

大豆 β -コングリシニン内在ペプチドの惹起する飽食促進機構の探索

原 博*・前川敏宏・比良 徹

北海道大学大学院農学研究科

Mechanism of Inducing Satiety Effects by Peptides Derived from Soybean β -Conglycinin

Hiroshi HARA, Toshihiro MAEKAWA and Tohru HIRA

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

ABSTRACT

Soybean β -conglycinin peptone (β -con) enhances satiety via cholecystokinin (CCK) secretion, and the β -conglycinin β -subunit 51-63 (β 51-63, VRIRLLQRFNKRS) is responsible for this effect. The aim of the present study is to identify signaling pathway induced with β -con by using the enteroendocrine cell line, STC-1. We found that β -conglycinin peptone induced Ca signaling in the STC-1 cells, which correlated with the binding activity of peptides derived from β -conglycinin to the rat jejunal brush-border membrane. The Ca signaling induced by β -con was dependent on Ca outside of cells passing through L-type Ca channel. Adenylate cyclase was partly involved in the induction of Ca signaling by β -con in STC-1 cells. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 108-113, 2004.

Key words: soybean β -conglycinin, satiety effect, cholecystokinin, calcium signaling, STC-1 cells

食品ペプチドの生理機能が注目されている。私どもは、食品ペプチドの新しい機能として、消化管ホルモン分泌促進を介して発揮される作用に注目してきた。従来知られていたペプチドは、消化を免れ吸収されて、始めて作用を発揮するのに対して、本研究で報告する食品ペプチドは、消化管の中でその作用が発揮されるため、その有効性および安全性において従来のものより有利である。消化管ホルモンは、耐糖能改善作用を

はじめとして生活習慣病と関係する様々な生理作用を有しており、コレシストキニン (CCK) の持つ食欲調節作用もその一つである¹⁻³⁾。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。特に、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。

私どもは、これまで食品たん白質による膵外分泌調節機構を研究する中で、小腸管腔内で食品たん白質の

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

部分分解物がペプチドとして、粘膜細胞に直接作用して、CCK分泌を刺激することを明らかにしてきた^{4,5)}。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。これまでの研究で、この小腸上皮細胞によるたん白質の受容には、Arg-richな部分構造が関与していることが推定された^{6,7)}。私どもは、このことを基に大豆 β -コングリシニンのアミノ酸配列から、CCK分泌を強く刺激する内在配列を同定した。この大豆 β -コングリシニン内在ペプチドを腸内に投与すると、ラットの摂食量を抑制した^{8,9)}。

本研究では、CCK産生細胞膜上に存在し、 β -コングリシニン内在活性ペプチドを受容する機構を明らかにすることを目的として、マウス由来のCCK産生細胞株、STC-1を用いて、 β -コングリシニンペプトン (β -con) および活性ペプチドが惹起する細胞内シグナル経路を探り、活性ペプチドの細胞膜結合と生理作用の関係をより明確にすることを旨とする。

方 法

ペプトンおよび β -コングリシニン内在フラグメントの合成

β -コングリシニン (不二製油製) をリン酸にてpH 1.85に調整しながら、ペプシンを1:100で添加して37°Cで10分間反応させ、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、凍結乾燥し β -コングリシニンペプトン (β -con) 粉末を得た。大豆 β -コングリシニンの3つのサブユニット (α 、 α' 、 β) の

全アミノ酸配列より、Argが近接して4残基存在する13個のアミノ酸からなる3種の β -コングリシニン内在ペプチドを合成した (Fig. 1下線部)。

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¹⁰⁾。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、ペプトンあるいは合成ペプチドをそれぞれ100 μ g/mL、流速10 μ 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。Fig. 2には、 β -con、 β -コングリシニン内在配列で、Argを配列内に4残基もつ、 β 51-63、 α 212-224、 α' 75-86および β 51-63のN末端かC末端のArg、あるいは両端のArgを外したペプチドの、小腸刷子縁膜成分との結合活性を示した。

STC-1細胞の培養および細胞内カルシウム濃度の測定

STC-1細胞は、ダブルトランスジェニックマウスの消化管内分泌細胞がん由来で¹¹⁾、Dr. D. Hanahan (University of California, San Francisco, CA) より供与を受けた。細胞は、10%牛胎児血清を含むDMEM培地で培養し、継代数30~40のものを、80~90%コンフルエントの状態で使用した。

細胞内カルシウムの測定は、STC-1細胞に、10 μ M Fura2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) を0.03% Pluronic F-127 (Molecular Probes) 存在下、37°C、60分間細胞内に取り込ませ、洗浄後、刺激因子あるいは阻害剤などを添加して、340 nmと380 nmで励起し、510 nmの蛍光の経時変動を、蛍光光度計

β -conglycinin α subunit

MMRARFP~~LLLLGLVFLASVS~~SGFIAYWEKENPKHNKCLQSCNS**ERDSYRNQ**ACHARCNLLKVEKEECEEGEI**PRPRPRPQ**HPEREPQPPQGEKEEDEDQ 100
 PRPIPP~~FPQPQ~~QEEHEEQREEQEWPR**KEEKRGE**KGSEEEDEDEDEEQDERQFPFFPRPPHQKEERNEEDEDQRESESESESELRRHKNNKPFLLFGS 200
 NRFETL~~FNKQYGRIRVLQRFNORS~~PQLQN**LRDYRI**LEFNPKPNTLLPNHADADYLVILNGTALISLVNNDNRDYSRLQSGDALRVPSTGYVYVVPNDN 300
 NENLRLITLAI~~PVNVKGRFESFFLS~~STEAQQSYLQGFNRNILEASDYDKFEEINKVLF**SREEGQQQ**QEQRLQESVIVEISKE**QIRALSKRAK**SSSRKTI 400
 SEDKPNLRSRDI~~PYSNKLGRFPI~~TPKPNQLRDLDFLSIVDMNEGALLLPHFNKAIVILVINEGDANIELVGLKE**QQEQPLEV**RYRAEL 500
 SEQDIFVIPAGYVPMVFNATSNLNF**FAIGINAEN**QRNFLAGSQDNVSIQPSVQVQELAFPGSAQAVEKLLKNQRESYFVDAQPKKKEGNGKRGKPLSSI 600
 LRAFY 605

β -conglycinin α' subunit

MMRARFP~~LLLLGLVFLASVS~~SGFIAYWEKQNP~~SHNKCL~~RSCNSEKDSYRNQACHARCNLLKVEECEEQGI**PRPRPQHPERERQ**QHGKEEDEDQEQP 100
 RPFPPRPRP**QPHQ**EEHEEQKEEHEWHRKEEKHGKGSEEEQ**EREHPR**PHQPHQKEEKEHEWQHKEKHQKGESEEEEDQDEDEEQDKESQESGEGSEQ 200
REPRRHKNNKPNPHFN**SKRFTL**FKNQYGH**VRVLQRFN**KRSQQQLQN**LRDYRI**LEFNPKPNTLLPHHADADYLVILNGTALITLVNNDNRDYSYLNQSGDA 300
 LRVPA~~GTTFYV~~VNPNNDENLRMIAGTTFYVVPNDENLRMITLAI~~PVNVKGRFESFFLS~~STEAQQSYLQGFNRNILEASDYDKFEEINKVLF**GREEGQ** 400
 QGEERLQESVIVEISKKQIRELSKHAKSSSRKTISS**EDKPF**NLGRSDPIYSNKLGLK**FEIT**QRNPQLRDLDFLSVDMNEGALFLPHFNKAIVLVIN 500
 EGEANIELVGIKEQQQQ**QEQPLEV**RYRAELSEQDIFVIPAGYVPMVFNATSNLNF**FAIGINAEN**QRNFLAGSKDNVSIQPSVQVQELAFPRSAKDI 600
 ENLKSQSESYFVDAQ**PQKKEG**NGKRGKPLSSILRAFY 639

β -conglycinin β subunit

MMRVRF~~PLLVGL~~TVFLASVCSFLKVRDENPNFYFRSSNS**FQTLFENQN**VRIRLL**ORFNKRS**PQLENLRDYRI**VQFQ**SKPNTILLPHHADADFLFVLS 100
 GRAILLTVNNDNRDYSYLN**HPGDAQ**RIPAGTYYLVNPHDQNLKIKLAIPVNVKGRYDDFFLSSTEAQQSYLQGFNSHNILETSFHSFEFEEINRVLFGE 200
 EEQRQQEGVIVELSK**EQIRQLS**RRAKSSSRKTISS**EDKPF**NLGRSDPIYSNKNFGK**FEIT**PEKNPQLRDLDFLSVDMNEGALLPHFNKAIVLVIN 300
 EGDANIELVGIKEQQQ**KQEQE**EPLEVRQYRAELSEDDVFI**PAAY**FPMVFNATSNLNF**LAFGINAEN**QRNFLAGEKDNV**VRQIERQ**VQELAFPGSAQDV 400
 ERLKQRESYFVDAQ**PQKKEG**SKRGKPPPSILGALY 439

Fig. 1. Amino acid sequences of three subunits of soybean β -conglycinin.

(CAF-110; JASCO, Tokyo, Japan) でモニターした。被験飼料添加時の340 nm/380 nm値, および0.2% TritonX-100 (Rmax), 10 mM EGTA (Rmin) 添加時の340 nm/380 nm値を用いて, 下記の式により, 細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を計算した¹²⁾。

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times 224 \times \left(\frac{340 \text{ max}}{380 \text{ min}}\right)$$

Rmax : Triton-X使用, Rmin : EGTA使用

結果と考察

Fig. 3に, カバースリップ上に培養されたSTC-1細胞に, β -conを100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で添加した後の, Fura2により測定された細胞内カルシウム濃度の変動を示した。 β -conの濃度に依存した, 添加後1分以内にプラトーに達する, 非常に早い細胞内カルシウム濃度の上昇 (Caシグナル) が観察された。 β -conは, CCK分泌細胞であるSTC-1に受容され, その結果なんらかの細胞内情報伝達路により, Caシグナルを惹起させたと考えられる。細胞内のカルシウム濃度上昇は, CCK分泌を引き起こすことが知られているため, β -conによるCCK分泌促進作用は, 受容後, Caシグナルを介すると思われる。

Fig. 4には, β -コングリシニンに内在するArg-rich配列を含む3種の合成ペプチド, β 51-63, α 212-224, α '75-87により惹起されるCaシグナルを示した。これら3種のペプチドは, いずれも4残基のArgを含んでいる。BIAcoreセンサーチップを用いて調べた, これら合成ペプチドと粘膜上皮細胞膜との結合能は β 51-63 (VRIRLLQRFNKRS) が最も高く, α '75-87も β 51-63と似た間隔で4個のArg残基を含むが, 結合活性は低い。 α 212-224の結合活性はこれらの中間である

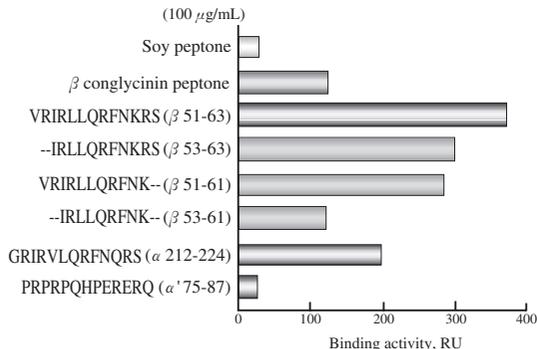


Fig. 2. Binding activities of internal peptides of soybean β -conglycinin to the brush-border membrane components in the rat proximal small intestine.

(Fig. 2)。これらの β -コングリシニン内在ペプチドは, Caシグナルを惹起したが, β -conによるCaシグナルとは異なり, いずれも持続的に上昇するものであった。その程度は, β 51-63で最も高く, α 212-224と α '75-87は同程度であった。しかし, 図には示されていないが α 212-224によるCaシグナルの方が持続時間が長く, Caシグナル強度は, Fig. 2で示された, 小腸刷子縁膜との結合活性とおおむね一致するものであった。最も強いCaシグナルを惹起した β 51-63の用量依存性を,

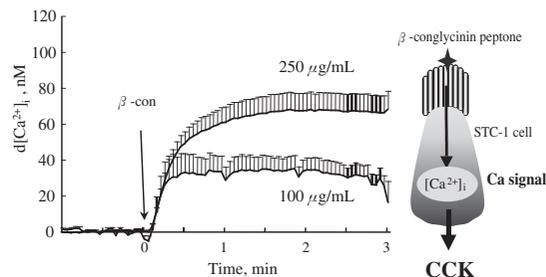


Fig. 3. Responses of intracellular calcium signaling of STC-1 cells to β -conglycinin peptone measured by Fura-2. β -con: β -conglycinin peptone.

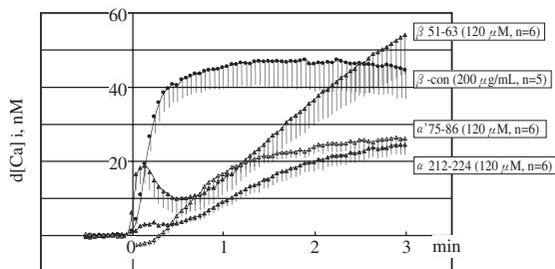


Fig. 4. Responses of intracellular calcium signaling of STC-1 cells to three peptides of β -conglycinin with different binding activities to the brush-border membrane. β -con: β -conglycinin peptone.

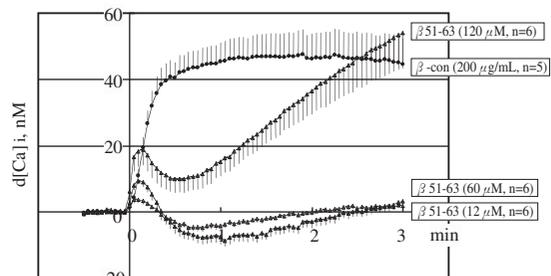


Fig. 5. Responses of intracellular calcium signaling of STC-1 cells to β 51-63 (VRIRLLQRFNKRS). Dose response to β 51-63. β -con: β -conglycinin peptone.

Fig. 5に示した。結合活性と飽食作用もほぼ一致していることから⁹⁾、CCK分泌活性はCaシグナルを惹起する活性と一致する可能性が高い。今後これらの相関を直接確認する必要がある。

β -conによるCaシグナルがどのような経路で惹起されたかを探るため、上昇したCaが、細胞外由来か、細胞内Ca storeに由来するかを確かめた。このため、まず細胞外のCaを除いた培地 (Ca free) において、 β -conを作用させた。その結果、Caシグナルは大幅に減弱し、 β -conによるCaシグナルは大半が細胞外のCaに依存していることが明らかになった (Fig. 6)。細胞外からのCa流入経路には、いくつかのCa channelが関与している。そこで、次にL型Ca channelの阻害剤である、Diltiazemを用いてCa流入経路を探った (Fig. 7)。Diltiazemのみで細胞内Caが低下しているように見えるが、これはDiltiazemが測定している蛍光強度に若干の影響があったものと思われる。結果として、Diltiazemにより、 β -conによるCaシグナルは大きく減弱した。このことは、 β -conはL型Ca channelを介して細胞外Caを流入させ、Caシグナルを惹起させたことを示す。しかし、Diltiazem存在下で β -conにより惹起されたCaシグナルは小さいものの、Fig. 6で見たCa free条件でのCaシグナルよりはやや大きく、L型Ca channel以外の流入経路の寄与を示唆している。50 μ M Diltiazemは最大作用を示すことは確かであるが、阻害がなお不完全であった可能性も否定はできない。

次に、受容体以降の情報伝達路を探る目的で、アデニル酸シクラーゼの阻害剤である、SQ22536を用いた。SQ22536処理後の β -con添加によるCaシグナルは、SQ22536の用量依存的な減弱が見られ (Fig. 8)、高用量

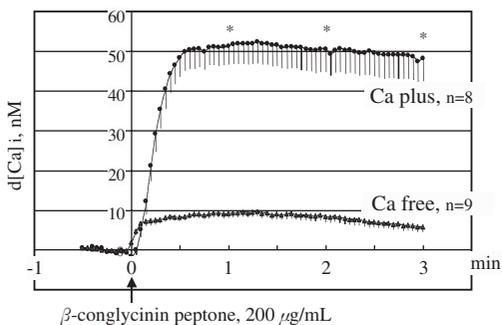


Fig. 6. Effects of removal of extracellular calcium (Ca free) on calcium signaling of STC-1 cells induced with β -conglycinin peptide. *Show significant differences between Ca plus and Ca free 1, 2 and 3 min after addition of β -conglycinin peptide ($P < 0.05$).

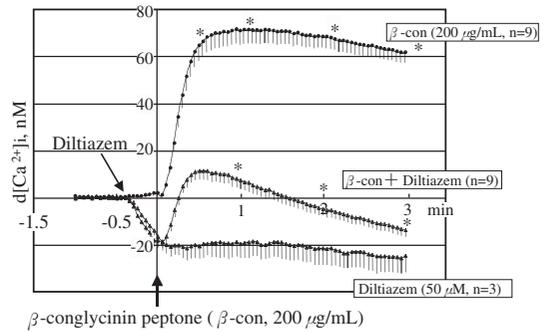


Fig. 7. Effects of L-type calcium channel blocker, diltiazem, on calcium signaling of STC-1 cells induced with β -conglycinin peptide. *Show significant differences from the values without diltiazem 1, 2 and 3 min after addition of β -conglycinin peptide ($P < 0.05$).

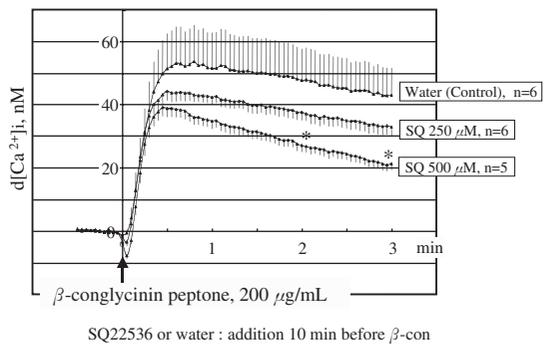


Fig. 8. Effects of adenylate cyclase inhibitor, SQ22536, on calcium signaling of STC-1 cells induced with β -conglycinin peptide. *Show significant differences from the values without SQ22536 2 and 3 min after addition of β -conglycinin peptide ($P < 0.05$).

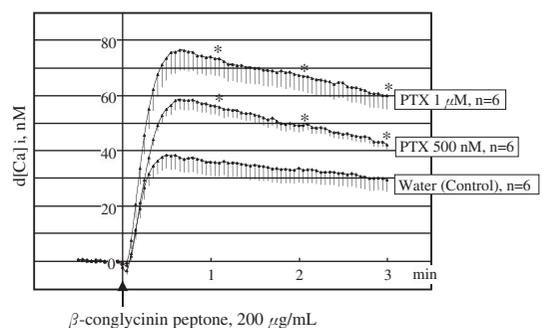


Fig. 9. Effects of pertussis toxin (PTX) on calcium signaling of STC-1 cells induced with β -conglycinin peptide. PTX was added to culture medium 24 hr before assays. *Show significant differences from the values without PTX 1, 2 and 3 min after addition of β -conglycinin peptide ($P < 0.05$).

で無処理群に対して有意な差となった。このことは、Gたん白質型受容体の主要な情報経路であるアデニル酸シクラーゼが、 β -conによるCaシグナル惹起に一部関与していると思われた。次に、Gたん白質のうち、主にG α iを阻害する百日咳毒素 (PTX) で、STC-1細胞を処理すると、 β -conによるCaシグナルは、用量依存性に増強された (Fig. 9)。このことは、 β -conは百日咳毒素感受性Gたん白質を介して一部作用しており、G α iが阻害するアデニル酸シクラーゼが、 β -conによるCaシグナル惹起に関与していることが再度示唆された。

ここで明らかになった β -conにより惹起されるCaシグナルに関与する、細胞内の情報伝達経路をFig. 10にまとめた。

以上より、 β -コングリシニンペプトンおよび β -コングリシニン内在ペプチドは、細胞内Caシグナルを

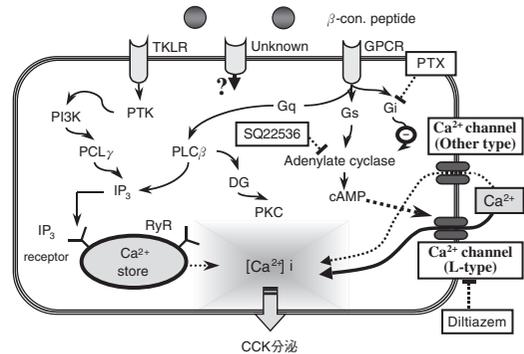


Fig. 10. Signal transduction pathways for β -conglycinin peptide.

惹起し、それには細胞外のCaが主に寄与していることが明らかになった。

要 約

大豆 β -コングリシニンペプトンは小腸粘膜に存在するコレシストキニン (CCK) 産生細胞に認識され、CCK分泌を強く刺激し、ラットの飽食を促進した。この作用には β -コングリシニンの β サブユニットに内在する、4つのアルギニン残基を含むペプチド配列 (β 51-63, VRIRLLQRFNKRS) が関与する。本研究では、 β -コングリシニンペプチドの作用機構を探る目的で、 β -コングリシニンペプチドの細胞内シグナル伝達経路を、マウス消化管上皮細胞由来のCCK産生細胞株STC-1を使って探った。STC-1細胞に β -コングリシニンペプトンを作用させると、非常に早く強い細胞内Caシグナルが惹起された。一方、 β 51-63と、これより弱い飽食作用を示す2種の β -コングリシニン内在ペプチド、 α 212-224と α ' 75-86による細胞内Caシグナルを比較した結果、飽食促進作用に相関したシグナルが惹起された。これらのシグナルは、おもに、電位依存性L型チャンネルを介して流入する細胞外のCaに依存していることが明らかになった。また、adenylate cyclaseの活性化が、細胞内Caシグナル惹起に一部関与することが示唆された。

文 献

- 1) Reidelberger RD and O'Rourke F (1989): Potent cholecystokinin antagonist L364718 stimulates food intake in rats. *Am J Physiol*, **257**, R1512-R1518.
- 2) 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.
- 3) Moran TH and McHugh PR (1982): Cholecystokinin suppresses food intake by inhibiting gastric emptying. *Am J Physiol*, **242**, R491-R497.
- 4) Hara H, Nishi T, Narakino H and Kasai T (1996): CK-independent increases in pancreatic secretion induced by dietary protein in chronic BPJ-diverted rats. *Am J Physiol*, **271**, G501-G508.
- 5) 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.
- 6) Hara H, Nishi T and Kasai T (1995): A protein less sensitive to trypsin, guanidinated casein, is a potent stimulator of exocrine pancreas in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **210**, 278-284.

- 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) Nishi T, Hara H and Tomita F (2003): Soybean β -conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *J Nutr*, 352-357.
- 9) Nishi T, Hara H Asano K and Tomita F (2003): The soybean β -conglycinin β 51-63 fragment suppresses appetite by stimulating cholecystokinin release in rats. *J Nutr*, **133**, 2537-2542.
- 10) 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.
- 11) Rindi G, Grant SG, Yiangou Y, Ghatei MA, Bloom SR, Bantach VL, Solcia E and Polak JM (1990): Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol*, **136**, 1349-1363.
- 12) Gryniewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.