

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**

伊藤 雅子

Ito Masako

名古屋大学大学院 工学研究科 化学・生物工学専攻

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of

Engineering, Nagoya University, Japan

目次

第1章 序章 1

- 1.1 胆汁酸結合ペプチド 1
- 1.2 生理活性ペプチド 2
- 1.3 ペプチドのスクリーニング 3
- 1.4 本研究の目的と構成 4

第2章 主成分分析を用いた胆汁酸結合ペプチドの探索 12

- 2.1 はじめに 12
- 2.2 実験方法 13
 - 2.2.1 活性化メンブレンの作製 13
 - 2.2.2 ペプチドアレイの作製 14
 - 2.2.3 4残基・512個の短鎖基本ペプチドライブラリー 14
 - 2.2.4 ペプチドアレイを用いた胆汁酸結合実験 15
 - 2.2.5 主成分分析 16
 - 2.2.6 胆汁酸に結合するルール領域の解析 16
 - 2.2.7 ランダムペプチドライブラリーからの胆汁酸に高結合または低結合のペプチドの選択 17
- 2.3 実験結果及び考察 21
 - 2.3.1 主成分分析に使用する変数の選択 21
 - 2.3.2 4残基・512個の短鎖基本ペプチドを使用した主成分分析から決定した胆汁酸

に高結合のルールおよび低結合のルール 21

2.3.3 4 残基・500 個のランダムペプチドと 6 残基・500 個のランダムペプチドの主成分分析からの高結合ペプチド及び低結合ペプチドの抽出 22

2.3.4 4 残基・500 個及び 6 残基・500 個のランダムペプチドから抽出した高結合ペプチドと低結合ペプチドの胆汁酸結合活性 23

2.3.5 その他の解析方法により抽出された高結合ペプチドとの比較 24

2.4 結言 43

第 3 章 胆汁酸に高結合する短鎖ペプチドの新たな特性 44

3.1 はじめに 44

3.2 実験方法 45

3.2.1 ペプチドアレイの作製 45

3.2.2 胆汁酸の結合実験 45

3.2.3 主成分分析 (PCA) 45

3.2.4 胆汁酸に高結合するペプチドの抽出 45

3.2.5 食品タンパク質のトリプシン分解により生成が予想される短鎖ペプチドの選択 46

3.2.6 胆汁酸ミセル崩壊活性の測定 46

3.2.7 統計処理 47

3.3 実験結果及び考察 50

3.3.1 胆汁酸結合を評価した 90 個のペプチドの特徴 50

3.3.2 4 残基・500 個のランダムペプチド及び 6 残基・500 個のランダムペプチドの C 末端を K および R に変換したペプチドの主成分分析 50

3.3.3 トリプシン分解により生成が想定される短鎖ペプチド 52

3.3.4 トリプシン加水分解された短鎖ペプチドの胆汁酸ミセル崩壊活性 52

3.4 結言 64

第4章 結論と今後の展望 65

参考文献 68

研究業績 73

謝辞 75

第 1 章

序論

1.1 胆汁酸結合ペプチド

脂質異常症は血液中の脂質成分が高くなる生活習慣病の一つで、その中の高コレステロール血症は脂質のうちコレステロール値が高くなる疾病である[1]。コレステロールは、細胞の構成成分となり、また、活動のエネルギーとして生体の維持に必須な物質であるが、血液中における増加は動脈硬化など他の疾病を引き起こす可能性がある。したがって、高コレステロール血症の患者においては、血液中のコレステロールを減らす治療法が必要である。

胆汁酸は腸管内で食物中のコレステロールの吸収に重要な役割を果たす。胆汁酸は肝臓において、コレステロールより合成される。消化時に胆管を経て十二指腸へ分泌され、その 95%は小腸で吸収され、再び肝細胞に戻る腸肝循環のシステムにより体内で一定量に保たれている[2]。胆汁酸は構造に親水部と疎水部があり、疎水部を内側にしたミセルを形成し、ミセル内部に脂溶性のコレステロールを取り込む。脂溶性のコレステロールはこの胆汁酸ミセルの内部に取り込まれることで、小腸において血液中に吸収される (**Fig. 1-1**)。したがって、胆汁酸ミセルの形成阻害により、コレステロールの吸収を抑えることが可能となる。

高コレステロール血症の治療薬であるコレステラミンは、小腸コレステロール吸収

阻害剤と言われている[3]。腸管内において胆汁酸を吸着し、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制する。また、これにより吸収されず排出された胆汁酸を補填するため、肝臓においてコレステロールから胆汁酸への異化が進むことでも、血中コレステロール濃度の低下作用があると考えられている。したがって、胆汁酸に結合するペプチドには、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の低減させる作用が期待できる (Fig. 1-2)。大豆タンパク質由来のペプチド、VAWWMY (Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr) は、コレステロール吸収抑制効果により、血清コレステロールを低下させることが報告されている[4-6]。このような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。

1.2 生理活性ペプチド

生理活性ペプチドは、タンパク質、多糖類、ヌクレオチドなどのさまざまな生物学的因子との相互作用により、我々の体内で様々な生体反応を調節している[7]。血液中のグルコース量の調節に関与するインスリン[8]やグルカゴン[8]、子宮の収縮に関与するオキシトシン[9]などは、その化学構造からペプチドホルモンと言われ、標的細胞の特異的な受容体に結合することで、目的とする生理活性を発現させている。また、これらペプチドホルモンは、そのまま治療薬として用いられるものがあり、例えば、インスリンは、糖尿病に不可欠な治療薬となっている。この様に安全性の高いペプチドの医薬品としての役割は、病気の治療の観点で非常に重要なものとなっている。

一方、高血圧、糖尿病などの生活習慣病が着目され、これらは食生活や運動習慣の見直しにより、疾病の改善が期待できる。そこで、生活習慣病の改善や予防の観点から、食品に含まれるポリフェノールやペプチド等の生理活性に注目が集まり、数多くの研究により、酵素分解により得られるペプチドの生理活性が明らかとなっている[10]。例えば、乳タンパク質由来では、血圧降下ペプチドとして VPP (Val-Pro-Pro) や IPP (Ile-Pro-Pro) [11]、免疫調節機能ペプチドとして TTMLPW (Thr-Thr-Met-Pro-

Leu-Trp) [12]、コレステロール低下作用を示すペプチドとして IIAEK (Ile-Ile-Ala-Glu-Trp) [13]などが見つかっている。その他の食品からも生理活性ペプチドが複数見つかり、現在、一部のペプチドはペプチド素材として、既存の食品へ添加されるなどで、機能性表示食品として多くが製品化されている (Table 1-1、Fig. 1-3)。日本人の主食である米、味噌や醤油などの日本の伝統発酵食品の原料である大豆、栄養素の補給・バランス補正効果が高く学校給食に導入されている乳など、普段の生活で多食されている食品から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。このため、様々な食品素材から有用な生理活性ペプチドを効率的に探索及び簡易に製造する方法が必要となる。

1.3 ペプチドのスクリーニング

ペプチドは 20 種類の天然アミノ酸のポリマーであり、残基数が多くなると、その総数は指数関数的に増加し、4 残基で 16 万通り、5 残基で 320 万通り、6 残基で 6,400 万通りのペプチドが存在する。このような膨大な数のペプチドの中から、ターゲットとする機能を有するペプチドを効率的に探索することが必要である。

ペプチドのスクリーニング方法に、生細胞を用いるファージディスプレイ法[14]や酵母ディスプレイ法がある[15]。特にファージディスプレイ法は、取り扱いの簡便さや安定性から、長年、多くの研究者に使用されている。ペプチドのライブラリー作製にファージを用い、標的分子とライブラリーを結合反応させ、選択操作（バイオパニング）を行うことにより、標的分子に結合するライブラリーを得る方法である。その他、リボソームディスプレイ法[16]やmRNA ディスプレイ法[17,18]などの無細胞タンパク質合成系を用いたディスプレイ法も多く開発されており、標示可能なライブラリーサイズが大きい、細胞を培養する必要がないため迅速に選択ができるなどの長所がある。これらのディスプレイ法は、多検体スクリーニング法として非常に有用であるが、標的分子に結合活性の高いペプチドしか得られず、配列の特徴についての情報を

得ることができない。

一方、我々の研究室では、ペプチド固相合成法を用い、自由に設計したペプチドを1残基ずつセルロースメンブレン上に合成したペプチドアレイを用いたスクリーニングを行っている (Fig. 1-4)。1枚のセルロースメンブレン上に数百種類のペプチドの合成が可能で、標的分子との親和性を一度で評価できる。得られた評価結果から、標的分子に結合活性の高いペプチドと低いペプチドの判定ができ、ターゲットに対する親和性の高いペプチドの配列の特徴を把握することができる。我々の研究室ではペプチドの情報解析とペプチドアレイによる活性評価により、血圧降下ペプチド[19]、アミラーゼインヒビター[20]など、様々な生理活性ペプチドを探索している[21-26]。胆汁酸結合ペプチドについては、2212個の6残基ランダムライブラリーから、ニューラルネットワークに基づく情報解析により、胆汁酸に高結合のペプチドを識別するための位置規則を発見し、コレステロール吸収の抑制効果の知られている大豆タンパク質由来ペプチド (VAWWMY) より胆汁酸結合活性の高いペプチドを抽出できている[23]。しかし、この方法は、残基数を固定した解析しかできないというデメリットもあり、より効率的に胆汁酸結合ペプチドを探索することが必要である。

1.4 本研究の目的と構成

胆汁酸結合ペプチドの探索は、医薬品の開発に繋がる意義のある研究である。また、ペプチドの情報解析とペプチドの配列の特徴を把握しながらスクリーニングできるペプチドアレイの技術で、膨大な数が存在するペプチドからターゲット機能を有するペプチドを効率的に探索できる。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と考える。

我々の研究室では、生理活性ペプチド探索方法として、新たに、小規模ペプチドライブラリーを提案した。①4残基・512個の小規模ペプチドライブラリーを一定のルールに基づき作製、②これらのペプチドの物理化学的特徴量を主成分分析 (Principal

Componet Analysis, PCA)、③ライブラリーペプチドとターゲットとの活性評価結果から、目的の機能を持つペプチドの探索に最適な主成分分析用の変数（モデル）を選抜、④選択した変数を用いた主成分分析と活性評価から、目的の機能を持つペプチドが選択可能な領域を決定、⑤新しいライブラリーに対して、選択した変数を用いた主成分分析を実行、⑥決定した領域を適用し、領域に入ったペプチドを活性を有するペプチドとする、新規生理活性ペプチドを探索する方法を開発した[27]。主成分分析は、多変数を小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り、様々な機能に対する新規なペプチドの探索に有効である。

そこで、本研究では、主成分分析を用いた小規模ペプチドライブラリーの探索方法を用いて、胆汁酸に高結合する新規なペプチドを探索した。これらのペプチドから、既存の胆汁酸結合ペプチドとは異なった特徴を新たに発見することができた。さらに、これら胆汁酸高結合ペプチドの実用化を目指し、明らかとなった新規胆汁酸高結合ペプチドの特徴から、食品タンパク質に由来するプロテアーゼ分解ペプチド製造法を提案するとともに、プロテアーゼ分解により得られたペプチドの生体調整機能、つまりコレステロール吸収抑制効果の驚くべき結果を得ることができた。

本論文は第1章から第4章で構成される。

第1章では、本研究の背景と研究目的を述べた。

第2章では、主成分分析を用いた小規模ペプチドライブラリーの探索方法で、胆汁酸に高結合する新たなペプチドを抽出した。胆汁酸に高結合と推定されたペプチドは、胆汁酸に低結合と推定されたペプチドより、胆汁酸への結合活性が高く、主成分分析を用いた小規模ペプチドライブラリーの探索方法は、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検証した。

第3章では、第2章で抽出した胆汁酸に高結合する新規ペプチドの特徴について検

証した。また、これらの新規ペプチドの特徴から、食品由来タンパク質から胆汁酸高結合ペプチドを混合物として簡易に製造できる方法を考えた。さらに、この製造方法により得られた、胆汁酸高結合ペプチドの特徴を有したペプチドのコレステロール吸収抑制効果について評価した。

第4章では、これらの結果をまとめ、今後の展望について述べた。

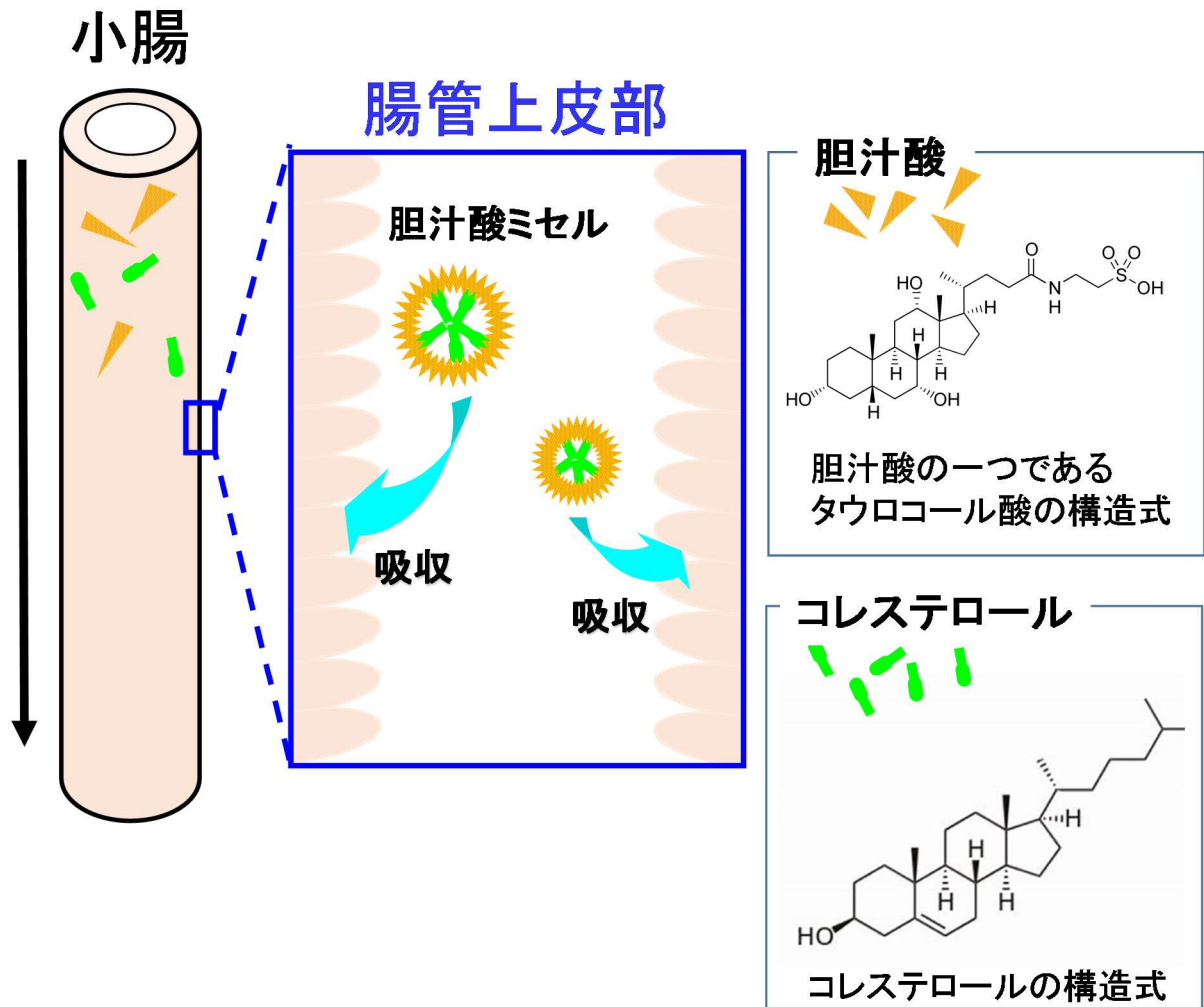
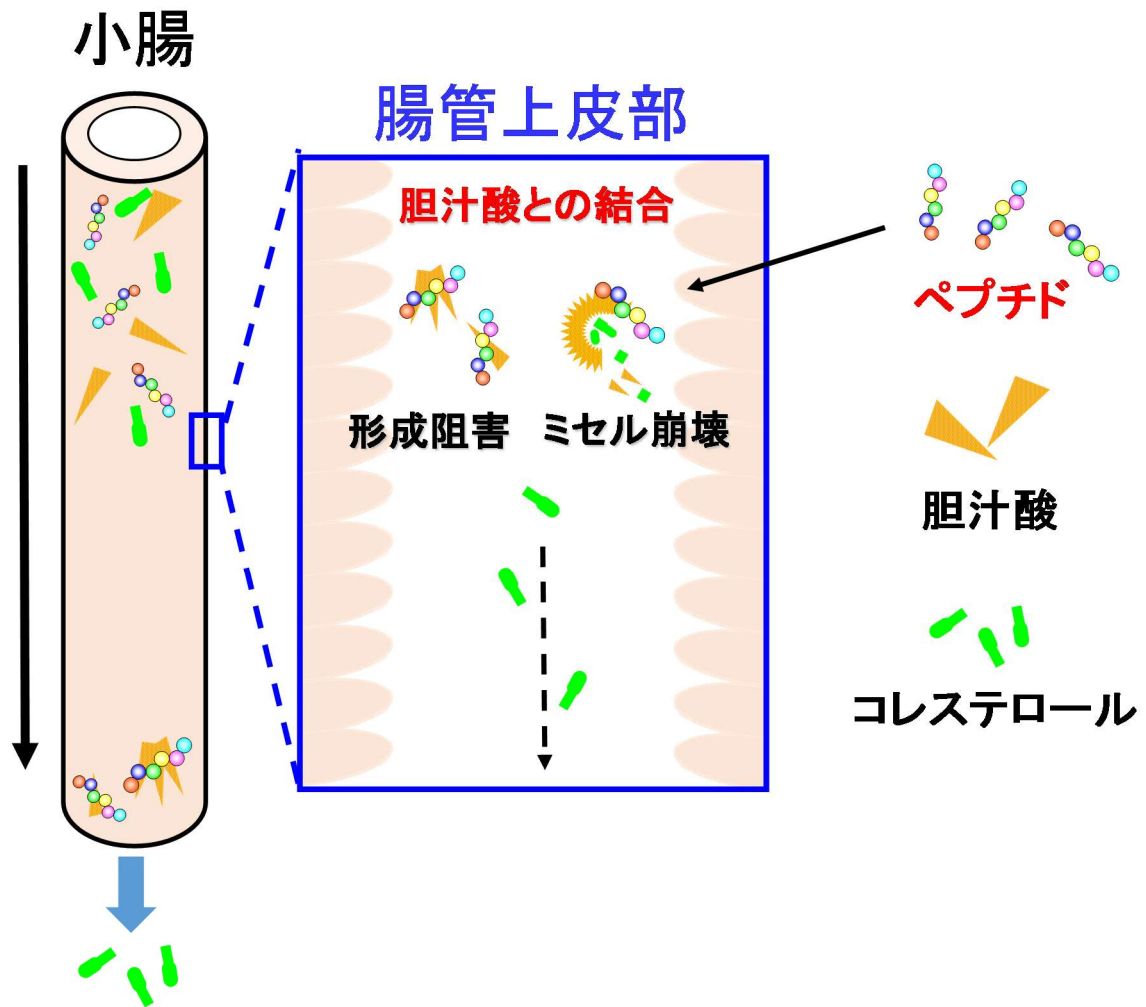


Fig. 1-1 小腸におけるコレステロールの吸収機構

胆汁酸は疎水部を内側にしたミセルを形成し、ミセル内部に脂溶性のコレステロールを取り込む。脂溶性のコレステロールはこの胆汁酸ミセルの内部に取り込まれることで、小腸において吸収される。



**コレステロールの排出
=血中コレステロール値の低下**

Fig. 1-2 コレステロールの吸収における、期待されるペプチドの効果

胆汁酸に結合するペプチドには、ミセル形成阻害やミセル崩壊活性により、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。

Table 1-1 機能性表示食品として製品化されている生理活性ペプチド

機能性関与成分		期待できる効果(届出効果)
名称	アミノ酸配列	
ラクトノナデカペプチド	NIPPLTQTPVVVPPFLQPE	認知機能の一部である注意力の維持と計算作業の効率維持
海苔オリゴペプチド	AKYSY	血圧が高めの方の血圧を下げる
トリペプチドMKP	MKP	認知機能の一部である見当識のサポート 高めの血圧(収縮期血圧)を下げる
ラクトリペプチド	VPP、IPP	血圧を低下させる
ゴマペプチド	LVY	血圧を低下させる
大豆ペプチド	SY	血圧を低下させる 認知機能の一部である記憶力を維持
わかめペプチド	FY、VY、IY	高めの血圧を下げる
サーデンペプチド	VY	血圧を低下させる

*機能性表示食品制度届出データベース（消費者庁）より抜粋

届出効果は、機能性表示食品を届け出た食品関連事業者の表現による。

生理活性ペプチド添加機能性表示食品

 <p>IPP VPP 3残基</p>	 <p>LVY 3残基</p>	 <p>MKP 3残基</p>	 <p>WYP 4残基</p>	 <p>WYP 4残基</p>
<p>ACE変換酵素阻害効果 (昇圧ホルモン生成阻害)</p>			<p>血中中性脂肪の上昇抑制効果</p>	
 <p>VPP 3残基</p>	 <p>VY 2残基</p>	 <p>FY VY IY 2残基</p>	 <p>SY 2残基</p>	 <p>SY 2残基</p>
				<p>認知機能の一部である 記憶力を維持する効果</p>

Fig. 1-3 生理活性ペプチドが添加された機能性表示食品の製品群

*一部、特定保健用食品を含む

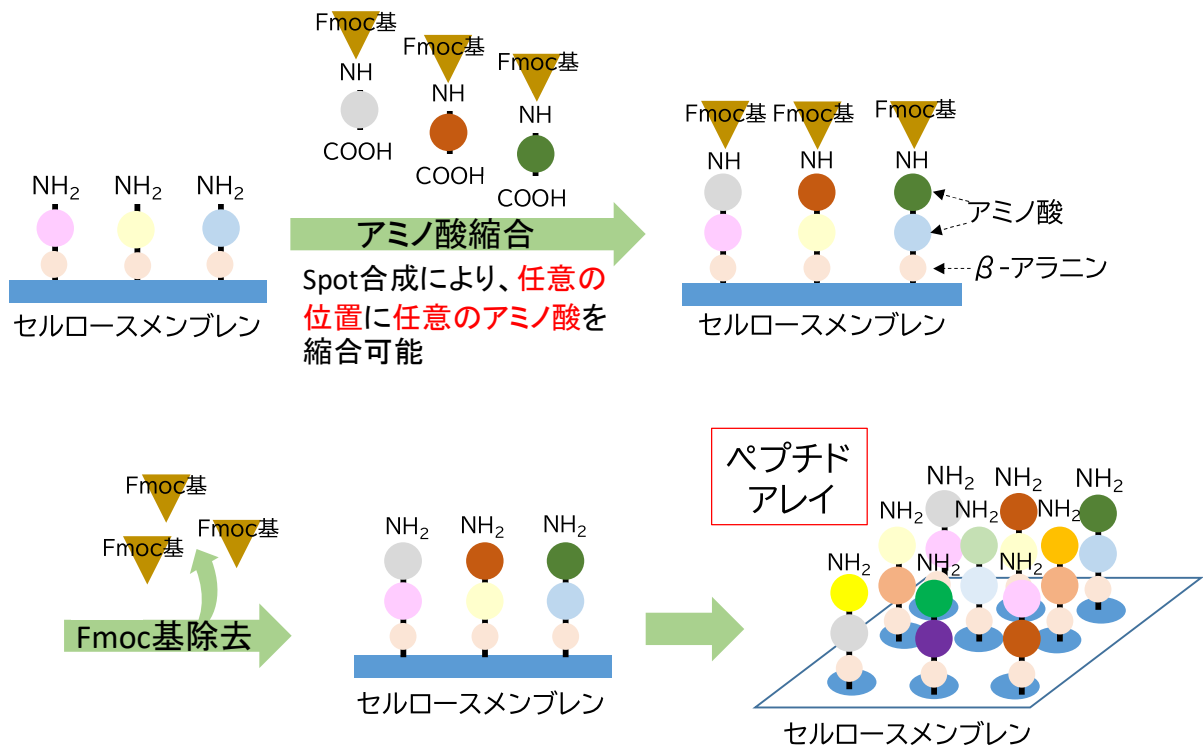


Fig. 1-4 ペプチド固相合成法の概略とペプチドアレイ

ペプチド固相合成法では、自由に設計したペプチドを1残基ずつ合成できる。セルロースメンブレン上に数百種類のペプチドを合成したペプチドアレイを用い、標的分子との親和性を評価する。

第2章

主成分分析を用いた胆汁酸結合ペプチドの探索

2.1 はじめに

脂溶性のコレステロールは、胆汁酸により形成されるミセルに取り込まれ、小腸上部より吸収されることから、胆汁酸ミセルの形成阻害により、コレステロール吸収を抑制することが可能となる[28]。したがって、胆汁酸結合ペプチドには、ミセル形成を阻害することによるコレステロール吸収阻害の効果が期待できる。大豆タンパク質のグリシニン A1a/B1b サブユニットの、疎水性 6 残基ペプチドである VAWWMY は、コレステロール吸収に抑制効果があり、血清コレステロールを低下させることが報告されている[4-6]。そこで、我々の研究室では VAWWMY の各位置を別のアミノ酸で置換して、胆汁酸結合活性の高い 6 残基ペプチドのスクリーニングを試みた（未発表データ）。また、6 残基・2212 個のランダムペプチドライブラリーのニューラルネットワーク（ANN、Artificial neural network）解析を行い、高結合ペプチドを識別するための位置ルールを発見した。そのルールによりスクリーニングされたペプチドを、ペプチドアレイを用いて評価したところ、約 33% のペプチドが高い結合活性を持つことが示された[23]。既に多くのペプチドに胆汁酸に結合する可能性があることが見出されており、胆汁酸に高結合の 6 残基のペプチドやそれより長鎖のペプチドの探索は意義がある。しかし、この方法では、ニューラルネットワーク（ANN）モデル構築のために配列と機能がわかっている学習用データが必要で、学習データの数と質によ

って異なるモデルが構築され、少しずつ異なるルールが得られてしまう。残基数を固定した解析しかできないというデメリットもある。一方、ペプチドは長鎖になればなるほど、ライブラリーのペプチド数が指数関数的に増加し、長鎖のペプチドライブラリーからターゲットとするペプチドのスクリーニングは非常に困難となる。そこで、本研究では、4 残基ペプチドに注目し、512 ペプチドという極めて少ない数のペプチドをマスタースクリーニングライブラリーとして定め、その活性データを使う。配列情報から可能な限り多数の物理化学的データを抽出し、そのデータが無駄なく有効に使う解析方法として主成分分析を用いた。物理化学的データは、得られたルールを長残基ペプチドの探索に拡張できるように、残基長に依存しないデータを使うこととした。すでにこの新しい探索方法で、IL2 と IgG に結合するペプチドの配列ルールの抽出と長残基ペプチド探索への拡張に成功している[27]。この章では、この新しい探索方法で、胆汁酸に結合するペプチドの探索を行った。また、ニューラルネットワーク (ANN) を用いて探索した結果[23]との比較を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 活性化メンブレンの作製

セルロースろ紙 (542、Whatman、Maidstone、England) を 10cm×14cm の大きさに裁断し、DMF (N,N-dimethylformamide) (A00185、関東化学株式会社、東京) で 1 晩振とうした。Fmoc- β -Ala-OH (K00410、渡辺化学工業株式会社、広島)、1-Methylimidazole, redistilled, 99+% (336092-100ML、SIGMA-ALDRICH、USA)、DIPCI (N,N'-Diisopropylcarbodiimide) (A00011、渡辺化学工業株式会社)を混合した β -アラニン溶液 (32 mL 0.5 M β -アラニン、1.6 mL 1-Methylimidazole、2 mL DIPCI in DMF 100 mL) にセルロースろ紙を浸漬し、2 日間振とうさせることでセルロースの OH 基と β -アラニンの COOH 基がエステル結合した活性化メンブレンを作製した。DMF とメタノール (139-01827、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)を用いてメ

ンブレンを洗浄し、未反応の β -アラニンを除去した。自然乾燥後、真空包装をして、冷蔵庫で保存した。

2.2.2 ペプチドアレイの作製

2.2-1 で作製した活性化メンブレンを 20% piperidine / DMF (A00177、渡辺化学工業株式会社)に浸し、Fmoc 基を脱保護した。DMF で洗浄して piperidine を完全に除去した後メタノールで洗浄を行い、1% BPB (ブROMOフェノールブルー)(021-02911、富士フィルム和光純薬株式会社) 溶液と酢酸(017-00256、富士フィルム和光純薬株式会社)をメタノール溶液に加え、NH₂ 基を染色した。スポットするアミノ酸溶液は、Fmoc-アミノ酸(渡辺化学工業株式会社) in NMP (N-メチル-2-ピロリドン)(133-15115、富士フィルム和光純薬株式会社))と DIPCI、1-hydroxybenzotriazole (HOBt Anhydrous) (A00015、渡辺化学工業株式会社)を混合し、アミノ酸の終濃度が 1.5M となるように準備した。Peptide synthesizer (ASP222、IntavisAG、Köln、Germany)を用いてメンブレン上に、各アミノ酸をスポットした。メンブレンを DMF で洗浄し、未反応のアミノ酸を取り除いた。さらに、未反応アミノ基をブロッキングするために、5%無水酢酸(011-00276、富士フィルム和光純薬株式会社)溶液 in DMF で振とうして、未反応アミノ基をアセチル化した。これらのステップを 4 回または 6 回繰り返して、4 残基または 6 残基のペプチドをメンブレン上に合成した。

ペプチド伸長反応終了後、20% piperidine / DMF で Fmoc 基を完全に脱保護した。さらに、各アミノ酸側鎖に結合している保護基を除去するため、脱保護試薬、TFA(trifluoroacetic acid) (A00025、渡辺化学工業株式会社) : *m*-クレゾール(034-04646、富士フィルム和光純薬株式会社) : 1,2-Ethanedithiol (A00057、渡辺化学工業株式会社) : チオアニソール(T0191、東京化成工業株式会社、東京) を 40 : 1 : 3 : 6 の割合で混合した液にメンブレンを浸漬した。脱保護後、残存試薬を取り除くためにジエチルエーテル (051-01157、富士フィルム和光純薬株式会社)とメタノールで洗浄した。

2.2.3 4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドライブラリー

4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドライブラリーは、久米らの方法で用意した[27]。また、これらのペプチドの物理化学的特徴量は R (version.4.3) を用いて算出した。使用した 4 残基・512 個のペプチドを **Table 2-1** に示す。

2.2.4 ペプチドアレイを用いた胆汁酸結合実験

ペプチドアレイを用いた胆汁酸との結合アッセイは、竹下ら[23]の方法に従って行った。ペプチドアレイをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.0) で数回洗浄し、残存する試薬を除去した。胆汁酸の非特異的吸着を防ぐため、PBS に溶解した 1%ウシ血清アルブミン (BSA、富士フィルム和光純薬株式会社) 溶液に 5°C で、24 時間浸漬した。PBS で 5min×1 回、2min×2 回、室温で洗浄し、余剰の BSA を除去した。アレイを、PBS に溶解した 0.01M タウロコール酸ナトリウム (T-4009、SIGMA chemical、St.Louis、MO、USA) 溶液中で、37°C で 1 時間、振とうした。非結合のタウロコール酸を PBS 中で振とうすることにより除去した。次に、タウロコール酸に対する一次抗体 (FKA502、コスモバイオ、東京、日本) と共に、37°C で 1 時間、50rpm で振とうした。非結合の一次抗体を 0.05% Tween 20 / PBS 中で溶解した溶液で振とうすることにより除去した。次に、2 次抗体 (Alexa 488、ab150117、Abcam、Cambridge、England) と共に、37°C で 1 時間、50rpm で振とうした。非結合の二次抗体を 0.05% Tween20/PBS で洗浄することで除去した。

各ペプチドの蛍光強度値は、Typhoon FLA-2500 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences、Buckinghamshire、England) と ImageQuantTLSoftware (GE Healthcare Life Sciences) を用いて測定した。

胆汁酸に対する結合量は、各ペプチドスポットの蛍光強度値から以下の式に従って、計算した。

$$\text{胆汁酸に対する蛍光強度値} = (\text{一次抗体を使用した場合の各ペプチドスポットの蛍光強度値}) - (\text{一次抗体を使用しない場合の各ペプチドスポットの蛍光強度値})$$

胆汁酸との結合活性の評価方法を **Fig. 2-1** に示す。

2.2.5 主成分分析 (PCA)

主成分分析は、Table 2-2 に示す変数を使用して、R を用いて実行した。具体的には、変数として利用した物理化学的特徴量として、極性[29]、タンパク質安定性に対する側鎖の寄与度[30]、等電点[29]、Hydropathy index[31]、LogP[32]、分子量[33]を使用し、各ペプチドのそれらの平均値、最大値、最小値を使用した。また、20 個のアミノ酸を疎水度と等電点を指標に 4 つのグループに分け[27]、各ペプチドに含まれる各グループのアミノ酸の数を使用した。分子量と各グループのアミノ酸の数以外の変数は、アミノ酸インデックス (AAindex、<https://www.genome.jp/aaindex/>) より選択した。胆汁酸結合に対する最も最適な変数を選択するために、Table 2-2 に示す変数の組み合わせを使用し、7 つのモデルで (Run No.1~7) 主成分分析を実行した。次に、蛍光強度値と第一主成分 (PC1) 及び第二主成分 (PC2) との相関係数を算出し、最も最適な変数の組み合わせ (モデル) を選択した。寄与率と累積寄与率は R を用いて算出した。

2.2.6 胆汁酸に結合するルール領域の解析

4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドより算出した PC スコアから、胆汁酸への高結合及び低結合の領域を決定する方法を策定した。初めに、2.2.4 により算出した各ペプチドの蛍光強度値の平均と標準偏差 (SD) を計算した。512 個のペプチドの蛍光強度値の平均 + 1 SD 以上の蛍光強度値となったペプチドを高結合ペプチド、512 個のペプチドの蛍光強度値の平均 - 1 SD 以下の蛍光強度値となったペプチドを低結合ペプチドとした。2 SD の使用により、より結合活性の高いまたは低いペプチドが選択できるが、評価に値する十分な数の高結合ペプチド数及び低結合ペプチド数が得られなかったため、1SD とした。次に、512 個全てのペプチドの PC スコアを、PC1 を横軸に、PC2 を縦軸にしてプロットとした、PC スコアプロット図を作成した。このスコアプロット図上に、高結合ペプチドと低結合ペプチドをプロットした。先に決定した高結合ペプチドの、PC1 の平均 + 1 SD と平均 - 1 SD を算出し、ルール領域の PC1 の上限値及び PC1 の下限値とした。同様に PC2 の平均 + 1 SD と平均 - 1 SD を算出

し、ルール領域の PC2 の上限値及び PC2 の下限値とした。同様に低結合ペプチドのルール領域を決定し、この長方形の領域を「高結合ルール」及び「低結合ルール」とした。また、これらの領域外の部分は、「その他のルール」とした。

2.2.7 ランダムペプチドライブラリーからの胆汁酸に高結合または低結合のペプチドの選択

2.2.5 で決定した、最も最適な変数の組み合わせ (Run No.2) を使用して、4 残基および 6 残基の 500 個ランダムペプチドの PC スコアを算出し、PC スコアプロット図を作成した。さらに 2.2.6 で決定した長方形の「高結合ルール」及び「低結合ルール」をあてはめ、この領域にプロットされているペプチドを、高結合ペプチド及び低結合ペプチドとした。また、これらの領域外にプロットされたペプチドをその他のペプチドとした。これら 3 つの領域にプロットされているペプチドの一部を選択し、アレイ上に合成して、胆汁酸に対する結合活性を評価した。

Table 2-1 4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドライブラリー

No.	peptide name	No.	peptide name	No.	peptide name	No.	peptide name	No.	peptide name	No.	peptide name	No.	peptide name	No.	peptide name
1	IVFF	65	PGIL	129	KGIM	193	EGIC	257	MVLF	321	SLVA	385	KIIV	449	EFLG
2	VILW	66	QFVS	130	HFFN	194	EILN	258	ILFS	322	PLFY	386	RMFT	450	DCIQ
3	GCVH	67	WFFH	131	RVLR	195	EMVH	259	CVVR	323	WAIR	387	HGVR	451	DGVR
4	IMIE	68	QMLE	132	RVVE	196	DCFD	260	FIID	324	SALE	388	HFLD	452	DMFD
5	IFWC	69	PVPF	133	HFNL	197	DLPI	261	GCQG	325	QINC	389	HCNV	453	DISM
6	MVSQ	70	TCNT	134	HMYW	198	EAWY	262	FMPQ	326	PVYN	390	KLSP	454	EFTT
7	VIPR	71	YAQR	135	RISR	199	DCTK	263	IMSK	327	SFPH	391	HVTH	455	EAWH
8	VCQE	72	TLYD	136	RCTD	200	EISE	264	CAWE	328	NCQE	392	RIYD	456	EMPE
9	GGHL	73	QMHM	137	HMKF	201	DGHF	265	VFRC	329	YIHG	393	KMKA	457	EGHL
10	IGKQ	74	SART	138	HLHN	202	DFKQ	266	MCKY	330	NCKP	394	KVRS	458	EVKQ
11	LARH	75	QCRR	139	KCRK	203	DVRH	267	AGKH	331	YVRR	395	HGHK	459	DAKK
12	VFKD	76	NLKD	140	KAHE	204	DMKE	268	MAHE	332	YGRE	396	HFHE	460	EIRD
13	FLDV	77	YVEV	141	HGEM	205	DFEM	269	MIDC	333	NMEC	397	HLEI	461	DCDA
14	FLEY	78	YGDP	142	KAEY	206	EDDW	270	GGEP	334	WFDT	398	HAEN	462	DLEY
15	FMDH	79	WIDK	143	RIDH	207	EADR	271	VFER	335	TMER	399	RADH	463	DVDR
16	CAEE	80	WIEE	144	HLDD	208	DLED	272	ALDD	336	YGDE	400	HCDD	464	DLLE
17	LPAV	81	TQAA	145	HYAA	209	DTCA	273	CYGA	337	WSCV	401	HTAA	465	EWAI
18	AWCN	82	SWGQ	146	KWGT	210	DPGT	274	MQAW	338	QTGN	402	KNMP	466	EQMQ
19	ASMK	83	WYCK	147	HNMK	211	EWMK	275	LSCH	339	SPAH	403	KTGR	467	DTCH
20	CTGD	84	SSMD	148	RNCE	212	ENAD	276	ATME	340	QWMD	404	RWCD	468	ESGE
21	VTTV	85	STPV	149	HTQL	213	EWTI	277	IWSC	341	NYPL	405	RSWF	469	ETTA
22	LPYN	86	NQWS	150	HQPY	214	EYYY	278	LNNP	342	WNWW	406	HQQQ	470	EYQP
23	CTNH	87	PPSK	151	HSWH	215	DYQH	279	GPYR	343	WNTK	407	RYPK	471	EPNR
24	ISSD	88	TYTD	152	KQND	216	DSNE	280	FSTD	344	SYSD	408	RYNE	472	DWYD
25	GYHI	89	YTRM	153	RYKA	217	DNKL	281	GPRM	345	SSHA	409	KWHV	473	DPKM
26	ANRP	90	YWHQ	154	RPRS	218	EQRS	282	VYKY	346	QTKT	410	KOKY	474	DYHY
27	CYRK	91	QWKR	155	KTHK	219	DQRR	283	GQHK	347	WPRR	411	HPRH	475	DNRK
28	MNKE	92	YNHE	156	RPKE	220	ESHD	284	LTRD	348	TWHE	412	RSKD	476	DQRE
29	GQEC	93	YPEG	157	HNDG	221	ETDL	285	MSDA	349	SQDV	413	HNEF	477	DYDL
30	LWDQ	94	WSDN	158	KWES	222	DPDW	286	VWES	350	PPEQ	414	KPDQ	478	DNDT
31	VSDK	95	NNER	159	KQDH	223	ETEK	287	LTER	351	NWDH	415	RNDK	479	ESER
32	FQEE	96	NPDE	160	HSED	224	DYEE	288	MNDE	352	YQED	416	RQEE	480	ETED
33	CHFG	97	SKFM	161	KRFV	225	DKIM	289	IHIL	353	TKFI	417	KHFG	481	DRIM
34	MHLP	98	WHVQ	162	RRVT	226	DHVP	290	CHLW	354	TRIW	418	KKVS	482	ERFN
35	AKVR	99	NRLR	163	KKIK	227	DHFR	291	FRVK	355	WRLR	419	RKLH	483	DRLH
36	VRID	100	THID	164	RRLE	228	DKLD	292	AKFD	356	NKVE	420	KHID	484	EKVE
37	FHNC	101	PKTG	165	KHSF	229	EKQI	293	GRQF	357	THNL	421	RRTM	485	EHSG
38	FKPP	102	PRNY	166	HKYY	230	DRPW	294	LRPP	358	YRQQ	422	KHWN	486	DHPY
39	LHQH	103	YKQK	167	RHTH	231	EHWK	295	CRNR	359	QHTK	423	KKYR	487	DHWR
40	LKWE	104	QRYD	168	HHWE	232	DKSE	296	VHWE	360	THYE	424	RHSE	488	DRQD
41	IKHL	105	QKKF	169	HHRL	233	DHHA	297	CRHI	361	THKF	425	HRRC	489	DKHM
42	GKHS	106	WHKT	170	HKRY	234	ERHP	298	FHHQ	362	SRHW	426	KRKS	490	EKRW
43	ARRR	107	NRHR	171	KKKH	235	EKRR	299	FKKK	363	PKRK	427	HRHK	491	EHHK
44	FHKE	108	SRRE	172	KHHD	236	ERKE	300	VKRE	364	PKKD	428	RRRE	492	EKKE
45	LREM	109	YKEG	173	KRDG	237	DRDA	301	IKEM	365	WKEL	429	HHDF	493	EKDM
46	LRDT	110	THDP	174	HKDY	238	DHDT	302	VHEY	366	PKDS	430	HRDW	494	DHEN
47	IRDR	111	YHEH	175	KREK	239	EHEK	303	AKDR	367	QRDH	431	RKEH	495	ERDH
48	MHEE	112	PKDD	176	KRED	240	DRED	304	GHDD	368	NHED	432	KKED	496	EHED
49	ADMV	113	TECG	177	RDGC	241	EDAC	305	FEGL	369	YEAJ	433	REMG	497	DEMC
50	CEAW	114	PEMQ	178	REAN	242	EEMN	306	IECN	370	QDMT	434	HEAN	498	DECT
51	MDGH	115	QEAR	179	RDCH	243	DDGH	307	ADAH	371	WDGK	435	RDCK	499	EDAR
52	GECE	116	SDGD	180	KDME	244	DDCD	308	AEME	372	YDCD	436	REGD	500	DEGD
53	VEWV	117	WESI	181	RENC	245	EETI	309	LDYI	373	YDPL	437	HDYF	501	EDTF
54	FEST	118	NDPP	182	RDYS	246	EESQ	310	IETW	374	SDQS	438	RDQW	502	DDYP
55	GDYR	119	TDQR	183	HEPK	247	DDNK	311	LESK	375	PESK	439	RENH	503	EDSH
56	IDTD	120	NDWE	184	HEQD	248	EEYE	312	FDWE	376	QEWE	440	KDPE	504	DEND
57	MEKF	121	SDKA	185	REHG	249	EDKI	313	ADKG	377	NEKI	441	KEKG	505	EERI
58	MDKS	122	SDRW	186	REHW	250	EEKW	314	LDKT	378	PERT	442	RDHS	506	EDHN
59	GDHR	123	QERK	187	KDRH	251	EERH	315	MEHH	379	TDHR	443	KEHK	507	DEKK
60	AERE	124	WEHD	188	RDKD	252	EDHD	316	VERE	380	QDRD	444	HDRD	508	EDKE
61	MDEI	125	TEEF	189	REDC	253	EDDA	317	CEDC	381	NEDV	445	RDV	509	EDEV
62	AEWV	126	PEDS	190	REEP	254	DEEN	318	IDDP	382	TDDY	446	HEDW	510	DDES
63	CEDR	127	PDEH	191	KDEK	255	EEDR	319	MEEH	383	PEEK	447	KEDH	511	DEDH
64	CDDD	128	NDDD	192	KDDE	256	DDEE	320	CDED	384	YEEE	448	KDEE	512	EEDD

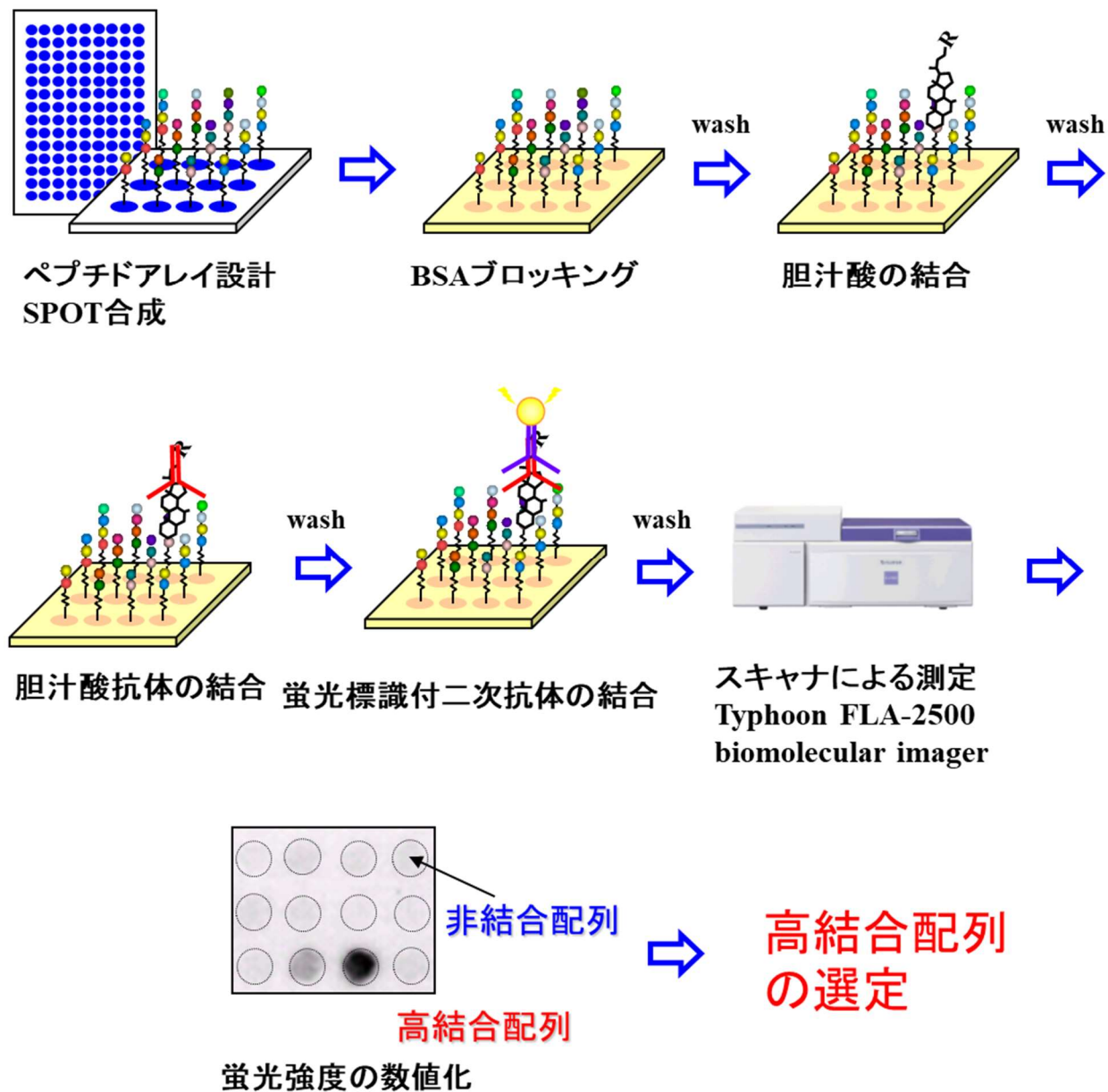


Fig. 2-1 胆汁酸結合活性の評価方法

胆汁酸と高結合のペプチドには、胆汁酸抗体及び蛍光標識付二次抗体が結合しているため、蛍光強度値が高くなる。つまり、蛍光強度値が高いペプチドが、胆汁酸との結合活性が高いペプチドである。

Table 2-2 主成分分析に使用した変数の組み合わせ

Run No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
変数の数	18	16	16	16	13	13	9
極性	平均	○	○	○	○	○	○
	最大	○	○	○	○	○	○
	最小	○	○	○	○	○	○
側鎖の寄与度	平均	○	-	-	○	-	-
	最大	○	-	-	○	-	-
	最小	○	-	-	○	-	-
等電点	平均	○	○	○	○	○	- ○
	最大	○	○	○	○	○	- ○
	最小	○	○	○	○	○	- ○
Hydropathy index	平均	○	○	○	○	○	○
	最大	○	○	○	○	○	○
	最小	○	○	○	○	○	○
分子量	平均	○	-	○	-	-	-
	最大	○	-	○	-	-	-
	最小	○	-	○	-	-	-
LogP	平均	○	○	-	-	-	○ -
	最大	○	○	-	-	-	○ -
	最小	○	○	-	-	-	○ -
各ペプチドに含まれる、各グループのアミノ酸数	グループ 1	-	○	○	○	○	○ -
	グループ 2	-	○	○	○	○	○ -
	グループ 3	-	○	○	○	○	○ -
	グループ 4	-	○	○	○	○	○ -

ライブラリーペプチドとターゲットとの胆汁酸との結合活性評価結果から、胆汁酸に高結合するペプチドの探索に最適な PCA 用の変数を選抜する。

2.3 実験結果及び考察

2.3.1 主成分分析に使用する変数の選択

アミノ酸の7つの物理化学的特徴量を使用して、4残基・512個の基本ペプチドライブラリーの主成分分析を行った。物理化学的特徴量として、極性、タンパク質安定性に対する側鎖の寄与度、等電点、Hydropathy index、LogP、及び分子量を選択し、各ペプチドの、それぞれの特徴量の平均値、最大値、最小値を算出したものを主成分分析の変数として使用した。加えて、アミノ酸を4つのグループに分けた時[27]の、各ペプチドに含まれる各グループのアミノ酸の数も、変数として使用した (Table 2-2)。

久米らの論文[27]の経験に基づき、Table 2-2 に示すように、最初に、9から18の変数を組みにした Run No.1 から Run No.7 の主成分分析を実行し、各 Run No.における累積寄与率を算出した (Table 2-3)。PC1 と PC2 の累積寄与率は0.56から0.67の範囲であった。Run No.2、5、6、7の累積寄与率は、Run No.1、3、4の累積寄与率より高い値となった。

次に、久米らの論文[27]の方法にならない、胆汁酸との結合量の指標とした蛍光強度値と PC1 及び PC2 との相関係数を Table 2-4 に示した。蛍光強度値と PC1 の相関係数は、全ての Run No.において0.1未満であり、蛍光強度値と PC1 の間に相関は無いと判断できた。一方、PC2 においては、相関係数の値が0.3を超えた組 (Run No.2、3、4) が存在し、PC2 との相関が比較的高かったと判断できた。PC1 と PC2 の累積寄与率の高かった Run No.2 (変数 16) を最も最適な組み合わせとして採用した。Run No.2 を用いて主成分分析を実行した際の PC スコアプロット図を Fig. 2-2 に示す。また、蛍光強度値と PC1 及び PC2 との相関図を、Fig. 2-3 及び Fig. 2-4 に示す。

2.3.2 4残基・512個の短鎖基本ペプチドを使用した主成分分析から決めた、胆汁酸に高結合のルールおよび低結合のルール

4残基・512個の短鎖基本ペプチドの、胆汁酸との結合量の指標とした蛍光強度値

の平均と SD を算出し、平均+1 SD を越えた蛍光強度値となったペプチドを高結合ペプチド、平均-1 SD より低い蛍光強度値となったペプチドを低結合ペプチドと定義した。Table 2-5 に、59 個の高結合ペプチドと 12 個の低結合ペプチドを示した。次に、Run No.2 で実行した PC スコアプロット図上に、高結合ペプチドと低結合ペプチドをプロットした (Fig. 2-5)。上記の通り、PC2 との相関が比較的高い最適なモデルを選出したため、高結合ペプチドと低結合ペプチドがランダムに分散することなく、高結合ペプチドが集中する領域と低結合ペプチドが集中する領域を見出すことができた。これは、胆汁酸に高結合するというペプチドの機能に対して、ペプチドの物理化学的指標を選別して構築した分析モデルが、配列の特徴をある程度表現していることを意味している。Table 2-2 で比較した他のモデルで、PC2 と結合活性の相関が高くない場合は、ここまでの偏りは見出すことができない。そこで、高結合ペプチドが集中している領域を「高結合ルール」、低結合ペプチドが集中している領域を「低結合ルール」とし、具体的には、PC1 が-1.43 から 3.06、PC2 が-3.53 から-0.58 の範囲を「高結合ルール」、PC1 が-1.05~4.03、PC2 が 1.04~3.72 の範囲を「低結合ルール」とすることができた (Fig. 2-5)。

2.3.3 4 残基・500 個のランダムペプチドと 6 残基・500 個のランダムペプチドの主成分分析からの高結合ペプチド及び低結合ペプチドの抽出

まず、4 残基・500 個のランダムペプチドと 6 残基・500 個のランダムペプチドを用意し、各々のペプチドの物理化学的特徴量を算出した。次に、4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドの主成分分析を実行した時と、同じ変数 (Run No.2) 及び同じ係数を使用して、主成分分析を実行した。それらの PC スコアより、4 残基の PC スコアプロット図 (Fig. 2-6) と 6 残基の PC スコアプロット図 (Fig. 2-7) を作製した。次にこれらの PC スコアプロット図上に「高結合ルール」及び「低結合ルール」を適用し、各ルール領域にプロットされているペプチドを、ランダムライブラリーより抽出した 4 残基及び 6 残基の、高結合ペプチド、低結合ペプチドとした。4 残基・500 個のラン

ダムライブラリーから 89 個の高結合ペプチド（500 個ペプチドの 17.8%）と 34 の低結合ペプチド（500 個のペプチドの 6.8%）を選択できた（Table 2-6）。また、6 残基・500 個のランダムライブラリーから、94 個の高結合ペプチド（500 個のペプチドの 18.8%）と 19 個の低結合ペプチド（500 個のペプチドの 3.8%）を選択できた（Table 2-7）。

2.3.4 4 残基・500 個及び 6 残基・500 個のランダムペプチドから抽出した高結合ペプチドと低結合ペプチドの胆汁酸結合活性

4 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーから 90 個のペプチドを選択した。具体的には、89 個の高結合ペプチドのうち 24 個、34 個の低結合ペプチドのうち 8 個、377 個のその他のペプチドのうち 58 個を選択した（Table 2-8）。同様に、500 個の 6 残基ランダムペプチドライブラリーからも 90 個のペプチドを選択した（Table 2-9）。これら各 90 個のペプチドをアレイ上に合成し、胆汁酸との結合活性を評価した。高結合ペプチドと低結合ペプチドの蛍光強度値の平均と SD を Table 2-10 に示す。4 残基では、24 個の高結合ペプチドの蛍光強度値の平均（37860）は、3 つのグループの中で最も高く、8 個の低結合ペプチドの蛍光強度値の平均（4542）よりも 8.3 倍高かった。6 残基では、24 個の高結合ペプチドの蛍光強度値の平均（8202）は、3 つのグループの中で最も高く、6 個の低結合ペプチドの蛍光強度値の平均（2752）の 3.0 倍であった。4 残基、6 残基共に、高結合ペプチドは、低結合ペプチドより高い蛍光強度値を示し、本方法により高結合ペプチドとして抽出されたペプチドは、胆汁酸との結合活性が高いことがわかった。本検討では、4 残基・500 個のランダムペプチドから、24 個のペプチドを高結合性の可能性のあるペプチドとして探索できた。この割合は、発見率として 4.8%で、160000 個存在する 4 残基ペプチドのうち 9600 個のペプチドが高結合性である可能性を提案できる、有意義な方法と言える。

以上の結果より、4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドライブラリーで決定したルールを適用して、胆汁酸に対する高結合および低結合の 6 残基ペプチドをスクリーニン

グすることができ、胆汁酸に高結合するペプチドのスクリーニングに利用可能な手法であることが示唆された。

2.3.5 その他の解析方法により抽出された高結合ペプチドとの比較

VAWWMY は胆汁酸に対して高い結合活性を示し、コレステロール低下能を有することが報告されている[4-6]。以前の論文[23]で、アミノ酸残基置換により、高い結合活性を持つペプチドを取得できた。したがって、ランダムペプチドライブラリーから高い結合活性を持つ新規ペプチドのスクリーニングを試み、VAWWMY と比較した。VAWWMY をアレイ上に合成し、胆汁酸の結合アッセイを行った。2.3.4 において 6 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーから高結合ペプチドとして抽出され、胆汁酸との結合活性を評価した 24 個のペプチド (Table 2-9) のうち、VAWWMY よりも高い蛍光強度値を示したのは 8 個で、24 個の 33.3%となる。モデルで高結合と予測してもすべてのペプチドが正しく高結合になることはない。これは限られた数のペプチドの活性データ (学習用データ) で構築したモデルであるため、モデルの推定精度の限界である。当研究室では、ニューラルネットワーク (ANN) 解析を用いて、胆汁酸に高い結合親和性を持つ 6 残基ペプチドの位置ルールをランダムに選択した 2212 個のペプチドから構築した[23]。この方法を用いて抽出した高結合のペプチドの 32.5%が VAWWMY よりも胆汁酸への結合活性が高い、という結果が得られている。この方法は 6 残基ペプチドに特化し 2000 以上の学習用データを用いて構築した精緻なモデルである。しかし、高結合と予測し、正しく高結合になったペプチドは、今回の結果と同程度であった。これは、今回の PCA モデルが、学習データが少ないながらも高精度なモデルであることを示唆している。

次いで、前回の ANN モデルと今回の PCA モデルで高結合と推定されたペプチドの比較を行った。ANN モデルでは 6 残基のうち最初の 4 残基が胆汁酸への結合に重要であり、これに相当する 4 残基・2352 個のペプチドを抽出できた。これら全てのペプチドが高い結合活性を示すとは限らないため、4 残基・512 個の短鎖基本ペプチド

の主成分分析実行時と、同じ変数 (Run No.2)及び同じ係数を使用して、4 残基・2352 個のペプチドの主成分分析を実行した。PC スコアを算出し、PC スコアプロット図を作製したところ (Fig. 2-8)、ペプチドが集中する明確な領域が 4 つ、存在した。各領域のスコア範囲を Table 2-11 に示す。これらのうち、領域 A には 96 個 (4.1%)、領域 B には 1227 個 (52.2%)、領域 C には 147 個 (6.3%) 領域に D には 882 個 (37.5%) が存在した。領域 D の高結合ペプチドの数は領域 A よりも高かった。これは、同定された「高結合ルール (領域)」の周辺領域にも高結合ペプチドが多く存在したためと考えられた。Fig. 2-8 に示した通り、領域 D の一部が「高結合ルール」と重なり、高結合ペプチドを特定するための最も重要な領域であると考えられた。さらに、この手法によって、新しい高結合領域である領域 E、高結合ルール内で、PC1 が約-0.26 から 3.06、PC2 が約-1.6 から-0.58 の範囲を発見できた。

一方、検討した 2352 個のうち、最も数の多い 1227 個のペプチド (全ペプチドの 52.2%) は領域 B に存在した。長岡ら[34]は、4 つの高結合性ペプチド、PWWWMY、IPWYFY、VIWWFK、IYWYMY を同定した。主成分分析により、これら 4 つのペプチドのうち 3 つが領域 B にあることがわかった。今回、PC1 が-1.43 から 3.06、PC2 が-0.35 から-0.58 の範囲を「高結合ルール」と同定したが、領域 B とは重複していない。

さらに、2352 個のペプチドのうち、VAWWMY より結合活性が高い高結合ペプチドを新規の高結合ペプチドと定義し、その特徴を調べることにした。2352 個のうち 95 個が高結合ペプチドであった。驚くべきことに、それらの 49 個は領域 D に存在した。また、領域 B に 40 個、領域 C に 6 個存在した (Table 2-11)。領域 D に存在したペプチドの比率は、高結合ペプチドの 51.6%にも達した。以前の研究で構築した位置ルールは、6 残基の高結合ペプチドを検索するための重要なルールであることが報告されている[23]。したがって、今回特定した高結合領域に一部重なる領域 D が、高結合ペプチドを同定する最も重要な部分の 1 つであることを強く示唆できた。

ANN モデルで推定した高結合ペプチドと、今回の PCA モデルで決定した高結合領域とは一部一致するに留まった。これは、①ANN モデルに使用した 2212 個の学習データ用ペプチドに偏りがあり、特に重要な領域 D および E を指摘することができなかった、あるいは逆に、②PCA モデルの学習用データが小さすぎる、③解析に用いた物理化学的指標がまだ適切でないため、領域 A、B、C を指摘することができなかった、という 3 つの理由が考えられる。

Table 2-3 各 RunNo.における累積寄与率

Run No.	累積寄与率
1	0.56
2	0.64
3	0.56
4	0.57
5	0.64
6	0.64
7	0.67

Table 2-2 に示した変数の組み合わせ（Run No.1～Run No.7）で主成分分析を実行した際の PC1 から PC2 までの累積寄与率を示す。

Table 2-4 蛍光強度値と PC1 及び PC2 との相関係数

Run No.	蛍光強度値との相関係数	
	PC1	PC2
1	0.0002	0.1985
2	0.0068	0.3228
3	0.0534	0.3021
4	0.0057	0.3302
5	0.0036	0.2934
6	0.0045	0.0076
7	0.0401	0.2733

胆汁酸結合活性の評価値（蛍光強度値）と、Table 2-2 に示した変数の組み合わせ（Run No.1～Run No.7）で主成分分析を実行した際の PC1 及び PC2 との相関を示す。

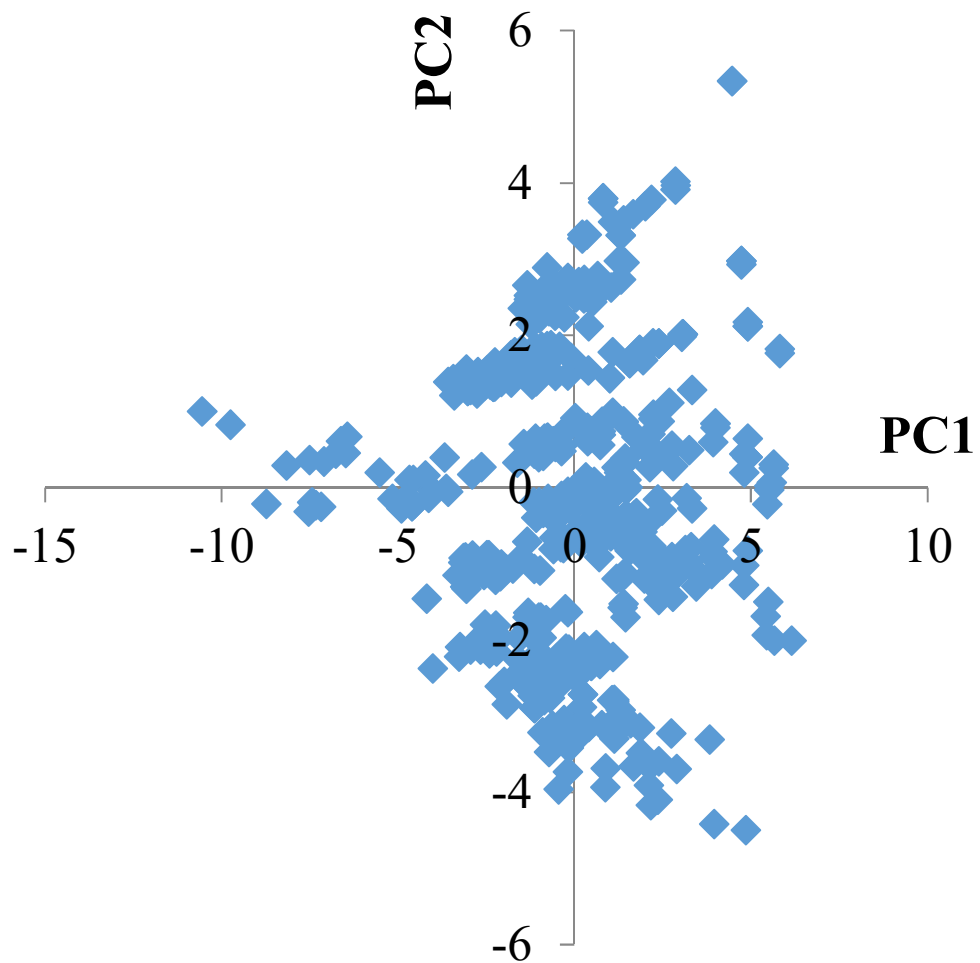
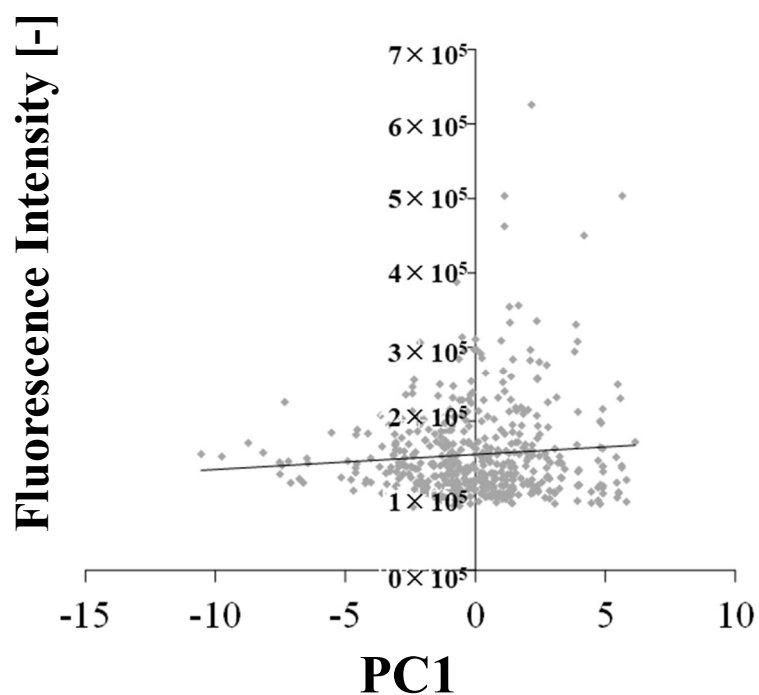


Fig. 2-2 4残基・512個の短鎖基本ライブラリーのPCスコアプロット

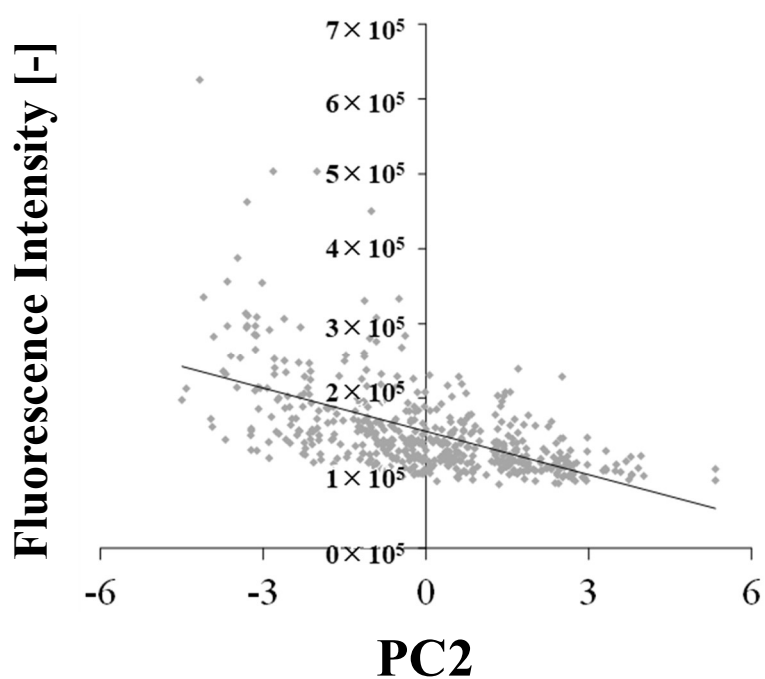
短鎖基本ペプチドライブラリーの4残基・512個のペプチドを、Run No.2を用いて主成分分析を実行した際のPCスコアプロット図を示す。



$$y=2.01 \times 10^3 + 1.55 \times 10^5 \quad R^2=0.0068$$

Fig. 2-3 蛍光強度値と PC1 との相関

短鎖基本ペプチドライブラリーの 4 残基・512 個のペプチドの、胆汁酸との結合量の指標とした蛍光強度値と、Run No.2 を用いて主成分分析を実行した際の PC 1 との相関を確認した。蛍光強度値と PC1 に相関は認められなかった。



$$y = -1.92 \times 10^5 + 1.55 \times 10^5 \quad R^2 = 0.3228$$

Fig. 2-4 蛍光強度値と PC2 との相関

短鎖基本ペプチドライブラリーの4残基・512個のペプチドの、胆汁酸との結合量の指標とした蛍光強度値と、Run No.2 を用いて主成分分析を実行した際の PC2 との相関を確認した。蛍光強度値と PC2 にわずかに相関が認められた。

Table 2-5 高結合ペプチドと低結合ペプチド

高結合ペプチド										低結合ペプチド	
No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename	No. peptidename
1	ARRR	13	RISR	25	SDRW	37	LRPP	49	QKKF	1	MNDE
2	QCRR	14	RYPK	26	KKYR	38	KDRH	50	EERH	2	DRED
3	EKRR	15	DNRK	27	DHWR	39	GPRM	51	HSWH	3	KDME
4	WPRR	16	VIPR	28	GDHR	40	FKPP	52	QEAR	4	CDED
5	DQRR	17	YVRR	29	GDYR	41	CRNR	53	YAQR	5	DDEE
6	RVLR	18	KVRS	30	NRLR	42	NDPP	54	DDYP	6	DSNE
7	KCRK	19	HKRY	31	DHFR	43	SFPH	55	DHVP	7	NHED
8	QWKR	20	GPYR	32	EKRW	44	FKKK	56	PVPF	8	DECT
9	PKRK	21	NRHR	33	HPRH	45	VYKY	57	ERHP	9	EKKE
10	DRPW	22	CYRK	34	HMYW	46	HMKF	58	ANRP	10	FQEE
11	QERK	23	RYKA	35	WRLR	47	TDHR	59	EEKW	11	ETDL
12	AKVR	24	LARH	36	SRHW	48	HHRL			12	SALE

4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドの、胆汁酸との結合量の指標とした蛍光強度値の平均と SD を算出し、平均+1 SD を越えた蛍光強度値となったペプチドを「高結合ペプチド」、平均-1 SD より低い蛍光強度値となったペプチドを「低結合ペプチド」と定義した。

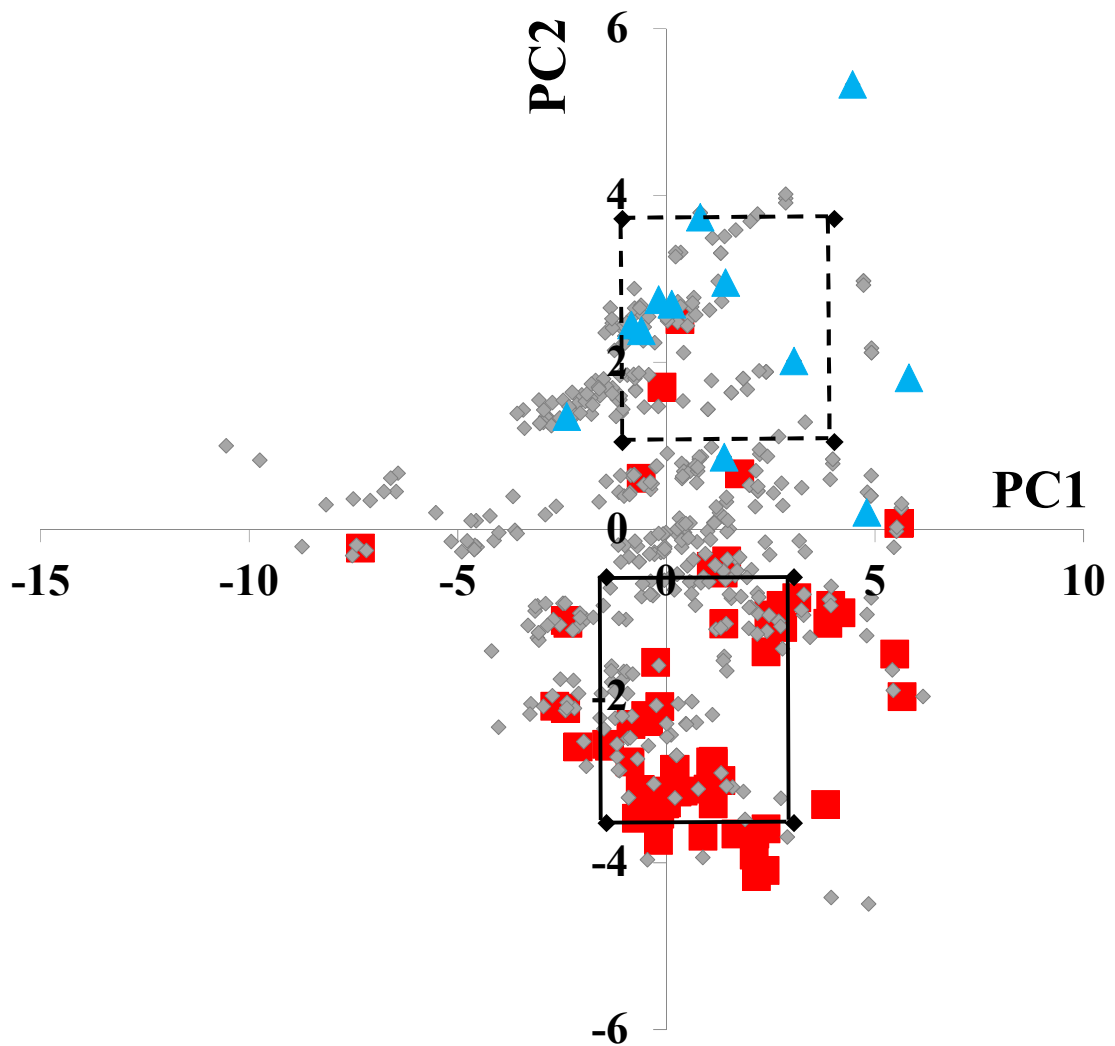


Fig. 2-5 4残基・512個のライブラリーのPCスコアプロット

Fig.2-2 のPCスコアプロット図上に、胆汁酸結合実験における高結合のペプチドを■で、低結合のペプチドを▲でプロットした。高結合ペプチドが集中する領域と低結合ペプチドが集中する領域を定義することができた。具体的には、PC1 が-1.43 から3.06、PC2 が-3.53 から-0.58 の範囲を「高結合ルール」、PC1 が-1.05~4.03、PC2 が1.04 ~3.72 の範囲を「低結合ルール」とすることができた。高結合の領域を実線で、低結合の領域を点線で示す。

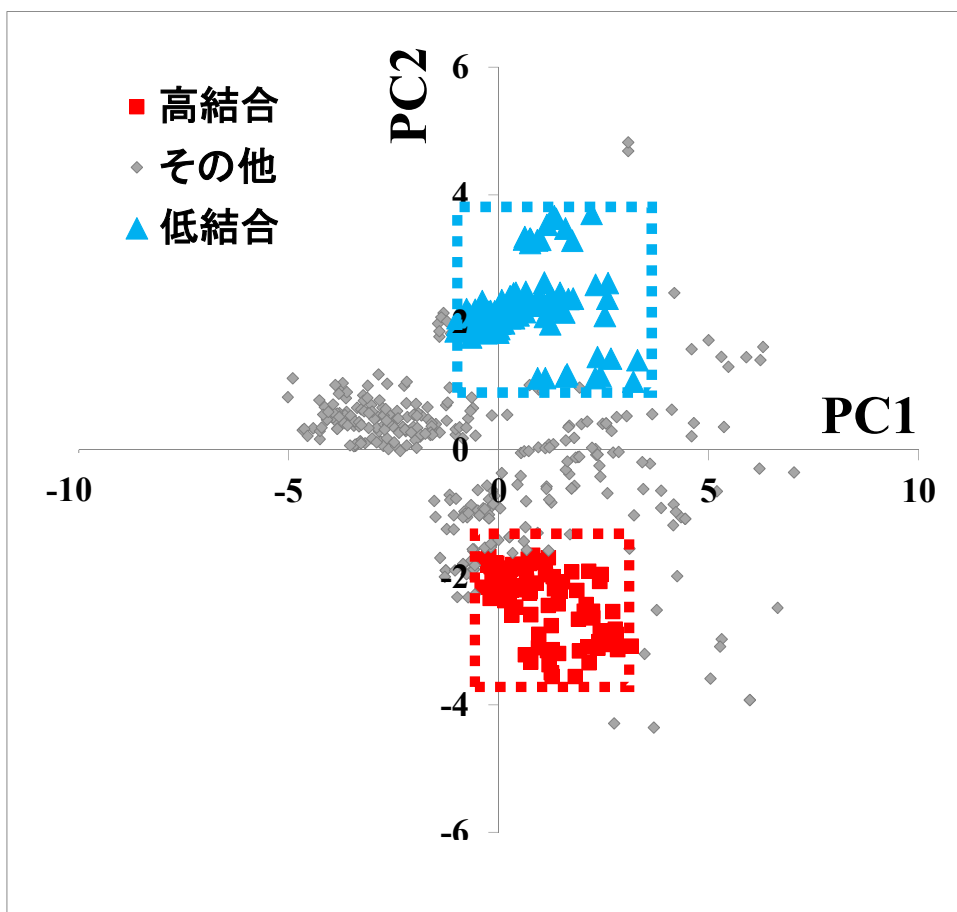


Fig. 2-6 4 残基ランダムペプチドの PC スコアプロット

Run No.2 (変数の組み合わせ) を用いて、4 残基 500 個のランダムペプチドの主成分分析を実行した際の PC スコアプロット図。

PC1 が-1.43 から 3.06、PC2 が-3.53 から-0.58 の「高結合ルール」を赤色の点線で囲った。PC1 が-1.05~4.03、PC2 が 1.04~3.72 の「低結合ルール」を水色の点線で囲った。高結合のルール内の高結合のペプチドを■で、低結合のルール内の低結合のペプチドを▲でプロットした。

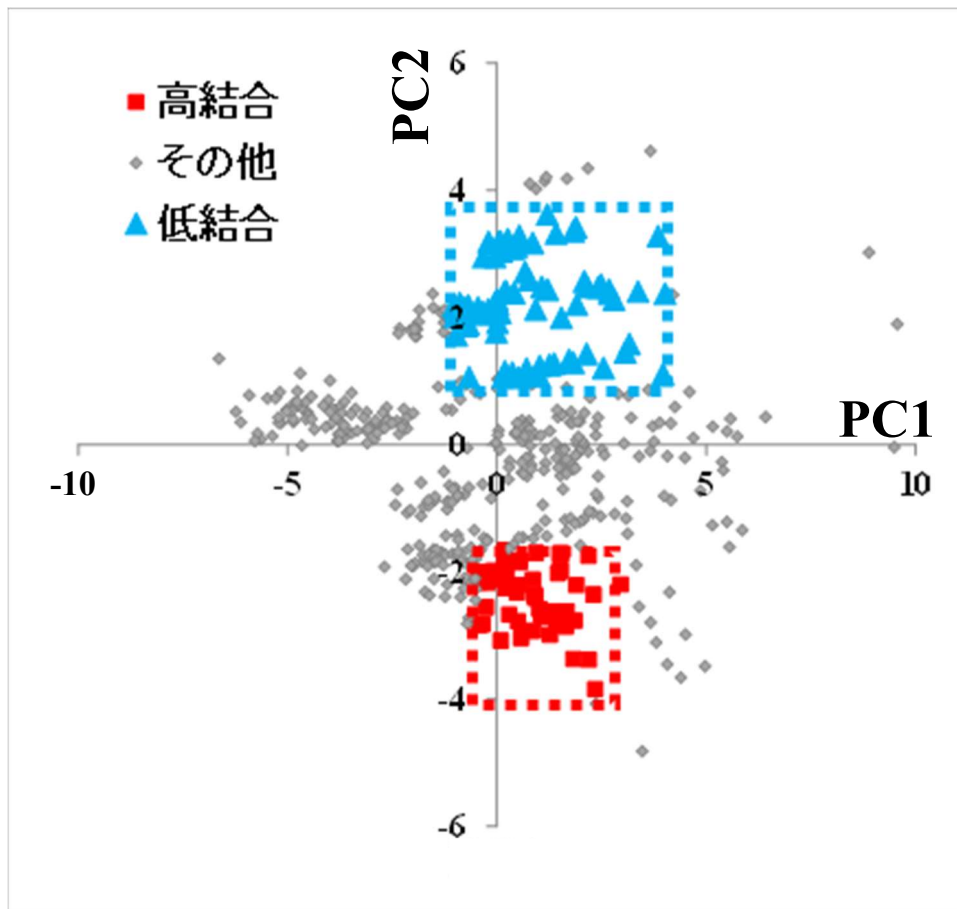


Fig. 2-7 6 残基ランダムペプチドの PC スコアプロット

Run No.2 (変数の組み合わせ) を用いて、6 残基 500 個のランダムペプチドの主成分分析を実行した際の PC スコアプロット図。

PC1 が-1.43 から 3.06、PC2 が-3.53 から-0.58 の「高結合ルール」を赤色の点線で囲った。PC1 が-1.05~4.03、PC2 が 1.04~3.72 の「低結合ルール」を水色の点線で囲った。高結合のルール内の高結合のペプチドを■で、低結合のルール内の低結合のペプチドを▲でプロットした。

Table 2-6 4 残基ランダムペプチドから選択された高結合ペプチドと
低結合ペプチド

高結合ペプチド										低結合ペプチド			
1	AQRF	21	HPNS	41	KWSR	61	RPKI	81	WRCR	1	AAEE	21	PEAN
2	AREK	22	HPWN	42	LGRE	62	RPMA	82	YCHK	2	CDDY	22	PEGP
3	CRGH	23	HQNM	43	LNRM	63	RPMY	83	YDIR	3	DDFT	23	QTEA
4	CRPP	24	HRIW	44	LRHG	64	RPRS	84	YERA	4	DDMD	24	SPDG
5	CRQV	25	HRVE	45	MERV	65	RRDA	85	YKIR	5	DMDC	25	SWQE
6	CWRH	26	HRWT	46	MLRR	66	RTCM	86	YKKN	6	DMDN	26	TNTE
7	DKMK	27	HSHH	47	MRHE	67	RTYV	87	YPGR	7	DSCQ	27	TTEP
8	DKRW	28	HSPN	48	NPPR	68	RVPP	88	YPRH	8	DVEW	28	TYNE
9	EHRA	29	HSQS	49	NYGR	69	RYMR	89	YQRV	9	DVHD	29	TYTE
10	ERPP	30	HTQG	50	PHAR	70	SNIR			10	ECEC	30	VHEE
11	FHKT	31	IKKN	51	PNRG	71	SRKH			11	EDME	31	WDNT
12	FRGT	32	IRSP	52	PPHR	72	SYRW			12	EDNV	32	WDNW
13	FRQK	33	KART	53	PPHS	73	TMKR			13	ETSY	33	YDEL
14	GTCR	34	KFLR	54	PPQR	74	TMRS			14	GNPD	34	YTYD
15	HATN	35	KHKN	55	PRRV	75	TRCC			15	GQDY		
16	HELK	36	KKAS	56	QKHK	76	TRHS			16	GWSD		
17	HGYK	37	KKDW	57	RAGY	77	TVQR			17	NEYW		
18	HILR	38	KKPG	58	RAKD	78	TYKT			18	NQEY		
19	HLKN	39	KNNA	59	REIR	79	VMKH			19	NQTE		
20	HPCK	40	KSYP	60	RPHL	80	WHKG			20	PDHE		

4 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーの PC スコアプロット (Fig. 2-6) において、赤色の点線で囲った「高結合ルール」内にプロットされた 89 個の高結合ペプチドと、水色の点線で囲った「低結合ルール」内にプロットされた 34 個の低結合ペプチドを示す。

Table 2-7 6 残基ランダムペプチドから選択された高結合ペプチドと
低結合ペプチド

高結合ペプチド						低結合ペプチド					
1	AGHRWT	21	FHCETK	41	KWTESH	61	QSYKSQ	81	TWCGKR	1	DIYKEE
2	AHPERF	22	FKHDTL	42	LDMKKW	62	QTYRHL	82	VNRNGS	2	EFDEWT
3	AHTEKT	23	GHEGHR	43	LDRFYW	63	RCDHKT	83	VWFRWE	3	EHDSPM
4	AKNAAH	24	GMNRYE	44	LDRNNK	64	RCWEMY	84	WKDHWI	4	ENHYSE
5	ANKGSK	25	GRPNTA	45	MAKRIE	65	REPLHP	85	WKMGRN	5	ETGNTT
6	AQLHTR	26	GWNRTG	46	MHNRMQ	66	RFGDPH	86	WKYQYK	6	EWMQYD
7	CDFKKR	27	HKVADC	47	MKTSRE	67	RFHPWH	87	WPCRTE	7	HGEDMS
8	CDSNRH	28	HQRHSW	48	MRQNLK	68	RISTTH	88	WRQPMP	8	HTPEET
9	CSSPKH	29	HRLCNT	49	NCFRHA	69	RNNEVI	89	YHRHMV	9	METEFH
10	DAFRPF	30	HRRDDF	50	NLHTKT	70	RNRLQI	90	YKNRNR	10	NDYDWG
11	DHKWSI	31	HVPHQN	51	NSWNRG	71	RNVEGC	91	YMRSKG	11	NEQSQW
12	DWIGRL	32	HWAGEK	52	NTKSKF	72	RPHCKS	92	YREVQS	12	PEEDHA
13	EARPAY	33	HYLECK	53	PDLKRI	73	RTEWPV	93	YRFTQK	13	PTESQN
14	EFVRGP	34	IESKRC	54	PHRNSD	74	RTFKAY	94	YRHDGV	14	QNEEDM
15	EFYRSV	35	IKHENH	55	PRHQPD	75	RTSPTN			15	QRNDED
16	EPAAIR	36	IPRWDW	56	QDIPPR	76	RVFKWD			16	SLDTEH
17	EPRPHM	37	KKTGTH	57	QKYHDR	77	SFRCPK			17	VTQDDE
18	ERTNLS	38	KNRDCR	58	QNPRKG	78	SHPNHA			18	YDPQNQ
19	EVRRTTR	39	KQRAKN	59	QQFHKN	79	SNPQHN			19	YTQPDN
20	FGQKCR	40	KWNKFN	60	QRDLPK	80	SPKSTN				

6 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーの PC スコアプロット (Fig. 2-7) において、赤色の点線で囲った「高結合ルール」内にプロットされた 94 個の高結合ペプチドと、水色の点線で囲った「低結合ルール」内にプロットされた 19 個の低結合ペプチドを示す。

Table 2-8 胆汁酸結合活性を評価した 4 残基・90 個のペプチド

4残基															
高結合ペプチド				その他の領域						低結合ペプチド					
1	EHRA	13	RPMY	1	ADNM	13	DTVI	25	HYDM	37	MKGP	49	RQKR	1	DDFT
2	FRGT	14	RRDA	2	AHSF	14	DWWY	26	IPIF	38	MKWC	50	SECI	2	DMDC
3	FRQK	15	RTCM	3	ALHH	15	EDHH	27	KFKR	39	MLEW	51	SFMK	3	EDME
4	HILR	16	RVPP	4	CEPY	16	EIIT	28	KPLK	40	MMQT	52	TYCT	4	GQDY
5	HSQS	17	RYMR	5	CFAH	17	ENLQ	29	KSQE	41	MQEH	53	VFEN	5	SWQE
6	IKKN	18	SYRW	6	CMLQ	18	FDNL	30	KVYA	42	NCCL	54	WMMK	6	TNTE
7	KART	19	TMRS	7	CMNQ	19	FNDT	31	LGPD	43	NCWM	55	WQVV	7	TTEP
8	PHAR	20	TYKT	8	DAML	20	GINP	32	LHCW	44	NECY	56	YDAA	8	YTYD
9	PPHR	21	YKIR	9	DDIW	21	GVWD	33	LHVH	45	NVVK	57	YDKS		
10	PRRV	22	YKKN	10	DEFR	22	GYLD	34	LMTL	46	PADG	58	YQLM		
11	RAGY	23	YPRH	11	DQIN	23	HERT	35	LSMN	47	PKLQ				
12	RPHL	24	YQRV	12	DRGV	24	HSCC	36	LYPR	48	PPKI				

Table 2-6 に示した、4 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーから選択された 89 個の高結合ペプチドのうち 24 個、34 個の低結合ペプチドのうち 8 個、377 個のその他のペプチドのうち 58 個の計 90 個のペプチドについて、胆汁酸との結合活性を評価した。

Table 2-9 胆汁酸結合活性を評価した 6 残基・90 個のペプチド

6残基															
高結合ペプチド				その他の領域				低結合ペプチド							
1	ANKGSK	13	NTKSKF	1	ADGWSY	13	ETGTWM	25	IGMPLH	37	MSSQNY	49	RISDRD	1	EHDSPM
2	AQLHTR	14	QDIPPR	2	ALGFRK	14	FASSAD	26	IKNFVW	38	MWLPLC	50	RLNKWK	2	ENHYSE
3	CSSPKH	15	QNPRKG	3	ANRLPI	15	FRYRMF	27	INDMHG	39	NDAWCR	51	RWKFPR	3	NDYDWG
4	DHKWSI	16	RFHPWH	4	ARISKC	16	FWFPLY	28	IQSDTH	40	NDIIDD	52	SLPKDV	4	PEEDHA
5	EVRRTR	17	RNRLQI	5	CHLYDW	17	GFWRTY	29	KETYMM	41	PCGGPI	53	TDYCYN	5	SLDTEH
6	FGQKCR	18	RTFKAY	6	CWPCMG	18	GKWIYK	30	KVCWEG	42	PFVPRP	54	TWDCGN	6	YDPQNO
7	GRPNTA	19	SFRCPK	7	DDSWVK	19	GMPGYD	31	LCLCAM	43	PGQRTI	55	VEDCWN		
8	HQRHSW	20	TWCGKR	8	DQQHSI	20	GVRWPT	32	LMGWYK	44	PVRVAL	56	VEFIFN		
9	HRLCNT	21	WKYQYK	9	EEQWCC	21	HCKTTL	33	LVAEPK	45	QDIEAA	57	VGDSGV		
10	KKTGTH	22	WRQPMP	10	EGCCSS	22	HWMKMG	34	MDVYKE	46	QLTDHQ	58	VLRQPW		
11	KWNKFN	23	YHRHMV	11	EGWSDL	23	ICRNIW	35	MGEKDQ	47	QPMGEN	59	WYSELW		
12	KWTESH	24	YMRSKG	12	ESGHQG	24	IDNENV	36	MLGKNH	48	QTALRF	60	YQTVYQ		

Table 2-7 に示した、6 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーから選択された 94 個の高結合ペプチドのうち 24 個、19 個の低結合ペプチドのうち 6 個、387 個のその他のペプチドのうち 60 個の計 90 個のペプチドについて、胆汁酸との結合活性を評価した。

Table 2-10 結合活性評価（蛍光強度値）

		蛍光強度値		評価ペプチドの数
		平均	標準偏差	
4残基	高結合	37,860	27,665	24
	低結合	4,542	2,828	8
	その他の領域	10,920	15,661	58
6残基	高結合	8,202	5,893	24
	低結合	2,752	805	6
	その他の領域	6,313	6,754	60

4残基、6残基共に、高結合ペプチドは、低結合ペプチドより高い蛍光強度値を示し、本方法により高結合ペプチドとして抽出されたペプチドは、胆汁酸との結合活性が高いことが示された。

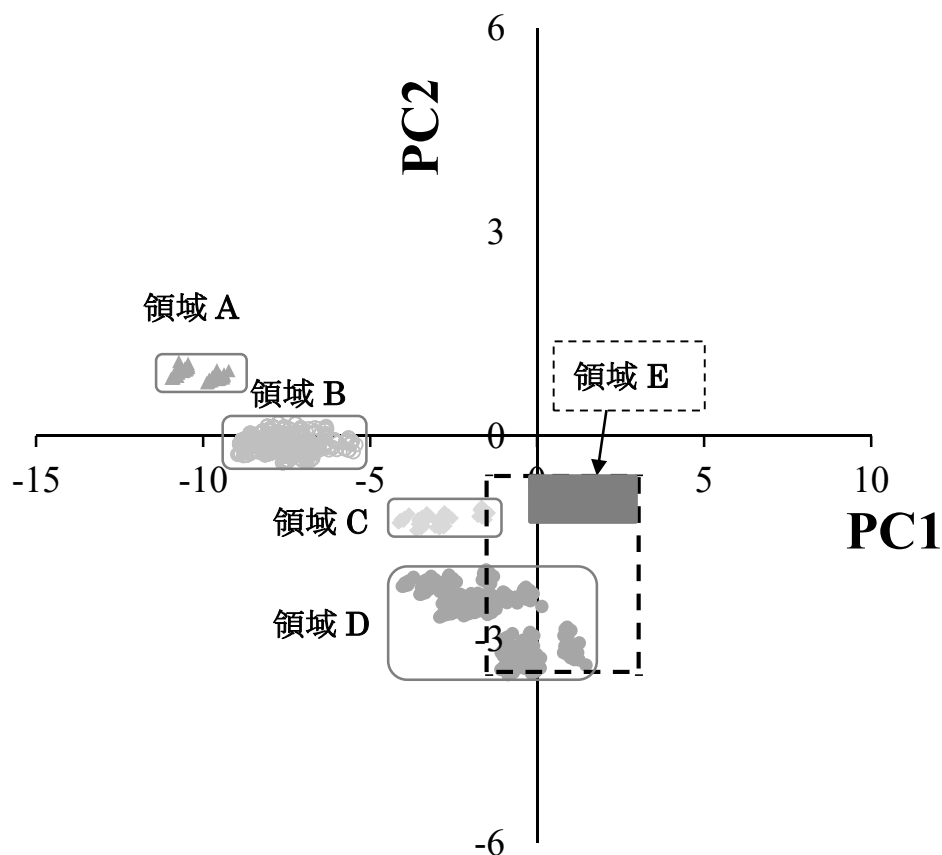


Fig. 2-8 4 残基・2352 個のペプチドの PC スコアプロット

ニューラルネットワーク (ANN) 解析を用いて、胆汁酸に高い結合親和性を持つ 6 残基ペプチドの位置ルールをランダムに選択した 2212 個のペプチドから構築した [23]。6 残基のうち最初の 4 残基が胆汁酸への結合に重要であり、これに相当する 4 残基・2352 個のペプチドを抽出した。これらのペプチドについて、RunNo.2 を用いて主成分分析を実行した際の PC スコアプロット図を示す。

ペプチドが集中する明確な領域が 4 つ存在し、これらを領域 A～領域 D とした。また、新しい高結合領域である領域 E (PC1 が約-0.26 から 3.06、PC2 が約-1.6 から-0.58) を発見した。

Table 2-11 各領域の幅と各領域にプロットされたペプチドの数

	スコア範囲				2352ペプチドのうち各領域に入った数	95個の高結合ペプチドのうち、各領域に入った数
	PC1		PC2			
	下限	上限	下限	上限		
領域A	-10.96	-9.23	0.79	1.09	96	0
領域B	-8.97	-5.43	-0.39	0.19	1227	40
領域C	-4.16	-1.43	-1.39	-1.04	147	6
領域D	-4.03	1.47	-3.52	-1.98	882	49

2.4 結言

これまでに当研究室では、特定のターゲットに高結合するペプチドの新たな探索方法を開発した[27]。まず初めに、物理化学的特性に基づいて、20種類のアミノ酸を4つのグループに分類した。次に、各グループに属するアミノ酸に対応した4残基・512個の短鎖ペプチドライブラリーを作成した。この4残基・512個の基本短鎖ペプチドの物理化学的特徴量を算出し、それらを変数に複数のPCスコアプロット図を作製した。次に、4残基・512個のペプチドをスポット合成したペプチドアレイとターゲットとの活性評価結果から、目的の機能を持つペプチドの探索に最適な主成分分析用の変数を選抜した。その変数を用いて実行したPCスコアプロット図上に、ペプチドアレイとターゲットとの活性評価結果から得られた、ターゲットに高結合のペプチドと低結合のペプチドをプロットすると、明らかに分離した高結合の領域および低結合の領域が得られ、PCスコアプロット図上に特定のターゲットに対する「高結合ルール」及び「低結合ルール」を定義できた。これらのルールを、様々なペプチドライブラリーに適用すると、ライブラリーからターゲットに対する高結合ペプチドを抽出できた。以前の研究[27]では、ターゲットはIL-2およびIgGで、基本とした4残基だけでなく、より長鎖の高結合ペプチドも抽出できた。本研究では胆汁酸に高結合するペプチドの探索を行ったところ、PCスコアプロット図上に明らかに分離した高結合の領域および低結合の領域が得られ、胆汁酸に対する「高結合ルール」及び「低結合ルール」を定義できた。新しく作成したランダムペプチドライブラリーにそのルールを適用したところ、高結合ルールに入るペプチドは、低結合ルールに入ったペプチドより、明らかに胆汁酸との結合活性が高かった。本方法を用いることで、膨大な数を有するペプチド群から、胆汁酸に高結合する新たなオリゴペプチドを探索できた。

第3章

胆汁酸に高結合する短鎖ペプチドの新たな特性

3.1 はじめに

第2章において、ペプチドアレイを用いた結合アッセイと、ペプチドの物理化学的特徴量を変数として行った主成分分析により、コレステロール低下作用を示す可能性のある胆汁酸に高結合する新たなペプチドの探索に成功した。4 残基・512 個の基本短鎖ペプチドに対して主成分分析を実行し、胆汁酸に対する結合活性の評価結果から、PC スコアプロット図上に、明らかに分離された「高結合ルール」領域と「低結合ルール」領域を選定できた。ルール領域の確かさを、新しく選定した4 残基・500 個及び6 残基・500 個のランダムペプチドの胆汁酸に対する結合データを使用して検証した。合計で90 個の4 残基および6 残基のペプチドを合成し、それらの胆汁酸に対する結合活性を評価したところ、これらのルール領域には、高結合または低結合ペプチドの頻度が高いことを確認でき、高結合または低結合ペプチドの特性を把握できた。しかし、これらの解析から、推定された胆汁酸に対する高結合のペプチドを、産業的に利用するためにどのように製造していくかが課題となる。

プロテアーゼは異なる切断部位を持つため、加水分解により生成されるペプチドは、選択するプロテアーゼにより特徴のあるペプチドを得られる。したがって、着目している食品タンパク質から生理活性ペプチドを得るのに、どのプロテアーゼが適してい

るか、またその着目しているプロテアーゼによって、食用タンパク質から生理活性ペプチドを得られるのかどうかを明らかにする必要がある。これらを確認することで、生理活性ペプチドの新しい生産方法が提案でき、産業利用へと繋がっていくと考えられる。

2章の主成分分析を用いた解析方法では、多くの入力変数が必要で主成分分析の構造が複雑であることから、得られた高結合のペプチド配列の物理化学的特徴を明確に説明することが難しい。そこで、得られた高結合のペプチドを構成するアミノ酸の観点から再評価することにより、新規胆汁酸高結合ペプチドの特徴を調べることにした。さらに、乳タンパク質 (*Bos taurus*) と米グルテリン (*Oryza sativa subsp. japonica*) からプロテアーゼ消化によって生成されるペプチドに焦点を当てて、これらのペプチドの胆汁酸ミセル崩壊活性の評価を試みた。

3.2 実験方法

3.2.1 ペプチドアレイの作製

活性化メンブレン及びペプチドアレイは、**2.2.1** 及び **2.2.2** と同様に準備した。

3.2.2 胆汁酸の結合実験

ペプチドアレイ上のペプチドと胆汁酸との結合実験は、**2.2.4** と同様に行った。

3.2.3 主成分分析 (PCA)

主成分分析は、**2.2.5** と同様に、4 残基・512 個の短鎖基本ペプチドの主成分分析実行時と同じ変数 (Run No.2) 及び同じ係数を使用して実行した。具体的には、極性、等電点、Hydropathy index、LogP の、各ペプチドの平均値、最大値、最小値と、20 個のアミノ酸を疎水度と等電点を指標に 4 つのグループに分け、各ペプチドに含まれる各グループのアミノ酸の数の、計 16 変数を使用した。また、第一主成分 (PC1) を横軸に、第二主成分 (PC2) を縦軸にした PC スコアプロット図を作製した。

3.2.4 胆汁酸に高結合するペプチドの抽出

胆汁酸に高結合するペプチドは、新たに作製した PC スコアプロット図上に、**2.2.6** で決定した「高結合ルール」(PC1 スコアが-1.43 から 3.06、PC2 スコアが-3.53 から-0.58) を適用し、その領域に入ったペプチドを胆汁酸に高結合するペプチドとして抽出した。

3.2.5 食品タンパク質のトリプシン分解により生成が予想される短鎖ペプチドの選択

食用タンパク質として、6つの乳タンパク質、 α S1-カゼイン、 α S2-カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、および米グルテリンを選択した。これらのタンパク質のアミノ酸配列は Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) から選択した (**Table 3-1**)。さらに、トリプシンの加水分解により生成が予想される、C末端に K と R を含む 4 残基、5 残基、6 残基の短鎖ペプチドを選択した。

3.2.6 胆汁酸ミセル崩壊活性の測定

胆汁酸ミセル崩壊活性は、長岡らにより報告された方法を一部変更して行った [35]。脂質成分として、コレステロール (03-1833、富士フィルム和光純薬株式会社)、オレイン酸 (15-0340、富士フィルム和光純薬株式会社)、モノオレイン (23408-12、ナカライテスク株式会社、京都、日本)、および卵黄由来の L- α -ホスファチジルコリン (27554-01、ナカライテスク株式会社) を混合し、メタノールに溶解させた。溶媒を蒸発させた後、混合脂質をタウロコール酸ナトリウムを含む PBS (pH 7.4) に溶解した。混合液中の各成分の終濃度は、6.6 mmol/L のタウロコール酸ナトリウム、0.5 mmol/L のコレステロール、1 mmol/L のオレイン酸、0.5 mmol/L モノオレイン、および 0.6 mmol/L ホスファチジルコリンとなるようにした。37°C で 24 時間インキュベート後、ミセル溶液に各ペプチドを添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。10,000×g で 20 分間、5°C で遠心分離した後、上澄みを回収し、0.45 μ m のフィルターで

ろ過した。コレステロールキット (439-17501、富士フイルム和光純薬株式会社) を使用して、ミセル溶液中のコレステロール濃度を測定した。胆汁酸ミセル崩壊活性の測定方法を **Fig. 3-1** に示す。

3.2.7 統計処理

データは平均値と標準偏差 (SD) として表示した。また、スチューデントの t 検定で統計的有意差を算出した。0.01 未満の p 値 ($p < 0.01$) は統計的有意差を示す。

Table 3-1 各タンパク質のアミノ酸情報

(a) 乳タンパク質 (*Bos taurus* (Bovine))

タンパク質名	アミノ酸残基数	リジンとアルギニンの数	全残基数に対するリジンとアルギニンの割合(%)	起源 (Uniprot No.)
αS1カゼイン	214	21	9.8	P02662
αS2カゼイン	222	31	14.0	P02663
β-カゼイン	224	16	7.1	P02666
κ-カゼイン	190	15	7.9	P02668
α-ラクトアルブミン	142	13	9.2	P00711
β-ラクトグロブリン	178	19	10.7	P02754

(b) グルテリン (*Oryza sativa subsp. japonica* (Rice))

タンパク質名	アミノ酸残基数	リジンとアルギニンの数	全残基数に対するリジンとアルギニンの割合(%)	起源 (Uniprot No.)
グルテリン タイプA1	499	52	10.4	P07728
グルテリン タイプA2	499	48	9.6	P07730
グルテリン タイプA3	496	51	10.3	Q09151
グルテリン タイプB1	499	48	9.6	P14323
グルテリン タイプB2	495	46	9.3	Q02897
グルテリン タイプB4	500	48	9.6	P14614

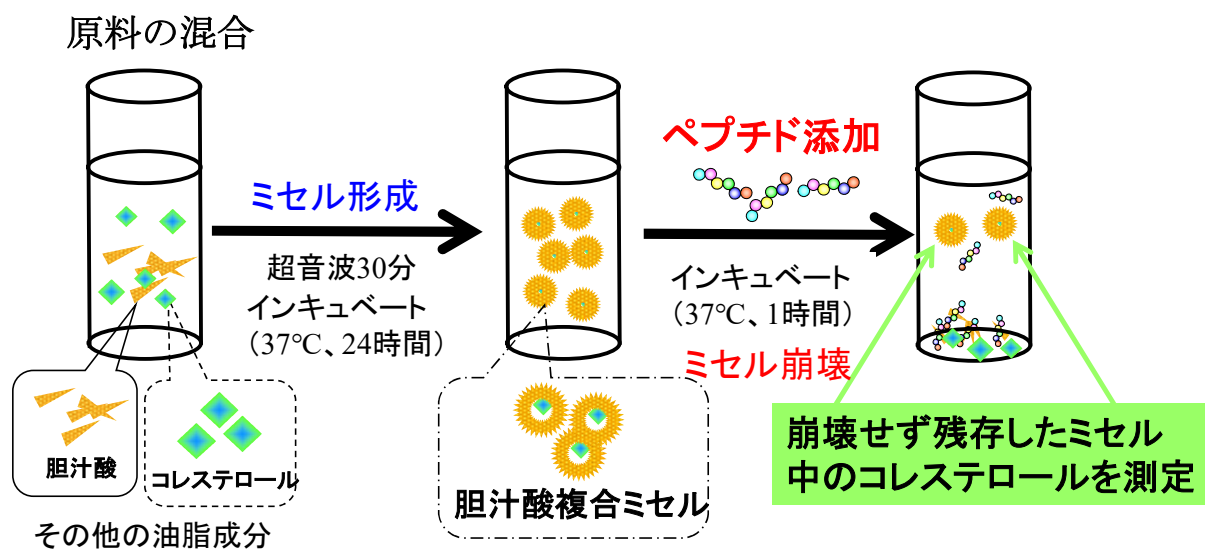


Fig. 3-1 胆汁酸ミセル崩壊活性の測定方法

ペプチドの添加により、ミセルが崩壊し、コレステロールは沈殿する。崩壊せずに残存したミセル中のコレステロール量を酵素法にて測定した。少ない添加量でコレステロールの濃度の低下が起きるほど、ペプチドのミセル崩壊活性が高い。

3.3 実験結果及び考察

3.3.1 胆汁酸結合を評価した 90 個のペプチドの特徴

胆汁酸の高結合のペプチドの明確な特徴を把握するため、結合活性を評価した 90 個のペプチドについて (Table 2-8、Table 2-9)、特定のアミノ酸残基の有無について検討した。具体的には、R (アルギニン) または K (リジン) (塩基性アミノ酸) の有無、アスパラギン酸 (D) またはグルタミン酸 (E) (酸性アミノ酸) の有無、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。その際の、各グループに含まれるペプチドの個数とそれらの平均の蛍光強度値を (Table 3-2) に示す。まず初めに、任意の位置に R または K を含むペプチドの個数を数えた。90 個のうち、4 残基は 40 個、6 残基は 53 個の R または K を含むペプチドが存在し、平均蛍光強度値はそれぞれ 29.0×10^3 と 8.7×10^3 であった。さらに、R または K を含まないペプチドの平均強度値と比較して、4 残基は 3.4 倍、6 残基は 2.4 倍と高く、有意差も認められた。同様に、任意の位置に D または E を含むペプチドは、4 残基、6 残基共に、平均蛍光強度値が有意に低く、それぞれ 7.1×10^3 および 3.6×10^3 であった。また、I、L または V の分岐鎖アミノ酸を含むペプチドについては、それらを含まないペプチドとの間で蛍光強度値に差は認められなかった。K と R を含むペプチドは、他のアミノ酸を含むものよりも著しく高い胆汁酸結合活性を持っていることが明らかとなった。胆汁酸は主に胆汁に含まれるステロイド酸の総称で、数種の胆汁酸が実際に体内で合成分泌されている。遊離胆汁酸の pKa は 5 から 6 の範囲であることから[36,37]、塩基性アミノ酸である K および R 含むペプチドと静電的に結合する可能性が考えられる。

3.3.2 4 残基・500 個のランダムペプチド及び 6 残基・500 個のランダムペプチドの C 末端を K および R に変換したペプチドの主成分分析

第 2 章で、4 残基・500 個のランダムペプチド及び 6 残基・500 個のランダムペ

チドの主成分分析解析により、これらのペプチドは PC スコアプロット図上で広く分散していることを確認した (Fig. 2-6、Fig. 2-7)。

K と R を含むペプチドが、胆汁酸に対する高い結合能力があるかを判断するため、4 残基・500 個のランダムペプチドと 6 残基の 500 個のランダムペプチドの C 末端を K 及び R に変換したペプチドの PC スコアプロット図を新たに作製した。4 残基・500 個のランダムペプチドのスコアプロット図を Fig. 3-2 (A) に、C 末端を K に変換したペプチドの PC スコアプロット図を Fig. 3-2 (B) に、C 末端を R に変換したペプチドの PC スコアプロット図を Fig. 3-2 (C) に示す。また、6 残基・500 個のランダムペプチドのスコアプロット図を Fig. 3-3 (A) に、C 末端を K に変換したペプチドの PC スコアプロット図を Fig. 3-3 (B) に、C 末端を R に変換したペプチドの PC スコアプロット図を Fig. 3-3 (C) に示す。PC スコアプロット図上に示した「高結合ルール」領域にあるペプチドの数は、C 末端を K 及び R に変換したペプチドで著しく増加した。変換前の 4 残基・500 個と 6 残基・500 個のランダムペプチドでは、「高結合ルール」領域にプロットされたペプチドは、それぞれ 89 個と 94 個であった (Fig. 3-2 (A)、Fig. 3-3 (A))。4 残基で C 末端を K に変換したペプチドでは 164 個、R に変換したペプチドでは 309 個と著しく増加し、R に変換したペプチドでは半数以上が、「高結合ルール」領域にプロットされた。(Fig. 3-2 (B)、Fig. 3-2 (C))。6 残基で C 末端を K に変換したペプチドでは 169 個、R に変換したペプチドでは 250 個と、4 残基の場合と同様の結果が得られた (Fig. 3-3 (B)、Fig. 3-3 (C))。これらの結果から、K および R を含むペプチドは胆汁酸に対する結合活性の高いペプチドであると考えられた。

K および R の位置による胆汁酸に対する結合活性の差異を確認した。結合活性を評価した 90 個のペプチドについて (Table 2-8、Table 2-9)、C 末端が K または R であるペプチド、C 末端以外に K または R を有するペプチドの蛍光強度値を再計算した。4 残基では、C 末端が K または R を有するペプチドが 14 個、C 末端以外に K ま

たは R を有するペプチドが 26 個あり、蛍光強度値の平均はそれぞれ、33608 及び 26500 であった。6 残基では、C 末端が K または R であるペプチドが 16 個、C 末端以外に K または R を有するペプチドが 37 個あり、蛍光強度値の平均はそれぞれ、11823 及び 7435 であった。つまり、4 残基、6 残基共に、C 末端以外に K または R を有するペプチドより、C 末端が K または R であるペプチドの方が結合活性が高かった。また、6 残基には、末端が K または R であるペプチドと C 末端以外に K または R を有するペプチドとの間に統計的な有意差はあったが、4 残基には統計的な有意差はなかった。

3.3.3 トリプシン分解により生成が想定される短鎖ペプチド

セリンプロテアーゼであるトリプシンは、K および R の C 末端側のペプチド結合を加水分解する。したがって、生成されるペプチドは、少なくとも 1 つの K または R 残基を有する。タンパク質として食品由来を考え、6 つの乳タンパク質と米グルテリンを選択した。これらのタンパク質のアミノ酸配列から、トリプシンによって加水分解されると予想される短鎖ペプチドに着目し、4 残基、5 残基、6 残基のペプチドを合成した。6 つの乳タンパク質と米グルテリンのアミノ酸情報を **Table 3-1** に、合成した 44 個のペプチド（乳タンパク質由来のペプチド 22 個、米グルテリン由来のペプチド 22 個）を **Table 3-3** に示した。トリプシン加水分解ペプチドは、C 末端に K または R が含まれるため、これらのペプチドは胆汁酸への結合活性が有り、また、ミセル崩壊活性を示すことが期待できる。

3.3.4 トリプシン加水分解された短鎖ペプチドの胆汁酸ミセル崩壊活性

これらのペプチドの腸内での機能を確認するため、*in vitro* での胆汁酸ミセル崩壊活性について検討した。各ペプチドを、2、4、6、8 および 10 mg/ml となる様に添加し、添加量によるミセル溶液中のコレステロール濃度の変化を測定した (**Fig. 3-4**、**Fig. 3-5**)。VAWWMY (**Fig. 3-4-X**、**Fig. 3-5-X**) 及びカゼイン酸加水分解物 (**Fig. 3-4-Y**、**Fig. 3-5-Y**) はそれぞれポジティブコントロール及びネガティブコントロールとして使用

した。乳タンパク質由来の短鎖ペプチドのほとんどにミセル崩壊活性があり (Fig. 3-4)、特に CEVFR (Cys-Glu-Val-Phe-Arg) は、4 mg / mL の添加でコレステロール濃度はゼロとなり、非常に高いミセル崩壊活性を示した (Fig. 3-4-K)。一方、6 残基ペプチドの VNELSK (Val-Asn-Glu-Leu-Ser-Lys) (Fig. 3-4-N)、ITVDDK (Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys) (Fig. 3-4-O) 及び LTEEEK (Leu-Thr-Glu-Glu-Glu-Lys) (Fig. 3-4-P) は活性の無いことが示された。

グルテリン由来の短鎖ペプチドも同様に、ほとんどすべてのペプチドに胆汁酸ミセル崩壊活性が認められた (Fig. 3-5)。NGLK (Asn-Gly-Leu-Lys) (Fig. 3-5-F) 及び NSVFR (Asn-Ser-Val-Phe-Arg) (Fig. 3-5-R) は、CEVFR と同等の高いミセル崩壊活性を示した。

ペプチド添加時のミセル溶液のコレステロール濃度の 50%減少値 (DC₅₀) を測定した結果を Table 3-4 に示す。以下の 9 個のペプチド、EQAR (Glu-Gln-Ala-Arg) (Fig. 3-5-E)、EVVR (Glu-Val-Val-Arg) (Fig. 3-4-C)、LNSQK (Leu-Asn-Ser-Gln-Lys) (Fig. 3-5-O)、EAMAPK (Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys) (Fig. 3-4-R)、GLDIQK (Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys) (Fig. 3-4-U)、IPAVFK (Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys) (Fig. 3-4-V)、ITVDDK (Fig. 3-4-O)、LTEEEK (Fig. 3-4-P) および VNELSK (Fig. 3-4-N) 以外の 35 個のペプチドで、添加量 10 mg 未満で、ミセル溶液のコレステロール濃度が半分以下となり (Table 3-4、Fig. 3-4 及び Fig. 3-5)、K または R を含む短鎖ペプチドは、胆汁酸ミセル崩壊活性を有していたことが明らかとなった。胆汁酸の有する負電荷と塩基性アミノ酸 (K および R) の有する正電荷との間の静電的相互作用がミセル崩壊に影響を与えたと推測できた。

DC₅₀ が 5 mg / mL 以下のペプチドがミセル崩壊活性が高いとすると、4 残基は 4 個、5 残基は 6 個、6 残基は 1 個の活性が高いペプチドが存在した。次に、4 残基の 13 個、5 残基の 19 個、6 残基の 12 個のペプチドについて、DC₅₀ の平均値と SD 値を求めた。4 残基で 7.0 mg ± 2.6 mg、5 残基で 5.9 mg ± 2.5 mg、6 残基で 12.7 mg ± 6.8 mg

となり、4 残基と 5 残基の DC_{50} の平均値は、6 残基よりも優位に低かった。6 残基は 4 残基、5 残基よりわずかに長いため、K または R による静電的相互作用が、長くなったことにより減衰したためと考えられた。

そこで、K および R を除き、他のどのアミノ酸が崩壊活性に影響を与えているかについて検討した。**Fig. 3-6** に示すとおり、ペプチドに F (フェニルアラニン) および Y (チロシン) が含まれると、比較的高いミセル崩壊活性を示すことが分かった。多くの研究者が、CH- π 相互作用や OH- π 相互作用など、芳香族アミノ酸と様々な化学物質間のスタッキングおよび T 型相互作用を報告している[38,39]。Nishio らは、芳香環がコレステロールの炭素環とのスタッキングにより、CH- π 相互作用の可能性について述べている[39]。コレステロールへの結合に対する芳香環の効果的な作用として、タンパク質-コレステロール相互作用が特徴として挙げられる。胆汁酸はコレステロールから合成されるため、胆汁酸にもコレステロールと同様のステロイド骨格がある。したがって、F または Y の有するベンゼン環と胆汁酸のステロイド核との相互作用がミセルの崩壊に影響を与えた可能性が考えられる。

Table 3-2 と同様に、結合活性を評価した 90 個のペプチドについて (**Table 2-8**、**Table 2-9**)、胆汁酸への結合に対する F または Y の芳香族アミノ酸の影響について検討した。4 残基は、F または Y を含むペプチドは 34 個で、それらの蛍光強度値は $21.2 \pm 30.2 \times 10^3$ で、F または Y を含まない 56 個のペプチドの蛍光強度値は $15.3 \pm 16.3 \times 10^3$ であった。同様に 6 残基は、F または Y を含むペプチドは 33 個で、それらの蛍光強度値は $9.5 \pm 8.4 \times 10^3$ 、F および Y を含まない 57 個のペプチドの蛍光強度値は $4.9 \pm 4.2 \times 10^3$ であった。4 残基、6 残基共に 2 つのグループ間で蛍光強度値に有意差はなく、芳香族アミノ酸を有するペプチドによる胆汁酸ミセル崩壊作用は、塩基性アミノ酸を有するペプチドによる静電的相互作用による胆汁酸ミセル崩壊作用ほど強い影響を与えていないことが明らかとなった。他方、非常に興味深いことに、Banno ら[40] は最近、芳香族アミノ酸であるジペプチド、FP (フェニルアラニン-プロリン) をコ

レステロール吸収阻害ジペプチドとして報告した。ジペプチドというより短いペプチドでは、芳香環はより効果的であるのかもしれない。

以上より、胆汁酸の負電荷と、**K** および **R** に由来するペプチドの正電荷との静電相互作用が、胆汁酸ミセルの崩壊に最も効果的であると考えられた。また、**F** または **Y** のベンゼン環が、**CH- π** 相互作用により胆汁酸のステロイド骨格と相互作用して、胆汁酸ミセルの形成を妨げる可能性が考えられた。

Table 3-2 アミノ酸の有無により分類分けしたペプチドの蛍光強度値とペプチドの数

ペプチドの分類	4残基			6残基		
	蛍光強度値		ペプチド の数	蛍光強度値		ペプチド の数
	平均	標準偏差		平均	標準偏差	
90個の全てのペプチド	19.4×10^3	15.4×10^3	90	5.9×10^3	4.6×10^3	90
RまたはKを有するペプチド	$29.0 \times 10^{3*}$	29.4×10^3	40	$8.7 \times 10^{3*}$	7.4×10^3	53
それ以外	$8.4 \times 10^{3*}$	6.9×10^3	50	$3.6 \times 10^{3*}$	2.7×10^3	37
DまたはEを有するペプチド	$7.1 \times 10^{3*}$	5.6×10^3	38	$3.6 \times 10^{3*}$	3.0×10^3	42
それ以外	$25.1 \times 10^{3*}$	27.0×10^3	52	$9.2 \times 10^{3*}$	7.4×10^3	48
I、LまたはVを有するペプチド	18.8×10^3	18.7×10^3	38	6.5×10^3	5.6×10^3	49
それ以外	16.6×10^3	25.2×10^3	52	6.7×10^3	7.3×10^3	41

*: P value < 0.005

2.3.4 で評価した、4 残基・500 個のランダムペプチドライブラリー及び 6 残基・500 個のランダムペプチドライブラリーから選択した各 90 個のペプチド (Table 2-8、Table 2-9) について、アミノ酸の有無で蛍光強度値を再評価した。

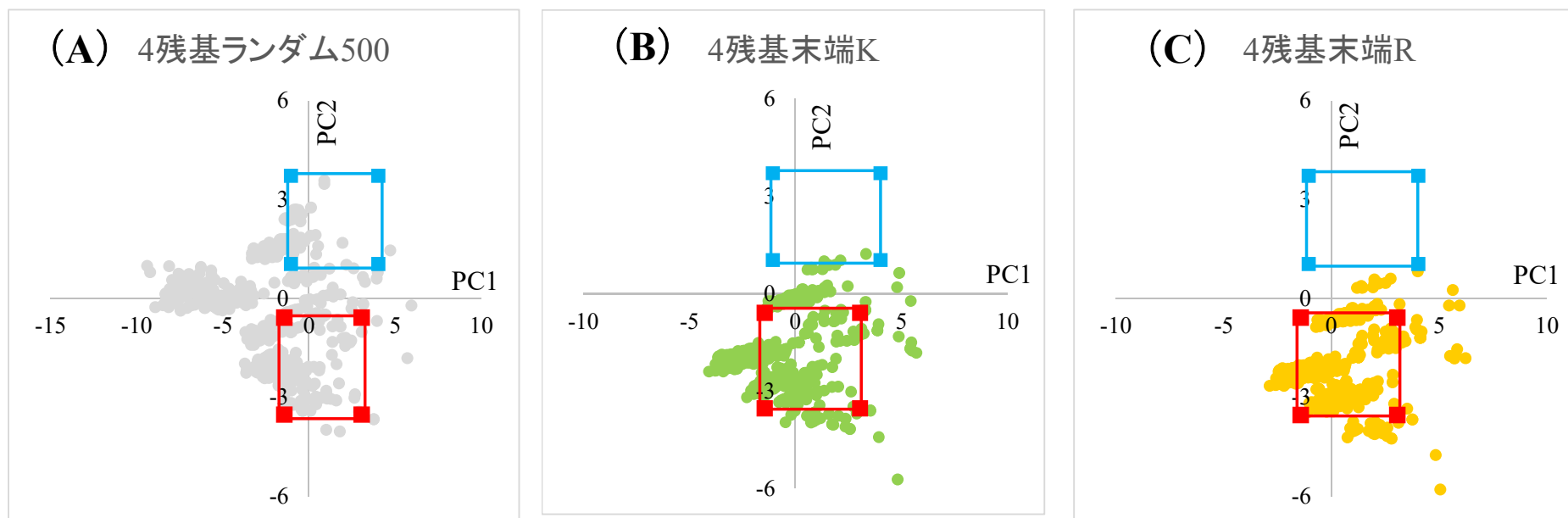


Fig. 3-2 4残基ランダムペプチドのPCスコアプロット

4残基・500個のランダムペプチドを、Run No.2を用いて主成分分析を実行した際のPCスコアプロット図に、PC1が-1.43から3.06、PC2が-3.53から-0.58の「高結合ルール」を赤色の実線で、PC1が-1.05~4.03、PC2が1.04~3.72の「低結合ルール」を水色の実線で示した。

(A) 基準となる4残基・500個のランダムペプチドのPCスコアプロット

(B) 4残基・500個のランダムペプチドのC末端をKに変換したペプチドのPCスコアプロット

(C) 4残基・500個のランダムペプチドのC末端をRに変換したペプチドのPCスコアプロット

赤色の実線で囲った高結合の領域にプロットされたペプチド数は、基準となる4残基・500個のペプチドは89個であった。C末端をKに変換したペプチドでは164個に増加し、C末端をRに変換したペプチドでは309個と著しく増加し、半数以上となった。

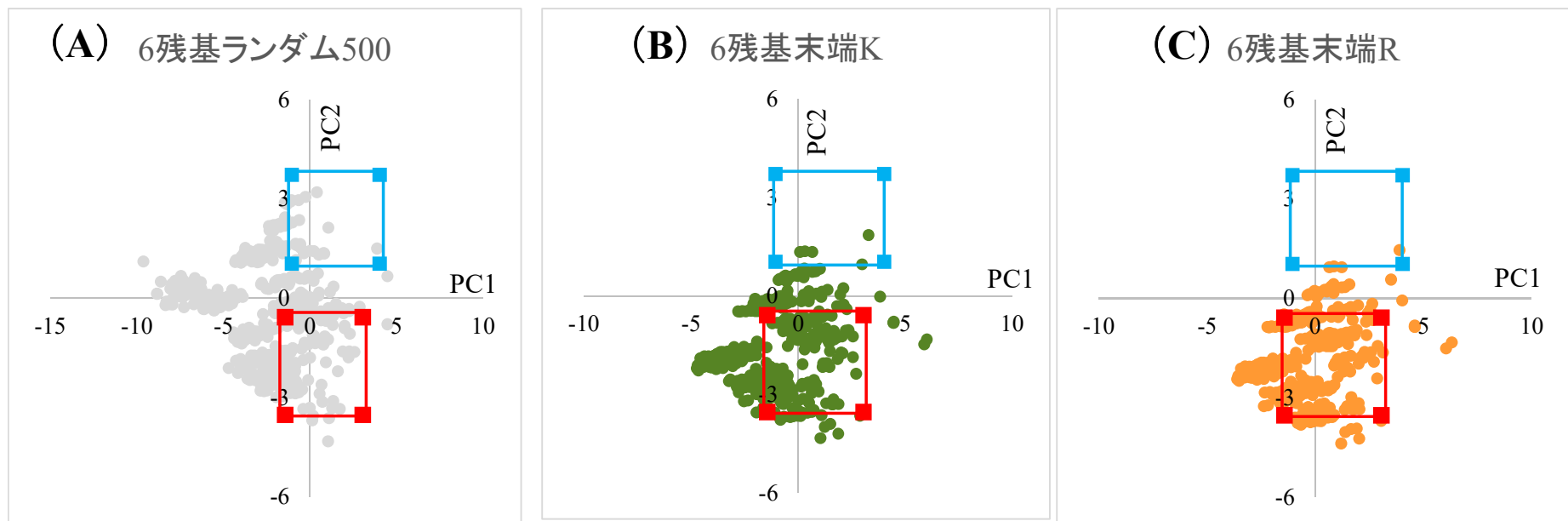


Fig. 3-3 6残基ランダムペプチドのPCスコアプロット

6残基・500個のランダムペプチドを、Run No.2を用いて主成分文s系を実行した際のPCスコアプロット図に、PC1が-1.43から3.06、PC2が-3.53から-0.58の「高結合ルール」を赤色の実線で、PC1が-1.05~4.03、PC2が1.04~3.72の「低結合ルール」を水色の実線で示した。

(A) 基準となる6残基・500個のランダムペプチドのPCスコアプロット

(B) 6残基・500個のランダムペプチドのC末端をKに変換したペプチドのPCスコアプロット

(C) 6残基・500個のランダムペプチドのC末端をRに変換したペプチドのPCスコアプロット

赤色の実線で囲った高結合の領域にプロットされたペプチド数は、基準となる4残基・500個のペプチドは94個であった。C末端をKに変換したペプチドでは169個に増加し、C末端をRに変換したペプチドでは250個と増加し、半数となった。

Table 3-3 合成した食品タンパク質由来の 44 種のペプチド

(a) 乳タンパク質 (22 種/22 個)

4残基	種類	5残基	種類	6残基	種類
HIQK	α S1カゼイン	LHSMK	α S1カゼイン	TTMPLW	α S1カゼイン
HPIK	α S1カゼイン	LNFLK	α S2カゼイン	VNELSK	α S1カゼイン
EVVR	α S2カゼイン	FFSDK	κ -カゼイン	ITVDDK	α S2カゼイン
HYQK	α S2カゼイン	CEVFR	α -ラクトアルブミン	LTEEEK	α S2カゼイン
ISQR	α S2カゼイン	IIAEK	β -ラクトグロブリン	VIPYVR	α S2カゼイン
NQDK	κ -カゼイン			EAMAPK	β -カゼイン
ILDK	α -ラクトアルブミン			EMPFK	β -カゼイン
				ALCSEK	α -ラクトアルブミン
				GLDIQK	β -ラクトグロブリン
				IPAVFK	β -ラクトグロブリン

(b) グルテリン (22 種/43 個)

4残基	グルテリン タイプ	5残基	グルテリン タイプ	6残基	グルテリン タイプ
GSPR	A1,A2,A3	MATIK	A3	NPQAYR	A1,A2
YEAR	A3	QGSFR	B1,B2	QQTSSR	B1
DNSK	A3	QGGFR	B4		
NGLK	B4	VIEPR	A1,A2,A3		
EQAR	B1,B2,B4	DEHQK	A1,A2,A3,B1,B2,B4		
EEAR	A3	IHQFR	B1,B2,B4		
		EVEER	A1		
		GEIVR	A1,A2,A3		
		GEIIR	B4		
		LNSQK	B4		
		SSIFR	A1,A2		
		NSVFR	B1,B2		
		NSIFR	A3,B4		
		EEAQR	A1,A2		

6つの乳タンパク質と米グルテリンのアミノ酸配列から推定された、トリプシンの加水分解により生成が予想される、4残基、5残基、6残基のペプチドを示す。6つの乳タンパク質から22種類、米グルテリンの6つのタイプから22種類のペプチドの生成が想定された。これら44個のペプチドを合成して、胆汁酸ミセル崩壊活性試験に供した。

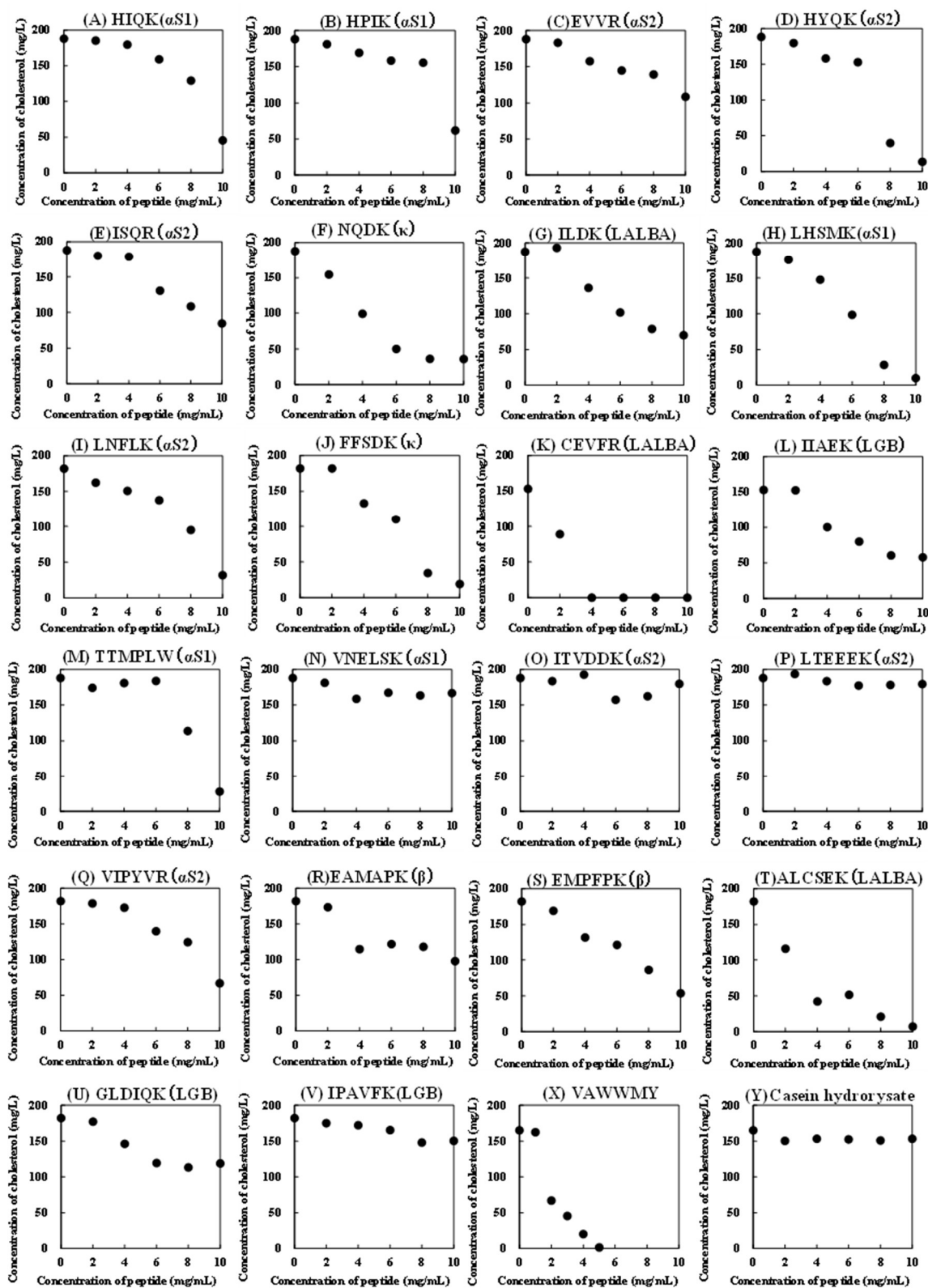


Fig. 3-4 乳タンパク質由来ペプチドによる胆汁酸ミセル崩壊活性

各ペプチド添加時のミセル溶液中のコレステロール濃度を示す。22個のペプチドの19個に活性が認められ、CEVFR (Cys-Glu-Val-Phe-Arg) (Fig. 3-4-K) は、4 mg/mL の添加でコレステロール濃度はゼロとなり、非常に高い活性を示した。

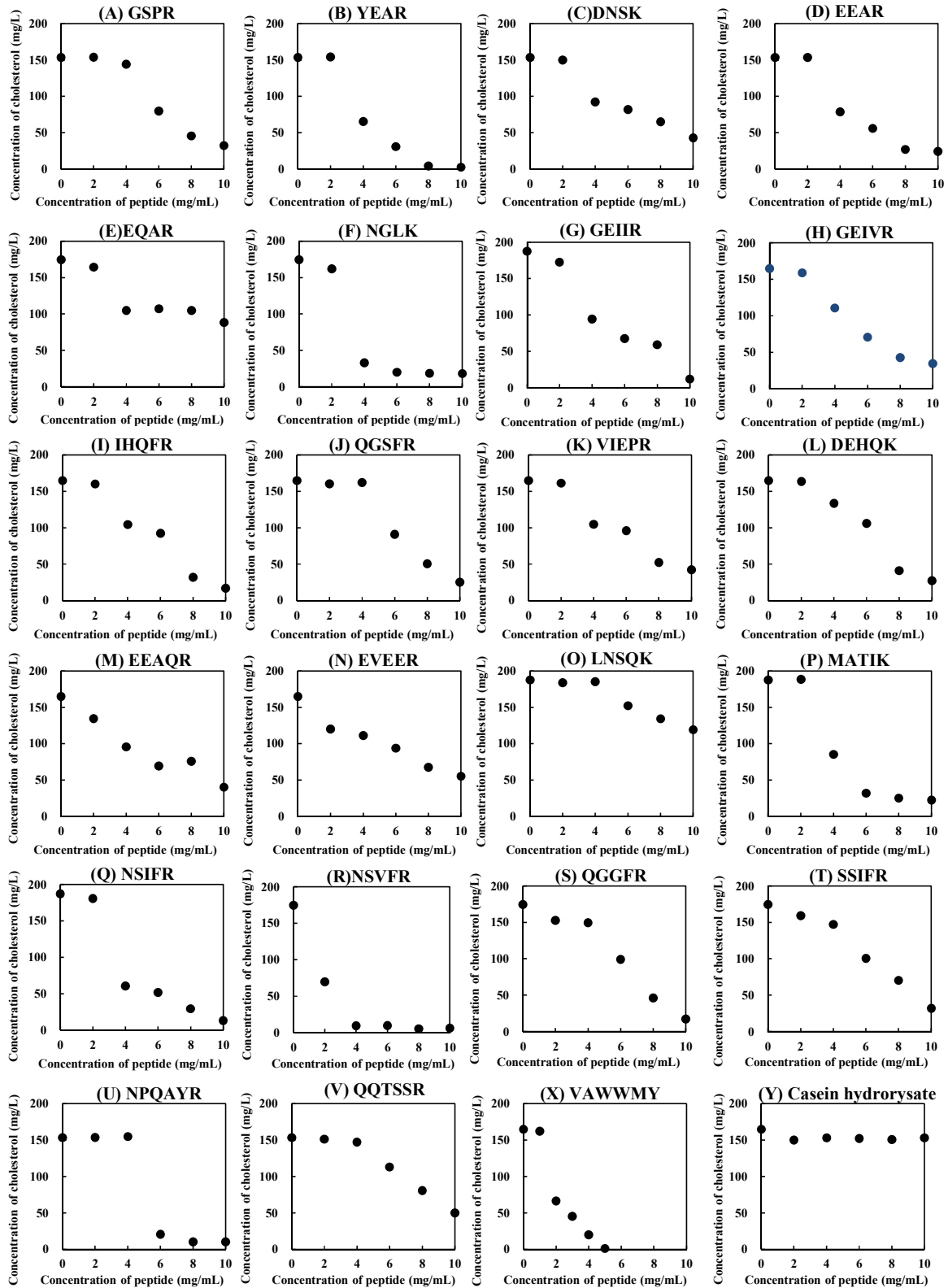


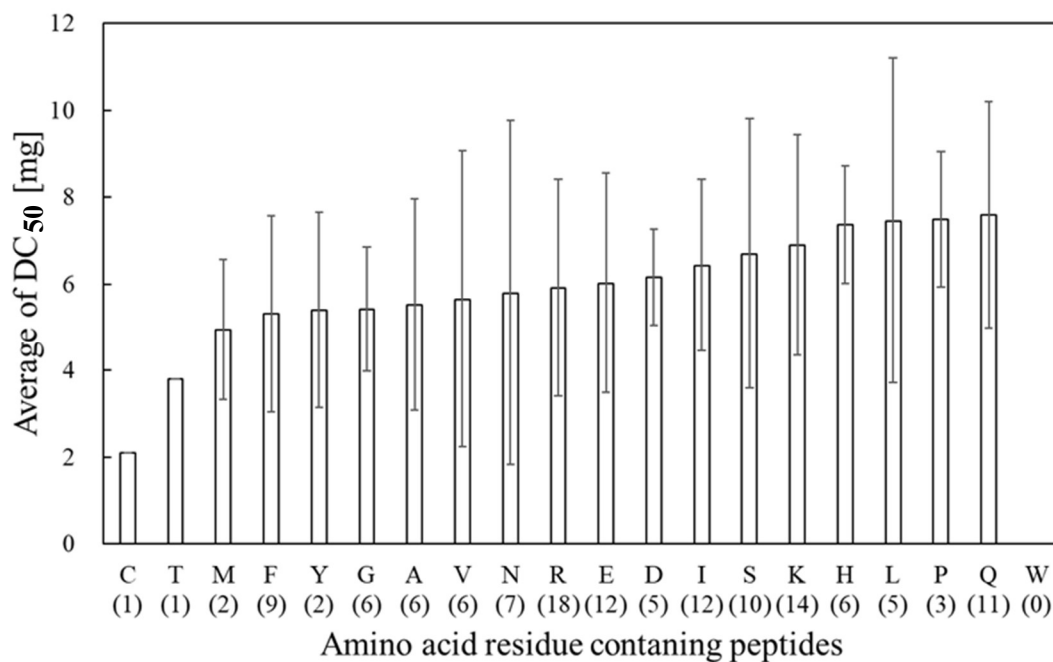
Fig. 3-5 米グルテリン由来ペプチドによる胆汁酸ミセル崩壊活性

各ペプチド添加時のミセル溶液中のコレステロール濃度を示す。22個のペプチド全てに胆汁酸ミセル崩壊活性が認められ、NGLK (Asn-Gly-Leu-Lys) (**Fig. 3-5-F**)、NSVFR (Asn-Ser-Val-Phe-Arg) (**Fig. 3-5-R**) は、高いミセル崩壊活性を示した。

Table 3-4 各ペプチド添加時のミセル崩壊活性の50%減少値 (DC₅₀)

4-mer			5-mer			6-mer		
Peptide	DC50 [mg]	Type	Peptide	DC50 [mg]	Type	Peptide	DC50 [mg]	Type
NGLK	3.2	R	NSVFR	1.7	R	ALCSEK	2.7	L
YEAR	3.8	R	CEVFR	2.1	L	NPQAYR	5.1	R
EEAR	4.1	R	NSIFR	3.5	R	EMPFPK	7.7	L
NQDK	4.2	L	MATIK	3.8	R	QQTSSR	8.3	R
GSPR	6.6	R	GEIR	4.1	R	TTMPLW	8.4	L
ILDK	6.7	L	EEAQR	5.0	R	VIPYVR	9.2	L
DNSK	6.7	R	GEIVR	5.7	R	EAMAPK	10.7	L
HYQK	7.0	L	LHSMK	6.1	L	GLDIQK	>20	L
HIQK	8.8	L	IIAEK	6.3	L	IPAVFK	>20	L
ISQR	9.2	L	IHQFR	6.3	R	ITVDDK	>20	L
HPIK	9.3	L	QGSFR	6.4	R	LTEEEK	>20	L
EQAR	10.1	R	FFSDK	6.5	L	VNELSK	>20	L
EVVR	10.9	L	QGGFR	6.5	R			
			VIEPR	6.6	R	VAWWMY	1.9	—
			DEHQK	6.7	R	Casein		
			EVEER	6.9	R	Hydrolysate	>20	—
			SSIFR	6.9	R			
			LNFLK	7.9	L			
			LNSQK	13.4	R			

R は米グルテリン由来のペプチド、L は乳タンパク質由来のペプチドを示す。



*カッコ内の数字は、そのアミノ酸を含むペプチド数を示す。

Fig. 3-6 ミセル溶液のコレステロール濃度の50%減少値 (DC₅₀)

ペプチド添加時のミセル溶液のコレステロール濃度の50%減少値 (DC₅₀) の平均を、ペプチドの構成するアミノ酸を指標として比較した。

3.4 結言

胆汁酸の結合活性を評価した 90 個のペプチドを、ペプチドに含まれるアミノ酸に着目して胆汁酸に対する結合活性を評価した。4 残基ペプチドと 6 残基ペプチド共に、K または R を含むペプチドの平均蛍光強度値は、K または R を含まないペプチドよりも有意に高いことが明らかになった (Table 3-1)。K または R を含むペプチドの生産方法として、トリプシンによるタンパク質の加水分解を考えた。食品由来タンパク質から、トリプシン分解により生成が想定されるペプチドを合成し、新たに評価するペプチドとして準備した。乳タンパク質と米グルテリンから、トリプシン分解により生成が想定される、4 残基、5 残基、6 残基の計 44 個のペプチドについて、胆汁酸ミセル崩壊活性を測定した。6 残基の 3 つのペプチドを除く 41 個のペプチドにミセル崩壊活性が認められた。これは、胆汁酸の有する負の荷電と、K または R の有する正の荷電の静電的相互作用により、胆汁酸とペプチドがより結合しやすくなり、ミセル崩壊活性につながったことが想定された。つまり、今までに明らかとなっている疎水性の高いペプチドだけでなく、正電荷を持つペプチドも、胆汁酸と静電的相互作用によりミセル崩壊を促し、コレステロールの低減作用を示す可能性を示唆できた。

今回、食品由来タンパク質からトリプシンを用いることで、目的とする性質を確実に有する生理活性ペプチドを生産できること、さらにそれらのペプチドが予想通りの生理活性を有することを明らかにできた。この方法は、ペプチドの簡便な製造方法として画期的な成果である。

また、K、R を含むこれらのペプチドは、胆汁酸ミセルを崩壊し、腸でのコレステロール吸収を抑制する。食事から十分なエネルギーが得られれば、タンパク質、多糖類、核酸、脂質化合物など、あらゆる生体成分を簡単に合成できる。従って、十分なタンパク質性の食事が摂取されている場合、コレステロールの吸収は必要ではない可能性があり、また、トリプシンが K または R でペプチドを作成する生理学的意義が推測される。

第 4 章

結論と今後の展望

本論文では、経口摂取によって生活習慣病の改善が期待できる生理活性ペプチド、なかでもコレステロールの吸収抑制効果が期待できる胆汁酸結合ペプチドを効率よく探索する方法について述べた。さらに、胆汁酸高結合ペプチドのアミノ酸の特徴を把握することで、食品由来タンパク質からの簡易な製造方法と、食品由来胆汁酸高結合ペプチドの 93% に胆汁酸ミセル崩壊活性があり、それらはコレステロールの吸収抑制効果が期待できることを述べた。

第 1 章の序論では、本研究の目的と課題を述べた。

第 2 章では、4 残基・512 個の基本ペプチドを用いた小規模ペプチドライブラリー法を用いた胆汁酸高結合ペプチドの探索について述べた。4 残基・512 個の基本ペプチドの物理化学的特徴量を使用した主成分分析と 4 残基・512 個のペプチドのターゲットとの活性評価により、PC スコアプロット図上に胆汁酸に高結合するペプチドが集中する領域を特定することができた。ランダムペプチドライブラリーの PC スコアプロット図上にこの領域を適用することで、胆汁酸に高結合するペプチドを新規に見出すことができた。

第 3 章では、2 章で新たに発見した胆汁酸高結合ペプチドを構成するアミノ酸の特徴から、胆汁酸高結合ペプチドの食品由来タンパク質からの製造と胆汁酸ミセル崩壊

活性評価について述べた。新規なペプチドの特徴として、塩基性アミノ酸 (R、K) を有するペプチドが、胆汁酸高結合であることが明らかとなった。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、食品タンパク質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た。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。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。

第一世代の遺伝子組換え作物開発は、除草剤耐性、病害虫耐性、貯蔵性増大などの形質を導入して、作物の生産性を上げる技術の導入であったのに対し、第二世代の遺伝子組換え作物は、有用タンパク質の増産や、栄養素の増大などをターゲットとした開発となっている。日本においては、経口免疫寛容によるスギ花粉症を低減するコメや鉄分を蓄積するコメなどが開発されている[41,42]。スギ花粉症を低減するコメは、花粉アレルゲン（抗原タンパク質）のアミノ酸配列を改変したタンパク質が発現される。つまり、日本において、コメの遺伝子に有用タンパク質の遺伝子を導入し、有用タンパク質を多量に生産・種子（コメ）に蓄積させる技術は確立されている。

したがって、この技術を利用し、本研究で新たに見出した食物由来タンパク質の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。本研究で検討した 22 個のグルテリン由来のペプチドは、全てに胆汁酸ミセル崩壊活性が認められた。また、乳タンパク質においては、6 つの乳タンパク質のうち、ラクトアルブミン由来のペプチド 3 個 (ILDK、CEVFR、ALESEK) 全てに胆汁酸ミセル崩壊活性が認められた。特に CEVFR は VAWWMY (大豆グリシニン由来のコレステロール吸収抑制効果の認められたペプチド) と同等の高い活性が認められた。したが

って、グルテリンの繰り返し遺伝子配列またはラクトアルブミンの遺伝子配列を、コメの貯蔵タンパク質であるグルテリン遺伝子に導入することで、コメにこれらのタンパク質が蓄積された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可能となる。このコメを、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、コレステロールの低減が期待でき、患者の生活習慣病の改善に貢献できるものとする。

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を大量に生産できることになる。このミックスペプチド素材は、小腸コレステロール吸収阻害剤としての医薬品原料としての使用が想定できる。現在、胆汁酸を結合してコレステロール吸収抑制効果を示す医薬品は、イオン交換樹脂であるコレステラミンしかない。樹脂そのものが薬であることから、陰イオン性物質である胆汁酸の吸着力が非常に高く、胆汁酸の吸着には非常に効果の高い薬剤と考えられる。その反面、必要な陰イオン性物質までも吸着し、摂取すべき栄養分の吸収の遅延・抑制が生じたり、腹痛などの副作用が出る症例がある。それに対し、食品由来のペプチドは安全性が高い。したがって、このミックスペプチド素材の利用により、胆汁酸吸着性能がコレステラミンより穏やかで、かつ、生体に安全な、樹脂を使用しない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のが期待できる。

この様に、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。

参考文献

1. Graham, R.B.: CHAPTER 37 - Lipids and disorders of lipoprotein metabolism, *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition)*, 702-736 (2014).
2. Borja, C. R., Vahouny, G. V., and Treadwell, C. R.: Role of bile and pancreatic juice in cholesterol absorption and esterification, *Physiol. Rep.*, **206**, 223-228 (1964).
3. Ståhlberg, M., Jalovaara, P., Laitinen, S., Mokka, R., Hentilä, R., Järvensivu, P., and Kairaluoma, M.: Adsorption of bile acids by sucralfate, antacids, and cholestyramine in vitro, *Clin Ther.*, **9**, 615-621 (1987).
4. Nagaoka, S., Nakamura, A., Shibata, H., and Kanamaru, Y.: Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1738–1741 (2010).
5. Choi, S.-K., Adachi, M., and Utsumi, S.: Identification of the bile acid-binding region in the soy glycinin A1aB1b subunit, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2395–2401 (2002).
6. Choi, S.-K., Adachi, M., and Utsumi, S.: Improved bile acid-binding ability of soybean glycinin Ala polypeptide by the introduction of a bile acid-binding peptide (VAWWMY), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1980–1983 (2004).
7. Sánchez, A., and Vázquez, A.: Bioactive peptides: A review, *Food Qual. Saf.*, **1**, 29-46 (2017).
8. Hayes, J. R., Callaghan, S., and Grant, A. P. : Effect of glibenclamide treatment on the insulin and glucagon-responses to oral glucose and galactose in maturity onset diabetics, *Diabetes & Metabolism*, **5**, 207-211 (1979).
9. Lee, H. J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H., and Young, W. S.: Oxytocin: The great facilitator of life, *Progress in Neurobiology*, **88**, 127-151 (2009).
10. Wang, Y., Huang, Q., Kong, D., and Xu, P. : Production and functionality of food-derived bioactive peptide. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **18**, 1524-1535 (2018).

11. Osawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjo, M., Takano, T., and Shimizu, M.: Producibility and digestibility of antihypertensive β casein tripeptides, Val-ProPro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract : Analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion. *Agric. Food. Chem.*, **56**, 854-858 (2008).
12. Meisei, H. : Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins, *Curr.Med.Chem.*, **12**, 1905-1919 (2005).
13. Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., and Kuwata, Y. : Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**,11–17 (2001).
14. Smith, GP. : Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, **228**, 1315-1317 (1985).
15. Kondo, A., and Ueda, M. : Yeast cell-surface display - applications of molecular display, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 28-40 (2004).
16. Matheakis, L.C., Bhatt, R.R., and Dower, W.J.: An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9022-9026 (1994).
17. Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., and Yanagawa, H.: In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro, *FEBS Lett.*, **414**, 405-408 (1997).
18. Richard, W. R., and JACK, W. S.: RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12297-12302 (1997).
19. Kato, R., Kunimatsu, M., Fujimoto, S., Kobayashi, T., and Honda, H.: Angiotensin II inhibitory peptide found in the receptor sequence using peptide array, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 22–29 (2004).
20. Ochiai, T., Sugita, T., Kato, R., Okochi, M., and Honda, H. : Screening of α -amylase inhibitor peptide by photolinked-peptide array, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 819–824 (2012).

21. Sugita, T., Katayama, M., Okochi, M., Ichihara, T., Kato, R., and Honda, H.: Screening of peptide ligands that bind to the Fc region of IgG using peptide array and its application to affinity purification of antibody, *Biochem. Eng. J.*, **79**, 33–40 (2013).
22. Kume, A., Okochi, M., Shimizu, K., Yoshida, Y., and Honda, H.: Development of a Tactical Screening Method to Investigate the Characteristics of Functional Peptides: *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **21**, 119-127 (2016)..
23. 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)..
24. Kato, R., Okuno, Y., Kaga, C., Kunimatsu, M., Kobayashi, T., and Honda, H.: Pentamer peptide from Fas antigen ligand inhibits tumor-growth with solid-bound form found by peptide array, *J. Pep. Res.*, **66** (Suppl 1), 146-153 (2006).
25. Kaga, C., Okochi, M., Nakanishi, M., Hayashi, H., Kato, R., and Honda, H.: Screening of a novel octamer peptide, CNSCWSKD, that induces caspase-dependent cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 1063–1068 (2007).
26. Kanie, K., Narita, Y., Owaki, J., Zhao, Y., Kuwabara, F., Satake, M., Honda, S., Kaneko, H., Yoshioka, T., Okochi, M., Honda, H., and Kato, R. : Collagen Type IV-Specific Tripeptides for Selective Adhesion of Endothelial and Smooth Muscle Cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 1808–1816. (2012)..
27. Kume, A., Kawai, S., Kato, R., Iwata, S., Shimizu, K., and Honda, H.: Exploring of high binding octamer peptides based on principal component analysis of tetramer peptides, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 230–238 (2017).
28. Altmann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P. N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., and Graziano, M.P.: Niemann–Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption, *Science*, **303**, 1201–1204 (2004).
29. Zimmerman, J. M., Eliezer, N., and Simha, R.: The characterization of amino acid sequences in protein by statistical methods, *J. Theoret. Biol.*, **21**, 170–201 (1968).

30. Takano, K., and Yutani, K.: A new scale for side-chain contribution to protein stability based on the empirical stability analysis of mutant proteins, *Protein Eng.*, **14**, 525–528 (2001).
31. Kyte, J., and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.*, **157**, 105–132 (1982).
32. Black, S. D., and Mould D. R.: Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications, *Anal. Biochem.*, **193**, 72-82 (1991).
33. Zamyatnin, A. A.: Protein volume in solution, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **24**, 107-123 (1972).
34. 長岡 利, 加藤竜司, 大河内美奈, 本多裕之 : ペプチドアレイによる大豆たん白質由来胆汁酸結合ペプチドの網羅解析および VAWWMY の効率的な高機能化, *大豆たんぱく質研究*, **13**, 90-95 (2010).
35. Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., and Yamamoto, K.: Soyprotein peptic hydrolyzate with bound phospholipids decrease micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells, *J Nutr*, **129**, 1725-1730 (1999).
36. Donna, J. C., James, A. H., and Donald, M. S.: The ionization behavior of bile acids in different aqueous environments, *J. Lipid Res.*, **27**, 334-343 (1986).
37. Cantafora, A., Biase, D., Angelico, M., and Alvaro, D.: Study of biologically relevant physical-chemical properties of bile salts by reverse-phase liquid chromatography, *Chromatographia.*, **24**, 277-281 (1987).
38. Riccardo, C., Francesco, L., Gervasio, P. P., and Vincenzo, S.: Stacking and T-shape Competition in Aromatic–Aromatic Amino Acid Interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6133-6143 (2002).
39. Nishio, M., Umezawa, Y., Jacques, F., Manfred, S. W., and Pinak, C.: CH–PAI hydrogen bonds in biological macromolecules. *Chem. Phys.*, **16**, 12648-12683 (2014).
40. Banno, A., Wang, J., Okada, K., Mori, R., Mijiti, M., and Nagaoka, S.: Identification of a novel cholesterol-lowering dipeptide, phenylalanine-proline (FP), and its down-regulation

of intestinal ABCA1 in hypercholesterolemic rats and Caco-2 cells, *Sci. Rep.*, **9**, 19416-19427 (2019).

41. Takagi, H., Hiroi, T., Yang, L., Tada, Y., Yuki, Y., Takamura, K., Ishimitsu, R., Kawauchi, H., Kiyono, H., and Takaiwa, F., : A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 17525–17530 (2005)
42. Qu, L. Q., Yoshihara, T., Ooyama, A., Goto, F., and Takaiwa, F.,: Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds, *Planta*, **222**, 225–233 (2005).

本博士論文に関する発表論文

1. **Masako Ito**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Searching for high-binding peptides to bile acid for inhibition of intestinal cholesterol absorption using principal component analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 127, No. 3, pp. 366-371 (2019)
2. **Masako Ito**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Bile acid micelle disruption activity of short-chain peptides from tryptic hydrolysate of edible proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 130, No. 5, pp. 514-519 (2020)

学会発表

国際学会 1 回、国内学会 2 回

1. **Masako Ito**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Design of bile acid binding peptides for inhibition of intestinal cholesterol absorption using Principal Component Analysis, The 10th International Peptide Symposium, December 3-7, Kyoto, Japan (2018)
2. **伊藤雅子**、清水一憲、本多裕之：トリプシン加水分解で生じる単鎖ペプチドのコレステロールミセル崩壊活性、日本農芸化学会 2020 年度大会、3 月 17 日-3 月 22 日、福岡、日本 (2020)
3. **伊藤雅子**、清水一憲、本多裕之：胆汁酸ミセル崩壊活性を有する短鎖機能性ペプチド、日本生物工学会西日本支部大会 2020、11 月 14 日、岡山、日本 (2020)

謝辞

本研究の推進、ならびに本論文の執筆を進めるにあたり、終始、懇切なるご指導をしてくださいました名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻の本多 裕之教授、清水 一憲 准教授に厚く御礼申し上げます。またご多忙な中副査を担当していただきました工学研究科 生命分子工学専攻の清中 茂樹 教授、名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用生命科学専攻の柴田 貴広 教授に厚く御礼申し上げます。

本多先生には、研究の立案、実験の組み方、論文の書き方などの基本的な技術だけでなく、研究に真摯に取り組むことの大事さと自分なりの発想を持つことの大事さを教えていただきました。また、論文の記述に際し、時間をかけて何回も何回も丁寧にご指導下さいました。厚く御礼申し上げます。教えていただいたことは、今後の研究に生かしていきます。

研究室のペプチドチームのメンバーである小崎 一功博士、岩田 晋明さん、今井 健人さん、田添 佳歩さん、山下 春来さん、游 盛兆さん、梁 韵姿さん、池田 彩さん、高 紫維さん、鈴木 健弘さん、森 陽子さん、吉岡 慶太郎さん、金丸 佳樹さん、木下 怜実さん、羽川 瞳には、実験技術を丁寧に教えていただきました。また、ミーティングを通じて有意義なディスカッションをしていただきました。感謝申し上げます。デバイスチームの皆様（新井 小百合博士、費 佳慧さん、前川 忠儀さん、山岡 奈央さん、長島 拓則さん、大隅 早紀さん、吉川 真広さん、古谷 太樹さん、葛西 晴郎さん、中村 健人さん、村田 朱里さん、有本 加奈絵さん、山本 一貴さん）にも、研究についてご指導いただきました。感謝申し上げます。

最後に、学生生活と社会人としての生活を日々支えてくれた両親に、心より感謝申し上げます。本当にありがとうございました。また、あいち産業科学技術総合センター産業技術センターの森川 豊博士には、職場での仕事を調整下さり、学業に専念できる環境を整えて下さいました。さらに、大学の研究に対して、時間をかけて丁寧に

アドバイスして下さるなど、終始、支え、見守り下さいました。厚く御礼申し上げます。

2021年1月 伊藤 雅子