

オリゴメチオニンをプローブとするたん白質，ペプチド， アミノ酸混合物の栄養特性評価

NUTRITIONAL EVALUATION OF DIETARY PROTEIN, PEPTIDES,
AND AMINO ACIDS USING OLIGOMETHIONINE AS A PROBE FOR
EXOCRINE PANCREATIC SECRETION

桐山修八・尹 曉紅（北海道大学農学部）
知地英征（藤女子短期大学）

Shuhachi KIRIYAMA¹, Hideyuki CHIJI² and Xiaohodg YIN¹

¹Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

²Fuji Women's College, Sapporo 001

ABSTRACT

When oligo-L-methionine (OM, a mixture of hexa- and hepta-methionine) was supplemented to low casein (Cas) and soybean protein isolate (SPI) diets, growth-stimulating effects of OM was observed only in the Cas diet. In this report, following experiments were made to clarify the cause of the difference in effects of feeding OM-supplemented Cas or SPI diets. Dietary nitrogen sources used here were SPI, its pepsin hydrolysate (molecular weight : 1.5-10 kD, SPI-H), insoluble residues after pepsin hydrolysis of SPI (SPI-R), a mixture of small peptides from SPI (containing di- and tri-peptides and amino acids supplied by Fuji Oil Co., SPI-SP), and the corresponding amino acid mixture (SPI-AA). In experiment 1, we compared the digestibility of OM by measuring the incremental portal methionine (Met) concentration (delta-PMC) 30 min after feeding diets containing above nitrogen sources with 3% OM to fasted rats. Delta-PMC of rats fed SPI-H plus 3% OM diet was two times higher than that when fed the SPI plus 3% OM diet. In experiment 2, rats were fed the same diets supplemented with 0.3% Met or 0.3% OM for 2 wk to compare the supplemental effects of Met and OM. The addition of 0.3% OM to SPI-H and SPI-AA diets significantly improved the growth rate of rats. When 0.3% OM was supplemented to SPI, SPI-R, and SPI-SP diets, the growth rate was not improved. There was a close correlation between delta-PMC and growth-stimulating effects of OM supplemented to diets containing nitrogen sources with various molecular sizes ($r=0.97, n=4, p<0.01$), except for the case of SPI-SP. These results suggest that nitrogen sources used here have different abilities to stimulate exocrine pancreatic enzyme secretion (SPI-H has the highest). *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **11**, 78-82, 1990.

低カゼイン（Cas）飼料と低分離大豆たん白質（SPI）飼料はどちらもメチオニン（Met）が第一制限アミノ酸であるが、これらの飼料にMetを0.3%添加するとラットの成長は著しく改善される。しかし、こ

のMetの代りにオリゴメチオニン（OM、重合度6-7の混合物）を添加すると、Cas飼料だけに有意な成長改善効果が認められ、SPIでは成長の改善は見られなかった¹⁾。このようにOMの補足効果が大きく異なる

る原因は、摂取した飼料たん白質源の膵外分泌刺激能力の違いのためであると推定した。一方、小麦グルテン (WG) とそのペプシン水解物 (WGH, 平均分子量約 1~1.5万) を用いて検討したところ, OM の補足効果は原料たん白質よりペプシン水解物の方が有意に高いことを見出し, またそれはやはり飼料窒素源の膵外分泌刺激能力に依存していることを明らかにした²⁾。これはたん白質をペプシン水解した結果, その消化管内での溶解性やプロテアーゼとの親和性などが増したことになるものと思われた。そこで今回は SPI を WG のペプシン水解と同じように処理し, いままで SPI で見られなかった OM の補足効果が出現するかどうかを調べることにした。

実験方法

実験材料

OM は荒井ら³⁾と Jost ら⁴⁾の方法で L-メチオニンエチルエステルから酵素的に合成した。

SPI のペプシン水解物の調製はつぎのとおりである。100 g の SPI に稀塩酸を 1.8 l 加え, ホモジナイズした後, 1 N HCl で pH 1.85 に調整する。さらにペプシンを 1.0 g 添加し, 37℃, 12 時間反応させる。反応 pH は pH Stat で 1.85 に保持する。反応終了後, 20 分煮沸し, 酵素を失活させ, 中和し, 遠心分離した。得た沈澱を遠心分離で, 上清を限外濾過でそれぞれ脱塩処理し, 凍結乾燥した。沈澱はペプシン抵抗性区分 (SPI-R) とし, 上清はペプシン水解物 (SPI-H) と呼ぶことにした。また, ゲル濾過で SPI-H の分子量を測定した結果, 平均分子量は 1.5-10 kD であることが分かった。ハイニート-PM (SPI-SP) は不二製油株式会社から頂いた製品で, 主としてジ-, トリ-ペプチド及びアミノ酸の混合物である。また, SPI にシュミレートしたアミノ酸混合物 (SPI-AA) も用いた。

動物実験と分析

実験 1

OM 消化性に対する残存失活ペプシンの影響

SPI-H を調製する際, 少量の失活ペプシンがサンプルに混ざっている。そこで, 本実験を始める前にまずそれが OM の消化性に影響するかどうかを調べた。3 週齢の SD 系雄ラットを 25% Cas 飼料で 2 週間飼育し, 1 日絶食させた後, 実験飼料を各 2.0 g ずつ再給餌し, 30 分後, 麻酔下で門脈から採血し, 血中 Met 濃度を測定した。実験飼料としては 8% Cas, 8% Cas+3% OM, 8% Cas+3% OM+0.08% 失活 pepsin と 10% SPI, 10% SPI+3% OM, 10% SPI+3% OM+0.1% 失活 pepsin を用い, 各群 6 匹で行った。

実験 2

化学的形態の異なった飼料窒素源による OM の消化性

実験 2 では, 化学的形態の異なったいろんな SPI を用い, それらの材料に対する OM の消化性の違いを調べた。方法は実験 1 と同様にラットに以下の飼料: 8% Cas, 10% SPI, 9.25% SPI-H, 12.36% SPI-R, 10.13% SPI-SP, 8.49% SPI-AA 及びこれらに 3% OM を添加した飼料を再給餌し, 30 分後, 麻酔下で門脈から採血し, 血中 Met 濃度を測定した。また, 8% Cas 飼料以外の飼料はすべて窒素含量が等しいものである。

実験 3

化学的形態の異なった飼料窒素源による OM の補足効果

SD 系雄ラットを 25% Cas 飼料で 2 日間, さらに 8% Cas 飼料で 2 日間予備飼育した後, 実験 2 と同じ飼料 (8% Cas だけを除き) およびそれらに 0.3% Met または 0.3% OM を添加した飼料で 2 週間飼育した。ラットの成長速度を比較することによって, OM の補足効果を調べた。

実験 4

化学的形態の異なった飼料窒素源による膵外分泌応答

実験 1 と同様に絶食ラットに以下の飼料: 8% Cas, 10% SPI, 9.25% SPI-H, 12.36% SPI-R, 10.13% SPI-SP, 8.49% SPI-AA を再給餌し, 30 分後, 麻酔下で総胆管から胆胆汁を 5 分間集め, その中の膵たん白質分泌量及び各膵プロテアーゼ (トリプシン, キモトリプシン, カルボキシペプチダーゼ A) の活性を測定した。

結果と考察

SPI-H に残存するペプシンの影響 (実験 1)

8% Cas+3% OM 摂取群と 8% Cas+3% OM+0.08% 失活 pepsin 摂取群, また 10% SPI+3% OM 摂取群と 10% SPI+3% OM+0.1% 失活 pepsin 摂取群の門脈血中 Met 濃度はほとんど同じだったので, SPI-H に少量残存した失活ペプシンは OM の消化性に影響しないと考えた (Table 1)。

化学的形態の異なった飼料窒素源による OM の消化性 (実験 2)

実験 2 の結果を Fig. 1 に示した。この図に用いた数値は OM 添加群と OM 無添加群の間の差, 即ち血中 Met 濃度の増分である。SPI-R 摂取時と SPI-SP 摂取時の門脈血中 Met 濃度の増分は SPI 摂取群とはほぼ同じ値である。SPI-H 摂取時の Met 濃度の増分はバ

Table 1. Effect of heat-inactivated pepsin added to an 8% casein (Cas) and 10% soy protein isolate(SPI) diets on digestibility of oligo-L-methionine (OM) (experiment 1)

Test diet	Portal plasma Met concentration
	$\mu\text{mol/l plasma}$
8% Cas (8C)	$50.9 \pm 1.8^{\text{bc},1}$
8C+3% OM	$64.9 \pm 4.0^{\text{a}}$
8C+3% OM+0.08% boiled pepsin	$60.7 \pm 3.8^{\text{ab}}$
10% SPI (10S)	$45.9 \pm 2.6^{\text{c}}$
10S+3% OM	$51.8 \pm 5.8^{\text{bc}}$
10S+3% OM+0.1% boiled pepsin	$51.3 \pm 3.1^{\text{bc}}$

¹ Mean $\pm$ SEM (n=6). Values not sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

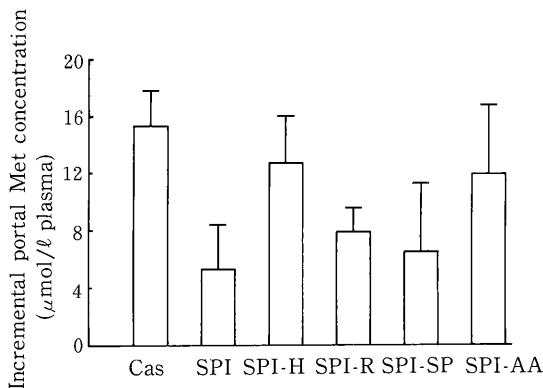


Fig. 1. Incremental portal plasma methionine (Met) concentration 30 min after feeding rats fasted for 24 h various diets with 3% oligo-L-methionine (OM) (experiment 2). Cas, 8% casein diet; SPI, 10% soy protein isolate diet; SPI-H, diet containing 9.25% pepsin hydrolysate of SPI; SPI-R, diet containing 12.4% insoluble residue after pepsin hydrolysis of SPI; SPI-SP, diet containing 10.1% mixture of amino acids and small peptides (di- and tripeptides) prepared by bacterial enzyme-hydrolysis of SPI; and SPI-AA, diet containing 8.5% amino acid mixture simulated to SPI. Rats were fed a 25% casein diet for 2 weeks before the fast. Each value is the mean of six animals and vertical bars represent SEM.

ラツキが大きかったため有意差が出なかったが、SPI 摂取時の 2 倍以上にも達したので、OM の消化性は大きく改善される傾向があると思われる。これはたん白質をペプチド化することによってその膵外分泌刺激能力が増強したことによるものだと考えている。

化学的形態の異なった飼料窒素源による OM の補足効果 (実験 3)

Fig. 2 は SPI と SPI-R をベースとした時のラットの成長曲線である。いずれも Met 添加によってラットの成長は有意に改善されるが、OM 添加による成長改善効果はこれまで報告した結果とまったく同じように認められなかった。SPI-H, SPI-SP, SPI-AA の場合 (Fig. 3), 3 つの材料ともほぼ同じ応答を示した。どちらも Met 添加群の成長速度は他の群に比べ、有意に高く、また、OM 添加による補足効果は Met 添加群ほどに達していなかったが、OM 添加の SPI-H 群と SPI-AA 群では有意な成長改善が見られた。これは実験 2 で、OM 添加 SPI-H 群でインタクト SPI より OM の消化性が改善されていたという結果とよく一致している。

Fig. 4 では 4 種の飼料について OM 添加飼料摂取時の門脈血中 Met 濃度の増分 (即ち、OM の消化性) と OM 添加飼料で 2 週間飼育した後の体重増加量 (即ち、OM の補足効果) との相関性を調べてみた。このように両者の間に強い相関が見られた ($Y = 2.04X + 6.47$, $r = 0.97$, $n = 4$, $p < 0.01$)。ここで、SPI-SP を摂取した場合だけかなり異なった値を示したが、この原因はまだ分からない。SPI, SPI-H, SPI-R, SPI-AA の 4 種に対する応答から、OM の補足効果の強さ、弱さはたん白質源による OM の消化性の違いとよく関連していると考えて良いのではないと思われる。

化学的形態の異なった飼料窒素源による膵外分泌 (実験 4)

実験 4 の結果は Table 2 に示した。膵たん白質の分泌応答には、各群の間で差はなかった。また、各膵プロテアーゼの活性について見ると、SPI-H 摂取群では SPI 摂取群より、やや高いものの、有意な差が認められなかった。以前の研究²⁾で、小麦グルテンのペプシン水解物を用いた場合、原料の小麦グルテンより膵外分泌刺激活性が有意に高くなった結果を得たが、今回は、SPI-H の膵外分泌刺激能力はグルテンのペプシン水解物ほどに達していなかった。その原因はおそらくこれらのペプチドのサイズとシーケンスの違いによるものと考えられる。これはペプチドの栄養特性を明らかにする面で重要と思われる。今後、この点についてさらに検討する予定である。

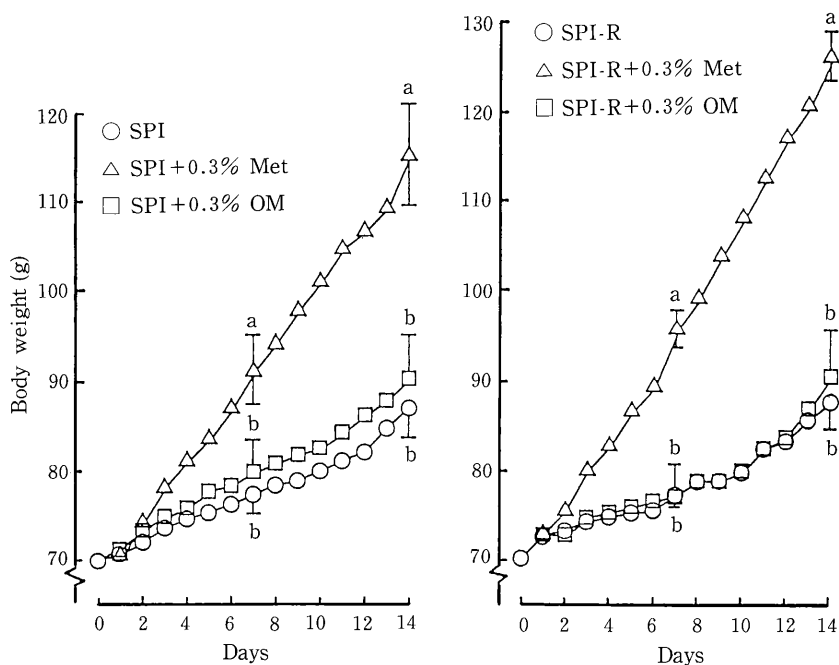


Fig. 2. Change in body weight of rats fed 10% SPI or 12.4% SPI-R basal diet (○), and the basal diet plus 0.3% Met (△) or 0.3% OM (□) (experiment 3). Each point is the mean of six animals and vertical bars represent SEM. Values not sharing a common superscript letter are significantly different when tested by ANOVA and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

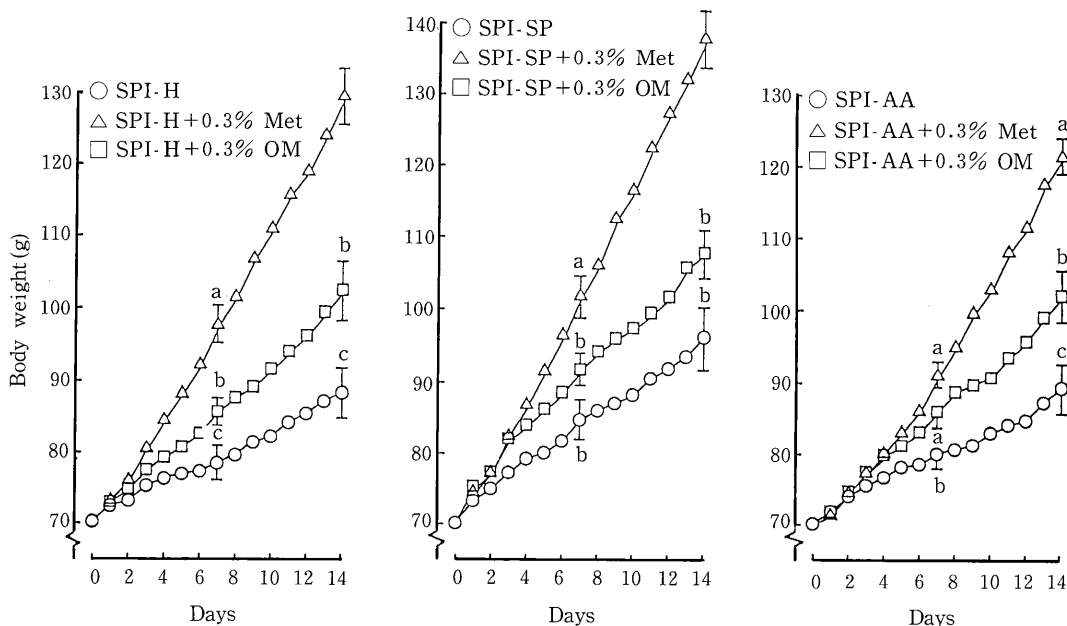


Fig. 3. Change in body weight in rats fed 9.25% SPI-H, 10.1% SPI-SP or 8.5% SPI-AA basal diet (○), and these basal diets plus 0.3% Met (△), and 0.3% OM (□) (experiment 3). Each point is the mean of six animals and vertical bars represent SEM. Values not sharing a common superscript letter are significantly different when tested by ANOVA and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 2. Exocrine pancreatic enzyme secretion in response to various dietary nitrogen sources with different molecular sizes (experiment 4)

	Total activity of			Protein concentration
	Carboxypeptidase A	Trypsin	Chymotrypsin	
	units/5 min	units/5 min	units/5 min	mg/ml
8% Cas	30.9±6.4 ^{a,1}	11.1±2.7	6.3±0.8 ^{abc}	7.6±0.9
10% SPI	25.5±4.5 ^{ab}	8.8±1.4	5.5±0.9 ^{abc}	6.9±1.1
9.3% SPI-H	27.5±3.7 ^{ab}	9.9±1.5	7.0±1.1 ^{ab}	7.9±0.8
12.4% SPI-R	21.4±3.3 ^{ab}	7.9±1.0	5.2±0.9 ^{bc}	7.8±0.8
10.1% SPI-SP	32.3±3.3 ^a	10.8±1.5	6.8±0.9 ^{ab}	8.5±0.9
8.5% SPI-AA	31.7±2.6 ^a	11.2±1.0	8.3±1.1 ^a	7.9±0.8
Fast	17.4±3.8 ²	6.4±1.4	3.7±0.7 ^c	6.8±1.1

¹ Mean±SEM (n=6). Values not sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

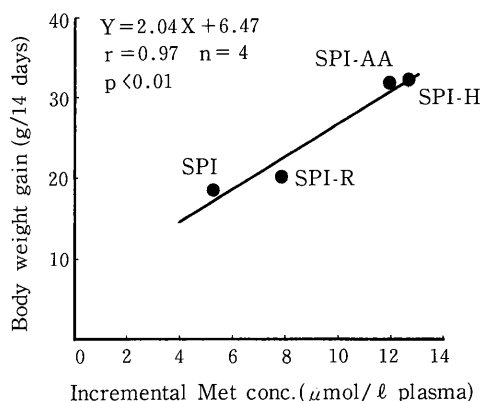


Fig. 4. Correlation between incremental portal Met concentration (experiment 2) and growth-stimulating effects of OM when supplemented to diets containing various nitrogen sources derived from SPI with different molecular sizes and amino acid mixture simulated to SPI (experiment 3).

文 献

- 1) Chiji, H., Harayama, K. and Kiriyaama, S. (1990): Effects of feeding rats low protein diets containing casein or soy protein isolate supplemented with methionine or oligo-L-methionine. *J. Nutr.*, **120**, 166-171.
- 2) 尹 曉紅, 知地英征, 桐山修八 (1989): 小麦グルテン, そのベブシン水解物及びアミノ酸混合物に対するオリゴメチオニンの補足効果と腸外分泌応答の差異. 日本農化大会要旨集, P 327.
- 3) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M. (1979): A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: papain-catalyzed polymerization of L-methionine ethyl ester and its regulation by adding a protein substrate. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1069-1074.
- 4) Jost, R., Brambilla, E., Monti, J. C. and Luis, P. L. (1980): Papain catalyzed oligomerization of α -amino acids. Synthesis and characterization of water-insoluble oligomers of L-methionine. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 375-384.