

大豆たん白質が代謝と行動の日周リズムに及ぼす効果に関する研究

瀧口正樹*・松本絵里子・大平綾乃・岩瀬克郎

千葉大学大学院医学研究院遺伝子生化学

Effects of Soy Protein on Daily Rhythms of Metabolism and Locomotor Activity

Masaki TAKIGUCHI*, Eriko MATSUMOTO, Ayano OOHIRA and Katsuro IWASE

Department of Biochemistry and Genetics,
Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670

ABSTRACT

Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) is a pivotal transcriptional regulator of genes for lipogenesis, which is a representative circadian event of the liver, and the expression of the *Srebp-1* gene exhibits a robust daily rhythm of mice with a peak in the nocturnal feeding period under standard housing conditions. We recently reported that the *Srebp-1* expression rhythm was remarkably altered by a high carbohydrate diet, a high fat diet and a high protein (69% milk casein fraction) diet, compared to that on a standard diet (Matsumoto, E., et al., 2010, *J. Biol. Chem.* **285**: 33028-33036). Here, we examined the effects of a high soy protein diet on daily rhythms of gene expression in the liver, as well as on circadian rhythms of locomotor activity. We originally prepared a solidified diet containing 69% soy protein isolate (Fujipro-F), allowing us to monitor intake of a high soy protein diet, which showed a daily rhythm comparable to that of a standard diet. The high soy protein diet exhibited more moderate effects on daily expression rhythms of *Srebp-1*, as well as of the clock gene *Dbp* and the gene for the ornithine cycle enzyme argininosuccinate lyase. Effects of the high soy protein diet on the circadian rhythm of locomotor activity were also limited: phase advance of the rhythmicity in constant darkness is comparable between the standard diet and the high soy protein diet, while more remarked with the high casein diet. Therefore, soy protein is likely of relatively reduced effect on daily rhythms of metabolism and locomotor activity. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 32-37, 2011.

Key words : biological clock, lipid, nutrient, transcription factor, urea cycle

*〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1

生物は、地球の自転による昼夜サイクルに適合し、時計遺伝子により規定される約24時間周期の自発性、内在性の概日リズムを有する。これに光刺激、摂食、社会的制限等の環境要因が作用して全身の広範な各種生理機能の日周リズムが形成される^{1,2)}。近年、世界的に広範な疫学的、実験医学的研究により、概日リズム、日周リズムの変調、破綻が様々な健康障害、疾患の原因となるのが大きな注目を集めている。事実、時計遺伝子の変異等の遺伝学的要因、および、現代社会において増加の一途をたどる夜間労働、時間交代勤務、時間帯域変化(時差)勤務等の環境要因が、共に、睡眠障害、各種精神疾患、代謝疾患、心血管障害、がん等の様々な疾患の危険因子であることが明らかにされた^{3,4)}。今日、概日リズム、日周リズムを是正する時間治療法、さらに広く一般に健康増進法の確立が急務である。

夜行性のマウスを12時間：12時間の明暗サイクル条件下で飼育すると暗期に活動・摂食し、明期には休眠・絶食する。肝臓における三大栄養素の代謝のうち、脂肪合成は摂食期(暗期)に充進し、グルコース合成(糖新生)は絶食期(明期)に充進することが知られている。また、アミノ酸分解とそれに伴う尿素合成は、アミノ酸を摂取する摂食期のみならず、体たん白質分解の起こる絶食期にも充進すると考えられる。近年、我々は、マウス肝臓において日周発現リズムを示す遺伝子の検索を行い、脂肪合成を調節するSpot14遺伝子が強いリズム性発現を示すことを明らかにし⁵⁾、そのリズムが時計遺伝子、明暗(昼夜)サイクル、摂食/絶食サイクル(食餌タイミング)等の制御下にあることを明らかにした⁶⁾。さらにごく最近、申請者らは、高炭水化物(とうもろこし澱粉)配合食、高脂肪(粉末牛脂、紅花油)配合食、高たん白質(ミルクカゼイン)配合食が、マウス肝臓において、脂肪合成系酵素の遺伝子群を統御する転写調節因子であるsterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)の遺伝子(*Srebp-1*)や時計遺伝子の日周発現リズムの位相を変化させることを明らかにした⁷⁾。本研究では、大豆たん白質がこれらの遺伝子の日周発現リズム、ならびに日周行動リズムに及ぼす効果を調べた。

方 法

マウスの飼育条件

マウスの飼育と実験は、千葉大学動物実験実施規程に準拠して行った。6週齢オスC57BL/6マウスは日本クレアから購入した。各種実験に先立ち、同マウスを

12時間：12時間の明暗サイクル[点灯時をZeitgeber Time (ZT) 0時、消灯時をZT12時と称する]、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、通常食[CE-2(クレア、東京)：63%炭水化物、5%脂肪、32%たん白質]自由摂食下にて少なくとも2週間飼育した。固形化ミルクカゼイン画分高含有(69%)食は日本クレアに依託調製した。固形化分離大豆たん白質高含有(69%)食は以下の様に調製した。60°Cの水に澱粉を溶解してペースト状にし、これに分離大豆たん白質(フジプロ-F：不二製油、大阪)等の他の成分を加え良く混和してパテ状にした。型(家庭用製氷皿)に充填し、 -20°C にて1晩固化させたのち、型より取り出し室温にて2晩風乾して完成品とした。

RNAプロット解析

餌を高たん白質食に変え、さらに1週間飼育後、4時間ごと(ZT 3, 7, 11, 15, 19, 23時)に各3匹のマウスから肝臓を採取した。全RNAを、酸-グアニジンチオシアネート-フェノール/クロロホルム法⁸⁾またはTRIzol試薬(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, 米国)を用いて調製した。RNAを、ホルムアルデヒド変性アガロース(1%)ゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンにプロットした。ジゴキシゲニン標識RNAプローブは、各cDNAクローンを鋳型として試験管内転写キット(Roche Diagnostics, Mannheim, ドイツ)を用いて合成した。ハイブリダイゼーション、洗浄、化学発光検出は、Roche Diagnostics推奨のプロトコールに準拠した。検出・定量は、CS Analyzer ver 3.0(アトー、東京)を用いて行い、値を平均 \pm 標準誤差で示した。

行動リズムの解析

餌を高たん白質食に変え2週間飼育後、恒暗としてさらに3週間飼育した。この間、ケージの上方に装着した熱放射感知式運動検出装置により行動量を連続的にモニターし、1分毎にコンピューターに記録した。リズム性をClockLabソフトウェア(Actimetrics, Evanston, IL, 米国)を用いて解析した。

摂食リズムの解析

固形食をマウス摂食量測定装置FDM-300S(メルクエスト、富山)の天秤を装着した餌箱に入れ、摂食量を連続的にモニターし、15分毎にコンピューターに記録した。

結果と考察

固形化大豆たん白質高含有食の調製と摂食リズムの検出

摂取栄養素が各種生理機能の日周リズムに及ぼす効

果を検討するためには、高大豆たん白質食等も固形通常食と同様の形状とすることが望ましい。しかし、固形化分離大豆たん白質69%含有食の依託調製は飼料会社等においても困難であったため、独自の調製を試みた。方法に記載した様に、60°Cの水に澱粉を溶解してペースト状にし、これに分離大豆たん白質等の他の成分を混和し、成形の後、-20°Cにて1晩、続いて室温にて2晩風乾して完成品を得た。これを摂餌量測定装置の天秤を装着した餌箱に入れてC57BL/6マウスに与え、12時間：12時間の明暗サイクル条件下で摂餌量を連続的にモニターし、1時間毎の値を示した (Fig. 1)。通常食と同様に固形化分離大豆たん白質69%含有食についても、夜行性のマウスの活動・摂食期である暗期において、休眠・絶食期の明期に比べて、摂食量の増加を示す日周リズムが認められた。

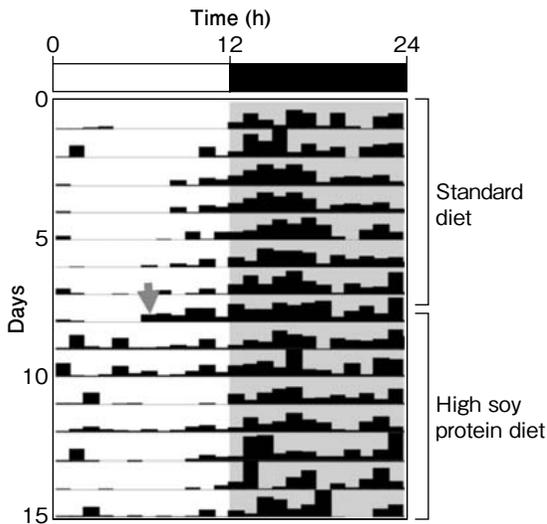


Fig. 1. Daily rhythms of food intake with a standard diet and a high soy protein diet. A male wild-type C57BL/6 mouse was fed *ad libitum* with a standard diet in 12 h:12 h light (the white horizontal bar and unshaded area)/dark (the black horizontal bar and shaded area) for 7 days, and further for 7 days with a high soy protein (69% soy protein isolate) diet as indicated by the brackets at the right margin. The arrow indicates the time point when diets were changed. Chows were served from a feeding box harboring a scale. Food intake was continuously recorded every 15 min on a computer, and is plotted in 1-h bins. The vertical scale for each day corresponds to 0.5 g.

肝臓における*Srebp-1*、時計遺伝子*Dbp*、オルニチンサイクル酵素アルギニノコハク酸リアーゼ遺伝子の日周発現リズムに対する効果

12時間：12時間の明暗サイクル条件下、通常食にて2週間マウスを飼育後、餌を高大豆たん白質食あるいは高ミルクカゼイン食に変え（対照は通常食を維持）、さらに1週間飼育後、4時間ごとに各3匹のマウスから肝臓を採取した。全RNAを調製しノザン解析を行った (Fig. 2)。以前報告した通り⁷⁾、脂肪合成系を統御する遺伝子*Srebp-1*は、通常食では摂食開始期に相当する暗期初期にピークを示す日周発現リズムが見られたのに対し、高ミルクカゼイン食ではピークが明期に変移した。一方、高大豆たん白質食では通常食と同様、暗期初期にピークが見られた (Fig. 2, upper panels)。

時計遺伝子*Dbp*の日周発現リズムでは、通常食で見られた明期後期のピークが高ミルクカゼイン食により前方に変移したのに対し、高大豆たん白質食では明らかな変移は認められなかった (Fig. 2, middle panels)。

多量のたん白質を摂取すると、アミノ酸に由来するアンモニアからの尿素合成が高まることが知られており、尿素合成系であるオルニチンサイクルの4番目の酵素アルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) mRNAレベルの日周リズムを調べた (Fig. 2, lower panels)。通常食では暗期・摂食期の前半にピークを示すリズムが見られた。高カゼイン食では、全体に上昇すると共に、暗期後半にもピークが見られた。高大豆たん白質食でも全体的な上昇が見られたが、暗期後半のピークは認められなかった。一つの解釈として、高大豆たん白質食では高カゼイン食に比べ、摂食に伴うアンモニアの負荷がより軽微である可能性が考えられた。

以上より、大豆たん白質は肝臓における代謝系遺伝子と時計遺伝子の日周発現リズムに対して負荷の少ない食物であると考えられた。

行動の概日リズムに対する効果

概日リズムは生物内在性の時計遺伝子により規定され、明暗サイクルの作用しない恒明、恒暗等の条件下で顕在化する。概日リズムに対する高大豆たん白質食の効果を、恒暗条件下での自発行動をモニターすることにより検討した。12時間：12時間の明暗サイクル条件下、通常食にて2週間、続いて高たん白質食に変え（対照は通常食を維持）2週間飼育した後、恒暗条件に変えさらに3週間飼育した。この間、熱放射感知式運動検出装置により行動量を連続的にモニターした (Fig. 3)。高ミルクカゼイン食では通常食に比べ、恒

暗条件に移行後、行動開始時点がより前方に変移する傾向がみられた。これに対し、高大豆たん白質食では通常食との明らかな差異は認められなかった。従って、

大豆たん白質は自発行動の概日リズムに対しても負荷の少ない食物であると考えられた。

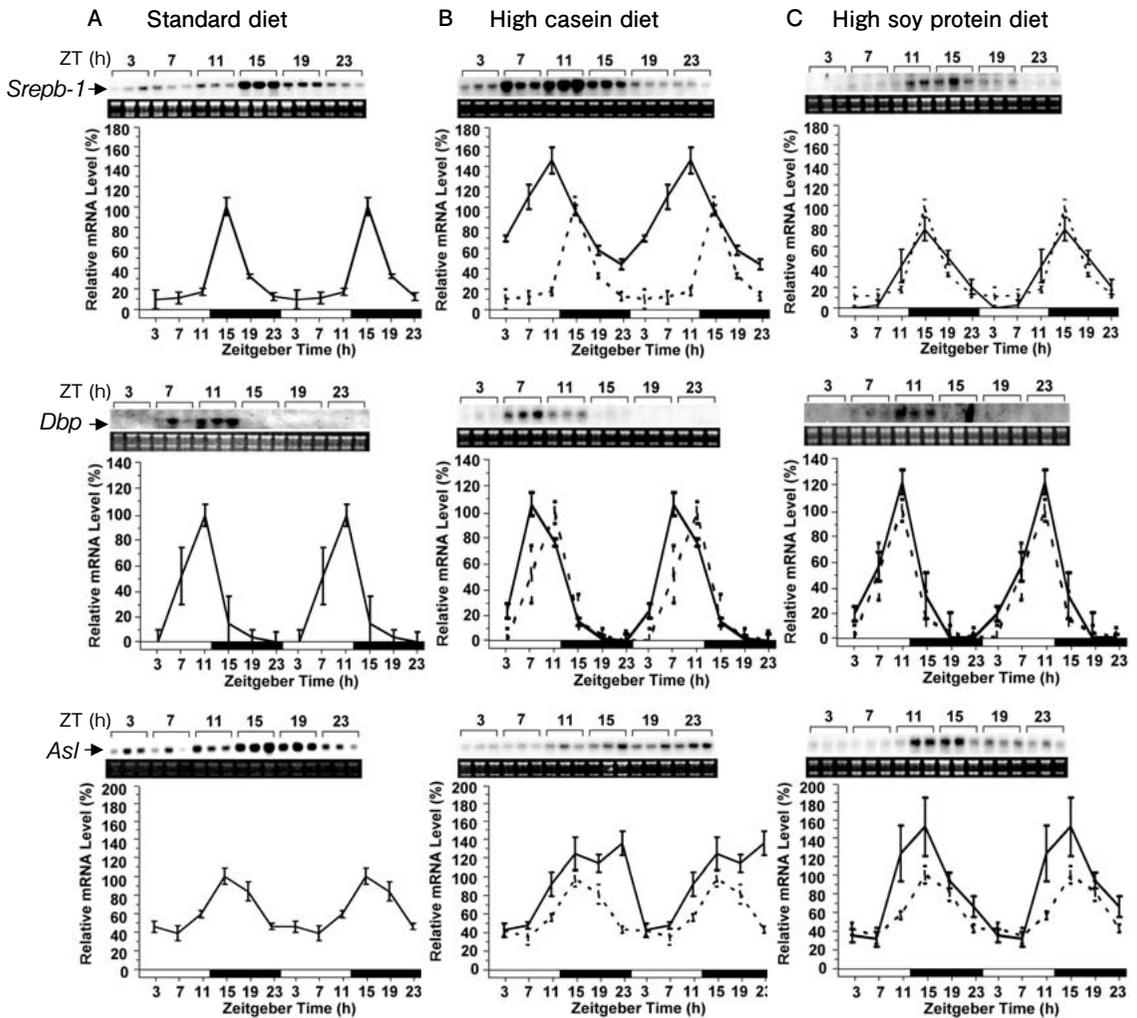


Fig. 2. Effects of the high soy protein diet on daily gene expression rhythms in the mouse liver. Mice were fed *ad libitum* with a standard diet in 12 h:12 h light/dark for at least 2 weeks, and further for 7 days with the standard diet (A), high casein diet (B), or high soy protein diet (C). Daily rhythms of hepatic *Srebp-1* (top panels), *Dbp* (middle panels) and argininosuccinate lyase (*Asl*) mRNA levels were examined by Northern analysis. A chemiluminogram for detection of each mRNA is shown along with ethidium bromide staining for 28S and 18S rRNAs. Below, quantified results of each mRNA level for one day are plotted twice to cover a 2-day span, and values relative to the maximum value with the standard diet (100%) are represented as mean \pm S.E. The broken lines for comparison represent the results reproduced from A. Results for *Srebp-1* and *Dbp* in A and B are partly reproduced from Ref. 7.

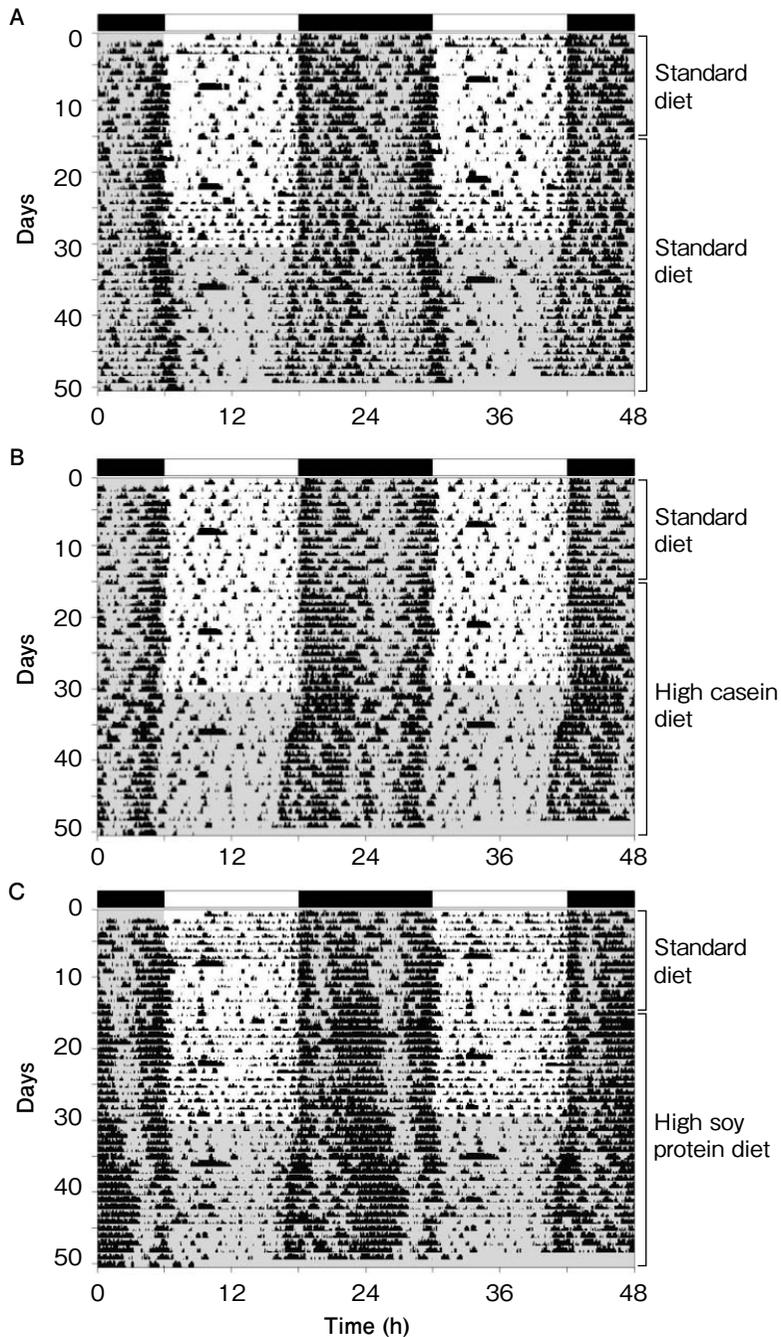


Fig. 3. Effects of the high soy protein diet on circadian rhythms of locomotor activity in constant darkness. Mice were fed *ad libitum* with a standard diet in 12 h:12 h light (white horizontal bars and unshaded areas)/dark (black horizontal bars and shaded areas) for the first 2 weeks, and further with the standard diet (A), high casein diet (B), or high soy protein diet (C) for 5 weeks as indicated by the brackets at the right margin. Two weeks after the diet change, mice were transferred to constant darkness. Locomotor activity was measured by a passive thermal-radiation motion sensor mounted above the cage for continuous recording every 1 min on a computer, and is plotted in 5-min bins for 2 days (48 h) in each horizontal span. Consecutive days are also aligned vertically, giving a double-plotted chart.

要 約

夜行性のマウスでは、肝臓における脂肪合成は暗期の摂食期に亢進する。脂肪合成系の遺伝子群を統御する転写調節因子であるsterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) の遺伝子 (*Srebp-1*) の発現には、摂食開始期にピークを示す顕著な日周リズムが見られる。最近、我々は、高炭水化物配合食、高脂肪配合食、高たん白質 (69%ミルクカゼイン画分) 配合食が、マウス肝臓において、*Srebp-1*や時計遺伝子 (*Dbp*) の日周発現リズムの位相を変化させることを明らかにした。本研究では、大豆たん白質が肝臓における遺伝子の日周発現リズム、ならびに概日行動リズムに及ぼす効果を調べた。マウスを12時間：12時間の明暗サイクル、通常食自由摂食下にて2週間飼育後、餌を高大豆たん白質配合食 (24%炭水化物、7%脂肪、69%フジプロ-F) に変え、さらに1週間飼育後、4時間ごとに各3匹のマウスから肝臓を採取した。全RNAを抽出し、ノザン法にて*Srebp-1*、*Dbp*、オルニチンサイクル酵素アルギニノコハク酸リアーゼのmRNAレベルの日周リズムを調べたところ、高大豆たん白質食では、高カゼイン食に比し、通常食の場合に類似したパターンを示した。また、明暗サイクルの作用しない3週間の恒暗条件における自発行動の概日リズムも、高大豆たん白質食では通常食に近似した周期長が観察された。以上の結果から、大豆たん白質は代謝と行動の日周リズムに対して負荷の少ない食物であると考えられた。

文 献

- 1) Dibner C, Schibler U and Albrecht U (2010): The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, **72**, 517-549.
- 2) Reppert SM and Weaver DR (2002): Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-941.
- 3) Takahashi JS, Hong HK, Ko CH and McDearmon EL (2008): The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*, **9**, 764-775.
- 4) Mongrain V and Cermakian N (2009): Clock genes in health and diseases. *J Appl Biomed*, **7**, 15-33.
- 5) Sakao E, Ishihara A, Horikawa K, Akiyama M, Arai M, Kato M, Seki N, Fukunaga K, Shimizu-Yabe A, Iwase K, Ohtsuka S, Sato T, Kohno Y, Shibata S and Takiguchi M (2003): Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem*, **278**, 30450-30457.
- 6) Ishihara A, Matsumoto E, Horikawa K, Kudo T, Sakao E, Nemoto A, Iwase K, Sugiyama H, Tamura Y, Shibata S and Takiguchi M (2007): Multifactorial regulation of daily rhythms in expression of the metabolically responsive gene *Spot14* in the mouse liver. *J Biol Rhythms*, **22**, 324-334.
- 7) Matsumoto E, Ishihara A, Tamai S, Nemoto A, Iwase K, Hiwasa T, Shibata S and Takiguchi M (2010): Time of day and nutrients in feeding govern daily expression rhythms of the gene for sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 in the mouse liver. *J Biol Chem*, **285**, 33028-33036.
- 8) Chomczynski P and Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.