

# 大豆由来新規オリゴペプチドのコレステロール代謝改善作用

長岡 利\*

岐阜大学応用生物科学部

## New Oligopeptides Derived from Soybean Ameliorates Hypercholesterolemia

Satoshi NAGAOKA \*

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

### ABSTRACT

This experiment was designed to identify oligopeptides which have hypocholesterolemic activity from soybean  $\beta$ -conglycinin. First, in HepG2 screening, we found that QEK derived from soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$ 'subunit exhibited the enhancement of CYP7A1 mRNA levels compared to control as a hypocholesterolemic peptide lactostatin (IIAEK). Second, we found some bile acid-binding peptides in the peptide array screening. In this context, we selected VVFLASVS to evaluate bile acid-binding ability and micellar solubility of cholesterol *in vitro*, using soystatin (VAWWMY) as a positive control. VVFLASVS showed higher bile acid-binding ability *in vitro*, than other synthesized peptides. VVFLASVS also showed significantly lower micellar solubility of cholesterol than did other synthesized peptides *in vitro* like the medicine cholestyramine used as a positive control. In rats, intestinal cholesterol absorption was significantly decreased by oral administration of VVFLASVS compared to control. Serum cholesterol level was significantly decreased by oral administration of VVFLASVS compared to control. Thus, we found for the first time, a novel soybean hypocholesterolemic oligopeptide, VVFLASVS in rats. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 53-56, 2013.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, peptide array, VVFLASVS, soystatin, bile acid, rat, QEK

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。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、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>1)</sup>。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。

\*〒501-1193 岐阜市柳戸1-1

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 (ソイスタチン)<sup>2)</sup>、PVNKP<sup>3)</sup>、VIWWFK、PWWMY<sup>4)</sup>、 $\beta$ -コングリシニン由来VVFLASVS<sup>5)</sup> 以外は不明である。そこで、次の点について検討した。[1] 未だ発見されていない動物実験で血清コレステロール低下作用を発揮する大豆たん白質由来ペプチドの発見を目指す。[2] 大豆構成たん白質中で、最も血清コレステロール低下活性が強い(長岡ら：日本栄養食糧学会(2010))  $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットをトリプシンで加水分解した際に生成するオリゴペプチドQEKをHepG2細胞で評価する。

## 方 法

### [1] $\beta$ -コングリシニンのイソフラボンの除去、およびイソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットの精製(実験1)

#### (1) $\beta$ -コングリシニンのイソフラボンの除去

$\beta$ -コングリシニン(不二製油株式会社)に、70%アセトンを加え、攪拌した。攪拌後、遠心分離を行った。遠心後、上清をビーカーに移し、70%アセトンを加え混合した。上記の操作を3回繰り返す。3回目の遠心後の上清を移した後、乾燥させ、イソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニンを調製した。

#### (2) イソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットの精製

$\alpha'$ サブユニットは、 $\alpha$ サブユニットと比較してZn<sup>2+</sup>に親和性をもつヒスチジンをアミノ酸配列のN末端側に多く持つことに着目した。その性質を利用して、Zn<sup>2+</sup> affinity columnを用い、高純度の $\alpha'$ サブユニットを精製した。また、Zn<sup>2+</sup> affinity columnで得られた $\alpha'$ サブユニット溶出液には、塩が混在している。これらの塩を除くために、電気透析装置を用いて脱塩を行った。そして、脱塩の完了した試料を凍結乾燥し、粉末の $\alpha'$ サブユニットを得た。

#### [2] *in vitro*におけるイソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットのトリプシン加水分解物の調製(実験2)

上記[1]により、イソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニンから精製した $\alpha'$ サブユニットに滅菌水を加えて、溶解した。0.1%KOHを加えて、pH8.0に調整した後、1%トリプシン溶液を加え、混合した。再度0.1%KOH溶液にてpH8.0に調製し、40℃にて、振とうしながら24時間加水分解した。その後、沸騰水中にて5分間加熱し、トリプシンを失活させた。常温にて放冷し、HClでpH7.0に中和した。その後、遠心分離した。上清

をイソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットトリプシン加水分解物とした。

### [3] ヒト肝臓培養細胞HepG2におけるコレステロール代謝関連遺伝子mRNA定量実験(実験3)

10%牛胎児血清を含むMEM培地で培養したHepG2細胞に1 mg/mLまたは、3 mg/mLの濃度でイソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットトリプシン加水分解物やQEK( $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットのトリプシン加水分解により生成することが予想されるオリゴペプチド)を添加し、24時間培養した。培養後、細胞から全RNAを回収した。回収したRNAを用いて、コレステロール代謝関連遺伝子(HMG-CoA還元酵素、コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素、LDL受容体)のmRNAレベルに対する影響をリアルタイム定量PCR法にて定量した。なお、上記のそれぞれのmRNA値はGAPDH mRNAで補正した。

### [4] ラットにおけるVVFLASVS経口投与によるコレステロール代謝に対する影響評価(実験4)

4週齢のWistar系ラットを市販の固形飼料(MF、オリエンタル酵母)にて3日間予備飼育後、3群(CMセルロース投与群(FigではCと表示)、カゼイントリプシンペプチド投与群(FigではTHと表示)、VVFLASVS投与群(FigではVと表示)に群分けした。CMセルロースに溶解したカゼイントリプシンペプチドやVVFLASVSを含む試験投与液をゾンデにより、3日間連続で経口投与(600 mg/kg/日)した。その後、解剖し、血清コレステロールを定量した。

## 結果と考察

$\beta$ -コングリシニンのイソフラボンの除去後に、イソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットを精製し、トリプシンで加水分解した(実験1, 2)。HepG2細胞に1 mg/mL、3 mg/mLでイソフラボンフリー $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットトリプシン加水分解物を添加した結果、コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素(Fig. 1ではCYP7A1と表示)、HMG-CoA還元酵素(Fig. 2ではHMGRと表示)、LDL受容体(Fig. 3ではLDLRと表示)のmRNAは有意な変化は観察されなかった(実験3)。また、 $\beta$ -コングリシニン由来のトリプシン消化で生成することが予想されるQEKをHepG2細胞に添加した。QEKを選択した理由は、QEKがIIAEK(ラクタスタチン：血清コレステロール低減化ペプチド)と共通するEK配列を有するためである<sup>6)</sup>。EKはIIAEKには及ばないが、HepG2でコレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素mRNAを増加させることが

報告されている<sup>7)</sup>. HepG2細胞にQEKを添加した結果、コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素 (Fig. 1ではCYP7A1と表示) のmRNAは対照と比較して、有意に増加した。なお、HMG-CoA還元酵素 (Fig. 2ではHMGRと表示) やLDL受容体 (Fig. 3ではLDLRと表示) のmRNAは有意な変化は観察されなかった (実験3)。

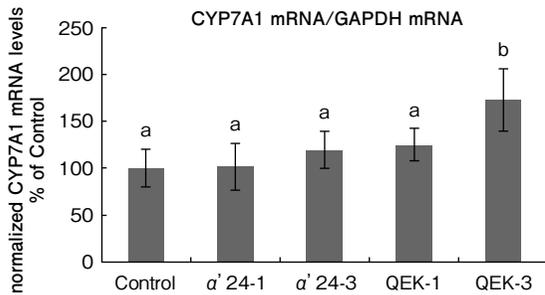


Fig. 1. Effects of  $\beta$ -conglycinin  $a'$  subunit tryptic hydrolysates on cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA level in HepG2 cells.  $a'$  24-1 (medium containing 24 h tryptic hydrolysate, 1 mg/mL) subunit,  $a'$  24-3 (medium containing 24 h tryptic hydrolysate, 3 mg/mL) subunit, QEK-1 (medium containing QEK, 1 mg/mL), QEK-3 (medium containing QEK, 3 mg/mL). Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=3). Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test.

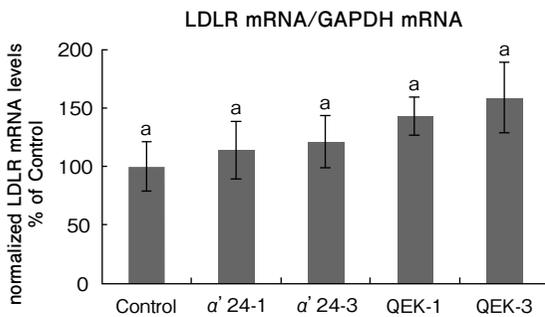


Fig. 3. Effects of  $\beta$ -conglycinin  $a'$  subunit tryptic hydrolysates on LDL receptor mRNA level in HepG2 cells.  $a'$  24-1 (medium containing 24 h tryptic hydrolysate, 1 mg/mL) subunit,  $a'$  24-3 (medium containing 24 h tryptic hydrolysate, 3 mg/mL) subunit, QEK-1 (medium containing QEK, 1 mg/mL), QEK-3 (medium containing QEK, 3 mg/mL). Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=3).

さらに、実験4では、ペプチドアレイにより発見したコレステロール吸収抑制作用を発揮するVVFLASVSが、実際に、ラットにおいて、血清コレステロール低下作用を発揮するかどうかを評価した。その結果、VVFLASVS投与群は対照群と比較して血清コレステロールを有意に低下させることを発見した (Fig. 4, 実験4)。

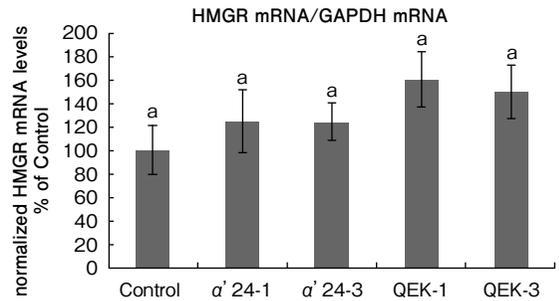


Fig. 2. Effects of  $\beta$ -conglycinin  $a'$  subunit tryptic hydrolysates on HMG-CoA reductase mRNA level in HepG2 cells.  $a'$  24-1 (medium containing 24 h tryptic hydrolysate, 1 mg/mL) subunit,  $a'$  24-3 (medium containing 24 h tryptic hydrolysate, 3 mg/mL) subunit, QEK-1 (medium containing QEK, 1 mg/mL), QEK-3 (medium containing QEK, 3 mg/mL). Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=3). Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test.

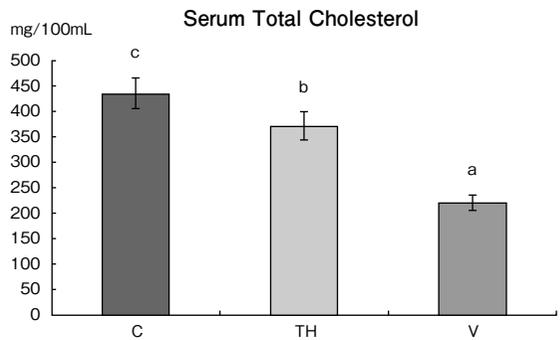


Fig. 4. Effects of oral administration of VVFLASVS on serum cholesterol level in rats. CM-cellulose group (C), casein trypsin-peptide group (TH), VVFLASVS group (V). Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test.

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VAWWMY (ソイスタチン)<sup>2)</sup>、PVNKPG<sup>3)</sup>、ソイスタチンの高機能化ペプチドであるVIWWFK, PWWWY<sup>4)</sup>、 $\beta$ -コングリシニン由来VVFLASVS以外は不明である。従来の私たち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の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用を発揮することを発見した<sup>5)</sup>。よって、今回の研究で、VVFLASVSはラットにおいて、

血清コレステロールを低下させる世界初の大豆由来オリゴペプチドであることを発見した。

以上の結果は、我々の提案した「大豆たん白質の血清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>1)</sup>。

## 要 約

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、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。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。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 (ソイスタチン)、PVNKPG, VIWWFK, PWWWY,  $\beta$ -コングリシニン由来VVFLASVS以外は不明である。そこで、次の点について検討した。(1) 未だ発見されていない動物実験で血清コレステロール低下作用を発揮する大豆たん白質由来ペプチドの発見を目指す。(2) 大豆構成たん白質中で、最も血清コレステロール低下活性が強い(長岡ら：日本栄養食糧学会(2010))  $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットをトリプシンで加水分解した際に生成するオリゴペプチドQEKをHepG2細胞で評価する。その結果、[1] QEKは、HepG2細胞で、CHOL分解系律速酵素であるCHOL 7 $\alpha$ -水酸化酵素mRNAを有意に増加させた。[2] 医薬品であるコレステラミンと同様に、コレステロールミセル溶解性を強力に低下させるVVFLASVSはラットにおいて、血清CHOLを低下させる世界初の大豆由来オリゴペプチドであることを発見した。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 長岡 利 (2011)：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。大豆たん白質研究, **14**, 48-52.
- 6) Morikawa K, Kondo I, Kanamaru Y and Nagaoka S (2007): A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, **352**, 697-702.
- 7) Morikawa K, Ishikawa K, Kanamaru Y, Hori G and Nagaoka S (2007): Effects of dipeptides having a C-terminal lysine on the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA level in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 821-825.