

|           |                                                                                                     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | ま と の ば の お ゆ き<br>的 場 伸 行                                                                          |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                           |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1195 号                                                                                        |
| 学位授与の日付   | 平 成 13 年 3 月 23 日                                                                                   |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                             |
| 研究科・専攻    | 農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻                                                                           |
| 学位論文題目    | Studies on a novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin<br>(卵白アルブミン由来の新規血圧降下ペプチドに関する研究) |

論文調査委員 (主 査)  
教 授 吉 川 正 明      教 授 佐 々 木 隆 造      教 授 内 海 成

### 論 文 内 容 の 要 旨

食品タンパク質の酵素消化物から血圧降下作用を有するペプチドがこれまでに複数見出されており、そのいくつかは高血圧予防のための特定保健用食品として応用されている。それらは全てアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害に基づいた血圧降下作用であり、内因性の動脈収縮・血圧上昇ペプチドであるアンジオテンシンⅡの生成を阻害することにより血圧降下を起こす。一方、動脈弛緩作用を有する多くの内因性ペプチドも血圧降下作用を示すことが知られている。そこで本論文では、食品タンパク質である卵白アルブミンから動脈弛緩および血圧降下作用を有する新規ペプチドを単離し、そのメカニズムの解明を行った。さらに、その血圧降下ペプチドを基により強力な血圧降下作用を持つペプチドを設計した。

得られた強力な血圧降下作用を有するペプチドを食品に応用する方法の1つに、該当強化ペプチドを遺伝子組換え技術により食品タンパク質に導入して血圧降下機能を賦与し、さらにそれを農作物中で生産させることが考えられる。従来の遺伝子組換え (GM) 作物は、除草剤耐性や病虫害抵抗性など生産者の利益に基づいた改変が中心であったが、このように消費者側の利益となる特質を組込むことは次世代の GM 作物として重要な試みである。本論文では、まずその前段階として、強力な血圧降下作用を持つペプチド配列を食品タンパク質へ導入し、大腸菌で発現させた改造タンパク質について血圧降下作用を確認した。得られた結果は以下のように要約される。

1. 卵白アルブミンのキモトリプシン消化物から、高血圧自然発症ラット (SHR) の摘出腸間膜動脈に対する動脈弛緩活性を指標にして6残基の新規ペプチド RADHPF を単離した。本ペプチドは、以前にペプシン消化物から得られた動脈弛緩ペプチド ovokinin (FRADHPFL) の部分構造 ovokinin (2-7) に相当するが、ovokinin よりも強力な動脈弛緩作用を有していた。Ovokinin (2-7) の動脈弛緩作用は内皮依存性であり、ニトロアルギニンメチルエステルで抑制されることから、一酸化窒素が弛緩因子であることを明らかにした。SHR に対する経口投与の結果、ovokinin (2-7) は用量依存的な血圧降下を示し、その最少有効投与量は10mg/kg であった。一方、本ペプチドは正常血圧 Wistar-Kyoto ラット (WKY) に対しては20mg/kg の経口投与でも有意な血圧降下を示さなかった。

2. Ovokinin (2-7) の構成アミノ酸残基を部分的に置換することにより、さらに強力な血圧降下ペプチドの設計を行った。その結果、[Pro<sup>2</sup>, Phe<sup>3</sup>]-ovokinin (2-7) (RPFHPF) は ovokinin (2-7) の場合の約1/30の用量に相当する0.3mg/kg の経口投与で SHR の血圧を降下させた。さらに本ペプチドを改変して得た RPLKPW は0.1mg/kg で有意な血圧降下を示した。つまり、ovokinin (2-7) と比較して100倍の活性強化に成功したことになる。以上の ovokinin (2-7) 誘導体ペプチドはいずれも WKY の血圧は下げないことから、強力かつ理想的な血圧降下物質であることが示された。

3. 強力な血圧降下作用を有する RPLKPW 配列を大豆β-コングリシニンα'サブユニット (559残基) 中に存在する3ヶ所の類似配列に導入するため、α'サブユニット cDNA に部位特異的変異を施した。大腸菌を用いてこの RPLKPW 導入α'サブユニットを発現させたところ、全菌体タンパク質の約10-15%のレベルに達し、そのほとんどが可溶性画分に回収された。イオン交換クロマトグラフィーにより精製した後、得られた RPLKPW 導入α'サブユニットをトリプシンおよ

びキモトリプシンで消化することにより RPLKPW が遊離することを LC/MS により確認した。さらに未消化の RPLKPW 導入  $\alpha'$  サブユニットを SHR に経口投与したところ、20mg/kg という低用量で血圧降下作用 ( $-24\text{mmHg}$ ) を示した。なお、同一条件下で血圧降下作用を示す卵白アルブミンの最少用量は 2g/kg であった。

## 論文審査の結果の要旨

食品タンパク質由来の血圧降下ペプチドの中で、高血圧予防のための特定保健用食品としてこれまでに実用化されてきた血圧降下物質は、全てアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドであった。一方、多くの内因性動脈弛緩ペプチドが血圧降下作用を発揮することが知られているが、動脈弛緩作用に基づいて強力な血圧降下作用を示すペプチドは未だ食品タンパク質からは得られていなかった。本研究では、卵白アルブミンのキモトリプシン消化物から動脈弛緩作用を指標にして新規血圧降下ペプチドを単離し、その動脈弛緩メカニズムを解明するとともに、構成アミノ酸残基を部分的に置換することにより活性の増強に成功している。さらに、得られた強力な血圧降下ペプチドを遺伝子の部位特異的変異により食品タンパク質へ導入することを試みたものである。本論文の評価すべき点は次のとおりである。

1. 卵白アルブミンのキモトリプシン消化物から、6 残基の新規動脈弛緩ペプチド RADHPF (ovokinin(2-7)) を単離した。本ペプチドの動脈弛緩作用は内皮依存性であり、一酸化窒素が弛緩因子であることを明らかにした。本ペプチドは高血圧自然発症ラット (SHR) に対する経口投与の結果、10mg/kg で有意な血圧降下作用を示した。

2. Ovokinin(2-7) の構成アミノ酸残基を 2 残基置換することにより、0.3mg/kg の経口投与で SHR の血圧を降下させる [Pro<sup>2</sup>, Phe<sup>3</sup>]-ovokinin(2-7) (RPFHPF) を得た。さらに本ペプチドを改変して得た RPLKPW は 0.1mg/kg という医薬品に匹敵する少量の経口投与で有意な血圧降下を示した。つまり、ovokinin(2-7) と比較して約 100 倍の活性強化に成功したことになる。以上の ovokinin(2-7) 誘導体ペプチドはいずれも正常血圧ラットの血圧は下げないことから、理想的な血圧降下物質であることが示された。

3. 大豆  $\beta$ -コングリシニン  $\alpha'$  サブユニット (559 残基) 中に存在する 3 ケ所の類似配列に、強力な血圧降下作用を有する上記 RPLKPW 配列を部位特異的変異により導入し大腸菌を用いて発現させたところ、改変タンパク質は全菌体タンパク質の約 10-15% のレベルに達し、そのほとんどが可溶性画分に回収された。さらに本改変タンパク質を精製して SHR に経口投与したところ、20mg/kg という低用量で有意な血圧降下作用を示した。

以上のように本論文は、卵白アルブミンから得られた新規血圧降下ペプチド ovokinin(2-7) が、食品由来のペプチドとしては一酸化窒素に基づいて動脈弛緩作用を示す最初の物質であることを明らかにするとともに、本ペプチドのアミノ酸残基を部分的に置換して得られた強化ペプチドを遺伝子操作により大豆タンパク質に移植することによって、卵白アルブミンの場合の 1/100 以下の低用量で血圧降下作用を示す食品タンパク質の設計に成功したものである。このことは高血圧の予防・治療に役立つ新しい食品の開発に繋がるものであり、食品機能学、ペプチド生理学およびタンパク質工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 13 年 2 月 21 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にあるものと認めた。