

大豆レクチンの消化吸収性と食品機能性

梅澤有希子・佐藤勇紀・永沼孝子・小川智久・村本光二*

東北大学大学院農学研究科

Stability of Soybean Lectin during Food Processing and in Digestive Tract

Yukiko UMEZAWA, Yuhki SATO, Takako NAGANUMA,
Tomohisa OGAWA and Koji MURAMOTO

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555

ABSTRACT

Soybean lectin (agglutinin, SBA) is a N-acetylgalactosamine binding protein which can interact with different types of cell and exert various biological activities. This study demonstrated the extent of survival of SBA during food processing and in digestive tract to explore its applicability as a physiological modulator originated from foods. The lectin kept a significant activity even after 2 h at 80°C, and the heat-resistancy improved in the presence of other food components as in soy milk. SBA was stable at neutral or acidic pH, however, its activity was abolished at alkaline pH due to the aggregation. Proteolytic digestion with pancreatin, trypsin and chymotrypsin did not affect on the lectin activity, whereas peptic digestion gradually inactivated SBA to produce the lectin fragments of Mr ~4000. ELISA assay of circulating blood in mice which were given SBA by stomach-tube showed that variable but significant amounts of the SBA fragments could cross the intestinal barrier. The immunoreactivity level became to be maximal 4 to 6 h after administration of SBA. Gel filtration HPLC analysis of the sera from mice which were orally administered FITC-SBA showed the SBA fragments of Mr ~4000 penetrated the intestinal wall and circulated in blood. Furthermore, FITC-SBA and its fragments still remained on the small intestinal mucosa 8 h after administration. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 59-64, 1999.

Key words : soybean agglutinin, lectin, hemagglutination, ELISA, FITC

大豆に約0.1%含まれるレクチンは、N-アセチルガラクトサミンに対して結合特異性を示すだけでなく、リンパ球の幼若化を惹起するなどの多様な生理活性をもっている¹⁾。レクチンはトリプシンインヒビターと

同様に食品加工や調理において加熱失活すると理解されている^{2,3)}が、各種大豆加工食品の多くには残存するレクチン活性がみられ、特にきなこや炒り豆のように乾燥状態で加熱加工したものには強いレクチン活性が検出される。本研究では、大豆食品に含まれるレクチンを生体機能調節因子として積極的に活用できるか

*〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

否かを検討することを目的として、レクチンの加熱、pH および各種消化酵素に対する安定性を調べるとともに、マウスに経口投与した大豆レクチンの消化器官における挙動と腸管からの吸収性を調べた。

方 法

大豆レクチンの単離精製

脱脂大豆（ミヤギシロメ）粉に5倍量の0.15 M NaClを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）（PBS）を加え、4℃で一晩攪拌抽出した。抽出液のpHを4.5にして、生じた沈澱を遠心分離で除いた。上清を80%飽和硫酸溶液にしてたん白質画分を回収した。これを少量のPBSに溶解してエピクロロヒドリンで架橋したグアーガムゲルに加え、PBSでゲルを洗浄後、吸着したレクチンを0.2 M ガラクトース/10 mM PBSで溶出した。最後にイオン交換クロマトグラフィー（DEAE-Cellulofine A-500）で分離して精製大豆レクチン（SBA）を得た。100 gの脱脂大豆粉から約60 mgのSBAを単離した（活性収率：約30%）。単離したSBAは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で単一バンドを与え、分子量30,000のサブユニットが4量体を形成していた。

レクチン活性の測定

U底96穴マイクロタイタープレートに作成した試料液（50 μ L）の2倍希釈系列に、4% ウサギ赤血球懸濁液（50 μ L）を加えて攪拌後、室温に30分間放置して凝集活性を観察した。血球の凝集が肉眼で確認できたものを陽性として、その最大希釈倍率を試料のレクチン活性とした⁴⁾。

FITCによるSBAの蛍光ラベル化

SBA 20 mgとフルオレセインイソチオシアネート（FITC）16 mgを8 mLの0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.0）に溶解し、室温で3時間反応させた。反応後、10 mM PBSで平衡化したSephadex G-25 カラム（2.5 cm $\times$ 28 cm）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで未反応FITCを分離除去した。FITC-SBAは蒸留水に対して透析後、凍結乾燥して17 mgのFITC-SBAを得た。モル吸光係数から算出した修飾率は、0.7 mol FITC/mol SBAであった。

FITC-SBAの投与

6週齢のSlc:ICR系雄マウスを固形試料で1週間予備飼育後、1群3匹として実験に用いた。12時間絶食後、生理食塩水0.3 mLに溶解した2 mgのSBA（FITC-SBAを10%含む）を胃内に投与した。経時的に腋下大動脈より採血し、遠心分離して得た血漿に含まれるFITC-

SBAをゲル濾過HPLCで分析した。試料20 μ Lを50 mM Tris-HCl（pH 8.0）/0.15 M NaClで平衡化したSuperdex 200（10 mm $\times$ 300 mm）に注入し、280 nmの吸光度と蛍光（励起波長、490 nm；蛍光波長、520 nm）で溶出ピークを検出した。また、FITC-SBAを投与して8時間後にマウスの十二指腸、空腸および回腸の粘膜組織から回収したFITC-SBAについても同様に分析した。

酵素免疫測定法によるSBAの吸収測定

生理食塩水0.3 mLに溶解したSBA 1 mgをマウスに胃内投与した。経時的に腋窩の動脈より採血し、血漿を調製した。希釈した血漿試料（100 μ L）を、精製抗SBAウサギ抗体をコーティングした96穴マイクロタイタープレートに加え、37℃で2時間インキュベート後、さらにパーオキシダーゼ標識抗SBAウサギ抗体と同様にインキュベートした。プレートを洗浄後、基質液（100 μ L）を加えて発色させたのち、2 N H₂SO₄で反応を停止してオートリーダーを用いて492 nmの吸光度を測定した。

結果と考察

レクチン活性の熱安定性

食品加工および生体内でのSBAの安定性に対するpH、温度、消化酵素の影響を調べた。SBAをpH 3（50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液）、pH 5（同）、pH 7（50 mM リン酸ナトリウム緩衝液）、pH 9（同）に溶解後、50℃、70℃、90℃で加熱処理した。90℃ではいずれのpHでもレクチン活性は急速に減少し、30分以内に活性は未処理の6%以下になった（Fig. 1）。70℃では、pH 3のSBAは1時間で失活したが、その他では3時間の加熱でも未処理の12%の活性を保持していた。50℃では、pH 3と7で活性が短時間に1/2に低下したが、それ以上の活性の低下は3時間後にもみられなかった。以上の結果より、SBAを高温で処理すれば短時間でレクチンを失活させることが可能であるが、通常の生理活性たん白質に比べれば高い安定性を持っているといえる。

大豆に一晩吸水させて作った豆乳を80℃に加熱したときのレクチン活性の低下は、SBAのみの場合に比べて50%遅くなった。これは、SBAの熱安定性がグロブリンや他の成分によって向上したためと考えられる。

SBAのpH安定性

SBAをpH 2～12に4℃で24時間放置後、pH 7に調整してレクチン活性を測定した。酸性条件下ではSBAの活性はあまり低下せず、一方、アルカリ条件下（とくにpH 10以上）では著しく活性が低下した（Fig. 2）。

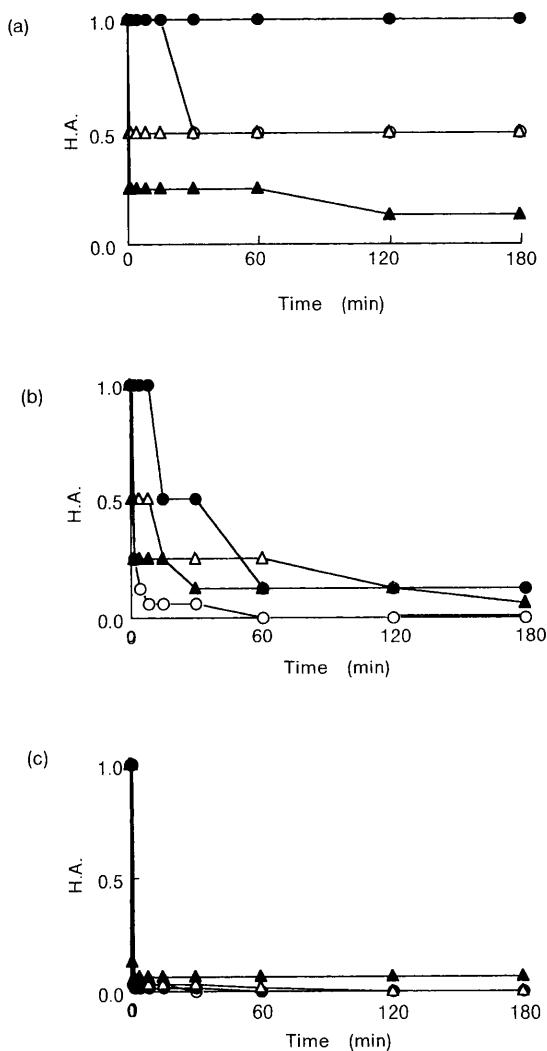


Fig. 1. Changes in hemagglutinating activity of SBA by incubating at various pH and temperature. (a), 50 °C; (b), 70 °C; (c), 90 °C. ○, pH 3.0; ●, pH 5.0; △, pH 7.0; ▲, pH 9.0.

アルカリ条件に放置したSBAをゲル濾過HPLCで分析すると、高分子域に溶出ピークがみられた (Fig. 3). SDS-PAGE による分析結果から、ジスルフィド結合の交換反応により SBA の凝集が起こったと考えられる.

SBA の消化酵素に対する安定性

SBA をペプシン、トリプシン、キモトリプシン、およびパンクレアチンで処理してレクチン活性の変化を調べた。ペプシンの消化には 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 2.0) を用い、他の酵素には 0.1 M 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) を用いた。レクチンと酵素の

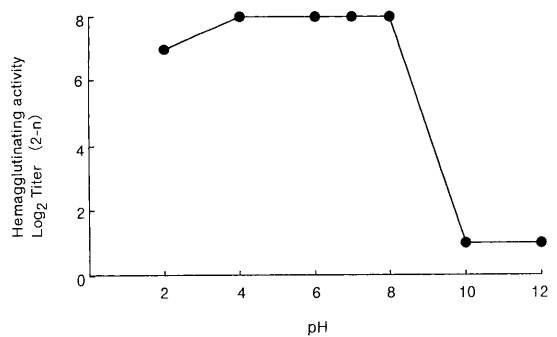


Fig. 2. Changes in hemagglutinating activity of SBA by incubating at various pH at 37 °C for 24 h.

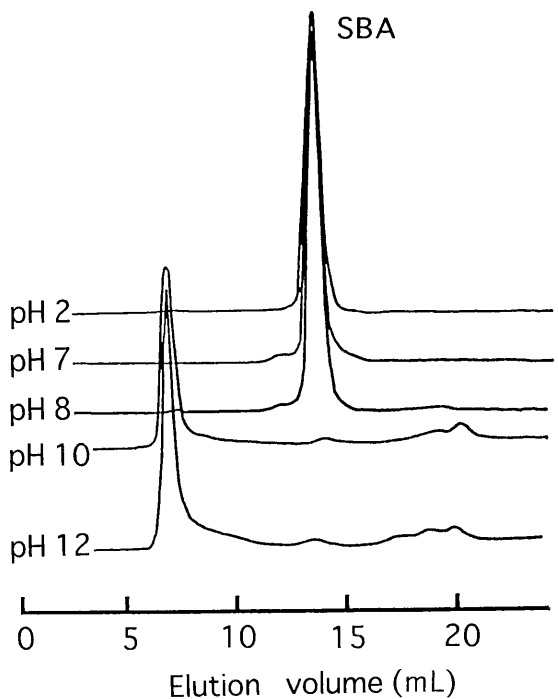


Fig. 3. Gel filtration HPLC of SBA after incubating at various pH at 37 °C for 24 h. HPLC was performed on Superdex 200 (1 cm × 30 cm) eluted with 10 mM sodium phosphate (pH 7.2) / 0.15 M NaCl at a flow-rate of 0.5 mL/min.

重量比は 50 : 1 および 100 : 1 になるように調整し、37 °C で酵素消化を行った。ペプシン消化では 8 時間以降からレクチン活性が低下し、24 時間後には最初の 6% になった。他の酵素では 24 時間後でもレクチン活性に変化はみられなかった (Fig. 4)。ペプシン消化液を分取してゲル濾過 HPLC にかけたところ、経時的に未変

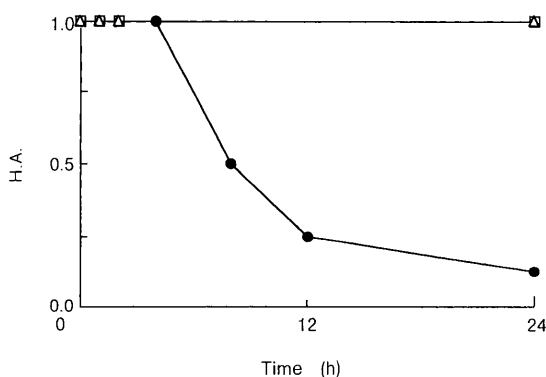


Fig. 4. Effect of enzymatic digestion on the hemagglutinating activity of SBA. ●, Pepsin; ○, trypsin; □, chymotrypsin; △, pancreatin.

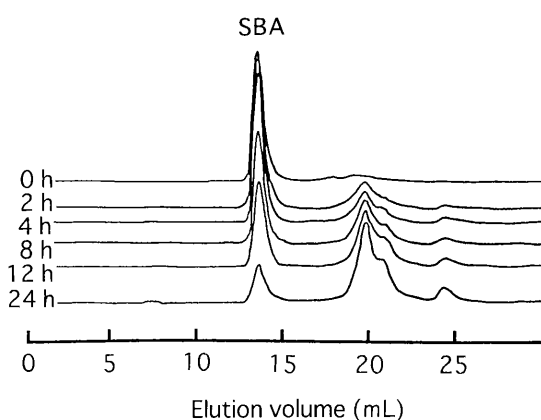


Fig. 5. Gel filtration HPLC of SBA after peptic digestion for various periods. HPLC was performed as in Fig. 3.

性 SBA のピークが減少し、分子量約 4,000 のピークが増加した (Fig. 5).

SBA の吸収測定

マウスに SBA を胃内投与し、経時的に血液中の SBA 量を酵素免疫測定法 (サンドイッチ ELISA) で測定した (Fig. 6). 本法で 0.1 ~ 10 ng の SBA を定量することが可能であった. 各時間毎の測定値は 6 ~ 8 匹で求めたが, 吸収量に大きな個体差がみられた. 投与後 6 時間後にほぼ最大値の 30 ng / mL に達し, 12 時間を経過しても 10 ng / mL の SBA が血液に残存していた.

FITC-SBA の動態

FITC-SBA を 10% 混合した SBA (1 mg / 匹) をマウスに投与後, 経時的に全採血して調製した血漿を Superdex 200 カラムを用いたゲル濾過 HPLC にかけた (Fig. 7). FITC で標識された SBA およびその断片を蛍光検出器でモニターしたところ, SBA 溶出位置の蛍光は 4 時間後と 6 時間後にわずかに増大したのみであった. しかし, 分子量約 4,000 の蛍光ピークは 1 時間後から増大し, 4 時間後に最大に達したのち徐々に減少した. この蛍光標識された断片は, SBA をペプシン消化したときに観察されたものとほぼ同じものが腸管から吸収されたものと考えられる.

FITC-SBA の投与 8 時間後に, マウスの十二指腸, 空腸および回腸の粘膜附着物を回収し, 腸管内における FITC-SBA の構造変化をゲル濾過 HPLC で分析した (Fig. 8). 十二指腸には未消化の FITC-SBA が多く滞留しており, 空腸では分解中間物の生成がみられ, 回腸では分子量約 4,000 の蛍光標識断片が検出された. これらの結果から, マウスに投与した SBA は腸管粘膜の上皮細胞と相互作用しながらゆっくりと移動し, 部分

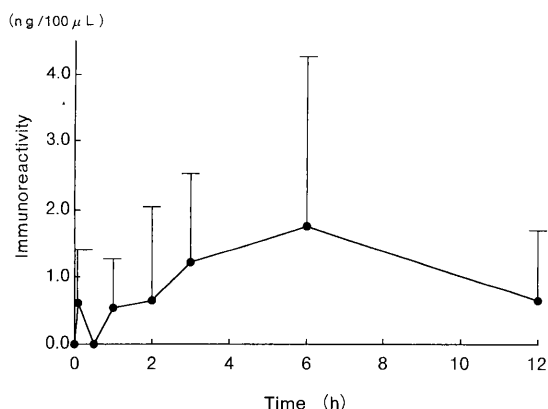


Fig. 6. SBA like immunoreactivity levels in blood samples from mice which were given SBA by stomach-tube as measured by a sandwich-ELISA. Data are means $\pm$ SE ($n = 6 \sim 8$).

的加水分解を受けながら, その一部の断片が腸管から体内に吸収されることが明らかになった. 従って, SBA が生体に及ぼす食品機能性としては, 腸管の上皮細胞および内分泌細胞, 腸管内の微生物叢との相互作用によるもの, そして, 今後検討を要するが, 腸管から吸収された SBA 断片の生理活性によるものが期待できる.

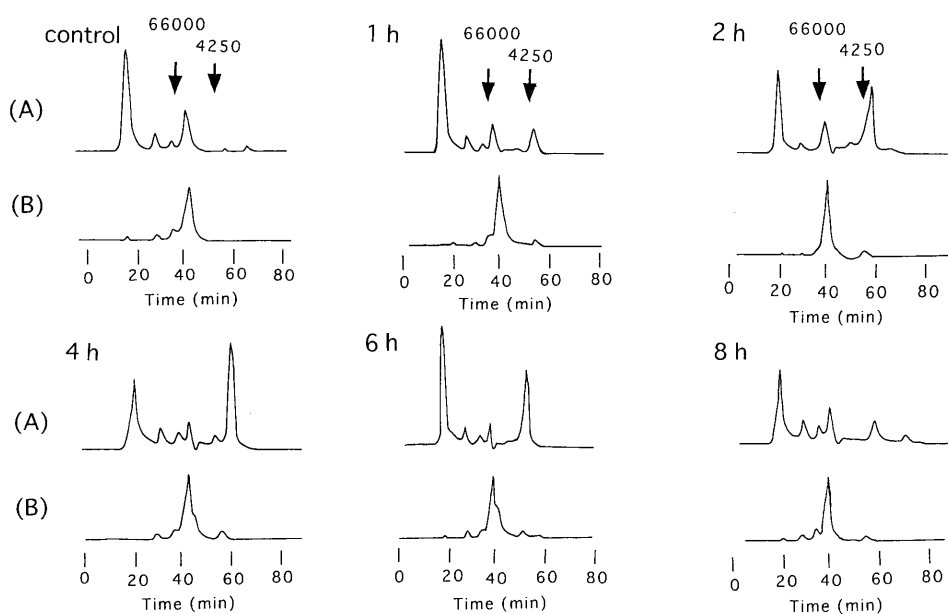


Fig. 7. Gel filtration HPLC of sera from mice which were given FITC-SBA by stomach-tube. HPLC was performed on Superdex 200 (1 cm $\times$ 30 cm) eluted with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 0.15 M NaCl at a flow-rate of 0.5 mL/min. (A) Elution peaks were detected by fluorescence (Ex, 490 nm; Em, 520 nm); (B) detected by absorbance at 280 nm.

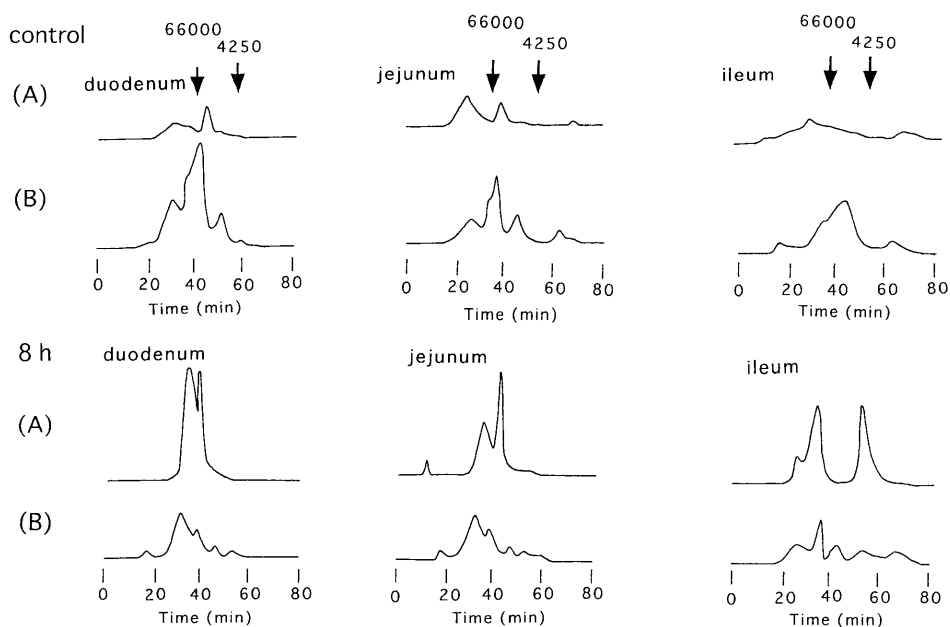


Fig. 8. Gel filtration HPLC of the extracts of intestinal mucus from mice which were given FITC-SBA by stomach-tube. HPLC was performed on Superdex 200 (1 cm $\times$ 30 cm) eluted with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 0.15 M NaCl at a flow-rate of 0.5 ml/min. Elution peaks were detected by (A) fluorescence (Ex, 490 nm ; Em, 520 nm) or (B) UV absorption at 280 nm.

要 約

大豆レクチンは、90℃ に加熱すると急速に活性を失ったが、80℃ では2時間の加熱でも活性を維持した。また、豆乳のように他の成分が共存する複合系においてはレクチン活性の安定性が向上した。弱アルカリよりも弱酸性から中性で高い安定性がみられた。ペプシン消化に対してレクチンは、主要貯蔵たん白質よりも大きな抵抗性を示す一方、パンクレアチンによっては全く消化を受けなかった。マウスに経口投与したレクチンの挙動を酵素免疫測定法および蛍光標識法で追跡し、小腸管壁における未消化レクチンの存在とその一部の断片化、および分子量約4,000のレクチン断片の血液への取り込みを確認した。血中のレクチン断片は、投与1時間後から増加し、4ないし6時間後に最高レベルに達した。

文 献

- 1) Pusztai A and Bardocz S (1996) : Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract : Metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci Glycotechnol*, **8**, 149-165.
- 2) 岩井和夫, 樋口雅子 (1987) : 大豆たん白質の消化特性と構成アミノ酸の有効性. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 52-58.
- 3) 岸 恭一, 寺井幸子, 志塚ふじ子, 木戸康博 (1987) : 大豆乳清たん白質の栄養価の改善. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 70-75.
- 4) Tateno H, Saneyoshi A, Ogawa T, Muramoto K, Kamiya H and Saneyoshi M (1998) : Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. *J Biol Chem*, **273**, 19190-19197.