

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850081

研究課題名(和文)食品由来情動調節ペプチドの新しいシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Novel signaling pathway in food-derived neuromodulating 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は、ジペプチドTyr-Leu(YL)が抗うつ作用を示すことを動物行動学的手法により明らかにした。また、YLの細胞膜結合タンパク質を探索し、骨形成タンパク質(BMP)受容体タイプ1A(BMPR1A)を同定した。本研究において、YLとBMPR1Aの相互作用が抗うつ作用に関与するか検討した。結果、BMPR1Aの*in vivo* RNAiによる発現抑制により、YLの抗うつ作用は消失し、BMP阻害剤の投与は抗うつ作用を示した。また、YLはBMPの海馬神経幹細胞の増殖抑制を阻害した。これらの結果は、YLによるBMPシグナルの抑制により海馬神経新生を促進し抗うつ作用を示すことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We found that a dipeptide, tyrosyl leucine (Tyr-Leu, YL), exhibited an antidepressant-like effect in behavioral tests using mice. This antidepressant-like activity was blocked by RNAi knockdown of hippocampal bone morphogenetic protein (BMP) receptor type 1A (BMPR1A). It was reported that the inhibition of BMP signal stimulated neuronal proliferation. We found that the inhibition of BMP signal exhibited the antidepressant-like effect. YL suppressed BMP-induced decrease in neuronal proliferation in cultured cells. In mice, YL enhanced the proliferation of hippocampal progenitor cells *in vivo*. Our findings demonstrate that inhibition of the BMP signaling by YL exhibits an antidepressant-like effect, and YL induces hippocampal neuronal proliferation.

研究分野：生物機能化学

キーワード：ペプチド うつ ストレス 骨形成タンパク質受容体

## 1. 研究開始当初の背景

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低分子ペプチドのなかに抗不安作用や抗うつ作用(精神的ストレス緩和作用)、学習促進作用、食欲調節作用など脳神経系に対して作用するものが存在し、なかには、経口投与で有効な場合があることを明らかにしてきた。そのなかで、ジペプチドのチロシルロイシン(YL)が抗不安作用に加え、イミプラミンなどの医薬品に匹敵する低用量で強力な抗うつ作用を併せ持つことを見出した。この作用は、脳室内投与でも示されており、YLが脳で直接作用していることが示唆されている。また、YLがうつ様行動に関与するとされる海馬神経幹細胞の増殖を促進することを、動物を用いた検討で明らかにした。一方、脳膜タンパク質画分を用いた Pull-down アッセイにより YL の標的受容体候補を探索したところ、セリン/スレオニンキナーゼ活性を示す受容体である骨形成タンパク質受容体(BMPR)<sub>1A</sub>を見出した。一部の抗うつ薬や BMP アンタゴニストである Noggin が海馬神経新生を促進することが報告されているが、BMP シグナルとうつ行動との直接的な関連は不明である。本研究では、YL-BMPR 相互作用とうつ行動との関係を明らかにし、新たな抗うつ素材の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

これまで我々は、YL が抗不安作用に加え、抗うつ作用を示すことを動物行動学的試験により明らかにした。また、YL の標的受容体候補として BMPR<sub>1A</sub> が見出された。そこで、YL の抗うつ作用が BMPR<sub>1A</sub> を介したものか否か、さらに BMP シグナルに対してどのように作用するかについて検討し、YL の抗うつ作用

の作用メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) in vivo RNAi 法による BMPR<sub>1A</sub> 発現の抑制方法

siRNA ( 0.625 μg ) および invivofectamine を混合し、30 分間、室温でインキュベートした。5% グルコース溶液を加え、脳室内投与した。海馬における BMPR<sub>1A</sub> の発現が抑制していることを real time RT-PCR により確認した。

2) 抗うつ作用のマウス行動学的評価

抗うつ作用は、強制水泳試験または尾懸垂試験を用いて評価した。

強制水泳試験は高さ 20 cm のビーカーに 12 cm まで水( 25 )を入れ、ddY マウス( 雄、5 週齢 ) を強制的に遊泳させた。尾懸垂試験は高さ 30 cm のところでマウス尾を固定し逆さ吊りにした。両試験とも、6 分間の無動時間を計測し、無動時間が増加した場合に抗うつ作用ありと判定した。

3) BMP シグナルの評価

神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を用いた。Neuro2a 細胞に YL またはその溶媒を加え 30 分後に BMP2 またはその溶媒を加えた。BMP2 の添加から 120 分後に細胞を剥離させ、NP40 を含む細胞懸濁液で 30 分間、氷上でインキュベートした。遠心分離し( 10,000 rpm、10 分間、4 )、上清を回収した。抗 p-smad 1/5/8 抗体を用いたウェスタンブロット法により、BMP 下流シグナルである smad リン酸化について調べた。

4) 海馬神経幹細胞を用いた細胞増殖の評価

生後 1 日のマウスから海馬を採取した。0.25%トリプシンで処理した後、トリプシン阻害剤で処理した。DMEM / F12 培地、B27、Glutamax、ペニシリンストレプトマイシン溶液、bFGF、および EGF の混合培地に懸濁し、プレートに播種した。新たに、ポリオルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングしたプレートを準備した。増殖した神経球を採取し、0.25%トリプシンで処理した後、トリプシン阻害剤で処理した。Neurobasal 培地、B27、Glutamax、ペニシリンストレプトマイシン溶液、bFGF、および EGF の混合培地に懸濁し、コーティングしたプレートに播種した。3 日間培養した後、YL (3-300  $\mu$ M) を添加した。YL の添加から 30 分後に BMP2 (100 ng/mL) および増殖細胞に取り込まれる臭化デオキシウリジン (BrdU) を添加した。BMP2 および BrdU の添加から 120 分後にパラホルムアルデヒドにより細胞を固定した。抗ネスチン抗体、抗 BrdU 抗体を用いて、増殖細胞を免疫染色した。BrdU / ネスチン陽性細胞を増殖細胞として、その数をカウントした。

#### 4 . 研究成果

1 ) YL の標的分子候補 BMPR<sub>1A</sub> の発現抑制マウスを用いた抗うつ作用に関する検討

コントロールマウスでは、強制水泳試験で YL 投与により無動時間が有意に減少し、YL の抗うつ作用が見られたが、BMPR<sub>1A</sub> 発現抑制マウスにおいて、YL 投与による抗うつ作用は見られなかった。このことから、YL の抗うつ作用は BMPR<sub>1A</sub> が関与していることが示唆された。

2 ) YL の BMP シグナルに対する作用

Neuro2a 細胞に YL を単独で添加したところ、smad1/5/8 のリン酸化に対する影響は確認されなかった。一方で、BMP2 の単独添加では smad1/5/8 のリン酸化が確認されたが、YL を添加した後に BMP2 を添加したところ、BMP2 による smad1/5/8 のリン酸化が有意に抑制された。これらのことから、YL が BMPR<sub>1A</sub> と何らかの形で相互作用し、その下流シグナルが阻害されていることが示唆された。

3 )BMP シグナルのうつ様行動に対する作用

BMP シグナルの阻害剤である Noggin を投与し、強制水泳試験を用いて、BMP シグナル阻害のうつ様行動に対する作用を調べた。その結果、Noggin を脳室内投与することにより、無動時間が有意に減少し、BMP シグナル阻害は抗うつ作用を示すことを明らかにした。

4 )BMP による海馬神経幹細胞の増殖抑制に対する YL の作用

BMP は海馬神経幹細胞の増殖を抑制することが報告されている。そこで、YL が BMP による海馬神経幹細胞の増殖抑制に対してどのように作用するか検討した。我々の検討においても、培養海馬神経幹細胞への BMP2 添加により、その増殖は抑制されたが、YL を BMP2 添加 30 分前に添加すると、BMP2 による海馬神経幹細胞の増殖抑制作用が阻害された。

以上をまとめると、本研究において、BMP シグナルの活性化は、海馬神経幹細胞の増殖を抑制し、抗うつ作用を示すことが明らかとなった。一方、YL は、BMP シグナルを阻害することにより、海馬神経幹細胞の増殖を促進し、抗うつ作用を

惹起することが示唆された。YL と BMPR<sub>1A</sub> がどのような形で相互作用しているか、また YL を経口摂取した場合に、消化吸収過程を経て、どのように標的部に到達しているかについては未だ明らかになっておらず、今後の検討課題であると考えられる。本研究成果は、YL - BMPR<sub>1A</sub> 相互作用が海馬神経幹細胞の増殖促進およびうつ様行動の抑制に関与していることを示している。また、YL のような BMP シグナル抑制が新たな抗うつ機構として期待でき、世界中で問題となっている精神疾患の予防あるいは治療のツールの 1 つとして考えられる。

#### 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 4 件 )

1. A novel Alaska pollack-derived peptide, which increases glucose uptake in skeletal muscle cells, lowers the blood glucose level in diabetic mice. Ayabe T, Mizushige T, Ota W, Kawabata F, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Kanamoto R, Ohinata K. Food Funct. 2015 Aug;6(8):2749-57.

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

3. Fish protein intake induces fast-muscle hypertrophy and reduces liver lipids and serum glucose levels in

rats.

Kawabata F, Mizushige T, Uozumi K, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Kishida T. Biosci Biotechnol Biochem. 2015;79(1):109-16.

4. Orally administered  $\delta$  opioid agonist peptide rubiscolin-6 stimulates food intake in aged mice with ghrelin resistance.

Miyazaki Y, Kaneko K, Iguchi S, Mizushige T, Kanamoto R, Yoshikawa M, Shimizu T, Ohinata K.

Mol Nutr Food Res. 2014 Oct;58(10):2046-52.

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

1. ○水重貴文、石田祐己、金本龍平、大日向耕作、情動調節における BMP 経路の新しい役割、第 68 回日本栄養食糧学会、2014 年 6 月 1 日、江別

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 3 件 )

1. 名称 : 抗うつ剤又は抗不安剤

発明者 : 大日向耕作、水重貴文、山本裕佳子、原田昌卓、新村 由記

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2014-162735

取得年月日：2014 年 09 月 08 日

国内外の別：国内

2. 名称：抗うつ / 抗不安薬の標的受容体  
B M P R 1 A

発明者：大日向耕作、水重貴文、石田祐己

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2015-154757

取得年月日：2015 年 08 月 27 日

国内外の別：国内

3. 名称：新規トリペプチド及びペプチド含有組成物、並びにそれらの使用、それらを有効成分として含有する摂食抑制剤、抗肥満剤、動脈弛緩剤、血圧降下剤、メタボリックシンドローム予防改善剤、又は食欲調節用の食品組成物

発明者：井上孝司、大日向耕作、水重貴文、大前諒、奥田知夏

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2015-209400

取得年月日：2015 年 11 月 24 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/biochemistry/index.htm>

6 . 研究組織

(1)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：705701008

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：