
微生物由来加水分解酵素を用いた卵殻膜分解と 分解物中の生理活性ペプチドの検索

神戸大学大学院農学研究科・准教授 竹中 慎治

■ 緒 言

鶏卵をはじめとする鳥卵は、栄養成分の複雑な混合体からなる動物性タンパク質食品の一つで、栄養価が高く、私達の生活と健康に大きく寄与している。鶏卵は卵殻部、卵白部、卵黄部に区分され、それぞれ卵重量の約10%、60%、30%を占める。卵白部および卵黄部は可食であるが、残りの卵殻部[卵殻(9.1%)、卵殻膜(0.9%)]の多くは不可食部として廃棄されている¹⁾。近年、廃棄物再利用化の要求が高まっており、特に、未利用資源である卵殻部の有効利用を目指した研究が行われてきた。

卵殻膜の有効利用に関する先行研究として、旗影会の助成研究を含めて膜自身を機能性基材として利用する試み^{2,3)}が挙げられるが、「卵殻膜の限定分解」や「分解物の有効利用」に関する研究およびその実用化を目指した研究は少ない。卵殻膜は切り傷ややけどの治癒、保湿効果などに効果があると言われており⁴⁾、化粧品や医薬品およびサプリメントを開発する分野において潜在的な利用価値があると期待されるが、あまり利用されていない。その要因として卵殻膜が水に不溶なことが挙げられ、利活用には温和な条件で簡便に卵殻膜を処理できる方法の開発が必要である。

卵殻膜の可溶化法として酸やアルカリによる化学的処理^{5,6)}は簡便ではあるが、再現性よく加水分解を進めて特定のタンパク質やペプチド類を取得することは困難である。また、市販の酵素製剤(ペプシン、サーモリシン等)は卵殻膜に対する加水分解活性が低く、その利用は期待できない。申請者は卵殻膜を分解できる *Pseudomonas aeruginosa* ME-4 を分離し、同菌の加水分解酵素(金属プロテアーゼ)の特性解析や同酵素による卵殻膜の分解条件の検討などを行い、同酵素が卵殻膜の分解にとり有用であることを明らかにした⁷⁾。しかしながら、*P. aeruginosa* は緑膿菌に属する日和見感染細菌であり、同酵素の調製のためにME-4株を大量培養することは、一般的に受け入れ難い。そこで、本研究では「分解酵素遺伝子の大量発現系の確立」と「組み換え酵素を用いた卵殻膜分解と機能性タンパク質・ペプチドの検索」を目的として研究を進める。つまり、卵殻膜の可溶化によって得られたペプチドの混合溶液を用い、ACE阻害活性、筋肉細胞への糖取り込みを指標とした高血糖予防効果と脂肪細胞の分化調整を指標とした肥満予防効果に有効性を示すペプチドの検索を行うことを目的とした。

■ 方 法

培地組成および培養条件

卵殻膜分解酵素および遺伝子の取得のための親株 *P. aeruginosa* ME-4 の培養は、既報の方法に従った⁷⁾。*E. coli* XL-1 Blue および *E. coli* BL21(DE3)pLysS の培養にはLB培地を用い、必要に応じてIPTG(終濃度:238 μ g/ml)、X-Gal(40 μ g/ml)、アンピシリンナトリウム(100 μ g/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ C、140rpmで振とう培養した。

ME-4株由来卵殻膜分解酵素の精製

既報の方法に従い⁷⁾、培養して得られた培養上清から分解酵素を硫酸分画・各種クロマトグラフィーにより精製した。また、プロテアーゼ活性もまた既報の方法に従って測定した⁷⁾。

大腸菌および *Bacillus subtilis* 形質転換株による卵殻膜分解酵素の発現と組換え酵素の精製

P. aeruginosa ME-4 由来卵殻膜分解酵素遺伝子の塩基配列(DDBJ/EMBL-Bank /GenBank accession No. AB618054)を基に設計したプライマー、ME4_Expression_primer_F1 (5'-ACCCATATGAAGAAGGTTTCTACGCTTGACCTGT-3')およびME4_Expression_primer_R1 (5'-TAAGGATCCTTACAACGCGCTCGGCAG-3')にて同酵素遺伝子のプレプロ配列-成熟タンパク質をコードする領域を増幅し、増幅断片を制限酵素処理後、pET 11a vector に挿入した。構築した発現ベクターを用いて大腸菌組換え酵素発現株を得た。また、ME4_Expression_primer_F2 (5'-TTTTGCCGCGCCCTGATCGAC-3')およびME4_Expression_primer_R2 (5'-CGCGCTTCTAGAGGTCACGCCGAC-3')にて同酵素遺伝子のプロ配列-成熟タンパク質をコードする領域を増幅し、*B. subtilis* secretory protein expression system manual に従い、

pBE-S vector に挿入した。構築した発現ベクターを用いて *B. subtilis* RIK1285(*trpC2*, *lys1*, *aprE*Δ3, *nprR2*, *nprE18*) から組換え酵素発現株の作成を試みた。

組換え酵素の精製

大腸菌形質転換株を LB 培地 (Amp (100μg/ml)、150ml/500ml 坂口フラスコ) にて培養し、濁度 (OD₆₀₀) が 0.5 ~ 0.6 となった時点で、IPTG (23.8μg/ml) を添加してさらに 6 時間培養した。得られた湿菌体 (1.6g) を 15ml の 20ml Tris-HCl buffer (pH8.0) を添加して懸濁した後、超音波破碎した。つづいて、遠心分離後の上清に対してアセトン濃度が 25% (v/v) となるように加え、30°C で 12 時間振とう (60 rpm) した。さらに、遠心分離後得られた上清を 20mM Tris-HCl buffer (pH8.0) にて透析し、DE52 カラムクロマトグラフィーにより組換え酵素を精製した。

精製酵素および市販プロテアーゼによる卵殻膜の可溶化試験

組換え酵素と市販のプロテアーゼ (α -キモトリプシン (ナカライテスク、Cat No. 09041-84)、コラゲナーゼ (Cat No. 09353-04)、エラスターゼ (Cat No. 14363-14) 等) を用い、5mg の卵殻膜粉末を含む酵素反応溶液 (1ml) に 0.2 U の酵素を添加し、30°C、140rpm の条件で 24 時間振とうした。

卵殻膜由来酵素反応生産物の精製

29ml の 10mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH6.5) に卵殻膜粉末 (150mg) と 1ml の精製酵素 (36units/ml) を加えて、pH6.5、50°C、140rpm にて 12 時間インキュベートした。遠心分離 (16,440×g, 10min, 4°C) した後、得られた上清を Amicon Ultra Centrifugal Filter (Ultracel®-3K) にて遠心分離し、通過液 (以下卵殻膜由来ペプチド) を回収した。通過液を逆相クロマトグラフィーに供し、分画した。HPLC の条件は以下に示した。

[条件]

- ・カラム: COSMOSIL 5C18-AR-II (10×250mm、ナカライテスク)
- ・溶離液: solvent A: 5mM トリフルオロ酢酸
: solvent B: 5mM トリフルオロ酢酸-アセトニトリル (40:60, v/v)
- ・溶出: solvent A-solvent B (100:0, v/v) → (75min) → solvent A-solvent B (0:100, v/v)
- ・流速: 2.5ml/min
- ・検出: UV 216nm
- ・分取: 5.0ml/tube

ACE 阻害活性 (アンジオテンシン変換酵素阻害活性)

ACE Kit-WST (同仁) を用いた。卵殻膜由来ペプチドおよびその逆相クロマトグラフィー精製画分について検討した。反応系および条件は、添付マニュアルに従った。対照として、Captopril を用いた。

卵殻膜可溶性ペプチドによる糖取り込みおよび脂肪蓄積に及ぼす効果

1) 細胞培養・処理

L6 筋管細胞 (L6): 仔牛胎児血清 (FBS) を 10% (v/v) 含む Minimum essential medium (MEM) 培地によって L6 細胞をコンフルエントになるまで培養した。その後、FBS を 2% (v/v) 含む MEM 培地に交換し分化させ、2 日ごとに培地交換をおこなった。分化 5 ~ 7 日目に BSA を 0.2% 含む MEM 培地に交換し 18 時間脱感作をおこなった。脱感作後、卵殻膜由来ペプチド (31.3 ~ 250μg/ml) を 4 時間作用させ各測定に供した。

3T3-L1 前駆脂肪細胞 (L1): 牛血清 (bovine serum) を 10% (v/v) 含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地により 3T3-L1 細胞を培養した。コンフルエントになってから 2 日後に FBS を 10% (v/v) 含む DMEM 培地に交換した。翌日に FBS を 10% (v/v) 含む DMEM 培地に分化誘導剤 (0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、1μM デキサメタゾン、10μg/ml インスリン) を負荷した培地に交換し分化誘導をおこなった (分化 0 日目)。この時、同時に卵殻膜由来ペプチド (31.3 ~ 250μg/ml) を作用させた。分化 3 日目には 10μg/ml インスリン、FBS を 10% (v/v) 含む DMEM 培地に交換し、分化 6 日目には FBS を 10% (v/v) 含む DMEM 培地に交換した。その後、分化 8 日目まで培養し各測定に供した。

2) 毒性試験

L6 筋管細胞 : L6 細胞を 18 時間脱感作したのちに卵殻膜由来ペプチド(31.3 ~ 250 μ g/ml)を 4 時間作用させた。陰性対照としては、同量の水を同様に 4 時間作用させた。その後、0.2% (v/v) クリスタルバイオレットにより細胞を染色し、コントロールとの相対比より細胞生存率を測定した。

3T3-L1 前駆脂肪細胞 : 3T3-L1 細胞に分化誘導剤を負荷すると同時に卵殻膜由来ペプチド(31.3 ~ 250 μ g/ml)を 3 日間作用させた。陰性対照としては、同量の水を同様に 3 日間作用させた。その後、5 日間培養した脂肪細胞を 0.2% (v/v) クリスタルバイオレットにより細胞を染色し、コントロールとの相対比より細胞生存率を測定した。

3) 糖取り込みに及ぼす影響

L6 細胞を 18 時間脱感作したのちに卵殻膜由来ペプチド(31.3 ~ 250 μ g/ml)を 4 時間作用させ、次に、1mM 2-デオキシグルコース(2DG)を 20 分作用させた。陰性対照ならびに陽性対照としては、それぞれ水ならびに 100nM インスリンを同様に作用させた。これらの細胞を Yamamoto らによって確立された糖取り込み評価法である酵素反応を用いて細胞内への 2DG 取り込み量を測定した⁸⁾。

4) 脂肪蓄積に及ぼす影響

上記の毒性試験と同様に、3T3-L1 細胞に分化誘導剤を負荷すると同時に卵殻膜由来ペプチド(31.3 ~ 250 μ g/ml)を 3 日間作用させた後、さらに 5 日間分化させた脂肪細胞を Sudan II により染色することで脂質の蓄積量を測定した。

タンパク質および可溶性ペプチドの定量

Lowry 法またはニンヒドリン法によって定量し、BSA および GlyGlyGly 換算で濃度を算出した。

■ 結果

大腸菌および *Bacillus subtilis* 形質転換株による卵殻膜分解酵素の発現

プレプロ配列-成熟タンパク質をコードする約 1.5 kb 増幅断片を調製後、制限酵素処理した pET 11a ベクターとライゲーションし、発現ベクター pET11a-lasB を得た。さらに、同プラスミドを有する *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 形質転換株を取得し、スキムミルクを含む LB 培地に移植することで、プロテアーゼ分泌株(ハロー形成株)を選抜した。一方、プロ配列-成熟タンパク質領域をコードする増幅断片を挿入した pBE-S-lasB および *B. subtilis* 形質転換株では、クリアなハローを形成する株を得ることができなかった。そこで、組換え酵素の調製には大腸菌形質転換株を用いることにした。

大腸菌形質転換株由来組換え酵素の精製

菌体中の組換え酵素を抽出後、アセトン処理による活性化および大腸菌由来タンパク質の変性を行い、DE52 カラムクロマトグラフィーにより同酵素を単一に精製した。(Table 1 および Fig.1)

組換え酵素および市販のプロテアーゼによる卵殻膜の可溶化試験

試験したプロテアーゼの中には卵殻膜を可溶化し、可溶性タンパク質およびポリペプチドを遊離する酵素がみられた。組換え酵素(可溶性タンパク質濃度、140 \pm 3.0 μ g/ml)を用いた反応系において最も可溶性タンパク質量が多く、エラスターゼ(77 \pm 2.0 μ g/ml)、 α -キモトリプシン(48 \pm 3.0 μ g/ml)、コラゲナーゼ(8.9 \pm 1.0 μ g/ml)の順となった。一方、パパイン、サーモライシン、ペプシン、トリプシンはほとんど卵殻膜を分解しなかった。

卵殻膜由来酵素反応生産物の精製

卵殻膜粉末 150mg を加水分解する反応系(30ml)を 3 連行い、可溶性ペプチドを得ることにした。加水分解開始前の可溶性タンパク質濃度は BSA 換算で 0.95 \pm 0.038mg/30ml であった。組換え酵素による加水分解処理およびフィルター濾過により得られた卵殻膜由来ペプチドを濃縮乾固、再溶解(5ml)し、GlyGlyGly 換算で 26.5 \pm 0.15mg/5.0ml 得ることができた。つづいて、逆相クロマトグラフィーに供し、40 画分に分けた(Fig.2)。

ACE 阻害活性(アンジオテンシン変換酵素阻害活性)

逆相クロマトグラフィーにて分画した Fraction 1 から 25 について調べた結果、Fraction No. 11、

12、13、16、17において活性が見られた。ポジティブコントロールとして使用した Captopril(0.1 μ M)と阻害度合いを比較すると、No. 11(1.16倍)、12(1.16倍)、13(1.21倍)、16(1.03倍)、17(1.07倍)となった。

毒性試験

L6細胞に卵殻膜由来ペプチド(31.3～250 μ g/ml)を4時間作用させた場合、いずれの濃度においても細胞毒性はみられなかった(Fig.3A)。また、3T3-L1細胞に卵殻膜由来ペプチドを3日間作用させた場合にも、いずれの濃度においても細胞毒性はみられなかった(Fig.3B)。

糖取り込みにおよぼす影響

L6細胞に卵殻膜由来ペプチドを作用させた際、濃度依存的な糖取り込み促進作用を示した。特に、125、250 μ g/mlの濃度においては水と比べ有意な増加が認められ、250 μ g/mlではインスリンと同程度の作用が認められた(Fig.4)。

脂肪蓄積に及ぼす影響

3T3-L1細胞に卵殻膜由来ペプチドを作用させた際、濃度依存的に脂肪蓄積を抑制した。特に、125、250 μ g/mlの濃度においては水と比べ有意な抑制効果が認められた(Fig. 5)。

■ 考 察

P. aeruginosa ME-4の生産する卵殻膜分解酵素は、Pseudolysinと呼ばれる金属プロテアーゼに属しており、有機溶媒に対して耐性を示すことから、有機溶媒存在下での物質変換への応用が試みられているが⁹⁾、本研究で対象とした繊維状天然タンパク質に対する基質特異性はこれまで明らかではなかった。同酵素を用いた卵殻膜分解には、酵素を効率的に調製する方法が重要であることから、既存の宿主ベクター系を中心に大量発現系を検討した結果、大腸菌宿主ベクター系で達成できた。親株ME-4株では培養液350mlから硫安分画および各種クロマトグラフィーにより精製酵素4mgを得ていたが⁷⁾、大腸菌形質転換株では培養液70mlからアセトン処理と陰イオンクロマトグラフィーのみで5mgの精製酵素を得ることができた。本法は、既報の組換え酵素発現系と比較しても効率的である¹⁰⁾。

卵殻膜からペプチドを得るための方法はこれまでも検討されており、例えば、NaOHによる加水分解(5時間)、HClによる中和、フィルター濾過、イオン交換クロマトグラフィー、電気透析処理¹¹⁾が報告されているが、化学処理法はペプチド結合をランダムに加水分解するため、再現性良く限定的な加水分解を行うことは困難であると思われる。本研究では、組換え精製酵素と卵殻膜との反応を3連行い、得られた可溶性ペプチドをHPLC分析し、クロマトグラフィーの溶出パターンから再現性良く卵殻膜が限定分解されていることを確認できた。例えば、Fig.2(A)の溶出時間19.6、20.7、24.5、34.8min等のペプチド由来ピークは再現性良く観察された。よって、生理活性ペプチドの検索を行う上で、卵殻膜分解酵素を活用する方法は有効であるといえる。

得られた卵殻膜由来ペプチドについて生理活性試験を行った。まず、ACE阻害活性試験では、ポジティブコントロールのペプチド(Captopril)と同程度の阻害活性を示す画分が見られた。それぞれのフラクションにはペプチド由来の複数のピークが見られることから、単一のペプチドによる効果が共存することで阻害活性を示しているのかは不明である。今後、さらに分画を進め、ペプチドの構造解析と阻害活性について明らかにしたい。さらに、糖の取り込みおよび脂肪の蓄積に及ぼす影響を調べ、これらについても効果が見られた。卵殻膜由来ペプチドは、筋肉細胞に作用させることで濃度依存的にグルコースの取り込みを促進し、一方では、脂肪細胞による脂肪蓄積を抑制した。これまでにいくつかの報告で、ペプチド類が、糖・脂質代謝に関わっていることと、その作用機構について明らかにされている。例えば、糖代謝に関して大豆ペプチドであるアグリシンが、IR/IRS経路を介して2型糖尿病モデルマウスのグルコース恒常性を改善したという報告がある¹²⁾。また、脂質代謝に関しては、ニュートラーゼにより加水分解された大豆タンパク質が、3T3-L1細胞のPPAR γ 、C/EBP α の発現量を低下させたことが報告されている¹³⁾。今回の検討に用いた卵殻膜由来ペプチドも、これらの因子を介して筋肉細胞の糖取り込みを促進し、脂肪細胞による脂肪蓄積を抑制した可能性があるが、現時点では作用機構解明に至っていないため、今後引き続き検討を進める必要がある。また、今回の作用に関わる有効ペプチドの構造も現時点では不明であるが、卵殻膜には、コラーゲン(タイプI、V、X)が多く含まれていることが確認されており¹⁴⁾、卵殻膜由来ペプチドにもコラーゲン由来のペプチドが有効性を示す可能性も考えられた。さらに、グルコースの取り込み促進に寄与する有効

成分と脂肪細胞の分化抑制に寄与する有効成分は同一であるか、あるいは異なるのかも興味深い点であるが、今後の検討を要する。以上のことから、有効成分の単離・同定と作用機構解明が残された課題であるといえよう。しかし、卵殻膜由来ペプチドの混合液の作用として、筋肉でのグルコース取り込み促進は高血糖の予防に、また、脂肪細胞の分化抑制は肥満予防に関わることから、卵殻膜由来ペプチドは生活習慣病の予防に有効な食品素材開発の材料となりえる。

■ 要 約

P. aeruginosa ME-4 の生産する卵殻膜分解酵素を用いた卵殻膜からの可溶性ペプチドの効率的な調製法の確立を目指した。大腸菌形質転換株による発現系と有機溶媒による組換え酵素の活性化法により、親株からの調製法と比較して約5倍効率的に調製する方法を確立できた。組換え酵素は、市販のプロテアーゼよりも効率的に可溶性ペプチドを遊離し、繊維状の天然タンパク質の加水分解にとって有用な酵素であった。卵殻膜と組換え酵素との反応で得られた卵殻膜由来ペプチドについて生理活性試験を行った結果、ACE阻害活性やペプチドの混合溶液の作用としてL6筋管細胞について糖取り込みを促進し、脂肪細胞による脂肪蓄積を抑制した可能性が見られた。よって、卵殻膜由来ペプチドを素材として用いることで、様々な生活習慣病の予防に有効な食品素材を開発できる可能性を示すことができた。

■ 文 献

1. 中村良 .1998.「卵の科学」, 朝倉書店, pp.1-9.
2. S. Ishikawa, K. Suyama, K. Arihara, and M. Itoh. 2002. Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. *Bioresource. Technol.* 81:201-206.
3. D. Xiao, and M. M. F. Choi. 2002. Aspartame optical biosensor with bienzymeimmobilized eggshell membrane and oxygen-sensitive optode membrane. *Anal. Chem.* 74:863-870.
4. T. Ino, M. Hattori, T. Yoshida, S. Hattori, K. Yoshimura, and K. Takahashi. 2006. Improved physical and biochemical features of a collagen membrane by conjugating with soluble egg shell membrane protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:865-873.
5. K. Takahashi, K. Shirai, M. Kitamura, and M. Hattori. 1996. Soluble egg shell membrane protein as a regulating material for collagen matrix reconstruction. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:1299-1302.
6. F. Yi, J. Yu, Z. X. Guo, L. X. Zhang, and Q. Li. 2003. Natural bioactive material: a preparation of soluble eggshell membrane protein. *Macromol. Biosci.* 3:234-237.
7. M. Cheng, S. Takenaka, S. Aoki, S. Murakami, and K. Aoki. 2009. Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *J. Biosci. Bioeng.* 107:373-8.
8. N. Yamamoto, T. Sato, K. Kawasaki, S. Murosaki, and Y. Yamamoto. 2006. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. *Anal. Biochem.* 351:139-145.
9. H. Ogino, M. Yamada, F. Watanabe, H. Ichinose, M. Yasuda, and H. Ishikawa. 1999. Peptide synthesis catalyzed by organic solvent-stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in monophasic aqueous-organic solvent systems. *J. Biosci. Bioeng.* 88:513-518.
10. H. Ogino, J. Yokoo, F. Watanabe, and H. Ishikawa. 2000. Cloning and sequencing of a gene of organic solvent-stable protease secreted from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and its expression in *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 5:191-200.
11. 平松 肇, 山田 有砂, 堀池 俊介, 坂本 和加子. 新規な可溶性卵殻膜の製造方法. 特許公開 2009-132661.
12. J. Lu, Y. Zeng, W. Hou, S. Zhang, L. Li, X. Luo, W. Xi, Z. Chen, and M. Xiang. 2012. The soybean peptide aglycin regulates glucose homeostasis in type 2 diabetic mice via IR/IRS1 pathway. *J. Nutr. Biochem.* 23:1449-1457.
13. M-J. Tsou, W-T. Lin, H-C. Lu, Y-L. Tsui, and W-D. Chiang. 2010. The effect of limited hydrolysis with Neutrase and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein. *Process Biochem.* 45:217-222.
14. Y. Nys, J. Gautron, M.D. McKee, J.M. Gautron, and M.T. Hincke. 2001. Biochemical and functional characterization of eggshell matrix proteins in hens. *Worlds Poult. Sci. J.*, 57:401-413.

Table 1 Purification of the recombinant eggshell-membrane-degrading enzyme from *E.coli* transformant

Fraction	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Recovery ^a (%)
1: Crude cell extracts	1.7	93	0.018	–
2: Acetone-treated crude extracts	85	30	2.8	100
3: DE52 cellulose	47	5.3	8.9	55

^a Recovery was calculated relative to the total activity of the crude extract incubated with acetone.

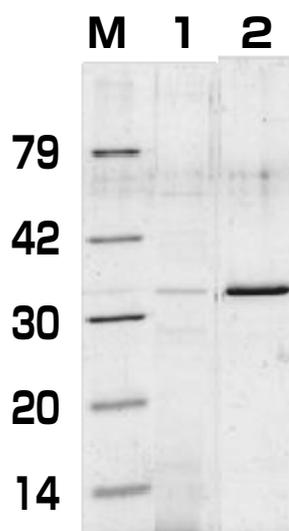


Fig. 1. SDS-PAGE による組換え酵素の純度の確認
 ATTO AE-6530M 電気泳動装置および添付のマニュアルに従い、12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルにて精製の各段階の活性画分を電気泳動に供した。レーン M, 和光純薬社製 中分子量マーカー (BSA (79 kDa), Aldolase (42 kDa), Carbonic anhydrase II (30 kDa), Trypsin inhibitor (20 kDa), Lysozyme (14 kDa))、レーン 1, 菌体破碎液(上清)、レーン 2, DE52 活性画分

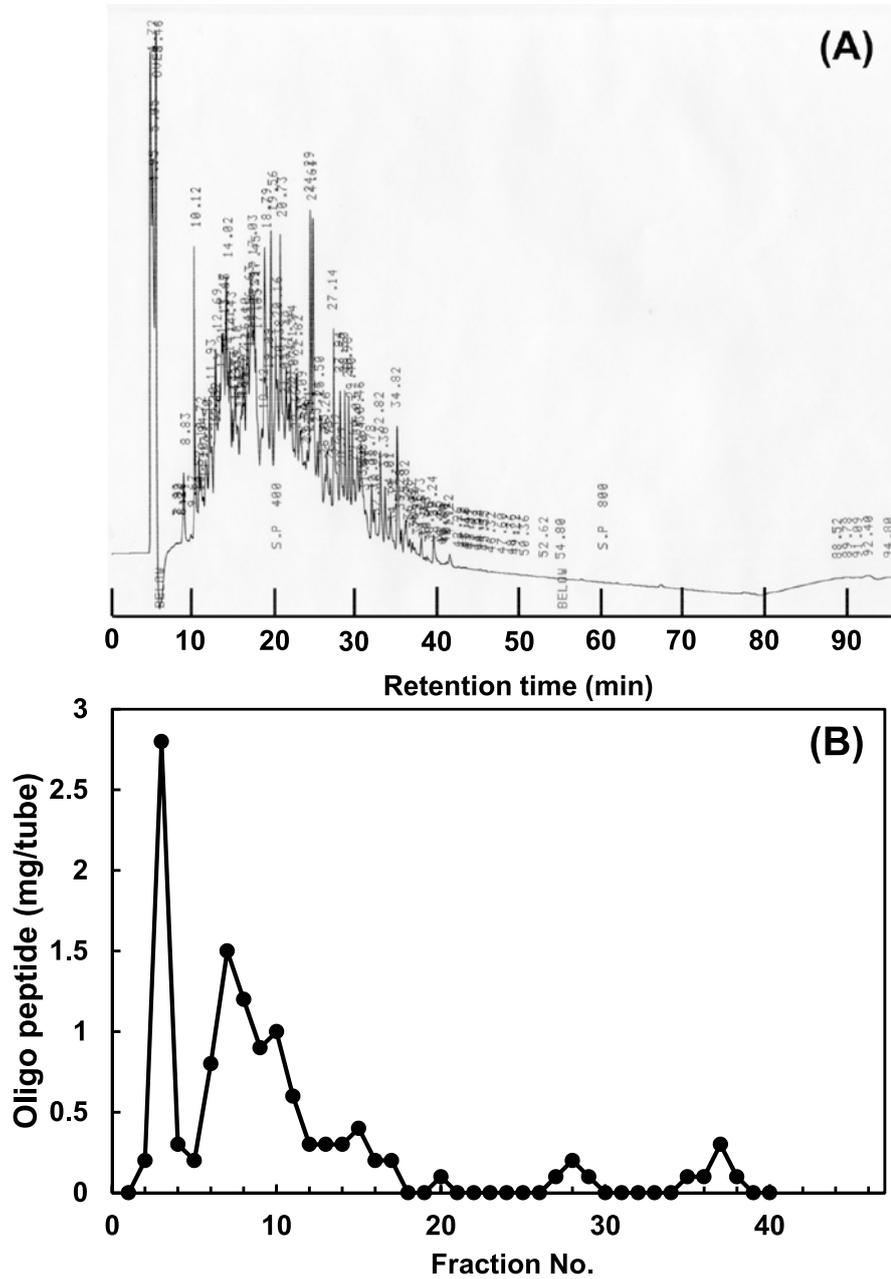


Fig. 2. Cosmosil AR-II を用いた逆相クロマトグラフィーによる卵殻膜由来ペプチドの分画
 (A) Amicon Ultra-3K を用いたフィルター濾過により得られた通過液を方法に述べた条件にて分画した。
 (B) 分画したフラクションのペプチド濃度はニンヒドリン法にて定量し、GlyGlyGly 換算で算出した。

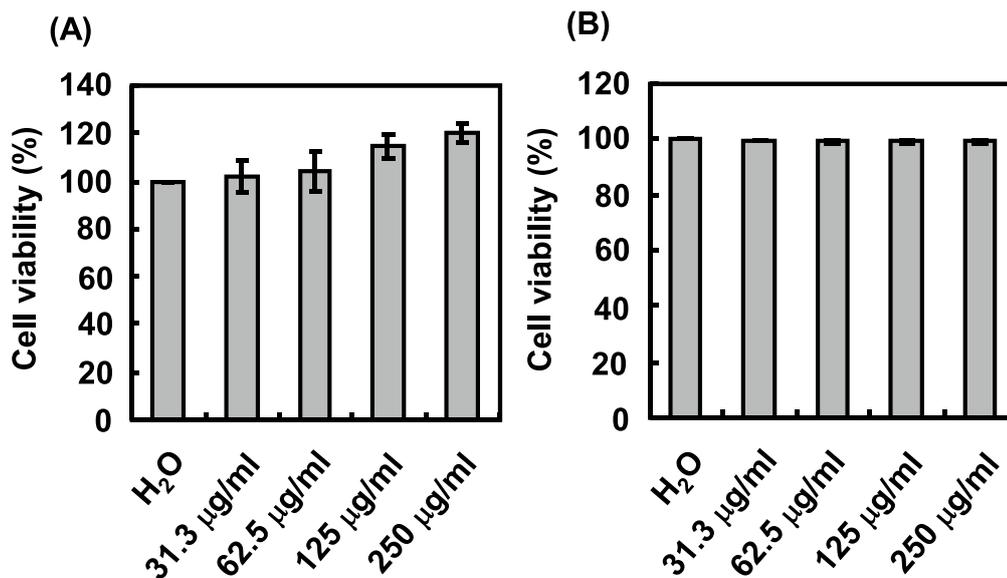


Fig. 3. 卵殻膜由来ペプチドの毒性試験

(A) L6 細胞に水(陰性対照)、卵殻膜ペプチド(31.3 ~ 250µg/ml)を4時間作用させた。その後クリスタルバイオレットで染色し細胞生存率を測定した。(B) 3T3-L1 細胞に分化誘導剤をかけると同時に水(陰性対照)、卵殻膜由来ペプチド(31.3 ~ 250µg/ml)を3日間作用させた。その後5日間培養した脂肪細胞をクリスタルバイオレットで染色し測定した。値は平均 ± 標準偏差(n=3)を示しており、水を100%としたときの割合を示す。

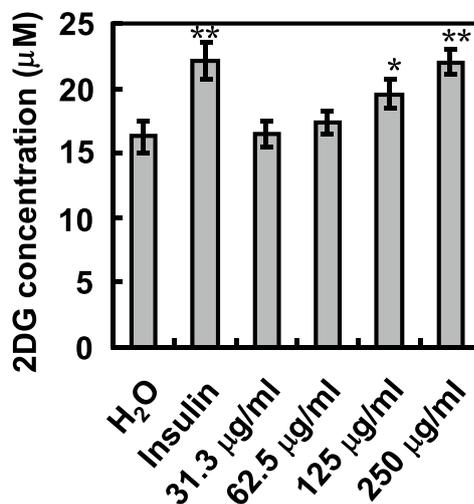


Fig. 4. 卵殻膜由来ペプチドが糖取り込みに及ぼす効果

L6 細胞に水(陰性対照)、100nM インスリン、卵殻膜ペプチド(31.3 ~ 250µg/ml)を4時間作用させた時の細胞内への糖取り込み量を測定した。実験結果は平均 ± 標準偏差(n=3)を示している。Dunnett を用いて統計処理し、水と比較した場合の有意水準が * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ になった場合に有意差があるとみなした。

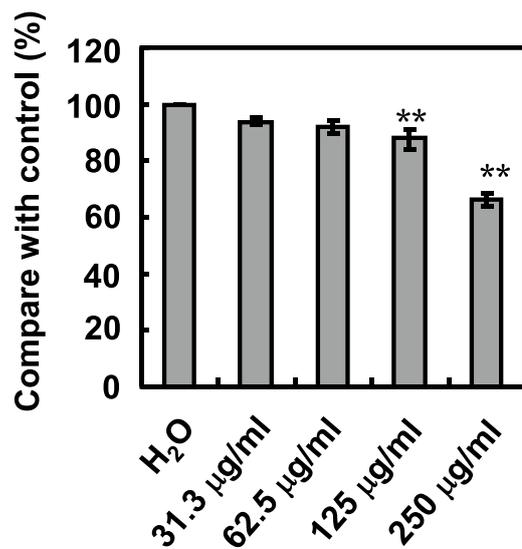


Fig. 5. 卵殻膜由来ペプチドが脂肪蓄積に及ぼす効果

3T3-L1 細胞に分化誘導剤をかけると同時に水(陰性対照)、卵殻膜由来ペプチド(31.3 ~ 250µg/ml)を3日間作用させた。さらに5日間培養した脂肪細胞の脂質蓄積量を測定した。実験結果は平均 ± 標準偏差(n=3)を示しており、水を100%としたときの割合を示している。Dunnetを用いて統計処理し、水と比較した場合の有意水準が $**p < 0.01$ になった場合に有意差があるとみなした。