

高純度大豆たん白質の食品生理機能

裏出令子^{*1}・河野光登²

¹京都大学大学院農学研究科

²不二製油株式会社フードサイエンス研究所

Physiological Function of Highly Purified Soy Proteins

Reiko URADE¹ and Mitsutaka KOHNO²

¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University Gokasho, Uji 611-0011,

²Food Science Institute, Fuji Oil Co., LTD. 1 Sumiyoshicho, Izumisano 598-8540

ABSTRACT

HepG2 cells were treated with short peptides (7S-peptides) derived from highly purified soybean β -conglycinin, which was free from lipophilic protein, and the effect of the peptide treatment on lipid metabolism was determined. 7S-peptide-treatment suppressed the secretion of apolipoprotein B-100 from HepG2 cells into the medium. The 7S-peptides also suppressed the incorporation of ³H-glycerol and ¹⁴C-acetate into triacylglyceride, but not into major phospholipids, such as phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. Additionally, the synthesis of cholesterol esters was dramatically decreased for 2 h after the addition of the 7S-peptides, whereas the synthesis of cholesterol remained unchanged by 4 h and increased by 8 h after the addition of the 7S-peptides. The cleaved nuclear form of SREBP-2 increased 8 h after the addition of the 7S-peptides, suggesting a decrease in intracellular cholesterol levels. Analysis of changes in mRNA expression after 7S-peptide-treatment suggested that the 7S-peptides increase the mRNA of genes related to β -oxidation of fatty acids and the synthesis of cholesterol. From these results, it may be concluded that the peptides derived from β -conglycinin altered the lipid metabolism to decrease secretion of apolipoprotein B-100-containing lipoprotein from HepG2 cells. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 30-36, 2010.

Key words : β -conglycinin, apolipoprotein B-100, very low density lipoprotein, triacylglycerol, HepG2 cell.

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

単離大豆たん白質 (SPI) が血中コレステロールおよびトリアシルグリセロール (TG) レベルを低下させる作用があることが明らかとなり、1999年のFDA勧告を支えるものとなっている。コレステロール低下作用は、SPIを構成する主要たん白質の一つであるグリシニン (11S) にあるとされてきた。しかし、11Sのコレステロール低下作用に疑問を持つ報告もある¹⁾。従来、SPIは11Sと β -コングリシニン (7S) の2種類の主要たん白質で構成されているとされてきた。しかし、最近不二製油のグループにより2種類ではなく11S, 7S, lipophilic proteins (LP) の3種類であることが明らかにされた²⁾。従来のSPI分別法では、LPは11Sおよび7S画分に混入することが明らかにされている。その上、LPに血中コレステロールを低下させる作用が示された³⁾。したがって、LPを完全に除いた11Sあるいは7SおよびLPに関して改めてそれらの生理機能性を検証する必要がある。7Sに関しては、TGおよび内臓脂肪を低下させる効果があることが大規模ヒト介入試験で明らかとなり⁴⁾、「特定保健用食品」となっている。しかし、高純度7Sの作用機構は不明である。本研究では、以上の3課題の研究を行い、得られる成果を検討することにより、大豆たん白質を構成する個々のたん白質の食品生理機能を明瞭なものとするをを目指す。平成21年度は高純度7Sの作用機構に関する研究を行った。

方 法

7Sペプチドの調製

精製した β -コングリシニンはアセトン処理によりイソフラボンを完全に除いた後、*Bacillus sp.*と*Aspergillus sp.*由来のプロテアーゼであるThermoase (大和化成)、Biopraxe (Nagase Chemtex)、Sumizyme FP (Shin Nihon Chemical) で消化した⁵⁾。消化液は90℃で20分加熱後、限外濾過 (Centriplus YM-10, MILLIPORE) によりプロテアーゼを除き、実験に供した。

細胞

ヒト肝臓由来の培養細胞HepG2は10%ウシ胎児血清含有 α MEM培地を用いて37℃でSubconfluentになるまで48時間培養させた後、ペプチドを最終濃度が3 mg/mL、および6 mg/mLとなるように添加した。

Apolipoprotein (Apo) B-100の定量

培地中のApoB-100はELISA法により定量した。

脂質生成活性の測定

ペプチド添加2, 4および8時間後に[2-³H]-glycerol (5.0 μ Ci/mL) あるいは[1-¹⁴C]-酢酸 (1.17 μ Ci/mL) (Amersham Biosciences) を培地に添加し、1時間後に培地を取り除いた。細胞内TG定量のためには、ペプチド添加24時間前から添加24時間後まで細胞を[2-³H]-glycerolで代謝標識した。細胞から総脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより分離した。各脂質のスポットをかきとり、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。

DNAマイクロアレイ解析

HepG2細胞にペプチドを最終濃度3 mg/mLとなるように添加し、添加8時間後にmRNAを抽出した。mRNAからターゲットcRNAを作製し、Affimetrix社のDNAアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0) を用いてアレイ解析を行った。

脂質関連酵素活性の測定

ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT)、脂肪酸合成酵素 (FAS)、Malic酵素、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 活性は定法により測定した^{6~9)}。

Sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2のウエスタンブロッティング

細胞から抽出したたん白質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、PVDF膜に転写後、抗SREBP-2血清を用いた化学発光法によりSREBP-2のバンドを検出した。

結果と考察

7S-ペプチド添加によるHepG2からのApoB-100分泌量の低下

7Sの血清TG低下作用は、肝実質細胞からのVLDL分泌を低下させることによっている可能性が高い。そこで、VLDL分泌量の指標となるVLDL構成たん白質ApoB-100のHepG2細胞からの分泌量に対する、7S-ペプチドの影響を検討した。アセトン洗浄によってイソフラボンを除いた高純度7Sをプロテアーゼ消化することによって7S-ペプチドを調製した。消化後の7S-ペプチドをゲル濾過HPLCにより分析し、分子量が

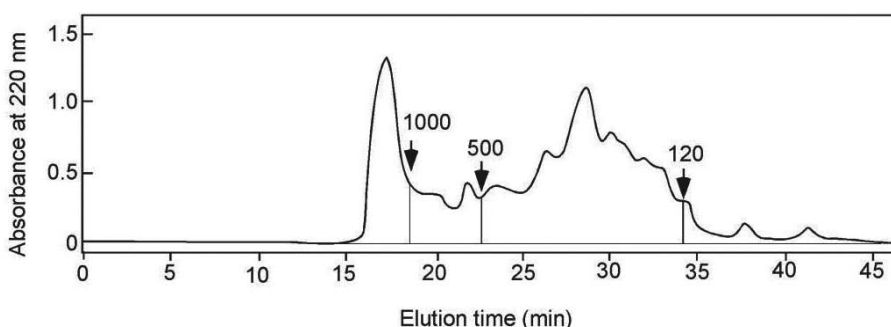


Fig.1. Size distribution of the 7S-peptides. The 7S-peptides were separated by gel filtration column chromatography. Arrows indicate the elution time for peptides with molecular weight of 1,000, 500, or 120 daltons.

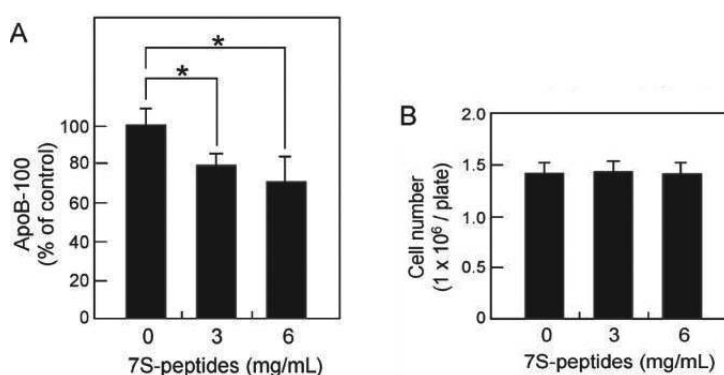


Fig. 2. Decrease in the secretion of ApoB-100 from HepG2 cells by 7S-peptide treatment. A, The 7S-peptides were added to the culture medium at 3 or 6 mg/mL. At 24 h post peptide addition the amount of ApoB-100 secreted in medium was measured by ELISA. B, Cells were counted 24 h after the addition of the 7S-peptides. Values are presented as the percentage of the value obtained from the mock treated cells. Bars represent the mean \pm standard deviation of three experiments. *, $p < 0.05$ compared with the control.

1,000以下のペプチドが約90%であることを明らかにした (Fig. 1). また限外濾過後のペプチドのアミノ酸配列シーケンサーによる分析で、ペプチド組成は dipeptides (26%), tripeptides (25%), tetrapeptides (15%), pentapeptides (13%), hexapeptides (5%), heptapeptides (4%), octapeptides (3%), nanopeptides (2%), >decapeptides (6%) と概算された。7S-ペプチド添加により、24時間にHepG2細胞から分泌され培地へ蓄積したApoB-100量は減少した (Fig. 2A)。7S-ペプチドは細胞毒性を示さなかったことから (Fig. 2B)、7S-ペプチドによって引き起こされた脂質代謝の変動がその要因と考えられた。

7S-ペプチド添加によるTG生合成の変化

肝細胞小胞体で生合成されたApoB-100ポリペプチド鎖にTGの付加が十分でない場合、ApoB-100ポリペ

プチド鎖はVLDLを形成することなく細胞内で分解される。したがって、7S-ペプチド添加によるApoB-100分泌量の減少はTG生合成量の減少による可能性が考えられた。7S-ペプチド無添加に比較して、7S-ペプチド (3 mg/mL) を添加した細胞内TG量は約70%に減少した (Fig. 3A)。また、7S-ペプチド添加により2～8時間後にTGの生合成活性が無添加に比して有意に低下していた (Fig. 3B and C)。一方、主要リン脂質であるホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) の生合成活性に差はなかった。TGの生合成量は細胞内での脂肪酸のレベルに依存するため、7S-ペプチド添加によって脂肪酸の生合成が低下したか、あるいは脂肪酸の β 酸化が促進したと考えられる。

7S-ペプチド添加によるTG生合成活性の減少とト

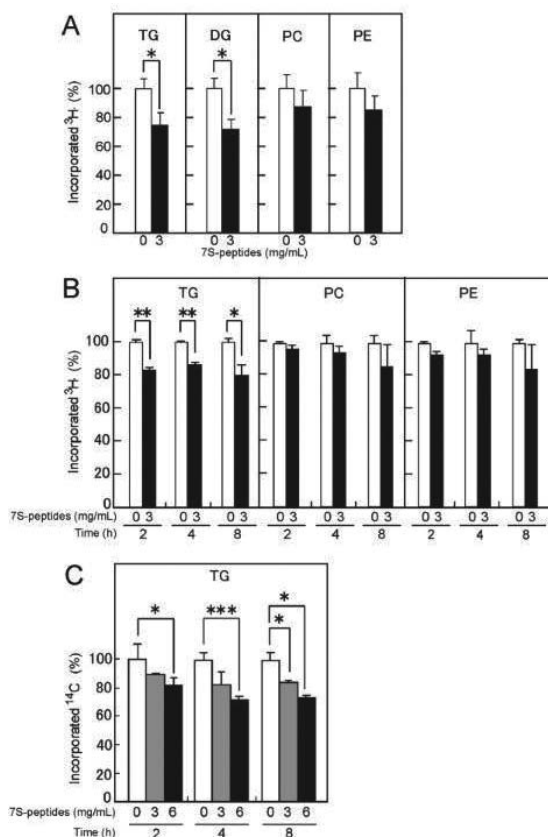


Fig. 3. Effects of the 7S-peptide treatment of HepG2 cells on the incorporation of $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glycerol}$ and $[^{14}\text{C}]\text{-acetic acid}$ into glycerolipids. A, HepG2 cells were incubated for 24 h in the presence of $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glycerol}$, and then incubated in the presence of $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glycerol}$ with or without 3 mg/mL of the 7S-peptides for an additional 24 h. The amounts of radioactivity incorporated into HepG2 cell TG, DG, PC, and PE were measured. B, HepG2 cells were incubated for 2, 4, or 8 h in the presence or absence of 3 mg/mL of the 7S-peptides, and then incubated in the presence of $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-glycerol}$ for 1 h. The amount of radioactivity incorporated into the HepG2 cell TG, PC, or PE was measured. C, HepG2 cells were incubated for 2, 4, or 8 h in the presence or absence of 3 or 6 mg/mL of the 7S-peptides, and then incubated in the presence of $[^{14}\text{C}]\text{-acetic acid}$ for 1 h. The amount of radioactivity incorporated into the HepG2 cell TG was measured. Values are presented as the percentage of the value obtained from the mock treated control cells. Bars represent the mean \pm standard deviation of three experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$ compared to control.

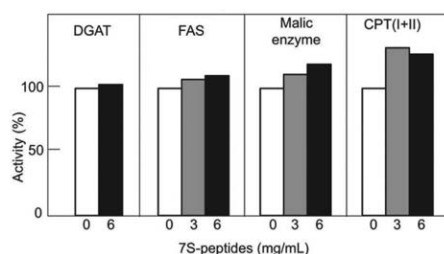


Fig. 4. Enzyme activities of HepG2 cells supplemented with or without 7S-peptides. Enzyme activities were measured at 8 h after addition of 7S-peptides. Results shown represent the mean \pm SD of three experiments.

ランスクリプトームとの関係を明らかにするために、DNAマイクロアレイ解析を行った (Table 1). 7S-ペプチド添加により、脂肪酸の生合成および取り込みを減少させるような大きな遺伝子発現量の変動はなかった。酵素活性の測定でも、脂肪酸生合成に重要なFASおよびmalic酵素活性への7S-ペプチドの影響はほとんどなかった (Fig. 4). なお、TGを含めたグリセロ脂質の前駆体であるホスファチジン酸の生合成にかかわる1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3のmRNAが半分に減少していた。一方、 β 酸化関連遺伝子の発現を活性化する核内レセプターPPAR α のcofactorとして機能するlipin-1 mRNAが、7S-ペプチド添加で2.3倍に増加していた。 β 酸化を促進するCPT活性は7S-ペプチド添加により増加する傾向がみられた (Fig. 4). 以上の結果から、7S-ペプチド添加によるTG生合成活性の低下は、脂肪酸の β 酸化に関わる遺伝子発現増加による可能性が考えられる。

7S-ペプチド添加による細胞内コレステロールレベルの低下

VLDLのもう一つの主要構成脂質であるコレステロールエステルの生合成活性が、7S-ペプチド添加2時間後から低下した (Fig. 5A). 一方、コレステロールの生合成活性は7S-ペプチド添加8時間後に増加した (Fig. 5B). また、7S-ペプチド添加によりコレステロール生合成酵素群およびLDLレセプターのmRNAが上昇した (Table 1). さらに、これらの遺伝子の転写を活性化する核内型SREBP-2の増加がみられた (Fig. 6). これらの結果は、7S-ペプチドの添加により細胞内コレステロールレベルが低下したことを示唆している。さらに、核内型SREBP-2により転写が抑制されるhepatocyte nuclear factor-4a (HNF-4a)のmRNAが減少していた。HNF-4aはApoBおよびmicrosome TG transfer proteinのmRNAの転写を活性化する因子で

Table 1. Lipid metabolism related genes, which were up-regulated or down-regulated in HepG2 cells by addition of 7S-peptides. HepG2 cells were incubated with or without 6 mg/mL 7S-peptides for 8 h. mRNAs were isolated and DNA microarray analysis was performed.

Gene product	Accession number	Function related to lipid metabolism	Fold variation (7S-peptides / control)
acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	BC000408	fatty acid synthesis	1.23
stearoyl-coenzyme A desaturase	NM_005603	fatty acid synthesis	1.23
fatty acid binding protein 1	NM_001443	fatty acid uptake, transport, metabolism	1.32
ATP-binding cassette, subfamily D, member 1	NM_000033	beta-oxidation	1.23
AMP-activated kinase alpha 1 subunit	NM_006251	beta-oxidation	0.71
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	AB040138	glycerolipid synthesis	0.47
glycerol kinase	NM_000167	glycerolipid synthesis	1.32
lipin-1	D 80010	cofactor of PPAR alfa	2.3
lipin-2	NM_14646	similar to lipin-1	1.41
acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase	S73751	CE synthesis	0.81
squalene epoxidase	NM_003129	steroids synthesis	2.00
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1	NM_002130	steroids synthesis	1.74
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	NM_000859	steroids synthesis	1.74
7-dehydrocholesterol reductase	NM_001360	steroid synthesis	1.52
mevalonate kinase	NM_000431	steroids synthesis	1.41
lanosterol synthase	NM_002340	steroids synthesis	1.41
farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	BC003573	steroid synthesis	1.23
cytochrome P450-51	NM_000786	steroid synthesis	1.23
isopentenyl-diphosphate delts isomerase	NM_004508	steroid synthesis	1.52
LDL receptor	NM_000527	LDL uptake	1.87
LDL receptor-related protein 6	AF074264	chyromicron uptake	1.62
angiopoietin-like 3 (ANGPTL3)	NM 021146	inhibition of serum TG clearance	0.09
hepatocyte nuclear factor 4, alpha	NM 000457	transcription factor for genes related to lipid and bile acid metabolism	0.29
ER-60	NM_005313	protein folding, degradation of ApoB-100	0.40

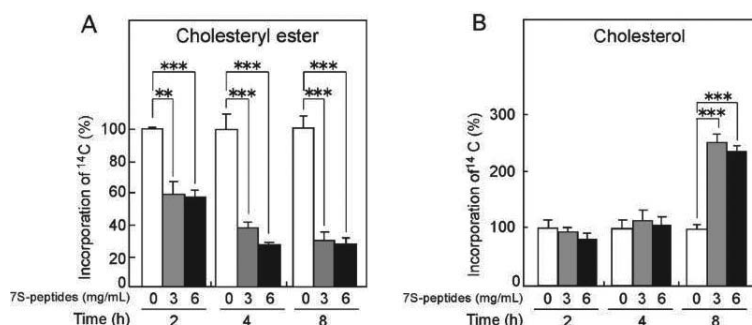


Fig. 5. Effect of 7S-peptide treatment on the incorporation of [14 C] acetic acid into cholesteryl ester and cholesterol of HepG2 cells. HepG2 cells were incubated for 2, 4, or 8 h in the presence or absence of 3 or 6 mg/mL of the 7S-peptides, and then incubated in the presence of [14 C]-acetic acid for 1 h. The amount of radioactivity incorporated into the HepG2 cell cholesteryl ester (A) or cholesterol (B) was measured. Values are presented as the percentage of the value obtained from the mock treated control cells. Bars represent the mean \pm standard deviation of three experiments. **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$ compared to control.

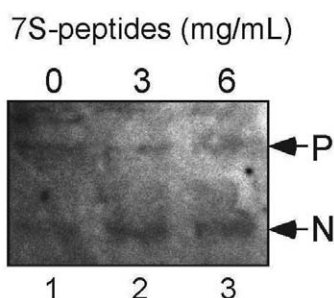


Fig. 6. Increase in the cleaved nuclear form of SREBP-2 by treatment with 7S-peptide. HepG2 cells were incubated for 8 h (lanes 1-3) in the presence or absence of 3 or 6 mg/mL of 7S-peptides. SREBP-2 was detected by immunoblot analysis. N and P denote the cleaved nuclear form and the uncleaved precursor forms of SREBP-2, respectively.

あることが示されている¹⁰。また、コレステロールから生じるオキシステロールをリガンドとするLXRにより転写が活性化されるANGPTL3のmRNAが⁸、減少していた。ANGPTL3はリポプロテインリパーゼの内因性阻害剤であり、血清VLDLレベルに影響することが報告されている¹¹。したがって、7S-ペプチド添加による細胞内コレステロールレベルの低下は、細胞内TG生成量の減少によるVLDL分泌量減少と合わせて、血清TGレベルの低下に寄与している可能性があることが明らかとなった。

要 約

本研究によりイソフラボンを含まない高純度7Sから得られたペプチドが*in vitro*で、ApoB-100 (VLDL) の分泌量を低下させることを示した。7S添加により、細胞内のTGおよびコレステロールのレベルが低下していた。また、7S-ペプチドは脂肪酸の β 酸化の促進、リポたん白質発現の活性化および末梢でのVLDLのTGの分解の抑制に関わる遺伝子の発現を変化させ、血清TGレベルを適正化する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Blair RM, Appt SE, Bennetan-Pelissero C, Clarkson TB, Anthony MS, Lamothe V and Potter SM (2002): Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in Golden Syrian F1B hybrid hamsters. *J Nutr*, **132**, 3585-3591.
- 2) Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, Kugitani H, Kohno M, Hirotsuka M and Kito M (2007): Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chem*, **102**, 317-322.
- 3) Kanamoto R, Kimura S and Okamura G (2007): Cholesterol lowering effect of soybean lipophilic proteins associated with phospholipids in rat. *Soy Protein Res* **10**, 83-87.
- 4) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.
- 5) Maebuchi M, Samoto M, Kohno M, Ito R, Koikeda T, Hirotsuka M and Nakabou Y (2007): Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men. *Food Sci Technol Res*, **13**, 45-53.
- 6) Ganji SH, Tavintharan S, Zhu D, Xing Y, Vajinath S, Kamanna VS and Kashyap ML (2004): Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J Lipid Res*, **45**, 1835-1845.
- 7) Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W and Verhoeven G (1997): Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res*, **57**, 1086-1090.
- 8) Hsu RY and Lardy HA (1967): Pigeon liver malic enzyme: II. Isolation, crystallization, and some properties. *J Biol Chem*, **242**, 520-526.
- 9) Markwell MAK, McGroarty EJ, Bieber LL and Tolbert NE (1973): The subcellular distribution of carnitine acyltransferase in mammalian liver and

kidney. *J Biol Chem*, **248**, 3426-3432.

- 10) Hayhurst GP, Lee Y, Lambert G, Ward JM and Gonzalez FJ (2001): Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol*, **21**, 1393-1403.
- 11) Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH and Cohen JC (2009): Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest* **119**, 70-79.
- 12) Mochizuki Y, Maebuchi M, Kohno M, Hirotsuka M, Moriyama T, Kawada T and Urade R (2009): Soybean β -conglycinin-derived peptides elicit in lipid metabolism in HepG2 cells. *J Agric Food Chem*, **57**, 1473-1480.