

食餌大豆たん白質摂食のラット皮膚のプロテオグリカンに与える 影響の分子レベルでの解析

大石 祐一*

中部大学応用生物学部

Effects of Soy Protein Isolate Diet on Rat Skin Proteoglycan

Yuichi OISHI

College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, Aichi 487-8501

ABSTRACT

Proteoglycan is a class of glycosylated protein characterized by the presence of glycosaminoglycan (GAG) as a carbohydrate component in the skin. GAGs are enzymatically epimerized and sulfated such as N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST1) and heparan sulfate 2-sulfotransferase (HS2ST). Syndecan 4, whose core protein is plasma membrane-spanning, is abundant in the skin. This proteoglycan combines with many factors such as growth factors, cytokines, and proteases, which regulates cell proliferation, the activity of proteins. To examine whether and how protein diet or peptide diet affects the status of skin proteoglycan, mRNA levels of Syndecan 4 core protein, NDST1 and HS2ST were analyzed in the skin of rat fed a 12% soy protein isolate (SPI, Fujipro) diet, 12% soybean peptide (Spep, Hinute D1) diet, and 12% soybean soluble peptide (SSP, Hinute D3) diet. The mRNA levels of NDST1 and HS2ST in rats fed a Spep diet for 1 week were similar to those in rats fed a 12% casein diet. When SPI diet and SSP diet had been given, these mRNA levels were reduced. The mRNA level of syndecan 4 core protein was not reduced. These results suggest that soybean insoluble peptide increases the mRNA levels of NDST1 and HS2ST and the regulation of syndecan 4 core protein is different from those of its transferases. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 86-89, 2005.

Key words : Proteoglycan, NDST, HS2ST, Syndecan 4

皮膚は、体内の水分の蒸散防止と外環境からの様々な物質の侵入を防御する大きな役割を果たしている。この役割のために皮膚には様々な分子、特に細胞外マトリク

スが存在している。その中で、ヒアルロン酸 (HA) は水分を保持することによって、抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞の移動をスムーズにし¹⁾、また、プロテオグリカン (PG) は、サイトカインの受容体として、真皮繊維芽細胞、表皮細胞の増殖や他の細胞外マトリク

*〒487-8501 春日井市松本町1200

スの代謝に関与する²⁾。HAおよびPGは、グリコサミノグリカンという糖で構成されており、HAはN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の2糖の繰り返し構造をし、PGは、たん白質からなる軸に上記2糖の他に、2位3位6位などが硫酸化されたグルコサミンや、イズロン酸などからなる。PGの糖鎖の修飾は、ヘパラン硫酸の骨格であるグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し骨格に対して、ヘパラン硫酸N-アセチル・N-硫酸転移酵素 (NDST) 群、グルクロン酸C5-エピメラーゼ、ヘパラン硫酸2-硫酸転移酵素 (HS2ST)、ヘパラン硫酸6-硫酸転移酵素などによって行われる²⁾。とくにNDST1およびHS2STはノックアウトマウスにより致死となること^{3,4)}、また硫酸化する部位が増殖因子の結合部位にあたることから重要な酵素と考えられている。PGには細胞膜貫通型のものが存在し、シンデカンファミリーを構成している。とくにシンデカン4は他の細胞外マトリクスと結合したり、繊維芽細胞成長因子、肝細胞増殖因子などの増殖因子のレセプターとしての役割を果たし、細胞周囲の濃度を制御してその情報伝達を調節していると考えられている。

一方、大豆たん白質は、そのペプチドに様々な作用が見出されている。そこで、今回は、分離大豆たん白質、大豆ペプチドおよび大豆可溶性ペプチドの摂取によって、シンデカン4のコアたん白質、NDST1およびHS2STがどのような影響を受けるかについて検討したので報告する。

方 法

Wistar系雄性ラット（5週齢、チャールズリバー）を12%カゼイン食で予備飼育後、ポジティブコントロール群として12%カゼイン食群（12C）、12%グルテン食群（12G）、リジンおよびトレオニンを含む12%グルテン食群（GLT）、12%分離大豆たん白質食群（SPI、フジプロ）、12%大豆ペプチド食群（Spep、ハイニュートD1）、12%大豆可溶性ペプチド食群（SSP、ハイニュートD3）およびネガティブコントロール群として無たん白質食群（PF）を設け、10時～18時まで制限給餌しながら1週間飼育した⁵⁾。

1週間後、皮膚背部を採取し、RNAを抽出した。

RNAはAcid-Guanidium-Phenol-Chloroform法にて抽出し、DNase (RQ1 DNase, Promega) 処理後、逆転写（逆転写酵素はSuperScript III, Invitrogen, RNase阻害剤はRNAaseOUT, Invitrogen）操作を行い、cDNAを得た。mRNA量は、作製したcDNAをreal time PCR (PRISM7000, Applied Biosystems) に供して測定した。

各mRNA量の比較は、 β -アクチンmRNA量当りの相対値を求め、さらに12C群の値を1としたときの各群の値を算出して行った。統計処理は、スチューデントニューマンクール検定で行った。

結 果

体重変化および摂取量

1週間摂取後のSPI, Spep, SSP群の体重は、12C群を1とした場合、それぞれ0.9, 0.9, 0.89であり、増加量が少なかった。なお、12G, GLTおよびPFは、それぞれ0.82, 0.93, および0.73であった。摂取量は、体重と同様の傾向であった。

ヒアルロナン合成酵素(Has)mRNA量

繊維芽細胞で発現しているHas2mRNA量は、12Cを1とすると、SPI, Spep, およびSSP群はそれぞれ0.15, 0.55, 0.16となり、減少あるいは減少傾向を示し、大豆たん白質の処理によっても大きく変化することがわかった (Fig. 1)。一方、表皮細胞で発現しているHas3mRNA量は、12Cを1とすると、SPI, Spep, およびSSP群はそれぞれ0.19, 0.38, 0.09となり、Has2mRNA量と同様の傾向だった (Fig. 2)。

シンデカン4 mRNA量

細胞膜貫通型のプロテオグリカンであるシンデカン4のコアたん白質のmRNA量は、12C群を1とするとSPI, Spep, およびSSP群はそれぞれ1.42, 1.30, 0.57となり、前者2群は12C群よりも増加傾向を示した (Fig. 3)。

NDST1mRNA量

プロテオグリカン糖鎖の修飾酵素であるNDST1のmRNA量は、12C群を1とするとSPI, Spep, およびSSP群はそれぞれ0.28, 1.19, 0.22となり、シンデカン4コアたん白質mRNA量の傾向と異なった (Fig. 4)。

HS2STmRNA量

ラットHS2STのシークエンスは公表されていないため、部分的にcDNAの配列を決定した。その結果、マウスと93%の相同性があった。この配列を用いてHS2STmRNA量を測定したところ、12C群を1とするとSPI, Spep, およびSSP群はそれぞれ0.17, 0.56, 0.07となり、減少あるいは減少傾向を示した (Fig. 5)。

考 察

今回、大豆たん白質摂取が、皮膚PG代謝に与える影響について検討した。その結果、大豆可溶性ペプチドにおけるシンデカン4、NDST1およびHS2STのそれぞれのmRNA量は12%カゼイン食群に比して少なかっ

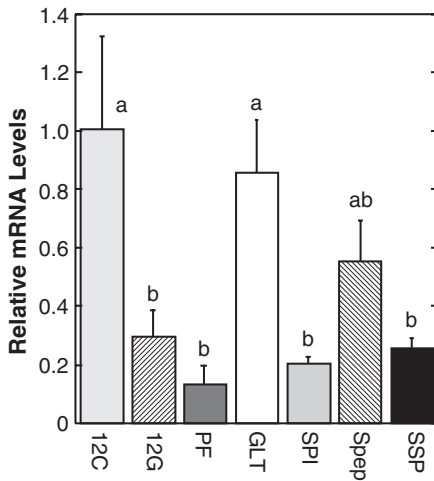


Fig. 1. Effect of soy protein isolate on the mRNA levels of *rhas2* in the dorsal skin of rats. Rats were fed 12% casein diet (12C), 12% gluten diet (12G), protein-free diet (PF), 12% gluten diet containing Lys and Thr (GLT), 12% soy protein isolate diet (SPI, Fujipro), 12% soy peptide diet (Spep, Hinute D1) or 12% soy solute peptide diet (SSP, Hinute D3) for 7 days. The mRNA levels of *rhas2* were determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=4). Letters denote statistical significance ($P<0.05$).

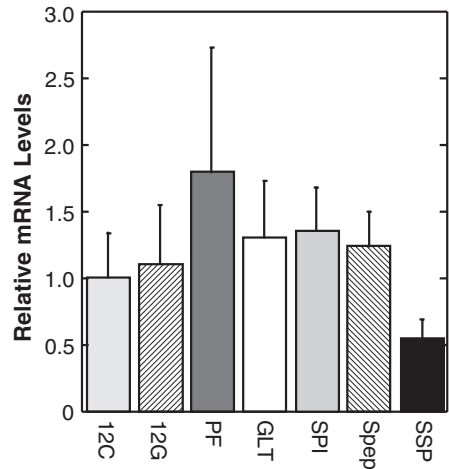


Fig. 3. Effect of soy protein isolate on the mRNA Levels of *Syndecan 4* in the dorsal skin of rats. Rats were fed the respective diets as described in the legend of Fig. 1. The mRNA levels of *syndecan 4* were determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=4).

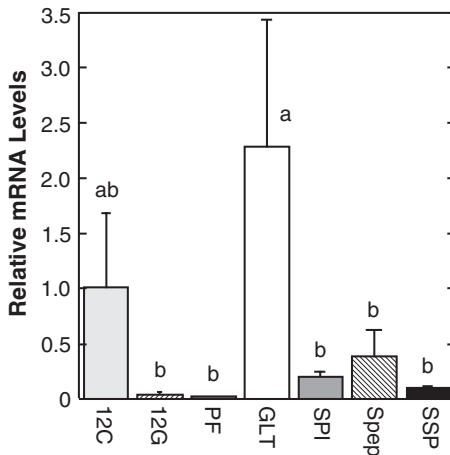


Fig. 2. Effect of soy protein isolate on the mRNA levels of *rhas3* in the dorsal skin of rats. Rats were fed the respective diets as described in the legend of Fig. 1. The mRNA levels of *rhas3* were determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=4). Letters denote statistical significance ($P<0.05$).

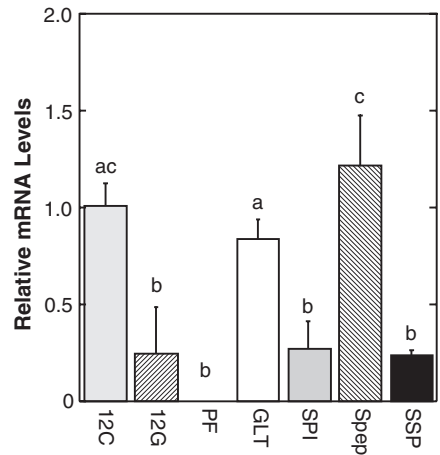


Fig. 4. Effect of soy protein isolate on the mRNA levels of *NDST1* in the dorsal skin of rats. Rats were fed the respective diets as described in the legend of Fig. 1. The mRNA levels of *NDST1* were determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=4). Letters denote statistical significance ($P<0.05$).

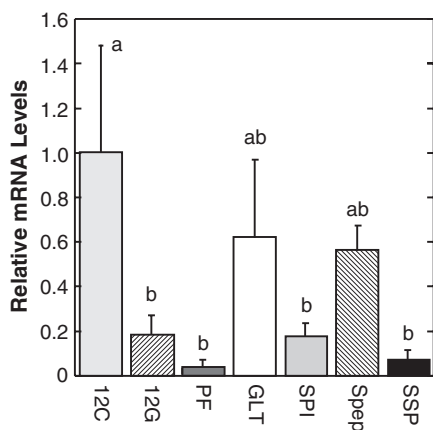


Fig. 5. Effect of soy protein isolate on the mRNA levels of *HS2ST* in the dorsal skin of rats. Rats were fed the respective diets as described in the legend of Fig. 1. The mRNA levels of *HS2ST* were determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=4). Letters denote statistical significance ($P<0.05$).

要 約

皮膚は、体を防御するとともに、体内の水分蒸散防止という大きな役割を果たしている。今回、大豆たん白質の食餌によって、ラットの皮膚におけるヒアルロン酸、プロテオグリカンといったグリコサミノグリカンがどのような影響を受けるのかについて検討した。ヒアルロン酸合成酵素2、プロテオグリカンの糖鎖の修飾に重要なヘパラン硫酸脱N-アセチル・N-硫酸転移酵素群、ヘパラン硫酸2-硫酸転移酵素のmRNA量は、他の大豆食と比して大豆ペプチド食において高い値を示した。一方、シンデカン4のコアたん白質mRNA量は、分離大豆たん白質食および大豆可溶性ペプチド食を含めて、たん白質栄養に関係なく一定であった。このことから、大豆ペプチド食に含まれる大豆不溶性ペプチドは、プロテオグリカンの糖鎖mRNA量を多くする作用がある可能性があった。また、プロテオグリカンの代謝制御は、コアたん白質と糖鎖関連酵素では異なっていると考えられた。

文 献

- 1) Mummert ME, Mohamadzadeh M, Mummert DI, Mizumoto N and Takashima A (2000): Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking. *J Exp Med*, **192**, 769-779.
- 2) 羽淵弘子, 木全弘治 (2001): 上皮と間充織のはざまにあるヘパラン硫酸プロテオグリカン. 生化学, **73**, 1246-1256.
- 3) Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, van Kuppervelt T, Ellin F, Eriksson I, Olofsson AM, Kjellen L and Forsberg E (2000): Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1. *J Biol Chem*, **275**, 25926-25930.
- 4) Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS and Wilson VA (1998): Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Gens Dev*, **12**, 1894-1906.
- 5) Oishi Y, Kato H and Noguchi T (2003): Dietary protein as a potent regulator of the hyaluronan synthase gene in rat skin. *Biosci Biotech Biochem*, **67**, 736-742.