

脂質代謝改善作用を持つ大豆たん白質由来ペプチドの検索

永尾晃治^{*1}・井上奈穂¹・坂田幸太郎¹・山野尚美¹・松井利郎²・柳田晃良¹

¹佐賀大学農学部生命機能科学科 ²九州大学大学院生物資源環境科学府

Screening of Soy Protein-Derived Hypolipidemic Peptides Using *in vitro* and *in vivo* Systems

Koji NAGAO¹, Nao INOUE¹, Kotaro SAKATA¹, Naomi YAMANO¹,
Toshiro MATSUI² and Teruyoshi YANAGITA¹

¹Laboratory of Nutrition Biochemistry, Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502

²Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University,
Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Soy protein is one of the vegetable proteins examined extensively for lipid lowering effect in humans and in experimental animals. Although soy protein isolate contains certain amount of bioactive peptides which have distinct physiological activities in lipid metabolism, it is not clear that which peptides are responsible for these effects. In the present study we have investigated the effect of soy protein-derived peptides on lipid metabolism in HepG2 cells and obese OLETF rats. In the first experiment, we found that soy crude peptide (SCP-LD3), which is made by hydrolysis of soy protein isolate with endo-type protease, showed hypolipidemic effects in HepG2 cells and in OLETF rats. In the second experiment, we found that hydrophilic peptides, separated from SCP-LD3 with hydrophobic synthetic absorbent, revealed lipid lowering effect in HepG2 cells and in OLETF rats. In the third experiment, we found that F4 peptides, fractionated from hydrophilic peptides by GPC-HPLC, significantly reduced TG synthesis and apoB secretion in HepG2 cells. In the fourth experiment, we found that 0% CH₃CN/0.1% TFA-fraction, isolated from F4 peptides by ODS column chromatography, showed hypolipidemic effect in HepG2 cells. In conclusion, we could have isolated active peptide fraction of lipid lowering effects from soy protein. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 99-104, 2008.

Key words : soy peptide, OLETF rat, HepG2 cell, triglyceride, apolipoprotein B-100

*〒840-8502 佐賀市本庄町1番地

近年、過栄養や運動不足を背景とした生活習慣病の増加が社会的問題となっている。中でも主要な症候である脂質代謝異常は、肝臓における脂質蓄積から高脂血症、さらに動脈硬化性疾患を惹起するため、その予防や改善に有効な機能性食品成分の導入が望ましいとされている。大豆たん白質は、これまでに血清コレステロール低下作用や抗がん作用などが報告され、注目されている食品素材である^{1~4)}。また近年、食用たん白質からより多様な機能性を求めて、様々な酵素消化によりペプチドを調製する試みが行われている^{5~9)}。本研究では、微生物由来プロテアーゼによる分離大豆たん白質の酵素消化物SCP-LD3から、脂質低下作用、特にトリグリセリド低下作用を持つペプチド配列を同定することを目的とした。

方 法

*in vivo*実験

実験1および2ともに、雄Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット（大塚製薬(株)、徳島）を粉末食で1週間予備飼育した。AIN76組成に準じた純化食を対照食として、SCP-LD3もしくは疎水性ペプチドについて窒素含量を考慮してカゼインと置き換えた実験食を調整し、OLETFラットに2週間摂食させた。飼育終了後、ジエチルエーテル麻酔下にて大動脈採血により屠殺を行い、肝臓を摘出した。脂質分析は、肝臓からFolch法により総脂質を抽出し、アセチルアセトン法によりトリグリセリド濃度を測定した。

*in vitro*実験

HepG2細胞は大日本住友製薬株式会社（大阪）から購入した。細胞をDulbecco's modified Eagle's medium (DME培地, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) にて培養し、コンフルエントな状態で0.5 mMオレイン酸を含む1% BSA-DME培地で24時間前培養した。前培養後、試験培地に交換し、同時に放射性脂質前駆体である [¹⁴C] 酢酸を18.5 kBq添加し、24時間培養を行った。これらの細胞と培地を回収し、分析に供した。細胞および培地の脂質は、Bligh and Dyer法により抽出した。抽出した脂質は、薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) 法により分画し、イメージングプレートおよびバイオイメージングアナライザ (BAS1000, 富士写真フイルム, 神奈川) を用いて各脂質画分の放射能活性を測定した。培地中のアポリポたん白質B100は、Total Human Apolipoprotein B ELISA assay (ALerCHEK, inc., Maine, USA) を用いたELISA法によって測定した。

統計処理

データの統計解析は、Student's *t*-testもしくはTukey-Kramer法を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果と考察

実験1では、ヒト肝臓由来のHepG2細胞を用いた*in vitro*実験系と肥満・高脂血症を発症するOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いた*in vivo*実験系を用いて、分離大豆たん白質を微生物由来のエンド型プロテアーゼで処理して調製した大豆ペプチドSCP-LD3が、脂質、特にトリグリセリド低下作用を持つことを見出した (Fig. 1)。

さらにその活性本体の単離を目指し、大豆ペプチドSCP-LD3を疎水性吸着樹脂によって分画を行い、同様の評価を行ったところ、HepG2細胞において未吸着の親水性画分が強いトリグリセリド合成の低下を示し、OLETFラットにおいても肝臓トリグリセリド濃度の低下を示すことが確認された (Fig. 2)。

そこで、この大豆たん白質由来ペプチドSCP-LD3親水性画分について更なる分画を行い、ヒト肝臓由来HepG2細胞を用いて栄養生理機能を持つペプチド配列の検索を行った。分取できるペプチドが微量であること、これまでの評価において*in vitro*実験系と*in vivo*実験系の結果が対応していることから、実験3および4では*in vitro*実験系のみで作用評価を行った。

実験3では、大豆ペプチドSCP-LD3親水性画分のGPC-HPLC分画物 (F2, F3, F4) がHepG2細胞の脂質合成に及ぼす影響について検討した。その結果、ペプチド無添加群と比較して、F3とF4画分は濃度依存的に細胞トリグリセリド合成を抑制した (Fig. 3)。これまでに報告されている大豆由来機能性ペプチドの鎖長は、主に3~13のアミノ酸からなるオリゴペプチドである^{10~15)}。本実験において脂質低下作用を示したF3, F4画分は、ジもしくはトリペプチドを多く含む画分であり、小腸上皮細胞刷子縁膜で発現するオリゴペプチドトランスポーターによってそのまま吸収されることが考えられることから¹⁶⁾、腸管からの吸収され易さからも生体内で生理機能を発揮しやすいことが示唆される。

実験4では、大豆ペプチドSCP-LD3親水性F4画分をODSオープンカラムクロマトグラフィーにより分画し、得られた0%CH₃CN/0.1%TFA画分と20%CH₃CN/0.1%TFA画分がHepG2細胞の脂質合成および分泌に及ぼす影響について検討した。その結果、

ペプチド無添加群と比較して、0%および20%CH₃CN/0.1%TFA画分の添加により、細胞のトリグリセリド合成が顕著に低下し、とくに0%CH₃CN/0.1%TFA画分では培地中へのトリグリセリドの分泌も抑制していた (Fig. 4, 5)。

アポリポたん白質B100は肝臓で生合成されるVLDLの必須構成たん白質である。アポリポたん白質B100の細胞内代謝にはトリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質代謝が影響するが、特にトリグリセリド合成が強く関与することが知られている^{17, 18)}。血中におけるアポリポたん白質B100の濃度は冠状動脈疾患

といった動脈硬化症の発症率と正の相関を示すため、その過剰分泌は独立した危険因子である¹⁹⁾。そこで、両ペプチド画分がアポリポたん白質B100分泌に及ぼす影響について検討した結果、0%CH₃CN/0.1%TFA画分の添加により顕著な低下が認められた (Fig. 6)。その機序として、0%CH₃CN/0.1%TFA画分がトリグリセリドを中心とする脂質合成を顕著に低下させたことで、アポリポたん白質B100は十分量の脂質を得ることができず、ユビキチン化されてプロテアソームで分解されたものと推察された。

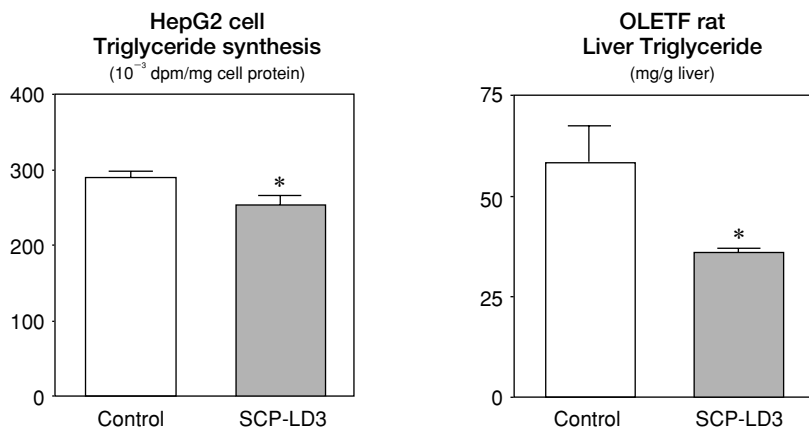


Fig. 1. Effect of SCP-LD3 on triglyceride synthesis in HepG2 cells and liver triglyceride concentration in OLETF rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells and six rats. Asterisk shows significant difference at $p < 0.05$.

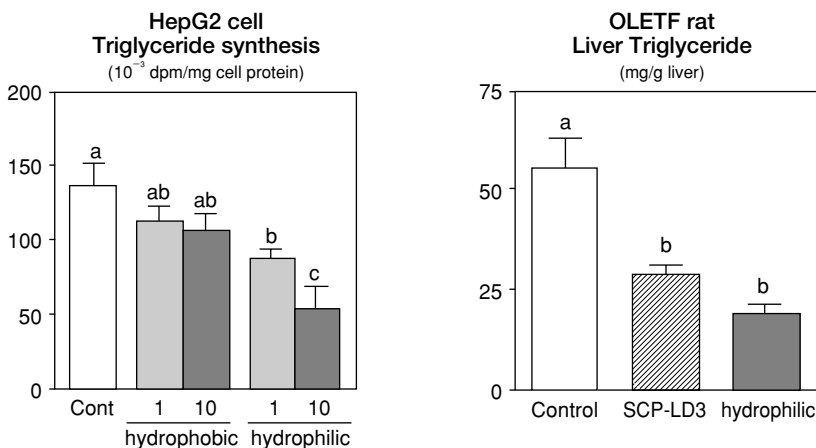


Fig. 2. Effect of hydrophilic fraction of SCP-LD3 on triglyceride synthesis in HepG2 cells and liver triglyceride concentration in OLETF rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells and six rats. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$.

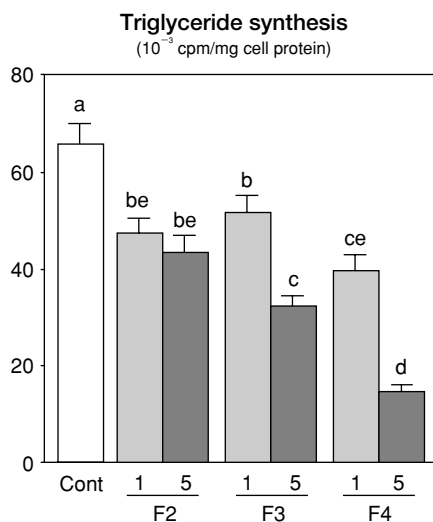


Fig. 3. Effect of soy peptides on triglyceride synthesis in HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$. Soy peptide were added to the medium at the concentration of 1 or 5 mg/mL.

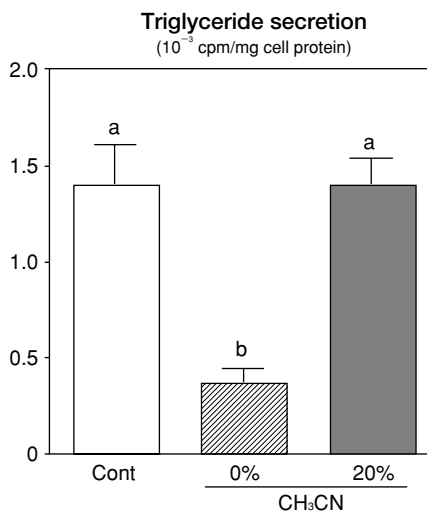


Fig. 5. Effect of soy peptides on triglyceride secretion from HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$. 0%, 0%CH₃CN/0.1%TFA fraction; 20%, 20%CH₃CN/0.1%TFA fraction.

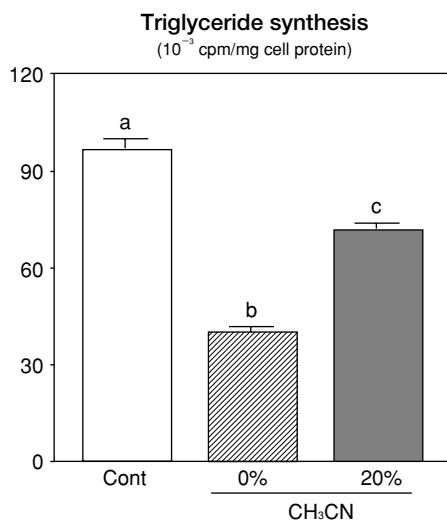


Fig. 4. Effect of soy peptides on triglyceride synthesis in HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$. 0%, 0%CH₃CN/0.1%TFA fraction; 20%, 20%CH₃CN/0.1%TFA fraction.

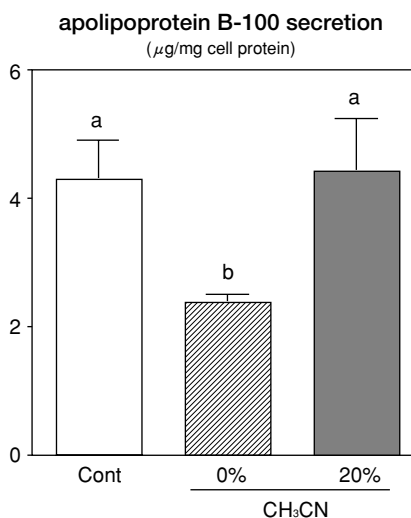


Fig. 6. Effect of soy peptides on apolipoprotein B-100 secretion from HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$. 0%, 0%CH₃CN/0.1%TFA fraction; 20%, 20%CH₃CN/0.1%TFA fraction.

要 約

実験の結果、SCP-LD3およびその疎水性吸着樹脂分画物である未吸着親水性画分が、ヒト肝臓由来HepG2細胞および肥満・高脂血症モデルであるOLETFラットの肝臓におけるトリグリセリド蓄積を抑制することを見いだした。そこで、親水性画分をゲル浸透高速液体クロマトグラフィーにより分画を行い、得られた画分を用いてHepG2細胞の脂質代謝およびリポたん白質分泌に及ぼす影響について検討した。その結果、主にジペプチドを含む画分に、脂質低下作用を有するペプチドが含まれていることが示唆された。そこで次に、ODSカラムクロマトグラフィーを用いて更なる分画を行い、HepG2細胞における脂質代謝およびリポたん白質分泌に及ぼす影響について検討した結果、トリグリセリド低下作用を有する画分を得た。以上の研究から、大豆たん白質由来脂質低下ペプチドを含む画分を得ることが出来た。今後は含まれるペプチドの同定と*in vitro*および*in vivo*実験による評価を経て、脂質低下ペプチド配列の決定を進めていく予定である。

文 献

- 1) Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F and Gatti E (1995): Soy and cholesterol reduction. *J Nutr*, **125**, 598S-605S.
- 2) Imura T, Kanazawa T, Watanabe T, Fukushima Y, Kudou S, Uchida T, Osanai T and Onodera K (1993): Hypotensive effect of soy protein and its hydrolysate. *Ann N Y Acad Sci*, **676**, 327-330.
- 3) Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA and Torres N (2005): Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res*, **46**, 1823-1832.
- 4) Badger TM, Ronis MJ, Simmen RC and Simmen FA (2005): Soy protein isolate and protection against cancer. *J Am Coll Nutr*, **24**, 146S-149S.
- 5) Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K and Kuwata T (2001): Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 11-17.
- 6) Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H and Saito T (2004): Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci*, **87**, 1967-1974.
- 7) Katsuda S, Ito M, Waseda Y, Morimatsu F, Taguchi Y, Hasegawa M, Takaichi S, Yamada R, Furukawa Y and Shimizu T (2000): Papain-hydrolyzed pork meat reduces serum cholesterol level and premature atherosclerosis in dietary-induced hypercholesterolemic rabbits. *J Nutr Sci Vitaminol*, **46**, 180-187.
- 8) Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T and Osajima Y (2000): Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*, **14**, 519-523.
- 9) Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T and Korpela R (2003): A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*, **77**, 326-330.
- 10) Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, Tsuruki H and Takahata K (2000): Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors*, **12**, 143-146.
- 11) Matsui T (2003): Production of hypotensive peptides, SVY, from 7S globulin of soybean protein and its physiological functions. *Soy Protein Research Japan*, **6**, 73-77.
- 12) Matoba N, Doyama N, Yamada Y, Maruyama N, Utsumi S and Yoshikawa M (2001): Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *FEBS Lett*, **497**, 50-54.
- 13) de Lumen BO (2005): Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutr Rev*, **63**, 16-21.

- 14) Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T and Yoshikawa M (2003): Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean beta-conglycinin, is an fMLP agonist. *FEBS Lett*, **540**, 206-210.
- 15) Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K and Nokihara K (1998): Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem*, **46**, 49-53.
- 16) Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF and Hediger MA (1994): Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, **368**, 563-566.
- 17) Wu X, Shang A, Jiang H and Ginsberg HN (1996): Low rates of apoB secretion from HepG2 cells result from reduced delivery of newly synthesized triglyceride to a "secretion-coupled" pool. *J Lipid Res*, **37**, 1198-1206.
- 18) Furukawa S, Sakata N, Ginsberg HN and Dixon JL (1992): Studies of the sites of intracellular degradation of apolipoprotein B in Hep G2 cells. *J Biol Chem*, **267**, 22630-22638.
- 19) Huff MW and Burnett JR (1997): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion. *Curr Opin Lipidol*, **8**, 138-145.