

卵成分の精神的ストレス緩和作用に関する基礎的研究

京都大学大学院農学研究科・准教授 大日向 耕作／修士 小田 亜矢子

■ 緒 言

これまで我々は、種々の食品タンパク質の酵素消化により派生する生理活性ペプチドのなかには、摂食調節作用や学習促進作用、精神的ストレス緩和作用(抗不安作用)など、多彩な神経調節作用を示すものが存在することを明らかにしてきた。鶏卵は栄養価および加工特性に優れ、嗜好性の高い食品の素材として利用されているが、卵成分の神経調節作用については未だ不明な点が多い。一方、ジペプチド Tyr-Leu (YL)が医薬品に匹敵する強力な抗不安活性を示すことを最近見出したが¹⁾、この YL 配列が主要な卵白タンパク質のオボアルブミンの一次構造中に存在することがわかった。そこで本研究では、オボアルブミン由来の YL 配列を含む低分子ペプチドが抗不安作用を示すか否かを行動薬理学的に検討するとともに、その作用機構を明らかにした。さらに、卵黄の抗不安作用についても検討した。

■ 方 法

1. 試薬

オボアルブミンの一次構造中に存在する低分子の抗不安ペプチド候補を、Fmoc 法により固相合成し、逆相 HPLC を用いて精製し、凍結乾燥したものを使用した。

2. 高架式十字迷路試験

実験動物として雄性 ddY マウス(24～26g)を使用した。オボアルブミン由来の低分子ペプチドの情動調節に及ぼす影響について抗不安薬のスクリーニング系に使用される高架式十字迷路を試験で評価した^{1,2,3,4,5)}。高架式十字迷路(図 1)は、高さ 50cm 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構成される。通常、マウスは、50cm の高さを怖がり、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。マウスのこの特性を利用し、抗不安活性を示すか否かを評価した。ペプチドを生理的食塩水に溶解した後に、マウスに対し腹腔内あるいは経口投与し、30 分後に高架式十字迷路の中央に置き、5 分間行動を観測した。

3. 卵白アルブミン酵素消化物中の抗不安ペプチドの定量

卵白アルブミン(20mg/ml, SIGMA 社製)にトリプシン(SIGMA 社製)を酵素：基質 = 1:100 の割合で添加し、37°C でインキュベートした。5 時間後に 10 分間ボイルし、酵素反応を停止した。酵素消化により得られたペプチド混合物を、逆相 HPLC(ODS カラム：5C18AR II, 4.6mm × 150mm, ナカライテスク；移動相：0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルの直線グラジエント, 1%/min)により分離した。化学合成した標準品の保持時間に一致するピークについて、質量分析計(Mariner, Applied Biosystems)およびプロテインシーケンサー(Procise HT Protein Sequencing System, Applied Biosystems)を使用して一次構造を決定した。

■ 結 果

1. オボアルブミン由来の抗不安ペプチド VYLPR の発見

高架式十字迷路試験により、オボアルブミン由来の低分子ペプチドの抗不安活性を測定した。Val-Tyr-Leu-Pro-Arg(VYLPR)の腹腔内投与により、オープンアームでの滞在時間および進入回数の割合(%)が増加することを見出した(図 2)。行動量を示すオープンアームとクローズドアームへの進入回数の合計には変化が認められなかった。したがって、VYLPR は抗不安作用を示すことが明らかとなった。今回検討した低分子ペプチドの中で、VYLPR の抗不安作用の最小有効量が 0.3mg/kg と最も低いことから、VYLPR の抗不安作用に着目しさらに検討した。

2. VYLPR は経口投与で抗不安作用を示す

7 アミノ酸残基以下の低分子ペプチドが経口投与で種々の生理作用を示す場合がある^{1,2,3,4)}。そこで、VYLPR が、経口投与でも抗不安作用を示すかを検討した。VYLPR(1mg/kg)は、経口投与によりオープンアームでの滞在時間および進入回数の割合が有意に増加し、本ペプチドは、経口投与でも有効であることが明らかとなった(図3)。

3. VYLPR の抗不安機構

各種阻害剤を用いて VYLPR の抗不安機構を検討した。オピオイドはモルヒネ様の作用を示す生理活性物質で、その主要な受容体サブタイプとして μ および δ 受容体が知られている。チロシン残基を含む食品タンパク質由来の低分子ペプチドがオピオイド受容体を介して抗不安作用を示す例をこれまでに見出している^{2,3)}。そこでまず、VYLPR の抗不安作用がオピオイド受容体を介しているか否かを μ 受容体アンタゴニストの naloxone および δ 受容体アンタゴニストの naltrindole を用いて検討した。その結果、VYLPR(0.3mg/kg, i.p.)の抗不安作用は、いずれのオピオイド受容体アンタゴニスト(naloxone, 3mg/kg or naltrindole, 1mg/kg, i.p.)によっても阻害されなかった(data not shown)。したがって、本ペプチドの抗不安作用には、 μ および δ オピオイド受容体は関与していないことが明らかとなった。なお、本ペプチドは、マウス輸精管(MVD)アッセイにおいて、 δ オピオイド活性を示さないことが明らかとなり、抗不安作用の検討結果と一致することがわかった。

一方、食品タンパク質由来の低分子ペプチドのなかには、プロスタグランジン(PG)類の遊離を促進し、抗不安作用を示す場合があることを、これまでに見出している^{4,5)}。そこで、VYLPR の抗不安作用に PG 類が関与しているかを、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤の indomethacin を用いて検討した。VYLPR(0.3mg/kg, i.p.)によるオープンアームへの滞在時間および進入回数の割合の上昇は、indomethacin(10mg/kg)の併用投与により阻害され(図4)、VYLPR の抗不安作用には PG 類の放出が関与していることが明らかとなった。現在、どのような PG 分子種が関与しているのかを検討中である。なお、VYLPR 分子中には、強力な抗不安ペプチド YL が含まれるが、YL の抗不安作用には PG 類の放出は関与しないことから¹⁾、VYLPR と YL の抗不安機構は相異なることがわかった。

4. VYLPR はオボアルブミンのトリプシン消化により派生する

加熱処理後(10分間ボイル)のオボアルブミン溶液にトリプシンを添加し、37°Cで5時間インキュベートし得られた酵素消化物を、逆相 HPLC で分離した。図5はその HPLC チャートである。化学合成した VYLPR の保持時間(25分)と一致するピークについて、質量分析計で分析したところ、 $m/z = 324.1861$ に 2 価イオンピークが認められ、VYLPR 標準品 MS のスペクトル($m/z = 324.1990$)および理論値($m/z = 324.1974$)と良く一致した。さらに、プロテインシークエンサーにより、アミノ酸配列を調べ、VYLPR であることを確認した。なお、HPLC チャートにおけるピーク面積から VYLPR の派生効率を計算したところ、37°C×5時間のインキュベートにより、モル換算で44%の VYLPR が派生することが明らかとなった。なお、トリプシン処理前にオボアルブミン溶液を加熱しなかった場合には、ペプチドの派生効率が著しく低下することから、VYLPR の効率的生成には加熱処理が必要であることが明らかとなった。

5. 卵黄の抗不安作用

鶏卵のもうひとつの主要成分である卵黄についても、抗不安作用が認められるかを検討した。生理的食塩水に30%卵黄を添加、攪拌混合したもの(卵黄として3g/kg)をマウスに腹腔内投与し、高架式十字迷路試験により情動調節に及ぼす影響を予備的に検討した。その結果、卵黄投与群のオープンアームでの滞在時間と進入回数の割合が上昇する傾向が認められた(図6)。今後、例数を追加するとともに、卵黄中の機能分子を特定する予定である。

■ 考 察

オボアルブミン由来の低分子ペプチドの抗不安作用を、高架式十字迷路試験により検討したところ、VYLPR が抗不安作用を示すことを見出した。VYLPR は経口投与でも抗不安作用を示すことがわかった。0.3～1mg/kg という非常に低い用量で有効であったことから、本ペプチドは、従来の抗不安薬に匹敵する強力な抗不安作用を有するといえる。さらに、VYLPR の抗不安機構について検討したところ、そのメディエーターとして PG 類が関与していることが明らかとなった。現在、関与する PG 分子種を検討している。また、卵白アルブミンのトリプシン消化により VYLPR が派生することがわ

かった。したがって、生理的条件の消化管内で VYLPR が派生し、本ペプチドが鶏卵のおいしさや卵製品摂取後の心地よさに、潜在的に寄与している可能性も否定できない。なお、卵黄も抗不安作用を示すことから、鶏卵は抗不安作用を示す優れた食品と考えられる。

■ 要 約

これまで我々は、種々の食品タンパク質の酵素消化により派生する生理活性ペプチドのなかには、摂食調節作用、学習促進作用、および精神的ストレス緩和作用(抗不安作用)など、多彩な神経調節作用を示すものが存在することを明らかにしてきた。本研究では、主要な卵白タンパク質であるオボアルブミンに由来する低分子ペプチドに着目し、それらの抗不安作用を高架式十字迷路を用いて行動薬理的に検討した。その結果、Val-Tyr-Leu-Pro-Arg(VYLPR)が 0.3mg/kg, i.p. という医薬品に匹敵する低用量で抗不安作用を示すことを見出した。本ペプチドは経口投与でも有効であった。本ペプチドの抗不安作用は、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤の indomethacin によりブロックされることから、本作用にプロスタグランジン(PG)類の合成が関与していると考えられる。また、卵白アルブミンのトリプシン消化物により VYLPR が派生することがわかった。

■ 文 献

1. 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.
2. Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities. Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71(10):2618-21.
3. Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating δ_1 and dopamine D₁ receptors. Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, Yoshikawa M. Peptides. 2007;28(10):1998-2003.
4. Rubimetide (Met-Arg-Trp) derived from Rubisco exhibits anxiolytic-like activity via the DP₁ receptor in male ddY mice. Zhao H, Ohinata K, Yoshikawa M. Peptides. 2008;29(4):629-32.
5. Central prostaglandin D₂ exhibits anxiolytic-like activity via the DP₁ receptor in mice. Zhao H, Ohinata K, Yoshikawa M. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2009;88(3-4):68-72.

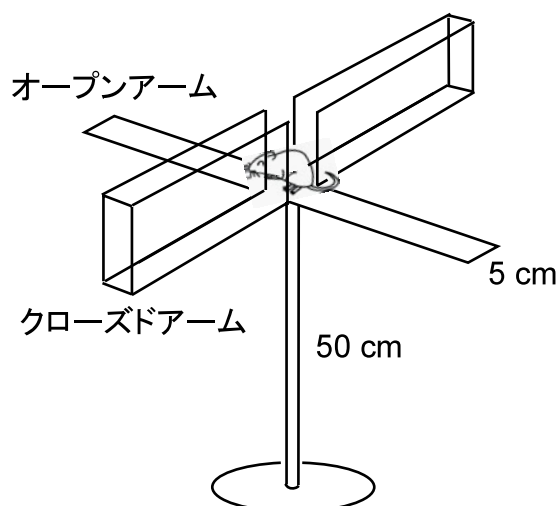


図 1. 高架式十字迷路
(elevated plus-maze)

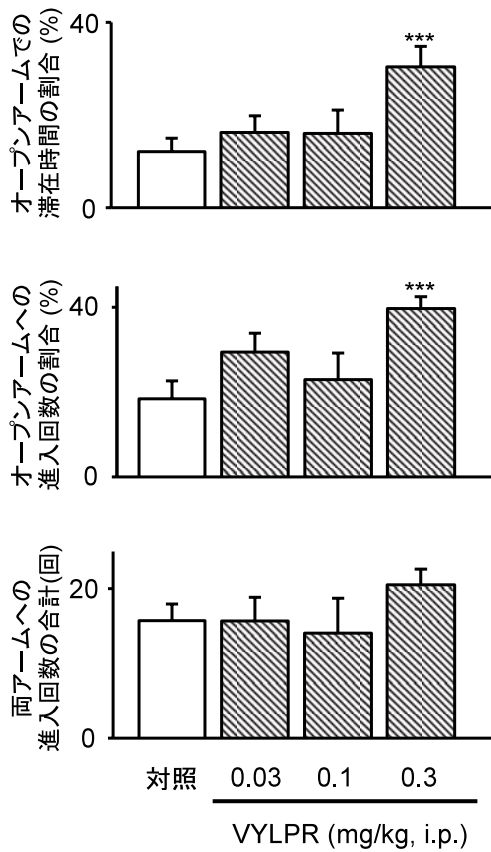


図2 VYLPRの腹腔内投与による抗不安作用
mean ± SEM (n=5-10), ***p<0.001 vs control

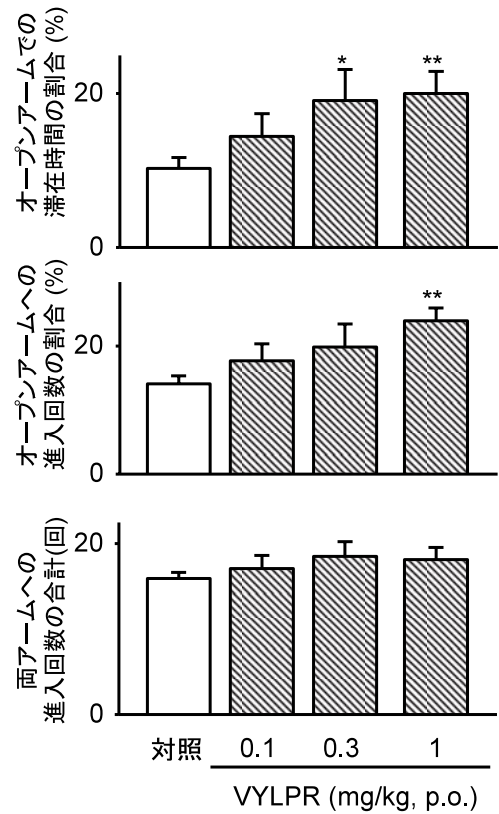


図3 VYLPRの経口投与による抗不安作用
mean ± SEM (n=11-20), *p<0.05, **p<0.01 vs control

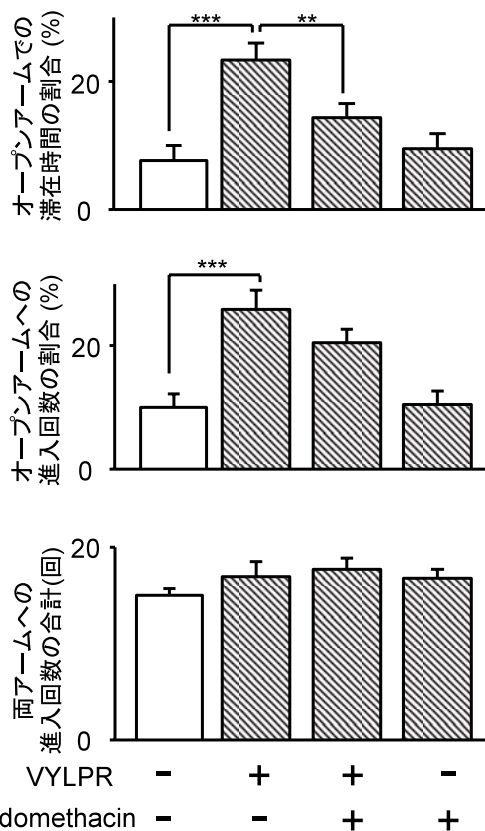


図4 VYLPRの抗不安作用に及ぼすCOX阻害剤の影響
mean ± SEM (n=12-15), **p<0.01, ***p<0.001

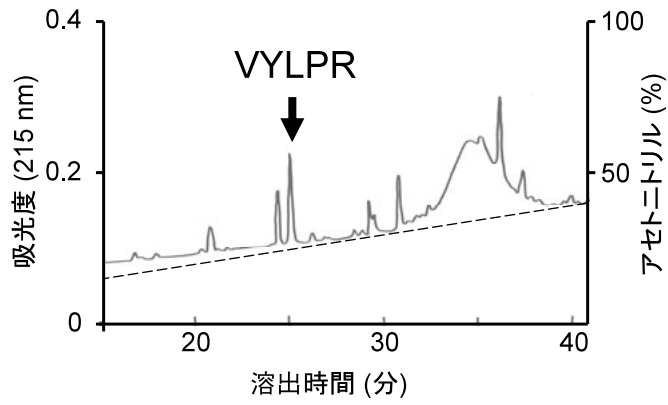


図5 卵白アルブミントリプシン消化物からのVYLPRの精製

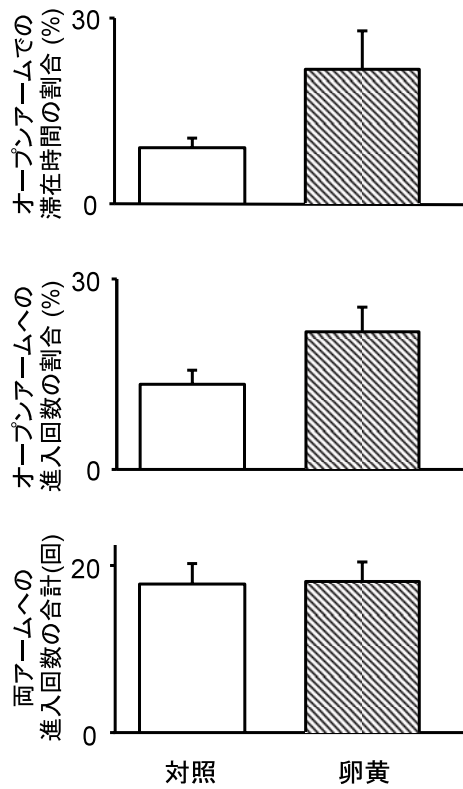


図6 卵黄の腹腔内投与による情動調節に及ぼす影響
mean ± SEM (n=5)