

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04031

研究課題名（和文）包括的ペプチド利用による生体情報伝達ネットワークの加齢による変容・破綻の解明

研究課題名（英文）Studies on modification and disintegration of the signaling network by aging using comprehensive peptide library

研究代表者

大日向 耕作（OHINATA, Kousaku）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00361147

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体は、部分的な機能障害が原因で個体の機能不全に陥ることがないように情報伝達ネットワークによってコントロールされている。この情報伝達ネットワークは加齢により徐々に変容し破綻して行く。本研究では、多様性と反応性を兼ね備えるジペプチドライブラリーを用いて、情報伝達ネットワークの変容を体系的・包括的に検討し、老化の全体像を俯瞰することを目指した。併せて、情報伝達ネットワークが変容した個体において有効な生理活性ペプチドを探索し発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化とは情報伝達ネットワークの変容や破綻により生じる表現型と考えられるが、実際に、どのような細胞や組織がどのようなプロセスを経て機能が低下していくのが不明な点が多い。今回、多様性と反応性を有するジペプチドライブラリーを用いて変容する情報伝達ネットワークの実体をあぶり出すことに成功した。加えて、加齢や栄養条件によって変容したネットワークにおいて効率的に作用する新しいペプチドも発見した。基礎科学とその応用のいずれにも貢献したといえる。

研究成果の概要（英文）：The body is known to be regulated by signal transduction networks so that the partial dysfunction does not induce dysfunction of the entire body. These networks gradually changes and collapses with aging. In this study, we systematically and comprehensively examined the changes in the signal transduction networks using a dipeptide library that has both diversity and reactivity, and aimed to overview aging. At the same time, we searched for bioactive peptides that are effective in individuals with altered signal transduction networks.

研究分野：食品生理機能学

キーワード：ジペプチドライブラリー 加齢 老化 情報伝達ネットワーク 作用経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重要なシステムの多くはネットワークである。これは、ネットワークでは一部の機能不全が生じていても全体の機能不全に波及しないためと考えられる。生命も極めて重要なシステムであることから、多彩な情報伝達ネットワークによって支えられている。ネットワークによる生体調節は恒常性を維持するために大きなメリットがあるが、ネットワークゆえに、どの部分がどの程度の機能障害を生じて、それが全体の調節にどの程度影響を与えているかを調べるのは容易ではない。部分的な障害があっても全体の機能は損なわれていないからである。そこで今回、ネットワーク上の情報の流れによって、どの部分が機能障害を生じているのかを検討しようとした。この検討には、ネットワークの情報の流れを生み出す多様性と反応性を兼ね備えた一群の生理活性物質が不可欠である。

ペプチドは20種類の共通アミノ酸から構成される。2アミノ酸残基のジペプチドであっても理論上 $20 \times 20 = 400$ 通りあり、十分な多様性を有する。また、一般的な生理活性の強さは、アミノ酸 < ジペプチド < 中分子ペプチドであり、ジペプチドは比較的高い反応性を有すると考えられる。したがって、ジペプチドは多様性と反応性を併せ持つ優れたプローブとして機能するものと期待できる。実際、ジペプチドのなかで強力な生理活性を示す例を複数見出していたことから、加齢による情報伝達ネットワークの変容と破綻を解明するためにジペプチドライブラリーを使用することにした。

2. 研究の目的

老化の実体とはどのようなものか？加齢により細胞や組織、個体レベルにおいて様々な機能低下が起こり、やがて死を迎える。同じタイミングで全ての機能を失うのではなく、部分的な機能低下が起こるが、生命はネットワークで支えられ恒常性が維持される。ライフステージが進むと、生理的老化、病的老化、さらには加齢関連疾患の発症が観察される。すなわち、恒常性が維持されているステージから、変容し、システムが破綻することが知られている(図1)。

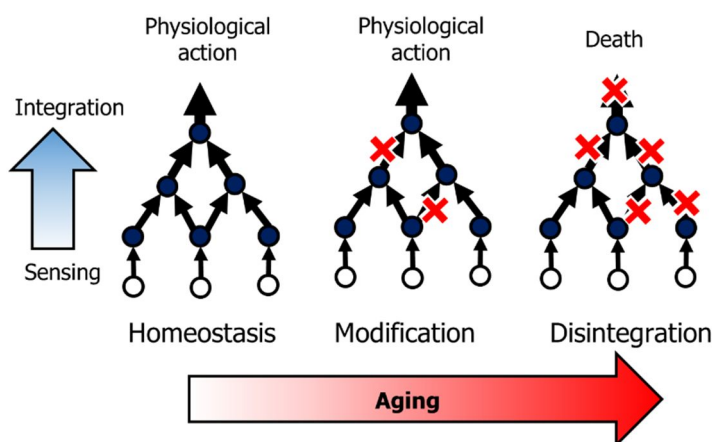


図1. 加齢による生体情報伝達ネットワークの変容・破綻

この情報伝達ネットワー

クが変容し破綻していく過程を、ライフステージが異なる組織や個体を用いて、包括的ペプチドライブラリーに対する反応性を検討することにより、老化の実体をあぶり出すことを目指した。

3. 研究の方法

特に、循環器系と神経系の生理活性に注目した。循環器系の検討では、高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた。高血圧の発症後早期(15~18週齢)と加齢により血管反応性が低下する後期(27週以上)のSHRから腸間膜動脈を摘出し、ジペプチドに対する反応性を包括的に検討した。336種類の入手可能なジペプチドを用いたが、N末端が共通のジペプチド混合物と、C末端が共通のジペプチド混合物を作成し、試験回数を大幅に減らし試験の効率化を図った。まず、それぞれのステージで、最も強い動脈弛緩作用を示すペプチド混合物を選抜した。次に、それらの混合物に含まれるジペプチドのなかから、最も強力な作用を示すジペプチドを選抜した。さらに、それぞれの動脈弛緩作用のメディエーターについて各種阻害剤を用いて検討した。加えて、それぞれのペプチドをSHRに経口投与したときの血圧降下作用について検討した。

神経系における検討では雄性マウスを用いた。若齢マウスと二年齢を超える老齢マウスに対して生理活性ペプチドを経口投与し摂食に及ぼす影響について検討した。老齢マウスでは、グレリンシグナルの低下が認められるためグレリン感受性増強ペプチドを用いた。これはグレリン受容体強制発現CHO細胞においてグレリン応答性を増強するペプチドでジペプチドライブラリーの構造活性相関情報に基づいて見出したものである。

4. 研究成果

4-1. 加齢により変化する血管機能の質的変化

加齢により血管機能が低下することが知られているが、どのような質的変化が生じているのか不明な点が多い。今回、包括的なジペプチドライブラリーを用いて種々のペプチドの反応性がどのように変化するかを検討した。本態性高血圧のモデルとして知られるSHRを使用した。高血圧発症前期のSHRおよび、更に血圧が上昇し種々の降圧物質の効果が減弱する発症後期のSHRの

両方から腸間膜動脈を摘出し、ペプチドに対する応答性を検討した。その結果、高血圧発症前期と後期で動脈弛緩作用を示すジペプチドのパターンが大きく異なることが判明し、加齢により高い反応性を示すペプチドの種類が変化することが明らかとなった(図2 A、B)。

加えて、前期と後期において最も高い反応性を示すジペプチドを選抜した(図2 C、D)。次に、これらのジペプチドの動脈弛緩作用のメカニズムを検討した。

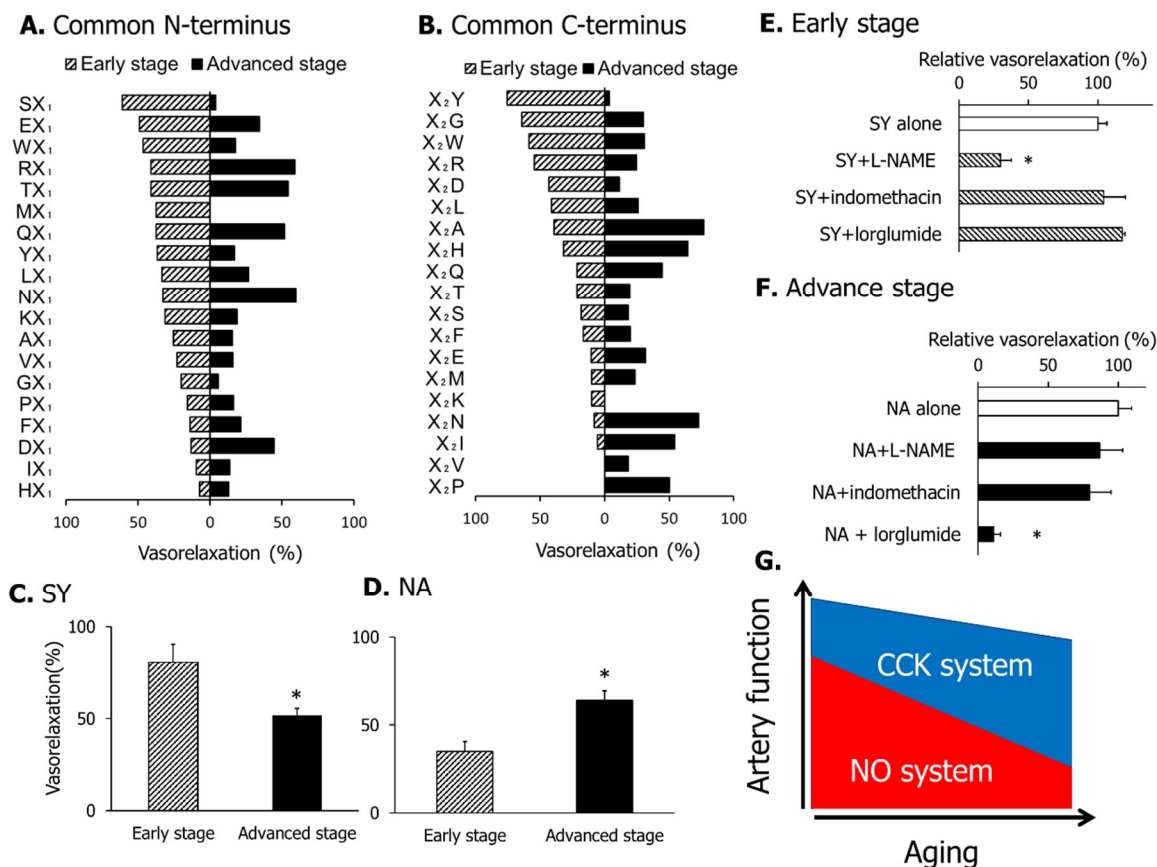


図2. 包括的ジペプチドライブラリーを用いた加齢による血管機能の質的変化の解明 [論文 より抜粋し修正] 高血圧発症前期と後期における血管弛緩作用(A~D)、関与するメディエーターの解明(E、F)、加齢による血管機能の質的な変化(G)

4 - 2 . 加齢により変容する情報ネットワークの解明

高血圧発症前期において強い動脈弛緩作用を示したのは Ser-Tyr (SY) であった。この動脈弛緩作用は一酸化窒素 (NO) の合成酵素阻害剤である L-NAME で阻害されることが明らかとなり、NO 系を活性化することが判明した(図2 E)。一方、高血圧発症後期において強い動脈弛緩作用を示したのは、Asn-Ala (NA) であった。本ジペプチドの動脈弛緩作用は、NO 合成酵素阻害剤 L-NAME では阻害されず、消化管ホルモンとして知られるコレシストキニン (CCK) に対する受容体アンタゴニスト lorglumide でブロックされた(図2 F)。本ペプチドは CCK 受容体には親和性を示さないことから CCK の分泌促進を介しているものと考えられる。一般的に、高血圧発症前期よりも後期のほうが、血管応答性が低下することは認識されていたが、その質的な変化の詳細は不明であった。一方、我々は前期と後期で高い反応性を示すジペプチドを用いて、それぞれの作用経路を検討したところ、それぞれのメディエーターが異なることを発見した(図2 G)。動脈弛緩作用を仲介する NO 系と CCK 系の寄与が加齢によって変化していたのである。すなわち、ジペプチドの包括的・体系的な活用により、加齢による血管機能の質的な変化をあぶりだしたものと考えられ、老化の実体解明に寄与したといえる。

4 - 3 . 加齢に着目したターゲットを活性化する新規ペプチドの探索

加齢によって反応性が低下した血管においては NO 経路が減弱しているものの、少なくとも CCK 経路に機能障害は生じていないと考えられる。そこで CCK を標的に新しい機能性ペプチドを探索した。まず、CCK 分泌能を有する STC-1 細胞と包括的なジペプチドライブラリーを使用し CCK 活性化ペプチドを選抜した。その結果、Phe-Trp (FW) が最も強力な反応性を示した。本ジペプチド FW (1.5 mg/kg) を SHR に経口投与すると血圧降下作用が認められた。FW 配列はウシ血清アルブミン (BSA) の一次構造中に存在する。そこで、FW 配列を含むペプチドが生成していると考えられる BSA のトリプシン消化物を SHR に投与したところ血圧降下作用を示すことが明らかとなった。この消化物中に含まれるペプチドのなかで 4 残基の FWGK の最小有効量が 0.05 mg/kg で

あることを見出した。さらに、5残基のKFWGKの最小有効量は0.005 mg/kgであり、FW配列を含むCCK活性化ペプチドは血管機能が低下している高血圧発症後期のSHRの高血圧を改善するものと考えられる。したがって、加齢によって変容した作用経路を標的に新規物質を探索することも可能である。

4 - 4 . 老齢動物において食欲促進作用を示すペプチド

老齢マウスにおいて摂食量や体重の低下が認められる。実際、摂食促進作用を示し消化管ホルモンとして知られるグレリンを投与しても摂食促進作用が顕著に減弱している。そこでグレリン感受性を増強する生理活性ペプチドに着目した。グレリン感受性は、グレリン受容体として知られるGHS受容体の強制発現細胞に、グレリンを添加した場合に、観察されるカルシウム応答で評価できる。包括的ジペプチドライブラリーを用いて解明したグレリン感受性を増強するペプチド構造上のルールと、グレリン感受性を増強する食品タンパク質の酵素消化物のペプチド一斉分析情報に基づき、得られたグレリン感受性増強ペプチド候補について、*in vivo*における生理活性を検討した。その結果、本ペプチドは、グレリン感受性の低下が認められる老齢マウスにおいて、摂食促進作用を示すことが明らかとなった。内因性リガンドよりも、むしろ外因性ペプチドが優れた効果を示すことから注目に値する。

4 - 5 . 疾患モデル動物において有効な生理活性ペプチド

加齢だけでなく種々の疾患モデルにおいて情報伝達経路の変容が認められる。高脂肪食負荷マウスにおいて高脂肪食摂取抑制作用を示す食品由来ペプチドを発見した。rALP-2は緑葉タンパク質Rubiscoに由来する抗不安ペプチドとして発見されたものである。このrALP-2は高脂肪食負荷マウスに経口投与すると高脂肪食摂取を低下させることを見出した。さらに、本作用はMC4受容体アンタゴニストにより阻害された。

4 - 6 . ジペプチドライブラリーの構造活性相関により発見した新規ペプチド

包括的なジペプチドライブラリーは、生理活性ペプチド探索の強力なツールである。グレリン分泌活性の構造-活性相関情報に基づき、生理活性を示す酵素消化物の一斉分析情報から新たな生理活性ペプチドを発見しwheat-ghrelinと命名した。構造活性相関情報と一斉分析情報に基づいて効率的に新しいペプチドを見出した例を追加した。

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 3件）

1. 著者名 Koyama D, Sasai M, Matsumura S, Inoue K, Ohinata K	4. 巻 11(11)
2. 論文標題 A milk-derived pentapeptide reduces blood pressure in advanced hypertension in a CCK system-dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Funct	6. 最初と最後の頁 9489-9494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0fo01122c	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 Tanikawa K, Kaneko K, Abe S, Nakato J, Tokuyama Y, Odaka S, Iwakura H, Sato M, Kurabayashi A, Suzuki H, Makita M, Ikemoto H, Matsumura S, Inoue K, Ohinata K	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 Wheat-ghrelinotropins: novel ghrelin-releasing peptides derived from wheat protein.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1144-1152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Koyama, Xinghui Sun, Masaki Sasai, Shigenobu Matsumura, Kazuo Inoue, and Kousaku Ohinata	4. 巻 11(21)
2. 論文標題 Ser-Tyr and Asn-Ala, vasorelaxing dipeptides found by comprehensive screening, reduce blood pressure via different age-dependent mechanism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY)	6. 最初と最後の頁 9492-9499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.102400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko K, Takekuma Y, Goto T, Ohinata K.	4. 巻 12(1):
2. 論文標題 An orally active plant Rubisco-derived peptide increases neuronal leptin responsiveness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12595-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大日向耕作
2. 発表標題 ペプチドハンティング ~多彩な機能性を示す食品由来ペプチドの発見とそのメカニズム~
3. 学会等名 第3回生活習慣病予防研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山大貴、笹井雅樹、松村成暢、井上和生、大日向耕作
2. 発表標題 加齢ラットで強力な血圧降下作用を示す新しい血圧降下ペプチド
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会関西支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu K, Kaneko K, Koyama D, Inoue K, Ohinata K.
2. 発表標題 NOVEL PEPTIDES ENHANCING GHRELIN SENSITIVITY
3. 学会等名 ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaneko K, Tokuyama Y, Taniguchi E, Abe S, Nakato J, Iwakura H, Sato M, Kurabayashi A, Suzuki H, Ito A, Higuchi Y, Nakayama R, Uchiyama K, Takahashi H, Ohinata K.
2. 発表標題 A DISCOVERY OF NOVEL BIOACTIVE PEPTIDES FROM RICE PROTEIN CONTROLLING GHRELIN RELEASE
3. 学会等名 ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大日向耕作	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本醸造協会	5. 総ページ数 7
3. 書名 血圧調節における老化の実体解明と加齢ラットで有効な新規血圧降下ペプチド	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------