

メタボリックシンドロームを予防する機能性食品成分としての 大豆極性脂質結合たん白質の生理効果とその作用機構の解明

金本龍平*・稲井まりえ・宮木和歌子

京都府立大学大学院生命環境科学研究科

Physiological Function and Its Mechanism of Soybean Lipophilic Protein as a Functional Food for Prevention of Metabolic Syndrome

Ryuhei KANAMOTO, Marie INAI and Wakako MIYAKI

Graduate School of Life and Environmental Science, Kyoto Prefectural University,
Kyoto 606-8522

ABSTRACT

We investigated whether Soybean lipophilic proteins (LP) and its enzymatic hydrolysate, LP-peptide (LP-Pep) were effective for prevention of a metabolic syndrome in mouse which was maintained on high fat diet for 28 and 70 days to induce obesity. Feeding of LP and LP-Pep decreased plasma concentrations of triacylglycerol (TG) and total bile acid (TBA) concomitant with the increase of fecal excretion of TBA. Although LP-Pep was more effective than LP itself, the effects of LP-Pep were less than those of HMF (high-molecular-weight fraction of soy protein digest) and SPI (soy protein isolate). Unlike previous many reports, these dietary protein and peptide did not decrease a plasma concentration of cholesterol though they increased fecal excretion of TBA in C57BL/6J mouse maintained on high fat diet. LP-Pep and HMF slightly reduced the accumulation of body fat caused by high fat diet. The expression of Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), HMG-CoA reductase and Acetyl-CoA carboxylase (ACC) mRNA in liver were changed by experimental diets. However, the expression did not correlated with the plasma concentrations of TG, TCHO and TBA. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 75-81, 2008.

Key words: lipophilic proteins, metabolic syndrome, bile acids, triacylglycerol, cholesterol

*〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

メタボリックシンドロームは、肥満を基盤に高血糖・高血圧・高脂血症のうち2つ以上を合併した状態を言い、動脈硬化性疾患の危険性を高める複合型リスク症候群である。平成16年国民健康・栄養調査によれば、30歳～60歳代の男性、60歳代の女性の約3割は肥満と報告されており、2005年に提唱されたわが国における診断基準を当てはめると、40歳～74歳のメタボリックシンドロームの有病者数と予備群者数は、併せて約1,960万人と見積もられている。従ってその対策は急務であり、発症を予防するための機能性食品にも注目が集まっている。中でも、大豆分離たん白質（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おり、メタボリックシンドロームに対するその効果が期待されている^{1~4}。

大豆極性脂質結合たん白質（LP）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40%を占め、およそ10%のリン脂質を含んでいる⁵。これまで、LPおよびその加水分解物であるLPペプチドをコレステロールを負荷したラットに与え、脂質代謝におよぼす効果を検討してきた結果、LPおよびLPペプチドとも顕著な血清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を有することが明らかとなった⁶。また、LPよりLPペプチドに強い効果が見られた。ところが、コレステロール降下作用を有する食物たん白質に良く見られる糞中へのステロイド排泄促進作用は認められなかった。これらのことはLP摂取が脂質代謝そのものに作用し、その生理効果を発揮する事を示唆している。そこで、今回、高脂肪食で肥満が誘導されるC57BL/6Jマウスを用いて、LPおよびLPペ

プチドが発揮する生理効果を、体内脂質の代謝制御に中心的な役割を果たす遺伝子の発現変動の観点から解析し、その作用の分子機構を明らかにすることでメタボリックシンドロームを予防する機能性食品としての利用可能性を検討した。

方 法

大豆たん白質

大豆極性脂質結合たん白質（LP）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（LP-Pep）、大豆分離たん白質（SPI、フジプロR、不二製油）およびHMF（High molecular weight fraction of soy protein digest）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。なお、LP-Pepは吸湿性があるため、デシケーター中冷暗所にて保存した。

試験食

高脂肪（HF）食は武田ら⁷の報告に従って、40%ラードと36%カゼインを含むように調製した。これを基本にカゼインの半量を、LP、LP-Pep、HMF、SPIに置き換えたものを試験食とした。また、通常の20%カゼイン食をControl食として用いた（Table 1）。

マウスの飼育

5週齢雄C57BL/6Jマウスは日本SLCより購入した。飼育は、3匹または4匹を一つの金網ケージに入れ、室温22±2℃、湿度55±10%、12時間の明暗周期下（明期 6:00～18:00）で行い、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。水は自由摂取とし、体重と摂食量は2日毎に測定した。実験1では、4匹1群とし4週間飼育した。実験2では6匹1群とし3匹を1ケージに入れ10週間飼育し

Table 1. Experimental diets

	Control	HF	HF+LP	HF+LP-Pep (g/kg)	HF+HMF	HF+SPI
Casein	250	360	180	180	180	180
LP	0	0	205	0	0	0
LP-Peptide	0	0	0	220	0	0
HMF	0	0	0	0	245	0
SPI ⁵	0	0	0	0	0	182
Sucrose	90	90	90	90	90	90
Lard	0	400	400	400	400	400
Soybean Oil	5	5	5	5	5	5
Cornstarch	447.5	47.5	22.5	7.5	32.5	45.5
Cellulose	50	50	50	50	0	50
AIN-93 Vitamin Mix	10	10	10	10	10	10
AIN-93G Mineral Mix	35	35	35	35	35	35
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

た。これらの実験は、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時間後にネンブータル麻酔下、大静脈より採血し血漿を調製した。放血屠殺後、直ちに肝臓および睪丸周囲脂肪組織を採取し、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°C で保存した。また屠殺前3日間の糞を1日毎に採集し、凍結乾燥後に破碎して -30°C で保存した。

血漿の分析

血漿総コレステロール (TCHO) とトリアシルグリセロール (TG) 濃度は血液自動分析機を用いて測定した。血漿総胆汁酸 (TBA) 濃度は総胆汁酸テストワコーを用いて求めた。

糞中胆汁酸含量の測定

胆汁酸の抽出はホットエタノール法により行った。糞の乾燥粉末50 mgを99.8%エタノール2.5 mLに懸濁して 65°C で1時間インキュベートした後、遠心分離し上清を得た。さらに沈澱を99.8%エタノールで2回洗い、その洗液と先の上清と合わせた後、溶媒を蒸発乾固した。これに、90%エタノール1.0 mLを加え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定量した。

Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), HMG-CoA reductaseおよびAcetyl-CoA carboxylase (ACC) 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、 β -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'-ATGAGCTGCGTGTGGC -3' (sense), 5'-TGGCTGGGGTGTGAAGG -3' (antisense), HMG-CoA-Reductase; 5'-CGAGCCACGACCTAATGAAG -3' (sense),

5'-CCGGCGAATAGACACACCA -3' (antisense), Cyp7a1; 5'-CAAGAGCAACTAAACAACCTGCC -3' (sense), 5'-GTGCATTAAGTGTGGGTAAAGAGC -3' (antisense), ACC; 5'-TCTGACAGGAGCAGGTGCC -3' (sense), 5'-GCCAGTGTAAGACTGTGAAGACTC -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

実験 1

試験食で28日間飼育した時の1日当たり摂取エネルギー量と体重増加率、および、飼育終了時の睪丸周囲脂肪組織量と肝臓重量を100 g体重当たりに換算したものをTable 2に示す。摂食量は餌によって異なり、HF食ではControl食の80%となったが、摂取エネルギー量はControl食の115%であった。体重増加率と脂肪重量は摂取エネルギー量に、ほぼ関連しており、体重増加率、脂肪重量ともHF食で最も大きいことから、高脂肪により肥満が誘導されたものと思われる。6群の中で、LP-Pep食の摂食量は最も少なく、Control食の70%となり、このため摂取エネルギー量はControl食とほぼ等しくなったが、体重増加率は6群間で最も小さく、また、統計的に有意差は認められなかったが、脂肪重量も最も少なかった。また、HMF食とSPI食では、エネルギー摂取量がControl食より多いのにもかかわらず、体重増加率および脂肪重量はControl食とほぼ等しくなった。これらのことから、LP-Pep, HMF, SPIには高脂肪食による肥満を抑制する効果を示唆された。

Table 3に血漿TG, TCHO, TBA濃度を示した。TG濃度は高脂肪食によって低下する傾向が見られ、その傾向はLP, LP-Pep, HMF, SPIの順に強くなり、SPI食ではControl食の60%まで低下した。TCHO濃度は

Table 2. Food intake, body weight gain, white adipose tissue and liver weight of C57BL/6J mouse fed experimental diets for 28 day

Diet	Food intake (kJ/d/mouse)	Bw gain (fold)	Adipose (g/100g Bw)	Liver (g/100g Bw)
Control	40.5	1.16 $\pm$ 0.03 ^{abc}	2.02 $\pm$ 0.45	3.82 $\pm$ 0.21
HF	46.0	1.22 $\pm$ 0.04 ^a	2.44 $\pm$ 0.43	3.85 $\pm$ 0.22
LP	45.2	1.20 $\pm$ 0.02 ^{ab}	2.17 $\pm$ 0.54	3.87 $\pm$ 0.12
LP-Pep	41.9	1.13 $\pm$ 0.03 ^c	1.62 $\pm$ 0.42	4.05 $\pm$ 0.51
HMF	43.8	1.15 $\pm$ 0.03 ^{bc}	2.04 $\pm$ 0.22	3.79 $\pm$ 0.13
SPI	45.0	1.18 $\pm$ 0.03 ^{abc}	2.03 $\pm$ 0.46	3.69 $\pm$ 0.51

たん白質の種類にかかわらずControl食に比べ高脂肪食で高くなる傾向が見られHMF食でControl食の1.5倍となった。血漿TBAはControl食とHF食、LP食群間で差はなく、LP-PepおよびHMF食で低下する傾向が見られ、SPI食ではControl食の30%にまで低下した。一方、糞中に排泄されるTBA量は高脂肪食で多くなる傾向が見られ、HMF食で最も多くなった。

次に脂質代謝に及ぼす影響を検討するために、胆汁酸、コレステロール、脂肪酸合成、それぞれの律速酵素であるCholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1)、HMG-CoA reductaseおよびAcetyl-CoA carboxylase mRNA (ACC) の発現量をreal-time PCR法によって測定した (Fig. 1)。CYP7A1およびHMG-CoA reductase mRNAの発現量はLP-Pep、HMFおよびSPI食で高くなる傾向が見られ、CYP7A1 mRNAの発現量はControl食に比べSPI食で8倍、HMG-CoA reductase mRNAの発現量はHMF食で2倍になった。しかし、HFおよびLP食での発現量はControl食と変わらなかった。ACC mRNA量は、Control食とSPI食で個体間のバラツキが大きく、6群間で有意の差は認められなかった。

実験 2

飼育期間を70日間に延長し、摂食期間による効果に差があるかどうかを検討した。

Table 3. Plasma concentrations of triacylglycerol (TG), total cholesterol (TCHO) and total bile acid (TBA) in C57BL/6J mouse fed experimental diets for 28 day

Diet	TG (mg/100mL)	TCHO (mg/100mL)	TBA (μ M)
Control	41 $\pm$ 8 ^a	79 $\pm$ 6 ^b	32 $\pm$ 4 ^a
HF	37 $\pm$ 5 ^{ab}	102 $\pm$ 5 ^{ab}	31 $\pm$ 8 ^a
LP	34 $\pm$ 4 ^{ab}	110 $\pm$ 4 ^{ab}	33 $\pm$ 4 ^a
LP-Pep	33 $\pm$ 10 ^{ab}	107 $\pm$ 2 ^{ab}	22 $\pm$ 7 ^{ab}
HMF	28 $\pm$ 6 ^{ab}	119 $\pm$ 5 ^a	21 $\pm$ 8 ^{ab}
SPI	25 $\pm$ 4 ^b	111 $\pm$ 10 ^{ab}	11 $\pm$ 1 ^b

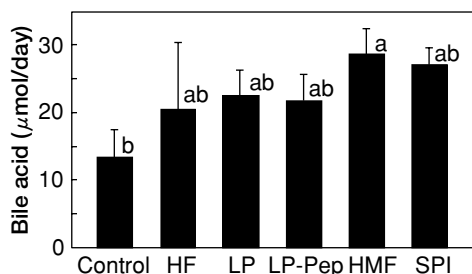


Fig. 1. Fecal excretion of bile acids in C57BL/6J mouse fed experimental diets for 28 day.

長期飼育によってControl食とHF食の差がさらに顕著になるものと期待したが、体重の増加率に期待したほどの差は現れなかった。しかし、脂肪重量はHF食でControl食のほぼ2倍になっており、長期飼育によって肥満が充進したことを示している (Table 4)。一方、LP-Pep食は28日間の飼育では肥満の抑制を示唆する結果が得られたが、70日間の飼育では、体重増加率はControl食より小さいにもかかわらず、体脂肪重量の割合が大きくなり、肥満抑制効果が見られなくなった。LP食も同様に肥満抑制効果は認められなかった。HMF食は摂取エネルギー量がHF食とほぼ同じであるが、体重増加率や脂肪含量がHF食に比べ小さくなった。また、SPI食は摂取エネルギー量が大きいにもかかわらず、体重増加率や脂肪含量がHF食より低くなる傾向が見られた。したがって、HMF食とSPI食は長期飼育によっても肥満抑制効果のある程度維持しているものと考えられる。

血漿TG、TCHO、TBA濃度は28日間飼育と同様な

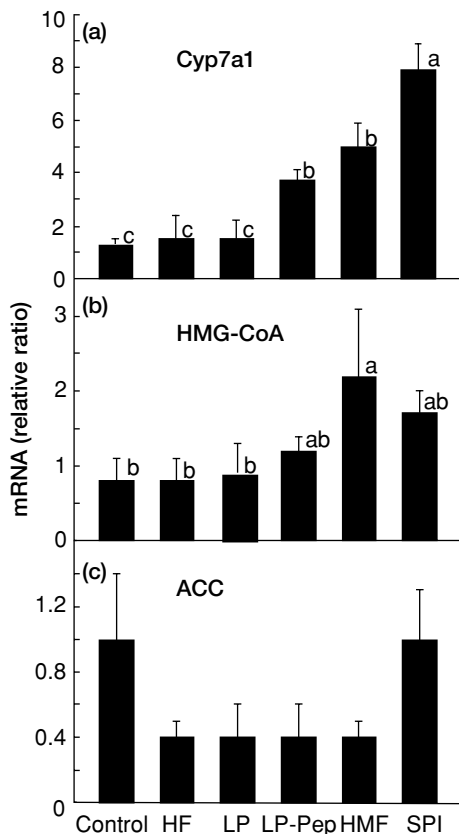


Fig. 2. Expression of liver Cyp7a1, HMG-CoA reductase and ACC mRNA in C57BL/6J mouse fed experimental diets for 28 day.

Table 4. Food intake, body weight gain, white adipose tissue and liver weight of C57BL/6J mouse fed experimental diets for 70 day

Diet	Food intake (kJ/d/mouse)	Bw gain (fold)	Adipose (g/100 g Bw)	Liver (g/100 g Bw)
Control	48.4	1.44±0.06 ^b	2.36±0.49 ^b	3.62±0.21 ^a
HF	52.0	1.62±0.16 ^a	4.20±1.21 ^a	3.11±0.39 ^c
LP	47.5	1.57±0.07 ^{ab}	3.89±0.89 ^a	3.18±0.18 ^{bc}
LP-Pep	47.9	1.40±0.04 ^c	3.64±0.37 ^{ab}	3.25±0.10 ^{abc}
HMF	51.0	1.48±0.06 ^{abc}	3.28±0.54 ^{ab}	3.58±0.30 ^{ab}
SPI	58.9	1.50±0.12 ^{abc}	4.09±1.04 ^a	3.01±0.21 ^c

Table 5. Plasma concentrations of triacylglycerol (TG), total cholesterol (TCHO) and total bile acid (TBA) in C57BL/6J mouse fed experimental diets for 70 day

Diet	TG (mg/100mL)	TCHO (mg/100mL)	TBA (μ M)
Control	34±8 ^a	94±10 ^c	23±5 ^{ab}
HF	27±2 ^{ab}	117±10 ^b	31±5 ^a
LP	24±4 ^{bc}	145±9 ^a	24±5 ^{ab}
LP-Pep	18±3 ^{cd}	139±11 ^a	22±4 ^{ab}
HMF	15±3 ^d	132±7 ^{ab}	21±2 ^b
SPI	14±3 ^d	115±14 ^b	27±4 ^{ab}

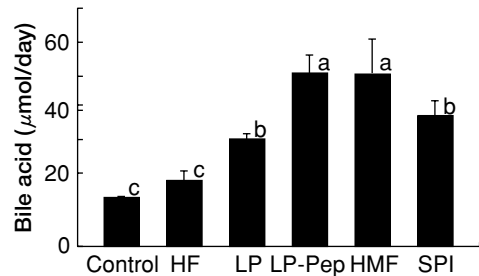


Fig. 3. Fecal excretion of bile acids in C57BL/6J mouse fed experimental diets for 70 day.

傾向を示した (Table 5). TG濃度は高脂肪食によって低下する傾向が見られるが、それはSPI食の時に最も顕著で、Control食の40%近くまで減少し、TCHO濃度はたん白質の種類にかかわらずControl食に比べいずれの高脂肪食でも高くなる傾向が見られLP食でControl食の1.5倍となった。また、血漿TBAはHF食で増加するがその増加は大豆たん白質で抑制される傾向が見られ、HMF食が最も強い効果があった。一方、糞中に排泄されるTBA量は血漿TB濃度と相反して、HMF食で最も多くなった (Fig. 3)。

Fig. 4にCholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), HMG-CoA reductaseおよびAcetyl-CoA carboxylase mRNA (ACC) の発現量を示した。CYP7A1は28日間飼育とは異なり、TBAの血漿濃度および糞中排泄量が実験食群で異なるにもかかわらず、群間に有意差は認められなかった。また、HMG-CoA reductase mRNAの発現量もHMF食でのバラツキが大きく、群間での有意差は認められなかった。しかし、ACC mRNA量は、血漿TG濃度にはほぼ相関した発現量を示した。

考 察

C57BL/6Jマウスに高脂肪食を与えることで、肥満を誘導した。肥満の誘導は28日間の飼育でもその傾向

は認められたが、70日間の飼育でより顕著に表れた。摂取エネルギー量が餌によって異なったため、明確な結果は得られなかったが、摂取エネルギー量と脂肪組織重量の比較からLP-Pep、HMF、SPIに肥満を抑制する可能性が示唆された (Table 2, 4)。

血漿TG濃度はLP、LP-Pep、HMF、SPI食の順にHF食に比べ低くなった。その傾向は70日間の飼育でより顕著であった (Table 3, 5)。このとき、ACC mRNA量の発現量もほぼ相関して減少していた (Fig. 4a)。SPIあるいは β -conglycininが脂肪酸合成を抑制し、脂肪酸分解を促進することが報告されており、本結果もそのことを支持している^{1, 2, 8, 9)}。したがって、LP、LP-PepもSPI同様遺伝子レベルで作用し、血漿TG濃度を減少させるものと思われるが、その効果はSPIにはおよばないものと考えられた。

血漿TBA濃度も血漿TG濃度とはほぼ同様の変化が見られ、LP、LP-Pep、HMF、SPI食の順に低くなった (Table 3, 5)。糞中へのTBA排泄量は、血漿TBA濃度と相反するように増加したことから、糞中への排泄促進によって血漿TGA濃度が低下したものと思われる (Fig. 1, 3)。このとき、28日間飼育のマウス肝臓では胆汁酸とコレステロール合成、それぞれの律速酵素であるCYP7A1とHMG-CoA reductase のmRNA量が排泄量と相関するように増加した (Fig. 2a, b)。胆汁酸と

コレステロール合成は、これら律速酵素を転写レベルでフィードバック制御することで調節されている。したがって、糞中への胆汁酸排泄の増加に伴い、コレステロールから胆汁酸への異化が促進され、その結果コレステロール合成も促進されと考えれば、これらのmRNA発現量の変化は説明できる。しかし、70日間飼育の糞中胆汁酸排泄量の増加が28日間飼育に比べ、より顕著であるにもかかわらず、mRNA量の変化は見られなかった (Fig. 4a, b)。さらに、これまでの多くの報告と異なり、胆汁酸排泄量が増加するにもかかわらず、血漿TCHO濃度はむしろ増加する傾向が見られた (Table 2, 4)。この原因は現在のところ不明である。今回の実験では餌によって摂食量が異なり、飼育期間も比較的長期間であるため、体内におけるコレステロールの動態の僅かな差の蓄積によって、このような結果になった可能性が考えられる。

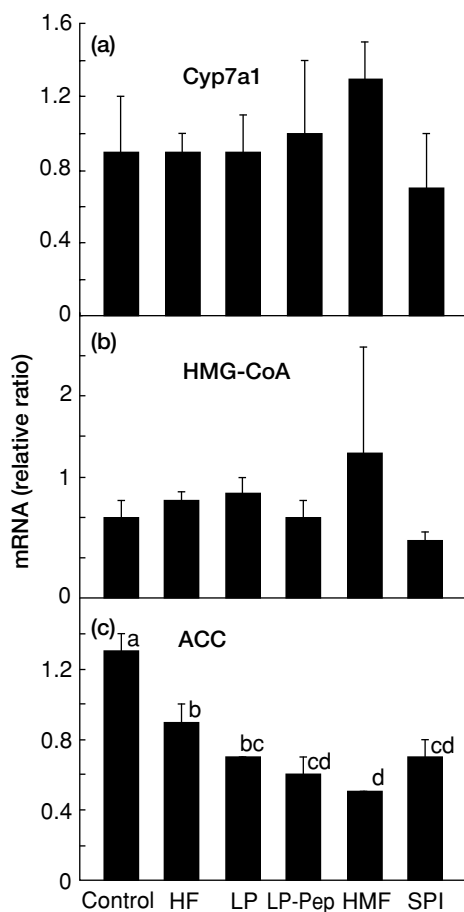


Fig. 4. Expression of liver Cyp7a1, HMG-CoA reductase and ACC mRNA in C57BL/6J mouse fed experimental diets for 70 day.

要 約

大豆極性脂質結合たん白質 (LP) と、その酵素加水分解産物であるLP-ペプチド (LP-Pep) がメタボリックシンドロームを予防する機能特性を有するか否かを高脂肪食によって肥満が誘導されるC57BL/6Jマウスを用いて検討した。LPとLP-Pepをたん白質源とした高脂肪食をマウスに与え28日間、あるいは70日間飼育した。LPとLP-Pepは血漿トリアシルグリセロール (TG) と総胆汁酸 (TBA) の濃度を減少させ、また、糞中へのTBA排泄量を増加させた。この効果はLPよりLP-Pepで顕著であったが、HMF (high-molecular-weight fraction of soy protein digest) やSPI (soy protein isolate) に比べると劣っていた。また、いずれのたん白質、あるいはペプチドもTBAの糞中排泄を促進したが、これまでの多くの報告とは異なり、血漿コレステロール濃度を減少させることはなかった。高脂肪食によって誘導される体脂肪の蓄積に対しては、LP-PepとHMFが僅かに抑制効果のあることが示唆された。肝臓におけるCholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), HMG-CoA reductase and Acetyl-CoA carboxylase (ACC) mRNAの発現もそれぞれの実験食により影響を受け変動したが、血漿TG, TCHO, TBA濃度との明確な相関は認められなかった。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.
- 4) Azadbakht L, Kimiagar M, Mehrabi Y, Esmailzadeh A, Padyab M, Hu FB and Willett WC (2007): Soy inclusion in the diet improves features of the metabolic syndrome: a randomized crossover study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, **85**, 735-741.
- 5) 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.
- 6) 金本龍平, 木村真也, 岡村 岳 (2007): 大豆極性脂質結合たん白質のコレステロール低下作用. 大豆たん白質研究, **10**, 83-87.
- 7) 武田忠明, 錦織孝史, 住吉真帆, 韓立 坤, 奥田拓道 (1999): サケ鼻軟骨由来コンドロイチン硫酸の抗肥満作用とその機序. 日本栄養・食糧学会誌, **52**, 381-386.
- 8) 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.
- 9) 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.