

大豆たん白質から派生する低分子ペプチドによる 脂質代謝調節に関する研究

竹中康之・仲村太志・吉川正明*

京都大学食糧科学研究所

Study on Lipid Metabolism Regulation by a Low Molecular Weight Peptide Derived from Soybean Protein

Yasuyuki TAKENAKA, Futoshi NAKAMURA and Masaaki YOSHIKAWA

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

ABSTRACT

Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg, a fragment peptide derived from soybean glycinin A₅A₄B₃ subunit, has structural homology to enterostatin (Val-Pro-Asp-Pro-Arg) which is known as an anorexigenic peptide derived from procolipase. We found that both Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg and enterostatin had hypocholesterolemic and anorexigenic activities. So, we compared the activities of these two peptides in detail. Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg increased excretion of bile acids in feces while enterostatin did not. Furthermore, we found that enterostatin had anti-analgesic and anti-amnesic activities, while Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg did not. Thus, it is suggested that Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg and enterostatin might act by different mechanisms. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 105-109, 2000.

Key words : soybean, enterostatin, hypocholesterolemic, anti-analgesia, anti-amnesia

大豆たん白質は血清コレステロール低下作用を示し、その作用メカニズムの1つとして難消化性の高分子ペプチドによる胆汁酸の再吸収阻害が提唱されている¹⁾。一方、我々は大豆たん白質由来の低分子ペプチドによるコレステロール低下作用を検討する過程でグリシニン A₅A₄B₃ サブユニットから派生するペプチド：Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg (LPYPR) が高コレステロール、高コル酸食投与マウスにおいてコレステロール

上昇抑制作用を示すことを見出している。また、本ペプチドと構造的類似性を持ち、procolipase から派生する内因性の摂食調節ペプチド enterostatin (Val-Pro-Asp-Pro-Arg)²⁾ も同様のコレステロール低下作用を示し、さらに Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg (VPDPR) が enterostatin 様の摂食抑制作用を有することを昨年度報告した³⁾。そこで、本年度は両ペプチドについてその作用を詳細に比較検討した。

*〒 611-0011 宇治市五ヶ庄宮有地

方 法

ペプチド合成

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

コレステロール低下作用

昨年度報告した手順を基に一部条件を改変した。昨年度は ICR マウスを用いたが、今年度は後に述べる抗鎮痛実験等と条件を揃えるため ddy マウス (4 週齢, 雄) をを用いた。また, 各個体の糞分析を行うため個別ケージにて飼育した。高コレステロール, 高コール酸食 (コレステロール 1.0%, コール酸 0.5%, コーン油 5%, ココナツツ油 10%, カゼイン 20% 含有) を投与し, 投与開始日より 1 日 1 回計 3 回ペプチド (100 mg/kg) を投与し, 3 回目の投与の 24 時間後に採血した。血清総コレステロールおよび HPL (LDL+VLDL) コレステロールは市販のキットを用いて酵素法にて測定した。また, 採血前 2 日間の糞を回収し, エタノールを用いて熱抽出を行った後, 酵素法にて胆汁酸およびコレステロール量を測定した。

抗鎮痛作用

ddy マウス (雄, 20~22 g) をを用い, モルヒネ 6 mg/kg の皮下投与後 15 分間隔で tail-pinch 法で測定した。ペプチドはモルヒネ投与 5 分前に脳室内投与した。

抗健忘作用

ddy マウス (雄, 24~26 g) をを用いた。訓練試行 30 分前に scopolamine (0.2 mg/kg) の腹腔内投与によりマウスに健忘を誘発し, ペプチドは訓練試行直後に脳室内投与した。24 時間後に step-through 型装置を用いて学習効果の維持を判定した。

回腸収縮作用

モルモット回腸縦走筋神経叢標本を Krebs-Ringer 液中でマグヌス管に懸垂し, ペプチド投与により惹起される収縮を検出した。

結果と考察

コレステロール上昇抑制作用

Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg 及び enterostatin (Val-Pro-Asp-Pro-Arg) は 100 mg/kg の経口投与で共に有意なコレステロール上昇抑制作用を示した (Fig. 1)。糞中の胆汁酸は enterostatin 投与群では変動が見られなかったのに対して, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg 投与群では統計学的に有意な差ではなかったものの約 30% の上昇が見られた (Fig. 2a)。また, 糞中のコレステロール量は Leu-

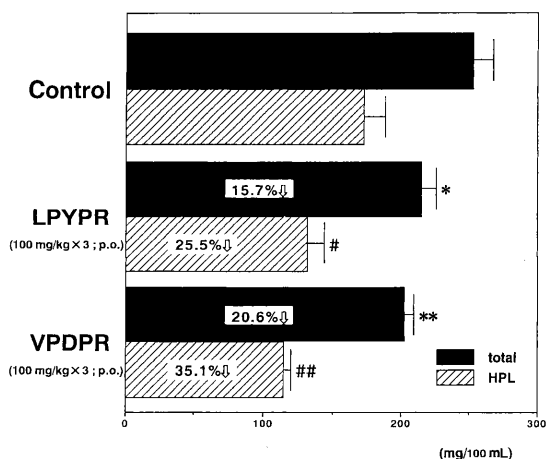
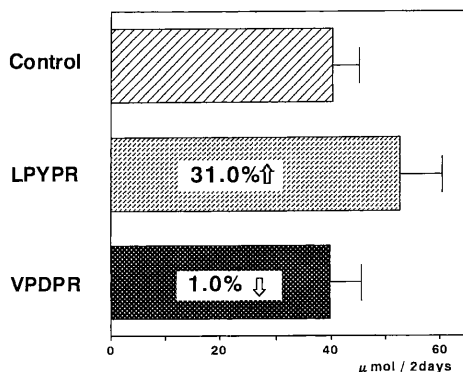


Fig. 1. Effect of LPYPR and VPDPR on total and HPL cholesterol in serum. Statistical analysis was performed by Student's *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, #*P* < 0.05 and ##*P* < 0.01 compared with respective control.

(a) Bile acids



(b) Cholesterol

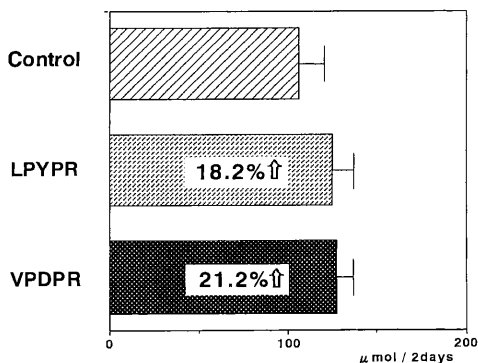


Fig. 2. Effect of LPYPR and VPDPR on excretion of bile acids and cholesterol in feces.

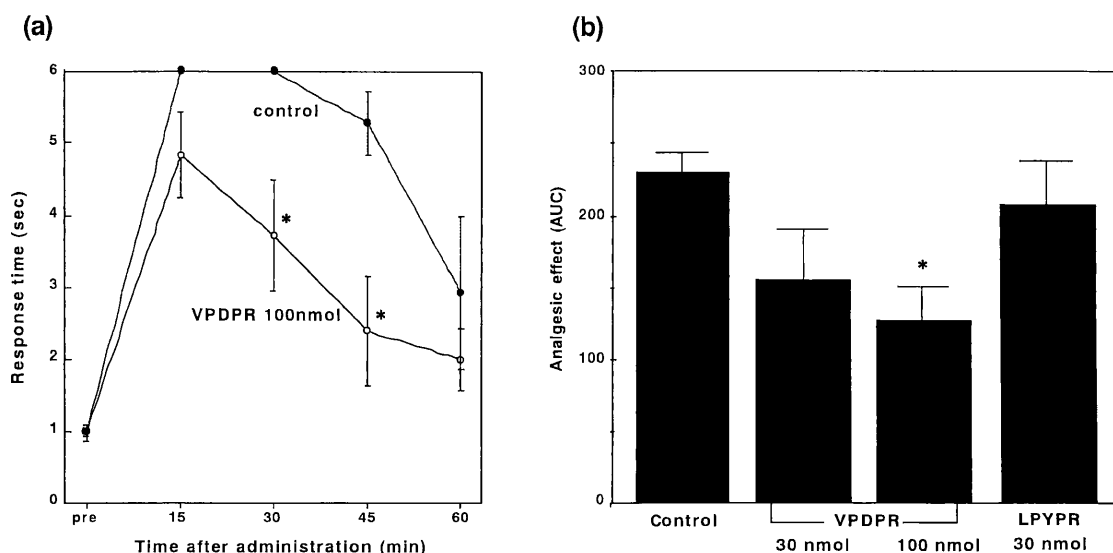


Fig. 3. Antagonistic effect of LPYPR and VPDPR on morphine-induced antinociception. Statistical analysis was performed by Student's *t* test. **P* < 0.05 compared with respective control.

Pro-Tyr-Pro-Arg, enterostatin 投与群共にやや増加する傾向が見られたが統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 2b). なお, 両ペプチド投与による肝臓中のコレステロール量の変動は見られなかった. 以上の結果, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg と enterostatin では, 胆汁酸の排出量に大きな差が見られることから, 異なったメカニズムで作用している可能性が示唆された. enterostatin は腹腔内投与でもコレステロール上昇抑制作用が認められるのに対し, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg では認められない. したがって, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg の作用部位は腸管内であり, enterostatin は腸管から吸収された後に作用していると考えられる. さらに Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg は *in vitro* の系で弱い回腸収縮活性を示すが enterostatin では見られない (data not shown). そこで, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg によるコレステロール上昇抑制の作用機構として, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg が腸管の蠕動運動を促進させることにより腸管内での胆汁酸, コレステロールの透過時間を短縮させ, その吸収量を減少させる結果, 血中コレステロールの上昇を抑制しているという作業仮説を立て検討を行っている. 一方, enterostatin の摂食抑制作用にはセロトニンの関与が示唆されているので⁴⁾, そのコレステロール上昇抑制作用に対するセロトニンの関与について現在検討している. また, enterostatin がインスリン分泌抑制作用を有することが知られているが⁵⁾, インスリン分泌抑制作用と血中コレステロールとの関連も今後検討する予定である.

さらに今後, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg 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にどの程度寄与しているのか, また, 両ペプチドの作用が他の動物種においても有効かどうか更なる検討が必要である.

抗鎮痛作用

μ -opioid である β -casomorphin による摂食促進作用は enterostatin によりブロックされることが報告されている⁶⁾. また, 我々は enterostatin によるコレステロール低下作用が μ -opioid であるモルヒネにより阻害されることを見い出しており, 摂食調節およびコレステロールレベルの調節については enterostatin はオピオイドと拮抗する. そこで, μ -opioid の鎮痛活性に着目し, 抗オピオイドという観点から enterostatin が鎮痛に及ぼす効果について検討した. その結果, enterostatin は 100 nmol の脳室内投与により有意にモルヒネの鎮痛活性を抑制することを見い出した (Fig. 3a, b). 30 nmol 投与でも抑制傾向が見られたが有意なものではなかったため, enterostatin の抗鎮痛活性の最小有効用量は 100 nmol であると推定している (Fig. 3b). 一方, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg の抗鎮痛活性を検討したが, 30 nmol を超える量を脳室内投与するとマウスが死ぬためそれ以上の用量では測定できなかった. 30 nmol では抗鎮痛活性は見られなかったため, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg の活性は少なくとも enterostatin よりも弱いと推測している (Fig. 3b).

抗健忘作用

μ -opioid は学習を阻害する作用を有する. そこで,

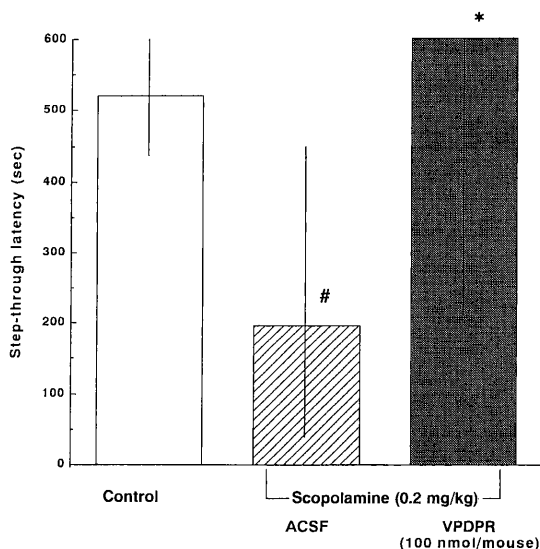


Fig. 4. Effect of VPDPR on scopolamine-induced amnesia. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney's U-test. Statistical difference : # $P < 0.05$ vs control and * $P < 0.05$ vs ACSF. ACSF : artificial cerebrospinal fluid.

抗オピオイド作用を持つ enterostatin の学習に対する効果を検討した。Scopolamine 誘発健忘マウスにおいて

Table 1. Physiological effects of LPYPR and VPDPR

	LPYPR	VPDPR
Serum cholesterol	↓	↓
Liver cholesterol	→	→
Fecal cholesterol	(↑)	(↑)
Fecal bile acids	(↑)	→
Food intake	↓	↓↓
Anti-analgesia	—	+
Anti-amnesia	*	+
Ileum-contraction	+	—

* : not tested. (): statistically insignificant.

100 nmol 脳室内投与により有意な抗健忘作用を示すことを見出した (Fig. 4) が、無処置マウスに対して学習促進作用は確認されなかった。

以上のように、両ペプチドはコレステロール低下作用を示すが、いくつかの相違点が存在する (Table 1)。したがって、両ペプチドは異なったレセプターを介して作用すると思われる。今後、Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg の作用が enterostatin レセプターを介しているかどうかについては、 ^3H -enterostatin を合成してレセプターアッセイを行うことにより明確にする必要がある。

要 約

大豆グリシニン A₅A₃B₃ サブユニットに由来するペントペプチド (Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg) は内因性摂食調節ペプチド enterostatin (Val-Pro-Asp-Pro-Arg) と類似した構造を持ち、共に血清コレステロール上昇抑制作用および摂食抑制作用を有することを見出している。そこで、両ペプチドの作用を詳細に比較した。血清コレステロール上昇抑制作用を示す条件では、Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg 投与群は糞中の胆汁酸量が増加する傾向が見られたのに対して enterostatin 投与群は変動しなかった。また、enterostatin は抗鎮痛作用、抗健忘作用を示すことを新たに見出したが、Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg にはそのような作用は認められなかった。このように、enterostatin と Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg の作用を比較すると細部において異なるため、違ったメカニズムにより作用する可能性が示唆された。

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) Erlanson AC and Larsson A (1998) : The activation

peptide of pancreatic procolipase decreases food intake in rats. *Regul Pept*, **22**, 325-331.

- 3) 吉川正明, 山本大地, 竹中康之 (1999) : 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. 大豆たん白質研究, **2**,

125-128.

- 4) Ling L and York DA (1994) : Metergoline blocks the feeding response to enterostatin. *Appetite*, **23**, 313.
- 5) Mei J, Bouras M and Erlanson-Albertsson C (1997) : Inhibition of insulin release by intraduodenally infused enterostatin-VPDPR in rats. *Peptides*, **18**, 651-655.
- 6) Lin L, Umahara M, York DA and Bray GA (1998): β - Casomorphins stimulate and enterostatin inhibits the intake of dietary fat in rats. *Peptides*, **19**, 325-331.