

食生活を視野に入れた大豆たん白質機能のニュートリゲノミクスの研究

加藤久典*・辻 真之介

東京大学大学院農学生命科学研究科

Nutrigenomics Study of Soy Protein Function in Light of Dietary Life

Hisanori KATO and Shinnosuke TSUJI

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

ABSTRACT

Amid the expansion of nutrigenomics research area, transcriptomics analysis is becoming one of the primary choices for the efficient analysis of the functions of foods. This technology has already been applied to the evaluation of the function of soy protein, and these studies have revealed some beneficial effects of soy protein. However, it is not clear at present that such effects can be maintained in the presence of other dietary proteins. The present study was conducted to evaluate the effect of soy protein isolate on gene expression profile when it is consumed with other proteins. Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein plus 10% soy protein diet (C+S), or a 10% gluten plus 10% soy protein diet (G+S) for two weeks. Only modest changes in the cholesterol and triglyceride levels in the liver and serum were observed. Liver RNA was subjected to DNA microarray analysis. Principal component analysis revealed that gene expression patterns of C+S and G+S groups were closer to S group than to C and G groups. S diet caused upregulation of the genes for cholesterol metabolism, fatty acid oxidation, antioxidation, and alcohol metabolism as well as downregulation of the genes for fatty acid synthesis. These effects were consistently observed in rats fed on the mixed protein diets. The results suggest that soy protein retain at least part of its beneficial effects even when it is ingested with other proteins. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 102-107, 2006.

Key words : nutrigenomics, DNA microarray, lipid metabolism

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

食餌成分の機能性解明がDNAマイクロアレイなどのニュートリゲノミクス技術によって加速している¹⁾。大豆たん白質の機能性の解析についても、この技術の応用例がいくつか見られるようになった。例えば、Badgerら²⁾は乳腺や大腸組織において、大豆分離たん白質のがん抑制作用に注目して遺伝子発現解析を行った。Tachibanaら³⁾は、大豆たん白質摂取シロネズミ肝臓での遺伝子発現プロファイルを調べ、脂質代謝改善作用の機構を中心に報告している。これらのマイクロアレイ解析も含めて、従来の大豆たん白質の機能解析研究では、大豆たん白質を唯一の窒素源として動物に与えて、その効果を検討したものが多く、しかし実際の食生活において、大豆たん白質は他のたん白質とともに摂取されており、たん白質の混合摂取条件下における効果を検証することの重要性は明白である。本研究では、大豆たん白質とカゼインまたはグルテンを当量混合した食餌をシロネズミに2週間摂取させ、肝臓の遺伝子発現プロファイルを個々のたん白質の単独摂取の場合と比較した。この検討から、大豆たん白質単独で認められる効果が混合系ではどの程度得られるかを確認する一方で、他のたん白質との相互作用の結果生じる新たな機能を探索することも可能となると考えた。

方 法

動物飼育

5週齢のWistar系雄シロネズミ（日本チャールズリバー）を、明期（8時～20時）と暗期（20時～8時）の12時間サイクルで、室温23℃、湿度60%の環境下で飼育した。搬入後2日間ベレット食、その後3日間は20%カゼイン（和光純薬）食で自由給餌、さらに3日間は20%カゼイン食で制限給餌（10時～18時）を行い、計8日間の予備飼育を行った。予備飼育後に、20%カゼイン食（C）、20%グルテン（ナカライ）食（G）、20%分離大豆たん白質（フジプロ）食（S）、10%カゼイン+10%分離大豆たん白質食（C+S）、10%グルテン+10%分離大豆たん白質食（G+S）、の計5群（各5頭）に分けて同様の制限給餌で2週間飼育した。食餌組成はTable 1に示した。実験食開始から15日目に1.5時間食餌を与えた後に、1.5時間絶食させてネンブタール麻酔、頸動脈より採血を行い、その後直ちに肝臓等を摘出した。組織は直ちに液体窒素中で凍結した。

血漿中総コレステロール濃度、血清中トリグリセリド濃度の測定は、それぞれコレステロールE-テストワ

コー、トリグリセリドE-テストワコー（いずれも和光純薬）により行った。クロロホルム：メタノール＝2：1により肝臓総脂質の抽出を行い、血中の場合と同様に、肝臓中のコレステロールとトリグリセリドの濃度を測定した。

肝臓組織をTRIzol reagent（Invitrogen）でホモゲナイズし、その後既報⁴⁾に従って総RNAを抽出した。

DNAマイクロアレイ解析は、群毎に各個体の総RNAを混合して1 mgにし、PolyA Tract® mRNA Isolation Systems III & IV（Promega）を用いてmRNAの抽出を行った。Expression Analysis Technical Manual（Affymetrix）に従って、各群15 µgの断片化したcRNAを含むHybridization cocktailを調製し、GeneChip Rat Genome 230 2.0（Affymetrix）に添加して、45℃で16時間ハイブリダイズさせた。その後、GeneChip Fluidics 400（Affymetrix）を用いて、洗浄・染色を行い、Affymetrix Agilent Gene Array Scannerを用いて蛍光強度を検出した。Microarray Analysis Suit（MAS）version 5.0を用いて、シグナル強度の解析を行った。

RNase Protection Assayは報告されている配列をもとに設計したプライマーをInvitrogenに依頼して合成し作製したプローブを用いて、RNase Protection AssayによりmRNAを定量した⁴⁾。

測定値は平均値±標準誤差（S.E.）で表した。各群の有意差検定は分散分析により行った。

Table 1. Composition of the diets (g/kg)

Composition	C	G	S	C+S	G+S
Casein	233.3	—	—	116.7	—
Gluten	—	250.0	—	—	125.0
Soy Protein Isolate	—	—	222.2	111.1	111.1
Cornstarch	561.7	548.0	575.8	568.7	561.9
Soybean Oil	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral Mixture	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Vitamin Mixture	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Choline Chloride	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Methionine	3.0	—	—	1.5	—
Total	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0

C: 20% casein, G: 20% gluten, S: 20% soy protein, C+S: 10% casein + 10% soy protein, G+S: 10% gluten + 10% soy protein. The mineral and vitamin mixtures (obtained from Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) were prepared according to the American Institute of Nutrition.

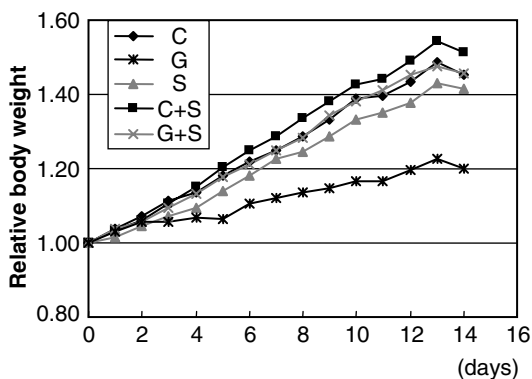


Fig. 1. Body weight changes of the rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein and 10 % soy protein diet (C+S) or a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S) for two weeks (n=5).

結果と考察

試験食期間中の摂食量は、G群を除く4群では差がなかったが、G群では他の群の85%程度に低下していた。試験期間中の体重変化をFig. 1に示すが、G群は他の群と比較して顕著に低かった。試験終了時の体重は、G群が他の何れの群よりも有意に低かった他、C+S群はS群と比較して有意に高かった。

血中および肝臓中の総コレステロールおよびトリグリセリドの濃度をFig. 2に示す。血中のコレステロールは、群間で目だった差は認められなかったが、予想に反してG群で他の群よりも高いという結果となった。血中トリグリセリドは、有意な差ではなかったが、SやGを含む群で低下する傾向が認められた。肝臓中のコレステロールやトリグリセリドも群間で差は認められなかったが、Sを含む群でトリグリセリドが若干低下する傾向があった。

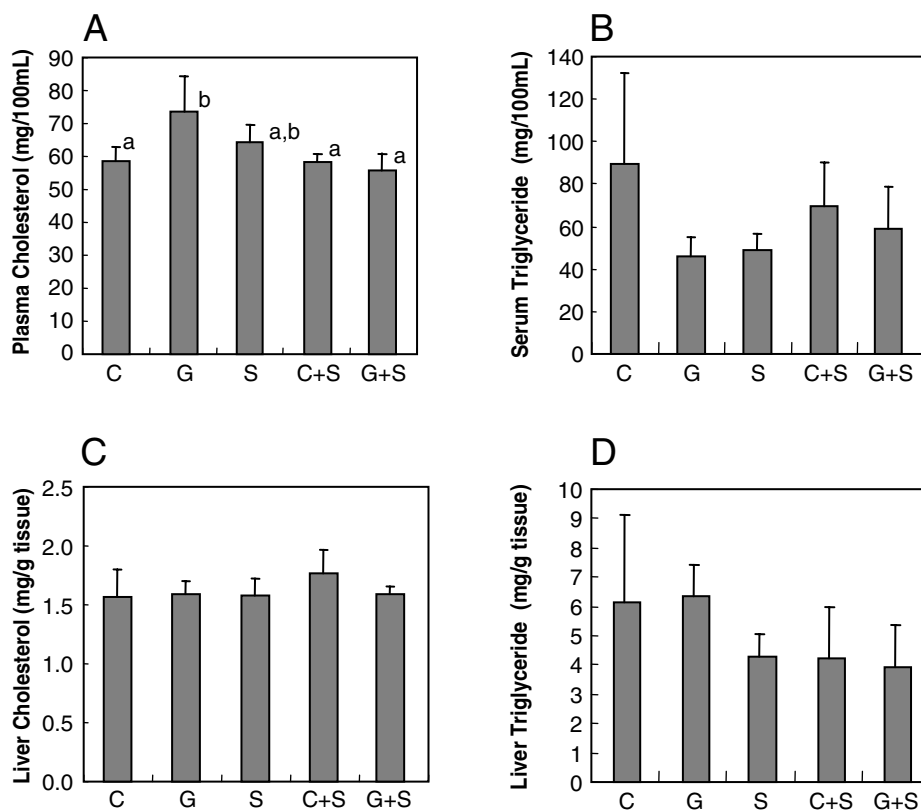


Fig. 2. Blood and liver lipid levels of rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein and 10% soy protein diet (C+S) or a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S) for two weeks (n=5). Plasma cholesterol (A), serum triglyceride (B), liver cholesterol (C), and liver triglyceride (D) were measured. The bars not sharing the same letter are significantly different ($P<0.05$).

肝臓のDNAマイクロアレイ解析の結果に関して、まず全ての遺伝子について主成分分析を行った。Fig. 3の横軸に第1主成分を、縦軸に第2主成分をとって2次元空間にプロットしたが、第1主成分の寄与率が98.6%と高く、横軸の値を比較することで各群の特徴を捉えられると思われる。C群とG群は他とやや離れていたが、S、C+S、G+S群の3つは近くにプロットされ、これらの3群は遺伝子発現に与える影響に共通性が高いと考えられた。

次に発現が高かった遺伝子（GeneChipのアルゴリズムでPositiveと判断されたもの）のうち、カゼイン群に対して1.5倍以上の発現変化が見られた遺伝子を各群から抽出し、それらをGene Ontologyに基づいて

機能分類した。各群で増加または減少した遺伝子は、500から1,000個程度となった。その数は、G群で最も多かった。特にS群で変化が多かった遺伝子群としては、脂質代謝系、アルコール代謝系、たん白質代謝系があり、それらの変化は混合摂取群でも同様に認められるものが多かった。それらのうち、コレステロール代謝系、脂肪酸代謝系、抗酸化・アルコール代謝系の遺伝子について、S群で変化があったものを中心に抜き出したのがTable 2である。下線をつけたものはGeneChipのアルゴリズムにより発現上昇と判断されたもの、斜体は発現減少したものである。Sによってコレステロール合成系と異化系の遺伝子の発現上昇、脂肪酸の β 酸化系遺伝子の発現上昇、脂肪酸合成系の

Table 2. Expression changes of selected genes for lipid metabolism, antioxidation, and alcohol metabolism

Gene Name	G	S	C+S	G+S
Metabolism of Cholesterol and Bile Acid				
HMG-CoA reductase	<u>4.6</u>	<u>4.0</u>	<u>1.3</u>	<u>3.5</u>
Isopentenyl-diphosphate delta isomerase	<u>8.0</u>	<u>2.6</u>	<u>2.3</u>	<u>1.9</u>
Squalene epoxidase	<u>6.1</u>	<u>3.0</u>	<u>1.5</u>	1.4
HMG-CoA syntase 1	<u>4.9</u>	<u>2.0</u>	<u>1.7</u>	1.2
Farnesyl dipohosphate farnesyl transferase	<u>3.0</u>	<u>1.6</u>	0.9	1.0
Mevalonate decarboxylase	<u>2.6</u>	<u>1.4</u>	1.3	1.2
Cytochrome P450	<u>2.6</u>	<u>1.2</u>	<u>1.4</u>	<u>1.0</u>
Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide*	1.2	<u>1.9</u>	<u>1.7</u>	<u>2.1</u>
Aldehyde dehydrogenase family 1, member A1*	<u>1.9</u>	<u>2.5</u>	<u>1.7</u>	<u>2.5</u>
Fatty Acid Oxidation				
Carnitine palmitoyltransferase 1	<u>2.5</u>	<u>2.0</u>	<u>1.5</u>	<u>2.1</u>
Acetyl-CoA acyltransferase 2	1.4	<u>1.4</u>	<u>1.5</u>	<u>1.4</u>
Acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	<u>2.5</u>	<u>3.0</u>	<u>2.0</u>	<u>3.3</u>
L-3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain	3.3	<u>4.0</u>	<u>3.5</u>	<u>5.7</u>
Hydroxy-CoA dehydrogenase, beta subunit	<u>1.6</u>	<u>1.4</u>	<u>1.4</u>	<u>1.3</u>
Carnitine/acylcarnitine translocase	1.3	<u>1.3</u>	1.2	<u>1.3</u>
2,4-dienoyl-CoA reductase 1, mitochondrial	1.2	<u>1.4</u>	1.7	<u>1.5</u>
Fatty Acid Synthesis				
Fatty acid synthase	1.2	0.7	0.7	0.6
Stearoyl-CoA desaturase 1	0.3	0.5	1.0	0.4
Acetyl-CoA caboxylase alpha	0.9	0.8	0.8	0.6
Acetyl-CoA caboxylase beta	0.5	0.3	0.5	0.3
Antioxidation and Alcohol Metabolism				
Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	<u>2.8</u>	<u>2.3</u>	<u>1.5</u>	<u>3.0</u>
Glutathione reductase	<u>1.4</u>	<u>2.0</u>	<u>1.6</u>	<u>2.8</u>
Microsomal glutathione S-transferase 1	1.2	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>
Superoxide dismutase 1	1.3	<u>1.2</u>	<u>1.2</u>	<u>1.3</u>
Thioredoxin reductase 1	1.6	<u>1.7</u>	1.3	<u>2.6</u>
Cytochrome P450, family 2, subfamily e	<u>1.5</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>

Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein and 10% soy protein diet (C+S) or a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S) for two weeks. Their liver RNA was subjected to DNA microarray analysis. The expression levels of some of the genes in G, S, C+S and G+S groups were compared with those in C group and shown in the table. The values with underline show "increase" and those in italic show "decrease".

*: These genes are also involved in alcohol metabolism.

発現低下, アルコール代謝系と抗酸化系の遺伝子の発現上昇が見られた. これらの変化は概ねC+SやG+S群でも同じ方向の変化となっていた.

それらのうち6種の遺伝子についてRNase protection法でmRNA量の確認を行った (Fig. 3).

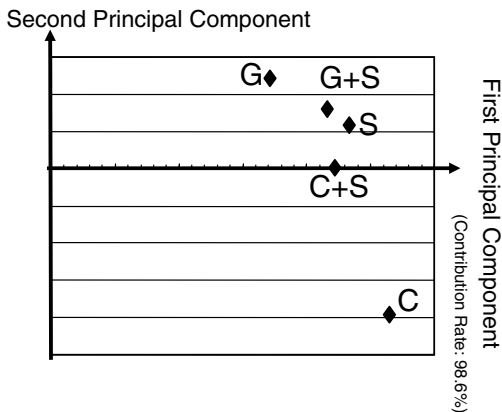


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of the DNA microarray data obtained from the liver of rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on respective diets as shown in the legend to Fig. 1. PCA was carried out using all raw data obtained by DNA microarray analysis of rat liver transcripts. The result was plotted in the two dimensional space.

CPT1 (カルニチンアシルトランスフェラーゼ1) については, アレイではSやGを含む群で増加していたが本法では変化が見られなかった. しかしその他の遺伝子については, 概ねDNAマイクロアレイの結果の通りの傾向で変化していた.

これらの結果から, 混合たん白質系でも大豆たん白質による脂質代謝改善や肝機能維持効果は遺伝発現レベルで検出することができることがわかった. 特に今回の実験のように血清や肝臓の生化学的指標では顕著な効果が見られない場合にも, 遺伝子発現レベルでは明確な変化が現れている場合があることが示された. これらの遺伝子は, 実際の食生活を視野に入れた食餌たん白質の機能性を解析する上での有効なバイオマーカーとして利用できることが期待される.

血清や肝臓中のコレステロールやトリグリセリドはS群やG群でカゼイン群と比較して変化がなく, 多く報告されている例^{3, 5)}とは異なっていたことに関しては, 飼育期間や飼育条件の違いによるところが大きいのではないかと考えられる. 脂肪の代謝に関しては, 遺伝子レベルでは酸化が亢進し, 合成が抑制されると予想されたので, 飼育期間を長くするなどすれば差が認められたかもしれない. コレステロール関連遺伝子については, 合成系と異化系の両方が亢進するという既報の内容³⁾と一致するものであった. 大豆たん白質やグルテン自身には胆汁酸排泄促進などによるコ

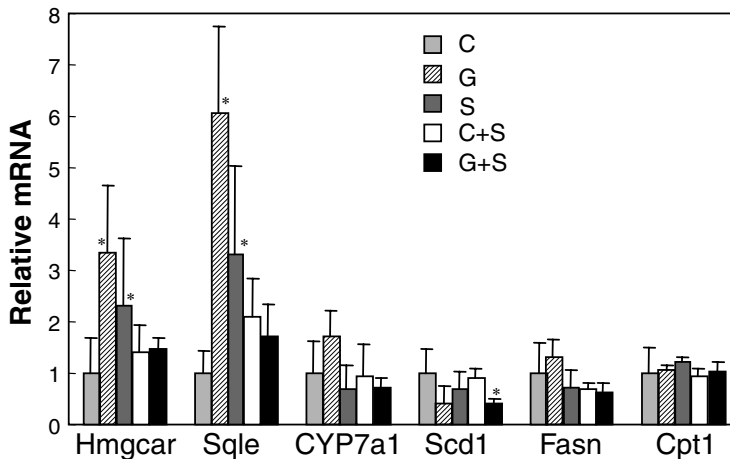


Fig. 4. Validation of the result of DNA microarray by RNase protection assay. Rats were fed on respective diets as shown in the legend to Fig. 1. Six genes were picked up from Table 2 and their expression levels were validated by using RNase protection assay. The results were normalized by the mRNA levels of GAPDH. Each bar indicates mean expression level $\pm$ SE in each dietary group relative to that in the 20% casein (C) group. Asterisks show that the values are significantly different ($P < 0.05$) as compared with C group. Hmgcar: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase, Cyp7a1: Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1, Scd1: Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1, Fasn: Fatty acid synthase, Sqle: Squalene epoxidase, Cpt1: Carnitine palmitoyltransferase 1.

レステロール低下作用があるが、それに応答して合成系遺伝子が誘導されている可能性が考えられ、総じて血中などのコレステロールには今回は差が見られなかったことが考えられる。合成と分解のダイナミックな制御下にあることを考えると、経時的な変動を追跡する必要があるだろう。また、今回は食餌中にコレステ

ロールを添加しない条件で行ったが、コレステロール負荷時の効果を検討する必要もあると考えられる。

今後は、単独摂取では生じないが混合摂取で特異的に生じる変化についても解析を進めて、混合摂取による新たな機能性の発見に向けての検討も行いたい。

要 約

トランスクリプトーム解析による大豆たん白質の機能性の解析がされ始めている。本研究では、分離大豆たん白質を他のたん白質との混合で摂取したときの効果を調べる目的で、シロネズミ肝臓のDNAマイクロアレイ解析を行った。5週齢Wistar系雄シロネズミを20%カゼイン食群(C)、20%SPI食群(S)、20%グルテン食群(G)、10%C+10%S食群(C+S)、10%G+10%S食群(G+S)に分け2週間飼育した。S、C+S、G+S群では、C群に比べて血中コレステロール濃度に有意な差は認められなかった。主成分分析の結果、C+SやG+Sの発現プロファイルはSに近い傾向が認められた。また、コレステロール・胆汁酸代謝に関わる遺伝子の発現上昇がS群だけでなくC+S群、G+S群においても確認された。さらに β 酸化に関わる酵素の発現が上昇し、脂肪酸合成に関わる遺伝子の発現は減少していた。抗酸化作用やアルコール代謝関連の遺伝子もSを含むたん白質群で発現増加していた。CやGとの混合摂取においてもSの作用が維持される場合が多いと考えられる。遺伝子発現プロファイルによる大豆たん白質の機能性解析は鋭敏な指標として活用が期待される。

文 献

- 1) Kato H, Saito K and Kimura T (2005): A perspective on DNA microarray technology in food and nutritional science. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **8**, 516-522.
- 2) Badger TM, Ronis MJ, Simmen RC and Simmen FA (2005): Soy protein isolate and protection against cancer. *J Am Coll Nutr*, **24**, 146S-149S.
- 3) Tachibana N, Matsumoto I, Fukui K, Arai S, Kato H, Abe K and Takamatsu K (2005): Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. *J Agric Food Chem*, **53**, 4253-4257.
- 4) Endo Y, Fu, ZW, Abe K, Arai S and Kato H (2002): Dietary protein quantity and quality affect rat hepatic gene expression. *J Nutr*, **132**, 3632-3637.
- 5) 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.