

平成 22 年 3 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19208012  
 研究課題名（和文） 血管系疾患予防作用を有するペプチドの網羅的解明  
 研究課題名（英文） Study on the prophylaxis effect of peptides on vascular-related diseases  
 研究代表者 松井 利郎（MATSUI TOSHIRO）  
 九州大学・農学研究院・准教授  
 研究者番号：20238942

研究成果の概要（和文）：食品タンパク質由来の低分子ペプチドが、高血圧・動脈硬化症発症に深く関わる血管機能に対して潜在的な改善作用を示すかどうかを検討した。その結果、塩基性アミノ酸を有する低分子ペプチドが収縮した血管を弛緩させることが判明した。この血管弛緩作用は降圧剤であるカルシウムブロッカーと同様であり、さらに、動脈硬化を誘発する動物モデルマウスへの投与試験によって、大動脈硬化病変を抑制することを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The object of this study was to clarify the prophylaxis effect of small peptides on vascular-related diseases. As a result, peptides having basic amino acids could evoke a significant vasorelaxation effect in contracted rat aorta. The effect was closely associated with the reduction of intracellular  $Ca^{2+}$  through a  $Ca^{2+}$  channel. In addition, a 9-wk administration of WH to apo E deficient mice successfully improved a significant atherosclerosis area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	21,500,000	6,450,000	27,950,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	32,900,000	9,870,000	42,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ペプチド、高血圧、動脈硬化、LC-MS

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は高血圧予防を目的とした一連の食品機能研究を実施し、イワシタンパク質加水分解物からの高血圧予防食品（厚生労働省認可 特定保健用食品）の調製と、臨床効果（血圧低下作用）を実証してきた。

この知見は、“たとえ食品成分であっても循環系疾患（高血圧）に対して十分な代替医療効果を発揮し得る”ことを実証したものであり、今日の我が国の食品科学分野発展の原動力となる学術的成果であった。食品成分、特にペプチドによる高血圧予防作

用の発現機構は、国内外ともに「レニン-アンジオテンシン(RA)系での ACE 阻害作用」であると考察され、学術的にも本機構が認知されつつある。このような学術的背景に対して、申請者はこれまでに以下に示す作用機構を世界で初めて提唱し、独自の視点から食品による健康性維持に関するペプチド科学のさらなる展開性を提唱するに至っている。すなわち、

- ① ヒト RA 系を保有するトランスジェニックマウスにおいて、血圧低下作用と循環系 ACE 阻害挙動は相関しないことを究明
- ② ジペプチドの体内吸収動態を解明し、血管及び腎臓組織への蓄積を初めて報告
- ③ ヒト血管平滑筋細胞において、ジペプチドは RA 系関連レセプター (AT1, AT2) に対して全く作用せず、L 型 Ca チャンネルをブロックすることを世界で初めて報告
- ④ ラット大動脈血管に対してジペプチドは内皮非依存的な弛緩作用を示す

## 2. 研究の目的

本研究では低分子ペプチドの血圧低下機構に関して、世界初の知見である「血管組織でのカルシウムチャンネルブロック作用」を多面的に解明し、血管機能改善作用の達成を目的とした機能性食品の創製を図る。以下の項目は食品科学分野における初めての追究例となる。

### (1) Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害ペプチドの同定

血管標本を用いて Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害作用を有するペプチドを系統的に究明し、構造・活性発現要件を明示する。また、分子動力学 (MD シミュレーション) 概念を食品科学に導入し、ACE-ペプチド間での相互作用、生理作用の理論評価を試みる。

### (2) 腸管吸収性

LC-MS/同位体標識ペプチドアッセイ法を新たに構築し、in vivo でのペプチド吸収・蓄積動態解明のための高感度・高選択的アッセイシステムを確立する。

### (3) 抗動脈硬化予防効果の検証

apo E 欠損マウスを用いた長期投与試験を実施し、ペプチド投与による抗血管肥大・血圧代謝系改善作用・抗動脈硬化作用を実証する。

## 3. 研究の方法

### (1) Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害ペプチドの同定

#### ① 血管弛緩性試験

8-12 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットをエーテル麻酔下において全血屠殺し、胸部大動脈を摘出した。摘出後、混合ガス (95% : O<sub>2</sub>, 5% : CO<sub>2</sub>) で飽和した 37°C PSS buffer (組成, mM ; NaCl 145, KCl 5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5, glucose 10, HEPES 5) 中で 45 分間平衡化した。その後、

外膜周辺組織を除去し、2-3 mm 幅のリング状に切断したものを大動脈血管リング標本として実験に使用した。張力が安定したのち、50 mM KCl と置換することによって、血管リングを収縮させた。張力がベースラインで安定したのちペプチド溶液 0.5 mL を添加し、さらに張力が安定していることを確認したのち (5~10 min)、終濃度 50 mM KCl or 1.0 μM Phenylephrine により血管を再び収縮させた。なお、収縮張力はマグヌス測定装置 (Micro Tissue Organ Bath, Model MTOB-1Z, Labo Support 社製) にて測定した。血管内皮の有無は、1 μM Phenylephrine により収縮した血管に対する 100 μM Acetylcholine の弛緩によって判断した。弛緩活性ペプチド (6 5 種類) はすべて Fmoc 固相合成法により合成したものをを用いた。

#### ② 細胞培養及び [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定

血管平滑筋細胞 (VSMC) 内の Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 測定には、25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ (Corning 社製) において 70~90% コンフルエントになるまで培養したものをを用いた。VSMC は 8 週齢雄性 Wistar-Kyoto (WKY) ラットの胸部大動脈血管より単離した。培養は 10% FBS 含有 D-MEM (0.29 g/L L-glutamine, 10 万単位/L Penicillin, 0.1 g/L Streptomycin, 0.01 g/L Insulin, 10 mL/L Minimal Essential Medium Non-Essential Amino Acids) を用いて、25 cm<sup>2</sup> フラスコボトルにて 37°C で行った。実験には 70%~90% コンフルエントの培養細胞 (継代数 4 及び 5) をを用いた。また、本試験系におけるマイトジェン濃度は、Ang II において 10 μM、Bay K 8644 においては 50 μM に設定した。Ang II 刺激の際には、2 型 Ang II 受容体 (AT<sub>2</sub>R) への非特異的作用を排除するため、AT<sub>2</sub>R アンタゴニストである PD123177 (1 μM) を Ang II 刺激 10 min 前に予め添加した。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定は、まず無血清培地にて 24 h 同調培養を行った VSMC を 0.1% トリプシン/EDTA 溶液で剥離したのち、得られた細胞ペレットを 1 μM Fura-2/AM 溶液 (0.1% DMSO 及び 0.02% Cremophor EL-PSS buffer) で懸濁し、インキュベーター内で 60 min 静置することで Fura-2/AM を細胞内へ取り込ませた。Fura-2 取り込み後、VSMC を細胞数 1.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL となるように石英セルに再懸濁した。その後、5 mM ペプチドを添加し、37°C で 10 min 静置した。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定は、100 μM Ang II あるいは 100 μM Bay K 8644 刺激後の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に伴う蛍光強度変化を蛍光分光計 (RF-5300PC, SHIMADZU 社製、励起波長 340/380 nm、蛍光波長 500 nm) を用いて連続的に測定することにより行った。

#### ③ MD シミュレーション

Amber 9 ソフトウェアの LEaP プログラム及び Antechamber プログラムを用いて水溶液構造の構築を行った。系の力場には Amber force

field 03 を適用した。また、リガンドの力場は Gaussian 03 を用いた一点計算により求めた。

さらに、LEaP プログラムを用いて TIP3P BOX 12 と呼ばれる正 12 面体の水溶液構造をタンパク質・リガンド複合体周辺に配置した。なお、系全体の電荷を 0 にするため、LEaP プログラムを用いてカウンターイオンとして Cl<sup>-</sup>を加えた。

Amber 9 ソフトウェアの Sander プログラムを用いて MD シミュレーションを行った。計算条件及び計算環境を以下に示した。(計算条件)

温度：300 K、圧力：1 atm、計算時間：4000 psec、総ステップ数：200000 steps、dt：2 fsec/step

本研究では、配列が類似しており、かつその ACE (N ドメイン) 阻害活性が大きく異なる LIW (IC<sub>50</sub>：35 μM) と VIW (IC<sub>50</sub>：212 μM)、IFY (IC<sub>50</sub>：269 μM) と VY (IC<sub>50</sub>：1530 μM)、IW (IC<sub>50</sub>：516 μM) と FW (IC<sub>50</sub>：2590 μM) の 6 種類のペプチドについて MD シミュレーションを行い、その結合様式を解析した。なお、これまでの研究で得られた複合体構造に関してさらに詳細な情報を得るため、Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) 法による水溶液中での結合自由エネルギー評価を行った。

結合自由エネルギーは、次式により算出した。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - \Delta G_{\text{receptor}} - \Delta G_{\text{ligand}}$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{LE}} + \Delta V_{\text{DW}} + \Delta P_{\text{BSOL}}$$

すなわち、複合体のエネルギーから、タンパク質・リガンドのそれぞれの系のエネルギーを差し引くことで結合自由エネルギーを求めた。なお、 $\Delta E_{\text{LE}}$  (静電相互作用エネルギー)、 $\Delta V_{\text{DW}}$  (ファンデルワールス力のエネルギー) 及び  $\Delta P_{\text{BSOL}}$  (溶媒和自由エネルギー) の和として評価される。

(2) ペプチド吸収動態解明のための安定同位体標識ペプチド (SIP) -LC-MRM-MS/MS 法の構築

Val-Tyr (VY), Met-Tyr (MY), Leu-Tyr (LY) の <sup>13</sup>C 安定同位体標識ペプチドは、Fmoc-<sup>13</sup>C (-C\*OOH) アミノ酸を用いて Fmoc 固相合成法により行った。LC-MS 分析は MRM (Multi-reaction monitoring) 法を採用し、ESI (Positive) イオン化によるフラグメントイオン (Tyr: [M+H]<sup>+</sup>, 182.2 m/z) 検出により行った。最適化した本アッセイ条件は以下の通りである。

<LC 条件>

カラム：5C18-AR-II (2.0×150 mm)

溶離液：MeOH-water/0.1%HCOOH

流速：0.25 mL/min

初期 Hold：5% (0~5 min)

グラジエント：4.75%/min

<MS 条件>

Nebulizer：40 psi

Dry Gas：8 L/min

Dry Temp：330°C

電圧関係：5%MeOH/0.1%HCOOH で調製した各 SIP で最適化したパラメーター

セグメント：0~3 min (hold)

3~5 min (<sup>13</sup>C-VY)

5~8 min (<sup>13</sup>C-MY)

8~12 min (<sup>13</sup>C-LY)

(3) 動脈硬化進展マウスに対するジペプチド投与試験

Apo E 欠損 (Apo E(-/-)) マウスは Jackson Laboratory 社より 1994 年に購入し、九州大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて飼育・保管したものを用いた。摂食試験の実施にあたり、8-18 週齢雄性 Apo E(-/-) マウスを Control 群、10 及び 100 mg/kg/day WH 投与群の 3 群に分け、9 週間の飼育を行った。各群の週齢に有意差がないように無作為群分けを行った (Control：15.0 ± 0.8 週齢, 10 mg/kg WH 群：14.3 ± 3.0 週齢, 100 mg/kg WH 群：14.6 ± 1.3 週齢)。食餌は AIN-76 組成に準じた 0.1% 高コレステロール食を与えた。WH は 10 及び 100 mg/kg となるように 1 mL の脱イオン水に溶解し、栄養カテーテルにより経口投与した。Control 群には等量の脱イオン水を与えた。マウスはそれぞれ個別ケージにて、気温 22°C、明暗サイクル 12 時間 (明期：8:00 - 20:00) の条件下において飼育した。飼育期間中は脱イオン水を自由飲水にて与えた。

実験終了後、6 時間の絶食を行ったのち、麻酔下において心臓採血にてと殺した。肝臓は摘出後、重量測定を行い、直ちに液体窒素にて凍結し、分析に供するまで冷凍保存 (-30°C) した。心臓及び大動脈組織は摘出後、脂肪組織を除去し、ホルマリンにて固定した。

血清 Triacylglycerol (TG) 濃度の測定には TG E test (和光純薬工業社製)、総コレステロール及び HDL-コレステロール濃度の測定には Total-cholesterol Kainos Kit (Kainos 社製) を用いた。また、血清 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は Mouse MCP-1 ELISA Kit (Invitrogen 社製) を用いて測定した。肝臓脂質は、クロロホルム：メタノール = 2：1 溶液を用いて脂質を抽出したのち、関連脂質量を測定した。

ホルマリン固定した心臓組織は、心臓弁近傍における大動脈根病変観察に用いた。心臓弁近傍の大動脈根におけるアテローム性動脈硬化病変面積は、Ni らの方法に準じて定量的に評価した。組織切片はパラフィン包埋組織を心臓から大動脈弁にかけて水平方向にスライス (8 μm 幅) することで作製し、得られた組織切片を Elastic Van Gieson と Haematoxylin (EH) 染色に供した。EH 染色組織切片は万能写真顕微鏡アキシオフォト

(Carl Zeiss 社製) を用いて撮影し、内膜肥厚面積を動脈硬化病変として測定した。病変面積は、心臓弁から 160  $\mu\text{m}$  毎の組織切片を 5 枚抽出し、それら病変面積の平均値とした。

ホルマリン固定後の大動脈血管における病変面積は *en face* 法により評価した。大動脈をタテ方向に切り開き、Sudan IV により染色したものをスライドガラス上に貼付け、デジタルカメラ (COOLPIX5700, Nikon 社製) にて撮影した。撮影画像をもとに大動脈全体の面積に対する大動脈全体の病変面積、すなわち、大動脈弓部の病変面積及び大動脈弓部以外の病変面積の割合を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) L 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害ペプチドの同定とその弛緩機構解明

内皮非依存的な血管弛緩作用を示す VY を基本骨格として、トリペプチドまでの鎖長を有する低分子ペプチドを合成し、ラット血管標本での弛緩活性-構造相関の解明を試みた。その結果、血管弛緩作用を有する VY を基本骨格とした 50 種類のジペプチドを合成し、それらの弛緩作用を評価したところ、WH 及び HW において顕著な血管弛緩作用が認められた。さらに、ジペプチドの弛緩作用には N 末端に存在する Trp 残基の存在あるいは Trp 残基と His 残基の組み合わせが大きく寄与している可能性が示された。

高活性ジペプチドの構造的特徴を考慮し、トリペプチドにおける弛緩作用に関わる構造要件の検討を行ったところ、活性発現には次項に示した 2 因子が重要であることが明らかとなった。これらの構造要件を満たす HRW において、顕著な弛緩作用 ( $\text{EC}_{50} = 1.2 \text{ mM}$ ) が認められた。次いで、HRW 分子における活性発現要件を明らかにするため、HRW 誘導体を用いて弛緩性を評価したとこ

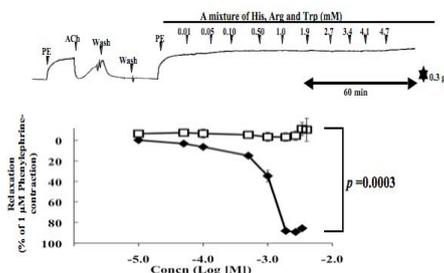


Fig. 1 Dose-dependent curves of relaxation of HRW (■) and a mixture (□) of amino acids corresponding to HRW (His, Arg and Trp) on 1  $\mu\text{M}$  Phenylephrine-contracted thoracic aorta ring from SD rat. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Statistical difference between the curves was analyzed by a two-way repeated ANOVA. PE; Phenylephrine, ACh; Acetylcholine (100  $\mu\text{M}$ ).

ろ、His イミダゾール基の N 原子をメチル化した H(1-Me)-RW 及び H(3-Me)-RW において、

HRW と比較して有意な弛緩作用の減弱が認められた (Fig. 1)。

さらに、HRW の Arg 残基を Citrulline に置換した H-Cit-W においても有意な活性の減弱が認められた。これらの知見を考慮すると HRW の弛緩作用発現には、His 残基のイミダゾール基及び Arg 残基のグアニジウム基が重要であることが示唆された。さらに、His + Arg + Trp のアミノ酸混合添加による血管弛緩作用は全く認められなかったことから (Fig. 1)、血管弛緩作用を有するジペプチド及びトリペプチドの作用はペプチド体を認識した結果であることが初めて明らかとなった。

さらに、これら活性ペプチドを用いて VSMC 細胞内の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化を明らかにした。その結果、Fig. 2 で示したように 50  $\mu\text{M}$  Bay K 8644 刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した

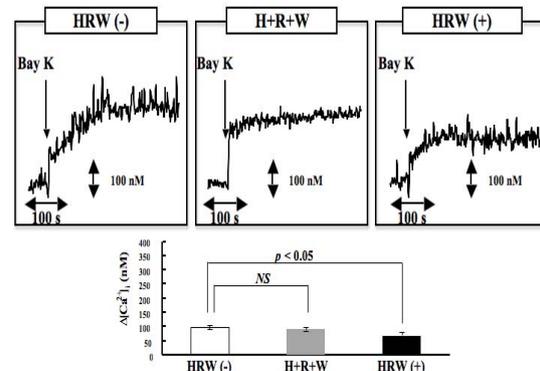


Fig. 2 Records of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  on 50  $\mu\text{M}$  Bay K 8644 (Bay K)-stimulated VSMC from 8 wk WKY rat thoracic aorta in the presence (+) or absence (-) of 100  $\mu\text{M}$  HRW. H+R+W indicates a mixture of 100  $\mu\text{M}$  amino acids corresponding to HRW. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Significant difference between the two groups at  $p < 0.05$  were analyzed by unpaired Student's *t*-test. NS, not significant ( $p > 0.05$ ).

$\text{Ca}^{2+}$  流入量の増大に対して 100  $\mu\text{M}$  HRW は明らかな抑制作用を示した。アミノ酸では本作用は全く認められなかったことから、低分子ペプチドによる血管弛緩作用発現は L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルへの結合による細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入阻害が要因の一つであると考えられた。

##### (2) MD シミュレーション法による ACE/N-domain 阻害活性の客観評価

初期構造として Protein Data Bank より N-ドメイン/Lisinopril 複合体の X 線結晶構造を採用した。次に、構造修正ソフトウェア SYBYL 7.3 を用いて欠損残基等の修正を行うことで、より適切な N-ドメイン結晶構造体を構築した。続いて、構造最適化された N-ドメインに対して ACE 阻害ペプチドを複合体化し、結晶構造中での結合自由エネルギー ( $\Delta G_t$ ) を Surfex-Dock プログラムにより算出した。得られた  $\Delta G_t$  と実験値との相関を求めたところ、両者には良好な関係 ( $r = 0.71$ ) が存在したことから、本研究で構築した仮想複合体は実際の結晶構造を良好に反映していると考えられた。

次に、水溶液中での両者の複合体構造を解析するため、N-ドメイン/Lisinopril、ペプチドに関して、周囲に水分子を配置することで仮想水溶液系を構築し、標準状態で系が平衡に達するまで MD シミュレーションを行った。その後、得られた水溶液系での複合体構造をもとに MM-PBSA 法による  $\Delta G_t$  の算出を行った。その結果、VY の  $\Delta G_t$  は  $-47.1$  kJ/mol となり N-ドメイン阻害活性との良好な相関が得られたことから、今回構築した仮想水溶液系は実際系での阻害挙動を良好に再現していると判断された。さらに、これら複合体を MD 解析した結果、Lisinopril は主に His491, His331 間で水素結合等を形成しているのに対し、VY はいずれの残基とも相互作用しておらず、VY の低い N-ドメイン阻害性、すなわち BK 蓄積による空咳発症を伴わない結果を反映するものであった。以上の結果より、構築した N-ドメイン/ACE 阻害ペプチド複合体に対する MD シミュレーション法は、ACE 阻害ペプチドの N-ドメイン阻害性を十分に理論予測させるものであった。

### (3) SIP-LC-MRM-MS/MS 法の確立

前項（研究方法）にて最適化した LC-MS/MS 分析をもとに本法の妥当性を評価した。その結果、本条件により 15 分以内での 3 種 SIP の一斉分析が達成され、LOD/LOQ (ng/mL,  $S/N > 3$ ) は  $^{13}\text{C-VY}$ : 0.04/0.12,  $^{13}\text{C-MY}$ : 0.02/0.06,  $^{13}\text{C-LY}$ : 0.03/0.11 であった。また、 $^{12}\text{C-SIP}$  の  $^{13}\text{C-SIP}$  検出に対する検出妨害は 5% 以下であったことから、内因性ペプチドが同濃度血液中に存在する場合においても摂取（外因性）ペプチド  $^{13}\text{C-SIP}$  の特異的検出が可能であった。さらに、ラット血漿に対するスパイク試験による回収率は 85% 以上であり、日内・日間変動はともに 10% 未満であった。本法により SHR への各 SIP 吸収量を測定した結果、各 SIP は投与 60 分後に  $C_{\max} (> 1 \text{ ng/mL-plasma})$  となることが判明した。今後、構築した LC-MRM-MS/MS 法を適用することにより網羅的にペプチド吸収動態が解明され、さらには生体内での作用・蓄積臓器等の詳細が明らかになるものと期待される。

### (4) 血管弛緩性ペプチドによる抗動脈硬化作用発現

動脈硬化モデル動物である Apo E(-/-) マウス（雄性、8-18 週齢）を Control 群、10 及び 100 mg/kg/day WH 投与群の 3 群に分け、9 週間の長期投与試験を実施した。その結果、両 WH 投与群において成長パラメータ（体重、摂食量、臓器重量）、血清・肝臓脂質濃度及び血清 MCP-1 量のいずれの項目においても Control 群との有意差は認められなかった。従って、WH 投与は Apo E(-/-) マウスの成長、脂質代謝及び MCP-1 量に影響を与えないことが明らかとなった。

心臓弁近傍の大動脈根における病変観察

の結果、WH 投与による心臓弁近傍における病変形成抑制効果は認められなかった。一方、*en face* 法による大動脈病変観察の結果、10 及び 100 mg/kg の両 WH 投与群において明らかな病変形成抑制作用が認められ、100 mg/kg 投与群においては有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた (Fig. 3)。従って、血管弛緩作用を有する WH は *in vivo* レベルにおいて、脂質代謝に影響を与えることなく動脈硬化を予防する機能性低分子ペプチドであること

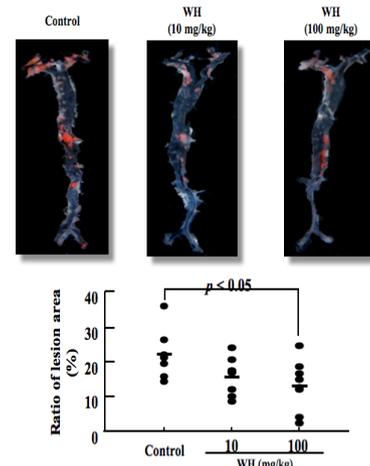


Fig. 3 Photographs and areas of *en face* measurements of atherosclerotic lesion in aortic tree of WH (10 mg/kg;  $n=7$ , or 100 mg/kg;  $n=8$ ) or equivalent volume of deionized water (Control;  $n=8$ )-daily-administered Apo E(-/-) mice. The area of lesion was expressed as percentage. Mean values are expressed as horizontal bar. Significant differences between the groups at  $p < 0.05$  were analyzed by Tukey-Kramer's  $t$ -test.

が初めて実証された。

これまで、脂質代謝に影響を与えることなく動脈硬化病変を直接的に予防するペプチドについては全く報告例がなく、本知見が初めてのものであった。さらに、本知見は、たとえ低分子のペプチドであっても全身系において生体調節作用を発揮する機能体である可能性を示唆しており、今後の機能性ペプチド科学の進展に大いに資する結果といえる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Zhu XL, Matsui T, Watanabe K, Shiraiishi K, Ueki T, Matsumoto K: Simultaneous determination of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in tryptic casein hydrolysate by high-performance liquid chromatography combined with a replicate heart-cut column-switching technique. *J. Agric. Food Chem.*, 55(21), 8367-8374 (2007).
- 2) Zhu XL, Matsui T, Watanabe K, Shiraiishi K, Ueki T, Matsumoto K: Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell

- monolayers. *Peptides*, 29(3), 338-344 (2008).
- 3) Tanaka M, Tokuyasu M, Matsui T, Matsumoto K: Endothelium-independent vasodilation effect of di- and tri-peptides in thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *Life Sci.* 82(15-16), 869-875 (2008).
  - 4) Tanaka M, Watanabe S, Tokuyasu M, Matsui T, Matsumoto K: Structure-activity relationship between vasodilating di- and tri-peptides in thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *J. Hypertension*, 26(suppl.1), S171 (2008).
  - 5) Matsui T, Shimada M, Saitoh N, Matsumoto K:  $\alpha$ -Glucosidase inhibition assay in an enzyme-immobilized amino-microplate. *Anal.Sci.* 25(4), 559-562 (2009).
  - 6) Tanaka M, Watanabe S, Wang Z, Matsumoto K, Matsui T: His-Arg-Trp potently attenuates contracted tension of thoracic aorta of Sprague-Dawley rats through the suppression of extracellular  $Ca^{2+}$  influx. *Peptides*, 30, 1502-1507 (2009).
  - 7) Matsui T, Sato M, Tanaka M, Yamada Y, Watanabe S, Fujimoto Y, Imaizumi K, Matsumoto K: Vasodilating di-peptide Trp-His can prevent atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Br. J. Nutr.*, 103(3), 309-313 (2010).

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 徳安茉依、松井利郎ら: 血管弛緩作用を有する低分子ペプチドの検索と作用機構の解明. 第 54 回日本食品科学工学会大会. 中村学園大学 (福岡市) 2007.9.7.
  - 2) M.Tanaka, T.Matsui et al: Vasodilating small peptides and their mechanism in isolated rat thoracic aortas. Symposium in multi-functionality and sustainability of land use in south-Asia and Eastern-Asia. 九州大学 (福岡市) . 2007.9.12.
  - 3) 渡辺慎平、松井利郎ら: 血管弛緩性低分子ペプチドの構造—活性相関の解明及びその作用機序の解明. 第 62 回日本栄養・食料学会大会. 女子栄養大学 (埼玉県) .2008.5.2.
  - 4) S. Watanabe, T.Matsui et al: Structure-activity relationship of vasodilating small peptides in rat aortic rings. 14<sup>th</sup> IUFoST. Shanghai (China). 2009.10.18.
  - 5) T.Matsui: Antihypertensive mechanism of small peptides. 99<sup>th</sup> AOCS. Seattle (USA). 2009.5.21.
  - 6) 渡辺慎平、松井利郎ら: トリペプチドにおける血管弛緩作用-構造相関の検討. 第 63 回日本栄養・食糧学会大会. ブリックホール (長崎市) . 2009.5.21.
- その他、2009 年度 4 件

[図書] (計 2 件)

- 1) 松井利郎: 第 13 章 タンパク質とペプチド・アミノ酸の機能性、“食品機能性の科学” 西川研次郎監修 (産業技術サービスセンター) 東京 2008 年 4 月.
- 2) Toshiro Matsui and Mitsuru Tanaka: Anti-hypertensive peptides and their underlying mechanisms (chapter 2) In *Biologically Active Food Proteins and Peptides in Health- Fundamental and Clinical aspects-* (Eds.) Mine, Y., Li-Chan, E.C.Y., Jiang, B., IFT Book Series, Wiley Blackwell (Iowa), in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「抗アテローム性動脈硬化作用のあるジペプチド」

発明者: 松井利郎

権利者: 九州大学. 不二製油 (株)

種類: 特許

番号: 特願 2 0 0 9-6 0 9 7 8

出願年月日: 2009/03/31

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/bunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 利郎 (MATSUI TOSHIRO)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号: 2 0 2 3 8 9 4 2

(2) 研究分担者

松本 清 (MATSUMOTO KIYOSHI)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号: 8 0 0 3 8 3 2 2

佐藤 匡央 (SATO MASAO)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号: 9 0 2 9 4 9 0 9

(H20～: 研究分担者)

木元 幸一 (KIMOTO KOICHI)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号: 6 0 1 3 3 3 7 8

(H19→H20: 研究連携者)

(3) 連携研究者

木元 幸一 (KIMOTO KOICHI)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号: 6 0 1 3 3 3 7 8