

【研究題目】

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)

【研究背景・目的】

腸管は、外部から入力された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、腸管によって直接認識され、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場合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などが関与するが、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。そこで本研究では、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た。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。

【第1章】大豆由来の新規グレリン分泌促進ペプチド soy-ghretropin

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。これまで一部の内因性ホルモンによるグレリン分泌促進作用が報告されているが、食品タンパク質由来の外因性ペプチドについては全く不明である。そこで、大豆の主要な貯蔵タンパク質 β -conglycinin (β -CG) からグレリン分泌促進ペプチドを探索した。

β -CG トリプシン消化物をマウス胃由来グレリン分泌細胞株 MGN3-1 に添加した結果、グレリン分泌を促進することが判明した。次に、 β -CG 消化物を逆相 HPLC で分画し、各フラクションのグレリン分泌活性を検討した。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 "soy-ghretropin" と命名した。Soy-ghretropin は、 β -CG のトリプシン消化により実際に生成した。Soy-ghretropin 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減弱したことから、両末端が活性発揮に重要であることが判明した。なお、soy-ghretropin は、MGN3-1 の細胞内 Ca^{2+} および cAMP を増加させなかったことから、従来とは異なるグレリン分泌促進経路を介して作用することが示唆された。Soy-ghretropin 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 soy-ghretropin (NKNPFLFGSNR) を見出した。

【第2章】牛乳由来の新規グレリン分泌抑制ペプチド lacto-ghrestatin

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。脂肪酸やグルコ

ースによるグレリン分泌抑制作用が報告されている一方で、食品タンパク質由来ペプチドによるグレリン分泌抑制作用は明らかではない。そこで、牛乳乳清の主要なタンパク質 β -lactoglobulin (β -LG)からグレリン分泌抑制ペプチドを探索した。

β -LG を *Bacillus thermoproteolyticus* 由来酵素サーモリシンで処理して得られた消化物 MGN3-1 細胞に添加したところ、グレリン分泌を抑制した。そこで、 β -LG 消化物中に含まれるペプチドを nanoLC-OrbitrapMS 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”lacto-ghrestatin”と命名した。Lacto-ghrestatin は MGN3-1 細胞において、フォルスコリン刺激による cAMP 合成亢進を阻害したことから、 $G\alpha_i$ シグナリングを活性化することが判明した。さらに、lacto-ghrestatin 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、lacto-ghrestatin 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、lacto-ghrestatin 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 lacto-ghrestatin (LIVTQTMKG)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-リジン (Lys)、L-オルニチン (Orn)、L-アルギニン (Arg)の経口投与により、Lys と Orn がマウスの腸管運動を促進する一方で、Arg は抑制することを見出した。即ち、同じ塩基性アミノ酸でも異なる受容機構が腸管に存在することが示唆された。塩基性アミノ酸の標的受容体は、*in vitro* 評価系において幾つか報告されているが、*in vivo* における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ならびに下流のメディエーターを検討した。

Lys と Orn は経口投与により摂食抑制作用を示した。陽イオンチャネル Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)のアゴニストであるカプサイシンも、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、TRPV1 欠損マウスでは Lys と Orn の腸管運動促進作用は消失した。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 HEK293 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 TRPV1 下流のメディエーターを検討した。腸管運動を調節する神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh)および一酸化窒素 (NO)の関与を検討したところ、Lys、Orn およびカプサイシンの腸管運動促進作用は、ムスカリン性 ACh 受容体アンタゴニストおよび NO 合成酵素 (NOS)阻害剤によって阻害された。また、NOS のアイソフォームを選択的阻害剤により検討した結果、Lys および Orn は内皮型 NOS 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ー一酸化窒素系を介して腸管運動を促進することを見出した。