

血清リポたん白質代謝における分離大豆たん白質の栄養特性

NUTRITIONAL SPECIFICITY OF SOY PROTEIN ISOLATE FOR SERUM LIPOPROTEIN METABOLISM IN RATS

小田裕昭・丹羽真一・吉田 昭 (名古屋大学農学部)

Hiroaki ODA, Shin-ichi NIWA and Akira YOSHIDA
School of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464-01

ABSTRACT

We previously demonstrated that soy protein has a hypocholesterolemic effect in rats as compared with either casein or rice protein although fecal excretion of steroids was stimulated by soy protein and rice protein. We also reported that the hypocholesterolemic effect of soy protein appeared after one day of feeding soy protein, and secretion rate of very low density lipoprotein (VLDL) was concomitantly repressed by soy protein. These results suggest the importance of alterations in the secretion of lipoproteins and in the synthesis of apolipoproteins. In this paper, distribution of lipids and apolipoproteins among lipoproteins was investigated in detail. Serum level of cholesterol in rats fed soy protein was lower than that in rats fed casein or rice protein after one day feeding of the experimental diets and kept the lower value on day 7. High density lipoprotein (HDL) cholesterol contributed to the lowered level of cholesterol due to soy protein. However, on day 1 serum level of apolipoprotein A-I (apo A-I) which is a major apolipoprotein in HDL was not significantly lower in rats fed soy protein as compared with casein or rice protein groups and was reduced by soy protein on day 7. From the results of ultracentrifugation separation of serum lipoproteins, soy protein suppressed the level of apo E-rich lipoproteins, HDL₁ and VLDL, at early period of feeding soy protein and subsequently soy protein reduced the level of apo A-I rich lipoprotein, HDL₂. Since hepatic level of apo A-I mRNA was lower in rats fed soy protein as compared with casein or rice protein on day 1, this reduction of apo A-I mRNA might be responsible for the suppression of the serum level of HDL cholesterol due to soy protein on day 7. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 11, 67-73, 1990.

大豆たん白質の血清コレステロール濃度低下作用に関しては、これまで多くの場合カゼインとの比較で研究されてきた。また、植物性たん白質は一般に動物性たん白質に較べて血清コレステロール濃度を低下させると考えられていた¹⁻³⁾。著者らはさきに、カゼイン、大豆たん白質、米たん白質の3者についてラットを用いた実験を行い、米たん白質摂取ラットでは大豆たん白質の場合と異なり、血清コレステロール濃度は低下

せず、カゼイン食の場合とほぼ同程度の値であることを示した^{4,5)}。しかし糞中への胆汁酸の排泄は大豆たん白質食でも、米たん白質食でも同様にカゼイン食の場合より高く、大豆たん白質食による血清コレステロール濃度の低下が単に胆汁酸やコレステロールの吸収阻害による作用だけでないことが示唆された⁴⁾。また、大豆たん白質による血清コレステロール濃度の低下は摂食期間24時間で起こり、このときVLDLの放出が減少

していることを報告した⁴⁾。これまで大豆たん白質による血清コレステロール濃度の低下がどのリポたん白質画分で起こっているか何度か調べられているが、主に HDL コレステロールが減少しているという報告^{1,6)}、VLDL+LDL コレステロールが減少しているという報告⁷⁾など結果は必ずしも一致していない。そこで今回は、血清リポたん白質を超速心法で分離した。ラットはヒトと異なり HDL が低密度に分布しているの⁸⁾、HDL を HDL₁ と HDL₂ に分けた⁹⁾。さらに大豆たん白質による血清コレステロール濃度低下作用の経日の変化を検討した。

実験方法

実験動物には100 g 前後の Wistar 系雄ラットを使用した。実験飼料は十分量のビタミン、ミネラルを含む15%たん白質で、たん白質源としてカゼイン、分離大豆たん白質（フジプロ-R, SPI）、濃縮米たん白質（RPC）を用いた。

カゼイン食を10日間与えた後、24時間実験食を与えた実験と、7日間実験食を与えた実験を行い、屠殺後以下の測定を行った。

血清リポたん白質は Hatch と Lees の方法に従い VLDL (d < 1.006 g/ml), LDL (d 1.006–1.045 g/ml), HDL₁ (d 1.045–1.080 g/ml), HDL₂ (d 1.080–1.210 g/ml) に分離した¹⁰⁾。アポリポたん白質（アポ）は SDS-PAGE で分離し¹¹⁾、クマシーブリリアントブルー染色後、デンスitométer で測定したピーク面積の比とたん白質濃度の積をとりアポリポたん白質量とした。この方法は正確なアポリポたん白質量を表さないが、群間の比較には簡便である。

肝臓の RNA はグアニジンチオシアネート法により抽出した。RNA はホルムアルデヒド変性下でアガロースゲル電気泳動後、ニトロセルロースフィルターに

移した。プローブとして、ラット ApoA-I、マウス ApoE、ラットアルブミン（それぞれ J. I. Gordon 博士¹²⁾、田嶋正二博士¹³⁾、中村研三博士¹⁴⁾から供与されたものである。）の cDNA を用い ECL システムで検出した。

結果と考察

ラットの体重増加量はこの実験期間では、食餌たん白質による影響はなかった（Table 1）。肝臓重量はたん白質、米たん白質の1日摂取で有意に低下していた。この肝臓重量の低下は大豆たん白食で大きかった。糞の乾燥重量は、大豆たん白質、米たん白質の1日摂取で増加した。

血清をアガロースゲル電気泳動後コレステロール染色したものを Fig. 1 に示した。血清コレステロール濃度は大豆たん白質の1日摂取で有意に低下し、この低下はおもに HDL (α) 画分で起こっていた。大豆たん白質の7日摂取でも同様に HDL (α) の低下がみられた。このことは、ラットでは大豆たん白質の降コレステロール効果は主に HDL で起こることを示しており、兎でみられる LDL の低下とは大きく異なっている²⁾。さらに7日目ではむしろ LDL (β) コレステロールが大豆たん白質により増加する傾向がみられた。

血清アポリポたん白質 A-I と血清アルブミン濃度を Fig. 2 に示した。HDL を構成する主要アポたん白質であるアポ A-I は大豆たん白質食群で、1日目には僅かに低下していたが、7日目では大きく低下していた。このことは大豆たん白質による HDL の低下が1日目と7日目では異なった HDL で起こっていることを示しており、1日目ではアポ A-I に富んだ HDL の低下は大きくないことを示唆している。血清リポたん白質代謝と直接関係の薄いたん白質であり肝臓特異的に発現する血清アルブミンを測定したところ、予想

Table 1. Body weight gain, liver weight and fecal weight in rats fed diets containing 15% casein, soy protein or rice protein

	CAS	SPI	RPC
1 day feeding			
Body weight gain, g/day	5.9 ± 0.5	6.1 ± 0.4	5.0 ± 0.5
Liver weight, g/100 g BW	4.41 ± 0.06 ^c	3.84 ± 0.06 ^a	4.14 ± 0.05 ^b
Fecal weight, g/day	0.36 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.02 ^b	0.60 ± 0.02 ^c
7 day feeding			
Body weight gain, g/7 days	29.5 ± 1.9	31.7 ± 1.4	31.8 ± 2.8
Liver weight, g/100 g BW	4.43 ± 0.04 ^c	3.63 ± 0.06 ^a	4.10 ± 0.06 ^b

Values are means ± SEM. Values with different alphabetical superscripts within a line are significantly different (p < 0.05). CAS: casein, SPI: soy protein isolate, RPC: rice protein concentrate.

外にも大豆たん白質食群・米たん白質食群で有意に減少していた。この原因は今のところ不明であるが、大豆たん白質による肝臓重量の低下と関係があるのではないかと思われる。

次にリポたん白質を超速心法で分離しその脂質組成、アポリポたん白質組成を測定した (Fig. 3)。大豆たん白質の1日摂取によりリポたん白質全体が低下しているが、コレステロールでみると VLDL 及び HDL₁ における低下が有意であった (Fig. 3A)。大豆たん白質の7日間摂取ではコレステロールは VLDL, HDL₁, HDL₂ で有意な低下がみられた (Fig. 3B)。アポリポたん白質全体の変化でみてみると (Fig. 4), 1日目, 7

日目ともに各アポリポたん白質は大豆たん白質で減少しているが, 1日目ではアポ A-I V, アポ E が顕著に減少しており, 7日目ではアポ A-I V, アポ A-I の減少が大きかった。これらの結果は, 大豆たん白質によって減少するリポたん白質はおもに HDL であるが, 摂取1日目という初期においては, アポ E に富んだりポたん白質である HDL₁ が減少し, 続いてアポ A-I に富んだ HDL₂ が減少することを示している。LDL コレステロールは7日間の大豆たん白質摂取でむしろ増加傾向にあり (Fig. 3B), LDL 中のアポ B 濃度は有意に増加していた。この結果は兎で起こる結果と全く異なるものである。兎ではカゼインにより LDL レセ

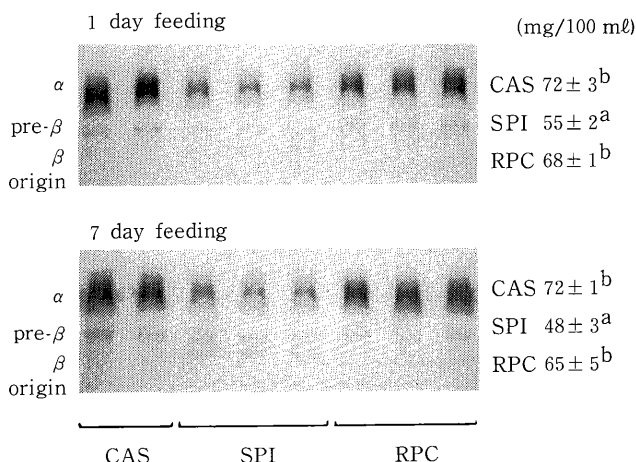


Fig. 1. Serum cholesterol in rats fed diets containing 15% casein, soy protein or rice protein. Left: agarose gel electrophoresis of lipoproteins. Right: serum levels of cholesterol (mg/100 ml). CAS: casein, SPI: soy protein isolate, RPC: rice protein concentrate.

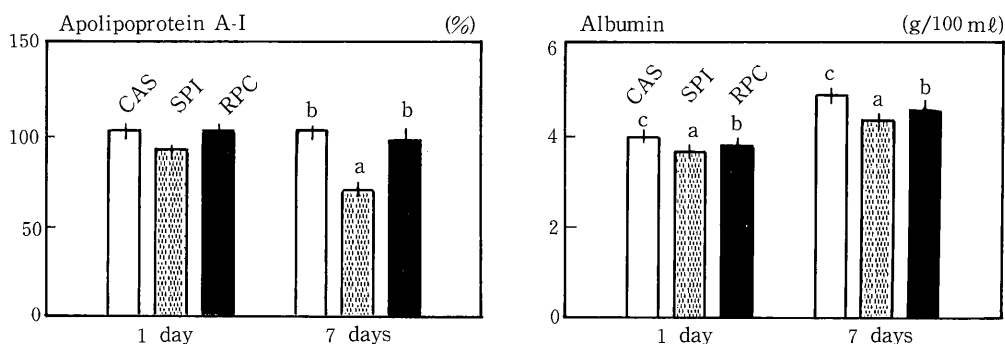


Fig. 2. Serum levels of apolipoprotein A-I (left) and albumin (right) in rats fed diets containing 15% casein, soy protein or rice protein. Values of apolipoprotein A-I were expressed as percent of value of casein group. CAS: casein, SPI: soy protein isolate, RPC: rice protein concentrate.

プター活性の抑制が起こり^{15,16)}, コレスチラミンにより LDL レセプターの活性上昇が報告されているが^{17,18)}, ラットでは今回示したようにカゼインで LDL の上昇はみられず, コレスチラミンによる LDL レセプター活性の上昇もみられない¹⁹⁾。これらのことは以下

下の2つのことを示唆している。まず第一は、ラットと兎では大豆たん白質の血清コレステロール濃度低下作用の機序は必ずしも同じではなく、大豆たん白質のコレステロール代謝に影響を与える作用点は1つではなく複数あると考えられる。第二は、大豆たん白質の

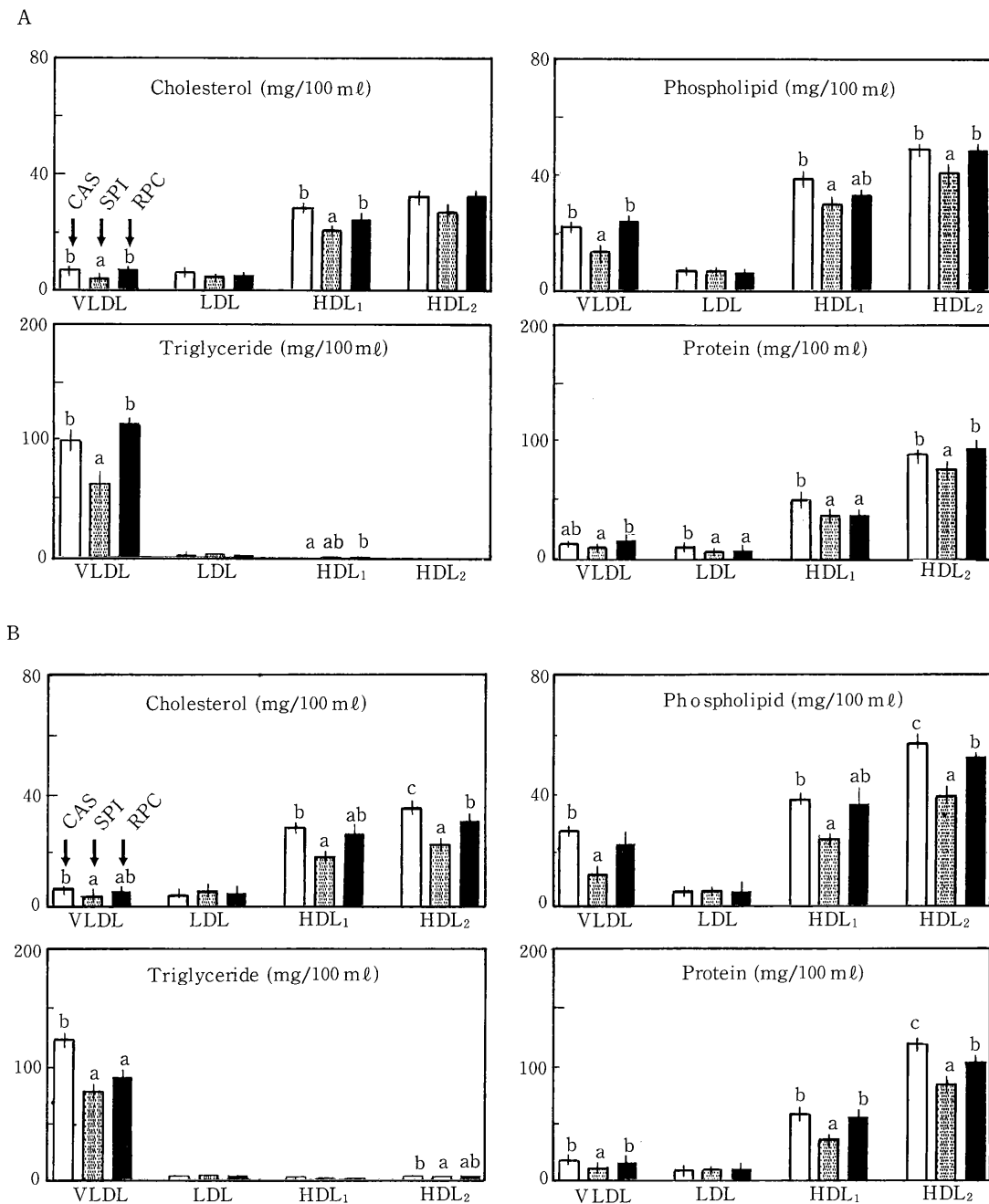


Fig. 3. Serum lipoproteins, lipids and protein in rats fed diets containing 15% casein, soy protein isolate or rice protein concentrate for 1 day (A) or 7 days (B). CAS : casein, SPI : soy protein isolate, RPC : rice protein concentrate.

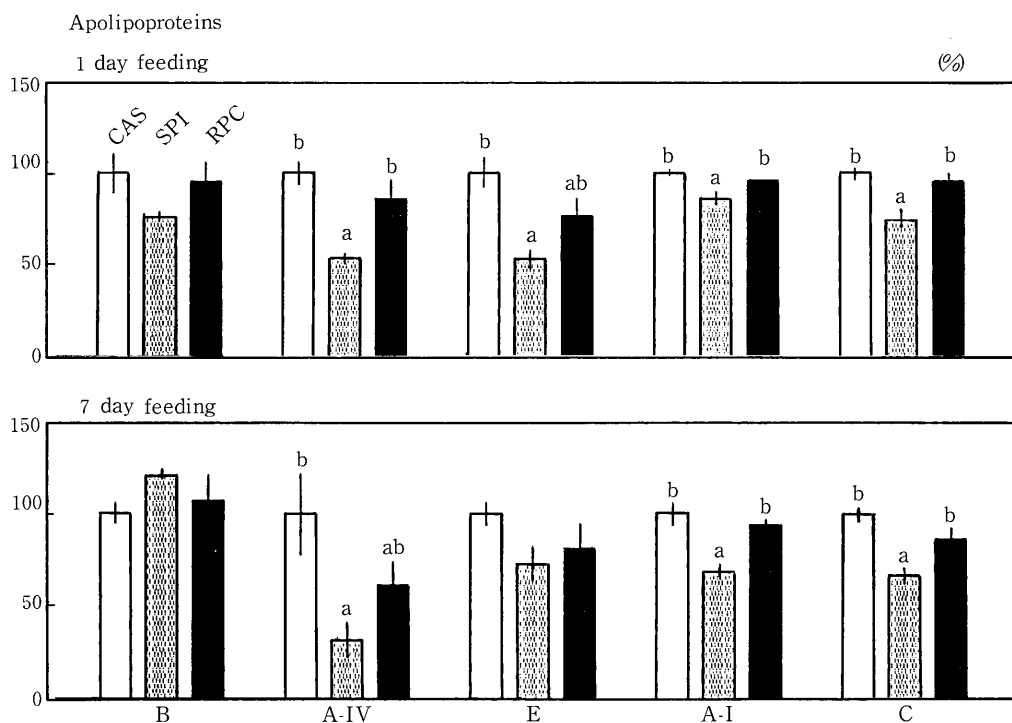


Fig. 4. Serum levels of apolipoproteins in rats fed 15% casein, soy protein or rice protein. Values were expressed as percent of value of casein group. CAS: casein, SPI: soy protein isolate, RPC: rice protein concentrate.

持つ胆汁酸排泄促進作用だけではラットにおける血清コレステロール濃度の低下を説明できず、アポリポタン白質の合成、分泌、分解の変化によって血清コレステロール濃度が低下するものと考えられる。初期に起こる VLDL の低下は、以前報告したように新生 VLDL の放出速度の低下が一つの原因と考えられる⁵⁾。また初期においてはアポ E に富んだりポタン白質である VLDL, HDL₁ がともに減少していることから、大豆たん白質摂取ラットでは血液中から組織へのアポ E の取り込みが増加していると考えられる²⁰⁾。

7 日目で行っているアポ A-I に富んだ HDL₂ の低下は、肝臓²¹⁾及び小腸²²⁾からのアポ A-I の放出、合成速度の低下によるものと考えられる。そこで肝臓のアポ A-I mRNA の量を調べた (Fig. 5)。血清アポ A-I 濃度がまだ減少していない 1 日目ですでに肝臓のアポ A-I mRNA 量は大豆たん白質摂取ラットで低下しており、7 日目でも同様に大豆たん白質食群でアポ A-I mRNA は減少していた。この結果は、大豆たん白質摂取によりアポ A-I mRNA が減少し、その結果としてアポ A-I を含んだ HDL の放出が減少し、血清 HDL 濃度が低下したことを示唆している。ヒ

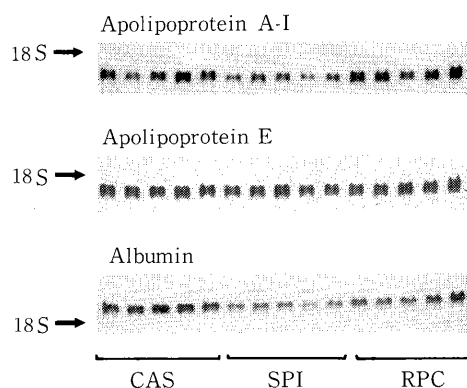


Fig. 5. RNA blotting analysis. mRNA of apolipoprotein A-I, apolipoprotein E and serum albumin was detected with ECL system (Amersham). 18S RNA was indicated.

ト²³⁾や兎²⁾では大豆たん白質による血清コレステロール濃度の低下は主に LDL で起こり、ラットにおける HDL の低下の生理的意義は現在のところ不明であるが、ラットはアポ A-I の発現が比較的高くコレステロールエステル転送たん白質の活性が殆んどないこと

などから HDL 代謝を研究する良い実験動物であると思われる。血清アルブミンの mRNA も大豆たん白質群で低下していた。アポ E mRNA は米たん白質群でカゼインに比べ増加していた。

つぎに、日本人にとって重要なたん白質源である米たん白質、大豆たん白質を混合し、このときの血清コレステロール濃度に与える影響を検討した。たん白質含量を15%とし、米たん白質と大豆たん白質の比を100:0, 75:25, 50:50, 0:100とした食餌を2週間与えた。これまで示したように米たん白質で大豆たん白質より血清コレステロール濃度が高いものの米たん白質を25%大豆たん白質で置き換えることにより有意に血清コレステロール濃度を低下させ、大豆たん白質単独の時とほぼ同程度の血清コレステロール濃度になった。さらにこの血清コレステロール濃度の変化は、主に HDL (α) コレステロールの変化であった (Fig. 6)。

文 献

- 1) Nagata, Y., Ishiwaki, N. and Sugano, M. (1982): Studies on the mechanism of anti-hypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixture in relation to casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625.
- 2) Terpstra, A. H. M., Hermus, R. J. J. and West, C. E. (1983): Dietary protein and cholesterol metabolism in rabbits and rats, in *Animal and Vegetable Protein in Lipid Metabolism and Atherosclerosis*, ed. by Kritchevsky, D. and Gibney, M. J., Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 19-49.
- 3) Sugano, M. (1983): Hypocholesterolemic effect of plant protein in relation to animal protein: Mechanism of action, in *Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis*, ed. by Kritchevsky, D. and Gibney, M. J., Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 41-84.
- 4) 吉田 昭, 奥村佳史 (1985): コレステロール代謝における分離大豆たん白質の栄養特性. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **6**, 63-67.
- 5) 吉田 昭, 小田裕昭, 福井英夫 (1989): コレステロール代謝における分離大豆たん白質の栄養特性. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **10**, 63-66.
- 6) Beynen, A. C., Terpstra, A. H. M., West, C. E.

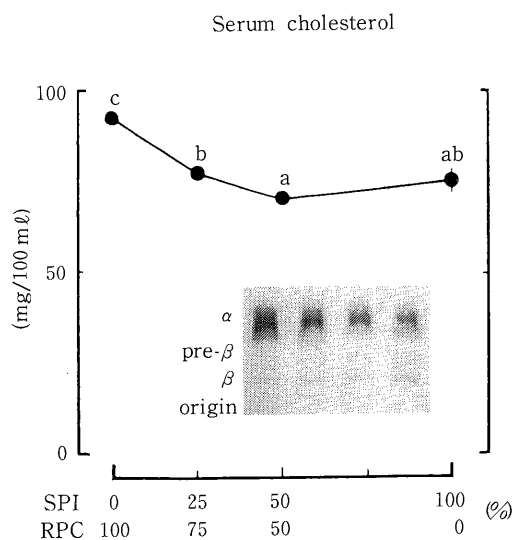


Fig. 6. Serum level of cholesterol in rats fed diets containing soy protein and rice protein. Lipoprotein cholesterol was stained enzymatically (inset). Fifteen percent of protein was included in the diets. SPI: soy protein isolate, RPC: rice protein concentrate.

- and Tintelen, G. V. (1983): The concentration of serum cholesterol in rats fed cholesterol-free low-fat semipurified diets containing either casein or soybean protein. *Nutr. Rep. Int.*, **28**, 363-374.
- 7) Lefevre, M. and Schneeman, B. O. (1984): High density lipoprotein composition in rats fed casein or soy protein isolate. *J. Nutr.*, **114**, 768-777.
- 8) Lasser, N. L., Roheim, P. S., Edelstein, D. and Eder, H. A. (1973): Serum lipoproteins of normal and cholesterol-fed rats. *J. Lipid Res.*, **14**, 1-8.
- 9) Lusk, L. T., Walker, L. F., DuBien, L. H. and Getz, G. S. (1979): Isolation and partial characterization of high-density lipoprotein HDL₁ from rat plasma by gradient centrifugation. *Biochem. J.*, **183**, 83-90.
- 10) Hitch, F. T. and Lees, R. S. (1968): Practical method for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.*, **6**, 1-68.
- 11) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- 12) Boguski, M. S., Elshoubagy, N., Taylor, J. M. and Gordon, J. I. (1985) : Comparative analysis of repeated sequences in rat apolipoproteins A- I, A-IV, and E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 992-996.
 - 13) Horiuchi, K., Tajima, S., Menju, M. and Yamamoto, A. (1989) : Structure and expression of mouse apolipoprotein E gene. *J. Biochem.*, **106**, 98-103.
 - 14) Iwatsuki, N., Hattori, T., Iwasaki, Y., Nakano, M. and Nakamura, K. (1987) : A complete rat serum albumin cDNA clone directly identified by immunological screening of cDNA expression library. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 379-384.
 - 15) Khosla, P., Samman, S., Carroll, K. K. and Huff, M. W. (1989) : Turnover of ¹²⁵I-VLDL and ¹³¹I-LDL apolipoprotein B in rabbits fed diets containing casein or soy protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1002**, 157-163.
 - 16) Samman, S., Khosla, P. and Carroll, K. K. (1989) : Effects of dietary casein and soy protein on metabolism of radiolabelled low density apolipoprotein B in rabbits. *Lipids*, **24**, 169-172.
 - 17) Chao, Y. S., Yamin, T. T. and Alberts, A. W. (1982) : Effects of cholestyramine on low density lipoprotein binding sites on liver membranes from rabbits with endogenous hypercholesterolemia induced by a wheat starch-casein diet. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3623-3627.
 - 18) Chao, Y. S., Yamin, T. T. and Alberts, A. W. (1982) : Catabolism of low density lipoproteins by perfused rabbit liver : cholestyramine promotes receptor-dependent hepatic catabolism of low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3983-3986.
 - 19) Spady, D. K., Turley, S. D. and Dietschy, J. M. (1985) : Rates of low density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver. *J. Lipid Res.*, **26**, 465-472.
 - 20) Sirtori, C. R., Galli, G., Lovati, M. S., Carrara, P., Bosisio, E. and Kienle, M. G. (1984) : Effect of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. *J. Nutr.*, **114**, 1493-1500.
 - 21) Sugano, M., Tanaka, K. and Ide, T. (1982) : Secretion of cholesterol, triglyceride and apolipoprotein A- I by isolated perfused liver from rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixture. *J. Nutr.*, **112**, 855-862.
 - 22) Tanaka, K., Imaizumi, K. and Sugano, M. (1983) : Effects of dietary proteins on the intestinal synthesis and transport of cholesterol and apolipoprotein A- I in rats. *J. Nutr.*, **113**, 1388-1394.
 - 23) Verrillo, A., Patrizia, A., Giarrusso, P. C. and Rocca, S. L. (1985) : Soybean protein diets in the management of type II hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, **54**, 321-331.