

## 易吸収性トリペプチドが脂肪細胞の

### 脂肪滴形成およびミトコンドリア機能に与える影響

Effects of easy absorbable tripeptides on lipid droplet formation and energy metabolism in 3T3-L1 adipocytes.

長谷川 千織

Chiori Hasegawa

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 博士後期課程

キーワード：脂肪細胞, ペプチド, ミトコンドリア

Key words : Adipocyte, Peptide, Mitochondria

#### 1. 研究目的

近年, タンパク質の消化産物であるペプチドが、アミノ酸まで消化されずにそのまま吸収されて血中に移行し、様々な生理活性作用を示すことが注目を集めている。消化管におけるペプチドの吸収速度はアミノ酸配列特異的であることが報告されており、易吸収性ペプチドとして研究が行われている。

脂肪細胞は様々な生理活性物質を分泌してエネルギー代謝を積極的に調節する内分泌細胞である。脂肪細胞が肥大化すると炎症性サイトカインの分泌が増加し、生活習慣病の原因になると言われている。炎症性サイトカインの分泌を増加させる原因の一つとして、ミトコンドリアの状態変化に注目が集まっている。ミトコンドリアによるエネルギー代謝に異常が起ると、細胞に炎症性サイトカインの分泌を促進する可能性が考えられている。

大豆の主要タンパク質であるβ-コングリシニン由来のペプチドには配列特異的な生理活性機能があることが徐々に明らかになっており、中でもトリペプチド Phe-Leu-Val (FLV) や Val-Pro-Tyr (VPY) に脂肪細胞の炎症性サイトカイン放出を減少させる効果があることが報告されている。一方、もっとも単純なトリペプチドである Gly-Gly-Gly

(GGG) には脂肪細胞の脂肪滴形成を抑制する効果があることを、本研究室の予備的実験で見出している。

本研究ではペプチドが腸管から取り込まれて血中に移行し、脂肪細胞にどのように作用して、脂肪滴の肥大化および脂肪細胞から分泌される様々

な生理活性物質の分泌に影響を与えるのか、ペプチドの消化・吸収から脂肪細胞での作用機序までを明らかにすることを目的としている。今年度は脂肪細胞にペプチドを添加して培養する際の条件検討および様々なタンパク質やアディポカインの遺伝子発現量を定量し、ペプチドが脂肪細胞へ与える影響の概観をとらえるための実験を行った。

#### 2. 研究実施内容

これまで脂肪細胞に対する抗炎症効果が報告されている FLV, VPY に、Gly を含むジ・トリペプチド GGG および GG (Gly-Gly), Gly を吸収されやすいとされるアミノ酸に置換した GGF

(Gly-Gly-Phe), GF (Gly-Phe), GP (Gly-Pro) を加えた7種類のペプチドについて、脂肪細胞の脂肪滴形成およびミトコンドリア機能に与える影響について調べた。

ペプチドの人工消化試験：ペプチドが腸管からペプチドトランスポーターを介して取り込まれることは知られているが、消化管を通過して腸管に到達するまでの間の消化酵素の影響をどの程度受けるのかを確認するため、ペプチドの人工消化を行なった。

トリペプチド GGG, GGF, FLV, VPY, コントロールとして大豆タンパク質の酸水解物を、ペプシンおよびパンクレアチンで人工的に消化し、SDS-PAGE による分離・検出を行なったが、消化反応に最適なペプチド濃度が SDS-PAGE の検出限界に近かったため、定量が困難であった。

BCA アッセイを利用してトリペプチド (分解前/ジペプチド (分解後) 比を求めることにより定量が可能であることを予備実験で確認できたため、人工消化のトリペプチドへの影響はこの方法を用いて調べる予定である。

ジ・トリペプチドが 3T3-L1 脂肪細胞へ与える影響: ジ・トリペプチドの添加が、3T3-L1 脂肪細胞の脂質代謝、脂肪滴形成、ミトコンドリア機能に与える影響を関連タンパク質の mRNA 発現量の変化で調べた。

マウス線維芽細胞 3T3-L1 を脂肪細胞へ分化させ、分化誘導後 18 日目に total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA の相対発現量を調べた。GG, GF, GP, GGG, GGF, FLV, VPY の 7 種類のペプチドをそれぞれ 10 $\mu$ M の濃度で培地に添加し、分化誘導後 6 日目から 12 日間、あるいは分化誘導後 17 日目から 24 時間培養した。

脂肪滴形成など目に見える効果を観察するためには長期間のペプチド添加が必要であるが、mRNA 発現量に与える影響を調べる場合には、24 時間添加が適切であることがわかった。

24 時間のペプチド添加による脂肪細胞への影響を総合的に調べるために、エネルギー代謝関連、脂肪合成・分解関連、ミトコンドリア融合・分裂関連のタンパク質、および脂肪滴表面タンパク質ペリリピン、ペプチドトランスポーターの mRNA 発現量を調べた。

FLV 添加細胞ではエネルギー代謝全体が低下し、ミトコンドリアの融合・分裂関連タンパク質の mRNA 発現量も減少していた。VPY 添加細胞では脂質代謝に関与する酵素および脂肪滴表面タンパク質ペリリピン 1 の発現量が増加していた。FLV, VPY は脂肪細胞において炎症性サイトカインの分泌を抑制し、抗炎症効果があることが報告されているが、本実験からエネルギーや脂質の代謝にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。

グリシンを含む 5 種類のペプチドの中では脂肪細胞に対して GGG が最も強い影響を与えること

がわかり、グリシンが他のアミノ酸に置き換わることにより効果が弱められることが考えられた。これは本研究室で予備の実験として行なった蛍光観察の結果と同様であった。GGG 添加細胞では脂質代謝関連酵素、ミトコンドリアの融合・分裂関連タンパク質およびペプチドトランスポーターの発現量が増加していた。脂肪細胞には Gly を含むアミノ酸配列を特異的に認識してエネルギー代謝や脂質代謝を制御する仕組みが存在することが示唆された。

### 3. まとめと今後の課題

本研究は易吸収性のペプチドが脂肪細胞に与える影響を、ペプチドの消化・吸収から作用機序までを明らかにすることを目的としている。今年度は脂肪細胞の脂肪滴形成およびミトコンドリア機能に効果のあるジ・トリペプチドをスクリーニングすることを目的として、細胞への吸収効率が異なると考えられる合成ジ・トリペプチド 7 種について調べた。

それぞれのペプチドで脂肪細胞に様々な影響を与えることが示唆されたが、なかでも GGG の添加が脂肪の合成・分解、ミトコンドリアの融合・分裂に影響を与え、ペプチドトランスポーターの発現量を増加させることがわかった。またジペプチドよりもトリペプチドで効果が強いことが考えられた。

今後はトリペプチド GGG をターゲットとし、脂肪細胞の内外での動態やタンパク質との共局在について調べたいと考えている。またマイクロアレイ解析により GGG がどの遺伝子発現に影響を与えているか網羅的に調べることに取り組む予定である。