

消化管内分泌細胞における食品ペプチド認識機構の解明

学位論文内容の要旨

胃腸管上皮に散在している消化管内分泌細胞は、管腔内に存在する栄養素の化学的情報を感知し、消化管ホルモンを分泌することで、消化・吸収の機能を統合的に調節している。消化管ホルモンの一種である Cholecystokinin (CCK) は、上部消化管に散在する CCK 産生細胞 (I cell) より分泌され、食欲抑制、胃排出遅延、膵酵素分泌亢進、胆のう収縮などの生理作用を示す。食品たんぱく質由来のペプチドは、CCK 分泌の刺激因子の一つとして知られているが、CCK 産生細胞における認識機構については解明されていない。CCK 産生細胞における食品成分の認識機構を明らかにすることは、経口摂取した食品素材や薬剤により CCK の分泌を促し、これを介した食欲コントロールを可能とすることが期待される。本研究では、食品ペプチドを認識する受容体の特定を目的とし、また、新規食品素材による CCK 分泌を介した食欲抑制の有用性をラットにおいて評価した。

1. CCK 産生細胞における食品ペプチド受容体としてのカルシウム感知受容体の役割

当研究室では、大豆 β コングリシニンに内在する $\beta 51-63$ ペプチド (VRIRLLQRFNKR) が、ラットにおいて CCK 分泌を介して食欲を抑制することを見いだした。しかしながら、 $\beta 51-63$ ペプチドが CCK 産生細胞に直接作用するかどうかを含め、その受容体については明らかにされていなかった。本研究では、アミノ酸や塩基性ポリペプチドを認識するカルシウム感知受容体 {calcium-sensing receptor (CaSR)} が、CCK 産生細胞において $\beta 51-63$ ペプチドを認識して CCK 分泌を誘導する受容体として機能するかどうかを、培養細胞を用いて検討した。

マウス小腸由来の CCK 産生細胞株 STC-1 において、 $\beta 51-63$ ペプチドが用量依存的に CCK 分泌、細胞内 Ca^{2+} シグナルを誘導したことから、 $\beta 51-63$ ペプチドは CCK 産生細胞に直接作用することが明らかとなった。CaSR アンタゴニスト処理により $\beta 51-63$ ペプチド応答性の CCK 分泌および、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は減少した。これにより、CaSR が $\beta 51-63$ ペプチドを受容して CCK 分泌を誘導することが明らかとなった。また、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK 293 に CaSR を強制発現させると、暴露した $\beta 51-63$ ペプチドの用量依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことより、CaSR が $\beta 51-63$ ペプチドを認識することが確かめられた。

次に、CaSR が $\beta 51-63$ ペプチドだけでなく、その他の食品ペプチドの受容体として機能するかどうかを検討するため、様々な食品たんぱく質加水分解物 (卵アルブミン、肉、小豆、カゼイン、ジャガイモ、 β コングリシニン) を用いて、CaSR アンタゴニスト処理下での STC-1 細胞におけ

る CCK 分泌試験、および CaSR 強制発現 HEK 293 細胞における細胞内 Ca^{2+} 応答試験を行った。

各種加水分解物による CCK 分泌は、肉加水分解物を除き、CaSR アンタゴニスト処理により有意に減少した。CaSR 強制発現 HEK 293 細胞においては、全ての加水分解物により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。これらの結果から、CaSR が種々の食品ペプチドを認識し、CCK 分泌を誘導することが明らかとなった。上記試験において比較的活性の高かった、小豆および β コングリシニンの加水分解物について、ゲルろ過カラムによる分子量分画を行ったところ、 β コングリシニン加水分解物は、全ての画分で CaSR アンタゴニストにより CCK 分泌が抑制されたが、小豆加水分解物中の場合は、比較的低分子の画分による CCK 分泌が、CaSR アンタゴニスト処理によって有意に減少した。また、分子量分画により各種加水分解物の分子量 500 以下の画分を除いても、これらによる CCK 分泌は CaSR アンタゴニスト処理により減少した。これらの結果から、CCK 産生細胞において、CaSR は食品たんぱく質加水分解物に含まれる様々な大きさのペプチドを認識する受容体として機能することが示された。

2. ジャガイモ抽出物による CCK 分泌を介した食欲抑制作用の検討

食品タンパク質やトリプシンインヒビターは、小腸管腔内に存在するトリプシン感受性 CCK 放出刺激因子を、トリプシン消化から守ることで、間接的に CCK 分泌を誘導することが知られている。本研究では、トリプシン阻害タンパク質を含むジャガイモ抽出物が、CCK 分泌を介して食欲を抑制するかどうかを検討するため、ラットにジャガイモ抽出物を経口投与し、その後の摂餌量を測定した。また、STC-1 細胞を用いてジャガイモ抽出物の直接的な CCK 分泌促進能を評価した。

12 時間絶食させた SD 系雄性ラットにおいて、0.1 g のジャガイモ抽出物経口投与で 1, 3 時間後の摂餌量が有意に減少し、0.1 g の精製大豆トリプシンインヒビター (SBTI) 投与では、6 時間後まで有意に減少した。0.2-0.4 g のジャガイモ抽出物投与では、用量依存的に摂餌量を減少させ、その効果は 6 時間後まで持続した。ジャガイモ抽出物のトリプシン阻害活性は、SBTI に比べ約 20 倍低かったが、SBTI と同程度の食欲抑制作用を示したことから、トリプシン阻害以外の寄与が考えられた。STC-1 細胞を用いて、直接的な CCK 分泌作用を検討したところ、ジャガイモ抽出物は用量依存的に CCK 分泌を誘導したが、SBTI にはその作用は見られなかった。消化酵素処理 (ペプシン、パンクレアチン) により、ジャガイモ抽出物の CCK 分泌活性は減少せず、一部の処理では CCK 分泌活性が増強された。これらの結果から、ジャガイモ抽出物は、CCK 産生細胞に直接作用することで CCK 分泌を促進し、食欲を抑制することが示唆された。

以上より、①消化管内分泌細胞において、食品ペプチドの受容体として CaSR が機能すること、②ジャガイモ抽出物が直接的に CCK 産生細胞に作用して CCK 分泌を促進し、食欲を抑制すること、が明らかとなった。本研究は、培養細胞を用いた食品ペプチド受容体の特定から、ラットにおける CCK 分泌を介した食欲抑制作用までを網羅しており、消化管内分泌細胞における食品ペプチド認識機構の一端や、それらを応用した食品素材の有用性を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	原	博
副 査	教 授	浅 野 行 藏	
副 査	准教授	石 塚	敏
副 査	助 教	比 良	徹

学 位 論 文 題 名

消化管内分泌細胞における食品ペプチド認識機構の解明

本論文は、和文 100 頁、図 23、表 12、6 章からなり、参考論文 4 編が添えられている。

胃腸管上皮に散在している消化管内分泌細胞は、管腔内に存在する栄養素の化学的情報を感知し、消化管ホルモンを分泌することで、消化・吸収の機能を統合的に調節している。消化管ホルモンの一種である Cholecystokinin (CCK) は、上部消化管に散在する CCK 産生細胞 (I cell) より分泌され、食欲抑制、胃排出遅延、膵酵素分泌亢進、胆のう収縮などの生理作用を示す。食品たんぱく質由来のペプチドは、CCK 分泌の刺激因子の一つとして知られているが、CCK 産生細胞における認識機構については解明されていない。CCK 産生細胞における食品成分の認識機構を明らかにすることは、経口摂取した食品素材や薬剤により CCK の分泌を促し、これを介した食欲コントロールを可能とすることが期待される。本研究では、食品ペプチドを認識する受容体の特定を目的とし、また、新規食品素材による CCK 分泌を介した食欲抑制の有用性をラットにおいて評価した。

1. CCK 産生細胞における食品ペプチド受容体としてのカルシウム感知受容体の役割

当研究室では、大豆 β コングリシニンに内在する $\beta 51-63$ ペプチド (VRIRLLQRFNKRS) が、ラットにおいて CCK 分泌を介して食欲を抑制することを見いだした。しかしながら、 $\beta 51-63$ ペプチドが CCK 産生細胞に直接作用するかどうかを含め、その受容体については明らかにされていなかった。本研究では、アミノ酸や塩基性ポリペプチドを認識するカルシウム感知受容体 {calcium-sensing receptor (CaSR)} が、CCK 産生細胞において $\beta 51-63$ ペプチドを認識して CCK 分泌を誘導する受容体として機能するかどうかを、培養細胞を用いて検討した。

マウス小腸由来の CCK 産生細胞株 STC-1 において、 $\beta 51-63$ ペプチドが用量依存的に CCK 分泌、細胞内 Ca^{2+} シグナルを誘導したことから、 $\beta 51-63$ ペプチドは CCK 産生細胞に直接作用することが明らかとなった。CaSR アンタゴニスト処理により $\beta 51-63$ ペプチド応答性の CCK 分泌および、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は減少した。これにより、CaSR が $\beta 51-63$ ペプチドを受容して CCK 分泌を誘導することが明らかとなった。また、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK 293 に CaSR を強制発現させると、暴露した $\beta 51-63$ ペプチドの用量依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことより、CaSR が $\beta 51-63$ ペプチドを認識することが確かめられた。

次に、CaSR が $\beta 51-63$ ペプチドだけでなく、その他の食品ペプチドの受容体として機能するかどうかを検討するため、様々な食品たんぱく質加水分解物 (卵アルブミン、肉、小豆、カゼイン、ジャガイモ、

β コングリシニン) を用いて、CaSR アンタゴニスト処理下での STC-1 細胞における CCK 分泌試験、および CaSR 強制発現 HEK 293 細胞における細胞内 Ca^{2+} 応答試験を行った。

各種加水分解物による CCK 分泌は、肉加水分解物を除き、CaSR アンタゴニスト処理により有意に減少した。CaSR 強制発現 HEK 293 細胞においては、全ての加水分解物により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。これらの結果から、CaSR が種々の食品ペプチドを認識し、CCK 分泌を誘導することが明らかとなった。上記試験において比較的活性の高かった、小豆および β コングリシニンの加水分解物について、ゲルろ過カラムによる分子量分画を行ったところ、β コングリシニン加水分解物は、全ての画分で CaSR アンタゴニストにより CCK 分泌が抑制されたが、小豆加水分解物中の場合は、比較的低分子の画分による CCK 分泌が、CaSR アンタゴニスト処理によって有意に減少した。また、分子量分画により各種加水分解物の分子量 500 以下の画分を除いても、これらによる CCK 分泌は CaSR アンタゴニスト処理により減少した。これらの結果から、CCK 産生細胞において、CaSR は食品たんぱく質加水分解物に含まれる様々な大きさのペプチドを認識する受容体として機能することが示された。

2. ジャガイモ抽出物による CCK 分泌を介した食欲抑制作用の検討

食品タンパク質やトリプシンインヒビターは、小腸管腔内に存在するトリプシン感受性 CCK 放出刺激因子を、トリプシン消化から守ることで、間接的に CCK 分泌を誘導することが知られている。本研究では、トリプシン阻害タンパク質を含むジャガイモ抽出物が、CCK 分泌を介して食欲を抑制するかどうかを検討するため、ラットにジャガイモ抽出物を経口投与し、その後の摂餌量を測定した。また、STC-1 細胞を用いてジャガイモ抽出物の直接的な CCK 分泌促進能を評価した。

12 時間絶食させた SD 系雄性ラットにおいて、0.1 g のジャガイモ抽出物経口投与で 1, 3 時間後の摂餌量が有意に減少し、0.1 g の精製大豆トリプシンインヒビター (SBTI) 投与では、6 時間後まで有意に減少した。0.2-0.4 g のジャガイモ抽出物投与では、用量依存的に摂餌量を減少させ、その効果は 6 時間後まで持続した。ジャガイモ抽出物のトリプシン阻害活性は、SBTI に比べ約 20 倍低かったが、SBTI と同程度の食欲抑制作用を示したことから、トリプシン阻害以外の寄与が考えられた。STC-1 細胞を用いて、直接的な CCK 分泌作用を検討したところ、ジャガイモ抽出物は用量依存的に CCK 分泌を誘導したが、SBTI にはその作用は見られなかった。消化酵素処理 (ペプシン、パンクレアチン) により、ジャガイモ抽出物の CCK 分泌活性は減少せず、一部の処理では CCK 分泌活性が増強された。これらの結果から、ジャガイモ抽出物は、CCK 産生細胞に直接作用することで CCK 分泌を促進し、食欲を抑制することが示唆された。

以上より、①消化管内分泌細胞において、食品ペプチドの受容体として CaSR が機能すること、②ジャガイモ抽出物が直接的に CCK 産生細胞に作用して CCK 分泌を促進し、食欲を抑制すること、が明らかとなった。本研究は、培養細胞を用いた食品ペプチド受容体の特定から、ラットにおける CCK 分泌を介した食欲抑制作用までを網羅しており、消化管内分泌細胞における食品ペプチド認識機構の一端や、それらを応用した食品素材の有用性を明らかにした。

よって、審査員一同は、中島 進吾が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。