

大豆たん白質によるアポ E 欠損マウスの動脈硬化進展の抑制機構

津田恭征・神代美和・洪 美珠・佐藤匡央・今泉勝己*

九州大学大学院生物資源環境科学研究科

The Suppressing Mechanism of Soy Protein against Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E-deficient Mice

Yasuyuki TSUDA, Miwa KUMASHIRO, Mei-Chu HUNG,
Masao SATO and Katsumi IMAIZUMI

Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Graduate School, Kyushu University,
Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

In the first experiment, male apolipoprotein (apo) E-deficient mice were fed a diet containing casein, soy protein isolate (SPI) or ethanol extracted SPI (EE-SPI) for 9 weeks. The diet containing SPI or EE-SPI, compared with casein contained diet, reduced atherosclerotic lesion development in the aorta, suggesting that antiatherogenic effects of dietary SPI attribute to the proteins. In the second experiment, male and female apoE-deficient mice were fed a diet containing casein, SPI or rice protein isolate (RPI) for 9 weeks. The latter two proteins contained a comparable amount of arginine. Both SPI and RPI diet, compared with the casein diet, lowered the atherosclerotic lesion development in the aorta and aortic root. There were no dietary effects on the serum cholesterol level. These results suggest that the arginine content in SPI might exert these beneficial effects through arterial wall. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 138-142, 1999.

Key words : apolipoprotein E-deficient mice, atherosclerosis, cholesterol, casein, soy protein isolate, rice protein isolate, arginine

食事中的大豆たん白質には抗動脈硬化作用があることが知られており、その作用の主な機作はコレステロール濃度低下に基づくことがヒト¹⁾や実験動物²⁾において報告されている。我々は分離大豆たん白質(SPI)をたん白質源とする食事が動物性たん白質であるカゼインの場合と比較して、アポ E 欠損マウスの動

脈硬化病変の進展を抑制することを見いだした³⁾。しかしながら、そのメカニズムや有効成分は明らかではない。

そこで今回は、このようなたん白質源の効果の違いが SPI に含まれるエタノール可溶性成分に基づくのか、あるいはアミノ酸組成に基づくのかについて明らかにするために、実験 1 では雄のアポ E 欠損マウスを用いて、エタノール抽出した SPI の抗動脈硬化作用を検討

* 〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

した。実験2では、SPIはカゼインに比べアルギニンが多く含まれていることから、SPIと同レベルのアルギニンを含む米たん白質（RPI）を調製して、雌雄のアポE欠損マウスの動脈硬化病変の進展に及ぼす3種類のたん白質の影響を検討した。また、血清脂質濃度に対する影響も調べた。

方 法

実験1

14～15週齢の雄アポE欠損マウスにAIN-93G⁴⁾に準じた食事を9週間与えた。食事には20%のレベルでたん白質を添加した。たん白質源の違いにより、カゼインを与えたCAS群、SPIを与えたSPI群およびエタノール抽出したSPI⁵⁾を与えたEE-SPI群を設けた。なお、SPIのエタノール可溶性画分には143 mg/100 g たん白質のイソフラボンが含まれていた。

実験2

12～13週齢の雌雄のアポE欠損マウスに実験1と同様にAIN-93Gに準じた食事を9週間与えた。カゼインを与えたCAS群、SPIを与えたSPI群、SPI (8.4 g アルギニン/100 g たん白質)と同レベルのアルギニンを含む米たん白質 (8.1 g アルギニン/100 g たん白質)を与えたRPI群を設けた。米たん白質はMorita & Kiriyaamaの方法⁶⁾に準じて調製した。

血清脂質濃度は市販のキットを用いて測定した。大動脈の動脈硬化病変はTangiralaらの方法⁷⁾、大動脈根のそれはPaigenらの方法⁸⁾に従ってそれぞれ測定した。なお、実験1では凍結切片のoil red Oを用いた脂肪染色、実験2ではパラフィン切片のオルセインを用い

た弾性膜染色を行った

結果と考察

実験1では各群間で血清コレステロール濃度の違いは見られなかった。この結果は他の動物モデルにおいてSPIが血清コレステロール濃度を低下させたという報告とは一致しない。アポEは低密度リポたん白質レセプターやレムナントレセプターのリガンドであることから、大豆たん白質の降コレステロール作用はこれらのレセプターを介して発現している可能性がある。また、血清トリグリセリド、リン脂質、HDL-コレステロール濃度にも各群間で違いは見られなかった。さらに、大動脈の病変面積にも各群間で違いは見られなかった (Table 1)。

一方、大動脈根の病変面積はCAS群でSPI群あるいはEE-SPI群よりも有意に高い値を示した (Fig. 1)。なお、SPI群の大動脈根の病変面積はEE-SPI群のそれとほぼ同程度であった。

これらの結果から、SPIの抗動脈硬化作用はエタノール可溶性成分に基づくのではなく、たん白質成分に起因することが示唆された。また、SPIは血清コレステロール濃度とは独立した機構を介して、動脈硬化病変の軽減作用を有することが示唆された。

実験2においても雌雄のマウスの血清コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度は食事たん白質の影響を受けなかった (Table 2)。なお、これら血清脂質濃度は雄で雌よりも顕著に高い値を示した。

大動脈の病変面積はCAS群でSPI群あるいはRPI群よりも有意に高い値を示した (Fig. 2)。これらの違い

Table 1. Serum lipid levels and lesion areas of aorta in apoE-deficient mice fed casein (CAS), soy protein isolate (SPI) or ethanol extracted SPI (EE-SPI) for 9 weeks^{1,2}

Group	n	TC	TG	PL	HDL-C	Lesion area		
						TA	AA	WAA
mg/100 mL						%		
CAS	5	984	299	604	35.6	14.3	38.8	6.07
SPI	6	1,145	198	641	32.7	13.2	35.4	5.26
EE-SPI	6	1,009	213	572	22.0	14.9	39.4	6.47
Pooled SEM		44	21	31	3.9	0.7	1.8	0.45

¹ Values are expressed as means with pooled SEM.

² Abbreviations used : TC, total cholesterol ; TG, triacylglycerols ; PL, phospholipids ; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol ; TA, total area ; AA, aortic arch ; WAA, without aortic arch.

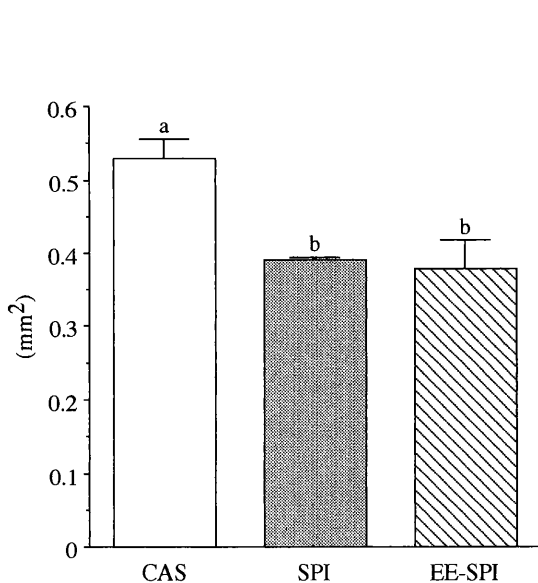


Fig. 1. Intimal lesion on transversal tissue sections of aortic root in apoE-deficient mice fed casein (CAS), soy protein isolate (SPI) or ethanol extracted SPI (EE-SPI) for 9 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 5 ~ 6 mice per group. ^{ab} Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

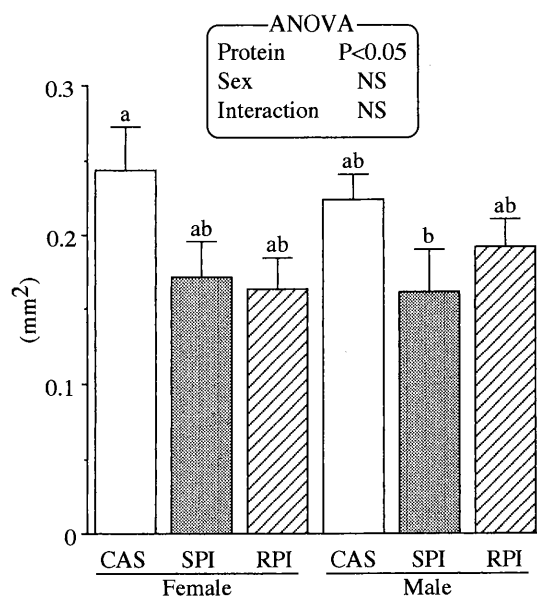


Fig. 3. Intimal lesion on transversal tissue sections of aortic root in apoE-deficient male and female mice fed casein (CAS), soy protein isolate (SPI) or rice protein isolate (RPI) for 9 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 4~5 mice per group. ^{ab} Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

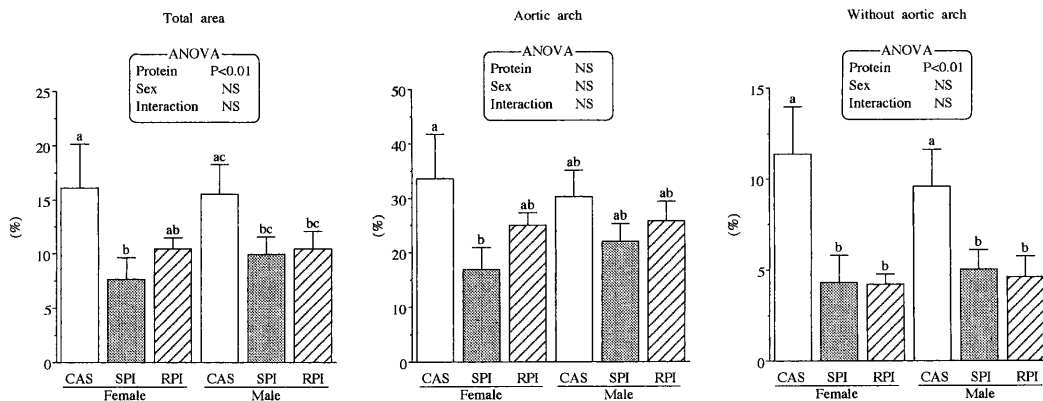


Fig. 2. Atherosclerotic lesions of aortic surface in apoE-deficient male and female mice fed casein (CAS), soy protein isolate (SPI) or rice protein isolate (RPI) for 9 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 4 ~ 5 mice per group. ^{abc} Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

Table 2. Serum lipid levels in apoE-deficient male and female mice fed casein (CAS), soy protein isolate (SPI) or rice protein isolate (RPI) for 9 weeks^{1,2}

Group	n	TC	TG	PL	HDL-C
mg/100 mL					
Male					
CAS	4	927 ^b	196	426 ^{ab}	39.6
SPI	5	1,073 ^b	186	514 ^b	34.4
RPI	5	1,040 ^b	196	458 ^b	27.6
Female					
CAS	4	554 ^a	133	262 ^a	15.3
SPI	5	578 ^a	109	265 ^a	27.8
RPI	4	568 ^a	68	271 ^a	26.2
Pooled SEM		59	18	29	3.4
ANOVA					
Protein		NS	NS	NS	NS
Sex		$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.01$	NS
Interaction		NS	NS	NS	NS

¹ Values are expressed as means with pooled SEM.

² Abbreviations used : TC, total cholesterol ; TG, triacylglycerols ; PL, phospholipids ; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol.

^{ab} Different letters within each column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

は腹部大動脈で顕著であった。なお、雄と雌とでは大動脈の病変面積に違いが見られなかった。

大動脈根の病変面積に及ぼす食事たん白質の影響は、大動脈のそれと同様な傾向であった (Fig. 3)。すなわち、CAS 群は SPI 群あるいは RPI 群よりも有意に高い病変面積を示した。大動脈根の場合も雌雄の病変面積に違いが見られなかった。

これらの結果から、食事たん白質は血清コレステロール濃度への影響とは独立した機構を介して動脈硬化病変の進展に影響することが示唆された。カゼインのアルギニン含量は SPI や RPI のそれと比較して低いことから、食事のアルギニンは動脈の病変進展に重要な役割を果たしている可能性がある。

要 約

アポ E 欠損マウスにカゼイン、分離大豆たん白質 (SPI) およびエタノール抽出した SPI (EE-SPI) を含む食事を 9 週間与えた。SPI および EE-SPI はカゼインと比較して動脈硬化病変の進展を抑制したことから、SPI の抗動脈硬化作用は主としてたん白質成分に起因することが示唆された。また、アポ E 欠損マウスにカゼイン、SPI あるいは SPI と同レベルのアルギニンを含む米たん白質 (RPI) をたん白質源とする食事を 9 週間与えたところ、RPI および SPI はカゼインと比較して大動脈と大動脈根での病変進展を抑制した。なお、血清コレステロール濃度は食事たん白質の影響を受けなかった。これらの結果から、SPI 中のアルギニンは血清コレステロール濃度とは独立した機構を介して動脈硬化病変の進展抑制に関与する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Anderson JW, Johnstone BM and Cook-Newell ME (1995) : Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, **333**, 276-282.
- 2) Potter SM (1996) : Soy protein and serum lipids. *Curr Opin Lipidol*, **7**, 260-264.
- 3) Ni WH, Tsuda Y, Sakono M and Imaizumi K (1998) : Dietary soy protein isolate, compared with casein, reduces atherosclerotic lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr*, **128**, 1884-1889.
- 4) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC Jr (1993) : AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951.
- 5) Kudou S, Fleury Y, Welte D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K and Okubo K (1991) : Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds. *Agric Biol Chem*, **55**, 2227-2233.
- 6) Morita T and Kiriya S (1993) : Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. *J Food Science*, **58**, 1393-1396.
- 7) Tangirala RK, Rubin EM and Palinski W (1995) : Quantitation of atherosclerosis in murine models : correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*, **36**, 2320-2328.
- 8) Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D and Williams RA (1987) : Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, **68**, 231-240.