

Study on bioactivity and function of marine imidazole dipeptide, balenine

海洋性イミダゾールジペプチドバレニンの生理活性と機能性に関する研究

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

YANG MIN

第1章では、本研究の背景と目的を説明した。食品中には生体調節や疾病予防などの機能性を有する物質が存在する。その中でもイミダゾールジペプチドは pH 緩衝作用、抗疲労効果、抗酸化作用、および抗炎症作用などの機能性を持つことが知られている。これまでに、カルノシン (β -アラニル-ヒスチジン)、アンセリン (β -アラニル-N-メチルヒスチジン) およびバレニン (β -アラニル-1-メチル-L-ヒスチジン) がイミダゾールジペプチドとして見出されており、海洋生物由来のジペプチドとしてアンセリンやバレニンなどが存在する。バレニンはこれまでにクジラ、イルカおよび海ヘビの筋肉にのみ含まれていることが知られていたが、アカマンボウ *Lampris guttatus* にも含まれていることがわかってきた。実際に、アカマンボウ筋タンパク質粗抽出画分に含まれるバレニン含量はおよそ 30% を占めており、有用な資源となりうる。バレニンは抗酸化能や抗筋疲労効果を有するアンセリンと類似構造を持つため、同様あるいは新規の機能性を有することが考えられる。そこで本研究では、筋機能に対するバレニンの生理活性および機能性を明らかにすることを目的とした。

第2章では、マウス由来 C2C12 筋管細胞を用いて、バレニンの抗酸化作用について調べた。筋管細胞にバレニンを添加しスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の産生を検討したところ、10, 100, 1000 μ M のバレニンを添加した細胞では無添加と比較して、内在性の O_2^- 産生が有意に抑制された。一方、過酸化水素 (H_2O_2) の産生については、バレニンの添加濃度依存的に増加する傾向を示した。 O_2^- から H_2O_2 へと変換する酵素として superoxide dismutase (SOD) が知られている。SOD 活性はバレニン添加で濃度依存的に増大した。従って、バレニンは SOD の活性化に大きく寄与していることがわかった。そこで、バレニンがどのように SOD の活性化に寄与しているのかを確かめるために、SOD の mRNA 発現について解析を行った。SOD1 (細胞質に存在)、SOD2 (ミトコンドリアに存在) および SOD3 (細胞外マトリックスに存在) は、バレニンを添加しても mRNA レベルでの発現量に変化はなかった。この結果よりバレニンは間接的に遺伝子の発現レベルを増大させることで SOD の活性化を増大させていることではないことがわかった。そこで、バレニンが直接 SOD を活性化することが出来るかどうかを解析したところ、バレニンを添加した群では SOD タンパク質単独より有意に SOD 活性の上昇が認められた。また、バレニン同様イミダゾールジペプチドであるカルノシンもまた、SOD タンパク質単独より有意な活性上昇を認めたが、バレニンと比較すると低値であった。これに対して、イミダゾールジペプチドの構成要素である単独のアミノ酸 (L-アラニン、 β -アラニン、L-ヒスチジン、3-メチル-ヒスチジン) の効果は、SOD タンパク質単独と同等のレベルであった。これらの結果より、SOD の直接的な活性化にはジペプチド様構造が必須であることが考えられ

た。

第 3 章では、実験動物 C57BL/6j マウスを用いて、筋機能に対するバレニンの作用について調べた。まず初めに、0, 0.25, 0.5, 1%アカマンボウ由来バレニンを含む食事を C57BL/6J マウスに 5 週間与え、安全性試験を行った。摂食量と体重変動は各群で変化がなかった。同様に、5 週間後の後肢筋(長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋)、脾臓、肝臓、白色脂肪重量も各群で有意な差は認められなかった。ヘマトクリット値は 0.25, 0.5, 1%バレニン食群で 0%群よりもやや高い傾向を示したが、血清中 GOT, GPT および血清タンパク質濃度は各群間で変化を示さなかった。これらの結果より、1%バレニン食でも安全性は確保されることが示唆された。次に、1%バレニン食を与えたマウスを用いて筋機能解析を行った。バレニン食群における筋線維の断面積は、普通食群と比較して同等であった。一方、バレニン食は骨格筋内のミトコンドリア生合成および脂質代謝に関連する peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC)-1 α および pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4 の発現を有意に誘導した。加えて、バレニン食群における骨格筋内の SOD 活性は、普通食群と比較して有意に高値を示したが、SOD mRNA の発現レベルには影響しなかった。これらの結果により、食餌性バレニンが、骨格筋内においてミトコンドリア生合成と代謝および SOD 活性の調節に寄与することが示された。

第 4 章では、筋再生に対するバレニンの作用について調べた。骨格筋へカルディオトキシン (CTX) を投与することで、3 日後、免疫細胞による筋組織の貪食が見られ、7 日後には、再生筋の出現が観察された。CTX 投与 14 日後には、全体で筋再生している様子が観察された。バレニン食群では CTX 投与 7 日目において、普通食群よりも筋線維の再生が促進される様子を示した。加えて、バレニン食群は筋衛星細胞の増殖に関与する paired box gene 7 (Pax7) や筋細胞の分化マーカーである myoblast determination protein 1 (MyoD1) の発現が普通食群よりも高値であった。筋再生には免疫細胞の活性化が重要な働きをしていることから、サイトカイン、ケモカインおよび免疫細胞活性化に関与する転写因子の発現量を解析した。筋損傷初期に活性化する炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α および monocyte chemotactic protein (MCP)-1 mRNA の発現はバレニン食群で普通食群よりも有意に高い値を示した。さらに、修復に関与するマクロファージが産生する抗炎症性サイトカイン IL-10 と transforming growth factor (TGF)- β 1 mRNA の発現もまた、バレニン食群で有意に高かった。これらの結果より、バレニンが筋再生に関与する免疫細胞の活性化を調節し、筋再生を促進する可能性が示唆された。

第 5 章では、総合考察を行った。まず初めに、バレニンが培養細胞および動物試験において筋内 SOD 活性を増大しうることを発見した。また、*in vitro* アッセイにより、バレニンは SOD を直接活性化することがわかった。以上より、バレニンは SOD の活性化を介して抗酸化作用に寄与することが示唆された。次に、食餌性バレニンの摂取は、骨格筋内において、ミトコンドリア生合成および脂質代謝に関連する PGC-1 α および PDK4 の発現を有意に上昇させることを見出し、バレニンは骨格筋内の代謝調節にも大きく寄与していることが示された。最後に、バレニンは免疫細胞の活性化を調節することで筋再生を促す作用があることがわかった。以上より、バレニンは抗酸化作用や筋機能向上に関与する有用な機能性生理活性物質であると考えられた。