

# 消化管を標的とする食品由来の新規血圧降下分子に関する研究

大日向 耕作

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻食品生理機能学分野

**概要** 【目的】 消化管は、外部環境(管腔内)と内部環境(体内)を分けるインターフェースであり、病原体や異物の侵入を防ぐとともに、栄養素を消化し体内に吸収する役割を担う。さらに、消化管は、管腔内の情報を受容し、その情報を体内に伝達し、循環器系、内分泌系や神経系など種々の調節系と相互作用することが明らかになってきている。しかしながら、食品摂取により消化管内で生成する分子種は膨大であり、その受容機構の詳細は不明であった。これまで我々は消化管が受容する分子を体系的に検討するため、ジペプチドライブラリー(338 種)を用いて腸内分泌細胞に対する応答性を検討したところ、Phe-Trp (FW) が最も強力な反応性を示すことを発見した。さらに、食品タンパク質の酵素消化により生成するペプチドの中に FW 配列を含むものを見出した。本研究では、FW 配列を含むペプチドの循環器系に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】 一次構造中に FW 配列を含む食品タンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)に着目した。BSA のズブチリシン消化物を SHR に経口投与したところ有意な血圧降下作用が認められた。ズブチリシン消化物に含まれる FW 配列を含むペプチドを探索したところ、5 残基ペプチドが存在することが判明した。さらに、本ペプチドを化学合成し、その動脈弛緩活性を検討した。その結果、動脈弛緩活性を示すことが明らかとなった。本ペプチドの動脈弛緩作用は、プロスタグランジン合成酵素阻害剤(indomethacin)で阻害されなかった。一方、コレシストキニン(CCK)の阻害剤でブロックされることが明らかとなった。CCK は消化管ホルモンとして知られ、血圧降下作用を仲介することが判明している。そこで、本ペプチドの血圧降下作用を検討し、経口投与で強力な血圧降下作用を示すことが判明した。最小有効量は 0.005 mg/kg であり、これまで発見された食品由来ペプチドとしては最も強力な作用を示すことが明らかとなった。また、投与 24 時間後においても血圧降下作用が認められることから、低用量で、かつ、持続的な血圧降下作用を示すものと考えられる。

## 1. 研究目的

消化管は、外部環境(管腔内)と内部環境(体内)を分けるインターフェースであり、病原体や異物の侵入を防ぐとともに、栄養素を消化し体内に吸収する役割を担う。さらに、消化管は、管腔内の情報を受容し、その情報を体内に伝達し、循環器系、内分泌系や神経系など種々の調節系と相互作用することが明らかになってきている。しかしながら、食品摂取により消化管内で生成する分子種は膨大であり、その受容機構の詳細は不明であった。これまで我々は消化管が受容する分子を体系的に検討するため、338 種のジペプチドライブラリーを用いて腸内分泌細胞に

対する応答性を検討したところ、Phe-Trp (FW) が最も強力な反応性を示すことを発見した。さらに、食品タンパク質の酵素消化により生成するペプチドの中に FW 配列を含むものを見出した。本研究では、FW 配列を含むペプチドの循環器系に及ぼす影響について検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 高血圧自然発症ラット(SHR)

実験動物は雄性の高血圧自然発症ラット(SHRs/Izm)を使用した<sup>1-6)</sup>。室温 23±1℃、湿度 50%、12 時間/12 時間の明暗サイクルの条件で飼育した。船橋 SP(船橋農場)と

水を自由摂取させた。

## 2. 2 動脈弛緩活性の評価

麻酔下で SHR の腸間膜動脈を摘出し螺旋状に切開して標本を作成した<sup>[1-6]</sup>。マグヌス管中 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub> 混合ガスを飽和させた 37 °C の Krebs-Henseleit 溶液 (120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Glucose) を入れ、その溶液中に動脈標本を懸垂し張力変化を歪みトランスデューサーで検出した。予め血管収縮剤のフェニレフリン (PE) で収縮させ安定したところで、サンプルを添加し、その後の張力変化を測定した。最後に、平滑筋弛緩剤のパパベリン (Pa) を添加し動脈を完全に弛緩させ弛緩率を計算した。

## 2. 3 Tail-cuff 法による血圧測定

覚醒下の SHR を用いて収縮期血圧を Tail-cuff 法 (MK-2000ST, 室町機械) で測定した<sup>[1-6]</sup>。12 週齢から約 3 週間 Tail-cuff 装置でトレーニングをした SHR を血圧測定に使用した。なお、サンプルは生理食塩水に溶解しゾンデを用いて強制的に経口投与し、経時的に血圧を測定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 ウシ血清アルブミン (BSA) の酵素消化物は血圧降下作用を示す

一次構造中に FW 配列を含む食品タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) に着目した (図1)。BSA のズブチリシン消化物を SHR に経口投与したところ有意な血圧降下作用が認められた (図2)。したがって、血圧降下作用を示すペプチドフラグメントが酵素消化物中に存在することが推定される。

### 3. 2 BSA の酵素消化により FW 配列を含むペプチドが生成する

ズブチリシン消化物中に含まれる FW 配列を含むペプチドを探索した。その結果、5 残基の KFWGK が存在することが判明した。さらに、本ペプチドを化学合成し、その動脈弛緩活性を検討した。その結果、動脈弛緩活性を示すことが明らかとなった。本ペプチドの動脈弛緩作用は、コレシストキニン (CCK) の阻害剤でブロックされることが明らかとなった (図3)。CCK は消化管ホルモンとして知られ、血圧降下作用を仲介することが判明している。そこで、本

ペプチドの血圧降下作用を検討した。



図1. ウシ血清アルブミン (BSA) の一次構造

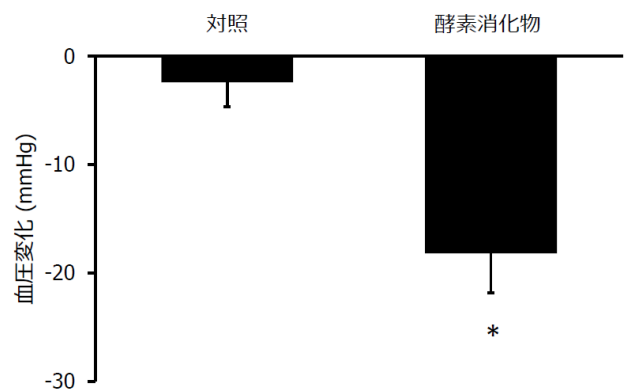


図2. 高血圧自然発症ラット (SHR) における BSA 酵素消化物の経口投与による血圧降下作用。酵素消化物 (50 mg/kg) の経口投与後 4 時間目の血圧変化。値は平均値 ± 標準誤差 (n=10), \*P < 0.05 vs 対照群。

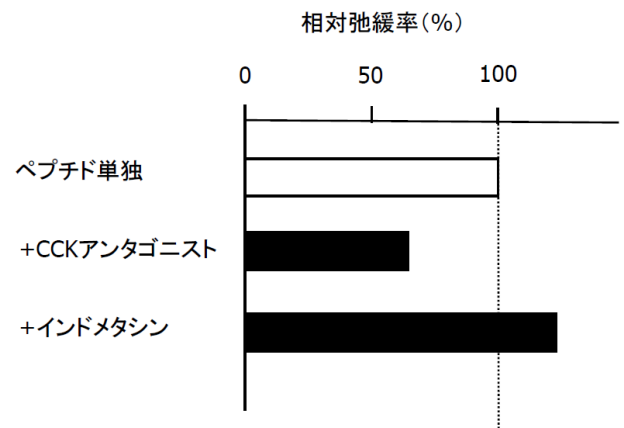


図3. BSA 由来の 5 残基ペプチド KFWGK の動脈弛緩メカニズム。ペプチド単独 (10 uM) 添加による動脈弛緩作用は、COX 阻害剤の indomethacin (3 uM) では阻害されなかったが、CCK アンタゴニストの lorglumide (10 uM) により阻害された (n=1)。

### 3. 3 FW 配列を有する5残基ペプチドは強力な血圧降下作用を示す

KFWGK の血圧降下作用を検討した。その結果、本ペプチドは経口投与で強力な血圧降下作用を示すことが判明した(図4)。最小有効量は 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、これまで発見された食品由来ペプチドとしては最も強力な作用を示すことが明らかとなった。また、投与 24 時間後においても血圧降下作用が認められることから、低用量で、かつ、持続的な血圧降下作用を示すものと考えられる。

### 3. 4 強力な血圧降下作用は CCK 系を介する

本ペプチドの血圧降下作用は CCK アンタゴニストの lorglumide で阻害されることから CCK 系の活性化を介して血圧降下作用を示すものと考えられる(図5)。動脈弛緩作用が同じアンタゴニストの lorglumide で阻害される実験結果と一致していた。以上、CCK 系を活性化する 5 残基の新規ペプチドを BSA の酵素消化物から見出した(図6)。

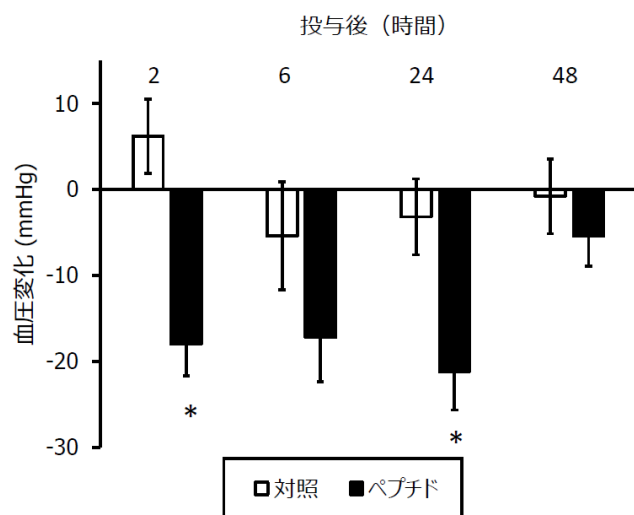


図4. 5 残基ペプチドの経口投与による血圧降下作用。5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の経口投与により強力な血圧降下作用を示し、その効果は 24 時間目まで持続した。値は平均値±標準誤差 (n=5), \*P < 0.05 vs 対照群。

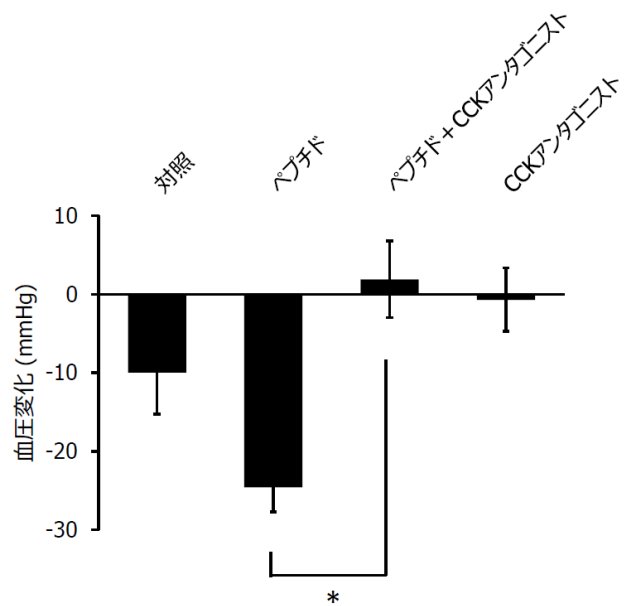


図5. 5 残基ペプチドの血圧降下作用に及ぼす CCK アンタゴニストの影響。ペプチド 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の血圧降下作用は CCK アンタゴニストの lorglumide (1  $\text{mg}/\text{kg}$ ) により阻害された。値は平均値±標準誤差 (n=7-8), \*P < 0.05 vs 対照群。

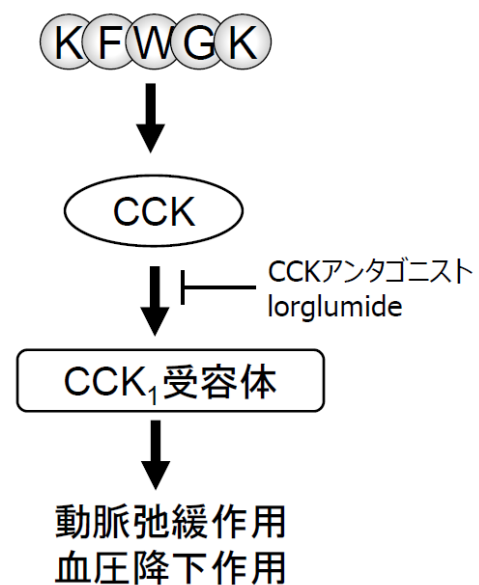


図6. 予想される BSA 由来の 5 残基ペプチドの作用機構

#### 4. 考察

高血圧は虚血性心疾患や脳梗塞など命に関わる疾患のリスクを上昇させることから「サイレントキラー」と呼ばれ、これを予防・治療することが期待されている。実際、様々な血圧調節システムに作用する血圧降下物質が見出され応用されている。重要な血圧調節システムとして知られるレニン-アンジオテンシン系を標的とした血圧降下物質は数多く存在する<sup>[7]</sup>。これまで食品タンパク質の酵素消化物から、血圧上昇作用を有するアンジオテンシンIIの生成を抑制するアンジオテンシンI変換酵素(ACE)を阻害する生理活性ペプチドが発見され機能性食品の素材として数多く活用されている<sup>[7-9]</sup>。加えて、動脈弛緩作用を示すペプチドが血圧降下作用を示す例も少なくない<sup>[1-9]</sup>。さらに最近、腸管を標的として血圧降下作用を示す例が新たに発見されている<sup>[5,6]</sup>。腸管を標的とする血圧降下ペプチドの主要なメディエーターはCCKである。本研究で新たに発見した5残基ペプチドもCCKを介した動脈弛緩作用を示すとともに、腸内分泌細胞のCCK分泌を促進することから、作用点が血管と消化管の両方に存在するものと考えられる。特に経口投与で強力な生理作用を示すことから消化管が中心的な作用点と考えられる。

#### 5. 今後の展望

19世紀の医学者William Oslerは「ヒトは血管とともに老いる」と指摘している。実際、血管のしなやかさが失われ血圧が上昇し各種疾患リスクが上昇することが知られている。加齢ラットにおける動脈弛緩反応は低下するが、特に、

NOを介して動脈弛緩作用を示すペプチドは、加齢により顕著に動脈弛緩反応が減弱する。一方、加齢ラットにおいてもCCKを介して動脈弛緩作用を示すペプチドの反応性は低下しないことが明らかとなった。すなわち、CCK系を活性化する血圧降下ペプチドは加齢により反応性が低下した動物個体においても効果的に血圧降下作用を示すことが期待される。そこで、ジペプチドライブラリーを用いてCCK分泌細胞の活性化能を体系的かつ包括的に検討したところFWが最も強力にCCK系を活性化することが判明した<sup>[6]</sup>。今回、このFW配列に着目しCCK系を活性化し強力な血圧降下作用を示す生理活性ペプチドを新たに発見した。最初にCCKを介した血圧降下ジペプチドとして報告したRFの最小有効用量は、15 mg/kgであった<sup>[4]</sup>、FWの最小有効量は1.5 mg/kgである<sup>[6]</sup>。さらに、今回の見出した5残基ペプチドは5 ug/kgであり、最初に見出したRFの1/3,000の用量で血圧降下作用を示し、かつ、持続的な作用を示す(表1)。しかも、CCK系を活性化するため、一部の血圧降下物質が効果を示しにくい加齢ラットにおいても効果を示すことが期待できる。また、ジペプチドよりも分子量が大きな5残基ペプチドのほうが経口投与ではるかに強い生理活性を示すことから吸収を前提としない作用機構の寄与が少なくないと考えられる。

先進国のなかで高齢化の先頭を走る我が国で、超高齢社会に適応した高機能食品を開発することができれば世界をリードすることができる。また、食と腸管の相互作用研究は独創性が高く波及効果も大きいことから今後の更なる発展が期待される。

表1. CCK系を活性化するペプチドの血圧降下作用の比較

	RF	FW	KFWGK
ライブラリーサイズ	20	338	
血圧降下作用			
最小有効量 (mg/kg)	15	1.5	0.005
持続時間(時間)	2	6	24
参考文献	Kagebayashi et al Mol Nutr Food Res 2012	Sasai et al BBRC 2018	

## 6. 文献等

- [1] Matoba N, Usui H, Fujita H, Yoshikawa M. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett.* 1999;452(3):181-4.
- [2] Yamada Y, Iwasaki M, Usui H, Ohinata K, Marczak ED, Lipkowski AW, Yoshikawa M. Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK<sub>1</sub> receptor. *Peptides.* 2010;31(5):909-14.
- [3] Zhao H, Usui H, Ohinata K, Yoshikawa M. Met-Arg-Trp derived from Rubisco lowers blood pressure via prostaglandin D<sub>2</sub>-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides.* 2008;29(3):345-9.
- [4] Kagebayashi T, Kontani N, Yamada Y, Mizushige T, Arai T, Kino K, Ohinata K. Novel CCK-dependent vasorelaxing dipeptide, Arg-Phe, decreases blood pressure and food intake in rodents. *Mol Nutr Food Res.* 2012 Sep;56(9):1456-63.
- [5] Kontani N, Omae R, Kagebayashi T, Kaneko K, Yamada Y, Mizushige T, Kanamoto R, Ohinata K. Characterization of Ile-His-Arg-Phe, a novel rice-derived vasorelaxing peptide with hypotensive and anorexigenic activities. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Feb;58(2):359-64.
- [6] Sasai M, Sun X, Okuda C, Nakato J, Kanamoto R, Ohinata K. Orally active anti-hypertensive peptides found based on enteroendocrine cell responses to a dipeptide library. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Sep 5;503(2):1070-1074.
- [7] News Letter in press
- [8] Shobako N, Ogawa Y, Ishikado A, Harada K, Kobayashi E, Suido H, Kusakari T, Maeda M, Suwa M, Matsumoto M, Kanamoto R, Ohinata K. A Novel Antihypertensive Peptide Identified in Thermolysin-Digested Rice Bran. *Mol Nutr Food Res.* 2018 Feb;62(4).
- [9] Shobako N, Ishikado A, Ogawa Y, Sono Y, Kusakari T, Suwa M, Matsumoto M, Ohinata K. Vasorelaxant and Antihypertensive Effects That Are Dependent on the Endothelial NO System Exhibited by Rice Bran-Derived Tripeptide. *J Agric Food Chem.* 2019 Feb 6;67(5):1437-1442.

## Study on Novel Food-Derived Antihypertensive Molecules Acting on the Gastrointestinal Tract

Kousaku Ohinata

Division of Food Science and biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

### Summary

The gastrointestinal tract, an interface between external and internal milieu, defends against pathogens and potentially injurious chemicals, and absorbs nutrients. It is also known that the gut senses ingested ruminal contents and the gut-derived signal is conveyed to the central nervous system (CNS) via neuronal or hormonal pathways. We found that Phe-Trp (FW), induced the most potent enteroendocrine cell responses out of total 338 dipeptides. In this study, we investigated effect of food protein-derived peptide with FW sequence on the cardiovascular system.

A pentapeptide with FW sequence, which was effectively produced by enzymatic digestion of bovine serum albumin, decreased blood pressure after oral administration in spontaneously hypertensive rats (SHRs). The pentapeptide exhibited vasorelaxing activity isolated from mesenteric artery of SHRs. Nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) are known to be vasorelaxing factors; however, the vasorelaxing activity was inhibited by neither *NG*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a NO synthase inhibitor, nor indomethacin, a COX inhibitor. Interestingly, this activity was blocked by lorglumide, an antagonist of the cholecystokinin (CCK)<sub>1</sub> receptor; It stimulated cholecystokinin (CCK) secretion in the enteroendocrine cells and exhibited vasorelaxing and antihypertensive effects via the CCK1 system. Taken together, a novel CCK-dependent vasorelaxing pentapeptide decreases blood pressure in SHRs.