

〔報 文〕

コレステロール負荷時におけるキノア蛋白質の コレステロール上昇抑制効果

油原 佳奈・鶴岡 裕香里・須田 沙織
渡辺 睦行・中津川 研一・高尾 哲也

Hypocholesterolemic Effects of Protein Isolated from Quinoa
(*Chenopodium quinoa*, Willd.) Seeds at Cholesterol Loading in Mice

Kana YUHARA, Yukari TSURUOKA, Saori SUDA,
Nakamichi WATANABE, Kenichi NAKATSUGAWA and Tetsuya TAKAO

We extracted protein fraction (QPro) from quinoa seeds. Mice were fed on 0.5% cholesterol diet, containing 0% (control), 2.5% and 5.0% of QPro respectively (2.5% QPro and 5.0% QPro) for 4 weeks. Neither of the diets with additional QPro showed a significant difference between food intake and body weight gain. The QPro additional diet significantly prevented the increase in plasma and liver total cholesterol levels. Excretion of bile acids in the QPro groups was higher than in the control group by the 14th day. Expression of mRNA of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver, a key enzyme for cholesterol biosynthesis, was suppressed by the QPro diet. These results suggest that the prevention of increases in plasma and liver cholesterol levels in mice fed the QPro diet can be ascribed to the promotion of fecal excretion of bile acid and to suppress the expression of the cholesterol synthesis enzyme.

Key words: quinoa (キノア), cholesterol (コレステロール), protein (蛋白質),
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA 還元酵素)

緒 言

キノア (*Chenopodium quinoa*, Willd.)^{1~4)} はアカザ科アカザ属に属する一年草で、高さ80~150cmの植物体先端部に密に枝分かれした部分に種子をつける。キノアの種子は直径1~2mmの円形で、厚さは0.5mmほどである。南アメリカのアンデス山脈に沿ったエクアドル、ペルー、ボリビアからチリ北部に至る、海拔2,000~4,000mの高地で比較的降雨の少ない荒れた土地に生育する。小麦や他の作物がほとんど育たない環境である。

キノアは古くはインカ帝国の人々の間で主食として広く供され、「母なる穀物」として利用されていた。その栄養価の高さとバランスの良さから、近年

の健康ブームで見直され栽培が拡大してきている。日本でも最近輸入・加工業者は増えつつある。

キノアの栄養成分組成について以下の報告がある^{4~5)}。ボリビア産の有機栽培キノア・レアルを用いた一般成分分析では、水分が10.1%、蛋白質は13.4%、脂質が4.9%、糖質67.5%、灰分は1.9%である。繊維は2.2%と白米や小麦粉の7倍から10倍、またソバ粉の2倍含まれている。食物繊維は4.8%含まれ、ソバ粉の4.3%に比しても多く、白米の6倍、小麦粉の2倍となっている。ビタミン群ではビタミンB₂を他の穀物に比べ多く含む。無機塩類の含有量も他の穀物と比べて比較的多い。必須・純必須アミノ酸をまんべんなく含み、リジンの含有量は他の穀物に比べて豊富である。キノア蛋白質のアミ

ノ酸スコアは82であり、特に欠落するアミノ酸もなく、非常にバランスの良い蛋白質である。

キノアはアワやヒエと似た粒状であるが、無味無臭なので多様な料理に利用されている。多くはキノア粒をそのまま、もしくは挽いて粉状にして使用する。伝統的な料理法としては主食として無発酵のパンとして食するほかに、リゾット状にして肉、じゃが芋、とうもろこし、野菜などを入れて食べたり、粗挽きにしたキノア粉を使用して団子状にして食べることもある。また各種のサラダや菓子類へ使用されている。キノアは種子のほかに葉や茎も野菜の一種として食されることもある^{3~4)}。

キノア果皮(外皮)にはマウスの血漿および肝臓コレステロールを低下させる作用があると報告されている^{2, 6)}。しかし、キノア穀部についての検討はほとんど行われてこなかった。大豆・ソバなどでは穀部に含まれる蛋白質にコレステロール低下作用があると報告されている⁷⁾。そこで、キノア蛋白質を取得し、マウスへ経口投与することによりマウスの血清脂質や肝臓脂質類に与える影響について検討した。

実験方法

1. 実験動物および飼育方法

8週齢のCrj:CD-1系雄マウス(チャールズ・リバー社)を使用した。固形飼料MF(オリエンタル酵母社)で10日間予備飼育した後、群間の体重および血中コレステロールをもとに1群6匹の計3群に分けた。本飼育では、食餌および水道水を自由摂取とし、28日間飼育した。飼育は5連のマウス飼育用ケージにマウスを1匹ずつ入れ、室温24±2℃、湿度60%、8:00~20:00を明期とした明暗サイクルに設定した本学飼育室で行った。

体重、食餌残量は毎日測定し、食餌残量から食餌摂取量を算出した。また、本飼育14日目および28日目の糞を採取した。血液採取は7日おきに尻尾の微静脈よりヘマトクリット管を用いて行った。血液採取の際は、18時間絶食させた。血液は10,000G、10分間遠心分離して血清を取得し、分析まで冷凍保存(-20℃)した。

2. 試料調整

キノア蛋白質画分(QPro)はKayashitaらの方法により取得した⁸⁾。すなわち、キノア全粒粉の20倍量の0.9%-NaCl水溶液で30分間攪拌後、NaOH粒を添加してpH8.0に調整し、2時間攪拌抽出した。それを10,000G、4℃で遠心分離し、上清を取得した。その後HCl水溶液を添加してpH4.5に調整し、再び10,000G、4℃で遠心分離を行い、沈殿物を取得した。この沈殿物にイオン交換水を添加し、NaOH水溶液でpH4.8に調整後、5,400G、4℃で10分間遠心分離して沈殿物を取得した。この操作を3回繰り返した後、沈殿物を凍結し、凍結乾燥機にて乾燥させた。これをQProとした。

3. 食餌組成

QProの一般分析組成を表1に、食餌組成を表2に示した。食餌は事前に混合し、10.0gずつの団子状にして冷凍保存(-20℃)した。

表1 QPro一般分析組成

成分	濃度
水分 (%)	3.2
蛋白質 (%)	72.7
脂質 (%)	15.3
灰分 (%)	6.0
炭水化物 (%)	2.8
エネルギー(kcal/100g)	440.0

表2 食餌組成

栄養成分(g)	群		
	コントロール群	QPro 2.5%群	QPro 5.0%群
カゼイン	200.0	178.1	156.1
シュクロース	247.0	246.7	246.3
コーンスターチ	248.0	247.7	247.3
大豆油	200.0	196.2	192.3
セルロース	50.0	50.0	50.0
ミネラル混合	45.0	43.5	42.0
ビタミン混合	10.0	10.0	10.0
QPro	0.0	25.0	50.0
コレステロール	5.0	5.0	5.0
コール酸ナトリウム	2.5	2.5	2.5

4. 解剖

28日間の本飼育期間の最終日には、18時間絶食させて解剖を行った。解剖は断首により行った。断首後血液を採取し、7,840G、10分間遠心分離し、血清を取得した。開腹後肝臓を生理食塩水で洗浄して摘出し、取得した。肝臓は -80°C 、血清は -20°C でそれぞれ分析まで冷凍保存した。

5. 分析

1) 血清

7日間おきに採取した血清を用いて総コレステロール (TC) を測定した。解剖後に採取した血清では総コレステロール (TC)・トリグリセライド (TG)・HDL-コレステロール (HDL-C)・リン脂質 (PL) の測定を行った。測定には酵素法を用いて、TCはコレステロール E-テストワコー (和光純薬社)、TGはトリグリセライド G-テストワコー (和光純薬社)、HDL-CはHDL-コレステロールテストワコー (和光純薬社)、PLはリン脂質 C-テストワコー (和光純薬社) のキットを使用した。

2) 肝臓脂質

肝臓は重量および TC, TG を測定した。肝臓からの脂質抽出は Folch 法に準じて行った。肝臓と等量の生理食塩水を加え、ポッターエルベジェム型のテフロンホモジナイザーにて、50%ホモジネートを作成した。この50%ホモジネート1mlにクロロホルム：メタノール (2:1) を4ml加え、650G、10分間遠心分離し、下層を取得した。残りの上層にクロロホルム：メタノール：生理食塩水 (86:14:1) を加え、650G、10分間遠心分離し、下層を取得した。再び残りの上層にこの溶液を加え、遠心分離し、下層を取得した。これら3つの下層を混合し、クロロホルム：メタノール：生理食塩水 (3:48:47) 溶液で2回洗浄した。その後、ロータリーエバポレーターにて溶媒を減圧乾固して総脂質を精秤し、脂質20mgに対して1mlのクロロホルムを添加した。これを脂質分析用のサンプルとした。

脂質分析用サンプルから $10\mu\text{l}$ 分取し、1.5%トリトンX100溶液0.5mlを加え、気体窒素にて溶媒を除去した。蒸留水 $10\mu\text{l}$ を加え、血清分析で使用し

たキットと同様のキットを用いて TC と TG を測定した。

3) 糞

糞は重量、水分量、総胆汁酸 (TBA) を測定した。TBA の測定には総胆汁酸-テストワコー (和光純薬社) のキットを使用した。

水分量は本飼育14日目および28日目の糞を 105°C の乾燥法により測定した。

TBA は本飼育14日目および28日目の糞を測定した。糞を秤量し、粉碎した糞10mgに対し、90%エタノール0.2mlを添加し、懸濁して恒温水槽 65°C で1時間抽出後、10,000G、5分間で遠心分離し、上清を取得した。残った沈殿物には90%エタノール0.1mlを加えて洗浄し、遠心分離後、上清を取得した。これら2つの上清を混合し、 75°C 、4時間加熱し、溶媒を除去した。その後、残渣に90%エタノール0.5mlを加え、 75°C 、30分間加温して溶解し、TBA を測定した。

4) 肝臓酵素の発現検索

肝臓中に発現するコレステロール合成系のキーエンザイムである HMG-CoA reductase, コレステロールから胆汁酸を合成する異化系のキーエンザイムである Cholesterol-7 α -hydroxylase, および内在性因子の GAPDH の発現を RT-PCR 法^{9~11)}により検討した。

100mgの肝臓に Trizol 液1mlを添加し、ポリトロンにより破碎、肝臓細胞懸濁液とした¹²⁾。これにクロロホルム0.2mlを添加し激しく攪拌後、室温で2分間変性処理した。その後12,000G、15分間 4°C で遠心分離を行い、上清を取得した。取得後0.5mlのイソプロパノールを添加し攪拌後、室温で10分間静置した。その後12,000G、10分間 4°C で遠心分離し、沈殿物を取得した。沈殿物に1mlのエタノールを添加し、12,000G、10分間 4°C で遠心分離し沈殿物を取得した。沈殿物を乾燥させ、 $50\mu\text{l}$ の RNAase Free 水に溶解し、totalRNA 溶液とした。この溶液を10倍に希釈して OD₂₆₀ および OD₂₈₀ を測定し、RNA 量を算出した。

totalRNA として $1\mu\text{g}$ 分の溶液を取得し、これに $250\text{ng}/\mu\text{l}$ の Random Primer を $1\mu\text{l}$ 、2.5mMの

dNTP mix を $4\mu\text{l}$, および RNAase Free 水を加えて $13\mu\text{l}$ とした。この溶液を 65°C で 5 分間恒温後、水中で 1 分間処理した。その後、逆転写用 buffer を $4\mu\text{l}$, 0.1M の DTT 溶液を $1\mu\text{l}$, $10\text{units}/\mu\text{l}$ の RNase OUT を $1\mu\text{l}$, Super Script III 逆転写酵素を $1\mu\text{l}$, 添加した。添加後 25°C で 5 分間、続いて 50°C で 60 分間、 70°C で 15 分間逆転写処理を行い、cDNA を作製した。処理後 RNA を分解するために RNase H を $1\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 20 分間 RNA 分解処理を行い、cDNA を取得した。

$1\mu\text{l}$ の cDNA, $0.5\mu\text{l}$ の ExTaq, 各 $1\mu\text{l}$ のプライマー, $4\mu\text{l}$ の dNTP, $5\mu\text{l}$ の ExTaq buff., $37.5\mu\text{l}$ の dw, を混合し計 $50\mu\text{l}$ とした。これを GenAmp9700 (Applied Biosystems 社) により、 94°C 30 秒, 45°C 30 秒, 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 25 サイクルの PCR を行った。

プライマーは HMG-CoA reductase 用として, TAAAGGAGGCCTTTGATAGC および CACGTTTCCTATCTCTATCG を, Cholesterol-7 α -hydroxylase 用として, CTGATGGGGAAATATGTCCA および TAGACGGATCAGTTCAGAGA を, GAPDH 用として, TTAGCCCCCCTGGCCAAGGT および TCCTTGCTGGGGTGGGTGGT を使用した。

PCR により増幅された遺伝子量をキャピラリー電気泳動 - 蛍光分析装置 (Agilent 2100, DNA 7500 Assay, Agilent 社) を用いて分析を行った。

5) 統計学的処理

得られた実験結果は全て、平均値 \pm 標準偏差で示した。コントロール群と QPro 食餌投与群とで Stat View を用いて有意差検定を行った。検定は Fisher の PLSD 法により判定した。

結 果

1. 成長状態

図 1 に本飼育 28 日目の最終体重増加量, 図 2 に本飼育期間 28 日間での食餌摂取量を示した。最終体重増加量は各群とも約 $11\sim 12\text{g}$ で有意差を認めなかった。また、食餌摂取量は各群とも約 $180\sim 190\text{g}$ で有意差を認めなかった。

2. 血清

図 3 に本飼育 28 日間での 7 日おきの血清 TC 濃度, 図 4 ~ 7 に本飼育 28 日目の血清 TG 濃度, PL 濃度, HDL-C 濃度, HDL-C/TC 比を示した。

血清 TC は, 7 ~ 28 日間すべてコントロール群に比べて QPro 食餌投与群で有意に低値を示した。血清 TG は QPro 食餌投与群はコントロール群に比べて有意な差を認めなかった。血清 PL, HDL-C とともに QPro 食餌投与群はコントロール群に比べて有意な差を認めなかったがわずかに低値を示した。血清 HDL-C/TC 比は, コントロール群に比べて QPro 2.5% 群で有意に増加し, QPro 5.0% 群においても有意差を認めなかったが増加傾向にあった。

3. 肝臓脂質

図 8 に体重当たりの肝重量, 図 9 ~ 10 に肝臓 1 g 当たりの TC 濃度および TG 濃度を示した。

体重当たりの肝重量は, コントロール群に比べて QPro 食餌投与群で低値を示し, 特に QPro 5.0% 群では有意に低値を示した。肝臓 1 g 当たりの TC 濃度および TG 濃度は, コントロール群に比べて QPro 食餌投与群で低値を示した。特に TC 濃度において, QPro 5.0% 群で有意に低値を示した。

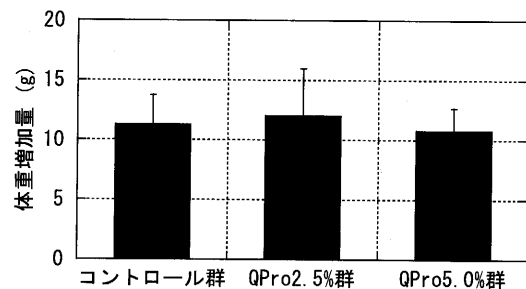


図 1 28 日目の最終体重増加量

n=6 mean \pm SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

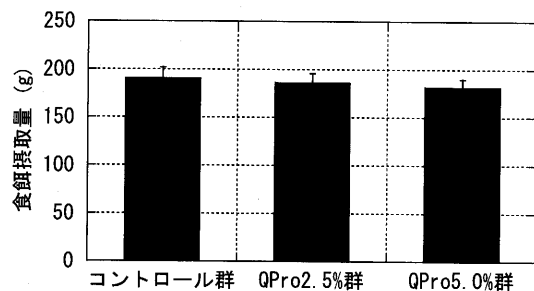


図 2 28 日間の食餌摂取量

n=6 mean \pm SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

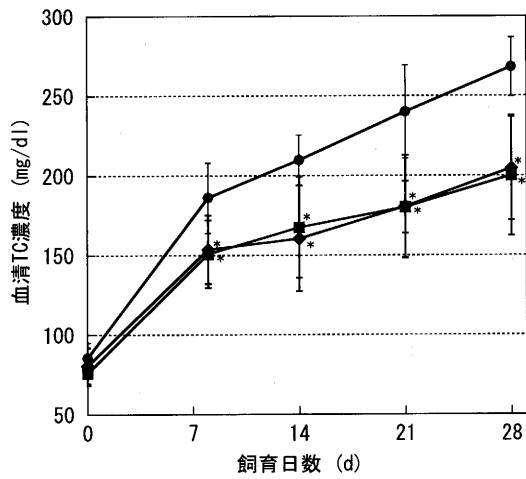


図3 QPro 食餌投与による血清 TC 濃度の変化
 ●コントロール群, ■QPro 2.5%群, ◆QPro 5.0%群
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

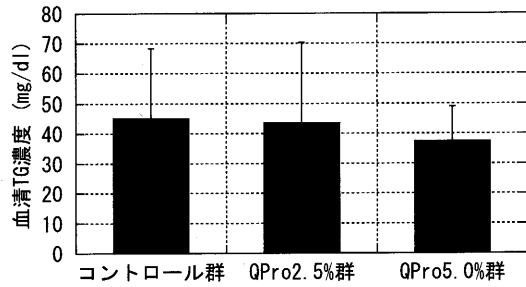


図4 QPro 食餌投与による血清 TG 濃度の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

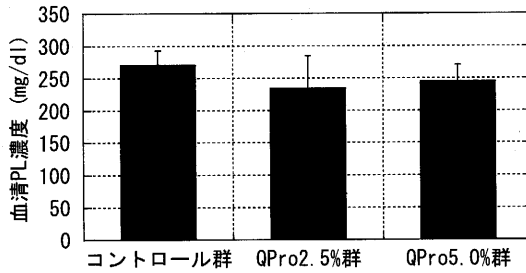


図5 QPro 食餌投与による血清 PL 濃度の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

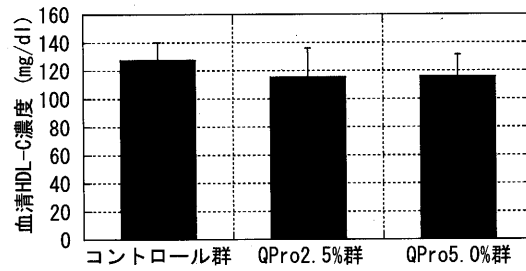


図6 QPro 食餌投与による血清 HDL-C 濃度の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

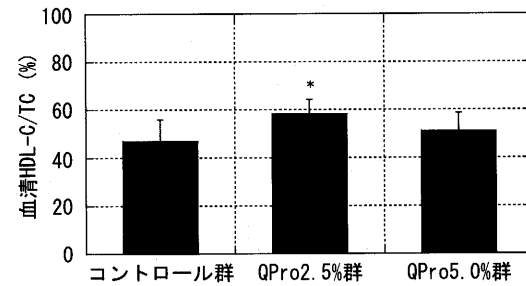


図7 QPro 食餌投与による血清 HDL-C/TC 比の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

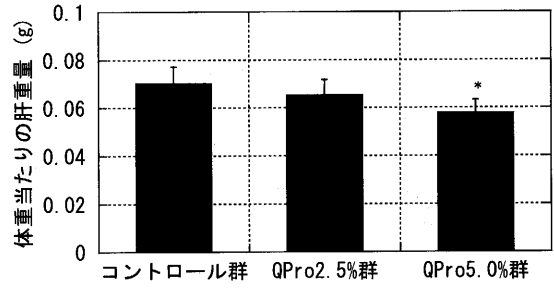


図8 QPro 食餌投与による体重当たりの肝重量の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

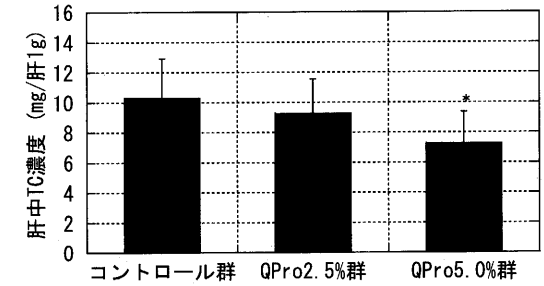


図9 QPro 食餌投与による肝臓 1g 当たりの TC 濃度の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

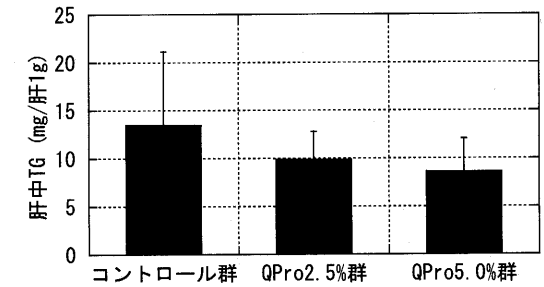


図10 QPro 食餌投与による肝臓 1g 当たりの TG 濃度の変化
 n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

4. 糞

図11に本飼育14日目および28日目に採取した糞の固形分重量, 図12に本飼育14日目および28日目に採取した糞中の TBA 濃度を示した。

糞固形分重量は, 14日目ではコントロール群と比べて QPro 食餌投与群で有意差はないが, わずかに減少傾向にあった。また, 28日目ではコントロール群と比べて QPro 2.5%群において有意に低値を示し, QPro 5.0%群において有意差はないが増加傾向にあった。糞中 TBA 濃度は, 14日目ではコントロール群と比べて QPro 食餌投与群で有意差はないが増加傾向にあった。また, 28日目ではコントロール群と比べて QPro 食餌投与群において有意に低値を示した。

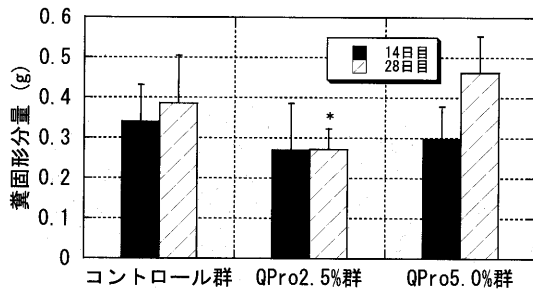


図11 QPro 食餌投与による14日目および28日目の糞固形分量の変化

n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

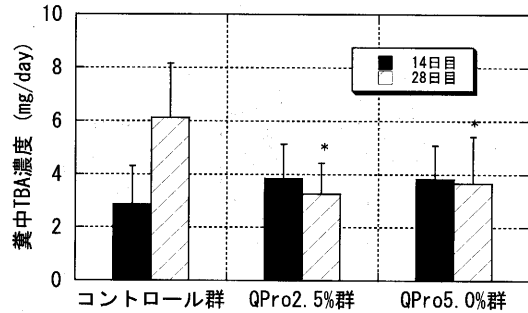


図12 QPro 食餌投与による14日目および28日目の糞中TBA濃度の変化

n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

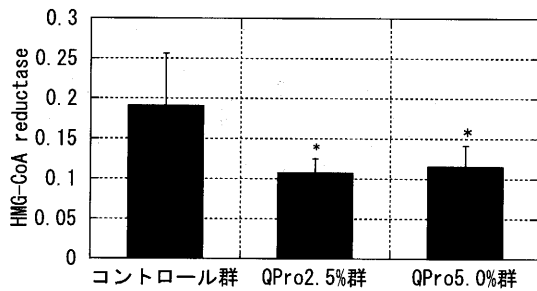


図13 QPro 食餌投与による肝臓中のHMG-CoA reductaseの発現量の変化

n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

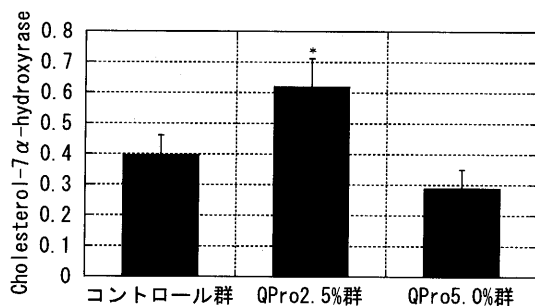


図14 QPro 食餌投与による肝臓中のCholesterol-7α-hydroxylaseの発現量の変化

n=6 mean±SD *コントロール群と有意差があった群 (P<0.05)

5. 肝臓酵素の発現検索

図13にコレステロール合成系のキーエンザイムであるHMG-CoA reductaseの発現量, 図14にコレステロールから胆汁酸を合成する異化系のキーエンザイムであるCholesterol-7α-hydroxylaseを内在性因子のGPDHの発現との相対量として示した。

HMG-CoA reductaseの発現量は, コントロール群に比べてQPro食餌投与群で有意に低値を示した。また, Cholesterol-7α-hydroxylaseの発現量は, コントロール群に比べてQPro 2.5%群で有意に増加した。

考 察

体重増加量および食餌摂取量において, コントロール群とQPro食餌投与群とで有意差を認めなかったことから, QProを食餌に混合させたことによる成長におよぼす影響はなかったと推察できる。また, マウスへのQPro食餌投与により, 血清および肝臓TCの濃度が有意に低値を示し, 血清HDL-C/TC比においては有意に高値を示した。食品素材中の蛋白質によるコレステロール値上昇抑制の作用機序として, 1) 糞中への胆汁酸排泄^{13~15)}, 2) 胆汁酸と結合し, コレステロールのミセル可溶化を抑制¹³⁾, 3) 肝臓中のCholesterol-7α-hydroxylaseの発現促進^{16~17)}, 4) 肝臓中のHMG-CoA reductaseの発現抑制¹⁷⁾が挙げられる。

QPro投与によるコレステロール値上昇抑制の作用機序は明確ではない。

本実験においては, 糞中のTBA濃度がQPro食餌投与群で本飼育14日目に高値を示した。また, 肝臓中のコレステロール合成系のキーエンザイムのHMG-CoA reductaseの発現がQPro食餌投与群で有意に低値を示し, 肝臓中のコレステロールから胆汁酸を合成する異化系のキーエンザイムのCholesterol-7α-hydroxylaseの発現がQPro 2.5%群で有意に高値を示した。これらのことから, QPro投与によるコレステロール値上昇抑制の作用機序は, 糞中への胆汁酸排泄の促進および肝臓中のコレステロール合成系の酵素の発現抑制であると推察する。

しかし、糞中のTBA濃度がQPro食餌投与群で本飼育28日目に低値を示したことおよび、Cholesterol-7 α -hydroxyraseの発現がQPro 5.0%群で低値を示したことは、肝臓中のTC濃度が減少したため相対的に胆汁酸の必要量も減少し、コレステロールから胆汁酸への異化系酵素が減少して、その結果、糞中への胆汁酸排泄量も減少したと推察した。また、コントロール群の糞中のTBA濃度が14日目に比べ、28日目で約2倍の数値を示したことは、内在コレステロールの増加により胆汁酸の必要量が増加し、コレステロールから胆汁酸の異化が促進された。しかし、胆汁酸は生体内で一定量に保つように維持されているため、過剰な胆汁酸が糞中に排泄されたと推察した。

今後、コレステロールを負荷しないQPro食餌をマウスに経口投与し、コレステロール上昇抑制効果の検討を行うことにより、QProの体内コレステロールに関する作用機序がより明らかになると考えられる。他の穀類同様に、コレステロール上昇抑制を有する食品素材として、キノア蛋白質の新たな活用法が見出され、キノア蛋白質の需要が増えることが期待される。

要 約

キノアより蛋白質画分(QPro)を取得した。マウスに0.5%コレステロールを含む食餌を基本とし、これにQProを0%(コントロール群)、2.5%および5.0%添加(QPro添加群)して4週間経口投与した。QPro添加群とコントロール群間で食事摂取量、体重増加に有意差を認めなかった。QPro添加群では血清と肝臓の総コレステロールの上昇を有意に抑制した。QPro添加群の糞中胆汁酸量は14日目でコントロール群に比べ増加した。肝臓におけるHMG-CoA reductaseの発現は、コントロール群に比べQPro添加群で有意に減少した。

これらの結果より、キノア蛋白質画分の血清および肝臓コレステロールの上昇抑制作用は、糞中への胆汁酸排泄の促進およびコレステロール合成系酵素の抑制にあると推察した。

参 考 文 献

- 1) Weber, J. E.: *Nature*, **272**, 486 (1978)
- 2) 高尾哲也: 食の科学, **253**, 57-58 (1999)
- 3) 藤倉雄司・本江昭夫・山本紀夫: 農耕の技術と文化, **26**, 25-52 (2003)
- 4) 光永俊郎: 食品と科学, **42**, 77-84 (2000)
- 5) 高尾哲也: 食の科学, **253**, 55-56 (1999)
- 6) Y. Konishi et al.: *HYDROCOLLOIDS-PART2*, 417-422 (2000)
- 7) 福島男児: 食の科学, **283**, 52-56 (2001)
- 8) Kayashita, J., Shimaoka, I., Nakajyoh, M.: *Nutr. Res.*, **15**, 691-698 (1995)
- 9) Kotewicz, M.L. et al.: *Gene*, **35**, 249 (1985)
- 10) Gerard, G.F. et al.: *DNA*, **5**, 271 (1986)
- 11) Houts, G.E. et al.: *J. Virol.*, **29**, 517 (1979)
- 12) Chomczynski, P., and Sacchi, N.: *Anal. Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 13) 長岡利: 日本栄養・食糧学会誌, **49**, 303-313 (1996)
- 14) Masako Masuo: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **46**, 30-33 (2000)
- 15) Satoshi Nagaoka et al.: *The Journal of Nutrition*, **129**, 1725-1730 (1999)
- 16) 佐伯茂・金東浩: 日本農芸科学学会誌, **77**, 1120-1123 (2003)
- 17) 板倉弘重: 食品成分シリーズ 脂質の科学, 53-58 (1999)

(ゆはら かな 生活機構研究科生活科学研究専攻2年)
 (つるおか ゆかり 平成15年度生活科学科卒業生)
 (すだ さおり 平成15年度生活科学科卒業生)
 (わたなべ なかみち 生活科学科)
 (なかつがわ けんいち 生活機構研究科)
 (たかお てつや 生活機構研究科)