

# ダイズ由来ペプチドによる糖代謝改善作用に関する研究

水重貴文\*

京都大学学際融合教育研究推進センター

## Effect of Peptides Derived from Soy Protein on Glucose Metabolism

Takafumi MIZUSHIGE\*

Research Unit for Physiological Chemistry,  
Center for the Promotion of Interdisciplinary Education and Reserch,  
Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

### ABSTRACT

It has been reported that  $\beta$ -conglycinin, a soybean deposit protein, exhibits a glucose metabolism-improvement effect. We previously found that soymorphin, which is a  $\beta$ -conglycinin derived pentapeptide, exhibits a blood glucose lowering effect by activating insulin sensitivity after adiponectin secretion in KKAY mice, a model of type 2 diabetes mellitus. The soymorphin is released by the enzyme reaction of elastase and leucine aminopeptidase. In the current study, we found that pepsin-pancreatin digestion, mimicking gastrointestinal enzymatic conditions, of  $\beta$ -conglycinin lowered blood glucose after insulin administration. Thus, we must consider the possibility that novel  $\beta$ -conglycinin derived peptide with glucose metabolism improvement effect is released by the pepsin-pancreatin digestion of  $\beta$ -conglycinin. Moreover, we tried to identify the functional peptide candidate and to clarify the mechanism of the blood glucose lowering effect by injection of pepsin-pancreatin digest into mice. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 116-119, 2014.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, peptide, glucose metabolism, glucose uptake, C2C12

大豆の主要な種子貯蔵たん白質 $\beta$ -コングリシニンの糖代謝改善作用が報告されている<sup>1,2)</sup>。これまで当研究室ではダイズ $\beta$ -コングリシニンに由来する5残基ペプチドsoymorphinをII型糖尿病モデル動物のKKAYマウスに長期経口投与したところ、アディポネクチン分泌を亢進し、インスリン感受性を向上することにより血糖値上昇抑制作用を示すことを見出した<sup>3)</sup>。本ペプチ

ドはエラスターゼとロイシンアミノペプチダーゼにより生成することが判明している。本研究において、我々はこの条件ではなく、より一般的な消化管内を想定した酵素条件（ペプシンやパンクレアチン）で処理した $\beta$ -コングリシニン消化物をマウスに単回投与したところ、インスリン投与後の血糖値を低下させることを見出した。したがって、soymorphinとは異なる新しいインスリン感受性上昇ペプチドが派生しているものと考えられる。本研究ではさらに、 $\beta$ -コングリシニンの

\*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

ペプシンおよびパンクレアチンによる消化物を投与することにより血糖値が低下する作用機構を解明するとともに、機能性ペプチドの同定を図る。

## 方 法

### 試薬

ダイズβ-コングリシニンの一次構造に相当する候補ペプチドはFmoc法により化学合成し、逆相HPLCで精製したものをを用いた。

### インスリン負荷試験

4週齢の雄性ddYマウス（日本エスエルシー株式会社）を23±1℃、明暗サイクル12時間（明期7:00～19:00）の動物飼育室で1週間予備飼育し、実験を行った。飼育期間中、マウスには固形飼料MF（日本エスエルシー株式会社）と水を自由に摂取させた。マウスを6時間絶食させた後、インスリンを0.5 U/kg体重となるように腹腔内投与した。投与前と投与後15分、30分、60分後に尾静脈より採血し、ニプロフリースタイルキッセイメーター（ニプロ株式会社）を用いて血糖値を測定した。インスリン投与の3時間前に消化物およびペプチドの腹腔内投与を行った。

### HPLC分画

β-コングリシニン消化物を50 mg/mLとなるように溶解し、4℃、10,000 rpmで5分間遠心し、上清を得た。上清1 mLをODSカラム（Cosmosil 5C18-AR-II, 20×250 mm, ナカライテスク）を用いてHPLC（Waters 600, 日本ウォーターズ）で分画した。移動相は0.1%TFAを含むH<sub>2</sub>Oと0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CNとし、後者の割合を0-50%（0-50 min, linear gradient）、流速を10 mL/minとした。0～15分、15分～25分、25分～35分、35分～50分の4画分で分取した。血糖低下作用を示した画分はさらに1ピークずつ分取した。血糖低下作用を示したピークは条件を変えてさらに分画した。カラムはCNカラム（Cosmosil<sup>5</sup>CN-R, 4.6×250 mm, ナカライテスク）を用いてHPLC（MD-1510, Jasco）で分画した。移動相は0.1%TFAを含むH<sub>2</sub>Oと0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CNとし、後者の割合を0-50%（0-50 min, linear gradient）、流速を1 mL/minとし、各ピーク（吸収波長230 nm）を分取した。サンプルは、*in vivo*試験、*in vitro*試験、質量分析、およびプロテインシーケンサーに用いた。

### 筋肉培養細胞C2C12における糖取り込み

マウス由来骨格筋細胞C2C12を実験に用いた。増殖培地としてDMEM + GlutaMAX (gibco) に10%非働

化ウシ胎児血清、1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地を使用し、継代培養した。細胞は37℃、5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターで培養した。細胞を12ウェルプレートに播種し、増殖培地で培養を行った。90-100%コンフルエントになった時点で、筋管細胞へ分化させるため、培地を分化培地（DMEM + GlutaMAX, 2% Horse serum, 1% ペニシリン・ストレプトマイシン）に交換し培養した。5日間培養し実験に用いた。

糖取り込み活性試験において、培地を無血清培地に交換し、6時間インキュベートした。培地を2%ウシ血清アルブミン（Sigma）を含んだKRPHバッファー（1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH7.5）に交換した後、KRPHバッファーに溶解したペプチド（500 μM）またはインスリン（1 μM）を添加した。その20分後に2-DGを1 mM添加し、細胞内に取り込ませた。20分後、糖取り込み阻害剤であるPhloretin（Sigma）を含んだPBSで洗浄し、反応を停止した。この細胞を回収し、得られた抽出液中の2-DG量を2-DG代謝速度測定キット（コスモバイオ）を用いて定量した。

## 結果と考察

### β-コングリシニンの消化酵素分解物は血糖降下作用を示す

雄性マウスを用いたインスリン負荷試験によりサンブルの血糖低下活性を評価した。まず、各種消化管酵素によりβ-コングリシニンを分解して得られたペプチド混合物について評価した。その結果、ペプシン、続いて、パンクレアチンで消化したペプチド混合物が、血糖低下作用を示すことを見出した（Fig. 1）。すなわち、消化管を想定した酵素条件によりβ-コングリシニンから、血糖低下ペプチドが生成することが判明した。

### β-コングリシニン由来の血糖降下ペプチド候補の探索

さらに、逆相HPLCで4つの画分に分画した（Fig. 2）。このうち、保持時間の最も早い画分A（0～15分）および最も遅い画分D（35～50分）が血糖低下作用を示すことを明らかにした（Fig. 3）。さらに、各ピークの血糖低下作用を検討したところ、保持時間12分のピークが、最も強い血糖低下活性を示すことがわかった。プロテインシーケンサーおよび質量分析計により、β-コングリシニンの一次構造に相当する候補ペプチドが複数同定された。現在、これらのペプチドを化学合成し、糖代謝に及ぼす影響を検討中である。

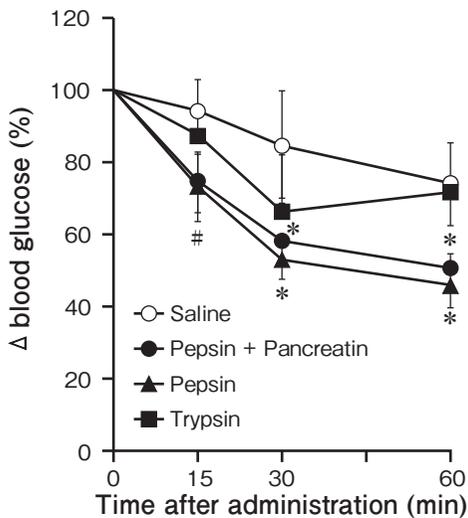


Fig. 1. Effect of enzymatic digest of  $\beta$ -conglycinin on blood glucose level in intraperitoneal insulin tolerance test. Means  $\pm$  SEM (n=4·5), # $p$ <0.10, \* $p$ <0.05 vs. saline

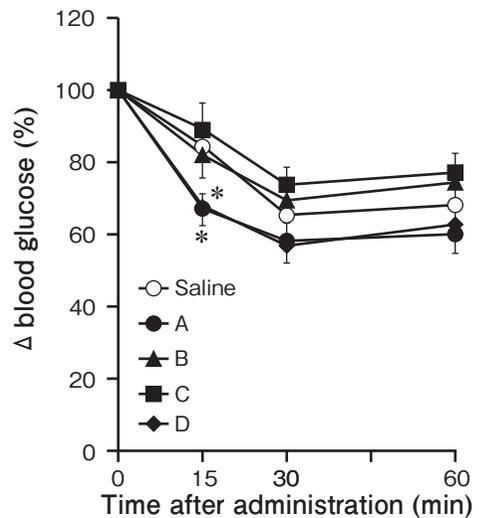


Fig. 3. Effect of fractionated pepsin and pancreatin digest of  $\beta$ -conglycinin on blood glucose level in intraperitoneal insulin tolerance test. Means  $\pm$  SEM (n=6), \* $p$ <0.05 vs. saline

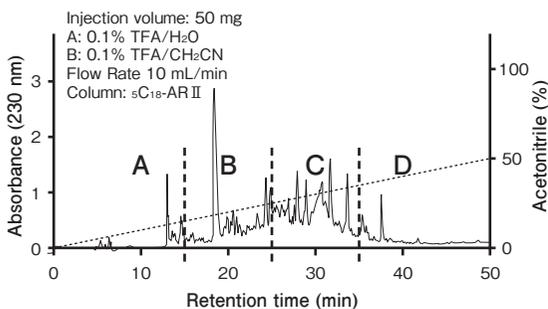


Fig. 2. Separation of pepsin and pancreatin digest of  $\beta$ -conglycinin with high performance liquid chromatography.

## 要 約

大豆の主要な種子貯蔵たん白質である $\beta$ -コングリシニンの糖代謝改善作用が報告されている<sup>1, 2)</sup>。本たん白質を摂取した際に、消化管で生成する低分子ペプチドが糖代謝改善作用に寄与しているものと考えられるが、その作用本体は不明であった。そこで我々は、 $\beta$ -コングリシニンを消化管酵素条件下で分解し得られたペプチド混合物について、その糖代謝改善作用を検討するとともに、機能性ペプチドの同定を試みた。まず、各種消化管酵素により $\beta$ -コングリシニンを分解して得られたペプチド混合物について評価した。その結果、ペプシン、続いて、パンクレアチンで消化したペプチド混合物が、血糖低下作用を示すことを見出した。すなわち、消化管を想定した酵素条件下により $\beta$ -コングリシニンから、血糖低下ペプチドが生成することが判明した。さらに、逆相HPLCで4つのフラクションに分画した。このうち、保持時間の最も早い(0~15分)フラクションAが血糖低下作用を示すことを明らかにした。さらに、各ピークの血糖低下作用を検討したところ、保持時間12分のピークが、最も強い血糖低下活性を示すことがわかった。プロテインシークエンサーおよび質量分析計により、 $\beta$ -コングリシニンの一次構造に相当する候補ペプチドが複数同定された。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) Tachibana N, Yamashita Y, Nagata M, Wanezaki S, Ashida H, Horio F and Kohno M (2014): Soy  $\beta$ -conglycinin improves glucose uptake in skeletal muscle and ameliorates hepatic insulin resistance in Goto-Kakizaki rats. *Nutr Res*, **34**, 160-167.
- 3) Yamada Y, Muraki A, Oie M, Kanegawa N, Oda A, Sawashi Y, Kaneko K, Yoshikawa M, Goto T, Takahashi N, Kawada T and Ohinata K (2012): Soymorphin-5, a soy-derived  $\mu$ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR $\alpha$  systems in diabetic KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **302**, E433-E440.