

大豆たん白質が食餌性マグネシウム欠乏障害の改善に及ぼす 効果のトランスクリプトーム解析

石島智子*・米光翔吾・中村紀章・中井雄治・阿部啓子

東京大学大学院農学生命科学研究科

Transcriptome Analysis of the Effect of Soy Protein on Improvement of Magnesium-deficient Diet-induced Disorder in Rats

Tomoko ISHIJIMA*, Shogo YONEMITSU, Toshiaki NAKAMURA,
Yuji NAKAI and Keiko ABE

ILSI Japan-Endowed Chair of Functional Food Science and Nutrigenomics, Graduate School of
Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

The dietary protein sources, casein and soy protein isolate (SPI), differed from each other in terms of the effect of dietary Mg-deficiency on the metabolism of rats. In detail, 4-week-old male Wistar rats were fed 4 formulas with different dietary Mg levels and protein sources for 4 weeks. As a result, the serum non-esterified fatty acid level was significantly decreased when rats were fed the Mg-deficient SPI diet. Hepatic DNA microarray analysis was conducted, with the result that, in dietary Mg deficiency, casein feeding significantly changed the expression of 660 genes, while SPI feeding changed that of 419 genes. The significantly changed genes in rats fed the Mg-deficient diet included transcription factor sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1) and genes involved in cholesterol metabolism. These two changes differ between the dietary protein sources. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 55-60, 2012.

Key words : soy protein isolate, Mg deficiency, lipid metabolism, DNA microarray, rat

生体内において多くの生理的・生化学的作用に関与しているマグネシウム (Mg) は、摂取不足が重篤な栄養障害の原因となる。著者ら¹⁾ は、ラットへのMg欠乏食投与によりたん白質栄養状態が低下すること

を明らかにした。また食餌性Mg量とたん白質量の関係が生体に及ぼす影響については報告^{2,3)} されているが、食餌性Mg量とたん白質の質の関係が生体に及ぼす影響についてはよくわかっていない。必須アミノ酸をバランスよく含む良質なたん白質の一つに大豆たん白質が挙げられる。とりわけ分離大豆たん白質 (Soy

*〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Protein Isolate, SPI) は通常飼料のたん白質給源であるカゼインと比較して血中グルコース⁴⁾ やコレステロール⁵⁾ を低下させる効果があるとされている。著者らは、Mg欠乏カゼイン食投与ラットの肝臓でトランスクリプトーム解析を行いエネルギー代謝が変化することを明らかにしている。SPIの生理効果に関する知見から、Mg欠乏食投与時のエネルギー代謝の改善に有効であることが期待される。そこで本研究では、たん白質給源としてカゼインまたはSPIを用いたMg欠乏食投与により引き起こされる肝臓への影響が、両者によってどのように変化するかを遺伝子発現変動から網羅的に解析することを目的とした。実際には、SPIにMg含有量が多いため、Mg欠乏の度合いが先行研究¹⁾ の0.004% (正常食0.05%の約10分の1) よりも0.02% (正常食の約5分の2) と軽度の条件で実施した。したがって本研究では、Mg欠乏食投与時におけるたん白質給源の違いによる影響を遺伝子発現変動から網羅的に解析することを新たな目的とした。

方 法

飼料はAIN-93G飼料組成⁶⁾ を基に作製した (Table 1)。SPI食は、カゼイン食とたん白質含有量が等しくなるようにSPI (フジプロ, 不二製油株) を添加した。

飼料中Mg濃度は、正常食が0.05%、Mg欠乏食が0.02%になるように調製した。被験動物として3週齢Wistar系雄ラット (日本クレア株) を用い、正常カゼイン食 (CC) で1週間予備飼育後4群に分け、それぞれCC、Mg欠乏カゼイン食 (MDC)、正常SPI食 (CS)、Mg欠乏SPI食 (MDS) を自由摂食させた。4週間飼育後、麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血と肝臓の摘出を行った。

採血後に遠心分離して得られた血清において、Mg、カルシウム、総たん白質、アルブミン、総コレステロール、LDLおよびHDLコレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸、総ケトン体、グルコースの測定を行った。

飼育および血液分析データの統計解析にはIBM SPSS Statistics Version 20を用い、飼料中Mg濃度とたん白質給源を因子として二元配置分散分析を行った後、有意差のあるものについてはScheffeの多重比較検定を行った。いずれの場合においても危険率5%未満を有意とした。

DNAマイクロアレイ解析は、血清中Mg濃度が平均に近い各群4匹のラットの肝臓で行った。TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies) でTotal RNAを抽出し、3' IVT Express Kit (Affymetrix) を用いてaRNAを合成した。45°C、16時間GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix) にハイブリダイズさせ、

Table 1. Composition of the experimental diets

	CC	MDC	CS	MDS
Mg Level	Control	Mg-deficiency	Control	Mg-deficiency
Protein Source	Casein	Casein	Soy protein isolate	Soy protein isolate
Ingredient	g/kg diet			
Casein	200.000	200.000	—	—
Soy protein isolate	—	—	201.193	201.193
Corn starch	531.657	532.154	530.685	531.293
Sucrose	100.000	100.000	100.000	100.000
Corn oil	70.000	70.000	70.000	70.000
Cellulose powder	50.000	50.000	50.000	50.000
Mineral mixture ¹	35.000	35.000	35.000	35.000
Vitamin mixture ²	10.000	10.000	10.000	10.000
Choline bitartrate	2.500	2.500	2.500	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Magnesium oxide	0.829	0.332	0.608	—
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Chemical analysis	%			
Crude protein	17.5	17.4	17.3	17.3
Magnesium	0.046	0.021	0.049	0.018
Calcium	0.507	0.505	0.518	0.513
Phosphorus	0.319	0.313	0.347	0.345

¹ The mineral mixture is a modification of AIN-93G mineral mixture without magnesium oxide.

² AIN-93 vitamin mixture.

その後、洗浄・染色を行い、スキャナーで蛍光シグナルを検出した。蛍光シグナルは、RとBioconductorを用いてqFARMSで数量化した。階層的クラスター解析は、Rを使用して行った。Mg欠乏食投与により発現が変化した遺伝子の抽出には、カゼイン（CCとMDC間）とSPI（CSとMDS間）においてRank products法による検定を行い、False Discovery Rate (FDR) 0.05未満を有意とした。Mg欠乏食投与により発現が変化した遺伝子に濃縮される機能を抽出するため、DAVIDとQuick GOを用いて、Gene Ontology (GO)のBiological Processに基づいたGene-annotation enrichment analysisを行った。EASE scoreがBenjamini and Hochberg FDRで多重比較補正された危険率5%未満のものを有意とした。

結果と考察

4群間において飼料摂取量に有意な差はみられなかったが、体重増加量は、SPI投与で有意に低下した (Table 2)。血清中Mg、カルシウムおよび総ケトン体濃度は、Mg欠乏食投与により有意に変化し、たん白質給源より飼料中Mg濃度による影響の強いことが示された。その他有意差のあった総たん白質、アルブミ

ン、LDLおよびHDLコレステロール、トリグリセリドおよび遊離脂肪酸といった血清成分の多くが、SPI投与により有意に変化し、飼料中Mg濃度よりたん白質給源による影響の強いことが示された。その中で遊離脂肪酸については、Mg欠乏食投与時のみSPI投与による有意な低下が示された。血清中総コレステロールとグルコース濃度については、SPI投与による低下が報告^{4,5)}されているが、本実験では4群間に有意な差はみられなかった。

DNAマイクロアレイ解析の結果、階層的クラスター解析ではカゼインとSPIで大きく分かれ、遺伝子発現上においても飼料中Mg濃度よりたん白質給源による影響が強く現れた (Fig. 1)。カゼインとSPIで遺伝子発現パターンが大きく異なることから、各たん白質給源におけるMg欠乏食投与による影響も異なると推察し、それぞれにおいてMg欠乏食投与により発現が変化した遺伝子の抽出を行った。その結果、カゼインでは660遺伝子、SPIでは419遺伝子が抽出された。Mg欠乏食投与により発現が変化した遺伝子に濃縮された機能をみたとすると、カゼインでは脂質代謝、有機酸代謝、エーテル代謝、酸化還元、刺激応答、免疫応答、細胞死に関するものが含まれていた (Table 3)。

Table 2. Food intake, weight gain and serum characteristics in rats fed CC, MDC, CS or MDS¹

	CC	MDC	CS	MDS	Two-way ANOVA ²
Food intake (g/day)	17.6±0.3	17.0±0.9	17.4±1.4	16.5±0.9	
Weight gain (g/day)	6.8±0.3 ^a	6.8±0.3 ^a	5.5±0.5 ^b	5.3±0.4 ^b	P
Magnesium (mg/100mL)	2.0±0.1 ^a	1.7±0.2 ^b	2.1±0.1 ^a	1.5±0.1 ^b	M, M×P
Calcium (mg/100mL)	10.2±0.4	10.6±0.3	10.1±0.3	10.4±0.3	M
Total protein (g/100mL)	5.8±0.3 ^a	5.7±0.2 ^a	5.2±0.1 ^b	5.1±0.1 ^b	P
Albumin (g/100mL)	3.9±0.2 ^a	3.9±0.1 ^a	3.5±0.1 ^b	3.5±0.0 ^b	P
Total cholesterol (mg/100mL)	72.8±6.0	76.2±8.9	72.5±4.5	77.7±10.9	
LDL cholesterol (mg/100mL)	5.5±1.0 ^a	6.3±0.5 ^{ab}	7.7±1.5 ^{ab}	8.3±2.6 ^b	P
HDL cholesterol (mg/100mL)	23.5±1.8 ^a	24.3±2.1 ^a	28.7±1.2 ^b	30.7±3.1 ^b	P
Triglyceride (mg/100mL)	297.3±133.4 ^a	289.0±52.3 ^a	119.2±42.5 ^b	105.5±34.4 ^b	P
Nonesterified fatty acid (μEq/L)	166.5±78.3 ^{ab}	227.3±93.4 ^a	110.2±38.5 ^b	97.2±27.9 ^b	P
Total ketone body (μmol/L)	133.5±21.8 ^{ab}	156.5±16.0 ^a	124.2±12.6 ^b	137.7±16.3 ^{ab}	M
Glucose (mg/100mL)	162.7±16.5	166.5±10.8	152.2±8.3	161.8±11.9	

CC, control casein diet; MDC, Mg-deficient casein diet; CS, control soy protein isolate diet; MDS, Mg-deficient soy protein isolate diet.

¹ Values are means ± SD for six rats.

² Significant effect ($p < 0.05$): M, effect of dietary magnesium level; P, effect of dietary protein source; M×P, effect of interaction.

^{a, b} Values with different superscript letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

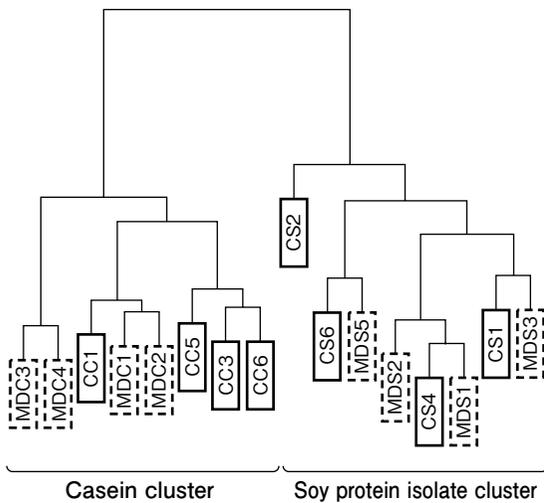


Fig. 1. Hierarchical clustering dendrograms from qFARMS DNA microarray data. CC, control casein diet; MDC, Mg-deficient casein diet; CS, control soy protein isolate diet; MDS, Mg-deficient soy protein isolate diet. Control diet, Mg-deficient diet.

一方SPIにおいては、脂質代謝、有機酸代謝、酸化還元、刺激応答などが含まれていた。濃縮された機能の中でエネルギー代謝に関連するものに含まれる遺伝子の発現変化から脂質合成の抑制、脂肪酸 β 酸化、糖新生およびアミノ酸合成の亢進が示された。これらの変化についてはたん白質給源に関わらずMg欠乏食投与による影響が同じであった（データ省略）。また脂肪酸 β 酸化の亢進については、血中総ケトン体濃度の上昇と一致する結果となった。一方、脂質合成の転写調節因子であるsterol regulatory element binding transcription factor 1 (srebf1) およびコレステロール代謝に関係する遺伝子の発現変化については、たん白質給源によりMg欠乏食投与による影響が異なる結果となった。血清中コレステロール濃度にMg欠乏食投与による有意な差はみられなかったことから、たん白質給源により血清中のコレステロール制御機構が異なることが示唆された。

今後はMg欠乏食投与による代謝変化の解明と共に、これに対する飼料中たん白質給源の関わりについて、さらに詳細を検討していきたい。

Table 3. Significantly enriched GO terms found in changed genes by Mg-deficient diet¹

A.	GO term	B.	GO term
Lipid metabolism		Lipid metabolism	
lipid biosynthetic process		lipid biosynthetic process	
steroid metabolic process		fatty acid metabolic process	
sterol metabolic process		fatty acid biosynthetic process	
cholesterol metabolic process		Organic acid metabolism	
fatty acid metabolic process		organic acid biosynthetic process	
glycerolipid metabolic process		carboxylic acid biosynthetic process	
neutral lipid metabolic process		cellular amino acid biosynthetic process	
acylglycerol metabolic process		serine family amino acid biosynthetic process	
triglyceride metabolic process		Oxidation reduction	
Organic acid metabolism		oxidation reduction	
organic acid biosynthetic process		Response to stimulus	
carboxylic acid biosynthetic process		response to endogenous stimulus	
Ether metabolism		response to organic substance	
organic ether metabolic process		response to hormone stimulus	
glycerol ether metabolic process		response to extracellular stimulus	
Oxidation reduction		response to nutrient levels	
oxidation reduction		response to nutrient	
Response to stimulus			
response to extracellular stimulus			
cellular response to extracellular stimulus			
response to nutrient levels			
cellular response to nutrient levels			
response to starvation			
cellular response to starvation			
response to endogenous stimulus			
response to organic substance			
response to hormone stimulus			
response to drug			
response to unfolded protein			
response to protein stimulus			
Immune response			
antigen processing and presentation of peptide antigen			
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I			
Cell death			
negative regulation of cell death			
negative regulation of programmed cell death			
negative regulation of apoptosis			
anti-apoptosis			

A, 660 genes changed by Mg-deficient casein diet (between CC and MDC); B, 419 genes changed by Mg-deficient soy protein isolate diet (between CS and MDS).

¹Significant effect (Benjamini and Hochberg FDR corrections $p < 0.05$).

要 約

マグネシウム (Mg) 欠乏食投与時のカゼインまたは分離大豆たん白質 (SPI) の摂取は, Mg 欠乏食投与による代謝への影響を変化させることを提示した. 4週齢Wistar系雄ラットにMg濃度 (0.05%と0.02%) とたん白質給源 (カゼインとSPI) が異なる飼料を4週間投与した. 血清中遊離脂肪酸濃度は, Mg欠乏SPI投与群において低下することが示された. 肝臓におけるDNAマイクロアレイ解析の結果, Mg欠乏食投与により発現が変化した遺伝子として, たん白質給源がカゼインでは660遺伝子, SPIでは419遺伝子が抽出された. これらの中には, たん白質給源によってMg欠乏食投与による発現変化の異なる転写調節因子sterol regulatory element binding transcription factor 1 およびコレステロール代謝に関係する遺伝子が含まれていた.

文 献

- 1) Nemoto T, Matsuzaki H, Uehara M and Suzuki K (2006): Magnesium-deficient diet-induced reduction in protein utilization in rats is reversed by dietary magnesium supplementation. *Magn Res*, **19**, 19-27.
- 2) Menaker W (1954): Influence of protein intake on magnesium requirement during protein synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, **85**, 149-151.
- 3) Bunce GE, Reeves PG, Oba TS and Sauberlich HE (1963): Influence of the dietary protein level on the magnesium requirement. *J Nutr*, **79**, 220-226.
- 4) Nagasawa A, Fukui K, Funahashi T, Maeda N, Shimomura I, Kihara S, Waki M, Takamatsu K and Matsuzawa Y (2002): Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res*, **34**, 635-639.
- 5) Tovar-Palacio C, Tovar AR, Torres N, Cruz C, Hernandez-Pando R, Salas-Garrido G, Pedraza-Chaverri J and Correa-Rotter R (2011): Proinflammatory gene expression and renal lipogenesis are modulated by dietary protein content in obese Zucker fa/fa rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **300**, F263-271.
- 6) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC Jr (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951.