

飼料に含まれる脂肪細胞分化促進因子の探索

河内 浩行^{1,2)}, 丸山 静香¹⁾, 亀井 康富³⁾, 河田 照雄¹⁾, 松井 徹¹⁾
 (1)京都大学大学院農学研究科*, (2)長浜バイオ大バイオサイエンス学部**, (3)東京医科歯科大学難治疾患研究所***)

Investigation for Activators of Adipocyte Differentiation in Feed for Beef Cattle

Hiroyuki KAWACHI^{1,2)}, Shizuka MARUYAMA¹⁾, Yasutomi KAMEI³⁾, Teruo KAWADA¹⁾ and Tohru MATSUI¹⁾

¹⁾ Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

²⁾ Faculty of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology,

³⁾ Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

Summary

Beef marbling is an important trait of meat quality, which contributes directly to the value of beef especially in the Japanese market. The development of beef marbling was closely associated with an increase in the number of adipocytes, that is, adipocyte differentiation in the skeletal muscle. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a ligand-dependent transcription factor that directly activates the expression of adipocyte-specific genes, and is universally accepted as the master regulator for adipocyte differentiation. Through screening for natural PPAR γ activator in feed using the PPAR γ luciferase reporter assay, the ethanol extracts of sake lees, soy sauce lees, vinegar lees, and beer lees, and soy sauce oil activated PPAR γ . Treatment with the ethanol extracts of these lees materials enhanced some markers of adipocyte differentiation such as glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity and triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells. These results suggest that these lees materials possess PPAR γ activators. Moreover, according to the results of the sequential fractionation assay, we confirmed that PPAR γ -activate factors in soy sauce oil were different from linoleic acid, originated from soy bean oil.

わが国における肉牛の肉質評価は脂肪交雑が大きく影響する。脂肪交雑は骨格筋内の白色脂肪組織量によって決定されるもので、これは脂肪細胞数の増加、つまり脂肪細胞の分化が大きく関与していると考えられる。したがって、脂肪細胞の分化を促進し脂肪交雑を高めることで、肉質の向上が期待できる。

脂肪細胞は単に脂肪をため込むだけでなく、外界からの刺激に対応しレプチンやアディポネクチンと言ったアディポサイトカインを分泌、PPAR γ , C/EBPファミリーと言った転写因子を発現することで、様々な生理機能や脂肪組織量、脂肪細胞数の制御を行っている。なかでも、PPAR γ は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして働くリガンド依存性の核内転写因子であり、同じく核内受容体型転写因子であるRXRとヘテロダイマーを形成して、認識配列であるPPREに結合する。PPAR/RXRヘテロダイマーにPPARもしくはRXRのアゴニストが結合すると、コリプレッサーの解離とCBPなどのコアクチベーターの

会合が起こり、転写活性化能を有するようになる^{1,2)}。牛間質脈管系幹細胞から脂肪細胞への分化にはPPAR γ の合成リガンドであるチアゾリジンジオンが必須であることが分かっており³⁾、牛においてはPPAR γ のリガンドが不足していることが考えられ、PPAR γ のリガンドを与えれば筋肉内の脂肪細胞数が増加して脂肪交雑の向上および質的改善につながることを予想される。また、ツッカーラットにチアゾリジンジオンを投与した試験では筋肉内の脂肪細胞数が増加したという報告がある⁴⁾。しかし、チアゾリジンジオンは抗糖尿病薬として用いられる薬物であり、肥育牛の飼料に添加することには問題がある。

現在では、天然物中にいくつかのPPAR γ リガンドが見出されている。高感度リガンドアッセイ系を用いたPPAR γ リガンドスクリーニングでは食品由来成分であるいくつかのイソプレノイドがPPAR γ を活性化させることが明らかとなっている。また、脂肪酸のシクロオキシゲナーゼ代謝産物などのPPAR γ 活性化因子が見出され、リガンドであ

*所在地：京都市左京区北白川追分町（〒606-8502）TEL：+81-75-753-6056 FAX：+81-75-753-6344

**所在地：滋賀県長浜市田村町1266番地（〒526-0829）TEL：+81-749-64-8177 FAX：+81-749-64-8177

***所在地：東京都千代田区神田駿河台2-3-10（〒101-0062）TEL：+81-03-5280-8109 FAX：+81-03-5280-8109

る可能性が示唆されている⁵⁾。また、麹菌はその発酵過程でオキシリピンと呼ばれるシクロオキシゲナーゼ様酵素による脂肪酸代謝物を産生している⁶⁾。これらのことから発酵食品製造副産物にも PPAR γ リガンドが存在している可能性が高い。

したがって、本試験では牛の飼料として利用可能な食品製造副産物の脂溶性成分、とくに粕類の脂溶性成分について PPAR γ リガンドアッセイを行うことで、天然物から PPAR γ 活性化因子を探索した。さらに、PPAR γ 活性化能を有する試料についてはマウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化に及ぼす影響を検討した。これと同時に、醤油油についても PPAR γ 活性化能を検討した。

実験方法

1. PPAR γ 活性化因子の探索

1) 添加試料の調製

凍結乾燥処理した発酵食品製造副産物 5 g を 100% エタノール 100 mL で抽出した。遠心分離により固形成分を沈殿後、遠心エバポレーターにより溶媒を除去し、エタノールに再懸濁後、 -20°C で保存した。

2) レポーターアッセイ

CV-1 細胞を 100 mm dish に 5×10^4 個/mL の密度で播種し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 環境下でインキュベーター内において 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で 24 時間培養後、pM-PPAR γ , p4 \times UASg-tk-luc, および pRL-CMV をトランスフェクトした。5 時間後トリプシン処理により細胞を回収し、 6×10^4 個/mL の密度になるように 96 well dish に再び播種し、そこに発酵食品製造副産物エタノール抽出物および醤油油を添加した。 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 環境下で 24 時間インキュベート後、市販のキット Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System に従い、ルミノメーターによりホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性を定量した。添加試料の PPAR γ 活性化能は Control に対する割合 (%) で評価した。

3) Sep-Pak Plus Long Silica Cartridges による脂溶性成分の分画

醤油油 50 mg あるいは対照区としてリノール酸 25 mg をヘキサン 500 μL に溶解させたものをカラムに添加した後、ジエチルエーテルの割合がそれぞれ 0, 5, 15, 30, 50, 70, 100% となるようにヘキサンと混合した溶出液を加え溶出させた。その後、溶媒を除去しアルゴン封入を行い、 -20°C で保存した。

2. 脂肪細胞分化に及ぼす影響

1) 細胞培養

マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞を 1×10^4 個/mL の密度で 12 well dish に播種し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 環境下のインキュベーター内において 10% FBS を含む DMEM で培養を行った。

コンフルエント 2 日後、 $0.25 \mu\text{M}$ デキサメタゾン (DEX), 0.5mM メチル-3-イソブチルキサンチン (MIX), $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ インスリンを加えた分化誘導培地に交換し、2 日間培養を続けた。その後 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ インスリンを加えた 10% FBS 含有 DMEM でさらに 8 日間培養を行った。試料はエタノールに溶かし、それぞれ 10,100 および $250 \text{mg}/\text{L}$ の濃度で分化誘導時から 10 日間添加した。

2) GPDH 比活性および TG 濃度

分化誘導 10 日後、 0.1M トリス-EDTA を用いて細胞抽出後、分析まで -80°C で保存した。脂肪細胞分化の指標としてグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 活性を Green らの方法⁷⁾ により測定した。併せてタンパク質量を Lowry 法⁸⁾ により測定し、GPDH 比活性を求めた。また、細胞抽出液をトリグリセライド E-テストワコーを用い TG 濃度を測定し、タンパク質量で補正した。

3) 統計処理

各試料とコントロール (培地中濃度 0.1% のエタノール溶剤) との差の比較は t-検定を用いた。また、すべての検定は $p < 0.05$ で有意とした。

結果と考察

CV-1 細胞に、まず牛の飼料として利用可能な粕類の脂溶性成分について様々な濃度で添加し、Dual Luciferase Reporter Assay System を用いて、リガンド候補試料の PPAR γ に対する活性化能を評価した (Fig. 1)。

デュアルルシフェラーゼアッセイは PPAR γ リガンド結合ドメインと GAL-4DNA 結合ドメインからなるキメラタンパク質を合成するプラスミド pM-PPAR γ , GAL-4 応答配列を持ち、pM-PPAR γ が合成するタンパクにより発現を制御されるようにデザインされた luc レポーター遺伝子プラスミド p4 \times UASg-tk-luc およびトランスフェクション時における効率を標準化する内部標準プラスミド pRL-CMV を CV-1 細胞にトランスフェクションし、生成したウミホタルおよびウミシイタケ由来のルシフェラーゼ活性を測定することでリガンド候補試料の PPAR γ に対する活性化能を評価するアッセイシステムである。ウミシイタケ由来ルシフェラーゼは細胞内でリガンドに影響されず発現量が一定であるため、この変動にトランスフェクション時における効率の違いが反映され、データ処理の段階で標準化することによりリガンドの正確な評価を行える。

酒粕、醤油粕、酢粕およびビール粕は濃度 1, 5, 10 および $100 \text{mg}/\text{L}$ となるように、赤ワイン粕、白ワイン粕は、濃度 1, 5 および $10 \text{mg}/\text{L}$ となるように培地に添加した。その結果、コントロールと比較し、赤ワイン粕、白ワイン粕では有意な活性上昇は見られなかったが、酒粕、醤油粕、酢粕およびビール粕は添加濃度依存的に活性が上昇し、10 および $100 \text{mg}/\text{L}$ で有意な活性上昇が見られた (Fig. 1)。

次に、Fig. 1 において活性の見られた粕類抽出物について、3T3-L1 脂肪前駆細胞分化に及ぼす影響を検討した

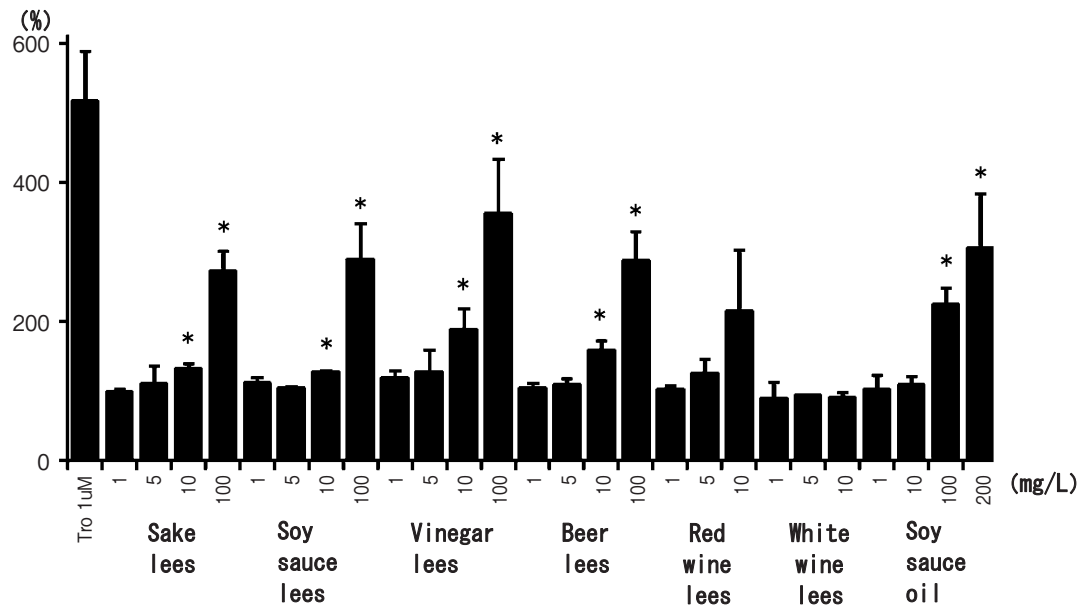


Fig. 1 Effect of food processing by-products on activation of PPAR γ by luciferase ligand assays. pM-hPPAR γ , p4 x UASg-tk-luc and pRL-CMV were transfected into CV1 cells, and 5 h after transfection, the cells were treated with various food processing by-products for 24 h. The activity of a vehicle control was set at 100 % and the relative luciferase activities were presented as fold induction to that of the vehicle control. Troglitazone (1 μ M) was the positive control and 0.1 % ethanol was the vehicle control. The bars represent mean values \pm SD for 4 well. * $p < 0.05$ vs. vehicle control.

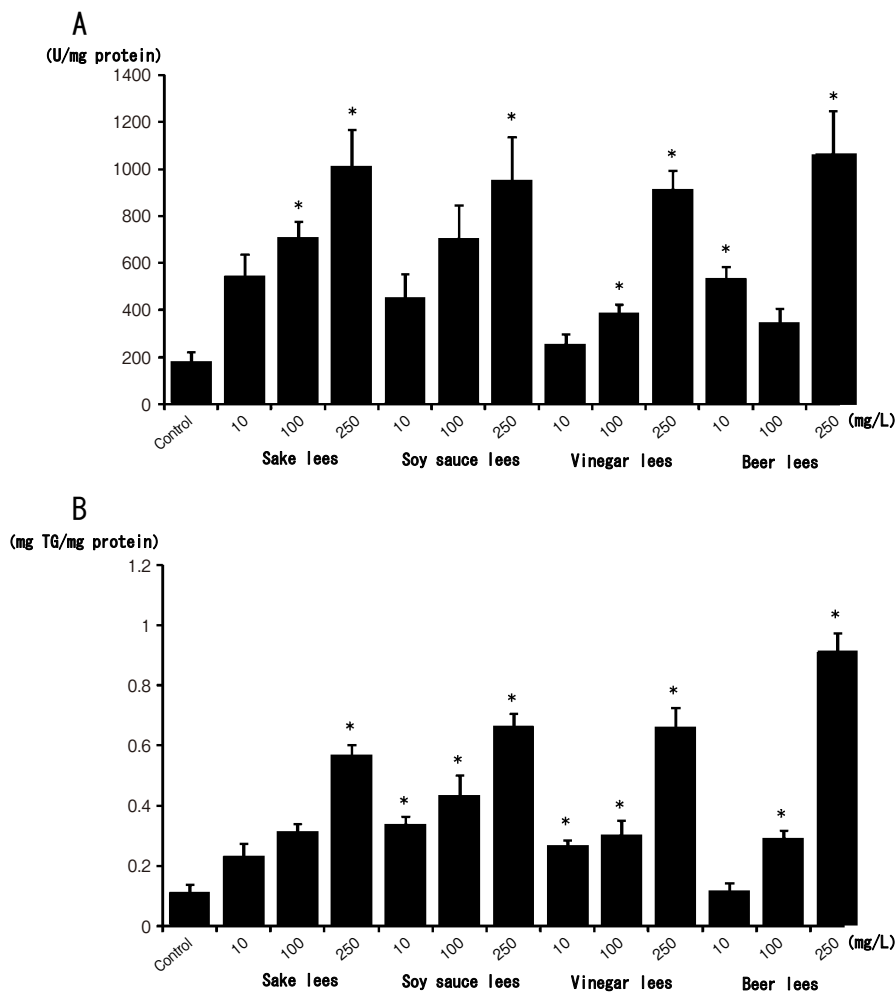


Fig. 2 Effect of lees materials on differentiation of 3T3-L1 cells. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with or without lees materials for 10 days. The assays were performed on differentiated adipocytes (day 10). (A) GPDH activity (B) Intracellular triglyceride concentration. The bars represent mean values \pm SD for 4 well. * $p < 0.05$ vs. cultures treated without lees materials.

(Fig. 2)。分化誘導後、酒粕、醤油粕、酢粕およびビール粕がそれぞれ培地中濃度 10, 100および250 mg/Lとなるように10日間添加した。GPDH比活性は、酒粕、醤油粕および酢粕で添加濃度依存的に有意に上昇が見られた (Fig. 2A)。またビール粕においても、添加濃度依存的ではないが有意にGPDH比活性が上昇した。トリグリセリド濃度は、添加した全ての粕類で濃度依存的に増加が見られた。以上の結果から、これら抽出物はPPAR γ の活性化因子として働き、脂肪細胞分化を促進させたものと考えられる。

天然物において、脂肪酸のシクロオキシゲナーゼ代謝産物などのPPAR γ 活性化因子が見出され、リガンドである可能性が示唆されている⁵⁾。麹菌はその発酵過程でオキシリピンと呼ばれるシクロオキシゲナーゼ様酵素による脂肪酸代謝物を産生している⁶⁾。また、赤唐辛子発酵産物であるコチュジャンは脂肪細胞でPPAR γ を制御していることが報告されている⁹⁾。さらに、微生物および微生物由来生産物によりPPAR γ は活性化されている¹⁰⁾。これらのことから、今回用いた発酵食品製造副産物にもそれらの活性化因子が存在し、活性化能を示したことが考えられる。しかし、赤ワイン粕、白ワイン粕についてPPAR γ 活性化能を検討した結果、どちらも濃度 1, 5 および 10 mg/L 添加では有意な活性化能を示さなかった (Fig. 1)。これらの製造過程は、赤ワインは発酵後に圧搾を行うのに対し、白ワインは除梗破砕後、ただちに圧搾機で搾汁し得られた果汁をアルコール発酵させる。つまり、赤ワイン粕には発酵産物が含まれているが、白ワイン粕には含まれていない。上述で述べたように、発酵食品製造副産物にはPPAR γ リガンドが存在している可能性が高いが、赤ワイン粕では活性化能が見られず、酒粕、醤油粕、酢粕、ビール粕などの発酵産

物で活性化能が見られたのは、オキシリピンのような脂肪酸代謝物がPPAR γ リガンドとして作用している他に別の活性化因子を含んでいる可能性も示している。

ワインにはアントシアニン、カテキン、プロシアニジン、フラボノールなどのポリフェノールが溶存している。それらの中で、ブドウ由来ポリフェノールであるリスベラトロールはPPAR γ および α を選択的に活性化させること、さらにPPAR α の活性化が脳保護効果をもたらすことが報告されている¹¹⁾。しかし、赤ワイン粕、白ワイン粕についてPPAR γ 活性化能を検討した結果、いずれの試料も濃度 1, 5 および 10 mg/L 添加では有意な活性化能を示さなかった (Fig. 1)。これはブドウ由来の活性化因子の多くは抽出物中に溶存し、残渣には少量であった可能性、あるいは今回の試験で 10 mg/L では、活性化能を示すには試料中に含まれる活性化因子の濃度が低かったことが考えられる。

醤油油は、丸大豆に含まれる多量の油脂が、もろみを圧搾して得られた液体の上に油として浮んでくるものである。醤油油と醤油粕は同時期に出てきた産物であり、醤油粕にPPAR γ 活性化能が見られたことから、醤油油も醤油粕で見られたPPAR γ 活性化能を有する可能性がある。そこで、醤油油のPPAR γ 活性化能を検討するために、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した (Fig. 1)。その結果、培地中濃度 100 mg/L からコントロールと比較し有意に上昇が見られ、醤油油もPPAR γ 活性化能を有することが分かった。

醤油油の脂肪酸組成は大豆油と同様リノール酸が主体であるが、このリノール酸はPPAR γ のリガンドであると言われている¹²⁾。そこで醤油油のPPAR γ 活性化能はリノー

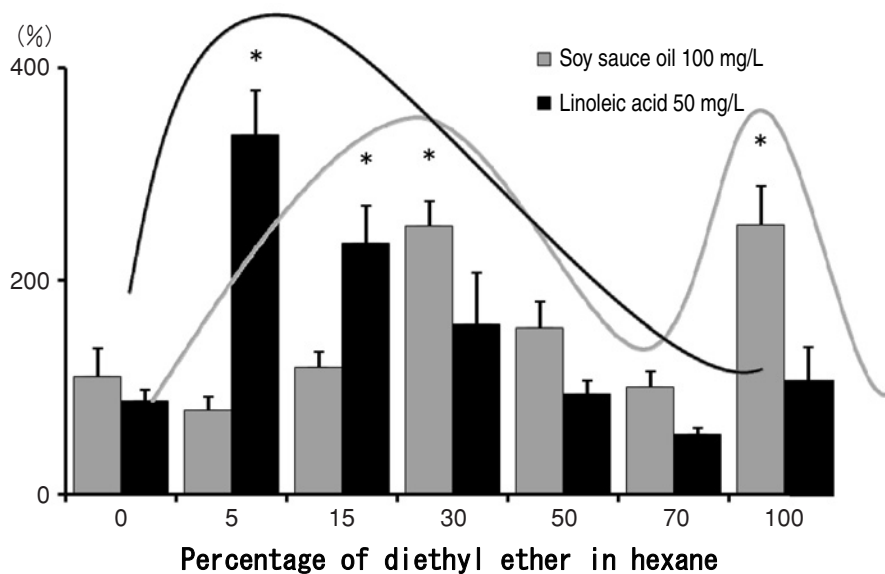


Fig. 3 Distribution of the PPAR γ activator in soy sauce oil.

50 mg soy sauce oil or 25 mg linoleic acid dissolved in 500 μ L hexane was added to a silica Sep-Pak Plus cartridge conditioned with hexane. The cartridge was eluted with 0, 5, 15, 30, 50, 70, and 100 % diethyl ether in hexane successively, and these fractions were further analyzed by PPAR γ ligand assays. The activity of a vehicle control was set at 100 % and the relative luciferase activities were presented as fold induction to that of the vehicle control. Troglitazone (1 μ M) was the positive control and 0.1 % ethanol was the vehicle control. The bars represent mean values \pm SD for 4 well. * p < 0.05 vs. vehicle control.

ル酸によるものかを検討するため、醤油油およびリノール酸を Sep-Pak Plus Long Silica Cartridges により分画し、レポーターアッセイを用いて PPAR γ に対する活性化能を検討した (Fig. 3)。ジエチルエーテル濃度が 0, 5, 15, 30, 50, 70, 100% となるようにヘキサソールと混合し溶出後、レポーターアッセイを行った。その結果、醤油油中の PPAR γ 活性化因子はジエチルエーテル濃度 30 および 100% の画分中に見られた (Fig. 3)。これに対し、リノール酸の PPAR γ 活性化因子は 5 および 15 mg/L の画分中に見られた。したがって、醤油油のジエチルエーテル濃度 30% および 100% 画分に見られる PPAR γ 活性化因子は、大豆油由来のリノール酸ではないことが示唆された。今後この醤油油のジエチルエーテル濃度 30 および 100% 画分について、3T3-L1 脂肪前駆細胞を用い脂肪細胞分化に与える影響を検討しなければならない。

コチュジャンは脱塩大豆を発酵させた大豆味噌であるが、70%エタノールで抽出した疎水性の比較的弱い画分においてイソフラボノイドのアグリコン含量が増加し、3T3-L1 脂肪細胞においてインスリン刺激による糖取り込みが増加した¹³⁾。とくに、ダイゼインが多く含まれる画分において、PPAR γ のアゴニストとして作用しグルコース取り込み量が増加することが報告されている。また、大豆に多く含まれるイソフラボン類は疎水性の強い成分である。今回、検討した醤油粕および醤油油には PPAR γ 活性化因子が存在することが示唆されたが、活性を示す画分は試料によって異なる可能性もある。今後、醤油粕においても Sep-Pak による分画を比較検討する必要がある。

結論として、本試験ではレポーターアッセイの結果、調べた食品製造副産物抽出物等のうち、酒粕、醤油粕、酢粕、ビール粕、醤油油が PPAR γ 転写活性化能を有した。さらに、これら転写活性化能を有した粕類は、3T3-L1 脂肪細胞分化を促進した。また、醤油油に含まれる PPAR γ 活性化因子は、大豆油由来のリノール酸ではないことが示唆された。今後はそれぞれの PPAR γ 活性化因子が何であるのか検討していく必要がある。

参考文献

- 1) Rosen ED, Spiegelman BM (2001) PPAR γ . A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276: 37731–37734.
- 2) Michalik L, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 10: 564–570.
- 3) 鳥居伸一郎, 山崎恭子, 大山路世, 松井 徹, 矢野秀雄 (1998) チアゾリジン誘導体および脂肪酸が肥育牛の脂肪組織から調製した脂肪前駆細胞の分化に及ぼす影響. *肉用牛研究会報* 65: 10–14.
- 4) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umehara K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354–1361.
- 5) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83: 803–812.
- 6) Tsitsigiannis DI, Bok JW, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Keller NP (2005) Aspergillus cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. *Infect Immun* 73: 4548–4559.
- 7) Green H, Wise LS (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* 254: 273–275.
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- 9) Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Park KY (2006) Antiobesity effect of Kochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 9: 15–21.
- 10) Lee SK, Kim HJ, Chi SG, Jang JY, Nam KD, Kim NH, Joo KR, Dong SH, Kim BH, Chang YW, Lee JI, Chang R (2005) *Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in HT-29 cells. *Korean J Gastroenterol* 45: 328–334.
- 11) Inoue H, Jiang XF, Katayama T, Osada S, Umehara K, Namura S (2003) Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor α in mice. *Neurosci Lett* 352: 203–206.
- 12) Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG (2002) Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Nutr Res* 22: 817–824.
- 13) Kwon DY, Jang JS, Lee JE, Kim YS, Shin DH, Park S (2006) The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity *in vitro*. *Biofactors* 26: 245–258.