

大豆たん白質摂取による血漿グルカゴン/インスリン比の上昇機構の解明

長谷川 信*・加野浩一郎・元木 徹

神戸大学大学院自然科学研究科

Mechanism of Elevation in Plasma Glucagon/Insulin Ratio by Soybean Protein Intake

Shin HASEGAWA, Kohichiro KANO and Tohru MOTOKI

Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe 657-0011

ABSTRACT

The present study was conducted to elucidate the mechanism of elevation in plasma glucagon/insulin ratio by soybean protein intake in chicks. Firstly, chicks were fed purified diets containing two types of protein (soy protein isolate and casein), and the effects of dietary protein types on growth performance, concentrations of plasma free fatty acid, glucose, glucagon and insulin were examined. Soybean protein intake had tendencies to reduce the body fat accumulation, and to raise the concentrations of plasma free fatty acid, glucose and glucagon, and glucagon/insulin ratio. Secondly, chicks were administered intravenously with glucagon-like peptide-1 (GLP-1). GLP-1 administration raised the concentrations of plasma free fatty acid, glucose and glucagon, and glucagon/insulin ratio. Finally, chicken adipocytes in primary culture were used to characterize the effects of GLP-1 on lipolysis. GLP-1 did not affect lipolysis in chicken adipocytes. And, BALB/c mice were received the intraperitoneal injection of GLP-1, and the marked serum antibody response was induced for all mice. Further the conjugation of the spleens from the immunized mice and mouse myeloma cells are in progress to obtain monoclonal antibodies specific for chicken GLP-1. *Soy Protein Research, Japan* 1, 86-90, 1998.

Key words : soybean protein diet, plasma glucagon/insulin ratio, glucagon-like peptide-1, lipolysis, chicken, body fat accumulation

種々の動物において、大豆たん白質摂取により体脂肪蓄積が抑制されることが広く知られているが、この場合、血中のグルカゴン/インスリン比 (G/I比) が上

昇し¹⁻³⁾、この増加するグルカゴンの中に腸管グルカゴンが含まれることが推察されてきた⁴⁾。これまで、腸管グルカゴンの主要な生理機能としてはインスリン分泌充進作用が哺乳動物において報告されているのみで、上述の血漿 G/I 比の上昇機構、延いては体脂肪蓄積の

* 〒 657-0011 神戸市灘区六甲台町 1-1

抑制機構への関与は不明のままである。最近我々は、腸管グルカゴンと前駆体をーにするグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) に着目し、GLP-1 をコードする塩基配列⁵⁾ からの推定に基づき合成したニワトリ GLP-1 (7-36) アミドを、成長中のニワトリへ投与して、ニワトリ GLP-1 は血漿 G/I 比並びに血糖値の上昇作用を有する可能性を推察した。このことから、GLP-1 は、種特異性を有し、ニワトリにおいては大豆たん白質による血漿 G/I 比の上昇に直接関与する、延いては大豆たん白質摂取による体脂肪蓄積抑制を誘導する因子の一つである可能性が強く暗示された。そこで、本研究の目的は、ニワトリにおける大豆たん白質摂取による血漿 G/I 比の上昇の現象を確認すると共に、血漿 G/I 比の上昇機構への GLP-1 の関与を明らかにし、大豆たん白質摂取による血漿 G/I 比の上昇機構、延いては大豆たん白質摂取による体脂肪蓄積の抑制機構を解明することにある。

方 法

供試ニワトリとして単冠白色レグホン種雄初生雛を用い、飼料および水は自由摂取とした。

まず、初生から3日齢まで市販飼料を給与後、Table 1 に示した代謝エネルギーレベルで18%のたん白質を含有する2種類のたん白質飼料⁶⁾ (たん白質源：大豆たん白質あるいはカゼイン)で21日齢まで飼育後、

断頭屠殺により採血し血漿を分離して、血漿遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン及びインスリン濃度を測定した。血漿遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン及びインスリン濃度の測定は、それぞれ市販キット (NEFA-テストワコー、和光純薬; グルコース CII-テストワコー、和光純薬; グルカゴンキット「第一」、第一ラジオアイソトープ研究所、及びインスリン・ダイナパック、ダイナボット) を用いて行った。

次に、初生から24日齢まで市販飼料で飼育後、一羽当たり0.1 μg の GLP-1 を静脈内に投与し、投与後60分間まで経時的に採血し、血漿を分離して、上述と同様の方法で、血漿遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン及びインスリン濃度を測定した。

最後に、遊離脂肪細胞の調製・培養は、Oscarの方法⁷⁾ に準じて行った。即ち、初生から24日齢まで市販飼料で飼育後、断頭屠殺し、腹腔内脂肪組織を摘出してコラゲナーゼ分解を行って脂肪細胞を遊離させ、この細胞密度を約 10^6 個/mLに調整し脂肪細胞培養液とした。この培養液中に終濃度が 10^{-11} ~ 10^{-6} になるようにニワトリ GLP-1 を添加後、37°C で60分間培養し遊離した脂肪酸量を測定した。遊離した脂肪酸量の測定は、上述の血漿遊離脂肪酸濃度の測定と同様の方法で行った。

また、8週齢のBALB/cマウスを用い、一頭当たり100 μg のBSA結合GLP-1 (抗原) を、3回にわたって腹腔内へ投与した。1回目は8週齢時に等量の完全ア

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Soybean protein	Casein
	(g/100 g diet)	
Soy protein isolate	15.8 ¹⁾	—
Casein	—	15.2 ²⁾
Glucose	60.3	60.3
Soybean oil	2.0	2.0
Cellulose powder	14.0	13.6
Vitamin mixture	1.5	1.5
Mineral mixture	6.0	6.0
Choline-Cl	0.2	0.2
DL-methionine	0.2 ³⁾	0.2 ⁴⁾
L-arginine-HCl	—	0.7 ⁴⁾
Glycine	—	0.3 ⁴⁾
Butylated hydroxytoluene	0.012	0.012
Metabolizable energy (kcal/kg diet)	2,900	2,900

1) Containing 84.9% crude protein.

2) Containing 81.2% crude protein.

3) Added with DL-methionine at the level of 1.5% of crude protein.

4) Added with DL-methionine, L-arginine-HCl and glycine at the level of 1.9%, 5.9% and 2.2% of crude protein, respectively.

ジュバント (complete Freund's adjuvant, 半井 IMM-1) と共に, 2 回目は 10 週齢時に等量の不完全アジュバント (incomplete Freund's adjuvant, 半井 IMM-2) と共に, 3 回目は 12 週齢時に抗原のみをそれぞれ投与した。その間, 経時的に尾静脈より採血し, 血清を分離して, 得られた血清を個体毎に -20°C で保存した。GLP-1 に対する血清中の特異抗体の検出は, 200 倍希釈した血清について酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて行った。即ち, 血清抗体測定用抗原として化学合成 GLP-1 (ペプチド研) を, 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリン (IgG + IgM) 抗体 (アフィニティー精製 F(ab)₂ 分画, TAGO) を, 基質として *p*-nitrophenyl phosphatase (SIGMA) を 10% diethanolamine buffer で希釈したものを, 反応停止液として 150 mM EDTA をそれぞれ用いた。そして, 反応停止 10 分後に波長 410 nm で吸光度を測定した。

結果と考察

まず, 2 種類 (大豆たん白質及びカゼイン) のたん白質飼料を成長中のニワトリに給与し, 飼料中のたん白質源の違いが血中の遊離脂肪酸濃度, 血糖値, グルカゴン濃度及びインスリン濃度に及ぼす影響を調べた。その結果, 大豆たん白質の摂取により, カゼインの摂取に比べて, 体脂肪蓄積量が減少する傾向, 並びに血糖値, 遊離脂肪酸濃度, グルカゴン濃度及び G/I 比が上昇する傾向が認められた (Table 2)。この結果は, ラットにおいて大豆たん白質食では, カゼイン食に比べ, 血中グルカゴン濃度 (あるいは G/I 比) が高くなることを示唆した菅野ら¹⁻³⁾の報告とはほぼ一致するものであり, ニワトリにおいても大豆たん白質は, 哺乳動物におけると同様の生理的効果を有することが推察された。

次に, ニワトリ GLP-1 の静脈内投与が, 血中の遊

Table 2. Effect of dietary protein types on growth performance, and concentrations of plasma glucose, FFA, glucagon and insulin in chicks¹⁾

Measure	Diet	
	Soybean protein	Casein
Feed intake (g/18 days/chick)	227	232
Body weight (g)	149±4	145±6
Adipose tissue weight (g/100 g BW)	0.51±0.05	0.54±0.04
Plasma glucose (mg/100 mL)	260±24	236±10
Plasma FFA (μEq/100 mL)	18.1±1.8	15.0±4.5
Plasma glucagon (pg/mL)	351±49	327±43
Plasma insulin (μU/mL)	12.7±0.8	13.1±1.0
Glucagon / insulin ratio	27.5±3.6	24.1±1.9

1) Values are means ± SEM of five chicks.

Table 3. Effect of GLP-1 intravenously administrated on concentrations of plasma glucose, FFA, glucagon and insulin in chicks¹⁾

Measure	Time after administration (min)				
	0	5	15	30	60
Plasma glucose (mg/100 mL)	255 ± 4	268 ± 3	274 ± 3 ²⁾	294 ± 4 ^{**}	313 ± 3 ^{**}
Plasma FFA (μEq/100 mL)	7.7 ± 1.1	7.5 ± 0.6	14.4 ± 2.2	14.3 ± 3.0	16.1 ± 2.0 [*]
Plasma glucagon (pg/mL)	330 ± 29	428 ± 12 [*]	623 ± 78 [*]	489 ± 77	466 ± 54
Plasma insulin (μU/mL)	14.6 ± 0.8	13.8 ± 1.1	13.1 ± 0.4	12.8 ± 0.8	13.6 ± 0.9
Glucagon / insulin ratio	22.5 ± 0.8	31.3 ± 2.9 [*]	47.7 ± 6.5 [*]	37.9 ± 4.1 [*]	34.8 ± 5.7

1) Values are means ± SEM of three chicks.

2) An asterisk represents a significant difference between values of the 0 minute group and of other groups in the same column.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

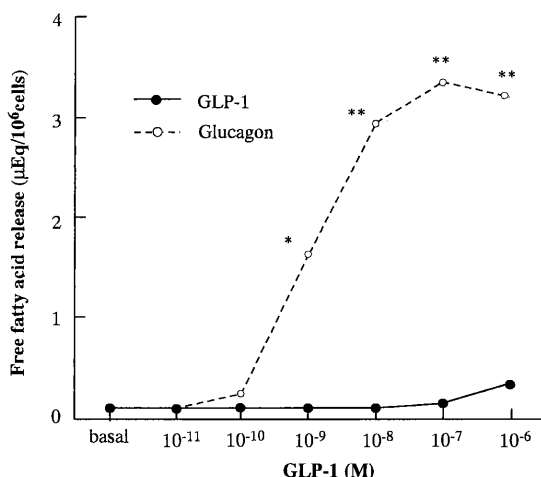


Fig. 1. Effects of GLP-1 and glucagon on lipolysis in chicken adipocytes. Each point represents mean $\pm$ SEM of five chicks. An asterisk represents a significant difference between values of the basal group and of other groups. * P <0.05, ** P <0.01

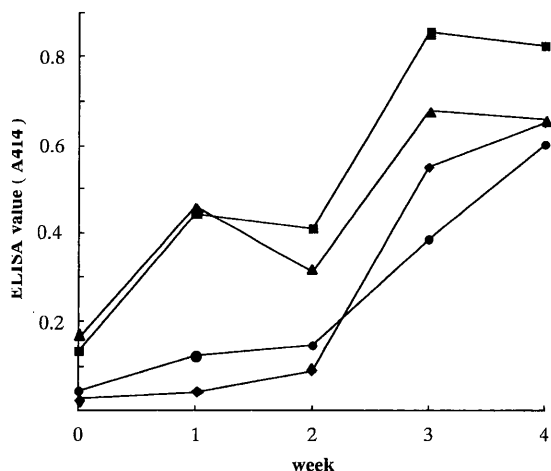


Fig. 2. Changes in serum antibodies specific for chicken GLP-1 of BALB/c mice by intraperitoneal injection of chicken GLP-1. Apparent antibody (absorbance at 414 nm). Each point represents the value for each mouse.

離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン濃度及びインスリン濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、GLP-1 投与は、血糖値、遊離脂肪酸濃度、グルカゴン濃度及び G / I 比を上昇させる作用を有することが明らかとなった (Table 3)。この結果は、上述の大豆たん白質摂取時の種々の変動と現象的にはほぼ一致するものである。Nosedal ら⁴⁾は、大豆たん白質摂取時に小腸グルカゴン (エンテログルカゴン) 様の比較的低分子のグルカゴンのレベルが上昇することを報告しており、この報告と本研究の結果とを考えると、GLP-1 がこの低分子グルカゴンの一つである可能性が十分推察される。今後、ニワトリ GLP-1 検出のための高感度酵素免疫定量法が開発され、血中の GLP-1 濃度の変動が正確に把握できるようになれば、大豆たん白質の摂取による血漿 G / I 比の上昇機構への GLP-1 の関与、延いて

は血漿 G / I 比の上昇機構の解明が期待できる。

最後に、ニワトリ遊離脂肪細胞を用いた *in vitro* 実験の結果から、GLP-1 は、グルカゴンと異なり、脂肪細胞においてリポリシスを直接促進しないことが判明した (Fig. 1)。それ故、大豆たん白質摂取時に傾向として認められた血中遊離脂肪酸濃度の上昇に、GLP-1 が直接的に関与している可能性は低いと考えられる。

また、ニワトリ GLP-1 検出の為の高感度酵素免疫定量法の開発、並びにニワトリ小腸からの GLP-1 の単離に資する目的で、既に、ニワトリ GLP-1 を Freund のアジュバントと共にマウス腹腔内に投与し顕著な血清抗体価の上昇を認めており (Fig. 2)、現在このマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を用いてニワトリ GLP-1 に特異的な単クローン抗体を作製中である。

要 約

ニワトリにおける大豆たん白質摂取による血漿グルカゴン / インスリン (G / I) 比の上昇機構を解明する目的で、まず、たん白質源を大豆たん白質或いはカゼインとする 2 種類のたん白質飼料を給与し、飼料中のたん白質源の違いが血中の遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン濃度及びインスリン濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、大豆たん白質給与は、カゼイン給与に比べて、体脂肪蓄積量を減少させる傾向、並びに血中の遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン濃度及び G / I 比を上昇させる傾向を有することが認められた。次に、ニワトリ GLP-1 の静脈内投与が血中の遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン濃度及びインスリン濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、GLP-1 投与は

血中の遊離脂肪酸濃度，血糖値，グルカゴン濃度及び G / I 比を上昇させる作用を有することが明らかとなった。最後に，ニワトリ遊離脂肪細胞を用いた *in vitro* 実験の結果，GLP-1 はグルカゴンと異なり，脂肪細胞においてリポリシスを直接促進しないことが判明した。また，既にニワトリ GLP-1 をマウス腹腔内に投与し顕著な血清抗体価の上昇を認めており，現在このマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を用い，ニワトリ GLP-1 に特異的な単クローン抗体を作製中である。

文 献

- 1) 菅野道廣 (1987) : コレステロール代謝の調節に関する栄養生化学的研究. 日本栄養・食糧学会誌, **40**, 93-102.
- 2) Sugano M, Ishiwaki N and Nakashima K (1984) : Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats. Significance of the arginine / lysine ratio. *Ann Nutr Metab*, **28**, 192-199.
- 3) Sugano M, Ishiwaki N, Nagata Y and Imaizumi K (1982) : Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. *Br J Nutr*, **48**, 211-221.
- 4) Nosedá G, Fragiaco C, Gatti E, Descovich G and Sirtori CR (1982) : Glucagon release following experimental diets in man: effects of soybean and casein enriched diet. *Pharmacol Res Commun*, **14**, 867-878.
- 5) Hasegawa S, Terazono K, Nata K, Takada T, Yamamoto H and Okamoto H (1990) : Nucleotide sequence determination of chicken glucagon precursor cDNA. *FEBS Lett*, **264**, 117-120.
- 6) Ueda H (1992) : Effects of dietary protein and soybean saponins on plasma cholesterol concentration in chicks. *Anim Sci Technol*, **63**, 793-799.
- 7) Oscar TP (1991) : Glucagon-stimulated lipolysis of primary cultured broiler adipocytes. *Poultry Sci*, **70**, 326-332.