

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	中戸 絢也
論文題目	Physiological studies on gastrointestinal sensing of peptides and amino acids (ペプチドおよびアミノ酸の腸管受容に関する生理学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>腸管は、外界の情報を生体に反映するインターフェイスである。我々が摂取した食品成分は、腸管において栄養素として吸収されたのちに体内で利用される。一方で、管腔内に存在する食品成分が、腸管に直接認識され、吸収等を前提としない受容機構を介して多彩な生理作用を示す例が明らかとなりつつある。これらの作用には、ホルモン分泌や神経活動の調節が関与するが、食品成分による、腸管受容を介した内分泌系・神経系の調節については不明な点が多い。本論文では、食品タンパク質の酵素消化により生成するペプチドおよびアミノ酸に着目し、内分泌系に作用して食欲を調節する食品タンパク質由来ペプチドを2種類同定した。また、神経系に作用して腸管運動を促進するアミノ酸を見出し、その詳細な作用機構を解明した。</p>			
第1章 大豆由来の新規グレリン分泌促進ペプチド「ソイグレットロピン」			
<p>グレリンは、摂食促進作用を示す消化管ホルモンである。グレリンの血中濃度は加齢に伴って減少することから、高齢者における食欲不振の改善に寄与するグレリン分泌促進物質の開発が望まれる。そこで、大豆の主要な貯蔵タンパク質β-コングリシニン(β-CG)からグレリン分泌促進ペプチドを探索した。</p> <p>マウス胃由来グレリン分泌細胞株MGN3-1において、β-CGのトリプシン消化物はグレリン分泌を促進した。この消化物を逆相HPLCで分画し、最も強力にグレリン分泌を促進したフラクションを質量分析計およびプロテインシーケンサーで分析した結果、β-CGのαサブユニット(192-213)に相当する22残基ペプチドを同定した。このペプチドのN末端側の11残基ペプチドNKNPFLFGSNRは、全長の22残基ペプチドよりも強力なグレリン分泌活性を示したことから、NKNPFLFGSNRをソイグレットロピンと命名し、ソイグレットロピンがβ-CGのトリプシン消化により実際に生成することを確認した。</p> <p>ソイグレットロピンのN末端およびC末端のアミノ酸残基を欠失させるとグレリン分泌活性が低下したことから、両末端が活性発揮に重要であることが判明した。ソイグレットロピンを雄性ddYマウスに経口投与した結果、血中グレリン濃度が上昇し、摂食促進作用を示した。以上、大豆β-CGより、経口投与で有効な11残基のグレリン分泌促進ペプチド「ソイグレットロピン(NKNPFLFGSNR)」を見出した。</p>			
第2章 牛乳由来の新規グレリン分泌抑制ペプチド「ラクトグレスタチン」			
<p>摂食促進ホルモンであるグレリンの血中濃度は、絶食により増加し、摂食開始後に減少する。したがって、グレリン分泌抑制物質は食欲抑制および抗肥満効果が期待できる。そこで、牛乳乳清の主要なタンパク質β-ラクトグロブリン(β-LG)からグレリン分泌抑制ペプチドを探索した。</p> <p>β-LGを微生物由来酵素サーモリシンで処理して得られた消化物が、MGN3-1細胞に</p>			

においてグレリン分泌を抑制した。消化物中に含まれるペプチドをnanoLC-Orbitrap-MSにより網羅的に分析し、検出強度が高い順に10個のペプチドを合成した。これらのグレリン分泌抑制活性を検討した結果、9残基ペプチドLIVTQTMKGが最も強力な活性を示したことから、LIVTQTMKGをラクトグレスタチンと命名した。ラクトグレスタチンはMGN3-1細胞において、 $G\alpha_i$ シグナリングを活性化した。さらに、ラクトグレスタチンはグレリン前駆体およびその成熟に関連する遺伝子の発現を抑制し、細胞内グレリン含量を減少させた。したがって、ラクトグレスタチンはグレリンの分泌だけでなく、合成も抑制すると考えられた。また、血中グレリン濃度が高値を示す絶食条件下において、雄性ddYマウスにラクトグレスタチンを経口投与したところ、血中グレリン濃度が低下し、摂食抑制作用を示した。以上、牛乳 β -LGより、経口投与で有効な9残基のグレリン分泌抑制ペプチド「ラクトグレスタチン」を見出した。

第3章 アミノ酸による腸管運動促進作用の作用機序解明

塩基性アミノ酸であるL-リシン (Lys)およびL-オルニチン (Orn)が、経口投与により腸管運動を促進することを見出した。塩基性アミノ酸の受容体は、*in vitro*系において幾つか報告されているが、*in vivo*での生理作用を仲介する受容体の報告は無い。そこで、LysとOrnの腸管運動促進作用を仲介する受容体と下流の分子を検討した。

LysとOrnは摂食抑制作用も示した。陽イオンチャネルTRPV1のアゴニストであるカプサイシンは、腸管運動を促進し摂食を抑制することが知られている。そこで、LysとOrnの腸管運動促進作用におけるTRPV1の関与を検討した。その結果、LysとOrnの腸管運動促進作用はTRPV1欠損マウスにおいて消失した。また、Ornの腸管運動促進作用はTRPV1アンタゴニストの腹腔内投与ではなく、経口投与によって阻害されたことから、腸管のTRPV1に作用していると考えられた。さらに、TRPV1を強制発現させた HEK 293細胞にLysおよびOrnを添加したところ、TRPV1を介した Ca^{2+} の流入が観察されたことから、LysとOrnのシグナリングはTRPV1を介していることが判明した。

次に、LysおよびOrnの腸管運動促進作用を仲介する下流のメディエーターを、阻害剤等を用いて検討した。その結果、LysおよびOrnの作用はムスカリン性アセチルコリン受容体および一酸化窒素合成酵素の活性化を介することが判明した。また、選択的阻害剤を用いた検討により、LysおよびOrnは内皮型一酸化窒素合成酵素を介して作用することが判明した。以上、LysとOrnはTRPV1の下流でアセチルコリン-一酸化窒素合成系を介して腸管運動を促進することを見出した。

以上、本論文では、経口投与で有効なグレリン分泌調節ペプチドを2種類見出した。また、塩基性アミノ酸の腸管運動促進作用の詳細な作用機序を解明した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

腸管は、摂取した食品成分を栄養素として吸収するだけでなく、リガンドとして認識する。近年、食品成分が腸管受容機構を介して多彩な生理作用を示す例が報告されているが、食品成分による内分泌系・神経系の調節の詳細は不明である。本論文は、様々な酵素消化を用いて得られた食品タンパク質由来ペプチドならびにアミノ酸に着目し、経口投与により内分泌系に作用して摂食調節作用を示すペプチドを検索・同定するとともに、神経系に作用して腸管運動促進作用を示すアミノ酸の作用機序を明らかにしている。評価される点は以下の通りである。

1. 大豆β-コングリシニンのトリプシン消化物から、グレリンの分泌を促進する22残基ペプチドを同定した。このペプチドの構造活性相関を検討し、N末端側の11残基ペプチドNKNPFLFGSNRがより強力なグレリン分泌活性を示すことを見出し、ソイグレットロピンと命名した。さらに、ソイグレットロピンの経口投与により、マウスの血中グレリン濃度が上昇し摂食量が増加することを示した。
2. 牛乳β-ラクトグロブリンのサーモリシン消化物に含まれるペプチドの網羅的分析により、9残基のグレリン分泌抑制ペプチドLIVTQTMKGを同定し、これをラクトグレスタチンと命名した。ラクトグレスタチンはG α_i シグナリングを活性化し、グレリンの分泌だけでなく合成も抑制することを明らかにした。さらに、絶食させたマウスにラクトグレスタチンを経口投与すると、血中グレリン濃度が低下するとともに摂食量が減少することを示した。
3. 塩基性アミノ酸であるL-リシンとL-オルニチンが、経口投与により腸管運動を促進することを見出した。その作用は、腸管のTRPV1の下流でアセチルコリン—酸化窒素合成系の活性化を介していることを明らかにした。

以上のように、本論文は、グレリンの分泌調節を介して摂食調節作用を示す2種類の食品タンパク質由来ペプチドを初めて発見するとともに、アミノ酸の新しい腸管運動促進経路も明らかにしたものであり、食品生理機能学、食環境学、健康科学および酵素化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年2月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）