

氏名	たけ なか やす ゆき 竹 中 康 之
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2428 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Novel Pharmacological Action and Production of Enterostatin (エンテロスタチンの新しい薬理作用と生産に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 吉 川 正 明 教 授 小 川 正 教 授 内 海 成

### 論 文 内 容 の 要 旨

エンテロスタチン (VPDPR) は procolipase がトリプシンにより colipase に変換される際にその N 末端から遊離する 5 残基のペプチドである。VPDPR は高脂肪食の摂取を選択的に抑制することが知られている。本研究は VPDPR が抗鎮痛作用、抗健忘作用、血圧調節作用および血清脂質低下作用等の新しい作用を有することを明らかにすると共に、VPDPR 配列を食品タンパク質に導入することによって、高機能食品タンパク質の設計を目指したものであり、内容は次のように要約される。

#### 1. エンテロスタチンの抗鎮痛および抗健忘作用

VPDPR は  $\mu$ -オピオイドであるモルヒネの鎮痛作用を有意に抑制することを見出した。この抗鎮痛作用は  $\mu$ -オピオイドに特異的であり、 $\kappa$  および  $\delta$ -オピオイドに対しては抗鎮痛作用は見られなかった。また、VPDPR が  $\mu$ -レセプターに親和性を示さないことから、その抗鎮痛作用は、 $\mu$ -レセプター上での拮抗によるものではないことを示した。VPDPR による摂食抑制作用と抗鎮痛作用の構造-活性相関が異なることから、両作用が異なるメカニズムを介することを示唆した。さらに、この抗鎮痛作用がグルココルチコイドレセプターアンタゴニストにより阻害されること、副腎摘出によりその抗鎮痛作用が消失すること、およびコルチコステロン投与により抗鎮痛作用が見られることを見出し、本作用には副腎から放出されたコルチコステロンが関与していることを明らかにした。また、スコボラミン健忘誘発マウスに対して、VPDPR が抗健忘作用を示すことを見出した。

#### 2. エンテロスタチンの血圧に対する作用

VPDPR をラットに投与すると一過性の血圧上昇作用と持続的な血圧降下作用を示すことを見出した。血圧上昇作用は  $\alpha$ -ブロッカーで阻害されること、副腎摘出によりその血圧上昇作用が消失することを示し、本作用には副腎から放出されるアドレナリンが関与していることを明らかにした。また、高脂肪食投与ラットでは血圧降下作用が顕著になることを見出し、その構造-活性相関は摂食抑制作用と一致することを示した。本作用は摂食抑制作用と同様にセロトニンレセプターのアンタゴニストである metergoline により阻害されることを見出し、セロトニンを介した作用であることを明らかにした。

#### 3. エンテロスタチンの血中脂質レベルに対する作用

VPDPR は高コレステロール・コルチコステロン投与マウスに対して血清コレステロール低下作用を有することを見出した。コレステロール低下作用の構造-活性相関は摂食抑制作用とは異なり、抗鎮痛作用のそれと類似していたが、抗鎮痛作用とは異なりコルチコステロンを介したものではなかった。また、VPDPR は高脂肪食投与マウスに対して血清中性脂肪低下作用を示すことを見出した。本作用の構造-活性相関には摂食抑制作用との類似性が認められた。

#### 4. エンテロスタチンおよびフラグメントペプチドの大豆タンパク質への導入

遺伝子の部位指定変異により、VPDPR および DPR 配列を食品タンパク質中に導入して、高機能食品タンパク質を設計することを試みた。グリシニン A1aB1b サブユニット中に存在する類似配列に VPDPR 配列を導入し、大腸菌で発現させ

た。変異導入グリシニンは大腸菌全菌体タンパク質あたり約20%のレベルで発現したが、不溶性画分に回収された。この画分をトリプシン、キモトリプシンで消化したところ、40%の収率でVPDPRが得られた。一方、大豆 $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ サブユニット中の2箇所の類似配列にDPR配列を導入し、大腸菌で発現させたところ、全菌体タンパク質あたり約15%以上の高レベルで発現し、可溶性画分に回収されることを確認した。発現タンパク質を精製後トリプシンで消化することによって、DPRが約21%の収率で得られた。

## 論文審査の結果の要旨

エンテロスタチン (VPDPR) は procolipase の N 末端 5 残基に由来し、procolipase がトリプシンにより colipase に変換される際に遊離するペプチドである。エンテロスタチンは高脂肪食の摂取を選択的に抑制することが知られているが、他の作用については未解明の部分が多い。本研究は中枢、血圧、および血清脂質に対するエンテロスタチンの作用を解明すると共に、遺伝子の部位指定変異によりエンテロスタチン配列を大豆タンパク質中に導入することによって、高機能大豆タンパク質の設計を試みたものである。成果として評価すべき点は次の通りである。

1. VPDPR は  $\mu$ -オピオイドであるモルヒネの鎮痛作用を有意に抑制することを見出した。さらに、VPDPR が  $\mu$ -レセプターに親和性を示さないことから、その抗鎮痛作用は、 $\mu$ -レセプター上での拮抗によるものではなく、副腎から放出されたコルチコステロンが関与していることを示した。また、スコポラミン健忘誘発マウスに対して、VPDPR が抗健忘作用を示すことも見出した。

2. VPDPR はラットに対して、一過性の血圧上昇作用と持続的な血圧降下作用を示すことを見出した。血圧上昇作用には副腎から放出されるアドレナリンが関与していることを明らかにした。また、持続的な血圧降下作用は高脂肪食投与ラットで顕著になり、摂食抑制作用の場合と同様にセロトニンを介した作用であることを明らかにした。

3. VPDPR は高コレステロール・コール酸食投与マウスに対して血清コレステロール低下作用を、また高脂肪食投与マウスに対しては血清中性脂肪低下作用を示すことを明らかにした。また、C 末端トリペプチドである DPR が VPDPR よりも強力な血清コレステロール低下作用を有することを見出した。

4. VPDPR 配列および DPR 配列を遺伝子の部位指定変異により、それぞれ大豆グリシニンおよび  $\beta$ -コングリシニンに導入した。大腸菌でこれらの変異導入大豆タンパク質を発現させ、精製の後消化したところ、VPDPR および DPR が設計通りに効率よく遊離することを確認した。

以上のように、本論文はエンテロスタチンが摂食抑制作用以外に抗鎮痛作用、抗健忘作用、血圧調節作用および血清コレステロール・中性脂肪低下作用を有することを見出し、さらに、エンテロスタチン配列を遺伝子の部位指定変異により大豆タンパク質に導入することによって、その生体調節機能の強化を図ったものであり、食品生理機能学、食品分子機能学、食品設計開発学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。