

大豆たん白質から生成する多機能性ペプチドの*in vivo*における生理作用

大日向耕作*

京都大学大学院農学研究科

In Vivo Physiological Action of a Soy Protein-Derived Multifunctional Peptide

Kousaku OHINATA*

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

ABSTRACT

We reported that Arg-Phe (RF), a vasorelaxing dipeptide, exhibits hypotensive and anorexigenic effects. In this study, we found that a vasorelaxing tripeptide Gln-Arg-Phe (QRF) is released by gastrointestinal protease-digestion of β -conglycinin, a major storage protein of soybean. Furthermore, we focused on pyroGlu-Arg-Phe (pERF), which was assumed to be converted by QRF, and detected in the digest. pERF exhibited vasorelaxing activity equally to RF. Both pERF- and RF-induced vasorelaxing activities were not blocked by inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase, which contribute to production of NO and prostaglandins already-known vasorelaxing factors. pERF also activated CCK-releasing enteroendocrine cell STC-1. Intriguingly, pERF exhibit long-lasting hypotensive effect than RF in spontaneously hypertensive rats (SHR) after oral administration. pERF is the first pyroglutamyl peptide derived from soy protein with long-lasting hypotensive activity. The conversion to pERF was enhanced during heat treatment. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 89-92, 2015.

Key words : β -conglycinin, peptide, vasorelaxing activity, hypotensive activity, food intake regulation

最近、我々は、ジペプチドの構造-活性相関情報を基盤としたペプチドの機能性予測を試みている。ジペプチドArg-Phe (RF) は、我々が見出した血圧降下作用と摂食抑制作用を併せ持つ動脈弛緩ペプチドである¹⁾。レトロ体には動脈弛緩作用が認められないこと

から、アミノ酸配列が重要である。また、N末端側への鎖長延長が許容されることも明らかにしている。今回、大豆たん白質の酵素消化物中に存在するペプチドの中で、このルールに従うペプチドを見出した。それらの動脈弛緩作用を検討するとともに、*in vivo*における生理作用について検討した。

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

方 法

試薬

Gln-Arg-Phe (QRF) およびpyroGlu-Arg-Phe (pERF) 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。L-NAME (ナカライテスク社製)、インドメタシン (和光純薬社製) およびlorglumide (Sigma-Aldrich社製) などの阻害剤は購入した。

動脈弛緩作用の評価法¹⁻³⁾

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、ペプチドサンプル添加による張力変化をトランスデューサーで検出した (Fig. 1)。また、既知の内皮由来因子のNOやPG類の阻害剤に加え、CCK₁受容体アンタゴニストなどを用いて作用機構を詳細に検討した。

血圧降下作用の検討¹⁻³⁾

無麻酔状態のSHRの血圧をtail-cuff法 (MK-2000, 室町機械) により測定した。数週間、Tail-cuff装置でトレーニングをした動物を使用した。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。

CCK分泌マウス腸内分泌細胞STC-1の応答に及ぼす影響¹⁾

STC-1細胞をDMEM (10%FBS) にて培養したものを96穴プレートに播種し (33,000 cells/well)、一晚培養した。細胞内カルシウムの測定にはCalcium Kit II-Fluo 4 (同仁化学) を使用した。カルシウム蛍光指示薬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

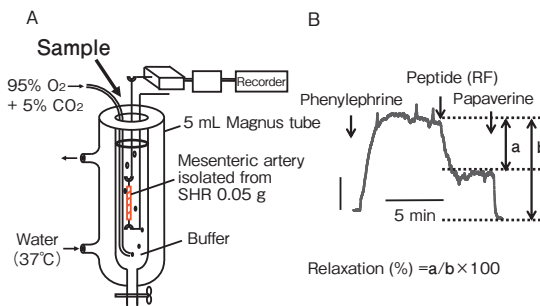


Fig. 1. Measurement of vasorelaxing activity (A) and typical vasorelaxation (B).

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 ($\lambda_{ex}=480-500$ nm, $\lambda_{em}=518$ nm)。

結果と考察

大豆β-コングリシニンの消化管酵素分解物中に含まれるRFペプチド

ダイズの主要な種子貯蔵たん白質であるβ-コングリシニンを各種消化管プロテアーゼで処理したところ、キモトリプシン消化物中にQRF (78 mol%) が効率的に生成することが判明した。N末端のグルタミン酸残基が環状化し、ピログルタミン酸残基に変換されたpERFも検出された (Fig. 2)。N末端のピログルタミン酸残基は、内因性のペプチドホルモンや神経ペプチドにも認められる構造で、一般に、酵素分解抵抗性を示し、内因性ペプチドの効果の持続化に寄与しているものと考えられる。今回、このpERFの生理作用に着目し、生理作用を検討した。

大豆由来のRF関連ペプチドによる動脈弛緩作用

β-コングリシニン由来のRF配列を有するペプチドのpERFおよびQRFともに動脈弛緩作用を示すことを新たに見出した。用量依存性を検討したところ、それらの動脈弛緩作用はRFと同等であることがわかった (Fig. 3)。

pERFの動脈弛緩作用を仲介するメディエーター

pERFの動脈弛緩機構をさらに検討した。その結果、pERFの動脈弛緩作用は、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に対する阻害剤である、L-NAMEやインドメタシンでブロックされなかった (Fig. 4)。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) のアンタゴニストとして知られるlorglumideにより阻害されることが明らかとなった。pERF自身はCCK受容体に親和性を示さないことから、CCK分泌を促進している

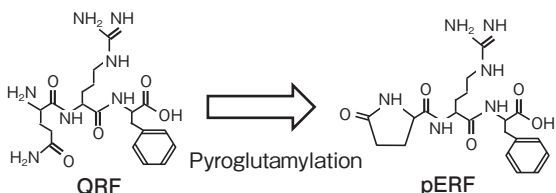


Fig. 2. Conversion from Gln-Arg-Phe (QRF) to pyroGlu-Arg-Phe (pERF).

ものと考えられる。

pERFは経口投与で持続的な血圧降下作用を示す

pERFの経口投与により血圧降下作用を示すことが明らかとなった。また、QRFは経口投与2時間後にのみ血圧降下作用を示すのに対し、pERFは、投与後4時間目まで、血圧降下作用が持続することがわかった (Table. 1)。pERFを腹腔内投与した場合には、血圧降下作用が顕著に減弱することから、pERFが消化管に作用し持続的な血圧降下作用を示すと考えられる。また、pERFの経口投与による血圧降下作用は、CCKアンタゴニストにより阻害されることも見出した。一方、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、pERF添加により、細胞内カルシウム濃度が上昇することが判明した (Fig. 5)。本結果は、pERFの経口投与による血圧降下作用がCCKアンタゴニストによりブロックされる事実と一致している。以上、pERFは、消化管に対して作用し、かつ、CCK分泌細胞を活性化することから、CCKが持続的な血圧降下作用に寄与しているものと考えられる。

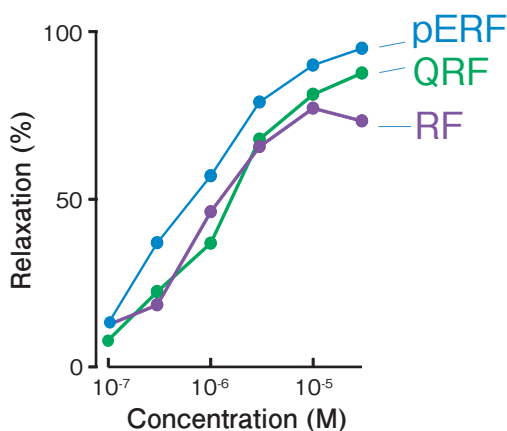
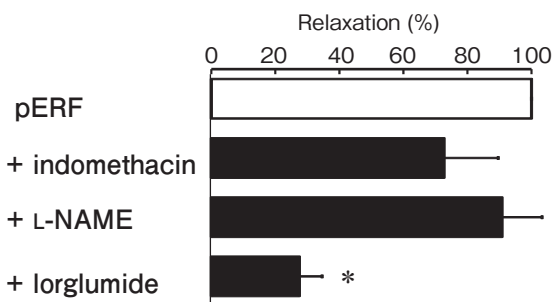
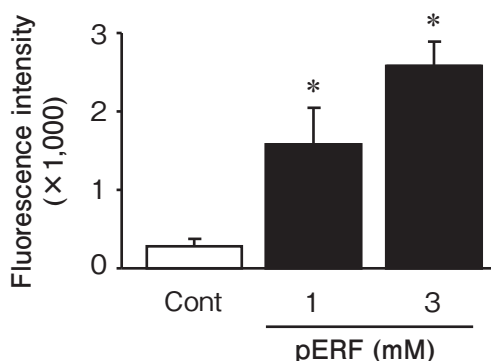


Fig. 3. Comparison of vasorelaxing activities of soy-derived RF-related peptides.



The mean $\pm$ SEM (n=3-4), * p <0.05 vs control

Fig. 4. Effects of several blockers on pERF-induced vasorelaxing activity. pERF (10 μ M) was added after application of indomethacin, a COX inhibitor (3 μ M); L-NAME, a NOS inhibitor (100 μ M); or lorglumide, a CCK antagonist (30 μ M).



Mean $\pm$ SEM (n=3-4), * p < 0.05 vs cont.

Fig. 5. Calcium response of pERF in CCK-releasing enteroendocrine cell STC-1.

Table 1. Comparison between physiological actions of QRF and pERF

Action	QRF	pERF
Vasorelaxing effect	+	+
Max. hypotensive effect (mmHg)	9	20
Duration (hrs)	2	4

要 約

Arg-Phe (RF) は、血圧降下作用と摂食抑制作用を併せ持つ動脈弛緩ジペプチドである。RFの構造－活性相関に基づいて、大豆たん白質を消化管酵素で処理した際に生成する新しい動脈弛緩ペプチドを複数見出した。特に、N末端がピログルタミン酸残基のpyroGlu-Arg-Phe (pERF) に着目し、その生理活性を検討した。pERFはRFと同等の動脈弛緩作用を示すことがわかった。いずれの動脈弛緩作用も従来の動脈弛緩因子として知られる一酸化窒素やプロスタグランジン類の阻害剤ではブロックされず、コレシストキニン (CCK) アンタゴニストにより阻害された。実際、pERFはCCK分泌腸内分泌細胞STC-1を活性化することを確認した。さらに、pERFをSHRに経口投与し、*in vivo*における作用を検討したところ、同等の動脈弛緩作用を示すRFよりも持続的な血圧降下作用を示すことがわかった。ピログルタミン酸残基は内因性ペプチドホルモンのN-末端にしばしば見られる構造であるが、今回、大豆由来の動脈弛緩ペプチドによる血圧降下作用の持続化に寄与することが明らかとなった。

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**, 1456-1463.
- 2) 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 CCK₁ receptor. *Peptides*. **31**, 909-914.
- 3) Zhao H, Usui H, Ohinata K and Yoshikawa M (2008): Met-Arg-Trp derived from Rubisco lowers blood pressure via prostaglandin D₂-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides*. **29**, 345-349.