

大豆由来トリペプチドFLVの肥満性脂肪組織への抗炎症作用

峯 芳徳^{*1}・Rina YU²

¹University of Guelph ²University of Ulsan

Soy Tri-Peptide FLV and Obesity-Related Adipose Anti-Inflammation

Yoshinori MINE^{*1} and Rina YU²

¹Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, ON, N1G 2W1 Canada

²Department of Food Science and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan 680-749, South Korea

ABSTRACT

Adipose inflammation plays a crucial role in the development of obesity induced metabolic disorders such as insulin resistance and type 2 diabetes. Tumor necrosis factor- α (TNF α), which triggers inflammatory signaling cascades in adipocytes/macrophages, is implicated in adipose inflammation and metabolic complications such as insulin resistance. Here we demonstrate that soy peptide, the β -conglycinin-derived tripeptide FLV, reduces adipose inflammation and insulin resistance *in vitro*. Soy peptide FLV significantly inhibited MCP-1-induced macrophage migration and downregulated expression of MCP-1 receptor CCR2 in a dose-dependent manner. Soy peptide FLV also decreased release of inflammatory cytokines (TNF α , MCP-1, IL-6) from co-cultured macrophages/adipocytes, and the action was mediated by inactivation of inflammatory signaling molecules (JNK, IKK, I κ B α). Moreover, soy peptide enhanced insulin responsiveness and increased glucose uptake in adipocytes. Furthermore, we for the first time found that adipocytes expressed peptide transporters (PepTs) PepT1 and PepT2, and the peptide transporter inhibitor disrupted the inhibitory action of soy peptide FLV on the inflammatory responses. These findings suggest that soy peptide, which is transported to adipocytes by PepT1/2, inhibits TNF α -induced inflammatory signaling, and protects insulin resistance in the cells. Soy peptide FLV may have a potential to prevent obesity-induced adipose inflammation and insulin resistance. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 74-81, 2015.

Key words : obese, type 2 diabetes, soy peptides, adipose inflammation, insulin resistance,

* 〒N1G 2W1 50 Stone Rd E, Guelph, ON CANADA

大豆ならびに大豆加工品は日本では伝統食品として広く食されている。また、近年の成人病対策の観点から大豆たん白質のもつ、種々の生理活性作用が注目されている。事実、大豆たん白質には抗酸化作用、抗肥満、食欲抑制、免疫賦活作用など、種々の機能性が期待されている。筆者らの研究室においても、これまで大豆たん白質の生理活性作用について研究を行い、腸管炎症を抑制できる大豆由来トリペプチドを見出し、その配列を同定している。今回はその同定されたペプチドの一つである β -コングリシニン由来のFLVが、脂肪前駆細胞において炎症性サイトカイン産生を抑制すること、細胞内インスリンシグナルを賦活化することを見出した。

方 法

材料と試薬

大豆トリペプチド、FLVは合成ペプチド (GL Biochem Ltd, Shanghai) で純度95%のものを使用した。それ以外の試薬についてはシグマカナダ、あるいはフィッシャーサイエンスカナダから購入した。実験に使用した細胞は全て、ATCC USAまたは理研バイオサイエンス (埼玉) から購入したものを使用した。細胞実験、動物実験についてはゲルフ大学 (カナダ) バイオセーフティーならびに動物実験指針に基づき、その許可のもとに行った。

FLVによる抗炎症作用評価

マウス由来マクロファージ細胞 (RAW 264.7) および、同マウス由来脂肪前駆細胞 (3T3-L1) を用い、FLVの抗炎症作用を評価した。なお、3T3-L1は脂肪細胞化因子により分化させたものを使用し、RAW 264.7との共培養はSuganamiら¹⁾の方法に従った。細胞由来のサイトカイン量、たん白質発現量およびmRNA発現量は、それぞれELISA法、ウェスタンブロット法およびPCR法により評価した。細胞走化性はBoyden Chamberアッセイにより評価した。細胞内グルコースとり込み活性は、トリチウム標識2-デオキシ-D-グルコースの壊変毎分 (dpm) 測定により評価した。Peptsの活性測定は、基質である蛍光ペプチドD-Ala-Lys-AMCAのとり込み試験により評価した。

肥満マウスにおけるPepTs発現量評価

8週齢雄性C57BL/6マウスに対し、高脂肪食 (脂質カロリー比50%) または低脂肪食 (脂質カロリー比12%) を10週間投与した。飼育終了後、これらのマ

ウスより副睾丸脂肪、肝臓、肺および空腸を摘出し、PepT1およびPepT2 mRNA発現量を評価した。

統計処理

統計処理はStudent's *t*-test あるいは one-way analysis of variance (One-way ANOVA) を用いた。有意差検定は $p < 0.05$ で行った。

結果と考察

ケモカイン (MCP-1) は脂肪組織におけるマクロファージの遊走および湿潤を誘導し、炎症性シグナルを賦活化する。そこでマクロファージの遊走に対するFLVの作用を評価したところ、MCP-1 (20 ng/mL) 刺激によるRAW 264.7の遊走を、FLVは濃度依存的 (0.1-10 μ M) に抑制 (Fig. 1A) し、さらにMCP-1受容体であるCCR2の発現を抑制 (Fig. 1B) した。続いて肥満誘導による炎症のトリガーとなる、脂肪細胞とマクロファージの相互作用を評価した。その結果3T3-L1とRAW264.7共培養下において、FLVはMCP-1、IL-6、TNF α 産生を抑制し、アディポネクチン産生を促進した (Fig. 2A)。なお、FLVによるMCP-1、IL-6抑制作用は3T3-L1単体で認められたものの、TNF α 産生抑制はRAW264.7において認められなかった (Fig. 2B)。これらのことから、FLVは3T3-L1内炎症性シグナルを抑制することが考えられた。

腫瘍壊死因子であるTNF α は、炎症性サイトカイン産生やインスリン抵抗性に大きく寄与する。そこで3T3-L1における関連シグナル因子活性を評価したところ、TNF α 誘導によるJNK、IKKさらにはIkB α の賦活化をFLVは有意に抑制した (Fig. 3)。このことから、FLVは炎症性シグナルの抑制を介してインスリン抵抗性を改善する可能性が考えられた。そこで、3T3-L1におけるインスリン受容体基質IRS1および関連シグナルであるAktの活性を評価したところ、TNF α 誘導によるIRS1およびAktの脱リン酸化 (活性低下) をFLVは有意に抑制した (Fig. 4A)。さらには、FLVはIRS-1およびAktの活性化を介して直接グルコース取り込み量を増大させることを明らかにした (Fig. 4B)。これらの知見は、FLVが炎症性シグナルを抑制すること、さらにはFLVがインスリンシグナルを直接活性化することでインスリン抵抗性を改善する可能性を示すものであった。

ペプチドトランスポーターは、ジ・トリペプチドの取り込みに関わる膜たん白質であり、小腸上皮細胞の刷子縁膜に主に発現しているPepT1²⁾と、肺や腎臓な

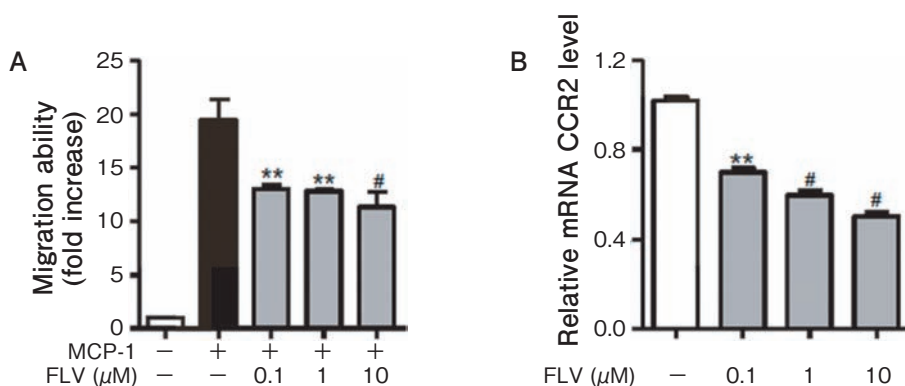


Fig. 1. Soy peptide FLV inhibits MCP-1-induced macrophages migration. (A) RAW 264.7 macrophages (2×10^6 cells/mL) were placed in the upper wells of a 96-well culture chamber that were separated from the lower wells containing MCP-1 (20 ng/mL) incubated for 4h at 37°C. The cells that migrated across the filter were fixed and stained with Diff-Quick, and counted under a light microscope in four randomly chosen high-power fields. RAW264.7 macrophages treated with FLV (0.1-10 μM) for 4h at 37°C. (B) Effect of FLV on CCR2 mRNA in RAW 264.7 macrophages. CC chemokine receptor mRNA expression level was measured by semiquantified reverse transcriptase-PCR. Level of mRNA was normalized to level of β -actin mRNA. Values are means $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$, # $p < 0.005$ significantly different from control. FLV; synthetic soy tripeptide FLV.

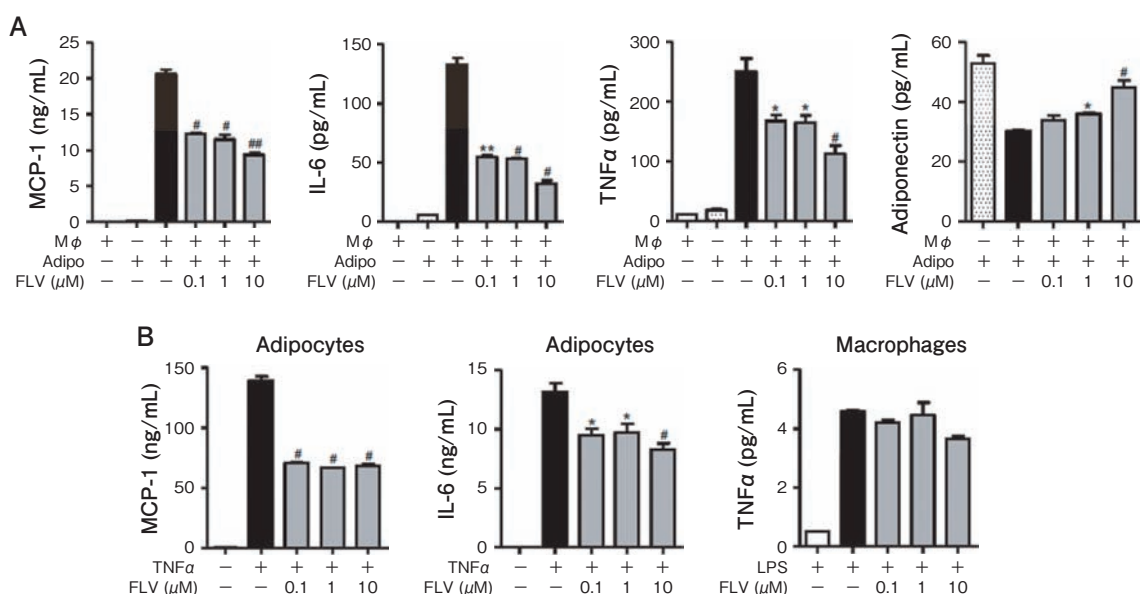


Fig. 2. Soy peptide FLV inhibits cytokines release from co-cultured adipocytes and macrophages. (A) 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) and RAW 264.7 macrophages (3×10^5 cells/mL) were co-cultured in the presence or absence of FLV (0.1-10 μM) for 16h at 37°C. (B) 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) treated with TNF α 10 ng/mL and RAW 264.7 macrophages (1×10^6 cells/mL) treated with LPS 100 ng/mL for 24h at 37°C. MCP-1, IL-6, TNF α and adiponectin concentration in the supernatant were determined by ELISA. Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.005$, ## $p < 0.001$ significantly different from control. FLV; synthetic soy tripeptide FLV.

ど多くの臓器に発現しているPepT2³⁾が挙げられる。他方、これまで脂肪細胞組織での発現に関する報告はない。そこでマウスにおけるPepT1およびPepT2の発現を評価したところ、副睪丸脂肪組織において両トランスポーターの発現 (Fig. 5A, B) を見出し、脂肪マウスにおいて同トランスポーターの発現量が増大することを明らかとした (Fig. 5D)。さらに3T3-L1においても、炎症刺激により細胞内トランスポーターの発現量が増大することを明らかとした (Fig. 5C)。このことから、肥満／炎症は脂肪組織におけるペプチドトランスポーター発現量を増大させることが明らかとなっ

た。続いて、3T3-L1内ペプチドトランスポーター活性を評価するため、PEPTsの基質ペプチドD-Ala-Lys-AMCA⁴⁾を用いたとり込み試験を行った。その結果、阻害ペプチドであるGlySar⁵⁾と同様に、FLVはD-Ala-Lys-AMCAの取り込みを阻害した (Fig. 6A)。さらにFLVによるサイトカイン産生抑制作用は、GlySar共存下において減弱した (Fig. 6B, C)。以上のことから、FLVがペプチドトランスポーターを介して脂肪細胞内に取り込まれ、抗炎症作用を発揮することが明らかとなった。

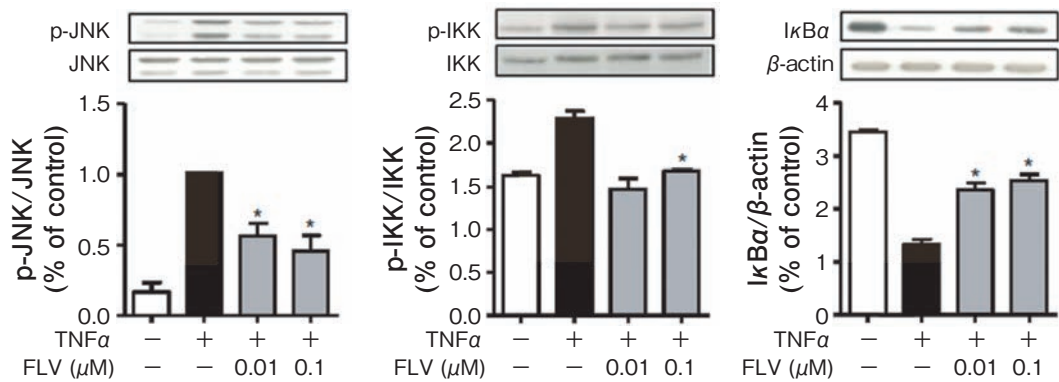


Fig. 3. Soy peptide FLV inhibits TNF α -induced activation of JNK, IKK and degradation of I κ B α in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) were treated with TNF α (20 ng/mL) in the presence of FLV (0.01-0.1 μ M) for 15 min at 37°C. The cell lysates were subjected to 11% SDS-PAGE and nitrocellulose membrane. Protein extracts of the cells were subjected to western immunoblot analysis with anti-phospho (P)-JNK, IKK and I κ B α degradation in 3T3-L1 adipocytes. Values are means $\pm$ SEM. * p <0.05 significantly different from control. FLV; synthetic soy tripeptide FLV.

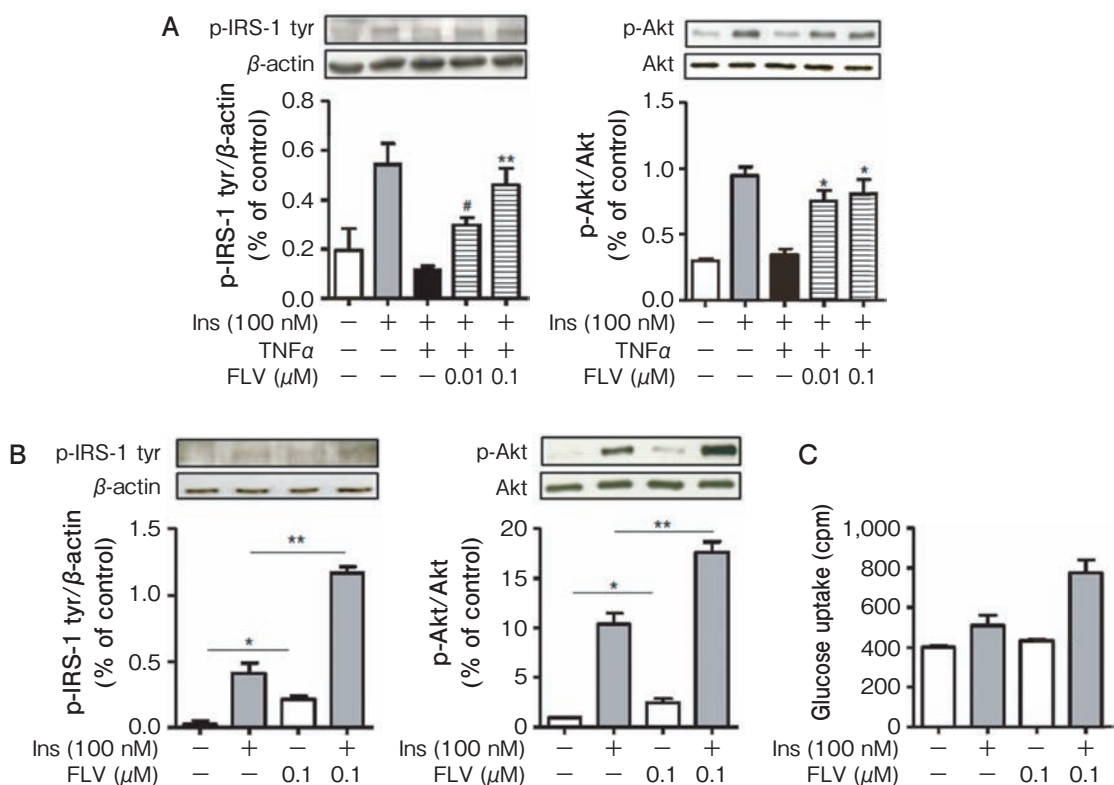


Fig. 4. Soy peptide FLV improves insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) were treated with 10 ng/mL TNF α in the presence of FLV (0.01-0.1 μ M) for 24h and subsequently the cells were treated with 100 nM insulin for 15 min at 37°C. (A-B) The cell lysates were subjected to 11% (p-Akt), 8% (p-IRS-1 Tyr) SDS-PAGE and nitrocellulose membrane. Protein extracts of the cells were subjected to western immunoblot analysis with anti-phospho (P)-Akt, anti-phospho (P)-IRS-1 Tyr in 3T3-L1 adipocytes. (C) 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) were incubated with FLV (0.1 μ M) for further 48h at 37°C, and then the cells were stimulated with insulin (100 nM) for 30 min. Values are means $\pm$ SEM. * p <0.05, ** p <0.01, # p <0.005 significantly different from control. FLV; synthetic soy tripeptide FLV.

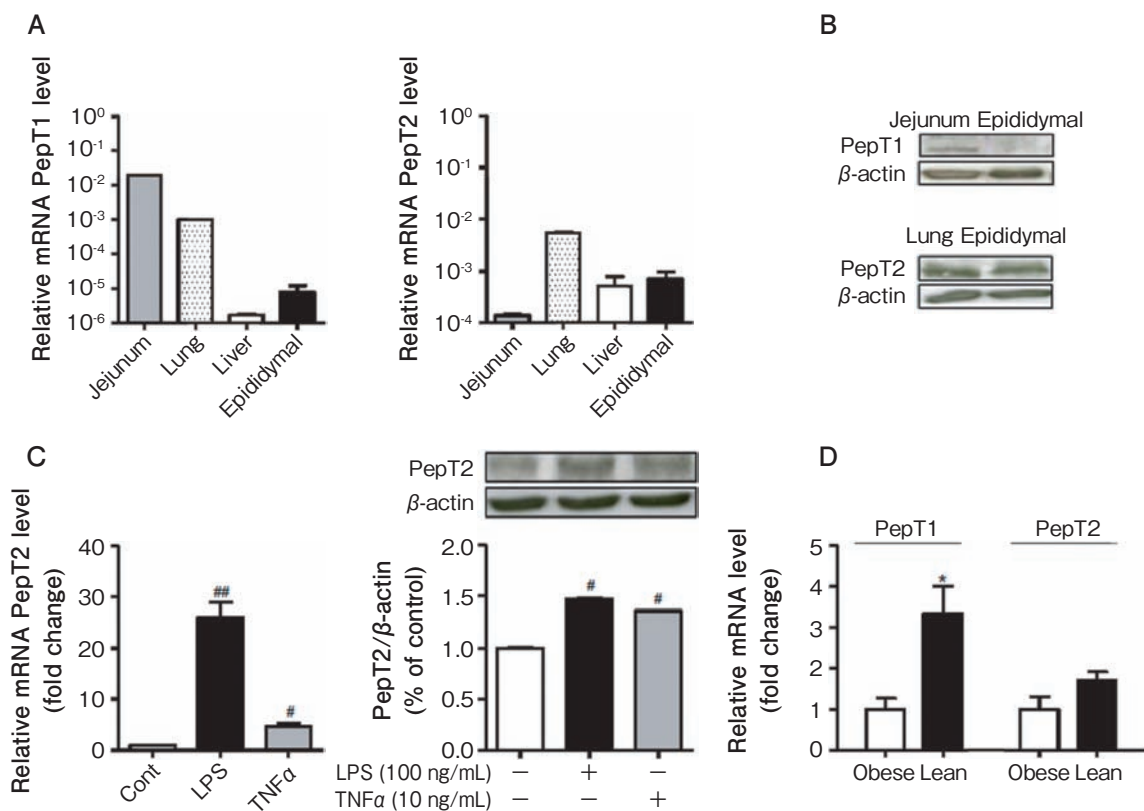


Fig. 5. Peptide transporter is expressed in adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. (A) Relative expression of PepT1, PepT2 mRNA in the jejunum, lung, liver and epididymal of mice were characterized by real-time reverse transcriptase-PCR. Level of mRNA was normalized to level of β -actin mRNA. (B) Protein expression of PepT1, PepT2 in mouse jejunum (positive control for PepT1), lung (positive control for PepT2) and epididymal. (C) Expression of PepT2 mRNA and protein in LPS and TNF α -induced inflammatory condition in 3T3-L1 adipocytes. (D) Relative expression of PepT1, PepT2 mRNA in obese mice and lean control epididymal adipose tissue. Values are means $\pm$ SEM. # $p < 0.005$, ## $p < 0.001$ significantly different from control.

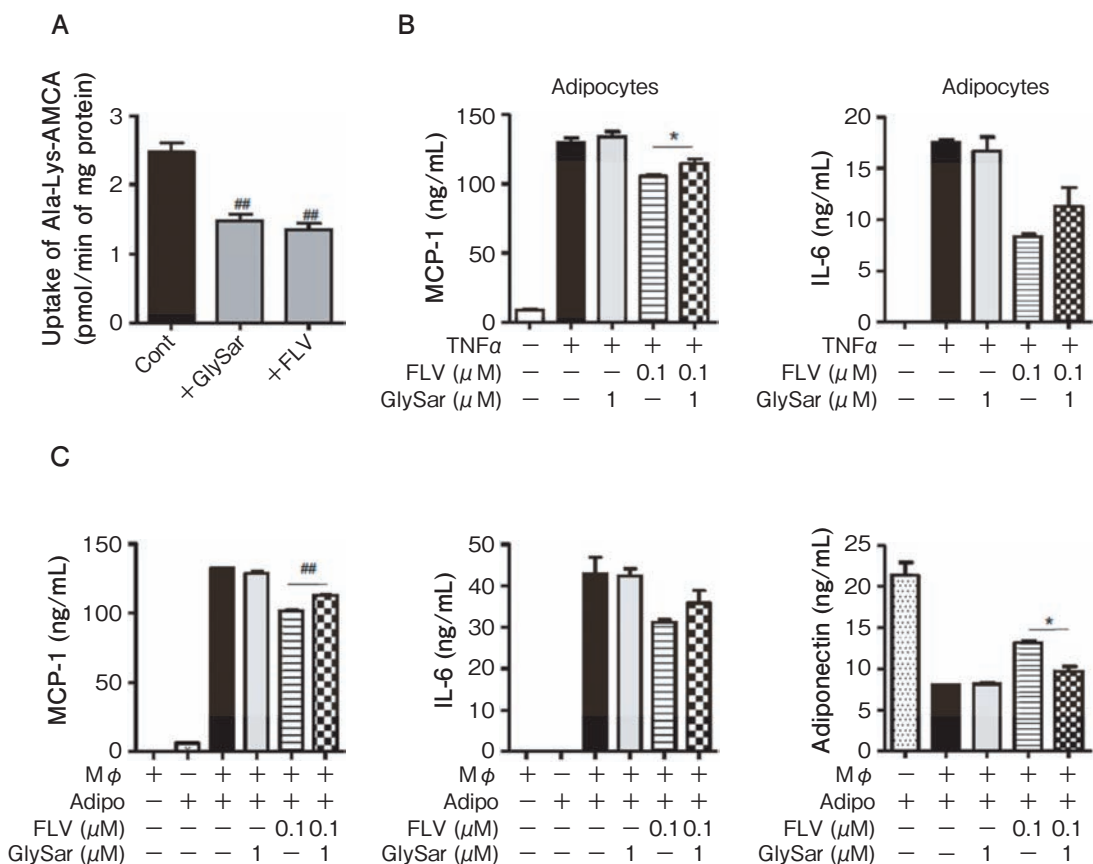


Fig. 6. Anti-inflammatory effect of soy peptide FLV is blunted by peptide transporter inhibitor. (A) Cellular uptake of FLV in 3T3-L1 adipocytes. (B) 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) were treated with 10 ng/mL TNF α in the presence of FLV (0.1 μ M) and/or GlySar (1 μ M) for 24h at 37°C. (C) 3T3-L1 adipocytes (3×10^5 cells/mL) and RAW 264.7 macrophages (3×10^5 cells/mL) were co-cultured in the presence of FLV (0.1 μ M) and/or GlySar (1 μ M) for 16h at 37°C. MCP-1, IL-6, adiponectin concentration in the supernatant were determined by ELISA. Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ significantly different from FLV group. FLV; synthetic soy tripeptide FLV.

要 約

大豆ペプチドFLVが、脂肪前駆細胞において炎症性サイトカイン産生を抑制すること、細胞内インスリンシグナルを賦活化することを見出した。さらにマウス脂肪組織におけるペプチドトランスポーターの存在を明らかとし、FLVが同トランスポーターを介して脂肪細胞内に取り込まれることを明らかとした。以上の知見は、FLVが脂肪細胞内へ直接取り込まれることで抗炎症作用を発揮し、インスリン抵抗性改善に寄与することを示唆するものであった。

文 献

- 1) Suganami T, Nishida J and Ogawa Y. (2005): A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes: Role of Free Fatty Acids and Tumor Necrosis Factor α . *Arterioscler, Thromb Vasc Biol*, **25**, 2062-2068.
- 2) Jappard D, Wu S-P, Hu Y, Smith DE. (2010): Significance and regional dependency of peptide transporter (PEPT) 1 in the intestinal permeability of glycylsarcosine: in situ single-pass perfusion studies in wild-type and Pept1 knockout mice. *Drug Metab Dispos*, **38**, 1740-1746.
- 3) Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Döring F, Daniel H, Fischer A. (2001): Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol*, **158**, 707-714.
- 4) Groneberg DA, Döring F, Eynott PR, Fischer A, Daniel H. (2001): Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **281**, G697-G704.
- 5) Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach F. (1994): Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem J*, **299**, 253-260.