

令和元年6月11日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07731

研究課題名(和文)食品由来低分子ペプチドの腸管吸収機構解明と新規生理作用探索

研究課題名(英文) Gastrointestinal absorption mechanism and novel physiological function of food-derived low-molecular weight peptides

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食餌タンパク質摂取時に生成するペプチドの中から抗うつ作用を示すものを探索した。その結果、コラーゲンおよび魚肉タンパク質の分解物を胃内投与したマウスにおいて、抗うつ作用を示すことを見出した。魚肉タンパク質分解物のHPLC分画およびin situ門脈灌流系で同定した魚肉由来ペプチド2種のうつ様行動に対する作用を調べたが、いずれの検討においても抗うつ作用は認められなかった。2成分以上の複合的な作用であることが示唆された。コラーゲン由来の消化吸収ペプチドであるPro-Hypにおいて抗うつ作用を示すことを見出した。本研究において、消化吸収過程を経て体内循環する新規抗うつペプチドを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国のうつ疾患患者の数は100万人を超え、今後も増加の一途を辿ることが予想されており、その解決は大きな課題となっている。一方、うつ疾患を改善する医薬品には副作用等の問題があり、その使用が問題視される場合もある。本研究結果により見出した抗うつ活性を示す低分子ペプチドが今後、安全な抗うつ素材開発の一助となることが期待され、実用化された際には非常に大きな社会的意義を持つと考えられる。また、本研究成果は独創的な発想かつ新規発見を含んでおり、将来的に作用機序の全容を解明し、特許を取得することや学術大会や学術論文で報告することで、学術的な意義を示すことができると期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for food derived peptides with antidepressant like activity. As a result, it was found that collagen and fish protein degraded hydrolysates administered orally were exhibited the antidepressant activity in mice. The effects of two fish derived peptides identified in situ portal perfusion system and HPLC fractions of fish protein degraded hydrolysate on depression-like behavior were examined. However, there was no change of depressant like behavior in those peptides and fractions, suggesting that it is a combined activity of two or more components. On the other hand, it was found that Pro-Hyp, a collagen-derived peptide, exhibited antidepressant like activity. It was reported that the Pro-Hyp circulated in blood after digestion and intestinal absorption. Totally, we found novel antidepressant peptides that circulate through digestive and absorption processes.

研究分野：生物化学

キーワード：うつ ストレス ペプチド 消化吸収 腸管吸収 神経新生 コラーゲン

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

1. 研究開始当初の背景

現代のストレス社会では、過剰な精神的ストレスに対して抗うつ薬など医薬品が処方されることがあるが、それらの副作用や耐性などの問題が指摘されている。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うつ作用（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、食品成分が脳神経系で制御される行動に影響することを明らかにしてきた。シンプルな構造であるジペプチドやトリペプチドのような低分子食品化合物が医薬品に匹敵する強力な抗うつ作用を示すことを見出した。一方、低分子ペプチドを摂取した際に、消化吸収過程を経て、どのように体内を循環し、またどこで作用しているのかについてはいずれの活性ペプチドについても不明である。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抗ストレス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い。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。生理活性ペプチドを探索するだけでなく、それらの体内動態や標的分子を明らかにすることが、今後の機能性素材探索には必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、食品タンパク質の酵素分解により生成する低分子ペプチドを経口摂取した際に消化吸収されるものに着目し、それらの中から抗うつ作用など精神的ストレス緩和作用を示すものを見出すことを目的とした。それを達成するために、まず *in situ* 門脈灌流系やすでに報告されている情報を用いて、消化吸収後に体内を循環している低分子ペプチドと脳神経系との相互関係を明らかにすることを目的とした。近年、患者数の増加が指摘され問題となっているうつに着目し、動物行動学的手法でうつ様行動の変化の有無について調べ、新たな精神的ストレス緩和作用を示す消化耐性低分子ペプチドの発見を目標とした。

3. 研究の方法

1) 試料

コラーゲン分解物は、株式会社ニッピより提供いただいた。魚肉タンパク質、枝豆試料、鶏肉タンパク質は、日本水産株式会社より提供いただいた。大豆タンパク質は、不二製油株式会社より提供いただいた。卵白タンパク質および乳清タンパク質は、第一化成株式会社より提供いただいた。牛乳カゼインタンパク質は、オリエンタル酵母社より購入した。Pro-Hyp および Hyp-Gly は、Bachem 社より購入した。魚肉タンパク質および枝豆試料は、ペプシン(37、PH2.0)で3時間、インキュベートし、遠心分離後、上清を凍結乾燥したものを分解物として使用した。

2) *in situ* 門脈灌流および LCMSMS を用いたペプチド配列の同定

動物は、Wistar ラット(雄、8週齢)を用いた。18時間の絶食後、魚肉タンパク質 1g をラットに経口投与した。投与から1時間後に心臓の上行大動脈および門脈にカニューレーション術を行い、心臓から血清入りの灌流液を 1 mL/min の流速で流し、門脈から灌流液を回収した。回収した門脈灌流液に等量のエタノールを加え、遠心分離後、上清を回収した。LCMSMS 分析を行い、ペプチド配列を同定した。

3) 抗うつ薬様作用のマウス行動学的評価

抗うつ薬様作用は、強制水泳試験を用いて評価した。動物は、ddY マウス(雄、5週齢)を用いた。MF(オリエンタル酵母)および水道水を自由摂取させた。国立大学法人宇都宮大学動物管理等規程に基づき、本学動物実験委員会に認可された後、実験を行った。魚肉タンパク質、大豆タンパク質、牛乳タンパク質、枝豆素材、または生理食塩水を経口投与し、3時間後に強制水泳試験を行った。強制水泳試験では、高さ 20 cm のピーカーに 12 cm まで水(25℃)を入れ、マウスを強制的に遊泳させた。マウスの遊泳状況のビデオ撮影を行い、6分間の無動時間を計測した。無動時間が増加した場合に抗うつ作用ありと判定した。

4. 研究成果

1) 各種食品タンパク質のペプシン分解物の抗うつ作用

各種食品タンパク質を摂取した場合に精神的ストレスによる行動に対する行動を調べるため、魚肉タンパク質、大豆タンパク質、枝豆素材、鶏肉タンパク質、牛乳タンパク質(カゼインおよびホエイ)のペプシン分解物のうつ様行動に対する効果を調べた。その結果、魚肉タンパク質のペプシン分解物の経口投与により、無動時間が有意に減少し、抗うつ作用を示すことを見出した(図1)。また、枝豆素材のペプシン分解物の経口投与により、無動時間が有意に減少し、抗うつ作用を示した。その他のタンパク質のペプシン分解物投与による無動時間の変化は認められなかった。

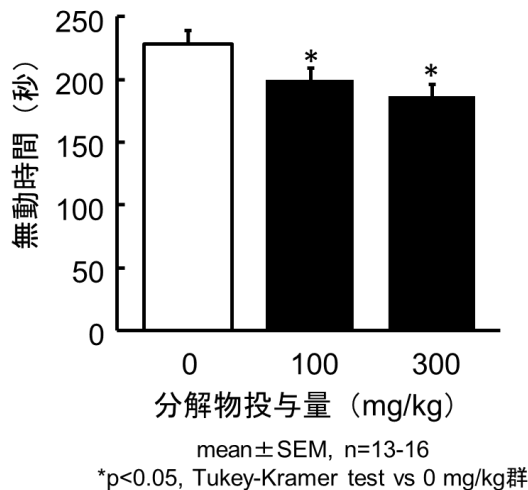


図1 魚肉タンパク質ペプシン分解物の経口投与により抗うつ作用を示した

2) 魚肉タンパク質由来の消化吸収ペプチドの抗うつ作用

1) の検討において、魚肉タンパク質のペプシン分解物の経口投与により、抗うつ作用を示すことが明らかになった。そこで、過去の我々の研究において、1 g の魚肉タンパク質を経口投与し、門脈から回収した灌流液に含まれる消化吸収後のペプチドのアミノ酸配列を調べたところ、Lys-Lys(Ac)および Asp-Arg-Lys が同定されたため、それらのペプチドの抗うつ作用を調べた。その結果、Lys-Lys(Ac)および Asp-Arg-Lys の経口投与による無動時間の変化は認められなかった。そこで、魚肉タンパク質のペプシン分解物を液体クロマトグラフィーにより画分に分け、それらの画分の抗うつ作用を調べた。その結果、いずれの画分においても、経口投与による無動時間の変化は認められなかった。魚肉タンパク質の抗うつ作用は、複数種のペプチドによる複合的な作用であることが示唆され、本研究において魚肉タンパク質由来の抗うつ活性ペプチドの配列決定には至らなかった。

3) コラーゲン分解物およびコラーゲン消化吸収ペプチドの抗うつ作用

本研究室では、これまでコラーゲン分解物の皮膚創傷治癒に及ぼす影響について検討してきた。また、コラーゲン分解物の低分子画分が抗不安作用を示すことが報告されている (Kakoi et al. Biomed Res. 33 273-279 2012)。そこで、ショウガ由来酵素により分解されたコラーゲン分解物の抗うつ作用を調べた。その結果、コラーゲン分解物の経口投与により、無動時間が有意に減少し、抗うつ作用を示すことを見出した (図2)。コラーゲン分解物を経口摂取した際に、血液中に多く存在し、体内を循環しているペプチドとして、Pro-Hyp および Hyp-Gly が知られている。そこで、これら2つのペプチドの抗うつ作用を検討した。その結果、Pro-Hyp の経口投与により、無動時間が有意に減少し、抗うつ作用を示すことを見出した。一方、Hyp-Gly の経口投与による無動時間の変化は認められなかった。以上より、コラーゲン分解物およびコラーゲン由来ジペプチド Pro-Hyp が抗うつ作用を示すことを新たに発見した。今後は、コラーゲン分解物の抗うつ作用の活性成分が Pro-Hyp であるかどうか、またこれらの抗うつ作用の作用メカニズムを明らかにすべきであると考えている。

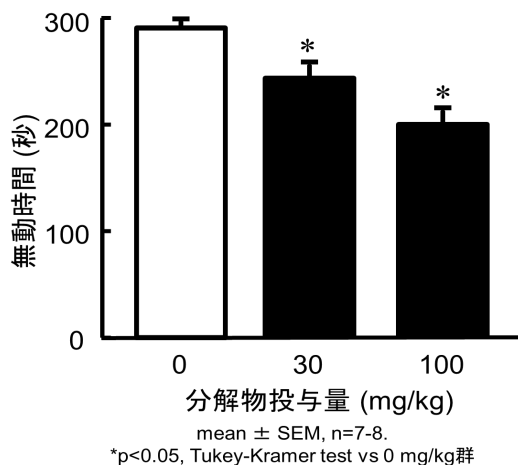


図2 コラーゲン分解物の経口投与により抗うつ作用を示した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Absorption and metabolism of orally administered collagen hydrolysates evaluated by the vascularly perfused rat intestine and liver in situ.

Osawa Y, Mizushige T, Jinno S, Sugihara F, Inoue N, Tanaka H, Kabuyama Y.

Biomed Res. 査読有 2018;39(1):1-11.

Fish protein hydrolysate exhibits anti-obesity activity and reduces hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA expressions in rats.

Mizushige T, Komiya M, Onda M, Uchida K, Hayamizu K, Kabuyama Y.

Biomed Res. 査読有 2017;38(6):351-357.

〔学会発表〕(計 14 件)

○野木村 大、三ツ橋 春香、多賀 祐喜、楠畑 雅、服部 俊治、水重 貴文、蕪山 由己人、コルチコステロン投与マウスにおけるコラーゲン分解物の抗うつ作用とその作用に対するドーパミン神経の関与、日本アミノ酸学会第 12 回学術大会、2018 年 10 月 20 日、東京

○庄司 紗代、水重 貴文、蕪山 由己人、コラーゲン由来ペプチドが培養海馬神経幹細胞の増殖に及ぼす影響、日本アミノ酸学会第 12 回学術大会、2018 年 10 月 20 日、東京

○野木村 大、永井 研迅、多賀 祐喜、楠畑 雅、林田 治、服部 俊治、水重 貴文、蕪山 由己人、海馬における神経幹細胞の増殖および神経栄養因子の発現に及ぼすコラーゲン加水分解物の影響、日本アミノ酸学会第 11 回学術大会、2017 年 9 月 30 日、京都

○永井 研迅、東 奈央、水重 貴文、蕪山 由己人、コラーゲンペプチド Pro-Hyp の抗うつ作用、第 71 回日本栄養食糧学会、2017 年 5 月 19 日、那覇

○永井 研迅、東 奈央、水重 貴文、蕪山 由己人、コラーゲン由来抗うつペプチドの同定およびその脳脊髄液への移行、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17 日、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：蕪山由己人

ローマ字氏名：KABUYAMA YUKIHITO

所属研究機関名：宇都宮大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20285042

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。