

# 卵白由来ペプチドによる睡眠の質改善作用に関する研究

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻（現 明治大学農学部農芸化学科栄養生化学研究室・専任講師） 金子 賢太郎

## ■ 緒言

近年、食品成分が栄養素としての機能に留まらず、多彩な生体調節機能 / 健康機能を示すことが判明してきた<sup>1,2)</sup>。その中でも食と脳機能のクロストークの実態解明が重要課題の一つである理由として、加齢に伴う食欲不振に起因する低栄養状態がフレイル発症の中核を成すからである。特別な疾患がなくても加齢に伴う生理的食欲不振の存在が知られているが、食欲低下は低栄養を誘導し、低栄養は体重・代謝・筋肉量の低下を誘発、身体機能の低下は意欲や活動量の低下、認知障害や抑うつ、睡眠障害を引き起こし、更なる食欲低下を誘導するフレイルサイクルとなる。しかし、従来の機能性食品研究は末梢での生理機能が評価されることが大半を占め、脳機能(食欲、代謝、学習、意欲制御、睡眠)をターゲットとする研究はほとんど例を見ない。我が国においては約20%の人が「睡眠で休養が取れていない」もしくは「何らかの不眠がある」とされ(令和元年度国民健康・栄養調査(厚生労働省調べ))、また加齢とともに不眠は増加し60歳以上の人では約30%の人が睡眠問題で悩んでいることが知られていることから、食による睡眠の質改善は、勤労世代のみならず高齢者における睡眠問題を改善し、働く意欲(活力)やQOLの向上に貢献できることが期待される。

我々はこれまでに、外因性の食由来機能性ペプチドの中には脳機能を制御できる場合があることを数多く明らかにし、そのメカニズムの一端には脳の睡眠誘発物質プロスタグランジン(PG)D2系の活性化を介するものが存在する<sup>2,3)</sup>。我々は最近、卵白アルブミンのトリプシン消化により生成し、精神的ストレス緩和作用を示す機能性ペプチドVYLPRを報告しているが<sup>3)</sup>、本研究では、VYLPRによる精神的ストレス緩和作用を示すメカニズムがPGD2系の活性化を介することに着目し、卵白アルブミン酵素消化物および卵白由来ペプチドVYLPRによる睡眠の質への影響を解析することを目的とした。

## ■ 方法

### サンプル

卵白タンパク質の主要成分オボアルブミンのトリプシン消化物を作製した。また、オボアルブミンのトリプシン消化物由来の機能性ペプチドVYLPR(Val-Tyr-Leu-Pro-Arg)はF-moc法により合成し、HPLCによる精製後に使用した。

### 実験動物

雄性C57BL/6マウス(8週齢)を12時間明暗サイクルに設定され23度に温度管理された飼育保管施設にて1週間程度の予備飼育を行った後、サンプルを経口 / 腹腔内 / 飲水投与し各種行動試験を実施した。飼育飼料はMF(オリエンタル酵母工業)を用い、水は自由摂水させた。

### 行動量測定

行動量測定には、高架式十字迷路またはオープンフィールドを用い、SMART3.0によるマウスの重心点を認識したトラッキングシステムにより総移動距離やゾーン侵入、滞在時間、移動速度などを測定した。試験は明期に実施した。

### 睡眠測定

睡眠測定には、無侵襲睡眠・覚醒計測システムPiezo Sleepを用い、さらに行動量解析システムActimoを用いて解析を行った。Piezo Sleepを用いた睡眠測定は東京都健康長寿医療センター研究所の重本和宏副所長との共同研究で実施した。本装置は従来の睡眠測定において必要であった電極などの各種センサー類のマウスへの留置が不用で、無侵襲かつ連続的に睡眠覚醒サイクルのモニタリングが可能な実験系である。雄性C57BL/6マウスを予備飼育した後、専用ケージにて卵白アルブミン酵素消化物の経口投与またはVYLPRの腹腔内投与を単回または複数回行うことで、1日の睡眠割合、暗期の睡眠割合、明期の睡眠割合、1日における平均の睡眠時間(bout)の長さ、暗期の平均睡眠bout長、明期の平均睡眠bout長等に及ぼす効果を解析し、睡眠の質への影響を評価した。

### 統計解析

統計解析には、Graph Pad Prism9を用い、値は平均値±標準誤差で示した。

## ■ 結果

### 卵白由来ペプチドによりマウスの行動量が低下する

卵白アルブミンの酵素消化により派生するペプチド VYLPR の経口投与による精神的ストレス緩和作用は、脳の睡眠誘発物質 PGD2 系の活性化を介する<sup>2)</sup>。そこで VYLPR による行動量の抑制効果の存在を想定し、マウスに VYLPR を 1 日間もしくは 3 日間の飲水投与を実施した結果、VYLPR(30mg/kg/day)により明期における行動量の減少や休息時間の増加といった睡眠への影響を示唆する表現型を示すことを明らかにした(図 1)。

### 卵白アルブミン消化物および卵白由来ペプチドの睡眠の質へ及ぼす影響

我々は次に、卵白タンパク質摂取および卵白由来ペプチド VYLPR が睡眠に及ぼす影響を解析する目的で、卵白アルブミンのキモトリプシン消化物ならびに派生ペプチド VYLPR をマウスに投与し、Piezo Sleep による睡眠測定を実施した。卵白アルブミン酵素消化物を経口投与(100mg/kg)することによる睡眠時間の割合の変化を図 2 に示す。睡眠時間の割合と活動量が逆相関を示し、本系が正しく作動していることが示されている。Piezo Sleep 測定の特徴の一つである“まとまった睡眠時間の割合”を専用ソフトウェア Sleep Stats にて解析を実施すると、消化物経口投与群では生理食塩水投与のコントロール群と比較して、短い睡眠時間の割合がコントロールと比較して低い値を示すこと、まとまった睡眠時間割合(Sleep bout: 1920sec)が高い値を示すことを明らかにした(図 3)。

そこで我々は、卵白アルブミンの酵素消化に由来する機能性ペプチド VYLPR の投与により、より明確な睡眠の質への表現型が得られるものと仮定した。VYLPR の雄性マウスへの腹腔内投与(30mg/kg)を実施した結果、腹腔内投与開始 1 日後には消化物と同様に、まとまった睡眠時間の割合(Sleep bout: 1920sec)が増加傾向(p=0.07)を示すことを見出した(図 4A)。さらに投与を継続し、投与 2 日後にはまとまった睡眠時間の割合(Sleep bout: 1920sec)が有意に増加することを明らかにした(図 4B)。いずれもトータル睡眠時間の変化を確認できなかったことから(図 4C)、まとまった睡眠時間の割合の増加は熟眠割合の向上を示しているものと考えられる。

## ■ 考察

本研究では、無侵襲睡眠・覚醒計測システム Piezo Sleep を用い、電極の埋込み手術を行わず無侵襲に「睡眠/覚醒」を自動分類することが可能な実験系を活用し、通常飼育環境下における卵白タンパク質摂取の睡眠への影響を解析した。卵白アルブミンの酵素消化物を若齢の雄性 C57BL/6 マウスに投与することにより、まとまった睡眠時間の割合の増加を確認した。さらに卵白アルブミン由来の機能性ペプチド VYLPR を投与することにより、まとまった睡眠時間の割合が有意に増加することを明らかにした。しかしながら、トータルでの睡眠時間の有意な変化を確認できなかったことから、まとまった睡眠時間の割合の増加は熟眠を誘発していることが示唆され、卵白タンパク質の摂取により睡眠の質が向上することが示唆された。今回、飲水投与ならびに Smart 3.0 を用いた行動解析によりマウスの行動量の減少を確認した後、Piezo Sleep 試験により睡眠へ及ぼす影響を明らかにすることができたことから、一連の実験系を駆使することで睡眠の質を向上する食品由来機能性成分のスクリーニングが可能となることが期待できる。また、卵白アルブミン由来ペプチド VYLPR はマウス個体への投与により精神的ストレス緩和作用を有するが、本研究により新たに、熟眠誘発効果を発揮することが示された。今回、卵白アルブミンの酵素消化にはパンクレアチンを使用した。消化管を想定した酵素条件(ペプシン、ペプシン+パンクレアチン)のみならず、食品添加物利用可能な微生物由来酵素(サーモリシン、サチライシン、スミチーム等)で処理し得られた消化物をマウスに経口投与し、睡眠の質への影響を解析することで卵白オボアルブミンの食品利用としての可能性が高まるものと考えている。また末梢投与した食品由来成分が脳の睡眠中枢に作用していること示されていることから、本課題の発展により、従来の研究では明らかとなっていなかった外因性の食シグナルと脳機能の相互関連機構の解明に繋がることを期待される。

## ■ 要約

超高齢化社会を迎えた我が国における今世紀最大の課題は、“老化疾患を制御して健康寿命を延伸すること”、“高齢者を含む働く意欲と能力のある者の労働力を維持すること”である。食品による睡眠の質の改善は健康寿命の延伸のみならず、医療費削減や新規健康食品産業の創出といった社会的要請に応えることができ、世界に与えるインパクトは大きい。本研究においては、卵白アルブミンの酵素消化物および酵素消化物由来の機能性ペプチドをマウス個体に投与することにより、まとまった睡眠時間の割合を増加させ熟眠を誘発させることを明らかにした。鶏卵は日常的に摂取している食品の一つ

であるが、本研究において膵液パンクレアチン消化により生成する機能性ペプチドが睡眠の質の向上に寄与していることが示唆され、外因性の食シグナルが脳の睡眠中枢に積極的に介入していることが考えられた。今後、睡眠の質を向上し栄養価の高い鶏卵加工食品が創製されることが期待される。

## ■ 文 献

1. Kaneko K.(2021)Appetite regulation by plant-derived bioactive peptides for promoting health. *Peptides*. 144, 170608.
2. Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y, Ohinata K.(2012)Orally administered rubiscolin-6, a delta opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice. *Mol. Nutr. Food Res*. 56, 1315-1323.
3. Oda A, Kaneko K, Mizushige T, Lazarus M, Urade Y, Ohinata K.(2012)Characterization of ovolin, an orally active tryptic peptide released from ovalbumin with anxiolytic-like activity. *J Neurochem*. 122(2), 356-62.

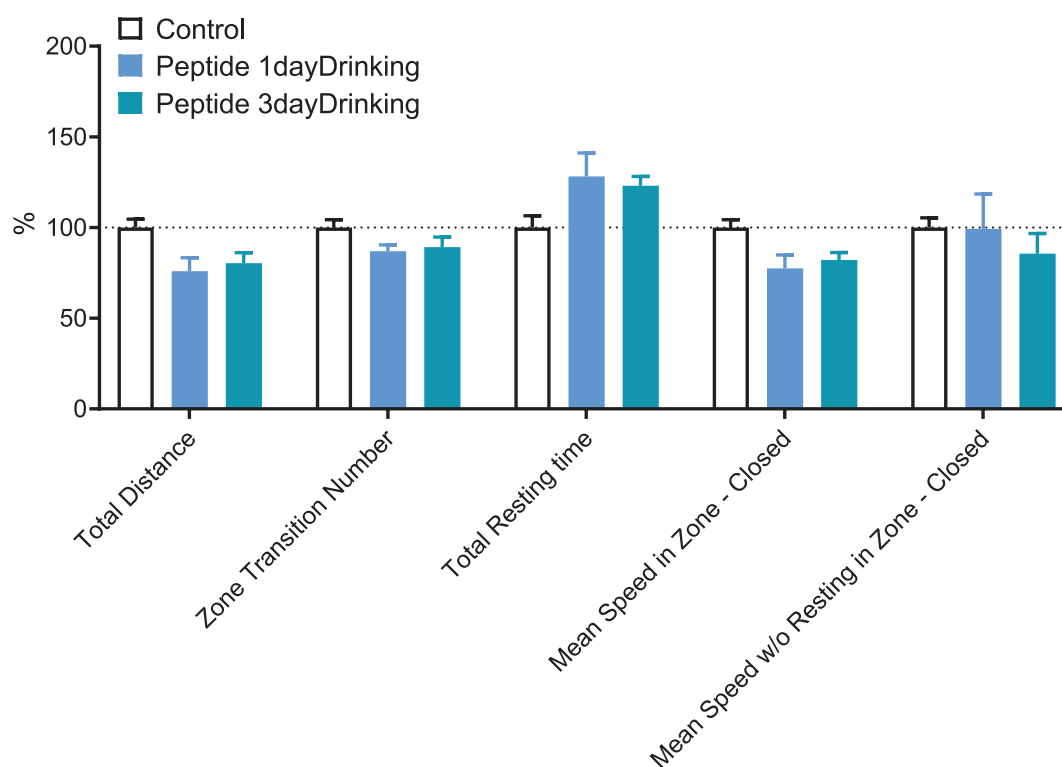


図 1. 卵白アルブミン由来ペプチドの飲水投与によりマウスの行動量が減少する  
 ペプチド(30mg/kg/day)または蒸留水をマウスに飲水投与を行い、高架式十字迷路を用いたマウスラッキング解析により、総移動距離、ゾーン侵入回数、休息时间、移動速度を解析した結果、ペプチドの飲水投与により行動量の減少と休息时间の増加を確認した。値は平均値±標準誤差(N=3-4)。

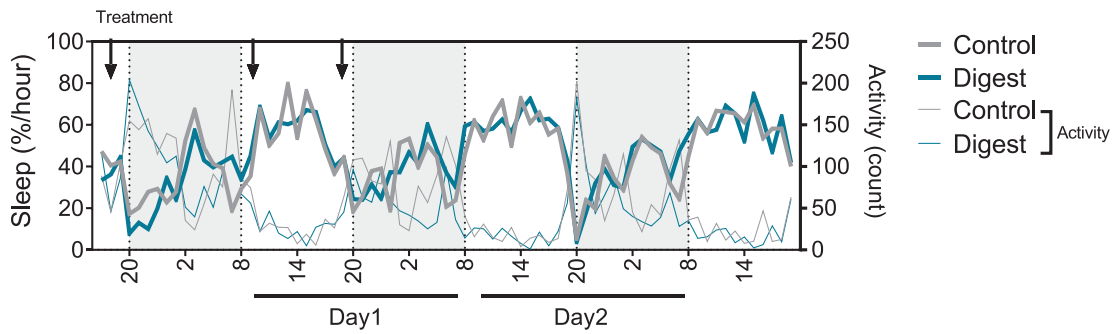


図2. 卵白アルブミン酵素消化物の経口投与による睡眠割合への影響  
 消化物(100mg/kg)または生理食塩水をマウスに経口投与し、Piezo Sleep を用いて睡眠覚醒(左Y軸)を解析し、Actimo を用いて行動量(右Y軸)を解析した。値は平均値(N=6)。

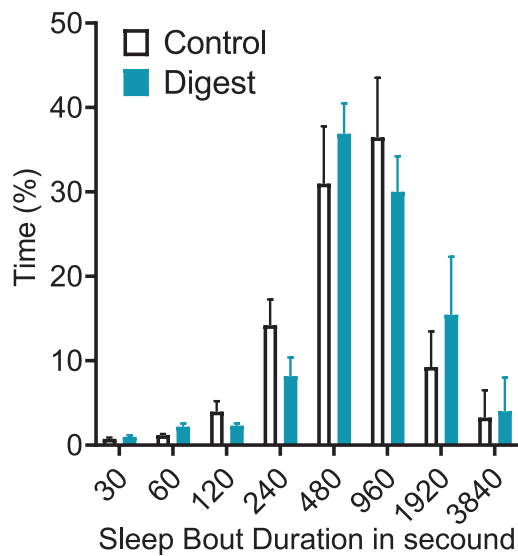


図3. 卵白アルブミン酵素消化物の経口投与によるまとまった睡眠時間への影響  
 消化物(100mg/kg)または生理食塩水をマウスに経口投与し Piezo Sleep を用いた睡眠覚醒解析(図2)において、Day1 における平均睡眠 bout 長を解析した。値は平均値±標準誤差(N=6)。

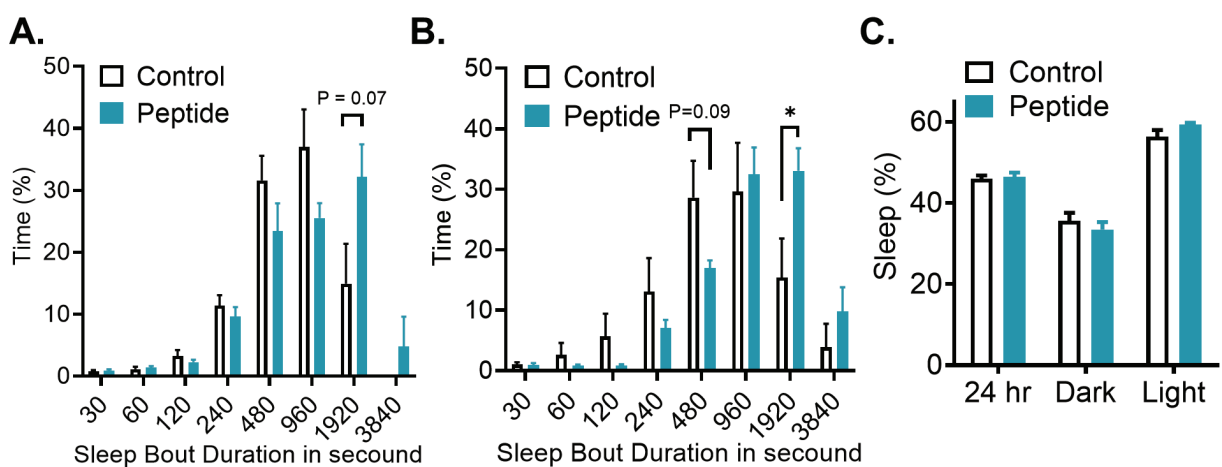


図 4. 卵白アルブミン酵素消化物由来ペプチドの腹腔内投与によるまとまった睡眠時間への影響  
 ペプチド(30mg/kg)または生理食塩水をマウスに腹腔内投与し Piezo Sleep を用いた睡眠覚醒解析を行った。A、投与開始 1 日後の平均睡眠 bout 長。B、投与開始 2 日後の平均睡眠 bout 長。C、投与開始 2 日後のトータル睡眠時間割合。値は平均値±標準誤差 (N=6)。  
 統計解析には GraphPad Prism 9 を用い two-tailed unpaired Student's t-test にて検定を行った。  
 \*P<0.05 vs.コントロール。