

SHR における肝臓ミクロソームのチトクローム P-450 およびジメチルニトロソアミン脱メチル化活性におよぼ す分離大豆たん白質と運動の影響

EFFECTS OF SOY PROTEIN ISOLATE AND EXERCISE ON
DIMETHYLNITROSAMINE DEMETHYLASE ACTIVITY BY MI-
CROSOMAL CYTOCHROME P-450 SYSTEM IN SHR LIVER

鈴木啓文・賀来正俊・堀 清記（兵庫医科大学第一生理）

細野道雄（杏和総合医学研究所生化学部門）

河野節子（名古屋女子大学家政学部）

Hirofumi SUZUKI¹, Masatoshi KAKU¹, Seiki HORI¹, Michio HOSONO²,
and Setsuko KAWANO³

¹First Department of Physiology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya
663

²Kyowa Synthetic Medical Laboratory, Nishinomiya 663

³Department of Food Science and Nutrition, Nagoya Women's University,
Nagoya 464

ABSTRACT

Twenty-four spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into four groups of 6 rats each, A; high(40%) soy protein isolate(SPI) diet and exercise group, B; high SPI diet and non-exercise group, C; low(10%) SPI diet and exercise group, and D; low SPI diet and non-exercise group. All animals were allowed to feed freely throughout the study from 8 to 17-week-old. A treadmill set to 15 m/min was used for the regular exercise in which the animals ran 30 min three times a week. At 17 weeks of age, blood was drawn from the abdominal aorta of anesthetized animals and all animals were killed. Microsomes were isolated from the liver and the small intestinal mucosa, and were used for measurement of P-450 content, NADPH-P-450 reductase activity, cytochrome b₅ and dimethylnitrosamine (DMN) demethylase activity by P-450. The retardation of growth and smaller relative liver weight were observed in the low SPI (C, D) groups. Concentrations of total plasma protein, albumin and creatine phosphokinase also decreased in these groups. On the contrary, microsomal proteins (14.0~19.8 mg/g liver) and DMN demethylase activity (1.18~1.60 nmol HCHO/min/mg microsomal protein) catalyzed by P-450 dependent monooxygenase, whose activity was inhibited to 36~48% by carbon monoxide and was reduced to about 80% by deficiency of NADPH, were increased in these groups. These changes induced by low SPI diet were not influenced by exercise. Microsomal P-450 content (1.19~1.52 nmol/mg microsomal protein) was not markedly effected by experimental diet but increased approximately 18% of

them in the exercise (A, C) groups. NADPH-P-450 reductase activity and cytochrome b₅ content did not change significantly by diet or exercise. In conclusion, the present study has shown that P-450 induced by exercise might not catalyze DMN demethylation while the other different P-450 isozyme induced by low SPI diet catalyze it. Intake of low SPI diet for a long time may promote carcinogenesis in the animals. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 9, 25-32, 1988.

ジメチルニトロソアミン Dimethylnitrosamine (DMN) はヒトにとっても強力な肝、胃などの発癌物質として認められており¹⁾多くの食品や水道水にも含まれるほか、胃内にてアミンと亜硝酸により自然生成される不可避な異物である²⁻⁴⁾。DMN それ自身は発癌性のない前(駆)発癌物質であるが生体内に入ると肝臓のミクロソーム膜にあるチトクローム P-450 (P-450) によって脱メチル化 (DMN demethylation) され変異原性を有するホルムアルデヒド (HCHO) を生じる⁵⁾。さらに DNA を傷害する究極的な発癌物質、メチルカチオン (CH₃⁺) などを発生することが知られている⁶⁾。今回我々は長期 (9 週間) 40% 分離大豆たん白質 (SPI) 摂取によって自然発症高血圧ラット (SHR) の肝ミクロソームの P-450 による DMN 脱メチル化活性が低下する傾向を認めた。このことは長期高 SPI 食が化学発癌機序ともいうべき DMN 脱メチル化活性を低下させることを示唆しており大変興味深い。また既に我々はウサギ消化管粘膜ミクロソームの P-450 によって DMN が脱メチル化されることを報告^{7,8)}しているが、本実験においても SHR 小腸粘膜ミクロソームの P-450 含量を測定した。

実験方法

動物飼育法

7 週齢雄 SHR 24 匹 (体重 143.0 ± 14.8 g, 自治医大薬理コロニーから分与) を 1 週間市販標準固形飼料 (日本クレア CE-2) で予備飼育後 (体重 179.7 ± 16.1 g), A: 高大豆たん白 (40%) 食運動群, B: 同非運動群, C: 低大豆たん白 (10%) 食運動群, D: 同非運動群の計 4 群に分けた。全ての SHR を 8 から 17 週齢まで各々の実験食 (自由摂食) で飼育した。実験食は粉末 SPI (フジプロ R®) を用いて高大豆たん白 (40%) 食と低大豆たん白 (10%) 食を作りそれぞれミネラル、ビタミン、繊維、塩分などは等量の配合とし、いずれもコーンスターチにて 100% とした (Table 1)。食餌は期間中全て自由摂食、摂水とした。運動はトレッドミルを用いた強制運動で週 3 回、毎分 15 m, 1 日 30 分間とし、いずれも午前 9 時から 11 時の間に実施した。

Table 1. Composition of experimental diet (%)

Ingredients	10% protein	40% protein
Soy protein isolate*	10	40
Soybean oil	15	15
Mineral mix**	4	4
Vitamin mix**	1	1
Cellulose powder	3	3
NaCl	1	1
Corn starch	66	36

* Fuji-pro R ** Harper's mixture

試料採取

飼育終了後、12 時間絶食の後屠殺解剖し、腹部大動脈より採血するとともにすみやかに肝臓、小腸をとり出し賀来ら⁹⁾の方法によってミクロソームを調製した。

ミクロソーム電子伝達系成分の測定

P-450 含量は還元型一酸化炭素結合差スペクトルを用いる大村と佐藤の方法¹⁰⁾を用いて測定した。NADPH-チトクローム P-450 還元酵素活性、チトクローム b₅ 含量は谷口らの方法¹¹⁾を用いて各々測定した。たん白含量は Lowry 法¹²⁾を用いて測定した。

ジメチルニトロソアミン脱メチル化活性

DMN 脱メチル化活性は Yang. らの方法¹³⁾を一部改変して測定した。即ち反応液 0.5 ml 中にミクロソーム 0.75 mg, そのほか最終濃度として 100 mM の DMN, 10 mM の NADPH, 100 mM の TrisHCl buffer (pH 7.5) を入れ 37°C, 20 分間反応させ代謝産物であるホルムアルデヒド (HCHO) の含量を測ることによって測定した。さらに high performance liquid chromatography (HPLC) 法¹⁴⁾によっても代謝産物である HCHO を同定、定量しこの方法でも活性測定した。

血漿成分測定法

血漿成分測定法としては、総たん白質はビュレット法、血漿アルブミンは BCG 法、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP) は L-ロイシル CPA 基質法、クレアチンフォスフォカイネース (CPK) は紫外部測定法、Na, K, Cl は電極法、総脂質は積算法、総コレステロールは COD 比色法、遊離コレステロールは COD-POD 酵素系比色法、リン脂質はホスホリパーゼ D による酵素法、遊離脂肪酸は ACS-ACO 酵素法、低比重リ

ポ蛋白 (LDL) はヘパリンカルシウム比濁法を用いて測定した。

結 果

摂取大豆たん白質量の相異と運動の有無による SHR の体重、肝重量、肝ミクロソームへの影響

Table 2 は体重、肝重量、肝ミクロソームたん白質含量を A, B, C, D 4 群間で比較したもので体重と肝重量は高たん白食群で有意に高値を示したが運動による影響は認められなかった。次に肝ミクロソームたん白質含量については肝全体としては高たん白食群にて有意に高値を示したが肝重量、体重の差を考慮すると肝臓 1 g あたりのミクロソームたん白質含量および体重 100 g あたりの肝ミクロソームたん白質含量は逆に低たん白食群で有意に高値を示した。運動による影響には有意な差は認められなかった。

ミクロソーム電子伝達系成分の含量および活性

P-450 は後述する血漿中たん白質と異なり肝全体の P-450 含量、ミクロソームたん白質 1 mg あたりの P-450 含量ともに摂取大豆たん白質濃度による差は有意ではなく、むしろ高大豆たん白食群、低大豆たん白食群ともに運動によって増加する傾向が認められた

(Table 3)。NADPH-チトクローム P-450 還元酵素 (fP₂) 活性および、チトクローム b₅ 含量に関してはいずれも食餌および運動による有意差は認められなかったが肝全体でみると fP₂ 活性は高大豆たん白食群に高い傾向が示された。

ジメチルニトロソアミン脱メチル化活性

本活性は一酸化炭素により 52~64% 阻害され、NADPH 非存在下では約 80% 減弱することより主に P-450 依存一原子酸素添加酵素によって触媒されていることが明らかである。Fig. 1 は SHR 肝臓のミクロソーム P-450 による DMN 脱メチル化活性を 4 群間で比較したものである。その結果斜線で示す様に DMN 脱メチル化活性は肝全体としては低たん白食群で増加する傾向を認めた。さらに肝臓 1 g あたりの活性、1 mg ミクロソームたん白質あたりの活性も低たん白食群で有意に増加していた。しかし運動による DMN の脱メチル化活性への影響は高たん白、低たん白食群ともに有意差は認められなかった。

血漿成分への影響

Fig. 2 は、9 週間飼育後の血漿総たん白質、アルブミン、CPK、LAP および電解質を 4 群間で比較したもので、値はいずれも平均値を示している。血漿総たん

Table 2. Effects of SPI diet and exercise on weights of the body and the liver, and content of hepatic microsomal protein in SHR.

Group	SPI level	Exercise	Body wt	Liver wt	Microsomal protein		
	(%)		(g)	(g)	(mg/whole liver)	(mg/g liver)	(mg/relative liver wt)
A	40	+	304.0±8.5	10.9±0.3	163.7±16.7	15.0±1.5	54.2±6.2
B	40	—	285.5±19.7	10.3±0.4	143.0±16.2	14.0±1.6	49.1±3.6
C	10	+	213.0±20.0	6.6±0.5	129.9±12.9	19.8±2.0	60.9±2.0
D	10	—	249.0±10.6	6.5±0.4	128.3±11.6	19.8±1.8	51.5±4.4

SPI: Soy protein isolate. Values represent means ± S. E. M. (n: A=6, B=6, C=4, D=5)

Table 3. Effects of SPI diet and exercise on P-450 content, NADPH-P-450 reductase activity and cytochrome b₅ content of liver microsomes in SHR.

Group	SPI level	Exercise	Cytochrome P-450		NADPH-P-450 reductase		Cytochrome b ₅	
	(%)		(nmol/liver)	(nmol/mg Ms* protein)	(Unit/liver)	(Unit/mg Ms* protein)	(nmol/liver)	(nmol/mg Ms* protein)
A	40	+	231.7±27.1	1.41±0.08	17.9±1.8	0.11±0.004	50.2±8.1	0.31±0.03
B	40	—	175.6±27.0	1.19±0.08	15.9±0.9	0.10±0.008	33.1±6.7	0.24±0.04
C	10	+	197.5±21.9	1.52±0.05	10.4±1.0	0.08±0.007	38.9±7.2	0.29±0.03
D	10	—	159.2±34.4	1.24±0.21	10.3±0.9	0.08±0.005	38.3±5.8	0.29±0.03

SPI: Soy protein isolate. Ms*: microsome. Values represent means ± S. E. M. (n: the same as table 1.)

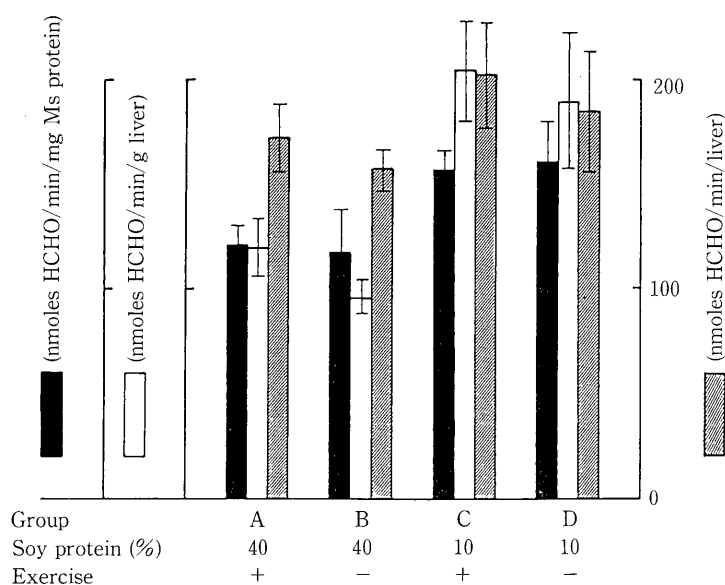


Fig. 1. Dimethylnitrosamine demethylase activities by hepatic microsomes in four SHR groups. Bars represent means $\pm$ S. E. M. (n: the same as table 1)

白質、アルブミンはいずれも高たん白食群で有意に高値を示しており運動による影響は高たん白食、低たん白食群ともに現われていない。CPK も高たん白食群で有意に高値を示しているが運動による影響は高たん白食群において非運動群に高い傾向を認めた。これらの傾向とは逆に LAP に関しては運動による有意な影響はみられなかったが、低たん白食群で有意に高値を示していた。また Na, K, Cl など種々の電解質にはいずれも食餌および運動による影響は認められなかった。即ち血漿中たん白質成分は LAP 以外は低たん白食群で明らかに低値を示した。

Fig. 3 では 4 群間における 9 週間飼育後の血漿中脂質成分を比較している。総脂質、総コレステロール、遊離コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸、リポ蛋白質の中の低比重リポ蛋白質(LDL)などは全て低たん白食群で有意に高値を示した。運動による影響は LDL でのみ非運動群で高い値となったがそのほかの成分には明らかな影響は認められなかった。

考 察

血漿中たん白質成分や肝重量はいずれも低たん白食群で有意に減少しているにもかかわらず、逆に肝ミクロソーム中でのたん白質含量は体重100 g あたりや肝 1 g あたりでは低たん白食群で増加する傾向を認めた。さらに肝ミクロソーム中の P-450 含量も 1 mg ミクロソームたん白質あたりで低たん白食群で増加する

傾向を認めた。一方高たん白食、低たん白食群ともに運動によって P-450 含量が増加する傾向が認められた。また P-450 により触媒される DMN の脱メチル化活性は運動による影響は認められないものの低たん白食群にて有意な上昇が認められた。このことより今回低大豆たん白食摂取にて誘導された肝ミクロソームの P-450 には DMN 脱メチル化活性を有するものが含まれ、運動により増加した肝ミクロソームの P-450 は DMN 脱メチル化活性を有しない異なった分子種であると考えられた。低たん白食摂取群の P-450 含量の増加が DMN 脱メチル化活性の増加に比べて少ないということは、肝ミクロソームに存在する多数種(ラット肝ミクロソームでは20種以上の P-450 が知られている^{15,16)} の P-450 の内、DMN 脱メチル化活性を有する少数の分子種のみが誘導され P-450 総含量には余り影響を与えなかったからではないかと推測している。肝ミクロソームのチトクローム P-450 含量に影響を与える食餌成分はアミノ酸^{17,18)} (メチオニンやシスチン)、リノール酸¹⁹⁾や炭水化物²⁰⁾および必須金属である Fe²¹⁾, Se²²⁾などが知られている。含硫アミノ酸添加カゼイン食¹⁷⁾, 低 Fe, 低 Se 食²²⁾や高炭水化物食¹¹⁾などは肝や腸のミクロソーム P-450 含量および aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase 活性, aniline hydroxylase 活性などの外来物質代謝活性を低下させるという報告があり我々の実験結果にもこれらの食餌成分の影響が考えられる。他方運動により増

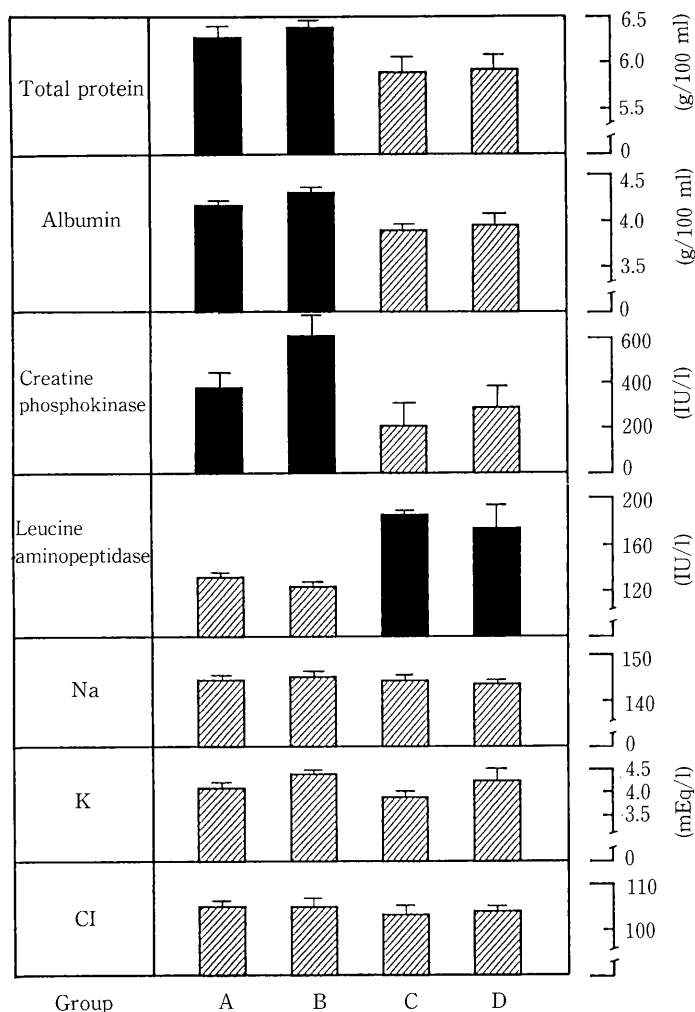


Fig. 2. Plasma proteins and electrolytes of 16-week-old SHR in four groups. Bars represent means $\pm$ S. E. M. (n : the same as table 1)

加した P-450 の分子種やその機能に関しては全く不明であり一般的知見も非常に少ないが、運動によって DMN 脱メチル化活性が増加していないことより本 P-450 は内因性物質^{7,15,16,23~26}を基質とする分子種である可能性がある。我々は経口摂取物が最初に接し吸収される消化管粘膜のミクロソームでも P-450 が活発に異物代謝していることを^{7,8,9,23~25,27,29}報告してきたが、ウサギで最も異物代謝活性の高い消化管臓器である小腸についてもその粘膜ミクロソーム中の P-450 含量について測定した。その含量は 0.018~0.026 (nmol P-450/mg ミクロソームたん白質) であり、ウサギのその 20~30% と少なく、肝臓と異なり食餌や運動による明らかな影響は認められなかった。今回の我々の実験により、長期、低分離大豆たん白質を摂取

していると動物の肝臓に DMN による癌が発生する可能性のあることが示唆された。

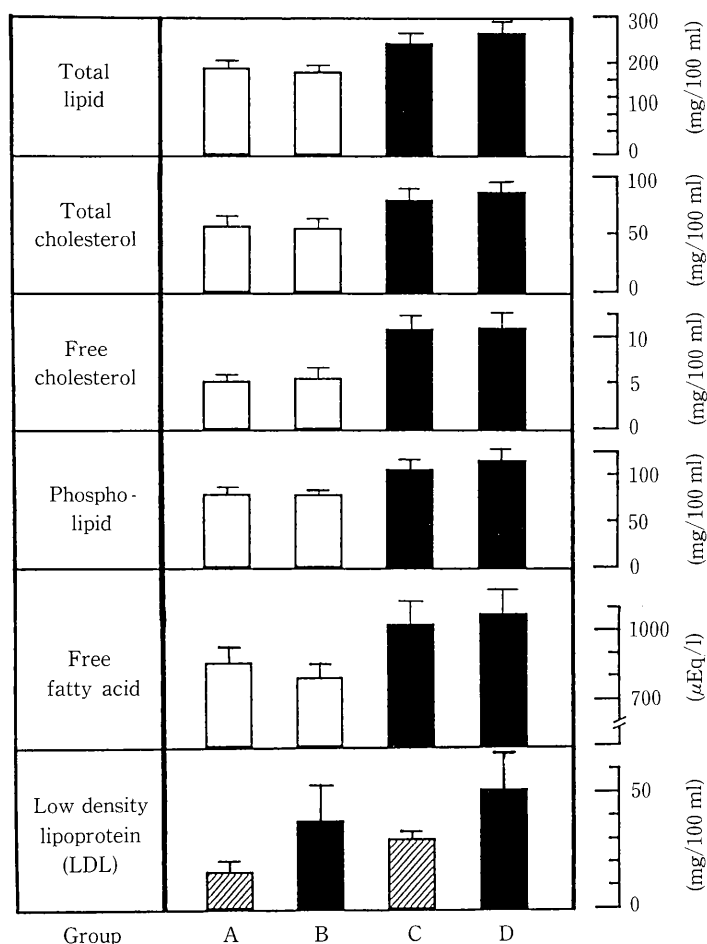


Fig. 3. Plasma lipids of 16-weeks-old SHR in four groups.

Ms*: microsome. Bars represent means $\pm$ S. E. M. (n: the same as table 1)

文 献

- 1) Bartsch, H. and Montesano, R. (1984): Relevance of nitrosoamines to human cancer. *Carcinogenesis*, **5**, 1381-1393.
- 2) Forman, D., Al-Dabbagh, S. and Doll, R. (1985): Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature*, **313**, 620-625.
- 3) Hecht, S. S. (1985): Chemical carcinogenesis: an overview. *Clin. Physiol. Biochem.*, **3**, 89-97.
- 4) 根岸友恵, 早津彦哉 (1987): 発癌物質の摂取と排泄. 代謝, **24**, 17-27.
- 5) Alderson, T. (1985): Formaldehyde-induced mutagenesis: a novel mechanism for its action. *Mutation Res.*, **154**, 101-110.
- 6) Montesano, R. and Bartsch, H. (1976): Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards. *Mutation Res.*, **32**, 179-228.
- 7) 賀来正俊, 堀 清記 (1987): 消化管のチトクローム P-450, 代謝的生体防御および消化管と他臓器間機能調節. 最新医学, **42**, 2431-2450.
- 8) Kaku, M. and Suzuki, H. (1988): Arachidonic acid dependent and independent monooxygenase pathways of dimethylnitrosamine demethylation in the microsomes of rabbit stomach mucosa. in "Xenobiotic Metabolism and Disposition", 2nd International ISSX Meeting (abstract). p. 67.
- 9) Kaku, M., Ichihara, K., Kusunose, E., Ogita, K., Yamamoto, S., Yano, I. and Kusunose, M. (1984): Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for prostaglandin and fatty acid hydroxylase activities from the

- microsomes of rabbit small intestinal mucosa. *J. Biochem.*, **96**, 1883-1891.
- 10) Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2385.
 - 11) Taniguchi, H., Imai, Y., Iyanagi, T. and Sato, R. (1979): Interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **550**, 341-356.
 - 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 - 13) Yang, C. S., Tu, Y. Y., Koop, D. R. and Coon, M. J. (1985): Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.*, **45**, 1140-1145.
 - 14) Selim, S. (1977): Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **136**, 271-277.
 - 15) Astrom, A. and DePierre, W. (1986): Rat-liver microsomal cytochrome P-450: purification, characterization, multiplicity and induction. *Biochim. Biophys. Acta*, **853**, 1-27.
 - 16) Guengerich, F. P. (1987): Enzymology of rat liver cytochromes P-450. in "Mammalian Cytochromes P-450", ed. by Guengerich, F. P. CRC Press, Inc. Florida, U.S.A. Vol. 1, pp. 1-54.
 - 17) Birt, D. F., and Schuldt, G. H. (1982): Dietary amino acids and hepatic microsomal drug metabolism in syrian hamsters. *Drug-Nutr. Interact.*, **1**, 177-187.
 - 18) Edes, T. E., Clinton, S. K., Truex, C. R. and Visek, W. J. (1979): Intestinal and hepatic mixed function oxidase activity in rats fed methionine and cysteine-free diets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **162**, 71-74.
 - 19) Antal, M., Nagy, K. and Bedo, M. B. (1982): Effect of dietary protein and lipid on the activity of hepatic mixed-function oxidase system in young and adult rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **26**, 393-399.
 - 20) Teschke, R., Moreno, F. and Petrides, A. S. (1981): Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): Respective roles of ethanol and carbohydrates for the enhanced activity after chronic alcohol consumption. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1745-1751.
 - 21) Bissell, D. M. and Hammaker, L. E. (1976): Cytochrome P-450 heme and the regulation of hepatic heme oxygenase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 91-102.
 - 22) Pascoe, G. A. and Correia, M. A. (1985): Structural and functional assembly of rat intestinal cytochrome P-450 isozymes. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 599-608.
 - 23) 賀来正俊, 堀 清記 (1988): 消化管のエイコサノイドカスケード. 日生誌, **50**, 149-162.
 - 24) Kusunose, E., Kaku, M., Yamamoto, S., Ichihara, K. and Kusunose, M. (1985): Separation and characterization of cytochrome P-450 from rabbit colon microsomes. in "Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Induction". ed. by Veczkey, L. and Magyar, K., Academiai Kiado, Budapest., pp. 501-504.
 - 25) Kusunose, M., Kusunose, E., Ichihara, K., Ogita, K., Kaku, M. and Yamamoto, S. (1985): Cytochrome P-450-linked prostaglandin ω -hydroxylase. Adv. Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res. vol. 15, pp. 155-158.
 - 26) Kusunose, M., Sogawa, K., Yamamoto, S., Matsubara, S., Yokotani, N., Kusunose, E. and Fujii-Kuriyama, Y. (1987): Fatty acid and prostaglandin ω -hydroxylase cytochrome-P-450. in "Cytochrome P-450: New Trends", ed. by Sato, R. Omura, T., Imai, Y. and Fujii-Kuriyama, Y., Yamada Science Foundation, Japan. p. 81-86.
 - 27) Ichihara, K., Ishihara, K., Kaku, M., Ogita, K., Yamamoto, S. and Kusunose, M. (1983): Separation of two forms of cytochrome P-450 with aryl hydrocarbon hydroxylase activity from intestinal mucosa microsomes of rabbits treated with 3-methylcholanthrene. *Biochem. Int.*, **7**, 179-186.
 - 28) Ichihara, K., Kusunose, E., Kaku, M., Yamamoto, S. and Kusunose, M. (1985): Separation of two constitutive forms of cytochrome

- P-450 active in aminopyrine N-demethylation from rabbit intestinal mucosa microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **831**, 99-105.
- 29) Kaku, M., Kusunose, E., Yamamoto, S., Ichihara, K. and Kusunose, M. (1985) : Multiple forms of cytochrome P-450 in rabbit colon microsomes. *J. Biochem.*, **97**, 663-670.