

## インシリコ探索で銀杏タンパク質から生理活性ペプチドを発見

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院工学研究科の本多 裕之 教授らの研究グループは、銀杏タンパク質から新規の生理活性ペプチド<sup>注1)</sup>を発見しました。

コレステロールは胆汁酸ミセル<sup>注2)</sup>に包まれて吸収されますが、ミセルが崩壊されるとコレステロールの吸収が抑えられるため、血中コレステロールを低下させることが可能です。これまでに天然アミノ酸からなる胆汁酸ミセル崩壊ペプチドが探索されてきましたが、可食性タンパク質<sup>注3)</sup>由来のペプチドは大豆コングリシニン由来のVAWWMY<sup>注4)</sup>のみでした。天然アミノ酸からなるペプチドは主に胃の消化酵素ペプシン<sup>注5)</sup>で分解されますが、VAWWMYもペプシンで分解される問題点がありました。

一方、同グループは富士シリシア化学株式会社と共同で、ペプチドを吸着できる無毒な高温焼成シリカゲルを開発しました。このシリカゲルは 10nm の細孔を持ち、酸性かつ疎水性のペプチドを胃酸の低 pH 条件下で細孔内部に吸着し、ペプチドの胃での加水分解を防ぐことができ、腸送達を可能にします。

本研究で、胆汁酸ミセル崩壊活性を持ち、シリカゲル吸着特性を兼ね備え、かつ可食性タンパク質由来の生理活性ペプチドとして、銀杏タンパク質由来の天然ペプチド VEEFYCS の探索に成功しました。この探索は、機械学習<sup>注6)</sup>を用い 35 万種類にも及ぶ可食性ペプチドデータベースからコンピュータで探索するインシリコスクリーニング<sup>注7)</sup>であり、従来の探索の困難さを一気に解決する全く新しい方法です。食品分野で使用する生理活性ペプチドは、可食性タンパク質を抽出し、産業用酵素で分解し、カラムクロマトグラフィーなどで分画し、生理活性画分を同定し、産業応用の可能性を追究するという非常に多くの工程と時間と人手をかける方法ですが、大学院生 1 人で約半年の探索期間で発見できており、非常に高速な探索法であることを実証しています。

本研究は、2021 年 10 月 18 日付学術雑誌「Foods, 10, 2496 (2021)」に掲載されました。

## 【ポイント】

- ・銀杏タンパク質からコレステロール低下作用が期待できるペプチド VEEFYCS を発見した。
- ・機械学習を使って可食性ペプチドデータベースからコンピュータ探索できることを示した。
- ・当該ペプチドは胆汁酸ミセルを崩壊させる活性を示す。
- ・さらに酸性条件下で無毒なシリカゲルに吸着し胃分解抵抗性を示すことで腸送達が可能。

## 【研究背景と内容】

### 生理活性ペプチド

ペプチドは 20 種類の天然アミノ酸が 2 から 20 個程度連なったポリマーです。このため無数の配列の可能性があります。糖類のような親水性分子から脂質のような疎水性分子まで、電荷も酸性から塩基性まで幅広く分布します(図 1A 参照)。認識できる相手分子を選ばず、生体内であらゆる反応に関与します。近年では、生活習慣病の予防・改善を目的とした生理活性ペプチドが注目されており、実際に血圧降下、抗酸化作用などの生理活性ペプチドが発見されています。また、特定保健用食品だけでなく機能表示食品<sup>注⑧</sup>も制度化され、ペプチドを含め生理活性を示す食品添加物市場の拡大が続いています。

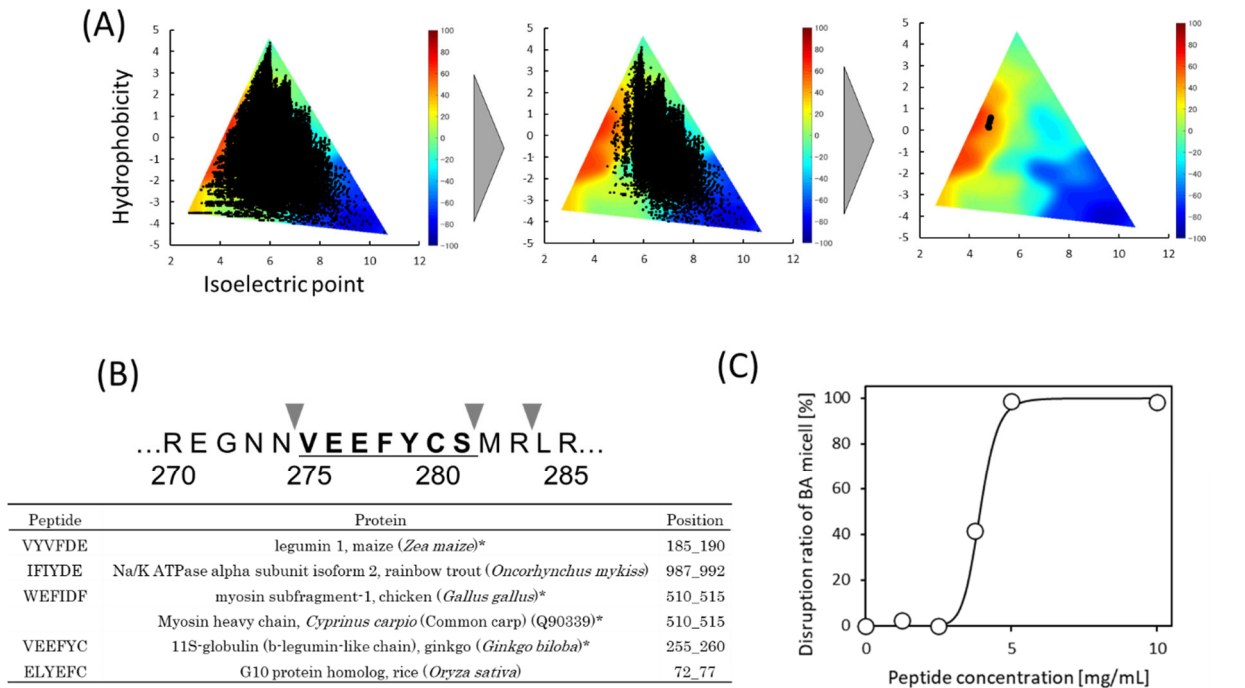
### 可食性タンパク質からの生理活性ペプチドの探索

食品添加物として生理活性ペプチドを利用するためには、乳・卵・魚介類・豆類・穀類・海藻類など食経験のある毒性のない食材由来のタンパク質を加水分解することで探索／製造されます。しかし、食品分野で使用する生理活性ペプチドの製品化は、従来、食材を粉碎・脱穀・脱脂などの前処理をしたのち可食性タンパク質のみを抽出し、動植物あるいは微生物由来の産業用酵素で分解し、カラムクロマトグラフィーなどで精密分画ののち、細胞試験や動物試験で生理活性画分を同定し、ペプチドを特定、大規模製造の可能性や経済性を精査したうえで産業応用の可能性を追究する、という非常に多くの工程と時間と人手をかける方法によってのみ実現されてきました。ペプチドの機能はタンパク質の状態では不明で、加水分解して初めて顕在化するためです。ペプチドは無数の配列可能性があり、幅広い特性を持つため、認識できる相手分子を選ばず、生体内であらゆる反応に関与する可能性があります。これらのペプチドを健康増進に利用するためには、高速探索法の開発が非常に重要です。

### コレステロール吸収抑制作用

コレステロールは、生体内で細胞膜の構成成分となるだけでなく消化に欠かせない胆汁酸やホルモンのほか、ビタミン D の原料でもあるため必要な栄養素です。しかし、血中濃度が高くなると肥満や動脈硬化の原因になるため、脂質代謝異常症と診断されます。脂質代謝異常症は日本国内で 220 万人にもおよび漸増を続けており、生活習慣病の中では高血圧、糖尿病に次いで多くの方が通院治療を受けています。治療薬としては、肝臓でのコレステロール合成を抑える薬や排泄を促進する薬、コレステロールを積極的に代謝させる薬などがありますが、コレステロールの吸収抑制も重要な標的経路です。コレステロールは脂溶性が高く、食品中のコレステロールは腸内で形成される胆汁酸ミセルに包埋されて吸収されます。胆汁酸に結合しミセル崩壊活性を示す物質は、コレステロールの吸収を抑えて血中コレステロールを低下される効果があります。こ

の作用を示す可食性タンパク質由来のペプチドとして大豆コングリシニン由来の VAWWMY が知られていますが、胃の消化酵素ペプシンで分解されることが課題でした。



## 図 1 研究成果の概要

- A) 6 残基ペプチドの特性マップ、左：可食性 6 残基ペプチド 98387 種類すべてをプロット、中：胆汁酸結合活性を持つペプチドのみのプロット、右：腸送達スコア 50 以上の 5 ペプチドを表示。これがインシリコスクリーニングの結果である
- B) 5 種類の 6 残基ペプチドと由来及び 11S グロブリンタンパク質の VEEFYCS ペプチド近傍のサーモライシン切断サイト
- C) VEEFYCS ペプチドのミセル崩壊活性 (約 4mg/ml で試験した半分のコレステロール含有ミセルが崩壊する)

## 得られた成果

まず、食経験のある可食性タンパク質 710 種類が収録されているデータベース BIOPEP-UWM<sup>注9)</sup> (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) を使って、各タンパク質の N 末端<sup>注10)</sup> から 4 残基ずつ 1 残基ずつずらして配列設計 (具体的には ABCDEF という配列に対して ABCD、BCDE、CDEF という配列設計) した約 20 万種類のペプチドデータベースを構築しました。同様に 5 残基から 7 残基までのライブラリー<sup>注11)</sup> も構築し、重複のないペプチド配列のみを収録した総数 35 万種類からなるペプチドデータベースを構築しました。

次に、胆汁酸結合ペプチドの特性を評価しました。Fmoc 固相合成法<sup>注12)</sup> でセルロース膜上に 460 種類のペプチドをランダム配列でスポット合成したペプチドアレイを作製し、胆汁酸に結合するペプチドを胆汁酸抗体及びその 2 次抗体を用いて検出しました。結合するポジティブペプチドと結合しないネガティブペプチドの特徴量、すなわち各残基のアミノ酸の物理化

学的な特徴(疎水度、電荷、分子量、極性など 7 種)や各指標の平均値、最大値、最小値、偏差などの指標を用いて、ランダムフォレスト<sup>注 13)</sup>で機械学習し、配列特徴量から胆汁酸結合活性を推定するモデルを構築しました。

さらに、腸送達を評価しました。既往の研究で開発済みの高温焼成シリカゲルに、酸性条件で結合し中性条件で脱離できる腸送達に適したペプチドを 32 種類の特徴の異なる代表ペプチドで評価しました。ペプチドの疎水度及び電荷でペプチドの特性をマップ化したところ、酸性及び疎水性のペプチドが腸送達に適していることが分かりました。

35 万種類の可食性ペプチドデータベースのペプチドを 2 段階で探索しました。第 1 段階として、上記機械学習モデルで、胆汁酸に結合しやすいペプチドを選別しました。胆汁酸に強く結合するペプチドは胆汁酸ミセル崩壊活性も期待できます。第 2 段階として高い腸送達活性が期待できるペプチドをマップから探索しました。その結果 5 種類の 6 残基可食性ペプチドが探索できました。加水分解酵素による切断予測サイト (Peptide Cutter : [https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/))<sup>注 14)</sup>で評価したところ、VEEFYC のみが切断酵素サーモライシンによって C 末端にセリン(S)残基を付与した 7 残基ペプチドとして取り出せることが推定されました。VEEFYCS は、銀杏種子に含まれるレグミン(グロブリン様貯蔵タンパク質:タンパク質配列データベース UniProt <sup>注 15)</sup> Q39770)に存在するペプチドです。そこで、実際に名古屋大学東山キャンパスのイチョウから銀杏を採取し、実験室で脱殻、粉碎、種子可食部貯蔵タンパク質のアルカリ抽出を行い、実際にサーモライシンを作用させたのちに LC-MS で分析したところ、7 残基ペプチド VEEFYCS を確認しました。これは、VEEFYCS ペプチドがレグミンのβサブユニットの N 末端付近に存在し容易に回収できたためと考えられます。この 7 残基ペプチドの胆汁酸ミセル崩壊活性及び腸送達活性を調べたところ、ミセル崩壊活性は既知の VAWWMY と遜色なく、腸送達活性も高かったです。

## 【成果の意義】

胆汁酸ミセル崩壊活性を持つ物質は、吸収抑制することで血中コレステロールを低下させます。この活性を持つペプチドは、脂質代謝異常症の改善が期待できるため注目されてきましたが、可食性タンパク質由来のペプチドは 1 例しかなく、そのペプチドも胃のペプシンで分解されるため、分解されずに直接腸送達できるペプチドの開発が望まれていました。同グループが開発した生体に無毒な高温焼成シリカゲルは、胃での分解を抑えて腸送達を可能にする安価なペプチドキャリア(送達体)です。このキャリアに吸着可能な特性を示し、しかも可食性タンパク質由来のペプチドとして発見した銀杏貯蔵タンパク質由来ペプチド VEEFYCS は、健康食品など、安全な食品添加物の開発につながります。また、今回、機械学習モデルと腸送達活性評価マップを使うことで、実際に可食性タンパク質から生理活性ペプチドを約半年の研究期間で探索することに成功しました。これは生理活性ペプチドのインシリコスクリーニングの先鞭になる優れた成果です。

## 【用語説明】

注 1)ペプチド :

アミノ酸がペプチド結合で連なったポリマー。タンパク質になる天然アミノ酸は 20

種類ある。

注 2)胆汁酸ミセル:

胆汁酸は胆汁に含まれる有機酸で、肝臓でコレステロールから合成される。ヒトではコール酸、ケノデオキシコール酸が一次胆汁酸として合成され、さらにアミノ酸のグリシンあるいはタウリンとの抱合体を形成して、胆汁成分として十二指腸に分泌される。胆汁酸は疎水性が高いため分子同士が会合してコロイド粒子を作る。これをミセルと呼ぶ。胆汁酸は食物として腸に入ってきた脂肪をミセル化して吸収を促進する。コレステロールも胆汁酸ミセルに包埋されて小腸から吸収される。

注 3)可食性タンパク質:

食経験のある食物由来のタンパク質。乳、卵、魚介類、大豆などの豆類、米や小麦などの穀類など多数ある。

注 4)配列情報 VAWWMMY:

ペプチドはアミノ酸配列の違いで機能が発現したり消失したり、別の機能が発現されたりするため、その配列情報がとても重要である。20種類あるアミノ酸を1文字表記した。Vはバリン、Aはアラニン、Wはトリプトファン、Mはメチオニン、Yはチロシンを示す。ちなみにコングリシニンは大豆の主要タンパク質の1つであり、中性脂肪、内臓脂肪の軽減効果があると知られている。

注 5)消化酵素ペプシン:

食物の消化を助けるため胃で分泌される代表的なタンパク質加水分解酵素。アミノ酸のポリマーであるタンパク質のペプチド結合を加水分解し、低分子のペプチドやアミノ酸にしてタンパク質の吸収を促す。体内ではほかに膵液中に分泌されるトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼなどのプロテアーゼがある。

注 6)機械学習:

学習データを使ってある現象の本質を帰納法的に明らかにしようとするアルゴリズムあるいは構築した数学的関係式(モデル)のこと。ここではアミノ酸の物理化学的特徴を説明変数として生理活性の大小を学習している。

注 7)インシリコスクリーニング:

in silico(インシリコ)は、in vivo(生体内で)や in vitro(試験管内で)に対応して作られた用語で、「コンピュータ(シリコンチップ)の中で」を意味するこの概念は主に薬物探索分野で使われてきた。インシリコスクリーニングとは、新規薬物の候補化合物の構造などの情報とそれに対応する薬理活性や副作用などの情報をデータベース化して、コンピュータに入力し、コンピュータ上で仮想実験を行い、薬物として優れた性質を持つ化合物を選択すること。化合物ライブラリーが膨大になればなるほど、すべて科学実験で探索することは不可能なので、正確にインシリコスクリーニングできる方法の確立が強く望まれている。

注 8) 特定保健用食品及び機能表示食品：

どちらも保健機能食品（一般食品と医薬品の中間に位置する一定の機能を持つ食品群）に含まれ、どちらもその機能に科学的な根拠を持つ。特定保健用食品（トクホ）はその機能を安全性も含めて国が審査し内閣総理大臣が認可した食品。一方、機能表示食品は平成 27 年から始まり、機能や安全性を販売する事業者（企業）の責任において、消費者庁に届け出を行って販売されるもの

注 9) BIOPEP-UWM:

可食性タンパク質のみに特化して収載されている最大規模のデータベース。現在 740 種類まで増えている。

注 10) N 末端:

タンパク質やペプチドはアミノ酸がペプチド結合で連結し、ひも状分子として合成される。ペプチド結合はアミノ酸のアミノ基とカルボキシ基の間で生成する。このため、末端はアミノ基もしくはカルボキシ基になる。アミノ基末端を N 末端、カルボキシ末端を C 末端と呼ぶ。

注 11) ライブラリー:

配列の異なる多数のペプチドを合成した集団のこと。評価できる多数のペプチドが集められたコレクションなのでライブラリーと呼ばれる。

注 12) Fmoc 固相合成法:

高収率で  $\alpha$  アミノ酸をペプチド結合で連結させるための化学合成方法。反応後の目的分子以外の不要物や残存試薬の除去が簡便である。N 末端のアミノ基を塩基で除去できる Fmoc 基で保護する方法。 $\alpha$  アミノ酸の側鎖は別の保護基で保護する

注 13) ランダムフォレスト:

機械学習の方法の 1 つ。決定木という方法を組み合わせた手法。各決定木の説明変数は異なる。各決定木の判定を多数決によって最終判定にする。組み合わせることで汎用性を向上させている。

注 14) Peptide Cutter:

Swiss Institute of Bioinformatics が運営するポータルサイト Expasy の中の 1 つのリソース。無料のリソースで、利用者がペプチド配列を入力すると、38 種類のプロテアーゼの加水分解を推定できる。

注 15) UniProt:

タンパク質の配列と機能に関する網羅的で高精度の情報を、無料で提供するデータベース。タンパク質ごとに独立した番号が付与されている。相同性検索や発見された学術論文もリンクされている。分かっているれば立体構造も表示できる。

**【論文情報】**

掲載紙: Foods, 10, 2496 (2021)

論文タイトル: In Silico Screening of a Bile Acid Micelle Disruption Peptide  
for Oral Consumptions from Edible Peptide Database

著者: Kento Imai, Yuri Takeuchi, Kazunori Shimizu and Hiroyuki Honda

名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻

DOI : 10.3390/foods10102496

URL : <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/10/2496>