報告番号	甲　第　13631　号

主　論　文　の　要　旨

論文題目　**食品タンパク質由来コレステロール吸収抑制ペプチドの探索に関する研究**
(Study on search for bioactive peptides suppressing cholesterol absorption from edible protein)

氏　　名　**伊藤　雅子**

論　文　内　容　の　要　旨

高コレステロール血症は血液中のコレステロール値が高くなる生活習慣病の一つである。高コレステロール血症の改善には、小腸におけるコレステロールの吸収を抑える必要がある。コレステロールは、小腸において胆汁酸ミセルに取り込まれ、血液中に吸収される。高脂血症の治療薬の 1 つであるコレスチラミンは、胆汁酸に結合し、胆汁酸ミセルの形成を阻害することで、コレステロールの吸収を抑える。したがって、胆汁酸に結合するペプチドにも、胆汁酸ミセル形成阻害やミセル崩壊により、コレステロールの吸収を抑え、血中コレステロール値を低減させる効果が期待できる。このような腸管内で働く生理活性ペプチドを探索することは、経口摂取によって生活習慣病の改善が期待できる機能性食品や治療薬の開発に繋がる研究として、非常に意義がある。

生活習慣病の改善や予防の観点から、食品由来のペプチドの生理活性が着目され、様々な生理活性が明らかとなった。例えば、乳タンパク質由来のペプチドで、VPP 及び IPP に血圧降下作用、TTMPLW に免疫調節作用、IIAEK にコレステロール低下作用がある。その他の食品からも生理活性ペプチドが複数見つかっている。食品由来のペプチドは安全性が高く、これらの食材から新たに発見される生理活性ペプチドは生体機能を調整するツールとして期待が大きい。

タンパク質分解物として得られるペプチドは 20 種類の天然アミノ酸がつながったアミノ酸のポリマーである。そのため、ペプチドの残基数が多くなるにつれ、探すべき母数は膨大となる。したがって、ターゲット機能を有するペプチドを効率的に探索することが必要

となる。さらに、実際に機能性食品や治療薬の開発に繋げるため、発見した新規生理活性ペプチドを、一般的に摂取できるタンパク質源からどのように効率的に製造するかが非常に重要である。

本論文では、コレステロールの吸収を抑え、血中コレステロール値の低減が期待できる、胆汁酸に高結合するペプチドの探索と、実際の利用を想定し、食品タンパク質からの胆汁酸に高結合するペプチドの探索と製造を目指した。第1章では研究の意義を記述した。第2章では、我々の研究室で新たに提案した小規模ペプチドライブラリー探索法を用いて、胆汁酸に高結合するペプチドの探索を試みた。この方法は小規模ペプチドライブラリーのペプチドの物理化学的特徴量を主成分分析（PCA）し、ライブラリーペプチドとターゲットとの結合活性評価から、目的の機能を持つペプチドの探索に最適なモデルを選抜する方法である。主成分分析は、多変数を少変数に圧縮するため、非常に多くの情報を無駄なく有効に扱える利点がある。さらに、変数として残基長に依存しないものを考案しているため、提案したライブラリー自体にも、またその解析結果にも汎用性がある。この方法が、胆汁酸に高結合するペプチドの探索に有効であることを明らかにした。第 3 章では、第 2 章で探索した胆汁酸に高結合するペプチドの、構成するアミノ酸の特徴を明らかとした。さらに、これらの高結合ペプチドの実用化を目指し、プロテアーゼ分解ペプチド製造法を提案した。食品由来タンパク質のプロテアーゼ分解により生成が期待される4，5，6残基のペプチドを評価し、胆汁酸ミセル崩壊活性があることを明らかとした。最後に第 4 章では総括を行った。以下に各章の具体的な内容を述べる。

第2章では、小規模ペプチドライブラリーとして用意した、4残基・512種類のペプチド（基本ペプチド）をアレイ上に合成し、胆汁酸との結合活性について評価した。一方、基本ペプチドの物理化学的特徴量を変数とした主成分分析を行い、胆汁酸との結合活性と相関のあるPCAモデルを選別した。選抜したモデルで、第一主成分（PC1）と第二主成分（PC2）をプロットしたPCスコアプロット図を作製した。先に評価した胆汁酸との結合活性高いペプチドと低いペプチドをPCスコアプロット図にプロットしたところ、各々のペプチドが集中する領域を描出することに成功した。高結合領域は、-1.43＜PC1＜3.06、及び、-3.53＜PC2＜-0.58、低結合領域は、-1.05＜PC1＜4.03、及び、1.04＜PC2＜3.72を選択できた。この領域が胆汁酸との結合活性が高いペプチドの選択に有効であることを確認するため、新たなペプチドライブラリーをデザインして、胆汁酸に高結合するペプチドの選択の可否を評価した。

4残基及び6残基の、各500個のランダムペプチドライブラリーをデザインし、各500個のペプチドの物理化学的特徴量を算出し、選抜したNo.2モデルを使用した主成分分析により、PCスコアプロット図を作製した。基本ペプチドを使用して決定した高結合領域と低結合領域を適用し、これらの領域内のペプチドの胆汁酸結合活性を評価した。高結合と推定したペプチドの結合活性の平均は、低結合と推定したペプチドの平均より、4残基ペプチドで8.3倍、6残基ペプチドで3.0倍と高く、高結合ペプチドを選択できていることを確認

した。
以上より、本探索方法は、ランダムペプチドライブラリーから胆汁酸への高結合ペプチドを効果的に特定でき、また長鎖の生理活性ペプチドを特定するのに有効であることを明らかにすることができた。
第3章では、第2章で探索できた胆汁酸に高結合する新規なペプチドの実用化を進めるため、特定した高活性ペプチドの特徴とペプチド製造法とを有機的につなげる方法を検討した。まず、結合活性を評価した4残基及び6残基の各90個のペプチドの、構成するアミノ酸と結合活性との関連性に着目した。アルギニン（R）またはリジン（K）（塩基性アミノ酸)、アスパラギン酸（D）またはグルタミン酸（E)（酸性アミノ酸)、イソロイシン（I)、ロイシン（L)、またはバリン（V）（分岐鎖、非極性アミノ酸）の有無について検討したところ、任意の位置にR、K含むペプチドは、それらを含まないペプチドより有意に胆汁酸結合活性が高かった。さらに、4残基及び6残基の、各500個のランダムペプチドのC末端アミノ酸をRまたはKに変換したペプチドの主成分分析を行い、変換前のペプチドのPCスコア図と比較した。変換後のペプチドで高結合領域に存在したペプチド数は、R、K共に著しく増加し、特にRに変換した場合において6割を越えた。つまり、塩基性アミノ酸を有するペプチドが、胆汁酸に高結合なペプチドである特徴を新規に発見できた。
一般に、私たちが摂取するタンパク質は、酵素により加水分解されること、また、酵素には特異性があり、例えば、トリプシンはK、RのC末端側を、キモトリプシンはW（トリプトファン)、Y（チロシン)、F（フェニルアラニン）のC末端側を切断することが知られている。そこで、胆汁酸に高結合なペプチド、つまり塩基性アミノ酸を有するペプチドの効率的な生産に、トリプシンの利用が有効であると考えた。食品タンパク質として6種類の乳タンパク質、および米の主要なタンパク質であるグルテリンを選択し、これらのタンパク質のアミノ酸配列から、トリプシン分解により生成が想定される4、5、6残基ペプチド（乳タンパク質由来の22個、グルテリン由来の22個）を選出・合成し、胆汁酸ミセル崩壊活性を評価した。その結果、驚くべきことに44個中41個ものペプチド（93%）に活性が有り、R、K含むペプチドは、胆汁酸ミセル崩壊活性を有する可能性が高いことが分かった。以上より、トリプシン分解で小分子ペプチドを分離するだけで、コレステロール吸収抑制ペプチドが効率的生産できることを明らかとすることができた。
以上の様に、本研究では、ペプチドの物理化学的特徴量を変数とした主成分分析により、胆汁酸と高結合するペプチドを新たに探索できた（第2章)。さらに、塩基性アミノ酸（R、K）を有するペプチドが胆汁酸との結合活性が高いという新たな特徴も見いだした。トリプシンは、R、KのC末端で特異的に切断するプロテアーゼであることに着目し、乳タンパク質及び米グルテリンからトリプシン分解により生成される短鎖ペプチドの胆汁酸ミセル崩壊活性を評価したところ、評価ペプチドの93%に胆汁酸ミセル崩壊活性が認められ、R、Kを有するペプチドは、胆汁酸への結合活性が高いこと、さらに、コレステロール吸収抑制効果が期待できる生理活性ペプチドを、トリプシン分解により生産できることを示せた（第

3 章)。この技術は、コレステロール吸収抑制効果を示す生理活性ペプチドの簡便な製造方法に繋がる画期的な成果である。

トリプシンは産業用酵素であると共に、生体内では膵液に含まれる消化酵素である。可食性タンパク質が食された後、体内で分解され、ここで発見されたペプチドが生成される可能性もある。例えば、コメの遺伝子に本研究で新たに見出したコレステロール吸収抑制効果のあるペプチドを含むタンパク質を発現する遺伝子を導入することで、コレステロール吸収抑制効果が期待できるイネの開発が期待できる。このイネから収穫したコメを、高コレステロール血症の患者に通常の食事として食べてもらうことで、食事によるコレステロールの低減が期待でき、生活習慣病改善への効果が期待できる。また、上記の遺伝子導入により開発したコメグルテリンをトリプシンで分解することで、コレステロール吸収抑制効果が期待できる、R 及び K を有するペプチドミックスの大量生産の可能性がある。食品由来のペプチドミックス素材は安全性が高く、胆汁酸吸着能が医薬品のコレスチラミンより穏やかな、新しいタイプの医薬品、小腸コレステロール吸収阻害剤の開発へと繋がることが期待できる。この様に、今後は、本研究で新たに見出したコレステロール吸収抑制効果が期待できる生理活性ペプチドとそのペプチドの簡易製造方法を活用することにより、生活習慣病の改善が期待できる食品や医薬品の開発が大きく進むことを期待する。