

大豆ペプチドleginsulinの生体利用率とin vivo機能評価

静岡県立大学大学院 食品栄養環境科学研究所

三好 規之

レグインスリン (leginsulin; 図 1) は、37 アミノ酸あるいは C 末端の Gly が欠損した 36 アミノ酸からなるペプチドで (それぞれ Leg_v1_37 および Leg_v1_36 とする)、43 kDa basic 7S globulin (Bg) に高い親和性を示す分子として大豆発芽種子幼根から発見された¹。レグインスリンは、前駆体タンパク質 albumin 1 から翻訳後修飾により生成し、分子内に 3 つのジスルフィド結合を有する (図 1)。レグインスリンは、受容体 Bg に結合し受容体自己リン酸化 (チロシンキナーゼ) を活性化することで、細胞の増殖分化に関わる様々なシグナルを誘導する植物ホルモン様活性を示す^{1,2}。しかし、還元剤の処理によりジスルフィド結合が還元されたレグインスリンは、Bg のリン酸化を誘導しないため、その活性には立体構造が重要であることが示唆されている¹。哺乳類のインスリンあるいはインスリン様増殖因子は、レグインスリンとアミノ酸配列の類似性が認められないが、Bg への結合活性が認められているため、それらの三次構造の類似性が示唆されている^{3,4}。さらに、レグインスリンは、熱や消化酵素に対して抵抗性を示すことが報告されている。それゆえレグインスリンは、植物ペプチドホルモン様作用だけでなく、動物細胞に対するインスリン様ペプチドホルモン作用を示す可能性が示唆されている^{5,6}。

我々はこれまでに、大豆 11 品種 (エンレイ、フクユタカや青大豆、赤大豆、茶大豆、黒大豆など) のエタノール抽出画分について LC-MS を用いた成分分析を行ったところ、Leg_v1_37 および Leg_v1_36 は特定の品種 (エンレイ、エチゴミドリなど 4 品種) で高発現しており、成分プロファイルを特徴付ける重要な化合物であることを見出した⁷。さらに詳細な成分分析 (LC-MS) および DNA シーケンス解析より、残りの 7 品種において一塩基多型 (SNPs) に起因する Leg バリエント 2 (Leg_v2) を新規に検出・同定した (図 2)⁷。加えて、遺伝子重複 (paralogue) に起因する Leg バリエント 3 (Leg_v3) についても新規に検出・同定した (図 2)⁷。エンレイなど 4 品種で発現していたバリエント 1 (Leg_v1) は、高発現型のバリエントであり、フクユタカなど 7 品種で発現していたバリエント 2 (Leg_v2) は中発現型 (v2 は v1 の 1/8 程度)、低発現型の Leg_v3 は全ての品種で僅かに (v3 は v2 の 1/20 程度) 発現するバリエントであった⁷。さらに、36 および 37 アミノ酸からなる Leg_v1~v3 (計 6 種) の Leg 組換え体 (thioredoxin-6×His 標識) のうち Leg_v1_37 が、*in vitro* (培養細胞) 試験において強いインスリン様活性を示すことを見出した⁷。

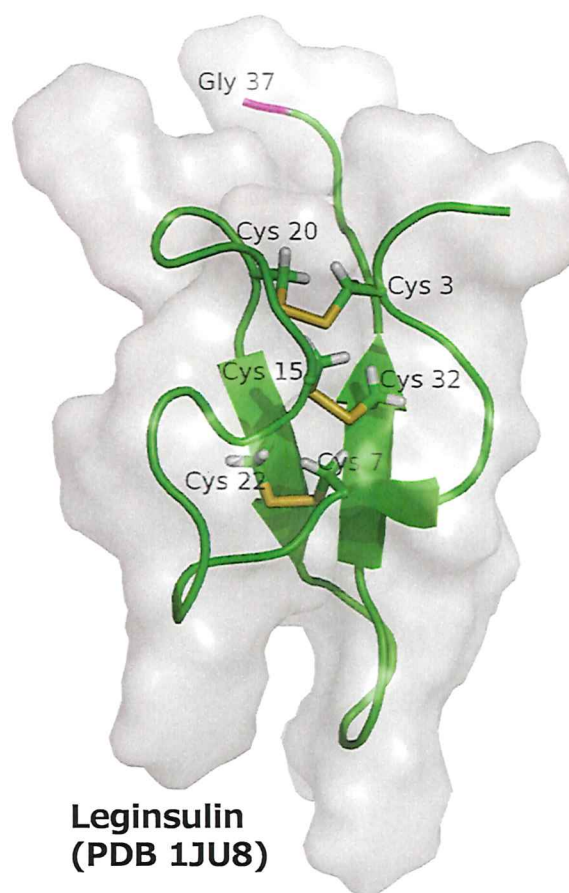


図 1 大豆ペプチドレグインスリンの立体構造 (PDB: 1JU8)

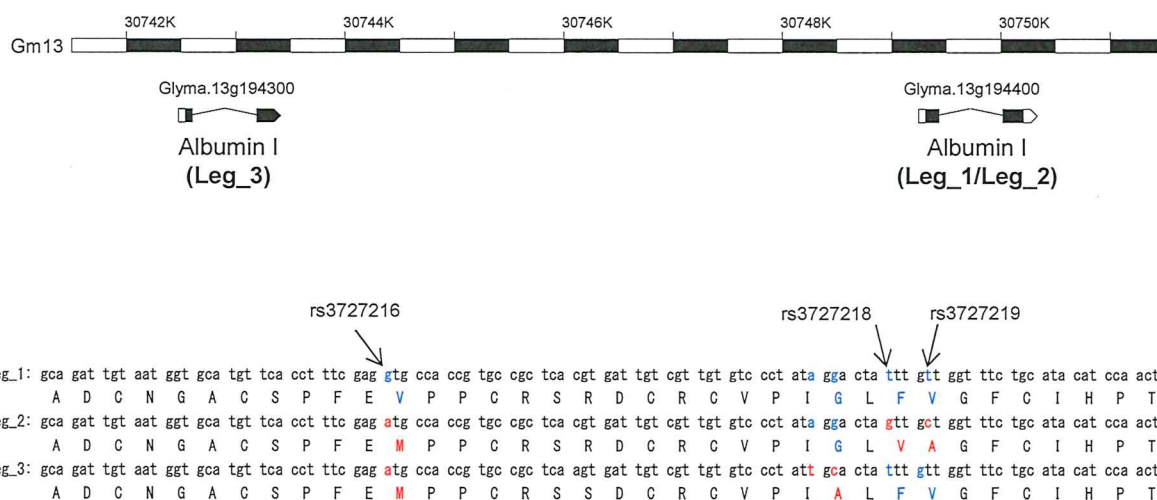


図2 Albumin 1 遺伝子およびレグインスリンバリエントの遺伝子・アミノ酸配列。アミノ酸置換を伴う non-synonymous SNPs(rs3727216、rs3727218、rs3727219)の位置を矢印で示す。

そこで本研究では、レグインスリンの生物活性を *in vivo* で評価することを目的とし、各レグインスリンバリエント組換え体の大量調製法を検討した。さらに実験動物への投与により、生体への吸収性やインスリン様作用を検討した。

【実験方法】

Leginsulin 組換え体の調製

レグインスリン各バリエントの36アミノ酸残基および37アミノ酸残基からなるペプチドは、化学的性質が似ているため各種クロマトグラフィーで分離することができない。それゆえ本研究では、それぞれのレグインスリンペプチド単体の活性を評価する目的で、組換え体の作成を試みた。Hanadaらの方法⁴に従いレグインスリン組換え体の調製を行った。エチゴミドリ1粒をドライアイスで冷却したアセトン溶液中で乳鉢を用いてホモジナイズしたのち、TRIzol 試薬を用いて total RNA を回収した。逆転写後、以下に示す primer でレグインスリン cDNA を PCR 法によって増幅し、制限酵素 (*NcoI/EcoRI*) で切断後、pET32a vector にクローニングした。挿入したインサートは PCR およびシーケンス法により確認した。

Primer; Forward primer: 5'-AACCATGGCTAAAGCAGATTGTAATGGTGCATGT-3'

Reverse primer (TRX-leg37): 5'-AAGAATTCTTATTATCCAGTTGGATGTATGCAGAA-3'

Reverse primer (TRX-leg36): 5'-AAGAATTCTTATTATCAAGTTGGATGTATGCAGAA-3'

pET32/leg_v1_36 および pET32/leg_v1_37 vector で形質転換した Origami (DE3) を 0.7 mM ITPG 存在下で培養し、thioredoxin (TRX) および His-tag 融合タンパク質 (TRX-leg_v1_36 および TRX-leg_v1_37) として発現誘導させ、超音波破碎により得られた可溶性画分を Ni-NTA カラムで TRX-leg_v1_36 および TRX-leg_v1_37 を精製した。

精製した組換え体は、lysyl endopeptidase (富士フィルム和光純薬株式会社) の処理により標識タグの除去を試みた。0.2 M AMP 緩衝液 (pH 9.5) 中で組換え体タンパク質 (μg) : 酵素 (μAU) を 10:1 で反応させ、Tricine SDS-PAGE にて酵素消化を確認した。

大豆粗抽出画分の調製とレグインスリンの精製

エンレイ(黄大豆:先行研究により leg_v1_37 と leg_v1_36 がほぼ等量含まれていることが確認されている)を破碎した大豆粉末に 3.0 g にヘキサン 30 ml を加えて一晩振とうし、脱脂した。試料を濾過し残渣を乾燥させ 70% エタノールを 25 ml 加え、6 時間振とうした。試料を濾過後 70%エタノール抽出液を回収し、濃縮遠心エバポレーターにより濃縮した。超純水を 5 ml 加え凍結乾燥により 70% エタノール抽出画分(粉末)を調製した。70%エタノール画分(粉末)を 1 mg/ml になるように 20%エタノールに溶解させ HPLC サンプルとした。HPLC(逆相カラム)を用いピークを見ながら、約 17.8 分~18.8 分を分取した(約 1 ml)。遠心エバポレーターにより濃縮、1 ml の超純水に溶解させソニケーションして凍結乾燥し、レグインスリン精製品とした。レグインスリン精製品の一部は、超純水に溶解し、UPLC-TOF-MS に供し、その純度を確認した。UPLC-TOF-MS システムは、Acquity™ UPLC (Waters, Milford, MA)および MicroQTOF II mass spectrometer (Bremen, Germany)を使用した。カラムは UPLC™ BEH C18 column (1.7 μm, 50 mm × 2.1 mm i.d., Waters)、カラム温度は 40°C、移動相 A (0.1% formic acid in water)および移動相 B (MeCN containing 0.1% formic acid)を用い、流速 0.4 ml/min、5%移動相 B (0-2 分)、90%移動相 B (13-16 分)のリニアグラジエント方式で分析を行った。イオン源は ESI、*m/z* 50-2500 のポジティブモードで検出を行い、キャリブレーション液 (Low concentration tuning mix, Agilent technologies, Palo Alto, CA)で精密 MS の補正を行った。

ラットへのレグインスリン経口投与によるインスリン様活性

動物実験は、静岡県立大学における動物実験に関する指針 (Guidelines for the care and use of laboratory animals of the University of Shizuoka) に従い静岡県立大学倫理委員会の承諾を得て行った。雄性 Wistar ラット(22 週齢)を 2 群(各 n=3)に分け、グルコース溶液(2g/kg 体重)と精製した Leg_v1_36+37(0.1 mg/kg 体重)を含むグルコース溶液をゾンデで胃内投与した。投与後経時的に尾静脈より採血し血糖値測定と血中レグインスリン測定を行った。血糖値は、ACUU-CHEK® Aviva および ACUU-CHEK® Aviva ストリップ F を用いて測定した。また、採取した血漿を 70%エタノール抽出で調製した試料を LC-MS に供し、外部標準法により血中レグインスリン濃度を算出した。

【実験結果および考察】

Leg_v1_37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysyl endopeptidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SDS (%)	-	0.1	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeCN (%)	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea (M)	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 20 (%)	-	-	-	-	-	1	0.1	0.01	-	-	-	-	-	-	-
Triton X-100 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.1	0.01	-	-	-	-
NP-40 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.1	0.01	-

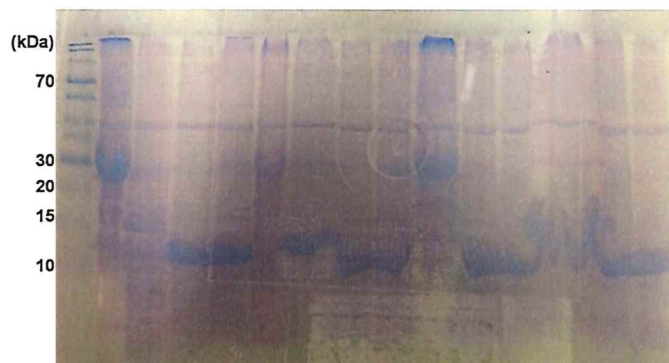


図3 各変性剤添加が TRX-leg_v1_37 の lysyl endopeptidase 消化へ及ぼす影響

上記に示す条件で変性剤を添加し、37°C で 24 時間反応後、Tricine SDS-PAGE により酵素消化を確認した。

予試験的に、21 kDa 付近に検出される TRX_leg_v1_37 のバンドを指標に添加する酵素量、反応温度、時間を検討し、酵素反応条件の最適化を行った。基質:酵素=10:1、37°C、24 時間の条件で、TRX_leg_v1_37 のバンドが十分に消化されることを確認した。しかし、消化物からは、12 kDa 程度のペプチドフラグメントが検出されるのみで、天然型の Leg_v1_37 は検出されなかった。酵素反応液への SDS 添加によって 12 kDa 程度のペプチドの消化が促進されたため、変性剤の添加による酵素消化への影響を検討した。図3が示すとおり、TRX_leg_v1_37 は、0.1% SDS 添加条件で十分な酵素消化を示す泳動パターンが得られた。一方、8M Urea や 1% Triton X-100 では酵素反応が阻害されており、それ以外の条件では 12 kDa 付近に検出されるペプチドフラグメントの十分な酵素消化が認められなかった。それゆえ 0.1% SDS 添加の条件で酵素処理した試料を、イオン交換カラムあるいは HPLC 逆相カラムなど様々な方法を用い精製を試みたが、操作途中で大部分を失ってしまい目的の天然型 Leg_v1_37 を十分量確保することができなかった。

それゆえ、大豆素材よりレグインスリンを抽出精製し、実験動物へ投与後、レグインスリンの生体利用率およびインスリン様活性を評価することとした。エンレイ(黄大豆)70%エタノール抽出画分(粉末)を 20%エタノールに溶解し、逆相カラムを用いた HPLC 精製を行った。分取したフラクションを LC-MS に供したところ、Leg_v1_36 および Leg_v1_37 を主要なピークとするクロマトグラムが得られたため、このフラクション(Leg_v1_36+37)を以降のレグインスリン標準品とし、以降の動物実験に使用した。

雄性 Wistar ラットに対してグルコース溶液あるいはレグインスリン(0.1 mg/kg 体重で投与)を含むグルコース溶液を用いた糖負荷試験を実施し、レグインスリンのインスリン様活性を評価した。その結果、レグインスリン(Leg_v1_36+37)の血中濃度は、レグインスリン非投与群で検出限界以下であり、投与群では投与後 30 分がピークで 81.9 ± 24.1 nM であった。糖負荷後の血糖値については、両群で顕著な差は認められなかったが、投与後 2 時間の血糖値がレグインスリン投与群で低値($p=0.11$)であった。

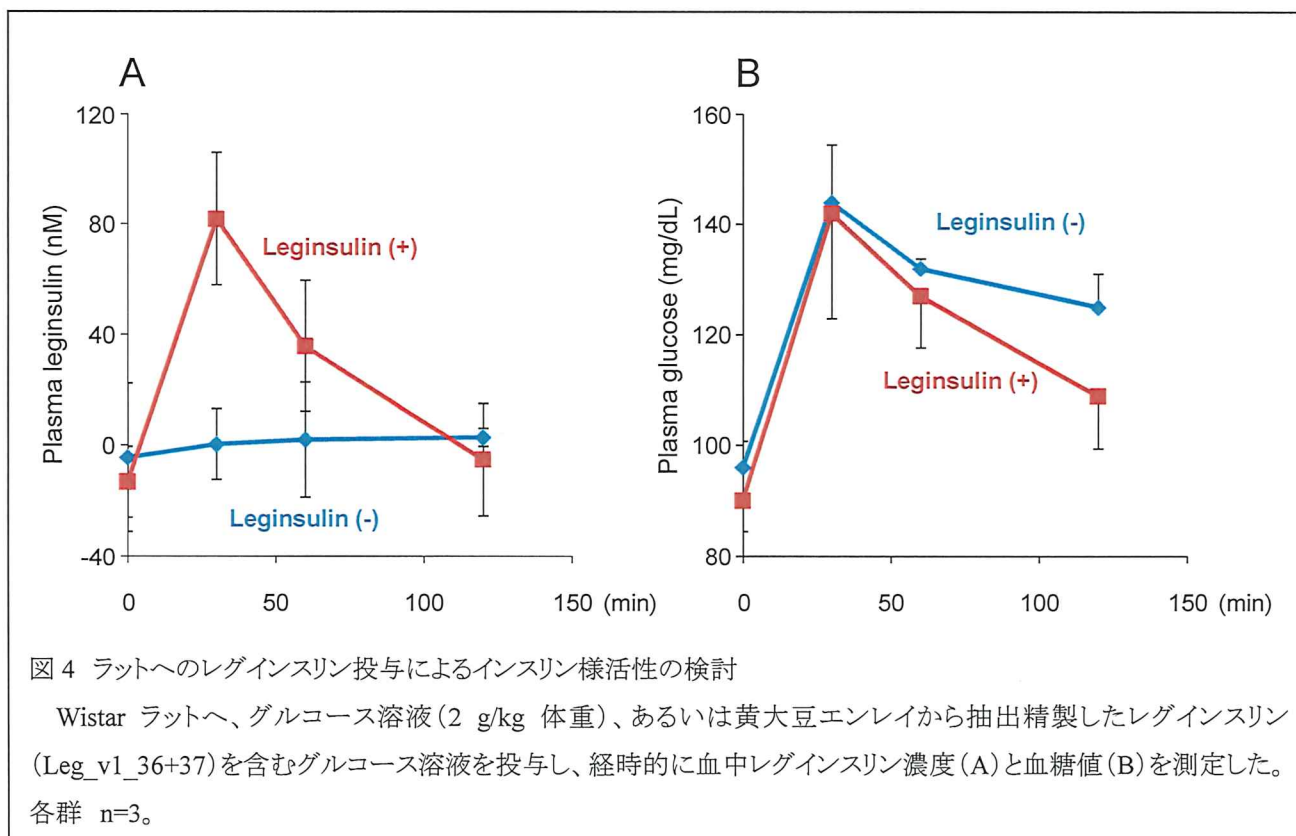


図4 ラットへのレグインスリン投与によるインスリン様活性の検討

Wistar ラットへ、グルコース溶液 (2 g/kg 体重)、あるいは黄大豆エンレイから抽出精製したレグインスリン (Leg_v1_36+37) を含むグルコース溶液を投与し、経時的に血中レグインスリン濃度 (A) と血糖値 (B) を測定した。各群 n=3。

【要約】

我々の最近の報告で、大腸菌タンパク質発現系で調製した TRX 標識レグインスリン組換体が、筋管様細胞に分化したマウス C2C12 細胞とラット L6 細胞において糖の取り込みを促進するインスリン様活性を示す可能性が示唆された⁷。そこで本研究では、大豆ホルモン様ペプチドレグインスリンの動物個体に対する生理活性を *in vivo* で評価する目的で、先行研究で使用してきた TRX 標識レグインスリン組換体の標識タグを除去し、天然型のレグインスリンを大量に調製することを試みた。レグインスリンにはリジン残基が存在せず、且つ TRX 標識レグインスリン組換体には天然型レグインスリン領域の直前にリジン残基を含む enterokinase 切断配列 (DDDDK) が仕込まれている。市販の enterokinase は高価であり大量調製には不向きである。そのため、lysyl endopeptidase による切断を試みた。しかし、目的の天然型レグインスリンを得ることができなかった。今後は、enterokinase の大量調製を検討し、レグインスリン各バリエーションの大量調製を検討する。

レグインスリン各バリエーションの大量調製が上手くいかなかったため、大豆 70%エタノール抽出画分より、Leg_v1_36 および Leg_v1_37 の両方を含むフラクション (Leg_v1_36+37) を精製した。精製した Leg_v1_36+37 はグルコースとともに実験動物へ投与し、糖負荷時のインスリン様作用を評価した。Leg_v1_36+37 の血中濃度は投与 30 分後をピークに約 80 nM に達した。糖負荷時の血中グルコース濃度は、Leg_v1_36+37 投与、非投与群で有意な差は認められなかったが、糖負荷 2 時間後の血糖値が Leg_v1_36+37 投与群で低値をしめした。今回の検討ではレグインスリン単回投与での影響を検討したが、今後持続的なレグインスリンの経口摂取が示すインスリン様作用の可能性について詳細に検討する必要がある。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。また実験を行うにあたり貴重な御助言および御協力を頂きました静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究所の橋詰力先生、河原崎泰昌先生、伊藤創平先生、中野祥吾先生、伊藤圭祐先生、実験を精力的に手伝っていただきました研究室の学生など(坂野太研さん、望月綾香さん、澤井大哉さん)に深く感謝します。

【参考文献】

- (1) Watanabe, Y.; Barbashov, S. F.; Komatsu, S.; Hemmings, A. M.; Miyagi, M.; Tsunasawa, S.; Hirano, H. A Peptide That Stimulates Phosphorylation of the Plant Insulin-Binding Protein. Isolation, Primary Structure and cDNA Cloning. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224* (1), 167–172.
- (2) Yamazaki, T.; Takaoka, M.; Katoh, E.; Hanada, K.; Sakita, M.; Sakata, K.; Nishiuchi, Y.; Hirano, H. A Possible Physiological Function and the Tertiary Structure of a 4-KDa Peptide in Legumes. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270* (6), 1269–1276.
- (3) Komatsu, S.; Koshio, O.; Hirano, H. Protein Kinase Activity and Insulin-Binding Activity in Plant Basic 7S Globulin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58* (9), 1705–1706.
<https://doi.org/10.1271/bbb.58.1705>.
- (4) Hanada, K.; Nishiuchi, Y.; Hirano, H. Amino Acid Residues on the Surface of Soybean 4-KDa Peptide Involved in the Interaction with Its Binding Protein. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270* (12), 2583–2592.
- (5) Dun, X.-P.; Wang, J.-H.; Chen, L.; Lu, J.; Li, F.-F.; Zhao, Y.-Y.; Cederlund, E.; Bryzgalova, G.; Efendic, S.; Jörnvall, H.; Chen, Z.-W.; Bergman, T. Activity of the Plant Peptide Aglycin in Mammalian Systems. *FEBS J.* **2007**, *274* (3), 751–759.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05619.x>.
- (6) Hancock, K. R.; Ealing, P. M.; White, D. W. Identification of Sulphur-Rich Proteins Which Resist Rumen Degradation and Are Hydrolysed Rapidly by Intestinal Proteases. *Br. J. Nutr.* **1994**, *72* (6), 855–863.
- (7) Hashidume, T.; Sakano, T.; Mochizuki, A.; Ito, K.; Ito, S.; Kawarasaki, Y.; Miyoshi, N. Identification of Soybean Peptide Leginsulin Variants in Different Cultivars and Their Insulin-like Activities. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 16847.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35331-5>.