

# 大豆成分により活性化される新規抗酸化システムの検索

竹中麻子\*

山形大学農学部

## Research for a New Antioxidative Pathway Activated by Soybean Protein

Asako TAKENAKA

Faculty of Agriculture, Yamagata University, Yamagata 997-8555

### ABSTRACT

Oxidative stress results in part from the production and accumulation of reactive oxygen species, and is supposed to cause critical damage to DNA, protein and cellular membranes. This study is undertaken to find a new antioxidative pathway which is activated by soybean protein intake *in vivo*. At first, we fed male Wistar rats diets containing 20% casein, 8% casein and 8% soybean protein as protein sources and examined antioxidative enzyme activities, glutathione contents, and lipoperoxide concentration in the liver. Soybean protein intake did not affect liver antioxidative enzyme activities and liver glutathione contents, while decreased liver lipoperoxide level (estimated as TBARS). These results show a possibility that soybean protein intake can prevent peroxidation. Therefore, we constructed a new experimental system to find a protein concerning for prevention against peroxidation and at the same time activated by soybean protein intake. cDNA library from male Wistar rats was constructed using pYES2 vector and transformed into INVSc1 *Saccharomyces cerevisiae*. Colonies which can survive on the plate containing 3.3 mM paraquat was screened. *Soy Protein Research, Japan* 2, 55-58, 1999.

Key words : soybean protein, antioxidative pathway

食品が有する生体調節機能のなかでも、生体内で発生する活性酸素を除去する機能は特に注目されているもののひとつである。抗酸化機能をもつ食品の検索はすでに国内外の多くのグループにより行われているが、報告されている多くの抗酸化食品は、ラジカルスカベンジャーとして生体内で活性酸素種を捕捉することにより機能すると考えられている。これに対して本研究では、生体内の活性酸素防御系を活性化することによ

り機能する成分を検索し、その機構を解明することを目的としている。大豆に未同定の抗酸化成分が含まれている可能性が高いと考え、今回は特にラジカルスカベンジャー活性をもたないと考えられる大豆たん白質が有する抗酸化作用を動物個体レベルで検討した。また、大豆成分の抗酸化作用が何らかの遺伝子発現を介して発揮される場合、抗酸化作用を指標とした機能発現スクリーニングによりその遺伝子を取得できる可能性があると考えた。そこで続いて大豆たん白質を摂取した動物体内で発現が上昇し、かつ抗酸化物質をコー

\* 〒 997-8555 鶴岡市若葉町 1-23

ドする遺伝子を単離する実験系について検討を行った。

## 方 法

### 実験動物

初体重平均 68 g の 4 週齢 Wistar 系雄ラット（日本 SLC）を 1 群 5 頭づつ 3 群に分け、それぞれたん白質として 20% カゼイン（20CAS）、8% カゼイン（8CAS）、8% 大豆たん白質（8SP）を含む食餌（Table 1）を与えて 14 日間飼育した。飼料摂取量は各群で有意差がないように、8% 群に合わせて pair feeding を行った。飼育最終日に 10 時間の絶食後、ネブタール麻酔下で開腹し、心臓からの採血の後、肝臓を摘出して各種分析に供した。

### 肝臓からの分析用サンプルの調製

摘出した肝臓から約 0.6 g を切除して、Gilberto Del-Boccio らの方法<sup>1)</sup>に従って各種抗酸化酵素および過酸化脂質測定用サンプルの作成に供した。

### 肝臓成分の分析

過酸化脂質の測定は Uchiyama & Mihara の方法<sup>2)</sup>を用い、TBA 反応物（TBARS）として求めた。脂質重量は肝臓 0.5 g 前後を用いて、Folch 法<sup>3)</sup>に従って測定した。カタラーゼ（CAT）活性は紫外部吸収法を用い、酵素による過酸化水素の分解に基づく 240 nm の吸光度の減少を経時的に測定することにより求めた<sup>4)</sup>。スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性は NBT 法を用いて測定した<sup>5)</sup>。グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）活性は *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを基質とし、グルタチオンレダクターゼ（GSSG-R）と

の共役を利用して測定した<sup>6)</sup>。グルタチオンレダクターゼ（GSSG-R）活性は何・安本の方法を用い、GSSG-R 活性発現に伴う NADPH の減少量を測定することにより求めた<sup>7)</sup>。グルタチオン（GSH）量の測定のため、肝臓約 0.5 g を氷冷した 30% メタリン酸と 34.3 mM EDTA 各 5 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離（2,800 × *g*, 4℃, 15 min）後の上清を分析に供した。測定用サンプル 100  $\mu$ L に 5 N 水酸化ナトリウム 10  $\mu$ L を加えて中和し、さらに反応バッファー（0.5 M ほう酸：0.5 M KCl = 1 : 1, pH 8.0）300  $\mu$ L, 0.02 M EDTA 20  $\mu$ L, および N-(9-acridinyl) maleimide (NAM, 60 nmol/ml acetone) 50  $\mu$ L を加えて攪拌後、3 時間室温放置して反応させた。この反応混合物をメンブランフィルター（4 mm Millex-FH, NIHON MILLIPORE LTD）にて濾過し、HPLC 分析に用いた。たん白質の定量は Lowry らの方法<sup>8)</sup>に従って測定した。

### 統計分析

結果の有意性は、Bartlett 検定および Duncan's multiple range test を用いた分散分析もしくは Mann-Whitney's U-test により検定した。

### 酵母を用いた機能発現スクリーニング系の検討

20% カゼイン食で飼育したラット肝臓より pYES2 をベクターとする cDNA ライブラリーを作製し、サッカロミセス酵母（INVSc1）に酢酸リチウム法を用いてトランスフェクトした。INVSc1 が生育できない 3.3 mM PQ を培地に添加して酸化ストレスを負荷し、生育能を獲得したクローンを選択した。

## 結果と考察

実験食の食餌組成を Table 1 に、実験期間中の増体重、食餌摂取量、肝臓重量を Table 2 に示した。低たん白質食群では通常食に比べて摂食量の低下がみられるが、今回は pair feeding を行ったため、摂食量に有意差は生じなかった。しかし、体重増加量は低たん白質食群で有意に低かった。

このときの肝臓の各種抗酸化酵素活性の変動を Table 3 に示した。CAT, SOD, GSH-Px, GR いずれの酵素活性も群間に有意差はなく、大豆たん白質摂取による影響はみられなかった。また、細胞内で主要な還元バッファーとして働く GSH 量についても群間で有意差はみられなかった。さらに肝臓の脂質過酸化レベルを TBARS として測定したところ、大豆たん白質食摂取群で有意な低下を示した（Table 3）。低たん白質食の摂取により脂質過酸化の上昇が報告されている例もあるが、今回はそのような結果は得られず、むしろ大

Table 1. Composition of diets (%)

|                               | 20CAS  | 8CAS   | 8SP + Met |
|-------------------------------|--------|--------|-----------|
| Casein                        | 20.00  | 8.00   | —         |
| SPI <sup>1)</sup>             | —      | —      | 7.88      |
| Methionine                    | —      | —      | 0.13      |
| Corn oil                      | 10.00  | 10.00  | 10.00     |
| $\alpha$ -Cornstarch          | 43.67  | 51.67  | 51.66     |
| Sucrose                       | 21.83  | 25.83  | 25.83     |
| Vitamin mixture <sup>2)</sup> | 1.00   | 1.00   | 1.00      |
| Mineral mixture <sup>2)</sup> | 3.50   | 3.50   | 3.50      |
| total                         | 100.00 | 100.00 | 100.00    |

<sup>1)</sup>soy protein isolate

<sup>2)</sup>AIN 93

Table 2. Body weight, food intake and liver weight of rats

|                                 | 20CAS                    | 8CAS                     | 8SP + Met                 |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Initial body weight (g)         | 68.1 ± 3.3 <sup>a</sup>  | 68.2 ± 2.9 <sup>a</sup>  | 68.1 ± 3.5 <sup>a</sup>   |
| Body weight gain (g/14 days)    | 60.6 ± 3.7 <sup>a</sup>  | 24.6 ± 1.7 <sup>a</sup>  | 30.4 ± 1.0 <sup>b</sup>   |
| Food intake (g/14 days)         | 146 ± 2.4 <sup>a</sup>   | 141 ± 5.7 <sup>a</sup>   | 148 ± 3.3 <sup>a</sup>    |
| Liver weight (% of body weight) | 3.94 ± 0.10 <sup>b</sup> | 3.55 ± 0.08 <sup>c</sup> | 3.77 ± 0.13 <sup>bc</sup> |

Values are means ± SEM of 5 rats per each group.

Values within the same row that does not share a common superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$ .

Table 3. Liver antioxidative enzyme activities, GSH concentration and TBARS level of rats

|                                | 20CAS                       | 8CAS                        | 8SP + Met                  |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| CAT (U/mg protein)             | 135 ± 9 <sup>a</sup>        | 104 ± 10 <sup>a</sup>       | 109 ± 6 <sup>a</sup>       |
| SOD (U/mg protein)             | 0.417 ± 0.0010 <sup>a</sup> | 0.417 ± 0.019 <sup>a</sup>  | 0.429 ± 0.009 <sup>a</sup> |
| GSH-Px (U/mg protein)          | 0.328 ± 0.024 <sup>a</sup>  | 0.321 ± 0.034 <sup>a</sup>  | 0.287 ± 0.029 <sup>a</sup> |
| GR (U/mg protein)              | 0.059 ± .0007 <sup>b</sup>  | 0.077 ± 0.0029 <sup>a</sup> | 0.072 ± .0065 <sup>a</sup> |
| GSH (mmol/g liver)             | 9.57 ± 1.33 <sup>a</sup>    | 6.13 ± 0.82 <sup>a</sup>    | 8.61 ± 1.07 <sup>a</sup>   |
| TBARS (nmol/mg of total lipid) | 2.44 ± 0.10 <sup>a</sup>    | 2.25 ± 0.16 <sup>a</sup>    | 1.58 ± 0.08 <sup>c</sup>   |

Values are means ± SEM of 5 rats per each group.

Values within the same row that does not share a common superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$ .

豆たん白質食の摂取により肝臓が受ける酸化ストレスレベルが低下している可能性が示された。抗酸化酵素の活性については、肝臓をサイトゾル画分、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分にそれぞれ分画して同様の測定をあわせて行い、また赤血球や肝臓についても抗酸化酵素活性およびTBARSの測定を行ったが、大豆たん白質摂取による活性の変動は観察されなかった。今回肝臓で観察されたTBARSの減少は、大豆たん白質中の成分が生体内で何らかの抗酸化作用を発揮

したことによると考えられる。

続いて、抗酸化能を指標としてラット肝臓由来のcDNAをスクリーニングする系について、20%カゼイン食摂取ラットの肝臓を用いて検討を行った。約 $5 \times 10^4$ コロニーをスクリーニングした段階でpositiveなクローンは得られていないが、引き続き検討を行っている。

## 要 約

大豆たん白質が有する新規抗酸化系を検索する目的で、特に生体内の活性酸素防御系の活性化に注目して検討を行った。まず、大豆たん白質が有する抗酸化作用を、動物個体レベルで検討した。20%カゼイン食、8%カゼイン食、8%大豆たん白質食を14日間給与し、各種抗酸化酵素活性、グルタチオンレベル、過酸化脂質レベル等の解析を行った。その結果、8%大豆たん白質摂取動物群において8%カゼイン食摂取群と比べて肝臓の脂質過酸化レベルが低下することが示された。また、大豆たん白質を摂取した動物体内で発現が上昇し、かつ抗酸化物質をコードする遺伝子を単離する実験系の構築を目的として、酵母を用いた機能発現スクリーニング系について検討を行った。

## 文 献

- 1) Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G and Cuccurullo F (1990) : Aortic antioxidant defence mechanisms : time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, **81**, 127-135.
- 2) Uchiyama M and Mihara M (1978) : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, **86**, 271-278.
- 3) Folch J, Lees M and Stanley GHS (1957) : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.
- 4) 富田 勲, 佐野満昭 (1983) : ラジカルスカベンジャー酵素の測定. 金田尚志, 植田伸夫編「過酸化脂質実験法」, 医歯薬出版株式会社, pp. 136-154.
- 5) Beauchamps C and Fridovich I (1971) : Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, **44**, 276-287.
- 6) Lawrence RA and Vurk RF (1976) : Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **71**, 952-958.
- 7) 何 普明, 安本教傳 (1990) : 老化促進マウス赤血球の細胞齢によるグルタチオンペルオキシダーゼ活性と酸化タンパク質レベルの変化. 日本栄養・食糧学会誌, **43**, 121-125.
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.