

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年5月11日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380075

研究課題名（和文） ペプチドアレイを活用したコレステロール代謝改善ペプチドの作用機構
解明と応用

研究課題名（英文） The clarification and application of mechanism of hypocholesterolemic
peptides by peptide array

研究代表者

長岡 利 (NAGAOKA SATOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50202221

研究成果の概要（和文）：

[1]ペプチドアレイにより、大豆タンパク質のCHOL吸収抑制作用に寄与している胆汁酸結合ペプチドを探索した結果、対照ペプチドより胆汁酸結合能が高い胆汁酸結合ペプチドを発見した。さらに、CHOL吸収抑制ペプチドであるVAWWMYの高機能化ペプチドとして、PWWMY、VIWWFKを発見した。

[2]ラクトスタチンのコレステロール 7 α -水酸化酵素（CYP7A1）遺伝子転写活性化機構をLUC（ルシフェラーゼ）分析で解析した結果、HNF4およびHNF3結合領域がラクトスタチンのCYP7A1遺伝子転写活性化に重要であることを発見した。

研究成果の概要（英文）：

[1] This experiment was designed to identify the peptides that have bile acid-binding ability from soybean protein to inhibit an intestinal cholesterol absorption by peptide array. We found some bile acid binding peptides in this screening. Furthermore, we evaluated the efficient modification of VAWWMY (cholesterol absorption inhibitory peptide) activity by peptide array. We found PWWMY and VIWWFK as new peptides with higher activity than VAWWMY.

[2] We studied the mechanism of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene transactivation by a luciferase promoter assay. We found that HNF3 or HNF4 were incorporated into the lactostatin induced the transactivation of CYP7A1 gene in HepG2 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総 計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：コレステロール、ラクトスタチン、コングリシニン、ペプチドアレイ、胆汁酸

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール (CHOL) 血症、動脈硬化症予防改善のための多くの医薬品・食品の登場にもかかわらず、世界の死因の第1位は、依然、心臓血管疾患であり、その原因である動脈硬化症の根本的解決には至っていないのも厳然たる事実である。このような背景から、食物繊維、大豆タンパク質などが研究されてきたが、満足できる食品成分が発見されていないことは、この事実からも明白である。つまり従来の食品や医薬品では高 CHOL 血症の予防改善には不十分であり、そのための理論・技術も未成熟である。よって、CHOL 代謝を改善するための革新的理論・技術が必要である。

ところで、大豆タンパク質による血清 CHOL 低下作用は広く知られているが、CHOL 吸収抑制作用を発揮する大豆タンパク質由来胆汁酸結合ペプチドは、グリシニン由来 VAWWY (長岡ら: Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 1738-1741 (2010)) 以外は不明である。つまり、大豆タンパク質を構成する、どのアミノ酸配列がコレステロール吸収抑制作用に寄与する胆汁

酸結合ペプチドであるのかを、ペプチドアレイにより網羅的に解析し、大豆タンパク質の CHOL 吸収抑制作用に寄与している胆汁酸結合ペプチドを発見することは新規性に富んだ研究である。

また、90 年以上の長い間、誰も発見できなかった CHOL 代謝改善ペプチド (ラクトスタチン: IIAEK) を長岡らは世界で初めて発見した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 11-17 (2001))。ラクトスタチンの CHOL 代謝改善作用は動物実験では医薬品 β -シトステロールよりも強力である。ところで、体内での CHOL 分解は肝臓 CHOL 7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) を律速酵素とする経路にのみ依存している。CYP7A1 のマウスでの過剰発現は高 CHOL 血症・動脈硬化症を改善する。つまり CYP7A1 の活性化剤は高 CHOL 血症・動脈硬化症改善素材である。しかし、CYP7A1 活性化剤は転写因子 LXR リガンドの 22-ヒドロキシ CHOL などであり、副作用ため活用不可能である (Nat. Genet. 30, 151-157 (2002))。よって、有用な CYP7A1 活性化剤は未発見である。特筆すべきことに、ラクトスタチンの標的遺伝子が CYP7A1 であることをマウスで特

定した (アメリカ油化学会出版 (2005))。さらに、ラクトスタチンはヒト肝臓培養細胞 HepG2 で、CYP7A1 遺伝子を活性化し、CHOL 分解を促進することを発見した。この CYP7A1 活性化は細胞内カルシウム (Ca) 上昇を伴い、MAP キナーゼ (PD98059)、Ca チャネル (Diltiazem) などの阻害剤で防止された。つまり、ヒト肝臓には Ca チャネルに関連した MAP キナーゼ依存型の新規 CHOL 分解調節系が存在することを発見した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 352, 697-702 (2007))。

以上の背景から、研究ではラクトスタチンに媒介される新規 CHOL 分解調節系の詳細な解明とペプチドアレイによる新規 CHOL 代謝改善ペプチドの効率的発見とその高機能化を目指すこととする。

2. 研究の目的

CHOL 吸収抑制作用を発揮する大豆タンパク質由来胆汁酸結合ペプチドは、グリシニン由来 VAWWMY (長岡ら: Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 1738-1741 (2010)) 以外は不明である。そこで、大豆タンパク質を構成する、どのアミノ酸配列が CHOL 吸収抑制作用に寄与する胆汁酸結合ペプチドであるのかを、ペプチドアレイにより網羅的に解析し、大豆タンパク質のコレステロール吸収抑制作用に寄与している胆汁酸結合ペプチドを発見することを目的とした。

さらに、大豆グリシニン由来の VAWWMY を鍵ペプチドとして、ペプチドアレイによりアミノ酸置換を行ってペプチドを評価し、VAWWMY の効率的な高機能化を検討することを目的とした。

第2に、CHOL 代謝改善ペプチド (ラクトスタチン: IIAEK) を私たちは世界で初めて発見した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 281,

11-17 (2001))。さらに、ラクトスタチンの標的遺伝子が CYP7A1 であることをマウスで特定し、ヒト肝臓には Ca チャネルに関連した MAP キナーゼ依存型の新規 CHOL 分解調節系が存在することを発見した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 352, 697-702 (2007))。

以上の背景から、ラクトスタチンに媒介される新規 CHOL 分解調節系の詳細な解明とペプチドアレイによる新規 CHOL 代謝改善ペプチドの効率的発見とその高機能化を目指すこととする。

3. 研究の方法

[実験1] β -コングリシニン (α 、 α' 、 β サブユニット) の各サブユニットの全アミノ酸配列からペプチドアレイを作成し、タウロコール酸とハイブリダイゼーションした。抗コール酸抗体、蛍光標識抗体と順次反応させ、蛍光強度を測定した。

さらに、大豆グリシニン由来の VAWWMY を鍵ペプチドとして、ペプチドアレイによりアミノ酸置換を行ってペプチドを評価し、VAWWMY の効率的な高機能化を検討した。

[実験2] ラクトスタチンのコレステロール 7α -水酸化酵素 (CYP7A1) 遺伝子転写活性化機構を CYP7A1 遺伝子プロモーターの種々の変異プラスミドを用いて解析した。たとえば、転写因子 LXR 応答領域の欠損プラスミドや CYP7A1 を活性化する HNF4 結合領域の欠損プラスミドなどを作成し、LUC (ルシフェラーゼ) を連結し、LUC 分析を行なった。

4. 研究成果

[実験1] 対照ペプチドと比較して、より胆汁酸結合能が高い数個の胆汁酸結合ペプチドを発見した。これらは従来法 (in vitroで放

射性胆汁酸との結合能を定量)によっても、胆汁酸結合能を示した。これらの胆汁酸結合ペプチドには、医薬品コレステラミンと同程度の強力なコレステロールミセル溶解性の阻害作用を発揮するペプチドも存在した。

さらに、大豆グリシニン由来のVAWWMYを鍵ペプチドとして、ペプチドアレイによりアミノ酸置換を行ってペプチドを評価し、VAWWMYの効率的な高機能化を検討した。その結果、PWWWY、IPWYFY、VIWWFK、IYWYMYなどが胆汁酸結合ペプチドとして同定された。VAWWMYよりも強力にコレステロールミセル溶解性を阻害するVAWWMY改変ペプチドPWWWY、VIWWFKを見出した。これらVAWWMY改変ペプチドPWWWY、VIWWFKはin vivoでコレステロール吸収抑制作用を発揮した。

[実験2] ラクトスタチンのコレステロール7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) 遺伝子転写活性化機構をCYP7A1遺伝子プロモーターの種々の変異プラスミドを用いて解析した結果、HNF4およびHNF3結合領域がラクトスタチンによるCYP7A1遺伝子転写活性化に重要であることを発見した。

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3件)

1. Takeshita, T., Okochi, M., Kato, R., Kaga, C., Tomita, Y., Nagaoka, S. and Honda, H.: Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis. J. Biosci. Bioeng. (2011) "in press"
(査読有り)

2. Nagaoka, S., Nakamura, A., Shibata, H. and Kanamaru, Y.: Soystatin (VAWWMY), a novel

bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74, 1738-1741 (2010) (査読有り)

3. Nakade, K., Kaneko, H. Oka, T., Ahhmed, A.M., Muguruma, M., Numata, M. and Nagaoka, S.: The cattle heart protein hydrolysate ameliorates hypercholesterolemia accompanying with the suppression of cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 607-612 (2009) (査読有り)

[学会発表] (計6件)

1. 長岡 利、高橋千奈、加藤由喜奈、小林浩子、後藤剛、加賀千晶、大河内美奈、加藤竜司、本多裕之：ペプチドアレイによる大豆由来疎水性胆汁酸結合ペプチドの網羅解析、日本栄養食糧学会第65回大会講演、2011年5月14日(東京)

2. 井辰かおる、後藤剛、長岡 利：ラクトスタチンの媒介する新規肝臓コレステロール分解調節系、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月26日(京都)

3. 高橋千奈、小林浩子、山下祐加、森川健正、加賀千晶、大河内美奈、加藤竜司、本多裕之、後藤剛、長岡 利：ペプチドアレイを活用した大豆 β -コングリシニン由来新規胆汁酸結合ペプチドの網羅解析、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日(東京)

4. 長岡 利、石川久純子、金丸義敬：コレステロール代謝改善ペプチド(ラクトスタチン：IIAEK)は腸管からインタクトな形で吸収され

る、第63回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集p. 231、2009年5月22日（長崎）

5. 世古聖士、森川健正、長岡 利：ラクトスタチンの媒介するコレステロール分解調節系の解析、第 63 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集p. 230、2009年5月22日（長崎）

6. 長岡 利：食品タンパク質由来の脂質改善ペプチド、第63回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム「機能性タンパク質・ペプチドと生体利用」（招待講演）第63回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集p. 52、2009. 5. 21（長崎）

〔図書〕（計4件）

1. 長岡 利：機能性タンパク質・ペプチドと生体利用，第 2 章 食品タンパク質由来の脂質代謝改善ペプチド，建帛社，pp. 31-50（2010）

2. 長岡 利：大豆のすべて，第 5 章第 1 節タンパク質の機能性，6 項ペプチド，6-2 コレステロール代謝改善，サイエンスフォーラム，pp. 207-210（2009）

3. 長岡 利：機能性ペプチドの最新応用技術，第 9 章 コレステロール代謝改善ペプチド，シーエムシー出版，pp. 86-95（2009）

4. 長岡 利：種子のバイオサイエンス（改訂版），8. 種子成分と食品機能性，8-1-5 ダイズの生理機能性ペプチド，学会出版センター，pp. 263-265（2009）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：機能性ペプチドを表すルール of 抽出法、機能性ペプチドの設計法及び調製法、

ポリペプチド又はポリペプチド含有組成物の評価法、並びに機能性ペプチド

発明者：長岡 利、本多裕之、加藤竜司ら

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2009-071498

出願年月日：2010年3月24日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 利 (NAGAOKA SATOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50202221

(2) 研究分担者

加藤竜司 (KATOU RYUJI)

名古屋大学大学院工学系研究科・助教

研究者番号：50377884

(3) 連携研究者

()

研究者番号：