

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24年 5月23日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880024

研究課題名（和文） 食相乗性科学構築のためのプラットフォーム研究

研究課題名（英文） Research on the synergistic enhancement of physiological functions by food components

研究代表者

田中 充 (TANAKA MITSURU)

九州大学・農学研究院・特任助教

研究者番号：70584209

研究成果の概要（和文）：

本研究では、抗高血圧、抗動脈硬化等を示す低分子ペプチドの生理作用の多様性に着目し、血管機能改善を指標とした相乗性検証を試みた。その結果、エピガロカテキンガレート (EGCg) が血管機能改善ペプチドである Trp-His の血管弛緩作用を相乗的に増強することが明らかとなり、本相乗効果には EGCg による NO-cGMP 弛緩系シグナルの賦活化が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to demonstrate the enhancement of the small peptide Trp-His-induced vasorelaxation by food components. We found that epigallocatechin gallate (EGCg) dramatically enhanced the Trp-His-induced vasorelaxation. The present study also suggests that the Trp-His-induced vasorelaxation is significantly potentiated by the activation of the NO/cGMP pathway by EGCg.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,220,000	366,000	1,586,000
2011年度	930,000	279,000	1,209,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,150,000	645,000	2,795,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：食相乗性、ペプチド、血管機能

1. 研究開始当初の背景

生体調節作用を有する機能性食品は我が国発の概念であり、世界的にも「Functional Food」として認識されている evidence-based food である。その開発戦略は、目的とする機能性を有する素材を抽出・分離し、機能本体と考えられる成分を単離した後、その生理作用を解析するものであり、今日においても主流の研究戦略である。しかしながら、実際の

機能性画分には、活性本体とされる成分以外にも多数の機能性成分が存在するため、それらが関与成分の活性発現に深く関わっている可能性は十分にある。当研究室において研究開発した高血圧予防食品（サーデンペプチド、イワシすり身加水分解物：特定保健用食品）には、関与成分としてアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害ペプチド Val-Tyr (VY) が存在する。他方、本分解物から同定した

Met-Tyr (MY) (*Biosci. Biotech. Biochem.* 1994, 58:2244-45) には血管内皮保護作用があること (*J. Nutr.* 2006, 136:2148-52)、VY には腎血管拡張作用があること (*Regul. Pept.* 2009, 155:81-90) 等が報告され、本加水分解物の示す高血圧予防作用は多様なペプチド機能の集約の結果である可能性が推察される。食品成分による相乗作用発現に関する研究は、抗酸化成分 (*J. Agric. Food Chem.* 2010, 58:209-17) については検討されているが、その他の生体調節成分に関する研究例はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの機能性食品の主流であった1成分による1疾病対応型研究を覆し、多成分混合系である食品でこそ達成可能な機能、すなわち複数成分による相乗的疾病预防作用を明らかにすることを目的とした。具体的には抗高血圧、抗動脈硬化等を示す低分子ペプチドの生理作用の多様性に着目し、血管機能改善を指標とした相乗性検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 血管張力試験

8-10 週齢雄性 Sprague-Dawley rat から摘出した胸部大動脈血管を用いて血管リング (2-3 mm) を調製した。PSS バッファーで平衡化後、1 μ M Phenylephrine により収縮させ、張力が安定化した後、サンプルを添加した。サンプル添加後、張力が安定したことを確認し、血管弛緩ペプチド (WH) を累加的に添加した。

(2) Combination Index の算出

まず、Trp-His 及び併用する化合物の Dose-reduction index (DRI : ある活性発現量 (本試験では 50% の血管弛緩作用) を達成するのに必要な濃度において、供試サンプル単独使用時の濃度を併用時の化合物濃度で除した値) を算出した。それら DRI を用いて下記の計算式に従って、Combination Index (CI) を算出した。

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 = 1 / DRI_{\text{Trp-His}} + 1 / DRI_A$$

(D)₁ 及び (D)₂ は併用時の Trp-His 及び化合物 A の濃度を示し、(Dx)₁ 及び (Dx)₂ は単独使用時の濃度を示す。

Chou ら (*Trends Pharmacol. Sci.* 1983, 4, 450-454.) により提唱された CI と併用効果によると、CI < 1, CI = 1 及び CI > 1 はそれぞれ「相乗効果」、「相加効果」及び「相殺効果」を示す。

4. 研究成果

SD ラット由来胸部大動脈血管において、内皮依存的な弛緩作用を示す Met-Tyr (1 mM) 存在下での Trp-His (平滑筋依存的な弛緩作用を有する) の弛緩作用を評価したところ、Met-Tyr 添加は Trp-His の弛緩作用に全く影響を及ぼさないことが明らかとなった。一方、Trp-His の弛緩作用に対するカテキン類 (300 μ M) の併用効果を検討したところ、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC) あるいはエピカテキンガレート (ECg) の併用による Trp-His の血管弛緩作用への影響は認められなかった。一方で、エピガロカテキンガレート (EGCg) 存在下においては、Trp-His の誘導する血管弛緩作用が顕著に増強 (Trp-His 単独 EC₅₀ : 2.8 mM, EGCg 併用時 EC₅₀ : 0.5 mM) されることが明らかとなった (Fig. 1)。

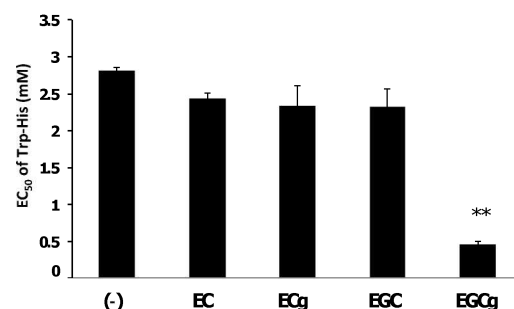


Fig. 1: カテキン類 (300 μ M) 併用時における Trp-His の血管弛緩作用 EC₅₀ : 50% の血管弛緩作用を発現するのに必要な濃度
** $p < 0.01$ vs Trp-His 単独添加 (-)

そこで、これら血管弛緩性成分の併用効果を判定するため、併用効果判定の指標として用いられる Combination Index (CI : Chou ら, *Pharmacol. Rev.* 2006, 58, 621-681.) を算出したところ、50% の血管弛緩作用を誘導する濃度において、300 μ M EGCg と Trp-His の併用時における CI は 0.51 となり、EGCg による Trp-His の血管弛緩作用の増強は、「相乗的」であると判定された。

さらに、本相乗的血管弛緩作用の作用機序を明らかにするため、内皮除去血管を用いた試験を実施した。その結果、内皮除去血管において、300 μ M EGCg による Trp-His の血管弛緩作用の増強は認められなかった (Fig. 2)。このことから、本相乗的血管弛緩作用は、内皮と平滑筋におけるシグナルが協同的に作用することで発現すると考えられた。すなわち、内皮由来の血管弛緩性因子 (NO あるいは過分極シグナル等) が Trp-His の血管弛緩作用の増強に寄与している可能性を示していると考えられた。

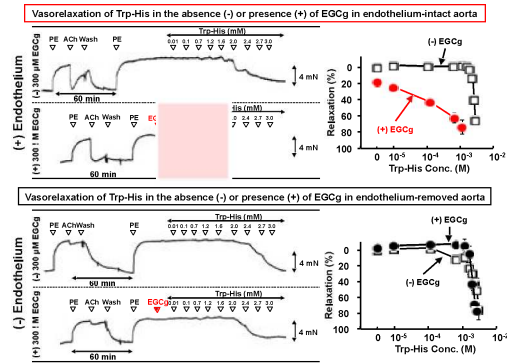


Fig.2 内皮インテクト(+)Endothelium)及び内皮除去(-)Endothelium)血管における Trp-Hisの血管弛緩作用(300 μ M EGCg存在下(+))及び非存在下(-))

次いで、Trp-Hisの弛緩作用増強に関するさらなる作用機構解明を目指し、70 mM KCl (脱分極)刺激血管におけるEGCgとTrp-Hisとの併用効果を検証した。その結果、脱分極刺激血管において、EGCgとTrp-Hisとの相乗的血管弛緩作用は完全に消失した。このことから、本作用への過分極シグナル系の関与が考えられた。

他方、EGCgの血管弛緩作用には、NO/cGMP系シグナルが主体的に関与していると考えられていることから、本相乗効果におけるそれら血管弛緩性シグナル影響を評価した。その結果、eNOSの阻害剤であるL-NMMA(100 μ M)存在下では、EGCgによるTrp-Hisの血管弛緩作用の増強は認められなかった(Fig. 3(A))。

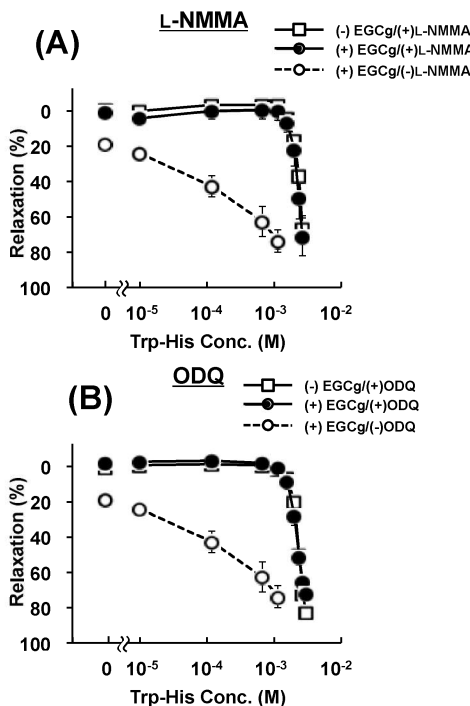


Fig.3 eNOS阻害剤(L-NMMA: 100 μ M)存在下(A)及びsGC阻害剤(ODQ: 10 μ M)存在下(B)におけるTrp-Hisの血管弛緩作用(300 μ M EGCg存在下及び非存在下)

このことから、本相乗効果発現において血管内皮より産生されるNOが極めて重要な役割を果たしていることが示された。さらに、NO

により活性化される可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)は血管弛緩性因子であるcGMPの産生に関わることから、sGCの阻害剤であるODQ(10 μ M)存在下での併用効果を検討した。その結果、ODQの添加により、Trp-His/EGCg相乗的弛緩作用は完全に消失した(Fig. 3(B))。これらの結果より、Trp-Hisの血管弛緩作用の増強には、EGCg誘導性のNO/cGMP系シグナルの賦活化が必須要件であることが明らかとなった。

さらに、これまでの研究において、Trp-Hisは電位依存性L型Ca²⁺チャンネルにおいてCa²⁺チャンネルブロッカーであるNifedipineと同様の部位に結合することが明らかとなっていることから、EGCgとNifedipineとの併用効果を検討した。その結果、EGCg添加によりNifedipineの弛緩作用が顕著に増大した(Fig. 4)。このことは、Ca²⁺チャンネル阻害を介したTrp-Hisの血管弛緩作用が、EGCgの誘導するNO/cGMP系シグナルの賦活化により相乗的に増強されるというこれまでの仮説を強く支持する結果であると考えられた。

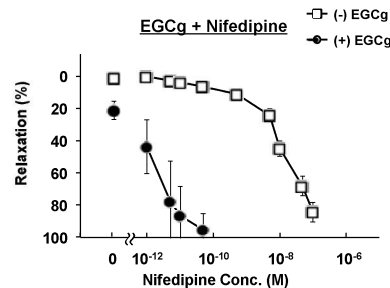


Fig.4 EGCg(300 μ M)存在下におけるCa²⁺チャンネルブロッカー(Nifedipine)の血管弛緩作用

以上本研究は、複数食品成分による相乗的な機能増強作用を明らかとしたものであり、新たな機能性食品開発戦略の基盤となる成果であると考えられる。

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 Y. Kobayashi, T. Fukuda, M. Tanaka, T. Matsui. The anti-atherosclerotic di-peptide, Trp-His, inhibits the phosphorylation of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Open Bio* 査読: 有, 2, 83-88, 2012
- ② 松井利郎, 田中 充. 血管機能とペプチド. *New Food Industry* 査読: 無, 53, 22-30, 2011

- ③ Z. Wang, S. Watanabe, Y. Kobayashi, M. Tanaka, T. Matsui. Trp-His, a vasorelaxant di-peptide, can inhibit extracellular Ca²⁺ entry to rat vascular smooth muscle cells through blockade of dihydropyridine-like L-type Ca²⁺ channels. *Peptides* 査読：有, 31, 2060-2066, 2010.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 田中 充, 須山 晶, 趙 健, 松井 利郎. 低分子ペプチド Trp-His と EGCg との相乗的血管弛緩作用は NO/cGMP 系賦活化を介して 発現する. 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 2012 年 5 月 19 日, 東北大学(宮城県)
- ② 福田 俊彦, 小林 優多郎, 田中 充, 松井 利郎. 抗動脈硬化ペプチド Trp-His は血管平滑筋細胞での L 型 Ca²⁺チャンネルのリン酸化を抑制する. 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 2012 年 5 月 19 日, 東北大学 (宮城県)
- ③ 松村 慎也, 王 正全, 田中 充, 松井 利郎. グリニン酵素加水分解物からの血管平滑筋細胞内 Ca²⁺流入阻害ペプチドの検索. 平成 23 年 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部及び日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2011 年 9 月 4 日, 佐賀大学(佐賀県)
- ④ 小林優多郎, 福田俊彦, 田中 充, 松井 利郎. 血管平滑筋細胞における抗動脈硬化ペプチド Trp-His の細胞内 Ca²⁺シグナル系制御機構の解明. 平成 23 年 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部及び日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2011 年 9 月 4 日, 佐賀大学 (佐賀県)
- ⑤ 田中 充, 松井 利郎. 低分子ペプチドの生理機能相乗作用に関する研究(1); ポリフェノールによる 血管弛緩性ペプチドの増強作用, 第 65 回 日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月 14 日, お茶の水女子大学 (東京都)
- ⑥ M. Tanaka, Z. Wang, Y. Kobayashi, T. Matsui. Anti-atherosclerotic effect of a small peptide, Trp-His, in apolipoprotein E deficient mice. China-Japan Joint Symposium on Food Science & Technology of Food Industry Level, 2010 年 11 月 3 日, 中国
- ⑦ Y. Kobayashi, Z. Wang, M. Tanaka, T. Matsui. A small peptide, Trp-His, that improves vascular health can act as a Ca²⁺ channel blocker. China-Japan Joint Symposium on Food Science & Technology of Food Industry Level, 2010 年 11 月 3 日, 中国
- ⑧ Z. Q. Wang, M. Tanaka, S. Watanabe, Y.

Kobayashi, T. Matsui. Anti-atherosclerotic di-peptide, Trp-His, can suppress intracellular [Ca²⁺] in vascular smooth muscle cells in a similar manner to dihydropyridine type Ca²⁺ channel blocker. The 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2010 年 9 月 30 日, Canada

- ⑨ 小林優多郎, 王 正全, 渡邊慎平, 田中 充, 松井利郎. 血管平滑筋細胞を用いた血管機能改善ジペプチド Trp-His の L 型 Ca²⁺チャンネルに対する結合部位の解明. 第 57 回日本食品科学工学会, 2010 年 9 月 3 日, 東京農業大学 (東京都)

[図書] (計 2 件)

- ① T. Matsui, Z. Wang, M. Tanaka. World Scientific Publishing Co., Chapter 2. Vascular regulation by small peptides. : *Bioactive Natural Products: Opportunities & Challenges in Medicinal Chemistry* : 2012, pp201-221.
- ② T. Matsui, M. Tanaka. (Institute of Food Technologists, Chapter 4. Anti-hypertensive peptides and their underlying mechanism. : *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals* 2010, pp43-54.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 充 (九州大学・農学研究院・生命機能科学部門・**特任助教**)

研究者番号：70584209

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

松井 利郎 (MATSUI TOSHIRO)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：20238942

(4) 研究協力者

なし ()

研究者番号：