

新規の牛乳による入眠促進機構の解明とその入眠促進因子の単離

神戸大学大学院農学研究科 長谷川 信

1. 要 約

我々は、これまでに牛乳に含まれる α -ラクトアルブミンがグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の遺伝子発現を促進すること、及び、GLP-1 は中枢神経系における入眠促進作用に α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) を介して入眠を促進することを示唆している。本研究では、牛乳による入眠促進機構の全容解明を最終目的として、GLP-1 が関与する入眠促進機構の更なる解明と、 α -ラクトアルブミンから産生される入眠促進ペプチドの検索を行なうこととした。その結果、GLP-1 及び α -MSH の鶏中枢への投与による入眠の促進及び摂食量の低下は、ノルアドレナリン合成系の律速酵素の阻害剤である α -メチル-p-チロシンの前投与により影響を受けなかったことから、GLP-1 による α -MSH を介した入眠促進はノルアドレナリンの合成促進に基づくものではないことが示唆された。又、 β -アドレナリン受容体 (松果体におけるノルアドレナリンのシグナル伝達に関与) のアンタゴニストであるプロプラノロールの前投与は、GLP-1 及び α -MSH による入眠の促進及び摂食量の低下を緩和したことから、GLP-1 による α -MSH を介した入眠促進は、 β -アドレナリン受容体を介することが示唆された。 α -ラクトアルブミン酵素分解物をゲルろ過クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分画した9つの分画面分の内の2つの画分が初代培養小腸細胞において、GLP-1 の前駆体であるプレプログルカゴン mRNA 量を増加させた。これらのことから、 α -ラクトアルブミン酵素分解物中に複数のプレプログルカゴンの遺伝子発現を促すペプチドが存在することが示唆された。

キーワード: GLP-1、MSH、 α -MPT、プロプラノロール、 α -ラクトアルブミン酵素分解物、ペプチド、培養細胞

2. 緒 言

我が国においては、国民の約2割が睡眠による休養が不十分であると感じており、又、1984年から1993年にかけて、睡眠障害による外来推計患者数は約2.3倍に増加している (Yamadera, 2001)。ここで、睡眠障害とは睡眠と覚醒に関連する多様な疾患の総てを指すが、昼夜を問わず経済活動を営む先進諸国においては、夜間勤務者の増加、夜間帯に活動する若者の増加、或いは海外渡航者の増加等が今後も避け得ないことから、このような睡眠障害者は増加の一途を辿ることになると予想される。加えて、年齢を重ねるに伴い、睡眠時刻のずれ、深いノンレム睡眠の減少、中途覚醒の増加による睡眠の分断化等が起こることから、高齢化社会を迎えつつある我が国においては、睡眠障害の解消は益々重要な課題になると考えられる。

ところで、脳の松果体は、環境の明暗サイクルに体内機能を同調させる機能を果たしており、この松果体で産生されるメラトニンは、その合成と分泌が暗期に高まり明期に低値に維持されることから、明暗サイクルの一つである概日リズムの最も安定したマーカーとして位置付けられている。ここで、この概日リズムの乱れを修正する為には1週間以上の期間が必要とされるが、不規則な夜間勤務を行なう看護師等の場合には概日リズムの乱れを修正することは不可能であること、及び、高齢者における睡眠障害は入眠前の血中メラトニン濃度の上昇時刻のずれと睡眠中の血中メラトニン濃度のピーク値低下に基づくこと等が知られていることから、必要な時刻に入眠する為の手段の一つとして、欧米では、医薬品或いは食品としてのメラトニンの利用が認められている。しかし、日本では、メラトニンは医薬品として認可されておらず、又、食品として使用することもできない（薬事法上、医薬品成分と見做されていることに拠る）。そこで、我が国では、メラトニンの前駆物質であるセロトニンの脳内含有量を高めることにより入眠を促進するべく、セロトニン合成の原料となるトリプトファン或いはトリプトファンを多く含む食品の摂取が推奨されている。実際、食餌へのトリプトファン添加により、脳内セロトニン濃度が上昇し、入眠時間が短縮すること（Sarwar *et al.*, 1999）が確認されている。又、古くから牛乳の入眠促進効果が知られており、その機構の一つとして、乳清タンパク質の一つである α -ラクトアルブミンによる血中トリプトファン濃度上昇とそれに基づく入眠の促進（Markus *et al.*, 2000；Minet-Ringuet *et al.*, 2004）が報告されている。これらのことから、牛乳による入眠促進機構の1つとして、血中トリプトファン濃度の上昇に基づく脳内セロトニン含量の増加（以下、トリプトファン-セロトニン系と称す）が示唆されている。

我々は、鶏の摂食調節機構解明を目的とした一連の研究において、消化管ホルモンの一つであるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1、ラットでは小腸L細胞で産生）の摂食抑制作用が入眠促進に基づくものであること（Bungo *et al.*, 1999）、そして、GLP-1の中枢投与は、視床下部においてセロトニン含量に影響することなくノルアドレナリンの合成或いは分泌を促進すること（Tachibana *et al.*, 2002）、及び、ノルアドレナリンの前駆物質であるドーパミンのノルアドレナリンへの変換酵素であるドーパミン β -ヒドロキシラーゼを阻害することによりGLP-1の入眠促進効果が緩和されること（Bungo *et al.*, 2001）を見出したことから、GLP-1の入眠促進作用の発現にはセロトニンではなくノルアドレナリンが関与していることを示唆した。加えて、GLP-1による入眠促進に食餌タンパク質の相違が影響を及ぼすこと（Honda *et al.*, 2000）を示した。最近、ヒトに関して、乳清タンパク質の摂取が血漿GLP-1濃度の上昇を引き起こして食欲を減退させること（Hall *et al.*, 2003）が報告されたが、このことと我々による此れ迄の研究成果を考え合わせると、トリプトファン-セロトニン系とは異なる"もう一つの牛乳による入眠促進機構"が存在し、その機構に、牛乳に含まれる未知の因子による消化管からのGLP-1分泌促進と、それに基づく視床下部ノルアドレナリンの合成或いは放出の促進（以下、GLP-1-ノルアドレナリン系と称す）が関与している可能性が極めて高いと判断された。

ここで、現在のところはマウスやラットを用いて睡眠関連実験が行なわれているが、これらの実験動物はヒトと異なり、血中メラトニン濃度が低下する明期に睡眠をとることから、その結果を直接ヒトに反映させることについて疑問が残されている。しかし、これらの実験動物に対して鶏は、ヒトと同様、暗期に睡眠をとること、鶏の松果体は光（明暗の入力情報）に対する感受性が高くメラトニン産生試験等に頻繁に利用されていること（Nagy *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2003; Sanada *et al.*, 2000）、及び、GLP-1 の脳室内投与による入眠促進効果はラットにおいては認められないこと（McMahon *et al.*, 1998）から、ヒトのモデル動物として鶏を用いれば、トリプトファン-セロトニン系以外の系、即ち、GLP-1-ノルアドレナリン系を介した新たな入眠促進機構の存在を明らかにできると共に、牛乳中の入眠促進因子を分離・同定できると判断された。

そこで、我々は、鶏を用いて、GLP-1 が関与する入眠促進機構の解明と共に、牛乳に含まれる入眠促進因子の検索を行なうこととした。まず、GLP-1 が関与する入眠促進機構の解明については、始めに、GLP-1 の中枢投与が視床下部神経ペプチド群の mRNA 量に及ぼす影響を調べた。その結果、GLP-1 の脳室内投与は、 α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) の前駆体プロオピオメラノコルチン及び副腎皮質刺激ホルモン放出因子の mRNA 量を有意に増加させることが明らかになった（平成 19 年度牛乳栄養学術研究事業調査・研究報告書）。哺乳動物においては、プロオピオメラノコルチンから産生される α -、 β -、 γ -MSH 及び β -エンドルフィンのうち、 α -、 β -及び γ -MSH は、いずれも摂食を抑制すること（Tung *et al.*, 2006）が知られていることから、これら 3 種のペプチドが GLP-1 が関与する入眠促進機構において重要な役割を果たす可能性が推察された。そこで、 α -、 β -或いは γ -MSH を鶏に中枢投与した結果、 α -MSH のみが強力に摂食を抑制すると共に睡眠様行動をも併せて引き起こすことが明らかになった（平成 19 年度牛乳栄養学術研究事業調査・研究報告書）。次に、牛乳に含まれる入眠促進因子の検索については、種々の牛乳画分（全脂粉乳、脱脂粉乳、乳脂肪、カゼイン [酸カゼイン並びにナトリウムカゼイン]、牛乳タンパク濃縮物、ホエイパウダー、ホエイタンパク濃縮物、分離ホエイタンパク及び乳清ミネラル）の給与が鶏の入眠に及ぼす影響について調べた結果、入眠を促進する牛乳画分としてホエイタンパク濃縮物を特定した（長谷川信、牛乳中の入眠促進因子の単離とその入眠促進機構の解明、平成 17 年度研究の概要 [糧食研究会], 7-12, 2006）。そして、ホエイタンパク濃縮物に含まれる主要なタンパク質の一つである α -ラクトアルブミンの経口投与が小腸遠位部における GLP-1 発現を促進することを明らかにした（平成 18 年度牛乳栄養学術研究事業調査・研究報告書）。加えて、この分解物の経口投与が小腸におけるプレプログルカゴン及び初代培養小腸細胞におけるプレプログルカゴン発現を促進することを明らかにした（平成 19 年度牛乳栄養学術研究事業調査・研究報告書）。

そこで、本研究では、鶏を用いて、GLP-1 が関与するノルアドレナリンを介した新たな入眠促進機構を更に明らかにすると共に、牛乳中の入眠促進因子を出来得る限り単離することを目的とした。

3. 材料及び方法

(1) GLP-1 による入眠促進機構の解明

- 1) ノルアドレナリン合成系の律速酵素阻害剤 (α -メチル-p-チロシン、 α -MPT) の前投与が α -MSH 及び GLP-1 の入眠促進効果に及ぼす影響

2時間45分間絶食した8日齢の白色レグホーン種雄雛に、0.1%エバンスブルーを含む生理食塩水(対照) 或いは α -MPTを投与し、その15分後に生理食塩水、40pmolの α -MSH 或いは33pmolのGLP-1を側脳室内投与し、投与後2時間に渡り、摂食量及び入眠促進行動に及ぼす影響を調べた。投与2時間後に断頭により屠殺し、側脳室内がエバンスブルーにより染まっている個体のデータのみを採用した。

- 2) β アドレナリン受容体アンタゴニスト (プロプラノロール、PP) の前投与が α -MSH 及び GLP-1 の入眠促進効果に及ぼす影響

2時間45分絶食した8日齢の白色レグホーン種雄雛に、生理食塩水 或いは PP を投与し、その15分後に0.1%エバンスブルーを含む生理食塩水(対照)、40pmolの α -MSH 或いは33pmolのGLP-1を側脳室内投与し、投与後2時間に渡り、摂食量及び入眠促進行動に及ぼす影響を調べた。投与2時間後に断頭により屠殺し、側脳室内がエバンスブルーにより染まっている個体のデータのみを採用した。

(2) 牛乳に含まれる入眠促進因子の検索

- 1) α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画

α -ラクトアルブミン酵素分解物を1mg/mlの濃度で20mMリン酸緩衝液(pH6.5)に溶解してゲルろ過カラム(Protein-Pak 125、日本ウォーターズ株式会社)に注入し、7分後から15分後までに認められるピークを分取した。

- 2) 小腸細胞の培養

8日齢の白色レグホーン種雄雛の小腸遠位部を摘出し、生理食塩水により小腸内腔を洗浄し、メスを用いてリン酸緩衝液中で小腸内腔から小腸上皮の細胞のみを分離・懸濁した。室温で2分間静置し、浮遊する細胞を含む上澄み液を遠心管に移した後、遠心分離(1,000rpm、5分間)により細胞を回収した。得られた沈殿をF-12培地に懸濁し、遠心分離(1,000rpm、5分間)により細胞を回収した。この操作を合計3回繰り返した。3-(2)-1)で調製した α -ラクトアルブミン酵素分解物分画物を含むF-12培地で37°Cで3時間、5%CO₂下で培養した。

- 3) リアルタイムPCR解析

3-(2)-2)で培養した小腸細胞を遠心分離(1,000rpm、5分間)により回収し、得られた沈殿をリン酸緩衝液に懸濁した。再度、遠心分離(1,000rpm、5分間)した後、得られた沈殿からセパゾールRNA I(ナカライテスク株式会社)を用いて総RNAを抽出した。総RNAはDNase I(Ambion Inc.)処理した後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(アプライドバイオン

ステムズ株式会社) を用いて cDNA に変換した。リアルタイム PCR は Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system を用いて行なった。GLP-1 の前駆体であるプレプログルカゴンの mRNA 量を、プレプログルカゴン mRNA に特異的なプライマー (sense, 5'-CGA GAG TTC ATT ACG TTA AAG GTT-3'; antisense, 5'-TGT AGG TGC CTT CAG CAT GTC T-3') 及び内部標準として β -アクチンに特異的なプライマー (sense, 5'-TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC-3'; antisense, 5'-GTG GAC AGT GAG GCC AGG AT-3') を用いて解析した。

4) プレプログルカゴン mRNA 発現促進画分の逆相カラムクロマトグラフィーによる分画

3-(2)-3) で初代培養小腸細胞においてプレプログルカゴン mRNA 発現を促進した画分を 20mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解して逆相カラム (Inertsil ODS-3、ジーエルサイエンス株式会社) に注入し、4 分後から 15 分後までに認められるピークを分取した。

4. 結果及び考察

(1) GLP-1 による入眠促進機構の解明

1) ノルアドレナリン合成系の律速酵素阻害剤の前投与が α -MSH 及び GLP-1 の入眠促進効果に及ぼす影響

α -MSH の中枢投与は入眠促進効果及び摂食抑制効果を示したが、 α -MPT の前投与は、この α -MSH の効果に影響を及ぼさなかった (図 1 及び 2)。同様に、GLP-1 の中枢投与は入眠促進効果及び摂食抑制効果を示したが、 α -MPT の前投与は、この GLP-1 の効果に影響を及ぼさなかった (図 3 及び 4)。これらの結果から、GLP-1 による α -MSH を介した入眠促進はノルアドレナリンの合成促進に基づくものではないことが示唆された。

2) β -アドレナリン受容体アンタゴニストの前投与が α -MSH 及び GLP-1 の入眠促進効果に及ぼす影響

α -MSH の中枢投与は入眠促進効果及び摂食抑制効果を示したが、PP の前投与は、この α -MSH の効果を緩和した (図 5 及び 6)。同様に、GLP-1 の中枢投与は入眠促進効果及び摂食抑制効果を示したが、PP の前投与は、この GLP-1 の効果を緩和した (図 7 及び 8)。これらの結果から、GLP-1 による α -MSH を介した入眠促進に β -アドレナリン受容体が関与することが示唆された。ここで、松果体におけるノルアドレナリンのシグナル伝達に β -アドレナリン受容体が関与することが知られている (Karolczak *et al.*, 2005)。また、松果体におけるメラトニン産生は暗期に高まり明期に低くなることが知られているが、その変動は松果体におけるメラトニン合成系の律速酵素であるアシルアルキルアミン-N-アセチルトランスフェラーゼ (AA-NAT) の mRNA 量の変動に基づき調節されていることが知られている (Bernard *et al.*, 1997)。これらのことから、今後、GLP-1 による入眠促進が松果体の β -アドレナリン受容体を介した AA-NAT の遺伝子発現の促進に基づく可能性について明らかにする必要があると考えられた。

(2) 牛乳に含まれる入眠促進因子の検索

- 1) α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画物が初代培養小腸細胞プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

α -ラクトアルブミン酵素分解物をゲルろ過クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分画した結果、9つのピークが検出された (図9)。これらの内の2つの画分が、初代培養小腸細胞のプレプログルカゴン mRNA 量を増加させた (図10及び11)。このことから、 α -ラクトアルブミン酵素分解物中には複数の入眠促進因子が存在する可能性が考えられた。

- 2) α -ラクトアルブミン酵素分解物分画画分の逆相カラムクロマトグラフィーによる分析

4-(2)-1) でプレプログルカゴン発現促進作用を示した2つの画分を逆相カラムクロマトグラフィーを用いて分画した結果、2画分合わせて19のピークが検出された (図12及び13)。今後、これらのピークからプレプログルカゴンの遺伝子発現を促進する画分を特定し、そのアミノ酸分析を行なうことにより、 α -ラクトアルブミン酵素分解物に含まれる入眠促進因子を単離することが可能となると判断された。

5. 参考文献

- Bernard M., Klein D. C., Zatz M., Chick pineal clock regulates serotonin N-acetyltransferase mRNA rhythm in culture. *Proceedings the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 304-309, 1997.
- Bungo, T., Kawakami, S. -I., Ohgushi, A., Sashihara, K., Saito, N., Sugahara, K., Hasegawa, S., Denbow, D. M. and Furuse, M. Intracerebroventricular injection of fusaric acid attenuates the anorexia by glucagon-like peptide-1 in the neonatal chick. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 70, 251-255, 2001.
- Bungo, T., Kawakami, S. -I., Ohgushi, A., Shimojo, M., Masuda, Y., Saito, N., Sugahara, K., Hasegawa, S. and Furuse, M. Intracerebroventricularly administration of glucagon-like peptide-1 induces sleep-like behavior in the neonatal chick. *Japanese Poultry Science*, 36, 377-381, 1999.
- Hall W. L., Millward D. J., Long S. J., Morgan L. M.: Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89, 239-248, 2003.
- Hayashi, Y., Sanada, K., Hirota, T., Shimizu, F. and Fukada, Y., p38 mitogen-activated protein kinase regulates oscillation of chick pineal circadian clock, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25166-25171, 2003.
- Honda, K., Suzuki M., Kamisoyama H., Motoki T., Kano K., Yagi K., Sugawara K., Furuse M. and Hasegawa, S. : Influences of dietary protein types on the suppressive food intake induced by intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1 in chicks. *Japanese Poultry Science*, 37, 251-257, 2000.

- Karolczak M., Korf HW., Stehle JH., The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine*, 27, 89-100, 2005.
- Markus, C. R., Olivier, B., Panhuysen, G. E., Van der Gugten, J., Alles, M. S., Tuiten, A., Westenberg, H. G., Fekkes, D., Koppeschaar, H. F and de Haan E. E.: The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1536-1544, 2000.
- McMahon, L. R. and Wellman, P. J. : PVN infusion of GLP-1- (736) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *American Journal of Physiology*, 274, R23-R29, 1998.
- Minet-Ringuet, J., Le Ruyet, P. M., Toméa, D., Even, P. C.: A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152, 335-340, 2004 .
- Nagy, A. D., Csernus, V. J., The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland, *Peptides*, 28, 1767-1774, 2007.
- Sanada, K., Hayashi, Y., Harada, Y., Okano, T. and Fukada, Y. : Role of circadian activation of mitogen-activated protein kinase in chick pineal clock oscillation. *The Journal of Neuroscience*, 20, 986-991, 2000.
- Sarwar, G. and Botting, H. G. : Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *Journal of Nutrition*, 129, 1692-1697,1999.
- Tachibana, T., Tanaka, S., Furuse, M., Hasegawa, S., Kato, H. and Sugahara, K. : Intracerebroventricular injection of glucagon-like peptide-1 decreases the monoamine concentrations of the hypothalamus in chicks. *British Poultry Science*. 43, 122-126, 2002.
- Tung, Y. C., Piper, S. J., Yeung, D., O'Rahilly, S. and Coll, A. P., A comparative study of the central effects of specific proopiomelanocortin (POMC) -derived melanocortin peptides on food intake and body weight in pomc null mice, *Endocrinology*, 147, 5940-5947, 2006.
- Yamadera, H., The topics of sleep disorder : Concerning sleep-wake rhythm disorder, *Journal of Nippon Medical School*, 68, 344-348, 2001.

6. 図表

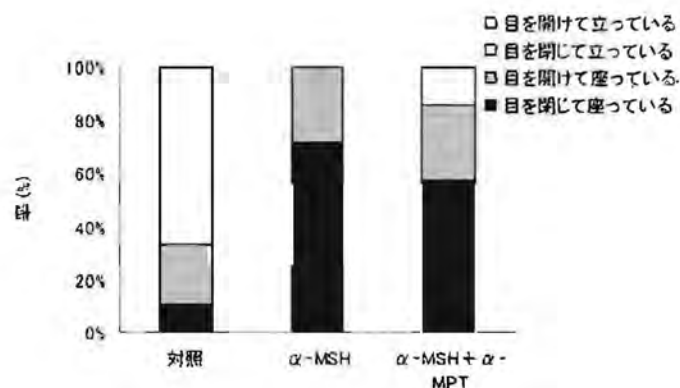


図 1. ノルアドレナリン合成系の律速酵素阻害剤 (α-メチル-p-チロシン、α-MPT) の前投与がα-MSH の入眠促進効果に及ぼす影響

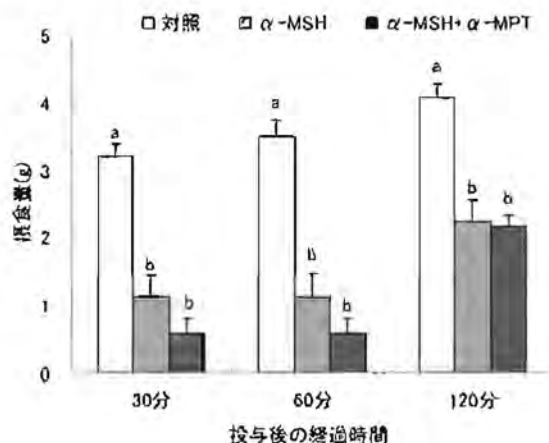


図 2. ノルアドレナリン合成系の律速酵素阻害剤 (α-メチル-p-チロシン、α-MPT) の前投与がα-MSH の摂食抑制効果に及ぼす影響

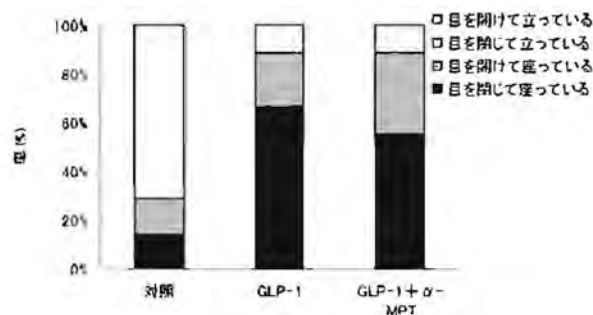


図 3. ノルアドレナリン合成系の律速酵素阻害剤 (α-メチル-p-チロシン、α-MPT) の前投与が GLP-1 の入眠促進効果に及ぼす影響

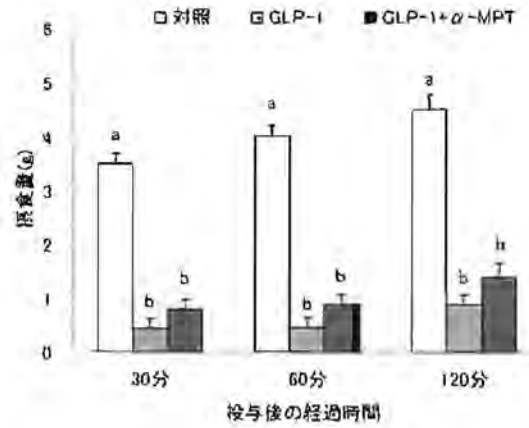


図4. ノルアドレナリン合成系の体速酵素阻害剤 (α -メチル-p-チロシン、 α -MPT) の前投与が GLP-1 の摂食抑制効果に及ぼす影響

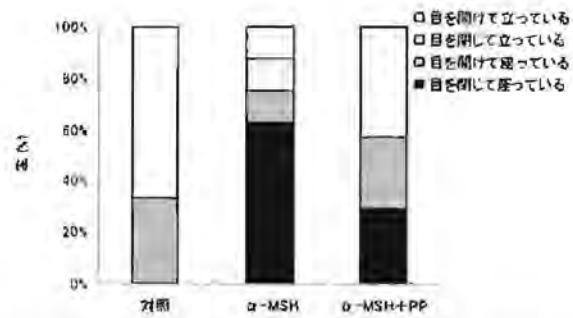


図5. β -アドレナリン受容体アンタゴニスト (プロプラノロール、PP) の前投与が α -MSH の入眠促進効果に及ぼす影響

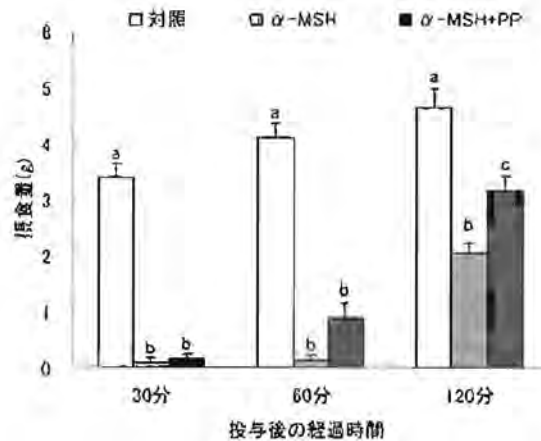


図6. β -アドレナリン受容体アンタゴニスト (プロプラノロール、PP) の前投与が α -MSH の摂食抑制効果に及ぼす影響

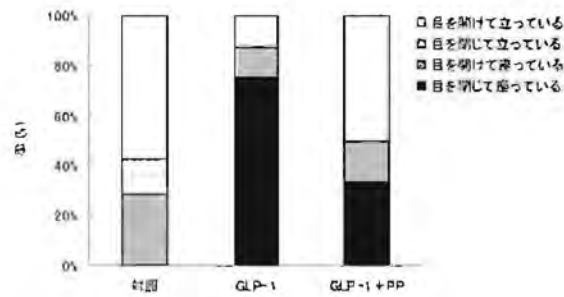


図 7. β -アドレナリン受容体アンタゴニスト (プロプラノロール、PP) の前投与が GLP-1 の入眠促進効果に及ぼす影響

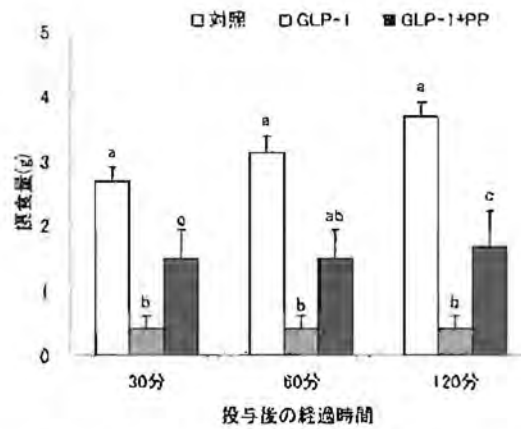


図 8. β -アドレナリン受容体アンタゴニスト (プロプラノロール、PP) の前投与が GLP-1 の摂食抑制効果に及ぼす影響

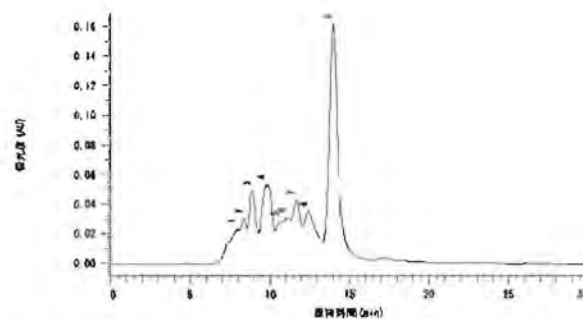


図 9. α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画

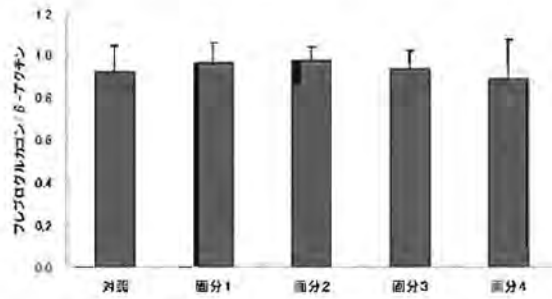


図 10. α-ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画物（画分 1～4）が初代培養小腸細胞プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

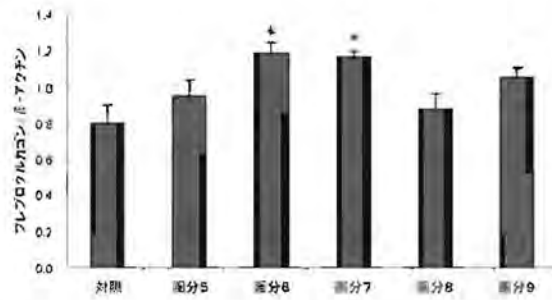


図 11. α-ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画物（画分 5～9）が初代培養小腸細胞プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

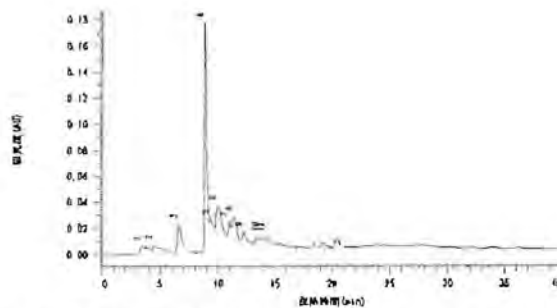


図 12. プレプログルカゴン発現促進活性を有するα-ラクトアルブミン酵素分解物由来画分（画分 6）の逆相カラムクロマトグラフィー解析

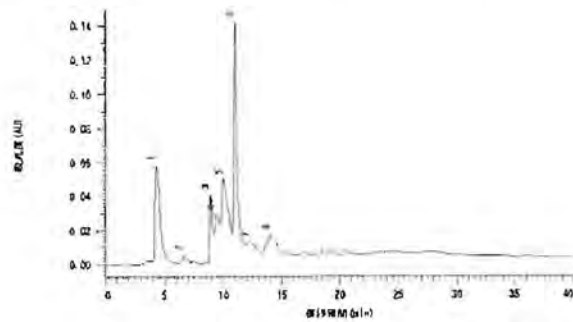


図 13. プレプログルカゴン発現促進活性を有するα-ラクトアルブミン酵素分解物由来画分（画分 7）の逆相カラムクロマトグラフィー解析