

大豆極性脂質結合たん白質のコレステロール低下作用

金本龍平*・木村真也・岡村 岳

京都府立大学大学院農学研究科

Cholesterol Lowering Effect of Soybean Lipophilic Proteins Associated with Phospholipids in Rat

Ryuhei KANAMOTO, Shinya KIMURA and Gaku OKAMURA

Graduate School of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522

ABSTRACT

Recently, a group of lipophilic proteins (LP) associated with lecithin (phospholipids) was fractionated from soy protein isolate (SPI) by newly developed methods of acid-precipitation. LP was found a major component of SPI and comprises about 30% of the total proteins. In this study, we examined effect of LP on plasma concentration of cholesterol and triacylglycerol to clarify whether LP exerts hypocholesterolemic action as observed in SPI. Five-week-old male Sprague-Dawley rats were fed diets containing casein, LP and its partial hydrolysate, LP-peptide or SPI as a protein source. The plasma levels of cholesterol and triacylglycerol were lower in the rats fed either LP, LP-peptide or SPI diet than in the rat fed casein diet. The lowering effect is greater in the rat fed LP-peptide than in the rat fed LP itself. The fecal bile acids and total lipids excretion did not differ significantly among the groups. Therefore, it can be considered that LP-peptide as well as LP itself modifies lipid metabolism directly and affect the plasma cholesterol and triacylglycerol levels. However, the expression of liver HMG-CoA reductase, Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and LDL receptor mRNA did not differ significantly among dietary groups. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 83-87, 2007.

Key words : lipophilic proteins, soy protein isolate, hypocholesterolemic action, bile acids, triacylglycerol, rat

大豆極性脂質結合たん白質 (LP; lipophilic proteins) は、従来の等電点沈殿法を改良した分画法によって大

豆分離たん白質 (SPI) 中に新たに見いだされた主要成分で、SPIの30%を占め、およそ10%のリン脂質を含んでいる¹⁾。SDS電気泳動での解析の結果、LPには様々な大きさのたん白質が検出され、おそらくオイル

*〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

ポディーを形成するオレオシンなどの膜たん白質の集合体であると推定される。

SPIや、その主要成分である β -conglycinin (7S) には血漿コレステロール低下作用やトリアシルグリセロール降下作用のあることはよく知られている^{2,3)}。またSPIを加水分解して得られたペプチドにリン脂質を加えることで、さらに強いコレステロール降下作用を発揮することが報告されている⁴⁾。そこで本研究では、LPの脂質代謝に対する効果を明らかにする事を目的に、LPおよびLPをプロテアーゼで部分加水分解したLPペプチドをラットに与え、血中および糞中の脂質と胆汁酸を分析した。

方 法

大豆極性脂質結合たん白質 (LP) およびLP-ペプチド

大豆極性脂質結合たん白質とそれを細菌のプロテアーゼで加水分解したLP-ペプチドおよび分離大豆たん白質 (SPI, フジプロR, 不二製油) は不二製油フードサイエンス研究所佐本博士より供与頂いた。LPとLP-ペプチドの組成をTable 1に示した。なお、LP-ペプチドは吸湿性があるため、デシケーター中冷暗所に保存した。

動物・試験食

5週齢Sprague-Dawley系雄ラット (日本SLC株式会社)、初体重110~120 gのものを購入した。ラットの飼育は、個別のワイアケージにて、室温22±2℃、湿度55±10%、12時間の明暗周期下 (明期 8:00~20:00) で行った。飼料および水は自由摂取。予備飼育として固形飼料を一週間摂取させたのち、試験飼料に切り替えた。試験はすべて、京都府立大学実験動物委員会の承認を得たうえで、京都府立大学実験動物飼育ガイドラインに沿って行われた。

試験飼料は、たん白質源として20%カゼイン食を基本食とし、カゼイン10%にLP、LP-ペプチド、SPIをそれぞれ10%加えたものを用いた。なお、LP-ペプチドはLPよりたん白質含量が若干劣るので (Table 1) それを補正するため10.7%加えた。Table 2に試験食の組成を示す。試験開始日に平均体重がほぼ等しくなるようにラットを4群に分け、各群6匹とした。試験食は16日間与え、その間、体重と摂食量は毎日測定した。

試料の採取

飼育終了日の朝8:00時にエサを抜き、8時間後にネンブタール麻酔下、大動脈より採血し血漿を調製した。放血屠殺後、直ちに肝臓を採取し、氷冷生理食塩水で

洗浄、秤量の後、液体窒素中で凍結した。凍結試料は分析まで-30℃で保存した。また屠殺前3日分の糞を採集し、凍結乾燥後に破碎して-30℃で保存した。

血漿の分析

血漿コレステロールは市販のアッセイキット (コレステロールCテストワコー) を用いて操作マニュアル通りにコレステロール濃度の測定を行った。トリアシルグリセロール、 β -リポたん白質、遊離脂肪酸およびケトン体は血液自動分析機を用いて測定した。

糞中胆汁酸含量の測定

糞中胆汁酸含量は、糞の乾燥粉末50 mgを99.5%エタノール2.5 mLに懸濁して65℃で1時間インキュベート、遠心分離後の上清と沈澱の洗液を合わせ溶媒を蒸発乾固後、残渣を90%エタノール0.5 mLに溶かしたものを測定用サンプルとし、総胆汁酸テストワコーを用いて求めた。

肝臓および糞中総脂質の定量

凍結保存した肝臓をドライアイス中で粉碎し、その0.5 gを秤取りBligh-Dyer法により、総脂質を抽出した。粉末にした糞0.2 gからも同様に抽出し、溶媒を除去した後に、秤量により総脂質量を求めた。

Table 1. Chemical composition of LP and LP-peptide

Ingredient	LP	LP-peptide
	g/kg	
Protein	797.7	743.5
Lipids	78.4	105.4
Sugar	27.9	29.3
Moisture	54.4	26.0
Ash	41.6	95.8

Table 2. Experimental diets

	Casein	LP	LP-Peptide	SPI
Casein	20	10	10	10
LP		10		
LP-Peptide			10.7	
SPI				10
Sucrose	10	10	10	10
α -Cornstarch	13.2	13.2	13.2	13.2
β -Cornstarch	39.4	39.4	38.7	39.4
Soybean oil	7	7	7	7
Vitamin (AIN93)	1	1	1	1
Mineral (AIN93G)	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose	5	5	5	5
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	0.13	0.13	0.13	0.13

HMG-CoA reductase, Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) およびLDL receptor mRNA発現量の測定

凍結保存した肝臓をドライアイス中で粉碎し、その0.2 g からAGPC法 (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法) によりRNAを調製した。各遺伝子のmRNAの発現量はリアルタイムPCR法で求め、Actin mRNA量で標準化した。用いたプライマーセットを以下に示す。

β -actin;

5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3' (sense),

5'-ATGGCTACGTACATGGCTGG-3' (antisense),

HMG-CoA-Reductase;

5'-TGTGCTGCTTTGGCTGTATGTCCG-3' (sense),

5'-AATTGGACGACCCTCACGGCTTTC-3' (antisense),

Cyp7a1;

5'-CTGTCATACCACAAAGTCTTATGTCA-3' (sense),

5'-ATGCTTCTGTGTCCAAATGCC-3' (antisense),

Table 3. Body weight change and total food intake of rats during the experiment

Diet	Body weight		Total food intake
	Initial	Final (g)	
Casein	160 $\pm$ 9	267 $\pm$ 23	285 $\pm$ 34
LP	160 $\pm$ 7	276 $\pm$ 21	316 $\pm$ 27
LP-peptide	159 $\pm$ 7	263 $\pm$ 24	296 $\pm$ 33
SPI	159 $\pm$ 9	277 $\pm$ 17	327 $\pm$ 28

Mean $\pm$ SD, n=6

Table 4. Effects of dietary proteins on plasma cholesterol, triacylglycerol, β -lipoprotein, free fatty acids and ketone body in rats

	TCHO	TG	β -Lip	FFA	Ketone
	mg/100mL	mg/100mL	mg/100mL	μ Eq	μ mol/L
Casein	149 $\pm$ 29 ^a	83.2 $\pm$ 27.5 ^a	446 $\pm$ 77 ^a	157 $\pm$ 29	72.5 $\pm$ 20.8
LP	133 $\pm$ 25 ^{ab}	70.5 $\pm$ 17.6 ^{ab}	389 $\pm$ 91 ^{ab}	130 $\pm$ 46	68.0 $\pm$ 13.8
LP-Peptide	111 $\pm$ 17 ^b	58.5 $\pm$ 13.3 ^{ab}	324 $\pm$ 58 ^b	165 $\pm$ 31	99.8 $\pm$ 43.2
SPI	111 $\pm$ 20 ^b	43.0 $\pm$ 17.2 ^b	308 $\pm$ 69 ^b	153 $\pm$ 26	111.0 $\pm$ 40.4

Mean $\pm$ SD, n=6

Table 5. Effects of dietary proteins on fecal bile acids and lipids excretion, and liver lipids in rats

Diet	Fecal			Liver	
	Dry weight	total lipids	bile acids	Weight	total lipids
	g/day	g/day	μ mol/day	g	g/tissue
Casein	1.44 $\pm$ 0.13 ^b	0.96 $\pm$ 0.09 ^c	45.6 $\pm$ 6.2	13.7 $\pm$ 2.3	0.60 $\pm$ 0.25
LP	1.87 $\pm$ 0.18 ^a	1.23 $\pm$ 0.10 ^a	50.1 $\pm$ 6.3	12.9 $\pm$ 1.2	0.46 $\pm$ 0.07
LP-peptide	1.67 $\pm$ 0.19 ^{ab}	1.03 $\pm$ 0.13 ^{bc}	49.1 $\pm$ 5.1	12.2 $\pm$ 1.7	0.52 $\pm$ 0.13
SPI	1.83 $\pm$ 0.21 ^a	1.15 $\pm$ 0.13 ^{ab}	48.6 $\pm$ 8.0	12.7 $\pm$ 1.0	0.50 $\pm$ 0.08

Mean $\pm$ SD, n=6

LDL-Receptor;

5'-CCATCAAGGAGTGCAAGACCAACG-3' (sense),

5'-AACCGGAAACCGCTGGGACATAG-3' (antisense).

統計処理

各測定値は、一元配置分散分析を行い、有意な差を認めたものについて、Tukey検定で群間の有意差 ($p<0.05$) を求めた。

結 果

Table 3には飼育開始と終了時の体重および、期間中の総摂食量を示している。CaseinとLP-peptideを与えた群の体重増加はLPとSPIを与えた群に比べ、僅かに低値を示している。摂食量も同様に、CaseinとLP-peptide群が他の2群に比べ僅かに少ない。しかし、いずれの場合も有意な差ではなかった。

Table 4に血漿中の総コレステロール、トリアシルグリセロール、 β -リポたん白質、遊離脂肪酸およびケトン体の濃度を示す。カゼイン食にくらべ、血漿総コレステロール値はLP-peptideとSPI食で有意に低値を示し、カゼイン食のおよそ70%まで低下していた。トリアシルグリセロール値もSPI食で有意に低下し、カゼイン食のおよそ50%となった。LP-peptide食においても低下傾向が見られカゼイン食のおよそ70%となったが有意ではなかった。 β -リポたん白質もLP-peptide, casein食において有意に低下し、カゼイン食のおよそ70%となった。LP食においても総コレステロール、

トリアシルグリセロール、 β -リポたん白質とも低下する傾向が認められたが、いずれも有意差は認められなかった。遊離脂肪酸は4群間で差は認められなかった。ケトン体の平均濃度はLP-peptideとSPIで高値を示したが、個体差が大きく有意差は認められなかった。

糞の排泄量はカゼイン食に比べ、LP、SPIでいずれも多くなり、LP-peptideも多くなる傾向が見られたが有意な差ではなかった。総脂質の糞への排泄量は糞量とはほぼ相関しており、LPで最も多く続いてSPI、LP-peptideの順となったが、LP-peptideとカゼイン食の間には有意な差はなかった。胆汁酸の糞中への排泄量はLP、LP-peptide、SPIでごく僅か増える傾向が見られたが、4群間で有意差は認められなかった。また、肝臓重量、肝臓総脂質量ともLP、LP-peptide、SPI食でカゼイン食に比べ僅かに減少する傾向が見られたが、やはり有意差は認められなかった (Table 5)。

Fig. 1は血漿コレステロール値と糞中に排泄された胆汁酸量との相関を見たものだが、コレステロール値と胆汁酸量の間には全く相関が見られなかった。

Table 6に体内コレステロールのホメオスタシスに中心的な役割を果たしているHMG-CoA reductaseと、Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) およびLDL receptor mRNAの発現量をリアルタイムPCR法で測定した結果を示す。いずれの遺伝子の発現量も4群間で有意な差は認められなかったが、CYP7A1のmRNA量はLPとLP-peptide食を与えたラットで、1.5倍ほど高くなる傾向が認められた。

考 察

今回の実験で、LPおよびLP-peptideが血漿コレステロールとトリアシルグリセロールの降下作用を持つことが明らかとなった (Table 4)。血漿コレステロール値降下の割合が β -リポたん白質減少の割合とほぼ一致することから、これは主としてLDLコレステロールの減少によるものと考えられる。一方、LPとLP-peptideの効果を比較すると、LP-peptideの方が強い効果を発揮している。長岡らはSPIと、SPIのトリプシン加水分解物にそれぞれリン脂質を結合させたSP (soy protein with bound phospholipids) とSPHP (soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids) をラットに与えてコレステロール降下作用を比較し、SPHPにより強いコレステロール降下作用のあることを報告している⁴⁾。今回の我々の結果はこのことと一致している。しかし、長岡らによるとSPHPの作用の一部は胆汁酸の糞中への排泄促進によるとされている

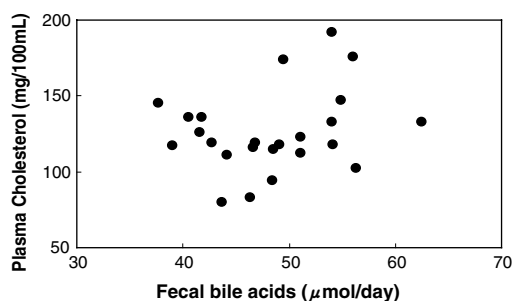


Fig. 1. Correlation between fecal bile acids excretion and plasma cholesterol concentration.

Table 6. Effects of dietary proteins on the expression liver HMG CoA reductase, Cyp7a1 and LDL receptor mRNA in rats

	HMG CoA reductase	Cyp7a1	LDL receptor
Casein	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1
LP	0.9 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0
LP-peptides	1.0 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1
SPI	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1

Mean $\pm$ SD, n=6

が、LP-peptideには胆汁酸排泄促進作用は認められなかった (Table 5)。このことからLP-peptideは、より直接的にコレステロール代謝に作用しているものと考え、コレステロール代謝で中心的な役割を果たしているHMG-CoA reductaseと、Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) およびLDL receptorへの影響を、それらのmRNA発現量を測定することで検討したが、いずれの発現量にも有意な変化は認められなかった (Table 6)。今後、これらの活性へ影響も調べる必要があるものと思われる。

SPIの血漿トリアシルグリセロール降下作用に関して、入谷らはSPIを与えたラットの肝臓での脂肪酸合成活性が減少することを報告している⁵⁾。さらに、鬼頭らは β -conglycininにSPI以上のトリアシルグリセロール降下作用を見いだし²⁾、このときラット肝臓のミトコンドリアcarnitine palmitoyltransferaseの活性が上昇し、fatty acid synthase活性が減少する事を報告している³⁾。さらに、森山らは β -conglycininを与えたマウスで、acyl-CoA oxidase mRNAの発現量が増加することを見いだしており、脂肪酸酸化も亢進している可能性が示された⁶⁾。LPおよび、LP-peptideが β -conglycininと同じ機構でトリアシルグリセロール降下作用を発揮しているかどうかは今回の実験で

はわからないが、血漿中のケトン体濃度に増加の傾向が見られることから、 β 酸化が亢進しているかもしれない。

以上、今回の研究でLPおよびLP-peptideに血漿コレ

ステロールおよびトリアシルグリセロール降下作用のあることが明らかになったが、その作用機構は不明であり、今後のさらなる検討が待たれる。

要 約

大豆極性脂質結合たん白質 (LP; lipophilic proteins) は、分離大豆たん白質 (SPI) より新たに分画されたリン脂質結合たん白質でSPIのおよそ30%を占める。本研究では、LPの脂質代謝に対する効果を明らかにするため、LPおよびLPをプロテアーゼで部分加水分解したLPペプチドをラットに与え、血中および糞中の脂質と胆汁酸を分析した。5週齢のSD系雄ラットに20%カゼイン、10%LP (10%LP+10%カゼイン)、10%LP-peptide (10.7%LP-peptide+10%カゼイン)、10%SPI (10%SPI+10%カゼイン) 食を与え16日間飼育した。その結果10%LP、10%LP-peptide、10%SPI食ともカゼイン食に比べ、血漿コレステロール値およびトリアシルグリセロール値が低くなった。また、LP-peptide食の効果の方がLP食より大きかった。一方、糞に排出される胆汁酸と総脂質、および肝臓の総脂質含量に違いは見られなかった。これらの結果はLPおよびLP-peptideが直接脂質代謝を修飾する可能性を示唆している。しかし、HMG-CoA reductase, Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) およびLDL receptor mRNAの発現量に有意な変化は認められなかった。

文 献

- 1) Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, Kugitani H, Kohno M, Hirotsuka M and Kito M (2007): Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chem*, **102**, 317-322.
- 2) Aoyama T, Kohno M, Saito T, Fukui K, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Hirotsuka M and Kito M (2001): Reduction by phytate-reduced soybean beta-conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 1071-1075.
- 3) Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M and Kito M (2004): Effects of soybean beta-conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 1153-1155.
- 4) Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G and Yamamoto K (1999): Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *J Nutr*, **129**, 1725-1730.
- 5) Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K and Ikeda H (1996): Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr*, **126**, 380-388.
- 6) Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N and Maebuchi M (2004): Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 352-359.