

ペプチドアレイによる大豆たん白質由来
胆汁酸結合ペプチドの網羅解析

長岡 利*

岐阜大学応用生物科学部

**Exhaustive Analysis of Peptides Derived from Soybean Protein
with Bile Acid Binding Ability through Use of the Peptide Array**

Satoshi NAGAOKA

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

ABSTRACT

This experiment was designed to evident peptides which have bile acid-binding ability from soybean beta-conglycinin. In this study, we used a peptide array to evaluate the bile acid binding ability of peptide derived from soybean beta-conglycinin. In the peptide array, bile acid binding ability was evaluated for the binding ability of taurocholic acid and fixed peptides on cellulose menbrane, then binding peptides with taurocholic acid were detected by first antibody of bile acid, and finally the antibody-taurocholic acid complexes were detected by second antibody. High bile acid-binding ability regions were evaluated in the first screening. In second screening, only peptides having stability with pepsin and trypsin were designed and evaluated. We selected PVNKPG, IPFPRP, IPVNKPSR, PRPIPF, RPIPF, NVISQIPS, PIPFPR, PRPIPFPR to evaluate bile acid-binding peptides with a digestive enzyme resistance. PVNKPG had a higher bile acid-binding capacity *in vitro* than other synthesized peptides. IPFPRP or PVNKPG had a lower micellar solubility of cholesterol than other synthesized peptides *in vitro*. In Caco-2 cells models of small intestine, the uptake of cholesterol of PVNKPG had the lowest value among the peptides groups. Thus, we found that PVNKPG derived from soybean β -conglycinin bound taurocholate and inhibited cholesterol absorption in Caco-2 cells. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 120-124, 2009.

Key words : beta-conglycinin, peptide array, PVNKPG, cholesterol, bile acid

*〒501-1193 岐阜市柳戸1-1

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。一般に、大豆たん白質などの植物性たん白質は、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ヒトや動物で知られている¹⁻³⁾。我々は大豆たん白質による血清コレステロール低下作用は、腸管内で胆汁酸との結合能を有する「胆汁酸結合ペプチド」が胆汁酸と結合することにより、コレステロールミセル形成を阻害し、空腸でコレステロール吸収を抑制し、ひいては、血清コレステロール低下作用を発揮することを明らかにした³⁾。また、「胆汁酸結合ペプチド」は回腸で胆汁酸と結合し、回腸での胆汁酸再吸収を抑制し、血清コレステロール低下作用を発揮することも推測されている。しかし、大豆たん白質由来「胆汁酸結合ペプチド」は、グリシニン由来VAWWMY以外は不明である⁴⁾。

しかし、大豆たん白質は複数の構成たん白質が存在する上、大豆たん白質を構成するペプチドのアミノ酸配列は極めて多様であり、胆汁酸結合ペプチドの特定は容易ではない。そこで、本研究では大豆たん白質の主要構成たん白質であるβ-コングリシニン由来のペプチドについて、百～数千種類のペプチドを同時に解析可能なペプチドアレイを導入し網羅的に解析することで、新規胆汁酸結合ペプチドを探索・評価することを目的とした。また、胆汁酸結合能を有するペプチドについてコレステロールミセル溶解性試験やCaco-2細胞によるコレステロール吸収に対する影響を検討した。

方 法

ペプチドアレイによる胆汁酸結合能の網羅解析

大豆β-コングリシニン(a, a', βサブユニット)の配列を元に、各サブユニット由来の配列をそれぞれ1枚のアレイに合成した。各サブユニット配列は、まず、8残基、3アミノ酸ずらしのペプチドに切り出し、n=3となるようにペプチドアレイにより合成するペプチドの配列を設計した。さらにポジティブコントロールとしてVAWWMY、ネガティブコントロールとしてGGGGGG、ブランクスポットとしてB(リンカーのみ、バックグラウンド測定用)が入るように設計し、アレイを合成した。そして、作製したペプチドアレイを、PBSを用いて洗浄した。メンブレンの洗浄後、ブロッキングバッファーでブロッキングを行った。PBSを用いて、洗浄を行った後、PBSに溶解した10μg/mLタウロコール酸溶液で37℃インキュベートし、ハイブリダイゼーションを行った。PBSで洗浄を行った後、抗コール酸抗体で37℃でインキュベートし、1次抗体

反応を行った。0.05%のTween20-TBSで洗浄を行った後、PBSを用いて希釈したAlexa-488標識抗rabbit-IgG抗体で37℃インキュベートし、2次抗体反応を行った。0.05% TTBSで37℃インキュベートを行った後、スキャンして胆汁酸結合能を算出し、胆汁酸高結合能領域を特定した。次に、胆汁酸高結合能領域のうち、ペプシン、トリプシンに耐性のある3～8残基のペプチドのみを再度合成し、同様の操作を行い、胆汁酸結合能を測定した。

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³⁾に従って測定した。0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に1.85 kBq/mL[カルボニル-¹⁴C]タウロコール酸(ナトリウム塩)、0.1 mmol/Lのタウロコール酸、そして、サンプル濃度5 mg/mLでカゼイントリプシン加水分解物、大豆β-コングリシニン由来ペプチドを加え、その混合物を37℃で2時間インキュベートした。その後、15,000×g、37℃で15分間超遠心した。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³⁾に従って測定した。1.48 MBq/mL[4-¹⁴C]-コレステロール、6.6 mmol/Lタウロコール酸、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ホスファチジルコリン、132 mmol/L塩化ナトリウム、15 mmol/L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℃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に濃度10 mg/mlとなるように、カゼイントリプシン加水分解物、大豆β-コングリシニン由来ペプチドを加え、37℃で1時間インキュベートした。その後、100,000×g、37℃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。

ヒト結腸がん株化細胞Caco-2細胞におけるコレステロール吸収実験

Caco-2細胞におけるコレステロール吸収量は既報³⁾に従って測定した。M-199培地中に1.48 MBq/mL[4-¹⁴C]-コレステロール、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ホスファチジルコリン、132 mmol/L塩化ナトリウムを含む混合物をソニケーションし、エマルジョンを調製した。それぞれ最終濃度5 mg/mLとなるように、カゼイントリプシン加水分解物、大豆β-コングリシニン由来ペプチドをエマルジョンに加え、ソニケーションによ

て添加液を調製した。48穴プレートに培養したCaco-2細胞の培地を吸引除去した。そして、M-199培地で洗浄し、ここに上記で調製した添加液を細胞に添加し、37℃で20分間インキュベートした。その後、添加液を吸引除去し、DMEMで2回洗浄した。0.1% SDS溶液を加えて細胞をはがしバイアルに移した。ここにAquasol-2を加え、液体シンチレーションカウンターによって吸収された¹⁴C-コレステロール量を測定した。

結果と考察

大豆β-コングリシニン由来胆汁酸結合ペプチドの網羅解析 (実験1)

実験1では、β-コングリシニンの全配列の網羅解析により、個々のペプチドの蛍光強度値がポジティブコントロール (VAWWMY) と比較して高いペプチドの集合領域 (アミノ酸配列) とその前後5アミノ酸を含む領域である胆汁酸高結合領域を特定した。そして、その領域よりペプシンとトリプシンに耐性のある3~8残基のペプチドについて再度、ペプチドアレイを作成し胆汁酸結合能を評価した。その結果、胆汁酸結合能の高い順番に、IPVVKPSR, PRPIPF, RPIPF, NVISQIPS, PIPFPR, PRPIPFPR, IPFPR, PVNKPG

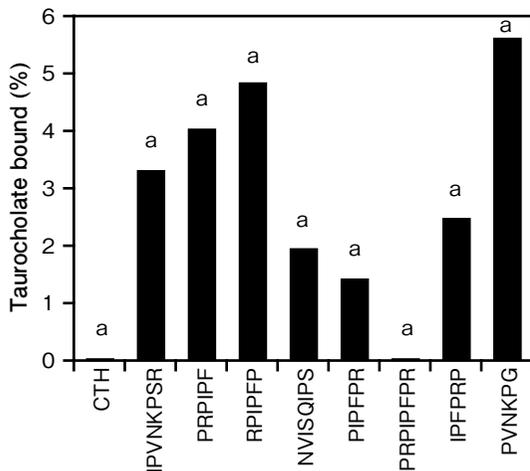


Fig. 1. Effect of casein tryptic hydrolysate (CTH), IPVVKPSR, PRPIPF, RPIPF, NVISQIPS, PIPFPR, PRPIPFPR, IPFPR and PVNKPG (5 mg/mL) on taurocholate binding ability *in vitro*. Each value is expressed as means \pm SEM (n=3). Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

であった。

大豆β-コングリシニン由来ペプチドの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響 (実験2)

実験2では、実験1により明らかとなった8種類の胆汁酸結合ペプチドについて、*in vitro*における胆汁酸結合能を評価した。検討したペプチド中で、PVVKPGが最も高い胆汁酸結合能を示した。(Fig. 1).

大豆β-コングリシニン由来ペプチドの*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3)

実験3では、実験1により明らかとなった8種類の胆汁酸結合ペプチドについて、*in vitro*におけるミセル溶解性に対する影響を検討した。最も強くミセル溶解性を低下させたIPFPRは、カゼイントリプシン加水分解物 (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).

大豆β-コングリシニン由来ペプチドのヒト結腸がん株化細胞Caco-2細胞におけるコレステロール吸収に対する影響 (実験4)

実験4では、実験2において高い胆汁酸結合能を示したペプチドの小腸モデル細胞Caco-2細胞におけるコレステロール吸収に対する影響について検討した。その結果、*in vitro*胆汁酸結合能試験においてもっとも高い結合能を示したPVVKPGの添加により、コレステロール吸収量は最も低下した (Fig. 3).

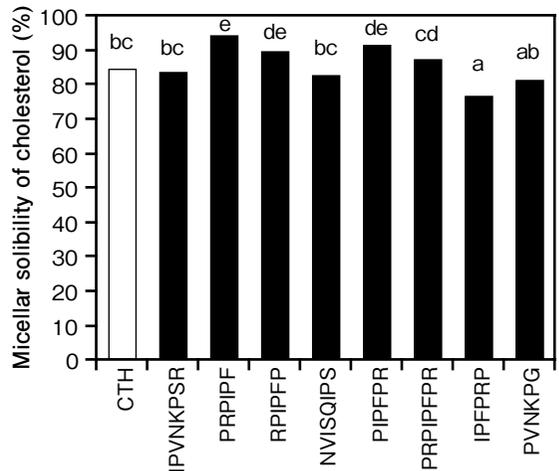


Fig. 2. Effect of casein tryptic hydrolysate (CTH), IPVVKPSR, PRPIPF, RPIPF, NVISQIPS, PIPFPR, PRPIPFPR, IPFPR and PVNKPG (10 mg/mL) on micellar solubility of cholesterol *in vitro*. Each value is expressed as means \pm SEM (n=4). Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

以上の結果より、大豆β-コングリシニン由来ペプチド、PVNKPGRは胆汁酸結合を有し、胆汁酸と結合することにより、コレステロール吸収抑制作用を示す事が明らかとなった。

ところで、胆汁酸結合能を有するオリゴペプチドはVAWWMY以外に報告がない⁴⁾。今回の研究から、胆汁酸結合能を有するオリゴペプチドを数個発見した。また、胆汁酸結合能を有するオリゴペプチドの中から、ミセル溶解性を低下させ、Caco-2細胞におけるコレステロール吸収を抑制するオリゴペプチドを発見した。

以上の結果は、我々の提案した「大豆たん白質のコレステロール低下機構に関する理論」である“大豆たん白質による血清コレステロール低下作用は、腸管内で胆汁酸との結合能を有する「胆汁酸結合ペプチド」が胆汁酸と結合することにより、コレステロールミセル形成を阻害し、空腸でコレステロール吸収を抑制し、ひいては、血清コレステロール低下作用を発揮する”を支持するものである³⁾。

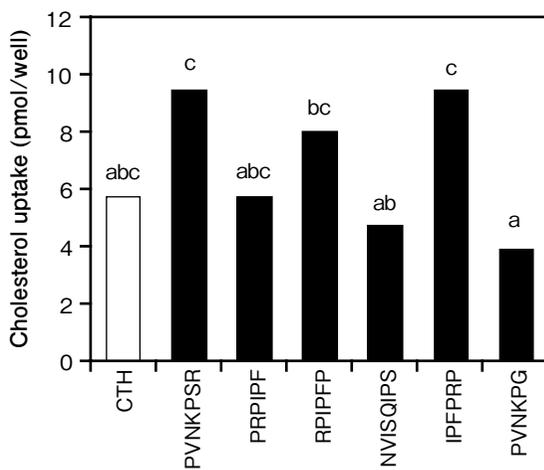


Fig. 3. Effect of casein tryptic hydrolysate (CTH), IPVNKPSR, PRPIPF, RPIPF, NVISQIPS, IPFPRP, PVNKPGR (5 mg/mL) on cholesterol uptake in Caco-2 cells. Each value is expressed as means \pm SEM (n=6). Means with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

要 約

*in vivo*で機能する大豆たん白質由来胆汁酸結合ペプチドは、グリシニン由来VAWWMY以外は不明である。本研究では、百~数千種類のペプチドを同時にアッセイ可能なペプチドアレイの技術を新たに導入し、大豆の主要構成たん白質の一つであるβ-コングリシニンのアミノ酸配列中から、コレステロール代謝改善作用に寄与する可能性のある新規胆汁酸結合ペプチドを網羅解析した。β-コングリシニン (α, α', βサブユニット)の各サブユニットの全アミノ酸配列を網羅したペプチドアレイを作成し、タウロコール酸とハイブリダイゼーションした。抗コール酸抗体、蛍光標識抗体と順次反応させ、蛍光強度を測定した(1次スクリーニング)。その結果から、胆汁酸結合能が高いアミノ配列を選択し、その配列を*in silico*で、トリプシンとペプシンで仮想消化し、得られたアミノ酸配列 (*in vivo*において、消化酵素で分解されず、腸管内で胆汁酸結合能を発揮可能なペプチド)をペプチドアレイに配置した。これらの胆汁酸結合ペプチドをペプチドアレイで評価した(2次スクリーニング)結果、対照ペプチドと比較して、より胆汁酸結合能が高い数個の胆汁酸結合ペプチドを発見した。発見した胆汁酸結合ペプチドを化学合成し、*in vitro*で従来法(試験管内で放射性胆汁酸との結合能を定量)により、胆汁酸結合能を評価した結果、従来法でも胆汁酸結合能を示した。発見した胆汁酸結合ペプチドについて、*in vitro*のコレステロールミセル溶解性試験を行った結果、カゼインペプチドと比較して、より強いコレステロールミセル溶解性の阻害作用を発揮することを発見した。

文 献

- 1) Anderson JW, Johnstone BW and Cook-Newell ME (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* **333**, 276-282.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 長岡 利 (2005) : 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. 大豆たん白質研究, **26**, 121-126.
- 5) 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.