

ペプチドアレイによる大豆たん白質由来の
新規疎水性胆汁酸結合ペプチドの
網羅解析および *in vivo* での作用機構解析

長岡 利*

岐阜大学応用生物科学部

**Exhaustive Analysis of New Hydrophobic Peptides Derived
from Soybean Protein with Bile acids Binding Ability
and *in vivo* Analysis of Peptide Activity**

Satoshi NAGAOKA *

Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193

ABSTRACT

This experiment was designed to identify peptides which have bile acid-binding ability from soybean beta-conglycinin. In this study, we used a 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 by 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, finally the antibody-taurocholic acid complexes were detected by the second antibody. We found some bile acid binding peptides in this screening. In this context, we selected IIKLAIPV, IFVIPAGY, VVFLASVS to evaluate bile acid-binding ability and micellar solubility of cholesterol *in vitro* using soystatin (VAWWMY) as a positive control. VVFLASVS had higher bile acid-binding ability *in vitro* than did other synthesized peptides. VVFLASVS had significantly lower micellar solubility of cholesterol than did other synthesized peptides *in vitro* like cholestyramine as a positive control. In rats, intestinal cholesterol absorption was significantly decreased by the administration of VVFLASVS. Thus, we found that VVFLASVS significantly decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 48-52, 2011.

Key words : beta-conglycinin, peptide array, VVFLASVS, 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¹⁻³⁾。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「疎水性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CHOL低下作用を発揮することを明らかにした³⁾。また、「疎水性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、我々が世界で最初に発見した*in vivo*でコレステロール吸収抑制作用を発揮できるグリシニン由来の疎水性胆汁酸結合ペプチドであるソイスタチンVAWWMY⁴⁾、PVNKPG⁵⁾、ソイスタチンの高機能化ペプチドであるVIWWFK、PWWWMY⁶⁾ 以外は不明である。そこで、大豆たん白質を構成し、強力なコレステロール代謝改善作用を発揮する大豆β-コングリシニン由来の、どの疎水性ペプチドがコレステロール吸収抑制作用に寄与する「疎水性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低下作用に寄与している「新規疎水性胆汁酸結合ペプチド」を発見することを目的とした。

方 法

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β-コングリシニン (α, α', β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 μg/mLタウロコール酸溶液で37℃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℃でインキュベートし、一次抗体反応を行った。0.05%のTween20-TBS (TTBS)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℃インキュベートし、二次抗体反応を行った。0.05%TTBSで37℃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。

*in vitro*における胆汁酸結合能実験 (実験2)

タウロコール酸との結合能は、既報³⁾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-¹⁴C] 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 (CTH), 大豆β-コングリシニン由来ペプチドなどを加え、その混合物を37℃で2時間インキュベートした。その後、15,000×g, 37℃で15分間超遠心した。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。

*in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性実験 (実験3)

*in vitro*におけるコレステロールのミセル溶解性は、既報³⁾に従って測定した。1.48 MBq/mL[¹⁴C]-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℃で24時間インキュベートした。インキュベートミセル溶液に濃度10 mg/mLとなるように、カゼイントリプシン加水分解物 (CTH), 大豆β-コングリシニン由来ペプチドなどを加え、37℃で1時間インキュベートした。その後、100,000×g, 37℃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。

*in vivo*におけるコレステロール吸収実験 (実験4)

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、³H-コレステロールやペプチド (VVFLASVS, VAWWMY) など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³⁾に従って行った。

結果と考察

大豆 β -コングリシニン由来疎水性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、 β -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IIKLAIPV, IFVIPAGY, VVFLASVSであった。(Fig. 1)

大豆 β -コングリシニン由来疎水性胆汁酸結合ペプチドの*in vitro*における胆汁酸結合能に対する影響 (実験2)

実験2では、実験1により明らかとなった胆汁酸結合能を有するペプチド (IIKLAIPV, IFVIPAGY, VVFLASVS) 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、VVFLASVSが最も高い胆汁酸結合能を示した。(Fig. 2)。

大豆 β -コングリシニン由来疎水性胆汁酸結合ペプチドの*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3)

実験3では、実験1により明らかとなった胆汁酸結合能を有するペプチド (IIKLAIPV, IFVIPAGY, VVFLASVS) 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。最も強くミセル溶解性を低下させたVVFLASVS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. 3)。

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4) (Table 1)

対照群である溶媒のみ投与と比較して、VVFLASVSとVAWWMY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。

以上の結果より、大豆 β -コングリシニン由来ペプチドであるVVFLASVSは胆汁酸結合を有し、胆汁酸と結合することにより、ラットにおいてコレステロール吸収抑制作用を発揮することを発見した。

ところで、胆汁酸結合能を有するオリゴペプチドは、グリシニン由来の疎水性胆汁酸結合ペプチドであるソ

イスタチンVAWWMY⁴⁾、PVNKP⁵⁾、ソイスタチンの高機能化ペプチドであるVIWWFK、PWWWMY⁶⁾以外は不明である。今回の研究から、胆汁酸結合能を有するVVFLASVSは医薬品であるコレステラミンと同様に強力なコレステロールミセル溶解性の低下作用を発揮し、ラットにおいてコレステロール吸収抑制作

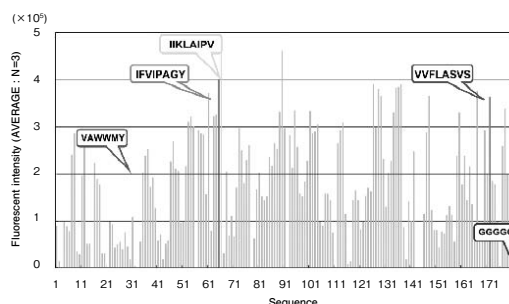


Fig. 1. Bile acid binding capacity of peptides by peptide array. Fluorescent intensity of taurocholic acid binding to overlapping peptides 8 residues in length, covering β -conglycinin α subunit, α' subunit, β subunit (Sequence is selected 8 residues with more than 0.8 hydrophobicity). The sequence is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

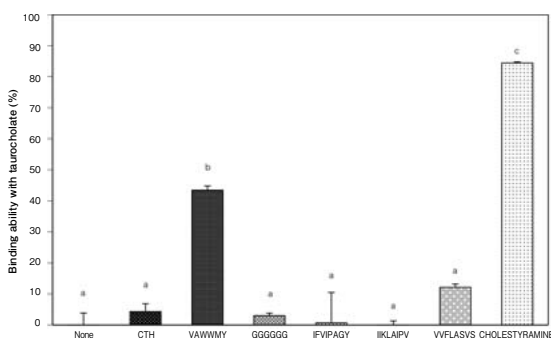


Fig. 2. Bile acid binding capacity of peptides. Peptides (IIKLAIPV, IFVIPAGY, VVFLASVS, VAWWMY, GGGGGG), casein tryptic hydrolysate (CTH), and cholestyramine were compared for their affinity to ^{14}C -taurocholate. Each value is expressed as means $\pm$ SEM (n=3). Means with different superscript letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

用を発揮することを発見した。

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³⁾。

Table 1. Effect of the Infusion of Cholesterol Micelles Containing VVFLASVS, VAWWMY on the Distribution of [³H]-Cholesterol in the Serum, Liver and Intestine of Rats^{1,2}

	Control	VVFLASVS	VAWWMY
	%		
Serum ²	0.343 ± 0.073 ^b	0.127 ± 0.028 ^a	0.186 ± 0.094 ^a
Liver	0.545 ± 0.114 ^c	0.207 ± 0.045 ^b	0.098 ± 0.031 ^a
Intestine	0.535 ± 0.049 ^c	0.164 ± 0.015 ^a	0.259 ± 0.081 ^b
Total	1.424 ± 0.229 ^b	0.499 ± 0.062 ^a	0.543 ± 0.167 ^a

¹Each value is the mean ± SEM, *n*=9. Within a row, means with different superscript letters are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range test.

²Measured in a 5-mL serum sample.

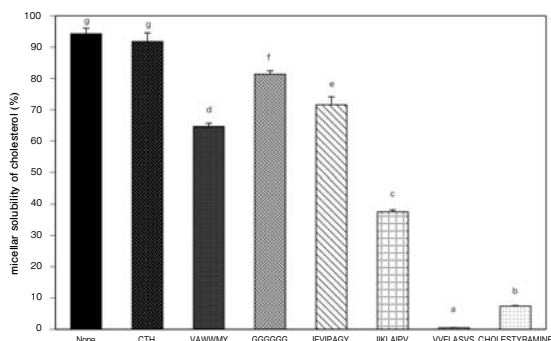


Fig. 3. Effects of peptides on the micellar solubility of cholesterol *in vitro*. Bile acid and ¹⁴C-cholesterol were incubated for 24 h and sonicated to form bile acid micelles containing cholesterol. Peptides were incubated with pre-formed micelles for 1 h and radioactivity in the supernatant was counted after ultra-centrifugation. Relative decrease in percentage of radioactivity compared to the prior sample without peptide addition was expressed as the micellar solubility of cholesterol *in vitro*. Peptides (IKLAIPV, IFVIPAGY, VVFLASVS, VAWWMY, GGGGGG), casein tryptic hydrolysate (CTH), and cholestyramine were used in this assay. Each value is expressed as means ± SEM (*n*=3). Means with different superscript letters are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range test.

要 約

高コレステロール (CHOL) 血症などの生活習慣病の増加が指摘されている。著者は大豆たん白質によるCHOL低下作用は、腸管内で胆汁酸との結合能を有する「疎水性胆汁酸結合ペプチド」が胆汁酸と結合することにより、CHOLミセル形成を阻害し、空腸でCHOL吸収を抑制し、ひいては、血清CHOL低下作用を発揮することを明らかにした(長岡ら:J. Nutr. 129, 1725-1730 (1999))。また、「疎水性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CHOL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、グリシニン由来の疎水性胆汁酸結合ペプチドVAWWMY (ソイスタチン, 長岡ら: Biosci. Biochem. Biotechnol. 74, 1738-1741 (2010) 速報), PVNKPG (長岡:大豆たん白質研究 12, 120-124 (2009)), VIWWFK, PWWWMY (長岡ら:大豆たん白質研究 13, 90-95 (2010)) 以外は不明である。そこで、大豆たん白質を構成し、強力なCHOL代謝改善作用を発揮する大豆β-コングリシニン由来の、どの疎水性ペプチドがCHOL吸収抑制作用に寄与する「疎水性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CHOL低下作用に寄与している「新規疎水性胆汁酸結合ペプチド」を発見することを目的とした。その結果、胆汁酸結合ペプチドVVFLASVSを発見した。VVFLASVSは従来法(*in vitro*で放射性胆汁酸との結合能を定量)によっても、胆汁酸結合能を示した。胆汁酸結合ペプチドVVFLASVSは医薬品コレステラミンと同程度の強力なCHOLミセル溶解性の阻害作用を発揮した。VVFLASVSはラットにおいて、VAWWMYと同様にCHOL吸収抑制作用を発揮した。

文 献

- 1) Anderson JW, Johnstone BM 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 KK and Hamilton RMG (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 Biochem Biotechnol*, **74**, 1738-1741.
- 5) 長岡 利 (2009) : 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. 大豆たん白質研究, **12**, 120-124.
- 6) 長岡 利, 加藤竜司, 大河内美奈, 本多裕之 (2010) : 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. 大豆たん白質研究, **13**, 90-95.