

# 大豆たん白質由来の強力な動脈弛緩ペプチドの生成条件と生理作用解明

大日向耕作\*

京都大学大学院農学研究科

## Enzymatic Conditions for Release of Vasorelaxing Peptides Derived from Soy Protein and their Physiological Functions

Kousaku OHINATA\*

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

### ABSTRACT

We previously found that dipeptide Arg-Phe (RF) has potent vasorelaxing activity. In the current study, we discovered that a vasorelaxing pentapeptide Val-Leu-Gln-Arg-Phe (VLQRF) is released by gastrointestinal protease digestion of  $\beta$ -conglycinin, a major storage protein of soybean. We then investigated its physiological functions. VLQRF lowered blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) after oral administration. Intriguingly, the VLQRF-induced blood pressure-lowering activity was more potent and longer-lasting than that of RF. Nitric oxide (NO) and prostaglandins are known to be endothelium-derived vasorelaxing factors; however, the VLQRF-induced vasorelaxing activity was not blocked by inhibitors of NO synthase and cyclooxygenase. The vasorelaxing activity was blocked by an antagonist for CCK, which is known as a satiety factor. Indeed, orally administered VLQRF decreased food intake. VLQRF also activated CCK-releasing enteroendocrine STC-1. VLQRF is the first soy-derived peptide having both hypotensive and anorexigenic activities. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 57-61, 2013.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, peptide, vasorelaxing activity, hypotensive activity, food intake regulation

最近、我々はジペプチドArg-Phe (RF) が強力な動脈弛緩活性 ( $EC_{50}=0.58 \mu M$ ) を示すことを見出した<sup>1)</sup>。本ジペプチドは従来の食品たん白質由来動脈弛緩ペプチドよりも低い用量で弛緩活性を示した。レトロ体

Phe-Arg (FR) は活性を示さなかったことから、RF というアミノ酸配列が活性に必須であることがわかった。また、RFのN末端側に鎖長を延長したペプチドも同様に強力な動脈弛緩活性を示すことが判明した<sup>1)</sup>。興味深いことに、経口投与による血圧降下作用は、ジペプチドRF自身よりも、N末端側に鎖長を延長したテ

\*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

トラペプチドのほうがより強力で持続的であることが明らかとなった<sup>2)</sup>。大豆の主要貯蔵たん白質の一次構造中にはRF配列が複数含まれる。そこで本研究では、大豆たん白質からRF配列を含む低分子ペプチドが生成する酵素的条件を明らかにするとともに、大豆由来のRF関連ペプチドの動脈弛緩作用を検討した。さらに、*in vivo*評価系で血圧降下作用などの生理作用を検討した。

## 方 法

### RF関連ペプチドの酵素的生成条件

$\beta$ -コングリシニンの一次構造に相当する14アミノ酸残基のモデルペプチドGHVRLVLRFNKRSQをFmoc法により化学合成し、逆相HPLCで精製した。モデルペプチドを各種消化管酵素で消化し、得られた消化物を逆相HPLCで分離し、RF関連ペプチドを定量した。また、酵素消化により生成するVal-Leu-Gln-Arg-Phe (VLQRF)をFmoc法により化学合成し、以下の実験に使用した。

### 動脈弛緩実験<sup>1~4)</sup>

高血圧自然発症ラット (SHR) の腸間膜動脈を摘出し螺旋状に切開し、この血管標本を栄養液中に懸垂し、その張力変化をトランスデューサーで検出した (Fig. 1A)。また、既知の内皮由来動脈弛緩因子の一酸化窒素 (NO) やプロスタグランジン類の阻害剤 (L-NAME, ナカライテスタ社製、およびインドメタシン, 和光純薬社製) に加え、CCK1受容体アンタゴニスト (lorglumide, Sigma-Aldrich社製) を用いて作用機構を検討した。

### 血圧降下作用<sup>1~4)</sup>

無麻酔状態におけるSHRの血圧変化をtail-cuff法 (MK-2000, 室町機械) により測定した。ペプチドサンプルを経口投与し、経時的に血圧を測定した。

### 摂食実験<sup>1, 2, 5~8)</sup>

実験動物として7週齢雄性ddYマウス (日本SLC, 静岡) を用いた。プラスチックケージに個別飼育し、固形飼料および水を自由摂取させた。18時間絶食後、ペプチドサンプルを投与し、予め重量を測定した固形飼料を与え、経時的に固形飼料の重量を測定し、摂食量を算出した。

### 腸内分泌細胞STC-1の応答<sup>1)</sup>

STC-1細胞をDMEMで培養したものを96穴プレートに播種し (33,000 cells/well)、一晚培養した。Calcium Kit II-Fluo 4 (同仁化学) を使用し細胞内カルシウム濃度の変動を測定した。まず、カルシウム濃度蛍光指示薬Fluo-4AMの入ったLoading Bufferを細胞培養上清に添加し、さらに1時間インキュベートした後に、ペプチド等のサンプルを加え、蛍光強度変化を蛍光プレートリーダーで測定した。

## 結果と考察

### $\beta$ -コングリシニン由来の新しい動脈弛緩ペプチド VLQRF

$\beta$ -コングリシニンの部分構造に相当するモデルペプチドGHVRLVLRFNKRSQを消化管プロテアーゼで消化した際に、RF配列を有する低分子ペプチドが生成するか否かを検討した。その結果、ペプシンおよびトリプシン、あるいはキモトリプシンおよびトリプシンで消化した場合に、VLQRF (それぞれ8 mol%および11 mol%) が生成することを見出した。さらに、動脈に対する影響を検討し、VLQRFが用量依存的な動脈弛緩作用を示すことを明らかにした (Fig. 1)。

### VLQRFは経口投与で持続的な血圧降下作用を示す

動脈弛緩ペプチドは血圧降下作用を示す場合がある。そこで、血圧に及ぼす影響を高血圧モデル動物のSHRを用いて検討したところ、VLQRFの経口投与により血圧降下作用を示すことがわかった (Table 1)。VLQRFおよびRFは、ともに15 mg/kgの投与量で、同程度の血圧降下作用を示したが、モル換算ではVLQRFのほうがより強力な血圧降下作用を有すると

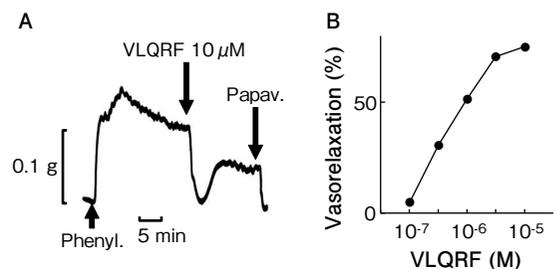


Fig. 1. VLQRF, a pentapeptide derived from soy  $\beta$ -conglycinin, has vasorelaxing activity. (A) Typical vasorelaxing activity of VLQRF in the mesenteric artery isolated from SHR. (B) Dose-dependency. Values are mean (n=2).

いえる。また、RFの血圧降下作用のピークが投与後2時間であるのに対し、VLQRFは7時間目であり、より持続的な血圧降下作用を示すことが明らかとなった (Table 1)。動脈弛緩作用はRFとVLQRFではほぼ同等であることから、VLQRFの吸収により時間を要する、あるいは、消化管内で分解して派生したRF配列を有するペプチドがプロドラック的に作用している可能性も否定できない。今後、更なる検討が必要である。

### VLQRFの動脈弛緩作用は飽食因子コレシストキニンを介する

さらに、VLQRFの動脈弛緩機構について各種阻害剤を用いて検討した。VLQRFの動脈弛緩作用は、従来の動脈弛緩因子として知られるNOやプロスタグランジン類に対する阻害剤のL-NAMEやインドメタシンでブロックされなかった。一方、食後の飽食因子として知られるコレシストキニン (CCK) のアンタゴニストlorglumideで阻害された (Fig. 2)。VLQRF自身はCCK受容体に親和性を示さないことから (data not shown)、VLQRFはCCK遊離を促進しているものと考えられる。

### VLQRFは経口投与で摂食抑制作用を示す

VLQRFの動脈弛緩作用が、内因性の摂食抑制ペプチドCCKを介することから、VLQRF自身の摂食調節作用を検討した。その結果、VLQRFの経口投与によりマウスの摂食量が低下することが判明した (Fig. 3)。なお、この実験条件ではRFは摂食抑制作用を示さないことから、VLQRFがより強力な摂食抑制作用を有すると考えられる。また、CCK遊離能を有するマウス腸内分泌細胞STC-1に対する応答を検討したところ、VLQRF添加 (1 mM) により細胞内カルシウム濃度が対照群の4倍に上昇した。すなわち、VLQRFはCCK分泌細胞を活性化することがわかった。この*in vitro*の実験結果は、VLQRFが摂食抑制作用を有するという*in vivo*の結果と一致している。

このほかに、ダイズグリシニン由来のVHRFやPGRFなどC末端側にRF構造を有するペプチドが動脈弛緩作用を示すことを見出しており、血圧降下作用や摂食抑制作用を併せ持つと予想される。さらなる酵素的生成条件の検討によりRF関連ペプチドの効率的な生産方法が確立されれば、新しい機能性素材の開発につながる。さらに、メタボリックシンドローム患者ではCCK分泌が低下しているとの報告もあり<sup>9,10)</sup>、血圧降下作用と摂食抑制作用を示すCCK分泌促進ペプチド

は抗メタボリックシンドローム効果を示す可能性が考えられる。

Table 1. Comparison of hypotensive activities of RF-related peptides in SHR.

	VLQRF	RF
Minimum effective dose (mg/kg)	5	15
Time after administration with maximum activity (hr)	7	2
Maximum decrease in blood pressure* (mmHg)	-24	-25

\*At a dose of 15 mg/kg after oral administration.

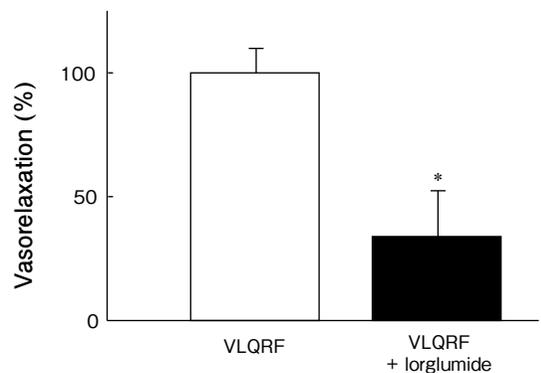


Fig. 2. Effect of lorglumide, a CCK antagonist, on the vasorelaxing activity of VLQRF in the mesenteric artery. VLQRF (1  $\mu$ M) was applied after pretreatment of lorglumide (30  $\mu$ M). Mean  $\pm$  SEM (n=3). \* $p$ <0.05 vs. VLQRF-treated control.

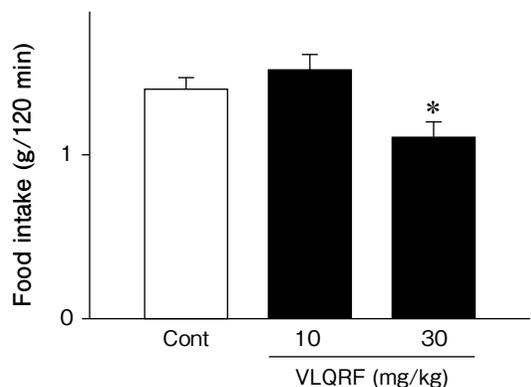


Fig. 3. Effect of VLQRF on food intake after oral administration in fasted male mice. Mean  $\pm$  SEM (n=8). \* $p$ <0.05 vs. saline control group.

## 要 約

最近、我々はジペプチドArg-Phe (RF) が強力な動脈弛緩作用を示すことを見出した。ダイズたん白質の一次構造中にはRF配列が含まれることから、消化管酵素によりRF配列を含む低分子ペプチドが派生するか否かを検討するとともに、その生理作用について検討した。その結果、 $\beta$ -コングリシニンに由来する5残基ペプチドVal-Leu-Gln-Arg-Phe (VLQRF) が消化管酵素処理で生成することが判明した。このVLQRFはRFと同様に高血圧自然発症ラット (SHR) から摘出した動脈標本を弛緩させること明らかにした。本ペプチドをSHRに経口投与したところ、持続的な血圧降下作用が認められた。VLQRFの動脈弛緩機構を検討したところ、従来の動脈弛緩因子として知られる一酸化窒素 (NO) やプロスタグランジン類の阻害剤ではブロックされず、飽食因子として知られるコレシストキニン (CCK) アンタゴニストにより阻害された。VLQRF自身はCCK受容体に親和性を示さないことから、CCK遊離を促進しているものと考えられる。さらに、VLQRFの経口投与により摂食抑制作用を示すことを見出し、CCK様作用を有することを明らかにした。実際に、CCK遊離能を有するSTC-1細胞を活性化することも明らかにした。以上、血圧降下作用と摂食抑制作用を併せ持つダイズ由来の動脈弛緩ペプチドVLQRFを新たに見出した。

## 文 献

- 1) Kagebayashi T, Kontani N, Yamada Y, Mizushige T, Arai T, Kino K and Ohinata K (2012): Novel CCK-dependent vasorelaxing dipeptide, Arg-Phe, decreases blood pressure and food intake in rodents. *Mol Nutr Food Res*, **56**, 1456-63.
- 2) Kontani N, Omae R, Kagebayashi T, Kaneko K, Yamada Y, Mizushige T, Kanamoto R and Ohinata K (2014). Characterization of Ile-His-Arg-Phe, a novel rice-derived vasorelaxing peptide with hypotensive and anorexigenic activities. *Mol Nutr Food Res*, **58**, 359-364.
- 3) Yamada Y, Iwasaki M, Usui H, Ohinata K, Marczak ED, Lipkowski AW and Yoshikawa M (2010): Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK<sub>1</sub> receptor. *Peptides*, **31**, 909-14.
- 4) Zhao H, Usui H, Ohinata K and Yoshikawa M (2008): Met-Arg-Trp derived from Rubisco lowers blood pressure via prostaglandin D<sub>2</sub>-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, **29**, 345-9.
- 5) Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y and Ohinata K (2012): Orally administered rubiscolin-6, a  $\delta$  opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice. *Mol Nutr Food Res*, **56**, 1315-23.
- 6) Kaneko K, Iwasaki M, Yoshikawa M and Ohinata K (2010): Orally administered soymorphins, soy-derived opioid peptides, suppress feeding and intestinal transit via gut mu<sub>1</sub>-receptor coupled to 5-HT<sub>1A</sub>, D<sub>2</sub>, and GABA<sub>B</sub> systems. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **299**, G799-805.
- 7) Marczak ED, Ohinata K, Lipkowski AW and Yoshikawa M (2006): Arg-Ile-Tyr (RIY) derived from rapeseed protein decreases food intake and gastric emptying after oral administration in mice. *Peptides*, **27**, 2065-8.
- 8) Ohinata K, Fujiwata Y, Shingo F, Masaru I, Masatsugu H and Yoshikawa M (2009): Orally administered novokinin, an angiotensin AT<sub>2</sub> receptor agonist, suppresses food intake via prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent mechanism in mice. *Peptides*, **30**, 1105-8.
- 9) Hayes MR, Miller CK, Ulbrecht JS, Mauger JL, Parker-Klees L, Gutschall MD, Mitchell DC, Smiciklas-Wright H and Covasa M (2007): A carbohydrate-restricted diet alters gut peptides and adiposity signals in men and women with metabolic syndrome. *J Nutr*, **137**, 1944-50.

- 10) Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sadowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa M, Kukla M, Berdowska A, Rehfeld JF, Bielanski W and Brzozowski T (2007): Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol*, **58** Suppl 1, 13-35.