

酵素処理分離大豆たん白質のラット血清コレステロール濃度および肝・小腸機能への影響

EFFECTS OF FEEDING SOY PROTEIN ISOLATE AND ITS PROTEOLYTIC DIGESTS ON CHOLESTEROL LEVEL IN RAT SERUM AND HEPATIC AND SMALL INTESTINAL FUNCTIONS

土井裕司・岩見公和・伊吹文男（京都府立大学農学部）
金森正雄（武庫川女子大学家政学部）

Hiroshi DOI¹, Kimikazu IWAMI¹, Fumio IBUKI¹ and Masao KANAMORI²

¹Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

²Department of Food and Nutrition, Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663

ABSTRACT

Growing rats of the Wistar strain were fed *ad libitum* diets containing casein and soy protein isolate (SPI) and its peptic (SPI-P) and tryptic digests (SPI-T) as protein sources for one month, followed by measurements of serum cholesterol and triglyceride levels and activities several enzymes such as glutamate-pyruvate transaminase, leucine aminopeptidase, alkaline phosphatase, choline esterase and γ -glutamyltransferase. Body weight gains of rats fed the SPI- and its proteolytic digest-based diets were significantly lower than those of rats fed the casein-based diet, but there were no differences in liver, small intestine and caecum weight (g/100 g of body weight). No differences were observed for the levels of such enzymes as above. Feeding SPI and its proteolytic digests caused a significant decrease in the serum cholesterol level as compared with feeding casein; feeding SPI-P was the most effective in hypocholesterolemic action. A possible mechanism of the action was discussed. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn* 6, 58-62, 1985.

植物性たん白質が、動物性たん白質に比べて血清コレステロール降下作用を有することはよく知られている¹⁾。その作用機作に関しては多くの研究があり、コレステロール・胆汁酸の吸収低下、体内コレステロール代謝亢進などいろいろ考えられているが²⁻⁵⁾、未だ一致した見解には達していない。他方、食品たん白質由来の生理活性ペプチドが近年注目を集めている⁶⁻¹⁰⁾。それらの多くはペプシンやトリプシンなどたん白質分解酵素を作用させることによって得られたものである。

本報告は、消化過程中食餌たん白質から生ずるペプチドと血清コレステロール降下作用との関連を探るこ

とを目的として、あらかじめペプシンやトリプシンで部分的に水解させた分離大豆たん白質 (SPI-P, SPI-T) を用いて、消化産物投与が血清コレステロール値ならびに肝や小腸の機能に及ぼす影響について検討を加えたものである。

実験方法

実験にはウィスター系雄ラット (初体重 50~60 g) を用い、〔A〕カゼイン (20%) 投与群、〔B〕SPI 投与群、〔C〕SPI-P 投与群、〔D〕SPI-T 投与群の 4 群に分け (8 匹/群)、Table 1 に示す組成の飼料で一ヵ月

(31 日)間飼育した。給餌形態は粉食とし、食餌および飲料水は自由に与えた。SPI のペプシン消化産物 (SPI-P) は、SPI 1.5 kg を水 10 l 中で懸濁し (ただし pH は 1.6 に調整)、豚ペプシン (シグマ製) 15 g を添加して 48℃ で 1 時間反応後、凍結乾燥を行なって乾燥粉末とした。SPI のトリプシン消化産物 (SPI-T) も、SPI に牛トリプシン (シグマ製) を作用させ、上と同様の方法で調製した。所定期間飼育後、ラットは断頭屠殺によって放血し、その血清中の総-, 遊離-, HDL-コレステロール値を測った。血清中の酵素活性および小腸粘膜局在性酵素活性の測定は文献¹¹⁻¹³⁾記載の方法に準じた。有意差検定は Student の t-テスト¹⁴⁾に従って行なった。

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients	%
Protein source*	20
Sucrose	63
Soybean oil	7
Mineral mixture	4
Vitamin mixture	1
Cellulose powder	5

*Casein, soy protein isolate (SPI) or its peptic (SPI-P) and tryptic digests (SPI-T).

結 果

1. ラットの成長および飼料摂取量

Table 2, 3 に [A] ~ [D] 各群ラットの体重増加量および飼料摂取量、臓器 (肝, 小腸, 盲腸) 測定の結果を示した。体重増加量は, [A] に比べて [B] で有意に低く, [B] に対しても [C], [D] でさらに低い傾向を示したが, [B] ~ [D] 間に有意な差は見出せなかった。[B] ~ [D] 間における体重の変動は飼料摂取量の増減をよく反映しており, 摂取量当りの体重増加量 $\left(\frac{\Delta BW}{FI}\right)$ で表わせば, 3 群の飼料効率はずっと同じであった。体重 100 g 当りで表わした肝, 小腸, 盲腸重量は, 各々 3.96~4.57 g, 4.15~4.78 g, 1.00~1.19 g の範囲にあり, [D] 群の肝重量にのみやや低い傾向が認められた。

2. 血清のコレステロールおよびトリグリセリド

Table 4 に血清中の総-, 遊離-, HDL-コレステロール値およびトリグリセリド値測定の結果を示した。すでに数多くの研究者によって報告されているように, 総コレステロール値は, SPI 食群に比べてカゼイン食群で高く, SPI 食群に対しては消化産物投与群で若干

Table 2. Body weight gains and food intakes of rats fed SPI and its proteolytic digests for one month

Groups	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	$\frac{\Delta BW}{FI}$
Casein	198.9±6.2	16.1±0.5	0.40
SPI	148.8±8.9	14.1±1.3	0.34
SPI-P	127.0±9.5	12.4±0.8	0.33
SPI-T	132.0±7.4	13.0±0.6	0.33

Values are the means ± SE for 8 animals.

低くなる傾向が認められた。しかし, 遊離コレステロール値には 4 群間で有意な差は見出せず, HDL-コレステロール値は SPI-T 投与群のみ低くなった。逆に, トリグリセリド値はカゼイン食群より SPI 投与群で高く, HDL-コレステロール値に対応して SPI-T 投与群で低かった。トリグリセリド値の増減とコレステロール値変動との間には必ずしも直接的な因果関係はない。

3. 血清の各種酵素活性 (肝機能の指標として)

血清中のある種の酵素レベル変動は, 肝機能が正常か否かを間接的にチェックする手段としてよく用いられる。本実験では, 測定上の便宜のため, glutamate-pyruvate transaminase (GPT), leucine aminopeptidase (LAP), alkaline phosphatase (ALP), choline esterase (Ch-E) の活性を測った。活性測定の結果を Table 5 に示した。各群間で多少の変動はみられるものの (有意差なし), これら酵素活性の正常値の中も広い範囲に測定値はバラツキの範囲内におさまる。投与した食餌の種類の違いによって肝機能上に何らかの変化が生じたとはみなすことができなかった。

4. 小腸粘膜局在性酵素の活性 (小腸機能の指標として)

小腸は, 肝に次ぐアポリポタン白質生産の場であると同時にコレステロール吸収の場であり, 腸肝循環によって血清コレステロール値調節にも重要な役割を果たしている。酵素処理した SPI 投与によって小腸機能

Table 3. Organ weight of rats following one month feeding on SPI and its proteolytic digests

Groups	Organ weight (g/100 g BW)		
	Liver	Intestine	Caecum
Casein	4.57±0.17	4.37±0.16	1.19±0.06
SPI	4.47±0.07	4.22±0.14	1.11±0.16
SPI-P	4.42±0.05	4.31±0.03	1.13±0.06
SPI-T	3.96±0.04	4.15±0.18	1.00±0.06

Values are the means ± SE (n=8).

Table 4. Serum cholesterol (CHOL) and triglyceride levels in rats fed SPI and its proteolytic digests for one month

Groups	Serum level, mg/100 ml			
	Total CHOL	Free CHOL	HDL-CHOL	Triglyceride
Casein	91.8±1.9 ^a	18.3±1.6 ^a	63.4±3.2 ^a	259.7±52.1 ^{ab}
SPI	84.2±1.1 ^b	16.1±1.9 ^a	58.8±1.9 ^{ab}	340.4±44.3 ^a
SPI-P	78.8±1.3 ^c	19.5±2.1 ^a	55.6±1.6 ^{ab}	221.9±21.8 ^{ab}
SPI-T	80.3±1.8 ^{bc}	15.9±0.9 ^a	49.9±2.3 ^b	154.9±13.6 ^b

Values (means ± SE for 8 animals) not sharing a common superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 5. Activity levels of some enzymes in serum of rats fed SPI and its proteolytic digests for one month

Groups	Enzyme activity, units/l			
	GPT	LAP	ALP	Ch-E
Casein	28.1±3.0	48.5±9.0	39.8±8.4	99.6±8.1
SPI	28.1±4.7	53.8±3.7	32.9±4.6	95.8±8.3
SPI-P	25.8±2.3	57.7±3.8	37.9±7.1	103.6±9.5
SPI-T	26.2±3.7	66.0±9.7	26.5±3.8	87.4±10.3

Values are the means ± SE (n=8). Abbreviation: GPT, glutamate-pyruvate transaminase; LAP, leucine aminopeptidase; ALP, alkaline phosphatase; Ch-E, choline esterase.

がどのような影響をうけるかをみるため、小腸粘膜局在性酵素である γ -glutamyltransferase (γ -GT) および leucine aminopeptidase (LAP), alkaline phosphatase (ALP) の活性変動の有無を調べた。食塊の管腔内移動速度は消化産物を投与すればそうでないものに比べ当然何らかの影響をうけると考えられるが、Table 6 に示すように、いずれの酵素活性もバラツキの範囲内にあって各群間に有意な差はなく、酵素活性にみる限り小腸粘膜の消化吸収機能に本質的な変化は生じていないと判断された。

Table 6. Activity levels of some enzymes in small intestine of rats fed SPI and its proteolytic digests for one month

Groups	Enzyme activity, units/mg protein		
	LAP	ALP	γ -GT
Casein	3.12±0.28	1.68±0.07	0.85±0.07
SPI	3.30±0.10	1.71±0.17	1.00±0.21
SPI-P	2.93±0.08	1.98±0.21	0.89±0.05
SPI-T	2.75±0.33	1.52±0.16	1.09±0.14

Values are means ± SE (n=8). Abbreviation: LAP, leucine aminopeptidase; ALP, alkaline phosphatase; γ -GT, γ -glutamyl transferase.

考 察

消化酵素で前処理した SPI を幼ラットに与えると、そうでないものに比べ食餌摂取量が減少し、従って体重増加の割合も鈍る傾向がみられた（ただし有意差なし）。それら食餌で飼育したラットの血清コレステロール値を平均体重に対してプロットすると、SPI, SPI-P, SPI-T 投与群の測定値は 5% カゼイン食群（コレステロール値、約 62 mg/100 ml）と 20% カゼイン食群（コレステロール値、約 92 mg/100 ml）の測定値を結ぶ直線上に位置した（Fig. 1）。食餌中の糖質変更（ショ糖→でんぷん）によって、あるいは食物繊維や脂肪の増量によって、血清コレステロール値は変動し、Fig. 1 で示した関係は必ずしも成り立たなくなるが、血清コレステロール値がラットの栄養状態と密接な関係にあることは明らかである。

動脈硬化症誘発の危険因子としては、血清総コレステロール値より HDL-コレステロール値との相対比が重要である。そこで、各試験群ラットの血清コレステロール値を、飼育期間中の中間（17 日目、尾の先端より採血）と最終日（31 日目、断頭屠殺）について atherogenic index で表わしてみた（Fig. 2）。グラフからも明らかのように、atherogenic index は SPI-P 投与群で最も低く、SPI 投与群がそれに次いだ。しかし、

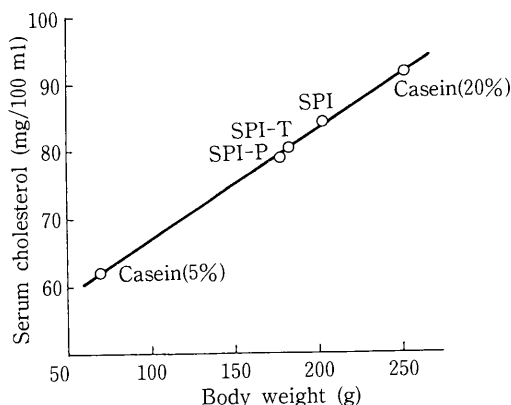


Fig. 1. Relationship between serum cholesterol level (mg/100 ml) and body weight (g) in rats fed casein- and SPI-based diets for one month.

SPI-T 投与群の atherogenic index は低 HDL-コレステロール値を反映して、むしろカゼイン食群と同等かそれより幾分高い傾向を示した。Huff ら¹⁵⁾は、パンクレアチン処理した SPI を用いて、その血清コレステロール値がカゼイン食群と類似の値しか示さないことを報告している。このことは、トリプシン消化後には著しく減少するが、ペプシン消化によっては切られないペプチド切片（分子量 3000~5000 のペプチドが主体）の中に血清コレステロール値降下作用を有する物質が残存することを示唆している。

市販固型飼料が大豆たん白質よりもさらに低い血清コレステロール値を与えるという報告がある^{16~18)}。我々の実験結果でも、固型飼料食群は SPI-P 投与群と同等か、さらにそれより低い血清コレステロール値を示した(未掲載)。市販固型飼料のたん白質源は、ホワイトフィッシュミール、脱脂粉乳、脱脂大豆、酵母をアミノ酸バランスが適当になるよう配合したものである。食餌たん白質のアミノ酸組成と血清コレステロール値との関係についても種々検討が加えられており、大豆たん白質の降コレステロール作用はアミノ酸組成よりもむしろアミノ酸配列に起因することが指摘されている^{3,19)}。我々も²⁰⁾ SPI ペプシン消化産物の疎水性はカゼインのペプシン消化産物のそれよりかなり高く、コレステロール・胆汁酸吸着力も強いことを観察している。消化過程に出現、消失あるいは残存するペプチドがどのような機作で降コレステロール作用を発揮するか、消化産物の管腔内移送と消化管ホルモン分泌と

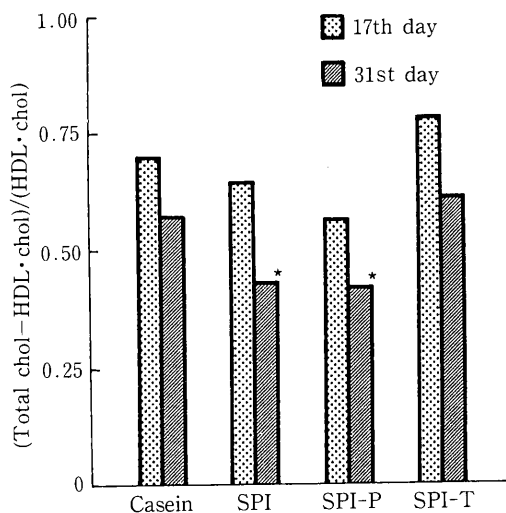


Fig. 2. Atherogenic index in rats fed casein- and SPI-based diets for 17 and 31 days.

の関係も含めて、さらに詳しい検討が必要である。

文 献

- 1) Carroll, K. K. and Hamilton, R. M. G. (1975): Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J. Food Sci.*, **40**, 18-23.
- 2) Terpstra, A. H. M., Hermus, R. J. J. West, C. E. (1983): Dietary protein and cholesterol metabolism in rabbits and rats, in "Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis", ed. by Kritchevsky, D. and Gibney, M. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 19-49.
- 3) Sugano, M. (1983): Hypocholesterolemic effect of plant protein in relation to animal protein: mechanism of action, in "Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis", ed. by Kritchevsky, D. and Gibney, M. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 51-84.
- 4) Huff, M. W. and Carroll, K. K. (1980): Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, **21**, 546-558.
- 5) Nagata, Y., Ishiwaki, N. and Sugano, M. (1982): Studies on the mechanism of anti-

- hypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixture in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625.
- 6) Brantl, V., Teschemacher, H., Henshen, A. and Lottspeil, F. (1979): Novel opioid peptides from casein (β -Casomorphins). *Hoppe-Zeiler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1211-1216.
 - 7) Zioudrow, C., Streaty, R. A. and Klee, W. A. (1979): Opioid peptides derived from food proteins. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2446-2449.
 - 8) Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. (1979): Peptide inhibitors of angiotensin I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 128-137.
 - 9) Maruyama, S. and Suzuki, H. (1982): A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393-1394.
 - 10) 吉村孝司・吉川正明・千葉英雄(1984): 人乳カゼイン由来オピオイド様ペプチドの精製と構造に関する研究. 日本農芸化学会昭和59年度大会講演要旨集, p. 489.
 - 11) Little, G. H., Strarnes, W. L. and Behal, F. J. (1976): Human liver aminopeptidase, in "Methods in Enzymology" ed. by L. Lorand, Academic Press, New York, vol. 45, pp. 495-503.
 - 12) Malamy, M. and Horecker, B. L. (1966): Alkaline phosphatase, in "Methods in Enzymology" ed. by W. A. Wood, Academic Press, New York, vol. 9, pp. 639-642.
 - 13) Connell, G. E. and Adamson, E. D. (1970): γ -Glutamyl transpeptidase, in "Methods in Enzymology" ed. by G. E. Perlmann and L. Lorand, Academic Press, New York, vol. 19, pp. 782-789.
 - 14) Fisher, R. A. (1970): Statistical Methods for Research Workers, Oliver & Boyd, Edinburgh, 14th ed. pp. 140-142.
 - 15) Huff, M. W., Hamilton R. M. G. and Carroll, K. K. (1977): Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol free, semipurified diets: Effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. *Atherosclerosis*, **28**, 187-195.
 - 16) Katan, M. B., Vroomen, L. H. M. and Hermus R. J. J. (1982): Reduction of casein-induced hypercholesterolaemia and atherosclerosis in rabbits and rats by dietary glycine, arginine and alanine. *Atherosclerosis*, **43**, 381-391.
 - 17) Terpstra, A. H. M., Karkes, L. and van der Veen F. H. (1981): The effect of different proportions of casein in semipurified diets on the concentration of serum cholesterol and the lipoprotein composition in rabbits. *Lipids*, **16**, 114-119.
 - 18) Terpstra, A. H. M., van Tintelen, G. and West, C. E. (1982): The effect of semipurified diets containing different proportions of either casein or soybean protein on the concentration of cholesterol in whole serum, serum lipoproteins and liver in male and female rats. *Atherosclerosis*, **42**, 85-95.
 - 19) Huff, M. W. and Carroll, K. K. (1980): Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits *J. Nutr.*, **110**, 1676-1685.
 - 20) 岩見公和・榊原 潔・土井裕司・伊吹文男(1985): 食品たん白質消化産物中の疎水性ペプチドとその胆汁酸再吸収に及ぼす影響. 日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨集, p. 138.