

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380076

研究課題名(和文) 新しい外因性神経調節ペプチドの網羅的機能解明とその応用

研究課題名(英文) Studies on comprehensive physiological functions of novel exogenous neuromodulating peptides

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) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：食品成分、特に低分子ペプチドに着目し、神経系との相互作用について多角的に検討した。これまでに蓄積した強力な不安薬様作用を示すジペプチドの構造-活性相関情報に基づき、食品タンパク質を摂取した際に生成する新しい情動調節ペプチドを見出した。本ペプチドは、外因性の神経調節因子と言える。また、情動調節作用を示す低分子ペプチドの中に、睡眠誘発作用や摂食調節作用、エネルギー代謝調節作用を示すものを見出した。すなわち、外因性神経調節ペプチドを用いて神経系と他の調節系の新しいクロストークを顕在化した。

研究成果の概要(英文)：We investigated interaction between low-molecular weight peptides and the nervous system. We found novel anxiolytic-like peptides released from food proteins by gastrointestinal proteases, based on structure-activity relationship of potent anxiolytic peptides. The food-derived peptides may be one of exogenous neuromodulating factors. We also found that low-molecular peptides with neuromodulating activities sometimes exhibited sleep inducing activity, changed food intake, and modulated energy metabolism.

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：ペプチド 情動調節 睡眠 食欲 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、ジペプチドの中に医薬品に匹敵する強力な抗不安薬様作用(精神的ストレス緩和作用)を示し、経口投与で有効なものが存在することをマウス行動実験により明らかにした(FEBS Lett 2010)。さらに、抗不安ジペプチドの構造-活性相関を検討したところ、強力な抗不安作用に必要な構造上のルールがあることがわかってきた。このルールを満たすペプチドは新しい外因性神経調節因子として作用する可能性がある。しかしながら、食品タンパク質を摂取した際に、消化管内で情動調節作用を示すペプチドが生成するかは不明であった。そこで本研究では、これまでに蓄積した強力な抗不安薬様作用を示すジペプチドの構造-活性相関情報を活用して新しい外因性神経調節因子を探索した。

神経系は、神経細胞やグリア細胞を介して細胞や各組織間の迅速な情報伝達と処理を行う高度に制御された全身性システムであり、食欲、睡眠、体温、痛覚、さらには情動、記憶・学習など多岐にわたる生理作用に関係し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。また近年、神経系を介した臓器間代謝情報ネットワークの重要性が指摘されている。しかしながら、食品タンパク質由来の情動調節ペプチドが代謝系とどのように相互作用するのか、多彩な生理作用を実際に示すのかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 構造-活性相関を基盤とした新しい情動調節ペプチドの探索

近年、グレリンやオレキシンなど数多くの内因性神経ペプチドと、それらの受容体が同定され、神経系の生体調節に重要な役割を演じていることが判明している。これらの内因性神経ペプチドは、脳室内投与や静脈内投与では強力な活性を示すものの、迅速に酵素分解され、生体内半減期はきわめて短く、経口医薬品としての開発は困難とされる。一方、食品タンパク質の酵素消化により派生する低分子ペプチドの中には、消化抵抗性を示し経口投与で作用するものが存在する。従来、食品タンパク質由来の低分子ペプチドの神経系に対する作用の詳細は、ほとんど検討されていなかったが、我々は行動薬理学的手法により、数多くの低分子ペプチドが抗不安薬様作用を示すことを見出した。中でもジペプチド Tyr-Leu は、医薬品に匹敵する低用量で作用するとともに経口投与でも有効であった。さらに、構造-活性相関を検討したところ、芳香族アミノ酸-ロイシンという配列が活性に重要で、末端側への鎖長延長が許容されることが判明した。さらに本研究では、構造-活性相関情報、並びに食品タンパク質の

一次構造情報に基づき、食品タンパク質を摂取した際に生成する新規の抗不安ペプチドを探索した。

(2) 情動調節ペプチドの網羅的機能性解析

内因性神経ペプチドは多彩な生理作用を示す。一方、新しく見出した外因性神経調節因子とも呼べる経口投与で有効な低分子ペプチドの機能性は、ごく一部しか解明されておらず多角的な機能性解析が必要である。近年、末梢臓器と脳の神経を介した情報ネットワークの重要性が指摘されている。摂食や代謝調節情報ネットワークのメディエーターとしてグレリンやレプチン、コレシストキニン(CCK)などの内因性神経ペプチドが関与していることが判明しているが、外因性神経調節ペプチドがこれらの情報ネットワークをどのように修飾するかは全く不明である。そこで今回、外因性神経調節ペプチドの摂食/エネルギー代謝に及ぼす影響を検討した。

このほか、プロスタグランジン D₂(PGD₂)放出を介して抗不安作用を示す低分子ペプチドが複数存在することを見出した(Peptides 2008)。PGD₂は中枢神経系において最も多く存在するPGで、最も強力な睡眠誘発物質である。PGD₂放出活性を示す抗不安ペプチドの睡眠誘発作用も検討した。

3. 研究の方法

(1) 新しい情動調節ペプチドの探索

消化管を想定した酵素条件で牛乳タンパク質を消化した際に生成するペプチドから抗不安薬様作用を示す低分子ペプチドを探索した。抗不安活性の評価には、高架式十字迷路試験やオープンフィールド試験などのマウス行動試験を用いた。これまでに得られた構造-活性相関情報と牛乳タンパク質の一次構造情報を活用し抗不安ペプチド候補を予想した。抗不安ペプチド候補を化学合成し、これを標品として、消化物中に含まれる該当ペプチドをLC-MSで定量した。さらに抗不安ペプチド候補が実際に、抗不安作用を示すか否かを検討した。

(2) 生理機能の評価

情動調節ペプチドのエネルギー代謝に及ぼす影響は、マウスを用いてグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行った。糖取り込みの7割以上が筋肉組織に起こるとされている。そこで、筋肉細胞由来C2C12を用いて糖取り込みに及ぼす影響を検討した。

摂食調節に及ぼす影響を検討した。ペプチドをマウスに投与し摂食量を測定した。通常は普通食で実験を実施したが、栄養条件による影響を検討する場合には、高脂肪食群を設

定した。各種阻害剤による影響を検討し作用機構を解明した。

睡眠誘発活性についても検討した。まず、ペプチドサンプルをマウスに投与し行動量低下により睡眠誘発物質候補をスクリーニングした。候補ペプチドを予め電極を移植したマウスに投与し、脳波、心拍数、行動量を同時計測する睡眠ステージ解析システム（SleepSign：キッセイコムテック）により実際に睡眠誘発活性を示すかを検討した。

4. 研究成果

(1) 牛乳由来の新しい抗不安薬様ペプチドの発見

これまで我々は、ジペプチド Tyr-Leu (YL) が医薬品に匹敵する低用量で抗不安作用を示すことを見出している。食品タンパク質の一次構造中には YL 配列が存在するが、食品タンパク質を摂取した際に、実際に消化管内で YL 配列を持つ低分子ペプチドが生成するか否か不明であった。そこで本研究では、YL 配列が複数存在する牛乳の主要なタンパク質₁ カゼインに注目し、消化管を想定した酵素条件で処理した場合に、YL および YL 類縁ペプチドが生成するか否かを検討した。その結果、₂ カゼインをペプシン消化後に、さらにパンクレアチンで消化したところ、YL がわずかに生成したが、YLG がより効率的に (YL の 5~10 倍) 生成することが判明した。この YLG を含むモデルペプチドを合成し YLG 生成に寄与している消化管酵素を検討し、ペプシン、トリプシン、カルボキシペプチダーゼが関与していることを明らかにした。さらに、YLG を含む₃ カゼインのペプシン+パンクレアチン消化物が抗不安作用を示すことをマウス高架式十字迷路試験で明らかにした。この結果は、YLG が YL と同様に強力な抗不安作用を示す事実と一致するものである。なお、YLG を牛乳由来の新しい抗不安ペプチドとして報告した。

(2) 情動調節ペプチドのエネルギー代謝に及ぼす影響

YL のエネルギー代謝に及ぼす影響を情動調節の観点から検討した。その結果、強制水泳ストレスによるマウス血糖値上昇が YL 投与により抑制されることを明らかにした。すなわち、YL はストレス反応を低減することにより血糖値上昇を抑制していると考えられた。また、ストレスを負荷しない場合のエネルギー代謝に及ぼす影響を検討した。YL 投与 3 時間後にインスリン負荷試験を行ったところ、顕著な血糖値低下作用が認められ、極めて短時間でインスリン感受性が上昇することが判明した。グルコース負荷試験でも血糖値上昇抑制作用を示すことを見出した。

筋肉は糖取り込みが起こる主要な組織と

して知られる。そこで、筋肉由来の培養細胞 C2C12 を用いて 2-デオキシグルコース (2-DG) の糖取り込みに及ぼす YL 類縁体添加の影響を検討した。抗不安薬様作用は芳香族アミノ酸-Leu 配列が活性に重要であることをこれまでに見出しているが、C2C12 における 2-DG 取り込み活性は、必ずしも抗不安薬様活性の構造活性相関とは、一致しないことが判明した。したがって、情動調節に依存する、あるいは、依存しないエネルギー代謝系が存在するものと考えられる。

(3) 新しい睡眠誘発ペプチドの発見

YL の強力な抗不安作用の構造-活性相関研究により、(芳香族アミノ酸)-Leu というアミノ酸配列が重要であることが判明している。実際、レトロ体の LY には活性が認められない。興味深いことに、高架式十字迷路試験において Leu-Phe (LF) は非常に弱い抗不安作用しか認められないものの、行動抑制作用を示すことを明らかにした。実際、オープンフィールド試験において行動量の低下が認められた。抗不安剤は睡眠誘発剤として処方されることがあり、共通の作用機構を介する場合がある。そこで、LF の睡眠誘発作用を睡眠ステージ解析システム SleepSign により解析した。その結果、LF 投与後に覚醒時間が低下し NREM 睡眠時間が増加することが判明した。LF は睡眠誘発作用を示すジペプチドとしては、はじめての例である。その他、外因性神経調節ペプチドの機能解析により新しい神経経路を複数発見した。

LF 投与後に脳内のどのような部位が活性化されるのかを c-Fos の免疫染色により検討した。その結果、LF 投与により睡眠中枢として知られる VLPO では c-Fos 発現は変化しなかったが、扁桃核および海馬でその発現上昇が認められた。この発現パターンは睡眠導入剤として用いられる diazepam のものと一致していた。

(4) 栄養条件による摂食調節ペプチド反応性の修飾

情動調節作用を示す食品タンパク質由来オピオイドペプチドの摂食調節に及ぼす影響を検討した。オピオイドはモルヒネ様の鎮痛活性を示す一群の化合物で主要なオピオイド受容体として μ (ミュー) と δ (デルタ) が知られている。これまで δ アゴニストがニューロペプチド Y (NPY) - PGD₂ 系を介して、摂食促進作用を示すことを報告した。また、予め高脂肪食を与えた場合には、デルタアゴニストは逆に摂食抑制作用を示すことを明らかにした。今回、この摂食抑制作用がメラノコルチン (MC) - コルチコトロピン放出因子 (CRF) 系を介することを明らかにした。普通食摂取の際には オピオイド受容体の

下流で NPY - PGD₂ 摂食促進系が活性化される一方、高脂肪食摂取の際には、受容体の下流で、MC-CRF 摂食抑制系が活性化されることが判明した。すなわち、栄養条件によって神経経路が修飾されることを見出した。

以上、これまでに蓄積した強力な不安薬様作用を示すジペプチドの構造 - 活性相関情報に基づき、食品タンパク質を摂取した際に消化管内で生成すると考えられる新しい情動調節ペプチドを見出した。医薬品に匹敵する強力な情動調節作用を示すことから、新しい外因性神経調節因子である可能性が考えられる。また、情動調節作用を示すペプチドの中に、睡眠誘発作用や摂食調節作用、エネルギー代謝調節作用を示すものを見出した。普通食摂取と高脂肪食摂取では、同じリガンドであっても、異なる神経経路を活性化することを明らかにし、栄養条件により神経経路が修飾されることを明らかにした。潜在的な神経系と他の調節系のクロストークは今後の重要な研究課題である。

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 13 件)

1. Kaneko K, Mizushige T, Miyazaki Y, Lazarus M, Urade Y, Yoshikawa M, Kanamoto R, Ohinata K. δ -Opioid receptor activation stimulates normal diet intake but conversely suppresses high-fat diet intake in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 査読有 2014; 306(4):R265-72.
2. Kontani N, Omae R, Kagebayashi T, Kaneko K, Yamada Y, Mizushige T, Kanamoto R, Ohinata K. Characterization of Ile-His-Arg-Phe, a novel rice-derived vasorelaxing peptide with hypotensive and anorexigenic activities. **Mol Nutr Food Res**. 査読有 2014; 58(2):359-64.
3. Yamada A, Mizushige T, Kanamoto R, Ohinata K. Identification of novel β -lactoglobulin-derived peptides, wheylin-1 and -2, having anxiolytic-like activity in mice. **Mol Nutr Food Res**. 査読有 2014; 58(2):353-8.
4. Mizushige T, Sawashi Y, Yamada A, Kanamoto R, Ohinata K. Characterization of Tyr-Leu-Gly, a novel anxiolytic-like peptide released from bovine α S-casein. **FASEB J**. 査読有 2013; 27(7):2911-7.
5. Mizushige T, Kanegawa N, Yamada A, Ota A, Kanamoto R, Ohinata K. Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice. **Neurosci Lett**. 査読有 2013; 543:126-9.
6. Kaneko K, Yoshikawa M, Ohinata K. Novel orexigenic pathway prostaglandin D₂-NPY system--involvement in orally active orexigenic δ opioid peptide. **Neuropeptides**. 査読有 2012;46(6):353-7.
7. Kagebayashi T, Kontani N, Yamada Y, Mizushige T, Arai T, Kino K, Ohinata K. Novel CCK-dependent vasorelaxing dipeptide, Arg-Phe, decreases blood pressure and food intake in rodents. **Mol Nutr Food Res**. 査読有 2012; 56(9):1456-63.
8. Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y, Ohinata K. Orally administered rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice. **Mol Nutr Food Res**. 査読有 2012; 56(8):1315-23.
9. Oda A, Kaneko K, Mizushige T, Lazarus M, Urade Y, Ohinata K. Characterization of ovalin, an orally active tryptic peptide released from ovalbumin with anxiolytic-like activity. **J Neurochem**. 査読有 2012; 122(2):356-62.
10. Miyamoto C, Yoshida M, Yoshikawa M, Mizushige T, Ohinata K. Complement C5a exhibits anxiolytic-like activity via the prostaglandin D₂-DP₁ receptor system coupled to adenosine A_{2A} and GABA_A receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**. 査読有 2012; 98(1-2):17-22.
11. Yamada Y, Muraki A, Oie M, Kanegawa N, Oda A, Sawashi Y, Kaneko K, Yoshikawa M, Goto T, Takahashi N, Kawada T, Ohinata K. Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KK Δ y mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 査読有 2012; 302(4):E433-40.
12. Hou IC, Suzuki C, Kanegawa N, Oda A, Yamada A, Yoshikawa M, Yamada D, Sekiguchi M, Wada E, Wada K, Ohinata K. β -Lactotensin derived from bovine β -lactoglobulin exhibits anxiolytic-like activity as an agonist for neurotensin NTS₂ receptor via activation of dopamine D₁ receptor in mice. **J Neurochem**. 査読有 2011; 119(4):785-90.
13. Suzuki C, Miyamoto C, Furuyashiki T,

Narumiya S, Ohinata K. Central PGE₂ exhibits anxiolytic-like activity via EP₁ and EP₄ receptors in a manner dependent on serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D₁ and GABA_A receptors. **FEBS Lett.** 査読有 2011; 585(14):2357-62.

〔学会発表〕(計7件)

1. 大日向耕作、水重貴文、金本龍平．神経調節ペプチド．日本栄養・食糧学会シンポジウム 2013年5月26日、名古屋
2. 大日向耕作．消化管ホルモンを介する外因性ペプチドの多様な生理作用、第5回アミノ酸学会夏のシンポジウム、2013年7月26日、小樽
3. Kousaku Ohinata. Food-derived orexi-genic peptide. 第7回国際カヘキシアカンファランス種子島シンポジウム、2013年12月13日、種子島
4. Kousaku Ohinata. Orally Active Neuro-modulatory Peptides. 103th AOCs Annual Meeting & Expo, 2012年4月29日~5月2日、Long Beach, CA, USA
5. 大日向耕作. コメ由来ペプチドの多機能性と持続化作用. 日本栄養・食糧学会シンポジウム 2012年5月18-20日、仙台
6. Kousaku Ohinata. Novel orally active peptides derived from food proteins. Cornell University-Kyoto University Joint Symposium on Bioactive Food Components. 2012年3月5日、Cornell Univ., Ithaca, NY, USA
7. 大日向耕作．PGE₂はEP₄/EP₁受容体を介して抗不安作用を示す．日本生化学会シンポジウム．2011年9月22日、京都

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

(3)連携研究者

裏出良博 (URADE Yoshihiro)
大阪バイオサイエンス研究所・研究部長
研究者番号：10201360