

高脂肪食摂取により生じる肥満およびインスリン抵抗性と 大豆たん白質摂取との関連

角田伸代・藤兼裕子・金 賢珠・江端みどり・池本真二*

城西大学薬学部

Effect of Soy Protein Intake on High-fat Induced Obesity and Insulin Resistance

Nobuyo TSUNODA, Yuko FUJIKANE, Hyounju KIM, Midori EBATA
and Shinji IKEMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakato 350-0295

ABSTRACT

High-fat diet feeding leads to obesity and insulin resistance. Recently, it was reported that sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) is involved in this mechanism of high-fat induced obesity and insulin resistance. SREBP-1c is an important factor regulating cholesterol and fatty acid metabolism. Some reports suggested soy protein (SPI) also has the effect of decreasing plasma cholesterol levels. Therefore, SPI may modulate the effect of high-fat on obesity and insulin resistance and/or SREBP-1c expression level. Furthermore, our previous study demonstrated levels of high-fat induced obesity and insulin resistance were different by types of oil. In this study, we investigated whether SPI intake modulates levels of obesity and insulin resistance induced by high-fat diets composed of three different oils (safflower oil, fish oil, palm oil). No significant effects are on body weight, adipose tissue weight and glucose tolerance tests by SPI intake. But insulin tolerance tests deteriorated in mice fed high-safflower oil diets contained SPI (S-SPHF) compared with mice fed high-safflower oil diets contained casein (S-HF). S-SPHF-fed mice had high plasma glucose levels compared with S-HF-fed mice while no difference of plasma insulin levels was observed. These results indicate that S-SPHF-fed mice may produce insulin resistance causing decreased glucose uptake by the peripheral tissues. Furthermore, we found that insulin resistance in S-SPHF-fed mice may be caused by decreased glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA in white adipose tissue. But it is remained to clear which tissues (skeletal muscle or adipose tissue or liver) relate to insulin resistance. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 81-85, 2002.

*〒350-0295 坂戸市けやき台1-1

Key words : soy protein(SPI), oils, obesity, insulin resistance

高脂肪食を摂取すると肥満およびインスリン抵抗性を生じるが、その発症機序に転写因子であるSREBP-1cが関与していることが近年示唆されている^{1, 2)}。この転写因子は、コレステロールおよび脂肪酸合成を調節することにより、脂質代謝の恒常性を維持する重要な役割を果たしていると考えられている³⁾。一方で、大豆たん白質が血清コレステロール低下作用を有しているとの報告があり^{4, 5)}、高脂肪食摂取によって生じる肥満およびインスリン抵抗性の発症に大豆たん白質が影響を与える可能性は大きい。また、これまでの我々の研究により、高脂肪食によって生じる肥満およびインスリン抵抗性の程度は油脂の種類によって異なることが分かっている⁶⁾。そこで、本研究では、脂肪酸組成の異なる3種類の油脂を用いて作成した高脂肪食をマウスに約3ヶ月間摂取させた時に生じる肥満、高インスリン血症、高脂血症、インスリン抵抗性に及ぼす大豆たん白質の影響について検討した。

方 法

食餌組成

油脂として、サフラワー油 (S)、パーム油 (P)、魚油 (F) を用い、次の3通りの餌を作成した。カゼインをたん白質源とした脂肪エネルギー比20%の高炭水化物食 (S-HC, P-HC, F-HC)、カゼインをたん白質源とした脂肪エネルギー比50%の高脂肪食 (S-HF, P-HF, F-HF)、大豆たん白質をたん白質源とした脂肪エネルギー比50%の高脂肪食 (S-SPHF, P-SPHF, F-SPHF) の計9種類の餌を作成し実験に用いた。これらの食餌組成をTable 1に示した。

飼育および測定項目

作成した餌をそれぞれ7週齢のC57BL/6J雄マウスに14週間摂取させた。毎週、体重測定を行うとともに、9週目に糖負荷試験 (GTT)、13週目にインスリン負荷試験 (ITT) を行い、屠殺時に、血中パラメーターの分析、および肝臓、褐色・白色脂肪組織、筋肉における脱共役たん白質 (UCPs)、糖輸送体 (GLUT4) のmRNA発現量の測定を行った。

経口糖負荷試験 (GTT)

一晩 (11時間) 絶食の後、空腹時血糖値を測定した。その後、D-グルコース (1 mg/g BW) を経口投与し、30分、60分、120分後の血糖値を測定した。血漿グルコースの測定は、デキスターZII (三共) を用いて行った。

Table 1. Composition of the experimental diets

Components (%)	High-carbohydrate (S-HC, F-HC, P-HC)	High-fat (S-HF, F-HF, P-HF)	High-fat (SPI) (S-SPHF, F-SPHF, P-SPHF)
Oil	8.0	25.0	25.0
Casein	20.0	25.0	
Soy protein (SPI)			25.0
Sucrose	10.4	13.0	13.0
β -starch	38.9	18.6	18.6
α -starch	13.0	6.2	6.2
Vitamin mix	1.0	1.3	1.3
Mineral mix	3.5	4.4	4.4
Cellulose powder	5.0	6.3	6.3
L-cystin	0.3	0.4	0.4
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.0016	0.0050	0.0050
Energy (kcal/100 g)	374.0	464.1	464.1
Fat energy (kcal/100 g)	73.7	230.3	230.3
(%)	19.7	49.6	49.6

インスリン負荷試験 (ITT)

まず、摂食時血糖値を測定した。その後、インスリン (ヒューマリンR, 日本イーライリリー) をマウスの腹腔内に投与 (0.75 mU/g BW) し、15分、30分、60分、90分後の血糖値を測定した。血漿グルコースの測定は、デキスターZII (三共) を用いて行った。

遺伝子発現量の測定

屠殺時に採取し凍結した臓器から、TRIZOL Reagent (Invitrogen) を用いてRNAを精製した。RNA 20 μ gをグリオキサルで変性した後、1%アガロースゲルにて泳動し、ナイロンフィルターに転写した。UVクロスリンクしたナイロンフィルターに、³²P-dCTPで標識した各種プローブをハイブリダイゼーションさせ、洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。シグナルをスキャナーで取り込み、NIHイメージを用いて定量した。

統計処理

全ての統計処理はWindowsのStatView J-5.0を用いた。各群間のデータの分散分析を行い、FisherのPLSDにより有意差検定を行った。測定値は危険率5%をもって有意とした。

結果と考察

体重は、これまでの報告と一致して、サフラワー油およびパーム油を用いると、高炭水化物食群 (HC) に比べ、高脂肪食群 (HF) および高脂肪食にSPIを添

Table 2. Body weight and organ weights

	Initial BW	Final BW	WAT weight	Liver weight	BAT weight
	g	g	g	g	g
S-HC	21.9±0.3	31.8±0.7	0.82±0.06	1.61±0.04	0.12±0.01
S-HF	22.1±0.4	41.5±1.3***	2.26±0.17***	1.76±0.11	0.19±0.01*
S-SPHF	21.6±0.2	42.2±1.3***	2.18±0.19***	1.87±0.16	0.18±0.01
F-HC	21.4±0.3	33.2±0.9	1.23±0.14	1.59±0.04	0.15±0.02
F-HF	21.4±0.3	30.0±1.4	1.00±0.20	1.53±0.08	0.12±0.02
F-SPHF	22.2±0.3	29.9±1.3	0.88±0.14	1.58±0.06	0.11±0.02
P-HC	22.1±0.2	34.2±1.1	1.15±0.09	1.64±0.03	0.14±0.02
P-HF	21.2±0.1	39.9±1.3**	2.43±0.11***	1.74±0.15	0.16±0.02
P-SPHF	22.0±0.2	40.3±1.4**	2.28±0.17***	1.70±0.23	0.18±0.02

Valuse are means±SE. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ for HC in individual oils.

Table 3. Plasma lipid concentration

	TC	TG	NEFA
	mg/100 mL	mg/100 mL	mEq/L
S-HC	106±2	43±4	0.20±0.04
S-HF	153±6***	13±1***	0.26±0.02
S-SPHF	156±6***	18±1***	0.27±0.04
F-HC	56±3	15±1	0.13±0.02
F-HF	80±4**	7±1*	0.25±0.02
F-SPHF	73±3**	9±1	0.25±0.02
P-HC	120±3	28±4	0.28±0.05
P-HF	170±1***	14±2***	0.32±0.03
P-SPHF	173±2***	25±3##	0.28±0.06

Valuse are means±SE. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ for HC in individual oils. ## $P<0.01$ for HF in individual oils.

Table 4. Blood glucose, plasma leptin and insulin concentration

	Glucose		Leptin	Insulin
	Feeding	Fasting		
	mg/100 mL	mg/100 mL	ng/mL	ng/mL
S-HC	152±10	105±9	11.8±1.8	8±2
S-HF	196±8**	123±7	43.0±3.6***	13±1**
S-SPHF	240±15****#	135±6**	45.7±2.0***	13±1**
F-HC	—	109±8	30.8±4.0	9±1
F-HF	185±3	106±8	14.4±5.4**	5±1*
F-SPHF	186±8	101±4	7.0±2.3**	5±1**
P-HC	—	107±8	17.1±1.9	13±1
P-HF	186±7	136±6**	36.5±6.7**	12±1
P-SPHF	206±9	134±5	39.6±4.1***	13±1

Valuse are means±SE. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ for HC in individual oils. ## $P<0.01$ for HF in individual oils.

加した群 (SPHF) において有意な体重増加が認められた (Table 2)。しかし、HF群とSPHF群を比較すると、体重に大きな差は認められなかった。

屠殺時の臓器重量をTable 2に示した。S-HC群に比べてS-HF群およびS-SPHF群では、有意な白色および褐色脂肪組織重量の増加が認められたが、他の群間では有意な差は認められなかった。

血中脂質濃度の結果をTable 3に示した。総コレステロール (TC) 値は、どの油脂を用いた場合にも、HC群に比較して、HF群およびSPHF群において有意に高かった。一方、中性脂肪 (TG) 値は、TC値とは逆に、サフラワー油と魚油を用いた場合において、HC群に比べ、HFおよびSPHF群において有意な低下が認められた。しかし、HF群とSPHF群で比較すると、P-HF群に比べP-SPHF群でTG値が高いこと以外には、差は認められなかった。

次に、GTTおよびITTについて検討した。GTTは、サフラワー油およびパーム油を用いた場合に、HC群

に比べ、HF群およびSPHF群において悪化していたが、HF群とSPHF群との間には、有意差はなかった (Fig. 1)。ITTは、S-HC群に比較して、S-HF群、S-SPHF群、P-HF群、P-SPHF群で悪化していた (Fig. 2)。P-HF群とP-SPHF群で比較すると差がないが、S-HF群に比べ、S-SPHF群では、ITTの悪化が認められた。

この原因を明らかにするため、さらに、血糖値および血中レプチン値、インスリン値を測定した。その結果をTable 4に示した。S-HF群とS-SPHF群で摂食時インスリン値に差がないにもかかわらず、摂食時血糖値はS-HF群に比べ、S-SPHF群で有意に高かった。空腹時血糖値には、S-HF群とS-SPHF群で差がなかった。このことから、S-SPHF群では組織での糖の取り込みが低下しており、その結果インスリン抵抗性が生じている可能性が示唆された。

そこで、組織での糖の取り込み低下の原因を明らかにするため、細胞内への糖の取り込みに関与するGLUT4およびエネルギー代謝に関与するUCPsの遺伝

子発現量について検討した。白色脂肪組織における GLUT4 および UCP2, 腓腹筋における GLUT4 および UCP3, 肝臓における UCP2, 褐色脂肪組織における UCP1 および UCP2 について検討した。その結果, 白色脂肪組織における GLUT4 mRNA 量が S-HC 群, S-HF 群, S-SPHF 群の順に低下していることが示された (Fig. 3)。この結果より, S-SPHF 群では, 白色脂肪組織における GLUT4 遺伝子の発現量の低下により, 細胞内への糖の取り込みが低下している可能性が示唆された。

SPI の血中コレステロール低下作用や血糖低下作用に関しては様々な報告がなされているが, その結果は

一致していない^{4,7)}。本研究では, 脂肪エネルギー比 50% のサフラワー油と大豆たん白質を同時に長期間摂取すると, インスリン抵抗性をきたすという結果を得た。しかし, 予備的な我々の研究において, S-HF 群に比べて S-SPHF 群では, 肝臓での SREBP1 および FAS mRNA 量が低下することを確認しており, 肝臓における脂質代謝は良好な可能性がある。また, 大豆たん白質は肝臓におけるインスリン抵抗性を改善するという報告⁸⁾もあり, 今後は筋肉や脂肪組織といった末梢組織と肝臓に分けて検討する必要があると思われる。

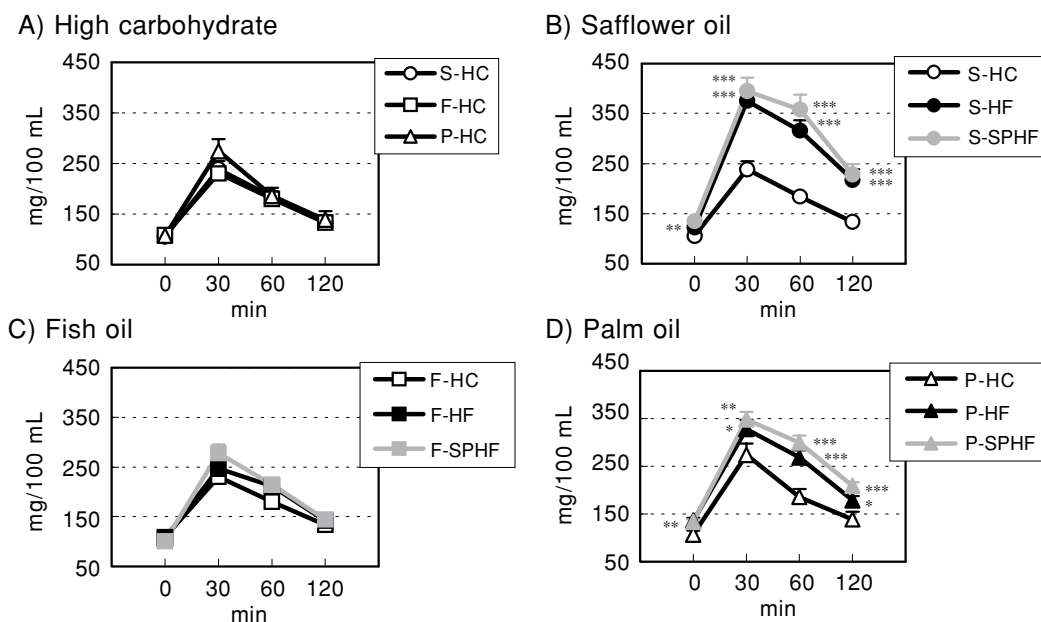


Fig. 1. Effect of SPI on GTT. Values are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for HC in individual oils.

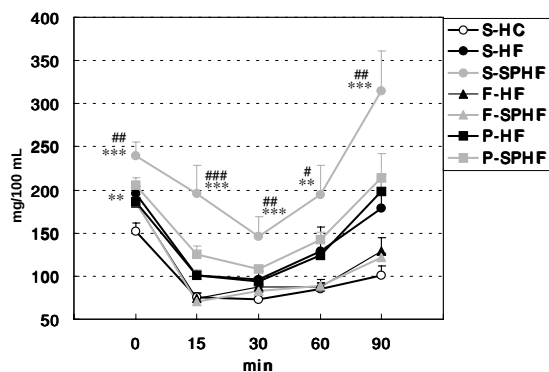


Fig. 2. Effect of SPI on ITT. Values are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for HC in individual oils. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ for HF in individual oils.

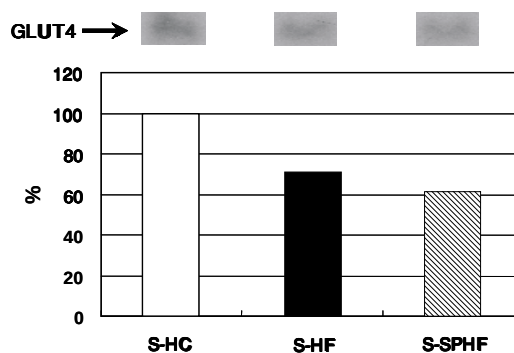


Fig. 3. Effect of SPI on GLUT4 mRNA in white adipose tissue.

要 約

脂肪酸組成の異なる3種類の油脂（サフラワー油、魚油、パーム油）を用いて作成した高脂肪食をマウスに摂取させた時に生じる肥満、高インスリン血症、高脂血症、インスリン抵抗性の程度に及ぼす大豆たん白質（SPI）の影響について検討した。体重、脂肪組織重量、糖負荷試験に対するSPIの大きな影響は認められなかった。しかし、インスリン負荷試験では、脂肪エネルギー比50%のサフラワー油群に比べ、この群にSPIを添加した群ではインスリン感受性が低下していた。摂食時のインスリン値は両群間に差がみられないにも関わらずSPI添加群では血糖値が高いことから、SPI添加群では組織での糖の取り込みが低下しており、インスリン抵抗性が生じている可能性が示唆された。このメカニズムとして、脂肪組織における糖輸送体（GLUT4）遺伝子の発現量がやや低下していることを見いだすことができた。しかし、大豆たん白質は肝臓におけるインスリン抵抗性を改善するという報告もあり、今後は末梢組織と肝臓に分けて検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL and Brown MS (1998): Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev*, **12**, 3182-3194.
- 2) Kim HJ, Takahashi M and Ezaki O (1999): Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J Biol Chem*, **274**, 25892-25898.
- 3) Shimano H (2001): Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*, **40**, 439-452.
- 4) 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.
- 5) Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK and Sirtori CR (2000): Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr*, **130**, 2543-2549.
- 6) Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H and Ezaki O (1996): High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. *Metabolism*, **45**, 1539-1546.
- 7) Lucas EA, Khalil DA, Daggy BP and Arjmandi BH (2001): Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. *J Nutr*, **131**, 211-214.
- 8) Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H and Marette A (2001): Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *Am J Physiol*, **281**, E62-E71.