

新しい卵白由来の認知機能改善ペプチドの発見と作用機構解明

京都大学大学院農学研究科・准教授 大日向 耕作

■ 緒言

高齢化は世界的に進行しており、現在 5,500 万人の認知症患者が存在し、毎年新たに 1,000 万人近くが認知症を発症している (WHO2021)。中でも、我が国の高齢化率は、世界トップで 29.1% (内閣府 2021) であり、懸念される認知症を予防することは活力ある健康長寿社会の実現に不可欠と考えられる。疫学調査では、タンパク質摂取が認知機能低下リスクを低減することが報告され、また、卵摂取と認知機能に正の相関があるとの報告がある¹⁾。実際、我々が検討したところ、卵白の主要なタンパク質として知られるオボアルブミンを酵素消化して得られた消化物が、認知機能改善作用を示すことが明らかとなった²⁾。今回、この酵素消化物中に含まれる膨大なペプチド分子の中から認知機能改善ペプチドを新たに見出した。さらに、消化物中の含量が最も高い 5 残基ペプチドに着目し、その作用機構を検討した。

■ 方法

1. 候補ペプチドの化学合成

酵素の基質特異性に基づいて消化物中に含まれるペプチドフラグメントを予想し候補ペプチドを絞り込んだ。これらの、候補ペプチドを F-moc 法で化学合成し、逆相 HPLC で精製し、さらに、凍結乾燥して得られたサンプルを使用した。

2. マウスを用いた認知機能の評価^{3,4)}

実験動物として雄性 ddY マウスを用いた。認知機能は新奇物体認識試験 (ORT) と位置認識試験 (OLT) によって検討した (図 1)。高脂肪食摂取より認知機能低下を惹起したマウスに対して候補ペプチドを経口投与した後に、これらの行動試験を実施した。ORT では、新奇物体に対するアプローチ時間の割合が増加した際に、OLT では、新しい場所へ移動した物体に対するアプローチ時間の割合が、増加した際に、認知機能が高いと判定する。

3. 卵白ペプチドの認知機能改善機構の解明

アセチルコリンは、認知において最も重要な神経伝達物質である。ペプチドによる認知機能改善作用がアセチルコリンを介しているか否かを $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の特異的な阻害剤 methyllycaconitine (MLA) を用いて検討した。併せて、記憶学習に重要な脳部位として知られる海馬について各種遺伝子変化を qRT-PCR にて検討した。

■ 結果

1. 主要な卵白タンパク質から生成する新しい認知機能改善ペプチドの発見

これまで我々は、主要な卵白タンパク質として知られるオボアルブミンの酵素消化物を経口投与したところ、マウスの認知機能を改善することを見出した。さらに、本研究では、どのようなペプチド分子が認知機能を改善するのかを検討した。酵素の基質特異性情報から生成するペプチド候補を絞り込み、それらを化学合成した。さらに、これらの候補ペプチドについて、認知機能改善作用を検討した。最終的に、Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr (ILPEY) という 5 残基の認知機能改善ペプチドを見出した。具体的には、本ペプチドを高脂肪食負荷したマウスに経口投与し、新奇物体認識試験 (ORT) を実施したところ、新奇物体へのアプローチ時間の割合が有意に増加し、認知機能が改善していることが判明した (図 2)。もう一つの海馬依存的な認知機能の評価系として知られる位置認識試験 (OLT) も検討したところ、位置を変えた物体へのアプローチ時間の割合が上昇する傾向が認められ、認知機能が改善していることが示唆された。したがって、ORT および OLT の 2 つの行動試験において認知機能の改善効果が示唆された。本ペプチドは、卵白タンパク質に由来する認知機能改善ペプチドとしては最初の例である。

2. 卵白由来の認知機能改善ペプチドはアセチルコリン系を介する

アセチルコリンは、記憶学習に重要な役割を演じる主要な神経伝達物質であり、その受容体の一つである $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体が認知に関与することが知られている。そこで、卵白由来の認知機能改善ペプチドについて、本アンタゴニストを用いて検討したところ、ペプチドによる認知機能作用が消失すること明らかとなった(図3)。なお、MLA 単独投与により、新奇物体のアプローチ時間に影響を及ぼさない実験条件を予め確認し、本実験を実施した。以上、卵白由来ペプチドの認知機能改善作用は、アセチルコリン系を介していることが明らかとなった。

3. 海馬における遺伝子発現のペプチド投与による影響

記憶学習に重要な脳の部位として知られる海馬において、神経栄養因子などの遺伝子発現が変化するか否かを検討した。NGF や GDNF には変化が認められなかった(図4)。一方、BDNF はペプチド投与群の遺伝子発現の平均値がコントロール群よりも高値を示した。有意差は認められなかったが、さらに検討することにより、その変動を検出できる可能性がある。今後、追試等で再現性を確認するなど、どのような遺伝子変化が生じるのかを確認する予定である。

■ 考察

今回、主要な卵白タンパク質に由来するペプチドが、経口投与により認知機能改善作用を示すことを初めて見出した。腹腔内投与では効果を示さないことから(data not shown)、本ペプチドが主に腸管に作用し、そのシグナルが中枢に伝達されているものと考えられる。一部、消化により低分子化されたものが、脳に対して作用する可能性も否定できないが、詳細については、今後の検討が必要である。

$\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の阻害剤を用いた検討により、アセチルコリン系の活性化を介していることが明らかとなった。アルツハイマー型認知症治療薬ドネペジルもアセチルコリン依存的であり、本ペプチドがアセチルコリン系を介する実験結果と一致している。

また、記憶に重要な海馬における遺伝子発現の変動を検討したところ、神経栄養因子の BDNF が上昇する可能性が示された。併せて、炎症性サイトカインとして知られる TNF- α や IL-1 β などは低値を示し(data not shown)、神経炎症を抑制している可能性も想定される。同様に認知機能を改善するペプチドが異なる遺伝子発現プロファイルを示していることは興味深い。おそらくペプチドごとに活性化される情報伝達経路が異なると考えられる。

これまで我々は、世界に先駆け卵白由来のストレス緩和ペプチド ovolin を見出し報告したが⁵⁾、さらに今回、本研究課題を推進し、新規ペプチドを発見することができた。したがって、基礎科学の発展に貢献したといえる。また、食品や医薬品を問わず新しい認知機能改善素材のニーズは高く波及効果は極めて大きい。既にオボアルブミンの酵素消化物に認知機能改善作用を示すことを明らかにしており、加えて、関与成分候補も特定できており、既に実用化に道筋がついていると考えられる。卵白は高タンパク質であり、認知機能改善作用を有する卵白素材は、栄養価と機能性を両立させた極めて有用な素材として活用が期待される。加えて、卵白素材はとろみ剤として既に利用されており介護食など高齢者向けの食品との親和性は高い。さらに、超高齢社会の日本において、全く新しい素材開発により高齢者向けの新規市場を開拓することができれば世界展開も十分可能といえる。

■ 要約

これまで我々は、鶏卵の主要なタンパク質として知られるオボアルブミンの酵素消化物が認知機能改善作用を示すことを報告した。さらに、本研究では、その消化物中に含まれるペプチドフラグメントの中で認知機能改善作用を示すものを探索した。新奇物体認識試験など行動試験により評価したところ、5 アミノ酸残基ペプチド Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr (ILPEY) の経口投与により、新奇物体へのアプローチ時間の割合が上昇し、認知機能改善作用を示すことが明らかとなった。また、本ペプチドの認知機能改善作用は、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体のアンタゴニストの MLA によって消失した。したがって、ILPEY の認知機能改善作用は、アセチルコリン依存的であることが判明した。さらに、記憶学習に重要な海馬の遺伝子発現が変動する可能性も考えられ、更なる作用機構の解明が期待される。以上、卵白由来の経口投与で有効な新しい認知機能改善ペプチドを見出した

■ 文 献

- 1) Ylilauri MPT, Voutilainen S, Lönnroos E, Mursu J, Virtanen HEK, Koskinen TT, Salonen JT, Tuomainen T, Virtanen JK. Association of dietary cholesterol and egg intakes with the risk of incident dementia or Alzheimer disease : the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr.* (2017) 105, pp. 476-484
- 2) 大日向耕作 2020 年度旗影会報告書 97-102
- 3) Nagai A, Mizushige T, Matsumura S, Inoue K, Ohinata K. Orally administered milk-derived tripeptide improved cognitive decline in mice fed a high-fat diet. *FASEB J.* 2019 ; 33(12) : 14095-14102. doi : 10.1096/fj.201900621R.
- 4) Shobako M, Shobako N, Zhang B, Kaneko K, Ohinata K. Rice-memolin, a novel peptide derived from rice bran, improves cognitive function after oral administration in mice. *Sci Rep.* 2023 ; 13(1) : 2887. doi : 10.1038/s41598-023-30021-3.
- 5) Oda A, Kaneko K, Mizushige T, Lazarus M, Urade Y, Ohinata K. Characterization of ovolin, an orally active tryptic peptide released from ovalbumin with anxiolytic-like activity. *J Neurochem.* 2012 ; 122 (2) : 356-62. doi : 10.1111/j.1471-4159.2012.07777.x. .

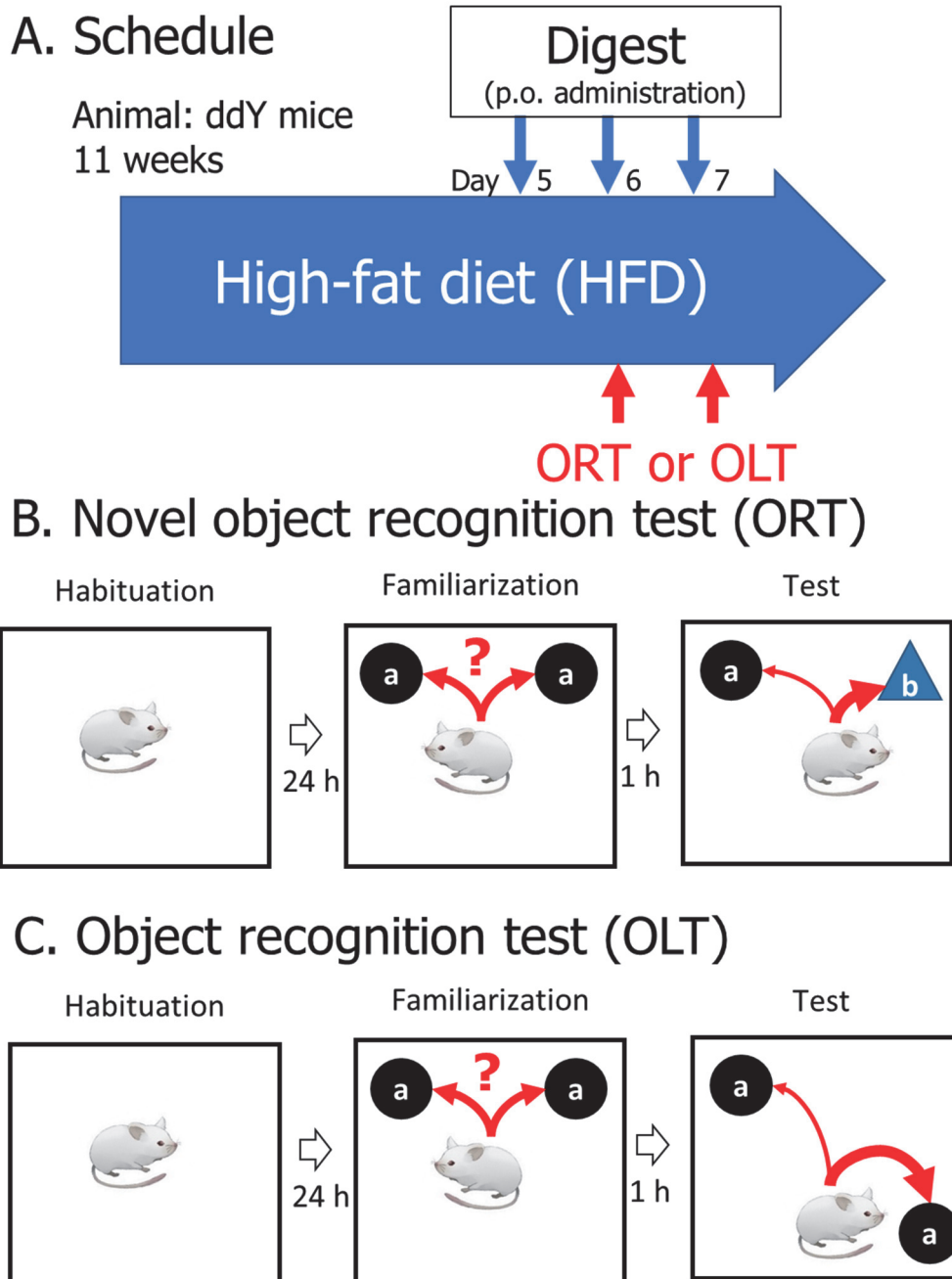


図 1. 認知機能評価方法

A. 実験スケジュール。高脂肪食を雄性 ddY マウスに 1 週間与え、5～7 日目にペプチドを経口投与し、行動試験を実施した。B. 新奇物体認識試験 (ORT)。新奇物体へのアプローチ時間が増加した際に認知機能が上昇したと判定する。C. 位置認識試験 (OLT)。新しい位置に移動した物体に対するアプローチ時間が増加した際に認知機能が上昇したと判定する。

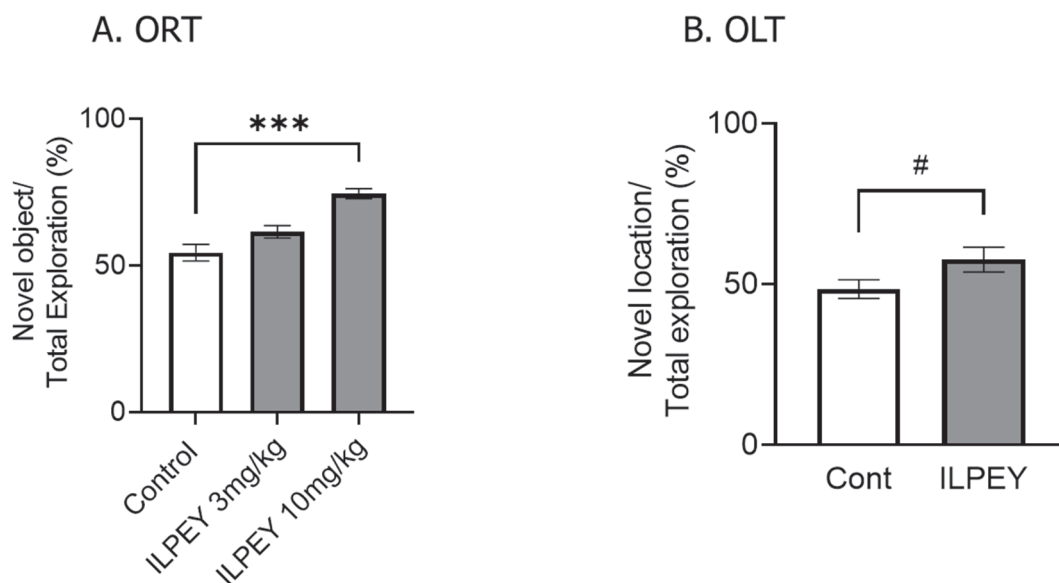


図 2. 卵白由来の 5 残基ペプチド ILPEY の認知機能改善作用
ORT (A) および OLT (B) により認知機能を評価した。ペプチドの経口投与により認知機能が改善する結果が得られた。値は平均値±標準誤差 (A, n=4-5 ; B, n=8-9)

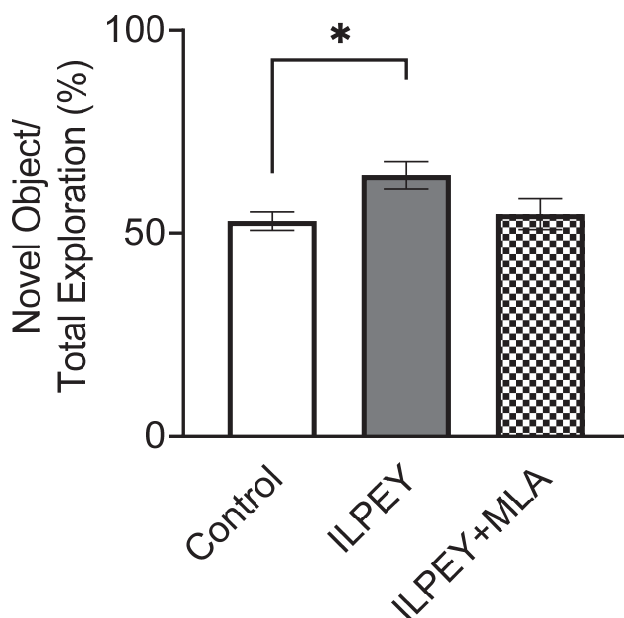


図 3. ILPEY の認知機能改善作用はアセチルコリン阻害剤の併用投与により効果が消失した
ILPEY (3 mg/kg, p.o.) および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体阻害剤 MLA (0.3 mg/kg, p.o.)。値は平均値±標準誤差 (n=6-7)。

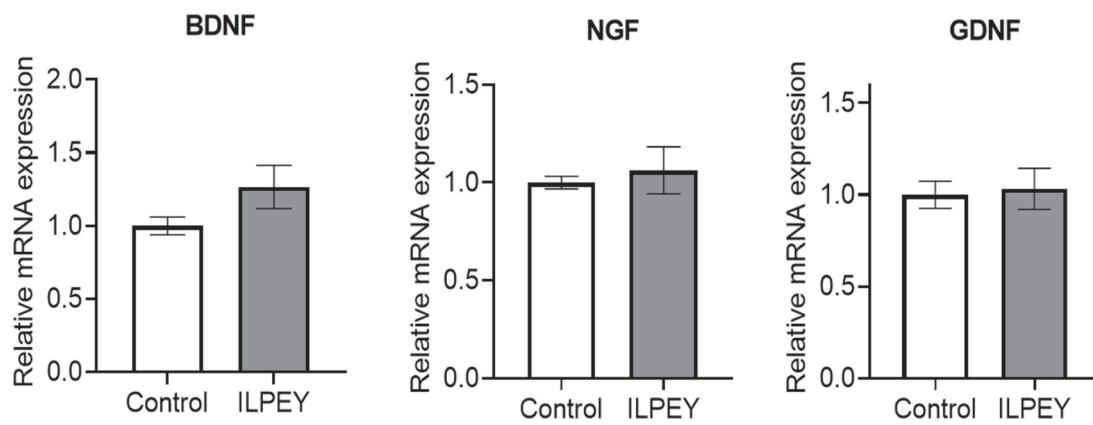


図 4. 海馬における遺伝子発現変動
値は平均値±標準誤差(n=5-6)。