

抗糖尿病効果をもつ卵殻膜に含有する
新規活性ペプチドの単離とその作用機構解明

神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻・教授 芦田 均

■ 緒 言

卵殻膜は、創傷治癒効果、やけど治療、ならびに保湿効果などの機能性が認められており、機能性材料としての利用が期待される¹⁾。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²⁾。近年、卵殻は、肥料または家畜の飼料としての利用が進んでいる。しかしながら、卵殻膜は水に難溶なことからあまり利用されていない。有効な利用には、簡便に卵殻膜を有効成分へと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は簡便であるが、再現性よく特定の機能性タンパク質やペプチドを生成することは困難である^{3,4)}。共同研究者の竹中らは、平成24年度旗影会の助成を受けて、卵殻膜を効率よく分解できる組換え酵素を得ることに成功した⁵⁾。しかしながら、その酵素は、日和見感染症を引き起こす緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* ME-4 由来のエステラーゼであり、「天然素材・安心・安全・高品質」等を訴求するサプリメントやコスメティックの分野では、同菌由来の酵素で調製した可溶性ペプチドやタンパク質が幅広く受け入れられることは難しい。そこで、NBRCより購入したエラスターゼ生産菌の中から目的にかなう微生物酵素を選抜し、卵殻膜の分解を念頭に入れた酵素の特性解析を検討することにした。また、申請者らは、ME-4由来のエステラーゼを用いて精製したペプチドの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見出している⁶⁾。

申請者らは、これまでに食品中に含まれる成分が、筋肉への糖の取り込みを促進させることで、高血糖を予防していることを明らかにしてきた。キューピー株式会社より分与して頂いた卵殻膜ペプチドは、水に易溶であり、化粧品、医薬品並びにサプリメントだけでなく、食品への応用にも期待できる。そこでわれわれは、卵殻膜の持つ高血糖予防効果に着目した。卵殻膜の高血糖予防効果に関する研究はあまり進んでおらず、活性をもつ卵殻膜由来ペプチドの同定やその詳細な活性機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、これまでの成果を発展させるために、卵殻膜ペプチドから筋肉細胞へのグルコース取り込みを指標として卵殻膜由来活性ペプチドの精製を行った。また、より有効な卵殻膜分解酵素の探索を行った。

■ 方 法

1. 高血糖予防効果をもつ卵殻膜由来ペプチドの探索

1-1. 高血糖予防効果をもつ卵殻膜ペプチドの精製

卵殻膜ペプチド(WP)は、キューピー株式会社により新たに開発された酵素を用いて消化されたものであり、酵素に関する詳細な情報の記載は難しい。有効ペプチドの精製にあたり、WPを3kDaの限外ろ過に供することで低分子画分(EMP)を得た。EMPを弱陰イオン交換クロマトグラフィー(GigaCap, DEAE-650M, Tosoh)、ゲルろ過クロマトグラフィー(Bio Gel P-2, Bio-Rad)、ならびに逆相HPLC(Aeris PEPTIDE XB-C18, Phenomenex)に供することで有効ペプチドの単離・精製を行った。ペプチドの濃度は、ニンヒドリン反応を利用し、1mol glycylglycylglycineを1当量(eq)としてmeq/Lで示した。

1-2. 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または精製ペプチド画分を4時間細胞に作用させ、以降の実験に用いた。

1-3. L6筋管細胞へのグルコース取り込み試験

脱感作したL6筋管細胞に卵殻膜由来ペプチドを4時間作用させ、次いで、グルコースアナログである2-デオキシグルコース(2DG)を1mMで20分間作用させた。細胞内への2DGの取り込み量は酵素法を用いて測定した⁷⁾。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。

1-4. 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(承認番号:26-08-01)。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7:00-21:00 明期/21:00-7:00 暗期の明暗サイクル下で7日間順化飼育した。マウスを14時間絶食させた後、各群5匹ずつ、水投与(コントロール)群、500mg/kg 体重のWP 投与群、または250、500mg/kg 体重 RMP 投与群の3群に分けた。水、WP あるいは EMP の投与は、ゾンデ針で強制経口投与した。これらの化合物の投与1時間後にグルコース(1.0g/kg 体重)を負荷し、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 TM グルコース)を用いて血漿中のグルコース量を測定した。

2. 卵殻膜分解酵素の探索

2-1. BLAST 検索による類縁酵素の検索

P. aeruginosa ME-4 由来卵殻膜分解酵素(メタロプロテアーゼ、accession no. AB618054)の成熟タンパク質領域(301 a.a.)を基に BLAST 検索を行った。

2-2. NBRC 保存菌株の培養とプロテアーゼ活性の評価

Aeromonas 属(NBRC 12659 および 13784)、*Bacillus* 属(NBRC 15308)、*Collimonas* 属(NBRC 3740)、*Janthinobacterium* 属(NBRC 102515)、*Geobacillus* 属(NBRC 12550) および *Pseudomonas* 属(NBRC 14159 および NBRC 103045)の細菌について ME-4 株とともに LB 培地にて培養し、良好な生育の見られた株について培養上清のカゼイン、エラスチン-オルセイン、ならびに卵殻膜に対する分解活性を調べた。

2-3. *P. indica* NBRC 103045 由来プロテアーゼの精製と精製酵素を用いた卵殻膜分解

LB 培地にて 30°C、140rpm で1日間培養し、得られた上清を透析後、DE52 イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

2-4. 卵殻膜の分解と可溶性ペプチドとタンパク質の分析

卵殻膜分解と可溶性ペプチドとタンパク質の分画は既報の方法に従った⁸⁾。つまり、150mg の卵殻膜を含む 10mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液(pH6.5)29ml に精製酵素(36U/ml)1ml を添加し、50°Cで24時間反応した。遠心分離を行って不溶性の粉体を除去することで可溶性ペプチドおよびタンパク質溶液を得た。つづいて、分画分子量 3.0kDa の遠心式限外ろ過ユニットにて通過液(ペプチド画分)と残渣(ポリペプチド・タンパク質画分)に分けた。ペプチドおよびタンパク質の定量は、それぞれニンヒドリン法および Lowry 法によった。

さらに、ペプチド画分については以下に示す条件にてサイズ排除クロマトグラフィーにて分析した。

カラム: YMC-Pack Diol-60 (4.6 x 300mm, YMC Co., LTD.)

溶離液: 100mM potassium phosphate buffer (pH7.4)-acetonitrile (80 : 20, v/v)

流速: 0.25ml/min

検出: UV 216nm

同条件にて標品の insulin chain B (MW, 3,495)、vitamin B12 (1,355)、ならびに *N*-hippuryl-His-Leu (429)は、それぞれ 9.8、12.1、ならびに 12.9min に溶出した。

2-5. *P. indica* NBRC 103045 由来プロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現系の構築

NBRC 103045 のゲノムデータから目的のプロテアーゼ遺伝子配列(NZ_BDAC 01000018.1)を基に PCR 用プライマー(5'-ATGAAGCATGCTTTACGTAT-3'および 5'-CAGGGCGCTCGGGCAGTTCA-3')を設計した。発現ベクターは pET28b(+)とし、増幅断片のベクターへの挿入は In-Fusion 反応によって行った。また、発現用宿主は大腸菌 BL21 (DE3)株を用いた。

■ 結果

1. 筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進活性を有するペプチドの探索

WP を限外ろ過に供することにより、EMP を得た。EMP は、10 および 20meq/L の濃度で有意に L6 筋管細胞へのグルコースの取り込みを促進させた (Figure 1)。EMP を弱イオン交換クロマトグラフィーに供することで、Fractions I-V を得た (Figure 2)。Fraction I は、1.25 および 2.5meq/L の濃度で、有意なグルコース促進活性を示した (Figure 3)。Fractions IV および V は回収量が微量のため、グルコース取り込み活性の測定を行えなかった。グルコース取り込み促進活性の認められた Fraction I をゲルろ過クロマトグラフィーに供し、Fractions I-I ~ I-III を得た (Figure 4)。Fraction I-II は、1.25 および 2.5meq/L の濃度で、有意なグルコース促進活性を示した (Figure 5)。Fraction I-II を HPLC で分析したところ、多数のピークが検出され、Fractions I-II-1 ~ I-II-7 に分画した (Figure 6)。Fraction I-II-6 は、1.25meq/L の濃度で、有意なグルコース促進活性を示した (Figure 7)。Fraction I-II-7 は、微量のため、グルコース取り込み試験を行えなかった。活性の認められた Fraction I-II-6 を異なる条件で HPLC 分析を行い、6 つに分画した (Figure 8)。Fraction I-II-6-B-c は、1.25meq/L の濃度で、有意なグルコース促進活性を示した (Figure 9)。また、Fraction I-II-6-B-b は、HPLC の分析により、単一のピークであることが確認された (Figure 10)。

2. EMP の ICR マウスにおけるグルコース負荷に対する効果

EMP の生体における高血糖抑制効果を検証するため、ICR を用いた経口グルコース負荷試験を行った。EMP は、250 および 500mg/kg 体重の濃度で、グルコース負荷後 15 分および 30 分の血糖値の上昇を有意に抑制した (Figure 11)。一方、WP は効果を示さなかった。

3. 類縁酵素の評価

本研究で選抜したプロテアーゼは、ME-4 株由来同酵素と 30 から 80% の類似性を示した。つづいて、NBRC から購入した 8 種類について良好な生育とともに培養上清中に顕著なプロテアーゼ活性が見られたものとしては、*A. salmonicida* NBRC 12659 (カゼイン (0.02U/mg)、エラスチン-オルセイン (1.2U/mg)) および *P. indica* NBRC 103045 (0.0043U/mg, 1.0U/mg) であった。NBRC 12659 は ME-4 株と同様病原性を示す細菌のグループに属しているのに対し、NBRC 103045 株はブタン資化性菌として単離された細菌であること⁹⁾から、以後の実験には NBRC 103045 株を用いることにした。

4. NBRC 103045 株由来プロテアーゼの精製と卵殻膜分解

培養上清より 28 倍の精製度 (0.12U/mg) で 1.4U の精製酵素を得た。同酵素を用いて卵殻膜 (粉体) の加水分解を行い、可溶性のペプチドおよびタンパク質量を定量した (Table 1)。酵素無添加の反応系と比較し、NBRC 103045 プロテアーゼで処理すると可溶性タンパク質とペプチド量は、それぞれ 5.5 および 10 倍となった。

5. サイズ排除クロマトグラフィーによる可溶性ペプチド画分の分析

標品との比較により、可溶性ペプチド画分にはオリゴペプチドが含まれており、少なくともサイズの似通ったオリゴペプチドが 6 画分から成ることがわかった (Figure 12)。

■ 考察

卵殻膜ペプチド (キューピー株式会社) を、筋肉細胞へのグルコースの取り込み促進作用を指標にして、弱イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ならびに HPLC を用いて分画・精製したところ、Fraction I-II-6-B-b を得た (Figure 10)。この画分は、HPLC 分析において、単一のピークが検出された (Figure 11)。現在、この Fraction に含まれる有効ペプチドの配列決定を行っている。

EMP が L6 筋管細胞において、グルコース取り込みを有意に増加させることから、生体における効果を検証するため、グルコース負荷試験を行った。EMP は、グルコース負荷による血糖の上昇を抑制することが明らかとなった (Figure 12)。EMP が食後高血糖を抑制することが示唆されたが、その機構については検討していない。筋肉へのグルコースの取り込みは、グルコース輸送体 4 型 (GLUT4) の細胞膜への移行によって生じる。このことから、マウスの筋肉における GLUT4 の局在を明らかにすることは重要である。また、マウスの血中および筋肉中から有効なペプチドを検出することは重要であると考えられる。さらに、本研究において精製されたペプチドのマウスに取り込まれる

か否かを明らかにすることも重要である。

P. aeruginosa ME-4 株由来のプロテアーゼは卵殻膜分解に優れるが、*P. aeruginosa* は日和見菌であるため、消費者に受け入れられやすい製造法の確立のため卵殻膜分解酵素を新たに検索することにした。選抜した NBRC 103045 プロテアーゼは成熟タンパク質領域の類似性は 68% (207/301 a.a.) であり、可溶性ペプチドやタンパク質量から卵殻膜分解についても同程度の力価があることがわかった (Table 1)。また、サイズ排除クロマトグラフィーによる可溶性ペプチド分析からコントロールと比較して目的とするオリゴペプチドが得られていた。

本研究課題での実験結果から、EMP は、生体において食後高血糖予防効果を示すこと、また筋肉培養細胞において、グルコース取り込みを促進することを明らかにした。さらに、EMP に含まれる活性ペプチドとして Fraction I-II-6-B-b を見出した。しかしながら、生体における EMP の食後高血糖抑制効果の機構および培養細胞における Fraction I-II-6-B-b のグルコース取り込み促進機構は不明である。今後は、Fraction I-II-6-B-b のアミノ酸配列の決定およびグルコース取り込み作用機構を明らかにするとともに、生体に取り込まれるか否かについて検討したい。

■ 要 約

卵殻膜ペプチドの低分子画分である EMP は、マウスを用いた経口グルコース負荷試験において、糖負荷後の血糖値の上昇を抑制することが明らかになった。また、EMP は、L6 筋管細胞において、グルコースの取り込みを促進させることが明らかとなった。さらに、EMP を L6 筋管細胞へのグルコースの取り込みを指標として、弱イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ならびに HPLC に供することにより有効ペプチドを単離・精製した。これらの分画により、活性ペプチドとして fraction I-II-6-B-b を見出した。一方で、卵殻膜ペプチドの製品化には、代謝酵素の特徴が重要である。そこで本研究では、新たな卵殻膜分解酵素として NBRC103045 を見出した。

■ 文 献

1. 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.
2. 中村良. 1998. 卵の科学. 朝倉書店. pp. 1-9
3. 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.
4. 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.
5. 竹中慎治. 2012. 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探索. 平成 24 年度旗影会特別助成報告書
6. 芦田均. 2013. 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. 平成 25 年度旗影会特別助成報告書
7. N. Yamamoto, Y. Yamashita, Y. Yoshioka, S. Nishiumi, H. Ashida. 2016. Rapid Preparation of a Plasma Membrane Fraction : Western Blot Detection of Translocated Glucose Transporter 4 from Plasma Membrane of Muscle and Adipose Cells and Tissues. *Curr Protoc Protein Sci.* 85. 29.18.1-29.18.12.
8. S. Takenaka, S. Hano, M. Cheng, K. Yoshida, K. Aoki. 2012. Organic solvent-tolerant elastase efficiently hydrolyzes insoluble, cross-linked, protein fiber of eggshell membranes. *Biotechnol. Lett.* 34 : 949-955.
9. KK. Pandey, S. Mayilrai, T. Chakrabarti. 2002. *Pseudomonas indica* sp. nov., a novel butane-utilizing species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 : 1559-1567.

Table 1. Fractionation of soluble peptides and protein from egg shell membrane

Fraction	Protein (mg/batch)	Peptide (mM)
Control		
Supernatant of reaction mixture	0.24 ± 0.042	0.04 ± 0.003
Residue (> 3.0 kDa)	> 0.004	0.038 ± 0.0003
Filtrate (< 3.0 kDa)	0.05 ± 0.0024	0.034 ± 0.003
Sample		
Supernatant of reaction mixture	1.32 ± 0.094	0.41 ± 0.021
Residue (> 3.0 kDa)	0.68 ± 0.09	0.53 ± 0.085
Filtrate (< 3.0 kDa)	1.2 ± 0.11	0.39 ± 0.039

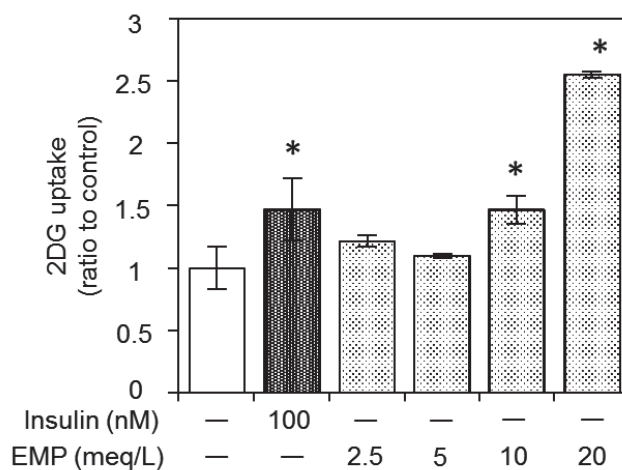


Figure 1. Effect of EMP on glucose uptake in L6 myotubes

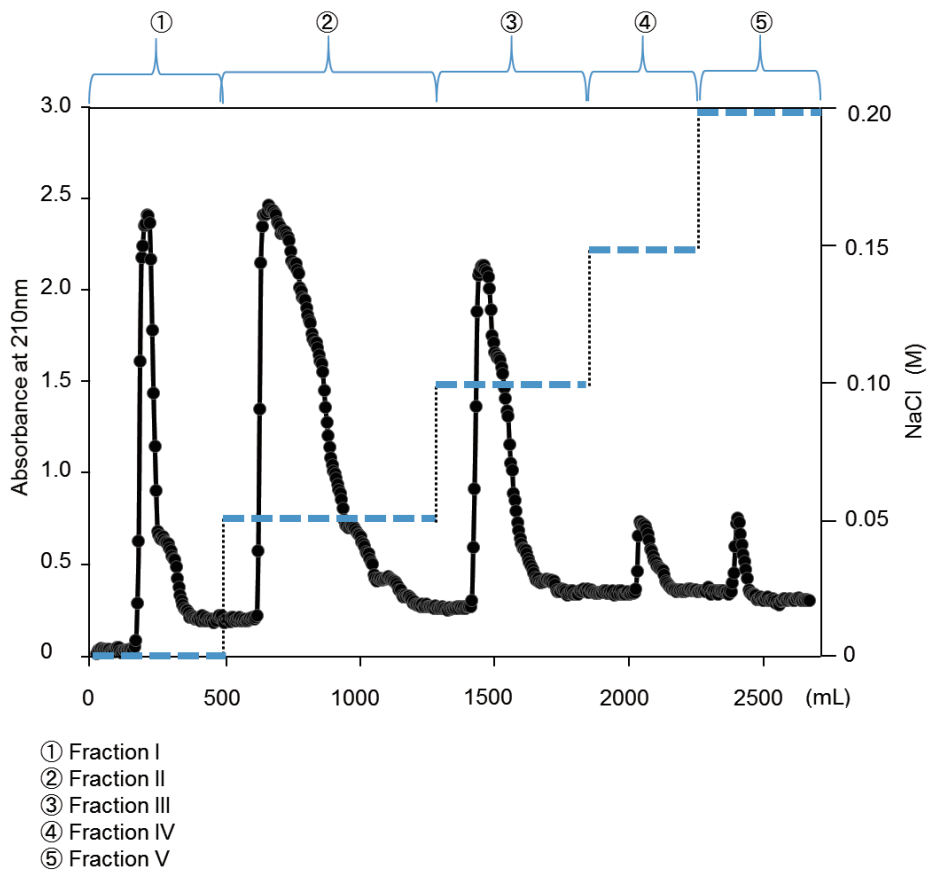


Figure 2. Chromatogram of EMP by weak anion exchange column chromatography

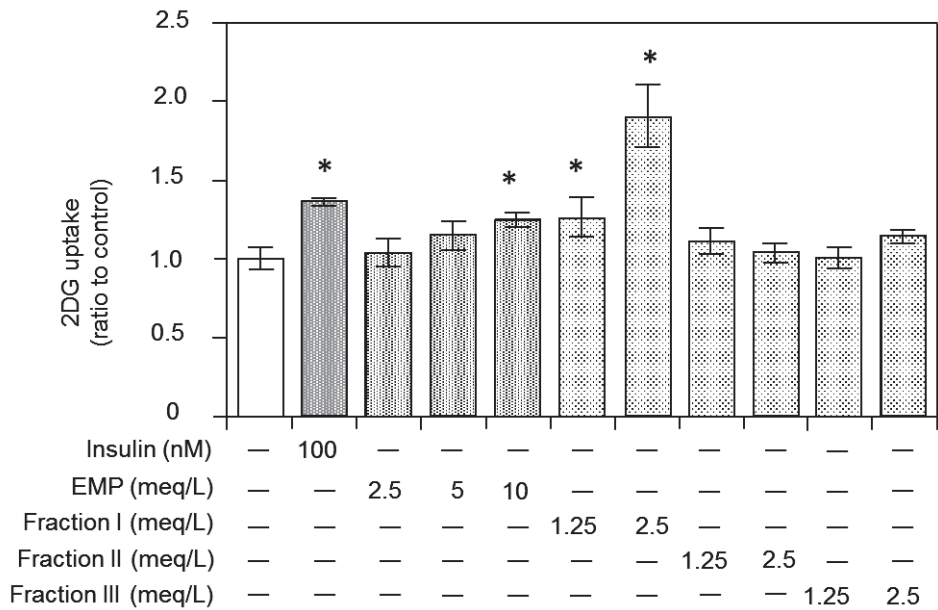


Figure 3. Effect of Fractions I to III from EMP on glucose uptake in L6 myotubes

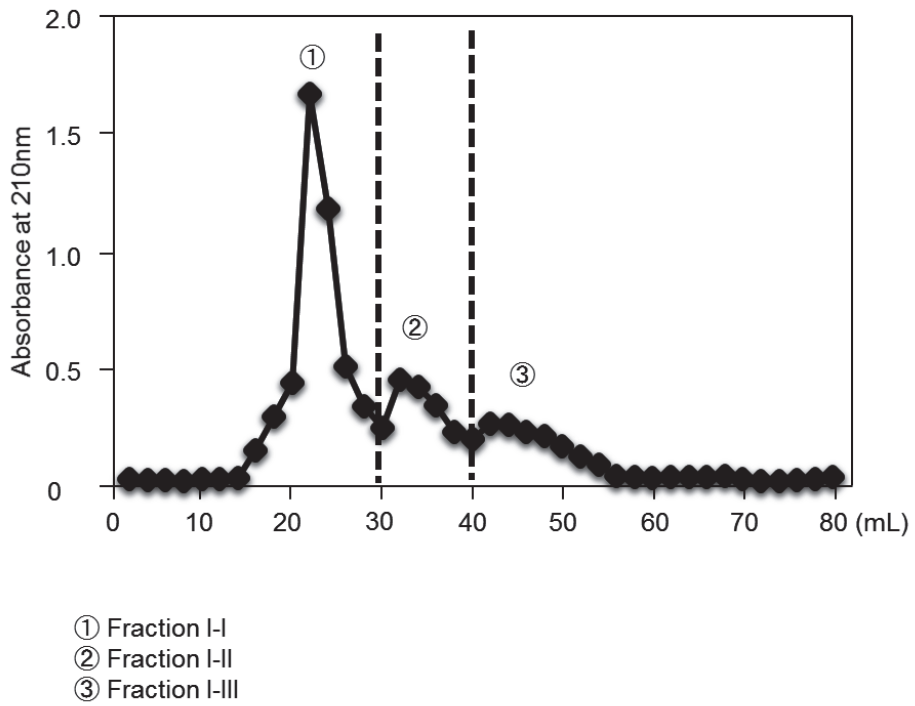


Figure 4. Chromatogram of Fraction I by GFC

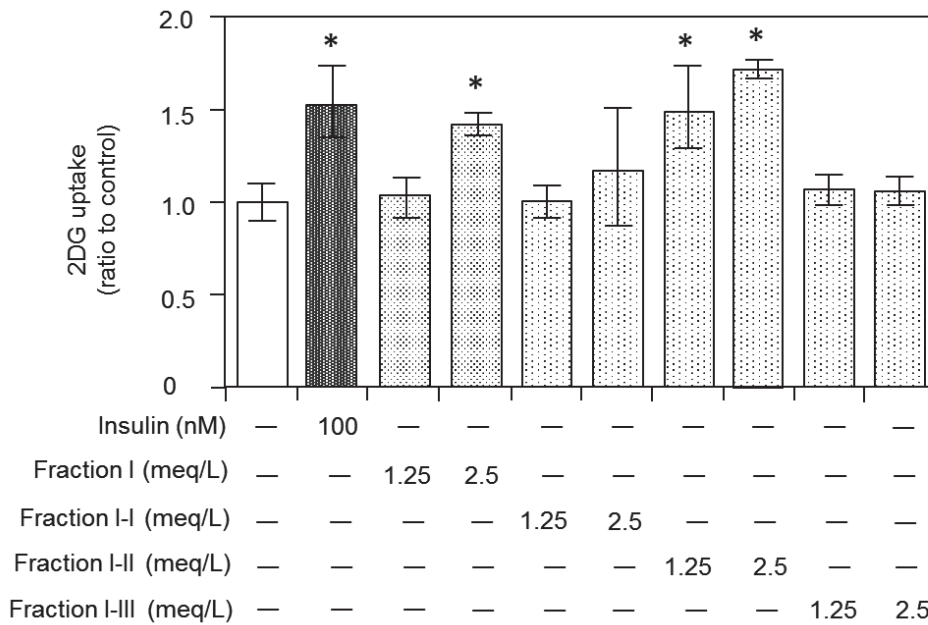
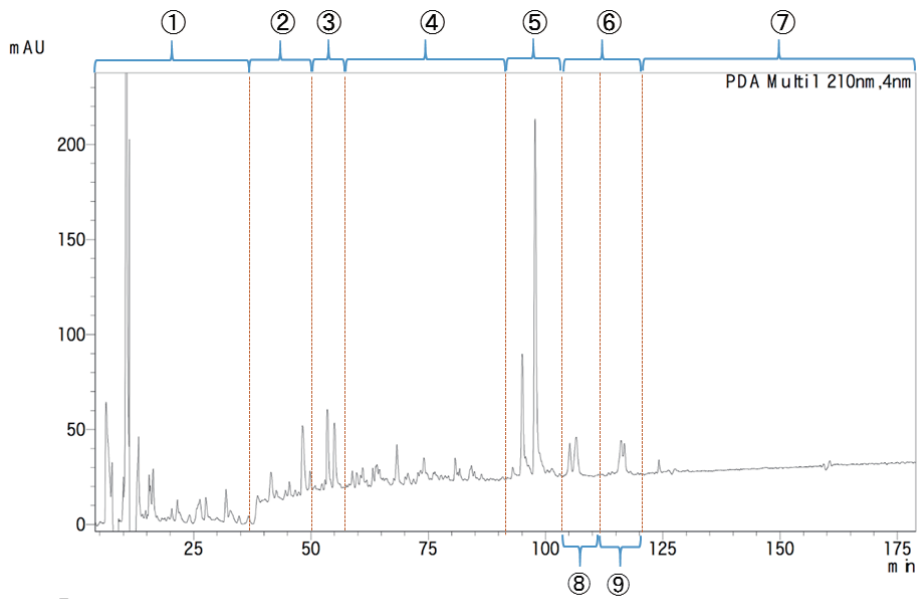
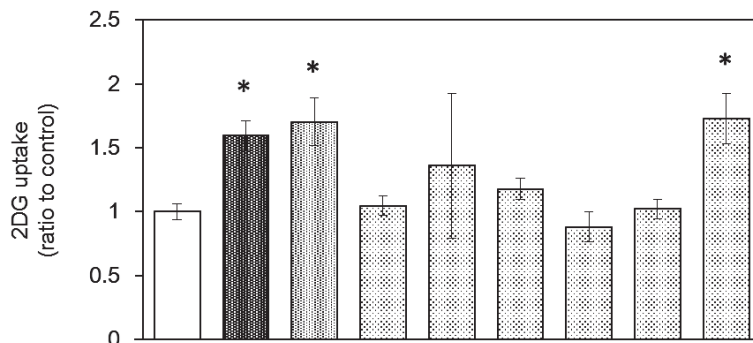


Figure 5. Effect of Fractions I-I to I-III from Fraction I on glucose uptake in L6 myotubes



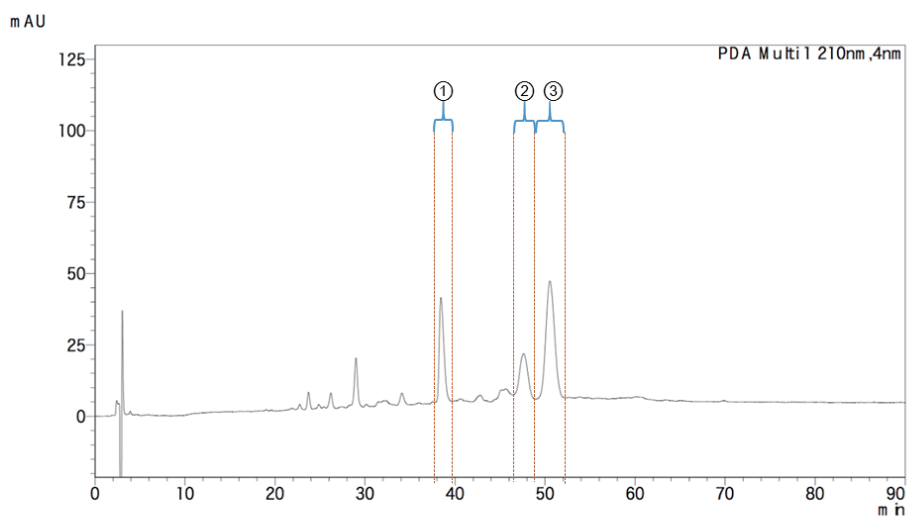
- ① Fraction I-II-1
- ② Fraction I-II-2
- ③ Fraction I-II-3
- ④ Fraction I-II-4
- ⑤ Fraction I-II-5
- ⑥ Fraction I-II-6
- ⑦ Fraction I-II-7
- ⑧ Fraction I-II-6-A
- ⑨ Fraction I-II-6-B

Figure 6. Chromatogram of Fraction I-II by HPLC

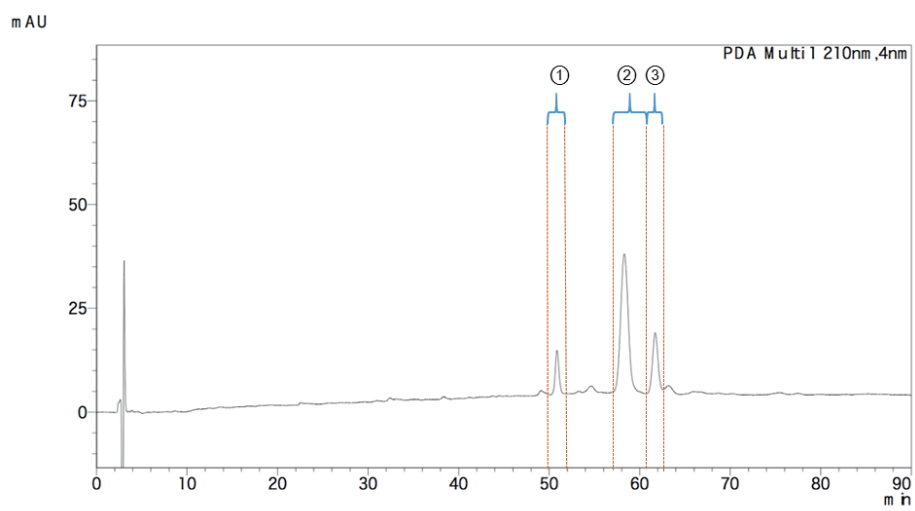


Insulin (nM)	—	100	—	—	—	—	—	—	—
Fraction I-II (mEq)	—	—	1.25	—	—	—	—	—	—
Fraction I-II-1 (mEq)	—	—	—	1.25	—	—	—	—	—
Fraction I-II-2 (mEq)	—	—	—	—	1.25	—	—	—	—
Fraction I-II-3 (mEq)	—	—	—	—	—	1.25	—	—	—
Fraction I-II-4 (mEq)	—	—	—	—	—	—	1.25	—	—
Fraction I-II-5 (mEq)	—	—	—	—	—	—	—	1.25	—
Fraction I-II-6 (mEq)	—	—	—	—	—	—	—	—	1.25

Figure 7. Effect of Fractions I-II-1 to I-II-6 from Fraction I-II on glucose uptake in L6 myotubes



- ① Fraction I-II-6-A-a
- ② Fraction I-II-6-A-b
- ③ Fraction I-II-6-A-c



- ① Fraction I-II-6-B-a
- ② Fraction I-II-6-B-b
- ③ Fraction I-II-6-B-c

Figure 8. Chromatogram of Fractions I-II-6-A and I-II-6-B by HPLC

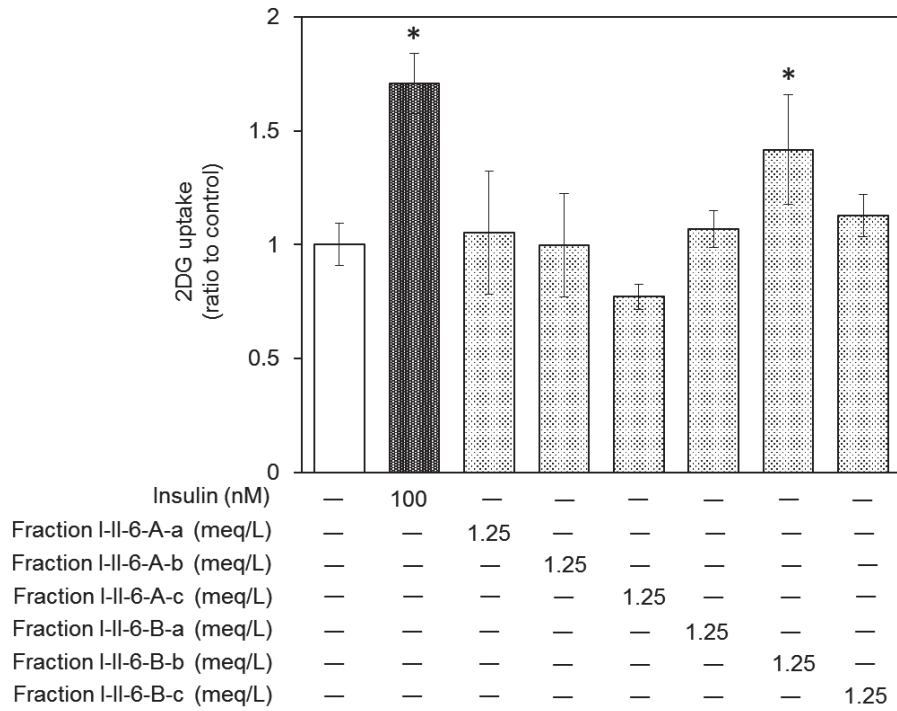


Figure 9. Effect of Fractions I-II-6-A-a to I-II-6-A-c and I-II-6-B-a to I-II-6-B-c from Fraction I-II-6 on glucose uptake in L6 myotubes

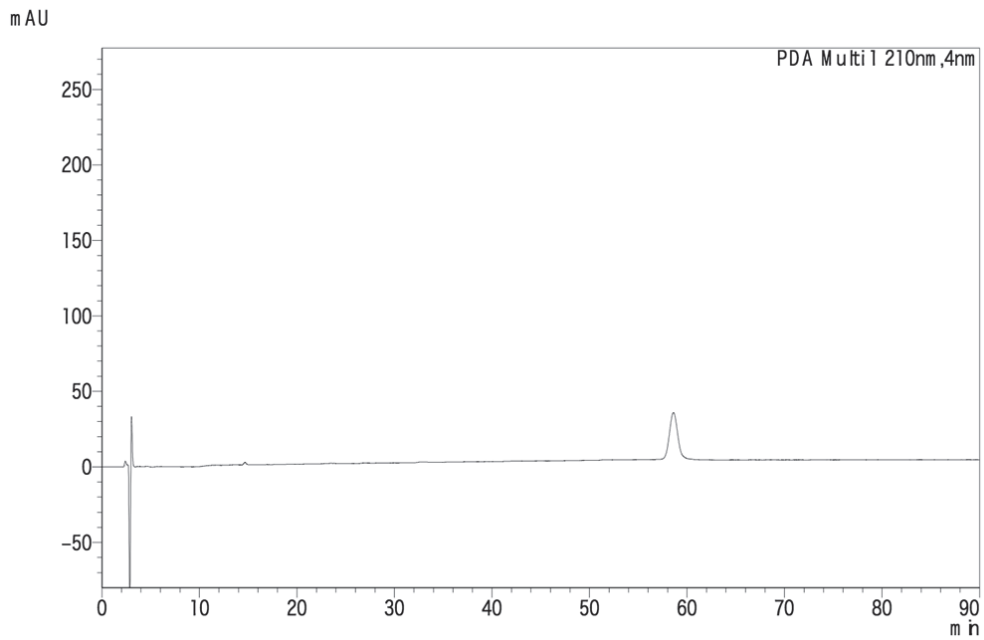


Figure 10. Chromatogram of an active peptide isolated from EMP by HPLC

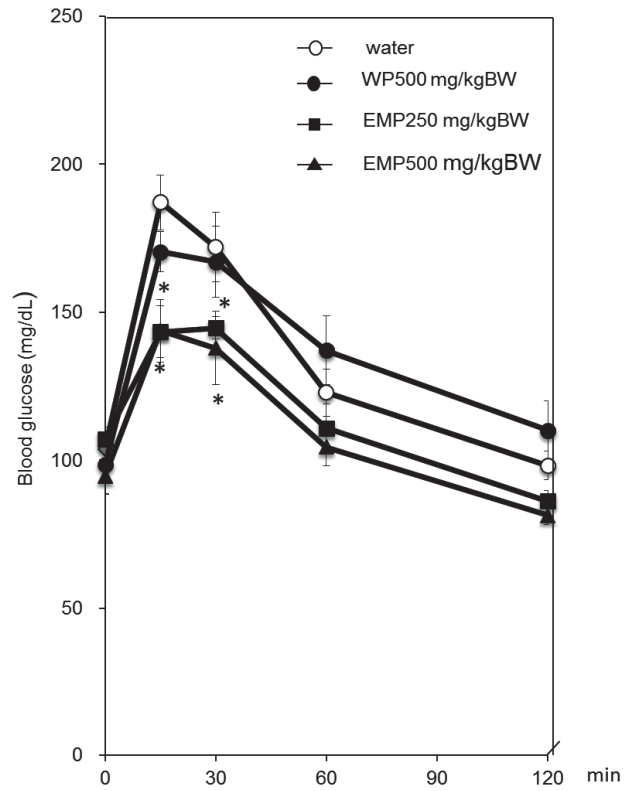


Figure 11. Inhibitory effect of EMP against acute hyperglycemia by OGTT in ICR mice

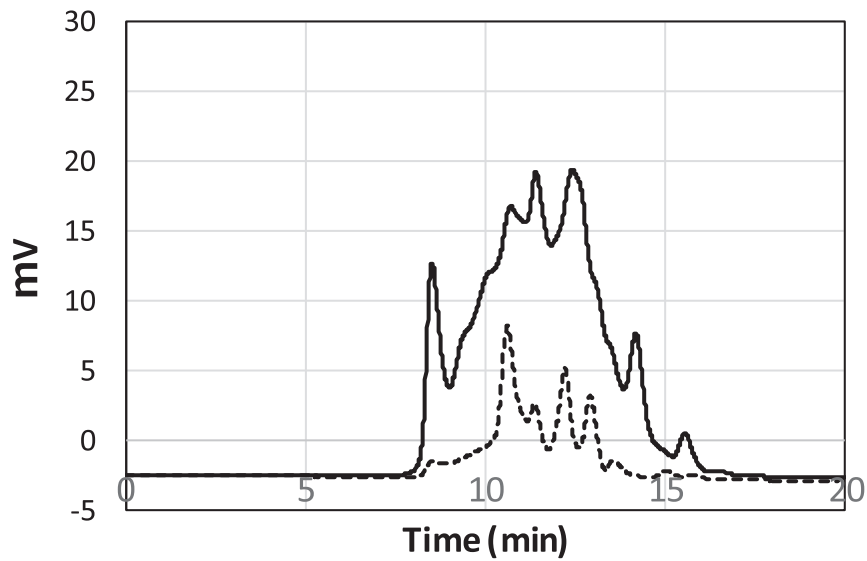


Figure 12. Analysis of soluble peptides from egg shell membrane by size exclusion chromatography