

# カルシウム吸収をアシストする卵殻成分の探索と機能の解明

慶應義塾大学理工学部応用化学科・准教授 犀川 陽子

## ■ 緒 言

鳥類の卵殻は約 97% の炭酸カルシウムと約 3% の有機物から成り立っており、この卵殻の内側が溶解し、孵化の際に胚が利用するカルシウムの約 80% を供給することが知られている。しかし、ニワトリの卵殻外培養にて、カルシウム源として卵殻の代わりに市販の炭酸カルシウムを与えても孵化せず、溶解性の良い乳酸カルシウムを与えると孵化するという報告があるが、乳酸カルシウムは卵殻中にほとんど含まれていない。このことから、卵殻内側の炭酸カルシウムは、炭酸カルシウムでありながら特別溶解、吸収されやすい状態に保たれているととらえることができ、このしくみが解明できれば、吸収されやすいカルシウム製剤などの応用も期待できる。本研究では、卵殻カルシウムの特別な性質は共存するマイナーな成分である有機物の作用によるものではないかと推測した。そこで、卵殻内側の有機成分に注目し、これまでにダチョウ卵殻内側から抽出した成分として、リン酸、クエン酸、乳酸、イノシトール二リン酸を同定した。また、このうちリン酸、イノシトール二リン酸が石灰化環境にて溶解しやすい非晶質の炭酸カルシウムの生成を誘起することを明らかにした。つまり、これらの酸が共存することにより、卵殻カルシウムの内側の炭酸カルシウムは溶解、吸収されやすい状態になっていることを示唆した。一方、予備実験から、ニワトリやエミューの卵殻にはイノシトール二リン酸とは異なるリン酸エステルが含まれていることがわかったため、今回ニワトリ卵殻からリン酸エステルを抽出し、化学合成の手法も含めてその構造を決定した。また、卵殻内側の有機成分が存在すると、胚に吸収されやすい炭酸カルシウムになるのかを検証するため、抽出物を含んだ炭酸カルシウムを作成し、卵殻外培養を行ってカルシウム源としての吸収効率を調べることで卵殻内側の炭酸カルシウムの性質が再現できるか検証した。

## ■ 方 法

### 1. ニワトリ卵殻に含まれるリン酸エステル類の構造決定と化学合成

ニワトリ(ヤマギシの食用卵を使用)卵の上部を切り取って内容物を取り出して器状にしたのち、希酢酸を加えて卵殻内側のみを溶解させる方法で抽出した。抽出液を減圧濃縮したのち、陽イオン交換体を繰り返し通すことによりカルシウムイオンを除去して卵殻内側抽出物を得た。この抽出物に対して酢酸カルシウムを加えることでリン酸エステルのカルシウム塩を沈殿させる方法や陰イオン交換クロマトグラフィーを検討し、リン酸エステルの精製を行った。また、NMR(核磁気共鳴)スペクトルの解析により推定した構造を化学合成し、卵殻に含まれるリン酸エステルの同定を行った。また、化学合成によって得たリン酸エステルを添加した炭酸水素ナトリウム溶液に塩化カルシウム溶液を滴下することにより得た炭酸カルシウムについて、粉末 X 線解析(XRD)にて結晶状態を調べた。

### 2. ニワトリ卵殻外培養における卵殻抽出物含有炭酸カルシウムの吸収効率の調査

まず、ニワトリ卵殻外培養に用いる炭酸カルシウムを作成する方法を検討し、培養に影響の出る恐れのある別の塩が生成しない方法として水酸化カルシウム溶液に二酸化炭素を吹き込む方法を採用した。1 で示した方法により得たニワトリ卵殻内側抽出物を水酸化カルシウム水溶液に添加し、二酸化炭素を吹き込んで抽出物含有炭酸カルシウムを作成した。この際、抽出物および炭酸カルシウムは卵殻の内側中の含有率を再現するよう行った。得られたカルシウム粒子の形状をデジタル顕微鏡によって評価した。

一方、卵殻外培養は千葉県立生浜高校田原豊教諭の指導を仰ぎ、ニワトリ卵(ヤマギシ学術用有精卵)を保温したのち、伸ばしたラップに割卵し、プラスチックコップ中で培養する方法で行った。<sup>1)</sup> 割卵の際に抽出物含有炭酸カルシウム、市販の炭酸カルシウム、市販の乳酸カルシウムをそれぞれカルシウム源として加えて、胚の成長の様子をモニタリングした。

## ■ 結果

### 1. ニワトリ卵殻に含まれるリン酸エステル類の構造決定と化学合成

ニワトリ卵殻内側の抽出物に酢酸カルシウムを添加してリン酸エステルとカルシウムの塩を沈殿させる方法にて精製したものは、リン酸エステル以外の有機成分が多くみられた一方、陰イオン交換(ACCELL QMA)<sup>2)</sup>ではリン酸エステルを示すシグナルが主成分として見られ、有効な分離方法であることがわかった(図1)。主成分について<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P 二次元 NMR スペクトルや<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 二次元 NMR スペクトルにより詳細に解析を行った結果、ミオイノシトール四リン酸(IP4)と推定された。そこで、既知の方法<sup>3)</sup>を参考にしつつ検討して化学合成を行い、合成品と卵殻由来天然物の NMR スペクトルの比較により、同定することができた(図2)。また、以前に得られたエミュー抽出物のスペクトルとの比較により、エミュー卵殻にも IP4 が主成分として含まれていることがわかった。しかし、卵殻由来の精製画分には IP4 以外のリン酸エステルも含まれており、IP4 のもつ絶対立体配置(可能な鏡像体のどちらであるか)を明らかにするには至らなかった。化学合成にて得た IP4 を 5mM 添加して作成した炭酸カルシウムは XRD にてほぼ非晶質となっていることがわかり、IP4 がダチョウ卵殻から得られた IP2 と同様に炭酸カルシウムを溶解しやすい状態に保つ作用をもつことが示唆された。

### 2. ニワトリ卵殻外培養における卵殻抽出物含有炭酸カルシウムの吸収効率の調査

ニワトリ卵殻外培養は技術指導を受けながら試行段階ではあるが、20～30個の卵を2回培養し、胚が外部からのカルシウム吸収を始める7日目以降に生存する個体に注目し、孵化直前に処理して観察した。21日目まで生存した個体は、乳酸カルシウムを添加したものが2個体、市販の炭酸カルシウムを添加したものが1個体、抽出物含有炭酸カルシウムを添加したものが4個体であった(図3)。個体数が少ないため、正確な比較はできないが、外見上の大きな違いは足の長さであり、体長(頭から尻尾までの長さとした)に対する足の長さ(関節から指先の長さとした)の比を測定した個体は、乳酸カルシウム添加では0.58、抽出物含有炭酸カルシウムでは0.43、市販の炭酸カルシウムでは0.26となった。また、抽出物含有炭酸カルシウムと市販の炭酸カルシウムの粒子をデジタル顕微鏡にて観察したところ、抽出物含有炭酸カルシウムは市販の炭酸カルシウムと比べて粒子が小さく、丸みを帯びていることがわかった。<sup>4)</sup>

## ■ 考察

鳥類の卵殻の内側のカルシウムが雛の骨に使われるという現象については古くから研究されており、炭酸脱水素酵素とカルシウム結合タンパク質の協働によって卵殻から漿尿膜を通してカルシウムを取り込むことがわかっている。このメカニズムの解明の一助として卵殻外培養が開発される上で、添加するカルシウム源には問題があり、市販の炭酸カルシウムではカルシウム欠乏症となり、塩化カルシウムなどアニオン種が異なる場合は胚に毒性を示す場合があったことから、溶解性が良く悪影響の少ない乳酸カルシウムが用いられることになった。しかし、実際の卵殻はほぼ炭酸カルシウムできていることから、「吸収される側」の卵殻カルシウムにも、特に吸収されやすいしくみがあると言える。このような推測の下、今回卵殻内側の成分に注目し、炭酸カルシウムの形状に影響を与える成分としてニワトリ卵殻から IP4 を同定した。これまでにダチョウ卵殻から得られた IP2 および今回得られた IP4 はいずれも鳥類の卵殻から初めて見つかった化学成分である。IP4 の絶対立体配置が未決定のため、今回培養には用いていないが、IP4 含有炭酸カルシウムの溶解性が良いことは XRD の結果から支持されており、胚への吸収が良いことも期待できる。また、今回卵殻内側の成分を抽出し、これを添加して作成した炭酸カルシウムを用いて卵殻外培養を行ったところ、予備的な結果ではあるがカルシウムが不足すると短くなるニワトリ胚の足の長さに違いが見られた。溶解性の良い乳酸カルシウムを添加した個体の足が長かったが、次いで抽出物含有炭酸カルシウムを添加した個体の足が長く、市販の炭酸カルシウムに比べて吸収効率が良いと言える結果が得られた。しかし、乳酸カルシウムとは違い、培養器の底にカルシウムの沈殿が見られたため、卵殻カルシウムを再現できていない可能性を考え、現在抽出操作で除かれる可能性のある高分子やマグネシウムイオンの影響を調査している。卵殻カルシウムの特別なしくみを化学成分の再構築によって完全再現し、胚へのカルシウム移動をスムーズに行わせることができれば、親が子のために予め備えた完璧な培養器である卵殻の優れたシステムが1つ解き明かされるものと考えている。

## ■ 要 約

鳥類の卵殻内側からカルシウムが溶解して胚の骨形成に使われるという現象に注目し、以下の結果を得た。①ニワトリ卵殻からリン酸エステルを精製し、構造解析と化学合成によってイノシトール四リン酸(IP4)であることを明らかにした。また、IP4を添加して作成した炭酸カルシウムが比較的溶解しやすい非晶質になることがわかった。②ニワトリ卵殻内側の抽出物を添加した炭酸カルシウムを作成し、ニワトリ卵殻外培養に添加することによって、市販の炭酸カルシウムよりも吸収効率が良い結果を得た。

## ■ 文 献

1. Tahara, Y., Obara, K.,(2014), A Novel Shell-less Culture System for Chick Embryos Using a Plastic Film as Culture Vessels, J. Poult. Sci., 51, 307-312.
2. Wreggett, K. A., Irvine, R. F.(1987), A rapid separation method for inositol phosphates and their isomers, Biochem. J., 245, 655-660.
3. Ozaki, S., Ling, L., Ogasawara, T., Watanabe, Y., Hirata, M.,(1994), A convenient chemoenzymatic synthesis of D-and L-myo-inositol 1, 4, 5, 6-tetrakisphosphate, Carbohydr. Res., 259, 307-310.
4. 上村美帆、糸川肇、伊藤卓、田原豊、中田雅也、犀川陽子、(2018)ニワトリ卵殻成分の添加による胚のカルシウム吸収効率の調査、日本畜産学会第124回大会 一般講演(形態、生理)V29-04



図1 IP4の精製経路

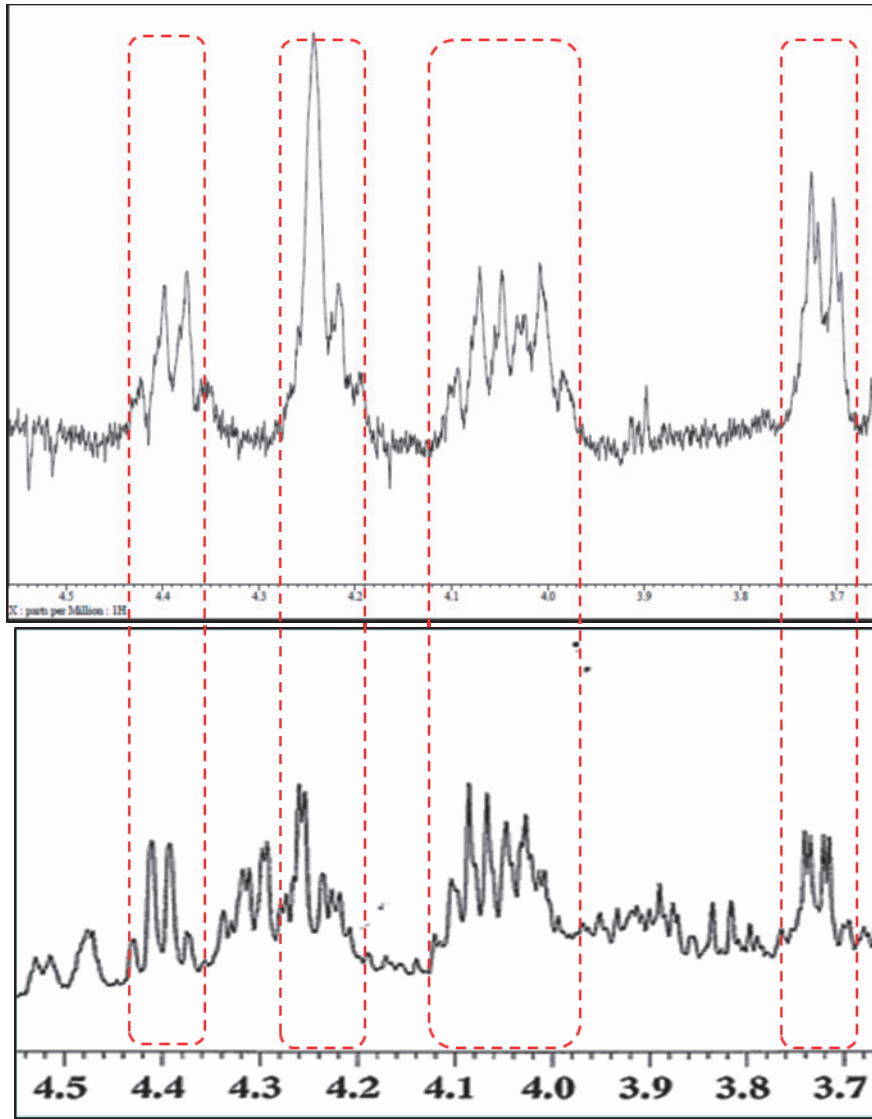


図2 合成品および卵殻由来天然物の<sup>1</sup>H NMR スペクトル  
 (上：合成品、400MHz, 下：卵殻由来天然物、500MHz, D<sub>2</sub>O, HOD=4.79ppm, pH=8.2)

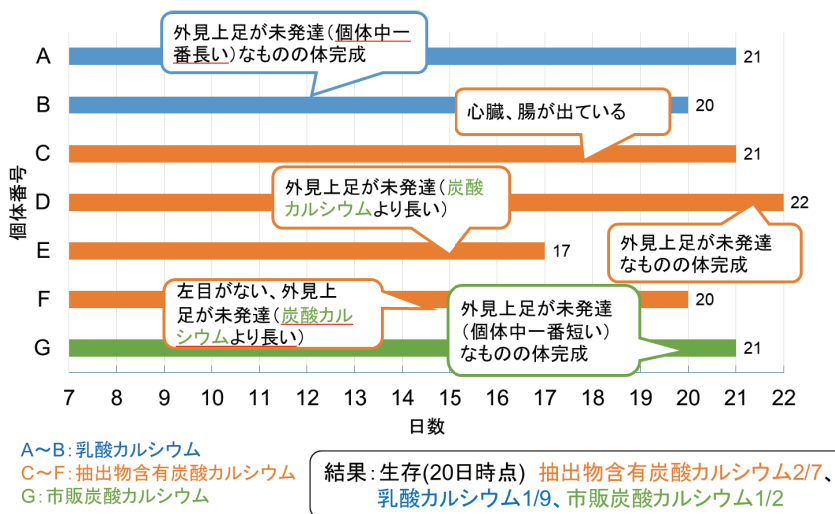


図3 卵殻外培養によって成長したニワトリ胚の生存日数と観察事項(青：乳酸カルシウム添加、橙：抽出物含有炭酸カルシウム添加、緑：炭酸カルシウム添加)