

生活習慣予防作用を有する大豆たん白質由来の新規ペプチドの探索

大日向耕作*・岩崎将志・金子賢太郎・金川典正・吉川正明

京都大学大学院農学研究科

Studies on Bioactive Peptides Derived from Soy Protein Preventing Lifestyle-related Disease

Kousaku OHINATA, Masashi IWASAKI, Kentaro KANEKO,
Norimasa KANEGAWA and Masaaki YOSHIKAWA

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

Mental stress and food intake disorder are known to be involved in onset of obesity, which increase the risk of lifestyle-related disease. We investigated effect of low molecular weight peptides derived from soy protein on the central nervous system, and found bioactive peptide with both anxiolytic and anorexigenic activity. Soymorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Val-Val) is an opioid peptide derived from β -conglycinin β subunit. It has affinity for μ opioid receptor and active in opioid assay system using guinea pig ileum. We found that soymorphin-5 increases rate of time spent in open arm in the elevated plus-maze after intraperitoneal (i.p.) or oral administration, suggesting that soymorphin-5 has anxiolytic activity. The anxiolytic activity after i.p. administration of soymorphin-5 was completely blocked by opioid antagonist naloxone. These results suggest that soymorphin-5 shows anxiolytic activity via μ opioid receptor. In general, opioid peptides may stimulate food intake, however; soymorphin-5 suppressed food intake after intracerebroventricular or oral administration. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 132-137, 2008.

Key words: β -conglycinin, soymorphin, casomorphin, anxiolytic activity, food intake regulation

「肥満」が糖尿病、高血圧、心疾患、動脈硬化などの生活習慣病のリスクを上昇させることは広く認知されているにも関わらず、その割合はむしろ増加し、

BMI 25以上を肥満と定義すると、日本人の4人に1人は肥満である。肥満発症に関与する要因のなかで、精神的ストレスや過食（食欲調節異常）は特に重要であり、生活習慣病予防の観点から、これらを抑制する物質の開

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

発が期待されている。本研究では、大豆たん白質由来の種々の低分子ペプチドの中樞作用を検討した結果、ストレス低減作用と摂食抑制作用を併せ持つ生理活性ペプチドを見出した。

これまで牛乳およびヒト乳汁カゼインの酵素消化物からオピオイドペプチド単離されているが^{1,2)}、オピオイド受容体への結合にはN末端のTyr-Pro-Pheというアミノ酸配列が必須であることが知られている (Fig. 1)。ヒト β -casomorphin-7のN末端アミノ酸配列 (Tyr-Pro-Phe-Val, YPFV) が大豆 β -コングリシニン β サブユニットの一次構造中に存在することから、このアミノ酸配列を含む低分子ペプチドを化学合成し、それらの性質を検討したところ、ヒト β -casomorphinよりも強力なオピオイド活性を有することを見出し、これらをsoymorphinと命名した³⁾。さらに本研究では、本ペプチドの抗不安作用および摂食抑制作用について検討した。

方 法

試 薬

大豆たん白質由来のsoymorphin-5, 6, 7 (Tyr-Pro-Phe-Val-Val, YPFVV; Tyr-Pro-Phe-Val-Val-Asn, YPFVVN; Tyr-Pro-Phe-Val-Val-Asn-Ala, YPFVVNA) および乳たん白質由来のヒトcasomorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Val-Glu, YPFVE)、ウシcasomorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly, YPFPG) は、Fmoc法により固相合成し、逆相HPLCを用いて精製し、さらに凍結乾燥したものを使用した。カルボキシメチルセルロース (ナカライテスク社製) およびオピオイド受容体アンタゴニストnaloxone (BIOMOL international社製) を使用した。

bovine β -casomorphin-7

YPFPGPI (Brantl *et al.*, 1979)

human β -casomorphin-7

YPFVEPI (Yoshikawa *et al.*, 1984)

soy β -conglycinin

β ...³¹⁷FVIPAAY³³⁴PFV³³⁴VNATSNLN...
 α ...FVIPAGYPVVVNATSNLN...
 α' ...FVIPAGYPVMVNATSDLN...

Fig. 1. Opioid peptides derived from casein, and homology of human β -casomorphin-7 and soy β -conglycinin.

抗不安試験

低分子ペプチドの情動に及ぼす影響を、高架式十字迷路 (Fig. 2) を用いて検討した³⁻⁵⁾。高架式十字迷路は、床上50 cmに保持された囲いのあるオープンアームと囲いのないクローズドアームからなる装置で、通常、マウスは50 cmの高さを恐れ、クローズドアームに長く滞在するが、抗不安作用を有する物質を投与すると、オープンアームへの滞在時間と進入回数が増加することが知られている。マウス (雄性ddY系, 25~30 g, 日本SLC, 静岡) に対し、生理的食塩水に溶解したペプチドサンプルを腹腔内または経口投与し、30分後に、高架式十字迷路の中央部にマウスを置き、各アームへの滞在時間と進入回数を5分間測定した。なお、オピオイドアンタゴニストのnaloxone (3 mg/kg) は、ペプチド投与の30分前に腹腔内投与した。

摂食実験

実験動物として7週齢雄性ddYマウス およびBALB/cマウス (日本SLC, 静岡) を用いた。プラスチックケージに個別飼育し、固形飼料 (CE-2, 日本クレア) および水を自由摂取させた。18時間絶食後、ペプチドサンプルを投与し、予め重量を測定した固形飼料を与え、経時的に固形飼料の重量を測定し、摂食量を算出した。

腹腔内投与の場合は、ペプチドを生理的食塩水に溶解した後に投与した。また、経口投与の場合には、0.5%カルボキシメチルセルロースを添加した生理的食塩水にペプチドサンプルを溶解し、胃ゾンデを用いて投与した。

脳室内投与の場合は、脳室内にガイドカニューレを予め移植したマウスを用いた⁶⁻⁹⁾。すなわち、ネプタール麻酔下 (80~85 mg/kg, i.p.) で、bregmaより0.9 mm後方, 0.9 mm側方, 深さ3 mmの位置に、24G

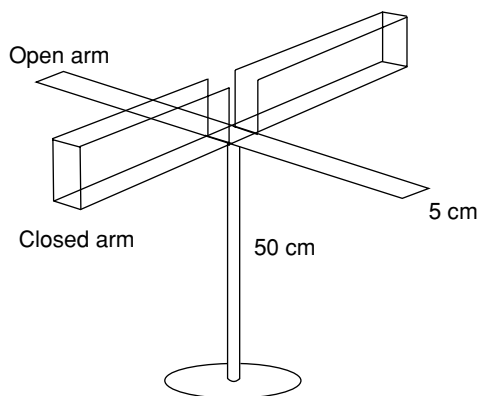


Fig. 2. Elevated plus maze.

カニューレ-セーフレットキャス（ニプロ，大阪）を加工したガイドカニューレを，脳位固定装置を用いて移植・固定し，1週間の回復期間の後に，摂食実験を行った．ペプチドは人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid: ACSF; 138.9 mM NaCl, 3.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 4.0 mM NaHCO₃, 0.6 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, pH 7.4）に溶解し，無麻酔・無拘束状態のマウスにマイクロシリンジを用いて4 μ L投与した．

結果と考察

soymorphinの抗不安作用

大豆 β -コングリシニン β サブユニット由来のsoymorphinの情動に及ぼす影響について，高架式十字迷路を用いて検討した．soymorphin-5（YPFVV）のマウスの腹腔内および経口投与により，オープンアームにおける滞在時間の割合の増加が認められた（Fig. 3）なお，オープンアームとクローズドアームの進入回数の合計は群間に変化が認められなかったことから（data not shown），行動量には影響しないと考えられる．以上の結果より，soymorphin-5は抗不安作用を示すことが明らかとなった．soymorphin-5は μ オピオイド受容体に親和性を示すとともに³⁾，モルモット回腸（GPI）を用いた μ オピオイド活性を有することから（Table 1），soymorphin-5の抗不安作用が本レセプターを介しているか否かを，オピオイドアンタゴニストのnaloxoneを用いて検討した．soymorphin-5の腹腔内投与によるオープンアームでの滞在時間の増加は，naloxoneの前処置によって完全に阻害された（Fig. 4）．

したがって，soymorphin-5の抗不安作用は μ オピオイド受容体を介しているものと考えられる．

これまで我々は，主要な緑葉たん白質D-ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（Rubisco）由来の δ オピオイドペプチドrubiscolin-6の腹腔内および経口投与により抗不安作用を示すことを見出しているが，rubiscolin-6の抗不安作用は， δ オピオイド受容体の下流で， σ_1 受容体およびドーパミンD₁受容体を介していることを明らかにしている⁴⁾．一方，soymorphin-5の抗不安作用は， σ_1 受容体およびD₁受容体に対するアンタゴニストによって阻害されなかった（data not shown）．また，Rubisco由来のもう一つの抗不安ペプチドrubimetideによる抗不安作用は，プロスタグランジンD₂-DP₁受容体の活性化を介していることを見出したが⁵⁾，soymorphin-5の抗不安作用はDP₁受

Table 1. Opioid activities of casomorphins and soymorphins using guinea pig ileum (GPI) and mouse vas deferens (MVD) assay

Peptides	opioid activity (IC ₅₀ ; μ M)	
	GPI (μ)	MVD (δ)
human β -casein		
human β -casomorphin-4 YPFV	20	>300
human β -casomorphin-5 YPFVE	14	n.d.
human β -casomorphin-6 YPFVEP	25	>300
soy β -conglycinin β		
soymorphin-5 YPFVV	6.0	50
soymorphin-6 YPFVVN	9.2	32
soymorphin-7 YPFVVNA	13	50

n.d.: not done.

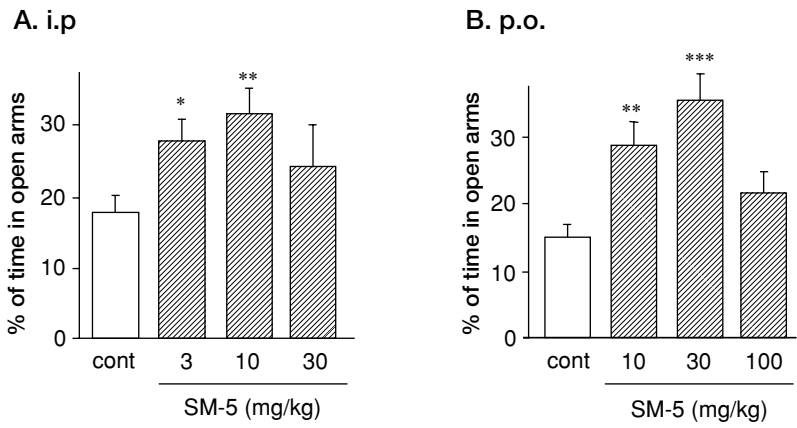


Fig. 3. Anxiolytic activity of soymorphin (SM)-5 after intraperitoneal (i.p., A) or oral (p.o., B) administration. Values are presented as means $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 as compared with the saline control group.

容体アンタゴニストによって阻害されなかったことから (data not shown), 他の情動調節経路を介しているものと考えられる。soymorphin-5の μ オピオイド受容体の下流の抗不安機構は今後の検討課題である。

soymorphinは抗不安作用を有する大豆たん白質由来の生理活性ペプチドとしては、初めての例である。少なくとも消化管酵素に存在するエラスターゼおよびロイシンアミノペプチダーゼの酵素消化により soymorphin-5が生成することを見出している³⁾。最近、大豆たん白質やその酵素消化物にストレス低減作用が認められるという報告がなされ注目を集めているが¹⁰⁾, soymorphinは、その原因分子かもしれない。

soymorphinの摂食抑制作用

従来、オピオイドは摂食促進作用を示すとされ¹¹⁾, 我々の実験系においても、 μ オピオイドアゴニストとして知られる乳たん白質由来のヒトcasomorphins-5 (YPFVE)やウシcasomorphin-5 (YPFPG)は、マウス腹腔内投与により摂食促進作用を示すことを確認している (Fig. 5)。ヒトcasomorphin-5よりも一桁強いオピオイド活性を有するウシcasomorphin-5が、より強力な摂食促進作用を示したことから、これらの摂食促進作用は μ オピオイド受容体を介しているものと考えられる。

大豆たん白質由来のオピオイドペプチドについて摂食調節作用を検討したところ、意外なことに、soymorphin-5の経口投与により用量依存的な摂食量の低下が認められ、むしろ食欲を抑制することを初めて見出した (Fig. 6)。また、soymorphin-5は、脳室内投与でも用量依存的な摂食抑制作用を示すことが明らかとなった (Fig. 7)。さらに、soymorphin-7はオピオイド活性が弱いにも関わらず (Table 1), より強い摂食抑制作用を示すとともに消化管運動抑制作用を有することを見出している (data not shown)。乳由来のcasomorphinと大豆由来のsoymorphinが、同じ μ オピオイドアゴニストでありながら、摂食調節において反応の生理作用を示すのは、作用する受容体サブタイプが異なるか、あるいはsoymorphinが μ オピオイド受容体以外の受容体に作用している可能性が考えられる。

近年、情動調節および食欲調節に関与する内因性の生理活性ペプチドとそれらの受容体が数多く同定され、脳機能において重要な役割を演じていることが判明している。代表的な視床下部ペプチドのneuropeptide Y (NPY)は摂食促進作用と抗不安作用を有し、同様に、casomorphinは摂食促進作用と抗不安作用を示す。一方、摂食抑制ペプチドの

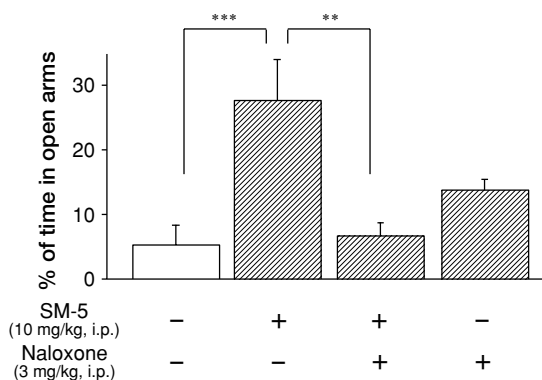


Fig. 4. Effect of opioid antagonist naloxone on anxiolytic activity of soymorphin (SM)-5. Values are presented as means $\pm$ SEM. ** p <0.01, *** p <0.001 as compared with each group.

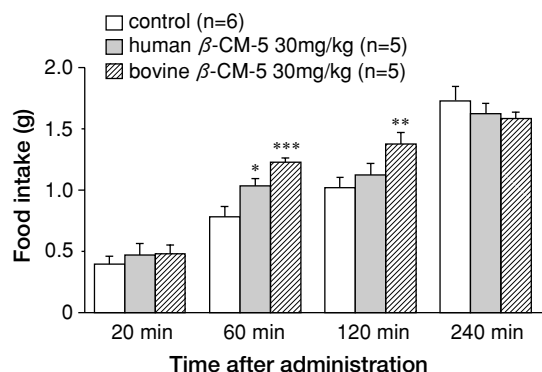


Fig. 5. Effect of intraperitoneal administration of human or bovine β -casomorphin (CM)-5 on food intake in fasted ddY mice. Values are presented as means $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 as compared with the saline control group.

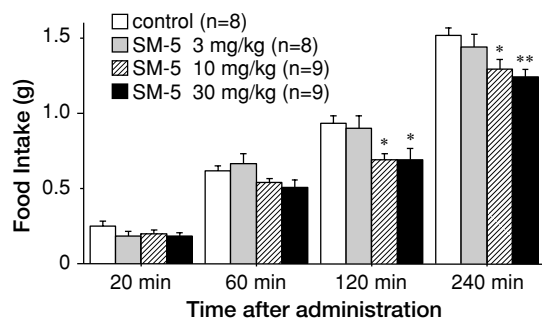


Fig. 6. Effect of oral administration of soymorphin (SM)-5 on food intake in fasted BALB/c mice. Values are presented as means $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01 as compared with the saline control group.

corticotropin-releasing factor (CRF) は摂食抑制作用と不安増強作用を有することが知られている。しかしながら、摂食抑制作用と抗不安作用を併せ持つ生理活性ペプチドの例は極めて珍しい。soymorphinは、摂食抑制作用と抗不安作用を有するため、生活習慣病のリスクを低減させる方向に効果的に作用するものと考えられる。また、両作用を併せ持つsoymorphinの作用機構は非常に興味深く、既知あるいは未知の摂食調節ペプチド受容体を介するのかを、今後検討する予定である。

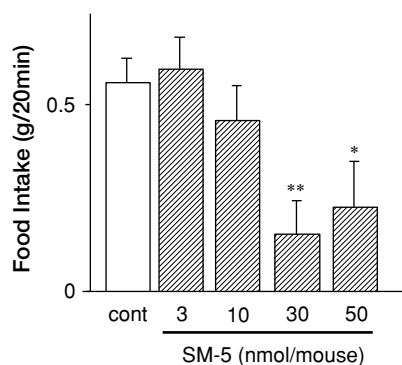


Fig. 7. Intracerebroventricularly (i.c.v.) administered soymorphin (SM)-5 suppressed food intake in fasted ddY mice. Values are presented as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the control group.

要 約

生活習慣病のリスクを高める肥満の発症には、精神的ストレスや食欲調節異常が関与することが知られている。本研究では、大豆たん白質由来の低分子ペプチドの中枢作用に着目し、抗不安および食欲抑制作用を有する生理活性ペプチドを見出した。 β -コングリシニン β サブユニット由来の新規オピオイドペプチドとして我々が見出したsoymorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Val-Val) は、腹腔内および経口投与により高架式十字迷路におけるオープンアームの滞在時間の増加が認められ、抗不安作用を有することが明らかとなった。soymorphin-5は、 μ オピオイド受容体に対する親和性およびモルモット回腸 (GPI) における μ オピオイド活性を示すとともに、本ペプチドによる抗不安作用は、オピオイドアンタゴニストのnaloxoneによって阻害されることから、 μ オピオイド受容体を介していることが明らかとなった。一般に、オピオイドオピオイドペプチドは摂食促進作用を示すことが知られているが、意外なことにsoymorphin-5は、脳室内および経口投与により摂食抑制作用を示すことが判明した。

文 献

- 1) Brantl V, Teschemacher H, Henschen A and Lottspeich F (1979): Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **360** (9), 1211-1216.
- 2) Yoshikawa M, Yoshimatsu T and Chiba H (1984): Opioid peptides from human β -casein. *Agric Biol Chem*, **48**, 3185-3187.
- 3) Ohinata K, Agui S and Yoshikawa M (2007): Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71** (10), 2618-2621.
- 4) Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K and Yoshikawa M (2007): Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating σ_1 and dopamine D_1 receptors. *Peptides*, **28** (10), 1998-2003.
- 5) Zhao H, Ohinata K and Yoshikawa M (2008): Rubimetide (Met-Arg-Trp) derived from Rubisco shows anxiolytic-like activity via DP_1 receptor in male ddY mice. *Peptides*, **29** (4), 629-632.
- 6) Ohinata K, Takagi K, Biyajima K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Eguchi N, Urade Y, Asakawa A, Fujimiya M, Inui A and Yoshikawa M (2008): Central prostaglandin D_2 stimulates food intake via the neuropeptide Y system in mice. *FEBS letters*, **582** (5), 679-684.

- 7) Ohinata K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Iwai M, Horiuchi M and Yoshikawa M (2008): Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT₂ receptor and prostaglandin EP₄ receptor in mice. *FEBS letters*, **582** (5), 773-777.
- 8) Ohinata K, Suetsugu K, Fujiwara Y and Yoshikawa M (2007): Suppression of food intake by a complement C3a agonist [Trp⁵]-oryzatensin (5-9). *Peptides*, **28** (3), 602-606.
- 9) Ohinata K, Suetsugu K, Fujiwara Y and Yoshikawa M (2006): Activation of prostaglandin E receptor EP₄ subtype suppresses food intake in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **81** (1-2), 31-36.
- 10) 畠山英子, 山口政人, 村本光二, 伊藤 豪, 本橋 豊, 樋口重和 (2003): 脳科学を基礎とした大豆たん白質・ペプチドの学習・記憶・情緒への寄与に関する研究. 大豆たん白質研究, **6**, 147-152.
- 11) Asakawa A, Inui A, Momose K, Ueno N, Fujino MA and Kasuga M (1998): Endomorphins have orexigenic and anxiolytic activities in mice. *Neuroreport*, **13**, 2265-2267.