

食餌炭水化物源が大豆たん白質の脂質代謝調節機能に及ぼす影響の解明

高橋陽子*

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Effect of Dietary Carbohydrate Source on the Modulation of Lipid Metabolism by Soy Protein

Yoko TAKAHASHI*

National Food Research Institute (NFRI),
National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Ibaraki 305-8642

ABSTRACT

Dietary soy protein is known to have hypolipidemic properties. The carbohydrate source in the diet also affects lipid metabolism; compared with starches, sugars tend to increase hepatic lipogenesis and serum triacylglycerol concentration. To investigate the possibility of the interaction between protein and carbohydrate sources in lipid metabolism, the interference of dietary carbohydrate on the hypolipidemic effect caused by soy protein was compared with those of corn starch and sucrose in rats. Animals were fed one of four diets containing casein-corn starch, casein-sucrose, soy protein-corn starch, or soy protein-sucrose for three weeks. Serum and hepatic triacylglycerol levels were significantly lowered in rats fed soy protein compared to those fed casein when the carbohydrate source was corn starch, whereas soy protein increased these parameters in the presence of sucrose. The activity of enzymes involved in fatty acid synthesis was increased by sucrose diets compared with corn starch diets. However, soy protein significantly decreased the activity regardless of carbohydrate source. However, the activity of enzymes involved in fatty acid oxidation was not affected by dietary factors. The mRNA expression of hepatic enzymes concerned with triacylglycerol uptake and synthesis was decreased in response to sucrose, but the reduction was attenuated when the protein source was soy protein. Therefore, the increased serum and hepatic triacylglycerol concentrations caused by the simultaneous ingestion of soy protein and sucrose may be attributed, in part, to the alteration of hepatic triacylglycerol metabolism rather than to fatty acid metabolism in liver. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 27-31, 2011.

* 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Key words : soy protein, sucrose, lipid metabolism, triacylglycerol, glucose

たん白質の種類は、生体の脂質代謝に影響する重要な食餌因子である。大豆たん白質は、腸管からのコレステロール吸収抑制、肝臓での胆汁酸合成の促進や脂肪酸合成の抑制、脂肪組織でのアディポネクチン産生量の増加等により、血清脂質濃度を低下させることが明らかにされている¹⁾。たん白質だけでなく、脂質や炭水化物等の食餌成分も生体の脂質代謝に影響する。高炭水化物食、特にフルクトースやスクロースのような糖類の摂取は、血清脂質濃度を増加させることが知られている²⁾。このような食餌炭水化物源の違いによる脂質代謝の変化は、大豆たん白質の脂質代謝改善作用に重大な影響を与える可能性が高いが、多くの試験研究ではほとんど考慮されてきていない。大豆たん白質の血清および肝臓脂質濃度の低下作用について、これまでに実験動物を用いた研究が数多く報告されているが、コーンスターチ等のデンプンが主要な食餌炭水化物源であることが多い¹⁾。一方、著者らの実験では、スクロースを多く含む大豆たん白質食はラットの血清脂質濃度を低下させたが、肝臓での脂質濃度の減少は見られなかったため³⁾、食餌炭水化物源の違いが大豆たん白質の脂質代謝調節作用に大きく影響するのではないかと推測した。そこで本研究では、食餌中の炭水化物源の違いが大豆たん白質の脂質代謝改善作用に及ぼす影響を調べるため、コーンスターチ（デンプン）とスクロース（ショ糖）を使用し、血清や肝臓での脂質濃度、および肝臓での脂質代謝に関連する酵素等の遺伝子発現や活性等の変化を分析し、食餌たん白質源と脂質源の交互作用を検証した。

方 法

動物試験

4週齢のSprague-Dawley雄ラット（日本チャールス・リバー）を市販の標準飼料で予備飼育した後、たん白質源と炭水化物源の組み合わせが異なる食餌で3週間の摂食試験を行った（ $n=7-8$ ）。たん白質源としてカゼイン（CAS）または分離大豆たん白質（SPI; フジプロR）を、炭水化物源としてコーンスターチ（STA）またはスクロース（SUC）を使用し、4群を設定した（Table 1）。試験期間中は自由に飲水・摂食させた。飼育後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、肝臓を採取した。本実験は食品総合研究所動物実験委員会の承認を得て、同所規定の動物実験ガイドラインに従い実施した。

血清、肝臓の成分分析

血清中性脂肪およびグルコース濃度は市販の測定キット（和光純薬）、血清インスリン濃度は超高感度インスリン測定キット（森永生科学研究所）で定量した。肝臓中性脂肪は総脂質を抽出した後、アセチルアセトンを用いた方法で定量した³⁾。

酵素活性測定

解剖後、直ちに肝臓片を氷冷したスクロース緩衝液でホモジナイズし、遠心分離したサイトソール画分を脂肪酸合成系酵素とグルコキナーゼ活性、総ホモジネートを脂肪酸酸化系酵素活性の測定に供した³⁾。

遺伝子発現量解析

肝臓より総RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを調製後、リアルタイムPCR法によりmRNA量を定量した³⁾。遺伝子を検出するためのプライマーとプローブは既知の遺伝子配列より設計した。発現量はglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量を対照値とし、CAS/STA群での発現量を100としたときの相対量で表した。

統計処理

統計処理にはSPSS 13.0J for Windows（日本IBM）を用い、実験結果は平均値±標準誤差（SE）で表した。食餌たん白質源と炭水化物源の作用および交互作用は、二元配置分散分析により有意差を判定し（ $p<0.05$ ）、交互作用が認められる場合にはBonferroniの単純主効果

Table 1. Composition of the experimental diets

Protein Carbohydrate (g/kg diet)	Groups			
	CAS		SPI	
	STA	SUC	STA	SUC
Casein	200	200	—	—
Soy protein	—	—	200	200
Cornstarch	579.5	—	579.5	—
Sucrose	—	579.5	—	579.5
Palm oil	150	150	150	150
Cellulose	20	20	20	20
Mineral mix (AIN-93G)	35	35	35	35
Vitamin mix (AIN-93)	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Energy (kJ/kg diet)	17,513	18,313	17,597	18,397

CAS, casein; SPI, soy protein isolate; STA, corn starch; SUC, sucrose.

果検定を行った。

結果と考察

飼育期間中の摂食量には有意差はなかったが、CAS食群と比べSPI食群で終体重が小さかった (Table 2)。一方、白色脂肪組織重量はCAS食群と比べSPI食群で低下傾向を示した。体重には影響しなかったが、白色脂肪組織と肝臓重量はSTA食群と比べSUC食群で有意に大きかった。

血清中性脂肪濃度は、食餌たん白質と炭水化物の交互作用が有意になり、SUC食群ではCAS食と比べSPI食で高く ($F(1,25)=9.431, p=0.005$)、SPI食群ではSTA食と比べSUC食で高くなった ($F(1,25)=22.49, p<0.001$) (Table 3)。血清グルコース濃度や肝臓中性脂肪濃度も同様の交互作用があり、SPI-SUC群で最も高い値を示した。血清インスリン濃度は炭水化物源がSUC食のとき有意に増加したが、たん白質源の影響はなかった。

この中性脂肪やグルコース濃度で認められた、食餌たん白質源と炭水化物源による交互作用の原因を解明

するため、肝臓での脂質代謝の変化を酵素活性レベルで解析した。脂肪酸合成系酵素 (fatty acid synthase, ATP-citrate lyase (ACL), and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)) 活性にはいずれも有意な交互作用が見られた (Table 4)。交互作用が大きいACLとG6PDでは ($p=0.001$)、CAS食群でSTA食と比べSUC食で有意に高かったが (ACL, $F(1,25)=41.22, p<0.001$; G6PD, $F(1,25)=29.49, p<0.001$)、SPI食群ではSTA食とSUC食での差がなかった。このことは、食餌たん白質は同時に摂取する炭水化物源の種類にかかわらず脂肪酸合成系酵素の活性を抑制することを示唆するが、血清や肝臓の中性脂肪濃度の変化と一致しない。一方、carnitine palmitoyltransferaseをはじめとする肝臓脂肪酸酸化系酵素の活性には、食餌たん白質と炭水化物源の影響はほとんどなかった (データは示していない)。

また、肝臓での中性脂肪代謝に関連する酵素等の変化を、遺伝子発現レベルで測定した。肝臓への中性脂肪取り込みに関わるhepatic lipase, low density lipoprotein receptor (LDLR)とvery low density lipoprotein receptor (VLDLR)の発現量では、食餌たん白質源と炭水化物源の交互作用が示された (Table

Table 2. Effect of soy protein in combination with different carbohydrate sources on growth parameters and tissue weights

Protein Carbohydrate	Groups				Two-way ANOVA		
	CAS		SPI		P	C	P x C
	STA	SUC	STA	SUC	p-value		
Food consumption (g/day)	22.0 ± 0.6	22.6 ± 1.1	20.1 ± 0.5	21.8 ± 0.6	0.056	0.116	0.445
Body weight (g)							
Initial	168 ± 3	168 ± 3	167 ± 2	168 ± 2	0.810	0.993	0.934
Final	368 ± 7	373 ± 12	336 ± 8	359 ± 8	0.015	0.129	0.293
Tissue weight (g/100 g body weight)							
Epididymal white adipose tissue	1.30 ± 0.15	1.67 ± 0.14	1.14 ± 0.10	1.37 ± 0.09	0.066	0.019	0.563
Perirenal white adipose tissue	1.96 ± 0.13	2.56 ± 0.20	1.54 ± 0.15	2.38 ± 0.10	0.047	<0.001	0.412
Liver	4.40 ± 0.07	5.02 ± 0.20	4.22 ± 0.10	4.80 ± 0.15	0.167	<0.001	0.897

P, protein; C, carbohydrate; P x C, interaction of protein and carbohydrate. For other abbreviations, see Table 1. Values are expressed as mean ± SE ($n=7-8$).

Table 3. Effect of soy protein in combination with different carbohydrate sources on serum triacylglycerol, glucose, insulin, and hepatic triacylglycerol concentrations

Protein Carbohydrate	Groups				Two-way ANOVA		
	CAS		SPI		P	C	P x C
	STA	SUC	STA	SUC	p-value		
Serum concentrations (mmol/L)							
Triacylglycerol	3.24 ± 0.42	3.90 ± 0.38	2.85 ± 0.47	5.83 ± 0.5	0.097	<0.001	0.015
Glucose	8.89 ± 0.34	8.65 ± 0.26	8.02 ± 0.40	9.89 ± 0.63	0.678	0.069	0.022
Hepatic triacylglycerol (μmol/g)	23.2 ± 3.6	35.5 ± 2.4	31.4 ± 2.1	61.0 ± 5.9	<0.001	<0.001	0.039
Serum insulin (pmol/L)	1.84 ± 0.41	2.88 ± 0.23	1.56 ± 0.22	2.23 ± 0.40	0.183	0.017	0.587

For abbreviations, see Table 1 and 2. Values are expressed as mean ± SE ($n=7-8$).

Table 4. Effect of soy protein in combination with different carbohydrate sources on the activity of enzymes involved in hepatic lipid metabolism

Protein Carbohydrate	Groups				Two-way ANOVA		
	CAS		SPI		P	C	P x C
	STA	SUC	STA	SUC	<i>p</i> -value		
Enzyme activity (nmol/min per mg protein)							
Fatty acid synthase	10.8±1.8	24.6±1.8	4.88±0.51	12.6±1.3	<0.001	<0.001	0.049
ATP-citrate lyase	38.6±3.6	85.9±9.1	26.2±1.4	36.2±3.5	<0.001	<0.001	0.001
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	45.7±3.8	111±17	20.3±1.2	24.7±2.4	<0.001	<0.001	0.001

For abbreviations, see Table 1 and 2. Values are expressed as mean ± SE ($n=7-8$).

Table 5. Effect of soy protein in combination with different carbohydrate sources on mRNA expression of proteins involved in hepatic lipid metabolism

Protein Carbohydrate	Groups				Two-way ANOVA		
	CAS		SPI		P	C	P x C
	STA	SUC	STA	SUC	<i>p</i> -value		
Enzyme mRNA level (%)							
Hepatic lipase	100±4	75.3±4.5	85.1±3.9	78.6±2.9	0.141	<0.001	0.025
LDL receptor	100±6	78.3±3.7	95.2±2.0	90.5±3.4	0.363	0.003	0.044
VLDL receptor	100±5	65.1±6.9	102±5	91.2±3.6	0.008	<0.001	0.026
DGAT1	100±5	73.1±4.4	102±4	86.8±2.1	0.060	<0.001	0.143
DGAT2	100±6	82.5±6.6	120±6	113±3	<0.001	0.038	0.356
Apolipoprotein B	100±6	67.4±3.1	95.8±3.6	81.7±3.3	0.221	<0.001	0.030

LDL, low density lipoprotein; VLDL, very low density lipoprotein; DGAT, Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase. For other abbreviations, see Table 1 and 2. Values are expressed as mean ± SE ($n=7-8$).

5). Hepatic lipaseではCAS食群における食餌炭水化物源の単純主効果が有意であり ($F(1,25)=4.338$, $p=0.048$), LDLRとVLDLRではSUC食群における食餌たん白質源 (LDLR, $F(1,25)=4.803$, $p=0.038$; VLDLR, $F(1,25)=14.175$, $p=0.001$) と, CAS食群における食餌炭水化物源 (LDLR, $F(1,25)=14.347$, $p=0.001$; VLDLR, $F(1,25)=23.81$, $p<0.001$) の単純主効果が有意であった。CAS食ではSUCによって発現量が低下するが, SPI食では食餌炭水化物源の影響が小さく, 肝臓への中性脂肪の取り込みが抑制されにくくなることを示唆している。一方, 中性脂肪合成に関わる2つのacyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT)⁵⁾ の発現量では交互作用は見られなかったが, SUC摂取で発現量が有意に低くなり, 肝臓の中性脂肪濃度増加に関与するDGAT2はSPI摂取時に発現量が高くなった。したがって食餌SPIは脂肪酸合成と異なり, 肝臓での中性脂肪合成は抑制させにくく考えられた。また, 肝臓からの中性脂肪分泌に必要なapolipoprotein B (ApoB) の発現量にも食餌たん白質源と炭水化物源の交互作用があり, SUC食群における食餌たん白質源の単純主効果が有意でSPI摂取で高くなった ($F(1,25)=6.555$, $p=0.017$)。以上のことから, スクロース摂取時の大豆

たん白質は, これらの遺伝子発現変化を通して肝臓での中性脂肪蓄積量増加を引き起こし, 血清中性脂肪濃度の増加に至ったと考えられた。しかし本研究では, コーンスターチとの同時摂取でも, 大豆たん白質による肝臓での中性脂肪取り込みや合成の抑制傾向が遺伝子発現レベルでは確認できなかったため, 実際の中性脂肪代謝の変動については更なる検討が必要である。

肝臓でのグルコース代謝の変化については, 解糖系のglucokinaseとpyruvate kinase活性を測定した。いずれもインスリンによって活性化する酵素であり⁴⁾, 血清インスリン濃度が上昇していたSUC食群でSTA食群よりも有意に高かった (Table 6)。食餌たん白質はpyruvate kinaseには影響しなかったが, glucokinaseの活性はSPI食群でCAS食群と比べて大きく低下した。これらの酵素活性に食餌たん白質と炭水化物源の交互作用はなかった。glucokinaseは肝臓での解糖系の初段階でグルコースのリン酸化を担うため⁴⁾, 大豆たん白質による本酵素の活性低下により, 肝臓へのグルコース取り込みが間接的に抑制された可能性がある。グルコキナーゼ活性が大豆たん白質によって抑制されるメカニズムは明らかでないが, 脂質代謝変化との関連が予想される。

Table 6. Effect of soy protein in combination with different carbohydrate sources on the activity of enzymes involved in hepatic glucolysis

Protein Carbohydrate	Groups				Two-way ANOVA		
	CAS		SPI		P	C	P x C
	STA	SUC	STA	SUC	<i>p</i> -value		
Enzyme activity (nmol/min per mg protein)							
Glucokinase	29.4 ± 7.6	42.9 ± 2.4	3.19 ± 0.61	11.2 ± 4.5	<0.001	0.028	0.552
Pyruvate kinase	209 ± 11	246 ± 7	196 ± 13	243 ± 11	0.467	0.001	0.664

For abbreviations, see Table 1 and 2. Values are expressed as mean ± SE (n=7-8).

要 約

大豆たん白質の脂質代謝調節機能は、同時に摂取する炭水化物源の種類に影響されるかについて検討した。コーンスターチが炭水化物源のとき、ラットの血清および肝臓中性脂肪濃度は、カゼインと比べて大豆たん白質により低下したが、スクロースのときは大豆たん白質摂取により上昇した。この食餌たん白質源と炭水化物源の交互作用について、肝臓での脂質代謝への影響を調べた。スクロースはコーンスターチと比べ、肝臓での脂肪酸合成系の酵素活性を有意に増加させたが、大豆たん白質は同時摂取する炭水化物の種類にかかわらずこれらの活性を抑制した。しかし、中性脂肪の合成や輸送に関わる酵素の遺伝子発現量に対しては、大豆たん白質の作用は小さくなる可能性が推定された。また、大豆たん白質食によりグルコキナーゼ活性が低下したことから、肝臓でのグルコース取り込みを抑制すると考えられ、大豆たん白質の脂質代謝調節作用はグルコース代謝の変化とも関連があることが示唆された。

文 献

- 1) Torres N, Torre-Villalvazo I and Tovar AR (2006): Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem*, **17**, 365-373.
- 2) Chong MF, Fielding BA and Frayn KN (2007): Metabolic interaction of dietary sugars and plasma lipids with a focus on mechanisms and *de novo* lipogenesis. *Proc Nutr Soc*, **66**, 52-59.
- 3) Takahashi Y and Ide T (2008): Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipose tissues of rats. *J Nutr Biochem*, **19**, 682-693.
- 4) Vaulont S and Kahn A (1994): Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J*, **8**, 28-35.
- 5) Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S and Ezaki O (2005): Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. *J Biol Chem*, **280**, 21506-21514.