

# 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（第二報）

佐藤隆一郎<sup>\*1</sup>・清水 誠<sup>1</sup>・井上裕康<sup>2</sup>・中田理恵子<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

<sup>2</sup>奈良女子大学生生活環境学部

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

Ryuichiro SATO<sup>\*1</sup>, Makoto SHIMIZU<sup>1</sup>, Hiroyasu INOUE<sup>2</sup> and Rieko NAKATA<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Human Life and Environment  
Nara Women's University, Nara 630-8506

### ABSTRACT

In the current experiments we used  $\beta$ -conglycinin as a dietary protein source by comparing casein with it. When C57BL/6N mice were fed a high-fat diet containing either casein or  $\beta$ -conglycinin for 9 weeks, the  $\beta$ -conglycinin diet lowered serum glucose, cholesterol, and insulin concentrations, and weight gain. The  $\beta$ -conglycinin diet produced positive changes in hepatic gene expression as reported previously. Oral glucose tolerance test revealed that orally loaded glucose was more rapidly cleared in mice fed the  $\beta$ -conglycinin diet, suggesting that this diet stimulated insulin sensitivity and improved insulin tolerance. When mice were fed the  $\beta$ -conglycinin diet for 6 hours after 24-hour fasting, hepatic gene expression of fibroblast growth factor (FGF) 21 was significantly increased in the  $\beta$ -conglycinin diet mice. Because this gene is one of the PPAR $\alpha$  targets, PPAR $\alpha$ -deficient mice were fed the  $\beta$ -conglycinin diet to determine whether PPAR $\alpha$  is activated by  $\beta$ -conglycinin feeding. We found that neither an increase in FGF21 mRNA nor most effects of the  $\beta$ -conglycinin diet were abolished by PPAR $\alpha$ -deficiency, suggesting that  $\beta$ -conglycinin may exert its beneficial effects without involving PPAR $\alpha$ . These results indicate that increased FGF21 induced by  $\beta$ -conglycinin feeding may account for lowering body weight gain and serum glucose level caused by a high fat diet. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 7-11, 2013.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, FGF21, PPAR $\alpha$

\* 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

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、PPAR $\gamma$  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<sup>1)</sup>。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摂取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 $\beta$ -コングリシニン ( $\beta$ -con) の機能についての昨年の研究成果に基づき、さらなる解析を進展させた。長期間投与実験においては、複数の代謝改善効果が認められた。さらにこれらの効果が、短期投与において実現されるかについて、単回投与実験を実施した。その結果、 $\beta$ -コングリシニンの代謝改善効果の一部を説明する新たな分子の同定に成功した。

## 実験方法

### 【大豆たん白質】

不二製油株式会社より提供いただいた、 $\beta$ -コングリシニン ( $\beta$ -con) を用いた。さらに、エタノール処理により混入イソフラボンを約90%除去した $\beta$ -コングリシニンサンプルを提供いただいた。

### 【実験動物】

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 $\beta$ -conを含む高脂肪食を投与した。雄PPAR $\alpha$ 欠損マウスについても同様の投与実験を行った。

### 【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。

### 【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。

## 結果と考察

### 高脂肪 $\beta$ -con食の長期投与の効果

【実験1】カゼインもしくは $\beta$ -conを20%含む高脂肪食をマウスへ9週間投与した。 $\beta$ -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、 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -con食で減少していた (Fig. 1)。

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 $\gamma$ などの遺伝子発現が減少していた<sup>2)</sup>。同様に、以前の報告と同じく、白色脂肪組織で $\beta$ -con食摂取によりadiponectin mRNA量の増加が検出された<sup>3)</sup>。小腸においては、FXRの応答遺伝子発現は $\beta$ -con食摂取により有意に減少しており、胆汁酸吸収の低下が推察された (Fig. 2)。

【実験2】再現性の確認と測定項目を増やす目的で同様の長期投与実験を行った。本実験では、上記と同様の条件で、マウスに食餌を4週間投与した。3週間目に、

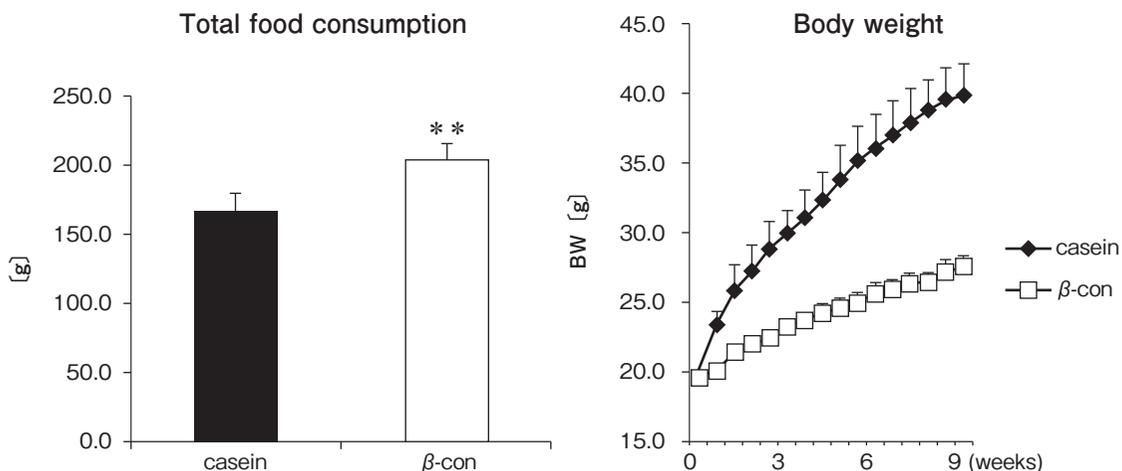


Fig. 1. Food consumption and body weight gain of mice fed either casein or  $\beta$ -conglycinin diet for 9 weeks. The data represent means  $\pm$  SD (n=6). \*\*,  $p < 0.01$ .

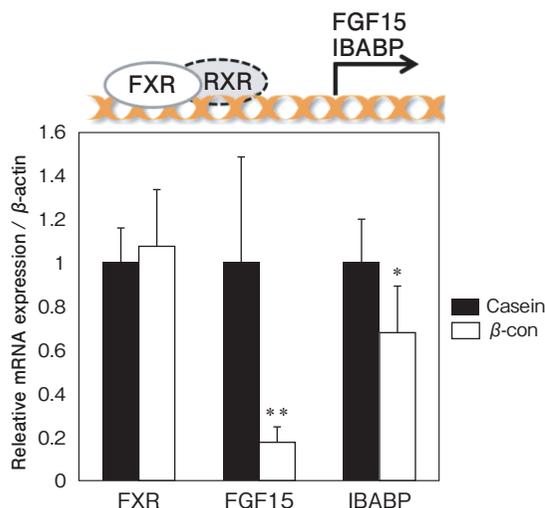


Fig. 2. Effect of  $\beta$ -conglycinin consumption on the expression of FXR target genes in the small intestine. Total RNA was isolated from the small intestine of mice fed either casein or  $\beta$ -conglycinin diet for 9 weeks. The mRNA levels of FXR, FGF15 (Fibroblast growth factor 15), and IBABP (Ileum bile acid-binding protein) were determined by quantitative RT-PCR (n=6). Relative mRNA levels were determined after being normalized to  $\beta$ -actin RNA. Relative mRNA levels in casein diet-fed mice were set to 1. The data represent means  $\pm$  SD. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

グルコースを経口投与しその消失を解析するOGTTアッセイを実施した。また、腹部脂肪蓄積をCTスキャンにより解析した。3週間の時点ですでに体重増加は $\beta$ -con食で有意に低下しており、OGTTアッセイでも開始30分以降、血中グルコース濃度は $\beta$ -con食マウスで有意に低値を示した。4週間の投与期間終了後、精巢上体脂肪重量、皮下脂肪重量はいずれも $\beta$ -con食マウスで半減していた。腹部脂肪率、脂肪重量も $\beta$ -con食マウスで50%以下に有意に減少していた。

### 高脂肪 $\beta$ -con食の短期投与の効果

[実験3] 上記と同様のエサを雄C57BL/6Nマウスに単回投与した。マウスは24時間絶食後、6時間それぞれのエサを摂取し、直ちに解剖した。肝臓、血液等を採取し、遺伝子発現、各種パラメーターについて測定した。肝臓サンプルを用い、DNAマイクロアレイ解析に供した。

肝臓において、摂食直後インスリンに応答してSREBP-1c mRNAが上昇するが、カゼイン食に比べ $\beta$ -con食では、その上昇は有意に低かった。大豆たん白質によるインスリン分泌応答の遅延が報告されており、その結果を良く反映する結果と理解できる。

DNAマイクロアレイの結果、 $\beta$ -con食摂取により遺伝子発現が著しく上昇した遺伝子としてFGF21が見いだされた。FGF21は絶食時にPPAR $\alpha$ の活性化に伴い肝臓において遺伝子発現が亢進し、摂食に伴い発現が減少する。実際、カゼイン食摂取により有意な減少が認められた。一方、 $\beta$ -con食摂取によりFGF21 mRNA発現は絶食時より増加し、カゼイン食とは全く逆の応

答が見いだされた。FGF21の下流に位置すると想定される遺伝子群にも発現変動が認められた。FGF21は肝臓、脂肪組織において代謝改善効果を発揮し、成長抑制効果を持つ事から<sup>4)</sup>、 $\beta$ -con食摂取による効果の一部はFGF21の作用による事が推察された (Fig. 3)。

[実験4] 上記単回投与により、薬理的効果とも言える応答が $\beta$ -con食摂取により認められた事より、 $\beta$ -conに混入した微量成分がその作用を発揮する事が想定される。そこで、イソフラボン等の微量成分をエタノール除去した $\beta$ -conを調製し、未処理 $\beta$ -conと機能の比較をした。

上記と同様のタイムスケジュールでマウスは24時間絶食後、6時間それぞれのエサを摂取し、直ちに解剖した。微量成分をエタノール除去した $\beta$ -conには配糖体当量41 mg/100gが含まれ、未処理サンプルの約90%が除去されていた。摂食6時間後の肝臓におけるFGF21 mRNAの上昇は、エタノール処理 $\beta$ -conでも未処理同様認められた。この結果は、 $\beta$ -conに含まれる微量成分の効果を完全に否定するものではないものの、 $\beta$ -conたん白質の持つ固有の機能としての可能性

を強く示唆している。

[実験5]  $\beta$ -conたん白質のアミノ酸組成に従い、アミノ酸混合食、カゼイン食、 $\beta$ -con食を用いて、上記と同様の単回投与実験を行った。

その結果、アミノ酸混合食には、 $\beta$ -con食に見られる効果を発揮する能力は無く、 $\beta$ -conたん白質のアミノ酸組成が重要な役割を演じていない事が示唆された。

#### PPAR $\alpha$ 欠損マウスを用いた解析

[実験6] FGF21はPPAR $\alpha$ による遺伝子発現制御を受ける事から、 $\beta$ -con食の効果がPPAR $\alpha$ を介したものであるかについて、PPAR $\alpha$ 欠損マウスでも検討を行った。

カゼイン食、 $\beta$ -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。肝臓におけるFGF21遺伝子発現もPPAR $\alpha$ 欠損マウスでも野生型と同様の応答が認められた。以上の知見より、 $\beta$ -con食で引き起こされる応答現象にPPAR $\alpha$ が直接関与している可能性は低いものと推察された。

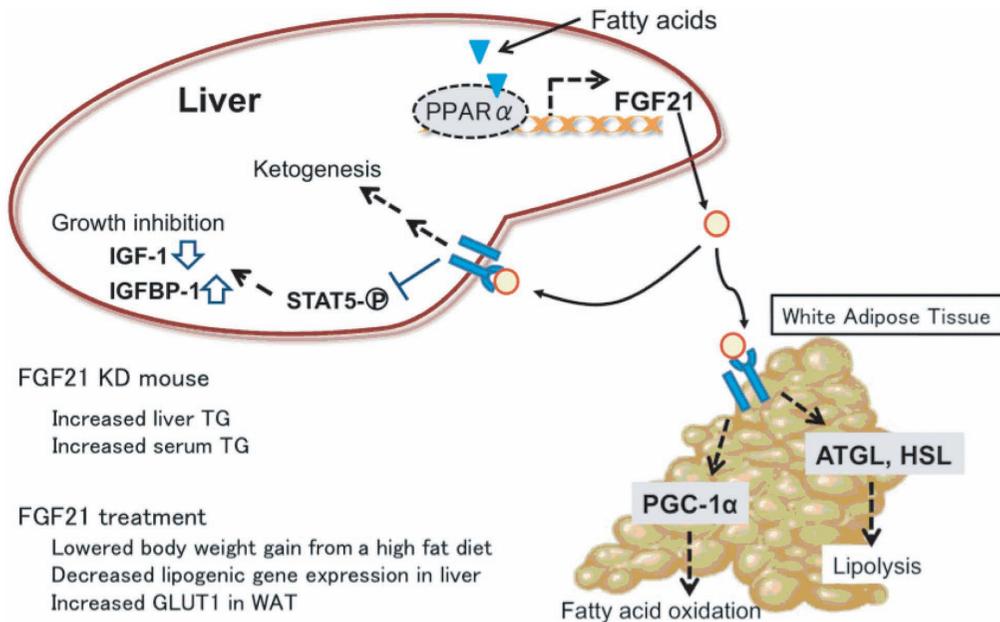


Fig. 3. Functions of FGF21 in the liver and white adipose tissue. FGF21 gene expression is stimulated by PPAR $\alpha$  in the liver. Secreted FGF21 is recognized by a specific receptor located in the liver and adipose tissues, thereafter exerting various functions there. Totally, FGF21 is thought to be a positive regulator for improving glucose, lipid, and energy metabolism. ATGL: Adipocyte triglyceride lipase, HSL: Hormone sensitive lipase, IGF: Insulin-like growth factor, STAT: Signal transduction and activator of transcription, GLUT1: Glucose transport type 1, PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha.

## 要 約

マウスにカゼインもしくは $\beta$ -コングリシニン含有高脂肪食を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。耐糖能の改善、腹部脂肪率の低下などの代謝改善効果が確認された。単回投与を行なった所、肝臓においてFGF21の顕著な上昇が認められた。FGF21はPPAR $\alpha$ の応答遺伝子である事から、PPAR $\alpha$ 欠損マウスに試験食を4週間投与し、解析を行った。 $\beta$ -コングリシニン食の効果の大半は欠損マウスでも認められ、FGF21の上昇も見られた。従って、 $\beta$ -コングリシニンの効果に対するPPAR $\alpha$ の寄与は小さいことが推察された。さらに、 $\beta$ -コングリシニンのアミノ酸組成に従って作ったアミノ酸混合食では、これらの効果は認められない事から、 $\beta$ -コングリシニンたん白質そのものに、FGF21発現上昇を介した代謝改善効果のある事が検証された。その作用機構について更なる解析を進行している。

## 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) Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S and Ezaki O (2011): Dietary  $\beta$ -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 protein. *J Nutr Biochem*, **23**, 123-132.
- 3) 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.
- 4) Inagaki T, Lin VY, Goetz R, Mohammadi M, Mangelsdorf DJ and Kliewer SA (2008): Inhibition of Growth Hormone Signaling by the Fasting-Induced Hormone FGF21. *Cell Metabolism*, **8**, 77-83.