

胆汁酸結合性ポリペプチドのたん白質工学的研究

CHARACTERIZATION OF A MAJOR "BILE ACID - BINDING PEPTIDE" FROM THE PEPTIC-PANCREATIC DIGEST OF SOYBEAN PROTEIN

岩見公和・金谷昌広・伊吹文男（京都府立大学農学部）

Kimikazu IWAMI, Masahiro KANAYA and Fumio IBUKI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

Acidic subunits of glycinin (11S globulin) were prepared from defatted soy bean flakes by means of buffer extraction, weak-acid precipitation, ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sephadex chromatography, and were digested by using pepsin (at pH 2) and pancreatin (at pH 8). The digestive product was passed through a cholic acid-immobilized Sepharose 4B column. The adsorbed components were eluted with 0.2% deoxycholate and then fractionated by gel filtration with Sephadex LH-20 and Bio-Gel P-10. A major peak-component with apparent molecular weight of about 3,200 was separated by reversed-phase HPLC. Amino acid analysis revealed that the peptide would be composed of glutamic and aspartic acids at the 7:3 ratio. Nothing but glutamic acid was released from the peptide by treatment with carboxypeptidase Y. WQEQEDED was identified with the aid of a ABI 477A/120A protein sequencer system. It was assumed on the basis of this and other observations that the peptide must have arisen from residues 251-264 of glycinin A₃ subunit. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 74-80, 1994.

食餌たん白質の未消化成分や食物繊維の生理機能の一つに整腸作用が挙げられるが¹⁾消化過程で生成するペプチドにはそれ自体で生理活性を有するものも見出されている²⁾。大豆たん白質の非吸収性消化産物は従来から用いられてきた食品たん白質中で最も高いコラーゲン結合性を有し³⁾、カゼイン食との比較で常に強調されるコレステロール無添加食における血清コレステロール値低下作用は、胆汁酸の糞中排泄増加とそれに伴うコレステロール異化亢進によってかなりの部分を説明できる⁴⁾。胆汁酸は腸腔内でミセルを形成して脂肪の消化吸収を助け、また他にも未知の生理的作用があるものと信じられている。しかし、近時の我国の食生活変遷と脂肪摂取量増大（食物繊維摂取量の減少）に伴って急増しつつある大腸癌罹患原因では、その危険因子としての二次胆汁酸の役割が指摘されている。

胆汁酸軽減の治療例としてよく用いられるコレステラミンは、胆汁酸とイオン結合して小腸からの再吸収を妨げるが、長期に服用した場合における大腸癌の発生が注目されている⁵⁾。大豆たん白質消化産物中の胆汁酸吸着成分は、コレステラミンと違って胆汁酸の疎水性部分と結合すると考えられる。このような性質をもつ成分は小腸での消化吸収の後にも残存し、腸内細菌の作用にも耐えるものであるとすれば大腸において二次胆汁酸の疎水性部分をマスクできるかもしれない。

本研究はそのような応用に適う“胆汁酸結合性”ペプチドの新規デザイン化を目的としたもので、先ずその基礎となるモデルを大豆たん白質の構造中に求め、ペプシン・パンクレアチン消化産物から胆汁酸不溶性担体に捕捉される様々なペプチド中の主要成分を単離してその構造的特徴を明らかにした。

実験方法

グリシニン (11S グロブリン) 酸性サブユニットの分離⁶⁻⁸⁾

脱脂大豆200 g を20倍容の10 mM メルカプトエタノールを含む30 mM (pH 8.0) Tris-HCl 緩衝液と共に室温で1 h 攪拌, 遠心分離後の上澄液を pH 6.4 の微酸性として4℃に1 h 放置し, 生じた沈澱を35 mM, pH 7.6, リン酸緩衝液 (10 mM メルカプトエタノールと0.4 M NaCl を含む) に溶かし, N-エチルマレイミドを11 mM になるよう加えて30 min 攪拌後, 硫酸飽和51~66%の画分を分別した。この画分を脱塩後 DEAE-Sephadex A-50 カラムに通して0.2~1.0 M までのNaCl 濃度勾配により0.5 M 以上で溶出される ANS 活性画分を集めた。さらに Sephacryl S-300 カラムに

通して分子量 4 K 付近に溶出される ANS 活性画分を集め, もう一度 DEAE-Sephadex A-50 で分画したものをグリシニン酸性サブユニットとした (収量645 mg)。

コール酸不溶化担体の調製⁹⁾

Pattinson et al. の方法に従ってカルボジイミド存在下 (1.6 g/500 mL in 50% EtOH) コール酸 (0.5 g/50 mL in 99% EtOH) を EAH-Sephacryl 4B (Pharmacia product, 20 mL) にカップリングさせ (24℃, 16 h), 溶媒濾別後50%エタノールと0.5 M 食塩水で十分に洗浄したものを10 mM, pH 8.0, Tris-HCl (0.02% Na₂S₂O₃ と0.15 M NaCl を含む) 緩衝液中で4℃に保存した。

ANS 活性測定¹⁰⁾

脱脂大豆の水 (pH 8) 抽出成分の DEAE-Sephadex

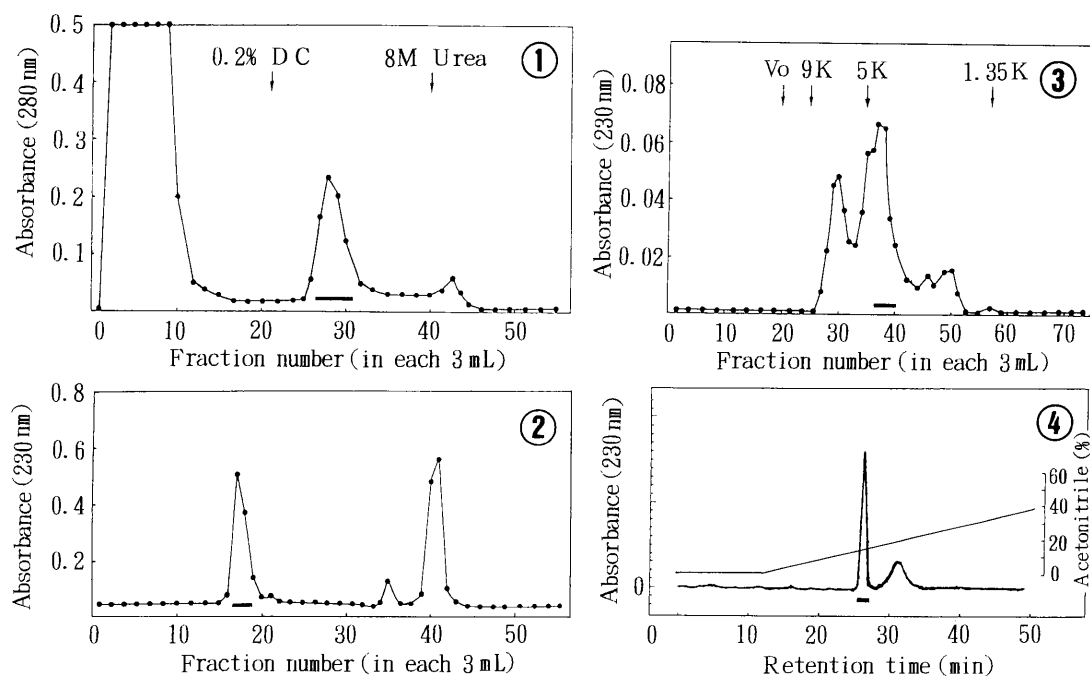


Fig. 1. Four steps in isolation of a major "bile acid-binding polypeptide" occurring in the peptic-pancreatic digest from glycinin acidic subunits. Aliquots of the digestive product were fractionated by ① affinity chromatography with a cholic acid-immobilized Sepharose 4B column (1.2φ×17 cm), ② gel filtration with a Sephadex LH-20 column (2.0φ×45.5 cm) and ③ with a Bio-Gel P-10 column (2.0φ×61 cm), and ④ high-performance liquid chromatography with a Wako SIL C₁₈ column.

や Sephacryl による各画分の疎水性の程度は、90 mM Tris-HCl 緩衝液中 (pH 8.0) で 1.6×10^{-4} の 1-anilino-naphthalene-5-sulfonate (=ANS) と反応させて生ずる蛍光強度 (Ex 365 nm; Em 480 nm) により求めた。ペプシン-パンクレアチン消化¹⁰⁾

大豆グリシニン酸性サブユニット調製品を pH 8 の Tris-HCl 緩衝液に溶かし (たん白質濃度は5%) 2 N HCl にて pH 2 に調整後、たん白質量の1/50のペプシンを加え37℃に24 h インキュベートした。2 N NaOH にて中和後 (pH 8.0; 0.02% NaN_3 を含む) 1/50量のパンクレアチンを加え再び37℃で24 h インキュベートし、Spectra/Por 6 (MWCO 1,000) チューブを用いて10 mM (pH 8) Tris-HCl 緩衝液中で透析したものを目的とする「ペプチド」単離の出発物質とした。

結 果

Fig. 1 は脱脂大豆から調製した 11S グロブリン酸性

サブユニット人工消化産物からの当該ペプチド単離の過程をまとめたものである。ペプシン・パンクレアチン消化産物をコール酸不溶化 Sepharose 4B カラムに通して0.02%デオキシコール酸塩で溶出される画分を集め (①), 低分子物質 (MW<1,000) を透析除去, 凍結乾燥によって濃縮後 Sephadex LH-20 カラムに通した (②)。主要なピークは二つ現れたが、後半のピークが分子量1,000以下でニンヒドリン反応に陰性であることから除去不十分なデオキシコール酸によるものと判断し、前半のピーク部分のみ集めた。この画分を濃縮して Bio-Gel P-10 カラムにかけると分子量2,000~8,000の範囲に数個のピークがみられ (③), このうち最も大きいピーク画分 (分子量3,000-4,000に相当) を集めて凍結乾燥後、少量ずつ逆相 HPLC にアプライシアセトニトリルの濃度勾配で15%前後から溶出される画分を今回の最終標品とした (④)。

Fig. 2 は得られた最終標品の分子量確認のため Bio-

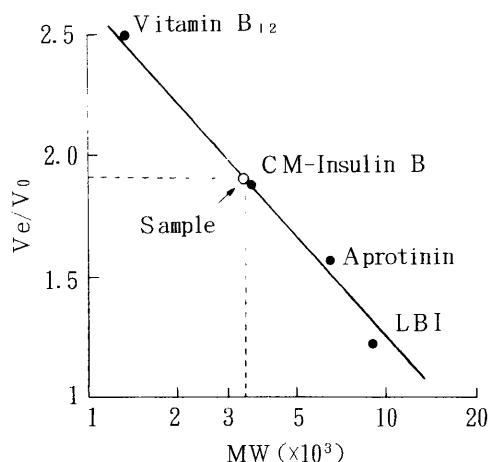


Fig. 2. Estimation of apparent molecular weight of the isolate. The same column as in Fig. 1-③ was used for this purpose. Standard markers are as follows; hemoglobin (void volume), lima bean trypsin inhibitor (MW 9,000), aprotinin (MW 6512), carboxymethylated insulin B chain (MW 3515), and vitamin B₁₂ (MW 1350). A regression line with high correlation coefficient was obtained between logarithms of molecular weight and V_e/V_0 values.

Gel P-10 カラムを用いてその溶出位置を分子量既知の標準品のそれと比較したものである。標準物質の相対溶出位置 V_e/V_0 と分子量との間には高い相関係数 ($r = -0.994$) の回帰式 $Y = -0.634 \log X + 7.09$ が求められた。単離品の溶出位置は CM-insulin B chain のすぐ後で、標準線上のプロットからその分子量はおおよそ 3,200 と推定された。

Fig. 3 は単離品の塩酸加水分解物のアミノ酸分析の一例を示したものである。標準サンプルのそれ（下段チャート）と対応させて同定されたアミノ酸はグルタミン酸とアスパラギン酸だけで、両アミノ酸のモル比

(Glu/Asp) は 2.3 と求められた。これらアミノ酸以外に由来するチャート上の微小ピークは必ずしも再現性が高く、汚染または機械エラーによる可能性が高い。

Fig. 4 は単離品の C 末端アミノ酸を定めるためカルボキシペプチダーゼ処理した反応液を薄層クロマトグラフィーで分析した結果の一例である。酵素反応により遊離が認められたアミノ酸は唯一グルタミン酸のみで、反応時間を延長しても他のアミノ酸は出現しなかった。なお、基質「ペプチド」量に比べて使用した酵素量は極めて僅か（検出限界以下）なので、酵素自体の自己消化によるアミノ酸を誤って測定した可能性は

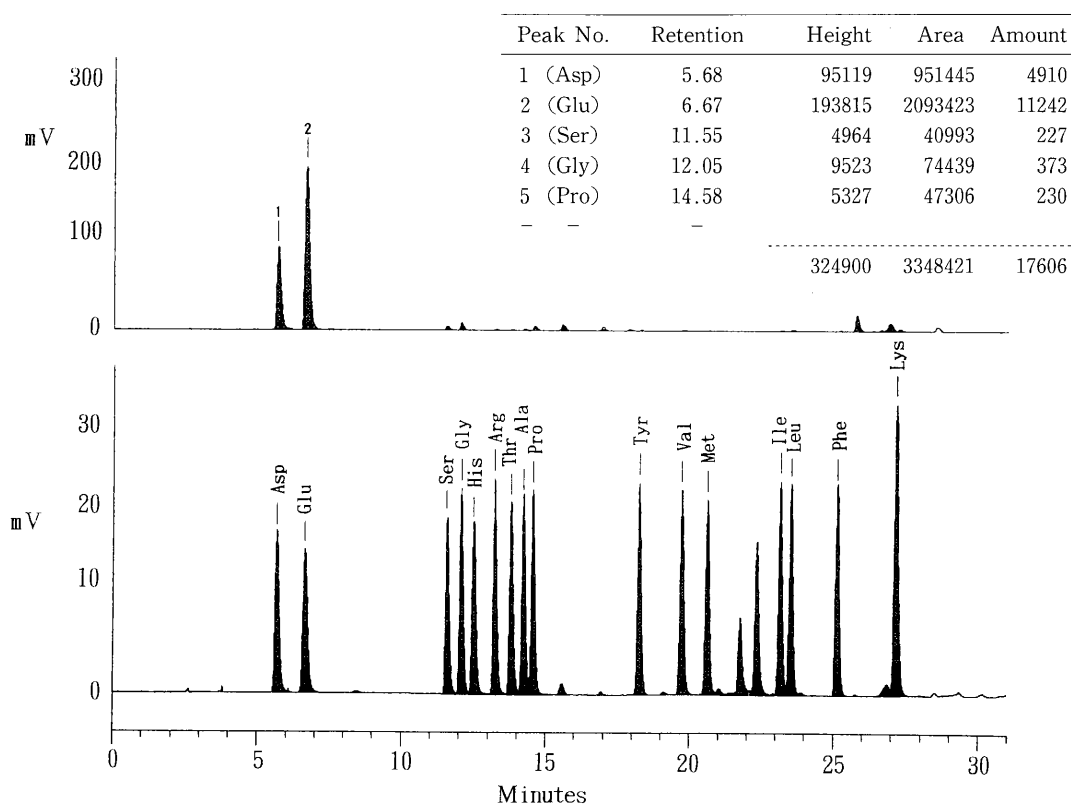


Fig. 3. Amino acid composition of the isolate. The isolate was acid-hydrolyzed for 1 h in 6 N HCl at 150°C. A methanol-water-TFA (7:1:2) was added to the hydrolysate and evaporated to dryness *in vacuo*. The residual amino acids were converted to phenylthiocarbonyl derivatives, which were analyzed with a Shimadzu HPLC assembly by Dr. Kenji Sato, Kyoto Prefectural University. The upper and lower charts represent the amino acid patterns of the isolate and standards, respectively.

BtOH-AcOH-Water
(4:1:1)

Front

Glu

Start

A

S₃₀

S₁₂₀

Fig. 4. TLC analysis of amino acid released from the isolate by carboxypeptidase Y. The isolate was dissolved in 0.2 M, pH 5.6, pyridine-acetate buffer containing 20% methanol and allowed to react at 37°C with carboxypeptidase Y in its two-hundreds amount. The reaction mixture was withdrawn at certain intervals and immediately applied on the silica gel plate. After being developed, the chromatogram was sprayed with a ninhydrin reagent: A, authentic glutamic acid; S₃₀, the reaction mixture after 30 min; S₁₂₀, the reaction mixture after 120 min.

否定できる。

これらの知見を背景に、次にプロテインシーケンサーによる解析に着手した。N末端から順に同定されたアミノ酸は Trp(W), Gln(Q), Glu(E), Gln(Q), Glu(E), Asp(D), Glu(E), Asp(D), Glu(E), Asp(D) の10残基で、それ以降の識別は困難であった。この配列をグリシニン酸性サブユニットに搜してみると A₃ サブユニット¹¹⁾のC末端に近い251-260部分にその存在が確かめられた (Fig. 5)。

考 察

グリシニンが消化をうけた場合、酸性サブユニットのみが“胆汁酸結合性”ペプチドを遊離するとの証拠はないが、酸性サブユニットにアルブミンに匹敵する強い疎水性領域が含まれることは牧野ら¹²⁾によって報告されている。我々はSPI ペプシン・パンクレアチン消化産物から“胆汁酸結合性”ペプチドを単離しようと試みてきたが、簡便で信頼性のある“結合活性”の測定手段がなく、多量の夾雑物の存在もあって単離困難が予想されたので、大豆たん白質まるごとではなくグリシニン酸性サブユニットから生じたものにしばって追究することに計画変更した。今回単離した「ペプチド」は比較的分子量の低いものであったが、それでもゲル濾過から推定された分子量とアミノ酸配列およびアミノ酸分析から推定された分子量には2倍の違いがあった。ゲル濾過による推定分子量は6 M 尿素存在下でも変化せず、「ペプチド」が二量体を形成している可能性はない。従って、その矛盾の説明には「ペプチド」の分子形状 (例えば横長) を考慮に入れるべきかもしれない。

一方、「ペプチド」構成アミノ酸中には“疎水性”アミノ酸の存在が少ない。このような組成を持つ「ペプチド」がほんとうに再現性よくコール酸不溶化担体に結合しうるのであろうか。ために最終標品を、使い古しのカラム (ペプシン・パンクレアチン消化産物のアフィニティクロマトグラフィーを3回行ったもの)に通したところ、当該「ペプチド」は確かにカラムに吸着された。しかし、「ペプチド」を等モルの [14 C] タウロコール酸と共に平衡透析 (透析膜 MWCO 1,000) を行った場合、pH を酸性領域に移しても両化合物の結合は認められなかった。タウロコール酸中のスルホン酸基の解離能は高く、pH > 2ではイオン状態で存在する。一般に動物大腸では嫌気発酵で有機酸が生じ、pH が5近くまで下がると言われている¹³⁾。回腸での再吸収を免れた脱抱合胆汁酸は腸内細菌の作用をうけて二次胆汁酸に変化し、pH 5付近ではそのほぼ2/3

¹ITSSKFNECQLNNLNALEPDHRVESEGGLIETWNSQHPELQCAGVTVSKR⁵⁰
 TLNRNGSHLPSYLPYPQMIIVVQKGKGAIGFAFPGCPETFEKPQQQSSRRG¹⁰⁰
 SRSQQQLQDSHQKIRHFNEGDVLVIPLGVPHYWTYNTGDEPVVAISPLDTS¹⁵⁰
 NFNNQLDQNPRVFYLAGNPDI EHPETMQQQQQKSHGGRKQGQHRQEEE²⁰⁰
 GGSVLSGFSKHFLAQSFNTNEDTAEKLRSPDDERKQIVTVEGGLSVISPK²⁵⁰
 ↓
WQEQEDEDEDEEYGRTPSYPPRRPSHGKHEDDEDEDEEDQPRPDHPP³⁰⁰
 QRPSRPEQQEPRGRGCQTRN

Fig. 5. Primary structure of glycinin A₃ subunit and amino acid sequence relevant to the isolate. N-terminal amino acids were in turn determined by using a ABI 477A/120A protein sequencer system; 10 residues (WQEQEDEDED) were reliable. The sequence of additional EDEE was assumed, taking account of data in Figs. 3 and 4 as well as susceptibility of A₃ to trypsin and chymotrypsin.

が非解離状態にある¹⁴⁾。従って、本「ペプチド」が酸性 pH 条件下で二次胆汁酸と結合し、その大腸粘膜からの取り込みや粘膜表面への刺激を防ぎうるか否か、更なる検討を要する。

文 献

- 1) Alpers DH (1994): Digestion and absorption of carbohydrates and proteins, *In: Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd Ed., Johnson LR, ed., Raven Press, New York. pp. 1723-1749.
- 2) 千葉英雄・吉川正明 (1988): 食品成分中の潜在的生理活性物質. 食品機能—機能性食品創製の基盤, 藤巻正生監修, 学会出版センター, 東京. pp. 201-206.
- 3) 岩見公和・金谷昌広・伊吹文男 (1993): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **14**, 42-48.
- 4) 菅野道廣 (1991): 大豆たん白質のコレステロール低下作用. 植物性たん白質の栄養, 大豆たん白質栄養研究会/日本植物蛋白食品協会, 大阪/東京. pp. 55-83.
- 5) 成沢富雄 (1987): 大腸癌と胆汁酸. 代謝, **24**, 719-725.
- 6) Thanh VH and Shibasaki K (1976): Major proteins of soybean seeds—A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **24**, 1117-1121.
- 7) Wolf WJ, Babcock GE and Smith AK (1962): Purification and stability studies of the 11S component of soybean proteins. *Arch Biochem Biophys*, **99**, 265-274.
- 8) Mori T, Utsumi S and Inaba H (1979): Interaction involving disulfide bridges between subunits of soybean seed globulin and between subunits of soybean and sesame seed globulins. *Agric Biol Chem*, **43**, 2317-2322.
- 9) Pattinson N, Collins D and Campbell B (1980): Covalent coupling of cholic acid to aminohexylamino-Sepharose 4B and its use in affinity chromatography of serum albumin. *J Chromatogr*, **187**, 409-412.
- 10) 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.
- 11) Fukazawa C, Momma T, Hirano H, Harada K and Udaka K (1985): Glycinin A₃B₄ mRNA—Cloning and sequencing of double stranded cDNA complementary to a soybean storage protein. *J Biol Chem*, **260**, 6234-6239.

- 12) 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.
- 13) Hofmann AF (1994): Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents, *In: Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd Ed., Johnson LR, ed., Raven Press, New York. pp. 1845-1865.
- 14) Cary MC (1985): Physical-chemical properties of bile acids and their salts, *In: Sterols and Bile Acids*, Danielssin H and Sjövall J, eds., Elsevier, Amsterdam. pp. 345-403.