

低マグネシウム食摂取条件下での大豆たん白質摂取が白色脂肪組織に 及ぼす影響のトランスクリプトーム解析

石島智子^{*1}・米光翔吾¹・中井雄治²・阿部啓子^{1,3}・岡田晋治¹

¹東京大学大学院農学生命科学研究科

²弘前大学食料科学研究所

³神奈川科学技術アカデミー

Transcriptome Analysis of the Effect of Soy Protein Ingestion on White Adipose Tissue in Dietary Magnesium-deficient Rats

Tomoko ISHIJIMA^{*1}, Shogo YONEMITSU¹, Yuji NAKAI², Keiko ABE^{1,3} and Shinji OKADA¹

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

²Institute for Food Sciences, Hirosaki University, Aomori 038-0012

³Kanagawa Academy of Science and Technology, Kawasaki 210-0821

ABSTRACT

In rat white adipose tissue, the dietary protein sources, casein and soy protein isolate (SPI), differed from each other in terms of the effect of dietary Mg-deficiency. In detail, 4-week-old male Wistar rats were fed 2 formulas with different dietary Mg levels (0.05% or 0.02%) and 2 different protein sources (casein or SPI) for 4 weeks. As a result, epididymal white adipose tissue weights were no significantly differences among the 4 diet groups, but hierarchical clustering of DNA microarray data revealed that the effects of dietary SPI on gene expression profile alteration induced by Mg deficiency was smaller than that of casein. In dietary Mg deficiency, casein feeding significantly changed the expression of 288 genes, while SPI feeding changed that of 113 genes. Changes in expression of the genes related to energy utilization induced by Mg deficiency were similar in both protein sources, whereas thermogenesis related genes were different from each other. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 69-73, 2015.

Key words : soy protein isolate, Mg deficiency, energy metabolism, DNA microarray, white adipose tissue

^{*}〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

マグネシウム (Mg) は、生体内において多くの生理的・生化学的作用に関与しており、Mg不足状態では様々な代謝障害を引き起こす。平成25年国民健康・栄養調査報告によれば、平均Mg摂取量は推奨量を下回り、その原因に野菜類や藻類といったMgを多く含む食品の摂取不足が挙げられる。現代の食生活において、これらの食品を日常的に充分摂取することは難しい。そこで我々は、食餌構成によりMg不足によって引き起こされる症状を緩和できないかと考えた。我々は、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という知見から、食餌性Mgとたん白質代謝との関係について明らかにした¹⁾。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いくつか報告^{2,3)} がされているが、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。そこで我々は必須アミノ酸をバランスよく含む良質なたん白質である分離大豆たん白質 (Soy Protein Isolate, SPI) を用い、血糖値⁴⁾ やコレステロール⁵⁾ の低下作用といったそ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を期待し、カゼインとの比較により血液分析および肝臓のトランスクリプトーム解析を行った⁶⁾。その結果、両たん白質給源においてMg欠乏の程度は同程度であったが、血清中遊離脂肪酸濃度がMg

欠乏食投与時においてのみカゼイン食に比べSPI食で有意に低下。また脂質生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、カゼインとSPIでMg欠乏食投与による影響が異なるなど、主に脂質代謝を中心にMg欠乏食投与による影響がたん白質給源によって異なることを明らかにした。そこで本研究では、脂質代謝と関係の深い白色脂肪組織において、SPI摂取によるMg欠乏の影響の変化について遺伝子発現の変化から網羅的に解析を行った。

方 法

飼料はAIN-93G飼料組成⁷⁾ を基に作製した (Table 1)。たん白質給源にはカゼイン (コントロール) とSPI (フジプロ、不二製油 (株)) を用い、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調製した。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 (各n=6)、たん白質給源と飼料中Mg濃度の視点から、CC、Mg欠乏カゼイン食 (MDC)、正常SPI食 (CS)、Mg欠乏SPI

Table 1. Composition of the experimental diets

	CC	MDC	CS	MDS
Mg Level	Control	Mg-deficiency	Control soy	Mg-deficiency
Protein Source	Casein		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.

食（MDS）をそれぞれに4週間自由摂食させた。飼育終了後、麻酔下で開腹し、精巣周囲白色脂肪組織の摘出を行った。なお、本研究で用いた動物は前報⁶⁾と同じである。

DNAマイクロアレイ解析は、肝臓での解析を行った前報⁶⁾と同様に血清中Mg濃度が平均に近い各群4匹のラットの精巣周囲白色脂肪組織で行った。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℃、16時間GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix) にハイブリダイズさせ、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。

結果と考察

4群間において精巣周囲白色脂肪組織重量に有意な差はみられなかった（データ省略）。

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CS群とMDS群とがほぼ同一のクラスターを形成し、次に近いのがCC群、最も離れたのがMDC群となった（Fig. 1）。このことから精巣周囲白色脂肪組織の遺伝子発現プロファイルにおけるMg欠乏食投与の影響は、たん白質給源にカゼインを用いるよりも、SPIを用いた時に弱く、健常状態として用いられる（コントロールである）CC摂取時に近い状態であることが示唆された。また精巣周囲白色脂肪組織の遺伝子発

現プロファイルは、たん白質給源の影響が食餌中Mg濃度の影響よりも大きいことを示した前報⁶⁾の肝臓の遺伝子発現プロファイルと異なった。

カゼインとSPIでMg欠乏食投与による遺伝子発現パターンが異なることから、各たん白質給源におけるMg欠乏食投与による影響を捉えるため、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288遺伝子（発現上昇 169, 発現低下 119）、SPIでは113遺伝子（発現上昇 64, 発現低下 49）が抽出された。これら抽出された遺伝子についてGene Ontologyを基に機能分類したところ、栄養素代謝、刺激応答、炎症・免疫などに関する遺伝子が含まれていた（Table 2）。これらの

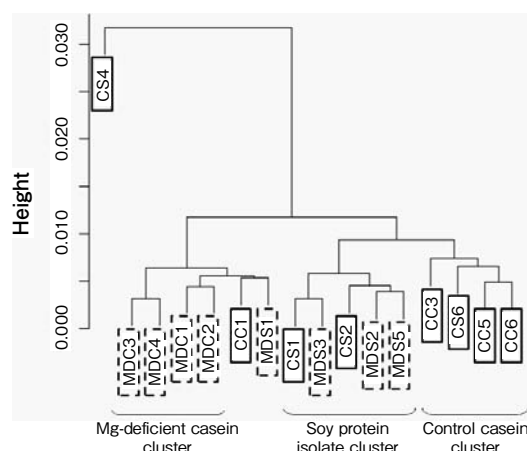


Fig. 1. Hierarchical clustering dendrograms from qFARMS DNA microarray data. CC, control casein diet; MDC, Mg-deficient casein diet; CS, control soy protein isolate diet; MDS, Mg-deficient soy protein isolate diet. Control diet, Mg-deficient diet.

Table 2. Functional classification in significantly changed genes by Mg-deficient diet

Proetien Source	Casein ¹	Soy protein isolate ²
Function		
Nutrition metabolism	22	4
Response to stimulus	32	17
Cell cycle	6	1
Immune response/Inflammatory response	17	5
Signal transduction	16	2
Organogenesis/Organ development	25	9
Regulation of gene expression	12	7
Transport	6	0

¹ 288 genes changed by Mg-deficient casein diet (between CC and MDC).

² 113 genes changed by Mg-deficient soy protein diet (between CS and MDS).

中からエネルギー代謝に関連する遺伝子の発現変動についてみたところ、SPIとカゼインとで共通してエネルギー源の取り込みに関する遺伝子は発現低下、遊離脂肪酸の放出に関わる遺伝子は発現上昇していた。このことからたん白質給源に関係なくMg欠乏食投与によりエネルギー源の取り込みは抑制され、遊離脂肪酸の血中への放出は促進されることが示唆された。本研究の精巣周囲白色脂肪組織において示唆されたこの代謝変動は、前報⁶⁾のMg欠乏食投与による血清中総ケトン体濃度の上昇が示唆する脂質のエネルギー源としての利用の亢進と一致した。

一方、ミトコンドリアの熱産生に関係する遺伝子の

発現変動は、SPIとカゼインとで異なっており、Mg欠乏食投与時の熱産生がたん白質給源により異なる可能性が示唆された。SPIは脂肪組織における熱産生遺伝子の発現を上昇させることが報告⁸⁾されており、このことがMg欠乏食投与の影響を変化させたとも推察される。

今後は、たん白質給源によって引き起こされる代謝変動を踏まえた上で、Mg欠乏食投与の影響に差異が生じる原因について検討し、Mg不足状態における代謝機構についてさらに解析を進め、SPI摂取のメリットを明確にしたいと考えている。

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、白色脂肪組織におけるMg欠乏食投与による代謝への影響を変化させる。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。精巣周囲白色脂肪組織重量に差はみられなかったが、DNAマイクロアレイ解析の結果、遺伝子発現プロファイルにおいては、Mg欠乏食投与の影響はカゼイン摂取時よりもSPI摂取時に弱いことが示された。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288遺伝子、SPIでは113遺伝子が統計的に抽出された。これら遺伝子の発現変動から、たん白質給源に関係なくエネルギー源の取り込みは抑制され、遊離脂肪酸の血中への放出は促進されることが判明した。一方で、Mg欠乏食投与時の熱産生がたん白質給源により異なる可能性が示唆された。

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. *Magnes 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) 石島智子, 米光翔吾, 中村紀章, 中井雄治, 阿部啓子 (2012): 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. 大豆たん白質研究, **15**, 55-60.
- 7) 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.
- 8) Iritani N, Sugimoto T, Fukuda H, Tomoe K (2002): Changes in UCP family expressions in rat tissues due to diet and aging. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **48**, 410-416.