

# 牛乳タンパク質由来の精神的ストレス緩和ペプチドに関する 神経生理学的研究

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  
大学院生：金川 典正、鈴木 千尋

## 要 約

乳由来成分の精神的ストレス緩和作用（抗不安作用）を、マウスを用いた行動学的実験により検討したところ、複数の低分子ペプチドが抗不安作用を示すことを見出した。そのなかで、乳タンパク質の一次構造中に多数含まれるジペプチドTyr-Leu (0.1 mg/kg, i. p.) が最も強力な抗不安作用を示し、その作用は現在広く使用されている抗不安薬のジアゼパムに匹敵した。さらに、本ペプチドは経口投与で有効であった。構成アミノ酸のチロシンとロイシンの混合物には抗不安活性が認められなかったことから、ジペプチドとして作用しているものと考えられる。また、レトロ配列ペプチドのLeu-Tyrには活性が認められなかったことから、Tyr-Leu配列が重要であることがわかった。さらに、構造-活性相関を検討し、Tyr-LeuのN末端側へのアミノ酸付加により、著しく抗不安活性が低下する一方、C末端側へのアミノ酸付加は許容されることを明らかにした。

次に、情動調節に重要な神経伝達物質であるセロトニン、ドーパミン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の関与を種々の受容体アンタゴニストを用いて検討した。Tyr-Leuの抗不安作用は、セロトニン $5\text{-HT}_{1A}$ 受容体、ドーパミン $D_1$ 受容体、 $\text{GABA}_A$ 受容体のアンタゴニストにより完全に阻害された。しかしながら、Tyr-Leuはこれらの受容体には親和性を示さなかったことから、セロトニン、ドーパミンおよびGABAの放出を介して、抗不安作用を示すことがわかった。さらに、これらの受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニストを用いて、 $5\text{-HT}_{1A}$ 受容体、 $D_1$ 受容体、 $\text{GABA}_A$ 受容体の順番に活性化されることを明らかにした。以上の結果より、Tyr-Leuは $5\text{-HT}_{1A}$ 受容体  $\rightarrow$   $D_1$ 受容体  $\rightarrow$   $\text{GABA}_A$ 受容体の活性化という新規神経伝達経路を介して強力な抗不安作用を示すことを明らかにした。

**キーワード**：精神的ストレス緩和作用、牛乳タンパク質、ジペプチド、Tyr-Leu

## 1. はじめに

精神的ストレスは、単なる気分の問題ではなく、生活習慣病の発症リスクを上昇させることから、現代のストレス社会では精神的ストレスを緩和する食品が強く望まれている。古くから牛乳は精神的ストレス緩和作用（抗不安作用）を示すとされているが、その作用機構の詳細は未だ不明である。おそらく牛乳タンパク質から消化酵素により生成する低分子ペプチドが、牛乳の抗不安作用に寄与していると思われるが、その機能分子は明らかではない。

牛乳タンパク質由来の生理活性ペプチドの情動調節に及ぼす影響を動物行動学的に検討したところ、His-Ile-Arg-Leu (HIRL,  $\beta$ -lactotensin), Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly (YPPFG, casomorphin-5), Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg (LYEIIAR) など、既知の回腸収縮およびオピオイドペプチドが抗不安作用を示すという予備的な実験結果を得た(表1)。さらに、新しい抗不安ペプチドを探索した。

表 1. 牛乳タンパク質由来の低分子ペプチドによる抗不安作用

peptide	origin	minimum effective dose (mg/kg mouse, i.p.)
HIRL ( $\beta$ -lactotensin)	$\beta$ -lactoglobulin	10
YPFPG (casomorphin-5)	$\beta$ -casein	1
YLYEIAR	serum albumin	0.3
-----		
YL	$\alpha_{S1}$ -casein/ $\beta$ -lactoglobulin/ serum albumin	0.1

アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害物質が精神的ストレス緩和作用を示すことが報告されている。強力なACE阻害活性を有するIle-Tyr (IY, 10 mg/kg, i. p.) が弱いながら抗不安作用を示すことを発見した。さらに、本ペプチドの構造-活性相関を検討し、最終的に、乳タンパク質の一次構造中にも多数存在するTyr-Leu (YL) が医薬品に匹敵する極めて強力な抗不安作用を示すことを明らかにした(表1)。加えて、本ペプチドの抗不安機構を検討し、従来の食品タンパク質由来の抗不安ペプチドとは異なる神経伝達機構を介することを明らかにした。なお、これらの研究成果はFEBS letters に報告した[1]。

## 2. 実験方法

### 2-1. 試薬

ジペプチド (Tyr-Leu、Leu-Tyr等) はBachemより購入した。トリペプチドは、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. 高架式十字迷路試験[1]

高架式十字迷路 (図1) は、高さ50 cmの位置に十字に設置された、壁で覆われた クローズドアームと壁で覆われていない オープンアームからなる装置である。マウスは通常、高い場所を怖がり、壁で覆われた クローズドアームによく入るが、抗不安薬を処置するとオープンアームでの滞在時間および進入回数の割合が増加する。ペプチド等を投与して30分後にマウスを装置の中央に置き、5分間行動を観測した。

### 2-3. オープンフィールド試験[1]

オープンフィールド (図2) は、直径60 cm、高さ50 cm円筒状の灰色の装置で、黒い線で25区画に分割されている。マウスは新奇環境におかれた場合に探索行動を行なうが、通常であれば装置の中央への探索は少ない。しかし抗不安薬を処置すると、中心円での滞在時間および進入回数が増加する。ペプチド等を投与して30分後にマウスを装置の中央に置き、5分間行動を観測した。

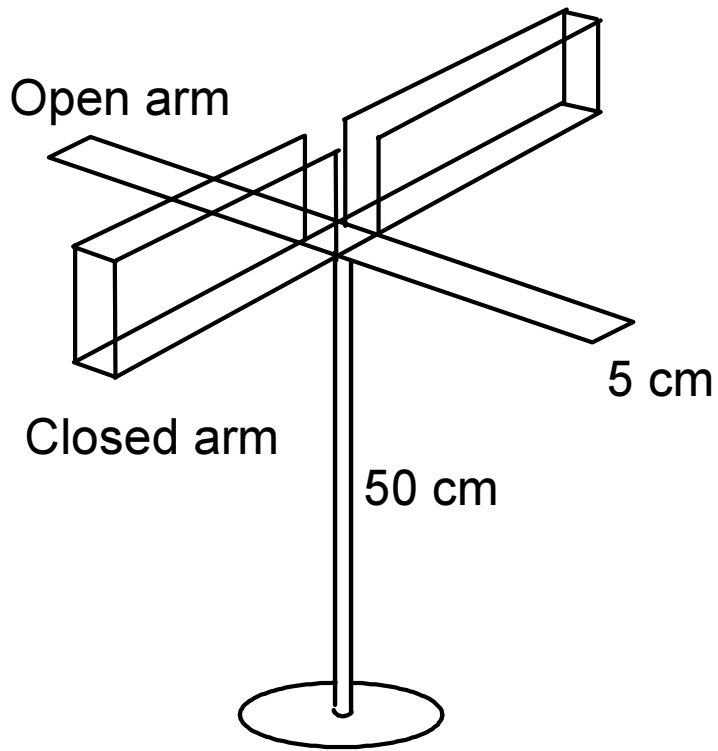


図1. 高架式十字迷路 (Elevated Plus-Maze)

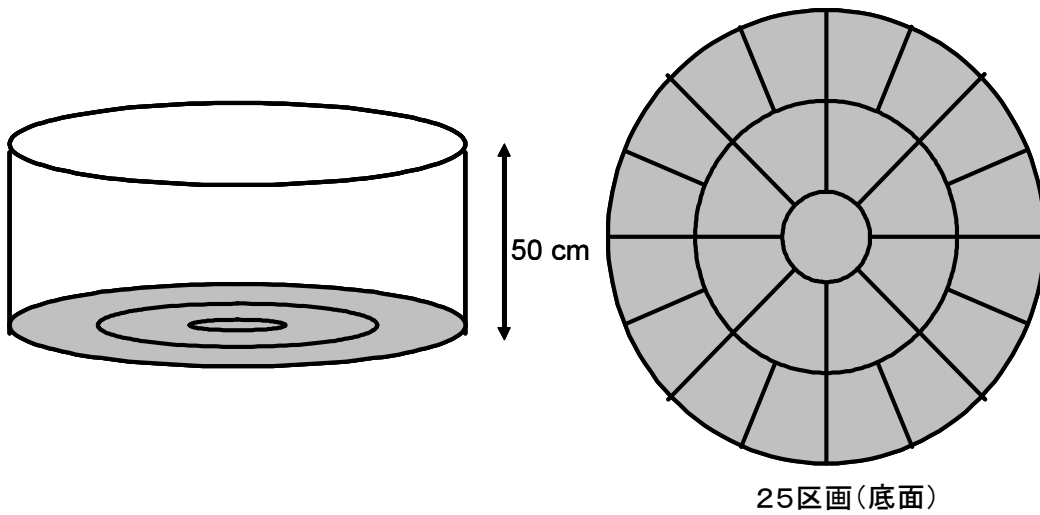


図2. オープンフィールド (Open field)

### 3. 結果

#### 3-1. Tyr-Leuは医薬品ジアゼパムに匹敵する強力な抗不安作用を示す

Tyr-Leu (YL) をマウスに腹腔内投与し(0.03-1 mg/kg)、高架式十字迷路における5分間の行動を観察したところ、生理的食塩水のみを投与した対照群と比較し、オープンアームでの滞在時間の割合および進入回数の割合が、用量依存的に増加することがわかった(図3)。なお、行動量を示すオープンアームとクローズドアームの進入回数の合計に差は認められなかった。したがって、YLが強力な抗不安作用を示すことが明らかとなった。さらに、オープンフィールド試験によりYLの抗不安作用を確認した。その結果、YL (0.1 mg/kg)の腹腔内投与により、オープンフィールドの中心円に滞在する時間が延長することがわかった(表2)。YLは二つの行動学的評価系で強力な抗不安作用を示すことを確認することができた。

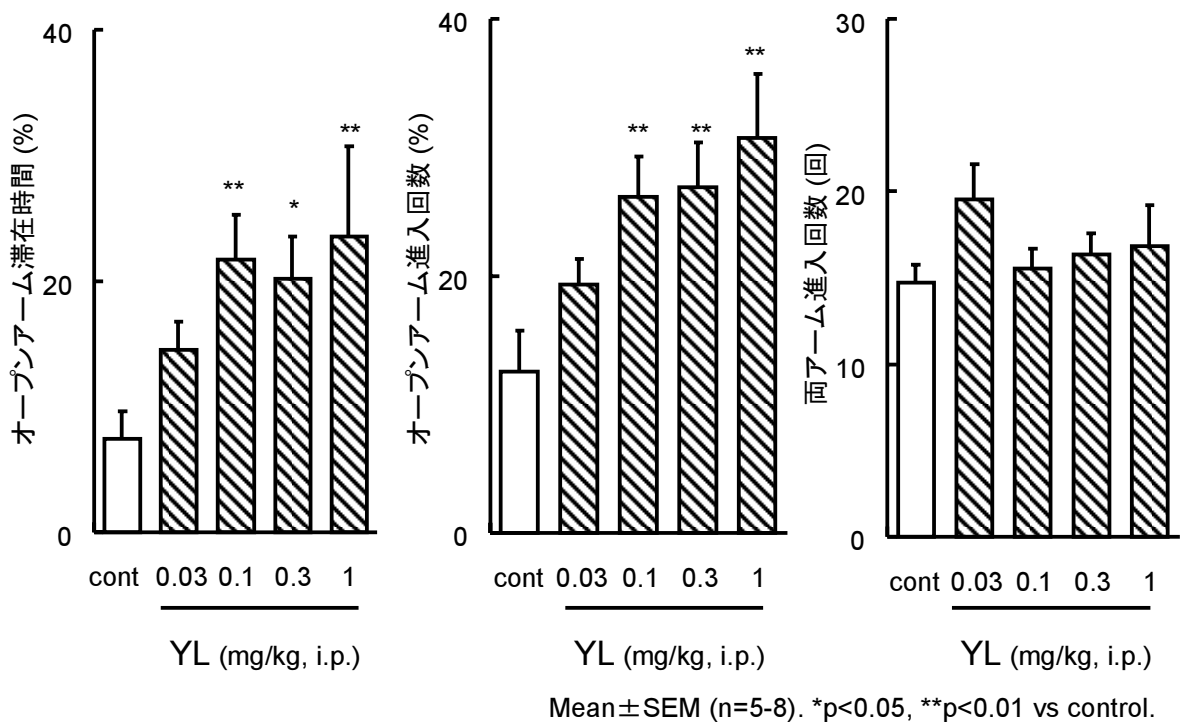


図3. YLの腹腔内投与による抗不安作用(高架式十字迷路試験)

表2. YLの腹腔内投与による抗不安作用(オープンフィールド試験)

	cont	YL (0.1 mg/kg, i.p.)
中心円滞在時間(%)	0.889 ± 0.318	2.06 ± 0.234*
中心円進入回数(%)	1.53 ± 0.428	3.02 ± 0.404*
行動量	187 ± 13.4	189 ± 22.2

Mean ± SEM (n = 6). \*p<0.05 vs cont.

このジペプチドYLの抗不安作用と一般的な抗不安薬として知られるジアゼパムと比較したところ、同じ投与量 (1 mg/kg) ではむしろYLのほうが強い抗不安作用を示す傾向があった (図4)。したがって、YLは医薬品に匹敵する強力な抗不安作用を示すことが判明した。

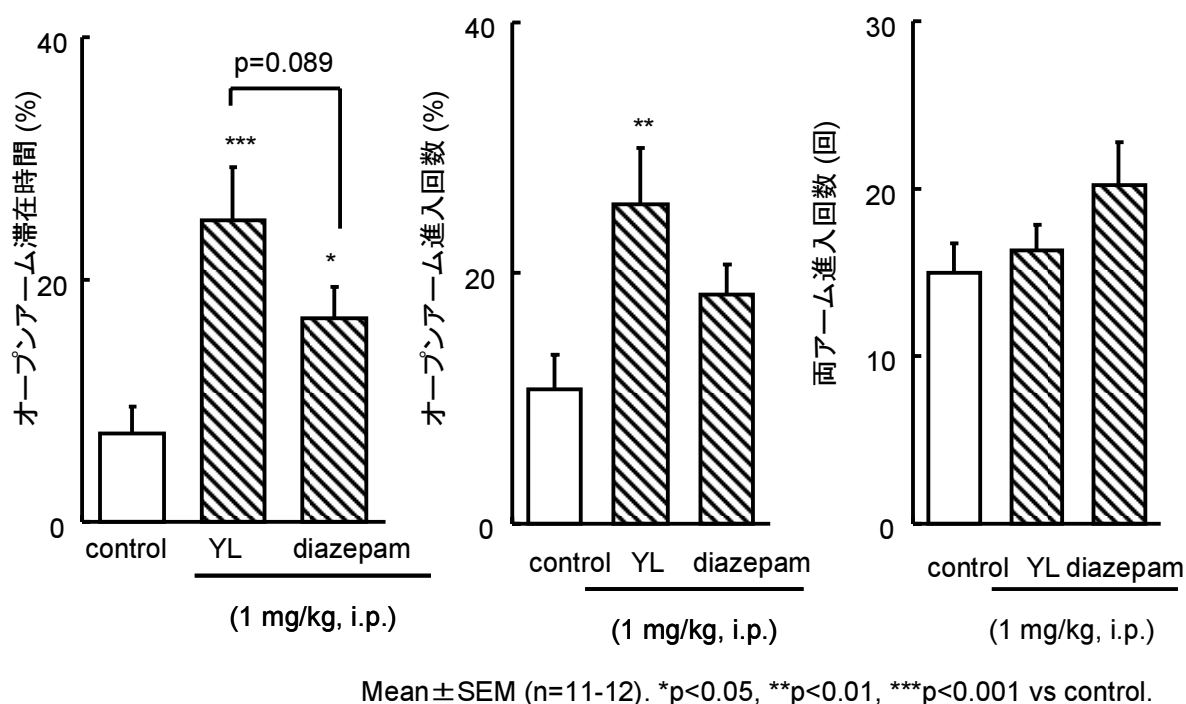


図4. YLの抗不安作用は医薬品ジアゼパムに匹敵する

### 3-2. Tyr-Leuはジペプチドとして強力な抗不安作用を示す

YLの構成アミノ酸について、抗不安活性が認められるかを検討した。チロシン単独、あるいはチロシンとロイシンの混合物を3.4 μmol/kg (YL 1 mg/kgに相当) 投与したところ、抗不安作用は全く認められなかった (図5)。構成アミノ酸混合物に抗不安作用が認められなかったことから、YLはアミノ酸としてではなく、ジペプチドとして作用しているものと考えられる。

### 3-3. Tyr-Leuの構造活性相関

YLの構造-活性相関を検討した。YLは、0.1-1 mg/kgという投与量において、抗不安作用を示すのに対し、そのレトロ配列ペプチドLYは活性を示さなかった (図6 A)。なお、LYは30 mg/kg以上から抗不安作用を示すことから、レトロ体の抗不安活性は、1/300に低下したことになる。したがって、YLというアミノ酸配列が強力な抗不安作用に重要であることが判明した。YLのロイシンをイソロイシン置換した、YIおよびIYも0.1-1 mg/kgでは、抗不安作用を示さないことがわかった。なお、これらの類縁体の中で、最も強力なACE阻害活性 (IC<sub>50</sub>=3.4 μM) を有するIYの抗不安作用が弱く、最も強力な抗不安作用を示すYLのACE阻害活性 (IC<sub>50</sub>=109 μM) は非常に弱いことから、YLの抗不安作用にはACE阻害活性は寄与していないと考えられる。

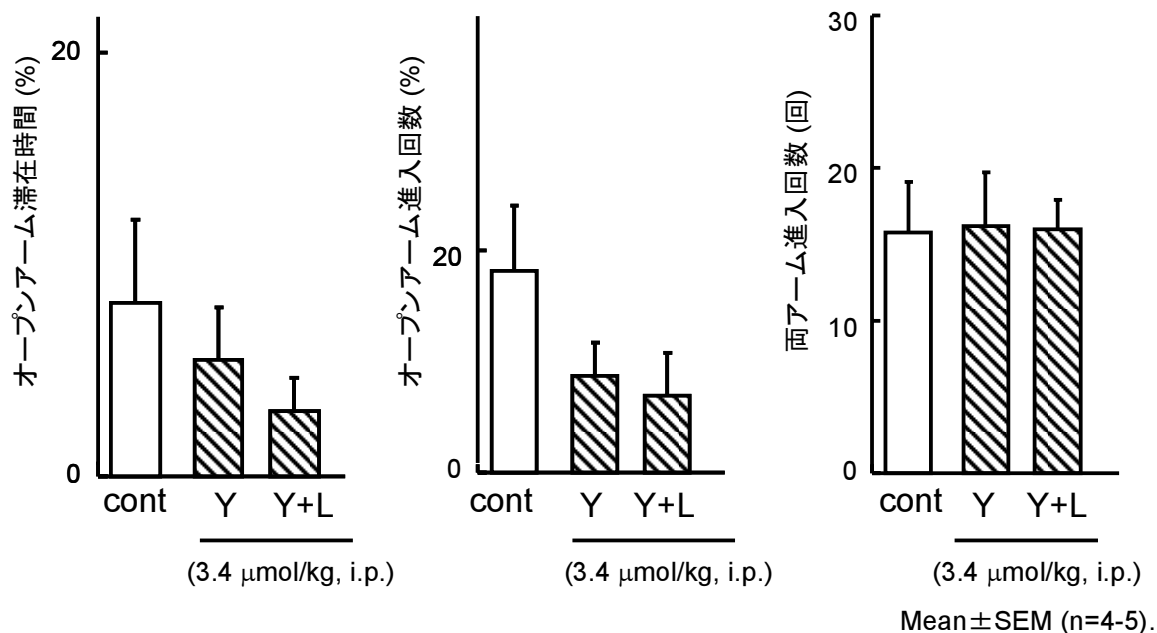
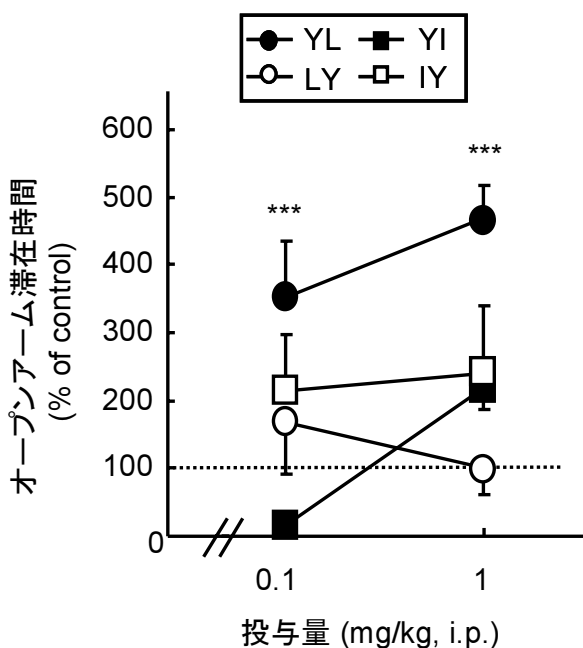


図5. 構成アミノ酸は抗不安作用を示さない

A. ジペプチド



B. トリペプチド

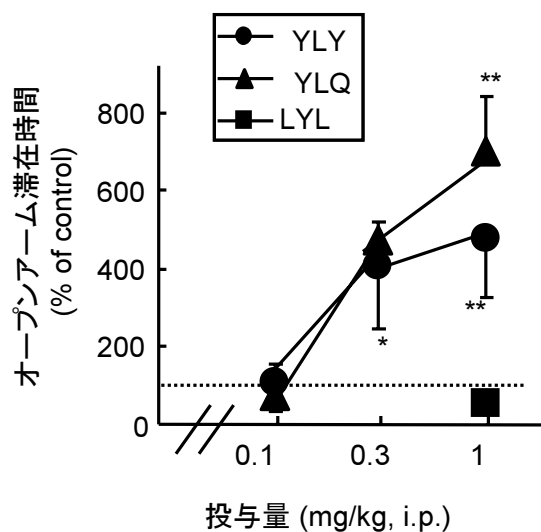
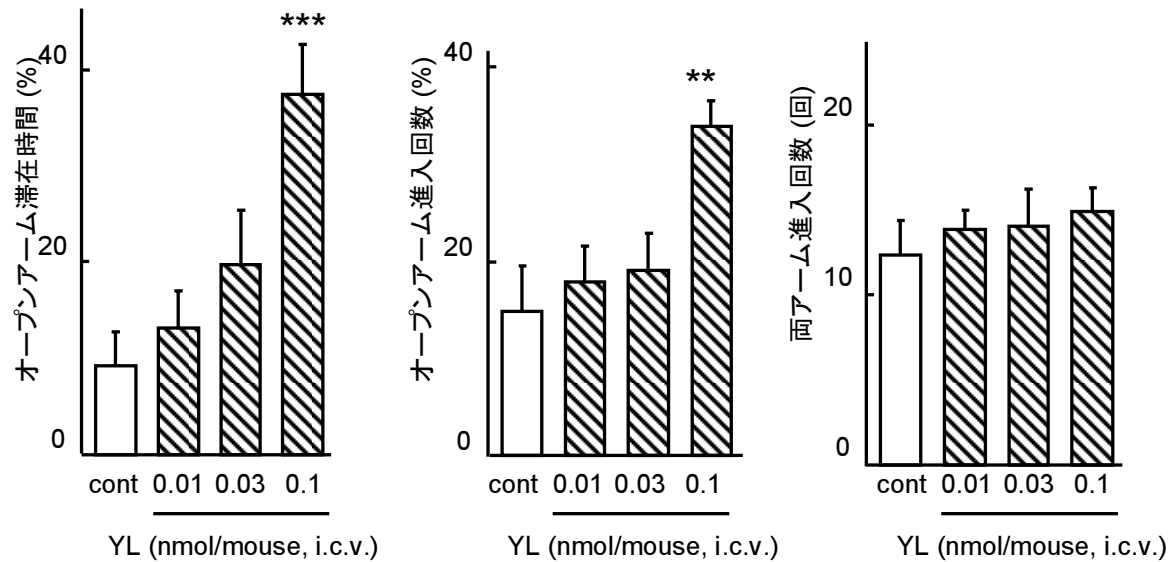


図6. YLの構造-活性相関

さらに、トリペプチドについて検討したところ、YLのC末端にアミノ酸を付加したYLQおよびYLYは、強力な抗不安作用を示すことがわかった(図6B)。なお、これらのYLQおよびYLYというペプチド配列は牛乳タンパク質中に存在する。一方、YLのN末端側にアミノ酸を付加したLYLは1 mg/kgでは抗不安作用を示さないことがわかった。したがって、YLのC末端側へのアミノ酸付加は許容されるが、N末端側へのアミノ酸付加により、その活性が著しく低下することが判明した。

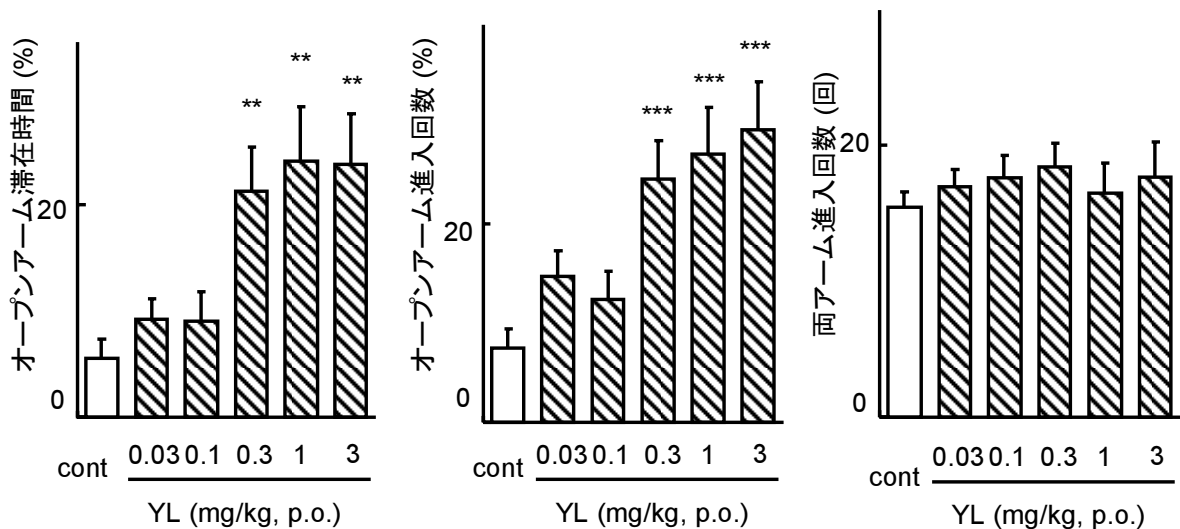
また、YLは脳室内投与(0.1 nmol/mouse)により、オープンアームへの滞在時間の割合および進

入回数の割合が増加することがわかった (図7)。さらに、YLは、経口投与 (0.3-3 mg/kg) により、オープンアームへの滞在時間および進入回数の割合が、用量依存的増加した (図8)。なお、脳室内投与および経口投与のいずれの場合にも行動量には影響がなかった。以上の結果より、YLが、経口投与により強力な抗不安作用を示すことが明らかとなった。そこで、YLの抗不安機構について詳細に検討した。



Mean±SEM (n=7-9). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control.

図7. YLの脳室内投与による抗不安作用



Mean±SEM (n=5-14). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, vs control.

図8. YLの経口投与による抗不安作用

### 3-4. Tyr-Leuの抗不安作用はセロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体、およびGABA<sub>A</sub>受容体の活性化を介する

情動調節にはセロトニン、ドーパミンおよびGABAなどの神経伝達物質、ならびにその受容体が関与していることが知られている[2-4]。そこで、YLの抗不安作用にどのようなメディエーターが関与しているかを、各種受容体アンタゴニストを用いて検討した。その結果、YL (1 mg/kg, i.p.) の抗不安作用は、セロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体アンタゴニストのWAY100135 (10 mg/kg, i.p.)、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体アンタゴニストのSCH23390 (30 μg/kg, i.p.)、およびGABA<sub>A</sub>受容体アンタゴニストのbicuculline (5 mg/kg, i.p.) およびflumazenil (1 mg/kg, i.p.) により阻害された(図9-12)。なお、アンタゴニスト単独投与による影響は認められなかった。しかしながら、YL自身は、これらの受容体に親和性を示さなかったことから (data not shown)、YLは、これらの受容体を活性化することで抗不安作用を示すものと考えられる。

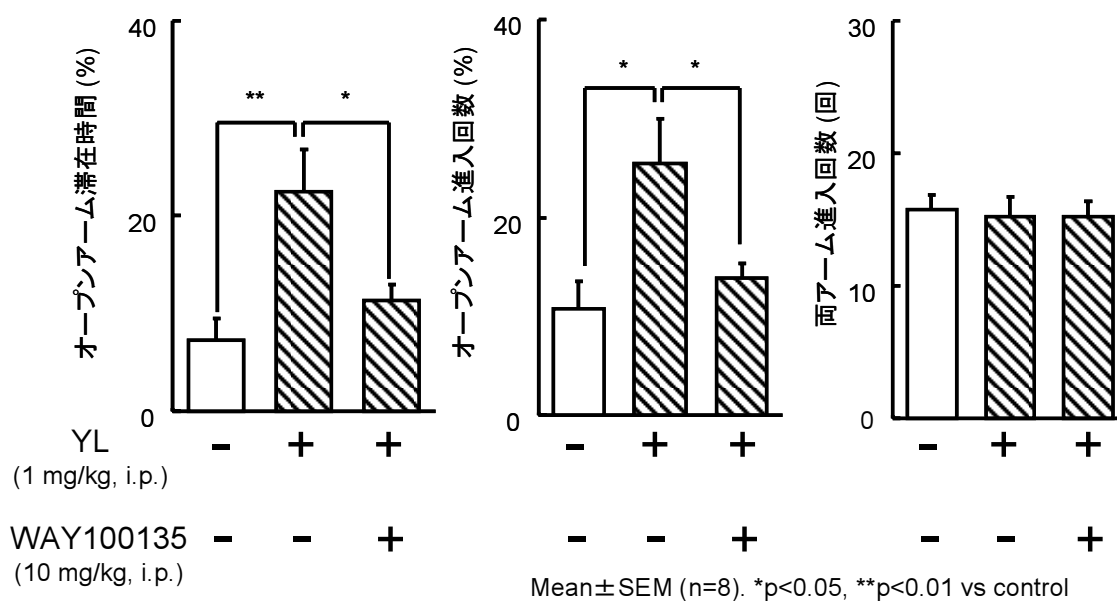


図9. YLの抗不安作用はセロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体アンタゴニストにより阻害される

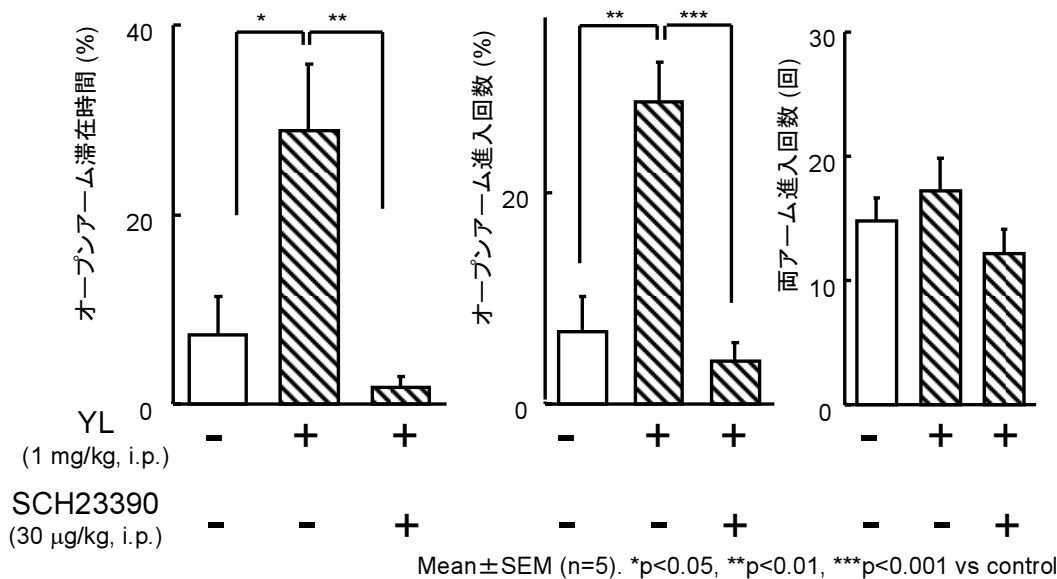


図10. YLの抗不安作用はドーパミンD<sub>1</sub>受容体アンタゴニストにより阻害される



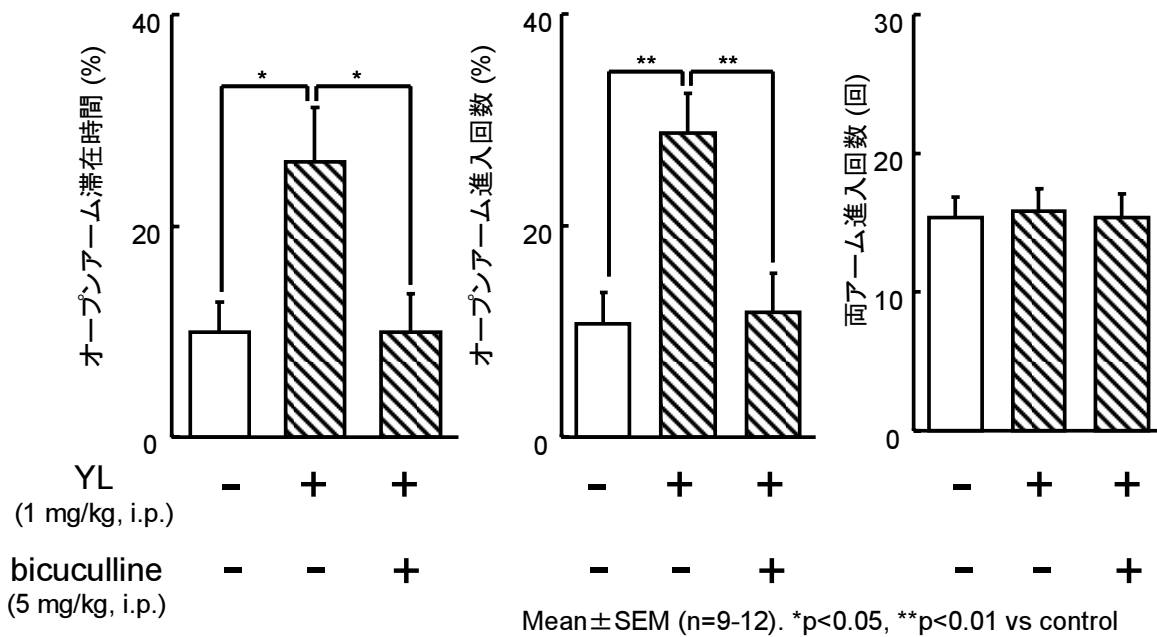


図 1 1. YLの抗不安作用はGABA<sub>A</sub>受容体GABAサイトアンタゴニストに阻害される

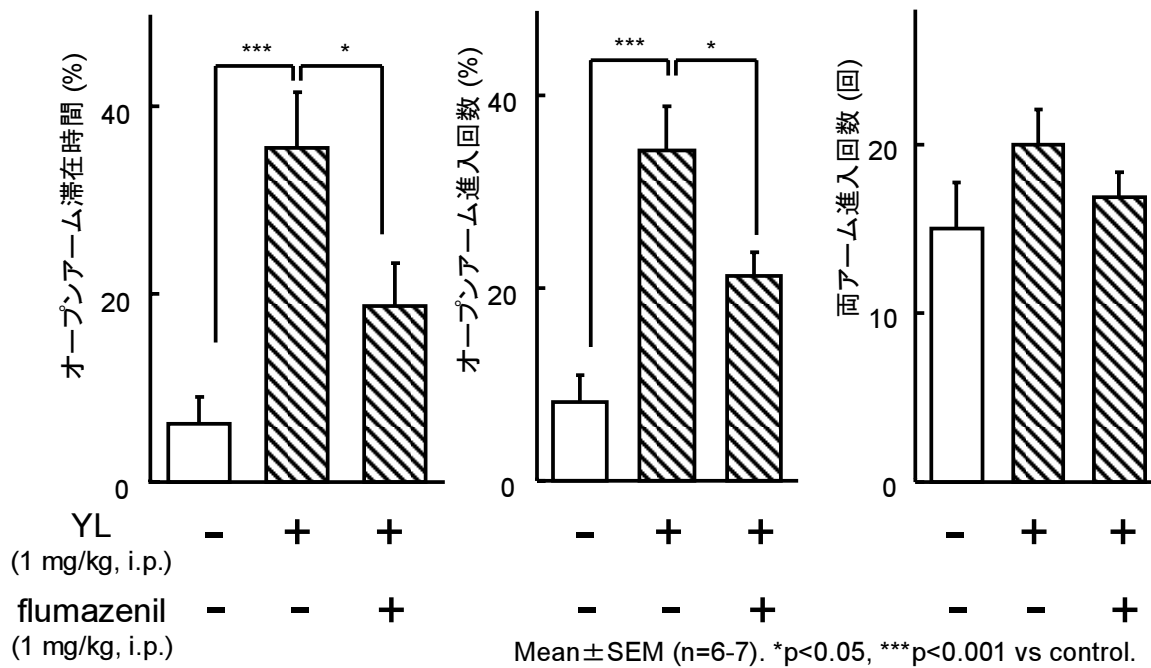


図 1 2. YLの抗不安作用はGABA<sub>A</sub>受容体ベンゾジアゼピンサイトに対するアンタゴニストに阻害される

### 3-5. セロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体、およびGABA<sub>A</sub>受容体を介する新しい情動調節経路の発見

YLがセロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体およびGABA<sub>A</sub>受容体の活性化を介して抗不安作用を示すことが判明したが、これら受容体の活性化の上下関係は不明であった。そこで、これらの受容体のアゴニストおよびアンタゴニストを用いて、その情報伝達経路を検討した。

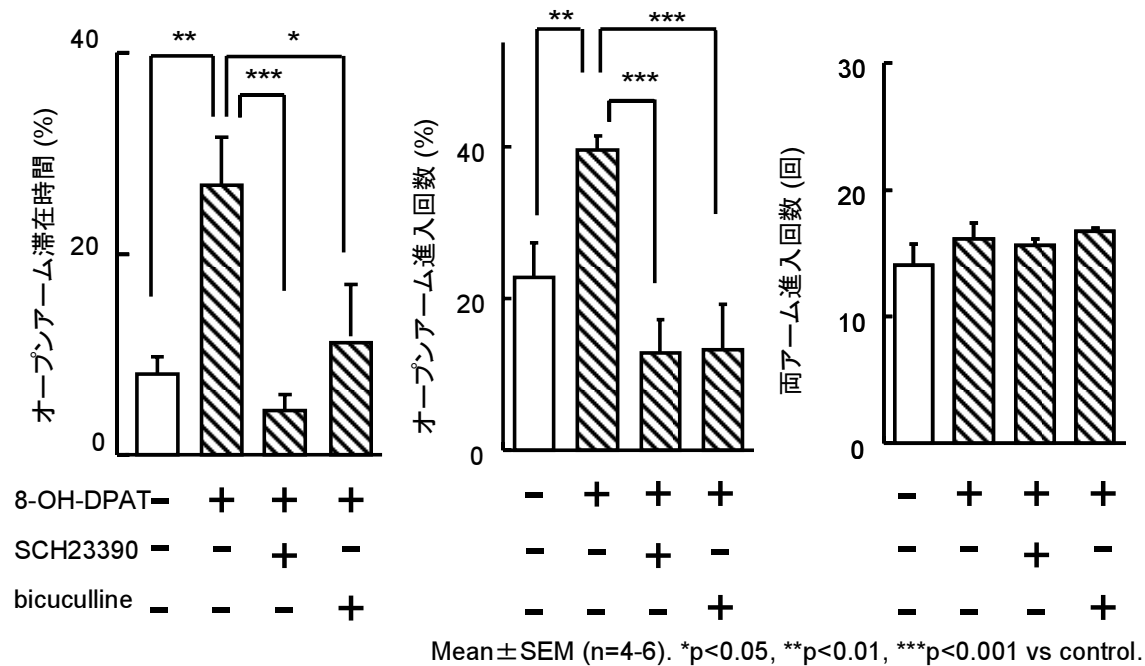


図13. セロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニストの抗不安機構

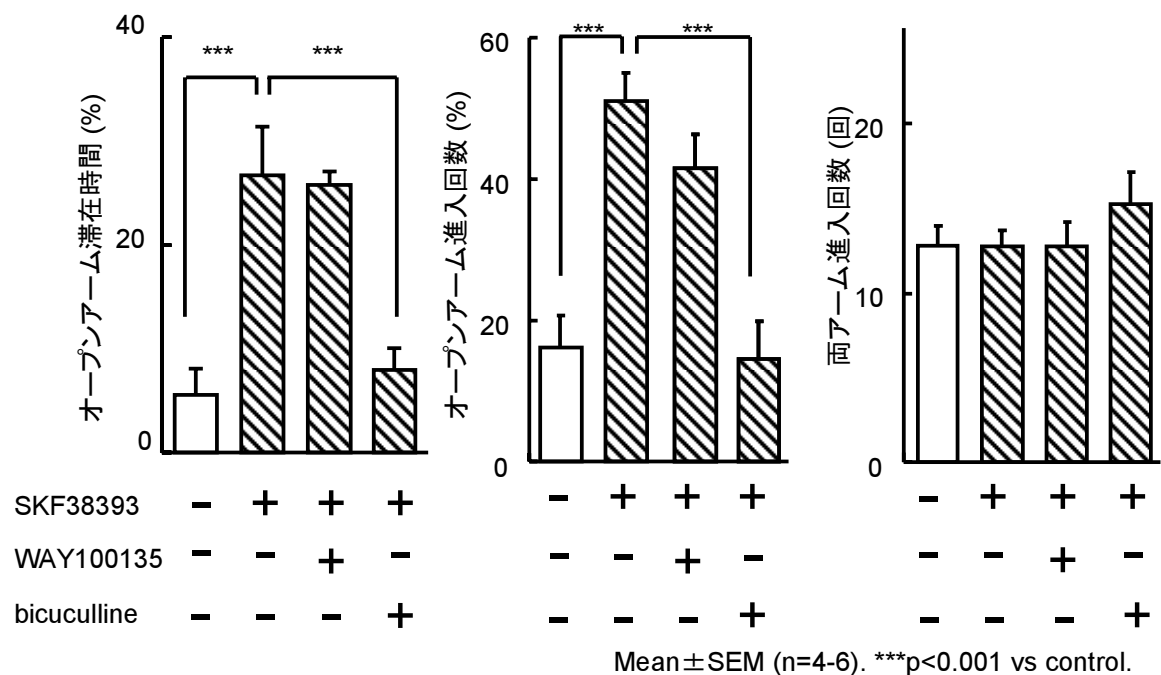


図14. ドーパミンD<sub>1</sub>受容体アゴニストの抗不安機構

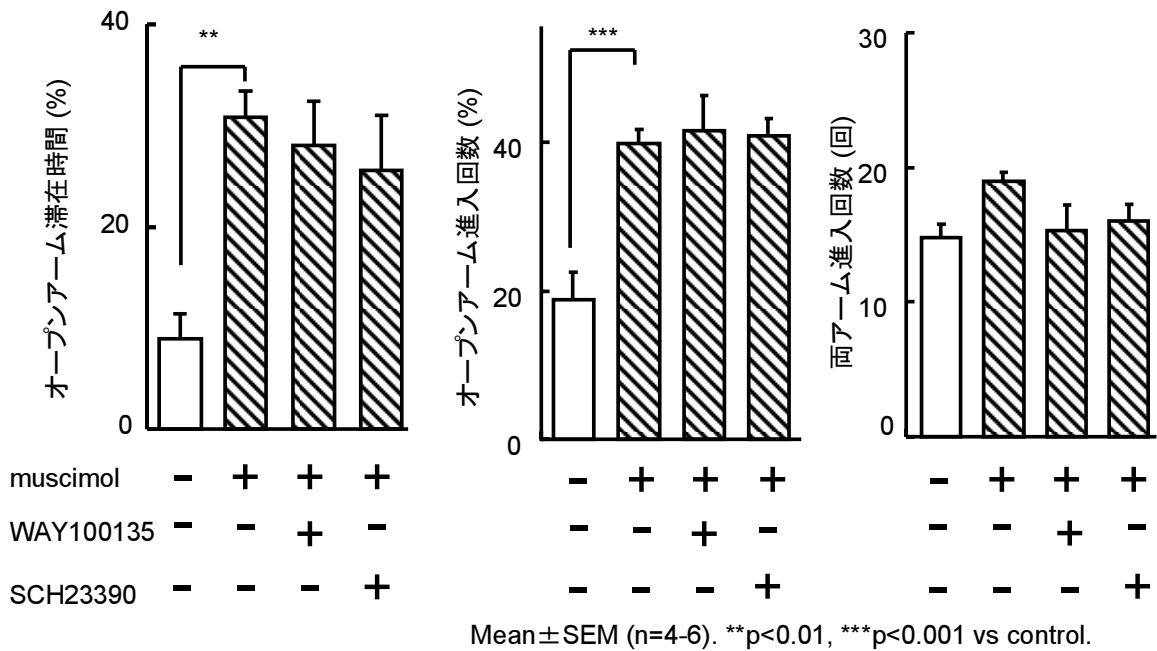


図 1 5. GABA<sub>A</sub>受容体アゴニストの抗不安機構

5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニストの8-OH-DPATの抗不安作用は、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体およびGABA<sub>A</sub>受容体に対するアンタゴニストの両方で阻害されたことから (図1 3)、5-HT<sub>1A</sub>受容体が最も上流に位置することがわかった。ドーパミンD<sub>1</sub>受容体アゴニストのSKF38393による抗不安作用は、GABA<sub>A</sub>アンタゴニストでは阻害されたが、5-HT<sub>1A</sub>アンタゴニストでは阻害されなかった (図1 4)。さらに、GABA<sub>A</sub>受容体アゴニストのmuscimolの抗不安作用は、5-HT<sub>1A</sub>受容体、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体のいずれのアンタゴニストにも阻害されなかった (図1 5)。以上の結果より、5-HT<sub>1A</sub>受容体の活性化 → ドーパミン放出 → ドーパミンD<sub>1</sub>受容体の活性化 → GABA放出 → GABA<sub>A</sub>受容体の活性化 → 抗不安作用という新しい情報伝達経路が明らかとなった。おそらく、YLはこの経路を介して抗不安作用を示しているものと考えられる。

これまで食品タンパク質由来の生理活性ペプチドが、μおよびδオピオイドアゴニストとして作用する場面があることを見出している [5-7]。しかしながら、YLの抗不安作用は、μおよびδオピオイドアンタゴニストのナロキソンおよびナルトリンドールで阻害されないことがわかった (図1 6)。また、δオピオイド受容体の下流で活性化されるσ<sub>1</sub>受容体 [5] に対するアンタゴニストによっても阻害されなかった (図1 7)。以上の結果、YLはオピオイド系を活性化しないことが判明した。また、プロスタグランジン (PG) 類が抗不安ペプチドのメディエーターとして作用する場面があることを報告しているが [8]、YLの抗不安作用は、PG類の合成に重要なシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害剤であるインドメタシンによっても阻害されなかった (図1 8)。したがって、YLは従来の抗不安ペプチドとは異なる作用経路を介しているものと考えられる。

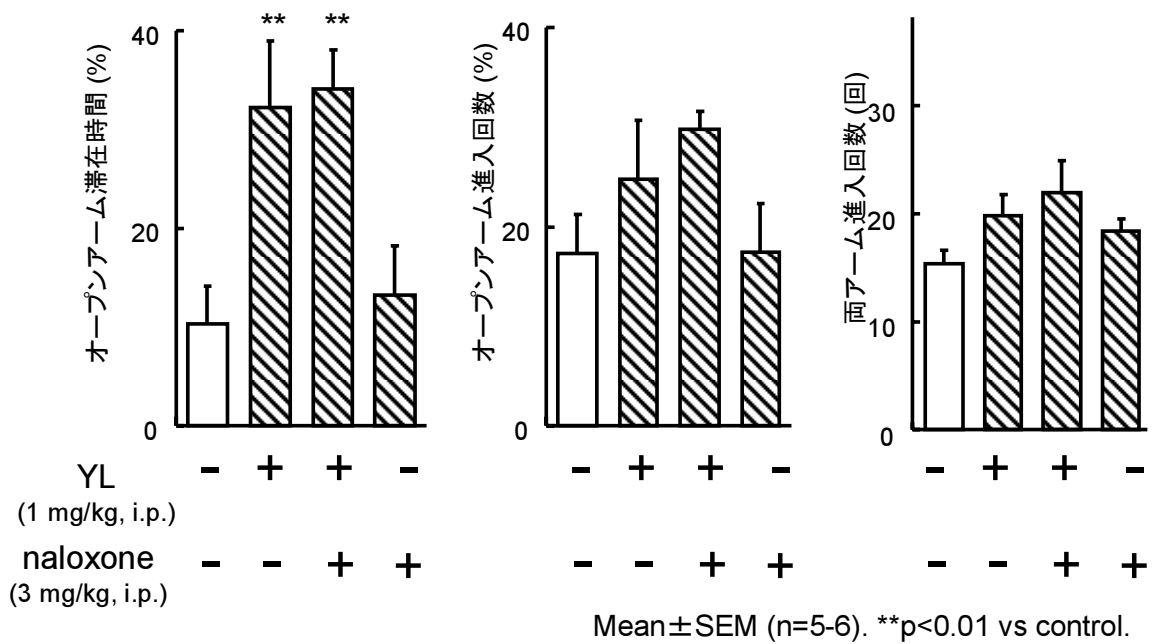


図 16. YLの抗不安作用はμオピオイド受容体アンタゴニストにより阻害されない

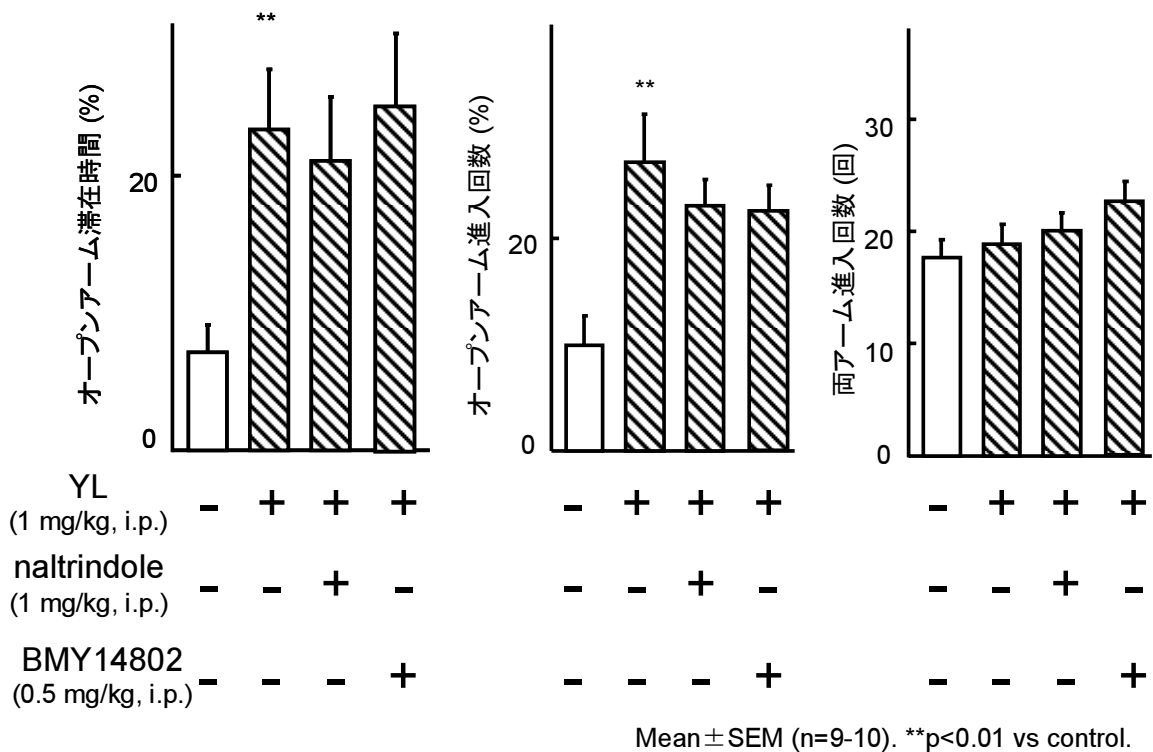


図 17. YLの抗不安作用はδオピオイド受容体およびσ<sub>1</sub>受容体アンタゴニストにより阻害されない

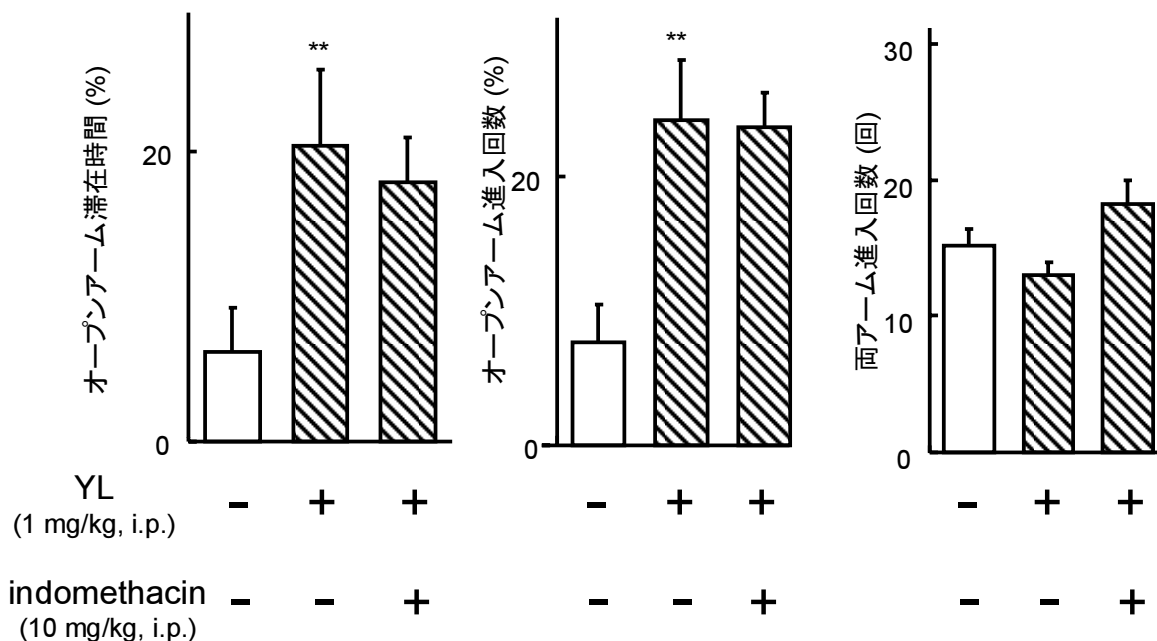


図 18. YLの抗不安作用はシクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメタシンにより阻害されない

#### 4. 考察

牛乳タンパク質由来の低分子ペプチドの情動調節作用を検討し、複数の抗不安ペプチドを見出した。そのなかで、牛乳タンパク質の一次構造中に多数含まれるジペプチドTyr-Leuが医薬品に匹敵する低用量(0.1 mg/kg, i. p.)で抗不安作用を示すことを初めて見出した。さらに本ペプチドは経口投与で抗不安活性を示すことを明らかにした。実際に牛乳あるいは乳タンパク質を摂取した場合に消化管内でYLおよびYL配列を含む抗不安ペプチドがどの程度派生し、情動にどのような影響を与えるかは、今後、実験動物さらにはヒトでの詳細な検討を要する。また、酵素処理などによりYLおよびYL配列を含む抗不安ペプチドを高含有する食品加工の開発が期待される。

さらに、YLのメディエーターについて薬理的に検討したところ、セロトニン、ドーパミン、GABAなどの神経伝達物質の遊離を促進し、抗不安作用を示すことを証明した(図19)。本ペプチドは、1)オピオイド受容体を活性化しないこと、2)プロスタグランジン類の放出を促進しないこと、から従来の食品タンパク質由来の抗不安ペプチドの作用機構とは異なることが判明した。また、一般的な抗不安薬として知られるジアゼパムなどのベンゾジアゼピン系の薬剤はGABA<sub>A</sub>受容体のベンゾジアゼピン結合部位に結合し、抗不安作用を示すのに対し、YLはこの結合部位に親和性を示さないことから、GABA遊離を促進し抗不安作用を示すものと考えられる。したがって、従来の抗不安薬とも作用機構を異にすることがわかった。現在、本ペプチドの直接結合する受容体の同定を試みているが、非常に強力な抗不安ペプチドであるYLの標的受容体が明らかになれば、新規の抗不安機構を解明することができるだけでなく、新しい創薬のターゲットになりうる。

YL以外にも、牛乳タンパク質由来の抗不安ペプチドを複数見出している。これらの抗不安ペプチドの作用経路の詳細は不明であるが、作用機構が異なる場合には、複数のペプチド投与による相加作用および相乗作用が期待できる。また、抗不安ペプチドの部分構造にも抗不安活性が認め

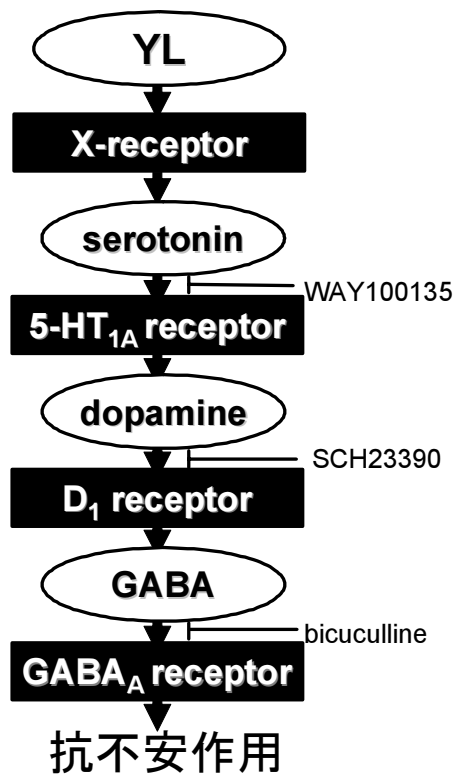


図 19. YL の抗不安機構

られる場合があることを経験しており、今後新しい抗不安ペプチドが見出される可能性もある。したがって、牛乳タンパク質を摂取した際には、複数の低分子の抗不安ペプチドが派生し、相加効果および相乗作用を示しているものかもしれない。

一般に精神的ストレス緩和作用を示す薬品は睡眠誘発作用を併せ持つことが多く、代表的な抗不安薬ジアゼパムは睡眠導入剤として処方されている。また、種々の食品由来抗不安ペプチドが睡眠誘発活性を示すGABAやPGD<sub>2</sub>、アデノシンをメディエーターとしていることを明らかにしている。今後の牛乳タンパク質由来の抗不安ペプチドのさらなる研究により、牛乳の睡眠物質の同定に結びつくかもしれない。すべての年齢において精神的ストレスおよび不眠症の緩和が望まれており、特に最近、高齢者のストレスや不眠症が社会問題となっている。加えて、健全な乳幼児の発達に精神的ストレス緩和作用を有する牛乳ペプチドが寄与できるか否か今後詳細な検討が必要である。

## 参考文献

1. Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, dopamine D<sub>1</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors in mice. Kanegawa N, Suzuki C, Ohinata K. FEBS Lett. 2010;584(3):599-604.
2. Leonardo ED, Hen R. Anxiety as a developmental disorder. Neuropsychopharmacology. 2008; 33(1):134-40.
3. Short JL, Ledent C, Drago J, Lawrence AJ. Receptor crosstalk: characterization of mice deficient in dopamine D<sub>1</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Neuropsychopharmacology. 2006; 31(3):525-34.
4. Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. Nat Rev Neurosci. 2008;9(5):331-43. Review.
5. Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, Yoshikawa M. Rubiscolin-6, a  $\delta$  opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating  $\sigma_1$  and dopamine D<sub>1</sub> receptors. Peptides. 2007; 28(10): 1998-2003.
6. Yang S, Yunden J, Sonoda S, Doyama N, Lipowski AW, Kawamura Y, Yoshikawa M. Rubiscolin, a delta selective opioid peptide derived from plant Rubisco. FEBS Lett. 2001; 509: 213-7.

7. Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M. Soymorphins, novel  $\mu$  opioid peptides derived from soy  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit, have anxiolytic activities. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(10): 2618-21.
8. Zhao H, Usui H, Ohinata K, Yoshikawa M. Rubimetide (Met-Arg-Trp) derived from Rubisco exhibits anxiolytic activity via the DP<sub>1</sub> receptor in male ddY mice. *Peptides* 2008; 29:629-632.