

# 肝オートファジーに対する大豆たん白質の効果

門脇基二\*・古屋文宏・渡辺真貴子・藤村 忍

新潟大学農学部

## Effect of Soy Protein on Hepatic Autophagy

Motoni KADOWAKI, Fumihiro FURUYA, Makiko WATANABE and Shinobu FUJIMURA

Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-2181

### ABSTRACT

The possibility that soy protein may have a specific effect on hepatic protein turnover, especially autophagic proteolysis, was investigated. Wistar strain male rats weighing about 200 g were meal-fed with a 20% casein or soy protein diet from 1000 h to 1800 h for 2 to 3 weeks. One day after last meal, the liver was perfused to measure *in vivo* proteolytic rates, or separated into hepatocytes to measure *in vitro* proteolytic rates and their responses to amino acids and glucagon. The *in vivo* proteolysis, which was measured from valine release for initial 15 min perfusion, was 20% lower in a soy protein group than a casein group. Since the liver weight was not different between the two groups, protein synthesis, an another part of protein turnover, must also have been lower in the soy protein group, which strongly suggests a lower protein turnover with this protein. In the isolated hepatocytes, there were no differences in proteolytic responsiveness to amino acids between the two groups, but the responsiveness to glucagon was more sensitive with soy protein. Measurement of amino acid patterns in the portal blood proved that the effect of soy protein was not due to a direct effect of amino acid composition of the diet. It is concluded for the first time that hepatic autophagy can be controlled by dietary protein. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 95-99, 2000.

Key words : amino acid, autophagy, glucagon, proteolysis, soy protein

オートファジー (autophagy; 自食作用) はたん白質や RNA, 膜脂質など細胞内構成成分の統合的代謝回転を担うことにより, 細胞の恒常性維持, ひいては生体

の健康維持に大きく寄与している機構である<sup>1)</sup>. このオートファジーは毎日の食事摂取リズムによって大きく変動することがよく知られている<sup>2)</sup>が, 食事たん白質の種類が果たしてこのオートファジーに対して影響を与えるか否かについては知見がない. オートファ

\* 〒 950-2181 新潟市五十嵐二の町 8050

ジーは電子顕微鏡による形態的方法か、たん白質分解速度による生化学的方法によって定量・評価することができる。そこで今回、肝灌流法を用いて *in vivo* たん白質分解速度を測定し、単離肝細胞法を用いて *in vitro* たん白質分解速度およびそれに対するアミノ酸・ホルモンの効果を評価し、両者の定量法の比較を行いつつ、食餌中大豆たん白質の効果をカゼインと比較検討した。

## 方 法

### 動物

Wistar 系雄ラット（体重約 200 g）をカゼインまたは大豆たん白質を 20% 含む試験食（AIN-93G の組成）でミールフィーディング（10:00～18:00）により 2～3 週間飼育した。オートファジーに対する摂食リズムの影響を避けるため、最後の摂食後、翌日正午に実験に供した。

### 灌流実験

まず、動物の *in vivo* での肝たん白質分解速度に対する食餌たん白質の効果を肝灌流法で行った。灌流操作は Mortimore らの方法<sup>2)</sup> を用い、循環式灌流を行った。灌流液組成は、酸素キャリアとしてウシ赤血球（25%）、3% ウシ血清アルブミン、10 mM グルコースを含む Krebs-Ringer 緩衝液（pH 7.4）を用いた。アミノ酸を加える場合は、オートファジー抑制作用をもつ調節アミノ酸（Reg AA: Leu, Tyr, Pro, Met, His, Trp, Ala の 7 種）を門脈血中濃度の 4 倍量（4×）で添加した。ここで、本来、器官灌流法は灌流液組成に鋭敏に応答する *in vitro* 実験系であるが、灌流開始直後しばらく全く灌流液組成の影響を受けない時間がある。その時間をバリン（Val）放出で確かめたところ、約 20 分であった（Fig. 1A）。そこで、灌流開始直後 15 分間の値はその動物の生理状態での *in vivo* 速度を示すと判断した。たん白質分解速度測定の場合、シクロヘキシミド（20  $\mu$ M）を灌流開始時に添加した。

### 肝細胞実験

肝実質細胞は Seglen らの方法<sup>3)</sup> に基づき、コラゲナーゼにより分散させて用いた。45 分のプレインキュベーション後、Reg AA とグルカゴン（ $10^{-7}$  M）の有無で 30 分間インキュベートし、その後シクロヘキシミド（20  $\mu$ M）を添加し、37～47 分での Val 放出で *in vitro* たん白質分解速度を測定した（Fig. 1B）。Val 分析はダンシル化を行い、HPLC で分離し、蛍光分析で定量した<sup>3)</sup>。

### 門脈血中のアミノ酸濃度

食餌たん白質の消化吸収後の門脈血中への出現を確

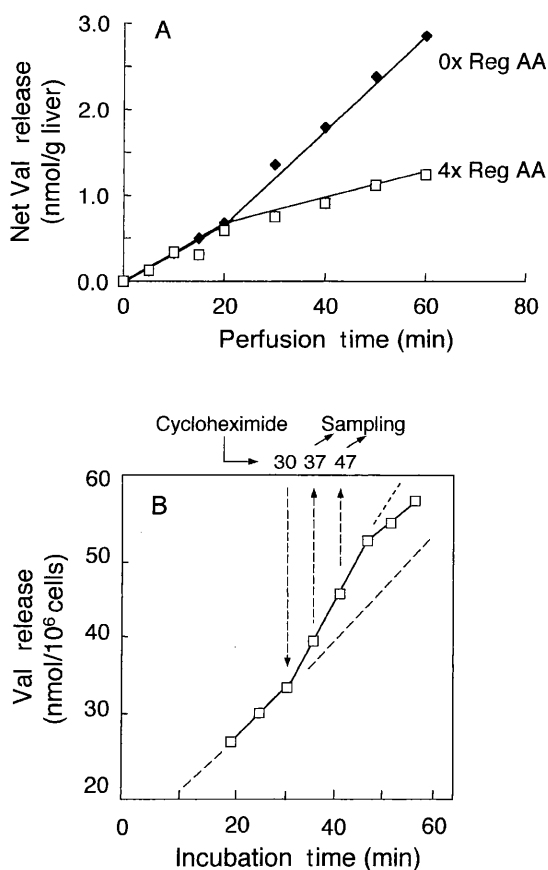


Fig. 1. Validation of valine release as an index of hepatic proteolysis. (A) Net valine release from rat liver during cyclic perfusion. The liver was cyclically perfused without (◆) and with regulatory amino acids (Reg AA, □) at 4× level. (B) Valine release from isolated hepatocytes. By taking samples at 7 and 17 min after addition of cycloheximide (20  $\mu$ M), the valine release rate represents the proteolytic rate.

かめるため、実験に供した時刻のラット門脈血を採取し、血漿中アミノ酸濃度を分析した。分析は島津製作所製アミノ酸分析機により、クエン酸リチウム緩衝液系で分析した。

## 結果と考察

肝灌流法で得られた *in vivo* たん白質分解速度は、大豆たん白質食ではカゼイン食に比べて約 20% 有意に低かった（Fig. 2A）。このとき、肝重量はカゼイン食と大豆たん白質食で各々  $2.60 \pm 0.12$ ,  $2.47 \pm 0.11$  g/100 g rat となり、両者で有意差がなかった。この結果はたん

白質分解速度の違いが肝重量に反映していないということ、表現を変えると、肝重量に差がないにもかかわらず分解速度に差があったということから、たん白質合成速度も大豆たん白質食ではカゼイン食より約20%低下していることが推測される。類似の結果はブタを用いた「まるごと」の動力学モデル実験でも報告されている<sup>4)</sup>。ここで得られた *in vivo* たん白質分解速度を、肝重量 2.5 g/100 g rat, 肝細胞 10<sup>8</sup>/g 肝重量とみなして肝細胞当りに換算してみると、それぞれ 0.41, 0.32 nmol/min/10<sup>6</sup> cells となり、肝細胞での 1× RegAA の値と近いものとなり (Fig. 2B と比較), 両実験法の

信頼性を示すものである。

次いで、新鮮な単離肝細胞を用いて *in vitro* たん白質分解速度を測定した (Fig. 2B)。培地中に何も含まない状態 (0× Reg AA) で最大値を示すが、このとき、大豆たん白質食のラットから調製した肝細胞では分解速度が約 17% 低かった。培地に 10 倍量の調節アミノ酸 (10× Reg AA) を加えると (マクロ) オートファジーを完全に抑制することがよく知られている<sup>1)</sup> が、この抑制された部分、すなわちオートファジー性たん白質分解速度も同様に約 15% の差があった。以上のことは単離肝細胞は *in vivo* の状態をよく保存していることを示している。

続いて、単離肝細胞を用いてアミノ酸とグルカゴンの応答性に対する食餌たん白質の影響を検討した (Fig. 3)。調節アミノ酸の添加は 4×, 10× と濃度の増加とともにたん白質分解はカゼイン食で 42.5, 34.6% へ、大豆たん白質食で 55.8, 36.2% へと低下し、その割合は両者の間で有意差はなかった (Fig. 3A・B, Table 1)。グルカゴンはオートファジーを促進する代表的生理因子として知られている<sup>1)</sup> が、アミノ酸がない状態 (0×)

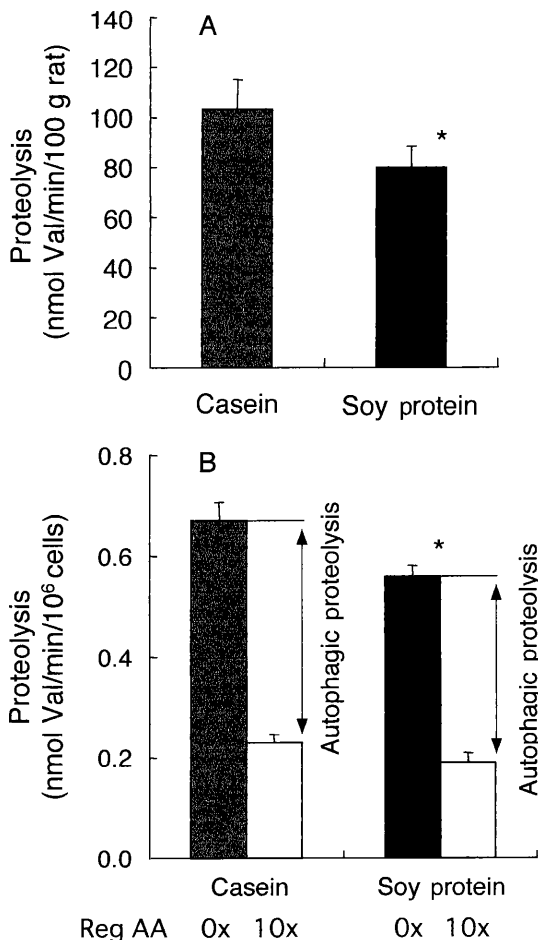


Fig. 2. Hepatic proteolysis of rats fed a casein and soy protein diet. (A) *In vivo* proteolytic rates from initial 15 min perfusion in the presence of cycloheximide as described in Fig. 1A. (B) *In vitro* proteolytic rates from isolated hepatocytes as described in Fig. 1B. Differences between the rates at 0× and 10× Reg AA represent autophagic proteolysis. \**P* < 0.05 vs casein.

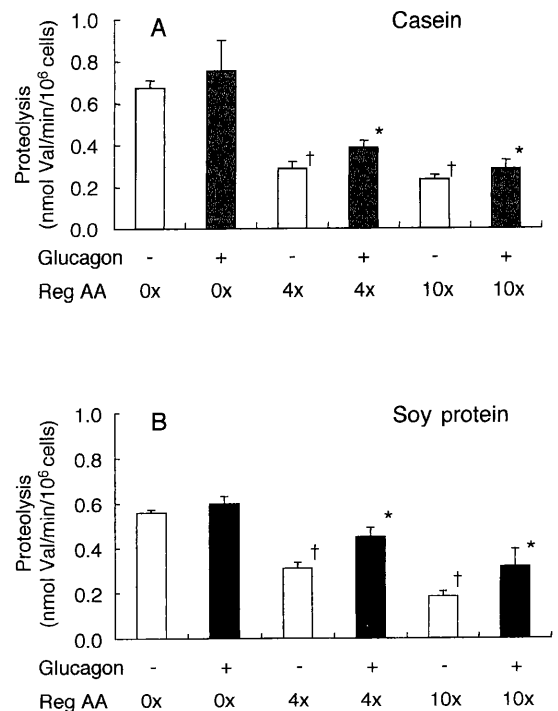


Fig. 3. Effect of Reg AA and glucagon on proteolysis in isolated hepatocytes obtained from rats fed a casein (A) and soy protein (B) diet. † *P* < 0.05 vs 0× control, \**P* < 0.05 vs glucagon (-).

Table 1. Proteolytic responsiveness to regulatory amino acids in the isolated hepatocytes: Comparison between casein and soy protein in the diet.

| Reg AA | Casein      | Soy protein |
|--------|-------------|-------------|
|        | (%)         | (%)         |
| 0×     | 100         | 100         |
| 4×     | 42.5 ± 2.0* | 55.8 ± 3.5* |
| 10×    | 34.6 ± 1.5* | 36.2 ± 8.5* |

Data were presented as a percentage of 0× control value. See Fig. 3. \* $P < 0.05$  vs 0× control.

Table 2. Proteolytic responsiveness to glucagon in the isolated hepatocytes: Comparison between casein and soy protein in the diet.

| Reg AA | Casein        | Soy protein    |
|--------|---------------|----------------|
|        | (%)           | (%)            |
| 0×     | + 10.5 ± 7.3  | + 7.4 ± 6.1    |
| 4×     | + 29.4 ± 6.2* | + 37.3 ± 5.4** |
| 10×    | + 21.0 ± 5.9* | + 68.7 ± 9.2** |

Data were presented as a percent stimulation of proteolysis by glucagon at indicated levels of RegAA. See Fig. 3. \* $P < 0.05$  vs glucagon(−). \*\* $P < 0.05$  vs a casein diet.

では有意な効果が認められず、アミノ酸が共存する場合にその促進効果が示された (Fig. 3A・B, Table 2). そして4×, 10×の場合ともに大豆たん白質食摂取の時, 促進効果は有意に大きかった. アミノ酸共存下でのみグルカゴンの効果がみられる<sup>5)</sup> のは, ホルモンとアミノ酸のシグナリングのクロストークが議論されている現在, 両者の作用機構を探る上で興味深い.

現在, このオートファジー性たん白質分解に対する大豆たん白質の効果について, その作用機構は不明である. そこで可能性のひとつとして, これら食餌たん白質のアミノ酸組成 (Fig. 4A) の違いが影響している可能性を探るため, 灌流実験および肝細胞実験を行った時点での門脈血中のアミノ酸パターンを調べてみることにした. というのはアミノ酸によるオートファジー抑制効果は基本的に10~20分という短時間で作用し, かつ可逆的であるからである. Fig. 4Bに示すように, 両者のアミノ酸パターンは, グリシンを除き, 全く差がなかった. かつ, この門脈血中パターンは各々の食餌たん白質のアミノ酸組成を反映するものではなかった. これは, 採血を行った時刻が最後の食餌を抜

いてから約18時間経過しており, 完全に消化吸収が終了していることを明確に示している. 参考までに, このとき門脈と同時に頸動脈採血を行い, 門脈と動脈の濃度差 (消化管へアミノ酸の出入り) を計算したところ, グルタミンの消化管への取り込みとアラニンの放出が認められたのみで, その他のアミノ酸については両たん白質ともに全く消化管への出入りがなかった. 以上の結果より, 大豆たん白質の効果は消化吸収されたたん白質由来のアミノ酸が門脈を経由して直接肝細胞表面で作用したためであるという可能性は否定された.

大豆たん白質が脂質代謝 (コレステロール, 中性脂肪) を改善することはよく知られている. また, 血中ホルモン, 特にグルカゴン/インスリン比を上昇傾向にさせることもよく知られているが, その栄養効果の全体像についてはまだよく知られていない. 今回, 肝のたん白質代謝, 特にオートファジー性たん白質分解

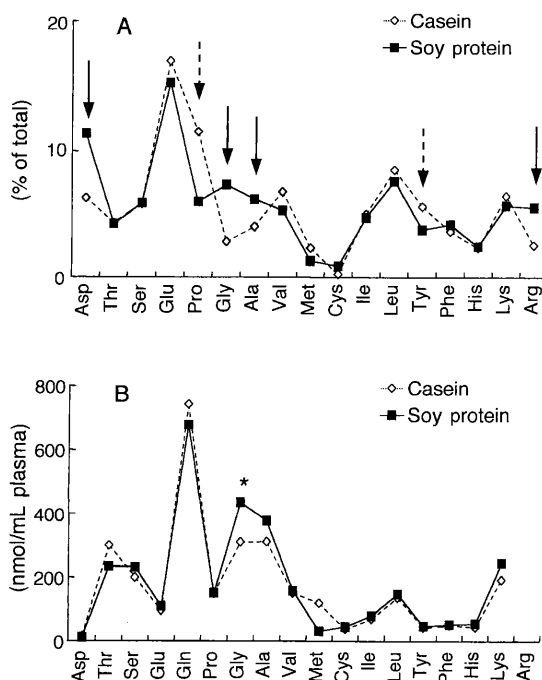


Fig. 4. (A) Amino acid composition of casein (◇) and soy protein (■). Data were cited from Standard Tables of Food Composition in Japan, 4th ed. (1982), and expressed on molar basis. (B) Plasma amino acid pattern of portal vein from rats fed a casein (◇) and a soy protein (■) diets. Blood was withdrawn at the time of perfusion or cell isolation, about 18 h after the removal of last meal. \* $P < 0.05$  vs casein.

に対する大豆たん白質の効果が初めて認められた。近年、特に成人では、肝の代謝回転を支配するのはたん

白質の合成よりむしろ分解であることが指摘されてきている<sup>6)</sup>。今後、この分野のより詳細な検討が望まれる。

## 要 約

大豆たん白質が肝のたん白質代謝、特にオートファジー性たん白質分解に影響を与えるか否かを検討した。Wistar 系雄ラット（約 200 g）を 20% カゼインまたは大豆たん白質食で 2～3 週間ミールフィーディングに馴致し、摂食 1 日後、肝灌流法と単離肝細胞法でたん白質分解速度とアミノ酸、グルカゴンに対する応答性を調べた。灌流開始直後 15 分の Val 放出より得られた *in vivo* たん白質分解速度は大豆たん白質食ではカゼイン食より約 20% 低かった。この時肝重量には有意差がなかったことから、たん白質合成速度も大豆たん白質食で低いことになり、結局代謝回転が低いことが示唆された。肝細胞ではアミノ酸によるたん白質分解の抑制作用は食餌による違いはなかったが、グルカゴンに対する応答性は大豆たん白質食の方が有意に高かった。門脈血中アミノ酸濃度の測定より、これら大豆たん白質の効果はそのアミノ酸組成の違いによる直接的な効果ではないと結論された。以上より、細胞の健康維持に大きな役割を担うオートファジーは食餌たん白質により影響を受けることが初めて示された。

## 文 献

- 1) Mortimore GE, Miotto G, Venerando R and Kadowaki M (1996): Autophagy. In: *Biology of the Lysosome*. (Subcellular Biochemistry Vol. 27) Lloyd JB and Mason RW, eds., Plenum Press, New York, pp. 93-135.
- 2) Hutson NJ, Lloyd CE and Mortimore GE (1982): Degradation of intra- and extrahepatic protein by livers of normal and diabetic mice: Differential responses to starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 1737-1741.
- 3) Niioka S, Goto M, Ishibashi T and Kadowaki M (1998): Identification of autolysosomes directly associated with proteolysis on the density gradients in isolated rat hepatocytes. *J Biochem*, **124**, 1086-1093.
- 4) Deutz NEP, Bruins MJ and Soeters PB (1998): Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *J Nutr*, **128**, 2435-2445.
- 5) Mortimore GE, Pösö AR, Kadowaki M and Wert JJ Jr. (1987): Multiphasic control of hepatic protein degradation by regulatory amino acids. General features and hormonal modulation. *J Biol Chem*, **262**, 16322-16327.
- 6) Waterlow JC (1995): Whole-body protein turnover in humans -past, present, and future. *Annu Rev Nutr*, **15**, 57-92.