

鶏卵タンパク質由来ペプチドの新規機能の探索と有効利用

九州栄養福祉大学食物栄養学部・教授 杉元 康志

■ 目的

高齢化社会を迎え、国民の健康に対する意識は非常に高くなる一方、如何に加齢や生活習慣に関係する疾患に罹らないあるいは防御することが大きな課題である。過剰な栄養やバランスの悪い摂取がもたらす健康への悪影響は認識されているが、飽食の時代でなかなかヒトの意識は変わらないのが現状である。そうした中、食品が持つ潜在的疾病予防や老化防止などの機能が注目されており、積極的な利用が進められている。食品の機能性成分については多くの様々な疾患に対して予防・改善の情報があり、ヒトへの検証実験が盛んに行われている。しかし、食品成分の疾患への効果の検証は難しく、疾患予防や改善に利用をするにはより確実な検証が必要である。

社会的に大きな問題となっている疾患にアミロイド病やII型糖尿病がある。両者には共通する点もあり、加齢とともに発症し、快復が難しいがため、効果ある治療薬の開発が急がれている。これらの疾患予防に食品成分の利用も研究されている。本研究では鶏卵タンパク質分解物の機能を検証するために多くのタンパク質変性疾患に関係するアミロイド線維の抑制効果と糖尿病における毛細血管損傷の原因の1つとなるポリオール経路の阻害効果に焦点を当てた。また、鶏卵タンパク質分解物の新しい機能としてマラリア感染抑制効果についても検証した。

■ 実験材料と方法

1 鶏卵由来のタンパク質分解物のアミロイド線維形成抑制効果の検証

アミロイド線維形成実験ではアミロイドベータ(A β)-42 ペプチド、およびヒトリゾチームおよび卵白リゾチームを用いた。アミロイド線維形成の評価はThioflavin T(ThT)を使って蛍光強度の変化によって行った¹⁾。線維形成抑制効果については鶏卵の卵白、卵黄、カラザおよび卵殻膜タンパク質の分解物を使って検討した。

鶏卵由来のタンパク質分解物の分離は逆相カラム TSKgeIODES-80TsQA6.0 \times 200nm を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で行った。

A β -42 ペプチドの調製とアミロイド線維形成は旗影会平成 27 年度研究報告書の通り行った²⁾。ヒトおよびリゾチームの調製とアミロイド線維形成は旗影会平成 27 年度研究報告書の通り行い、所定の日数、インキュベートしてアミロイド線維の形成を観察した。アミロイド線維抑制効果は鶏卵由来タンパク質分解物(1mg/ml)をそれぞれのアミロイド線維形成系に添加してThTの蛍光強度の変化を観察することで評価した。

2 鶏卵由来のタンパク質分解物の二糖類分解酵素抑制効果およびポリオール経路阻害効果の検証

マルターゼ、スクラーゼおよびラクターゼの活性はそれぞれの基質であるマルトース、スクロース、ラクトースを用いて、生じるグルコースを定量することで評価した。50mM リン酸緩衝液(pH6.8)で希釈しそれぞれ2%基質溶液を調製した。鶏卵由来タンパク質分解物は5%(5mg/ml)となるように水に溶解した(卵黄については希塩酸で溶解)。反応液(基質溶液 100 μ l、濃度の異なる鶏卵由来タンパク質分解物溶液 100 μ l (0、5、25、50、100 μ l、総量は水で調整)に酵素 20 μ l を加え、室温にて 20 分間反応させた。92 $^{\circ}$ C、3 分の加熱で酵素を失活させた後、マイクロプレートにそれぞれ 20 μ l ずつとり、発色試薬 100 μ l を加え、マイクロプレートリーダーを用いて生成されたグルコースを波長 505nm の吸光度を測定した。

ポリオール経路阻害実験は鶏卵タンパク質分解物によるアルドース還元酵素およびソルビトール脱水酵素の阻害効果を観察することで行った。アルドース還元酵素の活性はグルコースからソルビトールが生成されるとき NADPH の減少、ソルビトール脱水酵素の活性はソルビトールからフルクトースが生成される NADH の増加を波長 340nm で測定することで評価した。

3 マラリア感染に関係するヘモゾイン形成および分解抑制効果の検証

ヘモゾイン形成手順は、Kaeko Kamei らの方法に準じて行った³⁾。つまり、50 μ l の 200 μ M Heme

solution 溶液(ヘミン 16.3mg を DMSO 1ml に溶かし、1M Acetate buffer、pH4.8 で調製)、20 μ l の 200mM H₂SO₄ および H₂O あるいはペプチド溶液(0 ~ 100mg)を 96well plate に加え、ヘモゾインへの重合化の誘発剤の tween-20 を 50 μ l 加え、ヘモゾインの形成をおこなった。ヘムのピークの吸光度 405nm(ソーレー帯)およびヘモゾインのピークである 620nm(Q 帯)を 37°C でインキュベートし、0h、4 時間インキュベートした。ヘモゾインの形成能は遊離ヘムとヘモゾインの割合を吸光度から算出した。各ペプチドのヘモゾイン形成阻害能は未添加およびポジティブコントロール(クロロキン(CHQ)、最終濃度: 1mM)から算出した。

ヘモゾイン分解能評価は上記のヘモゾイン形成手順に従って形成したヘモゾインを遠心分離によって回収し、Tris-buffered saline(TBS)で懸濁し、ペプチドサンプルを添加して 37°C、4 時間インキュベートした。ヘモゾイン分解は目視および顕微鏡観察をおこなった。

■ 結果

1 鶏卵由来のタンパク質分解物のアミロイド線維形成抑制効果

前回の報告書で報告したように卵黄タンパク質分解物とカラザタンパク質分解物に A β -42 による蛍光強度の上昇を明らかに抑制する効果が見られた。また、卵殻膜タンパク質分解物にも抑制効果が観察された。一方、リゾチームの線維形成抑制実験では卵白タンパク質分解物とカラザタンパク質分解物に、ヒトリゾチームおよび卵白リゾチーム共に抑制効果が観察されたことから、アミロイド線維形成抑制ペプチドの単離はカラザタンパク質分解物から行うこととした。

カラザタンパク質分解物の逆相カラム TSKgeI ODS-80TsQA による HPLC 分離パターンを図 1 に示した。サンプル(2mg/ml 500 μ l)をカラム吸着後、アセトニトリル濃度を 0% ~ 100% まで上げてペプチドを溶出させた。その結果、17 のピークが検出され、それぞれのピークについて A β -42 凝集抑制効果およびリゾチーム凝集抑制効果を調べた。A β -42 凝集抑制効果については画分 2、4、5、6、7 に抑制効果が見られ、特に 4、5、6 は強い効果を観察した(本実験に使った分離ペプチドは HPLC を 10 回行い、分離回収し、濃縮したものを 10 分の 1 使用したものでカラザタンパク質分解物 0.5mg に相当する)(図 2)。一方、リゾチームに対しては 1、2、3、8 が抑制効果を示したが、画分 2 が最も強く、有望なペプチドであることが期待された(図 2)。

2 鶏卵由来のタンパク質分解物の糖尿病予防効果の検証

2-1 鶏卵タンパク質分解物の二糖類分解酵素阻害

マルターゼ、スクラーゼおよびラクターゼについて卵白、卵黄、カラザ、卵殻膜それぞれのタンパク質分解物の阻害効果を検証した。その結果、卵殻膜タンパク質分解物にマルターゼおよびスクラーゼ阻害が見られ、卵白タンパク質分解物にラクターゼ阻害が見られた。よって、ここでは糖尿病に最も関係すると思われるマルターゼとスクラーゼを阻害する卵殻膜タンパク質分解物を HPLC でペプチドを分画し、活性を調べた。HPLC 分画では 24 のピークを認め(図 3)、それぞれのピークの酵素阻害活性を見た。マルターゼ阻害は画分 1、9、13、17 に、スクラーゼ阻害は 5、6、9、13、20 に見られ、阻害ペプチドはいずれも複数であることが確認された(図 4)。

2-2 鶏卵タンパク質分解物のポリオール経路関連酵素の阻害

鶏卵タンパク質分解物のポリオール経路関連酵素、アルドース還元酵素(AD)およびソルビトール脱水素酵素(SDH)の阻害効果を見た。卵殻膜ペプチドと卵黄ペプチドに AD および SDH 阻害作用があることが明らかになった。特に卵殻膜ペプチドに活性が高かったので、卵殻膜タンパク質分解物を HPLC で分画し、SDH に対する活性ペプチドを分離した。画分 10、11、12、17、22 の複数のフラクションに活性を認めた(図 5)。AD については検討中である。

3 卵殻膜タンパク質分解物のヘモゾイン形成阻害効果および分解促進効果

3-1 卵殻膜タンパク質分解物のヘモゾイン形成阻害効果

マラリアにとって遊離のヘムは有害となるためこれを重合してヘモゾインにして無毒化している。これまでチオラクトマイシンなどにヘモゾイン形成抑制効果が知られているが、最近、ミルクタンパク質にもその効果があるものが見つかっている。鶏卵由来タンパク質分解物にその効果があるかを検証した。その結果、卵殻膜タンパク質分解物がヘモゾインの形成を阻害することが明らかになった(図 6)。分解物はペプチドの混合物なので、ポジティブコントロールの 1mM のチオラクトマイシンとは比較は難しいが、10mg/ml で強い効果があると思われる。卵白、卵黄およびカラザタンパク質分解物には阻害効果は認められなかった。

3-2 卵殻膜タンパク質分解物のヘモゾイン分解促進効果

マラリアは無毒化したヘムをヘモゾインの形で保持するが、これを分解すると毒性が再び発するとされており、クロロキンにその分解促進効果がある。卵由来タンパク質分解物に分解促進効果があるかを検証した。形成したヘモゾインは遠心分離で沈殿することからヘモゾインは可視で観察でき、また、光学顕微鏡でヘモゾイン粒子の大きさを測定することが出来る。図7に示すように卵殻膜タンパク質分解物はヘモゾイン分解促進効果が確認された。それは濃度依存的に分解が促進され、クロロキンやミルクタンパク質と同等の効果を示すことが明らかになった。定性的に行った実験ではあるが、卵殻膜タンパク質分解物をHPLCで分画して、得たいくつかのペプチドに同様の効果(ヘモゾイン形成阻害およびヘモゾイン分解促進効果)を確認した(データ省略)。

■ 考 察

鶏卵タンパク質の分解物であるペプチドの潜在的利用が図られる期待が増している。加齢や生活習慣に起因する様々な疾患や多くの感染症に対する予防や防御因子として活用するための基礎的研究が行われ、高血圧や脂質代謝の改善などの報告がなされている。しかし、機能あるペプチドの同定は少なく、利用も少ないのが現状である。

本研究は鶏卵タンパク質分解物からアミロイド線維形成阻止効果を示すあるいは糖尿病改善効果、マラリア感染予防効果を有するペプチドの探索・分離を目指してデータの蓄積を図った。その結果、カラザタンパク質分解物にアミロイド β ペプチドの凝集を抑制するいくつかのペプチドの存在を確認した。また、リゾチームを使ったアミロイド線維形成実験でカラザおよび卵白タンパク質の分解物に線維形成抑制効果があり、効果ペプチドを分離することができた。しかし、逆相クロマトグラフィーだけでは単一のペプチドを得ることができなかつたので、精製を進めるためにさらなるクロマトグラフィーが必要である。これらの効果ペプチドの作用機作については不明であるが、凝集を司る疎水性領域の集合を妨げる効果である可能性が高い。

同様に鶏卵タンパク質の分解物中に糖尿病の予防あるいは改善に寄与するペプチドの探索を行った。卵殻膜タンパク質分解ペプチドにマルターゼおよびスクラーゼ阻害が見られ、卵白ペプチドタンパク質分解にラクターゼ阻害が見られた。糖の吸収を抑制することで現在使われている α -グルコシダーゼ阻害剤と同様の作用ををすると思われ、天然物由来の治療薬として期待が持てる。

糖とたんぱく質の反応はメイラード(アミノカルボニル)反応であり、グリケーションともいわれ、タンパク機能を損なうことが知られ、糖尿病の合併症に大きく関与しているとされている。つまり、慢性的に高血糖が続くと、血液循環中や組織で、メイラード反応の終末化合物である糖化終末産物(AGEs)の生成が促進され、これがタンパク機能や血管組織に悪影響を与え、合併症を引き起こすとされている。グリケーションとなる糖は、グルコース、フルクトースが中心であり、フルクトースはグルコースからポリオール代謝経路にて生成される。フルクトースはグルコースよりグリケーション力が10倍ほど高いとされ、また、過剰のフルクトースが生成されるとフルクトースの代謝が阻害され、ソルビトールからフルクトースへの経路が行かなくなり、ポリオール代謝の中間体であるソルビトールが細胞内に蓄積することが知られ、その結果、細胞内の浸透圧が高くなり、浮腫を起こし、ナトリウムポンプに異常を来たすとも言われている。卵殻膜タンパク質由来のペプチドにポリオール経路、すなわちアルドース還元酵素(AD)とソルビトール脱水素酵素(SDH)を阻害するものが見つかった。過剰のフルクトースの生成を阻害し、AGEs産生を抑制し、タンパク質の機能阻害を防ぐことやソルビトール蓄積による細胞膜損傷を防御する可能性が示唆された。

卵殻膜タンパク質分解ペプチドにマラリアの感染を抑制する可能性が見つかった。マラリアが赤血球に侵入し、ヘモグロビンを栄養とするが、ヘムは生育を阻害するためヘムの重合体、ヘモゾインを形成して無毒化して生育することが知られている。マラリアの増殖阻害の1つにはヘモゾインの形成を抑制することである。また、形成したヘモゾインを分解すれば遊離のヘムとなり毒性を示すことから、分解を促進する効果あるものがあればマラリアの生育を抑えることが出来る。卵殻膜タンパク質分解ペプチドは両機能を有していた。これが実際 *in vivo* で効果があるかはこれからの研究の進展によるが、十分な期待が出来る。

鶏卵タンパク質の分解物、ペプチドにはアミロイド病、糖尿病など日本人が抱える重大な疾患に有効なものが含まれていると推定される。さらなる検証が必要であるが、その可能性は広く、期待の出来るものである。体内でのペプチドの消化を阻止し、細胞に如何に到達させるかの問題はあがあるが、機能ペプチドを単離・同定し、それをもとに改良していけば新しい予防・治療薬として活用できると考えられる。

■ 要 約

鶏卵タンパク質の分解物であるペプチドの疾患に対する有効性を検索し、以下のような結果を得た。①カラザタンパク質分解物にアミロイドベータ(A β)およびリゾチームの線維形成を阻止するペプチドが見つかった。②卵殻膜タンパク質分解物にマルターゼとスクラーゼおよびソルビトール脱水酵素を阻害するものが確認された。③卵殻膜タンパク質分解物にマラリア感染防止となるヘモゾインの形成を阻害するものおよびヘモゾイン分解を促進するものが見つかった。

■ 文 献

- 1 Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils. Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y. *Int J Biol Sci.* 2013;9(2):219-27.
- 2 卵白タンパク質由来ペプチドの神経変性疾患などの小胞体ストレス緩和効果の検証 杉元康志 2015年度旗影会報告書 p69-77.
- 3 A simple and rapid colorimetric method to measure hemozoin crystal growth in vitro. Huy NT, Uyen DT, Sasai M, Trang DT, Shiono T, Harada S, Kamei K. *Anal Biochem.* 2006 Jul 15;354(2):305-7. No abstract available.

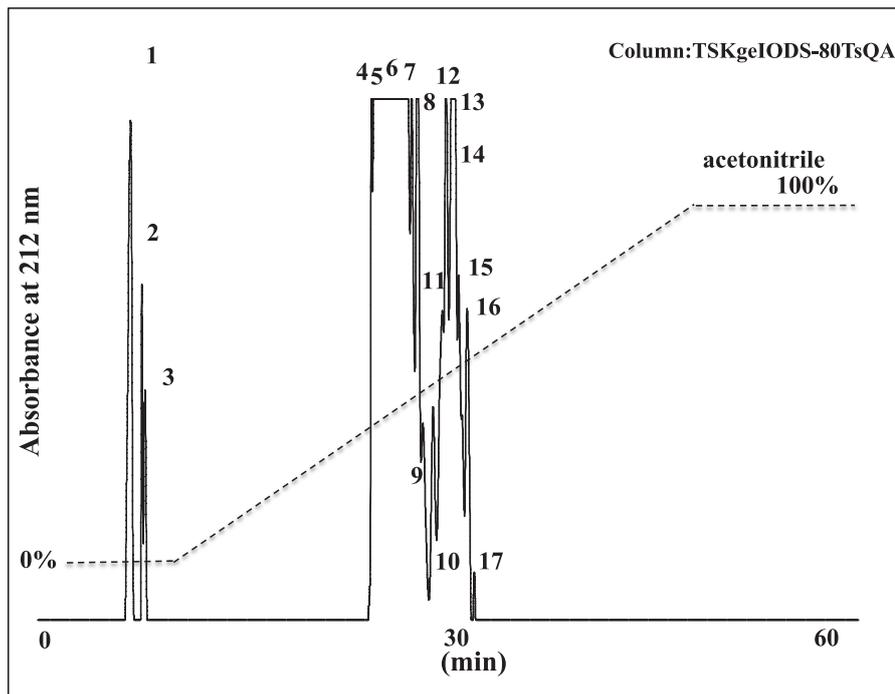


図1 カラザタンパク質分解物の逆相カラムにおける分離パターン

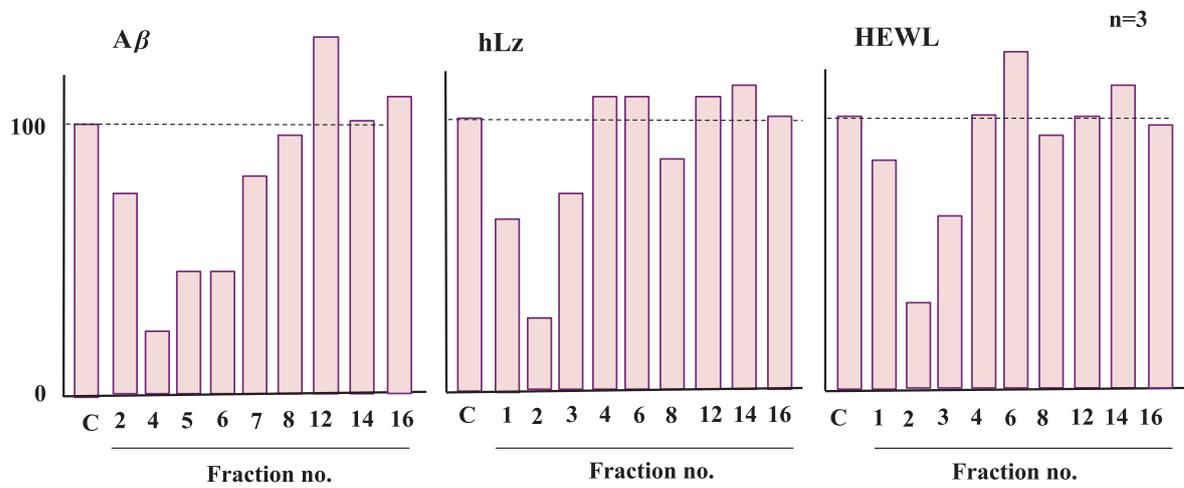


図2 カラザペプチドの線維形成阻止効果

Aβ, amyloid β peptide; hLz, human lysozyme; HEWL, hen egg white lysozyme. Fraction no., the peak number of Fig. 3.

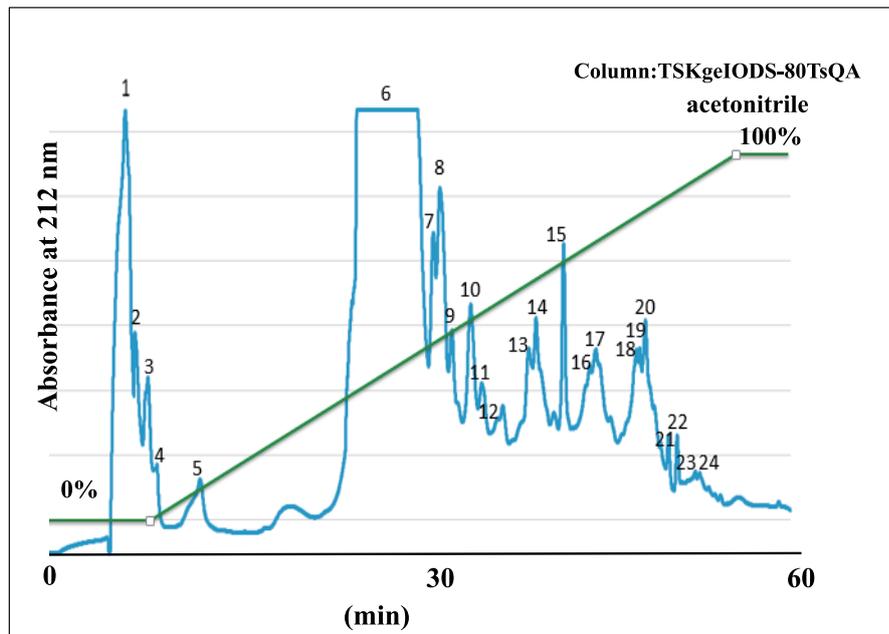


図3 卵殻膜タンパク質分解物の逆相カラムにおける分離パターン

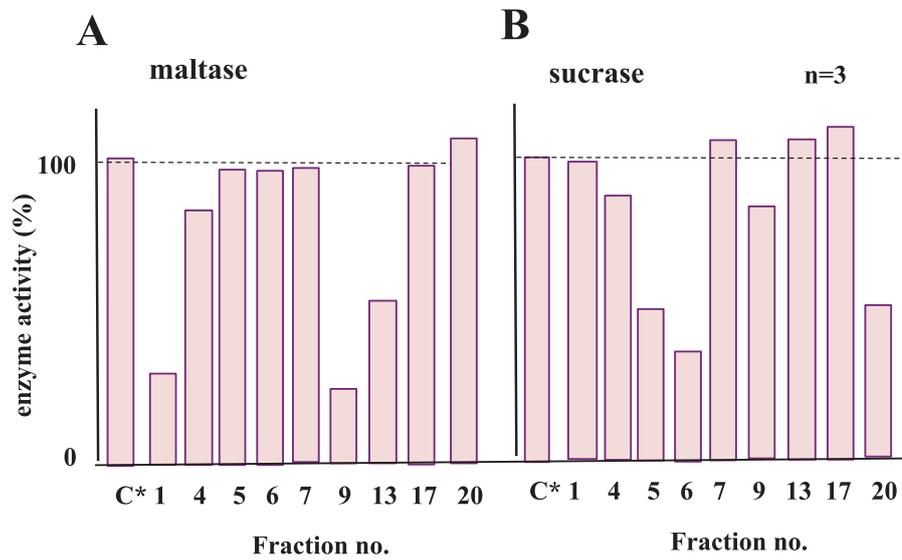


図4 卵殻膜ペプチドの二糖類分解酵素阻害活性
C*, without peptide.

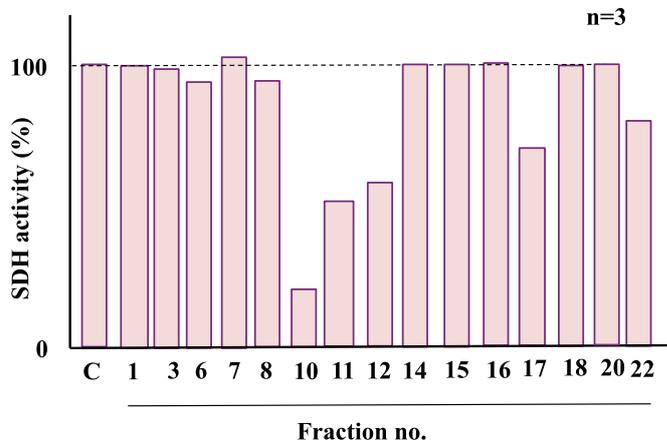


図5 卵殻膜ペプチドのソルビトール脱水酵素(SDH)阻害活性

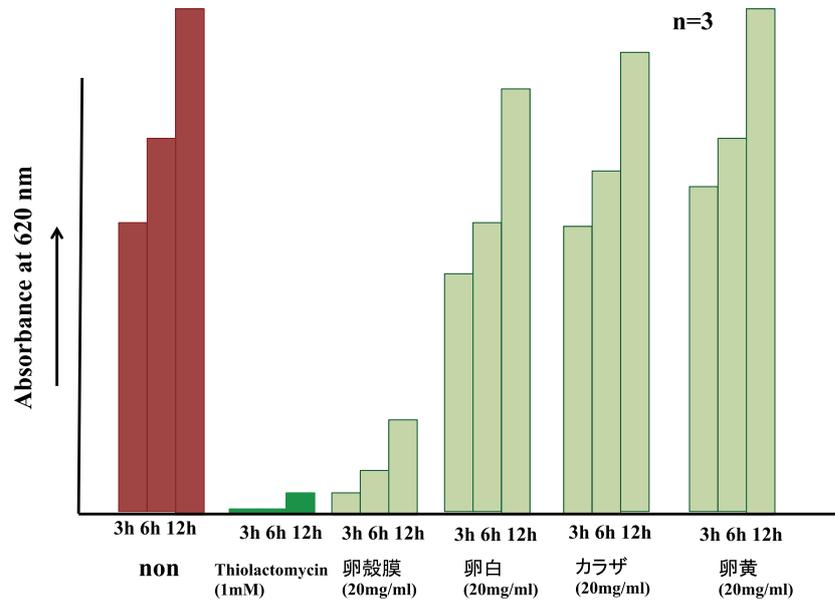


図6 卵殻膜タンパク質分解物のヘモジン形成阻害作用

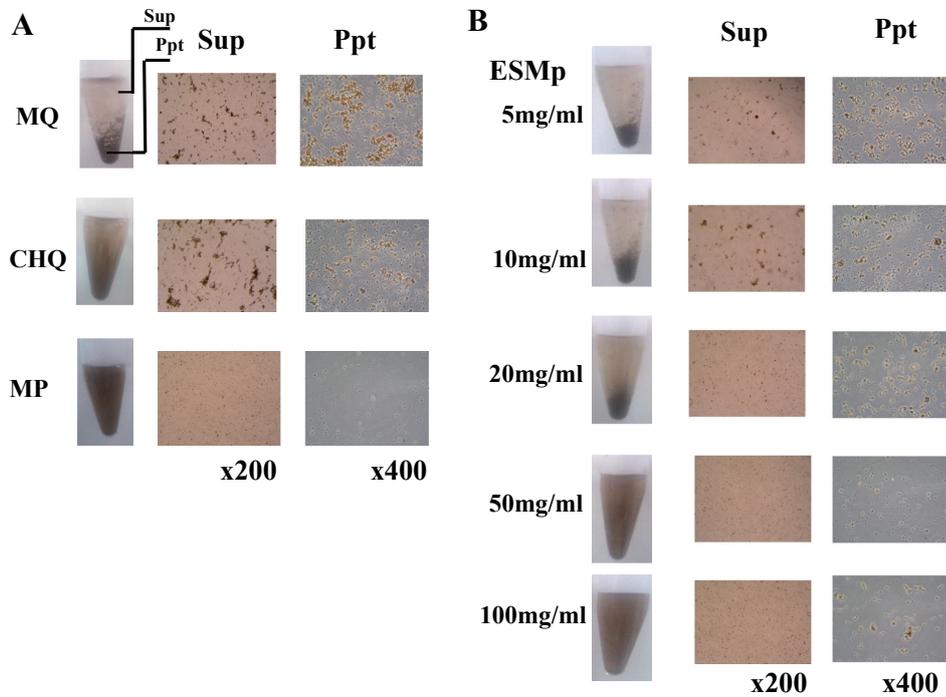


図7 卵殻膜タンパク質分解物によるヘモジンの分解

(A), MQ, MiliQ; CHQ, chloroquine; MLF, milk protein. (B), ESMp, egg shell membrane peptide: Sup, supernatant; Ppt, precipitation. Left panel, suspension; right panel, microscope.