

胆汁酸結合性を発揮する大豆グリシニン由来の 新しいコレステロール代謝改善ペプチド

長岡 利*

岐阜大学応用生物科学部

New Cholesterol-Lowering Peptides with Bile Acids Binding Ability Derived from Soybean Glycinin

Satoshi NAGAOKA

Department of Applied Life Science, Faculty of Applied Biological Sciences,
Gifu University, Gifu 501-1193

ABSTRACT

In this study, we investigated the effects of VAWWMY peptide that is the most hydrophobic region in soy glycinin A1a subunit sequences, and SPH-sup (soy protein peptic hydrolysate supernatant) on cholesterol metabolism. VAWWMY peptide had a significantly greater bile acid-binding capacity *in vitro* compared to casein tryptic hydrolysate (CTH). In addition, it significantly lowered the micellar solubility of cholesterol *in vitro* and significantly suppressed cholesterol absorption *in vivo* compared to CTH. SPH-sup without bile acid-binding capacity has significantly lower micellar solubility of cholesterol *in vitro* compared to CTH. In HepG2 cells, SPH-sup significantly increased cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA level compared to CTH. Thus, we first found the peptide (VAWWMY, we designated as soystatin) derived from soybean glycinin exhibited inhibitory action of cholesterol absorption *in vivo*. Our results suggest that both hydrophobic peptide, for example, soystatin and water-soluble peptide contribute to the hypocholesterolemic action induced by soy protein. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 121-126, 2005.

Key words : soystatin, glycinin, VAWWMY, cholesterol, cholesterol 7 α -hydroxylase

高コレステロール血症などの生活習慣病の増加が指摘されている。これまでの生活習慣病と深く関連する血清コレステロールに対する食餌たん白質の影響に関する研究から、一般に大豆たん白質などを代表とする

植物性たん白質は、牛乳カゼインなどを代表とする動物性たん白質と比較して、血清コレステロール低下作用を有することが知られている¹⁻⁵⁾。大豆たん白質に血清コレステロール低下作用があることは以前から多く報告され、大豆たん白質由来の疎水性ペプチドがコレステロール吸収に大きな役割を担っていると推定さ

* 〒501-1193 岐阜市柳戸1-1

れてきた。しかし、*in vivo*で、コレステロール吸収抑制作用や血清コレステロール低下作用を発揮する大豆ペプチドは、未だに発見されていない。

そこで、大豆たん白質の主要構成たん白質グリシニンのAlaサブユニットで最も疎水度の強い配列であり、*in vitro*で胆汁酸結合性を有することが明らかにされているVal-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr (VAWWMY) ペプチドのコレステロール代謝改善作用について検討した⁶⁾。この検討から、これまで未発見の大豆たん白質由来の新しい血清コレステロール低減化ペプチドを発見し、将来的には特定保健用食品の創成や新しい大豆の分子育種への高度有効利活用をめざしたい。

また、我々は大豆たん白質ペプシン加水分解物の水溶性画分 (SPH-sup) が、カゼイントリプシン加水分解物 (CTH) と比較して、ヒト小腸上皮細胞モデルのCaco-2細胞において、コレステロール吸収を抑制することを見出した。そこで、SPH-supのコレステロール代謝改善作用についても、コレステロール代謝関連遺伝子に対する影響などを検討した。

方 法

SPH-supの調製方法

大豆たん白質ペプシン分解物 (SPH) を20 mg/mLの濃度で純水に懸濁させた。その後、懸濁液を9,000×g, 15°Cで1時間遠心した。遠心後、上清を凍結乾燥した。これをSPHの水溶性画分 (SPH-sup) とした。

*in vitro*における胆汁酸結合能実験

タウロコール酸との結合能は、既報¹⁾に従って測定した。0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) 5 mLに1.85 kBqのタウロ [カルボニル-¹⁴C] コール酸 (ナトリウム塩) (Amersham International, Buckinghamshire, UK), 0.1 mol/Lのタウロコール酸ナトリウム、そして結合基質を含む混合物を37°Cで2時間インキュベートした。その後、15,000×g, 37°Cで15分間遠心した。遠心後、上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

*in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性実験

*in vitro*におけるコレステロールのミセル溶解性は、既報¹⁾に従って測定した。6.6 mmol/Lタウロコール酸ナトリウム, 0.5 mmol/Lコレステロール, 1 mmol/Lオレイン酸, 5.0 mmol/Lモノオレイン, 0.6 mmol/Lフォスファチジルコリン, 132 mmol/L塩化ナトリウム, 15 mmol/Lナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4) を含むミセル溶液をソニケーションによって調製した。その後、混合物を37°Cで24時間インキュベートした。イン

キュベートミセル溶液を反応基質に加え、37°Cで1時間インキュベートした。その後、100,000×g, 37°Cで1時間遠心した。遠心後、上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

in vivo (ラット) におけるコレステロール吸収実験

市販の非精製飼料 (MF, オリエンタル酵母) にて3日間予備飼育後、9週令のWistar系ラットを水は自由摂取のまま48時間絶食させた。ゾンデによって、³Hコレステロールを含む試験溶液を胃の中に経口投与した。方法の詳細は、既報¹⁾に従って行った。

ヒト肝培養細胞HepG2細胞におけるコレステロール代謝関連遺伝子mRNA定量実験

10%ウシ胎児血清を含むMEM培地で培養したHepG2細胞に5 mg/mLの濃度で大豆たん白質ペプシン分解物 (分子量約1,000~8,000のペプチド混合物) や大豆たん白質ペプシン分解物のペプチド分画物 (分子量約1,000~3,000の分画物および、分子量約3,000~8,000の分画物) を添加し、24時間培養した。培養後、細胞を回収し、細胞から全RNAを回収した。回収したRNAを用いて、コレステロール代謝関連遺伝子のmRNAレベルに対する影響をリアルタイム定量PCR法にて定量した。

結果と考察

VAWWMYの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響 (実験1)

実験1では、VAWWMYペプチドの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響について検討した。VAWWMYペプチドは、カゼイントリプシン分解物 (CTH) と比べて、強力な胆汁酸結合能を有することを見出した。コレステロール吸収を抑制する医薬品であるコレステラミンとほぼ同等の胆汁酸結合能を有することが明らかにされた (Fig. 1)。

VAWWMYの*in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性に対する影響 (実験2)

実験2では、VAWWMYペプチドの*in vitro*におけるコレステロールのミセルへの溶解性に対する影響を検討した。VAWWMYペプチドは、CTHと比較して、コレステロールのミセル溶解性を有意に低下させた (Fig. 2)。

VAWWMYの*in vivo* (ラット) におけるコレステロール吸収に対する影響 (実験3)

実験1, 2の結果を踏まえ、実験3では、VAWWMYペプチドの*in vivo* (ラット) におけるコレステロール吸収に対する影響を放射性コレステロールを用いて検

討した。VAWWMYペプチドはCTHと比較して、コレステロール吸収を有意に抑制した (Fig. 3)。実験1～3の結果から、VAWWMYペプチドは腸管内で胆汁酸と結合してコレステロールミセルへの溶解を阻害することにより、腸管でコレステロール吸収抑制作用を示す可能性が示唆された。

SPH-supの*in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性に対する影響 (実験4)

実験4では、SPH-supの*in vitro*におけるコレステロールのミセルへの溶解性に対する影響について検討した。SPH-supはCTHと比較して、コレステロールのミ

セルへの溶解性を有意に低下させた (Fig. 4)。

SPH-supの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響 (実験5)

実験5では、SPH-supの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響について検討した。しかし、SPH-supはCTHと同様にほとんど胆汁酸結合能を示さなかった (Fig. 5)。実験4、5の結果より、水溶性画分であるSPH-supは、疎水性の高いVAWWMYペプチドとは異なるコレステロール代謝改善メカニズムを示すことが明らかにされた。

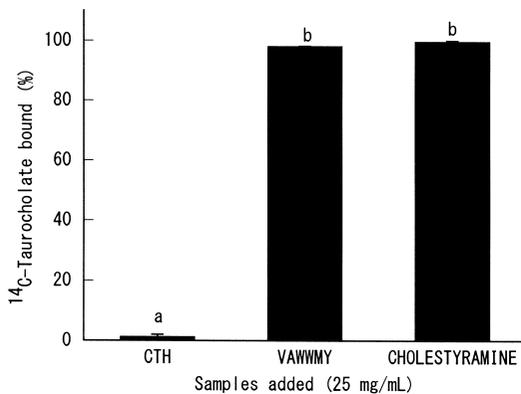


Fig. 1. Binding of taurocholate to casein tryptic hydrolysate (CTH), VAWWMY peptide or cholestyramine *in vitro*. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=3). Mean with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

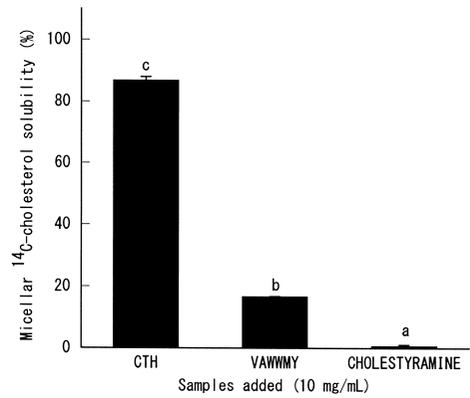


Fig. 2. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH), VAWWMY peptide or cholestyramine on the micellar solubility of cholesterol *in vitro*. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=4). Mean with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

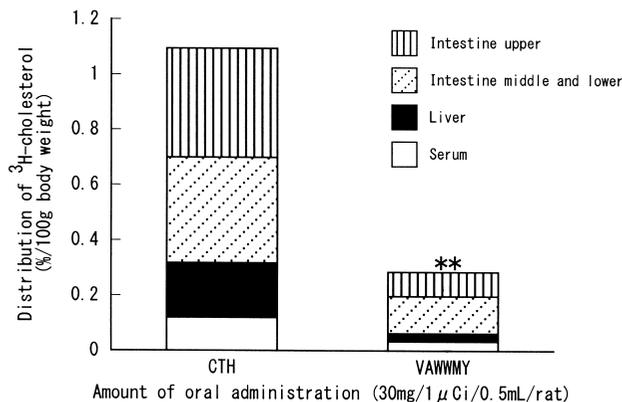


Fig. 3. Effects of the infusion of cholesterol micelles containing casein tryptic hydrolysate (CTH) or VAWWMY peptide on the distribution of [³H]-cholesterol in serum, liver and small intestine of rats. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=9). Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

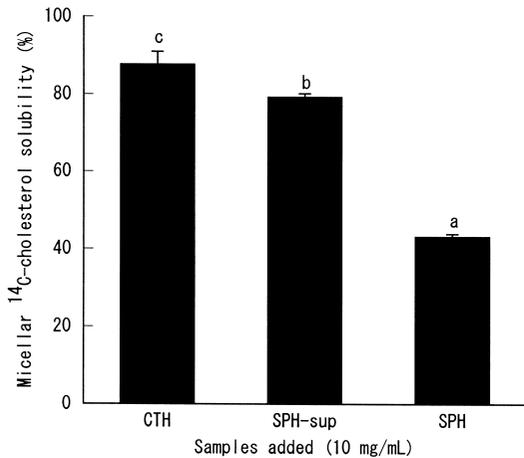


Fig. 4. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH), supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup) or soyprotein peptic hydrolysate (SPH) on the micellar solubility of cholesterol *in vitro*. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=4). Mean with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

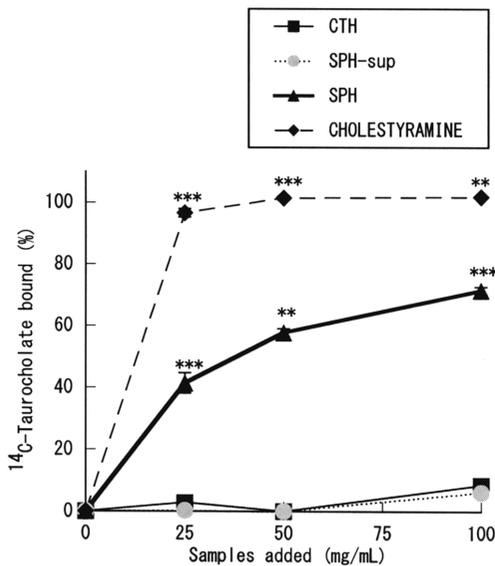


Fig. 5. Binding of taurocholate to casein tryptic hydrolysate (CTH), supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup), soyprotein peptic hydrolysate (SPH) or cholestyramine *in vitro*. Each value is expressed as mean \pm SEM (n=3). Statistical significance compared to CTH or SPH by Student's *t*-test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

SPH-supのヒト肝培養細胞HepG2細胞におけるコレステロール代謝関連遺伝子mRNAレベルに対する影響 (実験6)

実験6では、SPH-supの肝臓への影響を検討するために、HepG2細胞を用いてコレステロール代謝関連遺伝子mRNAレベルに対する影響について検討した。SPH-supはCTHと比較して、コレステロール生合成系の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素および血中から肝臓へコレステロールを取り込むLDLレセプターのmRNAレベルは変化しなかったが、コレステロール分解系の律速酵素であるコレステロール7 α -水酸化酵素(CYP7A1)のmRNAレベルは有意に増加させた(Fig. 6)。このように、SPH-supはコレステロール分解系に働きかけ、肝臓コレステロールレベルを低下させる可能性が示唆された。

SPH-supの分画物(分子量約1,000~3,000: SPH-sup < MW3,000, および分子量約3,000~8,000: SPH-sup > MW3,000)のヒト肝培養細胞HepG2細胞におけるコレステロール7 α -水酸化酵素mRNAレベルに対する影響 (実験7)

実験7では、SPH-supやSPH-supの分画ペプチド(SPH-sup > MW3,000およびSPH-sup < MW3,000)の肝臓への影響を検討するために、HepG2細胞を用いてコレステロール7 α -水酸化酵素(CYP7A1)mRNAレベルに対する影響について検討した。SPH-supはCTHと比較して、コレステロール分解系の律速酵素であるCYP7A1のmRNAレベルを有意に増加させた(Fig. 7)。また、分画したペプチド(SPH-sup > MW3,000)は、SPH-sup自身よりも、CYP7A1のmRNAレベルを増加させた。どのようなペプチドがCYP7A1遺伝子の活性化に関与しているのかは、今後検討すべきたいへん興味深い点である。

以上より、高い疎水性を持つVAWWMYペプチドは、腸管内で胆汁酸と結合してコレステロールのミセルへの溶解を阻害することにより、*in vivo*においてコレステロール吸収抑制作用を示すことを初めて発見し、VAWWMYペプチドをsoystatinと命名した。大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分であるSPH-supは小腸でコレステロール吸収を抑制し、肝臓でコレステロールの分解を促進している事が示唆された。このように、大豆たん白質のコレステロール代謝改善作用は、それぞれ役割の異なる疎水性ペプチドおよび水溶性ペプチドの協調作用により発現している可能性が示唆された。

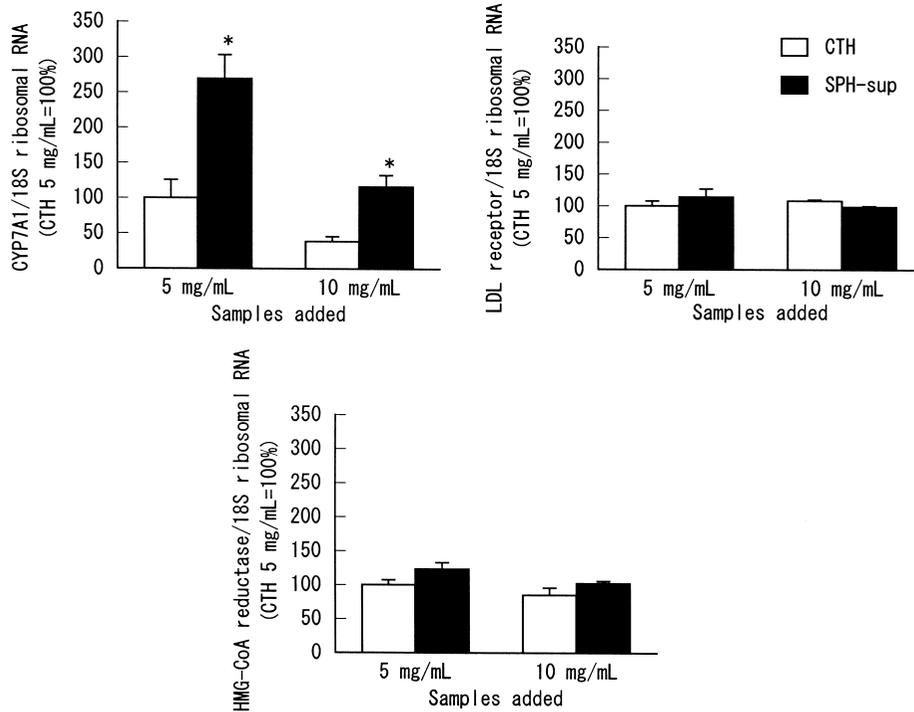


Fig. 6. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH) or supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup) on the hepatic gene expression related to cholesterol metabolism in HepG2 cells (Standardized against 18S ribosomal RNA). Each value is expressed as mean \pm SEM (n=3). Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test (* $P < 0.05$).

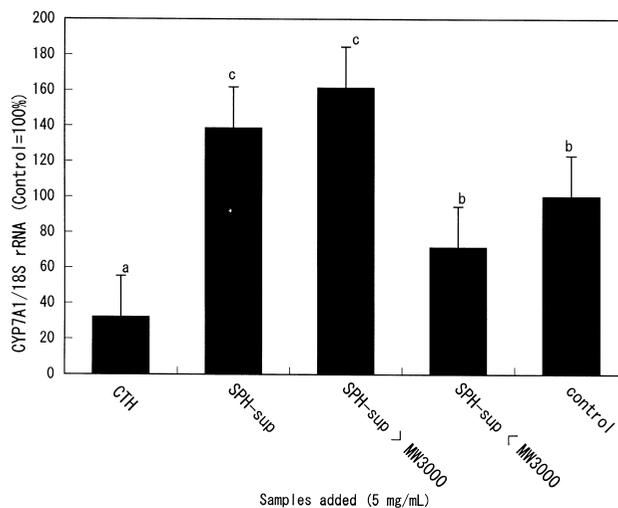


Fig. 7. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH) or supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup), SPH-sup fraction over molecular weight 3,000 (SPH-sup > MW 3,000) or SPH-sup fraction below molecular weight 3,000 (SPH-sup < MW 3,000) on cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression in HepG2 cells (Standardized against 18S ribosomal RNA). Each value is expressed as mean \pm SEM (n=3). Bars without a common letter differ ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

要 約

大豆グリシニンのAlaサブユニット配列中で最も疎水度の強いVAWWMYペプチドおよび大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分 (SPH-sup) のコレステロール代謝改善作用について検討した。VAWWMYペプチドはカゼイントリプシン加水分解物 (CTH) と比較して, *in vitro*で胆汁酸結合能を示し, コレステロールミセル溶解性を有意に低下させ, *in vivo*においてコレステロール吸収を有意に抑制した。SPH-supはCTHと比較して, *in vitro*でコレステロールミセル溶解性を有意に低下させたが, 胆汁酸結合能は示さなかった。HepG2細胞において, SPH-supはCTHと比較して, コレステロール 7 α -水酸化酵素のmRNAレベルを有意に増加させた。以上より, *in vivo*において, コレステロール吸収抑制作用を発現する大豆グリシニン由来ペプチド (VAWWMY: soystatinと命名) を初めて発見した。また, 大豆たん白質の疎水性ペプチドだけでなく, 水溶性ペプチド (分子量約 3,000~8,000の分画物) もコレステロール代謝改善作用に寄与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G and Yamamoto K (1999): Soyprotein peptic hydrolyzate with bound phospholipids decrease micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J Nutr*, **129**, 1725-1730.
- 2) Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Kojima T and Kuwata T (2001): Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 11-17.
- 3) Carroll KK and Hamilton RMG (1975): Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J Food Sci*, **40**, 18-23.
- 4) Nagaoka S, Kanamaru Y and Kuzuya Y (1991): Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. *Agric Biol Chem*, **55**, 813-818.
- 5) 長岡 利 (1996): 食品成分および生体異物によるコレステロール代謝制御に関する研究. 日本栄養・食糧学会誌, **49**, 303-313.
- 6) Choi SK, Adachi M and Utsumi S (2004): Improved bile acid-binding ability of soybean glycinin Ala polypeptide by the introduction of a bile acid-binding peptide (VAWWMY). *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 1980-1983.