

高脂肪食マウスにおける運動負荷とコラーゲンペプチド摂取の作用

宮澤 理花子^{1,2)}, 檜内 祥子¹⁾, 清水 宗茂³⁾,
曾根 英行¹⁾, 神山 伸^{†,1)}

¹⁾新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科*

²⁾筑波大学大学院人間総合科学研究科体育学専攻**

³⁾東海大学海洋学部水産学科食品科学専攻***

(受付 2019年8月31日, 受理 2019年10月15日)

**The effects of administration of collagen peptides and exercise
in obese mice fed a high-fat diet.**

Rikako MIYAZAWA^{1,2)}, Shoko KASHIUCHI¹⁾, Muneshige SHIMIZU³⁾,
Hideyuki SONE¹⁾, Shin KAMIYAMA^{†,1)}

¹⁾Department of Health and Nutrition, Faculty of Life Studies, University of Niigata Prefecture*

²⁾Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Master's Program in Physical Education, Health and Sport Sciences, University of Tsukuba**

³⁾Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, Tokai University***

Summary

Collagen peptides (CP) are functional peptides known to have various biological effects. In the present study, we investigated the effect of CP derived from chicken type I collagen on the obesity of mice induced by a high fat diet (HFD). Male ddY mice were fed a HFD for 3 weeks and divided into four groups: HFD with no exercise (H), HFD with exercise (H+Ex), HFD with exercise and CP (H+Ex+CP), and HFD with exercise and branched chain amino acid (H+Ex+BC). Mice in the H+Ex, H+Ex+CP, and H+Ex+BC groups were administered experimental diets supplemented with 20 mg/g of casein, CP, or branched chain amino acid, respectively, for an additional three weeks and forced to perform a low-intensity activity by wheel running thrice in a week. As a reference group, mice in the normal diet (N) group were maintained with a normal chow diet throughout the experimental period. The body fat mass of the mice in the H group was significantly higher than that in the N group mice, and the mesenteric fat mass was significantly decreased in the H+Ex and H+Ex+BC groups as compared to that in the H group. Administration of CP did not exert any effect on the body weight and body fat mass but decreased the expression of genes involved in *de novo* fat synthesis. Additionally, CP showed a suppressive effect on food intake in the obese mice fed the HFD. Further clarification is required to determine the effectiveness of CP on obesity induced by a HFD.

コラーゲンはプロテオグリカンとともに細胞外マトリックスを構成する主要タンパク質成分であり、皮膚、腱、結合組織、骨、軟骨などの構成成分として、身体のタンパク質の約1/3を占めている。皮膚や骨などに多く含まれるコラーゲンはI型コラーゲンが中心であり、軟骨ではII型コラーゲンが主成分である。コラーゲンには、プロリン (Pro) とリシン (Lys) が水酸化を受けたヒドロキシプロ

リン (Hyp) 及びヒドロキシリシン (Hyl) のような特徴的な水酸化修飾アミノ酸が多く含まれており、これらの水酸化アミノ酸がコラーゲンの三重らせん構造の安定化に寄与している。コラーゲンを構成するアミノ酸はグリシン (Gly) が約1/3であり、その他にPro, アラニン (Ala), Hypなどが多く含まれるが、非必須アミノ酸が大部分であり、必須アミノ酸であるトリプトファン (Trp) をほと

*所在地：新潟市東区海老ヶ瀬471 (〒950-8680)

**所在地：茨城県つくば市天王台 1-1-1 (〒305-8574)

***所在地：静岡県静岡市清水区折戸3-20-1 (〒424-8610)

†連絡先 (Corresponding Author), Tel: 025-368-8269, E-mail: kammy@unii.ac.jp

んど含まないため、アミノ酸スコアはゼロと見なされている。コラーゲンはGly-X-Y (X,Y:任意のアミノ酸)のトリプレットによる繰り返し構造で構成されており、特にGly-Pro-Hypのトリプレットを多く含んでいる¹⁾。

非変性状態のコラーゲン線維は水に不溶であるが、加熱して変性させたものがゼラチンであり、食材として広く用いられている。近年、ゼラチンを酵素処理で加水分解して低分子化し、水溶性と消化性を向上させたコラーゲンペプチド (collagen peptides, CP) が機能性ペプチドとして注目されている。CPはPro含有量が高く、Hypのような特殊な修飾アミノ酸を含むことから、消化酵素や細胞内ペプチダーゼに対して抵抗性を示し、経口摂取したCPの一部はアミノ酸まで分解されず、Pro-HypやHyp-Glyのようなオリゴペプチドの形で吸収されて血液中に存在することが報告されている^{2,3)}。特にPro-Hypには皮膚線維芽細胞の増殖・遊走の促進⁴⁾、骨芽細胞の分化促進⁵⁾、軟骨細胞の増殖促進⁶⁾、ヒアルロン酸およびグリコサミノグリカンの合成増加⁷⁾など、さまざまな機能性が報告されている。

CPの機能性としては皮膚や骨、関節炎の症状軽減や骨の形成促進を中心に研究されてきたが、近年では糖代謝異常の改善作用⁸⁻¹⁰⁾や、アンジオテンシン変換酵素の阻害と高血圧改善作用^{11,12)}、動脈硬化の改善作用¹³⁾など、さまざまな効果が報告されている。糖代謝改善作用に関しては、CPによるインスリン抵抗性の改善作用^{9,10)}に加え、CPが腸管のL細胞を刺激してインクレチンであるGLP-1の分泌を促進するとともに、吸収されたCPがGLP-1を不活性化する酵素であるDPP4の働きを阻害する作用が推察されている⁸⁾。CPによる脂質代謝への作用としては、サケ及びニジマス皮由来CPの摂取が大豆油投与ラットにおいて血中TGの上昇抑制作用を示すことが報告されている¹⁴⁾。さらに、CP摂取は筋肉に対しても作用を示すことが報告されており、トレーニングとCP摂取の併用により、サルコペニア高齢者における筋力向上効果¹⁵⁾や、学生アメリカンフットボール選手におけるトレーニング期の筋重量増加及びトレーニング終了後の減少抑制効果などが報告されている¹⁶⁾。また、Hyp-GlyはC2C12筋芽細胞の筋管細胞への分化と肥大を促進し、この筋分化促進作用はタンパク質合成に関わるPI3K/mTORシグナルに依存的であることが示唆されている¹⁷⁾。

過食や運動不足によって引き起こされる肥満は、高血圧や糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病を招くが、肥満の改善には運動が効果的であるとされている。従来、運動による糖・脂質代謝異常改善や体組成改善に寄与する栄養成分として分枝アミノ酸 (Branched chain amino acids, BCAA) が知られており、筋肉量増加や脂質代謝亢進作用を示すことが明らかとなっている。上述のように、CPは骨・関節疾患の症状緩和や骨形成促進作用のみならず、筋肉量増加や糖代謝異常の改善、脂質代謝亢進に作用することも報告されており、BCAAと類似した機能を有している。本研究では、高脂肪食により肥満状態を誘発させたマ

ウスにおいて、運動負荷とCP摂取の併用による相乗効果を確認することにより、その肥満抑制と生活習慣病予防に及ぼす影響をBCAAの作用と比較しながら検討した。それにより、運動負荷とCP摂取の併用が肥満状態にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的として行った。

実験方法

実験動物と実験群

Slc:ddYマウス4週齢雄25匹 (日本エスエルシー株式会社)を固形飼料CE-2 (日本クレア株式会社)で1週間予備飼育した後、5匹を通常食 (N)群としてCE-2で継続飼育し、残りの20匹は脂質エネルギー比率60%の高脂肪固形飼料 (HFD32, 日本クレア株式会社)を3週間摂食させて肥満を誘発させた。その後これを高脂肪食非運動 (H)群、高脂肪食運動 (H+Ex)群、CP添加高脂肪食運動 (H+Ex+CP)群、BCAA添加高脂肪食運動 (H+Ex+BC)群の4群 (n=5)に分け、H+Ex群、H+Ex+CP群、H+Ex+BC群には低強度 (8.4 m/分)のホイール走行運動を負荷させた。運動負荷は、運動開始1週目は30分/日を週3回、2週目は30分/日を週5回、3週目は60分/日を週7回で行い、ホイール装置はチューブローテーター (TR-350, アズワン株式会社)を用いて自作したものを使用した。

また、運動実施日にH群とH+Ex群はカゼイン、H+Ex+CP群はCP、H+Ex+BC群はBCAA (バリン:ロイシン:イソロイシン=1:2:1)を含む実験食を投与し、運動非実施日にはHFD32 (H群、H+Ex群、H+Ex+CP群、H+Ex+BC群)を摂食させた。高脂肪食各群の投与量はペアフィーディングとし、群間で1週間の累積摂食量に差が生じないように調整した。N群は、実験期間を通してCE-2を自由摂食させた。実験期間中は摂食量を記録するとともに、各週における体重を測定した。

実験開始から6週間後にマウスを解剖し、動脈血、肝臓、腎臓、腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、大腿筋、腓腹筋を採取してそれぞれの重量を測定した。大腿筋と精巣周囲脂肪については、遺伝子発現量の測定のために重量測定後、直ちに-80℃で保存した。動物実験は、新潟県立大学の動物実験委員会の承認を受け、動物実験ガイドラインを遵守して行った。

実験食の調製

CPは、ニワトリ足由来のI型CP (C-LAP, 日本ハム株式会社)を使用した。BCAAは、バリン:ロイシン:イソロイシン=1:2:1の割合で配合したものをを用いた。実験食のエネルギー統一のためのコントロールタンパク質としては、カゼイン (富士フィルムワコーケミカル社)を用いた。

実験開始から3週目までの高脂肪食摂食量が約5g/日であったため、実験食は5gにカゼイン、CP、BCAAの

Table 1 Primers used in this study.

Gene	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Accession number
β -actin	cttgggtatggaatcctgtgg	gtacttgcctcaggaggag	NM_007393
ACC1	gcaactgacagaggaagatgg	tggaaggggaatccatagtg	NM_133360
Akt1	ctgcccttctacaaccagga	catacacatcctgccacacg	NM_009652
Akt2	cttcggcaaggtcattctgg	ttgagggtgtaaggaaggg	NM_001110208
AMPKa1	ctcagttcctggagaagatgg	ctgccggttgagtatcttcac	NM_001013367
AMPKa2	catggctgagaagcagaagcac	cttaactgccactttatggcctg	NM_178143
ATGL	caacgccactcacatctacg	accaggttgaaggaggatg	NM_001163689
CD36	gtgcaaaaccagatgacgt	tccaacagacagtgaaggct	NM_001159558
CPT1b	atctgggctatctgtgtccg	tccttgccaatgtctccat	NM_009948
FAS	tctgtcccgtctctatac	ggaggtatgctcgtctct	NM_007988
GLUT4	gtaacttcattgtcggcatgg	agctgagatctggcaaacg	NM_009204
HSL	tgagattgaggtgctgtcgt	gtaccttgcctctctct	NM_010719
PGC-1 α	agcctctttgccagatctt	ggcaatcctcttcatccac	NM_008904
PPAR- α	cacagacaccctctccag	agcccttacagccttcacat	NM_011144
PPAR- γ	agggcgtcttgacagaaa	cgaaactggcaccttgaaa	NM_001127330
SREBP-1c	cccacctcaaacctggatct	aagcagcaagatgtcctct	NM_011480
UCP2	agaccattgcacgagaggaa	agaagtgaagtggcaaggga	NM_011671
UCP3	gccattgtcaactgtctga	tcctgagccaccatctcag	NM_009464

いずれかが 100 mg 含まれるよう設定した。実験食調製においては、4.9 g の HFD32 にカゼイン、CP、BCAA のいずれかを 100 mg 添加した後よく混合して成形し、作成後は使用当日まで冷凍庫で保存した。

血液成分と肝臓脂質の分析

空腹時血糖値は解剖時に動脈血を採取し、血糖自己測定器（フリースタイルフリーダムライト及び血糖センサー、ニプロ製）を用いて測定した。さらに、血漿を試料とし、血漿遊離脂肪酸、血漿トリグリセリド、総コレステロール、HDL コレステロール濃度のそれぞれを、NEFA C-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、HDL コレステロール E-テストワコー（いずれも富士フィルムワコーケミカル社）を用いて測定した。

肝臓可溶性トリグリセリド量の測定では、Arakawa ら¹⁸⁾ と同様の方法を用いて抽出した。すなわち、肝臓 200 mg に 1 mL のホモジナイズバッファー（150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH7.4, 0.1% Triton X-100）を加えてポリトロンホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズし、遠心分離（5,000 rpm, 10 分, 4°C）を行った後、上清 0.1 mL を試料とし、トリグリセライド E-テストワコーで測定した。

リアルタイム PCR による組織中遺伝子発現量の測定

組織中の遺伝子の発現状態は、SYBR 法による real-time PCR により解析した。増幅に利用したプライマーはそれぞれ NCBI Reference Sequence の配列をもとに、エキソジャンクションを含む配列を増幅部位とする上流及び下流プライマーを primer 3 を用いて設計した（Table 1）。発現補正用のコントロール遺伝子としては β -actin 遺伝子を用いた。

組織からの RNA の調製は、Trizol 試薬（Thermo

Fisher Scientific 社）を用いて行った。調製した RNA から、PrimeScript RT Master mix（タカラバイオ社）を用いた逆転写反応によって cDNA を合成した。それぞれの cDNA に含まれる目的遺伝子産物の量を SYBR premix Ex taq II（タカラバイオ社）と Pikoreal real-time PCR system（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて測定した。増幅サイクルは、95°C 30 秒の熱変性のあと、（95°C, 5 秒→60°C, 30 秒）の 40 サイクル反応で行い、その後 60°C から 95°C の融解曲線測定より反応産物の特異性を解析した。測定蛍光から増幅曲線を作成し、 $\Delta\Delta C_t$ 法により補正用コントロール遺伝子（ β -actin）に対する目的遺伝子の相対的定量値を算定した。定量値は、N 群の値を 1 として表した。

統計学的解析

統計解析は R プログラム（v 3.1.3）を用いて行った。検定は一元配置分散分析と Tukey-Kramer 法による多重検定で行った。全ての検定において、有意水準は P 値 < 0.05 とした。

結果と考察

実験期間中の摂食量と体重の変化

実験期間中の摂食量の変化及び高脂肪食各群の週間累積摂食量を Fig. 1 に示した。高脂肪食各群の週間累積摂食量に関しては、ペアフィーディング法による投与を行ったため、全ての週において群間での有意差はみられなかった。実験食開始前の摂食量は安定して 5 g/ 日前後であったが、実験食投与後は H+Ex+CP 群で摂食量が次第に減少し、最終的に 3 g/ 日まで減少した。このことから、高脂肪食による肥満状態では、運動と組み合わせた CP の摂取は摂食量の減少を起こす可能性が示唆された。この H+Ex+CP 群の摂食量に合わせて高脂肪食各群の給餌量を制限したた

め、実際に摂取されたCPあるいはBCAAの量は60～80 mg程度であった。

実験期間中の体重変化をFig. 2に示した。10週齢の時点では、H群はN群に対して有意に体重が増加し、肥満状態となった。一方、運動を負荷した各群では有意ではな

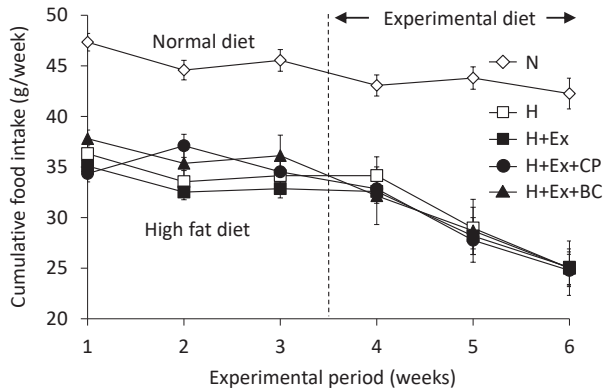


Fig. 1 Cumulative food intake of the mice in each group during experimental periods. Cumulative food intake was determined from daily food intake. Values obtained from 5 mice are shown as mean \pm SEM. The first (1) and the last (6) week of the experimental period correspond to 6 and 11 weeks of age, respectively.

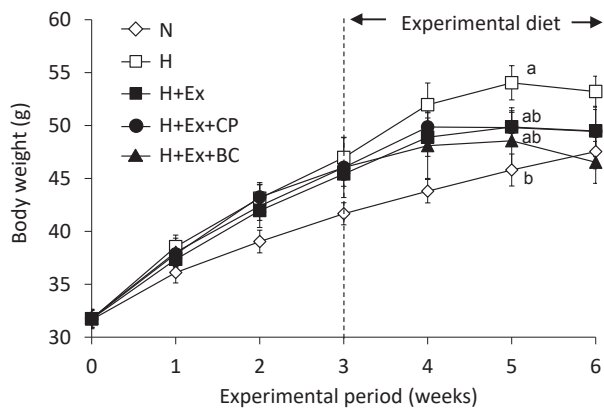


Fig. 2 Body weight changes of the mice in each group during experimental periods. Values obtained from 5 mice are shown as mean \pm SEM. The initial (0) and the last (6) week of the experimental period correspond to 5 and 11 weeks of age, respectively. ^{a, b} Mean values indicated by dissimilar letters are significantly different ($p < 0.05$).

いもののH群に対して減少傾向がみられた。11週においてはH+Ex+CP群における摂食量の減少のため、H群を含むペアフィーディングを行った高脂肪食各群で体重が減少しており、特にH+Ex+BC群で大きな体重の低下がみられた。

臓器重量と脂肪重量

11週の時点における体重及び各臓器の重量をTable 2に示した。肝臓及び腎臓重量は、ともに群間で差がみられなかった。脂肪重量は、H群では全ての脂肪組織でN群に対して有意に増加したが、運動負荷により腸間膜脂肪重量が有意に低下した。H+Ex+BC群は全ての脂肪組織で最も低い値を示したが、H+Ex+CP群では腸間膜脂肪や総脂肪量はむしろH+Ex群よりも増加しており、CP摂取による体脂肪減少効果はみられなかった。

腓腹筋量はH+Ex群とH+Ex+CP群でN群に対して有意に増加したが、H+Ex+BC群では有意差はみられなかった。一方、大腿筋重量に群間で差はみられず、運動による影響も認められなかった。本研究では低強度の有酸素運動（ホイール走行運動）を運動の条件として設定したため、走行時の活動に大きく関与する筋肉である腓腹筋で変化がみられたのに対し、レジスタンストレーニングによって増強される大腿筋では運動負荷による影響がみられなかったものと考えられる。

空腹時血糖値と血漿脂質濃度、肝臓可溶性トリグリセリド量

11週の時点における空腹時血糖値と血漿脂質、および肝臓の可溶性トリグリセリド量をTable 3に示した。空腹時血糖値はH群でN群に対し有意に増加しており、インスリン抵抗性の増加による高血糖が示唆された。空腹時血糖値はH+Ex群、H+Ex+CP群とH+Ex+BC群で低下傾向を示したが、群間で有意差は認められなかった。血漿トリグリセリド濃度に関してはいずれも有意差は見られなかったが、総コレステロール濃度はH+Ex群、H+Ex+CP群、H+Ex+BC群でN群に対し有意に上昇しており、特にH+Ex群とH+Ex+CP群はH群よりも上昇傾向が認められた。HDLコレステロールでも同じ傾向が認められたことから、HDLが主要リポタンパク質であるマウスに

Table 2 Body weight and organ weights of the mice in each group.

	N	H	H+Ex	H+Ex+CP	H+Ex+BC
Body weight (g)	43.8 \pm 1.10	52.0 \pm 2.06	48.9 \pm 1.81	49.9 \pm 1.41	48.1 \pm 3.11
Liver (g)	1.82 \pm 0.08	2.00 \pm 0.10	1.73 \pm 0.24	1.83 \pm 0.08	1.82 \pm 0.16
Kidney (g)	0.67 \pm 0.04	0.61 \pm 0.02	0.60 \pm 0.03	0.60 \pm 0.05	0.63 \pm 0.04
Testicular fat (g)	1.01 \pm 0.11 ^a	2.33 \pm 0.13 ^b	2.10 \pm 0.29 ^b	2.56 \pm 0.39 ^b	1.90 \pm 0.21 ^{ab}
Mesenteric fat (g)	0.73 \pm 0.10 ^a	1.40 \pm 0.10 ^b	0.75 \pm 0.16 ^a	0.84 \pm 0.24 ^{ab}	0.64 \pm 0.08 ^a
Perirenal fat (g)	0.35 \pm 0.04 ^a	0.87 \pm 0.05 ^b	0.67 \pm 0.15 ^{ab}	0.76 \pm 0.18 ^{ab}	0.57 \pm 0.10 ^{ab}
Total visceral fat (g)	2.08 \pm 0.21 ^a	4.60 \pm 0.17 ^b	3.52 \pm 0.58 ^{ab}	4.15 \pm 0.79 ^b	3.11 \pm 0.38 ^{ab}
Femoral muscle (g)	0.57 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.57 \pm 0.02	0.56 \pm 0.03	0.55 \pm 0.02
Gastrocnemius muscle (g)	0.34 \pm 0.03 ^a	0.36 \pm 0.03 ^{ab}	0.46 \pm 0.02 ^{bc}	0.47 \pm 0.01 ^c	0.43 \pm 0.02 ^{abc}

Values obtained from 5 mice are shown as mean \pm SEM.

^{a, b, c} Mean values indicated by dissimilar letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3 The concentrations of blood glucose, plasma lipids, and liver triglyceride of the mice in each group.

	N	H	H + Ex	H + Ex + CP	H + Ex + BC
Blood glucose (mg/dL)	91 ± 14 ^a	150 ± 9 ^b	121 ± 14 ^{ab}	122 ± 8 ^{ab}	126 ± 13 ^{ab}
Free fatty acid (mEq/L)	0.51 ± 0.04 ^{ab}	0.46 ± 0.01 ^a	0.57 ± 0.04 ^{ab}	0.60 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.03 ^{ab}
Triglyceride (mg/dL)	99 ± 16	130 ± 8	121 ± 16	101 ± 2	108 ± 11
Total cholesterol (mg/dL)	96 ± 10 ^a	167 ± 20 ^{ab}	192 ± 17 ^b	203 ± 15 ^b	171 ± 23 ^b
HDL cholesterol (mg/dL)	80 ± 7 ^a	143 ± 17 ^b	160 ± 13 ^b	170 ± 10 ^b	139 ± 17 ^b
Liver triglyceride (mg/g)	20.2 ± 1.7 ^{ab}	24.8 ± 1.3 ^a	22.4 ± 2.5 ^a	19.0 ± 2.3 ^{ab}	13.4 ± 2.3 ^b

Values obtained from 5 mice are shown as mean ± SEM.

^{a, b, c} Mean values indicated by dissimilar letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4 The expression levels of genes for lipid metabolism in adipose tissue of the mice in each group.

	N	H	H + Ex	H + Ex + CP	H + Ex + BC
SREBP-1c	1.00 ± 0.18	0.36 ± 0.05	0.91 ± 0.26	0.40 ± 0.19	0.78 ± 0.33
FAS	1.00 ± 0.19 ^{ab}	0.53 ± 0.10 ^{ab}	1.11 ± 0.27 ^a	0.30 ± 0.13 ^b	0.52 ± 0.21 ^{ab}
ACC-1	1.00 ± 0.19	0.54 ± 0.09	1.05 ± 0.26	0.32 ± 0.03	0.78 ± 0.26
PPAR- γ	1.00 ± 0.19	1.16 ± 0.16	1.51 ± 0.25	1.02 ± 0.16	1.13 ± 0.15
CD36	1.00 ± 0.18	1.54 ± 0.14	1.80 ± 0.28	1.12 ± 0.14	1.05 ± 0.16
HSL	1.00 ± 0.19	0.50 ± 0.16	1.18 ± 0.37	0.50 ± 0.14	1.23 ± 0.53
ATGL	1.00 ± 0.16	0.84 ± 0.09	1.68 ± 0.44	0.51 ± 0.12	1.15 ± 0.41
UCP2	1.00 ± 0.14	1.53 ± 0.19	1.48 ± 0.08	1.10 ± 0.09	1.86 ± 0.42

Values obtained from 5 mice are shown as mean ± SEM. The relative amounts of transcripts were normalized with β -actin transcripts present in the same cDNA and values obtained for the N group are presented as 1.

^{a, b, c} Mean values indicated by dissimilar letters are significantly different ($p < 0.05$).

において HDL コレステロールの上昇と連動して総コレステロール濃度も上昇したものと考えられる。血漿遊離脂肪酸量は、H 群は N 群よりも低い値を示したが、H + Ex 群では上昇傾向がみられ、H + Ex + CP 群では N 群に対して有意に上昇していた。本実験で用いたマウスは 16 時間絶食させたため、血漿遊離脂肪酸は脂肪組織から放出されたものが中心であるものと考えられ、H 群に対し H + Ex 群で上昇傾向がみられるとともに H + Ex + CP 群で有意に上昇していたことは、運動によるエネルギー消費の増加を反映しているものと考えられる。

肝臓可溶性トリグリセリド量に関しては、H + Ex + BC 群では H 群および H + Ex 群の両方に対し有意に低下した。H + Ex + CP 群においても、有意ではなかったものの低下傾向を示した。このことから、BCAA は運動との併用により脂肪肝を抑制することが示され、CP においても抑制効果がある可能性が示された。

脂肪組織における遺伝子発現量

精巢周囲脂肪組織における脂肪酸合成に関連する遺伝子発現量の測定結果を Table 4 に示した。核内受容体型の転写調節因子である PPAR- γ は、高脂肪食負荷により脂肪細胞の肥大化と脂肪蓄積、インスリン抵抗性を誘導する。PPAR- γ の標的遺伝子の一つである CD36 は、細胞内への脂肪酸輸送を担っている。PPAR- γ と CD36 の発現量は群間で類似した傾向を示し、有意ではないものの H 群と H + Ex 群で上昇し、H + Ex + CP 群と H + Ex + BC 群で低下する傾向がみられた。また、脂肪酸新規合成の転写因子である SREBP-1c と、その標的遺伝子である脂肪酸合成酵

素 FAS およびアセチル CoA カルボキシラーゼ ACC1 の発現量に関して、H 群はいずれも通常群の半分程度の発現量であったが、H + Ex 群では通常群と同程度の値を示した。H + Ex + CP 群では H + Ex 群に対していずれも低値を示しており、特に FAS の発現は有意に低下した。

一方、脂肪分解に関連する遺伝子として、ホルモン感受性リパーゼ HSL と脂肪細胞特異的トリグリセリドリパーゼ ATGL の発現量は有意ではないものの H 群で低下し、H + Ex 群で増加する傾向が見られた。H + Ex + CP 群では有意ではないものの H + Ex 群の半分以下に低下しており、全群の中で最も低い値を示した。脂肪細胞に発現している脱共役タンパク質である UCP2 の遺伝子発現量では、高脂肪食を投与した各群で N 群に対して有意ではないものの上昇傾向を示した。UCP2 の発現に対する運動負荷の影響は認められず、H + Ex + CP 群においては H + Ex 群に対してやや低値を示した。

これらのことから、高脂肪食摂取における運動負荷は脂肪酸の新規合成と脂肪分解の両方が増加するが、CP 摂取はそのいずれをも抑制する可能性が示された。実際の体脂肪量は、H + Ex 群と H + Ex + BC 群で H 群に対して低下傾向を示し、H + Ex + CP 群では低下が抑制されたことから (Table 2)、カテコールアミンによるこれらの酵素の活性調節についても検討する必要があるものと考えられる。

大腿筋における遺伝子発現量

大腿筋における脂肪代謝と糖代謝に関わる遺伝子発現量を Table 5 に示した。脂肪酸 β 酸化に関連する遺伝子について、脂肪酸 β 酸化を調節する PPAR- α と細胞内への脂

Table 5 The expression levels of genes for β -oxidation and glucose metabolism in skeletal muscle of the mice in each group.

	N	H	H + Ex	H + Ex + CP	H + Ex + BC
PPAR- α	1.00 \pm 0.37 ^a	0.26 \pm 0.04 ^b	0.34 \pm 0.09 ^{ab}	0.26 \pm 0.03 ^b	0.20 \pm 0.04 ^b
CD36	1.00 \pm 0.12 ^a	0.56 \pm 0.06 ^b	0.62 \pm 0.12 ^b	0.50 \pm 0.02 ^b	0.39 \pm 0.04 ^b
CPT1b	1.00 \pm 0.16	1.17 \pm 0.10	0.99 \pm 0.08	0.97 \pm 0.15	1.08 \pm 0.05
PGC-1 α	1.00 \pm 0.17	1.34 \pm 0.32	2.03 \pm 0.53	1.36 \pm 0.15	1.46 \pm 0.16
GLUT4	1.00 \pm 0.16	0.90 \pm 0.05	0.87 \pm 0.05	1.11 \pm 0.08	0.86 \pm 0.12
Akt1	1.00 \pm 0.11	1.22 \pm 0.22	0.90 \pm 0.05	1.06 \pm 0.13	0.79 \pm 0.07
Akt2	1.00 \pm 0.04 ^a	0.84 \pm 0.10 ^{ab}	0.63 \pm 0.05 ^b	0.65 \pm 0.07 ^b	0.63 \pm 0.10 ^b
AMPK1 α	1.00 \pm 0.04	0.98 \pm 0.11	0.91 \pm 0.06	0.87 \pm 0.09	0.83 \pm 0.05
AMPK2 α	1.00 \pm 0.18	1.42 \pm 0.17	1.14 \pm 0.13	0.86 \pm 0.08	0.94 \pm 0.12
UCP3	1.00 \pm 0.20	0.98 \pm 0.10	1.14 \pm 0.16	0.89 \pm 0.13	0.85 \pm 0.09

Values obtained from 5 mice are shown as mean \pm SEM. The relative amounts of transcripts were normalized with β -actin transcripts present in the same cDNA and values obtained for the N group are presented as 1.

^{a, b, c} Mean values indicated by dissimilar letters are significantly different ($p < 0.05$).

脂肪酸輸送を行う CD36 の発現量は、高脂肪食各群で N 群に対し大きく低下しており、エネルギー過剰により骨格筋細胞への脂肪酸取り込みとミトコンドリアでの β 酸化が抑制されたことが示唆された。また、ミトコンドリア内への脂肪酸輸送に関与する CPT1b の発現量では群間で差がみられなかったが、ミトコンドリア合成に関わる PGC-1 α は有意ではないものの H+Ex 群で N 群及び H 群に対して高値を示しており、運動負荷によるミトコンドリアの増加が示唆された。これらのいずれも CP あるいは BCAA 摂取による影響はみられず、筋肉におけるエネルギー産生に影響しない可能性が示された。

糖代謝に関連する遺伝子として、エネルギーセンサーとして蓄積エネルギーの異化亢進に関わる AMPK1, 2 と、細胞への糖の取り込みに関わる GLUT4 の発現量に関して群間で有意差はみられなかった。インスリンシグナルの伝達分子である Akt1 の発現量も群間で有意差はみられなかったが、Akt2 の発現量は H+Ex 群、H+Ex+CP 群、H+Ex+BC 群いずれも N 群に対し有意に低値を示した。Akt は GLUT4 のトランスロケーションに関与するシグナル伝達分子であり、H+Ex 群で空腹時血糖値の改善傾向がみられたことと合致していないが、高脂肪食によるエネルギーの過剰が関連している可能性が考えられる。筋肉に発現する脱共役タンパク質である UCP3 の発現量では、N 群と H 群、H+Ex 群との間で発現量に大きな差はみられなかった。

結 論

本研究では、高脂肪食により肥満状態を誘発させたマウスにおいて、運動負荷と CP 摂取の併用が肥満状態にどのような影響を及ぼすかを BCAA 摂取との比較とともに明らかにすることを目的として行った。

実験期間中の体重は高脂肪食により増加を示し、高脂肪食を摂取させた H 群では全ての脂肪組織で脂肪重量が N 群に対して有意に増加していたが、運動負荷により腸間膜脂肪重量が有意に低下するとともに、BCAA の摂取によ

り有意ではないものの脂肪量の減少促進傾向がみられた。一方、H+Ex+CP 群では腸間膜脂肪や総脂肪量はむしろ H+Ex 群よりも増加しており、CP 摂取による体脂肪減少効果はみられなかった。空腹時血糖値と血漿脂質濃度に関しても CP の有効性は認められなかったが、脂肪組織における脂肪酸合成酵素遺伝子の発現量は H+Ex 群と比べて大きく低下しており、体脂肪量には反映されていないものの、CP による脂肪新規合成の低下が示唆された。今回の実験は 3 週間という比較的短期の実験期間であり、運動強度も低強度で行ったことから、肥満に対する CP の作用を明確にするためには、運動負荷期間と負荷方法、運動強度、さらに実験食の投与方法・投与期間などの再検討が必要であるものと考えられる。

また、本研究では高脂肪食各群における摂食量を統一するためペアフィーディング法で給餌を行ったが、H+Ex+CP 群で摂食量の顕著な減少が認められた。したがって、給餌量を制限しない状態では、CP 摂取による有効性はより明確に現れるものと推察される。この CP による摂食量抑制効果は高脂肪食によるエネルギー過剰状態でみられることなのか、あるいは運動との組み合わせが必要なのかどうか興味深いところであり、今後、CP による摂食抑制作用に焦点を当てた研究がなされることが望まれる。今後の研究により運動負荷における CP 摂取の併用が肥満進抑制や体重減少に効果的であることがより明確に示されれば、肥満者の減量を目的とした運動療法の 1 つとして CP の併用摂取が推奨される可能性が期待される。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 26350153 と 19K02376 の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) 神山伸, 曾根英行 (2013) コラーゲン加水分解物の吸収と生理作用. ビタミン 87 : 572-574.

- 2) Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y, Ohtsuki K (2005) Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 53: 6531-6536.
- 3) Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M (2010) Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem* 58: 835-841.
- 4) Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, Taira T, Park EY, Nakamura Y, Sato K (2009) Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem* 57: 444-449.
- 5) Kimira Y, Ogura K, Taniuchi Y, Kataoka A, Inoue N, Sugihara F, Nakatani S, Shimizu J, Wada M, Mano H (2014) Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 498-501.
- 6) Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M (2009) Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1620-1627.
- 7) Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, Tajima S (2010) Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol* 37: 330-338.
- 8) Iba Y, Yokoi K, Eitoku I, Goto M, Koizumi S, Sugihara F, Oyama H, Yoshimoto T (2016) Oral Administration of Collagen Hydrolysates Improves Glucose Tolerance in Normal Mice Through GLP-1-Dependent and GLP-1-Independent Mechanisms. *J Med Food* 19: 836-843.
- 9) Zhu C, Zhang W, Mu B, Zhang F, Lai N, Zhou J, Xu A, Liu J, Li Y (2017) Effects of marine collagen peptides on glucose metabolism and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *J Food Sci Technol* 54: 2260-2269.
- 10) Devasia S, Kumar S, Stephen PS, Inoue N, Sugihara F, Suzuki K (2018) Double blind, randomized clinical study to evaluate efficacy of collagen peptide as add on nutritional supplement in type 2 diabetes. *J Clin Nutr Food Sci* 1: 6-11.
- 11) Saiga A, Iwai K, Hayakawa T, Takahata Y, Kitamura S, Nishimura T, Morimatsu F (2008) Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *J Agric Food Chem* 56: 9586-9591.
- 12) Kouguchi T, Ohmori T, Shimizu M, Takahata Y, Maeyama Y, Suzuki T, Morimatsu F, Tanabe S (2013) Effects of a chicken collagen hydrolysate on the circulation system in subjects with mild hypertension or high-normal blood pressure. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 691-696.
- 13) Igase M, Kohara K, Okada Y, Ochi M, Igase K, Inoue N, Kutsuna T, Miura H, Ohyagi Y (2018) A double-blind, placebo-controlled, randomised clinical study of the effect of pork collagen peptide supplementation on atherosclerosis in healthy older individuals. *Biosci Biotechnol Biochem* 82: 893-895.
- 14) Saito M, Kiyose C, Higuchi T, Uchida N, Suzuki H (2009) Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J Agric Food Chem* 57: 10477-10482.
- 15) Zdzieblik D, Oesser S, Baumstark MW, Gollhofer A, König D (2015) Collagen peptide supplementation in combination with resistance training improves body composition and increases muscle strength in elderly sarcopenic men: a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 114: 1237-1245.
- 16) 岩佐慎也, 川島恵理子, 向井直樹, 麻見直美 (2010) マリンコラーゲン摂取が学生アメリカンフットボール選手の体づくりに及ぼす影響. *Food style* 21 14: 62-65.
- 17) Kitakaze T, Sakamoto T, Kitano T, Inoue N, Sugihara F, Harada N, Yamaji R (2016) The collagen derived dipeptide hydroxyprolyl-glycine promotes C2C12 myoblast differentiation and myotube hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 478: 1292-1297.
- 18) Arakawa M, Masaki T, Nishimura J, Seike M, Yoshimatsu H (2011) The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocr J* 58: 161-170.