

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292070

研究課題名(和文) 経口投与で有効な新規神経調節ペプチドの受容システムの分子機構解明

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanism of the sensing system of novel orally active 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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：多成分からなる食品を摂取すると消化管酵素により分解され膨大な分子種が生成する。これまで我々はペプチド構造-活性相関情報を基盤に膨大な分子種を含むペプチド混合物から生理活性ペプチドを効率的に探索し、一群の生理活性ペプチドが存在することを明らかにした。さらに本研究では、中鎖ペプチドの経口投与により強力な神経調節作用を示す場合があることを見出した。これらの中鎖ペプチドは、吸収を前提とした作用機構とは異なり、まず、消化管に作用し、求心性迷走神経を介し、あるいは体液性に、中枢へとペプチドシグナルが伝達されると考えられる。食品タンパク質に由来する中鎖ペプチドによる神経調節作用の新しい腸-脳連関を解明した。

研究成果の概要(英文)：A number of molecules are produced from food composed of various components after digestion by enzymes present in the gastrointestinal tract. We found many bioactive peptides derived from enzymatic digests of food proteins based on structure-activity relationship of functional peptides. In this study, we found that orally administered mid-size peptide exhibits potent neuromodulating effect. The neuromodulating effect was blocked by vagotomy, and it increased c-Fos positive cell in the NTS, where the input from the vagus nerve is known to be received. These results suggest that the mid-size peptide acts on the gastrointestinal tract, and thereafter, the peptide signal from the gut is transferred to the central nervous system. Thus, we revealed that mid-size peptides derived from food proteins act via the novel gut-brain communication.

研究分野：食品生理機能学

キーワード：ペプチド 中鎖 腸-脳軸 情動調節 食欲 グレリン

1. 研究開始当初の背景

多成分からなる食品を摂取すると、多様な酵素により分解され膨大な分子種が生成する。生体は、これらの分子の、おそらく一部を認識し、恒常性を維持していると考えられる。タンパク質を例にとると、食品中に含まれる多種類のタンパク質は、消化管内で基質特異性の異なるプロテアーゼにより分解され、様々なアミノ酸鎖長とアミノ酸配列からなる膨大な種類のペプチドが生じる。あるいは、発酵食品など、摂取前に微生物由来のプロテアーゼで分解される場合もある。このように生成する膨大な分子種全てを同定し生理活性を評価することは困難である。そこで我々は、比較的組み合わせの少ないジペプチドに着目し、まず、生理活性に不可欠なペプチド構造を明らかにし、次に、生理活性を示すタンパク質の酵素消化物から、生理活性のルールを満たすペプチドを効率的に探索した。その結果、一群の生理活性ペプチドが存在することが明らかとなった。

これまで我々はジペプチドの神経系に対する作用に着目し、抗不安薬や抗うつ薬のスクリーニングに使用される行動試験により、医薬品に匹敵する強力な抗不安ペプチド Tyr-Leu (YL) を見出した (FEBS Lett 2010)。さらに、消化管を想定した酵素条件で牛乳の主要タンパク質カゼインを消化した際に、Tyr-Leu-Gly (YLG) が効率的に生成するとともに、YLG も同様に強力な抗不安作用を示すことを明らかにした (FASEB J 2013)。さらに今回、この構造上のルールを満たす 11 残基の新しい抗不安様ペプチドを大豆タンパク質の酵素消化物から発見した。本ペプチドは比較的分子量が大きいにも関わらず、経口投与で医薬品に匹敵する強力な抗不安様作用を示すことを明らかにした。従来からの吸収を前提とした作用機構ではなく、腸-脳連関を介した新しい作用機構が想定された。

2. 研究の目的

(1) 経口投与により強力な抗不安様作用を示す中鎖ペプチドの作用機構解明

主要なダイズ種子貯蔵タンパク質β-コングリシニンのキモトリプシン消化で効率的に生成する 11 残基ペプチドは、分子量が比較的大きいにも関わらず (MW.1260)、経口投与 (0.3 mg/kg) で強力な抗不安作用を示す。モルに換算すると、これまでに発見した食品由来ペプチドの中で最も強力な抗不安様作用を示すと言える。興味深いことに、腹腔内投与よりも経口投与で効果的に抗不安作用を示すことから、その作用点は消化管であると考えられる。従来、情動調節に関する受容体研究は中枢神経系を中心に行われてきたが、消化管を介したシグナル伝達経路はほとんど考慮されておらず注目に値する。そこで

本研究では、この中鎖ペプチドの腸-脳連関を介した情動調節機構を検討した。

(2) 中鎖グレリン分泌抑制ペプチドの摂食抑制作用

グレリンは、胃から単離された 28 アミノ酸残基の食欲亢進作用を示す内因性ペプチドホルモンである。これまで食品成分のグレリン分泌機構の詳細は不明であり、特に、タンパク質の酵素消化により生成するペプチドフラグメントのグレリン分泌に及ぼす影響について報告は皆無であった。そこで我々は食品由来ペプチドについて検討し世界に先駆けて複数のグレリン分泌調節ペプチドを見出した (FESB 2016)。さらに本研究では、牛乳タンパク質由来する 9 残基のグレリン分泌抑制ペプチド lacto-ghrestatin の作用機構を検討した。また、経口投与によりグレリン様の生理作用を示すか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1) 中鎖ペプチドの情動調節作用評価

ペプチドの情動調節作用は、マウス行動試験により検討した。抗不安様作用は抗不安薬のスクリーニングに使用される高架式十字迷路試験により評価した。高さ 50cm に設置されたオープンアームとクローズドアームからなる高架式十字迷路にペプチドを経口投与したマウスを置き 5 分間行動を観察した。オープンアームの滞在時間と進入回数の割合が上昇した際に、抗不安作用ありと評価した。

(2) 腸-脳連関の解明

大豆由来ペプチドの経口投与による抗不安様作用の腸-脳軸を介しているかを検討した。まず、末梢情報を中枢へ伝達する求心性迷走神経の関与を検討するため、迷走神経切除 (vagotomy) を実施した。麻酔下において開腹し、食道両側の迷走神経を物理的に切除した。回復期間を経過した後に、マウスにペプチドサンプルを経口投与し高架式十字迷路試験を実施した。

また、求心性迷走神経が入力する部位として知られる孤束核 (NTS) における神経活動を、神経活動マーカー c-Fos 発現の上昇で評価した。マウスにサンプルを経口投与した後に、麻酔下で還流固定後に脳を摘出、凍結切片を作成し、抗 c-Fos 抗体を用いて免疫染色した。c-Fos 陽性細胞をカウントした。

(3) 中鎖ペプチドのグレリン分泌機構解明

ペプチドサンプルのグレリン分泌におよぼす影響を岩倉らが樹立した MGN3-1 細胞 (Endocrinology 2010) を用いて検討した。

MGN3-1 細胞にサンプルを添加し、4 時間後に培地を回収し ELISA でグレリン濃度を測定した。また、ペプチド添加後のセカンドメッセンジャーを測定し細胞内シグナル伝達を検討した。

牛乳β-ラクトグロブリン由来のグレリン分泌抑制ペプチドの in vivo 生理活性を検討した。具体的には、本ペプチドをマウスに経口投与し、採血し、血漿グレリン濃度を測定した。また、一晚、絶食後にペプチドを投与し、固形飼料を与え、その重量を測定し、摂食量を算出することにより、摂食調節作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 構造 - 活性相関を基盤とした新規ペプチドの効率的な探索

これまで我々は、ジペプチド Tyr-Leu (YL) の抗不安様作用の発見を起点に N 末端が芳香族アミノ酸-Leu であり、C 末端に鎖長を延長したペプチドが抗不安様作用を示すことを明らかにし、抗不安様作用を示すペプチドの構造上ルールがあることを見出した。一方、マウス行動試験により、大豆の種子貯蔵タンパク質β-コングリシニンのペプシン消化物の情動調節作用を検討したところ、β-コングリシニンのキモトリプシン消化物が抗不安様作用を示すことを明らかにした。本消化物には抗不安様作用を示す生理活性ペプチドが生成することが推定された。

次に、このキモトリプシン消化物に含まれるペプチドの中で、上記の抗不安様作用を示すペプチド構造上のルールを満たす抗不安様ペプチド候補を探索した。なお、本消化物に含まれるペプチドは、NanoLC-OrbitrapMS を用いた一斉分析により得られたデータを利用した。その結果、β-コングリシニンαサブユニット(323-333)、以後β-CGα(323-333)とする、に相当する 11 残基ペプチドが候補として浮上した。そこで、本ペプチドを化学合成し、その情動調節作用を検討した。その結果、本ペプチドの抗不安様作用を示すことが判明した。興味深いことに、11 残基と比較的分子量が高いにも関わらず、経口投与で 0.3 mg/kg という医薬品に匹敵する強力な活性を示すことが明らかとなった。腹腔内投与の最小有効量が 1.0 mg/kg であり、吸収を前提とした従来の低分子化合物とは異なる作用機構を介しているものと考えられた。したがって、この抗不安様ペプチドの標的は消化管に存在し、さらに、消化管で生じたペプチドシグナルが中枢に伝達されるものと考えられた。そこで、本ペプチドの腸-脳連関について検討した。

(2) 経口投与で有効な中鎖ペプチドの腸 - 脳軸を介した抗不安様作用

経口投与で強力な抗不安様作用を示す新規ペプチドβ-CGα(323-333)の作用機構を検討した。まず、本ペプチドが、消化管から中枢へ末梢情報を伝達する求心性迷走神経を介して抗不安様作用を示すか否かを、迷走神経切除(vagotomy)により評価した。その結果、sham 群では、β-CGα(323-333)の経口投与により抗不安様作用を示す一方、vagotomy 群では、抗不安様作用を示さなかった(図1)。したがって、β-CGα(323-333)の抗不安様作用は、迷走神経を介していることが判明した。実際、本ペプチドの経口投与により、迷走神経の入力先として知られる孤束核における c-Fos(神経活動マーカー)陽性細胞数が有意に増加し、抗不安様作用が迷走神経を介している実験結果と一致している。本ペプチドは、迷走神経を介して抗不安様作用を示す食品ペプチドとしては初めての例であり注目に値する。

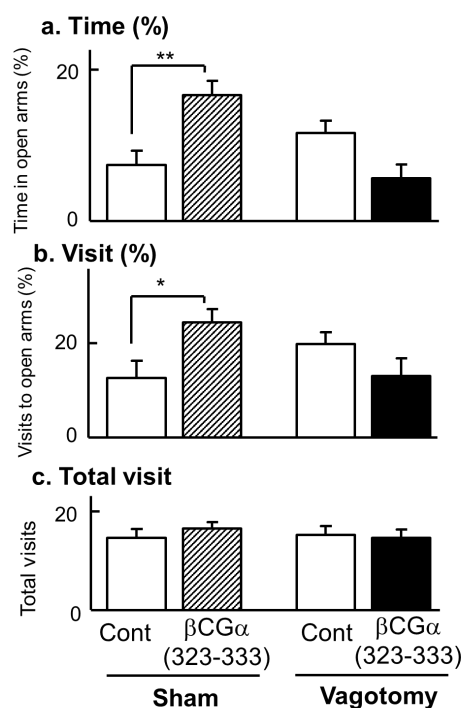


図1. 迷走神経を介したβ-CGα(323-333)の抗不安様作用。Sham(偽手術)およびVagotomy(迷走神経切除)マウスに対し大豆ペプチドを投与し高架式十字迷路試験を実施した(NeuroChem Int 2016より転載)。

さらに、本ペプチドのメディエーターについて情動調節に関連する受容体のアンタゴニストを用いて検討した。β-CGα(323-333)の抗不安様作用は、セロトニン5-HT_{1A}受容体アンタゴニストWAY100635により阻害された。本ペプチドは5-HT_{1A}受容体に親和性を示さないことから、内因性のセロトニン遊離を介しているものと考えられる。セロトニンは中枢神経のみならず消化管にも存在し神経伝達物質として重要な役割を演じることが知られている。そこで、中枢および消化管の

いずれのセロトニン系が情動調節に重要かを検討した。その結果、5-HT_{1A} アゴニスト 8-OH-DPAT は、脳室内投与では抗不安様作用を示す一方、経口投与では抗不安様作用は認められなかった。また、消化管に存在する 5-HT₃ 受容体に対するアゴニストを経口投与した場合も抗不安様作用を示さなかった。したがって、中枢の 5-HT_{1A} 受容体が抗不安様作用を仲介することが判明した。以上の結果より、β-CGα (323-333) は消化管に作用し、迷走神経を活性化、さらに、孤束核に入力し、中枢の 5-HT_{1A} 受容体を活性化するものと考えられる。

さらに 5-HT_{1A} 受容体の下流の作用機構を検討した。本受容体の下流でドーパミン D₁ 受容体および GABA_A 受容体が活性化されることが知られている。そこで、これらの受容体に対するアンタゴニストを用いて検討した。その結果、β-CGα (323-333) の抗不安様作用はドーパミン D₁ 受容体アンタゴニスト SCH23390 および、GABA_A 受容体アンタゴニスト Bicuculline により阻害された。本ペプチドはいずれの受容体にも親和性を示さないことから、内因性のドーパミンおよび GABA 遊離を介して、それぞれの受容体を活性化するものと考えられる。

(3) 経口投与で有効な中鎖グレリン分泌抑制ペプチドのキャラクタリゼーション

最近、我々が発見した乳清タンパク質β-ラクトグロブリンの酵素消化により生成する 9 残基ペプチド lacto-ghrestatin について、その性質を検討した (FEBS Lett, in press)。本ペプチドをグレリン分泌細胞 MGN3-1 に添加しセカンドメッセンジャーを検討したところ cAMP の上昇を抑制した。一方、細胞内 Ca²⁺ については、変化が認められなかった。また、lacto-ghrestatin 添加後に変動するグレリン生合成関連遺伝子を検討した結果、preproghrelin, ghrelin O-acyl transferase (GOAT), prohormone convertase 1/3 (PC1/3) などの mRNA 発現が低下することが明らかとなり分泌抑制に加えグレリン合成も抑制されていることが示唆された。さらに、in vivo における活性を検討した。本ペプチドを血中グレリンレベルが高値を示す絶食マウスに経口投与したところ、グレリン濃度が低下することが判明した。一方、グレリンレベルが低い非絶食マウスでは、ペプチドの効果が認められなかった。したがって、食欲が亢進している状態において、本ペプチドが効果的に作用することが予想される。実際、絶食マウスに本ペプチドを経口投与することにより、摂食量が低下することを発見した。

9 残基ペプチドと比較的分子量大きいにも関わらず、低用量の経口投与で生理活性を示すことより、吸収されて効果を示すというよりは、消化管に直接作用しシグナルが中枢に伝達されるものと考えられる。

(4) 新しいシグナル伝達機構の解明

食品タンパク質由来の生理活性ペプチドの中には、細胞内 Ca²⁺ や cAMP など従来のセカンドメッセンジャーに依存しないシグナル伝達系を介する場合も少なくない。そこで、PathScan 抗体アレイにより、リン酸化タンパク質を検討した。また、Wes (ProteinSimple 社) を使用しタンパク質リン酸化を迅速に定量する評価系を確立した。

(5) 今後の展望

食品タンパク質に由来する中鎖ペプチドの生理活性を検討した。その結果、大豆由来の 11 残基ペプチドが強力な抗不安様作用を示すことを明らかにした。加えて、牛乳タンパク質に由来する 9 残基グレリン分泌抑制ペプチドが経口投与で摂食抑制作用を示すことが判明した。いずれも比較的分子量大きいにも関わらず経口投与で強力な生理活性を示すことから、従来の吸収を前提とした作用機構ではなく、消化管に直接作用し、ペプチドシグナルが求心性迷走神経を介して neuronal に、あるいは hormonal に中枢に伝達され、生理作用を示すものと考えられる (図 2)。このような中鎖ペプチドは、基礎科学の発展に寄与するだけでなく新しい機能性食品の素材や医薬品のリードとして応用が可能である。また今後、消化管における中鎖ペプチドの標的受容体を同定することにより新しい学術分野の確立が十分に期待できる。

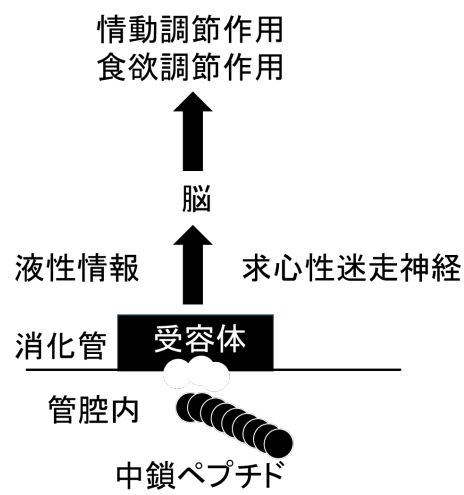


図 2 . 経口投与で有効な中鎖ペプチドの腸 - 脳連関。大豆由来の中鎖ペプチド β-CGα (323-333) の経口投与の抗不安様作用、並びに、牛乳に由来する中鎖グレリン分泌抑制ペプチド lacto-ghrestatin の摂食抑制作用に関するスキーム。

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)

1. Aoki H, Nakato J, Mizushige T, Iwakura H, Sato M, Suzuki H, Kanamoto R, Ohinata K. **FEBS Lett.** 査読有 in press. Lacto-ghrestatin, a novel bovine milk-derived peptide, suppresses ghrelin secretion.

2. Ota A, Yamamoto A, Kimura S, Mori Y, Mizushige T, Nagashima Y, Sato M, Suzuki H, Odagiri S, Yamada D, Sekiguchi M, Wada K, Kanamoto R, Ohinata K. **Neurochem Int.** 査読有 2017; 105:51-57. Rational identification of a novel soy-derived anxiolytic-like undecapeptide acting via gut-brain axis after oral administration.

3. 大日向耕作. 構造 - 活性相関を基盤とする食品由来の情動調節ペプチドの探索と脳腸相関. 臨床栄養. 2016; 128:795-800

4. Yamamoto Y, Mizushige T, Mori Y, Shimmura Y, Fukutomi R, Kanamoto R, Ohinata K. **Neuropeptides.** 査読有 2015; 51:25-9. Antidepressant-like effect of food-derived pyroglutamyl peptides in mice.

5. Miyazaki Y, Kaneko K, Iguchi S, Mizushige T, Kanamoto R, Yoshikawa M, Shimizu T, Ohinata K. **Mol Nutr Food Res.** 査読有 2014; 58(10): 2046-52. Orally administered δ opioid agonist peptide rubiscolin-6 stimulates food intake in aged mice with ghrelin resistance.

〔学会発表〕(計9件)

1. 大日向耕作. 経口投与で有効な食品由来の情動調節ペプチドと腸 脳連関. 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会. 2016年9月. 福岡国際会議場

2. 大日向耕作. 消化管を標的とする中鎖ペプチドによる情動および食欲調節作用. 平成28年度生理研研究会-情動研究会「神経回路研究と精神疾患研究の連合による情動機構解明」2016年10月. 生理学研究所(岡崎)

3. 大日向耕作. 情動および摂食調節を示す経口投与で有効な中鎖ペプチドと腸 脳連関. 生理化学ユニット第6回シンポジウム. 2016年12月. 京都大学

4. 大日向耕作. 食品タンパク質由来の新しいグレリン分泌調節ペプチドの発見. 第3回鹿児島黒豚「食と健康シンポジウム」2017年1月. 鹿児島大学

5. 大日向耕作. ペプチドと神経系—食品タンパク質由来ペプチドの多彩な機能性— 第11回食と健康研究会、2015年10月、北海道大学

6. Akane Yamamoto, Kousaku Ohinata An Orally Active Soy-derived Undecapeptide That Exerts An Anxiolytic-like Effect Via the Gut-brain Axis. 第52回ペプチド討論会、2015年11月、神奈川県平塚市

7. 大日向耕作. 水重貴文. 抗うつ薬様活性を有するジペプチドの標的受容体. 日本生化学会、2014年10月、京都国際会議場

8. Kousaku Ohinata. Novel food-derived bioactive peptides acting on the nervous system. 日本解剖学会・日本生理学会、2015年3月、神戸国際会議場

9. 大日向耕作. 構造活性相関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、2015年3月、岡山大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

大日向 耕作 (OHINATA Kousaku)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 00361147