

高純度大豆たん白質の食品生理機能

裏出令子^{*1}・河野光登²

¹京都大学大学院農学研究科

²不二製油株式会社フードサイエンス研究所

Physiological Function of Highly Purified Soy Proteins

Reiko URADE^{*1} and Mitsutaka KOHNO²

¹Laboratory of Food Design and Development, Division of Agronomy and Horticultural Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 611-0011,

²Food Science Institute, Fuji Oil Co., LTD., Osaka 598-8540

ABSTRACT

We developed a method to prepare highly purified soybean glycinin (11S). Both polar lipids and lipophilic proteins, which are major impurities in crude 11S prepared by conventional methods, were removed by the novel method. We then tested the effect of the highly purified 11S on the serum cholesterol level in Wistar rats. Male 6-week-old rats were fed an ad libitum diet containing 22% casein, crude 11S, or highly purified 11S as a protein source for 14 days. Food intake and body weight gain were almost the same among the rats, despite their diets. Relative liver weight was significantly lower in rats fed crude 11S and highly purified 11S than in the casein group. The concentrations of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in the rats' serum were also significantly lower in the crude 11S and highly purified 11S groups than in the casein group. The serum cholesterol lowering effect depends upon the dietary level of 11S. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 7-11, 2011.

Key words : glycinin, serum cholesterol, low density lipoprotein, rat

分離大豆たん白質（SPI）が血清コレステロールおよびトリアシルグリセロール（TG）レベルを低下させる作用があることが明らかとなり、1999年のFDA勧告を支えるものとなっている。コレステロール低下作用は、SPIを構成する主要たん白質の一つであるグ

リシニン（11S）にあるとされてきた。しかし、11Sのコレステロール低下作用に疑問を持つ報告もある¹⁾。従来、SPIは11Sとβ-コングリシニン（7S）の2種類の主要たん白質で構成されているとされてきた。しかし、最近不二製油のグループにより2種類ではなく11S、7S、lipophilic proteins（LP）の3種類であることが明らかにされた²⁾。従来のSPI分別法では、LPは11S

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

および7S画分に混入することが明らかにされている。その上、LPに血清コレステロールを低下させる作用が示された³⁾。したがって、LPを完全に除いた11Sあるいは7SおよびLPに関して改めてそれらの生理機能性を検証する必要がある。7Sに関しては、血清TGレベルおよび内臓脂肪の適正化効果があることが大規模ヒト介入試験で明らかとなり⁴⁾、「特定保健用食品」となっている。しかし、高純度7Sの作用機構は不明であった。本研究では、以上の3課題の研究を行い、得られる成果を検討することにより、大豆たん白質を構成する個々のたん白質の食品生理機能を明瞭なものとするを目指している。平成21年度は高純度7Sの作用機構に関する研究を行い、7S由来のペプチドが肝臓実質細胞内のTGおよびコレステロールのレベルを低下させることで肝臓からのVLDLの分泌量を低下させるとともに、肝臓実質細胞内での脂肪酸の β 酸化の促進および末梢でのVLDLのTGの分解抑制に関わる遺伝子の発現を変化させることを明らかにし、これらの作用により血清TGレベルを適正化する可能性を示した⁵⁾。平成22年度は、高純度11Sの血清コレステロール低下作用を検証した。

方 法

粗11Sと純化11Sの調製

脱脂大豆粉末に8倍容量の水を加えたたん白質を抽出した。高純度11Sの場合はLPを不溶化させて除くため加熱処理した脱脂大豆粉末から抽出した。粗11Sの場合は $3,000 \times g$ で、高純度11Sの場合は $8,000 \times g$ で10分間遠心し、上清を採取した。また、粗11Sの場合はこの抽出操作を2回行い、抽出液を合わせて次の操作に供した。抽出液に亜硫酸ナトリウムを最終濃度が 1 mmol/L になるように添加し、粗11SではpH 6.4に調整して冷沈させ、高純度11SではpH 5.8に調整して11Sを沈殿させた。懸濁液を中和後、沈殿を集め、殺菌、凍結乾燥を行い粗11S標品とした。高純度11S標品は、沈殿させた11Sをさらに水に懸濁後、硫酸ナトリウムを最終濃度が 1 mol/L になるように加えて溶解させたのち、pH 4.5に調整することにより不純物たん白質を不溶化させ除いた。この上清に50倍容量の水を加えて塩濃度を下げることにより、11Sを沈殿させ、中和、殺菌、凍結乾燥処理を行い純化11S標品とした (Fig. 1)。

脂質の抽出と分析

標品5 gからBligh & Dyer法⁶⁾により総脂質を抽出した。抽出した脂質を二重展開法の薄層クロマトグラフィーにより分離した。一回目の展開溶媒としてクロ

ロホルム (100) : アセトン (100) : メタノール (50) : 純水 (10) : 酢酸 (4) 混液を、二回目の展開溶媒としてクロロホルム (180) : メタノール (150) : 純水 (10) : 酢酸 (30) 混液を用いた。展開後、ヨウ素で脂質を発色させた。

SDS-PAGE

SPI, 粗11Sおよび純化11S標品をSDS化し、 $20 \mu\text{g}$ 分をSDS-PAGEに供した⁷⁾。ゲル上のたん白質はクマシーブリリアントブルーで染色した。

動物実験

5週齢の雄Wistarラットを一週間カゼイン食を与えて個別ケージで飼育することにより馴化したのち、2週間試験食を自由摂食させた。試験期間中、摂餌量および体重を毎日測定した。試験期間終了後直ちに6時間絶食させた後、ネブタール麻酔下でヘパリン処理した注射器で腹部大動脈から採血し、 4°C 、3,000回転で10分間遠心処理し血漿を採取した。血漿中の総コレステロール (T-CHO)、LDLコレステロール (LDL-CHO)、HDLコレステロール (HDL-CHO) は、定法により測定した。放血致死させた後、臓器を摘出し重量を測定した。

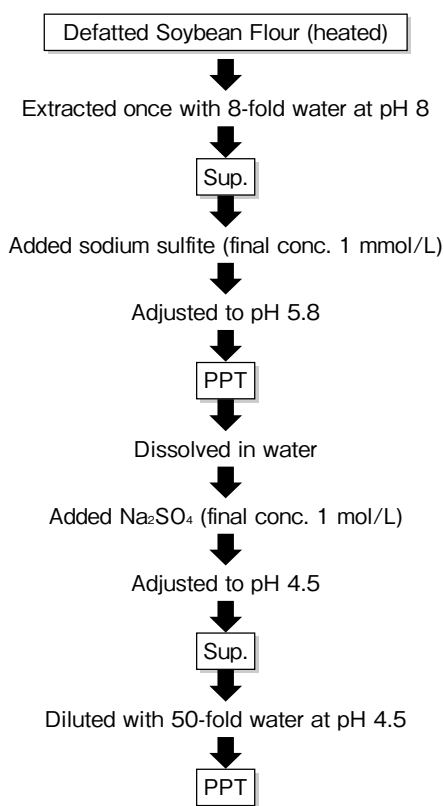


Fig. 1. Procedure to create highly purified 11S.

結果と考察

高純度11Sの調製

従来法⁸⁾により調製した粗11S標品にはLPおよびLPに結合した脂質が混入している。11Sそのものの機能性を明らかにするために、大量の純化11Sを調製する方法を開発した (Fig. 1)。等量のたん白質を供した SDS-PAGEにおいて、粗11Sに比して新法で調製した純化11Sの酸性および塩基性サブユニットのバンドは濃く、純度が高いことが示された (Fig. 2A)。また、純化11Sでは脂質がほとんど除去されておりLPが除かれていることが示された (Fig. 2B)。

11S摂取の血清コレステロール値への影響

11Sの血清コレステロール値への影響の有無を明らかにするために、ラットに純度の異なる11Sを含有する食餌 (Table 1) を2週間与えた。食餌中のたん白質含量は22.5 wt%とし、コントロール実験のたん白質はカゼイン100%とした。

実験1では、試験食のたん白質をすべて粗11Sあるいは純化11Sとして与えた (Table 1)。試験期間中の摂

餌量 (Fig. 3) および体重の変化 (Fig. 4) はカゼイン食と差がなかった。摂餌期間終了後、臓器を採取し臓器重量への食餌の影響を検討した。検討した各臓器のうち肝臓の重量のみが粗11S食と純化11S食で有意に減少した (Fig. 5)。血清中の総コレステロール値およびLDLコレステロール値はカゼイン食に比して粗11S食と純化11S食で有意に減少し、純化11Sでより強い減少効果がみられた (Table 2)。

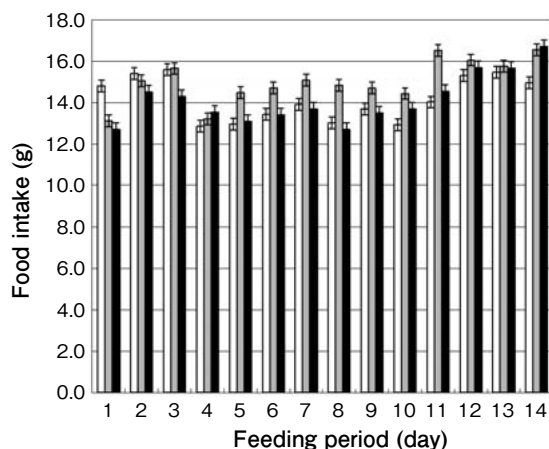


Fig. 3. Effects of casein diet (white bar), crude 11S diet (gray bar), or highly purified 11S (pure 11S) diet (black bar) on food intake in Experiment 1. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of seven experiments.

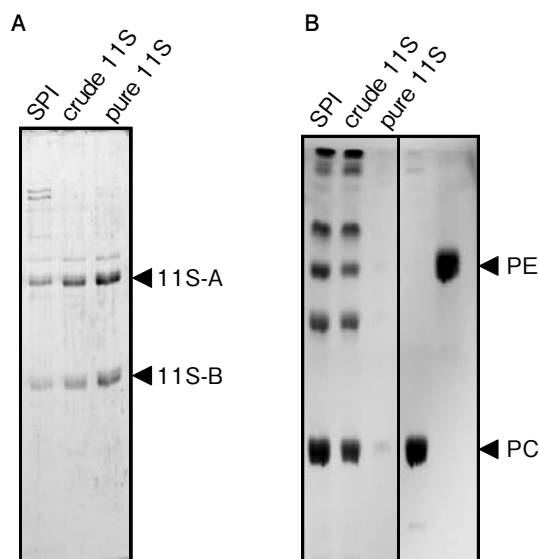


Fig. 2. Purity of 11S preparation. A: soy protein isolate (SPI), crude 11S, or highly purified 11S (20 μ g) were subjected to SDS-PAGE. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. B: The extracted lipids from 25 mg of soy protein isolate, crude 11S, or highly purified 11S were separated by thin-layer chromatography. Lipids were developed with I_2 .

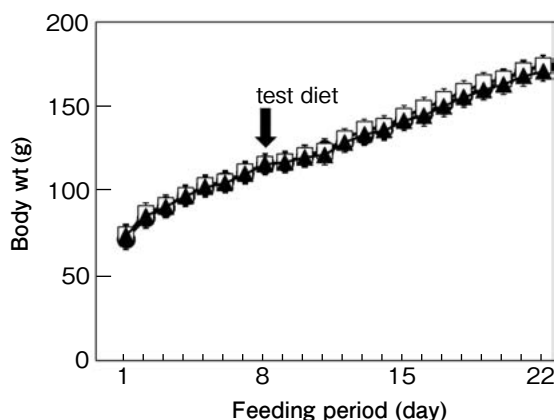


Fig. 4. Effects of casein diet (black circle), crude 11S diet (white square), or highly purified 11S (pure 11S) diet (black triangle) on body weight in Experiment 1. Values represent the mean $\pm$ standard deviation of seven experiments.

実験2では試験食のたん白質としてカゼインと粗11Sあるいは純化11Sの1:1の混合物を用いた。摂餌期間中の摂餌量および体重増加はコントロール食群と試験食群で差がなかった。肝臓の重量はカゼイン食に比して粗11S食および純化11S摂取により有意に減少した。しかし、血清中の総コレステロール値、LDLコレステロール値はカゼイン食に比して有意な差はなかった (Table 2)。

以上の結果から、摂取する正味の11S量が多くなると血清コレステロール低下作用が増加することが明らかとなり、11Sに血清コレステロール低下作用がある

Table 1. Composition of experimental diets

Component	Diet				
	Control	Experiment 1		Experiment 2	
		Crude 11S	Pure 11S	Crude 11S	Pure 11S
Casein	22.5	0	0	11.25	11.25
Crude 11S	0	22.5	0	11.25	0
Pure 11S	0	0	22.5	0	11.25
Sucrose	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
mineral mixture*	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
vitamin mixture*	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cholic acid sodium salt	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Corn starch	42.175	42.175	42.175	42.175	42.175
Total (wt %)	100	100	100	100	100

*AIN-76

Table 2. Effects of dietary 11S on serum cholesterol level (mg/dL)

Experiment 1 (n=7)			
Diet	T-CHO	LDL-C	HDL-C
Casein	134.3	31.4	30.2
Crude 11S	118.1*	34.1	21.9*
Pure 11S	103.6*	23.7*	25.6*
Experiment 2 (n=9)			
Diet	T-CHO	LDL-C	HDL-C
Casein	137.3	32.1	30.2
Crude 11S	122.7	32.7	23.3
Pure 11S	131.2	35.2	24.2

* $p<0.05$

ことが示唆された。過去の研究で、11Sの血清コレステロール低下作用はプロテアーゼ消化後に残る高分子量ポリペプチド (HMF) による腸管からのステロール排出作用によることが示唆された⁹⁾。しかし、メタノール洗浄したHMFには、コレステロール低下作用がないことも報告された¹⁰⁾。その理由として、HMFに結合していたイソフラボンが有望視されたが、その後イソフラボン説は否定的となっている。メタノール処理はHMFの構造をアンフォールドさせると考えられるため、メタノール処理によりHMFが消化管で完全に消化されるようになり胆汁酸排出作用を失った可能性が考えられる。本研究においても、摂取する11Sの量が多くなるほど血清コレステロール低下作用が強くなることが示されたことから、11Sの作用は生理的な作用ではなく物理化学的な作用であり、構造を維持した11Sを大量に摂取すれば血清コレステロール低下作用がでることが示唆された。

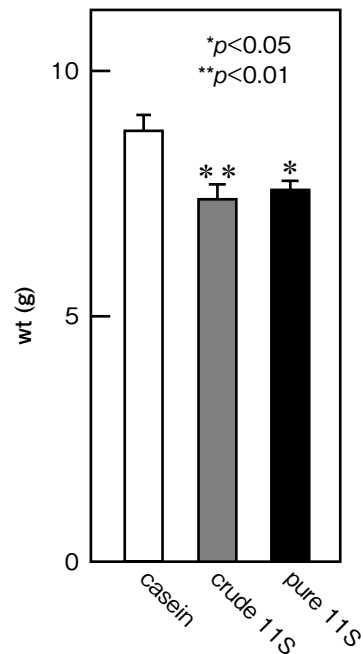


Fig. 5. Effects of casein diet (white bar), crude 11S diet (gray bar), or highly purified 11S (pure 11S) diet (black bar) on liver weight in Experiment 1. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of seven experiments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ compared to casein group.

要 約

LPや脂質を含まない高純度11Sを大量に調製する方法を開発した。本法により調製した高純度11Sを用いて、血清コレステロール低下作用を検証した。6週齢の雄Wistarラットに2週間22 wt%のカゼイン、粗11Sあるいは純化11Sを含む食餌を自由摂食させた。摂餌量、体重増加には食餌間で差がなかった。一方、肝重量、血清総コレステロールレベルおよびLDLコレステロールレベルは、カゼイン食グループに比して粗11S食および純化11S食グループで有意に低かった。食餌の血清コレステロールレベル低下作用は正味の11S摂食量に依存していた。このことから、11Sには血清コレステロール低下作用のあることが示唆された。

文 献

- 1) Blair RM, Appt SE, Bennetau-Pelissero C, Clarkson TB, Anthony MS, Lamothe V and Potter SM (2002): Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in Golden Syrian F1B hybrid hamsters. *J Nutr*, **132**, 3585-3591.
- 2) Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, Kugitani H, Kohno M, Hirotsuka M and Kito M (2007): Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chem*, **102**, 317-322.
- 3) Kanamoto R, Kimura S and Okamura G (2007): Cholesterol lowering effect of soybean lipophilic proteins associated with phospholipids in rat. *Soy Protein Res*, **10**, 83-87.
- 4) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.
- 5) Mochizuki Y, Maebuchi M, Kohno M, Hirotsuka M, Moriyama T, Kawada T and Urade R (2009): Soybean β -conglycinin-derived peptides elicit in lipid metabolism in HepG2 cells. *J Agric Food Chem*, **57**, 1473-1480.
- 6) Bligh EG and Dyer WJA (1959): Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, **37**, 911-917.
- 7) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 8) Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, Kohyama K and Nishinari K (1992): Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybean. *J Agric Food Chem*, **40**, 941-944.
- 9) 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.
- 10) 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.