

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 3 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658044

研究課題名（和文） 機能性ペプチドの腸管吸収は疾病状態を反映する-その仮説と検証-

研究課題名（英文） Study on the absorption of bioactive peptides depending on the onset of diseases

研究代表者

松井 利郎 (MATSUI TOSHIRO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20238942

研究成果の概要（和文）：

血圧低下ペプチドの体内吸収性に関して新たな分析法を開発し、週齢（血圧亢進）によるペプチド吸収性の違いを明らかにすることを目的として本研究を実施した。投与したペプチドの選択的アッセイ法として安定同位体標識LC-MRM-MS/MS法を構築した。高血圧自然発症ラットに対する10 mg/kgのTrp-His単回投与試験を実施し、正常ラットと比較して2倍程吸収量が増大することが初めて明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, in order to elucidate effect of the onset of diseases on absorption of bioactive small peptides, a stable isotope labeling LC-MRM-MS/MS method for successive determination of peptides in rat blood was primarily developed. By using this newly developed assay method, ca. 2-times higher absorption of one of di-peptides, Trp-His in SHR was observed for the first time, compared to normal rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,400,000	0	1,400,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	330,000	2,830,000

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：食品機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 血圧低下ペプチドは生体内にそのままの形で（分解を受けることなく）吸収されることが明らかにされつつあった。

(2) 特に、小腸にはジ及びトリペプチドまでの鎖長を認識するトランスポーターが存在することが報告され、トリペプチドまでの低分子ペプチドが吸収可能成分であると考えられていた。しかしながら、吸収挙動とペプチド構造との関連、さらにはペプチド吸収

を直接的にかつ高感度に測定する分析法はほとんど見当たらなかった。

2. 研究の目的

(1) 低分子ペプチド高感度・高選択分析法の確立

摂取（投与）した外因性ペプチドと内因性ペプチドとの識別を前提として、質量数の違いによる高選択LC-MS法の確立を試みた。

(2) 高血圧及び正常ラット間でのペプチド

吸収挙動の評価

高血圧自然発症ラット (SHR) 及び正常ラットである Sprague-Dawley (SD) ラットに対するジペプチド (Trp-His) の単回投与試験を実施し、血圧亢進に伴うペプチド吸収量の違いを評価した。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体標識ペプチドを用いた LC-MS/MS 分析法の設定

① 安定同位体標識ペプチドの作製

試験で用いた安定同位体標識ジペプチドは α 位の炭素を ^{13}C 標識した下記の Fmoc 合成試薬を用いて、固相合成法により獲得した (以下、 ^{13}C -SIP)。

Fmoc - Tyr (tBu) - o - Alkoxybenzyl alcohol (Wang) resin (国産化学)

Fmoc - Val - OH (1 - ^{13}C) (ISOTEC)

Fmoc - Leu - OH (1 - ^{13}C) (ISOTEC)

Fmoc - Met - OH (1 - ^{13}C) (ISOTEC)

これにより、 ^{13}C -SIP として、Val-Tyr, Met-Tyr, Leu-Tyr を合成した。なお、ペプチド配列は Shimadzu PPSQ-21 により確認した。

② 安定同位体標識導入の検証

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR 法により、合成した ^{13}C -SIP の同位体標識を確認した。測定は、NM-A400 FT NMR SYSTEM (JEOL)、Superconducting Magnet 400 MHz (JEOL) を用い、試料調製には重水 (D_2O , 和光純薬工業) を、内標準には 3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DSS, 和光純薬工業) を用いた。

③ LC-MRM-MS/MS 分析

LC-MS 装置は ESI-Ion Trap タイプの esquire6000 (ブルカーダルトニクス) 及び HPLC 1200 シリーズ (アジレントテクノロジー) を用いた。なお、測定に関する基本条件は以下の通りである。

カラム: COSMOSIL 5C₁₈ AR-II (ϕ 2.1 × 150 mm) インジェクション量; 25 μL

グラジエント; 5-100% MeOH in 0.1% formic acid/20 min

流速; 0.25 mL/min

カラムオープン; 40°C

Nebulizer; 40 psi

Dry Gas; 8 L/min

Dry Temp.; 330°C

(2) ラットへの単回投与試験

一晚絶食したラット (8 週齢)

Sprague-Dawley, 12 週齢及び 18 週齢高血圧自然発症ラット (SHR) に対して、各 ^{13}C -SIP が 10 mg/kg となるよう経口投与した。投与後、0, 15, 30 min, 1.0, 1.5, 2.0, 6.0, 24 hr 後に尾静脈採血を行い、約 200 μL の血液を経時的に採取した。得られた血液をヘパリン処理し、遠心分離 (3500 × g, 15 min, 4°C) 後、血漿を回収した。得られた血漿を 100% アセトニトリル/0.1% TFA で 10 倍希釈し、除

タンパク処理を行った。遠心分離 (10,000 × g, 15 min, 4°C) 後、得られた上清の 9 割を回収・乾固し、100 μL の 0.1% TFA にて再溶解し、平衡化した Sep-pak カートリッジに負荷した。0.1% TFA でカートリッジを洗浄後、各 ^{13}C -SIP の疎水性を考慮し、40% アセトニトリル/0.1% TFA (3 mL) で溶出した。得られた溶出液を遠心エバポレーターで乾固後、60 μL の 0.1% ギ酸に再溶解し、LC-MRM-MS/MS 分析に供した

4. 研究成果

(1) ^{13}C -SIP-LC-MRM-MS/MS 法の確立

① ^{13}C -SIP 合成

Fmoc 固相合成法により得た ^{13}C -Val-Tyr を $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR 法に供した結果、図 1 で示したように、100 回の ^{13}C -NMR スキャンにより明らかなシングルピークが得られ、確実にペプチド結合部位の α 炭素が ^{13}C ラベル化されていることが確認された。これにより、 ^{13}C -SIP ペプチドを用いることにより、12C → 13C への 1 mass 単位増大による質量数 m/z を分子イオンとした選択的な MS 解析が可能であることが明らかとなった。

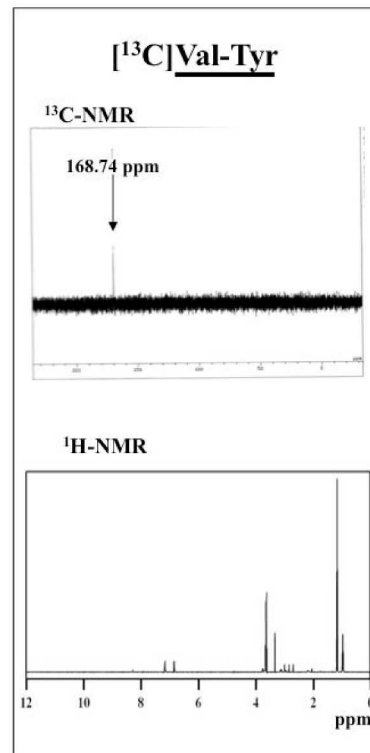


図 1 ^{13}C -Val-Tyr の NMR 解析

② LC-MRM-MS/MS 条件の最適化

カラム、溶離液 (MeOH あるいは CH_3CN)、MRM 条件を種々検討した結果、

^{13}C -Val-Tyr; m/z 282.4 > m/z 182.0

^{13}C -Met-Tyr ; m/z 314.4 > m/z 182.0
 ^{13}C -Leu-Tyr ; m/z 296.4 > m/z 182.0
 でのフラグメントイオンのMRM検出が最適であった。なお、 ^{12}C ペプチドとの誤判別を防ぐため、Isolation width $\pm 1.2/4.0$ に設定した。その結果、以下の測定条件で、図2に示すような20分以内での3種のペプチドの一斉分析が可能となった。

MRM-MS分析条件：

Skimmer (V): 40.0, Capillary Exit (V): 112.1, Trap Drive: 42.2, Octapole 1 (V): 12.0, Octapole 2 (V): 1.7

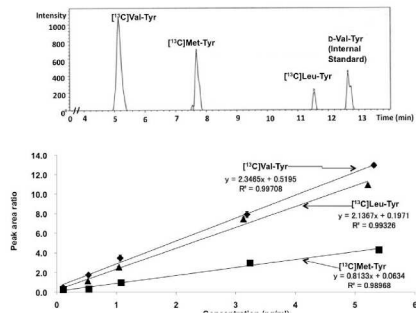


図2 各SIPペプチドの一斉LC-MRM-MS/MS解析

図2で示したように、本研究によって低分子ペプチド測定のために、新たに安定同位体標識法を設定し、高感度分析に関して下記のパラメータを明らかにすることができた。
 LOD (ng/mL): Val-Tyr; 0.04, Met-Tyr; 0.02, Leu-Tr; 0.03
 LOQ (ng/mL): Val-Tyr; 0.12, Met-Tyr; 0.06, Leu-Tr; 0.11
 検量線: 0.1-5.0 ng/mL ($R > 0.995$)
 日内・日刊変動: <10%
 回収率 (血漿への添加試験): 85-120%

(2) ラット血液へのペプチド吸収挙動
 ①18週齢SHRへのVal-Tyr及びその他ジペプチドの吸収挙動

すでに血圧低下作用を有することが明らかとなっているVal-Tyr及びACE阻害作用が知られているMet-Tyr、Leu-Tyrのラットへの単回投与試験を実施した(30 mg/kg)。その結果、投与した各SIPの24時間までの経時的な吸収量の変化が本LC-MS法により明らかとなり(図3及び図4)、ペプチド構造によって吸収動態が大きく異なることが判明した(表1)。特に、Val-Tyr (AUC: 5.46 ± 0.20 ng h/mL, C_{max} : 1.16 ± 0.32 ng/mL)ではAUC量としてMet-Tyr (AUC: 0.38 ± 0.03 ng h/mL, C_{max} : 0.12 ± 0.03 ng/mL)及びLeu-Tyr (AUC: 0.42 ± 0.03 ng h/mL, C_{max} : 0.16 ± 0.06

ng/mL)の約15倍程度吸収されやすいペプチドであることが明らかとなった。なお、Met-Tyr及びLeu-Tyrとの間には有意な吸収量の差は認められなかった。ペプチドの種類によるin vivoレベルでの吸収量の違いに関する報告例はほとんど見当たらないことから、ペプチド構造-吸収量相関に関してはさらなる検討が必要である。

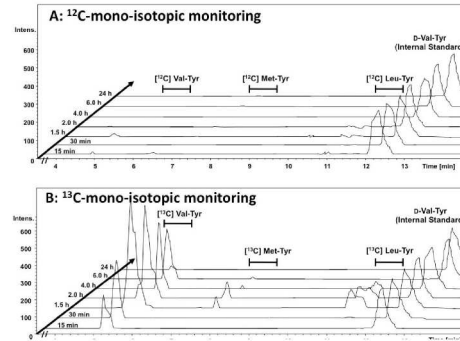


図3 LC-MRM-MS/MS法によるSHRへのSIP投与後の血中内吸収挙動

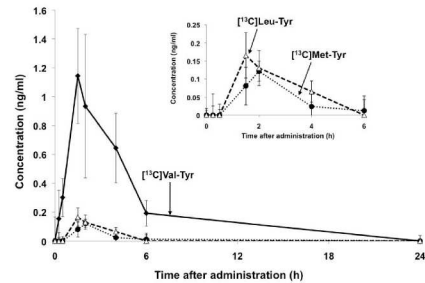


図4 SIP投与後の24時間までの血中濃度変化

表1 SHRへのSIP投与試験結果

	t_{max} (h)	C_{max} (ng/ml-plasma)	$t_{1/2}$ (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/ml - plasma)
^{13}C Val-Tyr	1.5	1.16 ± 0.32	4.1	5.46 ± 0.20
^{13}C Met-Tyr	2.0	0.12 ± 0.03	4.1	0.38 ± 0.03
^{13}C Leu-Tyr	1.5	0.16 ± 0.06	4.1	0.42 ± 0.03

Data represented the mean \pm SEM (n=4)

t_{max} : time to reach maximum concentration; C_{max} : maximum concentration; $t_{1/2}$: half-life; AUC₀₋₂₄: area under the curve over 24 h

②SD及び18週齢SHRへのTrp-Hisの吸収挙動 (加齢及び血圧亢進の影響)

アポE欠損マウスでの抗動脈硬化進展作用を有し、かつ収縮した摘出血管を内皮非依存的に弛緩させるジペプチドであるTrp-Hisを用いて、8週齢SD系ラット及び18週齢SHRに対する単回投与試験(10 mg/kg)を実施し、週齢及び疾病状態の異なるラット系でのペプチド吸収挙動の相違を検討した。LC-MS分

析条件等は下記のとおりである。

カラム : Waters T3 カラム (2.1×150 mm)
溶離液 : 0-100% MeOH in 0.1% formic acid (25 min)

流速 : 0.20 ml/min

MS 検出 : Positive mode

MRM 検出 [M+H]⁺ : 342>324 m/z

最適化 MS 条件での MRM-MS クロマトグラムを
図 5 に示す。

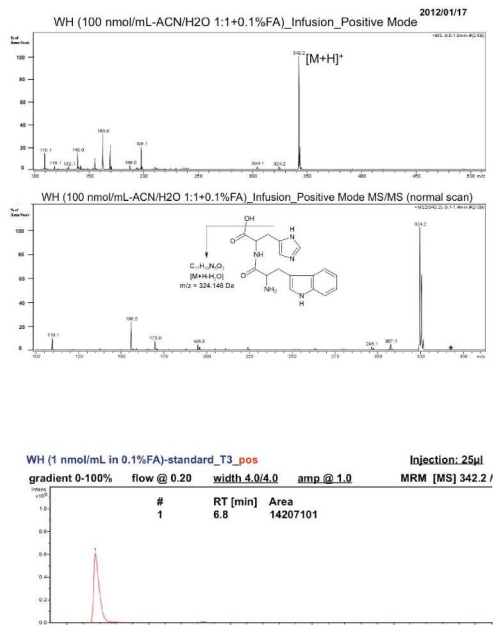


図 5 Trp-His の MS/MS クロマトグラム

Trp-His 単回投与試験の結果、Trp-His の 8 週齢 SD ラットに対する C_{max} は 3.6 ng/mL, AUC は 13.2 ng h/mL であることが判明した。それに対して、18 週齢 SHR では、C_{max} は 6.3 ng/mL, AUC は 26.1 ng h/mL となった。すなわち、ジペプチドである Trp-His の吸収に関して、週齢が進むとともに、あるいは血圧の亢進とともに約 2 倍の吸収量の増大となることが初めて明らかとなった。本研究では、加齢/血圧亢進を同軸上で評価したため、いずれの因子がペプチド吸収促進作用に大きく関わっているかを判定することは困難であったが、18 週齢 SHR では正常ラットの血圧値 (収縮期血圧 : ~130 mmHg) と比較してすでに十分な高血圧状態 (収縮期血圧 : ~200 mmHg) となっていることから、本結果は高血圧疾患による小腸でのペプチドトランスポーター発現の亢進を大いに示唆する知見と考えられた。本点については、週齢 (あるいは血圧値) の違いによるトランスポーター発現量の相違を明らかにする必要があり、今後さらなる検討を進めていくものとする。

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 1 件)

- ① E. Nakashima, A. Kudo, Y. Iwaihara, M. Tanaka, K. Matsumoto, T. Matsui: Application of ¹³C stable isotope labeling liquid chromatography-multiple reaction monitoring-tandem mass spectrometry method for determining intact absorption of bioactive dipeptides in rats. *Anal. Biochem.*, 414, 109-116 (2011). 査読有。

[学会発表] (計 6 件)

- ① E. Nakashima, A. Kudo, Y. Iwaihara, M. Tanaka, K. Matsumoto, T. Matsui: Study of ¹³C-stable isotope labeled bioactive di-peptides behavior in circulatory system of SHR by LC-MRM-MS/MS. IUPAC int. Congress on Analytical Sciences 2011 (Kyoto) 2011. 5. 23.
- ② 祝原由莉, E. Nakashima, 田中 充, 松本 清, 松井利郎: LC-MRM-MS/MS 法を用いたラット循環系におけるジペプチドの吸収挙動解明と臓器分布可視化への試み. 第 65 回日本栄養食糧学会 (東京) 2011. 5. 14.
- ③ 松井利郎: 食品成分と腸管吸収. 第 21 回食品産業創造展 (福岡) 2011. 5. 26
- ④ 松井利郎: MS と食品分析における活用. H22 年度 JST 地域産学官連携拠点整備事業セミナー (長崎) 2011. 2. 10
- ⑤ 祝原由莉, E. Nakashima, 松井利郎, 松本 清: 安定同位体標識 LC-MS/MS-MRM 法を用いた血しょうからのペプチド検出. 第 284 回日本農芸化学会西日本支部大会 (熊本) 2010. 9. 18
- ⑥ 松井利郎, 工藤章寛, 仲村 周, E. Nakashima, 松本 清: 安定同位体標識 LC-MS/MS-MRM 法によるペプチド吸収動態解析法の確立. 第 64 回日本栄養食糧学会 (徳島) 2010. 5. 23

[図書] (計 1 件)

- ① T. Matsui, M. Tanaka: Anti-hypertensive peptides and their underlying mechanisms (Chapter 4) In *Biologically Active Food Proteins and Peptides in Health-Fundamental and Clinical aspects* (Eds.) Mine, Y., Li-Chan, E.C.Y., Jiang, B., IFT Book Series, Wiley

Blackwell (Iowa), 2010, pp.43-54

[その他]

ホームページ等

HP:<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/bunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 利郎 (MATSUI TOSHIRO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20238942