

# 大豆たん白質の皮脂セラミド，スフィンゴシンおよび その合成酵素への影響の分子レベルでの解析

大石祐一\*

東京農業大学応用生物科学部

## Effects of Feeding on the Soy Protein Isolate Diet on Ceramide in Rat Epidermis

Yuichi OISHI

Faculty of Bio-Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

### ABSTRACT

Ceramides form extracellular lamellar membrane structures within the stratum corneum that subserve the permeability barrier to water loss, are necessary for the survival of mammals in a terrestrial environment. To examine whether and how soy protein diet or soy peptide diet affects the status of stratum ceramides (SC), the amount of SC and the mRNA levels of serine palmitoyl transferase (SPT), the first committed step for ceramide synthesis, were analyzed in the epidermis of rat fed on a 12% soy protein isolate (SPI, Fujipro) diet, a 12% soybean peptide (SP, Hinute D1) diet, a 12% soybean soluble peptide (SSP, Hinute D3) diet, a 12% casein diet (C), or a protein-free diet (PF). The amount of SC in rats fed on SPI, SP, SSP, and PF diets did not decrease in comparison with that in rats fed on a C diet. While the mRNA levels of SPI in rats fed on the SP diet drastically decreased, the levels in rats fed on the PF diet increased. Cholesterol is also one of the lipids in the stratum corneum. The mRNA levels of HMG CoA reductase, an important enzyme of cholesterol synthesis, did not significantly decrease in rats fed on the SP diet, but the levels in rats fed on a PF diet drastically decreased. These results suggest that the SP diet for a week affected ceramide de novo synthesis, but did not affect the amount of ceramides in stratum corneum. Furthermore, the regulation of SPT by dietary protein might be different from that of HMG CoA reductase in rat epidermis. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 72-75, 2007.

Key words : soybean, ceramide, serine palmitoyl transferase, stratum corneum

\* 〒156-8502 世田谷区桜丘1-1-1

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が存在している。筆者は、今までに大豆たん白質などの摂食の、皮膚ヒアルロン酸、コラーゲン、プロテオグリカンへの影響について検討し、大豆ペプチドの摂食に、これらの分子に関わるたん白質のmRNA量を増加させる効果があることを明らかにした。皮膚の体内水分の蒸散防止作用には、水分保持能があるヒアルロン酸とともに、細胞外角層脂質 (Extracellular Stratum Corneum Lipids) であるセラミド、脂肪酸、コレステロールが重要である<sup>1)</sup>。ゴーシェ病は角層セラミドの生成障害を伴う疾患であり、水分蒸散が防止できないため、生後まもなく死亡する<sup>2)</sup>。このことからわかるように、特に、セラミドは重要な因子である。セラミドの生合成は、L-セリンとパルミトイルCoAからserine palmitoyl transferase (SPT) による、スフィンゴイドの生合成からはじまる。数段階を経てセラミド、アシルセラミドが生成される。これらは、細胞内でスフィンゴミエリン、グルコシルセラミド、アシルグルコセラミドへと変換され、細胞が顆粒層から角質層に移行する間にセラミドに変換され、細胞外へ分泌される (Fig. 1)<sup>3)</sup>。よって、SPTは、セラミド合成の第1段階の酵素として重要である。

角層セラミドの食餌による影響については、ほとんど報告が無い。そこで、本研究では、動物性たん白質カゼイン、植物性たん白質大豆分離たん白質、大豆ペプチド、大豆可溶性ペプチドおよび無たん白質をラットに給餌し、角層セラミドおよびその合成への影響を検討したので、報告する。

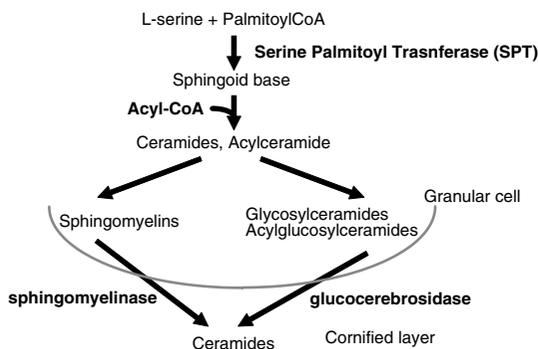


Fig. 1. Scheme for the production of the ceramides in extracellular stratum corneum.

## 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, 12%カゼイン食群 (C), 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 (SP, ハイニユートD1), 12%大豆可溶性ペプチド食群 (SSP, ハイニユート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<sup>4)</sup>。

1週間後, 角質を採取し皮脂を抽出するとともに, 背部の皮膚からRNAも抽出した。

皮脂は, クロロホルム-エタノール溶液 (95:5) にて角質から抽出し, 濃縮後, high performance thin-layer chromatography (HPTLC) に各サンプルを同重量ずつ供し, クロロホルム:メタノール:酢酸溶液 (192:7:1) にて展開した。発色は, 硫酸銅 (II)-リン酸溶液噴霧後, 150°C, 10分間処理で行った。セラミド量の数値化は, Las-1000plus (Fuji film) を用いた。

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 (PRISM7300, Appliedbiosystems) に供して測定した。各mRNA量は,  $\beta$ -アクチンmRNA量当りの相対値として求めた。

## 結 果

### 体重変化および摂取量

1週間摂取後のSPI, SP, SSP群の体重は, C群を1とした場合, それぞれ $0.91 \pm 0.02$ ,  $0.93 \pm 0.01$ ,  $0.92 \pm 0.02$ であり, 増加量が少ない傾向だった。また, PFは $0.74 \pm 0.02$ で有意に減少した。摂取量は, 体重と同様の傾向だった。

### 角層セラミド量

角質層に存在するセラミド量をHPTLCにて分離後, 数値化した。その結果, C群でのセラミド量を1としたとき, SPI, SP, SSPおよびPF群での量は, それぞれ $1.47 \pm 0.29$ ,  $1.62 \pm 0.33$ ,  $1.56 \pm 0.24$ , および $1.60 \pm 0.30$ だった (Fig. 2)。このことから, セラミド量は, 動物性たん白質摂食よりも植物性たん白質摂食の方が多傾向を示した。また, たん白質栄養の最も悪い無たん白質食摂食でも高かった。

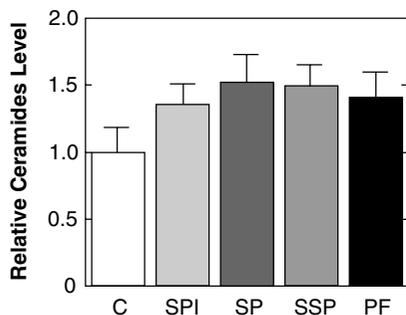


Fig. 2. Effect of soy protein isolate on the ceramides level in the dorsal epidermis of rats. Rats were fed 12% casein diet (C), 12% soy protein isolate diet (SPI, Fujipro), 12% soy peptide diet (SP, Hinute D1), 12% soy solute peptide diet (SSP, Hinute D3), or protein-free diet (PF) for 7 days. The ceramide level was determined by HPTLC. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=6).

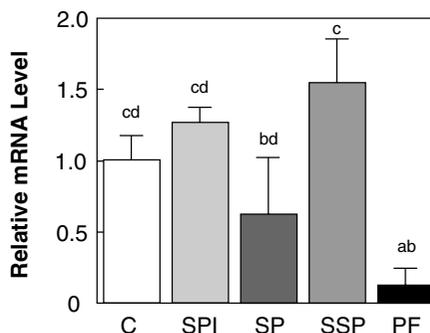


Fig. 4. Effect of soy protein isolate on the mRNA level of HMG CoA reductase in the dorsal skin of rats. Rats were fed 12% casein diet (C), 12% soy protein isolate diet (SPI, Fujipro), 12% soy peptide diet (SP, Hinute D1), 12% soy solute peptide diet (SSP, Hinute D3), or protein-free diet (PF) for 7 days. The mRNA level was determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=6). Different letters denote statistical significance ( $p < 0.05$ ).

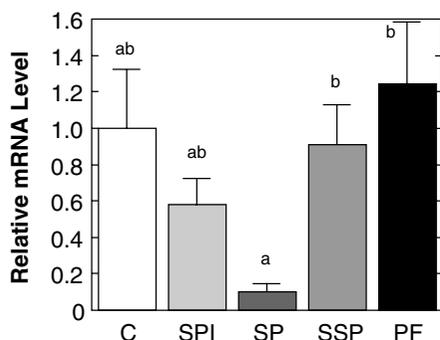


Fig. 3. Effect of soy protein isolate on the mRNA level of SPT in the dorsal skin of rats. Rats were fed 12% casein diet (C), 12% soy protein isolate diet (SPI, Fujipro), 12% soy peptide diet (SP, Hinute D1), 12% soy solute peptide diet (SSP, Hinute D3), or protein-free diet (PF) for 7 days. The mRNA level was determined by quantitative PCR. Each value is the mean with its standard error represented by a vertical bar (n=6). Different letters denote statistical significance ( $p < 0.05$ ).

#### SPTmRNA量

セラミドのkey enzymeであるSPTのmRNA量を測定した。その結果、C群でのセラミド量を1としたとき、SPI, SP, SSPおよびPF群での量は、それぞれ0.57 ± 0.14, 0.10 ± 0.05, 0.91 ± 0.21, および1.24 ± 0.34だった (Fig. 3)。この結果は、角層セラミド量の結果と一致しないことを示し、またSP群で顕著に低かった。

#### HMG CoA reductase mRNA量

皮脂にはセラミド以外に脂肪酸およびコレステロールが存在する。そこで、コレステロールのkey enzymeであるHMG CoA reductaseのmRNA量を測定した。その結果、C群でのセラミド量を1としたとき、SPI, SP, SSPおよびPF群での量は、それぞれ1.27 ± 0.11, 0.63 ± 0.39, 1.55 ± 0.30, および0.13 ± 0.11だった (Fig. 4)。この結果は、SPTと異なった傾向を示し、たん白質栄養による、セラミドとコレステロールの代謝制御が異なることを示唆した。

#### ヒアルロン酸合成酵素3 mRNA量

表皮には、皮脂以外にも多糖であるヒアルロン酸などが存在する。表皮のヒアルロン酸はヒアルロン酸合成酵素3によって主に合成されるので、ヒアルロン酸合成酵素3のmRNA量を測定した。その結果、C群でのセラミド量を1としたとき、SPI, SP, SSPおよびPF群での量は、それぞれ0.62 ± 0.12, 0.48 ± 0.06, 0.63 ± 0.08, および0.69 ± 0.14となり、カゼイン食摂食でのmRNA量が最も高かった。

## 考 察

表皮細胞は、基底層で分裂してから約1ヶ月をかけて、角質層まで移行し、最終的には垢となる。セラミドはその間に細胞内に貯留され、角質層へ移動する際

に、細胞外に分泌される。今回、大豆たん白質等を1週間摂食させ、皮脂セラミド代謝に与える影響について検討した。その結果、セラミド量は、大豆たん白質(SPI, SP, およびSPP)摂食によって、カゼイン食摂食よりも増加する傾向だった(Fig. 2)。一方、セラミドのkey enzymeであるSPTのmRNA量は、大豆ペプチド(SP)群で顕著に減少した(Fig. 3)。セラミド量とその合成酵素mRNA量との違いは、飼育期間が1週間と短く、SPTのmRNA量の変化が角層セラミド量にまで影響を与えなかったのかもしれない。また、細胞の分化、角層セラミドへの変換酵素への影響も少ないのかもしれない。今後、飼育期間を2, 4週間に延長した実験も含めて検討すべきと考えている。

表皮にはコレステロールも存在するので、そのkey

enzymeであるHMG CoA reductaseのmRNA量を測定した。その結果は、SPTのmRNA量と異なった傾向を示した(Fig. 4)。このことは、たん白質栄養のコレステロールとセラミドの制御機構が異なることを示唆するものであり、表皮のバリアーを人工的に破壊後の修復時における制御と似ていた<sup>3)</sup>。

無たん白質の摂食では、皮膚に存在するたん白質や糖およびその関連遺伝子のmRNA量は減少する<sup>4,5)</sup>。しかし、SPTのmRNA量は減少しなかった。表皮のバリアー機能は、生命にとって非常に重要であり、他の分子とは異なった制御を受けるのかもしれない。

今後、様々な飼育期間後の皮脂およびその合成酵素遺伝子のmRNA量を測定し、これら分子の機構をさらに明らかにしていきたい。

## 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、ラットの皮脂のセラミド量およびその生合成での重要な酵素serine palmitoyl transferase (SPT) のmRNA量がどのような影響を受けるのかについて検討した。セラミド量は12%大豆たん白質、12%大豆ペプチド、および12%大豆可溶性ペプチド食の1週間摂食によって、12%カゼイン食摂食よりも増加傾向を示した。一方、SPTのmRNA量は、大豆ペプチド摂食で顕著に減少した。興味深いことに無たん白質食摂食によるものが最も高い傾向を示した。これらのことから、1週間の摂食によるSPT mRNA量への影響は、角層セラミド量には影響しないことが考えられた。セラミド以外の皮脂の合成を検討するべく、コレステロールの制御酵素であるHMG CoA reductaseのmRNA量を測定したところ、SPTとは異なった傾向を示し、セラミドとコレステロールの生合成は異なった制御を受けていると考えられた。

## 文 献

- 1) 濱中すみこ (2007): 細胞間脂質 (細胞外角層脂質). 日本皮膚科学会誌, **117**, 143-148.
- 2) 濱中すみこ (2003): バリア障害を示す皮膚疾患—グルコシルセラミドの役割—. 皮膚臨床, **45**, 685-1692.
- 3) Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, Suzuki A, Elias PM, Holleran WM and Hamanaka S (2000): Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res*, **41**, 2071-2082.
- 4) 大石祐一 (2005): 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. 大豆たん白質研究, **8**, 86-89.
- 5) Oishi Y, Fu ZW, Ohnuki Y, Kato H and Noguchi T (2003): Effets of protein deprivation on  $\alpha 1$  (I) and  $\alpha 1$  (III) collagen and its degrading system in rat skin. *Biosci Biotech Biochem*, **66**, 117-126.