

牛乳タンパク質由来の低分子ペプチドによる食欲抑制作用

京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻

食品生理機能学分野 准教授 大日向 耕作

教授 吉川 正明

大学院生 侯 依静

大学院生 末次 建太郎

要 約

牛乳タンパク質の酵素消化によって派生する種々の生理活性ペプチドから摂食調節ペプチドを探索した。 α -ラクトアルブミン由来の Gly-Lue-Phe (GLF)、および β -ラクトグロブリン由来のニューロテンシンアゴニスト His-Ile-Arg-Leu (HIRL, β -ラクトテンシン) をマウスに腹腔内投与 (100 mg/kg) することにより、用量依存的な摂食抑制作用を示すことを初めて見出した。このうち β -ラクトテンシン (500 mg/kg) は、経口投与により有意な摂食抑制作用を示すことを見出した。さらに、 β -ラクトテンシンは 30-60 nmol/mouse の脳室内投与により用量依存的な摂食抑制作用を示すとともに、60 nmol/mouse の脳室内投与により胃排出能 (gastric emptying) を抑制することを明らかにした。したがって、本ペプチドの摂食抑制作用は、胃排出の遅延による可能性が考えられる。 β -ラクトテンシンは牛乳タンパク質由来の経口投与で有効な摂食抑制ペプチドとしては初めての例であり、今後のより詳細な検討が必要である。

キーワード: 乳タンパク質、食欲調節、生理活性ペプチド、 β -ラクトグロブリン、 β -ラクトテンシン、ニューロテンシン、消化管運動

1. はじめに

牛乳は、栄養価の優れた食品であるという認識が定着している一方で、肥満を増長するのではないかという潜在的なイメージも浸透している。しかしながら実際には、牛乳摂取量と Body Mass Index (BMI) が、むしろ逆相関するという疫学調査結果も報告されており [1]、牛乳は肥満を促進する食品には分類されていない。この一因として、牛乳タンパク質から派生する低分子ペプチドが、食欲を抑制している可能性が考えられる。

近年、レプチンやグレリンなどに代表される内因性の摂食調節ペプチドおよびそれらの受容体が数多く見出され、食欲調節に重要な役割を演じていることが明らかとなっている。既に食品タンパク質の酵素分解により多彩な生理作用を示す低分子ペプチドが派生することが判明しているが、これらの中には食欲を調節するものがあることを見出している [2]。そこで本研究では、特に牛乳タンパク質の酵素消化によって得られる低分子の生理活性ペプチドに着目し、食欲に及ぼす影響について検討した。

2. 実験方法

2-1. 試薬

牛乳タンパク質由来の低分子ペプチド Gly-Leu-Phe および His-Ile-Arg-Leu は、Fmoc 法により固相合成し、逆相 HPLC を用いて精製し、さらに凍結乾燥したものを使用した。

2-2. 摂食実験

実験動物として7週齢雄性 ddY マウス（日本 SLC、静岡）を用いた。プラスチックケージに個別飼育し、固形飼料（CE-2、日本クレア）および水を自由摂取させた。3日間以上予備飼育し、摂食実験を行った。18時間絶食後、ペプチドを投与し、予め重量を測定した固形飼料を与え、経時的に固形飼料の重量を測定し、摂食量を算出した（図1）。

経口投与および腹腔内投与の場合は、各ペプチドを生理的食塩水に溶解した。また、経口投与には胃ゾンデを用いた。

脳室内投与の場合は、手術によりマウス脳室内にガイドカニューレを予め移植し、回復したのちに、摂食実験に供した [3-5]。すなわち、ネンブタールを ddY マウスに腹腔内投与し (80-85 mg/kg)、麻酔したのち、第三脳室内にペプチド溶液が投与できるように、bregma より 0.9mm 後方、0.9mm 側方、深さ 3mm の位置に 24G カニューレーサーフレットキャス（ニプロ、大阪）を加工したガイドカニューレを、脳位固定装置を用いて移植、固定した。カニューレーション手術から1週間程度経過したのちに、摂食実験を行った。ペプチドは人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid: ACSF; 138.9 mM NaCl, 3.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 4.0 mM NaHCO₃, 0.6 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, pH7.4) に溶解し、無麻酔・無拘束状態のマウスにマイクロシリンジを用いて 4 μl 投与した。

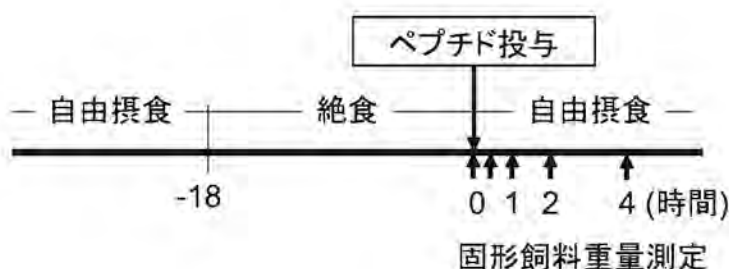


図1 摂食実験方法



図2 胃排出能 (gastric emptying rate) 測定方法

2-3. 胃排出能

ddY マウスを18時間絶食したのちに、1時間、固形飼料を与え、その摂食量を測定し、ペプチド溶液を脳室内投与した(図2) [3,4]。さらに2時間絶食し、頸椎脱臼後、開腹し、胃内容物の流出を防ぐため幽門と噴門を結紮し、胃を摘出した。さらに、胃内容物を凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。胃排出能は以下の式に従って計算した。

$$\text{胃排出能 (\%)} = \{1 - (\text{胃内容物重量}/\text{摂食量})\} \times 100.$$

3. 結果

3-1. 牛乳タンパク質由来の摂食抑制ペプチドの探索

牛乳タンパク質由来の低分子ペプチドを腹腔内投与した際に、どのように摂食量が変化するかを検討した。その結果、種々の生理活性ペプチドの中で His-Ile-Arg-Leu (β -ラクトテンシン) [6] および Gly-Lue-Phe (GLF) [7] という2種類の低分子ペプチドが摂食抑制作用を示すこと見出した。

3-1-1. Gly-Leu-Phe の摂食抑制作用

β -ラクトアルブミン由来の免疫促進ペプチドである GLF を 100mg/kg 腹腔内投与したところ、投与後 20 分および 120 分において有意な摂食抑制作用を示した (図3)

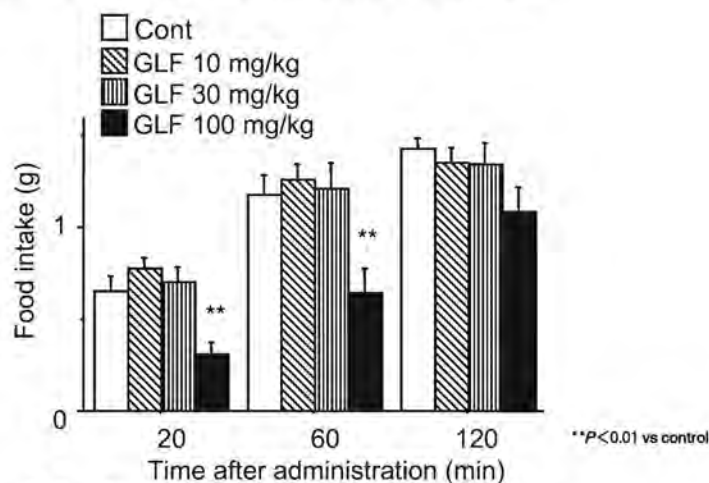


図3 GLF の腹腔内投与による摂食抑制作用

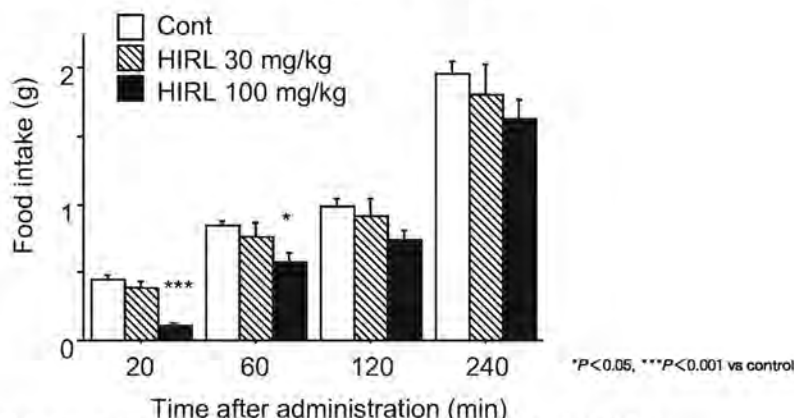


図4 β -ラクトテンシン (HIRL) の腹腔内投与による摂食抑制作用

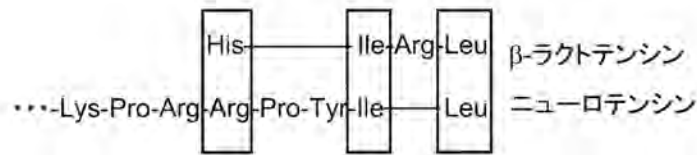


図5 β -ラクトテンシンとニューロテンシンのホモロジー

表1 ニューロテンシンと β -ラクトテンシンのニューロテンシン NT₁ および NT₂ 受容体に対する親和性と選択性

	K _i (μ M)		NT ₁ / NT ₂
	NT ₁	NT ₂	
ニューロテンシン	0.00012	0.0054	0.022
β -ラクトテンシン	360	7.7	47

3-1-2. His-Ile-Arg-Leu (β -ラクトテンシン) の摂食抑制作用

β -ラクトテンシン (30-100 mg/kg) の腹腔内投与により、用量依存的な摂食量の低下が認められ、100 mg/kg 投与群の摂食量は、投与後 20 分および 60 分において有意に低い値を示した (図4)。したがって、本ペプチドは摂食抑制作用を有することが明らかとなった。 β -ラクトテンシンは、 β -ラクトグロブリンのキモトリプシン消化物から単離した回腸収縮ペプチドで、脳-腸ホルモンとして知られるニューロテンシンにホモロジーを有し (図5)、2 種類のニューロテンシン受容体のうち NT₂ 受容体に選択的なアゴニストであることを、これまでに明らかにしている (表1)。

3-2. 経口投与で摂食抑制作用を示す β -ラクトテンシン

腹腔内投与により摂食抑制作用を示した β -ラクトテンシンおよび GLF が、経口投与により作用を示すか否か ddY マウスを用いて検討した。図6 に示したように、 β -ラクトテンシン (500 mg/kg) は経口投与後 60 分まで摂食量の低下が認められた。したがって、本ペプチドは、経口投与で有効な摂食抑制ペプチドといえる。 β -ラクトテンシンは乳タンパク質由来の摂食抑制ペプチドとしては初めての例である。

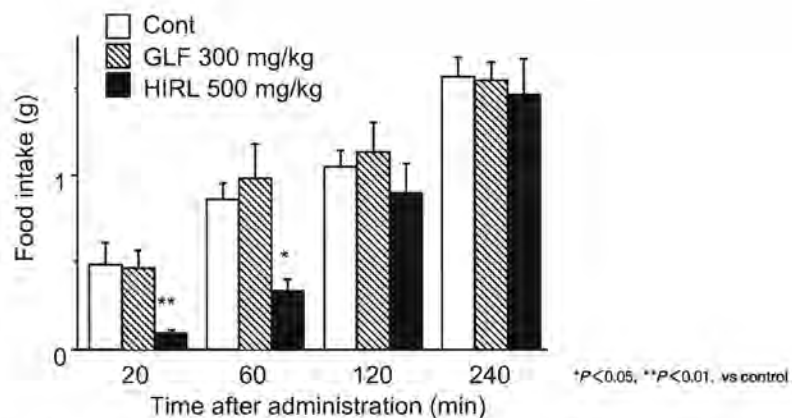


図6 GLF および β -ラクトテンシン (HIRL) の経口投与による摂食抑制作用

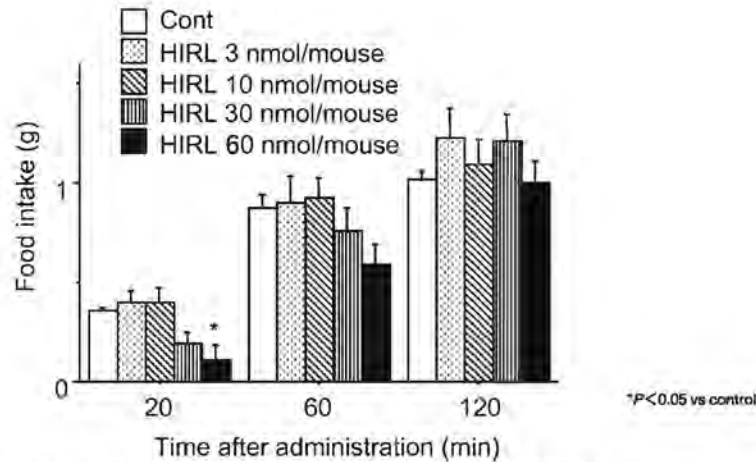


図7 β-ラクトテンシンの脳室内投与による摂食抑制作用

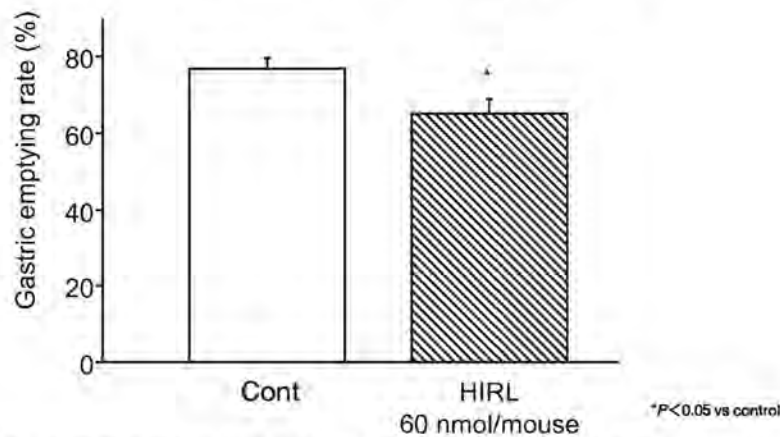


図8 β-ラクトテンシンの脳室内投与による胃排出抑制作用

なお、腹腔内投与で摂食抑制作用を示した GLF は、経口投与では有意な摂食量の変化を示さなかった

3-3. β-ラクトテンシンの脳室内投与による摂食抑制作用と胃排出遅延作用

β-ラクトテンシンが腹腔内投与および経口投与により摂食抑制作用を示したことから、次に中枢神経系に直接投与した場合の、摂食量の変化を検討した。その結果、β-ラクトテンシン (30-60 nmol/mouse) は用量依存的な摂食抑制作用を示した (図7)。摂食抑制作用を有する生理活性ペプチドの多くは、消化管運動に影響をおよぼし、胃排出を抑制することが知られている。そこで、β-ラクトテンシンの胃排出能に及ぼす影響について検討した。60 nmol/mouse の脳室内投与により、β-ラクトテンシンは、有意に胃排出能を抑制したことから、β-ラクトテンシンは消化管運動を抑制する作用を有することが判明した (図8)。摂食抑制作用が認められる濃度で、胃排出能が阻害されることから、β-ラクトテンシンによる摂食抑制には、胃排出能の遅延が影響しているかもしれない。

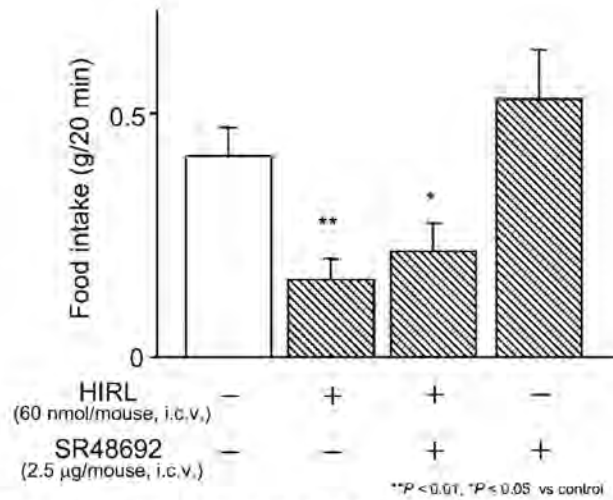


図9 β-ラクテンシンの摂食抑制作用に及ぼすNT₁受容体アンタゴニストの影響

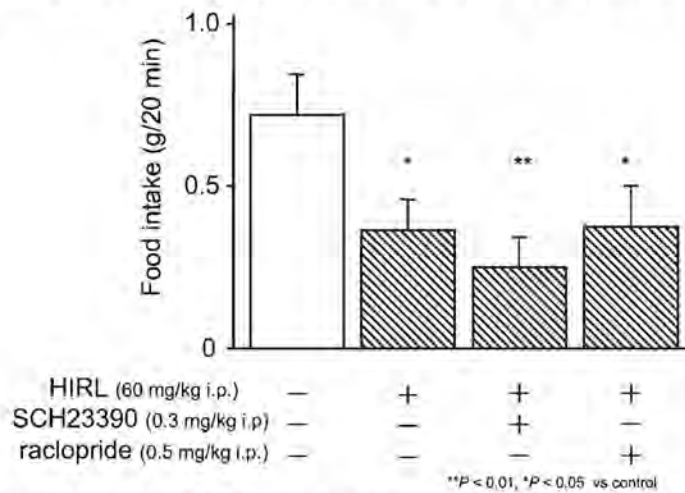


図10 β-ラクテンシンの摂食抑制作用に及ぼすドーパミンD₁およびD₂受容体アンタゴニストの影響

3-4. β-ラクテンシンの摂食抑制機構

β-ラクテンシンの摂食抑制の作用機構を種々のアンタゴニストを用いて検討した。β-ラクテンシンは、NT₂受容体に選択性を示すが、ニューロテンシン自身の摂食抑制作用は、NT₂受容体ではなく、むしろNT₁受容体を介するため、まず、NT₁受容体が関与するか検討した。意外なことに、β-ラクテンシンの摂食抑制作用は、NT₁受容体アンタゴニストのSR48692では阻害されなかった(図9)。さらに、NT₁およびNT₂受容体に対する非選択的アンタゴニストSR142948によっても、阻害されなかったことから(data not shown)、β-ラクテンシンの摂食抑制作用は、ニューロテンシン受容体以外の受容体を介しているものと考えられる。また、摂食抑制作用を有する神経伝達物質であるドーパミンの関与についても検討したところ、β-ラクテンシンの摂食抑制作用は、ドーパミンD₁受容体アンタゴニストのSCH23390およびD₂受容体アンタゴニストのracloprideにより影響を受けなかった(図10)。したがって、β-ラクテンシンは、ドーパミン系とは別の経路を介して摂食抑制作用を示すものと考えられる。

4. 考 察

牛乳タンパク質の酵素消化によって派生する種々の生理活性ペプチドの摂食調節作用を検討したところ、 β -ラクトアルブミンのキモトリプシン消化によって生成する β -ラクトテンシンが、経口投与で摂食抑制作用を示すことを初めて見出した。これまでに、本ペプチドは、コレステロール低下作用、胆汁酸分泌促進作用、鎮痛作用、学習促進作用および恐怖学習抑制作用を有することを見出してきたが(図 11) [8-11]、さらに、本研究により摂食抑制作用という新しい作用を有することが判明した。 β -ラクトテンシンは、コレステロール低下作用や、胆汁酸分泌促進作用などの末梢作用に加え、学習促進作用および摂食抑制作用などの中枢作用を示すことから、消化管から吸収されたのちに、脳-血液関門を越え、中枢神経系に作用している可能性が考えられる。さらに、脳室内投与により中枢に直接投与した場合にも、摂食抑制作用を示すことは、この仮説を支持している。

これまでに、 β -ラクトテンシンは、ニューロテンシン NT_2 受容体に親和性を示し、本ペプチドのコレステロール低下作用、鎮痛作用、および恐怖学習抑制作用は、 NT_2 受容体を介することを明らかにしている [9-11]。また、 β -ラクトテンシンは NT_2 受容体に選択性を示すが、 NT_1 受容体にも弱い親和性を示し、回腸収縮作用は NT_1 受容体を介することが判明している(図 11)。しかしながら、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は NT_1 および NT_2 のいずれの受容体も介さないことが明らかとなり、摂食抑制作用に関しては、ニューロテンシン受容体以外の受容体を介しているものと考えられる。

なお、 β -ラクトテンシンによるコレステロール低下作用、鎮痛作用、学習促進作用はドーパミンを介することが判明しているが [8,11] (図 11)、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は、ドーパミン D_1 および D_2 受容体アンタゴニストにより阻害されなかったことから、ドーパミン系とは別の経路を介して摂食抑制作用を示すものと考えられる。このことは、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用が NT_1 および NT_2 受容体を介さないという実験結果に一致する。

最近、 β -ラクトテンシンは、ニューロテンシン受容体以外に、アドレナリン受容体に親和性を

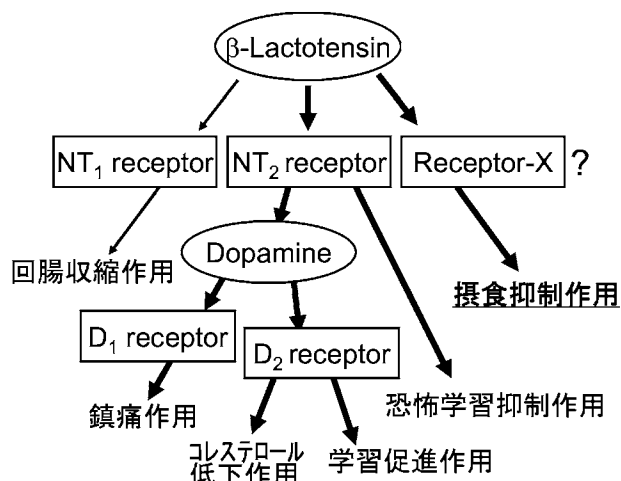


図 11 β -ラクトテンシンの生理作用とその作用機構

示すことが報告されている [12]。摂食抑制作用に加え、交感神経活性による代謝亢進作用を示す可能性が考えられ、抗肥満作用が期待される。

参考文献

1. Barba G, Troiano E, Russo P, Venezia A, Siani A. *Br J Nutr.* 2005 ; 93 (1) : 15-9. Inverse association between body mass and frequency of milk consumption in children.
2. Arg-Ile-Tyr (RIY) derived from rapeseed protein decreases food intake and gastric emptying after oral administration in mice. *Peptides.* 2006 ; 27 (9) : 2065-8.
3. Ohinata K, Inui A, Asakawa A, Wada K, Wada E, Yoshikawa M. Albutensin A and complement C3a decrease food intake in mice. *Peptides.* 2002 ; 23 (1) : 127-33.
4. Ohinata K, Suetsugu K, Fujiwara Y, Yoshikawa M. Suppression of food intake by a complement C3a agonist [Trp⁵]-oryzatensin (5-9). *Peptides.* 2007 ; 28 (3) : 602-6.
5. Ohinata K, Shimano T, Yamauchi R, Sakurada S, Yanai K, Yoshikawa M. The anorectic effect of neurotensin is mediated via a histamine H₁ receptor in mice. *Peptides.* 2004 ; 25 (12) : 2135-8.
6. Yamauchi R, Usui H, Yunden J, Takenaka Y, Tani F, Yoshikawa M. Characterization of beta-lactotensin, a bioactive peptide derived from bovine β -lactoglobulin, as a neurotensin agonist. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003 ; 67 (4) : 940-3.
7. Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L, Jollès P. *Immunol Lett.* Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. 1988 ; 18 (1) : 27-31.
8. Ohinata K, Sonoda S, Inoue N, Yamauchi R, Wada K, Yoshikawa M. β -Lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine β -lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice. *Peptides.* 2007 ; 28 (7) : 1470-4.
9. Yamauchi R, Wada E, Yamada D, Yoshikawa M, Wada K. Effect of β -lactotensin on acute stress and fear memory. *Peptides.* 2006 ; 27 (12) : 3176-82.
10. Yamauchi R, Ohinata K, Yoshikawa M. β -lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT₂ receptor. *Peptides.* 2003 ; 24 (12) : 1955-61.
11. Yamauchi R, Sonoda S, Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Antinociception induced by β -lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from β -lactoglobulin, is mediated by NT₂ and D₁ receptors. *Life Sci.* 2003 ; 73 (15) : 1917-23.
12. Buhler AV, Proudfit HK, Gebhart GF. Neurotensin-produced antinociception in the rostral ventromedial medulla is partially mediated by spinal cord norepinephrine. *Pain.* 2008 ; 135 (3) : 280-90.