血中コレステロール低下作用を持つ大豆たん白質由来低分子ペプチドに関する研究

吉川正明*・山本大地・竹中康之

京都大学食糧科学研究所

Study on a Low Molecular Weight Peptide Derived from Soybean Protein Having Hypocholesterolemic Activity

Masaaki YOSHIKAWA, Taichi YAMAMOTO and Yasuyuki TAKENAKA

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

We measured hypocholesterolemic activity of peptides in mice. During the evaluation of hypocholesterolemic activity of Leu-Pro-Leu-Pro-Arg, a complement C3a agonist peptide, we found that a fragment peptide of soybean glycinin Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg also exhibited hypocholesterolemic activity despite the absence of C3a agonist activity. We noticed that these peptides had structural homology to enterostatin Val-Pro-Asp-Pro-Arg, which is known as an anorexigenic peptide derived from procolipase. Therefore, we examined whether enterostatin had hypocholesterolemic effect. It was active at a dose of 50 mg/kg/day. As well as enterostatin, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg also lowered serum triglyceride after oral administration and suppressed food intake after intracerebroventricular administration in mice fed with high fat diet. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 125-128, 1999.

Key words : soybean, peptide, cholesterol, hypocholesterolemic, enterostatin, food intake, triglyceride

大豆たん白質は血清コレステロール低下作用を有することが知られており，そのメカニズムの一つとして難消化性の高分子ペプチドによる胆汁酸再吸収阻害が提唱されている[1]．一方，低分子ペプチドがコレステロール低下作用を有する可能性も指摘されている．我々は大豆たん白質による胆汁酸再吸収阻害が起こらないと報告されているマウスを用いた微量アッセイ系によって，新しいメカニズムによるコレステロール低下ペプチドの探索を行った．微量アッセイ系とは言え，HPLCで分画した各フラクションのコレステロール低下作用を*in vivo*で直接評価することは出来ない．そこで，何らかの基準で選んだペプチドについて，そのコレステロール低下作用を検討するという方法に従った．

我々は食品たん白質の消化物から回腸収縮および抗オピオイド活性を指標にして単離したペプチドが補体

*〒611-0011　宇治市五ヶ庄官有地

C3a レセプターを介して作用する例をいくつか見出してきたが[2,3]，これらのうちコメアルブミン由来の oryzatensin (Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg) を基にして設計した C3a 低分子アゴニスト Leu-Pro-Leu-Pro-Arg はコレステロール低下作用を有することを新たに見出した．本ペプチドと一残基のみ異なるペプチド Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg は大豆グリシニン A5A4B3 サブユニットに存在する．そこで先ず，そのコレステロール低下作用を検討した．

方　　法

ペプチド

ペプチドは t-Boc 法または Fmoc 法に従って合成したものを用いた．

コレステロール低下作用

Panlab 社のコレステロール低下試験を参考に条件を改変した[4]．ICR マウス（4 週齢，雄）に高コレステロール・高コール酸食（コレステロール 0.6%，コール酸 0.3%，コーン油 3.6%，ココナッツ油 10%，カゼイン 14.4% 含有）を投与し，投与開始後 1 日および 2 日目にペプチドを経口投与，3 日目に心臓採血した．血清総コレステロールおよびヘパリン沈澱性リポたん白質（HPL，LDL + VLDL）コレステロールを酵素法により定量した．なお，Panlab 社のコレステロール低下試験ではサンプルを 6 日および 7 日目にペプチドを経口投与，一夜絶食の後 8 日目に採血となっている．ICR マウスでは高コレステロール・高コール酸食投与後 2 日間で血清コレステロールは著しく上昇するので，我々のアッセイ系では主に初期のコレステロール上昇抑制を見ていることになる．また，我々の系では一夜の絶食は行わず，採血 2 時間前に餌を除去した．

中性脂肪低下作用

ICR マウス（4 週齢，雄）に高脂肪食（コーン油 3.6%，ココナッツ油 20% 含有）を投与し，投与開始後 1 日および 2 日目にペプチドを経口投与，3 日目に心臓採血した．血清中性脂肪を酵素法により定量した．

摂食抑制作用

ddY マウス（4 週齢，雄）に上記同様の高脂肪食を 10 日間投与し，一夜絶食の後，10 μL の生理的食塩水に溶解したペプチドを側脳室内に投与し，30，60 および 120 分後の摂食量を測定した．

結果と考察

コレステロール低下作用

コメアルブミン由来の補体 C3a アゴニストペプチド oryzatensin (Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg) を基にして設計した低分子ペプチド Leu-Pro-Leu-Pro-Arg (LPLPR) はコレステロール低下作用を示した (Fig. 1)．大豆グリシニン中に存在し，本ペプチドにホモロジーを持つペプチド Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg (LPYPR) はさらに強力なコレステロール低下作用を示した (Fig. 1)．本ペプチドは補体 C3a 活性に必要な，疎水性残基－ X_1 － Leu － X_2 － Arg という条件に合致しないことから C3a アゴニスト活性は示さない．このことは Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg のコレステロール低下作用は少なくとも補体 C3a レセプターを介したものではない

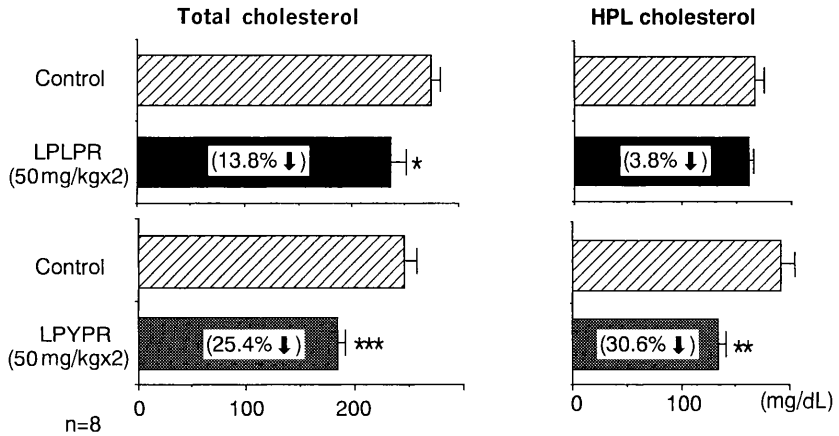

Fig. 1. Effect of LPLPR and LPYPR on total and HPL cholesterol in serum. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

ことを意味している．そこで本ペプチドとホモロジーを有するペプチドとして摂食抑制および中性脂肪低下作用を有することが知られている enterostatin（Val-Pro-Asp-Pro-Arg）に着目した[5]．両者を比較したところ enterostatin そのものもコレステロール低下作用を有することがわかった（Fig. 2）．

中性脂肪低下および摂食抑制作用

Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg は高脂肪食投与マウスに対して enterostatin 同様，中性脂肪低下作用（Fig. 3）および摂食抑制作用（Fig. 4）を示した．なお，enterostatin および Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg の摂食抑制作用は高脂肪食投与マウスでのみ見られるものであり高コレステロール・高コール酸食投与では見られない．したがって，enterostatin および Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg のコレステロール低下作用は摂食抑制の結果によるものではない．

enterostatin および Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg によるコレステロール低下が同一レセプターを介したものか，またどのようなポストレセプター情報伝達機構によるものかについてはさらなる検討を要する．

Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg はトリプシンおよびキモトリプシンの作用により大豆たん白質から派生することを確認しているが，本ペプチドが大豆たん白質のコレステロール低下作用に対して実際どの程度寄与しているかについてもさらなる検討が必要である．

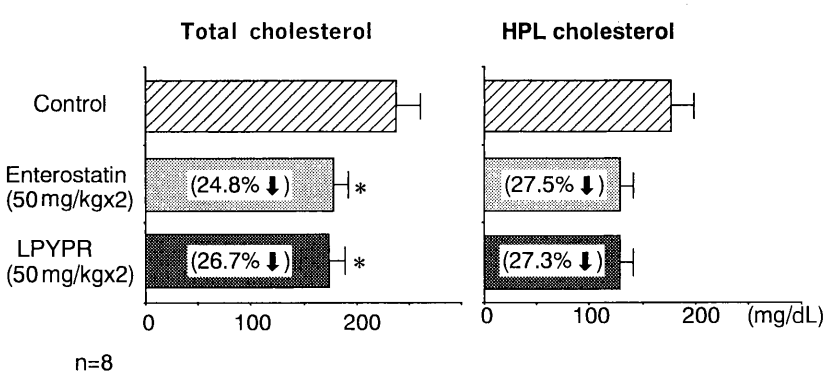

Fig. 2. Effect of enterostatin and LPYPR on total and HPL cholesterol in serum. $^{*}P < 0.05$.

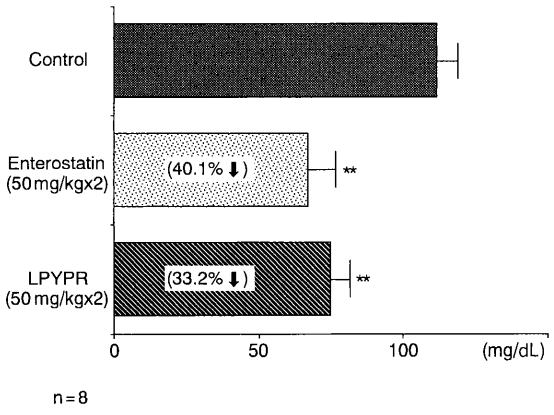

Fig. 3. Effect of enterostatin and LPYPR on triglyceride in serum. $^{**}P < 0.01$.

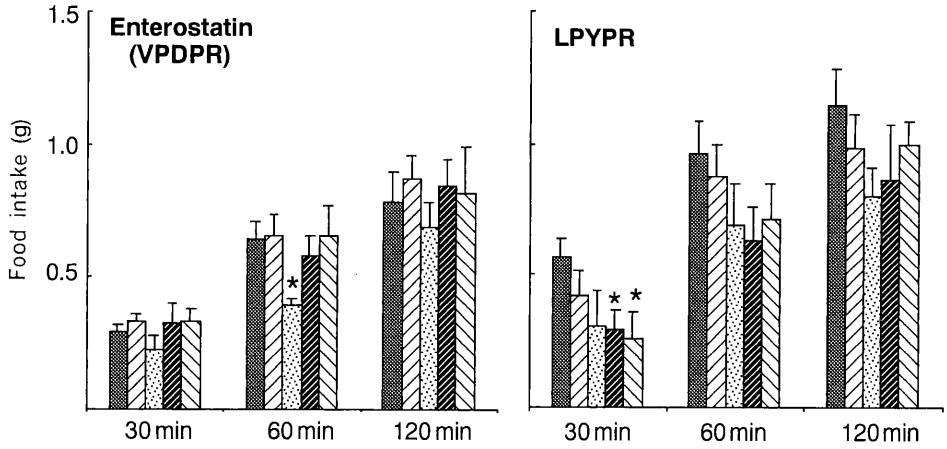

Fig. 4. Effect of enterostatin and LPYPR on food intake. Enterostatin and LPYPR were injected intracerebroventricularly at doses of 0, 0.01, 0.1, 1.0 and 10 nmol/mouse. Mice were fed with a high fat diet for 10 days before the experiment. n = 5 or 6. *$P < 0.05$.

要　　約

マウスを用いた微量アッセイ系でペプチドのコレステロール低下作用を測定した．補体C3aアゴニスト活性を持つLeu-Pro-Leu-Pro-Argのコレステロール低下作用を評価する過程で，大豆グリシニン由来のLeu-Pro-Tyr-Pro-ArgがC3aアゴニスト活性を持たないにも拘わらずコレステロール低下作用を有することを見出した．本ペプチドがprocolipase由来の摂食抑制ペプチドenterostatin（Val-Pro-Asp-Pro-Arg）とホモロジーを有することに着目し検討したところ，enterostatinも経口投与（50 mg/kg，2日）でコレステロール低下作用を示した．また，enterostatin同様，Leu-Pro-Tyr-Pro-Argは中性脂肪低下作用および摂食抑制作用を示した．

文　　献

1) 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.

2) Takahashi M, Moriguchi S, Ikeno M, Kono S, Ohta K, Usui H, Kurahashi K, Sasaki R and Yoshikawa M (1996) : Studies on the ileum-contracting mechanism and identification as a complement C3a receptor agonist of oryzatensin. *Peptides*, **17**, 5-12.

3) Takahashi M, Moriguchi S, Suganuma H, Shiota A, Tani F, Usui H, Kurahashi K, Sasaki R and Yoshikawa M (1997) : Identification of casoxin C, an ileum-contracting peptide derived from bovine κ-casein, as an agonist for C3a receptors. *Peptides*, **18**, 329-336.

4) Panlabs Pharmacology Services (1993) : Current Test Protocols PS48-49, Bothell, WA.

5) Erlanson A C and Larsson A (1988) : The activation peptide of pancreatic procolipase decreases food intake in rats. *Regul Pept*, **22**, 325-331.