

卵殻膜由来ペプチドの肥満・高血糖予防効果の可能性探索

神戸大学大学院農学研究科・教授 芦田 均

■ 緒 言

鶏卵タンパク質は、理想的なアミノ酸スコアを持つタンパク質として知られているが、鶏卵の外側を覆う卵殻部は、卵重量の約 10% [卵殻(9.1%)、卵殻膜(0.9%)] を占めており、その多くは不可食部として廃棄されている¹⁾。近年、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なわれてきた。卵殻膜の有効利用に関する先行研究として、膜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、保湿効果などに効能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、有効利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。竹中らは、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⁾。これを基盤技術として、竹中は、昨年度旗影会の助成を受けて、*P. aeruginosa* ME-4 株が分泌する卵殻膜分解酵素遺伝子の大量発現系を構築し、培養液よりも効率よく卵殻膜を分解できる組み換え酵素を得ることに成功した⁸⁾。さらに、酵素により分解されて生じた卵殻膜由来ペプチドに、筋肉細胞へのグルコース取り込み増加作用があることを示唆するデータを得た。

そこで本研究は、この成果を発展させて、卵殻膜由来ペプチドの肥満・高血糖予防効果の可能性探索のため、組み換え卵殻膜分解酵素を精製し、精製した酵素より卵殻膜を可溶化して、得られたペプチド混合物を用いて、筋肉細胞への糖取り込みを指標とした高血糖予防効果の検証を行った。

■ 方 法

(1) L6 筋芽細胞の培養・分化・処理

L6 筋芽細胞を 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) を含む MEM 培地によってコンフルエントになるまで培養した。その後、培地を 2% (v/v) FBS を含む MEM 培地に交換し、2 日ごとに培地交換を行うことで筋管細胞へと分化させた。分化 5-7 日目の細胞を顕微鏡観察下で、筋管形成を確認した後に、培地を 0.2% BSA を含む無血清 MEM 培地に交換し 14-18 時間脱感作をおこなった。脱感作後、卵殻膜由来ペプチド(0.5-4mg/ml) を 60、120、240 分作用させ、実験に用いた。

(2) L6 筋管細胞へのグルコース取り込み試験

グルコース取り込み試験は、昨年度の報告に準じて行った⁸⁾。すなわち、脱感作した L6 筋管細胞に卵殻膜由来ペプチドを 60、120、あるいは 240 分作用させ、次いで、グルコースアナログ 1mM 2-デオキシグルコース(2DG) を 20 分間作用させ、2DG の細胞内取り込み量を測定した。陰性対照としては、同量の滅菌水を、陽性対照としては 100nM インスリンを細胞に作用させた。

(3) マウスを用いたグルコース負荷試験

動物実験は、「神戸大学における動物実験に関する指針」に従って実施した。ICR 雄性マウス[日本エスエルシー(株)]を市販固形飼料と水を自由摂取させながら、23°Cで 8:00-20:00 明期/20:00-8:00 暗期の 12 時間明暗サイクル下で 7 日間順化飼育した。マウスを 14 時間絶食させた後、水投与(コントロール)群、卵殻膜投与 1 時間群、そして卵殻膜投与 2 時間の群の 3 群(各群 5 匹)に分けた。コントロール群には蒸留水、卵殻膜投与群には蒸留水に懸濁した卵殻膜を 10mg/kg・体重となるようにゾンデ針で強制経口投与した。コントロール群と、卵殻膜投与 2 時間群については、水または卵殻膜を経口投与してから 2 時間後に、卵殻膜投与 1 時間群に関しては卵殻膜投与後 1 時間後にグルコース溶液を 1g/kg・体重となるように経口投与することで、耐糖能試験を実施した。グルコース負荷前(0 分)、

負荷 15、30、60、ならびに 120 分後にマウスの尾先端より採血した。回収した血液より血漿を調製し、市販グルコース測定キット(和光純薬製ラボアッセイ™ グルコース)を用いて血漿中のグルコース量を測定した。

(4)卵殻膜の高血糖予防効果のマウスでの検証

ICR 雄性マウスを順化飼育した後、マウスを水投与(コントロール)群、卵殻膜投与 1 時間群、そして卵殻膜投与 2 時間の群の 3 群(各群 4 匹)に分け、上記と同様にコントロール群には蒸留水、卵殻膜投与群には蒸留水に懸濁した卵殻膜を 10mg/kg・体重となるようにゾンデ針で強制経口投与した。これらのマウスから心臓採血を行い、調製した血漿を用いて血糖値、トリグリセリド量と総コレステロール量について、市販測定キット(和光純薬製ラボアッセイ™ シリーズ)を用いて測定した。また、後肢ヒラメ筋を摘出し、細胞膜画分を調製した⁹⁾。この細胞膜画分を用いて、骨格筋のグルコース取り込みに大きな役割を果たすグルコーストランスポーター4(GLUT4)の細胞膜移行をウエスタンブロット法により検討した⁹⁾。対照には、細胞膜に普遍的に発現している GLUT1 の発現量を調べた。

(5)*P. aeruginosa* ME-4 株の培養と組み換え卵殻膜分解酵素の精製

P. aeruginosa ME-4 由来卵殻膜酵素(組み換え酵素)の生産の大腸菌の培養は、既報の方法に従った⁷⁾。つまり、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°C、140rpm で振とう培養した。

既報の方法に従い⁷⁾、培養して得られた菌体から調製した細胞抽出液をアセトン処理・陰イオン交換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¹⁰⁾。

(6)精製酵素および市販酵素による卵殻膜の可溶化

組み換え酵素と市販の消化酵素剤(Pancreatin from porcine pancreas, Sigma Aldrich, P3292-25G)を用いた。145ml の 10mM Sodium-potassium phosphate buffer(pH6.5)に卵殻膜粉末(750mg)と 5ml の酵素液(60U/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。また、可溶性ペプチド量は、ニンヒドリン法によって定量し、GlyGlyGly 換算で濃度を算出した。

[HPLC 条件]

- ・カラム :COSMOSIL 5C18-AR-II(4.6×250mm、ナカライテスク)
- ・容離液 :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 :0.5ml/min
- ・検出 :UV216nm

■ 結果

(1)L6 筋管細胞へのグルコース取り込み試験

昨年度の竹中の旗影会報告書⁸⁾にある卵殻膜ペプチドの分取逆相 HPLC により得た分画物のクロマトグラム(Fig.1A)とニンヒドリンによるペプチド量(Fig.1B)に従って、9 画分に分けた。有効ペプチドに関する情報を得るため、各画分を L6 筋管細胞に作用させ、グルコース取り込み試験を行ったところ、全ての画分で取り込みが上昇した(図 1C)。特異的な画分が得られなかったことと、各画分の量が限られており、これ以上評価することができなかったことから、有効ペプチドに関する情報を得ることを断念し、卵殻膜をマウスに投与することで高血糖予防効果が認められるか否かを評価することとした。

昨年度の竹中の旗影会報告書⁸⁾にあるように、われわれはこれまでに L6 筋管細胞や 3T3-L1 前駆脂肪細胞をもちいて卵殻膜由来ペプチドを作用させ、卵殻膜由来ペプチドに筋肉細胞への糖取り込み促進効果や脂肪細胞の脂肪蓄積抑制効果があることを培養細胞レベルで明らかにしてきたが、実際に肥満・高血糖予防効果を明確にするには、少なくとも実験動物により培養細胞レベルで検討してきたことを検証する必要がある。そのため、動物実験での投与量と投与時間を決めることは重要である。まず、投与量に関しては、卵殻膜を水で懸濁し、胃ゾンデを用いて投与できる濃度を調べ、10mg/kg・

体重以下でないと、不溶性の卵殻膜の沈殿が早く、投与できないことが判った。そのため、投与量は10mg/kg・体重と定めた。次に、投与後の筋肉摘出時間を定めるための予備検討として、L6筋管細胞に卵殻膜ペプチドを作用させて経時的な変化を調べた(Fig.2)。その結果、ペプチドを作用させて1時間後からグルコース取り込みが上昇するが、有意な上昇は120分以降に見られ、240分後ではやや低下した。なお、卵殻膜ペプチドによるグルコース取り込み上昇は、陽性対照である100nMインスリンと匹敵する程度であった。そこで、長時間経つと効果が薄れることを懸念して、卵殻膜が消化されて吸収され、血流に乗って筋肉に到着するまでの時間として、投与後1～3時間であると推定した。

(2)卵殻膜の高血糖予防効果のマウスでの検証

卵殻膜の高血糖予防効果を動物実験で検証するため、マウスを用いたグルコース負荷試験を実施した。先の培養細胞実験から推測した投与時間から、グルコース負荷の1または2時間前に卵殻膜10mg/kg・体重を経口投与し、グルコース負荷後の血糖値を経時的に測定した。その結果、コントロール群では投与15分後に血糖値が最高となり120分後に投与前の正常レベルに戻った(Fig.3A)。これに対し、卵殻膜1時間前投与群では、グルコース投与15、30、60分値で、水群と比べて有意に血糖値の上昇抑制が認められた。卵殻膜2時間前投与群でも、有意差はないものの抑制傾向があり、最高血糖に達する時間が遅延することが認められた。血糖値の曲線下面積も卵殻膜1時間前投与群では、水群と比べて有意に低くなった(Fig.3B)。

そこで、卵殻膜投与1時間後にマウスから心臓採血するとともに後肢ヒラメ筋を摘出し、細胞膜画分を調製した。心臓採血した血液から血漿を調製し、血糖値、総コレステロール値、ならびに中性脂肪(トリグリセリド)値を測定したところ、血糖値には変化が見られなかった(Fig.4)。すなわち、グルコース負荷をしていない条件では血糖値が低下しないという結果であったが、このことから、卵殻膜は高血糖状態では血糖値を低下させるが、空腹時には低血糖にならないという点で好ましい結果である。また、中性脂肪には変化がないが、コレステロールは投与時間に依存して低下傾向を示した。

次に、卵殻膜が消化されて有効ペプチドが効果を示す量だけ生じているのであれば、骨格筋で主にグルコース取り込みを担うグルコーストランスポーター4(GLUT4)が細胞膜に移行しているのではないかと仮説を立て、GLUT4タンパク質を骨格筋の細胞膜上(膜移行量)と組織可溶化液全体(発現量)を用いて、ウエスタンブロット法により検討した(Fig.5)。その結果、GLUT4の細胞膜移行の増加は認められず、むしろ低下傾向にあった。また、発現量にも変化がなかった。また、対照として普遍的に細胞膜上に存在するGLUT1についても検討したところ、細胞膜上でも細胞全体でも発現量に変化がないことが確認できた。

(3)組換え卵殻膜分解酵素および消化酵素剤による卵殻膜の可溶化試験

動物実験の結果から、GLUT4の細胞膜移行が認められなかったことから、卵殻膜による高血糖予防効果は、培養細胞で認められた筋肉細胞へのグルコース取り込み促進効果によるものではないことが強く示唆された。このことは、動物の膵液由来加水分解酵素では有効なペプチドが生成せず、微生物由来の卵殻膜分解酵素での消化で生じたペプチドが効果を発揮する可能性がある。そこで、微生物由来の卵殻膜分解酵素と市販の膵液由来加水分解酵素代表としてPancreatinを用い、卵殻膜の可溶化を比較した。

酵素処理(卵殻膜の可溶化)と並行し、酵素無添加の反応系およびPancreatinのみの反応系からも限外ろ過通過液を回収し、卵殻膜由来可溶性ペプチド量を調べた。その結果、酵素処理しなかった際の可溶性ペプチド量は 2.8 ± 0.05 mg/150ml batchであり、卵殻膜分解酵素およびPancreatinにて処理するとそれぞれ 45.6 ± 1.1 mg/150ml batchおよび 55.1 ± 4.1 mg/150ml batchとなった。

卵殻膜由来可溶性ペプチドのペプチドマッピングを行うため、微生物由来の卵殻膜分解酵素およびPancreatinによる処理液から回収して得られた可溶性ペプチドについてHPLC分析した(Fig.6(A) and 6(B))。卵殻膜分解酵素による処理液からは多数のペプチドと考えられるピークが見られた。Pancreatin処理でも卵殻膜分解酵素と比べるとピーク数は少ないものの、ペプチドの蓄積を示すピークが複数見られたが、対照として調製したPancreatinのみの反応系からもこれらのピークが観察された。今回、ペプチドのアミノ酸配列解析をしていないが、Pancreatinに含まれるアミラーゼ、リパーゼ、トリプシン、リボヌクレアーゼがプロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ)により加水分解されて生じたと考えらえる。

■ 考 察

卵殻膜を卵殻膜分解酵素により処理して生じたペプチド混合物を分画して、得られた画分を培養筋管細胞に作用させてグルコース取り込み試験を実施したところ、全ての画分に効果が認められたことから (Fig.1)、有効性を示すペプチドは複数あることが示唆された。しかし、分画物の量が少なかったために、これ以上の検討を行うことはできなかった。そこで、まず動物実験での検証を試みた。

マウスに卵殻膜を投与してグルコース負荷試験を実施した結果から、卵殻膜に高血糖予防効果があることが明らかになった (Fig.3)。しかし、卵殻膜を投与したマウス筋肉での GLUT4 の細胞膜移行が認められなかったことから (Fig.5)、培養細胞での結果との間に相違があった。この原因として、次の二点が考えられる。①卵殻膜は、マウス消化酵素では有効性を示すペプチドが生じない。②有効ペプチドが体内に入らないか、さらに消化されてしまう。

このうち、②については、現段階で有効ペプチドが同定できていないので、体内吸収に関する試験を実施できない。そのため、①に関する可能性を探索することと、動物実験に使用できるだけのペプチドを確保することを目指して、これまでよりスケールアップして、卵殻膜を卵殻膜分解酵素および Pancreatin により加水分解処理した。HPLC のクロマトグラムから、昨年度の竹中の旗影会報告書⁸⁾と同様の結果が得られたことから、スケールアップは成功したと判断した。次に、これらの酵素により生じたペプチドを調べた結果、GlyGlyGly 換算での総ペプチド量には顕著な相違はなかったが、HPLC 分析によるペプチドマッピングをすると、卵殻膜分解酵素により特異的に生じたペプチドは多くあったが、Pancreatin により特異的に生じたペプチドはあまり見られなかった。卵殻膜分解酵素を添加した反応系では、単一酵素のため卵殻膜由来タンパク質の限定分解が期待できるが、Pancreatin にはトリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ等の種々のタンパク質分解酵素が含まれており、さまざまなアミノ酸からオリゴペプチドまでに加水分解されたのかもしれない。今後、卵殻膜分解酵素を作用させて調製したペプチドをマウスに投与して、グルコース負荷試験と筋肉組織での GLUT4 の細胞膜移行を検証する必要がある。

本課題での実験結果から、哺乳類の消化酵素で卵殻膜を処理しても高血糖予防に有効なペプチドは生じないか、生じても量的に少ないことが推測された。それでは、何故卵殻膜を経口投与したマウスで、グルコース負荷試験での耐糖能改善効果が出たのかということが疑問として残る。これについては、更なる試験が必要であるが、卵殻膜の未消化物や消化物が小腸でのグルコース吸収阻害をしたことが考えられる。このことは、卵殻膜を単回投与したマウスでコレステロールが低下傾向を示したこと (Fig.4)からも推察できる。すなわち、卵殻膜あるいはその消化物がコレステロールと結合しての腸肝循環を阻害したと考えられる。別の可能性としては、卵殻膜あるいはその消化物が小腸でのグルコースの取り込みに関わるナトリウム-グルコース共輸送体タンパクの SGLT-1 が阻害されたことも考えられる。これらの点についても、今後の検討課題である。

■ 要 約

マウスに卵殻膜を投与してグルコース負荷試験を実施した結果から、卵殻膜に高血糖予防効果があることが明らかになった。しかし、卵殻膜を投与したマウス筋肉での GLUT4 の細胞膜移行が認められなかったことから、この作用は、腸管でのグルコース吸収阻害によることが考えられた。また、動物実験の結果は、昨年度見出した培養筋管細胞での結果と異なるものであった。そこで、卵殻膜を卵殻膜分解酵素および Pancreatin により加水分解処理した。これらの酵素により生じたペプチドを調べた結果、GlyGlyGly 換算での総ペプチド量には顕著な相違はなかったが、HPLC 分析によるペプチドマッピングをすると、微生物由来卵殻膜分解酵素と Pancreatin により生じた特異的ペプチドは差異があった。このことから、哺乳類のタンパク質分解酵素では卵殻膜から有効性を示すペプチドが生じないことが推察され、微生物由来卵殻膜分解酵素により生じたペプチドが、筋肉細胞へのグルコース取り込み促進作用を有することが強く示唆された。また、有効性を示すペプチドが複数あることも示唆された。

■ 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 bienzyme-immobilized 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.* 107:373-378.
8. 竹中慎治 2013 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. 旗影会報告書 48-56.
9. S. Nishiumi and H. Ashida 2007. Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:2343-2346.
10. S. Takenaka, S. Hano, M. Cheng, K. Yoshida, and K. Aoki. 2012. Organic solvent-tolerant elastase efficiently hydrolyzes insoluble, cross-linked, protein fiber of eggshell membranes. *Biotechnol. Lett.* 34:949-955.

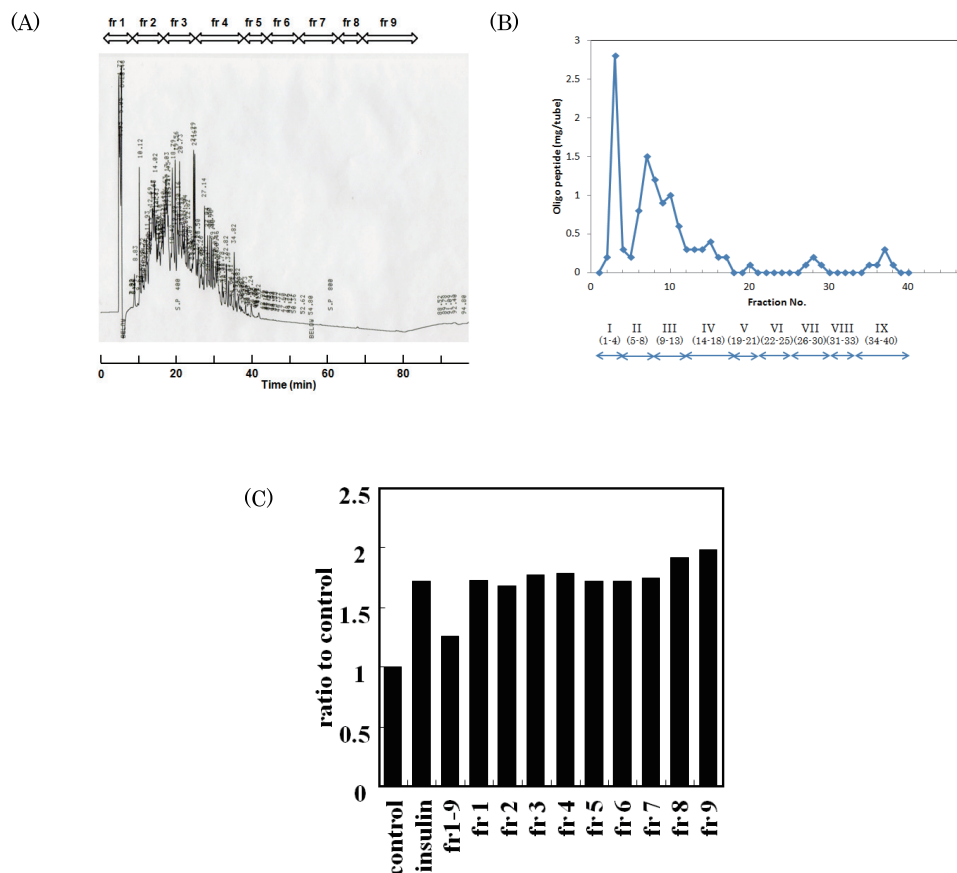


Fig.1 卵殻膜分解酵素により分解したペプチドの有効成分探索

(A) 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(文献 8 改変)。(B) (A) のペプチドの量(文献 8 改変)。(C) 各画分の筋肉細胞へのグルコース取り込み量。各画分のペプチドは、分画前の Fr1-9 では 250 μ g/ml(乾物重で 2mg/ml)であり、各画分は乾物重で 2mg/ml で 4 時間細胞に処理してグルコース取り込み量を測定した。

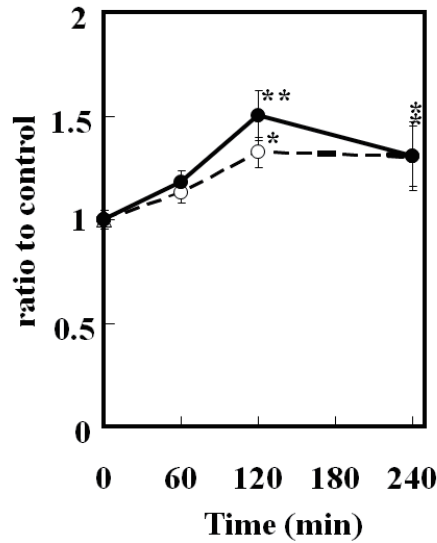


Fig.2 卵殻膜由来ペプチドの L6 筋管細胞へのグルコース取り込み活性の経時的変化
 L6 細胞に水 (control)、100nM insulin、卵殻膜ペプチド (250 μ g/ml) を 60,120,240 分作用させ、グルコース取り込み量を測定した。○ :insulin、● : 卵殻膜ペプチド。実験結果は、control との相対比で表し、平均 \pm 標準偏差 (n=3) を示している。Dunnet を用いて統計処理した (* p <0.05,** p <0.01)。

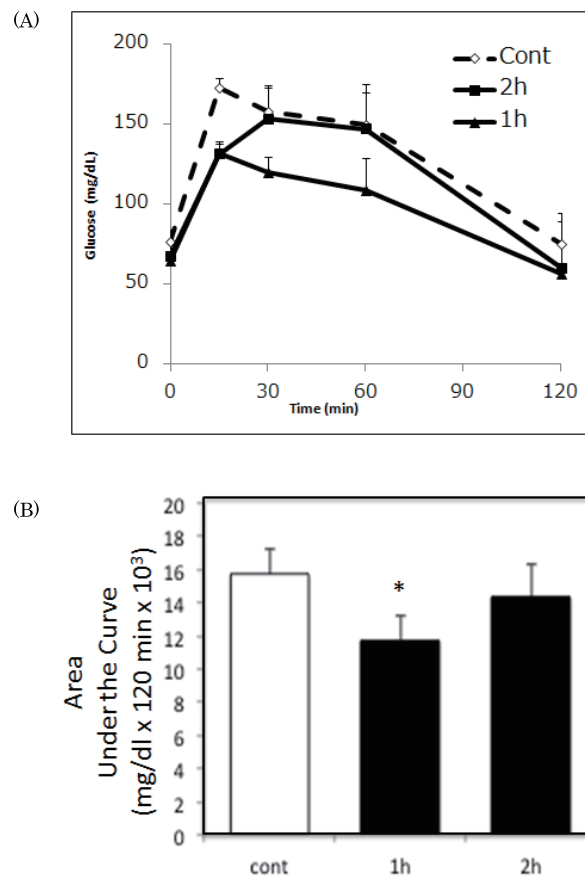


Fig.3 卵殻膜を投与したマウスの耐糖能試験結果
 ICR 雄性マウスを水投与 (コントロール) 群、卵殻膜投与 1 時間群、そして卵殻膜投与 2 時間の群の 3 群 (各群 4 匹) に分け、水投与群には蒸留水を卵殻膜投与群には卵殻膜を 10mg/kg \cdot 体重となるように経口投与した。これらのマウスを用いて耐糖能試験を行った。

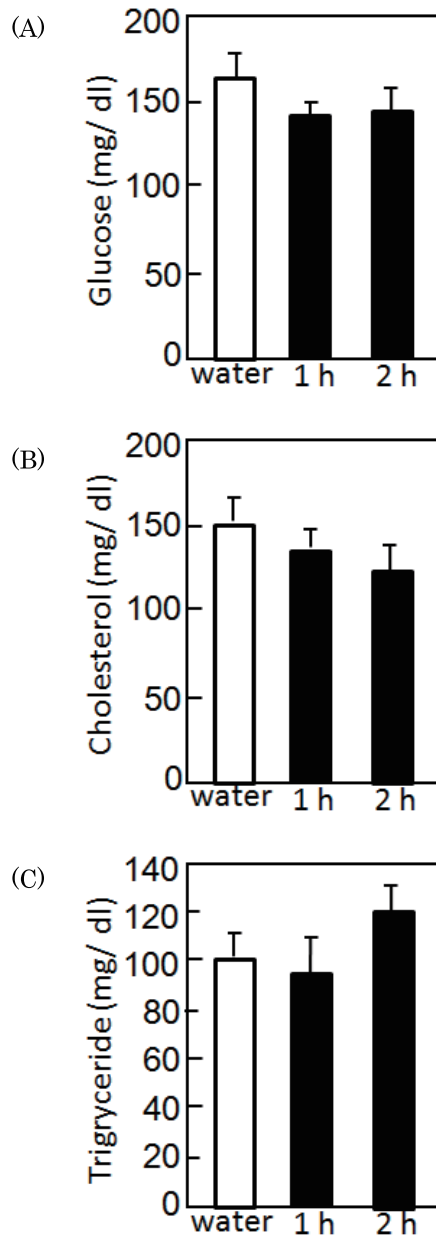


Fig.4 卵殻膜を投与したマウスの(A)血糖値、(B)血漿コレステロール量、(C)トリグリセリド量
ICR 雄性マウスを水投与(コントロール)群、卵殻膜投与1時間群、そして卵殻膜投与2時間の群の3群(各群4匹)に分け、水投与群には蒸留水を卵殻膜投与群には卵殻膜を10mg/kg・体重となるように経口投与した。これらのマウスから心臓採血を行い、調製した血漿を用いて血糖値、総コレステロール量、ならびにトリグリセリド量を測定した。

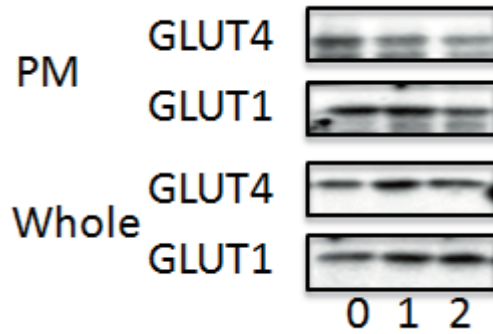


Fig.5 卵殻膜を投与したマウス後肢筋肉の細胞膜(PM)と組織溶解液(Whole)の GLUT4 ならびに GLUT1 のタンパク質量

ICR 雄性マウスを水投与(コントロール)群、卵殻膜投与 1 時間群、そして卵殻膜投与 2 時間の群の 3 群(各群 4 匹)に分け、水投与群には蒸留水を卵殻膜投与群には卵殻膜を 10mg/kg・体重となるように経口投与した。これらのマウス後肢筋肉から細胞膜と組織溶解液を調製し、GLUT4 ならびに GLUT1 のタンパク質量をウエスタンブロット法にて測定した。

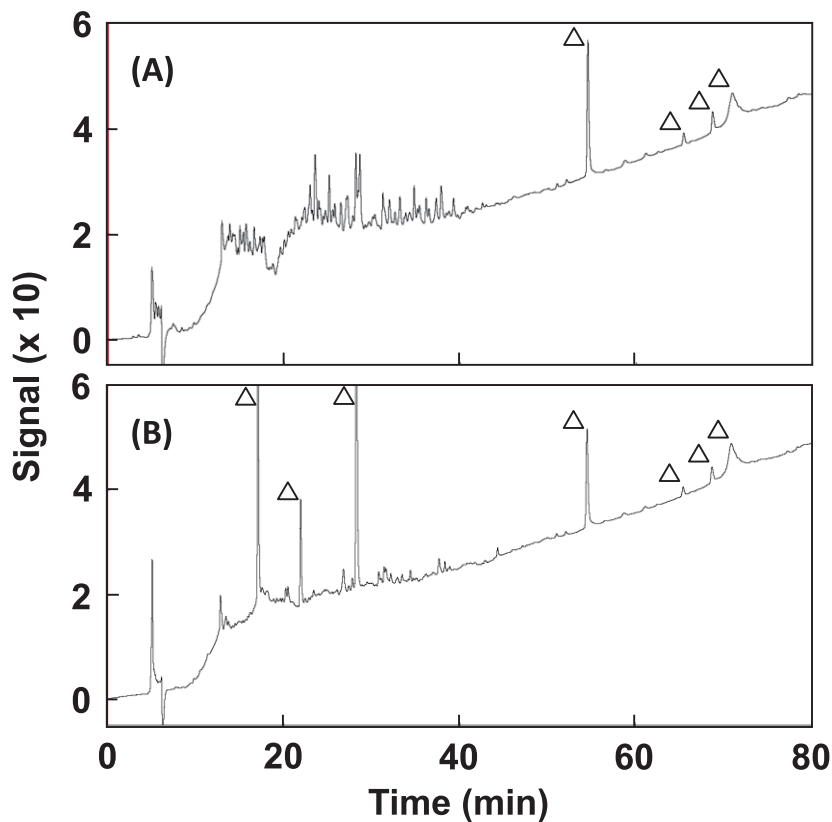


Fig.6 卵殻膜由来可溶性ペプチドのペプチドマッピング

(A)卵殻膜分解酵素、および(B)pancreatin にて卵殻膜を分解後、生じた可溶性タンパク質・ペプチドについて有効分画範囲 3kDa 以下のろ過膜にて通過液を得、HPLC 分析に供した。対照サンプル(卵殻膜のみまたは酵素液のみを添加)についても見られた非特異的ピークには”△”をつけた。