

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：56301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15490

研究課題名（和文）抗炎症効果を有する新規リゾチーム由来ペプチドの探索および作用機構の解明

研究課題名（英文）Search and elucidating action-mechanisms of novel peptide from lysozyme having anti-inflammatory effects

研究代表者

田頭 歩佳（TAGASHIRA, Ayuka）

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・助教

研究者番号：40847282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トリプシン処理された卵白由来リゾチームの分解断片の抗炎症作用に着目した。主にトリプシン処理リゾチームの分解断片に含まれる3種類のオリゴペプチドについて検討した。その結果、すべてのオリゴペプチドにおいて炎症性サイトカインであるインターロイキン（IL）-6の産生抑制がみられ、特に疎水性アミノ酸が多く含まれているオリゴペプチドにおいて特に抑制効果がみられた。マクロファージにおいて、リゾチームは細胞内部に取り込まれることが明らかになっていることから、リゾチーム由来のオリゴペプチドにおいても細胞内部に取り込まれた後に作用を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵白由来リゾチームは安全性の高い天然食品添加物として多くの食品に用いられており、抗菌作用以外にも抗ウイルス作用、免疫促進作用を有することが明らかになっている。本研究では、リゾチームの機能性食品素材としての有効性をさらに高めるために、特に抗炎症効果に着目した。また、タンパク質の多くは小腸においてオリゴペプチドの形で吸収され、かつその吸収スピードはアミノ酸の数倍であることが明らかになっていることから、リゾチーム由来オリゴペプチドの抗炎症作用および活性部位を明らかにすることは、安全性が高く吸収効率の良い機能性食品素材の開発への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the anti-inflammatory effects of trypsin-treated lysozyme-fragments from hen egg. Mainly, we investigated three types of oligopeptides contained in the fragments of trypsin-treated lysozyme. As a result, these oligopeptides inhibited the production of inflammatory cytokine, interleukin (IL)-6, in LPS-stimulated RAW264.7. Particularly, the oligopeptide containing amount of hydrophobic amino acids suppressed IL-6 production. Since it has been shown that lysozyme is taken into the cells in macrophages, it suggested that lysozyme-derived oligopeptides also exhibit effects after being taken into the cells.

研究分野：食品科学

キーワード：リゾチーム ペプチド RAW264.7 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リゾチームは、細菌の細胞壁を分解する抗菌作用を有する酵素であり、分子量は約1万4000の塩基性タンパク質($pI=11$)である。涙や粘膜に含まれるリゾチームが感染を予防したり、唾液中に含まれるリゾチームが校内で抗菌作用を示したりするなど、リゾチームは侵入微生物に対する水際のバリアとして、初期防御に大きく関わっている。現在、卵白から工業的に抽出したリゾチームは安全性の高い天然の食品添加物として、その抗菌作用により、日持ち向上や発酵、酵素処理中の微生物制御を目的として多くの食品に用いられており、その利用の範囲は、チーズや畜産製品、お菓子など多岐にわたっている。一方、リゾチームは抗菌作用以外に、免疫促進作用を有することが明らかになっており、申請者はリゾチームの機能性食品素材としての有効性をさらに高めるため、リゾチームの免疫調節活性について、特に抗炎症効果に着目した。これまでに先行研究によって、リゾチームがグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)と結合して複合体を形成し、LPSの生物活性を消失させることで炎症応答を抑制することが報告されている。加えて、報告者はリゾチームがLPSとの複合体形成とは異なる機序によっても抗炎症効果を示すことを明らかにした。さらに、リゾチームをタンパク質分解酵素であるトリプシンで処理することによって得られる分解断片にも、抗炎症効果があることを明らかにした。これらの結果から、リゾチーム分解断片中に活性ペプチドが含まれることが示唆されるものの、そのアミノ酸配列は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、トリプシン処理によって得られたリゾチームの分解断片に含まれる活性ペプチドおよびその配列を特定し、作用メカニズムの解明を目的とした。ペプチドは構成するアミノ酸の種類や配列の違いにより、栄養以外の生理活性を有するものがあり、これまでにリゾチーム由来ペプチドにおいて、抗菌活性を有するものが報告されている。その一方で、抗炎症作用を有するペプチドの報告は少なく、リゾチームの分解断片に含まれる活性ペプチドの配列を明らかにすることで、抗炎症作用を有する機能性ペプチドの情報の蓄積の一助となると考えた。

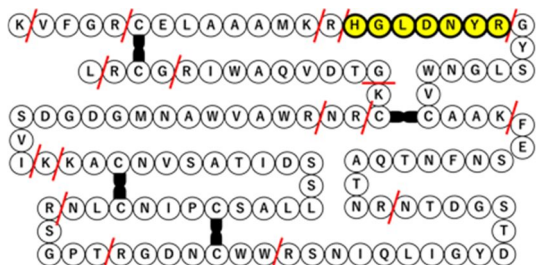
3. 研究の方法

卵白由来リゾチームを、一定時間トリプシンで処理することで分解した。トリプシン処理で得られたリゾチーム分解断片をHPLCにより分画し回収したのち、活性評価を行った。活性評価は、マウス由来マクロファージ様細胞株RAW264.7をLPSで炎症誘導し、炎症性サイトカイン産生に与える影響を酵素抗体法(ELISA)、細胞毒性はWST-8法により評価した。

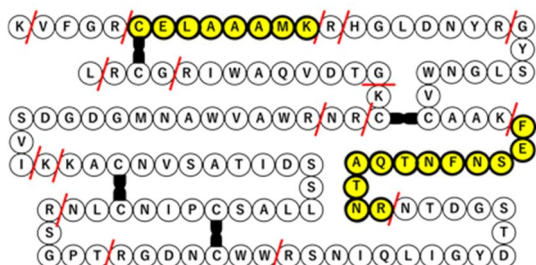
4. 研究成果

これまでの検討において、トリプシン処理によって得られたリゾチーム分解断片にも抗炎症効果があることが明らかになっていることから、HPLCを用いて分解断片を分画し、各画分を炎症状態に誘導したRAW264.7に作用させ、炎症性サイトカイン産生に与える影響をELISAにより検討した。その結果、7つの画分のうち、2つの画分において炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-6および腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor; TNF)- α の産生抑制がみられた。なお、得られたすべての画分において、細胞毒性は認められなかった。

次に、活性が認められた画分をLC-MS分析により解析した結果、3種類のオリゴペプチド(それぞれ7残基、8残基、12残基)が含まれていることが明らかとなった。これらのオリゴペプチドを活性ペプチドの候補とし、炎症状態のRAW264.7に与える影響を検討した。その結果、すべてのオリゴペプチドにおいてIL-6産生抑制効果がみられたが、その一方で、TNF- α については1種類のオリゴペプチドでのみ抑制がみられた。この1種類のオリゴペプチドは3種類のうち最も多くの種類および数の疎水性アミノ酸を有している。また、他のオリゴペプチドに比べ



画分①に含まれるペプチド(1種類)



画分②に含まれるペプチド(2種類)

図 活性ペプチド候補(3種類)

疎水性アミノ酸が連続して結合していることから、疎水性が大きいことが示唆された。先行研究において、リゾチームはマクロファージの細胞内部に取り込まれることが明らかになっている。このことから、リゾチーム同様、細胞表面上の受容体に結合して作用するのではなく、細胞の脂質二重膜を通過して細胞内で作用するのではないかと考えられた。また、近年朝刊炎症抑制効果が報告されているアラニンが連続して結合している部分があり、またグルタミン酸、アラニン、グリシンの配合剤には抗炎症作用をはじめとした複数の作用があると考えられており、これらのアミノ酸についても、影響を示している可能性が示唆された。

今後は上記の疎水性アミノ酸に着目して、さらなる作用検討を進めると同時にアミノ酸配列の特定を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 田頭歩佳	4. 巻 4(11)
2. 論文標題 抗炎症効果を有する新規リゾチーム由来ペプチドの探索および機能解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ（北隆館）	6. 最初と最後の頁 106-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------