原　著

ブタ冠状動脈において血管平滑筋弛緩作用を有する新規の魚類由来ペプチド

木村友彦

山口大学大学院医学系研究科生体機能分子制御学分野(生理学第一)　宇部市南小串１丁目１－１（〒755-8505）

Key words：魚類由来ペプチド，血管平滑筋弛緩，質量分析計，合成ペプチド，カルシウム非依存性血管弛緩

和 文 抄 録

血管拡張薬は，虚血性心臓病，高血圧症，心不全など多くの心血管病に対して，急性期／慢性期を問わず，頻用されている治療薬である．これらの心血管病では，急性発症や急性増悪する場合も少なくないため，日常から摂取可能な食品や食品成分の中から，血管弛緩を引き起こす成分が発見できれば，これらの心血管病の予防の一助となる可能性が期待される．さらに，同定された食品成分が水溶性であれば，注射薬の開発にも繋がると期待される．

そこで，食品や食品成分から幅広くスクリーニングを行い，血管弛緩作用を有する食品成分として，水溶性の魚類由来ペプチド群（FDPFs）を見出した．FDPFsは，食用可能なタンパク質分解酵素を用いて魚類タンパク質から生産されたペプチド群であり，内膜を除去したブタ冠状動脈平滑筋条片を濃度依存性に強力かつ持続的に弛緩させた．さらに，タンデム型質量分析計を用いて，FDPFsの中から，連続性のあるアミノ酸配列を有する４つのペプチド（PG，GPG，VGPG，VGPGG）を同定した．これらのペプチドは生理活性を有するものとして過去に全く報告のない新規ペプチドであった．

FDPFsから同定された新規ペプチドのアミノ酸配列に従って合成したペプチドは，実際にブタ冠状動脈平滑筋条片を濃度依存性に弛緩させた．さらに，ペプチド長に応じて血管弛緩作用も増強したため，最長のVGPGGを認識する新規の受容体の関与が示唆された．また，この弛緩は，血管平滑筋の細胞質カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の低下を伴わなかったため，平滑筋収縮のCa^{2+}感受性の低下によるものと考えられた．

FDPFsは強力かつ持続的な血管弛緩作用を有していたことから，血管病を予防する有望な食品成分となり得ると期待される．また，同定ペプチドも同様な作用を有しており，また水溶性であることから，注射液などの医薬品への応用が可能となれば，心血管病の急性期治療へ貢献できる可能性を持っていると期待される．

緒　　言

血管拡張薬は，虚血性心臓病，高血圧症，心不全など多くの心血管病に対して急性期／慢性期を問わず頻用されている治療薬である．これらの心血管病では，急性発症や急性増悪する場合も少なくないため，日常から摂取可能な食品や食品成分の中から，血管弛緩を引き起こす成分が発見できれば，これらの心血管病の予防の一助となる可能性が期待される．さらに，同定された食品成分が水溶性であれば，注射薬の開発にも繋がると期待される．

そこで，食品や食品成分から幅広くスクリーニングを行い，強力な血管弛緩作用を有する食品成分として，水溶性の魚類由来ペプチド群（FDPFs）を

平成27年２月９日受理

見出したので報告する．本研究の目的は，このFDPFsの血管弛緩作用を実験的に検証することである．

試薬と実験方法

1　試薬類

ブラジキニン（BK）はペプチド研究所，合成ペプチドのPGGはスクラム株式会社，PGGを除くその他の合成ペプチドは国産化学，その他のすべての試薬は和光純薬より最上級の品質のものを購入した．FDPFsは食用可能なタンパク質分解酵素（プロテアーゼN「AMANO」）を用いてカツオ動脈球から生産[1)]されたものであり，林兼産業株式会社から入手した．

2　標本

北九州食肉センターより，新鮮なブタ冠状動脈（左前下行枝）を主幹分岐部の約1cm下から約3cm採取し，あらかじめ混合ガス（95% O_2, 5% CO_2）を通気し氷冷したKrebs液（123mM NaCl，4.7mM KCl，15.5mM $NaHCO_3$，1.2mM KH_2PO_4，1.2mM $MgCl_2$，1.25mM $CaCl_2$，11.5mM D-glucose）で動脈内の血液を洗い流し，研究室に持ち帰った．採取当日に血管周辺の脂肪を取り除いた後，外膜を取り除き，Krebs液中にて4℃で保存した．

実験当日，あらかじめ混合ガスで通気したKrebs液中にて，血管を長軸方向に切り開き，剃刀を用いて平滑筋条片1mm×4mmを作製した．内皮（内膜）は，血管を長軸方向に切り開いた時点で，綿棒を用い血管内腔を軽く一方向に擦り，除去した．内膜の除去は，BKによる弛緩反応の消失により確認した．

3　ブタ冠状動脈血管平滑筋条片（1mm×4mm）を用いた張力測定

張力測定実験については，以前の論文で記述した方法に従って行った[2-8)]．具体的には，ワイヤーの片側に内膜と外膜を除去した血管標本を吊るし，反対側をトランスデューサー（FDピックアップ：Panlab）に繋ぎ，増幅器（歪圧力用アンプ：Panlab）を通して記録計（卓上型ペンレコーダーU-603：Pantos）で張力を検出した．

血管条片は，マグヌス管中の7mlのKrebs溶液に浸るよう調整し，Krebs液は常に混合ガスでバブリングした．マグヌス管外は，恒温槽にて37℃に保った水を循環させた．また，交換用の試験液についても，37℃で保温し混合ガスを通気したものを用いた．10分後に高（118mM）カリウム液（10.9mM NaCl，116.8mM KCl，15.5mM $NaHCO_3$，1.2mM KH_2PO_4，1.2mM $MgCl_2$, 1.25mM $CaCl_2$，11.5mM D-glucose）に交換し脱分極収縮を5分間引き起こし，その後Krebs液に交換し5分間弛緩させ，静止張力を調節した後，さらに5分間Krebs液中での張力を観察する操作を繰り返し，高カリウム脱分極による収縮の安定性と大きさを指標に静止張力を最適化した．

静止張力を最適化した後で，40mMカリウム溶液（40mM K^+；87.2mM NaCl, 38.8mM KCl, 15.5mM $NaHCO_3$, 1.2mM KH_2PO_4, 1.2mM $MgCl_2$, 1.25mM $CaCl_2$，11.5mM D-glucose）を加え，その収縮が定常状態に達した後，BKを最終濃度1μMになるように加えて内皮の有無を確認した．内皮が温存されている場合，弛緩が起こるが，除去した場合，弛緩は起こらない．

その後，40mMカリウム溶液により収縮させ，FDPFsまたは合成ペプチドを加え，血管弛緩反応を観察した．弛緩率は，40mM K^+の収縮を100%として，最大弛緩率を表した．

4　質量分析計によるペプチドの同定

FDPFsのアミノ酸配列決定は，タンデム型質量分析計（API 2000, AB SCIEX社製）を用いて決定した．

まず，最初にFDPFsの質量分析（MS）スペクトルを得た後，ターゲットとするペプチドのMSスペクトルを抽出し，各ピークのタンデム型質量分析（MS/MS）スペクトル[9-11)]とカルフォルニア大学サンディエゴ校により提供されている分析ソフト「Pep Novo」[12)]から，FDPFsの内5アミノ酸までの4つのペプチドのアミノ酸配列を決定した．さらに，決定したペプチドと同一のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドを合成し，FDPFs由来ペプチドと合成ペプチドのMS/MSスペクトルを比較することで，アミノ酸配列を確定した．

5　ブタ冠状動脈血管平滑筋条片（内皮無し）$[Ca^{2+}]_i$の測定

ブタ冠状動脈血管平滑筋条片（内皮無し）における$[Ca^{2+}]_i$の測定は，以前の論文[2-8)]で述べた方法で測定した．簡単に記述すると，上記条片を25μM

の蛍光試薬Fura-2を含むKrebs溶液中で，37℃，90分間インキュベートし，蛍光試薬を条片に負荷した．その後，340nm（F340）と380nm（F380）の交互励起光照射による510nmの蛍光強度を測定し，その比（F340/F380）を算出する事により，$[Ca^{2+}]_i$の測定を行った．$[Ca^{2+}]_i$は，40mMカルウム溶液による$[Ca^{2+}]_i$上昇を100%として算出した．

6　統計処理

数値は平均±標準誤差で表記した．3群以上の有意差測定には，まず一元配置分散分析で群内の有意差検定を行い，有意差がある場合多重検定（Tukey-Kramer検定）を行った．

結　　果

1　血管弛緩におけるFDPFsの効果

食品や食品成分をスクリーニングした結果，FDPFsが，内膜を除去したブタ冠状動脈血管平滑筋条片を弛緩させることを見出した（図1A）．図1Bに示すように，この弛緩作用は，濃度依存性を示した（$P<0.01$）．

2　タンデム型質量分析計を用いた魚類由来ペプチドの同定

FDPFs中で，血管弛緩作用を有する天然ペプチドを同定するために，タンデム型質量分析計を用いて質量分析を行ったところ，図2Aの上段のMSスペクトルに示す様に，FDPFsには多くのペプチドが含まれていた．星印をつけたピークは，溶媒のみのコントロール（図2Aの下段）では観察されなかったため，FDPFs由来のものであると判断された．この研究では1～4の番号をつけた天然ペプチドに注目して解析した．

さらに，MSスペクトル（図2Aの下段）で1～4の番号をつけた天然ペプチド（FDPF1～4）に対してMS/MS解析を行い，得られたMS/MSスペクトルをペプチド分析ソフト（Pep Novo, カルフォルニア大学サンディエゴ校提供）を用いて解析したところ，これら4つの天然ペプチドのアミノ酸配列は，PG（＝FDPF1），GPG（＝FDPF2），VGPG（＝FDPF3），VGPGG（＝FDPF4）と決定され，これらのペプチドは一連の連続したアミノ酸配列を有していた．次に，これら決定された各ペプチドのアミノ酸配列の確証を得るために，それぞれのアミノ酸配列に従ってペプチドを合成し，質量分析計でMS/MSスペクトルを測定し，FDPFs由来の天然ペプチド（FDPF1～4）のMS/MSスペクトルと比較した．その結果，両者のMS/MSスペクトルは完全に一致したので，FDPFsの1～4の天然ペプチドは，それぞれ，PG，GPG，VGPG，VGPGGであると同定された（図2B～2E）．

3　血管弛緩における合成ペプチドの効果

合成ペプチド（PG, GPG, VGPG及びVGPGG）が実際に血管弛緩効果を有するか調べるため，内膜を除去したブタ冠状動脈血管平滑筋条片を用い，張力実験を行った．図3に示すように，これらすべての合成ペプチドはブタ冠状動脈血管平滑筋において，濃度依存性に持続的な血管弛緩効果を示した（$P<0.01$）．

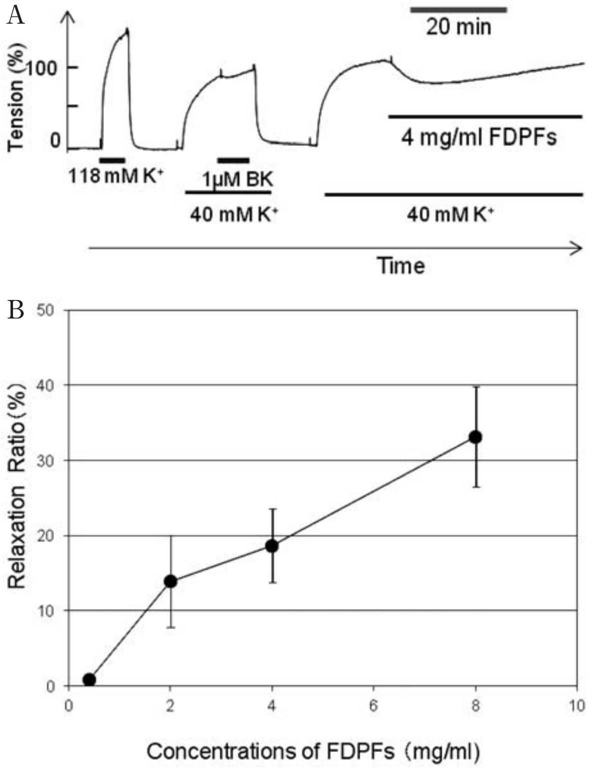

図1　内膜を除去したブタ冠状動脈血管平滑筋条片の40mM K^+による収縮に対するFDPFsの弛緩効果
（A）4回行った実験の代表的な張力測定トレースを示す．40mM K^+による収縮が定常状態に達した後，FDPFsを添加し，血管弛緩効果を観察した．内膜の除去は，BKによる弛緩反応の消失により確認した．（B）FDPFsによる濃度依存性の血管弛緩率．データは平均±標準誤差（n=3～4）にて表示した．濃度依存性に関して，一元配置分散分析結果は$P<0.01$となった．その後の多重検定結果は，濃度0.4mg/mlと8mg/mlの間で$P<0.05$となった．弛緩率は，40mM K^+による収縮を100%として最大弛緩率を算出した．

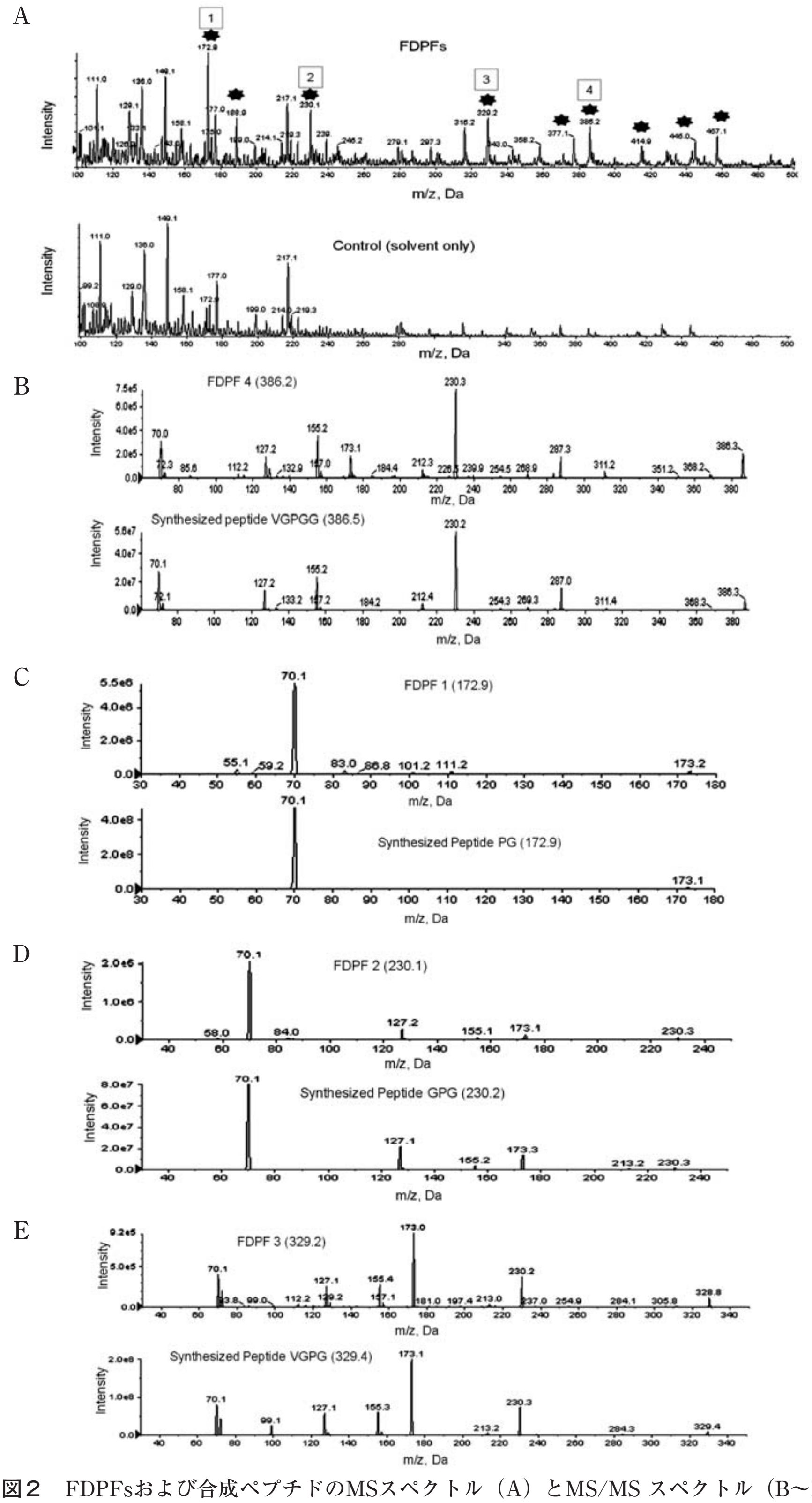

図２　FDPFsおよび合成ペプチドのMSスペクトル（A）とMS/MS スペクトル（B〜E）
（A）FDPFsのMSスペクトル（上段）を溶媒のみのコントロールのMSスペクトル（下段）と比較した．星印のピーク（上段）は，コントロール（下段）では検出されずFDPFsのみに検出されたため，FDPFs由来と判断されたピークである．この研究では，１～４の数字の付いた天然ペプチドのピークに焦点を当てて解析した．
（B）天然ペプチドFDPF4のMS/MSスペクトル（上段）の解析により，VGPGGと判定された．下段は合成ペプチドVGPGGのMS/MSスペクトル．（C）FDPF1と合成ペプチドPGのMS/MSスペクトル．（D）FDPF2と合成ペプチドGPGのMS/MSスペクトル．（E）FDPF3と合成ペプチドVGPGのMS/MSスペクトル．（B）～（E）中のカッコ内の数字は分子量を表す．

また，これら一連の連続するアミノ酸配列を有したペプチドは，そのアミノ酸数の増加に伴い，弛緩率は増加する傾向が観察された（ペプチド濃度5.81mMで$P<0.05$, 11.61mMで$P<0.01$）．

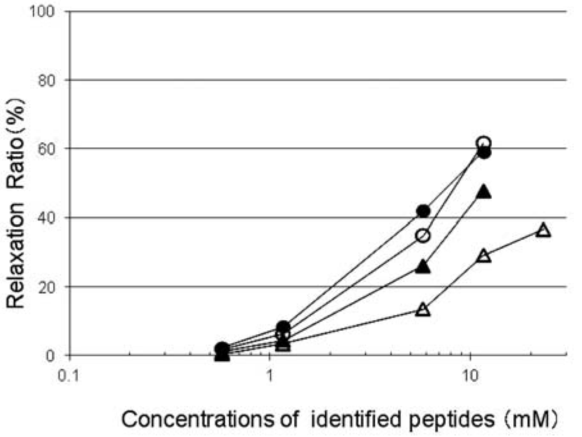

図３　内膜を除去したブタ冠状動脈血管平滑筋条片の40mM K^+による収縮に対する合成ペプチドの弛緩効果の濃度依存性
（A）MS/MS分析によりFDPFsから同定されたペプチドのアミノ酸配列に従って合成したペプチドによる最大弛緩率：VGPGG（=FDPF4, ●），VGPG（=FDPF3, ▲），GPG（=FDPF2, ○）及びPG（=FDPF1, △）．弛緩率は，40mM K^+による収縮を100%として最大弛緩率を算出した．データは平均値（n=３～９）で表示した．誤差棒（<9.1%）は，図中で区別しづらいので省略した．
ペプチド毎の濃度依存性は，一元配置分散分析においてすべて$P<0.01$となった．その後多重検定を行った．VGPGGは0.58－5.81mM，0.58－11.6mM，1.16－11.61mMで，VGPGは0.58－5.81mM, 0.58－11.6mM, 1.16－5.81mM, 1.16－11.61mMで，GPGは0.58－11.6mM，1.16－11.61mMで，PGは0.58－11.6mMで$P<0.05$となった．
同一濃度におけるペプチド間の有意差は，一元配置分散分析において，5.81mMで$P<0.05$，11.61mMで$P<0.01$となった．その後多重検定を行った．ペプチド濃度5.81mMでVGPGGとPG，11.61mMでVGPGGとPG及びGPGとPGで$P<0.05$となった．

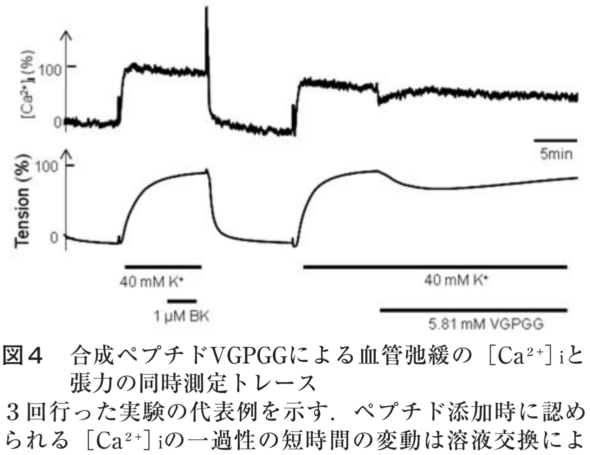

図４　合成ペプチドVGPGGによる血管弛緩の［Ca^{2+}］iと張力の同時測定トレース
３回行った実験の代表例を示す．ペプチド添加時に認められる［Ca^{2+}］iの一過性の短時間の変動は溶液交換によるものである．

４　合成ペプチドVGPGGによる血管弛緩の機序

合成ペプチドによる血管弛緩機序を解明するため，同定ペプチドで最長，最大弛緩効果を持つVGPGGを用い，内膜を除去したブタ冠状動脈平滑筋条片を用いて［Ca^{2+}］iと張力の同時測定を行った．図４に示すように，5.81mMの合成ペプチドVGPGGは［Ca^{2+}］iを低下させることなく持続的な弛緩を引き起こした．これは，VGPGGが平滑筋収縮のCa^{2+}感受性低下（=Ca^{2+}非依存性弛緩）により冠状動脈を弛緩させることを強く示唆している．

議論とまとめ

１　FDPFs又は合成ペプチドによる血管弛緩効果

FDPFsによる血管弛緩効果は，0.4mg/ml～８mg/mlの濃度範囲で（図１B），合成ペプチドでは0.58mM～11.61mMの濃度範囲で（図３），弛緩率に濃度依存性が観察された．今後一段の高濃度での弛緩効果と内皮存在下で弛緩効果の検討が必要であると考えられる．

また一連の合成ペプチド（VGPGG, VGPG, GPG及びPG）の同一濃度の血管弛緩効果は，アミノ酸の数が増加するにつれて，その弛緩効果が増加したため（図３），これらのペプチドに対する新しい細胞膜受容体が存在する可能性が考えられる．

２　合成ペプチドVGPGGによる血管弛緩の機序

［Ca^{2+}］iと張力の同時測定の結果から，VGPGGによる血管弛緩は，［Ca^{2+}］iの低下によるものではなく，カルシウム非依存性の血管弛緩を示唆していた．

平滑筋収縮のカルシウム感受性を低下させる細胞内のセカンドメッセンジャーとしては，cAMPとcGMPが知られているので，VGPGGはアデニル酸シクラーゼやグアニル酸シクラーゼを活性化する可能性が考えられる．これら環状ヌクレオチド経路の関与については，今後の検討が必要である．もし，本研究で発見された新規ペプチドが細胞膜受容体を介するのであれば，アデニル酸シクラーゼを活性化するG蛋白連結型受容体，グアニル酸シクラーゼを含有した受容体などが関与する可能性が考えられる．

３　タンデム型質量分析計によるFDPFsのペプチドの同定

本研究では，タンデム型質量分析計による，MSスペクトルとMS/MSスペクトルを用いてFDPFsに

含まれる４つの天然ペプチドをVGPGG，VGPG，GPG及びPGと同定することができた（図２A～２E）．これらのペプチドは，これまで生理活性を有するという過去の報告はなく，全く新しいペプチドであった．

４　まとめ

FDPFsは，カツオの動脈球から生産されており，粉末の状態で提供され，水溶性である．かつ小腸から吸収され得る２ペプチドや３ペプチドを含んでいる[13]．本研究でも，血管弛緩作用を有するペプチドとして，２ペプチドのPGと３ペプチドのGPGが同定された．これらを考えあわせると，FDPFsは，血管病を予防する有望な食品成分になり得る可能性が考えられる．その可能性を検討するには，今後，実際にFDPFsを食した後の新規ペプチドの血中濃度を調べる必要がある．

また，質量分析計により同定されたペプチド（VGPGG，VGPG，GPG及びPG）は，FDPFsと同様に強力かつ持続的な血管弛緩効果をもっており，かつ水溶性であることから，注射液などにすることができれば血管病の急性期治療にも貢献する可能性を持っていると考えられる．

謝　　辞

本稿を終えるにあたり，ご指導下さいました器官制御医科学領域・生体機能分子制御学分野の小林誠教授，岸博子准教授，加治屋勝子前講師（現鹿児島大学農学部講師），張影助教，高田雄一前博士研究員（現ライフテクノロジー・ジャパン社）の皆様に深く感謝申し上げます．そして，いつもご支援頂いた同教室の大学院生宮成健司さんに厚く御礼申し上げます．

FDPFsをご提供頂きました林兼産業株式会社の白土絵理さん及び関係者の皆様に厚く感謝致します．

また，ブタ冠状動脈サンプルを譲渡頂きました北九州市立食肉センターの皆様に心から感謝致します．

利益相反の開示

林兼産業株式会社より奨学寄付金を受けています．

引 用 文 献

１）Shigemura Y, Nakaba M, Shiratsuchi E, Suyama M, et al. Identification of Food-Derived Elastin Peptide, Prolyl-Glycine（Pro-Gly），in Human Blood after Ingestion of Elastin Hydrolysate. *J. Agric and Food Chem* 2012；**60**：5128-5133.

２）Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, et al. Involvement of Src Family Protein Tyrosine Kinases in Ca^{2+} Sensitization of Coronary Artery Contraction Mediated by a Sphingosylphosphorylcholine-Rho-Kinase Pathway. *Circ Res* 2002；**91**：953-960.

３）Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, et al. Sphingosylphosphorylcholine Is a Novel Messenger for Rho-Kinase–Mediated Ca^{2+} Sensitization in the Bovine Cerebral Artery：Unimportant Role for Protein Kinase C. *Circ Res* 2002；**91**：112-119.

４）Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, et al. Cholesterol Primes Vascular Smooth Muscle to Induce Ca^{2+} Sensitization Mediated by a Sphingosylphosphorylcholine-Rho-Kinase Pathway：Possible Role for Membrane Raft. *Circ Res* 2006；**99**：299-306.

５）Mogami K, Mizukami Y, Todoroki-Ikeda N, Ohmura M, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces cytosolic Ca^{2+} elevation in endothelial cells in situ and causes endothelium-dependent relaxation through nitric oxide production in bovine coronary artery. *FEBS Lett* 1999；**457**：375-380.

６）Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, et al. Eicosapentaenoic acid（EPA）induces Ca^{2+}-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Lett* 2001；**487**：361-366.

７）Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, Kusuda T, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces Ca^{2+}-sensitization of vascular smooth

muscle contraction : possible involvement of Rho-kinase. *FEBS Lett* 2000 ; **482** : 85-90.

8) Mogami K, Kishi H, Kobayashi S. Sphingomyelinase causes endothelium-dependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide production without cytosolic Ca^{2+} elevation. *FEBS Lett* 2005 ; **579** : 393-397.

9) Domon B, Aebersold R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* 2006 ; **312** : 212-217.

10) Aebersold R, Mann M. Mass Spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003 ; **422** : 198-207.

11) Steen H, Mann M. The Abc' s (and Xyz' s) of Peptide Sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 ; **5** : 699-711.

12) Frank A, Pevzner P. PepNovo : De Novo Peptide Sequencing via Probabilistic Network Modeling. *Anal. Chem* 2005 ; **77** : 964-973.

13) Inui K, Terada T. Dipeptide Transportors. *Pharmaceutical Biotechnology* 2002 ; **12** : 269-288.

Novel Fish-derived Peptides Which Induce Vasorelaxation of Porcine Coronary Arteries

Tomohiko KIMURA

Molecular Physiology and Medical Bioregulation (Physiology I), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Vasodilators are widely and frequently used for the acute or chronic phases of cardiovascular diseases, including ischemic heart diseases, hypertension, and heart failure.

To enable the reliable prevention of such cardiovascular diseases, we attempted to discover foods or food components that induce vasorelaxation of the porcine coronary arteries. In the present study, after extensive screening, we eventually identified fish-derived peptide fragments (FDPFs), which were obtained via the edible enzyme digestion of fish proteins.

Using tandem mass spectrometry, we identified four novel peptides with sequential amino-acid sequence (VGPGG, VGPG, GPG and PG) among the FDPFs. These peptides are previously unreported and induced concentration-dependently strong and sustained vasorelaxation. The extents of the relaxation increased as the length of the peptides are longer, suggesting the involvement of the membrane receptor. The most potent and longest peptide, VGPGG induced vasorelaxation without any changes in $[Ca^{2+}]_i$, indicating the decrease in Ca^{2+}-sensitivity of smooth muscle contraction.

These findings support the possibility that these FDPFs may be highly promising food components for use in the prevention of cardiovascular diseases. In addition, these novel peptide are also highly soluble in water and therefore might have applications as intravenously injectable medication for the treatment of acute and severe cardiovascular diseases.