

食品ペプチドによる GLP-1 分泌／分解制御機構の解明

比 良 徹

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門食品科学分野 助教

緒 言

消化管ホルモン Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、食事摂取により、主に下部小腸に多く分布する消化管内分泌細胞 L-cell より血中に放出される。インスリン分泌増強作用、膵β細胞増殖、保護作用を有することから、そのアナログや分解抑制剤 [Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 阻害剤] の糖尿病治療薬としての臨床応用が国内でも広まりつつある。

一方で、内因性 GLP-1 の分泌、産生を高めることの、糖尿病の病態改善、予防における有効性が期待されており、アミノ酸の一つであるグルタミン¹⁾ や、L 細胞に発現する GPR119²⁾ の特異的アゴニストの経口投与による GLP-1 分泌、血糖上昇抑制が確認されている。

食品成分の中でも、グルコースや脂肪酸が GLP-1 分泌を強く刺激することが知られており、GLP-1 産生細胞株を用いた研究により、これら栄養素による GLP-1 分泌機構が明らかになりつつある³⁾。糖や脂肪酸の認識機構については、GPCR やトランスポーターの関与が近年報告されている。

食品たんぱく質、ペプチドが GLP-1 分泌を刺激するという報告があるが、L 細胞がどのようにこれらを認識しているかについては、未だ不明である。

我々は、マウス大腸由来 GLP-1 産生細胞株 GLUTag を用い、各種食品たんぱく質加水分解物の中から GLP-1 分泌を強く刺激する Zein ペプチド (トウモロコシたんぱく質 Zein の加水分解物) を見出し、ラット消化管での GLP-1 分泌促進を確認した。

さらに、この Zein ペプチドは、ラット腸管に投与することで、GLP-1 分泌促進に加え、血中での DPP-IV 活性を抑制することにより、分泌された GLP-1 の分解 (不活性化) を防ぐという、2つの生理作用を併せ持つことを見出した。これにより Zein ペプチドは GLP-1 分泌促進、GLP-1 分解抑制によるインスリン分泌促進を介した血糖上昇抑制作用を持つことを明らかにした⁴⁾。

本研究においては、GLP-1 分泌促進作用と GLP-1 分解抑制作用 (DPP-IV 活性抑制作用) を併せ持つ Zein ペプチドについて、両作用機構の解明を目的とした。

実験方法

1. GLP-1産生細胞株を用いたGLP-1分泌試験

マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株 GLUTag を、10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium にて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。トリプシン処理により培養フラスコより回収した GLUTag 細胞を、48 ウェルプレートにサブコンフルエントになるまで 2-3 日間培養した。

試料溶液添加前に、Hepes バッファー (140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 20 mM Hepes, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose, 0.1% BSA, pH 7.4) にてウェルを洗浄し、同バッファーに溶解した試料溶液を 80 μL 添加、37°C にて 60 分間インキュベーションした。上清を回収後、遠心分離 (800 × g for 5 min at 4°C) し、その上清 70 μL を回収、凍結保存した。上清中の GLP-1 濃度を市販の Enzyme immuno assay kit (YK-160、矢内原研究所) にて測定した。

2. Zeinペプチドの分画

イソプロパノールを用いて、溶媒分画を行った。Zein ペプチドを水に溶解し、これに終濃度 70% となるようにイソプロパノールを加え、十分に攪拌後、遠心分離により上層と沈殿を得た。沈殿を 70% 沈殿画分として回収し、上清には終濃度 80% となるようにさらにイソプロパノールを添加し、同様に遠心分離し、80% 沈殿画分と、上清画分を得た。上清のイソプロパノール濃度を段階的に高め、90% 沈殿画分、95% 沈殿画分、95% 上清画分を得た。これらを凍結乾燥後、10 mg/mL の Zein ペプチドに含まれる濃度にて Hepes バッファーに

再溶解し、上述の GLP-1 分泌試験に供した。

Zein ペプチドの分画物をさらに分離するため、C18 カラム (4.6 × 250 mm) を用いた逆相 HPLC に供した。アセトニトリルのグラジエント溶出により5つの画分を分取した。これらを凍結乾燥後、10 mg/mL の Zein ペプチドに含まれる濃度にて HEPES バッファーに再溶解し、GLP-1 分泌試験に供した。

3. ZeinペプチドによるDPP-IV活性への影響

Zein ペプチド (Zein をパパインで 60 分間加水分解したもの) を、ペプシンで 1 時間、さらにパンクレアチンで 1 時間加水分解したものを Zein ペプチド人工消化物とした。ラットより採取した血漿を DPP-IV の酵素液とし、人工基質として Gly-Pro-p-nitroaniline を用い、Zein ペプチド (4.8 mg/mL) 共存下での DPP-IV 活性を測定した。

結 果

1. ZeinペプチドによるGLP-1分泌機構

細胞外のカルシウムの関与を検討するため、カルシウムを含まない HEPES バッファー (カルシウム不含、2 mM EDTA 添加) に Zein ペプチドを溶解し、GLP-1 分泌試験を実施した。その結果、細胞外のカルシウム除去により、Zein ペプチドによる GLP-1 分泌はやや低下したが、基礎分泌も同様に低下した (図 1)。

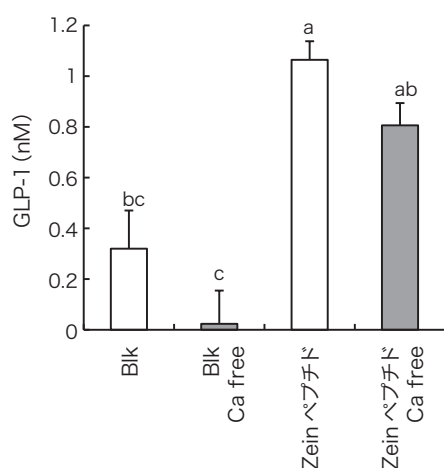


図 1 GLUTag 細胞における細胞外カルシウム除去下での Zein ペプチドに対する GLP-1 分泌応答

カルシウム含有または不含の HEPES バッファー (Blk) に Zein ペプチドを 10 mg/mL にて溶解した。これらの溶液に GLUTag 細胞を 60 分間暴露し、上清中の GLP-1 濃度を測定。値は平均値 ± 標準誤差 (n=3-4)。同じアルファベットを有さない平均値間に有意差あり (Tukey's test, P < 0.05)。

次に、腸管でのペプチド吸収を担う、ペプチドトランスポーター PepT1 の関与を検討した。PepT1 の阻害剤 4-aminomethyl benzoic acid (AMBA) 存在下でも、Zein ペプチドによる GLP-1 分泌は維持された (図 2)。

細胞内情報伝達経路の探索として、cAMP 経路の関与を検討するため、cAMP を産生する酵素であるアデニル酸シクラーゼの阻害剤 MDL-12,330A (MDL) を用いたところ、Zein ペプチドによる GLP-1 分泌は維持された。また、細胞内カルシウムシグナルの関与を検討するため、細胞膜透過性のカルシウムキレート剤 BATA-AM を用いても Zein ペプチドによる GLP-1 分泌は阻害されなかった。

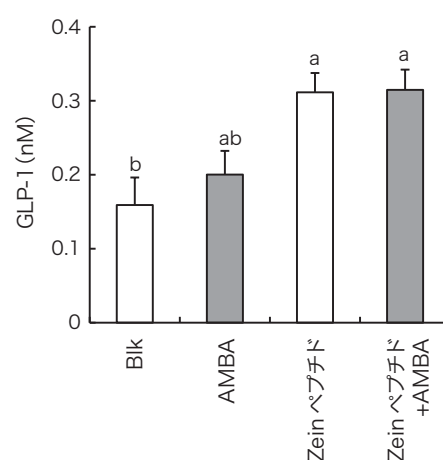


図 2 PepT1 阻害剤存在下での Zein ペプチドに対する GLP-1 分泌応答

AMBA (20 mM) 含有または不含の HEPES バッファー (Blk) に Zein ペプチドを 10 mg/mL にて溶解した。これらの溶液に GLUTag 細胞を 60 分間暴露し、上清中の GLP-1 濃度を測定。値は平均値 ± 標準誤差 (n=3-4)。同じアルファベットを有さない平均値間に有意差あり (Tukey's test, P < 0.05)。

2. Zeinペプチド中の活性ペプチドの探索

Zein ペプチドは、Zein タンパクをパパインで加水分解したペプチド混合物であり、この中のどのペプチドが GLP-1 分泌を促進するのかを明らかにするため、Zein ペプチドを分画して活性成分の単離同定を検討した。

Zein ペプチドをイソプロパノールにより段階的に分画し、GLP-1 の分泌活性を検討したところ、95% イソプロパノール上清 (可溶性) 画分に GLP-1 分泌活性が見られた (図 3)。

この画分をさらに逆相 HPLC により分画したところ、比較的后半に溶出してきた画分 4 に GLP-1 分泌活性が確認された。

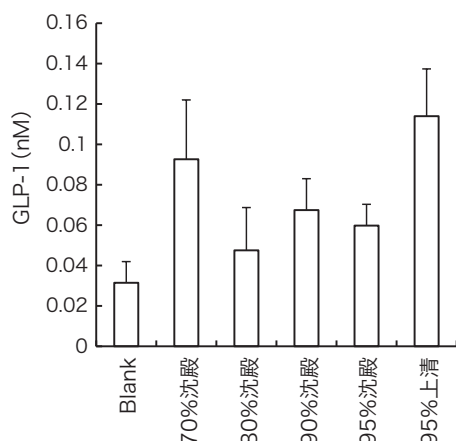


図3 Zein ペプチド分画物に対する GLP-1 分泌応答

イソプロパノールを用いた段階分画により得られた Zein ペプチド分画物を、それぞれ Zein ペプチド 10 mg/mL に含まれる濃度で HEPES バッファーに溶解し、GLP-1 分泌試験に供した。値は平均値 ± 標準誤差 (n=3-4)。

3. ZeinペプチドによるDPP-IV活性への影響

Zein ペプチド中に DPP-IV 活性を阻害する成分が含まれるかを検討するため、ラット血漿を酵素源として阻害試験を行った。Zein ペプチド共存下で、DPP-IV 活性は大きく低下した。また、Zein ペプチド人工消化物共存下でも同程度の DPP-IV 活性低下が見られた (図4)。

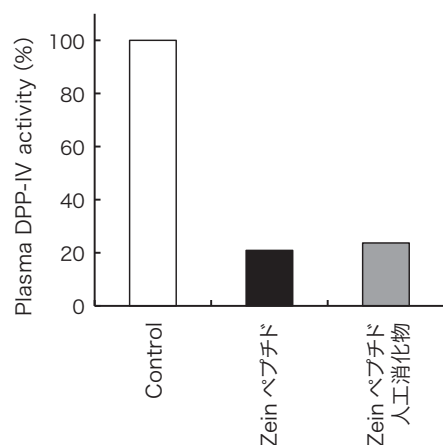


図4 Zein ペプチドおよびその人工消化物共存下での血中 DPP-IV 活性

ラット血漿中の DPP-IV 活性を、Zein ペプチドおよびその人工消化物 (各 4.8 mg/mL) 共存下で測定。値は、ペプチド非共存下での DPP-IV 活性に対する相対値 (%) で、3回測定 of 平均値。

考 察

消化管内分泌細胞が食品ペプチドを直接認識して消化

管ホルモンを放出することは、本研究でも用いている消化管内分泌細胞株の導入により、多くの報告がなされている。しかしながら、その認識機構ならびに細胞内情報伝達経路についての知見は限られている。食品ペプチド全般に共通の機構があるのか、個々のペプチド断片に特異的な認識機構が働くのかについても、よく分かっていない。ここでは、Zein ペプチドを GLP-1 分泌促進ペプチドのモデルとして、GLP-1 産生細胞がどのようにこのペプチド (混合物) を認識するのかを検討した。

ペプチドホルモンや神経伝達物質の分泌に、細胞内カルシウムシグナルがセカンドメッセンジャーとして機能し、この供給源として細胞外液、小胞体等の細胞内カルシウムストアが知られている。細胞外カルシウム除去下でも Zein ペプチドに対する GLP-1 分泌応答が消失しなかった (図1) ことより、細胞外カルシウムは基礎分泌に必要であるが、Zein ペプチドによる GLP-1 分泌誘導には関与しないことが考えられた。

腸管でのペプチド吸収を担う PepT1 がペプチドのセンサーとして機能することを示唆する報告がある⁵⁾が、PepT1 阻害剤の影響がなかった (図2) ことより、Zein ペプチドは PepT1 非依存的に GLP-1 分泌を誘導することが示唆された。PepT1 の基質となるのは低分子のペプチド (ジ、トリペプチド) であり、Zein ペプチドの平均分子量は約 1600 であることから、Zein ペプチドに含まれる比較的鎖長の長いオリゴペプチドが活性本体である可能性も考えられる。

細胞内情報伝達経路として主要な、cAMP、カルシウムシグナルの関与を検討したが、いずれの阻害剤処理下でも Zein ペプチドによる GLP-1 分泌促進は維持された。このことより、これらの経路は関与しないことが考えられた。

食品ペプチド、すなわち食品たんぱく質の加水分解物中のどのようなペプチド断片が、高い消化管ホルモン分泌促進作用を有するのかについて、特定された例は少ない。Zein ペプチドのイソプロパノール分画により、95% イソプロパノール可溶性画分に高い GLP-1 分泌活性が見られた (図3) ことより、この画分に活性ペプチドが濃縮された。95% イソプロパノールに可溶性のペプチド、すなわち比較的疎水性のペプチドが活性を担うことが考えられた。これをさらに逆相 HPLC で分画し、アセトニトリル濃度が高まる比較的后半に溶出して来た画分4に GLP-1 分泌活性が見られたことは、疎水性のペプチドが GLP-1 分泌活性を持つことを支持する結果

と言える。

今後、この画分に含まれるペプチドを単離、同定することで Zein ペプチドに含まれる GLP-1 分泌促進ペプチドを特定できると考えられる。

In vitro での DPP-IV 阻害試験において、Zein ペプチドが DPP-IV 活性を低下させることが示された (図 4)。また、ペプシンとパンクレアチンによる人工消化処理後も DPP-IV 活性を低下させる作用は維持されており、Zein ペプチドに含まれる消化耐性のペプチド、あるいは低分子ペプチドが DPP-IV の活性を阻害することが示唆された。この結果より、ラット回腸管腔内に Zein ペプチドを投与した際に見られた回腸静脈中の DPP-IV 活性の低下⁴⁾は、Zein ペプチド由来成分によるものであることが考えられた。しかしながら、本試験で用いた Zein ペプチドの濃度は生理的濃度より高く、また、膜消化を受けて吸収されたペプチド断片の作用とは異なることも考えられるため、さらなる検討が必要である。

要 約

GLP-1 分泌を促進する Zein ペプチドについて、GLP-1 産生細胞での認識機構、活性画分の探索、血中 DPP-IV 活性抑制機構の解明を目的とした。

GLP-1 産生細胞株を用いた試験において、Zein ペプチドが、消化管内分泌細胞に認識される際に、細胞外カ

ルシウムやペプチドトランスポーターは関与しないことが示唆された。種々の分画法を検討した結果、Zein ペプチド中の活性成分を簡便な有機溶媒分画で濃縮することを可能とし、さらにそれに含まれる疎水性のペプチド画分に GLP-1 分泌活性があることを明らかにした。In vitro において、Zein ペプチドおよびその人工消化物共存下でラット血漿中の DPP-IV 活性が低下したことより、Zein ペプチド中に DPP-IV の活性を抑制する成分が存在することが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より学術研究奨励金を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) J. R. Greenfield, et al.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 9 (1) , 106-113,2009.
- 2) Z. L. Chu, et al.; *Endocrinology*, 149 (5) , 2038-2047, 2008.
- 3) G. Tolhurst, et al.; *J. Physiol.*, 587 (1) , 27-32, 2009.
- 4) T. Mochida, et al.; *Endocrinology*, 151 (7) , 3095-3104, 2010.
- 5) N. P. Darcel, et al.; *J. Nutr.*, 135 (6) , 1491-1495, 2005.