

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660104

研究課題名(和文) ヒト母乳由来の新しい神経分化制御因子の探索

研究課題名(英文) Studies on novel neuromodulatory factors derived from human milk protein

研究代表者

大日向 耕作 (Ohinata, Kousaku)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00361147

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)：ヒトを含む哺乳類は、生後、母体が分泌する乳を摂取することにより発達・成長する。乳摂取により、神経系と相互作用する分子が消化管内に生成することは合目的である。本研究では、特に、ヒト母乳タンパク質に着目した。ヒトラクトフェリンを、消化管を想定した酵素条件で分解した際に生成するペプチドを分析するとともに、神経系との相互作用を行動学的に検討した。その結果、ヒトラクトフェリン由来ペプチドを経口投与した際に抗不安作用を示すことを見出した。神経系における新しい母子間相互作用と考えられ、今後、ヒト母乳由来の神経調節因子として生理的意義の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that offspring in mammals, including human, grow and develop by intake of milk, which their mothers biosynthesize and secrete. We hypothesized that milk-derived molecules, which were produced in the gastrointestinal tract of offspring, interact with the nervous system, and focused on peptides derived from lactoferrin, known as a major human milk protein. We found that, among peptides released from human lactoferrin under enzymatic conditions simulating the gastrointestinal tract, a novel peptide exhibited anxiolytic-like effect after oral administration in mice using behavior test. This is the first neuromodulating peptide derived from human lactoferrin. These results imply a new maternal-infant interaction in the nervous system, and further investigation will uncover the biological significance of this milk peptide-mediated interaction.

研究分野：食品生理機能学

キーワード：ペプチド 母乳 ヒトラクトフェリン 抗不安作用 情動調節 経口投与 消化管酵素

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類は、生後、母体が分泌する乳を摂取することにより発達・成長する。したがって、乳摂取により、神経系と相互作用する分子が消化管内に生成することは合目的である。

これまで我々はジペプチド Tyr-Leu (YL) が強力な抗不安作用(精神的ストレス緩和作用)を有することを見出し、経口投与でも効果を示すことを明らかにした(Kanegawa et al. FEBS Lett 2010)。また、主要な牛乳タンパク質 α s-カゼインを消化管酵素で分解した際に、YL よりも Tyr-Leu-Gly (YLG) が効率的に生成するとともに、YL と同じメディエーターを介して抗不安作用を有することを明らかにした(Mizushige et al. FASEB J 2013)。さらに、最近、これらのペプチドが抗うつ作用を示すことを明らかにした(unpublished observation)。近年、成体脳における神経新生が抗うつ作用と関連することが指摘されており、我々も検討したところ、YL および YLG が海馬神経新生を促進することを見出し(unpublished observation)、細胞分化に関係していることが判明した。すなわち、これらの牛乳由来ペプチドが神経分化制御因子として機能する可能性が考えられた。

一方、ヒト母乳タンパク質からも類似の神経分化制御因子が生成すること予想されるが、牛乳とはタンパク質組成が大きく異なり、母乳中には α s-カゼインはほとんど含まれない。ヒト母乳に豊富に含まれる他のタンパク質が機能を代替しているものと考えられる。しかしながら、実際に、どのような分子が関与しているか詳細は不明であった。また、ヒト母乳タンパク質由来ペプチドによる情動調節作用はほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

ヒト母乳タンパク質から、牛乳 α s1-カゼイン由来の神経調節ペプチドと類似の生理作用を示す生理活性ペプチドを探索することを目的とする。具体的には、ヒト母乳中の主要なタンパク質として知られるラクtofエリンについて、消化管を想定した酵素条件で分解し、得られたペプチドに着目し、その神経調節作用を検討した。

これまで我々は、YL の抗不安作用について、構造-活性相関を検討したところ、芳香族アミノ酸-Leu というアミノ酸配列が抗不安作用に重要であり、C 末端側への鎖長延長は許容されるというルールが存在することを明らかにした(Mizushige et al. Neurosci Lett. 2013)。ヒトラクトフェリンの酵素消化によりどの程度 YL 配列を有するペプチドが生成するのかを定量するとともに、生成率の高いペプチドについて神経系に対する作用を行動試験で検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒトラクトフェリンの酵素消化物作成および神経調節ペプチド候補の定量

消化管を想定した酵素条件でヒトラクトフェリンを消化した際に生成するペプチドについて、LC/MS を使用して定量した。酵素は、ペプシン(E:S = 1:100, pH 2.0)、トリプシン(E:S = 1:100, pH 7.5)、キモトリプシン(E:S = 1:100, pH 7.5)、パンクレアチン(膵臓酵素の混合物, E:S = 1:20, pH 7.5)を用いた。いずれも消化管内に存在する酵素である。実際の消化を想定し、まず、ペプシンで消化し、続いて、トリプシン、キモトリプシン、あるいは、パンクレアチンで処理した。消化物中のペプチドの定量は、UPLC/QTOF-MS を使用し、化学合成した標準ペプチドによるピークに対する相対値を求め、生成率を算出した。標準ペプチドは、F-moc 法で化学合成し、逆相 HPLC で精製した後に、凍結乾燥したものを使用した。

さらに、ヒトラクトフェリン(556-574)に相当する 19 残基のモデルペプチドを同様に化学合成した。本ペプチドを消化管酵素で分解し、得られた消化物を分析することにより、酵素による切断サイトを詳細に調べた。

(2) 候補ペプチドの情動調節作用の検討

情動調節作用のうち、特に、抗不安作用を検討した。抗不安薬のスクリーニングに一般的に使用される高架式十字迷路試験を実施した。高架式十字迷路は、高さ 50 cm に設置された、幅 5cm の十字の迷路で、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を 5 分間観察した。マウスは普通、高い場所を怖がり、壁で覆われたクローズドアームによく入るが、抗不安薬を処置するとオープンアームでの滞在時間の割合が増加する。したがって、オープンアームでの滞在時間が増加した際に、抗不安作用ありと判定する。なお、消化管酵素により生成することが判明したペプチドを、同様に F-moc 法で化学合成し、HPLC 精製、凍結乾燥したものをサンプルとして使用した。ペプチドを経口投与および腹腔内投与し、その 30 分後に高架式十字迷路試験を実施した。

4. 研究成果

(1) ヒトラクトフェリンの酵素消化により生成する神経調節ペプチド候補

ヒトラクトフェリンを、ペプシン、次に、トリプシンで消化した際に、YLGPQY および YLGPQYVAG が、効率的に生成すること

がわかった（それぞれ 42 mol% および 50 mol%）。また、ペプシン、次に、パンクレチンで消化した場合に、Tyr-Leu-Gly-Pro-Gln (YLGPQ, 29 mol%) が生成することが明らかとなった。トリプシンおよびパンクレアチンはいずれも膵臓由来酵素である。胃由来のペプシンの次に、これらの膵臓由来酵素を処理した場合に、YL 配列を N 末端に有するペプチドが生成したことから、生理的条件下、YL 関連ペプチドが消化管内で生成しているものと考えられる。今回、見出したラクtoferrin 由来の YL 関連ペプチドは、抗不安作用を示す構造上のルールを満たすことから、神経調節作用を示すことが予想された。さらに、(2) において、それらの情動調節作用を行動学的に検討した。

続いて、19 残基のモデルペプチドを用いて、YL 関連ペプチドの生成に寄与する酵素の特定を試みた（図 1）。本モデルペプチドをペプシン処理したところ、チロシン残基-566、および、グリシン残基-569 の C 末端側が切断されることがわかった。トリプシンは塩基性アミノ酸残基の C-末端側を切断することが知られており、実際、リジン残基-560 の C 末端側を切断することを確認した。さらに、ペプシン+トリプシン消化により、YLGPQY および YLGPQYVAG が生成することも確認し、ヒトラクトフェリンの実験結果と一致することが明らかとなった。以上、ペプシンとトリプシンの切断サイトを特定した。

次に、ペプシン+パンクレアチン消化により YLGPQ が生成することを、モデルペプチドを用いた酵素消化実験により確認した。パンクレアチンは、トリプシンに代表される膵臓酵素の混合物である。ペプシン+トリプシン消化により、YLGPQY が生成することから、カルボキシペプチダーゼにより、C 末端のチロシン残基が脱離し、YLGPQ が生成した可能性が考えられる。一方、モデルペプチドをパンクレアチンで直接処理した場合も、グルタミン残基-565 の C 末端側が切断されることがわかった。ペプシンはチロシン残基-566 の C 末端側を完全に切断しないので、切れ残った全長ペプチドに対し、パンクレアチンのいずれかの酵素が作用している可能性がある。さらに現在、YLGPQ 生成に関与する酵素とその切断サイトを検討中である。

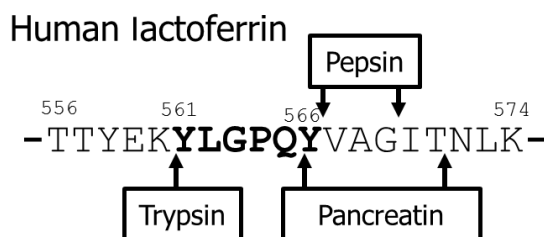


図 1 . ヒトラクトフェリンの消化管酵素により生成する情動調節ペプチドの生成モデル

一方、牛乳 α 1-カゼインのペプシン+パンクレアチン消化により YLG が生成するが、これは、ペプシン消化により生成した YLGY が、さらに、パンクレアチン中に存在するカルボキシペプチダーゼにより、C 末端のチロシン残基が脱離し、生成するものと考えられる (Mizushige et al. FASEB J 2013)。一方、ヒトラクトフェリンでは、アミノ酸配列が YLGPQ であり、YLG の C 末側がプロリン残基となっている。ヒトラクトフェリンの場合に、YLG が生成しないのは、プロリン残基が消化管酵素に対し抵抗性を示すためと考えられる。

以上、生理的条件下、YL 類縁体が消化管内で生成することをヒトラクトフェリン (タンパク質) とモデルペプチドを用いて確認するとともに、切断に寄与している消化管酵素を明らかにした。

(2) ヒトラクトフェリン由来の新しい情動ペプチドの発見

ヒトラクトフェリンを、消化管を想定した酵素条件下で分解した際に生成する複数のペプチドを、化学合成し、それらをマウスに投与し、高架式十字迷路試験を行った。その結果、YLGPQY が、1 mg/kg の経口投与によりオープンアームでの滞在時間の割合が有意に増加することがわかった。したがって、YLGPQY は、経口投与で抗不安作用を示すことが明らかとなった。また、YLGPQY の N 末端のチロシン残基が欠失した YLGPQ の経口投与では、オープンアームでの滞在時間増加には有意差は認められなかった。一方、より鎖長を延長した 9 残基の YLGPQYVAG の投与では、オープンアームでの滞在時間の割合は変化せず、今回の実験条件下では、抗不安作用を示さないことが明らかとなった。経口投与による抗不安作用の強さを比較すると YLGPQY > YLGPQ >> YLGPQYVAG となり、この中では、6 残基ペプチドが、最も強力な抗不安作用を示すことがわかった。以上、ヒトラクトフェリンを消化管酵素で分解した際に生成するペプチドの中で YLGPQY が、経口投与により抗不安作用を示すことを発見した。ヒトラクトフェリン由来の新しい抗不安ペプチドとして注目に値する。

また、YLGPQY は、腹腔内投与ではオープンアームでの滞在時間増加は有意ではなかった。したがって、本ペプチドは、経口投与では抗不安作用を示すものの、腹腔内投与では有意な抗不安作用を示さなかった。一方、以前に報告した牛乳由来の YLG は、腹腔内投与および経口投与、いずれの投与方法でも抗不安作用を示す。特に、腹腔内投与では、経口投与よりも、低用量で抗不安作用を示すことから、経口投与された YLG の一部が吸収され効果を示すモデルが妥当と考えられる。一方、YLGPQY は、経口投与でより強い効果を示す。したがって、吸収されて効果

を示すモデルではなく、まず、消化管に作用し、消化管から中枢にシグナルを伝達する迷走神経などを介し、中枢作用を示すモデルが妥当と思われる。実際、他のタンパク質の例で、酵素消化により生成する 11 残基ペプチドが消化管に直接作用し、迷走神経を介して抗不安作用を示すことを見出している (unpublished observation)。したがって、本研究で検討したヒトラクトフェリン由来 YLGPQY も同様の作用機構を介して作用すると考えられる。ただし、C 末端側にさらに鎖長を延長した 9 残基の YLGPQYVAG は経口投与で抗不安作用を示さなかった。したがって、N 末端が YL 配列で、かつ、中鎖ペプチドであること以外に、抗不安作用に必要な構造上のルールが存在するものと考えられる。さらに今後は、YLGPQY などの消化管に作用し効果を示すことが予想されるペプチドについて、脳腸相関を検討し、どのような中鎖ペプチドが本経路を活性化するかを明らかにする予定である。

また、YL および YLG は抗不安作用に加え、抗うつ作用を示すとともに、成体脳の海馬神経新生を促進することを見出しているが、今回、新たに発見した YLGPQY および、その類縁体が同様の生理活性を有するか否かは今後の検討課題である。

本研究では、ヒトラクトフェリンについて、消化管を想定した酵素条件で処理し、N 末端側が YL 配列である YLGPQY および YLGPQY が効率的に生成することを明らかにした。さらに、YLGPQY が経口投与で情動調節作用を示すことを見出し、神経系と相互作用することを明らかにした。本ペプチドは、新しい母子間相互作用分子として興味深い。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

1. Kousaku Ohinata. Novel food-derived bioactive peptide actin on the nervous system. 日本解剖学会・日本生理学会シンポジウム、2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場

2. 大日向耕作、構造 - 活性相関情報に基づいた食品タンパク質由来ペプチドの機能性予測とその実際、日本農芸化学会シンポジウム、2015 年 3 月 29 日、岡山大学

3. 大和礼奈、山本あかね、金本龍平、大日向耕作、ヒトラクトフェリンから生成する新しい抗不安ペプチド、食品科学工学会、2015 年 8 月 27 ~ 29 日、京都大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大日向耕作 (OHINATA Kousaku)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00361147