

大豆たん白質に含まれるセレンの 栄養有効性と化学形態

NUTRITIONAL EFFICIENCY AND CHEMICAL FORM OF
SELENIUM, AN ESSENTIAL TRACE ELEMENT, CONTAINED
IN SOYBEAN PROTEIN

安本教傳¹⁾・岩見公和²⁾・吉田宗弘³⁾

¹⁾京都大学食糧科学研究所, ²⁾京都大学農学部,

³⁾関西医科大学

Kyoden YASUMOTO, ¹⁾ Kimikazu IWAMI, ²⁾ and Munehiro YOSHIDA ³⁾
Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611, ¹⁾
Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606, ²⁾
Kansai Medical College, Moriguchi 570. ³⁾

ABSTRACT

Selenium content of milk casein, soybean meal, soybean protein concentrate, and soybean protein isolate ("Fujipro-R") was determined by a fluorometric method, and its nutritional efficiency was assayed by feeding weanling rats the diet containing either one of these materials at 15% protein level. The selenium content on dry weight basis ranged between 0.3 and 0.6 μg per g protein. Nutritional availability of selenium, as assessed by measuring the dietary intake and fecal output and by correcting for the metabolic obligatory fecal loss, ranged between 75 and 88%. The hepatic selenium level and glutathione peroxidase activity were found closely associated with the amount of nutritionally available selenium in the diet. Pepsin and pancreatin digestion of milk casein and soybean protein isolate was accompanied by a concomitant liberation of dialyzable selenium. Pronase digestion of pepsin- and pancreatin digests of these two proteins gave rise to selenium-containing substances which located on paper partition chromatography at the same positions where selenocystine (or selenotrisulfide) and selenomethionine located, respectively. These results indicate that selenium of soybean proteins occurs largely in the form of selenomethionine bound to proteins and its nutritional efficiency is slightly lower than that of milk casein.

セレン (Se) は動物にとって必須の微量元素である^{1,2)}。最近、中国の風土病として知られていた克山病が Se 欠乏症であることが指摘され^{3,4)}、栄養素としての Se が注目を集めている。Se の生体における機能の大部分は含 Se 酵素 glutathione peroxidase (GSH-Px) の作用として説明することができる^{5,6)}。われわれは日本人が 1 人 1 日約 200 μg の Se を摂取していることを報告したが⁷⁾、これは米国 NAS が定めた Se の所要量暫定値⁸⁾を十分満足させるものであった。しかしながら、食品中の Se は主としてたん白質画分に存在するが、その化学形態は一樣でなく^{9,10)}、従って栄養有効性にも差異のあることが知られている^{11~14)}。近

年、植物たん白質は食品工業の多くの分野で改良・増量剤として利用され、またそれ自体を主原料とする食品の開発も進められている。本研究は植物たん白質(とくに大豆たん白質)中の Se の栄養有効性について検討を加えたものである。

実 験 方 法

1. 実験動物および飼育条件

体重 50~60g の Wistar 系雄ラットに Table 1 に示した組成の飼料を与え、自然採光下で 3 週間飼育した。飲料水 (脱イオン水) は全群ラットとも自由に与えた。飼育開始後 12 日目より 6 日間にわたって糞を集め、糞

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredients	A	B	C	D	E
Protein source	16.5 ^a	30.6 ^b	24.9 ^c	17.6 ^d	16.5 ^e
Potato starch	53.5	40.3	45.1	52.4	53.5
Sucrose	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Soybean oil	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Salt mixture ^f	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture ^g	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	2.0 ^a	1.1	2.0	2.0	2.0
Se ($\mu\text{g/g}$)	0.05	0.09	0.09	0.07	0.15

a,e: Vitamin-free casein, 91.2% protein.

b: Soybean meal, 49.0% protein, autoclaved at 120°C for 30 min.

c: Soybean protein concentrate, 60.3% protein.

d: Soybean protein isolate ("Fujipro-R"), 85.3% protein.

e: Supplemented with 0.1 μg Se/g diet as sodium selenite.

f: Harper's salt mixture type B.

g: Obtained from Oriental Yeast Co.

中 Se 排泄量を測定した。一方、A 飼料 (カゼイン食) 群ラットの半数には飼育開始後12日目より無たん白質飼料を与え、腸腔内の食物由来の Se がほぼ排泄されたと考えられる15日目以降の糞中 Se 量を求め、これを“代謝性 Se”量とした。

2. 食品たん白質の人工消化

30 g のミルクカゼイン (MC) または分離大豆たん白質 ("フジプロ R", SPI) を 1 g の pepsin とともに 500 ml の 0.1N HCl 中に懸濁し、37°C にて 24 時間消化させた。消化終了後、2 N NaOH を用いて pH を 7.5 に調整し、3 g の pancreatin を加えてさらに 24 時間消化を行った。

Pepsin および pancreatin 消化終了後、消化物 5 ml を 0.1M NaCl と平衡化した Sephadex G-25 カラム (2.5 ϕ × 100cm) にアブライシ、標準ペプチドの溶出位

置との比較によって、溶出液を分子量 3,000 以上の画分、分子量 3,000~500 の画分および分子量 500 以下の画分に分離した。

一方これとは別に、20ml の pepsin-pancreatin 消化物を 40mg の pronase E と混合し、37°C にて 20 時間酵素加水分解を行った。

3. 測定法

(1) GSH-Px 活性: *tert*-butylhydroperoxide, NADPH, glutathione および glutathione reductase を用いて、Little らの方法¹⁵⁾ に従って測定し、単位時間当たりの NADPH 消費量 ($\mu\text{mol/min}$) として表示した。

(2) Se: 試料を硝酸-過塩素酸混液で湿式灰化した後、2,3-diaminonaphthalene を作用させて生ずる 4,5-benzpiaselenol の蛍光強度を測定する Watkinson

Table 2. Selenium intake, body weight gain and liver wet weight of rats pair-fed different diets for three weeks

Diets	Selenium intake (μg)	Body weight gain (g)	Liver weight (g)
A	9.8	83.7 $\pm$ 8.7 ^b	5.6 $\pm$ 0.5 ^b
B	16.5	40.8 $\pm$ 5.2 ^a	3.6 $\pm$ 0.4 ^a
C	17.2	50.3 $\pm$ 5.9 ^a	3.9 $\pm$ 0.3 ^a
D	12.1	46.0 $\pm$ 5.6 ^a	3.7 $\pm$ 0.4 ^a
E	29.1	87.8 $\pm$ 6.6 ^b	6.0 $\pm$ 0.8 ^b

Values (means $\pm$ SD for four rats) not sharing a common superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$

Table 3. Availability of dietary selenium at gastrointestinal level in rats

Diets	Dietary intake ($\mu\text{g Se/day/rat}$)	Fecal excretion ($\mu\text{g Se/day/rat}$)	Availability (%)
A	0.51 ± 0.01	$0.10 \pm 0.02(0.06)$	88.2 ± 2.8^b
B	0.85 ± 0.01	$0.21 \pm 0.03(0.17)$	80.0 ± 3.9^{ab}
C	0.88 ± 0.02	$0.26 \pm 0.03(0.22)$	75.0 ± 2.7^a
D	0.63 ± 0.04	$0.19 \pm 0.01(0.15)$	76.0 ± 2.0^a
E	1.51 ± 0.01	$0.25 \pm 0.01(0.21)$	86.1 ± 2.9^b

The data were obtained with the same animals in Table 2. Values given in parentheses represent the true fecal excretion of selenium corrected for metabolic, obligatory fecal loss, $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g Se/day}$. Availability was calculated as follows: availability = [Se intake - (fecal Se - obligatory Se)] / Se intake $\times 100$. Values (means $\pm$ SD for four rats) not sharing a common superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

法¹⁶⁾に従って求めた。

(3)たん白質: Lowry 法¹⁷⁾の Miller 変法¹⁸⁾によった。
ただし、飼料中のたん白質量は Kjeldahl 窒素に係数
(6.25) を乗じて求めた。

実 験 結 果

1. 飼料の Se 含量

ミルクカゼイン (MC), 大豆フレーク, 大豆濃縮たん白質, 分離大豆たん白質 (SPI) の Se 含量はおおの0.31, 0.28, 0.26, $0.38 \mu\text{g/g}$ であった。飼料中の他の成分には有意量の Se を検出することはできなかった。従って, 本実験に用いた A~E の各飼料に含まれる Se の大部分はたん白質源に由来するものとみなすことができた。

2. 実験動物の Se 摂取と育成

各群ラットが飼育期間中に摂取した Se 量, 体重増

加分および肝湿重量を Table 2 に示した。A, E 飼料群ラットへの給餌量は並行摂取法によって B, C, D 飼料群ラットの摂食量に合わせたので, 制限食となった。各群ラットの体重増加分は Se 摂取量とは関係なく, たん白価の高い飼料ほど大であった。15%カゼイン食に Se を補足した飼料 E と補足しなかった飼料 A の間には, ラットの体重増加分, 肝湿重量について何らの有意差を認めなかった。

3. 飼料に含まれる Se の消化吸収率

Table 3 は飼育開始後12日目から17日目までの6日間の各群ラットの Se 摂取量と, 糞中への Se 排泄量および“代謝性 Se”量との差から各飼料に含まれる Se の消化吸収率を求めたものである。無たん白質食投与後3日目以降の糞中 Se 排泄量, すなわち“代謝性 Se”量は $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g Se/day}$ (4 匹の平均値 $\pm$ SD) であった。Table 3 の括弧内の数値はみかけの糞中 Se 排

Table 4. Glutathione peroxidase activity and selenium content in livers of rats fed different diets

Diets	Glutathione peroxidase activity (unit/mg protein)	Selenium content ($\mu\text{g/g}$ tissue)
A	0.17 ± 0.03^a	0.16 ± 0.01^a
B	0.40 ± 0.10^b	0.23 ± 0.04^b
C	0.47 ± 0.06^b	0.23 ± 0.03^b
D	0.22 ± 0.10^a	0.16 ± 0.01^a
E	0.96 ± 0.16^c	0.35 ± 0.04^c

The feeding condition was the same as in Tables 2 and 3. Values (means $\pm$ SD for four rats) not sharing a common superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

泄量から“代謝性 Se”量を差し引いたもので、消化管から吸収されなかった“食物 Se”量を表している。各飼料に含まれる Se の消化吸収率は、MC およびこれに亜セレン酸を補足した飼料でほぼ90%に近く、精製度合の異なる大豆たん白質を用いた飼料でも70~80%に達した。

4. 肝の GSH-Px 活性

他方、肝における GSH-Px 活性の比較から (Table 4), 投与各飼料中の Se の栄養有効性を調べてみると, SPI 食群の活性レベルがやや低く, SPI を唯一のたん白質源として与え続けた場合, 軽度な Se 欠乏 (GSH-Px の活性低下) の起こる可能性のあることが示唆された。

5. MC および SPI に結合した Se の消化性と化学形態

本実験に用いた MC や SPI を生理食塩水に対して透析してもこれら食品たん白質の Se 含量に有意の変化は認められなかった。Fig. 1 は pepsin 消化を透析しながら実施した時, 透析内液に残存する Se およびたん白質量から求めた透析可能な Se 量の増加とたん白質消化率の経時的变化を示したものである。図からも明らかなように, MC および SPI に含まれる Se の半分以上が pepsin 消化開始 8 時間後には透析可能となっていた。また透析可能な Se の増加はたん白質の消化にほぼ並行していた。

Pepsin 消化に続いて pancreatin 消化を行うと, これらの食品たん白質中の Se の 9 割以上が透析可能となっていた (データ略)。Table 5 は pepsin-pancreatin 消化物の Sephadex G-25 カラムによる分画中に含まれる Se および総アミノ酸残基量を示したものである。6~7 割の Se が分子量 500 以下の画分に回収された。また, Se と総アミノ酸残基量の分布状況は, MC, SPI 間で大差はなかった。

アミノ酸分析によって MC および SPI のプロナーゼ水解物は 9 割以上が遊離のアミノ酸から成っていることが確認された。このプロナーゼ水解物をペーパークロマトグラフィーにより分画したところ, MC の Se の 72% は Rf 値 0.1~0.2 の画分に回収され, また SPI の Se の 86% は Rf 値 0.5~0.6 の画分に回収された。一方, 同じ溶媒系で Se 化合物のペーパークロマトグラフィーを実施したところ, Rf 値 0.1~0.2 の画分に Se が回収されたのは selenocystine の場合と亜セレン酸と cysteine をモル比 1:4 で混合した場合であり, Rf 値 0.5~0.6 の画分に Se が回収されたのは selenomethionine の場合であった。

考 察

食品を含めた生物体試料中の Se の化学形態が一様でないことは古くから指摘されていた。Se を高濃度に

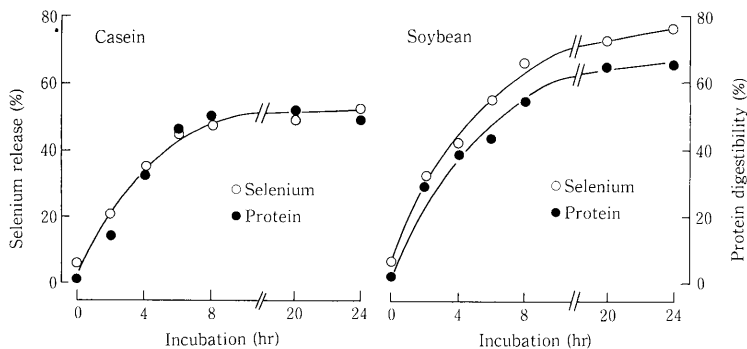


Fig. 1 Time-course of protein digestion and selenium release during pepsin treatment of milk casein and soybean protein isolate.

The pepsin digestion was allowed to proceed within a cellophane tube so that the digestion products could be continually removed. Aliquots of the tube content were withdrawn at intervals for the determination of remaining protein and selenium and for the calculation of the degree of protein digestion and selenium liberation.

Table 5. Distribution of selenium and amino acids of pepsin-pancreatin digest among Sephadex G-25 fractions

Molecular weight ^a	Selenium content ^b		Amino acid content ^c	
	Casein	Soy protein	Casein	Soy protein
> 3000	0.016	0.014	0.21	0.21
3000 – 500	0.043	0.052	1.54	1.35
< 500	0.090	0.197	3.86	2.80

a: Estimated by comparing elution volume of marker peptides.

b: Expressed as μg per g starting material.

c: Expressed as mmole leucine equivalent per g starting material.

蓄積した植物からは Se-methylseleno-methionine, Se-methylseleno-cysteine 等, 多くの遊離のセレンノアミノ酸が同定されている^{19,20)}。しかし, これらのセレンノアミノ酸は selenomethionine と selenocystine を除いてはたん白質に組み込まれることはなく, 結局, 食品たん白質中に存在していると予想されるのは selenomethionine, selenocystine およびたん白質中の cysteine 残基と亜セレン酸が反応して生じる²¹⁾ cysteine selenotrisulfide の形態である。本研究で得られた結果は, SPI 中の Se が selenomethionine であり, MC に含まれている Se が selenocystine もしくは cysteine selenotrisulfide の形態であることを強く示唆している。植物性たん白質と動物性たん白質とは含まれている Se の形態が異なるという事実はセレンノアミノ酸の生合成と関連しているようで興味深い。

穀類, 豆類中の Se の有効性に関する知見は乏しく, 実験法によって, あるいは用いた実験動物種によって, 異なった成績が得られている。たとえば Lane ら²²⁾ は, 血漿 GSH-Px 活性を有効性判定の指標として, ラットに投与した大豆中の Se が亜セレン酸より有効であると述べている。Gabrielsen and Opstvedt^{23,24)} は, ヒナに与えた大豆および小麦グルテン中の Se の有効性が魚肉中のそれより劣ると述べている。われわれは, 今回の栄養試験で大豆たん白質中の Se の消化吸収率がカゼイン中の Se や遊離亜セレン酸に比べると若干劣っていることを観察した。たん白質中の Se がセレンノアミノ酸としてペプチド鎖中に存在するのであれば, たん白質の腸腔内消化と Se の吸収との間に密接な関係があることになる。“食物 Se”の有効性を評価するにあたって, その存在形態とともに食物自体の, より厳密にはそのたん白質の消化吸収率も考慮する必要がある。

文 献

- 1) Schwartz, K. and Foltz, C.M. (1957): Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292-3293.
- 2) Thompson, J.N. and Scott, M.L. (1969): Role of selenium in the nutrition of the chick. *J. Nutr.*, **97**, 335-342.
- 3) Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences (1979): Observation on effect of sodium selenite in prevention of Keshan disease. *Chinese Med. J.*, **92**, 471-476.
- 4) Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences (1979): Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. *Chinese Med. J.*, **92**, 477-482.
- 5) Flohe', L., Günzler, W.A. and Shock, H.H. (1973): Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Letters*, **32**, 132-133.
- 6) Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973): Selenium: biological role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, **179**, 588-590.
- 7) Yasumoto, K., Iwami, K., Yoshida, M. and Mitsuda, H. (1976): Selenium content of foods and its average daily intake in Japan. *Eiyo To Shokuryo (J. Jpn. Soc. Food Nutr.)*, **29**, 511-515.
- 8) Food and Nutrition Board (1980): Recommended Dietary Allowances, 9th Rev. Ed.

- National Academy of Sciences, Washington, DC.
- 9) Franke, K.W. (1934) : A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food-stuffs. II. The occurrence of the toxicant in the protein fraction. *J. Nutr.*, **8**, 609-613.
 - 10) Underwood, E.J. (1977) : Trace element in human and animal nutrition, 4th Ed., Academic Press, New York, pp 302-346.
 - 11) Yoshida, M., Yasumoto, K., Iwami, K. and Tashiro, H. (1981) : Distribution of selenium in bovine milk and selenium-deficiency in rats fed casein-based diets, monitored by lipid peroxide level and glutathione peroxidase activity. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1681-1688.
 - 12) Schwartz, K. and Foltz, C.M. (1958) : Factor 3 activity of selenium compounds. *J. Biol. Chem.*, **233**, 245-251.
 - 13) Mathias, M.M., Hogue, E.E. and Loosli, J.K. (1967) : Biological value of selenium in bovine milk for rat and chick. *J. Nutr.*, **93**, 14-20.
 - 14) Cantor, A.H., Scott, M.L. and Noguchi, T. (1975) : Biological availability of selenium in feedstuffs and selenium compounds for prevention of exudative diathesis in chicks. *J. Nutr.*, **105**, 96-105.
 - 15) Little, C., Olinescue, R., Reid, K.C. and O'Brien, P.J. (1970) : Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632-3636.
 - 16) Watkinson, J.H. (1966) : Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene. *Anal. Chem.*, **38**, 92-97.
 - 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 - 18) Miller, G.L. (1959) : Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.*, **31**, 964.
 - 19) Trelease, S.F., DiSomma, A.A. and Jacobs, A. L. (1960) : Seleno-amino acid found in *Astragalus bisulcatus*. *Science*, **132**, 618.
 - 20) Shrift, A. and Virupaksha, T.K. (1965) : Seleno-amino acids in selenium-accumulating plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 65-75.
 - 21) Ganther, H.E. (1968) : Selenotrisulfide. Formation by reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, **7**, 2898-2905.
 - 22) Lane, H.E., Shirley, R.L. and Cerda, J.J. (1979) : Glutathione peroxidase activity in intestinal and liver tissues of rats fed various levels of selenium, sulfur and α -tocopherol. *J. Nutr.*, **109**, 444-452.
 - 23) Gabrielsen, B.O. and Opstvedt, J. (1980) : A biological assay for determination of availability of selenium for restoring blood plasma glutathione peroxidase activity in selenium-depleted chicks. *J. Nutr.*, **110**, 1089-1095.
 - 24) Gabrielsen, B.O. and Opstvedt, J. (1980) : Availability of selenium in fish meal in comparison with soybean meal, corn gluten meal and selenomethionine relative to selenium in sodium selenite for restoring glutathione peroxidase activity in selenium-depleted chicks. *J. Nutr.*, **110**, 1096-1100.