

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11090

研究課題名(和文) 発酵乳ホエーより単離したメラトニン合成を促進するペプチドの作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function mechanism of peptides that promote melatonin synthesis isolated from fermented whey

研究代表者

坪井 誠二 (Tsuboi, Seiji)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：50172052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：メラトニンは概日リズムを司る松果体ホルモンである。メラトニンの生合成は複雑に制御されているが、その中心は律速酵素であるserotonin N-acetyltransferase (NAT)を介したものである。以前より我々は、細胞内グルタチオンを介するNATの分子内-S-S-結合の変換による新しい制御機能を明らかにした。本研究により、COS7/NAT細胞に於いて、発酵乳ホエーにより細胞内グルタチオン量が上昇し、NAT活性が上昇すること、また、NAT活性を上昇させる9種類のペプチドを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠は、人が生存する上で衣食住とともに重要な課題である。睡眠不足の原因の一つとしては、脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。我々は、メラトニン生合成の律速酵素であるserotonin N-acetyltransferase (NAT)について研究を行っている。本研究により、発酵乳ホエーよりNAT制御・メラトニン量上昇・良質の睡眠確保する物質9種類のペプチドを同定した。その成果を社会に生かし、科学的根拠に基づく生活の質の向上へとつながる全く新しい機能性食品産業の創出が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Melatonin is a highly lipophilic hormone in pineal glands and plays important roles in many biological processes, especially in circadian rhythm and seasonal reproduction. Serotonin N-acetyltransferase (NAT) is a key enzyme for melatonin synthesis. We demonstrated that novel regulation of NAT activity by glutathione, in which an intramolecular disulfide bond may function as a switch for catalysis. In this study, fermented whey increased the intracellular glutathione level and NAT activity in COS7/NAT cells, and 9 types of peptides that increased NAT activity were identified from fermented whey.

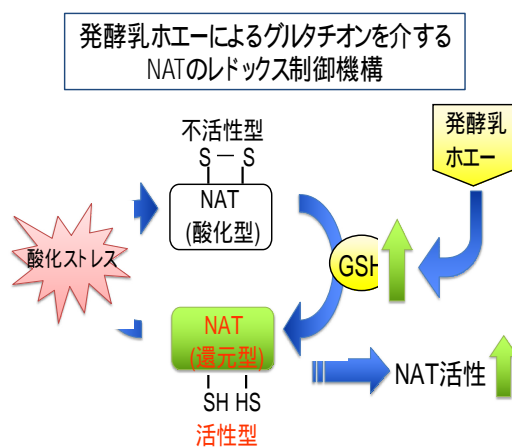
研究分野：生化学

キーワード：グルタチオン 発酵乳ホエー メラトニン合成酵素 メラトニン

1. 研究開始当初の背景

睡眠は、人が生存する上で衣食住とともに重要な課題である。不眠に悩んでいる現代人は多く、鬱病をはじめとする自律神経性の疾患や、睡眠不足に起因するあらゆる疾患の原因となっている。睡眠不足の原因は、不規則な生活様式を強いられることで、睡眠異常等の概日リズム障害や、その要因のひとつとして考えられる、脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。

申請者等は、睡眠ホルモンであるメラトニンを作り出す酵素セロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) 活性が、内因性トリペプチドであるグルタチオンによってレドックス制御を受けることを明らかにした (S. Tsuboi et al. J. Biol. Chem. 277(46):44229-44235 (2002)). これまでの研究により、NAT 活性の上昇は、NAT 分子に内在されているジスルフィド結合による分子スイッチと細胞内のレドックス状態が関係していると考えられる (S. Tsuboi et al. J. Biol. Chem. 2002). 即ち、NAT の 2 つのシステイン残基の間で形成される分子内-SS-結合が活性に重要な働きをしており、この NAT の分子内-SH/-SS-結合の変化が細胞内においても観察されている。過酸化水素を加えて細胞内環境を酸化状態にすると NAT は酸化型 (SS 型) に変換され活性はなくなるが、細胞内環境を還元状態に戻すと NAT は還元型 (SH 型) となり活性は回復する。NAT の酸化型または還元型への変換に細胞内グルタチオンが重要な役割を担っており、細胞内グルタチオン量の変動が NAT 活性を調節している。また、乳酸菌による発酵乳ホエーをラットに与えることにより、内因性メラトニン分泌リズムの位相調整又は振幅増強作用があることをみだしている (特許：特願 2004-106153 「内因性メラトニン分泌リズム改善用機能性食品、及び概日リズム改善用機能性食品」)。この作用は、発酵乳ホエー成分が細胞内グルタチオンレベルを上昇させ、メラトニン合成の律速酵素である NAT 活性を増強させていることによっていると考えている (坪井ら、化学と生物 43(4):251-255(2005)). さらに、この発酵乳ホエーの快眠誘導効果は、大阪大学医学研究科精神医学教室・杉田教授らによって、健康な高齢者 30 名を対象とした、ダブルブラインド・クロスオーバー試験によって、寝覚めの回数減少や寝とぼけ行動・足のむずむず感の減少が確認されている。



2. 研究の目的

本研究では、発酵乳ホエーに含まれるグルタチオン上昇作用を有するペプチドを単離し、NAT 活性への影響を明らかにすること、及び、最終的には発酵乳ホエー由来の機能性食品素材の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発酵乳ホエーの調製

発酵乳ホエーは限外濾過法により分子量 1 万以下の画分を使用した。

(2) 細胞の調製

COA7 細胞に NAT を強制発現させた COS7 細胞 (COS7/NAT 細胞) を、 1.5×10^5

cells/2 ml (DMEM)で6穴プレートに播種した。48時間培養後、発酵乳ホエーを添加し、24時間後細胞を回収した。過酸化水素付加処理では、発酵乳ホエー処理後、1 mM H₂O₂ 添加培地に交換し30分間処理した。回収した細胞について、細胞内グルタチオン量及びNAT活性を測定した。

(3) グルタチオン測定

過塩素酸で除タンパク後、全グルタチオン (GSH + GSSG) 量をDTNB法によりグルタチオンを測定した。GSHとGSSGの分別定量は次のように行った。過酸化水素で除タンパクしたサンプルに4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (ABD-F)を添加し、GSHを誘導体化した。その後、tri-*n*-butylphosphineによりGSSGを還元した後、4-fluoro-7-sulfobenzofurazan, ammonium salt (SBD-F)を加え誘導体化し、HPLCを用いて測定した。

(4) NAT活性測定

細胞をホモジナイズした後、15,000 rpm、10分、4℃で遠心した。上清に15 mM acetyl-CoA及び20 mM tryptaminを加え37℃、15分反応させた。Acidified tolueneを加え反応を停止した後、生成した*N*-acetyltryptamineをHPLCにより測定しNAT活性とした。

(5) 活性成分の分画

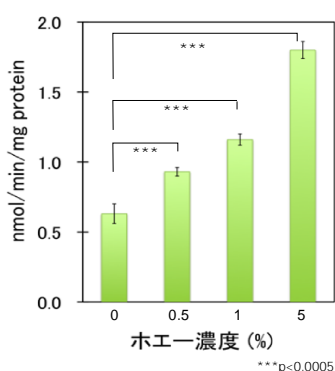
発酵乳ホエー分子量1万以下画分を凍結乾燥し、C18逆相カラムを用いてHPLCによる分離を行い、得られたフラクションを蒸発乾固させた。各フラクションを培地に溶解し細胞に添加した。

4. 研究成果

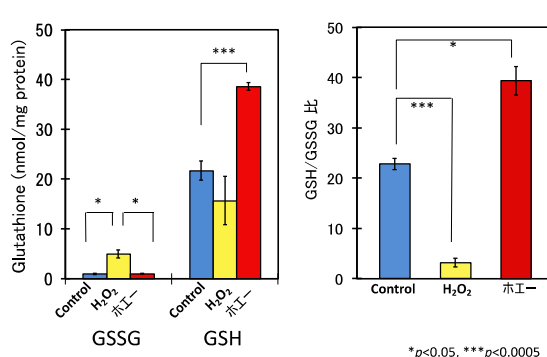
(1) NAT活性及び細胞内グルタチオン量に対する影響

発酵乳ホエーを、0.5%、1%及び5%の濃度で添加した結果、濃度依存的にNAT活性の上昇がみられた。5%添加時ではコントロールに比べて約3倍に上昇した。また、発酵乳ホエーを5%濃度添加した場合、細胞内GSH量はコントロールに比べて約1.75倍に上昇した。過酸化水素付加処理では、細胞内GSH/GSSG比はコントロールに比べ約12.5%に減少し、細胞内が酸化状態になっていることが明らかとなった。しかし、5%濃度発酵乳ホエーの添加により、GSH/GSSG比はコントロールの約2倍となり還元状態が維持されていることが示唆された。

発酵乳ホエーのNAT活性に対する影響



発酵乳ホエーの細胞内グルタチオン量に対する影響

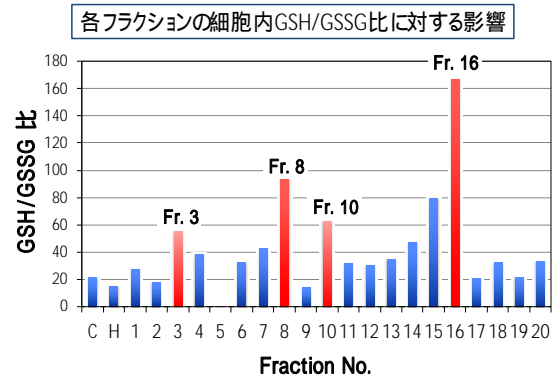
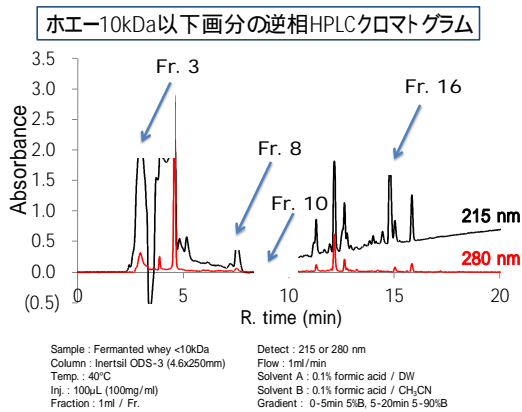


(2) 発酵乳ホエーよりNAT活性化ペプチドの同定

➤ HPLCによる活性フラクションの分離

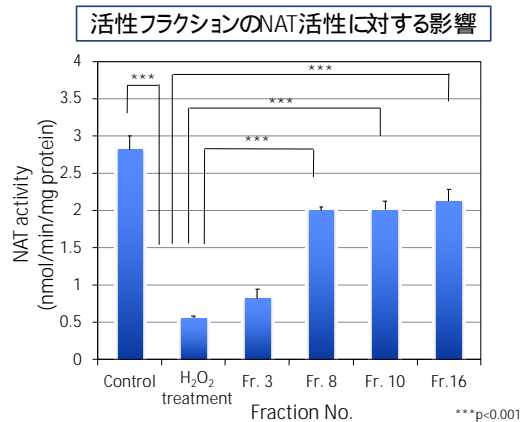
発酵乳ホエー分子量10 kDa以下画分を凍結乾燥し、C18逆相カラム (Inertsil ODS-

3、4.6 x 250) を用いて HPLC により分離した。得られたフラクションについて細胞内 GSH/GSSG 比に対する影響について検討した。その結果、Fr. 3、Fr. 8、Fr. 10 及び Fr. 16 について細胞内 GSH/GSSG 比の上昇がみられ、各々、コントロールに比べ 2.9 倍、4.5 倍、3.1 倍、8.4 倍であった。



➤ NAT 活性への影響

Fr. 3、Fr. 8、Fr. 10 及び Fr. 16 について NAT 活性への影響について検討した。過酸化水素付加処理により NAT 活性は 0.5 nmol/min/mg protein (コントロール : 2.75 nmol/min/mg protein) まで低下した。しかし、Fr. 8、Fr. 10 及び Fr. 16 の前処理により NAT 活性は、各々、1.98 nmol/min/mg protein、2.0 nmol/min/mg protein、2.15 nmol/min/mg protein となり 73% 活性が維持された。しかし、Fr. 3 にはこの様な活性維持は見られなかった。



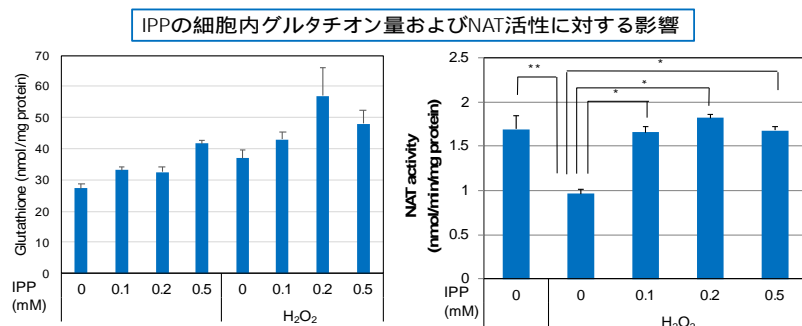
➤ 活性ペプチドの同定

Fr. 8、Fr. 10 及び Fr. 16 について MALDI-TOF-MS を行い、9 種類のペプチドを同定した。

(3) 同定したペプチドの NAT 活性及び細胞内グルタチオン量に対する影響

体内への吸収の可能性から同定したペプチドのうち分子量の小さい VPP、IPP を中心に解析を行った。まずグルタチオン上昇作用を検討したところ VPP に比べ IPP での上昇作用が顕著であり、500 µM 添加でコントロールの約 1.5 倍、過酸化水素処理を加えることで約 1.8 倍に上昇した。グルタチオン代謝に関連する酵素の発現について検討したところ、グルタチ

オン還元酵素は上昇傾向にあったが、グルタチオン合成の律速酵素である γ-グルタミルシステイン合成酵素やシステイン取り込み系の発現は誘



導されておらず、上昇メカニズムについては今後の検討が必要である。

続いて NAT 活性への影響を検討したところ、過酸化水素処理でコントロールの約 6 割となった活性は IPP 処理によりコントロールレベルに維持され、過酸化水素処理による不活性化が抑制された。

5. 主な発表論文等

【発表論文】

- 1) Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Akiko Fujita, Koji Kawakami, Hiroshi Shimoda, Tadashi Hatanaka, Seiji Tsuboi : Isolation of activating factors of serotonin N-acetyltransferase from rice peptides, *Journal of Functional Foods*, 41, 148-154 (2018).
- 2) 守谷智恵, 川上賀代子, 坪井誠二:天然物由来の Nrf2 活性化因子, *就実大学薬学雑誌*, 6, 8-16 (2019).
- 3) Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Hiroshi Shimoda, Tadashi Hatanaka, Etsuko Suzaki, Seiji Tsuboi: Protective Effects of Rice Peptide Oryza Peptide-P60 against Oxidative Injury through Activation of Nrf2 Signaling Pathway *In Vitro* and *In Vivo*, *ACS Omega*, 5, 13096-13107 (2020).
- 4) Kayoko Kawakami, Chie Moritani, Tadashi Hatanaka, Etsuko Suzaki, Seiji Tsuboi: Hepatoprotective Activity of Yellow Chinese Chive against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury via Nrf2 Signaling Pathway, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 66, 357-363 (2020).

【学会発表】

- 1) 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(金沢), 3 月 26 日.(ポスター)
- 2) 守谷智恵, 川上賀代子, 兼信実佳, 佐藤 泉, 藤田明子, 川上晃司, 下田博司, 畑中唯史, 坪井誠二:白オリザペプチド-P60 による Nrf2 経路活性化とそのメカニズムの解析. 日本薬学会第 138 年会(金沢), 3 月 26 日.(ポスター)
- 3) 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 細胞保護作用. 第 91 回日本生化学会大会(京都). 9 月 26 日(ポスター)
- 4) 守谷智恵, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 下田博司, 畑中唯史, 坪井誠二:白米由来ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素活性化作用. 第 91 回日本生化学会大会(京都). 9 月 26 日(ポスター)
- 5) 川上賀代子, 三原夏実, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二:黄ニラ抽出物の抗酸化作用メカニズムの解析. 第 92 回日本生化学会大会(神奈川). 9 月 20 日(ポスター)
- 6) 守谷智恵, 橋本果奈, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二:米ぬか由来ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素活性化作用およびそのメカニズムの解析. 第 92 回日本生化学会大会(神奈川). 9 月 20 日(ポスター)
- 7) 守谷智恵, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二:米ぬか由来ペプチドによる睡眠ホルモン合成酵素活性化作用のメカニズムの解析. 日本薬学会第 140 年会.(Web 要旨)
- 8) 川上賀代子, 守谷智恵, 植田 輝義, 畑中唯史, 坪井誠二:黄ニラ抽出物による睡眠ホルモン合成酵素の活性化. 第 93 回日本生化学会大会(オンライン). 9 月 14-16 日(ポスター)
- 9) 守谷智恵, 川上賀代子, 戸羽 光世, 平本 和義, 畑中唯史, 坪井誠二:米タンパク加水分解物のグルタチオン上昇作用における Keap1-Nrf2 経路の関与. 第 93 回日本生化学会大会(オンライン). 9 月 14-16 日(ポスター)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 守谷智恵, 川上賀代子, 坪井誠二	4. 巻 6
2. 論文標題 天然物由来の Nrf2 活性化因子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 就実大学薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 川上賀代子, 松尾泉里, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二	4. 巻 5
2. 論文標題 岡山県産黄ニラの抗酸化活性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 就実大学薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Akiko Fujita, Koji Kawakami, Hiroshi Shimoda, Tadashi Hatanaka, Seiji Tsuboi	4. 巻 41
2. 論文標題 Isolation of activating factors of serotonin N-acetyltransferase from rice peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 148-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 守谷智恵, 川上賀代子, 坪井誠二	4. 巻 6
2. 論文標題 天然物由来のNrf2活性化因子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 就実大学薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本果奈, 秋山智哉, 川上賀代子, 守谷智恵, 藤田 明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 米ぬか由来ペプチドの細胞内グルタチオン上昇作用を介した睡眠ホルモン合成酵素の活性化について
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野牧歩, 川上賀代子, 植田友香, 守谷智恵, 畑中唯史, 洲崎悦子, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物のアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月あやめ, 青木美磨, 守谷智恵, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 下田博司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 オリザペプチド-P60の抗酸化作用と細胞傷害抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱田帆野佳, 守谷智恵, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 PC12細胞における米由来ペプチドのグルタチオン上昇作用と細胞傷害抑制効果について
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上賀代子, 新崎由樹, 守谷智恵, 花房 満, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守谷智恵, 望月あやめ, 川上賀代子, 下田博司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 白米ペプチドはNrf2の活性化を介して細胞傷害を抑制する
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上賀代子, 三原夏実, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 岡山県産農産物の抗酸化活性
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上賀代子, 三原夏実, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物の抗酸化作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守谷智恵, 橋本果奈, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 米ぬか由来ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素活性化作用およびそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上賀代子, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物の細胞内グルタチオン上昇作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 米由来タンパク加水分解物の肝障害保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友國綾香, 守谷智恵, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 米由来ペプチドのグルタチオン上昇作用におけるNrf2経路の関与
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山智哉, 川上賀代子, 守谷智恵, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史
2. 発表標題 ぬか由来ペプチドの細胞内グルタチオン量上昇作用を介した睡眠ホルモン合成酵素の活性化
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守谷智恵, 川上賀代子, 兼信実佳, 佐藤 泉, 藤田明子, 川上晃司, 下田博司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 白オリザペプチド-P60によるNrf2経路活性化とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 岡山県産黄ニラの抗酸化作用
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 米由来タンパク加水分解物の胨 細胞保護作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守谷智恵, 川上賀代子, 藤田明子, 川上晃司, 下田博司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 白米由来ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素活性化作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友國綾香, 守谷智恵, 川上賀代子, 戸羽光世, 平本和義, 藤田明子, 川上晃司, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 米由来ペプチドの抗酸化作用と酸化ストレス防御に関わるKeap1-Nrf2経路の関与
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	川上 賀代子 (Kawakami Kayoko) (00505935)	就実大学・薬学部・助教 (35307)	
研究 分担者	守谷 智恵 (Moritani Chie) (60253001)	就実大学・薬学部・教授 (35307)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------