

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 an Antioxidative Pathway Induced by Soybean Components

Asako TAKENAKA

Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997-8555

ABSTRACT

The preventive effects of soy protein on paraquat-induced oxidative stress were determined in rats. Male Wistar rats of 4 weeks old were fed diets with 20% casein, 20% soy protein isolate or 20% casein supplemented with saponin and isoflavon. Decreased body weight gain and increased lung weight by feeding the rats diets containing paraquat were clearly suppressed in rats fed a diet containing soy protein isolate. Supplementation of saponin and isoflavon of soy protein did not have the preventive effect. These results suggested that soy protein isolate acted preventively against the oxidative stress *in vivo* induced by active oxygen species formed through the action of paraquat. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 40-44, 2000.

Key words : soy protein, paraquat, oxidative stress, rat

大豆たん白質には、疾病予防に関わるさまざまな機能が期待されている。しかし、生体への酸化防御を強化することにより疾病予防に貢献するという観点で、大豆たん白質の機能は未だ明らかにされていない。

本研究では、大豆たん白質の生体酸化防御機能を、パラコート投与による酸化ストレス負荷ラットを用いて *in vivo* で検討した。さらにその生体酸化防御機能が大豆たん白質中のどの成分によるのかを追求する目的で、大豆たん白質添加食と同レベルのイソフラボノイドおよびサポニンを添加した食餌群を設定し、同様に検討した。

方 法

動物実験

実験動物として初体重平均 66.6 g の 4 週齢 Wistar 系雄ラット（日本 SLC）を用いた。20% カゼイン食および大豆たん白質食、さらにカゼイン食に大豆たん白質食と同濃度のイソフラボノイドとサポニンを添加した食餌を実験食とし、さらにこの 3 種の食餌にそれぞれ 0.025% パラコートを添加した食餌の計 6 種の実験食群を設定した（Table 1）。これらの実験食で 11 日間の飼育の後、ラットを 10 時間絶食させ、ネンブータル麻酔後、心臓からの採血と肝、肺および結腸の摘出を行い分析に用いた。臓器は重量測定後直ちに液体窒素で

* 〒 997-8555 鶴岡市若葉町 1-23

凍結させ、測定まで -80°C で保存した。

測定用サンプルの調製

肝の酵素活性, TBARS 測定用サンプルの調製 抗酸化酵素活性および TBARS 測定用サンプルは Boccio ら¹⁾の方法に従って調製した²⁾。

肝の各種脂質測定用サンプルの調製 肝の脂質分析に際して Folch 法³⁾に従って肝脂質を抽出し、肝脂質測定用サンプルを作成した。

血中および肝における TBARS の測定 血中 TBARS の測定は Yagi ら⁴⁾、肝 TBARS の測定は Uchiyama ら⁵⁾の方法をそれぞれ参考にした。

血中成分の測定 赤血球中のヘモグロビン濃度、血清中の HDL コレステロール濃度および血清、肝中のトータルコレステロール (TC)、トリアシルグリセロール (TG) およびリン脂質 (PL) 濃度の測定は、各種キット (ヘモグロビン B テストワコー、HDL コレステロールテストワコー、コレステロール E テストワコー、トリグリセライド E テストワコー、リン脂質 B テストワコー、和光純薬工業) を用いて行った。

たん白質の定量 Lowry 法⁶⁾に従って測定した。

各種酵素活性の測定 Table 2 の各種抗酸化酵素活性は、Kimura ら²⁾と同様の方法で測定した。

統計処理

結果の有意性 ($P < 0.05$) は一元配置分散分析を用い、等分散でない場合は Mann-Whitney's U-test を用いた。

結果と考察

CAS+PQ 食を摂取したラットでは、飼料摂取量 (Fig. 1A)、体重 (Fig. 1B) および肝重量の減少および肺の肥大 (Fig. 2) といったパラコートによる全身症状が観察された。大豆イソフラボノイドとサポニン類 (SPIex) の摂取は CAS+PQ 群の体重の減少をわずかに改善したが、飼料摂取量と肝重量の減少および肺重量の上昇を抑制する効果はなかった。一方、大豆たん白質 (SPI) の摂取はパラコートによる体重の減少と肺重量の増加を有意に抑制する結果を示した (Table 2, Figs. 1, 2)。体重および肺重量の結果から、大豆たん白質の摂取はパラコート摂取による酸化ストレスを軽減する効果があること、またその効果は大豆たん白質中のイソフラ

ボノイドやサポニン添加食では見られないことが明らかとなった。

パラコート摂取による生体内抗酸化酵素活性の顕著な変動として、肝ミトコンドリア画分のカタラーゼ活性が CON 群に比べて有意に低下し、ラジカル消去活性を有する成分を摂取させるとこの低下が改善されることを我々は示してきた。しかしながら本実験では SPIex または SPI の摂取によってパラコートによるカタラーゼ活性の低下を抑制しなかった。このことから、大豆たん白質の摂取によってラジカル消去とは異なるパラコート酸化ストレス抑制機構が作用している可能性が考えられた。

肝サイトゾル画分の SOD 活性は、どの食餌についてもパラコート無添加食群に比べてパラコート給与によってやや上昇することが示されたが、パラコート負荷時における SPIex および SPI の摂取はカゼイン食に比べて上昇効果が大きく、その効果の程度は SPIex > SPI の順で大きかった。また肝サイトゾル画分の GST 活性は CAS+PQ 群が CON 群に比べてわずかに低下したが、SPIex、SPI の給与はこの低下を有意に抑制した。これらのことから大豆たん白質の摂取は酸化ストレス下において SOD による酸化防御および GST による解毒代謝を高める作用を有している可能性が推察され、大豆たん白質に混入するイソフラボノイドおよびサポニンがこの作用に寄与していることが示された。大豆摂取によって諸臓器における薬物代謝に関与する Phase II 酵素活性が誘導されることが報告されており⁷⁾、パラコート酸化ストレス下においても大豆成分による Phase II 酵素活性誘導の可能性が考えられる。

TBARS 値を指標とした脂質過酸化度の変動は、肝脂質重量当たりで補正した TBARS 値において見られた。CAS+PQ 群は CON 群に比べて有意に上昇したが、SPIex 添加によるこの上昇を抑制する効果は見られなかった。一方 SPI 群は CON 群に比べて有意に上昇したがパラコート給与によってさらに上昇することはなかった。

これらの結果から、大豆たん白質の経口摂取によりパラコート投与ラットの酸化ストレスが軽減されること、またその効果は分離大豆たん白質中のたん白質成分にある可能性が高いことが示された。さらに、大豆たん白質の有する酸化防御機能がラジカル消去成分とは異なることを示す結果が得られた。

Table 1. Composition of the experimental diets (%)

Ingredient	CON	CAS+PQ	SPIex	SPIex+PQ	SPI	SPI+PQ
Casein	20	20	20	20		
Soy protein isolate					20	20
Methionine					0.33	0.33
Corn oil	5	5	5	5	5	5
α -Cornstarch : sucrose 2 : 1	65.5	65.48	65.145	65.35	65.17	65.15
Cellulose	5	5	5	5	5	5
Vitamin mixture ¹	1	1	1	1	1	1
Mineral mixture ²	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Daidzin			0.0015	0.0015		
Genistin			0.0047	0.0047		
Daidzein			0.0033	0.0033		
Genistein			0.0027	0.0027		
Saponin			0.1122	0.1122		
Paraquat		0.025		0.025		0.025
Total	100	100	100	100	100	100

¹AIN-93, ²AIN-93G.

Table 2. Food intake, body weight gain, serum and liver antioxidative enzyme activity, and TBARS value

	CON	CAS+PQ	SPIex	SPIex+PQ	SPI	SPI+PQ
Food intake (g/11days)	113 $\pm$ 1 ^a	76.5 $\pm$ 8.5 ^b	114 $\pm$ 1 ^a	86.8 $\pm$ 6.8 ^b	113 $\pm$ 1 ^a	96.1 $\pm$ 3.6 ^b
Body weight gain (g/11days)	42.0 $\pm$ 0.8 ^a	7.23 $\pm$ 6.67 ^c	42.3 $\pm$ 0.8 ^a	15.3 $\pm$ 5.4 ^{bc}	46.1 $\pm$ 1.2 ^a	29.4 $\pm$ 3.8 ^b
Catalase activity						
Erythrocytes (U/Hb)	55.1 $\pm$ 3.5 ^a	49.5 $\pm$ 5.9 ^a	54.0 $\pm$ 4.7 ^a	66.1 $\pm$ 11.6 ^a	56.2 $\pm$ 9.4 ^a	46.9 $\pm$ 2.7 ^a
Liver mitochondrial fraction (U/mg protein)	99.3 $\pm$ 13.8 ^a	32.6 $\pm$ 4.3 ^b	81.7 $\pm$ 7.7 ^a	36.1 $\pm$ 3.8 ^b	67.5 $\pm$ 6.7 ^a	36.6 $\pm$ 1.8 ^b
Liver cytosolic fraction (U/mg protein)	153 $\pm$ 2 ^a	143 $\pm$ 14 ^a	163 $\pm$ 9 ^a	150 $\pm$ 11 ^a	145 $\pm$ 9 ^a	152 $\pm$ 8 ^a
SOD activity						
Erythrocyte (U/Hb)	2.80 $\pm$ 0.22 ^a	2.54 $\pm$ 0.23 ^a	3.19 $\pm$ 0.18 ^a	3.05 $\pm$ 0.18 ^a	3.48 $\pm$ 0.41 ^a	3.24 $\pm$ 0.16 ^a
Liver mitochondrial fraction (U/mg protein)	2.82 $\pm$ 0.16 ^a	2.23 $\pm$ 0.19 ^a	2.37 $\pm$ 0.13 ^a	2.24 $\pm$ 0.22 ^a	2.63 $\pm$ 0.11 ^a	2.29 $\pm$ 0.20 ^a
GSH-Px activity						
Erythrocyte (U/Hb)	3.79 $\pm$ 0.22 ^a	3.73 $\pm$ 0.17 ^a	3.97 $\pm$ 0.36 ^a	4.94 $\pm$ 0.86 ^a	3.96 $\pm$ 0.58 ^a	3.94 $\pm$ 3.89 ^a
Liver cytosolic fraction (U/mg protein)	0.298 $\pm$ 0.024 ^a	0.250 $\pm$ 0.026 ^a	0.277 $\pm$ 0.020 ^a	0.315 $\pm$ 0.033 ^a	0.264 $\pm$ 0.015 ^a	0.300 $\pm$ 0.013 ^a
GSSG-R activity						
Liver cytosolic fraction (U $\times$ 10 ³ /mg protein)	5.28 $\pm$ 0.14 ^a	4.82 $\pm$ 0.25 ^a	5.25 $\pm$ 0.11 ^a	5.80 $\pm$ 0.24 ^a	5.29 $\pm$ 0.28 ^a	5.24 $\pm$ 0.18 ^a
NADPH-Cyt. P450 reductase activity						
Liver microsomal fraction (U $\times$ 10 ³ /mg protein)	4.67 $\pm$ 0.55 ^a	4.86 $\pm$ 0.84 ^a	4.11 $\pm$ 0.16 ^a	4.41 $\pm$ 0.21 ^a	3.82 $\pm$ 0.37 ^a	4.75 $\pm$ 0.47 ^a
TBARS						
Serum (nmol/mL)	1.68 $\pm$ 0.18 ^a	1.50 $\pm$ 0.13 ^a	1.64 $\pm$ 0.21 ^a	2.09 $\pm$ 0.26 ^a	1.57 $\pm$ 0.05 ^a	1.58 $\pm$ 0.19 ^a
Liver (nmol/g)	39.0 $\pm$ 2.7 ^a	39.4 $\pm$ 2.3 ^a	41.9 $\pm$ 5.4 ^a	37.3 $\pm$ 2.7 ^a	41.2 $\pm$ 6.2 ^a	37.3 $\pm$ 2.7 ^a
Liver (nmol/mg of total lipid)	0.500 $\pm$ 0.041 ^{bc}	1.23 $\pm$ 0.24 ^a	0.571 $\pm$ 0.082 ^c	1.10 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.968 $\pm$ 0.111 ^a	1.03 $\pm$ 0.09 ^a
Liver (nmol/mg of PL+TC+TG)	0.561 $\pm$ 0.067 ^b	1.99 $\pm$ 0.39 ^a	0.754 $\pm$ 0.140 ^b	1.69 $\pm$ 0.19 ^a	1.55 $\pm$ 0.19 ^a	1.58 $\pm$ 0.11 ^a

Values are mean $\pm$ SEM of 5 or 6 samples per group. Values within the same row that do not share a common super-script letter are significantly different at $P < 0.05$.

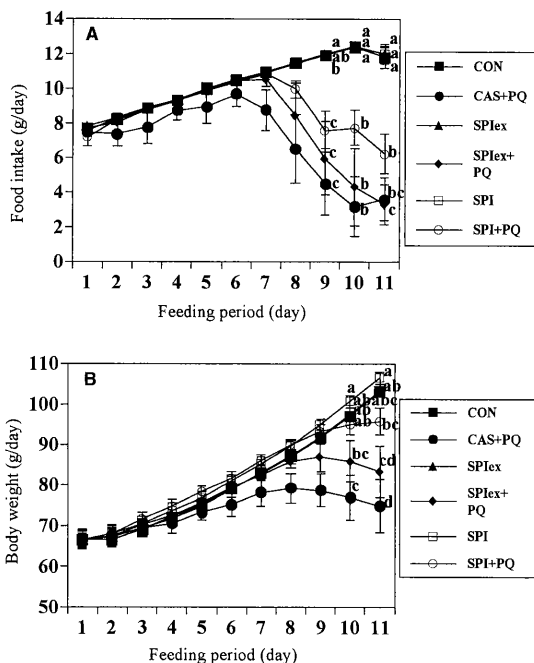


Fig. 1. Effect of soy protein, and saponin and isoflavon of soy protein on the food intake (A) and body weight (B) of rats fed diets with or without paraquat. CON, 20% casein diet ; CAS+PQ, 20% casein diet with 0.025% paraquat ; SPIex, 20% casein supplemented with saponin and isoflavon diet ; SPIex + PQ, 20% casein supplemented with saponin and isoflavon diet with 0.025% paraquat ; SPI, 20% soy protein diet ; SPI + PQ, 20% soy protein diet with 0.025% paraquat. Each symbol is expressed as the mean $\pm$ SEM. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ within each indicated day.

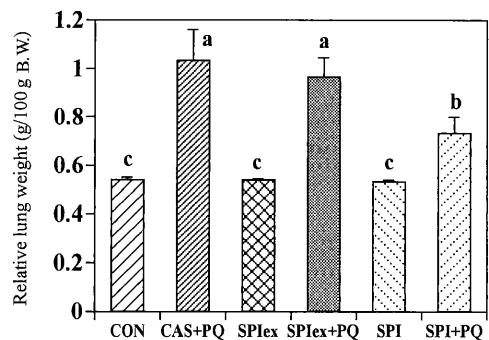


Fig. 2. Effect of soy protein, and saponin and isoflavon of soy protein on the lung weight of rats fed diets with or without paraquat. CON, 20% casein diet ; CAS+PQ, 20% casein diet with 0.025% paraquat ; SPIex, 20% casein supplemented with saponin and isoflavon diet ; SPIex + PQ, 20% casein supplemented with saponin and isoflavon diet with 0.025% paraquat ; SPI, 20% soy protein diet ; SPI + PQ, 20% soy protein diet with 0.025% paraquat. Each symbol is expressed as the mean $\pm$ SEM. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$.

要 約

大豆たん白質が有する抗酸化作用を、パラコート酸化ストレス負荷動物を用いて *in vivo* で検討した。20%カゼイン食および大豆たん白質食、さらにカゼイン食に大豆たん白質食と同濃度のイソフラボノイドとサポニンを追加した食餌を実験食とし、さらにこの3種の食餌にそれぞれパラコートを添加した食餌の計6種の実験食群を設定した。パラコート障害の指標となる肺の肥大は、イソフラボノイドとサポニンの添加により抑制されなかったが、大豆たん白質摂取群では有意に抑制された。また、ラジカル消去成分の摂取時に観察される酵素活性の変動が大豆たん白質の摂取では引き起こされなかったことから、大豆たん白質はラジカル消去物質とは異なる酸化防御機構によりパラコート酸化ストレスを軽減している可能性が示された。

文 献

- 1) Boccio GD, 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) Kimura Y, Araki Y, Takenaka A and Igarashi K (1999) : Protective effects of dietary nasunin on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biochem Biophys Biotech*, **63**, 799-804.
- 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) Yagi K (1976) : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*, **15**, 212-216.
- 5) Uchiyama M and Mihara M (1978) : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, **86**, 271-278.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- 7) Appelt LC and Reicks MM (1997) : Soy feeding induces phase II enzyme in rat tissues. *Nutr Cancer*, **28**, 270-275.