

大豆ペプチド摂取による脳内神経伝達物質合成および代謝亢進

古屋茂樹^{*1,2}・森安一樹¹・今井明香¹・中畑亜加音¹・市瀬嵩志¹

九州大学大学院¹生物資源環境科学府生命機能科学専攻生物機能デザイン分野

²農学研究院附属イノベーションバイオアーキテクチャーセンター

Intake of Soy Protein-derived Peptides Efficiently Stimulates Central Catecholamine Synthesis and Turnover in Mouse Brain

Shigeki FURUYA^{1,2}, Kazuki MORIYASU¹, Haruka IMAI¹,
Akane NAKAHATA¹ and Takashi ICHINOSE¹

¹Laboratory of Functional Genomics and Metabolism, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences

²Innovative-Bioarchitecture Center, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

The aim of this study was to assess effect on the catecholamine metabolism produced by oral administration of a soy-peptide mixture Hinute-AM in the brain of C57BL/6 mice. Catecholamine analysis using a high performance liquid chromatography with electrochemical detector system demonstrated that forced oral administration of Hinute-AM increased noradrenaline metabolites 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) and normetanephrine (NM) in the cerebral cortex and brainstem. Noradrenaline content was also significantly increased in the brainstem. A peptide mixture derived from collagens did not exhibit such action on noradrenaline and its metabolites. Enhanced noradrenaline metabolic turnover was also evident in these brain regions. These *in vivo* observations strongly suggest that intake of Hinute-AM leads to boost of central noradrenaline synthesis and transmission. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 102-107, 2015.

Key words : soy peptide, catecholamine, noradrenaline, brain

近年の疫学研究により、食習慣が認知症の発症に影響し得ることが報告された。福岡県久山町において60～70代による1,000人規模のコホートによる15年に渡る追跡では、大豆、大豆製品、野菜、海藻、乳製品の

摂食量が多く、相対的に米の摂取量が少ないとアルツハイマー型および脳血管型のいずれの認知症についても発症リスクが有意に低いことが報告された¹⁾。この疫学研究の成果は、痴呆を含む脳神経疾患の発症や進行が摂取する食事パターンに影響を受けることを示している。すなわち大豆などの食物に由来する成分が脳

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

の代謝や機能に物質レベルでの変化を惹起し、脳機能の健康維持に貢献している可能性が推定される。しかし、大豆を含む上記の食品成分が脳内の代謝物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を経口摂取させると、大脳皮質や海馬などの脳内主要領域で、遊離のGlu、D-Aspおよび分岐鎖アミノ酸等の含量が増加することを報告した^{2,3)}。Gluは脳内の主要な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役割を果たす。D-Aspについては、経口摂取により老齢マウスの神経可塑性（長期増強）を増強させる作用が報告されている⁴⁾。また分岐鎖アミノ酸は、脳への物理的損傷による認知機能低下からの回復を促進させる作用を持つことが報告されている⁵⁾。

マウスにHinute-AMを摂取させることにより、上述のneuroactiveなアミノ酸に加えてTyrも脳内において増加傾向を示し、それは血中での遊離Tyr濃度の上昇に起因することも我々は見いだしている²⁾。Hinute-AMに含まれるペプチドは分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸の含有比率が比較的高く、ヒト試験においても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⁶⁾。Tyrは中枢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、血中から脳内に移行後ドーパを経てドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンへと代謝される。

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。我々は化学合成したジペプチドSYをマウスに経口摂取させると、同量のTyr単体摂取に比べ血清中および脳内の遊離Tyr濃度が、より効率的に高く維持されることを見いだしていた^{7,8)}。さらにこれらのマウス脳モノアミン濃度を測定すると、SY投与群でのノルアドレナリン代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol（MHPG）含量の顕著な増加とノルアドレナリン代謝回転の亢進を確認した⁹⁾。この作用は、Tyrを含有しSY同様に大豆たん白質中に比較的高頻度に存在するIYやYPといったジペプチド配列の合成品では認められなかったことから、配列特異性があるものと考えられた。

ノルアドレナリンは中枢で神経伝達物質として機能しており、アドレナリン受容体を介して多様かつ重要

な脳機能への関与が推定されている。そのため、SYが有するノルアドレナリン代謝亢進作用が、他の多様なTyr含有ペプチドを含む大豆ペプチド標品にも認められれば、その摂取による中枢神経系での機能性の一端を明らかにすることが可能となる。そこで本研究は、Hinute-AM摂取による脳内カテコールアミン合成・代謝亢進作用解明を目的に、特にノルアドレナリンに着目し、他ペプチド標品との比較解析を行なった。

方 法

(1) 動物実験

本研究に係る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（認可番号A25-121-3）。雄性野生型マウス（C57BL/6N：8週齢）を購入し（日本チャールス・リバー株式会社）、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℃の恒温室内において、約1週間の馴化飼育を行った。飼料は市販固形タイプ（CE-2、日本クレア株式会社）を自由摂取させ、飲水にも制限を設けなかった。

投与試験前日に実験室に移動し、同様の明暗サイクルで一晩維持した。試験当日の午前中に胃ゾンデによる強制投与を実施した。マウスは3群に分けた（溶媒対照群 [n=8]、Hinute-AM（HINUTE）群 [n=8]、FCP-AS-L（Collagen）群 [n=8]）。Hinute-AMは前渕元宏博士（不二製油株式会社）より供与していただいた。FCP-AS-Lは魚コラーゲンを低分子化した市販ペプチド（平均分子量1,000、株式会社ニッピ）であり、Hinute-AMと同等の高溶解性を有する。そのため作用特異性の比較対照試験として投与を実施した。

ペプチド溶液は滅菌済み生理食塩水に溶解し、各群のマウスに体重あたり同量（0.26 g/mL/30 g body weight）を胃ゾンデにより強制投与した。溶媒対照群には生理食塩水を投与した。投与後30分に解剖し、脳を取出した後に大脳皮質と脳幹を分離し、液体窒素で急速凍結し-80℃に保存した。

(2) 脳組織カテコールアミン測定

解凍した脳組織サンプルを既報⁹⁾に従い除たん白後分析試料溶液を調製した。カテコールアミン類の測定はHPLC-電気化学検出法（HTEC-500、エイコム社）により推奨プロトコールに従い行った。以下の物質について定量した：ドーパミン（DA）、3,4-dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC：ドーパミン代謝物）、homovanillic acid（HVA：ドーパミン代謝物）、3-methoxytyramine（3-MT：ドーパミン

代謝物), ノルアドレナリン (NA), 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG: ノルアドレナリン代謝物), normetanephrine (NM: ノルアドレナリン代謝物). 得られた各カテコールアミン類および代謝物の定量値は, 溶媒対照群で測定された組織内含量 (ng/g wet tissue) に対する相対値としてグラフ化した. 代謝回転は以下の計算により算出した.

ノルアドレナリン代謝回転 = (3-MHPG含量+NM含量)/ノルアドレナリン含量

ドーパミン代謝回転 = (DOPAC含量+3-MT含量+HVA含量)/ドーパミン含量

(3) 統計解析

溶媒対照群に対する各投与群のカテコールアミン類および代謝物の含量および代謝回転の相対変化について, 有意差をTukey-HSD法によりKaleidaGraph 4.0を用いて検定した.

結果と考察

Fig. 1はHinuteおよびCollagenの強制経口投与による大脳皮質内遊離NA, MHPG, NM含量の変化を示す. 溶媒対照群に対し, ノルアドレナリン含量は両投与群共に有意な変化は認められなかった (Fig. 1A). 一方でノルアドレナリン代謝物であるMHPGとNMについてはHinute投与群では, それぞれ1.64倍 ($p<0.0001$: vs溶媒対照群, $n=8$) および1.53倍 ($p<0.001$: vs溶媒対照群, $n=8$) もの顕著な増加を検出した. Collagen投与群にはMHPGとNMの増加は認められなかった. これらの代謝物の含量増加は, ノルアドレナリンが神経伝達に利用された結果を反映していると考えられた. そこでHinute投与群各個体のノルアドレナリンおよびドーパミンの代謝回転を算出し, 溶媒対照群と比較した. その結果, 大脳皮質ではノルアドレナリン代謝回転がHinute投与群では1.62倍 ($p<0.0001$) に亢進していた. Collagen投与群ではこの様な増加は認められなかったことから, Hinuteに特異的な作用と推定された. これらの結果は, 大豆ペプチドの経口摂取により, ノルアドレナリン神経ネットワークの活動が選択的に賦活化される可能性を強く示唆している.

ヒトを含む哺乳類脳においては, ノルアドレナリンは脳幹の神経核である青斑核に局在するノルアドレナリン作動性神経細胞によってのみ合成され, 大脳皮質を含む脳内各領域に投射された神経線維終末から放出される¹⁰⁾. そのため, 大脳皮質での測定だけでは, 青斑核でのノルアドレナリン含量の定常的変化を評価で

きない. その検討を目的に, 脳幹でのカテコールアミン定量解析を行った. その結果, Hinute投与群脳幹においてはノルアドレナリンそのものの含量が溶媒対照群に比較して有意に増加していることが明らかとなった (1.14倍, $p<0.01$, $n=8$) (Fig. 2A). この作用はCollagen投与群には観察されなかった. MHPGとNMについても, Hinute投与群脳幹ではそれぞれ1.71倍 ($p<0.0001$: vs溶媒対照群, $n=8$) および2.16倍 ($p<0.0001$: vs溶媒対照群, $n=8$) の顕著な増加を検出した (Fig. 2B, C). しかしCollagen投与群ではノルアドレナリン同様に有意な量的変動は観察できなかった. ノルアドレナリンおよびドーパミンの脳幹での代謝回転は, ノルアドレナリンのみに有意な増加 (1.53倍, $p<0.0001$) を認め, 大脳皮質と同傾向の変化であった. 脳幹でのこれらの結果は, Hinute-AMの経口摂取がノルアドレナリンの合成そのものと神経ネットワークでの放出 (代謝) を選択的に賦活することを示しており, 大脳皮質での解析結果と概ね一致した.

本研究では, 大豆たん白質由来可溶性ペプチドHinute-AMの経口摂取による脳内ノルアドレナリン生合成および代謝亢進作用を初めて示した. Hinute-AMの作用はノルアドレナリンに特異的であり, ドーパミン代謝は影響を受けなかった. またコラーゲン由来可溶性ペプチドにはこのような作用は全く認められなかった. ノルアドレナリン生合成および代謝が亢進される詳細な分子機構は現時点で不明であるが, 我々が既に報告している, ジペプチドSY投与による同様なノルアドレナリン代謝の亢進から, 脳内遊離Tyr増加がその根幹にあると推定している. 実際到大脳皮質ではHinute-AM投与により大脳皮質での遊離Tyr含量の増加を見だしている (古屋ら, 未発表). しかしHinute-AMとSYのノルアドレナリン代謝への影響は完全に同一ではない. SYの場合, 脳幹でのノルアドレナリン含量は増加しておらず, さらに代謝物であるNM含量にも変化は観察されていない. SYに比べHinute-AMには複数の異なる配列のTyr含有ペプチドが含まれることから, それらによる輸送・代謝動態の多様性により脳への効率的かつ持続的な遊離Tyr供給を介してノルアドレナリン, MHPG, NMの含量増加が惹起されたものと推定している (Fig. 3).

我々は以前Hinute-AMの経口摂取によって, 脳内興奮性神経伝達に中心的な役割を担うGluや神経保護作用を持つ分岐鎖アミノ酸の増加を見出した^{2,3)}. さらに本研究により, ノルアドレナリン生合成・代謝の亢進作用は明らかにした. これらの結果は, 大豆ペプチドの作用は脳の神経伝達物質レベルにおよび得るもので

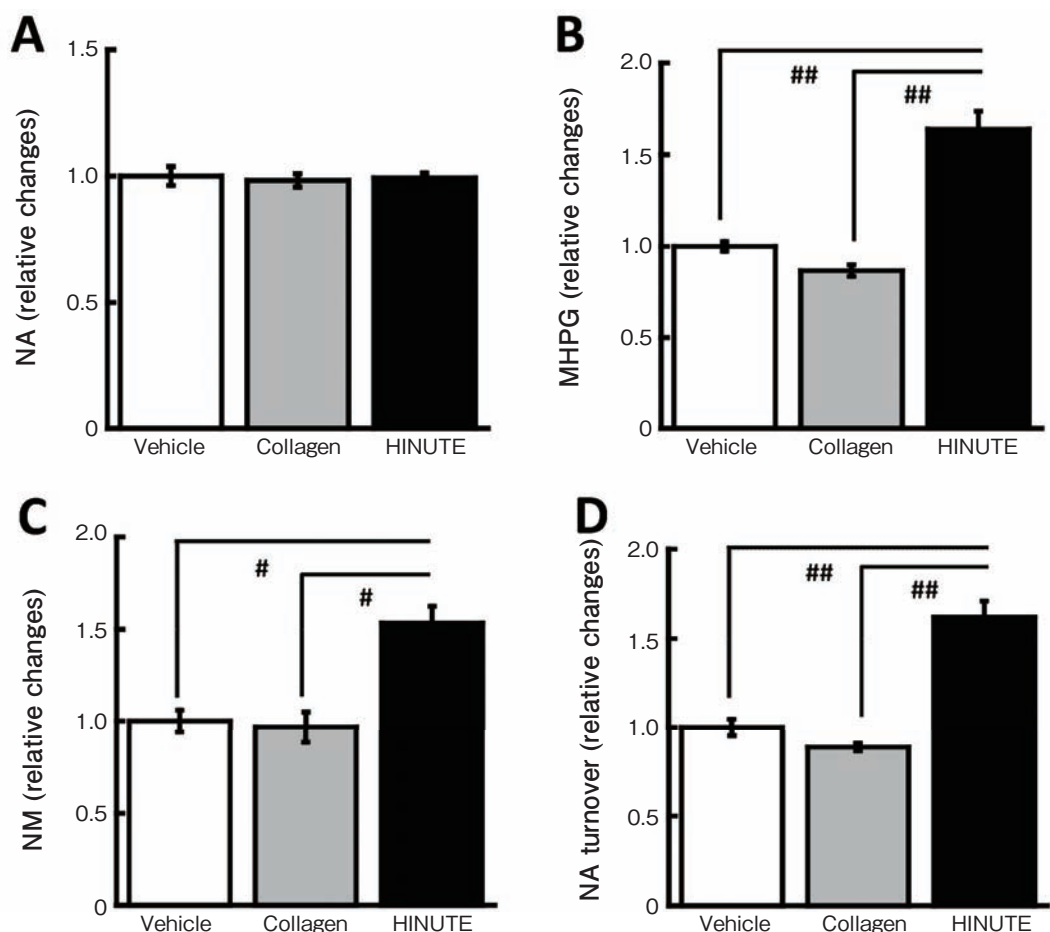


Fig. 1. Effect of peptide administration on noradrenaline and its metabolite contents in the cerebral cortex. Noradrenaline (A), MHPG (B), NM (C), and noradrenaline turnover (D) in the cerebral cortex were determined 30 after oral administration. Statistical significance: # $p<0.001$, ## $p<0.0001$ (Tukey HSD test). Abbreviations (Vehicle: saline administered group, Collagen: FCP-AS-L administered group, Hinate: Hinate-AM administered group).

あり、経口摂取が中枢神経系の神経機能促進または機能低下を予防・遅延に貢献できる可能性を示す。脳幹青斑核ノルアドレナリン神経細胞の投射先は新皮質、終脳基底部、視床、扁桃核、脳室周囲核、視床下部、小脳、脊髄までの中枢神経系のほぼ全体に渡る¹⁰⁾。また、青斑核ノルアドレナリン神経細胞は前頭前野や扁桃核などから投射を受けて活動が制御されている。ノルアドレナリンは中枢でシナプス後膜および終末部前膜に局在するアドレナリン ($\alpha 1, 2$) 受容体にリガンドとして認識され、興奮および抑制の両面から極めて多様な神経伝達修飾作用を担い、覚醒、感覚情報処理修飾、長期記憶形成の促進、記憶の想起など多岐に渡る重要な脳機能へ関与している¹⁰⁾。また、抗うつ薬には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、ノルアドレナリンの量的減少またはその神経伝達機能の低下が、うつ病の病因の一つと考えられている。さらにノルアドレナリンは脳内炎症反応の抑制に寄与しており、青斑核ノルアドレナリン神経細胞の脱落は β アミロイドペプチド沈着の増加に至る¹¹⁾。また、マウス個体レベルでの遺伝子操作によるノルアドレナリン合成欠損は海馬での空間記憶や可塑性の障害を惹起する¹²⁾。これらのノルアドレナリンに関する知見は、高次脳機能に維持や中枢神経疾患の予防にノルアドレナリン神経ネットワークの活動が不可欠であることを示している。

本研究ではHinate-AMの中枢ノルアドレナリン合成・代謝促進作用を明らかにした。しかし今後、この

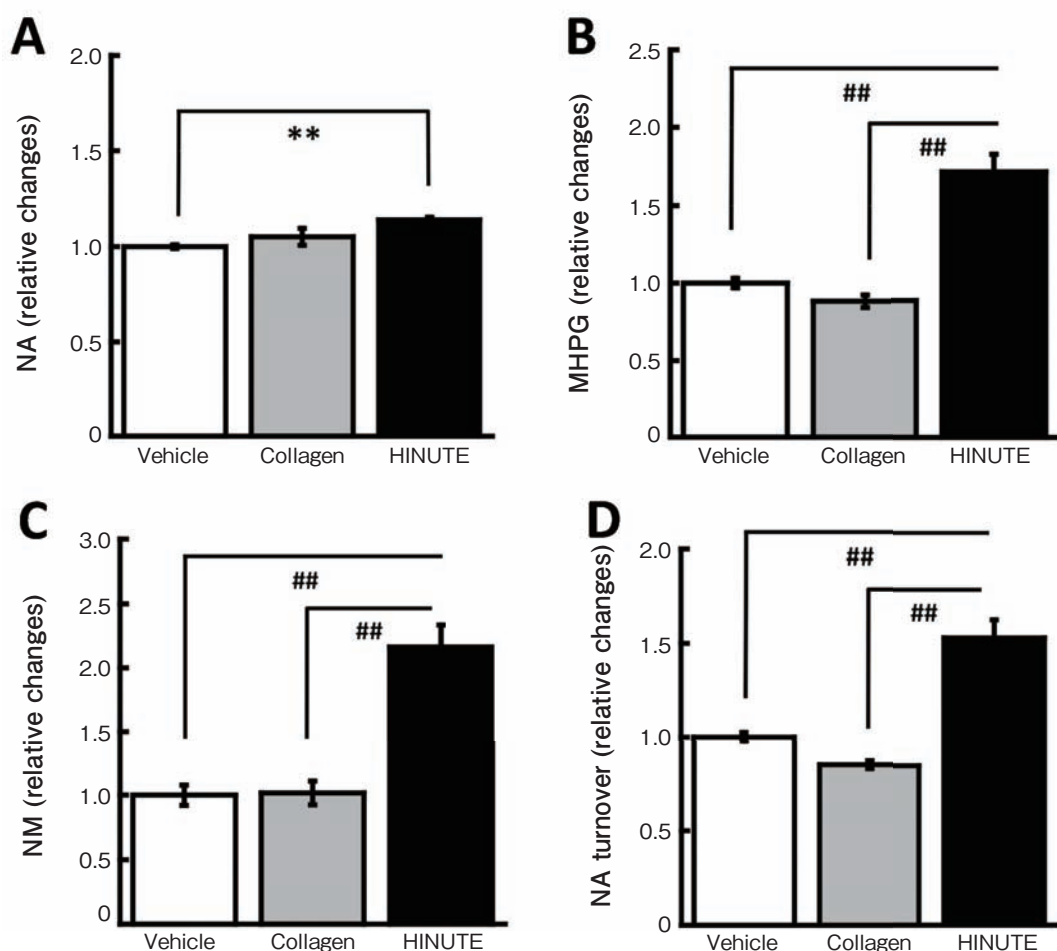


Fig. 2. Effect of peptide administration on noradrenaline and its metabolite contents in the brainstem. Noradrenaline (A), MHPG (B), NM (C) and noradrenaline turnover (D) in the cerebral cortex were determined 30 after oral administration. Statistical significance: ** $p < 0.01$, ## $p < 0.0001$ (Tukey HSD test). Abbreviations (Vehicle: saline administered group, Collagen: FCP-AS-L administered group, HINUTE: Hinate-AM administered group).

機能性を生かしてヒトの長寿・健康増進に資する食品素材としての応用にはまだ課題が残る。まず、マウスでの経口投与条件はHinate-AM投与量（8.7 g/kg body weight）に相当）は1食の大豆摂取量としては極めて高濃度である。そのため、ノルアドレナリン代謝亢進作用を示す下限投与量の設定が求められる。さらに、今回の実験は急性投与であり、長期間の継続的摂取がノルアドレナリン、さらにはドーパミン生合成と代謝に及ぼす作用は不明のままである。今後これらの課題を追求し、摂取条件の最適化が果たされることで、大豆ペプチドのノルアドレナリン神経伝達機能の維持・増強作用を生かした機能性食品・サプリメントの開発が期待される。

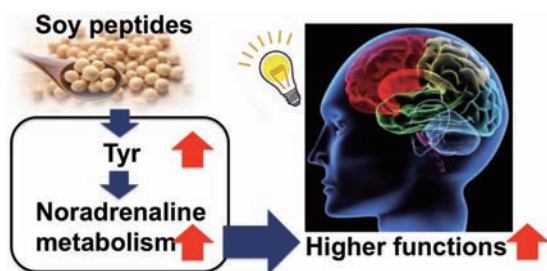


Fig. 3. Schematic diagram showing effect of soy peptide intake on noradrenaline synthesis and metabolism in the brain.

要 約

大豆ペプチド標品Hminute-AMを、マウスに経口強制投与し、大脳皮質と脳幹のカテコールアミン合成・代謝への影響を検討した。その結果、両脳内領域においてノルアドレナリン代謝物の増加および代謝回転の亢進を見いだした。脳幹でのノルアドレナリン含量の増加を確認した。脳では脳幹の青斑核に分布するノルアドレナリン作動性神経細胞によってのみ合成される。すなわち、Hminute-AMの経口摂取は同細胞でのノルアドレナリン生合成を促進し、さらに投与先での代謝を亢進させる作用を有すると考えられた。ノルアドレナリン代謝の亢進は、同神経ネットワーク活動の賦活を反映している。本研究課題の遂行により、大豆ペプチドの摂取によって、脳内ノルアドレナリン生合成および代謝の亢進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。

文 献

- 1) Ozawa M, Ninomiya T, Ohara T, Doi Y, Uchida K, Shirota T, Yonemoto K, Kitazono T and Kiyohara Y (2013): Dietary patterns and risk of dementia in an elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Clin Nutr*, **97**, 1076-1082.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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) 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.
- 7) Esaki K, Ohmori T, Maebuchi M, Nakamori T, Ohshima T and Furuya S (2013): Increased tyrosine in the brain and serum of mice by orally administering dipeptide SY. *Biosci Biotech Biochem*, **77**, 847-849.
- 8) 古屋茂樹, 江崎加代子 (2012) : 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。大豆たん白質研究, **15**, 79-84.
- 9) Ichinose T, Moriyasu K, Nakahata A, Tanaka M, Matsui T and Furuya S (2015): Orally administered dipeptide Ser-Tyr efficiently stimulates noradrenergic turnover in the mouse brain. *Biosci Biotech Biochem*, **79**, 1542-1547.
- 10) Sara SJ (2009): The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*, **27**, 694-718.
- 11) Heneka MT, Nadrigny F, Regen T, Martinez-Hernandez A, Dumitrescu-Ozimek L, Terwel D, Jandanhazi-Kurutz D, Walter J, Kirchhoff F, Hanisch UK and Kummer MP (2010): Locus coeruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 6058-6063.
- 12) Hammerschmidt T, Kummer MP, Terwel D, Martinez A, Gorji A, Pape HC, Rommelfanger KS, Schroeder JP, Stoll M, Schultze J, Weinshenker D and Heneka MT (2013): Selective loss of noradrenaline exacerbates early cognitive dysfunction and synaptic deficits in APP/PS1 mice. *Biol Psychiatry*, **73**, 454-463.