

<令和4年度助成>

## 消化管内分泌細胞における食品ペプチドセンシング

比良 徹

(北海道大学大学院 農学研究院)

### 背景

消化管内分泌細胞は、栄養素を認識して消化管ホルモンを分泌しており、グルコースや一部の脂肪酸、アミノ酸の作用メカニズムが明らかにされている<sup>1)</sup>。しかし、20種類のアミノ酸の重合体であるペプチドの作用メカニズムはごく一部しか解明されていない。我々は、種々の食品ペプチドがコレシストキニン (CCK) や Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) などの消化管ホルモン分泌を強く促進し、食欲や血糖上昇の抑制に寄与すること、ならびに一部の活性ペプ

チド、受容機構を明らかにした。また、アミノ酸混合物ではペプチドの作用を再現できないことから、消化によって生じたアミノ酸よりもペプチドとして作用するものと考えられる。

しかしながら、多様な構造 (アミノ酸配列、鎖長) を持つ食品ペプチドの、どのような構造が消化管ホルモン分泌促進に寄与するのかは、ほとんど分かっていない。これまでにアミノ酸配列が特定されたペプチドの数は20種程度に限られており、それらに明確な共通性は見られない (表1<sup>2,3)</sup>)。これまでにペプチドトランスポーターや一部のGPCRの関与が報告されているが、多様なペプチドを幅広く認識する受容機構があるのか、個々のペプチドの特異的構造を認識する多様な受容機構があるのかについても不明である。

表1 GLP-1分泌を促進するペプチド一覧 (Taguchi 2023より引用)

Peptide	Source
GGGG AAAA GWGG	Synthetic
Glycylsarcosine LGG GF	Synthetic
GL	Synthetic
TKAVEH ANVST KAAVT YGAE	Bovine hemoglobin
GPVRGPFPIIV	$\beta$ -Casein
PFL RVASMASEKM	Egg white protein
LKPT	Tilapia byproduct
RYLGYLE SRYPS	$\alpha$ 1-Casein $\kappa$ -Casein
LIVTQTM	$\beta$ -Lactoglobulin
VAWRNRCKGTD WRNRCKGTD WIRGCLR	Lysozyme

### 目的

本研究では、消化管内分泌細胞において、食品ペプチドのどのような構造が、どのように認識されるかを明らかにすることを目的とし、以下のような試験を実施した。

- ・食品ペプチドからの活性ペプチドの特定
- ・ジペプチドライブラリーからの活性ペプチドの特定
- ・活性ペプチドのデザインと作用検証
- ・作用メカニズム解明

## 食品ペプチドからの活性ペプチドの特定

食品タンパク質の中でも牛乳由来のホエイタンパク質が GLP-1 分泌促進作用を持つことがラット、ヒト試験において報告されている<sup>4,5)</sup>。ホエイタンパク質は $\alpha$ -ラクトアルブミン (ALA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン (BLG) を主成分とするが、GLP-1 分泌活性に寄与する構造 (ペプチド配列) は不明であり、これを特定することを目的とした。

GLP-1 産生細胞株として広く知られるマウス大腸由来 GLUTag 細胞を 48 ウェルプレートに、サブコンフルエントになるまで培養した。培地を取り除き、試験に用いる HEPES バッファーにてウェルを洗浄後、HEPES バッファーに溶解した試料に、GLUTag 細胞を 1 時間暴露した。上清中に分泌された GLP-1 濃度を ELISA により測定した。

分離乳清タンパク質 (WPI) による GLP-1 分泌促進作用が観察され、さらにその主成分である ALA よりも BLG も GLP-1 分泌を促進した。これらの結果より、GLP-1 産生細胞は、ペプチド、アミノ酸に限らず、そのポリマーであるタンパク質そのものにも応答することが示された。ALA よりも BLG の方がわ

ずかに高い作用を示したため、以後の試験では BLG を用いた。

BLG をトリプシン、キモトリプシンにて人工消化した BLGT、BLGC では、BLG と同程度の GLP-1 分泌活性が維持された一方で、両酵素で人工消化した BLGTC では、BLG よりも GLP-1 分泌活性が減弱した (図 1A)。このことから、それぞれの酵素で切断されない部分、かつ、両酵素を組み合わせで切断される箇所が活性に寄与することが示唆された。

BLGT を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と逆相カラムにて分画したところ (図 1B)、後半に流出した画分 (F5-7) に高い GLP-1 分泌活性が観察されたことから、比較的疎水性のペプチドに活性があることが示唆されたが、特定には至らなかった。

## ジペプチドライブラリーからの活性ペプチドの特定<sup>3)</sup>

20 種のアミノ酸の組み合わせにより 400 種類のジペプチドが存在する。そのうち 336 種類を網羅したジペプチドライブラリーに 3 種のジペプチドを加えた 339 種類のジペプチドの GLP-1 分泌活性を、

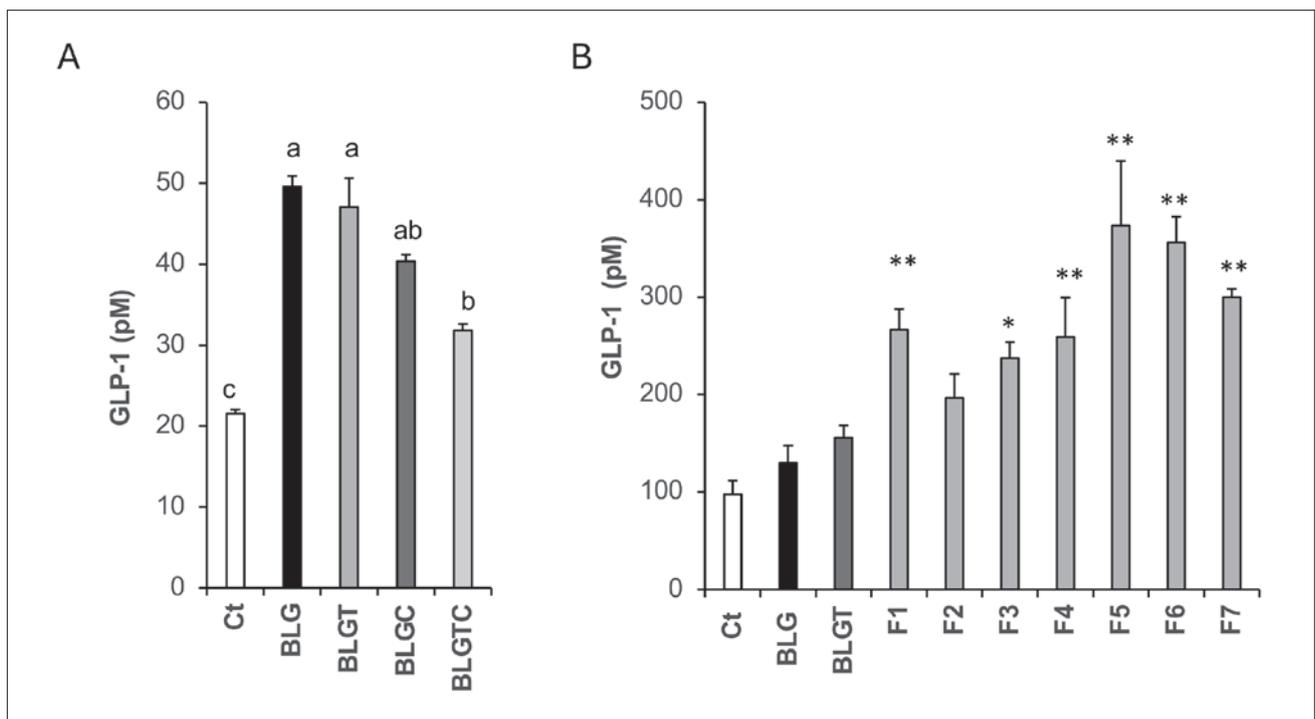


図1 A:  $\beta$ -ラクトグロブリン (BLG)、BLG加水分解物 (BLGT、BLGC、BLGTC)、および B: BLGT の分画物による GLUTag 細胞における GLP-1 分泌促進作用は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=3-4)。a、b、c は Tukey の多重比較検定の結果で、同じアルファベットを含まない平均値の間に有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。\* は Dunnett の多重比較検定の結果で、コントロール群 (Ct) に対して有意差があることを示す。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

GLUTag 細胞にて評価し（全て 5 mg/mL の濃度にて試験）、20 種のジペプチドがコントロールに比べて 1.5 倍以上の GLP-1 分泌促進作用を示した。これらのジペプチドを別途購入し、GLUTag 細胞にて再現性、用量依存性の確認試験を実施した。その結果、12 種のジペプチドが、いずれかの濃度にてコントロールに比べて有意に高い GLP-1 分泌増大を示した。このうち、Gly-Leu (GL)、Gly-Trp (GW)、Lys-Ala (KA)、については、他グループでの試験により GLP-1 分泌促進作用が報告されていたが<sup>6-8)</sup>、それ以外の 11 種は新規のジペプチドであった。GLP-1 は細胞内の分泌顆粒にて貯蔵され、刺激に応じて開口放出されるが、何らかの細胞傷害を受けると細胞から漏出することも想定される。そのため、細胞傷害性の指標として、細胞質に存在する乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出を評価した。どのジペプチドによっても、コントロール群よりも顕著に高い LDH 放出は観察されなかったことから、これらジペプチドは細胞傷害性を伴わず、生理的刺激により GLP-1 分泌を促進していることが示唆された。これらの結果から、GLP-1 産生細胞（ここでは GLUTag 細胞）は、ペプチドやアミノ酸に非得意的に応答するのではな

く、多様なペプチドの配列を何らかのメカニズムにより識別（認識）し、GLP-1 分泌応答を示すことが明らかとなった。

ここで見出された 12 種類のジペプチドのうち、WY が最も高く、次いで WF が高い GLP-1 分泌促進作用を示した。これらのジペプチドには一貫した共通性は見られないが、部分的には以下のような特徴が見られた（図 2）。

- N 末端に G、K、Q、W を持つ
- C 末端に F、L、Y を持つ

### 活性ペプチドのデザインと作用検証

BLG のアミノ酸配列ならびに、過去の報告を参考（表 1）に、以下のような条件にてペプチドをデザインした。

- 配列の末端に T が存在する
- 配列の末端付近に K が存在する
- 配列中に V を含んでいる
- 末端に L が存在する

合成したペプチド

- IPAVEK

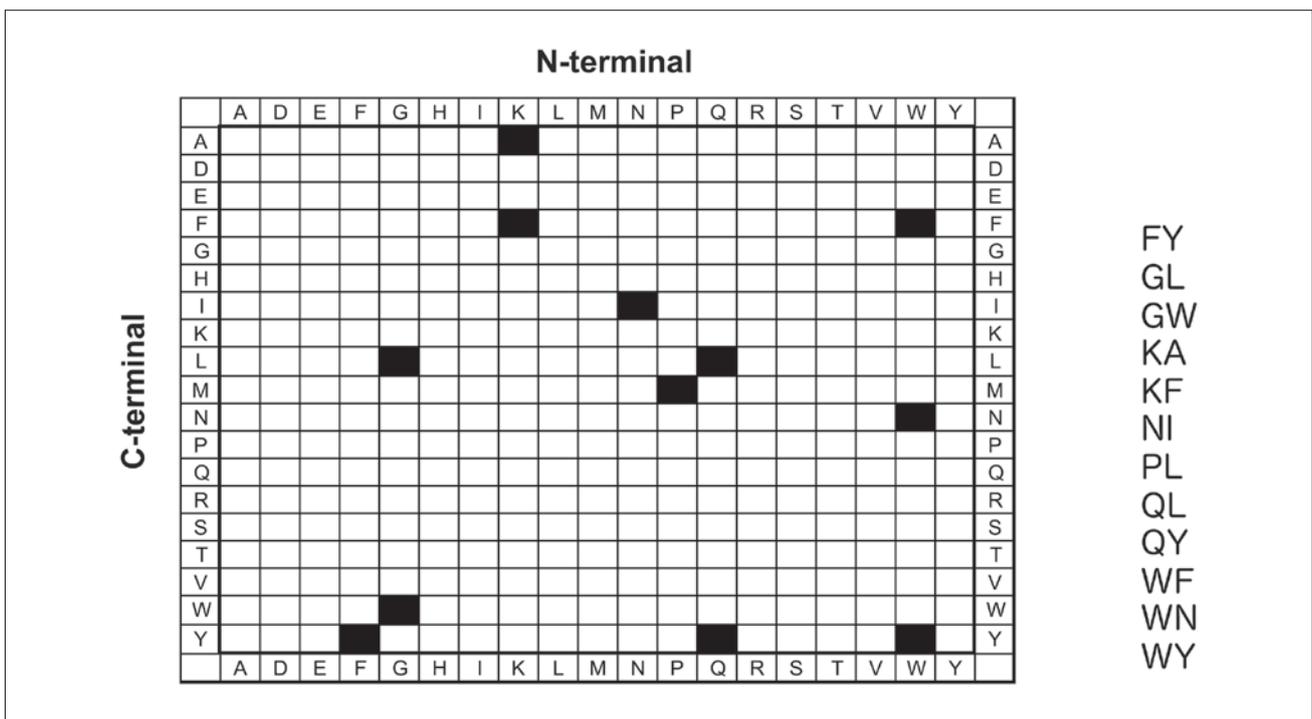


図2 ジペプチドライブラリーにより見出された GLP-1 分泌作用を持つジペプチドの配列  
横軸に N 末端、縦軸に C 末端のアミノ酸を列挙しており、黒く塗りつぶしたセルが GLUTag 細胞にて有意な GLP-1 分泌促進作用を示したジペプチドを示す。また、その一覧を右に表記した (Taguchi 2023 より引用)。

- IPAVF
- VPL
- LKPTPEGDLEIL
- TQMVDEEIMEK

これらを合成ペプチドのGLP-1分泌促進作用をGLUtag細胞にて評価したが、いずれもBLGのようなGLP-1分泌促進作用を示さなかった。従って、GLP-1分泌促進作用を示すペプチドとして、上記の予測は当てはまらず、他の要素が重要であると考えられた。

ジペプチドライブラリーでの試験結果より、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、フェニルアラニン(F)を組み合わせた6つのトリペプチドを合成し、それらのGLP-1分泌促進作用をGLUtag細胞にて評価した。その結果、WYのN末端側にFを付加したFWYは、WYと同じモル濃度(5 mM)にて、WYよりも顕著に高いGLP-1分泌促進作用を示した。また、WYのC末端側にFを付加したWYFも高いGLP-1分泌促進作用を示した。これらの結果より、WYの場合、N末端、C末端に関わらずFを付加することで大幅に活性が増大することが明らかとなった。これらの結果は、疎水性アミノ酸を含むペプチドが強いGLP-1分泌活性を持つことを示唆しており、上述のBLGT分画物で見出された結果(図1)とも類似する。

## 作用メカニズム解明

ペプチド、アミノ酸がGLP-1分泌を促進する分子機構に関して、種々の受容体、トランスポーターの関与が報告されている<sup>2)</sup>。ここでは、一部のペプチド、アミノ酸の受容体として知られるカルシウム感知受容体(CaSR)、GPR142、ペプチドトランスポーターPepT1の関与を、これらの阻害剤を用いて検討した。このうち、CaSR阻害剤がWYによるGLP-1分泌促進作用を抑制したことから、WYの作用にCaSRが関与することが示唆された。

## 今後の課題

多様な生理作用を持つ消化管ホルモンを産生・分泌する消化管内分泌細胞での栄養素の認識(nutrient sensing)は、食事成分と生体との直接的相互作用の根底を成す生理現象であり、これを理解することは食品学、栄養学、生理学の進展に貢献する。また、本研究で得られる成果により、経口摂取しても上部小腸で分解されずに、回腸部に到達してGLP-1分泌を高めるペプチドあるいはペプチド誘導体の開発への展開、それによる肥満や耐糖能障害の予防・改善への貢献も期待できる。

## 謝辞

本研究の実施に際し、公益財団法人浦上食品・食文化振興財団より学術研究助成を賜り、ここに深謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Gribble FM, Reimann F, et al., Gastrointestinal hormones. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 6th edition (Said HM ed.), 1, pp.31-70, Elsevier (2018)
- 2) Hira T, Trakooncharoenvit A, Taguchi H, Hara H. Improvement of Glucose Tolerance by Food Factors Having Glucagon-Like Peptide-1 Releasing Activity. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 21;22(12):6623.
- 3) Taguchi H, Murai K et al., Trp-Tyr is a dipeptide structure that potently stimulates GLP-1 secretion in a murine enteroendocrine cell model, identified by comprehensive analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 661, 28-33 (2023)
- 4) Jensen CZ, Bojsen-Møller KN, Svane MS, Holst LM, Hermansen K, Hartmann B, Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Kristiansen VB, Rehfeld JF, Clausen TR, Holst JJ, Madsbad S. Responses of gut and pancreatic hormones, bile acids, and fibroblast growth factor-21 differ to glucose, protein, and fat ingestion after gastric bypass surgery. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020 Apr 1;318(4):G661-G672.
- 5) Shimizu Y, Hara H, et al., Glucagon-like peptide-1 response to whey protein is less diminished by dipeptidyl peptidase-4 in comparison with responses to dextrin, a lipid and casein in rats. *Br J Nutr.*, 125(4), 398-407 (2021)

- 
- 6) P. Richards, R. Pais, A.M. Habib, C.A. Brighton, G.S. Yeo, F. Reimann, F.M. Gribble, High fat diet impairs the function of glucagon-like peptide-1 producing L-cells, *Peptides* 77 (2016) 21-27.
- 7) B. Le Neve, H. Daniel, Selected tetrapeptides lead to a GLP-1 release from the human enteroendocrine cell line NCI-H716, *Regul. Pept.* 167 (2011) 14-20.
- 8) J. Caron, B. Cudennec, D. Domenger, Y. Belguesmia, C. Flahaut, M. Kouach, J. Lesage, J.F. Goossens, P. Dhulster, R. Ravallec, Simulated GI digestion of dietary protein: release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion, *Food Res. Int.* 89 (2016) 382e390, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.033>.

## Dietary peptide sensing in enteroendocrine cells

Tohru HIRA

*Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University*

Gastrointestinal endocrine cells sense nutrients and secrete gastrointestinal hormones. However, the mechanisms of action of peptides are only partially understood. In previous work, we have shown that various food peptides strongly promote glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion. However, little is known regarding the structures of the food peptides (amino acid sequences and chain lengths) that contribute to the promotion of GLP-1 secretion. Thus, this study aimed to clarify the structures of food peptides that are recognized by gastrointestinal endocrine cells, as well as how they are recognized. Using a GLP-1-producing enteroendocrine cell line, GLUTag we found that  $\alpha$ -lactalbumin (ALA) and  $\beta$ -lactoglobulin (BLG), the major components of milk whey protein, induce GLP-1 secretion. This indicates that some dietary protein molecules, in addition to hydrolysates and amino acids, can be directly sensed by enteroendocrine cells. Using a dipeptide library, we identified various dipeptides (12 types) with GLP-1-releasing activity. Among these dipeptides, Trp-Tyr (WY) exhibited the most potent GLP-1-releasing activity. In addition, when Phe (F) was added to the N- or C-terminus of WY, it had a much larger effect on stimulating GLP-1 secretion. Further analysis revealed that WY stimulated GLP-1 secretion by activating the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) in GLUTag cells. These results demonstrate that GLP-1-producing enteroendocrine cells distinguish the molecular structures of dietary peptides, and that hydrophobic amino acid residues are important factors for potent GLP-1-releasing activity, possibly through the activation of CaSR.