

大豆たん白質の管腔内消化の研究(その1)

GASTROINTESTINAL DIGESTION OF SOY BEAN
PROTEIN (PART 1)

岩井和夫・伏木 亨（京都大学農学部）

Kazuo IWAI and Tohru FUSHIKI

Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606

ABSTRACT

Digestion process of soy bean 11S globulin was studied. In order to clear the digestion process of the 11S globulin specifically, the disappearance of its native antigenicity was employed as an indication of denaturation and digestion. The prepared antiserum for soy bean 11S globulin recognized the overall protein molecule and did not react with its each subunit. The antigenic determinants of soy bean 11S globulin were highly sensitive to conformational change in the protein molecule. None of the 11S globulin molecule which has some part of the antigenic determinants was detected by double immunodiffusion technique. The gel filtration of partially heat-denatured 11S globulin indicated that only intact 11S globulin has an antigenic activity. Thus, heat and acid denaturation destroyed the reactivities of all antigenic determinants of a 11S globulin at once. The experiments of protease digestion *in vitro* showed that native 11S globulin was hardly digested by pepsin at pH 2.7 and pancreatin 1:25. And once denatured soybean 11S globulin was rapidly digested by the proteases under the same conditions. These results suggested that the denaturation of native soy bean 11S globulin was a rate-limiting step in overall digestion, and the disappearance of its antigen was a useful indication of the initial process of the digestion.

食品たん白質の消化、吸収過程の解析は、たん白質の栄養を考える上で重要である。しかし、内因性たん白質の存在や、消化と吸収が同時に進行していることなど、解析に困難な点が多く、今日でも、消化過程に関しては一致した理解が得られていない。

われわれは、抗原抗体反応の特異性の高さに着目し、食品たん白質の抗原性の消失を消化の一つの新しい指標として用いてきた¹⁻³⁾。本研究では、大豆たん白質の管腔内における消化を抗原性を指標として解析する目的で、その基礎的な実験としてインタクトな大豆11Sグロブリンの抗原性の消失を、種々の条件で検討した。

方 法

大豆11Sグロブリンは、帝国女子大学、山本淳教授により供与されたグリシニン画分を DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーおよびショ糖密度勾配遠心法によって精製⁴⁾したものをを用いた。精製標品の純度は、SDS ディスク電気泳動上のサブユニット・パターンによって均一であることを確認した。

卵白アルブミン、 α -ラクトアルブミン、ウシ血清アルブミンは、すべてシグマ社製の最高純度のものを用いた。その他の試薬は、半井化学工業およびシグマ社より購入した。

抗体の調製

卵白アルブミン、 α -ラクトアルブミンおよびウシ血清アルブミンに対する抗血清は、これまでにわれわれの研究室で調製してストックしてきたものを用いた。

大豆11Sグロブリンの精製標品10mgを生理食塩水1mlに溶解し、等量のフロイント完全アジュバントと共にウサギ（日本白色種、3～4kg）背皮下に注射した。4週間後、同じく精製11Sグロブリンを、10mgアジュバントなしで追加し、10日後に採血した。

抗原量の測定

抗原の定量は、一次元免疫拡散法を用いた⁵⁾。抗原量は、インタクトな抗原たん白質の重量に換算して表示した。抗原決定基の部分的消失の検討には、二次元免疫拡散法、免疫電気泳動法を用いた⁵⁾。

変性実験

(酸変性実験)各試験たん白質を、酢酸ナトリウムおよび塩酸によって、所定のpHに調整した。これを37°Cで2時間インキュベートした後、リン酸緩衝液中で中和した。(熱変性実験)各たん白質をリン酸緩衝液(0.025M, pH7.2)に溶解し、所定の温度で10分間インキュベートした後、直ちに氷水中で冷却した。大豆11Sグロブリンについては、両変性実験とも、NaClでイオン強度を0.5および0.1にした。たん白質濃度は1mg/mlとした。

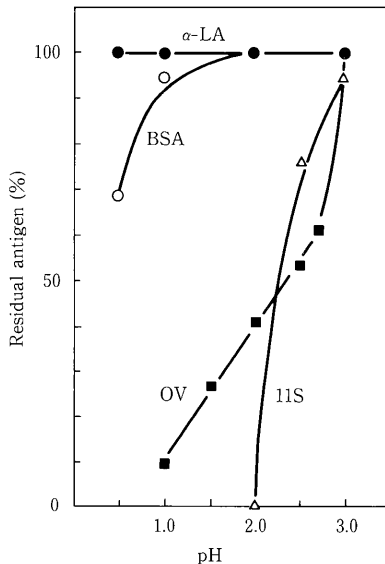


Fig. 1 Acid denaturation of soy bean 11S globulin and some food proteins. One mg per ml of soy bean 11S globulin (Δ), ovalbumin (\blacksquare), α -lactalbumin (\bullet), and bovine serum albumin (BSA, \circ) were incubated in 0.025 M sodium acetate-HCl buffer at 37°C. for 2 hr. Each antigen was determined by single immunodiffusion.

人工消化実験

Akeson and Stahmann⁶⁾の方法を一部変更して使用した。プタペプシンによる消化は、0.4M, pH8.0リン酸緩衝液の添加によって、また、プタパンクレアチンによる消化は、TLCK,TPCKを含むリン酸緩衝液によって反応を停止させ、直ちに液体窒素で凍結保存した。

結果と考察

初めに、大豆11Sグロブリンの抗原決定基の消失が、たん白質の構造変化および消化とどのような関係にあるのかについて検討した。酸および加熱によって、たん白質の構造を変化させ、抗原性の変化を観察した。

酸変性実験

大豆グロブリンの安定性は、イオン強度の影響を受けることが知られている⁷⁾。ここではI=0.1と0.5について検討した。大豆11Sグロブリンは、イオン強度の違いによって、それほど大きな差はみられずpH2.7以下で抗原性の減少を示した。この性質は卵白アルブミンのそれと類似している。一方、 α -ラクトアルブミンやウシ血清アルブミン(BSA)は、酸に対して安定であった(Fig.1)。

熱変性実験

各温度で試料たん白質をインキュベートすると、Fig. 2に示すように、 α -ラクトアルブミンの抗原性のみが

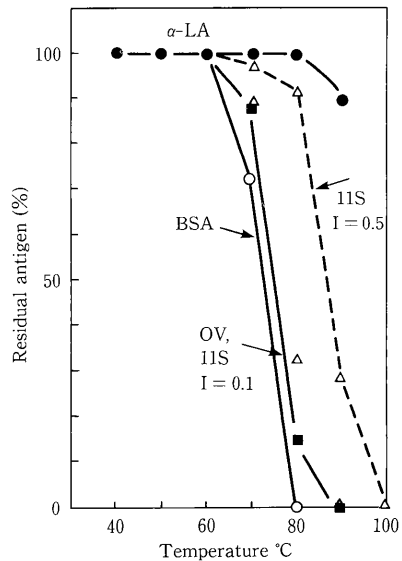


Fig. 2 Heat denaturation of the food proteins. Two mg per ml solutions, soy bean 11S globulin (Δ), ovalbumin (\blacksquare), α -lactalbumin (\bullet) and BSA (\circ), at pH 7.2 were maintained at each temperature for 10 min. Each antigen was determined by single immunodiffusion.

安定であった。11Sグロブリンは、イオン強度0.5の条件で、0.1に比べわずかに安定であった。イオン強度0.1の11Sグロブリンは、卵白アルブミンやBSAと同じく、70°C以上では急激に抗原性を失った。

大豆11Sグロブリンは、加熱や酸変性によってサブユニットがインタクトなままで、そのサブユニット組成の変化した分子が生成することが報告されている⁹⁾。それ故、11Sの変性物の中には、サブユニット組成の変化したものが存在している可能性がある。

そこで加熱変性によって抗原性の約50%を失った大豆11Sグロブリンの標品を、セルロフラインGCL 2000sfでゲル濾過したところ、インタクトな11Sグロブリン分子にのみ、抗原性が検出された。たん白質の凝集したものや、解離したものには、インタクトな11Sグロブリンの抗原性は全く検出されなかった(Fig. 3)。われわれは、これまでの検討で、卵白アルブミン、BSAとも変性によってその抗原決定基の一部のみを失うことはなく、変性によって分子上のすべての抗原決定基が一度に消えてしまうことを認めている⁹⁾。大豆11Sグロブリンに対する抗体を用いた検討から、11Sグロブリン分子の高次構造が抗体に認識されており、個々のサブユニットは、抗体とは反応しないことが示唆された。尿素存在下、メルカプトエタノール添加の条件で、イオン交換カラムによってサブユニットが分離されるが、これらは、抗原性を持たなかった(データは示していない)。

これらの結果から、大豆11Sグロブリンは変性によって、分子上の全抗原決定基を一度に失ってしまうた

め、11Sグロブリンの抗原性の消失は、消化に先立つ変性の過程を反映していると思われる。

人工消化実験

大豆11Sグロブリンの変性過程が、消化過程のなかで律速となっているかどうかを検討した。すなわち、ペプシンおよびパンクレアチンを用いて、人工消化実験を試みた。

ブタペプシンによる消化では、pH1.5の条件で、すべての試験たん白質はすみやかに抗原性を失った。酸に安定な α -ラクトアルブミンおよびBSAは、ペプシンによる切断を受けることにより抗原性が失われるのに対し、卵白アルブミンおよび大豆11Sグロブリンは、ペプシンが存在しなくてもまったく同じ抗原性の減少を示した。すなわち、抗原性の減少は、変性のみによって生じており、ペプシンによる消化は、抗原性の減少に引き続いておこっていることを示唆している。

pH2.7におけるペプシン消化は、Fig.4に示すように、 α -ラクトアルブミンおよびBSAでのみ起こっている。卵白アルブミンおよび大豆11Sグロブリンは、このpHではほとんど変性しないため、ペプシンによる消化が進行しないものと思われる。

たん白質の変性がほとんどおこらない中性の条件でのプロテアーゼ消化では、この現象はさらに顕著であった。 α -ラクトアルブミンに比べ、大豆11Sグロブリンの抗原性は、1:25の濃度のパンクレアチンでは非常にゆっくりとしか減少しなかった(Fig.5)。また、先のペプシンおよびパンクレアチンで消化した大豆11Sグロブリン標品(抗原性は完全に保持されている)

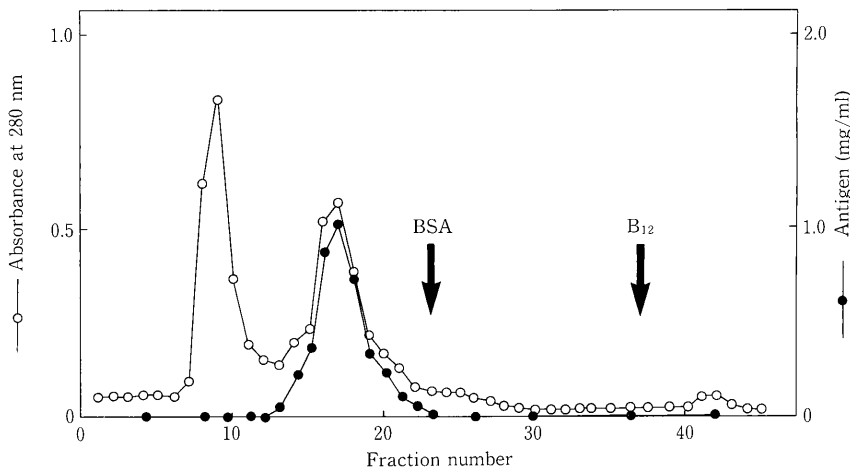


Fig. 3 Gel filtration of partially heat-denatured soy bean 11S globulin on a column of Cellulofine GCL 2000-sf. A 0.5 ml of the denatured protein solution was applied to the column (1.7 × 70 cm) in 0.025 M phosphate buffer containing 0.25 M NaCl (pH 7.2). —○—, absorbance at 280 nm; —●—, soy bean 11S globulin antigenicity.

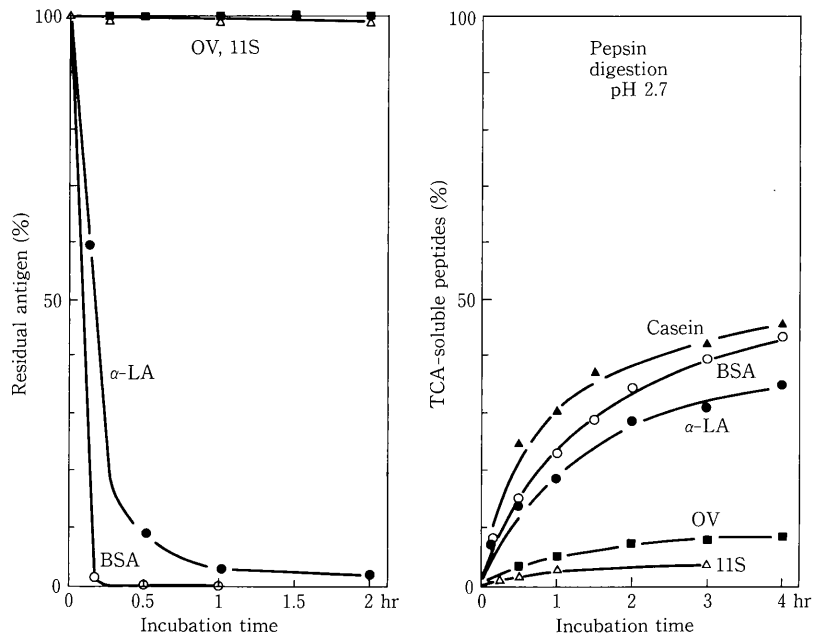


Fig. 4 Pepsin digestion of food proteins at pH 2.7. Fifty mg of each protein was incubated with 0.75 mg of pepsin (hog) in 7.5 ml at 37°C. pH was adjusted at 2.7 by HCl. Each antigen was determined by single immunodiffusion. Peptides of 10% TCA-soluble fraction were determined by microbiuret method.

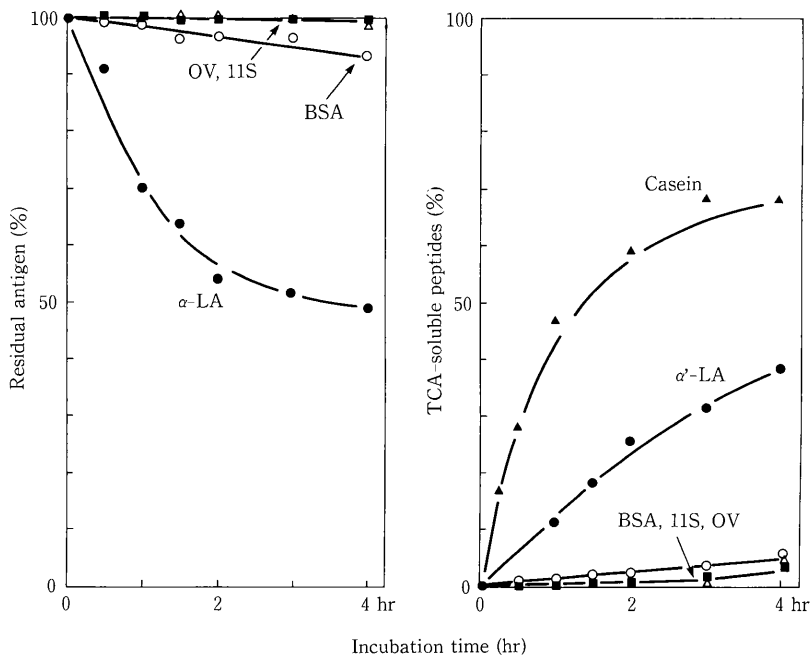


Fig. 5 Pancreatin digestion of 11S globulin and some food proteins. Fifty mg of each protein was incubated with 2 mg of pancreatin in 10 ml of phosphate buffer containing 0.25 M NaCl (pH 8.0) at 37°C. TCA-soluble peptides and residual antigen determination were same as Fig. 4.

を、SDSゲル電気泳動したところ、インタクトなものと同様に同一のサブユニットパターンを示し、分子内切断はこの条件では起こっていないことが示唆された（データは示していない）。

以上の結果、インタクトな大豆11Sグロブリンの消化性は、卵白アルブミンのそれに非常に類似していることが明らかとなった。11Sグロブリンの抗原決定基は、卵白アルブミンやBSAと同様、高次構造の変化に敏感であり、変性によって消失する。この変性の過程は、卵白および大豆11Sグロブリンでは消化過程の律速となっていることが示唆された。現在、ラットにインタクトな11Sグロブリンを投与して、*in vivo*における消化を検討している。

文 献

- 1) 山本奈美, 伏木 亨, 岩井和夫 (1982): 抗原性を指標とした卵白アルブミンの管腔内消化の研究. 昭和57年度日本農芸化学会大会要旨, p. 54.
- 2) 山本奈美, 伏木 亨, 岩井和夫 (1983): 食品たん白質の消化過程の多様性—抗原性を指標とした解析. 昭和58年度日本農芸化学会大会要旨, p. 286.
- 3) 伏木 亨, 山本奈美, 岩井和夫 (1983): 卵白アルブミンの抗原性を指標とした小腸内たん白質消化環境の解析. 昭和58年度日本農芸化学会大会要旨. p. 286.
- 4) Mori, T., Utsumi, S. and Inaba, H. (1979): Interaction involving disulfide bridges between subunits of soybean seed globulin and between subunits of soybean and sesameseed globulins. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2317-2322.
- 5) 右田俊介編 (1972): 医化学実験法講座4「免疫化学」 pp. 151-168, 中山書店
- 6) Akesson, W.R. and Stahmann, M.A. (1964): A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, **83**, 257-261.
- 7) Iwabuchi, S. and Shibasaki, K. (1981): Immunochemical studies of the effect of ionic strength on thermal denaturation of soybean 11S globulin. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 285-293.
- 8) 越山育則 (1976): ダイズ蛋白質, “植物酵素・蛋白質研究法” (別冊蛋白質核酸酵素), pp. 456-464.