

大豆たん白質加水分解物の腸管感染症予防効果の解析

服部 誠*

東京農工大学大学院共生科学技術研究院

Prevention against Intestinal Infection by Soy Protein Hydrolysate

Makoto HATTORI

Division of Agriscience and Bioscience, Tokyo University of Agriculture and Technology
Fuchu 183-8509

ABSTRACT

The preventive effects of soy protein hydrolysate (SPH) against intestinal infection were investigated. We prepared SPH by the following procedure: 1) soy protein isolate (SPI) was solubilized by the treatment with 6 M guanidine hydrochloride, 2) solubilized sample was dialyzed against 0.03 M Tris-HCl buffer (pH 8), 3) dialyzed sample was digested by trypsin, and 4) the digested sample was submitted to size-exclusion chromatography. The binding ability of SPH to intestinal pathogenic bacteria was evaluated by a binding assay with biotinylated bacteria. SPH showed the ability to bind to *Salmonella enteritidis* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. The preventive effect of SPH on the adhesion of *S. enteritidis* to Caco-2 cells was also investigated. SPH showed an inhibitory effect on the adhesion of *S. enteritidis*. Our results indicate SPH to be a promising agent for preventing intestinal infection. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 77-81, 2006.

Key words: intestinal infection, soy protein hydrolysate, prevention of infection, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7

近年、サルモネラ菌、腸管出血性大腸菌などの腸管感染症が社会的に大きな問題となっている。これらの感染の第一段階として、細菌が宿主細胞表面の糖質（マンノース、シアル酸など）を認識し、接着することが明らかとなっている。マンノース、シアル酸などの糖質を含む食品を摂取し腸管腔に常時存在するような

状態とすることができれば、これらが、菌体レセプターが腸管細胞上の糖鎖への結合に対し競合的に作用すると考えられ、腸管感染症の効果的な予防が期待される。本研究では、食品としては、マンノースを有する糖たん白質を含む大豆たん白質に着目し、その加水分解物より感染症予防に有効な可能性のある糖ペプチドを見出すこと、さらに、それらの腸管感染症予防食品としての有効性を明らかにすることを目的として研究を行った。

* 〒183-8509 府中市幸町3-5-8

実験方法

大豆たん白質加水分解物 (SPH; Soy protein hydrolysate) の調製

粉末状分離大豆たん白質 (400 mg, ソルピー-5000, 日清コスモフーズ) を6 M塩酸グアニジン溶液 (8 mL) により可溶化し, 0.03 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析の後, トリプシン (4 mg) を添加し, 37°C で反応させた. 反応開始24時間後に同量のトリプシンを追加し, 48時間まで反応を行った. 反応の停止は, 100°C で5分間加熱する事により行った. その後, 遠心分離 (18,000 rpm, 30 min, 4°C) を行って上清を回収し, サイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-50) に供した. 以上の工程により大豆たん白質加水分解物 (SPH; Soy protein hydrolysate) を得た.

なお, 塩酸グアニジン処理の後, 蒸留水に対して透析し得られた可溶性成分を大豆たん白質変性物とした.

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli法¹⁾に従ってSDS-PAGEを行い, SPHの分子量分布を測定した. 試料1 mgを2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE用試料緩衝液100 μ Lに加え, 100°C で5分間加熱溶解した後, ゲル (濃縮ゲル4%, 分離ゲル15%) に50 μ g負荷した. 泳動は, 定電流10 mAで約2時間泳動し, 終了後Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 染色, 過ヨウ素酸シッフ (PAS, periodic acid schiff) 染色を行った.

糖組成分析

SPHに含まれる糖の組成をABEE糖組成分析キットプラスS (Honen) を用い, Honenpak C18カラム (4.6 ID \times 75 mm, Honen) を用いたHPLCにより分析した^{2,3)}.

細菌のビオチン化

加熱処理した細菌を660 nmの吸光度で1.0になるようにPBSに懸濁し, この懸濁液 10 μ LにEZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE) 10 mgを添加し, 室温で2時間反応させた. 遠心分離 (2,500 rpm, 20 min) 後, 上清を除去し, PBSを約3 mLを加え, 再懸濁・遠心分離を行い洗浄した. 本洗浄操作を3回行った後, 10 mLのPBSを加え, 懸濁したものをビオチン化菌体として, 結合性の解析に用いた.

ビオチン化菌体をプローブとした結合アッセイ

SPH, あるいは, 大豆たん白質変性物を1 mg/mLになるようにPBSに溶解後, 3倍希釈系列を作成し, 100 μ Lずつ96 well plate (ポリスチレン製) に分注し, 4°Cで一晩コーティングを行った. コーティングの後, PBSで3回洗浄し, 1%ゼラチン (Mw. 9,000)/PBS

溶液を200 μ Lずつ分注し, 室温で2時間ブロッキングを行った. PBSで3回洗浄した後, 懸濁したビオチン化菌体を100 μ Lずつ分注し, 室温で1時間静置した. PBSで3回洗浄した後, アルカリ性ホスファターゼ標識ストレプトアビジン (Zymed) を1 wellあたり100 μ Lずつ分注し, 室温で1時間静置した. PBSで3回洗浄した後, 0.1%*p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (和光純薬)/ジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH 9.8) を100 μ Lずつ分注し, 室温で反応させた. 発色後, 5 M水酸化ナトリウム水溶液20 μ Lを加え, 反応を停止させて, マイクロプレートリーダーにより, 405 nmの吸光度を測定した⁴⁾.

Caco-2細胞の培養

液体窒素中, あるいは-80°Cで凍結保存していたCaco-2細胞を融解し, 10%ウシ胎児血清 (FCS), 2 mM L-グルタミン, および100 μ g/mLのペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO BRL) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で培養した. フラスコ内で増殖させた細胞を 1.75×10^5 cells/wellになるように24ウェルプレートに播種した. ウェルで細胞を10~14日間培養し, 接着阻害アッセイに用いた. また, 培地交換は1日おきに行った.

Caco-2細胞を用いた接着阻害アッセイ

接着阻害アッセイは, Sugita-Konishiらの方法⁵⁾をもとに行った. 試料溶液として用いたSPHは, 4 mg/mLに, 大豆たん白質塩酸グアニジン処理物は4 mg/mLに, マンノース (Man) は, 10 mg/mLになるよう, Caco-2細胞の培養に使用した10%FCS入りDMEMにより溶解し, ろ過滅菌して調製した. この試料溶液で*S. enteritidis*の菌懸濁液 ($2 \sim 5 \times 10^9$ cells/mL) を100倍希釈し, 37°Cで30分間インキュベートした. その後, この溶液 1 mLを24ウェルプレートの各ウェルに加えて, 4°Cで1時間インキュベートした. 1時間のインキュベーション後, 溶液を吸引しPBSで3回洗浄し, Triton-X 0.1%入りPBSを200 μ L加え, 37°Cで15分間インキュベートすることにより, ウェル底の細胞を剥離した. この接着した菌を含む溶液を連続的に10倍希釈して, 各希釈液をTrypticase soy agar (TSA) に塗布し, 一晩培養した後, コロニー数を計測した.

結果と考察

大豆たん白質加水分解物 (SPH; Soy protein hydrolysate) の化学的特徴

SPHの化学的特徴を調べるために, SDS-PAGEおよび糖組成分析を行った.

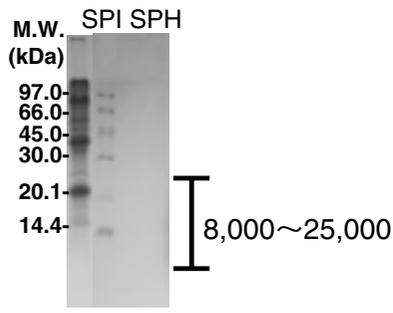


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of soy protein hydrolysate (SPH). SDS-PAGE of soy protein hydrolysate (SPH) was performed according to the method of Laemmli with 15% polyacrylamide gel. After electrophoresis, the protein bands were stained with Coomassie brilliant blue.

SDS-PAGEの結果 (Fig. 1), SPHは、主に分子量 8,000~25,000 Da付近に、ブロードなバンドとして検出された。

更に、細菌感染における細菌の宿主認識において、細胞表面の糖鎖が重要であるので、SPHの糖鎖の組成について調べたところ (Fig. 2), ガラクトース (Gal), マンノース (Man), N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が主に含まれている事が明らかとなった。

SPHの細菌に対する結合性

ビオチン化菌体を用いた結合アッセイの結果を行った結果 (Fig. 3), *S. enteritidis*, 腸管出血性大腸菌 O157への結合性を確認できた。結合性の本体については明らかにできなかったが, *S. enteritidis*, 腸管出血性大腸菌O157に対してマンノースが接着性を示す

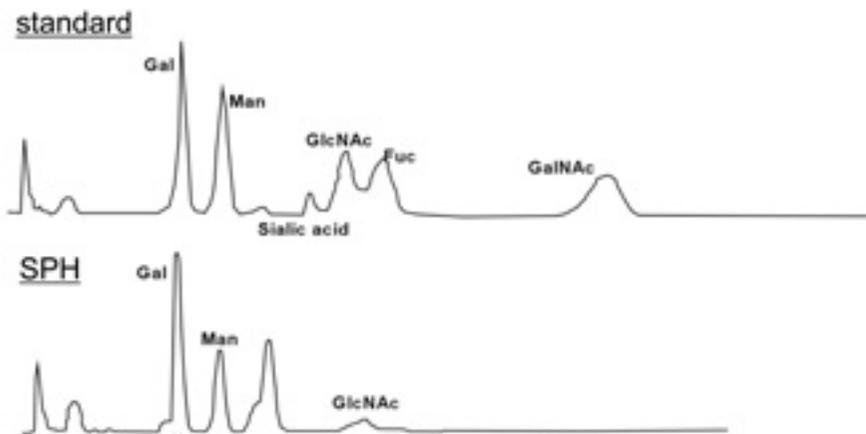


Fig. 2. Analysis of carbohydrate moiety of soy protein hydrolysate (SPH) by HPLC. HPLC conditions: column, Honenpak C18 (4.6 ID×75 mm, Honen, Tokyo, Japan); flow rate, 1.0 mL/min; mobile phase, 0.2 M Sodium borate/acetonitrill (97 : 7); detection, absorbance at 305 nm.

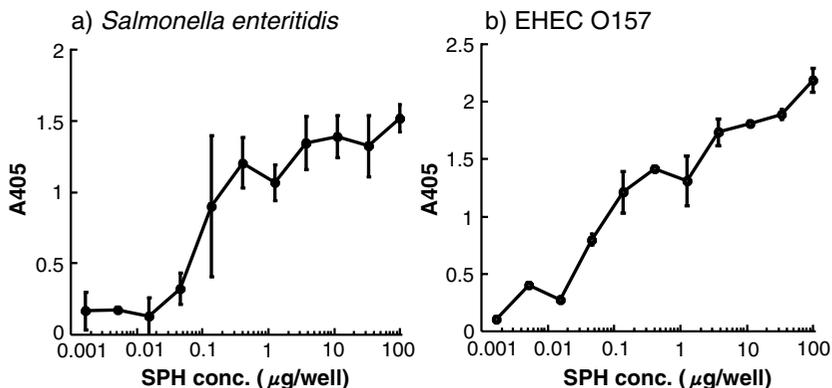


Fig. 3. Binding ability of soy protein hydrolysate (SPH) to pathogenic bacteria. The binding assay was performed with biotinylated bacteria. a) *Salmonella enteritidis*, b) EHEC O157.

という報告があり^{6,7)}、本研究による結果は、SPHがマンノースを含むことによるものと考えている。

次に、特に*S. enteritidis*に着目し、これに対するSPHの腸管感染症予防効果について、Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験系により、細胞表面への接着阻害効果を評価した。SPHの接着阻害効果の解析は、単層培養したCaco-2細胞に、SPHとともにインキュベートした*S. enteritidis*を感染させ、Caco-2細胞に接着した菌数を測定することにより行った。その結果 (Fig. 4)、SPHは*S. enteritidis*の接着に関与していると考えられているマンノースと同程度の接着阻害効果を示した。同時に大豆たん白質塩酸グアニジン処理物でも接着阻害実験を行ったところ、*S. enteritidis*の接着をほとんど阻害しなかった (結果省略)。このことから、トリプシンで加水分解することにより、大豆たん白質が潜在的に有する病原菌の接着を阻害する効果を顕在化することができたと考えられた。

以上の結果から、SPHは、腸管感染症予防が期待できる食品素材となり得ると考えられた。

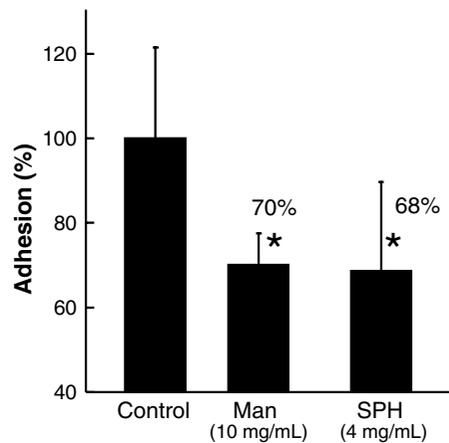


Fig. 4. Effect of soy protein hydrolysate (SPH) on the adhesion of *Salmonella enteritidis* to Caco-2 cells. *S. enteritidis* (2×10^7 cfu/mL) was preincubated with SPH at 37°C for 30min, and added to each well of a 24-well plate containing Caco-2 cell monolayers. After incubating with the bacterium at 4°C for 1 hr, the medium was taken, diluted with PBS and plated on TSA.

要 約

近年、サルモネラ菌、腸管出血性大腸菌などの腸管感染症が社会的に大きな問題となっている。これらの感染の第一段階として、細菌は宿主細胞表面の糖鎖を認識し、接着することが明らかとなっている。本研究では、この細菌による糖鎖認識メカニズムに着目し、細菌-宿主相互作用に対して阻害活性を有する糖ペプチドを、食品から探索し、腸管感染症予防食品としての可能性を検討することを目的とした。市販の粉末状分離大豆たん白質を塩酸グアニジンにより可溶化し、0.03 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析の後、トリプシンで加水分解した。次にサイズ排除クロマトグラフィーに供し、大豆たん白質由来糖ペプチドを得た。大豆たん白質由来糖ペプチドの種々の細菌に対する結合性は、ビオチン化菌体を用いた結合アッセイにより解析した。その結果、*S. enteritidis*、腸管出血性大腸菌O157への結合性を確認できた。さらに、特に*S. enteritidis*に着目し、これに対するSPHの腸管感染症予防効果について、Caco-2細胞を用いた*in vitro*実験系により、細胞表面への接着阻害効果を評価した。その結果、SPHは*S. enteritidis*の接着に関与していると考えられているマンノースと同程度の接着阻害効果を示した。以上の結果から、SPHは、腸管感染症予防が期待できる食品素材となり得ると考えられた。

文 献

- 1) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of heads of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 2) Yasuno S, Kokubo K and Kamei M (1999): New method for determining the sugar composition of glycoproteins, glycolipids, and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1353-1359.
- 3) Yasuno S, Murata T, Kokubo K, Yamaguchi T and Kamei M (1997): Two-mode analysis by high-performance liquid chromatography of p-aminobenzoic acid ethyl ester-derivative monosaccharide. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**, 1944-1946.

- 4) Nakajima K, Tamura N, Kobayashi-Hattori K, Yoshida T, Hara-Kudo Y, Ikedo M, Sugita-Konishi Y and Hattori M (2005): Prevention of intestinal infection by glycomacropeptide. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 2294-2301.
- 5) Sugita-Konishi Y, Sakanaka S, Sasaki K, Juneja LR, Noda T and Amano F (2002): Inhibition of bacterial adhesion and Salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. *J Agric Food Chem*, **57**, 3607-3613.
- 6) Dibb-Fuller MP, Allen-Vercoe E, Thorns CJ and Woodward MJ (1999): Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella* enteritidis. *Microbiology*, **145**, 1023-1031.
- 7) Winsor DK Jr, Ashkenazi S, Chiovetti R and Cleary TG (1992): Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains to a human colonic epithelial cell line (T84). *Infect Immun*, **60**, 1613-1617.