

令和元年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08002

研究課題名(和文) 褐色脂肪組織の活性化に寄与する鶏肉・羊肉ペプチドの探索とその機構の解明

研究課題名(英文) Studies on chicken and sheep meat peptides which contribute to activation of brown adipose tissue and raise body temperature after consumption

研究代表者

若松 純一 (WAKAMATSU, Jun-ichi)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：30344493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：in vivoにおける検討では、鶏肉の人工消化ペプチドでは親水性画分に食後の体温上昇作用があることが示唆された。鶏肉ペプチドの部位間での検討では、部位の影響があることが示された。また、食肉由来の消化・吸収ペプチドは畜種間や部位間でわずかに違いがあることから、生成される微量の特異的なペプチドが効果をもたらしている可能性が示された。一方、肝細胞を用いて人工消化ペプチドをin vitroで評価する系では、これまでのin vivoでの結果と逆の結果が得られたことから、食肉中の消化ペプチドは吸収して直接肝臓に作用して体温上昇をもたらすのではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中国で古来より口伝されてきた食肉の体を温めたり、冷やしたりする効果について、科学的に解明することができれば、単に嗜好性で食肉を選ぶだけでなく、その日の温度や体調に合わせて、食肉を選択・摂取することにより、健康に寄与できるかもしれない。また、有効ペプチドを明らかにでき、機構が解明できれば、長年の食経験もあることから保健機能食品や医薬品への応用も可能となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In in vivo study, the hydrophilic fraction of chicken artificial-digested peptide was suggested to have thermogenesis activity after consumption. Since there were some difference in meat digested- and absorbed-peptide among animal species, a small amount of animal species-specific peptide digested after consumption might have activity of thermogenesis. However, in vivo study using hepatocyte, the opposite results about gene expression were observed in vivo study. Therefore, it suggests that the digested and absorbed peptide of meat protein, especially chicken, do not increase the body temperature by acting on liver after absorption directly.

研究分野：食肉科学

キーワード：食肉 ペプチド 体熱産生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中医学・薬膳における食材の分類法の1つに「食性」がある。これは食材の摂取後に体に表れる反応によるもので、唐辛子やショウガのように摂取後に体が温まる「温熱性」、体が冷える「寒涼性」およびどちらの作用もない「平性」に大きく分けられる。カプサイシンやジンゲロールなどは摂取後にアドレナリンの分泌が促進されて体温上昇が認められる。一方、食肉では、鶏肉や羊肉、鹿肉、狗肉などが「温熱性」に、牛肉や豚肉などが「平性」に、馬肉や兎肉などが寒涼性に分けられている。食肉は家畜・家禽の骨格筋に由来し、構成するタンパク質は同等でアミノ酸組成も違いがない。しかし、このように分類される根拠については、科学的には明らかにされていない。

近年我々は、ラットを用いた実験で、食肉では鶏肉や羊肉が食後の体熱産生効果が高いこと、脂肪ではなくタンパク質画分が関与することを示し、ならびにアドレナリン・ノルアドレナリンの関与はなかったが、甲状腺ホルモンの関与を示唆した。その後の研究で、精製した食肉タンパク質を畜種間で比較すると、鶏肉タンパク質と羊肉タンパク質で、摂食開始後3時間の体温が他の畜肉と比べて有意に高かった。血漿甲状腺ホルモン量には差が見られなかったものの、BATおよび肝臓の甲状腺ホルモン標的遺伝子 (*THRSP*, *ME1*) ならびにその産物タンパク質 (Thyroid hormone responsible spot 14 protein, リンゴ酸酵素1) の発現量が高く、BATでの熱産生に直接関与する脱共役タンパク質1 (*UCP1*) の発現量も有意に増加することを示した。さらに、高脂肪・高シュクロース食による食事誘導性肥満ラットを用いて、長期的な食肉タンパク質の効果について検討したところ、鶏肉タンパク質摂取は肩甲骨間のBAT重量を有意に増加させ、腹腔内(腸間膜、精巣上体、腎周囲)白色脂肪を有意に減少させた。また、BAT重量だけでなく、BATミトコンドリア量や *UCP1* 量も増加させ、BATの活性化効果と、体脂肪蓄積抑制効果を示した。羊肉タンパク質にも同様な効果が推察されるが、未だ検討されていない。食肉のアミノ酸組成は畜種間でほとんど差がないことから、食肉間での作用の違いは消化によって産生されたペプチドの違いにより、甲状腺ホルモンの分泌や応答性、BATの増殖や機能亢進に違いがあると推察されるが、未だ解明されていない。甲状腺ホルモンはネガティブフィードバック機構があるため、その濃度は厳密に保たれているため、甲状腺ホルモンの分泌を促したのか、その後の経路を活性化させたのかは依然不明である。

本研究における鶏肉・羊肉ペプチドの作用機序としては、いくつかのルートが考えられる。1) 消化吸収されたペプチドが直接、褐色脂肪の増殖促進をもたらす、2) 消化吸収されたペプチドが甲状腺ホルモンの分泌を促進させ、間接的に褐色脂肪組織を活性化する、3) 消化されたペプチドが消化管内の受容体と結合して、上述の効果をもたらす、などが挙げられるが、ペプチドでこれらの効果を示した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

鶏肉・羊肉タンパク質摂取は甲状腺ホルモン応答性を高めて体熱産生亢進作用を有し、鶏肉タンパク質には褐色脂肪組織 (BAT) 増大効果も認められた。このため、消化・吸収された食肉ペプチドに焦点を当て、畜種によって摂取・消化後に産生されるペプチドが異なるのか、血中に移行したペプチドの中から網羅的に解析して、体温上昇(エネルギー代謝)に関与するペプチドをスクリーニングする。また、鶏肉・羊肉ペプチドから、BAT細胞活性化作用、ならびに視床下部-下垂体-甲状腺軸活性化作用を有するものの探索を行い、鶏肉・羊肉摂取によるBAT活性化と、それに伴う体温上昇作用のメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 食肉由来の消化・吸収ペプチドの畜種間の違い

鶏肉、羊肉、鹿肉、熊肉、牛肉、豚肉、馬肉、兎肉から純度95%以上の精製食肉タンパク質を調製した。各食肉タンパク質をピーカーに量り取り、それに対して人工胃液 (pH 1.42) を加えて、37、500 rpm の条件下で約15分間攪拌した後、ペプシン溶液を添加して2時間攪拌して消化した。

同様の手法でペプシンおよびトリプシンによる分解も行った。ペプシンによる分解を1時間行った後、直ちに水酸化ナトリウム水溶液でpHを約8.3に調整した。そして、pHを約8.3に調整したトリプシン溶液を1ml添加して、さらに1時間攪拌した。トリクロロ酢酸 (TCA) を添加して除タンパク処理を行った後、UPLC®/TOFMS に供した。

反転腸管法に供する試料は、各種タンパク質をペプシンおよびトリプシンで1時間ずつ分解した。その後、エタノールで除タンパク処理を行った消化酵素分解物を濃縮エバポレーターに供してエタノールを完全に除去した。ラット小腸を用いて、反転腸管サックを作製してサック内に取り込まれたペプチドをUPLC®/TOFMS に供した。

(2) in vivo における食肉タンパク質分解ペプチドの体温上昇作用の評価

動物実験には、1週間馴化を行った6週齢のWistar系雄ラットを用いた。各種食肉タンパク質溶液を多用途チューブを用いて胃に直接投与した。麻酔下で経時的な体温を測定した後、全採血、ならびに組織を採取した。各種血液生化学検査ならびに、総RNAを抽出、cDNAに変換後、Real-Time PCR systemを用いて各遺伝子の発現量を解析した。

(3) 鶏肉タンパク質分解物分画画分及びカゼイン酵素分解物の培地への添加がラット培養肝細胞 (H4IIE) の遺伝子発現に及ぼす影響

H4IIE 細胞を E-MEM (10% 牛胎児血清, 1% NEAA, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) 中で 5% CO₂ 条件下、37 °C で、80% コンフルエントに達するまで培養後、4 × 10⁴ cells/cm² の細胞密度で 12 well プレート 2 枚に継代した。更に、同条件下で 80% コンフルエントに達するまで培養し、培地、或いは 3 mg/ml の濃度で鶏肉タンパク質分解物分画画分、或いはカゼイン酵素分解物 (カゼイン) を含む培地で 2 或いは 4 時間培養した。PBS で 2 回細胞を洗浄後、総 RNA を抽出、cDNA に変換後、Real-Time PCR system を用いて各遺伝子の発現量を解析した。

同様の方法で H4IIE 細胞を同条件下で 80% コンフルエントに達するまで培養した後、10% 牛胎児血清を含まない同培地 (無血清培地、以下、E-MEM(-)) で更に 16 時間培養後、E-MEM(-)、或いは 3 mg/ml の濃度で鶏肉タンパク質分解物分画画分、或いはカゼイン酵素分解物 (カゼイン) を含む E-MEM(-) で 2 或いは 4 時間培養した。その後、同様の方法で遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 食肉由来の消化・吸収ペプチドの畜種間の違い

様々な食肉 (8 種類) を用いて、消化酵素 (ペプシンのみ、ペプシン & トリプシン) により分解したペプチドを UPLC-TOFMS により解析したところ、大部分は同一であったが、畜種により異なるペプチドが存在することが示された。さらに、反転腸管法により、畜肉の消化ペプチドを暴露したところ、腸管を通過するペプチドが畜種により異なるだけでなく、通過したペプチドに消化酵素分解ペプチドと一致するものが存在した。このことから、食肉の体熱産生能が畜種により異なる原因として、消化吸収した畜種固有のペプチドが関与する可能性があることが示された。

(2) in vivo における食肉タンパク質分解ペプチドの体温上昇作用の評価

鶏肉と羊肉タンパク質の高い体熱産生能が、畜種固有の消化ペプチドにもたらされているかどうかを確かめるために、消化酵素 (ペプシンのみ、ペプシン & トリプシン) により分解したペプチドから逆相カラムを用いてアセトニトリル濃度により分取して実験動物に投与し、食後の体温を測定したところ、鶏肉では親水性画分 (アセトニトリル 10% 溶出画分) で体温上昇することが確認された (図 1)。しかし、これまでの研究で発現量が上昇した mRNA を検証したが、有意差は認められなかった。この原因として、予め消化したことにより、体内での反応が早くなり、すでに遺伝子レベルでの発現量はフィードバックで戻されている可能性がある。

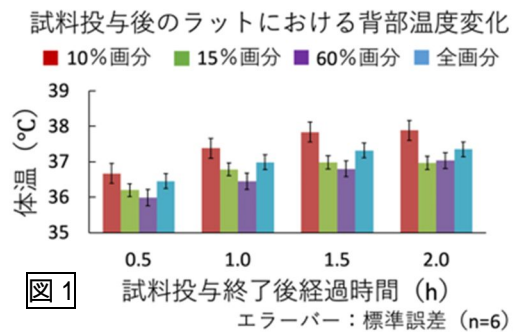
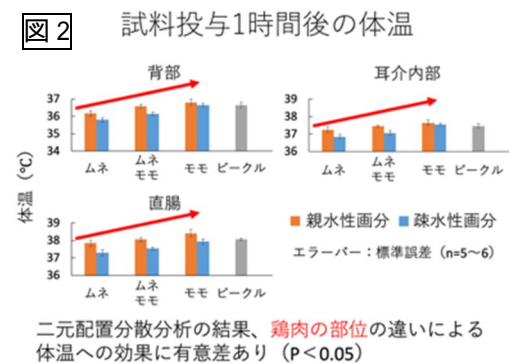


図 1

次に、鶏肉のペプシン消化ペプチドに焦点を絞って検討した。鶏肉では、胸肉ともも肉では肉質が大きく異なり、これは筋線維型の構成割合が大きく異なるためである。筋線維型が異なるとミオシンなどの筋原線維タンパク質はサブタイプが異なり、分子量やアミノ酸配列がわずかに異なる。このため、畜種による食肉の摂取後の体熱産生能の違いと同様に、生じるペプチドのわずかな違いにより、胸肉ともも肉の体熱産生能が異なる可能性がある。さらに、消化ペプチドの分画の方法も検討し直して、動物実験により摂食後の体温を指標に評価したところ、もも肉由来の消化ペプチドが胸肉よりも高い体熱産生効果を示し、筋線維型の違いが体熱産生効果に関係している可能性を示した (図 2)。分画方法では、消化酵素分解で形成される塩の影響を加味しても、親水性ペプチドに高い効果を有することが示された。エネルギー代謝を亢進することが示唆されたが、in vivo におけるメカニズムについては明らかにすることはできなかった。

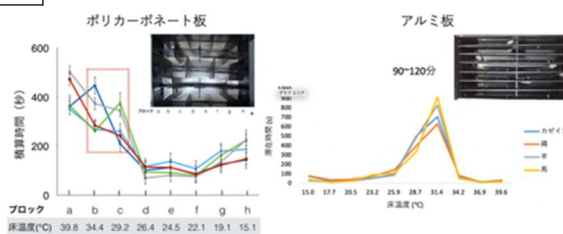
図 2



in vitro の評価系が使えない状況下で、候補ペプチドの探索を投与と麻酔下での体温測定だけで評価するのは使用動物数が増え、動物愛護の観点からも好ましくないことから、行動的体温調節機構からの評価系の確立を行なった。温度勾配のある床面で好ましい温度帯を動物自ら選択する評価系で、無麻酔で行うことが可能となる。床材と温度勾配の選択、ケージ内の幅と長さ、

評価時間及び時間帯の検証を行い、熱伝導性のよいアルミ板での実験が隅に集まるという習性を打ち消すのに良いことが明らかになり(図3) 評価系をおおむね確立できた。しかし、残念ながら、候補ペプチドの探索にまで利用するには時間が足らず助成期間内に行うことができなかった。

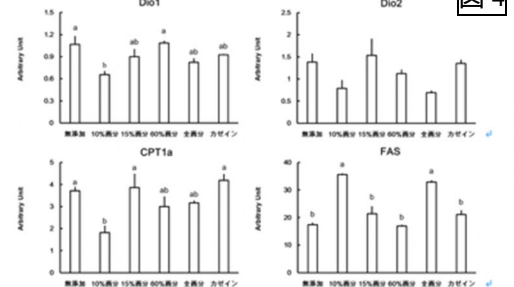
図3 各ブロックでの滞在積算時間に及ぼす床材の影響



(3)鶏肉タンパク質分解物分画画分及びカゼイン酵素分解物の培地への添加がラット培養肝細胞(H4IIE)の遺伝子発現に及ぼす影響

肝細胞を用いた in vitro の評価では、鶏肉ペプチドの親水性画分の添加は、脂肪酸の合成を促進し、甲状腺ホルモンの活性化や脂肪酸の分解を抑制して、エネルギー代謝を亢進しない可能性が示された。in vivo と in vitro とで相反する結果を示したことから、鶏肉の消化ペプチドが吸収されて肝臓などの器官には直接作用していない可能性が示された。さらに、無血清培地などの各種培養条件で検討したが、同様の結果が得られた。また、我々の別の検討において、鶏肉タンパク質摂取は肝臓での FAS の発現を抑制することが示されていたが、in vitro の評価系では有意の発現が上昇していた(図4)。このため、鶏もも肉摂取後に消化吸収されたペプチドが直接的に肝細胞などに作用して、効果をもたらすものではないことが示唆され、当初計画していた視床下部-下垂体-甲状腺軸活性化作用については評価を行うことを中断した。

図4 鶏肉タンパク質分解物分画画分及びカゼイン酵素分解物の培地への添加がラット培養肝細胞(H4IIE)の遺伝子発現に及ぼす影響(血清含有培地)



鶏肉タンパク質分解物分画画分及びカゼイン酵素分解物の培地への添加がラット培養肝細胞(H4IIE)の遺伝子発現に及ぼす影響(血清含有培地)
値は平均値±標準誤差(n=4)。異なる符号は危険率5%未満で有意差が有ることを示す。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

- 中原 健人、早川 徹、玖村 朗人、若松 純一、食肉由来消化・吸収ペプチドの畜種による違い、第122回日本畜産学会大会、2017
- 若松 純一、体を温める食肉、冷やす食肉、第71回日本栄養・食糧学会大会(沖縄コンベンションセンター) シンポジウム「Meet the World of Meat! ~食肉のおいしさ・機能性・遺伝子制御の新展開~」、2017

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 本田 和久

ローマ字氏名: HONDA, Kazuhisa

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 農学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40335427

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。