プロテアーゼ消化に伴う 断片化ペプチドのアミン修飾

## 甲第37号

伊藤 俊行

## プロテアーゼ消化に伴う 断片化ペプチドのアミン修飾

## 伊藤 俊行

### 論文目録

本学位論文は下記の原著論文を基に作成され、城西大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

- Toshiyuki Ito, Yoshiaki Sugita, Yoshihiko Ikeguchi, Akira Shirahata, Formation of polyamine-modified peptides during protein digestion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 159-162.
- 2. Toshiyuki Ito, Yoshiaki Sugita, Koichi Takao, Yoshihiko Ikeguchi, Akira Shirahata, Amine modification of digested peptide at C-terminal end during protein digestion by protease, *Biol. Pharm. Bull.* (2007), in press.
- 3. Toshiyuki Ito, Yoshiaki Sugita, Koichi Takao, Yoshihiko Ikeguchi, Akira Shirahata, Detection of alkylamine-modified tryptophan in rat gastrointestinal tract after oral administration of alkylamine, (In preparation)

#### 略号

総論の部

緒言

- 第一章 試験管内におけるプロテアーゼ消化に伴うアミン修飾ペプチ ドの生成
  - 第一節 モデルアミンの選択
  - 第二節 プロテアーゼ消化によるアミン修飾
  - 第三節 アミン修飾反応の時間依存性及び基質濃度依存性
  - 第四節 アミン修飾ペプチドの生成率の算出
  - 第五節 メタノールのアミン修飾反応に及ぼす影響
  - 第六節 小括
- 第二章 消化管内におけるアミン修飾アミノ酸の検出
  - 第一節 ラット腸管内でのプロテアーゼによるアミン修飾反応の 可能性
  - 第二節 モデルアミン修飾アミノ酸の選択と分析法の確立
  - 第三節 ラットへのタンパク質及びアミンの強制経口投与による 腸管内でのアミン修飾アミノ酸の生成
  - 第四節 *in situ* closed loop 法によるアミン修飾アミノ酸の組織への 分布の確認
  - 第五節 小括

第三章 試験管内における生体アミン及び薬物修飾ペプチドの生成

第一節 修飾ペプチドの生成におけるポリアミンの基質性

第二節 修飾ペプチドの生成における薬物の基質性

第三節 小括

総括と考察

謝辞

実験の部

引用文献

本論文で使用した略号を示す。

ACN; acetonitrile

Ang I; angiotensin I

Amp; ampicillin

CHCA; α-cyano-4-hydroxycinnamic acid

CytC; cytochrome C

ESI-MS; electrospray ionization mass spectrometry

HB; bovine hemoglobin

HEPES; 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

HPLC; high performance liquid chromatography

INH; isoniotinic acid hydrazide

INS; insulin

INS  $\beta$ ; insulin  $\beta$  chain

MALDI-TOF MS; matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry

NMR; nuclear magnetic resonance

PA; polyamine

PSD; post-source decay

Put; putrescine

PyPut; N-(2-pyridyl)-1,4-diaminobutane

Spd; spermidine

Spm; spermine

TA; tranexamic acid

TGase; transglutaminase

TFA; trifluoroacetic acid

TLC; thin layer chromatography

Tris; tris(hydroxymethyl)aminomethane

W-PyPut; N-[N-(2-Pyridyl)-putrescine]-L-tryptophanyl amide

総論の部

#### 緒言

多くの食品成分やサプリメント、薬物などが疾病予防や健康維持の ために経口的に摂取されており、これらの成分同士が化学的・生化学 的に直接または間接的に作用する相互作用の理解は、個別医療を推進 する上でも重要な課題である。薬物や食品が関わる相互作用は、薬物 -薬物間相互作用、薬物-食品成分間相互作用、食品成分-食品成分 間相互作用の3つに大別される。薬物-薬物間相互作用については薬 物動態あるいは薬物作用への影響に基づく数多くの報告がある(伊賀、 分光堂、1997;中川、医薬ジャーナル、1998)。一方、薬物-食品成分 間相互作用については、胃排泄速度の変化、消化管内のpHの変化、 輸送単体の変化などに基づく相互作用の報告が増加傾向にあるが、そ れら相互作用の全容を把握する上で十分ではない(城西大医療栄養学 科、丸善、2005;細谷、第一出版、2007)。さらに、食品成分-食品成 分間相互作用については、野菜中の硝酸塩が亜硝酸になりアミン類と 反応しニトロソアミンが生成すること(Marion *et al.*, 2005) など、幾 つかの例が知られているにすぎない。

ヒトの平均寿命から算出すると、ヒトは生涯で約8万食という膨大 な食品を摂取しており、食品成分の暴露量は他の成分とは比較になら ないほど多くなる。その中でもタンパク質、脂質、糖質は、経口的に 摂取する主要な成分である。消化管内におけるこれら食品成分が関与 する相互作用に関する報告は現在のところ少ないが、これらの成分が 関わる予期しない反応を理解することは起こりうる相互作用を予測す るためには非常に重要であると考えられる。

タンパク質、脂質、糖質が経口的に摂取されると、これらは消化酵素により分解され低分子になり、腸管から吸収される。タンパク質は プロテアーゼにより消化されトリペプチド、ジペプチド、アミノ酸と なり吸収され、また、脂質はリパーゼにより消化されモノグリセリド、 脂肪酸となり吸収される。さらに、糖質はグルコシダーゼにより単糖 などになり吸収される(細谷、第一出版、2002)。しかしながら、これ らの消化過程は、腸管内でほぼ同時に、またアミン類、ビタミン類、 イオン類など様々な成分の共在下で進行する。従って消化過程では、 これらの消化反応がさらに副次的な反応を引き起こすと予想される。

膵液に含まれるトリプシンやキモトリプシンはセリンプロテアーゼ の一種であり、その反応機構はトランスグルタミナーゼ(TGase)の反応 機構と類似していることが知られている(Nemes *et al.*, 2005)。TGase は哺乳類細胞が持つ翻訳後修飾を担う酵素であり、タンパク質中のグ ルタミン残基のアミノカルボニル部のアンモニアがリジン残基やポリ アミンなどのアミノ基で置換される反応を触媒する。TGase の反応機 構は以下の二段階で進行する(Fig. 1)。すなわち、活性中心のシステイ



Fig. 1 Reaction mechanism of transglutaminase (TGase)

ン残基がグルタミン残基のアミノカルボニル部のアシル炭素を求核的 に攻撃し、γ-グルタミルー酵素中間体の形成とアンモニアの遊離が最 初に起こり、次いで、γ-グルタミルー酵素中間体へアミノ基が反応し、 グルタミン残基のアミン修飾が起こる。

一方、セリンプロテアーゼの反応機構も二段階の求核置換反応で進行する(Fig. 2)。まず、活性中心であるセリン残基がポリペプチドのアミド結合におけるアシル炭素を攻撃し、アシルー酵素中間体の形成とC端側のペプチドの遊離が起こり、次いで、アシルー酵素中間体へ水分子がヒドロキシイオンとなり求核的に反応し、N端側のペプチドが遊離される(Tobin *et al.*, 1995)。したがって、セリンプロテアーゼによる酵素反応の際に求核反応に関与しうるアミノ基を有する化合物



Fig. 2 Serine protease-catalyzed amide hydrolysis and aminolysis

Proteins (or peptides) are hydrolyzed by trypsin in two steps. The first step is the acylation of the serine residue in the active site, resulting in liberation of the C-terminal peptide. The second step is hydrolysis of the acyl-enzyme intermediate for eliminating the N-terminal peptide. Amines rather than hydroxyl ions might react with the acyl-enzyme intermediate.

が反応中間体の近傍に存在する場合、TGase での酵素反応と同様なア シルー酵素中間体へアミノ基が反応し、遊離するペプチドのC末端が アミン修飾される可能性は十分に考えられる。

つまり、ポリアミンやチラミンなどの生体アミンやアミノ基を持つ 薬物が共存した場合には、タンパク質が消化される際に腸管内などで アミン修飾ペプチドが生成する可能性が示唆される。

本研究は、タンパク質が腸管内で消化される際に、生体アミンやア ミノ基を持つ薬物によりアミン修飾ペプチドが生成する可能性につい て検討し、薬物-食品成分間あるいは食品成分-食品成分間に起こり うる未知の相互作用の可能性を明らかにすることを目的として行った。

本研究論文では、第一章で、モデル化合物を用い試験管内における プロテアーゼ消化に伴うアミン修飾ペプチドが生成する可能性につい て扱い、第二章では、引き続きモデル化合物を用い生体内においてア ミン修飾が起こる可能性について扱った。最後に第三章では、実際の 生体アミンと薬物による修飾ペプチドの生成について扱った。

## 第一章 試験管内におけるプロテアーゼ消化に伴うアミン修飾ペプチ ドの生成

緒言でも述べたように、タンパク質のプロテアーゼ消化の際に断片 化ペプチドのC末端がアミンにより修飾されることが示唆される。通 常、タンパク質修飾ペプチドの検出には、TGaseの活性測定(Nemes et al., 2005)など放射性同位体で標識された化合物を用い、タンパク質分 画中の放射線を検出する方法が汎用されている。したがって、放射性 同位体を有するアミンを用いる方法が、微量に生成すると予想される 修飾ペプチドの検出に有利であると思われた。しかし、検出自体は比 較的に容易に行うことができるが、利用施設の制限のために質量分析 を用いる修飾部位の同定や、実験動物を用いた消化管内における検出、 同定を試みる実験には放射性同位体を用いることができない。そこで、 放射同位体を持つアミンに代わり、蛍光性アミンを用いてアミン修飾 ペプチドが生成するか否かについて検討した。

### 第一節 モデルアミンの選択

モデルアミンとする蛍光アミン誘導体の選出にあたり、1)生成する 修飾ペプチドが微量であることが予想されるため、HPLC にて高感度 に検出可能な強い蛍光強度を有すること、2)酵素反応の基質として用 いるため、活性部位に入りやすいように構造が小さく、蛍光団による 立体障害で反応が阻害されないようにアミノ基と蛍光団の距離を設け るために炭素鎖が蛍光団とアミノ基の間にある構造であること、3)正 電荷を有するイオンを検出する質量分析により修飾部位を同定するた め、質量分析で検出しやすい正電荷を構造中に持つこと等の条件を考 慮し、蛍光団であるアミノピリジンを持つ化合物である *N*-(2-pyridyl)-1,4-diaminobutane (PyPut) を合成し、用いることとした (Fig. 1-1)。 PyPut の酸性条件下の励起・発光極大波長はそれぞれ 310 nm と 390 nm で (Fig. 1-2)、蛍光強度は 1.5 μM (-)-Quinine (Ex 350 nm, Em 454 nm, Solvent; 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を 100 とした時に 1.5 μM PyPut (Ex 310 nm, Em 390 nm, Solvent; 100 mM HCl)は 25 であった。



Fig.1-1 Structure of PyPut



Fig. 1-2 Excitation and emission spectra of PyPut in 0.1% TFA/5% acetonitrile

第二節 プロテアーゼ消化によるアミン修飾

前節で選択した PyPut をモデルアミンとして用い、試験管内におい てタンパク質のプロテアーゼ消化の際に C 末端 PyPut 修飾ペプチドが 生成するか検討した。

修飾ペプチドの同定に用いる質量分析の際、アルギニンやリジンな どの正電荷を持つアミノ酸を構造内に有する場合にはペプチドの検出 感度が上がることが知られている(Chaurand *et al.*, 1998)。そこで、酵 素にはアルギニンとリジンの C 末端側で切断するトリプシンを用いる こととした。

変性剤の影響を回避するために、モデルタンパク質には変性剤を用いることなく酵素により容易に断片化されるタンパク質を選択した。 予備実験においてオボアルブミンは変性剤無しでは消化されず、ヘモ グロビン(HB)やシトクロムC(CytC)は変性剤を用いなくても容易 に消化されることが判った。そこで、モデルタンパク質としては HB を用いることとした。

HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中で 1 mg/ml HB を 50 mM PyPut の存在下ま たは非存在下で、トリプシン消化後、それぞれ HPLC 分析し、溶出液 を 30 秒ごとに分取した。HPLC 分析の結果を Fig. 1-3 に示した。UV 検出により、消化されたペプチドは保持時間 30 から 50 分の間に溶出 されることがわかり、両者の断片化ペプチドのクロマトグラムに大き な差異は認めらなかった (Fig. 1-3A, B)。保持時間 70 分付近の HB の ピークに差があり、PyPut により若干のトリプシンに対する阻害が認め られた。蛍光検出により、PyPut 存在下の消化物では数多くのピークが 検出され (Fig. 1-3D)、断片化ペプチドが PyPut により修飾されたこと が示唆された。

次に分取したサンプルのうち蛍光ピークを含むサンプル全てについ

て matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)分析したところ、理論上の PyPut 修飾ペ プチドの分子量と一致するピークが検出された (Table 1-1)。なお、Fig.



Fig. 1-3 HPLC chromatograms of tryptic digestion products of HB in the presence or absence of PyPut

Tryptic digestion products of HB in the absence (A, C) or in the presence (B, D) of PyPut were analyzed by HPLC with UV (A, B) and fluorescence detection (C, D) on a packed C18 column (TOSOH ODS 120T,  $4.6 \times 250$  mm). UV absorption was monitored at 220 nm. Fluorescence was monitored at Ex 310 nm and Em 390 nm. Eluates were collected every 30 s for mass analysis. White and black arrows indicate the retention time of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of HB, respectively.

## Table 1-1Detection of C-terminal PyPut-modified peptide by MALDI-TOFMS analysis and PSD

HB digestion with trypsin was performed in the presence of 50 mM PyPut. Tryptic digestion products were separated and fractionated every 30 s by HPLC, and fractions including fluorescence peaks on HPLC chromatograms (Fig. 2D) were analyzed by MALDI-TOF MS and PSD.

			Monoisotopic $MH^+$ at $m/z$
Retention time [min]	Fragment	Sequence	(Calculated monoisotopic mass)
34.5	β 19-29	VDEVGGEALGR-PyPut	1248.6 (1248.8)
36.0	β 95-103	LHVDPENFK-PyPut	1245.5 (1244.8)
37.0	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-PyPut	1676.4 (1676.9)
38.5	β 132-143	VVAGVANALAH <b>R-P</b> yPut	1324.5 (1324.9)
39.0	α 91-99	LRVDPVNFK-PyPut	1234.3 (1234.8)
39.5	β 8-18	AAVTAFWGKVK-PyPut	1324.3 (1324.9)
43.0	β 65-81	KVLDSFSNGMKHLDDLK-PyPut	2093.7 (2094.2)
44.0	β 120-131	EFTPVLQADFQK-PyPut	1569.9 (1569.9)

1-3Cの同じ保持時間の分画からは修飾ペプチドは検出されなかった。

PyPut が断片化したペプチドのどこに修飾されているか確かめるために、PyPut 修飾ペプチドの分子量の一致するピークについてpost-source decay (PSD)分析を行った。PSD 分析では、親イオンとして選択したペプチドのアミド結合の開裂により生じるフラグメントイオンが検出され、N 末端を含む b イオンと C 末端を含む y イオンから配列分析が可能となる。Fig. 1-4 には、Fig. 1-3D において 37.0 分に溶出したペプチドの PSD 分析の結果を示す。1,677 Da のペプチドは HB α







鎖 17-31 番目のペプチド(VGGHAAEYGAEALER)が PyPut により修飾 されたものと分子量が一致し、実際に、このペプチドを親イオンとし たとき、b イオンの4から15及び y イオンの1から15が検出された。 このことから、1,677 Da のピークは VGGHAAEYGAEALER-PyPut で あると同定した。PSD分析の結果、Table 1-1 で示したペプチドはすべ て C 末端 PyPut 修飾ペプチドであった。これらの配列は HB の配列と 一致した(Swiss-Prot Accession No. P01966 and P02070)。以上の結果から、 タンパク質がプロテアーゼにより消化される際に、共存するアミンに より断片化したペプチドが修飾されることが明らかになった。

次に、プロテアーゼによるアミン修飾反応がプロテアーゼとタンパ ク質の種類によらずに起こることを示すために、モデルタンパク質と して HB と CytC を用い、モデル酵素としてトリプシン、キモトリプシ ン、エラスターゼを用い、すべての組み合わせでアミン修飾反応が起 こるか検討した。

先程と同様に、50 mM PyPut の存在下で HB または CytC を消化した。 タンパク質の消化物を HPLC にて分離精製し、MALDI-TOF MS 分析を 行い、PyPut 修飾ペプチドの分子量の一致するものをすべて PSD 分析 した。その結果、調べたすべての組み合わせで PyPut 修飾ペプチドを 検出した(Table 1-2)。これらの修飾ペプチドのアミノ酸配列は、それ ぞれの酵素の断片化部位と HB 及び CytC の配列(Swiss-Prot Accession No. P01966, P02070 and P00004)から予想されるものであった。

これらの結果から、このアミン修飾反応は、タンパク質とプロテア ーゼの種類によらずに起こり、セリンプロテアーゼの加水分解反応に 付随する一般的な反応であることが明らかになった。

# Table 1-2Detection of C-terminal PyPut-modified peptide by MALDI-TOFMS analysis and PSD

HB or CytC digestion with trypsin, chymotrypsin or elastase was performed in the presence of 50 mM PyPut. Proteolytic digests were separated and fractionated every 30 s by HPLC, and fractions including fluorescence peaks on HPLC chromatograms were analyzed by MALDI-TOF MS and PSD.

				Monoisotopic $MH^+$ at $m/z$
Protease	Protein	Fragment	Sequence	(Calculated monoisotopic mass)
Trypsin	CytC	39-53	KTGQAPGFTYTDANK-PyPut	1618.2 (1617.9)
		40-53	TGQAPGFTYTDANK-PyPut	1746.7 (1746.0)
		α 1-24	VLSAADKGNVKAA-	2545 0 (2545 4)
			WGKVGGHAAEY-PyPut	2545.0 (2545.4)
		α 3-14	SAADKGNVKAAW-PyPut	1364.6 (1364.8)
		α 15-24	GKVGGHAAEY-PyPut	1135.6 (1135.7)
		α 35-42	SFPTTKTY-PyPut	1091.6 (1091.7)
	UD	α 67-73	TKAVEHL-PyPut	944.5 (944.6)
Chymotrypsin	nb	α 92-98	RVDPVNF-PyPut	993.5 (993.6)
		α 110-117	ASHLPSDF-PyPut	1020.5 (1020.6)
		β 15-27	GKVKVDEVGGEAL-PyPut	1448.0 (1447.9)
		β 32-36	<b>VVYPW-PyPut</b>	810.4 (810.5)
		β 96-102	HVDPENF-PyPut	1004.4 (1004.6)
		β 122-129	TPVLQADF-PyPut	1037.8 (1037.7)
	CytC	1-10	Ac-GDVEKGKKIF-PyPut	1310.1 (1309.9)
Elastase	HB	α 35-48	SFPTTKTYFPHFDL-PyPut	1847.9 (1848.1)
		β 31-47	LVVYPWTQRFFESFGDL-PyPut	2251.1 (2251.3)
		β 126-137	QADFQKVVAGVA-PyPut	1379.3 (1379.9)
	CytC	4-15	EKGKKIFVQKCA-PyPut	1525.9 (1526.0)
		7-15	KKIFVQKCA-PyPut	1211.8 (1211.8)
		12-24	QKCAQCHT VEKGG-PyPut	1534.8 (1535.8)
		35-41	LFGRKT G-PyPut	925.3 (925.6)
		85-98 -	IKKKTEREDLIAYL-PyPut	1867.2 (1867.2)

第三節 アミン修飾反応の時間依存性及び基質濃度依存性

前節の結果、切断部位及び修飾された断片化ペプチドのアミノ酸配 列から、この修飾反応はそれぞれの酵素反応に伴う現象であることが 強く示唆されたが、さらに修飾反応の性質を確認することを試みた。 すなわち、PyPut 修飾反応における基質濃度及び時間依存性について、 HB のトリプシン消化の際、反応の早い時期から検出される HB α鎖 17-31 の修飾ペプチドを指標として HPLC 分析により検討した。修飾ペ プチドの生成の時間依存性を調べた結果、修飾ペプチドは時間経過と ともに増加し、HB α鎖の分解と対応していた(Fig. 1-5)。基質濃度依 存性を調べると、1 mM の PyPut 濃度においても生成が確認され、また 修飾ペプチドの生成は HB 及び PyPut の濃度に依存しており、25 mM PyPut で飽和した(Fig. 1-6)。これらの結果からも、この修飾反応は酵 素を介する反応であることが明らかになった。





Tryptic digestion products of HB in the presence of PyPut were analyzed by HPLC. Relative fluorescence intensity of the peak area of PyPut-modified peptide (17-31 of HB  $\alpha$  chain, VGGHAAEYGAEALER-PyPut) and absorbance unit of peak area of HB  $\alpha$  chain are shown (n=3).





Tryptic digestion products of HB in the presence of PyPut were analyzed by HPLC. Formation of PyPut-modified peptide (17-31 of HB a chain, VGGHA AEYGAEALER-PyPut) in the presence of 1 mg/ml HB (A) or 50 mM PyPut (B) was monitored in order to determine the effects PyPut-concentration (A) and HB-concentration (B), respectively (n=3).

第四節 アミン修飾ペプチドの生成率の算出

これまでの結果から、本修飾反応がプロテアーゼの消化反応に付随 する副反応であることが明らかになった。そこで、トリプシン消化過 程における PyPut 修飾ペプチドの生成率を合成ペプチドを用いて検討 した。断片化後に C 末端になるリジンへの修飾率を求めるために SLIGKV-OH を用い、断片化後に C 末端になるアルギンニンへの修飾 率を求めるために SFLLRN-NH<sub>2</sub>を用いた。これらの合成ペプチド(50 mM) について 50 mM PyPut の存在下でトリプシン消化を行い、HPLC によって分離精製し、PyPut 修飾ペプチドの生成を質量分析で確認した。 修飾ペプチドの分画を加水分解し、得られた PyPut の量を定量するこ とで修飾ペプチドの量を算出した。その結果、SLIGK-PyPut と SFLLR-PyPut の生成率は、断片化ペプチドのそれぞれ 0.07 ± 0.01%と 0.09 ± 0.01%であった(n=3)。この結果から、合成ペプチドについてのト リプシンによる修飾ペプチドの生成率は約 0.1%であることが明らか になった。

50 mM PyPut 存在下での修飾ペプチドの生成の割合は未修飾ペプチドの0.1%であり、Fig. 1-6Aから1 mM Py4では10分の1くらいの0.01%前後になると思われる。ヒトは一日に約 60 g タンパク質を摂取しているといわれているので(0.8 g/kg body weight)(Pellet, 1990)、腸管に1 mM アミンが存在していればアミン修飾ペプチドまたはアミノ酸が $\mu$ mol/day レベルで生成する可能性が考えられる。

第五節 メタノールのアミン修飾反応に及ぼす影響

前節で修飾率が約0.1%であることが明らかになったが、消化時の環境によって修飾量が変化するか検討を行った。

アミン修飾反応はアミンと水との競合反応であるため、水分子の量 が減少した条件では、修飾ペプチドの生成量が増加することが考えら れる。有機溶媒中においてもタンパク質の消化が効率的に行われるこ とが知られているので(Russell *et al.*, 2001)、メタノールを添加して水 の割合を低下させたときに PyPut 修飾ペプチドの生成量が変化するか、 HB α 鎖 17-31 の PyPut 修飾ペプチドを指標とし評価した。その結果、 HB 消化時に緩衝液の 17、34、50%をメタノールに置換すると、コン トロール (0%) に比べて修飾ペプチドの生成量がそれぞれ 3.2 ± 0.9、 14.0 ± 0.9、18.6 ± 1.1 倍となった (n=3)。

消化時の環境の変化、すなわち、水をメタノールに置換したことに よって修飾ペプチドの生成量が増加することが明らかになった。しか し、この大幅な生成量の増加は水分子の減少によるものだけでは説明 できず、HBの立体構造の不安定化とトリプシンの活性部位の構造変化 も影響している可能性が考えられる。このメタノールによる修飾量の 増加は、通常の条件では生成量の少ない修飾ペプチドの同定に応用で きることが示唆された。また、これらのことによって、消化時の腸管 内の環境によって修飾量が変化することが予想される。

第六節 小括

試験管内においてタンパク質を PyPut 存在下セリンプロテアーゼに よって消化した際に、断片化ペプチドの C 末端が共存する PyPut によ り修飾されることを明らかにした。

HBを PyPut 存在下トリプシン消化した際に、修飾ペプチドの生成量が PyPut 及び HB 濃度依存的に増加し、また、その増加は HB の分解に対応していた。このことからも、この修飾反応は酵素を介して進行していることが明らかになった。

合成ペプチドを基質に用いトリプシンによる断片化ペプチドへのア ミンによる修飾率を求めた結果、切断ペプチドの約0.1%であった。

メタノールなどの有機溶媒が共存することにより修飾ペプチドの生 成量が変化することがわかった。 第二章 消化管内におけるアミン修飾アミノ酸の検出

前章で試験管内においてアミン修飾ペプチドが生成することが明ら かになった。そこで、本章は腸管内における修飾反応の可能性につい て検討した。試験管内の実験のような単一のタンパク質と単一の消化 酵素による反応ではなく、腸管内では投与タンパク質や内因性タンパ ク質、膵液プロテアーゼや刷子縁膜プロテアーゼなどの多様な因子が 絡み合う複雑な反応となる。このため、投与タンパク質由来ではない 修飾ペプチドが生成する可能性、さらに、修飾ペプチドがさらに代謝 される可能性などが考えられる。

## 第一節 ラット腸管内でのプロテアーゼによるアミン修飾反応の可能 性

まず、ラットの腸管内において、PyPut 修飾が起きる可能性について 検討した。

24時間絶食後、SD系雄性ラット(n=3)に投与液(8 mg/ml HB ある いは 8 mg/ml HB+300 mM PyPut)を強制経口投与し、1時間後に腸管 を摘出した。この腸管から Hisada 等の方法(Hisada *et al*, 2002)でペプ チドを抽出し、HPLC分析した。クロマトグラムを Fig. 2-1 に示す。蛍 光検出において PyPut 非添加群に比べて、PyPut 添加群において明らか にピーク数の増加がみられた。通常のペプチド溶出領域である保持時 間 50 から 70 分ではほとんど蛍光ピーク数の増加は見られなかった。 40 から 55 分の間で蛍光ピークの増加が認められたため、PyPut 修飾ペ プチドの検出を試みたが、PSD 分析においては同定されなかった。保 持時間 40 から 55 分の蛍光ピークを分取して加水分解した結果、PyPut が HPLC により検出された。これらのことから水溶性の高い非ペプチ ド成分あるいはトリペプチド、ジペプチド、アミノ酸などの低分子が 修飾されている可能性が強く示唆された。



Fig. 2-1 HPLC chromatograms of extracts from small intestine

After a 1 h administration of 1 mL solution of HB (A, C) or HB with PyPut (B, D), the small intestine was excised from the sacrificed rat. The extracts from intestine with 1:1 ACN/water were analyzed by HPLC with UV absorbance (A and B) and fluorescence detection (D and E) on a packed C18 column (TOSOH ODS 120T,  $4.6 \times 250$  mm). UV absorption was monitored at 220 nm. Fluorescence detection was monitored at Ex 310 nm and Em 390 nm.

第二節 モデルアミン修飾アミノ酸の選択と分析法の確立

前節の結果から、ラットの腸管内において低分子への PyPut の修飾 反応が起こることが示唆された。ラットにおいて外来性のタンパク質 は1時間程度で 65%吸収されることが知られている(Curtis et al., 1978)。 つまり、タンパク質の量によって差はあるが、数時間程度でトリペプ チド以下まで分解されているということになる。これらの事柄から、 タンパク質消化の際にプロテアーゼにより生成したアミン修飾ペプチ ドは、さらに分解されてアミン修飾アミノ酸となるのではないか、あ るいはアミノ酸になる段階で修飾されるのではないかと考え、アミン 修飾アミノ酸の生成について検討することとした。

アミン修飾アミノ酸を組織から検出するにあたり、1) 膵液中含量の 最も高いプロテアーゼであるキモトリプシンで切断時にC未端になる アミノ酸であること、2) アミン修飾された場合に容易に抽出できるよ うに脂溶性が高いこと等の条件を考慮し、トリプトファンが PyPut に より修飾された化合物である *N-*[*N-*(2-Pyridyl)-putrescine]-L-tryptophanyl amide (W-PyPut) をモデル化合物とし、新規合成した。W-PyPut の構 造式とスペクトルを Fig. 2-2 に示す。W-PyPut の酸性条件下の励起・発 光極大波長はそれぞれ 277 nm・390 nm であり、蛍光強度は PyPut の 1/6 程度であった。

W-PyPut を用い前処理および HPLC 及び electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) による分析法を確立した。

確立した W-PyPut 前処理法を以下に示した。すなわち、臓器 1gまたは血液 1ml あたり 8 M アンモニア水 1ml 加え、氷冷下ホモジナイズする。これを 5 倍量のクロロホルムで 2 回抽出し、クロロホルム層を減圧留去し、残渣を 0.1% TFA 含有 30% ACN に溶解させる。これを遠心分離し、不溶性成分と油滴を取り除き、HPLC 分析サンプルとし

た。添加回収実験の結果、この方法で肝臓、血液から共に W-PyPut について添加量の 99%を回収し、g 組織あたり 10 pmol の W-PyPut の検出が可能であることがわかった。



Fig. 2-2 Structure (A) and excitation and emission spectra (B) of W-PyPut

また、W-PyPut の腸管における安定性を検討し、比較として PyPut 修飾ペプチド、PyPut の分解についても HPLC 分析にて検討した。その結果、Fig. 2-3 に示すように、腸管ホモジネート中 37℃で 2 時間イン キュベートによって PyPut (■) はほぼ完全に分解した。化学的に合成 した修飾ペプチド (CIKHIATNAVLFFGR-PyPut) の PyPut と R 間の結 合が切断されて脱離してくる PyPut を分析した結果 (○)、1 時間で約 25%開裂することが明らかになった。一方、W-PyPut (●) については 分解が認められず、検出を試みるモデル化合物として適していること が示唆された。これらの結果から、アミンが結合するアミノ酸の種類 によって腸管ホモジネート中での安定性が異なることが示唆された。



Fig. 2-3 Stability of W-PyPut, PyPut-modified peptide (CIKHIATNAVLFF GR-PyPut) and PyPut in rat intestine homogenate

W-PyPut, PyPut-modified peptide or PyPut was incubated at 37°C for 16 hr in homogenate of rat intestine. After pretreatment, W-PyPut or PyPut was analyzed by HPLC. Closed circle or square shows stability of W-PyPut or PyPut, respectively. Open circle shows elimination of PyPut from modified peptide.

第三節 ラットへのタンパク質及びアミンの強制経口投与による腸 管内でのアミン修飾アミノ酸の生成

第一節において、タンパク質及び PyPut を経口投与した時に、腸管 内において低分子が修飾されていることが強く示唆された。そこで、 同様にタンパク質と PyPut を経口投与し、腸管内において W-PyPut が 生成し、さらに臓器に分布するか検討した。W-PyPut の同定には、HPLC 分析での保持時間、低分子の同定に用いられる ESI-MS 分析による質 量数の同定により行うこととした。

24 時間絶食後、SD 系雄性ラット (n=3) に投与液 (500 mg/ml HB あ るいは 500 mg/ml HB+300 mM PyPut) を強制経口投与し、4 時間後、 臓器を摘出した。これらの臓器について W-PyPut 分析のための前処理 を行った後、HPLC 分析を行った。HB 及び PyPut の投与ラットにおけ る脳、心臓、肝臓、腎臓、肺においては W-PyPut は HPLC により検出 されなかった。しかし、Fig. 2-4 に示したように、腸管については PyPut





The extract from small intestine of group A (HB) or group B (HB+PyPut) was analyzed by HPLC with fluorescence detection on a packed C18 column (TOSOH ODS 120T,  $4.6 \times 250$  mm). Fluorescence detection was monitored at Ex 270 nm and Em 390 nm. Arrows indicate the retention time of W-PyPut.

添加群に W-PyPut と保持時間が同一のピークが検出された(71.2±15.5 pmol/g tissue)。検出分画を分取し ESI-MS で分析した結果、W-PyPut のプロトン化分子である 352 のピークが検出された(Fig. 2-5)。また、分取した W-PyPut 分画を加水分解後、HPLC分析を行った結果、W-PyPut の消失と PyPut の生成が認められ、その量は W-PyPut の定量値とほぼ 一致した。 W-PyPut (MW 351.21) と L-Tryptophyl-L-phenylalanine (W-F; MW 351.16)は、ほぼ同一の分子量なので、分取条件で両者が 混ざらないか検討した結果、用いている HPLC 条件では W-F はカラム から溶出しないことがわかった。

これらの結果から、Fig. 2-4B における検出成分が W-PyPut であるこ とが明らかになり、ラット腸管内でプロテアーゼによるアミン修飾反 応が起きていることが強く示唆された。腸管のみで W-PyPut が検出さ れた理由として、腸管内における生成量が微量であったこと、吸収が 不十分であったこと、代謝されやすいことなどを予想した。



Fig. 2-5 ESI MS spectrum of W-PyPut (MH<sup>+</sup>; 352) in extracts from small intestine of group of HB+PyPut

## 第四節 *in situ* closed loop 法によるアミン修飾アミノ酸の組織への分 布の確認

HB 及び PyPut を経口投与したときに、W-PyPut の生成量が少ないた めに、肝臓などで代謝され臓器内に分布しないことが予想された。ア ミン修飾アミノ酸が臓器に分布するとしたら、アミン修飾アミノ酸が 局所的ではなく全身に作用する可能性がある。そこで、十分量生成さ れた場合に W-PyPut が組織に分布するかどうかを検討するため、以下 の実験を行った。すなわち、SD 系雄性ラットについて *in situ* closed loop 法による W-PyPut の投与実験を行った(n=3)。3.2 mM W-PyPut 溶液 1 ml を空腸で作製したループ内に投与し、経時的に血液及び臓器を採取 した。前処理後、各試料中の W-PyPut 濃度を HPLC 分析した結果、血 液、肝臓、心臓、腎臓、肺臓から W-PyPut が検出された(Fig. 2-6)。 血液、各臓器とも時間経過に伴い、W-PyPut 含量が上昇したが、脳に ついては検出限界以下であった。これらの結果から、腸管内でアミン 修飾アミノ酸が十分量生成すれば組織に分布しうることが明らかにな った。

### 第五節 小括

HB 及び PyPut を同時に投与した際に、腸管内において W-PyPut が生成することを明らかにした。このことから、腸管内においてプロテアーゼによって断片化されたペプチドがアミンにより修飾され、その後分解によってアミン修飾アミノ酸などが生成することが強く示唆された。

W-PyPut が吸収実験において組織に分布したことから、生成した修飾アミノ酸は組織に分布することが予想される。



Fig. 2-6 W-PyPut contents in blood (A) and tissues (B) on W-PyPut absorption in the *in situ* rat jejunum loop study

The rat jejunum was treated with 1 mL of W-PyPut solution (3.2 mM, n=3). After blood and organs were excised, extracts from the blood and the organs were analyzed by HPLC with fluorescence detection on a packed C18 column (TOSOH ODS 120T,  $4.6 \times 250$  mm). Fluorescence detection was monitored at Ex 270 nm and Em 390 nm.

第三章 試験管内における生体アミン及び薬物修飾ペプチドの生成

腸管内においてアミン修飾反応が起こること、反応より生じる修飾 アミノ酸が組織に分布することから、この修飾反応が食品成分間の相 互作用、薬物-食品成分間の相互作用につながる可能性が示唆された。 本章では、多様な構造を持つ食品及び薬物由来のアミンが修飾反応の 基質になるかについて、第一章と同様に HB を種々のアミン存在下ト リプシン消化し、試験管内における修飾ペプチドの生成の可能性を MALDI-TOF MS 分析及び PSD 分析により検討した。

第一節 修飾ペプチドの生成におけるポリアミンの基質性

ポリアミン(PA) は多様な食品中に存在し、摂取量の多いアミンの 一つである。また、PA 修飾アミノ酸が生理活性を示すことが知られて おり、PA 修飾リジンまたはトリプトファンは PA 輸送阻害(Burns *et al.*, 2001)、修飾アルギニンは神経保護作用が報告されている(Morrison *et al.*, 2002)。そのため、食品由来のアミンとして、PA であるスペルミジン (Spd) とスペルミン (Spm) を選択した。

HBを1または50 mM SpdまたはSpm存在下トリプシン消化後、 HPLCにより分離した。50 mM Spd及びSpm存在下消化したサンプルのUV吸収で検出したHPLCクロマトグラムをFig. 3-1に示す。PA存在下における消化試料のクロマトグラムは、コントロールと大きな差異は見られなかったが、溶出液を30秒ごとに分取しMALDI-TOF MS分析及びPSD分析したところ矢印で示した分画から、Table 3-1に示す修飾ペプチドが検出された。また、この修飾ペプチドは1 mM 濃度のSpd及びSpm存在下における反応によっても生成されることを確認した。





(A) Tryptic digests of HB in the presence of 50 mM spermidine. (B) Tryptic digests of HB in the presence of 50 mM spermine. (C) Tryptic digests of HB in the absence of spermidine and spermine. The protease digests were fractionated by HPLC on a packed C18 column (TOSOH ODS 120T, 4.6 x 250 mm). UV absorption was monitored at 220 nm. Eluate was collected every 30 sec. Arrows indicate retention time of polyamine-modified peptides identified by mass analysis.

-つの PA 修飾ペプチドの PSD 分析結果を Fig. 3-2 に示す。Spd 修飾 ペプチドで'1\*', '2\*' '3\*'で示すフラグメントピークが見られ、Spm 修 飾ペプチドにおいては'1\*'で示すピークが検出された。すなわち、これ らのピークは、今後 PA 修飾ペプチドを生体試料中で検出する上での 指標になることが示唆された。

食直後の腸管 PA 濃度が mM レベルまで上昇することが知られてお り(Seidel et al., 1997)、1 mM で修飾反応が進行したことは健常なヒ トの腸管内においても PA 修飾反応が十分起こり得ることが示唆され る結果である。

# Table 3-1MALDI-TOF MS and PSD detection of polyamine-modifiedpeptides

HB digestion with trypsin was performed in the presence of spermidine (1 or 50 mM) or spermine (1 or 50 mM). Those protease digests were separated and fractionated every 0.5 min by HPLC, and every fraction was analyzed by MALDI-TOF MS and PSD.

			Average $MH^+$ at $m/z$
Alkylamine	Fragment	Sequence	(Calculated average mass)
50 mM Spd	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-Spd	1658.0 (1656.9)
	α 41-56	TYFPHFDLSHGSAQVK-Spd	1961.1 (1961.0)
	α 91-99	LRVDP VNFK-Spd	1214.9 (1214.8)
	β 17-29	VKVDEVGGEALGR-Spd	1455.9 (1454.9)
	β 120-131	EFTPVLQADFQK-Spd	1550.0 (1549.9)
50 mM Spm	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-Spm	1714.1 (1713.9)
	α 41-56	TYFPHFDLSHGSAQVK-Spm	2018.2 (2018.1)
	β 30-39	LLVVYPWTQ0R-Spm	1459.0 (1458.9)
	β 120-131	EFTPVLQADFQK-Spm	1607.0 (1606.9)
1 mM Spd	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-Spd	1657.9 (1656.9)
1 mM Spm	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-Spm	1713.8 (1713.9)



Fig. 3-2 PSD spectra of protonated C-terminus spermidine-modified 1657.6 Da peptide (A) and C-terminus spermine-modified 1714.9 Da peptide (B)

HB  $\alpha$  chain modified peptide spanning residues 17 to 31 (VGGHAAEY GAEALER-Spd or -Spm, 1,657 Da or 1,714 Da) was used as a parent ion for PSD, respectively.

第二節 修飾ペプチドの生成における薬物の基質性



Amp Fig. 3-3 Structure of tested drugs

本節では薬物由来のアミンが実際に修飾反応の基質になるか検討した。イソニコチン酸ヒドラジド(INH)の基質性を調べることで、ア ミノ基だけでなくヒドラジド基が修飾に関わる可能性について、また、 トラネキサム酸(TA)とアンピシリン(Amp)の基質性からアミン側 の基質認識がどの程度厳しいかについて明らかにすることを目的とし て、経口投与量の比較的多い3種の薬物を選択した(Fig. 3-3)。

50 mM 薬物存在下 HB をトリプシン消化した後、分析したところ、 調べたすべての条件で薬物修飾ペプチドが検出された(Table 3-2)。 Amp 修飾ペプチドは MALDI-TOF MS 分析では検出は可能であったが、 PSD 分析ではイオン強度が不足して十分な解析が困難であったため、 第一章五節において明らかにしたことを基に、反応液中にメタノール を添加し生成量を増加させ PSD 分析により同定した(Fig. 3-4)。

INH により修飾されたことから、アミノ基だけでなくヒドラジド基 も修飾反応に関わることが明らかになった。かさ高い構造をもつ Amp によっても修飾ペプチドの生成を確認したことから、多様なアミンが

基質となりうることが強く示唆された。これらのことは、アミノ基ま たはヒドラジド基を持つ薬物が大量に投与された場合に断片化したペ プチドに結合しうることを強く示唆している。特に腸溶性製剤の場合、 小腸において薬物が局在するため高濃度になる可能性が高いので、こ の修飾反応の基質になりやすいと思われる。

## Table 3-2Detection of drug-modified peptide by MALDI-TOF MS analysisand PSD

HB digestion with trypsin was performed in the presence of 50 mM of INH, TA or Amp. The proteolytic digests were separated and fractionated every 30 s by HPLC, and every fraction was analyzed by MALDI-TOF MS and PSD.

			Average $MH^+$ at $m/z$
Alkylamine	Fragment	Sequence	(Calculated average mass)
INH	α 8-16	GNVKAAWGK-INH	1049.3 (1050.2)
	α 91-99	LRVDPVNFK-INH	1207.1 (1207.4)
	α 128-139	FLANVST VLT SK-INH	1398.8 (1399.6)
	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-INH	1649.1 (1649.8)
	α 1-16	VLSAADKGNVKAAWGK-INH	1735.8 (1735.0)
	β 82-94	GTFAALSELHCDK-INH	1511.8 (1511.7)
	β 66-81	VLDSFSNGMKHLDDLK-INH	1939.4 (1939.2)
TA	α 1-7	VLSAADK-TA	842.9 (843.0)
	α 93-99	VDPVNFK-TA	958.0 (958.1)
	α 32-40	MFLSFPTTK-TA	1212.4 (1211.5)
	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-TA	1669.5 (1669.8)
	α 41-56	TYFPHFDLSHGSAQVK-TA	1973.2 (1974.2)
	β 17-29	VKVDEVGGEALGR-TA	1467.9 (1468.7)
	β 1-16	MLTAEEKAAVTAFWGK-TA	1893.1 (1893.3)
Amp	α 17-31	VGGHAAEYGAEALER-Amp	1862.5 (1862.0)
	α 69-92	AVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLR-Amp	2969.6 (2969.4)



Fig. 3-4 PSD spectrum of protonated C-terminus of Amp-modified peptide (1862 Da)

HB  $\alpha$  chain PyPut-modified peptide spanning residues 17 to 31 (VGGH AAEYGAEALER-Amp, 1,862 Da) was used as a parent ion for PSD.

第三節 小括

試験管内においてポリアミンや薬物などのアルキルアミンによりペ プチドが修飾されることを明らかにした。腸管内において多様なアミ ンにより修飾が起きることが示唆された。

### 総括と考察

本研究では、腸管内でのタンパク質、脂質、糖質の消化時における 相互作用の可能性を探る研究の一環として、タンパク質が消化される 際に生じる断片化ペプチドが、共存するアルキルアミンによって修飾 されるか検討した。

試験管内において、タンパク質をアミン共存下プロテアーゼ消化さ せ、質量分析した結果、C 末端がアミンにより修飾された断片化ペプ チドが検出された。このことから、プロテアーゼ消化の際に断片化さ れたペプチドのC末端がアミンにより修飾されることが明らかになっ た。Amp などのかさ高いアミンが修飾されたことから、修飾され易さ・ 難さがあったとしても、多様な1級アミノ基を持つ化合物がこの修飾 反応の基質となることが強く示唆された。

腸管内において生成したアミン修飾ペプチドは分解されてアミン修飾アミノ酸などになることが予想されたので、最終産物であるアミン修飾アミノ酸を検出することで、腸管内でプロテアーゼによるアミン修飾反応が起きていることを証明することとした。タンパク質とモデルアミンである PyPut をラットに投与したところ、4 時間後の腸管からアミン修飾アミノ酸である W-PyPut を検出した。このことから、腸管内においてプロテアーゼによるアミン修飾反応が起きることが強く示唆された。また、*in situ* closed loop 法において W-PyPut の吸収実験をした結果、W-PyPut が全身に分布することがわかった。これらのことから腸管でアミン修飾アミノ酸が生成し、全身に分布される可能性が示唆された。

本研究結果は、腸管内でのプロテアーゼ消化に伴い共存するアミン によりペプチド C 末端修飾反応が起こりうることを明瞭に示したもの

である。今回、HBに由来する修飾ペプチドそのものが組織から検出さ れなかったことから、生成する修飾ペプチドはさらに消化分解を受け、 修飾アミノ酸となる可能性が高い(Fig. 3)。従って、生成する修飾ペ プチドが高頻度に吸収される確率は不明であるものの、難分解性のタ ンパク質から修飾ペプチドが生成する場合や限定されたプロテアーゼ のみが働く状況等(プロテアーゼ阻害剤となる成分の過剰摂取)では 修飾ペプチドが消化管から吸収される可能性もあるものと考えている。



Fig. 3 Possibility of production and absorption of amine-modified peptide or amino acid

さらに今回、修飾アミノ酸である修飾トリプトファンは腸管ホモジ ネートにより分解を受けにくいことが明らかとなった。トリプトファ ンの比較的大きな疎水性構造が何らかの影響を与えているものと思わ れるが、修飾されるC末端アミノ酸の種類によって組織における分解 性に大きな差がみられたことは、修飾アミノ酸の構造によっても生成 する修飾アミノ酸の吸収分布に違いが生じることが予想される。第三 章で明らかになったように、Amp など非常にかさ高い構造を持つアミ ンによる修飾も起こりうるため、特に腸溶製剤などの薬物による副次 的な作用を考慮する場合には本修飾反応も一つの可能性として考慮す べきであろう。

本研究によって、日常的に摂取する成分の消化過程において生理学 的な作用を持ちうる化合物が生成し、生体内に分布しうることを示し たことは、腸管内における薬物-食品成分間および食品成分-食品成 分間の相互作用に関して新たな視点を提供した意味で意義は大きいと 考えている。

本研究は腸管内プロテアーゼを指標としたものであるが、組織など に分布するセリンプロテアーゼや同様の反応機構を持つシステインプ ロテアーゼも生体内アミン共存下アミン修飾反応を引き起こすと考え られる。また、脂質を加水分解する酵素であるリパーゼはセリンプロ テアーゼの反応機構と同様にアシル-酵素中間体を経て進行すること が知られていることから(Jaeger *et al.*, 1999)、リパーゼもアミン修飾 反応を行う可能性は高い。つまり、生体反応においてアシルー酵素中 間体を経て進行するすべての加水分解反応は同時にアミン修飾反応を 併発する可能性を持っていると考えられる。

#### 謝辞

本研究に際し、研究テーマの設定から結論に至るまで終始ご懇篤な るご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科 白幡 晶 教授に衷心より感謝致します。

AXIMA-CFR の測定に際し、御配慮頂きました慈恵会医科大学 生 化学第二講座 松藤 千弥 博士、村井 法之 博士、ならびに講座 の皆様の温かい御心遣いに、心より感謝致します。

本研究に際し、数々の有益かつ適切な御助言と御指導を賜りました 城西大学薬学部生化学講座 池口 文彦 准教授 に深謝の意を表し ます。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました城 西大学薬学部細胞生理学講座 杉田 義昭 助教 に深謝の意を表し ます。

数々の有益かつ適切な御助言と御指導を賜りました武蔵野大学薬学 研究所 鮫島 啓二郎 教授、城西大学薬学部 新津 勝 教授に感 謝致します。

ESI-MS 分析の際に御協力頂きました山崎 雅恵 氏、田所 治樹 氏に感謝致します。

実験に際し、終始御協力頂きました高尾 浩一 助教、和田 牧子 助手、佐々木 ひとみ 元助手、小林 正樹 博士、矢敷 実希子 先 輩、宮武 晋治 先輩、手塚 淑人 助手、日下部 真彦 氏、山嵜 健一 氏、石井 育美 氏に感謝致します。

本文作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました従二 和彦 教授 ならびに杉林 堅次 教授に深く感謝致します。

最後に、生化学講座、細胞生理化学講座、分析化学講座、鮫島研究 室、城西大学機器センターの皆様に感謝致します。

1. 試薬

HB (牛)、Amp、1-オクタンスルホン酸ナトリウム、2-ブロモピリジ ン及び TFA (HPLC grade) は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)より; INH、TA は Tokyo Chemical Industry Co. (Tokyo, Japan)よ り;キモトリプシン(sequencing grade) は Roche (Mannheim, Germany) より;トリプシン(sequencing grade) は Promega (Madison, WI)より; 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES)、エラス ターゼ、CytC (馬)、アンギオテンシン I (Ang I)、オボアルブミン、 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid、インスリン β鎖(Ins β) (牛)、Spd 三塩 酸塩、Spm 四塩酸塩 及びα-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) は SIGMA (St. Louis, MO, USA)より;合成ペプチド(SLIGKV-OH と SFLL RN-NH<sub>2</sub>)、*N*-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-tryptophan-4-nitrophenyl ester (Boc-W-ONP) は Bachem (Bubendorf, Switzerland)より; アセトニト リル (HPLC grade) は KANTO KAGAKU (Tokyo, Japan)より購入して 用いた。今回の実験に用いた水はすべて Mill Q により調製したものを 用いた。

<u>PyPut の合成</u> プトレシン (106.5 ml, 1.06 mol) に 2-ブロモピリジン (20.2 ml, 0.212 mol) を加え、窒素置換し 120 ℃10 時間反応させた。 反応終了を TLC にて 2-ブロモピリジンの消失により確認した後、過剰 のプトレシンを減圧留去した。残渣に 4 M アンモニア水溶液 (200 ml) を加え、クロロホルム (600 ml) で 4 回抽出し、クロロホルム層を減 圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム: メ タノール 10:1)に供し、PyPut を得た (24.5 g, 70%)。PyPut (22.8 g, 0.138 mol) をエタノール (30 ml) 及び濃塩酸 (26.7 ml) を加えた後、溶媒 を減圧留去し、残渣をエタノールで再結晶し、PyPut・二塩酸塩を得た (29.5 g、59%)。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) d 1.56-1.68 (4H, m, H-2 and H-3), 2.90 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-4), 3.26 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-1), 6.71 (1H, ddd, *J* = 7.0, 6.4, 0.9 Hz, PyH-5), 6.86 (1H, d, *J* = 9.1 Hz, PyH-3), 7.61 (1H, dd, *J* = 6.4, 1.5 Hz, PyH-6), 7.72 (1H, ddd, *J* = 9.1, 7.0, 1.5 Hz, PyH-4). FAB-MS *m/z*: 166 (Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>: 166). *Anal*. Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 45.39; H, 7.19; N, 17.64. Found: C, 45.23; H, 7.28; N, 17.54.

W-PvPut の合成 Boc-W-ONP (602 mg, 1.4 mmol) に PvPut (249 mg, 1.5 mmol)を加え、無水ジクロロメタン中室温で3時間反応させた。 反応終了後、シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノー ル: 濃アンモニア水 10:1:0.1)で精製し Boc-W-PyPut を得た(697 mg, 110%)。得られた Boc-W-PyPut に TFA を 1 ml 加え脱保護し、シリカゲ ルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール:濃アンモニア水 20:1:0.1)で精製して、W-PyPut を得た(400 mg, 81%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl3)  $\delta$  1.46-1.54 (4H, m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.06 (1H, dd, J = 14.3, 7.6 Hz, Indole-CH<sub>2</sub>-), 3.19-3.35 (4H, m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.30 (1H, dd, J = 14.3, 4.6 Hz, Indole-CH<sub>2</sub>-), 3.71 (1H, dd, J = 7.6, 4.6 Hz, H<sub>2</sub>N-CH-CO-), 4.53 (1H, bs, -NH-Py), 6.38 (1H, dd, J = 8.5, 0.9 Hz, PyH-3), 6.58 (1H, ddd, J = 7.0, 5.2, 0.9 Hz, PyH-5), 7.06 (1H, d, J = 2.4 Hz, IndoleH-2), 7.12 (1H, ddd, J = 7.9, 7.0, 0.9 Hz, IndoleH-5 or -6), 7.19 (1H, ddd, J = 8.2, 7.0, 1.8 Hz, IndoleH-5 or -6), 7.22 (1H, bs, -CONHCH<sub>2</sub>-), 7.35 (1H, dd, J = 7.9, 0.9 Hz, IndoleH-4 or -7), 7.43 (1H, ddd, J = 8.5, 7.0, 1.8 Hz, PyH-4), 7.67 (1H, dd, J = 7.9, 0.9 Hz, IndoleH-4 or -7), 8.09 (1H, m, PyH-6), 8.61 (1H, bs, IndoleH-1). FAB-MS *m*/*z*: 352 (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O: 352).

<u>PyPut 修飾ペプチド(CIKHIATNAVLFFGR-PyPut)の合成</u>1 mMオ ボアルブミン 0.5 ml に 50 mM 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid 0.6 ml を加 え 37 ℃で 30 分 0.1 M 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES), 6 M guanidine (pH 8.0) 緩衝液中で反応後、1.6 M PyPut 1.1 ml を加え 37 ℃で 16時間反応させた。反応液を Sep-Pak Vac 20cc (5g)  $C_{18}$  (Waters)に供し、0.1%TFA 含有 25%アセトニトリル (ACN) で洗浄 後、CIKHIATNAVLFFGR-PyPut を 0.1%TFA 含有 40%ACN で溶出させ た。溶出液を凍結乾燥後、得られた白い結晶を 0.5 ml の 0.1%TFA 含有 20%ACN に溶解させ、遠心分離し不溶性成分を除去し、 CIKHIATNAVLFFGR-PyPut溶液を得た。得られた修飾ペプチドを HPLC 分析にて単一のピークであることを確認し、また、アミノ酸配列を PSD 分析によって同定した。

2. 酵素によるタンパク質およびペプチド消化反応

1.0 mg/ml HB 又は CytC に 1/20 (w/w)量のトリプシン、キモトリプシ ン又はエラスターゼを加えて、1 mM あるいは 50 mM アルキルアミン 存在下 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.5)中で 37℃3 または 16 時間反応さ せた。メタノール添加実験では、この反応条件に 17, 33 あるいは 50% になるようにメタノールを加えて反応させた。

合成ペプチド (SLIGKV-OH 又は SFLLRN-NH<sub>2</sub>) に、それぞれ 1/60、 1/75 (w/w)量のトリプシンを加えて、50 mM PyPut 存在下 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.5)中で 37℃16 時間させた。

3. プロテアーゼ消化物を分離精製

プロテアーゼ消化物を HPLC を用い分離精製した。カラムは C<sub>18</sub> column (TOSOH ODS 120T, 4.6 × 250 mm)、流速は 1.0 ml/min、カラム温 度は 35℃、UV 吸収は 220 nm、蛍光は Ex 310 nm・Em 390 nm であっ た。サンプルを 10 µl インジェクションし、下記に示した分離条件で分

離し、30 秒ごとに分取した。それぞれのフラクションを凍結乾燥し、 2:3 ACN/0.1% TFA 20 µl に溶解させ、MS 分析サンプルとした。

<u>HBとCytCの消化物の分離条件</u>

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% ACN

B; 0.1% TFA in 80% ACN

100% A for 10 min, then 0-100% B over 90 min

合成ペプチドの消化物の分離条件

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% ACN

B; 0.1% TFA in 25% ACN

100% A for 20 min, 0-20% B over 5 min, then 20-100% B over 60 min

4. 実験動物

埼玉実験動物より購入した6又は7週齢のS.D.系雄性ラットを使用 した。すべての動物実験は城西大学動物実験規定に基づいて行った。

4-1. 動物への投与実験

24 時間絶食させた S.D.ラットに 8 又は 500 mg/ml HB と 300 mM PyPut を 1.5 mL ゾンデを用いて経口強制投与した。1 または 4 時間後 エーテル麻酔し頚椎脱臼にて屠殺し、開腹し、内容物が漏れ出さない ように紐で腸管を縛り小腸、盲腸を取り出し、脳、心臓、肺臓、肝臓、 腎臓を摘出した。取り出した臓器は液体窒素ですぐに凍結し-80℃で保 存した。

4-2. *in situ* closed loop 法

ラットを18時間絶食させ、ウレタンで麻酔した(1 g/kg, ip)。開腹後、空腸を生理食塩水で洗浄後、空腸のループ(長さ 10 cm)を作製し、そこに 3.2 mM W-PyPut(溶媒; PBS、pH 7.4)をミクロシリンジで1 ml 注入した。血液を頚動脈からサンプリングした。頚椎脱臼にて 屠殺後、脳、心臓、肺臓、肝臓、腎臓を摘出した。

5. 腸管ホモジネート中での分解実験

摘出した腸管に湿重量 1g あたり 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加えてホモジナイズした。ホモジネート 20  $\mu$ l に 100  $\mu$ M W-PyPut、 化学的に合成した修飾ペプチド (CIKHIATNAVLFFGR-PyPut)、PyPut を 10  $\mu$ l を加えて、37℃で 0、15、30、60、120 分インキュベートした。 ここに 0.1 M 塩酸を加えて反応終了とした。次いで、50% TCA 9  $\mu$ l 加 えて除タンパクし HPLC 分析した。

カラムは C<sub>18</sub> column (TOSOH ODS 120T, 4.6 × 250 mm)、流速は 1.0 ml/min、カラム温度は 30℃、蛍光は W-PyPut の分析では Ex 277 nm・ Em 390 nm、PyPut の分析ではで Ex 310 nm・Em 390 nm であった。サ ンプルを 5 µl インジェクションし、下記に示した分離条件で分離した。

W-PyPut の分離条件

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% ACN

B; 0.1% TFA in 80% ACN

100% A for 40 min, 0-7% B over 10 min, 7% B for 60 min, then 100% B for 10 min

PyPut の分離条件

Mobile phase : 0.1% TFA and 8 mM 1-Octanesulfonic acid Na in 25% ACN

6. 腸管からのペプチドの抽出と HPLC 分析

摘出した腸管を凍結乾燥した後、砕いた。そこに乾燥重量で 4 μl/g の 割合で 1:1 0.1% TFA/50% ACN を加えて攪拌し、15 分間超音波処理し た。遠心(3,000 × 10 min)し上清をとり、セルロースアセテートフィ ルター(0.2 μm)に通して HPLC 分析した。

カラムは C<sub>18</sub> column (TOSOH ODS 120T, 4.6 × 250 mm)、流速は 1.0 ml/min、カラム温度は 30℃、UV 吸収は 220 nm、蛍光は Ex 310 nm・ Em 390 nm であった。サンプルを 10 µl インジェクションし、下記に示 した分離条件で分離した。

分離条件

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% ACN

B; 0.1% TFA in 80% ACN

100% A for 30 min, then 0-100% B over 90 min

7. 臓器からの W-PyPut の抽出と HPLC 分析

摘出した臓器に、湿重量1gあたり8M アンモニア溶液を1ml入れ、
氷冷下ホモジナイズした。これを三倍量のクロロホルムで二回抽出を
行い、クロロホルムを遠心エバポレーターによって留去した。残渣に
0.1% TFA 含有 30%ACN 200 µl に溶解させ、遠心(13,000 × 20 min)し
上清をとり、HPLC分析した。

カラムは C<sub>18</sub> column (TOSOH ODS 120T, 4.6 × 250 mm)、流速は 1.0 ml/min、カラム温度は 30℃、蛍光は Ex 277 nm・Em 390 nm であった。 サンプルを 5 µl インジェクションし、下記に示した分離条件で分離した。

血液サンプルの分離条件

Mobile phase : 0.1% TFA in 12% ACN

心臓・脳・腎臓・肝臓・肺臓サンプルの分離条件

Mobile phase : 0.1% TFA and 8 mM 1-Octanesulfonic acid Na in 27% ACN

腸管サンプルの分離条件

Mobile phase : A; 0.1% TFA in 5% ACN

B; 0.1% TFA in 80% ACN

100% A for 40 min, 0-7% B over 10 min, 7% B for 60 min, then 100% B for 10 min

8. PyPut 修飾ペプチドまたは W-PyPut 中の PyPut 含量の分析

合成ペプチド由来の PyPut 修飾ペプチドまたは W-PyPut 分画を HPLC によって分離分取し、凍結乾燥後、水 100 µl に溶解させた。同 量の濃塩酸を加えて、窒素置換し 110℃24 時間反応させた。加水分解 サンプルを凍結乾燥後、0.1% TFA 含有 30% ACN 100 µl に溶解させ HPLC サンプルとした。

得られた PyPut を HPLC を用いて分析した。カラムは C<sub>18</sub> column (TOSOH ODS 120T, 4.6 × 250 mm)、流速は 1.0 ml/min、カラム温度は 40℃、蛍光は Ex 310 nm・Em 390 nm、移動相は 0.1% TFA 及び 8 mM 1-octaneslufonic acid 含有 25% ACN、インジェクション量は 10 µl であ った。PyPut の保持時間は 9.3 分であった。

9. 質量分析

#### 9-1. MALDI-TOF MS 分析

飛行時間型質量分析装置 AXIMA-CFR (Shimadzu / Kratos, Manchester, U.K.)を用いた。マトリックスは 2:3 ACN/0.1% TFA 溶液に CHCA を飽和させたものを用いた。ステンレス製サンプルプレートの ウェルに、試料を 1  $\mu$ L 乗せて空気乾燥させ、さらにマトリックスを 1  $\mu$ L 乗せて空気乾燥させて結晶化させた後、分析した。質量更正には Ang I [10<sup>-5</sup> M、*m*/*z* 1297.5]と Ins β [10<sup>-5</sup> M、*m*/*z* 3496.9]の二点を用いて行 った。

9-2. ESI-MS 分析

装置は API300 (PE-SCIEX, Thornhill, Canada) を用い、イオン化に ESI 法を用いた。flow injection 法で行い、移動層は 5 mM 酢酸アンモ ニア含有 90%ACN を用い、流速は 20 μl/min で行った。インジェクシ ョン量は 10 μl であった。

## 引用文献

Burns MR, Carlson CL, Vanderwerf SM, Ziemer JR, Weeks RS, Cai F, Webb HK, Graminski GF (2001) Amino acid/spermine conjugates: polyamine amides as potent spermidine uptake inhibitors. *J. Med. Chem.*, **44**, 3632–3644

Chaurand P, Luetzenkirchen F, Spengler B (1998) Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom., **10**, 91-103

Curtis KJ, Kim YS, Perdomo JM, Silk DBA, Whitehead JS (1978) Protein digestion and absorption in the rat. J. Physiol., 274, 409-419

Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 315-351

Hisada M, Konno K, Itagaki Y, Naoki H, Nakajima T (2002) Sequencing wasp venom peptides by endopeptidase digestion and nested collision-induced dissociation/post-source decay methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1040-1048

Marion D, Gladys B, Janice MP, Patricia B, Stephen H, Susan PM (2005) A review: dietary and endogenously formed *N* nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes and Control,* 16, 619-635 Morrison III B, Pringle AK, McManus T, Ellard J, Bradley M, Signorelli F, Iannotti F, Sundstrom LE (2002) L-Arginyl-3,4-spermidine is neuroprotective in several in vitro models of neurodegeneration and in vivo ischaemia without suppressing synaptic transmission. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 1255–1268

Nemes Z, Petrovski G, Fesus L (2005) Tools for the detection and quantitation of protein transglutamination. *Anal. Biochem.*, **342**, 1-10

Pellet PL (1990) Protein requirements in humans. Am. J. Clin. Nutr., 51, 723-737

Russell WK, Park Z-Y, Russell DH (2001) Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for pptide mass mapping using mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **73**, 2682-2685

Seidel ER, Scemama JL (1997) Gastrointestinal polyamines and regulation of mucosal growth and function. J. Nutr. Biochem., 8, 104-111

Tobin JB, Whitt SA, Cassidy CS, Frey PA (1995) Low-barrier hydrogen bonding in molecular complexes analogous to histidine and aspartate in the catalytic triad of serine proteases. *Biochemistry*, **34**, 6919-6924

Wang JY, Johnson LR (1990) Luminal polyamines stimulate repair of mucosal stress ulcers. *Am. J. Physiol.*, **259**, G584-592

伊賀立二,一目でわかる医薬品相互作用,分光堂,1997

城西大学薬学部医療栄養学科,食品-医薬品相互作用ハンドブック,丸 善株式会社,2005

中川義人, 医薬品相互作用(第二版), 医薬ジャーナル社, 1998

細谷憲政,消化・吸収-基礎と臨床-,第一出版,2002

細谷憲政, 医薬品・栄養素の相互作用, 第一出版, 2007

0

Ö

0

Ø