

糞中ステロイド排泄増加における大豆レジスタントプロテインの 中心的役割と捕捉胆汁酸の構造特異性

岩見公和*・藤井尚人・鈴鹿智彦・金本龍平

京都府立大学大学院農学研究科

A Crucial Role of Soybean Resistant Protein in Increased Fecal Steroid Excretion and Structural Peculiarity of Caught Bile Acids

Kimikazu IWAMI, Naoto FUJII, Tomohiko SUZUKA and Ryuhei KANAMOTO

Graduate School of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522

ABSTRACT

Growing male Wistar rats were divided into three groups ($n = 6$), which were fed the respective SPI (+7% cellulose), HMF (no cellulose) and SPI+RP diets with supplementary 0.5% cholesterol over a period of 4 weeks. In the meantime, the rats were examined for fecal acidic or neutral steroid excretion and serum total cholesterol concentration at weekly intervals and for hepatic cholesterol content at the 4th week. There were no significant variations in serum total cholesterol concentration among these three groups during the period of feeding, but the difference in fecal acidic or neutral steroid excretion was significant between both SPI and HMF (or SPI+RP) groups, being inversely proportional to hepatic cholesterol content. These observations support the possibility of RP bringing about improvement in cholesterol level within the body. In this connection, the stereoselectivity of RP for a variety of bile acids was further inspected by equilibrium dialysis. Consequently RP turned out to have a different affinity for DCA, CDCA \gg HDCA $>$ TDCA, GCDCA, UDCA, CA in their order. Noteworthy, dihydroxybile acids such as DCA and CDCA were more effectively captured by RP than their amino acid conjugates (TDCA, GCDCA) or other analogs (HDCA, UDCA). Taking into account a serious risk of secondary bile acid in practice, the RP intake favorably serves as a preventive against tumorigenesis in colon. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 58-62, 2002.

Key words : resistant protein (RP), SPI+RP diet, fecal steroid excretion,
equilibrium dialysis, dihydroxybile acid, cancer prevention

*〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

Abbreviations : RP, resistant protein; DCA, deoxycholic acid; CDCA, cheno-deoxycholic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; TDCA, taurodeoxycholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid; CA, cholic acid.

卵や肉を過剰に加熱処理すると、消化性が低下する現象は古くからよく知られている。このように調理加工過程で生じた或いは食品素材に本来存在する難消化性たん白質、ならびに糖質や脂質など他の成分と複合体を形成して難消化性となった含たん白質成分を、レジスタントプロテイン (RP) と云う¹⁾。RPの健康指向性生理作用には、高コレステロール血症の改善、便秘や肥満の緩解、大腸がんや肝臓がんの発生抑制、腸内有機酸発酵の調節などがある。血中コレステロール値の上昇抑制や抗がん作用の観点からは、RPを内包した大豆たん白質製品中にその効果が期待される。例えば、分離大豆たん白質 (SPI) を或種の微生物プロテアーゼで処理後、可溶性のペプチドやアミノ酸を除去した“不溶性高分子画分 (HMF)”は約25%のRPを含み、これまでの動物実験でHMF食に観察された健康指向性作用の発現は、このRPの所為に依る可能性が高い¹⁾。そこで今回、RPをセルロースと代替させたRP+SPI食がHMF食 (セルロース無添加) に比べ優れた若しくは同等の酸中性ステロイドの糞中排泄増加をもたらすことを実証すると共に、各種胆汁酸立体異性体やアミノ酸抱合体に対するRPの捕捉能の違いについて検討を加えた。

方 法

RPの調製²⁾

HMFの0.1 M HCl懸濁液 (100 g/2 L) を9,000× g, 10 min遠心分離後、その残渣の懸濁液 (pH 2) にペプシン 1 gを加えて37℃で攪拌振盪の4時間後、pH 8に調整してパンクレアチン 2 gを加え37℃で攪拌振盪の16時間後、遠心分離 (9,000× g, 15 min) によって不溶性画分を集めた。この沈澱物を0.1 M HClで再度洗浄後、pHを4.5に戻し遠心分離によって得られた残渣の凍結乾燥物の粉末をRP標品とした。

動物実験

4週齢ウィスター系雄ラットを用いてカゼイン食で1週間予備飼育後3群に分け、コレステロール添加実験食で4週間飼育した。予備飼育食および実験食の飼料組成はTable 1に示した。ラットは明暗12時間周期 (点灯時間 8:00~20:00)、恒温 (24℃) 恒湿 (60%) の飼育室内吊り下げケージに個々に住まわせ、飼料お

Table 1. Composition of diets used in this experiment

	Casein	SPI	HMF	RP+SPI
Casein	20.0	—	—	—
SPI	—	20.0	—	20.0
HMF	—	—	27.0	—
α-Cornstarch	61.7	61.1	61.1	61.1
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	7.0	7.0	—	—
Resistant protein	—	—	—	7.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Cholesterol	—	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	—	0.1	0.1	0.1

Mineral and vitamin mixtures were AIN-93G likeness (products of Oriental Yeast Co., Tokyo).

SPI and HMF were gifted from Fuji Oil Co., Osaka.

よび飲料水は自由摂取とした。飼育期間中の1, 2, 3, 4週目に血液と糞の採取を行ったが、採血後の血液は直ちに血清を分離して用時まで-20℃で凍結、糞は採取直前の3日分を集めて凍結乾燥後に粉碎して4℃に保存した。

コレステロール測定

血清は原液の希釈液をそのまま、糞や肝臓については予めエタノール抽出液を作成し、市販のアッセイキット (コレステロールCテストワコー) を用いて操作マニュアル通りにコレステロール濃度の測定を行った。とくに後者については、肝臓0.5 gを3 mLの0.1%アンモニア-95%エタノールと共にホモジナイズし、70℃で30分間インキュベート、遠心分離 (3,000× g, 5 min) によって得られた上清と沈澱の洗液を合わせて溶媒を留去、残渣の2 mL石油エーテル溶液を測定用サンプルとした。

胆汁酸測定

糞中胆汁酸含量は、まず糞の乾燥粉末10 mgを90%エタノール0.2 mLに懸濁して65℃で1時間インキュベート、遠心分離後の上清と沈澱の洗液を合わせ溶媒を蒸発乾固後、残渣を90%エタノール0.5 mLに溶かしたものを測定用サンプルとし、総胆汁酸テストワコーを用いて求めた。

平衡透析³⁾

セロファン膜で隔てられた装置各室の左右両側に0.4 mL定容のサンプル懸濁液 (左側にサンプル

10 mg/mL) と一定濃度の各種胆汁酸溶液 (右側に 0.2 mM) を入れて 37℃ に 6 時間振盪後, 総胆汁酸テストワコーを用いて溶液中の胆汁酸濃度を測り, サンプルによる胆汁酸捕捉率 (%) を求めた. また, RP の [^{14}C] ケノデオキシコール酸 (CDCA) 捕捉に対する各種胆汁酸の競合実験においては, 当初の左側サンプル濃度を 5 mg/mL に固定, 右側の非放射性胆汁酸濃度を 0~50 μM に変化させた (インキュベーション条件は上と同じ). なお放射活性の測定は, 液体シンチレーションアナライザーを用いて行った.

結果と考察

Table 2 は, 実験食 (SPI, HMF, RP+SPI) で 4 週間飼育した場合の成長指標を示したものである. 飼料摂取量, 体重増加量および臓器 (肝臓, 腎臓) 重量に差はみられなかった. そこで各週における血清総コレステロール濃度を比較した (Fig. 1). 別途設定したカゼイン食対照群に比べて, コレステロール添加実験食群は一様に低い傾向があり, 4 週目で更に低値となったが, 1~4 週目の何れにおいても大豆たん白質食 3 群間に有意な差は認められなかった. 糞中コレステロール排泄量は, コレステロール添加実験食では投与開始 1 週目で著しく増加し, 飼育期間を通して常に高く, 3 群間でも RP+SPI と HMF の 2 群が SPI 群より高い傾向にあった (Fig. 2). その背景となる糞中胆汁酸排泄量を調べてみると, コレステロール排泄の場合より更に明瞭な差が認められ (Fig. 3), HMF 消化残渣すなわち RP の胆汁酸捕捉によるミセル形成阻害

がコレステロール排泄増加の原因となっていることが示唆された. 実験開始後 4 週目を経過した全ラットは屠殺して肝臓を取出し, その一部を 6 倍容の 95% エタノール (+1% アンモニア) と共に磨碎, 抽出したコレステロールを測定すると, 程度に多少の差こそあれ肝臓コレステロール含量は糞中の胆汁酸やコレステロール排泄と逆の関係にあることが分かった (Fig. 4). 糞中に失われた胆汁酸の不足は, 肝臓内コレステロールからの合成によって補われる. Figs. 1~4 の結果を全体的にみると, 糞中胆汁酸排泄増加や肝臓コレステロール保留率低下において RP+SPI 食が HMF 食に勝るとも劣らない事実は, HMF の消化によって腸内に残存する RP が直接的にせよ間接的にせよ原因物質として機能していることを暗示する.

腸腔に分泌された一次胆汁酸は, 腸内細菌の作用をうけて二次胆汁酸に変化する. 就中コール酸 (CA) から微生物変換をうけたデオキシコール酸 (DCA) が長らく大腸に滞留すると, 既知の生体内代謝産物中では最も危険な発がんプロモーターとして作用する. 体内コレステロール異化の主要経路は胆汁酸への合成と体外排泄であるが, 大腸壁は二次胆汁酸を含む糞便に暴露され常に発がん誘発の危険を伴う³⁾. 一方, SPI に

Table 2. Indication of growth for experimental rats

Group (n=6)	Food intake (g/day)	Body weight (Δ g/rat)	Tissue weight (g/rat)	
			Liver	Kidney
SPI	19.8 \pm 0.6	187 \pm 10	12.3 \pm 0.3	2.1 \pm 0.1
HMF	19.7 \pm 0.6	209 \pm 11	11.9 \pm 0.4	2.3 \pm 0.1
RP+SPI	19.3 \pm 0.4	192 \pm 8	10.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.1

Values are the means \pm SE for six rats of each group fed the respective experimental diets for 4 weeks.

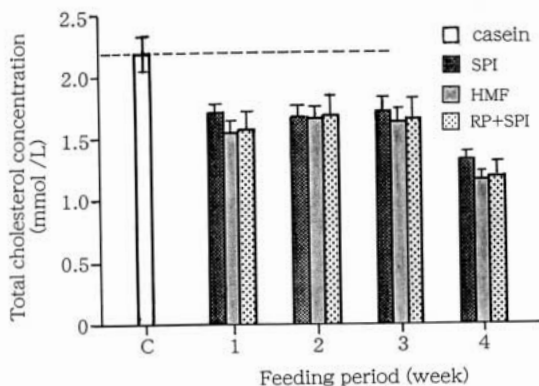


Fig. 1. Total cholesterol concentrations in rat serum at 1, 2, 3 and 4 weeks after dietary exchange. Cholesterol was colorimetrically determined in the usual way by the use of a commercial assay kit (cholesterol C-test Wako).

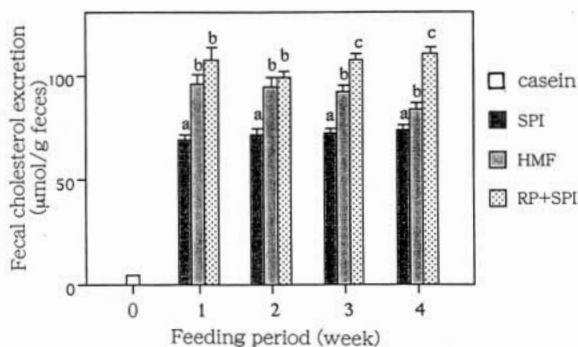


Fig. 2. Changes in fecal cholesterol excretion at weekly intervals for 4 weeks after dietary exchange. Lyophilized feces powders were extracted with 90% ethanol, followed by measurement of cholesterol.

潜在的に存在する胆汁酸捕捉能はHMFに引き継がれ、更にRPに移行する。動物腸内で生じたRPと二次胆汁酸の接触機会の是非を調べるため、大豆たん白質標品の胆汁酸立体異性体やジヒドロキシ酸のアミノ酸抱合体に対する捕捉特異性を調べた。

Fig. 5は、平衡透析法によって行ったSPI, HMF, RPの胆汁酸捕捉能(%)を比較したものである。ジヒドロキシ酸に対して、何れの標品もDCA, CDCA>HDCA>UDCAの順に高い捕捉能を示し、アミノ酸抱合をうけたタウロデオキシコール酸(TDCA)やグリコケノデオキシコール酸(GCDCA)はヒオデオキシコール酸(HDCA)とウルソデオキシコール酸(UDCA)の中間に位置した。注目されたのはDCAやCDCAに対する捕捉能がそれらのアミノ酸抱合化によって著しく弱まったことで、言い換えれば大豆RPは

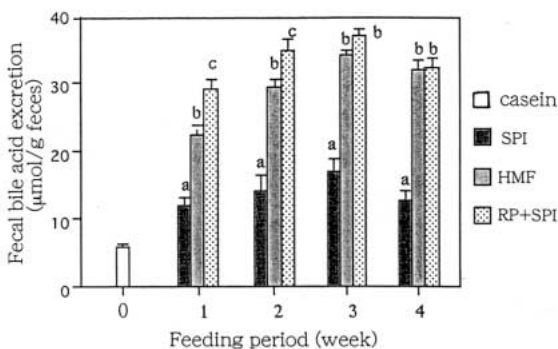


Fig. 3. Changes in fecal bile acid excretion at weekly intervals for 4 weeks after dietary exchange. Aliquots of the 90% alcoholic extract were subjected to measurement of total bile acid on the basis of reaction with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase as usual.

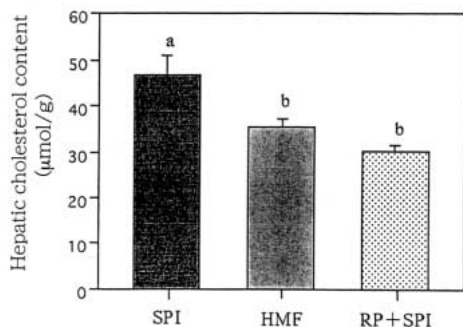


Fig. 4. Hepatic cholesterol content at week 4 after dietary exchange. Cholesterol was extracted from liver homogenate as described in Method, and then determined by the use of cholesterol C-test Wako.

人体での主要胆汁酸コール酸(CA)のアミノ抱合体に対して殆ど反応しないが、腸内で脱抱合と脱水酸化をうけたDCAに対しては寧ろ積極的に捕捉する可能性を推察させる。この推論を確かめるため、放射性CDCAを用いてRPの[¹⁴C]CDCAに対するCA, UDCA, GCDCA, DCAによる競合の程度を調べた。Fig. 6から明らかなように、CA, UDCA, GCDCAは共存濃度が増すにつれ[¹⁴C]CDCA結合量を徐々に低下させたが、DCAはそれらより低い濃度においてRPと[¹⁴C]CDCAとの結合を妨げることが判明した。従って*in vivo*腸管内でも類似の反応が起こるなら、RPの持続的摂取は二次胆汁酸を介する大腸や肝臓の発がん促進に対して安全かつ有効な予防手段となりうる。

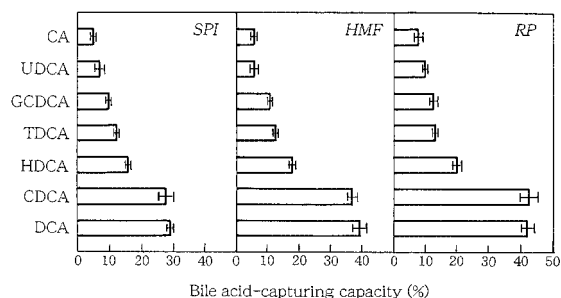


Fig. 5. Apparent affinity of SPI, HMF and RP for various dihydroxybile acids and amino acid conjugates. The bile acid-capturing capacity of soy protein samples was evaluated by equilibrium dialysis as previously described²⁾.

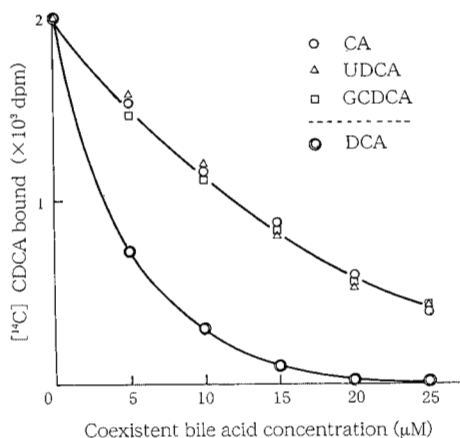


Fig. 6. Competitive inhibition of DCA, GCDCA, UDCA and CA at varied concentrations against [¹⁴C]CDCA incorporation into RP. Equilibrium dialysis was principally carried out in the same manner as in Fig. 5. The radioactivity of [¹⁴C]CDCA bound was measured with a Packard LSA-2500TR.

要 約

成長期ラットをコレステロール添加SPI (+7%セルロース), HMF (セルロース無添加), RP+SPI食で4週間飼育し, その間の糞中ステロイド排泄量や血清総コレステロール濃度変化ならびに4週目の肝臓コレステロール含量を比較した. 飼育期間を通して3群間で血清総コレステロール濃度に有意な差は認められなかったが, 酸中性ステロイドの糞中排泄量はSPI群に比べてHMFおよびRP+SPI両群で有意に高く, 概してHMF群よりRP+SPI群で幾らか高い傾向にあった. 一方, 肝臓コレステロール含量はSPI>HMF, RP+SPIで, 糞中ステロイド排泄とは逆の関係がみられた. これらの結果は, HMFの消化後の残渣RPがSPI群とHMF群間で顕在化した糞中ステロイド排泄増加と肝臓コレステロール蓄積減少を引き起こす原因物質として機能した可能性を強く示唆する. その背景は胆汁酸の高い糞中排泄で説明できる. RP+SPI群でみられたHMF群に匹敵する高い胆汁酸排泄は, HMFに含まれる胆汁酸捕捉能が分解を免れRPにかなり移行したことを意味する. そこで胆汁酸立体異性体やアミノ酸抱合体に対するRPの捕捉特異性を平衡透析法によって調べたところ, DCA, CDCA>>HDCA>TDCA, GCDCA, UDCA, CAの順に捕捉能が高く, 放射性測定によって求めた [^{14}C] CDCAの捕捉もDCA共存によって強く阻害されることから, RPが生理的条件下でも二次胆汁酸の捕捉に関与して発がん誘発の回避に役立つことが推察された.

文 献

- 1) Kato N and Iwami K (2002) : Resistant protein : its existence and function beneficial to health. *J Nutr Sci Vitaminol*, **48**, 1-5.
- 2) 岩見公和, 松田英治, 小森猛夫, 金本龍平 (2001) : 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. 大豆たん白質研究, **4**, 58-64.
- 3) 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.