

食品タンパク質由来の新しい動脈弛緩ペプチドとその生理作用に関する研究

大日向 耕作

京都大学大学院農学研究科

概要 【目的】 食品タンパク質の酵素消化による生産法に加え、近年、L-アミノ酸リガーゼ(Lal)を用いた効率的生産法が開発されたジペプチドの生理機能を評価した。その結果、強力な動脈弛緩ペプチドを見出し、さらに、その作用機構を検討した。

【方法・結果】 高血圧自然発症ラット(SHR)の摘出腸間膜動脈を用いて、ArgをN末端、芳香族アミノ酸をC末端に持つジペプチドが内皮依存性の動脈弛緩作用を示すことを発見した。この中でRFは最も強い動脈弛緩作用($EC_{50}=0.58 \mu M$)を示し、従来の食品由来動脈弛緩ペプチドよりも強力であった。なお、RFにはACE阻害活性は認められなかった。RFの動脈弛緩作用は、NO合成酵素阻害剤のL-NAMEおよびCOX阻害剤のindomethacinでは阻害されなかったが、コレシストキニン(CCK)₁受容体アンタゴニストのlorglumideによりブロックされた。さらに、RFはSHRへの経口投与で血圧降下作用を示し、この血圧降下作用もlorglumideで阻害された。RFはCCK受容体に親和性を示さないことから、RFの血圧降下作用にはCCK遊離およびCCK₁受容体の活性化を介した動脈弛緩が関与していることが判明した。なお、Lalを用いて合成したRFも動脈弛緩作用を示すことがわかった。

1. 研究目的

最近、我々はジペプチドArg-Phe(RF)が従来の食品由来の動脈弛緩ペプチドよりも強力な活性を示すことを見出した($EC_{50}=580 \text{ nM}$)。このRF配列はコメやダイズタンパク質などの種子貯蔵タンパク質の一次構造中に存在するとともに、実際に消化管酵素で処理することによりRF自身やRF配列を含む低分子ペプチドが生成する。さらに本研究ではRFの動脈弛緩および血圧降下機構を詳細に検討した。

2. 研究方法

2.1 高血圧自然発症ラット(SHRs)

実験動物として高血圧自然発症ラット(SHRs/Izm, ♂, SLC)を使用した。飼育条件は、室温 $23 \pm 1^\circ C$ 、湿度 50%、12時間/12時間の明暗サイクルとした。固形飼料SP(船橋)と水と自由摂取させた。

2.2 動脈弛緩実験(図1)

SHR(15-23週齢)の腸間膜動脈を摘出し、螺旋状に切

開した組織標本を使用した^[1-3]。Krebs-Henseleit 栄養液(120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, 37°C, O₂/CO₂ 混合ガス飽和)の中で、この標本を懸垂し、張力変化を歪みトランスデューサーで測定した。血管標本を予めフェニレフリン(血管収縮剤)で収縮させ、安定した後に、ペプチドサンプルを添加し張力変化を観察した。

2.3 血圧測定(tail-cuff法)

無麻酔状態のSHR(20-27週齢)の収縮期血圧を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。ペプチドサンプルは、生理食塩水に溶解し、胃ゾンデを用いて強制的に経口投与した。血圧測定は、投与直前および2、4時間後に行った。また、アンタゴニストはサンプル投与直前に腹腔内投与した。

3. 研究結果

3.1 RFは強力な動脈弛緩作用を示す

SHR の摘出腸間膜動脈を用いてペプチドサンプルの反応性を検討したところ、ジペプチド Arg-Phe (RF) が動脈弛緩作用を示すことがわかった(図1)。RF は 30 nM から有意な動脈弛緩反応を示し、用量依存的な反応が観察された(図2)。さらに、RF の動脈弛緩作用のEC₅₀は580 nMであり、従来の食品タンパク質由来の動脈弛緩ペプチドよりも強力であった。なお、本実験条件では、RF の構成アミノ酸であるアルギニンやフェニルアラニンに動脈弛緩活性が認められなかった。したがって、アミノ酸としてではなくジペプチドとして強力な動脈弛緩作用を示していると考えられる。また、RF のレトロ体である Phe-Arg (FR)には動脈

弛緩活性が全く認められず、RF というアミノ酸配列が活性に重要であることが判明した。ちなみに、RF のN末端およびC末端をアラニンに置換したAFおよびRAは、いずれも動脈弛緩作用を全く示さなかった。以上、RF の強力な動脈弛緩作用にはアルギニンとフェニルアラニンの両方のアミノ酸が必須で、かつ、RF というジペプチド配列が活性に重要であることが明らかとなった。

3. 2 RF の新しい動脈弛緩機構

従来、動脈弛緩因子として一酸化窒素(NO)やプロスタグランジン(PG)I₂が知られているが^[4]、RF の動脈弛緩作用はNO合成酵素やシクロオキシゲナーゼの阻害剤で

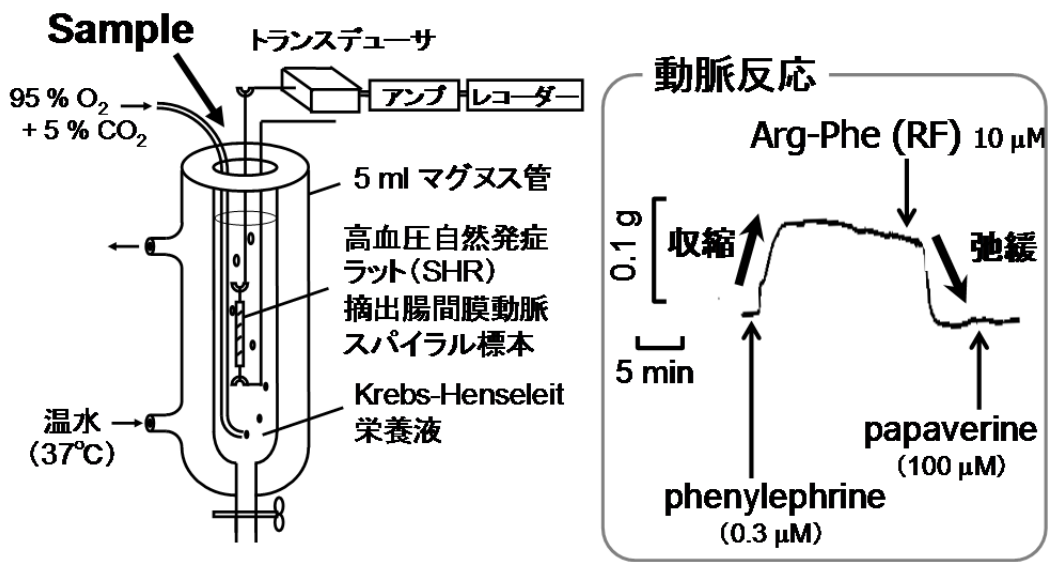


図1. 動脈弛緩実験法。麻酔下 SHR の腸管膜動脈を摘出、スパイラルにカットした標本の張力変化を測定(左)。動脈標本に Phenylephrine を添加し収縮、安定した後に、ペプチドサンプルを添加した。右は、Arg-Phe (RF) 添加による典型的な動脈弛緩反応。

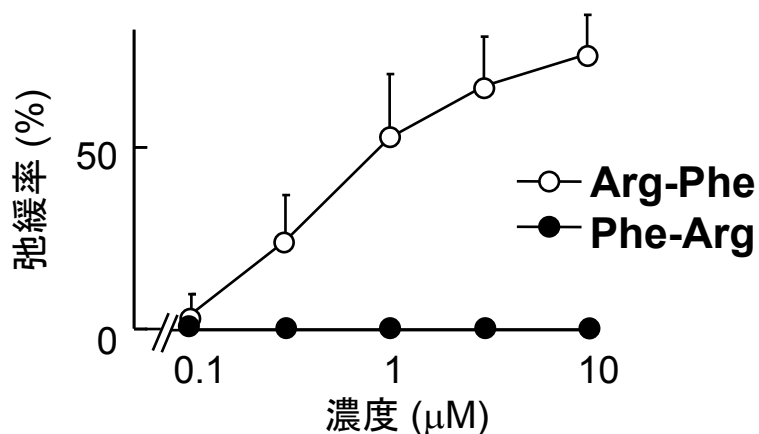


図2. ジペプチド Arg-Phe の動脈弛緩作用の用量依存性。Mean ± SEM (n=3-5)。

ロックされなかった(図 3)。したがって、RF は従来の動脈弛緩機構とは全く異なる作用機構を有することが明らかとなった。

コレシストキニン(CCK)は食後の飽満因子(satiety factor)として知られる。RFの動脈弛緩作用がCCKを介するかを否かをCCK₁受容体アンタゴニスト lorglumide を用いて検討した。その結果、RFの動脈弛緩作用は lorglumide で阻害されることを見出した(図 3)。しかしながら、RF自身はCCK₁およびCCK₂受容体に親和性を示さなかった。したがって、RFはCCK遊離-CCK₁受容体活性化による新しい動脈弛緩機構を介することが判明した。

3.3 RFの血圧降下作用はCCKを介する

RFの動脈弛緩作用がCCK遊離-CCK₁受容体活性化を介することから、RFの血圧降下作用が同様の作用機構を介するかCCK₁受容体アンタゴニスト lorglumide を用いて検討した。RFの経口投与による血圧降下作用は lorglumide 腹腔内投与により完全に阻害された(図 4)。したがって、RFの血圧降下作用はCCK₁受容体活性化を介することが明らかとなった。この作用機構はRFの動脈弛緩機構と一致することから、主に動脈弛緩作用が血圧降下に寄与しているものと考えられる。

4. 考察

これまでにジペプチドを含む数多くの生理活性ペプチドが食品タンパク質の酵素分解物から単離されたが^[5-8]、近年、L-アミノ酸リガーゼ(Lal)を用いた効率的なジペプチド生成法が確立し^[9,10]、その機能性が注目されている。我々は、ジペプチドRFが強力な動脈弛緩作用を示すことを見出した。卵白アルブミン由来 ovokinin(2-7)や菜種ナピン由来の rapakinin、緑葉タンパク質由来 rubimetide など、これまで報告された食品タンパク質由来の動脈弛緩ペプチドよりも強力な動脈弛緩作用であった^[1-3]。RFの動脈弛緩作用および血圧降下作用はCCK₁受容体アンタゴニストにより阻害されるが、CCK₁受容体に親和性を示さないことから、CCK遊離促進およびCCK₁受容体の活性化を介するものと考えられる(図 5)。興味深いことに、動脈弛緩因子として知られるNOやPGI₂系とは全く異なる作用経路である。動脈弛緩作用を仲介するCCKシステムがどの部分に存在するかは、現在のところ不明である。RFの動脈弛緩作用は内皮除去によりわずかに減弱する傾向が認め

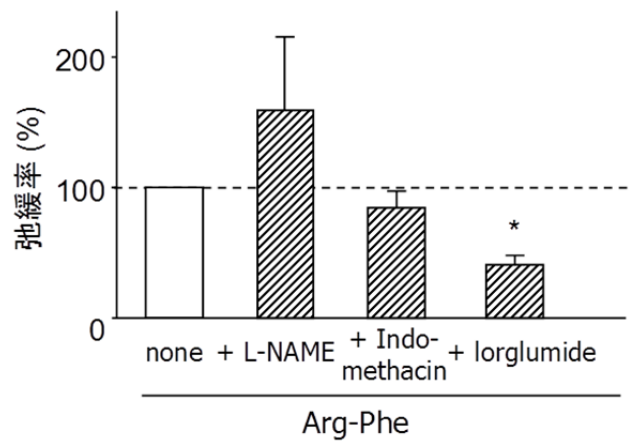


図 3. Arg-Phe の動脈弛緩機構。L-NAME(NO 合成酵素阻害剤, 100 μM)、indomethacin(COX 阻害剤, 300 nM)、lorglumide(CCK₁受容体アンタゴニスト, 30 μM)を前処置した後に、Arg-Phe(10 μM)を添加し、動脈弛緩反応を測定した。

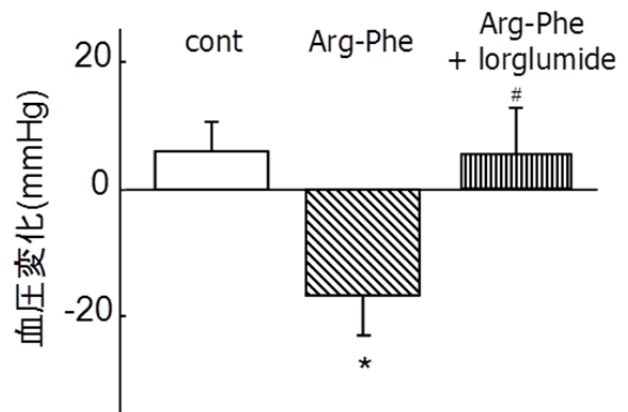


図 4. Arg-Phe による血圧降下作用と CCK₁受容体アンタゴニストによる影響。Arg-Phe 投与後 2 時間における血圧変化値を測定。Means ± SEM(n=10-11), *P<0.05 vs. cont, #P<0.05 Arg-Phe vs. lorglumide, Arg-Phe(15 mg/kg, p.o.), lorglumide(CCK₁受容体アンタゴニスト, 0.3 mg/kg, i.p.)

られ、CCKが内皮由来の可能性は完全には否定できない。しかしながら、CCK分泌能を有する腸内分泌細胞STC-1においてRF添加により細胞内[Ca²⁺]_iが上昇する一方、内皮由来細胞HUVECでは変化しない。STC-1は一種の神経系培養細胞として知られおり、血管に存在する神経細胞にCCK-CCK₁受容体系が存在する可能性が大きいのではないかと考えている。なお、魚肉や海草、マ

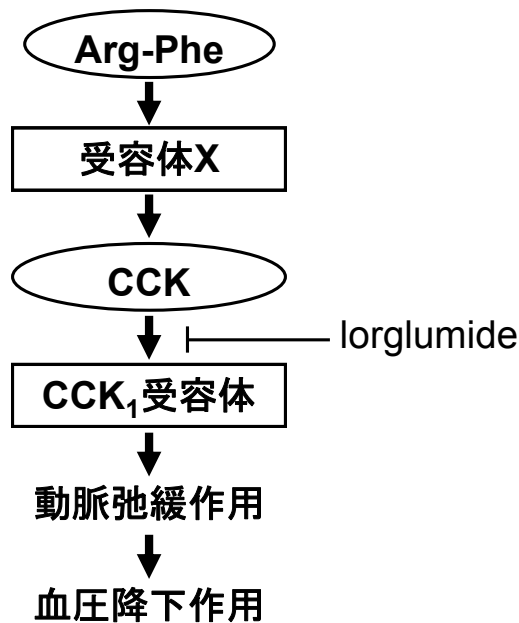


図 5. ジペプチド Arg-Phe (RF) の血圧降下機構

ツシユルームの抽出物もしくは分解物は血圧降下作用を示すことが報告されているが、その活性成分はアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性ペプチド (Ile-Tyr, Lys-Trp, Val-Tyr, Ile-Trp) であるが、RF 自身は ACE 阻害活性を示さない。

5. 今後の課題

食品は複雑系である。数多くの食品タンパク質から構成され、かつ、消化管内には基質特異性の異なる酵素が複数存在する。したがって、消化管内では様々な鎖長からなる膨大なアミノ酸配列の組み合わせのペプチドが生成するものと考えられる。このような高度な複雑系を一度に取り扱うことは困難である。消化管内で派生する全ての膨大なペプチド数と比較すると、ジペプチドの組み合わせは比較少ないので、まずは、ジペプチドの構造と機能の関係を明らかにすることにより、最終的に、タンパク質自身の機能性を予測することが可能になるのではないかという仮説のもとに、基礎的研究を進めている。その過程で、RF が強力な動脈弛緩作用を示すことを見出した。構造－活性相関の結果、RF の N 末端側への鎖長延長は許容されることが判明した。実際、主要なコメタンパク質グルテリンの一次構造中に存在する IHRF には RF と同等の動脈弛緩作用を示すが、興味深いことに、IHRF がより持続的な血圧降下作用を示すことを見出した。なお、消化管酵素

処理により IHRF がコメグルテリンから生成することをモデルペプチドにより明らかにしている。加えて、コメ以外の食品タンパク質の一次構造中に存在する RF 関連ペプチについても、同様の機能性を示唆する予備的結果を得ている。種々の食品タンパク質の一次構造中に存在する RF 配列の生理的意義の解明は今後の検討課題である。

CCK は食後の飽食因子として知られている。実際、RF が摂食抑制作用や消化管運動抑制作用などの CCK 様作用を示すことを明らかにしている。以上、RF は循環器系および神経系の両方に作用する多機能性分子である。メタボリックシンドローム患者において、CCK シグナルが低下しているという報告もあり^[11,12]、血圧降下作用と摂食抑制作用を併せ持つ RF は抗メタボリックシンドローム効果も期待できる。今後、糖尿病モデル動物を使用した機能性研究が期待される。

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 CCK₁ 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 D₂-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides.* 2008; 29(3): 345-9.
- [4] Schror K. Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 1985; 80: 502-14.
- [5] Brantl, V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich, F. Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem.* 360, 1211-1216 (1979).

- [6] Yoshikawa M, Yoshimatsu T, Chiba H. Opioid peptides from human β -casein. *Agric Biol Chem.* 48, 3185-3187 (1984).
- [7] Fukudome S, Yoshikawa M. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett.* 1992 Jan 13; 296(1): 107-11.
- [8] Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, Tsuruki H, Takahata K. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors.* 2000; 12(1-4): 143-6.
- [9] Kino K, Nakazawa Y, Yagasaki M. Dipeptide synthesis by L-amino acid ligase from *Ralstonia solanacearum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 371(3): 536-40.
- [10] Kino K, Kotanaka Y, Arai T, Yagasaki M. A novel L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* NBRC3134, a microorganism producing peptide-antibiotic rhizocticin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73 (4): 901-7.
- [11] Hayes MR, Miller CK, Ulbrecht JS, Mauger JL, Parker-Klees L, Gutschall MD, Mitchell DC, Smiciklas-Wright H, Covasa M. A carbohydrate-restricted diet alters gut peptides and adiposity signals in men and women with metabolic syndrome. *J Nutr.* 2007; 137(8): 1944-50.
- [12] Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sadowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa M, Kukla M, Berdowska A, Rehfeld JF, Bielanski W, Brzozowski T. Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58 Suppl 1: 13-35.

Study on Novel Vasorelaxing Peptide Derived from Food Proteins and Its Physiological Functions

Ohinata Kousaku

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

Summary

A number of low-molecular-weight bioactive peptides have been found from the protease hydrolysate of various food proteins. In the current study, we found that Arg-Phe (RF), a simple dipeptide consisting of two L-amino acids, exhibits vasorelaxing activity ($EC_{50}=580$ nM). RF had no ACE-inhibitory activity. To the best of our knowledge, RF-induced vasorelaxing activity seems to be more potent than that of previous reported bioactive peptides derived from food proteins. The retro-sequence dipeptide FR was inactive, suggesting that the RF sequence is important for potent vasorelaxing activity. RA and AF were also inactive. Nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) are known to be vasorelaxing factors; however, the vasorelaxing activity of RF was inhibited by neither *NG*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a NO synthase inhibitor, nor indomethacin, a COX inhibitor. Interestingly, this activity of RF was blocked by lorglumide, an antagonist of the cholecystokinin (CCK)₁ receptor; however, RF had no affinity for CCK₁ and CCK₂ receptors, suggesting that RF stimulates CCK release. Orally administered RF decreased blood pressure in SHR, and this anti-hypertensive activity of was also blocked by a CCK₁ antagonist. Taken together, a novel CCK-dependent vasorelaxing RF decreases blood pressure in SHR.