

令和元年5月17日現在

機関番号：35307

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21534

研究課題名(和文) DPP-4阻害に着目した米由来ペプチドの血糖改善作用に関する研究

研究課題名(英文) Rice-derived protein hydrolysates as a source of dipeptidylpeptidase-IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes.

研究代表者

川上 賀代子 (KAWAKAMI, Kayoko)

就実大学・薬学部・助教

研究者番号：00505935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は、血糖値を低下させるインスリンの作用不足により血糖値が上がる病態であり、インスリン分泌に関与しているインクレチンを分解するDPP-4を阻害することでインスリンのコントロールが可能となる。本研究により米タンパク加水分解物が最も高いDPP-4阻害活性を示すこと、その活性成分としてIle-Proを同定した。また、膵細胞は抗酸化酵素の発現量が低く、酸化ストレスは膵細胞の細胞死を引き起こす重要な原因といわれている。米タンパク加水分解物によりラット膵細胞内の抗酸化物質であるグルタチオン量が有意に上昇し、過酸化水素による細胞傷害を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病は、膵細胞からのインスリン分泌障害により発症・進展する疾患であり、膵細胞の機能低下は2型糖尿病の発症に直結すると考えられている。本研究により、米タンパク加水分解物は日本においても新たな糖尿病治療ターゲットとなっているDPP-4阻害作用があることを明らかとした。また、米由来タンパク加水分解物は膵細胞内グルタチオンを上昇させることにより、酸化ストレスによる細胞傷害抑制効果があることを見出した。以上の結果から、米由来タンパク加水分解物はDPP-4阻害作用によるインスリン量の調節と細胞保護作用により、糖尿病予防に対して相乗的な効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)： In this study, anti-diabetic activities of rice-derived protein hydrolysates (RPH) were evaluated. RPH showed an inhibitory activity ($IC_{50} = 1.5 \pm 0.1$ mg/mL) toward dipeptidylpeptidase-IV (DPP-4) that metabolizes the insulinotropic hormone, glucagon-like peptide-1. Further, we identified that the dipeptides Ile-Pro, Met-Pro, Val-Pro, and Leu-Pro from the RPH are involved in the inhibitory activity against DPP-4. Pancreatic beta-cell dysfunction is a major feature of type 2 diabetes. Previous studies have demonstrated that high glucose can increase the accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS) that results in oxidative stress to the beta-cells. Glutathione, the most abundant intracellular antioxidant, protects cells against ROS induced oxidative stress. We demonstrated that RPH showed increasing effect of the intracellular glutathione levels and the protective effect against oxidative stress.

研究分野：食品機能学

キーワード：糖尿病 米タンパク加水分解物 DPP-4 酸化ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

日本では、米の生産力（870万トン/年）が需要量（720万トン/年）を大幅に上回り、減反や転作に莫大な費用が投じられ、生産調整が行われている（農林水産省 2012 年度食料需給表）。したがって、この過剰米の有効活用方法が待望されている。申請者のグループでは、これまで大部分が廃棄処分されていた米糠を食品用途として活用するために、含まれる有用成分を使用可能な方法で抽出し、機能的食品用途として実用化する研究を行ってきた。

世界の糖尿病人口は爆発的に増え続けており、2014 年現在で糖尿病有病者数は 3 億 8,670 万人（有病率 8.3%）に上り、有効な対策を行わないと、2035 年までに 5 億 9,190 万に増加すると予測されている（糖尿病アトラス 第 6 版 2014 UPDATE）。また、厚生労働省の 2011 年「国民健康・栄養調査」によると、日本の糖尿病有病者と予備群は約 2,050 万人と推計されており、社会問題になっているため、その予防と対策は、国民の最大の関心事のひとつである。

糖尿病とは、血糖値を低下させるホルモンであるインスリンの量的不足あるいは作用不足により、細胞へのグルコースの取り込みが低下し、その結果、血糖値が上がる病態のことをいう。そのため、糖尿病の予防や改善には、インスリンのコントロール、即ち、血糖値を適切にコントロールすることが重要である。インスリン分泌には消化管で産生されるインクレチンというホルモンが大きく寄与しており、このインクレチンは Dipeptidyl Peptidase-IV（DPP-4）という酵素によって速やかに分解される。すなわち、DPP-4 を阻害することにより血糖値のコントロールが可能となるため、DPP-4 阻害剤は 2009 年から日本においても新たな糖尿病治療薬として用いられている。

我々のグループでは、ヒト DPP-4 リコンビナントをメタノール資化性酵母に発現させ、DPP-4 阻害の評価系を確立しており、食品成分から、DPP-4 阻害作用をもつ成分を探索した。その結果、コラーゲン由来ペプチドや米糠由来ペプチドに DPP-4 作用があることを発見し、活性成分を同定した（*Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **6**, 823-828. (2014)、*Food Chemistry*, **134**, 797-802. (2012)）。また、米関連製品をスクリーニングした結果、米由来ペプチドに DPP-4 阻害活性があることを明らかにしている。

前述の通り、米由来ペプチドに DPP-4 阻害作用があることを確認しているが、その活性成分の同定には至っていない。また、米は加工方法により、玄米、発芽玄米、白米など様々な形態が考えられるが、DPP-4 阻害作用を示す成分が最も含まれている形態についても明らかとなっていない。

これまで DPP-4 阻害作用をもつ食品成分として、海藻・茶類・クルミ・ザクロ・ブドウ種子・黄杞葉・カカオ・ブドウ新芽・グアバ・生コーヒー豆・コタラヒムブツ・タマリンドの各抽出物（特開 2010-13423）、食肉の乳酸菌発酵物（日本畜産学会大会要旨, 107, 135, (2007)）、熟成ナチュラルチーズ成分中のペプチド（*Milk Science*, **55**, 91-92, (2006)）などが報告されている。また、米の血糖改善作用に関しては、米糠・胚乳ペプチドがインクレチンの一種である Glucagon-like peptide-1（GLP-1）の分泌を促進するという報告（*Food & Function*, **6**, 2525-2534. (2015)）があるが、米由来ペプチドの DPP-4 阻害活性成分に関してはまだ明らかとなっていない。

また、2 型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌障害により発症・進展する疾患であり、β細胞の機能低下は 2 型糖尿病の発症に直結すると考えられている。β細胞は抗酸化酵素の発現量が低く、酸化ストレスはβ細胞の細胞死を引き起こす重要な原因といわれている。生体内で産生される抗酸化物質であるグルタチオンは、酸化ストレスに対する防御をはじめ、様々な生理作用を有している。我々は、これまでに米由来タンパク加水分解物にヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞内グルタチオン量上昇作用があることを明らかにしてきた。しかし、β細胞でのグルタチオン上昇作用は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、余剰米の有効活用方法として、米由来タンパクの酵素分解ペプチドの血糖改善に関わる機能について、DPP-4 阻害作用および細胞内グルタチオン上昇作用を指標として評価を行い、最終的には、米由来の機能的食品素材の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 米タンパク加水分解物の調製

米タンパク 2 g を蒸留水 40 mL で懸濁し、pH を 5 N NaOH により pH 7 に調整した。懸濁液に食品加工用の酵素（ウマミザイム G、デナチーム AP あるいはビオブラーゼ SP）を添加し 40 °C、750 rpm、15 hr 反応させた。その後、80°C、30 min 加熱を行い、遠心分離（2000×g、20 min、4 °C）し、得られた上清を凍結乾燥して米タンパク加水分解物を得た。調製したタンパク加水分解物はゲルろ過カラムにより分析を行い、酵素分解物が生成しているか確認した。また、比較対照として酒粕、米糠および大豆タンパクを同様に処理し、加水分解物を調製した。

(2) DPP-4 阻害作用の評価

DPP-4 はメタノール資化性酵母（*Pichia pastoris* KM71H）にヒト腎臓由来 DPP-4 遺伝子を菌体外発現ベクターに組み込み形質転換を行った。メタノール資化性酵母を 1%メタノールを添加し誘導をかけながら 3 日間培養し、その培養上清を硫酸沈殿後、透析して酵素液とした。

阻害活性は米由来タンパク加水分解物に基質として Ala-Pro-pNA を添加し、37 度でプレインキュベートした。その後、DPP-4 酵素液を添加し、経時的に 405 nm の吸光度を測定した。調製した米タンパク加水分解物を 0–10000 µg/mL の濃度で添加して 50 % 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

(3) 細胞内グルタチオン上昇作用の測定

ラット膵β細胞由来 INS-1E 細胞を 3×10⁵ cell/6 well plate に播種した。48 時間培養後、各タンパク加水分解物を 2 mg/mL になるように添加した。試料を添加していないものを control とした。24 時間後に細胞を回収し、除タンパク後に全グルタチオン(還元型+酸化型)量を DTNB 法を用いて測定した。細胞抽出液のタンパク量を測定し、タンパクあたりのグルタチオン量を算出した。

(4) 細胞傷害抑制作用の評価

INS-1E 細胞を 2×10⁴ cell/96 well plate に播種した。48 時間培養後、各タンパク加水分解物を 0、0.5、1、2、4 mg/mL になるように添加した。酸化ストレスとして過酸化水素を 200 または 300 µM 添加し、24 時間培養後、MTT 法により細胞生存率を算出した。

(5) 活性成分の分画

米タンパク加水分解物をミリ Q 水に再溶解し、Sep-Pak C18 35 cc Vac Cartridge (日本ウオーターズ) に供した。0%アセトニトリル (ミリ Q 水)、2.5%アセトニトリル、5%アセトニトリル、10%アセトニトリル、40%アセトニトリルで溶出させた。各溶出液は凍結乾燥または減圧濃縮して試料とした。また、活性の見られた画分は逆相 HPLC により再分画し、LC-MS および MALDI-TOF-MS により構成アミノ酸残基を決定した。

4. 研究成果

(1) 米タンパク加水分解物の DPP-4 阻害活性

米タンパクおよび酒粕/デナチム加水分解物、米ぬか/ウマミザイム G およびバイオプラゼ SP 消化ペプチドの DPP-4 活性に対する IC₅₀ (mg/mL) は、それぞれ 1.5±0.1、27.6±5.8、2.3±0.1、26.4±2.3 であり、米タンパク/デナチム加水分解物が最も高い阻害活性を示した (Table 1)。米タンパク/デナチム加水分解物を、ゲルろ過カラム (Superdex peptide) を用いて分析した結果、その最大分子量は、約 150 であった (Fig.1)。

Table 1 各種タンパク加水分解物の DPP-4 阻害活性(平均±SD、n=3)

	DPP-4阻害活性 (IC ₅₀ mg/mL)
米/デナチム	1.5 ± 0.1
酒粕/デナチム	27.6 ± 5.8
米ぬか/ウマミザイム	2.3 ± 0.1
米ぬか/バイオプラゼ	26.4 ± 2.3
コラーゲン由来ペプチド	1.6 ± 0.03

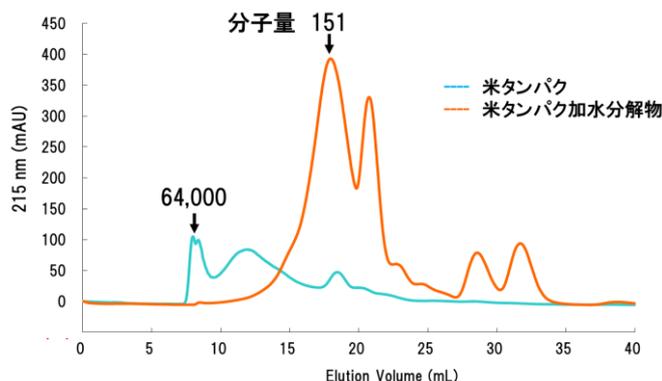


Fig.1 米タンパク加水分解物の分子量分布

(2) 米タンパク加水分解物の DPP-4 阻害活性成分の同定

DPP-4 阻害活性の認められた米タンパク/デナチム加水分解物をゲルろ過カラムや透析膜によって分画し、活性成分の同定を試みた。LC-MS 分析したところ、プロリン含有ジペプチドである Met-Pro (分子量 247)、Val-Pro (分子量 215)、Leu-Pro および Ile-Pro (いずれも分子量 229) が検出された。また、米タンパク/デナチム加水分解物中の Met-Pro、Val-Pro、Leu-Pro、Ile-Pro 含有量はそれぞれ 1.2、0.2、1.6、1.9 µg/mg であった。そこで市販の Xaa-Pro ジペプチド 15 種類について、DPP-4 阻害活性を検討した。その結果、15 種類の中で、最も強い阻害活性を示すものは、Ile-Pro であり、その IC₅₀ 値は、0.41±0.07 mM であった。また、そのレトロペプチドである Pro-Ile は、DPP-4 に対して、まったく阻害活性を示さないことが明らかとなった。

(3) 米タンパク加水分解物の細胞内グルタチオン上昇作用

酒粕や大豆タンパクの加水分解物では細胞内グルタチオン量の上昇が見られなかったが、米タンパク加水分解物により上昇した (Fig.2)。中でも米タンパク/デナチム AP 加水分解物を添加することにより濃度依存的に上昇し、終濃度 4 mg/mL でコントロールに比べ 1.9 倍に有意に上昇した (Fig.3)。過酸化水素による酸化ストレス細胞傷害抑制効果を調べた結果、米タンパク/デナチム AP 加水分解物により濃度依存的に細胞傷害の抑制がみられた (Fig.4)。以上

の結果から、細胞内グルタチオンを上昇させることにより、酸化ストレスによる細胞傷害の抑制効果があることが示唆された。

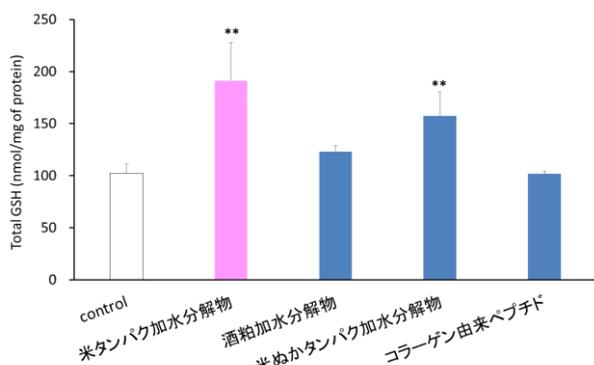


Fig.2 各種タンパク加水分解物の細胞内グルタチオン上昇活性(n=3、平均±SD、** $p<0.01$ vs. control)

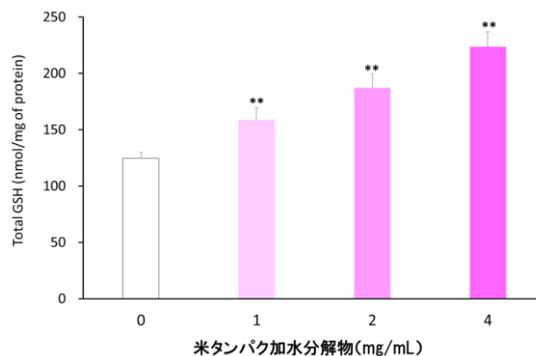


Fig.3 米タンパク加水分解物の細胞内グルタチオン上昇活性(n=3、平均±SD、** $p<0.01$ vs. control)

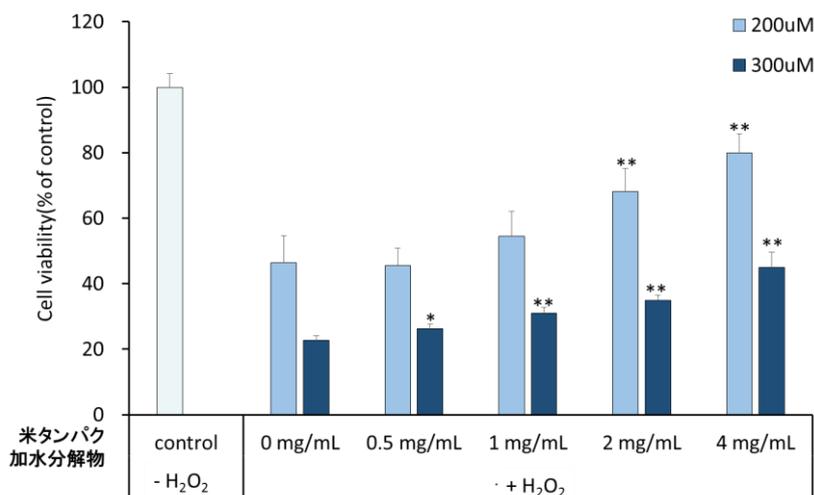


Fig.4 米タンパク加水分解物の細胞傷害抑制作用(n=8、平均±SD、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ vs. 0 mg/mL)

(4) 米タンパク加水分解物の細胞内グルタチオン上昇活性成分の同定

米タンパク加水分解物を逆相カラム (Sep-Pak C18) に供し、5つの画分に分画し、細胞内グルタチオン上昇活性を調べた結果、40%アセトニトリル溶出画分が最もグルタチオン量を上昇させることが明らかとなった (Fig.5)。さらに逆相 HPLC で分画を行ないフラクション (Fr.) 3 から Fr.8 について細胞内グルタチオン上昇活性を調べた結果、Fr.8 に活性が認められた (Fig.6)。さらに、LC-MS および MALDI-TOF-MS により 3つの候補ペプチドを同定し、6または8個の疎水性アミノ酸を多く含むペプチドであり、DPP-4 阻害活性を有するジペプチドとは異なることが明らかとなった。

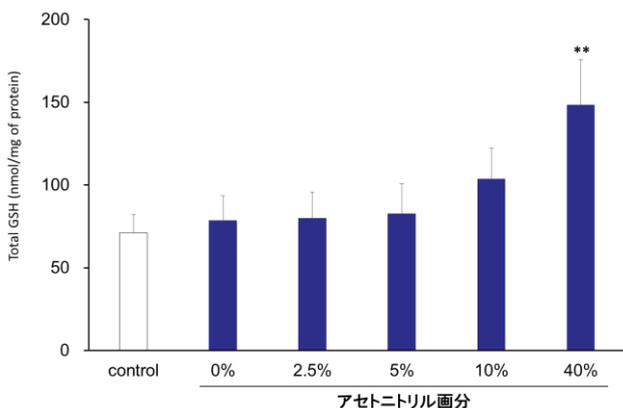


Fig.5 各画分の細胞内グルタチオン上昇活性(n=3、平均±SD、** $p<0.01$ vs. control)

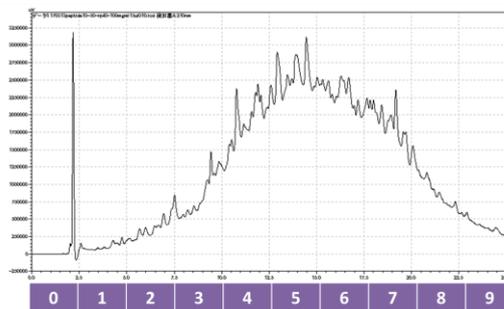


Fig.6 40%アセトニトリル溶出画分のクロマトグラム

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計7件)

- ①川上賀代子、加藤春華、垣内紗恵子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二、酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇による酸化ストレス軽減作用について、第89回日本生化学会大会、2016
- ②川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二、米由来タンパク加水分解物のジペプチジルペプチダーゼ-4阻害作用、日本農芸化学会2017年度大会、2017
- ③川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、藤田明子、川上晃司、坪井誠二、米タンパク加水分解物の細胞内グルタチオン上昇による細胞傷害抑制作用、第71回日本栄養・食糧学会、2017
- ④川上賀代子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、洲崎悦子、花房満、畑中唯史、坪井誠二、酒粕加水分解物の肝障害保護作用機序の解析、第70回日本酸化ストレス学会2017
- ⑤川上賀代子、大塚友貴、大西亜沙美、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、下田博司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二、オリザペプチド-P60のアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017
- ⑥川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、藤田明子、川上晃司、洲崎悦子、坪井誠二、米由来タンパク加水分解物の肝障害保護作用、日本薬学会第138年会、2018
- ⑦川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、藤田明子、川上晃司、加地弘明、小野浩重、坪井誠二、米由来タンパク加水分解物の膵β細胞保護作用、第91回日本生化学会大会、2018

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。