

バイオインフォマティクス技術を活用した新規高機能性ペプチドの探索

向井友花¹⁾ *、池田有理²⁾

1) 青森県立保健大学、2) 明治大学

Key Words ①機能性ペプチド ②*in silico*スクリーニング ③機能性評価
③脂質代謝改善作用 ④培養細胞

I. 研究の背景と目的

従来、食品に含まれる新規の機能性成分の探索研究は、スクリーニング、つまり網羅的な実験検索の手法を基盤として行われてきた。すなわち、機能性成分が含まれると考えられる食材から候補となる成分を抽出し、酵素分解や分画の後、全画分の生理活性測定により候補を絞り込み、単離精製して機能性成分を同定する、という方法が定石である。しかしながら、膨大な数の成分の中から生理活性を有するわずかな物質を捉えるのは、効率の良い方法であるとは言い難い。もし、既存の情報から機能性成分を予測することができれば、新規機能性成分の探索研究の加速が期待できる。そこで、配列情報を活用して未知タンパク質の構造や機能が推定できる生命情報科学（バイオインフォマティクス）の技術を活用した『*in silico* スクリーニング』による候補ペプチドの選出と、栄養生化学的手法による機能性評価を連動させることで、さらに強い生理活性を有するペプチドや新規の高機能性食材の発見の促進に貢献できるとの着想を得た。

本研究では、バイオインフォマティクス技術と栄養生化学的機能性評価によるハイスループットな新規高機能性ペプチドの網羅的同定法の確立を目指した基盤的な研究を行った。すなわち、脂質代謝改善作用のある既知の機能性ペプチドのアミノ酸配列情報を基に、1) 既知ゲノム ORF を対象として完全一致あるいは類似性の高い配列を持つ生物種やそのタンパク質の高速かつ網羅的な検索、2) 培養細胞を用いた機能性ペプチドの脂質代謝改善作用の機能性評価系の樹立、を目的とした。

II. 研究方法

1. 高機能性ペプチド候補配列の *in silico* スクリーニング

肝細胞において脂質代謝改善作用が報告されている既知のペプチド FVFNATSN¹⁾を問い合わせ配列として、タンパク質アミノ酸配列データベースを対象に、完全一致検索を BLASTP、および配列相同性検索を FASTA を用いて行った。

2. 候補ペプチドの機能性評価法の構築

高機能性ペプチド候補の脂質代謝調節機能について、培養細胞を用いて評価する系の確立を試みた。ここでは、ヒト肝臓由来株化細胞（以下 HepG2 細胞）を高グルコース環境下（30mM グルコース含有 DMEM 培地）で培養してトリグリセリド合成を促進した脂質代謝異常モデルを作製し、化学合成した FVFNATSN に曝露して細胞内トリグリセリド含量を Triglyceride Quantification Kit（BioVision）を用いて定量した。

*連絡先：〒030-8505 青森市浜館間瀬 58-1 E-mail: y_mukai@auhw.ac.jp

III. 結果および考察

1. 高機能性ペプチド候補配列の *in silico* スクリーニング

1) FVVNATSN の完全一致配列検索

完全一致した領域を持つタンパク質 8 種がヒットした。すべて大豆由来の β -コングリシニンのエントリーであった。

2) FVVNATSN の配列相同性検索

該当ペプチド配列領域を含む "PAAYPFVVNATSNLNFLA" 配列を問い合わせ配列とした FASTA による配列相同性検索により、マメ科植物 8 種に該当ペプチドに相当する領域を有するタンパク質が発見された。

2. 候補ペプチドの機能性評価法の構築

1) 脂質代謝異常モデル株化肝細胞の作製

30mM グルコースに曝露された HepG2 細胞は、標準的なグルコース濃度 (5.5mM) と比較して、細胞内トリグリセリド含量の有意な増加が認められた。高グルコース含有 DMEM 培地で培養した HepG2 細胞は脂質代謝異常モデルとなり得ることが確認された。

2) FVVNATSN の毒性試験

各濃度 (0, 50, 100, 200, 300, 400 μ M) の FVVNATSN に曝露された HepG2 細胞の細胞生存率あるいはタンパク質量の有意な減少は認められなかった。少なくとも 400 μ M までの濃度においては FVVNATSN による細胞毒性は無いものと考えられた。

3) FVVNATSN の細胞内トリグリセリド合成抑制作用

リセリド合成抑制作用

高グルコース環境下で培養し脂質代謝異常とした HepG2 細胞の細胞内トリグリセリド量は、FVVNATSN 濃度依存的に減少した (図 1)。FVVNATSN が肝細胞のトリグリセリド合成抑制作用を有することが見出された。

以上の結果から、本培養細胞系を用いることにより候補ペプチドが肝細胞のトリグリセリド合成に及ぼす影響を定量評価することが可能になった。今後、高機能性ペプチド候補の脂質代謝調節機能評価に応用し、*in silico* スクリーニングによる網羅的検索と連動させることでさらにハイスループットな新規高機能性ペプチドの探索が可能になると考えられる。

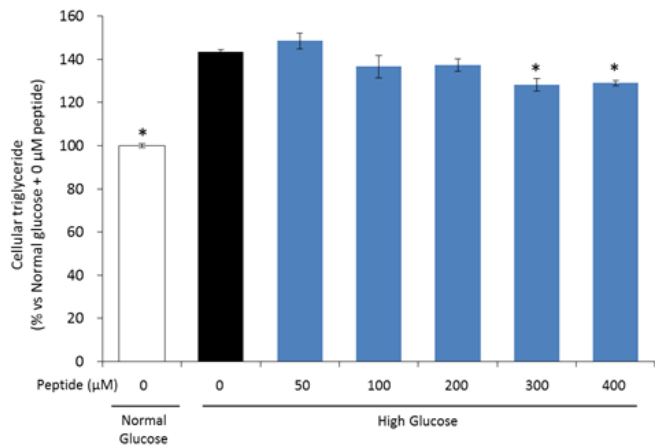


図 1 細胞内トリグリセリド量に及ぼす FVVNATSN 濃度の影響。値は平均値 \pm 標準偏差。* $p < 0.05$ vs High Glucose + 0 μ M peptide.

IV. 文献

1) Cho SJ, Juillerat MA, Lee CH. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. *J Agric Food Chem* 56, 4372-6, 2008.