

# 大豆たん白質脂質代謝改善効果の 遺伝子欠損マウスを用いた分子標的解析

佐藤隆一郎\*

東京大学大学院農学生命科学研究科

## Study of the Molecular Targets of Lipid Metabolism Improvement Caused by Soy Protein Intake Using Gene Defect Mice

Ryuichiro SATO

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

### ABSTRACT

Wild type and FXR KO mice were administered with either 20% casein or soy protein isolated (SPI) diet for 10 days. Blood components and gene expression in the liver were analyzed. There were no changes in blood components between two animal groups or diets. SPI reduced the expression of a set of genes related to fatty acid synthesis or gluconeogenesis in wild type mice, whereas no reduction was observed in FXR KO mice with SPI. These results show that SPI intake gives rise to improve carbohydrate and lipid metabolism prior to making a change in blood components. In addition, the expression of FXR target genes in the intestine of wild type mice was found to be suppressed by feeding SPI. This finding well interprets nonresponse to feeding SPI in FXR KO mice. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 75-78, 2010.

Key words : Soy protein, FXR, Bile acid, Fatty acid synthesis, Gluconeogenesis.

大豆たん白質に脂質代謝改善効果があることは広く知られた事実である。Adiponectin発現を上昇させると同時に、肝臓、脂肪組織トリグリセリド量低下、血清トリグリセリド濃度低下が観察される<sup>1)</sup>。しかしながら、その作用機序の詳細は明らかにされていない。大豆たん白質の効果の一つとして、腸管内において生成されたペプチドが脂質、胆汁酸と結合し、その吸収

を抑制することが提唱されている。胆汁酸を結合して活性化される核内受容体FXRは、活性の低下することが予想される。従って、大豆たん白質はFXRの関与する脂質代謝制御機構を変動させ、脂質代謝改善効果を発揮している可能性が考えられる。そこで、本研究ではFXR欠損マウスを用い、大豆たん白質の脂質代謝改善効果を追跡し、その作用の分子基盤について明らかにすることを目的とした。

\*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

## 方 法

**マウス：**C57BL/6Nマウス（日本クレア社）を野生型とし、FXR KOマウス（C57BL/6N background）と比較検討した。5週齢のマウスを用意し、20%カゼイン含有粉末高脂肪食を7日間投与し、その後、20%カゼイン高脂肪食あるいは20%大豆たん白質高脂肪食を所定の期間投与した。解剖当日、6時間の絶食をさせ、その後解剖し、各種臓器、血液等を採取した。

**飼料：**Table 1に組成を示した。

**血中成分解析：**血糖値はグルコース測定キット（グルコースCII-テストワコー、和光純薬）を用いて定量した。インスリンは、インスリン測定キット（レビスインスリン-マウスT、（株）シバヤギ）を用い、定量した。

トリグリセリド、総コレステロール、HDL-コレステロール、遊離脂肪酸、胆汁酸は、トリグリセリド測定用キット、総コレステロール測定用キット、HDL-コレステロール測定用キット、遊離脂肪酸測定用キット、胆汁酸測定用キット（いずれも和光純薬）を用いて定量した。

Table 1. Composition of the experimental diets

	Casein (g/100g)	energy (kcal)	SPI (g/100g)	energy (kcal)
Casein	22.9	79.0		
SPI			22.1	80.3
Cornstarch	21.1	84.5	21.8	87.3
α-Cornstarch	6.6	26.6	7.0	28.0
Sucrose	10.0	40.0	10.0	40.0
Soybean oil	7.0	63.0	7.0	63.0
Fiber	6.2		6.2	
Mineral Mix (AIN-93)	4.3		4.3	
Vitamin Mix (AIN-93)	1.2		1.2	
L-cystine	0.3	1.2		
Choline				
Bitartrate	0.3		0.3	
Lard	20.0	180	20	180
total	100.0	474.2	100.0	478.6
Protein	20.0		20.0	
(%)				
carbohydrate		31.9		32.5
protein		16.9		16.8
lipid		51.2		50.8

**肝臓における遺伝子発現量解析：**解剖後、肝臓より総RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを調製後、real-time PCR法によりmRNA量を定量した。多くの遺伝子について、それぞれのTaqman probeを用い、定量PCRを行った。一部の遺伝子は、固有のprimerを設計し、同じく定量PCRを行った。ABI PRISM 7000（Applied Biosystems）を用いて、定量を行った。

## 結果と考察

野生型、FXR KOマウスに10日間、カゼイン食もしくは大豆たん白質食を投与した際の、体重、血中成分値をTable 2に示した。野生型マウスにおいて、10日間の体重増加、食事摂取量はカゼイン食でやや高い傾向にあったが、有意な差ではなかった。血中成分に関しては、ややばらつきは見られたものの、野生型、KOマウス間、食餌の違いによる大きな差は認められず、10日間の投与では、これらの値に大きな変化が生じないことが確認された。従って、10日間の大豆たん白質投与で遺伝子発現に変動が見られた際には、血中脂質、臓器脂質含量の変動にตอบสนองしたのではなく、食餌の直接的刺激応答として捉えることが出来る。

そこで、肝臓より抽出した総RNAを用い、各種遺伝子mRNA量を定量PCR法により測定した。その結果、測定したほぼすべての遺伝子においてFXR KOマウスでは大豆たん白質とカゼイン間で差が認められなかった。一方、野生型マウスにおいて、脂肪酸・トリグリセリド代謝を制御するSREBP-1c mRNAの有意な低下が認められた。それに伴い、SREBP-1cの応答遺伝子であり、脂肪酸合成を司る酵素、脂肪酸合成酵素（FAS）、アセチルCoA カルボキシラーゼ（ACC1）のmRNAも有意に低下していた。従って、脂肪酸合成の低下が予想される。一方、同じファミリーに属するSREBP-2の発現は変動がなく、その応答遺伝子であるHMG CoA合成酵素、LDL受容体遺伝子発現も2群で差がなかった。特徴的な応答として、糖新生成素であるホスフォエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）、グルコース 6 ホスファターゼ（G6Pase）の遺伝子発現はいずれも大豆たん白質投与で有意な減少を示した。従って、大豆たん白質は血糖値を低減させる方向へと導く可能性が示唆された。さらに、複数の転写因子、核内受容体も大豆たん白質摂取により遺伝子発現が変動することが確認された。以上の変化の主たる経路についてはさらに分子レベルでの解析が必要となる。さらに、3日間の投与実験を同様に行った所、脂肪酸合成に関与する遺伝子群が低下しており、

Table 2. Body weight, food consumption and serum lipid concentration in mice

Wild type mice		
	casein	SPI
Body weight [g]	25.45 ± 2.11	23.08 ± 0.78
Weight gain [g]	4.36 ± 0.73	2.72 ± 0.62
Food consumption [g/10days]	26.8 ± 2.0	22.7 ± 2.5
Glucose [mg/100mL]	288.1 ± 24.8	249.0 ± 19.4
Insulin [ng/mL]	16.2 ± 12.3	6.1 ± 4.2
Triglyceride [mg/100mL]	46.9 ± 14.8	50.9 ± 10.9
NFFA [mEq/L]	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Cholesterol [mg/100mL]	127.4 ± 24.6	119.4 ± 2.8
HDL-cholesterol [mg/100mL]	15.7 ± 1.9	16.1 ± 0.4
Bile acid [ $\mu$ mol/L]	0.5 ± 0.3	0.1 ± 0.2
FXR KO mice		
	casein	SPI
Body weight [g]	24.99 ± 2.83	24.75 ± 2.07
Weight gain [g]	2.61 ± 1.13	1.89 ± 0.69
Food consumption [g/10days]	25.1 ± 3.8	25.3 ± 4.8
Glucose [mg/100mL]	261.6 ± 20.2	245.6 ± 12.1
Insulin [ng/mL]	3.7 ± 1.5	7.1 ± 6.0
Triglyceride [mg/100mL]	76.9 ± 36.1	54.0 ± 10.8
NFFA [mEq/L]	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0
Cholesterol [mg/100mL]	237.7 ± 31.7	241.7 ± 20.2
HDL-cholesterol [mg/100mL]	91.2 ± 16.1	89.5 ± 15.0
Bile acid [ $\mu$ mol/L]	17.8 ± 10.2	27.4 ± 9.4

これらの遺伝子応答が最も早い応答であることも明らかになった。

しかし、今回の実験から、大豆たん白質摂取により変動が認められた遺伝子の多くがFXR KOマウスにおいては変動しなかった。一つの可能性として、それらのいくつかは直接FXRの応答遺伝子である可能性が考えられる。しかし、FXR KOマウスにおいてもそれらの遺伝子発現が確認されることから、この可能性は却下できる。肝臓におけるFXRの応答遺伝子であるSHPの遺伝子発現は大豆たん白質で有意に減少していた。そのレベルは、FXR KOマウスにおけるレベルに近く、すなわち大豆たん白質摂取により小腸からの胆汁酸吸収が低下し、肝臓においてFXR活性化が行われなかつ

たことが考えられる。大豆たん白質摂取により小腸において脂溶性のペプチドが産生され、これらが胆汁酸、コレステロールと複合体を形成し、その吸収を低下させることが報告されている<sup>2)</sup>。従って、このような効果を介して胆汁酸吸収の低下することが、大豆たん白質の種々の遺伝子発現制御の分子機構の一端であることがうかがわれる。当然、FXR KOマウスにおいては胆汁酸の再吸収の増減はFXR機能に影響を及ぼさず、大豆たん白質、カゼイン間に差が認められなかったものと考えられる。

## 要 約

胆汁酸をリガンドとする核内受容体FXRを欠損したマウス (FXR KO) と野生型マウスを用意し、それぞれにカゼイン、大豆たん白質を20%含む飼料を10日間投与し、血中成分、肝臓の遺伝子発現の変動を追跡した。血中成分はどの項目でも有意な差は認められなかった。一方、各種遺伝子発現はFXR KOマウスでは食餌間で差が認められなかったのに対し、野生型マウスでは大豆たん白質摂取で脂肪酸合成系の遺伝子発現が低下した。同じく、糖新生系酵素の遺伝子発現も低下した。これらの結果より、大豆たん白質摂取は、血中成分に有意な差が生じる前に、肝臓において脂質、糖代謝を改善する方向へ導く活性を有することが明らかとなった。さらに、大豆たん白質摂取により、

胆汁酸の小腸における吸収が低下し、FXR応答遺伝子発現が減少することが野生型マウスで認められ、この作用が野生型とFXR KOマウスの大豆たん白質摂取への応答性の違いを良く説明している。

## 文 献

- 1) Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barraga VE, Cerbon-Cervantes MA and Torres N. (2007): Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr*, **138**, 462-468.
- 2) Yamatani K, Saeki T, Iwami K, Suzuka T and Kanamoto R. (2009): Soybean resistant protein elevates fecal excretion of cholesterol and bile acids and decreases hepatic cholesterol content in comparison with soybean protein isolate. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 921-922.