

大豆HMF由来ペプチドの消化管ホルモンGLP-1分泌を介した 血糖上昇抑制作用に関する研究

比良 徹*・村松茉耶・原 博

北海道大学大学院農学研究院

Effect of a Hydrolysate Prepared from Soy Protein High Molecular Weight Fraction on GLP-1 Secretion and Glycemia in Rats

Tohru HIRA, Maya MURAMATSU and Hiroshi HARA

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is known as an incretin hormone that is released from enteroendocrine L cells and enhances insulin secretion after meal ingestion. Sugar and fatty acids are well known to stimulate GLP-1 secretion. But studies are limited on protein/peptide-induced GLP-1 secretion. Recently, we demonstrated that a hydrolysate (ZeinH) prepared from the indigestible corn protein, Zein stimulates GLP-1 secretion and attenuates hyperglycemia in rats. In the present study, a hydrolysate was prepared from soy protein isolate indigestible fraction (high molecular weight fraction: HMF), and examined whether HMF hydrolysate (HMFH) stimulates GLP-1 secretion and affects glycemia. HMFH induced significant increase in GLP-1 secretion and intracellular calcium mobilization in GLP-1-producing enteroendocrine cell lines. Direct administration of HMFH solution into the ileal ligated loop of anesthetized rats induced significant increase in GLP-1 concentration in the ileal vein. However, HMFH administered into the ileum of conscious rats did not attenuate hyperglycemia induced by intraperitoneal glucose injection. In contrast, ileal ZeinH attenuated hyperglycemia. In our previous study, ZeinH was reported to reduce GLP-1 degradation in the plasma in addition to stimulating GLP-1 secretion. Results in the present study suggest that HMFH is insufficient to attenuate hyperglycemia due to the lack of potency to prevent GLP-1 degradation. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 70-74, 2010.

Key words : GLP-1, HMF, undigestible protein

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

消化管ホルモンGlucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、下部消化管(回腸～結腸)の消化管内分泌細胞L cellで産生、分泌され、血糖依存的インスリン分泌刺激作用、膵β細胞増殖促進作用を有することから、抗糖尿病ホルモンとして近年注目されている¹⁾。吸収されやすい栄養素である糖質、脂肪酸がGLP-1分泌を刺激することは知られているが、食品ペプチドによるGLP-1分泌に関する知見は少ない。

大豆たん白質の加水分解残渣であるHigh Molecular Weight Fraction (HMF)は、難消化性たん白質(レジスタンプロテイン)を含み、胆汁酸を捕捉することで、コレステロール低下作用²⁾、発がん抑制作用³⁾を持つことが報告されている。また消化されずに大腸まで到達することから、腸内細菌叢への影響を介した生理機能も考えられる。この「難消化性」という特性を生かした新たな生理作用の可能性が期待される。

我々は、トウモロコシの難消化性たん白質Zeinを人工消化したZein加水分解物(ZeinH)が、モデル細胞において強くGLP-1分泌を刺激することを見出し、さらにラット腸管においても強くGLP-1分泌を誘導し、血糖上昇を抑制することを明らかにした^{4,5)}。

本研究においては、難消化性たん白質HMFHの新たな生理機能として、これを人工消化したHMFHにGLP-1分泌を介した耐糖能改善効果があるかどうか、またそのGLP-1分泌機構を明らかにすること目的とした。

方 法

HMF加水分解物(HMFH)の調製

HMFを脱イオン水に懸濁し、pHを7に調整後、対基質濃度0.5%のパパイン(パパインF、アサヒフードケミカル)を加え、55℃にて60分間振盪した。100℃、20分間処理により酵素を失活させ、可溶性画分を濾過により回収し、凍結乾燥したものをHMFHとした。

実験1：GLP-1産生細胞株におけるGLP-1分泌試験

マウス大腸由来のGLP-1産生細胞株GLUTag(カナダトロント大学Dr. D Druckerより供与)を、48ウェルプレート中にサブコンフルエントに達するまで37℃、5%CO₂存在下で培養した。培地には、10% FBSを含むDMEMを用いた。培地を取り除き、Hepesバッファ(140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 20 mM Hepes, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4)にてウェルを洗浄後、同バッファに溶解したサンプル(各5 mg/mL)をウェルに添加した。サンプルとして、HMFHの他に、

加水分解していない牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン加水分解物(AEH)、肉ペプトン(MHY)、ゼイン加水分解物(ZeinH)を用いた。陰性対照として、Hepesバッファのみ、陽性対照として、70 mM KClを含むHepesバッファを用いた。

実験2：GLP-1産生細胞株における細胞内カルシウム濃度測定

24ウェルプレート中にてカバースリップ上にGLUTag細胞を培養し、2μMの蛍光カルシウム指示薬Fura 2-AM (Molecular Probe)、0.005%のPluronicF-127 (Molecular Probe)を含むHepesバッファ中で、37℃、20分間インキュベーション後、細胞内イオン解析装置(日本分光CAF-110)を用いて、2波長励起(340 nm, 380 nm)1波長蛍光(510 nm)測定を行い、蛍光強度比(340 nm / 380 nm)に基づき、細胞内カルシウム濃度を算出した。

実験3：ラット腸管結紮ループを用いたGLP-1分泌試験

Sprague-Dawley系雄性ラット(8週齢)を一夜絶食後、ケタミン/キシラジン麻酔下にて開腹し、回腸静脈に採血用のカテーテルを留置した。回腸部に30 cmの結紮ループを作成し、脱イオン水2 mLまたは、300 mgのHMFHを含む溶液(2 mL)をループ内に注入した。注入前(0分)、注入後30, 60, 90, 120分の回腸静脈血を採取し、血漿を回収後、GLP-1濃度を市販のキット(GLP-1 EIAキット、矢内原研究所)を用いて測定した。

実験4：腹腔内グルコース負荷試験

Sprague-Dawley系雄性ラット(8週齢)を一夜絶食後、ネンブタール麻酔下にて、採血用のカテーテルを頸静脈に、試料投与用のカテーテルを回腸部に留置した。3～4日の回復期間後に一夜絶食し、脱塩水2 mLまたは、HMFH, ZeinH溶液(500 mg / 2 mL)を回腸カテーテルより投与した。その30分後に腹腔内にグルコース溶液を投与した(1 g / kg)。サンプル、グルコース投与前後に、頸静脈血を採取し、血漿中のグルコース濃度を測定した。(グルコースCIIキット、和光純薬工業)

結果と考察

実験1

GLUTag細胞は、糖や脂肪酸、脱分極刺激などの生理的刺激に応答してGLP-1を分泌することから、GLP-1産生細胞のモデルとして広く用いられている。脱分極刺激である70 mM KClに加え、HMFH、

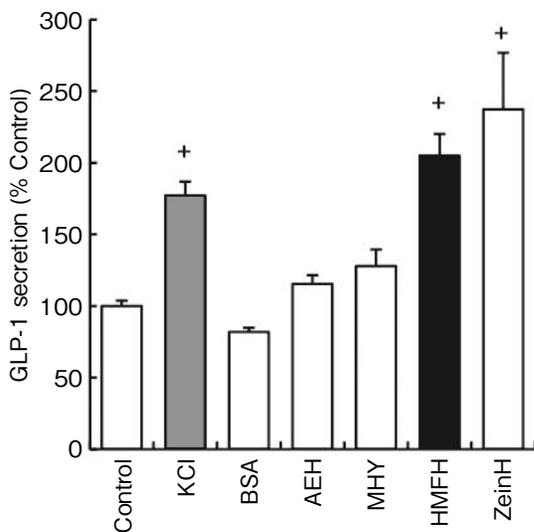


Fig. 1. GLP-1 secretion from GLUTag cells by various protein hydrolysates. GLUTag cells were exposed to various dietary protein hydrolysates (5 mg/mL), an intact protein (BSA at 5 mg/mL) and 70 mM KCl for 60 min. The supernatant was collected and assayed with GLP-1 EIA. Values are relative (%) to control GLP-1 secretion, and means \pm SEM (n= 6-8). +; $p < 0.05$ by Fisher's test. AEH; albumin egg hydrolysate, MHY; meat hydrolysate, HMFH; HMF hydrolysate, ZeinH; zein hydrolysate.

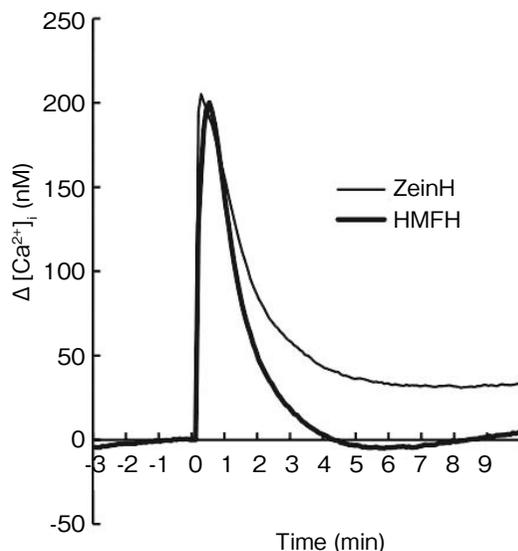


Fig. 2. Changes in intracellular calcium concentration in GLUTag cells in response to HMFH and ZeinH. GLUTag cells were loaded with fura-2 and exposed to HMFH and ZeinH (500 μ g/mL) from 0 min. Values are changes ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) from basal calcium level, and means of 3-4 experiments.

ZeinHに対して有意なGLP-1分泌促進が見られた。このことより、HMFHがZeinHに匹敵するGLP-1分泌促進作用を持つことが示された。過去に報告のあるAEH、MHYで有意なGLP-1分泌促進が見られなかったのは、本試験で用いた濃度(5 mg/mL)が、文献値(10 mg/mL)よりも低いことによるものと考えられる。

実験2

GLUTag細胞において、細胞内カルシウム濃度上昇がGLP-1分泌を誘導することが知られており、HMFHがGLP-1分泌を促進する際の情報伝達経路として、細胞内カルシウム濃度変化を測定した。GLUTag細胞を500 μ g/mLのHMFH溶液に暴露することで、ZeinHと同程度の細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こした。これにより、HMFHによるGLP-1分泌促進における細胞内カルシウムシグナルの関与が示唆された。この応答は一過性であり、GLP-1分泌にどの程度寄与するかは今後の検討が必要であるが、グルコース⁶⁾やグルタミン⁷⁾などに対しても同様の細胞内カルシウムシグナル応答が見られることが報告されている。

実験3

HMFHをラット回腸に直接投与することで、投与30分後から持続的に回腸静脈中のGLP-1濃度が大きく上昇(約1.5 nM)した。ZeinHを回腸に投与した場合、門脈血中で1 nM程度のGLP-1濃度の上昇が見られたことから、ラット腸管においてもHMFHはZeinHに匹敵するGLP-1分泌促進作用を持つことが示唆された。持続的なGLP-1分泌促進は、HMFHの消化性、吸収性の低さによる可能性も考えられる。

実験4

実験3より、HMFHを回腸部に直接投与することで、GLP-1分泌促進、インスリン分泌促進を介した血糖上昇抑制作用が期待された。HMFHそのものの作用を調べるために、ここでは腹腔内グルコース負荷試験(IPGTT)を行った。グルコース投与後の血糖値上昇は、コントロール(水投与)群に比べ、ZeinH投与群で低値を示し、30分の値は有意に低い値となった。HMFH投与群ではグルコース負荷30分後の値がコントロール群に比べて低い傾向が見られた。

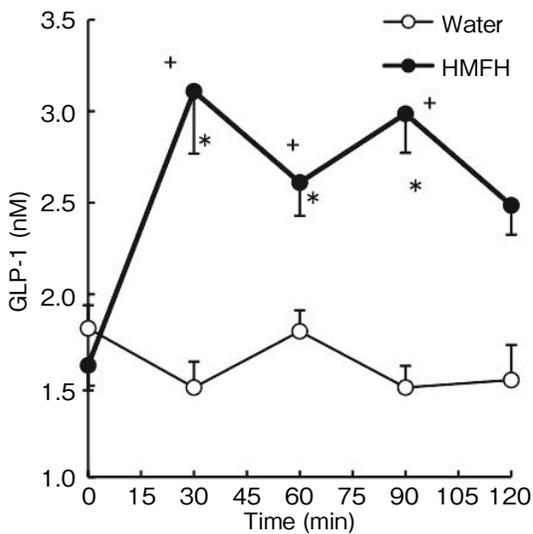


Fig. 3. Plasma GLP-1 concentrations in the ileal vein after ileal administration of water or HMFH solution into ligated ileal loop in anesthetized rats. A ligated ileal loop was prepared in anesthetized rats. Blood samples were collected from the ileal vein before and after ileal administration of water (2 mL, open circle) or HMFH solution (300 mg in 2 mL water, closed circle). Plots with a plus (+) sign differ significantly from the value at 0 min (Fisher's test, $p < 0.05$). Plots with asterisk (*) sign differ significantly between treatments at the same time point (T -test, $p < 0.05$).

ZeinHは、筆者らの試験によりGLP-1分泌促進に加えて、血中でのGLP-1の分解を抑制する作用があることが最近明らかとなった⁵⁾。消化管内分泌細胞L cellより分泌されたGLP-1は、血中のペプチダーゼDipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV)により速やかに分解、不活性化されることが知られており、その半減期は1~2分とされる。このため、GLP-1の活性を維持するために、DPP-IV耐性のGLP-1アナログや、DPP-IV阻害剤が、糖尿病治療において国内でも導入され始

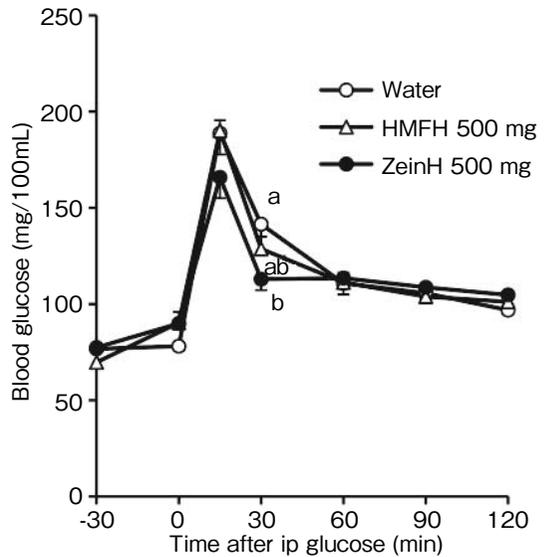


Fig. 4. Plasma glucose and levels during the intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in conscious rats after the ileal administration of water, HMFH or ZeinH. Water (2 mL, open square), HMFH (500 mg/2 mL, closed triangle), or ZeinH (500 mg/2 mL, closed circle) was administered into the ileum 30 min prior to intraperitoneal glucose injection (1 g/kg). Blood samples were collected from the jugular vein before (-30, 0 min) and after (15, 30, 60 min) the glucose injection. Values are displayed as the means \pm SEM of 6 rats in each group. Plots at the same time point not sharing the same letter differ significantly between treatments (Fisher's PLSD test, $p < 0.05$).

めている。ZeinH回腸投与後に回腸静脈血中のDPP-IV活性が低下することを見出し、このことが、GLP-1分解抑制に寄与することが示唆された。

本試験において、HMFHが強いGLP-1分泌促進作用を持つにも関わらず、血糖上昇を抑制しなかったことは、GLP-1分泌促進に加え、血中DPP-IV活性を抑制することが、GLP-1の生理作用発揮において重要であることを示唆するものと考えられる。

要 約

消化管ホルモンGlucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、下部消化管の消化管内分泌細胞L cellで産生、分泌され、インスリン分泌促進、 β 細胞増殖促進作用などを有する。糖質、脂質とは異なり、食品ペプチドによるGLP-1分泌に関する知見は少ない。本研究では、大豆たん白質の難消化性画分を含むHigh Molecular Weight Fraction (HMF) をパパイんで処理した加水分解物がGLP-1分泌促進作用を持つかどうかを、培養細胞ならびにラットにおいて検討した。

マウス大腸由来のGLP-1産生細胞株GLUtagを、各種たん白質加水分解物に暴露したところ、市販の肉ペプトン、卵白アルブミン加水分解物に比べてHMF加水分解物 (HMFH) が高いGLP-1分泌誘導を示した。また、この細胞においてHMFHは細胞内Ca濃度上昇を引き起こすことが見出され、HMFHによるGLP-1分泌における細胞内Caシグナルの関与が示唆された。

麻酔下のラット回腸部にHMFHを直接投与し、腸間膜静脈血中のGLP-1濃度を経時的に測定したところ、有意なGLP-1濃度上昇が見られた。これにより、HMFHはラット回腸においてGLP-1分泌を誘導することが示された。GLP-1の生理作用として、インスリン分泌を介した血糖上昇抑制が考えられる。そこで覚醒ラットの回腸部位に直接HMFHを投与して、腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT) を行ったが、血糖上昇の抑制は見られなかった。

我々は、トウモロコシの難消化性たん白質Zeinの加水分解物が、GLP-1分泌促進に加え、GLP-1の分解を抑制して、インスリン分泌促進を介した血糖上昇抑制作用を持つことを見出しており、HMFHの場合は、GLP-1分解抑制作用を持たないことが、分泌されたGLP-1の作用を十分に発現できない原因であると考えられた。

文 献

- 1) Brubaker PL (2010): Minireview: update on incretin biology: focus on glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*, **151**(5):1984-1989.
- 2) Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1990): Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J Nutr*, **120**(9):977-985.
- 3) Azuma N, Machida K, Saeki T, Kanamoto R and Iwami K (2000): Preventive effect of soybean resistant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **46**(1):23-29.
- 4) Mochida T, Hira T and Hara H (2010): The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats (2010): *Endocrinology*, **151**(7):3095-3104.
- 5) Hira T, Mochida T, Miyashita K and Hara H (2009): GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum, but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **297**(4): G663-G671
- 6) Reimann F and Gribble FM (2002): Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes*, **51**(9):2757-2763.
- 7) Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA and Gribble FM (2004): Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUtag cells. *Diabetologia*, **47**(9):1592-1601.