

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580134
 研究課題名（和文） 塩基性ペプチドの脂肪吸収抑制機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism of inhibitory activity of lipolysis by basic polypeptide.

研究代表者

辻田 隆広 (Tsujita Takahiro)
 愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授
 研究者番号：60112265

研究成果の概要（和文）： 塩基性ペプチドを含む塩基性ポリマーは脂質界面に作用してリパーゼ反応を阻害すること、および阻害にはアミノ酸として10個以上の重合が必要であることなどが明らかとなった。また *in vitro* で示された塩基性ペプチドのリパーゼ阻害は *in vivo* でも有効であり、脂肪の吸収抑制や肥満抑制効果が動物実験で確認された。このように塩基性ペプチドは副作用の少ない抗肥満剤の有力な候補として期待される。

研究成果の概要（英文）： We discovered that the basic biopolymers such as basic polypeptide was strong inhibitors of pancreatic lipase reaction. They might interact with substrate surface and inhibit lipolysis and have anti-obesity function that act by inhibiting intestinal absorption of dietary fat. The lipase inhibition increased with the degree of polymerization of basic amino acids up to 10. The basic polypeptide might be strong lipase inhibitors and free from side effect. Therefore, they could be considered a potential new tool to prevent obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：栄養学、脂質、食品、肥満

1. 研究開始当初の背景

リパーゼ反応の特徴は、基質となる脂質が水に溶けないということである。したがって、リパーゼ反応は、水に溶けているリパーゼが、水に溶けない脂質に作用する異相間の反応、

二相系の反応である。反応が起こるためには水相に存在するリパーゼは基質（脂質）の表面に結合する必要がある。そしてリパーゼは脂質相と水相との界面で酵素反応を行う。それゆえ界面の化学組成や物理的性質の変化

によりリパーゼ反応は著しく影響を受ける。この界面の存在がリパーゼの反応解析を複雑・困難にしてきた。報告者は、単分子膜、リポゾーム、二分子膜等の界面化学的手法を用いて、脂質界面に作用する物質を検索してきた。その結果、プロタミンや塩基性多糖等の塩基性ポリマーが強く脂質界面に作用し、膵リパーゼを阻害することを発見した。本研究は塩基性ペプチドの脂質界面との相互作用及び膵リパーゼ阻害機構を明らかにすることにより塩基性ペプチドの膵リパーゼ阻害機構を理解し、*in vivo*での脂肪吸収抑制作用および抗肥満作用を検証する。

2. 研究の目的

本研究では、塩基性ペプチドの膵リパーゼ阻害機構を解明する。塩基性ペプチドの荷電や疎水性基がどのように基質の『脂質界面』と相互作用をし、膵リパーゼ反応に影響するかを明らかにする。また塩基性ペプチドの *in vivo*での脂肪吸収抑制作用についても検証する。これらの結果より、塩基性ペプチドは有効な膵リパーゼ阻害剤であり、抗肥満作用を持つことを検証する。

3. 研究の方法

(1) 荷電や分子量の異なる塩基性ペプチドの調製。種々の分子量の異なる塩基性ペプチドを調製する。魚精巢由来のプロタミンを蛋白分解酵素により部分加水分解した後、荷電や重合度の異なるペプチドを分離、精製する。

(2) 塩基性ペプチドと脂質界面への相互作用及び膵リパーゼ阻害作用の特徴を考察する。塩基性ペプチドと基質であるトリオレインエマルジョンとの相互作用を、胆汁酸濃度やリン脂質の種類を変え、膵リパーゼ活性を指標として測定する。また、ゼニカル（オ

ルリスタット）の膵リパーゼ阻害と比較することにより、塩基性ペプチドの膵リパーゼ阻害機構の特徴を明らかにする。さらに、水に均一に分散するリパーゼ基質(4-methylumbelliferyl oleate)を用いてリパーゼ活性を測定し、塩基性ペプチドのリパーゼ阻害に及ぼす界面の役割を検証する。

(3) 塩基性ペプチドの小腸内での脂肪分解阻害作用を解析する。実験動物（ラット）を用いて、塩基性ペプチド(ポリリジン、プロタミン)の消化管内での脂肪分解阻害を放射性同位元素でラベルした脂肪を用いて測定する。ラットに¹⁴C-トリオレインを含む脂肪エマルジョンを胃チューブにより強制投与し、経時的に血液、胃及び小腸を採取し、血液中への放射性同位元素の吸収、消化管でのトリオレインの分解、及びそれに及ぼす塩基性ペプチドの影響を測定する。

(4) 抗肥満試験。実験動物（マウス）を高脂肪食(25%ミルクバターを含む)で飼育し、肥満モデルを作成する。高脂肪食にプロタミンを添加し、体重、血漿脂質、肝臓脂質等を測定する。

4. 研究成果

(1) ① 魚種の違いによるプロタミンの膵リパーゼ活性に及ぼす影響を測定した。ハマチ、サケ、ニシン、タイの精巢より調製したプロタミンの膵リパーゼ阻害強度はほとんど同じで、 IC_{50} は約 $3\mu\text{g/ml}$ であった(図1)。ペプチドを得るため、ハマチ精巢由来のプロタミンを蛋白分解酵素処理した。トリプシン処理で阻害活性は失われ、ペプシン処理では阻害の強さは変わらなかった(図2)。キモトリプシン処理では IC_{50} が10倍高くなった。そこで、キモトリプシンの濃度を変えてプロタミンを分解した(図3)。 0.3mg/ml のキモトリプシン処理では膵リパーゼ阻害活性は

図1. 魚種の違いによるプロタミンの膵リパーゼ活性に及ぼす影響

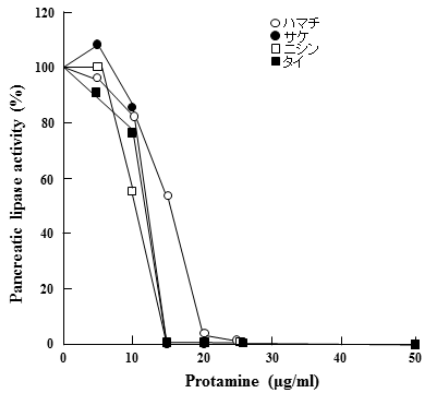


図2. タンパク分解酵素処理したプロタミンの膵リパーゼ活性に及ぼす影響

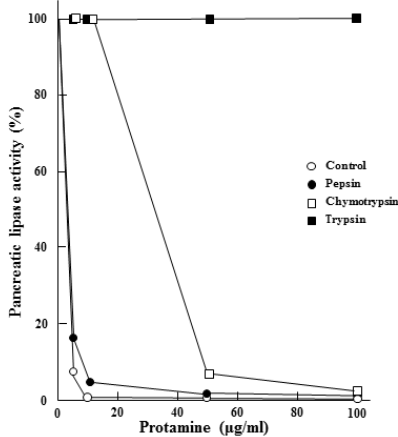
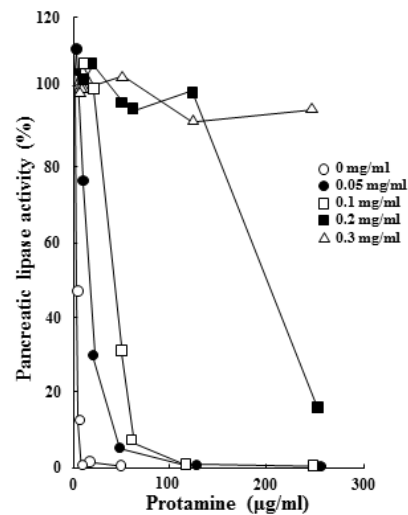


図3. 各種濃度のキモトリプシン処理したプロタミンの膵リパーゼ活性に及ぼす影響

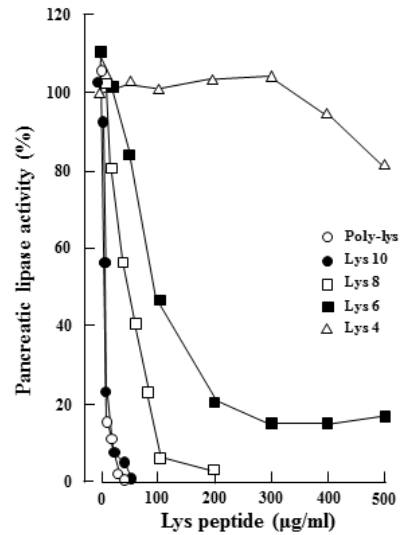


ほとんど失われ、また 0.1 mg/ml 以下のキモトリプシン処理では阻害活性への影響は少なかった。そこで、0.2mg/ml キモトリプシンで処理したプロタミンを用いて、イオン交換

樹脂やゲルろ過でペプチドの分離を試みたが、膵リパーゼ阻害活性の高いペプチドは得られなかった。プロタミンと同じアミノ酸組成のアミノ酸混合物やリジン及びアルギニンの遊離アミノ酸を用いた場合、1 mg/ml まで膵リパーゼの阻害は認められないことより、膵リパーゼを阻害にはアミノ酸の重合が必要であることが示唆された。

(1) ② リジンの合成ペプチドを用いて膵リパーゼ阻害を測定した (図 4)。重合度が増加するに従い膵リパーゼ阻害活性も増加し、重合度 10 でポリリジンやプロタミンと同じ強さの阻害活性を示した。

図4. リジン重合ペプチドの膵リパーゼ活性に及ぼす影響



また酸性アミノ酸の重合物であるポリグルタミン酸やポリアスパラギン酸では 1mg/ml まで膵リパーゼ阻害は示されなかった (data not shown)。以上のことより塩基性のアミノ酸が 10 個以上重合すれば強い膵リパーゼ阻害活性を示すことが示唆された。

(2) 塩基性ペプチドであるポリリジンはホスファチジルコリン (PC, $IC_{50} = 0.104 \mu g/ml$) を含むトリオレインエマルジョンでは膵リパーゼの活性を強く阻害するがアラビアゴム (GA, $IC_{50} = 86.2 \mu g/ml$) やホスファチジン酸 (PA, $IC_{50} = 52.9 \mu g/ml$) を含む基質に

対して阻害活性は弱かった (図5)。フォスファチジルエタノールアミン(PE、 $IC_{50}=1.52 \mu g/ml$)を含む基質では強い阻害を示し、フォスファチジルセリン(PS、 $IC_{50}=12.8 \mu g/ml$)を含む基質に対してはその中間であった。しかし、腓リパーゼの活性中心のセリンに結合して腓リパーゼを阻害することが知られているオリルスタットは基質エマルジョンのリン脂質の種類に関係なく、腓リパーゼを強く阻害し、 IC_{50} の値は $0.5 \sim 1.5 \mu g/ml$ の範囲であった (図6)。また、塩基性多糖であるキトサンや塩基性ペプチドであるプ

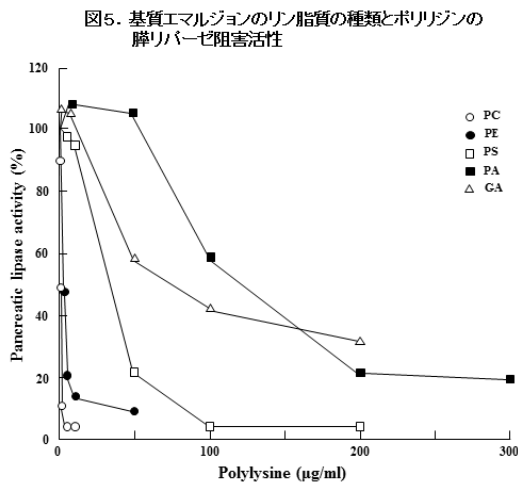
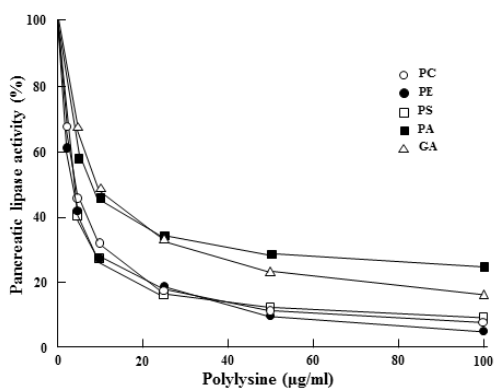


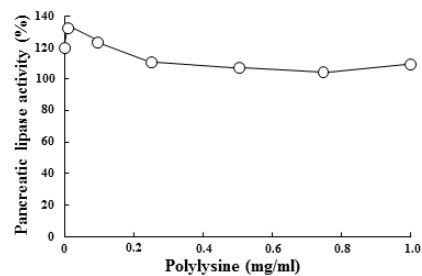
図6. 基質エマルジョンのリン脂質の種類とオリルスタットの腓リパーゼ阻害活性



ロタミンを用いた時もポリリジンと同様なリン脂質の影響が認められた (data not shown)。このように塩基性ペプチドを含む塩基性ポリマーはPCやPEで形成される界

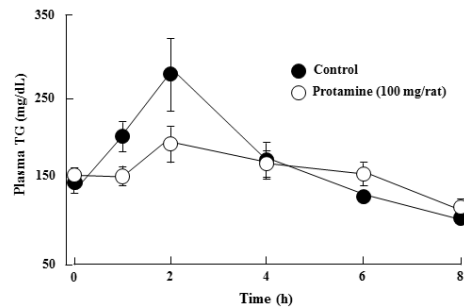
面と相互作用して、腓リパーゼの作用を阻害するものと推測された。腓リパーゼの基質として 4-methyl umbelliferyl oleate (4-MO)を用いた場合、ポリリジンは、 $1 mg/ml$ まで阻害しなかった (図7)。基質がエマルジョンでなく水に均一に分散する 4-MOを用いた場合には阻害活性が認められないことより、塩基性ペプチドは基質である脂質界面に作用して阻害している可能性が示唆された。

図7. 腓リパーゼの基質として4-MOを用いた場合のポリリジンの阻害



(3) 図2のようにプロタミンは消化酵素であるトリプシンやキモトリプシン処理で腓リパーゼ阻害活性が失活する。従って、塩基性ペプチドが生体内で腓リパーゼを阻害するか、どうか疑問であるのでラットを用いて検証した。ラット胃中にコーン油を強制投与し、同時にハマチ精巢より調製したプロタミンを経口投与し、血中トリアシルグリセロール濃度を経時的に測定した (図8)。プロタミン投与で1時間及び2時間での血中トリアシルグリセロール値が有意に減少し、逆に6時間目では有意に増加した。8時間に増加し

図8. コーン油投与後の血中トリアシルグリセロール濃度に及ぼすプロタミンの影響

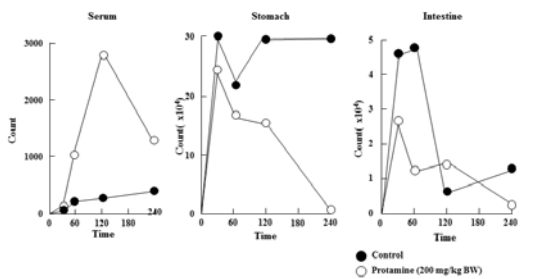


た血中トリアシルグリセロール総量はプロ

タミン投与により、約 50%減少した。

次いで ^{14}C -トリオレインをラットに経口投与し、血中、胃および小腸の放射性同位元素の量を経時的に測定し、プロタミンの影響を検討した (図 9)。放射性同位元素の血中への出現はプロタミン添加ですべての時間で減少した。胃および小腸では放射性同位元素の消失がプロタミン添加で遅れた。これらの結果は、プロタミンを添加すると消化管内で膵リパーゼ活性が阻害され、トリアシルグリセロールの消化、吸収が抑制されたと考えた。

図9. ^{14}C -トリオレイン経口投与における、血清、胃、小腸中の放射性同位元素の経時変化に及ぼすプロタミンの影響



(4) マウスを高脂肪食 (25%ミルクバターを含む) で飼育し、高脂肪食にプロタミンを 50mg/kg BW 及び 100mg/kg BW 添加し、20 週間飼育した。体重は普通食に比べ、高脂肪食で増加し、高脂肪食にプロタミンを添加すると体重は添加量に応じて減少した (図 10)。血中トリアシルグリセロール量はプロタミンの添加により有意な差は見られなかったが、血中コレステロール量はプロタミンの添加により有意に減少していた (図 11)。脂肪組織重量は高脂肪食で増加し、100 mg/kg BW のプロタミン添加で有意差はなかったが、減少する傾向にあった。肝臓重量は高脂肪食及びプロタミンの添加で変化なかったが、肝臓中のトリアシルグリセロール量は高脂肪食で増加し、プロタミン添加で有意に減少した (図 12)。以上のように高脂肪食で誘導される肥満に対して、塩基性ペプチドである

プロタミンの添加は肥満解消に有効であった。同様な結果は他の塩基性ポリマーであるポリリジンやキチンキトサンでも確認されている。

図10 高脂肪食で飼育したマウスの体重増加に及ぼすプロタミンの影響

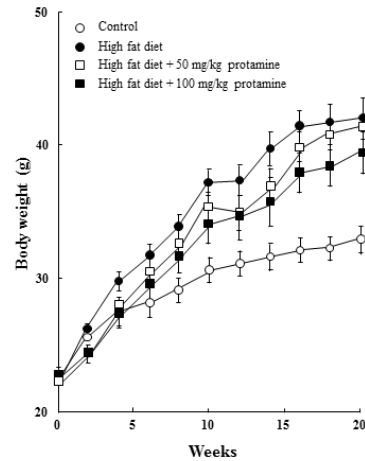


図11 高脂肪食で飼育したマウスの血中脂質含量に及ぼすプロタミンの影響

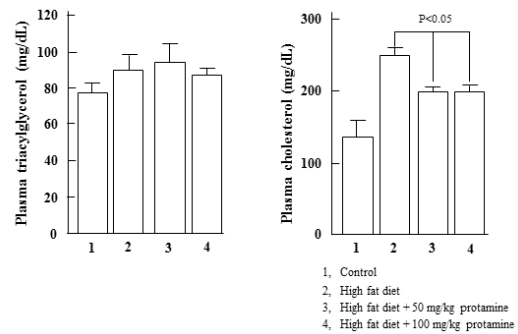
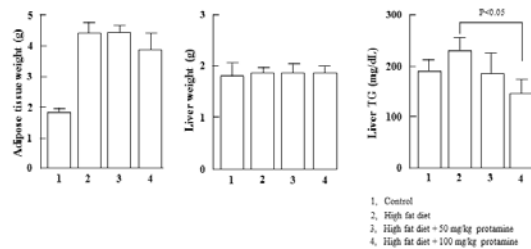


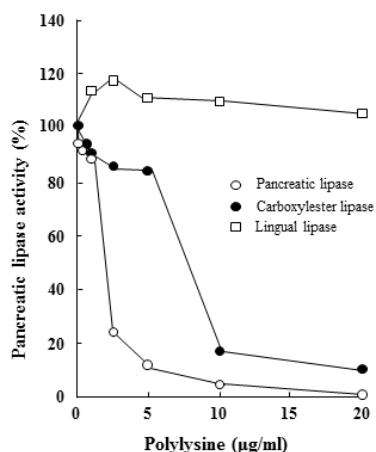
図12 高脂肪食で飼育したマウスの脂肪組織重量、肝臓重量及び肝臓TG量に及ぼすプロタミンの影響



(5) 他の消化酵素への塩基性ペプチドの影響を測定した。図 13 はポリリジンを用いた時の脂質分解酵素の阻害を示している。ポリリジンは膵リパーゼに対しては強く阻害し、膵コレステロールエステラーゼに対しても比較的強く阻害 (IC_{50} 値が膵リパーゼと比

較して約 6 倍)したが、舌リパーゼに対しては阻害しなかった。同様な傾向はプロタミンでも認められた。ポリリジン[®]は他の消化酵素である膵アミラーゼ、トリプシン及びキモトリプシンに対しては 1 mg/ml まで阻害しなかった。

図13. ポリリジンの脂質分解酵素に対する阻害



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 1 件)

- ① Takahiro Tsujita, Misato Yamada, Takeshi Takaku, Tomoyoshi Shintani, Kanae Teramoto and Takefumi Sato Purification and characterization of polyphenol from chestnut astringent skin. J. Agric Food Chem, 査読有, 59 巻, (2011), 8646-8654, DOI:10.1021/jf201679q

[学会発表] (計 6 件)

- ① 辻田隆広、高久武司 ピーナツ渋皮抽出物の血糖降下メカニズム 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 5 月 19 日 2012 年、仙台
- ② 辻田隆広、高久武司 栗渋皮ポリフェノールのリパーゼ阻害作用 日本農芸化学会 2012 年度大会 3 月 24 日 2012 年、京都
- ③ 辻田隆広、高久武司 ナッツ渋皮ポリフェノールの生理機能について 第 65 回日本栄養・食糧学会大会 5 月 15 日 2011 年、東京
- ④ 辻田隆広、高久武司、新谷智吉 栗渋皮ポリフェノールの精製と機能解析 日本農芸化学会 2011 年度大会 3 月 26 日 2011 年、京都

⑤ 辻田隆広、山田美里、高久武司 キトサンの膵リパーゼ阻害機序及び抗肥満作用について 第 64 回日本栄養・食糧学会大会 5 月 22 日 2010 年、徳島

⑥ 辻田隆広、山田美里、高久武司、石井靖子、枝重有祐 ペクチンの脂肪吸収抑制作用機序の解析 日本農芸化学会 2010 年度大会 3 月 28 日 2010 年、東京

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻田 隆広 (Tsujita Takahiro)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授

研究者番号：60112265