

# 食品タンパク質由来カチオン性ペプチドの多彩な生体防御機能

|       |                                                   |
|-------|---------------------------------------------------|
| 誌名    | 日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan |
| ISSN  | 09147314                                          |
| 著者名   | 谷口,正之                                             |
| 発行元   | 日本醸造協会                                            |
| 巻/号   | 114巻8号                                            |
| 掲載ページ | p. 470-479                                        |
| 発行年月  | 2019年8月                                           |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 食品タンパク質由来カチオン性ペプチドの多彩な生体防御機能

発酵食品には、原料タンパク質からの酵素分解ペプチドが多く含まれている。ペプチドの生理機能についての研究が着実に進められており、血圧降下作用、酵素活性抑制作用、抗酸化作用等の他にも生理機能が解明されている。穀類タンパク質由来のカチオン性ペプチドに関する著者の精力的な研究成果をわかりやすくまとめて解説していただきました。大豆発酵食品の製造にかかわる人の参考になると思います。ぜひ一読を。

谷口正之

## 1. はじめに

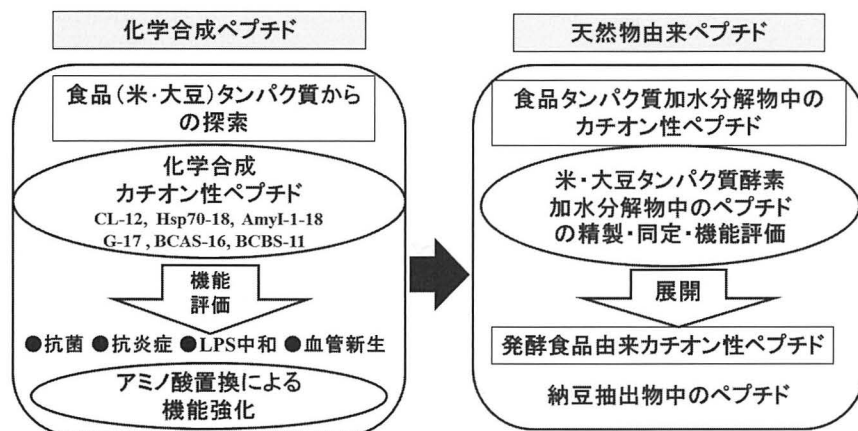
内因性のヒト抗菌ペプチドとして、唾液中の cystatin S や histatin などが報告されている。Histatin は、口内炎などに対する感染防御用の医薬品として治験が実施されている。また、LL-37,  $\beta$ -defensin, integrin などのヒトのペプチドは、抗菌作用ばかりでなく、免疫調節、抗炎症、創傷治癒（傷を早く治すこと）促進、細胞増殖促進などの多くの生体防御機能を有しており、それらの多彩な生理活性に着目した医薬品開発が進められている<sup>1,2)</sup>。最近、血管新生関連因子の遺伝子探索研究において抗菌活性や血管内皮細胞増殖促進活性を有す 30 残基のアミノ酸からなるペプチド (AG30) が発見され、その機能を強化するために改変された。この改変ペプチド (SR-0379) は皮膚潰瘍治療用の医薬品として、ベンチャー企業を含めて開発が進められている<sup>3)</sup>。さらに、カエル粘膜由来ペプチド (magainin 2)、ブタ白血球由来ペプチド (protegrin-1)、ウシ好中球由来ペプチド (indolicidin) やそれらの改変ペプチドなどについて、主に感染症の治療を目的とした治験が実施されている。

一方、食品由来の抗菌タンパク質・ペプチドとして、乳カゼインの酵素加水分解分解物<sup>4)</sup>、卵白の cystatin<sup>5)</sup> や lysozyme (分解産物に抗菌活性がある)<sup>6)</sup>などが報告されている。また、乳タンパク質である lactoferrin お

よびその分解物である lactoferricin B は、最近、サプリメントやガムなどの健康食品の成分として国内で実用化されている。特に、lactoferrin は lactoferricin B に比べて抗菌活性は低いが、多彩な生理活性（鉄結合活性、免疫調節活性、抗酸化活性など）を有することが報告されている。このように lactoferrin は多機能なことから化粧品にも応用されている。さらに、食品タンパク質由来ペプチドに関しては、アンジオテンシン変換酵素阻害活性に基づく降圧作用、ジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害活性に基づく血糖調節作用、コレステロール低下作用、テンピン分解酵素阻害作用、抗酸化作用などの多くの機能が報告されているが、抗菌作用に関する報告は、比較的少ない。また、筆者らが報告した米と大豆のタンパク質由来抗菌ペプチド以外に、生体防御に貢献する複数の機能を兼ね備えた食品タンパク質由来抗菌ペプチドは報告されていないと考えられる<sup>7)</sup>。

## 2. 食品タンパク質由来カチオン性ペプチドの研究

筆者らが実施してきたカチオン性ペプチドに関する研究の経過を第1図に示す。米と大豆のタンパク質由来カチオン性ペプチドに関しては、最初に、米と大豆のタンパク質のアミノ酸配列から、抗菌活性をはじめとする多彩な生理活性を発揮する可能性があるカチオン性ペプチドを探索し、それらが実際に複数の生理活



第1図 食品タンパク質由来カチオン性ペプチドの研究

性を有することを見出した。また、米タンパク質由来ペプチドに関しては、カチオン性や疎水性を強化することによって、生理活性を高めることができた。次に、これらのペプチドの実用化を考慮したときには、化学合成ペプチドは製造コストや安全性などが問題となるため、米と大豆のタンパク質の酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチドについて検討した。その結果、加水分解物から精製し、同定したカチオン性ペプチドが、各タンパク質のアミノ酸配列から見出したカチオン性ペプチドと同じように、多彩な生理活性を示すことを明らかにした。また、清酒、醤油、味噌、納豆、発酵乳製品（ヨーグルトや乳酸菌飲料）などの発酵食品中に含まれるペプチドの生理機能に関する研究は、降圧活性や抗酸化活性を中心に実施されているが<sup>8,9)</sup>、その他の生理活性に関する研究例は少ない。そこで、代表的な発酵食品である納豆に着目し、その抽出物に含まれるカチオン性ペプチドを精製・同定し、それらの生理活性を明らかにした。

本稿では、筆者が進めてきた研究の中で (1) 米と大豆のタンパク質のアミノ酸配列から見出したカチオン性ペプチドの生理活性に関する研究結果<sup>10,13)</sup>、(2) 米糠と米胚乳のタンパク質の酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性に関する研究結果<sup>14,15)</sup>、および (3) 納豆抽出物に含まれるカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性に関する研究結果<sup>16)</sup>について、順次紹介する。

### 3. 食品タンパク質のアミノ酸配列からのカチオン性ペプチドの探索

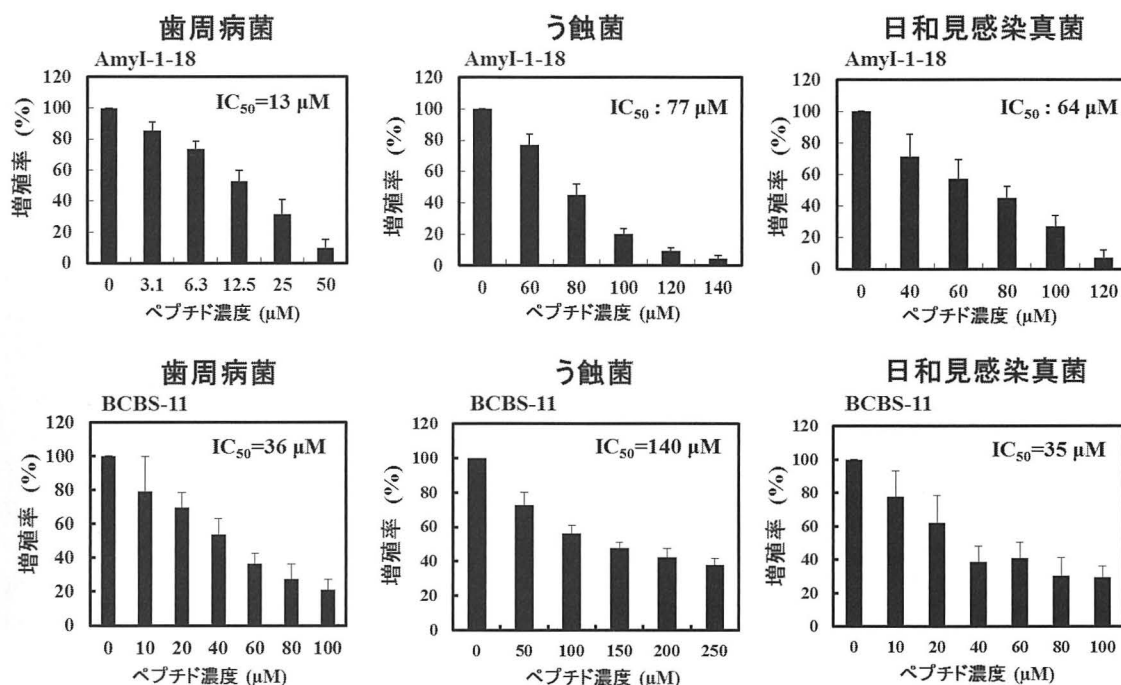
筆者らは、主に10～50残基のアミノ酸から構成されている、正味の正電荷を有する、両親媒性である、 $\alpha$ -helixや $\beta$ -sheetなどの2次構造を有する、などの抗菌ペプチドに共通する特徴に基づいて、食品タンパク質のアミノ酸配列から抗菌活性をはじめとする多彩な生理活性を発揮する可能性があるリジンやアルギニンを含むカチオン性ペプチドを探索した。その結果、これまでに第1表に示す9種類のカチオン性ペプチド（等電点が高く、正味の正電荷を有するペプチド）の配列を見出した。すなわち、米の酵素cyanate lyaseの部分配列であるペプチドCL-12<sup>10)</sup>および米のheat shock protein 70の部分配列であるペプチドHsp70-13、Hsp70-14、およびHsp70-18<sup>11)</sup>を見出し、それらのいくつかの生理活性について既に報告した。また、X線構造解析によって立体構造を明らかにした米の $\alpha$ -amylase (AmyI-1) から新規ペプチドとしてAmyI-1-17とAmyI-1-18を見出し、それらが病原微生物に対する抗菌活性、エンドトキシン（内毒素）であるリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) に対する中和活性などを示すことを報告した<sup>12,17)</sup>。さらに、最近、大豆の主要なタンパク質であるglycininと $\beta$ -conglycininからGlycinin-17, BCAS-16, およびBCBS-11を見出し、それらが複数の生理活性を兼ね備えていることを報告した<sup>13)</sup>。

第1表 食品タンパク質のアミノ酸配列から見出したカチオン性ペプチドのアミノ酸配列とそれらの特徴<sup>1)</sup>

| 食品 | ペプチド名       | ペプチドを含むタンパク質                           | アミノ酸配列             | 分子量(Da)<br>測定値 <sup>2)</sup><br>[M+H] <sup>+</sup> | 正味の<br>電荷 | 等電点<br>(-) |
|----|-------------|----------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|-----------|------------|
| 米  | CL-12       | cyanate lyase                          | RRLMAAKAESRK       | 1416.71                                            | + 4       | 11.72      |
|    | Hsp70-13    | heat shock protein 70                  | SQRQATKDAGVIS      | 1360.52                                            | + 1       | 8.46       |
|    | Hsp70-14    | heat shock protein 70                  | RARFEELNMDLFRR     | 1853.17                                            | + 1       | 9.45       |
|    | Hsp70-18    | heat shock protein 70                  | DNRMVNHVFQEFKRKHKK | 2341.77                                            | + 6       | 10.45      |
|    | Amyl-1-17   | $\alpha$ -amylase (AmyI-1)             | KEEIERLVSIRNRQGIH  | 2077.39                                            | + 1       | 8.75       |
|    | Amyl-1-18   | $\alpha$ -amylase (AmyI-1)             | HLNKRVQRELIGWLDWLK | 2304.75                                            | + 2       | 9.99       |
| 大豆 | Glycinin-17 | glycinin                               | RKSREWRSKKTQPRRPR  | 2253.13                                            | + 8       | 12.31      |
|    | BCAS-16     | $\beta$ -conglycinin $\alpha$ -subunit | KNQYGRIRVLQRFNQR   | 2077.38                                            | + 5       | 12.01      |
|    | BCBS-11     | $\beta$ -conglycinin $\beta$ -subunit  | RIRLLQRFNKR        | 1500.54                                            | + 5       | 12.48      |

1) 文献 14, 15) を一部改変して引用した。

2) [M+H]<sup>+</sup>は protonated molecule (プロトン化分子) を示す。



第2図 AmyI-1-18 と BCBS-11 の病原微生物に対する抗菌活性

米の  $\alpha$ -amylase と大豆の  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit のアミノ酸配列から見出したカチオン性ペプチド AmyI-1-18 と BCBS-11 の歯周病菌, う蝕菌, および日和見感染真菌に対する抗菌活性をそれぞれ示す。文献 12, 13) を一部改変して引用した。

#### 4. 食品タンパク質のアミノ酸配列から探索したカチオン性ペプチドの生理活性

##### 4-1. カチオン性ペプチドの抗菌活性

本項では, 第1表に示したカチオン性ペプチドのう

ち,  $\alpha$ -amylase の部分配列である 18 残基のアミノ酸からなる AmyI-1-18 および大豆の  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit の部分配列である 11 残基のアミノ酸からなる BCBS-11 を代表的なカチオン性ペプチドとして選択し, 両者の抗菌活性, LPS 中和活性, および血管新

生促進活性について検討した結果を解説する。

Amyl-1-18 と BCBS-11 について、グラム陰性細菌である歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*), グラム陽性細菌である球菌 (*Streptococcus mutans*), および日和見感染真菌 (*Candida albicans*) に対する抗菌活性を測定した結果を第 2 図に示す<sup>12,13</sup>。Amyl-1-18 と BCBS-11 は、どちらも 3 種類の病原微生物に対して、濃度依存的に抗菌活性を発揮した。これらのデータに基づいて、50% 増殖阻害濃度 (50% growth-inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) を算出した結果、Amyl-1-18 の *P. gingivalis*, *S. mutans*, および *C. albicans* に対する IC<sub>50</sub> は、それぞれ 13 μM, 77 μM, および 64 μM であり、BCBS-11 の各病原微生物に対する IC<sub>50</sub> は、それぞれ 36 μM, 140 μM, および 35 μM であった。

Amyl-1-18 と BCBS-11 の *P. gingivalis* に対する抗菌作用のメカニズムを解明するために、蛍光プローブ (diSC<sub>3-5</sub>) を用いた細胞膜脱分極アッセイや核酸染色蛍光色素 (propidium iodide, PI) によって染色される細胞数を計測する細胞膜損傷アッセイを実施し、Amyl-1-18 と BCBS-11 の病原微生物の細胞膜に対する作用を検討した<sup>12,13</sup>。その結果、Amyl-1-18 または BCBS-11 を作用させた場合、濃度依存的に細胞膜脱分極作用を発揮したが、その作用は弱かった。特に、Amyl-1-18 の細胞膜への作用は、BCBS-11 に比べて弱いことがわかった。また、Amyl-1-18 と BCBS-11 は、*S. mutans* の細胞膜を損傷することがわかった。一方、どちらのペプチドを作用させた場合も、*C. albicans* 細胞は PI によって染色されず、細胞膜が損傷されないことが明らかになった。Amyl-1-18 と BCBS-11 の病原微生物に対する細胞膜選択性は、細胞膜の構造とそのリン脂質の組成の差異によると考えられるが、この点に関しては、今後、詳細に検討する必要がある。また、Amyl-1-18 の *P. gingivalis* と *C. albicans* の細胞膜への作用および BCBS-11 の *C. albicans* の細胞膜への作用はいずれも弱いことから、他の抗菌作用メカニズム (例えば、標的が DNA, RNA, 酵素などの細胞内分子であるメカニズム) によって主に殺菌していると考えられる<sup>18,19</sup>。

#### 4-2. カチオン性ペプチドの LPS 中和活性

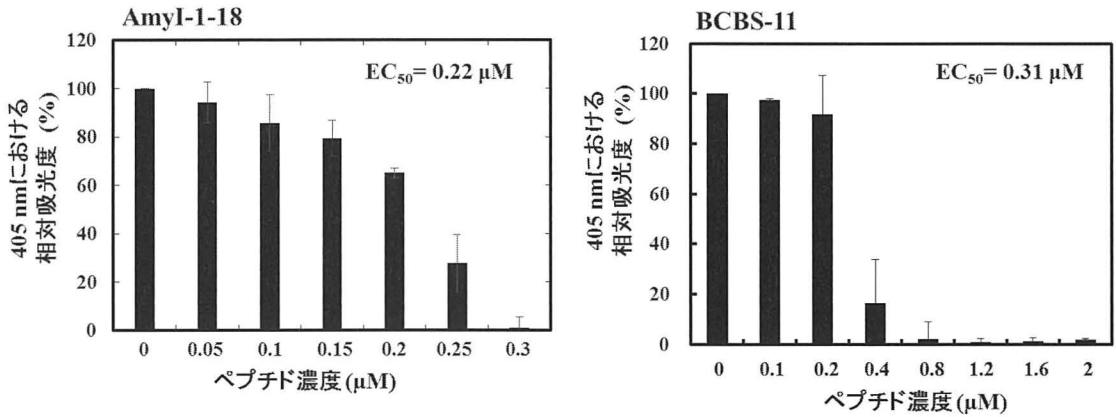
LPS は、グラム陰性細菌の外膜の構成成分であり、主に O 抗原、コア多糖、および lipid A から構成されており、発熱作用や細胞傷害作用などの種々の毒性を

有していることが知られている。この LPS がマクロファージなどの細胞表面に存在する Toll-like receptor 4 (TLR4) に結合すると、シグナル伝達経路が活性化され、細胞傷害性のある炎症性サイトカイン (インターロイキン(IL)-6, 腫瘍壊死因子 (TNF)-α, インターフェロン(LF)-γ など) が過剰に産生される<sup>17,20</sup>。そこで、TLR4 と LPS の結合から始まるシグナル伝達経路をカチオン性ペプチドによって阻害し、LPS 刺激によって誘導される炎症性サイトカインの産生を抑制できるかを検討した。また、カチオン性ペプチドの LPS 中和活性およびエンドトキシン (LPS と lipid A) との結合活性を定量的に解析し、カチオン性ペプチドの抗炎症の作用メカニズムを解析した<sup>21</sup>。

本項では、Amyl-1-18 と BCBS-11 の LPS 中和活性の結果を示す。LPS を特異的に検出することができる *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) 試薬を利用したリムルステストを用いて、ペプチドと LPS の結合に伴う 405 nm における吸光度の減少を測定した<sup>13,17</sup>。Amyl-1-18 と BCBS-11 の LPS 中和活性を、第 3 図に示す。Amyl-1-18 と BCBS-11 は、濃度に依存して発色反応を阻害した。LPS との結合によって発色反応を半分に抑えるために必要な 50% 有効濃度 (effective concentration, EC<sub>50</sub>) を算出した結果、Amyl-1-18 と BCBS-11 の EC<sub>50</sub> は、それぞれ 0.22 μM と 0.31 μM となった<sup>13,17,21</sup>。ところで、LPS と強く結合することが知られている抗生物質である polymyxin B は、治療薬として市販されている。リムルステストを用いて polymyxin B の LPS 中和活性を測定し、EC<sub>50</sub> を算出した結果、その値は 0.11 μM であった<sup>17</sup>。これらの EC<sub>50</sub> 値が低いという結果から、Amyl-1-18 と BCBS-11 は、polymyxin B と同じように、LPS に強く結合し、中和活性を発揮することがわかった。

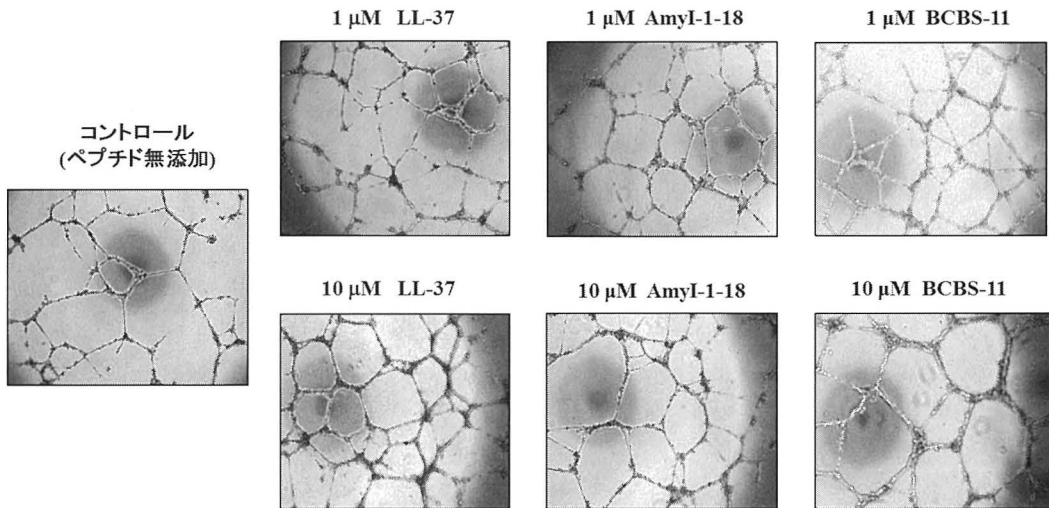
#### 4-3. カチオン性ペプチドの血管新生促進活性

Amyl-1-18 と BCBS-11 の創傷治癒作用を、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) の血管新生 (管腔形成) 促進作用に基づいて評価した<sup>13,22</sup>。創傷治癒作用を有するヒトの生体防御ペプチドとして知られている LL-37 をポジティブコントロールとして、Amyl-1-18 と BCBS-11 の血管新生促進作用を検討した結果を、第 4 図に示す。Amyl-1-18 と BCBS-11 は、LL-37 と同じように、血管新生促進作用を発揮した。すなわち、細胞懸濁液に 1



第3図 AmyI-1-18 と BCBS-11 の LPS 中和活性

LPS に AmyI-1-18 または BCBS-11 を混合した後、リムルテストを実施した結果を示す。文献 13, 17) を一部改変して引用した。



第4図 AmyI-1-18 と BCBS-11 の血管新生促進活性

AmyI-1-18 または BCBS-11 を添加した後、15 時間培養し、網目状(血管状)に増殖した HUVEC を顕微鏡で 40 倍の倍率で観察した結果を示す。LL-37 はヒトの生体防御ペプチドであり、ポジティブコントロールとして用いた。文献 13, 22) を一部改変して引用した。

μM および 10 μM の各ペプチドを添加した後、15 時間培養し、顕微鏡を用いてマトリゲル(人工基底膜)内の管腔(血管状)構造を有する HUVEC を観察し、その細胞の長さを計測した。その結果、AmyI-1-18 は LL-37 と同じ濃度(1 μM と 10 μM)において血管新生促進作用を示し、その作用は添加した濃度に依存していた。一方、BCBS-11 は 1 μM において血管新生

促進作用を示したが、10 μM において、その効果が低下した。今後、BCBS-11 の最適な添加濃度について検討する必要がある。以上の結果から、AmyI-1-18 と BCBS-11 は、LL-37 と同じように、HUVEC の血管新生を促進する作用を有することから、創傷治癒作用を示すことがわかった。さらに、本研究で用いたアッセイ系に、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothe-

第2表 米糠タンパク質(RBP)と米胚乳タンパク質(REP)の酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチドの性質と生理活性<sup>1)</sup>

| ペプチド名 <sup>1)</sup> | 分子量 (Da)                                |            | アミノ酸配列<br>(アンダーラインは<br>同じ配列を示す。) | 等電点   | 正味の<br>電荷 | 抗菌活性 <sup>4)</sup><br>IC <sub>50</sub> (μM) |                  | LPS中和<br>活性 <sup>5)</sup><br>EC <sub>50</sub><br>(μM) | 血管新生<br>促進活性 <sup>6)</sup><br>(%) | 溶血<br>活性 <sup>7)</sup><br>(%) |
|---------------------|-----------------------------------------|------------|----------------------------------|-------|-----------|---------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
|                     | 測定値 <sup>3)</sup><br>[M+H] <sup>+</sup> | 計算値<br>[M] |                                  |       |           | 日和見<br>感染真菌                                 | 歯周病菌             |                                                       |                                   |                               |
| RBP-LRR             | 1597.0156                               | 1595.7818  | LRRHASEGGHGPHW                   | 9.62  | + 1       | 289                                         | ND <sup>8)</sup> | 1.07                                                  | 142                               | 4.3                           |
| RBP-EKL             | 1667.8685                               | 1667.0094  | EKLLGKQDKGVIIRA                  | 9.70  | + 2       | ND                                          | 75.6             | 0.86                                                  | 153                               | 5.9                           |
| RBP-SSF             | 1284.7872                               | 1283.6622  | SSFSKGVQRAAF                     | 11.00 | + 2       | ND                                          | 78.5             | 1.41                                                  | 168                               | 4.3                           |
| REP-RSV             | 819.4008                                | 818.4722   | RSVSKSR                          | 12.01 | + 3       | ND                                          | ND               | 7.5                                                   | 110                               | 4.6                           |
| REP-RRV             | 925.6333                                | 924.5617   | RRVIEPR                          | 11.70 | + 2       | ND                                          | ND               | 4.0                                                   | 120                               | 2.5                           |
| REP-ERF             | 1420.7600                               | 1419.7194  | ERFQPMFRRPG                      | 11.70 | + 2       | ND                                          | ND               | 3.4                                                   | 122                               | 3.2                           |
| REP-RVR             | 2483.0571                               | 2482.265   | RVRQNIDNPNRADTYNPRAG             | 10.67 | + 2       | ND                                          | ND               | 2.7                                                   | 140                               | 9.5                           |
| REP-VVR             | 1406.9025                               | 1405.8881  | VVRRVIEPRGLL                     | 11.70 | + 2       | ND                                          | 87               | 1.7                                                   | 122                               | 3.3                           |

1) 文献 14, 15) を一部改変して引用した。

2) RBP: Rice bran protein (米糠タンパク質), REP: Rice endosperm protein (米胚乳タンパク質)。

3) [M+H]<sup>+</sup> は protonated molecule (プロトン化分子) を示す。

4) 抗菌活性は, IC<sub>50</sub> (50% 増殖阻害濃度) を示す。

5) LPS 中和活性は, EC<sub>50</sub> (50% 有効濃度) を示す。

6) 血管新生促進活性は, ペプチドを添加していないときを 100% とした相対値を示す。

7) 溶血活性は, ペプチドの濃度が 500 μM のときの値を示す。

8) ND: not detected (検出できなかった)。

lial growth factor, VEGF) レセプターの特異的阻害剤 (SU5416) を添加した結果, HUVEC の血管新生に対する AmyI-18 の促進効果は著しく低下した<sup>22)</sup>。したがって, カチオン性ペプチドは VEGF のレセプターに作用して, 血管新生促進作用を発揮していると考えられる。今後, カチオン性ペプチドの血管新生促進の作用メカニズムに関して, 詳細に検討する必要がある。

## 5. 食品タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性

### 5-1. 米糠タンパク質および米胚乳タンパク質の酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチド

これまで述べてきた結果は, タンパク質中のアミノ酸配列に基づいて, 化学合成したカチオン性ペプチドについて得られている。これらの化学合成ペプチドを産業的に実用化する場合, 製造コストや安全性などが問題となるため, 天然物由来のカチオン性ペプチドが求められている。

米糠中には, フィチン酸, イノシトール, トコトリエノール, γ-オリザノール, フェルラ酸などの生理活性成分が含まれており, 米糠はこれらの機能性成分を製造する原料として有効利用されている。しかし, 米

糠中のタンパク質成分の有効性は知られていない。一方, 小麦, 大豆, トウモロコシなどの穀類タンパク質の加水分解物, およびそれらに含まれるペプチドには多彩な生理活性があることが報告されている<sup>23-26)</sup>。そこで, 筆者らは既に米糠タンパク質の酵素加水分解物から美白効果があるチロシナーゼ阻害ペプチドを見出していることから<sup>27)</sup>, 生理活性ペプチドの原料として, 米糠タンパク質に着目した。また, 米胚乳タンパク質は, 米糠タンパク質とは大きく異なる性質を有することが報告されている。そこで, 米糠タンパク質と米胚乳タンパク質の酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチドの多彩な生理活性を明らかにすることを目的として, 次の4点, すなわち (1) 米糠と米胚乳タンパク質の酵素加水分解物の調製, (2) 等電点電気泳動によるカチオン性ペプチドの調製, (3) 逆相クロマトグラフィーと質量分析計を用いたカチオン性ペプチドの精製と同定, および (4) 同定したカチオン性ペプチドの複数の生理活性 (抗菌活性, LPS 中和活性, および血管新生促進活性) の測定について検討した。本項では, それらの結果<sup>14, 15)</sup>について, それぞれ解説する。

米糠タンパク質として rice bran protein (RBP) 55 (タンパク質含有量 55%, 築野食品工業株式会社) を,

第3表 納豆抽出物に含まれるカチオン性ペプチドの性質と生理活性<sup>1)</sup>

| ペプチド名 <sup>2)</sup> | 分子量 (Da)                                |            | アミノ酸配列        | 等電点   | 正味の電荷 | LPS 中和活性 <sup>4)</sup><br>EC <sub>50</sub> (μM) | 血管新生促進活性 <sup>5)</sup> (%) | 溶血活性 <sup>6)</sup> (%) |
|---------------------|-----------------------------------------|------------|---------------|-------|-------|-------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
|                     | 測定値 <sup>3)</sup><br>[M+H] <sup>+</sup> | 計算値<br>[M] |               |       |       |                                                 |                            |                        |
| FSB-KFN             | 912.4667                                | 911.4977   | KFNKYGR       | 10.29 | + 3   | 2.7                                             | 131                        | < 0.10                 |
| FSB-FPF             | 1250.6997                               | 1249.6720  | FPFPRPPHQQ    | 11.00 | + 2   | 3.8                                             | 123                        | < 0.10                 |
| FSB-GQS             | 1423.6526                               | 1422.7076  | GQSSRPQDRHQK  | 10.84 | + 2   | 5.5                                             | 129                        | < 0.10                 |
| FSB-QRF             | 1161.4742                               | 1160.5687  | QRFDQRSPQ     | 9.60  | + 1   | 3.9                                             | 123                        | < 0.10                 |
| FSB-ERQ             | 1663.7780                               | 1662.8743  | ERQFPFPRPPHQQ | 10.84 | + 2   | 3.1                                             | 124                        | < 0.10                 |
| FSB-GEI             | 1665.6509                               | 1664.8859  | GEIPRPRRPQHPE | 9.52  | + 1   | 2.7                                             | 98                         | < 0.10                 |
| FSB-EQP             | 1714.8907                               | 1713.9427  | EQPRPIPFRPQPR | 11.70 | + 2   | 2.6                                             | 126                        | 0.24                   |

1) 文献 16) を一部改変して引用した。

2) FSB: Fermented soybean (発酵大豆; 納豆)。

3) [M+H]<sup>+</sup> は protonated molecule (プロトン化分子) を示す。

4) LPS 中和活性は、EC<sub>50</sub> (50% 有効濃度) を示す。

5) 血管新生促進活性は、ペプチドを添加していないときを 100% とした相対値を示す。

6) 溶血活性は、ペプチドの濃度が 500 μM のときの値を示す。

および米胚乳タンパク質として亀田製菓株式会社から提供していただいた試作品を、それぞれ使用した。これらの米タンパク質に超純水を加え、POLYTRON Homogenizer (KINRMATICA) を用いて懸濁液の均質化を行い、分画分子量 500-1000 Da の透析膜を用いて、低分子成分を除去した。その後、適量のブタ胃粘膜由来ペプシン (Sigma-Aldrich) を用いて 5 時間、37℃ にて加水分解した。さらに、得られた加水分解物を遠心分離し、上澄液を再び分画分子量 500-1000 Da の透析膜を用いて低分子成分を除き、出発材料を調製した。次に、出発材料を等電点電気泳動 (Rotofor Cell System, Bio-Rad) を用いて、等電点 (isoelectric point, pI) の異なる 20 の画分に分離した。抗菌活性が検出された画分 (主に等電点が高い No.19 と No.20 の画分) から逆相クロマトグラフィーによってペプチドを精製した。必要に応じて粗精製画分をもう一度、逆相クロマトグラフィーによって精製し、いくつかの単一ピークを得た。各ピーク画分中のペプチドを MALDI-TOF/MS (Bruker) によって解析し、ペプチドの分子量を求め、MS/MS 解析とデータベース検索によって、ペプチドを含むタンパク質とペプチドのアミノ酸配列をそれぞれ決定した。米糠タンパク質 (RBP) と米胚乳タンパク質 (rice endosperm protein, REP) の酵素加水分解物から、それぞれ 3 種類と 5 種類のカチオン性ペプチドを同定することができた<sup>14,15)</sup>。同定したペプチドのアミノ酸配列とその特徴および各生理

活性を第 2 表に示す。なお、各ペプチドは N 末端の 3 残基のアミノ酸配列に基づいて命名した。

同定した 8 種類のペプチドを化学合成し、病原微生物に対する抗菌活性を測定した結果、ペプチド RBP-LRR は *C. albicans* に対して、ペプチド RBP-EKL, RBP-SSF, および REP-VVR は、それぞれ *P. gingivalis* に対して抗菌活性を示した。各ペプチドは、濃度依存的に抗菌活性を示したことから、これらのデータに基づいて、各ペプチドの IC<sub>50</sub> を算出した。それらの結果を第 2 表に示す。ペプチド RBP-LRR の *C. albicans* に対する IC<sub>50</sub> は 289 μM, ペプチド RBP-EKL, RBP-SSF, および REP-VVR の *P. gingivalis* に対する IC<sub>50</sub> は、それぞれ 75.6 μM, 78.5 μM, および 87 μM であった<sup>14,15)</sup>。

次に、ペプチドの抗炎症活性の 1 つとして、LPS 中和活性を測定した。同定した 8 種類のペプチドは、LPS によって引き起こされるリムルステストの反応を濃度依存的に阻害した。したがって、これらのリムルステストの結果から、同定した 8 種類のペプチドは、LPS に結合し、中和活性を発揮することがわかった。データに基づいて計算した結果、米糠タンパク質の酵素加水分解物に含まれるペプチド RBP-LRR, RBP-EKL, および RBP-SSF の EC<sub>50</sub> は、それぞれ 1.07 μM, 0.86 μM, および 1.41 μM となった<sup>14)</sup>。また、米胚乳タンパク質の酵素加水分解物に含まれるペプチド REP-RSV, REP-RRV, REP-ERF, REP-RVR, および



REP-VVRのEC<sub>50</sub>は、それぞれ1.7 μMから7.5 μMの範囲であった<sup>15)</sup>。

さらに、ペプチドの創傷治癒活性の1つとして、HUVECを用いて血管新生促進活性を測定した。LL-37をポジティブコントロールとして、同定した8種類のペプチドの血管新生促進活性を測定した結果、同定した8種類のペプチドは、LL-37と同じように、血管新生促進活性を発揮した。各ペプチドの10 μMにおける血管新生促進活性を、ペプチドを添加していない場合(100%)と比べた結果を第2表に示す。以上の結果から、同定した8種類のペプチドは、HUVECの血管新生を促進する活性を有することから、創傷治癒活性が期待されることがわかった<sup>14,15)</sup>。

同定した8種類のペプチドについて、細胞毒性を評価するために、哺乳類の赤血球に対する溶血活性を測定した。ヒツジの赤血球に対する溶血活性の結果を第2表に示す。抗菌活性、LPS中和活性、および血管新生促進活性を発揮する500 μM以下の濃度範囲では、ほとんど溶血活性を示さなかった。すなわち、各ペプチドの溶血活性は、コントロールの界面活性剤であるTriton X-100(100%)に比べて、500 μMにおいても2.5%から9.5%の範囲であり、細胞毒性が低いことがわかった<sup>14,15)</sup>。

## 5-2. 納豆抽出物に含まれるカチオン性ペプチド

降圧作用や抗酸化作用を中心に、清酒、酒粕、味噌、醤油、納豆、発酵乳製品などの食品中に含まれるペプチド(主に10残基以下のアミノ酸からなるペプチド)に関する研究も実施されている<sup>8,9)</sup>。そこで、筆者らは納豆に着目し、納豆抽出物からカチオン性ペプチドを精製し、同定することを試みた<sup>16)</sup>。最初に、市販の1パックの納豆(90 g)に対して250 mLの超純水を加えてすりつぶし、遠心分離することによって納豆抽出物を調製した。この納豆抽出物を凍結乾燥した後、再溶解し、5倍量の冷却したエタノールを加えて分子量が大きいタンパク質成分を沈殿させた。次に、遠心分離して得られた上澄液からエバポレーターを用いてエタノールを除去した後、分画分子量500-1000 Daの透析膜を用いて分子量が小さい成分を除去した。このようにして得られた抽出液を凍結乾燥して出発材料とした。米糠タンパク質と米胚乳タンパク質の酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチドの場合と同じようにして、等電点電気泳動によって分画し、逆相ク

ロマトグラフィーによって精製した後、MALDI-TOF/MSとデータベース検索によってカチオン性ペプチドを同定した。また、上述したカチオン性ペプチドの場合と同じようにして、同定した7種類のカチオン性ペプチドの抗菌活性、LPS中和活性、および血管新生促進活性を測定した<sup>16)</sup>。

同定したペプチドのアミノ酸配列とその特徴および各生理活性を第3表に示す。なお、各ペプチドはN末端の3残基のアミノ酸配列に基づいて命名した。同定できた納豆抽出物に含まれるカチオン性ペプチドは、いずれも病原微生物に対して抗菌活性を示さなかった。一方、同定した7種類のペプチドは、程度の差はあったが、すべてLPS中和活性を有していた。また、ペプチドFSB(fermented soybean)-GEIを除いた6種類のペプチドは、血管新生促進活性を発揮した。さらに、すべてのペプチドの溶血活性は500 μMにおいて0.3%以下であり、ほとんど細胞毒性を示さなかった。

## 6. おわりに

タンパク質酵素加水分解物や発酵食品などの天然物から単離した抗菌ペプチドは、化学合成の手法を用いたアミノ酸の置換や付加、ハイブリッド化などによって活性を高めることができるため、医薬品の素材として注目されている。一方、化学合成品は、実用化するためには製造コストや安全性などが問題となるため、食品タンパク質の酵素加水分解物から天然型ペプチドと類似の構造と活性を有するペプチドを調製することも試みられている。この場合には、原料のタンパク質の種類、酵素の種類とその加水分解条件、加水分解物からのペプチドの分画・精製条件などが検討課題となる<sup>7,25)</sup>。また、発酵食品中に含まれるペプチドに関する研究は、降圧作用や抗酸化作用を中心に実施されているが、5-2.において解説したように、今後、その他の生理活性についても解明する必要がある。

ペプチドの構造と活性の相関は、最も重要な課題である。抗菌作用を含めて、ペプチドの抗炎症作用や創傷治癒促進作用などの生理活性には、アミノ酸配列中に含まれる塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸、またはそのバランス(両親媒性)が共通して重要な貢献をしていると考えられる<sup>7,21,22,28-30)</sup>。しかし、ペプチドを構成する各アミノ酸のそれぞれの生理活性に対する寄与は複雑であり、今までのところ、各アミノ酸の寄与

はわずかししか解明されていない。今後、特定のアミノ酸を欠失・付加した改変体や特定のアミノ酸を置換した改変体を用いた研究データを蓄積することによって、構造（アミノ酸配列と立体構造）と活性（各種生理活性）の相関が解明されることを期待したい。

（新潟大学工学部機能材料工学科）

## 引用文献

- 1) E. F. Haney and R. E. W. Hancock : *Peptide Sci.*, **100**, 572-583 (2013).
- 2) H. Wakabayashi, K. Yamauchi, T. Kobayashi, T. Yaeshima, K. Iwatsuki, and H. Yoshie : *Anitmicrob. Agent Chemother.*, **53**, 3308-3316 (2009).
- 3) 平井昭光 : *生物工学*, **96**, 510-513 (2018).
- 4) H. A. Elbarbary, A. M. Abdou, Y. Nakamura, E. Y. Park, H. A. Mohamed, and K. Sato : *Bio-Factors*, **38**, 309-315 (2012).
- 5) M. F. Blankenvoorde, W. van't Hof, E. Walgreen-Weterings, T. J. van Steenberg, H. S. Brand, E. C. Veerman, and A. V. A. Nieuw : *Biol. Chem.*, **379**, 1371-1375 (1998).
- 6) H. R. Ibrahim, D. Inazaki, A. Abdou, T. Aoki, and M. Kim : *Biochim. Biophys. Acta*, **1726**, 102-114 (2005).
- 7) M. Taniguchi and A. Ochiai : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 634-650 (2017).
- 8) R.-Y. Gan, A. Gunaratne, Z.-Q. Sui, and H. Corke : *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, **16**, 489-531 (2017).
- 9) S. Sanjukta and A. K. Rai : *Trends Food Sci. Technol.*, **50**, 1-10 (2016).
- 10) N. Takei, N. Takahashi, T. Takayanagi, A. Ikeda, K. Hashimoto, M. Takagi, T. Hamada, E. Saitoh, A. Ochiai, T. Tanaka, and M. Taniguchi : *Peptides*, **42**, 55-62 (2013).
- 11) M. Taniguchi, A. Ikeda, S. Nakamichi, Y. Ishiyama, E. Saitoh, T. Kato, A. Ochiai, and T. Tanaka : *Peptides*, **48**, 147-155 (2013).
- 12) M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Takahashi, S. Nakamichi, T. Nomoto, E. Saitoh, T. Kato, and T. Tanaka : *Peptide Sci.*, **104**, 73-83 (2015).
- 13) M. Taniguchi, K. Saito, T. Nomoto, T. Namae, A. Ochiai, E. Saitoh, and T. Tanaka : *Peptide Sci.*, **108**, e23023 (11 pages) (2017).
- 14) M. Taniguchi, M. Kameda, T. Namae, A. Ochiai, E. Saitoh, and T. Tanaka : *J. Funct. Foods*, **34**, 287-296 (2017).
- 15) M. Taniguchi, J. Kawabe, R. Toyoda, T. Namae, A. Ochiai, E. Saitoh, and T. Tanaka : *Peptides*, **97**, 70-78 (2017).
- 16) M. Taniguchi, R. Aida, K. Saito, A. Ochiai, S. Takesono, E. Saitoh, and T. Tanaka : *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 472-478 (2019).
- 17) M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Matsushima, K. Tajima, T. Kato, E. Saitoh, and T. Tanaka : *Peptides*, **75**, 101-108 (2016).
- 18) M. Taniguchi, A. Ochiai, H. Kondo, S. Fukuda, E. Saitoh, T. Kato, and T. Tanaka : *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 591-598 (2016).
- 19) M. Taniguchi, A. Ochiai, S. Fukuda, T. Sato, E. Saitoh, T. Kato, and T. Tanaka : *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 385-392 (2016).
- 20) S. Takayama, K. Hashimoto, E. Kokubu, M. Taniguchi, K. Tajima, A. Ochiai, E. Saitoh, A. Saito, K. Ishihara, and T. Kato : *Microbial Pathogenesis*, **94**, 2-11 (2016).
- 21) M. Taniguchi, R. Toyada, T. Sato, A. Ochiai, E. Saitoh, T. Kato, and T. Tanaka : *J. Peptide Sci.*, **23**, 252-260 (2017).
- 22) M. Taniguchi, A. Ochiai, T. Namae, K. Saito, E. Saitoh, T. Kato, and T. Tanaka : *Peptides*, **104**, 78-84 (2018).
- 23) T. A. Egorov, T. I. Odintsova, V. A. Pukhalsky, and E. V. Grishin : *Peptides*, **26**, 2064-2073 (2005).
- 24) B. P. Singh, S. Vij, and S. Hati : *Peptides*, **54**, 171-179 (2014).
- 25) C. G. Rizzello, D. Tagliacozzi, E. Babini, G. S. Rutella, D. L. T. Saa, and A. Gianotti : *J. Funct. Foods*, **27**, 549-569 (2016).
- 26) E. Maestri, M. Marmiroli, and N. Marmiroli : *J. Proteomics*, **147**, 140-155 (2016).
- 27) A. Ochiai, S. Tanaka, T. Tanaka, and M. Taniguchi : *J. Natural Products*, **79**, 2545-2551 (2016).
- 28) M. Taniguchi, N. Takahashi, T. Takayanagi, A. Ikeda, Y. Ishiyama, E. Saitoh, T. Kato, A. Ochiai, and T. Tanaka : *Peptide Sci.*, **102**, 58-68 (2014).

- 29) M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Takahashi, S. Nakamichi, T. Nomoto, E. Saitoh, T. Kato, T. Tanaka : *Peptide Sci.*, **106**, 219-229 (2016).
- 30) M. Taniguchi, A. Ochiai, K. Takahashi, S. Nakamichi, T. Nomoto, E. Saitoh, T. Kato, and T. Tanaka : *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 652-659 (2016).
-