

論文の内容の要旨

論文題目 分離大豆タンパク質を摂取したラットの
肝臓での網羅的遺伝子発現解析

氏名 橋 伸彦

分離大豆タンパク質 (soy protein isolate, SPI) をはじめとする植物性タンパク質は、動物性タンパク質に比べて血中コレステロール低下能に優れること、とりわけ SPI には動脈硬化予防効果のあることなどが報告されて以降、数多くの研究が報告されている。我々は、SPI 中に微量成分として存在するイソフラボンやサポニンなどは単独での摂食試験では降コレステロール作用が見られるものの SPI 共存等ではその作用は弱く、SPI のタンパク質そのものが血中コレステロール低下の主要因であることなどを明らかにしてきた。しかしながら、食事タンパク質源としての SPI の摂取が生体内での様々な代謝に与える変動を全て捉えることは従来、非常に困難であった。

1990 年代初頭に、遺伝子発現を一度に網羅的に解析する DNA microarray の手法が開発され、生体内での代謝変動の全体像を捕らえることが可能となった。そこで我々は、SPI 摂取が生体に及ぼす影響について①その長期摂取がどのような効果をもたらすのか、②摂取開始時期の違いが代謝機能発現に差をもたらすのかの 2 点について DNA microarray を用いて検討することにした。タンパク質摂取による生体内変化を捉えるために、栄養素な

どの主要な代謝器官である肝臓を DNA microarray のターゲットとした。さらに、SPI 摂取によって報告されている血中中性脂肪低下効果が SPI の主要構成成分であるβ-コングリシニン (β-CG) が担っていることが解明されていることから、その中性脂肪低下効果の作用機序についても同様に検証した。

はじめに、我々は乳カゼインを対照として、SPI を比較的長期間 (8 週間) 摂取させることにした。Affymetrix 社の DNA chip を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、搭載されている 8740 遺伝子中 120 遺伝子で対照群と有意な差を得た。それらは、アミノ酸代謝・エネルギー代謝に加え、抗酸化作用・脂肪酸代謝・ステロイド代謝・シグナル伝達など約 10 カテゴリーにわたり変化を示した。特にコレステロール/ステロイド代謝では、SPI 摂取により非律速系の酵素遺伝子群が有意に発現増加した。これらの結果から、SPI 摂取によって各代謝の恒常性がシフトし、律速的制御を要しない状態へ変化していることを推定させた。

次に、食餌タンパク質に対して順応したと思われる 2 週間で、かつ摂取開始週齢を飼料効率の大きく異なる成長期あるいは成熟期のラットを用いて実験を行った。血中コレステロールなどの血清脂質は、成長度の違いによる摂食量の多少に依存せず、摂取たん白質の違いに対してより強い影響を受けていた。肝臓における遺伝子発現クラスターは、ラットの成熟度に関わらず摂取タンパク質の違いによってカゼイン食群と SPI 食群の 2 系統に大別された。得られた遺伝子発現結果をタンパク質の違いによる因子間 Rank Product 検定によって、約 350 遺伝子で有意な差を検出した。得られた遺伝子群について KEGG による代謝分類を行ったところ、xenobiotics やリノール酸代謝、アラキドン酸代謝および PPAR signaling pathway など、多岐に及んでいた。脂質代謝関連では長期摂取でみられた遺伝子とは異なり、各代謝の律速制御を行う遺伝子での有意な発現変動を認めた (図 1)。SPI 摂取のコレステロール調節では、コレステロールの生合成抑制が血中コレステロール低下をもたらしているのではなく、コレステロールの生合成は維持されつつも、積極的に血中か

らのコレステロール取り込みを行う状態であることを意味する。これは、SPI 摂取によって腸肝循環が抑制されることにより肝臓でのコレステロールプールが低下し、それを補完するシステムとして律速的代謝制御が起動している可能性が示唆された。以上のことから、SPI 摂取による代謝調節は、短期的には律速的な制御での調節で、長期になるにしたがって非律速的な段階での調節によって生体での恒常性をシフトさせることが示された。

SPI 短期摂食試験で得られた発現結果の中には、脂肪酸合成抑制の制御因子であるステロール制御領域結合タンパク質 1 (sterol regulatory element binding protein 1、SREBP1) の発現低下など、血中中性脂肪低下に関わる遺伝子のダウンレギュレーションが認められた。SPI を構成するタンパク質にはグリシニンと β -CG のいわゆる種子貯蔵タンパク質と、他にリン脂質会合性タンパク質 (LP) が報告されている。このうち β -CG には血中中性脂肪を低下する作用が知られており、肝臓中の脂肪酸合成酵素活性が低下することが見出されていたが、その詳細な作用メカニズムは明らかにされていない。我々は短期摂食試験結果によって得られた SREBP1 が関与すると考え、またその制御因子の一つであるインスリンの及ぼす影響も含めて検討を行った。 β -CG 摂取期間中に行った oral glucose tolerance test (OGTT) と insulin tolerance test (ITT) の結果から、 β -CG 摂取ではインスリン応答性が高く、かつ低インスリン量で血糖値を低下させていた。肝臓における SREBP1・脂肪酸合成酵素の発現は対照群に比べて低く、脂肪酸合成抑制や糖代謝改善作用を有するアディポネクチンは β -CG 群で有意に高い値を示した。また血中脂質分画解析より肝臓から分泌される超低密度リポタンパク質画分に含まれる中性脂肪が β -CG 群で有意に減少していた。すなわち、インスリン感受性が改善されることで過度なインスリンの分泌が抑制され、SREBP1 を介した脂肪酸合成抑制機構が作動する可能性を強く支持した。

以上のことから、SPI 摂取の肝臓に与える影響を DNA microarray を用いて網羅的に解析することで、肝臓の有する一部の代謝機能だけではなく全体にわたり影響を及ぼしていること、そして新たに SPI、とくに β -CG が中性脂肪低下メカニズムを有することが判明した。

今後、他組織での網羅的解析や他条件における検討を加えていくことで、SPI の更なる新機能発掘が可能になると期待される。

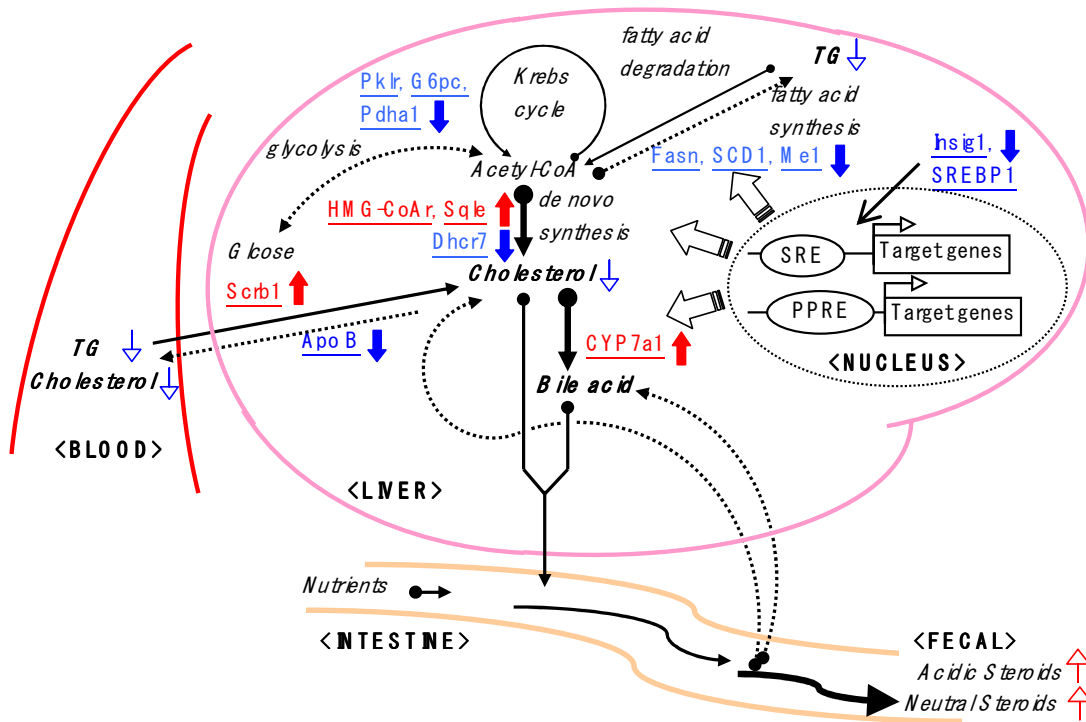


図 1. 短期 SPI 摂取試験における肝臓での代謝の概略

矢印（ボールド）で、赤は対照群に比べて SPI 摂取で有意に発現が増加した遺伝子を、青は有意に減少した遺伝子を示す。矢印（中抜き）で、赤は SPI 摂取で量が有意に増加した物質を、青は有意に減少した物質を示す。<NUCLEUS>からの黒中抜き矢印は、SPI 摂取が発現調節を介して影響する状態を表現した。物質の移動・合成・異化の流れを示す線表示で、点線は SPI 摂取によって減少される箇所を、太線は増加する箇所を示した。

CYP7a1; cholesterol 7 α -hydroxylase, Dhcr7; 7-dehydrocholesterol reductase, Fasn; fatty acid synthase, G6pc; glucose-6-phosphatase, HMG-CoAr; HMG-CoA reductase, Me1; malic enzyme 1, Pdha1; pyruvate dehydrogenase, Pklr; pyruvate kinase, Scrb1; scavenger receptor class B, SCD1; stearoyl-CoA desaturase 1, Sqle; squalene epoxidase, SREBP1; sterol regulatory element binding protein 1, TG; triglyceride.