

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 6 月 5 日現在

機関番号：21102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700735

研究課題名（和文）エチゼンクラゲ由来降圧活性ペプチドの起源タンパク質の探索とその体内動態

研究課題名（英文）The search for original protein and biokinetics of antihypertensive peptide derived from Jellyfish *Stomolophus nomurai*

研究代表者

森永 八江 (MORINAGA YAE)

青森県立保健大学・健康科学部・助教

研究者番号：40404818

研究成果の概要（和文）：研究代表者がエチゼンクラゲから発見した降圧活性を有するペプチド YYAPFE はクラゲの主要タンパク質であるコラーゲンのグリシン繰り返し〔Gly-X-Y〕_n 構造を持たず、その由来タンパク質は非コラーゲンタンパク質と推測された。そこで、長鎖の非コラーゲンタンパク質由来のペプチドの探索を行ったところ、NKPLAGSPAASELYTEAGG の配列を有するノナデカペプチドを発見した。しかし、このペプチドに ACE 阻害活性は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：I found the antihypertensive peptide YYAPFE derived from Jellyfish *Stomolophus nomurai*. The peptide has not a characteristic triple-helical conformation of collagen that is derived from the [Gly-X-Y]_n sequence. Therefore, the original protein of the peptide was estimated to be non-collagen protein. Furthermore, I searched long chain peptide derived from non-collagen protein. A new nonadecapeptide was identified as NKPLAGSPAASELYTEAGG. However, the peptide has not ACE inhibitory activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1300000	390000	1690000
2011 年度	600000	180000	780000
2012 年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総計	2700000	810000	3510000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食素材

1. 研究開始当初の背景

わが国では、生活習慣病の急増が問題となっている。高血圧は脳血管疾患、心疾患の原因となり、生活の質（Quality of Life:QOL）の低下を招く。そのため高血圧を予防・改善する治療薬や機能性食品などの開発は急務となっている。

近年、大量発生し日本の漁業に大きな被害

を与えているエチゼンクラゲをドラム乾燥機を使い粉末化し、その利用を阻んでいたクラゲの水分含量の多さを解決した。これまで低濃度のクラゲペプチド溶液しかできなかったが、このクラゲ粉末をペプシン処理し、高濃度のクラゲペプチド溶液を調製することが可能となった。このペプチド溶液を分離精製し、*in vitro* および *in vivo* で降圧活

性を示すペプチド YYAPFE を見出した¹⁾。

しかし、このペプチドがクラゲのどのタンパク質に由来しているかについては、まだ明らかになっていなかった。これまで、クラゲに関する研究の多くはコラーゲンについてであった。コラーゲントタンパク質は3残基ごとにグリシンを繰り返す一次構造を有する。クラゲのペプシン消化後のアミノ酸分析の結果よりグルタミン酸とグリシンが同量含まれていること、および YYAPFE がコラーゲン由来であれば、この配列の中にグリシンが2個は入っているという良いことから、三浦ら²⁾が既に報告したクラゲに数%含まれる非コラーゲントタンパク質である可能性が考えられた。

また、このペプチドがどのように体内に取り込まれているかは、明らかになっていない。近年、この分野ではカゼインデカペプチド、疎水性の高い YPGIV や高分子物質までもがトランスサイトーシスでパイエル板のM細胞や、細胞間経路等で取り込まれ、細胞内ペプチダーゼで分解される新たな吸収機構が続々と明らかにされている。

そこで、このペプチドがどのような形態で体内に取り込まれているかを明らかにすることにより、これまで研究や利用が進まなかったエチゼンクラゲの非コラーゲントタンパク質が高血圧の治療薬や生理機能物質のシーズとして有望ではないかと考えた。

2. 研究の目的

エチゼンクラゲから我々が見出した降圧活性ペプチド YYAPFE がエチゼンクラゲのどのタンパク質に由来しているかについては、明らかになっていない。これまで、クラゲに関する研究の多くはコラーゲンについてであった。しかし、YYAPFE の由来画分のアミノ酸組成とエチゼンクラゲから得た非コラーゲントタンパク質のアミノ酸組成が似ていたことから、YYAPFE は非コラーゲントタンパク質由来の可能性がある。YYAPFE がどのタンパク質に由来しているか、また YYAPFE がいかにして体内に取り込まれるかを明らかにすることで、クラゲの非コラーゲントタンパク質の利用の拡大につながる研究とする。

3. 研究の方法

(1) 実験試料

実験に用いたエチゼンクラゲは、全て2004年1月八戸市南浜沖の小型定置網に入網し、 -30°C で冷凍したエチゼンクラゲの傘部を用いた。試料調製の概要を図1に示す。

①クラゲからの酢酸可溶タンパク質の調製²⁾

クラゲを24時間水で脱塩後、凍結乾燥し0.5 M 酢酸で3日間攪拌抽出後、遠心分離し、上清を得た。得られた上清をガーゼで濾過、圧搾後、リン酸水素二ナトリウム溶液に対して透析を行い、遠心分離後、沈殿物を得た。この沈殿物を0.5 M 酢酸で再溶解後、遠心分離し、上清を得た。上清に塩化ナトリウムを加え0.9 Mに調製し、遠心分離後、沈殿物を0.5 M 酢酸に溶解し0.1 M 酢酸に対して透析を行った。この操作を3回繰り返し、水に対して透析を行い、遠心分離後、上清と沈殿物に分け凍結乾燥を行った。この上清は酢酸に溶解するコラーゲンである。

②0.5 M 硫酸アンモニウム含有10 mM リン酸三ナトリウム溶液不溶タンパク質（新規のタンパク質）の調製

酢酸可溶コラーゲンの一部を0.5 M 硫酸アンモニウムを含む10 mM リン酸三ナトリウム緩衝液に溶解後、遠心分離し、上清（可溶物）と沈殿物（不溶物）に分画した。可溶物は水に対して透析後、凍結乾燥を行い、不溶物は0.5 M 酢酸に溶解させ0.5 M 酢酸に対して透析後、さらに水に対して透析し、凍結乾燥を行った。

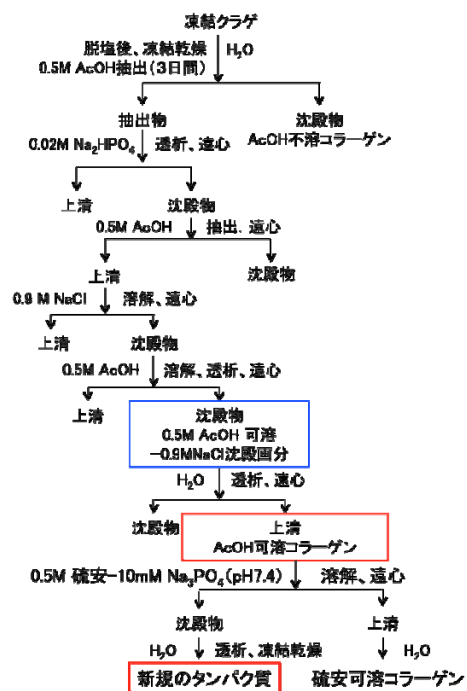


図1. 試料調製の概要

(2) 新規タンパク質のアミノ酸分析機によるアミノ酸の定量

アミノ酸分析は、アミノ酸分析装置で各アミノ酸を定量した。

(3) 新規タンパク質のペプシン処理ペプチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

①試料の調製

硫酸不溶コラーゲンおよび硫酸可溶タンパク質の各試料それぞれに 0.02%ペプシン-0.5 M 酢酸を添加し、それぞれを 4℃にて 120 時間攪拌した。その後、水酸化ナトリウムで、ペプシンを不活化し、遠心分離後、上清を透析した。さらに、凍結乾燥し、ペプシン処理タンパク質試料とした。

②電気泳動

ゲルに試料溶液（硫酸不溶タンパク質、硫酸可溶タンパク質、ペプシン処理後硫酸不溶タンパク質、ペプシン処理後硫酸可溶タンパク質）を添加した後、全自動電気泳動装置で、泳動した。終了後、染色を行った。

(4) ペプチドの分離精製

①Sep-Pak Vac C₁₈による粗分画

ペプシン処理した硫酸不溶タンパク質を Sep-Pak Vac C₁₈ に負荷した。水で溶出した画分を「素通り画分」、続いて 1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液で溶出した画分を「水溶出画分」とした。さらに、1%TFA にアセトニトリル (CH₃CN) を 20%、40%および 60%含む溶液で溶出した画分をそれぞれ「20% CH₃CN 画分」、「40% CH₃CN 画分」および「60% CH₃CN 画分」とした。各溶出液を減圧乾固し、凍結乾燥後、各粉末を得た。

②C₁₈ 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分画

研究代表者ら¹⁾の研究により、強い ACE 阻害活性が 40% CH₃CN 画分に見られた。このことから、40% CH₃CN 画分を試料とした。HPLC は C₁₈ 逆相カラムを用い、35℃で 0.1% TFA-20% CH₃CN を溶媒とし、CH₃CN を 20%から 40%の直線的濃度勾配で溶出、流速は 1 ml/min とし、1 ml ずつ 90 のフラクションに分画した。

(5) 新規ペプチドのアミノ酸配列の決定

ペプチドのアミノ酸配列の決定は、気相エドマン分解法で行った。

(6) 新規ペプチドのアミノ酸配列のデータベースによる相同性の検索

アミノ酸配列を決定したペプチドの既知ペプチドとの相同性の検索については、DNA Date Bank of Japan

(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.htm>) で検討した。

(7) 新規ペプチドのアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性測定⁴⁾

試験管に試料溶液、基質 (N-Hippuryl-His-Leu tetrahydrate) 溶液を加え、37℃の恒温水槽中で 5 分間保温した。さらに、ACE 溶液 (10 mU) を添加し、直ちに攪拌した後、37℃にて反応させた。その後、塩酸を添加し、攪拌して反応を停止させ、酢

酸エチルを添加して十分に攪拌し、基質から遊離した馬尿酸を抽出した。遠心分離後、上層を、減圧乾固後、水に溶解し、228 nm の吸光度を測定した。阻害活性は ACE の活性を 50% 阻害するのに必要な試料濃度 (IC₅₀) を求めた。なお、活性標準対照物質には captopril を使用した。

4. 研究成果

(1) 酢酸可溶・硫酸不溶タンパク質 (新規のタンパク質) の調製

凍結クラゲ 305.5 g を脱塩後、凍結乾燥すると 9.96 g (収量 3.25%) の粉末試料が得られ、さらに溶解と塩析を 3 回繰り返した結果、酢酸可溶のコラーゲンが 65 mg、酢酸不溶のコラーゲンが 22 mg の収量で得られた。その酢酸可溶のコラーゲンの 39.8 mg を 0.5 M 硫酸アンモニウム-10 mM リン酸三ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に可溶性物質 9.5 mg と不溶性物質 24.7 mg を得た (図 2、表 1)。

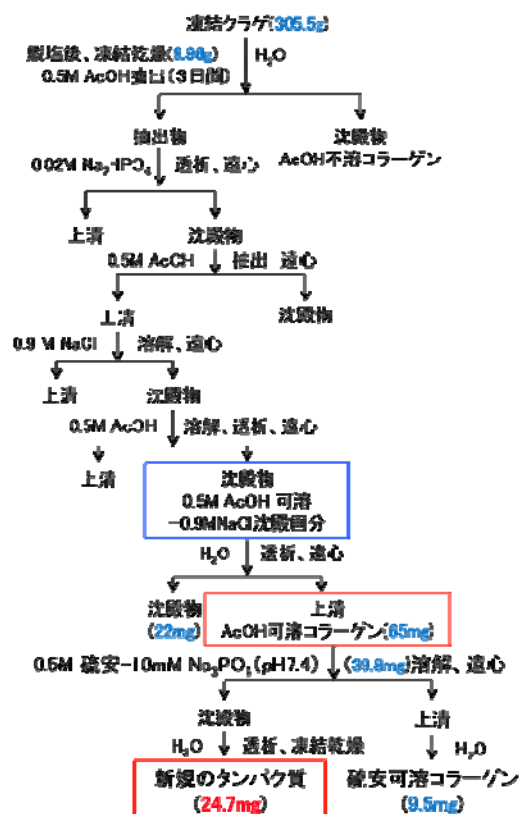


図2. 新規のタンパク質の調製と収量

表1. 凍結クラゲからの硫酸不溶(新規)タンパク質の収量

試料	収量(mg)	収率(%)
硫酸不溶タンパク質粉末	24.7	0.008
硫酸可溶コラーゲン粉末	9.5	0.003

*質量重量305.5gの凍結クラゲからの収量

(2) 新規タンパク質のアミノ酸分析機によるアミノ酸の定量

得られた硫酸不溶(新規の)タンパク質と、

研究代表者らの研究¹⁾で明らかとなった降圧ペプチド溶液中に含まれる活性ペプチド粗分画のアミノ酸組成の結果を比較検討した(図3、表3)。

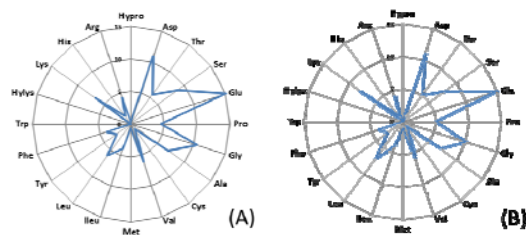


図3. 新規のタンパク質 (A) および活性ペプチド粗分画 (B) のアミノ酸組成

表3. 各試料のアミノ酸組成

アミノ酸	新規タンパク質 (%)	活性ペプチド粗分画 (%)
Asp	11	11
Thr	6	5
Ser	9	8
Glu	15	15
Gly	11	10
Ala	7	7
Val	6	6
Cys	1	1
Met	1	1
Ileu	4	4
Leu	6	7
Tyr	3	3
Phe	4	4
His	0	0
Lys	1	1
Arg	7	8
Hypro	4	4
Pro	0	0
Sum	100	100

その結果、本研究で得られた硫安不溶タンパク質のアミノ酸組成が、活性ペプチド粗分画のアミノ酸組成に非常に類似していることがわかった。

(3) 新規のタンパク質のペプシン処理によるペプチドの調製

硫安可溶コラーゲン 5.0 mg および不溶タンパク質 18.7 mg をペプシン処理した結果、可溶性物質 1.0 mg と不溶性物質 10.3 mg を得た(表4)。

表4. 新規タンパク質のペプシン処理試料の収量

試料	収量(mg)	AcOH 可溶コラーゲン収量から収量(%)
ペプシン処理 硫安不溶タンパク質粉末	10.3	55.1
ペプシン処理 硫安可溶コラーゲン粉末	1.0	20.0

硫安不溶タンパク質(収量 18.7 g)の収量
 硫安可溶コラーゲン(収量 5.0 mg)の収量
 AcOH 可溶コラーゲン(収量 39.9 mg)

(4) 新規タンパク質のペプシン処理ペプチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

新規タンパク質のアミノ酸組成と研究代表者ら¹⁾が得た活性ペプチドのアミノ酸組成が類似していることが明らかとなった。この結果より、その新規タンパク質から研究代表者ら¹⁾が得た活性ペプチドが得られるのではないかと考えた。研究代表者らは 37°C、48

時間の条件でペプシン処理したため、短い活性ペプチドが得られた。そこで、本研究では低温でペプシン処理することとした。その結果を図4に示した。

図4は1(HMW)、2(硫安可溶コラーゲン)、3(ペプシン処理-硫安可溶コラーゲン)、4(硫安不溶タンパク質)、5(ペプシン処理-硫安不溶タンパク質)および6(LMW)の20%SDS-PAGEの泳動結果を示したものであり、4と5を比較するとペプシン処理したことでタンパク質が分解され、低分子化したことがわかった。

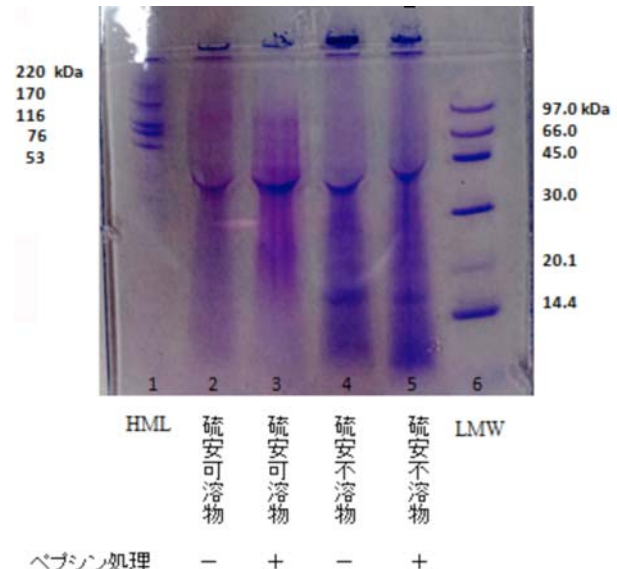


図4. 20%ゲル濃度SDS-PAGE 電気泳動結果

(5) 新規ペプチドの分離精製

ペプシン処理硫安不溶タンパク質中にどのような活性ペプチドが存在するのか、分離精製を試みた。その分離精製のスキームを図5に示した。

表5にペプシン処理硫安不溶タンパク質粉末 8.7 mg から得られたそれぞれの画分の収量を示した。

①Sep-Pak Vac C₁₈ によるペプチドの分離精製

ペプシン処理した硫安不溶タンパク質からACE阻害活性の強い画分を精製するために、まずSep-Pak Vac C₁₈による粗分画を行ったところ、収量は60%CH₃CN画分、0%CH₃CN画分、40%CH₃CN画分の順で、それぞれ32.1%、28.6%および23.5%であった(表5)。

研究代表者ら¹⁾は40%CH₃CN画分、20%CH₃CN画分、0%CH₃CN画分の順にACE阻害活性が高いことを示し、40%CH₃CN画分には降圧活性があることを *in vitro* および *in vivo* において示している。

②ペプシン処理 40%CH₃CN画分のC₁₈ 逆相 HPLC によるペプチドの分離精製

40%CH₃CN 画分を C₁₈ 逆相 HPLC にて分離した。また、研究代表者ら¹⁾は Fr. 1 画分に強い ACE 阻害活性が見られたことを示している。これらから、40%CH₃CN 画分を HPLC により分離精製し、Fr. 1 画分を得た。さらに、Fr. 1 画分を HPLC により Fr. 1-1 画分に分画した。

ヘフシン処理硫酸不溶タンパク質粉末

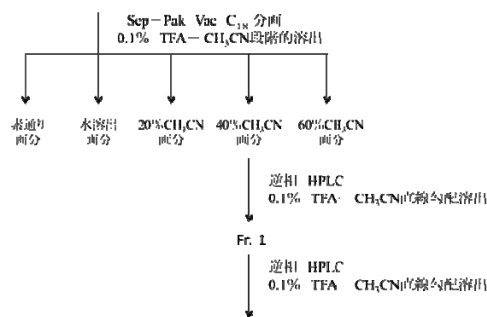


図5. ペプチドの分離精製

表5. ペプシン処理硫酸不溶コラーゲン粉末の Sep-Pak 粗分画の収量

画分	収量(mg)	収量(%)
素通り	0.6	7.4
0%CH ₃ CN	2.4	28.6
20%CH ₃ CN	0.6	7.4
40%CH ₃ CN	1.9	23.5
60%CH ₃ CN	2.6	32.1
計	8.1	99.0

⑥新規ペプチドのアミノ酸配列

Fr. 1-1 画分を気相エドマン分解法によるアミノ酸配列決定を行った結果、ACE 阻害活性を持つペプチドによく見られた-Pro-Leu-を含む⁴⁾ ペプチド

(Asn-Lys-Pro-Leu-Ala-Gly-Ser-Pro-Ala-Ala-Ser-Glu-Leu-Tyr-Thr-Glu-Ala-Gly-Gly) であることがわかった。

また、

Asn-Lys-Pro-Leu-Ala-Gly-Ser-Pro-Ala-Ala-Ser-Glu-Leu-Tyr-Thr-Glu-Ala-Gly-Gly (NKPLAGSPAASELYTEAGG) の構造式を図6に立体構造を図7に示した。

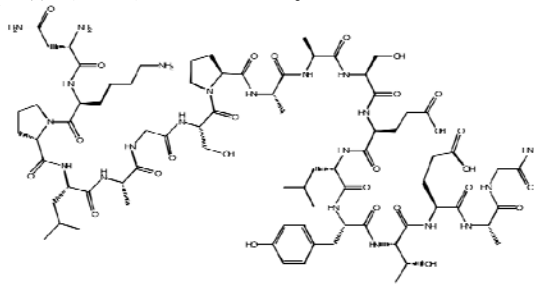


図6. NKPLAGSPAASELYTEAGGの構造式



図7. NKPLAGSPAASELYTEAGGの立体構造

⑦新規ペプチドのアミノ酸配列のデータベースによる相同性の検索

アミノ酸配列を決定したペプチドと、他の生物由来のタンパク質のアミノ酸配列との相同性について検索した結果、類似したタンパク質は見つからなかった。よって、この新規タンパク質は非常にめずらしいアミノ酸配列を持つことが明らかとなった。

⑧新規ペプチドの ACE 阻害活性

硫酸不溶タンパク質粉末を試料とし、ACE 阻害活性測定を行った結果、活性がないことがわかった。

⑨結論

研究代表者らの発見した降圧活性ペプチドは、クラゲの全個体粉末を直接ペプシン処理することによって調製したものである¹⁾。しかし、本研究ではその由来タンパク質を探るために、三浦・木村ら²⁾の酢酸溶解法を用いて、酢酸可溶コラーゲンと非コラーゲンに分画した。その酢酸可溶コラーゲンにわずかに含まれる硫酸不溶画分に、研究代表者らが発見した降圧活性ペプチドのアミノ酸組成と極めて類似したタンパク質画分を見出した。

さらに、この試料は電気泳動により、低温条件下でペプシン消化されることが明らかとなった。これらから、この調製方法でも新規のペプチドが得られた。しかし、このペプチドには ACE 阻害活性が見られなかった。

研究代表者¹⁾らの研究で明らかとなった ACE 阻害活性を持つペプチドのアミノ酸配列は、Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe-Glu (YYAPFE) のヘキサペプチドであり、本研究では、Asn-Lys-Pro-Leu-Ala-Gly-Ser-Pro-Ala-Ala-Ser-Glu-Leu-Tyr-Thr-Glu-Ala-Gly-Gly (NKPLAGSPAASELYTEAGG) のノナデカペプチドのアミノ酸配列を決定した。

ACE 阻害活性を持つペプチドは-Pro-Leu-を含む⁴⁾ことが多いと報告されている。この新規ペプチドも-Pro-Leu-を含んでいることから、ACE 阻害活性を持つ可能性がある。本研究で ACE 阻害活性が見られなかった要因として、今回見出したペプチドのアミノ酸配列が長いことが考えられる。よって、条件を変え、アミノ酸配列を短くすることで、活性を持つペプチドが得られる可能性を見出した。

⑩参考文献

- 1) Y. Morinaga *et. al.*, : Food Sci. Technol. Res., 16 (4), 333-340, 2010.
- 2) S. Miura *et. al.*, : The Journal of BioChem., 260 (28), 15352-15356, 1985.
- 3) U. K. Laemmli., : Nature., 227(5259), 680-685, 1970.
- 4) H. S. Cheung, F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, and D. W. Cushman., : J. BioChem., 255(2), 401-407, 1980.

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)

Yae Morinaga, Kunihisa Iwai, Hidehiro Tomita, Yoshiaki Takaya, Tetsushi Naraoka, Hajime Matsue, Chemical Nature of a New Antihypertensive Peptide Derived from Jellyfish, Food Science and Technology Research, 査読有、16 巻、2010、333-340

DOI: 10.3136/fstr.16.333

[学会発表] (計 2 件)

①Yae Morinaga, Kunihisa Iwai, Hidehiro Tomita, Yoshiaki Takaya, Tetsushi Naraoka and Hajime Matsue, A New Antihypertensive Peptide Derived from Jellyfish *Stomolophus nomurai*, ICOFF2011, 2011

②森永八江、岩井邦久、内沢秀光、富田秀弘、松江一、エチゼンクラゲ由来降圧活性ペプチドの由来タンパク質の探索、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森永 八江 (MORINAGA YAE)
青森県立保健大学・健康科学部・助教
研究者番号：40404818

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

松江 一 (MATSUE HAJIME)
青森県立保健大学・健康科学部・教授
研究者番号：30106843

岩井 邦久 (IWAI KUNIHISA)
青森県立保健大学・健康科学部・教授
研究者番号：80404812

富田秀弘 (TOMITA HIDEHIRO)
青森県産業技術センター・下北ブランド研究所・研究開発部長
研究者番号：

内沢秀光 (UCHISAWA HIDEMITSU)
青森県工業総合研究センター・環境技術研究部・部長

研究者番号：
奈良岡哲志 (NARAOKA TETSUSHI)
青森県工業総合研究センター・企画経営担当
研究者番号：