



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

プロタミン由来ペプチドRPR (Arg-Pro-Arg) 及びプロタミンの脂質代謝改善作用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Maihemuti, Mijiti メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101286

氏 名 (本国籍)	Maihemuti Mijiti	(中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)	
学 位 記 番 号	農博甲第799号	
学 位 授 与 年 月 日	令和5年3月13日	
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
研究指導を受けた大学	岐阜大学	
学 位 論 文 題 目	プロタミン由来ペプチド RPR (Arg-Pro-Arg) 及びプロタミンの 脂質代謝改善作用	
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 矢 部 富 雄 副査 岐阜大学 教授 長 岡 利 副査 静岡大学 教授 河 合 真 吾	

論 文 の 内 容 の 要 旨

申請者 Maihemuti Mijiti は、プロタミン及び RPR の脂質代謝改善作用に関する新規性の高い研究を下記のように実施し、食品成分による生活習慣病改善に関する研究に貢献した。

具体的には、肥満は、心血管疾患、高血圧、II型糖尿病及び慢性疾患や癌の増加に大きく影響を与えている。その中で、心血管疾患は毎年、世界の死因の第1位である。プロタミンは抗肥満作用及び血清コレステロール (CHOL) 低下作用の両方を発揮することができる。しかし、プロタミン由来の活性ペプチドとその分子メカニズムは不明である。本研究では、プロタミン及び RPR の脂質代謝に対する影響を調べることを目的とする。また、オレイン酸 (OA) 負荷をしたヒト培養肝細胞 HepG2 での脂肪蓄積に対する RPR の影響を評価した。

【方法】 <実験 1>シロザケ由来のプロタミンは、PeptideCutter でトリプシンによる *in silico* 分析を使用して消化された。<実験 2>C57BL/6J 雄マウスに高脂肪食 (HFD)、HFD+5%プロタミン及び HFD+0.5%プロタミン由来ペプチド RPR を用いて 50 日間混餌投与を実施した。体重増加量、食餌摂取量、脂肪組織重量の測定、肝臓、血清、及び糞分析を行った。肝臓及び脂肪組織の脂質代謝関連遺伝子 mRNA 発現量を測定した。<実験 3> 細胞毒性を調べるために、さまざまな濃度の RPR を HepG2 細胞に添加した。細胞生存率は、WST-1 アッセイを使用して決定された。<実験 4> 2 mM OA を培地に添加することで、HepG2 細胞に脂肪肝状態が誘導された。OA を 24 時間添加した HepG2 細胞に 2 mM RPR を添加し、24 時間培養後、①脂質代謝関連遺伝子の mRNA 量を測定、②細胞内トリグリセリド (TG) 濃度を測定、③培地 TG および遊離脂肪酸 (FFA) 濃度を測定、④脂質代謝関連遺伝子のタンパク質レベルを測定した。<実験 5>24 時間 OA 負荷をした HepG2 細胞に 2 mM RPR もしくは構成アミノ酸 (R+P+R) を添加し、24 時

間培養後、細胞内 TG 濃度を測定した。<実験 6> 細胞毒性を調べるために、さまざまな濃度の RP、PR を HepG2 細胞に添加した。細胞生存率は、WST-1 アッセイを使用して決定された。<実験 7>24 時間 OA 負荷をした HepG2 細胞に 2 mM RPR、2 mM RP、2 mM PR を添加し、24 時間培養後、細胞内 TG 濃度を測定した。<実験 8、9>PepT1 siRNA 導入による HepG2 細胞における OA 添加時に RPR が及ぼす mRNA レベル、TG レベル及び培地中 FFA への影響を評価した。

【結果】 <実験 1>プロタミンの PeptideCutter によるトリプシン消化は MPR、RRR、SSSRPVR、RRRRPR、VSR、RRRRR、GGR、及び RRR で構成され、その中で、RRRRPR はトリプシンによって N 末端からアルギニンを 1 つずつ加水分解され、最終的に *in silico* で RPR を生成する。<実験 2> 血清 CHOL 値は、対照群よりもプロタミン群と RPR 群で有意に低かった。白色脂肪組織重量は、プロタミン群と RPR 群で有意に減少した。CHOL と胆汁酸の糞便排泄は、対照群よりもプロタミン群と RPR 群で有意に高かった。また、プロタミン群では、肝臓の *SCD1*、*SREBP1*、および脂肪細胞の *FAS* mRNA の発現が有意に減少し、肝臓の *PPAR α* および脂肪細胞の *PPAR γ 1* mRNA の発現が有意に増加したことが観察された。よって、プロタミンの抗肥満効果が、脂肪組織の *PPAR γ 1* および肝臓 *PPAR α* の増加作用と、*SREBP1*、*SCD-1* 及び脂肪細胞 *FAS* の低下作用に関連していることを解明した。プロタミンに由来する RPR は、プロタミンの抗肥満作用において主要な役割を果たすことを発見した。<実験 3>各濃度の RPR の添加では、2mM まで細胞増殖量への影響は見られなかった。<実験 4> OA+RPR 群は、OA 群に比べて細胞または中 TG レベルが有意に低下した。*SCD1* または *SREBP1* タンパク質レベルは、OA 群よりも OA+RPR 群で有意に低かった。<実験 5> RPR 添加により細胞内 TG 濃度は有意に減少したが、構成アミノ酸では RPR の効果が消失した。<実験 6、7> 細胞内 TG 濃度は OA 群と比較して OA+RPR、OA+RP、OA+PR 添加により減少した。<実験 8、9>また、PepT1 を siRNA でノックダウンすると RPR の効果が消失した。

以上より、プロタミンの抗肥満効果が、脂肪組織の *PPAR γ 1* および肝臓 *PPAR α* の増加作用と、肝臓 *SREBP1*、*SCD-1* 及び脂肪細胞 *FAS* の低下作用に関連していることを解明した。プロタミンに由来する RPR は、プロタミンの抗肥満作用において主要な役割を果たすことを発見した。また、RPR が PepT1 経路を介して HepG2 細胞の脂肪肝（脂肪蓄積）を効果的に改善することを発見した。

審査結果の要旨

申請者 Maihemuti Mijiti は、プロタミン及び RPR の脂質代謝改善作用に関する新規性の高い研究を下記のように実施し、食品成分による生活習慣病改善に関する研究に貢献した。

具体的には、プロタミンは抗肥満作用及び血清コレステロール低下作用の両方を発揮することができる。しかし、プロタミン由来の活性ペプチドとその分子メカニズムは不明である。そこで、申請者は、プロタミン及び RPR の脂質代謝に対する影響をマウスによる動物実験やヒト培養肝細胞 HepG2 で評価した。その結果、プロタミンの抗肥満効果が、脂肪組織の *PPAR γ 1* および肝臓 *PPAR α* の増加作用と、肝臓 *SREBP1*、*SCD-1* 及び脂肪細胞 *FAS* の低下作用に関連していることを解明した (1)。

プロタミンに由来する RPR は、プロタミンの抗肥満作用において主要な役割を果たすことを発見した (1)。また、RPR が PepT1 経路を介して HepG2 細胞の脂肪肝 (脂肪蓄積) を効果的に改善することを発見した (2)。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

【基礎となる学術論文】

- (1) Mijiti, M., Mori, R., Huang, B., Tsukamoto, K., Kiriya, K., Sutoh, K. & Nagaoka, S.: Anti-obesity and hypocholesterolemic actions of protamine-derived peptide RPR (Arg-Pro-Arg) and protamine in high-fat diet-induced C57BL/6J mice. *Nutrients*. 13, 2501 (2021)
- (2) Mijiti, M., Mori, R., Nakashima, Y., Banno, A., Ye, Y., Takeuchi, A., Matsuba, S., Kiriya, K., Sutoh, K. & Nagaoka, S.: Protamine-derived peptide RPR (Arg-Pro-Arg) ameliorates oleic acid-induced lipogenesis via the PepT1 pathway in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2022) (印刷中)

【既発表学術論文】

- (1) Banno, A., Wang, J., Okada, K., Mori, R., Mijiti, M. & Nagaoka, S.: Identification of a novel cholesterol-lowering dipeptide, phenylalanine-proline (FP), and its down-regulation of intestinal ABCA1 in hypercholesterolemic rats and Caco-2 cells. *Sci. Rep.* 9, 19416 (2019)
- (2) Banno, A., Yamamoto, M., Mijiti, M., Takeuchi, A., Ye, Y., Oda, N., Nishino, N., Ebihara, A. & Nagaoka, S.: The physiological blood concentration of phenylalanine-proline can ameliorate cholesterol metabolism in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2022) (印刷中)