

大豆たん白質由来胆汁酸結合ペプチドの構造決定と機能 改変

BILE ACID-BINDING PEPTIDES FROM DIGESTIVE PRODUCTS OF
SOY PROTEIN: THEIR STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INVESTI-
GATIONS

岩見公和・金谷昌広・北川 優・伊吹文男(京都府立大学農学部)

Kimikazu IWAMI, Masahiro KANAYA, Masaru KITAGAWA and Fumio
IBUKI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

It was tried to isolate bile acid-binding peptides from peptic-pancreatic digests of soy protein. Such peptides were collected by affinity chromatography with glycocholate-linked Sepharose 4B beads. Both SDS electrophoresis and gel filtration revealed that this fraction was composed of several peptides ranging in molecular size from 3K to 10K. A major peak component which had been fractionated by gel filtration, also gave a similar broad band in SDS-PAGE. For this reason, further purification of these peptides was shelved for the time being. Alternatively, very hydrophobic components were first separated from proteins which had partially been purified by repeating isoelectric precipitation at pH 4.6, followed by peptic-pancreatic digestion in the usual manner. The digest was passed through another glycocholate-linked Sepharose 4B column. The fraction was desorbed from the column by elution with 0.2% deoxycholate, recovered as a single peak in gel filtration with Bio-Gel P-10 and proved to be homogeneous by reversed phase HPLC. As a result of amino acid analysis, the molecular weight of the peptide containing 41 residues turned out to be 4,210. Estimation of the primary structure and enzymatic or chemical modification in functional aspects are in progress. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 42-48, 1993.

胆汁酸は脂肪や脂溶性ビタミンの消化吸収に重要な役割をもつが¹⁾, 腸管での任務を終えた後その大部分は回腸末端に局在する Na⁺ 依存性輸送系の働きにより再吸収され²⁾, 一部損失を肝でのコレステロールからの合成によって補いながら, 摂食の機会毎に1日何度も腸肝循環を繰り返す²⁾。この間における胆汁酸への合成と再吸収を免れての体外への排泄が, コレステロール異化の主経路と目されている²⁾。通常の食餌条件下では食物繊維やその他の成分(とくにたん白質)にいくら胆汁酸吸収を妨げる作用があり食餌たん白質に

限るならばカゼインのような動物たん白質より SPI のような植物たん白質の効果が高いことは以前から認められている。SPI 摂取による血清コレステロール値の低下作用は³⁻⁵⁾, SPI と組成を同じくしたアミノ酸混合食によって打ち消されることから, たん白質構造そのものに起因し⁵⁾, 消化吸収過程で残存した疎水性ペプチドの胆汁酸吸収に及ぼす効果に深い関係があると考えられる^{6,7)}。本研究では, そのような胆汁酸吸収阻害に係わる“胆汁酸結合性ペプチド”の単離と構造決定および機能改変を目的とした。

実験方法

動物実験

12時間明暗周期の条件下(室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度50~60%) 4週齢のウィスター系雄ラットを(a)20%カゼイン, (b)20%卵白アルブミン, (c)19.2%小麦グルテン+0.6% Lys+0.2% Thr, (d)19.4% SPI+0.6% Met を窒素源とする半精製飼料(その他の成分, α -コーンスターチ60%, 混合油5%, 混合塩5%, ビタミン混合1%, セルロース粉末4%)で約1カ月間飼育した。所定の期間飼育後, 各群ラットから個別に血清を集め($n=5$)市販のアッセイキットを用いて総コレステロール値を測った。

人工消化⁶⁾

約1gの各食品たん白質を250mLの蒸留水に懸濁してpH2とし, ペプシン10mgを加えて 37°C で攪拌しながら1夜放置した。翌日, 反応液を NaHCO_3 粉末を用いて中和し(pH8)パンクレアチン30mgを加えた。5時間後にトリクロ酢酸を加えて酵素を失活させ, 遠心分離によって沈澱を除去し, NaHCO_3 で中和したものをペプシン-パンクレアチン消化産物とした。

平衡透析⁶⁾

各食品たん白質(50mg/mL)のペプシン-パンクレ

アチン消化産物0.5mLとタウロコール酸溶液(10mg/mL, $[^{14}\text{C}]$ 標識化合物濃度は $2\mu\text{Ci/mL}$)0.02mLの混合物をMWCO-1000のセロファン膜を隔てpH7.4, Tris-HCl緩衝液2mLに対して室温で3日間透析して内外液0.1mLの放射活性を測り, その相対比を仮に胆汁酸結合能と定めた。

反転腸管吸収実験⁷⁾

体重200g前後のラットの回腸部を摘出して長さ約5cm(漿膜側溶液量0.5mL)の反転腸管2個/匹を作り, 0.8mMタウロコール酸($[^{14}\text{C}]$ 標識化合物濃度 $0.08\mu\text{Ci/mL}$)を含むpH7.4緩衝液100mL中 O_2 - CO_2 (95:5)混合ガス通気下, 37°C で60分間インキュベートした。粘膜面をよく洗浄後, 内液を取り出してその放射活性を測り, タウロコール酸の腸管通過量を求めた。

疎水性の蛍光測定⁶⁾

各食品たん白質の消化産物(0.05% w/v)と8-アニリノ-1-ナフタリン硫酸(ANS, $8\times 10^{-5}\text{M}$)を含む0.05M, pH8, Tris-HCl緩衝液の蛍光強度を480nm(励起光365nm)で測り, 0.1ppm硫酸キニーネに対する相対値として表した。

グリココール酸不溶化担体の調製

Dippeらの方法⁸⁾に若干の修正を施しグリココール

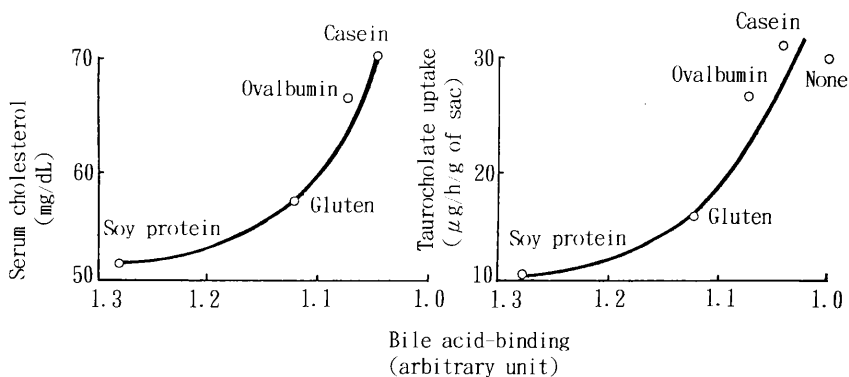


Fig. 1. Correlation between bile acid-binding and its intestinal absorption-inhibiting capacities of proteolytic products from various food proteins (right) or with hypocholesterolemic effects of their protein intakes (left). The peptic-pancreatic digests were used for this purpose. The bile acid-binding and absorption-inhibiting capacities were measured by equilibrium dialysis and *in vitro* uptake experiment with everted sacs, respectively. The hypocholesterolemic effects were evaluated by *in vivo* experiment with growing rats fed over a month's period on these dietary proteins.

酸不溶性担体の調製を行なった。すなわち、テトラヒドロフランに溶かしたコール酸溶液 (100 mg/mL) に 1/30 容のトリエチルアミンを加え 15 分間 -10°C で攪拌した後、1 M NaOH に溶かした N^{ϵ} -t-Boc-lysine (14 mg/mL) 5 倍量を加えて 5 分間攪拌後室温に 1 夜放置した。反応液を中和後、溶液を取り除き、残渣を 100 mL の水に溶かし (pH 2)、生じた白色沈澱を濾別、沈澱を 10 mL のメタノールに溶かして濾過後、溶媒を留去、 3α , 7α , 12α -trihydroxyl- 5β -cholan-24-oyl- N^{ϵ} -t-Boc-lysine の 1 g を得た。これを再び 2 mL のトリクロ酢酸に溶かしてシリカゲル カラムクロマトグラフィーを行ない、Boc 除去標品 (= lysylcholic acid) の約 400 mg を得た。この lysylcholic acid を活性 CH セファロース 4B と架橋させ、充分水洗後カラムに充填してアフィニティークロマトグラフィー用に供した。

結果と考察

Fig. 1 は、平衡透析法によって任意に定めたカゼイン、卵白アルブミン、小麦グルテン、SPI のペプシン-パンクレアチン消化産物の胆汁酸結合能と、当該たん

白質を窒素源とする飼料で 1 カ月間飼育したラットの血清コレステロール値 (左側) あるいは反転腸管を用いて求めた胆汁酸吸収に対する消化産物の阻害効果 (右側) との関係プロットしたものである。消化産物の胆汁酸結合能はカゼイン、卵白アルブミン、グルテン、SPI の順に高く、血清コレステロール値はその順に低くなる傾向がみられた。類似の傾向が胆汁酸結合能と吸収阻害の間にも認められ、血清コレステロール値低下作用と胆汁酸吸収阻害効果とは密接な関係にあることが示唆された。

Fig. 2 は、カゼイン、小麦グルテン、卵白アルブミン、SPI の各ペプシン-パンクレアチン消化産物をグリココール酸不溶性セファロース 4B カラムに通し、その 0.2% デオキシコール酸による溶出成分の量を比較したものである。カゼインや卵白アルブミン消化産物には吸着成分がほとんど無かったのに対し小麦グルテン消化産物から僅かな、SPI 消化産物から最も多量の成分溶出がみられた。このことから、SPI 消化産物では多くの胆汁酸結合性ポリペプチドがプロテアーゼ消化に耐えて残った (あるいは部分水解により埋没箇所

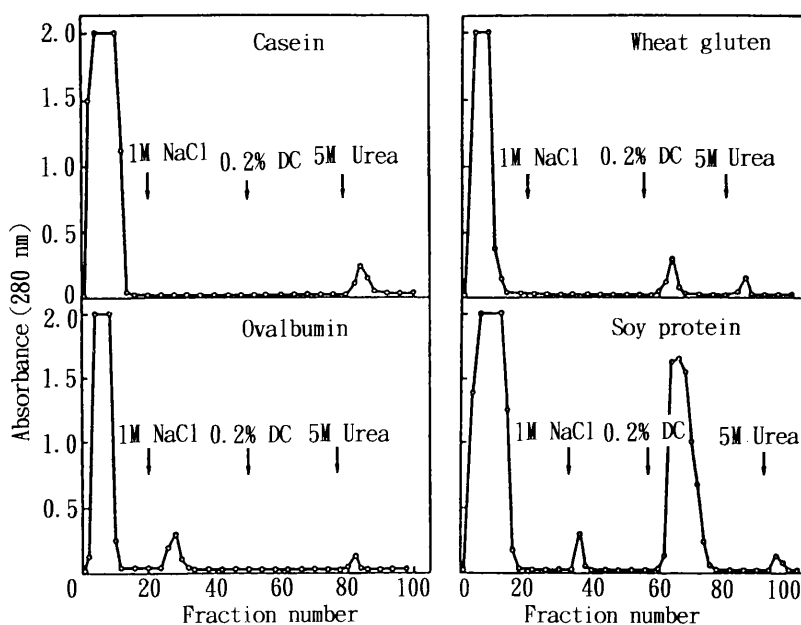


Fig. 2. Evidence for bile acid-binding peptides remaining in peptic-pancreatic digests of casein, ovalbumin, wheat gluten and SPI. These proteolytic products were individually passed through a glycocholate-linked Sepharose 4B column ($1\phi \times 3$ cm), which was eluted with 0.2% deoxycholate after being washed with 1 M NaCl. Eluates were monitored by UV-absorption measurement.

から遊離した?)ことが示唆される。

Fig. 3にグリコール酸不溶化カラムに通した SPI 消化産物の未吸着成分と0.2%デオキシコール酸溶出

画分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による 分析結果を示した。Lane 4と5の差や lane 6の泳動パターンから明らかなように、胆汁酸結合性ペプチドは

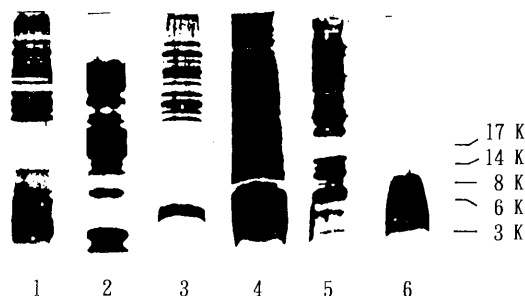


Fig. 3. SDS-PAGE electrophoresis of proteolytic digests of food proteins and bile acid-binding peptides arisen from SPI. Electrophoresis was carried out as usual, and the gel was stained with silver nitrate. A commercially available marker kit in the molecular weight range of 2,510 to 16,950 was used as a standard reference. Lanes represent the respective digests of; (1) casein (untreated), (2) ovalbumin (untreated), (3) gluten (untreated), (4) SPI (untreated), (5) SPI (unabsorbed on the glycocholate-immobilized column), and (6) SPI (desorbed from the above column by elution with 0.2% DOC).

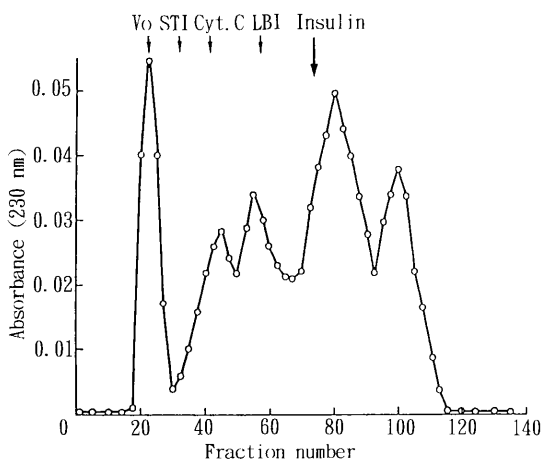


Fig. 4. Sephadex G-50 gel filtration of a SPI-digest adsorbed on the glycocholate-immobilized column. Eluates were fractionated in each 4 mL (column size, 2.5φ×90 cm). Molecular weight markers are as follows: STI, soybean trypsin inhibitor (MW. 21,500); Cyt. C, cytochrome C (MW. 13,000); LBI, lima bean trypsin inhibitor (MW. 9,000); insulin, from bovine pancreas (MW. 5,700).

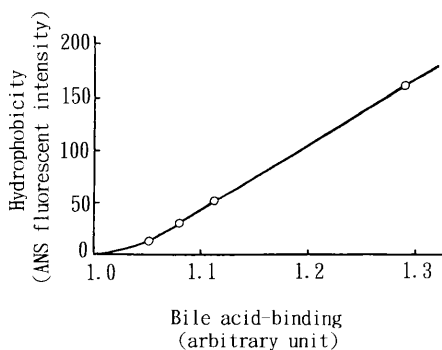


Fig. 5. Validity for temporary replacement of bile acid-binding capacity with surface hydrophobicity. Surface hydrophobicity was estimated from the fluorescent intensity (Ex. 365 nm; Em. 480 nm) in the presence of 8×10^{-5} M 8-anilino-1-naphthalene sulfonate and 0.05% (w/v) digest in pH 8 Tris-HCl buffer, which was obtained as the relative value to that of 0.1 ppm quinine sulfate.

泳動先端の低分子画分で濃く染色されたが、不連続な幅広いバンドのため構成ペプチドの数と分子量を識別することはできなかった。

次にデオキシコール酸塩溶出画分のゲル濾過による分別を試みた。Fig. 4はそのセファデックス G-50 カラムによる溶出パターンを示したものである。成分毎の重複はあるものの、3K から12K の分子量域に4つの

ピークが現れた。このうち最も量的に多いと思われる4K ピーク成分を集め再度 SDS 電気泳動分析を行なったが、泳動パターンは基本的には Fig. 3の lane 6とほとんど変わらず(鋭敏な染色バンドが得られない)均一バンドと特定するに到らなかった。

そこで急遽、行詰った“胆汁酸結合性ペプチド”単離を打開するため、まず疎水性の高いたん白質を部分

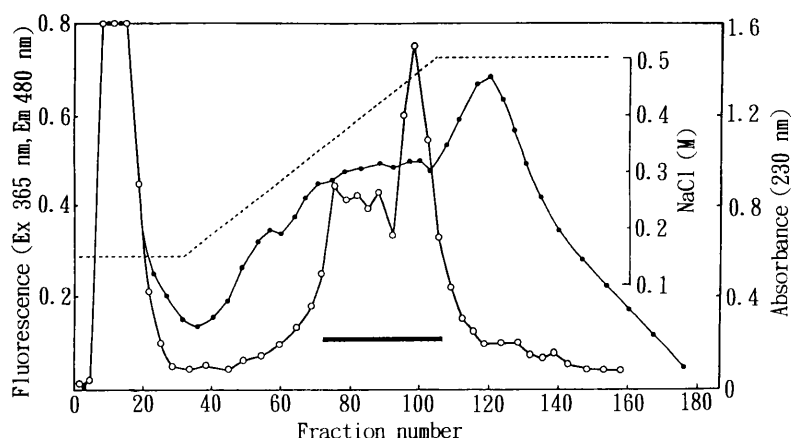


Fig. 6. Partial purification by ion-exchange chromatography of 'hydrophobic' proteins occurring in SPI. Isoelectric precipitation was several times repeated to remove whey or other albuminous components. The globulin fraction was dissolved in 10 mM (pH 8) Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl and 0.02% NaN₃ and its aliquot (100 mL) was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (3φ×35 cm). 'Active' fractions were eluted by linear gradient to 0.5 M NaCl, and then lyophilized after desalinization.

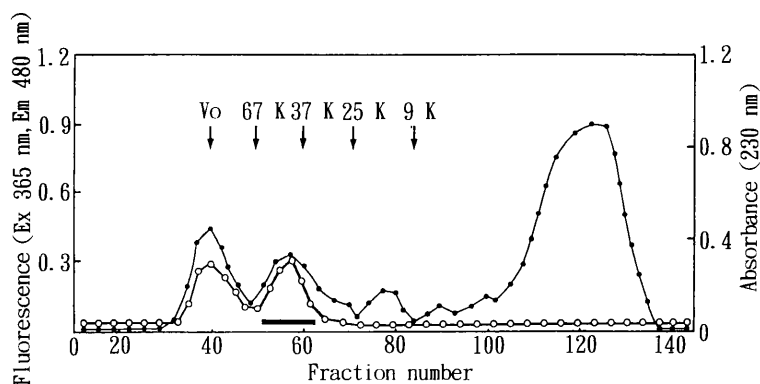


Fig. 7. Separation of 'hydrophobic' proteins by gel filtration with Sephadex G-75. The freeze-dried sample was dissolved in a small volume of buffer and its one-third was applied to a Sephadex G-75 column (3φ×94 cm). 'Active' fractions were collected, and after desalinization, were subjected to affinity chromatography.

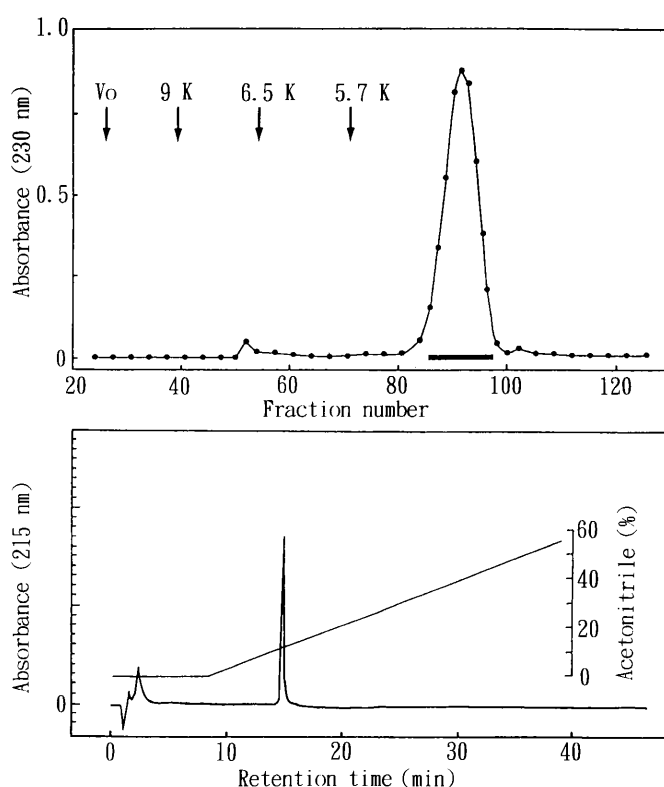


Fig. 8. Homogeneity of a "bile acid-binding peptide" isolated by affinity chromatography from peptic-pancreatic digest of previously semi-purified 'hydrophobic' proteins. Upper: elution pattern by gel filtration with Bio-Gel P-10 (column size, $2.6\phi \times 43$ cm; fractionated in each 3 mL). Lower: elution pattern by reversed phase HPLC (C_{18} column, 4.6×150 mm; acetonitrile, from 0 to 50% (linear gradient); flow rate, 1.0 mL per min.

Table 1. Amino acid composition of bile acid-binding peptide isolated from proteolytic digest of SPI 'hydrophobic' proteins

Amino acid	Number	Amino acid	Number
CysSO ₃ H	0.0 (0)	Ile	1.7 (2)
Cm-Cys	0.0 (0)	Leu	2.7 (3)
Asp	4.1 (4)	Tyr	1.3 (1)
Thr	0.2 (0)	Phe	1.2 (1)
Ser	1.0 (1)	GlcN	0.0 (0)
Homoser	0.0 (0)	GalN	0.0 (0)
Glu	8.1 (8)	Lys	1.7 (2)
Pro	2.2 (2)	NH ₃	0.0 (0)
Gly	9.1 (9)	His	1.3 (1)
Ala	4.2 (4)	Arg	0.7 (1)
1/2 Cys	0.0 (0)	Trp	0.0 (0)
Val	2.1 (2)	Total	(41)
Met	0.0 (0)		
		MW = 4,210	

精製し⁹⁾, そのペプシン-パンクレアチン消化産物から胆汁酸結合性の低分子ペプチドを得るよう改めた。また分離操作に先立ち胆汁酸結合能と表面疎水性の関係を確認し(Fig. 5), イオン交換やゲル濾過の段階ではANSを用いた蛍光法によって胆汁酸結合性たん白質またはペプチドの溶出箇所をつきとめるよう簡略化した。従来, SPIは提供品をそのまま用いていたが, 単離方法の一部変更に伴い SPIの等電点沈澱を数度繰り返してホエー成分を完全に除去した。緩衝化したDEAE-セファデックス G-50カラムに5%たん白質溶液を通し, 吸着たん白質を0.15~0.5 M NaClの濃度勾配によって溶出した(Fig. 6)。ANS-蛍光性の“活性”画分を集め濃縮後, セファデックス G-75によるゲル濾過分別を行なって分子量37K~80Kの画分を集め(Fig. 7), セファデックス G-25カラムで脱塩した。得られた高疎水性たん白質画分を上述通りペプシン-パンクレアチンで処理した後, グリココール酸固定化カラムにかけ, 0.2%デオキシコール酸塩溶出画分を分取した。

この画分をバイオゲル P-4カラムで脱塩後凍結乾燥し, 少量の緩衝液に溶かしてバイオゲル P-10カラムに通したところ, ほぼ単一のピークが出現し, その分子量はおよそ4Kと定められた(Fig. 8上段)。さらにこのピークを集め, MWCO 1000膜で透析, 凍結乾燥後逆相HPLC分析を行なったところピークは単一で他に夾雑ペプチドの存在は認められなかった(Fig. 8下段)。このように人工消化→アフィニティークロマトグラフィー→ゲル濾過(バイオゲル P-10)で得られた標品がHPLC分析によって均一と判定されたので, アミノ酸分析を実施した。その結果(Table 1), 胆汁酸結合能を有する本ペプチドのアミノ酸残基数は41, 分子量は4,210と決定された。現在, アミノ酸配列決定を行っており, 本ペプチドの全1次構造および酵素修飾や化学修飾による機能改変に関する検討結果は次回に報告する。

文 献

- 1) Borgstrom B, Barrowmann JA and Lindstrom M (1985): Roles of bile acids in intestinal lipid digestion and absorption, in “Sterols and Bile Acids”, ed. by Danielsson H and Sjovall J, Elsevier Amsterdam, pp. 405-425.
- 2) Erlinger S (1987): Physiology of bile secretion and enterohepatic circulation, in “Physiology of the Gastrointestinal Tract”, 2nd Ed. Vol. 2, ed. by Johnson LR, Raven Press, New York, pp. 1557-1580.
- 3) Kritchevsky D (1979): Vegetable protein and atherosclerosis. *Am J Oil Chem Soc*, **56**, 135-140.
- 4) Carroll KK (1981): Soya protein and atherosclerosis. *Am J Oil Chem Soc*, **58**, 416-419.
- 5) Sugano M (1987): Nutritional studies on the regulation of cholesterol metabolism; the effect of dietary protein (Japanese). *J Japan Soc Nutr Food Soc*, **40**, 93-102.
- 6) Iwami K, Sakakibara K and Ibuki F (1986): Involvement of post-digestion ‘hydrophobic’ peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric Biol Chem*, **50**, 1217-1222.
- 7) Iwami K, Kitagawa M and Ibuki F (1990): Effect of dietary proteins and/or their digestive products on intestinal tauro-choleate absorption. *J Nutr Sci Vitaminol*, **36**, S141-S146.
- 8) Dippe P, Ananthanarayanan M, Drain P and Levy D (1986): Purification and reconstitution of the bile acid transport system from hepatocyte sinusoidal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, **862**, 352-360.
- 9) Makino S, Nakashima H, Minami K, Moriyama R and Takao S (1988): Bile acid-binding protein from soybean seed; isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity. *Agric Biol Chem*, **52**, 803-809.
- 1) Borgstrom B, Barrowmann JA and Lindstrom