高グルタミンペプチドの大量生産法

田 辺 創 一^{*,1}, 荒 井 綜 一², 渡 辺 道 子¹

Large-scale Production of a High-glutamine Peptide

Soichi Tanabe,^{*,1} Soichi Arai,² and Michiko Watanabe¹

J Jpn Soc Nutr Food Sci 52: 103-106 (1999)

A practical method was developed for the large-scale production of a high-glutamine peptide mixture. A gluten ball was freeze-dried, pulverized, and passed through a 48-mesh screen to obtain a starting material. A 10-kg portion of this material as a substrate was mixed with 50 L of water containing 100 g of actinase AS, and the mixture was incubated at 40°C at pH 7.0 for 1 h, with the result that about 90% of the substrate was solubilized. The soluble sample was subjected to Sephadex G-15 column chromatography to obtain an oligopeptide fraction with a Glx content of 50.6%. This was then treated with a membrane filter to remove microorganisms, giving a final product for enteral nutrition use.

Key Words glutamine, peptide, gluten.

(Received October 12, 1998; Accepted November 30, 1998)

ヒトの血中遊離アミノ酸の中で最も濃度の高いグルタミンは、従来の栄養学では非必須アミノ酸とされており、その働きとしては、アンモニアの輸送、貯蔵、解毒などが指摘されていたにすぎない¹⁾。しかし、近年、グルタミンは生体においてきわめて重要な役割を担っていることが明らかとなり、“conditionally essential amino acid” と呼ばれるようになってきている²⁾。

グルタミンの重要な機能の一つは、グルタミンの取込み・消費臓器である腸管の主要なエネルギー基質としての役割である³⁾。このことは Windmueller *et al.*⁴⁾ によりラット灌流腸管を用いたモデル系で検証された。次いで、手術や外傷などの侵襲時には、小腸粘膜におけるグルタミン代謝が顕著に増加すること、一般的な開腹手術時には腸管でのグルタミンの取込みは約75%増加することが報告された⁵⁾。

グルタミンが腸管の機能維持をはじめ生体にとって重要であることが明らかとなったことから、グルタミン投与の効果について調べられてきている。メトトレキセートなどの抗ガン剤投与によって腸管細胞の障害を起こさせたラットにおける検討では、グルタミン投与群では、

非投与群に比べ、腸管重量やタンパク質およびDNA含量が高いなどの障害軽減効果が見られている⁶⁾⁷⁾。Hammarqvist *et al.*⁸⁾ は、腹部手術後患者における臨床的研究を行い、グルタミンの含まれていない通常の完全経静脈栄養液投与に比べて、グルタミンを添加することで、骨格筋細胞内のグルタミン濃度の低下が抑制され、タンパク質合成能力が維持され、累積窒素平衡が改善されたと報告している。

このようなことから、侵襲時にグルタミンを添加した輸液を臨床応用する試みが考えられてきているが、グルタミンをアミノ酸輸液に添加することは困難である。それは、難溶性である上に、遊離型グルタミンは水溶液中で不安定で、環化してピログルタミン酸に変化するためであるからである。

以上のような背景から、ペプチド型グルタミンの開発に対する社会的要求が高まっている¹⁾。ペプチド型であれば、N末端以外のグルタミンは環化せず、有効に利用される。

筆者らは、グルテンをモルシンおよびアクチナーゼにより水解し、グルタミン含量の高いオリゴペプチド（高

* 連絡・別刷請求先 (Corresponding author)

¹ 東京学芸大学教育学部生活科学科 (184-8501 東京都小金井市貫井北町 4-1-1)
Faculty of Education, Tokyo Gakugei University, Koganei, Tokyo 184-8501, Japan

² 東京農業大学応用生物科学部栄養科学科 (156-0054 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)
Department of Nutrition, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156-0054, Japan

グルタミンペプチド) を作製する方法をすでに報告している⁷⁾。本ペプチドは、低栄養ラットの小腸栄養状態改善能および小腸障害ラットの障害軽減能に優れていた⁷⁾。

本研究では、グルテンから簡易な工程により高グルタミンペプチドを大量生産する方法を開発することを目的とした。

実験方法

1. 材料

小麦粉(150 kg)から常法に従ってグルテンボールを調製し、凍結乾燥して基質とした。アクチナーゼ (AS, 250 Tyr units/mg) を科研製薬(株)より購入した。

2. アクチナーゼ反応

アクチナーゼ 100 g を溶解した水 50 L に基質 10 kg を懸濁した。反応中、1 M NaOH で pH を 7 に合わせ、攪拌しながら、40°C で反応を行った。

3. 可溶化グルテンの定量

酵素反応液の一部に 9 倍量の 4 M 尿素含有 Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) を加え、市販のタンパク定量キット (protein assay kit, BioRad) を用いて全タンパク質を定量した。別に、酵素反応液の一部を 5,000×g, 15 分間遠心分離し、同様に上清中の可溶化タンパク質を定量した。可溶化グルテン量は可溶化タンパク質量と全タンパク質量の比で表した。

4. ゲル濾過

酵素反応液を 5,000×g, 15 分間遠心分離し、その上清 (150 mL) を Sephadex G-15 (Pharmacia Biotech) カラム (20×60 cm) を用いてゲル濾過した。溶出には 10% エタノールを用い、流速は 100 mL/分、検出は 260 nm の吸収とした。排除体積は 5 L であった。

Figure 1 Scanning electron micrograph of the inside of a freeze-dried gluten.

Gluten ball was freeze-dried and then submitted to scanning electron microscopy. An ABT WS-250 scanning electron microscope was used at 200-times magnification. The bar indicates 100 μ m.

5. 膜濾過

ゲル濾過で得られた画分から減圧でエタノールを除去してから孔径 0.25 μ m のポリオレフィン系合成高分子膜 (旭化成, PMP-113) を通し、除菌した。

6. アミノ酸分析

試料 (1 mg) を 6N HCl (1 mL) に溶解し、脱気後、110°C で 24 時間加水分解し、アミノ酸自動分析計 (日立 835 型) により構成アミノ酸を定量した。過ギ酸酸化法⁹⁾によって試料を酸化した後、6N HCl で 110°C, 24 時間水解し、1/2 Cys を分析した。試料を 3N メルカプトエタンスルホン酸で水解し、Trp を分析した¹⁰⁾。アミノ酸組成は重量%で表した。

別に、試料 (5 mg) を 20 mM Tris 緩衝液 (0.5 mL) に溶かし、アクチナーゼ E, アミノペプチダーゼ, カルボキシペプチダーゼ A, カルボキシペプチダーゼ W を用いた一連の酵素反応¹¹⁾で試料を加水分解後、生体成分分析用プログラムで上述のアミノ酸分析計を用いてグルタミンを定量した。

実験結果および考察

グルテンを効果的に酵素水解するためには、グルテンを可溶化することおよび酵素の浸透を促進させることが重要であると考えられる。著者らは、すでに 1% 酢酸条件下でグルテンを懸濁させ、酸性プロテアーゼにより酵素水解することによりグルテンを可溶化した⁷⁾。その後、中性条件下でアクチナーゼを作用させ、高グルタミンペプチドを作製した⁷⁾。本研究では、酵素の浸透を助ける目的で、グルテンボールを凍結乾燥後、粉碎することで、多孔質の基質とすることを試みた。電子顕微鏡観察の結果、凍結乾燥したグルテンボールには空隙が多く認められ (Figure 1), 酵素溶液の浸透が容易になることが予想された。粉碎したグルテンボールをさらに 48 メッシュのふるいにかけ、アクチナーゼ反応を行った。経時的に反応液中の可溶化タンパク量の変化を調べた。その結果、可溶化タンパク量は反応開始 1 時間でほぼプラトーに達し、約 90% の基質が可溶化している (Table 1) ことが明らかとなった。

アクチナーゼを 1 時間作用させた反応物を遠心分離し、その上清を Sephadex G-15 カラムクロマトに供した。クロマトグラムを Figure 2 に示した。アクチナーゼ反応を 24 時間行った場合、アクチナーゼ中のエキソ型ペ

Table 1 Time course solubility of gluten by treatment with actinase.

Time (h)	Soluble protein ratio (%)
0	0
1	89
2	90
4	93
6	100

Figure 2 Gel filtration chromatogram of the actinase-treated gluten.

The sample was loaded on Sephadex G-15 column (20×60 cm). Elution was done with 10% ethanol at a flow rate of 100 ml/min.

プチダーゼの作用により遊離アミノ酸が多く生成した⁷⁾が、ここに示した方法で作製した場合には、主としてエンド型ペプチダーゼが働いた結果、排除体積直後に溶出されるオリゴペプチド画分 (*印) が大部分であった。

既法⁷⁾に従い、オリゴペプチド画分を分取し、減圧下でエタノールを除去して高グルタミンペプチド製品 (8.2 kg) を得た。グルタミンを N 末端に含むペプチドを加熱すると、N 末端グルタミンが環化し難消化性のピログルタミルペプチドが生成する可能性がある⁷⁾ので、ここで作製した高グルタミンペプチドは濾過除菌した。

滅菌製品を凍結乾燥後、アミノ酸組成を分析した (Table 2)。製品中の Glx 含量は 50.6% であり、これは原料グルテンの Glx 含量 (41.8%) の 1.2 倍であった⁷⁾。Glx のほとんどはグルタミンであった (Table 2)。以上より、凍結乾燥したグルテンボールを出発材料として、1 時間の酵素反応およびゲル濾過クロマトにより、高グルタミンペプチドが大量かつ簡便に生産できることが明らかとなった。本法の特徴は、凍結乾燥によって多孔質にしたグルテンを原料として用い、酵素の浸透性を高めることによって一段階の短時間酵素反応を可能にすると同時に収率を高めたことと、酵素反応物のペプチド画分を膜濾過で除菌したことである。製品の溶解性は既報⁷⁾のものと差がなく、アミノ酸組成では本報の製品でプロリン含量が高かった以外は既報⁷⁾のものと大きな差はなかった。今後、経腸栄養剤として高グルタミンペプチドが臨床応用されることが期待される。

要 約

グルテンボールを凍結乾燥後粉碎し、ふるいにかけたところ、多孔質のグルテンが得られた。この基質にアクチナーゼを pH 7, 40℃ で 1 時間作用させたところ、基質の約 90% が可溶化した。反応物を Sephadex G-15 カラムクロマトに供し、Glx 含量が 50.6% の高グルタミンペプチドを得た。このペプチドを濾過除菌することによ

Table 2 Amino acid composition of high-glutamine peptide.

Amino acid	wt%	Amino acid	wt%
Asx ^a	2.9	Leu	4.8
Thr	2.7	Tyr	2.1
Ser	6.0	Phe	3.0
Gln	50.1	Lys	0.7
Glu	0.5	His	1.5
Gly	2.8	Arg	1.8
Ala	1.7	Pro	11.0
Val	2.8	1/2Cys	1.4
Met	1.0	Trp	0.2
Ile	3.0		

^aAsp and Asn.

り、安定なグルタミン供給源として臨床応用されることが期待された。

文 献

- 1) 吉村一克, 望月英隆 (1994) グルタミン輸液. 医学のあゆみ **168**, 511-4.
- 2) Lacey JM, Wilmore DW (1990) Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* **48**: 297-309.
- 3) Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD (1988) The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery* **104**: 917-23.
- 4) Windmueller HG, Spaeth AE (1974) Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* **49**: 5070-1.
- 5) Souba WW, Wilmore DW (1983) Postoperative alteration of arteriovenous exchange of amino acids across the gastrointestinal tract. *Surgery* **94**: 342-50.
- 6) Fox AD, Kripke SA, Berman JR, Settle RG, Rombeau JL (1987) Reduction of the severity of enterocolitis by glutamine-supplemented enteral diets. *Surg Forum* **38**: 43-4.
- 7) Tanabe S, Watanabe M, Arai S (1993) Production of a high-glutamine oligopeptide fraction from gluten by enzymatic treatment and evaluation of its nutritional effect on the small intestine of rat. *J Food Biochem* **16**: 235-48.
- 8) Hammarqvist F, Wernerman J, Ali R, von der Decken A, Vinnars E (1989) Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg* **209**: 455-61.
- 9) Moore S. (1963) On the determination of cystine as cysteic acid. *J Biol Chem* **238**: 235-7.
- 10) Penke B, Ferenczi R, Kovács K (1974) A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal Biochem* **60**: 45-50.

- 11) Sato K, Tsukamasa Y, Omai C, Ohtsuka K, Shimizu Y, Kawabata M (1992) Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *J Agric Food Chem* **40** : 806-10.

(1998年10月12日受付, 1998年11月30日受理)