米由来タンパク消化物による睡眠障害改善への期待

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	畑中,唯史
発行元	日本醸造協会
巻/号	111巻7号
巻号補足	
掲載ページ	p. 431-436
発行年月	2016年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

米由来タンパク消化物による睡眠障害改善への期待

睡眠障害は脳血管疾患，鬱病，全死亡に対するリスクの１つとされ，臨床的重要性が非常に高い。そればかりでなく，寝不足による生産性の低下が大きな経済損失をももたらすとの報告もある。海外と比べ，日本人は平均睡眠時間が顕著に短いばかりでなく，睡眠障害を抱える人の多数の存在が明らかになっているが，現在のところ，その対処が遅れている。筆者らは，日本人が古くから主食とし，安全・安心に摂取できる米に着目して，米由来タンパク消化物の機能性解明に取り組んでいる。その一環として，睡眠障害改善と関連があるセロトニン-N-アセチルトランスフェレース活性に着目した解析を行った。この結果，米由来タンパク消化物がこれを活性化することを明らかにし，予想される機構を提示した上，睡眠障害改善につながる可能性を示した。

畑　中　唯　史

1. はじめに

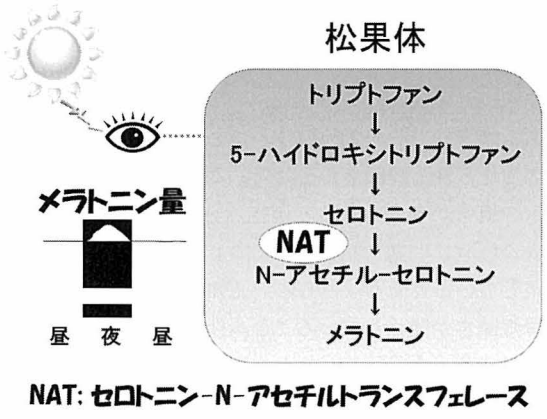
米は古くから日本人が主食としてきた食材であり，安全・安心に摂取できる代表的なタンパク源である。著者らは，従来から米由来タンパク消化物の機能性研究に取り組み，Ⅱ型糖尿病の要因である，血中酵素であるジペプジルペプチダーゼIVの阻害効果について研究し，その活性因子がIle-Pro，Val-Proなどプロリンを含むジペプチドであることを明らかにしてきた[1,2]。今回は，米由来タンパク消化物の新たな機能性として，睡眠障害の改善機能の可能性について，紹介したいと思う。

睡眠は，人が生存する上で衣食住とともに重要な課題である。不眠に悩んでいる現代人は多く，鬱病をはじめとする自律神経性の疾患や，睡眠不足に起因するあらゆる疾患の原因となっている。2006年に行われた内山真氏（日本大学・医学部教授）らの試算では，睡眠不足や不眠症による日本の経済損失は，年間で３兆５千億円にのぼるとされ，その多くが寝不足による生産性の低下が原因である。寝不足の原因は，不規則な生活様式を強いられることで，睡眠異常等の概日リズム障害や，その要因のひとつとして考えられる，脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。現在，日本人の４～５人に１人が睡眠に問題を抱え，９人に１人が睡眠導入薬を常用していると云う。さらに，認知症やうつ病などとも睡眠障害が関係していることも明らかになってきた[3]。海外では，合成したメラトニンを食品として直接的に摂取している事例もある。しかしながら，日本国内では，安全性が担保出来ないことから，合成メラトニンは食品としては利用されず，一部不眠症治療薬としてのみ販売されている。

メラトニンは，血中より供給されるL-トリプトファンを前駆物質として，トリプトファンヒドロキシラーゼと芳香族-L-アミノ酸デカルボキシラーゼの２つの酵素によりセロトニンに変換された後，セロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）とヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにより合成される，脳内の松果体で合成される睡眠ホルモンである。これらの酵素のうちNATが最もよく時間情報に応答し，その活性は強いリズム性を示す。つまり，NAT活性の変動とメラトニンの合成量はほぼ対応し

Expectation for Improvement of Sleep Disorder by Using Rice-derived Protein Hydrolysate
Tadashi HATANAKA (*Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry, and Fesheries, Research Institute for Biological Schences (RIBS), Okayama*)

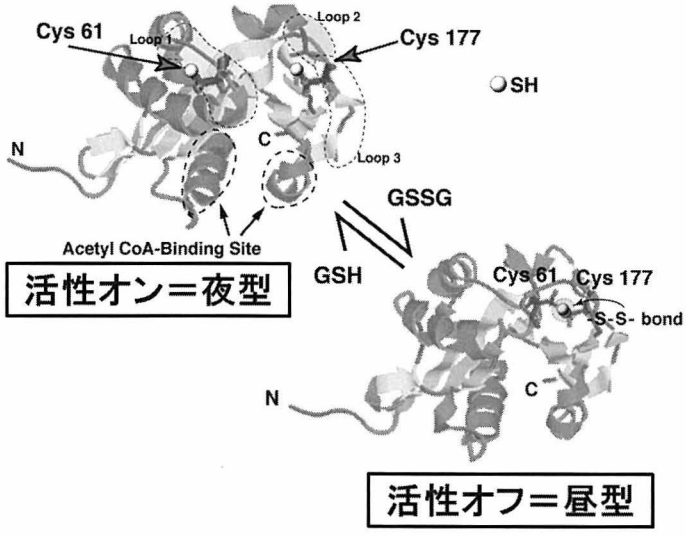
ており，NATはメラトニン合成の律速酵素である（第1図）。NATは，アセチルCoAとセロトニンとを基質とするが，その触媒反応は，アセチルCoAがNATに結合してできる疎水性ポケットの形成が重要とされてきた。共同研究者の坪井誠二氏（就実大学・薬学部教授）と著者らは，このメカニズムに加え，NATのふたつのシステイン残基の間で形成される分子内SS結合が，活性に重要な働きをしていることを明らかにした[4]。このふたつのシステイン残基の間で，-SH/-S-Sの交換反応が起こり，還元型（SH型）で，100%の活性（＝夜型）を示す一方，酸化型（SS型）では，活性がゼロ（＝昼型）になる（第2図）。NATは，遺伝子発現やNATタンパクの分解機構等，様々な制御を受けているが，最もレスポンスの早いメカニズムは，レドックス（＝酸化還元反応）制御によるオン・オフである。さらに，このオン・オフは，酸化ストレスを与えて，酸化型グルタチオン（GSSG）を増加させてやるとNATは酸化型に変換され活性はなくなるが，細胞内環境を還元状態にし，還元型グルタチオン（GSH）を増やしてやるとNATは活性型になる。つまり，NATの活性は，細胞内のグルタチオン量に依存していることも明らかとなっている。



第1図　睡眠ホルモン メラトニンの生合成

一方，坪井教授らは，乳酸菌による発酵乳ホエーをラットに与えることにより，内因性メラトニン分泌リズムの位相調整又は振幅増強作用があることをみいだしている[5,6]。この作用は，発酵乳ホエー成分が，細胞内グルタチオンレベルを上昇させ，メラトニン合成の律速酵素であるNAT活性を増強させていることによっていると考えている。さらに，この発酵乳ホエーの快眠誘導効果は，杉田義郎氏（大阪大学大学院・医学系研究科教授）らによって，健康な高齢者30名を対象とした，ダブルブラインド・クロスオーバー試験によって，寝覚めの回数減少や，寝とぼけ行動・足のむずむず感の減少が確認されている。

著者らは，上記の発酵性ホエーの情報を基に，NAT発現COS7細胞（COS/NAT細胞）を用いて，様々なバイオマス由来成分について，NATを活性化



第2図　セロトニンN-アセチルトランスフェレース(NAT)の立体構造

する成分の探索を行い，快眠を導くことが可能で安心・安全な材料を見出し，機能性食材の開発につながる研究を開始した。

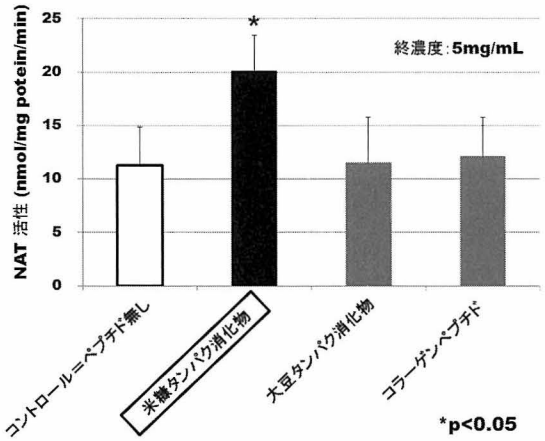
2. NAT 活性化バイオマスの探索

著者らは，経済産業省・地域イノベーション創出研究開発事業（平成 22 − 23 年度）および独立行政法人科学技術振興機構・研究成果展開事業　研究成果最適支援プログラム（A-STEP 探索タイプ，平成 22 年度）の研究の一環として，米糠ペプチドの機能性探索に取り組んできた。その過程で，前述したⅡ型糖尿病予防効果の可能性を見出したのだが，今回の探索についても，同じく米糠タンパクを，麹カビ由来酵素（アマノエンザイム社製ウマミザイム G）消化したものを用いることとした。対象サンプルとして，市販大豆タンパク（不二精油社製）を同じくウマミザイム G で消化したもの，あらかじめ酵素で消化された形の市販コラーゲンペプチド（ニッピ社製）を用いた。これらを COS/NAT 細胞の培地に添加し，NAT 活性に与える影響を検討した。その結果，米糠タンパク消化物のみに，NAT 活性化能があることを見出した（第 3 図）。前述したように，NAT は，第 1 図に示す Cys61-Cys177 間の分子内 SS 結合が形成されているとオフであり，それを開裂させ，活性型に導く因子は，細胞内に存在する還元型グルタチオンである。そこで，次に細胞内グルタチオンへの影響を検討することとした。

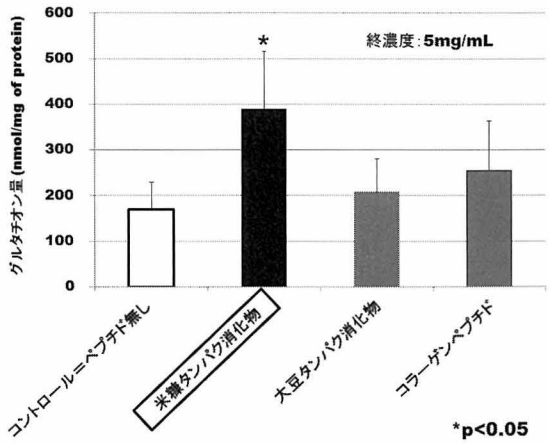
3. 細胞内グルタチオンへの影響

細胞内に豊富に存在する天然の酸化・還元物質であるグルタチオンは，グルタミン酸，システイン，グリシンの 3 つのアミノ酸からなるトリペプチドであり，主に肝臓で生合成される。グルタチオンの生体内での役割は，細胞内で発生した活性酸素種や，過酸化物と反応してこれを還元し消去する抗酸化ストレスの役割と，グルタチオン抱合による薬物解毒の役割の二つである。

そこで，ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いて，グルタチオン量に対する影響を検討した。NAT 活性同様に，大豆タンパクのウマミザイム G 消化物，コラーゲンペプチドを対象として，米糠タンパクのウマミザイム G 消化物を用いた。その結果，NAT 活性と同様に，米糠タンパク消化物のみに，グルタチオン増強効果を認めた（第 4 図）。ここまでの結果から，米糠タンパク消化物は，細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることによって，NAT に存在する分子内 SS 結合を開裂させ，NAT を活性化していることが示唆された。グルタチオン生合成の律速段階は，グルタミン酸の γ 位にシステインを結合させる酵素（γ- グルタミルシステイン合成酵素＝γ-GCS）であることが知られており，次にこの酵素の遺伝子発現に対する影響を検討した。



第 3 図　各種ペプチドの NAT 活性に及ぼす影響

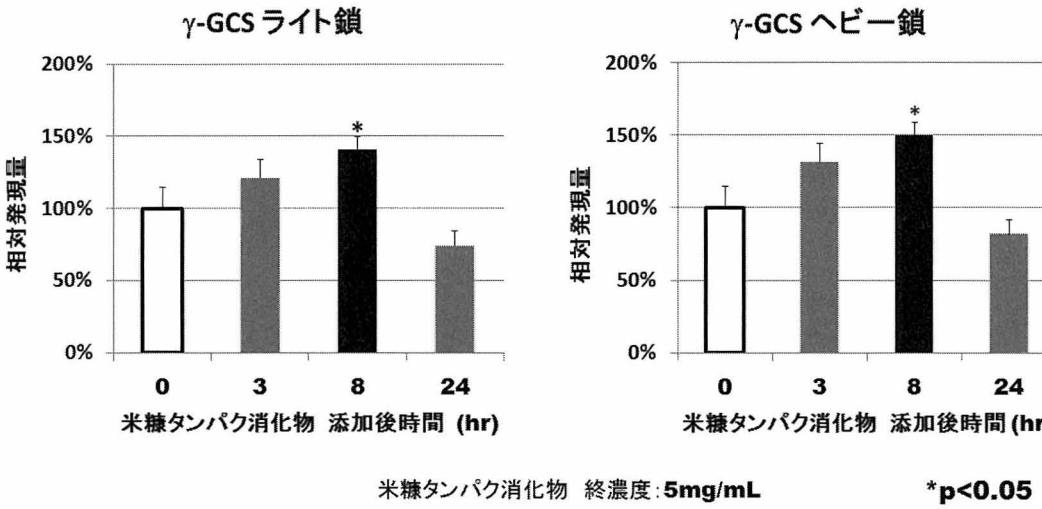


第 4 図　各種ペプチドの細胞内グルタチオン量に対する影響

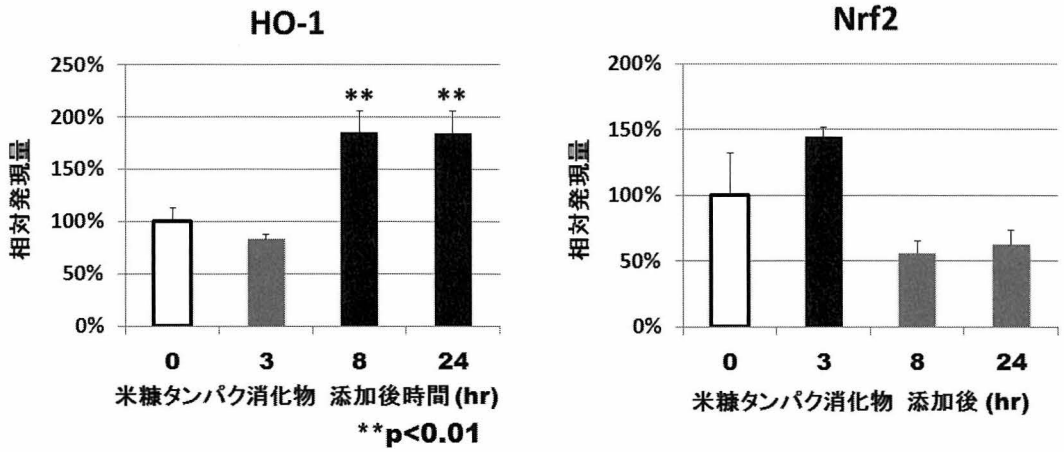
4. 米糠タンパク消化物の遺伝子発現への影響

前項と同じく，HepG2細胞の培地に，米糠タンパクのウマミザイムG消化物を添加し，リアルタイムPCRによって，γ-GCSの遺伝子発現の継時的な変動を追った（第5図）。γ-GCSは，ライト鎖，ヘビー鎖のヘテロダイマーからなる。示すように，どちらの遺伝子も，米糠タンパク消化物添加後8時間で，有意に発現量が上昇していることが示された。

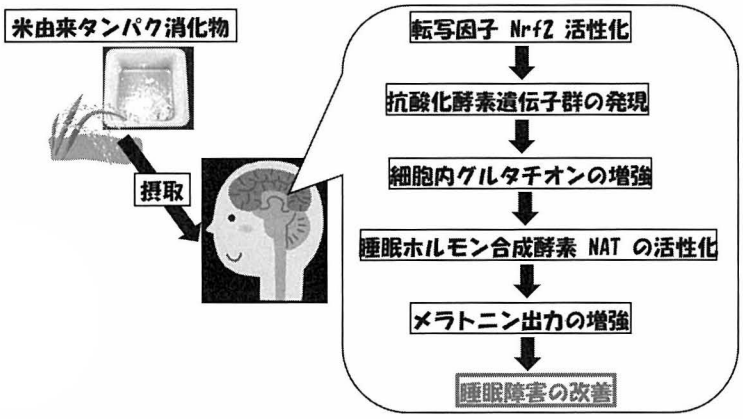
前述したようにグルタチオンの第一の役割は，抗酸化ストレスである。酸化ストレスに対して，細胞がすみやかに生体応答するための制御機構において，重要な機能を担っているのが，Keap1-Nrf2システムであり[7]，グルタチオン生合成の鍵酵素であるγ-GCSの発現は，このシステムによって支配されていることが明らかにされている。一方，ヘムオキシゲナーゼ－1（HO-1）は酸化ストレスを始めとする種々の急性ストレスにより誘導されることが知られており，転写因子Nrf2の標的遺伝子の1つでもある。非酸化ストレス下では，Nrf2はKeap1と名づけられた抑制性因子に



第5図　γ-グルタミルシステイン合成酵素(γ-GCS)遺伝子発現に対する影響



第6図　ヘムオキシゲナーゼ－1(HO-1)及び転写因子Nrf2遺伝子発現に対する影響



第7図　米由来タンパク消化物の睡眠障害改善メカニズム

より細胞質に留められ核移行が阻害されることで，遺伝子発現が抑制されている。細胞が，酸化ストレスにさらされると，Keap1 による Nrf2 抑制機構は解除され，核移行した Nrf2 が防御遺伝子の発現を誘導し，Keap1-Nrf2 は，ストレス応答型の転写制御システムを形成している。そこで，米糠タンパク消化物の HO-1，Nrf2 の遺伝子発現に対する影響についても，同様に調べてみた（第6図）。示すように，やはり，米糠タンパク消化物を培地に添加することによって，HO-1，Nrf2 の遺伝子発現が上昇することが確認された。

以上の結果から，米糠タンパク消化物は，Nrf2 による転写を発動させ，グルタチオン生合成を活性化すると云うメカニズム（第7図）が見えてきたことになる。

5. 今後の展望

今回は，米糠タンパク消化物について，これまでに得た結果を紹介した。米糠タンパク消化物に含まれる NAT 活性化分子あるいはグルタチオン増強因子について，精製を試みたのだが，残念ながら現在のところ同定には至っていない。分離精製工程を経るに従い，活性が低下する傾向があるため，複数の因子が協同して，機能を発揮している可能性が示唆される結果にとどまっている。加えて，米糠タンパクの製造コストも高価なものになることも，供給先の試算から明らかとなってきた。

平成 27 年度から，食品の新たな機能性表示制度が始まった。その中で重要な項目は，安全性の確保，科学的根拠，機能性表示，対象成分の 4 項目である。対象成分とは，作用機序が考察され，直接的あるいは間接的に定量可能な成分と定義されている。つまり活性分子の同定が，必須項目となる。そこで，現在は安価に入手可能な白米由来タンパクの消化物に材料を変更し，研究を進めており，米糠タンパク消化物と同様な機能を有することを確認できている。さらに機能性分子の単離・精製についても成功し，現在特許出願の作業中である。知的財産の確保を行った後，学会・論文等で公表する予定にしている。今回，紹介記事の表題を，米糠タンパク消化物とせず，米由来タンパク消化物としたのは，これらの経緯からである。

米山智子氏（金沢医科大学）らは 1,848 人の日本人の男女のデータを分析，睡眠の質をはかると共に，健康に関する生活習慣（食生活や喫煙，運動習慣など）についての聞き取り調査を行った結果，麺類・パン製品と比較し，米飯は睡眠の質を高める効果を認めた[8]。米飯は，グリセミック指数が高く，脳に運ばれるトリプトファンの量が増えることにより，トリプトファンから睡眠ホルモンであるメラトニンが作られ，良質な睡眠につながるという。これに加えて，白米タンパク消化物が，グルタチオン増強および NAT の活性化機能を発揮していることも充分考えられることである。

これまでの機能性食品は，高血圧，糖尿病，痛風といった，いわゆる生活習慣病予防に関するものばかりであったが，次世代型の機能性食品は，脳機能活性化・身体ロコモーション機能維持などがターゲットに

なると考えられ，日常の食事から，快眠へと導くことが可能になれば，非常に魅力的だと考えている。本内容の研究は緒に就いたばかりであるが，ヒト介入試験による実証などを経て，将来的には米由来タンパク消化物による快眠誘導機能性食品の開発へとつながることを夢見る次第である。

〈岡山県農林水産総合センター生物科学研究所〉

謝　辞

今回用いたデータは，すべて共同研究先の就実大学・薬学部・生化学教室のグループから提供いただいたものである。主催されている坪井教授および研究室のスタッフの皆様に厚く感謝いたします。

また，材料に用いた米糠タンパクは，同じく共同研究先の株式会社サタケから提供いただいたものであり，この場をお借りして，感謝申し上げます。

参考文献

1) Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M., and Mukaihara, M., : Food Chem., **134**, 797-802 (2012)
2) Hatanaka, T., Uraji, M., Fujita, A., and Kawakami, K., : Int. J. Pep. Res. Ther., **21**, 479-485 (2015)
3) 裏出良博：化学と生物，**51** (11)，574-762 (2013)
4) Tsuboi, S., Kotani, Y., Ogawa, K., Hatanaka, T., Yatsushiro, S., Otsuka, M., and Moriyama, Y., : J. Biol. Chem., **277** (46), 44229-44235 (2002)
5) 坪井誠二，森山芳則：化学と生物，**43** (4)，251-256 (2005)
6) 特許 WO2005/094849
7) Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M., : Mol. Cell Biol., **26** (1), 221-229 (2006)
8) Yoneyama, S., Sakurai, M., Nakamura, K., Morikawa, Y., Miura, K., Nakashima, M., Yoshita, K., Ishizaki, M., Kido, T., Naruse, Y., Nogawa, K., Suwazono, Y., Sasaki, S., and Nakagawa, H. : PLoS One., **9** (8), e105198 (2014)