

分離大豆たん白質の血漿コレステロール低下作用とリン脂質合成との関係

RELATIONSHIP BETWEEN PLASMA CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF SOYBEAN PROTEIN ISOLATE AND PHOSPHOLIPID BIOSYNTHESIS IN RATS

杉山公男・佐伯 茂・金森啓至（静岡大学農学部）
村松敬一郎（名古屋女子大学家政学部）

Kimio SUGIYAMA¹, Shigeru SAEKI¹, Hironori KANAMORI¹ and Keiichiro MURAMATSU²

¹Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422,

²Faculty of Home Economics, Nagoya Women's University, Nagoya 467

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate the relationship between plasma cholesterol levels and phospholipid composition of liver microsomes in rats. The addition of 0.4% choline and/or 0.8% methionine to the choline-free diets containing casein or soybean protein isolate (SPI) increased plasma cholesterol levels, and there existed a significant positive correlation between the plasma cholesterol levels and the ratio of phosphatidylcholine (PC) to phosphatidylethanolamine (PE) of the liver. When diet was changed from SPI diet to casein diet, both plasma cholesterol levels and liver PC/PE ratio increased rapidly and reached plateau on day 2 and day 1, respectively. The significant correlation between the plasma cholesterol level and PC/PE ratio was also found in rats fed cholesterol-free diets containing either casein, SPI, lactalbumin or wheat gluten, but not in rats fed those diets with cholesterol. These findings suggest a possibility that the alteration of the liver PC/PE ratio might be one of the causes for the hypocholesterolemic efficacy of SPI observed in rats fed a cholesterol-free diet. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 12, 56-62, 1991.

血漿コレステロール (CHOL) 濃度に及ぼす食餌たん白質の影響の機構に関してはいくつかの考え方が提示されている^{1,2)}。私共は食餌たん白質の効果をそのアミノ酸組成の面から検討し、CHOL 添加食を用いた場合にはたん白質の Cys 含量が³⁾、また CHOL 無添加食を用いた場合には Met 含量が⁴⁾血漿 CHOL 濃度と高い相関を示すことを認めた。たん白質中のこれらアミノ酸がどのような機構により血漿 CHOL 濃度に影響を及ぼしているかについては不明な点が多い。肝臓におけるリン脂質、特にホスファチジルコリン (PC) の

合成は食餌中のコリンや Met の影響を受け、血漿 CHOL 濃度にも反映される⁵⁾。CHOL 無添加食の場合、大豆たん白質投与ラットではカゼイン投与ラットに比べて肝臓ミクロソームの PC の割合や PC と PE (ホスファチジルエタノールアミン) の比が有意に低く、このことが大豆たん白質の血漿 CHOL 低下作用と関係している可能性が示唆された⁴⁾。本研究では、血漿 CHOL 濃度に及ぼす食餌たん白質の影響と肝臓ミクロソームのリン脂質組成との関係を明確にするためにいくつかの実験を行った。

実験方法

体重100～120 g の Wistar 系雄ラットを用い、実験食を自由摂取させた。基本食の組成を Table 1 に示す。一部の実験ではこれから塩化コリンを除いたり、Met を添加したりした。また、1% CHOL と 0.25% コール酸ナトリウムおよび 10% ラードを添加した高 CHOL 食も用いた。カゼインは半井化学、分離大豆たん白質 (SPI) は不二製油のフジプロ R、ラクトアルブミンは東京化成、小麦グルテンは新進工業のものをを用いた。小麦グルテンを用いた場合には 0.7% のリジン塩酸塩を補足した。また、一部の実験では 80% エタノールで洗浄した SPI を用いた。ラットは CHOL 無添加食の場合には絶食させずに、CHOL 添加食を用いた場合には 11～12 時間の絶食後、午前 11 時から 12 時の時間帯に解剖した。血漿の各脂質は酵素法によるキットを用いて測定した。糞中ステロイドは抽出後、胆汁酸については酵素法で、CHOL は Zak の方法⁶⁾で測定した。肝

Table 1. Composition of basal diet

Ingredient	g/100 g diet
Protein	25
α -Corn starch	43.8
Sucrose	20
Corn oil	5
Mineral mixture*	5
Vitamin mixture*	1
Choline chloride	0.2

*A. E. Harper (1959)

臓の一部はホモジナイズし、常法により粗ミクロソーム画分を調製した。ミクロソームの全脂質を抽出後、TLC で各リン脂質を分離し、Bartlett 法で無機リンを測定した。

結 果

実験 1

食餌中のコリンと Met 含量を変え、血漿 CHOL 濃度と肝臓ミクロソームのリン脂質組成に及ぼす影響をカゼイン食と SPI 食を用いて検討した。Table 2 にラットの成長や肝臓脂質含量を示す。コリン欠により SPI 食では成長抑制が見られ、一方、0.8% Met 添加によりカゼイン食では成長抑制が見られた。コリン欠による顕著な脂肪肝は、SPI 食でのみ見られた。Table 3 に血漿脂質、糞中へのステロイド排泄および肝臓リン脂質組成を示す。コリン欠食へのコリンおよび Met の添加により血漿 CHOL 濃度は、カゼイン食、SPI 食とも上昇した。糞中への CHOL および胆汁酸の排泄量はコリンと Met の添加に拘らず SPI 食ではカゼイン食の 2 倍近くの値を示した。肝臓ミクロソームのリン脂質組成は、PC と PE が大きく変化し、食餌中のコリンと Met 含量を高めると PC/PE 比は上昇したが、血漿 CHOL 濃度と同様に SPI 食での上昇の程度はカゼイン食比べて小さかった。Fig. 1 に示すように血漿 CHOL 濃度と PC/PE との間の相関 ($r=0.97$, $p<0.001$) は、血漿 CHOL 濃度と糞中ステロイド排泄の間の相関 ($r=-0.76$, $p<0.05$ および $r=-0.74$, $p<0.05$) よりも高かった。

実験 2

血漿 CHOL 濃度と肝臓のリン脂質組成との関係を、

Table 2. Effects of dietary choline and methionine on growth, food intake, liver weight and liver lipid content in rats fed on casein and SPI diets

Diet	Body wt gain <i>g/15 d</i>	Food intake <i>g/15 d</i>	Liver wt <i>g/100 g BW</i>	Liver lipids		
				CHOL <i>mg/g</i>	TG <i>mg/g</i>	PL <i>mg/g</i>
25C (Choline-free)	84±2 ^a	202±3 ^b	5.05±0.05 ^b	5.0±0.1 ^b	47.1±2.4 ^b	20.9±0.2 ^{cd}
+0.4% Cho•Cl	81±2 ^a	199±3 ^b	4.76±0.08 ^c	3.9±0.1 ^c	16.4±0.4 ^c	21.9±0.3 ^c
+0.8% Met	71±1 ^b	185±2 ^c	4.83±0.05 ^c	4.9±0.2 ^b	44.3±3.3 ^b	20.6±0.3 ^d
+0.4% Cho•Cl+0.8% Met	62±2 ^c	180±6 ^c	4.82±0.10 ^c	4.8±0.2 ^b	39.5±4.6 ^b	20.7±0.3 ^d
25S (Choline-free)	65±1 ^{bc}	203±3 ^b	7.48±0.10 ^a	17.2±0.3 ^a	350.4±11.0 ^a	15.2±0.3 ^e
+0.4% Cho•Cl	85±3 ^a	221±4 ^a	4.00±0.05 ^e	3.7±0.0 ^c	10.4±0.4 ^c	25.7±0.6 ^a
+0.8% Met	83±2 ^a	191±3 ^{bc}	4.21±0.07 ^d	3.7±0.1 ^c	13.1±0.4 ^c	24.3±0.4 ^b
+0.4% Cho•Cl+0.8% Met	85±3 ^a	193±6 ^{bc}	4.36±0.06 ^d	3.7±0.1 ^c	11.8±0.2 ^c	24.1±0.3 ^b

Values are mean±SE for 7 rats; values in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at $p<0.05$. 25G, 25% casein; 25S, 25% SPI; Cho•Cl, choline chloride; CHOL, cholesterol; TG, triglyceride; PL, phospholipid.

Table 3. Effects of dietary choline and methionine on plasma lipids, fecal steroid excretion and phospholipid composition of liver microsomes in rats fed on casein and SPI diets

Diet	Plasma lipids		Steroid excretion		PL composition of liver microsomes		
	CHOL	TG	CHOL	BA	PC	PE	PC/PE
	mg/100 mL	mg/100 mL	mg/3 d	mg/3 d	%	%	
25C (Choline-free)	70±1 ^{de}	211±14 ^a	12.3±1.1 ^d	6.7±0.4 ^c	58.7±0.5 ^e	24.3±0.5 ^b	2.43±0.07 ^e
+0.4% Cho•Cl	88±2 ^c	192±18 ^a	13.0±0.8 ^d	6.4±0.4 ^c	65.7±0.2 ^c	17.1±0.2 ^e	3.86±0.04 ^c
+0.8% Met	110±3 ^b	141±17 ^b	10.9±0.4 ^d	6.5±0.1 ^c	66.2±0.5 ^c	14.6±0.4 ^f	4.58±0.14 ^b
+0.4% Cho•Cl+0.8% Met	137±6 ^a	104±9 ^b	10.7±0.8 ^d	5.6±0.3 ^c	73.3±0.6 ^a	11.4±0.5 ^f	6.52±0.32 ^a
25S (Choline-free)	32±1 ^f	29±2 ^c	20.6±0.9 ^{ab}	10.9±0.9 ^{ab}	45.7±0.5 ^f	35.0±0.3 ^a	1.31±0.02 ^f
+0.4% Cho•Cl	65±4 ^e	132±12 ^b	23.0±1.3 ^a	9.1±0.8 ^b	62.2±0.4 ^d	22.3±0.5 ^e	2.79±0.06 ^{de}
+0.8% Met	71±3 ^{de}	145±11 ^b	17.6±0.6 ^c	11.7±1.1 ^a	62.2±0.5 ^d	20.4±0.6 ^d	3.08±0.11 ^d
+0.4% Cho•Cl+0.8% Met	78±3 ^d	114±18 ^b	18.6±0.8 ^{bc}	10.1±0.6 ^{ab}	67.5±0.1 ^b	16.3±0.2 ^e	4.14±0.04 ^c

Values are mean±SE for 7 rats. BA, bile acids.

両パラメータの経時変化の面から検討した。ラットに25% SPI 食を10日間与えたのち、一部は継続して25% SPI 食を与え、他は25%カゼイン食に切り換え日を追って解剖した。リン脂質組成、糞中ステロイド排泄ともに血漿 CHOL 濃度と有意な相関が見られたが、肝臓ミクロソームのリン脂質組成の変化は血漿 CHOL 濃度や糞中ステロイド排泄に比べてやや速やかであった。即ち、Fig. 2 に示すように、SPI 食からカゼイン食に切り換えると血漿 CHOL 濃度は1日目から有意に上昇したが、平衡レベルに到達したのは2日目以降であった。一方、肝臓の PC/PE 比は、カゼイン食に切り換えた1日目から顕著に上昇し、以後ほぼ平衡レベルで推移していた。Fig. 3 に示すように、糞中への CHOL および胆汁酸の排泄量はカゼインに切り換えた1日目から低下傾向が見られたが SPI 食に比べて有意ではなく、有意差が見られたのは2日目からであった。

実験 3

4 種の食餌たん白質を用い、血漿 CHOL 濃度と肝臓リン脂質組成との関係を食餌への CHOL 無添加と CHOL 添加の実験条件下で比較した。Table 4 に血漿脂質濃度を示す。CHOL 無添加の条件下では SPI 投

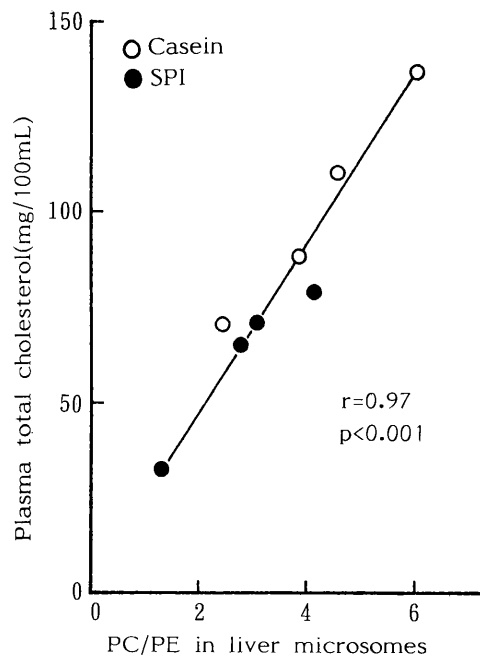


Fig. 1. Relationship between plasma total cholesterol level and PC/PE ratio of liver microsomes in rats.

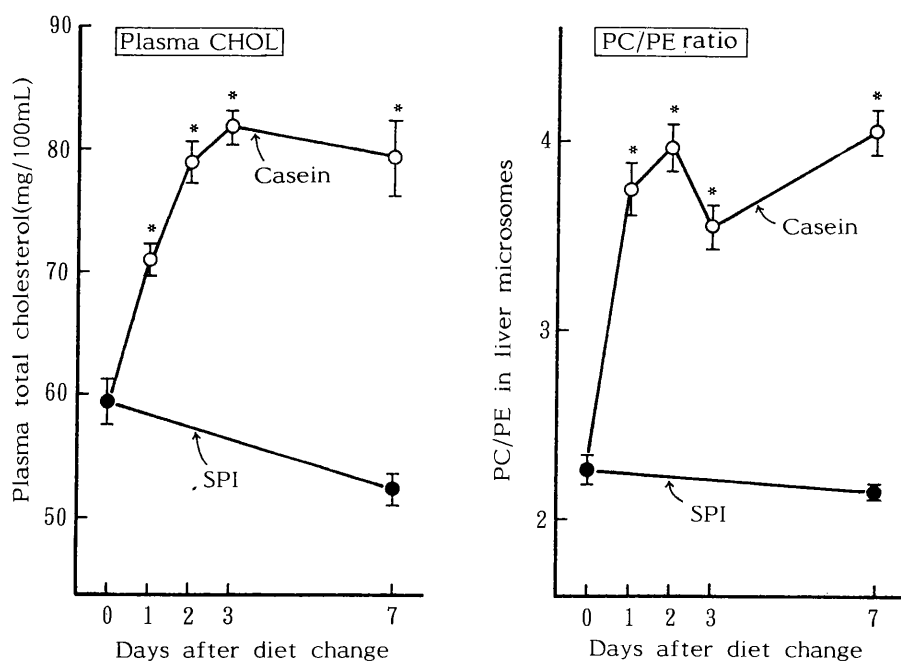


Fig. 2. Time-dependent alteration of plasma total cholesterol level and PC/PE ratio of liver microsomes after change of diet from 25% SPI diet to 25% casein diet in rats. * $p < 0.05$ from day 0.

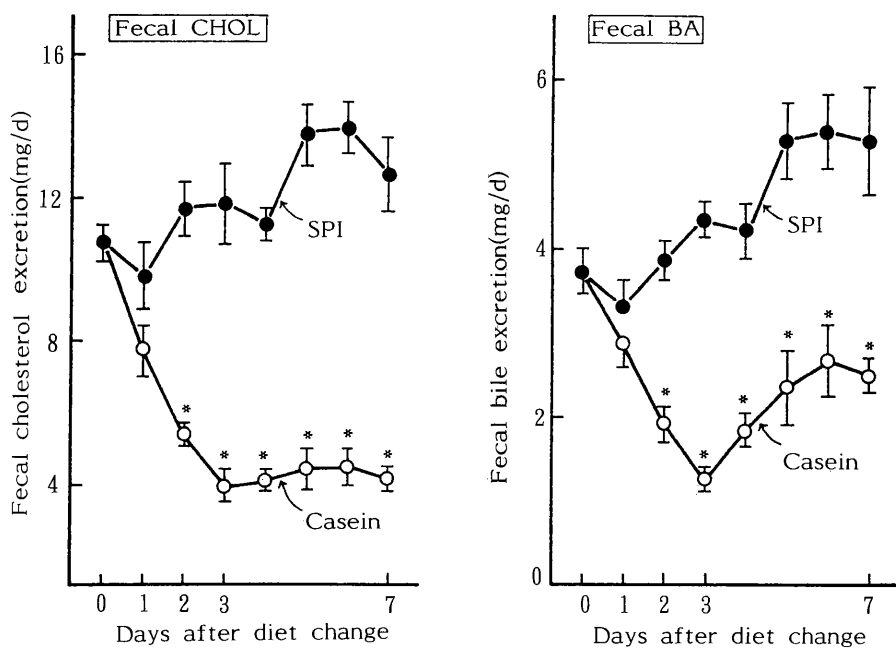


Fig. 3. Time-dependent alteration of fecal steroid excretion after change of diet from 25% SPI diet to 25% casein diet in rats. * $p < 0.05$ from SPI diet.

与で血漿 CHOL 濃度は最も低い値を示したが、CHOL 添加の条件下での SPI の効果はラクトアルブミンや小麦グルテンに比べてはるかに小さく、カゼインとの間に有意差は認められなかった。血漿 CHOL 濃度に及ぼす食餌たん白質の効果とたん白質のアミノ酸含量との関係を調べると、Fig. 4 に示すように、CHOL 無添加食の場合には Met 含量が、また CHOL 添加食の場合には Cys 含量が血漿 CHOL 濃度と最も高い相関

を示した。Table 5 に糞中ステロイド排泄と肝臓のリン脂質組成を示す。CHOL 無添加の場合、糞中への CHOL 排泄量と血漿 CHOL 濃度は比較的高い相関 ($r = -0.81$) を示したが有意ではなかった。CHOL 添加食の場合には、糞中ステロイド排泄と血漿 CHOL 濃度との関係は明確ではなかった。一方、肝臓ミクロソームのリン脂質組成と血漿 CHOL 濃度との間には CHOL 無添加の場合のみ有意な相関が見られた。

Table 4. Effect of dietary protein source on plasma lipid levels in rats fed on cholesterol-free and cholesterol-enriched diets

Diet	Plasma lipids				
	Total CHOL	HDL-CHOL	(VLDL+LDL)-CHOL	TG	PL
	mg/100 mL	mg/100 mL	mg/100 mL	mg/100 mL	mg/100 mL
I. CHOL-free diets					
25% Casein	92±2 ^a	57±2 ^a	34±3 ^a	247±27 ^a	210±5 ^a
25% Lactalbumin	68±2 ^b	44±1 ^b	25±1 ^b	259±20 ^a	190±7 ^b
25% W. gluten	63±3 ^b	40±2 ^b	23±2 ^b	250±20 ^a	183±6 ^b
25% SPI	57±1 ^c	40±1 ^b	16±1 ^c	148±10 ^b	155±3 ^c
II. CHOL-enriched diets					
25% Casein	213±12 ^a	23±1 ^b	190±12 ^a	157±8 ^a	158±4 ^a
25% Lactalbumin	121±6 ^b	38±2 ^a	83±7 ^b	110±6 ^b	138±2 ^b
25% W. gluten	114±9 ^b	25±1 ^b	89±9 ^b	81±6 ^c	120±2 ^c
25% SPI	187±10 ^a	14±1 ^c	173±15 ^a	77±5 ^c	123±3 ^c

Values are mean±SE for 7 to 9 rats.

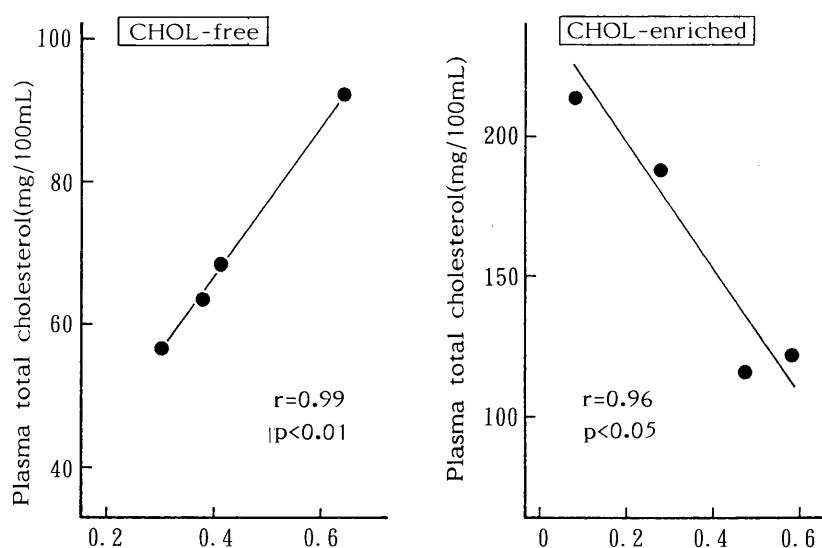


Fig. 4. Relationship between plasma total cholesterol level and methionine or cystine content of diets in rats fed on different dietary proteins.

Table 5. Effect of dietary protein source on fecal steroid excretion and phospholipid composition of liver microsomes in rats

Diet	Fecal steroid excretion		PL composition of liver microsomes		
	CHOL	BA	PC	PE	PC/PE
	<i>mg/3 days</i>		<i>%</i>	<i>%</i>	
I. CHOL-free diets					
25% Casein	16.2±1.6 ^c	7.5±0.3 ^b	65.9±0.5 ^a	17.4±0.7 ^b	3.82±0.15 ^a
25% Lactalbumin	22.3±1.8 ^b	15.8±1.5 ^a	56.6±0.6 ^b	25.4±0.2 ^a	2.23±0.02 ^b
25% W. gluten	24.8±3.1 ^b	9.5±0.6 ^b	56.2±0.9 ^b	24.5±0.4 ^a	2.30±0.06 ^b
25% SPI	42.4±1.4 ^a	8.6±0.7 ^b	54.9±0.9 ^b	25.9±0.6 ^a	2.13±0.06 ^b
vs Plasma CHOL	NS	NS	p<0.05	p<0.05	p<0.05
	<i>% of ingestion</i>				
II. CHOL-enriched diets					
25% Casein	47.6±1.2 ^b	114±5 ^{bc}	56.8±0.5 ^a	24.1±0.4 ^b	2.36±0.05 ^a
25% Lactalbumin	48.9±1.3 ^b	148±7 ^a	57.5±0.3 ^a	24.3±0.4 ^b	2.38±0.04 ^a
25% W. gluten	55.9±2.8 ^a	103±4 ^c	54.2±0.6 ^b	25.6±0.3 ^a	2.12±0.04 ^b
25% SPI	56.6±2.3 ^a	128±4 ^b	57.0±0.7 ^a	24.2±0.4 ^b	2.36±0.06 ^a
vs Plasma CHOL	NS	NS	NS	NS	NS

Values are mean±SE for 7 to 9 rats. NS, not significant.

CHOL 添加の場合には肝臓リン脂質組成の大きな変化は見られなかった。

考 察

SPI は糞中へのステロイド排泄作用が強く、SPI の血漿 CHOL 低下作用もこれに起因する可能性が指摘されてきた^{1,2,7)}。一方、CHOL 無添加食を用いた場合、たん白質の効果には Met 含量が関与している可能性が観察されており^{4,8)}、本研究でもこのことが確認された(実験3)。実験1で示されたように、肝臓ミクロソームのリン脂質組成は食餌中のコリンや Met 含量により大きく変化し、血漿 CHOL 濃度とも関連している。SPI 中の Met 含量はカゼインの1/2以下であり、SPI 食の投与により肝臓の PC の割合または PC/PE 比が低下する原因の1つには Met 摂取量の低下によると考えられる。SPI を投与したラットでは肝臓からの CHOL 分泌速度がカゼイン投与ラットに比べて小さいことが報告されている^{9,10)}。またコリン欠食を与えたラットから調製した肝細胞の培養メディウムにコリンや Met を添加すると肝細胞の PC 含量が増加するとともに、VLDL 分泌速度が高まることが観察されており¹¹⁾、肝臓における PC 合成がリポたん白質の合成・分泌を介して血漿 CHOL 濃度にも影響を及ぼしていることが示唆される。PC はコリンから CDP-コリン経路で合成されるが、PE のメチル化により生成される。CDP-コリン経路での PC 合成は PC により feedback 阻害を受けるのに対し、PE のメチル化反応

は基質の前駆体である Met の供給により制御されると考えられている¹²⁾。また、PE メチル化酵素は食餌条件の影響を受けにくく^{13,14)}、構成酵素の性格を有している¹⁵⁾。従って、食餌たん白質の Met 含量が PE のメチル化による PC 合成に影響を与え、ひいては血漿 CHOL 濃度に影響を及ぼすことは大いに考えられることである。

SPI の血漿 CHOL 低下作用に肝臓リン脂質組成の変化がどの程度寄与しているかは興味ある点であるが、本研究ではこの点を明らかにするには至らなかった。Kuyvenhoven ら¹⁶⁾は、カゼイン食と大豆たん白質食をウサギに投与し、カゼインによる糞中ステロイド排泄の減少は血漿 CHOL 濃度の上昇に先行していることを認め、糞中ステロイド排泄の変化は血漿 CHOL 濃度の変化の原因であり結果ではないとした。本研究の実験2において同じ論法を用いるならば、糞中のステロイド排泄も血漿 CHOL 濃度に影響を及ぼしている可能性もあるが、肝臓リン脂質組成の変化は血漿 CHOL 濃度の変化の原因であっても単なる結果ではないと言えよう。

文 献

- 1) 菅野道廣 (1987): コレステロール代謝の調節機構に関する栄養生化学的研究. 栄食誌, **40**, 93-102.
- 2) Beynen A. C. (1990): Comparison of the mechanisms proposed to explain the hypocholester-

- olemic effect of soybean protein *versus* casein in experimental animals. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**, S87-S95.
- 3) Sugiyama K., Ohkawa S. and Muramatsu K. (1987) : Relationship between amino acid composition of diet and plasma cholesterol level in growing rats fed a high cholesterol diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 413-423.
- 4) 杉山公男, 金森啓至, 村松敬一郎 (1990) : 血漿コレステロール濃度と肝臓の遊離アミノ酸パターンおよびリン脂質組成. 必須アミノ酸研究, No. 128, 39-43.
- 5) Vance J. E. and Vance D. E. (1985) : The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **63**, 870-881.
- 6) Zak B. (1957) : Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.*, **27**, 583-588.
- 7) Huff M. W. and Carroll K. K. (1980) : Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, **21**, 546-558.
- 8) Saeki S., Kanauchi O. and Kiriya S. (1990) : Some metabolic aspects of the hypocholesterolemic effect of soybean protein isolate in rats fed a cholesterol-free diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**, S125-S131.
- 9) 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 mixtures. *J. Nutr.*, **112**, 855-862.
- 10) Pfeuffer M. and Barth C. A. (1986) : Modulation of very low density lipoprotein secretion by dietary protein is age-dependent in rats. *Nutr. Metab.*, **30**, 281-288.
- 11) Yao Z. and Vance D. E. (1988) : The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2998-3004.
- 12) Tijburg L. B., Geelen M. J. H. and van Golde L. M. G. (1989) : Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1004**, 1-19.
- 13) Sugiyama K., Ohishi A., Siju H. and Takeuchi H. (1989) : Effects of methyl-group acceptors on the regulation of plasma cholesterol level in rats fed high cholesterol diets. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **35**, 613-626.
- 14) Sugiyama K., Ohishi A., Takeno H. and Takeuchi H. (1991) : Differential effects of dietary choline and methionine on plasma lipid levels in rats fed on a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 253-255.
- 15) Ridgway N. D., Yao Z. and Vance D. E. (1989) : Phosphatidylethanolamine level and regulation of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1203-1207.
- 16) Kuyvenhoven M. W., West C., van der Meer R. and Beynen A. C. (1986) : Fecal steroid excretion in relation to the development of casein-induced hypercholesterolemia. *J. Nutr.*, **116**, 1395-1404.