

牛乳由来の新しい精神的ストレス緩和 ペプチドの作用機構に関する研究

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：金川 典正

宮本 知京

要 約

これまで我々は牛乳タンパク質の一次構造中に数多く存在するジペプチドTyr-Leu (YL) が強力な精神的ストレス緩和作用（抗不安作用）を示すことを見出している。さらに、YLの構造－活性相関を高架式十字迷路試験とオープンフィールド試験により検討したところ、Trp-Leu (WL, 0.1 mg/kg, i. p.) など、(芳香族アミノ酸) -Leuという構造のジペプチドが強力な抗不安作用を有することを明らかにした。さらにWLは経口投与（0.3 mg/kg）でも有効であった。次に、WLのメディエーターを検討した。WLの抗不安活性は、セロトニン5-HT_{1A}受容体、ドーパミンD₁受容体およびγ-アミノ酪酸（GABA）_A受容体に対するアンタゴニストで完全に阻害された。なお、μおよびδオピオイド受容体のアンタゴニストや、シクロオキシゲナーゼの阻害剤によっては阻害されなかった。したがって、WLは、YLと同様に、5-HT_{1A}、D₁およびGABA_A受容体の活性化を介する新しい情報伝達経路を介していると考えられる。なお、YLやWL、FLなどの（芳香族アミノ酸）-Leu配列は、牛乳タンパク質の一次構造中に多数存在することから、牛乳のストレス緩和作用に潜在的に寄与している可能性が考えられる。

さらに、YL配列を有するトリペプチドについて抗不安作用を検討したところ、N-末端側への鎖長延長は活性を著しく低下させるが、C末端側への鎖長延長は許容されることが判明した。実際、牛乳タンパク質由来のTyr-Leu-Glu (YLQ) やTyr-Leu-Tyr (YLY) が抗不安作用を示した。

キーワード

精神的ストレス緩和作用、牛乳タンパク質、ペプチド

1. はじめに

我々人間は哺乳類（Mammalia）である。「哺乳」は口にふくむ、あるいは食べることを意味することから、哺乳類は、乳を口にふくませて育てる生物群といえる。乳は哺乳類において子（仔）の健全な発達と生育のために母体が作り出す分泌液であり、乳児期では母乳のみで生育できる。これまで我々は乳タンパク質由来の精神的ストレス緩和（抗不安）ペプチドを見出すとともに^{1,2)}、さらに今回、新しい抗不安ペプチドを追加したが（表1）、牛乳から機能性ペプチドが生成することは極めて合目的といえる。また、過度の精神的ストレスは精神疾患だけでなくメタボリックシンドロームや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緩和素材が強く望まれている。実際、牛乳・乳製品摂取の摂取がメタボリックシンドロ-

ムの予防に有効である可能性があることが最近報告されており³⁾、牛乳由来の抗不安ペプチドが潜在的に寄与している可能性が考えられる。

これまで我々は、牛乳タンパク質の一次構造中に数多く含まれるジペプチドTyr-Leu (YL) が抗不安薬として一般的に使用されるジアゼパムに匹敵する強力な抗不安作用を示すことを、高架式十字迷路試験などの行動薬理的試験により証明した。さらに本研究では、YLの構造-活性相関を検討し、YLのC-末端側への鎖長延長が許容されることを明らかにした。特に、YL配列を含有する牛乳由来の低分子ペプチドに着目し検討したところ、Tyr-Leu-Glu (YLQ) やTyr-Leu-Tyr (YLY) が強力な抗不安作用を示すことを明らかにした。さらに、これらの牛乳由来新規ストレス緩和ペプチドについて作用機構を検討した。

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 (β -lactotensin)	β -lactoglobulin	10
YPFPG (casomorphin-5)	β -casein	1
YL	α_{S1} -casein/ β -lactoglobulin/ serum albumin	0.1
YLY	α_{S2} -casein/serum albumin	0.1
YLQ	serum albumin	0.1
FL	α_{S2} -casein/ β -casein/ κ -casein/ α -lactalbumin	0.1
WL	α -lactalbumin	0.1

2. 実験方法

2-1. 試薬

ジペプチドは、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, 2)}

高架式十字迷路（図1）は、高さ50cmの位置に十字に設置された、壁で覆われた closed arm と壁で覆われていない open arm 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 closed arm によく入るが、抗不安薬を処置すると open arm 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。マウスは雄性ddYマウス4週齢を使用した。

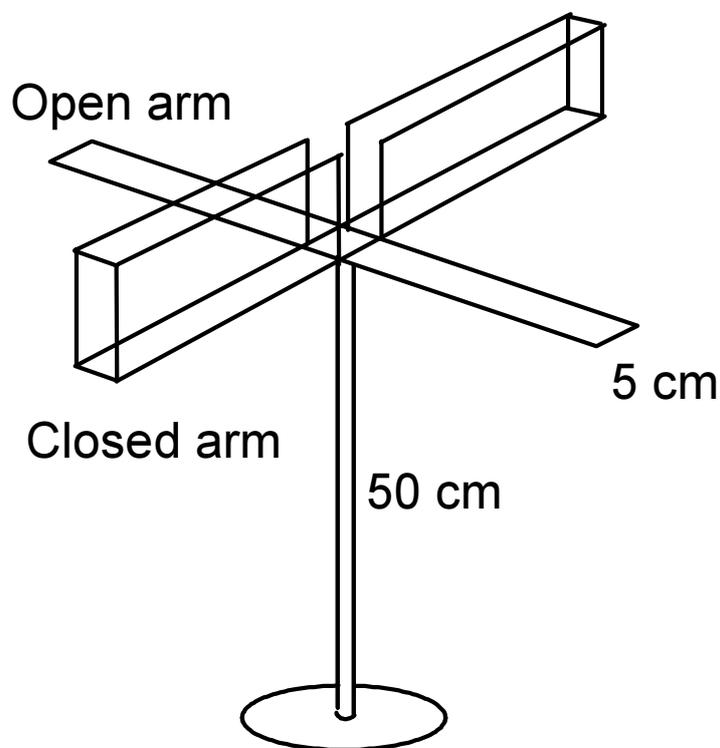


図1. 高架式十字迷路 (Elevated Plus-Maze)

2-3. オープンフィールド試験²⁾

オープンフィールド（図2）は、直径60 cm、高さ50 cm円筒状の装置で、壁面が灰色、床面が黒色である。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、中央の円への滞在時間および進入回数が増加する。ペプチドを投与して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。なお、マウスの行動は、ビデオ画像行動解析ソフト（SMART-Junior, Panlab, S.L., Spain）を用いて解析した。

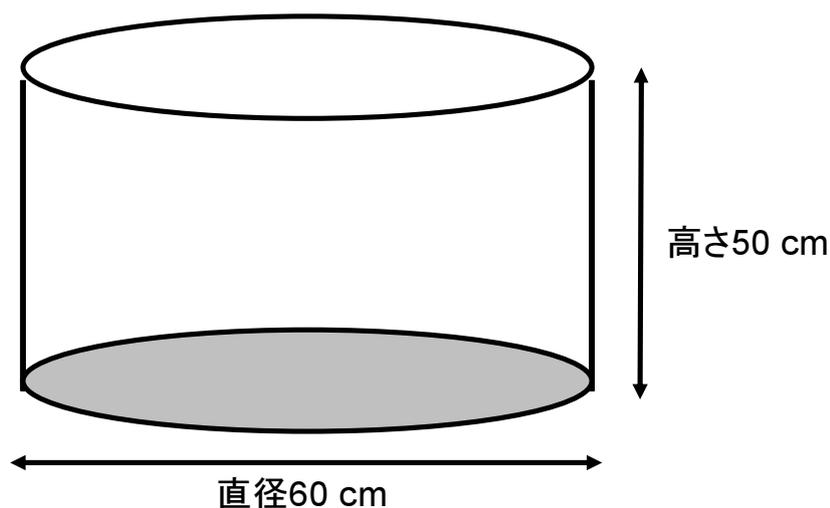


図2. オープンフィールド装置

3. 結果

3-1. Trp-LeuはTyr-Leuと同様に医薬品に匹敵する強力な抗不安作用を示す

これまで我々は、YL (0.01-1mg/kg) をマウスに腹腔内投与した際に、高架式十字迷路でのオープンアームへの滞在時間と侵入回数の割合が用量依存的に増加することを見出し、強力な抗不安作用を示すことを明らかにした²⁾。さらに、YLのTyrを同じ芳香族アミノ酸であるTrpに置換したTrp-Leu (WL) について高架式十字迷路試験で評価した。その結果、WLの腹腔内投与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増加し、抗不安作用を示すことがわかった(図3)。その最小有効用量は0.1 mg/kgと医薬品に匹敵する低用量であり、また、YLと同等の活性を示すことが判明した。さらに、オープンフィールド試験でWLの抗不安作用を確認した。その結果、WLの腹腔内投与(0.03 mg/kg)によりオープンフィールドの中心(半径30cm)に滞在する時間が延長し、抗不安作用を示すことがわかった(図4)。したがって、WL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した。さらに、Phe-Leu (FL) も同様に強力な抗不安作用を示すことが判明し、(芳香族アミノ酸)-Leuという構造が抗不安作用に重要であることを見出した。

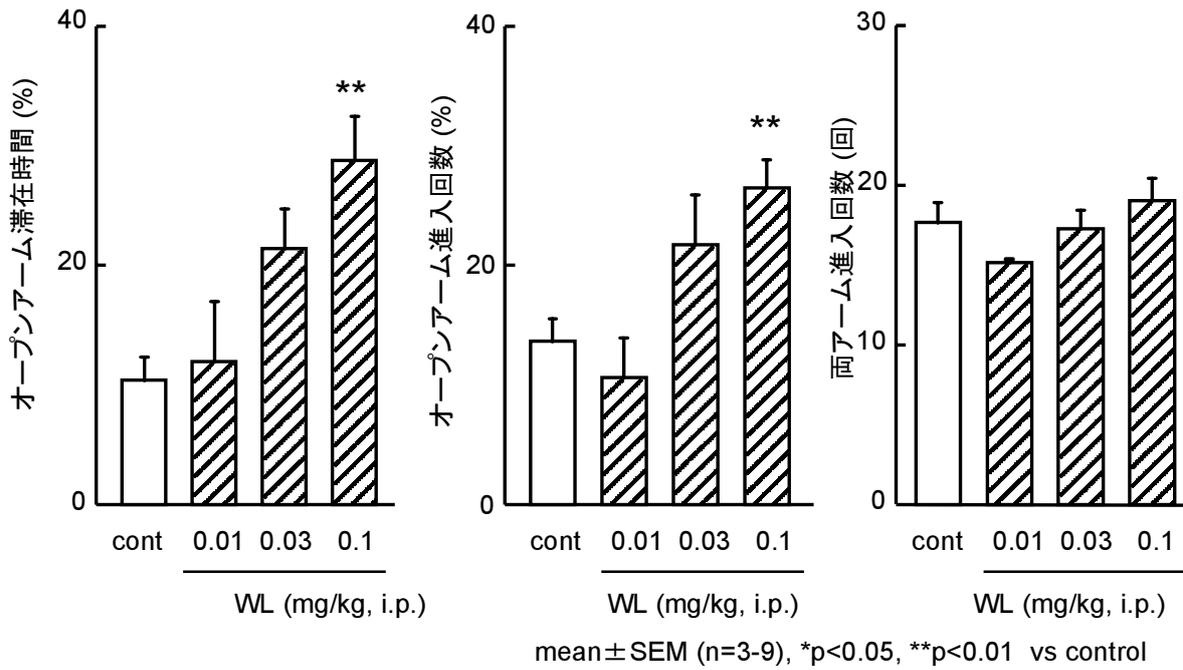
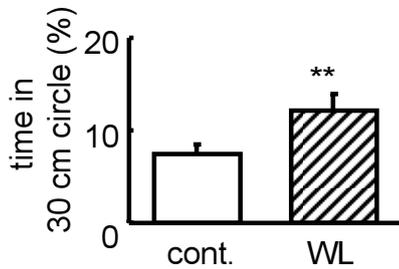
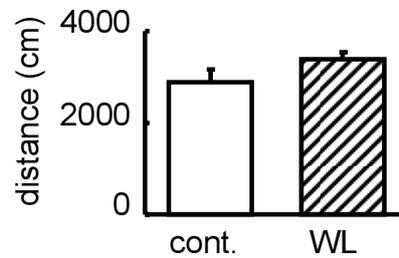


図3. WLの腹腔内投与による抗不安作用（高架式十字迷路）

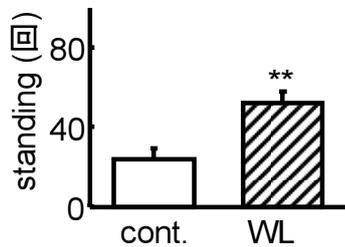
A. 中心円(30 cm)滞在時間の割合



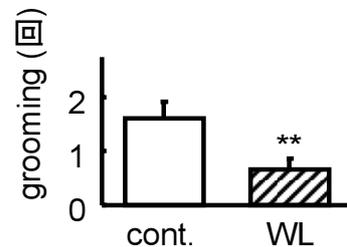
B. 総移動距離



C. 立ち上がり行動の回数



D. 毛づくろい行動の回数



mean ± SEM (n=10-12) **p<0.01 vs control group

図4. WL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）

3-2. Trp-Leuは経口投与でも強力な抗不安作用を示す

腹腔内投与により抗不安作用を示したWLについて、経口投与による影響を高架式十字迷路試験により検討した。WLの経口投与 (0.3 mg/kg) により、オープンアームでの滞在時間と進入回数の割合が有意に増加し、経口投与でも強力な抗不安活性を示すことが判明した (図5)。

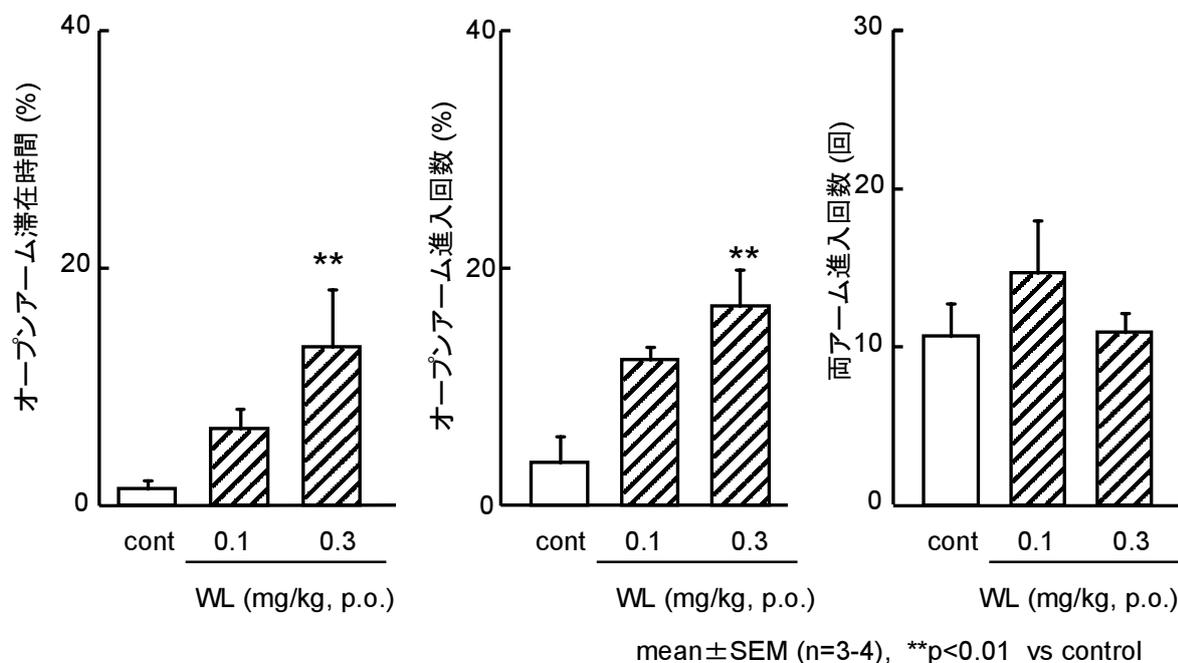
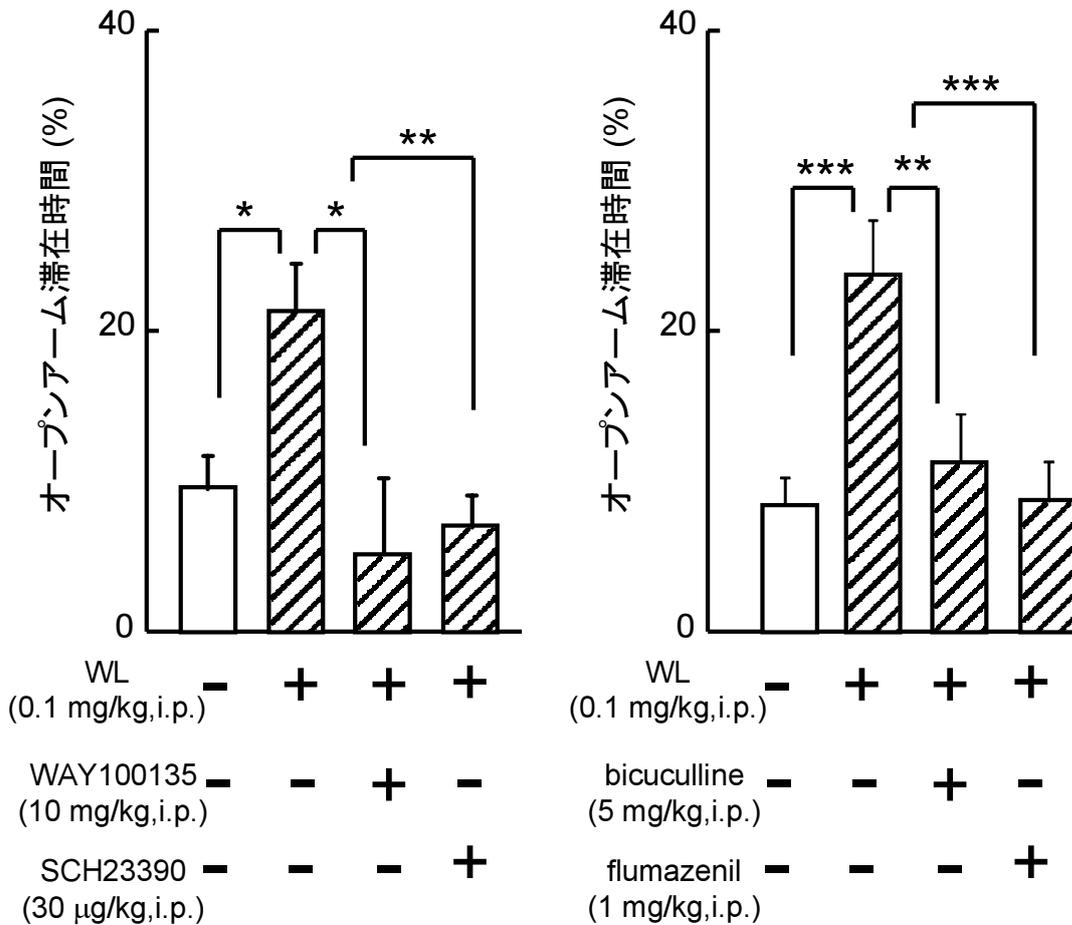


図5. WLの経口投与による抗不安作用

3-3. Trp-Leuの抗不安作用はセロトニン5-HT_{1A}受容体、ドーパミンD₁受容体、GABA_A受容体を活性化する新しい情動調節経路を介する

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⁴⁻⁶⁾。そこで、WL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、WL (1 mg/kg, i. p.) の抗不安作用は、セロトニン5-HT_{1A}受容体アンタゴニストのWAY100135 (10 mg/kg, i. p.)、ドーパミンD₁受容体アンタゴニストのSCH23390 (30 μg/kg, i. p.)、およびGABA_A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6)。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、WL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)、WLは内因性のセロトニン、ドーパミンおよびGABAの遊離を促進し、そ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。

既にYLが5-HT_{1A}受容体、ドーパミンD₁受容体、GABA_A受容体の活性化を介して抗不安作用を示すことを明らかにしているが、WLの抗不安作用はYLと同様のメディエーターを介しているものと考えられる。



mean±SEM (n=3-5), *p<0.05, **p<0.01 vs control mean±SEM (n=10), *p<0.05, **p<0.01 vs control

図6. WLの抗不安作用はセロトニン5-HT_{1A}受容体、ドーパミンD₁受容体、GABA_A受容体に対するアンタゴニストにより阻害される

これまで、食品タンパク質由来のオピオイドペプチドが抗不安作用を示すことを明らかにしているが⁷⁻⁹⁾、WLの抗不安作用は主要なオピオイド受容体として知られるμおよびδオピオイド受容体に対するアンタゴニスト (Naloxone, 3 mg/kg, i. p. ; Naltindole, 1 mg/kg, i. p.) によっても阻害されなかった (図7)。したがって、WLはオピオイド活性を示さないものと考えられる。また、食品タンパク質由来の抗不安ペプチドのなかにプロスタグランジン (PG) 類の遊離を介して活性を示すものが存在するが、WLの抗不安作用はシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤の indomethacin により阻害されなかった。なお、YLの抗不安作用も上記のオピオイドアンタゴニストとCOX阻害剤により阻害されなかった。以上の結果より、WLやYLなどの (芳香族アミノ酸) -Leu からなるジペプチドは、従来の食品タンパク質由来の抗不安ペプチドとは全く異なる作用機構を介しているものと考えられる。

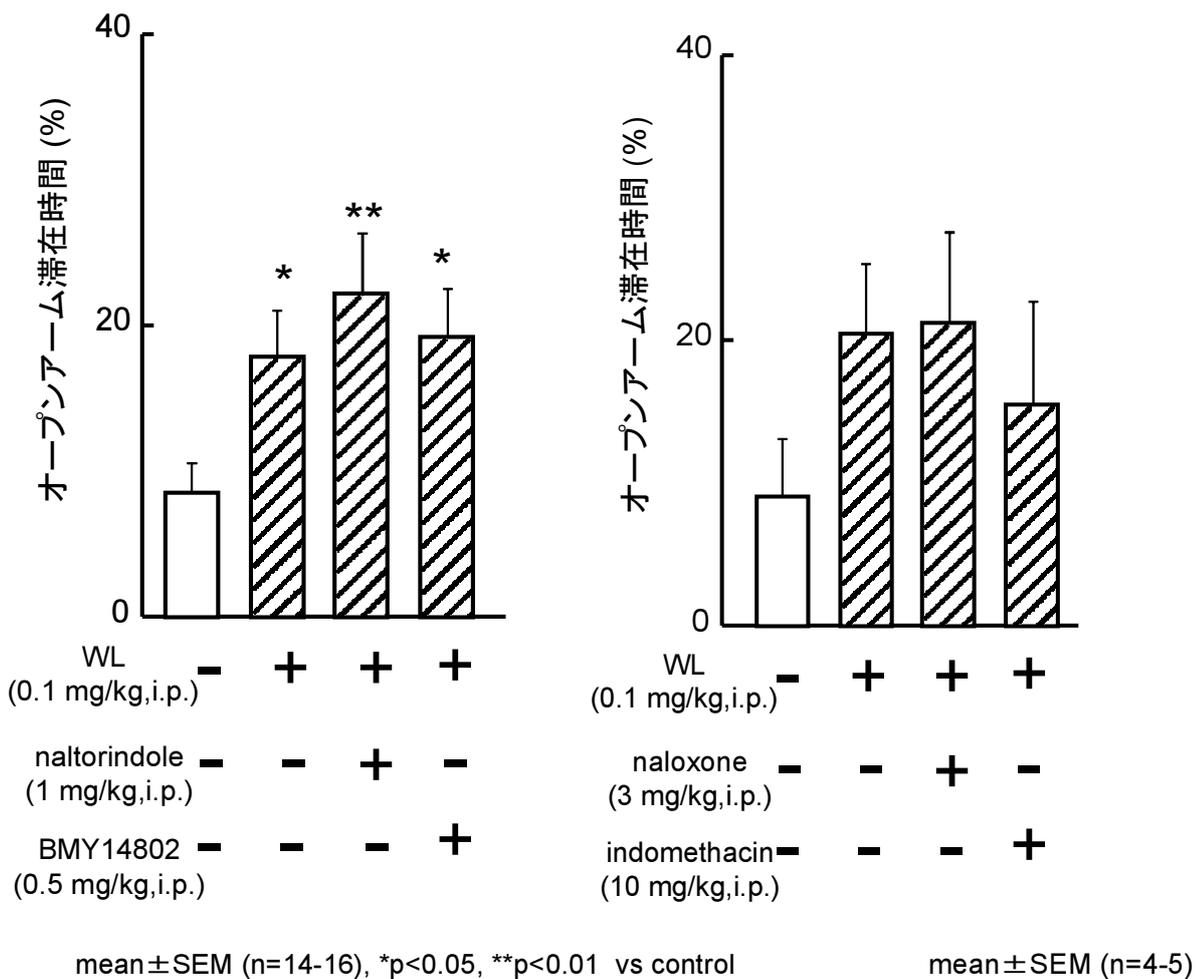


図7. WLの抗不安作用はオピオイド受容体アンタゴニストおよびCOX阻害剤により阻害されない

3-4. Tyr-LeuのC末端側への鎖長延長したトリペプチドは抗不安作用を示す

次に、トリペプチドの抗不安作用に着目した。YL配列を含むトリペプチドを合成し、構造-活性相関を検討したところ、YLのC-末端側にGluやTyrを付加したYLQやYLYの腹腔内投与（1 mg/kg）によりオープンアームへの滞在時間の割合が増加し、抗不安作用を示すことが判明した（図8, 9）。なお、いずれのトリペプチドも牛乳タンパク質の一次構造中に存在するアミノ酸配列である。一方、YLのN-末端側に同じくGluやTyrを付加したQYLやYYLは同量を投与したにも関わらずオープンアームへの滞在時間の割合には変化が認められず、抗不安作用を示さないことが判明した。したがって、YLのN-末端側への鎖長延長により強力な抗不安活性は失われるが、C-末端側への鎖長延長は許容されることが明らかとなった。

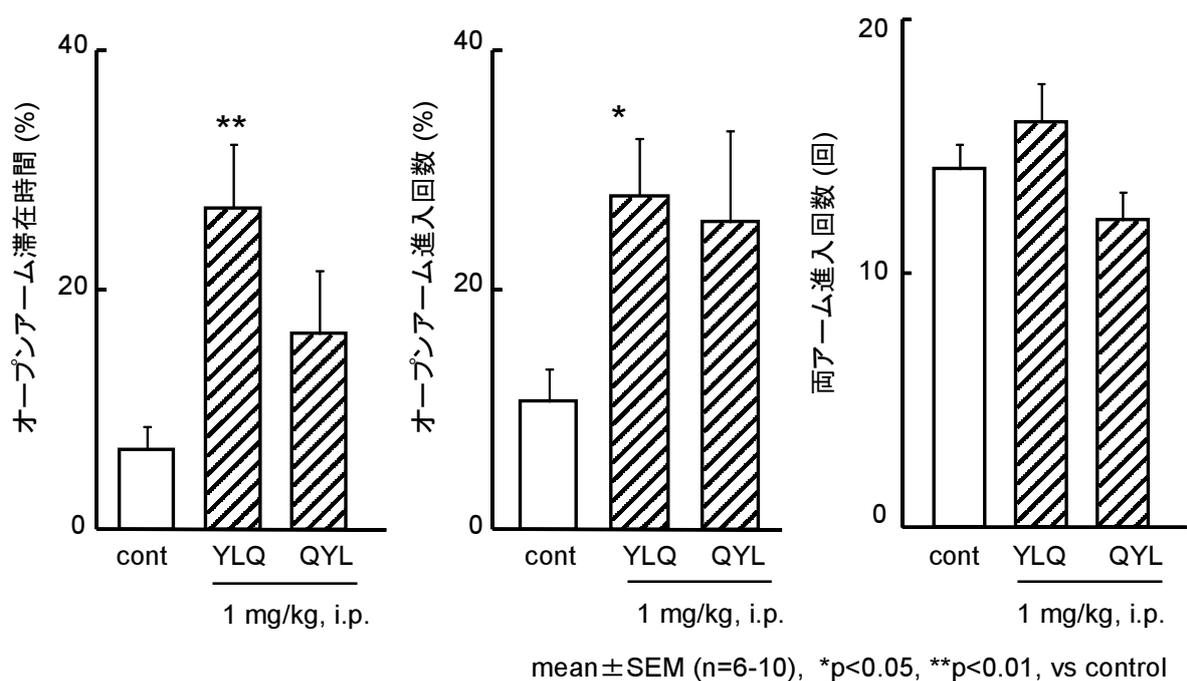


図8. YLのC-末端側に鎖長延長した牛乳由来のトリペプチドYLQは抗不安作用を示す

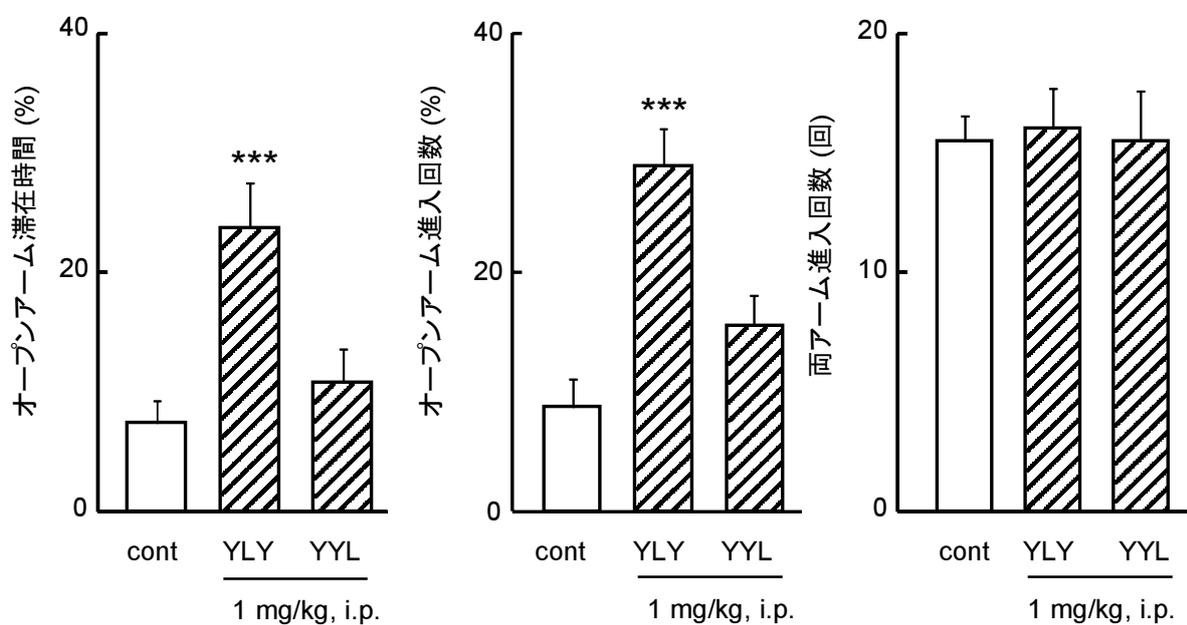


図9. YLのC-末端側に鎖長延長した牛乳由来のトリペプチドYLYは抗不安作用を示す

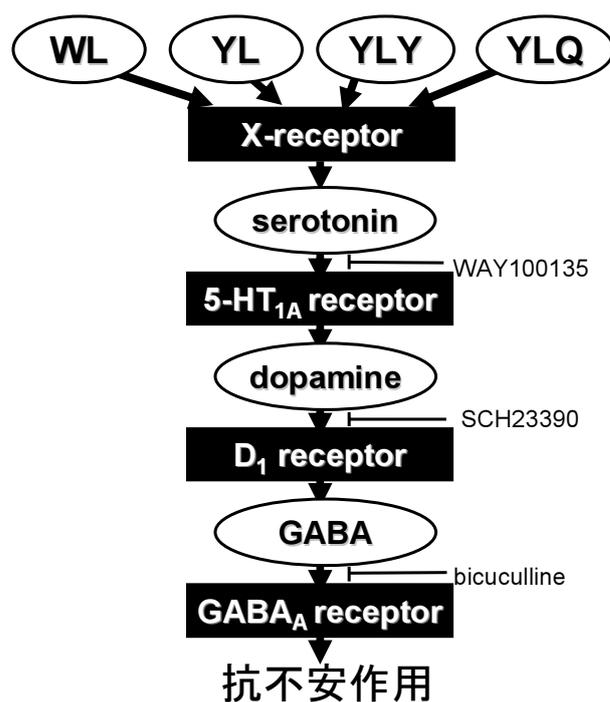


図 10. 牛乳タンパク質由来YL関連ペプチドによる抗不安作用の予想メカニズム

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YL、WL、FLなどの（芳香族アミノ酸）-Leuからなるジペプチドが医薬品に匹敵する低用量(0.1 mg/kg)で抗不安作用を示すことを見出した。さらに、これらは経口投与で抗不安活性を示すことを明らかにした。

WL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明らかにした(図10)。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わかった。これらのWLの特徴は、YLと同じであった。YLやWL、さらにはYLをC-末端側に延長したYLYおよびYLQなども、おそらく同じ受容体に作用しているものと考えられる。なお、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_A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、（芳香族アミノ酸）-Leuからなるジペプチド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。

牛乳には睡眠誘発作用があるといわれているが、その作用本体はよくわかっていない。一般に、抗不安薬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も処方される。我々は牛乳由来の抗不安ペプチドが牛乳の睡眠誘発作用に寄与しているという仮説を考えている。実際、これまで見出した牛乳由来の抗不安ペプチドは全て睡眠誘発作用を有

するGABAの遊離を介しており^{1,2)}、我々の仮説を支持している。また最近、ヒトラクトフェリン由来の補体C5aアゴニストペプチドであるラクトメジン1は、強力な睡眠物質として知られるプロスタグランジン (PG) D₂を介し、抗不安作用を示すことを見出した¹⁾。さらに、PGD₂が強力な抗不安作用を示すことも報告している¹⁰⁾。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。今後、これまで見出した乳由来抗不安ペプチド (表1参照) について睡眠誘発活性を検討し、牛乳成分が睡眠クオリティーの改善に寄与しているかを明らかにする必要があると思われる。

文献

1. 食品タンパク質由来ペプチドの多様な神経調節作用。大日向耕作、吉川正明。化学と生物 Vol.48、No.11、764-771 (2010)
2. Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D₁ and GABA_A receptors in mice. Kanegawa N, Suzuki C, Ohinata K. FEBS Lett. 2010;584(3):599-604.
3. 牛乳・乳製品摂取とメタボリックシンドロームに関する横断的研究。上西一弘、田中司郎、石田裕美、細井孝之、大橋靖雄、門脇孝、折茂肇、日本栄養・食糧学会誌、60巻、4号、151-159 (2010)
4. Leonardo ED, Hen R. Anxiety as a developmental disorder. Neuropsychopharmacology. 2008; 33(1):134-40.
5. Short JL, Ledent C, Drago J, Lawrence AJ. Receptor crosstalk: characterization of mice deficient in dopamine D₁ and adenosine A_{2A} receptors. Neuropsychopharmacology. 2006; 31(3):525-34.
6. Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. Nat Rev Neurosci. 2008;9(5):331-43. Review.
7. Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, Yoshikawa M. Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating σ_1 and dopamine D₁ receptors. Peptides. 2007; 28(10): 1998-2003.
8. Yang S, Yunden J, Sonoda S, Doyama N, Liplowski AW, Kawamura Y, Yoshikawa M. Rubiscolin, a delta selective opioid peptide derived from plant Rubisco. FEBS Lett. 2001; 509: 213-7.
9. Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M. Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities. Biosci Biotechnol Biochem. 2007; 71(10): 2618-21.
10. Zhao H, Ohinata K, Yoshikawa M. Central prostaglandin D₂ exhibits anxiolytic-like activity via the DP₁ receptor in mice. Prostaglandins and the other mediator. 2008; 29(4):629-32.