

卵白由来の新規認知機能改善ペプチド ovomemolin の腸 - 脳連関

京都大学大学院農学研究科・准教授 大日向 耕作

■ 緒 言

米国においてアミロイドβ抗体が迅速承認され認知症治療に新しい道筋が示されている一方、高額な薬価(年間\$26,500)や早期診断など解決すべき課題は多い。したがって、現時点においても認知症は神経変性が進行する前の予防が重要であり、「食」の果たす潜在的な役割は大きいといえる。これまで我々は、鶏卵の主要なタンパク質オボアルブミンの酵素消化物の経口投与により、認知機能改善作用を示すことを発見し一群の新しい認知機能改善ペプチドを特定し、さらに、これらを ovomemolin と命名した。今回、本研究では ovomemolin の認知機能改善機構を検討した。

■ 方 法

1. ペプチドの化学合成

ペプチドは F-moc 法で化学合成し脱保護したものを逆相 HPLC で精製した。さらに凍結乾燥したものをサンプルとして使用した。

2. 認知機能評価

新奇物体認識試験(ORT)により評価した¹⁻³⁾。雄性 ddY マウスに高脂肪食を与え認知機能が低下している状態を改善できるか否かを検討する。ペプチドサンプルは ORT を実施する 3 日前から経口投与した。新奇物体へのアプローチ時間の割合が上昇した場合に認知機能が改善したと判定した。

3. エネルギー代謝に及ぼす影響

グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を実施した。グルコース負荷試験では、グルコース投与の 18 時間前から絶食し 2 時間前にサンプルを経口投与し、グルコース 2g/kg 経口投与し尾静脈より採血、血糖値をグルコースセンサーで測定した。インスリン負荷試験では、インスリン投与の 6 時間前から絶食し 2 時間前にサンプルを経口投与し、インスリンを 0.5U/kg 腹腔内投与し尾静脈より採血、血糖値をグルコースセンサーで測定した。

4. 消化実験

オボアルブミンおよび合成ペプチドについて消化実験を実施した。消化管内の酵素条件を想定し、ペプシンおよびパンクレアチンで処理した消化物について、LCMS で分析した。

■ 結 果

1. 経口投与により認知機能改善作用を示す ovomemolin A (OMA) は腹腔内投与では効果を示さない

経口投与で認知機能改善作用を示す 5 残基ペプチド OMA (ILPEY : Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr) について、腹腔内投与における影響を検討した。OMA の経口投与により新規物体へのアプローチ時間の割合が上昇したが、腹腔内投与では変化が認められなかった(図 1A)。したがって、本ペプチドは経口投与で効果を示す一方で、腹腔内投与では効果を示さないことが判明し、作用点が腸管である可能性が示された。

また、記憶に重要な神経伝達物質であるアセチルコリンの受容体アンタゴニストである MLA と OMA を経口投与したところ、OMA の認知機能改善作用は MLA 投与により有意に阻害されることが確認された(図 1B)。OMA の認知機能改善作用はアセチルコリン系の活性化によるものと考えられる。

2. 末梢におけるエネルギー代謝に及ぼす影響(グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験)

これまで認知機能改善作用を示す生理活性ペプチドがエネルギー代謝を改善する例を複数見出している。そこで OMA の糖代謝に及ぼす影響を検討した。グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を実施したが、いずれの試験においても血糖値の低下作用は認められず、末梢におけるエネルギー代謝を改善する可能性は低いと考えられた(図 2)。

3. 海馬における遺伝子発現変化

記憶に重要な脳部位として知られる海馬を採取し、遺伝子発現の変動を検討した(図3)。その結果、アセチルコリン合成・分解に関与する ChAT や AChE の発現に変動は認められなかった。また、アセチルコリン受容体 $\alpha 7nAChR$ の発現も顕著な変化は認められなかった。さらに、認知機能を低下させることが判明している炎症の関連マーカーについて検討した。TNF- α や IL-1 β などのサイトカインの mRNA 発現は OMA 投与群で低い値を示した。また、小胞体ストレスマーカーとして知られる CHOP や ATF-4 の変動は認められなかった。有意差は得られなかったが、炎症抑制が作用機構の一つである可能性が考えられる。

4. 消化管を想定した ovomemolin の生成と消化抵抗性

OMA について消化管を想定した酵素条件で処理したところ、ペプシン消化物中には OMA が検出された(図4)。一方、パンクレアチン消化では OMA ペプチドによるピークは消失していた。したがって、OMA の作用点は消化管上部が想定される。なお、本ペプチドに加え、新しい認知機能改善ペプチド ovomemolin B と C(OMB と OMC)が発見されているが、OMC がオボアルブミンのペプシン-パンクレアチン消化により一部生成することを見出した。したがって、生理的な条件において、消化管内でオボアルブミン由来の認知機能改善ペプチドが生成している可能性があり、鶏卵による認知機能改善に寄与しているものと考えられる。

■ 考 察

オボアルブミン由来の新しい認知機能改善ペプチドである ovomemolin について作用機構について検討した。OMA は経口投与により認知機能改善作用を示す一方、腹腔内投与では効果を示さなかった。したがって、本ペプチドの作用点は消化管であると考えられ、消化管におけるシグナルが脳に伝達される、すなわち、腸-脳連関により作用することが示唆された。また、末梢でのエネルギー代謝に対する影響をグルコース負荷試験およびインスリン負荷試験で評価したが、変化は認められなかった。したがって、末梢での糖代謝を介した作用ではなく、消化管シグナルが中枢に伝達されていることが想定される。

学習・記憶に重要な神経伝達物質であるアセチルコリン系への影響を検討したところ、OMA の認知機能改善作用は、アセチルコリン受容体阻害剤の経口投与でブロックされた。海馬におけるアセチルコリン代謝に関連する遺伝子発現を検討したが、特徴的な変動は認められなかった。OMA は末梢のアセチルコリン系を活性化し、そのシグナルが中枢に伝達され認知機能改善作用を示すものと考えられる。なお、炎症に関係するサイトカインの mRNA 発現が低値を示したことから、神経系の炎症抑制作用を示す可能性もある。また、本ペプチドは神経栄養因子として知られる BDNF の発現を上昇させることから、神経新生を誘導し認知機能改善作用を示すものと考えられる。

さらに、鶏卵を摂取した場合に消化管内に認知機能改善作用を示すペプチドが生成するかを検討した。タンパク質含量の高い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について、消化管における酵素条件で処理したところ、認知機能改善ペプチドが生成することが判明した。複数の ovomemolin が発見されているが、ペプシンあるいは、ペプシン-パンクレアチン消化に抵抗性を示すことが明らかとなっている。これまでの研究で、鶏卵由来の新しい認知機能改善ペプチド ovomemolin を見出したが、他にもアセチルコリンの原料となるコリンが多く含まれる。ovomemolin が消化管におけるシグナル分子として機能する一方で、コリンは記憶のメディエーターであるアセチルコリンの前駆体であり、同様のアウトプットを示すが作用機構が全く異なると考えられる。したがって、鶏卵に含まれる生理活性分子が相加的・相乗的に認知機能を改善することが期待される。

一連の研究成果は原著論文として FASEB BioAdvances に受理された。鶏卵に由来する分子に関する新しい機能性を世界に発信し基礎科学の発展に貢献した。

■ 要 約

鶏卵中でタンパク質含量の高い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に由来する新規の認知機能改善ペプチドについて、その作用機構を検討した。ovomemolin A(OMA)と命名した残基ペプチド ILPEY(Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr)は、経口投与で認知機能改善作用を示す一方、腹腔内投与では効果を示さなかった。また、末梢のエネルギー代謝にも影響が認められなかった。したがって、本ペプチドの主な作用点は消化管と考えられ、消化管におけるペプチドシグナルが脳に伝達されることが示唆された。さらに、海馬における炎症抑制の可能性が示された。加えて、OMA のペプシン抵抗性

を示し、その作用点は消化管上部と想定された。また、消化管酵素を用いてオボアルブミンを処理したところ、一部の認知機能改善ペプチドが生成することが示され、鶏卵を摂取した生理的条件においても認知機能改善ペプチドが生成することが示唆された。以上、鶏卵由来の認知機能改善に寄与する新たな生理活性分子の作用機構を解明した。

■ 文 献

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Kawano K, Shobako M, Furukawa T, Toyooka T, Ohinata K. Fatty acid amides present in Camembert cheese improved cognitive decline after oral administration in mice. *Neurosci Res.* 2024 Mar 7 : S0168-0102(24)00040-3. doi : 10.1016/j.neures.2024.03.002.

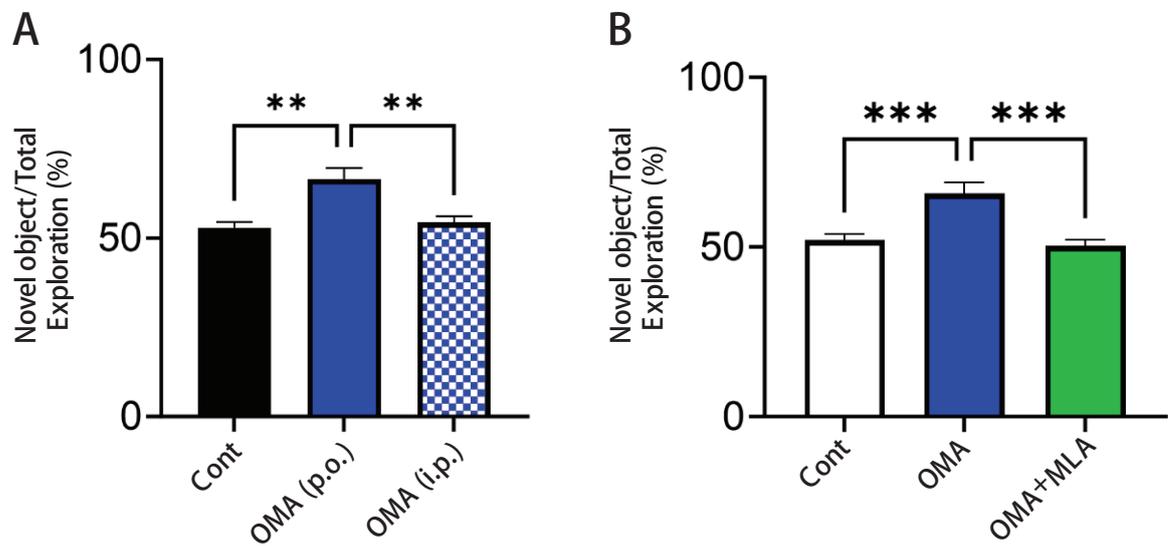


図 1. 卵白由来ペプチド ovomemolin A (OMA) の経口投与による認知機能改善作用
 OMA の経口投与 (p.o.) および腹腔内投与 (i.p.) の認知機能に及ぼす影響 (A)。OMA の認知機能改善作用に及ぼすアセチルコリン受容体アンタゴニスト MLA 投与の影響 (B)。値は平均値±標準誤差 (A, n = 4-7; B, n = 7-9)

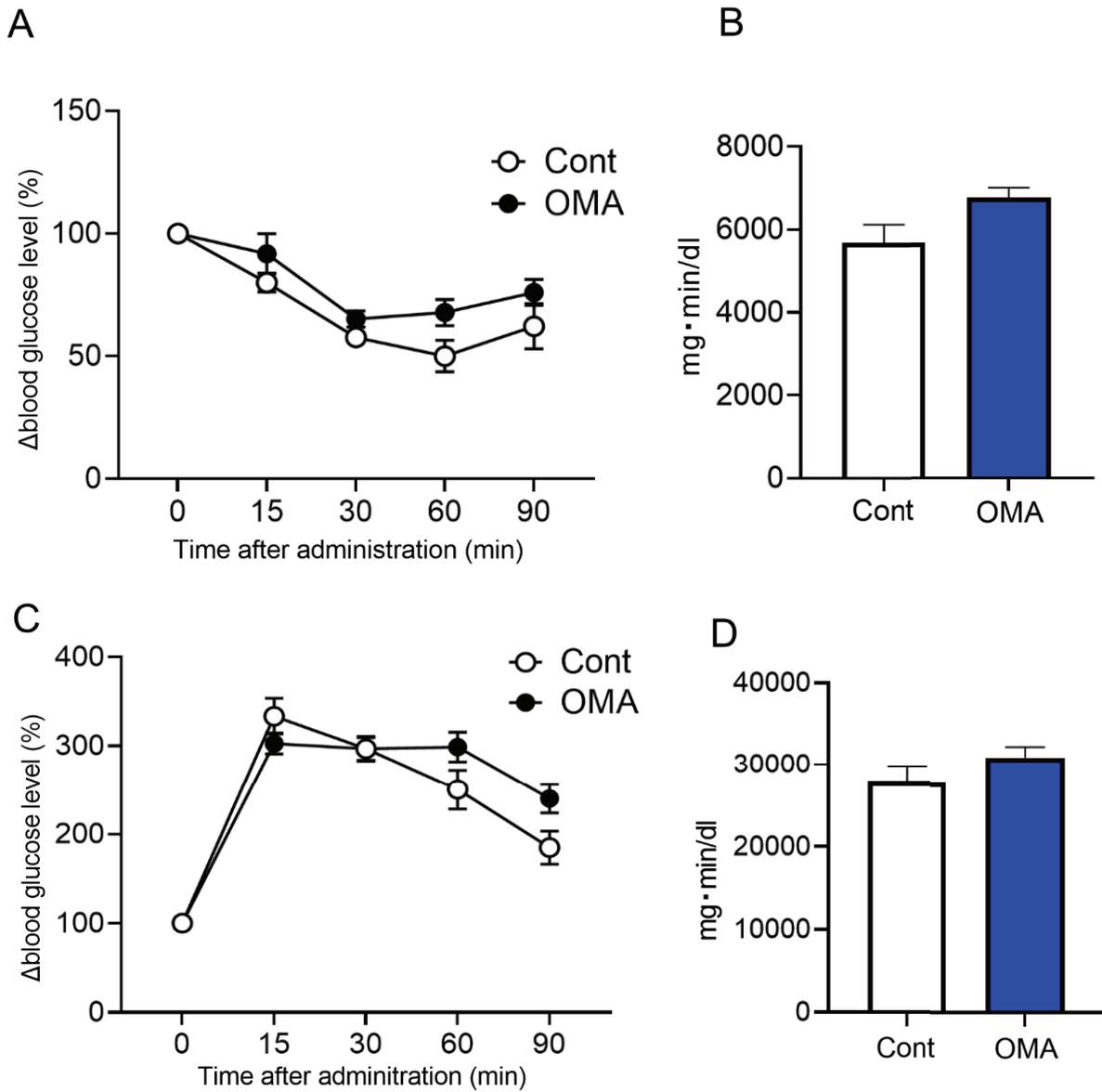


図 2. OMA の糖代謝に及ぼす影響
 インスリン負荷試験 (A, B) とグルコース負荷試験 (C, D)。曲線下面積 (B、D)。値は平均値±標準誤差
 (A, n = 7-8; B, n = 6-7)

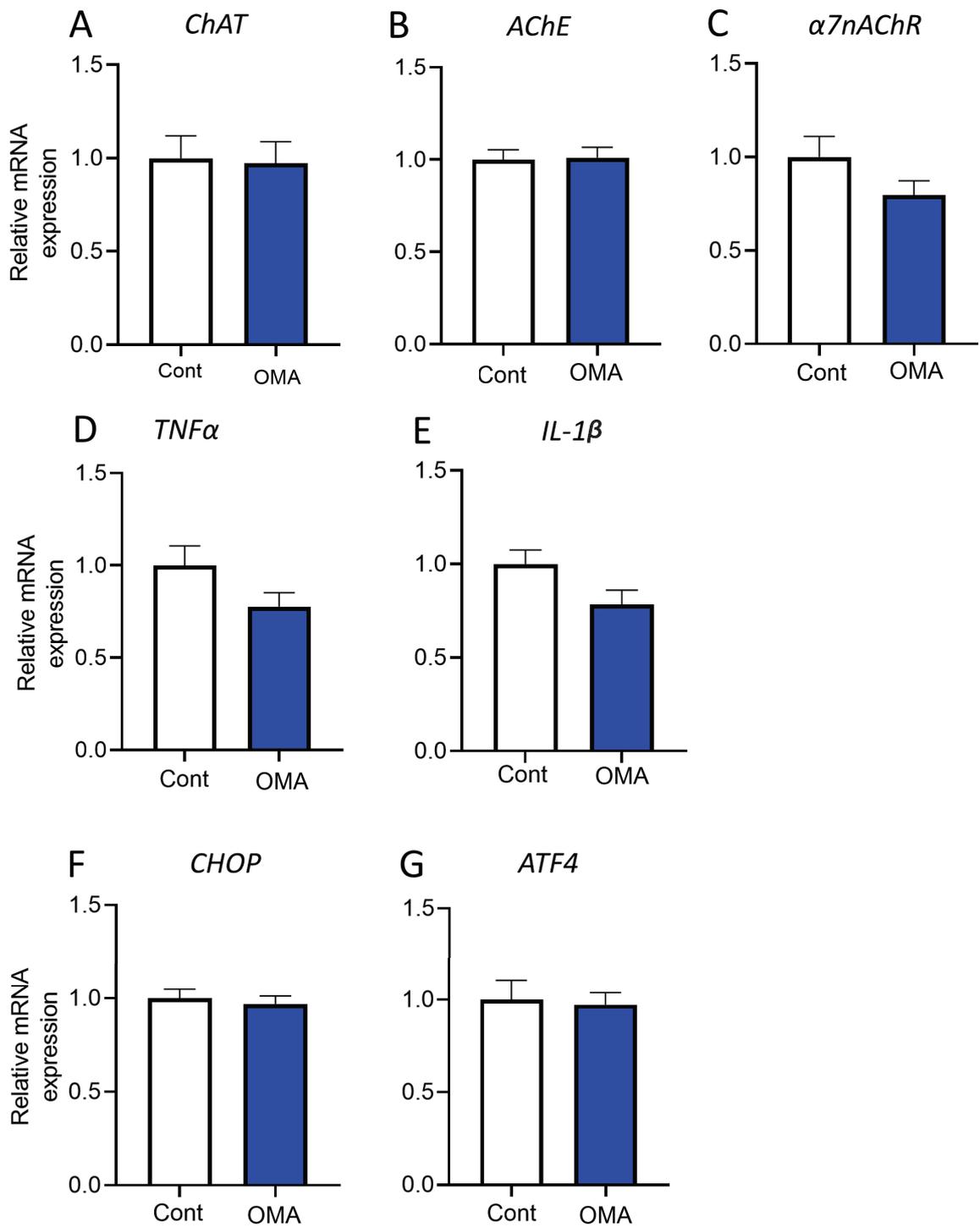


図3. 海馬における遺伝子発現変動値は平均値±標準誤差(n=5-6)

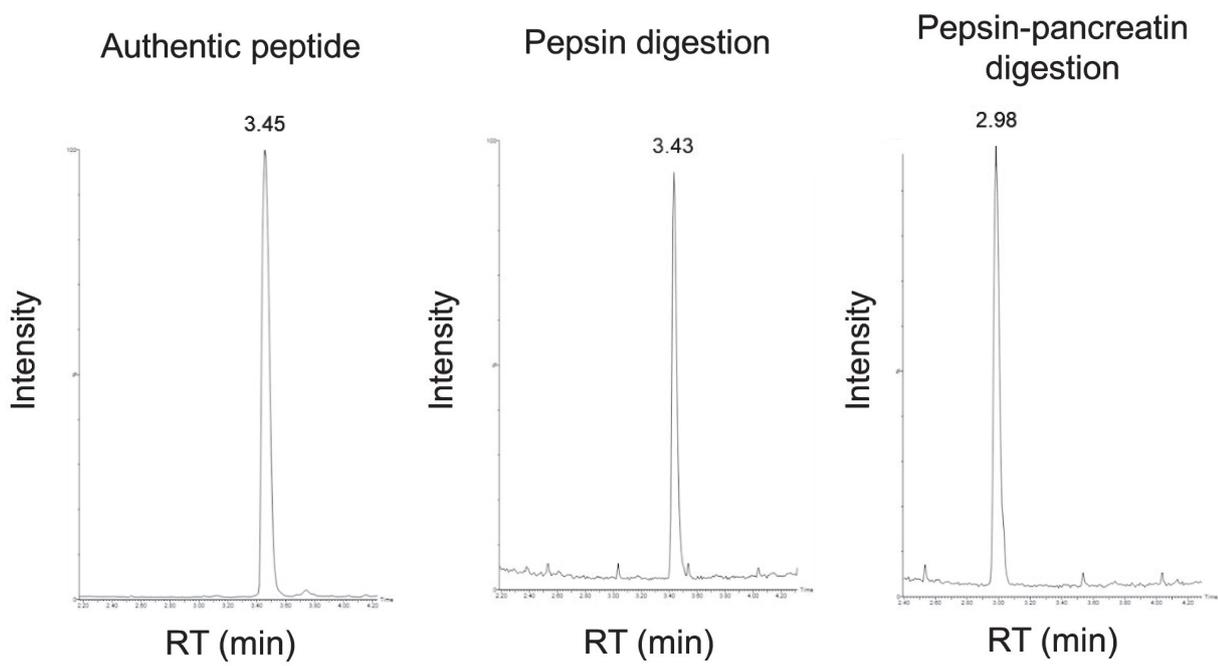


図4. 消化ペプチドのLCMS クロマトグラム
値は TIC