

卵白由来の学習機能改善素材の探索

京都大学大学院農学研究科・准教授 大日向 耕作

■ 緒 言

我が国の高齢化率は世界トップ(28.7%、2020年9月総務省調べ)であり、健康長寿社会の実現が強く期待されている。一方、認知症患者数は2025年には700万人を超えるという予想もあり、ありふれた疾患になりつつある。脳は要求性と独立性の高い特殊な臓器といえるが、末梢環境の影響を少なからず受けることも明らかになっている。実際、糖尿病など糖代謝異常が認知症の危険因子であることが疫学調査で判明している^{1,2)}。また、神経細胞が機能不全になる前の予防が重要であることから認知機能低下の初期段階に着目し、検討したところ、絶食時血糖の上昇が認められない短期間の高脂肪食摂取により認知機能が低下することが明らかとなった³⁾。さらに本研究では、この認知機能低下が卵白タンパク質の酵素消化物により改善されるか否かを検討した。併せて、消化物の糖代謝に及ぼす影響についても検討した。

■ 方 法

消化物作成(図1)

20 mg/mL のオボアルブミン水溶液をボイルしたのちに微生物由来酵素を E/S=1/100 となるように加え 37°C で 5 時間消化した。なお、反応中は pH が 7.5 となるように調整した。反応終了後、再びボイルし酵素反応を停止させ、遠心分離し、その上清を凍結乾燥した。逆相 HPLC により多数のペプチドが生成していることを確認した(図1B)

実験動物(図2A)

雄性 ddY マウス 11 週齢(日本 SLC)を 12 時間明暗サイクルに設定された飼養保管施設で 1 週間予備飼育した。次に、高脂肪食として 60% kcal 飼料(D12492、Research Diets)を 1 週間摂取させたのちに行動試験を実施した。なお、5～7 日目の 3 日間にわたり消化物(30 mg/kg/day)を経口投与した。

新奇物体認識試験(Object Recognition Test:ORT、図2B)^{3,4)}

認知機能は ORT で評価した。ORT は 3 つのステップ(馴化、獲得、テスト)から構成される。馴化は 6 日目に実施し、マウスを角型オープンフィールドに 5 分間放置した。次に、馴化の 24 時間後に獲得のステップに進んだ。獲得では 2 つの同一物体を置いたオープンフィールドにマウスを入れ、さらに、獲得の 1 時間後にテストを実施した。テストの際に、2 つの同一物体のうち 1 つを新しい物体に置き換えた。それぞれの物体への接近時間をもとにテスト試行における新奇物体への探索時間の割合を評価した。新奇物体への探索時間の割合が増加した場合に認知機能が上昇したと判定した。

インスリン感受性試験^{5,6,7)}

雄性 ddY マウスを 6 時間絶食させた後、インスリンを 0.5 U/kg BW となるように腹腔内投与した。投与前および投与後 15 分、30 分、60 分に尾静脈より採血し血糖値を測定した。なお、消化物はインスリン投与 3 時間前に経口投与した。

■ 結 果

オボアルブミン消化物の経口投与により認知機能改善作用を示す

1 週間高脂肪食でマウスを飼育すると認知機能の低下が観察される³⁾。この短期間の高脂肪食摂取により誘導される認知機能低下が鶏卵関連物質により改善されるか否かを検討した。オボアルブミン酵素消化物 30 mg/kg/day を経口投与したところ、ORT において新奇物体へのアプローチ時間の割合が有意に上昇することが判明した(図3)。したがって、本消化物は高脂肪食により低下した認知機能を改善させることが明らかとなった。鶏卵タンパク質の加工により認知機能が改善した初めての例といえる。

消化物の糖代謝に及ぼす影響

認知症の危険因子として糖尿病が報告されており、糖代謝の正常化が認知機能の改善に寄与している可能性が考えられる。そこで、酵素消化物投与によるインスリン感受性への影響を検討した。高脂肪食摂取により上昇した血糖値は、消化物の経口投与により低い値を示し(図4)、消化物は高脂肪

食摂取により低下したインスリン感受性を改善しているものと考えられる。認知機能低下の改善に関与する一つの要因に挙げられる。

■ 考 察

糖尿病が後天的危険因子であり、寿命の延伸によりその発症が促進される認知症は、現代病といえる。既に鶏卵と認知機能報告は疫学調査で一部明らかにされている。例えば、卵摂取と認知機能の改善に正の相関があることが報告され、また、卵黄中に多く存在するフォスファチジルコリンなどが関与成分の候補として挙げられている。一方、高タンパク質の摂取により認知症のリスクが減少するという報告があるが、タンパク質含量の高い卵白の認知機能に関する研究の詳細は不明である。今回、卵白の主要なタンパク質であるオボアルブミンの酵素消化物を経口投与することにより認知機能改善作用を示すことを明らかにした。鶏卵分子の加工により認知機能を顕著に改善することを新たに見出し、注目に値する。また、効果を示した投与量は 30 mg/kg であり、タンパク質の酵素消化物の有効量としては低く非常に強力な活性を有することが明らかとなった。以前に報告したトリペプチドの最小有効量は 10 mg/kg/day であることから、オボアルブミン消化物中の含まれる関与ペプチドは非常に低用量で効果を示すことが期待される。既に候補ペプチドを化学合成しており、そのうち、いくつかのペプチドが認知機能改善作用を示す予備的検討結果が得られている。

■ 要 約

世界的な高齢化が確実視されるなか認知症を改善し健康長寿社会を実現することが喫緊の課題である。認知症では神経変性による機能不全が惹起されるとそれを改善することは容易でなく対策は予防へとシフトしつつある。これまで我々は短期間の高脂肪食摂取により認知機能が低下することを見出し末梢環境が脳機能に強く影響することを明らかにした。さらに本研究では、この認知機能低下の初期段階の動物モデルを用いて卵白タンパク質の酵素消化物の経口投与により認知機能を改善することを見出した。同消化物はインスリン感受性を改善させる可能性が示され認知機能改善の一つの要因に挙げられる。今後、認知機能低下を予防する栄養価の高い新しい高齢者対応鶏卵加工食品を創製することが期待できる。

■ 文 献

- 1) Matsuzaki, T., Sasaki, K., Tanizaki, Y., Hata, J., Fujimi, K., Matsui, Y., Sekita, A., Suzuki, S. O., Kanba, S., Kiyohara, Y., and Iwaki, T. (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: The Hisayama study. **Neurology**.
- 2) Ohara, T., Doi, Y., Ninomiya, T., Hirakawa, Y., Hata, J., Iwaki, T., Kanba, S., and Kiyohara, Y. (2011) Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: The Hisayama Study. **Neurology**.
- 3) Orally administered milk-derived tripeptide improved cognitive decline in mice fed a high-fat diet. Nagai A, Mizushige T, Matsumura S, Inoue K, Ohinata K. **FASEB J**. 2019 Dec;33(12):14095-14102.
- 4) Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., and Freret, T. (2013) Object recognition test in mice. **Nat. Protoc**.
- 5) Enzymatic digest of whey protein and wheylin-1, a dipeptide released in the digest, increase insulin sensitivity in an Akt phosphorylation-dependent manner. Ogiwara M, Ota W, Mizushige T, Kanamoto R, Ohinata K. **Food Funct**. 2018;9(9):4635-4641.
- 6) A novel Alaska pollack-derived peptide, which increases glucose uptake in skeletal muscle cells, lowers the blood glucose level in diabetic mice. Ayabe T, Mizushige T, Ota W, Kawabata F, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Kanamoto R, Ohinata K. **Food Funct**. 2015;6(8):2749-57.
- 7) Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice. Yamada Y, Muraki A, Oie M, Kanegawa N, Oda A, Sawashi Y, Kaneko K, Yoshikawa M, Goto T, Takahashi N, Kawada T, Ohinata K. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2012;302(4):E433-40.

A. Digest

Ovalbumin 20 mg/ml
↓
Boil 10 min
↓
Enzyme (E:S=1:100)
↓
Incubation
37°C×5 hrs
↓
Boil 10 min
↓
Centrifuge
↓
Freeze dry

B. HPLC

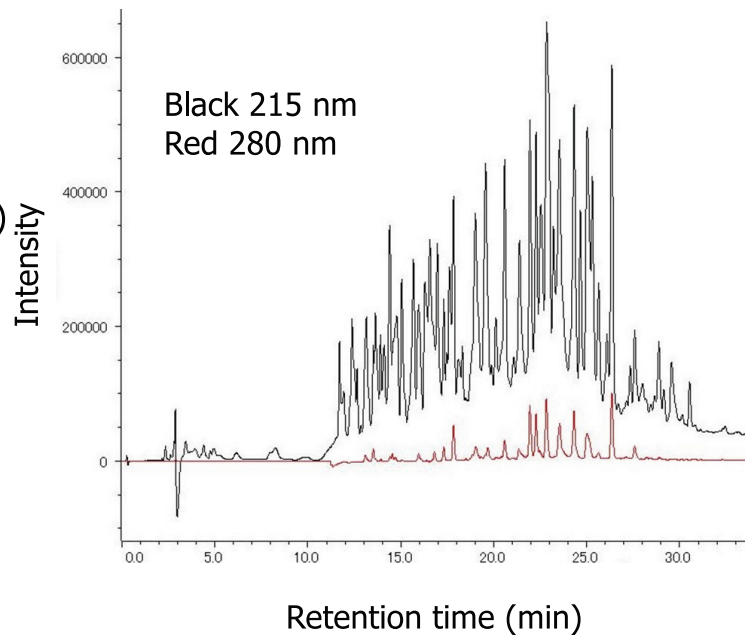
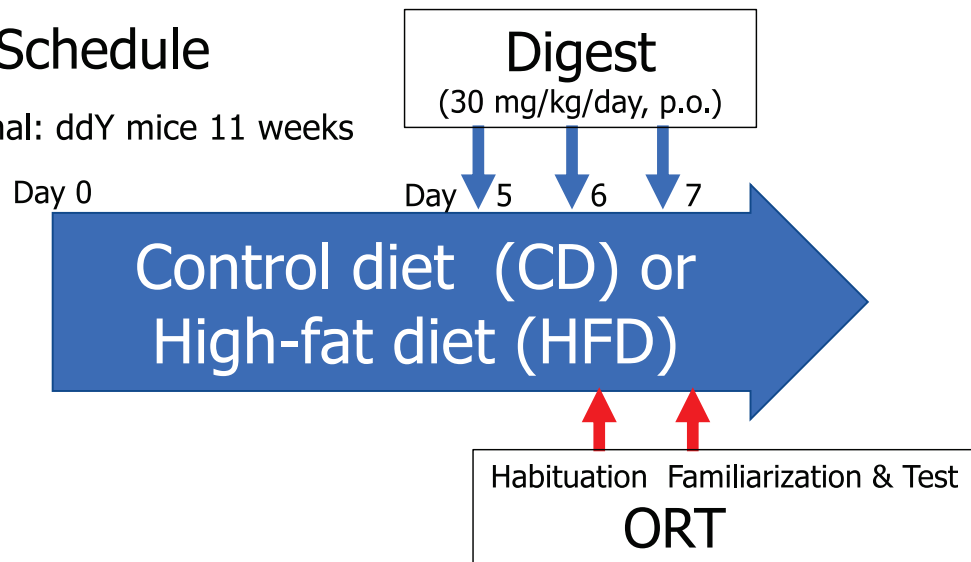


図 1. オボアルブミンの酵素消化

A、酵素消化条件。主要な卵白タンパク質オボアルブミンを酵素分解し得られた消化物を凍結乾燥した。B、HPLC チャート。オボアルブミン消化物をアプライした。黒(波長 215nm)、赤(波長 280nm)。

A. Schedule

Animal: ddY mice 11 weeks



B. Object recognition test (ORT)

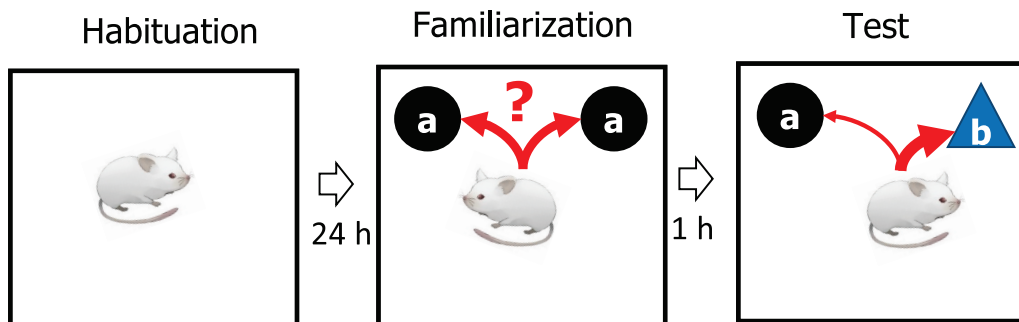
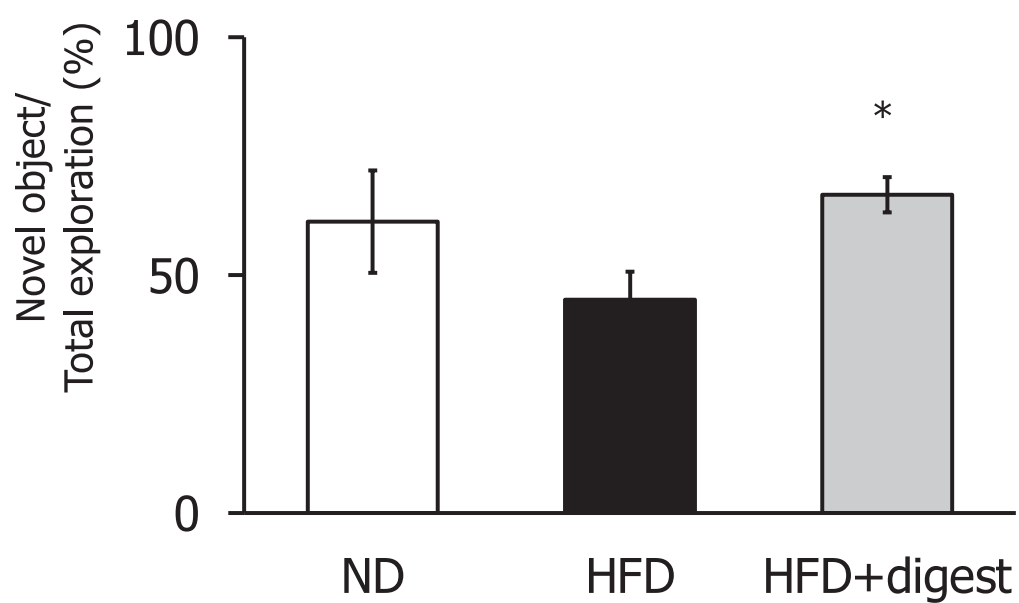


図 2. 実験スケジュール

A、実験スケジュール。試験飼料(普通食および高脂肪食)を雄性 ddY マウスに 1 週間与えた。オボアルブミン酵素消化物を試験開始 5 ～ 7 日目に経口投与(30 mg/kg/day)し新奇物体認識試験を実施した。B、新奇物体認識試験(ORT)。新奇物体へのアプローチ時間の割合が増加したときに認知機能が上昇したと判定する。



Mean±SEM (n=5-10)

図3. オボアルブミンの酵素消化物の経口投与により認知機能低下が改善される
高脂肪食摂取により低下した新奇物体へのアプローチ時間の割合がオボアルブミンの酵素消化物の経口投与により上昇した。値は平均値±標準誤差 (n=5-6)。*P<0.05 vs HFD group

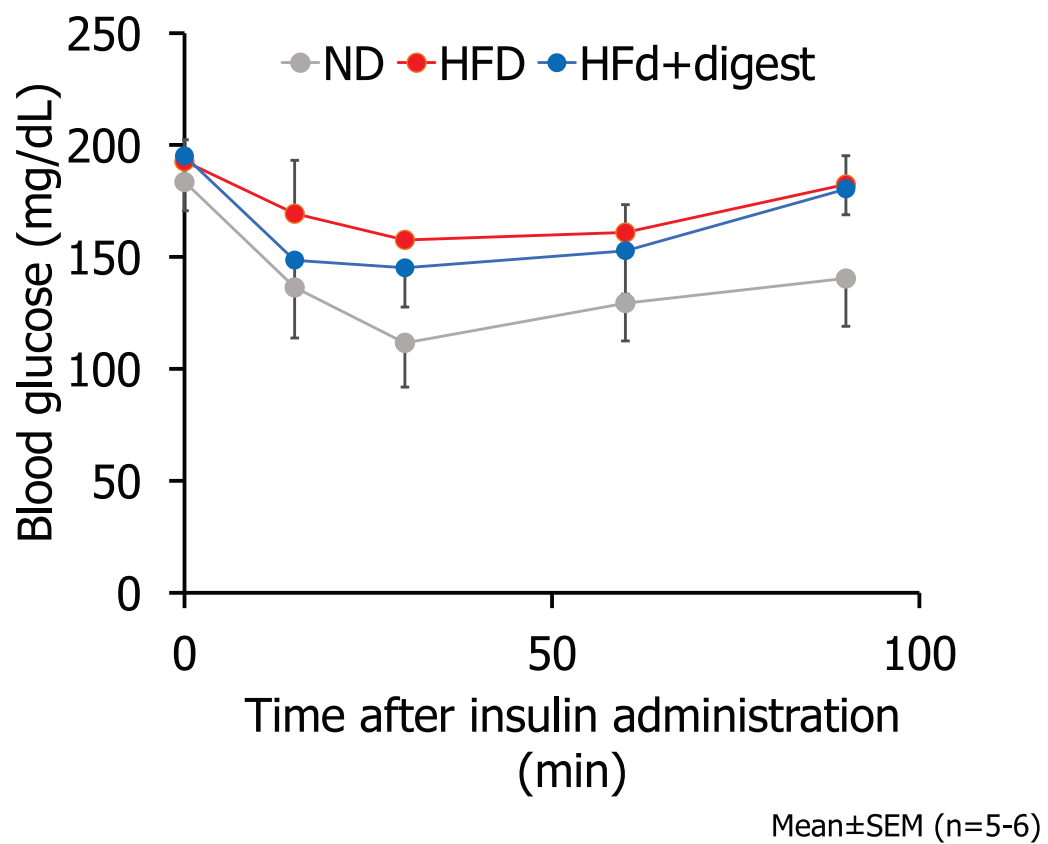


図 4. オボアルブミン酵素消化物の糖代謝に及ぼす影響

インスリン負荷試験を実施し酵素消化物の糖代謝に及ぼす影響について検討した。値は平均値±標準誤差 (n=5-6)。