

大豆たん白質の管腔内消化の研究（その2）

GASTROINTESTINAL DIGESTION OF SOYBEAN PROTEIN (part 2)

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

An attempt was made to use the disappearance of soybean 11S globulin antigen as an index for the analysis of its digestion process *in vivo*. At one hour after force-administration of 11S globulin to rats, only 10% of native antigen was detected in the gastrointestinal tract. By comparison of 11S globulin antigen contents with phenol red, a nonabsorbable marker, almost 11S globulin antigen was disappeared from the stomach. The native 11S globulin antigen free from denaturation in the stomach, remained its antigen in the ileum without digestion. While, spontaneous feeding of 11S globulin gave slightly different results. Its 11S antigen contents in stomach was larger than that of force-feeding. But 11S globulin antigen in small intestine of spontaneously fed rats was much smaller than that of force-fed rats. From previous findings, the denaturation of 11S globulin was a rate-limiting step in its digestion process. Thus, it suggested that the denaturation of 11S globulin in stomach is the most important step for its digestion, and spontaneous feeding is more intense than force-administration in denaturation of 11S globulin in stomach. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn* 6, 28-31, 1985.

われわれは、抗原抗体反応を消化の指標に利用して、食品たん白質の消化・吸収がたん白質の種類及び加工などによる変性状態によって著しく異なることを明らかにしてきた¹⁻³⁾。

本研究では、大豆たん白質の、ラット管腔内における消化を解析する目的で、ラットに投与した未変性 11S グロブリンの抗原性を用いた。大豆 11S グロブリンは、サブユニット構造をとっており、動物に投与した場合、未変性の 11S 分子が胃酸等で変性を受けて、サブユニット組織が変化する過程と、変性した 11S グロブリンが、プロテアーゼによって消化される過程がある。それぞれの過程について、前者は、未変性 11S グロブリンに対する抗体、後者は、サブユニットに対する抗体を用いて別個に解析することが可能である。

加工、調理された大豆食品では、むしろ、後者の消化過程が重要であろう。本報告では、まず、未変性 11S グロブリンに対する抗体を用いて、11S グロブリン

分子が、変性・消化される過程を検討した。

実験方法

大豆 11S グロブリンは、帝国女子大学、山本淳教授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及び、ショ糖密度勾配遠心法によって精製し、抗体を調製した。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⁴⁾、抗体調製に供した。動物実験の飼料には、同グリシニン画分を精製することなく用いた。

抗体の調製

大豆 11S グロブリンの精製標品 10 mg を生理食塩水 1 ml 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、3～4 kg）背皮下に注射した。4 週間後同じく精製 11S グロブリンを、10 mg、アジュバントなしで追加し、10 日後に採血した。

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredient	
Soybean 11S globulin	160 mg
Soluble starch (corn)	353 mg
Sucrose	176 mg
Mineral mixture ¹⁾	31 mg
Vitamin mixture ²⁾	8 mg
Phenol red solution ³⁾	
Soybean oil	48 μ l

1), 2) Mineral and vitamin mixtures were prepared by Oriental Yeast Co. Ltd.

3) Diet was filled up to 2ml with distilled water containing phenol red (saturated) (Experiment 1). Diet was mixed with water saturated with phenol red (Experiment 2).

抗原量の測定

抗原量は、一次元免疫拡散法を用いて定量した⁵⁾。抗原重量は、未変性の抗原たん白質の重量に換算して表示した。

動物実験

ウィスター系雄ラット(160~200 g)を用いた。各実験は、17:00より行なった。動物は実験当日朝06:00に飼料(固型飼料, オリエンタル酵母製 MF)を引き、以後絶食させた。水は自由に与えた。

実験 1

Table 1 に示した組成の試験食(2 ml)を、胃チューブを用いて、ラット胃内に強制投与した。0.5 時間、1 時間後に、各 4 匹ずつ断頭屠殺した。直ちに、消化管を胃、小腸上、中、下部(3 等分)、盲腸、結腸に分けて結紮した。TLCK (Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone), TPCK (Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) 各 0.05% を含む 0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.2, 4℃) 4 から 7 ml で、消化管内容物を洗い出した。洗液は、直ちに、一次元免疫拡散法で残存抗原量

を測定した。マーカーとして加えたフェノール・レッド量は、Schedle らの方法に従って定量した⁶⁾。

実験 2

Table 1 の飼料を、フェノール・レッドを含む少量の水で練り、ラットに自発的に摂取させた。この実験では、ラットはあらかじめ 1 日 2 時間のミール・フィーディングに慣らしてあり、すべてのラットは、試験食を 10 分間以内で食べ終えた。

消化管内容物の大豆 11S グロブリン抗原量は、実験 1 と同じ方法で測定した。

結果と考察

すでに報告した、試験管内での実験で⁷⁾、未変性大豆 11S グロブリンに対する抗体は、サブユニット構造全体を認識しているが、個々のサブユニットは、全く反応しないことが明らかとなっている。したがって、変性によって 11S グロブリンの構造が変化すると、抗原性は一挙に消失した。この抗体を用いて、ラット消化管内容物の大豆 11S グロブリン抗原量を測定した。

実験 1: 大豆 11S グロブリンの強制投与

Table 1 に示す試験食を、ラットに強制投与し 0.5 時間、1 時間後の、各消化管部位中の残存抗原量、フェノール・レッド量、及び総たん白質量を測定した。Table 2, 3 に示したように、投与した 11S グロブリンの抗原性は、胃で著しく減少している。前報では⁷⁾、変性を受けた 11S グロブリンは、すみやかに消化を受けることを示唆した。したがって 11S 大豆グロブリンの大半は、胃酸で変性を受け、直ちに、ペプシンで限定分解されていると思われる。

胃酸による変性を免れた 11S グロブリンは小腸内では比較的安定であり、小腸下部に未消化のまま達する。恐らく、内因性のプロテアーゼと同じく、回腸に長く滞留する間に徐々に消化されるものと思われる。

小腸での 11S グロブリンの変性は、胃酸によるそれ

Table 2. Force-administration of soybean 11S globulin

Gastrointestinal tract	11S antigen contents (A) (mg)	Phenol red (B) (%)	A/B	Total protein (mg)
30 min				
Stomach	0.25 $\pm$ 0.11	52.7 $\pm$ 4.1	5	42.4 $\pm$ 11.5
Small intestine				
Upper	1.90 $\pm$ 0.80	15.8 $\pm$ 3.7	88	20.4 $\pm$ 5.6
Middle	2.73 $\pm$ 0.52	20.3 $\pm$ 2.6	140	30.4 $\pm$ 3.6
Lower	0.64 $\pm$ 0.29	11.1 $\pm$ 3.4	75	26.1 $\pm$ 5.0

Values were means $\pm$ SE of 4 rats. Phenol red contents were calculated by the method of Schedle et al. and expressed as % of total amount of detected phenol red. Antigen was detected with single immunodiffusion method.

Table 3. Force-administration of soybean 11S globulin

Gastrointestinal tract	11S antigen contents (A) (mg)	Phenol red (B) (%)	A/B	Total protein (mg)
60 min				
Stomach	0.18±0.07	32.6±8.1	5	33.6±5.1
Small intestine				
Upper	0.10±0.07	3.8±2.0	17	8.7±4.3
Middle	1.14±0.37	19.4±3.8	55	22.4±2.3
Lower	2.40±0.57	31.1±10.3	170	45.7±14.0

とは当然機構が異なるものであるが、その詳細は明らかではない。大過剰量のプロテアーゼによって、回腸で消化されていく間に、変性がおこるのであろう。糞中には、大豆 11S グロブリンの抗原は検出できなかった。

小腸中部の内容物を、ゲルろ過で分離したところ、未変性の 11S グロブリンと同じ溶出位置に抗原性を持つたん白質が検出されたが、他の画分には抗 11S グロブリン抗体と反応するたん白質は全く検出されなかった(データは示していない)。すなわち、消化を受けて分子量が変化した 11S グロブリンで、抗原性を保持しているものは検出されない。このことは、小腸での消化の、ごく初期の間に、抗原性が失われることを示唆するものである。

実験 2 : 固型 11S グロブリン食投与

1 日 2 時間のミールフィーディングで予備飼育したラットに、実験 1 と同じ組成の飼料 (Table 1) を、少量の水で練って与えた(固型食)。1 時間後の消化管内容物中の 11S グロブリン抗原量を測定した (Table 4)。強制投与に比べて、固型食の、胃滞留時間は短かった。強制投与実験では、1 時間で 67% の食物が小腸へ移送されたのに対し、固型食では、94% が同じ時間内に移送された。これは、固型食の容積が小であったことが大きな要因であろう。胃での 11S グロブリン抗原残存量は、固型食群がわずかに少なかった。固型食は、口

腔及び胃で溶けないと、消化されない。固型食中の 11S グロブリンのうち、一時に溶解せずに、胃液と混じり合わなかった部分の抗原が残存しているであろう。

一方、小腸内には、固型で投与した 11S グロブリンの抗原性は、ほとんど検出されなかった。これは強制投与時と全く異なる結果である。固型の食物を口から与えた方が、胃での作用が著しいと思われる。この原因は明らかではないが、強制投与ラットでは、口腔及び胃での刺激 (cephalic phase) が消化液、消化酵素分泌を促進する過程を欠いている⁸⁾ためかもしれない。また、固型食を与えたラットは、あらかじめミール・フィーディングしてある。このようなラットでは、短時間内での消化能力が高まっている可能性もあり、検討が必要である。

今後 更に、変性した大豆たん白質に対する抗体を調製し、11S グロブリンの高次構造が変化してしまった後の過程を追跡する予定である。これは、加工された大豆食品の消化を研究するのにも、有用な手法であると思われる。

文 献

- 1) Fushiki, T., Yamamoto, N. and Iwai, K. (1985): Investigation of digestion and absorption of a dietary protein by using its antigenicity as an index: Gastrointestinal digestion of ovalbumin

Table 4. Spontaneous feeding of soybean 11S globulin

Gastrointestinal tract	11S antigen contents (A) (mg)	Phenol red (B) (%)	A/B	Total protein (mg)
60 min				
Stomach	0.35±0.19	5.5±1.7	48	6.4±7.2
Small intestine				
Upper	ND	9.7±1.5	—	2.2±0.5
Middle	ND	15.3±4.8	—	2.7±1.4
Lower	ND	69.5±6.2	—	16.2±5.3

Values were means±SE of 4 rats. ND; not detected. Each value was described as the same expression as Table 2.

- Agric. Biol. Chem.* **49**, 1335-1342.
- 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. 日本農芸化学会昭和 58 年度大会講演要旨集, 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. 日本農芸化学会昭和 58 年度大会講演要旨集, p. 286.
 - 4) Mori, T., Utsumi, S. and Inada, 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) Schedle, H. P. and Clifton, J. A. (1966): Small intestinal absorption of steroids. *Gastroent.*, **41**, 491-499.
 - 7) 岩井和夫, 伏木亨 (1984): 大豆たん白質の管腔内消化の研究(その 1). 大豆たん白質栄養研究会会誌, **5**, 43-47.
 - 8) 岩井和夫, 伏木亨 (1984): 食品に内在する膵酵素分泌情報とその認識機構. 化学と生物, **22**, 369-378.