

低分子ペプチドの吸収と生理機能に関する研究

松井, 利郎
九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品分析学研究室

<https://hdl.handle.net/2324/7343020>

出版情報 : Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi. 77 (6), pp.387-395, 2024. 日本栄養・食糧学会
バージョン :
権利関係 :



低分子ペプチドの吸収と生理機能に関する研究

(令和6年度日本栄養・食糧学会学会賞受賞)

松井利郎^{*1}

(2024年5月31日受付; 2024年8月29日受理)

要旨: アミノ酸の重合体であるペプチドには健康性を維持する機能があるとされ、高血圧予防や糖尿病予防作用、認知症などの疾患に対する予防効果が報告されている。筆者らが研究開発してきた高血圧改善作用を有する特定保健用食品「サーデンペプチド」はその好例である。他方、生理作用発現と相関するペプチドの生体利用性に関する研究は大いに立ち遅れている感がある。その要因のひとつとして適切な分析化学的評価系の欠如が考えられる。これまでに、蛍光誘導カラムスイッチング HPLC 法やアミン誘導体 LC-MS/MS 法、さらにはペプチドの組織分布を可視化して評価できる MS 分析法に基づくイメージング分析の最適化を図ってきた。これら分析法をもとに、血漿からピコモルレベルでのペプチド検出に成功し、循環血液系にそのままの形で吸収されることを明らかにしている。本稿ではペプチドの生体調節作用とペプチドの生体利用性に関するこれまでの研究について概説する。

キーワード: ペプチド, 生体利用性, 生活習慣病予防, 質量分析法

1. はじめに

食べ物は生命活動を維持するためのエネルギー供給機能を第一義とした多成分混合系からなる物質群である。また、食品の三次機能として生体恒常性（健康性）が提唱され、特定保健用食品（トクホ）の登場に至っていることは周知のとおりである。他方、トクホが食品の範疇にあることは明白であり、医薬品とはその目的を異にする。すなわち、食品の三次機能とは、健康を維持あるいは未病段階での改善による疾病予防する機能であり、病気の改善や治療に資する医薬品とは正反対の立ち位置にある。両者のベクトルは健康志向であるが、対応は逆となる。これまで、当研究室では食品の機能要件として官能性（受諾性）を重視して生体調節機能を究明してきた。さらに、生体内を作用場とする生理作用を前提とする場合、食品因子の生体利用性（bioavailability, BA）を明らかにすることが必要であるとの立場に立ち、研究を行ってきた。

本稿では、ペプチド、特にジペプチドやトリペプチドの健康機能と BA について、高血圧予防作用を中心に概説する。なお、最近の研究トピックスであるペプチドによるアルツハイマー型認知症に対する予防効果とその作用機構の詳細については他稿に譲りたい¹⁾。また、低分

子ペプチドを研究主軸としたのは、それらの腸管吸収性を考慮したためである（後述）。他方、BA を考える上で重要となる ADME（吸収 absorption, 分布 distribution, 代謝 metabolism, 排出 excretion）を明示した報告は僅かであり、ペプチドの生体利用性の解明には解決すべき課題も多い。

2. ペプチドの高血圧予防作用

2.1 高血圧予防作用

「ペプチドは消化管にて分解（消化）され、アミノ酸として吸収される」との概念を一部修正し、大部分は分解されるが、ごく一部はそのままの形で腸管吸収され、局所で生理作用を示す機能体であることを世界に先駆けて実証してきた。本節では、ペプチドの高血圧予防について概説する。本作用解明の契機となったのは、1987年文部省重点領域研究「食品の生体調節機能の解析」第5作業部会第2分科会（血圧低下ペプチド）への参画であり、1999年にはイワシすり身のアルカラゼ加水分解物を素材とする血圧が高めの方への食品が特定保健用食品（消費者庁認可、サーデンペプチド）として認可された。高血圧予防の研究戦略は、体内での昇圧代謝系であるレニン-アンジオテンシン（RA）系の抑制にある（図1）。血管収縮を強力に誘導するアンジオテンシン II（オ

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: tmatsui@agr.kyushu-u.ac.jp)

¹ 九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品分析学研究室 (819-0395 福岡市西区元岡 744)

血圧は体液量と血管抵抗性の積で決まる

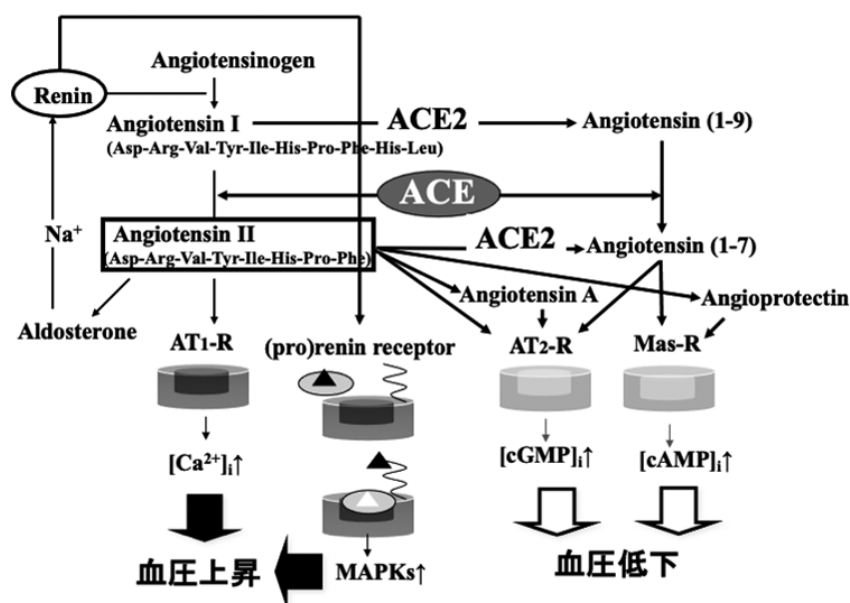


図1 レニン-アンジオテンシン系と血圧調節

レニン-アンジオテンシン系は昇圧/降圧として作用する血圧代謝系である。

文献7)より抜粋し、改変した。ACE, angiotensin I-converting enzyme

クタペプチド：Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)の産生経路の抑制あるいは血管収縮経路の遮断が基本であり、レニン酵素やアンジオテンシンI変換酵素(ACE：デカペプチドであるアンジオテンシンIのC末端Phe-His間を分解するジカルボキシペプチダーゼ)の阻害、あるいはアンジオテンシンII受容体に対する拮抗作用によって血圧の低下が期待される。なかでも、降圧剤として登場したカプトプリルがAla-Proを模したチオール型ペプチド系ACE阻害薬であったことから(他にもペプチド系降圧剤としてトリペプチドAla-Phe-Proを模したエナラプリルなど)、降圧戦略として低分子ペプチド(ジペプチドおよびトリペプチド)によるACE阻害と血圧低下作用を期待する機能性研究が活発化した²⁾。

2.2 血圧低下機構

これまでに様々な食品素材からACEに対して阻害作用を示すペプチドが単離、同定され、その活性が評価されている(>400種類³⁾)。例えば、サーデンペプチドからは関与ペプチドとしてVal-Tyrが同定され(IC₅₀: 26 μM)、高血圧自然発症ラット(SHR)やヒトRA系を保有するつくば高血圧マウス(THM)に対する単回投与試験で長時間にわたる血圧低下作用を示す⁴⁾⁵⁾。RA系亢進による従来の昇圧説に基づくと、ペプチド(Val-Tyr)による血圧低下作用はRA系でのACE阻害によるものと結論できる。しかしながら、SHRに対するVal-Tyrの投与によって血漿ACE活性は低下せず²⁵⁾、ペプチドによる血圧低下作用は循環RA系でのACE阻害ではないと推察される。前述のサーデンペプチドでは、本素材を2g/日で1カ月摂取すると、軽症高血圧症者の血圧が有

意に低下する(収縮期: 49.3 mmHg, 拡張期: 45.2 mmHg)⁶⁾。他方、試験終了後においても3週間にわたって正常域で血圧は推移し(リバウンドが認められない)、空咳は認められないなど、ACE阻害による血圧低下作用では説明できない事象が観察されている。ちなみに、ペプチドによって血中のACEを阻害するには、降圧剤と同等のACE阻害活性が必要(実際は、カプトプリルのIC₅₀値0.02 μMに対してVal-Tyrは約1/1,000程度の阻害活性)、あるいは薬剤よりも多い体内吸収量が必要となる。今日では、RA系は昇圧/降圧系として働く自己血圧調節系である(図1)と認識されており⁷⁾、ACE阻害による血圧低下戦略の意義が問われている。

血圧上昇は体液量 and/or 血管抵抗性の増大と相関する。そこで、ペプチドの血管抵抗性改善(弛緩)作用を明らかにするため62種類の低分子ペプチドを合成し、ラット大動脈血管を用いた収縮張力試験を実施した。検討の結果、Val-Tyrだけでなく、Trp-HisやHis-Arg-Trpにおいても収縮した血管を弛緩させる作用を有していることを明らかにしている⁸⁾⁹⁾。さらに、内皮除去血管においても同様に弛緩作用を示したことから、これら低分子ペプチドは内皮非依存的であり、血管中膜(平滑筋)に直接作用していると推察された。そこで、ラット由来血管平滑筋細胞を用いてペプチドの弛緩機構のさらなる解明を図った。血管収縮のトリガーである細胞内Ca²⁺濃度変化をもとにペプチド弛緩機構を検討したところ、上記ペプチドはアンジオテンシンII/AT₁R刺激を介した細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑制し、さらにL型カルシウムチャネルアゴニストであるBay K8644刺激による細

胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を阻害した¹⁰⁻¹³⁾。Trp-His はジヒドロピリジン系の電位依存性 L 型カルシウムチャンネルブロッカー (CCB) と同様の結合領域に作用するとともに、細胞内において Ca^{2+} -カルモジュリン (CaM)/CaM キナーゼ II (CaMKII) 経路を遮断してチャンネルのリン酸化を抑制していることを明らかにしている (図 2) したがって、ペプチドによる血圧低下作用は血管弛緩による抵抗性の改善が一因であり、降圧薬である CCB と類似した作用機構であると推察される。一般に、CCB 薬は AT_1R アンタゴニスト薬などと比べて降圧効果は緩和であり、また空咳などの副作用を示さないことが知られており、上述したサーデンペプチドを用いたヒト試験での降圧特性とも一致する。なお、Trp-His をアポ E 欠損マウスに対して長期投与すると動脈硬化の進展が抑制された¹⁴⁾ ことから、血管弛緩性ペプチド Trp-His はやはり血管を作用場としていることが理解できる。

2.3 ペプチド機能の *in silico* 予測

動物あるいは細胞を用いることなく食機能を評価することは時代の趨勢といえ、分子動力学に基づく *in silico* 予測法もそのひとつといえる。従来の *in silico* モデル設計はホスト分子とリガンド分子の相互作用を予測するための 2 分子複合体の構築であったが、生体内での生理作用発現の起点となる膜タンパク質受容体やチャンネルタンパク質とリガンド分子 (食品因子) の相互作用を予測するには水系での膜モデル構築が必要となる。我々は CHARMM-GUI を用いて細胞膜を設置し、仮想水系での安定なタンパク質とリガンド分子の複合体の構築に成功している。図 3 は 7 回膜貫通型のアディポネクチン受容体 AdipoR1 をホスファチジルコリン (PC) リン脂質膜に配置し、リガンド分子として AdipoR1 アゴニスト AdipoRon を挿入した仮想モデルを示している¹⁴⁾。この仮想膜受容体モデルを用いて低分子ペプチドの分子動力学シミュレーションを実行し、これまでに AdipoR1 に対して結合親和性の高いペプチド Tyr-Pro, Tyr-Pro-Gly や Tyr-Pro-Pro を推定するに至っている¹⁵⁾¹⁶⁾。本モデルによると、ペプチドの構造安定性は AdipoR1 の 2 つの結合ポケット (Site 1 および Site 2) における His351 あるいは Arg158 残基との分子間相互作用に起因していることが理解できる ($\Delta G_{\text{bind}} > -10 \text{ kcal/mol}$)。なお、これらペプチドと AdipoR1 の相互作用はラット筋肉細胞を用いて¹⁵⁾¹⁶⁾、*in vivo* 糖尿病予防作用については糖尿病自然発症ラットを用いて実証されている (未発表)。

3. ペプチドの生体利用性

3.1 高感度ペプチド検出と吸収動態

ペプチドの生体利用性 (BA) は生理機能発現の評価指標であり、吸収量や蓄積量、さらには生体での安定性が機能の程度を決定すると考えられる。Folz *et al.*¹⁷⁾ は、2010 年にペプチド機能研究における BA の重要性和欠如を指摘している。他方、我々はこの指摘の 10 年以上

前からペプチドの BA 研究に着手していたが、それまではペプチド分析法が未整備であり、また腸管で消化分解され、アミノ酸として吸収されるとの見解が主流であったため、先行する BA 研究はほぼ皆無であった。なお、1994 年に腸管上皮にはペプチド輸送を担うトランスポーター (SLC15 family, Pept1) が発現していること、Pept1 は 2 つまでのペプチド結合 (すなわち、ジペプチドやトリペプチド) を認識する膜輸送担体であることが報告され¹⁸⁾、ペプチド体としての膜透過の可能性が予測されていたが、高極性で類似の分子特性を有する低分子ペプチドを分離分析できるアッセイ法が設定されていなかったことから、体内吸収動態については不明のままであった。そこで我々は、まず高感度・高選択的分析法の構築を試み、ペプチド並びに生理活性成分の吸収動態の把握を試みた。一貫した課題項目は、1) 疎水性付与による逆相系 LC カラムでの保持向上と 2) 誘導体化 tag の分子特性 (蛍光特性や高イオン化特性など) を利用した極性ペプチドの LC 分離と高感度検出の達成を目的とした誘導体化反応である。まず、pM レベルでの検出を可能とする蛍光分子に着目し、ペプチドのアミノ基への蛍光 tag の導入を試みた。蛍光性試薬によるアミノ基誘導体化法としてはオルトフタルアルデヒド (OPA) を用いた OPA 法や Dansyl 法などが汎用されている¹⁹⁾。他方、ペプチドの誘導体化では pH や温度等の反応条件による非特異的な分解リスクを回避する必要がある。筆者らは 1999 年に血圧低下ペプチド Val-Tyr のヒト血中への吸収挙動を明らかにするために、蛍光試薬として naphthalene-2,3-dialdehyde (NDA) を用いた蛍光 HPLC 分析法を構築している²⁰⁾。NDA は室温でアミノ基と容易に縮合し、NDA 誘導体化ペプチドとなる。ただし、血液中には対象とするペプチド以外のアミン類が多数存在することから、NDA 化産物は多種多様であり、単一の LC 分離では対象とするペプチドを選択的に蛍光検出することは困難である。そこで、2 段階の LC カラムを並行配置したカラムスイッチング方式を採用し、ハートカットされた画分に存在する対象ペプチドのみを検出する蛍光 HPLC システムを新たに構築した。本法により、飲用した Val-Tyr はヒト血中にそのままの形で到達し (最大血中濃度として約 2 pmol/mL-plasma , 12 mg 摂取時)、循環血中に長時間存在する ($t_{1/2}$: 3 h) ことを初めて報告している²¹⁾。さらに、Val-Tyr は肝臓、肺、心臓、血管、腎臓などの循環系臓器に蓄積されることを高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた単回投与試験により明らかにしてきた²²⁾。

他方、NDA 蛍光誘導カラムスイッチング HPLC 法は煩雑な操作がネックであり、血液量も $\sim 1 \text{ mL}$ を要するなど、同一個体を用いた経時的な吸収性試験には不向きである。そこで、質量数 (質量電荷比, m/z) の違いにより高選択的にイオン化分子を検出できる質量分析 (MS) 法に着目し、アミン誘導体化法を組み合わせた

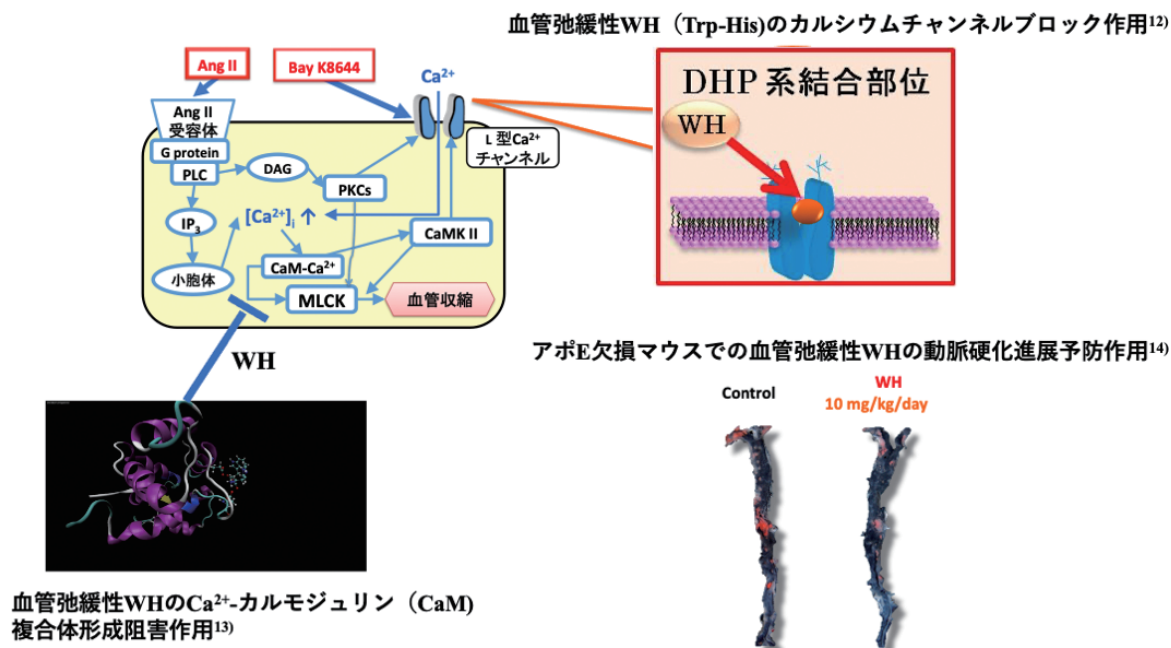
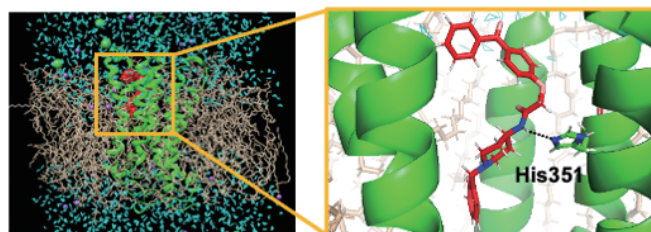


図2 血管弛緩性ペプチドの血圧低下機構

血管弛緩作用を示すペプチド Trp-His (WH) は、電位依存性 L 型 Ca²⁺ チャンネルに作用し、ジヒドロピリジン (DHP) 系の Ca²⁺ チャンネルブロッカー (CCB) と同様に、細胞外からの Ca²⁺ の流入を防ぐ。また、細胞内に取り込まれた WH は Ca²⁺ とカルモジュリンとの複合体形成を阻害して、L 型カルシウムチャンネルのリン酸化を防ぎ、やはり細胞外からのカルシウム流入を妨げる。また、WH をアポ E 欠損マウスに長期投与すると動脈硬化の進展が阻害されたことから、*in vivo* においてもジペプチド WH は血管を作用場として機能発現していることが示された。文献 12)、13)、14) より抜粋し、改変した。

AdipoR1のSite 1でのAdipoRonとの複合体



AdipoR1のSite 2でのAdipoRonとの複合体

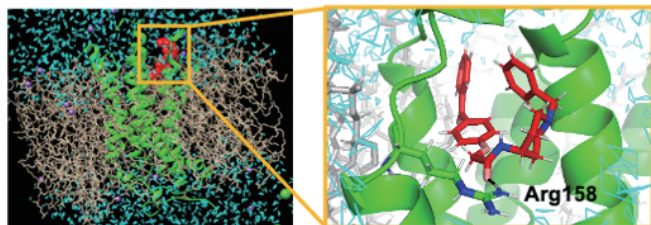


図3 仮想水中でのアディポネクチン受容体 AdipoR1 とアゴニスト分子 AdipoRon との仮想膜受容体モデル
7 回膜貫通型受容体 AdipoR1 をホスファチジルコリンからなるリン脂質膜に配置し、リガンド分子として AdipoRon を AdipoR1 の結合部位 (Site 1 と Site 2) に挿入した仮想モデルを設計した。His351 あるいは Arg158 はそれぞれ AdipoR1 受容体 Site 1 と Site 2 でのリガンド分子との相互作用の鍵となるアミノ酸残基を示している。文献 15) より抜粋し、改変した。

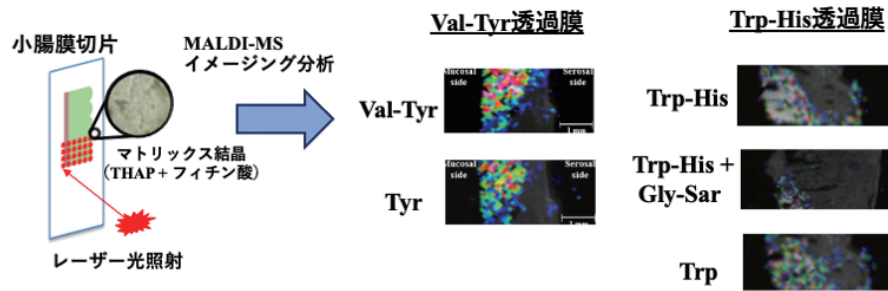


図4 MALDI-MS イメージング法によるジペプチド類のラット小腸膜透過挙動解析
ラット小腸（空腸）膜を用いてジペプチド類を60分間の透過試験に供したあとの組織切片をMALDI-MS イメージング分析した。マトリックス剤（THAP）にフィチン酸を添加することにより、マトリックス結晶が均一になることがわかる。また、Val-Tyr、Trp-His ともに一部が上皮膜側でアミノ酸まで分解されていること、さらに Pept1 に対する良基質（Gly-Sar）存在下では可視化強度が低下したことより、Trp-His は Pept1 を介して膜透過していることがわかる。文献 27) および 29) より抜粋し、改変した。

表1 これまでに行ってきた各種アミン誘導体化法と LC-MS 法によるペプチド検出

誘導体化法	対象ペプチド	反応条件	測定方法	検出限界 (fmol/mL)	参考文献
TNBS	Gly-Tyr	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS/MS	66	24)
	Val-Tyr	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS/MS	80	24)
	Met-Tyr	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS/MS	387	24)
	Glu-Tyr	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS/MS	565	24)
	Lys-Tyr	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS/MS	281	24)
	His-Tyr	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS/MS	54	24)
NDA	Gly-Gly	30℃, 50 min, pH 8.0	LC-MS	n.a.	25)
APDS	Gly-Gly	60℃, 30 min, pH 8.0	LC-MS	n.a.	25)
	Tyr-Pro	60℃, 30 min, pH 8.0	LC-MS/MS	990 (6 fmol/mg-組織)	26)
Cou	Gly-Gly	30℃, 30 min, pH 8.5	LC-MS	n.a.	25)

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate, NDA: naphthalene-2,3-dialdehyde, APDS: 3-aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, Cou: *N*-succinimidyl-7-methoxycoumarin-3-carboxylate

LC-MS (/MS) 法による低分子ペプチドの一斉分析法の構築を試みてきた。アミン誘導体化法はペプチドへの tag 導入による逆相系カラムでの保持性、すなわち溶媒効果とイオン化効率の向上による高感度分析が見込める。なお、30 mg/kg の投与量であれば、尾静脈採血（～数百 μ L）した血漿を誘導体化せずに LC-MS/MS 検出が可能である。一例として、3 種類のジペプチド (Val-Tyr, Leu-Tyr, Met-Tyr) を SHR に対して単回経口投与したところ、 $C_{\max}$ として 0.5–30 pmol/mL-plasma の濃度で検出が達成され、ペプチド配列によって吸収量が異なる (Val-Tyr > Leu-Tyr > Met-Tyr) ことを明らかにしている²³⁾。

他方、ペプチド吸収動態を把握するには、やはり同一個体での観察が重要であり、微量試料での高感度検出法の設定が必要となる。前述したとおり、ペプチドの高感度検出のためのアミン誘導体化では、反応過程でのペプチド分解を抑制できること、さらに ESI (イオンスプレーイオン化)-MS 分析では、導入される tag を含めた誘導体化ペプチドのイオン化効率が高いことが求められ

る。表1はこれまでに我々が行ってきたペプチドのアミン誘導体化と検出感度をまとめたものである^{24–26)}。一例として、2,3,4-trinitrobenzene sulfonate (TNBS) を用いた場合のジペプチド検出法について概説すると、TNBS 法では pH 8.5, 30℃, 30 分の反応条件においてペプチドの TNBS 誘導が達成でき、ペプチド分解も最小限となる。MS 検出限界は His-Tyr に対して 54 fmol/mL であり²⁴⁾、ラット尾静脈血 100 μ L 以下の採血量で同一個体を用いた経時的な吸収挙動の解析が可能となった。また、3-aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (APDS) 法を用いると、認知症予防作用を示す Tyr-Pro の血中および脳組織での MS 検出がそれぞれ >0.99 pmol/mL-plasma および >0.006 pmol/mg で達成できる。本法を用いてジペプチドの吸収挙動を明らかにしたところ（表2）、抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用を示す Trp-His の総吸収量は 7.13 pmol·h/mL-plasma/mg-dose であり、降圧剤であるカプトプリルと比べると吸収量は 1/500 程度と見積もられる²⁷⁾²⁸⁾。さらに、APDS-LC-qTOF/MS 法を用いることにより、ICR マウスに対する

表2 これまでに報告されているラット単回投与試験でのペプチド吸収性評価

ペプチド	$C_{\max}$ (pmol/mL-plasma)	$t_{\max}$ (h)	AUC (pmol · h/mL/mg-dose)	$t_{1/2}$ (h)
Gly-Sar	12,200 ± 1,800	0.1	569.8 ± 68.5	0.45
Trp-His	28.7 ± 8.9	1	7.13 ± 1.87	2.8
His-Trp	1.1	1	0.028	1.9
Val-Tyr	4.11 ± 1.13	1.5	0.64 ± 0.01	4.1
Met-Tyr	0.38 ± 0.09	2	0.04 ± 0.002	4.1
Leu-Tyr	0.54 ± 0.20	1.5	0.05 ± 0.002	4.1
Tyr-Pro*	49 ± 21	0.25	133.3 ± 26.7	0.24
Gly-Sar-Sar	4,600 ± 600	0.5	430 ± 53.5	1.25
Ile-Pro-Pro	12 ± 3	0.14	n.a.	0.16
Leu-Pro-Pro	11 ± 3	0.12	n.a.	0.25
Val-Pro-Pro	9 ± 2	0.15	n.a.	0.2
Captopril	3,700 ± 350	0.9	53.0 ± 4.1	n.a.

*Tyr-Pro は文献 26) より, その他は文献 27) および 28) より引用

Tyr-Pro の単回投与試験 (10 mg/kg) によって, 血中に吸収された Tyr-Pro の 2.6% が脳に到達することを初めて明らかにしている²⁶⁾。なお, これまで検討してきた各種アミン誘導体化 MS 法についての知見を集約すると, ESI でのイオン化効率 (検出感度) は誘導体化されたペプチドの分子表面積が 250–300 Å² の場合に最大となるようである²⁵⁾。したがって, この分子表面積領域に見合うようにペプチド構造に対してアミン誘導体化剤を選択すると, ESI-MS 検出感度はさらに向上することが期待される。

3.2 ペプチド吸収動態の可視化

LC-MS 法を駆使することにより摂取したペプチドがそのままの形で体内吸収され, 組織にて機能発現することを明らかにしてきた。しかしながら, LC-MS 法は総量評価であり, 組織分布情報は抽出過程で失われてしまう。そこで, ノンターゲットでの検出を可能とする MALDI-MS 法と組織分布情報を可視化できるイメージング法を組み合わせた MALDI-MS イメージング法をペプチドの生体利用性研究に応用することとした。なお, 本法はイオン化支援のためのマトリックス剤によるクラスターや Na⁺ や K⁺ などの無機イオンとの付加体形成によって, 低分子領域 (500 Da 以下) で多くのノイズシグナルが発生するため, 総じてこの領域に該当する低分子化合物 (ペプチドではテトラ以下の低分子ペプチドが該当) の検出は困難である。そこで, 我々はまずキレート剤添加による低分子領域でのノイズシグナルの低減とペプチド検出の向上を図った。検討の結果, マトリックス補助剤としてのフィチン酸の添加はマトリックス結晶を均一化させ, かつ低分子ペプチドの検出感度を向上させることが明らかとなった²⁹⁾。さらに, ノンターゲットでの網羅解析を得意とする MALDI-MS 法はペプチドだけでなくアミノ酸などの代謝物検出も同時に可能である。そこで, そのままの形で腸管透過する Val-Tyr²⁹⁾ や Trp-His²⁷⁾ のラット空腸膜での透過挙動について, フィチン酸を添加したマトリックス剤 (2',4',6'-trihydroxy-

acetophenone, THAP) を用いて MALDI-MS イメージング解析を行った (図 4)。両ペプチドは管腔側から側基底膜側の空腸膜全体にわたって検出されており, そのままの形で, かつペプチド輸送担体 (PepT1) を介して膜透過していることが判定できる。また, 得られた MS スペクトル情報をもとに両者の構成アミノ酸の m/z 値をターゲットとして同一切片を再解析すると, 管腔側付近で構成アミノ酸が検出され, 膜透過とプロテアーゼ分解が同時に起こっていることがわかる。なお, MALDI-MS 法によるノンターゲット可視化分析はポリフェノールの代謝解析にも応用でき, 小腸膜での代謝物の動態解析に威力を発揮している^{30–33)}。このように, イオン化分子を網羅的に検出できる MALDI-MS イメージング法は, 科学的事象を直裁的に捉えることができる有力手段であり, 新たな研究アプローチ法として今後の展開が期待される。

4. 今 後

我が国の科学分野の凋落は多方面から指摘されているが, 食機能研究はこれまで世界を先導してきた分野のひとつと考える。翻って, 食機能研究は疾病予防に有効に働く体内利用性 (吸収や蓄積) と組織等での機能発現が両輪となってはじめて成立すると考えるが, その両面からの研究アプローチを実践している例は僅かである。したがって, 生体利用性 (bioavailability) に基づき食機能研究を推進することがこれから (次世代) の食科学研究にとって重要といえ, 食品という多成分混合系での関与成分の bioaccessibility と bioactivity 評価を含む bioavailability 研究が大いに期待される (3BA)³⁴⁾。食品は多面性をもって生体を調節する機能体である。3BA を基盤として世界を先導できる食科学研究者の登場を願ってやまない。

利 益 相 反

申告すべき利益相反はない。

この度の栄えある日本栄養・食糧学会賞の受賞にあたり、ご推薦いただきました徳島大学医学部医科栄養学科教授 二川健先生、選考いただきました授賞選考委員会の先生方に心より御礼申し上げます。また、食科学・分析化学の礎をご教授いただきました九州大学（故）篠島豊名誉教授には衷心より感謝申し上げます。さらに、食の健康維持機能について、研究開始当初よりご教示頂き、また熱くご指導いただきました九州大学（故）川崎晃一名誉教授に御礼申し上げる次第です。本研究は、誌面では記載できない多くの先生方、企業関係者のご協力の賜であり、心より感謝申し上げます。最後に、食品分析学研究室に関わる諸氏に衷心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 松井利郎 (2024) 脳移行ペプチド. 日本栄養・食糧学会誌 **77**: 29-35.
- 2) 松井利郎 (2008) タンパク質とペプチド・アミノ酸の機能性 (第13章), 食品機能性の科学, 西川研次郎監修, 産業技術サービスセンター, 東京.
- 3) Matsui T, Matsumoto K (2006) Antihypertensive peptides from natural resources (Chapter 15). In: Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends (Khan MTH, Ather A, eds), p. 259-76. Elsevier, The Netherlands.
- 4) Matsui T, Hayashi A, Tamaya K, Matsumoto K, Kawasaki T, Murakami K, Kimoto K (2003) Depressor effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensin system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**: 262-5.
- 5) Matsui T, Imamura M, Oka H, Osajima K, Kimoto K, Kawasaki T, Matsumoto K (2004) Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J Peptide Sci* **10**: 535-45.
- 6) Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T, Osajima Y (2000) Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* **14**: 519-23.
- 7) 松井利郎 (2015) レニン-アンジオテンシン系と血圧調節. 化学と生物 **53**: 228-35.
- 8) Tanaka M, Tokuyasu M, Matsui T, Matsumoto K (2008) Endothelium-independent vasodilation effect of di- and tri-peptides in thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *Life Sci* **82**: 869-75.
- 9) Matsui T, Tanaka M (2010) Anti-hypertensive peptides and their underlying mechanisms (Chapter 4). In: Biologically Active Food Proteins and Peptides in Health—Fundamental and Clinical Aspects— (Mine Y, Li-Chan ECY, Jiang, B eds), IFT Book Series, p. 43-54. Wiley Blackwell, Iowa.
- 10) Matsui T, Ueno T, Tanaka M, Oka H, Miyamoto T, Osajima K, Matsumoto K (2005) Antiproliferative action of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Val-Tyr, via an L-type Ca^{2+} channel inhibition in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension Res* **28**: 545-52.
- 11) Tanaka M, Watanabe S, Wang Z, Matsumoto K, Matsui T (2009) His-Arg-Trp potently attenuates contracted tension of thoracic aorta of Sprague-Dawley rats through the suppression of extracellular Ca^{2+} influx. *Peptides* **30**: 1502-7.
- 12) Wang Z, Watanabe S, Kobayashi Y, Tanaka M, Matsui T (2010) Trp-His, a vasorelaxant di-peptide, can inhibit extracellular Ca^{2+} entry to rat vascular smooth muscle cells through blockade of dihydropyridine-like L-type Ca^{2+} channels. *Peptides* **31**: 2060-6.
- 13) Kumrungsee T, Saiki T, Akiyama S, Nakashima K, Tanaka M, Kobayashi Y, Matsui T (2014) Inhibition of calcium-calmodulin complex formation by vasorelaxant basic dipeptides demonstrated by *in vitro* and *in silico* analyses. *Biochim Biophys Acta-General Subjects* **1840**: 3073-8.
- 14) Matsui T, Sato M, Tanaka M, Yamada Y, Watanabe S, Fujimoto Y, Imaizumi K, Matsumoto K (2010) Vasodilating di-peptide Trp-His can prevent atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr* **103**: 309-13.
- 15) Lee Y, Nakano A, Nakamura S, Sakai K, Tanaka M, Sanematsu K, Shigemura N, Matsui T (2021) In vitro and in silico characterization of adiponectin-receptor agonist dipeptides. *NPJ Sci Food* **5**: 29.
- 16) Lee Y, Nakano A, Nagasato Y, Ichinose T, Matsui T (2022) In vitro and in silico analyses of the adiponectin receptor agonistic action of soybean tripeptides. *J Agric Food Chem* **70**: 7695-703.
- 17) Foltz M, van der Pijl PC, Duchateau MJE (2010) Current in vitro testing of bioactive peptides is not valuable. *J Nutr* **140**: 117-8.
- 18) Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA (1994) Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**: 563-6.
- 19) 松井利郎, 松本 清共編 (2015) 食品分析学: 機器分析から応用まで. 培風館書店, 東京.
- 20) Matsui T, Tamaya K, Kawasaki T, Osajima Y (1999) Determination of angiotensin metabolites in human plasma by fluorimetric high-performance liquid chromatography using a heart-cut column-switching technique. *J Chromatogr B* **729**: 89-95.
- 21) Matsui T, Tamaya K, Seki R, Osajima K, Matsumoto K, Kawasaki T (2002) Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into human circulatory blood system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**: 204-8.
- 22) Matsui T, Imamura M, Oka H, Osajima K, Kimoto K, Kawasaki T, Matsumoto K (2004) Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J Peptide Sci* **10**: 535-45.
- 23) Nakashima EMN, Kudo A, Iwaihara Y, Tanaka M, Matsumoto K, Matsui T (2011) Application of ^{13}C -stable-isotope labeling LC-MRM-MS/MS method for de-

- termining intact absorption of bioactive di-peptides in rats. *Anal Biochem* **414**: 109–16.
- 24) Nakashima EMN, Qing HQ, Tanaka M, Matsui T (2013) Improved detection of di-peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate conversion. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 2094–9.
- 25) Shen W, Ono K, Tanaka M, Matsui T (2021) Characteristics of electrospray-ionization detection of synthetic di- to penta-oligopeptides by amine derivatizations. *Anal Sci* **37**: 1629–32.
- 26) Cheng L, Tanaka M, Yoshino A, Nagasato Y, Takata F, Dohgu S, Matsui T (2023) A memory-improving dipeptide, Tyr-Pro, can reach the mouse brain after oral administration. *Sci Rep* **13**: 16908.
- 27) Tanaka M, Hong SM, Akiyama S, Hu QQ, Matsui T (2015) Visualized absorption of anti-atherosclerotic dipeptide, Trp-His, in Sprague-Dawley rats by LC-MS and MALDI-MS imaging analyses. *Mol Nutr Food Res* **59**: 1541–9.
- 28) Shen W, Matsui T (2017) Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides. *Food Funct* **8**: 4306–14.
- 29) Hong SM, Tanaka M, Yoshii S, Mine Y, Matsui T (2013) Enhanced visualization of small peptides absorbed in rat small intestine by phytic-acid-aided MALDI-imaging mass spectrometry. *Anal Chem* **85**: 10033–9.
- 30) Nguyen HN, Tanaka M, Li B, Ueno T, Matsuda H, Matsui T (2019) Novel in situ visualisation of rat intestinal absorption of polyphenols via matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Sci Rep* **9**: 3166.
- 31) Hahm TH, Tanaka M, Nguyen HN, Tsutsumi A, Aizawa K, Matsui T (2021) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-guided visualization analysis of intestinal absorption of acylated anthocyanins in Sprague-Dawley rats. *Food Chem* **334**: 127586.
- 32) Matsui T (2022) Polyphenols-Absorption and occurrence in the body system. *Food Sci Technol Res* **28**: 13–33.
- 33) Hahm TH, Matsui T, Tanaka M (2022) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of tissues via the formation of reproducible matrix crystals by fluorescence-assisted spraying method: a quantification approach. *Anal Chem* **94**: 1990–8.
- 34) Mine Y, Matsui T (2019) Current understanding of bioaccessibility and bioavailability of food-derived bioactive peptides. *Int J Food Sci Technol* **54**: 2319–20.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **77**: 387–395 (2024)

Review

Study on the Bioavailability and Functionality of Small Peptides

(JSNFS Award for Excellence in Research (2024))

Toshiro Matsui^{*,1}

(Received May 31, 2024; Accepted August 29, 2024)

Summary: It has been reported that peptides, condensed amino acids, may provide health benefits, such as anti-hypertensive, anti-diabetic, and anti-dementia effects. One successful TOKUHO product is a sardine peptide that can modulate high blood pressure. However, the bioavailability of bioactive peptides still remains unclear due to a lack of appropriate analytical assay systems. In order to detect absorbed analytes in a small volume of blood, highly sensitive analytical assays that allow detection at >pmol/mL-plasma, such as fluorescence-derivatization column-switching HPLC, amine-derivatization-LC-MS/MS, and MS imaging for visualization of tissue distribution have been developed. In this review, the bioavailability of small peptides as intact forms and their physiological potentials are discussed.

Key words: peptide, bioavailability, lifestyle-related disease, mass spectrometry

* Corresponding author (E-mail: tmatsui@agr.kyushu-u.ac.jp)

¹ Department of Bioresources and Biosciences, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, 744 Motoooka, Fukuoka 819-0395, Japan

受賞者紹介

松井 利郎（まつい としろう）／農学博士



九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品分析学研究室教授

●専門分野：食品分析学

●略歴：1991年九州大学農学研究科食糧化学工学専攻博士課程修了，1991年九州大学農学部助手，1996～1997年ドイツ連邦食品化学研究所文部省在外研究員，2000年九州大学大学院農学研究院准教授，2011年同農学研究院教授，2018年九州大学五感応用デ

バイス研究開発センターセンター長，現在に至る

●研究テーマと抱負：食べ物による健康維持，改善作用，さらには関与成分の生体利用性について研究を行っています。食べ物による積極的な健康維持は，超高齢化社会を迎えて重要な達成目標といえます。エビデンスに基づいた食科学研究の推進が希求されており，それを追究できればと思います。