

食餌大豆たん白質の肝臓脂質低下作用機構の解析

竹中麻子*

明治大学農学部

The Mechanism of Dietary Soy Protein Regulation of Liver Lipid Concentration

Asako TAKENAKA

School of Agriculture, Meiji University, Kawasaki 214-8571

ABSTRACT

Effects of dietary soy protein isolate on hepatic fatty acid synthesis and on insulin secretion were investigated. Male Wistar rats of 4 wk old were divided into two groups and fed diets containing 20% casein (CAS) or soy protein isolate (SPI). After two weeks, rats of each experimental group were sacrificed at three different feeding conditions (fasted for 16 hours, refed for 2 h or 24 h after 16 h fasting). Hepatic mRNA content of fatty acid synthase and acetyl-CoA carboxylase were lower in SPI fed rats of fasted and 24 h refed groups. As for transcription factors related to fatty acid synthesis, SREBP-1c mRNA content was lower in SPI fed rats of 2 h refed group. In order to elucidate the mechanism to reduce SREBP-1c mRNA level, effect of SPI feeding on insulin secretion was investigated. Male Wistar rats of 4 wk old were fed CAS or SPI diet for 14 d (9:00-17:00). On the day 3, 7 and 13 of the experiment, plasma samples were taken at 9:00, 10:00, 11:00 and 17:00 to measure insulin and glucose concentrations. The increase of plasma insulin concentration after feeding was observed in rats fed CAS diet but was suppressed in rats fed SPI diet for 3 d or more. These results demonstrate that even three days feeding of SPI diet suppressed insulin secretion dramatically and that this may also suppress SREBP-1 synthesis and contribute to reduction fatty acid synthesis in liver. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 115-119, 2009.

Key words : soy protein isolate, triglyceride, liver, rat, SREBP-1

* 〒214-8571 川崎市多摩区東三田1-1-1

たん白源として大豆たん白質を摂取すると血中脂質（コレステロール，トリグリセリド）濃度が低下することが古くから知られており，このはたらきを利用した食品開発も精力的に行われている．中性脂肪（トリグリセリド）濃度は大豆たん白質摂取によって血中よりも早く肝臓で低下し始め，大豆たん白質食に切り替えて3日ですでに低下しているという報告がある¹⁾．肝臓脂質濃度の低下は，消化管での脂質吸収抑制，脂肪酸の β 酸化促進²⁾あるいは脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現や活性の低下^{1), 3~5)}によって引き起こされる可能性が指摘されているが，各要因がどのように寄与しているかの詳細は不明である．

本研究では，大豆たん白質摂取開始後速やかに肝臓脂質濃度が低下する機構として脂肪酸合成活性の低下に着目し，糞中へのステロイド排泄の増加が引き金となって脂肪酸合成活性が低下する可能性をまず始めに検討した．大豆たん白質摂取に切り替えてから数日間の糞中脂質量を経時的に測定したところ，摂取開始後2日目から増加すると結果が得られ，これは糞中ステロイド排泄の増加に起因するものと考えられた．そこで，大豆たん白質摂取による体内のコレステロール量の低下がコレステロール代謝物をリガンドとする転写因子liver X receptor (LXR)の活性低下を引き起こし，脂肪酸合成に関与する一連の転写因子 [sterol regulatory element-binding protein (SREBP), carbohydrate response element binding protein (ChREBP)] や酵素 [fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC)] の合成が転写レベルで低下するという仮説をたてた．脂肪酸合成に関与する因子の遺伝子発現は食餌摂取刺激によって大きく増減するため，摂食状況が異なる複数の状態のラットを用いてこの仮説を検証した．

さらに，大豆たん白質摂取によって血中インスリン濃度が低下するという報告があり^{3,4)}，インスリンによる肝臓での脂肪酸合成促進活性が低下する可能性が考えられた．そこで，この変化が大豆たん白質摂取開始後速やかに生じるものなのかについても検討を行った．

方 法

動物実験1

4週齢のウイスター系雄ラットに窒素源としてカゼイン (CAS) あるいは分離大豆たん白 (フジプロR; SPI) を含む飼料を与えて2週間飼育した．飼料組成はAIN93にしたがい，10:00~17:00に摂食させる制限給餌とした．水は自由摂取させた．飼育最終日に

各食餌群のラットを16時間絶食後，絶食後2時間再給餌後，24時間再給餌後のそれぞれのタイミングで解剖し (各n=5)，肝臓，血漿をサンプルとして得た．また，飼育最終2日間の糞を採取した．

脂質量測定⁶⁾

Folch法により肝臓および粉砕した乾燥糞試料から脂質を抽出した．トリグリセリド，リン脂質，総コレステロール濃度の測定には市販の測定キット (和光純薬) を用いた．

RT-PCRによるmRNA量測定

肝臓からのtotal RNA抽出はTriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science) により行なった．抽出したRNAと各遺伝子に対応するプライマーを用いてRT-PCRを行ない，mRNA量を測定した．濃度の異なる鋳型を用いたPCRを同時に行ない，定量性が得られる反応サイクルの結果を用いた．内部標準として β -アクチンを用いた．

ウェスタンブロット分析によるたん白質量測定

液体窒素中で粉末化した0.1 gの肝臓を1 mLのLysis buffer [1 mM EDTA (pH8.0), 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 5 mg/L pepstatin, 10 mg/L leupeptin, 20 mg/L aprotinin, 20 mg/L PMSF] 中でホモジナイズし，遠心分離 (17,400 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 20分) 後の上清を再度遠心分離 (17,400 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 20分) し，上清をたん白質抽出サンプルとした．常法に従ってSDS-PAGE, PVDFメンブレンへの転写後，各特異抗体 [抗SREBP-1抗体 (Santa Cruz), 抗ChREBP抗体 (Santa Cruz)] を用いたウェスタンブロット分析により目的たん白質を検出，定量した．

動物実験2

4週齢のウイスター系雄ラットに予備飼育としてCAS食を4日間摂取 (9:00~17:00の制限給餌) させた後，CAS食とSPI食群の2群に分け，同様に制限給餌下で2週間本飼育した．予備飼育の最終日と本飼育3, 7, 13日目の摂食開始0, 1, 2, 8時間後に尾から血液を採取し，血漿を得た．

血中グルコース濃度の測定

動物実験2で得られた血漿を用いて，市販の測定キット (和光純薬) によりグルコース濃度を測定した．

血中インスリン濃度の測定

動物実験2で得られた血漿を用いて，レビスインスリン-ラットT (シバヤギ) によりインスリン濃度を測定した．

統計処理

二群間の有意差検定 (危険率5%) はstudent's t-tset

Table 1. Lipid concentration in feces and liver of rats fed casein (CAS) or soy protein isolate (SPI) diet

	Fasted		Fed (2 h)		Fed (24 h)	
	CAS	SPI	CAS	SPI	CAS	SPI
feces						
bile acid ($\mu\text{mol/g}$ dry feces)	1.96 \pm 0.07	7.76 \pm 1.03*	2.82 \pm 0.50	7.85 \pm 0.71*	3.42 \pm 0.79	6.78 \pm 0.97*
liver						
triglyceride (mg/g liver)	25.0 \pm 3.4	7.15 \pm 0.67*	27.5 \pm 2.7	6.42 \pm 0.57*	15.2 \pm 3.0	6.73 \pm 1.50*
phospholipid (mg/g liver)	14.0 \pm 0.2	15.7 \pm 0.3	14.8 \pm 0.9	14.3 \pm 0.7	12.5 \pm 1.5	11.4 \pm 1.5
total cholesterol (mg/g liver)	3.36 \pm 0.17	2.39 \pm 0.02	3.37 \pm 0.28	2.27 \pm 0.05	1.70 \pm 0.17	1.46 \pm 0.20

Values are means \pm SEM.

* significantly different from CAS group of the same feeding condition.

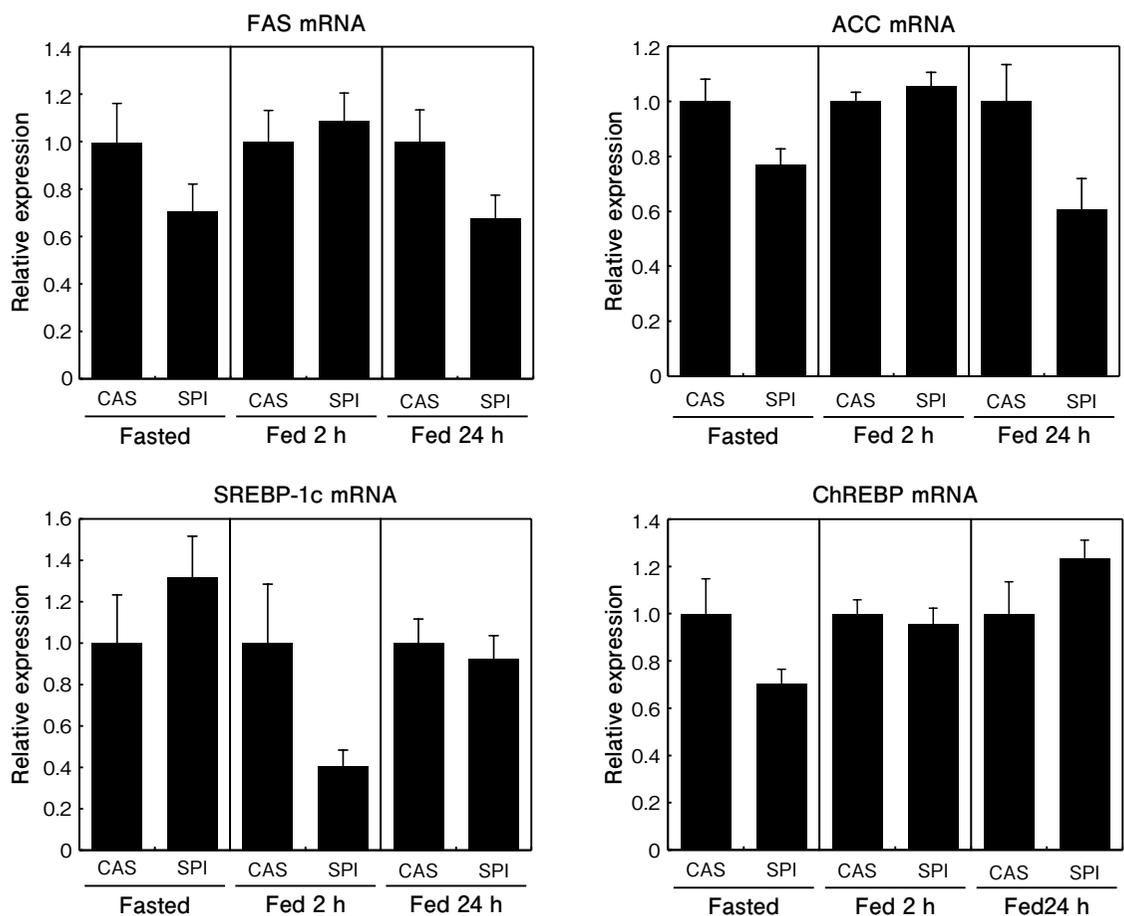


Fig. 1. Effect of dietary soy protein isolate (SPI) on fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC), sterol regulatory element-binding protein (SREBP) -1c and carbohydrate response element binding protein (ChREBP) mRNA contents. Male Wistar rats of 4 wk old were fed diet containing casein (CAS) or SPI for 14 days, and sacrificed at three feeding conditions (fasted for 16 hrs, refed for 2 hr or 24 hr after 16 hrs feeding). Total RNA was prepared from each rat, and mRNA contents were estimated by RT-PCR. Values are means \pm SEM, and expressed as relative value to the CAS group of each feeding condition.

により行なった（等分散でない場合にはウェルチのt検定により行なった）。

結果と考察

CAS群とSPI群で、摂食量、体重に差はみられなかった。糞中脂質はSPI群で有意に高く、肝臓トリグリセリド濃度はSPI群で有意に低かった（Table 1）。

脂肪酸合成系の酵素であるFAS、ACCのmRNA量は絶食時と再給餌24時間ではSPI群で低かったが、再給餌2時間では差がみられなかった（Fig. 1）。FAS、ACC mRNA発現は摂食刺激によって誘導されるため、再給餌2時間では群間の差が現れにくくなったと考えられた。これらの酵素mRNA量を制御する可能性のある転写因子として、SREBP-1、ChREBPのmRNA量とたん白質量を測定した。摂食後2時間のSREBP-1c mRNA量はSPI群でCAS群と比較して低くなったが、これは摂食刺激によるSREBP-1c mRNA量の増加がSPI群で小さいためであった。一方、成熟型SREBP-1たん白量にはいずれの摂食タイミングでも群間の差が

みられなかった。ChREBP mRNA量は絶食時にSPI群で低かった。ChREBPは絶食時や2時間摂食時には存在量が少なくウエスタンブロットで検出できず、24時間再給餌では群間でたん白量に差がみられなかった。LXR標的遺伝子のmRNA量には群間で差がみられなかった。これらの結果から、SPI摂取によってLXRの活性が変化するというデータは得られず、摂食に応答したSREBP-1合成誘導の低下と非摂食刺激下でのChREBP合成の低下が脂肪酸合成関連酵素の遺伝子発現低下に寄与する可能性が考えられた。

次に大豆たん白質の摂取が摂食刺激に応答したインスリン濃度におよぼす影響を検討した。CAS群では摂食刺激による血中インスリン濃度の顕著な上昇がみられたが、SPI群ではこの上昇が摂食開始3日目すでに抑制されていた（Fig. 2）。一方で食後血糖値にはCAS群とSPI群で差がみられなかった。したがって、摂食時のインスリン分泌の低下は、肝臓脂質濃度の低下と同様、大豆たん白質摂取開始後速やかに生じることが示された。

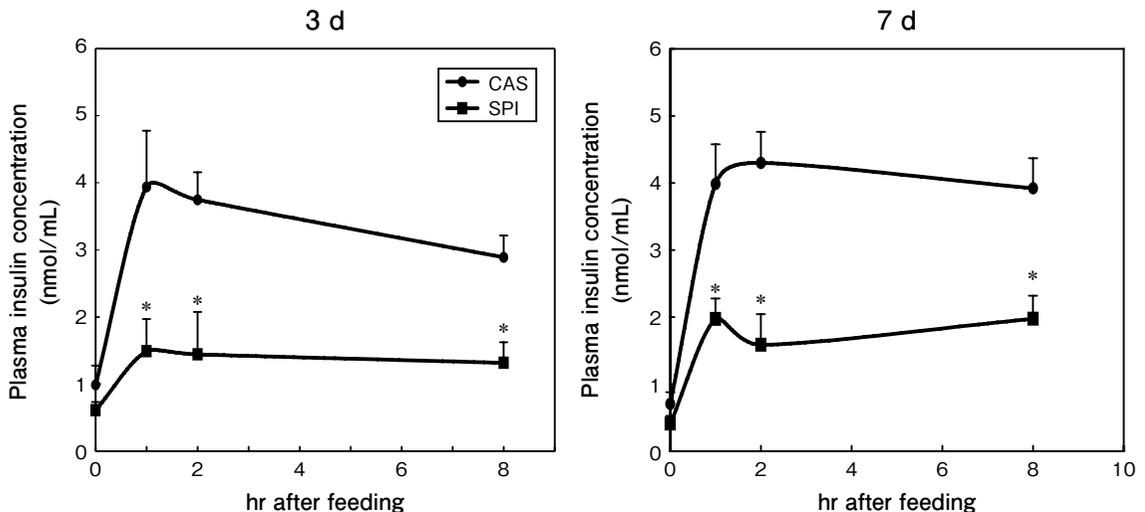


Fig. 2. Effect of dietary soy protein isolate (SPI) on insulin secretion. Male Wistar rats of 4 wk old were fed diet containing casein (CAS) or SPI from 9:00 to 17:00. Plasma insulin concentration at 9:00, 10:00, 11:00, 17:00 were measured on day 3 and day 7 of the experiment. Values are means \pm SEM.

要 約

数日間の大豆たん白食摂取により、カゼイン食摂取時と比較して肝臓中性脂肪量は顕著に低下する。この機構を解析する目的で、まずLXR活性低下を介して一連の脂肪酸合成関連因子の合成が低下する可能性を検証した。4週齢のウィスター系雄ラットに、カゼインあるいは分離大豆たん白をそれぞれ20%含む飼料（CAS食、SPI食）を2週間摂取させ、16時間絶食後、絶食後再給餌2時間後および24時間後に解剖した。脂肪酸合成酵素（ACC、FAS）mRNA量は絶食と再給餌24時間においてSPI群で低かった。脂肪酸合成に関与する転写因子では、摂食後のSREBP-1c mRNA量の上昇がSPI群で抑制されていたが、LXR標的遺伝子のmRNA量には差がみられなかった。次に、食後インスリン分泌に及ぼす影響を検討したところ、SPI食開始3日目には摂食後のインスリン濃度の上昇が著しく抑制されていた。数日のSPI摂取によって、食後インスリン濃度の低下、SREBP-1合成抑制が肝臓脂質低下へ寄与することが推察された。

文 献

- 1) Iritani N, Nagashima K, Fukuda H, Katsurada A and Tanaka T (1986): Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, **116**, 190-197.
- 2) Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N and Maebuchi M (2004): Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of β -oxidation, downregulation of fatty acid synthesis, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 352-359.
- 3) 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.
- 4) Xial CW, Wood A, Huang W, L'Abbe MR, Gilani GS, Cooke GM and Curran I (2006): Tissue-specific regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression by dietary soya protein in rats. *Brit. J. Nutr.*, **95**, 1048-1054.
- 5) Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gomez-Perez FJ, Hernandez-Pando R and Tovar AR (2004): Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.*, **134**, 522-529.
- 6) Aoki H, Kimura K, Igarashi K and Takenaka A (2006): Soy protein suppresses gene expression of acetyl-CoA carboxylase alpha from promoter PI in rat liver. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 843-849.