

大豆たん白質および大豆ペプチドの経口摂取により血中に移行する ペプチドの分離と構造解析

佐藤健司*

京都府立大学人間環境学部食保健学科食品科学研究室

Isolation and Identification of Food-derived Soy Peptides in Blood

Kenji SATO

Department of Food Sciences and Nutritional Health,
Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522

ABSTRACT

An enzymatic hydrolysate of soy protein concentrate, which was prepared in an industrial scale, was administered to rat stomach at 100 mg/kg of body weight. The portal blood was collected before and 30 min after the administration. The blood was deproteinized by mixing with TCA to give 5% (w/v). Peptides and amino acids in the supernatant were captured to a cation exchanger packed in a spin column (5 mm × 5 mm, i.d.) and eluted with 7.5 M ammonia-50% methanol solution. The clarified peptides were fractionated by size-exclusion chromatography (SEC) and reacted with phenylisothiocyanate. The derivatives were resolved by reversed phase HPLC. Three peaks appeared in the SEC fractions eluted from 18 to 20 mL specifically after the ingestion, which could be food-derived soy peptides. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 120-123, 2007.

Key words : soy peptide, absorption, food-derived peptide

近年、内臓脂肪の蓄積から派生する高脂血、糖尿病などいわゆるメタボリックシンドロームの危険性が指摘され、社会問題にもなっている。血中コレステロールの低下や脂肪の代謝促進作用が示唆されている大豆たん白質、およびその部分分解物である大豆ペプチドに対する関心が高まっている。これらの有益な作用は食事由来大豆たん白質またはペプチドから由来するペプチドの機能であることが示唆されている。生体に吸収された食事由来大豆ペプチドの分離・同定は試み

られているが、これまでに成功例はない。この原因として、血中には非常に多くの成分が存在し、ペプチドの同定が困難であることや、ペプチドの分画に最も汎用される逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相HPLC）で親水性のペプチドの分離が不十分であることが理由に挙げられる。一方、我々は、ゼラチンの酵素分解物であるいわゆるコラーゲンペプチドを摂取したヒトの末梢血からPro-Hyp, Pro-Hyp-Glyなどジペプチド、トリペプチドを同定している^{1,2)}。また最近、分離が困難な親水性のペプチドを強カチオン交換樹脂により濃縮後、フェニルイソチオシアネート（PITC）

*〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

によりラベルした後、逆相HPLCで分離法することにより食事由来コラーゲンペプチドの分離が改善することを見だしている³⁾。

そこで本研究では、これらの手法を用い大豆ペプチドを経口摂取したラットおよびヒトの血液中の食事由来大豆ペプチドの分離・同定を試みた結果を報告する。

実験方法

実験に用いた大豆ペプチド（大豆ペプチドハイニューD3）は不二製油株式会社より入手した。分析に用いた試薬は論文¹⁻³⁾に記載している。

ラットに10%ペプチド溶液（1 mL/100 g BW）投与前および30分後に門脈から採血した（n=6）。ラットの採血は不二製油株式会社にて行った。

採取した全血に2倍量の10%トリクロロ酢酸（TCA）および同量の蒸留水を直接添加し、トリクロロ酢酸の最終濃度が5%になるように調製した。その後、12,000 rpmで5分間の遠心分離を行い、上清を以下の実験に用いた。

上清中のペプチドはInoueらの方法によりH+型の強カチオン交換樹脂（AG50W×8）を用いた固相抽出により清澄化処理を行った³⁾。サンプルは各個体のTCA可溶性画分1 mLをプールして6 mLを固相抽出に用いた。

ペプチド画分を30%アセトニトリル-0.1% TFA 200 μ Lに溶解し、同溶液で平衡化したSuperdex Peptide 10/30を用いたサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）で分画した³⁾。

溶出液は1分ごとに分取し、各画分の全量を遠心濃縮機により乾固し、PITCと反応させた。誘導化され

たPTC-ペプチドは、Intertsil ODS-3（250×4.6 mm）カラムにて分離した。溶離液はA液に0.01% TFA、B液に60%アセトニトリルを用いた。カラムは15% B液で平衡化し、30分でB液を100%に上昇させた。検出は254 nmの吸光度のモニターにより行った。

分取したPTCペプチドは、Edman分解の切断反応から開始するペプチドシーケンサー（PPSQ-21）およびESIマスマスペクトロメーター（LC-Q）により構造解析を行った。

結果

Fig. 1に大豆ペプチド摂取前および摂取後30分のラット門脈血のPTC誘導体の逆相HPLCパターンを示す。SEC画分39～40分の溶出画分には大豆ペプチド摂取後のみに見られるペプチドピークが認められた（a～c）。これらのピークをペプチドシーケンサーで解析したところFig. 2～4に示す様にa, b, cはそれぞれAla-Trp, Tyr-Lys, X-Lysのシグナルが得られた。一方、ESIマスでは多くのピークが生じた（データはのせず）。

考察

従来分離が困難であった血中に移行した食餌由来の大豆ペプチドを大きな妨害の影響を受けずに、その一部を分離することに成功した。

予備実験により合成ペプチドとラットの血清を混合し、ペプチドの分解を調べたところ、数分間でかなりのペプチドが分解することを見だした。そのため、

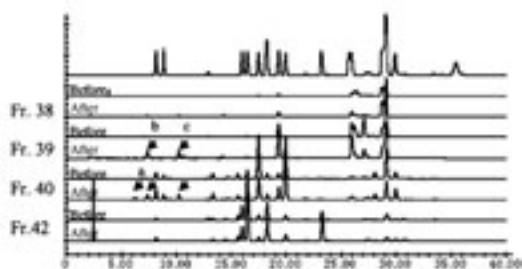


Fig. 1. Reversed-phase (RP) high performance liquid chromatographic (HPLC) patterns of phenylthiocarbamyl (PTC)-derivatives of the fractions obtained by size-exclusion chromatography (SEC). SEC-fractions (Fr.) were collected every 1 min from 37-42 min. Peaks indicated with arrows and a-c occurred by the RP-HPLC of the Fr. 39 and 40 after the ingestion of soy protein hydrolysate.

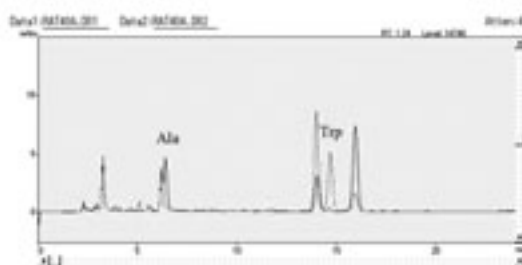


Fig. 2. RP-HPLC patterns of Edman degradation products of the peak a in the Fr. 40. First cycle yielded signal corresponding to Ala with slightly faster retention time. Second cycle yielded Trp. No significant signal was observed following cycles. These data suggest presence of sequence of Ala-Trp or unidentified amino acid-Trp.

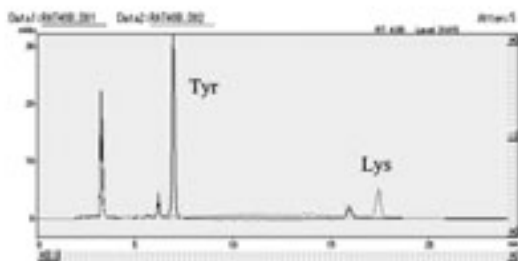


Fig. 3. RP-HPLC patterns of Edman degradation products of the peak b in the Fr. 40. First and second cycles yielded Tyr and Lys and no significant signal was observed in the following cycles, suggesting the presence of Tyr-Lys.

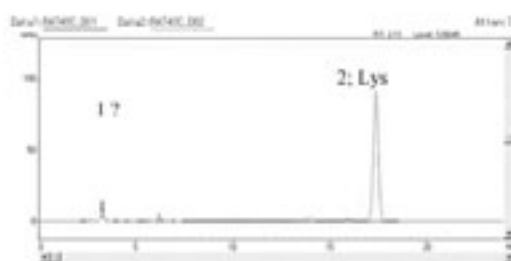


Fig. 4. RP-HPLC patterns of Edman degradation products of the peak c in the Fr. 40. No significant signal was observed in first cycle. Second cycle yielded Lys.

従来行われていた血清や血漿を調製している間に血中に移行したペプチドが分解を受ける可能性が存在する。そのため、全血を採取後、直ちに血中のペプチダーゼ活性を失活させるため、TCA溶液を加えた。TCAは不揮発性であるため、乾燥によって除去できない。そのため、TCA溶液中のペプチドをH⁺型の強カチオン交換樹脂を用いたスピнкаラムでキャプチャーし、50%メタノールで洗浄後、7.5 Mアンモニア-50%メタノール溶液で溶出することで有効な清澄化が可能となった。そのため、1 mL以上の血液由来のサンプルをSECカラムで分画が可能となった。さらにSEC画分中のペプチドをPITCと反応させPTCペプチドとすることで短鎖のペプチドの疎水性を増し、また紫外線吸収

をますことができ、逆相HPLCによる分離・検出が非常に改善した³⁾。本法により、ラット門脈中に、大豆ペプチド由来と考えられるピークが検出され、自動Edman分解によりAla-Trp, Tyr-Lys, X-Lysと考えられるシグナルを生じた。しかし、修飾アミノ酸がこれらのアミノ酸の一に溶出した可能性もある。そのため確認のためPTCペプチド画分をESIで解析したところ多くの共通ピークが認められ、シーケンサーの結果を支持できなかった。アミノ基のないPTCペプチドのESIでの最適化が必要であると考えた。

分離されたペプチドピークの構造解析を現在さらに進行中である。

要 約

工業的に製造された大豆分離たん白質の酵素分解物の10%水溶液をラットの胃内に投与した (1 mL/kg体重)。門脈から血液を投与前および投与後30分に採取した。血液にTCAを最終濃度で5%になるように加え、除たん白質処理を行った。上清中のペプチドはスピнкаラムに充填した強カチオン交換樹脂に吸着させ、7.5 Mのアンモニア-50%メタノール溶液で溶出した。清澄化したペプチド画分はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で分画後、フェニルイソチオシアネートにより誘導化し、誘導物を逆相HPLCにより分離した。SEC画分 (18~20 mL) に大豆ペプチド摂取後のみ特異的に認められるピークが少なくとも3種類存在した。これらのピークは食事由来大豆ペプチドであると考えられる。

文 献

- 1) Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y and Ohtsuki K (2005): Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem*, **53**, 6531-6536.
- 2) Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K and Sato K (2007): Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem*, **55**, 1532-1535.

- 3) Aito-Inoue M, Ohtsuki K, Nakamura Y, Park EY, Iwai K, Morimatsu F and Sato K (2006): Improvement in isolation and identification of food-derived peptides in human plasma based on precolumn derivatization of peptides with phenyl isothiocyanate. *J Agric Food Chem*, **54**, 5261-5266.