

科学研究費助成事業(科学研究費補助金)研究成果報告書

平成25年3月1日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650181

研究課題名(和文) 酵素処理卵白タンパク質による脂質代謝改善とその分子機構

研究課題名(英文) Study on ameliorating effect of the enzyme-processed hen egg white ovalbumin on lipid metabolism and its molecular mechanism

研究代表者

大塚 彰 (OHTSUKA AKIRA)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：10233173

研究成果の概要(和文)：酵素消化処理鶏卵白アルブミンにおける脂肪酸合成酵素阻害ペプチドの探索を行うと共に、ペプチド含有画分の大量調製法を開発した。ペプチド含有画分はラットにおいて血液中性脂肪濃度の低下や腹腔脂肪の蓄積低減等の脂質代謝改善効果を発揮した。分取されたペプチドは脂肪酸合成酵素の酵素機能を阻害し、HepG2 培養肝細胞の脂肪酸合成を抑制した。以上より、脂質代謝改善に関する卵白アルブミンの新たな機能が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study a new method for large scale preparation of the fraction of pepsin-processed hen egg white ovalbumin (PHOVA) was developed. PHOVA showed ameliorating effects on lipid metabolism in normal or hyperlipidemic rats. Reductions in abdominal fat accumulation and blood triglyceride concentration were observed. One of the identified peptide in PHOVA directly inhibited the enzyme function of fatty acid synthase and suppressed the fatty acid synthesis in HepG2 hepatocytes. As a result, a new function of ovalbumin on the improvement of lipid metabolism was shown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：卵白ペプチド, 生活習慣病, 脂肪酸合成酵素, 脂質, 食品

1. 研究開始当初の背景

オボアルブミンは鶏卵白の約54%を占める主要なタンパク質であり、385個のアミノ酸より成る1本のポリペプチド鎖である。オボアルブミンは鶏胚の発成長過程で胚体に取り込まれ、体タンパク質合成の基材として利用されるなどの役割をもつが、卵内での生理機

能には不明な点が多い。一方でオボアルブミンの酵素分解によって生じるペプチドには血圧降下作用などの生体調節機能が多数見いだされている。例えばキモトリプシン消化により生じるペプチドには血管拡張作用(Matobaら1999)、ペプシン消化により生じるオボキニンには動脈弛緩活性が報告されている

(Fujitaら1995). このように卵白タンパク質、特にオボアルブミン中には様々な機能性ペプチド配列が潜在しており、新たな機能を有するペプチドの存在が期待される(吉川1998; Korhonenら2003).

ところで、ストレス時に副腎皮質からの分泌が増大するグルココルチコイドはストレスホルモンとして知られているが、強力な糖新生作用を有し、蓄積体脂肪および体タンパク質を組織から動員し、これらを糖に変換する。新生された糖は脳や心臓など生命維持に必須な器官に供給され、その結果、生体はストレスを乗り切ることができる。しかし一方でグルココルチコイドは、高血糖、脂質代謝異常、体タンパク質の損失、骨密度の減少、肝脂肪の増加ならびに活性酸素の増大などの各種の生理異常を引き起こす。合成グルココルチコイドの一種デキサメタゾン投与したラットにおいても上記のような代謝異常が起こることが見出され、その状態が、糖尿病、高脂血症、筋萎縮、骨粗鬆症、アルコール性肝障害と非常に類似しており(Ohtsukaら1998; Sackeckら2004)、各種の病態モデルとしての応用が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレスホルモン誘発の高脂血症モデル動物に消化酵素処理卵白タンパク質を給与し、その脂質代謝改善効果を検証し、次いで機能性ペプチドの分離と作用機構の分子メカニズムを明らかにすることであった。そしてこのペプチドを利用した機能性食品素材の開発を行い、ヒトの健康増進に寄与することを目指した。ヒトが日常手軽に摂取できるタンパク質食品から、生活習慣病の予防につながる新たな機能性ペプチドを見出せれば、安価・大量に生産することが可能となり、広範囲な普及が期待される。

3. 研究の方法

(1) 高脂血症モデルラットの血液中性脂肪濃度に対する卵白タンパク質の影響ならびにその作用因子の推定:

まず、デキサメタゾン投与(皮下注射10mg/kg 体重/日×4日)して高脂血症を誘発させたラットを用いた動物実験系を確立した。次に、この高脂血症モデルラットに卵白タンパク質(EWP)を与え、脂質代謝改善効果の検証を行った。その結果、EWPに有意な脂質代謝改善効果が確認され、特に血液の中性脂肪濃度の低下作用が顕著であることが明らかとなった(図1)。次に、EWPの54%を占める主要構成タンパク質オボアルブミ

ンに着目し、正常ラットに、カゼイン、精製大豆タンパク質(SPI)、EWPおよびオボアルブミンを唯一のタンパク質源とする試験飼料を与え、血液中性脂肪濃度および腹腔内脂肪蓄積に対する影響を調べたところ、オボアルブミンに有意な腹腔脂肪低減効果(図2A)および中性脂肪低下効果(図2B)が確認された。これより卵白中には脂肪酸あるいは脂肪の合成を抑制する作用因子が存在しており、その本体はオボアルブミンの消化酵素産物であると推測した。

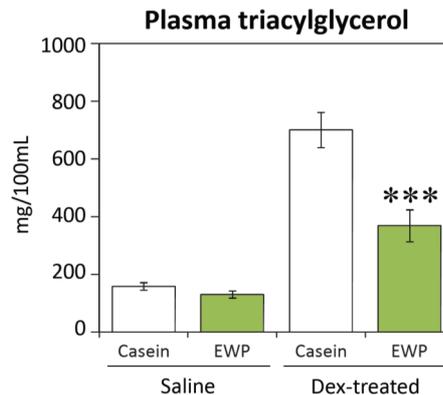


図1. デキサメタゾン(Dex)誘発の高脂血症に対する卵白タンパク質(EWP)給与の影響。Dex処理により高脂血症が誘発されるが、カゼイン(Casein)食給与と比較してEWP食給与では有意に血液中性脂肪濃度の上昇が抑制される。

***, $P < 0.005$ vs Dex-treated casein group

(2) 酵素処理オボアルブミン画分の脂質代謝改善効果

次に、方法(1)の結果を踏まえ、オボアルブミンにペプシン消化処理および加熱処理を施した試料(PHOVA)を試作した。オボアルブミンを純水に懸濁、HClでpHを2.0に調整し、ペプシンで加水分解(酵素:オボアルブミン=1:75, 37°C, 24時間)を行った。加熱(95°C, 10分)して反応を停止し、NaCO₃でpHを5.0に調整、遠心分離して不溶性の熱凝固画分を除去した。その後上清に消泡剤(シリコーンオイル, 0.02%)を加えて減圧濃縮し、凍結乾燥・粉末化してPHOVAを得た。

続いて動物実験においてPHOVAの効果の検証を行った。その結果、PHOVAがオボアルブミンと同等の脂質代謝改善効果を有することが確認され、さらに脂肪酸合成酵素(FAS)の抑制作用はPHOVAのほうが優れていることが明らかとなった。またPHOVAは高脂肪食を給与したラットの肝臓脂肪蓄積に対して高い効果を示すことが明らかとなった(図3)

また、PHOVAを限外ろ過で分子量1kDa以下に分画し、脂肪酸合成酵素の活性測定系に添加して直接的な影響を調べたところ、IC₅₀に換算して数mg/mlの阻害活性が確認できた。

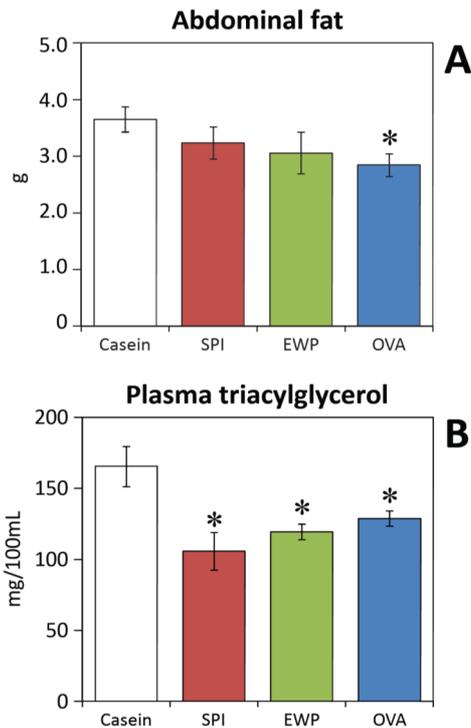


図2. 卵白による脂質代謝改善の主要因子はオボアルブミン(OVA)であった。Casein, 精製大豆タンパク質(SPI), 卵白タンパク質(EWP), OVA を唯一のタンパク質源とした飼料をラットに給与し, 脂質代謝改善効果の比較を行った。OVAに有意な腹腔内脂肪蓄積低減(A)および血液中中性脂肪低下作用(B)が認められた。*, $P < 0.05$ vs casein group

これより脂肪酸合成酵素阻害因子の本体は分子量 1kDa 以下の比較的的小型のペプチドであると推定された。

(3) 脂肪酸合成酵素 (FAS) の単離・精製

方法(2)の結果より, オボアルブミン中には FAS 阻害ペプチドの存在が推定された。このペプチドの分取に際して, FAS 阻害作用の正確な評価が重要であり, それには純粋な FAS が大量に必要であった。しかしながら, FAS はその複雑な構造ゆえに, 大腸菌発現系等では酵素活性を有するタンパク質分子の発現が困難であり, 本研究に適用可能な市販品も無かった。そこで独自に FAS の単離・精製を試みた。

48 時間の絶食後に無脂肪高炭水化物食を 72 時間給与する栄養条件操作, あるいはデキサメタゾン投与(皮下注射 10mg/kg 体重/日×2 日)によって FAS 誘導処理を行ったラットより肝臓を採取し, 組織塊を三倍量の 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5, 2mM DTT, 1mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 10% グリセロールを含む) 中でポリトロンホモジナイザーを使用してホモジナイズした。次に総ホモジネートを高速遠心分離 (4°C, 27,000×g, 15 分) して粗酵素液を得た。そこに硫酸アンモニウムを添加して 50%飽和に調整・維持 (4°C, 2 時間) した後, 高速遠心分離を行った。得ら

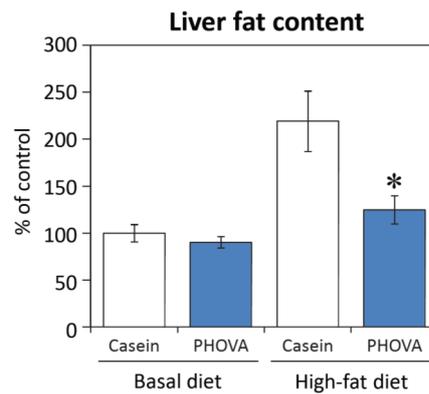


図3. 酵素処理オボアルブミン画分(PHOVA)の脂質代謝改善効果。Casein あるいは PHOVA をタンパク質源とした普通脂肪飼料(Basal diet, 7%)あるいは高脂肪飼料(High-fat diet, 27%)をラットに給与し, 肝臓脂肪含量に対する影響を調べた。PHOVA は高脂肪給与時に効果を発揮する。*, $P < 0.05$ vs casein high-fat diet group

れた沈殿を 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 中に懸濁し, 0.02%アジ化ナトリウムを含む 50mM 同緩衝液中で一晩透析を行った。透析後, 試料液を回収して, 超遠心分離 (4°C, 100,000×g, 2 時間) を行った。得られた上清を, 0.02%アジ化ナトリウムを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (DTT 等を含まない) 中で透析 (4°C, 2~3 時間) した後, GE ヘルスケア製低圧クロマトグラフタンパク質分取システム AKTA prime plus によるイオン交換クロマトグラフ (HiPrep DEAE FF 16/10 カラム) に供した。移動相 [A 液: 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5, 2mM DTT, 0.1mM EDTA を含む); B 液: 250mM リン酸カリウム緩衝液 (他は A 液と同じ)] のリン酸カリウム濃度を 50~250mM に上昇させるリニアグラジュエント溶出 (1mL/分) を適用した。図 4 A に示すように, 検出波長 280nm において 2 つの大きな吸収ピークが現れ, 209 分に溶出した 2 番目のピーク画分 (リン酸カリウム濃度 150~165mM 付近) を中心に FAS 活性が認められた。活性画分を回収, 硫酸アンモニウムを添加して 36%飽和に調整・維持 (4°C, 30 分) した後, 高速遠心分離を行った。得られた沈殿を 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5, 2mM DTT, 0.1M EDTA を含む) 中に懸濁し, ゲルろ過クロマトグラフ (HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR カラム) に供した。100mM リン酸カリウム緩衝液によるイソクラテック溶出を行い, 図 1 B のように 135 分に溶出したピーク画分を回収し, 硫酸アンモニウムを添加して 41%飽和に調整・維持 (4°C, 30 分) した後, 高速遠心分離を行った。得られた沈殿を 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5, 5mM DTT, 1mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 10% グリセロールを含む) 中に懸濁し, 同じ緩衝液中で透析を行った。

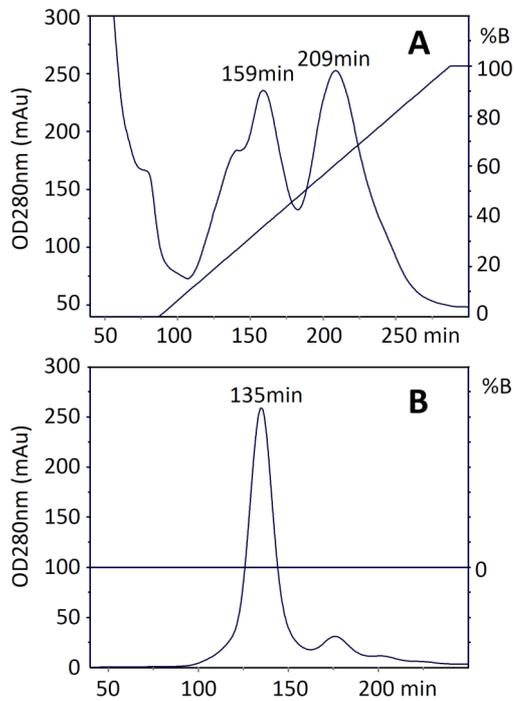


図4. 脂肪酸合成酵素(FAS)の単離・精製. A, HiPrep DEAE FF イオン交換クロマトグラフによる分画. FAS 活性を示す 209 分の溶出画分を回収して以降の工程に用いた; B, HiPrep Sphacryl S-300 HR ゲルろ過クロマトグラフによる分画. FAS 活性を示す 135 分の溶出画分を回収して以降の分画に用いた.

FAS による脂肪酸 (パルミチン酸) 合成の反応式は $\text{CH}_3\text{CO-S-CoA} + 7\text{HOOC-CH}_2\text{-S-CoA} + 14\text{NADPH} + 14\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH} + 7\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 8\text{CoA-SH} + 14\text{NADP}^+$ と表され, これより FAS 活性は NADPH の消費量とみなすことができる. 340nm における NADPH の吸光度の減少量が NADPH の消費量として表され, NADPH の 340nm における分子吸光係数は $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であるため, 結局, FAS 活性=NADPH の消費量=FAS 依存性の 340nm の吸光度の減少量÷分子吸光係数, と導かれる. この原理を基に, 分光光度計を用いた活性測定システムの構築を行った. まず石英セミマイクロセル(1mL)中で, 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0), NADPH, アセチル CoA, EDTA, 精製 FAS (あるいは FAS 含有画分) を混合, 37°C に保温した (恒温セルホルダーを使用). 反応系の 340nm における吸光度の変化を 2 分間モニターして, これを FAS 非依存性の吸光度の減少量とした. 次にマロニル CoA を添加して酵素反応を開始した. 各基質類の最終濃度は NADPH, 0.3mM; アセチル CoA, 0.05mM; マロニル CoA, 0.2mM; EDTA, 0.2mM; 精製 FAS (あるいは FAS 含有画分), 10 μg ; リン酸カリウム緩衝液, 100mM となる. 反応を 1 分間以上モニターし, 吸光度が直線的に減少する部分を FAS 活性の算出に用いた. 各手順を経る毎に画分中のタンパク質含量が減少する一方で, FAS 比活性は上昇した. 最終的に精製 FAS の比活性値は粗酵素液と比

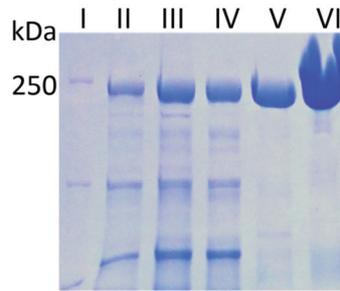


図5. SDS-PAGE 電気泳動による FAS 精製度の検証. レーン I, 分子量マーカー; II, 粗酵素液; III, 硫酸アンモニウム沈殿画分; IV, 超遠心画分 V, イオン交換クロマトグラフ画分; VI, ゲルろ過クロマトグラフ後 (精製 FAS). 各レーンのタンパク質の総量は 10 μg に調整.

較して約 14 倍の値を示した. また, デキサメタゾン処理ラットの肝臓を用いた単離・精製では, 粗酵素液と比較して約 30 倍の比活性を示す精製 FAS 画分を得ることが出来た.

次に, 上記の各画分を SDS-PAGE 電気泳動に供して, 精製度の検証を行った. 図 5 の泳動ゲル画像に示されるように, 260kDa 付近に現れる FAS タンパク質単量体のバンドは, 段階が進むに従って濃くなり, 単離精製システムが順調に機能していることが示された. ゲルろ過後はほぼ単一のバンドであり, 高純度な FAS が得られた. また-80°Cでの長期凍結保存後も酵素活性は維持された.

(4) FAS 阻害因子の分画とペプチドの同定

方法 (2) で得られたオボアルブミンのペプシン消化物を, カットオフメンブレンを用いて分子量 1kDa 以下に粗分画 (OVA-1kDa) し, 水/アセトニトリル/TFA 系逆相高速液体クロマトグラフ分析に供した (図 6). ペプチドピーク群を溶出時間ごとに区切って分取した後, それぞれの画分を濃縮・凍結乾燥した. 方法 (3) で得られた精製 FAS を用いて, 各画分の阻害活性の評価を行い, 画分の絞り込みを行った. 最後に四重極飛行時間型 LC-ESI-

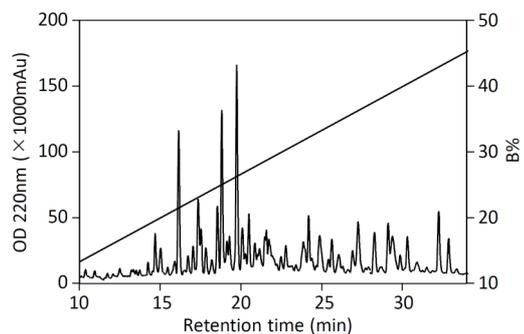


図6. 逆相高速液体クロマトグラフによる酵素処理卵白(OVA-1kDa)の分画. 移動相: A 液, 0.1%TFA; B 液, 0.1%TFA/80%アセトニトリル. 流速: 0.5mL/分. カラム: Nacalai C18-AR-II(10mmI.D. x 250mm). ピーク群を溶出時間ごとに区切って分取した後, それぞれの画分を濃縮・凍結乾燥し, 精製 FAS による阻害活性の評価に用いた.

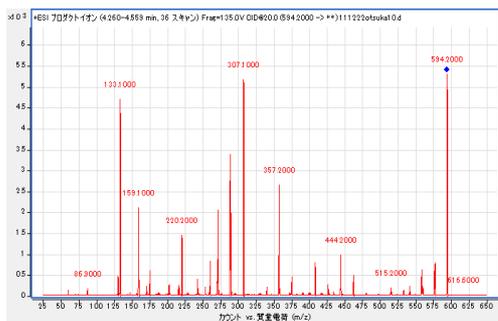


図7. 液体クロマトグラフトリプル四重極エレクトロスプレーイオン化質量分析装置(QQQ LC-ESI-MS)によるOVAPepのMS/MSスペクトル(フラグメントパターン). OVAPepは5アミノ酸残基より成る分子量は593の新規ペプチドであることが判明した.

質量分析装置で候補画分の精密質量分析を行い、次に液体クロマトグラフトリプル四重極エレクトロスプレーイオン化質量分析装置(QQQ LC-ESI-MS)でMS/MSスペクトルを測定し、そのフラグメントパターンよりペプチドの解析を行った(図7). その結果、オボアルブミンに由来するの5アミノ酸残基(分子量593)の新規ペプチド(OVAPep)であることが判明した.

(5)OVAPepのFAS阻害活性の検証ならびに培養肝細胞の脂肪酸合成に対する影響

合成OVAPepを精製FASを用いた測定系に添加して直接的な影響を調べたところ、1mg/mLの添加で42%の阻害効果が確認された(図8). またHepG2培養肝細胞の脂肪酸合成能に対するOVAPepの影響を調べるため、 $[2-^{14}C]$ acetateの脂質画分への取り込み量の測定を行った. 6-well dish中でHepG2細胞をコンフルエントに達するまで増殖させ、試験に用いた. まず、OVAPepを含む(300 μ g/mL)培地中で3時間の前培養を行い、次いで $[2-^{14}C]$ acetateを培地に添加して培養を続けた. 90分後に細胞を回収して脂質画分の抽出を行い、取り込まれた放射線量を脂肪酸合成能とした. 既存FAS阻害剤Cerulenin(15 μ g/mL)を比較として用いた. その結果、OVAPep処理によって $[2-^{14}C]$ acetateの脂質画分への取込量が有意に減少(23%減, $P < 0.01$)し、OVAPepによる脂肪酸合成能の阻害が確認された. 既存のFAS阻害剤Ceruleninは低濃度(15 μ g/mL)でも強い取込抑制作用(65%

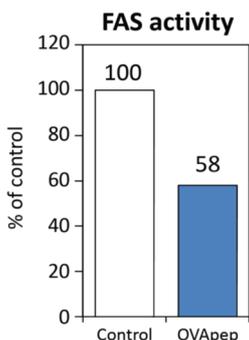


図8. 精製FASに対するOVAPepの直接的な阻害作用. 精製FASの活性測定系にOVAPepを添加(1mg/mL)して、その阻害作用を調べた.

減)を示した. 既存FAS阻害剤であるCeruleninやC75は動物生体において、体重の顕著な減少等の強い副作用が認められるため、臨床的な実用には至っていない. 元々卵白中に存在するペプチドであるOVAPepには副作用の低さが期待できる.

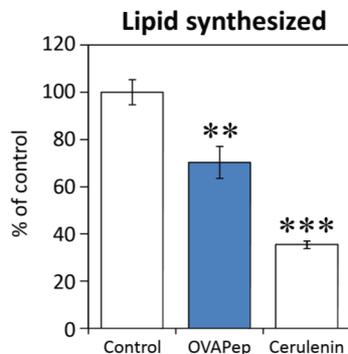


図9. HepG2培養肝細胞の脂肪酸合成能に対するOVAPep投与の影響. OVAPepを含む(300 μ g/mL)培地中で3時間の前培養を行い、次いで $[2-^{14}C]$ acetateを培地に添加して培養を続けた. 90分後に細胞を回収して脂質画分の抽出を行い、取り込まれた放射線量を脂肪酸合成能とした. 既存FAS阻害剤Cerulenin(15 μ g/mL)を比較として用いた.

4. 研究成果

本研究では、酵素消化処理鶏卵白アルブミンにおける脂肪酸合成酵素阻害ペプチドの探索を行うと共に、ペプチド含有画分の大量調製法を開発した. その結果、ペプチド含有画分は正常、高脂肪食給与、高脂肪血症ラットの何れにおいても血液中中性脂肪濃度の低下や腹腔脂肪の蓄積低減等の脂質代謝改善効果を発揮した. また、分取されたペプチドが脂肪酸合成酵素の酵素機能を直接阻害することを確認するとともに、HepG2培養肝細胞の脂肪酸合成を抑制することも見出した. 以上より、脂質代謝改善に関する卵白アルブミンの新たな機能が示された.

本研究で得られた結果は、余剰卵白の高付加価値化と高度利用の促進、抗肥満効果を有する機能性食品の開発、プロイラー生産性の向上、新たな癌治療薬の開発等につながると期待される.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Ohtsuka A, Kawatomi N, Nakashima K, Taro Araki T and Hayashi K. Gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase, atrogin-1/MAFbx, positively correlates with skeletal muscle proteolysis in food-deprived broiler chickens. J Poult

- Sci, 48 (2), 92-96 (2011)
- ② Saleh AA, Eid YZ, Ebeid TA, Kamizono T, Ohtsuka A and Hayashi K. Effects of feeding *Aspergillus Awamori* and *Aspergillus Niger* on growth performance and meat quality in broiler chickens. J Poult Sci, 48 (3), 201-206 (2011)

[学会発表] (計6件)

- ① 川富典子, 河村博明, 大塚彰, 林國興. ラット骨格筋タンパク質代謝関連遺伝子の発現に対する共役リノール酸と運動の影響. 第63回日本栄養食糧学会大会, 2009年5月21日, 長崎ブリックホール
- ② 月野真由美, 竹本千恵, 大塚彰, 林國興. 培養筋肉細胞のタンパク質分解におけるカスパーゼの役割. 第63回日本栄養食糧学会大会, 2009年5月21日, 長崎ブリックホール
- ③ 川富典子, 河村博明, 大塚彰, 林國興. 共役リノール酸と運動がラット骨格筋の脂質代謝に及ぼす影響. 平成21年度日本栄養食糧学会九州沖縄支部大会, 2009年10年31日, 琉球大学
- ④ 瀬名波咲, 木村直昭, 大塚彰, 林國興. C2C12筋管細胞のタンパク質分解に対するテストステロンの影響. 平成21年度日本栄養食糧学会九州沖縄支部大会, 2009年10年31日, 琉球大学
- ⑤ 西山幸佑, 川富典子, 大塚彰, 林國興. 走行運動ラットの骨格筋タンパク質分解に対する共役リノール酸の影響. 第43回日本栄養食糧学会中国四国支部大会, 2010年11月7日, 高知女子大学
- ⑥ 藤田弘志, 大塚彰, 林國興. オボアルブミンの脂肪酸合成抑制作用. 第65回日本栄養食糧学会大会, 2011年5月14日, お茶の水女子大学

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 卵白アルブミン分解物を含有する脂質代謝改善剤

発明者: 大塚 彰

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願番号 特願 2012-016753

出願年月日: 2012年7月27日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 彰(OHTSUKA AKIRA)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号: 10233173

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

井尻 大地 (IJIRI DAICHI)

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号: 50551090

榎元 廣文 (ENOMOTO HIROFUMI)

帝京大学・理工学部・助教

研究者番号: 30609392