

2P-245 米糠タンパク質酵素加水分解物からの生体防御ペプチドの精製とその特性解析

○亀田 光裕, 松嶋 健太, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】 当研究室では、これまでに3種類の米タンパク質から6種類の抗菌ペプチドを見出し、それらのペプチドは、分子量が1,000~3,000 Da程度であること、正味の正電荷を持つこと、等電点が8以上のカチオン性であることなどの共通の性質を有していた。そこで本研究では、米糠タンパク質のプロテアーゼ加水分解液を等電電気泳動によって分離し、カチオン性のペプチドを調製した。また、得られた画分の抗菌活性を測定し、生体防御機能を有するペプチドを調製することを試みた。

【実験方法】 本研究では、各種プロテアーゼを用いて米糠タンパク質を加水分解し、異なるペプチドサンプルを調製した。得られたペプチドサンプルを等電電気泳動によって分離し、そのカチオン性画分の *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* に対する抗菌活性を測定した。

【結果】 各種プロテアーゼを用いて米糠タンパク質を加水分解した後、等電電気泳動によって20画分に分離した。酵素の種類によって各画分のpHと取量が異なり、各画分の抗菌活性も異なっていた。これまでの結果から、米糠タンパク質のプロテアーゼ加水分解物中のカチオン性ペプチドは、抗菌活性を発揮することが確認された。現在、抗菌活性以外の生体防御機能として、カチオン性ペプチドの抗炎症作用と創傷治癒作用についても検討している。

Purification and properties of host defense peptide from enzymatic hydrolysates of rice bran protein.

○Mitsuhiro Kameda, Kenta Matsushima, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, host defense peptide, isoelectric focusing

2P-247 ヒトジペプチジルペプチダーゼ IV を新たな様式で阻害するオリゴペプチド群の発見

○伊藤 圭祐¹, 大野 真澄¹, Vuthituyet Lan¹, 楠畑 雅², 遠目塚 千紗², 小山 洋一², 伊藤 創平¹, 河原崎 泰昌¹
(¹静大院・薬食生命, ²ニッピ)
sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】 我々は抗2型糖尿病効果が期待できる食品・医薬品への応用を目指し、ヒトジペプチジルペプチダーゼ (hDPP) IV 阻害ペプチドの開発を進めている。先行研究において、ジペプチドライブラリーを用いた解析結果から Trp-Arg に強い hDPPIV 阻害効果が見出された。hDPPIV が基質として認識する Xaa-Ala/Pro ジペプチドが競合型阻害を示すことは多く報告されているが、Trp-Arg の阻害様式は不明である。そこで本研究では、Trp-Arg 関連ペプチドと hDPPIV との相互作用の詳細を解析した。

【方法と結果】 Trp-Arg は混合型阻害を示した。解析した19種類 Trp-Arg-Xaa トリペプチドの阻害様式は全て基質と結合した hDPPIV だけに作用するユニークな“不競合型”であり、中でも Trp-Arg-Glu は最も強い阻害効果を示した ($K_i = 0.13$ mM)。トリペプチドの C 末端アミノ酸残基の選択性を基に hDPPIV 結合構造モデルを構築した結果、既存の阻害剤とは異なり、トリペプチドの Trp, Arg, Glu はそれぞれ hDPPIV の Phe357, Glu205/206, Arg125 と相互作用することが示唆された。また、Trp-Arg-Glu の応用例として他の hDPPIV 阻害剤の効果を相乗的に増強することを見出し、詳細な解析を進めている。

本研究成果は世界初の不競合型 hDPPIV 阻害ペプチドの発見であり、hDPPIV 阻害剤開発への新しいコンセプトを提案する。

Trp-Arg-Xaa tripeptides act as uncompetitive-type inhibitors of human dipeptidyl peptidase IV

○Ito Keisuke¹, Ohno Masumi¹, Vuthituyet Lan¹, Kusubata Masashi², Tometsuka Chisa², Koyama Yoh-ichi², Ito Sohei¹, Kawarasaki Yasuaki¹
(¹Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, ²Nippi)

Key words diabetes, di/tripeptides, human dipeptidyl peptidase IV, inhibitor

2P-246 ペプチドライブラリーを用いた NF- κ B および p38 MAPK 結合ペプチドの探索

○春木 満, 木原 慶彦, 堀端 和人, 安達 優太, 平野 展孝
(日大・工・生命)
haruki@chem.ce.nihon-u.ac.jp

【背景と目的】 細胞内シグナル伝達因子や転写因子などは癌の発生や免疫反応において中心的役割を果たしている。このような因子として NF- κ B と p38 MAPK キナーゼ (p38 MAPK) に注目し、その働きを阻害するペプチドの取得を目指した。

【方法と結果】 まずペプチドライブラリーを用いて NF- κ B に結合するペプチドの探索を行った。その結果、共通性の高い配列が得られ、このペプチド配列をディスプレイしたファージが NF- κ B に特異的に結合することを確認した。そこで、ファージにディスプレイされた配列のペプチドを合成し、NF- κ B と DNA の結合の阻害活性を解析した。その結果、ペプチドの濃度を増加させると結合率の減少がみられ、0.2 mM で 50% の結合が阻害された。したがって、このペプチドは弱いながらも NF- κ B と DNA の結合を阻害することが示された。ついで、p38 MAPK のリン酸化部分に結合するペプチドの探索を行った。その結果、共通性の高い配列が得られ、このペプチド配列をディスプレイしたファージが p38 MAPK に特異的に結合することを確認した。得られたファージが p38 MAPK のリン酸化部位に特異的に結合するかを調べるために、p38 MAPK のリン酸化部分に対する抗体を加えて ELISA を行った。その結果、ファージの場合に比べて抗体を加えた場合にはファージの結合が阻害されることが示された。したがって、得られたファージは p38 MAPK のリン酸化部位に特異的に結合すると考えられる。

Screening of NF- κ B and p38 MAPK binding peptides using phage display peptide library

○Mitsuru Haruki, Yoshihiko Kihara, Kazuto Horigome, Yuuta Adachi, Nobutaka Hirano
(Dept. Chem. Biol. Appl. Chem., Coll. Eng., Nihon Univ.)

Key words NF- κ B, p38 MAPK, phage display, peptide

2P-248 ヒトジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害ジペプチドの網羅的解析

○Vuthituyet Lan¹, 伊藤 圭祐¹, 大野 真澄¹, 本山 貴康², 河原崎 泰昌¹
(¹静大院・薬食, ²不二製油)
s13211@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】 我々は抗2型糖尿病効果が期待できる食品・医薬品への応用を目指し、ヒトジペプチジルペプチダーゼ (hDPP) IV 阻害ペプチドの開発を進めている。ペプチド群の網羅的解析データは多種多様なペプチドが混在する食品の包括的機能性評価等に活用できるだけでなく、標的分子への親和性を予測可能とすることで医薬品の開発へも有用である¹⁾。そこで本研究では、ジペプチドライブラリーを用いて hDPPIV 阻害効果を網羅的に解析した。

【方法と結果】 出芽酵母により組換え生産した hDPPIV を用いて 337 種類のジペプチドの阻害効果を定量解析し、1 位~337 位までランキングした。最も高い hDPPIV 阻害効果を有したジペプチドは Trp-Arg ($IC_{50} = 0.020$ mM) であった。各ジペプチドの過去の報告の有無と阻害効果の高低にはほとんど関連がなく、阻害効果の高い TOP 17 ジペプチド中からも 5 個の新規ジペプチドが見出された (Thr-His; $IC_{50} = 0.048$ mM, Asn-His; $IC_{50} = 0.069$ mM, Val-Leu; $IC_{50} = 0.074$ mM, Met-Leu; $IC_{50} = 0.091$ mM, Met-Met; $IC_{50} = 0.093$ mM)。得られたデータを活用し、各種食品たん白質のアミノ酸配列における hDPPIV 高阻害ペプチドの出現頻度を算出した結果、大麦ホルテイン、小麦グルテニン、菜種クルシフェリンが hDPPIV 阻害ペプチド源として特に高いポテンシャルを有することが示唆された。

1) Ito *et al.* *Nature Commun.* (2013) 4, 2503.

Comprehensive analysis of human dipeptidyl peptidase IV inhibitory dipeptides

○Vuthituyet Lan¹, Keisuke Ito¹, Masumi Ohno¹, Takayasu Motoyama², Yasuaki Kawarasaki¹
(¹Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, ²Fujioco, Ltd)

Key words diabetes, di/tripeptides, human dipeptidyl peptidase IV, inhibitor