

大豆低分子ペプチドによる組織たん白質合成開始活性の変動

原 博・松本昌士・島 奈々子

北海道大学大学院農学研究院

Changes in Translation Initiation Activities for Rat Tissue Protein Synthesis by Feeding Small Peptides Derived from Soybean Protein

Hiroshi HARA, Masashi MATSUMOTO and Nanako SHIMA

Laboratory of Nutritional Biochemistry, Division of Applied Bioscience,
Graduate School of Agriculture, Hokkaido University Sapporo 060-8589

ABSTRACT

Dietary peptides efficiently supply amino acids into the body and promote tissue protein synthesis. We examined effects of soybean small peptides on protein translation initiation activities with phosphorylation of eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in the pancreas, liver and gastrocnemius muscle, and increases in amino acid concentrations in the portal blood compared with soybean protein isolate (SPI) and amino acid mixture simulating SPI (AA). Rats were fed 20% or 50% SPI, peptide or AA diet for 14 days with an 8-hr meal feeding, and killed before and 1 and 2 hr after feeding under anesthesia on the last day. Portal absorption of amino acids was much higher in the peptide and AA groups than in the SPI group. Highly phosphorylated 4E-BP1 (γ -form) were increased after feeding test diets, and pancreatic 4E-BP1 γ -form was the highest in the peptide group, followed by the AA and then SPI groups in 20% nitrogen diets. Hepatic and muscle γ -form in the peptide and AA groups were similarly higher than that in the SPI group. In rats fed 50% nitrogen diets, γ -form of the pancreas and muscle, but not the liver, were higher in the peptide group than in the other two groups 2 hr after feeding. These results indicate that absorbed amino acids also contribute to the promotion of translation initiation activity in the pancreas the same as in the liver and muscle after feeding a diet. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 71-76, 2006.

Key words : soybean small peptides, translation initiation, eIF4E-binding protein 1, pancreas, skeletal muscle

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

食品ペプチドの生理作用が注目されている。食品ペプチド、特に低分子ペプチドは、その吸収が速く、吸収されるアミノ酸のバランスがよいことが知られている。私どもは、低分子ペプチドを多く含む食品たん白質の酵素加水分解物でもこのことを実証している¹⁾。しかし、ペプチドでどうして栄養価が良くなるかは解明されていない。たん白質の栄養価には、食後の体たん白質の合成速度が密接に関わっている。特に体たん白質合成における翻訳開始活性の速やかな亢進が重要と思われ、それに係わる細胞内情報伝達経路も明らかになりつつある²⁾。この組織たん白質翻訳開始活性に、食事アミノ酸が係わっていることが、肝臓や骨格筋で明らかにされている³⁾。体組織の中で、食後に最もたん白質合成活性が上昇するのは、消化酵素を作る膵臓であり、高たん白質食摂取で、翻訳開始活性が上昇することを明らかにした⁴⁾。その合成開始活性の調節機構は明らかでない。食品ペプチドには、上で述べた易吸収性アミノ酸としての作用とともに、ペプチドそのものの作用があり^{5, 6)}、ともに食品ペプチドの栄養特性に係わっている。膵臓は高たん白質食摂取に適応して組織たん白質合成を亢進させるが⁷⁾、私どもはこの適応に消化管内で食品由来ペプチドにより刺激される消化管ホルモン、コレシストキニン (CCK) 分泌の亢進と⁸⁻¹⁰⁾、吸収されたアミノ酸による膵臓たん白質合成への直接的な作用が、ともに係わっていることを明らかにした^{11, 12)}。本研究では、Eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding protein 1 (4E-BP1) のリン酸化を指標としたラット膵臓たん白質合成翻訳開始活性を、大豆分離たん白質 (SPI) とその低分子ペプチド、および同アミノ酸組成のアミノ酸混合物摂取後と比較した。さらに、肝臓と骨格筋の翻訳開始活性を同時に観察し、体組織たん白質合成に対する食品ペプチドの特性を検討した。

方 法

動物・試験食

Sprague-Dawley系雄ラット (日本SLC株式会社)、初体重180 g程度のものを用いた。ラットの飼育は、個別のケージにて、室温22±2℃、湿度55±5%、12時間の昼夜逆転させた明暗周期下 (明期 0:00~12:00) で行った。飼料は暗期開始後8時間 (12:00~20:00) 摂取させた。水は自由摂取。予備飼育として上記条件にてAIN93Gを基本とした飼料を一週間摂取させたのち、試験飼料に切り替えた。試験はすべて、北海道大学大学院農学研究科実験動物専門委員会の承認を得た

うえで、北海道大学実験動物飼育ガイドラインに沿って行われた。

試験食は、窒素源として大豆分離たん白質 (SPI, フジプロR, 不二製油)、低分子ペプチド (ハイニューートD3, 不二製油)、および大豆たん白質組成のアミノ酸混合物 (Table 1) の3種を用いて、これら窒素源を20%含むもの (20%食: 基本飼料のカゼインと置換)、50%含むもの (50%食: 20%添加食中のショ糖と置き換え) である。これら試験食を暗期開始後8時間摂取させる周期にて、2週間飼育した。この間、体重と摂餌量を毎日測定した。最終日の摂食開始直前、ないし摂食開始、1および2時間後に、ネンブタール麻酔下、開腹して門脈血を採取、大動脈より放血屠殺後、直ちに膵臓、肝臓、腓腹筋を摘出した。直ちに、これらの一部を、Western解析用のLysis buffer (TritonX-100, EDTA, aprotinin, leupeptin等含有Hepes buffer, pH 7.4) にてホモゲナイズして、分析まで-80℃にて保存した。摘出した臓器の他の部分は、分析まで-80℃にて保存した。また、胃内容物を全量採取し、凍結乾燥後重量を測定、胃排出量を測定した。

分 析

4E-BP1リン酸化の解析は、anti-4E-BP1を使用したWestern-blot解析により行った。すなわち、4E-BP1はそのリン酸化の程度により、リン酸化の低い α form、中等度の β form、高度にリン酸化しeIF4Eと結合能を失った γ formの3つのバンドとして検出される。4E-BP1 γ formの割合は、translation initiationの律速となるeIF4Eの遊離を表す。各組織のlysis bufferによるホモジネートを10,000×g遠心分離し、その上清を10分間boilingした後、再度10,000×gで遠心分離。その上清を等量のbuffered 2×SDSで希釈し15% polyacrylamide gelにより電気泳動。Rabbit anti-4E-BP1 polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) を用いた、protein immunoblot analysisを行った^{3, 4)}。

膵臓は、凍結乾燥し重量測定後ホモジナイズして、Lowry法によりたん白質含量を測定した。門脈血は、血漿分離後遊離アミノ酸をPTC誘導体にして、HPLCにより各アミノ酸濃度を測定した。

Table 1. Composition of amino acid mixture (AA) simulating soybean protein isolate

g/ kg mixture					
Ile	30.0	Leu	49.0	Lys-HCl	38.0
Cys	8.2	Phe	33.0	His-HCl	17.0
Tyr	23.0	Thr	22.0	Trp	8.3
Ala	25.0	Asp	36.0	Glu	60.0
Pro	34.0	Ser	27.0	Asp	36.0
Met	7.8	Arg-HCl	48.0	Val	30.0
				Gly	25.0
				Gln	60.0

計 算

4E-BP1リン酸化度 (translation initiation活性) は, protein immunoblotにおける, α , β , γ のdensity総和に対する γ form densityの比率として求めた. 各測定値は, 一元配置, ないし二元配置の分散分析を行い, 有意な差を認めたものについて, Duncanの多重比較検定法で群間の有意差 ($P<0.05$) を求めた.

結果と考察

Table 2には, 同じアミノ酸組成をもつ3種類の形態が異なる窒素源を, 20%ないし50%含む試験食を2週間摂取させたときの, 体重増加, 摂餌量, および膵臓の乾燥重量と膵たん白質含量を示した. なお, Tableの各データは各食餌群において, 試験食開始14日目の再給餌前, 再給餌1時間後, 2時間後の3群を合わせたものである. 摂餌量では, 20%食でペプチド群が僅かに低値を示したが, 各食餌群間で大きな差はなかった. しかし, 20%食での体重増加は, 大豆たん白質食 (SPI) 群で他の2群に比べて高く, また50%食ではアミノ酸食群で他の2群に比べて低かった. アミノ酸食では, 摂餌量がほとんど他群と差がなく, 試料効率が低いと思われた. 膵臓重量では, 50%SPI食群で, 20%SPI食群および他の50%食に比べて著明に増加していた. 50%ペプチド食群は, 差は小さいものの50%アミノ酸食群に対して有意な膵臓重量の増加が観察された. 膵臓たん白質含量は, 重量とほぼ同じ変動を示した.

Table 3は, 14日目再給餌1時間目と2時間目に屠殺したラットの, 胃内容物乾燥重量と摂餌量の差から求めた, 摂取した食事の胃からの排泄量 (gastric emptying) を示した. 再給餌2時間目では, 各群間に差はなかったが, 1時間目においては20%, 50%ともに, SPI食群でやや低値を示した.

Fig. 1には, 20%食摂取後の門脈中アミノ酸濃度の経時変化を示した. 各アミノ酸は, 再給餌後1時間で最高値となり, その後アミノ酸群では多くのアミノ酸で低下したが, ペプチド食群では維持ないし増加傾向になった. SPI食群では, 全アミノ酸において他群より低値で推移した. 非必須アミノ酸であるアラニンやセリン濃度は, アミノ酸食群でペプチド食群より高値で推移した. 一方, リジン, チロシンでは再給餌2時間後でペプチド群がアミノ酸群より高値を示した. 他のアミノ酸では, この両群では大きな差はなかった.

Fig. 2は, 膵臓における4E-BP1 γ formの割合を示したものである. 再給餌1時間後で, 各食餌群の γ form

の割合は大きく増加したが, その増加の程度は50%食群で20%食群に比べて大きかった. 20%食における γ formの増加は, 1時間後, 2時間後ともにペプチド食, アミノ酸食, SPI食の順であったが, 前者2群間の差は有意ではなかった. 50%食再給餌1時間後では, SPI食群においても γ formは大きく増加して, 3群間の差は無くなったが, 2時間後ではアミノ酸群で γ formの割合が減少して, ペプチド食群に対して有意に低値となった.

Fig. 3は, 再給餌後の肝臓4E-BP1 γ formの割合を示す. 再給餌前 (0 time) において, γ formの割合は50%食群で20%食群より約2倍の高値を示した. 再給餌後は, 20%, 50%の両SPI食群で緩やかに増加したのに対し, ペプチド群およびアミノ酸群では20%, 50%の両レベル食群とも, 急激に増加し1時間後 γ formの割合は50%程度まで達した. 2時間目では, 20%食群ではやや低下したが, 50%食ではペプチド群, アミノ酸群ともに高値を維持し, 両群間に大きな差はなかった.

Fig. 4は腓腹筋 (骨格筋) の4E-BP1 γ formの割合で, 初期値においては20%および50%食間で差はなかった. 再給餌後の増加では, 50%食群がすべての窒素形態の

Table 2. Body weight gain, food intakes and pancreatic growth in rats fed test diets

	SPI	Peptide	AA
20% N diet			
Body weight gain (g)	62.2 $\pm$ 1.7 ^a	50.9 $\pm$ 1.4 ^b	50.3 $\pm$ 0.9 ^b
Food intake (g/day)	14.3 $\pm$ 0.08 ^a	13.9 $\pm$ 0.10 ^b	14.1 $\pm$ 0.08 ^a
Pancreas			
Dry weight (mg)	185 $\pm$ 9.4	170 $\pm$ 10.8	164 $\pm$ 6.5
Protein content (mg)	117 $\pm$ 5.3 ^a	93.1 $\pm$ 6.0 ^b	91.8 $\pm$ 5.5 ^b
50% N diet			
Body weight gain (g)	51.2 $\pm$ 1.4 ^a	50.3 $\pm$ 1.2 ^a	45.6 $\pm$ 1.3 ^b
Food intake (g/day)	13.7 $\pm$ 0.11	13.7 $\pm$ 0.08	13.5 $\pm$ 0.07
Pancreas			
Dry weight (mg)	341 $\pm$ 7.3 ^a	247 $\pm$ 6.7 ^b	206 $\pm$ 5.1 ^c
Protein content (mg)	278 $\pm$ 8.5 ^a	186 $\pm$ 8.3 ^b	154 $\pm$ 6.7 ^c

Mean $\pm$ SE, n=20

Table 3. Gastric emptying of test diets for 1 or 2 hrs after feeding

	SPI	Peptide	AA
20% N diets			
1 hr (g)	1.97 $\pm$ 0.11 ^b	2.55 $\pm$ 0.18 ^a	2.71 $\pm$ 0.10 ^a
2 hrs (g)	2.71 $\pm$ 0.10	3.02 $\pm$ 0.16	3.23 $\pm$ 0.18
50% N diets			
1 hr (g)	1.35 $\pm$ 0.17 ^b	2.45 $\pm$ 0.31 ^a	2.03 $\pm$ 0.25 ^a
2 hrs (g)	2.40 $\pm$ 0.15	2.99 $\pm$ 0.20	3.03 $\pm$ 0.25

Gastric emptying=(Intake)-(Gastric remaining) n=7

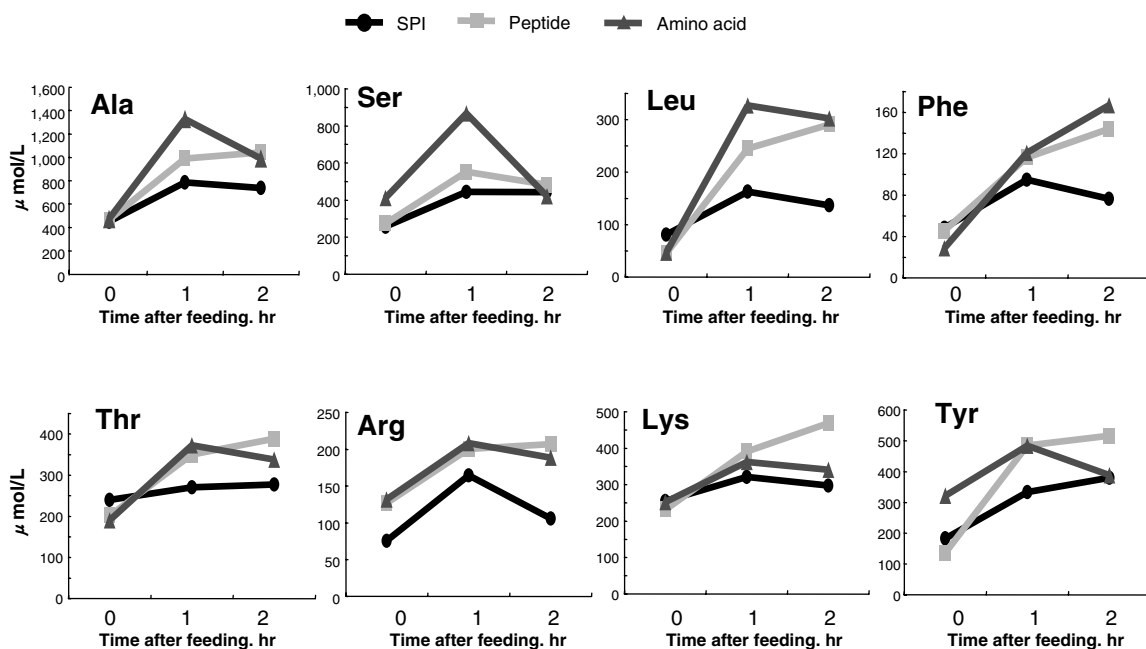


Fig. 1. Changes in amino acid concentrations in portal blood after feeding test diets containing 20% soybean protein isolate (SPI), soybean small peptide (peptide) and amino acid mixture.

試験食において20%食より大きかった。特にSPI食では、20%食の再給餌で γ formの割合がほとんど増加しなかったのに対して、50%SPI食群では、2時間後に初期値に対して約3倍にも増加した。ペプチド食群では、その増加は50%食群で20%食群より遙かに大きかったが、アミノ酸食群では窒素レベルの明確な差は見られなかった。ペプチド食とアミノ酸食の比較では、20%食では差はなかったが、50%食ではペプチド食群で有意に高値を示した。

以上の結果は、ペプチド食、アミノ酸食摂取後の門脈血中アミノ酸の大きな上昇、すなわち早いアミノ酸吸収は、体の各組織の急激なtranslation initiation活性の促進を引き起こして、体たん白質合成が促進されたものと思われる。一部の門脈中アミノ酸は、ペプチド食群でアミノ酸食群より高値となり、骨格筋におけるペプチド食群のより大きなtranslation initiation活性の促進につながった可能性がある。脾臓においては50%SPI食において、著明なたん白質量の増加があり、translation initiation活性も20%食に比べて50%食で大きく増加した。たん白質食摂取に伴って、脾臓のプロテアーゼ誘導、および脾臓たん白質増加作用のある

CCKが分泌される^{7,9)}。このCCKは、mTOR経路を活性化させて translation initiation活性化を起こすことが報告されており¹²⁾、これが50%SPI食の γ formの増加に寄与した可能性がある。しかし、本研究においては、CCK分泌をほとんど引き起こさないアミノ酸食群で、SPI群と同等の4E-BP1のリン酸化が起こった。このことは、摂食直後の脾臓たん白質合成の促進には、吸収されたアミノ酸も大きな役割を持っているものと思われる。

結論として、組織たん白質合成開始活性（4E-BP1 γ formの割合）は、脾臓においては、20%食群でペプチド、アミノ酸、SPI食の順であった。肝臓、筋肉では、ペプチド食とアミノ酸食の差はなかった。50%食摂取2時間後の肝臓では、ペプチド食とアミノ酸食の差はなかったが、脾臓と筋肉では、ペプチド食群が他の2群より高値を示した。食後の脾臓翻訳開始活性の急激な増加に、食事アミノ酸も寄与していると思われる。

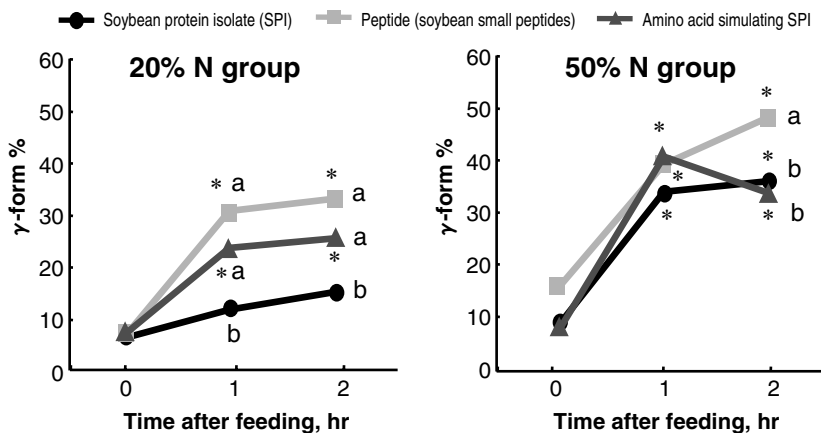


Fig. 2. Translation initiation activity in the pancreas evaluated with phosphorylation of eIF4E-binding protein 1 (ratio of γ -form) after feeding 20% or 50% SPI, peptide and amino acid diet.

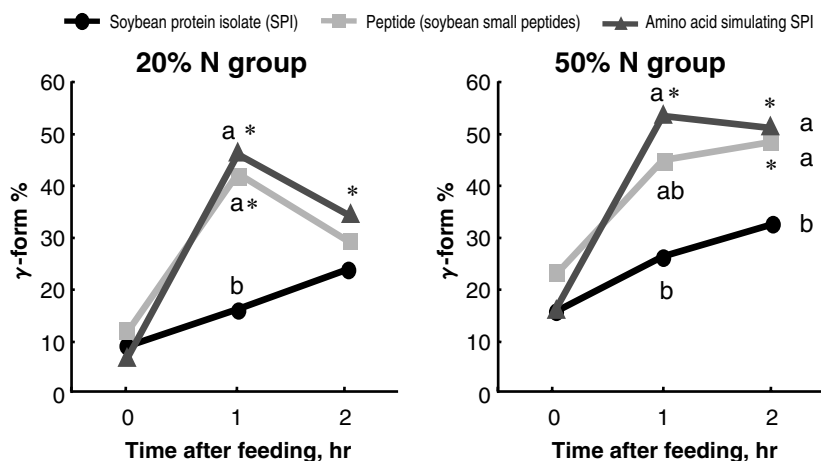


Fig. 3. Translation initiation activity in the liver evaluated with phosphorylation of eIF4E-binding protein 1 (ratio of γ -form) after feeding 20% or 50% SPI, peptide and amino acid diet.

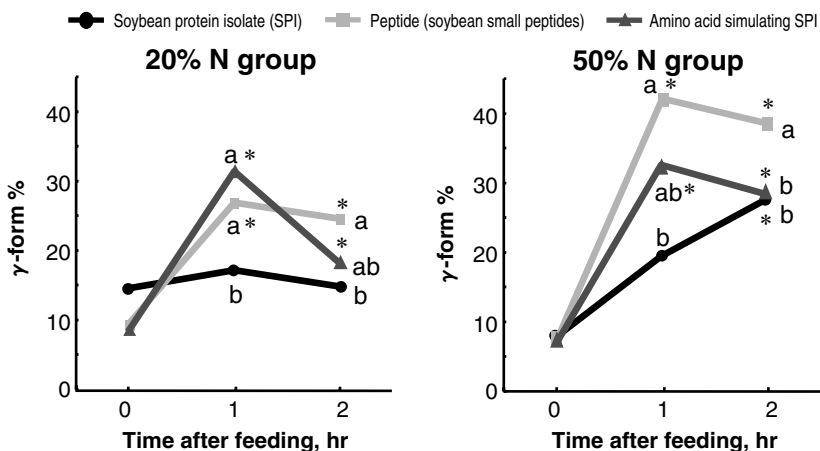


Fig. 4. Translation initiation activity in the gastrocnemius muscle evaluated with phosphorylation of eIF4E-binding protein 1 (ratio of γ -form) after feeding 20% or 50% SPI, peptide and amino acid diet.

要 約

ラット膵臓、肝臓、骨格筋のたん白質合成翻訳開始活性をeIF4E-BP1のリン酸化を指標として、大豆分離たん白質 (SPI) とその低分子ペプチド、および同アミノ酸組成のアミノ酸混合物摂取後で比較した。食餌中に、上記3種の形態の異なる窒素源を、20%ないし50%添加した試験食を、一日8時間給餌して2週間飼育したラットを用いて、摂食前、摂食開始1、2時間後に屠殺して、膵臓、肝臓、腓腹筋の4E-BP1リン酸化をWestern-blot法で測定した。同時に門脈血を採取して、アミノ酸濃度の変動を見た。大豆ペプチド食摂取後の、門脈中のアミノ酸濃度の経時的上昇は、SPI食群に比べると遙かに大きかった。一方、アミノ酸食群とは各アミノ酸により多少異なるものの大きな差はなかった。翻訳開始を示す、高度にリン酸化された4E-BP1 γ formの割合は、各群で食後増加したが、20%食摂取ラットの膵臓では、ペプチド、アミノ酸、SPI食の順であった。肝臓、筋肉では、ペプチド食とアミノ酸食で差がなかった。一方、50%食摂取ラットにおいては γ formの急速な増加が見られ、摂取2時間後の膵臓と筋肉でペプチド食群が他の2群より高値を示した。一方肝臓では、アミノ酸食とペプチド食は同等であった。食後の膵臓翻訳開始活性の増加は、吸収されたアミノ酸の寄与が大きいと思われた。

文 献

- 1) Hara H, Funabiki R, Iwata M and Yamazaki K (1984): Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J Nutr*, **114**, 1122-1129.
- 2) Kimball SR, Jurasinski CV, Lawrence JC Jr and Jefferson LS (1997): Insulin stimulates protein synthesis in skeletal muscle by enhancing the association of eIF-4E and eIF-4G. *Am J Physiol*, **272**, C754-C759.
- 3) Yoshizawa F, Kimball SR, Vary TC and Jefferson LS (1998): Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*, **275**, E814-E820.
- 4) Hashi M, Yoshizawa F, Onozuka E, Ogata M and Hara H (2005): Adaptive changes in translation initiation activities for rat pancreatic protein synthesis with feeding of a high-protein diet. *J Nutr Biochem*, **16**, 507-512.
- 5) Nishi T, Hara H, Hira T and Tomita F (2001): Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells. *Exp Biol Med*, **226**, 1031-1036.
- 6) Nishi T, Hara H and Tomita F (2003): Soybean β -conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *J Nutr*, **133**, 352-357.
- 7) Morisset J, Guan D, Jurkowska G, Rivard N and Green GM (1992): Endogenous cholecystokinin, the major factor responsible for dietary protein-induced pancreatic growth. *Pancreas*, **7**, 522-529.
- 8) Korc M (1982): Regulation of pancreatic protein synthesis by cholecystokinin and calcium. *Am J Physiol*, **243**, G69-G75.
- 9) Hara H, Ochi Y and Kasai T (1998): Bile-pancreatic juice-independent increases in pancreatic proteases and intestinal cholecystokinin by dietary protein in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 173-179.
- 10) Hara H, Ohyama S and Hira T (2000): Luminal dietary protein, not amino acids, induces pancreatic protease via CCK in pancreaticobiliary-diverted rats. *Am J Physiol*, **278**, G937-G945.
- 11) Hara H, Narakino H, Kiriya S and Kasai T (1995): Induction of pancreatic growth and proteases by feeding a high amino acid diet does not depend on cholecystokinin in rats. *J Nutr*, **125**, 1143-1149.
- 12) Hashimoto N and Hara H (2003): Dietary amino acids promote pancreatic protease synthesis at the translation stage in rats. *J Nutr*, **133**, 3052-3057.
- 13) Bragado MJ, Groblewski GE and Williams JA (1998): Regulation of protein synthesis by cholecystokinin in rat pancreatic acini involves PHAS-I and the p70 S6 kinase pathway. *Gastroenterology*, **115**, 733-742.