

大豆ペプチドのメチオニン利用効率—肝 γ -glutamyl-transferase 活性上昇の分離大豆たん白質との比較—

BIOAVAILABILITY OF METHIONINE IN SOYBEAN PEPTIDE—
COMPARISON WITH SOYBEAN PROTEIN IN INCREASING HE-
PATIC γ -GLUTAMYLTRANSFERASE ACTIVITY—

谷口巳佐子・木下千鶴（中村学園大学食物栄養学科）

Misako TANIGUCHI and Chizuru KINOSHITA

Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka
814-01

ABSTRACT

When weanling male rats were fed a 10% SPI diet for 3 weeks, hepatic γ -glutamyltransferase (GGT) activity increased in comparison with that fed a 10% casein or laboratory chow diet. Supplement of 0.3% methionine to a 10% SPI diet suppressed increase of GGT activity, but not by cystine. By feeding a 10% soybean peptide diet, increase of GGT activity was suppressed slightly, but statistically not significant. On the other hand, significant suppression of GGT activity was observed in rats fed a purified soybean peptide diet. Response of GGT activity to glucocorticoid (GC) was demonstrated in hepatocytes prepared from weanling rats and rats fed a 10% SPI diet while response to GC was repressed during growth when fed a laboratory chow diet. Comparing with a SPI diet, response of GGT activity in primary cultured hepatocytes to GC was slightly lowered by feeding on a purified soybean peptide diet. These results indicate that low bioavailability of methionine in SPI was improved by digesting SPI to peptides and/or removing non-peptide fractions. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 13, 34-37, 1992.

γ -Glutamyltransferase (GTT) はグルタチオン (GSH) の γ -グルタミル基を転移させる細胞膜酵素で、動物の肝臓では胎児期を除き活性は非常に低く、癌化すると活性が上昇することが知られている^{1,2)}。胎児期のほか、離乳直後期にも活性増加がみられ、2-3週後には成育レベルに低下する^{3,4)}。これらの活性増大期の GGT はグルココルチコイド (GC) で誘導され、成育にとともになくなる⁵⁾。しかし、離乳直後からシロネズミを10%分離大豆たん白質 (SPI) 飼料で飼育すると、GGT 活性は次第に高くなり、GC による活性の誘導が見られる。10% SPI による GGT 活性の増加は、SPI

のメチオニンの利用効率が低いことによることを見出された。この理由として1) SPI の消化が悪い、2) 吸収効率が低い、3) SPI にメチオニン利用を低める物質がある、などが推定される。SPI の代わりに、大豆ペプチドをシロネズミに与え、GGT 活性の変動を SPI のものと比較し、メチオニンの利用効率について調べた結果を報告する。

また、10% SPI 飼料で飼育したシロネズミから分離肝細胞を調製し、初代培養細胞を用い GC 感受性についてペプチド飼育のものとの比較を行った。

実験方法

動物と飼料

シロネズミ (Wistar 系, 雄性, 21日齢) を Table 1 の飼料を自由摂食させ飼育した。分離大豆たん白質 (SPI) はフジプロ-R; 不二製油KK, 大豆ペプチド (SP) はハイニュート PM; 不二製油KKのものをを用いた。SPI を限外濾過, ペプチダーゼ処理より, 陰イオン交換樹脂処理, 電気透析を行い, フィチン酸, その他の低分子を除いて精製した SP (p-SP) は不二製油KK研究室で調製されたものをを用いた。アミノ酸混合飼料は SPI 構成アミノ酸相当のものを, それぞれのアミノ酸を混合し調製した。カゼイン飼料は SPI の代わりにビタミンフリーカゼイン (ICN Bio-chemicals, Cleveland, OH, U. S. A.) をを用いた。たん白質レベルを変えた場合はデキストリン, アミノ酸混合では, グルタミン酸でそれぞれ総量を調整した。

酵素活性の測定

3 週間飼育後, 肝臓を取り出し, 4 倍容の 0.25 M シュクロース溶液でホモジナイズし, 最終濃度 1% Triton として膜結合 GGT を可溶化し, 15,000 rpm 上清を酵素標品として使用した。GGT 活性は Szasz の方法で測定した⁶⁾。GSH は dinitrobenzene 誘導体とし HPLC で定量した。

Table 1. Composition of a 10% soy protein diet

Component	Amount (%)
Soy protein isolate	10.0
Corn oil	5.0
Mineral mixture	5.0
Vitamin mixture	1.0
Choline chloride	0.15
Cellulose powder	2.0
Dextrin	to 100

Table 2. GGT activity and glutathione levels in livers of rats fed different protein diets.

Diets	BW gain g/3 wk	GGT mU/mg protein	GSH μmol/g liver
10% Soybean protein (SPI)	28.5 ± 3.5 (10)	3.90 ± 1.21 ^a (10)	1.67 ± 0.08 ^a (8)
10% SPI+0.3% methionine	54.8 ± 10.6 (8)	1.10 ± 0.27 ^b (8)	7.73 ± 2.20 ^c (4)
10% SPI+0.3% cystine	24.6 ± 3.1 (8)	4.82 ± 0.83 ^b (8)	8.40 ± 0.47 ^c (4)
10% Casein	60.5 ± 4.1 (8)	1.09 ± 0.52 ^b (8)	1.99 ± 0.32 ^a (4)
20% SPI	96.7 ± 7.1 (10)	1.42 ± 0.78 ^b (10)	2.06 ± 0.23 ^a (4)
Non-purified diet	123.0 ± 9.9 (10)	1.37 ± 0.46 ^b (10)	9.09 ± 1.60 ^c (4)

Values are mean ± SD. Figures in parentheses are numbers of rats used. Different letters denote significant differences between groups at least $p < 0.05$.

肝細胞分離と初代培養

3-5 週間飼育後, 肝臓をコラーゲナーゼ処理し⁷⁾, 分離した肝細胞を仔牛血清を含む MEM 培養液で 2 時間培養後, 無血清 MEM 培養液に dexamethasone (DX) を加え 3-5 日間培養し, 時間ごとの GGT 活性を測定した。

結果と考察

飼料による肝 GGT 活性の変化

離乳後 1 週で GGT 活性は上昇するが 10% カゼインまたは市販固形飼料 (クレア C2) で飼育した群では 3 週後, GGT 活性はほぼ成育レベルに低下する。しかし 10% SPI 飼料では徐々に上昇し低下はみられなかった。一方, メチオニン添加により成育にともなう活性は正常な経過変化を示した。しかしシスチン添加では GSH レベルは高くなるが, メチオニンに相当する効果は認められなかった。また 20% SPI 飼料群では, GSH レベルは低いが GGT 活性は固形飼料群と有意差はみられなかった (Table 2)。

SPI メチオニンの利用効率

メチオニン添加で GGT 活性の上昇の抑制がみられたので, SPI のアミノ酸に相当するアミノ酸混合飼料で SPI 飼育と同様な条件でシロネズミを飼育した。SPI 相当のメチオニン 1.2 g/全アミノ酸 100 g, シスチン 1.4 g/100 g 組成では GGT 活性は上昇せずメチオニン 0.5 g/100 g により活性の上昇がみられた。この結果から SPI メチオニンは遊離のものに比べ, 利用効率の低いことが推定された (Table 3)。

SPI, SP および精製 p-SP, それぞれ 10% 飼料で飼育し, 3 週後の GGT 活性の上昇への影響を比較した (Table 4)。10% SPI に比べ, SP では活性の上昇は低くなった。しかし, 動物数が少ないこともあり, SPI 群とは有意差はみられなかった。精製した p-SP 飼料群では 10% SPI 群に比べ有意な低下効果がみられた。

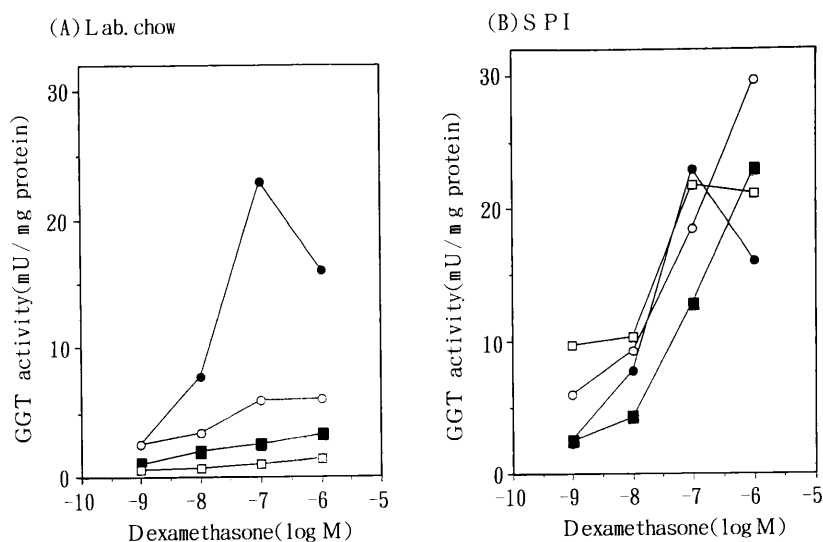


Fig. 1. Dose-response curves of dexamethasone to GGT activity of weanling rats and rats fed a SPI diet or laboratory chow diet,
—●— weanling, —○— 3w, —■— 5w, —□— 8w.

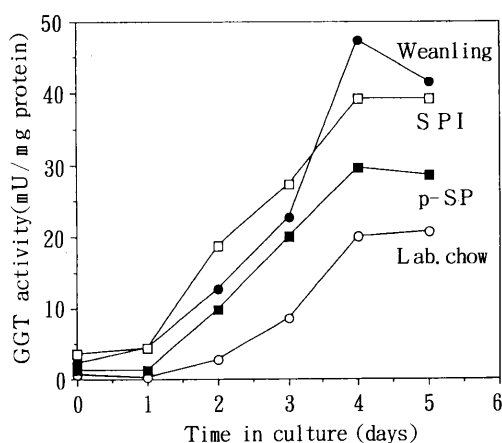


Fig. 2. Change in GGT activity response to 10^{-7} M dexamethasone during culture of hepatocytes.

Table 3. Effects of soybean protein and soybean peptide diets on GGT activity

Diets	Body weight gain, g/3 w	GGT activity mU/mg protein
10% SPI	9.5±2.6 ^a	4.1±1.5 ^a
10% S-P	17.6±1.7 ^b	2.5±1.1 ^{a,b'}
10% p-S-P	21.1±2.5 ^{b,c}	2.0±0.5 ^b
Lab. chow	117.0±7.5 ^d	1.6±0.4 ^{b'}

Values are mean±SD of 4 rats. Different letters denote significant differences between groups at least $p < 0.05$.

Table 4. Effects of methionine and cystine levels in amino acid mixed diets on liver GGT activity

Methionine	Cystine	Number of animals	Body weight gain, 3 weeks	GGT activity U/g protein
1.2	1.4	8	50.3±4.1 ^a	0.92±0.26 ^a
0.5	2.1	8	21.8±3.8 ^b	3.4±0.86 ^b
0.8	2.1	4	29.6±5.9 ^b	1.60±0.42 ^{a,b}
2.0	2.1	4	35.6±6.2 ^b	1.79±0.77 ^{a,b}

Values are mean±SD. Different letters denote significant differences between groups at least $p < 0.05$.

以上の実験結果から、SPI メチオニンの有効利用効率の低い原因は消化性、および SPI に結合または、混在する物質に問題のあることが推定された。

培養肝細胞の GGT 活性

離乳直後の肝 GGT 活性は GC により誘導される。正常（固形飼料）飼育では成長にともない DX による誘導はなくなるが（Fig. 1. A），10% SPI 飼育では，離乳期と同様な DX の dose-response がみられた（Fig. 1. B）。

3 週間，SPI，p-SP で飼育したシロネズミより調製した肝細胞の DX による GGT 活性の誘導をみると，SPI では離乳期のものと同様であった。これは SPI 飼育で肝 GGT 活性が高いことは正の GC 感受性によることを細胞レベルで示したものと見える。p-SP では SPI より低くなったが DX 応答は固形飼料群より高かった。10%レベルであることにもよるが，肝細胞の成熟化が阻止されていることを示す結果であった（Fig. 2）。

文 献

- 1) Igarashi T, Satoh T, Ueno I and Kitagawa H (1981): Changes of γ -glutamyltranspeptidase activity in the rat during development and comparison of the fetal liver, placental and adult liver enzymes. *Life Sci*, **29**, 483-491.
- 2) Barouki R, Chobert M-N, Finidori J, Billon M-C and Hanoune J (1983): The hormonal induction of γ -glutamyltransferase in rat liver and in a hepatoma cell line. *Mol Cell Biochem*, **53**, 77-88.
- 3) Taniguchi M, Hirayama K, Yamaguchi K, Tateishi N and Suzuki M (1989): Nutritional aspects of glutathione metabolism and function. In "Coenzymes and Cofactors" Vol. 3B, edited by Dolphin D, et al, pp. 645-722, Wiley & Sons Inc, USA, New York.
- 4) Taniguchi M and Inoue M (1986): Ontogenic changes in metabolism and transport of glutathione in the rat. *J Biochem*, **100**, 1457-1463.
- 5) Billon MC, Dupre G and Hanoune J (1989): In vivo modulation of rat hepatic γ -glutamyltransferase activity by glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol*, **18**, 99-108.
- 6) Szasz G (1969): A kinetic photometric method for serum γ -glutamyltranspeptidase. *Clin Chem*, **15**, 124-136.
- 7) Tanaka K, Sato M, Tomita Y and Ichihara A (1978): Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *J Biochem*, **84**, 937-946.