

大豆たん白質食へのシスチン添加による血清脂質，リポたん白質代謝の変動

METABOLIC CHANGES IN LIPIDS AND LIPOPROTEINS OF SERUM
INDUCED BY THE ADDITION OF EXCESS DIETARY CYSTINE TO A
SOY PROTEIN ISOLATE DIET

青山頼孝・湯浅恵造・藤井茂樹・石川智弘・吉田 昭（名古屋大学
農学部）

Yoritaka AOYAMA, Keizou YUASA, Shigeki FUJII, Tomohiro
ISHIKAWA and Akira YOSHIDA

School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-01

ABSTRACT

The addition of excess cystine to a soybean protein isolate (SPI) diet caused the accumulation of lipids in the liver. The increase in liver lipids was due to triacylglycerol. In order to know the accumulation of triacylglycerol in the liver, rat hepatocytes were isolated. Triacylglycerol in hepatocytes prepared from rats fed a SPI diet supplemented with cystine was increased, but triacylglycerol in the medium was decreased. The incorporation into triacylglycerol from radioactive glycerol increased in hepatocytes, and decreased in medium. Similar results were observed in phospholipid metabolism. Hepatic apolipoprotein B mRNA was not changed between two groups but the addition of cystine to a SPI diet decreased malic enzyme mRNA. Thus, overall results show that one of the factors for the accumulation of triacylglycerol in the liver induced by the addition of excess cystine to a SPI diet might be due to the decreased transport from liver into serum. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 81-84, 1994.

アミノ酸過剰摂取は、脂質代謝異常、とくにコレステロール代謝に大きな影響を及ぼし、高コレステロール血症を起こすことが報告されており、動脈硬化症などの疾患との関連で重要である¹⁻⁶⁾。ヒスチジン、チロシン、シスチン過剰食をラットに与えると高コレステロール血症を形成する。従来、高コレステロール血症の形成には、食餌にコレステロールを1%、コール酸を0.25%添加することによって行われてきたが、アミノ酸過剰による場合は、食餌にコレステロールを添加しなくても高コレステロール血症を生成する例であり、かつ比較的短期間で高コレステロール血症を形成することを示した²⁻⁶⁾。

シスチン過剰食による高コレステロール血症の生成

のメカニズム及びその栄養学的制御を著者らは検討しその一部を報告した⁴⁾。その研究の過程で肝脂質の異常蓄積を見いだした。リポプロテインリパーゼの阻害剤を用いた実験から、肝脂質の血中への放出が障害されることを明らかにした。さらに、血清 VLDL のトリアシルグリセロールとたん白質量の低下も観察した。これもまた肝臓から血中への脂質放出の低下を示唆するものであり、昨年の報告会において発表した⁷⁾。本研究の目的は、その肝脂質、とくにトリアシルグリセロールの蓄積機構を、肝におけるトリアシルグリセロールの合成と分解、培養肝細胞を用いた実験から解明することである。

実験方法

実験動物

初体重約130-140 g のウイスター系雄ラット（日本 SLC, 浜松）を用いた。

実験食

食餌たん白質として、分離大豆たん白質 (SPI) を用い、たん白質 (N×6.25) を20%含む食餌を SPI 食とした (Table 1)。また、SPI 食に3.5%の L-シスチンを添加した食餌を SPI+シスチン食とした。これらの食餌を3あるいは6日間自由摂取法で与えた。

実験 1

SPI 食あるいは SPI+シスチン食を0, 3, 6日間与えた後、肝脂質をクロロホルム：メタノール (2:1) 混液により抽出し、ついで精製した。この一部を用いてトリアシルグリセロールを酵素法⁹⁾により測定した。

実験 2

SPI 食あるいは SPI+シスチン食を6日間自由摂取法で与えた後、³H₂O を1 mCi (37 mBq) 腹腔内投与した。1時間後の肝脂質への取り込みを調べた。

実験 3

SPI 食あるいは SPI+シスチン食を3日間与えた後、肝ミトコンドリアを分離した⁹⁾。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性を測定した¹⁰⁾。ミトコンドリアたん白質は Bradford¹¹⁾ の変法によって測定した。

実験 4

SPI 食あるいは SPI+シスチン食を3日間自由摂取法で与えた後、培養肝細胞を用いて、[³H] グリセロールから細胞内と細胞外のトリアシルグリセロールへの取り込みを測定した。

また、脂肪内外のトリアシルグリセロール量の変動も測定した。

実験 5

SPI 食あるいは SPI+シスチン食を摂取した後、肝

アポリポrotein B および malic enzyme の mRNA を測定した。

結果と考察

食餌たん白質の違いによる肝脂質量に対するシスチンの添加の影響を調べた結果、たん白質源として、カゼイン、全卵たん白質、小麦グルテンを含む食餌にシスチンを添加しても肝脂質の変動は全く認められなかった。また、肝脂質を構成するトリアシルグリセロール、コレステロール、リン脂質の割合も殆ど変化なかった。一方、SPI 食にシスチンを添加すると肝脂質、とくにトリアシルグリセロールの蓄積が認められた^{6,7)}。

また、血清トリアシルグリセロールはカゼイン、SPI 食、小麦グルテン食にシスチンを添加すると低下したが、低下の割合は SPI 食にシスチンを添加した時に大きかった。SPI+シスチン食を摂取したラットの肝トリアシルグリセロールの蓄積の経日変化をみると、3日後すでに SPI 食より増加し、6日後ではさらに蓄積量は多くなった。SPI+シスチン食を摂取したラットにおいて、³H₂O から肝トリアシルグリセロールへの取り込みは SPI 食群より明らかに増加した。

肝ミトコンドリアのカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼは脂肪酸分解の律速酵素といわれている。SPI+シスチン食を摂取したラットのカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は SPI 食を摂取したラット群と比較して有意に高くなった。つまり肝脂質が蓄積したラットにおいて肝脂肪酸の分解が促進したことはむしろ適応的応答であると考えられる。

肝臓のトリアシルグリセロールの蓄積のメカニズムを明らかにするために、Triton WR 1339 をラットに投与し、肝臓から血中へのトリアシルグリセロールの移動の割合を測定した。この化合物はリポ蛋白質リパーゼを阻害するので血清中から組織にトリアシルグリセロールが取り込まれないことが知られている。

Table 1. Dietary composition

	SPI	SPI + cystine
Soy protein isolate (SPI)	25.3%	25.3%
L-cystine		3.5
Corn oil	5	5
Vitamin mixture	1	1
Choline chloride	0.2	0.2
Mineral mixture	3.5	3.5
Corn starch	65.0	61.5

SPI+シスチン食を3日間与えた時すでに血清トリアシルグリセロールの分泌の割合は著しく低下した。6日間与えた時も同じ結果が得られた。その時に肝トリアシルグリセロールも経日的に増加した。それゆえ、シスチンの添加による肝脂質の蓄積は肝から血中への移動の障害と考えられた⁷⁾。

初代培養肝細胞において、細胞内外のトリアシルグリセロール濃度はシスチンを添加した SPI 食群において、細胞内では高く、逆に細胞外では減少した (Table 2)。また、初代培養肝細胞を用い、ラベルしたグリセロールからトリアシルグリセロールへの取り込みは SPI+シスチン食において、細胞内ではシスチンの添加によって高くなった。一方、細胞外では低下した (Table 3)。これらの培養肝細胞を用いた実験結果もまた SPI 食にシスチンを添加すると肝臓から血清にトリアシルグリセロールが移動し難くなっていることを示すものである。In vivo の系において、肝脂質

への $^3\text{H}_2\text{O}$ からの取り込みの実験結果は脂質合成の促進と考えるより、肝から脂質の放出が低下した結果によるものであろう。

VLDL のトリアシルグリセロール量はシスチン食群において低下した⁷⁾。血清 VLDL を構成するたん白質量はシスチンを添加した分離大豆たん白質食において有意に減少した。さらに、たん白質としてアポリポ蛋白質 B, C, E がある。SPI 食にシスチンを添加するとアポリポ蛋白質 C は減少し、アポリポ蛋白質 E は変化しなかった。アポリポ蛋白質 B₁₀₀ はわずかに増加することを報告した⁷⁾。そこで、VLDL の重要な構成たん白質であるアポリポ蛋白質 B の mRNA について測定したが大きな変化はなかった (Table 4)。脂肪酸合成に關与する malic enzyme の mRNA はシスチンの添加によって約半分に低下したことからこの肝脂質の蓄積が脂質合成の促進によるとは考え難い。

Table 2. Triacylglycerol and phospholipid in hepatocyte and medium

	SPI	SPI + cystine	p
	$\mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$		
Hepatocyte			
Triacylglycerol	1.00±0.02	1.95±0.07	<0.01
Phospholipids	2.64±0.05	2.43±0.05	<0.05
Medium			
Triacylglycerol	1.68±0.11	1.11±0.04	<0.01
Phospholipids	0.45±0.04	0.46±0.03	NS

Table 3. Incorporation of radioactive glycerol into lipids of hepatocyte and medium

	SPI	SPI + cystine	p
	$\text{dpm}/\mu\text{g DNA}$		
Hepatocyte			
Triacylglycerol	847±54	1310±109	<0.01
Phospholipids	1222±121	2434±138	<0.01
Medium			
Triacylglycerol	280±31	134±13	<0.01
Phospholipids	177±20	266±29	<0.05

Table 4. Liver mRNA level of rats fed either a SPI diet or a SPI diet supplemented with cystine

	SPI	SPI + cystine	p
Apolipoprotein B	100±26	87.6±14.3	NS
Malic enzyme	100±13	52.2±9.0	<0.01

文 献

- 1) Serougne C and Rukaj A (1983): Plasma and lipoprotein cholesterol in rats fed L-amino acid-supplemented diets. *Ann Nutr Metab*, **27**, 386-395.
- 2) Ohmura E, Aoyama Y and Yoshida A (1986): Changes in lipids in liver and serum of rats fed a histidine-excess diet or cholesterol-supplemented diets. *Lipids*, **21**, 748-753.
- 3) Nagaoka S, Kato M, Aoyama Y and Yoshida A (1986): Comparative studies on the hypercholesterolaemia induced by excess dietary tyrosine or polychlorinated biphenyls in rats. *Br J Nutr*, **56**, 509-517.
- 4) Aoyama Y, Matsumoto H, Tsuda T, Ohmura E and Yoshida A (1988): Effects on liver and serum lipids in rats of dietary additions of fibers and cholestyramine to a cystine-excess diet. *Agric Biol Chem*, **52**, 2811-2816.
- 5) Hitomi-Ohmura E, Amano N, Aoyama Y and Yoshida A (1992): The effect of a histidine-excess diet on cholesterol synthesis and degradation in rats. *Lipids*, **27**, 755-760.
- 6) Aoyama Y, Matsumoto H, Hitomi-Ohmura E and Yoshida A (1992): Fatty liver induced by the addition of excess cystine to a soya-bean protein diet in rats. *Comp Biochem Physiol*, **102A**, 185-189.
- 7) 青山頼孝, 石川智弘, 鈴木徹司, 岩崎友紀子, 吉田 昭 (1993): 大豆たん白質へのシスチン添加による血清リポたん白質代謝の変動. 大豆たん白質研究会会誌, **14**, 60-64.
- 8) Nagele U, Wahlefeld A-W and Ziegenhorn J (1985): Fatty acids and derivatives. Triglycerides UV-methods. *Methods of Enzymatic Analysis* (3rd Ed.), **8**, 12-18.
- 9) Brady LJ, Hoppel CL and Brady PS (1986): Hepatic mitochondrial inner membrane properties, β -oxidation and carnitine palmitoyltransferase A and B. *Biochem J*, **233**, 427-433.
- 10) Bieber LL, Abraham T and Helmrath T (1972): A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem*, **50**, 509-518.
- 11) Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.