

オリゴメチオニンをプローブとするたん白質，ペプチド の栄養特性の評価 (2)

NUTRITIONAL EVALUATION OF DIETARY PROTEIN AND PEPTIDES USING OLIGO-L-METHIONINE AS A PROBE FOR DIGESTIVE FUNCTIONS

桐山修八・尹 暁紅・原 博 (北海道大学農学部)
知地英征 (藤女子短期大学)

Shuhachi KIRIYAMA¹, Xiaohong YIN¹, Hiroshi HARA¹ and Hideyuki CHIJI²

¹Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

²Fuji Women's College, Sapporo 001

ABSTRACT

We demonstrated that the pepsin hydrolysate of SPI (H-SPI) enhanced the absorption of oligo-L-methionine (OM) in early stages of feeding. Pancreatic protease secretions were increased by direct infusion of casein, SPI and H-SPI into the duodenum under pentobarbital anesthesia, and H-SPI tended to be higher than SPI in the secretion of chymotrypsin and carboxypeptidase A. In vitro digestibility of H-SPI by bile-pancreatic juice was higher than that of SPI and similar to casein. In order to increase the solubility of SPI, we prepared deamidated SPI (D-SPI) and examined the supplementary effects of OM to a low D-SPI diet, and estimated the OM absorption and pancreatic protease secretions after feeding of D-SPI diet. All parameters with D-SPI were identical to those with SPI. We conclude that the effects of H-SPI on the increases of OM absorption and pancreatic secretions are not responsible for its solubility and those may attribute to the effects of certain peptides contained in H-SPI. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 12, 85-90, 1991.

我々は、これまで難消化性ペプチドであるオリゴメチオニン (OM, 重合度7-11) をプローブとして、食餌たん白質、ペプチド、アミノ酸の消化管機能への影響を検索してきた^{1,2)}。本研究はその中で、特にペプチドに重点をおいたもので、昨年度は、SPI のペプシン分解物 (H-SPI) を低レベルで含む食餌を摂取すると、OM の吸収速度が、低 SPI 食に比べ、高くなることを報告した (Fig. 1)³⁾。

今回、この機構を探ることを目的として、N源の直接の膵外分泌刺激を見るために、十二指腸にカゼイン、SPI および H-SPI を連続注入して、膵プロテアーゼ

分泌を測定した。また、先の、SPI ペプチドの効果は、その溶解性の増加が寄与している可能性が考えられたため、SPI を低分子化せずに溶解性を増す方法として、SPI を脱アミド化して、OM をプローブとした評価を行った。

実験方法

実験材料

OM は、荒井ら⁴⁾、Jost ら⁵⁾の方法に従い、L-メチオニン (味の素) から酵素合成した。SPI のペプシン分解物 (H-SPI) は、前報³⁾に従って調製した。また、脱

アミド化 SPI (D-SPI) は、Fig. 2 に従い調製した。脱アミド反応中のアンモニア遊離速度は、Fig. 3 に示したが、15 hr の反応で、約50%のアミド態アンモニウムが SPI より除去された。Fig. 4 には、脱アミド化 SPI の分子量分布を intact な SPI との比較で示した。

動物実験と分析

実験1 十二指腸内投与による膵外分泌

3 週齢 SD 系雄ラットを、2 週間、25%カゼイン-蔗糖食で予備飼育した後、Fig. 5 に示した方法で、膵外分泌を測定した。すなわち、1 日絶食後ネンブタール麻酔下、開腹、胃部より十二指腸にカテーテルを通し、infusion pump (Harvard Model 975) を用いて、4 mL/hr の流速で、30 分間、1%のたん白質、ペプチドの溶液を注入。ただちに、総胆管より、カニユーレを挿入して、胆膵液を 5 分間採取、トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ A (CPA) を測定した。なお、control として、リン酸緩衝液を同様に注入した。

実験2 胆膵液 (BPJ) による人工消化

1%たん白質および、ペプチド溶液を、ラットより採取した BPJ 0.5%を含むリン酸緩衝液 (pH 8.0) 中、37℃で分解した。なお、BPJ はあらかじめ、0.2%エンテロキナーゼ溶液で活性化した。値は TNBS 法で測定したアミノ基末端の増分で表わした。

実験3 脱アミド化 SPI に対する OM 補足効果

3 週齢 SD 系雄ラットを 4 日間、予備飼育した後、0.3%の OM を添加した 8%カゼイン、10% SPI およ

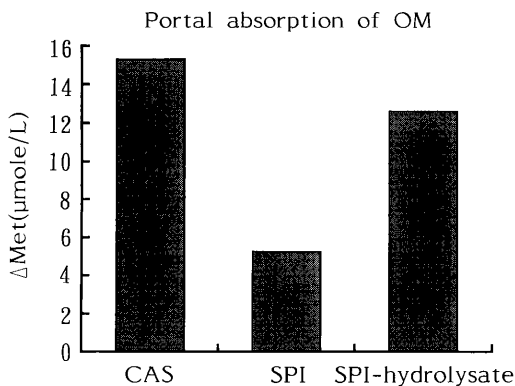


Fig. 1. The increments of methionine concentration of portal blood 30 min after feeding of low protein diets containing 3% oligo-L-methionine. The values were estimated by subtracting the average values of each diet group without OM (n=6).

び10.6%脱アミド化 SPI (D-SPI) 食を、2 週間投与し、体重増加より OM の各たん白質飼料に対する補足効果を比較した。

実験4

3 週齢 SD 系雄ラットを、25%カゼイン-蔗糖食で2 週間予備飼育した後、1 日絶食し、3%の OM を含む試験食2 g を再給餌し、30分後、ネンブタール麻酔下、門脈血を採取し、メチオニン濃度を測定した。値は OM を含まない試験食を再給餌したラットの値を差し引いて、OM 吸収速度とした。

実験5

実験4と同様のラットに、各試験食のみを再給餌し、5 分間総胆管より BPJ を採取、各プロテアーゼを測定した。

結果と考察

Table 1 は、十二指腸に各N源を直接 infusion した

Fig. 2. Preparation of deamidated SPI.

Soy protein isolate (SPI)

250 g
add water 4.25 L
Homogenize
add 0.1 N HCl 0.5 L
95°C for 15 hr
Adjust to pH 7.0 with 0.1 N NaOH
Freeze dry

Deamidated SPI

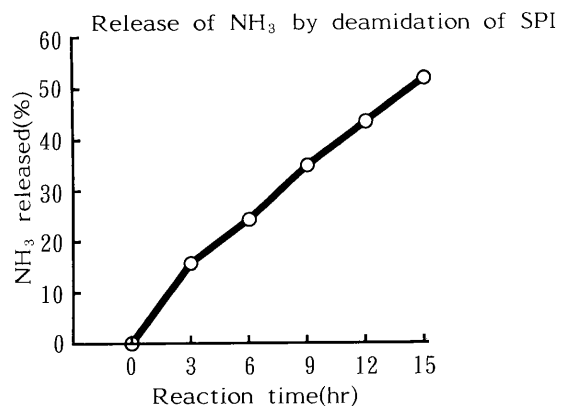


Fig. 3. The amount of ammonia released from SPI by incubation in 0.05 N HCl at 95°C.

ときの、膵プロテアーゼ分泌を示している。Control に対し、各N源投与で、膵プロテアーゼ分泌は上昇し、とくに CPA は著明であった。SPI ペプシン分解物

(H-SPI) 投与では、OM 分解活性のある、キモトリプシン、CPA において、上昇傾向にあった。このことは、緒言で述べた、H-SPI による OM 吸収促進作用

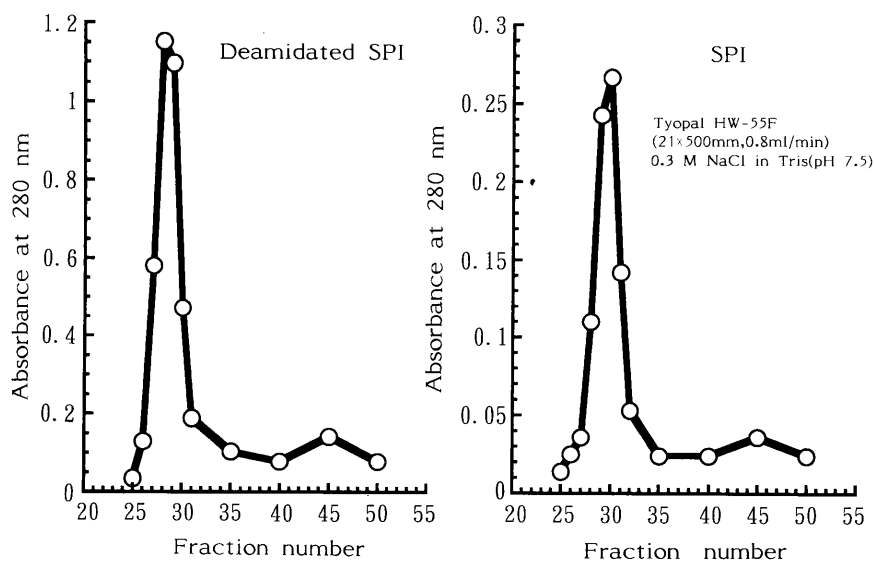


Fig. 4. Chromatographic profiles of deamidated SPI and SPI.

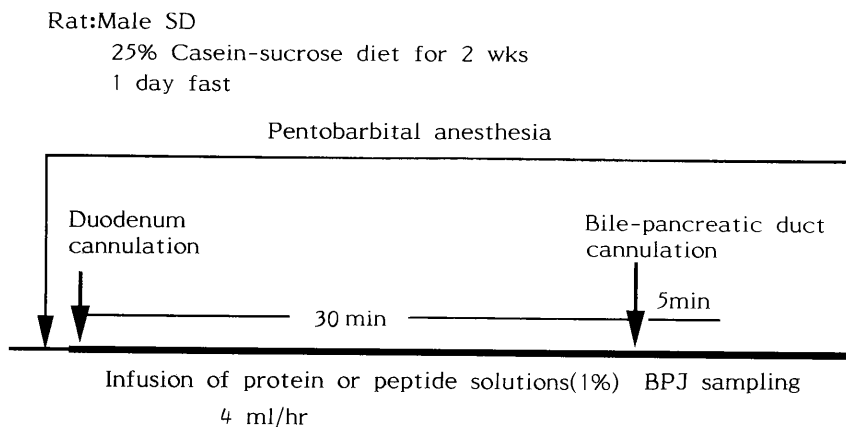


Fig. 5.

Table 1. Pancreatic secretions after duodenum infusion of SPI or peptic digest of SPI (H-SPI) for 30 min under pentobarbital anesthesia

	Control	Casein	SPI	H-SPI
Trypsin, <i>TAME Unit</i>	4.3±0.9	5.8±0.5	6.2±1.2	6.3±1.0
Chymotrypsin, <i>BTEE Unit</i>	3.0±0.7	4.0±0.6	3.3±0.4	4.0±0.4
Carboxypeptidase A, <i>ZGP Unit</i>	8.6±2.1	15.6±1.8	13.6±2.8	14.3±2.6

Mean±SEM (n=6)

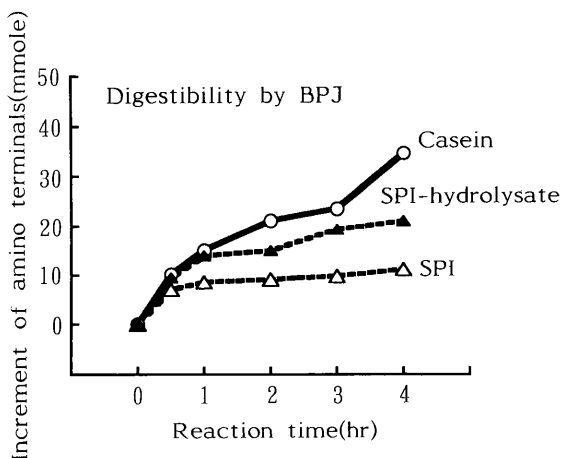


Fig. 6. Increase in amino terminals after bile-pancreatic juice digestion in vitro. Amino terminals were estimated by the TNBS method. One percent protein or peptide solution was digested by 0.5 % BPJ activated by enterokinase in phosphate buffer (pH 8.0) at 37°C.

との関連性を示唆している。

Fig. 6 には H-SPI の BPJ による人工消化の結果を示した。SPI はカゼインと比べその分解性は低い、ペプシン分解により、incubation 初期には、カゼインと同様の BPJ に対する感受性を示した。このことは、BPJ への感受性と膵外分泌、さらには OM の補足効果との関連を示唆している。

Fig. 7 は、脱アミド化 SPI (D-SPI) に対する OM の補足効果を、カゼインおよび SPI と比較したものである。D-SPI は SPI と同様、全く OM の補足効果は見られなかった。Fig. 8 には投与初期の門脈中への OM 吸収を示すが (右図)、補足効果と同様、D-SPI では SPI に比べ、OM 吸収の亢進は見られず、ともにカゼイン食での吸収より低値であった。

Table 2 に示した結果より、D-SPI は SPI と全く同じ膵プロテアーゼ分泌速度を示し、SPI の溶解性の上昇は、OM の補足効果、OM 吸収速度、膵外分泌に影響しないことが確認された。

以上の結果から、SPI のペプシン分解による OM 吸収の亢進は、その溶解性の上昇とは関係がなく、ペプチドが直接、膵外分泌等を亢進させることによって、発現したものと推定された。

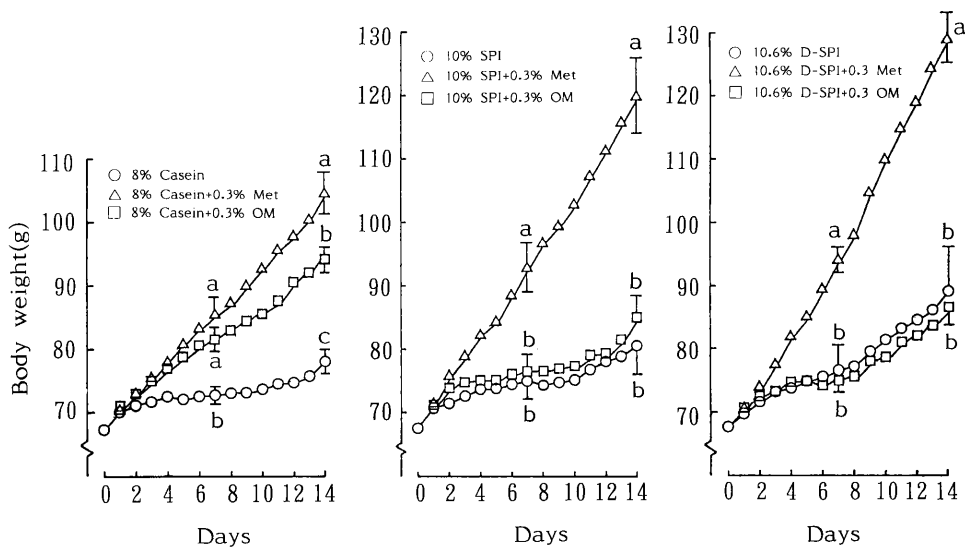


Fig. 7. Changes in body weight of rats fed an 8% casein, 10% SPI, and 10.6% deamidated SPI diets with or without 0.3% L-methionine or 0.3% oligo-L-methionine. Values were mean $\pm$ SEM (n=6). Values not sharing a common letter are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

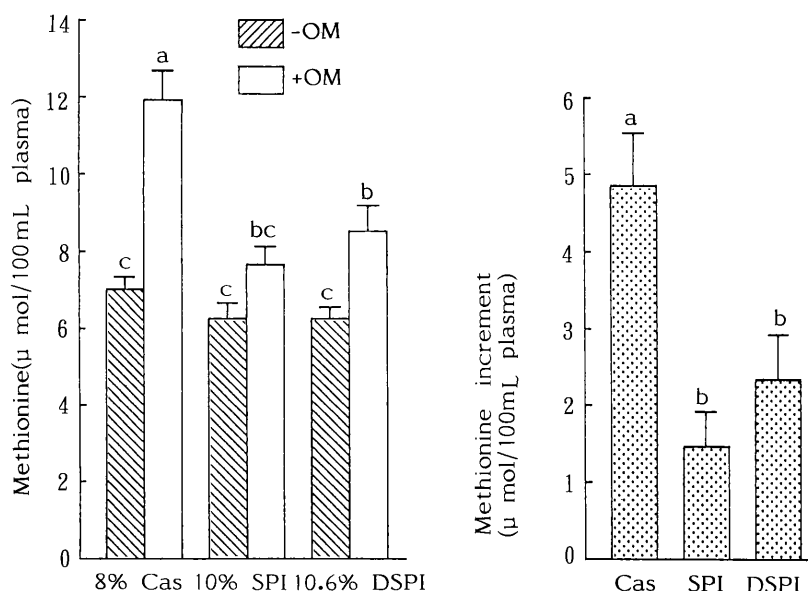


Fig. 8. Methionine concentrations of portal and venous blood after feeding of 8% casein, 10% SPI, and 10.6% deamidated SPI diets to rats fasted for 24 hr (left panel) and methionine increments in portal blood after feeding of diets containing 3% oligo-L-methionine (OM) (right panel). The increments were estimated by subtracting the average values of the rats fed the diets without OM from those with OM. Values were mean $\pm$ SEM (n=6). Columns not sharing a common letter are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 2. Pancreatic secretions after feeding of SPI or deamidated SPI (D-SPI) for 5 min under pentobarbital anesthesia

	10% SPI diet	10.6% D-SPI diet
Volume of BPJ, μ L	76 $\pm$ 3	80 $\pm$ 4
Trypsin, TAME Unit	10.7 $\pm$ 1.0	10.5 $\pm$ 1.4
Chymotrypsin, BTEE Unit	6.6 $\pm$ 1.0	5.3 $\pm$ 0.7
Carboxypeptidase A, ZGP Unit	14.2 $\pm$ 2.3	14.1 $\pm$ 1.1

Mean $\pm$ SEM (n=6)

文 献

- 1) Chiji, H., Harayama, K. and Kiriya, 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) Hara, H. and Kiriya, S. (1991): Absorptive behavior of oligo-L-methionine and dietary proteins in a casein or soybean protein diet: Porto-venous differences in amino acid concentrations in unrestrained rats. *J. Nutr.*, **121**, 638-645.
- 3) 桐山修八, 尹 曉紅, 知地英征 (1990): 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 78-82.
- 4) 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.
- 5) Jost, R., Brambilla, E., Monti, J. C. and Luis, P. (1980): Papain catalyzed oligomerization of α -amino acid. Synthesis and characterization of water-insoluble oligomers of L-methionine. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 375-384.