

# 腸内細菌叢の改善を目指した大豆たん白質摂取の時間栄養学的研究

佐々木 裕之\*

早稲田大学大学院先進理工学研究科  
薬理学研究

## The Timing Effects of Soy Protein Isolate Intake on Mice Gut Microbiota

Hiroyuki SASAKI\*

School of advanced science and engineering, Waseda University, Tokyo 162-8480

### ABSTRACT

Soy protein isolate intake is known to cause changes in gut microbiota. Although there are some reports about the effect of soy protein isolate intake on gut microbiota, the effective timing of intake has not been investigated. In this study, we examined the effect of soy protein isolate intake timing on gut microbiota. Mice were fed twice a day, in the morning and evening. The mice were divided into three groups: 1. Mice that were fed only casein protein; 2. Mice that were fed soy protein isolate in the morning; and 3. Mice that were fed soy protein isolate in the evening. Mice were housed under each experimental condition for two weeks, and then sacrificed at three points, i.e., before morning feeding, four hours after morning feeding, and four hours after evening feeding). We measured cecal pH, and collected cecal contents and feces. Short-chain fatty acids (SCFA) were measured by gas chromatography from cecal contents, and 16S rRNA was extracted from feces and for analyzing microbiota composition using a next-generation sequencer. Cecal pH was lower and SCFA was higher in the morning soy protein isolate intake group than that in the evening intake group. In addition, microbiota composition was significantly changed in the morning soy protein isolate intake group than in the evening intake group. Therefore, soy protein isolate intake in the morning may have relatively stronger effects on the microbiota than that in the evening. *Soy Protein Research, Japan* **23**, 192-198, 2020.

Key words : microbiota, chrono-nutrients, feeding timing, circadian

\*〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2

哺乳類の腸内には約40兆個の細菌が生息しており、この集団を腸内細菌叢と呼ぶ。腸内細菌叢は消化・吸収、代謝、免疫などの宿主の生理機能に影響を及ぼすことが報告されている<sup>1)</sup>。そして、腸内細菌叢の変化が代謝疾患や炎症性大腸炎疾患など種々の疾患を引き起こす要因となり得る。例えば、肥満患者の腸内細菌叢にはFirmicutesという細菌群が増加し、Bacteroidetesという細菌群が減少する。そしてこの腸内細菌叢を無菌マウスに移植すると、通常食を摂食しているにもかかわらず、脂肪量の増加が確認された。つまり、腸内細菌叢が原因となり肥満を誘発したことが明らかとなった<sup>2)</sup>。このように宿主の生理機能は腸内細菌叢の影響を強く受けている。

この腸内細菌叢と宿主の生理機能の関係性は、腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸 (SCFA) によって宿主の生理機能が調整されている<sup>3)</sup>。SCFAには酢酸・酪酸・プロピオン酸が含まれているが、腸内細菌叢が難消化性の食品成分を発酵・分解することでSCFAが産生される<sup>4)</sup>。さらにSCFAはそれ自身が弱酸性であるため、SCFAの増加は腸管のpHを低下させて、有害菌の増殖を抑える<sup>3)</sup>。

腸内細菌叢の構成は年齢、食事、運動など様々な要因によって変化するが、食事が腸内細菌叢に及ぼす影響については数多く報告されている。多くのたん白質は分解後に小腸で吸収されるが、一部のたん白質は小腸で分解されず、大腸にまで届き、腸内細菌叢の構成に影響する<sup>5)</sup>。大豆たん白質にはこのような性質を持つたん白質を多く含み、大豆たん白質の摂取が腸内細菌叢の多様性を高め、SCFAの産生を促すことが知られている<sup>6)</sup>。

多くの生物は体内時計を有しており、睡眠・覚醒、摂食行動、代謝機能などの生理機能は日内変動を示すことが知られている<sup>7)</sup>。この体内時計は脂質代謝や糖代謝に関わる酵素の発現も制御している<sup>7)</sup>。そのため、食事の時刻や摂食タイミングによって、その食品成分の影響が変化する可能性が考えられる。また、日内変動は腸内細菌叢の構成や機能にも存在していることが知られている<sup>8)</sup>。以上を踏まえると同じ食品成分でも、朝食摂取と夕食摂取では腸内細菌叢に与える影響が異なる可能性が考えられる。そこで、本研究では、大豆たん白質をいつ摂取することで腸内細菌叢をより改善させることができるのかを検証した。

## 方 法

### 使用動物

動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の許可を得た上で行った (許可番号2018 - A030)。本研究では、東京実験動物株式会社より購入した9週齢のICR雄マウスを使用した。マウスは22±2℃、湿度60±5%、明暗12時間ごとの環境で個別に飼育した。明期開始時刻をZeitgeber time 0 (ZT0)、暗期開始時刻をZT12と定義した。

本研究では、高脂肪食中のたん白質がカゼインたん白質である餌 (カゼイン餌) と大豆たん白質である餌 (大豆餌) を用意した。各餌の組成をTable 1に示す。なお、たん白質量は粗たん白質量が等しくなるように調整した。また、食物繊維はセルロースのみで、水溶性食物繊維を含んでいないため、腸内細菌叢が悪化する。

Table 1. Nutrition components (g) in each diet (100 g)

	Casein diet	Soy diet
Casein protein	22.86	—
Soy protein isolate	—	23.78
L-cysteine	0.18	0.18
β-corn starch	13.71	12.79
α-corn starch	15.5	15.5
Sucrose	10.0	10.0
Soybean oil	4.0	4.0
Lard	24.0	24.0
Cellulose	5.0	5.0
Mineral mixture	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.25	0.25
Total	100.0	100.0

Tamura K & Sasaki H *et al.* Nutrients (2019) より一部改変

### 実験スケジュール

本研究では腸内細菌叢の改善効果を検証するため、実験開始前に1週間カゼイン餌を自由摂食させ腸内細菌叢を悪化させた。マウスに1日2回、ZT12とZT20に1.8 gの餌を与えた。なお、活動期である暗期のうち、前半のZT12の餌を朝食、後半のZT20の餌を夕食と定義し、摂食可能時間を4時間と設定した。実験群は、朝食と夕食ともにカゼイン餌を摂取するカゼイン群、朝食に大豆餌・夕食にカゼイン餌を摂取する朝大豆群、朝食にカゼイン餌・夕食に大豆餌を摂取する夕大豆群を用意した。各条件下で2週間飼育した。その後、

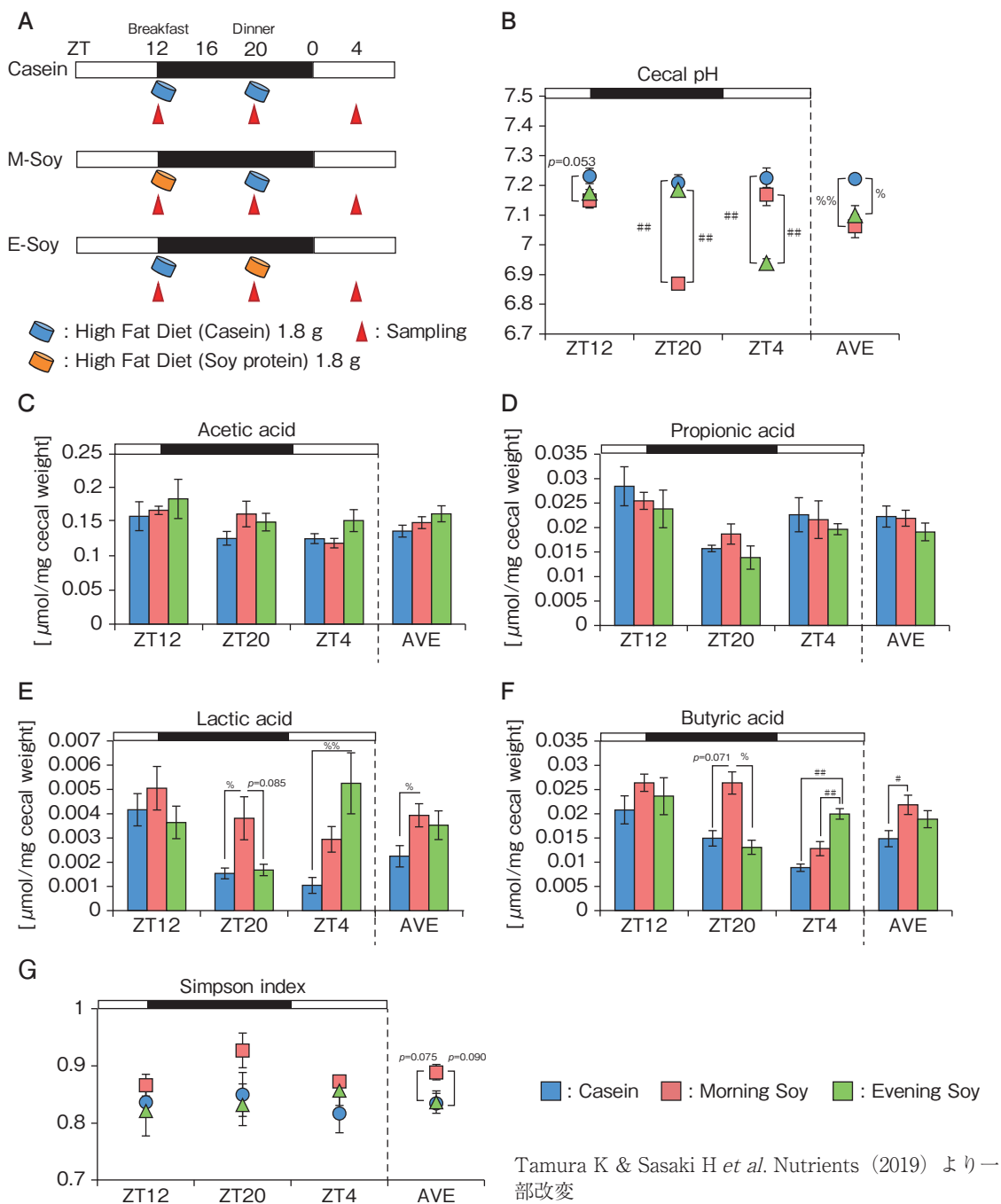


Fig. 1. The effect of soy protein isolate intake timing on cecal pH, SCFA levels and microbiota diversity. (A) Experimental schedule. The white and black bars indicate environmental 12 h light and dark conditions. The blue cylinder indicates the feeding timing of 1.8 g of High Fat Diet with casein. The orange cylinder indicates the feeding timing of 1.8 g of High Fat Diet with soy protein isolate. The red triangles indicate the sampling time. (B-F) Cecal pH and Short-chain fatty acid levels (ZT12, ZT20, ZT4 and an average of three points) of mice that were kept in each feeding condition for two weeks. (B: cecal pH, C: acetic acid, D: propionic acid, E: lactic acid, F: butyric acid). (G) Alpha-diversity about Simpson index. All data represented as mean  $\pm$  SEM (n=5). ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ , evaluated using one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. %%  $p < 0.01$ , %  $p < 0.05$ , evaluated using Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc test.

ZT12(食事前), ZT20(朝食摂食開始8時間後), ZT4(夕食摂食開始8時間後)の3ポイントでサンプリングを行い, 盲腸内pHの測定, 盲腸内容物, 糞便の採取を行った (Fig. 1A).

### SCFA測定

SCFA測定はガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出器 (FID) (GC2020; 島津製作所) を用いた. 0.05 gの盲腸内容物を0.4 mLのジエチルエーテルと0.2 mLのエタノールを加えSCFAを抽出し, 0.05 mLの硫酸で酸性化した. その後, 室温で30秒間12,000 rpmで遠心分離し, 1  $\mu$ Lの有機層をガスクロマトグラフィーに注入した. キャリアガスはヘリウムガスを使用し, 初期温度を80 $^{\circ}$ C, 最終温度を200 $^{\circ}$ Cとした.

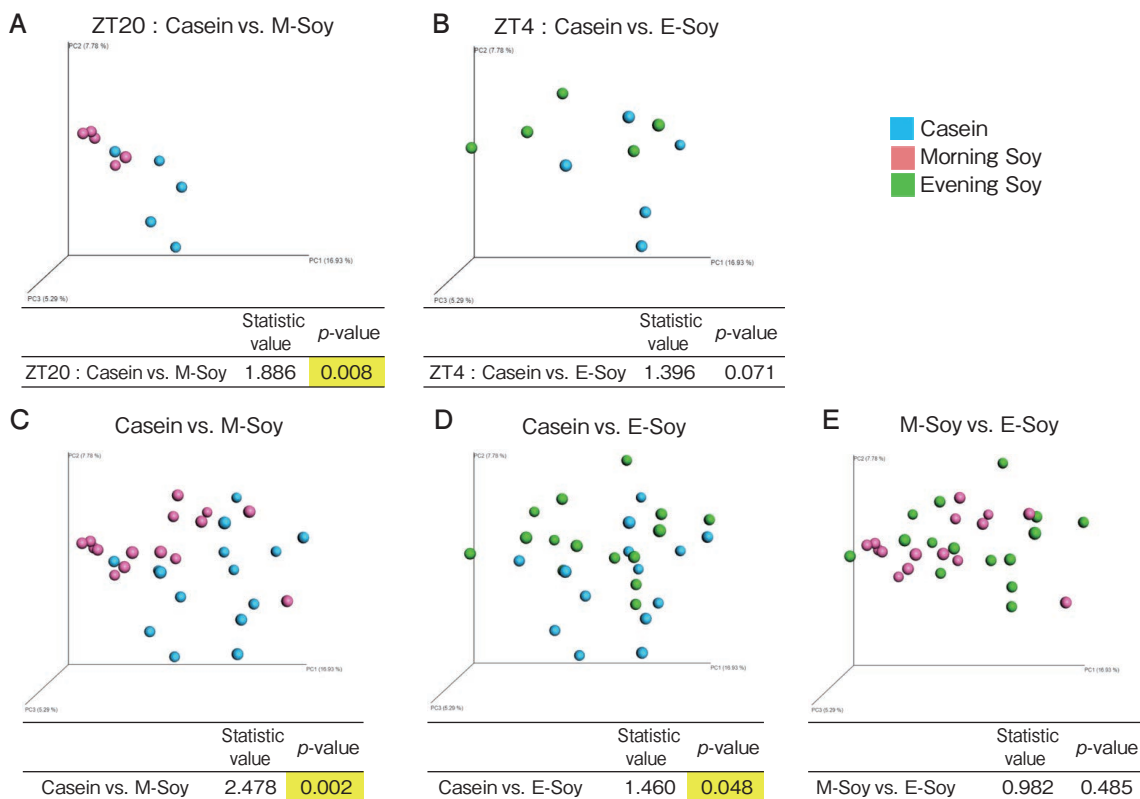
### 腸内細菌叢解析

約0.2 gの糞便サンプルを懸濁し, PCI (Invitrogen) 980  $\mu$ L, 3 mol/L酢酸ナトリウム溶液100  $\mu$ L, イソプロパノール900  $\mu$ Lを用いてDNA抽出を行った. その後, 16S rRNA遺伝子の可変領域の内, V3-V4領域をターゲットとしたプライマーを使用し, アンプリコンPCRを行った. なおプライマー配列はIlluminaが提供するプロトコルに基づいた. その後, Nextera XT Index Kit v2 (Illumina) を用いて, デュアルインデックスとイルミナシーケンスアダプターの2種類のタグを付加した. そして, Miseq reagent kit v3 (Illumina) を用いてシーケンスを行った. 得られたシーケンスデータはQIIME (ver. 1.9.1) というソフトウェアを用いて解析した.

## 結 果

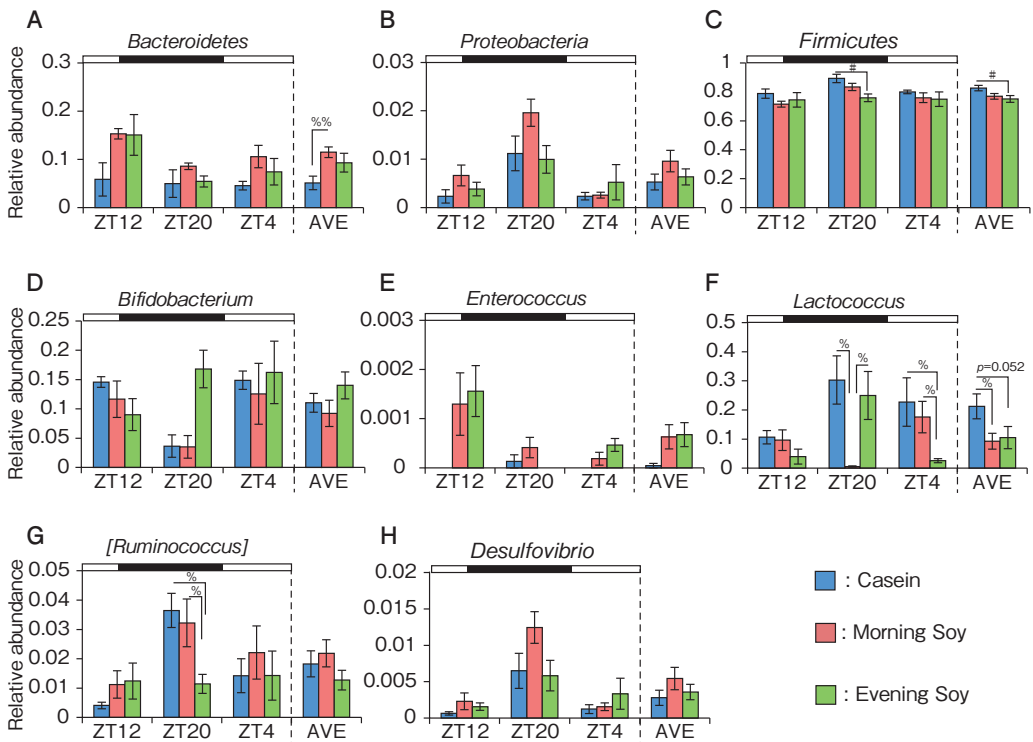
盲腸内pHは大豆たん白質を朝食に摂取しても, 夕食に摂取しても, 摂取4時間後の時刻において低下した. また, 1日を通しての影響を検証するために, 3ポイントの平均値 (AVE) を算出したところ, 朝食摂取も夕食摂取も盲腸内pHは低下した (Fig. 1B). SCFAは, 特に乳酸と酪酸において, 大豆たん白質を朝食に摂取しても, 夕食に摂取しても, 摂取4時間後の時刻において有意に増加した. しかし, AVEを見ると, 朝食摂取においてのみ有意な増加が確認された (Figs. 1E, F). 以上より, 大豆たん白質の摂取は朝食でも夕食でも, 摂取4時間後にSCFAが増加し, 盲腸内pHを低下させるが, 朝食に摂取すると, その効果が長く続くことが確認された.

次に腸内細菌叢の解析を行った. 腸内細菌叢の多様性を示す $\alpha$ 多様性 (Simpson index) はAVEにおいて, 朝食の大豆たん白質摂取によって増加する傾向が見られた (Fig. 1G). 次に, 大豆たん白質摂取から8時間後における腸内細菌叢の構成を解析した. 各個体の腸内細菌叢の構成をプロットで示し, プロット間距離が離れば, その個体間の腸内細菌叢の構成は異なっていることを示す. プロット間距離を算出したものを統計量として示し, 腸内細菌叢の構成に有意な差があるかどうかをPERMANOVAで検定を行った. ZT20において, カゼイン群と朝大豆群の腸内細菌叢の構成は有意に異なっていた (Fig. 2A). その一方で, ZT4において, カゼイン群と夕大豆群の腸内細菌叢の構成に有意な差は見られなかった (Fig. 2B). また全ポイントの腸内細菌叢の構成を比較すると, カゼイン群と朝大豆群のプロット間距離の方が夕大豆群よりも大きく離れており, 朝食の大豆たん白質摂取の方が腸内細菌叢の構成を大きく変えることがわかった (Figs. 2C-E). また, 具体的に*Bacteroidetes*, *Lactococcus*の腸内細菌が変化していることもわかった (Figs. 3A, F).



Tamura K & Sasaki H *et al.* Nutrients (2019) より一部改変

Fig. 2. The effect of soy protein isolate intake timing on microbiota composition. (A-E) Microbiota composition. (A: comparison of Casein and Morning Soy at ZT20, B: comparison of Casein and Evening Soy at ZT4, C: comparison of Casein and Morning Soy at all points, D: comparison of Casein and Evening Soy at all points, E: comparison of Morning Soy and Evening Soy at all points). The principal coordinate analysis plots of unweighted UniFrac distance metrics obtained from sequencing the 16S rRNA gene in feces (n=15). The tables in figure indicate the result using PERMANOVA.



Tamura K & Sasaki H *et al.* Nutrients (2019) より一部改変

Fig. 3. The effect of soy protein isolate intake timing on microbes. (A-C) The relative abundance of microbes at the Phylum level. (A: *Bacteroidetes*, B: *Proteobacteria*, C: *Firmicutes*). (D-H) The relative abundance of microbes at the Genus level. (D: *Bifidobacterium*, E: *Enterococcus*, F: *Lactococcus*, G: *[Ruminococcus]*, H: *Desulfovibrio*). All data represented as mean  $\pm$  SEM (n=5). #  $p < 0.05$ , evaluated using one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. %  $p < 0.01$ , %  $p < 0.05$ , evaluated using Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc test.

## 考 察

本研究の結果をまとめると、大豆たん白質を朝食または夕食に2週間摂取すると、大豆たん白質摂取8時間後の時刻で盲腸内pHが低下し、SCFA産生、腸内細菌叢の多様性が増加した。さらに、大豆たん白質を夕食よりも朝食に摂取すると、大きく腸内細菌叢の構成を変え、SCFA産生を促した。つまり、大豆たん白質は夕食ではなく朝食に摂取することで、より効果的に腸内細菌叢を改善する可能性が示唆された。

本研究では、朝食摂取と夕食摂取では、朝食摂取の方が腸内細菌叢の構成を大きく変え、腸内細菌叢を改善した。これは、摂取までの絶食時間の長さが関係していると考えられる。今回の実験条件では、朝食摂取するまでの絶食時間は16時間絶食で、夕食摂取するま

での絶食時間は8時間絶食である。ここで絶食時間の長さや腸内細菌叢の関係性について考察する。先行研究より、食物が胃に入り、胃壁が刺激されると中枢を介して蠕動運動が発生する<sup>9)</sup>。この時、絶食時間が長いほどこの反応は大きくなり、蠕動運動が促進される<sup>9)</sup>。さらに、長い絶食(36時間)後の再給餌により乳酸産生菌が増加する<sup>10)</sup>。一方で、モルヒネ投与による蠕動運動抑制で腸内細菌叢の種の豊富さが低下し、悪玉菌が増加する<sup>11)</sup>。以上の報告から、長い絶食時間後の朝食摂取により、蠕動運動が促進されたことが腸内細菌叢に良い影響を与え、その時に大豆たん白質を摂取したことで、大豆たん白質が有効に腸内細菌叢に影響し、腸内細菌叢が改善したと考えられる。本研究では検証していないが、我々の以前の報告で、水溶性食物繊維を絶食時間が等しい条件で朝食と夕食に摂取させると、朝食摂取と夕食摂取による腸内細菌叢への



影響に差がなくなることを示している<sup>12)</sup>。

実際のヒトの生活を考えると、一般的に3回の食事のうち夕食から朝食までの絶食時間が最も長い。した

がって、本実験の結果はヒトでは朝食の大豆たん白質摂取が腸内細菌叢の改善に効果的であると期待できる。

## 要 約

本研究ではマウスを用いて、朝食と夕食の1日2食の摂取条件下で、いつ大豆たん白質を摂取することで腸内細菌叢を効果的に改善するかを検討した。その結果、朝食に大豆たん白質を摂取したマウスの方が、夕食に摂取したマウスよりも、腸内細菌叢の構成を大きく変え、短鎖脂肪酸の産生量が増加した。つまり、大豆たん白質は朝食に摂取したほうが腸内細菌叢の改善に効果的である可能性が示唆された。この朝食摂取と夕食摂取の影響差は摂取までの絶食時間の長さが関係していると考えられ、今後は絶食時間の長さと腸内細菌叢の関係性を明確にする必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG and Hart A (2016): The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*, **65**, 330-339.
- 2) Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD and Gordon JI (2005): Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 11070-11075.
- 3) den Benston G, van Euen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J and Bakker BM (2013): The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lip Res*, **54**, 2325-2340.
- 4) Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P and Backhed F (2016): From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, **165**, 1332-1345.
- 5) Davila AM, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti PH, Sanz Y and Tomé D (2013): Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res*, **68**, 95-107.
- 6) An C, Kuda T, Yazaki T, Takahashi H and Kimura B (2014): Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**, 2779-2787.
- 7) Bass J and Takahashi JS (2010): Circadian integration of metabolism and energetics. *Science (N.Y.)*, **330**, 1349-1354.
- 8) Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Ziberman-Scapira G, Suez J, Tengeler AC, Abramson L, Katz MN, Korem T, Zmora N, Kuperman Y, Biton I, Gilad S, Harmelin A, Shapiro H, Halpern Z, Segal E and Elinav E (2014): Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, **159**, 514-529.
- 9) Hosoda S (2004): Life style and discomfort on defecation. *Juntendo Medical Journal*, **50**, 330-337.
- 10) Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H and Dohi T (2013): Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun*, **4**, 1654.
- 11) Nieuwenhuijs VB, van Duijvenbode-Beumer H, Verheem A, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG and Akkermans LM (1999): The effects of ABT-229 and octreotide on interdigestive small bowel motility, bacterial overgrowth and bacterial translocation in rats. *Eur J Clin Invest*, **29**, 33-40.
- 12) Sasaki H, Miyakawa H, Watanabe A, Nakayama Y, Lyu Y, Hama K and Shibata S (2019): Mice microbiota composition changes by inulin feeding with a long fasting period under a two-meals-per-day schedule. *Nutrients*, **11**, 2802.