

遺伝子工学的手法を含む新しい評価系を活用した大豆由来新規血清 コレステロール低減化ペプチドの探索・評価

長岡 利*

岐阜大学応用生物科学部

Screening and Evaluation of the New Cholesterol-lowering Peptides Derived from Soybean by a New Evaluation System Including a Genetic Engineering Approach

Satoshi NAGAOKA

Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193

ABSTRACT

Although the hypocholesterolemic action of soybean protein is well known, hypocholesterolemic peptides has not been found yet. Thus, in the present study, we investigated the effects of soybean peptides (SPH-sup: peptide mixture with molecular weight less than <8 KDa.) on gene expression related to cholesterol metabolism. The SPH-sup exhibited hypocholesterolemic action in rats by increasing the mRNA level of cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate limiting enzyme for cholesterol catabolism, compared to casein tryptic hydrolyzate (CTH) accompanying the decrease of cellular cholesterol. However, both HMG-CoA reductase and LDL-receptor mRNA levels were unchanged by SPH-sup in HepG2 cells. Furthermore, when we investigated the cholesterol absorption, excretion, and storage in Caco-2 cells using a membrane culture system, the cholesterol excretion significantly increased accompanying the decrease of cellular cholesterol absorption. ABCA1, NPC1L1, SR-BI and ACAT2 mRNA were unchanged by SPH-sup in Caco-2 cells. Taken all together, soy peptides may directly affect the regulatory system related to the hepatic and intestinal cholesterol metabolism. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 105-110, 2007.

Key words: cholesterol, cholesterol 7 α -hydroxylase, HMG-CoA reductase, LDL-receptor, HepG2, Caco-2

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 (CHOL) 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CHOL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CHOL低下作用があることは以前から多く報告され、

*〒501-1193 岐阜市柳戸1-1

大豆たん白質由来の疎水性ペプチドがCHOL吸収に大きな役割を担っていると推定されてきた。しかし, *in vivo*で, 血清CHOL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, 血清CHOL低下作用を発揮する大豆ペプシン分解物 (SPH) の水溶性画分 (SPH-sup) を用いて, CHOL代謝関連遺伝子に対する影響を含め, CHOL代謝改善作用について, ヒト肝臓のモデルであるHepG2細胞で検討した。また, 我々は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, CHOL吸収を抑制することを見出した。そこで, SPH-supの腸におけるCHOL代謝改善作用についても, CHOLの吸収・排出・貯蔵を含め, CHOL吸収・排出関連遺伝子に対する影響などを検討した。

これらの検討から, これまで未発見の大豆たん白質由来の新しい血清CHOL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。

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℃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。

ヒト肝培養細胞HepG2における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関連遺伝子mRNAに対する影響 (実験1)

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の水溶性画分 (SPH-sup: 分子量約1,000~8,000のペプチド混合物) 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。

ヒト肝培養細胞HepG2における大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分 (SPH-sup) およびSPH-supの分画物 (分子量約1,000以下: SPH-sup<MW1000, および分子量約1,000以上: SPH-sup>MW1000) のコレステロール7 α -水酸化酵素mRNAに対する影響 (実験2)

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の水溶性画分 (SPH-sup: 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水溶性画分のペプチド分画物 (分子量約1,000以下の分画物および, 分子量約1,000以上の分画物) 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7 α -水酸化酵素の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。

ヒト腸培養細胞Caco-2における大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分 (SPH-sup) のコレステロール吸収・排出・蓄積に対する影響 (実験3)

10%ウシ胎児血清を含むMEM培地で, セルカルチャーインサートプレート (膜状に培養する方法) を用いて検討した。培養したCaco-2細胞に5 mg/mLの濃度で大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分 (SPH-sup: 分子量約1,000~8,000のペプチド混合物) を添加し, 12時間または, 24時間培養した。培養後, 12時間および24時間で, [³H]コレステロールを用いて, コレステロール吸収・排出・貯蔵に対する影響を定量した。ヒト腸培養細胞Caco-2における大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分 (SPH-sup) のコレステロール吸収・排出関連遺伝子mRNAに対する影響 (実験4)

10%ウシ胎児血清を含むMEM培地で, セルカルチャーインサートプレート (膜状に培養する方法) を用いて検討した。培養したCaco-2細胞に5 mg/mLの濃度で大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分 (SPH-sup: 分子量約1,000~8,000のペプチド混合物) を添加し, 12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, コレステロール吸収・排出関連遺伝子の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

ヒト肝培養細胞HepG2における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関連遺伝子mRNAに対する影響 (実験1)

実験1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. 1)。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。

ヒト肝培養細胞HepG2における大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分（SPH-sup）およびSPH-supの分画物（分子量約1,000以下：SPH-sup<MW1000、および分子量約1,000以上：SPH-sup>MW1000）のコレステロール7 α -水酸化酵素mRNAに対する影響（実験2）

実験2では、SPH-supやSPH-supの分画ペプチド（SPH-sup<MW1000）およびSPH-sup>MW1000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. 2）。また、分画したペプチド（SPH-sup>MW1000）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。

ヒト腸培養細胞Caco-2における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

吸収・排出・蓄積に対する影響（実験3）

実験3では、SPH-supの腸への影響は、Caco-2細胞を用いてコレステロール吸収・排出・蓄積について検討した。SPH-supはCTHと比較して、腸粘膜細胞からのコレステロール排出を有意に増加させた。細胞内へのコレステロール吸収量は、SPH-supでCTHと比べて、有意に低下した。腸細胞からbasolateral側への排泄に有意な変化はなかった（Fig. 3a, 3b, 3c）。このように、SPH-supはコレステロール吸収・排出系に働きかけ、腸コレステロール吸収を低下させるとともに、排出を促進することが明らかにされた。

ヒト腸培養細胞Caco-2における大豆たん白質ペプシン分解物の水溶性画分（SPH-sup）のコレステロール吸収・排出関連遺伝子mRNAに対する影響（実験4）

実験4では、SPH-supの腸コレステロール吸収・排出関連遺伝子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、ABCA1, SR-BI, NPC1L1, ACAT2などのコレステロール吸収・排出関連遺伝子mRNAレベルは変化しなかった（Fig. 3）。

このように、SPH-supはコレステロール吸収・排出系に働きかけ、腸コレステロール吸収を低下させるとともに、排出を促進する可能性が示唆された。つまり、

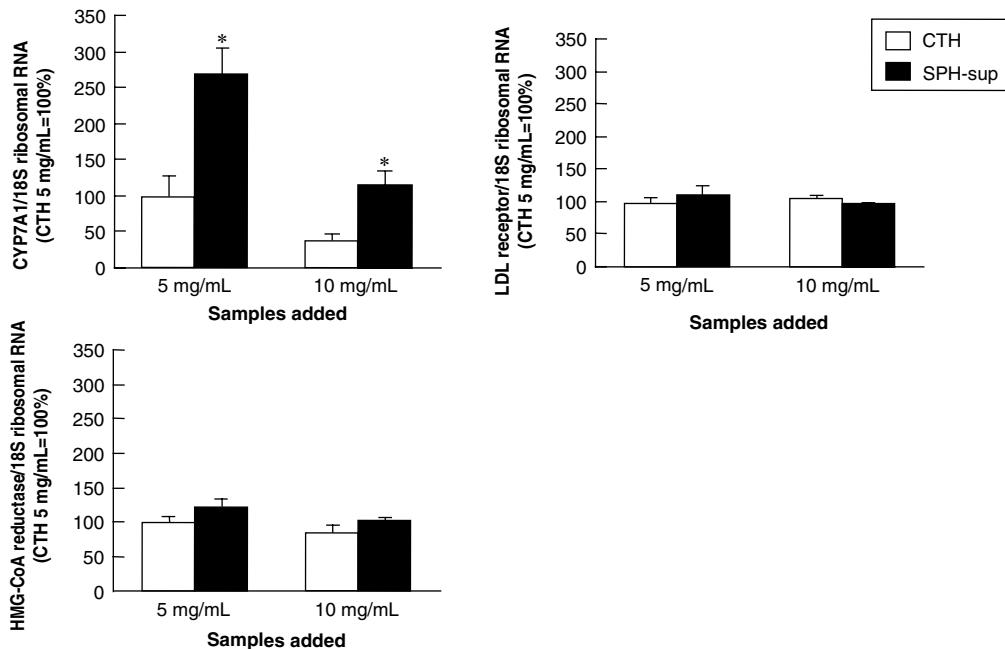


Fig. 1. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH) or supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup) on the hepatic gene expression related to cholesterol metabolism in HepG2 cells (standardized against 18S ribosomal RNA). Each value is expressed as means $\pm$ SEM (n=3). Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test (* p <0.05).

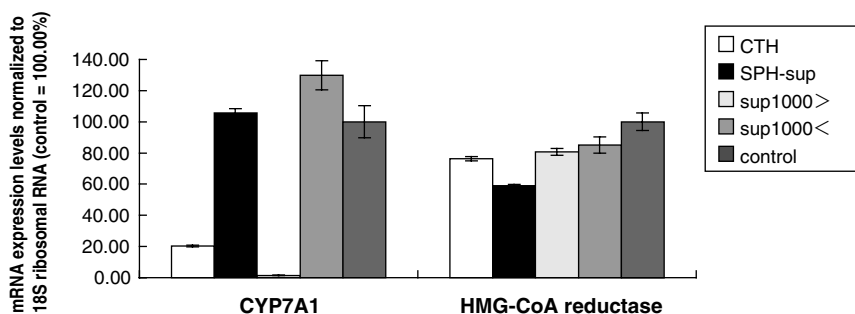


Fig. 2. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH) or supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup), SPH-sup fraction molecular weight more than 1,000 (SPH-sup>MW 1000) or SPH-sup fraction molecular weight less than 1000 (SPH-sup<MW 1000) on cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression in HepG2 cells (Standardized against 18S ribosomal RNA). Each value is expressed as means $\pm$ SEM (n=3). Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test (**p*<0.05).

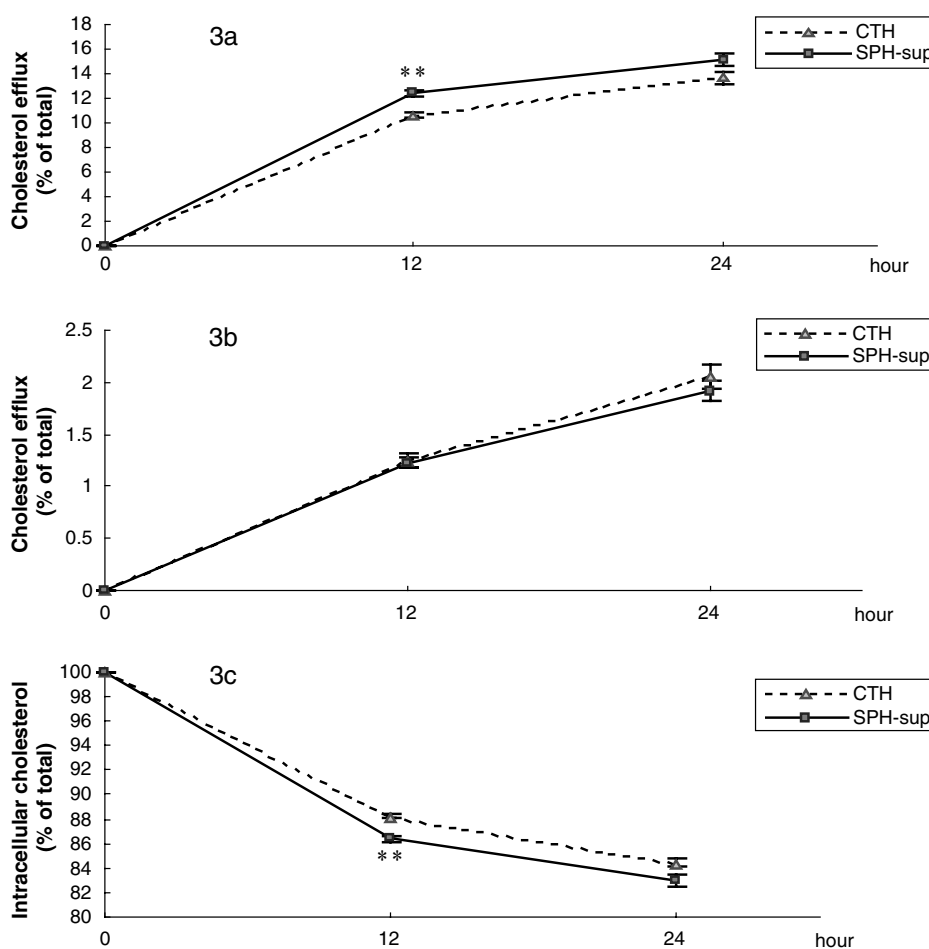


Fig. 3. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH) or supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup) on cholesterol efflux to apical side (3a), cholesterol efflux to basolateral side (3b), and intracellular cholesterol (3c) in HepG2 cells. Each value is expressed as means $\pm$ SEM (n=3). Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test (**p*<0.05).

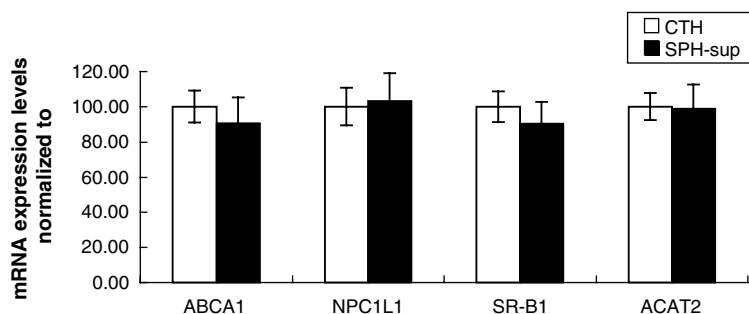


Fig. 4. Effects of casein tryptic hydrolysate (CTH) or supernatant of soyprotein peptic hydrolysate (SPH-sup) on ABCA1, SR-BI, NPC1L1 and ACAT2 gene expression in HepG2 cells (Standardized against 18S ribosomal RNA). Each value is expressed as means $\pm$ SEM (n=3). Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test (**p*<0.05).

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、コレステロール排出を促進するとともに、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。

以上の結果から、大豆ペプチドが肝臓や腸の細胞に「直接作用」して、CHOL分解促進作用やCHOL吸収抑制（排出促進）作用を発揮する可能性が考えられた。これは、大豆ペプチドが回腸で胆汁酸と結合し、胆汁酸の再吸収を抑制し、胆汁酸の体内プールが減少し、その結果として、肝臓の胆汁酸合成がCYP7A1の活性

化により誘導され、CHOL低下作用を発揮するという「間接作用」とも言うべき仮説とは異なった、従来にはない「新しい仮説」が提案できることを示すものである。この仮説は、我々の発見した乳由来のコレステロール代謝改善ペプチドである「ラクトスタチン」は、Caチャンネルの媒介するMAPキナーゼに関連した新しい肝臓分解調節系を活性化して、コレステロール7 α -水酸化酵素遺伝子を活性化する情報伝達機構の存在⁶⁾からも支持されると考える。

要 約

大豆たん白質に血清コレステロール (CHOL) 低下作用があることは以前から多く報告されてきたが、*in vivo*で、血清CHOL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、ヒト肝臓由来細胞HepG2に大豆ペプチド (SPH-sup：分子量約8,000以下のペプチド混合物) を添加し、CHOL代謝関連遺伝子のmRNAに対する影響を検討した。ラットで血清CHOL低下作用を発揮するSPH-supは、カゼインペプチド (CTH) と比較して、CHOL分解系の律速酵素であるCHOL7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) のmRNAを有意に増加させ、細胞内CHOLを有意に減少させた。さらに膜上に培養したヒト腸由来細胞Caco-2に、SPH-supを添加し、CHOL吸収、排出、貯蔵に対する影響を検討した結果、SPH-supはCTHと比較して、CHOL排出を有意に増加させ、細胞内CHOLを有意に減少させた。以上の結果から、大豆ペプチドが肝臓や腸の細胞に「直接作用」して、CHOL分解促進作用やCHOL吸収抑制（排出促進）作用を発揮する可能性が考えられた。これは、大豆ペプチドが回腸で胆汁酸と結合し、胆汁酸の再吸収を抑制し、胆汁酸の体内プールが減少し、その結果として、肝臓の胆汁酸合成がCYP7A1の活性化により誘導され、CHOL低下作用を発揮するという「間接作用」とも言うべき仮説とは異なった、従来にはない「新しい仮説」が提案できることを示すものである。

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) Morikawa K, Kondo I, Kanamaru Y and Nagaoka S (2007): A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, **352**, 697-702.