

DNAマイクロアレイによる大豆たん白質機能の総括的評価

阿部啓子*・松本一朗

東京大学大学院農学生命科学研究科

Comprehensive Evaluation of Soy Protein Functions by DNA Microarray Analysis

Keiko ABE and Ichiro MATSUMOTO

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Feeding rats with soy protein isolate (SPI) for a short term (2 weeks) decreased serum cholesterol and neutral lipid to a similar degree as feeding for a longer term (8 weeks). To better understand the molecular mechanism behind this phenomenon, we carried out a comprehensive analysis of the resulting gene expression profiles, with the expectation that it would contribute to our in-depth understanding of SPI functionalities. Male Wistar rats aged 6 and 12 weeks were dichotomized and fed an SPI or casein diet (control) for 2 weeks. Liver samples were obtained from rats in each diet group and a cRNA sample was prepared for use in DNA microarray analysis. The SPI feeding significantly up-regulated 138 and down-regulated 218 genes in the 6-week old rats, and significantly up-regulated 87 and down-regulated 248 genes in the 12-week old rats. Down-regulated genes included those for enzymes involved in fatty acid anabolism, the same genes down-regulated in longer term SPI feeding (mentioned above), as well as genes for enzymes involved in cholesterol catabolism, which were not down-regulated in the longer-term feeding studies. The present study suggests the possibility that the use of DNA microarray analysis is effective as a method for evaluating physiological functions of food proteins in general as well as those of SPI in particular. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 53-56, 2003.

Key words : soy protein isolate, functions of food proteins, DNA microarray, comprehensive analysis

* 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

生活習慣病のリスクを低減する機能性食品の評価法として従来、特定の代謝産物の定量が行われてきた。すなわち、産物そのものの活性や濃度の測定、あるいは代謝を直接制御する酵素の活性測定などである。

2001年にヒトの全ゲノム配列が解読された。引き続きマウスなどの動物の全ゲノムも判明した。このような状況下、遺伝子情報を利用するポストゲノムサイエンスが活発になってきた。とりわけ、数千種類のDNAを数cm四方のスライドガラスの板に固定化したDNAマイクロアレイ（DNAチップ）が作製された。これを用いれば1回の実験で数千種類の遺伝子の発現量を一挙に定量できる。

DNAマイクロアレイ解析は食品の生理機能を検証するために有効な方法である。本研究では、大豆たん白質（SPI）の機能についてDNAアレイ解析により検証することを目的として行った。とくに、摂取期間（2週間と8週間）が及ぼす影響について検討した。SPIの生理機能に関しては既に多くの研究^{1,2)}がある。例えばSPI摂取ラットでは血中コレステロール濃度が低下することにより動脈硬化の抑制³⁾、また血中トリグリセリド濃度の低下による高脂血症の抑制⁴⁾などが報告されている。さらに、それらの現象に関与する個別の酵素群の増減などの測定もなされている^{5,6)}。しかし、これらはいずれも事前に変化を予測した酵素や産物についてのみ解析対照となる。一方、DNAマイクロアレイ解析では、一度に網羅的な遺伝子発現情報が得られ、事前により予測し得なかった知見を得ることが可能となる。本研究の成果は、SPI摂取による生理機能を包括的に知るのに有効であることが示された。

方 法

動物試験

AIN-93G組成⁷⁾に基づき、たん白質源として、分離大豆たん白質（SPI、不二製油（株））、またはコントロールとしてビタミンフリーカゼイン（オリエンタル酵母（株））をたん白質含量換算で20%配合した食餌を用いた（Table 1）。5週齢および11週齢のSP/Wistar系雄ラット（日本SLC（株））を1週間固型食で予備飼育後、8週間および2週間の試験食飼育を行った。

血中の生化学データ

試験期間終了後、朝08:00より6時間絶食の後にネンブタール麻酔下で開腹し、採血した。ヘパリン処理後、遠心分離して得られた血漿を血液サンプルとした。血液成分は中性脂肪⁸⁾および総コレステロール⁹⁾の分析を行った。

Table 1. Composition of the experimental diets

	groups	
	Casein	SPI
	g/100 g	
Casein	22.40	—
SPI	—	23.20
β -Corn starch	37.65	36.85
α -Corn starch	13.20	13.20
Sucrose	10.00	10.00
Soybean oil	7.00	7.00
Cellulose powder	5.00	5.00
Mineral mixture	3.50	3.50
Vitamin mixture	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.25	0.25
Total	100.0	100.0

DNAマイクロアレイ

肝臓のRNAはISOGEN（（株）ニッポンジーン）を用いて抽出したのち、Affymetrix社の推奨する方法によりcRNAを調製した。rat Genome U34A Array（Affymetrix, Santa Clara, CA）にハイブリダイズした後、洗浄し、蛍光強度を測定した。得られた結果をthe GENECHIP analysis suite softwareを用いて解析した。

2群間の有意差検定はStudent's *t* test（SPSS 10.0J for windows, SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan）を行い、危険率5%以下を有意差とした。また、DNAマイクロアレイの結果は、Affymetrix社cit（<http://www.affymetrix.com>）あるいは、Genome Net（<http://www.genome.ad.jp>）を用いて遺伝子検索および機能検索を行った。

結果と考察

SPI摂取ラットの血中生化学データ

Fig. 1に示すように、SPI長期摂取群の血中トリグリセリド濃度はカゼイン長期摂取群にくらべ有意に低下した。6週齢および12週齢の短期摂取群でも有意差はないがSPI群で低い傾向が観察された。また、血中コレステロール濃度は長期・短期にかかわらず、いずれのSPI摂取群でも有意に低い値を示した。このように、SPIは摂取期間にも、初期週齢にも関係なく血中コレステロールおよびトリグリセリド濃度を低減させる機能が示された。この結果は既に報告されている知見¹⁰⁾とも一致した。

DNAマイクロアレイ解析

長期摂取の場合 SPI摂取群およびカゼイン摂取群の生化学データから、各群内の平均値に近いラットを各々3匹選択した。それぞれの肝臓から作製した

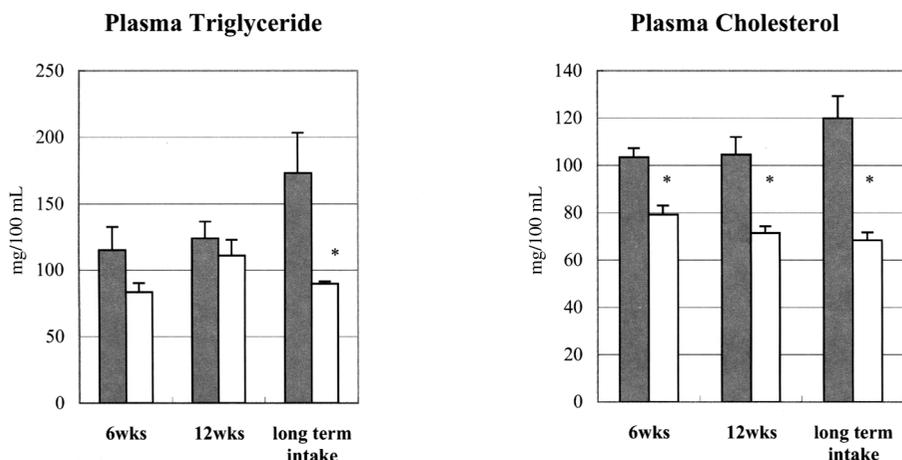


Fig. 1. Plasma chemistries of rats fed a SPI or a casein diets for 2 wks. *significantly difference $P < 0.05$ by *t*-test. ■, Casein; □, SPI.

cRNAをDNAマイクロアレイ解析に供した。各群3匹間 ($n=3$) の誤差は少なく相関係数は高かった。全遺伝子の発現量を β -アクチンによって標準化した。約8,000の遺伝子のうち、各群2匹以上で発現が認められた遺伝子約3,000についてt-検定 ($P < 0.05$) を行い、有意差のある124遺伝子を抽出した。それらのうち、SPI群において発現が上昇する遺伝子は63個、低下する遺伝子は61個であった。これらの遺伝子の機能特性をTable 2に示した。興味深いのは、SPI群において脂肪酸代謝に関わる遺伝子の発現低下とステロイド代謝関連酵素遺伝子群の発現上昇である。前者にはトリグリセリド合成系酵素群、後者にはコレステロール合成系酵素群などが含まれていた。以上から、SPI摂取は肝臓中のトリグリセリドを低下させることにより、それに伴って血中トリグリセリド濃度が低下することが示唆された。一方、コレステロールは血中では低下するが、肝臓中では上昇した。この理由として長期間のSPI摂取が挙げられる。SPI摂取が引き金となり、肝臓および血中コレステロールが低下するが、その状態が継続すると生体の恒常性を保つために、逆にコレステロールの供給が必要となる。したがって、供給源である肝臓ではコレステロール合成系の代謝が活発になると考えられる。これを確かめるため、次に短期摂取での解析を行った。

短期摂取の場合 SPIを短期間（2週）摂取させた若い6週齢と大人の12週齢ラットの肝臓からcRNAを作製し、DNAマイクロアレイ解析を行った。SPIとカゼイン摂取ラットの肝臓における遺伝子発現のスクエッタープロット (Fig. 2) から、6週齢は12週齢にくらべ

Table 2. Numbers of genes whose expression were up- or down-regulated at least two fold in liver in rats fed a SPI diet for 2 wks compared with control rats fed a casein diet

Functions	6W ¹		12W ¹		Long-term feeding	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓
Amino Acid metabolism	6	6	2	2	4	11
Antioxidant	12	13	11	3	9	3
Cell growth and/or maintenance	9	16	5	15	6	13
Energy Metabolism	11	9	3	7	5	8
Fatty acid metabolism	2	8	0	8	0	6
Immunity	16	17	9	31	2	0
Signal transduction	22	26	10	35	10	6
Steroid metabolism	8	11	5	5	9	0
Structural molecule	1	7	0	0	0	6
Transcriptinal regulator	6	11	10	12	5	5
Unassigned	45	94	32	130	13	3
Total	138	218	87	248	63	61

¹ 6-week-old or 12-week-old rats.

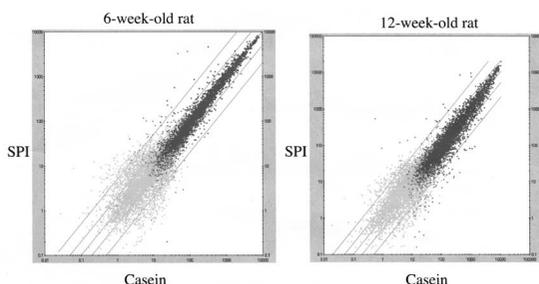


Fig. 2. Scattered plots of log-transformed average difference values.

SPIとカゼイン間での変化がやや大きいことが推定された。対照群（カゼイン摂取）にくらべ、SPIで発現が2倍以上上昇、あるいは低下した遺伝子群をTable 2に示した。脂肪酸代謝機能を持つ酵素群は短期摂取においても長期摂取と同様に発現が低下していた。一方、長期摂取で発現上昇の観察されたコレステロール合成系酵素群は短期では変化が認められなかった。逆に、

コレステロール異化系酵素の発現上昇が明らかになった。これは短期SPI摂取では肝臓中のコレステロール濃度はむしろ減少することを示唆する結果である。したがって、長期SPI摂取では恒常性を保つために、肝臓のコレステロール合成の上昇が生じる可能性がある」と推定された。今後の詳細な研究が待たれる。

要 約

分離大豆たん白質（SPI）をラットに2週間という短期間摂取させると、長期間（8週間）摂取させた際と同様に血中のコレステロールおよび中性脂質の濃度は有意に低下する効果があることを見だし、効果の背後にある分子機序を解明するため遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行い、大豆たん白質の生理機能の詳細な理解を意図した。6週齢および12週齢の雄ラット（Wistar）にSPIまたはカゼインを2週間投与した。肝臓からcRNAを作製しDNAマイクロアレイ解析を行った結果、SPI摂取で発現が上昇する（2倍以上）遺伝子が138個（6週齢）と87個（12週齢）、低下する（1/2以下）遺伝子は218個（6週齢）と248個（12週齢）であった。これらの中には長期摂取と同様に低下する脂肪酸合成系の酵素群や長期摂取と異なり上昇するコレステロール異化系酵素群が含まれていた。本研究は食品たん白質の生理機能の評価法としてDNAマイクロアレイ解析が有効であることを示した。

文 献

- 1) Potter SM (1995): Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterlemic effect of soy. *J Nutr*, **125**, 606S-611S.
- 2) Anthony MS (2000): Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. *J Nutr*, **130**, 662S-663S.
- 3) Carroll KK (1982): Hypercholesterolemia and atherosclerosis: effects of dietary protein. *Federation Proc*, **41**, 2792-2796.
- 4) Fukui K, Aoyama T, Hashimoto Y and Yamamoto T (1993): Effect of extrusion of soy protein isolate on plasma cholesterol level and nutritive value of protein in growing male rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, **46**, 211-216.
- 5) Iritani N, Hosomi H, Fukuoka H, Tada K and Ikeda H (1996): Soybean protein suppress hepatic lipogenic gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr*, **126**, 380-388.
- 6) Nagata Y, Ishikawa N and Sugano M (1982): Studies on the mechanism of antihypercholesterolemia action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J Nutr*, **112**, 1614-1625.
- 7) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey, Jr. GC (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc eriting committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951.
- 8) Fletcher MJ (1986): A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clinica Chem Acta*, **22**, 393-397.
- 9) Sperry WM and Webb M (1950): A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J Biol Chem*, **187**, 97-106.
- 10) Ogawa T, Gatchalian-Yee M, Sugano M, Kimoto M, Matsuo T and Hashimoto Y (1992): Hypocholesterolemia effect of Undigested fraction of soybean protein in rats fed no cholesterol. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 1845-1848.