

大豆たん白質による血漿グルカゴン濃度の上昇機構の解明： 特にグルカゴン様ペプチド-1 の関与について

長谷川 信*・加藤宏尚・伊庭早苗・山本亜弥・元木 徹

神戸大学大学院自然科学研究科

Mechanism of Elevation in Plasma Glucagon Concentration by Soybean Protein Intake, with Reference to Changes in the Concentration of Plasma Glucagon-like Peptide-1

Shin HASEGAWA, Hironao KATO, Sanae IBA, Aya YAMAMOTO and Tohru MOTOKI

Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe 657-8501

ABSTRACT

The present study was conducted to elucidate the mechanism of elevation in plasma glucagon concentration by soybean protein intake in chicks, with reference to changes in the concentration of plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Firstly, chicks were fed purified diets containing two types of protein (casein and soy protein isolate), and the effects of dietary protein types on growth performance, liver triglyceride content, and the concentrations of plasma triglyceride, free fatty acid, glucose, glucagon, insulin and GLP-1 were examined. Soybean protein intake significantly reduced adipose tissue weight, liver weight, liver triglyceride content and plasma triglyceride concentration, and had tendencies to reduce the concentrations of free fatty acid and glucose, although it had tendencies to raise the concentrations of plasma glucagon and GLP-1, and glucagon/insulin ratio. Secondly, chicks were administered intravenously with GLP-1 (7-36) amide and its fragments, namely GLP-1 (7-16), GLP-1 (17-26) and GLP-1 (27-36) amide. All the fragments had no effect on the concentrations of plasma free fatty acid, glucose, glucagon and insulin, although GLP-1 (7-36) amide had tendencies to raise the concentrations of plasma free fatty acid, glucose and glucagon, and glucagon/insulin ratio. From the results obtained above, the mechanisms by which soybean protein intake affects the plasma glucagon concentration were discussed. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 122-127, 2000.

Key words : soybean protein diet, plasma glucagon concentration, GLP-1 (7-36) amide, glucagon/ insulin ratio, body fat accumulation, liver triglyceride content

*〒 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

種々の動物において大豆たん白質摂取により体脂肪蓄積が抑制されることが広く知られているが、哺乳動物の場合、血中のグルカゴン濃度或いはグルカゴン/インスリン比が上昇し¹⁻³⁾、その増加するグルカゴンの中に腸管グルカゴンが含まれることが推察されてきた⁴⁾。著者等は、鶏においても大豆たん白質は哺乳動物におけると同様の生理的効果を有すること、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の鶏への投与が大豆たん白質摂取時の種々の生理的変動とほぼ一致する現象、特に血漿グルカゴン濃度の上昇を引き起こす傾向があること等から、大豆たん白質摂取時に増加する腸管グルカゴンの一つとして GLP-1 を推察した⁵⁾。さらに著者等は、これまでの一連の研究に基づき、鶏雛の脳室内に GLP-1 を投与すると摂食が著しく抑制されることが、この抑制作用に GLP-1 の N- 末端のヒスチジン或いは C 末端の 3 アミノ酸残基が重要であること等を示唆している^{6,7)}。そこで、今回の研究目的は、まず第一に、大豆たん白質摂取時の血中 GLP-1 濃度の変動を調べることに、大豆たん白質による血漿グルカゴン濃度上昇機構への GLP-1 の関与、ひいては大豆たん白質による体脂肪蓄積の抑制機構への GLP-1 の関与を明らかにすることにある。さらに第二に、体脂肪蓄積抑制誘導因子と推察される GLP-1 のカルボキシル末端やアミノ末端に関連する数種類のペプチドを鶏に投与してその生理活性発現の機構を明らかにすることにより、体脂肪蓄積抑制に有効な生理活性短鎖ペプチドの開発に着手することにある。

方 法

供試鶏として単冠白色レグホン種雄初生雛を用い、飼料および水は自由摂取とした。

まず、初生から 8 日齢まで市販飼料を給与後、Table 1 に示した 2 種類のたん白質飼料（たん白質源：大豆たん白質或いはカゼイン）で 27 日齢まで飼育後、断頭屠殺により採血すると共に、肝並びに腹腔内脂肪組織を摘出し重量を測定した。血液から血漿を分離し、トリグリセリド、遊離脂肪酸、血糖値、グルカゴン、インスリンおよび GLP-1 の濃度をそれぞれ測定した。血漿トリグリセリド濃度の測定は、Fletcher の方法⁹⁾に従って行った。また、血漿の遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン、インスリンおよび GLP-1 の濃度測定は、それぞれ市販キット（NEFA- テストワコー、和光純薬；グルコース CII- テストワコー、和光純薬；グルカゴンキット「第一」、第一ラジオアイソトープ研究所；インシュリン・ダイナパック、ダイナボット及び EIAH-

7168 EIA for GLP-1 (7-36), Peninsula Laboratories) を用いて行った。さらに、Folch らの方法¹⁰⁾ を用いて肝から総脂質を抽出し、上述の血漿トリグリセリド濃度の測定法に従って、総脂質中のトリグリセリド量を測定した。

次に、初生から 24 日齢まで市販飼料で飼育後、一羽当たり 0.1 μg の GLP-1 (7-36) アミドあるいはその断片 [GLP-1 (7-16), GLP-1 (17-26) および GLP-1 (27-36) アミド] を静脈内に投与し、投与 10 分後に採血し血漿を分離して、上述と同様の方法で、血漿の遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴンおよびインスリンの濃度をそれぞれ測定した。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Experimental group	
	Casein	Soybean protein
	g/100 g diet	
Soy protein isolate ¹	—	20.81
Casein ²	19.15	—
DL-Methionine	0.31	0.27
L-Arginine-HCl	0.97	—
Glycine	0.36	—
Glucose	53.94	54.20
Soybean oil	2.00	2.00
Cellulose powder	15.51	14.96
Vitamin mixture ³	1.51	1.50
Mineral mixture ⁴	6.05	6.05
Choline-HCl	0.20	0.20
Butylated hydroxytoluene	0.01	0.01
Crude protein (%)	18	18
Metabolizable energy (kcal/100 g diet)	285	285

¹Containing 85.2% crude protein, and being supplemented by DL-methionine at the level of 1.5% of crude protein.

²Containing 85.5% crude protein, and being supplemented by DL-methionine, L-arginine-HCl and glycine at the level of 1.9%, 5.9% and 2.2% of crude protein, respectively⁸⁾.

³per kg of diet : (in mg) thiamine-HCl 6.0 ; riboflavin 9.0 ; niacin 50.0 ; Ca-D-pantothenate 20.0 ; pyridoxine-HCl 8.0 ; biotin 0.3 ; folic acid 2.0 ; menadione sodium bisulfite 2.0 ; inositol 1,000 ; B₁₂ 20 μg ; A palmitate 25,000 USP units ; D₃ 1,200 IU ; d- α -tocopheryl acetate 17.6 IU.

⁴g per kg of diet : CaCO₃ 19.1 ; Ca(H₂PO₄) $\cdot$ 2H₂O 21.15 ; K₂HPO₄ 11.2 ; NaCl 6.0 ; MgCO₃ 2.08 ; FeSO₄ 0.2 ; ZnCO₃ 0.18 ; CuSO₄ $\cdot$ 5H₂O 0.015 ; MnSO₄ $\cdot$ H₂O 0.51 ; KI 0.04 ; NaMoO₄ $\cdot$ 2H₂O 0.0025.

結果と考察

まず、2種類（大豆たん白質およびカゼイン）のたん白質飼料を成長中の鶏に給与し、飼料中のたん白質源の違いが血中のトリグリセリド、遊離脂肪酸、血糖値、グルカゴン、インスリンおよびGLP-1の濃度に及ぼす影響を調べた。加えて、腹腔内脂肪組織量や肝トリグリセリド含量に及ぼす影響も合わせて調べた。その結果、大豆たん白質の摂取により、カゼインの摂取に比べて、腹腔内脂肪組織量、肝重量、肝トリグリセリド含量および血中トリグリセリド濃度に有意な減

少が、血中の遊離脂肪酸濃度および血糖値に減少の傾向がそれぞれ認められた (Table 2)。また、血中のグルカゴンおよびGLP-1の濃度とグルカゴン/インスリン比が上昇する傾向が認められた (Table 3)。この結果は、ラットにおいて大豆たん白質食では、カゼイン食に比べ、血中グルカゴン濃度（あるいはグルカゴン/インスリン比）が高くなることを示唆した菅野ら¹⁻³⁾の報告とはほぼ一致するものである (Fig. 1)。

次に、GLP-1 (7-36) アミドあるいはその断片の静脈内投与が、血中の遊離脂肪酸、血糖値、グルカゴンおよびインスリンの各濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、GLP-1 (7-36) アミドは、血中の遊離脂肪酸濃度、血糖値、グルカゴン濃度およびグルカゴン/インスリン比を上昇させる傾向を有することが確認されたが (Fig. 2)、その断片はいずれも有意な影響を及ぼさないことが明らかとなった (Table 3)。このような結果は、GLP-1の生理活性発現にそのN-末端のヒスチジン或いはC-末端の3アミノ酸残基が重要であること等を示唆した著者等による報告^{6,7)}と矛盾しないものである。そして、GLP-1が、大豆たん白質摂取時に増加する比較的低分子のグルカゴンの低分子グルカゴンの一つである可能性が高いことが示されたことになり、今後、今回の給与期間より長期にわたって大豆たん白質を給与すれば、これまでに得られている傾向がより顕著に、即ち有意な差として現出されてくる確率は高く、大豆たん白質の摂取による血漿G/I比の上昇機構へのGLP-1の関与、ひいては血漿G/I比の上昇機構の解明が期待できる。

Table 2. Effect of dietary protein types on growth performance, liver triglyceride content, and the concentrations of plasma triglyceride, free fatty acid and glucose in chicks

	Experimental group	
	Casein	Soybean protein
Feed intake (g/18 days/chick)	365	376
Body weight (g)	243 ± 9 ¹	246 ± 3
Adipose tissue weight (g/100 g BW)	3.1 ± 0.2	1.9 ± 0.2** ²
Muscle weight (g)	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Liver weight (g)	8.1 ± 0.3	7.2 ± 0.1* ²
Liver triglyceride (mg/g)	115 ± 9	81 ± 6*
Plasma triglyceride (mg/100 mL)	111 ± 11	72 ± 10
Plasma glucose (mg/100 mL)	301 ± 31	277 ± 20
Plasma FFA (μEq/100 mL)	115 ± 9	8.1 ± 0.7

¹Values are means ± SEM of five chicks.

²* and **: Significant at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively with respect to casein.

Table 3. Effect of GLP-1 fragments intravenously administrated on the concentrations of plasma glucose, FFA, glucagon and insulin in chicks

	Saline	GLP-1 (7-16)	GLP-1 (17-26)	GLP-1 (27-36) amide
Plasma glucose (mg/100 mL)	255 ± 7 ¹	265 ± 8	277 ± 13	254 ± 12
Plasma FFA (μEq/100 mL)	12.9 ± 1.9	13.3 ± 2.4	14.1 ± 2.0	13.2 ± 2.1
Plasma glucagon (pg/100 mL)	330 ± 29	298 ± 38	309 ± 41	289 ± 33
Plasma insulin (μU/mL)	14.6 ± 0.8	13.1 ± 0.1	12.8 ± 1.0	13.6 ± 0.9
Glucagon / insulin ratio	22.5 ± 0.8	22.7 ± 7.0	24.1 ± 4.2	21.3 ± 5.7

¹Values are means ± SEM of five chicks.

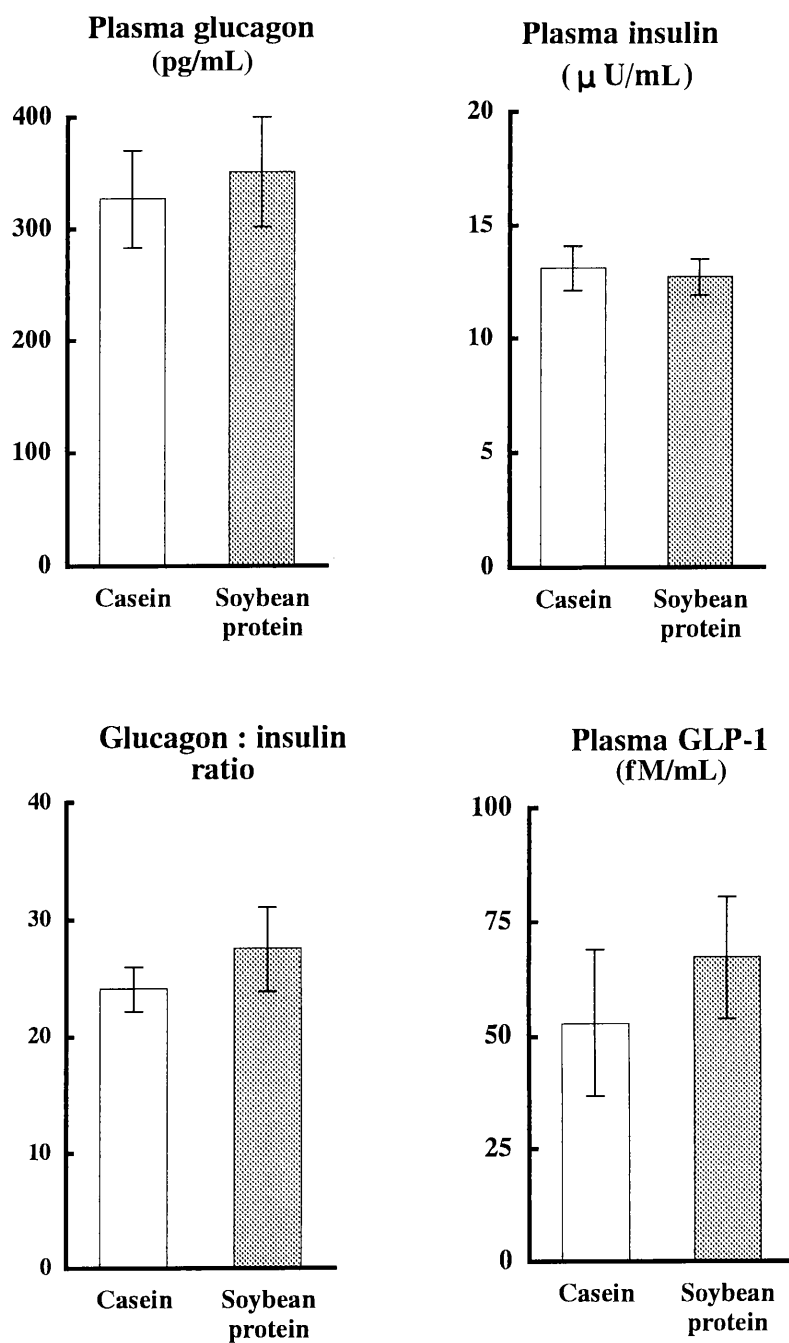


Fig. 1. Effect of dietary protein types on the concentrations of plasma glucagon, insulin and GLP-1 in chicks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM of five chicks.

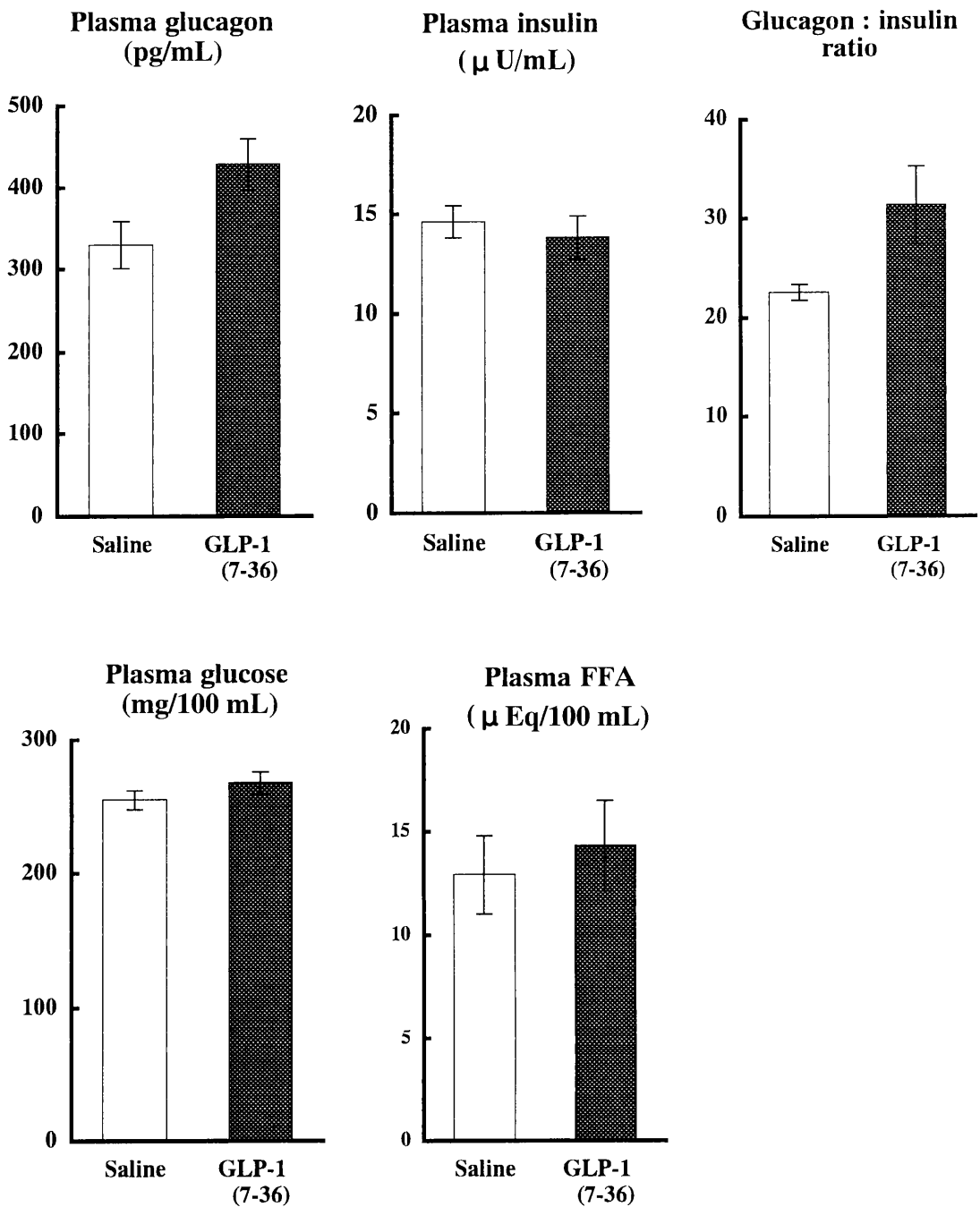


Fig. 2. Effect of GLP-1(7-36) amide intravenously administrated on the concentrations of plasma glucose, FFA, glucagon and insulin in chicks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM of five chicks.

要 約

種々の動物において大豆たん白質摂取により体脂肪蓄積が抑制されることが広く知られているが、哺乳類の場合、血中のグルカゴン濃度あるいはグルカゴン/インスリン比が上昇し、その増加するグルカゴンの中に腸管グルカゴンが含まれることが推察されてきた。本研究の結果、鳥類（鶏）においても大豆たん白質は哺乳類におけると同様の生理的効果を有すること、鶏においては大豆たん白質摂取によりグルカゴンと共にグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の血中濃度が上昇する傾向が認められること、GLP-1の鶏への投与が大豆たん白質摂取時の様々な生理的変動とほぼ同様の現象、特に血漿グルカゴン/インスリン比の増加を引き起こす傾向にあることがそれぞれ明らかにされた。これらのことから、GLP-1が大豆たん白質摂取時の体脂肪蓄積抑制の誘導因子の一つである可能性が推察された。ここで、これまでの我々の一連の研究によって、鶏雛の脳室内にGLP-1を投与すると摂食が著しく抑制されること、この抑制作用にGLP-1のN-末端のヒスチジンあるいはC-末端の3アミノ酸残基が重要であること等が示唆されている。そこで、さらに、GLP-1が関与すると思われる大豆たん白質摂取時の体脂肪蓄積抑制の機構解明に資するべく、GLP-1のN-末端あるいはC-末端に関連する数種類のペプチドを、鶏に投与し血中諸成分の濃度変動の解析を行なうことにより、GLP-1の機能発現に不可欠な構造を推察すると共に、大豆たん白質による血漿グルカゴン濃度の上昇機構について考察した。

文 献

- 1) 菅野道廣 (1987) : コレステロール代謝の調節に関する栄養生化学的研究. 日本栄養・食糧学会誌, **40**, 93-102.
- 2) Sugano M, Ishiwaki K and Nakashima K (1984) : Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats. *Ann Nutr Metabol*, **28**, 192-199.
- 3) Sugano M, Ishiwaki N, Nagata Y and Imaizumi K (1982) : Effects of arginine and lysine addition to casein and soybean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. *Br J Nutr*, **48**, 211-221.
- 4) Nosedá G, Fragiácomi C, Gatti E, Descovich G and Sirtori CR (1982) : Glucagon release following experimental diets in man : effects of soybean and casein enriched diet. *Pharmacol Res Comm*, **14**, 867-878.
- 5) 長谷川 信, 加野浩一郎, 元木 徹 (1998) : 大豆たん白質による血漿グルカゴン濃度の上昇機構の解明. 大豆たん白質研究, **1**, 86-90.
- 6) Furuse M, Bungo T, Shimojo M, Masuda Y, Saito N, Hasegawa S and Sugahara K (1998) : Effects of various N-terminal fragments of glucagon-like peptide-1 (7-36) on food intake in the neonatal chick. *Brain Res*, **807**, 214-217.
- 7) Bungo T, Shimojo M, Masuda Y, Saito N, Sugahara K, Hasegawa S and Furuse M (1999) : Effects of substitution of N-terminal amino acid of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on food intake of the neonatal chick. *Life Sci*, **24**, 295-299.
- 8) Ueda H (1992) : Effects of dietary protein and soybean saponins on plasma cholesterol concentration in chicks. *Animal Sci Technol*, **63**, 793-799.
- 9) Fletcher MJ (1968) : A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chim Acta*, **22**, 393-397.
- 10) Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH (1957) : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.