

## ラット肝臓の脂肪酸組成ならびに NADPH 産生酵素活性に及ぼす飼料油脂の影響

小松 あかね 佐々木 香苗 谷口 巳佐子

### Effects of Dietary Fat on Fatty Acid Composition and NADPH Producing Enzyme Activities of Rat Liver.

Akane KOMATSU

Kanae SASAKI

Misako TANIGUCHI

(1996年11月20日受理)

#### 緒 論

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) はペントースリン酸経路の律速酵素で、リンゴ酸酵素 (ME) とともに脂質合成に必要な NADPH を産生する。肝サイトソル中の両酵素は炭水化物と脂質の代謝に関係し、栄養摂取状態、特に高糖質食や無脂肪食により活性は上昇し<sup>1,2)</sup>、また、脂肪の量およびその種類により変動する<sup>3)</sup>。飽和脂肪酸含量の多い飼料でラットを飼育した場合、多価不飽和脂肪酸の多い飼料に比べ、G6PD 活性は高く、さらに肝細胞膜リン脂質中の多価不飽和脂肪酸 (P) と飽和脂肪酸 (S) の比 (P/S 比) と逆相関関係することが示されている<sup>4)</sup>。多価不飽和脂肪酸による G6PD 活性の上昇抑制は、脂肪酸の構造とは関係せず<sup>2)</sup>、リノール酸からの代謝産物が関与していることが報告されている<sup>5)</sup>。栄養による G6PD 誘導の調節因子には数種のホルモンが関与し、インスリンは第一シグナルとして作用する<sup>6,7)</sup>。

本研究は、脂肪酸の構造の違いや P/S 比、特に n-6/n-3 比の異なる多価不飽和脂肪酸が NADPH 産生酵素活性に及ぼす影響を明らかにする目的で、絶食後のラットにパーム油、コーン油及び大豆油を摂取させ、酵素活性誘導の違いを肝臓リン脂質の脂肪酸組成の変化ならびに血清インスリン・レベルとの相関から検討した。

#### 実験材料および方法

##### 1 実験動物

体重170~180g (生後4週齢) のウィスター系雄性ラットを、各群6匹ずつ個別ケージ内で飼育した。実験開始の2日前より二晩絶食し、2日もしくは5日間実験食を自由摂食させ、3日目もしくは6日目の午前中に屠殺し、肝臓および血清を採取し実験に供した。

##### 2 飼料組成

カゼイン、無機塩類、ビタミン、セルロース、メチオニン、コーンスターチを基本食とし、無脂肪、パーム油、コーン油および大豆油の各飼料を Table 1 の組成で作成した。ミネラル混合 (AIN76) とビタミン混合 (AIN76) はオリエンタル酵母工業株式会社製を用いた。カゼインは ICN Biomedicals 社製のビタミンフリーカゼインを用い、パーム油、コーン油および大豆油は和光純薬株式会社製を用いた。各油脂中の脂肪酸組成は Table 2 に示す。

##### 3 酵素標品の調製

大腿部静脈より血液を採取した後、肝臓を摘出し、冷却した0.9% NaCl 溶液で洗浄後、4倍量の0.25M Sucrose-1mM Tris-HCl-0.1mM EDTA (pH7.4) 溶液を加えホモジナイズした。ホモジネートを9,000×g で20分間遠心分離後、上清をさらに105,000×g で1時間遠心分離し、その上清をサイトソル分画とし酵素活

Table 1 Composition of Diet (%)

	g / 100g Diet
Casein	20.0
D-L-Methionine	0.6
Mineral mixture (AIN76)	4.0
Vitamin mixture (AIN76)	1.0
Choline bitartrate	0.2
Cellulose	2.0
Oil *	5.0
Corn starch	to 100.0

\* Palm oil, Corn oil, Soybean oil

Table 2 Composition of fatty acids in oils (%)

Fatty Acid	Palm oil	Corn oil	Soybean oil
12 : 0	—	1.5	—
14 : 0	1.1	0.4	0.1
14 : 1	0.1	—	—
16 : 0	41.9	10.9	10.9
16 : 1	0.1	—	0.02
18 : 0	4.2	1.8	3.3
18 : 1	41.6	28.2	23.3
18 : 2	9.6	53.1	54.7
18 : 3	0.2	1.9	6.7
20 : 0	0.4	—	0.4
PUFA	9.8	55.0	61.4
MUFA	41.8	28.2	23.3
SFA	47.6	14.6	14.7
PUFA/SFA	0.21	3.77	4.18

性標品に用いた。

#### 4 酵素活性の測定

G6PD 活性は Lee の方法<sup>8)</sup>, ME 活性は Ochoa の方法<sup>9)</sup>に準じてそれぞれ測定した。反応温度25°Cにおける吸光度340nm の変化より1分間当たりの1 $\mu$ mol NADPH 生成量を1U として求め、タンパク質1mg 当たりの活性として表した。タンパク質はローリー法<sup>10)</sup>で定量した。

#### 5 肝リン脂質の脂肪酸組成

肝臓のリン脂質は Folch らの方法<sup>11)</sup>に従い、肝臓0.5g よりクロロホルム/メタノール (C/M)=2:1 (v/v) 混液および C/M/Water=1:2:0.8 (v/v/v) 混液で抽出後、N<sub>2</sub>ガス気流中、ロータリーエバポレーターで濃

縮し、クロロホルム (0.5%MeOH 含有) 6 ml に溶かし脂質抽出液とした。脂質抽出液の一部を石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸=82:18:1 (v/v/v) 混液を展開液としたシリカゲル薄層クロマトグラフ (Silica Gel 60 F<sub>254</sub> plate with fluorescent indicator: Merck, Germany) にかけて、リン脂質分画をはぎとり、その分画を三フッ素化ホウ素メタノールでメチル化<sup>12)</sup>し、脂肪酸メチルエステルとしヘキササンで抽出後、その一部をガスクロマトグラフィ (島津 (GC-14A)) により分析した。カラムは5%ShinchromE71 (3.2mm $\times$ 3.1m) column を用い、分離条件はカラム温度215°C, 注入および検出温度250°Cで、キャリアーガスは N<sub>2</sub> ガス, 検出器は FID を使用した。

#### 6 インスリンの定量

大腿部静脈より採取した血液を、3,000rpm で15分間遠心し、上清の血清を用いインスリンの定量を行った。インスリンの定量には酵素免疫抗体法を原理とした和光純薬株式会社のグラザイム Insulin-EIA TEST を用いた。

## 結 果

絶食後2日間もしくは5日間の餌摂取量は各飼料群間に差は見られなかった (Table3)。しかし、体重の増加は2日摂食では無脂肪食、パーム油食、コーン油食に比べ大豆油食で大きかったが、5日摂食では差がなかった。食事効率比 (FER) は、5日摂食に比べ2日摂食で高く、特に、大豆油群は他群より有意に高くなった。体重100g 当たりの肝重量は2日摂食で絶食時より著しく増加したが、群間に差はなかった。

Table 3 Body weight gained, food intake, FER and liver weight of rats fed different oil diets.

	Gained weight (g)	Food intake (g)	FER	Liver / 100g weight (g)
Fasted	-38.0 $\pm$ 3.5			3.44 $\pm$ 0.19
2Days				
Non-oil	27.7 $\pm$ 2.4 a	34.8 $\pm$ 4.8	0.78 $\pm$ 0.05 a	7.44 $\pm$ 0.60
Palm oil	30.7 $\pm$ 4.4 a	38.6 $\pm$ 3.8	0.80 $\pm$ 0.13 a	6.89 $\pm$ 0.47
Corn oil	31.1 $\pm$ 2.7 a	37.4 $\pm$ 2.6	0.82 $\pm$ 0.07 a	7.38 $\pm$ 0.52
Soybean oil	34.1 $\pm$ 3.7 b	36.0 $\pm$ 1.8	0.95 $\pm$ 0.11 b	6.73 $\pm$ 0.57
5Days				
Non-oil	62.3 $\pm$ 6.9	104.1 $\pm$ 3.3	0.60 $\pm$ 0.06	6.80 $\pm$ 0.31
Palm oil	66.8 $\pm$ 6.4	102.0 $\pm$ 4.2	0.65 $\pm$ 0.05	6.94 $\pm$ 0.82
Corn oil	64.9 $\pm$ 4.6	100.2 $\pm$ 6.4	0.64 $\pm$ 0.05	6.85 $\pm$ 0.80
Soybean oil	67.4 $\pm$ 1.6	104.3 $\pm$ 7.0	0.65 $\pm$ 0.04	6.54 $\pm$ 0.38

Values are mean  $\pm$  SD of 6 rats.

Different superscript letters denote significant differences for non-oil groups at  $p < 0.05$ .

**Table 4 Effects of dietary fat on glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme activities of rat liver.**

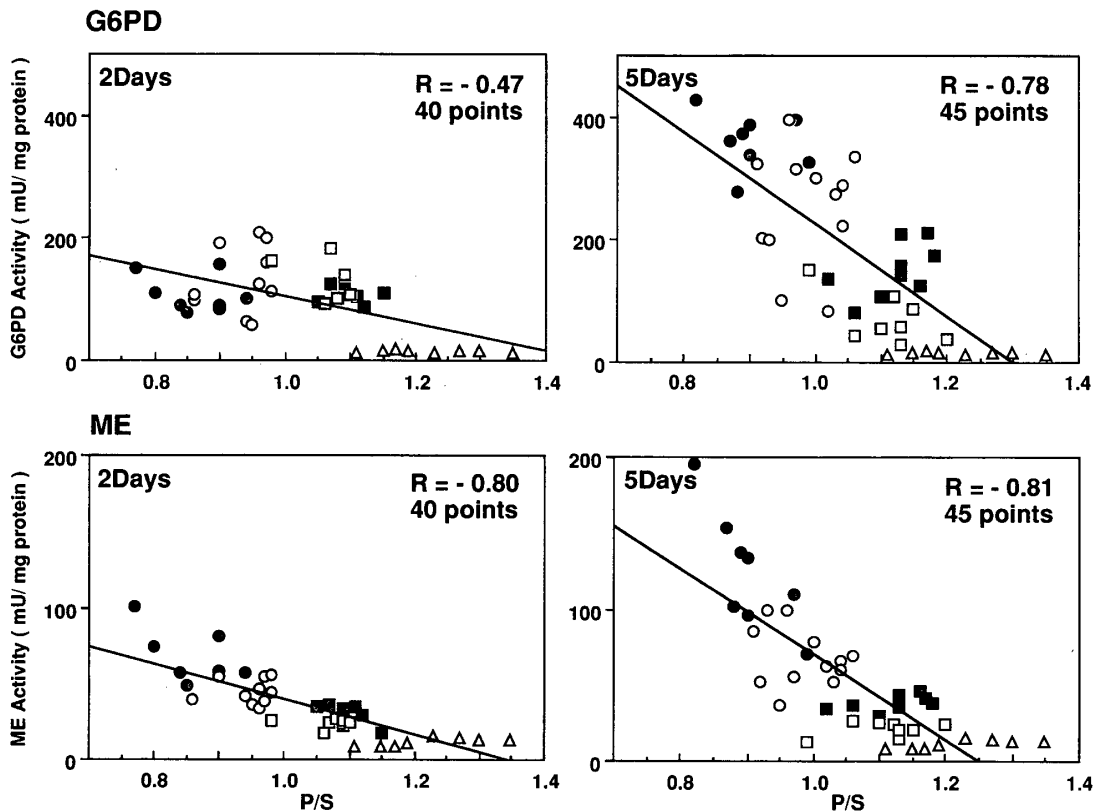
	G6PD Activity (mU/mg protein)			ME Activity (mU/mg protein)		
	Fasted	2Days	5Days	Fasted	2Days	5Days
	14.4 ± 2.1			11.4 ± 3.0		
Non-oil		113.0 ± 32.5	380.3 ± 30.6 a		63.4 ± 11.4 a	137.6 ± 34.9 a
Palm oil		126.9 ± 27.1	275.4 ± 51.4 b		41.9 ± 7.5 b	51.3 ± 10.9 b
Corn oil		114.4 ± 13.3	140.0 ± 23.2 c		31.4 ± 5.2 c	36.6 ± 3.9 b,c
Soybean oil		131.0 ± 37.0	51.4 ± 20.2 d		23.9 ± 3.4 c	22.2 ± 4.4 c

Values are mean ± SD of 6 rats. Different superscript letters in the same vertical lane denote significant differences between groups at  $p < 0.05$ .

G6PD, ME 活性は2日間の絶食により減少し, 摂食開始後, 活性は急激に上昇した (Table 4)。G6PD 活性は無脂肪, パーム油, コーン油, 大豆油食の2日摂食では飼料群間に有意差はなかった。しかし, 5日摂食では無脂肪食の活性を100%としたとき, パーム油食75%, コーン油食40%, 大豆油食14%にまで活性の上昇は抑制された。一方, ME 活性は2日摂食で有意な差が見られ, 無脂肪食の活性を100%としたとき, パーム油食59%, コーン油食42%, 大豆油食34%, さらに5日摂食ではパーム油52%, コーン油27%, 大豆油16%までに活性の上昇

は抑制された。G6PD 活性は無脂肪食とパーム油食で2日摂食に比べ, 5日摂食で著しく上昇, ME 活性においては無脂肪食のみ著しく上昇した。また, パーム油食のME 活性およびコーン油食の G6PD, ME 活性はわずかに上昇傾向を示したのに対し, 大豆油食では ME 活性は2日摂食と5日摂食で変動せず, G6PD 活性は2日摂食に比べ5日摂食で著しく低下した。

肝臓中のリン脂質の脂肪酸組成を分析し, 多価不飽和脂肪酸 PUFA (P) と飽和脂肪酸 SFA (S) の比 (P/S 比) を求め, G6PD または ME 活性との相関を求めた



**Fig.1 Relationship between G6PD or ME activities and PUFA / SFA (P/S) ratio of phospholipid in liver of rat fed different oil diets.**

△; Fasted, ●; Non-oil, ○; Palm oil, ■; Corn oil, □; Soybean oil

**Table 5 Comparison of n-6/n-3 ratio of phospholipid in liver of rats fed different oil diets.**

	n-6 / n-3 ratio		
		2Days	5Days
<b>Fasted</b>	<b>2.73 ± 0.19</b>		
<b>Non-oil</b>		<b>1.88 ± 0.35 a</b>	<b>2.36 ± 0.13 a</b>
<b>Palm oil</b>		<b>2.51 ± 0.37 b</b>	<b>3.01 ± 0.40 b</b>
<b>Corn oil</b>		<b>3.39 ± 0.54 c</b>	<b>5.19 ± 0.32 c</b>
<b>Soybean oil</b>		<b>2.91 ± 0.29 b,c</b>	<b>3.69 ± 0.30 b</b>

Values are mean ± SD of 6 rats. Different superscript letters in the same lane denote significant differences between groups at  $p < 0.05$ .  
n-6 are 18:2 plus 20:4, n-3 are 20:5 plus 22:6.

**Table 6 Change in serum insulin levels of rats fed on different oil diets.**

	Insulin concentration ( $\mu\text{U} / \text{ml}$ )		
		2Days	5Days
<b>Fasted</b>	<b>8.8 ± 2.2 (4)</b>		
<b>Non-oil</b>		—	<b>26.0 ± 1.3 (3)</b>
<b>Palm oil</b>		<b>18.5 ± 7.0 (4)</b>	<b>29.9 ± 4.8 (4)</b>
<b>Corn oil</b>		—	<b>23.9 ± 2.5 (5)</b>
<b>Soybean oil</b>		<b>22.3 ± 5.3 (6)</b>	<b>26.3 ± 3.3 (3)</b>

Values are mean ± SD. ( ); numbers of rat.

(Fig.1)。G6PD 活性と P/S 比の相関は 2 日摂食では低かった ( $R = -0.47$ ) が、5 日摂食は高い逆相関関係 ( $R = -0.78$ ) が示された。一方、ME 活性と P/S 比は 2 日摂食、5 日摂食ともに高い逆相関関係 ( $R = -0.80$ ,  $R = -0.81$ ) が示された。無脂肪食、パーム油食、コーン油食と大豆油食では P/S 比に差があったが、コーン油食と大豆油食の P/S 比に差はなかったため、肝リン脂質中の多価不飽和脂肪酸の n-6 系と n-3 系の脂肪酸比 (n-6/n-3 比) について検討した (Table 5)。n-6 系脂肪酸は 18:2 (リノール酸) と 20:4 (アラキドン酸)、n-3 系脂肪酸は 20:5 (エイコサペンタエン酸) と 22:6 (ドコサヘキサエン酸) の脂肪酸含量を合計し比率を求めた。n-6/n-3 比は大豆油食がコーン油食に比べ小さかった。

G6PD 誘導の第一シグナルとされているインスリン・レベルは、絶食時に比べ 5 日摂食で上昇していたが各飼料群間に差は見られなかった (Table 6)。

## 考 察

飼料油脂中の脂肪酸組成は、パーム油が 16:0 (パルミチン酸) と 18:1 (オレイン酸) で全体の約 80% を占める飽和脂肪酸の多い油脂であり、一方、コーン油と大豆油

は多価不飽和脂肪酸が全体の約 85% を占めており、n-6 系の 18:2 (リノール酸) の含量はほぼ同じであるが、n-3 系の 18:3 (リノレン酸) はコーン油 1.9 に比べ大豆油 6.7 と約 3.5 倍多く含んでいる。

今回の実験は絶食後の短期間摂食であったが、パーム油食に比べ大豆油食では餌摂取量が少ないにもかかわらず、体重増加量は高い傾向を示し、油脂の種類によって FER が異なることが示された。

絶食後のラットに 2 日間もしくは 5 日間再摂食させると、G6PD、ME 活性ともに有意に増加した。2 日摂食の各飼料群間で ME 活性には差があったのに対し、G6PD 活性では差がみられなかった。5 日摂食後は、両酵素とも無脂肪食に比べ、パーム油、コーン油、大豆油の順に活性増加は顕著に抑制された。大豆油食においては 5 日摂食で 2 日摂食に比べ、G6PD 活性は低下した。コーン油と大豆油は多価不飽和脂肪酸の含量の多い油脂であるが G6PD、ME 活性に及ぼす効果は異なり、両酵素の誘導には時間的な差があることが推定された。

一方、コーン油食と大豆油食群のラット肝リン脂質中の P/S 比には差は見られなかったが、n-6/n-3 比は 5 日摂食で有意な差が認められた。さらにアラキドン酸含量は、5 日摂食でのコーン油食 ( $25.1 \pm 1.3\%$ ) は大豆油食

(21.8±2.1%) に比べ有意に高かった。この結果はアラキドン酸が G6PD 上昇抑制に関与するとの報告<sup>5)</sup>に一致したものであった。従って、飼料中の油脂により肝リン脂質組成が変化し、G6PD, ME 活性の誘導抑制あるいは調節に関与していると思われる。

データには示していないが、ラット肝より Isogen で RNA を抽出後、cDNA より<sup>32</sup>P ラベルプローブを作成し、Dot-Blot 法を用いハイブリダイゼーションを行い mRNA の定量をした結果、G6PD, ME の mRNA レベルは絶食時に比べ 2 日摂食で増加し、さらに 5 日摂食では各飼料群間に有意な差がみられた。G6PD, ME ともに mRNA の変化が酵素活性誘導に先行していることが示されている。

肝リン脂質中の脂肪酸の P/S 比は絶食後の 2 日摂食ですでに変化し、ME 活性と逆相関関係を示し、さらに 5 日摂食では G6PD, ME 活性ともに有意な逆相関関係が示された。著者らは G6PD 活性と肝細胞膜中のリン脂質脂肪酸組成との相関を報告しているが<sup>4)</sup>、肝臓中の全リン脂質脂肪酸組成においても同様の相関を示した。肝リン脂質の脂肪酸組成の変化は酵素活性の変動に先行し、血清中のインスリン・レベルは飼料群間に有意差がないことから、飼料油脂により肝リン脂質の脂肪酸組成が変化することで、Pan ら<sup>13)</sup>、および著者ら<sup>4)</sup>により示されている膜レセプターへのインスリンの親和性が影響をうけた結果によるものと推定された。

## 参考文献

- 1) Prostko, C.R., Fritz, R.S. and Kletzien, R.F. (1989); *Biochem. J.*, **258**, 295-299.
- 2) Szepesi, B., Kamara, A.K. and Clarke, S.D. (1989); *J. Nutr.*, **119**, 161-165.
- 3) Gozukara, E.M., Frolich, M. and Holten, D. (1972); *Biochim. Biophys. Acta.*, **286**, 155-163.
- 4) Taniguchi, M., Kinoshita, C., Shoji, Y. and Inoue, K. (1994); *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 115-125.
- 5) Tomlinson, J.E., Nakayama, R. and Holten, D. (1988); *J. Nutr.*, **118**, 408-415.
- 6) Nakamura, T., Yoshimoto, K., Aoyama, K. and Ichihara, A. (1982); *J. Biochem.*, **91**, 681-693.
- 7) Rudack, D., Chisholm, E.M. and Holten, D. (1971); *J. Biol. Chem.*, **246**, 1249-1254.
- 8) Lee, C.-Y. (1982); *Methods Enzymol.*, **89**, 252-261.
- 9) Ochoa, S. (1968); *Methods Enzymol.*, **1**, 739-753.
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951); *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 11) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H.J. (1959); *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 12) Morrison, W.R. and Smith, L.M. (1964); *J. Lipid Res.*, **5**, 600-608.
- 13) Pan, J.-S. and Berdanier, C.D. (1991); *J. Nutr.*, **121**, 1811-1819.