

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380071

研究課題名（和文）

消化管ホルモン分泌を介して食欲や血糖をコントロールする抗肥満食品ペプチドの開発

研究課題名（英文）

Development of anti-obese dietary peptides which functions via gut hormone secretion

研究代表者

原 博 (HARA HIROSHI)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70198894

研究成果の概要(和文):種々の食品ペプチドの中から、食欲を抑制する消化管ホルモン CCK の分泌を促進するふじ豆ペプチド、ビール酵母ペプチドを見出し、ビール酵母ペプチドをラットに経口投与することでその後の食欲が抑制されることが確認された。また、インスリン分泌を促進する消化管ホルモン GLP-1 の分泌を刺激するトウモロコシペプチドを見出した。これをラット回腸に投与することで、GLP-1 分泌が促進され、インスリン分泌促進を介して血糖上昇が抑制されることを示し、食品ペプチドによる消化管ホルモン分泌を介した食欲抑制、血糖上昇抑制が実現された。

研究成果の概要(英文): From various dietary peptides, we found that country bean peptide and beer yeast peptide have potent activity to stimulate a satiating gut hormone CCK in enteroendocrine cell line. Oral preload of beer yeast peptide reduced following food consumption in rats. We also found that a hydrolysate prepared from corn protein Zein stimulates another gut hormone GLP-1. Ileal administration of Zein hydrolysate strongly induced GLP-1 secretion and subsequent insulin secretion in awake rats, which results in the improvement of glucose tolerance. These findings have revealed that dietary peptides are promising factor for prevention of overeating and hyperglycemia via stimulating gut hormone secretions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：消化管ホルモン、血糖値、Glucagon-like peptide-1、コレシストキニン、食品ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

増加の一途をたどる肥満は、メタボリックシンドロームの主要素であり、生活習慣病の発祥と深く関わっている。成人だけではなく、

米国においては30%以上(USA today)、英国においては20%以上(BBC)の子供が過体重との報告もあり、肥満の予防と改善は先進諸国において大きな課題である。肥満の防止、

改善には、摂取カロリーのコントロールが効果的なことは明らかであり、本研究においては、経口投与により消化管ホルモン分泌を促進し、その活性を介して食欲、血糖値をコントロールできる食品ペプチドの開発を目的とし、肥満や糖尿病の予防、改善への新たなアプローチの開拓を目指した。

食事摂取により消化管の内分泌細胞より分泌されるホルモン（消化管ホルモン）のうち、食欲を促進する Ghrelin、食欲を抑制する Cholecystokinin (CCK)、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)、Peptide-YY (PYY)などが知られている。CCK は、上部消化管に分布する I-cell と呼ばれる消化管内分泌細胞において産生され、消化管腔内に流入したたんぱく質、ペプチド、脂肪酸により分泌が刺激される。一方 GLP-1 は、下部消化管に分布する L-cell と呼ばれる内分泌細胞で産生され、グルコースや脂肪酸、たんぱく質により分泌が刺激される。グルコース、脂肪酸によるこれらのホルモン分泌のメカニズムが近年明らかになりつつあるが、食品たんぱく質、ペプチドによる分泌機構は明らかではない。

これら消化管ホルモンの作用に関する研究は国内外で盛んに行われているが、その分泌を食品ペプチドでコントロールする研究に着手しているのは、申請者のみである。

食品ペプチドによる CCK 分泌に関するこれまでの研究により、大豆たんぱく由来の  $\beta$  コングリシニンペプチドが、ラットにおいて消化管からの CCK 分泌を介して、摂食量を低下させることが見出された。消化管内分泌細胞株を用いた試験により、CCK 産生細胞が  $\beta$  コングリシニンペプチドを直接認識して、CCK 放出を刺激することが明らかとなり、さらにヒト試験において、 $\beta$  コングリシニンペプチドが大豆ペプチドよりも強く満腹感を誘導し、空腹感を抑制することを見出した。

## 2. 研究の目的

CCK 産生細胞(I-cell)は主に上部消化管に分布することから、経口摂取したペプチドによる CCK 分泌は一過性で、それに伴う満腹感誘導も一過性である。GLP-1 産生細胞(L-cell)は、下部消化管に多く分布し、食品ペプチドでも GLP-1 分泌が刺激されるという報告があることから、下部まで到達したペプチドにより、この細胞からの GLP-1 分泌を活性化することで、CCK と併せて持続性あるいは相加、相乗性のある満腹感誘導が可能になると考えられる。GLP-1 は、食欲抑制の他に、グルコース依存性のインスリン分泌を促進するインクレチンとしての作用が知られており、そのアナログが糖尿病治療薬として実用化されつつある。本研究においては、CCK、GLP-1 の分泌を刺激できる食品ペ

チドを新たに見出し、これらの経口摂取により、満腹感誘導、インスリン分泌コントロールを可能とすることでこれまでの研究をさらに発展させることを目指した。

ペプチドが下部消化管まで達するには管腔内プロテアーゼから分解されにくいことが望まれ、消化性も考慮に入れたペプチドの探索が必要である。本研究においては、難消化性のたんぱく質（穀類のプロラミン、大豆の難消化性たんぱく）を含む種々の素材からペプチドを調製し、培養細胞を用いたスクリーニングにより活性の高い食品ペプチドを検索し、動物個体レベルでの作用を検討した。活性の高いペプチドについては、どのような構造、フラグメントが活性本体であるかについても検討を行い、消化管内分泌細胞における食品ペプチド認識機構の解明も目的とした。

## 3. 研究の方法

### <食品ペプチドの調製>

種々の食品たんぱく質より、プロテアーゼ分解によりペプチドを調製した。基質として豆類、食肉、乳タンパクなどの一般的食品たんぱく質に加え、大豆、トウモロコシ、米由来の難消化性のたんぱく質も用いた。その分解にはペプシン、トリプシンなどとともに、消化管には存在しない食品加工用のプロテアーゼ（パパイン、ブロメラインなど）も用いた。

### <各種食品ペプチドの消化管ホルモン放出活性の測定>

マウス十二指腸由来の CCK 産生細胞株 STC-1 およびマウス大腸由来 GLP-1 産生細胞株 GLUtag を用い、これら消化管ホルモンの分泌を強く刺激する食品ペプチドを探索した。

### <活性成分の濃縮、精製>

CCK、GLP-1 分泌活性の見出されたペプチドについて、種々のイオン交換や逆相クロマトグラフィーなどにより分画、分取した。活性の評価には上記の培養細胞を用いた。

### <ラットにおけるペプチドの作用解析>

培養細胞を用いたスクリーニングにより GLP-1 分泌活性が見られたペプチドについて、ラットにおいてもその活性が見られるかをまず麻酔下のラットにて検討した。任意の腸管部位に結紮ループを作成し、門脈にカテーテルを留置した。サンプルを結紮ループ内に注入後、経時的に門脈血を採取し、血漿中の GLP-1 濃度を ELISA により測定した。

投与部位を変える（上部、下部消化管）ことで応答に変化があるかを観察し、また、微細な腸間膜静脈へのカニューレーション技術を確認し、各腸管部位での局所的な GLP-1 分泌応答を観察した。

### <ラットにおける食欲、耐糖能への影響>

分泌された CCK、GLP-1 の効果を解析するため、正常ラットにおいて、ペプチド投与による摂食量、血中インスリン濃度、血糖値などの変化を観察した。GLP-1 は Gastric insulinotrophic polypeptide (GIP) とともにインクレチンと呼ばれるが、この効果を検討するため、グルコースの腹腔内投与後の血糖値を比較した。これらの試験において、サンプルの投与量、投与のタイミング、持続性、作用部位などを検討した。

#### 4. 研究成果

< 食欲抑制作用を有する消化管ホルモンコレシストキニン (CCK) の分泌を刺激する食品ペプチドの探索 >

種々の豆よりペプシン分解物を調製し、CCK 産生消化管内分泌細胞株 STC-1 からの CCK 分泌活性を調べた。その結果、ふじ豆 (*Dolichos lab lab*) ペプトンが、これまで当研究グループで見出された大豆  $\beta$  コングリシニンペプトンよりも強力に CCK 分泌を刺激することを見出した。さらに、活性ペプチドが由来する分子量約 50 kDa の新規たんぱく質を同定し、「Dolicholin」と命名した。

また、ビール酵母を熱水、あるいは種々のプロテアーゼ処理したサンプルを調製し、同様に CCK 分泌活性を調べたところ、加水分解物に加え、熱水抽出サンプルに強力な CCK 分泌活性が見出された。この熱水抽出物を強力なプロテアーゼであるプロナーゼで処理することにより、CCK 分泌活性が失われたことから、活性本体がペプチド (たんぱく質) であることが示された。

このビール酵母熱水抽出物について、アセトニトリルによる溶媒分画を行ったところ、アセトニトリル可溶性画分に活性が濃縮された。これを上記と同様にプロナーゼ処理したところ、CCK 分泌活性はほぼ消失したことから、アセトニトリル可溶性画分の活性成分もペプチドであることが確かめられた。

これを FPLC によるゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、プロナーゼ未処理のものに比べ、高分子画分が消失していたことから、高分子画分に CCK 放出活性成分が存在することが考えられた。

さらに、ビール酵母熱水抽出物アセトニトリル可溶性画分を、同様のゲル濾過クロマトグラフィーにより、分画、分取したところ、分子量 1000 以上の画分が 10%、それより低分子の画分は 90% に分離された。これらをこの組成比率を反映した条件で STC-1 細胞に作用させたところ、低分子画分に弱い CCK 分泌活性が見られ、高分子画分には強い CCK 分泌活性が見られた。これにより、含量の少ない高分子画分に CCK 分泌を刺激するペプチド (タンパク) 存在することが明らかとなった。また、イソプロパノールを用いた溶媒分画を行

ったところ、一定の条件により活性を濃縮すること (比活性の向上) が可能となった。このものから逆相 HPLC、ゲル濾過 FPLC により分画を行ったところ、種々の画分に活性が分散したことから、様々な化学的性質を持つペプチドの相加的な刺激により CCK 分泌が促進されることが考えられた。

in vitro の試験において、CCK 分泌促進作用を持つことが明らかとなったビール酵母抽出物を、絶食させたラットに経口投与すると、投与量に依存して、その後の食事摂取量が減少することが確認された。これにより、ビール酵母熱水抽出物による CCK 分泌を介した食欲調節の有効性が示唆された。

強力な CCK 分泌作用を持つことを見出した新規ふじ豆 (*Dolichos lab lab*) たんぱく質 Dolicholin の遺伝子配列について、cDNA クローニングにより mRNA の全長を解読し、N 末端アミノ酸配列解析と同様に Phaseolin 様のたんぱく質であることが確かめられた。

< 抗糖尿病ホルモン Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌を刺激する食品ペプチド >

種々の食品たんぱく質加水分解物を調製し、GLP-1 産生消化管内分泌細胞株 GLUTag からの GLP-1 分泌活性を調べたところ、トウモロコシの難消化性たんぱく質 Zein のパピイン分解物 (ZeinH) に強い GLP-1 分泌活性があることを見出した。

ZeinH のラットにおける GLP-1 分泌作用を検討するため、麻酔下で門脈にカテーテルを留置し、小腸各部位 (十二指腸、空腸、回腸) に結紮ループを作成した。これらのループ内に ZeinH を投与して、門脈血中への GLP-1 分泌を観察した。その結果、ZeinH を回腸部位に投与した際に最も大きな GLP-1 分泌応答が見られた。十二指腸、回腸投与では回腸投与よりも弱い分泌応答が見られた。これにより、ラットにおいて、GLP-1 分泌細胞が多く存在する回腸部位においてペプチドへの感受性が高いこと、ペプチドは GLP-1 産生細胞に直接作用して GLP-1 分泌を刺激することが明らかとなった。

また、十二指腸に投与した ZeinH の刺激は、迷走神経を介して GLP-1 産生細胞に伝達されるという間接的機構を明らかにした。さらに、腸間膜静脈からの局所的微細採血により、十二指腸に ZeinH を投与することで、回腸部位からの GLP-1 分泌が誘導されることを初めて証明した。

in vitro および、in situ の試験において GLP-1 分泌促進作用を持つことを見出された ZeinH を覚醒ラットの回腸内へ直接投与することで、腹腔内グルコース負荷に対する血糖上昇が抑制されることが見出された。この時、血中の GLP-1 濃度、インスリン濃度の上昇が

確認され、回腸に投与した ZeinH が、GLP-1 分泌を促進し、これがインスリン分泌促進を介して血糖上昇を抑制することが明らかとなった。

さらに、ZeinH をラット回腸に投与すると、回腸静脈中のペプチダーゼ Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 活性が低下したことから、ZeinH は腸管内での GLP-1 分泌促進作用に加え、血中で DPP-IV 活性を抑制することで分泌された GLP-1 の作用を増強することが示唆された。

ZeinH を逆相 HPLC により分画し、疎水性画分に高い活性を持つペプチドが含まれることが見出された。また、ZeinH は GLP-1 産生細胞株 GLUTag において細胞内カルシウムシグナルを惹起するが、このシグナルは、GLP-1 分泌には寄与しないことが示唆された。

本研究課題は、食品が生体とファーストコンタクトする消化管の栄養素認識に着目し、その機構の解明と応用を目指すという、これまでにない新しい視点に立って行われた。これまで私どもが確立した種々の研究手法を用いることで、細胞レベルから、組織、動物個体まで一貫した研究が可能となった。

消化管内分泌細胞による食品シグナルから消化管ホルモンへのシグナル変換を利用することで、ペプチドが吸収されてからではなく、消化管腔内で作用することで食欲、インスリン分泌などをコントロールすることを目指した点において、国内外において高い独創性を有する。

これまで食品としての有効な利用方法が少なかった難消化性のたんぱく質 Zein の加水分解物が、GLP-1 の分泌促進を介して血糖上昇を抑制するという新たな機能性を見出した点は、栄養学のみならず糖尿病関連の学術領域に置いて大きなインパクトを与えた。

本研究により、CCK、GLP-1 の分泌を強く刺激できる食品ペプチドを新たに見出しとすることで、今後、その性質を利用して、経口摂取により食欲、インスリン分泌の調節が可能になると期待される。

これは、肥満や糖尿病の予防と改善における新たな選択肢となり、健康増進とともに医療費削減へ大きく寄与する点において非常に意義深い。また、消化管内分泌細胞の種々の異なるペプチドへの感受性の違いを元に、ペプチドの認識機構を解明する基盤のデータが得られ、今後の基礎研究の発展にも大きく貢献すると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①Taisuke Mochida, Tohru Hira, Hiroshi Hara, The corn protein, Zein, hydrolysate administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on GLP-1 secretion and DPP-IV activity in rats, *Endocrinology*, 査読有, Vol. 151 (7), 2010, pp. 3095-13104.

②Shingo Nakajima Tohru Hira, Yuzuru Eto, Kozo Asano, Hiroshi Hara, Soybean <math>\beta</math>-51-63 peptide stimulates cholecystokinin secretion via a calcium-sensing receptor in enteroendocrine STC-1 cells, *Regulatory Peptides*, 査読有, Vol. 159 (1-3), 2010, pp. 148-155.

③ Tohru Hira, Taisuke Mochida, Kyoko Miyashita, Hiroshi Hara, GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum, but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate in rats, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 査読有, Vol. 647 (4), 2009, pp. G663-G671.

④原 博, 比良 徹, ペプチド栄養学の新展開, *フードリサーチ*, 査読無, Vol. 647, 2009, pp. 62-66.

⑤ Tohru Hira, Toshihiro Maekawa, Kozo Asano, Hiroshi Hara, Cholecystokinin secretion induced by beta-conglycinin peptone depends on Galphaq-mediated pathways in enteroendocrine cells, *European Journal of Nutrition*, 査読有, Vol. 48 (2), 2009, pp. 124-127.

⑥ Tohru Hira, Shingo Nakajima, Yuzuru Eto, Hiroshi Hara, Calcium-sensing receptor mediates phenylalanine-induced cholecystokinin secretion in enteroendocrine STC-1 cells, *FEBS Journal*, 査読有, Vol. 275 (18), 2008, pp. 4620-4626.

⑦Md Kaosar Niaz Bin Sufian, Tohru Hira, Kozo Asano, Hiroshi Hara, Dolicholin', a phaseolin-like protein in country beans (*Dolichos lablab*), potently stimulate cholecystokinin secretion from enteroendocrine STC-1 cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有, Vol. 55 (22), 2007, pp. 8980-8986.

[学会発表] (計 10 件)

① Tohru Hira, Taisuke Mochida, Hiroshi Hara, Oral administration of zein hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-1 secretion and attenuates hyperglycaemia induced by intraperitoneal glucose administration

in rats、The Physiological Society, Metabolism & Endocrinology Themed Meeting including a focused symposium: "Towards an Understanding of the Enteroendocrine System", 2010年3月25日、AstraZeneca Pharmaceuticals (Macclesfield, UK).

- ②須田 和希、比良 徹、Kaosar SUFIAN 原 博、ビール酵母中に含まれる消化管ホルモン CCK 分泌活性を持つペプチドの探索、第39回日本栄養・食糧学会北海道支部会、2009年10月18日、北翔大学北方圏学術情報センター「ポルト」(札幌市)
- ③持田 泰佑、比良 徹、原 博、トウモロコシ Zein 加水分解物はラット腸管において GLP-1 分泌を刺激して血糖上昇を抑制する、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月21日、長崎ブリックホール(長崎県)
- ④川村 侑輝、比良 徹、原 博 消化管内分泌細胞株におけるトウモロコシ Zein 加水分解物による消化管ホルモン Glucagon-like peptide-1 分泌機構、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009年3月29日、マリンメッセ福岡(福岡市)
- ⑤持田 泰佑、比良 徹、原 博、トウモロコシの難消化性たんぱく質 Zein の加水分解物によるラットにおける Glucagon-like peptide-1 分泌機構、第13回日本食物繊維学会学術集会、2008年11月22日、国立健康・栄養研究所(東京都)
- ⑥川村 侑輝、比良 徹、原 博、消化管内分泌細胞株 GLUTag における、トウモロコシペプチドによる消化管ホルモン Glucagon-like peptide-1 分泌機構、平成20年度第二回合同学術講演会(日本農芸化学会北海道支部、日本栄養・食糧学会北海道支部合同開催、2008年11月9日、十勝プラザ(帯広市))
- ⑦ Tohru Hira、Taisuke Mochida, Kyoko Miyashita, Hiroshi Hara、Direct and indirect stimulation of Glucagon-like peptide-1 secretion by dietary protein hydrolysate in the rat duodenum and ileum 22nd Meeting of European Intestinal Transport Group (EITG 2008)、2008年9月8日、University of Navara (スペインパンプローナ市)
- ⑧持田 泰佑、比良 徹、原 博、トウモロコシ Zein 加水分解物は、ラット腸管で内分泌細胞への直接的、間接的作用により Glucagon-like peptide-1 分泌を刺激する、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008年3月28日、名城大学天白キャンパス(愛知県)
- ⑨ Sufian Kaosar, Tohru Hira、Osamu Kanauchi, Hiroshi Hara、Beer yeast (*S. cerevisiae*) peptides potently stimulate cholecystokinin secretion from

enteroendocrine STC-1 cells、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008年3月27日、名城大学天白キャンパス(愛知県)

- ⑩持田 泰佑、比良 徹、原 博、腸管においてトウモロコシ Zein 加水分解物は、内分泌細胞への直接的、間接的作用により消化管ホルモン Glucagon-like peptide-1 分泌を刺激する、平成19年度第二回合同学術講演会(日本農芸化学会北海道支部、日本栄養・食糧学会北海道支部、他)、2007年11月11日、東京農業大学生物産業学部(網走市)

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

- ①名称: 血中ジペプチジルペプチダーゼ-IV 阻害活性およびグルカゴン様ペプチド-1 の分泌促進活性を併せ持つ組成物  
発明者: 比良 徹、原 博、浅野 行蔵  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-053383  
出願年月日: 2010年3月10日  
国内外の別: 国内
- ②名称: GLP-1 分泌促進物  
発明者: 比良 徹、原 博  
権利者: 比良 徹、原 博、北海道大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-313160  
出願年月日: 2008年12月15日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原 博 (HARA HIROSHI)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 70198894

### (2) 研究分担者

比良 徹 (HIRA TOHRU)  
北海道大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号: 10396301

### (3) 連携研究者

なし