

高純度大豆たん白質の食品生理機能（第三報）

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 (Part III)

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

Soy protein isolate is known to have several beneficial effects on human health, such as lowering the cholesterol and triacylglycerol levels in the serum. Soy protein isolate is composed of the major seed storage proteins glycinin and β -conglycinin, and lipophilic proteins (LP), to which a large amount of phospholipids is adsorbed. In this study, the effects of untreated LP and delipidated LP (DLP) on serum cholesterol and triacylglycerol levels were determined. Young male Wistar rats (6-week-old) were fed high cholesterol diets containing 22.5% casein (casein diet), 11.25% casein and 11.25% LP (LP diet), or 11.25% casein and 11.25% DLP (DLP diet) for 14 days. The serum triacylglycerol and cholesterol levels were significantly lower in the DLP diet group than in the casein diet group, but not in the LP diet group. The fecal excretion of triacylglycerol or cholesterol was significantly higher in the DLP diet group than in the casein diet and/or LP diet groups. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 1-5, 2012.

Key words : lipophilic proteins, phospholipids, serum triacylglycerol, serum cholesterol, 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）値を低下あるいは適正化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、不二製油のグループにより2種類ではな

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

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, 弱いながらも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値および内臓脂肪量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ことを目指した。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値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値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, 未変性の11Sに弱い血清コレステロール低下作用があることを明らかにした。平成23年度はLPの効果を検討した。なお, LPには大量のホスファチジルコリンをはじめとするリン脂質が結合している。本研究では, LPそのものの効果を検証するため, リン脂質を除いたLPの効果も検証することとした。

方 法

LPおよびリン脂質除去LP (DLP) の調製

脱脂大豆粉末に5倍容量の水を加えpHを8.0に調整し, たん白質を1時間室温で抽出した。3,000×gで10分間遠心し, 上清を採取した。この抽出操作を2回行い, 抽出液を合わせ, 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, pH5.8に調整して11Sを沈殿させた。懸濁液を中和後, 3,000×gで10分間遠心し上清を採取した。pHを5.0に調整し55℃で15分間インキュベーション後, pHを5.5に調整し3,000×gで10分間遠心し沈殿を集めた。沈殿を凍結乾燥しLP標品とした (Fig. 1)。

LP標品をリン脂質分解酵素で処理し結合リン脂質を分解した。市販のリン脂質分解酵素 (三菱化学フーズ株式会社製) をカラムクロマトグラフィーで精製して用いた。処理後, LPを遠心分離処理により集め,

水に再懸濁後遠心分離処理により沈殿させる操作を3回繰り返し洗浄した。洗浄したLPを水に懸濁し, 中和, 殺菌 (140℃, 7秒), 凍結乾燥, 粉碎を行いリン脂質除去LP標品 (DLP) とした。

脂質の抽出と分析

標品 (LPあるいはDLP) 0.5 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。

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後, 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。摂餌開始後12, 13, 14日目に排泄された糞を個別に集めた。試験期間終了後直ちに6時間絶食させた後, ネンプタ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℃, 3,000回転で10分間遠心処理し血漿を採取した。血漿中のTG, 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,

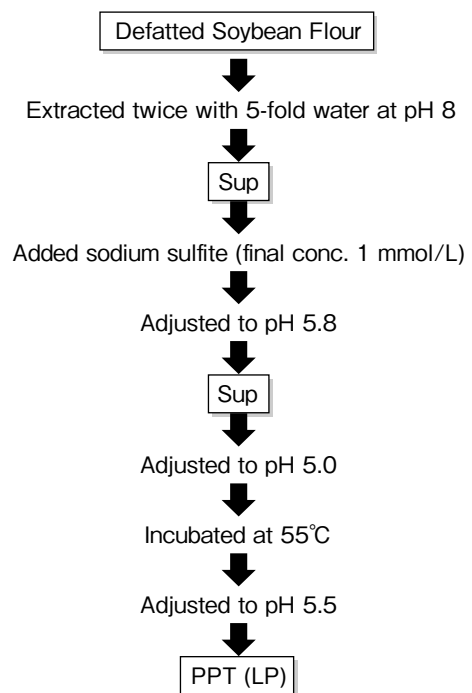


Fig. 1. Procedure to create LP.

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。糞中の総脂質をBligh & Dyer法により抽出し、TG、コレステロール、胆汁酸量を定法により測定した。

結果と考察

DLPの調製

調製したLP標品にはリン脂質をはじめとする極性脂質が強く結合している。LPそのものの血清コレステロール値およびTG値に対する影響を明らかにするために、リン脂質分解酵素を用いてたん白質を変性させることなくリン脂質を除去する方法を開発した。本法によりLPに含まれていたリン脂質はほとんどすべてが分解されて除かれた (Fig. 2)。アミノ酸組成の変化もなかったことから、たん白質組成に変化はなかったと考えられる。

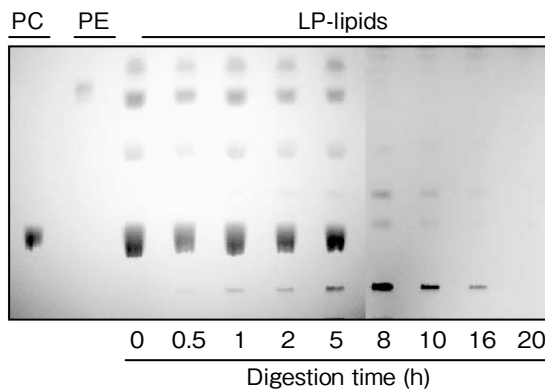


Fig. 2. Degradation of phospholipid adsorbed to LP by the phospholipid degradation enzyme. Suspension of LP was incubated for the indicated time in the presence of the phospholipid degradation enzyme. The extracted lipids from 25 mg of LP were separated by thin-layer chromatography. Lipids were developed with I_2 .

LPおよびDLP摂取の血清コレステロール値およびTG値への影響

LPおよびDLP摂取の血清コレステロール値およびTG値への影響を明らかにするために、ラットに全たん白質のうち50%がLP (LP食) あるいはDLP (DLP食) であり残りの50%がカゼインである試験食 (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。

試験期間中の摂餌量および体重の変化は食餌間で有意差がなかった (Figs. 3 and 4)。摂餌終了後、肝臓の重量はコントロール食と比してLP食とDLP食で有意に減少した (Fig. 5)。血清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DLP食で減少したが、LPでは減少する傾向はみられたが有意な低下はなかった (Table 2)。さらに、血清TG値がDLP食摂取によりカゼイン食の約50%に低下した。

Table 1. Composition of experimental diets

Component	Diet		
	Casein	LP	DLP
Casein	22.5	11.25	11.25
LP	0	11.25	0
DLP	0	0	11.25
Sucrose	20.0	20.0	20.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
AIN-76 vitamin mixture	1.0	1.0	1.0
AIN-76 mineral mixture	3.5	3.5	3.5
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5
Cholic acid sodium salt	0.125	0.125	0.125
Corn starch	42.175	42.175	42.175
Total (wt %)	100	100	100

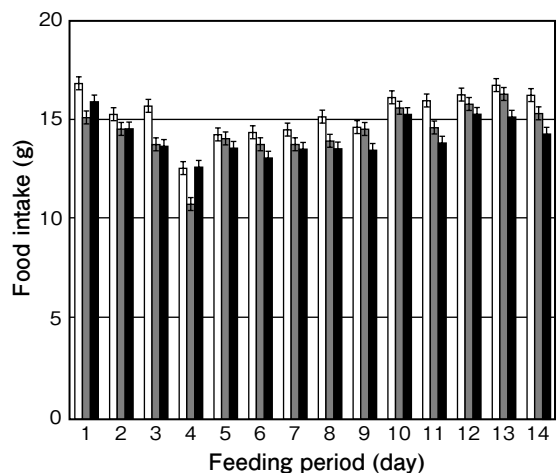


Fig. 3. Effects of casein diet (white bar), LP (gray bar), or DLP diet (black bar) on food intake during the experiment. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of nine experiments.

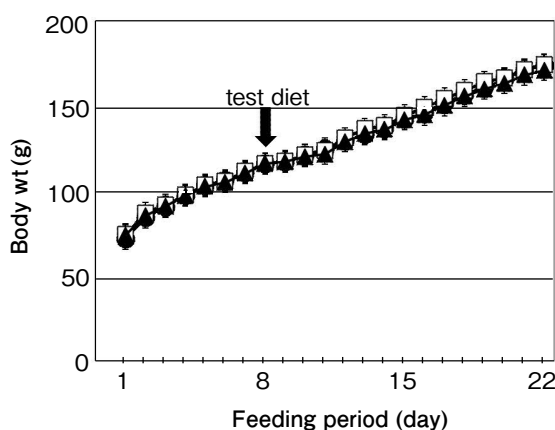


Fig. 4. Effects of casein diet (black circle), LP diet (white square), or DLP diet (black triangle) on body weight.

Table 2. Effects of dietary LP or DLP on serum cholesterol and TG levels

Diet	T-CHO (mg/100mL)	LDL-C (mg/100mL)	HDL-C (mg/100mL)	TG (mg/100mL)
Casein	145.6±19.6	36.4±8.6	30.4±5.2	98.8±29.0
LP	139.8±17.8	42.7±7.6	23.7±3.1*	78.9±39.4
DLP	106.2±11.6*	29.6±5.4*	22.1±2.1*	48.3±13.8*

Values are expressed as mean ± SD (n=9).

*, $p<0.01$ compared to casein group.

DLP食摂取により、糞中へのTG排出量が1.5倍に増加した (Table 3)。また、コレステロールと総胆汁酸の排出量も増加する傾向がみられた。一方、LP食摂取ではカゼイン食と比較してTG、コレステロール、総胆汁酸の排出量に有意な差はなかった。

以上の結果から、DLPは摂食したコレステロールの糞中への排泄量を増加させることにより、血清コレステロール値を低下させる作用があることが示唆された。LPは生体膜脂質であるリン脂質を10%以上含有しており、疎水性相互作用で強く結合している。このようなLPの特性から、LPはダイズ種子細胞のたん白質貯蔵液胞やオイルボディーなどのオルガネラを構成している膜たん白質が主成分であると考えられる。したがって、LPはリン脂質の脂肪酸側鎖が結合する疎水性領域を持つたん白質であるが、その疎水性領域が両親媒性のリン脂質によって覆われて水溶性になっているため水抽出操作により11Sや7Sと一緒に抽出されることが考えられている²⁾。リン脂質を除いたDLPでは疎水性領域が剥きだしになっており、食餌由来のコレステロールや腸管内に分泌された胆汁酸が疎水性相互作用

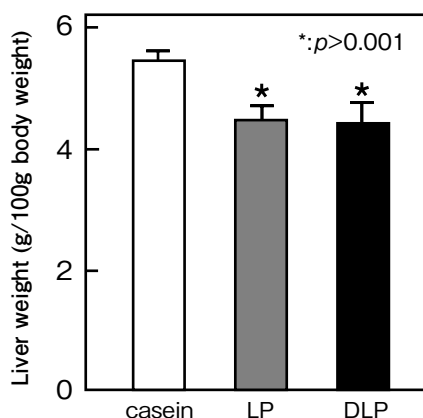


Fig. 5. Effects of casein diet (white bar), LP diet (gray bar), or DLP diet (black bar) on liver weight in the experiment. Bars represent the mean ± standard deviation of nine experiments. *, $p<0.01$ compared to casein group.

Table 3. Effects of LP and DLP on Fecal Cholesterol, Bile Acids and TG

	Casein	LP	DLP
cholesterol (mg/g dry feces)	11.02±2.14	10.42±1.00	11.96±1.17**
bile acids (μmol/g dry feces)	1.72±1.17	1.85±0.85	2.22±0.81
TG (mg/g dry feces)	1.22±0.16	1.40±0.37	1.93±0.79 ^{a*,b***}

Values are expressed as mean ± SD (n=9).

^aSignificantly different from LP group (*, $p\leq 0.05$; **, $p\leq 0.01$).

^bSignificantly different from casein group (***, $p\leq 0.001$).

で吸着し、未消化のLPと一緒に糞中に排泄されると考えられる。そのため、体内に取り込まれるコレステロールおよび再吸収される胆汁酸が減少し、血清TG値およびコレステロール値が低下したと推定される。一方、リン脂質で疎水性領域が覆われたLPにはTGや胆汁酸がほとんど結合しないため、排泄が促進されず、血清コレステロール値への影響もほとんど見られないと考えられる。DLPの作用は11Sの血清コレステロール低下作用と同様、生理的な機作によるものではなく物理化学的な作用機作によると考えられるが、11Sよりもその効果は高い。なお、TGの排泄量はDLP食摂取でも摂取量の1%以下であるため排泄促進により血清TGレベルが低下したとは考えにくい。作用機作は不明であるが、DLPには血清TG値低下作用も期待できることが明らかとなった。

要 約

LPを変性させずにリン脂質を除く方法を開発した。LPおよびリン脂質除去法を用いて調製したDLPの、血清コレステロール値およびTG値低下作用を検証した。6週齢の雄Wisterラットに2週間カゼインのみ、LPあるいはDLP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値およびLDLコレステロール値は、カゼイン食グループに比してDLP食グループで有意に減少した。また、糞中へのTG、コレステロールおよび総胆汁酸の排泄量がDLP食摂取により増加した。以上の結果から、リン脂質ではなくLPそのものに血清コレステロール値およびTG値低下作用があることが明らかとなった。

謝 辞

リン脂質分解酵素を供与頂きました三菱化学フーズ株式会社に、感謝致します。

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.