

大豆たん白質摂取による代謝改善効果の分子標的解析研究（第一報）

佐藤隆一郎^{*1}・清水 誠¹・井上裕康²・中田理恵子²

¹東京大学大学院農学生命科学研究科

²奈良女子大学生活環境学部

Study of the Molecular Targets of Metabolic Improvement Caused by Soy Protein Intake (Part I)

Ryuichiro SATO^{*1}, Makoto SHIMIZU¹, Hiroyasu INOUE² and Rieko NAKATA²

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

²Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, Nara 630-8506

ABSTRACT

In the current experiments we used β -conglycinin or lipophilic proteins (LP) as a dietary protein source in comparison to casein. When Syrian hamsters were fed a LP diet containing high fat and 2% cholesterol for 4 weeks, its supposed serum cholesterol-lowering effect was not observed. In contrast, the β -conglycinin diet significantly reduced weight gain as compared with the casein diet. When C57BL/6N mice were fed a high-fat diet containing either casein or β -conglycinin for 9 weeks, the β -conglycinin diet lowered serum glucose, cholesterol, and insulin concentrations, and weight gain. The β -conglycinin diet produced positive changes in hepatic gene expression as reported previously. When these diets were fed to PPAR α -deficient mice, most effects of the β -conglycinin diet were not abolished, suggesting that β -conglycinin may exert its beneficial effects without involving PPAR α . We found a novel gene that was weakly induced by the β -conglycinin diet, and have been focusing on its functions by which carbohydrate and lipid metabolism are regulated in response to β -conglycinin feeding. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 13-16, 2012.

Key words : β -conglycinin, lipophilic proteins, PPAR α , cholesterol

大豆たん白質の代謝改善効果は数多くの先行研究により明らかにされている。我々も先の助成研究で、分離大豆たん白質（SPI）をマウスに投与する実験によ

りいくつかの新たな知見を得ている。（1）カゼインもしくはSPIを20%含む高脂肪食（50%カロリー）を最長28日間C57BL/6Nマウスに投与した際に、血中の脂質、糖濃度に大きな変化は生じなかったものの、肝臓において脂質代謝関連遺伝子を制御するSREBP-1c、

^{*}〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

PPAR γ mRNAの減少が確認された。(2) 投与期間を10日、3日と短くすると、3日間投与においてSREBP-1c mRNAの減少、その応答遺伝子の脂肪酸合成系遺伝子の低下のみが確認された。(3) 胆汁酸をリガンドとする核内受容体FXRの欠損マウスに同様の飼料を投与すると、SPIの効果はほとんど検出されなかった。(4) 小腸におけるFXR応答遺伝子の応答はSPI食摂取マウスで低下傾向であり、胆汁酸吸収抑制効果がSPIによる代謝改善効果の一部に寄与する可能性が示唆された¹⁾。以上の知見は、血清プロファイルなどに変動が生じる以前から、SPI摂食開始のかなり早い時期より種々の遺伝子応答が変動し、代謝変動がスイッチオンされていること、また、大豆たん白質による胆汁酸、脂質吸収阻害作用が効果の一端を担っている可能性を意味している。

本研究では、粗分画たん白質であるSPIではなく、さらに分画された大豆たん白質である β -コングリシニン(β -con), lipophilic proteins (LP) を用い、大豆たん白質の効果の検証を進めた。それぞれの分画大豆たん白質の代謝改善効果の経路を明らかにし、そこに介在する機能分子を同定することを目指した。このような機能分子を大豆たん白質の標的分子と位置づけ研究を進めた。

方 法

【大豆たん白質】

不二製油株式会社より提供いただいた、 β -コングリシニン(β -con), lipophilic proteins (LP) を用いた。

【実験動物】

雄Syrian hamster (5週齢、日本チャールズリバー社) を予備飼育後、3群に分け(1群7匹)、それぞれ20%カゼイン、 β -conもしくはLPを含む高脂肪食(+2% cholesterol) を投与した。

雄C57BL/6Nマウス(5週齢、日本クレア社) を予備飼育後、2群に分け(1群6匹)、それぞれ20%カゼインもしくは β -conを含む高脂肪食を投与した。

【実験食】

高脂肪食(カロリー比として50%脂質含む)をもとに、たん白質材料をそれぞれ20%となるように加えた粉末食を調製した。ハムスターにはさらにコレステロールを2%添加した食餌を用意した(Table 1)。マウスには、Table 1のコレステロールを除き、コーンスターチを増量した飼料を投与した。

【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)を用いて定量した。

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)を用いてそれぞれ定量した。

【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。

Table 1. Composition of the experimental diets

	Casein (g/100g)	β -conglycinin (g/100g)	LP (g/100g)
Casein	22.9		
β -conglycinin/ LP		20.7	25.1
Cornstarch	19.1	21.2	19.0
α -Cornstarch	6.1	6.6	4.9
Sucrose	10.0	10.0	10.0
Soybean oil	7.0	7.0	7.0
Fiber	6.4	6.4	6.1
Mineral Mix (AIN-93)	4.5	4.5	4.3
Vitamin Mix (AIN-93)	1.3	1.3	1.2
L-cystine	0.3		
Choline Bitartrate	0.3	0.3	0.3
Lard	20.0	20.0	20.0
Cholesterol	2.0	2.0	2.0
total	100.0	100.0	100.0
Protein (%)	20.0	20.0	20.0

結果と考察

コレステロール含有高脂肪食摂取ハムスターへの大豆たん白質の影響

我々の先行研究結果より、小腸からの胆汁酸、脂質吸収の低下作用が大豆たん白質効果の一部を担うことが予想された。大豆たん白質の36-40%を占めるLPには、リン脂質結合能を有し、血中コレステロール低下作用が報告されている²⁾。従って、大豆たん白質で認められる効果はLPの作用に起因することが予想される。そこで、ヒトのコレステロール代謝機構に近い制御機構を持つハムスターを用い、コレステロール負荷食により血中コレステロール値を上昇させ、それに対するLPの効果を追跡した。また同時に、大豆たん白質の18-19%を占める β -conについても、比較検討を行った。

ハムスターを実験食で3週間飼育し、その後と殺し、血中各種成分濃度を定量した(Table 2)。摂取カロリー量に3群間で差はなかったが、 β -con食で体重増加が抑制された。血中グルコース、トリグリセリド濃度に3群間で大きな差は認められなかった。期待された血中コレステロール濃度は、カゼイン食で低値を示し、これまでの報告とは異なる結果であり、再現性の確認が必要であった。しかし、体重増加、精巣上体脂肪重量は β -con食で低値を示した。血中コレステロール濃度が想定外の値を示したことから判断は難しいものの、以下のマウスを用いた複数回の β -con食投与実験の結果と合わせると、 β -con食による体重増加抑制効果はハムスター、マウスの種差を超えて再現性があり、興味深い。

マウスを用いた高脂肪 β -con食の効果

カゼインもしくは β -conを20%含む高脂肪食をマウスへ9週間投与した。 β -con食の摂取量は、カゼイン食のそれに比べて有意に高かった。にもかかわらず、9週間の体重増加は、カゼイン食に比べ、 β -con食で有意に低かった。また、血中グルコース濃度、総コレステロール濃度、インスリン濃度はいずれも β -con食摂取マウスで低値を示した。さらに、肝臓トリグリセリド含量も β -con食で減少していた。(data not shown)

肝臓での遺伝子発現もこれまで報告があるように、SREBP-1c、PPAR γ などの遺伝子発現が減少していた³⁾。同様に、以前の報告と同じく、白色脂肪組織で β -con食摂取によりadiponectin mRNA量の増加が検出された⁴⁾。

これらの応答が、脂質代謝制御に深く関与するPPAR α 欠損マウスでも同じく認められるかについて、検討を行った。カゼイン食、 β -con食を4週間投与した所、血清成分の変動、体重増加、その他において、野生型と大きな差異が認められなかった。以上の知見は、 β -con食で引き起こされる応答現象にPPAR α が関与している可能性は低いものと推察された。

我々は β -con食を摂取したマウス肝臓において、わずかに遺伝子発現が変動した遺伝子Xについて、解析を進めた。本研究とは異なる研究より、我々は遺伝子Xが糖代謝、脂質代謝に少なからず影響を与える因子であることを明らかにしている。現在、本遺伝子を欠損したマウスを入手し、そのマウスにカゼイン食、 β -con食を投与し、各種パラメーターの変動、血清成分、体重増加変動を解析している。本因子が、 β -con食摂取による代謝調節作用の一部を担う可能性について解析を進行させている。

Table 2. Body weight and serum glucose, triglyceride and cholesterol concentrations of hamsters fed the experimental diets

	casein	β -conglycinin	LP
weight gain [g]	20.1 $\pm$ 3.7	11.2 $\pm$ 4.5**	23.4 $\pm$ 5.2
total cal [kcal]	553.0 $\pm$ 47.5	525.3 $\pm$ 57.3	576.1 $\pm$ 59.6
serum glucose [mg/100mL]	184.4 $\pm$ 55.3	226.7 $\pm$ 72.4	143.6 $\pm$ 31.0
serum TG [mg/100mL]	328.2 $\pm$ 84.6	410.0 $\pm$ 133.3	368.9 $\pm$ 101.4
serum total cholesterol [mg/100mL]	219.7 $\pm$ 20.5	378.9 $\pm$ 86.8**	322.3 $\pm$ 66.4**
epididymal WAT [g]	3.6 $\pm$ 0.6	2.9 $\pm$ 0.5*	3.2 $\pm$ 1.1

Values are means $\pm$ SD. * p <0.05, ** p <0.01 compared with the casein diet.

要 約

これまでの先行研究より、分離大豆たん白質に代謝改善効果のあることを明らかにしている。さらに精製されたたん白質画分を用いた研究を行う目的で、 β -conglycininとLPを用意し、これらをコレステロール含有高脂肪食に加え、ハムスターに3週間投与した。予想に反して、カゼイン食と比較し、有意な効果は認められなかった。しかし、 β -conglycinin食には、体重増加抑制効果、精巢上体質量減少効果が認められた。さらに、マウスにカゼインもしくは β -conglycinin含有高脂肪食を9週間投与する実験を行った。各種パラメーター変動、体重増加抑制効果など、既知のデータと一致する結果が得られた。脂質代謝制御に深く関与するPPAR α を欠損するマウスに試験食を4週間投与し、解析を行った。 β -conglycinin食の効果の大半は欠損マウスでも認められ、その効果に対するPPAR α の寄与は小さいことが推測された。さらに、 β -conglycinin食摂取した野生型マウス肝臓での遺伝子解析の結果、新たに糖・脂質代謝調節に関与することが予想される遺伝子Xのわずかな上昇を認めた。この遺伝子Xの寄与に関してさらに分子レベルでの解析を進め、また、その欠損マウスに上記と同様の試験食を投与し、その効果について検討する実験を進行させてつある。

文 献

- 1) Hashidume T, Sasaki T, Inoue J and Sato R (2011): Consumption of soy protein isolate reduces hepatic SREBP-1c and lipogenic gene expression in wild-type mice, but not in FXR-deficient mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 1702-1707.
- 2) Kanamoto R, Kimura S and Okamura G (2007): Cholesterol lowering effect of soybean lipophilic proteins associated with phospholipids in rat. *Soy Protein Res*, **10**, 83-87.
- 3) Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S and Ezaki O (2011): Dietary β -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protein. *J Nutr Biochem*, **23**, 123-132.
- 4) Tachibana N, Iwaoka Y, Hirotsuka M, Horio F and Kohno M (2010): Beta-conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1250-1255.