

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	正箱 尚久
論文題目	Identification and characterization of a novel anti-hypertensive peptide derived from rice bran protein (米ぬかタンパク質由来の新しい血圧降下ペプチドの同定と作用機構解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>玄米から精米する際に取り除かれる外皮や胚芽の部分である米ぬかは、タンパク質に富み、protein efficiency ratioも高いことが知られているものの、主に飼料および米油の原料として使用される以外、産業上活用されていないという課題がある。高血圧は冠動脈疾患や脳卒中のリスクファクターであり、世界で10億人以上が罹患していると報告されていることから、その対策が現在も求められている。血圧調節に深く関わっているアンジオテンシン- I 変換酵素 (ACE)の阻害剤は、その治療薬として用いられているが、プロテアーゼ消化による食品素材からのACE阻害ペプチドの生成が報告されており、それらは高血圧を予防する食品として利用されている。本論文では、米ぬかタンパク質からACE阻害ペプチドといった血圧降下作用を有するペプチドを産生することで、米ぬかの新規高度活用法の開発と高血圧予防等の問題の解決を試み、以下のような知見を得た。</p> <p>第1章では、<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>より産生されるプロテアーゼ Thermolysin (EC 3.4.24.27)により米ぬかを消化することで、新しい素材Thermolysin-digested Rice Bran (TRB)を開発し、その血圧降下作用を検討すると共に血圧降下ペプチドの同定を試みた。酵素処理前の米ぬかとTRBのACE阻害活性を評価した結果、TRBのみACE阻害活性を示すことを明らかにした。ACE阻害活性を指標にTRBに含まれるペプチドをHPLCにより分画した結果、ACE阻害ペプチドとしてLeu-Arg-Ala (LRA)が同定された。LRAの由来を確認するために、米ぬかタンパク質をSDS-PAGEにより分画し、分離されたバンドに含まれるタンパク質を分析した。その結果、Vicilin様貯蔵タンパク質 At2g28490を米において初めて同定し、そのアミノ酸配列中にLRA配列が存在することを見出した。更に、At2g28490タンパク質中でLRAを含む付近のペプチドを合成し、このモデルペプチドのthermolysin消化によりLRAが生成することから、LRAはAt2g28490に由来することを明らかにした。TRBおよびLRAを高血圧自然発症ラット (SHR)に経口投与し、2, 4, 6, 24時間後の収縮期血圧 (SBP)をtail-cuff法によって測定することで血圧に対する効果を検討した。その結果、両者共に投与4時間後最も血圧が低下し、投与6時間後までその効果が持続した。また、LRAは、0.25 mg/kg体重の投与量でもSHRに対して有意な血圧降下作用を示した。</p> <p>第2章では、LRAの主たる血圧降下メカニズムの解明を試みた。LRAのACE阻害活性を測定した結果、経口投与で示された強力な血圧降下作用を十分説明できる比活性を示さなかった。そこで、SHRから摘出した腸間膜動脈に対する血管収縮—弛</p>			

緩作用を測定し、LRAの血管に対する効果を評価した。その結果、LRAは濃度依存的に血管弛緩作用を示し、EC<sub>50</sub>値は0.1 μMと求められた。次に、LRAの血管弛緩メカニズムを検討するために、血管弛緩機構に対する既知の各種阻害剤がLRAの作用に及ぼす影響を検討した結果、LRAの血管弛緩作用は一酸化窒素(NO)産生酵素(NOS)阻害剤であるL-NAMEによって阻害されることを明らかにした。また、可溶性グアニル酸シクラーゼは血管内皮で産生されたNOを受けて血管弛緩を調節するが、その阻害剤である1H-[1,2,4]オキサジアゾロ[4,3-a]キノキサリン-1-オン(ODQ)によってもLRAの血管弛緩作用は阻害された。さらに、血管内皮を物理的に剥離した血管標本ではLRAの血管弛緩作用は確認できなかった。一方、PI3K阻害剤であるwortmannin、Mas受容体アンタゴニストA779、ブラジキニンB2受容体アンタゴニストHOE140などNO信号伝達系の阻害剤では血管弛緩作用を抑制できなかったことから、LRAは既知のNO信号伝達系とは異なる経路を介して血管弛緩作用を示していると考えられた。また、血管内皮モデル細胞であるHUVECsにおいて、LRAにより血管内皮局在型NOS (eNOS)のリン酸化が促進されるが、Aktのリン酸化には変化がないことを明らかにした。加えて、NO系がLRAの血圧降下メカニズムに寄与することをラットを用いた *in vivo*の試験系でも証明した。以上より、LRAの主たる血圧降下機構は、ACE活性阻害よりも、血管内皮に存在するeNOSのリン酸化を介してNO産生を亢進し、これが血管平滑筋に作用することで血管弛緩を促進するものであることを明らかにした。

第3章では、正常高値血圧・I度高血圧者を対象とした無作為化プラセボ対照・二重盲検並行群間比較試験により、TRBがヒトに対しても血圧調節において効果をもつことを検討した。その結果、TRBを12週間摂取することによって、プラセボ群よりも有意に収縮期血圧が低下したことから、実験動物だけでなくヒトに対しても血圧降下作用を有することを証明した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

高血圧は冠動脈疾患や脳卒中に対するリスクファクターであり、現代社会ではその罹患者数が非常に多いことから、これに対する方策が強く求められている。食品産業において米ぬかは高度に有効利用されているとは言いがたいため、この付加価値を高めて利用を促進することは高い意義をもつ。本論文では、それぞれの問題を克服するために、米ぬかの酵素消化物そのものが高血圧を抑制する作用を有することを見出し、さらに、その有効成分の本体と、血圧上昇の抑制にかかる血管を弛緩させる作用とその機構の詳細をもつことを明らかにした。加えて、米ぬか酵素消化物の摂取が実験動物だけではなく、ヒトにおいても有意に高血圧を抑制することを示したものである。評価すべき点は以下のように要約される。

1. 米ぬかを酵素処理する新規の加工法、およびその生成物を経口摂取した際の血圧降下作用を明らかにし、米ぬかの新しい利用法を見出した。
2. 上記の酵素処理米ぬかより、有意な血圧降下作用をもつ新規ペプチドのロイシルアルギニルアラニン (LRA) を同定し、米種子中vicilin様貯蔵タンパク質であるAt2g28490に由来することを明らかにした。
3. LRAの主たる血圧降下作用は、一酸化窒素 (NO) を介した血管弛緩により発現することを明らかにした。
4. 酵素処理米ぬかは、ヒトでの介入試験において高血圧を予防する作用があることを示した。

以上のように、本論文は、米ぬかタンパク質の利用において、その酵素処理物中に有意な血圧降下作用をもつ新規ペプチドを見出し、その作用機構を明らかにするとともに、ヒトに対する作用を証明して、機能性食品として応用する可能性を示したことから、食品生理機能学、食品化学、および農産製造学の発展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31年2月19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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：2019年8月20日以降 (学位授与日から3ヶ月以

内)