

ENZYMATICALLY MODIFIED SOY PROTEIN PRODUCED WITH  
COVALENT INCORPORATION OF  $[^{15}\text{N}]$  METHIONINE: ITS  
BEHAVIOR IN THE RAT SMALL-INTESTINAL TRACT

Soichi ARAI<sup>1</sup> and Hiroko KIMURA<sup>2</sup><sup>2</sup> Kagawa Nutrition College, Tokyo 170

It is known that when a mixture of soy protein isolate (SPI) and L-methionine ethyl ester (L-Met • OEt) is incubated with papain, an enzymatically modified protein (EMP), which has incorporated L-methionine in a covalent manner at to C-terminal, can be obtained. The present study first elucidated that L-[<sup>15</sup>N]-Met • OEt was almost similarly incorporated. When DL-[<sup>15</sup>N]-Met • OEt was used, the L-isomer was incorporated to produce <sup>15</sup>N-Met-EMP. Using this product, we undertook a feeding test with rats to characterize the behavior of exogenous (dietary) methionine. The test demonstrated that <sup>15</sup>N species existed mostly in an oligopeptide fraction of the small-intestinal content over a period of digestion of the EMP. However, <sup>15</sup>N-Met appeared in the free form in the systemic blood over the same period. It was thus possible by using the present procedure to differentiate the behavior of the fed methionine from that of exogenous methionine. *Nutr. Sci. Sov. Protein. Jpn.* 7, 14-17, 1986.

本研究は、 $^{15}\text{N}$  標識メチオニンを導入した酵素修飾たん白質 ( $^{15}\text{N}\text{-Met-EMP}$ ) を調製し、ラットに投与した際の  $^{15}\text{N}$ -メチオニンの運命を追跡し、EMP 由来のメチオニンの動態を内因性のメチオニンのそれと区別することができたので報する。

<sup>15</sup>N-メチオニン (95 atom %) を用い、酵素修飾に
$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{+P_1} ES' \begin{cases} \xrightarrow{+H_2O} E + P_2 \\ \xrightarrow{+N} E + P_3 \end{cases}$$

E : enzyme (protease, e. g., papain)  
S : substrate (protein)  
ES : Michaelis complex  
ES' : acyl-enzyme (or peptide-enzyme)  
P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> : hydrolysis products  
N : nucleophile (amino acid ester)  
P<sub>3</sub> : aminolysis product

まず Fig. 1 のように、酵素 (E) としてパバイン、基質 (S) として馬尿酸エチルエステル (Bz-Gly-OEt)、求核試薬 (N) として<sup>15</sup>N-Met-OEt (対照として<sup>14</sup>N-Met-OEt) を用いて生成物 P<sub>3</sub> (Bz-Gly-Met OEt) を得た。E/S 比を0.01、温度37℃、pH を6 に固定し、N の濃度を変え、経時的に P<sub>3</sub> の生成量を測定した結果、<sup>15</sup>N-Met からの P<sub>3</sub> 生成速度と<sup>14</sup>N-Met からのそれと大きな差異はなかった (Table 1)。この導入反応は D 型 Met・OEt によって阻害されず、DL 型 Met・OEt の使用が可能であることを確認した。<sup>15</sup>N-DL-Met は価格の面から大量使用は困難であるため、<sup>15</sup>N-DL-Met・OEt を用い、SPI にメチオニンだけが<sup>15</sup>N 標識された EMP を調製した。調製条件は既報<sup>1)</sup>に準じた。

Table 1. Reaction rates and kinetic parameters of L- [<sup>14</sup>N] methionine and L- [<sup>15</sup>N] methionine

|                             | L- [ <sup>14</sup> N] Methionine | L- [ <sup>15</sup> N] methionine |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Concentration of methionine | Incorporation rate (mM/min)      |                                  |
| 0.5 mM                      | 1.5                              | 1.3                              |
| 0.7 mM                      | 1.8                              | 1.6                              |
| 0.9 mM                      | 2.0                              | 1.7                              |
| 1.9 mM                      | 2.7                              | 2.2                              |
| Km                          | 0.42 mM                          | 0.41 mM                          |
| Vmax                        | 0.26 mM/min                      | 0.23 mM/min                      |

Incorporation rates were calculated from increases in hippuryl-methionine ethyl ester during 3 min.

<sup>15</sup>N の測定はすべて発光法により、<sup>15</sup>N アナライザー (日本分光 NIA-150 型) を用い<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N の比より算出した<sup>4)</sup>。

#### 動物実験:

飼料として窒素含量が1.5%に相当する<sup>14</sup>N および<sup>15</sup>N-Met・EMP (全飼料中では約10%) を配合し、他の栄養素は Harper 組成<sup>5)</sup>とした。

被検動物にはミールフィーディングを学習したウィスター系雄ラット (7 週齢) を用い、実験期にはまず非標識 EMP を 5 日間投与し、解剖日だけ<sup>15</sup>N-Met・EMP を与えた。摂食後、経時的に小腸管腔内容物を採

取し、膜濾過 (アミコン UF101) にて分子量別に分離し、500ダルトン以下、500-1,000ダルトン、1,000-2,000ダルトンの画分を得た。次いで、名画分中の Met 量と<sup>15</sup>N を測定して<sup>15</sup>N および<sup>14</sup>N-Met の存在比から、EMP 由来のメチオニンの挙動をしらべた。同時に、摂食後、経時的に心臓より採血し、血液中の<sup>15</sup>N-Met (遊離型) を定量した。

#### 結果と考察

前述に従い SPI に<sup>15</sup>N-DL-Met を導入したメチオニン含量4.98%の<sup>15</sup>N-Met・EMP を得た。この EMP の<sup>15</sup>N 存在比は3.607 atom %であった (Table 2)。

Table 2. Amino acid composition and other properties of <sup>15</sup>N-Met・EMP<sub>s</sub>

| Amino acid                                       | Content(%) |
|--------------------------------------------------|------------|
| Lys                                              | 6.05       |
| His                                              | 2.30       |
| Arg                                              | 7.14       |
| AsX                                              | 10.11      |
| Thr                                              | 3.57       |
| Ser                                              | 5.25       |
| Glx                                              | 18.25      |
| Pro                                              | 5.22       |
| Gly                                              | 4.16       |
| Ala                                              | 4.19       |
| Cys                                              | 1.43       |
| Val                                              | 4.64       |
| Met                                              | 4.98       |
| Ile                                              | 4.70       |
| Leu                                              | 8.36       |
| Tyr                                              | 3.56       |
| Phe                                              | 5.00       |
| Trp                                              | 0.98       |
| <sup>15</sup> N: 3.607 atom%, M. W.: 1,000-8,000 |            |

腸管腔内の総メチオニン量と<sup>15</sup>N 測定により得られた食餌由来メチオニン量の経時的な変化を Fig. 2 (下半) に示した。両者の差を内因性メチオニンとして Fig. 1 に空白部で示した。摂食開始後2時間でメチオニン量が最高であり、その中で食餌由来メチオニンは72%を占めていた。また内因性メチオニンの総量は経時的に大きな変動を示さず、摂食直前にはほぼ等しいことが判明した (Fig. 2)。

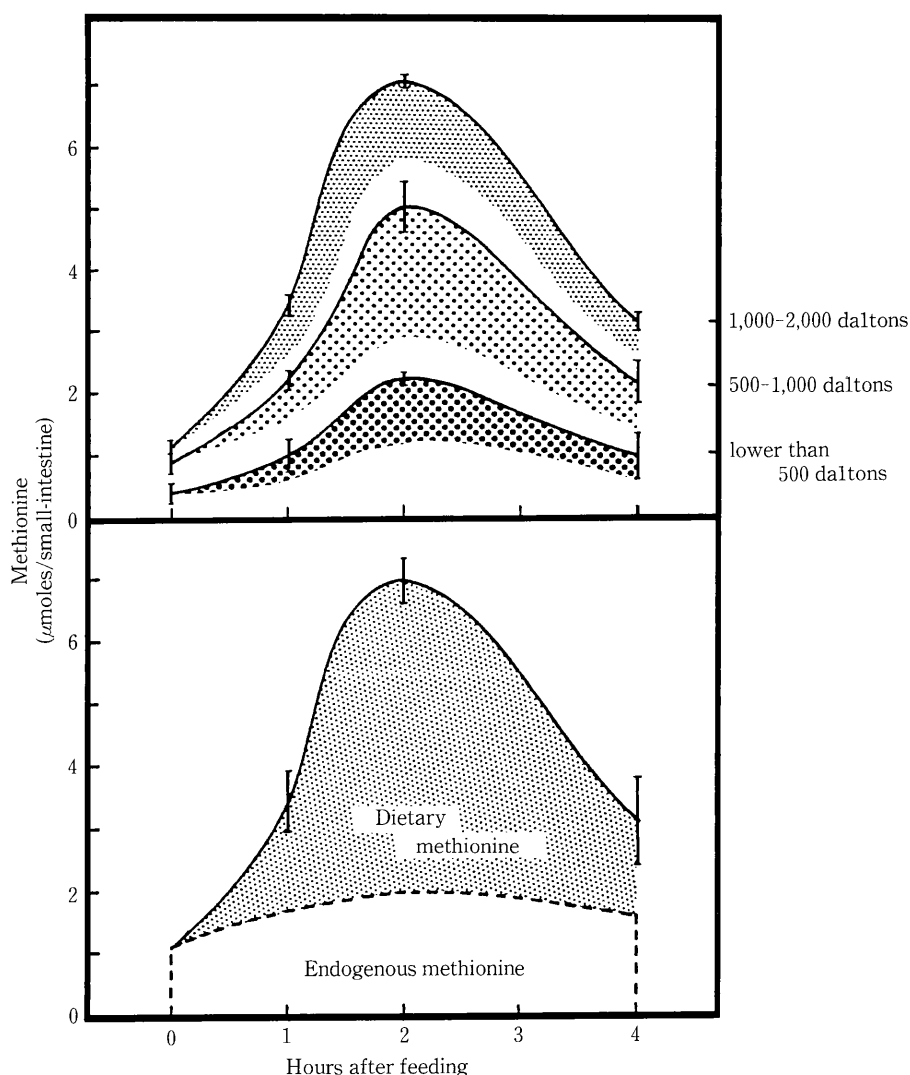


Fig. 2. Time-course of changes in various form of total and dietary methionine levels in the small-intestinal tract

さらにこの小腸管腔内容物の500ダルトン以下、500～1,000ダルトン、1,000～2,000ダルトンの画分について $^{15}\text{N}$ の存在状態から食餌性メチオニンをしらべたところ、摂食開始後1～2時間で、500～1,000ダルトン画分に多量に存在することが判明した (Fig. 2 上半)。内因性メチオニンは分子量画分ごとにも、経時的にも大きな変動がなく、摂食開始時のパターンに近似していると推察された (Fig. 2 上半空白部)。

血清中の $^{15}\text{N}$ 存在比から求めた遊離型 $^{15}\text{N}$ メチオニン量は、摂食1時間後既に上昇し (0.34 mg/血清1 ml)、小腸管腔内の $^{15}\text{N}$ -メチオニンが減少した4時間目にいたっても持続していた (0.333 mg/血清1 ml)。

以上の実験により、SPIから調製した酵素修飾たん

白質に共有結合状に付加しているメチオニンは、小腸管腔内で大部分は遊離型へと加水分解されることなく吸収され、吸収後にはじめて遊離するという前回報告<sup>1)</sup>の知見を、より正確に検証した。また、内因性メチオニンと区別したかたちで食餌性 (EMP由来) のメチオニンの動態を明らかにすることができた。

## 文 献

- 1) 荒井総一(1981): 酵素修飾による分離大豆たん白質の必須アミノ酸パターンの改良とその評価。大豆たん白質栄養研究会会誌, 2, 23-26.
- 2) 荒井総一(1982): 大豆たん白質の酵素修飾によるペプチドの調製とその栄養特性の評価。大豆たん

白質栄養研究会会誌, **3**, 13-17.

- 3) 木村廣子, 庄子由美子, 谷本信也, 荒井綜一  
(1982): 酵素法による蛋白質への<sup>15</sup>N 標識 L-メ  
チオニンの共有導入, 第36回日本栄養・食糧学会  
講演要旨集, p. 79.
- 4) 木村廣子(1983): 発光法による<sup>15</sup>N の測定, 臨床  
検査. **27**, 506-511.
- 5) Harper, A. E. (1959): Amino acid balance and  
inbalance. *J. Nutr.*, **68**, 405-418.