

# コレステロール負荷時における大豆たん白質摂取の効果の トランスクリプトーム解析

加藤久典\*・辻 真之介

東京大学大学院農学生命科学研究科

## Transcriptome Analysis of the Effect of Soy Protein Intake in Cholesterol-loaded Rats

Hisanori KATO and Shinnosuke TSUJI

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

### ABSTRACT

We have previously reported the effect of consumption of soy protein isolate (SPI) in combination with other proteins on gene expression profile of rat liver in an attempt to evaluate of the effect of SPI intake in dietary life. The result showed that a large part of the action of SPI including ones on fatty acid and cholesterol metabolism was maintained even in the presence of other dietary proteins. However the influence of such diets on serum cholesterol level was negligible. In the present study, similar analysis was conducted under a different experimental condition. Ten-week-old male Wistar rats were pair-fed on experimental diets containing 0.5% cholesterol for 2 weeks. The experimental diets used were 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). The increase of serum cholesterol level was significantly suppressed in S, G and G+S groups. Triglyceride and cholesterol levels in the liver were lowest in the S-fed group. The result of DNA microarray analysis showed that the total number of the genes that responded to dietary protein was lower in the mixed protein groups as compared with S and G groups. The expression levels of the genes for cholesterol synthesis pathway were low, and the impact of dietary protein on them was not evident. On the other hand, the expression levels of genes for the enzymes involved in fatty acid synthesis were relatively consistently reduced in groups fed on S- and G-containing proteins. The result indicates that the effects of mixed-protein feeding are less prominent under the present condition as compared with the previous experiment and that the responses of genes for fatty acid synthesis pathway are retained even when SPI is consumed with other proteins.

\*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

Key words : nutrigenomics, DNA microarray, lipid metabolism, cholesterol

昨年度の研究「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」において、大豆たん白質 (SPI) をカゼインやグルテンとの混合食としてラットに給餌した場合の効果をDNAマイクロアレイにより解析した<sup>1)</sup>。その結果、遺伝子発現全体のパターンや脂肪酸代謝やコレステロール代謝に関わる遺伝子の発現は、混合たん白質食においてもSPIの効果はかなり反映していることが明らかとなった。一方、その際に適用した実験条件においては、何れのたん白質食も血中のコレステロールへの影響は小さいことがわかった。そこで本年度は、いくつかの条件を変更し、大豆たん白質の脂質代謝改善作用やその他の健康増進作用に関してさらなる情報を得ることを目的として実験を行った。変更点は以下の3点である。食餌にコレステロール (0.5%) を添加したこと、昨年より週齢の進んだ動物を使用したこと、食餌摂取量の影響を排除するためグルテン群の摂食量に揃えたこと、である。たん白質の種類としては、昨年と同様に、20%カゼイン食群、20%SPI食群、20%グルテン食群、10%C+10%S食群、10%G+10%S食群とし、一週間の予備飼育後これらを2週間給与した。肝臓における遺伝子発現プロファイルを得て、特に混合たん白質の影響に注目して解析を行った。

## 方 法

### 動物飼育

9週齢のWistar系雄ラット (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2日間は0.5%コレステロール (Nakalai Tesque) を含む20%カゼイン (和光純薬) 食で自由給餌、さらに3日間は同じ餌で制限給餌 (10時~18時) を行い、計7日間の予備飼育を行った。予備飼育終了時に、5匹について (d0群)、頸動脈血の採取、肝臓の採取および精巣上体の脂肪重量測定を行った。引き続き残りのラットについて、0.5%コレステロールを含む各実験食に変え、さらに2週間摂取させた。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) の食餌組成はTable 1に示した。この間摂食量の影響を除くため、pair-feedingを行った。すなわち、昨年度の研究ではG食の摂食量が多少低くなっていたため、G群の摂食量を毎日測定してその量を他の全ての群に翌日与えた。実験食開始から14日目から15日目にかけて16時間絶食させた後、ネブタール麻酔、頸動脈採血を行い、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。また、実験食期間最後の3日間の糞を回収し乾燥させた。

血清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、トリグリセライド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。糞中のコレステロールは肝臓と同様に測定した。

肝臓組織をTRIzol reagent (Invitrogen) でホモゲナイズし、その後既報<sup>2)</sup>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、PolyAtract® mRNA Isolation Systems III & IV (Promega) を用いてmRNAの抽出を行った。Expression Analysis Technical

Table 1. Composition of 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     | —       |
| Cholesterol         | 5.0     | 5.0     | 5.0     | 5.0     | 5.0     |
| 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. Cholesterol was obtained from Nakalai Tesque.

Manual (Affymetrix) に従って、各群15 $\mu$ g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 $^{\circ}$ C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。

測定値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) で表した。各群

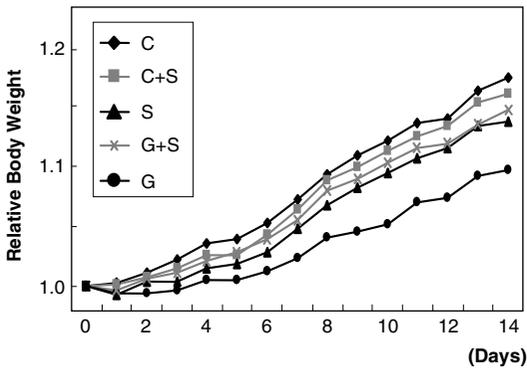


Fig. 1. Body weight changes of the rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein and 10% soy protein diet (C+S) or a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S) for two weeks (n=5).

の有意差検定は分散分析により行った。

## 結果と考察

試験期間中の体重増加量をFig. 1に示す。摂食量を抑えたにもかかわらず、G群は他の群と比較して顕著に低かった。S群では対照群よりわずかに体重増加が小さかった。G+S群ではS群のレベルまで回復していた。これらは、各たん白質の栄養価を反映しているためと考えられた。昨年とは異なりS群でわずかな低下が認められたのは、ペアフィーディングによる摂餌量の制限によってアミノ酸組成の違いが強めに現れたためと推察される。肝臓重量についてはG群とS群で対照群と有意に小さかった(データ省略)。精巢上体脂肪重量、血清中コレステロールをFig. 2に示した。脂肪重量(Fig. 2A)はG群で有意に低かったが、その他の食餌群の間に差は認められなかった。血中コレステロールはS, G, C+S, G+Sの全群で対照群より有意に低かった(Fig. 2B)。試験期間の最後の3日間の糞を集め、コレステロール排泄量を測定したところ、SとG+S群で有意な増加が認められ、一方C+SおよびG群でも増加傾向があった(データ省略)。各植物性たん白質によるコレステロールの吸収抑制が血中コレステロール低下作用の少なくとも一部を担っていると考えられた。血中のトリグリセリドおよびグルコースについては、摂取たん白質による差は無かった(データ省略)。Fig. 3に肝臓中の総コレステロールおよびトリ

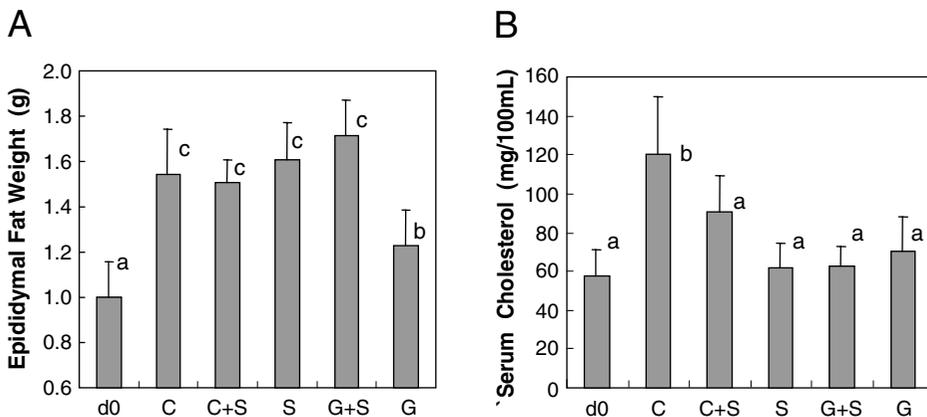


Fig. 2. Epididymal fat weight (A) and serum cholesterol levels (B) of rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein and 10% soy protein diet (C+S) or a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S) for two weeks (n=5). Day zero (d0) indicates the values on the starting day of the experimental diet. The bars not sharing the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

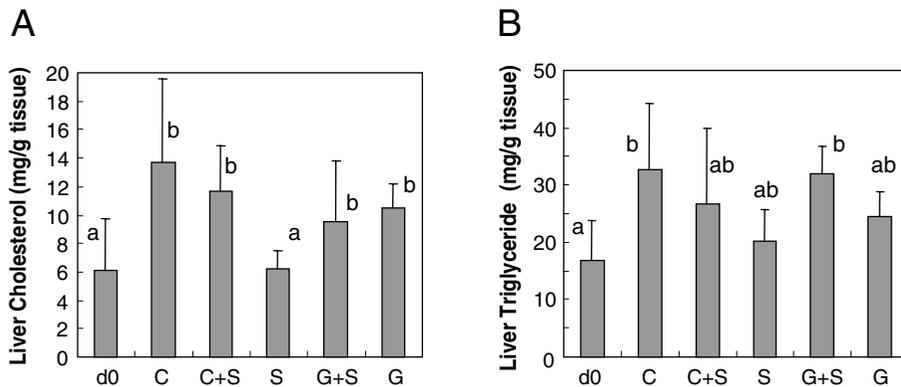


Fig. 3. Liver cholesterol (A) and liver triglyceride levels (B) of rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on a 20% casein diet (C), a 20% gluten diet (G), a 20% soy protein diet (S), a 10% casein and 10% soy protein diet (C+S) or a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S) for two weeks (n=5). Day zero (d0) indicates the values on the starting day of the experimental diet. The bars not sharing the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

グリセリド量を示す。肝臓中コレステロールは、S群で有意に低く、実験食摂取開始前のレベルと同程度であった (Fig. 3A)。G群、G+S群でも低下傾向が認められたが、有意な減少ではなかった。肝臓中トリグリセリドに関しては、S群、G群等で低下傾向があったが、対照群と比較して有意な差ではなかった (Fig. 3B)。本実験の条件下では、血中、肝臓中の何れに対してもコレステロールレベルに対するたん白質食の効果が強く表れることがわかった。特にSやGのみならず、これらの混合食でも比較的強い効果が維持されることが明らかとなった。

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. 4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。G群が他と離れていたが、C、S、C+S、G+S群の4つは近くにプロットされ、これらの4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。G+SはGよりもSに近かったため、SPIの効果がより強く現れていることが示唆された。

次に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、C+Sは162個、Sは628個、G+Sは267個、Gは689個であった。これらの数はどれも昨年度の結果に比べると小さいものであった。特に混合食で低い傾向が強かった。週齢の違い、コレステロール負荷の影響、ペアーフィードの影響のどれがこの

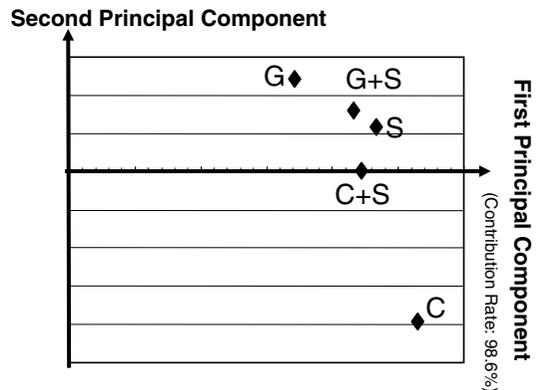


Fig. 4. Principal component analysis (PCA) of the DNA microarray data obtained from the liver of rats fed on diets with different protein sources. Rats were fed on respective diets as shown in the legend to Fig. 1. PCA was carried out using all raw data obtained by DNA microarray analysis of rat liver transcripts. The result was plotted in the two dimensional space.

違いに関与しているかは明確でないが、食餌摂取量を揃えたことが原因の一つとなっていることは考えられる。また、大豆たん白質の効果については、幼齢ラットと成獣では大きく異なることは既に報告されているので<sup>3)</sup>、これも重要なファクターであると推測された。

コレステロール代謝系と脂肪酸代謝系の遺伝子について、昨年度の研究でS群において発現変動が見られたものを中心に抜き出したのがTable 2である。表中の数字は、GeneChipのアルゴリズムによりC群と比較して発現が変化すると判断された遺伝子について、変

Table 2. Expression changes of selected genes for cholesterol and fatty acid metabolism

| Gene Name   | C+S       | S              | G+S       | G         |
|---|-----------|----------------|-----------|-----------|
| Metabolism of Cholesterol and Bile Acid               |           |                |           |           |
|   |           | (Fold Changes) |           |           |
| 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1      | 0.62      | NC             | 0.76      | NC        |
| Sterol-C4-methyl oxidase-like                         | NC        | NC             | NC        | NC        |
| Cytochrome P450, subfamily 51                         | NC        | NC             | NC        | NC        |
| Farnesyl diphosphate synthase                         | NC        | NC             | NC        | NC        |
| <i>Mevalonate (diphospho) decarboxylase</i>           | <i>NC</i> | <i>NC</i>      | <i>NC</i> | <i>NC</i> |
| <i>Llanosterol synthase</i>                           | <i>NC</i> | <i>NC</i>      | <i>NC</i> | <i>NC</i> |
| 7-Dehydrocholesterol reductase                        | NC        | NC             | NC        | NC        |
| Isopentenyl-diphosphate delta isomerase               | NC        | NC             | NC        | NC        |
| <i>Squalene epoxidase</i>                             | <i>NC</i> | <i>NC</i>      | <i>NC</i> | <i>NC</i> |
| <i>Isopentenyl-diphosphate delta isomerase</i>        | <i>NC</i> | <i>NC</i>      | <i>NC</i> | <i>NC</i> |
| Farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1           | NC        | NC             | NC        | NC        |
| <i>Mevalonate kinase</i>                              | <i>NC</i> | <i>NC</i>      | <i>NC</i> | <i>NC</i> |
| 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase       | NC        | NC             | NC        | NC        |
| Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 | 0.87      | 0.81           | NC        | 1.52      |
| Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide*   | 0.66      | NC             | 0.71      | NC        |
| Aldehyde dehydrogenase family 1, member A1*           | 0.57      | 1.52           | 0.71      | NC        |
| Fatty Acid Synthesis                                  |           |                |           |           |
| Sterol regulatory element binding factor 1            | NC        | 0.54           | 0.66      | 0.54      |
| Fatty acid synthase                                   | 0.47      | 0.57           | 0.66      | 0.50      |
| Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha                   | NC        | 0.62           | NC        | NC        |
| Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta                    | 0.76      | 0.62           | NC        | NC        |
| Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain   | NC        | 0.29           | 0.57      | NC        |
| Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1                      | NC        | NC             | NC        | 0.62      |
| Fatty Acid Oxidation                                  |           |                |           |           |
| Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1        | NC        | NC             | NC        | 0.66      |
| Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain   | NC        | 0.29           | 0.57      | NC        |
| Carnitine palmitoyltransferase 1, liver               | NC        | 0.71           | 0.76      | 0.71      |
| Carnitine palmitoyltransferase 1, liver               | NC        | 1.23           | NC        | NC        |
| Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2                  | NC        | NC             | 0.76      | NC        |

Rats were fed on a 20% casein diet, a 10% casein and 10% soy protein diet (C+S), a 20% soy protein diet (S), a 10% gluten and 10% soy protein diet (G+S), or a 20% gluten diet (G) 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 fold ratio of increase or decrease. "NC" indicates genes whose expression was determined "Not Changed" by the algorithm of Microarray Analysis Suit. Genes whose expression level was determined "Absent" are shown in italic.

化倍率を示したものである。NCは変化なしと判定されたもの、斜体で示されているものは発現量が非常に低かった (Absent) 遺伝子である。コレステロール合成系酵素の遺伝子発現については、コレステロール負荷の影響を反映して昨年の結果より発現量が顕著に低かった。発現量がAbsentであった遺伝子が多かったが、いくつかについてはPresentとなっていた。しかし何れの場合も食餌タンパク質による発現量の変化は認められなかった。例外的に混合たん白質食2種におけるHMG-CoA synthase 1についてのみ、発現量が低下していた。

コレステロール異化の律速酵素であるCyp7A1 (cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1,

cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase) の発現に関しては、G群では増加、SとC+S群では低下という逆の変動が見られた。これは、コレステロール排出促進に対する代償性の反応や食餌たん白質による同遺伝子への直接的な調節作用などの程度が異なるために生じた可能性がある。経時的な変動パターンなども解析する必要があると考えられる。

一方、脂肪酸合成系の酵素に関しては、脂肪酸合成酵素 (FAS) の発現が全ての実験食で低下していたこと、その他いくつかの酵素に関しても発現低下あるいはNCであったことから、S、G、混合食の何れも脂肪酸合成に抑制的に作用していることが予想された。ただし、血中や肝臓中のトリグリセリドや脂肪組織重量

には直接的には反映されない程度の効果であると考えられたが、これらについても飼育期間をより長くすれば違う影響が表れた可能性もある。興味深いことに、sterol regulatory element binding factor 1の遺伝子発現がS, G+S, G群で顕著に低下していた。この変化がFAS等の遺伝子発現低下の上流にあることが示唆された。脂肪酸酸化系については、一貫した応答は認められなかったが、各実験食により低下しているものはいくつかあった。少なくとも、今回の実験系においては脂肪酸酸化系遺伝子発現の上昇が関与するような機構は作用していないと言える。

分離大豆たん白質や小麦グルテンによる脂質代謝改善作用に関しては古くから知られており多くの報告があるが、ヒトでの効果についてはなおも議論的となっている<sup>4)</sup>。また、分離大豆たん白質の脂質代謝改善効果は、どのような成分によるものかについても様々な報告があり、たん白質自身のアミノ酸組成<sup>5)</sup>、部分分解ペプチド<sup>6)</sup>、あるいはイソフラボンやサポニン<sup>7)</sup>と

いった他の成分が重要であるとされている。昨年度の研究では、遺伝子発現プロファイルから判断した混合食の効果は、単独摂取に近い部分が多く、アミノ酸組成以外の寄与が大きいと考えられた。今回の結果では、脂肪酸合成系に関しては混合食でも効果が維持される場合が多いが、遺伝子発現全体のパターンなどに関しては、昨年度の結果ほど一貫した応答が見られず、たん白質を混合することによって効果が“薄められる”と考えられる部分も大きいことがわかった。

トランスクリプトーム解析をはじめとするニュートリゲノミクス技術は、食品成分の効果を網羅的に解析する手法として有効であると考えられる<sup>8)</sup>。Badgerら<sup>9)</sup>やTachibanaら<sup>10)</sup>の報告にも見られるように、この手法は大豆たん白質の効果を解析することにも利用され始めている。この技術をさらに有効に利用することで、大豆たん白質をどのように摂取すればその効果を十分に引き出せるかという方向にも研究を進展させることが可能と考えられる。

## 要 約

実際の食生活を視野に入れた大豆たん白質摂取の効果を遺伝子発現プロファイルの点から解析することを目的とし、分離大豆たん白質 (SPI) をカゼインやグルテンとの混合食としてラットに給餌した結果を昨年報告している。混合食においても脂肪酸代謝やコレステロール代謝に関わる遺伝子の発現は、SPIの効果をかなり反映していることが明らかとなったが、血中のコレステロールへの影響は小さいことがわかった。本年度は、コレステロールを負荷した際 (0.5%) の同様な検討を行った。10週齢Wistar系雄ラットを20%カゼイン食群、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G群に対してペアフィーディングで2週間飼育した後、血清および肝臓を採取した。血中コレステロールレベルはコレステロール添加カゼイン食で顕著に増加したが、S, G, G+S群で有意に低く、C+Sでも低下傾向が認められた。肝臓中のトリグリセリドおよびコレステロールはS群で最も低かった。DNAマイクロアレイ解析の結果、食餌たん白質の違いに応答した遺伝子数は、SやGでは多いが混合食ではかなり少なくなっていた。コレステロール代謝関連の遺伝子への影響は今回の条件では比較的小さいことが明らかとなった。一方、脂肪酸合成に関連する遺伝子の発現低下が、S群に加えてC+S, G+S群でも確認された。以上の結果から、大豆たん白質に他のたん白質を混合摂取させた場合の遺伝子発現に対する効果は、昨年条件と比べると今回の条件では全体としては小さくなること、脂肪酸合成系に関しては比較的特異的な効果が維持されることが明らかとなった。

## 文 献

- 1) 加藤久典, 辻真之介 (2006): 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的研究, 大豆たん白質研究, **9**, 102-107.
- 2) 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.
- 3) Choi YS, Goto S, Ikeda I and Sugano M (1989): Interaction of dietary protein, cholesterol and age on lipid metabolism of the rat. *Brit J Nutr*, **61**, 531-543.
- 4) Dewell A, Hollenbeck PLW and Hollenbeck CB (2006): Clinical review: A critical evaluation of the

- role of soy protein and isoflavone supplementation in the control of plasma cholesterol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, **91**, 772-780.
- 5) Saeki S, Kanauchi O and Kiriyama S (1990): Some metabolic aspects of the hypocholesterolemic effect of soybean protein in rats fed a cholesterol-free diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **36**, S125-S131.
  - 6) 吉川正明, 山本大地, 竹中康之 (1999): 血中コレステロール低下作用を持つ大豆たん白質由来低分子ペプチドに関する研究, *大豆たん白質研究*, **2**, 125-128.
  - 7) Potter SM (1995): Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr*, **125**, 606S-611S.
  - 8) 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.
  - 9) Badger TM, Ronis MJ, Simmen RC and Simmen FA (2005): Soy protein isolate and protection against cancer. *J Am Coll Nutr*, **24**, 146S-149S.
  - 10) 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.