

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780127

研究課題名(和文)新規脳神経調節ペプチドの探索と標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of target molecule on novel functional peptides in the central nervous system

研究代表者

水重 貴文 (Mizushige, Takafumi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：70571008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ジペプチドTyr-Leu (YL) が抗うつ薬様作用を示すことを行動試験により見出した。LYでは抗うつ活性が著しく減弱しYL配列が重要であると考えられた。YLのC-末端側への鎖長延長は許容された。これらの情報を活用し、YLの標的受容体候補をプルダウンしたところ、TGF- $\beta$ ファミリーの一回膜貫通型受容体が検出された。本受容体シグナルが神経新生に関与することや、抗うつ薬が効果を発揮する際に海馬神経新生を促進することが報告されている。本研究でYLが海馬神経新生を促進するという予備データを得た。これらの結果は、YLの抗うつ薬様作用が本受容体を介することを示唆し、本受容体はYLの標的受容体として有力である。

研究成果の概要(英文)：We found that a dipeptide, Tyr-Leu (YL), exhibited antidepressant-like activity by two behavioral tests. In the structure-activity relationship, Leu-Tyr (LY), a retro sequence of YL, have no effect on the antidepressant-like activity, suggesting that YL sequence is important for the activity. In addition, C-terminal elongation of YL tolerated for the antidepressant-like activity. In the pull-down assay using information of the structure-activity relationship, we found an one-transmembrane receptor belong to TGF- $\beta$  super family as a candidate of target receptor of YL. It has reported that signal pathway via the receptor related to neurogenesis and antidepressants promoted the hippocampal neurogenesis. In the present study, we found preliminarily that YL induced hippocampal neurogenesis. These results supported our hypothesis that YL exhibited antidepressant-like activity via the receptor.

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：低分子ペプチド 気分障害 うつ 不安 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

現代のストレス社会では、過度の精神的ストレスに対して抗不安薬や抗うつ薬が処方されることがある。一方、これまで我々は、食品タンパク質の酵素消化により生成する生理活性ペプチドの中に強力な抗不安薬様作用（精神的ストレス緩和作用）を示すものが存在することを見出し、食品成分と神経系の相互作用が意外にも強いことを明らかにしてきた。なかでも Tyr-Leu (YL) はシンプルなジペプチドであるにも関わらず医薬品に匹敵する強力な抗不安薬様作用を示した。しかしながら、YL が抗うつ薬様作用を示すか否か不明であり、各種行動試験を用いて総合的に情動調節に及ぼす影響を評価する必要があった。また、YL の情動調節作用の構造 - 活性相関の詳細は不明であった。

加えて、このような強力な生理活性ペプチドには標的受容体が存在し、これを活性化することで情動調節作用を示すものと予想されたが、その実態は明らかではなかった。標的受容体の同定は作用機構の全貌を明らかにするうえで極めて重要であり、また、標的受容体を介したシグナル伝達が新しい機能性素材や創薬のためのターゲットとなりうる。

## 2. 研究の目的

セロトニン再取り込み阻害剤など、抗不安剤の中には、抗うつ薬様作用を併せ持つものがある。本研究では、YL が抗不安薬様作用に加え、抗うつ薬様作用を示すか否かを各種行動試験により検討するとともに、その構造 - 活性相関、作用部位、および標的受容体を明らかにし、作用機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 抗うつ薬様作用および抗不安薬様作用のマウス行動学的評価

抗うつ薬様作用は、強制水泳試験また

は尾懸垂試験を用いて評価した。強制水泳試験は高さ 20 cm のビーカーに 12 cm まで水 (25 ) を入れ、ddY マウス (雄、5 週齢) を強制的に遊泳させた。尾懸垂試験は高さ 30 cm のところでマウス尾を固定し逆さ吊りにした。両試験とも、6 分間の無動時間を計測し、無動時間が増加した場合に抗うつ作用ありと判定した。

一方、抗不安薬様作用は、高架式十字迷路を用いて評価した。高架式十字迷路は、高さ 50 cm の十字迷路で、壁で覆われたクローズドアームと壁で覆われていないオープンアームから構成される。高架式十字迷路の中心にマウスを置き、オープンアームへの滞在時間の割合および進入回数を 5 分間観察した。オープンアームでの滞在時間および進入回数の割合が増加した場合に抗不安作用ありと判定した。

### 2) プルダウン法による標的受容体の探索

マウス全脳を用いて膜画分を調製した。アミノ酸の C 末端側を認識するセファロース担体に YL を結合させ、洗浄後、脳膜画分を添加し、一晚インキュベートした。さらに洗浄後、担体に結合したタンパク質を電気泳動および銀染色で可視化した。担体のみと比較して YL 結合担体で強く染色したバンドを採取し、トリブシン消化、Mass 分析、および Mascot データベース解析を行い、標的受容体候補を同定した。

### 3) 海馬神経新生の評価

マウスに YL を腹腔内投与し 30 分後に、増殖細胞に取り込まれる臭化デオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与した。YL は 3 時間ごとに合計 3 回投与した。BrdU 投与から 24 時間後にマウスを固定し、脳

を摘出した。海馬切片を作製し BrdU を免疫染色した。海馬における BrdU 陽性細胞の数をカウントした。

#### 4) ペプチド投与により活性化される脳領域の検討

マウスに YL を腹腔内投与し 60 分後に、マウスを固定し、脳を摘出した。切片を作製し Fos タンパク質を免疫染色した。海馬、扁桃核、視床下部における Fos 陽性細胞の数をカウントした。

### 4. 研究成果

#### 1) 新しい抗うつジペプチド Tyr-Leu の発見

強制水泳試験や尾懸垂試験などマウス行動試験を用いて、YL が抗うつ作用を示すことを初めて見出した。その抗うつ作用は既存の医薬品に匹敵する強力で、また経口投与でも有効であった。

#### 2) YL の抗うつ薬様作用に関する神経伝達物質

Serotonin や dopamine、GABA などの神経伝達物質が情動調節に重要であることが明らかになっている。YL の抗うつ機構をこれらの受容体アンタゴニストを用いて検討した結果、serotonin 5-HT<sub>1A</sub>、dopamine D<sub>1</sub>、GABA<sub>A</sub> の各受容体アンタゴニストで YL の抗うつ薬様作用が消失した。YL はこれらの受容体に親和性を示さないことから、これらの受容体は YL が相互作用する受容体ではないと考えられた。YL はおそらく、serotonin や dopamine、GABA など神経伝達物質の分泌促進を介して、抗うつ薬様作用を示すと考えられる。

#### 3) ジペプチドによる情動調節作用の構造 - 活性相関

構造 活性相関を検討した結果、Phe-Leu (FL) や Trp-Leu (WL) も YL と同様の抗うつ薬様作用を示し、芳香族アミノ酸 ロイシン配列がその作用に重要であることが判明した。レトロ体 (LY、LF、LW)、チロシン 他の分岐鎖アミノ酸 (YV、YI)、構成アミノ酸 (Y、L) は作用を示さなかった。なお、抗不安活性の構造 活性相関も検討し、芳香族アミノ酸 ロイシン配列が抗不安作用にも重要であることが明らかとなった。

#### 4) YL の標的受容体候補の同定

YL の抗うつ薬様作用の構造 - 活性相関情報に基づき、YL の C 末端側に担体を結合したサンプルを脳膜画分とインキュベートし、プルダウンした。YL に特異的に結合したタンパク質をペプチドマスマフィンガープリント (PMF) 法で同定したところ、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する一回膜貫通型受容体が検出された。

#### 5) YL の海馬神経新生に及ぼす影響

4) において検出された標的受容体候補は神経新生に関与することが報告されている。また、近年、抗うつ薬が効果を発揮する際に海馬神経新生を促進することが報告されている。YL 投与により海馬神経新生を促進するという予備的結果が得られた。この結果は YL の抗うつ薬様作用が本受容体を介するという仮説を支持するものであり、本受容体は YL の標的受容体として有力であると考えられる。

#### 6) YL が活性化する脳領域に関する検討

Fos は様々な細胞で種々の刺激に応答し発現するタンパク質であり、神経細胞での発現は神経活動と関連があるとされる。マウスに YL を投与し、各脳領域の Fos 陽性神経細胞数をカウントしたとこ

る、海馬で YL 投与により Fos 陽性細胞数が有意に増加した。視床下部と扁桃体では変化しなかった。これらのことから、YL は海馬の神経活動を活性化し、海馬の細胞に対して何らかの作用があることが示唆された。

以上をまとめると、本研究において、YL が抗不安薬様作用に加え、医薬品に匹敵する強力な抗うつ薬様作用を示すことが明らかとなった。また、芳香族アミノ酸およびロイシンで構成される配列が N 末端側に存在することが抗不安薬様作用および抗うつ薬様作用を示すために重要であることが判明した。一方で、YL の標的受容体候補として TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する 1 回膜貫通型受容体が同定された。我々の予備的検討において、YL は *in vivo* において海馬の神経新生を誘導した。本受容体を介したシグナルは神経新生を抑制することが知られており、YL が本受容体と相互作用し、そのシグナルを抑制するとすれば、YL が神経新生を誘導するメカニズムとして本受容体を介していることは十分に可能性がある。また、海馬の神経新生促進とうつ行動抑制との関連が報告されており、最終的に YL の抗うつメカニズムの解明につながるかもしれない。本研究成果は、新たな情動調節因子の発見につながる可能性があり、世界中で問題となっている精神疾患の予防あるいは治療のツールの 1 つとして期待できると考えている。

#### 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 5 件)

Identification of novel

$\beta$ -lactoglobulin-derived peptides, wheylin-1 and -2, having anxiolytic-like activity in mice.

Yamada A, Mizushige T, Kanamoto R, Ohinata K.

Mol Nutr Food Res. 2014 Feb;58(2):353-8.

Characterization of Tyr-Leu-Gly, a novel anxiolytic-like peptide released from bovine  $\alpha$ S-casein.

Mizushige T, Sawashi Y, Yamada A, Kanamoto R, Ohinata K.

FASEB J. 2013 Jul;27(7):2911-7.

Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice.

Mizushige T, Kanegawa N, Yamada A, Ota A, Kanamoto R, Ohinata K.

Neurosci Lett. 2013 May 24;543:126-9.

Characterization of ovolin, an orally active tryptic peptide released from ovalbumin with anxiolytic-like activity.

Oda A, Kaneko K, Mizushige T, Lazarus M, Urade Y, Ohinata K.

J Neurochem. 2012 Jul;122(2):356-62.

Complement C5a exhibits anxiolytic-like activity via the prostaglandin D2-DP1 receptor system coupled to adenosine  $A_{2A}$  and GABA $_A$  receptors.

Miyamoto C, Yoshida M, Yoshikawa M, Mizushige T, Ohinata K.

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2012 May;98(1-2):17-22.

[学会発表](計 6 件)

○水重貴文、大日向耕作、牛乳 $\alpha$ -casozepine とその分子内に存在するジペプチド Tyr-Leu の抗不安機構の比較、第 66 回日本栄養食糧学会、2012 年 5 月 20 日、仙台

○水重貴文、大日向耕作、ジペプチド Tyr-Leu は単回経口投与で抗うつ作用を示す、第 35 回日本神経科学会、2012 年 9 月 20 日、名古屋

○水重貴文、澤岷有里菜、金本龍平、大日向耕作、牛乳 $\alpha$ s-casein から抗不安トリペプチド Tyr-Leu-Gly が生成する、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 28 日、仙台

○水重貴文、山本 裕佳子、澤岷有里菜、金本龍平、大日向耕作、ジペプチド Tyr-Leu の抗うつメカニズム 海馬神経新生に及ぼす影響、第 67 回日本栄養食糧学会、2013 年 5 月 26 日、名古屋

○ Takafumi Mizushige, Yurina Sawashi, Ayako Yamada, Ryuhei Kanamoto, Kousaku Ohinata, Novel anxiolytic-like peptide released from  $\alpha$ -s-casein by gastrointestinal proteases, IUNS 20th International Congress of Nutrition, Sep 20th 2013, Granada (Spain)

○水重貴文、石田祐己、金本龍平、大日向耕作、海馬神経新生を誘導する抗うつジペプチド Tyr-Leu の標的受容体同定、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水重 貴文 (MIZUSHIGE TAKAFUMI)

宇都宮大学農学部・准教授

研究者番号 : 705701008

### (2) 研究分担者

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :