



ヒスチジン含有機能性ペプチドの探索, および応用研究

広島大学大学院統合生命科学研究科 Thanutchaporn Kumrungsee

はじめに

ペプチドは生体内において多様な生理機能を有しており, 自然界には機能未知のペプチドが数多く存在する. さらにその作用機序においても未解明な部分が多く, 天然由来のリソースとして貴重であるのみならず, 新たな創薬活動に対しても有用な情報を与えるものである. 筆者は新規ペプチドの探索とその生理機能の解明に焦点を当てて研究を邁進してきた.

まず初めに, 血圧低下効果を指向したペプチドの探索に着手し, 天然資源から機能性ペプチドを単離し, 構造決定を行った. 見出された Trp-His の *in silico* 解析を利用した構造活性相関を検証し,  $Ca^{2+}$ -カルモジュリン (CaM) 複合体形成を阻害する新しい分子機序を提案した. 一方, 心臓病やサルコペニアの予防効果が期待されるイミダゾールジペプチドであるカルノシンファミリーに着目し, 心臓, あるいは骨格筋特異的に同ペプチド量を増加させる食品因子の確立を行った. さらに, 動物実験に関する社会的問題を考慮し, 食品機能を非侵襲的に試験する方法を確立し, 特に腎症を予防する機能性ペプチドの探索方法としても利用可能である. 以下に詳しく研究成果を紹介する.

1. 血圧低下を指向した新規ペプチドの単離と分子機序の解明

血管内の  $Ca^{2+}$  シグナル伝達は血管収縮における主要な経路であり, 筆者は  $Ca^{2+}$  シグナリングの阻害活性を有するペプチドを探索する中で, 魚肉由来の新規機能性ペプチドである Trp-His, 大豆由来ペプチド His-Gly-Lys, および小麦胚芽由来 Trp-Val, および Trp-Ile を発見した. 特に  $Ca^{2+}$  シグナルに対して強力な阻害活性を示した Trp-His の分子メカニズムとして, 血管収縮に関与する  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) への阻害活性を示し (図1), さらに His

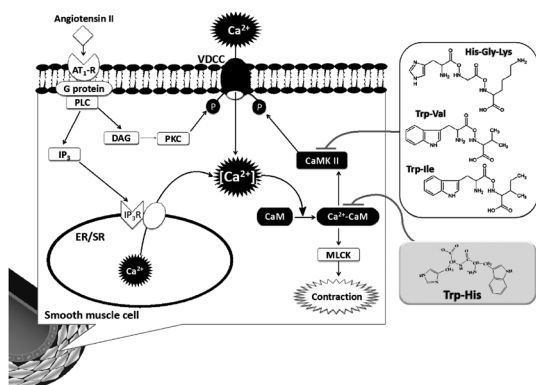


図1. Mechanisms of the peptides underlying the regulation of  $Ca^{2+}$  signaling pathways in blood vessels

由来のイミノプロトンが抑制効果に重要であることを明らかにした. Trp-His は, CaMK II 酵素タンパク質に直接結合するのではなく, 酵素の活性化因子であるカルモジュリン (CaM) に相互作用する新しいタイプの CaMKII 阻害剤であることを発見した. *in silico* 解析により, Trp-His は  $Ca^{2+}$  を模倣することで CaM に結合し, His のイミダゾール環の H+ 結合型の N 分子がペプチド-CaM 相互作用に不可欠であることを明らかにした (図2A). Trp-His が  $Ca^{2+}$ -CaM 複合体形成の阻害に基づく新しい機序を有する CaM 阻害剤であることから, CaM が発症に関与する様々な疾患をターゲットとして新規薬剤の開発への利用が期待される (図2B).

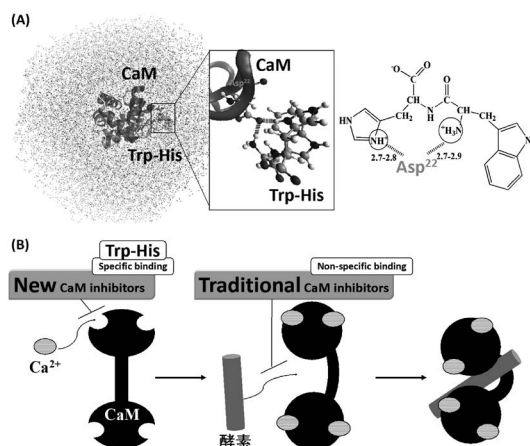


図2. *In silico* analysis demonstrating the interaction of Trp-His with CaM (A) and Trp-His as a new type of CaM inhibitor (B)

2. イミダゾールジペプチドであるカルノシンファミリーを増加させる栄養因子の確立

2-1. 心臓のイミダゾールジペプチドを増加させる栄養因子の発見

カルノシンファミリーは, 動物の骨格筋や脳に豊富に存在する His 含有ジペプチドであるが,  $\beta$ -アラニン ( $\beta$ -Ala) と His で構成されるカルノシンは, 骨格筋に存在するジペプチドであり, 抗酸化作用などの抗ストレス作用効果を有する. 骨格筋において重要な生理機能を担うと考えられており, 現在では, 機能性食品素材としても期待されている.

著者は, 古くから栄養素として研究が行われているビタミン B6 の食餌への添加により, 心臓においてカルノシンのみならず, アンセリン ( $\beta$ -Ala-1-methyl-His), およびホモカルノシン ( $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)-His) などのイミダゾールペプチド量が顕著に増加する興味深い研究成果を得た. その合成基質である  $\beta$ -Ala および GABA とともに心筋に含まれているが, 特にホ

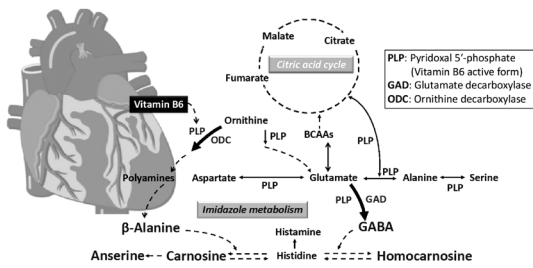


図3. Vitamin B6 supplementation increasing imidazole dipeptides of the carnosine family in heart muscle

モカルノシンの合成量の増加においては、ビタミン B6 が GABA 生成の律速酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼの補酵素として活性化に寄与することを示した。古くから栄養素として研究が行われてきたビタミン B6 が心臓のイミダゾールペプチドの恒常性を調節することを示した最初の研究結果である (図3)。この研究成果は、ビタミン B6 がイミダゾールジペプチドを調節することによって栄養機能を担う点のみならず、従来から知られているビタミン B6 摂取の心臓保護効果の分子機序の一端を示した点で極めて新規性の高いものである。さらにこの研究成果は、イミダゾールペプチド量の調節においては合成基質である  $\beta$ -Ala, あるいは GABA の供給量の上昇が極めて有効であることを示すものである。

### 2.2. 骨格筋でイミダゾールジペプチド合成を誘導するための新しい食品因子

ホモカルノシン (GABA-His) は、脳に豊富に存在するが、骨格筋では極めて含量の低いイミダゾールジペプチドである。上記研究成果を参考に、食餌への GABA の添加は骨格筋において新しいイミダゾールジペプチドとしてホモカルノシン量を増加させることを明らかにした (図4) この研究成果は、骨格筋におけるイミダゾールジペプチド量の調節しうる新しい食環境を示すだけでなく、骨格筋機能を強化する手法としても有用であると期待される。本研究内容は、ホモカルノシンの生理機能に新たに焦点を当てるものであるが、一方で、現在 GABA は人気のある食品因子として様々な食品開発へ利用されており、GABA によるイミダゾールジペプチド量の調節作用は従来の抑制性神経伝達物質として以外の新たな生理的意義が期待されるものである。

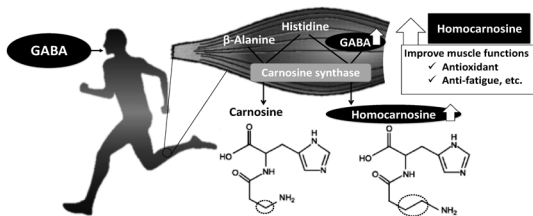


図4. Dietary GABA as a new method for inducing imidazole dipeptide synthesis in skeletal muscle

### 3. 実験動物を用いて非侵襲的に食品機能を試験する方法の確立

実験動物を研究に利用することは動物愛護の観点から大きな社会問題となっており、その動物実験数の削減を含めた 3R が提唱されている。3R の一つとして動物に対して痛みを伴わない非侵襲的な試験方法の開発が求められているが、著者は lu-

ciferase による化学発光を利用した *in vivo* imaging を機能性試験に利用することを考え、急性期タンパク質である Serum amyloid A3 遺伝子プロモーター領域に luciferase 遺伝子を連結させたキメラ遺伝子を有するトランスジェニックマウスを開発した。同マウスを利用して、アデニン食により形成される腎臓結石による腎症を化学発光により評価する新しい手法を確立した。さらに、化学発光を指標とした食品因子のスクリーニングにより、アデニン腎症を予防するポリフェノール類の探索にも成功し (図5)、今後の他疾患モデルを用いた非侵襲的な試験方法としての展開が大きく期待される。本研究成果は、慢性腎臓病の患者数の増加が社会的な問題である現在、腎新たな創薬活動にも貢献できるものと期待される。

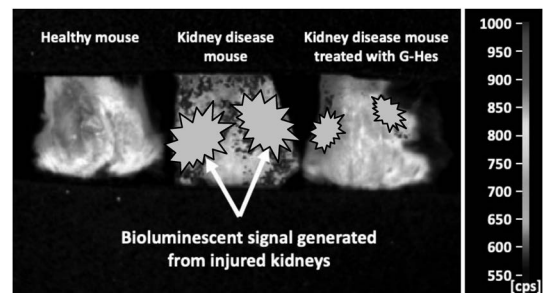


図5. A new method for visualization of kidney disease and therapy by bioactive compound (glucosyl-hesperidin (G-Hes) treatment in live animals

### おわりに

本研究では、新しいヒスチジン含有ジペプチドを発見し、それらの生理機能の解明、および新規の分子メカニズムを提案した。また本研究では、ビタミン B6 や GABA などの食品因子がイミダゾールジペプチドの代謝を調節することを示した。これら食品因子に関する新たな知見と新規性の高い解析手法 (ルシフェラーゼレポーターマウスなど) を組み合わせることで、ヒスチジンを含むジペプチドを発見するとともに、新規な生理作用の解明を目指して研究を続けていきたい。本研究は、疾病予防のための機能性食品の開発に貢献するとともに、この高齢化社会においてより健康的な生活を過ごすために役立つことを信じ、基礎と応用の両面においてさらなる研究を進めることで、農芸化学分野の発展に貢献したい。

謝辞 本研究は、広島大学大学院統合生命科学研究所の分子栄養学研究室において行われたものです。本研究に携わる機会を賜るとともに終始ご指導ご鞭撻を賜りました加藤範久先生、矢中規之先生に心より感謝申し上げます。また、九州大学農学研究院生命機能科学部門の松井利郎先生、田中充先生には学生時代から現在に至るまで温かいご指導を賜りました。両先生に深く感謝申し上げます。また、広島大学HIRAKU コンソーシアムプログラムの相田美砂子先生、鈴木榮一郎幸先生、三須敏幸先生には多大なご指導を受けましたことを心より感謝申し上げます。本研究は他にも多くの方々のご協力の下で行われました。本研究に携わった学生にも心より感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長の櫻谷英治先生ならびにご支援を賜りました中四国支部の先生方に厚く御礼申し上げます。