

分離大豆たん白質のメチオニン利用効率の改善と低食物アレルギー食品としての大豆ペプチドの利用について

USE OF SOYBEAN PEPTIDES TO IMPROVE BIOAVAILABILITY OF METHIONINE AND TO REDUCE GASTROINTESTINAL SOY-PROTEIN ALLERGY

谷口巳佐子・藤田 守・房野たかみ・矢野千奈美(中村学園大学食物栄養学科)

山本孝史・木本 実(不二製油株式会社)

Misako TANIGUCHI¹, Mamoru FUJITA¹, Takami FUSANO¹, Chinami YANO¹, Takashi YAMAMOTO² and Minoru KIMOTO²

¹Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814-01

²Fuji Oil Company, Izumi-Sano 598

ABSTRACT

When weanling rats were fed a low methionine diet, liver GGT activity was elevated. In rats fed a 10% SPI or simulated amino acid mixture diet with various levels of methionine, the response in hepatic GGT activity to the added methionine was larger than that in body weight gain, FER, NPU or BV. Using GGT activity as indication of methionine utilization, it was found that methionine utilization from peptide PM was apparently improved in comparison with that from SPI or SP. Though about 40% of glycosides of SPI was removed by treating SPI with glycosidases, methionine utilization could not be improved significantly. Tyrosine aminotransferase activity was not altered by dietary methionine levels. Anti-SPI IgG was produced by oral ingestion of SPI following abdominal administration of SPI to milk suckling rats. However, anti-SPI IgG could not be detected by PM administration. With electron microscopy, absorption pathway of soybean lectin was demonstrated to be similar to that of antibodies following adsorption on coated pit, coated vesicle formation and then transport into blood. Abbreviations: SP, soybean peptide; GGT, γ -glutamyltransferase; IgG, immunoglobulin G. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 28-33, 1993.

大豆たん白質はメチオニン含量が少ないことで栄養評価が低められている。離乳直後のラットを分離大豆たん白質(SPI)で飼育すると、グルタチオンの特異的分解酵素 γ -glutamyltransferase (GGT)活性が肝で上昇することを見だし、これが飼料中のメチオニン(Met)不足によることを報告した^{1,2)}。GGT 活性上昇の現象を SPI とそれに相当するアミノ酸組成をもつ

アミノ酸混合飼料で飼育し比較した実験から SPI 中の Met は遊離のものに比べ約1/2の利用効率であることが推定された。本報告では SPI とアミノ酸混合の Met レベルを変えた飼料で飼育し、たん白質栄養評価値と GGT 活性の変化から求めた Met 利用効率を比較検討した結果、GGT 活性が最もよく Met 利用効率を表すことが示された。SPI の Met の利用効率の低

い原因を明かにする目的で1)消化性については大豆ペプチド, また2)たん白結合糖鎖の影響についてはSPIをglycosidaseで処理した標品を飼料としてラットに与えGGT活性の変化から比較検討した。

経口感作と考えられる乳幼児のアトピー性皮膚炎発症機序の初期段階の一つは食物性抗原が消化管粘膜を高分子のまま通過し, 防御系細胞に認識されることによる。大豆たん白質の *Gly m Bd 30K* はアレルゲン

として最も強いことが小川らにより同定されている³⁾。大豆たん白質によるアレルギー発症の機序を明かにし, その予防に役立てることを目的として, 乳飲期のラットを用い, 1)大豆たん白質のアレルゲン性がペプチド化することで低められるかについて, SPIと大豆ペプチドPMを投与した後の抗SPI-IgG生成から調べ, また2)たん白質侵入経路については大豆レクチンを空腸管内に投与し電子顕微鏡を用いて形態学的に検索

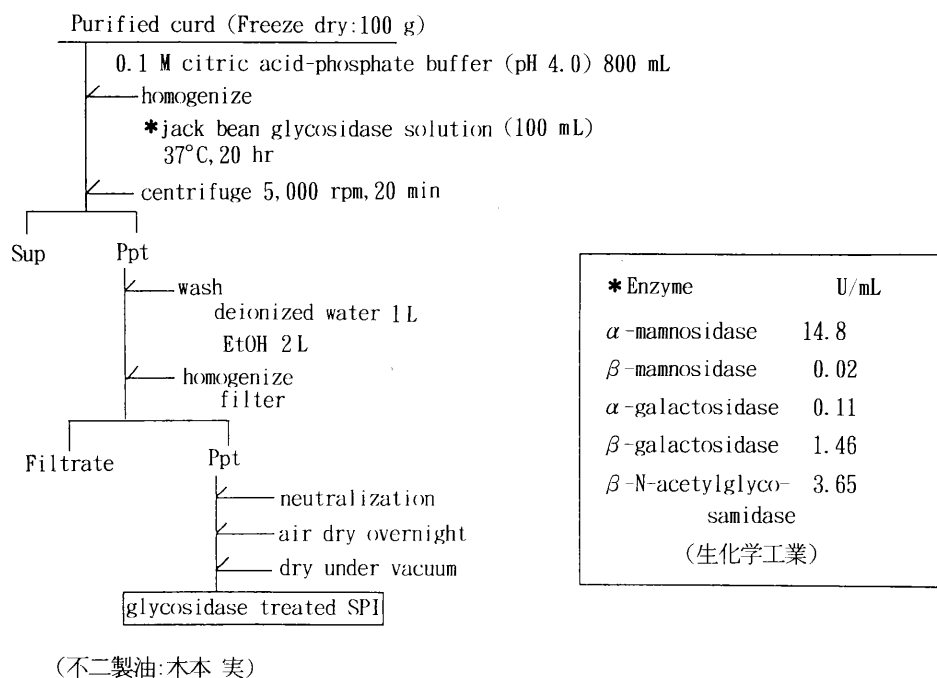


Fig. 1. Deglycosylation of SPI with jack bean glycosidases.

Table 1. Comparison of methionine utilization of soybean protein with use of nutrition index values and γ -glutamyltransferase activity

Diet	BW gain	Liver	FER	NPU	BV	GGT activity
	<i>g/3 W</i>	<i>g</i>	<i>%</i>			<i>mU/mg protein</i>
SPI M 1.2%	26.6 $\pm$ 3.7 ^a	4.3 $\pm$ 0.2	17.1 $\pm$ 1.7 ^a	45.7 $\pm$ 4.3 ^a	59.0 $\pm$ 5.3 ^{a,c}	1.51 $\pm$ 0.29 ^a
SPI M 1.6%	29.5 $\pm$ 3.6 ^a	4.3 $\pm$ 0.2	19.8 $\pm$ 1.1 ^a	49.7 $\pm$ 3.4 ^a	64.1 $\pm$ 3.0 ^a	0.89 $\pm$ 0.18 ^b
AA M 1.2%	34.5 $\pm$ 5.9 ^b	4.4 $\pm$ 0.4	21.7 $\pm$ 2.3 ^a	58.3 $\pm$ 1.8 ^b	71.0 $\pm$ 2.4 ^b	0.81 $\pm$ 0.08 ^b
AA M 0.8%	18.2 $\pm$ 7.4 ^c	4.5 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 4.9 ^b	44.2 $\pm$ 8.2 ^a	44.2 $\pm$ 8.9 ^c	1.10 $\pm$ 0.24 ^b
AA M 0.5%	6.0 $\pm$ 3.2 ^d	4.2 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.3 ^c	33.0 $\pm$ 6.0 ^c	33.0 $\pm$ 6.0 ^c	1.56 $\pm$ 0.17 ^a

Values are mean $\pm$ SD of each 6 rat group.

Different superscript letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$).

SPI: Soy protein isolate, AA: Amino acid mixture equivalent to amino acid composition of SPI.

M: Methionine content (%) in each SPI and AA.

FER: Food efficiency ratio (%), NPU: Net protein utilization, BV: Biological value.

GGT: Liver γ -glutamyltransferase.

した。

実 験 方 法

動物と飼料

離乳直後のラット(雄性, Wistar strain)を10% SPI, また10%アミノ酸混合飼料で, 3週間飼育した。飼料組成ならびに飼育方法は前回の報告に準じた²⁾。

糖鎖の除去

SPI 100 mg を glycosidase 混合標品(酵素活性, Table 1, 生化学工業) 0.1 mL とインキュベートし, エタノール沈澱, 洗浄後のたん白質の糖をフェノール硫酸法で測定し, たん白質の糖鎖除去反応の最適条件(pH, 温度, 時間)を設定し, SPI 100 g から糖鎖除去標品を作成した(Fig. 1, 不二製油, 木本)。標品中の糖鎖含量はSPIのものの40%が除去されていた。この標品を用い飼料を作成し SPI と同様ラットを飼育した。

酵素活性の測定

GGT 活性は肝臓をホモジナイズ後, 1% Triton で可溶化し測定した。Tyrosine aminotransferase (TAT)活性は肝臓を0.25 M sucrose 溶液で homogenize 後, 100,000 x g で遠心分離した上清サイトソルを用い, Granner らの方法で測定した⁴⁾。

抗 SPI IgG の作成

SPI またはペプチド-PM 10 mg, Freund の完全 adjuvant (FCA) 1 mL, 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4)/0.9% NaCl=1/1(v/v) 1 mL を混合し抗原エマルジョンを作成した。生後10日齢の乳飲ラットに抗原エマルジョンを10日(0.1 mL), 12日(0.2 mL), 14日(0.3 mL)それぞれ計3回腹腔投与し, 16日からは口腔から SPI またはペプチド 1 g/蒸留水 6 mL/コーン油 0.5 mL の混合乳化液を0.3 mL ずつ1日おきに3回強制投与した。離乳(21日齢)以後は, 20% SPI に 0.3%

Table 2. Comparison of absorption index of SPI- or AA-methionine with γ -glutamyltransferase activity

Diet	Met	Absorption (A)	(A)×Met		GGT activity	
	%	%	%	%	mU/mg protein	%
SPI	1.2	77.4±2.3 ^a	93	100	1.51 ^a	100
SPI	1.6	77.5±2.2 ^a	124	133	0.89 ^b	59
AA	1.2	82.1±2.1 ^b	98	106	0.81 ^b	54
AA	0.8	81.9±3.1 ^b	66	71	1.10 ^b	73
AA	0.5	82.7±3.1 ^b	41	44	1.56 ^a	103

Table 3. Comparison of soybean peptide PM and S for elevating liver γ -glutamyltransferase activity

Diet	BW gain	FER	GGT activity	TAT activity
	g/3 W	%	mU/mg protein	mU/mg protein
10% SPI	30.9±7.4 ^a	18.7±1.6	1.66±0.42 ^a	62.2±16.8
10% SP(PM)	54.7±7.1 ^b	22.2±3.8	0.95±0.20 ^b	66.4±22.2
10% SP(S)	42.0±6.2 ^a	20.2±2.1	1.65±0.31 ^a	69.1± 7.1

Values are mean ± SD of each 5 rat group.

Table 4. Effect of glycosidase treatment of soy bean protein on elevating γ -glutamyltransferase activity

Diet	BW gain	FER	GGT activity	TAT activity
	g/3 W	%	mU/mg protein	mU/mg protein
10% SPI	39.1±5.6 ^a	18.0±2.8 ^a	1.74±0.42 ^a	64.5± 7.3
10% SPI-glycosidase	46.1±5.2 ^a	19.6±3.2 ^a	1.13±0.24 ^a	45.3±12.6
10% SPI+0.3% Met	101.5±7.0 ^b	31.9±3.4 ^b	0.39±0.06 ^b	50.1±16.0

Values are mean ± SD of each 4 rat group.

10% SPI-glycosidase: SPI treated with glycosidase as shown in Fig. 1.

DL-Met を添加した飼料(10% SPI 飼料に準じデキストリン量で調整作成)で6週間飼育し、その血清を抗体試料として用いた。SPI はアルカリ(pH 10)条件でメルカプトエタノール1%を加え可溶化し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、各サブユニット画分を分離した。ニトロセルロース膜にブロットし、抗血清とインキュベート後、ペルオキシダーゼ標識抗ラット γ -globulin (Antibodies Inc.) を2次抗体とし、SPI と反応する抗体の場所を、コニカイムノステイン HRP で染色し検出した。

空腸の形態学的観察

14日齢の乳飲ラットに horse radish peroxidase 標識大豆レクチン(SBA-HRP; E-Y Laboratories, Inc.) 0.5 mg を空腸管腔内に投与し、0～60分まで経時的に空腸を採取した。細切後、half-Kalnovsky 固定液で前固定、DAB 反応、2%オスミウム溶液で後固定、脱水、包埋し光顕用切片を作成した。トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で観察した後、電顕用超薄切片を作成し、クエン酸鉛で染色を行い電子顕微鏡で観察した。

結果と考察

SPI とアミノ酸混合飼料で3週間飼育したラットについて、飼料効率、N出納、体重増加量から求めたたん白質栄養評価値(山本、不二製油)を、肝 GGT 活性の増加の値と比較した(Table 1)。たん白質利用効率の低いものは GGT 活性の増加がみられたが、NPU では SPI と差のない SPI M 1.6%、AA M 0.8% で GGT 活性の増加抑制がみられた。N出納、体重増加量では Met を含めた 必須アミノ酸による総合的な栄養価として表され、GGT 活性では Met により依存する結果と推定される。また吸収率に飼料中の Met を乗じた値は GGT 活性とは相関せず、SPI の Met が遊離アミノ酸のものより利用が低いことが示された(Table 2)。

大豆ペプチド、PM および S についてその Met 利用効率を SPI と同様に GGT 活性の変化から求めた。PM は S に比べ GGT 活性の増加が低いことが見出された(Table 3)。Glycosidase 処理し、SPI の糖鎖含量を減少させたものでは、GGT 活性の増加は SPI より低い傾向がみられたが、有意差はなかった(Table 4)。糖鎖が約60%残っていることもあり、糖鎖部分が Met の有効利用を低下させる原因であるか否かについての証明は今回の実験結果からはできなかった。

SPI とペプチド PM を乳飲期ラットに投与した後の抗 SPI-IgG の形式を免疫アッセイ染色で調べると、PM は対照の無投与と殆ど差のないことからペプチド化により抗体産生が低められたことが分かった(Fig.

2)。IgE については検討中である。

大豆レクチン(SBA)の侵入経路は電子顕微鏡写真(Fig. 3)に示される。空腸吸収上皮細胞の微絨毛表面及び微絨毛間の coated pit 及び coated vesicle 内に SBA-HRP 反応産物が観察された。さらに上皮細胞間隙にも反応産物が観察された。これらの結果から SBA は上皮細胞の管腔側の coated pit から vesicle によって細胞の基底-側部へ輸送されて細胞間隙に侵入することが考えられる(Fig. 4)。この侵入経路は乳児で母体から抗体がレセプターを介し取り込まれる時のもの⁵⁾と同様である。乳飲期の吸収上皮細胞の未成熟な時期では、糖たん白質である卵アルブミンの侵入経路が母乳の抗体の取り込み経路と同様であることが明かにされている⁶⁾。従って、乳飲期ラットでの糖たん白質の侵入の機構は共通した経路が推定され、糖鎖を含む大豆たん白質の取り込み経路も、今回示されたものと同様な機構を介し行われるものと考えられる。

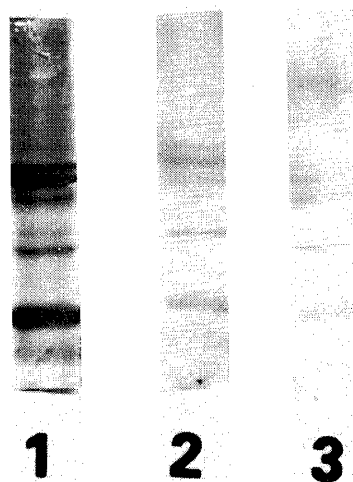


Fig. 2. Detection of anti-SPI IgG. SPI was separated on SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membrane, and anti-SPI IgG was detected after incubating the membrane with serum of rats to which SPI or PM was administered previously. Lane 1: SPI, lane 2: PM and lane 3 without administration.

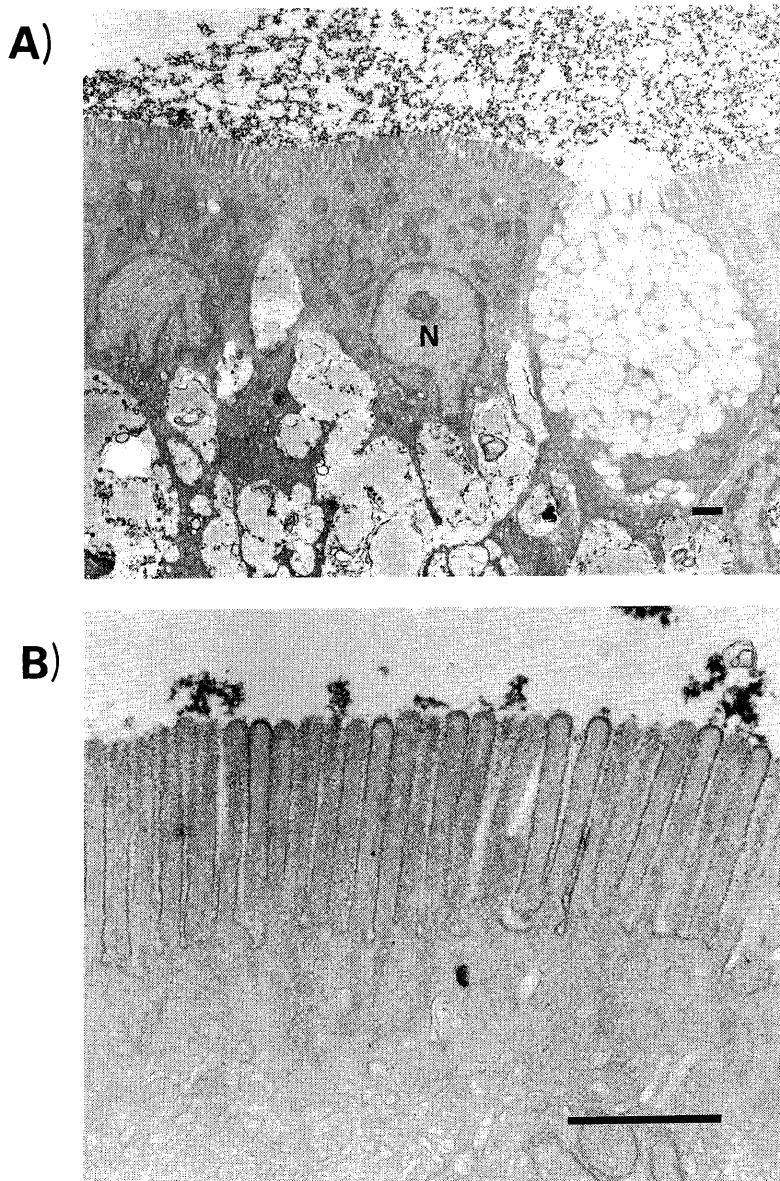


Fig. 3. A) Electron micrograph of a jejenum absorptive cell 30 min after injection of soy bean agglutinin (SBA). B) Higher magnification of the apical pole of a jejenum absorptive cell 30 min after injection SBA. Bar indicates 1 μ .

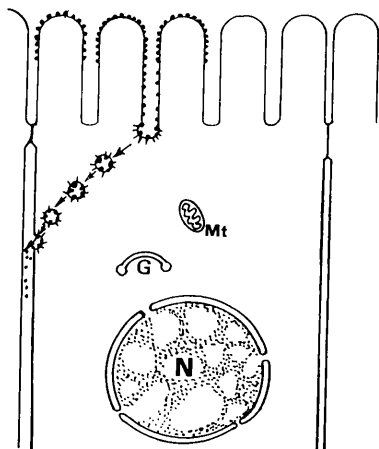


Fig. 4. A model of absorption pathway of soy bean agglutinin.

謝 辞

本研究にあたり貴重なグリコシダーゼ標品を多量にご恵与いただいた生化学工業株式会社に厚くお礼申し上げます。

文 献

1) Taniguchi M and Kinoshita C (1992): Modula-

tion of glucocorticoid response to rat hepatic γ -glutamyltransferase activity by a low methionine diet. In "Frontiers and New Horizons in Amino Acid Research", ed. by Takai K, Elsevier, Amsterdam-London, New York-Tokyo. pp. 641-644.

- 2) 谷口巳佐子, 木下千鶴 (1992): 大豆ペプチドのメチオニン利用率. 大豆たん白質栄養研究会誌, **13**, 34-37.
- 3) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y-L, Hirano H and Nishikawa K (1993): Identification of the soybean allergenic protein, *Gly m Bd 30K*, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1030-1033.
- 4) Granner DK and Tomkins GM (1970): Tyrosine aminotransferase. *Methods Enzymol*, **17**, 633-634.
- 5) Rodewald, R. (1980): Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rats. *J Cell Biol*, **85**, 18-32.
- 6) Fujita M and Matsukuma M (1992): Trans-epithelial transport of nonspecific macromolecules by absorptive cells of suckling rat jejunum. *J Clin Electron Microscopy*, **25**, 470-471.