

新規セレノネイン含有サバペプチドに含まれる難消化性ペプチドの構造

さとう けんじ¹⁾、えじま あきか¹⁾、まつもと さとし²⁾
佐藤 健司¹⁾、江島 晃佳¹⁾、松本 聡²⁾

1. はじめに

サバペプチドは天然のマサバ、ゴマサバを加熱処理後、微生物由来のプロテアーゼにより限定分解して製造されている。サバペプチドの経口摂取により高脂肪食摂取ラットの非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の進行が抑制され、さらに肝臓中の酸化ストレスマーカー (4-hydroxynonenal) の減少が見出されている¹⁾。これらの結果からサバペプチドがNAFLDの進行を抗酸化により抑制することが示唆されている。サバペプチド中に含まれる強い抗酸化能を持つセレノネインがNAFLDの進行抑制に関与していると考えられている。しかし、サバペプチド中の主要成分のペプチドの機能についてはほとんど見えない。

サバペプチドに限らないが、食品タンパク質の酵素分解物中には非常に多くの異なる構造をもったペプチドが存在する。タンパク質酵素分解物中のどのペプチドが活性を持つかを明らかにすることは非常に困難である。従来は食品中のペプチドを分離し、細胞培養系、酵素反応系などの試験管内の試験系で評価し、活性をもったペプチドが、経口摂取でも活性をもつと推測されてきた。しかし、このように同定されたペプチドの経口摂取後の血中または標的組織中での濃度は低nMレベルであり

SUMMARY

マサバ、ゴマサバの酵素分解物であるサバペプチドの経口摂取により動物モデルで非アルコール性脂肪肝の抑制効果が示されている。サバペプチド中に含まれるセレノネインが活性成分の一つと考えられているが、構成ペプチドの機能は不明であった。経口摂取後生体に移行するペプチドを推定するためにexo型ペプチダーゼでサバペプチドを消化し、残存するペプチドの構造を液体クロマトグラフィータンデム質量分析計により推定した。その結果、ヒドロキシプロリン(Hyp)、プロリン(Pro)、アスパラギン酸(Asp)およびピログルタミン酸(pyroGlu)を含むジ、トリペプチドが同定できた。主要な成分は Pro-Hyp、Leu-Pro、Asp-Ile、pyroGlu-Leuであった。Pro-Hypは線維芽細胞の増殖促進効果が報告されており、pyroGlu-Leuは経口摂取での肝炎抑制、腸内細菌叢の乱れの抑制、細胞に対する抗炎症効果が報告されており、サバペプチドが肝保護作用を持つペプチドを含むことが明らかとなった。またLeu-Pro、Asp-Ileの生体への作用は不明であるが、今後検討する必要がある。

著しく低い²⁾。そのため提案されている機構で生体に作用することに疑問が投げかけられている。一方、コラーゲンペプチドを経口摂取した時には数十μM程度のコラーゲンペプチドがヒトの血漿に存在することが見出され、食事由来のペプチドは実際には従来考えられているより高濃度で存在することが明らかになってきた^{3, 4)}。コラーゲンペプチド以外の植物性タンパク質酵素分解物を摂取した場合、コラーゲンペプチドと比べるとかなり低濃度であるが、従来考えられていた値と比べかなり高濃度である10-100 nM程度がヒト末

梢血で増加することが見出された⁵⁾。これらのペプチドはコラーゲンペプチドのように摂取前後のヒトの血漿のクロマトグラムと比較で見出すことは困難であった。その理由として、ペプチドの誘導化を行い、検出感度を上げてでもコラーゲンペプチドと比べて微量であるため、他の血中成分に妨害されて検出が困難であったことによる。そのため、前もってexo型のペプチダーゼで消化し、分解されないペプチドを同定した。このexoペプチダーゼ抵抗性のペプチドの血漿中での存在を液体クロマトグラフィータンデム質量分析計(LC-

1) 京都大学大学院農学研究科 応用生物科学専攻、2) 株式会社 エル・エス コーポレーション

MS/MS)のmulti reaction monitoring(MRM)モードを用いて検出した⁵⁾。MRMは対象のプレカーサーイオンおよびプロダクトイオンの質量/電荷比(m/z)の両方が一致する成分のみを検出するため極めて特異的な検出が可能であり、ヒトの血中から数nM程度の食事由来ペプチドが検出される。その結果、トウモロコシおよび小麦グルテン酵素分解物を摂取したヒトの血漿からプロリンまたはピログルタミン酸(pyroGlu)をもつジ、トリペプチドの有意な増加が検出された⁵⁾。図1に示す様に、ピログルタミン酸ペプチドはアミノ末端のグルタミン残基の側鎖の酸アミドからアンモニアが遊離し、生じたカルボニル基が α 位のアミノ基と縮合したものである。また*in vitro*の試験によりこれらのペプチドの一部は有意な生理機能を持つことも知られている。そのため、生体に吸収されるペプチドは生理活性ペプチドの良い候補であると考えられる。LC-MS/MSを用いてMRMモードで検出するためには前もって対象の分子の構造を知る必要がある。そこで、血中に移行する活性ペプチドの候補としてサバペプチドの中のexo型ペプチダーゼ抵抗ペプチドを同定することを目的とした。

2. 難消化性ペプチドの同定法

サバペプチド2.5 mgを1 mLの50 mM Tris-HCl緩衝液pH8.0に溶解し、2.45 Uのロイシンアミノペプチダーゼおよび7.7 UカルボキシペプチダーゼAを加え、37°Cで24時間反応させた。酵素分解物の一部はH⁺型の強カチオン交換樹脂(AG50W × 8、Bio-Rad Laboratories)を充填したミニスピнкаラム(Ultrafree-MC、Merck)で分画した。樹脂は50%メタノールに懸濁して充填した。樹脂を100 μ Lの50%メタノールで3回洗浄した後、100 μ Lの0.1%ギ酸で3回洗浄し、平衡化した。酵素分解物200 μ Lを加え、ピログルタミン酸ペプチドを含む溶出画分をピログルタミン酸ペプチド画分として用いた。酵素分解物およびそのピログルタミン酸ペプチド画分、各200 μ Lを、10%アセトニトリルを含む0.1%ギ酸で平衡化したSuperdex peptide 10/30を用いたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により分画した。流速は0.5 mL/分とした。ペプチドが溶出する30分から45分までを1分ごとに分取した(SEC画分31-46)。さらに、酵素分解物のSEC画分20 μ Lに0.3%の6-aminoquinolyl-N-hydroxy succinimidyl carbamate

(AccQ)アセトニトリル溶液 20 μ Lと50 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.8)60 μ Lを加え、50°Cで10分反応させたものを、AccQ誘導体とした。ピログルタミン酸ペプチド画分のSEC画分はAccQによる誘導化を行わずにそのまま使用した。SEC画分、およびそのAccQ誘導化産物 各20 μ Lを、LC-MS/MS(LCMS 8040、島津製作所)で分析した。ペプチドは0.1%ギ酸(A液)で平衡化した逆相HPLCカラム(ODS-3、2.1 × 250 mm、GL Science)で分離した。溶出はA液と80%アセトニトリルを含む0.1%ギ酸(B液)を用いた2液グラジエントにより行った。グラジエントのプログラムは 0-15分; B 0-50%、15-20分; B 50-100%、20-25分; B 100%、25-35分; B 0%で行った。流速は0.2 mL/分で行った。ピログルタミン酸ペプチドの場合は m/z 100-800の範囲を総イオンスキャンモードで検出した。AccQ誘導物についてはcollision energy(CE)-35で生じたAccQ由来のb1イオン(m/z = 171.1)を生成するプレカーサーイオンを検出するプレカーサーイオンモードで検出した。スキャン範囲は m/z = 300-350、350-400、400-450、450-500、500-600、600-800の範囲で行った。検出したピーク中の m/z を測定し、この値に対してCE -15、-35でプロダクトスキャンを行った。得られたプロダクトイオンとプレカーサーイオンの m/z からペプチドの構造を推定した。

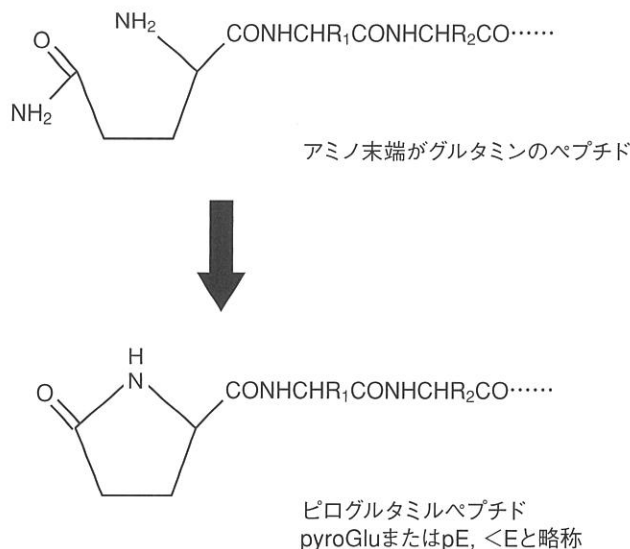


図1 アミノ末端にグルタミンを持つペプチドからピログルタミン酸ペプチドの生成

3. サバペプチド中の難消化性ペプチドの構造

図2にアミノ基をAccQで誘導化し、LC-MS/MSで推定したペプチドを示す。SEC画分と検出した際のイオン強度を示している。LC-MSでのイオン強度は分子によってかなり異なるが、主要な成分としてPro-Hyp(PO)、Leu-Hyp(LO)などのヒドロキシプロリンを持つコラーゲン由

来と考えられるペプチドとLeu-Pro (LP)、Gly-Pro(GP) の様なプロリンを持つペプチド、およびAsp-Ile (DI)等のアスパラギン酸ペプチドが主要成分として含まれていた。ロイシンとイソロイシンはMSでは区別がつかないが、逆相HPLCでは分離できることが多いため、標準との分離時間を比較して同定した。

これまでにヒドロキシプロリン、プロリンをもつペプチドはexo型ペプチダーゼに対して抵抗性があることが知られている^{3~5)}。しかし、これまでにアスパラギン酸ペプチドがexo型ペプチダーゼに抵抗性を持つことは知られていなかった。今後、なぜAsp-Ileがexoペプチダーゼに抵抗性を持つか明らかにしてゆきたい。

図3にピログルタミルペプチド画分の結果を示す。pyroGlu-Leu(pEL)、pyroGlu-Ile-Glu(pEIE)などの疎水性のピログルタミルペプチドと pyroGlu-Glu(pEE)などの親水性ピログルタミルペプチドが認められた。ピログルタミルジ、トリペプチドが難消化性であり、また血中に移行することは既に知られている^{5)~7)}。

4. 同定されたペプチドの機能

今回同定されたサバペプチドのexo型ペプチダーゼ抵抗ペプチドの中にはこれまで試験内、および生体内で機能が報告されているペプチドが存在する。Pro-Hypは線維芽細胞の増殖促進⁸⁾、線維芽細胞⁹⁾および軟骨細胞¹⁰⁾からのヒアルロン酸、グルコサミノグルカンの産生促進が報告され、コラーゲンペプチドを摂取したときの皮膚・関節の状態の改善、また褥瘡治癒促進との関係が指摘されている¹¹⁾。サバペプチドの材料にも当然コラーゲンが含まれており、コラーゲンペプチドの機能も一定持つと考えられる。また最もイオン強度が高かった pyroGlu-Leuは経口摂取でD-ガラクトサミン誘発肝炎(ラット)の抑制⁶⁾、デキストラ

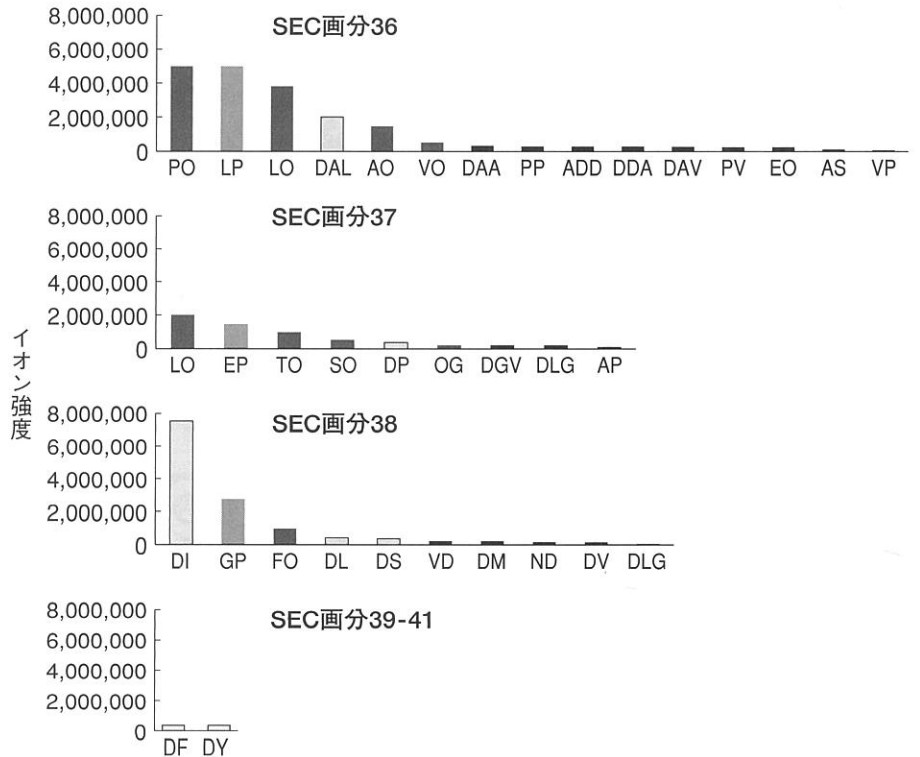


図2 サバペプチドのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)画分中で推定されたアミノ基を持つペプチドの構造

イオン強度はブリダクトイオンのイオン強度を示す。

アミノ酸残基は一字記号で示す：ヒドロキシプロリン(O)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、グリシン(G)、スレオニン(T)、アラニン(A)、プロリン(P)、チロシン(Y)、バリン(V)、メチオニン(M)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、フェニルアラニン(F)。

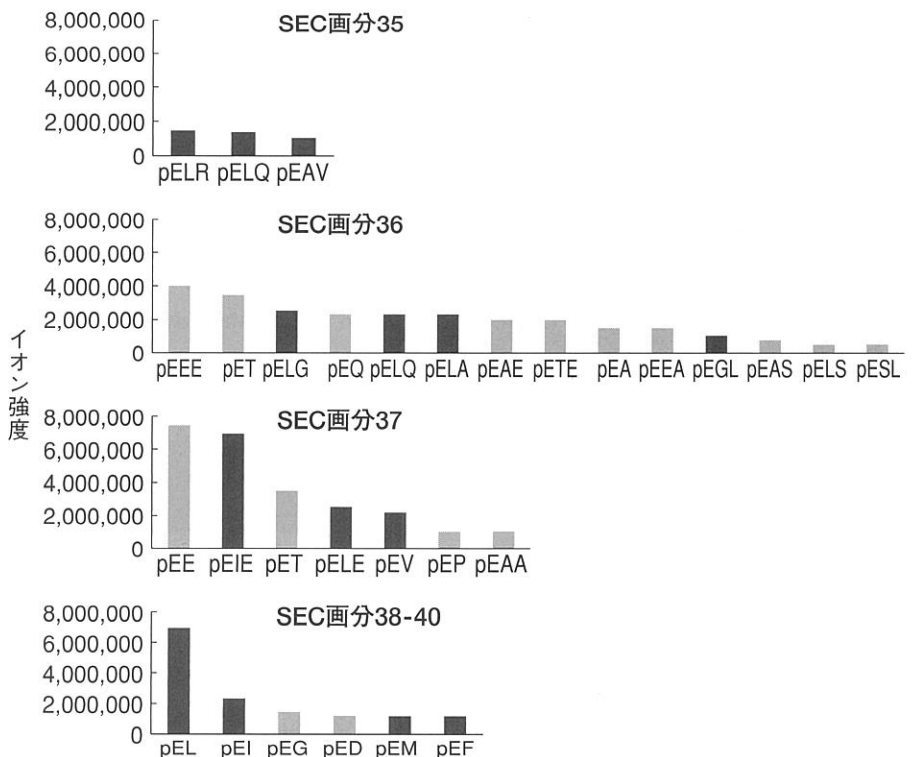


図3 サバペプチドのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)画分中で推定されたピログルタミルペプチドの構造

ピログルタミン酸(pE)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)以外は図2と同じ。

ン硫酸ナトリウム誘発大腸炎誘発腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)の改善⁷⁾が報告されている。さらに試験管内試験でもマクロファージ様細胞からの内毒素(LPS)誘発炎症性物質の産生抑制¹²⁾、初代肝細胞からのインターロイキン(IL)-1 β 誘発NO産生抑制等の抗炎症作用¹³⁾が報告されている。そのため、動物モデルで報告されているサバペプチドのNAFLD進行抑制に関与している可能性がある。pyroGlu-Leuなどのピログルタミン酸ペプチドは、タンパク質を摂取してもほとんど生じないが、ペプチドを加熱するとアミノ末端のグルタミン残基が環化して生じるため、食品としてのペプチドを製造した時に生成する¹⁴⁾。最近、発酵食品中にも存在することが明らかとなり、長い食経験を持つことが明らかとなっている¹⁵⁾。一方、比較的多量に存在するLeu-Pro、Asp-Ile、および親水性ピログルタミン酸ペプチドの生体への機能は今のところ不明である。

今回の研究によりサバペプチドを摂取すると経口摂取後血中で有益な機能をもつペプチド(Pro-Hyp、pyroGlu-Leu)が移行する可能性が高いことを示した。そのため、セレノニン以外にペプチドも肝保護作用を示す可能性が高い。pyroGlu-Leuは単独では前述の肝炎抑制を示すために20(mg/kg 体重)の用量が必要であったが、分画途中の他の成分と混在した状態では0.3(mg/kg体重)でも効果があった⁶⁾。そのため、サバペプチド中の他のペプチドと一緒に摂取することで微量でも効果を発揮する可能性がある。

今後は今回同定されたペプチドが実際にサバペプチドの摂取により、消化管内で生成し、標的組織に移行するかを調べてゆく必要がある。また標的組織に移行するペプチドを単独、または組合わせて摂取して有益な作用が生じることを確認し、そのメカニズムを試験管内試験で解明す

る予定である。

【参考文献】

- 1) Omagari, K., Fukuda, A., Suga, M., Ogata, A., Nishioka, S., Suruga, K., Ichimura, M., Tsuneyama, K. *OBM Hepatology Gastroenterology* 2, doi:10.21926/obm.hg.1803008, 2018.
- 2) Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., Platerink, C., van Koning, T.M.M.G., Kloek, J. *J. Nutri.* **137**, 953-958, 2007.
- 3) Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., Ohtsuki, K. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6531-6536, 2005.
- 4) Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., Sato, K. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, 1532-1535, 2007.
- 5) Ejima, A., Nakamura, M., Suzuki, Y., Sato, K. *J. Food Bioact.* **2**, 104-111, 2018.
- 6) Sato, K., Egashira, Y., Ono, S., Mochizuki, S., Shimmura, Y., Suzuki, Y., Nagata, M., Hashimoto, K., Kiyono, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., Itabashi, M., Sakata, Y., Furuta, S., Sanada, H. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6304-6310, 2013.
- 7) Wada, S., Sato, K., Ohta, R., Wada, E., Bou, Y., Fujiwara, M., Kiyono, T., Park, E.Y., Aoi, W., Takagi, T., Naito, Y., Yoshikawa, T. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8807-8813, 2013.
- 8) Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C., Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., Sato, K. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(2), 444-449, 2009.
- 9) Ohara, H., Ichikawa, S., Matsumoto, H., Akiyama, M., Fujimoto, N., Kobayashi, T., Tajima, S. *J. Dermatol.* **37**, 330-338, 2010.
- 10) Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J., Wada, M. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 1620-1627, 2009.

- 11) Sato, K. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 3082-3085, 2018.
- 12) Hirai, S., Horii, S., Matsuzaki, Y., Ono, S., Shimmura, Y., Sato, K., Egashira, Y. *Life Sci.* **117**, 1-6, 2014.
- 13) Oishi, M., Kiyono, T., Sato, K., Tokuhara, K., Tanaka, Y., Miki, H., Nakatake, R., Kaibori, M., Nishizawa, M., Okumura, T., Kon, M. *Nitric Oxide*, **44**, 81-87, 2015.
- 14) Sato, K., Nishimura, R., Suzuki, Y., Motoi, H., Nakamura, Y., Ohtsuki, K., Kawabata, M. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3403-3405, 1998.
- 15) Kiyono, T., Hirooka, K., Yamamoto, Y., Kuniishi, S., Ohtsuka, M., Kimura, S., Park, E.-Y., Nakamura, Y., Sato, K. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 11660-11667, 2013

● 筆者略歴 ●

さとう・けんじ

Kenji Sato

京都大学大学院農学研究科
応用生物学専攻 教授
1979年 京都大学農学部水産学科入学、
1988年 京都大学農学博士の学位を修得、
1989年 京都府立大学生活科学部助手、
1995年 助教授(生活科学部、人間環境学
部)、2005年 教授(人間環境学部、生命
環境科学研究科)、2014年 京都大学大
学院農学研究科 教授(現在に至る)

えじま・あきか

Akika Ejima

京都大学大学院農学研究科
応用生物学専攻
2001年 京都府立大学人間環境学部食保
健学科入学、2007年 京都府立大学大
学院修了、同年 株式会社ボゾリサーチセン
ター病理部 研究員(～2011)、2015年 京
都大学大学院農学研究科 技術補佐員(現
在に至る)

まつもと・さとし

Satoshi Matsumoto

(株)エル・エス コーポレーション 開発部部长
東京農業大学・農学部・栄養学科栄養学
専攻卒業、東京農業大学・農学部・農芸
化学科生物化学研究室研究生、科学技術庁
(元)・放射線医学総合研究所研究生、某薬
品会社研究所・薬理研究室室長(医薬品・
食品・化粧品関連薬理)を経て、現在、(株)
エル・エス コーポレーション開発部部长、品
質保証責任者、化粧品総括製造販売責任者

注目の新規素材!

「生活習慣病予防」「抗疲労」対応素材

新規成分セレノネイン含有 「特許第5669056号許諾製品」

サバペプチド

強力な抗酸化能をもつセレノネインを含有した
生活習慣病予防、抗疲労対応素材です。

サバのタンパク質をペプチド化したオリジナル素材です。

規格

たんぱく質(g/100g 85.0~95.0%)

脂質(g/100g)0.5以下

セレノネイン含有



国内産(佐賀、長崎県他)の天然サバを
丸ごと酵素分解した成分です

賦形剤を含まない100%サバエキス末



株式会社 エル・エス コーポレーション

〒103-0013

東京都中央区日本橋人形町3-10-1 かしきち人形町ビル3F

Tel 03(3662)7941

Fax 03(3662)7495

[https://www.ls-corporation.co.jp/
request@ls-corporation.co.jp](https://www.ls-corporation.co.jp/request@ls-corporation.co.jp)