

化粧品・スキンケア製品に適したコメ糠タンパク質由来 生理活性短鎖ペプチド素材の開発

新潟大学自然科学系（工学部機能材料工学科）

谷口 正之

In this study, to prepare the fraction containing multifunctional cationic peptides, we first hydrolyzed rice bran protein (RBP) with pepsin. We separated the enzymatic hydrolysate of RBP into 20 fractions containing peptides with different isoelectric point (pI) values by ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing). Subsequently, we examined the antimicrobial activity of each fraction against four pathogens. In addition, we purified the cationic peptides from fractions exhibiting antimicrobial activity by reversed-phase high-performance liquid chromatography and identified them by matrix-assisted laser/desorption ionization–time-of-flight mass spectroscopy. Of five cationic peptides identified, we chemically synthesized three peptides with high pI values and evaluated their multiple functions, including antimicrobial, lipopolysaccharide-neutralizing and angiogenic activities. Our results demonstrated that the three identified cationic peptides exhibited multiple functions. Fractions containing cationic peptides obtained from RBP hydrolysate have the potential to be used as functional ingredients in cosmetic and skin-care products.

1. 緒 言

近年、多くの生物が生産する抗菌ペプチドは、感染防御ばかりでなく、炎症制御、創傷治癒、免疫応答の促進などの生体を防御するための作用を兼ね備えていることが報告されており、食品ばかりでなく、化粧品、スキンケア製品、医薬品、医薬部外品の新しい素材として注目を集めている¹⁻³⁾。また、ヒトも生体を防御するために、多くのペプチドを生産している。例えば、唾液中の histatin は、抗炎症作用や抗菌作用を発揮する⁴⁾。また、好中球などの細胞が産生する LL-37 や β -defensin などのペプチドも、抗菌作用ばかりでなく、免疫調節、抗炎症、創傷治癒、細胞増殖促進などの多くの生体防御機能を有しており、それらの多機能性に着目した医薬品開発が進められている^{5,6)}。

コメ糠中には、フィチン酸、イノシトール、トコトリエノール、 γ -オリザノール、フェルラ酸などの生理活性成分が含まれており、コメ糠はこれらの機能性成分を製造する原料として有効利用されている。しかし、コメ糠中のタンパク質成分は有効に利用されていない。一方、コムギ、ダイズ、トウモロコシなどの穀類タンパク質の加水分解物、およびそれらに含まれるペプチドには多彩な生理活性があることが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。そこで、筆者らは生理活性ペプチドを生産するための原料として、コメ糠タンパク質に着目した。これまでにコメ糠タンパク質の酵素加水分解

物から美白効果があるチロシナーゼ阻害ペプチドを見出している¹¹⁾。本研究では、コメ糠タンパク質の酵素加水分解物から多彩な生理活性を兼ね備えたカチオン性ペプチドを調製することを目的として、(1)コメ糠タンパク質の酵素加水分解物の調製、(2)等電点電気泳動によるカチオン性ペプチド素材の調製、(3)逆相クロマトグラフィーと質量分析計を用いた素材中のカチオン性ペプチドの同定、および(4)同定した3種類のカチオン性ペプチドの複数の生理活性(抗菌活性、LPS中和活性、および血管新生促進活性)を検討した結果について報告する。

2. 方 法

2. 1. コメ糠タンパク質からのペプチドの調製とカチオン性ペプチド画分の調製

最初にコメ糠タンパク質RBP55（タンパク質含有量55%、築野食品工業株式会社）に超純水を加え、POLYTRON Homogenizer（KINRMATICA）を用いて溶液の均質化を行い、透析によって、低分子不純物を除去した。その後、ブタ胃粘膜由来ペプシンを用いて5時間、37℃にて加水分解した。さらに、加水分解物を遠心分離し、得られた上澄液を再び透析することによって生成した低分子成分を除き、出発材料を調製した。次に、出発材料をBio-Rad社の等電点電気泳動（Rotofor Cell System）を用いて、等電点（isoelectric point, pI）の異なる20の画分に分離した。

2. 2. ペプチド画分の抗菌活性の測定

等電点電気泳動によって分離した20の画分について、ヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した。すなわち、各画分のグラム陰性細菌である歯周病菌（*Porphyromonas gingivalis*）とアクネ菌（*Propionibacterium acnes*）、グラム陽性細菌であるう蝕菌（*Streptococcus mutans*）、および



Development of bioactive short peptides derived from rice bran protein and their application to cosmetic and skin-care products

Masayuki Taniguchi

Department of Materials Science and Technology, Graduate School of Science and Technology, Niigata University

日和見感染真菌 (*Candida albicans*) に対する抗菌活性を測定した。生菌数は、BacTiter-Glo™ reagent (Promega Japan KK) を用いて、生菌に由来する ATP の発光強度を測定することによって評価した。

2. 3. 活性画分からのカチオン性ペプチドの精製と同定

次に、抗菌活性が検出された画分から逆相クロマトグラフィーによってペプチドを精製した。必要に応じて粗精製画分をもう一度、逆相クロマトグラフィーによって精製し、単一ピークを得た。各ピーク画分中のペプチドを MALDI-TOF/MS (Bruker) によって解析し、ペプチドの分子量を求め、MS/MS 解析とデータベース検索によって、ペプチドを含むタンパク質とペプチドのアミノ酸配列をそれぞれ決定した。

2. 4. 同定したカチオン性ペプチドの抗菌活性の解析

同定したペプチドの中から正味の正電荷が高く、pI が高いカチオン性ペプチドを選択した。それらのペプチドを医学生物学研究所(株)に委託して化学合成し、2. 2. の項に記載した方法に従って、4 種類のヒト病原微生物に対して抗菌活性を測定した。各ペプチドの抗菌活性は、ATP 発光強度の結果から 50 % 増殖阻害濃度 (IC₅₀) を算出し、比較した。

2. 5. 同定したカチオン性ペプチドの LPS 中和活性の解析

リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を特異的に検出するカプトガニの血球抽出物から調製した *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) 試薬を用いるリムルステストは、LPS を検出・定量することができる。本研究では、エンドトキシンとして *Escherichia coli* O55:B5 由来の O 抗原を含む smooth 型 LPS を使用した。リムルステストにおいては、LAL 試薬に含まれる Factor C (セリンプロテアーゼ前駆体) と LPS の反応を起点としたカスケード反応により、最終的に LPS の濃度に応じて遊離した *p*-nitroaniline の 405nm における吸光度を測定した。本研究では、予め各カチオン性ペプチドと LPS をインキュベーションした後に反応系に添加し、コントロールと比べてときの吸光度の減少を測定し、LPS 中和活性を評価した。中和活性の強さは、リムルステストの反応を 50% 阻害する濃度、すなわち 50 % 有効濃度 (EC₅₀) として表した。

2. 6. 同定したカチオン性ペプチドの血管新生の解析

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞である (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) を用いて、次のようにして、各ペプチドの血管新生 (管腔形成) 促進活性を測定し

た。96 ウェルプレートにコラーゲン様マトリゲルを用いて人工基底膜を作製し、30 分間、37℃にてインキュベーションした。次に、HUVEC と各ペプチドまたはポジティブコントロールとして創傷治癒作用を有するヒトのペプチドである LL-37 を含む培地 HuMedia-EG2 を、各ウェルに添加した。CO₂ インキュベーター中で 15 時間、37℃にて 5 % CO₂ 雰囲気下で培養した後、顕微鏡を用いて管腔構造を形成した、すなわち血管様に増殖した細胞を観察し、5 ウェルについて写真を撮った。その後、それぞれの画像中の血管様の細胞の長さを、NIS-Elements BR Analysis software (株式会社ニコン) を用いて測定し、平均値を算出した。ペプチドを添加しないときの細胞の長さの平均値を 100 % として、各ペプチドの血管新生促進活性を評価した。

3. 結果

3. 1. ペプシン加水分解物の調製と等電点電気泳動によるペプチドの分画

最適な酵素加水分解条件を検討するために、コメ糠タンパク質 (RBP55) をパパイン、トリプシン、ペプシン、またはトリプシンとキモトリプシンの混合物を用いて、時間を変えて加水分解した。得られた加水分解物を等電点電気泳動によって分離し、各画分の抗菌活性について検討した結果、ペプシンを用いて 5 時間加水分解したときに、高い抗菌活性を有する画分を得ることができた。コメ糠タンパク質をペプシンによって 5 時間加水分解したサンプルを、等電点電気泳動によって分画した結果を図 1 に示す。pH が低い画分を除いて、各画分の回収率は、それぞれ 3-5 % 程度であり、pI の違いによって、ペプチドを 20 の画分に分離することができた。また、画分 16 から 20 の pH は、10 以上であり、これらの画分にカチオン性ペプチドが含まれていると考えられた。

3. 2. 等電点電気泳動によって分離した各画分の抗菌活性

ヒト病原微生物として、歯周病菌 (*P. gingivalis*) とアクネ菌 (*P. acnes*)、う蝕菌 (*S. mutans*)、および日和見感染真菌 (*C. albicans*) を用いた。各画分の濃度を 3 mg/mL として抗菌活性を測定した結果を図 2 に示す。縦軸は、生菌数を表す ATP の発光強度から求めた生残率を示す。ペプチドを添加しないコントロール (図中の C) の発光強度を 100 % とした。いずれの病原微生物に対しても、pI が高いカチオン性の画分から高い抗菌活性が検出された。特に、画分 20 のサンプルは、4 種類の病原微生物に対して、いずれも高い抗菌活性を示すことがわかった。そこで、画分 18, 19, および 20 からカチオン性ペプチドを精製し、同定することにした。

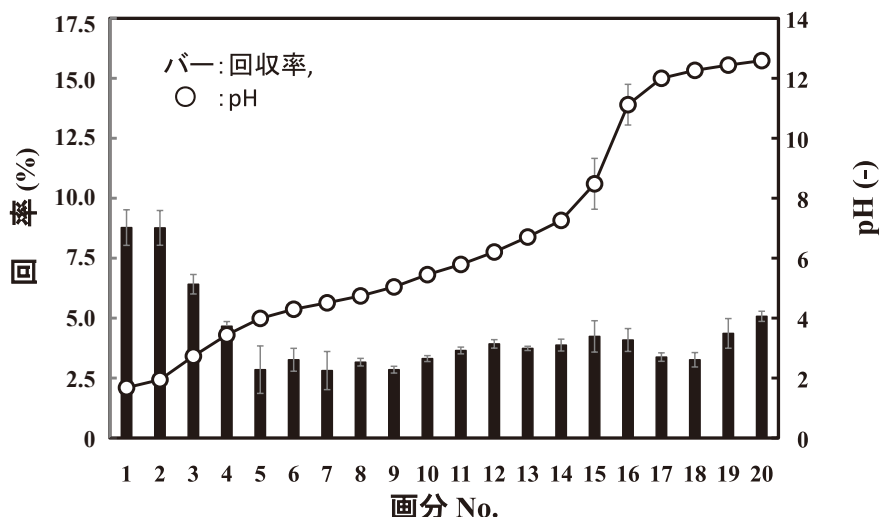


図1 等電点電気泳動によるコメ糖タンパク質酵素加水分解物の分画

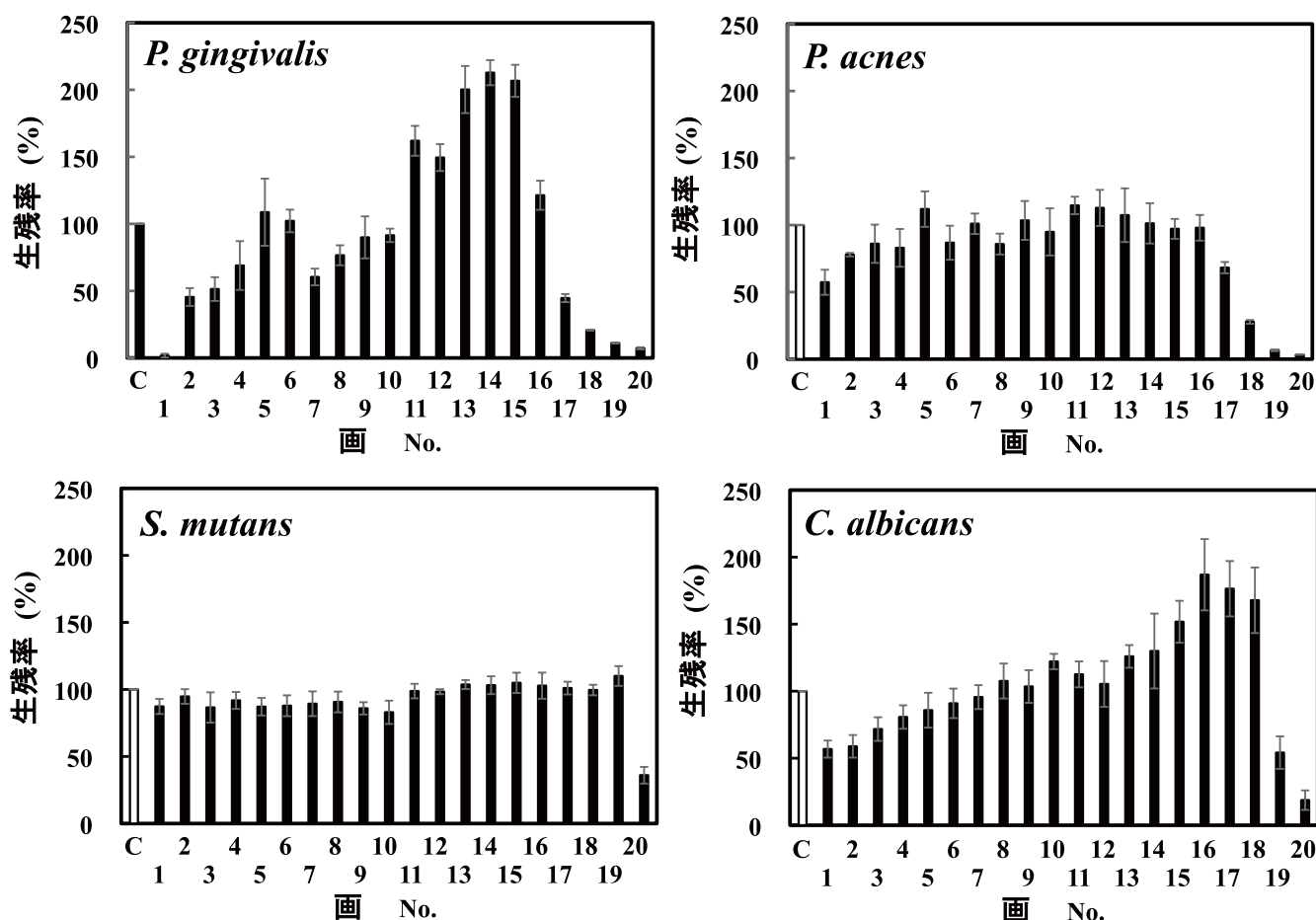


図2 等電点電気泳動によって分離した各分画の病原微生物に対する抗菌活性
C: ペプチドを添加していないときの生残率(100%)

3. 3. カチオン性ペプチドの精製と同定

画分 18, 19, および 20 から逆相クロマトグラフィーによって、それぞれペプチドを精製した。さらに、MALDI-TOF/MS によってペプチドの分子量を求め、MS/MS 解析とデータベース検索によって、ペプチドを含むタンパ

ク質とペプチドのアミノ酸配列を決定した。同定できたペプチドの中で、同定の信頼性が高く、pI が高く、かつ正味の電荷が正のペプチドを表 1 に示す。画分 18 から 4 種類、画分 19 からは 1 種類のペプチドがそれぞれ同定できたが、画分 20 からは、信頼性の高いペプチドを同

表1 コメ糖タンパク質酵素加水分解物から同定した短鎖カチオン性ペプチド

フラクション No.	分子量 (Da) (測定値)	ペプチドの略称	アミノ酸配列	タンパク質	位置	等電点	正味の電荷
18	1597.0156	LRR	LRRHASEGGHGPHW	63kDa globulin-like protein	286-299	9.62	+1
	1110.4941	—	<u>FSKGVQRAAF</u> ^c	globulin-like protein, partial	135-144	11.00	+2
	1667.8685	EKL	EKLLGKQDKGVIIRA	globulin-like protein, partial	152-166	9.70	+2
	1284.7872	SSF	<u>SSFSKGVQRAAF</u> ^c	globulin-like protein, partial	133-144	11.00	+2
19	1284.5777	SSF	<u>SSFSKGVQRAAF</u> ^c	globulin-like protein, partial	133-144	11.00	+2

アンダーラインは、同一のアミノ酸配列を示す。

定することができなかった。例えば、SSFSKGVQRAAFは、コメの globulin-like protein の133番目から144番目の12残基のアミノ酸配列であり、このペプチドのpIは12.0、正味の電荷は+2であった。また、ペプチドSSFSKGVQRAAFは画分18と19からそれぞれ同定され、ペプチドFSKGVQRAAFはSSFSKGVQRAAFの部分配列であることがわかった。そこで、3種類のペプチド(LRRHASEGGHGPHW, EKLLGKQDKGVIIRA, およびSSFSKGVQRAAF)を化学合成し、それらの生理活性を測定することにした。

3. 4. 同定したペプチドの抗菌活性

同定した3種類のペプチドを化学合成し、それらの4種類のヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した結果、ペプチドLRRHASEGGHGPHW(略称LRR)は*C. albicans*に対して、ペプチドEKLLGKQDKGVIIRA(略称EKL)とペプチドSSFSKGVQRAAF(略称SSF)はそれぞれ*P. gingivalis*に対して抗菌活性を示した。各ペプチドの抗菌活性の濃度依存性を図3に示す。これらのデータに基づいて、各ペプチドのIC₅₀を算出した結果、ペプチドLRRの*C. albicans*に対するIC₅₀の値は289 μM、ペプチドEKLとSSFの*P. gingivalis*に対するIC₅₀の値はそれぞれ75.6 μMと78.5 μMになった。

3. 5. 同定したペプチドのLPS中和活性

ペプチドの抗炎症活性の1つとして、LPS中和活性を測定した。同定した3種類のペプチドは、図4に示すように、LPSによって引き起こされるリムステストの反応を濃度依存的に阻害した。したがって、これらのリムステストの結果から、同定した3種類のペプチドは、LPSに結合し、中和活性を発揮することがわかった。

図4のデータに基づいて計算した結果、ペプチドLRR, EKL, およびSSFのEC₅₀の値は、それぞれ1.07 μM, 0.86 μM, および1.41 μMとなった。これらのEC₅₀の値は、polymyxin Bの値と比較して、10倍程度であることから、同定した3種類のペプチドは、比較的強くLPSを中和でき

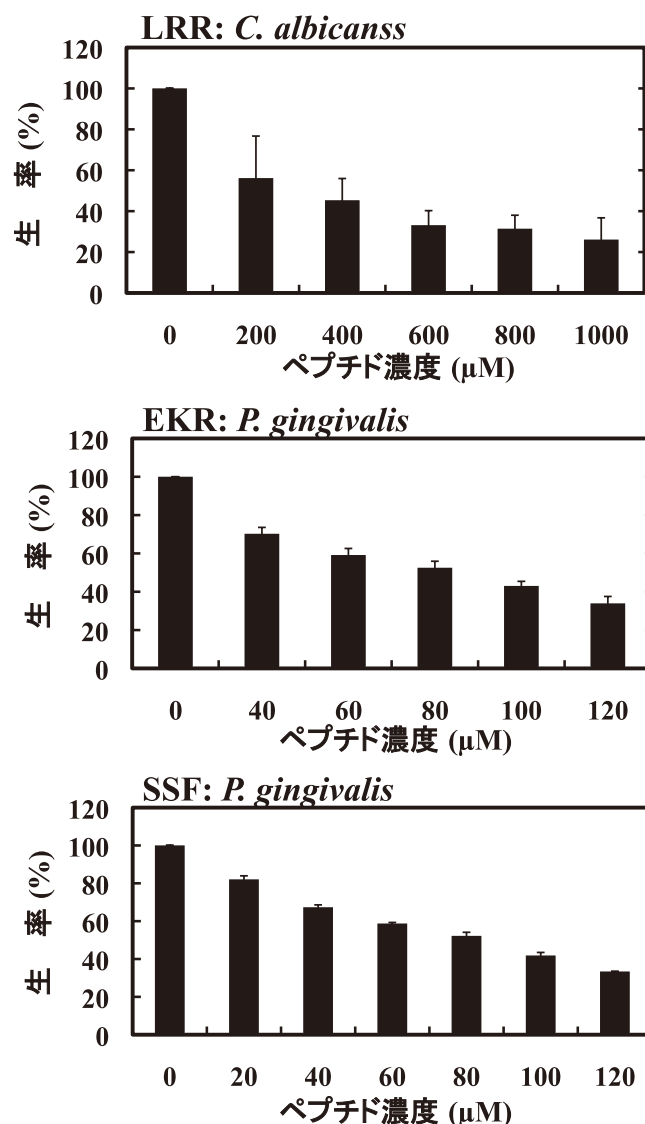


図3 同定した3種類のカチオン性ペプチドの抗菌活性

ることがわかった。

3. 6. 同定したペプチドの血管新生促進活性

ペプチドの創傷治癒活性の1つとして、HUVECを用いて血管新生促進活性を測定した。血管新生促進活性を有するヒトの生体防御ペプチドとして知られているLL-37をポ

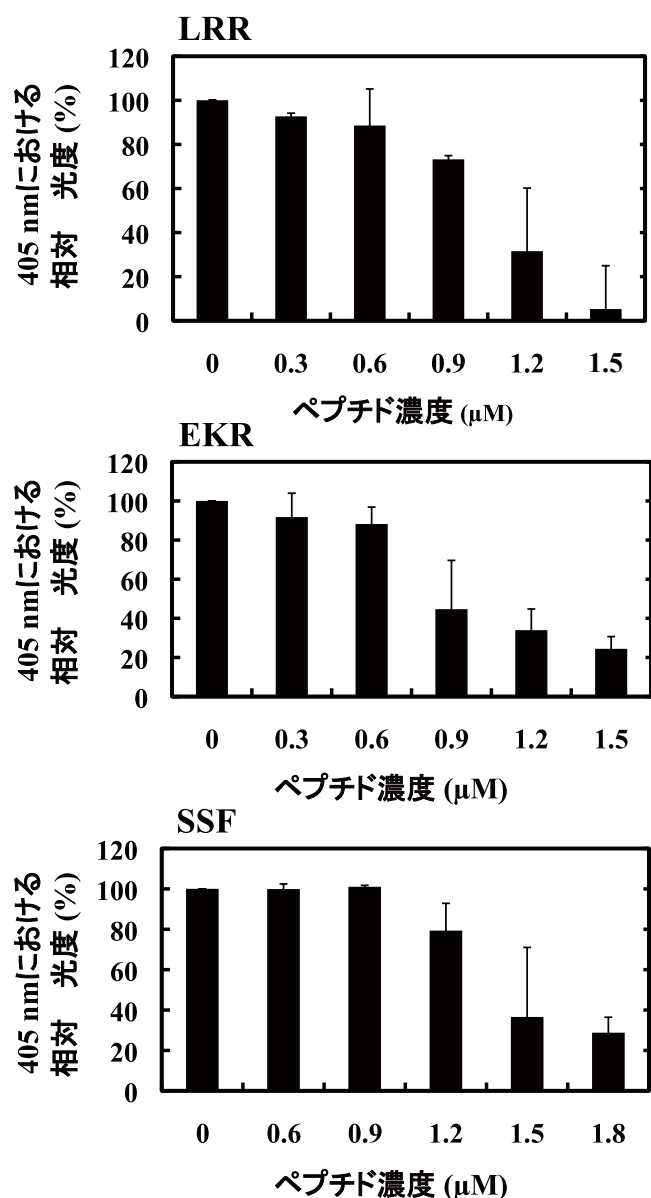


図4 同定した3種類のカチオン性ペプチドのLPS中和活性

ジティブコントロールとして、同定した3種類のペプチドの血管新生促進活性を測定した結果を、図5に示す。同定した3種類のペプチドは、LL-37と同じように、血管新生促進活性を発揮した。すなわち、細胞懸濁液に1 μMまたは10 μMの各ペプチドを添加した後、15時間培養し、マトリゲル内で管腔(血管様)構造を有するHUVECを、顕微鏡を用いて40倍の倍率で観察し、その細胞の長さを計測した。その結果、写真からもわかるように、ペプチドSSFは、LL-37と同じ濃度(1 μMと10 μM)において血管新生促進活性を示し、その作用は添加した濃度に依存していた。一方、ペプチドLRRとEKLは1 μMと10 μMにおいてはほぼ同じ血管新生促進活性を示した。以上の結果から、同定した3種類のペプチドは、LL-37と同じように、HUVECの血管新生を促進する活性を有することから、創傷治癒活

性を示すことがわかった。

4. 考 察

4. 1. 食品タンパク質酵素加水分解物から得られた生理活性ペプチド

ミルク、卵、魚などの動物性タンパク質ばかりでなく、ダイズ、コムギ、コメ、ノリなど植物性タンパク質の酵素加水分解物から生理活性があるペプチド画分やペプチドが得られている。特に、angiotensin I-converting enzyme (ACE) 阻害、dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) 阻害、抗酸化、コレステロール低減などの生理活性があるペプチドに関して、多くの研究報告がある⁷⁻¹⁰⁾。しかし、植物性タンパク質由来の多機能性ペプチドに関する報告は、抗酸化、抗炎症、癌細胞増殖阻害、コレステロール低下などの作用を兼ね備えたダイズタンパク質(アルブミン)由来のlunasin¹²⁾、ACE阻害と抗酸化の作用を兼ね備えたアサ種子由来の5種類のペプチド(WYT, WVYY, SVYT, PSLPA, およびIPAGV)¹³⁾などに限られており、また、これらのペプチドはカチオン性ではない。さらに、コメ糖タンパク質由来の生理活性ペプチドとして、抗酸化活性を有するペプチド(VAGAEDAAK, AAVVQGQVEK, GGHELK, CQHHDQWKなど)¹⁴⁾、癌細胞増殖阻害活性を有するペプチド(EQRPR)¹⁵⁾、DPP-IV阻害活性を有するジペプチド(LP, IP)¹⁶⁾などが報告されているが、いずれも単独の生理活性を示すペプチドであり、多機能性ペプチドに関する研究報告はない。

4. 2. コメ糖タンパク質酵素加水分解物から得られたカチオン性ペプチドの多機能性

本研究では、粗精製のコメ糖タンパク質から生理活性がある低分子成分を除去し、さらにペプシンで加水分解した後にもう一度、アミノ酸や低分子ペプチドを除去して、出発材料を調製した。両性担体を使用しない等電点電気泳動によって、この出発材料を分画した結果、pIが高い画分18, 19, および20が得られた。重量を基準とした3つの画分の回収率は、合計で13%であった。これらの画分からカチオン性ペプチドを精製し、同定した結果、最終的に3種類のペプチドが得られた。3種類のペプチドは*P. gingivalis*または*C. albicans*のどちらかの病原微生物に対して抗菌活性を発揮したが(図3)、*P. acnes*や*S. mutans*に対して抗菌活性を示さなかった。したがって、画分18, 19, および20(特に画分20)にはまだ同定されていない抗菌ペプチドが存在していると考えられる。今後、これらのペプチドを精製し、同定する必要がある。また、同定した3種類のペプチドは、いずれもLPS中和活性(図4)と血管新生促進活性(図5)を発揮した。

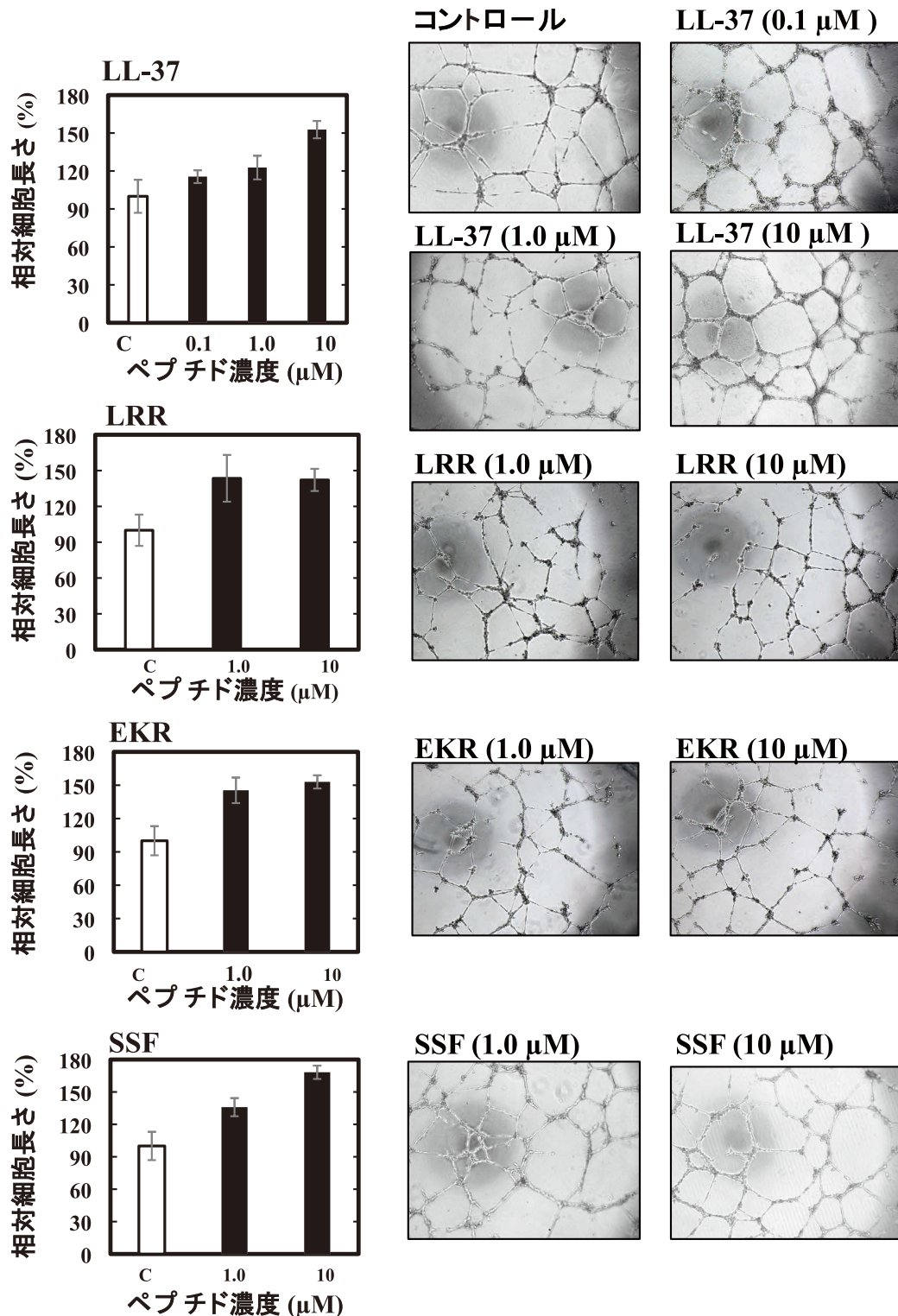


図5 同定した3種類のカチオン性ペプチドとLL-37の血管新生促進活性

4. 3. カチオン性ペプチドの多機能性とそれらの作用機構

ペプチドが抗菌活性を発揮するためには、負に荷電した微生物の細胞膜(リン脂質)と静電的な相互作用によって結合する必要がある。また、細胞膜内に入り込むか、細胞膜を通過して抗菌活性を発揮するためには、細胞膜の疎水性

部分と相互作用する必要がある。したがって、多くの抗菌ペプチドは、リジンやアルギニンを多く含み、かつ疎水性のアミノ酸を有している。すなわち、多くの抗菌ペプチドはカチオン性であり、かつ両親媒性である¹⁷⁻¹⁹⁾。一方、LPS中和活性を有する多くのペプチドは、LPSのlipid A部分(毒性の本体)と相互作用することが知られている^{20, 21)}。

このlipid Aには負に荷電したリン酸基があり、また疎水性の脂肪酸の鎖がある。そのため、抗菌活性を発揮する多くのペプチドの場合と同じように、カチオン性であり、かつ疎水性アミノ酸を有するペプチドは、lipid Aに結合してLPSの毒性を中和すると考えられる。実際、同定した3種類のペプチド(LRR, EKL, およびSSF)は、いずれもリジンやアルギニンを有し(表1)、ロイシン、トリプトファン、バリン、フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸も含んでいることから、抗菌活性とLPS中和活性を発揮したと考えられる。ペプチドの血管新生促進作用に関しては、その作用機構は完全には解明されていない。LL-37の場合には、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のレセプターに作用して、その後のシグナル伝達経路を活性化して、細胞の増殖を促進していると考えられている^{22, 23)}。本研究で同定したペプチドの血管新生促進の作用機構に関しては、現在、VEGFのレセプターの阻害剤を用いて検討を進めている。

5. 総 括

カチオン性ペプチドの各生理作用の機構を解明するためには、リジンやアルギニンをアラニンに置換した変異体、または特定のアミノ酸をアルギニンやリジン、またはロイシンやトリプトファンに置換した変異体を合成して、それらの各生理活性の変化を解析し、カチオン性アミノ酸と疎水性アミノ酸の各生理活性への寄与を解明する必要がある。

本研究において、コメ糠タンパク質加水分解物から抗菌、LPS中和、血管新生などの生理活性を有するペプチド混合物を調製することができた。今後、これらのペプチドが、ニキビ予防、シワやタルミの防止、炎症の抑制、保湿などを目的とした化粧品やスキンケア製品の素材として応用されることが期待される。また、ペプチド混合物から同定できたカチオン性ペプチドの生理活性とその作用機構を解明して、コメ糠タンパク質由来ペプチドの有用性に関する科学的な根拠を実証する必要がある。

(引用文献)

- 1) R. J. S. de Castro, H. H. Sato: Biologically active peptides: Process for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Res. Int.*, 74: 185-198, 2015.
- 2) N. B. da Cunha, N. B. Cobacho, J. F. C. Viana, L. A. Lima, K. B. O. Sampaio, S. S. M. Dohms, A. C. R. Ferreira, C. la Fuente-Núñez, F. F. Costa, O. L. Franco, S. C. Dias: The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov. Today*, 22: 234-248, 2016.
- 3) B. Mishra, S. Reiling, D. Zarena, G. Wang: Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 38: 87-96, 2017.
- 4) L.T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, 29: 464-472, 2011.
- 5) T. H. Nan, J.-K. Bang, B. Jacob, I.-S. Park, S. Y. Shin: Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37. *Peptides*, 35: 239-247, 2012.
- 6) F. Semple, J. Dorin: β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun.*, 4: 337-348, 2012.
- 7) T. A. Egorov, T. I. Odintsova, V. A. Pukhalsky, E. V. Grishin: Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26: 2064-2073, 2005.
- 8) B. P. Singh, S. Vij, S. Hati: Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54: 171-179, 2014.
- 9) C. G. Rizzello, D. Tagliazucchi, E. Babini, G. S. Rutella, D. L. T. Saa, A. Gianotti: Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *J. Funct. Foods*, 27: 549-569, 2016.
- 10) E. Maestri, M. Marmiroli, N. Marmiroli: Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *J. Proteomics*, 147: 140-155, 2016.
- 11) A. Ochiai, S. Tanaka, T. Tanaka, M. Taniguchi: Rice bran protein as a potent source of anti-melanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity. *J. Natural Products*, 79: 2545-2551, 2016.
- 12) V. K. Lule, S. Garg, S. D. Pophaly, Hitesh, S. K. Tomar: Poteintial health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. *J. Food Sci.*, 80: R485-R494, 2015.
- 13) A. T. Girgih, R. He, S. Malomo, M. Offengenden, J. Wu, R. E. Aluko: Structure and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *J. Funct. Foods*, 6: 384-394, 2014.
- 14) L. Wattanasiritham, C. Theerakulkait, S. Wickramasekara, C. S. Maier, J. F. Stevens: Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chem.*, 192: 156-162, 2016.
- 15) A. Kannan, N. S. Hettiarachchy, L. O. Lay, R. Liyanage: Human cancer cell proliferation inhibition

- by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31: 1629-1634, 2010.
- 16) T. Hatanaka, Y. Inoue, J. Arima, Y. Kumagai, H. Usaki, K. Kawakami, M. Kimura, T. Mukaiharu: Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chem.*, 134: 797-802, 2012.
 - 17) K. L. Brown, R. E. W. Hancock: Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 24-30, 2006.
 - 18) L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, 29: 464-472, 2011.
 - 19) M. Mihajlovic, T. Lazaridis: Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818: 1274-1283, 2012.
 - 20) S. Takayama, K. Hashimoto, E. Kokubu, M. Taniguchi, K. Tajima, A. Ochiai, E. Saitoh, A. Saito, K. Ishihara, T. Kato: Inhibitory effects of a novel cationic dodecapeptide [CL(14-25)] derived from cyanate lyase of rice on endotoxic activities of LPSs from *Escherichia coli* and periodontopathic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb. Pathogen.*, 94, 2-11, 2016.
 - 21) M. Taniguchi, R. Toyada, T. Sato, A. Ochiai, E. Saitoh, T. Kato, T. Tanaka: Effects of arginine- and leucine-substitutions on anti-endotoxic activity and mechanisms of action of a cationic and amphipathic antimicrobial octadecapeptide from rice α -amylase. *J. Peptide Sci.*, 23: 252-260, 2017.
 - 22) Y. Brudno, A. B. Ennet-Shepard, R. R. Che, M. Aizenberg, D. J. Mooney: Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation. *Biomaterials*, 34: 9201-9209, 2013.
 - 23) H. Tomioka, H. Nakagami, A. Tenma, Y. Saito, T. Kaga, T. Kanemori, N. Tamura, K. Tomono, Y. Kaneda, R. Morishita: New anti-microbial peptide SR-0379 accelerates wound healing via the P13 kinase/Akf/mTOR pathway. *Plos One*, 9: e92597, 2014.