

機能性ペプチド素材として的大豆たん白質酵素消化物の 総合的評価に関する研究

吉川正明*・竹中康之・釣木隆弘・大西邦彦・土山直美・丸山伸之・内海 成

京都大学大学院農学研究科

Comprehensive Evaluation of Soy Protein Digests as Sources of Bioactive Peptides

Masaaki YOSHIKAWA, Yasuyuki TAKENAKA, Takahiro TSURUKI, Kunihiro ONISHI,
Naomi DOYAMA, Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

Yield of soymetide-13 (MITLAIPVNVKPGGR), an immunostimulating peptide, from a recombinant β -conglycinin α' subunit after trypsin digestion was 15%. Yield of soymetide-13 from a recombinant β -conglycinin α' subunit fortified with 4 mol/mol of RPLKPW, a potent hypotensive peptide, by site-directed mutagenesis was 17%. Yields of soymetide-13 and DPR, a hypocholesterolemic/bile-secreting peptide, from a recombinant β -conglycinin α' subunit fortified with 3 mol/mol of DPR were 14% and 40%, respectively. Thus, it was concluded that RPLKPW and DPR sequences introduced into the β -conglycinin α' subunit did not interfere with release of soymetide-13 by the action of trypsin. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 78-82, 2003.

Key words: β -conglycinin, immunostimulating peptide, site-directed mutagenesis, blood pressure, cholesterol, trypsin

大豆たん白質には種々の生理活性ペプチド配列が潜在的に含まれているが、特定のサブユニットから生成するペプチドの場合、サブユニット組成が品種間で異なることや、その含有量の厳密な決定が難しい等の理由から、酵素消化後の個々のペプチドの生成効率の測定は容易でない場合が多い。soymetide-13 (Met-Ile-Thr-Leu-Ala-Ile-Pro-Val-Asn-Lys-Phe-Gly-Arg) は β -conglycinin の α' サブユニットからトリプシン消化によ

り派生する免疫促進ペプチドである¹⁾。本ペプチドは α' サブユニットの第260～272残基に由来するが、 α および β サブユニットでは活性発現に必要なMetがそれぞれ、Ile および Leu に置換されているので、これらからは同様の活性を示すペプチドは生成しない。soymetide-13 は fMLP レセプターを介してファゴサイトーシス促進作用や抗がん剤による脱毛を防ぐ作用を示す。これまでに、その正確な生成効率は測定できていなかったのに、今回は大腸菌で発現した β -conglycinin α' サブユニットを用いてトリプシン消化の際の生成効率を決定

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

した。我々は β -conglycinin α' サブユニットに部位特異的変異を施すことによって、生理活性ペプチドを導入した改変たん白質を生産する実験を進めているが、その際、新しく導入されたペプチドの酵素消化後の生成効率のみならず、soymetide-13のように、元来存在する生理活性ペプチドの生成効率が改変にともなって変化するかどうかを確認することは、得られたたん白質の生体調節機能を総合的に評価する上で重要である。我々は、卵白アルブミンから派生する動脈弛緩・血圧降下ペプチド ovokinin (2~7) をもとに設計した強力な血圧降下ペプチド (RPLKPW) を β -conglycinin α' サブユニットの extension domain 中に存在する 4 ケ所の類縁配列に移植することによって、2.5 mg/kg の単回経口投与で高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧を有意に低下させる改変たん白質をすでに得ている²⁻⁵⁾。そこで、本改変たん白質からの soymetide-13 の生成効率を求めた。また最近、コレステロール低下および胆汁酸分泌促進活性を示すことを見出した enterostatin (3~5)、すなわち Asp-Pro-Arg (DPR)⁶⁾ を 3 分子導入した改変 β -conglycinin α' サブユニットからの DPR および soymetide-13 の生成効率についても検討した。

方 法

β -conglycinin α' サブユニットへの DPR の導入、改変たん白質の大腸菌での発現および精製

すべて前報に記載の方法に準じて行った⁴⁾。

天然型および改変 β -conglycinin α' サブユニットの酵素消化と soymetide-13, DPR および RPLKPW の生成効率の算出

大腸菌で発現し、精製した天然型、RPLKPW 導入、および DPR 導入 β -conglycinin α' サブユニットを TPCK-トリプシン消化後 (E/S=1/100, pH 7.5, 37°C, 5 hr), HPLC により分離し、クロマトグラム面積から soymetide-13 および DPR の生成効率を算出した。RPLKPW についてはトリプシンのみでは生成しないので、RPLKPW 純品と RPLKPW 導入 β -conglycinin を経口投与した際の血圧降下作用の所要量から計算した値を in vivo 消化率と仮定して用いた⁴⁾。

結果と考察

新しいコレステロール低下ペプチド DPR 配列の導入による β -conglycinin α' サブユニットの改変設計

エンテロスタチン (VPDPR) は高脂肪食の摂食を抑制するペプチドとして知られている⁷⁾。我々は最近、

VPDPR および、その C 末端 3 残基に相当するフラグメントペプチド DPR がマウスに対する経口投与の際に血清コレステロール低下作用を示すこと、特に DPR のコレステロール低下作用は投与後 2 時間で見られ、胆汁酸の分泌促進によるものであることを示唆する結果を得ている⁶⁾。大豆たん白質による血清コレステロール低下作用は胆汁酸の再吸収阻害によるものであり、ラットおよびヒトでは見られるが、マウスでは認められない⁸⁾。本研究では、胆汁酸の再吸収阻害以外のメカニズムによる、大豆たん白質が本来持たない新しいコレステロール低下機能を導入することを目的としたので、マウスでも効果を示す DPR に着目した。我々は、遺伝子の操作により大豆たん白質に新しい生理活性ペプチドを導入する際、導入すべきペプチドとできるだけホモロジーのある部位を選んで、部位特異的変異を施すという戦略を従来から取ってきた^{3, 4, 9, 10)}。これは、改変たん白質の食品物性、生産・蓄積性およびアレルゲン性等の諸特性の変化の可能性をできるだけ小さくするためである。 β -conglycinin α' サブユニット中には DPR と 1 アミノ酸残基異なる配列が 8 ケ所存在するが (Fig. 1)、それらの内、N 末端側に近い 5 ケ所については、先に血圧降下ペプチド RPLKPW を導入した部位と重複すること、およびいずれの場合も消化管内での遊離を図るためにはそれら直前のアミノ酸を、Arg や Lys 等に改変することが必要になる。そこで、今回はこれら以外の 3 ケ所、すなわち、第 140~142 残基、第 187~189 残基、および第 366~368 残基に相等する、EPR, DYR, および DPI を DPR に改変するための部位として選んだ (Fig. 1)。これら 3 ケ所の DPR 導入部位の直前のアミノ酸はいずれも Arg であることから、改変たん白質のトリプシン消化により DPR が容易に遊離すると予想できる。また、高次構造予測からも、これら 3 ケ所はいずれも比較的改変自由度が大きいと考えられる (Fig. 1)¹¹⁾。

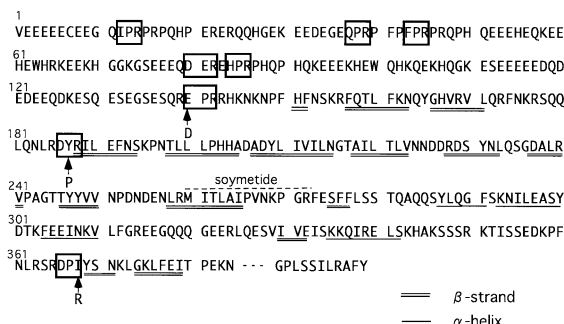


Fig. 1. Primary and secondary structures¹²⁾ of a β -conglycinin α' subunit.

なお、 β -conglycinin α' サブユニット中での soymetide-13, RPLKPWおよびDPRの位置関係はFig. 2に示した。

β -conglycinin α' サブユニット発現ベクターの部位特異的変異によるDPR配列の導入

β -conglycinin α' サブユニット中の上記で選んだ3ヶ所の部位をDPRに改変するための部位特異的塩基置換をFig. 3に従って、そのcDNAをコードするプラスミドpEC α' に対しPCR法により施した¹²⁾。

DPR導入 β -conglycinin α' サブユニットの大腸菌での発現および精製

改変発現ベクターで形質転換した大腸菌HMS174 (DE3) を1 mM IPTG存在下、20℃で48時間培養後、回収、破碎したところ、改変 β -conglycinin α' サブユニットは天然型 β -conglycinin α' サブユニットの場合同様、全菌体たん白質の約15%を占めていた。 β -conglycinin α' サブユニットはほとんどすべて可溶性画分に回収された。硫酸分別 (15~45%) および HiLoad 26/10 Q Sepharoseカラムを用いたイオン交換HPLCにより90%以上の純度を持つDPR導入 β -conglycinin α' サブユニットが得られた (Fig. 4)。

改変および天然型 β -conglycinin α' サブユニットの酵素消化によるDPR, RPLKPWおよびsoymetide-13の生成

DPRおよびRPLKPWの収率 Table 1に示したように、DPR導入 β -conglycinin α' サブユニットからはトリプシン消化により、約40%の収率でDPRが生成することがわかった (Table 1)。本改変ペプチドには3分子のDPR配列を導入したことから、その1分子からトリプシン消化により1.2分子のDPRが生成することになる。

RPLKPWが高血圧ラット (SHR) に対する経口投与で血圧降下作用を示すのに必要な用量は0.1 mg/kgであるのに対して、4分子のRPLKPWを導入した改変 β -conglycinin α' サブユニットのそれは2.5 mg/kgであった⁴⁾。この値から計算すると、in vivo消化によりRPLKPWが75~80%の高収率で生成していることになる。なお、RPLKPWはトリプシンのみによるin vitroの消化では生成しないので、Table 1には上記のin vivoの予測値を記載した。

soymetide-13の収率 一方、soymetide-13のトリプシン消化の際の収率は天然型、DPR導入およびRPLKPW導入 β -conglycinin α' サブユニットであまり大きい差は見られなかった (14~17%) (Table 1)。なお、これらの値は他のペプチドと比較してやや小さいが、Lys¹⁰-Pro¹¹結合がトリプシン耐性を有することは確認しているので、他にsoymetide-10が生成したことによ

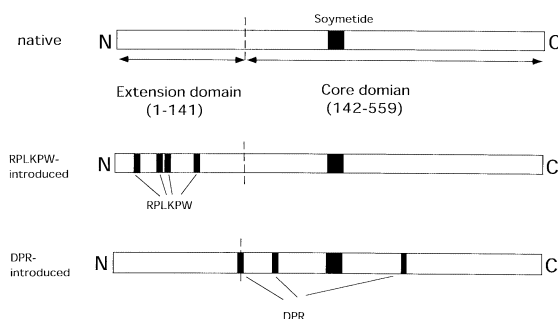


Fig. 2. Structures of genetically modified β -conglycinin α' subunits.

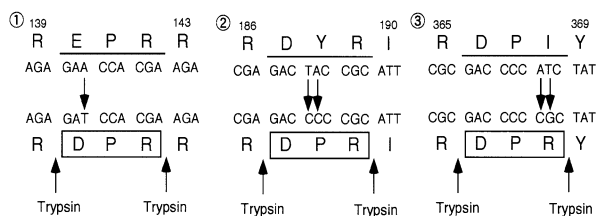


Fig. 3. Design of site-directed mutageneses to introduce DPR sequence into β -conglycinin α' subunit.

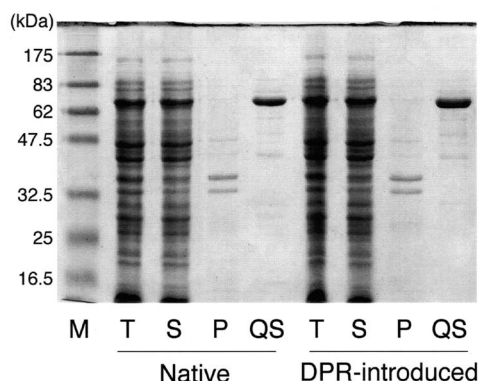


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of DPR-introduced β -conglycinin α' subunit. M, molecular weight markers; T, total protein; S, soluble protein; P, precipitated protein; QS, protein purified with Q Sepharose column.

Table 1 Release of bioactive peptides from β -conglycinin α' subunit

	Soymetide-13*	DPR*	RPLKPW**
native α'	15%	0%	0%
DPR-introduced α'	14	40	0
RPLKPW-introduced α'	17	0	75-80

*trypsin: E/S = 1/100, pH 7.5, 5hrs.

** in vivo digestion.

るものではない。各 β -conglycinin α' サブユニット標品の純度のわずかな相違や、HPLCによる定量値の誤差の許容範囲を考慮すると、各収率は10%程度の誤差を含む可能性がある。したがって、上記の結果は、 β -conglycinin α' サブユニットのトリプシン消化によるsoymetide-13の生成効率は、他の部位へ新たに導入された生理活性ペプチドの影響をほとんど受けないことを意味している。なお、今回は新たに導入されたペプチドとsoymetide-13が一次構造上でかなり離れていたが (Fig. 2)、より近傍に導入された場合については別に検討する余地があるかもしれない。

一般的に、酵素活性等、たん白質の生理活性がその高次構造に依存している場合、アミノ酸残基の置換による改良を行うには一次構造のみならず高次構造の変化に留意することが必須である。一方、今回のように酵素消化によって切り出されるべき生理活性ペプチド

を導入する場合は、たん白質の高次構造よりもむしろ、適切な切断部位の存在、および、ペプチドの自身のレセプター親和性やペプチダーゼ抵抗性が重要である。我々は従来、このような観点から、たん白質およびペプチドの一次構造情報に基づいて、食品たん白質の生理活性を強化するための設計を行ってきた。複数の生理活性ペプチドを導入しても差し支えないことを示す上記の結果は、このような方法の妥当性を新たな観点からも支持するものである。

本来、設計の最終的な評価は改変たん白質が実際に大豆で効率よく生合成・蓄積されるかどうかという観点をも含めた上でなされねばならないことは言うまでもない。比較的迅速に結果が得られる大腸菌での発現系で生理作用や生成効率等の最適化を行った改変大豆たん白質について、実際の大豆での生産性を検討するのが我々の方針である。

要 約

大豆 β -conglycinin α' サブユニットからトリプシンの作用により生成する免疫促進ペプチド soymetide-13 (MITLAIPVNKPGR) の生成効率を、大腸菌で発現した β -conglycinin α' サブユニットを用いて決定した。以前、cDNAの部位特異的変異によって、強力な血圧降下ペプチドRPLKPWを4分子導入して得た改変 β -conglycinin α' サブユニット、また最近、コレステロール低下・胆汁酸分泌促進活性を有するDPRを3分子導入して得られた改変 β -conglycinin α' サブユニットからのsoymetide-13および該当ペプチドの生成効率についても検討したところ、soymetide-13の収率は他の生理活性ペプチド導入の影響をほとんど受けないことがわかった。

文 献

- 1) Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T and Yoshikawa M (2003): Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean β -conglycinin, is an fMLP agonist. *FEBS Lett*, **540**, 206-210.
- 2) Yamada Y, Matoba N, Usui H, Onishi K and Yoshikawa M (2002): Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin (2-7). *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1213-1217.
- 3) Matoba N, Doyama N, Yamada Y, Maruyama N, Utsumi S and Yoshikawa M (2001): Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *FEBS Lett*, **497**, 50-54.
- 4) 吉川正明, 山田優子, 的場伸行, 内海 成, 丸山伸之, 大西邦彦 (2002): 大豆たん白質への新し
- い生理機能の導入に関する基礎研究. 大豆たん白質研究, **5**, 26-30.
- 5) Onishi K, Matoba N, Yamada Y, Utsumi S, Maruyama N and Yoshikawa M (2003): Design of highly functional soybean protein by genetic introduction of anti-hypertensive peptide. *In: Peptide Science 2002*. Yamada T, ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, pp. 123-126.
- 6) Takenaka Y, Nakamura F, Yamamoto T and Yoshikawa M (2003): Enterostatin (VPDPR) and its peptide fragment DPR reduce serum cholesterol levels after oral administration in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 1620-1622.
- 7) Erlanson-Albertsson C and Larsson A (1988): The activation peptide of pancreatic procolipase decreases food intake in rats. *Regul Pept*, **22**, 325-331.

- 8) 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.
- 9) Takenaka Y, Utsumi S and Yoshikawa M (2000): Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site-directed mutagenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2731-2733.
- 10) Takenaka Y, Utsumi S and Yoshikawa M (2001): Introduction of a low molecular weight agonist peptide for complement C3a receptor into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site directed mutagenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 1202-1205.
- 11) Maruyama N, Adachi M, Takahashi K, Yagasaki K, Kohno M, Takenaka Y, Okuda E, Nakagawa S, Mikami B and Utsumi S (2001): Crystal Structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *Eur J Biochem*, **268**, 3595-3604.
- 12) Maruyama N, Katsube T, Wada Y, Oh MH, Barba de la Rosa AP, Okuda E, Nakagawa S and Utsumi S (1998): The roles of the N-linked glycans and extension region of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features. *Eur J Biochem*, **258**, 854-862.