

分離大豆たん白質エタノール可溶性画分の 降コレステロール作用

高嶋慎一郎・佐藤博慶・津田恭征・佐藤匡央・今泉勝己*

九州大学大学院生物資源環境科学府

Hypocholesterolemic Effect of Ethanol Extract of Soy Protein Isolate

Shinichiro TAKASHIMA, Hiroyoshi SATO, Yasuyuki TSUDA,
Masao SATO and Katsumi IMAIZUMI

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

ABSTRACT

It has been reported that isoflavones in soy protein isolate (SPI) have hypocholesterolemic effect, but the mechanisms remain unclear. The structure of isoflavones is similar to that of estrogen, so they were called as phytoestrogen. In this study, we have investigated the hypocholesterolemic effect of dietary isoflavones in exogenously hypercholesterolemic (ExHC) rats. When isoflavones were fed to ExHC rat, serum cholesterol level was decreased. The mRNA abundance of cholesterol 7 α -hydroxylase and apolipoprotein E (Apo E) were decreased and of cytochrome *c* oxidase subunit VII related protein (COX7RP), which is estrogen responsive gene because estrogen response element (ERE) is present in promoter region of the gene, was increased. It has been also reported that binding of the estrogen or phytoestrogen, isoflavones, to the nuclear estrogen receptor, ER α or ER β , initiates interaction with ERE and activation of gene transcription. These results suggest that the hypocholesterolemic effect of dietary isoflavones is the estrogen like effect and isoflavones can contribute to the regulation of gene expression via estrogenic action, which is involved in lipid metabolisms. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 110-114, 2000.

Key words : isoflavones, serum cholesterol, mRNA abundance, cytochrome *c* oxidase subunit VII related protein, exogenously hypercholesterolemic rat

大豆たん白質はカゼインなどの動物性たん白質に比

べて、血清コレステロール濃度を低下させるといわれている。その有効成分として、難消化性ペプチド、サボニン、イソフラボン、レシチンなどが考えられてい

*〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

る¹⁻⁴⁾。この中でもイソフラボンは特に有力な因子とされており、様々な実験動物で血清コレステロール濃度の低下が観察されている。イソフラボンは大豆中に多く含まれており、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインの3種のアグリコンとそれぞれの配糖体が数種存在している。

一方、閉経後の女性に高脂血症や動脈硬化症がよく観察されるが、これは閉経に伴う生体内のエストロゲン量の減少によるものであるといわれており、エストロゲン補充療法 (estrogen replacement therapy) によってこれらの疾患は改善される⁵⁾。イソフラボンは、その化学構造が性ホルモンであるエストロゲンに類似しており、また血清コレステロール濃度低下作用を有するなど、エストロゲン様に作用することからフィトエストロゲンとも呼ばれている。しかしながらイソフラボンのエストロゲン様作用には組織選択性があり、特に肝での作用については十分な解明には至っていない。

筆者らは、大豆たん白質からイソフラボン画分を除去した食事を ExHC ラットに与えると血清コレステロールが上昇するとともに、cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) および LDL レセプター mRNA が低下することを観察した⁶⁾。そこで本実験では、ExHC ラットを用いて、カゼインをたん白質 (200 g/kg 食事) 源とする食事に分離大豆たん白質 (200 g/kg 食事) に含まれる量のイソフラボンを添加し、血清コレステロール濃度、肝の脂質代謝関連遺伝子およびエストロゲン応答遺伝子の mRNA レベルに及ぼす影響について検討した。なお大豆胚軸水抽出物 (ソヤフラボン E) をイソフラボン源とした。

方 法

実験 1

14 週齢の雄 ExHC ラットを、食事たん白質としてカゼインを用いた群 (Casein 群)、SPI を用いた群 (SPI 群)、カゼインにソヤフラボン E (大豆胚軸水抽出物) を SPI 中のイソフラボン相当量添加した群 (Casein+¹ 群) の3群に分け、0.5% コレステロール、10% オリーブ油を含む AIN-93G 純化食で2週間飼育した。またイソフラボン含量の測定は Kudou and Okubo⁷⁾ の HPLC を用いた方法で行った。屠殺は午前0時に断頭により行い、直ちに肝ミクロソームを調製した。屠殺の3日前に7時間絶食させ午後0時に尾静脈より採血した。

実験 2

Casein 群、SPI 群およびソヤフラボン E から大久保ら⁸⁾ の方法でイソフラボンを抽出したものをカゼイン

に添加した群 (Casein+² 群) を設け、実験1と同様の条件で飼育した。

脂質代謝関連遺伝子の mRNA レベルの測定

組織からグアニジンチオシアネート-超遠心法⁹⁾ で total RNA を調製した。mRNA 発現量の定量はノーザンブロット-ハイブリダイゼーション法¹⁰⁾ により行った。すなわち、調製した total RNA をアガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンフィルター (Hybond-XL, Amersham Pharmacia) にブロッティングし、UV 照射を行い RNA をメンブレンに固定した。次に、目的とする mRNA の cDNA を Multiprime Labeling System (Amersham Pharmacia) により [³²P] で標識したものをプローブとし、メンブレンに固定された mRNA とハイブリダイズさせた。放射活性の測定は、イメージングプレートを用いたバイオイメージングアナライザーで行った。

CYP7A 活性

CYP7A 活性は Chiang ら¹¹⁾ の方法で測定した。基質となるコレステロールは内因性のものとした。すなわち、調製したミクロソームを 0.015% CHAPS を含むリン酸緩衝液に懸濁させ、反応開始剤として β -NADPH を加え 37°C で 30 分間インキュベーションし、コレステロールを 7 α -hydroxycholesterol に変換させた。反応はコール酸ナトリウムを加えて停止させた。次にコレス

Table 1. Composition of isoflavones in SPI and Soyaflavone E

	SPI ¹	Soyaflavone E ²
	mol %	
Daidzin	9.0	33.9
Genistin	13.5	8.1
Glycitin	0.4	19.5
Malonyldaidzin	ND	2.9
Malonylgenistin	ND	0.6
Malonylglycitin	0.1	0.5
Acetyldaidzin	51.6	16.5
Acetylgenistin	0.2	1.9
Acetylglycitin	0.6	8.2
Daidzein	8.9	2.6
Genistein	13.4	0.5
Glycitein	2.2	4.7
Total	100.0	100.0

¹ soy protein isolate

² soy hypocotyl extract

テロールオキシダーゼ (Boehringer Mannheim) を加え 30 分間インキュベーションし, 7α -hydroxycholesterol を 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one に変換させた. これをヘキサンで抽出し, HPLC で測定した. またスタンダードとして, 7α -hydroxycholesterol (Steraloids) 標品をサンプルと同じ条件で酸化, 抽出したものを HPLC に供し, 検量線を作成した. なお保持時間約 12 分に 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one のピークが観察された.

Cytochrome c oxidase subunit VII related protein (COX7RP) のクローニング

COX7RP はその遺伝子のプロモーター領域にエストロゲン応答配列 (ERE) を有しており, エストロゲンおよび核内のエストロゲン受容体 ($ER\alpha$, $ER\beta$) を介して, その発現が制御されるたん白質である¹²⁾. そこでヒト COX7RP の cDNA 配列をもとにプライマーを設

計し, このプライマーを用いて SD ラットの肝から調製した total RNA より RT-PCR 法で COX7RP の cDNA を TA クローニングした. 得られた cDNA を用い, ハイブリダイゼーション法で各組織の mRNA レベルを測定した.

結果と考察

イソフラボン組成

SPI とソヤフラボン E のイソフラボン組成は異なっていた (Table 1). SPI, ソヤフラボン E ともにダイゼイン類が多く含まれており, それぞれ約 70%, 約 56% であった. またソヤフラボン E は, 特にグリシテイン類が多かった (約 30%).

血清コレステロール濃度

実験 1 では, 血清コレステロール濃度は Casein 群に比べて SPI 群, Casein⁺ 群で有意に低い値であった (Fig. 1). また純度を上げたイソフラボンを食事に添加した実験 2 においても同様に, Casein 群に比べて SPI 群, Casein⁺ 群で有意に低い値であった (結果は示していない). このことは, SPI の降コレステロール作用を有する成分の一つがイソフラボンであることを示している.

脂質代謝関連遺伝子の mRNA レベル

肝における CYP7A とアポリポプロテイン E (アポ E) の mRNA レベルは Casein 群に比べて SPI 群, Casein⁺ 群で低い値を示した (Fig. 2). 一方実験 2 では Casein⁺ 群でアポ E の mRNA レベルは高い傾向を示した (結果は示していない). LDL レセプター mRNA レベルは群間で差が見られなかった.

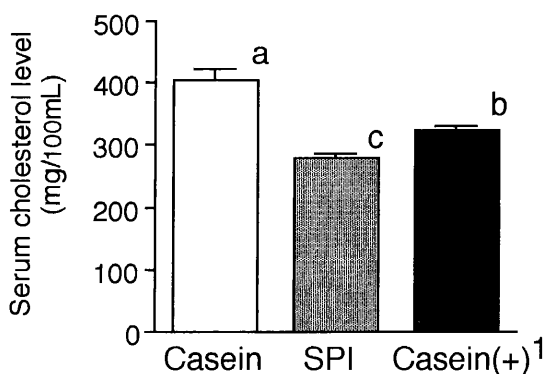


Fig. 1. Serum cholesterol level of ExHC rat fed casein, SPI, casein (+)¹ for 2 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 5 rats per group. ^{abc}Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

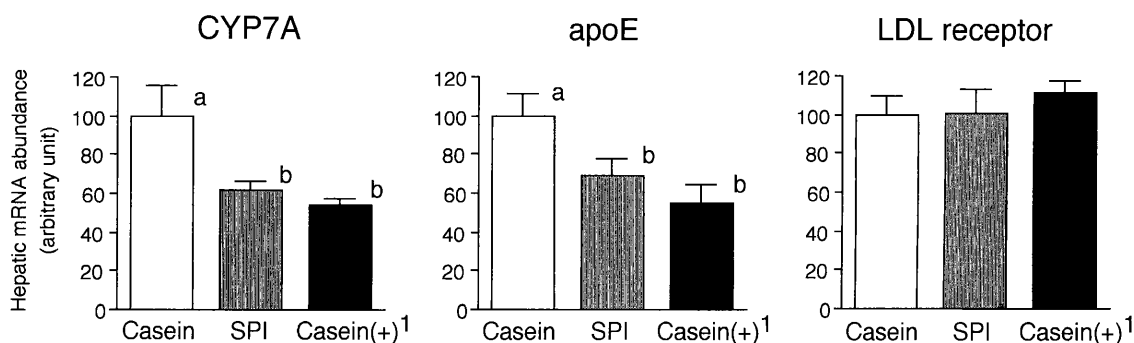


Fig. 2. Hepatic mRNA abundance of ExHC rat fed casein, SPI, casein (+)¹ for 2 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 5 rats per group. ^{ab}Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

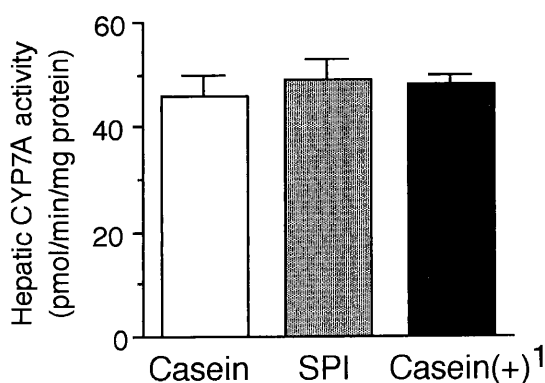


Fig. 3. Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) activity of ExHC rat fed casein, SPI, casein (+)¹ for 2 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 5 rats per group.

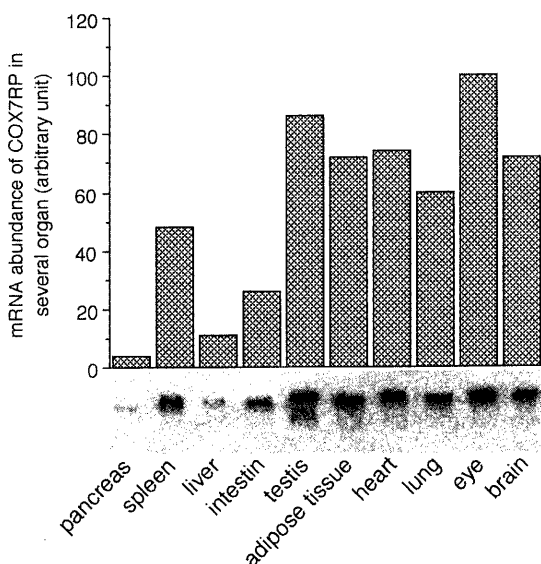


Fig. 4. Cytochrome c oxidase subunit VII related protein (COX7RP) mRNA abundance in several organs of male SD rat.

CYP7A 活性

CYP7A 活性は群間で差が見られなかった (Fig. 3).

COX7RP の発現

COX7RP は肝その他の広範囲の臓器で発現していた (Fig. 4). 肝での COX7RP の mRNA レベルは Casein +² 群, SPI 群, Casein 群の順に高い値であった (Fig. 5). このことは, 食事イソフラボンが肝でエストロゲンのアゴニストとして作用し得ることを示している.

これらの結果より, ExHC ラットにおいて食事から摂取したイソフラボンが, 肝でエストロゲン様に作用し, 脂質代謝関連遺伝子の発現制御等を介して, 血清コレステロール濃度を低下させる可能性が示唆された.

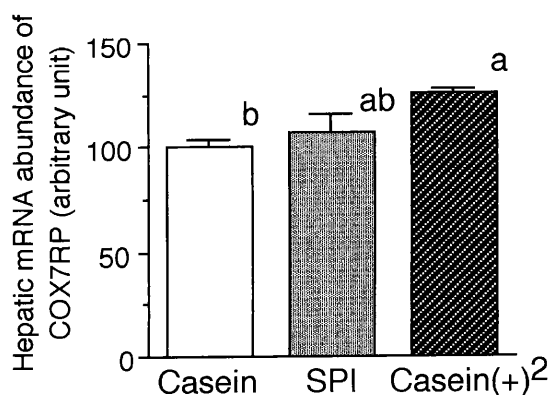


Fig. 5. Hepatic COX7RP mRNA abundance of ExHC rat fed casein, SPI, casein (+)² for 2 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 5 rats per group. ^{ab}Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

要 約

外因性高コレステロール血症 (ExHC) ラットを用いて, 分離大豆たん白質 (SPI) のエタノール可溶性成分が血清コレステロール濃度低下作用を有することを報告した. SPI からのエタノール可溶性画分にはイソフラボンが含まれ, それがエストロゲン様作用を介して降コレステロール作用を発現している可能性がある. そこで, 本実験ではこの可能性について検討した. カゼインあるいは SPI をたん白質源とする純化食, カゼインをたん白質源としイソフラボンを含む大豆胚軸抽出物 (ソヤフラボン E) を添加した純化食の 3 種類の食事を調製し, 雄性 ExHC ラットに 2 週間給餌した.

SPI およびソヤフラボン E からのエタノール抽出物に含まれるイソフラボン組成を HPLC によって分析した。脂質濃度と脂質代謝関連遺伝子の mRNA レベルを測定した。さらにエストロゲン応答配列を持つ遺伝子 (COX7RP) の cDNA をクローニングし、その mRNA レベルを測定した。SPI とソヤフラボン E について分析したイソフラボンのグリコン組成は異なっていた。SPI あるいはソヤフラボン E とカゼインを含む食事を摂取したラットの血清コレステロール濃度は、カゼインを含む食事を摂取した場合と比較して、低下した。apoE と 7α -ヒドロキシラーゼの肝 mRNA レベルは SPI およびソヤフラボン E 摂取群で低下した。COX7RP は肝その他の組織で発現していた。肝における COX7RP の mRNA レベルはソヤフラボン E 添加群で他群と比較して高かった。従って、食事として摂取したイソフラボンは、エストロゲン様作用を介して、コレステロール代謝に関与している可能性がある。

文 献

- 1) Sugano M and Koba K (1993) : Dietary protein and lipid metabolism: a multifunctional effect. *Ann N Y Acad Sci*, **676**, 215-22.
- 2) Sidhu GS and Oakenfull DG (1986) : A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *Br J Nutr*, **55**, 643-649.
- 3) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA and Chait A and Leboeuf RC (1998) : Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, **128**, 954-959.
- 4) Wilson TA, Meservey CM and Nicolosi RJ (1998) : Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate. *Atherosclerosis*, **140**, 147-153.
- 5) Urabe M, Yamamoto T, Kashiwagi T, Okubo T, Tsuchiya H, Iwasa K, Kikuchi N, Yokota K, Hosokawa K and Honjo H (1996) : Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocrine J*, **43**, 737-742.
- 6) Ni WH, Yoshida S, Tsuda Y, Nagao K, Sato M and Imaizumi K (1999) : Ethanol-extracted soy protein isolate results in elevation of serum cholesterol in exogenously hypercholesterolemic rats. *Lipids*, **34**, 713-716.
- 7) Kudou S and Okubo K (1991) : Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem*, **55**, 2227-2233.
- 8) 大久保一良, 高橋勝美 (1982) : 大豆配糖体成分の含量, 主成分との相互作用およびその呈味性について. 食品開発, **17**, 39-46.
- 9) Chirgwin JM, Plzbyla AE, McDonald RJ and Rutter WJ (1979) : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299.
- 10) Thomas PS (1983) : Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol*, **100**, 255-266.
- 11) Chiang JYL (1991) : Reversed-phase high-performance liquid chromatography assay of cholesterol 7α -hydroxylase. *Methods Enzymol*, **206**, 483-491.
- 12) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H and Muramatsu M (1998) : Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol*, **18**, 442-449.