

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292067

研究課題名(和文) 生体分子を標的にした革新的脂質代謝改善ペプチドの発見・革新的探索評価技術の創成

研究課題名(英文) Discovery of Innovative lipid lowering peptides by targeting the bio-molecule and Creation of novel screening technology

研究代表者

長岡 利 (Nagaoka, Satoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50202221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラクトスタチンによりコレステロール分解系の律速酵素であるCYP7A1 mRNAやタンパク質レベルの有意な上昇が観察された。CYP7A1遺伝子プロモーターのHNF-3 結合領域がラクトスタチンによるCYP7A1遺伝子の転写活性化に關与することを発見した。HNF-3 のノックダウンにおいて、CYP7A1タンパク質レベルは減少した。ジアジリンによる光標識とクリックケミストリーによる受容体の可視化技術を用いて、ラクトスタチンと親和性を有するタンパク質を検出した。コレステロール吸収を抑制するVAWWMYは胆汁酸分子(タウロコール酸)と電気的な相互作用により、ミセル粒子径を増加させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that a novel cholesterol lowering milk peptide, lactostatin (IIAEK) activates cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in HepG2 cells. We tried to clarify the molecular basis of the activation of cholesterol degradation by lactostatin in HepG2 cells. Lactostatin significantly and specifically increased CYP7A1 mRNA level in HepG2 cells. The protein level of CYP7A1 and its gene promoter activity determined by luciferase assay were increased by lactostatin. We have identified that the target promoter region of CYP7A1 gene mediated by lactostatin is the HNF3 responsive element. We found that HNF3 knockdown by siRNA inhibited the activation of CYP7A1 protein expression. By using the photo-affinity labelling technique by diazirine and click chemistry, we can detect the protein having an affinity to lactostatin in vitro. Cholesterol absorption inhibitory peptide, VAWWMY exhibit the increase in micellar particle size by the electorical binding with taurocholate.

研究分野：農学

キーワード：コレステロール ペプチド ミセル 胆汁酸 動脈硬化 ラクトスタチン CYP7A1 HepG2

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール (CHOL) 血症、動脈硬化症予防改善のための多くの医薬品・食品の登場にもかかわらず、世界の死因の第1位は、依然、心臓血管疾患であり、その原因である動脈硬化症の根本的解決には至っていないのも厳然たる事実である。このような背景から、食物繊維、大豆タンパク質などが研究されてきたが、満足できる食品成分が発見されていないことは、この事実からも明白である。つまり従来の食品や医薬品では高 CHOL 血症の予防改善には不十分であり、そのための理論・技術も未成熟である。よって、CHOL 代謝を改善するための革新的理論・技術が必要である。

100 年以上の長い間、誰も発見できなかった CHOL 代謝改善ペプチド (ラクタスタチン: IIAEK) を長岡らは世界で初めて発見した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 11-17 (2001))。ラクタスタチンの CHOL 代謝改善作用は動物実験では医薬品 β -シトステロールよりも強力である。ところで、体内での CHOL 分解は肝臓 CHOL 7α -水酸化酵素 (CYP7A1) を律速酵素とする経路にのみ依存している。CYP7A1 のマウスでの過剰発現は高 CHOL 血症・動脈硬化症を改善する。つまり CYP7A1 の活性化剤は高 CHOL 血症・動脈硬化症改善素材である。しかし、CYP7A1 活性化剤は転写因子 LXR リガンドの 22-ヒドロキシ CHOL などであり、副作用ため活用不可能である (Nat. Genet. 30, 151-157 (2002))。よって、有用な CYP7A1 活性化剤は未発見である。特筆すべきことに、ラクタスタチンの標的遺伝子が CYP7A1 であることをマウスで特定した (アメリカ油化学会出版 (2005))。さらに、ラクタスタチンはヒト肝臓培養細胞 HepG2 で、CYP7A1 遺伝子を活性化し、CHOL 分解を促進することを発見した。この CYP7A1 活性化は細胞内カルシウム (Ca) 上昇を伴い、MAP キナーゼ (PD98059)、Ca チャンネル (Diltiazem)

などの阻害剤で防止された。つまり、これらの結果から、ヒト肝臓には Ca チャンネルに関連した MAP キナーゼ依存型の新規 CHOL 分解調節系が存在することを発見した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 352, 697-702 (2007))。さらに、詳細な CYP7A1 活性化の分子機構解明を目的とした。

また、ラットやヒト腸モデル細胞である Caco-2 細胞においてラクタスタチンは CHOL 吸収を抑制することを明らかにした。しかし、その詳細な分子機構は明らかにされていない。そこで本研究では、Caco-2 細胞においてラクタスタチンの媒介する新しい CHOL 吸収調節系を解明することを目的とする。

一方、大豆タンパク質の血清 CHOL 低下作用は広く知られているが、CHOL 吸収抑制作用を有する大豆タンパク質由来の胆汁酸結合ペプチドはグリシニン由来 VAWWMY (Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 1738-1741 (2010)) や大豆 β -コングリシニン由来 VVFLASVS (長岡: 大豆たん白質研究 14, 48-52 (2011)) 以外は不明である。また、VAWWMY の胆汁酸分子との相互作用の機構は不明のため、その作用機構を解析することを目的とする。

さらに、ラクタスタチンの媒介する新規肝臓コレステロール (CHOL) 分解調節系や新規腸 CHOL 吸収調節系に関与する、ラクタスタチン受容体特定を含めた標的分子を解明することを目的に研究する。

以上の背景から、ラクタスタチン受容体特定を含めたラクタスタチンに媒介される新規 CHOL 代謝調節系の解明、大豆タンパク質由来の CHOL 吸収抑制ペプチド VAWWMY の作用機構の解明を目指すこととする。

2. 研究の目的

(1) コレステロール 7α -水酸化酵素 (CYP7A1) は肝臓のコレステロール分解系律速酵素であり、CYP7A1 遺伝子の活性化により

動脈硬化症が抑制されることが知られている。先行研究より、牛乳乳清 β -ラクトグロブリン由来ペプチドであるラクトスタチン (IIAEK) は、ヒト培養肝細胞 HepG2 において、CYP7A1 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。そして、CYP7A1 遺伝子プロモーターにいくつかの結合領域が報告されている肝細胞核因子 3 (HNF-3) に注目し、プロモーター解析を行ってきた。また、DNA マイクロアレイにより、ラクトスタチンの 24 時間添加により、ヒト CYP7A1 mRNA レベルの有意な上昇に伴い、HNF-3 α mRNA の有意な上昇を観察した。これらの結果から、ラクトスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性化には HNF-3 α が関与している可能性が示唆されている。そこで、本研究では、CYP7A1 遺伝子プロモーター上の HNF-3 α 結合領域や HNF-3 α の siRNA などに注目し、ラクトスタチンの CYP7A1 遺伝子転写活性化機構を解明することを目的とする。

(2) ラクトスタチンは、小腸モデル細胞 Caco-2 細胞において、コレステロール輸送に関わるトランスポーターである ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の遺伝子発現、タンパク質発現を低下させること、HepG2 細胞において、肝臓のコレステロール分解系の律速酵素であるコレステロール 7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) の遺伝子発現を活性化することが明らかになっている。このことから、体内にはラクトスタチン受容体が存在し、ラクトスタチンが媒介する新規コレステロール吸収・分解調節系が存在すると考えられているが、ラクトスタチン受容体の実体は不明である。本研究では、ジアジリンによる光標識とクリックケミストリーによる受容体の可視化技術を用いて、ラクトスタチン受容体を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

<実験 1> HepG2 細胞にラクトスタチン (1mM) を 48 時間添加し、ウエスタンブロット法により CYP7A1 タンパク質レベルを測定した。

<実験 2> CYP7A1 遺伝子プロモーターの -299~-289 領域 (HNF-3 α) 結合領域を欠損させた Luciferase プラスミドを一過性に導入した HepG2 細胞にラクトスタチン (1mM) を添加後、18 時間培養し、CYP7A1 遺伝子転写活性を Luciferase assay により定量的に比較検討した。

<実験 3> siRNA を用いて HNF-3 α をノックダウンした HepG2 にラクトスタチン (1mM) を 30 時間添加し、リアルタイム RT-PCR により HNF-3 α 並びに CYP7A1 mRNA レベルを測定した。また、ラクトスタチン (1mM) を 48 時間添加し、ウエスタンブロット法により HNF-3 α 並びに CYP7A1 タンパク質レベルを測定した。

<実験 4> 3,5-diaminobenzoic acid を出発物質とし、ジアジリンによる光標識とクリックケミストリーによる受容体の可視化技術を用いて、ラクトスタチン受容体を探索する光親和性標識プローブを新規合成し、ヒト腸由来培養細胞である Caco-2 細胞膜タンパク質からラクトスタチン受容体候補分子を特定することを目的とした。

<実験 5> 光散乱分析により、CHOL 吸収抑制作用を発揮する胆汁酸結合ペプチド VAWWMY と胆汁酸分子 (タウロコール酸) との相互作用を解析することを目的とした。

4. 研究成果

<実験 1> ラクトスタチンにより CYP7A1 タンパク質レベルの有意な上昇が観察された。

<実験 2>CYP7A1 変異体プラスミドについて転写活性試験を行った結果、-299~-289 領域の欠損においてラクトスタチンによる CYP7A1 遺伝子の転写活性化が観察されなかった。よって、CYP7A1 遺伝子転写活性化には、HNF-3 α 結合領域が関与することを明らかにした。

<実験 3>HepG2 細胞に HNF-3 α siRNA を導入することにより、HNF-3 α を mRNA、タンパク質レベルでノックダウンした。HepG2 細胞での HNF-3 α のノックダウンにおいて、ラクトスタチンによる CYP7A1 タンパク質レベルは減少した。

<実験 4>3-ethynyl-5-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl] benzoic acid を合成し、IIAEK のアラニン残基にアミド結合により導入し、IIAEK 変異体 (IIXEK) を得た。IIXEK に Azide-fluor 488 を導入した。分化 Caco-2 細胞から抽出した膜タンパク質と IIXEK、Azide-fluor 488 などを反応させ、IIXEK と親和性を有するタンパク質を検出した。

<実験 5>VAWWMY は胆汁酸分子 (タウロコール酸) と電気的な相互作用により、粒子径を増加させることを明らかにした。

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 11 件)

1. Kitamura, K., Okada, Y., Okada, K., Kawaguchi, Y. and Nagaoka, S. : Epigallocatechin gallate induces an up-regulation of LDL receptor accompanied by a reduction of PCSK9 via the annexin A2-independent pathway in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, “in press”

(2017) (査読あり)

2. Wang, J., Shimada, M. and Nagaoka, S.: Identification of the active protein in rice bran protein having an inhibitory activity of cholesterol micellar solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 1216-1219 (2017) (査読あり)

3. 長岡 利: 食品タンパク質由来ペプチドの生活習慣病予防改善作用に関する研究の展開, *化学と生物* 54, 804-811 (2016) (査読あり)

4. 渡邊明子, 佐藤千奈, 服部幸治, 高木寛, 八代洋一, 中田悟, 長岡利: 霊芝抽出物の血漿コレステロール低下作用とそのメカニズム, *日本食品科学工学会誌* 63, 319-324 (2016) (査読あり)

5. Ogawa, K., Hirose, S., Nagaoka, S. and Yanase, E.: Interaction between tea polyphenols and bile acid inhibits micellar cholesterol solubility. *J. Agric. Food Chem.* 64, 204-209 (2016) (査読あり)

6. Ogawa, K., Hirose, S., Yamamoto, H., Shimada, M., Nagaoka, S. and Yanase, E.: Synthesis of oolongtheanins and their inhibitory activity on micellar cholesterol solubility in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 749-752 (2015) (査読あり)

7. Wang, J., Shimada, M., Kato, Y., Kusada, M. and Nagaoka, S.: Cholesterol-lowering effect of rice bran protein containing bile acid-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 456-461 (2015) (査読あり)

8. Kashima, Y., Kanematsu, S., Asai, S., Kusada, M., Watanabe, S., Kawashima, T., Nakamura, T.,

Shimada, M., Goto, T. and Nagaoka, S.: Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly. PLOS ONE 9, e105073 (2014)

(査読あり)

9. 長岡 利: 油脂と健康, オレオサイエンス 14, 237-242 (2014) (査読あり)

10. Cabanosa, C., Katoa, N., Amaria, Y., Ohno, T., Shimizu, K., Goto, T., Shimada, M., Kuroda, M., Masuda, T., Takaiwa, F., Utsumi, S., Nagaoka, S. and Maruyama, N.: Development of the novel transgenic rice with hypocholesterolemic activity via high-level accumulation of the α' subunit of soybean β -conglycinin. Transgenic Res., 23, 609-620 (2014) (査読あり)

11. Tanaka, Y., Shimada, M. and Nagaoka, S.: L-Cysteine induced up-regulation of the low-density lipoprotein receptor is mediated via a transforming growth factor- α signalling pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun., 444, 401-405 (2014) (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. 秋江祐希、久松賢太郎、柳瀬笑子、島田昌也、長岡利: ペプチドアレイによる新規コレステロール代謝改善ペプチドの探索評価と作用機構解析. 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日 (札幌).

2. 岡田雄大、北村幸平、長岡 利: エピガロカテキニンガレート (EGCG) はスタチンによる動脈硬化促進因子 PCSK9 の増加を抑制する. 日本農芸化学会中部支部第 177 回例会、2016 年 9 月 24 日 (名古屋)

3. 大林由季奈、磯貝 渚、井辰かおる、島田昌也、長岡 利: ラクトスタチン (IIAEK) は肝特異的転写因子 HNF-3 α を介してコレステロール分解を促進する. 第 71 回日本栄養・食糧学会中部支部大会、2016 年 11 月 19 日 (岐阜)

4. 長岡 利: 2SY03 「食品タンパク質由来の健康機能性ペプチド研究の最先端」、脂質代謝改善ペプチド, 日本農芸化学会 2016 年度大会シンポジウム (招待講演 & オーガナイザー)、2016 年 3 月 28 日 (札幌)

5. Nagaoka, S.: Exhaustive analysis of a novel bile acid binding peptide derived from soybean protein and efficient modification of soystatin by peptide array, The 107 th American oil Chemist's Society Meeting & Expo (2016) (Salt Lake City, USA) 2016.5.4

6. 酒井 優治、小室 あゆ美、山本 達記、島田昌也、長岡 利: ラクトスタチンの媒介する新規腸コレステロール吸収調節系の解析、平成 27 年度酪農科学シンポジウム、2015 年 9 月 25 日 (帯広)

7. 久松賢太郎、秋江祐希、島田昌也、岩本悟志、長岡 利: 大豆由来ペプチド VVFLASVS は疎水性相互作用を介してコレステロールのミセル溶解性を低下させる. 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日 (岡山)

8. 磯貝渚、古田真優、島田昌也、長岡利: ラクトスタチンは HNF-3 α 及びカルシウムシグナルを介してコレステロール分解系を活性化する. 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日 (岡山)

9. Yuji Sakai, Akemi Komuro, Masaya Shimada, Satoshi Nagaoka: A novel hypocholesterolemic

pentapeptide, lactostatin, inhibits cholesterol absorption via the suppression of ABCA1 gene expression in Caco-2 cells. Poster presentation. Asian Congress of Nutrition 2015, (2015.5.15) (Yokohama)

10. Satoshi Nagaoka: Cholesterol lowering peptides. Symposium “Regulation of cholesterol metabolism”. Asian Congress of Nutrition 2015, (2015.5.16) (Yokohama)_

11. 古田真優、磯貝渚、井辰かおる、世古聖士、島田昌也、長岡利: IIAEK は HNF-3 α 及びカルシウムシグナリングを介してコレステロール分解系を活性化する. 日本アミノ酸学会第 8 回学術大会、2014 年 11 月 8 日 (東京)

12. 北村幸平、三島周平、岡田雄大、島田昌也、長岡利: Epigallocatechin gallate は PCSK9 低下を伴って LDL 受容体を活性化する. 第 8 回日本ポリフェノール学会学術大会、2014 年 8 月 8 日 (東京)

[図書] (計 0 件)

[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 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

長岡 利 (NAGAOKA SATOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 50202221

(2) 研究分担者

本多 裕之 (HONDA HIROYUKI)

名古屋大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 70209328

上野 義仁 (UENO YOSHIHITO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 20250467

島田 昌也 (SHIMADA MASAYA)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 10576755

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()