

ココアの抗肥満効果に関するDNAマイクロアレイ解析

荒井 綜一 (東京農業大学総合研究所客員教授)

現代は飽食の時代と呼ばれ、私たちは長年、栄養豊富でおいしいものを十分に摂って満ち足りた生活を謳歌してきた。しかし、その反動として過食・偏食に陥り、その他運動不足・喫煙・生活環境等の変化もあいまって、生活習慣病が大きな問題として浮上してきている。特に近年、メタボリックシンドロームの一形態である肥満症はマスコミでも取り上げられ、注目を集めている。

日本は世界に先駆けて機能性食品の科学を誕生させ、特定保健用食品の制度化が施行された。また、1993年には "Functional food" という英語が雑誌 "Nature" に初めて掲載され¹⁾、機能を有する食品によって疾病リスクの低減・QOLの向上を目指そうという試みは一挙に国際化した。機能性食品の研究には様々な技術が開発・利用されているが、なかでも最近各国で導入され始めたニュートリゲノミクス (栄養ゲノム情報科学) は食品摂取時の遺伝子応答が網羅的に観察できる画期的な特徴を有しており、日本では産学連携組織である東京大学イルシージャパン寄附講座「機能性食品ゲノミクス」がこの新科学を用いた機能性食品の研究を活発に行い始めた。

食品中には5大栄養素と呼ばれる栄養成分以外にも、ポリフェノール類を代表とする非栄養性機能物質が数多く存在し、その機能性が盛んに研究されている (図1)。特に、ポリフェノールはその強い抗酸化効果から最も注目を集めている機能性物質の一つであり、植物性食品のほぼすべてに含まれている単純ポリフェノールからその食品に特有のポリフェノールまで、その構造上の特徴や機能が解明されつつある (図2)。

このポリフェノールを多量に含有し、古くから嗜好飲料として親しまれていたココアが今、機能性飲料としても急速に認知され研究が進められている。ここで報告する「ココアの抗肥満作用に関するDNAマイクロアレイ解析」は、そのようなココアの機

図1 食品中の非栄養性機能物質の解析と体系化に関する研究

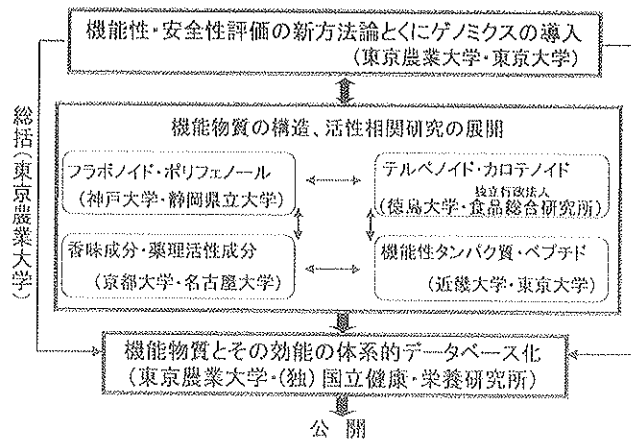
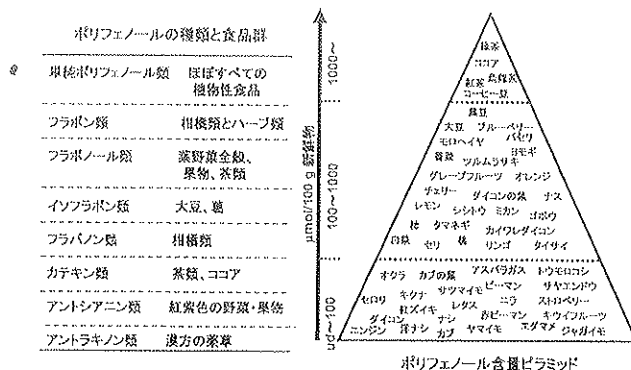


図2 ポリフェノールを含む食品群とポリフェノール含量ピラミッド



能性を研究する過程で、ココア摂取により体重や脂肪蓄積量の減少に気づき、ニュートリゲノミクスを用いてその抗肥満効果のメカニズムを明らかにすることを目的に行った研究の成果である。

実験方法を説明する。実験動物として、6週令のWistarラット（日本クレア株式会社）を20匹購入し1週間通常食（CE-2：日本クレア株式会社）により予備飼育を行なった。その後、体重を基準にして群間差がないように10匹ずつ2群に群わけを行なった。

試験食（HC食）及び対照食（HF食）の組成を図3に示す。試験食及び対照食ともにAIN-93Gを基礎飼料とし、そのコーンスターチの一部を牛脂に置き換えて作製した脂肪含量が27%の高脂肪食をベースとした。試験食の場合は、さらに、コーンスターチの一部を純ココア（森永製菓株式会社）に置き換えて最終ココア含量を12.5%とした。純ココアに含まれる脂肪分（ココアバター）を加えると試験食に含まれる脂肪分は約30%となる。対照食の場合は、コーンスターチの一部を図4に示される組成のココア代替物に置き換え、最終ココア代替物含量を12.5%とした。ココア代替物とは、純ココアと同じ栄養組成になるように精製飼料原料を組み合わせて調製した粉体である。このようにして、カロリー源となる脂肪・炭水化物およびタンパク質はもちろん、他の栄養成分もほぼ等量含まれる2種類の飼料を作成し、それぞれ制限給餌を行なうことにより摂取カロリー量も両群で同一にした。

図3 餌の組成—1

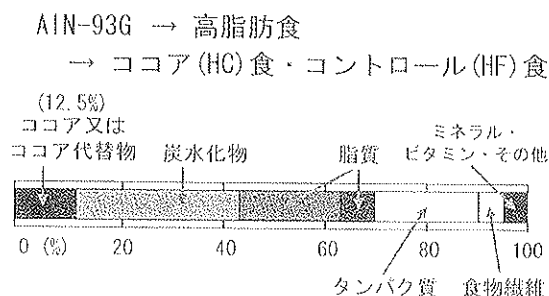


図4 餌の組成—2

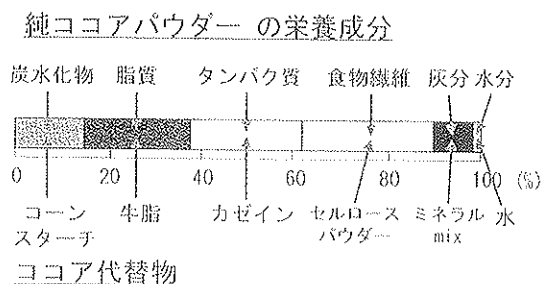
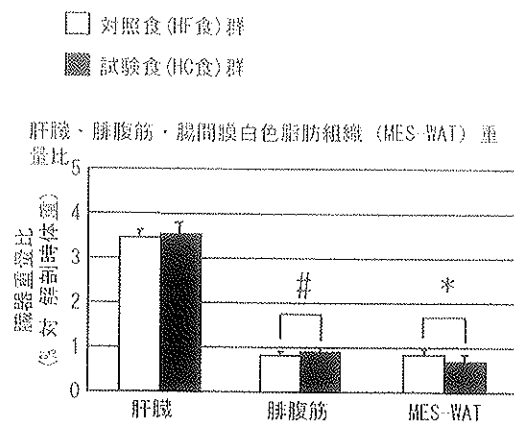


図5 解剖結果

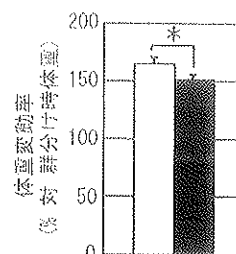


試験食または対照食で21日間制限給餌により飼育後、体重変動率、体重に対する肝臓、膵臓、腸間膜白色脂肪組織重量比および血中中性脂肪濃度を測定し2群間で比較した。

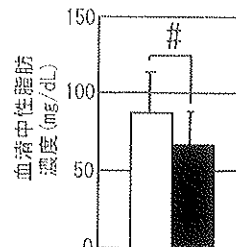
数値は平均値±標準偏差 (n = 10) で表した。

統計処理はstudent-t 検定により行った。* : P < 0.05、# : P < 0.08

体重変動率



血中中性脂肪濃度

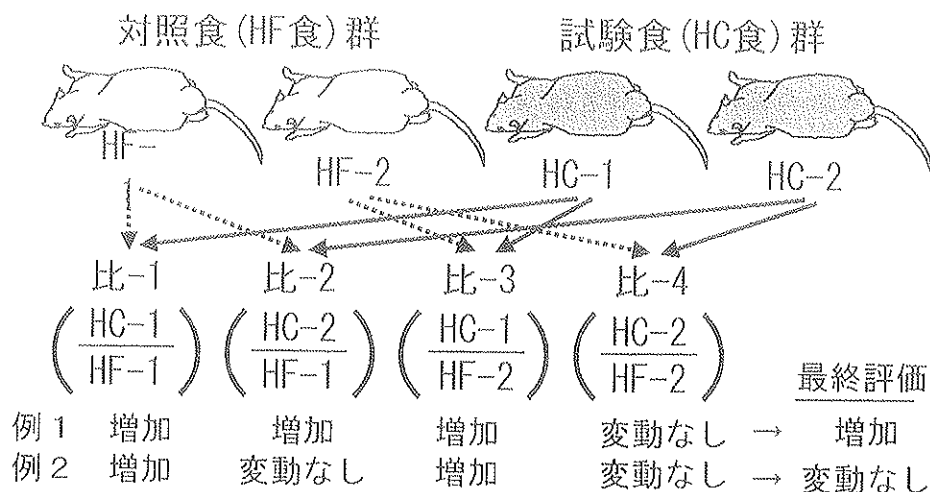


21日間の飼育後、体重の測定及び肝臓・腓腹筋・腸間膜白色脂肪組織（内臓脂肪の代表）の摘出及びそれぞれの重量を測定した。また、同時に血清を調製し血清中の中性脂肪値を測定した。その結果、図5に示すように体重の増加率・腸間膜白色脂肪組織（内臓脂肪の代表）については試験食摂取群のほうが対照食摂取群に比較し有意に低く、血清中性脂肪値についても有意ではないものの低下傾向が認められた。同時に測定した他の各種臓器重量では2群間で大きな変化は認められなかった。これらのことから、ココア摂取は高脂肪食による体重増加及び内臓脂肪の蓄積を抑制し、併せて血清中性脂肪量の増加を抑制することが示唆された。これらのデータから、エネルギー代謝に関係すると考えられる体重増加率・体重に対する肝臓重量割合・体重に対する腓腹筋重量割合・体重に対する腸間膜白色脂肪組織重量割合および血清中性脂肪値の5つの数値を元に2群からそれぞれ各群を代表する個体を2匹ずつ選択した。試験食群及び対照食群から選ばれた個体をそれぞれHC-1、HC-2及びHF-1、HF-2とする。

各個体の肝臓及び腸間膜白色脂肪組織からそれぞれ全RNAを調製しDNAマイクロアレイ解析に供した。DNAマイクロアレイ解析は8740遺伝子が搭載されているGeneChip™ Rat Genome U344 Array（Affymetrix社）を用いて行い、実際の実験方法はAffymetrix社の推奨マニュアルに従って行なった。

HC-1・HC-2及びHF-1・HF-2の肝臓及び腸間膜白色脂肪組織から得られた実験データをAffymetrix社の解析ソフト Microarray Suite version 5.0を用いて数値化し、ココア摂食による遺伝子発現量の変化を比較解析した。図6に記すように、各遺伝子についてHC-1・HC-2及びHF-1・HF-2からそれぞれ得られた数値を使って4つの組み合わせで割り算を行い、即ち（HC-1/HF-1）、（HC-1/HF-2）（HC-2/HF-1）（HC-2/HF-2）の計算結果が3組以上で“増加”または“減少”していると判断された時のみ、ココア摂取により遺伝子発現量が「増加」または「減少」と判断した。「増加」または「減少」した時の変動率は、4つの組み合わせから得られた数値の（平均値±標準偏差）で表した。

図6 データ解析方法



各遺伝子についてHF-1、HF-2及びHC-1、HC-2からそれぞれ得られた数値を使って4つの組み合わせで割り算を行い、即ち（HC-1/HF-1）、（HC-1/HF-2）、（HC-2/HF-1）、（HC-2/HF-2）の計算結果が3組以上で“増加”または“減少”していると判断された時のみ、ココア摂取により遺伝子発現量が「増加」または「減少」と判断した。

肝臓及び腸間膜白色脂肪組織でのこれら遺伝子群の発現量がココア摂取により「増加」または「減少」した結果を表1および表2に示す。

表1 DNAマイクロアレイ解析の結果1

* 使用したDNAチップ
GeneChipTM Rat Genome U34A Array (Affymetrix社製)
搭載遺伝子数: 8740遺伝子のうち
・機能既知遺伝子: 5286遺伝子
・機能未知遺伝子 (EST): 3454遺伝子

* ココアの摂取により変動が見られた遺伝子数

	増加(上向き調節)	減少(下向き調節)
肝臓	69 (13)	83 (39)
MES-WAT	313 (101)	368 (132)

()内数字: EST

表2 DNAマイクロアレイ解析の結果2

遺伝子の向上または下向き調節 詳細	変動比*
脂肪酸合成系酵素1 (減少: 4/14 増加: 0/14遺伝子) 例) fatty acid synthase	0.66 ± 0.12
コレステロール合成系酵素1 (減少: 6/17 増加: 0/17遺伝子) 例) squalene epoxidase	0.44 ± 0.06
腸間膜白色脂肪組織 (MES-WAT) 脂肪酸合成系酵素1 (減少: 4/14 増加: 0/14遺伝子) 例) fatty acid synthase	0.59 ± 0.13
脂肪酸合成系酵素の転写因子 (SREBP-1c) 1 脂肪酸運搬系因子 (減少: 5/9 増加: 0/9遺伝子) 例) intestinal FABP	0.66 ± 0.11
脂肪酸運搬系因子の転写因子 (PPAR γ) 1	0.59 ± 0.16
熱産生系タンパク (UCP2) 1	0.13 ± 0.13
	1.53 ± 0.60

* 平均値 ± 標準偏差 (n = 4).

【肝臓】

Fatty acid synthase (脂肪酸合成酵素) の遺伝子発現量がココア摂取群で減少していた。肝臓での主たる肥満抑制に関与するメカニズムは脂肪酸合成の抑制と脂肪酸酸化の活性化である。今回の結果では、ココア摂取により脂肪酸合成に関与する遺伝子群の発現が抑制されているが、脂肪酸酸化に関しては大きな変化が認められなかった。このことから、ココア摂取と同時に脂肪酸酸化を活性化する食品を摂取することにより、より効果的な肥満抑制効果が発揮される可能性が示唆された。

【腸間膜白色脂肪組織】

脂肪酸合成にかかわる遺伝子群、例えばfatty acid synthase (脂肪酸合成酵素) や脂肪酸合成に関与する転写因子として知られる sterol regulatory element-1 binding protein-1c (SREBP-1c: ステロール調節因子-1結合タンパク質1c) の発現が減少していた。また、SREBP-1cは脂肪酸合成に関与する転写因子として知られており、この因子の発現低下は脂肪酸合成の低下に関与すると考えられている。

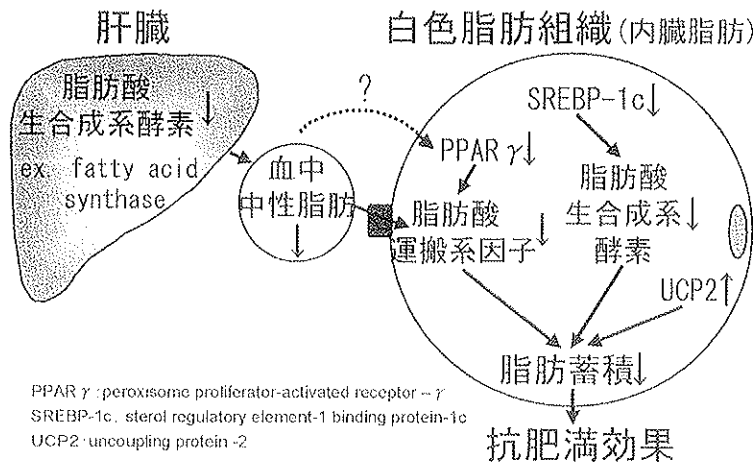
また、脂肪酸運搬系因子の遺伝子発現量がココア摂取群で減少していた。また、脂肪酸運搬系因子の転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ : ペルオキシソーム増殖因子応答性レセプター) の遺伝子発現量もココア摂取群で減少していた。

一方、熱産生系のタンパク質である uncoupling protein -2 (UCP-2: 脱共役タンパク質2) の発現量増加がココア摂取群で認められた。UCP-1 は熱産生系タンパク質として広く知られている。この UCP-1 をノックアウトしたマウスにおいてUCP-2 の発現量が高くなることから、UCP-2 もUCP-1 と同様に熱産生に関与していると考えられている。

以上の実験結果をまとめ、ココア摂取による脂肪蓄積抑制のメカニズムについて以下のような仮説を考えた。

1. 脂肪酸合成の場である肝臓において、脂肪酸合成系酵素の発現が抑制される。
2. 血中中性脂肪濃度が低下する。
3. 脂肪蓄積の場である白色脂肪組織において、PPAR- γ の発現が抑制された結果、脂肪酸輸送系因子の発現が抑制される。
4. 白色脂肪組織においてSREBP-1cの発現が抑制された結果、脂肪酸合成系酵素の発現が抑制される。
5. 白色脂肪組織において熱産生系因子の発現が亢進される。
6. 上記3~5の結果、脂肪組織中での脂肪蓄積が低下し、その結果、体重増加が抑制される。

図7 「ココアによる抗肥満効果」の作用仮説



以上の考察を図7にまとめる。

今回の結果をまとめると、

- ・ 高脂肪食によって生じる腸間膜の白色脂肪組織の重量変化はココア摂取によって抑制される。
- ・ ココア摂取による遺伝子発現の変動を見ると、
 - a. 肝臓では脂肪酸合成系の遺伝子が下向きに調節
 - b. 腸間膜では脂肪酸合成系の遺伝子が下向きに調節
脂肪酸運搬系の遺伝子が下向きに調節
脂肪酸燃焼系の遺伝子が上向きに調節

したがって、脂肪の蓄積は減少すると予測される。

今後は、脂肪酸の燃焼を促進する機能性食品因子（例えばL-カルニチン）とココアとの 相乗効果を検証し、機能性食品としてのココアの活用の途をさらに拓きたい。

参考文献

- 1) Swinbanks, D., and O'Brien, J., Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature*, 364, 180 (1993) .