

大豆たん白質の不消化画分のラットにおけるコレステロール低下作用

HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECTS OF UNDIGESTED FRACTIONS OF SOYBEAN PROTEIN IN RATS

菅野道廣・後藤章一郎・山田幸男・吉田克子（九州大学農学部）

Michihiro SUGANO, Shoichiro GOTO, Yukio YAMADA and Katsuko YOSHIDA

School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812

ABSTRACT

The undigested fraction of soybean protein, which was prepared after exhaustive digestion with microbial proteases or porcine pepsin, exerted a marked hypocholesterolemic effect in rats fed cholesterol-enriched diets. The effect can be attributed to an increased fecal excretion of both neutral and acidic steroids. Results of a series of experiments suggested that the peptides of the undigested fraction, rather than the contaminating lipids and saponins, are responsible for its hypocholesterolemic effect. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 10, 45-48, 1989.

これまでに、大豆たん白質を微生物由来のプロテアーゼを用いて人工消化した場合に、消化されない不溶性の高分子量ペプチド画分には顕著な血清コレステロール低下作用があることを報告した¹⁾。この画分は中性および酸性ステロイドの糞便中への排泄を強く促進した。大豆たん白質中に胆汁酸との結合能を示す疎水性ペプチドが存在することが報告されている^{2,3)}。

今回は、この大豆たん白質不消化画分中の活性成分について一連の動物実験を行った結果を報告する。

実験方法

分離大豆たん白質 (Fujipro R) を微生物プロテアーゼ (Protin FC および AC, 大和化成, 大阪) あるいは豚ペプシンにより強く人工消化した (詳細は文献1) 参照)。処理後、加熱し、遠心分離により不消化物を集め、水洗を繰り返した後、凍結乾燥し、不消化性高分子画分 (HMF) を得た。さらに、HMF を室温で10倍容のメタノールで抽出し、抽出物 (HMF-E) を40°C以下で濃縮後凍結乾燥した。残渣は50°C以下で

真空乾燥した (HMF-R)。また、HMF-R を種々のアルカリプロテアーゼ (Protin AC, Pronase E および trypsin) を用いて pH 9.0, 50°C, 6 時間加水分解し、中和加熱後、凍結乾燥した (HMF-RD)。各調製物の化学組成を Table 1 に示す。

すべての実験で Sprague-Dawley 系雄ラットを用いた。初体重と飼育期間は各表に示している。実験食は AIN 組成に準じて調製し、各試験試料群のたん白質レベルは20%大豆たん白質群と同じになるよう調整した。一定期間飼育後、断頭により採血し、肝臓を摘出した。

各消化産物の *in vitro* での胆汁酸との結合能は、試料 10 mg を 10^{-4} mol の胆汁酸塩を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液中で 37°C, 2 時間インキュベート後、同じ緩衝液に対し透析し、透析外液中の胆汁酸を酵素法で測定することにより求めた。

血清および肝臓のコレステロールは常法により測定した。HDL-コレステロールは酵素法、糞便中のステロイドはガスクロマトグラフィーにより分析した。

Table 1. Chemical compositions of protease digestion products of soybean protein¹

Samples ²	Composition (weight %)					
	Moisture	Protein ³	Ash	Sugar	Lipid	Saponin
Soybean protein	6.0	86.0	4.5	4.0	1.5	0.44
Microbial protease digest						
HMF	0.4-0.9	71.1-72.5	2.6-3.0	7.4-8.8	5.3-10.8	2.7-4.6
HMF-E	1.2-2.7	34.1-36.2	5.6-6.6	7.1-8.3	27.7-33.9	8.6
HMF-R	0.9-1.3	85.0-86.1	1.6-2.0	7.8-10.4	0.7-2.2	1.0
HMF-RD	2.4	72.5	9.9	9.9	0.8	0.9
Porcine pepsin digest						
HMF	4.0	61.4	5.4	8.6	7.8	4.5

¹Values with the range of two or three preparations. ²HMF: high-molecular weight fraction (undigested fraction, HMF-W2 in Table 3 is same with this), HMF-E: methanol extract of HMF, HMF-R: residue of methanol extraction, HMF-RD: alkaline protease digest of HMF-R. ³N x 6.25.

結 果

*In vitro*における胆汁酸結合能

各消化産物の *in vitro* での胆汁酸結合能は、2 種の MHF（微生物プロテアーゼおよびペプシン処理）で大豆たん白質そのものはもちろん、他の消化産物に比べ有意に高く、この傾向はタウロコール酸、グリココール酸のいずれにおいても認められた（Table 2）。

血清、肝臓のコレステロール濃度および糞便へのステロイド排泄

実験 I

この実験では、大豆たん白質の微生物プロテアーゼ処理後得られた不消化物の水洗の程度の影響と HMF-R の水解物の効果を調べた。体重増加量、摂食量および相対肝臓重量に各群間で有意な差はなかった。Table 3 に示すように、血清および肝臓コレステロール濃度は HMF の水洗回数が増すほど低値を示した。HDL-コレステロール濃度は水洗を繰り返した群（HMF-W2）で最も高かった。HMF-R をさらに加水分解したものを与えた群（HMF-RD）では、血清コレステロール濃度は対照の大豆たん白質と差はなかったが、HDL-コレステロールは高値を示した。糞便中へのステロイド排泄量は 3 種の HMF 群で対照群より有意に高く、とくに水洗回数が増すほど高かった。HMF-RD には排泄促進作用は認められなかった。

実験 II

この実験では、微生物プロテアーゼ処理後得られた

Table 2. Bile salt binding capacity of protease digestion products *in vitro*¹

Preparations	Binding capacity (% bound)	
	Taurocholate	Glycocholate
Cholestyramine	92.5±0.2 ^a	86.8±0.0 ^a
Soybean protein	28.9±0.1 ^b	19.0±0.3 ^b
Microbial HMF	36.1±9.2 ^c	24.6±0.3 ^c
" HMF-E	29.9±0.3 ^b	18.0±0.1 ^b
" HMF-R	29.0±0.7 ^b	17.8±0.4 ^b
" HMF-RD	27.7±0.1 ^b	17.9±0.3 ^b
Pepsin HMF	36.4±0.1 ^c	23.6±0.4 ^c

¹Values are mean±SE of 3 determinations.

^{a-d}Non-matching superscripts in each column denote significant ($p < 0.05$) difference.

HMF をメタノールで抽出した場合（HMF-E と HMF-R）の効果を調べた。ペプシン処理して得られた HMF についても検討した。なお、HMF-E については、たん白質含量が低いため、大豆たん白質と混合して用いた（たん白質として大豆たん白質 70%、HMF-E 30%）。体重増加量には差はなかったが、コレステロール摂取による肝臓肥大は試験群で抑制された。Table 4 に示すように、食餌コレステロールに起因する血清および肝臓コレステロールの上昇は、HMF 群、とくにペプシン HMF 群で効果的に抑えられた。HMF-E や HMF-R でもコレステロール低下作用は観察されたが、その程度は HMF に比べると低かつ

Table 3. Effects of frequency of washing and alkaline protease digestion of high-molecular weight fraction of soybean protein on serum and liver cholesterol of rats (Exp. I)¹

Cholesterol	Groups				
	Soybean	HMF-NW	HMF-W1	HMF-W2	HMF-RD
Serum (mg/100 ml)					
Total	312±15 ^a	213±16 ^b	160±10 ^c	141±12 ^c	279±17 ^a
HDL	16.2±1.6 ^a	20.9±1.9 ^{a b}	22.0±1.4 ^{a b}	35.5±8.1 ^c	26.8±3.8 ^b
Liver (mg/g)					
	67.2±2.3 ^a	50.1±2.0 ^b	43.8±1.5 ^c	27.1±6.9 ^d	60.1±1.6 ^a

¹Rats weighed on average 165 g were fed experimental diets for 3 weeks. HMF-NW: sediment of microbial protease digest of soybean protein (non-washed), HMF-W1 and W2: HMF-NW was washed with water once and twice, respectively. Values are mean ±SE of 6 rats per group. ^{a-d}Non-matching superscripts in each row denote significant (p < 0.05) difference.

た。ペプシン HMF は微生物 HMF と同等のステロイド排泄促進作用を示した。しかし、HMF 摂取による糞便中へのステロイド排泄の増加は、それをメタノール処理すると事実上消失した。

実験 III

この実験では、HMF-E と HMF-R を混合して HMF を再構成させたときの降コレステロール作用の再現性について調べた。体重増加量および相対肝臓重量は対照の大豆たん白質群に比べ、試験群でいずれも低かった。血清コレステロール濃度は HMF 群で対照群に比べ有意に低かったが、再構成群ではその中間の値であった。逆に、HDL-コレステロール濃度は HMF 群で最も高く、大豆たん白質群で最低で、再構成群では中間の値であった。肝臓コレステロールについても血清コレステロールの場合と同様の傾向にあった。2週目における糞便へのステロイド排泄量は HMF 群 > 再構成群 > 対照群の順であった。

考 察

本研究の結果、大豆たん白質中の不消化性高分子画分は、胆汁酸の再吸収阻害（コレステロール吸収の阻害）を介して食餌コレステロールによる血清および肝臓コレステロールの上昇を効果的に抑制することが示された。この効果はペプシン処理によっても再現できるので、大豆たん白質摂取時に消化管内でこのような胆汁酸結合性ペプチドが生成する可能性を強く支持す

る。一方、可消化の低分子画分には血清コレステロール上昇作用があることから¹⁾、この画分を水洗により HMF から除去することによって、HMF の降コレステロール作用を高めることができる。

HMF 中に濃縮される脂質（主にリン脂質）やサボニンもまた降コレステロール作用があることが知られているが、今回の実験の結果からは、これらのほとんどを含む HMF-E 画分の効果ははっきりしなかった。しかし、大豆サボニンはそれが HMF-E 中に存在する程度の量では、HMF 摂取時におけるような劇的な降コレステロール作用を発揮せず（未発表データ）、降コレステロール作用の主因子とはみなせない。リン脂質成分についても、その含量から効果を説明し難い⁴⁾。むしろ、メタノールにより抽出されたペプチドに活性の責任を求められよう。

HMF-R をさらに加水分解すると、降コレステロール作用は消失し、ステロイド排泄量も増加しないことから、HMF 中の比較的大きな分子量のペプチドが主要な役割を果たしていると考えられる。一方 HMF は一旦メタノール処理を受けると、抽出画分と残渣を再混合して HMF を再構成しても、降コレステロール作用はもとのレベルまでには回復しなかった。このことは、メタノール処理によるペプチドの変性によるものであろう。

本研究において *in vitro* における胆汁酸結合能とステロイド排泄との間に正の相関が認められた。

Table 4. Effects of methanol treatment of high-molecular fraction on serum and liver cholesterol of rats (Exp. II)¹

Cholesterol	Groups				
	Soybean protein	Microbial protease digestion			Pepsin digestion HMF
		HMF	HMF-E	HMF-R	
Serum (<i>mg/100 ml</i>)	291±11 ^a	125±5 ^b	171±12 ^c	189±17 ^c	109±5 ^b
Liver (<i>mg/g</i>)	45.5±2.2 ^a	15.3±1.4 ^b	20.5±1.5 ^b	35.6±5.2 ^c	6.99±0.70 ^d

¹Rats weighed on average 151 g were fed experimental diet for 2 weeks. Values are mean ±SE of 6 rats per group. ^{a-c}Non-matching superscripts in each row denote significant (p<0.05) difference.

Table 5. Effects of re-combination of high-molecular fraction of soybean protein on serum and liver cholesterol of rats (Exp. III)¹

Cholesterol	Groups		
	Soybean protein	HMF	HMF-E+ HMF-R
Serum (<i>mg/100 ml</i>)			
Total	206±5 ^a	89.1±6.2 ^b	150±18 ^c
HDL	16.2±2.6 ^a	39.9±1.5 ^b	30.4±1.9 ^c
Liver (<i>mg/g</i>)	42.2±1.8 ^a	26.3±0.8 ^b	32.0±1.2 ^c

¹Male rats weighed on average 150 g were fed experimental diets for 3 weeks. Values are mean±SE of 6 rats per group. ^{a-c}Non-matched superscripts in each row denote significant (p<0.05) difference.

文 献

- 1) Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M. (1988) : The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**, 115-122.
- 2) Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F. (1986): Involvement of post-digestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217-1222.
- 3) Makino, S., Nakashima, H., Minami, K., Moriyama, R. and Takao, S. (1988) : Bile acid-binding protein from soybean seed : Isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 803-809.
- 4) Imaizumi, K., Mawatari, K., Murata, M., Ikeda, I. and Sugano, M. (1983) : The contrasting effect of dietary phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on serum lipoproteins and liver lipids in rats. *J. Nutr.*, **113**, 2402-2411.