

機関番号：21301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20780195

研究課題名（和文） 畜産食品タンパク質をモデルとした合成ペプチドによる生体調節機能の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the physiological functions of phosvitin phosphopeptides by the synthesized phosphopeptides as a model of animal food proteins

研究代表者

石川伸一（Shin-ichi ISHIKAWA）

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：00327462

研究成果の概要（和文）：

酸化ストレスは、消化管における粘膜の炎症などに関与している。さまざまな動物および植物由来タンパク質の抗酸化作用が研究されており、卵白タンパク質、卵黄タンパク質、大豆、乳カゼインなどのさまざまなタンパク質の加水分解によって生じた抗酸化ペプチドが報告されている。最近、卵黄タンパク質であるホスビチンやその分解物であるホスビチンホスホペプチド（PPP）の抗酸化作用も明らかとなっている。炎症性ケモカインであるインターロイキン-8（IL-8）は酸化ストレスによって誘導され、抗酸化物質によって抑制されることが明らかになっている。過酸化水素はヒトの上皮由来細胞において IL-8 を産生することも知られている。本研究では、腸管上皮由来の Caco-2 細胞を用い、PPP のモデルペプチドとして、化学合成したポリホスホセリンの IL-8 産生に及ぼす影響について調べた。IL-8 産生は、ELISA（酵素免疫測定法）によって調べた。その結果、合成したポリホスホセリンは、Caco-2 細胞における過酸化水素が誘導する IL-8 の産生を有意に低下させることが明らかとなった。また、その阻害は濃度依存的であった。本研究結果から、ホスホペプチドが酸化ストレスによる腸管の炎症を緩和させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative stress has been implicated in the mucosal inflammation of the gastrointestinal tract. Several studies have described the antioxidant activity of proteins from several animal and plant sources. The antioxidant activity of peptides generated from the hydrolysis of various proteins, such as egg white protein, egg yolk protein, soy protein, and milk casein has been reported. Recent studies have described the antioxidant activity of egg yolk protein phosvitin and phosvitin phosphopeptides (PPP). An inflammatory chemokine, interleukin-8 (IL-8), is induced by oxidative stress, and the antioxidants have been shown to inhibit IL-8 expression. Hydrogen peroxide is known to increase IL-8 production in human epithelial cell lines. We investigated the effect a chemically synthesized poly-phosphoserine as a model of PPP on the production of IL-8 induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial Caco-2 cells. The chemokine production was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We found that the synthesized poly-phosphoserine significantly inhibited the hydrogen peroxide-induced IL-8 production in Caco-2 cells. Moreover, the inhibition was dose-dependent. The results suggested that the phosphopeptides have the potential to attenuate intestinal inflammation by oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000

総計	3,300,000	990,000	4,290,000
----	-----------	---------	-----------

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：畜産食品、ホスビチン、抗酸化作用、抗炎症作用、免疫賦活化作用

1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまで、鶏卵黄タンパク質ホスビチンの生理的機能について研究してきた。このホスビチンは、アミノ酸のうちセリンが約50%占めており、そのセリン残基のほとんどがリン酸化されている特殊なタンパク質である。ホスビチンの生理的機能はほとんど不明であったが、私たちが行った以前の実験により、ホスビチンは非常に高い抗酸化活性を有することが明らかとなった。さらに、ホスビチンをマウス皮膚に塗布することにより、化学発がん物質による皮膚腫瘍の発現を抑制することも示された。ホスビチンは、脂肪含量の高い鶏卵や魚卵などに特に多く含まれていることから、孵化するまでの間、鉄を安定的に結合することによって、鉄が触媒する酸化反応から胚や卵黄成分を保護しているのではないかと考えられる。このような作用は、“予防的抗酸化作用”と呼ばれており、抗酸化システムの一つとしてきわめて重要な作用である。

また、ホスビチンは、高度に負に帯電しているタンパク質であるため、消化抵抗性を有する“レジスタントプロテイン”であることも明らかとなった。レジスタントプロテインとは、消化酵素による分解に対して抵抗性を有するタンパク質のことで、これまでに絹タンパク質のセリシンやそばタンパク質などが知られている。現在、これらレジスタントプロテインは盛んに研究され、高コレステロール血症、便秘、大腸がんの腫瘍発症に対して予防的な効果や、短鎖脂肪酸の生成による保健的効果を有することが明らかとなっている。ホスビチンは腸内でも分子量の大きなマクロペプチドとして残存し、マウスにおいて大腸がんの発症の抑制、便秘の予防、腸内短鎖脂肪酸を増加させる作用などが明らかとなった。

ホスビチンそれ自体は消化されにくい、ホスビチンをアルカリにより部分的に脱リン酸後、トリプシン処理して得られたホスビチンホスホペプチド（phosvitin phosphopeptides: PPP）と呼ばれるオリゴペプチドは、カゼインホスホペプチド（casein phosphopeptides: CPP）よりもリン酸カルシウムをより可溶化させる能力を有することが明らかとなっている。特にリン酸含量が高く、アミノ酸が平均20個結合したホスビチンペプチド画分により高いカルシウム可溶化活性が認められている。

このホスビチンホスホペプチドPPPをヒトの培養細胞に添加すると、過酸化水素による細胞へのダメージを軽減する効果があることが明らかとなった。これは、ホスビチンペプチドには細胞中の抗酸化物質であるグルタチオン濃度を上昇させる作用があり、それによって酸化ストレスを低減させているものと考えられている。遺伝子レベルでも、ホスビチンのオリゴホスホペプチドは、グルタチオン合成酵素を亢進することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、畜産食品由来ペプチドとしてホスビチンホスホペプチド（PPP）、PPPのモデルペプチドとしてポリホスホセリンおよび卵白ペプチドなどの抗酸化ストレス作用、抗炎症作用、免疫賦活化作用などを調べることを目的とした。各実験のより詳細な背景および目的を下に記す。

2.1 合成ペプチドによる抗酸化ストレス作用

今日、生体は常に多くの酸化ストレスにさらされており、体内で過剰の活性酸素が発生すると、生活習慣病などを引き起こす原因となりえる。生活習慣病の予防には「食」が大きく関係し、食品の持つ有用成分は、機能的食品や医薬品の開発に繋がると期待されている。これまで私たちは、卵黄タンパク質であるホスビチンやその分解物であるPPPが抗酸化作用や抗がん作用を有していることを明らかにしてきた。しかし、PPPは様々な分子量のペプチド混合物であり、単離・精製を行った成分ではないため、その抗酸化作用の機能解明等を難しいものになっている。そこで本研究では、PPPのモデルペプチドとしてポリホスホセリンペプチドを化学合成し、この合成ペプチドの抗酸化作用について調べることを目的とした。抗酸化作用の評価方法は、ヒト結腸がん由来Caco-2細胞を用い、酸化ストレス時に細胞から産生される炎症性ケモカインのインターロイキン-8（IL-8）を測定することにより行った。

2.2 PPPの抗炎症作用

潰瘍性大腸炎、クローン病などの炎症性腸疾患は、大腸および小腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍の症状を呈する病気であり、その患者数は毎年増加の一途をたどっている。これらの発症原因には、自己免疫反応の異常説、細菌やウイルスなどの感染説が考えられているが、いまだ十分に明らかにされておらず、国の難病に指定されている。これらの炎症の

発症要因には、各細胞から産生される炎症性サイトカインが関与しており、これらが持続的かつ高濃度で放出されると、組織傷害を引き起こし、発熱、発赤などの炎症特有の症状を呈することが知られている。炎症反応は活性酸素などによる酸化ストレスによって促進されることから、抗酸化物質の中に抗炎症作用を有するものがいくつか知られている。PPP は、抗酸化作用を有することが知られており、また、難消化性であるため、腸まで活性を保持したまま届くことが明らかになっている。本研究では、Caco-2 細胞の腸管炎症モデルを用い、PPP が炎症性サイトカインの mRNA およびタンパク質発現量に及ぼす影響について調べ、PPP の抗炎症作用について検討することを目的とした。

2.3 卵白ペプチドの抗酸化ストレス作用

今日生体は、紫外線やタバコ、ストレスなど常に多くの酸化ストレスにさらされており、体内で過剰の活性酸素が発生すると糖尿病や動脈硬化といった病気を引き起こし、身体に異常をきたすことになる。卵白タンパク質はオボアルブミンやリゾチームなどのタンパク質が溶解しており、免疫調節機能や抗菌性、炎症の抑制といった機能を有している。また、その分解物である卵白ペプチドにも抗菌・抗ウイルス活性などの機能が報告されている。これまで私たちは、オボアルブミン由来の免疫賦活化ペプチドや卵黄由来の抗酸化ペプチドなどについて研究、報告してきた。本研究では、卵白を様々な酵素で分解して得られる卵白ペプチドの抗酸化ストレス作用を Caco-2 細胞を用いた実験系で調べることを目的とした。

2.4 卵白ペプチドの免疫賦活化作用

近年、偏食、ストレス、老化などによって免疫力が低下することにより、感染症や生活習慣病などを発病するケースが増えていることが懸念されている。これらの疾病の予防のためには日頃から免疫機能を賦活化させておく必要がある。私たちは、以前、卵白タンパク質のペプシン分解物からオボアルブミン (OVA) のアミノ酸配列中に免疫賦活化作用を有するペプチド OVA41-59 (オボアルブミンの N 末端から 41-59 番目) を同定した。そこで本研究では免疫賦活化作用を有すると考えられるオボアルブミン由来ペプチドを化学合成し、それらのペプチドがマウス脾臓細胞の増殖および抗体産生能に及ぼす影響とそのメカニズムについて調べた。

3. 研究の方法

3.1 合成ペプチドによる抗酸化ストレス作用

ポリホスホセリンペプチドは、ハイドロキシアパタイト上でホスホセリンを重合化させることにより合成した。重合化ホスホセリンは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離、精製を行った。Caco-2 細胞は

20%FBS を含む DMEM 培地でコンフルエントに達したものを実験に使用した。細胞に合成したペプチドを添加し、2 時間後に酸化ストレスとして過酸化水素を添加した。過酸化水素を添加してから 24 時間後に上清を回収し、ELISA 法により IL-8 濃度を測定した。

3.2 PPP の抗炎症作用

鶏卵卵黄ホスビチンを *in vitro* 消化し、PPP を調製した。PPP の Caco-2 細胞に対する毒性を WST-8 テトラゾリウム塩を用いて調べた。サルモネラ菌由来のリポポリサッカロイド (LPS) を Caco-2 細胞に添加し、炎症反応を誘導した。炎症性サイトカイン (IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α) の mRNA 発現量を、細胞から mRNA を抽出し、逆転写 PCR (RT-PCR) 法によって増殖した PCR 産物をアガロース電気泳動に供することにより、また、細胞培養液上清中の炎症性サイトカイン (IL-8) のタンパク質発現量を、ELISA 法によりそれぞれ調べた。

3.3 卵白ペプチドの抗酸化ストレス作用

卵白タンパク質を消化酵素 (ペプシン) および食品工業用酵素 (プロテアーゼ M、プロテアーゼ N、アルカラゼ) を用いて分解し卵白ペプチドを得た。抗酸化ストレス作用の評価方法は、Caco-2 細胞が酸化ストレス下で産生する IL-8 の量を ELISA 法によって測定することにより行った。酸化ストレスの誘導には過酸化水素を用いた。また、卵白ペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分画し、活性のあるペプチドを LC-MS およびプロテインシーケンサーにより同定した。その同定したペプチドを Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl) 化アミノ酸を用いた固相ペプチド合成法によって化学合成し、抗酸化ストレス試験に用いた。

3.4 卵白ペプチドの免疫賦活化作用

オボアルブミン由来の 3 種のペプチド (OVA41-59、OVA41-52、OVA53-59) を固相ペプチド合成法によって化学合成した。雄 ICR および C3H/HeN マウスから脾臓を採取してマルチウェルプレートに播種した。各ウェルに合成したペプチドをそれぞれ添加し、37°C で培養を行った。細胞増殖率は培養開始 72 時間後にテトラゾリウム塩法により測定し、抗体産生量は 120 時間後に細胞培養上清中の総 IgA 量を ELISA 法によって測定した。オボアルブミン由来の 3 種のペプチドを脾臓細胞に添加し、72 時間後に各種サイトカイン (IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IFN- γ) の mRNA 発現量を RT-PCR により定量した。

4. 研究成果

4.1 合成ペプチドによる抗酸化ストレス作用

酸化ストレスとして用いた過酸化水素は、1mM の濃度の時に最も高い IL-8 産生量を示した。ポリホスホセリンペプチドを細胞に添加した結果、過酸化水素によって誘導される

IL-8 産生量が濃度依存的に減少し、また、ペプチドの重合度が高い程 IL-8 の産生を抑制することが明らかとなった。単体のホスホセリンでは、IL-8 の産生量の減少は見られなかったことから、PPP の抗酸化作用は、単体のアミノ酸ではなく複数のホスホセリンが結合し、ペプチドになることで初めてその機能を発揮すると考えられた。

4.2 PPP の抗炎症作用

細胞生存率は、コントロール区と PPP 添加区間で有意な差がみられなかったことから、添加した濃度範囲内の PPP は、Caco-2 細胞に対する毒性はないことが示された。炎症誘導実験では、500 µg/ml LPS 添加、添加時間 6 時間において最も顕著な IL-6 の mRNA 発現が確認されたことから、同条件で PPP の抗炎症作用について検討を行った。RT-PCR 法の結果から、PPP は濃度依存的に IL-8 および TNF- α の発現を遺伝子レベルで抑制し、また、ELISA 法の結果から、IL-8 の発現をタンパク質レベルで抑制することが明らかとなった。以上の結果から、PPP は IL-8 などの炎症性サイトカインの発現を遺伝子およびタンパク質レベルで抑制することで、抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。

4.3 卵白ペプチドの抗酸化ストレス作用

卵白タンパク質分解物の中でペプシン分解物に最も高い IL-8 産生抑制効果が認められた。このペプシン分解物を HPLC により分画し、より抗酸化ストレス作用の高いペプチドを分離・精製した結果、オボアルブミン由来の新規な高酸化ストレスペプチドであるヘキサペプチド Glu - Ser - Ile - Ile - Asn - Phe (OVA256-261) が同定された。

4.4 卵白ペプチドの免疫賦活化作用

卵白オボアルブミン由来の免疫賦活化ペプチドである OVA41-59 のペプチドを脾臓細胞に添加した区は、コントロール区と比較して高い細胞増殖率を示した。培養上清中の総 IgA 量はオボアルブミン由来ペプチドを添加した区とコントロール区の間で、ICR および C3H/HeN マウスともに大きな差は見られなかった。OVA41-59 を添加した脾臓細胞では、IL-2 および IL-4 の mRNA 発現量がコントロールと比較して増加することが明らかとなった。このことから、OVA41-59 は IL-2 の生産を増強することによって細胞増殖作用を有する可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic

epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(8), 1182-1191 (2010).

2. 大畑 素子, 有原 圭三, 石川 伸一, 伊藤 良. 鶏肉あるいは鰹肉をパバインで分解して調製したペプチド性キャットフード素材の嗜好性に対する影響. *ペット栄養学会誌*, 13(1), 1-13 (2010).
3. Ishikawa S, Suzuki K, Fukuda E, Arihara K, Yamamoto Y, Mukai T, Itoh M. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Letters*, 584(4), 770-774 (2010).
4. Ishikawa S, Asano T, Takenoshita S, Nozawa Y, Arihara K, Itoh M. Egg yolk proteins suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and cell proliferation in the colon of rats. *Nutrition Research*, 29(1), 64-69 (2009).
5. Suzuki S, Ishikawa S, Arihara K, Itoh M. Continuous change in triacylglycerol molecular species composition by fatty acids in preinc adipocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1212-1218 (2008).
6. Suzuki S, Ishikawa S, Arihara K, Itoh M. Molecular species-specific differences in composition of triacylglycerols of mouse adipose tissue and diet. *Nutrition Research*, 28(4), 258-262 (2008).

[学会発表] (計 9 件)

1. 石川 伸一. 貯蔵中における鶏卵卵白タンパク質のプロテオーム解析. 平成 22 年度日本食品科学工学会東北支部大会 (福島). 2010. 10. 16.
2. 高部 祐允, 工藤 謙一, 伊藤 良, 石川 伸一. 牛肉熟成と牛肉ホモジネート貯蔵のプロテオーム解析. 日本食品工学会第 11 回 (2010 年度) 年次大会 (東京海洋大学). 2010. 8. 4.
3. 石川 伸一, 大畑 素子, 有原 圭三, 伊藤 良. 卵殻色素の光依存的抗菌作用, 日本畜産学会第 112 回大会 (明治大学). 2010. 3. 29.
4. 石川 伸一, 高部 祐允, 大畑 素子, 有原 圭三, 伊藤 良. 牛肉の真空熟成および牛肉ホモジネート貯蔵におけるプロテオーム解析. 日本畜産学会第 112 回大会 (明治大学). 2010. 3. 29.
5. Ishikawa S, Takanohashi Y, Ohata M,

Arihara K, Itoh M, Peptidomic analysis of immunoglobulin E-epitopes using an egg white allergy model in Brown Norway rats. 3rd EuPA Congress Clinical Proteomics (Stockholm, Sweden). 2009.6.16-17.

6. 石川 伸一、大畑 素子、有原 圭三、伊藤 良. 食品科学へ応用した経時的プロテオーム解析:貯蔵中における牛肉および鶏卵卵白の特徴的な変化. 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP) 第7回大会 (東京). 2009.7.28.
7. 石川 伸一、植竹 博基、大畑 素子、有原 圭三、伊藤 良. ウシ初乳、移行乳および常乳のプロテオーム解析, 日本畜産学会第110回大会 (藤沢). 2009.3.27.
8. 鷹嘴 勇宜、石川 伸一、岡庭 希、大畑 素子、有原 圭三、伊藤 良. 鶏卵卵白タンパク質の貯蔵中のプロテオーム解析. 日本畜産学会第110回大会 (藤沢). 2009.3.27.
9. 石川 伸一、齋藤 佑介、大畑 素子、有原 圭三、伊藤 良. 卵白タンパク質ペプシン分解物は腸管上皮細胞における酸化ストレス誘導によるインターロイキン8の産生を抑制する. 日本農芸化学会2009年度大会 (福岡). 2009.3.29.

[図書] (計1件)

1. 石川 伸一 (分担執筆). "免疫調節ペプチド", 機能性ペプチドの最新応用技術 -食品・化粧品・ペットフードへの展開-, シーエムシー出版. p.115-122
2009.8.7

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 上皮成長因子受容体に対する卵黄抗体およびその用途

発明者: 石川伸一、大畑素子、有原圭三、伊藤良

出願番号: 特願 2009-174415

出願年月日: 2009年7月27日

国内外の別: 国内

名称: コラーゲンを原料とする保健的機能性と嗜好性向上効果を備えた食品・ペットフード素材

発明者: 有原圭三、新井健夫、大畑素子、石川伸一、伊藤良

出願番号: 特願 2008-273268

出願年月日: 2008年10月23日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

研究室 Web サイト:

<http://molecular.jp/>

個人 Web サイト:

<http://web.me.com/ishin/home/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川伸一 (Shin-ichi ISHIKAWA)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号: 00327462

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし