

## ペプチド装置の開発で進む有用ペプチドの機能解明

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 佐藤健司

食品タンパク質の酵素分解物の経口摂取により、血圧低下、食後の高脂血の改善等の有益な作用が報告されている。これらは医薬品と同様に活性分子と生体の相互作用によると考えられる。しかし、食品タンパク質の酵素分解物中には非常に多くの種類のペプチドが存在する。またほとんどのペプチドは消化・吸収の過程でアミノ酸に分解される。そのため、従来から行われてきた試験管内でのアッセイに基づき活性成分を同定することは非常に困難である。一方、経口摂取によるアッセイで活性成分を同定するためには、かなりの量のペプチドを分画する必要がある。しかし、ペプチドを有害な試薬を用いずに大量に分画することはかなり困難であった。

我々はこの問題を解決するため、ここのペプチドの等電点の差に注目し、ペプチド自身を両性担体として用いる等電点電気泳動法が有効であることを示し、これを **Autofocusing** と呼んでいる。動物実験のため最大 50 L までのサンプルが分画可能なバッチ型 **Autofocusing** 装置の開発に成功し、この装置を用いて **in vivo** のアッセイのみで鮫軟骨由来の尿酸低下ペプチド、グルテン由来の肝炎抑制ペプチドの同定に成功している。これらの結果に基づき、**in vivo** の評価に基づく、**in vivo activity-guided fractionation** を機能性ペプチドの同定法として提案している。

さらの連続分画が可能な **Autofocusing** 装置の開発にも成功し、食品加工への応用の可能性をしめしている。

食品成分の摂取により従来の栄養的な価値を超えた健康増進作用が示唆されている。

高血圧の緩和、メタボリックシンドロームの改善、高尿酸血症の緩和、皮膚・関節の状態改善、メンタル面の改善...

特に食品タンパク質の酵素分解物であるペプチドは、

- ヒトへの応用は粗分画物なら容易
- 非常に複雑な多数の成分が存在
- ペプチド等は生体中でさらに分解する可能性が高く、*vitro*と*vivo*の評価が一致しない可能性が高い。
- Vivo*では混合物が評価に使われ、生体への移行がほとんど不明であり、活性成分は、ほとんど不明。

### 食品は基本的に食経験があるものを対象

ヒトでの評価のハードルが比較的低い

活性成分の同定が非常に困難

複雑な構造の成分でも利用可能

化学反応による活性の改変は困難

消化・吸収過程での変化が大きく、それを把握しにくい

そのため *In vitro* high throughput screening  
→ *Animal experiment* → *Human trial* といった従来の発想では *vitro* で活性があった成分が *Human trial* で活性がなければ、すべての努力が無駄になる可能性がある。

そこで、機能性食品の開発、特にペプチド性の機能性食品のために、*Vivo* での評価に基づく活性成分の同定 → *In vitro* の実験でのメカニズム解明のアプローチを提案する。

## 提案

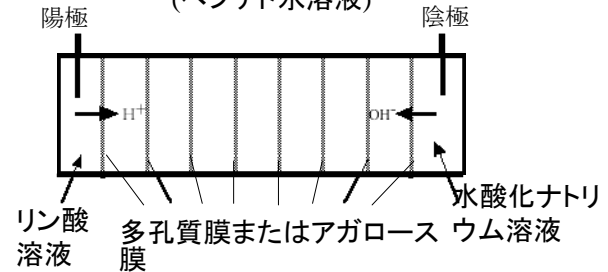
- 大量分画によるvivoで活性成分の同定
  - 標的組織に移行した活性成分の同定
- 上記の手法により決定した活性成分を用いてメカニズムの解明

### 1. 大量分画によるvivoで活性成分の同定

微量のペプチドの分画は可能、しかし、vivoでの評価が可能な量のペプチドを毒性の無い試薬をもちいて、低価格で分画することは困難

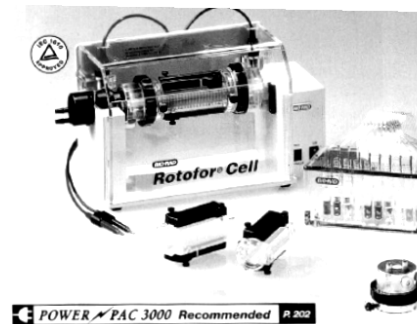
一つの解決として水を溶媒とする大容量 Ampholyte-Free 等電点電気泳動法 (Autofocusing) を紹介する。

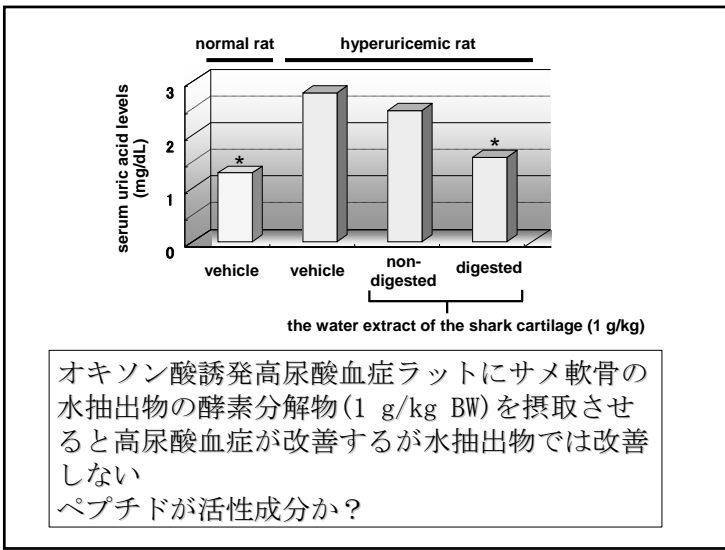
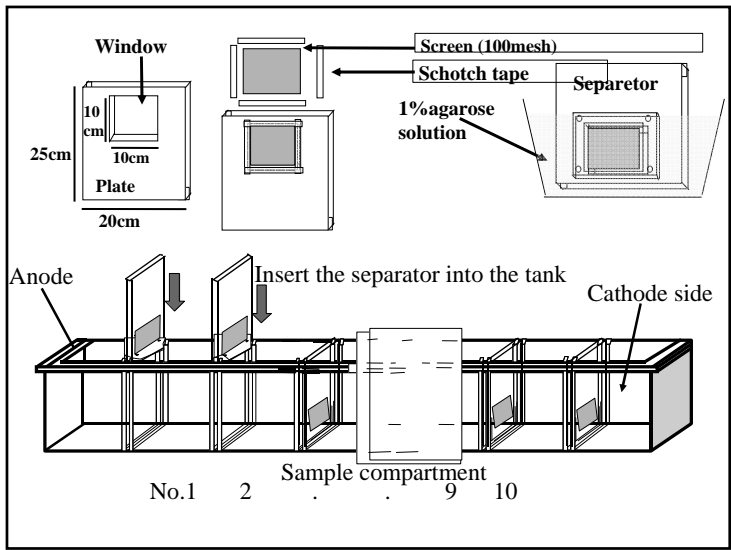
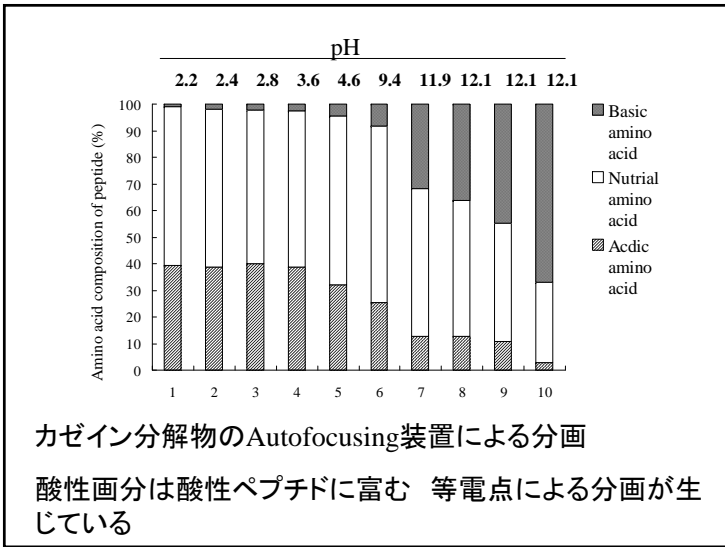
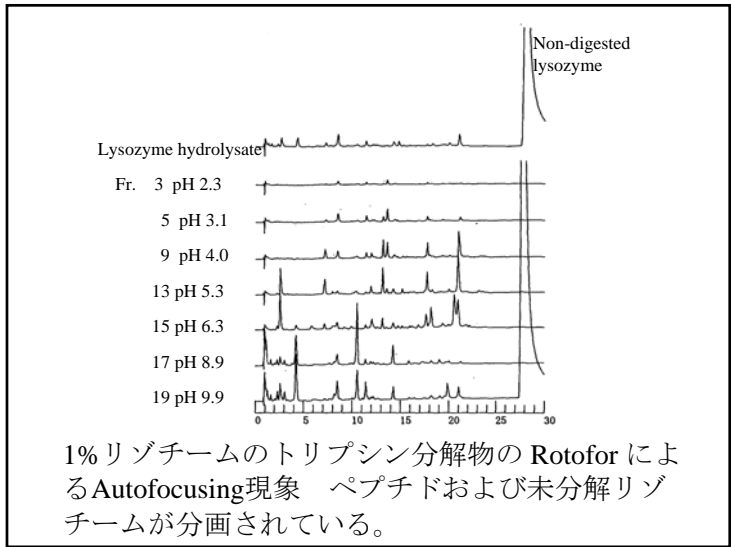
### サンプルコンパートメント (ペプチド水溶液)



Autofocusingの原理 化学合成アンフォアリンを加えることなくサンプルペプチドが両性担体として自らの等電点に移動

市販調製用等電点電気泳動装置 Rotofor (50 mL sample cell; Bio-Rad)を用いてペプチドの Autofocusing現象を確認

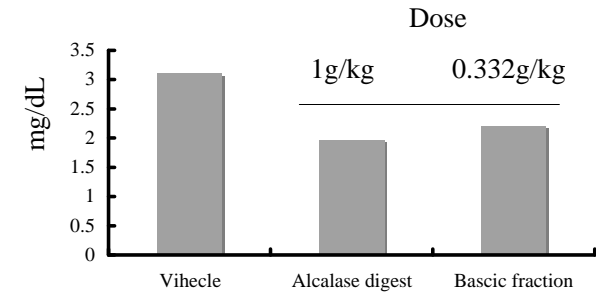




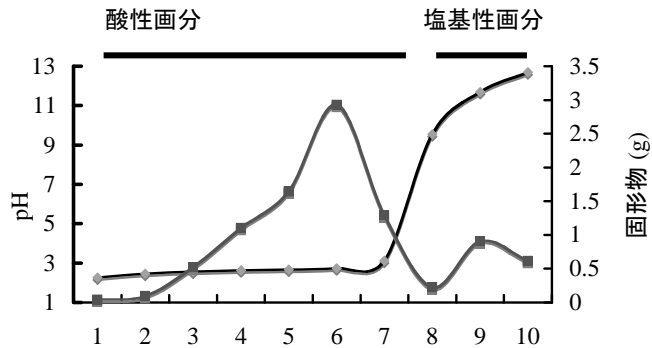
### 可能性のあるメカニズム

- 尿中への尿酸排出促進(-)
- 食事中のプリン体の吸収阻害(-)
- 尿酸合成酵素(キサンチンオキシダーゼ)の阻害 (in vitroでは-)

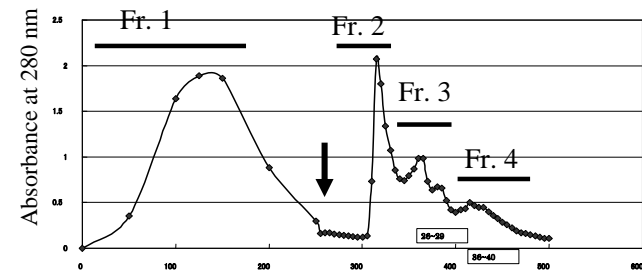
メカニズムが不明 In vitro  
のアッセイができない



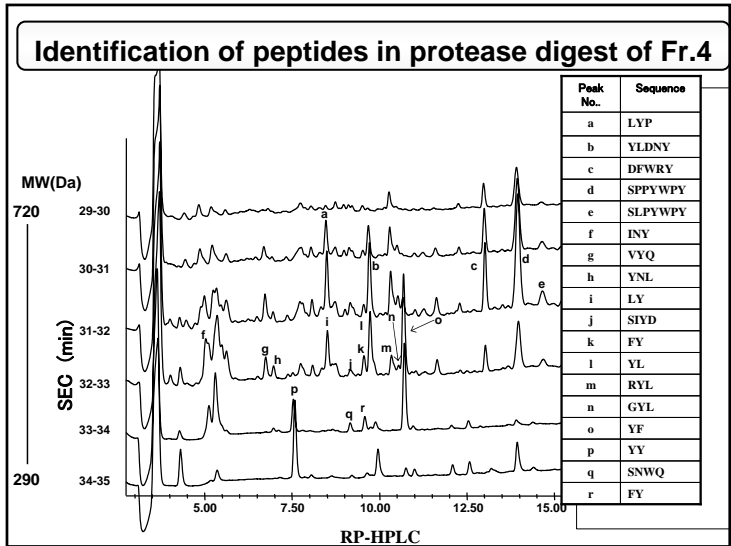
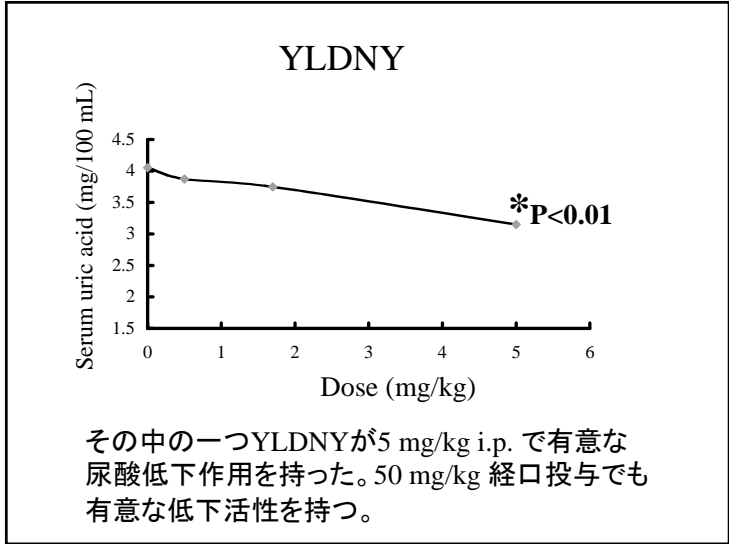
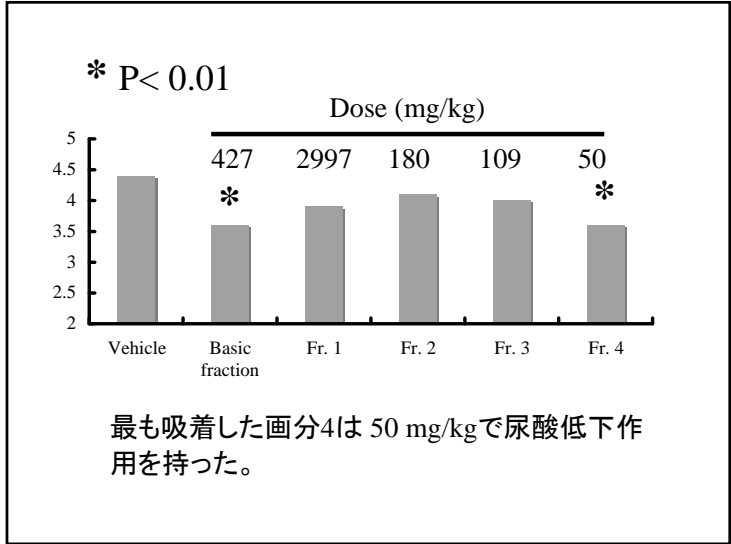
各画分を酵素分解し、動物に投与  
塩基性画分は少量で尿酸低下作用を持つ



Autofocusing (5 L)によるサメ軟骨の水抽出物の分画



塩基性画分のみ分取用逆相クロマトグラフィーによる分画  
矢印からアセトニトリルの濃度勾配開始



従来の in vitro のスクリーニングに基づくアプローチではこのペプチドの同定は不可能

Vivoでの評価に基づく分画により活性ペプチドの同定とそのメカニズムが解明できた

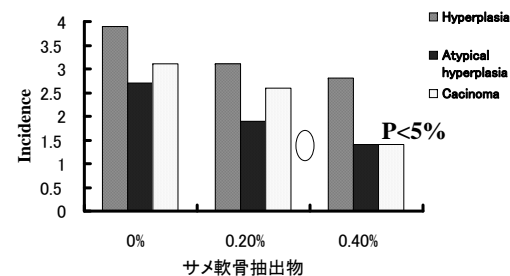
現在、vivoでの評価を基に活性ペプチドの同定を行っている

## 鮫軟骨の摂取によるがんの進行抑制

鮫軟骨中に血管新生を抑制し、MMPを抑制する物質が含まれる これは事実。

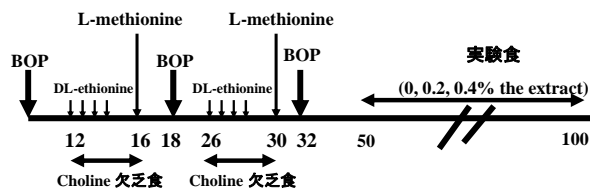
ただし、これは経口摂取での効果とは関係がない。

しかし、一方で鮫軟骨の経口摂取によるがんの進行抑制が期待されている。しかし、アカデミアではほとんど信じられていない。



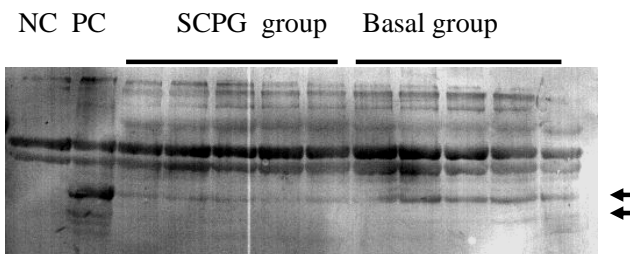
サメ軟骨水抽出物 (SCPG) の経口投与によるがん進行抑制

発がん処理後のがんの進行が、抑制された

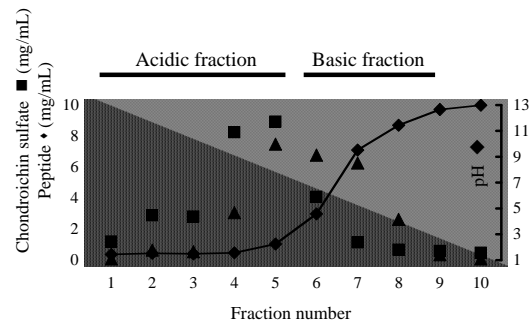


ハムスターを用いた化学誘発膀胱がんモデル

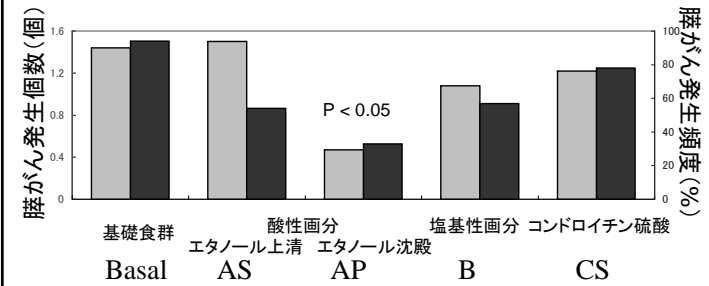
BOP; *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine



担がんハムスターの血清のMMP-9阻害活性  
SCPG投与でMMP-9 阻害活性が見かけ上上昇



Autofocusingによる鯨軟骨水抽出物の分画  
 酸性画分はコンドロイチン硫酸を含む  
 酸性画分は75%エタノールで沈殿

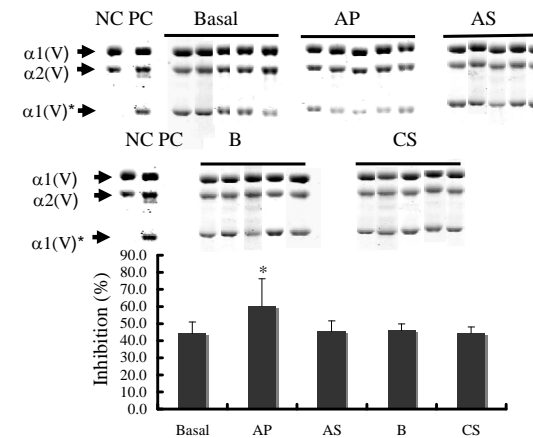


肝がんの進行抑制はAP:プロテオグリカン画分に認められた。

AP: アグリカン様タンパク質を持つプロテオグリカンと少量のコラーゲンペプチド

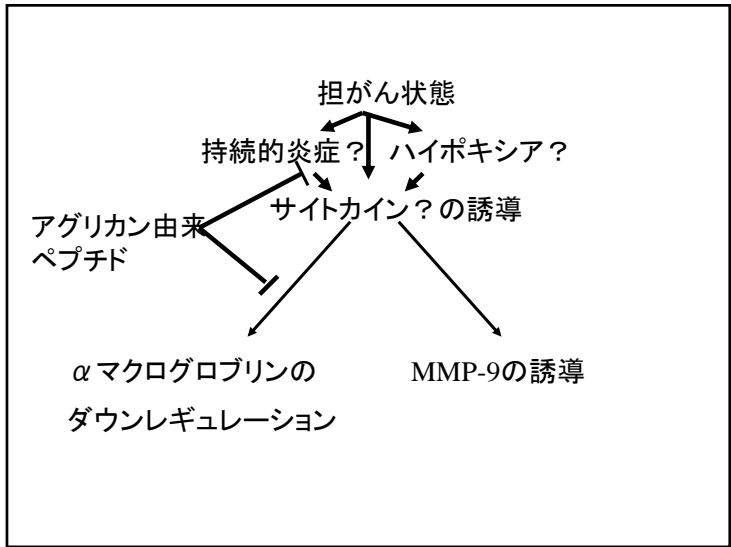
AS: 低分子コンドロイチン硫酸と酸性コラーゲンペプチド

B: 塩基性コラーゲンペプチド



血清中のMMP-9 阻害活性もAPの摂取で増加している。





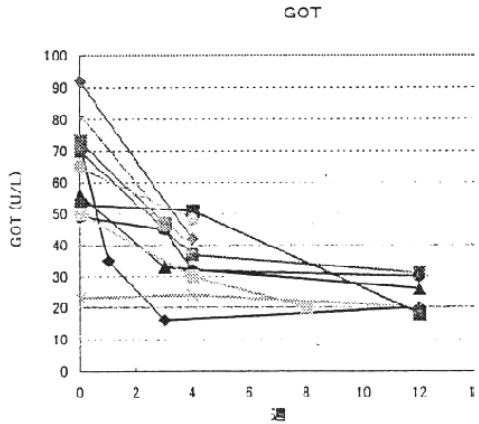
本プロジェクトは以下のエピソードから始まる

*Jpn Pharmacol Ther* (薬理と治療) vol.32 no.7 2004

Out-hospital Patients with Hyperlipidemia and Hepatitis with Various Backgrounds Improved by Wheat Protein Hydrolysate (Glutamine Peptide) Administration

Noboru Horiguchi<sup>1)</sup>, Hiroshi Horiguchi<sup>1)</sup> and Yoshio Suzuki<sup>2)</sup>

グルテン酵素分解物中の肝炎抑制ペプチドの同定



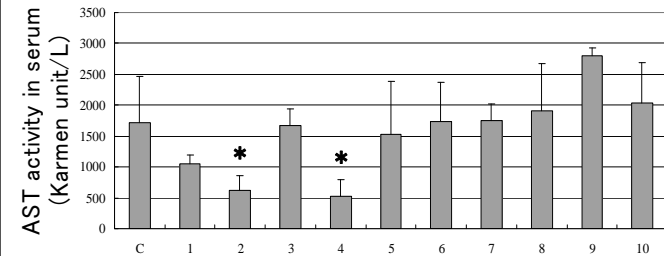
## 実験

ガラクトサミン誘発肝障害に対する保護効果

WGH中のペプチドを分画し、いずれの画分がガラクトサミン誘発肝障害を抑制するかを検討

## D-ガラクトサミン誘発肝障害モデルラットでの Autofocusing分画物投与による肝障害抑制効果

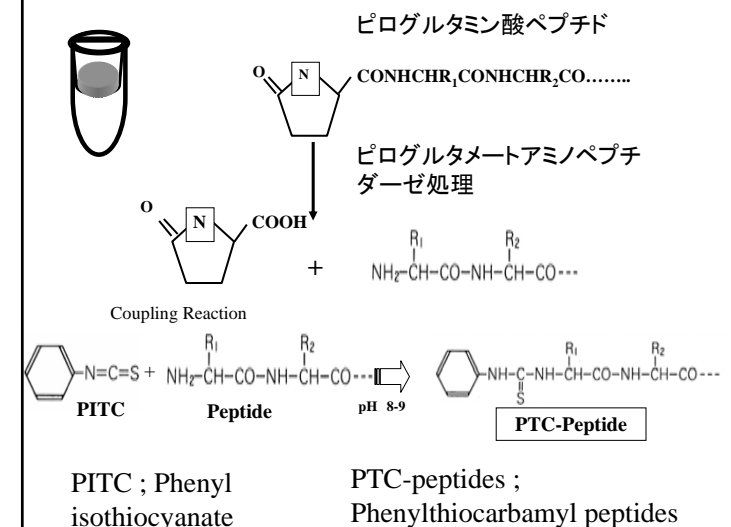
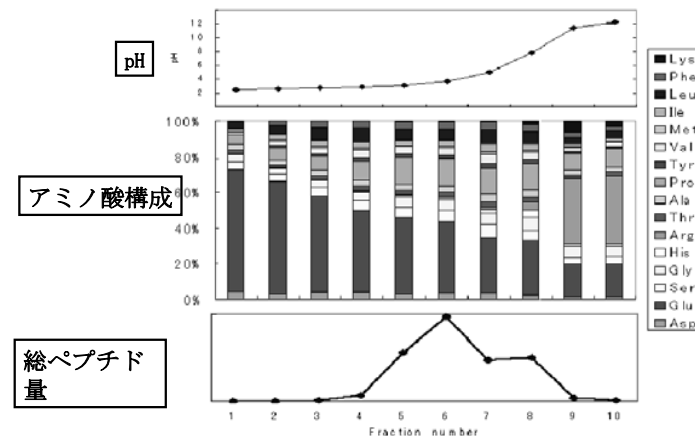
### 血清AST活性

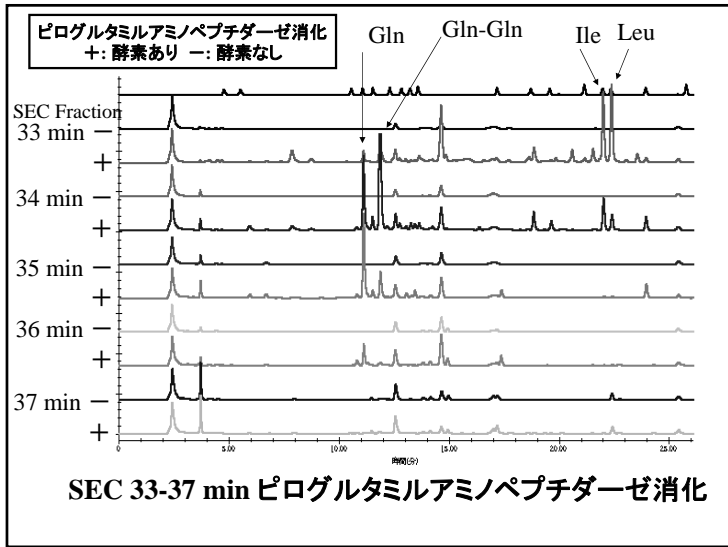


Fraction number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
投与量 (mg/kg体重)	50	8	50	100	100	100	100	100	100	100

(千葉大学園芸学部 真田先生より提供)

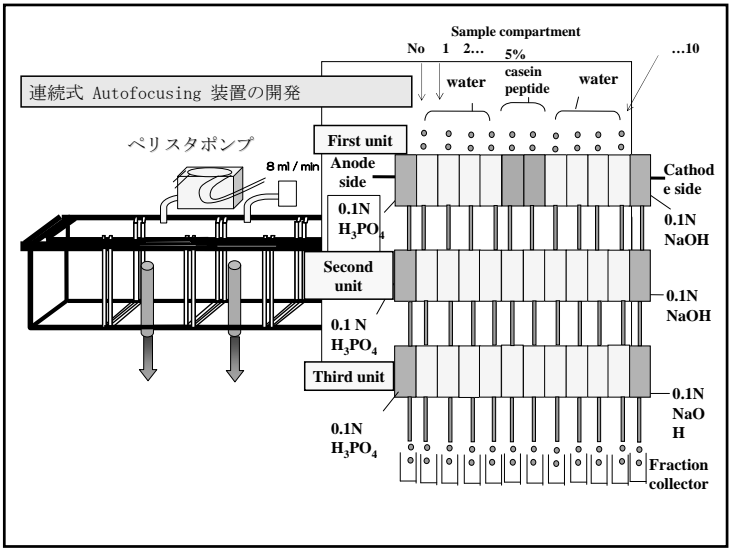
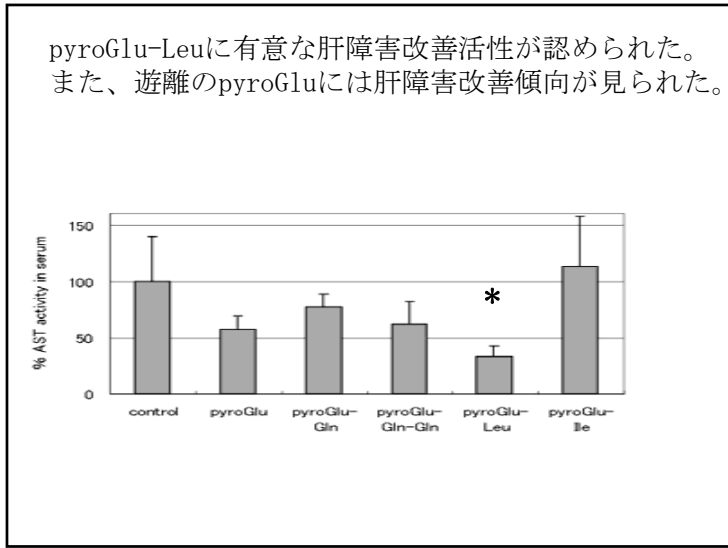
## 各FractionのpH、アミノ酸構成、総ペプチド量

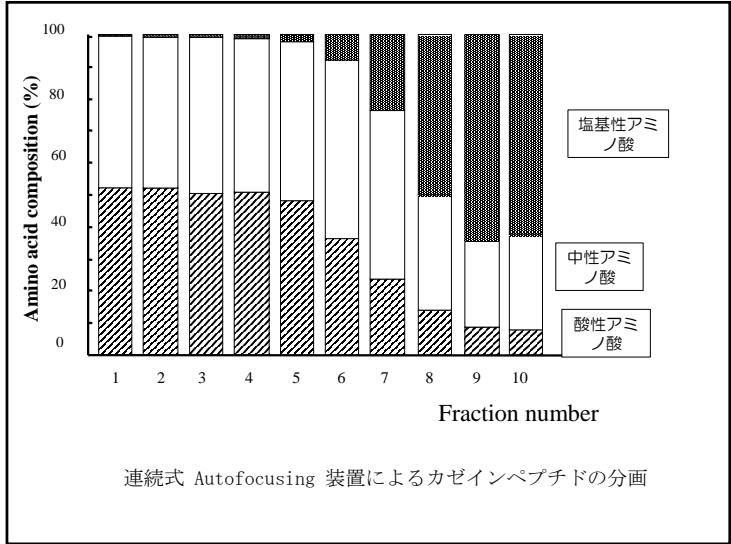




Autofocusing 装置により分画した画分の経口摂取により活性画分を同定してゆき、その中のペプチドを分離同定する。構造情報からペプチドを化学合成し、活性ペプチドを同定する Activity-guided fractionationにより消化・吸収を考えた活性ペプチドの同定が可能である。

またAutofocusing法は機能性成分の濃縮にも利用可能であると考えられる。





Autofocusingは連続分画も可能であり、  
食品加工技術としても利用可能であると  
考えている。