

**【研究題目】**

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)

**【研究背景】**

イネ (*Oryza sativa*)は世界三大穀物の一つであり、世界総人口のうちおよそ半分が主食として利用している。米ぬかとは、イネの籾から籾殻を取り除いた玄米から、更に精白米へ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、タンパクに富み、protein efficiency ratioも高い事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、世界の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。血圧調整に深く関わっている、アンジオテンシン-1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。また、食品素材をプロテアーゼで消化する事でも ACE 阻害ペプチドが生成されることも報告されており、それらは現在高血圧を予防する食品として活用されている。そこで、我々は米ぬかタンパクから ACE 阻害ペプチドなど、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た。

**【第1章】新規血圧降下ペプチド LRA の同定**

thermolysin (EC 3.4.24.27)は *Bacillus thermoproteolyticus* より産生されるプロテアーゼである。ゴマや鰹節などのタンパク質を多く含む食品の thermolysin 消化物は血圧降下作用を発揮することがこれまでに報告されており、関与成分として血圧降下ペプチドが同定されている。そこで、我々は米ぬかを thermolysin で消化することによって、新しい素材 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 にのみ ACE 阻害活性がある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、米ぬかタンパクを SDS-Page により分画し、CBB 染色により得られたバンドに含まれるタンパクを同定した。その結果、Vicilin 様貯蔵タンパク At2g28490 を米ぬかタンパクより初めて同定し、そのアミノ酸配列中に LRA 配列が存在していた。At2g28490 のモデルペプチドを合成し、thermolysin で消化した結果、LRA が生成されたことから、LRA は確かに At2g28490 を由来としていることが明らかとなった。

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降下作用を検証した。その結果、共に投与 4 時間後最も血圧が低下し、投与 6 時間後まで血圧降下作用が持続した。また LRA は 0.25 mg/kg 体重の経口投与でも SHR に対して有意な血圧降下作用を示した。

## 【第 2 章】 LRA の血圧降下メカニズムの解明

これまで、食品由来の血圧降下ペプチドは数多く報告されているがその多くは ACE 阻害によるものであり、一部のペプチドは血管弛緩の促進によっても血圧降下作用を発揮することが報告されている。我々は、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、上記の強力な血圧降下作用に対して十分なものではなかった。そこで、我々は SHR から摘出した腸管膜動脈を螺旋状に切開した後栄養液中に懸垂し、マグヌス法によって LRA の血管弛緩作用を評価した。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、既知の血管弛緩機構に対する各種阻害剤が LRA の作用に与える影響をマグヌス法によって評価した。その結果、LRA の血管弛緩作用は NO 産生酵素 (NOS)阻害剤である NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)によって阻害された。しかし、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 等従来報告されている NO 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 は従来報告されてきたものとは異なる NO 系を介して血管弛緩作用を示していると思われた。また、血管内皮で産生された NO を受けて血管弛緩を調整する可溶性グアニル酸シクラーゼの阻害剤である 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。更に、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。また、血管内皮モデル細胞である Human Umbilical Vein Endothelial Cells (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一方、Akt のリン酸化には変化がないことが確認された。更に NO 系が LRA の血圧降下メカニズムに寄与することを *in vivo* の試験系でも証明した。

これらのことから、LRA は血管内皮に存在する eNOS のリン酸化を促進することで血管内皮での 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し、これが主たる血圧降下メカニズムであることが明らかとなった。

## 【第 3 章】 TRB がヒトの血圧に与える影響

我々は正常高値血圧・I 度高血圧者を対象とした無作為化プラセボ対照、ダブルブラインド並行群間比較試験により、TRB がヒトに対しても血圧コントロールに有効であるか検証した。その結果、12 週間 TRB を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、動物だけでなくヒトに対しても血圧降下作用を証明した。

以上本論文では米ぬか **thermolysin** 消化物の血圧降下作用を動物およびヒトで確認した。また、その中に含まれる新規の血圧降下ペプチド **LRA** を同定し、**NO** を介した血管弛緩作用により血圧降下作用を発揮していることを明らかにした。