

牛乳由来の摂食抑制ペプチドβ-ラクトテンシンの作用機構

京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻

大日向 耕作

侯 依静

大阪大学大学院工学研究科 フロンティア研究センター

吉川 正明

要 約

β-ラクトテンシン (His-Ile-Arg-Leu) は、牛乳β-ラクトグロブリンのキモトリプシン消化により派生する回腸収縮ペプチドで、これまでにコレステロール低下作用、胆汁酸分泌促進作用、学習促進作用を有する多機能性ペプチドであることを明らかにしている。さらに最近、β-ラクトテンシンがマウスにおいて摂食抑制作用を有することを新たに見出した。そこで本研究では、β-ラクトテンシンの摂食抑制機構について検討した。

摂食抑制ペプチド受容体に対する種々のアンタゴニストを用いて、その作用機構を検討したところ、β-ラクトテンシンの摂食抑制作用は、corticotropin-releasing factor (CRF) 受容体のアンタゴニスト (astressin) と calcitonin gene-related peptide (CGRP) 受容体のアンタゴニスト (CGRP (8-37)) によって阻害された。なお、β-ラクトテンシンは CRF および CGRP の受容体には親和性を示さなかったことから、これらの受容体の活性化を介しているものと考えられる。なお、CRF の摂食抑制作用は、CGRP アンタゴニストで阻害される一方、CGRP の摂食抑制作用は、CRF アンタゴニストでブロックされなかった。すなわち、CRF 受容体の下流で CGRP 受容体が活性化されることを新たに見出したことになる。以上の結果より、β-ラクトテンシンは、CRF 受容体の下流で、CGRP 受容体を活性化し、摂食抑制作用を示すことが判明した。β-ラクトテンシンは新しい摂食抑制経路 CRF-CGRP 系を介する初めての摂食抑制ペプチドである。

キーワード: 摂食抑制、牛乳タンパク質、β-ラクトグロブリン、β-ラクトテンシン、CRF、CGRP、消化管運動

1. はじめに

近年、食品タンパク質の酵素消化物から数多くの生理活性ペプチドが生成することが明らかとなっている。これらの生理活性ペプチドの中には、血圧降下作用、コレステロール低下作用、免疫促進作用など末梢組織に対する作用のほかに、学習促進作用、抗不安作用および、摂食抑制作用など中枢神経系に対して作用するところを見出している [1]。また、牛乳は栄養価の優れた食品であることから、太りやすいというイメージが潜在的に浸透しているが、牛乳摂取量と

体格指数 (BMI) が逆相関するという疫学調査報告もあり [2]、実際には肥満を助長する食品には分類されていない。この潜在的な原因として牛乳由来の摂食抑制ペプチドが抗肥満作用を示している可能性が考えられる。そこで牛乳タンパク質の酵素消化により派生する種々の低分子ペプチドの中枢神経系に対する作用を検討したところ、種々の生理活性ペプチドの中で、 β -ラクトグロブリンのキモトリプシン消化により生成する4アミノ酸残基の β -ラクトテンシン (His-Ile-Arg-Leu) が経口投与で摂食抑制作用を示すことを見出した。さらに、本研究では β -ラクトテンシンによる摂食抑制機構を検討した。

β -ラクトテンシンは、コレステロール低下作用、胆汁酸分泌促進作用などの末梢作用に加え、学習促進作用を有する多機能性ペプチドである。 β -ラクトテンシンは脳腸ペプチドとして知られるニューロテンシンとホモロジーを有し、2種類のニューロテンシン受容体のうち、 NT_2 受容体に選択的な親和性を示す。これらの β -ラクトテンシンの多彩な生理作用は主に NT_2 受容体を介することをこれまでに明らかにしているが、意外なことに、摂食抑制作用は NT_2 および NT_1 受容体を介していないことを見出した。近年、数多くの摂食調節ペプチドとその受容体が同定され、複雑な食欲調節機構の一部が明らかにされている。そこで、 β -ラクトテンシンの摂食抑制機構がこれらのペプチド性摂食調節系を介しているかを薬理的に検討した。

2. 実験方法

2-1 試薬

β -ラクトテンシンは、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)。

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、ネプタールを 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 0.9 mm 後方、



図1 摂食実験方法

0.9 mm 側方、深さ 3 mm の位置に 24G カニューレ-セーフレットキャス (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, pH 7.4) 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。

2-3 胃排出能 (gastric emptying rate)

ddY マウスを 18 時間絶食した後に、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。

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

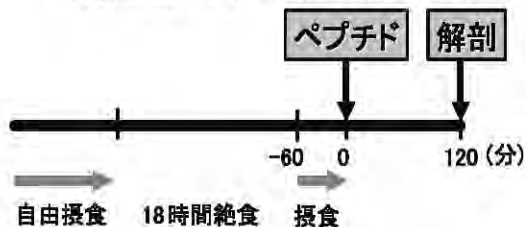


図 2 胃排出能の測定方法

2-4 消化管通過率 (gastrointestinal transit rate)

同様に雄性 ddY マウス (体重: 25 g, 日本 SLC) を 18 時間絶食した後に、ペプチドを経口投与し、その 30 分後に色素を経口投与し、さらに 5 分後に頸椎脱臼後、開腹、消化管を摘出した。小腸の全長と、色素の移動距離を測定し、小腸全体に占める色素の移動距離の割合を以下の数式にしたがって計算した。

$$\text{消化管通過率 (\%)} = (\text{色素の移動距離}/\text{小腸の全長}) \times 100$$

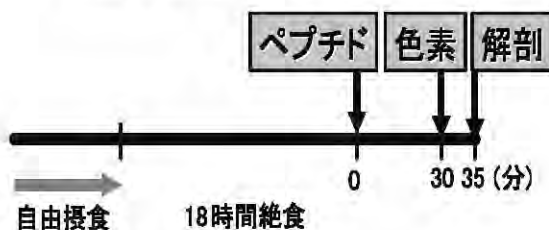


図 3. 消化管通過率の測定方法

3. 結果

3-1 β-ラクテンシンの摂食抑制作用

β -ラクトテンシンの経口投与により摂食抑制作用が認められることから、腹腔内投与および脳室内投与による摂食抑制作用の最小有効量を検討した。30-100 mg/kg の β -ラクトテンシンを腹腔内投与したところ、100 mg/kg 投与群において20分間の摂食量が有意に低下することがわかった(図4)。 β -ラクトテンシン(20-40 nmol/mouse)の脳室内投与では、20分間の摂食量が用量依存的に低下し、40 nmol/mouse 投与群において、有意な摂食量の低下が認められた(図5)。したがって、 β -ラクトテンシンは、経口投与に加え、腹腔内投与および脳室内投与により摂食抑制作用を示すことを見出した。以後、摂食抑制作用のメカニズムの検討は、 β -ラクトテンシンの脳室内投与により行った。

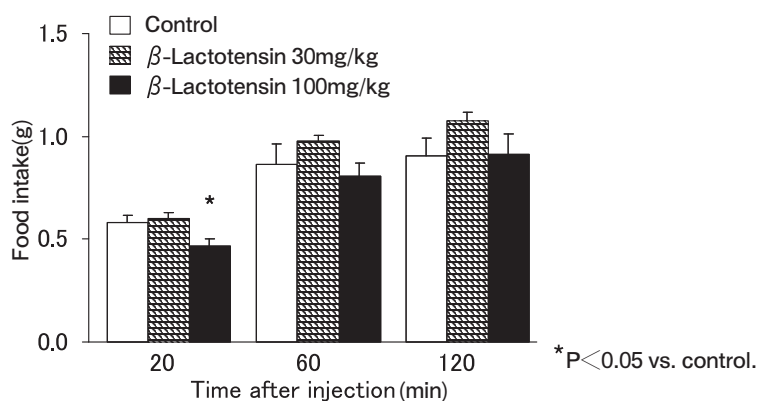


図4 β -ラクトテンシンの腹腔内投与による摂食抑制作用

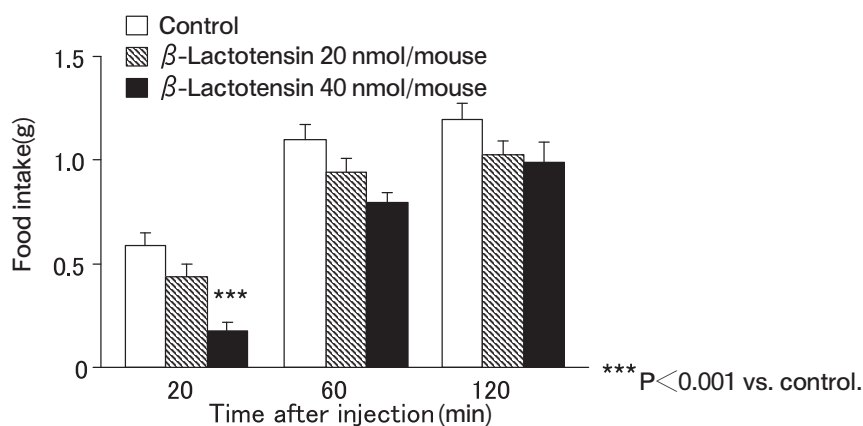


図5 β -ラクトテンシンの脳室内投与による摂食抑制作用

3-2 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用はニューロテンシン受容体を介さない

β -ラクトテンシンは、内因性の神経ペプチドであるニューロテンシンにホモロジーを有し、 NT_2 受容体を選択的親和性を示す。また、コレステロール低下作用および鎮痛作用などは NT_2 受容体を介することを NT_2 受容体アンタゴニストのlevocabastineなどを用いた薬理学実験により証明している。一方、 β -ラクトテンシンは弱いながら NT_1 受容体に親和性を示し、その回腸収縮作用は NT_1 受容体を介することを明らかにしている。さらにニューロテンシンの摂食抑制作用は NT_1 受容体を介することが判明しており、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用が NT_1 受容体を介する可能

性も考えられた。そこで、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用が NT_1 あるいは NT_2 受容体を介しているかを、それぞれ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 -ラクトテンシン (40 nmol/mouse) の脳室内投与による摂食抑制作用は、 NT_1 アンタゴニスト (SR48692, 2.5 μ g/mouse) および NT_2 アンタゴニスト (levocabastine, 2.5 μ g/mouse) のいずれの併用投与によっても阻害されなかった (図6)。したがって、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は、 NT_1 および NT_2 受容体を介さず、ニューロテンシン受容体とは異なる作用機構を介することが判明した。

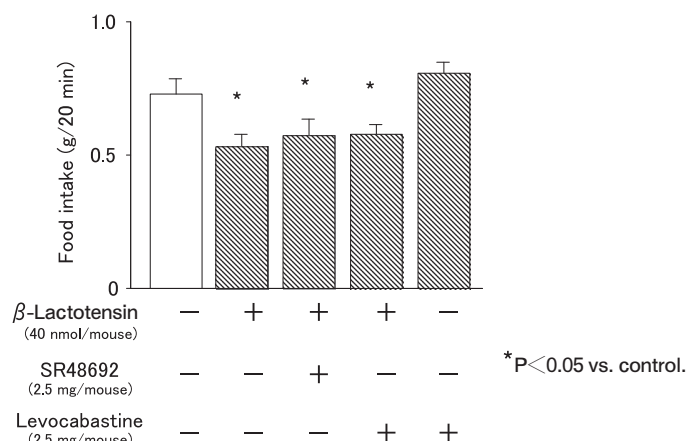


図6 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用に及ぼす NT_1 受容体 (SR48692) および NT_2 受容体アンタゴニスト (levocabastine) の影響

3-3 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は CRF および CGRP 受容体の活性化を介する

生体内には種々の摂食調節物質とその受容体が多数存在し、食欲の調節に重要な役割を果たしている。そこで種々の摂食調節物質に対するアンタゴニストを用いて、 β -ラクトテンシンの摂食抑制機構を検討した。その結果、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用には2種類の内因性ペプチドが関与していることが判明した。

ひとつは、摂食調節に重要な脳の領域である視床下部に存在する摂食抑制ペプチドとして知られる corticotropin-releasing factor (CRF) である。 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用 (40 nmol/mouse, i.c.v.) は、CRF アンタゴニストの astressin (6 nmol/mouse, i.c.v.) の併用投与によってブロックされた (図7)。なお、 β -ラクトテンシンは CRF 受容体に対する親和性を示さない。したがって、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は内因性 CRF アゴニストの放出および CRF 受容体の活性化を介していることが判明した。

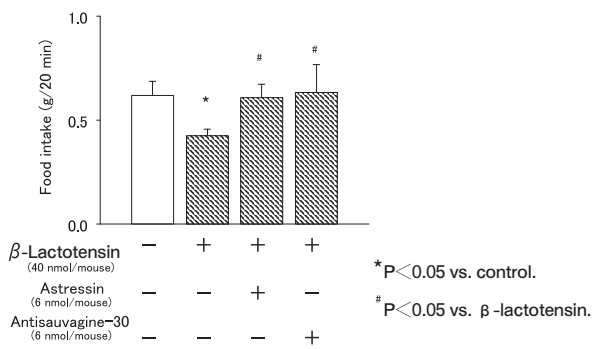


図7 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用に及ぼす CRF アンタゴニスト (astressin) の影響

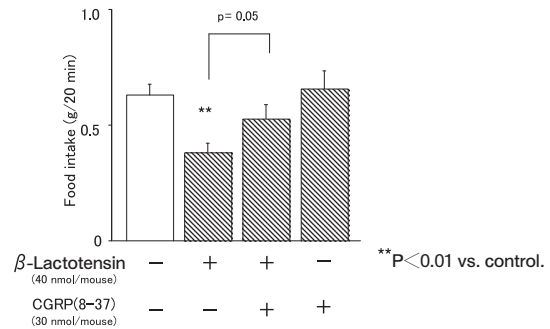


図8 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用に及ぼす CGRP アンタゴニスト (CGRP (8-37)) の影響

もうひとつは、摂食抑制作用および血圧降下作用を有する神経ペプチドの calcitonin gene-related peptide (CGRP) である。 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用 (40 nmol/mouse, i.c.v.) は、CGRP アンタゴニストの CGRP (8-37) (30 nmol/mouse, i.c.v.) によりブロックされた (図8)。 β -ラクトテンシン自身は CGRP 受容体に親和性を示さないことから、その摂食抑制作用は内因性 CGRP アゴニストの放出および CGRP 受容体の活性化を介していることが判明した。

3-4 CRF は CRF 受容体の下流で CGRP 受容体を活性化し摂食抑制作用を示す

β -ラクトテンシンの摂食抑制作用が CRF 受容体および CGRP 受容体の活性化を介していることが明らかとなったが、CRF 受容体と CGRP 受容体がどのようにクロストークするかは、これまで報告がない。そこで、CRF および CGRP による摂食抑制作用がそれぞれの受容体アンタゴニストでブロックされるかを検討した。その結果、CRF による摂食抑制作用は CGRP 受容体のアンタゴニストで阻害される (図9) 一方、CGRP の摂食抑制作用は CRF アンタゴニストでは阻害されなかった (図10)。したがって、CRF は CRF 受容体の下流で CGRP 受容体が活性化されることにより、摂食抑制作用を示すものと考えられる。本研究により CRF-CGRP 系という新しい摂食抑制経路が明らかになった。

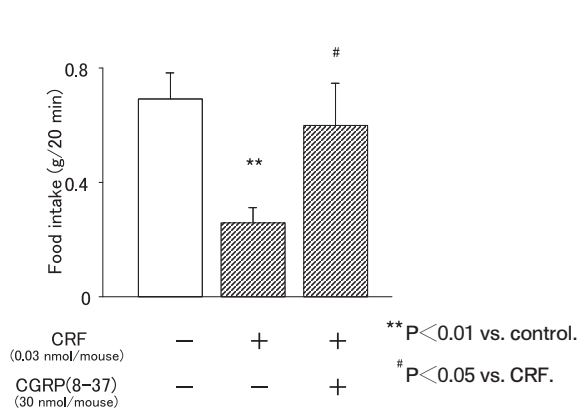


図9 CRF の摂食抑制作用に及ぼす CGRP アンタゴニスト (CGRP (8-37)) の影響

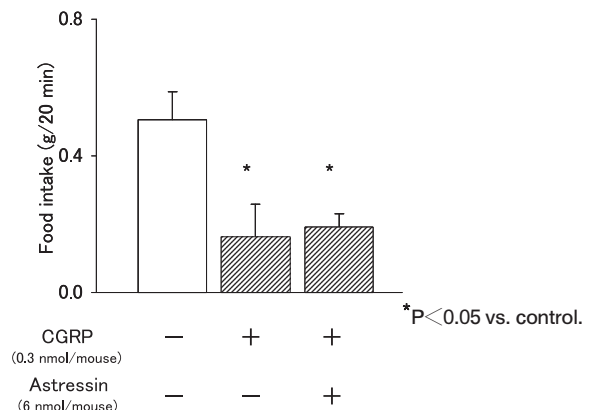


図10 CGRP の摂食抑制作用に及ぼす CRF アンタゴニスト (astressin) の影響

以上の結果より、 β -ラクトテンシンは直接作用する受容体は現在のところ不明であるが、CRF受容体を活性化した後に、CGRP受容体を活性化し、摂食抑制作用を示すことが判明した。

3-5 β -ラクトテンシンの消化管運動抑制作用

消化管運動は摂食調節と密接に関係し、多くの摂食抑制ペプチドが消化管運動を抑制することが知られている。そこで、 β -ラクトテンシンの消化管運動に及ぼす作用を検討した。 β -ラクトテンシン (30-60 nmol/mouse) の脳室内投与により消化管通過率が低下することがわかった (図 11)。本ペプチドの胃排出能に及ぼす影響を検討したところ、胃内容物の排出が遅延することが判明した (図 12)。したがって、 β -ラクトテンシンは、胃および小腸など消化管の運動を抑制することが判明した。また、 β -ラクトテンシン (60 nmol/mouse, i.c.v.) による胃排出能の低下は、CGRP アンタゴニストの CGRP (8-37) (30 nmol/mouse, i.c.v.) により全く阻害されなかった (図 12)。 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用が CGRP 受容体の活性化を介するのに対し、消化管運動抑制作用は CGRP 受容体を介していないことから、両作用は相異なるメカニズムに基づくと考えられる。

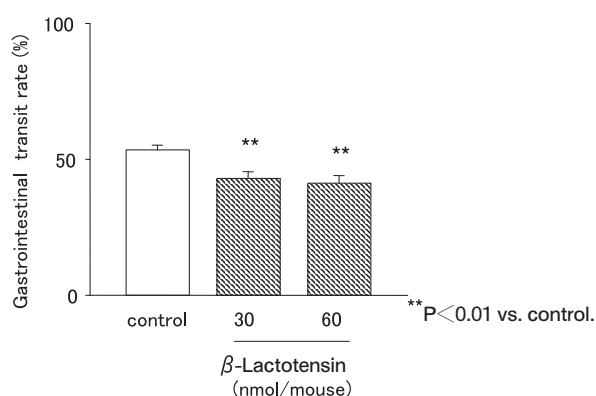


図 11 β -ラクトテンシンの脳室内投与による消化管通過率低下作用

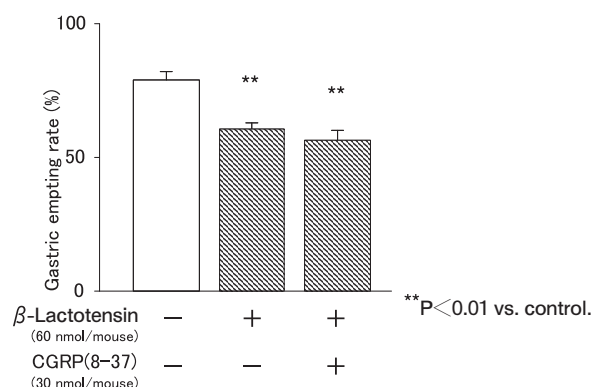


図 12 β -ラクトテンシンの胃排出能低下作用に及ぼす CGRP アンタゴニストの影響

4. 考察

牛乳 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示す多機能性ペプチドである [6-10]。さらに、経口投与で摂食抑制作用を示すことを見出し、その作用機構について検討した [11]。

β -ラクトテンシンは内因性神経ペプチドのニューロテンシンとホモロジーを有し、 NT_2 受容体に親和性を示すとともに、種々の生理作用が NT_2 受容体アンタゴニストの levocabastine でブロックされることから、 β -ラクトテンシンが直接作用する候補受容体としてニューロテンシン受容体が考えられた。しかしながら、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は NT_2 アンタゴニストの levocabastine でブロックされず、また、 NT_1 アンタゴニストの SR48692 でも阻害されなかったことから、ニューロテンシン受容体以外の作用機構を介することが判明した。

β -ラクトテンシンはアドレナリン α_{2B} 受容体に親和性を示すことが最近報告され、もうひとつの候補受容体として考えられたが、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は、 α_{2B} 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 (data not shown)、本受容体も β -ラクトテンシンの摂食抑制作用に関与しないことがわかった。 β -ラクトテンシンが直接作用する標的受容体は今後の検討課題である。

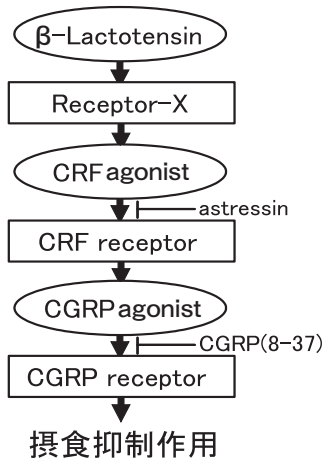


図 13 β -ラクトテンシンの摂食抑制機構

β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は CRF 受容体および CGRP 受容体の活性化を介することが明らかとなった (図 13)。 β -ラクトテンシンはいずれの受容体にも親和性を示さないことから、これらの受容体を活性化する内因性物質の放出が促進されていると考えられる。CRF 受容体には CRF₁ と CRF₂ という 2 種類のサブタイプが知られている。CRF は一般にストレスに関する視床下部ホルモンとして知られ、CRF₁ 受容体はストレス促進作用を、CRF₂ 受容体は逆にストレス緩和作用を仲介することが最近明らかとなっている。また、摂食抑制作用を仲介するのは CRF₂ 受容体であることが報告されている。実際、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は CRF₂ 受容体のアンタゴニストの antisauvagine-30 により阻害されることから (図 7)、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は CRF₂ 受容体を介しているものと考えられる。CRF₂ 受容体には CRF よりウロコルチンがより高い親和性を示すので、CRF₂ 受容体の活性化にはむしろウロコルチンの放出促進が関与しているかもしれない。

一方、CGRP 受容体のサブタイプとして、CGRP₁ 受容体、adrenomedullin (AM)₁ 受容体および AM₂ 受容体が知られている。本研究で用いた CGRP アンタゴニストの CGRP (8-37) は CGRP₁ 受容体に特異的に作用することから、 β -ラクトテンシンの摂食抑制作用は CGRP₁ 受容体の活性化を介していると思われる。

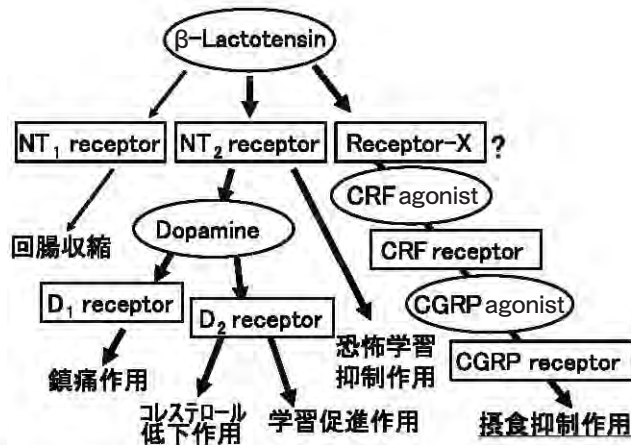


図 14 多彩な生理作用を示すβ-ラクトテンシン

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（図 14）、消化管から吸収されたのちに、血液-脳関門を越え、中枢神経系に作用している可能性が考えられる。さらに、脳室内投与した場合に、摂食抑制作用を示すことも、この仮説に一致している。また、β-ラクトテンシン（His-Ile-Arg-Leu）から N-末端アミノ酸および C-末端アミノ酸を削除した、Ile-Arg-Leu および His-Ile-Arg には摂食抑制作用が認められないことから（data not shown）、4 残基アミノ酸として摂食抑制作用を示すことがわかった。

以上をまとめると、β-ラクトテンシンが摂食抑制作用を示すことを見出し、その作用機構を検討したところ、β-ラクトテンシンは CRF 受容体の次に CGRP 受容体を活性化し、摂食抑制作用を示すことを見出した。本ペプチドは、新しい摂食抑制経路である CRF-CGRP 系を活性化する初めての摂食抑制ペプチドである [11]。

参考文献

1. 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.
2. 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.
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 [Trp⁶]-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 β-lactotensin, a bioactive peptide derived from bovine β-lactoglobulin, as a neurotensin agonist. *Biosci*

- Biotechnol Biochem. 2003 ; 67 (4) : 940-3.
7. 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.
 8. 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.
 9. Yamauchi R, Ohinata K, Yoshikawa M. β -lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT₂receptor. *Peptides*. 2003 ; 24 (12) : 1955-61.
 10. 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 D₁receptors. *Life Sci*. 2003 ; 73 (15) : 1917-23.
 11. Hou IC, Yoshikawa M, Ohinata K, β -lactotensin derived from bovine β -lactoglobulin suppresses food intake via the CRF system followed by the CGRP system in mice. *Peptides*. (in press)