

大豆ペプチドによるIRS-1の分解抑制

二川 健*・平坂勝也・不老地治美・山田千晴・後藤淳平・中尾玲子・岸 恭一

徳島大学医学部栄養生理

Inhibitory Effects of Soy Protein-Derived Peptides on IRS-1 Degradation

Takeshi NIKAWA, Katsuya HIRASAKA, Harumi FUROCHI, Jumpei GOTO,
Reiko NAKAO and Kyoichi KISHI

Department of Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine
Tokushima 770-8503

ABSTRACT

We previously demonstrated that ubiquitin ligase Cbl-b stimulates ubiquitination and degradation of IRS-1 in skeletal muscle and bone during unloading. In this study, we examined inhibitory effects of soy protein-derived peptides, such as glycine and β -conglycinin on Cbl-b-mediated ubiquitination of IRS-1. Using a cell-free ubiquitination system, we found that a kind of soy protein-derived peptides inhibit IRS-1 ubiquitination mediated by Cbl-b. Our results suggest that soy protein may contain bioactive peptides for regulating proteolysis in skeletal muscle. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 68-70, 2006.

Key words : IRS-1, skeletal muscle, soy protein-derived peptides, ubiquitination

寝たきりや無重力による廃用性筋・骨萎縮の原因遺伝子の一つがユビキチンリガーゼCbl-bであることを同定した¹⁻³⁾。このユビキチンリガーゼは、筋細胞や骨芽細胞の活性化因子であるインスリンやインスリン様増殖因子の重要な細胞内情報伝達分子インスリン受容体基質-1 (Insulin Receptor Substrate-1) のユビキチン化と分解を促進する。我々はまず、試験管内でCbl-bによるIRS-1のユビキチン化反応系を確立した。大豆たん白質を11S (グリシニン), 7S (β -コングリニシン), LP (脂質に富む大豆たん白質群) に精製し、

それぞれをたん白質分解酵素で分解したオリゴペプチド群のCbl-bユビキチン化阻害活性を上記のユビキチン化反応系で測定した。

方 法

大豆たん白質由来オリゴペプチド群

大豆たん白質を11S (グリシニン), 7S (β -コングリニシン), LP (脂質に富む大豆たん白質群) に精製し、それぞれをたん白質分解酵素で分解したオリゴペプチド群を用いた。

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

Cell-free Ubiquitination

Cbl-bによるIRS-1 (insulin receptor substrate-1) のユビキチン化を試験内で再構築した。Heck293細胞を直径10 cmのディッシュ2枚に培養する。それぞれにCbl-bとIRS-1の遺伝子を含むプラスミドを強発現し、それぞれの抗体による免疫沈降で精製する。

それらとオリゴペプチドを、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンとATPを含むエネルギー産生溶液反応系で37℃で4時間反応する。反応停止後、全量をSDS-5%-PAGEに供しWestern blotting解析した。

ウェスタンブロット法

20 μ g量のたん白質をSDS化後、8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のたん白質はセミドライプロット装置 (ATTO) を用いてPolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写後、PVDF膜を4%精製ミルクカゼインで1時間ブロッキングし、0.05% Tween-20を含むPBS (PBS-T) で洗浄した。次に膜を希釈した一次抗体と室温で1時間反応させた。PBS-Tで洗浄後、希釈した二次抗体 (抗ウサギIgG抗体) と室温でさらに1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence検出システム (Amersham, Little Chalfont, UK) を用いて抗体と反応したたん白質を検出した。

結 果

Cell-free ubiquitination

Fig. 1に示すように、Cbl-bはIRS-1のユビキチン化を有意に促進することがわかった。

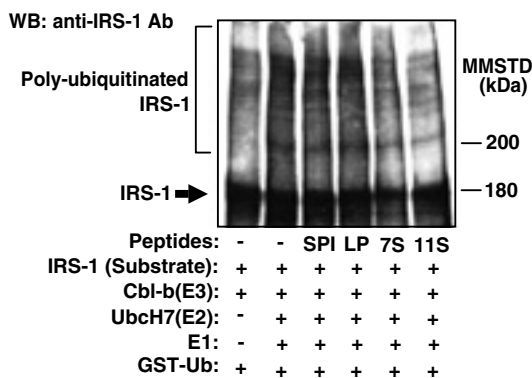


Fig. 1. Inhibitory effects of 11S (glycinin) on IRS-1 ubiquitination mediated by Cbl-b.

大豆たん白質由来オリゴペプチド群によるCbl-bのユビキチン化活性の阻害

Fig. 1に示すように、11SグリシニンがCbl-bによるIRS-1のユビキチン化を有意に阻害した。一方、7S-コングリシニンの阻害効果は弱く、脂質に富むたん白質群やSPI (Soy protein isolate) には阻害効果は認められなかった。

考 察

今回の結果より、11Sグリシニン由来の阻害ペプチド群はユビキチンリガーゼと基質の結合、あるいはユビキチンと基質の結合を競合阻害できることがわかった (Fig. 1)。11Sグリシニン由来の阻害ペプチド群の中で実際に基質のユビキチン化を阻害できるペプチドの含量はとても少ないので、多量のペプチド群が必要であった。今後この有効なペプチドを同定し、より阻害効果の高いものを多く含むペプチド群を作成していく必要がある。

ユビキチン-プロテアソームたん白質分解経路ががんや神経筋変性疾患で重要な働きをしていることは周知の事実である。この分解経路を制御することはこれら疾患の治療につながるが、ユビキチンリガーゼの阻害剤は、これまで全く報告されていない。そのため、これまでは分解の最終段階であるプロテアソームの活性を抑制するしか手段がなかった。しかしながら、プロテアソームの阻害剤は非常に毒性が強く、がんの末期などの治療薬としてしか実用化されていない。それに対し、本ペプチド群によるユビキチンリガーゼの阻害は基質選択性が高く、副作用が小さく、有用な食品成分としても期待されている。また、今回の阻害ペプチド群は大豆たん白質より作成されるものなので、食品サプリメントとしてすぐにでも実用化できる。大豆たん白質の健康補助食品としての価値を高めるものである。

要 約

これまでの研究で、我々はユビキチンリガーゼCbl-bはインスリン受容体基質たん白質（IRS-1）の分解を亢進する、寝たきりによる運動器（骨，筋）萎縮の原因遺伝子の一つであることを見出した。それゆえ、このCbl-bのユビキチン化活性を阻害できる物質は、寝たきりによる運動器の萎縮を抑制できる可能性が示唆された。本研究では、まずCbl-bによるIRS-1のユビキチン化をCell-freeで観察できるシステムを構築した。そこで、大豆たん白質をグリシニン、 β -コングリシニン、脂質に富むたん白質群に精製し、それらをそれぞれたん白質分解酵素で分解してできたペプチド群のユビキチン化阻害活性を測定した。興味深いことに、その分解産物群の一つにCbl-bによるIRS-1のユビキチン化に対する阻害活性があることがわかった。大豆由来ペプチドは、骨格筋内のユビキチン化依存性たん白質分解経路を制御することにより、筋肉の代謝を改善できる有益な食事素材になりうるのではないかと考えられた。

文 献

- 1) Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K and Takeda S (2004): Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18**, 522-524.
- 2) Nikawa T, Ikemoto M, Sakai T, Kano M, Kitano T, Kawahara T, Teshima S, Rokutan K and Kishi K (2002): Effects of a soy protein diet on exercise-induced muscle protein catabolism in rats. *Nutrition*, **18**, 490-495.
- 3) Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Kosaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K and Yasui N (2006): Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-I signaling in osteoblasts during denervation. *J Bone Miner Res*, **21**, 722-734.