



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	トウモロコシタンパク質由来 GLP-1 分泌誘導成分の同定および有効性に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	野口, 洋樹
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15752号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91917
Type	doctoral thesis
File Information	NOGUCHI_Hiroki_summary.pdf



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 野口 洋樹

学位論文題名

トウモロコシタンパク質由来 GLP-1 分泌誘導成分の同定および有効性に関する研究

現代では、健康寿命の向上を目指し、食環境や運動などの日常生活行動を中心に据え、疾病の予防や健康維持・増進に重点が置かれるようになってきた。食環境については、特定保健用食品や機能性表示食品など、食品の機能性に焦点を当てた製品が制度化されており、新規有効成分の探索と製品開発の重要性が高まっている。

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、食後の糖代謝調節に深く関与する消化管ホルモンの一種で、インスリンの分泌促進作用に加えて、降外作用（食欲調節、抗炎症、血管機能改善など）に寄与することが示されている。GLP-1 受容体作動薬などのインクレチン薬の使用は、糖尿病や肥満関連疾患の予防と治療に注目されているが、副作用のリスクがあるとともに糖尿病や肥満の予備軍への適用性においては制約もある。そのため、生体内の GLP-1 利用能を高めるための栄養学的アプローチが代替または補完的な解決策として考えられている。実験動物を用いた先行研究において、トウモロコシ由来タンパク質 (Zein) から調製した加水分解物 (ZeinH) が GLP-1 分泌を促進し、その後のインスリン分泌を促進することで食後高血糖を抑制することが明らかにされた。本研究では、その有効成分を同定し、さらに、臨床試験においてその有効性を検証した。

トウモロコシタンパク質加水分解物 (ZeinH) 由来の GLP-1 分泌誘導ペプチドの探索 (*in vitro*)

【背景・目的】

ZeinH は多数のペプチド断片を含む複雑な混合物であり、その作用本体は特定されていない。当試験では、ZeinH の活性ペプチドを特定することを目的とした。

【方法】

ZeinH のプロナーゼ処理前後での質量分析とペプチド同定を行い、処理前後で重複するペプチ

ド群を選抜した。ZeinH および合成した候補ペプチドの GLP-1 分泌活性は、マウス腸管由来内分泌細胞株 (GLUTag) を用いて、被験物添加後に分泌誘導された総 GLP-1 濃度を測定することにより評価した。

【結果と考察】

ZeinH のプロナーゼ処理前後で共通のペプチド 12 種類を ZeinH の活性成分候補として同定した。しかしながら、合成したペプチドの GLP-1 分泌活性はいずれも確認できなかった。今回の試験条件では、ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性において寄与度の高いペプチドを特定することができなかった。

トウモロコシタンパク質水抽出物 (ZeinS) の GLP-1 分泌誘導作用の検討 (*in vitro*・*in vivo*)

【背景・目的】

ZeinH の活性画分は、その調製方法に基づいて、Zein の水抽出物 (ZeinS) の活性画分と一部共通であると仮定できる。当試験では、ZeinS の GLP-1 分泌活性を *in vitro* 試験および *in vivo* 試験 (ラット) で評価することを目的とした。

【方法】

GLP-1 分泌活性は同様の *in vitro* 試験とラットを用いた *in vivo* 試験で評価した。動物試験では、8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用し、体重を基に無作為抽出法により、対照群 (Control)、陽性対照群 (ZeinH) および試験群 (ZeinS) の 3 群に割り付けた。群分け後、16 時間絶食させたラットに対して、腹腔内糖負荷試験開始の 15 分前 (-15 分) に尾静脈より事前採血した後、蒸留水 (8 mL/kg body weight (BW))、陽性対照 (ZeinH: 2 g/kg BW) または被験物 (ZeinS: 0.4 g/kg BW) を経口投与した。その 15 分後 (0 分) に尾静脈より採血した後、グルコース溶液 (1 g/kg BW) を腹腔内投与した。グルコース投与後 15、30、60、90 および 120 分後に尾静脈より採血し、血中総 GLP-1 濃度と血糖値を測定した。

【結果と考察】

ZeinS による GLP-1 分泌誘導活性および血糖上昇抑制効果が確認された。これにより、ZeinS が ZeinH の活性画分として寄与する可能性が示された。

ZeinS の活性成分の特定 (*in vitro*)

【背景・目的】

前章では、ZeinHの活性画分としてZeinSが寄与する可能性を示した。

ZeinSには様々な可溶性化合物が含まれていると予想し、当試験では、ZeinSの活性成分を特定することを目的とした。

【方法】

ZeinSを逆相カラムを用いた固相抽出法とHPLC（逆相）により分画し、これらの画分のGLP-1分泌活性を同様の細胞試験で評価した。その後、活性が確認された画分については、LC-MS/MS分析による化合物同定と候補化合物の選抜を行い、選抜された化合物の活性を同様の細胞試験で評価した。

【結果と考察】

GLP-1分泌活性を示す画分を固相抽出およびHPLC分画により特定した。固相抽出で得られた2つの活性画分は、併用により分画前のZeinSと同程度の活性を示した。さらに、これらの活性画分の質量分析の結果に基づき、最終的にZeinSの活性画分中の代表的なアミノ酸を複数同定した。同定された化合物の活性評価の結果から、 γ -アミノ酪酸（GABA）は単独でGLP-1分泌活性を示し、フェニルアラニン（Phe）はGABAとの併用で相乗的なGLP-1分泌活性を示した。以上より、ZeinSの活性成分として、GABAとPheを単独および相乗活性を示す化合物として特定した。

ZeinSおよび活性成分のGLP-1分泌促進機構の検討（*in vitro*）

【背景・目的】

前章では、アミノ酸成分の組み合わせによって相乗的なGLP-1分泌応答が誘導されたことを示した。このようなアミノ酸の相乗効果はこれまでに報告されていない。

当試験では、ZeinSと同定した活性成分であるGABAとPheの併用によるGLP-1分泌誘導活性の作用メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

作用メカニズムを検討するために、まず細胞外の Ca^{2+} の関与を検討した。 Ca^{2+} を含まないHEPESバッファー（0.2 mM EGTA 添加）でZeinSと活性成分を溶解し、同様の細胞試験でGLP-1分泌誘導活性を評価した。次に、GABAの受容体として知られる $\text{GABA}_{A/B/C}$ 受容体およびPheの受容体として知られるカルシウム感知受容体（CaSR）に焦点を当て、それぞれの受容体阻害剤が存在する条件下でZeinSおよびGABAとPheの併用によるGLP-1分泌活性に対する影響を評価した。

【結果と考察】

Ca²⁺不含 HEPES バッファーを用いて細胞外の Ca²⁺の関与を検討した結果、各被験物による GLP-1 分泌誘導活性がほぼ消失した。また、各被験物の受容体阻害剤を用いた活性阻害試験の結果、ZeinS の GLP-1 分泌は、GABA_A 受容体および CaSR の阻害剤により抑制され、これら 2 剤の同時処理によってほぼ消失した。同様に、GABA と Phe の併用による GLP-1 分泌も GABA_A 受容体および CaSR の阻害剤により抑制された。これらの結果から、ZeinS の GLP-1 分泌活性には、GABA と Phe の両方が関与し、その作用は GABA_A 受容体および CaSR を介していることが明らかとなった。

ZeinS 由来活性成分の追加探索 (*in vitro*)

【背景・目的】

活性成分のヒトにおける有効性評価に際して、臨床試験では被験食品の安全性が重要となる。GABA については適切な摂取量に関する安全性情報が十分得られたが、Phe については不十分であった。そのため、Phe に代わるより安全性の高い活性成分の探索が必要と判断した。

リンゴ酸 (MA) はトウモロコシ穀粒中に含まれる代表的な有機酸として知られており、GABA と同様に適切な摂取量に関する安全性情報が十分に得られた成分である。また、予備検討において MA が実際に ZeinS 中に含まれる可能性も得られた。

当試験では、GABA との組み合わせで相乗的な GLP-1 分泌誘導活性を示す Phe に代わる化合物として、MA の有効性を確認することを目的とした。

【方法】

ZeinS に含まれる MA 濃度は市販アッセイキットを用いて定量分析した。MA 単独および GABA との併用処理における GLP-1 分泌誘導活性はマウス腸管由来内分泌細胞株 (STC-1) を用いて評価した。

【結果と考察】

定量分析によって MA が ZeinS に含まれることが確認された。次に、細胞試験によって MA の GLP-1 分泌誘導活性を評価した結果、単独では活性は認められなかったが、GABA との併用による相乗的な GLP-1 分泌活性が確認された。これにより、Phe に代わる化合物として MA を見出した。

GABA とリンゴ酸の単回同時摂取が健康成人の GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響の検討—無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験—

【背景と目的】

これまでに、GLP-1 分泌誘導作用を介して食後血糖上昇抑制を示す機能性食品成分として、zein の水抽出物 (ZeinS) に焦点を当て、その代表的な活性成分として GABA と MA を特定した。

当試験では、GABA と MA の単回同時摂取が健康成人における GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響を評価することを目的とした。

【方法】

健康成人を対象に無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験を実施した。被験者は、食事負荷前に GABA と MA あるいはプラセボ (クエン酸) を単回摂取した。食事負荷後 15、30、45、60、90、120 および 180 分後に採血を行い、血中 GLP-1 (総・活性型)、グルコース、インスリン濃度を測定した。

【結果と考察】

GABA と MA の摂取により、食後の血中 GLP-1 (総・活性型) 濃度および曲線下面積 (0-180 分) が有意に増加した。一方、血中グルコースとインスリン濃度については、GABA と MA の摂取による顕著な変動は認められなかった。

食事負荷前の GABA と MA の同時摂取は食後 GLP-1 分泌を増大させることから、内因性の GLP-1 利用能の亢進を介して糖尿病などの慢性疾患、肥満関連疾患、血管障害の予防や改善に役立つ可能性がある。

【結論】

本研究により、ZeinH の有効性に寄与する関与成分として GABA、Phe および MA を特定した。さらに、GABA と Phe、または MA を組み合わせることで相乗的な GLP-1 分泌増加の可能性も示唆された。GLP-1 の糖代謝調節作用や腸外作用に対する栄養学的アプローチは、糖尿病や肥満の予備軍や健康意識の高い人々において疾病予防や健康維持に寄与する可能性がある。