

# 大豆由来の新規血清コレステロール低減化オリゴペプチド

長岡 利 \*

岐阜大学応用生物科学部

## Novel Hypocholesterolemic Oligopeptides Derived from Soybean

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  $\alpha'$ subunit. At first, *in vitro* screening related to the micellar solubility of cholesterol, we found that tryptic hydrolysates of soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$ subunit, ESEGESQR, ESEEEEEEDQDED or EEEEE derived from soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$ subunit exhibited a significant decrease in micellar solubility of cholesterol compared to control. Secondly, we evaluated the effects of ESEGESQR, ESEEEEEEDQDED or EEEEE on taurocholate binding capacity *in vitro*. Taurocholate binding capacity tended to increase with their peptides. In caco-2 cells, ESEGESQR treatment significantly decreased an intracellular cholesterol level accompanying a significant increase in the intestinal cholesterol efflux to the apical side. Furthermore, we tried to clarify the molecular mechanism of the decrease in micellar solubility of cholesterol by VAWWMY (soystatin) by physicochemical studies. The micellar particle size of taurocholate was almost 5 d. nm. VAWWMY containing taurocholate micellar particle size was 200 d. nm~1,000 d. nm. We found for the first time that VAWWMY (plus charge) binds with taurocholate (minus charge) mediated by an electronic molecular interaction accompanying the changes in the micellar particle size of taurocholate. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 110-115, 2014.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, VVFLASVS, soystatin, bile acid, micelle, peptide

\* 〒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。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。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、PWVWV<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。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))大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット自身や、大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来の数種のオリゴペプチドを*in vitro*で評価(コレステロールミセル溶解性試験、胆汁酸結合能試験、Caco-2細胞によるコレステロール吸収排出評価)する。さらに、動物実験でコレステロール吸収抑制作用を発揮するソイスタチン(VAWWV)と胆汁酸ミセルとの分子間相互作用の物理化学的解析を、ゼータ電位、粒子径などの測定により解析し、ペプチドの作用機構を解明することを目的とした。

## 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回繰り返し、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 $Zn^{2+}$ 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、 $Zn^{2+}$  affinity columnを用い、高純度の $\alpha'$ サブユニットを精製した。また、 $Zn^{2+}$  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、6時間または、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] *in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性に対する $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットあるいは、そのトリプシン分解ペプチド混合物(6時間、24時間でトリプシン加水分解)の影響評価(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<sup>1)</sup>に従って測定した。1.48 MBq/mL[4-<sup>14</sup>C]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 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット、大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットのトリプシン分解ペプチド混合物(6時間または、24時間でトリプシン加水分解)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。

#### [4] *in vitro*におけるコレステロールミセル溶解性に対する数種の $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来オリゴペプチドの影響評価 (実験4)

*in vitro*におけるコレステロールのミセル溶解性は、既報<sup>1)</sup>に従って測定した。1.48 MBq/mL[4-<sup>14</sup>C]-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°C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5 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 $\beta$ -コングリシニン由来 $\alpha'$ サブユニット由来オリゴペプチド (ESEEEDEDQE, ESEGESQR または、EEEEEE) を加え、37°Cで1時間インキュベートした。その後、100,000×g、37°C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。

#### [5] *in vitro*における胆汁酸結合能に対する数種の大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来オリゴペプチドの影響評価 (実験5)

タウロコール酸との結合能は、既報<sup>3)</sup>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-<sup>14</sup>C] 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 $\beta$ -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°Cで2時間インキュベートした。その後、15,000×g、37°Cで15分間遠心した。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。

#### [6] [<sup>3</sup>H]-コレステロールを用いた透過性膜上で培養した分化Caco-2細胞における大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来ペプチドESEGESQRのコレステロール吸収排出に対する影響 (実験6)

10%FBS含有DMEMを用いて12 well transwell plateにCaco-2細胞をtranswell membrane上に播種し、lower chamberには10%FBS含有DMEMを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>) の中で14日間培養した。第15日目に、培地を吸引除去し、FBSフリーDMEMを用いて1回洗浄した後、2.5  $\mu$ Ciになるように[1,2<sup>3</sup>H(N)]-コレステロールをFBSフリーDMEMに溶解し、添加した。low chamberにはFBSフリーDMEM

を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) 中で24時間培養した。第16日目に、[1,2<sup>3</sup>H(N)]-コレステロールを含むFBSフリーDMEMを吸引し、FBSフリーDMEMを用いて2回洗浄した後、ESEGESQR (5 mM) を含むFBSフリーDMEMを、upper chamberに添加し、lower chamberにはFBSフリーDMEMを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>) 中で12、および24時間培養した。

12時間および24時間後、upper chamberの培地を回収し、保存した。また、lower chamberの培地を回収し、保存した。培地を回収した後、upper chamber、lower chamberを、PBSを用いて2回洗浄し、upper chamberに0.1%SDSを添加してラバーポリスマンを用いてtranswell membrane上の細胞を剥離・溶解し、細胞溶解液を回収し、保存した。回収した培地および細胞溶解液をバイアルに移し、液体シンチレーションカウンターで培地および細胞懸濁液中の放射エネルギーを測定した。

#### [7] WAWWYのコレステロールミセルに対する影響評価 (実験7)

VAWWYと胆汁酸ミセルとの分子間相互作用の物理化学的解析を、ゼータ電位、粒子径などの測定 (Zetasizer nano zs) により解析した。具体的には、最終濃度が0.1 mM Cholesterol、1 mM Oleic acid、0.5 mM Mono oleoyl-rac-Glycerol、0.6 mM L- $\alpha$ -phosphatidyl choline、6.6 mMタウロコール酸を含む15 mM リン酸緩衝液/132 mM NaCl (pH7.4) 溶液を調製した。この溶液を、超音波処理し、振盪インキュベーター (37°C、1時間) した。その後、超遠心 (100,000×g、1時間、37°C) を行った。遠心後に上清を採取し、これを混合ミセル溶液とした。Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) を用いて、混合ミセル溶液の粒子径およびゼータ電位を測定した。また、VAWWYのみを含有する溶液、または、混合ミセルにVAWWYを添加した場合の影響も定量評価した。

## 結果と考察

大豆 $\beta$ -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)。

*in vitro*でのコレステロールミセル溶解性試験で、大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニットは、カゼイントリプシン分解ペプチド混合物と比較して、有意にコレ

ステロールミセル溶解性を低下させた。また、大豆 $\beta$ -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（6時間または、24時間加水分解物）は、いずれも、カゼイントリプシン分解ペプチド混合物と比較して、コレステロールミセル溶解性を低下させる傾向を示した（実験3, Fig. 1）。

さらに、大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来の数種のオリゴペプチド（ESEEEEEDEDQE, ESEGESQR または、EEEEEE）は、すべて、カゼイントリプシン分解ペプチド混合物と比較して、コレステロールミセル溶解性を有意に低下させた（実験4, Fig. 2）。*in vitro*における胆汁酸結合能に対する数種の大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来オリゴペ

プチド（ESEEEEEDEDQE, EEEEE）は、カゼイントリプシン分解ペプチド混合物と比較して、増加する傾向を示した（実験5, Fig. 3）。

apical側へのコレステロール排出は、ESEGESQR添加後12時間でコントロール（無添加）群と比較して有意に増加した（実験6, Fig. 4A）。細胞内コレステロールは、ESEGESQR添加後12時間で、apical側へのコレステロールの排出増加に伴って、コントロール群と比較して有意に減少した（実験6, Fig. 4B）。basolateral側へのコレステロール排出はESEGESQR添加後12時間、24時間共に変化を示さなかった（実験6, Fig. 4C）。

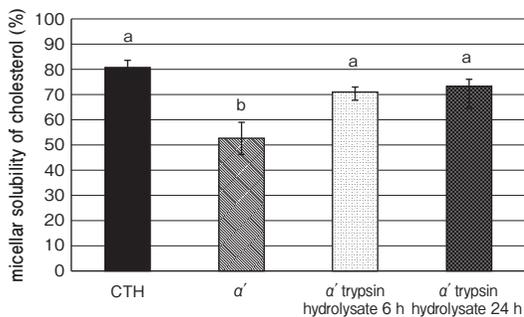


Fig. 1. Effects of  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  subunit and its tryptic hydrolysates on cholesterol micellar solubility *in vitro*. CTH (casein tryptic hydrolysate, 10 mg/mL),  $\alpha'$  ( $\beta$ -conglycinine  $\alpha'$  subunit),  $\alpha'$  trypsin hydrolysate 6 h ( $\beta$ -conglycinine  $\alpha'$  subunit 6 h digested tryptic hydrolysate, 10 mg/mL),  $\alpha'$  trypsin hydrolysate 24 h ( $\beta$ -conglycinine  $\alpha'$  subunit 24 h digested tryptic hydrolysate, 10 mg/mL). Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=4). Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test.

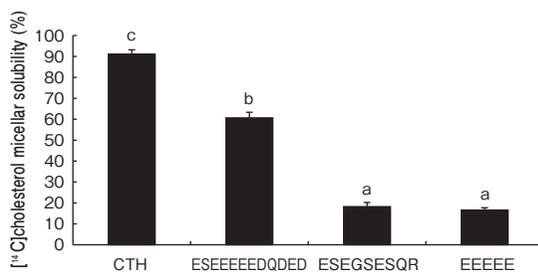


Fig. 2. Effects of CTH, ESEEEEEDEDQE, ESEGESQR or EEEEE on cholesterol micellar solubility *in vitro*. CTH (casein tryptic hydrolysate, 5 mg/mL), ESEEEEEDEDQE (5 mg/mL), ESEGESQR (5 mg/mL) or EEEEE (5 mg/mL). Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=4). Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test.

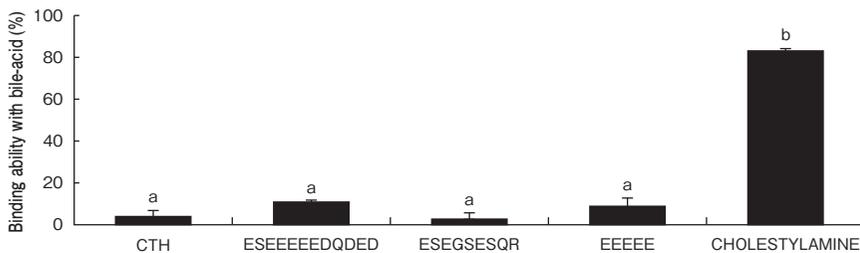


Fig. 3. Effects of CTH, ESEEEEEDEDQE, ESEGESQR or EEEEE on taurocholate binding capacity *in vitro*. CTH (casein tryptic hydrolysate, 5 mg/mL), ESEEEEEDEDQE (5 mg/mL), ESEGESQR (5mg/mL) or EEEEE (5 mg/mL). Each value is expressed as means  $\pm$  SEM (n=4). Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test.

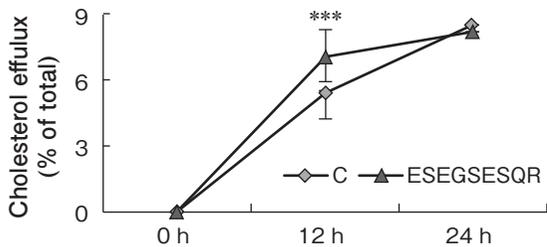


Fig. 4A. Effects of ESEGSESQR on intestinal cholesterol efflux to apical side in differentiated Cac-2-cells. C (vehicle) ◆, ESEGSESQR (5 mM) ▲  
 1. The data are Means  $\pm$  SEM of 6 wells.  
 2. Statistical significance compared with 12C, 24C group respectively by Student's t-test. (\*\*\*:  $p < 0.001$ )

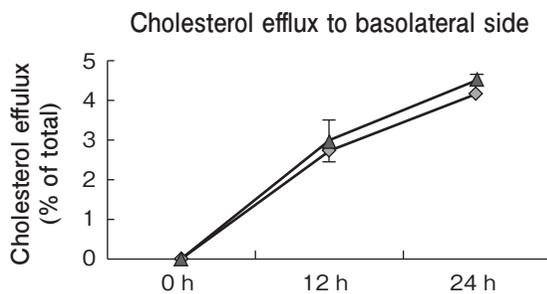


Fig. 4C. Effects of ESEGSESQR on intestinal cholesterol efflux to basolateral side in differentiated Cac-2-cells. C (vehicle) ◆, ESEGSESQR (5 mM) ▲  
 1. The data are Means  $\pm$  SEM of 6 wells.

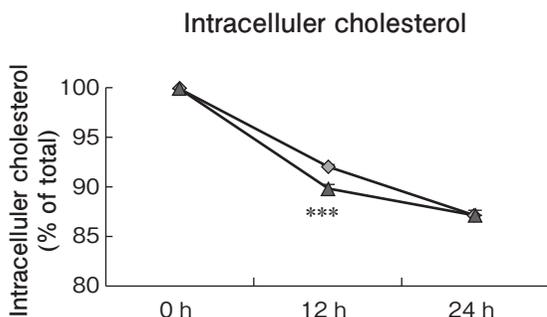


Fig. 4B. Effects of ESEGSESQR on intracellular cholesterol side in differentiated Cac-2-cells. C (vehicle) ◆, ESEGSESQR (5 mM) ▲  
 1. The data are Means  $\pm$  SEM of 6 wells.  
 2. Statistical significance compared with 12C, 24C group respectively by Student's t-test. (\*\*\*:  $p < 0.001$ )

タウロコール酸溶液とVAWWMY溶液のゼータ電位を測定した結果, タウロコール酸は負電荷, VAWWMYは正電荷を示した. タウロコール酸ミセルの粒子径は約5 d. nmであった. VAWWMYを含むミセルの粒子径は, 約200 d. nm~1,000 d. nmであった. VAWWMY, カゼイントリプシン分解ペプチド混合物 (CTH) をそれぞれコレステロールミセル溶液に添加し, 超遠心後の上清のゼータ電位と粒子径を測定した結果, 電位分布に大きな変化はなく, VAWWMY添加によりコレステロールミセルの粒子径は増加した (実験7).

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

本研究では、(1) 大豆構成たん白質中で、最も血清CHOL低下活性が強い（長岡ら：日本栄養食糧学会（2010年）） $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット自身や $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット由来の数種のオリゴペプチド（ESEGSESQR, ESEEEEEEDQDED, EEEEE）の*in vitro*評価（コレステロールミセル溶解性試験、胆汁酸結合能試験やCaco-2細胞によるコレステロール吸収排出の評価）(2) VAWWMYと胆汁酸ミセルとの分子間相互作用を物理化学的手法で解析（ゼータ電位、粒子径の測定）を検討した。その結果、次の点を明らかにした。(1) 対照ペプチドと比較して、 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット、ESEGSESQR, ESEEEEEEDQDED, EEEEEは*in vitro*でのコレステロールミセル溶解性を有意に低下させた。ESEGSESQRはCaco-2細胞で、apical側へのコレステロール排出を有意に増加するとともに、細胞内コレステロールレベルを有意に低下させた。(2) VAWWMYは胆汁酸ミセルとの電気的相互作用が示唆され、VAWWMYにより胆汁酸ミセルの粒子径が増大することを明らかにした。

## 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.