

# 卵由来の新しい精神的ストレス緩和物質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・准教授 大日向 耕作／修士 小田 亜矢子

## ■ 緒 言

最近、我々は食品タンパク質の酵素消化により派生する低分子ペプチドが精神的ストレス緩和作用(抗不安作用)を示し、かつ、経口投与で有効な場合があることを見出している<sup>1)</sup>。鶏卵は栄養価や加工特性に優れ広く食品素材として利用されており、卵製品の多くは高い嗜好性を示すものが多いが、卵成分の情動調節の詳細は不明であった。これまでに鶏卵タンパク質由来の低分子ペプチドの情動調節作用に着目し行動薬理的検討を行ったところ、主要な卵白タンパク質のオボアルブミンに由来する低分子ペプチド Val-Tyr-Leu-Pro-Arg (VYLPR)が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<sup>2,3)</sup>。さらに本研究では、この卵由来ペプチドの抗不安機構を解析するとともに、本ペプチドを高含有するオボアルブミンの酵素消化物が抗不安作用を示すか否かを検討した。

## ■ 方 法

### 1. 試薬

VYLPR 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. 高架式十字迷路試験

実験動物として ddY 系雄性マウス(24～26g)を使用した。抗不安薬のスクリーニング系として一般的な高架式十字迷路を用いて、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を評価した<sup>2,8)</sup>。本装置は、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、腹腔内あるいは経口投与し、投与 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。

### 3. 卵白アルブミン酵素消化物の作成

卵白アルブミン水溶液(20 mg/ml, SIGMA 社製)を予め加熱処理(10 分間ボイル)し、冷却した後に、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。得られた酵素消化物を凍結乾燥し、抗不安実験に使用した。

## ■ 結 果

これまでに VYLPR(0.3 mg/kg, i.p.)の抗不安作用はシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤の indomethacin(10 mg/kg, i.p.)によって阻害されることを明らかにしており<sup>2,3)</sup>、VYLPR の抗不安作用にはプロスタグランジン(PG)類が関与していると考えられる。さらに今回、PGD<sub>2</sub> に対する受容体サブタイプのひとつである DP<sub>1</sub> 受容体のアンタゴニスト BWA868C(60 μg/kg, i.p.)により、VYLPR(0.3 mg/kg, i.p.)の抗不安作用が阻害されることが判明した(図 1)。最近、PGD<sub>2</sub> が DP<sub>1</sub> 受容体を介して抗不安作用を示すことを見出した<sup>8)</sup>。さらに、PGD<sub>2</sub> による抗不安作用は、アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体アンタゴニスト(SCH58261)および GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニスト(bicuculline)により阻害され、DP<sub>1</sub> 受容体の下流で、A<sub>2A</sub> 受容体と GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化されることが明らかとなった<sup>8)</sup>。そこで、PGD<sub>2</sub>-DP<sub>1</sub> 受容体を活性化する VYLPR が PGD<sub>2</sub> と同様のメディエーターを介しているか否かを検討した。その結果、VYLPR の抗不安作用もアデノシン A<sub>2A</sub> および GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストにより阻害され(図 2)、PGD<sub>2</sub> の抗不安作用のメディエーターと一致することが判明した。なお、VYLPR は DP<sub>1</sub> 受容体には親和性を示さなかった。したがって、VYLPR は PGD<sub>2</sub> 遊離を促進し、DP<sub>1</sub> 受容体→アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体→GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化を介して抗不安作用を示すものと考えられる(図 3)。

次に、VYLPR を高含有する酵素消化物の情動調節作用を検討した。まず、オボアルブミン水溶液を

加熱処理(ボイル 10 分間)した後に、トリプシンを添加し(E:S=1:100)、37°Cで5時間インキュベートすると 44mol%の VYLPR が生成することがわかった。なお、予め加熱処理を行わずにトリプシン処理した場合には、VYLPR は検出できなかった。

トリプシン消化物(47 mg/kg)をマウスに腹腔内投与したところ、オープンアームでの滞在時間の割合が有意に増加することを見出し(図 4 A)、オボアルブミンのトリプシン消化物も抗不安作用を示すことが明らかとなった。消化物 47 mg/kg は VYLPR 0.3 mg/kg(最小有効量)に相当することから、主に本ペプチドが消化物の抗不安作用に寄与していると考えられるが、VYLPR の他にも抗不安ペプチドが派生している可能性も否定できない。さらに、このトリプシン消化物(100 mg/kg)は経口投与でも効果を示すことが明らかとなった(図 4 B)。

## ■ 考 察

主要な卵白タンパク質であるオボアルブミンのトリプシン消化により派生する経口投与で強力な抗不安作用を示す VYLPR の作用機構を検討した。その結果、VYLPR は COX が活性化された後に、PGD<sub>2</sub> 遊離が促進され、DP<sub>1</sub> 受容体→アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体→GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化により抗不安作用を示すものと考えられる(図 3)。なお、PGD<sub>2</sub> を介して抗不安作用を示す食品由来の低分子ペプチドとして、主要な緑葉タンパク質 Rubisco 由来の rubimetide やヒトラクトフェリン由来の lactomedin 1 が挙げられるが、これらの抗不安作用はアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体および GABA<sub>A</sub> 受容体のアンタゴニストで阻害され<sup>1)</sup>、VYLPR と共通のメディエーターを介することがわかった。

また、*in vitro* ではオボアルブミンのトリプシン消化により VYLPR が容易に生成することから(44 mol%)、生理的条件でも腸管内で VYLPR が派生し、抗不安作用を示す可能性がある。今回、オボアルブミンのトリプシン消化物が抗不安作用を示すこと、さらに、経口投与でも有効であることを明らかにした。したがって、潜在的なオボアルブミンの機能性をトリプシン消化という食品加工により高めることができたと考えられる。

構造 - 活性相関を検討したところ、VYLPR の抗不安作用には C-末端構造が重要であり、C-末端 Arg を除去すると抗不安活性が消失することが判明した(data not shown)。C-末端の Arg が活性に重要な役割を果たすポリペプチドとして補体 C3a と C5a が挙げられる。補体系とは生体異物の侵入の際に活性化される一群のタンパク質で C1 から C9 まで存在する。このなかの C5 から酵素分解により生成する補体 C5a は 74 アミノ酸残基の免疫促進ポリペプチドとして知られている。最近、我々は補体 C5a の中枢投与により抗不安作用を示し、PGD<sub>2</sub> をメディエーターとしていることを新たに見出した。また、ヒトラクトフェリン由来の lactomedin 1 はモルモット回腸収縮活性を指標に単離された補体 C5a アゴニストペプチドであるが、同様に PGD<sub>2</sub> を介して抗不安作用を示す。VYLPR の C-末端 Arg を除去すると抗不安活性が消失し、かつ PGD<sub>2</sub> をメディエーターとすることから、VYLPR が補体 C5a アゴニストとして抗不安作用を示す可能性も考えられた。しかしながら、lactomedin 1 とは異なり VYLPR はモルモット回腸収縮活性を示さないことが判明し、少なくとも補体 C5a 受容体アゴニストではないことが明らかとなった。

## ■ 要 約

オボアルブミンのトリプシン消化によって派生する 5 残基の抗不安ペプチド Val-Tyr-Leu-Pro-Arg (VYLPR) の作用機構を検討した。その結果、VYLPR の抗不安作用は PGD<sub>2</sub> 受容体(DP<sub>1</sub> 受容体)アンタゴニストで阻害され、PGD<sub>2</sub> 遊離を介していることが明らかとなった。最近、我々は PGD<sub>2</sub> の中枢投与により、アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体と 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を見出した。そこで VYLPR が同様の神経経路を介して抗不安作用を示すかを検討したところ、VYLPR の抗不安作用は A<sub>2A</sub> および GABA<sub>A</sub> 受容体に対するアンタゴニストにより阻害されることを見出し、VYLPR は PGD<sub>2</sub> の下流でアデノシン-A<sub>2A</sub> および GABA-GABA<sub>A</sub> 受容体系を活性化していることが判明した。さらに、オボアルブミンのトリプシン消化物が抗不安作用を示すことを見出した。

## ■ 文 献

1. 大日向耕作, 吉川正明: 化学と生物, Vol.48, No.11, p764-771, 2010
2. Ohinata K, Kanegawa N, Oda A. Novel orally active peptides with anxiolytic-like activity "Peptide Science 2010", The Japanese Peptide Society (in press).
3. 大日向耕作, 小田亜矢子: 旗影会研究助成 21 年度報告, p78-82
4. 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.
5. Soymorphins, novel  $\mu$  opioid peptides derived from soy  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit, have anxiolytic activities. Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71(10):2618-21.
  6. Rubiscolin-6, a  $\delta$  opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating  $\sigma_1$  and dopamine D<sub>1</sub> receptors. Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, Yoshikawa M. Peptides. 2007;28(10):1998-2003.
  7. Rubimetide (Met-Arg-Trp) derived from Rubisco exhibits anxiolytic-like activity via the DP<sub>1</sub> receptor in male ddY mice. Zhao H, Ohinata K, Yoshikawa M. Peptides. 2008;29(4):629-32.
  8. Central prostaglandin D<sub>2</sub> exhibits anxiolytic-like activity via the DP<sub>1</sub> receptor in mice. Zhao H, Ohinata K, Yoshikawa M. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2009;88(3-4):68-72.

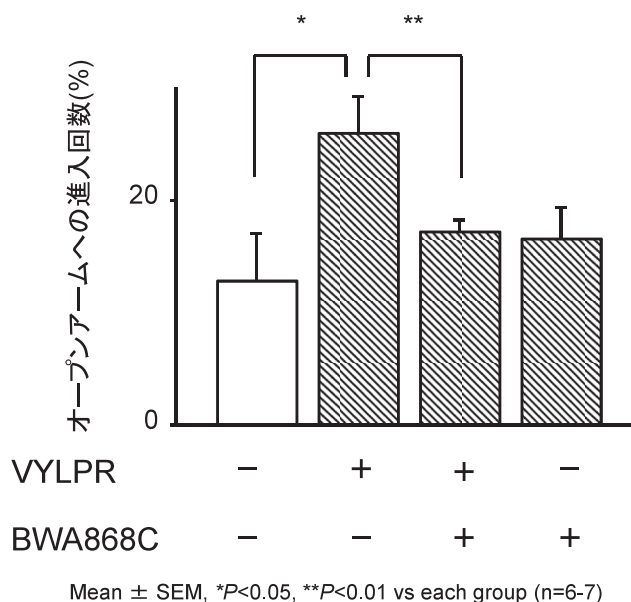


図1. VYLPRの抗不安作用に及ぼすプロスタグランジン D<sub>2</sub> 受容体 (DP<sub>1</sub>) アンタゴニストの影響

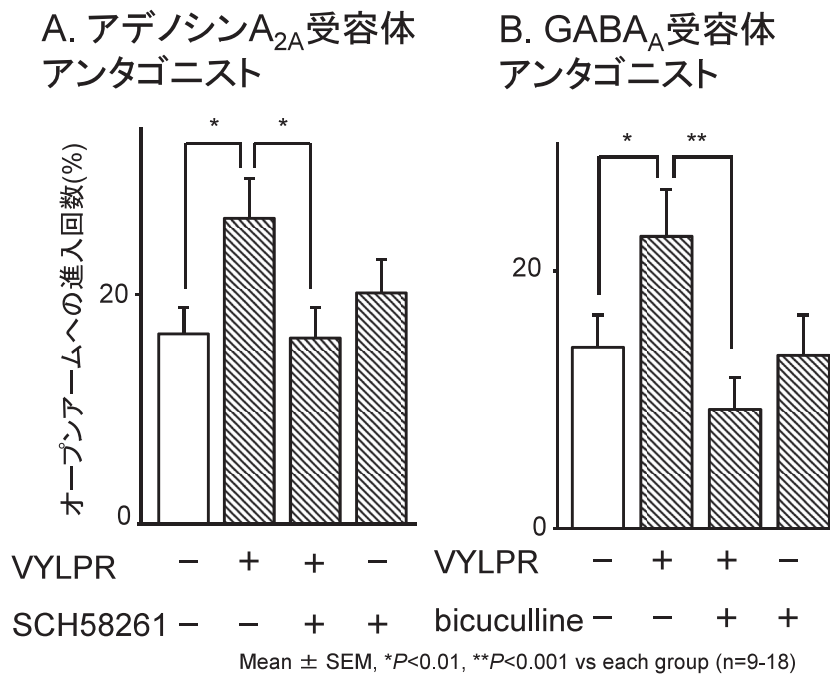


図2. VYLPRの抗不安作用に及ぼすアデノシン $A_{2A}$ 受容体およびGABA $_A$ 受容体アンタゴニストの影響

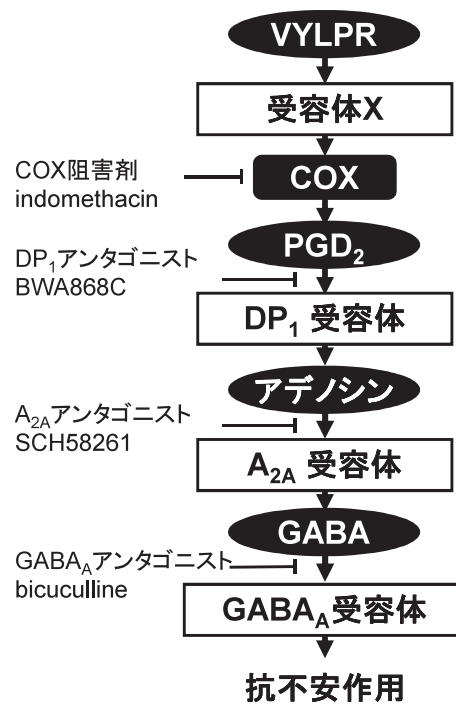
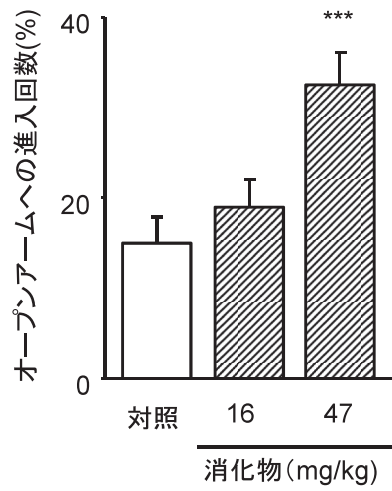
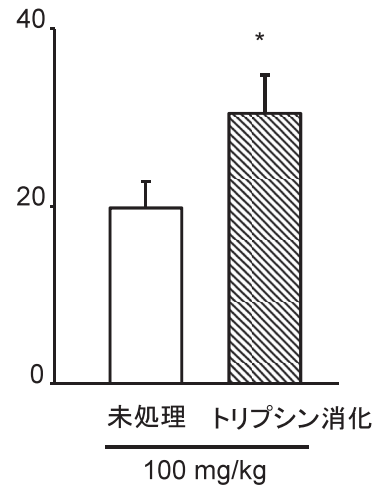


図3. VYLPRの抗不安機構

### A. 腹腔内投与



### B. 経口投与



Mean  $\pm$  SEM, \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 vs control group (n=10-12)

図4. オボアルブミンのトリプシン消化物による抗不安作用