

新たなタンパク質抗酸化剤の製作 及びその応用

山梨大学大学院総合研究部医学域
先端応用医学講座
准教授 姚 建

2024年10月8日

新技術の概要

本技術は、タンパク質のジスルフィド結合からシステインを露出させることにより、新しいタンパク質抗酸化物質を生成するものです。この新たな抗酸化物質は、分子・細胞・生物学的レベルで抗酸化作用を有し、生体適合性、抗酸化力、安全性、多様な生理機能に優れており、酸化ストレス関連疾患の予防・治療への応用が期待されます。さらに、医薬品、健康食品、化粧品など幅広い分野での活用が可能です。本技術は、タンパク質の構造と機能の理解にも重要な知見を提供し、基礎研究から臨床への応用まで広く貢献することが期待されます。

酸化ストレス

酸化ストレス

酸化ストレスとは、体内で発生する活性酸素種（ROS：Reactive Oxygen Species）と抗酸化物質とのバランスが崩れ、活性酸素種が過剰になることにより生じる細胞や組織への損傷のことを指します。

酸化ストレスの主な原因

- ・ 環境因子：大気汚染、紫外線、放射線など
- ・ 生活習慣：喫煙、過度のアルコール摂取、不健康な食生活など
- ・ 身体的ストレス：過度な運動、怪我、感染症など

酸化ストレスが引き起こす問題

酸化ストレスは、細胞成分の酸化を引き起こし、これが細胞機能の低下や細胞死を招くことで身体の状態や様々な疾患に関連することが知られています。

（心血管疾患、神経変性疾患、糖尿病、加齢、がん、感染症など）

抗酸化剤と分類

抗酸化剤は、体内で生成される過剰な活性酸素種（ROS）やフリーラジカルを中和し、酸化ストレスによる細胞損傷を防ぐ物質です。

分類	抗酸化剤の例	作用メカニズム
天然抗酸化剤	ビタミンC、ビタミンE、カロテノイド、ポリフェノールなど	活性酸素やフリーラジカルと直接反応して中和する。細胞の保護に寄与する。
合成抗酸化剤	BHA（ブチルヒドロキシアニソール）、BHT（ブチルヒドロキシトルエン）	直接フリーラジカルを捕捉して反応する。主に食品の保存剤として使用される。
酵素系抗酸化剤	スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）	体内で生成される特定の酵素で、活性酸素を無害な物質に変換する。例えば、SODはスーパーオキシドを過酸化水素に変換し、カタラーゼがこれを水と酸素に分解する。

抗酸化剤の重要性：疾患の予防・治療及び健康維持に寄与

抗酸化剤と分類

内因性抗酸化物質(体内の抗酸化物質)	外因性抗酸化物質(食品由来の抗酸化物質)
<p>酵素的抗酸化物質</p> <ul style="list-style-type: none">● スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) : スーパーオキシドラジカルを解毒する酵素● カタラーゼ (CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) : 過酸化物の解毒に関与する酵素 (CATはH₂O₂に対して、GPxはH₂O₂とROOHに対して作用)● グルタチオンレダクターゼ: グルタチオンの再生に関与する酵素● チオレドキシニンレダクターゼ: タンパク質の酸化防止に関与する酵素● グルコース-6-リン酸脱水素酵素: NADPHの再生に関与する酵素 <p>非酵素的抗酸化物質(主要な体内還元剤) グルタチオン (GSH)、尿酸、リポ酸、NADPH、コエンザイムQ、アルブミン、ビリルビン</p>	<ul style="list-style-type: none">● ビタミン: ビタミンC、ビタミンE● 微量元素: 亜鉛、セレン● カロテノイド: β-カロテン、リコペン、ルテイン、ゼアキササンチン● フェノール酸: クロロゲン酸、ガリック酸、カフェ酸など● フラボノール: ケルセチン、カンペルフェロール、ミリセチン● フラバノール: プロアントシアニジン、カテキン● アントシアニジン: シアニジン、ペラルゴニジン● イソフラボン: ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン● フラバノン: ナリンゲン、エリオジクチオール、ヘスペレチン● フラボン: ルテオリン、アピゲニン

一次抗酸化物質と二次抗酸化物質の利点と欠点

タイプ	一次抗酸化物質	二次抗酸化物質
抗酸化物質	<ul style="list-style-type: none"> ◆ スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) ◆ グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) ◆ カタラーゼ (CAT) (タンパク質酵素) 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ ビタミンC ◆ ビタミンE ◆ ベータカロテン など (小分子抗酸化剤、外部から摂取)
特徴	<ul style="list-style-type: none"> ・ スーパーオキシドラジカルの分解 ・ 過酸化水素の分解 ・ 脂質過酸化を防ぐ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 電子を提供する還元剤
利点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 作用が強い ・ 作用が早い ・ 特異性が高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 補充が簡単 ・ 入手し易い ・ 製作し易い ・ 値段は安い ・ 日常的に服用が可能
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 酵素が不安定 ・ 保存が困難 ・ 製作が困難 ・ 入手が困難 ・ 使用が困難 ・ 値段は高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 作用が弱い ・ 効果が短い ・ 局所的に蓄積 ・ 抗酸化後は酸化剤に転換
使用範囲	<ul style="list-style-type: none"> ・ 狭い ・ 医療応用 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 広い ・ 日常利用

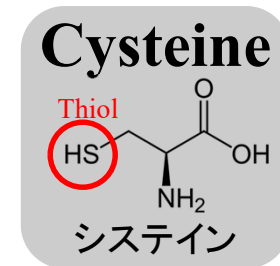
発明の目的

タイプ	一次抗酸化物質	二次抗酸化物質
抗酸化物質	<ul style="list-style-type: none"> ◆ スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) ◆ グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) ◆ カタラーゼ (CAT) (タンパク質酵素) 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ ビタミンC ◆ ビタミンE ◆ ベータカロテン など <p>(小分子抗酸化剤、外部栄養から摂取)</p>
特徴	<ul style="list-style-type: none"> ・ スーパーオキシドラジカルの分解 ・ 過酸化水素の分解 ・ 脂質過酸化を防ぐ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 電子を提供する還元剤
利点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 作用が強い ・ 作用が早い ・ 特異性が高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 補充が簡単 ・ 入手し易い ・ 製作し易い ・ 値段は安い ・ 日常的に服用が可能
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 酵素が不安定 ・ 保存が困難 ・ 製作が困難 ・ 入手が困難 ・ 使用が困難 ・ 値段は高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 作用が弱い ・ 効果が短い ・ 局所的に蓄積 ・ 抗酸化後は酸化剤に転換
使用範囲	<ul style="list-style-type: none"> ・ 狭い ・ 医療応用 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 広い ・ 日常利用

発明する新しい抗酸化剤は、

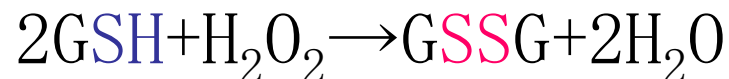
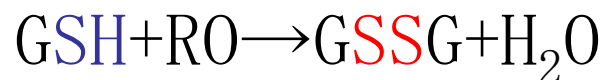
- ◆ 一次・二次抗酸化物質双方の利点を併せ持ち、それぞれの欠点を凌駕する
- ◆ 多様な生物活性があり、副作用が少なく、幅広く応用の可能性を持つ

チオール型抗酸化物質 (-SH)



チオール型抗酸化物質は、チオール基 (-SH) を利用してROSなどの自由基を無害化する化合物です。これらは細胞の酸化ストレスから保護する重要な役割を果たしています。

主なメカニズム



代表的なチオール型抗酸化物質

- グルタチオン (GSH)
- N-アセチルシステイン (NAC)
- α -リポ酸 :

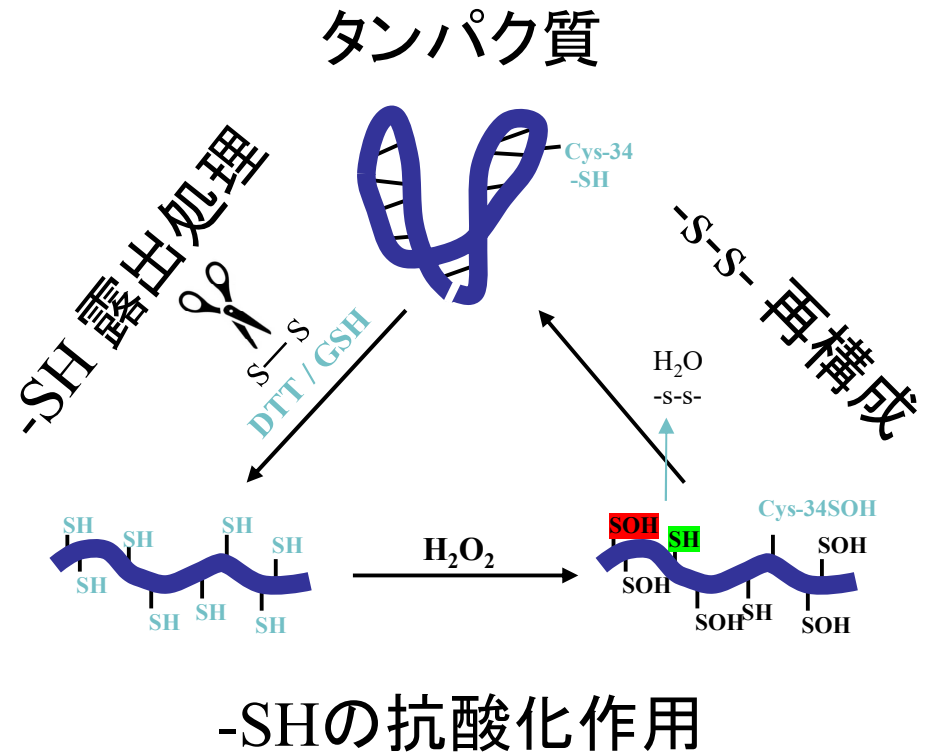
新たなタンパク質抗酸化剤の製作原理

【原理】 $\text{Protein-SH} + \text{RO} \rightarrow \text{Protein-SS-Protein} + \text{H}_2\text{O}$

タンパク質分子内および分子間ジスルフィド結合(-S-S-)を利用し、還元剤で処理することで、-SH基を露出する。

露出した-SH基は活性酸素種(ROS)を捕捉し、一時的にスルフェン酸中間体(-SOH)を形成することで抗酸化作用を示す。

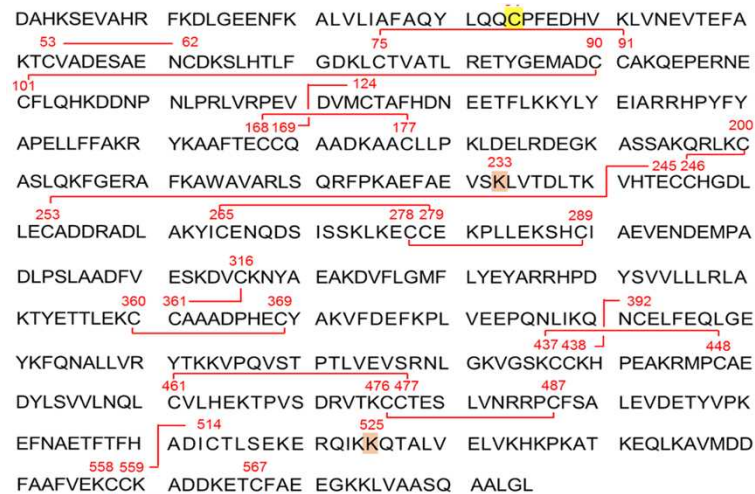
その後、-SH基は速やかにジスルフィド結合を再形成し、タンパク質の構造と機能を回復する。



抗酸化アルブミンの作製及び抗酸化作用

アルブミン (分子量66,348)

- アミノ酸585個
- 35個のシステイン
- 17対のジスルフィド結合
- 1個のフリーシステイン
- $35/585 = 1/16$



アルブミンの特徴

- 豊富に存在するタンパク質
- 体液中の自由SH基の大部分を占める
- 1個の自由システイン (Cys-34) と17個のジスルフィド結合 (-S-S-) を持つ構造
- 病態におけるレベルの低下と酸化の増加
- 輸送機能
- 浸透圧の調節
- バッファー作用
- よく使われる生物製品

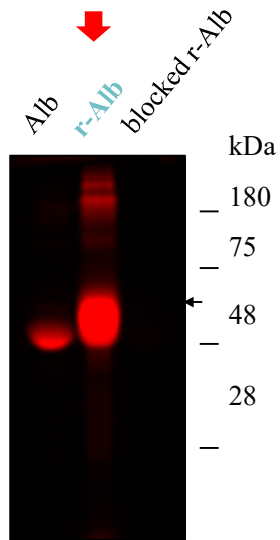
目的: アルブミンを利用した新しいチオールタンパク質抗酸化物質を開発し、酸化関連疾患の治療への応用を探る。

実験概要

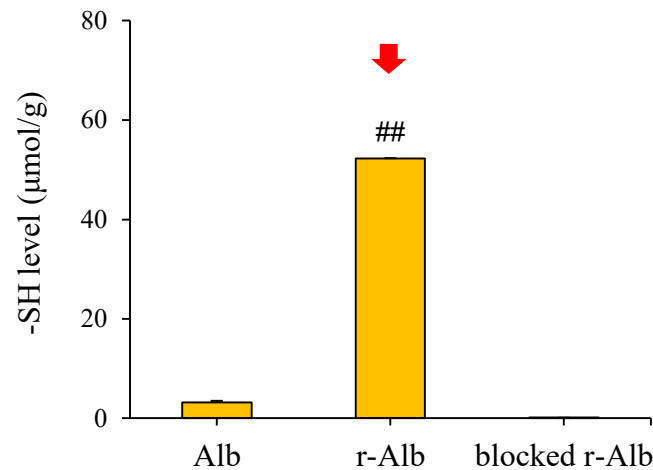
1. タンパク質の還元処理：還元剤処理によりタンパク質の-SHを露出する。
2. **in vitro**および**in vivo**における抗酸化活性の評価：露出した-SHの抗酸化活性を**in vitro**および**in vivo**実験により評価する。
3. 酸化ストレスモデルにおける治療効果の検証：DSSまたはTNBS大腸炎モデル、虚血性再灌流障害モデルを用いて-SH-タンパク質投与の治療効果を評価する。
4. 作用機序の解明：抗酸化作用による治療効果の分子メカニズムを細胞レベル、分子レベルで詳細に解析する。
5. その他：各段階において、-SH-タンパク質以外の適切な対照群（正常コントロール、タンパク質コントロール、**maleimide**によりタンパク質-SH基を遮断したグループ）を設定し、統計学的に有意な差があることを確認する。

還元処理されたアルブミンにおける フリーチオールの数と活性の増加

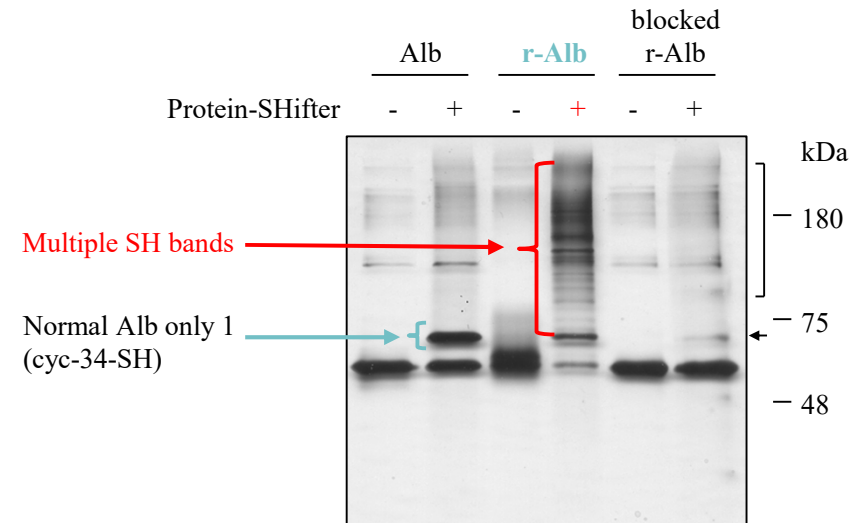
Maleimide binding assay



Elleman's assay



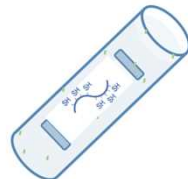
Protein Redox State Monitoring assay (Number of free -SH in Alb)



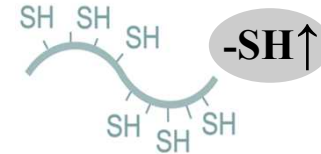
タンパク質



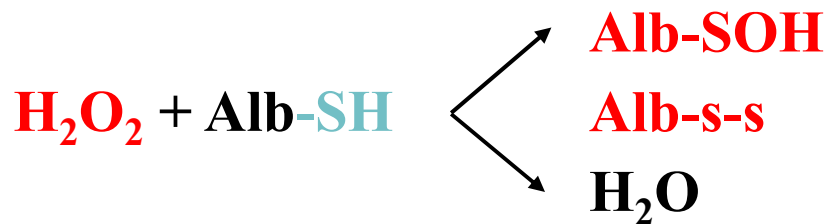
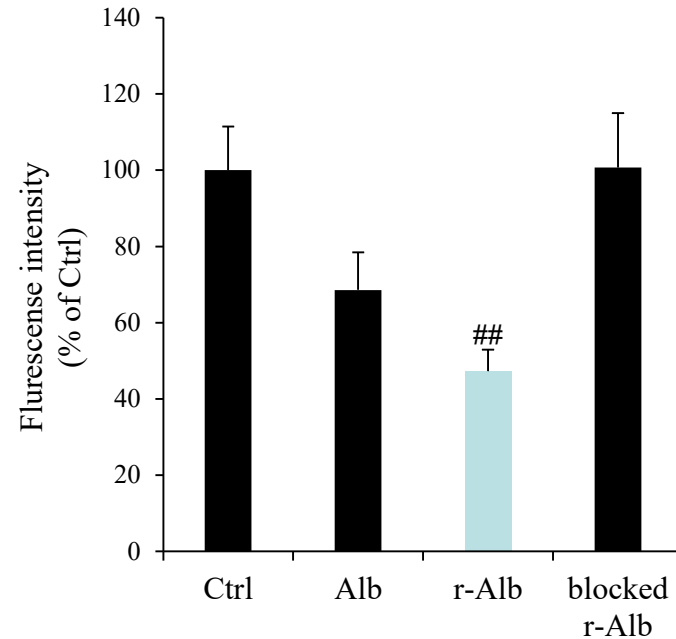
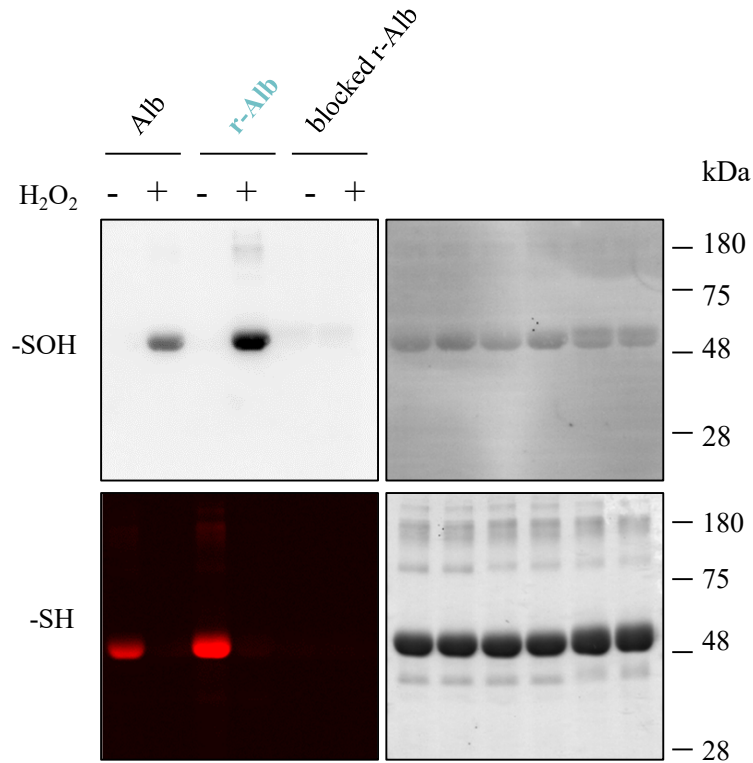
透析処理



-SH露出タンパク質

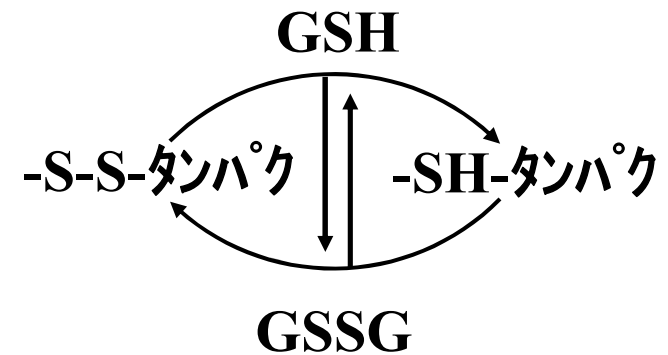
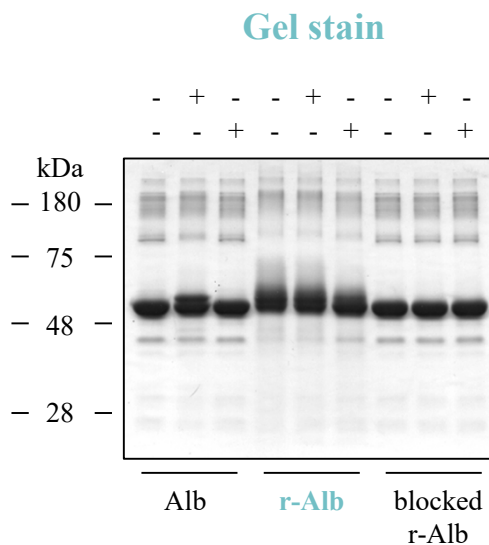
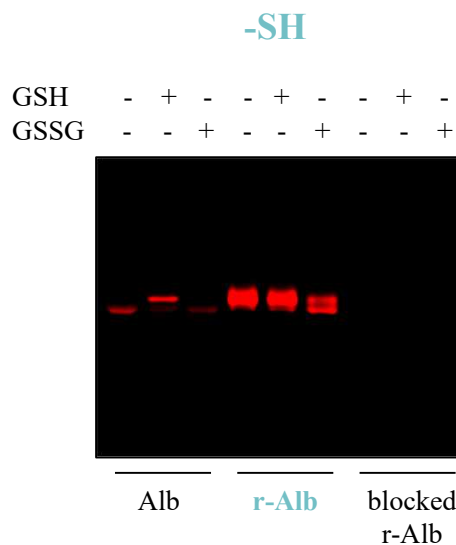
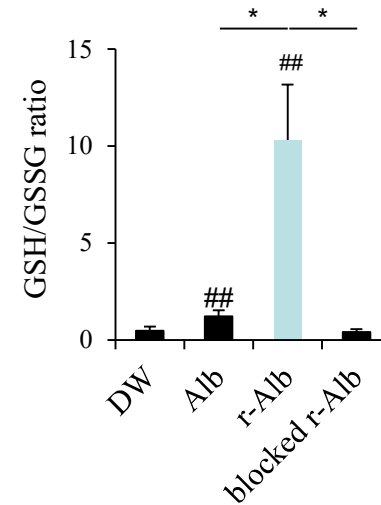
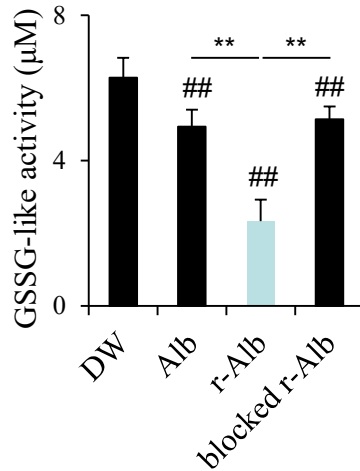
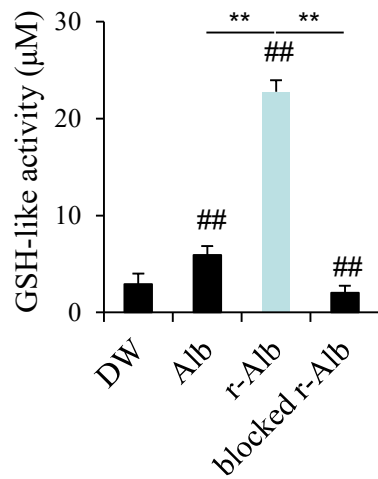


還元処理されたタンパク質によるH₂O₂の除去

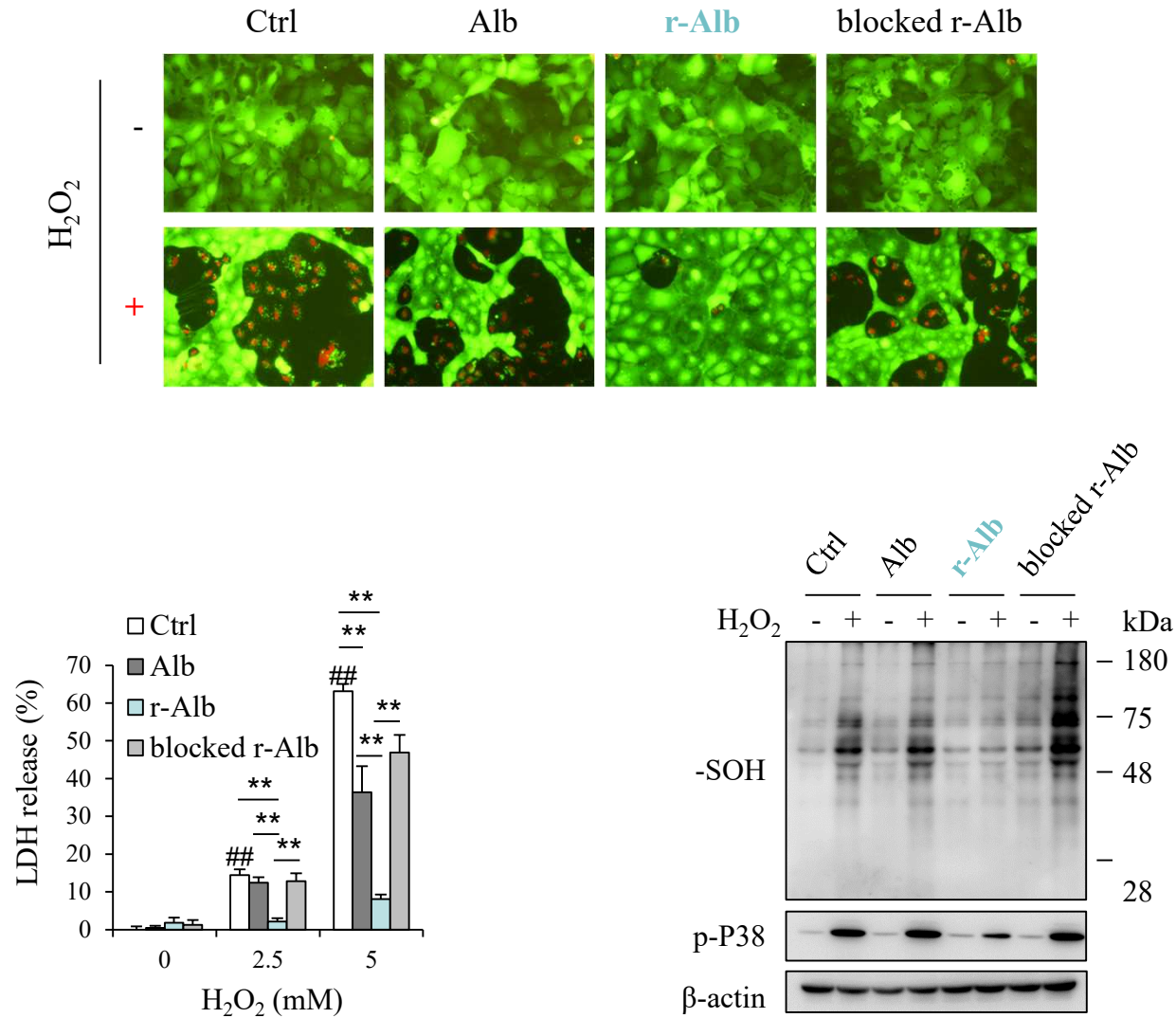


➤ -SH-AlbによるH₂O₂の除去

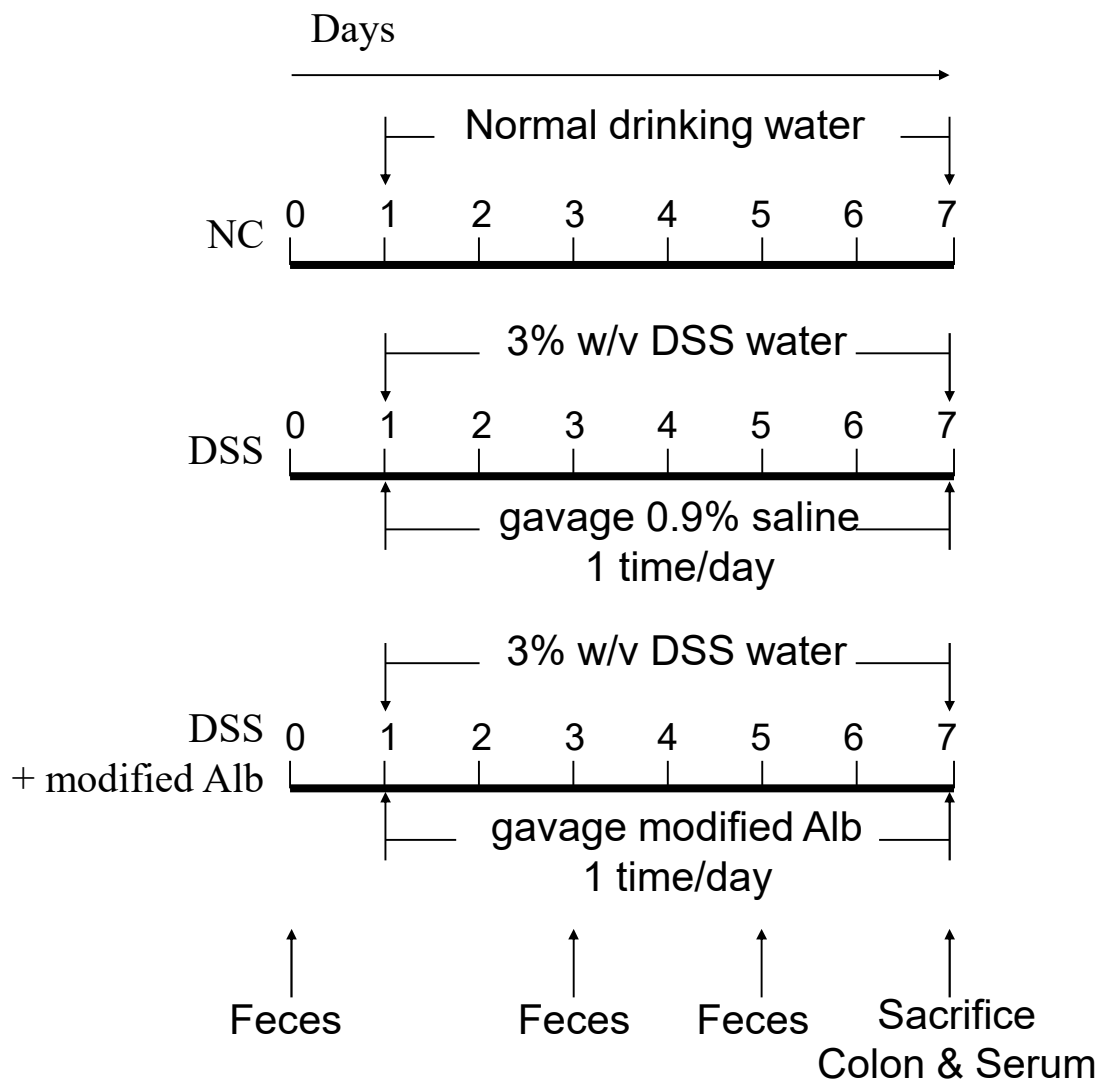
還元処理されたタンパク質はチオール/ジスルフィド結合の交換を通じて全身の酸化還元ホメオスタシスに参加



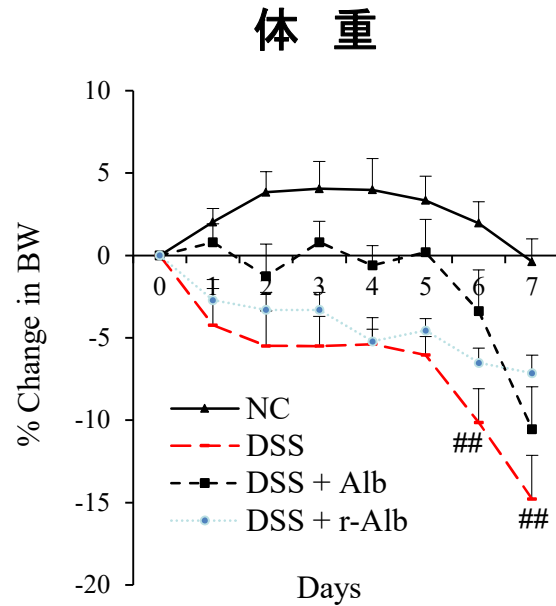
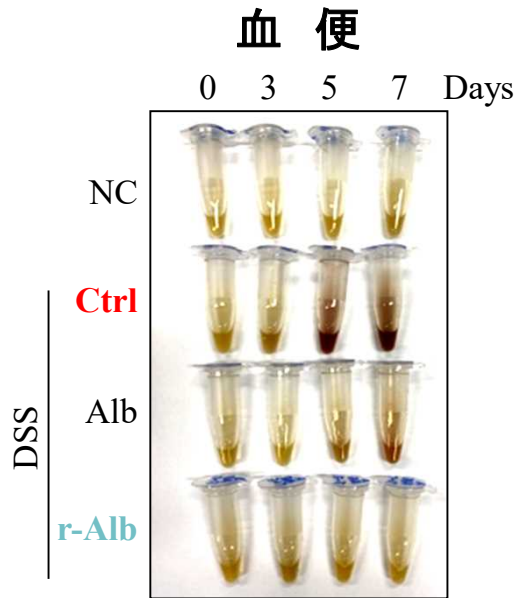
アルブミンがH₂O₂誘発細胞死を防ぐ



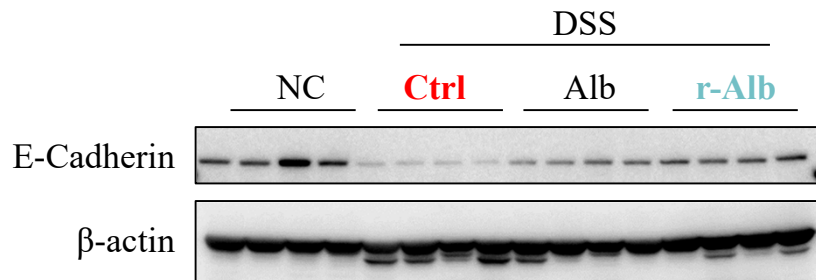
DSS大腸炎実験のアウトライン



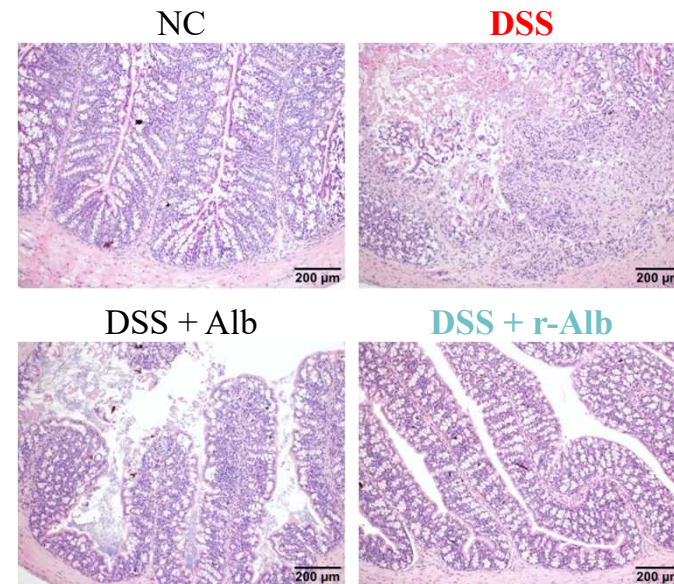
改変アルブミンがマウスのDSS大腸炎を軽減する



腸のバリアタンパクの変化

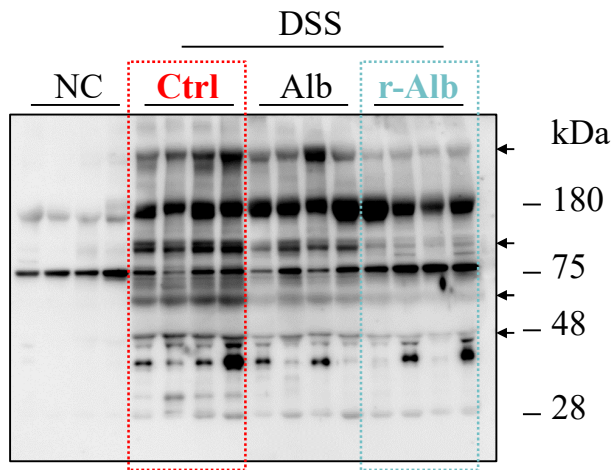


腸の病理変化

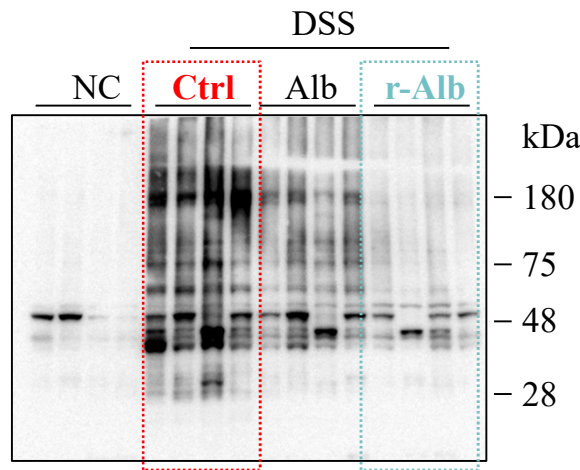


改変アルブミンがマウスの酸化ストレス 及び炎症を軽減する

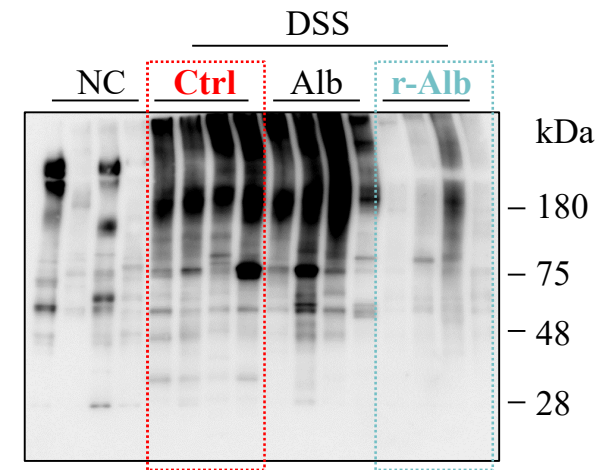
血清タンパクのSOH



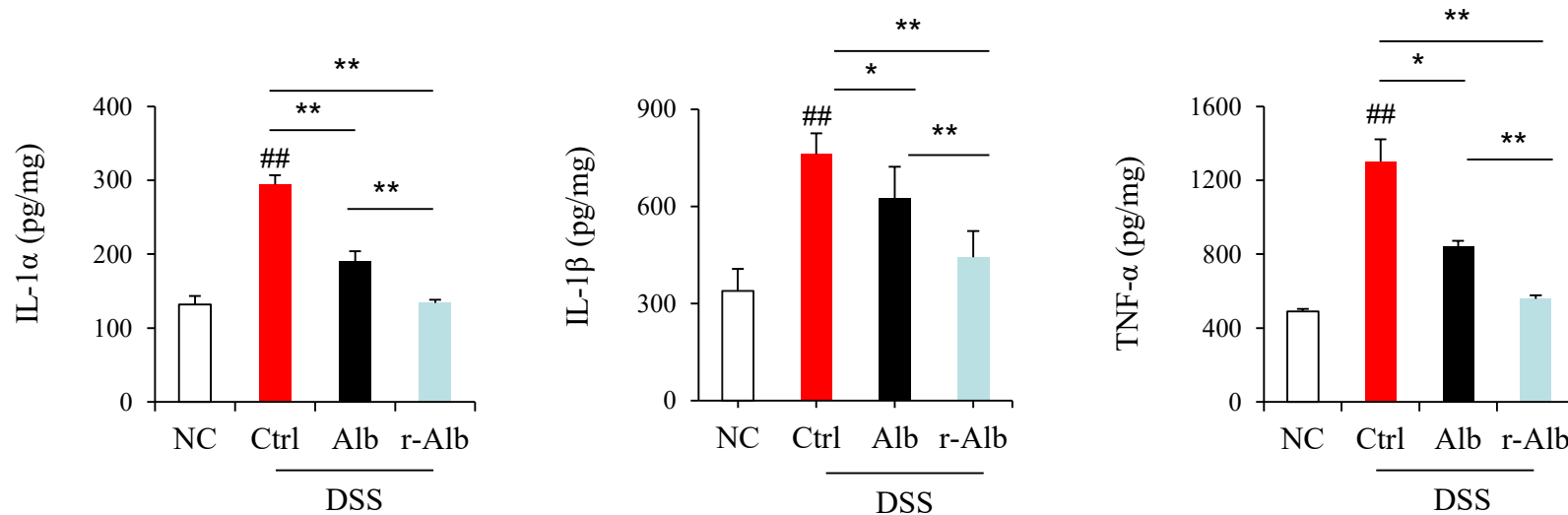
腸タンパクの-SOH



糞の-SOH

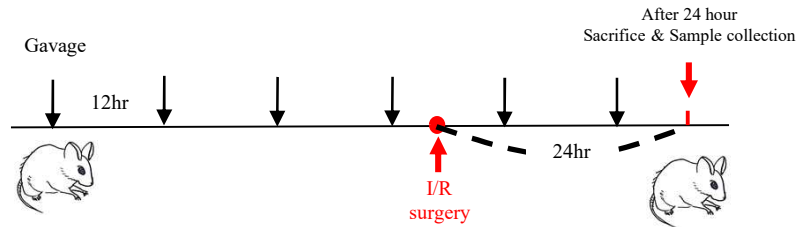


腸における炎症因子IL-1 α , β 及びTNF α の変化

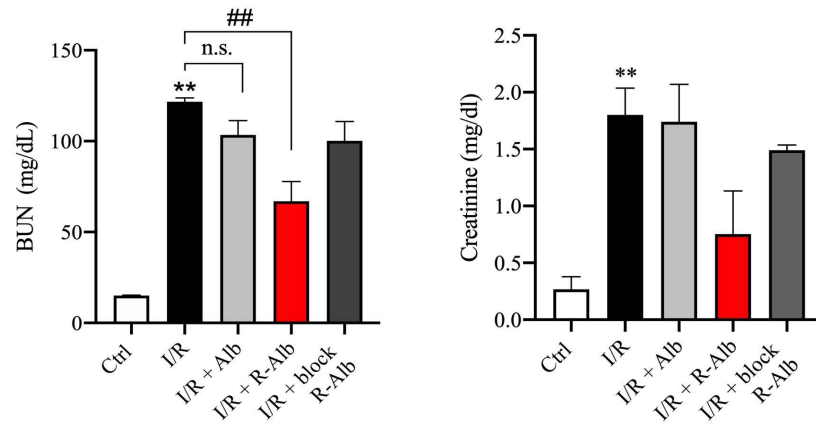


虚血性腎障害における改変アルブミンの治療効果

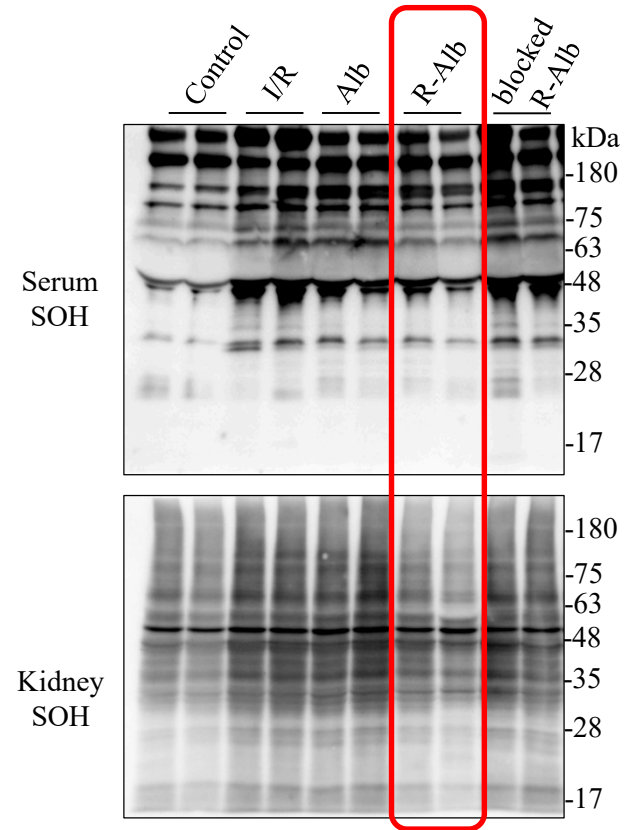
実験アウトライン



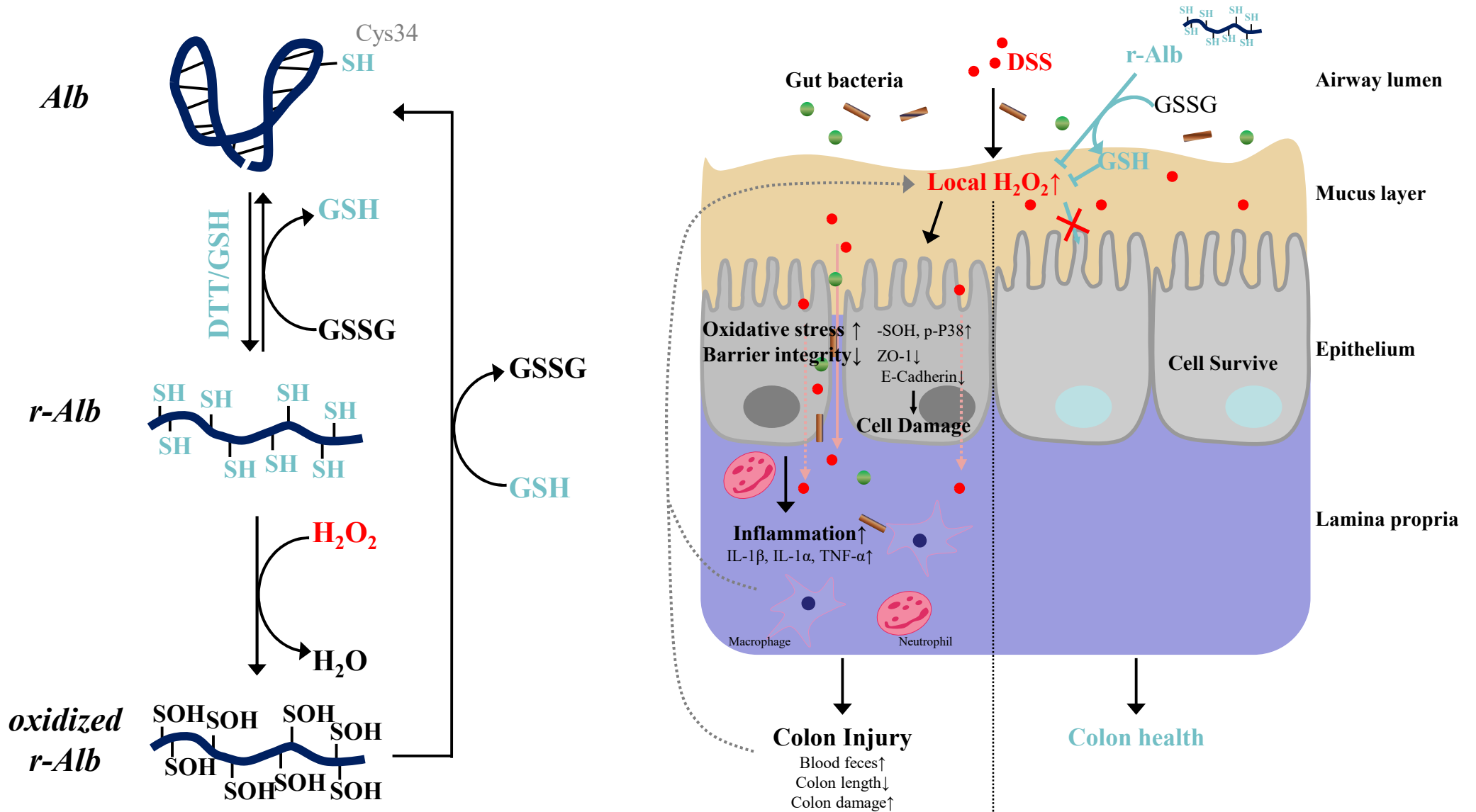
腎機能



血清及び腎臓タンパクの酸化状態



DSS大腸炎治療における 改変アルブミンの作用及びメカニズム



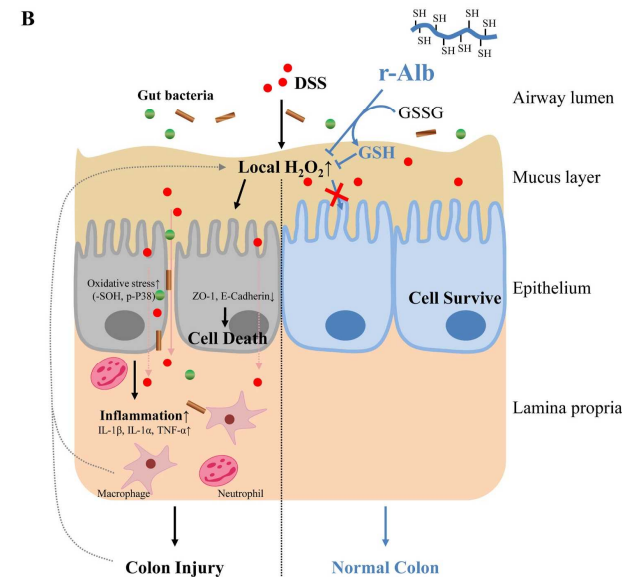
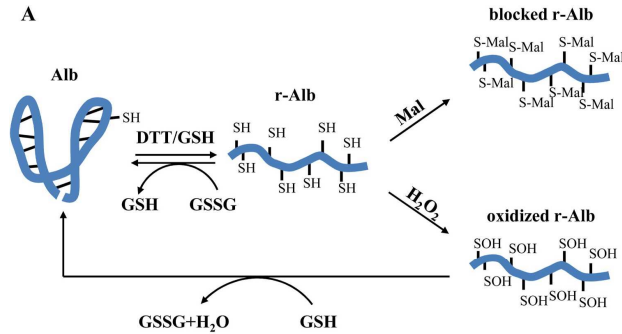
関係する研究論文



Research Paper
Reductively modified albumin attenuates DSS-induced mouse colitis through rebalancing systemic redox state

Xiawen Yang^a, Zhimin Mao^a, Yanru Huang^a, Haizhao Yan^b, Qiaojing Yan^b, Jingru Hong^a, Jianglin Fan^a, Jian Yao^{a,*}

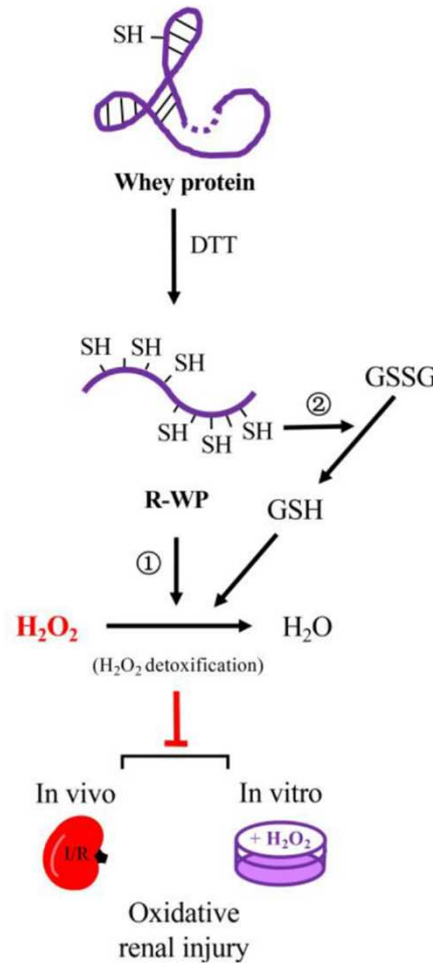
^a Division of Molecular Signaling, Department of the Advanced Biomedical Research, Interdisciplinary Graduate School of Medicine, University of Yamaguchi, Chuo City 409-3898, Japan
^b Department of Molecular Pathology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine, University of Yamaguchi, Chuo City 409-3898, Japan



Article
Development of Dietary Thiol Antioxidant via Reductive Modification of Whey Protein and Its Application in the Treatment of Ischemic Kidney Injury

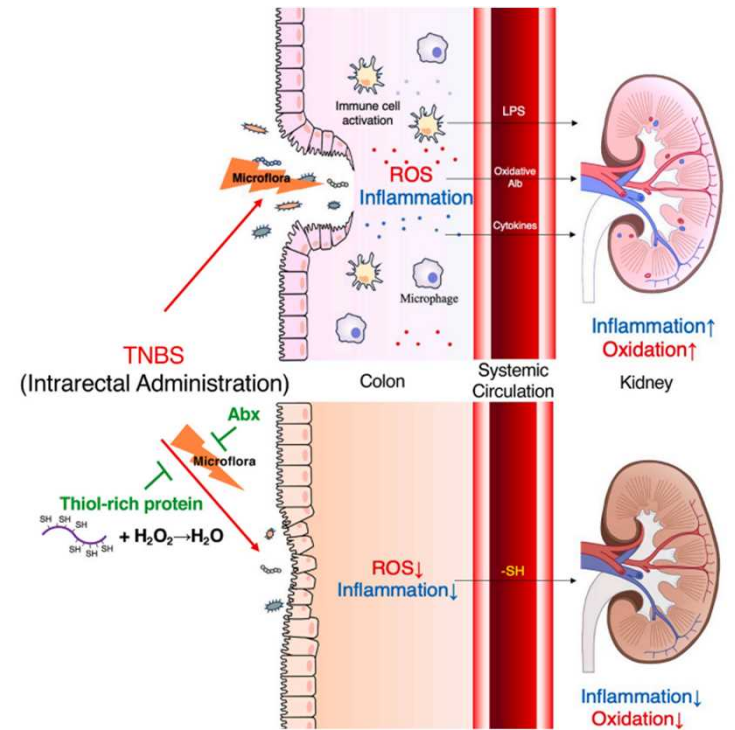
Yang Sui¹, Rui Jiang¹, Manabu Niimi², Jingru Hong¹, Qiaojing Yan¹, Zhuheng Shi¹ and Jian Yao^{1,*}

¹ Division of Molecular Signaling, Department of the Advanced Biomedical Research, Interdisciplinary Graduate School of Medicine, University of Yamaguchi, Chuo City 409-3898, Japan
² Division of Molecular Pathology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine, University of Yamaguchi, Chuo City 409-3898, Japan
* Correspondence: yaoh@yamaguchi.ac.jp; Tel.: +81-55-273-8074



Research Paper
Gut bacteria exacerbates TNBS-induced colitis and kidney injury through oxidative stress

Yang Sui^a, Rui Jiang^a, Manabu Niimi^b, Xin Wang^a, Yijun Xu^a, Yingyu Zhang^a, Zhuheng Shi^a, Mika Suda^a, Zhimin Mao^{a,c,*}, Jianglin Fan^{b,c,*}, Jian Yao^{a,b,c,*}



多疾患モデル
多臓器傷害
アルブミン、乳清タンパク

新たな抗酸化剤の特徴

- **多数の-SH基**：本抗酸化タンパク質は、複数のチオール基(-SH)を露出させることにより、強力な抗酸化活性を発揮します。
- **副作用のない安全性**：抗酸化作用後、タンパク質は元のジスルフィド結合構造に戻り、安定した元の構造を保つため副作用がありません。
- **多様な生物活性**：元のタンパク質の機能が維持されるため、複数の生物活性を示すことができます。
- **製造の容易性と適用性**：すべてのジスルフィド結合を持つタンパク質に適用可能で、容易に製造できます。
- **投与方法の多様性**：タンパク質の性質に応じて、経口投与または静脈内注射、腹腔内注射が可能です。

新規抗酸化物質と一次・二次抗酸化物質の比較

タイプ	抗酸化物質	特徴	利点	欠点	使用範囲
一次 抗酸化物質	<ul style="list-style-type: none"> スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) カタラーゼ (CAT) グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) (タンパク質酵素) 	<ul style="list-style-type: none"> スーパーオキシドラジカルの分解 過酸化水素の分解 脂質過酸化を防ぐ 	<ul style="list-style-type: none"> 作用が強い 特異性が高い 作用が早い 	<ul style="list-style-type: none"> 酵素が不安定 保存が困難 製作が困難 入手が困難 使用が困難 値段は高い 	<ul style="list-style-type: none"> 狭い 医療応用
二次 抗酸化物質	<ul style="list-style-type: none"> ビタミンC ビタミンE ベータカロテン など (小分子抗酸化剤、外部栄養から摂取) 	<ul style="list-style-type: none"> 電子を提供する還元剤 	<ul style="list-style-type: none"> 補充が簡単 入手し易い 製作し易い 値段は安い 日常的に服用が可能 	<ul style="list-style-type: none"> 作用が弱い 効果が短い 局所的に蓄積 抗酸化後は酸化剤に転換 	<ul style="list-style-type: none"> 広い 日常利用
新規抗酸化物質 発明品	<ul style="list-style-type: none"> チオール基を露出したタンパク質 ✓ アルブミン ✓ 免疫グロブリン ✓ 乳清タンパク質など 	<ul style="list-style-type: none"> 複数の-SH基による強力な抗酸化作用 副作用がなく元の構造に戻る安定性 	<ul style="list-style-type: none"> 一次/二次抗酸化物質の利点を併せ持つ 多様な生物活性を示す 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質不安定 保存困難 	<ul style="list-style-type: none"> 幅が広い 医薬品 日常健康食品 化粧品など

想定される用途

- **医療分野**

酸化ストレス関連疾患の治療（神経性、心血管、肝臓疾患、感染症、癌、大腸炎など）

- **予防医療と健康増進**

アンチエイジングサプリメント、免疫強化など

- **食品産業**

機能性表示食品

- **化粧品産業**

スキンケア製品（クリームや美容液の開発）

企業への貢献、PRポイント

- 本技術により、既存のタンパク質製品に抗酸化機能を付加することが可能となるうえ、新たな薬品や健康食品の開発へと発展する可能性が広がるため、この技術を共同研究・開発することは、参加企業に大きなメリットをもたらします。
- 導入前には、必要な追加実験を行い、科学的根拠を確実に示すことができます。また、技術の本格導入に際しては、技術指導も可能です。

実用化に向けた課題

安定性の確保

課題：タンパク質の構造が変化せず、長期間安定した機能の維持

対策：安定性を高めるための配合や処理方法の開発

理想的なタンパク質の選択と供給源の確保

課題：簡単に入手可能で、安全かつ信頼性の高いタンパク質の選択

対策：持続可能な供給源を確保し、品質管理基準を設けることで、供給の安定性と品質の一貫性を保証

規制のクリア

課題：医薬品および健康サプリメントとしての使用にあたり、国際的な規制基準を満たす

対策：規制当局との協力を強化し、承認プロセスをスムーズに進めるための詳細な安全性と有効性データを提供

企業への期待

- タンパク機能の安定性と有効性を高める技術を持つ企業との共同研究を希望します。
- 老化防止製品、機能性食品や健康補助食品を開発中の企業、また、医薬品、化粧品分野において本技術の導入が特に有効であると考えます。
- 共同研究を通じて、本技術の臨床および市場での適応範囲の拡大を図りたいと考えています。また、研究のターゲット・タンパク質を拡大することにより、より広範囲な消費者ニーズに応える製品開発を目指しています。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：改変アルブミン及びその応用

出願番号：特願2022-009896

出願人：山梨大学

発明者：姚 建

- 発明の名称：抗酸化剤及びその製造方法、医薬組成物及びその製造方法、食品、並びに化粧品

出願番号：特願2020-127543

出願人：山梨大学

発明者：姚 建

お問い合わせ先

国立大学法人山梨大学
研究推進・社会連携機構

〒400-8510 山梨県甲府市武田4丁目4番地37号

TEL:055-220-8759 / FAX:055-220-8757

e-mail: renkei-as@yamanashi.ac.jp

産学連携の経歴

これまでのところ、産学連携実績はありません。