

精神的ストレス抑制作用を有する大豆たん白質由来の 低分子ペプチドの探索とその応用

大日向耕作*¹・村木 彩¹・尾家麻里子¹・山田優子¹・吉川正明²

¹京都大学大学院農学研究科 ²大阪大学大学院工学研究科

Research and Application of Bioactive Peptide Derived from Soy Protein with Anxiolytic-Like Activity

Kousaku OHINATA, Aya MURAKI, Mariko OIE, Yuko YAMADA
and Masaaki YOSHIKAWA

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011
Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita 565-0871

ABSTRACT

It is known that excess mental stress increases risk of lifestyle-related disease. In the current study, we investigated the effect of soymorphin-5 (10 mg/kg/day for 5 weeks, p.o), an anxiolytic peptide derived from soy β -conglycinin β -subunit, on glucose and lipid metabolism using KK-Ay mice, a diabetes model animal. We found that soymorphin-5 ameliorated hyperglycemia 4-5 weeks after the start of oral administration. Difference of food intake between soymorphin-5 and control groups was not observed during the experimental period. Soymorphin-5 administration for 5 weeks decreased plasma insulin levels, suggesting that insulin resistance might be improved. Plasma triglyceride (TG) levels and liver weight decreased, and liver TG contents tended to be lower after soymorphin-5 administration. Thus we found that soymorphin-5 improves both glucose and lipid metabolism. Soymorphin-5 also increased plasma adiponectin concentration and liver mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and its target genes. Taken together, orally administered soymorphin-5 may improve glucose and lipid metabolism via activation of adiponectin and PPAR α followed by increases of β -oxidation and energy expenditure in KK-Ay mice. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 105-108, 2010.

Key words : β -conglycinin, soymorphin, anxiolytic activity, anti-diabetes, insulin resistance

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

不安感は生体の危険を回避するために本来必要な感情である。しかしながら、過度の精神的ストレスは精神疾患の発症や進行を促進するだけでなく生活習慣病のリスクを上昇させることから、これを緩和する物質の開発が期待されている。これまで我々は大豆たん白質由来の種々の低分子ペプチドが精神的ストレス緩和作用（抗不安作用）を示すことを見出している。本研究では大豆β-コングリシニンβサブユニット由来の抗不安ペプチドsoymorphin-5に着目し¹⁻³⁾、その長期投与による糖代謝・脂質代謝に及ぼす影響を糖尿病モデル動物を用いて検討した。

方 法

soymorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Val-Val, YPFVV) 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。実験動物として5週齢の雄性KK-Ayマウス（日本クレア株式会社）を用い個別飼育し（室温：22～24℃、湿度50%、12時間の明暗サイクル）固形飼料（CE-2、日本クレア株式会社）と水を自由に摂取させた。7日間予備飼育後、体重、摂食量および血糖値の平均値が同等となるよう2群に分けてcontrol群とsoymorphin-5投与群とした。soymorphin-5投与群には、飲水に10 mg/kg/dayとなるようsoymorphin-5を溶解し5週間継続的に投与した。摂食量および摂水量は毎日測定し体重は3～4日毎に測定した。試験開始5週目に麻酔下で血液および各臓器（肝臓、腸間膜脂肪、副睪丸周囲脂肪、褐色脂肪組織）を採取し生化学的パラメーターを測定するとともに定量的PCR法により各種遺伝子のmRNA発現量を測定した。なお、試験開始2および4週目に尾静脈より部分採血し血糖値の変化を測定した。

結果と考察

II型糖尿病モデル動物のKK-Ayマウスに対しsoymorphin-5 (10 mg/kg/day) を継続的に経口投与し血糖値の変動を測定した。その結果、試験飼育期間を通じて対照群の血糖値が継続的に上昇する一方、soymorphin-5投与群の血糖値は4～5週目において対照群よりも有意に低値を示すことが明らかとなった（Fig. 1）。すなわち、soymorphin-5が血糖上昇抑制作用を示すことを初めて見出した。また、対照群で認められる飲水量の上昇が4週目以降soymorphin-5投与により抑制された（data not shown）。一般に糖尿病では尿糖により尿細管内浸透圧が上昇するため水の再吸

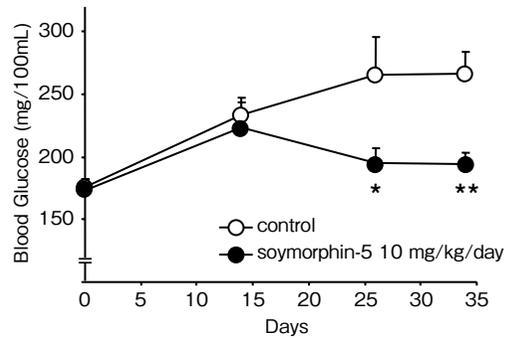


Fig. 1. Effect of soymorphin-5 on blood glucose levels in KK-Ay mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 7-8 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control group.

収が抑制され、尿量増加ならびに組織水分含量が減少し飲水量が増加する。したがって、soymorphin-5は血糖上昇を抑制することにより飲水量が正常化したと考えられる。なお、体重および摂食量は群間に差は認められなかった。

試験飼育5週目にKK-Ayマウスを採血および解剖し生化学的パラメーターを測定した。soymorphin-5投与群の血漿インスリン濃度は対照群と比較し有意な低下が認められた（Fig. 2）。soymorphin-5投与により血糖上昇が抑制され、かつ、血漿インスリン濃度が減少することから、soymorphin-5はインスリン抵抗性改善作用を有すると考えられる。

さらにsoymorphin-5投与群では血漿トリグリセライド濃度の減少が認められた（Fig. 2）。なお、コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度には変化が認められなかった。また、脂肪重量を測定したが、腸間膜脂肪、副睪丸周囲脂肪などの白色脂肪および褐色脂肪のいずれの組織重量にも差は認められなかった（Fig. 3）。一方、soymorphin-5投与により肝臓重量が減少することが判明した。さらに肝臓中のトリグリセライド含量が減少傾向を示すことが明らかとなった（Fig. 4）。血漿トリグリセライド濃度および肝臓重量が有意に低下し肝臓トリグリセライド含量が減少傾向を示したことから、soymorphin-5は糖代謝改善作用に加え脂質代謝改善作用を併せ持つ可能性が示唆された。また、soymorphin-5は脂肪重量に影響を与えず肝臓重量のみを低下させることから、本ペプチドの作用点の候補として肝臓が挙げられる。

血漿adiponectin濃度はsoymorphin-5投与により有意に上昇した（Fig. 2b）。なお、adiponectinはインスリン抵抗性改善作用および脂質代謝促進作用を有する脂

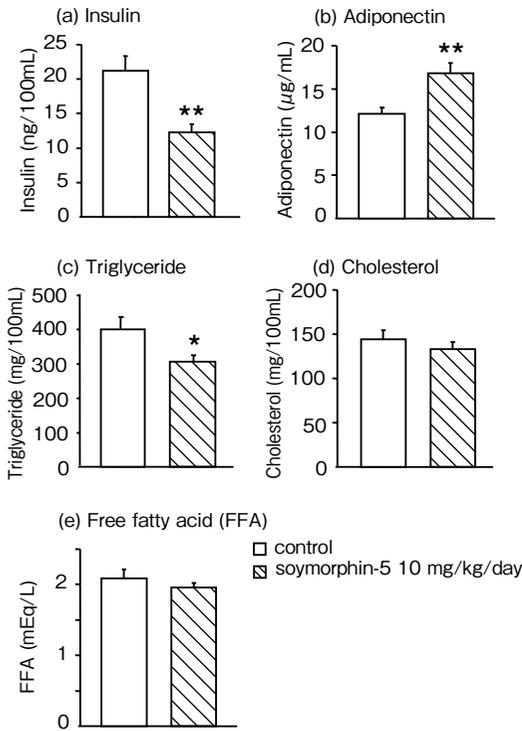


Fig. 2. Effect of soymorphin-5 on the levels of plasma biochemical parameters of KK-Ay mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 7-8 mice. * p <0.05, ** p <0.01 vs control group.

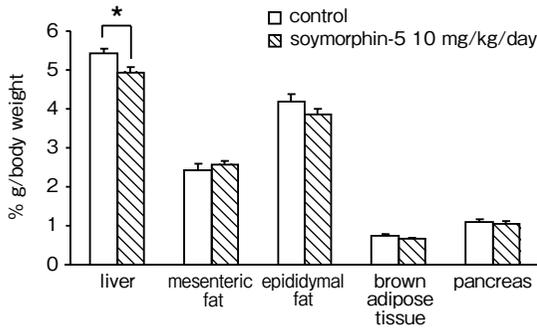


Fig. 3. Effect of soymorphin-5 on ratio of organ weight of KK-Ay mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 7-8 mice. * p <0.05 vs control group.

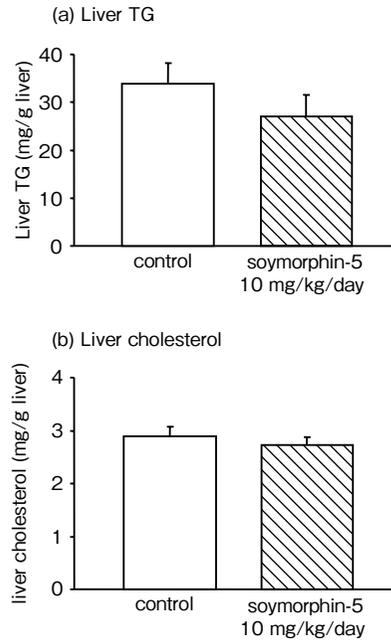


Fig. 4. Effect of soymorphin-5 on liver TG (a) and cholesterol (b) levels of KK-Ay mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 7-8 mice.

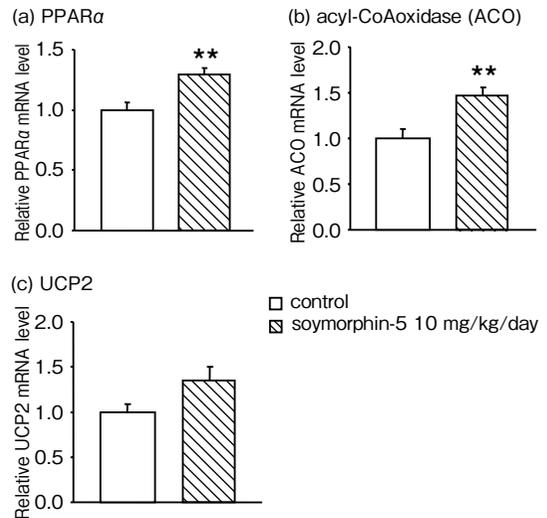


Fig. 5. Effect of soymorphin-5 on mRNA levels of lipid metabolism-related genes in the liver of KK-Ay mice. The mRNA levels were quantified by real-time PCR and normalized to b-actin mRNA. Results are expressed relative to control as the means \pm S.E.M. from 7-8 mice. ** p <0.01 vs control group.

肪細胞由来のアディポサイトカインであるが、腸間膜および副睪丸周囲脂肪のadiponectin mRNA発現量は上昇しなかった。したがって、翻訳あるいは分泌段階での調節により血中adiponectin濃度が上昇したものと考えられる。adiponectin受容体としてAdipoR1およびAdipoR2が同定され^{4),5)}、これらの発現量の低下が肥満およびインスリン抵抗性のモデル動物におけるインスリン抵抗性の一因となっていることが明らかとなっている。そこで、肝臓AdipoR1およびAdipoR2のmRNA発現量を検討したところ、soymorphin-5投与によりAdipoR2のmRNA発現量のみが有意に上昇することがわかった(データ示さず)。

AdipoR1はAMPキナーゼ活性化(糖新生抑制)に

関与する一方、AdipoR2はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α)活性化を惹起し脂肪酸の β -酸化亢進作用を示すことが報告され^{6),7)}、細胞内シグナル伝達において両受容体サブタイプが役割分担をしていることが明らかとなった。soymorphin-5投与群において肝臓PPAR α のmRNA発現量の上昇が認められた(Fig. 5)。さらに、PPAR α 標的遺伝子であるacyl-CoA oxidaseおよびUCP2発現量が増加することが判明した。したがって、soymorphin-5は血中adiponectin濃度の上昇、肝臓AdipoR2発現量の増加、PPAR α の活性化、およびその標的遺伝子の活性化により肝臓の β 酸化およびエネルギー消費が亢進し、糖代謝および脂質代謝改善作用を示すものと考えられる。

要 約

過度の精神的ストレスは精神疾患の発症や進行を促進するだけでなく生活習慣病のリスクを上昇させることから、これを緩和する物質が期待されている。本研究では大豆 β -コングリシニン β サブユニット由来の抗不安ペプチドsoymorphin-5に着目し、その長期投与による糖代謝および脂質代謝に及ぼす影響を糖尿病モデル動物を用いて検討した。soymorphin-5投与により、試験飼育4週目以降、血糖上昇抑制作用が認められた。なお、摂食量は群間に差は認められなかった。soymorphin-5投与群において血漿インスリン濃度の低下が認められインスリン抵抗性が改善されていることが示唆された。また、血漿トリグリセライド濃度および肝臓重量の低下、肝臓トリグリセライド含量も減少傾向が認められ、soymorphin-5が糖代謝および脂質代謝改善作用を示すことが判明した。さらに、soymorphin-5投与により血漿adiponectin濃度の上昇および肝臓PPAR α とその標的遺伝子のmRNA発現量の上昇が認められた。soymorphin-5の経口投与によりadiponectinおよびPPAR α が活性化され β 酸化およびエネルギー消費が亢進し、糖代謝および脂質代謝改善作用を示すものと考えられる。

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) Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl.* 2005; **6** (2), 7-14.
- 5) Tsuchida A. et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem.* 2004; **279** (29): 30817-30822.
- 6) Yamauchi T. et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 2007; **13** (3): 332-339.
- 7) Yamauchi T. et al. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond).* 2008; **32** Suppl 7: S13-18.