

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380075

研究課題名(和文)新規脂質代謝改善ペプチドの特定・網羅解析・作用機構解明・高機能化

研究課題名(英文) Identification, exhaustive analysis, clarification of action mechanism and efficient modification of novel hypolipidemic peptides

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) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：(1)CHOL輸送担体の腸ABCA1遺伝子を用いたルシフェラーゼ分析により、ラクトスタチンの媒介する腸のCHOL吸収抑制作用には、LXRが関与することが示唆された。(2)ペプチドアレイにより、大豆オレオシンの胆汁酸結合ペプチドを網羅解析し、2種類の新規胆汁酸結合ペプチドを発見した。発見したペプチドは、VAWWMYと比較して、in vitroでのCHOLミセル溶解性を顕著に低下させるとともに、ラットにおいて、CHOL吸収抑制作用を発揮した。(3)大豆-コングリシニンサブユニット由来のペプチドQEKIは、HepG2細胞でCYP7A1 mRNAレベルを有意に上昇させることを発見した。

研究成果の概要(英文)：We used the luciferase plasmid containing the cholesterol transporter, intestinal ABCA1 gene promoter to clarify the molecular mechanism of the inhibition of intestinal cholesterol absorption by lactostatin in Caco-2 cells. Our results suggested that PPAR/LXR responsive element related to the suppression of cholesterol absorption by lactostatin in Caco-2 cells. An oleosin having a hypocholesterolemic action was investigated to clarify the active sequence of its induced a hypocholesterolemic action by an exhaustive analysis using a peptide array. We found two novel bile acid binding peptides. Two novel bile acid binding peptides exhibited the greater inhibition of micellar solubility of cholesterol in vitro compared with a bile acid binding peptide VAWWY as a positive control. We found that QEK derived from soybean beta-conglycinin alpha prime subunit exhibited the significant increase in CYP7A1 mRNA levels compared to the control group in HepG2 cells.

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：コレステロール ペプチド ミセル ペプチドアレイ 胆汁酸 食品機能 ABCA1 ラクトスタチン

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。

90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 7 α -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、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 CHOL ミセル存在下でラクタスタチンが ABCA1 などの CHOL 代謝関連遺伝子に与える影響を評価することで、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した。

ところで、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。大変興味深い点は、これらが *in vitro* で医薬品コレステラミンと同程度あるいは、それ以上の CHOL ミセル溶解性の阻害作用を発揮し、動物実験で放射性 CHOL 吸収抑制作用を発揮することも発見した。つまり、大豆タンパク質を構成する、どのアミノ酸配列が CHOL 吸収抑制作用に寄与する胆汁酸結合ペプチドであるのかを、ペプチドアレイにより網羅的に解析し、大豆タンパク質の CHOL 吸収抑制作用に寄与している胆汁酸結合ペプチドを発見することは新規性に富んだ研究である。

以上の背景から、ラクタスタチンに媒介される新規腸 CHOL 吸収調節系の解明、ペプチドアレイによる大豆タンパク質由来の新規 CHOL 代謝改善ペプチドの効率的発見、 β -コングリシニン α ' サブユニット由来の

CHOL 代謝改善ペプチドの特定などを目指すこととする。

2. 研究の目的

CHOL代謝改善ペプチド（ラクタスタチン：IIAEK）を私たちは世界で初めて発見した（Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 11-17 (2001)）。さらに、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、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、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。

また、我々の研究から、大変興味深いことに、大豆 β -コングリシニン α サブユニットには従来にはない強力な脂質代謝改善作用があり、活性ペプチドのアミノ酸配列が特定可能である（第63回日本栄養食糧学会講演要旨p.197）。そこで、 β -コングリシニン α サブユニット由来ペプチドから新規大豆由来CHOL代謝改善ペプチドを特定することを目的とした。さらに、大豆のオイルボディーを形成する膜タンパク質であり、CHOL代謝改善作用を発揮する可能性のある大豆オレオシンのアミノ酸配列に的を絞って、ペプチドアレイにより胆汁酸結合ペプチドを網羅的に解析することを目的とした。

以上の背景から、ラクタスタチンに媒介される新規腸CHOL吸収調節系の解明、ペプチドアレイによる大豆タンパク質由来の新規CHOL代謝改善ペプチドの効率的発見、 β -コングリシニン α サブユニット由来のCHOL代謝改善ペプチドの特定などを目指すこととする。

3. 研究の方法

[実験1] (1)分化Caco-2細胞に、CHOLミセルを含む培地（対照群）及びCHOLミセルと2mMラクタスタチンを含む培地（実験群）を24時間添加し、全RNAを回収した。そして、ABCA1などのCHOL代謝関連遺伝子のmRNAレベルをリアルタイム定量PCR法により測定した。(2)分化Caco-2細胞に、CHOLミセルを含む培地（対照群）及びCHOLミセルと2mMラクタスタチンを含む培地（実験群）を48時間添加し、膜タンパク質を回収した後、ABCA1タンパク質レベルをウェスタンブロット法によって測定した。(3)ABCA1遺伝子のプロモーター（-928～+107）を連結させたluciferaseプラスミドを一過性に導入した分化Caco-2細胞に、CHOLミセルを含む培地（対照群）及びCHOLミセルと2mMラクタスタチンを含む培地（実験群）を12時間添加後、ABCA1遺伝子転写活性をluciferase assayにより定量的に評価した。また、ABCA1遺伝子のプロモーター（-126～+107、-536～+107）についても同様の方法で評価した。

[実験2] (1)16.5 kDa、24 kDa大豆オレオシンのアミノ酸配列（疎水度0.8以上）を網羅したペプチドアレイを作成し、タウロコール酸とハイブリダイゼーションを行った。抗コール酸抗体、蛍光標識した抗体と順次反応させ、蛍光強度を測定し、胆汁酸結合ペプチドを特定した。(2)上述の実験(1)で見出した胆汁酸結合ペプチドをin vitroで従来法（試験管内で放射性胆汁酸との結合能を測定）により胆汁酸結合能を評価した。(3)試験管内で放射性CHOLを含むミセル溶液に、上述の実験(1)で見出した胆汁酸結合ペプチドを添加し、CHOLミセル溶解性に対する影響を評価した。(4)Wistar系雄ラットに市販の固形飼料を3日間自由摂取させた後、48時間絶食させた。大豆オレオシン由来ペプチドFGLTALSと放射性CHOLを含むエマルジョン溶液を調製し、ラットに経口投与し、1時間後に解剖

し、CHOL 吸収に対する影響を評価した。

[実験 3] HepG2 細胞に精製した β -コングリシニン α' サブユニットのトリプシン加水分解物 (24h 加水分解)、 β -コングリシニン α' サブユニット由来ペプチド QEK を 1.0 または 3.0mg/ml 添加し、24 時間培養後、全 RNA を回収し、LDL 受容体、Cholesterol 7 α -水酸化酵素や HMG-CoA Reductase の mRNA レベルを Real Time 定量 PCR 法により測定した。

4. 研究成果

[実験 1] (1) ラクトスタチンにより、CHOL 代謝関連遺伝子の中でも ABCA1 の mRNA レベルが対照と比べて最も有意に減少した。(2) ラクトスタチンにより、ABCA1 タンパク質レベルは対照と比べて有意に減少した。(3) ラクトスタチンにより、ABCA1 遺伝子 (-928~+107) の転写活性は対照と比べて有意に低下した。また、ABCA1 遺伝子 (-126~+107、-536~+107) の転写活性も対照と比べて有意に低下した。以上の結果より、ラクトスタチンによる ABCA1 遺伝子発現抑制は肝臓 X 受容体 (LXR) を介して起きる可能性が示唆された。

[実験 2] (1) 16.5 kDa、24 kDa 大豆オレオシンのアミノ酸配列 (疎水度 0.8 以上) を網羅したペプチドアレイを作成し、タウロコール酸とハイブリダイゼーションを行った。抗コール酸抗体、蛍光標識した抗体と順次反応させ、蛍光強度を測定した結果、複数の胆汁酸結合ペプチドを発見した。(2) (1) で見出した胆汁酸結合ペプチドを in vitro で従来法 (試験管内で放射性胆汁酸との結合能を測定) により胆汁酸結合能を評価した結果、FGLTALSS は VAWWY よりも高い胆汁酸結合能を示した。(3) 試験管内で放射性 CHOL を含むミセル溶液に、上述の (1) で見出した胆汁酸結合ペプチドを添加し、CHOL ミセル溶解性に対する影響

を評価した結果、FGLTALSS および FSPILVPA は VAWWY と比較して CHOL ミセル溶解性を有意に低下させた。(4) Wistar 系雄ラットに市販の固形飼料を 3 日間自由摂取させた後、48 時間絶食させた。大豆オレオシン由来ペプチド FGLTALSS と放射性 CHOL を含むエマルジョン溶液を調製し、ラットに経口投与し、1 時間後に解剖した結果、FGLTALSS は CHOL 吸収抑制作用を発揮することを発見した。

[実験 3] QEK は対照群と比較して、有意に CYP7A1 の mRNA レベルを増加させた。対照群と群と加水分解物添加群の間で、LDL 受容体、Cholesterol 7 α -水酸化酵素や HMG-CoA Reductase の mRNA レベルは有意差を示さなかった。

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 4 件)

1. Goto, T., Mori, A. and Nagaoka, S.: Soluble soy protein peptic hydrolysate stimulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Mol. Nutr. Food Res., 57, 1435-1445 (2013) (査読あり)

2. 長岡 利 「乳成分の脂質代謝改善作用—乳清ペプチドを中心に—」『ミルクサイエンス』, No.61, p.253-258 (2012) (査読あり)

3. 長岡 利: ペプチドアレイによる大豆たん白質由来の新規疎水性胆汁酸結合ペプチドの網羅解析および in vivo での作用機構解析, 大豆たん白質研究, 14, 48-52 (2011) (査読なし)

4. Takeshita, T., Okochi, M., Kato, R., Kaga, C., Tomita, Y., Nagaoka, S. and Honda, H.: Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis. J. Biosci. Bioeng., 112, 92-97 (2011)
(査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1. 小室あゆ美, 山本達記, 木地裕美, 大畑愛美, 島田昌也, 長岡 利「ラクトスタチンは ABCA1 発現低下を介してコレステロール吸収を抑制する」日本農芸化学会 中部支部第 168 回例会講演要旨集 p. 33, 2013 年 10 月 12 日 (名古屋)

2. 山本 達記, 小室 あゆ美, 木地 裕美, 大畑 愛美, 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 25 年度酪農科学シンポジウム要旨集 p. 24, 2013 年 9 月 13 日 (岡山)

3. 長岡 利: 食品由来ペプチド・タンパク質とコレステロール代謝, 第 25 回夏期油脂・コレステロール研究会講演, 2013 年 7 月 20 日 (松山)

4. 山本 達記, 小室 あゆ美, 木地 裕美, 大畑 愛美, 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」第 67 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p. 122, 2013 年 5 月 25 日 (名古屋)

5. 長岡 利: 脂質代謝改善ペプチド, 日本栄養食糧学会シンポジウム講演, 第 67 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p. 122, 2013 年 5 月 25 日 (名古屋)

6. 長岡 利: 生活習慣病予防改善ペプチドの特定・網羅解析・作用機構解析・高機能化戦略, BIO tech 2013 講演, 2013 年 5 月 3 日 (東京)

7. 加藤由喜奈, 柴田 麗, 長岡 利, ペプチドアレイによる大豆オレオシン由来新規胆汁酸結合ペプチドの網羅解析, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p. 127, 2012 年 5 月 19 日 (仙台)

8. 井辰かおる, 後藤 剛, 長岡 利, ラクトスタチンは HNF3 α 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 2012 年度大会 講演要旨集 3J13a15, 2012 年 3 月 24 日 (京都)

9. 井辰かおる, 世古聖士, 長岡 利: ラクトスタチンは HNF-3 α 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 5 回学術大会 講演要旨集 P. 72, 2011 年 11 月 4 日 (名古屋)

10. 長岡 利, 高橋千奈, 加藤由喜奈, 小林浩子, 後藤剛, 加賀千晶, 大河内美奈, 加藤竜司, 本多裕之, ペプチドアレイによる大豆由来疎水性胆汁酸結合ペプチドの網羅解析, 第 65 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 p. 178, 2011 年 5 月 14 日 (東京)

11. 井辰かおる, 後藤 剛, 長岡 利, ラクトスタチンの媒介する新規肝臓コレステロール分解調節系, 日本農芸化学会 2011 年度大会 講演要旨集 P. 70, 2011 年 3 月 27 日 (京都)

〔図書〕（計 2 件）

1. 長岡 利: 「タンパク質、ペプチド、アミノ酸を用いた脂質代謝を改善する特定保健用食品及び機能性食品について」『医用機能性食品ガイドブック』, 医歯薬出版株式会社, p.82-86 (2012)

2. Nagaoka, S.: Ameliorative action of peptides on cholesterol and lipid metabolism from the viewpoint of peptide-lipid interactions. Chapter XV: Peptide-lipid interactions and functionalities, Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, and Commercialization, p.33-55 (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：コレステロール吸収抑制用食品組成物
発明者：長岡 利, 島田昌也, 高松 清治, 坂田 哲夫

権利者：岐阜大学・不二製油（株）

種類：特許

番号：特願 2012-252849

出願年月日：2012 年 11 月 19 日

国内外の別：国内

○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

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：