

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：21301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22567

研究課題名(和文) 鶏卵白による抗肥満・抗糖尿病作用機序の網羅的探索

研究課題名(英文) Mechanism of anti-obesity and anti-diabetic activities of chicken egg white protein

研究代表者

赤澤 隆志 (Akazawa, Takashi)

宮城大学・食産業学群・助教

研究者番号：00882276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：鶏卵白のペプシン消化物(EWP)は脂肪蓄積抑制作用及び耐糖能改善作用を有することが報告されているが、活性成分は特定されていない。本研究では、EWPをペプチド画分とタンパク質画分の2つに別け、各画分の糖及び脂質代謝改善作用を食餌誘発性肥満モデルマウスを用いて検討した。ペプチド画分の給餌によって、精巣周囲脂肪重量、肝臓中のコレステロール含量及び血中グルコース濃度が低下した。一方でタンパク質画分は脂肪蓄積を抑制しなかったが、経口糖負荷試験によって耐糖能を改善することが示された。EWPによる脂肪蓄積抑制作用と耐糖能改善作用には、それぞれペプチド画分とタンパク質画分が関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EWPの脂肪蓄積抑制作用に中心的に関与している成分は卵白タンパク質オボアルブミンであると考えられており、オボアルブミンが消化管において胆汁酸によるミセル形成を阻害し、脂質の吸収を阻害することで脂肪蓄積を抑制していると考えられている。一方、本研究ではタンパク質画分ではなく、低分子ペプチド画分から脂肪蓄積の抑制作用が認められた。また、ペプチド画分は食餌脂質の吸収を阻害しなかった。よって、オボアルブミンとは異なる作用メカニズムで抗肥満作用を示す卵白活性ペプチドの存在を明らかにすることができた。EWPのペプチド画分は、肥満や脂質代謝を改善する機能性食品素材となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Egg white hydrolysate prepared with pepsin (EWP) is known to reduce intra-abdominal fat accumulation and improve glucose tolerance. However, the active compound in EWP has not been determined. In this study, EWP was fractionated into a peptide fraction and a protein fraction. The effect of these fractions on glucose and lipid metabolisms was investigated in mice fed a high-fat and high-sucrose diet. Consuming the peptide fraction reduced the weight of the epididymal adipose tissue, liver cholesterol content, and plasma glucose level. Meanwhile, consumption of the protein fraction did not suppress fat accumulation, but it improved glucose tolerance as deduced from an oral glucose tolerance test. These findings suggest that EWP exerts its activity through the peptide fraction to inhibit fat accumulation and the protein fraction to improve glucose tolerance, respectively.

研究分野：食品科学

キーワード：鶏卵白 ペプチド 抗肥満 抗糖尿病

1. 研究開始当初の背景

鶏卵の生体調節機能に着目した研究が活発に行われ、卵白の酵素加水分解物は脂肪蓄積抑制作用及び耐糖能改善作用を有することが報告されている。卵白加水分解物を高脂肪・高シヨ糖食と共に健常ラットに給餌すると、肝臓、骨格筋、腹部における脂肪蓄積が抑制されること、また脂肪蓄積により惹起されるインスリン抵抗性が改善されることが報告されている^{(1),(2)}。これらの作用は、他の動物性タンパク質よりも強いことから、卵白特有の活性成分が存在することが考えられる。

卵白加水分解物の中でも、特に胃で分泌されるタンパク質分解酵素ペプシンの消化物(EWP)は優れた抗肥満及び抗2型糖尿病作用を示すことが報告されている^{(3),(4)}。しかし、標的組織・臓器で作用した活性成分は特定されていない。EWPを肥満及び2型糖尿病を予防する保健機能食品として応用するためには、活性成分を特定し、標的組織・臓器とその作用機序を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

卵白にはタンパク質分解酵素に対して耐性を示すタンパク質が存在しており、EWPにはペプチドだけではなく未消化のタンパク質も含まれている。本研究では、EWPの活性成分を探るために、ペプチド画分とタンパク質画分に分画し、それぞれの画分を食餌誘発性肥満モデルマウスに給餌し、糖と脂質代謝の改善作用を検討した。さらに、等電点電気泳動法を応用したペプチドの分画装置を作製し、分画後の各画分の糖及び脂質代謝改善作用を検討した。

3. 研究の方法

卵白をペプシンで加水分解(pH 2, 37°C, 24時間)し、EWPを得た。EWPを透析(分画分子量 14 kDa)し、タンパク質画分とペプチド画分に分画し、凍結乾燥粉末をそれぞれ EWP-High molecular weight (EWPH)及び EWP-Low molecular weight (EWPL)とした。各画分のタンパク質及びペプチドを SDS-PAGE 及び Tricine-SDS-PAGE で分析した。実験動物は C57BL/6N 雄マウスを用い、AIN-93G を参考に作製した高脂肪高シヨ糖食(HFSD)を 8 週間自由摂取させた。また、EWPH 又は EWPL が 10% になるようにカゼインの一部と置き換えた HFSD を摂取させた。飼育 6 週目から 7 週目において、耐糖能試験(経口投与 OGTT 及び腹腔内投与 ipGTT)及びインスリン負荷試験(ITT)を行った。飼育終了後、絶食後に解剖し、血中脂質及び血中グルコース濃度、内臓周囲脂肪組織重量、解剖直前に採取した新鮮糞の脂質含量を測定した。

等電点電気泳動法を応用したペプチドの大容量分画装置は、Hashimoto (2005) らの報告を参考に作製した⁽⁵⁾。500 V で 24 時間泳動し、200 g の EWPL を 10 画分に分画した。各画分に含まれるペプチドを塩酸分解し、アミノ酸分析計によって構成アミノ酸を調べた。酸性アミノ酸を多く含むペプチドの画分(分画番号 2~6)と塩基性アミノ酸を多く含むペプチドの画分(分画番号 7~10)に分け、上述と同様に動物実験に供した。

4. 研究成果

(1)脂肪蓄積抑制作用を有する画分の探索

SDS-PAGE 及び Tricine-SDS-PAGE の結果、EWPH には卵白の主要タンパク質であるオボアルブミンとリゾチームが主に含まれていた。EWPL にはこれらのタンパク質は含まれず、6.5 kDa 以下のペプチドが検出された。

EWPH 又は EWPL を食餌誘発性肥満モデルマウスに給餌した結果、体重増加において EWPL 群では HFSD 群と比べ低く推移した(Fig.1)。このことから、EWPL には高脂肪高シヨ糖食による体重増加を抑制する傾向があることが示された。EWPL 群の臓器(肝臓、膵臓、腎臓)重量は HFSD 群と差はなかった。脂肪組織重量を比較すると、EWPL 群の精巣周囲脂肪重量は HFSD 群と比べ有意に低い値を示した。EWPL 群の肝臓に蓄積された脂質量は、中性脂肪及び遊離脂肪酸は低い傾向を示し、コレステロールは有意に低かった(Fig.2)。また、EWPL の給餌は、血中グルコースを低下させた(Fig.1)。これらの結果から、EWPL には脂肪蓄積抑制作用を示す活性成分が含まれており、糖と脂質の代謝を改善する作用を有することが示された。

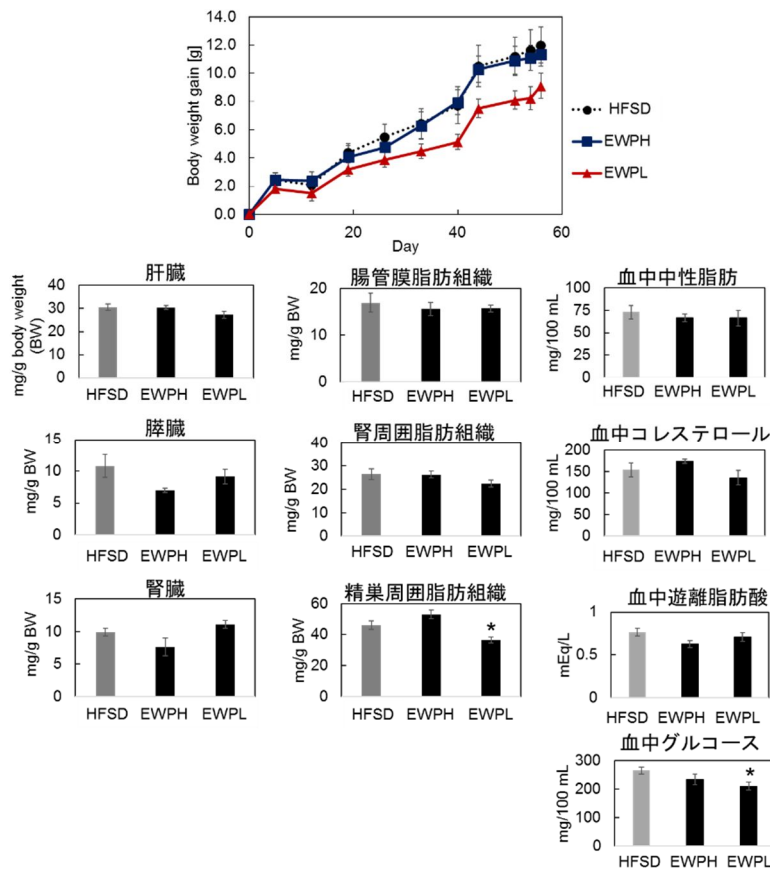


Fig.1 体重増加量，臓器重量，脂肪組織重量，血漿成分濃度に及ぼす影響
* $p < 0.05$ vs HFSD (Dunnett's test)

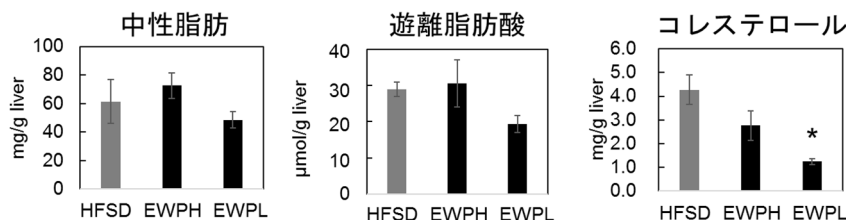


Fig.2 肝臓に蓄積する脂質量に及ぼす影響
* $p < 0.05$ vs HFSD (Dunnett's test)

卵白による脂肪蓄積抑制作用は，主に食餌脂質の吸収抑制によって引き起こされることが報告されている⁽²⁾。EWPL 群の糞に排出された脂質量を測定したが，中性脂肪及びコレステロールの排泄を増加させる結果は得られなかった(Fig.3)。卵白による食餌脂質の吸収抑制作用には，胆汁酸ミセルへの脂質の溶解に対する卵白タンパク質の阻害効果が関与していると報告されている⁽²⁾。in vitro 評価系において，EWPL がミセルへの脂質の溶解に及ぼす影響を調べた結果，30 mg/ml の EWPL の添加でも，ミセルに取り込まれたオレイン酸及びコレステロールの濃度は低下しなかった。以上のことから，EWPL に含まれる活性ペプチドは，食餌脂質の吸収阻害作用ではないメカニズムによって，脂肪蓄積を抑制していることが示された。EWPL に含まれる活性ペプチドは，糖と脂質のエネルギー代謝の亢進に寄与することで脂肪蓄積を抑制していることが考えられる。

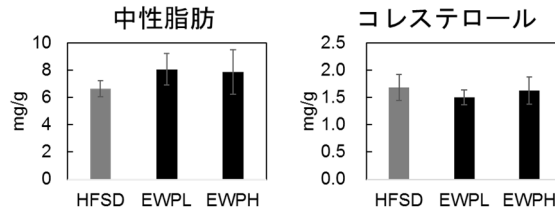


Fig.3 糞中に排出される脂質量に及ぼす影響
乾燥糞便 1g に含まれる中性脂肪量とコレステロール量を示す。

(2)耐糖能改善作用を有する画分の探索

EWPL 群では、OGTT 及び ipGTT の血糖値曲線は HFSD 群と比べ低く推移する傾向があったが有意な差はなかった(Fig.4)。一方で EWPH 群では、OGTT の血糖値曲線は有意に低く推移した。EWPH 群の ipGTT の血糖値曲線は低く推移する傾向があったが有意な差はなかった。ITT では EWPL 群及び EWPH 群共に HFSD 群と差はなかった。これらの結果から、EWPH には耐糖能を改善するタンパク質が含まれており、さらに消化管が標的臓器であることが示唆された。

以上の結果から、EWP の脂肪蓄積抑制作用と耐糖能改善作用には、異なる画分が関与しており、それぞれペプチド画分とタンパク質画分が関与していることが明らかとなった。

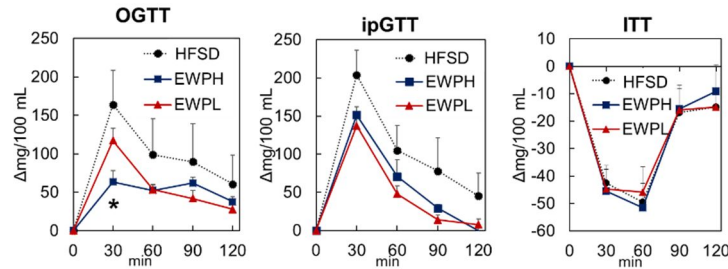


Fig.4 OGTT , ipGTT , ITT における血中グルコース濃度の変化
* $p < 0.05$ vs HFSD (Dunnnett's test)

(3)糖と脂質の代謝改善作用を有する EWPL 中の活性画分の探索

EWPL は脂肪蓄積抑制作用を有することが明らかとなった(Fig.1)。EWPL 中の活性ペプチドを探るため、等電点電気泳動法を応用した大容量ペプチド分画装置によって複数画分に分画し、食餌誘発性肥満モデルマウスに給餌し、糖と脂質代謝の改善作用を検討した。

既報⁽⁵⁾を参考に作製した大容量ペプチド分画装置によって 10 画分に分画した。各画分の pH は陽極側(分画番号 2 番)から陰極側(分画番号 10 番)にかけて上昇した(Fig.5)。各画分に含まれるペプチドを構成しているアミノ酸を分析した結果、分画番号の増加に伴って、酸性アミノ酸が減少し、塩基性アミノ酸が増加した。以上の結果から、EWPL 中のペプチドが等電点の違いに基づいて分画されていることが示された。

分画番号 2~6 を酸性ペプチド画分(EWPLa)、分画番号 7~10 を塩基性ペプチド画分(EWPLb)として回収し、食餌誘発性肥満モデルマウスに給餌した。体重増加量及び脂肪組織重量は、EWPLa 及び EWPLb の給餌による効果は認められなかった(Fig.5)。一方で、血中脂質及びグルコース濃度を比較すると、EWPLb 群は、HFSD 群と比べ血中中性脂肪及びグルコースが低下した。よって、EWPL の塩基性ペプチド画分に糖と脂質の代謝改善ペプチドが含まれていることが示唆された。

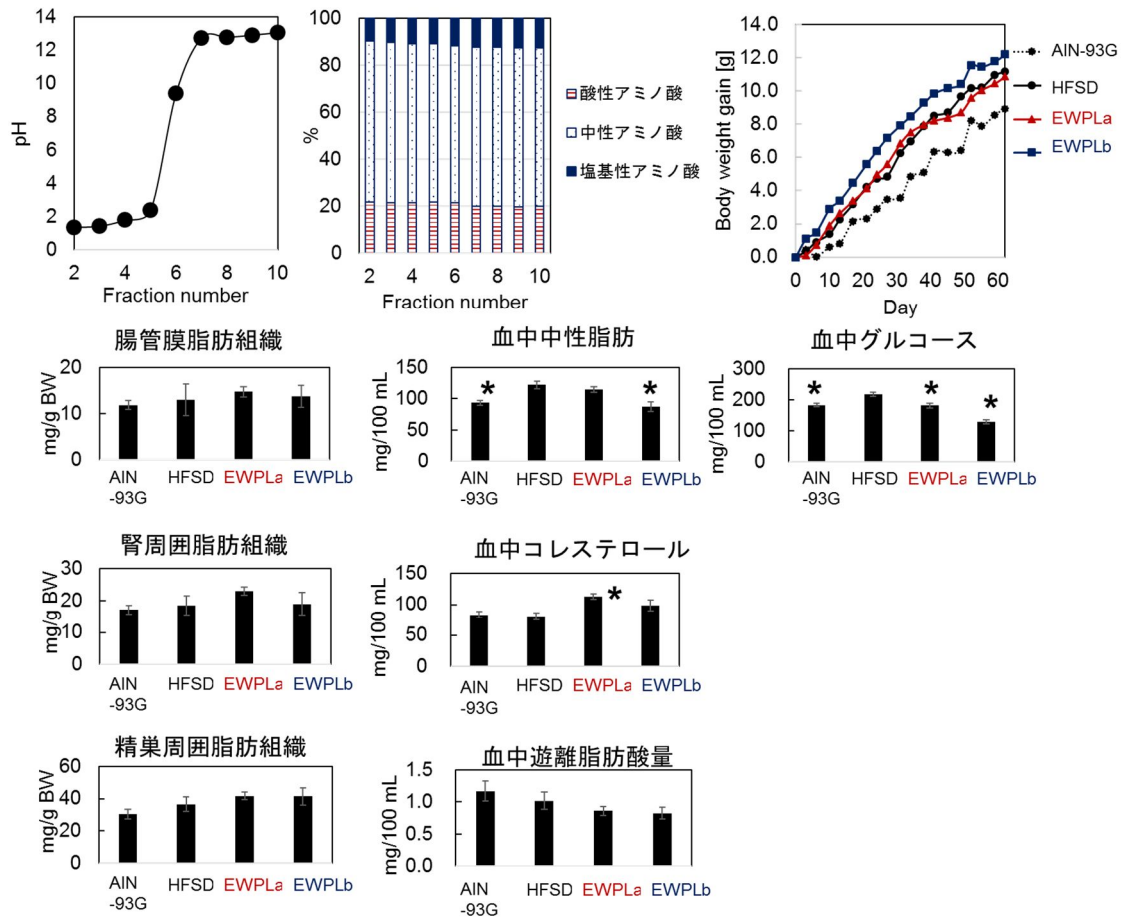


Fig.5 EWPL の分画物が体重増加量，脂肪組織重量，血漿成分濃度に及ぼす影響
 等電点電気泳動によって分画した画分 2~6 を酸性ペプチド画分 (EWPLa)，7~10 を塩基性ペプチド画分 (EWPLb) として回収し，食餌誘発性肥満モデルマウスに給餌した。
 * $p < 0.05$ vs HFSD (Dunnnett's test)

参考文献

- (1) Ochiai, M., & Azuma, Y. (2017). Egg white hydrolysate improves glucose tolerance in type-2 diabetic NSY mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 63(6), 422-429.
- (2) Matsuoka, R., Takahashi, Y., Muto, A., & Kimura, M. (2019). Heated egg white has no effect, but lactic fermented and unheated egg white reduces abdominal fat in rats. *Lipids in health and disease*, 18(1), 1-7.
- (3) Garcés-Rimón, M., González, C., Vera, G., Uranga, J. A., López-Fandiño, R., López-Miranda, V., & Miguel, M. (2018). Pepsin egg white hydrolysate improves glucose metabolism complications related to metabolic syndrome in Zucker fatty rats. *Nutrients*, 10(4), 441.
- (4) Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., González, C., Uranga, J. A., López-Miranda, V., Vera, G., & Miguel, M. (2018). Pepsin egg white hydrolysate ameliorates metabolic syndrome in high-fat/high-dextrose fed rats. *Food & function*, 9(1), 78-86.
- (5) Hashimoto, K., Sato, K., Nakamura, Y., & Ohtsuki, K. (2005). Development of a large-scale (50 L) apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in enzymatic hydrolysates of food proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 3801-3806.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤澤隆志、落合優、古田結歩
2. 発表標題 脂肪蓄積抑制作用及び耐糖能改善作用を示す卵白ペプシン消化物中の活性画分の解明
3. 学会等名 公益社団法人日本食品科学工学会 東北支部令和3年大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	落合 優 (Ochiai Masaru) (80750546)	北里大学・獣医学部・准教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------