

# 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 網羅解析およびVAWWMYの効率的な高機能化

長岡 利<sup>\*1</sup>・加藤竜司<sup>2</sup>・大河内美奈<sup>2</sup>・本多裕之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岐阜大学応用生物科学部 <sup>2</sup>名古屋大学大学院工学研究科

## Exhaustive Analysis of Peptides Derived from Soybean Protein with Bile Acids Binding Ability and Efficient Modification of VAWWMY Activity by Use of the Peptide Array

Satoshi NAGAOKA<sup>1</sup>, Ryuji KATO<sup>2</sup>, Mina OKOCHI<sup>2</sup> and Hiroyuki HONDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193

<sup>2</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464-8603

### ABSTRACT

This experiment was designed to identify peptides with bile acid-binding ability from soybean beta-conglycinin. We used the peptide array to evaluate the bile acid-binding ability of peptide derived from soybean beta-conglycinin (hydrophobicity > 0.8). In the peptide array, bile acid-binding ability was evaluated for the binding ability of taurocholic acid and fixed peptides on cellulose membrane, then binding peptides with taurocholic acid were detected by the first antibody of bile acid, and finally the antibody-taurocholic acid complexes were detected by the second antibody. We found some bile acid binding peptides in this screening. Furthermore, we evaluated the efficient modification of VAWWMY (soystatin) activity by using the peptide array. In this context, we selected PWWWMY, IPWYFY, VIWWFK, IYWYMY to evaluate bile acid-binding capacity and micellar solubility of cholesterol *in vitro*. VIWWFK had higher bile acid-binding capacity *in vitro* than did other synthesized peptides. PWWWMY or VIWWFK had significantly lower micellar solubility of cholesterol than other peptides. In rats, the uptake of cholesterol was significantly decreased by the administration of PWWWMY or VIWWFK. We found PWWWMY or VIWWFK had significantly decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 90-95, 2010.

Key words : beta-conglycinin, peptide array, PWWWMY, VIWWFK, soystatin, 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<sup>1-3)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。

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 $\beta$ -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、ペプチドアレイによりグリシニン由来VAWWMY (soystatin: ソイスタチン) の効率的高機能化について検討した。

## 方 法

### [1] ペプチドアレイによる胆汁酸結合能の網羅解析 (実験1)

大豆 $\beta$ -コングリシニン ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  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 (疎水度 $>0.8$ )、 $n=3$ 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10 $\mu$ g/mLタウロコール酸溶液で37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C インキュベートし、2次抗体反応を行った。0.05%TTBSで37 $^{\circ}$ C 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、胆汁酸結合ペプチドを特定した。

### (実験2)

VAWWMYのペプチドアレイによる高機能化を図るため、VAWWMY改変ペプチドについて検討した。VAWWMYの1アミノ酸置換を全てのアミノ酸 (VAWWMY改変ペプチド114種類) について評価した。方法は実験2と同様である。

### [2] *in vitro*における胆汁酸結合能実験 (実験3)

タウロコール酸との結合能は、既報<sup>3)</sup>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-<sup>14</sup>C] 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 $\beta$ -コングリシニン由来ペプチドを加え、その混合物を37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。その後、15,000 $\times$ g、37 $^{\circ}$ Cで15分間遠心した。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。

### [3] *in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性実験 (実験4)

*in vitro*におけるコレステロールのミセル溶解性は、既報<sup>3)</sup>に従って測定した。1.48 MBq/mL[4-<sup>14</sup>C]-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 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。インキュベートしたミセル溶液に濃度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 $\beta$ -コングリシニン由来ペプチドを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後、100,000 $\times$ g、37 $^{\circ}$ C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。

### [4] *in vivo*におけるコレステロール吸収実験 (実験5)

市販の非精製飼料 (MF, オリエンタル酵母) にて3日間予備飼育後、9週令のWistar系ラットを水は自由摂取のまま48時間絶食させた。ゾンデによって、<sup>3</sup>Hコレステロールを含む試験溶液を胃の中に経口投与した。方法の詳細は、既報<sup>3)</sup>に従って行った。

## 結果と考察

### 大豆 $\beta$ -コングリシニン由来胆汁酸結合ペプチド（疎水度 $>0.8$ ）の網羅解析（実験1）

実験1では、 $\beta$ -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（アミノ酸配列）を3個特定した。その結果、胆汁酸結合能の高い順番に、Peptide A, Peptide B, Peptide Cであった。（Fig. 1）

### VAWWMY改変ペプチドの胆汁酸結合に関する網羅解析（実験2）

VAWWMYを1アミノ酸置換したペプチドについて、ペプチドアレイにより胆汁酸結合能を評価した。その結果、VAWWMYより強い胆汁酸結合能を有するVAWWMY改変ペプチド（PWWWMY, IPWYFY, VIWWFK, IYWYMY）を発見した。（Table 1, 2）

### VAWWMY改変ペプチドの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響（実験3）

実験3では、実験2により明らかとなった胆汁酸結合能を有するVAWWMY改変ペプチド（PWWWMY, IPWYFY, VIWWFK, IYWYMY）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、VIWWFKが最も高い胆汁酸結合能を示した。（Fig. 2）。

### VAWWMY改変ペプチドの*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4）

実験4では、実験2により明らかとなったVAWWMY改変ペプチド（PWWWMY, IPWYFY, VIWWFK, IYWYMY）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。強くミセル溶解性を低下させたPWWWMYとVIWWFKは、医薬品であるコレステラミンと同程度にコレステロールミセル溶解性を低下させた。（Fig. 3A, Fig. 3B）。

### VAWWMY改変ペプチドの*in vivo*におけるコレステロール吸収に対する影響（実験5）（Table 3）

対照群であるカゼインペプチドと比較して、PWWWMYとVIWWFKは顕著にコレステロール吸収を抑制することが明らかにされた。

従来の研究では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<sup>4)</sup>。今回の研究から、胆汁酸結合能を有するオクタペプチドを数個発見した。また、ペプチドアレイによるVAWWMYの高機能化により、VAWWMYより強い胆汁酸結合能を有するVAWWMY改変ペプチド（PWWWMY,

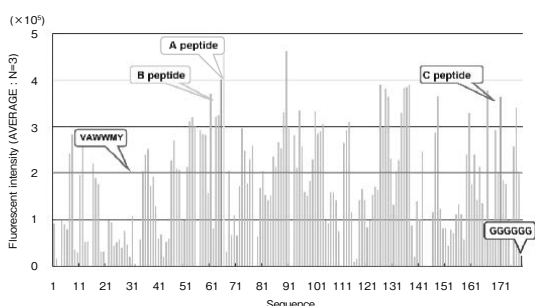


Fig. 1. Fluorescent intensity of taurocholic acid binding to overlapping peptides 8 residues in length, covering  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$  subunit,  $\alpha'$  subunit,  $\beta$  subunit (Sequence is selected 8 residues with more than 0.8 hydrophobicity). The sequence is in numeric order from left to right. The sequence VAWWMY or GGGGGG described in the figure is the positive control or the negative control.

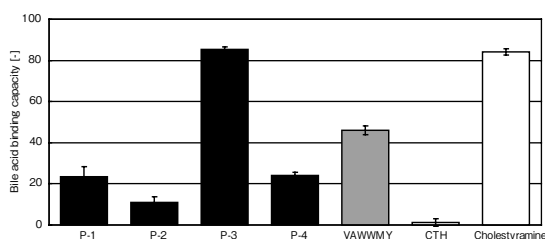


Fig. 2. Bile acid binding capacity of peptides. Peptides (P-1, PWWWMY; P-2, IPWYFY; P-3, VIWWFK; P-4, IYWYMY), parent bile acid binding peptide (VAWWMY), casein tryptic hydrolysate (CTH), and cholestyramine were compared for their affinity to  $^{14}\text{C}$ -taurocholate. Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=3). Means with different superscript letters are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

IPWYFY, VIWWFK, IYWYMY)の中から、ミセル溶解性を低下させ、ラットにおいてコレステロール吸収を抑制するヘキサペプチド（PWWWMYおよびVIWWFK）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<sup>3)</sup>。

Table 1. Influence of single residue substitutions on parent peptide (VAWWMY) binding to bile acid.

| Substituted amino acids | Substituted          |         |     |                      |         |     |                      |         |     |                      |         |     |
|-------------------------|----------------------|---------|-----|----------------------|---------|-----|----------------------|---------|-----|----------------------|---------|-----|
|                         | *AWWMY               |         |     | V*WWMY               |         |     | VA*WMY               |         |     | VAW*WY               |         |     |
|                         | Binding capacity [-] | p value | P/N | Binding capacity [-] | p value | P/N | Binding capacity [-] | p value | P/N | Binding capacity [-] | p value | P/N |
|                         | Average $\pm$ SD     |         |     | Average $\pm$ SD     |         |     | Average $\pm$ SD     |         |     | Average $\pm$ SD     |         |     |
| A                       | 0.91 $\pm$ 0.31      | 0.18    |     | 1.00 $\pm$ 0.05      | —       | —   | 0.60 $\pm$ 0.21      | <0.01   |     | 0.51 $\pm$ 0.26      | <0.01   |     |
| C                       | 0.82 $\pm$ 0.16      | 0.03    |     | 1.05 $\pm$ 0.26      | 0.12    |     | 0.55 $\pm$ 0.32      | <0.01   |     | 0.34 $\pm$ 0.21      | <0.01   | N   |
| D                       | 0.87 $\pm$ 0.31      | 0.20    |     | 1.00 $\pm$ 0.01      | 0.05    | P   | 0.56 $\pm$ 0.12      | <0.01   |     | 0.46 $\pm$ 0.25      | <0.01   | N   |
| E                       | 0.81 $\pm$ 0.11      | 0.04    |     | 0.86 $\pm$ 0.15      | 0.17    | N   | 0.47 $\pm$ 0.06      | <0.01   | N   | 0.70 $\pm$ 0.04      | 0.01    |     |
| F                       | 0.83 $\pm$ 0.29      | 0.15    |     | 1.01 $\pm$ 0.13      | 0.10    |     | 0.84 $\pm$ 0.14      | 0.14    |     | 1.04 $\pm$ 0.07      | 0.30    |     |
| G                       | 0.91 $\pm$ 0.27      | 0.29    |     | 1.29 $\pm$ 0.13      | <0.01   | P   | 0.72 $\pm$ 0.21      | 0.02    |     | 0.81 $\pm$ 0.25      | 0.11    |     |
| H                       | 0.78 $\pm$ 0.06      | 0.08    |     | 1.03 $\pm$ 0.13      | 0.05    | P   | 0.59 $\pm$ 0.09      | <0.01   |     | 0.54 $\pm$ 0.13      | <0.01   |     |
| I                       | 1.17 $\pm$ 0.08      | 0.01    | P   | 1.07 $\pm$ 0.06      | 0.02    | P   | 0.82 $\pm$ 0.16      | 0.06    |     | 0.90 $\pm$ 0.13      | 0.20    |     |
| K                       | 0.85 $\pm$ 0.31      | 0.18    |     | 1.27 $\pm$ 0.17      | <0.01   | P   | 1.06 $\pm$ 0.20      | 0.22    |     | 1.42 $\pm$ 0.31      | 0.06    | P   |
| L                       | 0.81 $\pm$ 0.34      | 0.12    |     | 0.95 $\pm$ 0.08      | 0.18    |     | 0.81 $\pm$ 0.21      | 0.05    |     | 0.76 $\pm$ 0.10      | 0.01    |     |
| M                       | 0.73 $\pm$ 0.31      | 0.09    | N   | 1.04 $\pm$ 0.06      | 0.01    | P   | 0.60 $\pm$ 0.10      | <0.01   |     | 0.76 $\pm$ 0.08      | 0.01    |     |
| N                       | 0.81 $\pm$ 0.34      | 0.16    |     | 0.95 $\pm$ 0.03      | 0.16    |     | 0.50 $\pm$ 0.13      | <0.01   | N   | 0.59 $\pm$ 0.26      | 0.01    |     |
| P                       | 1.38 $\pm$ 0.06      | <0.01   | P   | 1.38 $\pm$ 0.07      | <0.01   | P   | 0.69 $\pm$ 0.09      | 0.22    |     | 0.51 $\pm$ 0.11      | <0.01   | N   |
| Q                       | 0.83 $\pm$ 0.11      | 0.04    |     | 0.88 $\pm$ 0.09      | 0.38    | N   | 0.58 $\pm$ 0.251     | 0.01    |     | 0.60 $\pm$ 0.23      | <0.01   |     |
| R                       | 0.74 $\pm$ 0.44      | 0.12    | N   | 1.09 $\pm$ 0.11      | 0.04    | P   | 0.69 $\pm$ 0.09      | 0.01    |     | 1.13 $\pm$ 0.37      | 0.10    |     |
| S                       | 0.91 $\pm$ 0.19      | 0.11    |     | 0.94 $\pm$ 0.11      | 0.49    | N   | 0.50 $\pm$ 0.17      | <0.01   | N   | 0.53 $\pm$ 0.15      | <0.01   |     |
| T                       | 0.76 $\pm$ 0.09      | <0.01   | N   | 0.97 $\pm$ 0.03      | 0.12    |     | 0.53 $\pm$ 0.03      | <0.01   |     | 0.60 $\pm$ 0.14      | <0.01   |     |
| V                       | 1.00 $\pm$ 0.05      | —       | —   | 0.95 $\pm$ 0.13      | 0.21    |     | 0.67 $\pm$ 0.22      | 0.01    |     | 0.64 $\pm$ 0.01      | <0.01   |     |
| W                       | 0.76 $\pm$ 0.27      | 0.18    |     | 1.11 $\pm$ 0.05      | <0.01   | P   | 1.00 $\pm$ 0.22      | —       | —   | 1.00 $\pm$ 0.22      | —       | —   |
| Y                       | 0.89 $\pm$ 0.33      | 0.21    |     | 1.14 $\pm$ 0.08      | 0.02    | P   | 0.74 $\pm$ 0.05      | <0.01   |     | 1.17 $\pm$ 0.08      | 0.07    | P   |

The binding capacities of peptides with single residue substitution from VAWWMY are listed. With every substitution, statistical significance was determined by *t*-test. P in P/N column: Substitution with positive effect is the substitution that enhanced the bile acid binding capacity of parent peptide (>1.0) with significance  $p < 0.1$ . N in P/N column: Substitution with negative effect is the substitution that diminished the bile acid binding capacity of parent peptide with significance  $p < 0.1$ .

Table 2. Bile acid binding peptides selected from the designed 6-mer library screen.

| Peptide name | Sequence | <sup>a</sup> Bile acid binding capacity [-] | <sup>b</sup> <i>P</i> value | <sup>c</sup> GRAVY score [-] |
|--------------|----------|---------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| P-1          | PWWWMY   | 1.59 $\pm$ 0.13                             | 0.01                        | -0.62                        |
| P-2          | IPWYFY   | 1.52 $\pm$ 0.09                             | 0.03                        | 0.37                         |
| P-3          | VIWWFK   | 1.47 $\pm$ 0.06                             | 0.01                        | 0.97                         |
| P-4          | IYWYMY   | 1.38 $\pm$ 0.03                             | 0.01                        | 0.27                         |

Listed bile acid binding peptides were screened from the designed 6-mer library that covers all the combinations of contributing amino acids found in the parent peptide single residue substitutions (Table 1).

<sup>a</sup>Bile acid binding capacity is the average relative fluorescent intensity of 15 spots standardized to the parent peptide (VAWWMY) as 1.0.

<sup>b</sup>*p*-values comparing fluorescence intensity of candidate peptides to parent peptide were calculated by *t*-test.

<sup>c</sup>GRAVY is the hydrophobicity score where a higher score indicates greater hydrophobicity. The score is calculated based on the hydropathy plot

Table 3. Inhibitory effect of bile acid binding peptides on cholesterol absorption *in vivo*

| Excised part    | CTH                    | PWWWMY                 | <sup>a</sup> P value | VIWWFK                 | <sup>a</sup> P value |
|-----------------|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
|                 | Accumulating ratio [%] | Accumulating ratio [%] |                      | Accumulating ratio [%] |                      |
| Serum           | 0.23 ± 0.04            | 0.04 ± 0.01            | 0.001                | 0.09 ± 0.03            | 0.005                |
| Liver           | 0.39 ± 0.07            | 0.06 ± 0.02            | 0.002                | 0.09 ± 0.02            | 0.001                |
| Small intestine | 0.93 ± 0.16            | 0.37 ± 0.14            | 0.019                | 0.37 ± 0.07            | 0.008                |
| Total           | 1.55 ± 0.08            | 0.47 ± 0.04            | 0.002                | 0.54 ± 0.04            | 0.002                |

Each value is expressed as means ± SEM (n=9).

Statistical significance compared to CTH by Student's *t*-test.

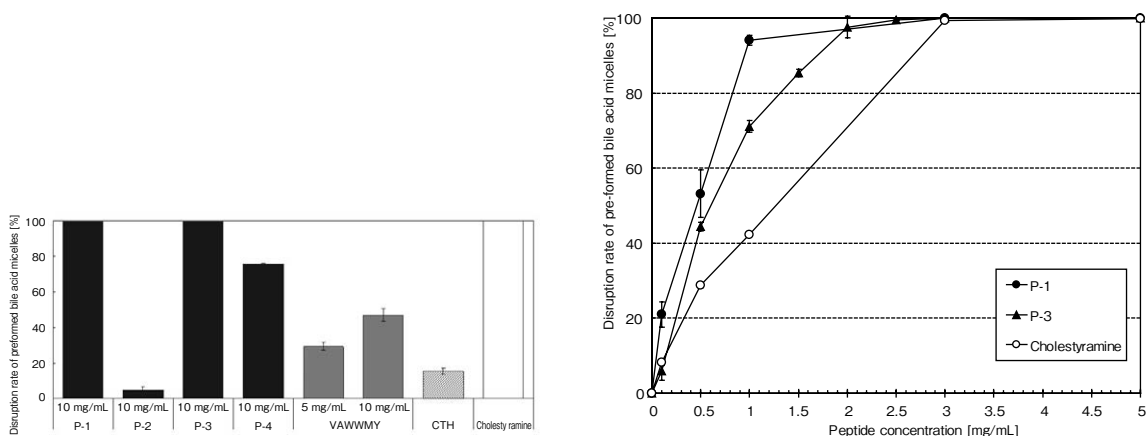


Fig. 3. Disruption rate of pre-formed bile acid micelles by bile acid binding peptides. Bile acid and <sup>14</sup>C-cholesterol were incubated for 24 h and sonicated to form bile acid micelles containing cholesterol. Peptides were incubated with pre-formed micelles for 1 h and radioactivity in the supernatant was counted after ultra-centrifugation. Relative decrease percentage of radioactivity compared to the prior sample without peptide addition was expressed as the disruption rate of pre-formed bile acid micelles.

A: Disruptive effect on bile acid micelles. P-1 and P-3 showed complete destruction of pre-formed micelles, comparable to cholestyramine.

B: Dose-response of peptides on bile acid micelle disruption. P-1 had a greater disruptive effect compared to P-3 peptide. Filled circle, P-1; filled triangle, P-3; open circle, cholestyramine. Means with different superscript letters are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range test.

## 要 約

コレステロール吸収抑制作用を発揮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（長岡ら：Biosci. Biotechnol. Biochem. (2010) “印刷中”）以外は不明である。そこで、大豆たん白質を構成する、どのアミノ酸配列がコレステロール吸収抑制作用に寄与する胆汁酸結合ペプチドであるのかを、ペプチドアレイにより網羅的に解析し、大豆たん白質のコレステロール吸収抑制作用に寄与している胆汁酸結合ペプチドを発見することを目的とした。具体的には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から、疎水度0.8以上のオクタペプチドを選別し、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。さらに、大豆グリシニン由来のVAWWMYを鍵ペプチドとして、ペプチドアレイによりアミノ酸置換を行ってペプチドを評価し、VAWWMYの効率的な高機能化を検討した。その結果、VAWWMYよりも強力にコレステロールミセル溶解性を阻害するVAWWMY改変ペプチド（PWWWMYおよびVIWWFK）を見出した。これらのVAWWMY改変ペプチドは*in vivo*でコレステロール吸収抑制作用を発揮した。

## 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, K K and Hamilton, R M G (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) Nagaoka, S, Nakamura, A, Shibata, H and Kanamaru, Y (2010) : Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* "in press"