

オカラ豆乳の乳酸発酵処理がラットの脂質代謝に及ぼす影響

福田 満¹⁾, 西村 侑子²⁾, 原田 智子²⁾, 高木 尚紘²⁾,
北脇 涼子¹⁾, 岩崎 充弘³⁾, 都築 公子³⁾

¹⁾武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科,

²⁾武庫川女子大学大学院生活環境学研究科食物栄養学専攻,

³⁾マルサンアイ株式会社・開発統括部

Effects of Lactic Fermentation Processing of Soymilk and Okara on Lipid Metabolism in Rats

Mitsuru Fukuda¹⁾, Yuko Nishimura²⁾, Tomoko Harada²⁾, Naohiro Takagi²⁾, Ryoko Kitawaki¹⁾,
Mitsuhiro Iwasaki³⁾ and Kimiko Tsuzuki³⁾

¹⁾Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

²⁾Food Science and Nutrition Major, Graduate School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

³⁾Marusan-ai Co., Ltd., 1, Aza-Arashita, Nikki-cho, Okazaki, Aichi 444-2193, Japan

This study examined the effects of fermented soymilk and okara on lipid metabolism in rats. Fermented soymilk and okara was prepared from a mixture of soymilk and okara blended in a ratio of 2 to 1 on dry basis by lactic acid fermentation using *Lactobacillus delbrueckii*. Male Sprague-Dawley rats were fed a diet based on the AIN-93 diet (control diet) or two kinds of test diets in which 20% of a control diet was replaced by unfermented soymilk/okara mixture or fermented soymilk/okara for 7 weeks. We investigated changes in plasma and hepatic lipid levels of rats, and the regulation of gene expression in mesenteric adipose tissue and liver by DNA microarray. Groups of test diet significantly reduced plasma cholesterol levels compared with the control diet. In addition, the hepatic triglyceride in rats fed test diets was significantly lower than that of control diet. DNA microarray analysis indicated that the test diet ingestion down-regulated the expression of genes related to lipid metabolism in mesenteric adipose tissue and liver. These results suggested that a mixture of soymilk and okara has the effect improving lipid metabolism. Especially, fermented soymilk and okara seems to promote the restraint of abdominal visceral fat accumulation in comparison with unfermented soymilk and okara. Therefore, fermented soymilk and okara is a functional food showing effect preventing metabolic syndrome.

緒 言

メタボリックシンドロームの基本的概念は、内臓脂肪肥満あるいはインスリン抵抗性を基盤として、耐糖能異常、脂質異常症、高血圧の状態が継続することによって、心血管系疾患を発症するリスクを上昇させるものである¹⁾。平成19年度国

民健康・栄養調査²⁾の結果より、メタボリックシンドローム及び糖尿病が強く疑われる者と予備軍の割合が増加していることが伺え、このような状態に至った背景として、食生活の欧米化などの食環境の変化が挙げられる。この予防対策として食生活の改善を中心とした一次予防が必要であり、さまざまな取り組みが国を挙げて行われている。

日本人は、豆腐、納豆、味噌など大豆をさまざまな形に加工して食生活に取り入れてきた。大豆に含まれる大豆タンパク質・大豆イソフラボン・食物繊維などによる脂質代謝改善効果について既に数多く報告されており³⁻⁴⁾、大豆食品の生理機能が日本人の健康に大きく寄与し、長寿の要因の一つであると考えられている。しかし、食生活の変化に伴い、従来の大豆を多く摂取する食生活パターンが失われつつあり、国民健康・栄養調査の結果においても年齢層が低くなるほど、大豆を含む豆類の摂取量が減少している。また、大豆加工時の副産物であるオカラにも、さまざまな生理的有効性を有することが知られているが⁵⁻⁶⁾、ほとんどが食品素材として有効利用されずに産業廃棄物として処分されていることが問題視されている。本研究では、豆乳とオカラの有効成分を余すことなく利用し、付加価値を付けるために植物性乳酸菌で乳酸発酵させた乳酸発酵大豆食品を作製した。機能性食品としての有効性を明らかにすることを目的とし、当該食品と未発酵大豆食品(オカラ豆乳)を雄性SD系ラットに投与し、乳酸発酵処理が脂質代謝に与える影響について報告する。

実験方法

1. 実験用試料

飼料原料となるオカラ豆乳及び乳酸発酵オカラ豆乳は、マルサンアイ株式会社(愛知県岡崎市)で製造したものを使用した。オカラ豆乳は、オカラと豆乳を乾燥重量換算で1:2の割合で混合し、凍結乾燥したものをを用いた。乳酸発酵オカラ豆乳は、オカラ・豆乳混合物を植物性乳酸菌(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 菌株 SNC33)で15時間発酵させた後、凍結乾燥したものをを用いた。オカラ豆乳及び乳酸発酵オカラ豆乳の成分組成を固形物換算でTable 1に示した。その他の飼料原料は、日本クレア株式会社及び和光純薬工業株式会社から購入したものを使用した。

2. 実験動物および飼育条件

5週齢の雄性Sprague-Dawley系ラットを日本クレア株式会社から購入し実験に供した。飼育温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 7\%$ 、12時間明暗サイクル(明期8:00-20:00)の環境下において、個別に金網ケージで飼育を行った。本実験の基準飼料は、

Table 1. Composition of freeze-dried unfermented and fermented soymilk/okara (Weight %)

| Component | Unfermented and fermented soymilk/okara |
|---------------|---|
| Water | 5.0 |
| Protein | 37.3 |
| Fat | 23.6 |
| Carbohydrate | 8.1 |
| Dietary Fiber | 21.1 |
| Ash | 4.9 |

Table 2. Composition of experimental diets (Weight %)

| | Diet group | | |
|--|------------|--------|--------|
| | CO | UO | FO |
| Casein ¹ | 20.0 | 11.4 | 11.4 |
| Cornstarch ¹ | 39.75 | 36.4 | 36.4 |
| Dextrinized cornstarch ¹ | 13.2 | 13.0 | 13.0 |
| Sucrose ¹ | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Purified soybean oil ¹ | 7.0 | 3.6 | 3.6 |
| Cellulose ¹ | 5.0 | 0.6 | 0.6 |
| Mineral mixture (AIN-93G-MX) ¹ | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mixture (AIN93 VX) ¹ | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L-Cystine ² | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate ² | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Butylhydroquinine ² | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |
| Unfermented soymilk/okara (dried) ³ | 0.0 | 20.0 | 0.0 |
| Fermented soymilk/okara (dried) ³ | 0.0 | 0.0 | 20.0 |

¹Japan CLEA, Osaka. ²Wako pure chemical industries, Osaka.

³Marusan-ai, Okazaki.

AIN-93の組成⁷⁾に基づいて調製した。基準飼料で2週間の予備飼育を行った後、次のように3群に群分けした。引き続き基準飼料を投与したコントロール群(n=5; 以下CO群)、CO群飼料の20%を乾燥オカラ豆乳または乾燥乳酸発酵オカラ豆乳で置換したオカラ豆乳群(n=5; 以下UO群)及び乳酸発酵オカラ豆乳群(n=5; 以下FO群)とし、各々の飼料(Table 2)を投与して7週間飼育した。

実験動物は、飼育期間中、自由摂食及び自由飲水させた。摂餌量は毎日測定し、体重は飼育期間の隔日に測定を行った。飼育7週目に2日間の糞を採取し、凍結乾燥を行った。血漿の採取は、隔週行い、15時間絶食後、エチルエーテル麻酔下で、尾部動脈よりヘパリン処理(ヘパリンナトリウム注N「味の素」; 日本薬局方)した注射器で採血、遠心分離後(3,000rpm, 4°C, 15min)採取し、分析時まで -80°C で冷凍保存した。組織摘出は飼育期間終了後に、解剖直前まで摂食させた状態で行い、

エチルエーテル麻酔下で心臓より脱血後、肝臓、盲腸、腎臓周囲脂肪組織、精巣周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、湿重量を測定した。各臓器は、分析時まで -80°C で冷凍保存した。なお、本実験は武庫川女子大学動物飼育委員会の規定に基づいて実施した。

3. 血漿成分の測定

血漿中の総コレステロール(以下 TC)、トリグリセリド(以下 TG)、血糖値について、それぞれ市販の測定キットであるコレステロール E-テストワコー、トリグリセリド E-テストワコー、グルコース C-II-テストワコー (和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

4. 肝臓脂質濃度の測定

肝臓脂質は Folch ら⁸⁾の方法に従い、クロロホルム-メタノール溶液で抽出した後、溶媒除去して粗脂肪とした。抽出した粗脂肪を 5%TritonX-100 含有イソプロパノールに溶解後、血漿成分分析と同様のキットを用いて、肝臓コレステロール(以下肝臓 Chol)及びトリグリセリド(以下肝臓 TG)を測定した。

5. 糞中胆汁酸の測定

凍結乾燥させた糞を乳鉢で粉碎後、0.25g を 2.5ml の加熱アルコール(70°C , 60 分)で抽出した。続いて、2.5ml のクロロホルム-メタノール混液(1:1, v/v)洗浄を 2 回繰り返す。抽出液と洗浄液を合わせ、溶媒除去し 100% エタノールに溶解後、市販の測定キットである総胆汁酸-テストワコー (和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

6. 腸間膜脂肪組織及び肝臓からの RNA 抽出

腸間膜脂肪組織及び肝臓の摘出直後に、RNA later RNA Stabilization Reagent (QIAGEN)で安定化させ、抽出時まで -80°C で保存したものを試料とした。腸間膜脂肪組織は、個体では十分な total RNA 回収率が得られなかったため、各群 5 匹のラットから等量採取し、RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN)を用いて、抽出した。肝臓は RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて、各群 5 匹のラットそれぞれについて total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度及び純度は、分光光度測定法及びアガロースゲル電気泳動法で確認した。腸間膜脂肪組織では減圧濃縮法により必要な濃度に調整したものを、肝臓では各群 5 匹から等量の total RNA を混合したものを DNA マイクロアレイ解析試料とした。

7. DNA マイクロアレイ解析

各群間の腸間膜脂肪組織及び肝臓の遺伝子発現の差異を検討するために、抽出した total RNA を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行なった。解析には、約 30,000 遺伝子が搭載された Affymetrix Rat Genome 230 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)を用いた。それぞれ total RNA $20\mu\text{g}$ より cDNA を調製した後、T7 DNA ポリメラーゼを用いて cRNA を合成した。cRNA 合成時にビオチン標識を行なった。ビオチン標識した cRNA を断片後、Affymetrix Rat Genome 230 2.0 array にハイブリダイズさせ、ストレプトアビジンフィコエリスリンで蛍光標識した。蛍光標識したアレイをスキャニングし、発現量の数値化・データ解析は Affymetrix Gene Chip Operating Software ver 1.4 を用いた。各群のラット肝臓及び腸間膜脂肪組織の遺伝子発現の変化は、データ解析で“present”となった遺伝子を基準とし、CO 群と比較して、1.5 倍以上発現したものを“発現上昇”・1/1.5 倍以下発現したものを“発現減少”として、解析を行った。

8. 統計処理

各実験結果は、平均値 \pm 標準誤差(mean \pm SE)で示した。データの解析は、SPSS for Windows 12.0j を用いて、Tukey の多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

実験結果

1. 摂餌量、体重及び組織重量

実験飼料投与期間中の摂餌量、体重及び組織重量を Table 3 に示した。摂餌量には、各群間に有意差は認められなかったが、UO 群及び FO 群で CO 群と比較してわずかに低値を示し、また FO 群の方が UO 群よりも低値であった。最終体重について、各群間に有意差は認められなかったが、CO 群と比較して UO 群及び FO 群の方がわずかに低値を示した。体重あたりの肝臓重量は、UO 群及び FO 群で CO 群と比較して有意に低値を示した。腎臓周囲脂肪組織・精巣周囲脂肪組織及び腸間膜脂肪組織重量の各群間に有意差は認められなかったが、3 部位の脂肪組織重量を合計すると、UO 群で CO 群及び FO 群よりも低値を示した。

2. 血漿成分の変化

血漿成分の変化を Table 4 に示した。血漿 TC 濃度は、投与 1 週で UO 群及び FO 群ともに低下し、

低値を維持する傾向を示した。CO群と比較してUO群は投与3週以降有意に低値を示し、FO群は投与5週に有意に低値を示した。血漿TG濃度及び血糖値には、各群間に有意差は認められなかった。

3. 肝臓脂質濃度

肝臓脂質濃度を Table 5 に示した。肝臓 Chol 濃

度は、各群間に有意差は認められなかったが、UO群及びFO群の方がCO群よりも低値であった。肝臓TG濃度は、UO群及びFO群でCO群と比較して有意に低値を示した。

4. 糞中胆汁酸排泄量

糞中胆汁酸総排泄量は、各群間に有意差は認められなかった(Table 6)。

Table 3. Effects of experimental diets on growth changes and tissue weights in rats

| Parameters | Diet group | | |
|--|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | CO | UO | FO |
| Daily food intake (g) | 26.7 ± 0.7 ^a | 25.3 ± 0.5 ^a | 24.6 ± 1.3 ^a |
| Initial body weight (g) | 268.9 ± 10.0 ^a | 266.3 ± 4.7 ^a | 265.5 ± 5.2 ^a |
| Final body weight (g) | 594.9 ± 19.2 ^a | 586.7 ± 9.5 ^a | 581.2 ± 28.6 ^a |
| Liver (g / 100g body weight) | 4.70 ± 0.20 ^a | 3.65 ± 0.14 ^b | 3.69 ± 0.11 ^b |
| Perirenal white adipose tissue (g / 100g body weight) | 3.64 ± 0.31 ^a | 2.60 ± 0.37 ^a | 3.41 ± 0.62 ^a |
| Epididymal white adipose tissue (g / 100g body weight) | 2.22 ± 0.25 ^a | 1.73 ± 0.23 ^a | 2.44 ± 0.28 ^a |
| Mesenteric white adipose tissue (g / 100g body weight) | 1.56 ± 0.13 ^a | 1.17 ± 0.11 ^a | 1.19 ± 0.16 ^a |

CO, Control; UO, Unfermented soymilk/*okara*; FO, Fermented soymilk/*okara*

Each value is the mean ± SE of 5 rats. ^{a,b}Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

Table 4. Effects of experimental diets on plasma parameter in rats

| Parameters | | Diet group | | |
|---------------------------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | CO | UO | FO |
| Total cholesterol (mg/dl) | 0w | 66.0 ± 2.9 ^a | 63.1 ± 5.5 ^a | 68.0 ± 6.4 ^a |
| | 1w | 70.1 ± 6.2 ^a | 54.2 ± 1.6 ^a | 53.9 ± 5.3 ^a |
| | 3w | 77.5 ± 7.4 ^a | 45.2 ± 1.9 ^b | 57.6 ± 7.5 ^{ab} |
| | 5w | 81.3 ± 6.8 ^a | 48.2 ± 2.9 ^b | 54.3 ± 5.0 ^b |
| | 7w | 77.5 ± 5.2 ^a | 53.4 ± 3.3 ^b | 58.7 ± 7.3 ^{ab} |
| Triglyceride (mg/dl) | 0w | 114.0 ± 16.9 ^a | 111.3 ± 6.7 ^a | 118.9 ± 8.7 ^a |
| | 1w | 107.9 ± 12.5 ^a | 110.2 ± 11.5 ^a | 134.3 ± 16.2 ^a |
| | 3w | 120.0 ± 12.2 ^a | 92.5 ± 6.5 ^a | 105.3 ± 21.4 ^a |
| | 5w | 149.1 ± 30.2 ^a | 92.1 ± 15.1 ^a | 94.3 ± 9.2 ^a |
| | 7w | 121.5 ± 13.6 ^a | 118.9 ± 21.9 ^a | 105.7 ± 17.5 ^a |
| Glucose (mg / dl) | 0w | 131.1 ± 9.2 ^a | 123.0 ± 9.0 ^a | 123.3 ± 8.5 ^a |
| | 1w | 110.0 ± 9.8 ^a | 100.5 ± 9.6 ^a | 100.2 ± 3.0 ^a |
| | 3w | 145.2 ± 4.8 ^a | 127.6 ± 13.7 ^a | 125.4 ± 7.9 ^a |
| | 5w | 143.6 ± 7.7 ^a | 155.6 ± 10.6 ^a | 169.0 ± 7.2 ^a |
| | 7w | 144.1 ± 11.1 ^a | 137.5 ± 13.9 ^a | 165.2 ± 16.5 ^a |

CO, Control; UO, Unfermented soymilk/*okara*; FO, Fermented soymilk/*okara*

Each value is the mean ± SE of 5 rats. ^{a,b}Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

Table 5. Effects of experimental diets on hepatic lipid concentration in rats

| Parameters | Diet group | | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | CO | UO | FO |
| Hepatic cholesterol (mg / g liver) | 5.50 ± 0.74 ^a | 3.77 ± 0.46 ^a | 3.91 ± 0.28 ^a |
| Hepatic triglyceride (mg / g liver) | 57.8 ± 10.3 ^a | 27.5 ± 4.7 ^b | 24.2 ± 1.2 ^b |

CO, Control; UO, Unfermented soymilk/*okara*; FO, Fermented soymilk/*okara*

Each value is the mean ± SE of 5 rats. ^{a,b}Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

Table 6. Effects of experimental diets on fecal bile acid in rats

| Parameters | Diet group | | |
|--|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | CO | UO | FO |
| Fecal bile acid excretion (mg / day feces) | 58.2 ± 21.1 ^a | 57.7 ± 4.2 ^a | 62.2 ± 11.5 ^a |

CO, Control; UO, Unfermented soymilk/*okara*; FO, Fermented soymilk/*okara*

Each value is the mean ± SE of 5 rats. ^a Means not sharing common superscript differ significantly by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

5. 腸間膜脂肪組織の遺伝子の発現量変化

今回解析した約 30,000 遺伝子のうち、発現が検出された遺伝子から脂質代謝に関連する遺伝子に絞り、Sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1), Acetyl coenzyme A carboxylase (ACC), Fatty acid synthase (FAS), Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), Malic enzyme (ME), Peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), Hormone sensitive lipase (HSL), Uncoupling protein 2 (UCP2), Glucose transporter 4 (GLUT4) の計 9 遺伝子について解析を行い、関連遺伝子の mRNA 発現量を Table 7 に示した。mRNA 発現量が 1.5 倍以上であった遺伝子は、両群ともに認められなかった。1/1.5 倍以下であった遺伝子は、UO 群及び FO 群ともに SREBP-1, ACC, FAS, GPAT, ME の 5 遺伝子であった。UO 群と FO 群を比較すると、SREBP-1 を除く遺伝子で発現量が FO 群の方が減少した。PPAR γ , HSL, UCP2, GLUT4 の 4 遺伝子は両群ともに有意な変化は認められなかったが、PPAR γ , GLUT4 の mRNA 発現量が両群ともに CO 群よりも減少傾向を示した。

6. 肝臓の遺伝子の発現量変化

今回解析した約 30,000 遺伝子のうち、発現が検出された遺伝子から脂質代謝に関連する遺伝子に絞って解析を行った。脂肪合成及び分解に関与する遺伝子である SREBP-1, ACC, FAS, GPAT, ME, Carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1), Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) の計 7 遺伝子の mRNA 発現量を Table 8 に示した。コレステロール代謝に関連する Sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR), Cholesterol 7 α -Hydroxylase (CYP7A1) の計 4 遺伝子の mRNA 発現量についても Table 8 に示した。mRNA 発現量が 1.5 倍以上であった遺伝子は、UO 群では、CPT-1, CYP7A1 であり、一方 FO 群は、CYP7A1 であった。CYP7A1 の mRNA 発現量を UO 群と

FO 群で比較すると、UO 群の方が増加した。また 1/1.5 倍以下であった遺伝子は、UO 群及び FO 群で SREBP-1, ACC, FAS, GPAT, ME, DHCR の 6 遺伝子であった。脂肪合成に関与する FAS, GPAT, ME の mRNA 発現量を UO 群と FO 群で比較すると、UO 群の方が減少した。PPAR α , SREBP-2, HMGCR の計 3 遺伝子については、両群ともに有意な変化は認められなかった。

考 察

大豆食品を摂取することで、大豆タンパク質、大豆レシチン、大豆トリプシンインヒビターによる摂食抑制作用が報告されている⁹⁻¹⁰。摂餌量は各群間に有意差は認められなかったが、オカラ豆乳摂取群である UO 群及び FO 群の方が CO 群よりも低値を示し、乳酸発酵することでさらに低値を示し、摂食抑制作用の可能性を示した。大豆タンパク質は主に β コングリシニン (7S グロブリン) およびグリシニン (11S グロブリン) であるが、 β コングリシニンは摂食抑制作用を示すことが報告され¹¹、直接小腸に存在する Icell と呼ばれる内分泌細胞から分泌される消化ホルモンのコレシストキニン (CCK) を刺激することが知られている。以前に著者らは、乳酸発酵オカラ豆乳のタンパク質のゲルろ過パターンを解析したところ、オカラ豆乳のタンパク質分子量分布と比べてほとんど差がなかった¹²。一方で、豆乳を *Lactobacillus* 属で発酵した時に、総タンパク質量に変化はないが、発酵によってタンパク質が加水分解されていることを示している報告があり¹³、乳酸発酵オカラの摂食抑制作用は、乳酸発酵による大豆タンパク質の変化が関与していると推測される。最終体重の有意差は認められなかったが、UO 群及び FO 群の方が CO 群よりも低値を示した。摂取量の抑制によって体重増加が抑制されたと示唆される。体重あたりの腎臓周囲・精巣周囲・腸間膜の 3 部位の合計白色脂肪組織重量は、各群間に有意

Table 7. DNA microarray data on lipid metabolism-related genes in the mesenteric white adipose tissue of rats fed experimental diets

| Gene name | Fold change | | |
|---|-------------|------|------|
| | CO | UO | FO |
| Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 | 1.00 | 0.57 | 0.60 |
| Acetyl Coenzyme A Carboxylase | 1.00 | 0.51 | 0.46 |
| Fatty Acid Synthase | 1.00 | 0.57 | 0.50 |
| Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase | 1.00 | 0.63 | 0.51 |
| Malic Enzyme | 1.00 | 0.58 | 0.50 |

Not Change

| Gene name | Fold change | | |
|---|-------------|------|------|
| | CO | UO | FO |
| Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ | 1.00 | 0.67 | 0.76 |
| Hormone Sensitive Lipase | 1.00 | 1.08 | 1.18 |
| Uncoupling protein 2 | 1.00 | 1.17 | 1.18 |
| Glucose Transporter 4 | 1.00 | 0.77 | 0.72 |

CO, Control; UO, Unfermented soymilk/*okara*; FO, Fermented soymilk/*okara*

The relative mRNA expression level in CO group is arbitrarily set as 1.00

Table 8. DNA microarray data on lipid metabolism-related genes in the liver of rats fed experimental diets**Up-regulation**

| Gene name | Fold change | | |
|-------------------------------------|-------------|------|------|
| | CO | UO | FO |
| Carnitine Palmitoyltransferase- I | 1.00 | 1.61 | 1.43 |
| Cholesterol 7 α -Hydroxylase | 1.00 | 2.82 | 1.56 |

Down-regulation

| Gene name | Fold change | | |
|---|-------------|------|------|
| | CO | UO | FO |
| Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 | 1.00 | 0.52 | 0.44 |
| Acetyl Coenzyme A Carboxylase | 1.00 | 0.66 | 0.62 |
| Fatty Acid Synthase | 1.00 | 0.33 | 0.41 |
| Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase | 1.00 | 0.40 | 0.40 |
| Malic Enzyme | 1.00 | 0.27 | 0.40 |
| 7-Dehydrocholesterol Reductase | 1.00 | 0.61 | 0.62 |

Not change

| Gene name | Fold change | | |
|---|-------------|------|------|
| | CO | UO | FO |
| Peroxisome Proliferator Activated Receptor α | 1.00 | 0.81 | 0.84 |
| Sterol Regulatory Element Binding Protein-2 | 1.00 | 0.82 | 0.87 |
| 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase | 1.00 | 1.02 | 0.81 |

CO, Control; UO, Unfermented soymilk/*okara*; FO, Fermented soymilk/*okara*

The relative mRNA expression level in CO group is arbitrarily set as 1.00

差は認められなかったが, UO 群及び FO 群で CO 群よりも低値を示した. 大豆タンパク質摂取時の脂肪組織への影響は, 高脂肪食及び普通食摂取ラットへの大豆タンパク質投与実験で報告されている^{14, 15)}. また, 白色脂肪組織重量は, 大豆タ

ンパク質と大豆イソフラボンが共存し, さらに大豆イソフラボンの濃度依存的に減少する傾向を示すことを Takahashi ら¹⁶⁾は報告している. 本実験での白色脂肪組織への脂肪蓄積抑制は, 大豆タンパク質及びイソフラボンが大きく寄与していると

推測される。オカラと豆乳を混合した食品によって、内臓脂肪蓄積を抑制する傾向を示し、乳酸発酵した場合も作用は維持されることを示した。これらのメカニズムを検討するために腸間膜脂肪組織について DNA マイクロアレイ解析を行った。脂肪酸合成に関与する酵素の発現を調節する転写因子である SREBP-1¹⁷⁾ の mRNA 発現量が、オカラ豆乳及び乳酸発酵オカラ豆乳の摂取によって減少を示した。さらに、SREBP-1 によって制御される ACC, FAS, GPAT, ME の mRNA 発現量も UO 群及び FO 群で減少を示した。UO 群と FO 群で比較すると、FO 群の方がこれらの遺伝子について減少率が大きかったことから、乳酸発酵することでさらに脂肪酸合成が抑制されると示唆された。白色脂肪組織重量に両群間には有意な差は認められなかったが、オカラ豆乳を乳酸発酵することで脂肪酸合成系遺伝子の発現が抑制され、内臓脂肪蓄積抑制作用を示すと推測される。大豆タンパク質及びイソフラボンを含んだ大豆タンパク質摂取によって、PPAR γ の mRNA 発現量が増加し、脂肪細胞が小球化されることが報告されているが¹⁶⁾、本実験では PPAR γ の mRNA 発現量が UO 群及び FO 群で逆に減少傾向を示し、トリグリセリド蓄積を抑制したと示唆される。中性脂肪を脂肪酸に分解する HSL の mRNA 発現に両群ともに変化がなかったことから血中遊離脂肪酸濃度は同程度であると推測される。また白色脂肪組織にも多く発現し、熱変換効率に関与する UCP2 の mRNA 発現が有意な変化ではなかったが、UO 群及び FO 群で増加傾向を示したことから、脂肪の燃焼が示唆され、脂肪蓄積を抑制したと考えられる。以上のことから、オカラ豆乳は内臓脂肪蓄積抑制作用を有するとが示され、さらに乳酸発酵によってその作用が促進すると示唆された。

肝臓 Chol 濃度に、有意差は認められなかったが、UO 群及び FO 群の方が CO 群よりも低値であった。また、血漿 TC 濃度では、UO 群及び FO 群ともに投与 1 週で低値を示し、それぞれ 3 週後、5 週後に有意に低値を示し、その後低値を維持した。肝臓及び血液分析結果については、乳酸発酵との有意な関係は認められなかった。さらに糞中胆汁酸排泄量には、有意な変化は認められなかった。大豆タンパク質及びイソフラボンには肝臓及び血中コレステロール低下作用を有することが数多く報告されている³⁻⁴⁾。糞中胆汁酸排泄量は各

群ともほぼ等値であったが、コレステロールから胆汁酸への異化に関与する CYP7A1 の mRNA 発現量が UO 群及び FO 群で 1.5 倍以上となり、UO 群ではより増加を示した。一方、肝臓コレステロール合成に関与する遺伝子では、コレステロール合成を調節する転写因子である SREBP-2 では有意な変化を示さなかったが、FO 群でコレステロール合成の律速酵素である HMGCR の mRNA 発現量が減少傾向を示し、コレステロール合成関連酵素である DHCR の mRNA 発現量が 1/1.5 倍以下となった。UO 群及び FO 群で肝臓 Chol 濃度が低値傾向に至るメカニズムについて、オカラ豆乳ではコレステロール異化促進作用が増大し、一方乳酸発酵オカラ豆乳ではコレステロール合成抑制作用が亢進すると考えられ、そのメカニズムは乳酸発酵処理と関わりと示唆された。以上のことから、オカラ豆乳及び乳酸発酵オカラ豆乳には、肝臓及び血中コレステロール低下作用を有すると示唆され、それぞれ異なるメカニズムでコレステロール低下作用を有している可能性を示した。

肝臓 TG 濃度が、UO 群及び FO 群で CO 群と比較して有意に低値を示したが、乳酸発酵の有無には差異は認められなかった。血漿 TG 濃度には、有意差は認められなかった。大豆タンパク質投与によって、肝臓における SREBP-1 の mRNA 発現量が減少し、脂肪酸合成系酵素の発現抑制によって脂肪酸合成の抑制及び β 酸化に関与する PPAR α の mRNA 発現量が増加し、脂肪酸の β 酸化が亢進すると報告されている¹⁸⁻¹⁹⁾。また、大豆タンパク質とイソフラボンの相互作用によって、イソフラボンの存在形態には関係なく、イソフラボン濃度依存的に血中トリグリセリド濃度が低下すると報告されている¹⁴⁾。本実験では、UO 群及び FO 群ともに SREBP-1, ACC, FAS, GPAT, ME の mRNA 発現量においても、両群ともに 1/1.5 倍以下となった。SREBP-1, ACC 以外で上記に示した 3 つの脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現が、UO 群で減少率が大きかった。オカラ豆乳の方が乳酸発酵オカラ豆乳よりも脂肪酸合成抑制作用が強力であることが推測される。本実験では、 β 酸化の初期過程に関与する CPT-1 の mRNA 発現量が UO 群で 1.5 倍以上となったが、肝臓での β 酸化に関連する PPAR α の mRNA 発現には有意な変化は認められなかった。オカラ豆乳の肝臓脂質蓄積抑制作用は、 β 酸化系に寄与せず、脂肪

酸合成抑制によるものであると示唆される。以上のことから、オカラ豆乳及び乳酸発酵オカラ豆乳には、肝臓脂肪蓄積抑制作用を有することが推測され、未発酵の方がその作用が促進することが示唆された。これは腸間膜脂肪組織の脂肪蓄積抑制作用が乳酸発酵豆乳の方で高かったことと対照的であり、乳酸発酵オカラ豆乳と未発酵オカラ豆乳では主として作用する標的組織が異なっていたと推測される。

要 約

日本人の健康に大きく寄与したオカラと豆乳を乾燥重量比 1:2 で混合した食品(オカラ豆乳)の植物性乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* での乳酸発酵処理がラットの脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。オカラ豆乳は摂食抑制作用を有する可能性を示し、内臓脂肪蓄積抑制作用・コレステロール異化促進作用による肝臓コレステロール低下作用・血中総コレステロール低下作用・肝臓脂質蓄積抑制作用を有することが示唆された。乳酸発酵によって、摂食抑制作用・内臓脂肪蓄積抑制作用が促進すると示唆された。豆乳の乳酸発酵処理の有無によって、作用する標的組織が異なることが推測され、また、肝臓コレステロールが低値に至るメカニズムも異なると推定した。以上のことから乳酸発酵オカラ豆乳は、オカラ豆乳同様に脂質代謝改善作用を有し、特に内臓脂肪蓄積抑制作用が促進することから、メタボリックシンドロームの予防に有効な食品である。

参考文献

- 1) 松下由実, 戸邊一之, 原一雄, 門脇 孝, *Mebio*, **23**, 10-23 (2004).
- 2) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室, 平成 19 年国民健康・栄養調査の概要.
- 3) Nagata, Y., Tanaka, K., and Sugano, M., *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241 (1981).
- 4) Potter, S.M., *J. Nutr.*, **125**, 606-611 (1995).
- 5) 福田 満, 杉原好枝, 伊藤みどり, 堀内理恵, 浅尾弘明, 日本食品科学工学会誌, **53**, 195-199 (2006).
- 6) 堀内理恵, 北脇涼子, 高木尚紘, 福田 満, 武庫川女子大学紀要(自然科学), **55**, 41-46 (2007).
- 7) Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey G. C. Jr., *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 8) Folch, J., Lees, M., and Stabley, G. H. S., *J Biol Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 9) Nishi, T., Hara, H., and Tomita, F., *J. Nutr.*, **133**, 352-357 (2003).
- 10) Nishimukai, M., Hara, H., and Aoyama, Y., *J. Nutr.*, **133**, 1255-1258 (2003).
- 11) Nishi, T., Hara, H., Asano, K., and Tomita, F., *J. Nutr.*, **133**, 2537-2542 (2003).
- 12) 高木尚紘, 北脇涼子, 浅尾弘明, 岩崎充弘, 福田満, 武庫川女子大学紀要(自然科学), **54**, 31-35 (2006).
- 13) Rekha, C. R., and Vijayalakshmi, G., *Appl Biochem Biotechnol.*, **151**, 452-463 (2008).
- 14) Tovar, A. R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., Elias, A. L., Ortiz, V., Aguilar-Salinas, C. A., and Torres, N., *J Lipid Res.*, **46**, 1823-1832 (2005).
- 15) 松澤祐次, 大豆たん白質研究, **7**, 1-12 (2004)
- 16) Takahashi, Y., and Ide, T., *J.Nutr Biochem.*, **19**, 682-693 (2008).
- 17) Horton, J. D., *Biochem Society.*, **30**, 1091-1095 (2002).
- 18) Tachibana, N., Matsumoto, I., Fukui, K., Arai, S., Kato, H., Abe, K., and Takamatsu, K., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4253-4257 (2005).
- 19) Moriyama, T., Kishimoto, K., Nagai, K., Urade, R., Ogawa, T., Utsumi, S., Maruyama, N., and Maebuchi, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 352-359 (2004).