

# 大豆たん白質由来ペプチドによる筋肉細胞への糖取込み活性促進作用とその作用機序の解明

澤田圭介・山下陽子・芦田 均\*

神戸大学大学院農学研究科

## Effect of Digested Peptides Derived from $\beta$ -conglycinin on Myocellular Glucose Uptake

Keisuke SAWADA, Yoko YAMASHITA and Hitoshi ASHIDA\*

Department of Agrobioscience, Graduate School of Agricultural Science,  
Kobe University, Kobe 657-8501

### ABSTRACT

It has been suggested that dietary intake of soy protein is potentially beneficial for prevention of obesity and hyperglycemia.  $\beta$ -Conglycinin, one of the major soy proteins, has been reported to lower the blood glucose and insulin levels with an increasing adiponectin level and decreasing plasma lipids levels in animal studies. However, the underlying molecular mechanism is not yet fully understood. In this study, we investigated the effect of digested peptide mixtures derived from  $\beta$ -conglycinin on myocellular glucose uptake and its molecular mechanism. Two peptide mixtures (peptide mixtures-A and -B) were prepared by treating  $\beta$ -conglycinin with an artificial digestive juice and the enzymes from microorganisms, respectively. When L6 myotubes were treated with these mixtures, both of them increased glucose uptake dose-dependently. Mixture-A had a stronger effect than mixture-B. Although we could not identify the active peptide in mixture-A, peptides with hydrophilic properties contribute to the stimulation of glucose uptake. Next, we investigated whether glucose uptake stimulation is accompanied by translocation of the glucose transporter 4 (GLUT4) to the plasma membrane, which is an insulin-responsive transporter and is distributed in adipose tissue and skeletal and cardiac muscles specifically; we found that the peptide mixture-A stimulated translocation of GLUT4 without altering its expression level. We also found that AMP-activated kinase (AMPK) was phosphorylated but Akt did not, indicating that translocation of GLUT4 by the peptides derived from  $\beta$ -conglycinin was dependent on the AMPK-pathway. In an animal study using type-2 diabetes mellitus model,

\*〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

GK rats, we confirmed activation of AMPK and downstream GLUT4 translocation and UCP-3 expression in soleus muscle. In conclusion, intake of  $\beta$ -conglycinin will prevent hyperglycemia by stimulating GLUT4 translocation followed by glucose uptake in muscle. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 72-78, 2012.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, peptide, anti-hyperglycemia, glucose transporter 4 (GLUT4), muscle

近年、わが国では食生活の欧米化に伴ったエネルギーの過剰摂取や運動不足により引き起こされる糖尿病が増加している。糖尿病は慢性的な高血糖状態を示す代謝性疾患であり、発症すると網膜症や腎症などの合併症を誘発するとともに、心筋梗塞や脳梗塞などのリスクを上昇させ、予後生命に大きく影響する。その患者数は予備軍を含めると2,210万人であり、成人の約5人に1人が該当する。また、平成20年度の糖尿病の医療費は1兆円を超えており、医療財政を圧迫している。

このような糖尿病の深刻な現状における対策の一つとして、食品による疾病の予防が望まれており、今日では血糖値調節効果を期待した機能性食品の開発が盛んに行われている。特定保健用食品に認定されているものを含めて、これらの機能性食品の多くは腸管内の消化酵素阻害に基づく炭水化物（糖質）の吸収阻害を作用点としている。我々は、血糖値調節の新たな標的分子として筋肉や脂肪組織に特異的に発現しているグルコース輸送担体4（GLUT4）に注目し、これを細胞内から細胞膜上へと局在移動させることにより細胞内へのグルコースの取り込みを亢進させることで、食後の一過的な高血糖を速やかに低下させることを研究戦略として提案している。

大豆たん白質は糖負荷したラットの血糖値を速やかに低下させることや、糖尿病モデルであるKK-Ayマウスにおいて高血糖抑制効果を示すことが知られている機能性食品である<sup>1)</sup>。特に、大豆に含まれる主要な貯蔵たん白質である $\beta$ -コングリシニン<sup>2)</sup>はラット血漿中におけるアディポネクチン量の増加を伴って、耐糖能やインスリンレベルを改善することが確認されている<sup>3)</sup>。その標的組織や作用機序に関する知見は十分ではない。本研究では、 $\beta$ -コングリシニンによる高血糖予防・改善作用機構解明の一環として、生体内におけるグルコースの最大消費器官である筋肉を標的組織として、 $\beta$ -コングリシニンを酵素的に分解した消化液を用いて、培養筋管細胞でのグルコース取り込み亢進作用を検討するとともに有効性を示すペプチド分子の単離を試みた。また、培養筋管細胞において $\beta$ -コングリ

シニン酵素分解液を用いて作用機構解明を試みるとともに、糖尿病モデルラットの後肢骨格筋での検証実験を実施した。

## 方 法

### 材料

$\beta$ -コングリシニンを人工ヒト消化酵素により分解した消化酵素分解液（peptide mixture-A）、または微生物由来の酵素により分解した微生物分解液（peptide mixture-B）を調製した（Fig. 1）。これらの分解液とその分画物は不二製油株式会社から提供して頂いた。

### 筋管細胞の培養と処理

実験にはラットL6筋芽細胞を2% FBSを含むMEM培地中で筋管細胞へと分化させて使用した。分化後の細胞は0.2% ウシ血清アルブミンを含む無血清MEM培地中にて18時間脱感作処理し、評価対象物を同培地中で15分または4時間作用させ、各実験に供した。

### グルコース取込み活性測定

グルコース取込み活性は、酵素反応を利用して評価対象物を処理した細胞への2-deoxyglucose（2DG）取込み量を測定した<sup>3,4)</sup>。すなわち、評価対象物を4時間作用させた細胞に1 mMの2DGを20分間処理し、細胞内に取込まれた2DG量を、複数の酵素反応により最終的にレザズリンを基質として生成したレゾルフィンの蛍光強度から算出した。

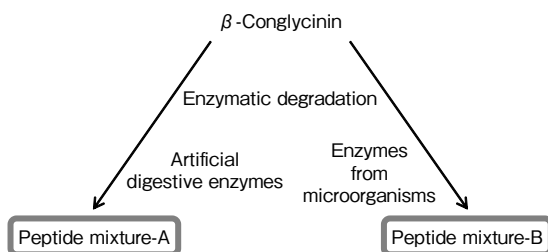


Fig. 1 Preparation of peptide mixtures.

## 動物試験

実験には2型糖尿病モデルラットであるGKラットを使用した。各個体を予備飼育後に、 $\beta$ -コングリシニンまたはコントロールとしてカゼインを20%混餌摂取させる群に分け、6週間飼育した。飼育終了後に、後肢骨格筋のたん白質発現量とリン酸化をウエスタンブロット法で評価した。

## ウエスタンブロット法

筋肉細胞または筋肉組織の全たん白質抽出液、ならびに細胞膜たん白質抽出液は既報に従って調製した<sup>5)</sup>。得られたたん白質抽出液を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供してたん白質を分離し、これをPVDF膜に転写した。このPVDF膜上の目的たん白質-抗体複合体の検出は既報に従って実施した<sup>6)</sup>。

## 結 果

$\beta$ -コングリシニン由来ペプチドの筋肉細胞へのグルコース取り込み促進作用を調べるため、 $\beta$ -コングリシニンを人工ヒト消化酵素により分解した消化酵素分解液 (peptide mixture-A)、または微生物由来の酵素に

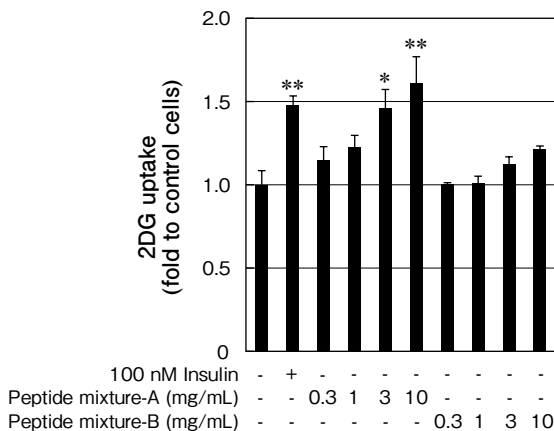


Fig. 2. Stimulation of myocellular glucose uptake by peptide mixtures. L6 myotubes were serum starved for 18 h and were treated with 100 nM insulin, peptide mixture-A or -B at 0.3, 1, 3, or 10 mg/mL for 4 h. 2DG uptake was determined as described in the text. Data are shown as the means  $\pm$  SE (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs control by Dunnett's test.

より分解した微生物分解液 (peptide mixture-B) を0.3, 1, 3, 10 mg/mLでL6筋管細胞に作用させたと、作用濃度依存的なグルコース取込み活性の亢進が認められた (Fig. 2). Peptide mixture-Aは特に高活性であり、これを3, 10 mg/mLで作用させた細胞ではコントロールと比べて有意に高い活性を示した。

有効ペプチド分子を探索するため、peptide mixture-AをダイヤイオンHP20SSカラムに供して、親水性の非吸着画分と水押し画分、および疎水性の5画分 (Fr. 1-5) を得た。これらの画分の活性を評価したところ、親水性の2画分とかなり疎水性の高い2画分に有意な活性が認められた (Fig. 3)。特に、親水性の画分が疎水性と比べて高活性であったが、分画前よりも活性が高い画分はなかった。そこで親水性画分をさらに限外ろ過膜により分画し、分子量3,000以下から100,000以上までの合計5画分を得てそれぞれの画分の活性を評価したが、分子量による活性の差は認められ

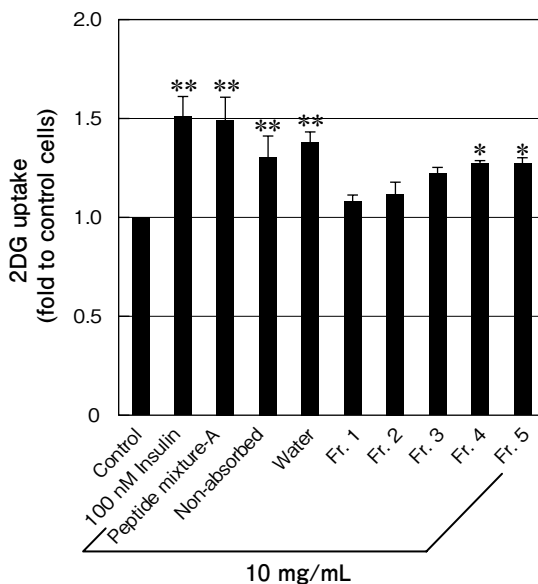


Fig. 3. Stimulation of myocellular glucose uptake by the fractions of peptide mixture-A obtained from HP20SS column chromatography. L6 myotubes were serum starved for 18 h and were treated with 100 nM insulin, peptide mixture-A and its fractions from HP20SS column chromatography at 10 mg/mL for 4 h. 2DG uptake was determined as described in the text. Data are shown as the means  $\pm$  SE (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs control by Dunnett's test.

なかった (Fig. 4). 分画過程において塩濃縮が起こった可能性を考え、吸着画分と非吸着画分に電気透析法により脱塩処理を施してから活性測定を行ったが、この操作により活性は回復せず、むしろ低下する傾向にあった (Fig. 5).

次に、 $\beta$ -コングリシニン由来ペプチドの筋肉細胞へのグルコース取り込み亢進効果の作用機構を解明するため、インスリン刺激や運動 (筋収縮) に応答して細胞膜移行する GLUT4 の局在を検討したところ、いずれのペプチド混合物とも 1, 10 mg/mL で作用濃度依存的に GLUT4 の膜移行を誘導することがわかった (Fig. 6A). また、この時、筋収縮やエネルギー消費に応答した GLUT4 膜移行に寄与する AMP 依存性キナーゼ (AMPK) のリン酸化体が増加しており (Fig. 6B), 一方で、インスリンシグナル伝達に關与する Akt の Ser473 および Thr308 リン酸化体は増減しなかった (Fig. 6C).

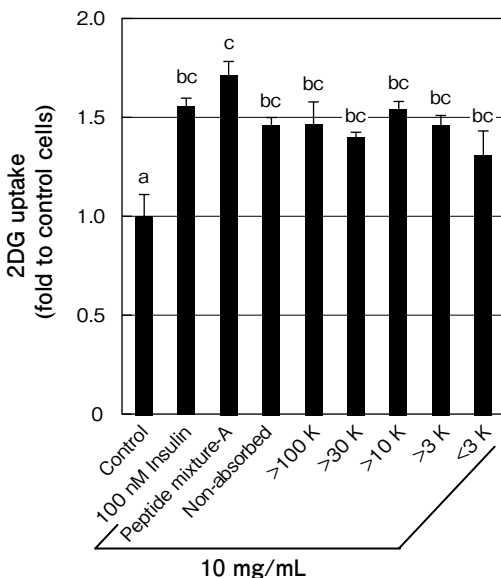


Fig. 4. Stimulation of myocellular glucose uptake by the fractions of peptide mixture-A obtained from ultrafiltration. L6 myotubes were serum starved for 18 h and were treated with 100 nM insulin, peptide mixture-A, non-absorbed fraction, and its fractions from ultrafiltration (>100 K, >30 K, >10 K, >3 K, <3 K as molecular weight) at 10 mg/mL for 4 h. 2DG uptake was determined as described in the text. Data are shown as the means  $\pm$  SE (n=4). Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey Kramer test.

最後に、培養細胞実験で見出した作用機構を2型糖尿病モデル動物であるGKラットを用いた試験で検証した。 $\beta$ -コングリシニンの摂取により、対照であるカゼインと比較して血糖値と血漿インスリン値が有意に抑制されていた (データ不掲載)。このとき、 $\beta$ -コングリシニンの摂取により、後肢骨格筋におけるAMPKのリン酸化体の量と細胞膜上のGLUT4局在量が増加することが確認できた (Fig. 7)。さらに、AMPKの下流にある脱共役たん白質 (UCP-3) の発現量が増加していたことから、細胞内の余剰なエネルギーは熱産生を介して消費されていた可能性が考えられた (Fig. 8)。これらのことから、 $\beta$ -コングリシニンはGKラットにおけるインスリン感受性を改善したことが考えられた。

## 考 察

本研究課題の実施により、培養細胞実験ならびに動物実験のいずれにおいても $\beta$ -コングリシニンが筋肉においてAMPKの活性化を介してGLUT4を膜移行させることによりグルコース取込み活性を誘導することが明らかとなった。この作用を担う有効なペプチド分子を探索するため、 $\beta$ -コングリシニンの人工消化酵素分解液をスチレン-ジニルベンゼン系合成吸着剤であるダイヤイオンHP20SSカラムで分画し、グルコース取込み活性を測定したが、親水性の高い画分と、逆に疎水性の高い画分の両極に比較的高い活性を認めた。これらのうち、より高活性であった親水性画分をさらに限外ろ過による分子量分画を行ったが、分子量による活性の違いは認められなかった。これらの結果は、 $\beta$ -コングリシニン人工消化酵素分解液中には様々な特性を持つ有効ペプチド分子が複数含まれ分散していること、およびそれらが相互作用することでペプチド混合物全体の活性を維持していることを示唆している。

AMPKはアディポネクチン受容体からのシグナルを受けて活性化されることが知られている。筋肉ではAdipoR1が特異的受容体として機能しており、 $\beta$ -コングリシニンはラットの血中におけるアディポネクチン量を増加させることが報告されていることから、生体内においては筋肉細胞のAMPK活性化は脂肪組織から分泌されたアディポネクチンに依存する組織間クロストークが作動していることは明らかである。GKラットにおいても、またL6筋肉細胞においてもAMPKの活性化がGLUT4の細胞膜移行を介して筋肉細胞内へグルコースの取り込みの促進をもたらし、動物個体では血糖値の低下に繋がっていることが明らかとなっ

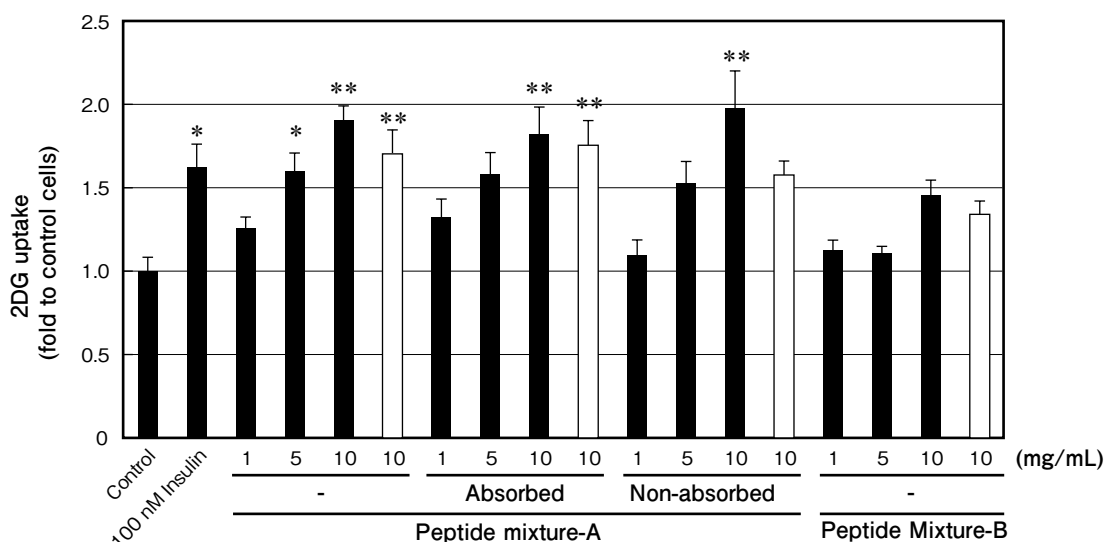


Fig. 5. Stimulation of myocellular glucose uptake by the desalting fractions of peptide mixture-A. L6 myotubes were serum starved for 18 h and were treated with 100 nM insulin, peptide mixture-A and its absorbed and non-absorbed fractions, and peptide mixture B with (open columns) or without (closed columns) desalting by an electronic dialysis system at 1, 5, or 10 mg/mL for 4 h. 2DG uptake was determined as described in the text. Data are shown as the means  $\pm$  SE (n=3-5). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs control by Tukey Kramer test.

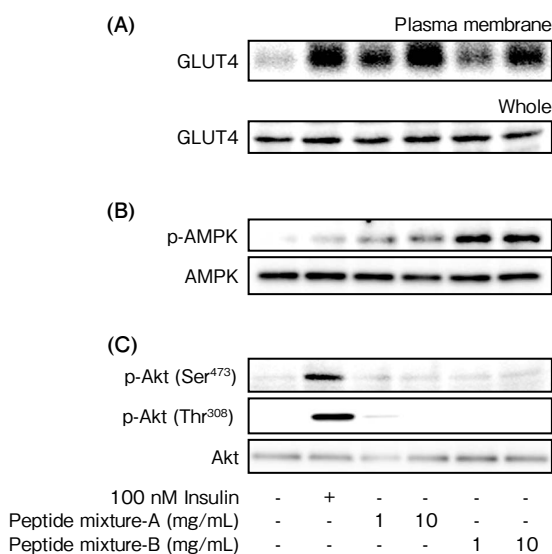


Fig. 6. GLUT4 translocation and phosphorylation of AMPK and Akt by peptide mixtures in L6 myotubes. L6 myotubes were serum starved for 18 h and were treated with 100 nM insulin or peptide mixtures at 1 and 10 mg/mL for 15 min. (A) GLUT4 in plasma membrane fraction and whole cell lysate, phosphorylation of (B) AMPK and (C) Akt were analyzed by Western blot.

た。すなわち、 $\beta$ -コングリシニンは運動と同じ作用機構で高血糖を抑制するという、極めて特徴的なたん白質である。さらに、 $\beta$ -コングリシニンを投与したラットでは脂肪組織における脂肪蓄積を抑制する効果が明らかにされており、本研究で見出した筋肉におけるUCP-3の発現上昇は、骨格筋における脂肪酸燃焼が亢進し、その結果として脂肪組織の重量低下に繋がった可能性がある。今後、潜在的な脂肪の蓄積の場である骨格筋内の脂肪量を測定するとともに、これらの好ましい作用をもたらす起因となったAMPKの活性化について、アディポネクチン分泌以外の作用を調べる必要がある。L6筋管細胞における試験結果を考慮すれば、 $\beta$ -コングリシニン由来のペプチドが直接的に筋肉細胞に発現するAdipoR1受容体に直接作用する可能性が高いと言える。

以上のように、 $\beta$ -コングリシニン由来のペプチドは、筋肉を標的組織の一つとして、AMPK/GLUT4経路を介したグルコース取込みを促進することにより血糖値の恒常性維持に寄与していることが明らかとなった。本研究課題の実施により、大豆たん白質の高血糖予防作用機構の解明に新たな糸口が見出されたと考えている。

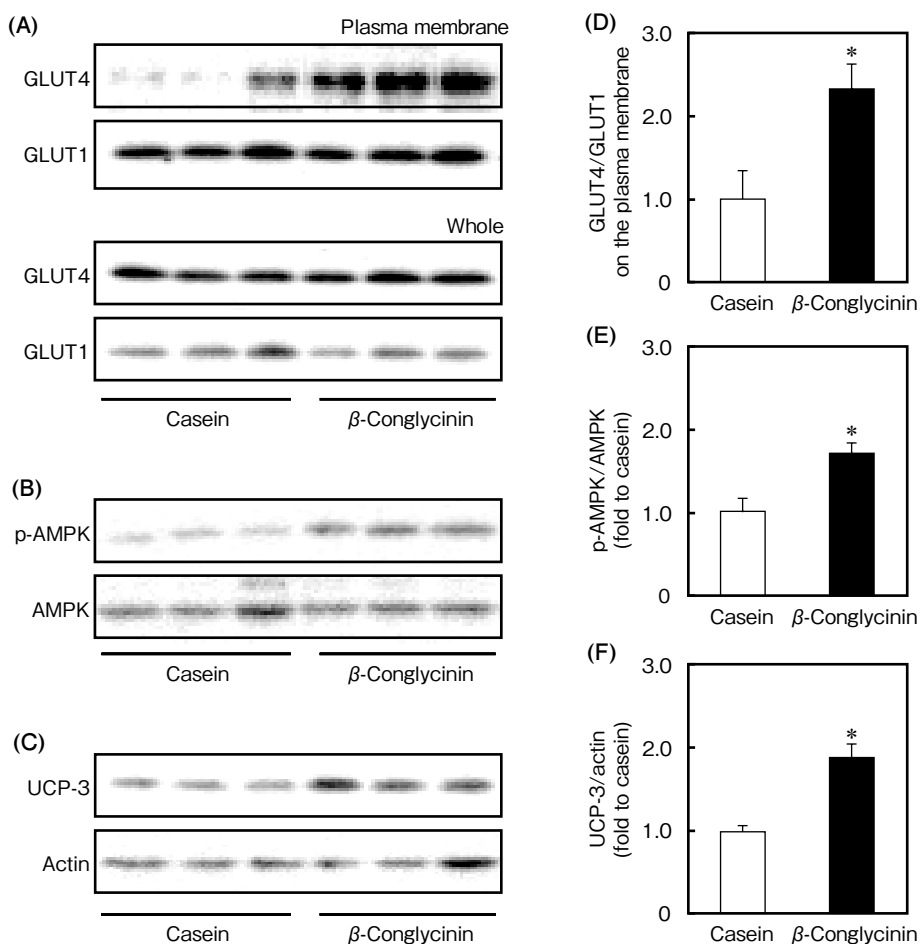


Fig. 7. GLUT4 translocation, AMPK phosphorylation and UCP-3 expression in soleus muscle of  $\beta$ -conglycinin-fed GK rats. Soleus muscle was isolated from  $\beta$ -conglycinin- or casein (control)-fed GK rats. (A and D) GLUT1 and GLUT4 in the plasma membrane fraction and whole cell lysate, (B and E) expression and phosphorylation levels of AMPK, (C and F) expression levels of UCP-3 and actin were detected by Western blot (A-C) and densitometric analysis (D-F). \* $p < 0.05$  vs casein by Student-*t* test.

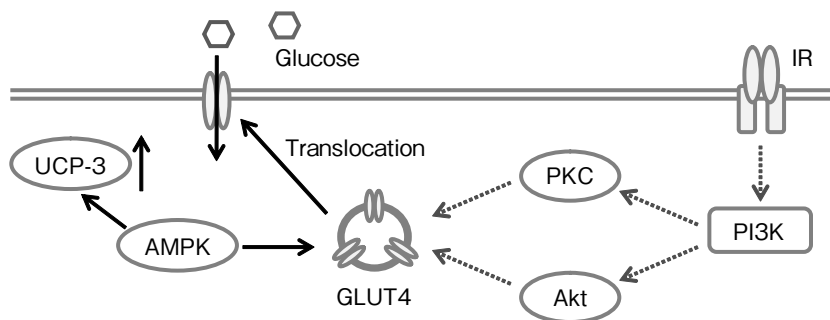


Fig. 8. Molecular mechanism of  $\beta$ -conglycinin-induced glucose uptake.

## 要 約

大豆に含まれる主要な貯蔵たん白質である $\beta$ -コングリシニンは、ラットを用いた試験で肥満や耐糖能異常を改善することが確認されている。しかし、その作用機序は明らかにされていない。そこで本研究では、血糖の最大消費器官である筋肉に着目し、大豆たん白質由来ペプチドによる筋肉細胞へのグルコース取込み活性促進作用とその作用機序の解明を試みた。 $\beta$ -コングリシニンを人工ヒト消化酵素により分解した消化酵素分解液、または微生物由来の酵素により分解した微生物分解液をラット由来L6筋管細胞に対して作用させたところ、細胞へのグルコース取込み活性は作用濃度依存的に亢進された。合成吸着樹脂や限外ろ過による分画から有効ペプチド分子の単離を試みたが、多様な特性と分子量を持つ複数のペプチドが活性に関与していることが示唆され、特に強い活性を有するペプチドを単離するには至らなかった。次に、作用機構を検討したところ、グルコースの取込み亢進作用は、インスリン応答性グルコース輸送担体 (GLUT4) の細胞膜移行によることが明らかとなった。このGLUT4 の細胞膜移行に関与する作用機構として、インスリン情報伝達経路は関与せず、運動や筋収縮により細胞膜移行を誘導するAMP依存性キナーゼ (AMPK) のリン酸化が促進された。同様の作用機構が、 $\beta$ -コングリシニンを6週間混餌摂取させた糖尿病モデル動物であるGKラットの後肢筋肉において確認できた。さらに、AMPK下流での脱共役たん白質 (UCP-3) の発現上昇も確認できた。これらの結果から、 $\beta$ -コングリシニン由来ペプチドは筋肉細胞においてAMPK/GLUT4経路を介してグルコース取込み活性を亢進することで大豆たん白質の高血糖予防効果に寄与していることが明らかとなった。

## 文 献

- 1) Nagasawa A, Fukui K, Funahashi T, Maeda N, Shimomura I, Kihara S, Waki M, Takamatsu K and Matsuzawa Y (2002): Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res*, **34**, 635-639.
- 2) Tachibana N, Iwaoka Y, Hirotsuka M, Horio F and Kohno M (2010):  $\beta$ -conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1250-1255.
- 3) Yamamoto N, Sato T, Kawasaki K, Murosaki S and Yamamoto Y (2006): A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. *Anal Biochem*, **351**, 139-145.
- 4) Yamamoto N, Kawasaki K, Kawabata K and Ashida H (2010): An enzymatic fluorimetric assay to quantitate 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose-6-phosphate for in vitro and in vivo use. *Anal Biochem*, **404**, 238-240.
- 5) Nishiumi S and Ashida H (2007): Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 2343-2346.
- 6) Kawabata K, Sawada K, Ikeda K, Fukuda I, Kawasaki K, Yamamoto N and Ashida H (2011): Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation. *Mol Nutr Food Res*, **55**, 467-475.