

抗腫瘍性ルナシンの大豆2Sアルブミンからの生成機構解明と 大豆加工食品への応用

小川智久*・平垣内一子・坪野真由美・佐藤瑠依・湯川真衣・村本光二

東北大学大学院生命科学研究科分子生命科学専攻

Molecular Mechanism of Derivation of Anti-Cancer Peptide, Lunasin, from 2S Albumin, and Its Application to the Processed Foods of Soybean

Tomohisa OGAWA*, Ichiko HIRAKAKIUCHI, Mayumi TSUBONO, Rui SATO,
Mai YUKAWA and Koji MURAMOTO

Department of Molecular Life Sciences, Graduate School of Life Sciences,
Tohoku University, Sendai 980-8577

ABSTRACT

The soybean peptide called lunasin, which constitutes 2S albumin together with long (L) chain, is known to have anti-cancer and anti-inflammatory effects. Although lunasin has been reported to be contained in various soybean-products, it is hardly found in raw soybean. Moreover, the derivation of lunasin from 2S albumin during food processing has remained unclear. In this study, we investigated the formation of lunasin from 2S albumin under various processing conditions using specific antibodies against lunasin and 2S albumin. Anti-pre-2S albumin antibody was also used to explore the formation of 2S albumin from its precursor, pre-2S albumin in maturing soybeans. Lunasin was most abundantly contained in low-fat soymilk among various soybean-products; e.g., soymilk, boiled soybean and its soup, enzyme-deactivated soyflour, roasted soyflour and soy-yogurt, though the peptide was not detected in raw soybeans. Lunasin was produced in a time-dependent manner by heating at 90°C, meanwhile, 2S albumin was decreased by its S-S exchange reaction. Nevertheless, lunasin could not be identified in isolated 2S albumin by the same treatment. It was found that enzymes including protein disulfide isomerase and puorhionin (thioredoxin-like enzyme) were not participated in the cleavage. These results suggest that other soybean components are involved in derivation of lunasin from soybean 2S albumin. On the other hand, pre-2S albumin was expressed in filling soybean 4-6 weeks after flowering and processed after 7 weeks. *Soy Protein*

*〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

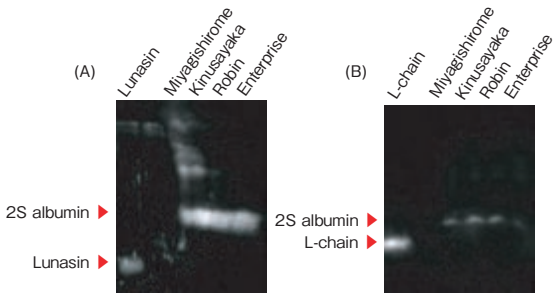


Fig. 2. Western blot analysis of soy proteins from various soybean cultivars (Miyagishirome, Kinusayaka, Robin, and Enterprise) using anti-lunasin (A) and anti-L chain (B) antibodies.

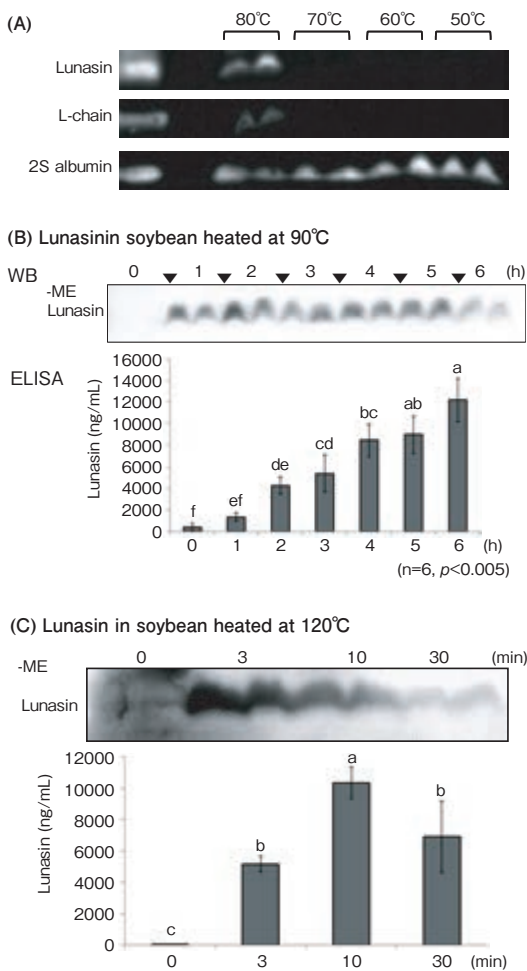


Fig. 4. Formation of lunasin and L-chain in soybean by heat treatment. Lunasin and L-chain were analyzed by western blotting (WB) and ELISA using anti-lunasin and anti-L-chain antibodies.

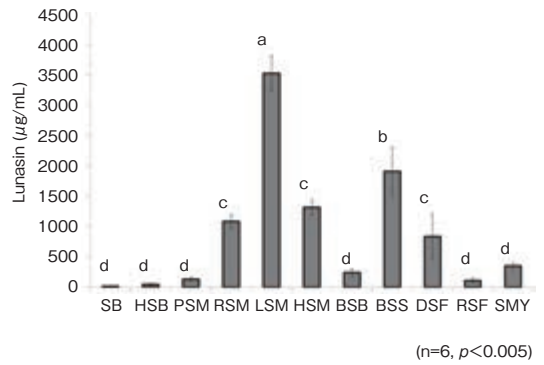


Fig. 3. Lunasin contents in soy products. SB: soybean, HSB: soybean heated at 80°C for 1 h, PSM: plain soymilk, RSM: rich soymilk, LSM: low-fat soymilk, HSM: high-fat soymilk, BSB: boiled soybean, BSS: soup of boiled soybean, DSF: enzyme-deactivated soyflour, RSF: roasted soyflour (*kinako*), SMY: soymilk yoghurt. (n=6, $p < 0.005$)

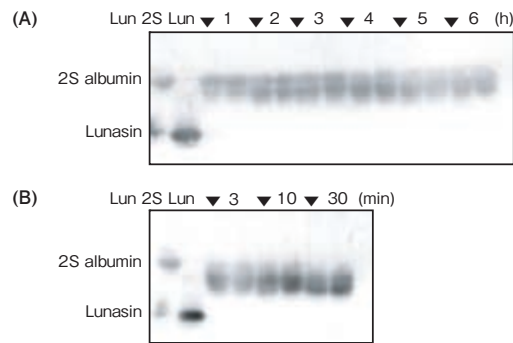


Fig. 5. Effect of heat treatment at 90°C for 1-6 h (A) and at 120°C for 3-30 min (B) on purified 2S albumin. Lunasin and 2S albumin were detected by western blot analysis using anti-lunasin antibody. No release of lunasin was observed.

熱処理による2Sアルブミンから遊離ルナシンの生成

脱脂大豆を50°Cから80°Cで加熱すると80°C以上でルナシンが検出された (Fig. 4A)。また、90°Cでは加熱時間依存的に遊離ルナシン量が増加した (Fig. 4B)。さらに、120°Cでのオートクレーブ (加圧加熱) 処理では、短時間で遊離ルナシンが生成したが、30分処理では減少した (Fig. 4C)。また、精製2Sアルブミンを用いて同様の実験を行ったところ、ELISAとWBの両方法において遊離ルナシンは検出できなかった (Fig. 5A)。一方、120°Cの加圧加熱処理ではELISAで検出されるルナシン量が有意に増加したが、WBでは検出されなかった (Fig. 5B)。90°Cと120°Cでの処理で

ELISAにみられた抗ルナシン抗体への反応性の違いは、2Sアルブミンの立体構造変化によるものと推定された。実際、WB解析で移動度の異なる成分が観察され、よりコンパクトな構造への変化や酸性領域（ポリアスパラギン酸配列）の構造変化が示唆された。加熱により精製2Sアルブミンからルナシンが遊離しなかったことから、ルナシンの生成には大豆に含まれる因子が関与することが示唆された。

ルナシンと2Sアルブミンの生理機能

ルナシンと2Sアルブミンの細胞毒性とインテグリンへの結合能を調べた。ヒト乳癌由来細胞MCF7およびマウス線維芽NIH/3T3に対して、いずれも毒性を示したが、白血球系細胞（HL60, Jurkat, L1201）には毒性を示さず、細胞特異性がみられた。一方、ルナシンはインテグリン $\alpha v \beta 3$ と $\alpha v \beta 5$ に結合するのに対して、2Sアルブミンは結合しなかった (Fig. 6)。これは2SアルブミンのRGD配列が分子内部に埋もれていることを示す。

プレ2Sアルブミンの発現とプロセッシング

プレ2Sアルブミン特異抗体を作成し、登熟時の大豆を調査した。開花4～6週後に、抗体と反応する約17

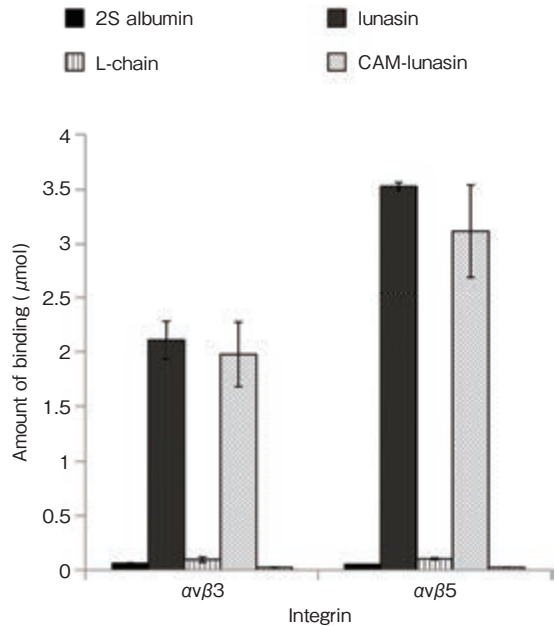


Fig. 6. Integrin binding activities of lunasin, L-chain and intact 2S albumin. The amount of bound samples was calculated by using a calibration curve for each sample. The data are presented as the mean \pm SD of three different determinations.

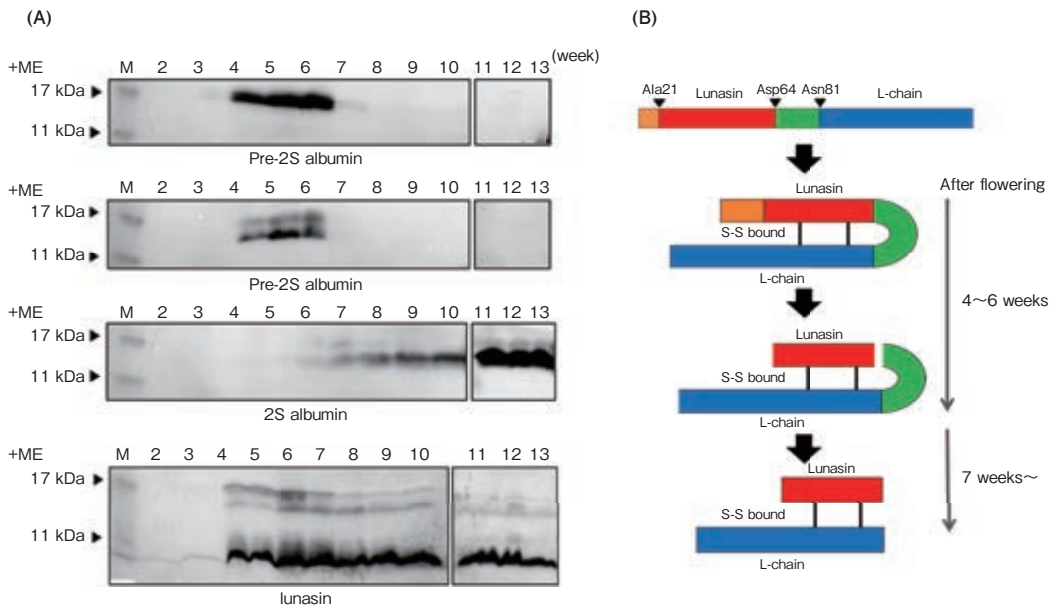


Fig. 7. Western blot analysis of the extracts of soybeans collected after flowering using anti-pre-2S albumin, anti-2S albumin, and anti-lunasin antibodies (A) and schematic representation of processing of pre-2S albumin (B). The numbers (2-13) indicate the weeks after flowering. +ME: reducing condition, -ME: non-reducing condition.

kDaの前駆体の発現が見られ、開花7週後から成熟2Sアルブミンへと変化した (Fig. 7). 還元条件で開花4~6週後にルナシンに相当するバンドが検出され、リ

ンカー部は先ずルナシン側で切断されると考えられる。

要 約

ルナシンは、抗腫瘍活性や抗炎症作用を持つが、2Sアルブミンからどのように派生するのか不明な点が多く、そのメカニズムは明らかでない。本研究では、ルナシンの生成機構解明を目的とし、抗2Sアルブミン抗体および抗ルナシン特異抗体を用いて、食品加工過程におけるルナシンの生成を調べた。また、抗pre2Sアルブミン特異抗体を用いて、大豆登熟時の前駆体から2Sアルブミンへの生成過程も調べた。非加熱大豆にはルナシンは含まれていないが、90℃加熱により時間依存的にルナシンが増加した。しかし、精製2Sアルブミンの処理ではルナシン生成はみられず、大豆の何らかの成分が関与していることが判明した。ルナシンと2Sアルブミンは、同様の細胞特異的毒性を示したが、インテグリンに対する結合能はルナシンにのみみられ、その理由としてRGD配列部分の立体構造の違いが考えられる。

文 献

- 1) Adlercreutz CHT, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KV, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Hase TA and Fotsis T (1995): Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, **25**, 757S-770S.
- 2) Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R and Elgavish A (2002): Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, **132**, 552S-558S.
- 3) Rao AV and Sung MK (1995): Saponins as anticarcinogens. *J Nutr*, **125**, 717S-724S.
- 4) Odani S, Koide T and Ono T (1987): Amino acid sequence of a soybean (*Glycine max*) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure. *J Biol Chem*, **262**, 10502-10505.
- 5) Galvez AF and de Lumen BO (1999): A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotech*, **17**, 495-500.
- 6) Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC and de Lumen BO (2011): Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Mol Nutr Food Res*, **55**, 989-998.
- 7) Hernandez-Ledesma B, de Lumen BO and Hsieh CC (2013): 1997-2012: Fifteen years of research on peptide lunasin. In *Bioactive food peptides in health and disease*. INTECH, DOI: 10.5772/52368.
- 8) Dia VP, Torres S, de Lumen BO, Erdman Jr JW and de Mejia EG (2009): Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption. *J Agric Food Chem*, **57**, 1260-1266.