

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248014

研究課題名(和文) 生体調節ペプチドの科学的基盤構築

研究課題名(英文) Elucidation of Evidence-based Physiological Functions of Small Peptides

研究代表者

松井 利郎 (MATSUI, TOSHIRO)

九州大学・(連合)農学研究科(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) 32,300,000円、(間接経費) 9,690,000円

研究成果の概要(和文)：低分子ペプチドの生体調節機能を明示し、先端的食科学の構築を図ることを目的として、血管及びその他組織での生理作用発現性について詳細な解明を試みた。その結果、塩基性ジペプチド類は内皮非依存的に血管を弛緩させること、その作用は細胞内でのカルシウムシグナル系の抑制であることを細胞並びにMDシミュレーション法により明らかにした。さらに、この血管弛緩作用は加齢に伴い、また高血圧進展に伴い減弱するとの新たな知見を得た。さらに、体内吸収過程の可視化に成功するとともに、筋肉組織においてAMPK活性化を誘導し、抗糖尿病作用を発現する可能性を初めて明示することができた。

研究成果の概要(英文)：In order to get new insights on physiological functions of small peptides, their potentials in tissues such as vessels and muscles were investigated in this study. As a result, it was clarified that basic di-peptides could relax contracted thoraces aorta in an endothelium-independent manner through the suppression of Ca²⁺-related signaling pathways by cell-line experiments and in silica analyses. Furthermore, we have demonstrated for the first time that the potent vasorelaxation power of basic di-peptides was ameliorated with aging and hypertension. We further got new evidence that basic di-peptides could absorb intact across intestinal membrane by our proposed new visualization technique (MADL-MS), and show anti-diabetic effect in muscle cells.

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：低分子ペプチド 生活習慣病予防 機能性食品 カルシウムシグナル MSシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

近年の研究において、Val-Tyr, Ile-Pro-Pro 及び Val-Pro-Pro 等の低分子ペプチドが軽症高血圧患者に対して高血圧予防作用を示すことが報告されている。さらに、これまでの研究によって低分子ペプチド Trp-His が apolipoprotein E (apo E)欠損マウスにおける血管機能を改善することを報告してきた。本知見は、低分子ペプチドが血管系疾患に対して有効な食品成分である可能性を示すものである。また Trp-His 及び His-Arg-Trp が L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入を阻害することで、血管弛緩作用を発現していることも明示してきた。さらに内皮非依存な血管弛緩作用を示す低分子ペプチドを多数同定しており、中でも Trp-His や His-Arg-Trp 等の複素環側鎖を有するものが他の低分子ペプチドと比較してより強い弛緩活性を示すことを報告してきた。

2. 研究の目的

上記のように低分子ペプチドが血管機能改善作用を構造特異的に示すことを明らかにしてきたが、1)血管機能改善機構の詳細、2)その他の疾患予防作用(抗糖尿病)については十分に解明されておらず、ペプチド摂取の有用性(抗生活習慣病予防作用)を論じるに至っていないのが現状であった。そこで、本課題においては所定研究期間において上記課題を中心に、in vitro、ex vivo 及び in silico の観点から網羅的にペプチド機能を明らかにすることを目的として研究を実施した。以下、その結果を列記する。

3. 研究の方法

(1)血管平滑筋細胞試験

細胞は8週齢雄性WKYラット (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC., Kanagawa, Japan) から単離した血管平滑筋細胞 (VSMC) を用いた。継代操作は0.025% Trypsin /EDTA 溶液を用いて行った。まず、培養培地を吸引除去し、HEPES 緩衝液により残存している血清を洗浄・除去した (DMEM 中の Ca^{2+} も Trypsin の活性を抑制するので、HEPES or PBS は洗浄用に使えるが、PSS は使えない)。次に Trypsin /EDTA 溶液を 1.5 mL 加え、インキュベーター内で5分間放置した。その後、位相差顕微鏡 OLYMPUS IX70 により 90%以上の細胞が剥離している (Trypsin 処理時間が長くなると細胞にダメージを与えるので剥離が不十分な場合、タッピングを行う) ことを確認した後、TNS を等量添加し、反応を停止した。これを 15 mL のアシストチューブに移し、遠心分離 (4、1000×g、1 min) を行った。遠心後、細胞がチューブ下端に沈殿しているのを確認し、上清を吸引除去した。継代の場合は細胞残渣に血清培地を適量加えた後、培養容器に播種し、インキュベーターで培養した。実験の場合は、後述の処理を続けて行った。なお、継代数5の細胞を実験に使用した。

また、蛍光プローブである Fura-2-AM による細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は以下の通りである。VSMC を 1750 μ L PSS により懸濁し、1 μ M PD123177 (SIGMA ALDRICH Corp. St. Louis, MO) 及び 1, 10, 100 μ M adenine となるように細胞懸濁溶液を調製した。その後 10 min 遮光下でインキュベートした (37)。測定は蛍光検出器 RF-5300PC (Shimadzu) を用いて、励起波長 340 nm (F340)、380 nm (F380) 及び蛍光波長 500 nm の 2 波長励起蛍光測定を行った。但し、励起波長は 0.5 秒ごとに切り替えた。測定開始後 50 秒の細胞内 Ca^{2+} 濃度をモニターし、測定開始後 50 秒後に刺激剤として Ang が終濃度 10 μ M となるようにシリンジにて添加した。測定開始 200 秒後(刺激後 150 秒後)に 100% Triton X-100 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を 33 μ L 加え Sb2 を、続いて 100 mM の EGTA を 100 μ L 加え Sf2 を得た。これらのパラメーターを Grynkiewicz らにより提案された式を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 ($\Delta [Ca^{2+}]_i$, nM) を経時的に算出した。この式において R_{max} は Triton X-100 を添加した場合の F340 と F380 の蛍光強度比を、 R_{min} は EGTA を添加した時の F340 と F380 の蛍光強度比を、 R は測定中の F340 と F380 を示している (F340/F380)。また、 K_d には 37 での Fura-2 と Ca^{2+} の解離定数 (224 nM) を用いた。

(2) 血管弛緩性試験

血管張力測定には Transducer (Micro Tissue Organ Bath, Model MTOB-1 Z, Labo Support, Osaka, Japan) を備えた 4-channel amplifier (emca technologies, Paris, France) を用いた。血管張力測定には 8, 40 週齢雄性の Wistar-Kyoto (WKY) ラット及び自然高血圧発症モデルラット (SHR) (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC., Kanagawa, Japan) を用いた。実験に供する各ラットをセボフレン麻酔下において全血屠殺し、開胸後素早く胸部大動脈を摘出した。摘出した血管を分割し、血管張力試験に供しない血管部分は液体窒素により急速凍結し、-80 下にて保存した。血管張力試験に供する血管は 37 PSS バッファー (以下 PSS と表記: 組成; NaCl 145, KCl 5, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.5, Glucose 10, HEPES 5, (数字は濃度 (mM) を示す)) 中でバブリングをしながら 45 分間平衡化した。この間、15 分おきに混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2) でバブリング処理した PSS を用いて平衡化溶液を交換した。その後、外膜周辺脂肪組織を素早く除去し、2~3mm に切断し大動脈血管リング標本作製した。

4.5 mL PSS を満たした Organ Bath 中のフック (100 μ m) 対に血管リング標本をマウントし、2.0g の張力が得られるように初期張力を負荷した後、45 分間平衡化を行った。この間 15 分毎に混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2) でバブリング処理した PSS を用いて平衡化

溶液を交換した。その後 10 μ M Phenylephrine (PE)を 0.5mL 添加し、血管を収縮させた(終濃度: 1 μ M)。30 分後、張力が一定であることを確認し、この時点での張力上昇値を PE による収縮量とした。その後、弛緩剤である Acetylcholine (Ach)を終濃度が 10 μ M となるように添加し、弛緩血管を弛緩させた。なお、これを Ach 弛緩量とした。Ach による弛緩を確認後、Organ Bath 中の溶液を回収し、新たな 4.5 mL PSS を添加することで、Wash した。Wash 後張力が安定していることを確認し、収縮剤である 10 μ M Angiotensin II (Ang II)または 10 μ M Bay K 8644 を添加(各終濃度 1 μ M)した。これら収縮剤による収縮量をそれぞれ Ang II 収縮量または Bay K 8644 収縮量とした。

(3) in silico 解析

タンパク質の立体構造の修正には Tripos 社製分子修正支援ソフト SYBYL ver. X.1.1 を用いた。MD シミュレーションには Amber 9 を、動画の解析には VMD for win32, ver.1.8.6 を用いた。また、動画の作成には Adobe premiere 6.0 を用いた。MD 計算には九州大学のスーパーコンピューターシステムである富士通 PRIMEQUEST、共有 64 コアのキューを使用した。環境は以下の通りである。

演算ノード : 富士通 PRIMEQUEST 580

使用メモリ : 89.2GB

コア : 64 コア

ノード数 : 1 ノード

ペプチド構造の作成では、血管張力試験において血管弛緩作用が認められている HRW、HKW、HW、WH、WL、WP、WV の計 7 種のペプチドについてドッキングを行うこととした。まず ChemDraw で構造を描画後、Chem3D で構造を読み込み、半経験的分子軌道計算プログラム MOPAC を用いて、以下の条件で水中での構造最適化を行った。

Job Type : Minimize Energy

Theory : AM1, Closed Shell

Properties : Cosmo Solvation in Water

General (Additional Keyword) : ESP=78.4

GEO-OK MMOK

なお、作製したペプチドは N 末端、C 末端のどちらもイオン化した状態 ($-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{COO}^-$) に設定した。構造最適化後の立体構造を GaussView で読み込み、ファイル形式を mol2 (SYBYL で認識可能な形式) に変換した。この構造を SYBYL で読み込む際、座標情報のみが保存されており、原子のタイプ(炭素、窒素などの原子軌道の種類; sp³ 等)に関する情報が欠損した状態となっている。そこで、過去に取扱っていた ACE/N-domain (PDB code: 2C6N) 構造中の各アミノ酸残基の原子タイプを基に、作成したリガンドに対し原子タイプの割り付けを行った。

4. 研究成果

(1) 血管機能改善ペプチド及びその類縁体の血管弛緩機構解明

これまで、血管弛緩性ペプチド Trp-His は血管平滑筋細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制することを示してきた。その作用の一部は L 型 Ca^{2+} チャンネルに対する結合による細胞外の Ca^{2+} 流入阻害作用であることを示したが、L 型 Ca^{2+} チャンネルのアゴニストである Bay K 8644 誘導性細胞内 Ca^{2+} 上昇抑制作用は、Ang II 刺激に対する抑制作用の 4 分の 1 まで減弱していた。主要な昇圧ホルモンである Ang II は細胞内の Ca^{2+} シグナルを活性化することが知られていることから、Ang II 刺激に対する Trp-His の細胞内 Ca^{2+} 調節作用は細胞内 Ca^{2+} シグナルの制御が関与することが推察された。そこで、血管弛緩性ペプチド Trp-His の細胞内 Ca^{2+} シグナル調節機構の解明を試みた。その結果、Trp-His のペプチド構造は VSMC の血管収縮シグナルを活性化させる [Ca^{2+}]_i 上昇を制御することに重要な役割を果たしていた。さらに、Trp-His は、AT₁R アンタゴニストとして作用するのではなく、PLC 関連 Ca^{2+} シグナル系における CaMK II 活性を抑制することが明らかとなった。CaMK II は VDCC を賦活化(リン酸化)させるとの知見から、VDCC のリン酸化レベルを評価したところ、Trp-His は VDCC リン酸化を抑制するとの知見を初めて得ることができた。

次に Trp-His と同様にヘテロ窒素環を有するプリン化合物 adenine (6-amino-6H-purine) を用いて、その血管弛緩作用並びに Trp-His 活性発現に関する構造要件の解明を図った。ラット血管モデルを用いて adenine の血管弛緩活性を評価した。その結果、adenine に明らかな血管弛緩作用が認められ ($\text{EC}_{50} = 0.40 \text{ mM}$)、さらに内皮除去血管においても同等の弛緩活性が認められた。また、adenine アナログ体を用いて adenine の血管弛緩作用における構造活性相関について検討を行った結果、adenine の血管弛緩作用発現には正電荷を帯びていないイミダゾール環及びその環上プロトンが関与していることが判明し、ジペプチドによる血管弛緩作用についても同様に His のイミダゾール環プロトンの存在が重要であるとの知見を得ることができた。

次いで、血管平滑筋細胞における adenine の作用メカニズム解明を目的とし、以後の検討を行った。なお、細胞は 8 週齢雄性 WKY ラットから単離した血管平滑筋細胞 (VSMC) を用いた。その結果、adenine は 100 μ M の濃度に至るまで VSMC に対して毒性を示さなかった (% of Control : 1 μ M ; 100.1, 10 μ M ; 106.1, 100 μ M ; 99.6)。そこで増殖因子である FBS (10%) を含む DMEM を用いて増殖させた VSMC を用いて、adenine の増殖抑制試験を行った。その結果、adenine は濃度依存的な増殖作用を示した。次に adenine による VSMC 内 Ca^{2+} 動態への関与評価を実施した。なお、細胞内 Ca^{2+} の上昇を誘導する Ang II を刺激剤として用い、

adenine 存在下において、Ang II 刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 変化をリアルタイムに測定することで adenine の作用性を評価した。その結果、Ang II による VSMC 内 Ca^{2+} 収縮シグナル賦活化に対して、adenine が抑制的に作用することが明らかとなった。また、adenine は L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入に対して抑制せず、チャンネルブロッカーとしての作用は有していないことが明らかとなった。ここで、血管弛緩性ペプチド Trp-His がチャンネルブロッカーとしての作用を有することを考慮すると、adenine と Trp-His は共に内皮非依存的な血管弛緩作用を有するイミダゾール系化合物であるが、それぞれは異なるメカニズムにより血管弛緩を誘導することが示された。

Adenine による作用シグナル同定のため、AT1R に共役している PLC を刺激する実験を行った。刺激剤を PLC アゴニストである *m*-3M3FBS (20 μ M) とした。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇値は、測定開始後 50 秒間の $[Ca^{2+}]_i$ 平均と TritonX 添加 5 秒前の $[Ca^{2+}]_i$ 平均との差とした。その結果、*m*-3M3FBS は、VSMC 内の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に対し、adenine は顕著に抑制した ($\Delta[Ca^{2+}]_i$: Control, 57.8 ± 10.3 nM, adenine, 20.8 ± 7.3 nM)。このことから、adenine は、AT1R の受容体アンタゴニストとして作用するのではなく、PLC シグナル系を抑制することが示唆された。

(2) 血管弛緩性食品成分の加齢血管における血管弛緩性評価

これまでに、当研究室で見出してきたペプチドや adenine をはじめ血管弛緩性食品成分が多数報告されているが、これらの知見は全て“正常血管”をモデルとして評価されたものである。他方、高血圧や動脈硬化などといった

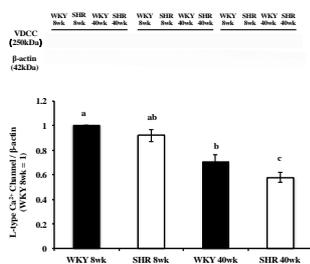


Fig. 3.6. Detection of L-type Ca^{2+} Channel by Western-blotting (20 μ g protein per lane) in thoracic arteries from WKY (8, 40wk), SHR (8, 40wk).

図1 加齢血管と Ca チャンネル発現量

血管関連疾患は中高年以上で発症する加齢と密接に関わる疾患であるが、加齢との関連に基づきその作用を明らかとする研究例は極めて少なく、加齢血管における詳細な作用性の解明には至っていないのが現状である。そこで本研究では血管状態を評価し、加齢血管に対する食品成分の弛緩性を評価するこ

とを目的とした。PE 収縮値及び ACh 弛緩値の比を血管伸縮値としたところ、各ラット種共に加齢に伴い伸縮値が減弱する傾向が見られた(ACh 弛緩値 / PE 収縮値: WKY 8wk ; 0.72 ± 0.06 , SHR 8wk ; 0.72 ± 0.08 , WKY 40wk ; 0.53 ± 0.08 , SHR 40wk ; 0.48 ± 0.09) (Fig.1)。このことから、WKY, SHR 種間に差は見られないものの、加齢に伴い血管の伸縮性が減弱することが示された。また、AT1R, AT2R 共に発現量が増加傾向にあるという結果が得られ、加齢に伴う Ang II 誘導収縮シグナルの賦活化に並行し、弛緩シグナルについても同様に賦活化している可能性が示された。他方、L 型 Ca^{2+} チャンネル介した血管収縮においては、加齢による影響は認められないことが明らかとなった。しかしながら、L 型 Ca^{2+} チャンネル発現量を評価した結果、ラット種間において差は認められなかったものの、WKY, SHR 両ラット種において加齢に伴う明らかなチャンネル発現量の低下が認められた。すなわち加齢に伴う収縮活性変化と、刺激受容体発現量変化には相関はなく、シグナル因子活性が大きく関与している可能性が考えられた(図1)。

(3) CaM - Ca^{2+} Complex の in vitro 及び in silico 解析

これまでの検討の結果、Trp-His の血管弛緩メカニズムとして、1) ジヒドロピリジン様 L 型 Ca^{2+} チャンネルブロッカーとしての Ca^{2+} 流入抑制、2) 血管平滑筋細胞におけるカルモジュリンキナーゼ II (CaMK II) の活性阻害及び 3) L 型 Ca^{2+} チャンネルのリン酸化抑制を介して Ca^{2+} シグナルを制御することを明らかとしてきた。そこで、さらなる血管弛緩作用機構として、CaMK II が Ca^{2+} -CaM 複合体依存性酵素であることから、Trp-His による Ca^{2+} -CaM 複合体形成阻害作用についてさらなる検討を行った。

その結果、Trp-His による Ca^{2+} -CaM 複合体形成阻害活性を検討したところ、Trp-His の濃度依存的に Ca^{2+} -CaM 複合体形成率は減少したことから、Trp-His が Ca^{2+} -CaM 複合体形成を阻害することが明らかとなった。さらに、Trp-His の逆配列である His-Trp の添加においても Ca^{2+} -CaM 複合体形成率が減少したこと、構成アミノ酸である Trp と His の等量混合物添加では複合体形成率に変化が見られなかった。以上の結果より、Trp-His による Ca^{2+} -CaM 複合体形成阻害作用に構成アミノ酸の配列の順序は関与していないこと、及び Trp-His と His-Trp はペプチド体として Ca^{2+} -CaM 複合体形成を阻害していることが明らかとなった。

CaM は 4 つの Ca^{2+} 結合部位を有しており、それぞれに Ca^{2+} が協同的に結合することが知られている (K_{d1} : 0.10 μ M, K_{d2} : 0.03 μ M, K_{d3} : 0.32 μ M, K_{d4} : 0.40 μ M) ことから、Trp-His が Ca^{2+} と CaM の結合の協同性に与える影響を検討した。Hill プロットを行ったところ、Trp-His を添加した場合の Hill 係数

は 1.9 となり、Trp-His を添加していない場合よりも減少した。この結果より、Trp-His は Ca^{2+} -CaM の結合の協同性を減弱させていることが示された。

SYBYL により得られたペプチド・CaM 複

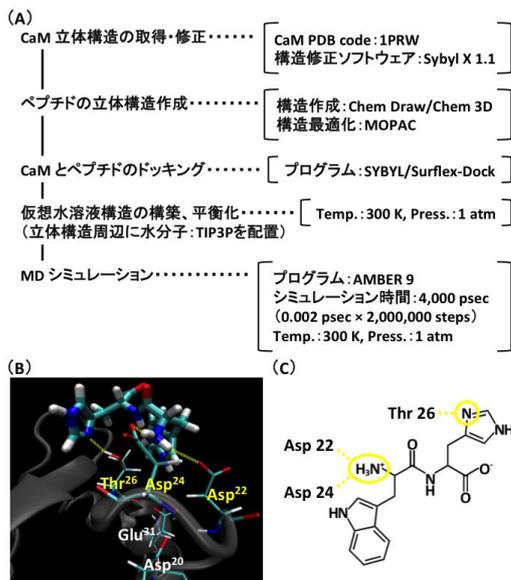


Fig.2 (A) The protocol and conditions for MD simulation. (B) The snap shot of simulation between Trp-His and CaM. Gray rebon model is CaM. Thin stick model is amino acid residues of CaM which are related to Ca^{2+} binding. Thick stick model is Trp-His. Yellow dot line is electrostatic interaction. (C) The relationship between Trp-His and Ca^{2+} binding residues of CaM.

図2 Ca-CaM 複合体の MD 解析

合体構造を用いて、AMBER 9 による計算を行い、塩基性ペプチドである Trp-His 及び His-Trp と CaM の Ca^{2+} 結合部位との間の相互作用に関する *in silico* 解析を行った。その結果、Trp-His がその塩基性官能基である N 末端アミノ基及びイミダゾール環の 1 位窒素原子と CaM の Ca^{2+} 結合残基である Asp22, Asp24, Thr26 との間に水素結合を形成することが明らかとなった。また、その結合の結合自由エネルギーは $G_{bind} = -49.2$ kJ/mol と算出され、 Ca^{2+} と CaM の結合 ($G_{bind} = -74.7$ kJ/mol) の 3 分の 2 程度と弱い結合性をもって水溶液中で安定な複合体を形成可能であることが示された。

以上の結果より、Trp-His は水溶液中でその塩基性官能基と CaM の Ca^{2+} 結合残基との間で水素結合を形成することで Ca^{2+} の結合を競合的に阻害することで Ca^{2+} -CaM 複合体形成を阻害すること考えられた。この結果は、Trp-His をはじめとする塩基性低分子ペプチド類が Ca^{2+} -CaM 複合体形成を阻害することで Ca^{2+} シグナル制御を制御するという新たなメカニズムを支持するものであるといえる。

(3) 筋芽細胞を用いた低分子ペプチド類の抗糖尿病 (インスリン抵抗性改善) 作用の検討
2 種のジペプチド (Trp-His, His-Trp) の新たな健康機能、特にメタボリックシンドロームの予防・抑制作用に関わる機能を細胞レベルで明らかにすることを試みた。

マウス脂肪細胞 3T3-L1 において、各濃度の試料添加時の TNF- による adiponectin の遺伝子発現低下に対する抑制作用を検討した。その結果、試料はいずれの濃度においても TNF- による adiponectin の発現低下を抑制する効果を有しなかった。

次いで、抗糖尿病作用について筋芽細胞を用いて検討を加えた。マウス筋管細胞 C2C12 において、各種試料添加時における AMPK の活性化作用を検討した。その結果、Trp-His 100 μ g/mL 濃度以上の添加後 1 5 分で AMPK の活性化が認められた。Trp-His やカルシウム

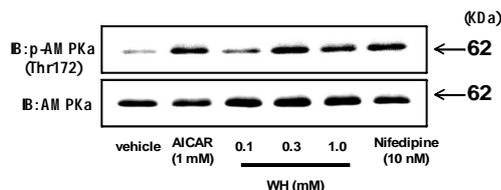


図3 Trp-His および nifedipine の筋管細胞における AMPK 活性化作用

AICAR; positive control (AMPK activator)

チャンネル拮抗剤であるニフェジピンの投与は、外因性カルシウムの流入を止めるにもかかわらず、AMPK の活性化が起きることは、興味深い結果であった。内因性カルシウムの動員、CaMKK を介さずに AMPK を活性化するなど想定できるかもしれない。

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 28 件)

T.Matsui, M.Sato, M.Tanaka, Y.Yamada, S.Watanabe, Y.Fujimoto, K.Imaizumi, K.Matsumoto: Vasodilating di-peptide Trp-His can prevent atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Br. J. Nutr.*, **103**(3), 309-313 (2010).

Z.Wang, S.Watanabe, Y.Kobayashi, M.Tanaka, T.Matsui: Trp-His, a vasorelaxant di-peptide, can inhibit extracellular Ca^{2+} entry to rat vascular smooth muscle cells through blockade of dihydropyridine-like L-type Ca^{2+} channels. *Peptides*, **31**, 2060-2066 (2010).

E. M. N. Nakashima, A.Kudo, Y. Iwaihara, M. Tanaka, K. Matsumoto, T. Matsui: Application of ^{13}C -stable-isotope labeling LC-MRM-MS/MS method for determining intact absorption of bioactive di-peptides in rats. *Anal. Biochem.*, **414**, 109-116 (2011).

S.Tokuda, T.Fukuda, Y.Kobayashi, M. Tanaka, T. Matsui: Uncharged imidazolium moiety in adenine is responsible for endothelium-independent relaxation in contracted thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**(4),

828-830 (2012).

Y.Kobayashi, T.Fukuda, M.Tanaka, T. Matsui: The anti-atherosclerotic di-peptide, Trp-His, inhibits the phosphorylation of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Open Bio*, **2**, 83-88 (2012).

C. Hashimoto, Y. Iwaihara, S.J. Chen, M. Tanaka, T. Watanabe, T. Matsui: Highly-sensitive detection of free advanced glycation end-products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate derivatization. *Anal. Chem.*, **85**, 4289-4295 (2013).

T.Kumrungsee, Z.-Q. Wang, S. Matsumura, T.Saiki, M. Tanaka, T. Matsui: Identification of Peptides from Soybean Protein, Glycinin, Possessing Suppression of Intracellular Ca^{2+} Concentration in Vascular Smooth Muscle Cells. *Food Chem.*, **152**, 218-224 (2014).

その他 21 件

〔学会発表〕(計 88 件)

松井利郎: 血管機能改善ペプチドと腸管吸収, 平成 25 年度食品流通問題別研究会講演会, 2013.11.21.

T. Matsui: High-sensitive detection and visualization of vasoactive small peptides, 2013 Symposium on Analysis and Efficacy of Functional Foods in East Asia Region, 2013.10.25.

松井利郎: 血管弛緩ペプチド, 第 67 回日本栄養・食糧学会シンポジウム, 2013.05.26.

曾我 実, 大橋彩加, 谷口恵美, 滝川雅仁, 松井利郎, 津田孝範: 血管弛緩性ペプチド Trp-His(WH)による AMP キナーゼ活性化作用とその機序, 第 67 回日本栄養・食糧学会, 2013.05.25.

その他 84 件

〔図書〕(計 4 件)

Ju Qiu, Norihiko Terahara, T. Matsui, *Bioactive Natural Products: Opportunities & Challenges in Medicinal Chemistry*, World Scientific Publishing, 2013.11.

T. Matsui, Z. Wang, M. Tanaka, *Bioactive Natural Products: Opportunities & Challenges in Medicinal Chemistry*, World Scientific Publishing, pp.201-221, 2012.10.

T. Matsui, M. Tanaka, *Biologically Active Food Proteins and Peptides in Health-Fundamental and Clinical aspects*, Wiley Blackwell, pp.43-54, 2010.07

松井利郎, 大豆のすべて, サイエンスフォーラム, 第5章, pp.213-217, 2010.04

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: アミノ化合物およびその高感度質量分析法

発明者: 松井利郎、渡辺俊明

権利者: 九州大学

種類:

番号: 特願 2012-156746

出願年月日: 2012/7/12

国内外の別: 国内

名称: AMP キナーゼ活性化剤及びその用途

発明者: 松井利郎、津田孝範

権利者: 中部大学

種類:

番号: 特願 2013-024082

出願年月日: 2013/02/21

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔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・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 20238942

(2) 研究分担者

佐藤匡央 (SATO Masao)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 90294909

(3) 研究分担者

津田孝範 (TSUDA Takanori)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号: 90281568

(4) 研究分担者

南部伸孝 (NAMBU Nobutaka)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号: 00249955