

# 大豆レジスタントプロテインの栄養機能特性と 胆汁酸結合様式解明へのアプローチ

岩見公和\*・東 直之・須田仁志・岩寄浩恭・金本龍平

京都府立大学農学部

## Characteristics of Soybean Resistant Protein in Nutritional-physiological Aspects and Approach to the Elucidation of Mode of Bile Acid-binding

Kimikazu IWAMI, Naoyuki AZUMA, Hitoshi SUDA, Hiroyuki IWASAKI  
and Ryuhei KANAMOTO

Kyoto Prefectural University School of Agriculture, Kyoto 606-8522

### ABSTRACT

Six groups of azoxymethane treated mature Fischer rats (n=10) were fed the respective diets different in protein sources such as milk casein, soybean high-molecular-weight fraction (HMF), yolk protein, wheat gluten and codfish meat, which had been supplemented as a cancer promoter with 0.2% deoxycholic acid (DCA) except for a DCA-unfed casein group. All rats were inspected for tumor incidence in the colon at 6 weeks' intervals between the 10th and 34th weeks by the use of a bronchus fiberscope. Colonic tumorigenesis was perceived at week 22 only in the DCA-fed casein group and at week 28 in five dietary groups except the DCA-unfed casein group, and at week 34 in all the groups among which both soybean HMF and yolk protein groups ranked in tumor incidence as inferior to the DCA-unfed casein group. When plasma steroid or lipid concentration was plotted against tumor incidence at week 28 or 34, positive correlations were found at both weeks between plasma bile acid concentration and tumor incidence. Soybean HMF and yolk protein had something in common with each other in antitumorigenic aspects, which can be accounted for by their excellent capacities of binding bile acids. In another experiment, the feces from casein-fed or HMF-fed rats were analyzed for their nitrogen and steroid contents or amino acid composition in order to ascertain this assumption. Fecal nitrogen excretion (g/g feces in weight) increased about 3.6-fold a few days after exchange of casein for HMF in the diet: there was a positive correlation between fecal nitrogen and bile acid excretions. As a result of HPLC, many kinds of polypeptides were detected in the water-extracts of feces from HMF-fed rats much more than from casein-fed rats, but their individual isolation and amino acid sequencing remained further investigated. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 129-137, 1999.

\*〒 606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

Key words : soybean HMF, yolk protein, tumor incidence, fiberscope, plasma bile acids, fecal nitrogen excretion, resistant protein, fecal amino acid composition

分離大豆たん白質を微生物由来のエキソ型プロテアーゼで処理した後に残り、遠心分離によって沈澱として得られる不溶性高分子画分（以下、HMF と略記）は高いステロイド結合能を有し、HMF 摂取による血中コレステロール低下作用は糞中への胆汁酸やコレステロール排泄増加に伴う補償機構で説明される<sup>1-3)</sup>。HMF を唯一のたん白質源として幼ラットの成長試験を行うと、その約4分の1が栄養源にならない消化吸収抵抗性のたん白質性複合成分とみなされる。最近、動物消化管内に消化吸収をうけずに残存する未消化ポリペプチドの生理作用が注目を集めている。澱粉には動物消化酵素の作用をうけない“レジスタントスターチ”の存在が以前から知られ<sup>4)</sup>、食物繊維に類する働きが報告されている。たん白質由来の高分子未消化吸収成分を澱粉に準えて“レジスタントプロテイン”と称する。これまで明らかにされているレジスタントプロテインの生理作用は、腸内菌叢を整え短鎖脂肪酸の生成を促すというものである<sup>5)</sup>。HMF の高い糞中ステロイド排泄能は、大豆レジスタントプロテイン自体がそのような機能を有すると解釈できる。ステロイドの糞中排泄増加はコレステラミンを投与した場合にもみられ、この機能によって長らく高コレステロール血症治療に応用されてきたが、二次胆汁酸の大腸腔内移行増大に伴う大腸発がん促進が指摘されるに及んで、HMF にもコレステラミンと同様の危険が疑われることとなった。しかし、我々のこれまでの一連の実験によって、対照カゼイン食に対してHMF 食には大腸での腫瘍発生を抑える効果のあることがわかり<sup>6,7)</sup>、愁眉を開いた。今回このようなHMF の抗腫瘍性食品素材としての効果をカゼインだけでなく他の食品たん白質間で格付け、また大豆レジスタントプロテインの二次胆汁酸捕捉能が抗腫瘍作用発現の本質ならば結合様式の解明が必要との認識からそれらのアプローチを試みた。

## 方 法

### 実験動物および飼育条件

成長し過ぎて栄養評価の目的に合わなくなった“リタイヤラット”は、長期腫瘍実験においては試験群間の体重差に厳密な注意を払わなくて済み好都合である。そのため体重300gに達した成熟雄フィッシャー系ラットを地元の業者から安価に購入した。飼料調製

用たん白質源はミルクカゼイン、大豆HMF、卵黄たん白質、小麦グルテン、鱈肉たん白質の5種類で、該当する各実験群の飼料組成はFig.1に挿入の表に示した。対照の“デオキシコール酸無添加カゼイン食”[カゼイン(-DCA)]以外はどの飼料も0.2%デオキシコール酸（発がんプロモーター）を含む。調製飼料中のたん白質含量は湿重10%とし、調整のためHMF食のみ3.5%加算した[セルロース 1.5%]。体重300gに達した7ヶ月齢F-344ラットを6群に分け(n=10)、常法に従って全てのラットにアゾキシメタン処理を施した<sup>8,9)</sup>。飼育開始10週目より34週目まで6週毎に内視鏡観察を行い、血液や糞を採取した。

### 内視鏡による大腸腫瘍発生の診断

各群ラットは一夜絶食の後、ペントバルビタール麻酔下で肛門からヒト気管支用内視鏡（オリンパスBF-3C30、先端口径3mmφ）を挿入し、大腸粘膜表面における腫瘍出現の有無を観察した。

### 血漿ステロイドおよび脂質濃度の測定

凍結保存中の血漿を融解分注し、市販のアッセイキット（総胆汁酸テストワコー、コレステロールCテストワコー、トリグリセライドEテストワコー）を用いて血漿胆汁酸、コレステロールおよび中性脂肪濃度を求めた。

### 糞中窒素、構成アミノ酸および胆汁酸の定量

糞中窒素の定量はケルダール法によった。糞サンプル中の組成アミノ酸は塩酸加水分解後、 $\alpha$ -アミノ基にフェニルイソチオシアナート（PITC）を導入、逆相HPLCによって分離分析を行った。糞中ステロイドは70℃のエタノール性0.2N-NaOH中でケン化後、酸性ステロイドをさらに強アルカリ処理、溶媒抽出後、上述のアッセイキットを用いて定量した。

## 結果と考察

Fig.1は化学発がん剤（アゾキシメタン）処理した6群のラットの飼育期間中の体重変化と内視鏡観察や採血および糞採集の時期を示したものである。34週を通しての体重増加は鱈肉群とカゼイン(-DCA)群で最も高く、逆に小麦グルテン群とカゼイン(+DCA)に体重増加は殆どみられず、HMF群と卵黄たん白質群はそれらの中間に位置し、3大別群間に有意な差があった。成熟期を過ぎたこれらの違いは体脂肪蓄積の

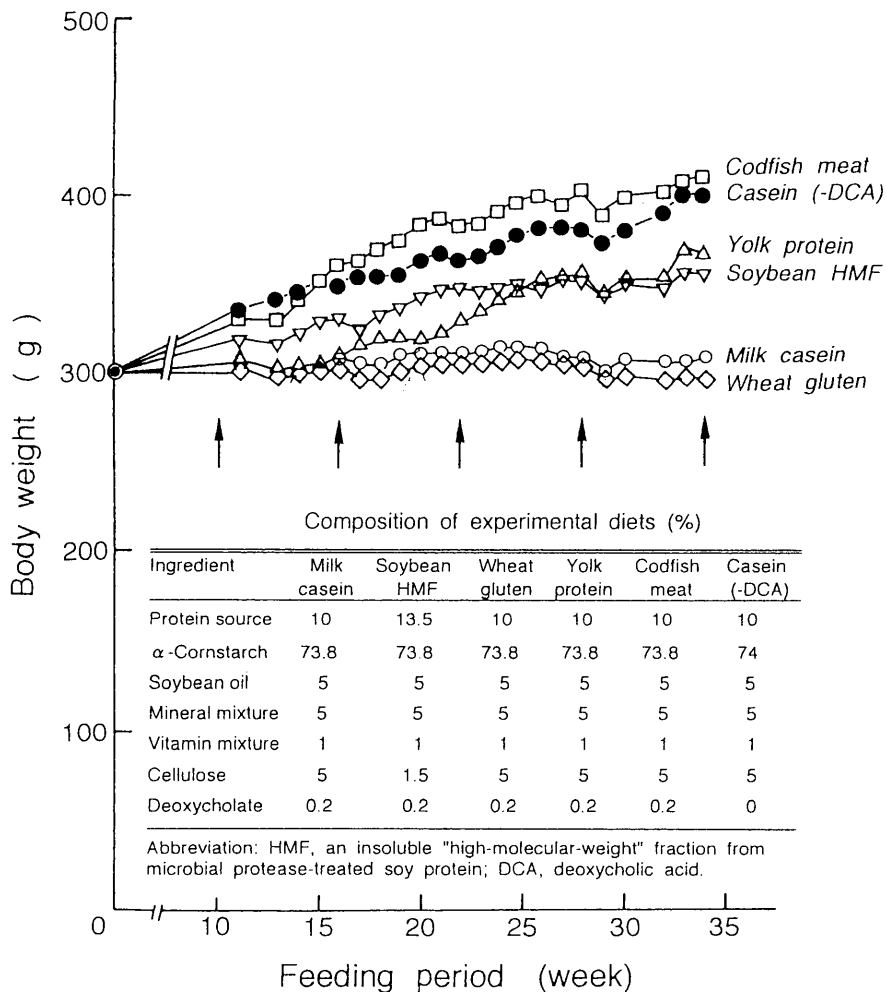


Fig. 1. Variation of body weight in each dietary group and check-points for endoscopy and blood-drawing. Each group was allowed free access to its respective diet shown in the inset. Arrows represent the times to endoscopically inspect colonic tumor and to take blood samples.

差によるものである。同じカゼイン群でもデオキシコール酸添加によって体重増加の見られなかったのは添加した胆汁酸の苦味が食欲減退を惹起したためと思われる。

Table 1 に飼育開始 10, 16, 22, 28, 34 週目における各群ラットの生存匹数 (分母) と内視鏡診断による担腫瘍ラット数 (分子) の割合を表示している。10, 16 週目の減少 (死亡) は内視鏡挿入ミスによるものである。22 週目以降、熟練によって操作ミスは起こしていない。これまで給餌形態が粉食の若齢ラット飼育中にも突然死を経験し、その原因を窒息死とみなしているので、今回の場合も同じ理由によるものと考えている。

因みに、何れの食餌群にも死亡ラットの剖検からは大腸に腫瘍の発生を認めていない。内視鏡観察による腫瘍発生の最初の確認は、カゼイン (+DCA) 群の 22 週目においてである。28 週目ではカゼイン (-DCA) 群を除く群に、34 週目では全ての群に腫瘍発生が認められた。従って 28 週目および 34 週目における各群の担腫瘍/生存ラットの相対比すなわち腫瘍発生率 (%) を求めると、デオキシコール酸無添加カゼイン群 (0.0, 25.0), 大豆 HMF 群 (11.1, 33.3), 卵黄たん白質群 (14.3, 16.7), 小麦グルテン群 (22.2, 44.4), 鱈肉群 (25.0, 50.0), デオキシコール酸添加カゼイン群 (50.0, 66.7) であった。

Table 1. Tumor incidence in each group endoscopically inspected at regular intervals

Period (week)	Milk casein	Soybean HMF	Yolk protein	Wheat gluten	Codfish meat	Casein (-DCA)
10	0/9	0/10	0/9	0/9	0/9	0/10
16	0/9	0/10	0/9	0/9	0/9	0/9
22	2/8	0/10	0/7	0/9	0/9	0/9
28	4/8	1/9	1/7	2/9	2/8	0/9
34	4/6	3/9	1/6	4/9	4/8	2/8

Each group was comprised of 10 rats at the start. The rats being alive at 10, 16, 22, 28 and 34 weeks were subjected to endoscopic inspection for colonic tumor at stated periods. Fractional numbers indicate the ratio of tumor-bearing rats to living ones for each group.

Table 2. Plasma bile acid, cholesterol and triacylglycerol concentrations at 28 and 34 weeks in rats fed the experimental diets

Dietary group	Bile acid ( $\mu\text{M}$ )		Cholesterol (mM)		Triacylglycerol (mM)	
	28 wk	34 wk	28 wk	34 wk	28 wk	34 wk
Milk casein	90 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	96 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
Soybean HMF	41 $\pm$ 5 <sup>bcd</sup>	20 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	1.8 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	1.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Yolk protein	44 $\pm$ 4 <sup>bcd</sup>	28 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>bc</sup>	2.5 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
Wheat gluten	51 $\pm$ 5 <sup>bc</sup>	73 $\pm$ 17 <sup>ab</sup>	2.2 $\pm$ 0.2 <sup>bc</sup>	2.3 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
Codfish meat	54 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	52 $\pm$ 13 <sup>bc</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Casein (-DCA)	29 $\pm$ 3 <sup>d</sup>	18 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>

The rats were fed their respective diets given in the inset of Fig. 1. Values are the means  $\pm$  SE for living rats at week 28 or 34; those not sharing common superscripts in the same column are significantly different at  $P < 0.05$  by the Student-Newman-Keuls test.

Table 2では、腫瘍発生の傾向と対応できる28, 34週目の各群ラット血漿中の胆汁酸、コレステロールおよび中性脂肪濃度についての測定結果をまとめた。大豆HMFが血中コレステロール値低下作用をもつことはよく知られているが、今回の実験でもその傾向は確かめられた。血漿中胆汁酸濃度も大豆HMF群と卵黄たん白質群で数値的に最も低い傾向にあり、カゼイン(+DCA)群に比べれば何れの場合も有意に低かった。これら血漿コレステロールおよび中性脂肪濃度を時期的に対応する腫瘍発生率に対してプロットしたのがFig. 2である。28週目と34週目の両方共、コレステロールや中性脂肪濃度と腫瘍発生率の間に有意な相関は認められなかった。これに対して胆汁酸濃度を腫瘍発生率に対してプロットすると (Fig. 3), 28週目でも34週目でも有意な相関が得られ、腫瘍発生が血中胆汁

酸濃度の影響を受けていることが強く示唆された。これまで大腸腫瘍の発生には腸腔内二次胆汁酸濃度の関与が重要と信じられてきたが、Fig. 3の結果は腸腔内胆汁酸の単なる濃度ではなく存在形態の違いによって関与の仕方が異なることを示している。糞中への胆汁酸排泄増加による腫瘍発生軽減は、腸肝循環に流入する胆汁酸量の減少を意味し、以って血中胆汁酸濃度の低下によってもたらされた効果と解釈すべきかもしれない。Fig. 4に糞中胆汁酸排泄量と血中胆汁酸濃度の関係をプロットした。当然のことながらカゼイン(-DCA)群は糞中胆汁酸排泄量も血中胆汁酸濃度の両方共低く、他の5群間に引かれた回帰直線からは大きく外れることとなった。二次胆汁酸の発がんプロモーター作用についての知見が決定的に不足している現段階で、カゼイン(-DCA)群を例外として扱うことは

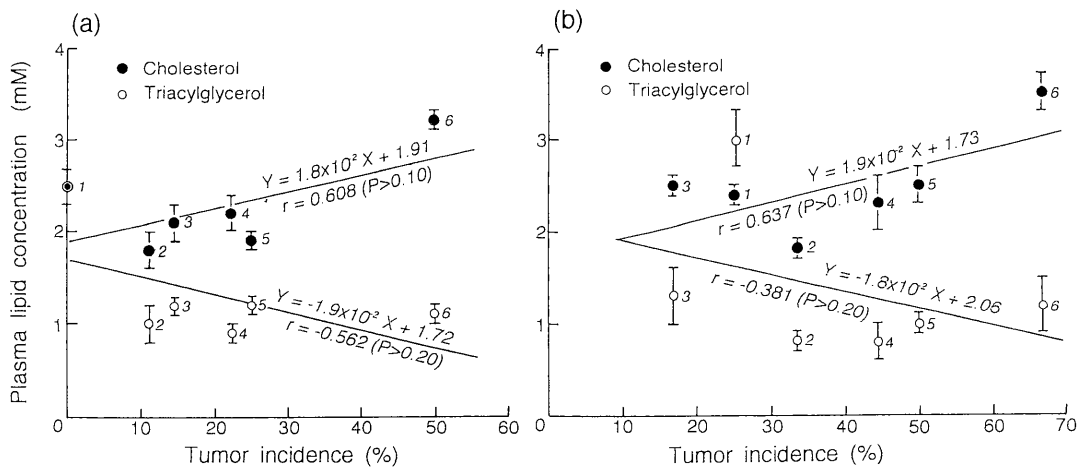


Fig. 2. Correlation between plasma lipid concentrations and tumor incidence at 28 weeks (a) or 34 weeks (b). The plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations (mM) given in Table 2 were plotted against tumor incidence (%) given in Table 1. Four regression equations and their correlation coefficients were calculated according to the least square method. There were negative correlations between two variables in all cases. Dietary groups are as follows: 1, casein (-DCA); 2, soybean HMF; 3, yolk protein; 4, wheat gluten; 5, codfish meat; 6, milk casein.

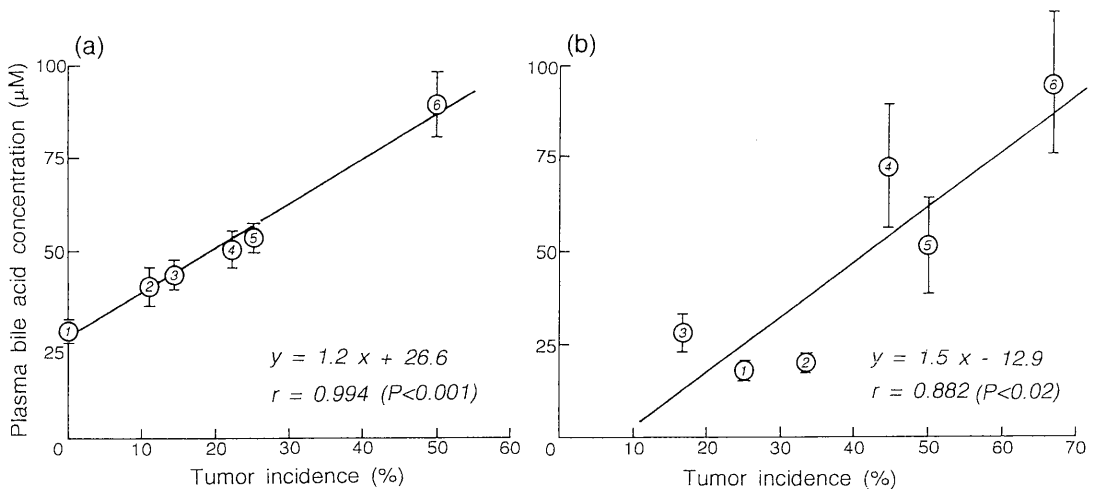


Fig. 3. Correlation between plasma bile acid concentration and tumor incidence at 28 weeks (a) or 34 weeks (b). Two regression lines and correlation coefficients were gained as usual from the plots of plasma bile acid concentration (μM) against tumor incidence (%). There were positive correlations between two variables in both cases. Numbers in open circles represent the following groups: 1, casein (-DCA); 2, soybean HMF; 3, yolk protein; 4, wheat gluten; 5, codfish meat; 6, milk casein.

憚られる。

Fig. 5 は 15% カゼイン食で 1 週間飼育したラットに 21% HMF 食を与え、食餌交換後 0, 1, 2, 3, 4, 7 日目の糞中窒素含量の変化 (左) ならびに糞中構成アミノ酸総量に対する糞中胆汁酸の関係 (右) を示したも

のである。糞中窒素排泄量は食餌交換後 4 日目ではほぼプラトーに達し、胆汁酸排泄の経日変化も窒素や構成アミノ酸の量的変化と連動したものであった。このことは糞中に排泄される未消化もしくは部分消化たん白質が胆汁酸を捕捉し、腸内挙動を共にしたことを示唆

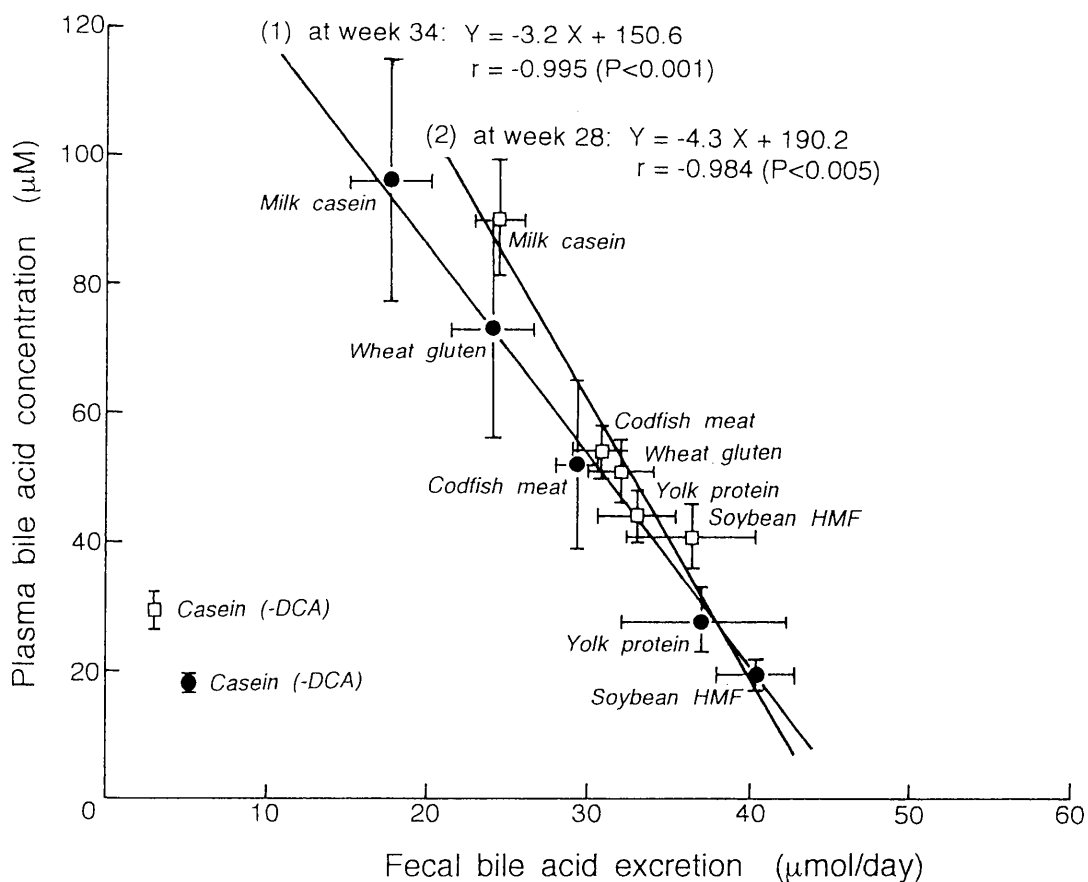


Fig. 4. Correlation between plasma bile acid concentration and fecal bile acid excretion at 28 or 34 weeks. The individual amounts of bile acids excreted into the faces were obtained on a daily average for 3 days before blood collection, which were plotted against their corresponding bile acid concentrations in the plasma. Two regression lines with high correlation coefficients were drawn among 5 groups excluding casein (-DCA) group.

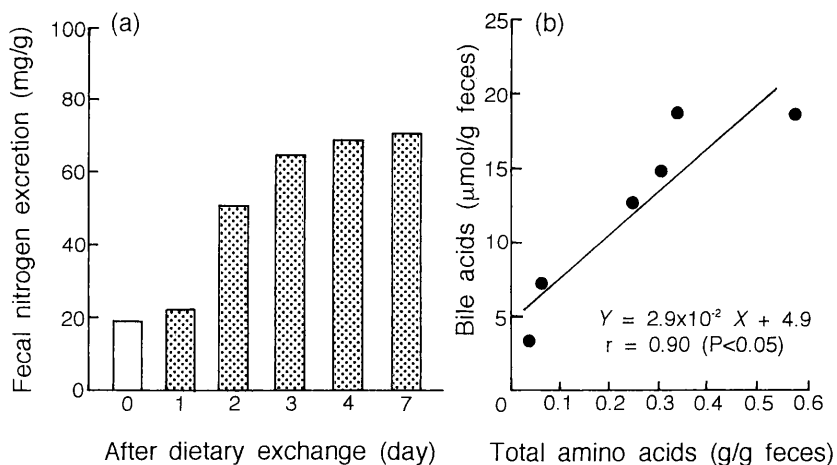


Fig. 5. Fecal nitrogen excretion after exchange of casein for HMF in the diet (left) and correlation between amino acid and bile acid contents in the feces (right).

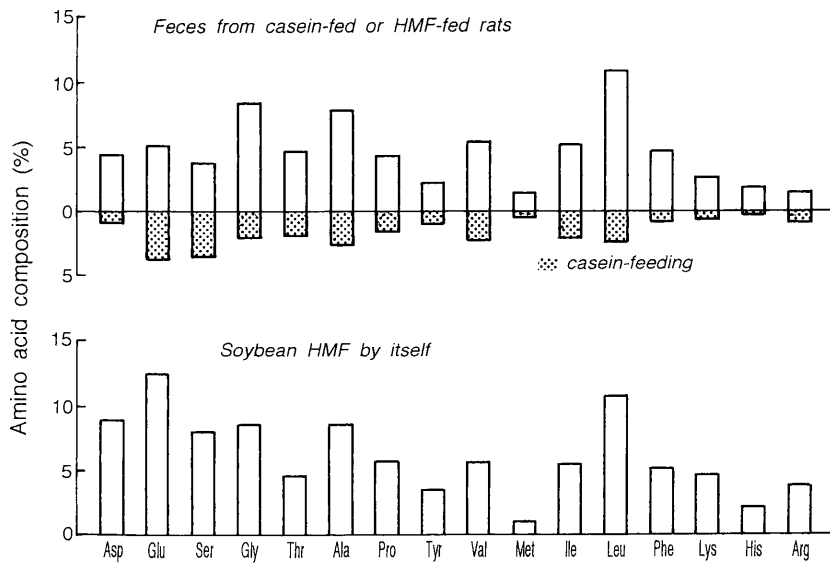


Fig. 6. Difference in amino acid composition between soybean HMF itself and feces on 4 days after exchange of casein for HMF in the diet. The feces collected before or 4 days after exchange of casein for HMF were analyzed for amino composition, which was corrected for fecal N excretion.

する。Fig. 6はHMF食に切り替えてから4日目の糞中たん白質構成アミノ酸の組成を食餌交換前のそれで補正し（グラフ上段部分）、HMF自体のアミノ酸組成と対比したものである。全般的によく似たパターンを示しているが、Asp, Glu, Ser, Arg等の減少が著しい。疎水性アミノ酸のパターンがそれほど変化していないことは、これら大豆レジスタントプロテインの疎水領域が胆汁酸結合に働いた可能性を示唆する。糞を水洗いすると糞たん白質構成総アミノ酸の約1/3が水溶性画分に回収される。Fig. 7はHMF食ラットおよびカゼイン食ラット糞の水溶性画分のゲルろ過パターンを示したものである。両曲線の差がHMF由来で、分子量2,000～10,000のポリペプチドが主体を成す（遊離アミノ酸は検出されない）。ゲルろ過では個々のペプチドはかなり重複しており、この方法で分離精製は困難である。Fig. 8は上述の水溶性画分をフェニルイソチオシアナートで処理してからHPLCによって分析したものである。カゼイン食ではみられないペプチドピークがHMF食では数多く検出された。今後、これらピーク成分を個々に分離精製してアミノ酸配列が構造既知の大豆たん白質のどの部分に相当し、胆汁酸結合にはどのような構造が必要か明らかにしたいと考えている。

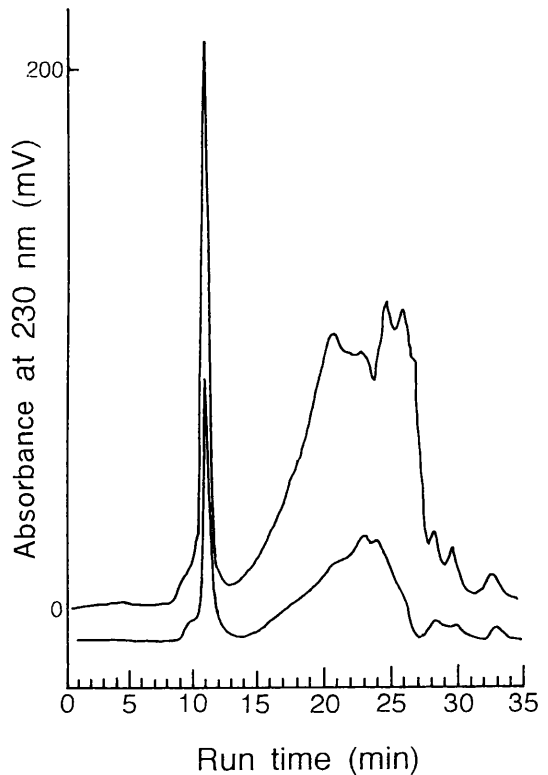


Fig. 7. Gel filtration profiles of water extracts of feces before (lower) and 4 days after exchange of casein for HMF in the diet (upper).

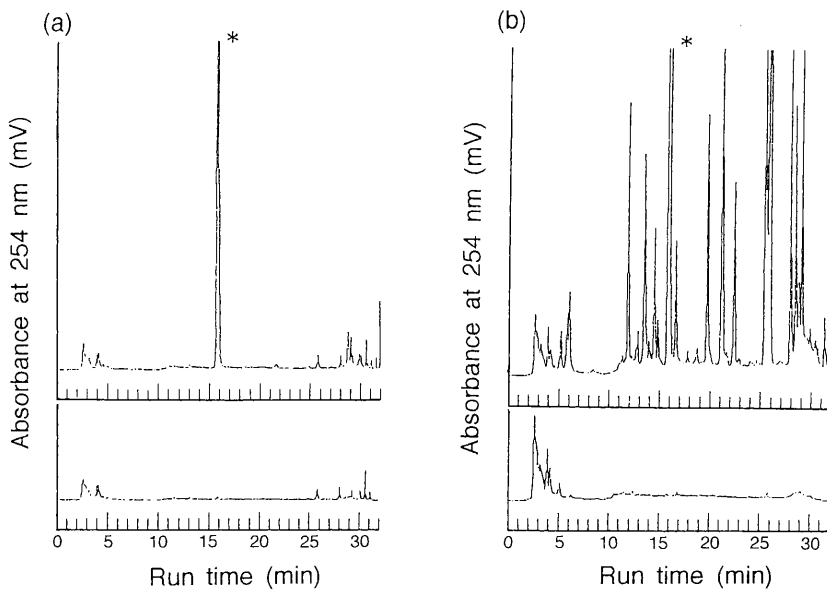


Fig. 8. HPLC profiles of water-extracts of feces before (a) and 4 days after (b) exchange of casein for HMF in the diet. Water-extracts were treated without (lower) and with PITC (upper) prior to HPLC analysis.

## 要 約

アゾキシメタン処理した成熟フィッシャー系ラットを6群に分け (n = 10), ミルクカゼイン, 大豆 HMF, 卵黄たん白質, 小麦グルテン, 鱈肉たん白質など, たん白質源の異なる飼料で飼育した (0.2% デオキシコール酸添加 5 群 + デオキシコール酸無添加カゼイン群). 全ラットは飼育開始 10 週目より 34 週目まで 6 週間隔で気管支内視鏡を用いて大腸における腫瘍発生率を調べた. 大腸腫瘍発生はカゼイン (+DCA) 群のみ 22 週目に見い出され, 28 週目ではカゼイン (-DCA) を除く 5 群に, 34 週目では全ての群に見い出された. 34 週目の大豆 HMF と卵黄たん白質の両群の腫瘍発生率はカゼイン (-DCA) 群のそれより低かった. 28 週目と 34 週目の血漿ステロイドまたは脂質濃度を腫瘍発生率に対してプロットすると, 胆汁酸濃度と腫瘍発生率間に有意な相関がみられた. 抗腫瘍の観点からは大豆 HMF と卵黄たん白質間には類似性があり, それらの優れた胆汁酸結合能によって説明できる. この推論を確かめるため別の飼育実験を行い, カゼイン食ラットと HMF 食ラットから得られた糞の窒素含量, ステロイド含量, およびアミノ酸組成について分析した. 糞中窒素排泄量 (g/g 糞重量) はカゼインから HMF への切り替え数日後 3.6 倍に増加し, 窒素と胆汁酸の糞中排泄量 (g 糞当り) 相互間には良い相関がみられた. HPLC 分析の結果, HMF 食ラットの糞中に数多くのペプチドピークが検出されたが, 個々のピーク成分の分離精製とアミノ酸配列の決定は今後の課題として残された.

## 文 献

- 1) Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1988) : The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**, 115-122.
- 2) Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1990) : Cholesterol-



- lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J Nutr*, **120**, 977-985.
- 3) Ogawa T, Gatchalian-Yee M, Sugano M, Kimoto M, Matsuo T and Hashimoto Y (1992) : Hypocholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in rats fed no cholesterol. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 1845-1848.
- 4) Annison G and Topping DL (1994) : Nutritional role of resistant starch : chemical structure vs physiological function. *Annu Rev Nutr*, **14**, 297-320.
- 5) Morita T, Kasaoka S, Oh-hashii A, Ikai M, Numasaki Y and Kiriama S (1998) : Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J Nutr*, **128**, 1156-1164.
- 6) 岩見公和, 東 直之, 町田恵子, 佐伯 徹, 金本龍平 (1996) : 大腸における腫瘍誘発の大豆たん白質食による軽減. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 77-83.
- 7) 岩見公和, 東 直之, 田口由美子, 須田仁志, 佐伯 徹, 金本龍平 (1997) : 二次胆汁酸の発癌プロモーター作用と大豆ペプチド高分子画分の大腸癌発生抑制効果に関する分子栄養学的解析. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 105-111.