

## 食欲抑制作用と血圧降下作用を併せ持つ 鶏卵由来ペプチドの作用機構

京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット・特定助教 水重 貴文

\*\*\*\*\*

### ■ 緒言

最近、我々は卵白の主要なタンパク質であるオボアルブミンの一次構造に相当するモデルペプチドを使用した消化実験で、4 アミノ酸残基の強力な動脈弛緩ペプチド Val-Val-Arg-Phe (VVRF) が生成することを明らかにした。VVRF を化学合成し生理作用を検討したところ、経口投与で血圧降下作用と摂食抑制作用を示すことを初めて見出した。さらに本研究では、実際にオボアルブミンを消化管酵素で分解した際に、VVRF が生成するか否か、さらに、事前の加熱処理により生成率が高まるか否かを検討した。また、得られたオボアルブミン消化物を高血圧自然発症ラット (SHR) に経口投与した際に、血圧降下作用を示すかを検討した。摂食調節に関連し本ペプチドの腸内分泌細胞の活性化能について検討した。

### ■ 方法

#### 1. 消化管プロテアーゼによるオボアルブミン消化物の作製

オボアルブミン水溶液 (10mg/mL) を調整し、E:S=1:100 となるように消化管プロテアーゼを加えた (図 1A)。なお、酵素の至適 pH を考慮し、ペプシンでは pH2、トリプシンおよびキモトリプシンの場合は、pH7.5 に調整した。また、消化前の加熱による影響を検討するため 10 分間ボイル後に同様に消化し分析を行った。

#### 2. 動脈弛緩活性 [1,2]

高血圧自然発症ラット (SHR) の腸間膜動脈を摘出し螺旋状に切開し、この血管標本を栄養液中に懸垂し、その張力変化をトランスデューサーで検出した。

#### 3. 血圧降下作用 [1,2]

無麻酔状態の SHR の血圧を tail-cuff 法 (MK-2000、室町機械) により測定した。数週間、Tail-cuff 装置でトレーニングをした動物を使用する。ペプチドサンプルを経口投与し、経時的に血圧を測定した。

#### 4. 腸内分泌細胞の応答性 [1,2]

STC-1 細胞を DMEM (10% FBS) にて培養したものを 96 穴プレートに播種し (33,000 cells/well)、一晚培養した。細胞内カルシウムの測定には Calcium Kit II-Fluo 4 (同仁化学) を使用した。カルシウム蛍光指示薬 Fluo-4AM の入った Loading Buffer を細胞培養上清に添加し、さらに 1 時間インキュベートした後に、ペプチド等のサンプルを加え、蛍光強度変化を蛍光プレートリーダーで測定した ( $\lambda_{ex}=480-500\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=518\text{nm}$ )。

### ■ 結果

#### 1. オボアルブミンの消化管酵素処理により強力な動脈弛緩ペプチド VVRF が生成する

オボアルブミンを消化管酵素で分解し、得られた消化物に含まれる強力な動脈弛緩ペプチドを UPLC-QTOF-MS で定量した。その結果、ペプシン、次に、トリプシンで分解した消化物中に 17mol% の VVRF が生成することがわかった。モデルペプチドを用いた検討では、非常に効率的に VVRF が生成することが判明しているため、オボアルブミンの高次構造が影響している可能性が考えられた。そこで、オボアルブミン水溶液を加熱処理した後に、同様の消化実験を行った。この事前加熱により、VVRF の生成率がおよそ 3 倍に上昇した (図 1B)。加熱処理によるオボアルブミンの高次構造変化により消化管プロテアーゼが作用しやすくなったと考えられる。

#### 2. オボアルブミン消化物は動脈弛緩作用を示す。

VVRF を高含有するオボアルブミン消化物が実際に動脈弛緩作用を示すか否かを検討したところ、VVRF と同様に動脈弛緩作用を示すことがわかった (図 2A)。消化物の分析結果より、オボアルブミン

消化物 100 $\mu$ g/ml 中には VVRF が約 10<sup>-6</sup>M の VVRF が含まれるが、この消化物と VVRF の動脈弛緩作用は、ほぼ同等であることから、消化物中に含まれている VVRF が主に消化物の動脈弛緩作用に寄与しているものと考えられる。

### 3. オボアルブミン消化物は持続的な血圧降下作用を示す。

オボアルブミン消化物を SHR に経口投与し、血圧に及ぼす影響を検討した。投与後 4 時間目から有意な血圧降下作用が認められ、7 時間目には 20mmHg 以上の血圧降下作用を示した(図 2B)。VVRF も経口投与により血圧降下作用を示すが、同様に、投与 7 時間後まで持続的な血圧降下作用を示すことが判明している。したがって、オボアルブミン消化物と VVRF のいずれを経口投与した場合においても、同様の血圧降下パターンを示すことが明らかとなった。

### 4. オボアルブミン由来 VVRF は腸内分泌細胞 STC-1 を活性化させる

STC-1 細胞は、マウス腸由来の株化細胞であり食後の飽食因子として知られるコレシストキニン (CCK) を分泌することが知られている。経口投与で摂食抑制作用を示すペプチドの中には、STC-1 活性化能を示すペプチドが存在することから、VVRF の STC-1 活性化能をカルシウム応答で検討した。その結果、VVRF 添加により、STC-1 の細胞内カルシウム濃度が上昇し、腸内分泌細胞を活性化することが明らかとなった(図 3)

## ■ 考 察

今回、卵白アルブミンを消化管プロテアーゼで分解したところ、強力な動脈弛緩ペプチドが生成することがわかった。ペプシン、次に、トリプシンで消化した場合に、生成する。食品摂取により胃、十二指腸、空腸、回腸と消化が進行することが知られているが、胃由来のペプシン、次に、膵臓由来のトリプシンやキモトリプシンが作用する。トリプシンは膵臓由来プロテアーゼのうち、主要で最も重要な酵素である。したがって、ペプシン、続いてトリプシンという酵素処理は生理的条件に近いと考えられ、実際に消化管内で VVRF が生成している可能性がある。

さらに、加熱処理により VVRF の生成率が顕著に増加することが明らかとなった。食品加工において様々な加熱処理が行われるが、微生物コントロールに加え、機能性を引き出すことができるのは興味深い。

また今回、VVRF を高含有するオボアルブミン消化物が動脈弛緩作用と血圧降下作用を示すことを明らかにした。VVRF と同様に持続的な血圧降下作用を有する。消化管から VVRF が一部吸収され動脈弛緩を介して血圧降下作用を示す可能性、あるいは VVRF が消化管に対して直接作用し内分泌系や神経系を介して作用する可能性も考えられる。実際、VVRF は腸内分泌細胞を活性化することを新たに見出した。腸管吸収を介さない血圧降下経路がペプチドの作用にどの程度寄与しているのかは今後の検討課題である。

メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満に起因するマルチリスクファクター症候群であり、高血圧、高血糖、高脂血症のうち 2 つを併発している状態をいう。我が国でも問題となっている。卵白由来の VVRF は血圧降下作用と摂食抑制作用を併せ持つことからメタボリックシンドロームの予防に有効と考えられる。特に、食欲抑制作用は、メタボリックシンドローム発症の原因である肥満リスクを低減できる。

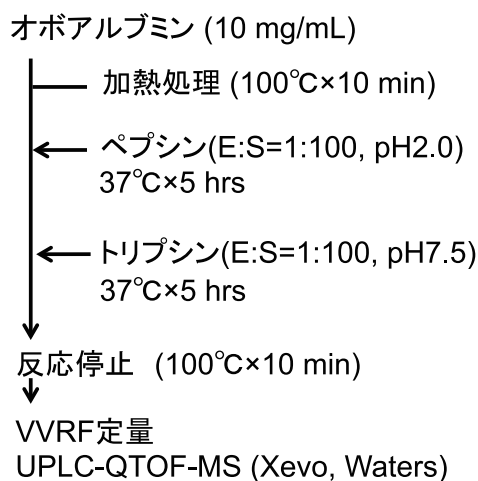
## ■ 要 約

主要な卵白タンパク質であるオボアルブミンを消化管酵素で分解した際に、強力な動脈弛緩ペプチド VVRF が生成することを見出した。さらに、VVRF を高含有するオボアルブミン消化物が動脈弛緩作用を示すことを明らかにした。また、本消化物を高血圧自然発症ラットに経口投与したところ持続的な血圧降下作用が示すことがわかった。さらに、VVRF はコレシストキニン (CCK) 分泌能を有する腸内分泌細胞 STC-1 を活性化することを明らかにした。本結果は、VVRF の経口投与により摂食抑制作用を示す昨年の報告と一致している。

## ■ 文 献

1. Novel CCK-dependent vasorelaxing dipeptide, Arg-Phe, decreases blood pressure and food intake in rodents. Kagebayashi T, Kontani N, Yamada Y, Mizushige T, Arai T, Kino K, Ohinata K. Mol Nutr Food Res. 2012 Sep;56(9):1456-63.
2. Characterization of Ile-His-Arg-Phe, a novel rice-derived vasorelaxing peptide with hypotensive and anorexigenic activities. Kontani N, Omae R, Kagebayashi T, Kaneko K, Yamada Y, Mizushige T, Kanamoto R, Ohinata K. Mol Nutr Food Res. 2014 Feb;58(2):359-64.
3. Short-term effect of eggs on satiety in overweight and obese subjects. Vander Wal JS, Marth JM, Khosla P, Jen KL, Dhurandhar NV. J Am Coll Nutr. 2005 Dec;24(6):510-5.

### A. 酵素消化法



### B. VVRF生成率

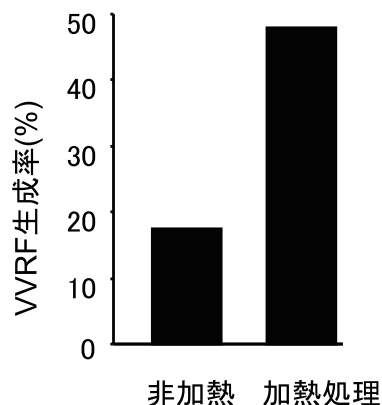


図1. 消化管プロテアーゼによるオボアルブミン由来の新しい動脈弛緩ペプチド VVRF の生成。  
A. オボアルブミンの消化方法。B. VVRF 生成率。

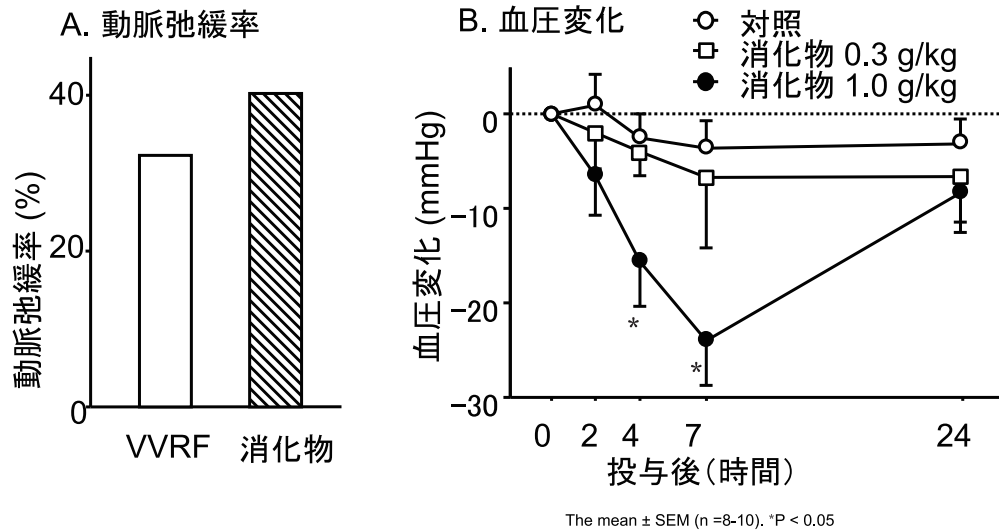


図2. オボアルブミン消化物の動脈弛緩反応(A)と血圧降下作用(B). AVVRF ( $10^{-6}$ M) およびオボアルブミン(OVA)消化物 ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) の動脈弛緩率。オボアルブミン消化物  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  中に VVRF は  $0.9 \times 10^{-6}$ M 含まれる。

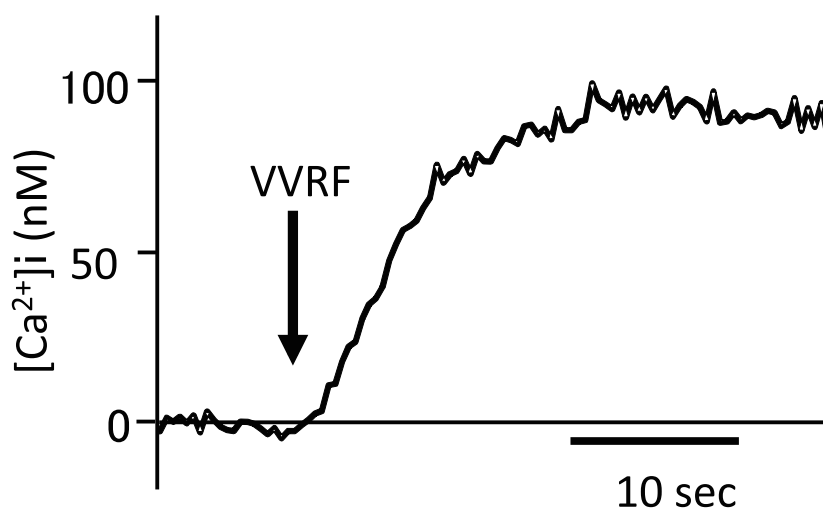


図3. VVRF の腸内分泌細胞 STC-1 活性化能。VVRF 添加による細胞内カルシウム濃度が上昇する。