

大豆たん白質由来ジペプチドが中枢神経系に及ぼす作用の神経化学的評価

古屋茂樹^{*1,2,3}・江崎加代子^{2,4}

九州大学大学院

¹農学研究院生命機能科学部門システム生物学講座 ²生物資源環境科学府生物産業創成専攻機能デザイン部門

³バイオアーキテクチャーセンター ⁴理化学研究所 脳科学総合研究センター

Administration of a Soy-Enriched Dipeptide Efficiently Increases Tyrosine Content in the Brain and Serum of Mice

Shigeki FURUYA^{*1,2,3} and Kayoko ESAKI^{2,4}

¹Division of Systems Biology, Department of Bioscience and Biotechnology, Fukuoka 812-8581

²Division of Functional Biomaterials Design, Department of Innovative Science & Technology for Bio-industry, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Fukuoka 812-8581

³Bioarchitecture center, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

⁴RIKEN Brain Science Institute, Wako, Saitama 351-0198

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the neurochemical effects produced by oral administration of dipeptide Ser-Tyr in genetic serine-deficiency model mice that were created using a gene-targeting technique. Amino acid analysis demonstrated that in the cerebral cortex and hippocampus forced oral administration of Ser-Tyr dipeptide increased free L-Tyr content more efficiently than that of sole L-Tyr at the same intake dose. In contrast, free L-Ser content in these brain regions did not differ significantly between Ser-Tyr dipeptide- and sole L-Ser-administered groups. Additionally, Ser-Tyr dipeptide administration caused a greater increase in L-Tyr concentration in serum than sole L-Tyr administration. The present findings indicate that intake of dipeptide Ser-Tyr efficiently enhance free L-Tyr levels in brain and systemic circulation. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 79-84, 2012.

Key words : tyrosine, serine, branched chain amino acids, soy peptide, brain

高齢化社会を迎え、脳神経系の働きをより長く健全に保つために必要な栄養代謝的基盤を解明し、脳神経疾患の予防や診断に役立てることは重要な研究課題である。しかし、食物に由来する成分が脳内代謝物の構

成に与える影響については、未だ十分な知見が集積していない。我々は、これまでに大豆たん白質由来可溶性ペプチドHINUTE-AM溶液の経口摂取が、Glu, D-Asp, および分岐鎖アミノ酸等の脳内遊離含量を増加させることを見いだした^{1,2)}。Gluは脳内の主要興奮性神経伝達物質であり、脳機能において極めて重要な

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

役割を果たす。D-Aspは脳内では微量成分であるが、Aspラセマーゼによって生成され、海馬新生神経細胞の生存と突起発達に必要であることが最近明らかにされている³⁾。さらにD-Aspは連続経口摂取によって、加齢によって減衰したシナプスレベルでの神経可塑性(長期増強)を回復させる作用も報告されている⁴⁾。また、分岐鎖アミノ酸の摂取は、脳の物理的損傷による認知機能低下からの回復を促進することが報告されている⁵⁾。大豆たん白質やペプチドの神経系への作用については研究が少ないが、げっ歯類の脳梗塞モデルにおいて、大豆の摂取が脳内梗塞叢体積を減少させ⁶⁾、前肢の機能回復を促進する等の様々な神経保護・再生促進作用が報告されている⁷⁾。さらに近年ヒトにおいてHINUTE-AMの摂取によって精神的疲労が軽減し、覚醒状態を反映する脳波が出現する等の作用を示す実験の結果が得られている^{8,9)}。これらの知見は大豆中のたん白質類およびそれに由来するペプチドが中枢神経系に多様な作用を及ぼす可能性を強く示唆している。しかし個々の成分と神経系への作用の対応は未だ明確ではない。特にたん白質類は消化される過程で多種類のペプチドやアミノ酸に分解されるため、構造と機能関連の実験的検証が容易ではない。

HINUTE-AMは大豆たん白質をプロテアーゼ消化によってジ-およびトリペプチドにまで分解した産物を主成分とするもので、腸管からの吸収性が大豆たん白質よりも高いことが知られている^{9,10)}。さらに様々な配列を持つジ-およびトリペプチドによる多彩な生理作用が期待される。我々はマウスにHINUTE-AMを摂取させると、上述のGlu、D-Asp、分岐鎖アミノ酸が脳内で有意に増加することに加え、Tyrも脳内において増加傾向を示し、さらに肝臓内と血中の遊離Tyr濃度が有意に上昇していることを見だしていた¹⁾。HINUTE-AMは分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸を含むペプチドの比率が高く(不二製油 前淵元宏博士、私信)、実際にヒトでHINUTE-AMの摂取によってこれらのアミノ酸の血中濃度が大豆たん白質やアミノ酸混合物よりも素早く上昇する¹⁰⁾。Tyrは神経伝達物質であるカテコールアミン類の前駆体であり、ドーパを経てドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンになる。脳内へのTyrの局所微量注入はドーパを増加させることから¹¹⁾、カテコールアミン類生合成系は脳内の遊離Tyr濃度変化に鋭敏に影響を受けると考えられている。大豆たん白質の主要成分である7Sグロブリン(β -コングリシニン)と11Sグロブリン(グリシニン)のアミノ酸配列には複数のTyr含有ジペプチド配列が含まれ、Ser-Tyr(SY)の出現頻度が最も高い

(不二製油 前淵元宏博士私信)。これらの知見を総合し、本研究ではHINUTE-AMに含まれるジペプチドSYによる効率的な体内へのSerとTyrの供給効率に関し、特に脳に着目して構成アミノ酸単体投与との比較検討を行なった。

方 法

(1) 動物および遺伝子型同定

動物実験は九州大学農学研究院動物実験委員会の認可を受けた。使用するマウスは、大学が管理している医学部附属動物飼育施設で、12時間明暗サイクル(明期 8:00 ~ 20:00)、室温25°Cの恒温室内で飼育し、20%カゼインを含む市販固形飼料を自由摂取させた。

脳特異的Phgdh KOマウス(CKOマウス)はPhgdh^{flax/flax}個体に、hGFAP^{+/-Cre}トランスジーンを持つトランスジェニックマウス(Albee Messing教授, Univ. Wisconsinより供与)を交配することにより作成した¹²⁾。CKOマウスの遺伝子型同定は、ゲノムDNAを鋳型としたpolymerase chain reaction法(PCR)により、hGFAP^{+/-Cre}トランスジーンに特異的なCreを増幅するプライマーによって行った。実験には10 ~ 13週齢の雄性個体を4群(SY [n=4], Ser [n=3], Tyr [n=5]の投与実験群と無投与対照群[n=4])に分けて使用した。

(2) SYジペプチド溶液の調製と投与

SYジペプチドは中森俊宏博士(不二製油株式会社)から供与された。SYジペプチドとその構成アミノ酸単体(Tyr(L-体)またはSer(L-体))は滅菌済み逆浸透膜(RO)水に溶解(373 μ mol/mL)し、各群のマウスに体重あたり同一モル量(373 μ mol/mL/50 g body weight)を胃ゾンデにより強制投与した。投与30分後に解剖し、脳を取出して液体窒素で急速凍結し超低温冷凍庫に保存した。血液も採取し、血清を調製して分析試料とした。血清は冷凍保存(-20°C)した。SYとSer投与の2群については、投与後90分についても同様の試料を調製した。無投与群からも同様に分析試料を調製し、各組織サンプルにおける0時間でのアミノ酸濃度とした。

(3) 脳組織アミノ酸濃度測定サンプルの調製

解凍したCKOマウス脳から大脳皮質と海馬を取出し、既報に従い以下の手順で分析試料を調製した^{1,2,12)}。採取した各領域の湿重量を測定後、5 μ L/mg湿重量のH₂Oを加え、ホモジナイズ後遠心分離(15,000 rpm, 30分)を行い、上清を回収後2.5 μ Lの過塩素酸を加え、水中に15 ~ 30分間静置した。その後遠心分

離 (15,000 rpm, 20分) して上清を得た。上清を8N KOHでpH7.0付近に中和後、再度遠心分離 (15,000 rpm, 10分) を行い、アミノ酸分析に供した。

(4) 遊離アミノ酸の測定

遊離L, D-アミノ酸濃度測定は九州大学大学院農学研究院 遺伝子資源開発研究センター 微生物遺伝子工学分野の大島敏久教授が所有するACQUITY UPLC (Waters) を使用して測定した。測定にはOPA-NAC 試薬を用いた。各アミノ酸濃度は対照群 (非投与群, 0時間) で測定された組織内含量 (nmol/mg wet tissue) に対する相対変化値でグラフ化した。統計解析には、Kaleida Graph 4.0を用い、非投与群 (0時間) に対する処理群での変化について有意差をDunnett法で、各処理群間はStudent's *t*-testにより検定した。

結果と考察

Fig. 1はSYおよびアミノ酸単体 (SerまたはTyr) の強制投与による脳内遊離L-Ser含量の相対変化を示す。大脳皮質と海馬のいずれにおいてもSY投与群、Ser投与群ともにL-Ser含量の変化が観察された。大脳皮質では、強制投与30分後ではいずれも非投与群 (0 min) に比べ有意な2.9倍の増加が観察された (SY投与群, $p < 0.01$; Ser投与群, $p < 0.05$) (Fig. 1A)。しかし両投与群間に有意差は認められなかった。Tyr投与群でもL-Ser含量が増加していたが有意差は認められなかった。投与90分後でL-Ser含量はさらに増加していたが (SY投与群: $p < 0.001$, Ser投与群: $p < 0.01$)、両投与群間に有意差は認められなかった。海馬では、投与30分後に脳内遊離L-Ser含量は2倍程度に増加し (有意無し)、90分後では有意な増加が観察された (SY投与群 2.5倍, $p < 0.05$; Ser投与群 2.8倍, $p < 0.01$) (Fig. 1B)。海馬においても両投与群間に有意差は認められなかった。血清L-Ser濃度は、投与30分後においてSY投与群で5.5倍 ($p < 0.01$)、Ser投与群で6.6倍 ($p < 0.01$) の有意な上昇を示した (Fig. 1C)。投与90分後ではSY投与群で5.0倍 ($p < 0.01$) であるのに対し、Ser投与群で3.5倍 (有意差無し) に低下していた。血清L-Ser濃度は投与90分後のSY投与群とSer投与群の間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

Fig. 2はSYおよびSerまたはTyr単体の強制投与による脳内遊離L-Tyr含量の変化を示す。大脳皮質と海馬のいずれにおいてもSY投与群では、TyrおよびSer投与群に比べ脳内Tyr含量が増加していた。大脳皮質では、投与30分後にSY投与群が非投与群に対して8.2倍 ($p < 0.001$) の増加であったのに対し、Tyr投与群では4.6

倍 ($p < 0.01$) の増加であった (Fig. 2A)。Ser投与群は有意な変化を示さなかった。SYとTyr投与群間に有意差が認められ ($p < 0.01$)、SY投与は、Tyr投与群よりも効率的に脳内L-Tyr含量を増加させた。投与90分後では、30分後よりもより高いレベルで脳内Tyr含量が維持され、非投与群の10倍に達していた ($p < 0.001$)。海馬でもSY投与によって大脳皮質と同傾向の脳内L-Tyr含量増加が観察された (Fig. 2B)。投与30分後に脳内遊離L-Tyr含量はSY投与群が非投与群の5.4倍 ($p < 0.001$) の増加であったのに対し、Tyr投与群では2.8倍 ($p < 0.05$) であった。大脳皮質同様にSer投与群は有意な変化を示さなかった。海馬でも投与90分後では30分後よりもより高いレベルで脳内Tyr含量が維持されており、非投与群の6.4倍であった ($p < 0.001$)。一方で血清L-Tyr濃度は、投与30分後においてSY投与群は非投与群の35.4倍 ($p < 0.001$) まで上昇していたのに対し、Tyr投与群では7.3倍 ($p < 0.01$) であった (Fig. 2C)。投与90分後でもSY投与群は16.8倍 ($p < 0.01$) の高レベルを維持していた。投与30分後で比較すると、SY投与はTyr投与よりも顕著に血清L-Tyr濃度を増加させることが明らかとなった ($p < 0.01$)。

続いてSY投与がTyr以外のアミノ酸動態に及ぼす影響についても検討を行なった。その結果、SY投与群ではTyrまたはSer単独投与群に比べ、分岐鎖アミノ酸の脳内含量が低下することを見いだした。投与30分後のSY投与群大脳皮質では、遊離L-Leu含量が非投与群の54% ($p < 0.001$) のレベルまで減少しており、一方でTyrまたはSer単独投与群ではそれぞれ89%と71%のレベルを維持していた (Fig. 3A)。投与90分後ではSY投与群のL-Tyr含量は若干回復するが、有意な低下は継続していた (70%, $p < 0.001$)。L-IleとL-Valについても同様の含量低下が観察された (data not shown)。海馬でもSY投与によってL-Leuの含量は有意かつ顕著に低下した (非投与群の53%, $p < 0.001$) (Fig. 3B)。しかし大脳皮質とは異なり、TyrまたはSer単独投与によってもL-Leu含量は有意かつ顕著に低下した。特にTyr単独投与群ではSY投与群と同レベルにまで低下していた (60%, $p < 0.001$)。興味深いことに、血清中の分岐鎖アミノ酸動態は脳とは大きく異なっていた。投与30分後のL-Leuは、Tyr単独投与群で有意に低下していたが (非投与群の52%, $p < 0.001$)、SY投与群では正常レベル (108%) を維持していた (Fig. 3C)。Tyr単独投与はL-IleとL-Valについてもそれぞれ非投与群の32% ($p < 0.001$) および67% ($p < 0.01$) まで低下させた。一方でSY投与群ではこれらの分岐鎖アミノ酸について有意な変化は認められなかった。しかし投与

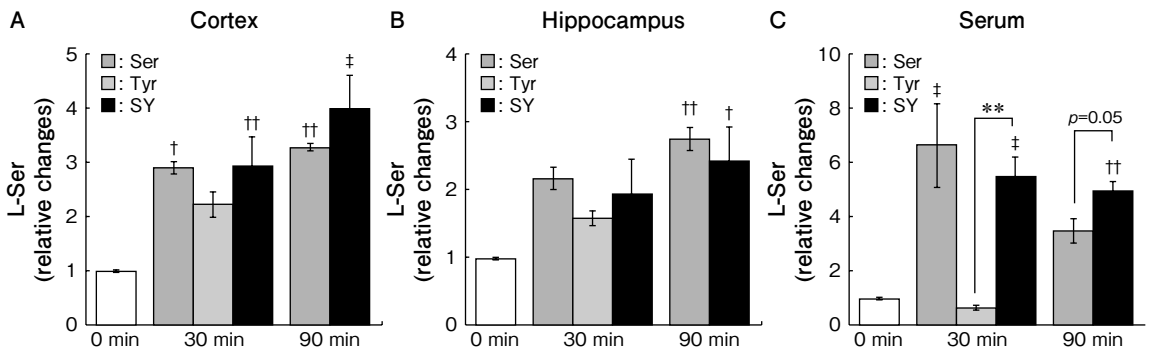


Fig. 1. Effect of SY peptide administration on L-Ser content in cerebral cortex, hippocampus, and serum of brain-specific Phgdh KO mice. Statistical significance: † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$, when compared with 0 min group (Dunnett). * $p < 0.01$, when compared with time-matched SY group (Dunnett or student's *t*-test). Abbreviations (Ser: L-Ser administered group, Tyr: L-Tyr administered group, SY: SY peptide administered group).

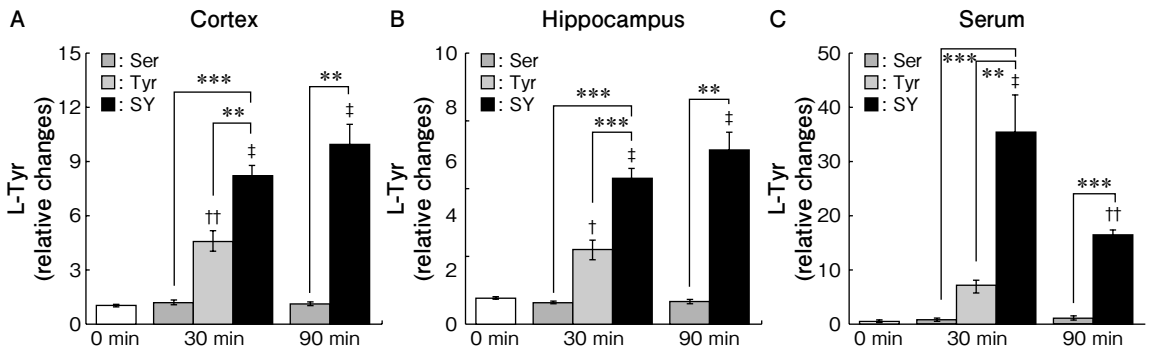


Fig. 2. Effect of SY peptide administration on L-Tyr content in cerebral cortex, hippocampus, and serum of brain-specific Phgdh KO mice. Statistical significance: † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$, when compared with 0 min group (Dunnett). * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, when compared with time-matched SY group (Dunnett or student's *t*-test). Abbreviations (Ser: L-Ser administered group, Tyr: L-Tyr administered group, SY: SY peptide administered group).

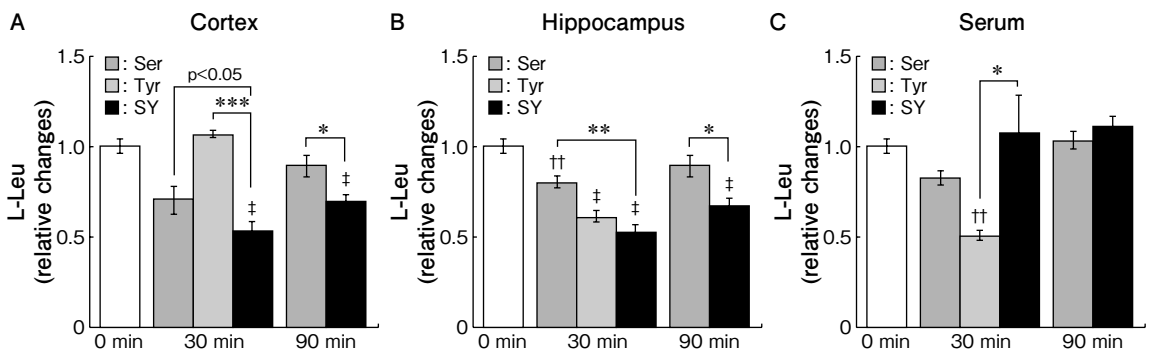


Fig. 3. Effect of SY peptide administration on L-Leu content in cerebral cortex, hippocampus, and serum of brain-specific Phgdh KO mice. Statistical significance: † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$, when compared with 0 min group (Dunnett). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, when compared with time-matched SY group (Dunnett or student's *t*-test). Abbreviations (Ser: L-Ser administered group, Tyr: L-Tyr administered group, SY: SY peptide administered group).

90分後にはSY投与群の血中L-Ile濃度は非投与群の70% ($p<0.05$) レベルに下がった。血清中のL-LeuとL-Valでは有意な濃度低下が起こらないことから、ジペプチドとアミノ酸の強制投与は脳と血中の分岐鎖アミノ酸プロファイルに異なった影響を及ぼすと考えられた。

本研究では、大豆たん白質中に出現する配列に由来するジペプチドSYを合成し、マウスに強制経口投与することにより、Tyr単体投与に比して脳と血中の遊離L-Tyrを効率的に増加させ得ることを初めて示した。今回解析を行なった大脳皮質と海馬ではいずれもSY投与によってTyr投与に比べ、遊離L-Tyr含量は約2倍に増加しており、さらに血清中ではTyr摂取に比べL-Tyr濃度は約5倍の高値に達していた。一方でSY投与群のL-Serの脳内含量増加レベルはSer単体投与群と同程度であり、ジペプチドを介したアミノ酸の脳内移行効率はアミノ酸の種類によって異なるものと予想される。

我々は大豆たん白由来ジペプチドおよびトリペプチドを主成分とするHINUTE-AMの経口摂取によって、脳機能に重要な役割を果たすGlu, 分岐鎖アミノ酸, およびD-Asp等の増加を見いだした^{1, 2)}。すなわち大豆ペプチドの作用は脳におよび得るものであり、その食品としての摂取が中枢神経系の生理機能促進または機能低下を予防する機能性を持つ可能性を論じてきた⁹⁾。Tyrは前述の様に、神経伝達物質であるカテコールアミン類の合成に際して出発物質として不可欠なアミ

ノ酸である。脳内L-Tyrの増加は速やかにドーパミンの前駆体であるドーパも増加させることから¹¹⁾、Tyrを含有する各種大豆由来ジペプチドは、脳に対してカテコールアミン類の合成促進作用という機能性を持つ可能性が示された。カテコールアミン類の低下は様々な精神神経疾患の病態に関連している。例えば抗うつ薬にはドーパミンとノルアドレナリンの再取り込み阻害や、ノルアドレナリン放出を増加させる作用を持つ化合物が含まれることから、ノルアドレナリンを中心としたカテコールアミン類の量的減少またはその神経伝達の低下が、憂うつ病の病因の一つと考えられている。またパーキンソン病では中脳黒質ドーパミン作動神経細胞が変性脱落し、ドーパミンによる神経伝達が低下することによって随意運動不全に至る。大豆ペプチド摂取により、脳内カテコールアミン類の合成促進を通じてドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンによる神経伝達が増強できれば、うつ病やその他の精神神経疾患の予防や発症遅延に寄与する機能性食品の開発が期待される。ただし、今回観察されたように、SYジペプチドによるTyrの増加は、脳内分岐鎖アミノ酸含量の低下を伴うため、摂取に際しては分岐鎖アミノ酸への影響を考慮し、慎重に最適条件を設定する必要がある。本研究の結果より、大豆ペプチド摂取による神経系への作用について、今後はカテコールアミン類に着目した神経科学的研究も必要となるであろう。

要 約

大豆たん白質に比較的高い頻度で存在する配列であるジペプチドSYを、脳特異的Phgdh KOマウスに経口強制投与し、大脳皮質と海馬の遊離アミノ酸組成への影響を検討した。その結果、両脳内領域においてL-Tyr含量がTyr単体投与に比べ顕著に増加していた。L-Ser含量もSY投与によって増加したが、Ser単体投与によっても同程度の変化を示し、両者の間に大きな違いは認められなかった。さらに血清中のL-Tyr濃度はSY投与によって劇的に増加し、Tyr単体投与の5倍高い濃度まで上昇した。本研究課題の遂行により、大豆ペプチドの摂取は、脳内L-Tyr含量の増加を介して脳機能に有益な作用をもたらす可能性が示された。

謝 辞

アミノ酸分析に関しご指導いただいた大島敏久教授（九州大学農学研究院 遺伝子資源開発研究センター）および大島研究室の皆様には感謝致します。

文 献

- 1) Esaki K, Kokido T, Ohmori T, Tsukino M, Ohshima T and Furuya S (2011): Soy peptide ingestion increases neuroactive amino acids in the adult brain of wild-type and genetically engineered serine-deficient mice. *J Nutr Food Sci*, **1**, 109. doi: 10.4172/2155-9600.1000109.
- 2) 古屋 茂樹 (2010) : 遺伝性セリン合成不全疾患モデルマウスの脳内遊離アミノ酸組成に及ぼす大豆ペプチド摂取効果の定量的検討. 大豆たん白質研究, **13**, 109-115.
- 3) Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H and Snyder SH (2010): Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 3175-3179.
- 4) Errico F, Nisticò R, Napolitano F, Mazzola C, Astone D, Pisapia T, Giustizieri M, D'Aniello A, Mercuri NB and Usiello A (2011): Increased d-aspartate brain content rescues hippocampal age-related synaptic plasticity deterioration of mice. *Neurobiol Aging*, **32**, 2229-2243.
- 5) Cole JT, Mitala CM, Kundu S, Verma A, Elkind JA, Nissim I and Cohen AS (2010): Dietary branched chain amino acids ameliorate injury-induced cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 366-371.
- 6) Schreihof DA, Do KD and Schreihof AM (2005): High-soy diet decreases infarct size after permanent middle cerebral artery occlusion in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R103-R108.
- 7) Cheatwood JL, Burnet D, Butteiger DN and Banz WJ (2011): Soy protein diet increases skilled forelimb reaching function after stroke in rats. *Behav Brain Res*, **216**, 681-684.
- 8) 本橋 豊 (2005) : 大豆ペプチドの機能と脳への働き. *Food Style21*, **9**, 59-61.
- 9) Maebuchi M, Yamaguchi N and Furuya S (2011): Soy peptide as functional food component. *Medicine and Biology*, **155**, 566-576.
- 10) Maebuch M, Samoto M, Kohno M, Ito R, Koikeda T, Hirotsuka M and Nakabou Y (2007): Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men. *Food Sci Technol Res*, **13**, 45-53.
- 11) Wurtman RJ, Larin F, Mostafapour S and Fernstrom JD (1974): Brain catechol synthesis: control by brain tyrosine concentration. *Science*, **185**, 183-184.
- 12) Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita OM, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitzu K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y and Furuya S (2010): Brain-specific *Phgdh* deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *J Biol Chem*, **285**, 41380-41390.