

脂質代謝改善作用を持つ大豆たん白質由来ペプチド配列の検索・同定

永尾晃治^{*1}・井上奈穂¹・坂田幸太郎¹・山野尚美¹，松井利郎²・柳田晃良¹

¹佐賀大学農学部 ²九州大学大学院農学研究院

Identification of Soy Protein-Derived Hypolipidemic Peptide-Sequences Using *in vitro* and *in vivo* Systems

Koji NAGAO^{*1}, Nao INOUE¹, Kotaro SAKATA¹, Naomi YAMANO¹, Toshiro MATSUI²
and Teruyoshi YANAGITA¹

¹Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502,

²Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University, Fukuoka 812-8581.

ABSTRACT

Soy protein is one of the vegetable proteins examined extensively for lipid lowering effect in humans and in experimental animals. Although soy protein isolate contains certain amounts of bioactive peptides which have distinct physiological activities in lipid metabolism, it is not clear which peptides are responsible for these effects. In the present study we have investigated the effect of soy protein-derived peptides on lipid metabolism in HepG2 cells and obese OLETF rats. In previous experiments, we found that soy crude protein (SCP-LD3) and hydrophilic peptides (separated from SCP-LD3 with hydrophobic synthetic absorbent) showed lipid lowering effects in HepG2 cells and in OLETF rats. Moreover, we found that F4 peptides (fractionated from hydrophilic peptides by GPC-HPLC) and 0% CH₃CN/0.1% TFA-fraction (isolated from F4 peptides by ODS column chromatography) showed hypolipidemic effects in HepG2 cells. In the present study, we found that three di-peptides reduced TG synthesis and one di-peptide reduced apoB secretion in HepG2 cells. In conclusion, we may have isolated active di-peptide sequences of lipid lowering effects from soy protein. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 116-119, 2010.

Key words : Soy peptide, HepG2 cell, triglyceride, apolipoprotein B-100

^{*}〒840-8502 佐賀市本庄町1番地

近年、過栄養や運動不足を背景とした生活習慣病の増加が社会的問題となっている。中でも主要な症候である脂質代謝異常は、肝臓における脂質蓄積から高脂血症、さらに動脈硬化性疾患を惹起するため、その予防や改善に有効な機能性食品成分の導入が望ましいとされている。大豆たん白質は、これまでに血清コレステロール低下作用や抗がん作用などが報告され、注目されている食品素材である^{1~4)}。また近年、食用たん白質からより多様な機能性を求めて、様々な酵素消化によりペプチドを調製する試みが行われている^{5~9)}。先に我々は、微生物由来プロテアーゼによる分離大豆たん白質の酵素消化物SCP-LD3およびその親水性画分が、ヒト肝臓由来HepG2細胞および肥満・高脂血症モデルであるOLETFラットの肝臓におけるトリグリセリド蓄積を抑制することを見だし、更にゲル浸透高速液体クロマトグラフィー分画物およびODSカラムクロマトグラフィー分画物がHepG2細胞における脂質合成およびアポリポたん白質分泌を抑制することを報告した。本研究では、脂質低下ペプチド配列の更なる検索・同定を試みた。

方 法

HepG2細胞は大日本住友製薬株式会社（大阪）から購入した。細胞をDulbecco's modified Eagle's medium（DME培地, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA）にて培養し、コンフルエントな状態で0.5 mMオレイン酸を含む1% BSA-DME培地で24時間前培養した。前培養後、試験培地に交換し、同時に放射性脂質前駆体である¹⁴C酢酸を18.5 kBq添加し、24時間培養を行った。これらの細胞と培地を回収し、分析に供した。細胞および培地の脂質は、Bligh and Dyer法により抽出した。抽出した脂質は、薄層クロマトグラフィー（thin layer chromatography, TLC）法により分画し、イメージングプレートおよびバイオイメージングアナライザ（BAS1000, 富士写真フイルム, 神奈川）を用いて各脂質画分の放射能活性を測定した。培地中のアポリポたん白質B100は、Total Human Apolipoprotein B ELISA assay（ALerCHECK, inc., Maine, USA）を用いたELISA法によって測定した。

統 計 処 理

データの統計解析は、Tukey-Kramer法を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果と考察

これまでに報告されている大豆由来機能性ペプチドの鎖長は、主に3～13のアミノ酸からなるオリゴペプチドである^{10~15)}。先の実験において脂質低下作用を示したF3、F4画分は、じもしくはトリペプチドを多く含む画分であり、小腸上皮細胞刷子縁膜で発現するオリゴペプチドトランスポーター PepT1によってそのまま吸収されることが考えられることから¹⁶⁾、腸管からの吸収され易さからも生体内で生理機能を発揮しやすいことが示唆されていた。本実験において、親水性ペプチド（SCP-LD3の疎水性吸着樹脂未吸着画分）F4画分（GPC-HPLC溶出時間65～75分の画分）のODSカラム分画物である0%CH₃CN/0.1%TFA画分を逆相HPLCに供したところ、7種類のジペプチド（Ala-Leu, Ala-Tyr, Leu-Val, Ala-Val, Lys-Ala, Ser-Tyr, Val-Lys）を分離・同定した。そこで、それらの合成ジペプチドについてHepG2細胞の脂質代謝に及ぼす影響を検討した。Leu-Valについては合成が出来なかったため、6つのジペプチドについて検討したところ、¹⁴C標識脂質前駆体から細胞内トリグリセリド画分への放射活性の取り込みにおいて、3つのジペプチド（Lys-Ala, Ser-Tyr, Val-Lys）による顕著な抑制作用が認められた（Fig. 1）。また培地中の新規合成トリグリセリドへの放射活性の取り込みにおいても、3つのジペプチド（Lys-Ala, Ser-Tyr, Val-Lys）による顕著な抑制作用

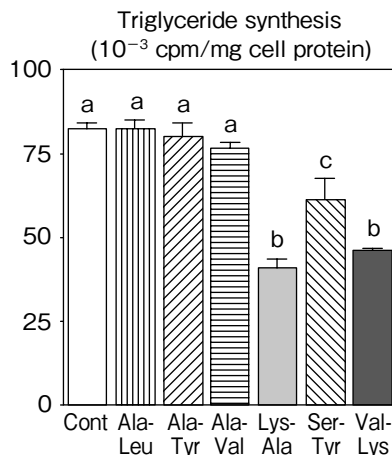


Fig. 1. Effect of soy protein-derived di-peptides on triglyceride synthesis in HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$.

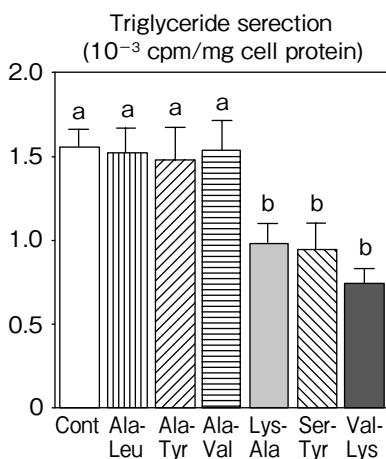


Fig. 2. Effect of soy protein-derived di-peptides on triglyceride secretion from HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$.

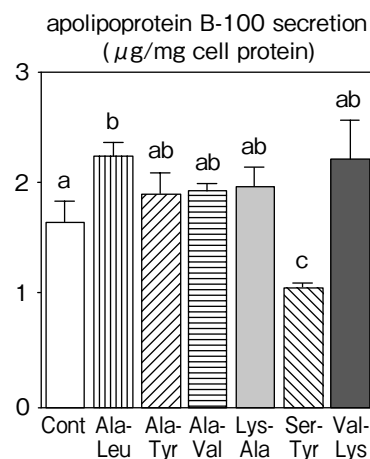


Fig. 3. Effect of soy protein-derived di-peptides on apolipoprotein B-100 secretion from HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of five wells. ^{abc}Different letters show significant difference at $p < 0.05$.

が認められた (Fig. 2).

アポリポたん白質B100は肝臓で生合成されるVLDLの必須構成たん白質である。アポリポたん白質B100の細胞内代謝にはトリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質代謝が影響するが、特にトリグリセリド合成が強く関与することが知られている^{17, 18)}。血中におけるアポリポたん白質B100の濃度は冠状動脈疾患と

いった動脈硬化症の発症率と正の相関を示すため、その過剰分泌は独立した危険因子である¹⁹⁾。そこで、6つのジペプチドがアポリポたん白質B100分泌に及ぼす影響について検討した結果、Ser-Tyrの添加により顕著な低下が認められた (Fig. 3)。このことから、大豆たん白質由来の脂質低下ジペプチド配列としては、Ser-Tyrが最も有力な候補であると考えられた。

要 約

実験の結果、親水性ペプチド (SCP-LD3の疎水性吸着樹脂未吸着画分) F4画分 (GPC-HPLC溶出時間65 ~ 75分の画分) のODSカラム分画物である0%CH₃CN/0.1%TFA画分を、逆相HPLCに供することで7種類のジペプチドを分離・同定した。そこで、それらの合成ジペプチドについてHepG2細胞の脂質代謝に及ぼす影響を検討したところ、¹⁴C標識脂質前駆体から細胞内および培地中のトリグリセリド画分への放射活性の取り込みにおいて、3つのジペプチドによる顕著な抑制作用が認められた。また、そのうちの一つにApoB100分泌抑制作用が認められた。

以上の結果から、3つの大豆たん白質由来脂質低下ジペプチドの候補を得ることが出来た。今後はマウスもしくはラットに投与して、*in vivo*での脂質低下作用を確認する。

文 献

- 1) Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F and Gatti E (1995): Soy and cholesterol reduction. *J Nutr*, **125**, 598S-605S.
- 2) Imura T, Kanazawa T, Watanabe T, Fukushima Y, Kudou S, Uchida T, Osanai T and Onodera K (1993): Hypotensive effect of soy protein and its hydrolysate. *Ann N Y Acad Sci*, **676**, 327-330.
- 3) Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA and Torres N (2005) Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res*, **46**, 1823-1832.

- 4) Badger TM, Ronis MJ, Simmen RC and Simmen FA (2005): Soy protein isolate and protection against cancer. *J Am Coll Nutr*, **24**, 146S-149S.
- 5) Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K and Kuwata T (2001): Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 11-17.
- 6) Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H and Saito T (2004): Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci*, **87**, 1967-1974.
- 7) Katsuda S, Ito M, Waseda Y, Morimatsu F, Taguchi Y, Hasegawa M, Takaichi S, Yamada R, Furukawa Y and Shimizu T (2000): Papain-hydrolyzed pork meat reduces serum cholesterol level and premature atherosclerosis in dietary-induced hypercholesterolemic rabbits. *J Nutr Sci Vitaminol*, **46**, 180-187.
- 8) Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T and Osajima Y (2000): Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*, **14**, 519-523.
- 9) Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T and Korpela R (2003): A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*, **77**, 326-330.
- 10) Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, Tsuruki H and Takahata K (2000): Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *BioFactors*, **12**, 143-146.
- 11) Matsui T (2003): Production of hypotensive peptides, SVY, from 7S globulin of soybean protein and its physiological functions. *Soy Protein Research, Japan*, **6**, 73-77.
- 12) Matoba N, Doyama N, Yamada Y, Maruyama N, Utsumi S and Yoshikawa M (2001): Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *FEBS Lett*, **497**, 50-54.
- 13) de Lumen BO (2005): Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutr Rev*, **63**, 16-21.
- 14) Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T and Yoshikawa M (2003): Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean beta-conglycinin, is an fmLP agonist. *FEBS Lett*, **540**, 206-210.
- 15) Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K and Nokihara K (1998): Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem*, **46**, 49-53.
- 16) Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF and Hediger MA (1994): Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, **368**, 563-566.
- 17) Wu X, Shang A, Jiang H and Ginsberg HN (1996): Low rates of apoB secretion from HepG2 cells result from reduced delivery of newly synthesized triglyceride to a "secretion-coupled" pool. *J Lipid Res*, **37**, 1198-1206.
- 18) Furukawa S, Sakata N, Ginsberg HN and Dixon JL (1992): Studies of the sites of intracellular degradation of apolipoprotein B in Hep G2 cells. *J Biol Chem*, **267**, 22630-22638.
- 19) Huff MW and Burnett JR (1997): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion. *Curr Opin Lipidol*, **8**, 138-145.