

メチオニンを共有結合状に補足した 大豆たん白質の構造と栄養特性

STRUCTURE AND NUTRITIONAL PRORERTY OF SOY PROTEIN
WITH COVALENTLY SUPPLEMENTED METHIONINE

荒井 綜一 (東京大学農学部)

Soichi ARAI

Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113

ABSTRACT

L-Methionine was covalently attached to a soy protein isolate (SPI) by modification with papain under the conditions we reported previously [*J. Agric. Food Chem. (USA)*, 27,52 (1979)]. The three kinds of enzymatically modified proteins, EMP₄, EMP₇, and EMP₁₁ which attached methionine at 3.9%, 6.8% and 10.7% levels, respectively were obtained. Any of these products had a molecular weight of approximately 2,000~13,000 daltons, with a polymerized methionine sequence at the C-terminal. EMP₁₁, for example, was found to have a methionine tetramer at the C-terminal. Feeding tests with rats demonstrated that the methionine tetramer attached covalently to EMP₁₁ was as bioavailable as free methionine, whereas a synthesized methionine polymer with a degree of polymerization of 4~6, when formulated non-covalently in SPI, was less bioavailable. The significance of covalently attaching methionine to SPI is discussed from a food and nutritional point of view.

たん白質にメチオニンを強化する際、通常は遊離型メチオニンを使用する。これに対して、筆者ら¹⁾が開発した酵素修飾法を使用すると、たん白質にメチオニンを共有結合状に導入することができ、しかもその導入量がほぼ期待どおりに調節された酵素修飾たん白質 (enzymatically modified protein に因んで EMP と記す) を収率よく得ることができる。

筆者らの最近の報告²⁾によれば、分離大豆たん白質 (SPI) から得られた EMP で、メチオニン含量が10.7%のもの (EMP₁₁と記す) を SPI に配合すると、PER の顕著な向上をもたらすことから、この種の EMP をたん白質の強化剤として使用しようとしている。

今回は、メチオニン含量3.9%、6.8%、10.7%の3種の EMP (それぞれ EMP₄、EMP₇、EMP₁₁と記す) につき、導入されたメチオニンの位置、状態を明らかにするとともに、このようなメチオニンの生体 (ラッ

ト) 利用性を検討した。

実 験 方 法

1. 酵素修飾たん白質の調製

原料として SPI (フジプロ R) を用い、パパイン触媒により、前報¹⁾のごとく処理し、EMP₄、EMP₇、EMP₁₁を調製した。メチオニン以外のアミノ酸のパターンは SPI のそれに近似していた²⁾。

2. 酵素修飾たん白質の構造の検討

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 処理: EMP の平均アミノ酸残基数を求めるため、Haynes ら³⁾の方法に従って TNBS 処理を行った。

ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) 処理: Hill and Smith の方法⁴⁾に準じた。すなわち、15mg の EMP を 5 ml の 0.005 M MgCl₂-0.005 M Tris (pH8.5) に溶解し、LAP (Sigma Chemical Co.) を加えて 40℃ でイン

キュベートした。経時的にサンプリングし、遊離アミノ酸を分析した。

カルボキシペプチダーゼA (CPase A) 処理: Fraenkel-Conrat らの方法⁹⁾に準じた。すなわち、20mgのEMPを2 mlの0.1M Tris-HCl(pH7.5) に溶解し、CPase A(Sigma Chemical Co.)と25°Cでインキュベートした。以後の処理はLAPの場合と同様である。

LiBH₄処理: Chibnall and Rees ⁹⁾が提唱した条件でEMPをLiBH₄で処理し、C末端アミノ酸をアミノールに変換した後、6N HClにて通常条件下で水解し、アミノ酸分析に供した。

BrCN 処理: Corrandin and Harburg の方法⁷⁾に従い、5 mgのEMPを0.5mlの70%ギ酸に溶解し、20mgのBrCNを加え、37°Cで72hr反応を行った。得られたホモセリンラクトンをAmbler and Brownの方法⁸⁾で開環してホモセリンとし、これをアミノ酸分析計で定量した。

3. 飼育試験

EMP₁₁を主試料とした。飼料はHarperの組成⁹⁾に準じて調製した。飼料中のたん白質レベルは10% (窒素レベルで1.6%に調節)とした。最大発育期(約4週齢)のWistar系ラット(雄性)を用い、1群7匹とした。飼料は毎日一定時に与え、自由摂食させた。飼育条件は温度22±1°C、湿度65%、12時間ごとの明暗サイクルとした。飼育は4週間行い、その結果をPERで評価した。なお、対照試料として、SPIのほか、酵素合成のポリメチオニン(重合度4~6のメチオニンオリゴマー混合物)¹⁰⁾、化学合成のジメチオニンおよびトリメチオニンを用いた。

実験結果および考察

1. EMPの平均的構造

TNBS法を用いたアミノ基定量の結果から、EMP₄、EMP₇、EMP₁₁はいずれもアミノ酸残基数が約18から約110までのペプチドの混合物(分子量2,000~12,000ダルトン)であると判定された。

いずれのEMPもLAP処理によりアミノ酸を効率よ

く遊離させたが、メチオニンの遊離率は他のアミノ酸のそれよりも低かった。したがって、EMPのN末端およびその近傍にメチオニンはほとんど存在しないと結論された。

これに対し、EMPをCPase Aで処理した際にはメチオニンは効率よく遊離した。しかもその遊離率はEMPのメチオニン含量と相関し、EMP₁₁ではメチオニンは他のいずれのアミノ酸よりも速く遊離した。このことから、EMPに導入されたメチオニンは、C末端に局在すると推定された。

この推定はLiBH₄処理の結果によっても支持された。すなわち、EMP₁₁のLiBH₄処理生成物の分析により、約1/3のメチオニンが消失(メチオノールへの変換)していた。

次いで各EMPをBrCN処理し、メチオニンからホモセリンへの変換率(%)を求めたところ、EMP₄では12.8%、EMP₇では29.4%、EMP₁₁では45.5%となり、メチオニン導入量の多いEMPほどMet-Met結合の多いことが明らかとなった。

以上を総合すると、たとえばEMP₁₁の平均的構造はFig. 1のようになると考察される。

2. EMPの栄養特性

SPI配合飼料を用いた飼育試験によりPERが約2という成績が得られ、SPIに遊離メチオニンを添加してメチオニン水準を3%とした試料でPERが約3という成績が得られた(Table 1)。これは既報²⁾の結果と一致していた。また、SPIにEMP₁₁を配合し、メチオニン水準を3%とした場合、PERは同じく約3となり、これも既報のとおりであった。

これに対して、SPIにポリメチオニンを配合し、メチオニン水準を3%としたものでは、アミノ酸組成が上記の試料に同等であるにもかかわらず、PERは有意に低かった。しかし、SPIにジメチオニンあるいはトリメチオニンを配合したものでは約3あるいはそれ以上のPERを与えた(Table 1)。

すなわち、SPIに混合されたジメチオニンおよびトリメチオニンのメチオニンは十二分に利用されるが、SPI

Table 1. Protein efficiency ratio of diets containing various types of methionine

Diet and Supplements	Met level (%)	No. of rats	Feeding period (days)	PER
SPI	1.1	7	28	1.71±0.15
SPI+Met	3.0	7	28	2.96±0.12
SPI+Met-Met	3.0	5	10	2.96±0.11
SPI+Met-Met-Met	3.0	5	10	3.21±0.06
SPI+EMP ₁₁	3.0	7	28	2.93±0.04

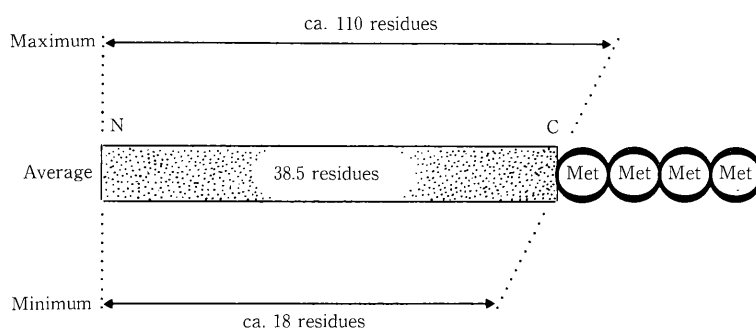


Fig. 1 Schematic representation of predicted structure of EMP₁₁

に混合されたポリメチオニン（重合度4～6）のメチオニンは利用されにくいことが示された。しかし、平均4残基のメチオニン（テトラメチオニン）がC末端にペプチド結合状に導入されているEMP（Fig.1）のメチオニンは十分に利用されるという実験結果（Table 1）から、ほぼ同等の重合度のメチオニンであっても、それが単に混合されているか共有結合されているかにより、生体利用性に大きな差異があることが明らかになった。

文 献

- 1) Yamashita, M., Arai, S., Imaizumi, Y., Amano, Y. and Fujimaki, M. (1979): A one-step process for incorporation of L-methionine into soy protein by treatment with papain. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 52-56.
- 2) Arai, S., Aso, H. and Kimura, H. (1983): An enzymatically modified protein produced with covalent incorporation of L-methionine for use in nutritional improvement of soy protein. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2115-2117.
- 3) Haynes, R., Osuga, D.T. and Feeney, R.E. (1967): Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. *Biochemistry*, **6**, 541-547
- 4) Hill, R.L. and Smith, E.L. (1958): Hydrolysis of mercuri-papain by leucine aminopeptidase without loss of enzymic activity. *J. Biol. Chem.*, **23**, 117-134.
- 5) Fraenkel-Conrat, H., Harris, J.I. and Levy, A.L.: "Methods of Biochemical Analysis" vol. 2, (1955) p. 359.
- 6) Chibnall, A.C. and Rees, M.W. (1958): Studies on the amide and C-terminal residues in proteins. 1. The characterization of the C-terminal residue. *Biochem. J.*, **68**, 105-111
- 7) Corradin, G. and Harburg, H. (1970): Cleavage of cytochrome C with cyanogen bromide. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 489-496.
- 8) Ambler, R.P. and Brown, L.H. (1967): The amino acid sequence of *Pseudomonas fluorescens* azurin. *Biochem. J.*, **104**, 784-825.
- 9) Harper, A.E. (1959): Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, **68**, 405-418.
- 10) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M. (1979): A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: papain-catalyzed polymerization of L-methionine ethyl ester and its regulation by adding a protein substrate. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1069-1074.