

大豆たん白質による胆汁酸の分子認識と包接分子モデリング

岩見公和*・松田英治・小森猛夫・金本龍平

京都府立大学農学部

Molecular Recognition of Bile Acids by Soy Protein and Modeling of Its Mimetics

Kimikazu IWAMI, Hideharu MATSUDA, Takeo KOMORI and Ryuhei KANAMOTO

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522

ABSTRACT

Resistant protein has some properties beneficial for health. Soybean resistant protein was prepared from HMF by a combination of pepsin and pancreatin digestions (hereinafter, referred to as HMF-RP). HMF-RP was superior to HMF in bile acid-capturing capacity. As for fecal nitrogen and bile acid excretions, they did not differ between both groups of rats fed 10% HMF-RP and 20% HMF diets. The feces were gathered from the rats fed the 10% HMF-RP diet and washed with water, 70% ethanol and 8 M urea. The fecal leavings thus obtained and HMF-RP itself after acid hydrolysis were quite similar in amino acid composition to each other. This implies that HMF-RP is scarcely impaired throughout the digestive tract and excreted, as it is, into the feces. HMF or HMF-RP was characteristic of masking bile acids. In this connection, several soy protein products were examined for bile acid-capturing capacities by equilibrium dialysis. These products were bovine serum albumin (BSA)>7S-G>HMF>soy flour>11S-G>SPI in order of deoxy cholate-capturing capacity. Interestingly the capacity of BSA decreased with increasing concentrations of coexistent fatty acid, while the presence of high concentrations of fatty acid did not affect those of other soy protein products at all. It was assumed from this observation that soy protein might have the structural specificity for the skeleton moiety of steroids. *Soy Protein Research, Japan* **4**, 58-64, 2001.

Key words : resistant protein, HMF-RP, bile acid-capturing capacity, equilibrium dialysis

動物性たん白質に比べて植物性たん白質、例えば分離大豆たん白質 (SPI) に血清コレステロール値改善効果の見られることはよく知られている¹⁾。SPIを微

生物酵素で処理した後に残る不溶性の高分子画分 (HMF) の降コレステロール作用はSPIより強い²⁻⁴⁾。動物成長試験によれば、HMFの栄養有効性はSPIに対して約3/4程度であるが、この栄養価減少分は、SPI酵素処理および乾燥過程で生じた消化抵抗性のレジスタ

*〒 606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

ントプロテイン (RP) の関与によると考えられる⁵⁾。一方, HMF 食の糞および胆汁酸排泄量は SPI 食より有意に高くなり, 胆汁酸排泄増加による実験的大腸がんや肝がんの発生抑制が認められる^{6,7)}。しかし, RP の消化管内での挙動や胆汁酸捕捉の実態については推測の域を出ず, HMF や RP 有効利用への展開は暗礁に乗り上げたままである。そこで, 本研究では SPI を凌駕する HMF の化学的特性である胆汁酸捕捉能に焦点を絞り, その機能が実際に HMF から RP にどの程度引き継がれ (あるいは新たに現れ) るかについて検討を加えた。

方 法

7S および 11S グロブリンの分離精製⁸⁾

脱脂大豆粉の水抽出液に CaCl_2 を加えて 4°C で 40 時間放置, 遠心分離して沈澱除去後, さらに最終濃度が 12.5 mM となるよう CaCl_2 を加えて遠心分離 ($10,000 \times g$, 30 min), 上澄み液からは $\text{pH } 4.5$ で生じた沈澱を分別して透析後, Sephadex G-100 および Sephacryl S-300 カラムに通して得られた画分を β -コングリシニン (7S) 標品とした。一方, CaCl_2 沈澱は溶解後 DEAE-Sephadex A-50 カラムに吸着させ NaCl の濃度勾配で溶出される当該画分を濃縮後, Con A-Sephacrose 4B カラムに通して (糖たん白質を除去), 通過する成分をグリシニン (11S) 標品とした。

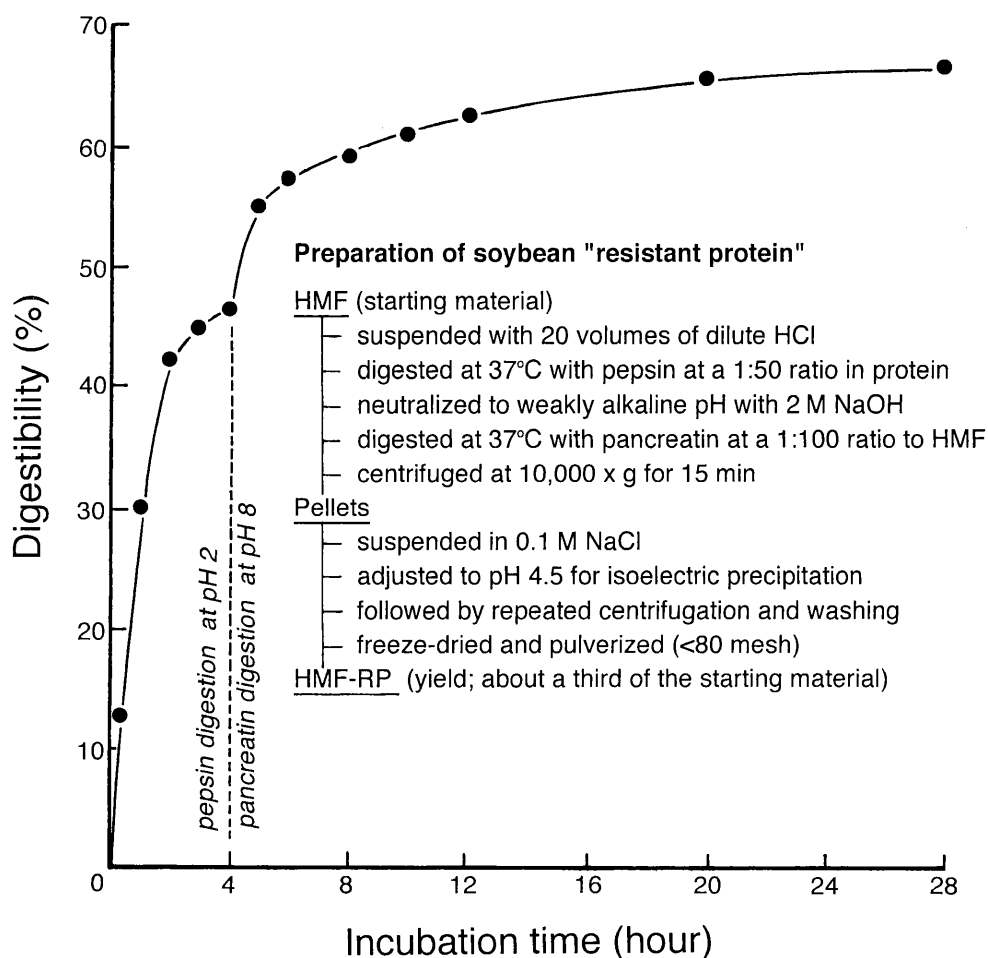


Fig. 1. Peptic-pancreatic digestion of HMF and thereby preparation of resistant protein. Digestibility during *in vitro* digestion was estimated from the measurement of Kjeldahl nitrogen content in insoluble fractions at arbitrary intervals. The preparation procedure of resistant protein was outlined in the insert.

大豆レジスタントプロテインの調製

5% HMF 懸濁液を 37℃ に保温しながらペプシン (pH 2, 4 h) とパンクレアチン (pH 8, 24 h) による人工消化を実施 (ケルダール窒素の分析による最終消化率 66%) し, pH 4.5 において遠心分離と洗浄を繰り返し, 凍結乾燥後の残渣をさらに細かく粉碎して (<80 mesh) HMF 由来のレジスタントプロテインすなわち HMF-RP とした (Fig. 1 参照).

動物飼育実験

カゼイン食に慣らした成熟フィシャー系雄ラットに 10% HMF-RP 食, 20% HMF 食あるいは 20% カゼイン食を与え (n=5), 食餌交換後 6 日目まで毎日糞を採取してケルダール法によって窒素量を, アッセイキットを用いた酵素法によって総胆汁酸量を測った.

HMF-RP の胆汁酸捕捉能

100 μ M デオキシコール酸 (DCA) 溶液を添加量の異なる HMF-RP 微細粉末と共存させ pH 7.4, 25℃ で数時間攪拌, 遠心分離後の清澄液はそのまま, 沈澱は 70% エタノール抽出液を緩衝液で希釈して胆汁酸濃度の測定に用いた.

HMF-RP 食ラット糞 (不溶残渣) のアミノ酸組成

10% HMF-RP 食で 1 週間飼育したラット糞の蒸留水, 70% エタノールおよび 8 M 尿素洗浄後の残渣に酸加水分解を施し, HPLC によって PITC 化アミノ酸の定量分析を行った.

平衡透析

8 連式透析装置のセロファン膜で隔てられた A, B 両室にそれぞれ定容 (0.4 mL) のサンプル懸濁液 (10 mg/mL) と 200 μ M 胆汁酸溶液を注入して 30℃ で 1 晩振盪後, B 室溶液の胆汁酸濃度を測って, サンプルの DCA 捕捉能を $a - 2b$ 式から概算した (Fig. 2 参照). また 200 μ M DCA に対してモル比 1, 3, 10, 30, 100 倍リノール酸共存下でのサンプル捕捉能変化から, 脂肪酸による障害の有無を調べた.

結果と考察

Fig. 3 は, 同濃度 (単位, mg/mL) の HMF と HMF-RP の DCA 捕捉能を比較したものである. インキュベーション後の上澄み液中の胆汁酸濃度の減少は, いず

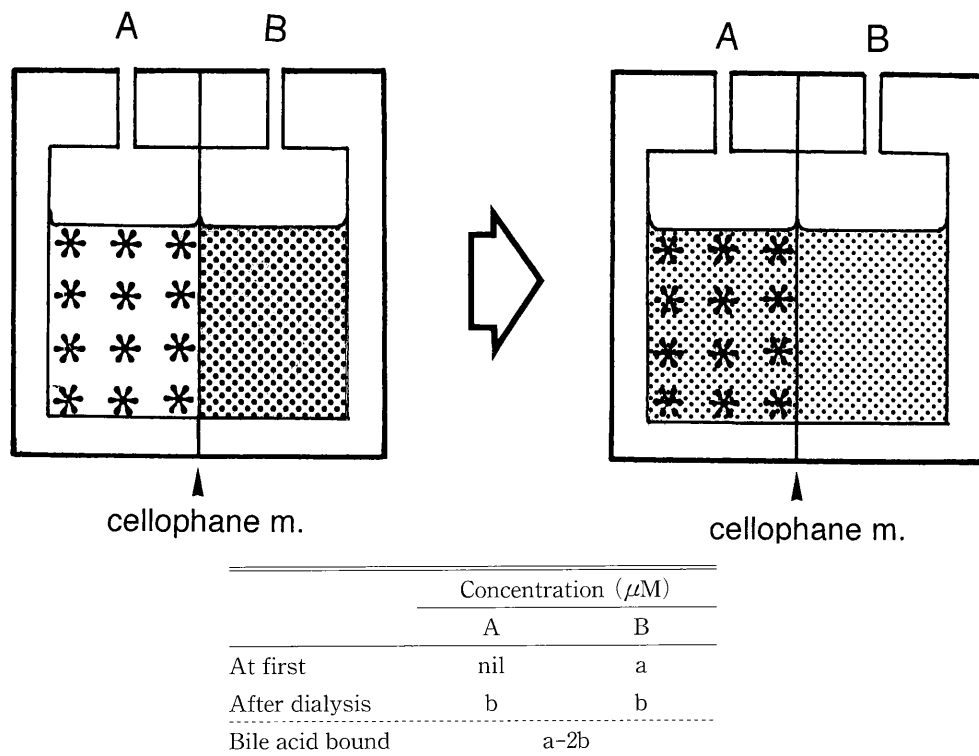


Fig. 2. A diagram showing equilibrium dialysis. Deoxycholic acid was used as a representative of bile acids, which was enzymatically determined by the use of a commercially available assay kit (a product of Wako Pure Chemical). The amount of bile acid bound was obtained from the difference between the DCA concentrations in room B before and after dialysis.

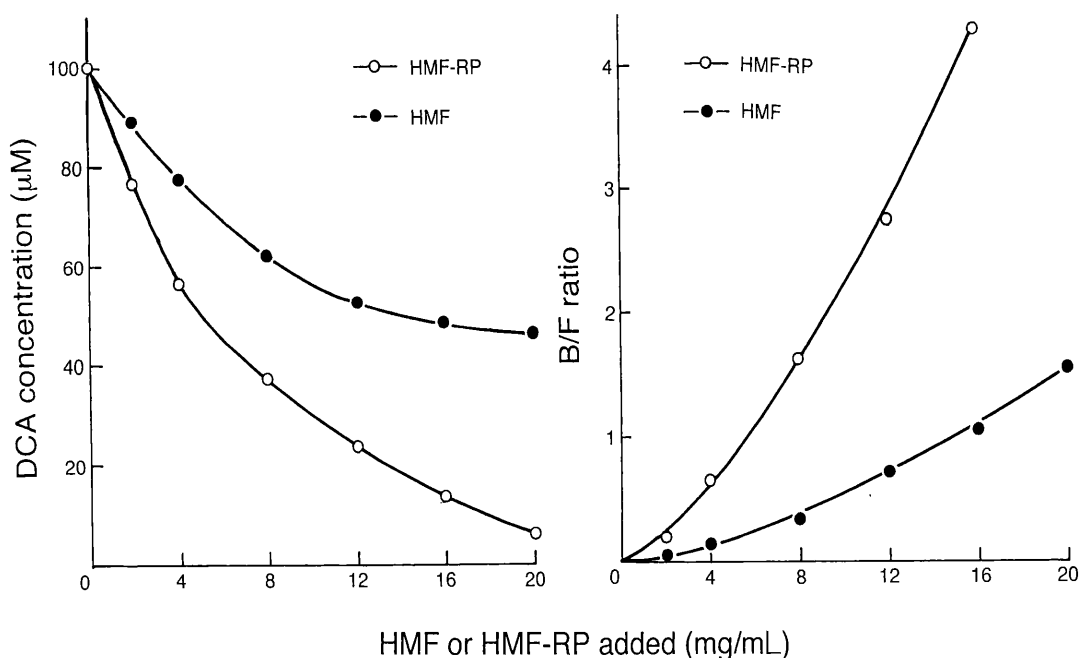


Fig. 3. Changes in DCA concentration and its bound/free ratio by addition of HMF or HMF-RP at varied levels. Various amounts of HMF or HMF-RP were added to 5 mL of 100 μ M DCA solution (pH 7.4) and put in a shaker overnight at room temperature, followed by centrifugal separation. The supernatant was appropriately eluted with pH 7.4 buffer and subjected to measurement of DCA concentration. The precipitate was washed by a rapid filtration with cold buffer and extracted with 70% ethanol. The extract, after being evaporated, was diluted to a suitable concentration for assay. The then measured value was taken as net bound DCA

れの場合も HMF より HMF-RP で高く、その添加量が 20 mg/mL のとき、ほとんどの DCA が HMF-RP に捕捉されていたのに対し、HMF では半量程度の捕捉で頭打ちとなった。いったん HMF-RP や HMF に捕捉された DCA 回収は、水抽出では効率が悪く、70% エタノール抽出によりほぼ定量的となった。結合 DCA と遊離 DCA の濃度比 (B/F) は、20 mg/mL において HMF の場合 1.5 であったのに対し、HMF-RP の場合 15 超となった。

このような HMF-RP と HMF の DCA 捕捉能の違いを勘案して、投与実験に用いる食餌組成を 20% HMF に対して HMF-RP を 10% と設定した。Fig. 4 は、飼育 6 日間における糞中窒素排泄量と胆汁酸排泄量の推移を示したものである。対照カゼイン食群に大きな変化は見られなかったが、食餌交換後数日で HMF-RP 食群と HMF 食群の糞中窒素排泄量はプラトーに達し、糞中胆汁酸排泄量も若干の遅れはあるものの両群間に類似の傾向がみられた。このことは、糞窒素の主体が HMF 中の消化抵抗性画分に由来したものであり、RP が糞中胆汁酸排泄に密接に関係していることを示唆す

る。この仮定に基づいて、次に HMF-RP 食ラット糞の含水アルコールおよび 8 M 尿素洗浄後の残渣を酸加水分解後、構成するアミノ酸の分析を行って HMF-RP や HMF との比較を試みた。Fig. 5 から明らかなように、糞不溶画分と HMF-RP そのもののアミノ酸組成は全般的にきわめて類似しており、摂取された HMF-RP がほとんど消化吸収を受けず移行しうることを裏付けている。

以前の研究で見出されている HMF 摂取による生理機能発現の少なからぬ部分は、その優れた胆汁酸捕捉能に帰せられる⁵⁻⁷⁾。機能と構造の相関についてさらなる知見を得るため、大豆たん白質成分および製品の胆汁酸捕捉能を平衡透析法によって比較検討した。比較対照の代表例には、血中で疎水性成分を運搬する役割を担うアルブミンを用いた。その結果、胆汁酸捕捉能は BSA > 7S-G (β -conglycinin) > HMF > soy flour > 11S-G (glycinin) > SPI の順に高く、標品の純度が不統一であることを差し引いても 7S-G に HMF より高い胆汁酸捕捉能のあることが確かめられた。HMF 食ラット糞に部分的酸加水分解を施したとき出現する主な

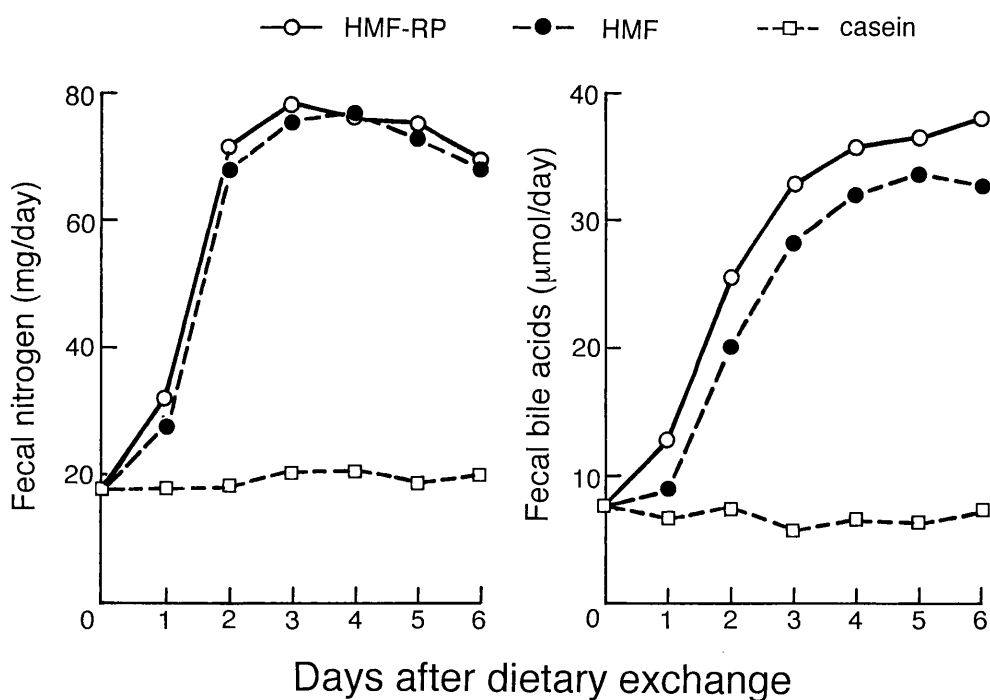


Fig. 4. Comparison of daily nitrogen and bile acid excretions into the feces of rats fed 10% HMF-RP and 20% HMF diets. A 20% casein diet to which adult F-344 rats had been accustomed for a while was replaced by 10% HMF-RP and 20% HMF diets ($n=5$). The feces were daily collected for 6 days after dietary exchange and assayed for nitrogen and bile acids as above-mentioned.

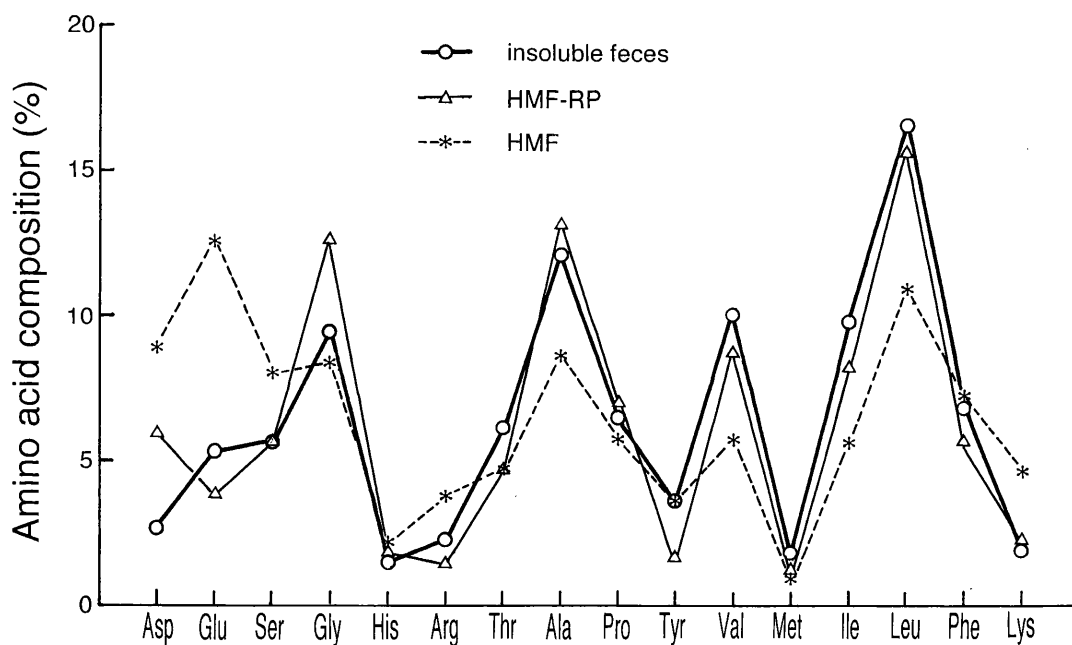


Fig. 5. Similarity in amino acid composition between HMF-RP and insoluble feces from rats fed its containing diet. The feces at a week after dietary exchange were rinsed out in distilled water, 70% ethanol and 8 M urea prior to acid hydrolysis. The individual amino acids were converted to phenylisothiocyanate derivatives, which were simultaneously determined by HPLC.

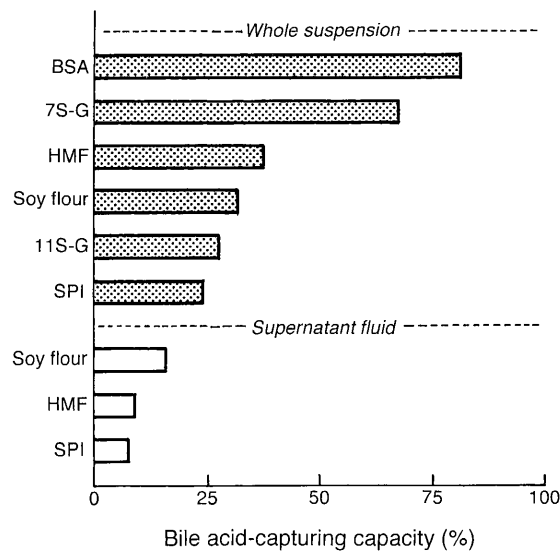


Fig. 6. Bile acid-capturing capacities of several soy protein products appreciated by equilibrium dialysis. Bovine serum albumin is a reference standard (a product of Sigma Chemical). Both 7S- and 11S-globulins were prepared from soy flour in our laboratory, but compare poorly with BSA in purity. HMF, soy flour and SPI were used without further purification.

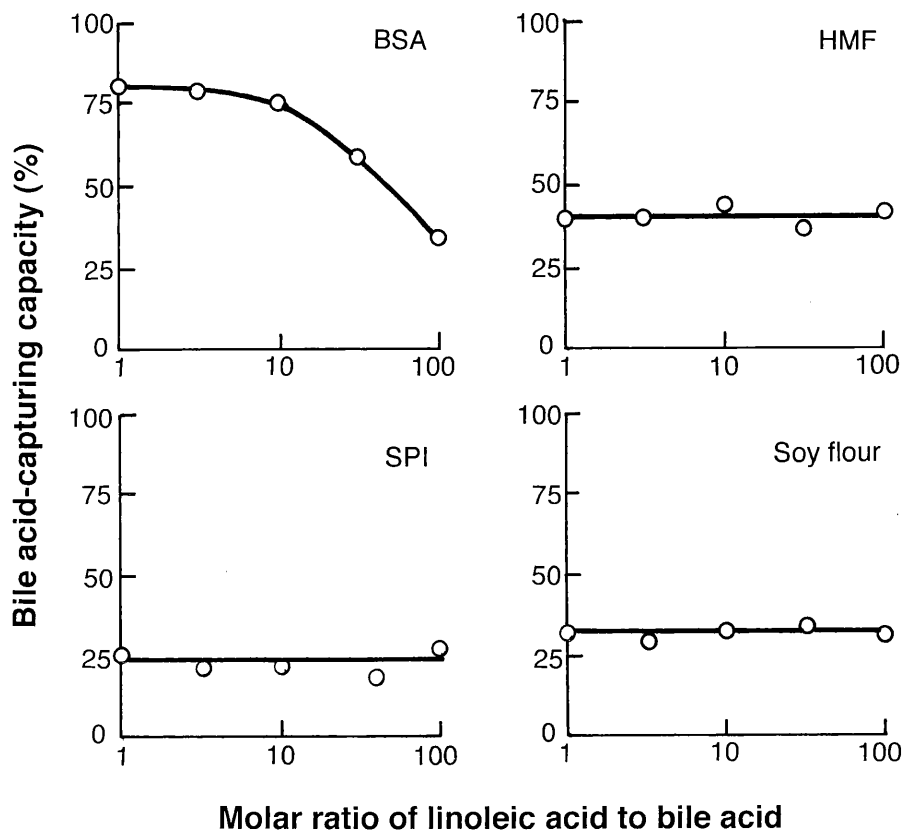


Fig. 7. Effects of various concentrations of linoleic acid on the bile acid-capturing capacities of BSA, HMF, soy flour or SPI. The experimental conditions were the same as in Fig. 6, except for the presence of coexistent linoleate.

オリゴペプチドの多くがいずれも β -コングリンシンの疎水領域の配列に帰属できることから、これらの成分によって再構築された消化抵抗性の疎水ポケットが胆汁酸捕捉能を形成している可能性が考えられる。Fig. 7 は、大豆たん白質製品の胆汁酸捕捉能が単なる疎水結合によるものかどうかについて行った予備実験の結果である。共存する脂肪酸濃度が高くなるにつれ、

BSA の胆汁酸捕捉能は低下するのに対し、大豆たん白質製品にそのような影響は見られなかった。このことは、大豆たん白質による胆汁酸の捕捉が単なる疎水結合と言うより、むしろステロイド環特異的な分子認識である可能性を示唆しているが、この考えが受け入れられるためにはさらなる実験証拠の積み重ねが必要である。

要 約

HMF にペプシン-パンクレアチン消化を施し、消化抵抗性のレジスタントプロテイン HMF-RP を得た (収量、HMF の約 1/3)。HMF または HMF-RP の添加量を変え胆汁酸 (初濃度 100 μ M) の捕捉能を調べたところ、HMF-RP での結合型胆汁酸対遊離型胆汁酸 (B/F) 比は 15 以上となった (HMF では 1.5)。両者の胆汁酸捕捉能の違いを考慮して、カゼイン食に慣らした成熟 F-344 ラットに 10% HMF-RP 食か 20% HMF 食を与え、食餌交換後 1 週間以内の毎日の糞を採取し窒素および胆汁酸の排泄量を求めたところ、両群間でほぼ同じ傾向を示され、HMF の胆汁酸捕捉能が概ね HMF-RP に引き継がれることが分かった。また HMF-RP 食ラット糞の洗浄後不溶性画分のアミノ酸分析を行ったところ、HMF-RP のそれと酷似することが分かった。平衡透析法によって調べた供試サンプルの胆汁酸捕捉能は BSA > 7S-G > HMF > soy flour > 11S-G > SPI の順となったが、大豆たん白質製品には BSA と異なって高濃度の脂肪酸による阻害が見られなかった。このことから、大豆たん白質の胆汁酸捕捉様式は単なる表面疎水性による結合ではなく、ステロイド環特異的な包接による可能性が示唆される。

文 献

- 1) Carroll KK and Krouska EM (1995): Soy consumption and cholesterol reduction; review of animal and human studies. *J Nutr*, **125**, 594S-597S.
- 2) 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.
- 3) Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1990): Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J Nutr*, **120**, 977-985.
- 4) Ogawa T, Galchalian-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 Biotechnol Biochem*, **56**, 1845-1848.
- 5) Azuma N, Kanaya M, Kanamoto R and Iwami K (1999): Feeding soybean resistant protein to rats raises fecal bile acid excretion but counteracts a deoxycholate-caused decrease in colonic aberrant crypt foci. *J Nutr Sci Vitaminol*, **45**, 183-192.
- 6) Azuma N, Machida K, Saeki T, Kanamoto R and Iwami K (2000): Preventive effect of soybean resistant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon. *J Nutr Sci Vitaminol*, **46**, 23-29.
- 7) Kanamoto R, Azuma N, Miyamoto T, Saeki T, Tsuchihashi Y and Iwami K (2001): Soybean resistant proteins interrupt an enterohepatic circulation of bile acids and suppress liver tumorigenesis induced by azoxymethane and dietary eoxycholate in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 999-1002.
- 8) 越山育則 (1976): ダイズ蛋白質「植物酵素・蛋白質研究法」森田・新・浅田・井田編 蛋白質核酸酵素, **76**(2), 456-464.