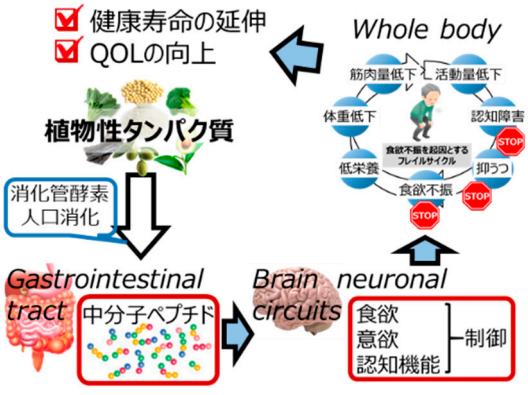
197　食シグナルによる新しい脳機能の探索と分子基盤の解明	金子　賢太朗

【目的】食による老化予防の実現には脳機能とのクロストークの実態解明が鍵となる。その理由として、加齢に伴う食欲不振／低栄養状態がフレイル発症の中核を成すことが挙げられる。もし食による正常食欲・正常体重の維持が可能となれば、中高年の肥満のみならず高齢者のフレイル対策が可能となり、健康長寿の新戦略となる。視床下部の食欲中枢機能は栄養情報を脳に伝えるホルモン（インスリンやレプチンなど）により制御されている。最近、我々は、腸管由来のインクレチンホルモン GIP の視床下部 GPCR を介したホルモン感受性制御機構を解明し、視床下部のホルモン感受性が腸脳連関を介した内因性・外因性の GPCR リガンドの制御下にあること示した（*Cell Rep* 2016、*J Clin Invest* 2019、*Endocrinology* 2020、*JCI Insight* 2021）。近年、食品成分が GPCR に結合することが数多く報告され、我々も経口投与した緑葉由来ペプチドが中枢 NPY 系を介して食欲を増進すること、さらには、2 年齢の老齢マウスにおいても食欲増進効果を発揮することを見出した（*Mol Nutr Food Res* 2014 他）。さらには、緑葉ペプチドによる中枢メラノコルチン系を介した高脂肪食摂取の抑制効果も明らかにしている（*Am J Physiol* 2014、*Peptides* 2021）。これらの成果は食品成分がリガンドとして脳機能を積極的に制御していることを示唆する。そこで本研究は、腸脳連関を介した食品成分による新しい脳機能制御メカニズムを解明し、食品成分が脳機能を積極的に制御しているという新しい概念を提示することを目的とした。温室効果ガスを排出する畜肉や魚肉ではなく、植物性タンパク質の中から、食欲抑制ホルモンであるレプチンとの相互作用を示す新規生理活性ペプチドの同定と作用機序の解明を目指した。

【方法】視床下部器官培養系はマウス新生仔（約 9 日齢）より作製した脳スライスを用い、実際の脳組織に近い状態でホルモンや外因性成分の応答性が高い再現性をもって検出できる独自の評価系である。本系を駆使し視床下部ホルモンシグナルと相互連関を示す食成分の同定を進めた。食成分で前処理した後にレプチン依存性 STAT3 リン酸化、インスリン依存性 AKT リン酸化、LPS 誘導炎症反応などを指標とした免疫組織化学、ウエスタンブロット、qPCR 等によりホルモンシグナル伝達における食成分の効果を解析した。さらに視床下部器官培養系にて効果が判明した食成分をマウス個体に経口投与することにより、レプチン感受性への効果を検証した。

【結果】消化管を想定した酵素条件（ペプシン＋パンクレアチン）により緑葉ルビスコを酵素消化した。緑葉ルビスコ消化物についてペプチド一斉分析を実施し、得られた包括的なペプチド情報と我々の研究室で独自に蓄積した構造－活性相関情報から生理活性ペプチドを探索した。探索の結果、緑葉ルビスコ由来の 6 アミノ酸残基ペプチド YHIEPV を選定した。そこで視床下部器官培養系を用い、レプチンシグナルに及ぼす効果を検討したところ、生理食塩水を添加したコントロール群と比較して、YHIEPV を添加した群では、レプチンによる STAT3 リン酸化（レプチンの中核シグナル伝達経路）が有意に増加し、YHIEPV が細胞内レプチン感受性を増強することを見出した。さらにマウス個体を用いた検討を実施した結果、経口投与した YHIEPV により肥満マウスにおける視床下部レプチン感受性の増強を確認した。

植物性タンパク質による脳機能をターゲットとした機能性食品開発



197. 食シグナルによる新しい脳機能の探索と分子基盤の解明

金子　賢太朗

*京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻

Key words：緑葉ルビスコ，視床下部，レプチン感受性，機能性ペプチド，腸脳連関

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。しかし、従来の機能性食品研究は末梢での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）をターゲットとする研究はほとんど例を見ない。食による老化予防を考える上で脳機能解析が重要である理由は、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。もし、食品成分、特に持続的入手可能な植物性の機能性成分により正常食欲・正常体重を維持することができれば、中高年の肥満制御のみならず、高齢者の低栄養対策や活力低下に重要な役割を果たすことが考えられ、新しい健康長寿戦略となる。

視床下部の食欲制御ニューロンの機能は、栄養状態を伝えるホルモンにより調節を受け、特にレプチン、インスリン、グレリンが食欲調節において重要である。しかし、過栄養や老化により視床下部のホルモン感受性異常が惹起されエネルギー代謝や糖代謝恒常性が障害されることにより、肥満や食欲不振、ひいては認識機能や行動意欲の低下、老化疾患である動脈硬化症が誘導される。そこで我々は、高脂肪食による視床下部レプチン応答性障害に関わる新しい細胞内シグナル分子を探索しRap1の同定に成功した［1］。Rap1は高脂肪食により活性化され、レプチン抵抗性や代謝異常を惹起する低分子量Gタンパク質である。一方、視床下部代謝異常を媒介する液性因子は長年不明であった。我々は、Rap1がGPCR/cAMPシグナルにより活性化されることに着目し、独自の視床下部器官培養系を用いることにより、腸管由来インクレチンホルモンGIPが視床下部GPCR―Rap1系を介し、細胞内レプチン抵抗性、肥満、糖代謝異常を誘導することを証明した［2～4］。さらに薬剤によるRap1経路阻害により、抗肥満や抗糖尿病効果が発揮されることを明らかにした。本成果の重要性は、視床下部のエネルギー代謝・糖代謝恒常性の維持機構が驚くべきことに、腸脳連関を介した内因性・外因性のGPCRリガンドの制御下にあること、Rap1が肥満症や糖尿病治療薬開発のターゲットとなり得ることを初めて証明したことにある。

これまで我々は食品由来ペプチドがGPCRに結合すること、経口投与により生体調節作用を示すことを数多く報告してきた。特に食品成分と食欲中枢の相互作用を研究し、緑葉由来の低分子ペプチド（YPLDLF）が普通食摂取による健常状態において、経口投与により中枢NPY系の活性化により食欲増進効果を示すことを見出した［5］。さらに老齢マウスではグレリンの感受性減退による食欲低下が確認されグレリンは効果を示さないのに対し、緑葉ペプチドYPLDLFは摂食促進作用を示すことを明らかにし、食品由来生理活性ペプチドが老齢マウスにおいても食欲増進効果を発揮できることを報告した［6］。一方、高脂肪食摂取による過栄養状態においては、緑葉ペプチドYPLDLFが高脂肪食摂取を抑制することを明らかにした［7，8］。さらにその作用は中枢メラノコルチン系の活性化を介することを明らかにした。これら一連の研究成果より我々は、食品由来機能性ペプチドが腸脳連関により中枢神経系に作用し、正常食欲の維持効果を発揮できる可能性、食品成分が脳機能制御に積極的に介入している可能性、食品成分が高齢者対応食品となり得る可能性を示した。

そこで本研究は、腸脳連関を介した食品成分による新しい脳機能制御メカニズムを解明し、食品成分が脳機能を積極

*現在の所属：明治大学 農学部 農芸化学科

的に制御しているという新しい概念を提示することを目的とした。温室効果ガスを排出する畜肉や魚肉ではなく、植物性タンパク質の中から、食欲抑制ホルモンであるレプチンとの相互作用を示す新規生理活性ペプチドの同定と作用機序の解明を目指した。

方　法

1. 実験動物

雄性 C57BL/6 マウスを 12 時間明暗サイクルに設定され 23℃に温度管理された飼養保管施設にて 1 週間程度の予備飼育を行った後、サンプルを投与し各種試験を実施した。飼育には高脂肪食（60% kcal fat、Research diet、D12492）を用いた。全ての試験は ARRIVE ガイドラインに則り、また、京都大学動物実験委員会の承認のもと実施した。

2. 視床下部器官培養系

視床下部器官培養系の作製には、マウス新生仔（約 10 日齢）の視床下部スライスを用いた。振動刃ミクロトームを用いて視床下部切片（250 μm）を作製した後、Millicell-CM filters（Millipore、pore size 0.4 μm、diameter 30 mm）を用いて約 10 日間培養した。レプチン感受性は、レプチンによる中核シグナル伝達経路である STAT3 リン酸化を指標に評価した。レプチン依存性 STAT3 リン酸化は、pSTAT3 抗体（1：3,000、Cell Signaling Technology、9131）を用いた免疫組織化学により検出した。

3. サンプル

緑葉タンパク質の主成分であるルビスコのペプシン／パンクレアチン消化物に由来するペプチド YHIEPV（Tyr-His-Ile-Glu-Pro-Val）を F-moc 法により合成し、HPLC による精製後に使用した。

4. 脳室内投与

麻酔下の雄性 C57BL/6 マウスを用い、脳定位固定装置にてガイドカニューラ（C315GS-5-SPC、Plastics One、Roanoke、VA、USA）を側脳室に留置した。1 週間以上の回復期間の後、レプチン投与を実施した。

5. 統計解析

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

結果

1.　緑葉由来ペプチドによる視床下部の細胞内レプチン感受性の増強

消化管を想定した酵素条件（ペプシン＋パンクレアチン）により緑葉ルビスコを人工的に酵素消化した。緑葉ルビスコ消化物についてペプチド一斉分析を実施し、得られた包括的なペプチド情報と我々の研究室で独自に蓄積した構造－活性相関情報から生理活性ペプチドを探索した。探索の結果、緑葉ルビスコ由来の 6 アミノ酸残基ペプチド YHIEPV を選定した。

そこで視床下部器官培養系を用いて、視床下部レプチン感受性における YHIEPV の効果を検討した。YHIEPV（100 μM）を視床下部器官培養系に添加した後、24 時間後にレプチンを添加した。レプチン添加の 1 時間後、パラホルムアルデヒドを用いて組織固定し、レプチンによる STAT3 リン酸化を免疫組織化学により検出した。結果、生理食塩水添加群と比較して、レプチン添加群では STAT3 リン酸化の有意な増加を確認し、視床下部器官培養系においてレプチン依存的なシグナル伝達が再現できていることが示されている（図 1）。さらに YHIEPV で前処理を行った群では、レプチン添加群と比較してレプチンによる STAT3 リン酸化が有意に増加し、YHIEPV が視床下部における細胞内レプチン感受性を増強できることを明らかにした（図 1）。

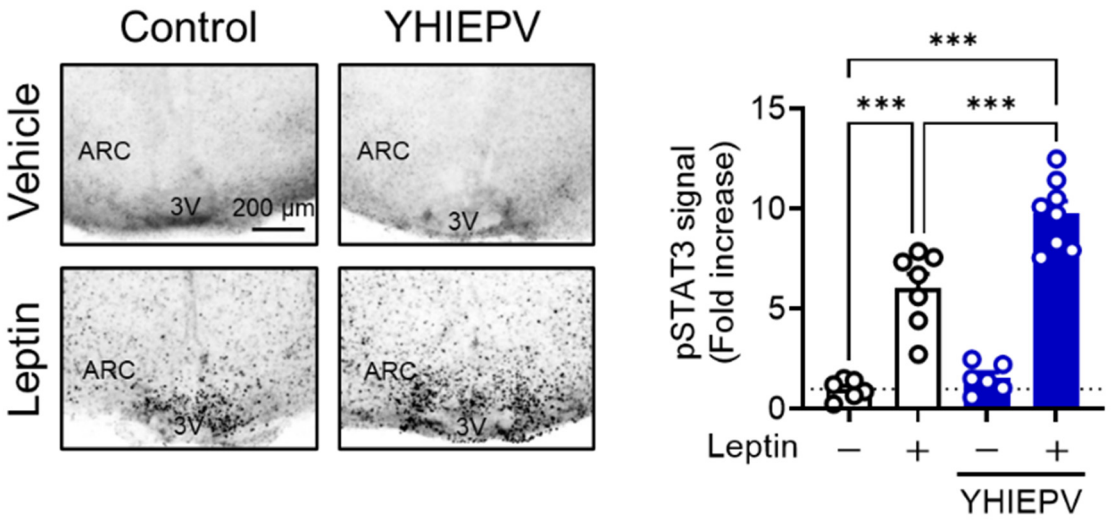


図 1. 緑葉ペプチドによる細胞内レプチン感受性の増強

YHIEPV の添加によるレプチン依存性 STAT3 リン酸化の増大（Scale bar：200 μm）。

***P＜0.001、by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test。

2. 緑葉ペプチドによるパルミチン酸誘導レプチン抵抗性の改善

パルミチン酸は高脂肪食の主要脂質であり、炎症反応を惹起する。そこで我々は視床下部器官培養系において、パルミチン酸によるレプチン抵抗性の誘導を試みた。パルミチン酸で前処理を行った後、レプチン依存性 STAT3 リン酸化を検出したところ、STAT3 リン酸化の明らかな消失を確認し、パルミチン酸が視床下部器官培養系において細胞内レプチン抵抗性を誘導することを明らかにした（図 2）。さらに重要なことに、パルミチン酸と YHIEPV の共添加群では、パルミチン酸によるレプチン抵抗性の誘導が有意に改善することを見出した（図 2）。これらの結果より、YHIEPV がレプチン感受性の増強効果に加え、パルミチン酸によるレプチン抵抗性の改善効果を発揮することを明らかにし、高脂肪食摂取等の過栄養状態において、個体におけるレプチン感受性を増強できる可能性を示した。

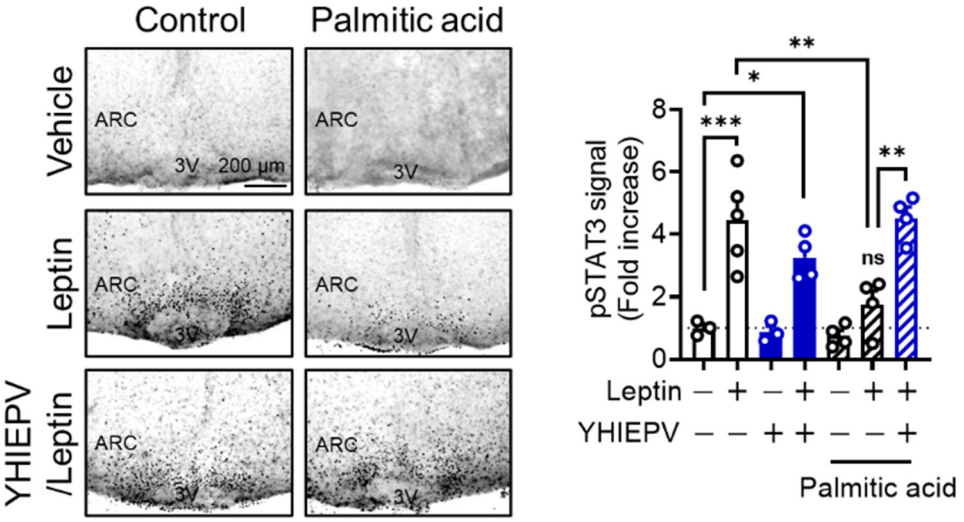


図 2. 緑葉ペプチドによるパルミチン酸誘導細胞内レプチン抵抗性の改善

パルミチン酸添加によるレプチン依存性 STAT3 リン酸化の阻害と YHIEPV による改善（Scale bar：200 μm）。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001、by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test。

3. 緑葉ペプチドの経口投与によるマウス個体における視床下部レプチン感受性の増強

我々は最後に、マウス個体を用いて YHIEPV のレプチンシグナルへの効果を検討した。高脂肪食で飼育したマウスにガイドカニューラを留置し、1 週間の回復期間の後、試験を開始した。5 週間高脂肪食で飼育したマウスに YHIEPV（0.3 mg/kg）を 3 日間連続で経口投与を実施した。その後レプチンを脳室内投与した後に還流固定を実施し、レプチン脳室内投与による STAT3 リン酸化を指標にレプチン感受性を評価した。高脂肪食飼育マウスにおいては、レプチン単独投与による STAT3 リン酸化の有意な増加を確認できず、本マウスにおいてレプチン感受性が減弱していることを確認した。一方、YHIEPV を経口投与した群ではレプチンによる有意な STAT3 リン酸化を確認し、YHIEPV がマウス個体においてもレプチン感受性を増強することを明らかにした（図 3）。

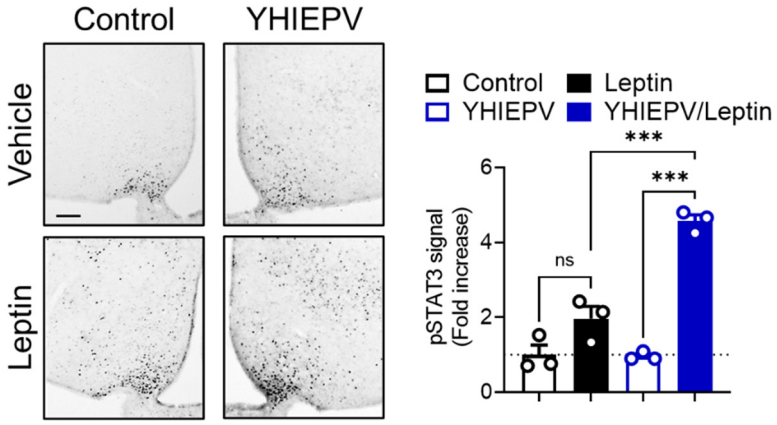


図 3. 緑葉ペプチドの経口投与によるマウス視床下部のレプチン感受性の増強
高脂肪食摂取マウスへの YHIEPV の経口投与により脳室内投与したレプチンシグナルが増強した（Scale bar : 100 μm）。***P＜0.001、by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test。

考　察

上述の検討結果より、我々は独自の視床下部器官培養系により、緑葉タンパク質ルビスコの消化管酵素消化（ペプシン／パンクレアチン）により派生したペプチド YHIEPV が細胞内レプチン感受性を増強するとともに、高脂肪食の主要脂質パルミチン酸によるレプチン抵抗性の誘導を YHIEPV が阻害できることを示した。さらには、緑葉由来ペプチド YHIEPV が経口投与により肥満マウスにおいて視床下部レプチン感受性の増強効果を明らかにしたことから、本研究を発展させることにより、YHIEPV が経口投与により抗肥満作用を発揮できる可能性が示された。これまで、食品由来ペプチドによる視床下部をターゲットとしたレプチン感受性の増強効果は報告されていない。今後の検討により、視床下部における YHIEPV のレプチン感受性増強に関わる分子メカニズムの解明を目指す。さらには、肥満マウス個体でのレプチンによる体重減少や摂食抑制などの抗肥満効果が YHIEPV 投与により増強できるのか検討を進めると共に、長期投与による抗肥満効果の実証を目指す。さらに本研究を端緒として、腸脳連関による食品由来ペプチドによるレプチン感受性の制御という新しい概念の提示と本成果による抗肥満戦略の提示に繋がることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の実施にあたり、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻食品生理機能学分野の井上和生教授、大日向耕作准教授、後藤剛准教授、神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター老化機構研究部の鍋島陽一教授をはじめ、多くの研究室員の方々の御支援を賜りました。そして、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団および

ご関係者様に深く感謝いたします。

文　献

1) Kaneko K, Xu P, Cordonier EL, Chen SS, Ng A, Xu Y, Morozov A, Fukuda M. Neuronal Rap1 Regulates Energy Balance, Glucose Homeostasis, and Leptin Actions. Cell Rep. 2016 Sep 13;16(11):3003-3015. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.039. PMID: 27626668

2) Kaneko K, Fu Y, Lin HY, Cordonier EL, Mo Q, Gao Y, Yao T, Naylor J, Howard V, Saito K, Xu P, Chen SS, Chen MH, Xu Y, Williams KW, Ravn P, Fukuda M. Gut-derived GIP activates central Rap1 to impair neural leptin sensitivity during overnutrition. J Clin Invest. 2019 Aug 12;129(9):3786-3791. doi: 10.1172/JCI126107. eCollection 2019 Aug 12. PMID: 31403469

3) Fu Y, Kaneko K, Lin HY, Mo Q, Xu Y, Suganami T, Ravn P, Fukuda M. Gut Hormone GIP Induces Inflammation and Insulin Resistance in the Hypothalamus. Endocrinology. 2020 Sep 1;161(9):bqaa102. doi: 10.1210/endocr/bqaa102. PMID: 32603429

4) Kaneko K, Lin HY, Fu Y, Saha PK, De la Puente-Gomez AB, Xu Y, Ohinata K, Chen P, Morozov A, Fukuda M. Rap1 in the VMH regulates glucose homeostasis. JCI Insight. 2021 Jun 8;6(11):e142545. doi: 10.1172/jci.insight.142545. PMID: 33974562

5) Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y, Ohinata K. Orally administered rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice. Mol Nutr Food Res. 2012 Aug;56(8):1315-23. doi: 10.1002/mnfr.201200155. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22715053

6) Miyazaki Y, Kaneko K, Iguchi S, Mizushige T, Kanamoto R, Yoshikawa M, Shimizu T, Ohinata K. Orally administered δ opioid agonist peptide rubiscolin-6 stimulates food intake in aged mice with ghrelin resistance. Mol Nutr Food Res. 2014 Oct;58(10):2046-52. doi: 10.1002/mnfr.201400100. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25047666

7) Kaneko K, Mizushige T, Miyazaki Y, Lazarus M, Urade Y, Yoshikawa M, Kanamoto R, Ohinata K. δ-Opioid receptor activation stimulates normal diet intake but conversely suppresses high-fat diet intake in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2014 Feb 15;306(4):R265-72. doi: 10.1152/ajpregu.00405.2013. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24401991

8) Kaneko K. Appetite regulation by plant-derived bioactive peptides for promoting health. Peptides. 2021 Oct;144:170608. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170608. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34265369 Review.