

報告番号	甲 第 13589 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 中長鎖生理活性ペプチドの探索と産業利用
に関する研究
(Study on exploring of proteolyzable
bioactive peptides and their industrial
application)

氏 名 今井 健人

論 文 内 容 の 要 旨

健康の保持増進に資する「機能性食品」は、糖尿病や高脂血症などの生活習慣病を改善するものとして期待されている。これら機能性食品の多くは、食品中の生理活性物質の働きを向上させたり、成分を外から添加させたりすることで開発されることが多い。このように生体に効能を示す成分のことを「有効成分」と言い、脂質、糖質、タンパク質など様々な成分がこれに当てはまる。とりわけこの中でもタンパク質由来の加水分解物は最も多様な性質を示し、最も研究対象とされている生理活性物質である。酵素で加水分解されたタンパク質は、タンパク質のままではあらわれなかったような形質（乳化効果、呈味効果、ホルモンのような働き）を示すものも多く、これらのうち生体内で効果を示すペプチドのことを「生理活性ペプチド」と呼ぶ。

ペプチドとは数分子から数十分子のアミノ酸がペプチド結合でつながったポリマーであり、その組み合わせは、1分子増えるごとに指数関数的にバリエーションが増えていく。そのため、たった6残基の中鎖のペプチドでも6400万種類にも及ぶ多様性を持ち、その機能も多岐に渡る。例えば、抗酸化作用、抗菌作用、抗肥満作用、血圧上昇抑制作用など多種多様である。

このように、他の生理活性物質に比べて多種多様な働きを示すことから有望視されているペプチドであるが、多くの課題が山積することによって産業応用が難しいという問題もある。例えば、どのタンパク質にどの酵素を用いれば目的のペプチド断片が得られるのかは常に trial and error で行われ、時間・コストともに効率が悪い。また、一般的にタンパク質は加水分解されると苦味ペプチドを放出し、食品の風味を悪くしてしまう問題がある。また

製品化の際には、ペプチドが生体内で分解されやすい性質を抑えながら製品化しなければならないといった課題もある。この課題はジペプチド・トリペプチド程度の長さでは、消化酵素の基質にならないため無視できる。そのため、ほとんどの機能性食品の有効成分は短鎖のペプチドを利用している。しかし、バリエーションの数が残基数に対して指数関数的に増加するペプチドにおいて、より長鎖のペプチドを利用可能にすることは、多種多様な機能性を発揮することのみならず、ターゲットにより強力に作用できるという点において有用である。このほかにも、製造に至るまでの研究開発の段階における課題も多く、コスト・時間ともにかかるのが、現在の生理活性ペプチドの製品開発である。

そこで本研究の目的は、これらの産業応用における課題を1つ1つ解決していくことである。本論文は、5章で構成されており、結果は第2章から第5章の4部で構成される。第2章で取り組んだ課題は「生理活性ペプチドが経口摂取後、消化酵素によって分解され失活してしまう」という問題である。生体内で作用する生理活性ペプチドの多くは、全身の細胞や腸管内部で働くものがほとんどである。これらのペプチドが生理活性を示すためには、ペプチドが吸収や作用する腸にまで、そのままの形を保持しながらデリバリーされる必要がある。しかし、我々の生体内では、経口摂取されたものは、まず強力な消化環境である胃へと送られるため、ペプチドはそのまま経口摂取すると、胃の中の酵素によって断片化され、本来の働きを失ってしまう。この問題を解決するために、キトサン、ゼラチン、多糖、ポリマーなどを用いて粒子化させる方法や、カプセルに入れて摂取する方法などが提案されている。これらの方法はペプチド製剤やタンパク質製剤など医薬品用途として高いニーズがある。しかし、食品としての利用を考えた時、風味や食感、そもそもの形状などを変えてしまうため、応用は難しい。そのため、安価で風味や食感、食品の形状を変えないようなデリバリー手法の開発が求められている。

我々はこの問題を解決すべく、食品添加物としての使用実績豊富な多孔性シリカゲルに注目し、これを用いた生理活性ペプチドの腸デリバリー手法の開発を行った。その結果、孔径を10 nm、焼成温度600 °Cで表面加工したシリカゲルを用いることで、疎水性かつ負電荷性といった限られた領域だが、ペプチドを効率よくデリバリーできる可能性を示唆した。また、内部に担持したペプチドの60%をそのままの形でデリバリーできることも示した。

第3章では、2章で開発したシリカゲルの、苦味ペプチドの除去担体としての応用を検討した。タンパク質は加水分解すると苦味ペプチドが産生し、風味を悪くしてしまう問題がある。2章で開発したシリカゲルの吸着特性を詳細に調べた結果、疎水性や塩基性といった苦味ペプチドが持つ物理化学的性質のペプチドを選択的に吸着できる可能性を示した。そこで第3章では、このシリカゲルが苦味ペプチドのマスキング担体として利用可能かどうかの検証を行った。2章で作製した焼成多孔性シリカゲルとともに、通常シリカゲル、市販されているポリスチレン系担体、活性炭などの担体との比較実験を行ったところ、焼成多孔性シリカゲルが最も苦味ペプチドに対する選択性が高く、また、加水分解物のなどの夾雑ペプチド存在下でも選択性が保持されることを確認した。また、味覚試験によっても苦みの低

減効果があることを証明した。

第4章では第2章で開発したシリカゲルの生理活性ペプチドへの応用のため、実際にこのシリカゲルに適応できるペプチドの設計を行った。具体的には「生理活性を保持し、高い腸デリバリー能」を持つ dual functional peptides の設計と設計指針の開発を行った。既報で知られている11種類の「胆汁酸結合ペプチド」をベースに残基置換改変を行い、2章で調べた、シリカゲルへの吸着性を物性値によって整理した、物理化学的特徴カラーマップを利用し、スクリーニングを行った。その結果、IYWEMY ペプチドのスクリーニングに成功し、このペプチドはポジコンである VAWWMY と同様に、高いミセル崩壊活性を有し、かつ VAWWMY よりも高いシリカゲルデリバリー特性があることを確認した。このことから、本章で提案された生理活性ペプチドの改変指針は、生理活性を保持しつつ、経口投与後、分解されない性質を付与する設計指針として有用であることを示唆した。

第5章では第4章で開発に成功したペプチドの設計指針を、産業応用で使えるレベルへの改善を行った。4章で作成した設計指針は、創薬などペプチドを自由に設計して良い条件であれば有用であるが、機能性食品開発の場合には多くの制限要素がある。そこで、多変量解析と、可食性タンパク質断片ペプチドデータベースを用いて設計指針の改良を行った。具体的には以下の流れで設計を行った。スクリーニングすべきペプチドが持たなければならない性質として「生理活性を保持していること、天然タンパク質中にその断片があること、疎水性で負電荷性の性質を持っていること、酵素分解によって切り出し可能であること」の4点に着目し、これら4つの性質をすべて満たすペプチドをスクリーニングすることを目標に設計指針を改良した。

その結果、前半3つの性質を備えたペプチドとして、VYVFDE、IFIYDE、WEFIDF、VEEFYC、ELYEFC という5種類のペプチドをスクリーニングすることに成功した。これらの中でも、VYVFDE、WEFIDF、VEEFYC の3種類はトウモロコシのレグミンタンパク質、トリ肉のミオシンタンパク質、銀杏のグロブリンタンパク質に含まれており、産業応用に都合のよい貯蔵タンパク質に含まれていることを明らかにした。また、酵素によるスクリーニングの結果、VEEFYC に関して、C末端にSが付いた形ではあるが、VEEFYCS という形でサーモライシンを用いることで銀杏のグロブリンタンパク質から抽出できる可能性を示した。このVEEFYCSはVEEFYC同様に高いミセル崩壊活性を保持していることも確認できたため、新たな生理活性ペプチドとしての利用が期待できる。

以上の研究結果から、本研究を通じて大きく以下の3点の成果が得られた。

1. 中長鎖の生理活性ペプチドの産業応用で課題になってくる消化管内での分解を防ぎながら、腸にまで送達できる新規手法の開発。
2. ペプチド製造上課題になる、苦みペプチドの除去に関して、既存のマテリアルに比べて高い選択性を示す担体の開発。
3. ペプチドの探索の段階でドロップアウト率の低いペプチドをスクリーニングできる指針の提案。