

食事たん白質の相違が食物繊維摂取時の 小腸ムチン分泌促進作用に及ぼす影響

森田達也*・伊藤弘幸・齋藤大輔・森田明雄・杉山公男

静岡大学農学部

Differential Effects of Casein and Soy Protein Isolate on Mucin Secretion Stimulated by Dietary Fiber Ingestion in the Rat Small Intestine

Tatsuya MORITA, Hiroyuki ITO, Daisuke SAITO, Akio MORITA and
Kimio SUGIYAMA

Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529

ABSTRACT

We compared the effects of soy protein isolate (SPI) with casein on the mucin secretion stimulated by dietary fiber ingestion in the rat small intestine. We used polystyrene foam (PSF) as a high-bulk forming fiber. Rats were fed the diets including casein or SPI at a dietary protein level of 25% with or without concurrent addition of 8% PSF for 10 days. Small intestinal mucin content and number of total goblet cells in the ileum were significantly increased in rats fed the casein + PSF diet compared to those fed the casein diet, whereas these changes were not observed in rats fed the SPI and the SPI + PSF diets. However, the number of sialo-mucin type goblet cells in the ileum was significantly increased in rats fed the PSF added diets irrespective of the dietary protein source. This was reflected in the increases in sialic acid content in the mucin fraction and *Siat4c* expression in the ileum. One might expect the differential effects of casein and SPI on the mucin secretion stimulated by dietary fiber ingestion to be exerted through the different amino acid pattern in the two proteins. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 85-89, 2010.

Key words : casein, soy protein isolate, polystyrene foam, mucin, goblet cell.

*〒422-8529 静岡市駿河区大谷836

食物繊維は不溶性 (insoluble dietary fiber ; IDF) では消化管内での嵩に比例して、水溶性 (soluble dietary fiber; SDF) では粘性に比例して小腸杯細胞を増加させ、同時に小腸内ムチン分泌量の増加をもたらす。これらは食事たん白質にカゼイン (CAS) を用いたときに認められる現象である^{1,2)}。ムチンは分子量 300 kDaを越える巨大糖たん白であり、セリン、スレオニン、プロリンを主体としたアミノ酸の繰り返しドメインから構成されるコアたん白質に数種の糖鎖がセリン、スレオニンの水酸基とO-グリコシド結合したもので、そのペプチド骨格を構成するアミノ酸の1/3はスレオニンである。ムチンたん白質は高度に糖鎖化されており (糖たん白重量の50–80%に達する)、小腸ではプロテアーゼによる分解を受け難く、分泌されたムチンの大半は大腸に流入し腸内細菌によって資化される。したがって、ムチン由来のスレオニンは宿主には回収されず内因性スレオニンロスとなる。一方、経口摂取したスレオニンは他のアミノ酸 (15–30%) と異なり、実に60%が上皮細胞によって消費されると報告されている³⁾。このような背景から、DF摂取時のムチン分泌促進作用は食事たん白質のスレオニン含量によって左右される可能性がある。

過去に、大豆たん白質 (soy protein isolate; SPI) とCASとのメチオニン含量の相違がコレステロール代謝やポリアミン生合成の研究に新たな展開をもたらした。CASとSPIのスレオニン含量の差はわずかに15% (w/w) 程度であるが、小腸ムチン分泌が促進される時、この差がどのような意味を持つのかに興味を持った。本研究では、IDFと同時に食事たん白質としてSPIを摂取したときの小腸ムチン分泌作用についてCASを対照に詳細に比較検討することを目的とした。

実験方法

6週齢のWistar系雄ラット24匹を用い、飼料中たん白質 (25%, w/w) をCASまたはSPIとした飼料、または夫々の飼料に8%の発泡スチロール粉末 (polystyrene foam; PSF) を添加した飼料 (Table 1) を10日間摂取させた。ラットは被絶食下で午後1時に解剖し、小腸内容物および回腸組織を採取した。小腸内容物は0.02 Mアジ化ナトリウムを含む生理的リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS, pH7.4) 15 mL、次いで空気 20 mL で管腔内をフラッシュすることで回収し、ムチン画分調製のため凍結乾燥した。回腸組織の一部はムチン関連遺伝子発現の解析に供した。残りの組織は10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬

し、常法に従いパラフィン包埋を行い、組織切片を作成した。

ムチン画分の調製およびO-結合性糖鎖当量、シアル酸の測定

小腸内容物中ムチン画分の調製はLienらの方法⁴⁾に準じ、60%エタノール沈殿画分として回収し、各ムチン画分は凍結乾燥後、蒸留水で5 mLに定容した。ムチン画分中のO-結合性糖鎖当量およびシアル酸の測定は既報¹⁾に従い、標品としてN-アセチルガラクトサミンおよびN-アセチルノイラミン酸を用い測定した。

RNA抽出およびMuc遺伝子発現量の解析

回腸粘膜からの全RNAの抽出は、RNAiso (タカラバイオ、東京) を使用し、添付の説明書に従い調製した。RNA濃度および純度はA260/A280の吸光度を測定することで算出した。RNAの逆転写反応にはPrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) を使用し、37℃、15分間の条件下で1 µgのRNAを逆転写しcDNAを得た。リアルタイムPCRにはLightCycler (ST300, ロシュ、USA) を使用し、*Muc2*⁵⁾、*Muc3*⁶⁾、*Siat4c* (sialyltransferase)⁷⁾、*Gal3ST4* (sulfotransferase)⁷⁾およびハウスキーピング遺伝子である*18S rRNA*⁸⁾の特異的プライマーは既報に準じ常法に従い実施した。PCR反応後、反応産物は融解曲線分析により解析し、発現量の解析には比較CT法を用いた。

過ヨウ素酸-シッフ (PAS), 高鉄ジアミン-アルシアンブルー (HID-AB) 染色

PAS染色は常法に従い実施した。PAS染色された細胞を総杯細胞として計測した。HID-AB染色は高鉄ジアミン溶液 (0.24% N, N-ジメチル-m-フェニレンジアミン, 0.04% N, N-ジメチル-p-フェニレンジアミン溶液100 mLに40% 塩化鉄 (Ⅲ) 溶液 4.2 mLを加え混合) に21時間浸漬、流水洗浄を行った後、1%アルシアンブルーを含む3%酢酸溶液 (pH2.5) に1時間に浸漬し、

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Casein	Casein+PSF	SPI	SPI+PSF
	g/kg diet			
Cornstarch	652.5	572.5	652.5	572.5
PSF	—	80.0	—	80.0
Casein	250.0	250.0	—	—
SPI	—	—	250.0	250.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture ¹	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture ¹	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5

SPI, soy protein isolate; PSF, polystyrene foam.

¹AIN-76.

その後透徹，封入処理を行った。HID-AB染色により，sulfo-mucinに富む杯細胞をHID陽性細胞，sialo-mucinに富む杯細胞をAB陽性細胞として計測した。

統計処理

結果は平均値と標準誤差（等分散）または中央値と範囲（不等分散）で示した。各データはBartlett検定により分散の均一性を確認した後，群間の差の検定を二元配置分散分析（ANOVA）後，Tukey-Kramer testを行った。

結果と考察

SPI群の飼料摂取量はSPI+PSF群に比べ，またSPI群の体重増加量はCAS群に比べ有意に低い値を示したが，他の群間で差は認められなかった（Table 2）。O-結合性糖鎖当量として測定した小腸内容物中ムチン量（以下，小腸ムチン量）はCAS群に比べCAS+PSF群では有意な増加を示したが，SPIとSPI+PSF群間に差は認められなかった。一方，ムチン画分中のシアル酸含量は食事たん白質に係わらず，PSF添加により有意な増加を示した（Fig. 1）。

PAS陽性の杯細胞数はCAS+PSF群でのみ有意な増加を示し，SPI+PSF群では杯細胞数の増加は認められなかった（Fig. 2）。ムチンは遺伝子コード以外に，それらの構成糖の特徴から中性ムチン，sialo-mucin（AB陽性）およびsulfo-mucin（HID陽性）に分類されるが⁹⁾，

PSFの摂取は食事たん白質に係わらずAB陽性杯細胞を有意に増加させ，逆にHID陽性杯細胞を有意に減少させた。CAS+PSF群ではAB陽性杯細胞の増加（171% vs. CAS）がHID陽性杯細胞の減少（-46% vs. CAS）を上回るため，PAS染色による総杯細胞数はCAS群に比べ有意な増加を示したと考えられる（Table 2，Fig. 3）。

ムチン関連遺伝子はヒト同様ラットでも小腸・大腸では分泌型ムチンである*Muc2*と膜結合型ムチンである*Muc3*が主であり，杯細胞（*Muc2*，*Muc3*）および

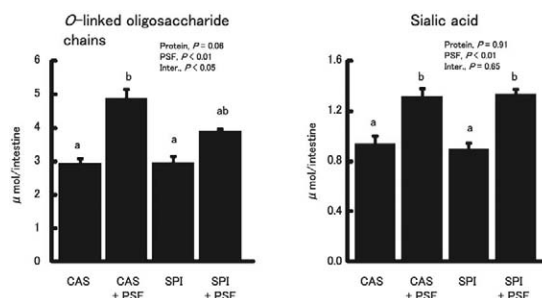


Fig. 1. O-linked oligosaccharide chains and sialic acid in the small intestinal contents in rats fed CAS or SPI diet with or without 8% dietary PSF for 10 days. Data means $\pm$ SE, n=6. Means without a common letter differ, $p<0.05$ when analyzed by Tukey-Kramer. CAS, casein; SPI, soy protein isolate; PSF, polystyrene foam.

Table 2. Food intake, body weight gain, and histologic variables in the ileum tissue in rats fed CAS or SPI diet with or without 8% dietary PSF for 10 days¹

	CAS	CAS + PSF	SPI	SPI + PSF	2-way ANOVA, <i>P</i> value		
					Protein	PSF	Protein $\times$ PSF
Initial body weight, g	144 $\pm$ 3	144 $\pm$ 3	144 $\pm$ 2	144 $\pm$ 2	0.87	0.98	0.97
Food intake, g/10 d	149 $\pm$ 6 ^{ab}	146 $\pm$ 4 ^{ab}	141 $\pm$ 4 ^a	162 $\pm$ 3 ^b	0.30	<0.05	<0.01
Body weight gain, g/10 d	55 $\pm$ 2 ^b	49 $\pm$ 1 ^{ab}	45 $\pm$ 3 ^a	52 $\pm$ 3 ^{ab}	0.12	0.78	<0.05
Ileum tissue							
Villus length, μ m	385 $\pm$ 16	385 $\pm$ 12	376 $\pm$ 5	357 $\pm$ 5	0.10	0.40	0.39
Goblet cells, n/villus (left side)	10.3 $\pm$ 0.3 ^a	14.0 $\pm$ 0.4 ^b	10.5 $\pm$ 0.3 ^a	11.5 $\pm$ 0.4 ^a	<0.01	<0.01	<0.01
HID ⁺ cells, n/villus (left side)	5.7 $\pm$ 0.3 ^b	3.1 $\pm$ 0.4 ^a	5.0 $\pm$ 0.2 ^b	2.2 $\pm$ 0.6 ^a	0.12	<0.01	0.32
AB ⁺ cells, n/villus (left side)	3.5 $\pm$ 0.2 ^a	9.5 $\pm$ 0.8 ^b	4.8 $\pm$ 0.3 ^a	8.9 $\pm$ 0.9 ^b	0.44	<0.01	<0.05
HID ⁺ + AB ⁺ cells, n/villus (left side)	9.3 $\pm$ 0.3 ^a	12.6 $\pm$ 0.5 ^c	9.8 $\pm$ 0.3 ^{ab}	11.1 $\pm$ 0.5 ^{bc}	0.22	<0.01	<0.05

¹Data means $\pm$ SE, n=6. Means in a row with superscripts without a common letter differ ($p<0.05$) when analyzed by Tukey-Kramer.

CAS, casein; PSF, polystyrene foam; SPI, soy protein isolate; AB, alcian blue; HID, high iron diamine.

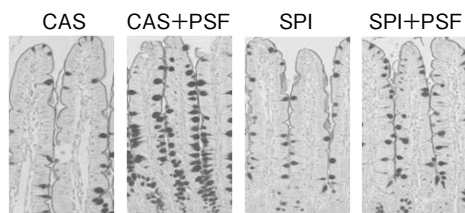


Fig. 2. PAS stained micrographs of the ileum tissues in rats fed CAS or SPI diet with or without 8% dietary PSF for 10 days. Magnification = 200X. CAS, casein; SPI, soy protein isolate; PSF, polystyrene foam; PAS, periodic acid-shiff.

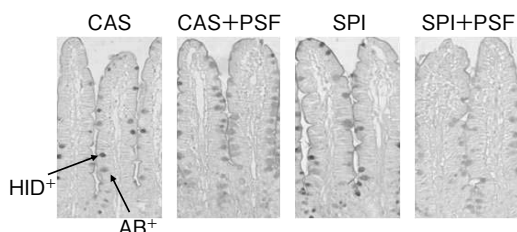


Fig. 3. HID-AB stained micrographs of the ileum tissues in rats fed CAS or SPI diet with or without 8% dietary PSF for 10 days. Magnification = 200X. CAS, casein; SPI, soy protein isolate; PSF, polystyrene foam; HID-AB, high iron diamine-alcian blue.

吸収上皮細胞 (*Muc3*) で発現している¹⁰⁾。PSF摂取はCAS, SPIに係わらず*Muc2*発現量を増加させ、逆に*Muc3*では減少させる傾向を示したが有意な変化ではなかった。一方、ムチン糖鎖の修飾に与する sialyltransferase および sulfotransferase をコードする *Siat4c* および *Gal3ST4* は、PSFの要因により *Siat4c* では有意な増加を、*Gal3ST4* では減少を示した (Fig. 4)。

食物繊維摂取による小腸ムチン分泌促進作用は、必ずしも *Muc2* の発現上昇を伴わず *Muc3* ではむしろ低下することから、その分泌促進作用は杯細胞への分化促進を介した基礎分泌量の増大によると考えられてい

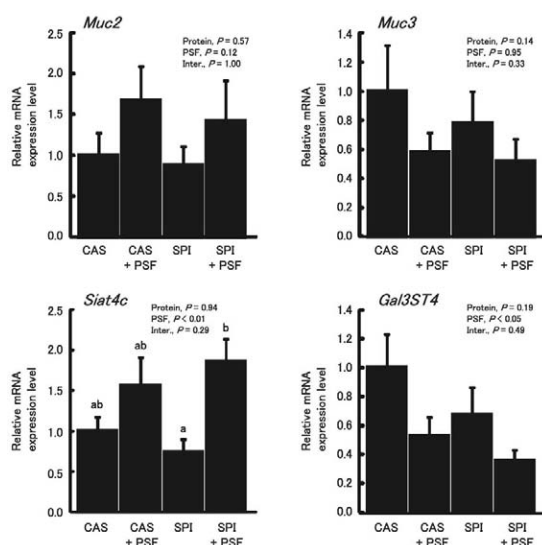


Fig. 4. Ileum mRNA expression of *Muc2*, *Muc3*, *Siat4c*, and *Gal3ST4* in rats fed CAS or SPI diet with or without 8% dietary PSF for 10 days. Data means $\pm$ SE, $n=6$. Means without a common letter differ, $p<0.05$ when analyzed by Tukey-Kramer. CAS, casein; SPI, soy protein isolate; PSF, polystyrene foam.

る^{1,2)}。本試験でもCAS+PSF群ではCAS群に比べ小腸ムチン量 (O-結合性糖鎖当量) の有意な上昇が観察されたが、食事たん白質をSPIとしたとき食物繊維摂取時のムチン分泌促進作用は認められなかった。一方、回腸粘膜の総杯細胞数 (PAS陽性) もSPIとSPI+PSF群間に差は認められなかったが、AB陽性杯細胞はSPI+PSF群でもCAS+PSF群と同程度に増加していた。この結果はムチン画分中のシアル酸含量や回腸粘膜の *Siat4c* 発現量の変動に呼応していた。以上、本試験で観察されたSPIとCASでの応答性の相違がスレオニン含量の差に、あるいはメチオニンをはじめとする必須アミノ酸パタンの相違に起因するものか、今後はアミノ酸の補足試験をとおして検討を行う予定である。

要 約

食事たん白質の相違が食物繊維摂取による小腸ムチン分泌促進作用に及ぼす影響をCASとSPIを用いて比較検討した。食事たん白質をCASとしたとき食物繊維の同時摂取は総杯細胞数および小腸内ムチン量の有意な上昇を示したが、SPIの場合、これらの変化は観察されなかった。しかし、食物繊維摂取時のAB陽性杯細胞の増加はCASと同様にSPIでも観察され、この結果は小腸ムチン画分中のシアル酸量や回腸粘膜での *Siat4c* 発現量の変動とも呼応していた。CASとSPIの両者間で認められる食物繊維摂取時の小腸ムチン分泌応答の相違には両たん白質の必須アミノ酸パタンの相違が起因すると考えられる。

文 献

- 1) Tanabe H, Sugiyama K, Matsuda T, Kiriya S, Morita T (2005): Small intestinal mucins are secreted in proportion to the settling volume in water of dietary indigestible components in rats. *J Nutr*, **135**, 2431-2437.
- 2) Ito H, Satsukawa M, Arai E, Sugiyama K, Sonoyama K, Kiriya S, Morita T (2009): Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats. *J Nutr*, **139**: 1640-1647.
- 3) Fuller MF, Milne A, Harris CI. (1994): Amino acid losses in ileostomy fluid on a protein-free diet. *Am J Clin Nutr*, **59**, 70-73.
- 4) Lien KA, McBurney MI, Beyde BI, Thomson ABR, Sauer WC (1996): Ileal recovery of nutrients and mucin in humans fed total enteral formulas supplemented with soy fiber. *Am J Clin Nutr*, **63**, 584-595.
- 5) Tsuboi Y, Kim Y, Paparella MM, Chen N, Schachern PA, Lin J (2001): Pattern changes of mucin gene expression with pneumococcal otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **61**, 23-30.
- 6) Kesavalu L, Bakthavatchalu V, Rahman MM, Su J, Raghu B, Dawson D, Fernandes G, Ebersole JL (2007): Omega-3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in Porphyromonas gingivalis-induced experimental periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, **22**, 232-239.
- 7) Soga K, Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Mitsufuji S, Yoshikawa T, Arizono N (2008): Alteration of the expression profiles of acidic mucin, sialyltransferase, and sulfotransferases in the intestinal epithelium of rats infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitol Res*, **103**, 1427-1434.
- 8) Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Tyskin A, Keefe DMK (2007): Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, **59**, 337-348.
- 9) Filipe MI (1979): Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. *Invest Cell Pathol*, **2**, 195-216.
- 10) Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M (2000): Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*, **47**, 589-594.