ゼイン由来ペプチドによる環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼの活性調節

苔庵泰志*・鈴木一正**・船津軍喜***・高橋孝雄****

向井 淳*****・中 充子*****・田中利男*****

Regulation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) by Zein Peptides

Yasushi KOKEAN*, Kazumasa SUZUKI**, Gunki FUNATSU***, Takao TAKAHASHI****,
Jun MUKAI*****, Michiko NAKA***** and Toshio TANAKA*****

* Laboratory of Food Science, Mie Industrial Research Institute,
5-5-45 Takachaya, Tsu, Mie 514-0819

** Research & Development Department, San-ei Sugarochemical Co., LTD,
24-5 Kitahama-machi, Chita, Aichi 478-0046

*** Laboratory of Protein Chemistry & Engineering, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, 46-09 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

**** Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507

***** Department of Molecular and Cellular Pharmacology, Mie
University School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507

We have prepared zein peptides and characterized their ability to regulate the activity of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes obtained from canine heart ventricle. Native-zein inhibited 42%, 18%, and 25% of the activities of PDE1, PDE2, and PDE4, respectively. AT1 was prepared by partial hydrolysis of the native-zein with 0.3 N HCl at 50°C for 24 hr. The AT1 increased the activities of 63% and 40% of PDE1 and PDE4. AT1 was hydrolyzed with pepsin, chymotrypsin, thermolysin, and subtilisin. Pepsin- and chymotrypsin-treated AT1 increased the activity of PDE1 by 75%. Deaminated-zein were prepared by mild HCl hydrolysis (with 0.2 N HCl at 55°C for 5 hr). Deamidation of zein had no effect on the activities of PDE1, PDE3, and PDE4. However, a deaminated-zein fraction (DA-3) increased PDE2 activity by 16%. From these results, it was confirmed that zein peptides had regulatory effects on PDE isozymes.

(Received Aug. 27, 1999; Accepted Oct. 15, 1999)

工業的に生産されている澱粉（スターチ）の原料となるトウモロコシ（*Zea mays* L.）は、世界的な規模での生産量を持ち、小麦、米に匹敵しているが、大部分はデンプン原料や飼料になり、そのまま食用に供される量は少ない。トウモロコシ種子のタンパク質含量は、品種によ

り差異があり、高タンパク系の品種では25%にも達する。Osborneのタンパク質分画法によると、アルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリン¹⁾からなり、このうち70%エタノール可溶性画分であるプロラミンはゼインと呼ばれている。

* 三重県工業技術総合研究所（〒514-0819 三重県津市高茶屋 5-5-45）

** サンエイ糖化株式会社（〒478-0046 愛知県知多市北浜町 24-5）

*** 九州大学農学部（〒812-8581 福岡市東区箱崎 46-09）

**** 三重大学生物資源学部（〒514-8507 三重県津市上浜町 1515）

***** 三重大学医学部（〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174）

ゼインは、トウモロコシ種子中に含まれる全タンパク質の60%近くを占め²⁾、一般的にトウモロコシ蛋白とも呼ばれている。ゼインは、必須アミノ酸であるリジンを含んでおらず、またトリプトファン含量も非常に低いことから栄養学的に劣るうえに、解離性の側鎖を持つアミノ酸が極めて少なく、一方で疎水性アミノ酸が多いため水に不溶で、その利用が著しく限定されている。

全ゼインは、アルコールに対する溶解性の差から α -ゼイン、 β -ゼイン、 γ -ゼインの3つに分けられる。このうち主として70%エタノールで抽出されてくるのが、分子量約21~25 kDの α -ゼインである³⁾。

ところで、食品の三次機能としての生体調節機能を担う物質としては、タンパク質(ペプチド)、糖質、脂質等様々な物質があるが、近年食品タンパク質由来の消化産物から得られる潜在的な生理活性ペプチドが注目されている。その研究例は一次構造が明らかなカゼイン類に集中している。カゼイン由来ではオピオイド活性化ペプチド⁴⁾、オピオイドアンタゴニストペプチド⁵⁾、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド⁶⁾、カルシウム可溶性ペプチド⁷⁾、マクロファージ活性化ペプチド⁸⁾、血小板凝集阻害ペプチド⁹⁾等があり、大豆タンパク質由来では、血清コレステロール低減化能を持つペプチド¹⁰⁾が報告されている。

ゼインの酵素分解による生理活性ペプチドについては、現在までに、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチドが見いだされている¹¹⁾¹²⁾。また、最近では、ゼインは機能性素材として商品化され、疎水性を利用したコート剤や、可食性フィルム、接着剤として利用される等、その物性を利用した応用が注目されている¹³⁾¹⁴⁾。しかし、ゼインの可溶性による研究例は少ない。

環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(PDE: cyclic nucleotide phosphodiesterase)は、細胞内情報伝達物質である環状ヌクレオチド[(cAMP: Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate), (cGMP: Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate)]の分解酵素であり、動物の臓器(脳、肝臓、心臓等)に広く分布している。薬物によるPDEの阻害は環状ヌクレオチド代謝に重大な影響を与え、最終的には細胞機能を変化させる。その活性化、阻害については数多くの報告がされている。しかし、PDE活性に対するペプチドの影響については、ポリアスパラギン酸がPDE Iを賦活化するという報告¹⁵⁾があるが、食品タンパク質由来のペプチドでは、未だPDEに対して何らかの生理活性を示すものは報告されていない。

PDEには、主なものだけでも以下の7種類のアイソザイムが知られており¹⁶⁾¹⁷⁾、現在でも新しいアイソザイムが次々と発見されている^{18)~20)}。以下PDE 1 (Ca^{2+} -CaM dependent), PDE 2 (cGMP-stimulated), PDE 3 (cGMP-inhibited), PDE 4 (cAMP-specific), PDE 5 (cGMP-inhibited), PDE 6 (Photoreceptor cGMP-specific), PDE 7 (cAMP-specific, rolipram-insensitive)である。このうち、ヒトをはじめブタ、モルモット、イヌ等の心臓にはPDE 1~4が存在しており、心筋の収縮に関与している。PDEの阻害剤は強心剤として有用であり²¹⁾²²⁾、薬剤による賦活化作用は、細胞内での各アイソザイムの機能を分子薬理学的に解明するために重要である。そこで、本研究は、ゼインに含まれる、PDE活性に影響を与える潜在的機能性ペプチドを検索することを目的として行った。

実験方法

1. 実験材料

各種ペプチドを調製するための出発物質であるゼインは、工業的デンブレン生産過程での副産物として得られるコーングルテンミールから分離抽出した。このコーングルテンミールは、トウモロコシ種子を希亜硫酸水で浸漬膨潤後、胚芽、種皮部分を除去、デンブレンを分離後の残渣を濃縮、脱水、乾燥することにより調製した。

2. ゼインの調製³⁾

(1) ZS-70 E

凍結乾燥したコーングルテンミールをヘキサノール:エタノール(1:1)溶液で脱脂した後、0.5 M塩化ナトリウムでアルブミン、グロブリン等を除去、水洗後70%エタノール溶液で60℃、6時間、その後室温で一晩抽出した。その後、脱イオン水に対して透析し、凍結乾燥した。

(2) ZS-70 ED

ZS-70 Eと同様の処理によってコーングルテンミールから抽出した後、活性炭処理で色素類を完全に除去し、脱イオン水に対して透析、凍結乾燥した。

(3) ZS-70 IPA

ヘキサノール:エタノール(1:1)溶液で脱脂したコーングルテンミールを70%イソプロピルアルコールで抽出し、以下ZS-70 EDと同様の処理によって調製した。

3. 酸処理ゼインの調製

(1) AT 1

ZS-70 Eを70%エタノールに対して2~8% (w/v)で溶解し、終濃度が3%程度になるように塩酸を加え、密閉状態で50℃、24時間保持した。反応液を、さらに

4℃で24時間放置し、生じた沈殿を遠心分離によって回収し、水洗後、凍結乾燥した。ここで得られた上清を、上清(1)とした。

(2) AT 2

上清(1)を濃水酸化ナトリウム溶液で中和した後、ロータリーエバポレーターによりエタノールを蒸発除去し、遠心分離により上清と沈殿に分けた。この沈殿を水洗した後、凍結乾燥物を得た。

4. 脱アミド化ゼインの調製

(1) DA 1

30 g の ZS-70 E にエタノール 600 ml、水 300 ml、20% 塩酸 90 ml を加えて、55℃で5時間反応させた後、冷却、遠心分離し、上清(1)と沈殿に分けた。この沈殿に1% アンモニア水 100 ml を加えて攪拌、再び遠心分離により上清(2)と沈殿に分けた。この沈殿を凍結乾燥した。

(2) DA 2

上清(2)を酢酸により pH 5.0 とした後、遠心分離で得られた沈殿を凍結乾燥した。

(3) DA 3

上清(1)からエタノールを除去後、遠心分離により上清(3)と沈殿に分けた。この沈殿を凍結乾燥した。

(4) DA 4

上清(3)を酢酸により pH 5.0 として得られた沈殿を凍結乾燥した。

5. 酸処理ゼイン(AT 1, AT 2)の酵素分解

(1) ペプシン処理

AT 1, AT 2 をそれぞれ 85% ギ酸 (V/V) に 2% 濃度 (w/w) になるように溶解後、水で 20 倍希釈し、ペプシン (E.C.3.4.23.1, SIGMA 社製: 3 200~4 500 U/mg) を基質に対して 1/50 量 (w/w) 加え、37℃で3時間反応させ、減圧濃縮後、凍結乾燥物を得た。

(2) キモトリプシン処理

AT 1, AT 2 をそれぞれ 55℃において1% アンモニア溶液に溶解し、水に対して透析後 pH 8.0 に調整し、キモトリプシン (E.C.3.4.21.1, SIGMA 社製: 40~60 U/mg) を基質に対して 1/100 量 (w/w) 加え、37℃で3時間反応させ、減圧濃縮後、凍結乾燥物を得た。

(3) サブチリシン処理

AT 1, AT 2 をそれぞれ 55℃において1% アンモニア溶液に溶解、水に対して透析後 pH 8.0 とし、サブチリシン (E.C.3.4.21.62, SIGMA 社製: 7~15 U/mg) を基質に対して 1/100 量 (w/w) 加え、37℃で3時間反応させ、減圧濃縮後、凍結乾燥物を得た。

(4) サーモライシン処理

(3) の調製時と同様の条件で、用いる酵素としてサーモライシン (E.C.3.4.24.4, 和光純薬製: 7000 U/mg) を用いて調製した。

6. 電気泳動

酸処理ゼイン (AT 1, AT 2) の分子量を未変性ゼインと比べるために、20% SDS ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った。また、泳動後のゲルの染色は銀染色法によって行った。

7. アミノ基の定量

各ペプチドの分解程度を比較するために、TNBS (2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸) を用いた末端アミノ基の定量を行った²³⁾²⁴⁾。

8. PDE アイソザイムの調製

PDE は、イヌの心臓の左心室心筋から調製した。動物を麻酔後、大動脈を切開して脱血死させ、開胸して心臓を摘出した。心房部分を除去、左心室の心筋を超音波破碎し、100 000×g で1時間遠心分離し、上澄をガラスウールとガーゼで濾過した。得られた上澄を Q-Sepharose fast flow (Pharmacia) を充填したカラム (φ 1.6×15 cm) に添加し、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) でカラムを平衡化させた後、緩衝液を直線濃度勾配 (20 mM~1 M) に変化させ、4 種類の PDE アイソザイムを溶出させた^{25)~27)}。

9. PDE の活性測定と生理活性ペプチドのスクリーニング

酵素活性の測定は、基質として 1 μM [³H]cAMP を含む反応溶液 (基本アッセイ法: 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0), 5 mM 塩化マグネシウム, 2 mM EGTA, 0.1 mg/ml BSA, PDE 1 別アッセイ系: EGTA に代えて 0.2 mM 塩化カルシウムと 0.4 μg/ml カルモジュリン, PDE 2: 基本アッセイ系に 10 μM cGMP 添加, PDE 4 の確認: 基本反応液に 4 μM ロリプラムを添加) 0.5 ml で²⁸⁾、粗酵素液の量は、シンチレーションカウンターの値が、20 000 cpm 付近となるように希釈して用いた。30℃, 10 分間反応させた後、5 分間湯浴中で煮沸し、酵素を失活させて反応を止めた。

全てのアイソザイムを活性化する反応液の組成には EGTA が必要である。また PDE 1 の活性測定には、その他にカルシウムとカルシウム結合タンパク質である、カルモジュリンの複合体が酵素反応液に存在するときに、EGTA 非依存で活性化される系がある。PDE 2 は、EGTA と cGMP の両方の存在で活性化される。PDE 3 と PDE 4 は、EGTA によって活性化されるが、2 つの A

イソザイムを区別するために、PDE 4 の代表的な阻害物質であるロリプラムを用いた反応系を本研究では用いた。

本反応により、反応液中に生成した 5'-[³H]AMP、又は 5'-[³H]GMP は、蛇毒ヌクレオチダーゼにより 5'-[³H]アデノシン、又は 5'-[³H] グアノシンに変換させた後、塩酸で活性化させた陽イオン交換樹脂に吸着させ、蒸留水で洗浄した後、アンモニアで溶出させ、シンチレーターを混合した後、液体シンチレーションカウンターにて [³H] を測定した。この条件下、ゼイン由来の 17 種類のタンパク質と粗ペプチドについて、PDE 1~4 の酵素活性に与える影響について調べた。それぞれの酵素反応は 2 連で行った。

実 験 結 果

1. 酸処理によるゼインの可溶化

酸処理ゼインは、電気泳動の結果は Fig. 1 に示した。この結果から分かる推定の分子量は、数千~1 万であった。また、TNBS 法を用いたアミノ基の定量による各ペプチドの分解率はサーモライシン処理した AT 2 が最も分解が進んでおり、AT 1 や、そのキモトリプシン分解ペプチドでは分解率が低かった (Table 1)。

2. スクリーニング結果

ペプチドによる各アイソザイムの、酵素活性への影響

Fig. 1

- Lane
1, 5 molecular weight marker
2 ZS-70E
3 AT1
4 AT2

Table 1 Determination of amino group

mM of -NH ₂ /weight (g) of peptides	
Compounds	
ZS-70E	13.8
ZS-70ED	11.5
ZS-70IPA	13.3
AT1	105
AT2	176
AT-1-Pep	197
AT-2-Pep	323
AT-1-Chy	115
AT-2-Chy	175
AT-1-The	532
AT-2-The	570
AT-1-Sub	388
AT-2-Sub	373
DA1	27.5
DA2	32.5
DA3	27.5
DA4	72.5

Determination were performed in duplicate.

ZS-70E was extracted with 70% ethanol and ZS-70IPA was extracted with 70% isopropanol from corn gluten meal.

ZS-70ED was extracted with 70% ethanol from corn gluten meal and treated with activated charcoal.

AT1, AT2, acid-treated zein ;

Pep, hydrolyzed with pepsin ; Chy, hydrolyzed with chymotrypsin ; The, hydrolyzed with thermolysin ; Sub, hydrolyzed with subtilisin.

DA1~DA4 were deaminated-zein.

について検討した。(ペプチド未添加の酵素活性を±0として比較した。活性の上がったものは+, 阻害されたものは-の符号を付した数値で表わした。但し, 0~±10%の範囲については0と表示した。)

(1) 未変性ゼイン

未変性ゼインは、PDE 1, PDE 2 (EGTA 存在下)、PDE 4 に対しては、活性を阻害し、その範囲は-42.3%~-36.2%であった。

PDE 1 は EGTA 存在下、カルシウム-カルモジュリン複合体存在下共に活性は阻害された。PDE 2 は、EGTA 存在下では 20% 前後の活性阻害が認められたが、cGMP 存在下での活性に影響は認められず、PDE 3 でも同様に活性調節作用は認められなかった。また、

Table 2 Effects of native zein on PDE isozymes

Compounds	PDE1		PDE2		PDE3		PDE4
	(EGTA)	(Ca-CaM)	(EGTA)	(cGMP)	(EGTA)	(cGMP)	
ZS-70E	-42.3	-22.7	-18.7	0	0	0	-25.3
ZS-70ED	-36.2	-22.5	-22.0	0	0	0	-26.2
ZS-70IPA	-38.6	-17.2	-21.0	0	0	0	-26.7

Assay were performed in duplicate.

1 μ M of cyclic AMP/[³H] cyclic AMP was used as a substrate.

All compounds were dissolved in DMSO at a final concentration of 1% DMSO (100 μ g / ml of compounds).

Base line assay, 1% DMSO alone=100%; +, enhancement (%); -, inhibition (%); 0, 0 $\sim$ $\pm$ 10%.

Ca-CaM, activation with calcium-calmodulin complex; EGTA, activation with EGTA; cGMP, activation with cGMP.

ZS-70E, ZS-70ED and ZS-70IPA, see the legend for Table 1.

PDE 4 に対しては 25% 前後活性を阻害した。(Table 2)

(2) 酸処理ゼインおよびその酵素処理ペプチド

AT 1, AT 2 は EGTA 存在下では PDE 1, PDE 3, PDE 4 活性を賦活化した。

AT 1 をペプシン処理, キモトリプシン処理, サーマライシン処理したペプチドを添加すると, EGTA 存在下, PDE 1 に対する活性化作用はさらに増強された。それに対してカルシウム-カルモジュリン存在下での PDE 1 活性は-21.6% $\sim$ 0 と活性は逆に阻害された。

PDE 2 は, EGTA 存在下ではキモトリプシン処理で +11.3% となった他は-21.6% $\sim$ 0 の範囲で活性は阻害された。また, cGMP 存在下では活性に影響を与えなかった。酵素活性は, どの酵素で処理したペプチドを添加しても, AT 1 を酵素処理したもののほうが, AT 2 を酵素処理したものより活性賦活化の効果が大きかった。(Table 3)

(3) 脱アミド化ゼイン

PDE 1 に対しては, EGTA, カルシウム-カルモジュリン複合体存在下共に活性は阻害され, その範囲は-45.6% $\sim$ 0 となった。

cGMP 存在下の PDE 2 活性は, 他のペプチド添加と同様に酵素活性の変化はほとんど認められず, PDE 3 は全て弱い賦活化傾向を示した。また, PDE 4 に対する活

Table 3 Effects of acid-treated zein and its hydrolyzates on PDE isozymes

Compounds	PDE1		PDE2		PDE3		PDE4
	(EGTA)	(Ca-CaM)	(EGTA)	(cGMP)	(EGTA)	(cGMP)	
AT1	+62.8	0	0	0	+18.3	+39.5	
AT2	+33.5	-29.7	-18.5	0	0	+23.7	
AT-1-Pep	+75.0	-16.9	0	0	+20.3	+30.8	
AT-2-Pep	-11.1	-14.2	-21.6	0	+11.6	+13.1	
AT-1-Chy	+76.6	-10.8	+11.3	0	+32.4	+42.7	
AT-2-Chy	+37.0	-20.4	-17.8	0	+10.8	+16.9	
AT-1-The	+61.4	0	0	0	+20.8	+34.8	
AT-2-The	0	-24.1	-16.7	0	+15.4	+13.3	
AT-1-Sub	+47.8	-11.5	0	0	+24.8	+45.9	
AT-2-Sub	0	-30.2	-17.7	0	0	+13.7	

Assay were performed in duplicate.

1 μ M of cyclic AMP/[³H] cyclic AMP was used as a substrate.

All compounds were dissolved in DMSO at a final concentration of 1% DMSO (100 μ g/ml of compounds).

Base line assay, 1% DMSO alone=100%; +, enhancement (%); -, inhibition (%); 0, 0 $\sim$ $\pm$ 10%.

Ca-CaM, activation with calcium-calmodulin complex; EGTA, activation with EGTA; cGMP, activation with cGMP.

AT1 $\sim$ AT3 were fractionated from ZS-70E with HCl.

Abbreviations of compounds, see the legend for Table 1.

性制御の作用はほとんど認められなかった。(Table 4 に表示)

考 察

酸処理によって可溶化したゼインには, 部分的な酸加水分解による分子の断片化(分子量: 数千 $\sim$ 1 万)(Fig. 1)と, アスパラギン, グルタミンの側鎖の脱アミド化が起こっていると考えられる。そのため, 分子内のマイナス(-)荷電が増加し, 側鎖の親水性が大きくなり, 溶解性が増加したと考えられる。可溶化することにより, 消化管内での消化酵素の作用を受けやすくなるので, ゼインを用いて新しい食品素材を作る場合, その効果は大きい。

分解に使用した酵素である, ペプシン, キモトリプシ

Table 4 Effects of deaminated-zein on PDE isozymes

Compounds	PDE1 (EGTA)	(Ca- CaM)	PDE2 (EGTA)	(cGMP)	PDE3	PDE4
DA 1	-23.7	0	0	0	+16.7	0
DA 2	-24.7	0	-21.4	0	+17.1	0
DA 3	-29.8	-21.9	+16.1	0	+11.3	0
DA 4	-45.6	-30.4	-34.3	0	0	0

Assay were performed in duplicate.

1 μ M of cyclic AMP/[³H] cyclic AMP was used as a substrate.

All compounds were dissolved in DMSO at a final concentration of 1% DMSO (100 μ g/ml of compounds).

Base line assay, 1% DMSO alone=100%; +, enhancement (%); -, inhibition (%); 0, 0 $\pm$ 10%; Ca-CaM, activation with calcium-calmodulin complex; EGTA, activation with EGTA; cGMP, activation with cGMP.

DA1 $\sim$ DA4 were deaminated with 1% NH₄OH and fractionated.

ン、サーモライシン、サブチリシンの中では、キモトリプシンを除く 3 種類の酵素は比較的基質特異性が低く、キモトリプシンは Try, Phe, Trp の C 末端側からペプチド結合を特異的に切断する性質がある。そのため、キモトリプシン分解物では、他の酵素分解物に比べて分解率が低くなっていると考えられる。しかしながら、PDE に対する各ペプチドの作用を見てみると、分解度の差による各アイソザイムに対する影響には、特定の傾向は認められなかった。

PDE 1 は、その活性化因子であるカルシウム-カルモジュリン (Ca²⁺-CaM) 系、EGTA 系共に未変性ゼイン存在下では活性が阻害されることから、ペプチド自身が直接酵素分子に作用しているものと推察された。また、PDE 1 に対する酸処理ゼインと、酵素処理 AT 1 の結果は、ゼインペプチドが PDE 1 の賦活化因子である Ca²⁺-CaM 複合体に対して影響を与えるのではなく、Ca²⁺-CaM 複合体非依存の条件で、直接酵素分子に働きかけて活性を調節していることを示唆している。

田中ら¹⁵⁾は、ポリ (L-) アスパラギン酸が Ca²⁺-CaM 複合体に非依存的に PDE 1 を活性化することを報告しているが、これはカルモジュリン分子中のアスパラギン酸が PDE の活性化に重要な役割を果たしていることを

示唆している。

ゼインは、その分子中に非解離性のアスパラギンやグルタミンが多く、これらのアミノ酸は酸アミドの状態で存在している。本研究で得られたペプチドは、酸による限定部分分解による低分子化、末端アミノ基、カルボキシル基の増加、またアスパラギンがアスパラギン酸に、グルタミンがグルタミン酸に変換されることによって可溶化していると考えられる。アスパラギン酸の分子内増加による PDE 1 の活性化は、知見¹⁵⁾と類似しており、同様の酵素活性の賦活化が、本研究によるペプチド添加においても起こっていると考えられる。

PDE 1 は脳、心臓、気管支等の組織細胞で主として生成されるため、その活性阻害剤は平滑筋弛緩剤として心疾患に利用できる可能性がある。一方、PDE 1 活性化因子は、阻害剤の特異性を検索し、アイソザイムの働きを解明するために重要である。

PDE 2 は、酵素分子のアロステリックな部位に cGMP が作用したときに cAMP に対する分解活性が上昇することが知られている¹⁶⁾。今回のように、cGMP が存在しない状態で活性が変化し、cGMP 存在下では変化が少ないのは、ゼインペプチドがアロステリック部位に対して、拮抗的に作用しているためであると考えられる。

PDE 3 は、cAMP 特異的な分解酵素で、cGMP によりその活性が阻害され、その選択的阻害剤には拮抗的なものと非拮抗的に働くものがある。今回調製したペプチドは調節ドメインに対して、拮抗的作用を持たないと考えられた。

PDE 4 賦活化物質については報告が少なく²⁹⁾、食品由来物質から特異的な賦活作用が認められれば、PDE 4 特異的な阻害剤と共に、PDE 4 の生体内での役割を解明する上で重要であると考えられる。また PDE 4 は、動物の脳、気管支等の組織、及びリンパ球等の免疫担当細胞中で主として生合成されることから、免疫細胞中の PDE 活性を促進することは生体の免疫機能を促進することにつながると考えられる。

要 約

ゼインの食品以外の分野への幅広い応用を目的として、希酸処理によるゼインの可溶化と限定分解、プロテアーゼによる分解、及び潜在的機能性物質の分離を試みた。

酸処理は、ゼインの 70% エタノール溶液に塩酸を加えることによって行った。この酸処理ゼイン (AT 1) と未処理のゼイン (ZS-70 E) についてペプシン、キモトリ

プシン、サーモライシン、サブチリシンによる処理を行って粗分画ペプチドを調製した。

粗分画ペプチドから、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) 活性に対して影響を持つペプチド画分を分離した。

PDE はイヌの心臓左心室の心筋を超音波処理後、超遠心分離によって不溶物を除去、イオン交換クロマトグラフィー (Q-Sepharose FF) により、PDE 1~4 の 4 つの粗分画アイソザイムを得た。

PDE 1 は、EGTA 存在下で未処理ゼインを添加すると、その活性が阻害され、酸処理ゼインにより賦活化された。しかし、 Ca^{2+} -CaM 存在下では、常に活性は阻害された。PDE 2 は、EGTA 存在下では阻害の傾向が強くなり、cGMP 存在下では活性に影響を及ぼさなかった。PDE 3 に対しては未処理ゼインは影響を及ぼさず、酸処理、酵素処理を行うと、賦活化の傾向が強くなった。PDE 4 は未処理ゼインによって活性を阻害され、酸処理、酵素処理ゼインによって活性化された。

文 献

- 1) WILSON, C.M.: Corn, WATSON, S.A. and RAMSTAD, P.E. eds. (American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul), p. 273 (1987).
- 2) WILSON, C.M.: Seed Proteins, GOTTSCHALK, W. and MÜLER, H.P. eds. (Nijhoff, M./Junk, W. Publishers, The Hague), p. 271 (1983).
- 3) ESSEN, A.: *J. Cereal Sci.* **5**, 117 (1987).
- 4) BRANTL, V., TESCHEMACHER, H., HENSCHEN, A. and LOTTSPEICH, F.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 2111 (1979).
- 5) YOSHIKAWA, M., TANI, F., ASHIKAGA, Y., YOSHIMURA, T. and CHIBA, H.: *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2951 (1986).
- 6) MARUYAMA, S. and SUZUKI, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393 (1982).
- 7) NAITO, H. and SUZUKI, H.: *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1543 (1974).
- 8) PARKER, F., SAMOUR, D.M., FLIOCH, F., ZERIAL, A., WERNER, G.H., JOLLES, J., CASARETTO, A., ZAHN, H. and JOLLES, P.: *Eur. J. Biochem.*, **145**, 677 (1984).
- 9) JOLLES, P., TOLEDANO, S.L., DUNN, F.W. and CAEN, J.P.: *Eur. J. Biochem.*, **158**, 379 (1986).
- 10) YASHIRO, A., ODA, S. and SUGANO, M.: *J. Nutr.*, **115**, 1327 (1985).
- 11) MARUYAMA, S., MIYOSHI, S., KANEKO, T. and TANAKA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1077 (1989).
- 12) MIYOSHI, S., ISHIKAWA, H., KANEKO, T., FUKUI F., TANAKA, H. and MARUYAMA, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313 (1991).
- 13) 高橋秀和: 食品と開発, **30** (12), 45 (1995).
- 14) PADGETT, T., HAN, I.Y. and DAWSON, P.L.: *J. Food Prot.*, **61**, 1330 (1998).
- 15) TANAKA, T., ITO, M., OHMURA, T. and HIDAKA, H.: *Biochemistry*, **24**, 5281 (1985).
- 16) 田中利男・向井 淳・中 充子: 日本薬理学会誌, **100**, 249 (1992).
- 17) 田中利男・林 正晃: よくわかる PDE 3 阻害薬の基礎と臨床 (エプセイブタメディカ), p. 7 (1998).
- 18) FISCHER, D.A., SMITH, J.F., PILLAR, J.S., ST DENIS, S.H. and CHENG, J.B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 570 (1998).
- 19) GUIPPONI, M., SCOTT, H.S., KUDOH, J., KAWASAKI, K., SHIBUYA, K., SHINTANI, A., ASAKAWA, S., CHEN, H., LALIOTI, M.D., ROSSIER, C., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N. and ANTONARAKIS, S.E.: *Hum. Genet.*, **103**, 386 (1998).
- 20) SODERLING, S.H., BAYUGA, S.J. and BEAVO, J.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7071 (1999).
- 21) BEAVO, J.A. and REIFSNYDER, D.H.: *Trends Pharmacol.*, **11**, 150 (1990).
- 22) BEAVO, J.: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase: Structure, Regulation and Drug Action (John Wiley & Sons Ltd, Chichester), p. 3 (1990).
- 23) FIELDS, R.: *Biochem. J.*, **124**, 581 (1971).
- 24) FIELDS, R.: Methods in Enzymology (Academic Press, New York), **25**, p. 464 (1972).
- 25) REEVES, M.L., LEIGH, B.K. and ENGLAND, P.J.: *Biochem. J.*, **241**, 535 (1987).
- 26) WEISHAAR, R.E., KOBYLARZ-SINGER, D.C. and KAPLAN, H.R.: *J. Cell Cardiol.*, **19**, 1025 (1987).
- 27) MUKAI, J., ASAI, T., NAKA, M. and TANAKA, T.: *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 389 (1994).
- 28) MASUOKA, S., ITO, M., NAKANO, T., NAKA, M. and TANAKA, T.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 315 (1990).
- 29) NEMOZ, G., SETTE, C. and CONTI, M.: *Mol. Pharmacol.*, **51**, 242 (1997).

(平成 11 年 8 月 27 日受付, 平成 11 年 10 月 15 日受理)