

〈一般研究課題〉 食品摂取を併用した運動効果の補完作用に関する研究
～熱産生を促す褐色脂肪細胞の誘導作用～

助成研究者 中部大学 津田 孝範



食品摂取を併用した運動効果の補完作用に関する研究 ～熱産生を促す褐色脂肪細胞の誘導作用～

津田 孝範
(中部大学)

Studies on amino acids mixture-mediated complementary functions of exercise

Tsuda, Takanori
(Chubu University)

Abstract :

Exercise combined with dietary factors may have significant effects on the suppression of body fat accumulation. We hypothesized that combining amino acid mixtures containing alanine, arginine, and phenylalanine (AAM) combined with exercise (EX) can significantly induce beige adipocyte (brown-like adipocyte) formation, whereas administration of AAM or EX alone would not. Administration of AAM (1 g/kg body weight, daily) combined with EX (The condition of EX did not significantly induce beige adipocyte formation in mice.) for 4 weeks significantly induced formation of beige adipocytes in inguinal white adipose tissue in mice, although AAM or EX alone did not. Metabolomic analysis showed that plasma 2-oxoglutarate, fumarate, malate and lactate concentration was significantly elevated in the EX + AAM group relative to the EX group. These findings demonstrate the unique effect of AAM combined with EX for inducing beige adipocyte formation, which may be associated with the suggested lactate-mediated pathway. Appropriate mixtures of amino acids could be used as a dietary supplement before EX and contributed to increasing energy expenditure.

1. はじめに

「褐色脂肪細胞」は熱産生を行い、エネルギー消費を促進する。これまでの研究から寒冷刺激な

どで白色脂肪組織(WAT)中に「誘導型」褐色脂肪細胞が増加し、体脂肪が減少することが明らかになっている[1]。しかし持続的な寒冷刺激は現実的ではない。従って実用的な方策としては、WAT中で褐色脂肪細胞化を誘導する食品因子とその機序を解明し、これを活用することである。

運動が多様な恩恵をもたらすことはよく知られている。運動がWATにおいて褐色脂肪細胞化を誘導すること(ベージュ化)が報告されている[2, 3]。著者らの研究グループは、これまでに食品因子による褐色脂肪細胞化誘導とその作用機構を複数報告している[4, 5]。しかし運動による褐色脂肪細胞化誘導は、あるレベル以上の運動強度が必要のため、疾患やハンディキャップを持つ人には困難であることが考えられる。したがって低～中強度の運動でも特定の食品を併用すれば「褐色脂肪細胞化」が効果的に誘導され、運動と食品の併用によるベネフィットを明らかにできるのではないかと考えられた。運動との併用に効果的な食品因子については、これまでの研究からアミノ酸の中で特にアラニン、アルギニン、フェニルアラニンの3種類のアミノ酸の混合物(AAM)が候補として挙げられる。以上の背景から運動とAAMの併用は体脂肪蓄積の抑制に有効であり、この作用機序の一つとしてWATでの褐色脂肪細胞化誘導が関わっているのではないかと、さらに運動と食品の併用による褐色脂肪細胞化誘導は、体脂肪蓄積抑制以外にも何らかの恩恵が得られるのではないかと考えられた。以上の背景を踏まえた本研究の目的は、運動とAAMの併用による白色脂肪組織中での「褐色脂肪細胞化」誘導の促進作用とその機序を明らかにし、「運動補完食品」の開発へつなげることである。

2. 試料および実験方法

実験動物としてはC57BL/6Jマウス(雄, 4週齢)を用いた。マウスは納品後、予備飼育を行い、飼育環境に順化させた。予備飼育終了後、マウスを群分けし、以下の実験を行った。なお餌はいずれもAIN-93Gを基本にした精製飼料を自由摂取させた。本動物実験は中部大学動物実験委員会で審査、承認を得て、動物の飼育、保管、苦痛の軽減、科学上の利用に関する配慮のもとで行った。AAMは協和発酵バイオ株式会社製のL-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンをそれぞれ25%、25%、50%の割合で混合したものである。

2.1 運動負荷条件の検討

予備飼育終了後のマウスを2群に分け、コントロール群(非運動群)あるいは運動(EX)群を設定した。運動負荷はトレッドミル装置を用いた事前の予備検討を経て、最終的な検証条件として、15 m/minから走行スピードを徐々に上げて最後の週は20m/minとし、1回当たり60分間の運動負荷を1週間に5日間行った。実験期間は4週間とした。飼育終了後、マウスより鼠径部白色脂肪組織(iWAT)、精巣上体白色脂肪組織(eWAT)および肩甲骨間の褐色脂肪組織(BAT)を採取した。得られた脂肪組織の一部はホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成し、その切片をhematoxylin & eosin (H&E)染色し、残りの組織はタンパク質を抽出して褐色脂肪細胞のマーカータンパク質であるuncoupling protein 1(UCP1)の発現レベルをウエスタンブロッティングにより測定した。

2.2 運動とAAM投与の併用による褐色脂肪細胞化誘導の検証

予備飼育終了後のマウスを4群に分け、コントロール群、AAM群、EX群、EXとAAMを投与後に運動する群(EX + AAM群)を設定した。AAMの投与は生理食塩水に溶解した溶液を4週間毎日経

口投与(1 g/kg体重)した。運動負荷は2.1で検証した条件を用いて実験期間は4週間とした。実験終了後マウスよりiWAT、eWATおよびBATを採取した。採取した脂肪組織は2.1と同様に解析・評価した。EX群とEX + AAM群の血漿については、代謝物を網羅的に解析するメボローム解析に供した。メタボローム解析は、ヒューマンメタボロームテクノロジーズ株式会社の受託解析を活用した。さらに褐色脂肪細胞化の誘導に伴う組織温の上昇を捉えるため、飼育終了時のiWAT内部温度、深部体温(直腸温)を、精密デジタル温度計とニードル型温度プローブを用いて麻酔・恒温下で測定比較を試みた。

2.3 統計解析

2群間の検定にはStudent's *t*-testを、4群間の比較は、two-way analysis of varianceを実施し、2つの処理間に相互作用が認められた場合はTukey-Kramer testによる多重検定を実施した。

3. 実験結果

3.1 運動負荷条件の検討

飼育終了時の体重、実験期間中の総摂餌量、解剖時の各脂肪組織重量は群間で有意な差は認められなかった。コントロール群とEX群のiWATおよびBATのH&E染色画像ではいずれも褐色脂肪細胞化に明確かつ特徴的な多房化形成の所見は認められず、eWATでも同様であった。BATでは群間に差は認められなかった。次にiWATおよびBATのUCP1タンパク質発現量を図1に示す。今回の最終選定条件として設定した運動負荷ではiWATにおいて褐色脂肪細胞の指標であるUCP1のタンパク質発現を有意に誘導せず、さらにBATにおいても群間に有意な差は認められなかった。従ってこの運動負荷条件を用いることとして、運動とAAMの投与の併用による褐色脂肪細胞化の誘導を検証した。

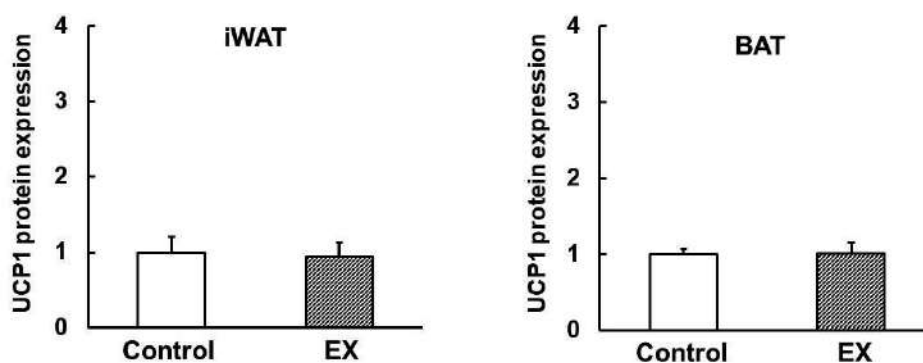


図1. 運動負荷時のiWATおよびBATのUCP1タンパク質の発現量

3.2 運動とAAM投与の併用による褐色脂肪細胞化誘導の検証

実験期間中の総摂餌量、体重および脂肪組織重量には群間で有意な差は認められなかったiWATおよびBATのH&E染色画像では、EX + AAM 群のiWAT において他の群と比較して褐色脂肪細胞化を示す多房化形成が顕著であった。一方BATは、UCP1を恒常的に発現している組織であるが、4群の間に差は認められなかった。eWATではいずれの群でも褐色脂肪細胞化を示す所見は認められなかった。iWATおよびBATのUCP1タンパク質発現量を図2に示す。iWATにおいては、EX + AAM 群は他の群と比較して褐色脂肪細胞化の指標であるUCP1タンパク質レベルは有意に上昇し

た。一方、BATにおいては群間に有意な差は認められなかった。以上の結果からAAMの摂取と運動を併用すると相乗的に褐色脂肪細胞化を誘導できることが明らかになった。この結果はAAMが運動による褐色脂肪細胞化の誘導作用に関する運動補完食品として活用できることを示唆するものである。

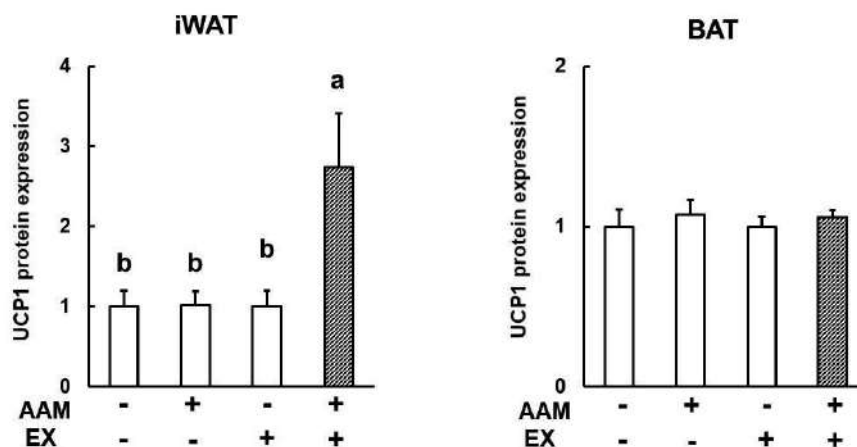


図2. AAMとEXの併用によるiWATおよびBATのUCP1タンパク質の発現量。グラフ上の異なるアルファベットは群間の有意差 ($P < 0.05$)を表す

EX群とEX + AAM群の血漿のメタボローム解析を行い、その一部として変化の認められたTCAサイクルの中間体である2-oxoglutarate、fumarate、malateおよびlactateの結果を図3に示す。これらの代謝物はいずれもEX + AAM群で有意に上昇した。これらの結果は、最終のAAMの投与と運動後約16時間を経ても有意な上昇が認められることから併用により糖代謝が亢進しているものと考えられる。Lactateについては、これまでの報告から脂肪細胞内での代謝によるレドックス状態の変化と活性酸素の生成が褐色脂肪細胞化を誘導しているのではないかと[6, 7]と考えられる。この点については検証に至っていないので、さらに進める必要がある。なお、EXとAAMの併用による褐色脂肪細胞化は体重増加抑制や脂肪組織重量に影響を与えていないが、正常マウスと普通食を用いた検証であることから奇異な結果ではない。今後は、食餌誘導性肥満モデルや遺伝的肥満モデルマウスを用いることでその効果を立証できると考えられる。

本研究では、運動とAAMの併用による褐色脂肪細胞化誘導に加えて、さらに肥満予防以外の複合的な効果として低体温などの抑制、免疫への好ましい影響も期待できるのではないかと考えた。そのため、熱産生計測のための組織温の直接計測法やポジティブコントロールとして交感神経を介して褐色脂肪細胞化を誘導し、熱産生を高める既存の薬剤である β 3-アドレナリン受容体アゴニスト投与での検証などを実施しiWATや深部体温上昇は観察できた。しかしながら運動との併用群において正確に検証することが計測上困難であったため、残念ながら本報告に耐えうる結果の提示には至らなかった。この理由は不明であるが、運動やAAMの特異的な影響の可能性があるかもしれない、今後は他の手法を検討する必要がある。

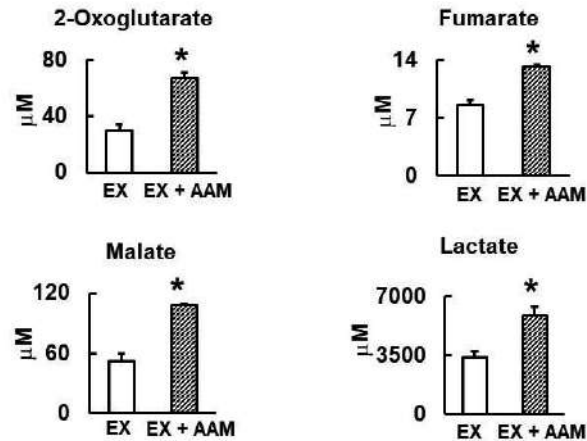


図3. メタボローム解析による血漿2-oxoglutarate、fumarate、malateおよびlactate濃度の変化。*; 群間で有意差あり($P < 0.05$)。

4. おわりに

運動の効果を高める食品因子の研究として運動とAAMの併用により相乗的に褐色脂肪細胞化を誘導することを明らかにした。この併用では、メタボローム解析の結果より運動とAAM投与後、約16時間を経てもTCAサイクルの中間体やLactateの有意な上昇が認められ、その効果に持続性があること、さらに褐色脂肪細胞の誘導機序としてLactateが関与しているのではないかと考えられた。以上の結果は、特定のアミノ酸混合物摂取と運動の併用が褐色脂肪細胞化誘導を引き起こす新しい事例の一つであり、アミノ酸混合物が運動補完食品として位置づけられることを示唆している。今後は併用による組織温や深部体温などの変化の正確な計測、作用機序に関して今回は検討に至らなかった骨格筋から分泌される種々のマイオカインの関与などを検証すること、ヒトにおいても運動とAAMの併用による褐色脂肪細胞化誘導作用を立証すること、などが課題である。本研究助成により得られた成果をもとにして前述の課題を克服し、運動補完食品の開発へつなげて運動と食を通じたヒトの健康に貢献するよう努める。

参考文献

- [1] Ishibashi J., Seale P. *Science* 328: 1113–1114 (2010).
- [2] Stanford K., Middelbeek I.R.J., Townsend K.L., Lee M.Y., Takahashi H., So K., Hitchcox K.M., Markan K.R., Hellbach K., Hirshman M.F., Tseng Y.H., Goodyear L.J. *Diabetes* 64: 2002–2014 (2015).
- [3] Díaz B.O., Flores M.R., Muñoz V.S., Preciado, F.M., Ortega S.O., Elias V.B., Guzmán G.B., Monge R.O., García E.G., González B.P., Molina M.T.V., Salazar M.S., Puente B.A. *Front. Physiol.* 9: 1781 (2018).
- [4] Nishikawa S., Kamiya M., Aoyama H., Nomura M., Hyodo T., Ozeki A., Lee H., Takahashi T., Imaizumi A., Tsuda T. *Mol. Nutr. Food Res.* 62: 1700731 (2018).
- [5] Nishikawa, S., Hyodo, T., Nagao, T., Nakanishi, A., Tandia, M., Tsuda, T. *J. Agric. Food Chem.* 67: 1948–1954 (2019).
- [6] Carrière A., Jeanson Y., Berger-Muller S., André M., Chenouard V., Arnaud E., Barreau C., Walther R., Galinier A., Wdziekonski B., Villageois P., Louche K., Collas P., Moro C.,

Dani C., Villarroya F., Casteilla L. *Diabetes* 63: 3253–3265 (2014).

- [7] Chouchani E.T., Kazak L., Jedrychowski M.P., Lu G.Z., Erickson B.K., Szpyt J., Pierce K.A., Laznik-Bogoslavski D., Vetrivelan R., Clish C.B., Robinson A.J., Gygi S.P., Spiegelman B.M. *Nature* 532: 112–116 (2016).