

ダイズ由来のトリペプチドPhe-Leu-Valが

3T3-L1脂肪細胞株のミトコンドリア機能に与える影響

Effect of soy tripeptides, Phe-Leu-Val, on mitochondrial energy metabolism in 3T3-L1 adipocytes

長谷川 千織, 山口 瑞貴, 鬼海 智佳, 森田 秋穂, 田中 直子
大妻女子大学家政学部食物学科

Chiori Hasegawa, Mizuki Yamaguchi, Tomoka Oniumi, Akiho Morita, and Naoko Iida-Tanaka
Department of Food Science, Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8357 Japan

キーワード：ダイズトリペプチド (FLV), 脂肪細胞, ミトコンドリア
Key words : Soy peptide (FLV), Adipocyte, Mitochondria

抄録

タンパク質の消化産物であるペプチドの機能性が注目を集めている。本研究では、肥満性脂肪組織への抗炎症作用が報告されているダイズ由来のトリペプチド Phe-Leu-Val (FLV) に着目し、脂肪細胞のミトコンドリアへの影響を調べることによって、トリペプチド FLV の抗炎症作用の作用機序を解明すること、および脂肪細胞の炎症性変化におけるミトコンドリアの役割を明らかにすることを目的とした。

白色脂肪細胞モデルである 3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化誘導後、FLVを添加して分化誘導後30日目まで培養し、ミトコンドリアを蛍光染色して観察するとともにミトコンドリア関連タンパク質のmRNA発現量を定量した。FLVを添加して培養した細胞では、添加せずに培養したControl細胞と比較して脂肪滴の大きさやその形成過程には大きな違いが見られなかったが、ミトコンドリアの蛍光強度が高く、また脂肪滴の成熟・肥大にともなって観察されるミトコンドリアの分裂と細胞全体への分散が見られなかった。このことから、FLVの添加は、ミトコンドリアのエネルギー代謝を高く保つ効果があると考えられ、ミトコンドリアエネルギー代謝の低下を抑制することによって抗炎症作用を発揮している可能性が示唆された。

1. 序論

タンパク質の消化産物であるジペプチド、トリペプチドは腸管での吸収速度がアミノ酸よりも速く、ペプチドのまま血中に移行しさまざまな生理活性作用を示すことが近年注目を集めている。特にダイズタンパク質由来のペプチドには抗酸化作用、抗炎症作用などの報告があり、精力的に研究が進められている^[1-3]。

ダイズタンパク質 β -コングリシニン由来のトリペプチド Phe-Leu-Val (FLV) は、細胞内に取り込まれやすい芳香族脂肪酸を含むペプチドで、脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞に対する抗炎症作用が報告されている^[4,5]。我々はこれまで、3T3-L1 脂肪細胞において、ミトコンドリア機能低下が炎

症性サイトカインの分泌を誘引する可能性について報告している^[6]。

ミトコンドリアは、融合・分裂によってその形態を変化させながら、エネルギー代謝を制御し、細胞の炎症状態をも制御していると推測されていることから^[7]、本研究では、トリペプチド FLV が、分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞のミトコンドリア機能に与える影響について、形態変化、関連タンパク質の mRNA 発現量の変化から調べた。

2. 方法

2.1. 細胞培養

マウス胎仔由来線維芽細胞 3T3-L1 を 10% calf serum / 20mM HEPES / 100 μ g/ml Penicillin /

Streptomycin (PS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) を用いて 5%CO₂ 下, 37°C で培養した. Confluent まで培養後, 10% Fetal bovine serum (FBS) / 20mM HEPES / 100µg/ml PS / 10µg/ml Insulin / 2.5µM Dexamethasone / 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine を含む DMEM を用いて 2 日間培養し, 脂肪細胞への分化誘導を行った. その後 10% FBS / 20mM HEPES / 100µg/ml PS / 10µg/ml Insulin を含む DMEM で 4 日間, さらに 10% FBS / 20mM HEPES / 100µg/ml PS を含む DMEM (分化維持培地) で, 分化誘導後 18 日および 30 日目まで培養した. ペプチド FLV は 0, 1 または 10µM で分化誘導後 6 日目から分化維持培地に添加した.

2.2. 蛍光観察

ミトコンドリアを MitoTracker DeepRed-FM (励起波長 633nm, 観察波長 650-710nm), 脂肪滴を Nile Red (励起波長 543nm, 観察波長 561-615nm) でそれぞれ染色し, 高速走査型共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて撮像した. 得られたデータは LSM Image Browser (Carl Zeiss) で, 蛍光強度は Image-J で解析した.

2.3. mRNA の定量

細胞から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて Total RNA を抽出し, Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) を用いて cDNA に変換した. SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用い, QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) で, 電子伝達系を構成するシトクローム c オキシダーゼ (COX4i1), ATP 合成酵素 (ATP5f1), 脱共役タンパク質 1 (UCP1), ミトコンドリア膜融合に関わるタンパク質 OPA1 と Mfn2 の 5 つのタンパク質の mRNA の定量を行った. リファレンス遺伝子として β -actin を用いた.

2.4. 統計処理

蛍光強度は student の t 検定で, mRNA 発現量は ANOVA と Tukey の post hoc test により分析した.

3. 結果

3.1. ミトコンドリア状態変化の蛍光観察

脂肪細胞へ分化誘導を行った 3T3-L1 細胞に, 6 日後からペプチド FLV を 10µM 濃度で添加して培

養し, 分化誘導 18 日および 30 日後に, 脂肪滴とミトコンドリアの状態を FLV を添加しない Control 細胞と比較した (図 1).

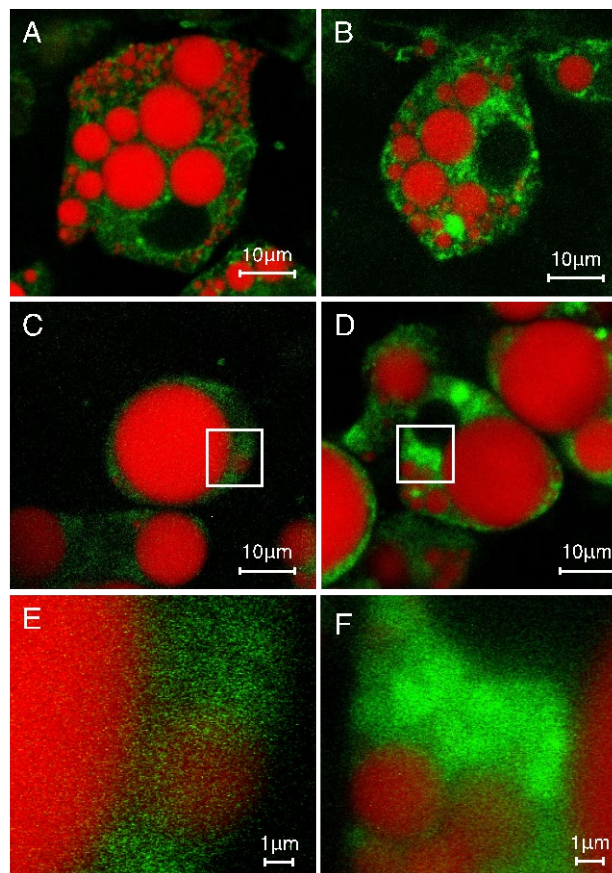


図 1. ミトコンドリアと脂肪滴の蛍光観察.

Control 細胞 (A, C, E) と FLV 処理細胞 (B, D, F) の様子を示した. 分化誘導後 6 日目から FLV を 10µM 濃度で添加して培養した分化誘導後 18 日目 (B) および 30 日目 (D, F) の細胞および Control 細胞について, MitoTracker DeepRed でミトコンドリア (緑), Nile Red で脂肪滴 (赤) を染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した. E, F は C, D の図中の口で囲った部分をそれぞれ拡大した.

脂肪滴の形態や形成の時間経過については, FLV 処理細胞と Control 細胞で大きな違いが見られなかった. 一方, ミトコンドリアは, FLV 処理細胞 (図 1B, D, F) では Control 細胞 (図 1A, C, E) と比較して, 蛍光強度が高く凝集しているように見える部分が細胞内に散見された. ミトコンドリアの形態については, 分化誘導後 18 日目の細胞

(図 1A, B) では大きな違いはみられなかったが、30 日目の細胞 (図 1C~F) では、FLV 処理細胞で Control 細胞と比較して融合が進んでいる様子が観察された。

ミトコンドリア領域の蛍光強度を比較したところ (図 2), FLV 処理細胞で Control 細胞に対して有意に増加していた。

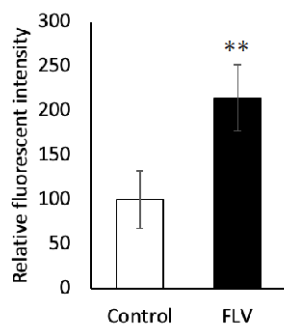


図 2. ミトコンドリア領域の蛍光強度.
分化誘導後 30 日目の細胞の MitoTracker DeepRed による蛍光画像から、ミトコンドリア領域 (Control, FLV 処理の各細胞についてそれぞれ n=50) の蛍光強度を比較した。

3.2. ミトコンドリア関連タンパク質の mRNA 発現量の定量

ミトコンドリアは、細胞内の状態を感知して独立に増殖することができ、また融合/分裂を行なってエネルギー産生効率を変化させることもできる。FLV 処理細胞でミトコンドリアの蛍光強度が高かったことから、ミトコンドリアにどのような変化があったのかを知る目的で、分化誘導後 30 日目の細胞のミトコンドリア関連タンパク質の mRNA 発現量を定量した (図 3)。

電子伝達系を構成する酵素である COX4i1 と ATP5f1 の mRNA 発現量には、FLV 処理による有意な変化は見られず、細胞内ミトコンドリア数には大きな変化がないことが示唆された。一方、ミトコンドリアの膜融合時に発現量が増加する OPA1 と Mfn2 の発現量は、10 μ M を添加した細胞で有意に低下していた。ミトコンドリアはエネルギー不足を感知して融合し、融合することによってエネルギー供給を増加させる。FLV 処理細胞では新たに融合を促すしくみが低下していることから、Control 細胞と比較して十分なエネルギー供給

がなされている可能性が示唆された。また、電子伝達系の ATP 合成を脱共役して ATP 合成量を減少させる UCP1 の発現量は、有意差はないものの減少する傾向にあり、ATP 合成量は増加傾向にあることが示唆された。

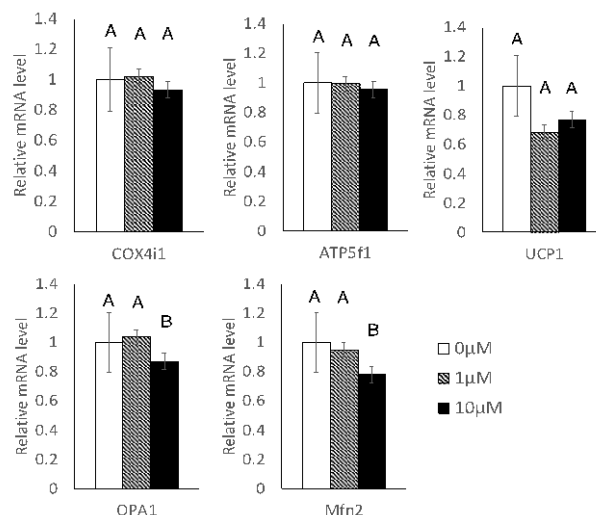


図 3. ミトコンドリア関連タンパク質の mRNA 発現量.
分化誘導後 6 日目から FLV を 0 μ M (□), 1 μ M (▨), 10 μ M (■) 濃度で添加して培養した分化誘導後 30 日目の細胞について、電子伝達系構成タンパク質 COX4i1, ATP5f1, 脱共役タンパク質 UCP1, ミトコンドリア融合関連タンパク質 OPA1, Mfn2 の mRNA 発現量を定量した。mRNA 発現量は Control 細胞に対する相対発現量として示した。異なるアルファベット間で p<0.05 で有意差あり。

4. 考察

本研究では、脂肪細胞への抗炎症作用が報告されているダイズ由来のトリペプチド Phe-Leu-Val (FLV) が、脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞のミトコンドリアに与える影響を調べた。蛍光画像から、FLV は脂肪細胞のミトコンドリアを融合させ、MitoTracker DeepRed の蛍光強度を増加させる変化を与えていることが明らかになった。

ミトコンドリアの蛍光強度が高いことから、①単位体積あたりのミトコンドリア数が増加している、あるいは、②ミトコンドリア融合によってミトコンドリアの局在に偏りが生じている、のいずれかの可能性が考えられた。また、ミトコンドリアの染色に使用した蛍光色素 MitoTracker

DeepRed は膜電位の影響を受けることから、③電子伝達系が活発になっている可能性も考えられた。

電子伝達系を構成する COX4i1, ATP5f1 の mRNA 発現量に変化が見られず、細胞全体からみてミトコンドリア数が増加している可能性 (①の可能性) が低いことから、ミトコンドリアの融合 (②の可能性) が進み細胞内での局在化が進んでいると考えられた。

一方、FLV 処理細胞では、エネルギー代謝も活発化している (③の可能性) と推測された。その根拠としては、ミトコンドリア膜電位の上昇を感知して蛍光強度が増加する MitoTracker DeepRed の蛍光強度が有意に増加していること、エネルギー不足を感知して新たなミトコンドリア融合を促すタンパク質 OPA1, Mfn2 の mRNA 発現量が有意に低下していること、電子伝達系の ATP 合成を脱共役して ATP 合成量を低下させるタンパク質 UCP1 の発現量が、有意差はないものの減少する傾向にあることなどが挙げられる。

脂肪細胞の肥大化は、脂肪細胞で合成される炎症性サイトカインの発現量を増加させる^[8]。このような脂肪細胞の炎症性変化は、血流を介して全身の器官に影響を与えて、インスリン抵抗性や高血圧といったいわゆるメタボリックシンドロームを引き起こすことが知られている。本研究の 3T3-L1 細胞 (Control 細胞) では、分化誘導後 18 日目 (図 1A) から 30 日目 (図 1C) にかけて、脂肪滴の肥大にともなってミトコンドリアの蛍光強度が低下するとともに、ミトコンドリアが分裂して細胞全体に分散する様子が観察され、脂肪細胞の肥大化と炎症性変化の際に、ミトコンドリアエネルギー代謝の低下が起こっていることが確認できる。これに対して FLV 処理細胞では、18 日目 (図 1B) から 30 日目 (図 1D) で脂肪滴は順調に肥大しているにもかかわらずミトコンドリアの様子に大きな違いが見られなかった。FLV の示す抗炎症作用は、脂肪細胞の肥大を抑制するのではなく、肥大に伴うミトコンドリア代謝の低下を抑制することによって発揮されている可能性が考えられた。

脂肪滴の肥大とミトコンドリアエネルギー代謝の低下、そして炎症性サイトカインの発現量増加へとつながる一連の流れの解明は、メタボリックシンドロームの発症のメカニズムの解明およびその予防法の開発に重要であると考えられ、今後のさらなる進展が期待される。

付記

本研究は、大妻女子大学人間文化研究所の大学院研究助成 (A) 研究助成 (DA2105)、大妻女子大学戦略的個人研究費 (S20523, S2117) を受けたものである。

引用文献

- [1] Daniel H., Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol*. 2004, 66, p.361-834.
- [2] Cynthia C *et al.* Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients*. 2018, 10, p.1211-1226.
- [3] Il-Sup K *et al.* Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, p.8570-8592.
- [4] Kwak S-J *et al.* Soy Tri-Peptide FLV and Obesity-Related Adipose Anti-Inflammation. *Soy Protein Research*, 2015, 18, p.74-81.
- [5] Mine Y *et al.* The Soy Peptide Phe-Leu-Val Reduces TNF α -Induced Inflammatory Response and Insulin Resistance in Adipocytes. *J. Med. Food*, 2016, 19, p. 678-685.
- [6] Hasegawa C *et al.* Mitochondrial dysfunction causes inflammatory changes in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Hum. Cult Stud*. 2021, 31, p.10-13.
- [7] Qingzhang Z *et al.* Mitochondrial Regulation and White Adipose Tissue. *Trends Cell Biol*. 2022, 32, p.351-364.
- [8] Tatsuo K *et al.* Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021, 320, p.375-391.

Abstract

Peptides, which are products of protein digestion, have been reported to have various functions in recent years. In this study, we focused on the tripeptide Phe-Leu-Val derived from soybean proteins, which has been reported to have an anti-inflammatory effect on obese adipose tissue, and investigated its effect on mitochondria in 3T3-L1 adipocytes to clarify the mechanism of the tripeptide Phe-Leu-Val anti-inflammatory effect and the role of mitochondria in inflammatory changes in adipocytes.

The 3T3-L1 cells, which are the model of white adipocytes, were cultured in 0~10 μ M of Phe-Leu-Val until 30th days after adipogenesis. The lipid droplets and mitochondria in the cells were observed by fluorescent microscopic analysis and the mRNA expression of mitochondria-related proteins was measured. There was no significant difference in the size of lipid droplets and their formation process in Phe-Leu-Val-treated cells compared to control cells cultured without Phe-Leu-Val. On the contrary, the fluorescence intensity of mitochondria in the Phe-Leu-Val-treated cells was higher than the control cells, and mitochondrial division and dispersion throughout whole cells observed with the maturation of lipid droplets in the control cells, were not observed in the Phe-Leu-Val-treated cells. These results suggest that Phe-Leu-Val may have the effect of maintaining high mitochondrial energy metabolism, and may exert its anti-inflammatory effect by suppressing mitochondrial energy metabolism.

(受付日：2023年6月15日，受理日：2023年9月15日)

長谷川 千織 (はせがわ ちおり)

現職：大妻女子大学家政学部食物学科助手

大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程修了。

専門は栄養生化学および細胞生物学。大学院在学中より一貫して脂肪細胞の炎症性変化とミトコンドリアの関係を研究している。