

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19912

研究課題名（和文）高血圧予防食品設計のための新戦略提案

研究課題名（英文）Proposal for new research design of anti-hypertensive foods

研究代表者

松井 利郎（Matsui, Toshiro）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20238942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、レニン-アンジオテンシン（RA）系ペプチドの一斉分析法を設定し、加齢/血圧亢進による循環系RA系ペプチド動態に対する影響を評価することを目的とした。LC-IT-MS/MS法を用いてRA系ペプチドの一斉分析法を設定し、高血圧自然発症ラットの循環血漿を分析した結果、加齢ラットの循環Ang II量は若齢ラットより高値を示し、RA系代謝物動態と加齢/血圧亢進との相関が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
なぜ高血圧は発症するのか、血圧代謝系をどのように制御すればよいのか、高血圧診断の指標はあるのか、の問いについて、本研究では血圧代謝系での降圧に関わるアンジオテンシン代謝物と昇圧に関わるアンジオテンシン代謝物を一斉に検出可能な分析法を設定し、血圧上昇との相関関係を解明することを目的とした。これにより、どのような代謝物を高血圧指標にできるか、さらには機能性食品世襲の有効性を血圧代謝系制御に基づき評価することができるかと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to evaluate the dynamics of circulatory renin-angiotensin peptides, an LC-IT-MS/MS method was developed and the blood samples from young and aging SHR were measured. As the result of the experiment, Angiotensin II concentration was increased by in aging rats, suggesting the correlation between renin-angiotensin-related peptide dynamics and aging/hypertension.

研究分野：食品分析学

キーワード：高血圧 レニン-アンジオテンシン系 アンジオテンシン代謝物 代謝物動態

1. 研究開始当初の背景

「レニン-アンジオテンシン (RA) 系は血圧上昇を担う代謝系であり、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害が降圧作用の本体である」との従来説に対し、近年、新たに RA 系ペプチド代謝物が同定され、RA 系は「昇圧/降圧」を担う調節系であることが判明しつつある。RA 系代謝物を網羅的に評価することによって、血圧調節系としての RA の系実証およびそれに基づく新たな高血圧および関連疾患予防食品研究の創生を提唱できると考えられている。しかしながら、循環血中における RA 系ペプチド代謝物を直接的にかつ高感度に測定する分析法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

(1) RA 系ペプチド代謝物の高感度一斉分析系の確立

LC-MS を用いて、アンジオテンシン (Ang) II を始めとする、RA 系における血圧調節に関わるペプチド代謝物の高感度一斉分析法の確立を試みた。

(2) RA 系ペプチドの動態と血圧/加齢の相関の評価

高血圧自然発症ラット (SHR) の循環血中 RA 系代謝物を定量し、その動態と加齢/血圧との相関の評価を試みた。

3. 研究方法

(1) RA 系代謝物ペプチドの一斉分析法の設定

①RA 系代謝物ペプチドの作製

ターゲットとする RA 系代謝物ペプチドは以下の表にまとめた。試験用ペプチドのうち、Ang A、Angioprotectin は固相合成法により合成し、獲得した。その他のペプチドに関して、市販品 (シグマ) を入手した。

対象ペプチド	配列
Ang I	DRVYIHPFHL
Ang-(1-9)	DRVYIHPFH
Ang II	DRVYIHPF
Ang-(1-7)	DRVYIHP
Ang A	ARVYIHPF
Angioprotectin	PEVYIHPF

②LC-IT-MS/MS 分析

LC-MS 装置は ESI-Ion Trap 型の esquire6000 (ブルカードルトニクス) および HPLC 1200 シリーズ (アジレントテクノロジー) を用いた。なお、測定に関する基本条件は以下の通りである。

カラム : COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (Ø2.1×150 mm)

インジェクション量 : 20 µL

グラジエント : 0-100% MeOH/0.1% formic acid (FA)/20 min

流速 : 0.2 mL/min

カラムオープン : 40°C

Nebulizer : 40 psi

Dry Gas : 8 L/min

Dry Temp. : 330°C

③誘導体化法の検討

より高い検出感度を得られるために、ペプチド誘導体化法を検討した。カルボキシル基誘導体化剤として 2-picolylamine、1-(2-pyrimidyl)piperazine、アミノ基誘導体化剤として TNBS、NDA、アセチル化剤として無水酢酸を用いて検討を行った。

(2) 循環血中 RA 代謝物の検出・定量

一晩絶食した SHR ラット（8 週齢および 40 週齢）から全血を回収した。プロテアーゼ阻害剤（アプロチニン、キモスタチン、EDTA）を添加した血液を遠心分離（3500×g, 15 min, 4℃）し、血漿を回収した。得られた血漿を同僚の氷冷アセトニトリルでタンパク質除去し、遠心分離（14000×g, 15 min, 4℃）後、得られた上清を回収・乾固し、0.1% FA にて再溶解し、平衡化した Sep-Pak カートリッジに付加した。0.1% FA でカートリッジを洗浄後、100% MeOH/0.1% FA（3 mL）で溶出した。得られた溶出液を遠心エバポレーターで乾固後、50 μL の 0.1% FA に再溶解し、LC-IT-MS/MS 分析に供した。

4. 研究成果

(1) RA 系代謝物ペプチドの一斉分析法の設定

①試験用ペプチドの作製

Fmoc 固相合成法により得られたペプチドを MS Infusion に供した。ペプチドの質量数実測値により、これらのペプチドの合成が確認された。

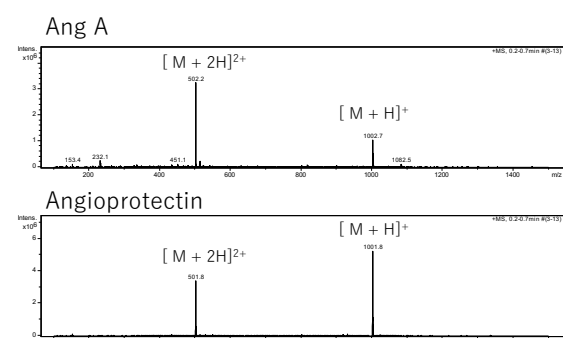


図 1 合成ペプチド Ang A および Angiotensin の MS Infusion 解析

②LC-IT-MS/MS 条件の最適化

カラム、溶離液（MeOH あるいは CH₃CN）、MRM 条件を種々検討した結果、対象 RA 系代謝物は 2 価イオンとしての検出が最適だった。その MRM transition を以下に示す。

対象ペプチド	MRM transition
Ang I	649.4 > 784.6
Ang-(1-9)	592.9 > 784.6
Ang II	524.5 > 784.6
Ang-(1-7)	450.6 > 784.6
Ang A	502.2 > 740.6
Angiotensin	501.8 > 739.5

MRM 分析条件：Skimmer (V)：40.0, Capillary Exit (V)：184.0, Trap Drive: 62.6, Octapole 1 (V)：10.76, Octapole 2 (V)：2.27, Octapole RF: 300.0

対象ペプチドの LC 分離条件を検討した結果、逆相系カラム COSMOSIL 5C₁₈-MS-II（Ø2.1×150 mm）を用いて、5-25 分の linear gradient 条件で、図 2 に示しているように、各対象ペプチドを分離し、良好なピーク形状が得られた。

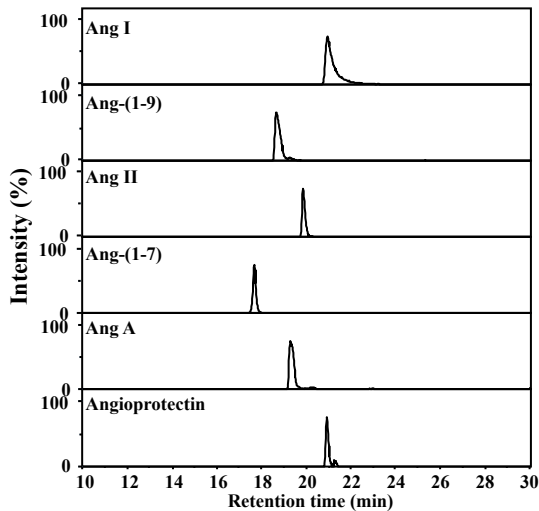


図2 各対象 RA 系代謝物の一斉 LC-MRM-MS/MS 解析

本研究によって設定した分析系では、対象とする RA 系代謝物を一斉高感度分析することができた。

LOD: Ang II, Ang-(1-7): 500 fmol/mL, Angiotensin: 1 pmol/mL, Ang A: 5 pmol/mL, Ang I: 10 pmol/mL

(2) ラット循環血中 RA 系代謝物の検出

若齢（8 週齢）および加齢（40 週齢）高血圧自然発症ラット SHR の循環血漿を処理し、本研究で設定した分析系に供した。その結果、Ang II が検出され、その濃度は若齢 SHR において ~12 fmol/mL に対し、加齢 SHR において、~150 fmol/mL で、高値を示した（図 3）。このことは、RA 系代謝物動態は、血圧亢進/加齢に相関する可能性が示唆された。

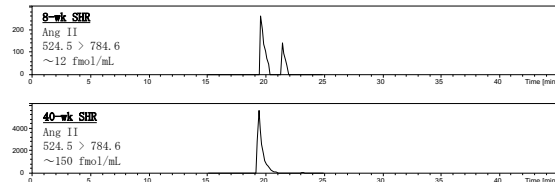


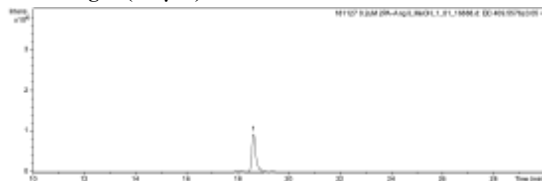
図3 若齢および加齢 SHR 循環血漿中における Ang II の LC-MS クロマトグラム

しかし、より網羅的に長期間 RA 系動態を評価するためには、更に高感度の分析法の設定が必要である。

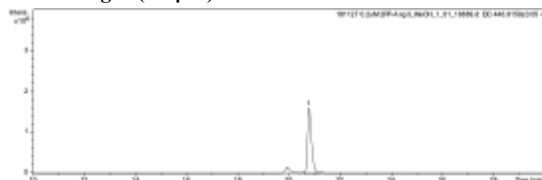
(3) ペプチド誘導体化法の検討

より高い検出感度を得られるために、各種ペプチド誘導体化法またはその組み合わせを試みた。結果は図 4 に示す。検討した誘導体化法のうち、2-picolylamine によるカルボキシル基誘導と無水酢酸によるアセチル化の組み合わせが一番高い検出感度を示した。

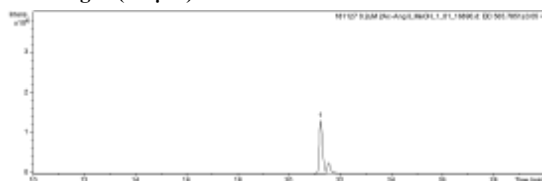
2PA-Ang II (0.2 μM)



2PMP-Ang II (0.2 μM)



2Ac-Ang II (0.2 μM)



2Ac2PA-Ang II (0.2 μM)

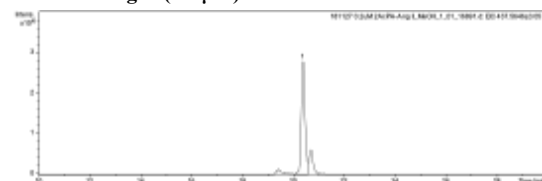


図4 各種誘導体化法による Ang II 検出感度に対する影響

本誘導体化法を用いて、Ang II の検出限界がサブ pmol/mL であった。しかし、循環系 RA 系ペプチド代謝物の濃度は fmol/mL であり、少量 (~100 μL) 血漿を用いる長期間に渡る観察では、更に高い検出感度を有する検出系が必要である。現在、超高感度分離分析を達成するため、免疫アッセイと組み合わせた LC-EIA 分析法の設定を試みており、本課題解決の達成を図っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shen Weilin, Matsui Toshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 4306 ~ 4314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c7fo01185g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mine Yoshinori, Matsui Toshiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Current understanding of bioaccessibility and bioavailability of food derived bioactive peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 2319 ~ 2320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1111/ijfs.14164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shen Weilin, Matsui Toshiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Intestinal absorption of small peptides: a review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 1942 ~ 1948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1111/ijfs.14048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 申 偉琳、田中 充、松井利郎
2. 発表標題 Simultaneous detection of angiotensin metabolites in rat plasma using LC-MS/MS method
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 ペプチド、ポリフェノール代謝解析に関する分析化学の重要性
3. 学会等名 第3回メタボローム解析シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 Transport of oligopeptides across Caco-2 cell monolayers
3. 学会等名 11th ISNFF（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 食品由来オリゴペプチドの吸収性および血圧調節作用について
3. 学会等名 第5回国際食品由来ペプチド学術交流会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 Effect of aging on vasorelaxation of small peptides on contracted rat aorta
3. 学会等名 ISNFF2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 申 偉琳、Vu Thi Hanh、松井 利郎
2. 発表標題 ペプチド吸収に対する加齢の影響の解明
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 Absorption of peptides into rat blood: Effect of peptide-length and aging of rats on absorption
3. 学会等名 108th AOCS Annual Meeting & Expo (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 Small peptides: Anti-hypertensive and vasorelaxation actions
3. 学会等名 International Symposium on Bioactive Peptides (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 Absorption behavior of bioactive peptides across intestinal membrane
3. 学会等名 2nd International symposium on bioactive peptides (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井利郎
2. 発表標題 Application of MALDI-MS imaging technique for intestinal absorption process of bioactive peptides
3. 学会等名 ICoFF2019 (7th)/ISNFF2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

食品分析学HP http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/foodanalysis/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考