

学 位 論 文 要 旨

氏 名 田丸 静香

題 目 ダイズ由来成分のラット肝臓トリグリセリド代謝調節に関する研究
(Studies on the regulation of hepatic triglyceride metabolism by the soybean components in rats)

高コレステロール (CHOL) 血症は動脈硬化症発症の危険因子であり、その食餌による改善は極めて重要な研究課題である。現在まで、高 CHOL 血症改善作用を有する種々の食品成分が探索されているが、植物性タンパク質である分離大豆タンパク質 (SPI) の改善作用が良く知られている。SPI による高 CHOL 血症改善の機序は、消化管内において未消化の高分子ペプチド画分が胆汁酸と結合して糞中への排泄を促進し、ひいては CHOL 吸収を阻害することによると報告されている。一方、最近 SPI は、動脈硬化症のもう一つの独立した危険因子である血清及び肝臓トリグリセリド (TG) 濃度も低下させる成分を含む可能性が報告されているが、その機序及び成分について不明な点が多い。本論文では、食餌 SPI の成分中、とくに TG 代謝改善作用を有する成分の探索とその低下の機序解明を目的として研究を行った。

はじめに、SPI の血清及び肝臓 TG 濃度低下がカゼインのそれに比較して有意であることを確認した。ついで、活性画分について、まず微生物由来のプロテアーゼで処理して得られる高分子と低分子画分を SD 系ラットに摂食させた。その結果、高分子画分には CHOL 低下作用が観察され、一方 TG 低下作用は低分子画分により発揮されることが明らかとなった。また、低分子画分の TG 低下作用はさらに分画した高親水性ペプチド画分 (LD-F) により引き起こされる可能性が示された。

ついで、低分子画分 (LD) の TG 低下作用の機序を明らかにするため、LD 摂取ラットの肝臓を用い、単離灌流法により脂肪酸代謝を調べた。その結果、LD は肝臓における脂肪酸の酸化系への代謝を促進し、これに伴いエステル化系への脂肪酸代謝及び TG の灌流液への分泌を抑制した。このことから、摂食実験において観察された TG 低下作用は、肝臓からの TG 分泌の抑制によることが示唆された。

さらに、LD による TG 低下の作用機序について、ラット初代肝細胞培養系に各種ペプチドを添加し、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸の TG 画分への取込を指標として脂質合成及び分泌を調べた。LD 及び LD-F の培養系への添加は、培地中 TG 画分への放射能活性の取り込みを低下させた。さらに、作用物質を解明するため、LD 及び LD-F に含まれるイソフラボン、サポニンなどの非タンパク質成分及び SPI の酵素消化物に存在する腸管膜透過性ジペプチドを初代肝細胞培養系に添加した。その結果、イソフラボン及びサポニンの添加は、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸の細胞中エステル化脂質への取り込み及び培地 TG への取込を低下させた。これらの低下は、イソフラボンアグリコンであるダイゼイン及びゲニステインで顕著であった。一方、ジペプチドのみの添加による影響は観察されなかった。以上のように、食餌 LD あるいは LD-F の血清及び肝臓 TG 濃度低下作用は、肝細胞における脂肪酸の TG への取り込み減少及びこれに伴う分泌の抑制により引き起こされている可能性が示された。一方、作用物質としてイソフラボンが関与している可能性が示された。

最後に、大豆には植物ステロールであるカンペステロールが含まれているが、このカンペステロールより誘導された高脂血症治療薬である 5-カンペステノンのラット脂質代謝に及ぼす影響について検討した。5-カンペステノンの摂食は、血清及び肝臓 CHOL 及び TG 濃度を有意に低下させた。5-カンペステノンは、肝臓における脂肪酸の酸化系への代謝を亢進させ、一方、脂肪酸のエステル化系への代謝、とくに TG への取込を抑制させることで、脂質代謝改善作用を発揮していることが示された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Shizuka TAMARU
題 目	Studies on the regulation of hepatic triglyceride metabolism by the soybean components in rats (ダイズ由来成分のラット肝臓トリグリセリド代謝調節に関する研究)

Since hypercholesterolemia is a risk factor for the incidence and/or progression of atherosclerotic diseases, the dietary component(s), which can decrease serum cholesterol, for the prevention of this disease has become much concern. It has been searching for the various food components to possess a hypocholesterolemic activity, and found that the soybean protein isolate (SPI) is may be such a candidate. The mechanism(s) responsible for the hypocholesterolemic activity by dietary SPI is reported to due to the binding activity of an undigested (high molecular weight)-peptide fraction of SPI to bile acids within the digestive tract, and thereby promoting the excretion of bile acids and cholesterol into feces. On the other hand, it has been reported that SPI may contain the components that decrease the concentration of serum and liver triglyceride (TG), another independent risk factor for atherosclerosis, although the mechanisms and active components are not well defined. In this thesis, we carried out to find the active components in the SPI in terms of the hypotriglyceridemic and liver TG-lowering action. We also examined their mechanism of action in the rat.

In the first, we confirmed that rats fed a SPI diet has a significantly lowered concentration of serum and liver TG as compared to those fed a casein diet. Next, rats were fed the diets containing the high molecular weight (HD) and low molecular weight (LD) fractions, prepared by fungus protease digestion of the SPI, respectively, and found that HD has a potent hypocholesterolemic and LD has a potent hypotriglyceridemic activity. Further, TG-lowering activity of LD was thought to be in the high hydrophilic peptide (LD-F) prepared from LD.

In the second, we examined the fatty acid metabolism in the isolated perfused livers of rats fed the diets containing LD to clarify the mechanism for TG-lowering activity. And it was found that TG-lowering activity of LD is induced through the enhancement of fatty acid oxidation and the suppressed fatty acid esterification and secretion of TG into perfusate. This result suggested that TG-lowering activity observed in the feeding experiments *in vivo* was attributed to the suppressed TG secretion from the liver.

For the further investigation the mechanism for TG-lowering activity of LD, we examined the effect of the addition of various peptides to the primary culture of rat hepatocytes on the incorporation of [14 C] oleate into lipids. The addition of LD and high hydrophilic peptide, LD-F, to the medium reduced the incorporation of the radioactivity into TG fraction in the medium. Further, soy isoflavones and saponines, which are the non-protein components of LD and LD-F, and intestinal membrane permeative dipeptides, which existed in SPI enzymatic digest, were added to the culture medium, and found that the addition of isoflavones and saponines reduced the incorporation of [14 C] oleate into esterified lipids both in the cell and medium. These reductions were prominent in the case of the addition of daidzein and genistein, the aglycones of soy isoflavones. On the other hand, the effect of the addition of dipeptides had no influence. It was therefore concluded that the decrease of serum and liver TG concentrations by dietary LD and LD-F might be due to the reduced incorporation of fatty acid into hepatic TG and their secretion. And, isoflavones are major active components in the SPI responsible for these beneficial actions.

Finally, we also examined the effect of 5-campestenone, which is a new hypolipidemic drug derived from plant sterols found in soybean on lipid metabolism in the rat. Dietary 5-campestenone significantly decreased the serum and liver cholesterol and TG concentrations. These reductions were due to the enhanced metabolism of fatty acid into oxidation pathway and the suppressed esterification, especially into TG molecule in the liver.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	田丸 静香
審査委員	宮崎大学農学部 教授 福田 亘博
	宮崎大学農学部 教授 窄野 昌信
	佐賀大学農学部 教授 柳田 晃良
	琉球大学遺伝子実験センター 教授 屋 宏典
	鹿児島大学農学部 教授 林 国興
審査協力者	
題目	ダイズ由来成分のラット肝臓トリグリセリド代謝調節に関する研究 (Studies on the regulation of hepatic triglyceride metabolism by the soybean components in rats)
<p>高コレステロール (CHOL) 血症は動脈硬化症発症の危険因子であり、その食餌による改善は極めて重要な研究課題である。現在まで、高 CHOL 血症改善作用を有する種々の食品成分が探索されているが、植物性タンパク質である分離大豆タンパク質 (SPI) の改善作用が良く知られている。SPI による高 CHOL 血症改善の機序は、消化管内において未消化の高分子ペプチド画分が胆汁酸と結合して糞中への排泄を促進し、ひいては CHOL 吸収を阻害することによると報告されている。一方、最近 SPI は、動脈硬化症のもう一つの独立した危険因子である血清及び肝臓トリグリセリド (TG) 濃度も低下させる成分を含む可能性が報告されているが、その機序及び成分について不明な点が多い。本論文では、食餌 SPI の成分中、とくに TG 代謝改善作用を有する成分の探索とその低下機序の解明を目的として研究を行っている。</p> <p>はじめに、SPI の血清及び肝臓 TG 濃度低下がカゼインのそれに比較して有意であることを確認している。次に、まず微生物由来のプロテアーゼで処理して得られる高分子と低分子画分を SD 系ラットに摂食させ、高分子画分には CHOL 低下作用があるが、TG 低</p>	

下作用は低分子画分に存在することを確認している。また、低分子画分の TG 低下作用はさらに分画した高親水性ペプチド画分 (LD-F) によりその作用が強くなることを明らかにしている。

ついで、低分子画分 (LD) の TG 低下作用の機序を明らかにするため、LD 摂取ラット肝臓を用い、単離灌流法により脂肪酸代謝を調べている。その結果、LD は肝臓における脂肪酸の酸化系への代謝を促進させ、一方 TG の灌流液へ分泌を抑制することを観察している。これらのことから、摂食実験において観察された TG 低下作用は、肝臓における脂肪酸酸化の亢進と TG 分泌の抑制によることを明らかにしている。

さらに、LD による TG 低下の作用機序について、ラット初代肝細胞培養系に各種ペプチドを添加し、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸の TG 画分への取込を指標として脂質合成及び分泌を調べている。まず、LD 及び LD-F の培養系への添加は、培地中 TG 画分への放射能活性の取り込みを低下させることから分泌は低下することを確認している。さらに、作用物質を同定するため、SPI の酵素消化物に存在する腸管膜透過性ジペプチド及び LD 及び LD-F に含まれると思われるイソフラボン、サポニンなどの非タンパク質成分を初代肝細胞培養系に添加している。その結果、イソフラボン及びサポニンの添加は、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸の細胞中エステル化脂質への取り込み及び培地 TG への取込を低下させることを見出している。イソフラボン、サポニンの低下効果の比較から、活性本体はイソフラボンアグリコンであるダイゼイン及びゲニステインであることを明らかにしている。一方、ジペプチドのみの添加による影響は観察されなかったことを認めている。以上のように、食餌 LD あるいは LD-F の血清及び肝臓 TG 濃度低下作用は、肝細胞における脂肪酸の TG への取り込み減少及びこれに伴う分泌の抑制により引き起こされていることを明らかにし、作用物質としてイソフラボンが関与している可能性を明らかにしている。

最後に、大豆には植物ステロールとしてカンペステロールが含まれているが、このカンペステロールより誘導された新規高脂血症治療薬である 5-カンペステノンのラット脂質代謝に及ぼす影響について検討している。5-カンペステノンの投与は、血清及び肝臓 CHOL 及び TG 濃度を有意に低下させることを確認している。さらに、5-カンペステノンは肝臓における脂肪酸の酸化系への代謝を亢進させ、一方、脂肪酸のエステル化系への代謝、とくに TG への取込を抑制させることで、脂質代謝改善作用を発揮していることを明らかにしている。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	田丸 静香
審査委員	宮崎大学農学部 教授 福田 亘博
	宮崎大学農学部 教授 窄野 昌信
	佐賀大学農学部 教授 柳田 晃良
	琉球大学遺伝子実験センター 教授 屋 宏典
	鹿児島大学農学部 教授 林 国興
審査協力者	
実施年月日	平成20年 1月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年1月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	田丸 静香
<p>[質問1] 大豆ペプチド画分のTG代謝改善作用のメカニズムには、肝臓における脂肪酸の酸化亢進が考えられる。作用成分としてイソフラボンの関与を示唆しているが、どのように考えたらいいか。また、ジペプチドは消化吸収性を基に実験しているが、どのように考えたらいいか。</p> <p>[回答1] イソフラボンに関しては初代培養肝細胞でのデータと、コレステロール代謝に関するこれまでの知見から、「関与している可能性がある」ということで結論している。ジペプチドに関しては、有意差はないがTGを低下させる傾向がある。食事として摂取して実際に生じるペプチドに作用があるかは検討する必要がある。</p> <p>[質問2] イソフラボンやサポニンの含量はどうか。</p> <p>[回答2] 分離大豆タンパク質中の含量は供給者からのデータである。実験に使用するサンプルを実際に測定する必要がある。</p> <p>[質問3] カゼインを対照としているが、どうか？</p> <p>[回答4] 分離大豆タンパク質の脂質代謝に及ぼす影響を検討する際には、従来からよく使われており、これまでの研究と比較しやすい。肝臓TG低下については、他の植物性タンパク質なども含めて検討する必要があると考えられる。</p> <p>[質問5] 培養ではサンプル添加で細胞の状態に影響はないか？</p> <p>[回答5] サンプル添加による形態的变化はなかった。細胞毒性のないレベルで実験している。</p> <p>[質問6] 血清脂質や肝臓脂質濃度が高いと思うが、絶食していない影響か？</p> <p>[回答6] 肝臓灌流実験を行う際には摂食条件化で行う必要があるため、絶食させていない。肝臓脂質濃度はカゼインベースのAIN-76をSDラットに与えると高くなる。他の動物種でも効果を確認する必要があると考えられる。</p> <p>[質問7] カンペステノンは吸収されるのか。肝障害を起こさないか？</p> <p>[回答7] 吸収性に関しては実験していない。吸収されても代謝、分解されている可能性がある。作成した誘導体の中で、有効性と安全性の面から選ばれたものではあるが、安全性の問</p>	

題を最終的にはクリアする必要がある。

〔質問 8〕

SPIからイソフラボンを抜いた場合はどうか。

〔回答 8〕

コレステロール代謝に関しては、そのような実験がある。TG代謝に関しても、イソフラボンを除いたサンプルで摂食実験をする必要があると考えられる。

〔質問 9〕

肝臓の重さが減っていることに関してはどう考えるか。

〔質問 9〕

TG含量の低下が関与していると考えられる。最終的には、摂食量とエネルギー摂取量を厳密にあわせた実験を行う必要であると考えられる。

〔質問 10〕

SPIからHDとLDの作製はどのようにおこなっているか。また、LDからLD-Fを作製したのはどういう観点からか。

〔回答 10〕

HDでは酵素分解を行った後の分離操作はない。LDでは酵素分解を行った後、遠心分離を行っている。基本的には低分子ペプチドに着目しているが、LDからLD-Fへの分画は、作用成分の探索の意味があるが、工業的な製品としては清涼飲料に利用できることを想定している。