

研究ノート

凍り豆腐がラット肝臓でのコレステロール代謝に及ぼす影響

高橋 陽子[§]

Freeze-dried tofu modulates the expression of cholesterol metabolism-related genes in liver of rats

Yoko TAKAHASHI[§]

*National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

Abstract

The effect of freeze-dried tofu on cholesterol metabolism was compared with soy protein and isoflavone in rats . Serum cholesterol levels were significantly lowered by tofu and soy protein compared with casein . The expression of some hepatic genes involved in cholesterol metabolism was altered by soy protein and tofu; cholesterol synthesis-related enzymes were decreased , and the rate-limiting enzyme of bile acid synthesis and the transporters of cholesterol excretion were increased . In contrast , isoflavone supplementation did not have significant effect on serum cholesterol levels and these gene expressions , and exerted little synergistic effects with protein sources . Therefore , the reduction in serum cholesterol levels may be triggered by a protein fraction of tofu , and derived from reduced cholesterol synthesis and induced bile acid excretion in liver .

Keywords: soy foods (大豆食品) , soy protein (大豆タンパク質) , isoflavone (イソフラボン) , cholesterol metabolism (コレステロール代謝)

緒言

疫学調査の結果、大豆食品を多く摂取する集団では、心臓病の危険因子である肥満度指数、血圧、血清総コレステロール (Total-C) 濃度が非摂取群よりも低いことが報告されている¹⁾。大豆食品には健康維持に寄与する成分が複数存在し、そのうち血清コレステロールの低下機構については、大豆タンパク質とイソフラボ

ンの作用が多く研究されている。実験動物を用いた実験結果から、大豆タンパク質の摂取の代表的な作用として、胆汁酸の排出促進、肝臓におけるコレステロール合成の増加と胆汁酸合成への代謝シフト、low density lipoprotein (LDL) 受容体の活性化が起こることが知られており、これらの変化が血清コレステロール濃度を低下させると推察されている²⁾。一方イソフラボンは、肝細胞を用いた実験でコレステロール合成と分泌を抑制したり、LDL 受容体の遺伝子発現と活性

[§]連絡先, youkot@affrc.go.jp

表 1 . 食餌組成

Ingredients (g/kg diet)	C	CI	S	SI	T10	T20
Casein (90.5% purity) ¹	225	225	0	0	113	0
Soy protein isolate (88.7% purity) ²	0	0	220	220	0	0
Freeze-dried tofu (50.3% protein) ³	0	0	0	0	199	398
Soybean oil	150	150	150	150	81.6	13.2
Corn starch	150	150	150	150	150	150
Cellulose	20	20	20	20	17.3	14.4
Vitamin mixture ⁴	10	10	10	10	10	10
Mineral mixture ⁵	35	35	35	35	35	35
L-Cystine	3	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Isoflavone mixture ⁶	0	0.12	0	0.10	0	0
Sucrose	404.5	404.4	409.5	409.4	388.6	373.9
Total energy (kJ/kg diet) ⁷	18,120	18,120	18,171	18,171	17,693	17,605

C, カゼイン食; CI, カゼイン+イソフラボン食; S, 大豆タンパク質食; SI, 大豆タンパク質+イソフラボン食;
T10, カゼイン+凍り豆腐食; T20, 凍り豆腐食.

¹ カゼイン, 乳由来 (和光純薬株)

² フジプロ (不二製油株)

³ トーフミール (株みすずコーポレーション)

⁴ AIN-93ビタミン混合 (オリエンタル酵母工業株)

⁵ AIN-93G ミネラル混合 (オリエンタル酵母工業株)

⁶ ゲニステイン:ダイゼイン=3:1 (wt:wt)

⁷ 五訂増補日本食品標準成分表を基に算出した値

を増加させたりすることが示され, 実験動物レベルでも LDL 受容体の活性化や血清コレステロール濃度の低下が認められた³⁾. このように大豆成分とコレステロール代謝の関係は解明されつつあるが, ヒト試験ではこれらの成分を摂取しても血清コレステロール濃度は有意に低下しなかったとの報告もある⁴⁾. その理由として, 大豆製品にはタンパク質やイソフラボン以外にも食物繊維や植物ステロール, 不飽和脂肪酸等の脂質代謝に影響する成分が含まれていることが挙げられる⁴⁾. さらに, 単一成分では見られない食品成分間の相互作用が脂質代謝に影響することも予想される. しかし食品そのものの機能性を調べた研究は少なく, 食品成分間の相互作用もほとんど解明されていないのが現状である. 本研究では, 大豆食品である凍り豆腐はラットの血清コレステロール濃度を低下させるのか, また, 肝臓でのコレステロール代謝にどのような影響を与えるのかを遺伝子発現レベルで解析した. 凍り豆腐は, その主要成分がタンパク質であり, イソフラボンも含んでいる. そのため, 大豆食品中の両成分による作用解明に適していると考え 本研究で取り上げた. さらに大豆タンパク質とイソフラボンの作用も解析し, これらの相互作用についても解析した.

実験材料及び方法

1. 飼料の材料

粉末凍り豆腐は(株みすずコーポレーション)より購入した. 100g 中にエネルギー2,193kJ, 水分7.4g, タンパク質50.3g, 脂質34.4g, 炭水化物1.9g, 食物繊維1.4g, 灰分4.6g (以上, 製造者による分析値), イソフラボンはアグリコン当量約30mg (著者による分析値) 含まれていた. 分離大豆タンパク質は不二製油(株)より恵与され, 80%メタノール水で洗浄・乾燥処理し, イソフラボン含量を低減させた(アグリコン当量9.12mg/100g).

2. 動物実験

4週齢の Sprague-Dawley 雄性ラット (Charles River 株) を明暗サイクル(点灯7:00, 消灯19:00), 室温(22 ± 1 °C), 湿度(55-65%) が一定の飼育室にて市販の標準飼料で5日間予備飼育した. その後, タンパク質源とイソフラボン含量の異なる食餌で14日間飼育した (n=7-8). 試験飼料はカゼイン食 (C), カゼイン+イソフラボン食 (CI), 大豆タンパク質食 (S), 大豆タンパク質+イソフラボン食 (SI), 飼料中タンパク質の構成割合が1:1であるカゼイン+凍り豆腐食 (T10) または凍り豆腐食 (T20) の6種類とした (表1). 食餌タンパク質量は各群20%に調製し, CI と SI

にはイソフラボンを T20に含まれる凍り豆腐由来の量 (0.12g/kg) と等しくなるように添加した。凍り豆腐は脂質や食物繊維も含むため、各食餌間で含有量が等しくなるよう大豆油、セルロースで調整した。試験期間中は自由に飲水・摂食させた。飼育終了後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、肝臓を採取した。本実験は食品総合研究所動物実験委員会の承認を得て、同所規定の動物実験ガイドラインに従い実施した。

3. 血清および肝臓コレステロール濃度の測定

血清 Total-C および high density lipoprotein コレステロール (HDL-C) 濃度はコレステロール E-テストワコーおよび HDL-コレステロール E-テストワコーにより測定した (和光純薬工業^株)。肝臓コレステロール濃度は Folch 法により総脂質を抽出し、cholesterol oxidase を用いて測定した⁶⁾。

4. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現量の測定

各個体の肝臓 RNA を Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法により抽出した後、血清脂質濃度を基準に各群 5 サンプルを選抜した。RNA は One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix^株) によりプローブ化され、Affymetrix Rat Genome230_2.0 アレイと反応させた。遺伝子発現強度は Affymetrix GeneChip Operating Software1.2 にて解析し、アレイ間、遺伝子間で標準化した後、発現シグナル強度が 50 以下の値を除いた。各群間で発現量が異なる遺伝子は GeneSpring7.3.1 ソフトウェア (Agilent Technology^株) にて解析した。測定方法および解析条件の詳細は文献⁵⁾ に準ずる。

5. リアルタイム PCR による遺伝子発現量の測定

肝臓 RNA から TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems^株) を用いて cDNA を得た。遺伝子発現量は ABI PRISM7000 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems^株) で測定した。発現量は 18S RNA の発現量を参照値とし、C 群での発現量を 1 としたときの相対量で表した。3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (Hmgcr) のプライマーおよびプローブの配列は 3'-CGTCTTCAGCACTGTCGTCATT-5', 3'-GAAAAAAGGGCAAAGCTTCATT-5', および 3'-TTCCTCGACAAAGAATTGACAGGCT-5' であった。

6. 統計処理

統計処理にはソフトウェア SPSS13.0J for Windows (日本 IBM^株) を用い、実験結果は平均値 ± 標準誤差 (SE) で表した。一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer の多重比較検定により危険率 5% 以下を有意

差ありと判定した ($p < 0.05$)。食餌タンパク質源とイソフラボン添加の相互作用は、C, CI, S, SI 群で二元配置分散分析により有意差を判定した。

実験結果および考察

実験期間中の摂食量に各群間での有意差はなく、エネルギー摂取量にも違いはなかった。血清 Total-C および HDL-C 濃度は、C および CI 群と比較して S, SI, T10, T20 群で有意に低く (図 1A), 凍り豆腐は大豆タンパク質と同様に血清コレステロール濃度の低下作用を持つことを示した。一方、C と CI, S と SI 群の間にはこれらの濃度に差がなかった。著者らのグループが過去に行った研究では、2.0g/kg ゲニステイン食はイソフラボンを含まない食餌と比べて血清脂質濃度を有意に低下させたが、1.0g/kg 食ではこの低下作用が小さくなったことを認めた⁵⁾。本研究では食餌イソフラボン濃度が 0.12g/kg 相当であり、凍り豆腐に含まれる程度の少量のイソフラボンは血清コレステロール濃度に影響しないことを示唆した。しかし、肝臓コレステロール濃度は血清とは逆の傾向を示した (図 1B)。また、これらの濃度への大豆タンパク質とイソフラボンの相互作用は有意でなく (血清 Total-C, $p = 0.197$; 血清 HDL-C, $p = 0.341$; 肝臓コレステロール, $p = 0.132$)、イソフラボンの血清脂質濃度調節作用は食餌タンパク質源の種類に依存しないことが示唆された。

次に、凍り豆腐食が血清コレステロール濃度の低下に寄与する機構を解明するため、肝臓で発現する遺伝子を DNA マイクロアレイで解析した。C 群と比べて他群で 1.5 倍以上発現量が変化した 688 遺伝子のうち、各遺伝子の生物学的機能を Rat Genome Database⁷⁾ で検索してコレステロール代謝に関連する遺伝子を抽出したところ、8 遺伝子が検出された (表 2)。そのうち 4 遺伝子 (Hmgcr, Lss, Tm7sf, Hsd17b7) がコレステロール合成系の酵素であった。コレステロール生合成経路の上流に存在する律速酵素 Hmgcr⁸⁾ とその下流に存在する Lss は C 群と比べて S, T20 群で低下あるいは低下傾向を示したことから、大豆タンパク質や凍り豆腐食は肝臓でのコレステロール合成を抑制し、その結果、肝臓から血清へのコレステロール分泌が減少したと考えられた。しかし、肝臓コレステロール濃度は大豆タンパク質と凍り豆腐群でカゼイン群よりも高かったため (図 1B)、フィードバック機構によりコレステロール合成が抑制された可能性もある。一方、

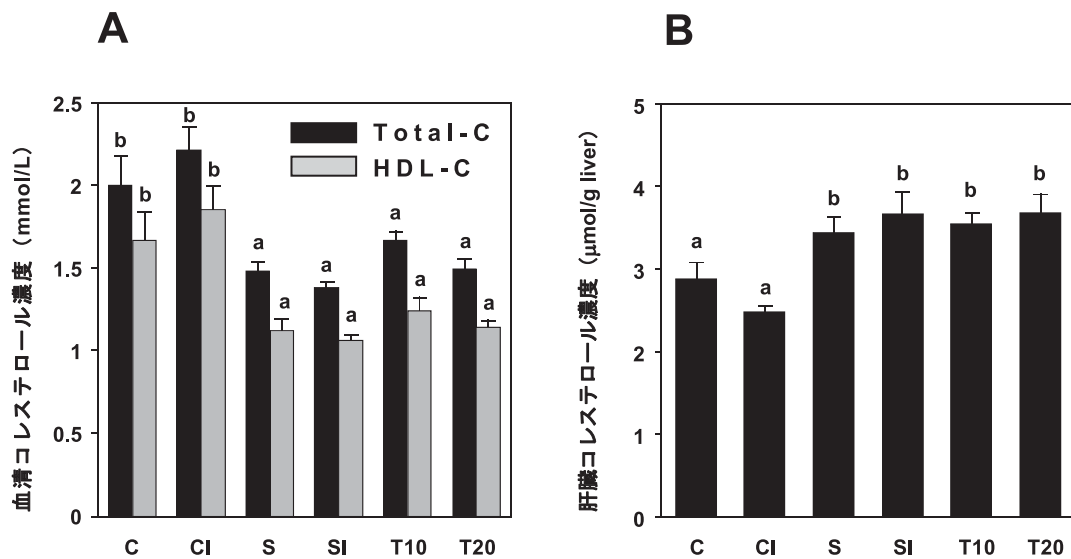


図1．タンパク質源とイソフラボン添加が血清コレステロール濃度（A）および肝臓コレステロール濃度（B）に及ぼす影響

C, カゼイン食; CI, カゼイン+イソフラボン食; S, 大豆タンパク質食; SI, 大豆タンパク質+イソフラボン食; T10, カゼイン+凍り豆腐食; T20, 凍り豆腐食. 値は平均値±SEで示す(各群7・8匹). 表中のa, bの表示は異なる文字を付した群間で有意差があることを示す($p < 0.05$).

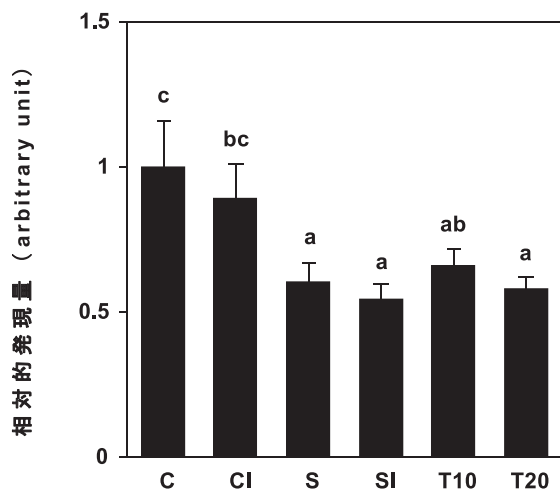


図2．食餌タンパク質源とイソフラボン添加が肝臓HMG-CoA reductase 遺伝子の発現に及ぼす影響(リアルタイムPCRでの測定値)

C, カゼイン食; CI, カゼイン+イソフラボン食; S, 大豆タンパク質食; SI, 大豆タンパク質+イソフラボン食; T10, カゼイン+凍り豆腐食; T20, 凍り豆腐食. 値はC群での発現量を1としたときの相対値を平均値±SEで示す(各群7・8匹). 表中のa, bの表示は異なる文字を付した群間で有意差があることを示す($p < 0.05$).

同経路のさらに下流に位置する Tm7sf2と Hsd17b7では, 前者はS群で低下し, 後者はSI群で増加しており, 同経路の上流と下流で発現量変化の相違が見られた. この経路の中間産物も, より上流の酵素活性に影響すると考えられており⁸⁾, 部分的にフィードバックが起きた結果とみられる. あるいは, 肝臓から末梢組織にコレステロールを輸送する very low density lipoproteinを形成するには, 核となる apolipoprotein B (ApoB) や脂質輸送タンパク質 microsomal triglyceride

transfer protein (MTP) が必要であるため⁸⁾, ApoB や MTP の合成が阻害されて肝臓からのコレステロール分泌が妨げられ, 血清コレステロール濃度が低下したとも考えられる. 実際, ApoB 遺伝子の発現量はマイクロアレイ解析の条件は満たさなかったが, C群に対してS群で 0.600 ± 0.02 倍, T20群では 0.524 ± 0.025 倍であり, 大豆タンパク質や凍り豆腐摂取による低下傾向を示した. 一方, 血清コレステロールを肝細胞に取り込む LDL 受容体 (Ldlr) 遺伝子の発現量は, C

表2. 食餌タンパク質源とイソフラボンの添加が肝臓コレステロール代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

GenBank accession number	Gene symbol	Gene name	Dietary group					
			C	CI	S	SI	T10	T20
BM390399	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	1.00 ± 0.18 ^b	0.776 ± 0.137 ^{ab}	0.497 ± 0.030 ^a	0.593 ± 0.019 ^{ab}	0.688 ± 0.066 ^{ab}	0.514 ± 0.085 ^a
NM_013134	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	1.00 ± 0.23 ^b	0.744 ± 0.127 ^{ab}	0.379 ± 0.066 ^a	0.482 ± 0.061 ^{ab}	0.665 ± 0.060 ^{ab}	0.488 ± 0.081 ^{ab}
BM390574	Lss	lanosterol synthase	1.00 ± 0.08 ^b	0.647 ± 0.110 ^a	0.438 ± 0.086 ^a	0.677 ± 0.098 ^{ab}	0.692 ± 0.152 ^{ab}	0.625 ± 0.124 ^a
BM390364	Tm7sf2	transmembrane 7 superfamily member 2	1.00 ± 0.09 ^{bc}	0.861 ± 0.126 ^{ab}	0.523 ± 0.046 ^a	0.663 ± 0.051 ^{ab}	1.21 ± 0.12 ^c	1.18 ± 0.16 ^c
NM_017235	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	1.00 ± 0.06 ^a	1.05 ± 0.05 ^a	1.44 ± 0.06 ^{ab}	1.73 ± 0.18 ^b	1.37 ± 0.11 ^{ab}	1.24 ± 0.16 ^{ab}
X13722	Ldlr	low density lipoprotein receptor	1.00 ± 0.06 ^b	0.750 ± 0.060 ^{ab}	0.548 ± 0.022 ^a	0.701 ± 0.053 ^a	0.681 ± 0.110 ^a	0.548 ± 0.070 ^a
NM_012942	Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	1.00 ± 0.31 ^a	0.830 ± 0.276 ^a	2.09 ± 1.12 ^{ab}	1.94 ± 0.24 ^a	1.28 ± 0.27 ^a	4.51 ± 0.97 ^b
NM_130414	Abcg8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	1.00 ± 0.31 ^a	1.20 ± 0.18 ^a	2.24 ± 0.57 ^a	2.62 ± 0.71 ^a	8.95 ± 2.71 ^b	9.16 ± 2.81 ^b
NM_053754	Abcg5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5	1.00 ± 0.22 ^a	0.931 ± 0.273 ^a	1.78 ± 0.41 ^a	1.94 ± 0.19 ^a	4.77 ± 0.65 ^b	4.30 ± 0.79 ^b

C, カゼイン食; CI, カゼイン + イソフラボン食; S, 大豆タンパク質食; SI, 大豆タンパク質 + イソフラボン食; T10, カゼイン + 凍り豆腐食; T20, 凍り豆腐食.

値はC群での発現量を1としたときの相対値を平均値 ± SE で示す (各群5匹).

表中の a-c の表示は異なる文字を付した群間で有意差があることを示す ($p < 0.05$).

群と比べ S, SI, T10, T20群で有意に減少したため(表2), 血清コレステロールの低下作用が血清から肝臓へのコレステロール輸送の促進によるものではないと推察できる. コレステロール異化関連の遺伝子では, 胆汁酸合成の律速酵素 cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp7a1) 遺伝子の発現量が S, SI 群で C 群よりも高く, T20群では有意に上昇した(表2). また, コレステロールを胆汁酸に排出する輸送体 ATP-binding cassette, sub-family G (Abcg) のファミリーである Abcg 5 と Abcg 8 遺伝子も T10 と T20群で有意な上昇が見られた(表2). これら遺伝子の発現増加は, 胆汁酸を介したコレステロール排出が増加したことを示唆している. イソフラボン添加は, Lss 遺伝子で C 群と比べて CI 群で有意に低下した以外は有意な影響を示さなかった. 大豆タンパク質とイソフラボンの相互作用は一部の遺伝子で有意差が生じた(Lss, $p=0.008$, Tm7sf2, $p=0.002$, Ldlr, $p=0.0006$) が, 血清や肝臓のコレステロール濃度には相互作用がなく, 生理的な影響を与えるものではなかったと考えられる.

更に, DNA マイクロアレイの結果を検証するため, リアルタイム PCR にて Hmgcr 遺伝子の発現量を測定した. 両方法で測定した発現量の変化は相似しており, DNA マイクロアレイ解析の結果が裏付けられた(図2).

以上の結果から, ラットで見られた凍り豆腐による血清コレステロール濃度低下作用は, イソフラボンではなく大豆タンパク質成分に由来することが明らかになった. また, 遺伝子発現レベルでの解析により, この低下作用は肝臓でのコレステロール合成の抑制および胆汁酸へのコレステロール排出促進により誘導されることが示唆された.

謝 辞

本研究は, 農林水産省委託プロジェクト研究「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発」の一部として行われたものである.

要 約

コレステロール代謝への凍り豆腐の影響を, 大豆タンパク質とイソフラボンによる影響と比較した. ラットの血清コレステロール濃度は, カゼインと比べ凍り豆腐と大豆タンパク質摂取により有意に低下した. 肝臓でのコレステロール代謝関連遺伝子の発現量は, 凍り豆腐と大豆タンパク質により変化した. コレステロール合成系酵素は減少し, 胆汁酸合成律速酵素とコレステロール排出輸送体は減少した. 一方, イソフラボンは血清コレステロール濃度や遺伝子発現に影響を

与えず，食餌タンパク質源との相互作用もほとんどなかった。よって，血清コレステロール濃度の低下作用は凍り豆腐のタンパク質成分に由来し，肝臓でのコレステロール合成の抑制と胆汁酸の排出促進によるものと考えられた。

参考文献

- 1) Yamori, Y. Worldwide epidemic of obesity: hope for Japanese Food. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**, S2-4 (2004)
- 2) Potter, S. M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr* **125**, 606S-611S (1995)
- 3) Ørgaard, A., Jensen, L. The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp Biol Med* **233**, 1066-1080 (2008)
- 4) Sacks, F. M., Lichtenstein, A., Van Horn L., Harris, W., Kris-Etherton, P., Winston, M. Soy Protein, isoflavones, and cardiovascular health. *Circulation* **113**, 1034-1044 (2006)
- 5) Takahashi, Y., Odbayar, T. O., Ide, T. A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver. *J Clin Biochem Nutr* **44**, 223-230 (2009)
- 6) Ide, T., Oku, H., Sugano, M. Reciprocal responses to clofibrate in ketogenesis and triglyceride and cholesterol secretion in isolated rat liver. *Metabolism* **10**, 1065-1072 (1982)
- 7) Rat Genome Database, <http://rgd.mcw.edu/>
- 8) Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S., Yamada, N. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 176-183 (2001)