

# 大豆たん白質に内在する食欲抑制作用を持つ配列の同定

原 博\*・西 隆司

北海道大学大学院農学研究科

## Identification of Amino Acid Sequence Responsible for the Satiety Effect of Soybean $\beta$ -Conglycinin

Hiroshi HARA and Takashi NISHI

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

### ABSTRACT

Peptides derived from dietary protein promote cholecystokinin (CCK) secretion via a putative receptor on the mucosal cells of the small intestine, and soybean  $\beta$ -conglycinin peptone suppresses food intake in rats via CCK secretion. The aim of the present study was to identify the amino acid sequence (peptide fragment) responsible for CCK secretion. We found that the  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit 51-63 ( $\beta$ 51-63, VRIRLLQRFNKRS) has the strongest binding activity to the brush-border membrane proteins of the rat jejunum. Duodenal infusion of the synthetic peptide  $\beta$ 51-63 reduced food intake for 1 hr (satiety effect), which was completely abolished by devazepide, a CCK<sub>A</sub>-receptor antagonist. Also, duodenal infusion of  $\beta$ 51-63 induced marked increase in portal plasma CCK concentration. We conclude that soybean  $\beta$ -conglycinin includes the sequence that strongly stimulates CCK secretion by binding to the brush-border membrane of the small intestine. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 94-99, 2003.

Key words: soybean  $\beta$ -conglycinin, satiety effect, cholecystokinin, brush-border membrane, rats

食欲のコントロールは、肥満や糖尿病の食事療法に重要な意味を持つ。直接中枢に働く薬剤による制御は危険性を伴うため、食品成分による抹消からの食欲調節、特に飽食感を早く惹起させる食品成分の開発は、食事療法に有用となる可能性がある。消化管ホルモン

であるコレシストキニン (CCK) は、小腸上部粘膜中に散在する内分泌細胞から、食事時のたん白質や脂質により、分泌が促進され、膵外分泌や消化管運動を調節している<sup>1,2)</sup>。CCKはまた、飽食感を惹起するホルモンとして、レプチンなどとともに重要な、内因性の食欲調節因子である<sup>3-5)</sup>。

私どもは、これまで食品たん白質による膵外分泌調

\*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

節機構を研究する中で、食品たん白質が、小腸管腔内でアミノ酸でなくペプチドとして、粘膜細胞に直接作用して、CCK分泌を刺激することを、in vivo<sup>6)</sup>, in vitro<sup>7)</sup>の試験で明らかにしてきた。また、他のグループから、同様の知見がいくつか報告されている<sup>8-10)</sup>。すなわち、食品たん白質はペプチド構造を保ったまま小腸粘膜内分泌細胞に存在する未知の受容体に受容され、CCKの分泌を亢進させることになる。これまでに、小腸上皮細胞によるたん白質の受容には、グアニジル基に富んだペプチド構造の関与が推定されたため<sup>7,11)</sup>、食品たん白質の小腸内分泌細胞による認識には、その中のArg-richな部分構造が関与していることが考えられる。私どもはまた、分離大豆たん白質は、直接作用によるCCK分泌促進作用が強いことも明らかにした<sup>12)</sup>。

本研究の目的は、小腸粘膜上皮細胞に認識され、CCK分泌を亢進して飽食感を惹起する、大豆たん白質中に存在するペプチド構造を見出すことである。既に、大豆たん白質中の7Sグロブリン、すなわちβコングリシニン(β-con)にCCK分泌促進作用、および飽食作用が局在することを確認しているため、β-conの全アミノ酸配列より、グアニジル基を含むアミノ酸であるArg-richの部分配列を選び、これらペプチドを合成した。これらの中から、β-conに内在するCCK分泌促進に関与する配列を、小腸粘膜刷子縁膜結合活性と、ラットを用いた飽食促進作用により同定した。

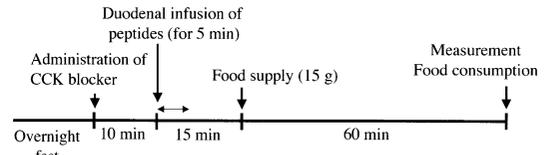


Fig. 2. Time schedule of feeding test.

Table 1. Binding activities of peptide fragments on β-conglycinin to solubilize components of the brush-border membrane in the rat proximal small intestine

	Position	Amount of binding (RU)
<b>β-conglycinin peptone</b>		
ERDSYRN	α 45-51	162.8 ± 6.1
PRPRPRP	α 74-80	-5.8 ± 4.8
PRPQPRQ	α 107-113	51.1 ± 24.8
PRKEEKRG	α 126-132	0.4 ± 10.6
LRDYRI	α 230-235	-3.1 ± 6.2
	α 246-251	
	β 69-74	0.9 ± 4.0
IRALSKRA	α 384-391	19.3 ± 7.6
VRKYRA	α 493-498	
	α 527-532	49.7 ± 5.3
PRPQHPERERQ	α 75-87	21.4 ± 4.6
EREHPRP	α 143-149	-6.0 ± 5.1
QREPRRH	α 200-206	2.9 ± 10.5
VRIRLLQRFNKR	β 51-63	597.2 ± 11.3*
IRQLSRR	β 218-224	42.8 ± 5.9
VRQIERQ	β 381-387	-5.9 ± 5.9

All peptides were tested in a concentration, 100 mg/L

Table 2. Specificity of peptide β51-63 for binding to the brush-border membrane

	Position	Amount of binding (RU)
VRIRLLQRFNKR	β 51-63	710.0 ± 30.0
VRIRLLQRF----	β 51-59	417.0 ± 25.9*
--IRLLQRFNKR	β 53-63	385.5 ± 9.1*
--IRLLQRF----	β 53-59	91.3 ± 7.1*
GRIRVLQRFNKR	α 212-224	388.4 ± 32.1*
VRVLQRFNKR	α 230-240	262.0 ± 22.2*

All peptides were tested in a concentration, 100 μmol/L

**β-conglycinin α subunit**

MMRARFPLLLGLVFLASVSFSGIAYWEKENPKHNKCLQSCNSEERDSYRNQACHARCNRLLKVEKEECEEGEIPPRPRPRPQHPPEREPQQPGEKEEDEDEQ 100  
 PRPFPPRPQPRQEEHEEQEEQEWPRKEEKRGEGKGSSEEEDEDEEQDERQFPPRPPHQKEERNEEEDDEEQRESESESESELRRHNKKNPFLFGS 200  
 NRFETLFKNQYGRIRVLQRFNQRSPQLQNLRDYRILEFNKSPNTLLPHHADADYLIVILNGTAILLSVNDDRDRSYRLQSGDALRVPSGTTYVVPNDP 300  
 NENLRITLAIPVNKGRPFESFFLSTEAQSYLQGFSRNILEASDYTKFEEINKVLFSREEQQQGQRLQESVIVEISKEIRALSKRAKSSSRKTIS 400  
 SEDKPFNLSRSDPIYSNKLKGFETITPEKPNQLRDLDFLSIVDMNEGALLPHFNKSAIVILVINEGDANIELVGLKEQQEQQEQPLEVRKYRAEL 500  
 SEQDIFVIPAGYVPMVNATSNLNFFAIGINAENNRNFLAGSQDNVISQIPSQVQELAFPGSAQAVEKLLKNQRESYFVDAQPKKKEEGNKGRKGLPSSII 600  
 LRAFY 605

**β-conglycinin α' subunit**

MMRARFPLLLGLVFLASVSFSGIAYWEKQNPSPHNKCLRSCNSEKDSYRNQACHARCNRLLKVEECEEQEGIPPRPRPQHPPERERQQHGEKEEDEGEQ 100  
 RFPFPPRPQPRQEEHEEQEEHWRKKEKHGGKGSSEEQDEREHPRPHQKKEEKHEWQHKEHQKQKGSSEEEEDQDEDEEQDKESQESGSESQ 200  
REPRRHKNKPNPFHNSKRFQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRSQQQLQNLRDYRILEFNKSPNTLLPHHADADYLIVILNGTAILLSVNDDRDRSYNLQSGDA 300  
 LRVPAGTTFYVVPNDNENLRMIAGTTFYVVPNDNENLRMITLAIPVNKGRPFESFFLSTEAQSYLQGFSGKNILEASDYTKFEEINKVLFGREEGQQ 400  
 QGEERLQESVIVEISKQIRELSKHAKSSSRKTISSEDKPFNLGSRDPIYSNKLKGFETITQPNQLRDLDFLSVVDNNEGALFLPHFNKSAIVILVIN 500  
 EGDANIELVGIKEQQQQQEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYVPMVNATSDLNFFAIGINAENNRNFLAGSKDNVISQIPSQVQELAFPRSAKDI 600  
 ENLKSQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGLPSSII LRAFY 639

**β-conglycinin β subunit**

MMRVRFPLLLVGLTVFLASVCVSLKVREDENNPFYFRSSNSFQTLFENQVRIRLLQRFNKRSQLENLDYRIVQFQSKPNTILLPHHADADFLFLVLS 100  
 GRAILTLVNNDDRDRSYNLHPGDAQRIPAGTTYLVNPHDHQNLKIIKLAPVNKPGRYDDFFLSSTQAQQSYLQGFSHNILETSFHFSEEEINRVLFGEE 200  
 EEQRQEGVIVELSKQIRQLSRRAKSSSRKTISSEDEPFNLSRNPISYNNFGKFFETITPEKPNQLRDLDFLSVDINEGALLPHFNKSAIVILVIN 300  
 EGDANIELVGIKEQQQKQKQEEPLVQYRAELSEDDVVFIPAAYPFVPMVNATSNLNFLAFGINAENNRNFLAGEKDNVRQIERQVQELAFPGSAQDV 400  
 ERLKKQRESYFVDAQPQQKEEGSKGRKGFPPSILGALY 439

Fig. 1. Amino acid sequence of soybean β-conglycinin subunit (α, α', β) Arg-rich fragments are underlined.

## 方 法

### ペプトンおよび $\beta$ コングリシニン内在フラグメントの合成

分離大豆たん白質（フジプロR）あるいは、生大豆粉末より7Sグロブリン分画（ $\beta$ -con）および11Sグロブリン分画を調製した<sup>13)</sup>。ペプトンの調製は、基質をリン酸にてpH1.85にし、ペプシンを（1：100）添加して、37℃で10分間反応させた。煮沸によりペプシンを失活させた後、遠心上清を中和、脱塩した後、凍結乾燥して、ペプトン粉末を得た。

$\beta$ -conの3つのサブユニット（ $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ ）の全アミノ酸配列（Fig. 1）より、Argが近接して2残基以上存在する配列を選択し、6～13残基からなる19種のペプチド（Table 1, 2）を合成した。

### 小腸刷子縁膜成分とペプトンおよびペプチドとの結合

小腸刷子縁膜成分とペプトンおよびペプチドとの結合強度は、物質間相互作用解析装置（BIAcore3000, BIAcore）を用いて測定した<sup>14)</sup>。ラット空腸粘膜より調製した刷子縁膜の、0.1% Triton X-100可溶性たん白質をBIAcoreのセンサーチップ（CA-5）に固定化し<sup>15)</sup>、ペプトンあるいは合成ペプチドをそれぞれ100  $\mu$ g/mL、流速10  $\mu$ L/minで流して、2分後の刷子縁膜成分との結合量を測定した。

### 摂食試験（飽食促進作用の検討）

Sprague-Dawley系の雄ラット、体重220～230 g、にペントバルビタール麻酔下で、十二指腸にカニューレ（シラスコンNo. 00）を挿入する手術を施した。また、

CCK blockerを投与した実験では、頸静脈にも同様のカニューレを挿入した。これらのラットは、手術回復後、一夜絶食させ、翌日、被験水溶液2.5 mLをシリンジポンプにより流速0.5 mL/minで5分間、十二指腸に投与した。対照群には溶媒である蒸留水を投与した。投与開始15分後に、25%カゼイン食を60分間自由摂取させ、60分目に摂食した餌の重量を測定した（Fig. 2）。 $\beta$ -conペプトンは2 mg/mL濃度で投与した。CCK<sub>A</sub>受容体阻害薬のdevazepide溶液は、被験液の十二指腸投与開始、10分前に、500  $\mu$ g/kg体重で頸静脈カニューレより投与した。対照群には、devazepideの溶媒のみを同様に投与した。また、手術からの回復、摂食試験に用いた食餌は、25%カゼイン、5%コーン油を含む、シヨ糖ベースの基本食である。

### 血漿CCK濃度測定試験

先の摂食抑制試験と同様にして、カニューレ留置手術を施したラットを一夜絶食させ、翌日、被験水溶液2.5 mLをシリンジポンプにより、流速0.5 mL/minで十二指腸に投与した。その後絶食状態を保ったままラットをケージ内に置き、45分後に麻酔をかけて直ちに門脈血を採取した。遠心分離により門脈血から血漿を回収し、Sep-pak C18を用いてCCKを抽出した後、膵腺房細胞を用いたbioassay法<sup>16)</sup>により血漿CCK濃度を測定した。

これらの実験は、すべて北海道大学動物実験ガイドラインに従い実施された。また、ラットを用いたすべての実験は、室温22℃、湿度55%、12時間の明暗周期の室内で行われた。

## 結果と考察

$\beta$ -conペプトン、5 mgを投与したときの、一夜絶食させたラットの摂食量低下を、Fig. 3に示した。一時間の摂食量としているが、実際は摂食開始30分でこの90%以上を摂食しており、すでに同様の差が見られた（データは示していない）。このことは、 $\beta$ -conペプトンの作用は、ミールサイズの減少によるものであることが示唆される。CCK<sub>A</sub>受容体の特異的アンタゴニストであるdevazepideの投与により、 $\beta$ -conペプトンによる摂食量の減少は、完全に消失した。このことより、 $\beta$ -conペプトンの作用は、CCKに依存していることが示された。最近他のグループからも、大豆たん白質に摂食量の減少作用が報告された<sup>17)</sup>。ここではCCKとともにオビエートの関与を示唆している。エストロゲンやレプチンの摂食調節作用にも、CCKが関わってい

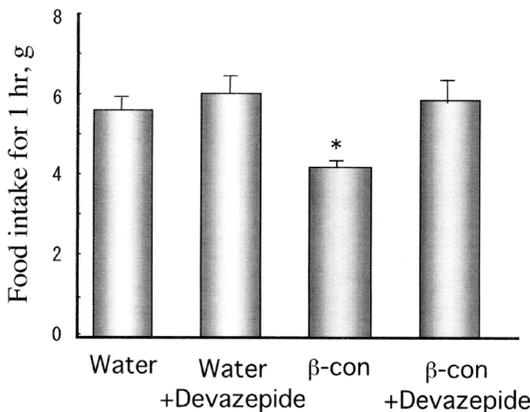


Fig. 3. Satiety effect (suppression of food intake) by  $\beta$ -conglycinin peptone ( $\beta$ -con) Effects of devazepide, a CCK<sub>A</sub>-blocker. Mean + SEM (n = 7).

るとする報告があることから<sup>18)</sup>, CCKは摂食調節に関与する他の因子の作用においても, 重要な役割をもっていることが示唆される。

$\beta$ -con各サブユニットの全アミノ酸配列中から, Argが局在するペプチド配列を選び, まずTable 1の13種のペプチドを合成した。これら合成ペプチドと粘膜上皮細胞膜との結合能を, 空腸刷子縁膜可溶性たん白質を固定化した, BIACOREセンサーチップを用いて調べた。その結果,  $\beta$ サブユニットの51~63ペプチド( $\beta$ 51~63, VRIRLLQRFNKRS)で, 他のペプチドに比べて, はるかに高い結合活性が認められた (Table 1)。このペプチドは, Arg残基を4個含み, 13種の中で最も多い。しかし,  $\alpha$ '75~82も $\beta$ 51~63と似た間隔で4個のArg残基を含むが, 結合活性はほとんどない。この結果は, 小腸刷子縁膜との結合は, Arg残基のみでなく, その間に挟まれるアミノ酸も結合に関与していることを示している。

またこの $\beta$ 51~63ペプチドは, 13種のうち最も長い13アミノ酸残基であるため,  $\beta$ 51~63両端のArgを除いたペプチドを合成して, 結合活性を測定した (Table 2)。 $\beta$ 51~63の4残基のArgのうち, N末, C末どちらかのArgを除くと, 結合強度は1/2程度に, 両方を除くと1/8に低下した。さらに,  $\beta$ 51~63と酷似した配列の $\alpha$ 212~224および $\alpha$ '230~240も合成し, 結合活性を測定したところ,  $\beta$ 51~63の半分程度の結合活性が見られた (Table 2)。これらの結果は, 刷子縁膜と結合するペプチドの特異性は, あまり高くないことが推察される。

先の実験で小腸刷子縁膜成分と高い結合活性を示した $\beta$ 51~63を, ラット十二指腸に投与し, 飽食促進作用を観察した。その結果, 7.5 nmolの $\beta$ 51~63を投与した時, 摂食量が低下した (Fig. 4)。この付近の量が,  $\beta$ 51~63の最小有効量 (閾値) だと思われる。 $\beta$ -conペプトンの最低有効量では, 5 mg (濃度2 mg/mL) である。その中に含まれている $\beta$ 51~63の量は約50  $\mu$ g (約30 nmol,  $\beta$ -conの平均分子量が約16万に対し $\beta$ 51~63の分子量は1686) である。モル量当たりの活性で見れば,  $\beta$ 51~63は $\beta$ -conペプトンの約4倍高い活性を持つことになる。 $\beta$ -conペプトン中では,  $\beta$ 51~63はペプシンにより, 部分的に切断されている可能性が高い。

次にラットを用いて, Table 2で使用したペプチドと $\beta$ 51~63の飽食促進作用を比較した。 $\beta$ 51~63投与で摂食量は有意に減少したが,  $\beta$ 51~63類似ペプチドの $\alpha$ 212~224および $\alpha$ '230~240や, 部分ペプチドの作用は減弱し, 摂食量は対照群に対して低下傾向は示し

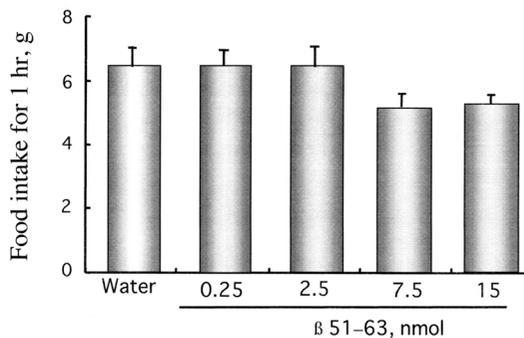


Fig. 4. Minimum concentration of  $\beta$ 51-63 for induction of satiety effect 7.5 nmol (2.5 mL of 3 mmol/L, 12.5 mg). Mean + SEM (n = 7).

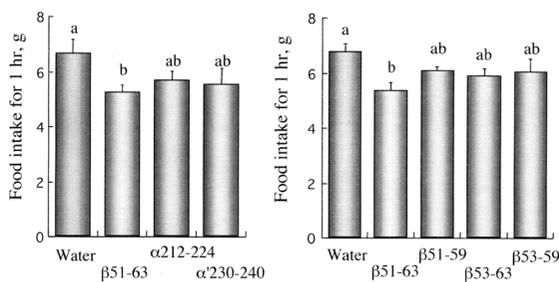


Fig. 5. Specificity of  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ 51-63 to induce satiety effect. Mean + SEM (n = 7).

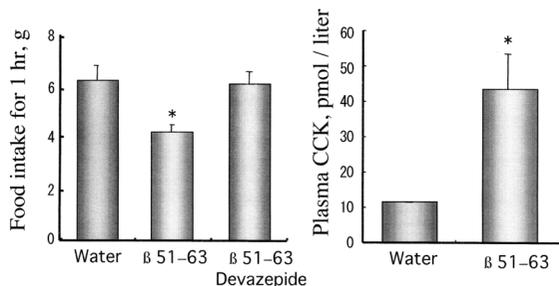


Fig. 6. Effects of devazepide (CCK<sub>A</sub>-blocker) on the satiety effect of  $\beta$ 51-63 and portal cholecystokinin secretion after an infusion of  $\beta$ 51-63. Mean + SEM (n = 7).

たものの, 有意な差にはならなかった (Fig. 5)。これらは, 小腸刷子縁膜との結合活性とおおよそ一致することから, この結合がCCK分泌活性に関係しており, 増加したCCK濃度により, 飽食作用が促進されたものと考えられた。しかし, 今後刷子縁膜の結合活性と, CCK分泌促進作用の, より詳細な関係を確認する必要がある。

$\beta$ 51~63の飽食促進作用は、CCK<sub>A</sub>受容体の特異的ブロッカーにより完全に消失し、また $\beta$ 51~63の投与はCCK分泌の著明な増加を惹起した (Fig. 6).

以上、大豆 $\beta$ -conはCCK分泌を促進させる飽食促進

ペプチドを内包し、その主な活性配列は $\beta$ 51~63であることが明らかになった。また、このペプチドは小腸刷子縁膜成分と強く結合することにより、その活性が惹起されることが示唆された。

## 要 約

食品たん白質は、ペプチド構造を保ったまま小腸粘膜の内分泌細胞に受容され、コレシストキニン (CCK) の分泌を亢進させる。この作用は、大豆 $\beta$ コングリシニン ( $\beta$ -con) に局在すること、さらに、ラット腸内に $\beta$ -conペプトンを投与することにより、摂食量の低下が確認された。本研究では、 $\beta$ -conの全アミノ酸配列より、Argが近接して2残基以上存在する配列を選択し、6~13残基からなる19種のペプチドを合成、小腸刷子縁膜との結合強度を測定した結果、 $\beta$ -con $\beta$ サブユニットの51~63番目の配列ペプチド ( $\beta$ 51~63, VRIRLLQRFNKRS) が、刷子縁膜たん白質に強く結合することが明らかになった。これと類似、あるいは短くしたペプチドの結合活性は減弱した。これらのペプチドの飽食促進作用を検討した結果、 $\beta$ -conおよび $\beta$ 51~63投与で摂食量は減少し、閾値は $\beta$ -con, 5 mg/ratで $\beta$ 51~63, 12.5 $\mu$ gであった。 $\beta$ 51~63の飽食促進作用は、CCKA受容体ブロッカーにより完全に消失した。以上、大豆 $\beta$ -conはCCK分泌を促進させる飽食促進ペプチドを内包し、その主な活性配列は $\beta$ 51~63であり、小腸刷子縁膜成分と強く結合することにより、その活性が惹起されることが示唆された。

## 文 献

- 1) Louie DS, May D, Millar P and Owyang C (1986): Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats. *Am J Physiol*, **250**, G252-G259.
- 2) Liddle RA, Green GM, Conrad CK and Williams JA (1986): Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. *Am J Physiol*, **251**, G243-G248.
- 3) Reidelberger RD and O'Rourke F (1989): Potent cholecystokinin antagonist 364718 stimulates food intake in rats. *Am J Physiol*, **257**, R1512-R1518.
- 4) Reidelberger RD and Solomon TE (1986): Comparative effects of CCK-8 on feeding, sham feeding, and exocrine pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol*, **251**, R97-R105.
- 5) Moran TH and McHuch PR (1982): Cholecystokinin suppresses food intake by inhibiting gastric emptying. *Am J Physiol*, **242**, R491-R497.
- 6) Hara H, Nishi T, Narakino H and Kasai T (1996): CCK-independent increases in pancreatic secretion induced by dietary protein in chronic BPJ-diverted rats. *Am J Physiol*, **271**, G501-G508.
- 7) Nishi T, Hara H and Kasai T (1998): Guanidinated casein hydrolysate stimulates pancreatic secretagogue release by direct action to the intestine in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **218**, 357-364.
- 8) Beucher S, Levenez F, Yvon M and Corring T (1994): Effects of gastric digestive product from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *J Nutr Biochem*, **5**, 578-584.
- 9) Cordier-Bussat M, Bernard C, Hauache S, Roche C, Abello J, Chayvialle JA and Cuber JC (1997): Peptones stimulate cholecystokinin secretion and gene transcription in the intestinal cell line STC-1. *Endocrinology*, **138**, 1137-1144.
- 10) Nemoz-Gaillard E, Bernard C, Abello J, Cordier-Bussat M, Chayvialle JA and Cuber JC (1998): Regulation of cholecystokinin secretion by peptones and peptidomimetic antibiotics in STC-1 cells. *Endocrinology*, **139**, 932-938.
- 11) Nishi T, Hara H and Aoyama Y (1999): Guanidinated casein hydrolysate stimulation of cholecystokinin release via pancreatic enzyme- and cholinergic-independent mechanisms in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1070-1074.
- 12) Nishi T, Hara H, Hira T and Tomita F (2001): Dietary protein peptic hydrolysates stimulate

- cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells. *Exp Biol Med* **226**, 1031-1036.
- 13) Morita S, Fukase M, Yamaguchi M, Fukuda Y and Morita Y (1996): Purification, characterization, and crystallization of single molecular species of  $\beta$ -conglycinin from soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 866-873.
  - 14) Lofas S and Johnsson B (1990): A novel hydrogel matrix on gold surface in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J Chem Soc Chem Commun*, **21**, 1526-1528.
  - 15) Hira T, Hara H and Tomita F (2001): Characterization of binding between the rat small intestinal brush-border membrane and dietary proteins in the sensory mechanism of luminal dietary proteins. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 1007-1015.
  - 16) Liddle RA, Goldfine ID and Williams JA (1984): Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: effects of food, trypsin inhibitor, and alcohol. *Gastroenterology*, **87**, 542-549.
  - 17) Pupovac J and Anderson GH (2002): Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *J Nutr*, **132**, 2775-2780.
  - 18) Eckel LA, Houpt TA and Geary N (2002): Estradiol treatment increases CCK-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. *Am J Physiol*, **283**, R1378-R1385.