

## 大豆低分子ペプチドの栄養特性—特に消化管機能への影響

NUTRITIONAL EVALUATION OF SPI-DERIVED PEPTIDES IN RATS  
—THE EFFECTS OF PEPTIDE CHAIN LENGTH ON THE DIGESTIVE  
INTENSITY OF OLIGO-L-METHIONINE

原 博・鈴木卓二・桐山修八（北海道大学農学部）

Hiroshi HARA, Takuji SUZUKI and Shuhachi KIRIYAMA  
Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

### ABSTRACT

The digestive intensity of oligo-L-methionine (OM) was observed in rats fed OM containing diets based SPI, peptic digest of SPI (SPI-LP) and small peptide of SPI (SPI-SP). The growth potency of a 10% SPI-LP diet was significantly higher than that of a 10% SPI-SP diet. Supplementary effect of 0.3% OM to SPI-SP diet tended to be higher than that to SPI diet. Porto-arterial difference of methionine derived from OM, which is an absorptive indication of early stages of feeding, was higher in the SPI-LP group than in the SPI group. The digestibility of OM evaluated by fecal excretion of undigested OM in the rats fed the SPI-LP- and SPI-SP-based diets were significantly higher than that in the rats fed the SPI diet. When dietary protein level was increased to 20%, the differences of OM digestibility between the protein sources were similar to those in the 10% protein groups. But, the digestibility of OM in the 20% protein diet fed rats were lower than those in the 10% protein diet fed rats. The OM digestibilities of the SPI-SP groups were similar to those of the SPI-LP groups in both 10% and 20% protein levels. These results represent that the gastrointestinal functions associated with OM digestion in the rats fed SPI-LP and SPI-SP were higher than those in the rats fed SPI. The lower digestibility of OM in 20% protein groups suggest that not only the pancreatic protease secretion, but also the competitive inhibitory activity of dietary protein in the lumen was responsible for the OM digestion in the gut. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **13**, 38-42, 1992.

難消化性ペプチドであるオリゴメチオニンは、低分子大豆たん白質（SPI）食に添加しラットに給餌した場合、メチオニンとしての補足効果が、低カゼイン食に添加した場合に比べ低いことを報告してきた<sup>1)</sup>。すなわち、同量のオリゴメチオニンを補足しても体重増加において、低SPI食は低カゼイン食より低いことが観察される。この原因として、これまでにオリゴメチオニンの消化速度ないし効率が、SPI食においてカゼイン食より低いことを明らかにしてきた<sup>2,3)</sup>。このこと

は、消化吸収機能に対してカゼインはSPIより強い亢進作用を有することを示唆している。昨年度本研究会においてはSPIに焦点をあて、SPIの物性、特に溶解性が消化吸収機能に与える影響を、オリゴメチオニンの消化性を指標として検討した<sup>4)</sup>。

本年度は、さらにSPIをベースとしてそのペプチド鎖長を変化させ、それが消化管に与える影響をオリゴメチオニンをプローブとして検討した。また、鎖長の異なる窒素源の性質をより明確にする目的で、たん白

質レベルを従来の10%から普通食レベルの20%にし、その影響も合わせて検討した。

## 実験方法

### 実験1 10%たん白質レベルにおけるオリゴメチオニン(OM)消化

Sprague-Dawley 系雄, 初体重50 g (日本 SLC, 浜松) を購入。平均体重65 g まで25%カゼイン-蔗糖食 (Table 3) で予備飼育し, その後, SPI, SPI のペプシン分解物 (SPI-LP), ハイニュート PM (SPI-SP) を, それぞれ10%含むように調製した飼料 (Table 3) を2週間自由摂取させた。その間体重増加, 飼料摂取量を毎日測定した。試験食群は10% SPI, SPI-LP, SPI-SP 食, 及びこれらに OM を添加したもの, 対照群として SPI 食に Met を添加したもの, 計7群である。OM は本教室でババインを用いて調製したもので, 5-10 の重合度をもつ混合物で, 7-9 量が全体の約80%を占める。また, SPI-LP は, SPI を基質:酵素 [ペプシン (1:10,000), ナカライテスク] 比, 100:1にて37℃, 12時間, pH スタットを用いリン酸にて pH 1.85 に保って反応させた。リン酸は水酸化カルシウムで中和除去し, 上清を凍結乾燥して調製した。

OM 消化率は飼育最終3日間の糞を全量採取し, その中の OM を定量し, 摂取 OM との差を消化吸収された OM として求めた。また, 2週間の飼育終了後1日絶食し, 試験食の OM 含量を3%とし, この餌2gを再給餌し, ペントバルビタール麻酔下で門脈と腹部大動脈より血液を採取し, メチオニン濃度を測定した。門脈と動脈のメチオニン濃度差 (P-A 差) より摂食初期のメチオニンの吸収速度を推定した。OM からのメチオニンの吸収速度は, OM 添加食摂取ラットの P-A 差より, 対応する OM 無添加のタンパク質食を摂取し

た P-A 差の平均値を差し引くことで推定した。

### 実験2 20%たん白質レベルにおける OM 消化

Sprague-Dawley 系雄, 初体重50 g のラットを購入, 20%レベルで SPI, SPI-LP, SPI-SP を含み, 0.3% OM を添加, または添加しない飼料, 計6種を試験食として2週間摂取させた。体重増加, 摂取量, OM 消化率を実験1と同様にして測定した。

### 測定

試験食中のたん白質のアミノ酸組成は, 被験たん白質を6N 塩酸中で110℃, 24時間加水分解して, 塩酸を除去後, 自動アミノ酸分析器 (日立835型) にて分析した。糞中, 飼料中の OM は蟻酸:塩酸 (1:1) の混酸中で48時間, 110℃加水分解し, 減圧乾固により酸を除去した後, また血漿は等量のアセトニトリルで除たん白後, イソチオシアン酸フェニル (東京化成) にて, フェニルチオカルバミル誘導体とし, HPLC (Waters M-600, ワコーシル PTC カラム, 20×7.6 mm) にてメチオニンを測定した。

SPI-LP, SPI-SP の分子量分布は, リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し HPLC (Waters M-600, Waters Protein Pak 60×2) にて測定した。

### 計算

OM の消化率は次のようにして求めた。

OM 消化率(%) = {(摂取 OM 量<sup>1)</sup> - 糞中 OM 量} / 摂取 OM 量 × 100

Table 2. Amino acid compositions of SPI, SPI-LP and SPI-SP

	SPI	SPI-L	SPI-S
		%	
Asp	12.03	12.12	11.68
Thr	3.83	3.54	3.38
Ser	4.77	4.60	4.44
Glu	19.55	20.83	20.68
Gly	3.72	3.50	3.57
Ala	4.17	3.79	3.85
Val	5.14	4.19	4.40
Cys	0.96	0.94	1.11
Met	0.75	0.67	0.85
Ile	4.68	4.56	4.54
Leu	7.69	7.39	7.37
Tyr	4.42	3.59	3.47
Phe	6.30	6.00	5.96
Lys	6.07	6.43	6.83
His	2.75	2.49	2.78
Arg	7.69	8.19	8.76
Pro	5.48	7.15	6.33
Total	100.00	100.00	100.00

Table 1. The distribution of chain lengths (molecular weight) of SPI-derived peptides

Ranges of molecular weight	SPI-LP	SPI-SP
	%	
More than 10,000	0.1	1.7
1,000-10,000	60.5	23.8
100-1,000	14.4	45.4
Less than 100	25.0	29.7

The values were estimated by chromatogram at 280 nm using HPLC constructed with Waters M-600 and Protein Pak 60 column×2. Conditions were as follows: column temperature 25℃, elution buffer 0.1 M KPi buffer (pH 7.0), flow rate 1.0 mL/min.

糞中 OM 量 = {OM 添加食群糞中 Met 量 - (OM 無添加対応群の糞中 Met 量  $\times$  F<sup>2)</sup>)} / 8<sup>3)</sup>

1) 摂取 OM 量は調製した OM と OM 無添加群の糞を1:1で混合, 飼料と同様に加水分解して求めた OM の回収率を乗じてある。

2) 摂餌量を考慮した係数で,

$F = (\text{OM 添加食摂餌量} / \text{OM 無添加対応群平均摂餌量})$  である。

3) OM の平均鎖長は8として計算してある。

値は全て平均値  $\pm$  標準誤差で表わした。有意差の検定は, Duncan の多重比較検定法を用いた。

Table 3. Compositions of stock and test diets

	Stock diet	10% protein diets <sup>1</sup>		
		SPI diet	SPI-LP diet	SPI-SP diet
		<i>g/kg diet</i>		
Casein <sup>2</sup>	250	—	—	—
SPI <sup>3</sup>	—	100	—	—
SPI-LP <sup>3</sup>	—	—	96	—
SPI-SP <sup>3</sup>	—	—	—	101
Corn oil <sup>4</sup>	50	50	50	50
Mineral mixture <sup>5</sup>	40	40	40	40
Vitamin mixture <sup>6</sup>	10	10	10	10
Granulated vitamin E <sup>7</sup>	1	1	1	1
Choline bitartrate	4	4	4	4
Sucrose		to make 1 kg		

<sup>1</sup> Oligo-L-methionine (OM) was added to test diet up to 0.3% for observations of growth and OM digestibility and up to 3% for measuring porto-arterial difference of methionine.

<sup>2</sup> Casein: ALACID; New Zealand Dairy Board, Wellington, NZ.

<sup>3</sup> SPI (Fujipro R, Fuji Oil Co. Osaka), SPI-LP is a peptic digest of SPI described in Materials and Methods, and SPI-SP is small peptide of SPI (Hinute PM, Fuji Oil Co.). These three protein sources were added 20.0, 19.2, and 20.2% in 20% protein diets for experiment 2, respectively.

<sup>4</sup> Retinyl palmitate (7.66  $\mu\text{mol/kg diet}$ ) and ergocalciferol (0.0504  $\mu\text{mol/kg diet}$ ) were added to corn oil.

<sup>5</sup> The mineral mixture is prepared based on the AIN-76 Workshop held in 1989. It provided (mg/kg diet); Ca, 4491; P, 2997; K, 3746; Mg, 375; Fe, 100; I, 0.32; Mn, 10.0; Zn, 34.7; Cu, 6.00; Na, 4279; Cl, 6542; Se, 1.05; Mo, 1.00; Cr, 0.50; B, 0.50; V, 0.25; Sn, 2.00; As, 1.00; Si, 20.0; Ni, 1.00; F, 2.72; Co, 0.20.

<sup>6</sup> The vitamin mixture was prepared in accordance with the AIN-76 mixture except that menadione and L-ascorbic acid were added to make 5.81  $\mu\text{mol/kg}$  and 284  $\mu\text{mol/kg diet}$ , respectively.

<sup>7</sup> Vitamin E granule (Juvela, Eisai Co., Tokyo) supplied 423  $\mu\text{mol all-rac-}\alpha\text{-tocopheryl acetate per kg diet}$ .

Table 4. Body weight gain and food intake for 14 days in rats fed 10% protein diets

Diet groups	Body weight gain	Food intake
	<i>g/14 days</i>	
SPI	23.7±4.5 <sup>d</sup>	125.4±10.1 <sup>c</sup>
SPI-LP	38.5±5.6 <sup>bc</sup>	154.9±13.7 <sup>ab</sup>
SPI-SP	32.3±4.3 <sup>bcd</sup>	141.1± 9.2 <sup>abc</sup>
SPI+0.3% OM	34.3±3.6 <sup>bcd</sup>	142.6± 9.0 <sup>abc</sup>
SPI-LP+0.3% OM	39.9±4.5 <sup>bc</sup>	152.6± 9.2 <sup>abc</sup>
SPI-SP+0.3% OM	44.1±1.8 <sup>ab</sup>	163.0± 5.0 <sup>a</sup>
SPI+0.3% Met	53.8±5.2 <sup>a</sup>	159.5± 8.4 <sup>a</sup>

Values are mean  $\pm$  SEM (n=6). Means not sharing a common superscript letters within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 結 果

Table 1 に SPI-LP (ペプシン分解物), SPI-SP (ハイニート PM) の分子量分布を示した。SPI-LP では60%以上が分子量1,000-10,000分画に存在するのに対し, SPI-SP では分子量1,000以下の分画に75%が存在していた。

Table 2 に3種の窒素源のアミノ酸組成を示したが, それぞれ大きな差はなかった。

10%たん白質レベルにおける2週間の各群の体重増加量, 摂餌量を Table 4 に示した。3種のたん白質のみを摂取した群 (−OM) の成長を比較すると, SPI-LP 群が SPI 群より有意に高く, SPI-SP 群も高い傾向を示した。対照群である SPI に0.3%メチオニンを加えた群が最大成長を示した。各窒素源へのOM添加でいずれも有意な成長改善は見られなかったが, SPI-

SP 群での成長が最も高かった。

Fig. 1 に摂取初期の OM 吸収速度の指標である P-A 値を示した。SPI-LP 群で最大値となったが, 全体に絶対値が低くバラツキも大きかったために3群間で有意差は見られなかった。

Fig. 2 に10%たん白食での OM 消化率を示した。SPI 群では29%と低い消化率であったのに対し, SPI-LP, SPI-SP 群では SPI 群に対して有意な消化率の上昇が見られた。

Table 5 に20%たん白質レベルでの2週間の体重増加を示した。OM 無添加では10%たん白質レベルの体重増加に比べて, いずれの窒素源でも2倍以上の体重増加を示したが, 群間の差はなかった。また, OM 添加による増加は見られなかった。

Fig. 3 に20%たん白質レベルでの OM 消化率を示した。消化率はいずれの窒素源でも10%たん白質レベ

Table 5. Body weight gain and food intake for 14 days in rats fed 20% protein diets

Diet groups	g/14 days	
	Body weight gain	Food intake
SPI	89.4±3.4	227.3±8.3
SPI-LP	78.7±4.4	219.2±8.7
SPI-SP	78.6±5.3	227.0±9.1
SPI+0.3% OM	87.5±5.5	228.7±9.5
SPI-LP+0.3% OM	89.3±1.9	241.6±5.6
SPI-SP+0.3% OM	83.4±4.4	234.1±9.2

Values are mean±SEM (n=7).

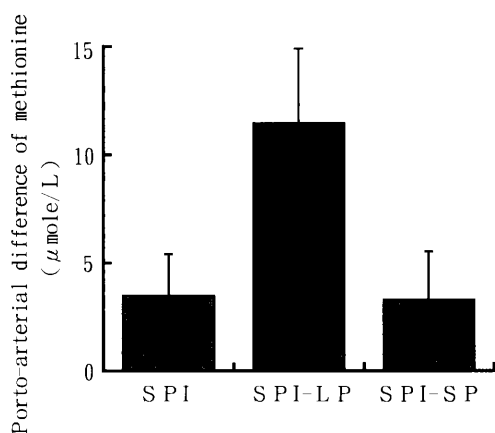


Fig. 1. Porto-arterial differences of methionine derived from oligo-L-methionine (OM) 30 min after feeding of 10% SPI, SPI-LP, and SPI-SP diets containing 3% OM. Mean±SEM (n=6).

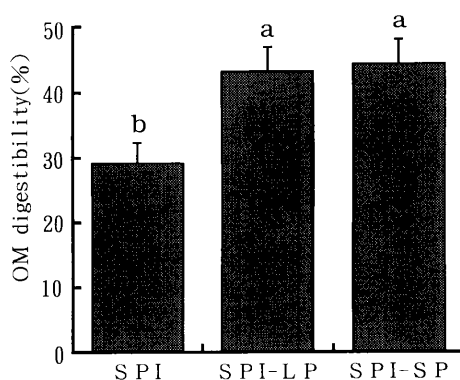


Fig. 2. Digestibility of oligo-L-methionine (OM) evaluated by the undigested OM excreted in feces of rats fed 10% SPI, SPI-LP, and SPI-SP diets containing 0.3% OM for 14 days. Means not sharing a common alphabetical letter are significantly different ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

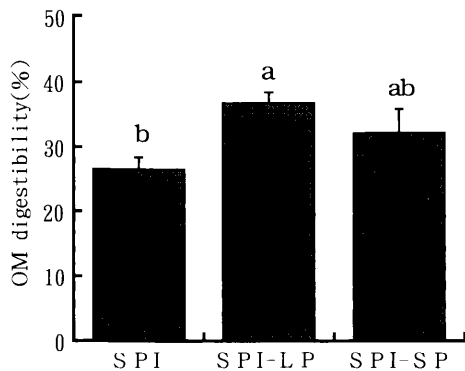


Fig. 3. Digestibility of oligo-L-methionine (OM) evaluated by the undigested OM excreted in feces of rats fed 20% SPI, SPI-LP, and SPI-SP diets containing 0.3% OM for 14 days. Means not sharing a common alphabetical letter are significantly different ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ).

ルの値に比べて減少した。しかし、10%たん白質レベル同様、SPI群に比べてSPI-LP群では有意に高く、SPI-SP群でも高い傾向を示した。

### 考 察

SPIをベースにしてペプチド鎖長を変化させ、その消化管機能への影響をOMをプローブとしてみた。指標としては、低たん白質レベル(10%)でのOM添加による成長改善(補足効果)、P-A差(門脈吸収)、OM消化率で、さらに普通食たん白質レベル(20%)でのOM消化率をとった。

全消化管を通じた消化吸收機能を反映するOM消化率は、SPI群に比べSPI-LP、SPI-SP群ともに改善した。この結果は、SPI-SP群ではOM添加による成長改善に反映されたが、SPI-LP群ではOM無添加群での成長がよく、OM添加による改善は見られなかった。OM無添加食による成長の差は、窒素源のペプチド鎖長の違いによる栄養価の差を示している。SPI-LP群がSPI群より高値を示したことは、鎖長のある程度長いペプチドの栄養価がたん白態のものより高いことを示している。この機構については、ホルモン分泌等が考えられるが現在のところ不明である。

Fig. 1, Fig. 3に10%及び20%たん白質レベルにおけるOM消化率を示したが、ともにSPI群よりSPI-LP

ないしSPI-SP群の方が高値を示し、ペプチド態の窒素源がOM消化吸収に有利に働いたことを示している。その機構として、膵外分泌、胃内消化、消化管腔内でのOMとたん白質源との拮抗、消化管移動速度等が考えられる。この中で、20%たん白質レベルでのOM消化率が10%たん白質レベルよりも、いずれも低値を示したことは、たん白質レベル上昇により亢進する膵外分泌よりも、たん白質レベル上昇により強くなる管腔内のたん白質源による拮抗阻害がより反映されたものと推定される。

SPIの*in vitro*での拮抗作用はSPI-LPやSPI-SPよりも強いことを確認しており、SPI群でOM消化率が最も低いことと一致する。しかし、SPI-LPはSPI-SPより*in vitro*での拮抗作用が強いが、OM分解には差が無い。一方、SPI-LPの膵外分泌作用は、SPIよりも強いことを報告しており、またSPI-LPは低分子ペプチドであるSPI-SPよりも強いと推定される。これらのことは、OM分解には膵外分泌量とたん白質による拮抗作用がともに関与していることを示唆している。

### 文 献

- 1) Chiji H, Harayama K and Kiriya S (1990): Effect 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 behaviors of oligo-L-methionine and dietary proteins in a casein or soybean protein diet: Observations by porto-venous difference in unrestrained rats. *J Nutr*, **121**, 638-645.
- 3) Hara H, Ando Y-I and Kiriya S (1992): Absorption of [ $^{35}$ S]-oligo-L-methionine after feeding of a low casein or a low soybean protein isolate diet in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **200**, 30-35.
- 4) 桐山修八, 尹 曉紅, 原 博, 知地英征 (1991): 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(2). 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 85-90.