

鶏卵白リゾチームの品質の安定性とそれに寄与する

卵タンパク質に由来するペプチドに関する研究

Studies on the quality stability of hen egg-white lysozyme

and the contribution of peptides derived from egg proteins

室井 由起子

2022

【目次】

第1章	序論	1
第2章	発生段階における鶏卵白のリゾチーム(HEWL)の安定性	13
2.1	目的	13
2.2	材料および実験方法	15
2.2.1	卵白の調製	15
2.2.2	HEWL の精製	15
2.2.3	酵素活性およびバクテリアに対する抗菌活性	17
2.2.4	タンパク質の構造的特徴の分析	18
2.2.5	統計解析	20
2.3	結果	20
2.3.1	インキュベーション中の卵白のタンパク質含有量と溶菌活性	20
2.3.2	孵化中の卵からリゾチームの精製	22
2.3.3	精製したリゾチームの酵素活性、溶菌、増殖阻害活性について	25
2.3.4	発生過程におけるリゾチームの構造的特徴	31
2.4	考察	38
2.5	小括	43

第3章 鶏卵タンパク質の安定性に関わる要因の探索ーリゾチームのアミロイド

形成を抑制するペプチドー	44
3.1 目的	44
3.2 材料および実験方法	47
3.2.1 卵白、卵黄、カラザ、および卵殻膜からのタンパク質の加水分解物の調製	47
3.2.2 卵白・ヒトリゾチームの線維化分析のインキュベーション条件	48
3.2.3 チオフラビン T(ThT)蛍光の測定と蛍光顕微鏡および透過電子顕微鏡 (TEM)による観察	49
3.2.4 統計解析	50
3.3 結果	51
3.3.1 HEWL および h-Lz 繊維形成に対する鶏卵タンパク質の加水分解物の効果	51
3.3.2 h-Lz による ThT 蛍光発光および卵タンパク質加水分解物による相互作用に対する金属イオンの影響	59
3.3.3 A β 1-42 に対する鶏卵タンパク質加水分解物の効果	62
3.4 考察	65

3.5 小括	69
第 4 章 総合考察	70
References	75
謝辞	87

(Abbreviations)

ANS: 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid

A β 1-42: amyloid β 1-42

C: chalaza

c-Lz: authentic HEWL

DSC: differential scanning calorimetry

ESM: eggshell membrane

EW: egg white

EY: egg yolk

FITC: fluorescein isothiocyanate

HEWL: hen egg-white lysozyme

h-Lz: human lysozyme

HS-OVA: heat stable ovalbumin

N-OVA: native ovalbumin

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

S-OVA: stable ovalbumin

TEM: transmission electron microscopy

ThT: thioflavin T

第 1 章 序論

タンパク質は生命を司る上で、生体内で最も重要な分子である。ヒトでは生体には 10 万種類を超えるタンパク質が存在していると考えられ、それぞれが重要な役割を演じている。タンパク質は遺伝子配列に従って、アミノ酸がペプチド結合によってポリペプチド鎖を形成し、これがさらに 2 次構造、3 次構造を形成することによって機能あるものとなる。構造は数十種類のパターンが見られるが、機能は多種多様であり、生体内では複雑な構成となっている。

タンパク質は遺伝子、つまり DNA の産物である mRNA の配列に従って合成され、構造の構築、いわゆるフォールディングが行われ、タンパク質の基本構造が出来上がり、プロセッシングを経て機能あるタンパク質が完成される。こうした経路で完成されたタンパク質は目的の場所へ移動し、生命活動の主役となる(Levitt *et al*, 1997)。このように作られたタンパク質は細胞内外で役割を演じるが、役割を終えると分解され、アミノ酸となり、再利用あるいは完全に分解される。一方、構造あるタンパク質は外部環境により大きく変化をする。物理的要因、化学的要因および生物的要因によって機能を喪失したり、正しい構造の損失あるいは不可逆的構造となる。このような状態のタンパク質はアンフォールド (unfold) あるいはミスフォールド (misfold) や変性したタンパク質と言われ、生体内では速やかに処理される。物理的要因としては温度 (高温、低温)、

乾燥、圧力、超音波、紫外線、X線などがある。化学的要因としては強酸・強塩基、尿素、有機溶媒、界面活性剤、酸化・還元剤、重金属などがあり、生物的要因としては酵素や微生物によるものがある。タンパク質の構造はかなりデリケートなものであり、生体内では正しい構造の維持が図られ、不正な構造のものを修復する機構が備わっている。つまり、アンフォールディングやミスフォールディングしたタンパク質は分子シャペロンによってフォールディングされ、再生される。しかしながら、フォールディング出来なかったものは速やかにユビキチン化され、プロテオソームに運ばれ、分解されてタンパク質としての生涯を閉じることになる。一方、こうしたフォールディングが出来ず、アンフォールドあるいはミスフォールドの状態分解されず、不良タンパク質として細胞内外に蓄積するものも多くある。これらはタンパク質の種類によって蓄積される場所も細胞に与える影響も異なるが、少なからず細胞にダメージをもたらすとされる。多くのフォールディング病と呼ばれる疾患は正しくフォールディングが出来なかったタンパク質が生体内で分解されずに残り、重合や凝集して特徴ある構造、いわゆる β -クロス構造を作り、規則的な線維状構造体であるアミロイド線維を形成し、細胞に毒性や損傷を与えて起こるものを称している。アルツハイマー病、パーキンソン病やクロイフェルトヤコブ病などの多くの神経変性疾患、トランスサイレチンやリゾチームの変異体が起こす全身性アミロ

イドーシスがあり、タンパク質の不良化が原因で起こる疾患は多種多様でそれらの治療法は困難にさらされている (Iadanza *et al*, 1997; Picken MM, 2020)。

タンパク質のミスフォールディングは先に記述したような要因で起こるが、生体内はどのように正しい構造、つまりネイティブ構造を維持しているのか興味を持たれる。例えばニワトリの発生では、卵は 38°C で 3 週間ほど保温される。発生が進めば胚は成長し、新しいタンパク質が合成され、生体による制御が充分行われると思われる。しかし、卵白や卵黄のタンパク質は鶏が合成したものであり、卵内で胚が制御するのは難しい環境にあると考えられる。卵黄タンパク質はアミノ酸源として活用され、胚の成長に優先的に使われると推定できるが、卵白のタンパク質はその役割が複雑であり、胚が孵化するまで卵内に残存している。当然、アミノ酸源として利用されるが、それらが持つ生理機能は胚発生に重要な役割を担っており、胚のコントロール下にあってタンパク質として機能することで胚の成長に寄与している (**Fig. 1.1**)。

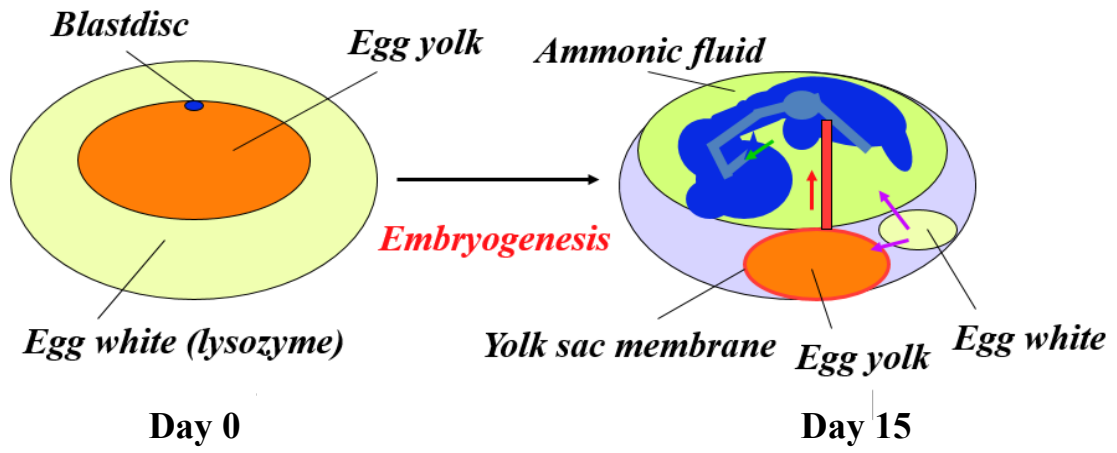


Fig. 1.1. Circumstances of egg white during embryonic development

卵白タンパク質の 55% を占めるオボアルブミンはセルピン構造を有するタンパク質であるが、プロテアーゼインヒビターの活性がないことから non-inhibitory serpin 属に分類され (Remold-O'Donnell E, 1993)、実際、機能については不明である。しかし、胚発生が進行するとオボアルブミンはネイティブ型と言われる N-オボアルブミン (N-OVA) から特徴ある中間型の HS-オボアルブミン (HS-OVA) になり、温度安定性が増す。そして最も熱安定性の高い S-オボアルブミン (S-OVA) に転換していく。すなわち、受精した直後から HS-OVA の転換は始まり、発生 48 時間後にはほぼ HS-OVA となり、そして速やかに S-OVA となっていく。N-OVA の変性温度は 78°C、HS-OVA は 82°C、S-OVA は 86°C であり、つまり発生が進行することによって熱安定型に変化していくことが知られている (Fig. 1.2) (Shinohara *et al*, 2005)。HS-OVA は中間体と考えられ、この転換が初期発生に何らかの影響を及ぼすと考えられる。この熱安定型への転換は以下のように説明されている。セルピンの構造は 3 つの β -シートのクラスター (A、B、C) およびそれらを取り囲む 8 個の α -ヘリックスと表面に突き出した reaction center loop (RCL) と呼ばれるペプチド鎖がある。標的プロテアーゼが RCL の内部のアミノ酸配列を切断することから阻害機序が始まり、最終的には EI complex の状態で RCL が β -シート A 内に loop insertion することによって酵素阻害は完成する (Kahn *et al*, 2011)。酵素とセルピンは強いアシル結合で安定しており、

酵素機能は失われる。オボアルブミンの熱安定型への転換はこの RCL の部分的 insertion によることが明らかにされた (Shinohara *et al*, 2007)。これまでセルピンは RCL の構造内部への insertion により Latent 型セルピンとなり、熱安定性が増すと報告されている。同じように胚発生が進むとオボアルブミンの RCL は分子構造内部に部分的に挿入され、構造がネイティブ型より熱に対して安定になり、変性温度が 8°C 以上上昇すると考えられる。この上昇が何を意味するかは不明であるが、胚発生中にこのようなことが起こるのは卵白を取り巻く厳しい環境に対応するためと思われる。オボアルブミンは胚発生中に構造変化が起こることは観察されるが、機能が不明であることから、卵白タンパク質で機能が解明されているタンパク質を取り扱うことでよりタンパク質の安定性という課題に取り組むことが出来ると考えられた。

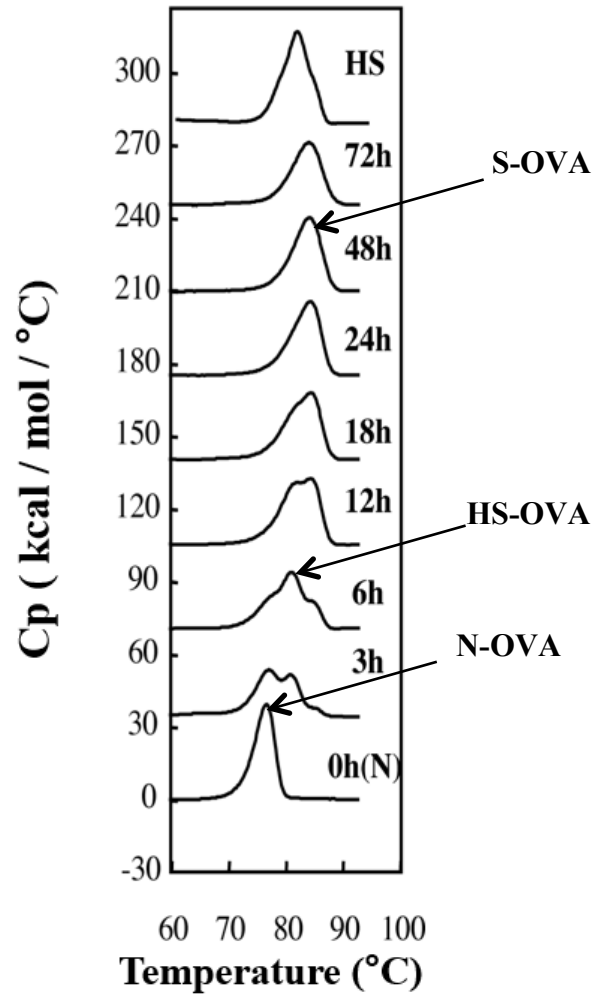
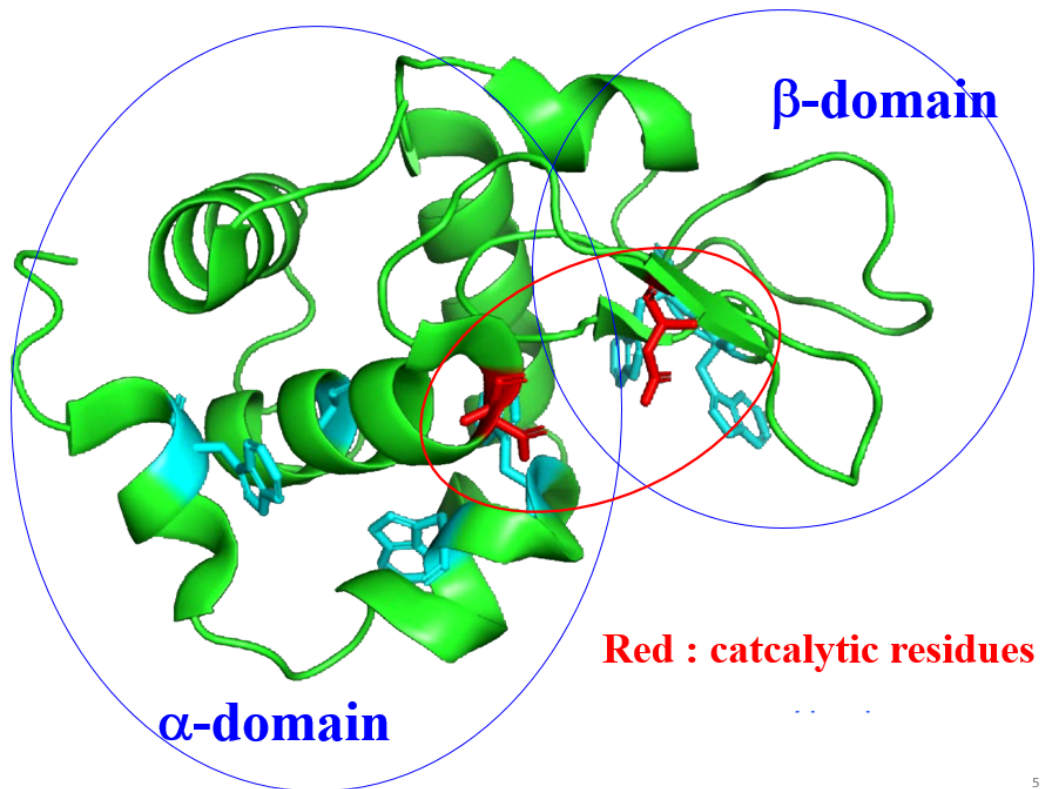


Fig. 1.2. Changes in heat denaturation of HEWL during the early embryonic development (Shinohara *et al*, *Bichim. Biophys. Acta*, 2005)

リゾチームは卵白タンパク質の3%を占め、一部のグラム陽性菌の細胞壁プロテオグリカンである *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチルグルコサミンのグリコシド結合を加水分解する酵素であり (Manchenko, 1994)、このため抗菌性を示す。卵白リゾチーム (HEWL) は分子量が1万4千と小さなタンパク質であり、分子内に4つの S-S 結合を持ち、比較的安定性の高いタンパク質である。構造的には α -ヘリックスからなる α -ドメインと β -構造からなる β -ドメインの2つのドメイン構造を持っており、両ドメインを繋ぐ領域はポケットのようになっており、そこに2つの触媒基を有している (Fig. 1.3)。つまり35番目のグルタミン酸 (Glu35) と52番目のアスパラギン酸 (Asp52) であり、両残基が触媒に関与している (Grisham and Garrett, 2007)。



5

Fig. 1.3. Three-dimensional structure of HEWL: It consists of two domains, an α -helix-rich α -domain and α β -structure-rich β -domain, and the active center is situated in the region connecting them (red circle).

この両残基の領域に、基質であるプロテオグリカンが挟まり、両残基によってグリコシド結合が切断される。しかしながら、HEWL のムラミダーゼ活性は全てのグラム陽性菌のグリコシド結合を加水分解するものではない。また、HEWL は大腸菌などのグラム陰性菌には、外側にリポポリサッカライドを含む外膜が存在するため抗菌作用はないと考えられている。HEWL はバクテリアの細胞壁を溶解することで抗菌作用を示すこと以外にも、HEWL は強い塩基性タンパク質であり、プラス(+)にチャージした構造表面がバクテリアのマイナス (-) 細胞膜と結合し、細菌の細胞膜に穴 (pore) を開けて細菌を溶解させることで抗菌作用を示すとも言われている (Derde 2013; Zhang *et al*, 2016)。さらに、加熱され酵素活性を消失したがグラム陰性菌の生育を阻害するという報告もなされている (Ibrahim HR *et al*, 1996)。

また、ヒトリゾチームは遺伝的変異により全身性アミロイドーシスを発症することが知られ、HEWL もある条件の下ではアミロイド線維を形成することからタンパク質のアミロイド線維形成モデルタンパク質として広く、詳しく研究されている (Swaminathan *et al*, 2011)。ヒトリゾチームの遺伝性全身性アミロイドーシスを発症する患者には β -ドメイン内かその周辺のアミノ酸の変異によって起こることが知られ、現在、アミロイドーシスとなる 5 種類のアミノ酸変異が報告されている (Pepys *et al*, 1993)。 β -ドメイン内にはアミロイド線維形成コ

ア領域という 9 個のアミノ酸配列があり、この領域はネイティブの時は分子構造内部にあるが、変異により構造が変化し、分子構造内部から表面に露出することがアミロイド線維形成に関わっていると考えられている。変異を起こしたリゾチームは凝集しやすく、不安定なタンパク質となって最終的には会合して線維化するものと思われる。

HEWL は酸性条件で、55°C 程度で保温した場合、2 週間程度でアミロイド線維を形成するとされ、エタノールのような有機溶媒や界面活性剤でもアミロイド線維を形成する (Sassi *et al*, 2011)。これはこうした処理によりアミロイド線維形成コア領域の表面への露出が起こり、アミロイド線維形成となっている (Swaminathan *et al*, 2011)。先述したように胚発生では 38°C で 3 週間ほど保温され、タンパク質にとっては安全な条件ではなく、多かれ少なかれ構造変化が起こる可能性は大きいと考えられる。オボアルブミンは熱安定型に転換され、構造が Latent 型になっていく。HEWL では、リゾチームはどのように変化しているのか、機能の明確なタンパク質であるため変化を追跡しやすいと考えられる。もし、構造変化がなく機能を保持・継続しているならば何故そのように出来るのか？構造変化が起こっているのであればアミロイド線維は形成されるのかなどリゾチームを対象にした研究は大きな意義があると考えられる。

そこで、本研究では、第 2 章では、HEWL の胚発生過程での安定性について

追究した。つまり 38°C の長時間の環境で、HEWL の構造に変化を起こるのか、それに伴いムラミダーゼ活性と抗菌性にはどのような影響があるのかに着目して、研究を進めた。また、第 3 章では、第 2 章の研究において発生過程での HEWL は構造的にも機能的にも比較的に安定性が確認されたので、鶏卵にはタンパク質の安定を保持する要因があると考え、鶏卵のタンパク質の分解物に注目して研究を進めた。HEWL はアミロイド線維を形成するタンパク質であることからアミロイド線維形成のモデルタンパク質として詳しくは研究されており、線維形成コア領域の存在も知られている (Dobson *et al*, 1994; Tokunaga *et al*, 2013)。また、HEWL 分子内にはアミロイド線維化を防ぐ領域の存在が予想されており (T. Ueda 私信)、線維形成阻害にペプチドの役割が期待されている。よって鶏卵にも HEWL の線維形成を防ぐ要因が備わっていると考え、鶏卵タンパク質の加水分解物 (ペプチド) に注目し、HEWL の線維形成抑制因子の探索を行った。その結果、カラザと卵白のペプチドに線維形成を抑制するものを見出した。さらにこれらはヒトリゾチーム (h-Lz) および amyloid β 1-42 (A β 1-42) のアミロイド線維形成も抑制することが明らかになった。

本論文は、タンパク質の安定性とそれに関わる要因について鶏卵タンパク質をモデルとしてまとめたものである。

第2章 発生過程における鶏卵白リゾチーム (HEWL) の安定性

2.1 目的

ニワトリの発生における卵白の役割は、発生過程の胚や卵黄を保護することや胚への栄養素の供給であり、特にタンパク質の役割は大きい。卵白タンパク質にはオボアルブミン、オボトランスフェリン、オボムコイド、オボムチンなどの卵白特有のタンパク質を含み、それぞれが重要な働きをすることにより、胚発生がうまく進行していると考えられている (Freeman, 1974)。発生卵を成長させ、孵化させるまで約3週間、38°C前後で保温する必要がある。保温した後、卵白のpHは、急激にアルカリ側に移行し、4日後に、中性に戻ることが報告されている (Cunningham, 1974)。このような環境の中で、卵白タンパク質がどのように構造と機能を維持しているのかは興味深い問題である。

オボアルブミンは発生過程に、変性温度78°CのNative型から発生初期には変性温度82°Cの中間体のHS型、その後変性温度86°C熱安定性のS型に転換していくことが示された (Sugimoto *et al*, 1999; Shinohara *et al*, 2005; Shinohara *et al*, 2007)。これは発生過程にオボアルブミンのreaction center loop (RCL)がオボアルブミン本体にpartial insertionをして、Latent型の構造を取ると説明された。このようにオボアルブミンは構造変化して熱安定型になるが、その機能が十分解

明されていないため、機能変化については不明である。このような発生過程でのタンパク質の構造変化と機能変化についての研究はほとんど行われておらず、ここでは機能がよく分かっている鶏卵白リゾチーム (HEWL) について発生過程におけるタンパク質の構造変化と機能変化について追究した。

HEWL は、ムラミダーゼ活性をもち、ある種のグラム陽性菌に対する溶菌作用を示すことから抗菌性のタンパク質として知られている (Manchenko, 1994)。

ムラミダーゼ活性は細胞壁に構成成分であるペプチドグリカンの糖鎖の *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチルグルコサミンの β 1-4 グリコシド結合を切断する

(Skujin's *et al*, 1973)。この反応には、活性の中心である Glu35 と Asp52 の 2 つのアミノ酸残基が関与しており、加水分解機序が明らかにされている (Grisham and Garrett, 2007)。HEWL は細菌のペプチドグリカンを加水分解することで細胞壁を溶解し、細菌を死滅させるとされる。一方、それに加えてリゾチームは酵素活性とは関係なく、抗菌作用を示すという報告がなされている (Ibrahim, 1988; Ibrahim *et al*, 2001; Nash *et al*, 2006)。リゾチームは等電点が 11.1~11.3 の塩基性タンパク質であり、分子表面は (+) 電荷をしており、細菌の細胞膜の (-) 電荷と電氣的に結合し、細胞壁に pore を開けることにより、細菌の細胞質が流出を起し、死滅してしまうとされている (Derde, 2013; Zhang *et al*, 2016)。こうしたムラミダーゼ活性や抗菌作用が発生過程でどのように維持されるかあるいは

変化するか、胚にとって重要な問題である。

発生過程におけるタンパク質の変化のモデルとして、ニワトリの発生過程では38°Cと比較的高い温度で長時間曝されることはタンパク質の安定にとって過酷な状態であると考えられ、今回の研究ではモデルタンパク質として、HEWLを選び、構造解析、酵素活性および抗菌性の変化を追究した。その結果、発生後期にやや構造変化が起こり、リゾチーム量は減少したものの酵素活性、溶菌活性、増殖抑制活性は保持していた。

2.2 材料および実験方法

2.2.1 卵白の調製

レグホーン種の有精卵(福岡県山形養鶏場、平均 58 ± 2 g)を温度38°C、湿度80%でインキュベートして、インキュベート前の0日目から孵卵18日目までの卵白を7個ずつ採取した。採取日の異なるそれぞれの卵白の重量、タンパク質量および細菌細胞壁分解活性を測定した。

2.2.2 HEWLの精製

採取した卵白にそれぞれ2倍量の水を加え懸濁し、遠心分離(12,000 rpm、15 min、4°C)を行い、グロブリンなどの不溶物を除去した。その後、上清液を塩酸

で pH 6.0 に調整し、遠心分離(12,000 rpm、15 min、4°C)して不溶物を除去した。次に、得られた上清液を塩酸で pH 4.0 に調整し、再度遠心分離して、不溶物を除き、粗上清液を得た。得られた粗上清液を 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を用いて透析し平衡化した。同緩衝液で平衡化したトヨパール CM-650 カラム (東ソー(株)、東京) を用いて陽イオンカラムクロマトグラフィーを行った。タンパク質を吸着後、同緩衝液中で NaCl 濃度を 0、0.1、0.2、0.3、0.5 M に替えて stepwise 法にて吸着したタンパク質を溶出させた。HEWL とと思われる溶菌活性のあるタンパク質は 0.3 M NaCl で溶出した。次に HiTrap CM FF Sepharose カラム(GE Healthcare Life Sciences Co.)を用いて分離を行った。同緩衝液中、0~0.4 M の直線的 NaCl グラジエント法で溶出させた。また、コントロールとして用いるリゾチーム(c-Lz)は、市販のリゾチーム(Wako Co.)を使用した。

タンパク質濃度の測定は、HEWL の吸光係数 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}_{280\text{ nm}} = 26.6$) を使用した比色法および Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay 法 (Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook 2010) で行った。タンパク質の純度検定は 15% ゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) および 8%ゲルを用いた Native-PAGE (Lewis *et al*, 1968) で行った。ゲルの染色は、Coomassie Brilliant Blue で行った。

2.2.3 酵素活性およびバクテリアに対する抗菌活性

精製された HEWL 分子量は、低分子標準マーカー (Bio-Rad、Hercules、CA) を使用して SDS-PAGE によって決定した。リゾチームの酵素活性は、基質としてのフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識 *Micrococcus lysodeikticus* 細胞壁 (EnzChek lysozyme assay kit) を使用して測定した。この測定は、細胞壁ムコ多糖の *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチル-D-グルコサミン残基の間の β -1,4 グリコシド結合の切断をすることで蛍光を発することに基づく方法である。蛍光標識した *M. lysodeikticus* および非標識の *M. lysodeikticus* の細胞壁の混合物を、所定の基質濃度 (1.5~50 mg/mL、標識と非標識の比 1 : 20) で調製したものを基質溶液とした。これらに 0.05 μ M の HEWL を添加することにより酵素反応を開始した。蛍光マイクロプレートリーダーで 485/530 nm の励起/蛍光を測定した。酵素 kinetics の K_m および V_{max} は、GraphPad Prism ソフトウェア (San Diego、CA) を使用して解析した。 *M. lysodeikticus* の細胞壁に対する溶菌活性は、濁度 (600 nm での光学密度) の減少によって決定した (Imoto and Yagishita, 1973; Ibrahim *et al*, 2001)。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (独立行政法人製品評価技術基盤機構より譲渡) および大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (*E. coli*) (タカラバイオ(株)) に対する増殖阻害を見ることで抗菌作用を評価した。バクテリア溶液 (*S. aureus* および *E. coli*, 1.3×10^6 CFU/mL) に、各ステージからの溶

液 (*S. aureus* に対しては 0、2、0.6 および 1 mg / mL、*E. coli* に対しては 1 mg / mL) を添加し、37°C で 1 時間プレインキュベートした。これからそれぞれ 10 μ L 培養液を採り、Luria broth (LB) 培地 (トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、NaCl 0.05%、pH 7.0) 寒天プレート (Agar、1.5%) に接種して、37 °C で 24 時間保温し、コロニーを観察した。別の実験では、上記の黄色ブドウ球菌ストックの 10 μ L 培養液 (1.3×10^6 CFU / mL) をそれぞれ 3 mL の新鮮な LB 培地に添加し、0~2 mg / mL で 16 時間培養した。これらの濁度 (600 nm での吸光度) を測定することにより細菌の増殖の程度を評価した。細菌の増殖阻害は、対数増殖期の濁度 (600 nm での吸光度) を測定することによって評価した。これらの実験を 5 回繰り返した。

2. 2. 4 タンパク質の構造的特徴の分析

示差走査熱量 (DSC) の測定は、Microcal 熱量計 (VP-DSC、Malvern、UK) を用いて行った。1mg / mL のタンパク質溶液 (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4) を脱気した後、1° C/min の加熱速度で測定した (Shinohara *et al*, 2005)。表面疎水性は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸 (ANS) を用いて蛍光スペクトルを測定することで評価した。各タンパク質の希釈液 (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0) を 100 μ M ANS と混合し、波長 380 nm で励起し、波長

400～600 nm のスペクトルを測定した (Tokunaga *et al*, 2013)。

円二色性 (Circular Dichroism: CD) スペクトルは円二色性分散計 (Jasco J-820) を用いて 200～250nm の範囲でスペクトルを記録した。試料は、20 mM のリン酸緩衝液、pH 7.0 で 0.1 mg/mL に調製した (Sugimoto *et al*, 1999)。トリプトファン蛍光スペクトルの測定は、0.1 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0) を励起波長 295 nm、蛍光波長 310～460 nm として行った (Tokunaga *et al*, 2013)。

アクリルアミドによるトリプトファン蛍光消光の解析は、タンパク質希釈液 (20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.0) にアクリルアミド溶液 (10 mM 2-シクロヘキシルアミノ-エタンスルホン酸、pH 9.0) を少量ずつ加えながら、トリプトファンの蛍光強度を測定することで行った。アクリルアミドの最終濃度が 0～0.5 M になるように設定した。混合物をセルに取り、混合し、暗所で 5 分間インキュベートした後、295 nm で励起し、蛍光は 300～500 nm でスキャンした (Tokunaga *et al*, 2013)。蛍光消光データは、Stern-Volmer 方程式: $F_0 / F = 1 + K_{sv} [Q]$ (Molla, 2009) に当てはめることによって分析した。ここで、 F_0 と F は、それぞれ消光剤の非存在下と存在下での蛍光強度である。 $[Q]$ はモル消光剤濃度であり、 K_{sv} は Stern-Volmer 消光定数である。

2.2.5 統計解析

すべての統計分析は、IBM SPSS Statistics ver.21 を使用した。データの解析は、Tukey's multiple comparison tests で行った。データは平均 \pm 標準偏差 (SD) として表した。発生 0 日に対する K_m および V_{max} 値の有意差の指標を、 $P < 0.05$ とした。

2.3 結果

2.3.1 インキュベーション中の卵白のタンパク質含有量と溶菌活性

卵白は、0 日目(孵卵前)と 3、5、7、11、15、18 日目の受精卵から取り出した。18 日目は孵化の 3 日前の受精卵となり、胚となるための栄養に卵白が使用されるため、量としては 1/5 程度であった。それぞれの卵白量 (g) と、タンパク質量、*M.lysodeikticus* 細胞壁に対する溶菌活性を測定した。Fig. 2.1 に示すようにインキュベーション日数が増加するとともに、卵白量も、総タンパク質量も減少した。全体のリゾチームの活性は低下したが、タンパク質あたりのリゾチームの活性は、ほとんど変化が認められなかった。

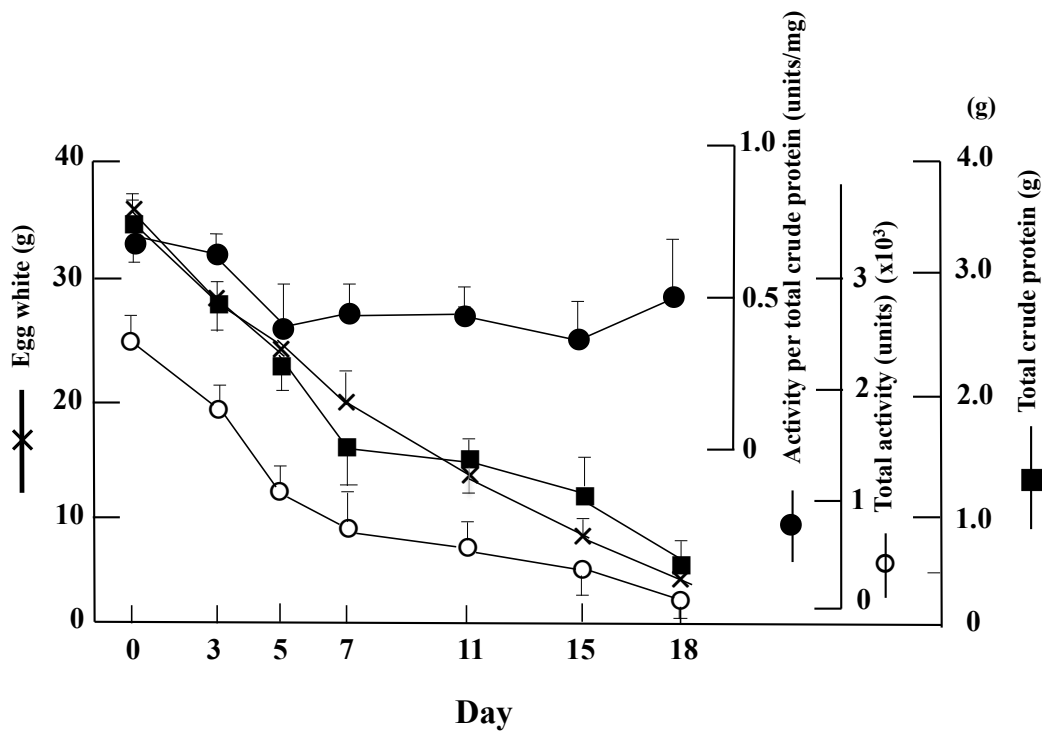


Fig. 2.1. The levels of egg white, its crude protein, and bacteriolytic activity in the hen egg during incubation. Fertile eggs of white leghorn hens were incubated at $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and sacrificed on indicated days shown along the abscissa for the collection of egg-white specimens, which were measured for the total weight (\times), total crude protein (\blacksquare), and the total bacteriolytic activity against *M. lysodeikticus* (\circ). The calculated levels of the apparent total bacteriolytic activity per total crude protein are also shown (\bullet). Seven independent experiments were conducted using one egg for each time point. Each value is expressed as a simple average, thus on a per-egg basis; error bars indicate the variation of the data.

2.3.2 孵化中の卵からリゾチームの精製

0、7、11、15、18 日目の受精卵から、分離した卵白タンパク質を前述の方法で pH 処理し、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。さらに、HEWL は Hi Trap CMFF を使用して分離を行った結果、0 日目のピークはコントロールのリゾチームと一致し、その後受精卵の発生が進むにあたりリゾチームの溶出が若干遅くなることが確認された(**Fig. 2.2**)。

それぞれのピークには、リゾチームに見られる *M. lysodeikticus* の細胞壁を分解する活性があることが確認された。これらの試料を SDS-PAGE (**Fig. 2.3 A**)と Native-PAGE (**Fig. 2.3 B**) で解析した。**Fig. 2.3 A** においては、全ての精製したタンパク質においてリゾチームと同じ分子量 14 k Da を確認した。以上より精製物は HEWL と判定した。Native-PAGE では発生の進行に従って、リゾチームはやや陰極側にシフトしていくことが観察された (**Fig. 2.3 B**)。

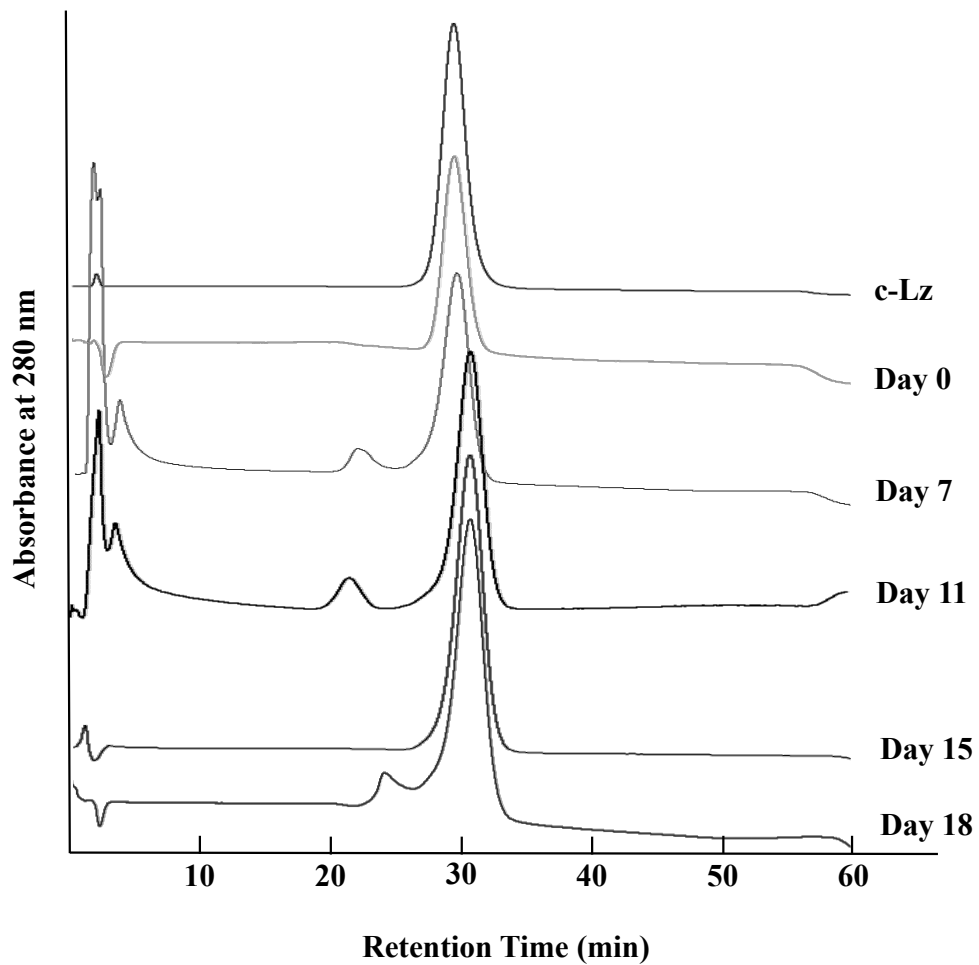


Fig. 2.2. Purification and electrophoretic analyses of the proteins from egg-white specimens on the indicated incubation days. Elution patterns of HiTrap CM FF column chromatography which was the final step of purification. Each sample showed a major peak eluted by ~ 0.3 M NaCl, and the fractions within the region of the major peak had the bacterolytic activity against *M. lysodeikticus* (cf. **Fig. 2.4**).

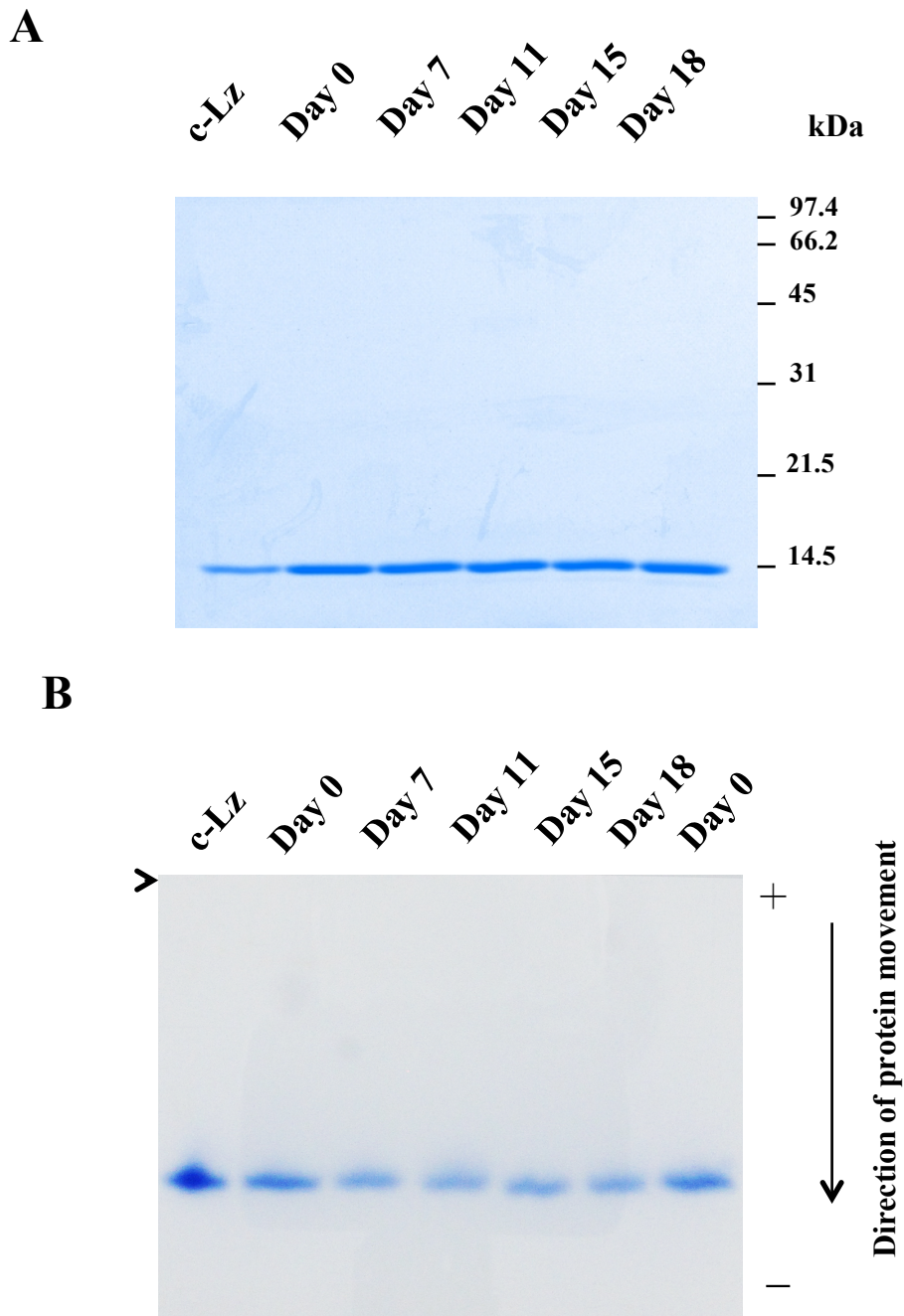


Fig. 2.3. Purification and electrophoretic analyses of the proteins from egg-white specimens on the indicated incubation days. **A, B:** SDS-PAGE and native-PAGE, respectively, of the specimens after the final chromatography step. c-Lz, authentic ; +, anode; -, cathode. Arrowhead points the end of separation gel.

2.3.3 精製したリゾチームの酵素活性、溶菌、増殖阻害活性について

0日目～18日目の受精卵から精製した HEWL に FITC ラベル *M. lysodeikticus* 細胞壁を作用させたところ、蛍光を発することが観察されたので酵素活性を有すると判断した(**Fig. 2.4**)。各ステージのそれぞれに酵素 kinetics を行ったところ、0日目、7日目のそれぞれの K_m 値 は約 24 mg/mL および V_{max} 値 は約 0.7 ($\Delta F/s$) とほとんど差は見られなかったが、 K_m 値と V_{max} は 11日目、15日には増加し、活性効率は低下した。18日目に V_{max} は 0日目と同程度であったが、 K_m 値は上昇した。以上の結果より、活性効率は、11日目から有意に低下することが分った (**Table 2.1**)。

また、精製したリゾチームの *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性を調べると、0日目はコントロールと同じように、強い溶菌を示し、0日目から18日目まで、明らかな溶菌活性が認められた。溶菌速度は、7日目、11日目、15日目ではやや遅く、18日目はさらに遅くなった(**Fig. 2.5**)。

すべての精製した HEWL において、*S. aureus* に対して抗菌活性が認められた (**Fig. 2.6 A, B**)。これらの精製したリゾチームは、濃度依存的に *S. aureus* のコロニー形成を阻害した(**Fig. 2.6 A**)。同じく、リゾチームの濃度依存的に黄色ブドウ球菌の増殖速度を強く抑制することが確認された(**Fig. 2.6 B**)。一方、大腸菌に対しては全てのステージで生育阻害効果がないことが確認された (**Fig. 2.6 A**)。

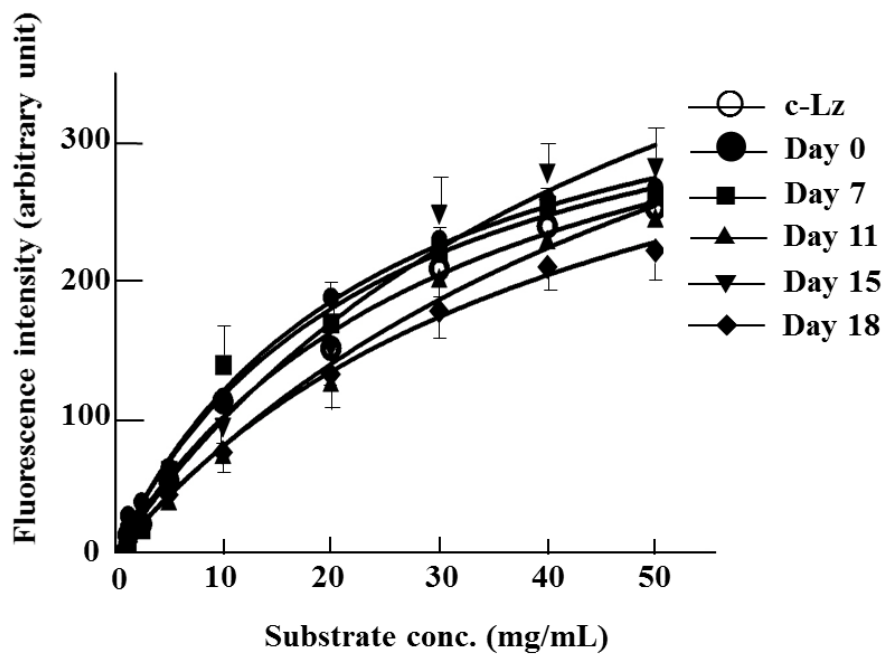


Fig. 2.4. Enzymatic activity versus the fluorescent-labeled substrate (the *M. lysodeikticus* cell wall) of the purified HEWL samples on the indicated incubation days. Assay was made as described in Materials and Methods. The simple average data from five independent experiments are plotted as a function of the substrate concentration (error bars indicate their variation). Using the data, K_m and V_{max} values were calculated and their statistical analyses were made as summarized in **Table 2.1.** c-Lz, authentic HEWL.

Table. 2.1 Enzyme kinetic parameters of purified specimens.

Age (days)	V_{\max} ($\Delta F/s$)	K_m (mg/mL)	V_{\max} / K_m
0	0.68±0.03	24.1±1.48	0.028
7	0.66±0.03	24.3±1.19	0.027
11	0.95±0.08*	61.7±4.30*	0.015
15	1.01±0.12*	51.8±4.17*	0.019
18	0.72±0.09	44.3±3.06*	0.016
c-Lz	0.70±0.04	31.9±1.33*	0.021

Values were derived from the data illustrated in **Fig. 2.3** and presented as means (SD) of five independent experiments. The numbers with asterisks within the same column were taken to be significantly different ($P < 0.05$) versus the day-0 value. $\Delta F/s$ means difference of fluorescence per second. c-Lz indicates authentic HEWL.

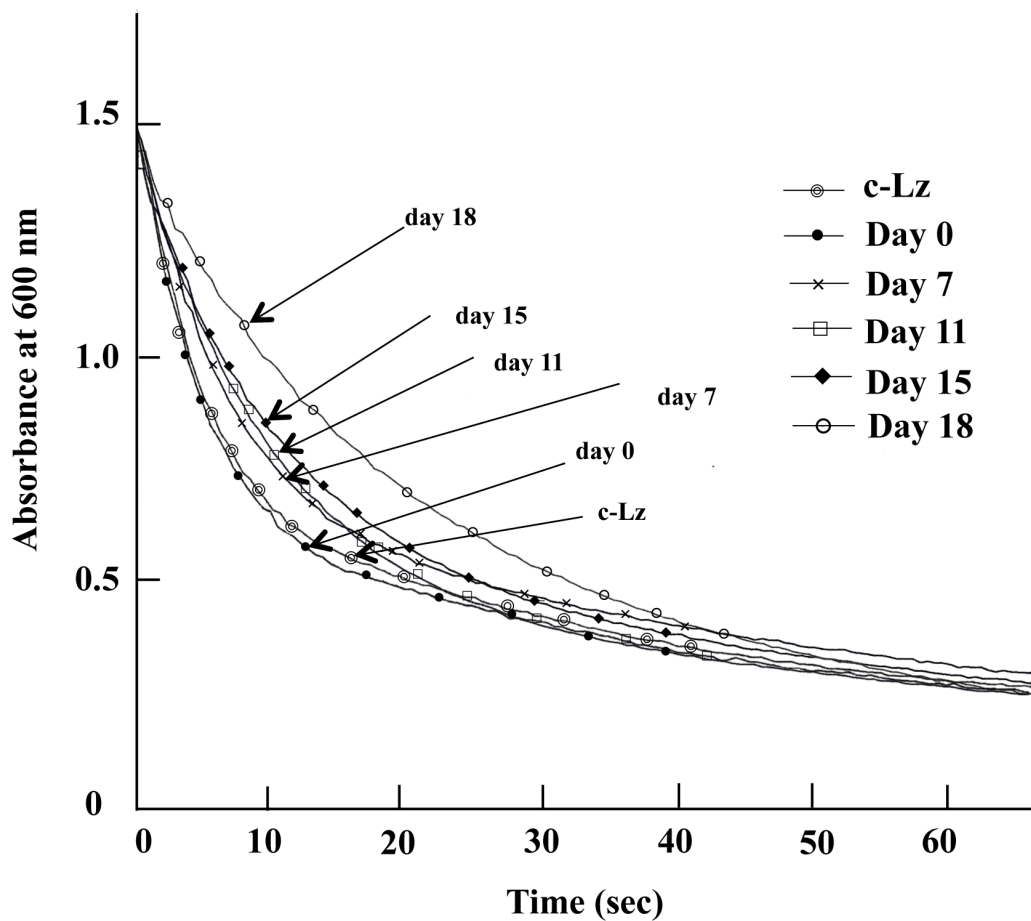


Fig. 2.5. Bacteriolytic activity of the purified HEWL samples against *M. lysodeikticus* measured by the reduction in turbidity (i.e., absorbance at 600 nm). Five independent experiments were performed and the illustrated patterns are simple averages of data. c-Lz, authentic HEWL.

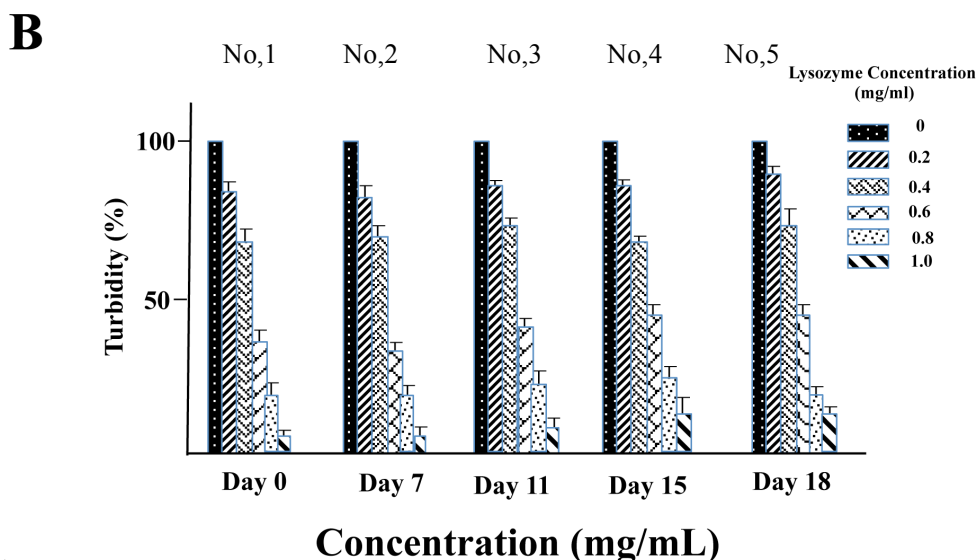
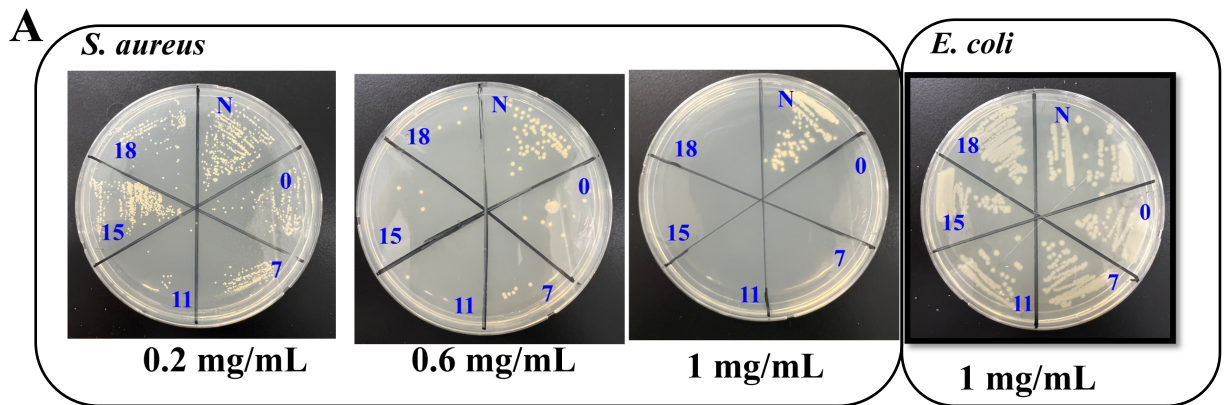


Fig. 2.6. Growth inhibition potency of the purified samples at the indicated incubation days. A: Inhibitory effects on colony formation by *S. aureus* (left) and *E. coli* (right).

The purified was added to a mixture having a bacterial concentration adjusted to 1×10^4 cfu / mL at 0 to 1.0 mg / mL, and the mixture was incubated at 37 °C for 30 minutes, and 20 μ L of the culture was applied to an LB gar plate. The specimens were incubated at 37 °C for 20 h. The numbers 1, 2, 3, 4 and 5 indicate the HEWL samples on days 0, 7, 11, 15, and 18 of incubation, respectively. N: without .

B: Concentration-dependent growth inhibition rates for *S. aureus*. The turbidity (Absorbance at 600 nm) of the culture was measured by adding 0 to 1.0 mg / mL of the purified lysozyme to an adjusted bacterial concentration of 1×10^4 cfu / mL and incubating at 37 °C for 12 hours. The turbidity of the lysozyme-free product was set to 100, and the ratio of each lysozyme-added product was shown in a bar graph. The vertical axis shows the ratio of turbidity. The data are presented as means \pm SD of five independent experiments. C-LZ, authentic .

2.3.4 発生過程におけるリゾチームの構造的特徴

各ステージから精製した HEWL の T_m 値を DSC によって測定した (Fig. 2.7)。発生 0 日目から 7 日目については、無精卵と同様に変性温度が 72°C であったが、それ以降の発生が進むにつれてわずかに低下し、70°C であった。

次に ANS による表面疎水性の分析を行った。発生が進むにつれて、ANS による蛍光強度が上昇しており、表面疎水性が上昇すると推定された (Fig. 2.8)。トリプトファン蛍光およびアクリルアミド消光実験の結果を Fig. 2.9 と Fig. 2.10 に示す。リゾチームのトリプトファンは 6 個存在しており (Fig. 1.3)、ほぼ分子内部にある。また、いくつかは活性中心の近くにあり、触媒機能に関与しているとされている。トリプトファン蛍光を測定してみると発生過程に従って、トリプトファン蛍光は弱くなり、トリプトファン残基の表面への移動に伴う溶媒との相互作用による量子収率の低下が示唆された (Chen and Barkley, 1998)。これを裏付けるようにアクリルアミド消光実験においても発生過程が進むに従ってトリプトファンの蛍光は低濃度のアクリルアミドで消光されるようになり、 K_{sv} 定数は増加した。トリプトファン蛍光スペクトルの変化と併せ、発生過程におけるトリプトファンのタンパク質分子表面への移動が推測された。

CD スペクトルにおいても発生過程が進むにつれてそのスペクトルが変化して行き、207nm における負の極大が小さくなり、18 日目では 208nm と 222nm の

負の極大を持つ α -ヘリックスのスペクトルに類似していた(**Fig. 2.11**)。218 nm に負の極大を持つ β -構造の変化については解析できなかった。

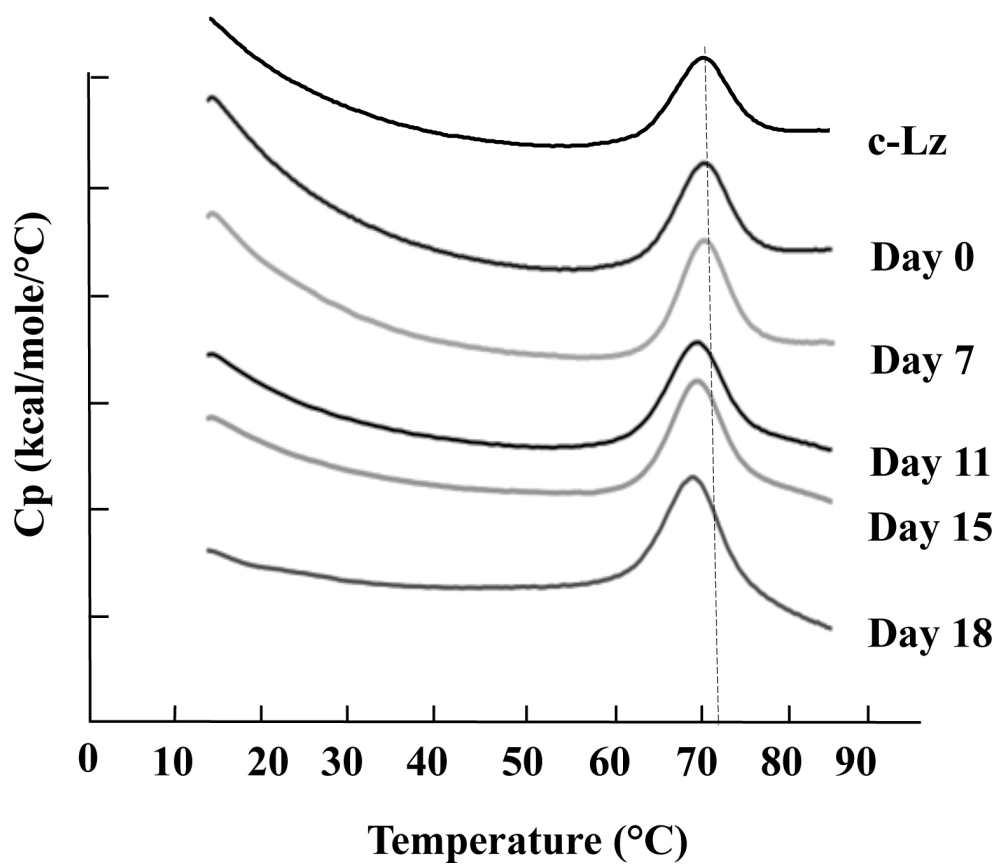


Fig. 2.7. DSC profiles of the purified samples at the indicated incubation days. The analysis was conducted with a protein concentration of 0.1 mg/ml. To make the comparison of the peak positions (the T_m value) among the different specimens easier, the obtained spectra are arranged along the vertical axis, and thus the heights of the drawn spectra are without implication. The vertical dotted

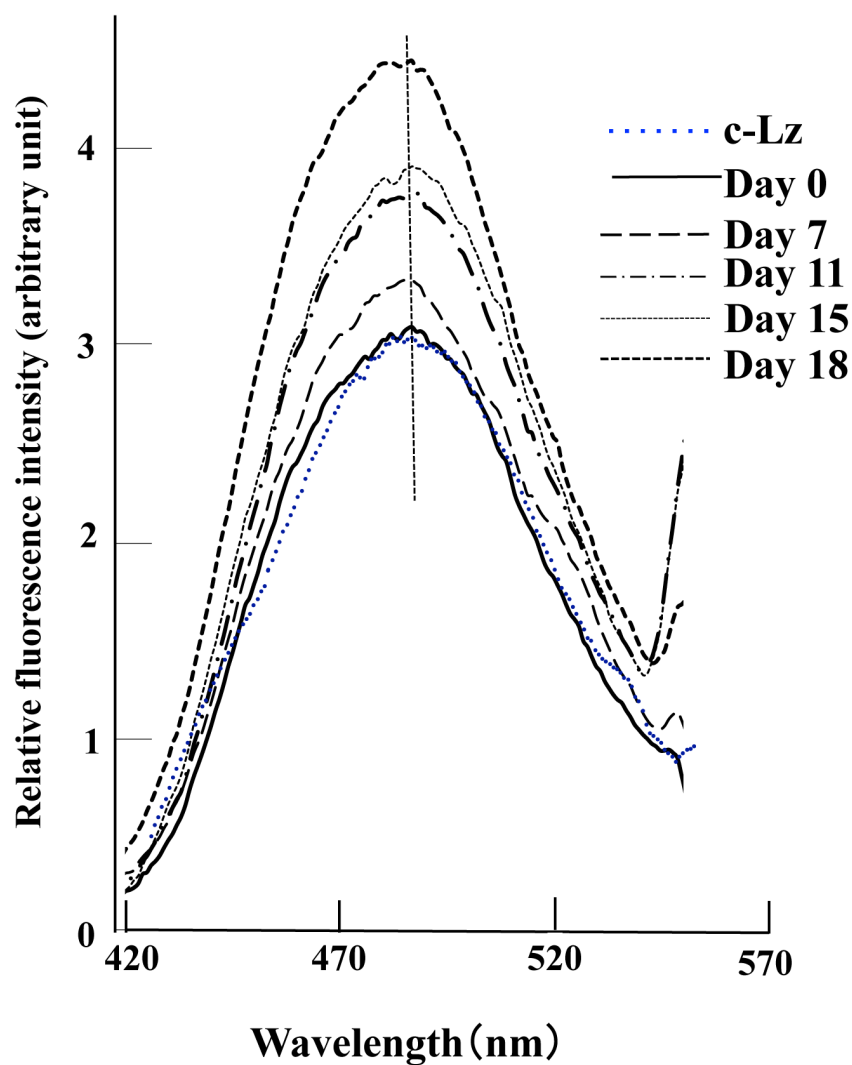


Fig. 2.8. ANS fluorescence spectra of the purified HEWL samples at the indicated incubation stages. The analysis was conducted using a protein concentration of 0.1 mg/ml. The vertical axis represents the relative values for the protein concentration, and, in contrast to **Fig. 2.6**, the heights of the drawn spectra are with implication, showing the difference in hydrophobicity. The *vertical line* shows the peak position of the spectra. C-Lz, authentic HEWL.

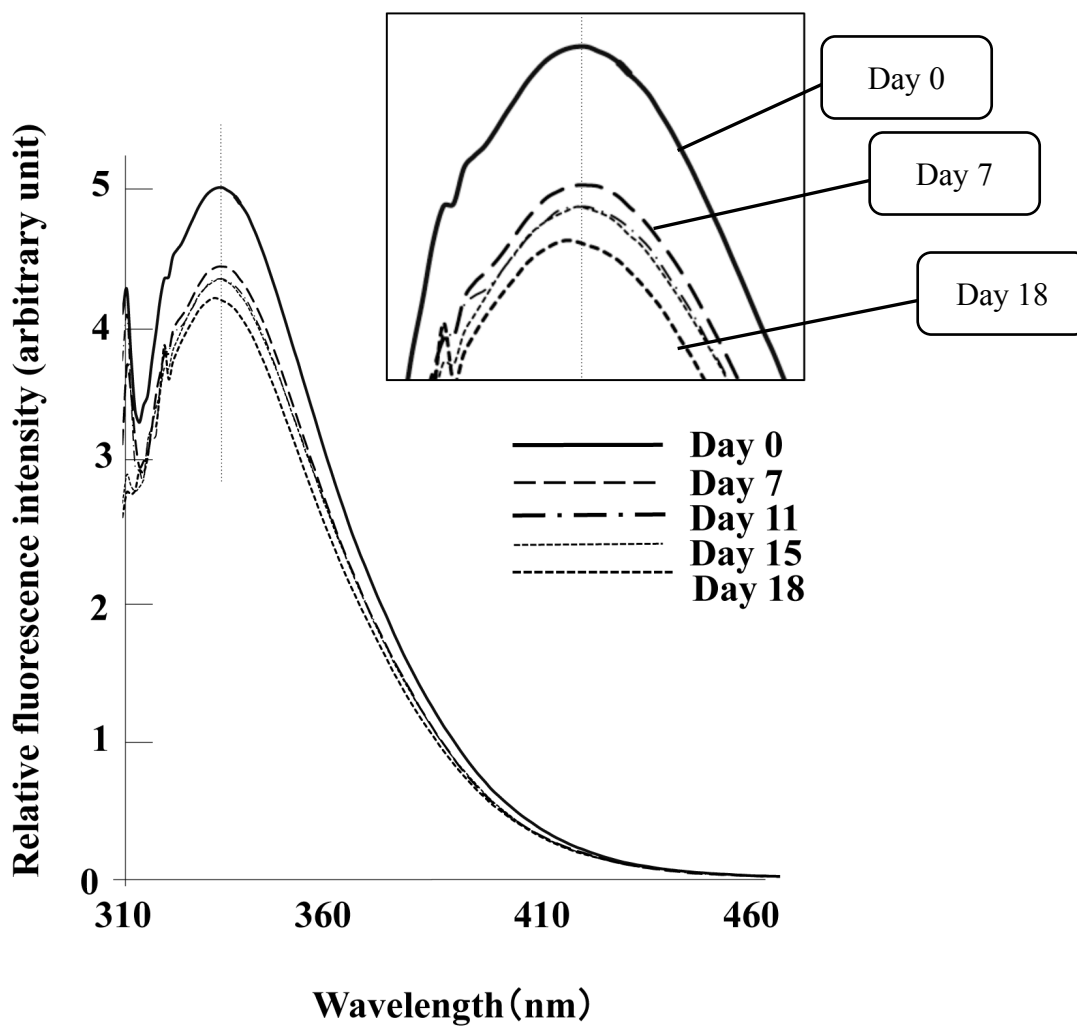


Fig. 2.9. Tryptophan fluorescence spectra of lysozyme from different incubation days. Samples indicated in the legend to **Fig. 2.8** were used. a.u (arbitrary unit), comparative fluorescence intensity.

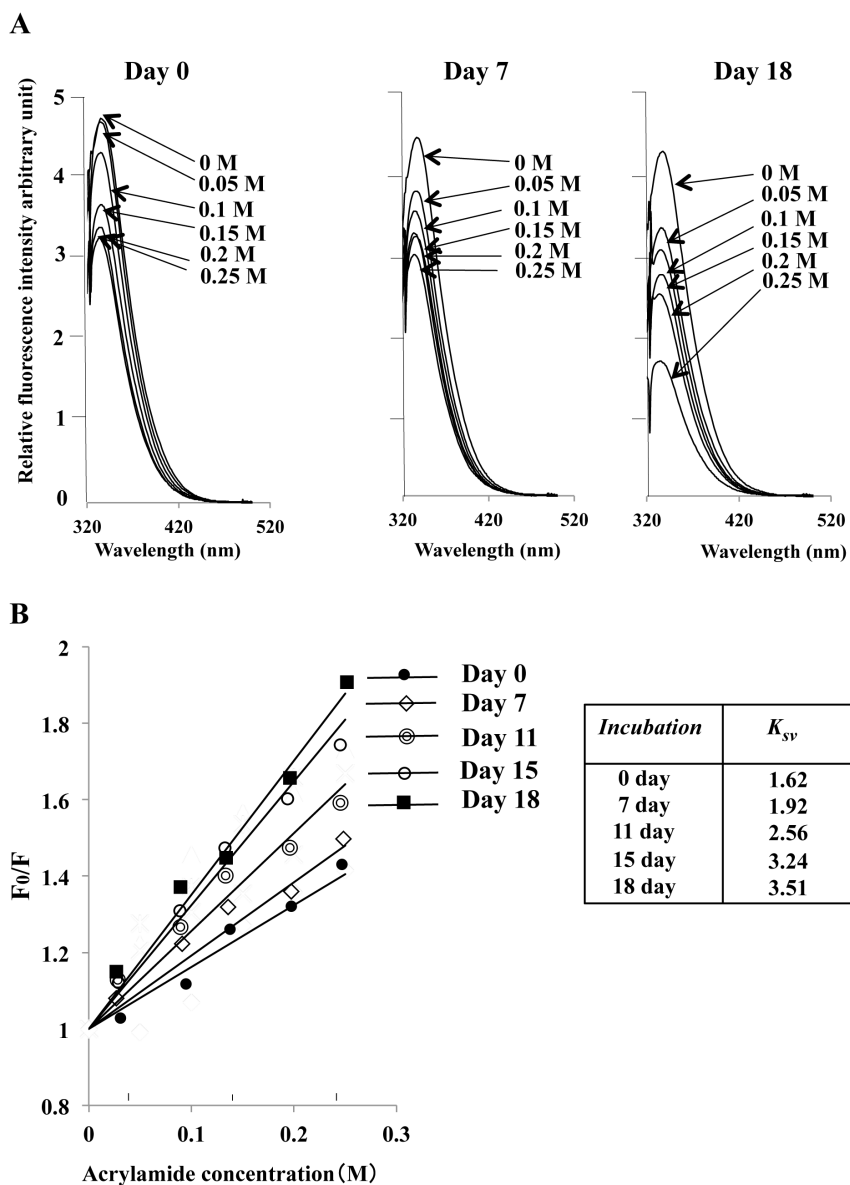


Fig. 2.10. Quenching of tryptophan fluorescence by acrylamide. The lysozyme preparations were used as described in the legend to **Fig. 2.9**, Fluorescence spectra of each lysozyme from eggs of day 0, day 7 and day 18. B, Stern-Volmer plots against the quencher concentration. K_{sv} constant was calculated from the equation of $F_0/F=1+K_{sv}[Q]$ (right table)). a.u (arbitrary unit), comparative fluorescence intensity.

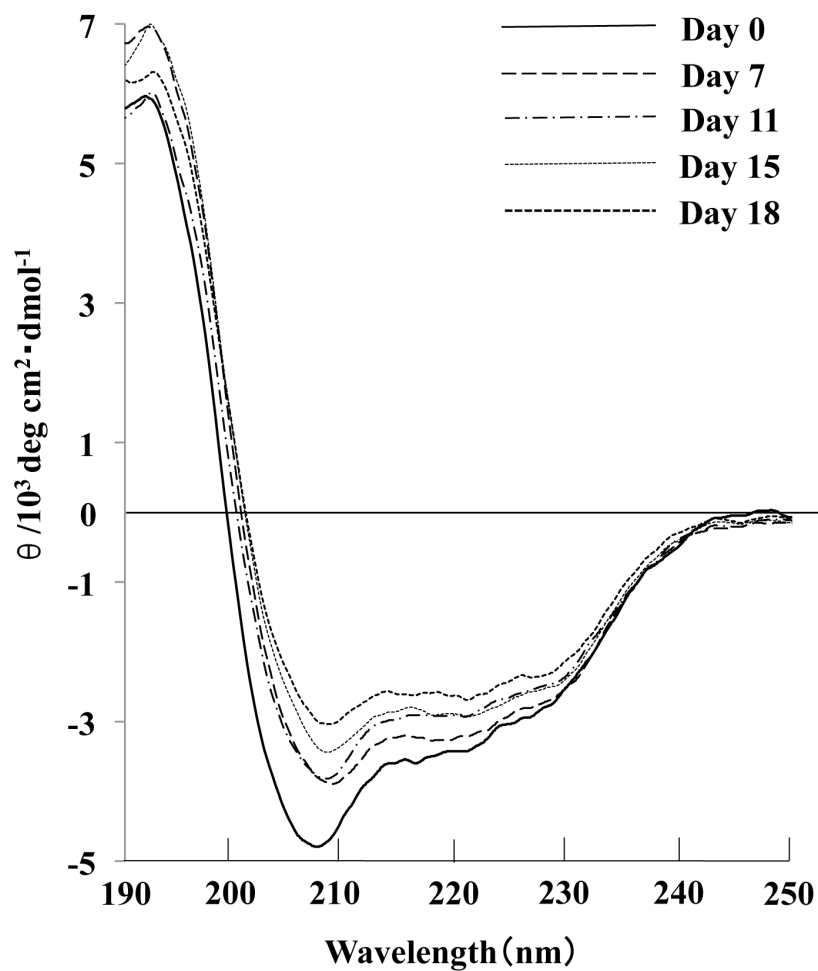


Fig. 2.11. CD spectrum profiles of lysozyme from different incubation days.

Nonincubated (solid line), 7-day incubated (1-dot dashed line), 11-day incubated (short dashed line), 15-day incubated (dot line), 18-day incubated (dashed line).

2.4 考察

発生中の卵白リゾチーム (HEWL) の構造と機能がどのように変化するかを知ることは興味深いことだが、Cunningham が発表して以来、このような研究の論文はほとんど報告されてない (Freeman, 1974; Cunningham, 1974)。本研究では、孵卵開始前から孵卵 18 日間までの卵から精製した HEWL の機能および構造について解析を行った。HEWL の機能としてはムラミダーゼ活性、*M. lysodeikticus* 細胞壁の分解あるいはある種のグラム陽性菌に対する抗菌性であり、これらが発生過程でどのように変化するかを観察した。Fig. 2.1 のように、発生過程においては、卵白の *M. lysodeikticus* 細胞壁分解比活性はほとんど変化しなかったが、Total activity は後期には大きく減少していた。この結果については、Cunningham の結果 (Cunningham, 1974) と一致しており、彼は共存するオボムチンや他の物質が HEWL を阻害するとしているが、HEWL 自体は変化しないのか？そのような疑問が生じる。実際に、HEWL はオボアルブミンと相互作用することにより、ムラミダーゼ活性を消失することが報告されている (Sugimoto *et al*, 2011)。0 日目から 18 日目の卵白リゾチーム (HEWL) が、他の卵白の因子との相互作用により、活性が変動したかどうかを調べるために、0 日目と 18 日目を 1:1 に混ぜ、*M. lysodeikticus* 細胞壁分解活性を評価する実験を行った。0 日目と 18 日目を混ぜても活性にはほとんど差はなく、阻害効果は見られなかった。阻害活性は、0

日目も 18 日目も同様であると考えられ、HEWL 自体の活性には変動はないと結論した。

次に、0、3、7、9、11、15、18 日目の卵白からそれぞれ HEWL を精製して、構造変化といくつかの活性を調べた。HEWL の最終精製は Hi Trap-CMFF カラムクロマトグラフィーを用いて行った。**Fig. 2.3** に示したように発生 11 日目の HEWL からは若干遅れて溶出しており、これは表面の電荷がわずかにプラスチャージに傾いていると推測された。このことは **Fig. 2.4B** の Native-PAGE の結果において、後期の HEWL は移動度がやや早くなっていることから、表面電荷がわずかにプラスチャージへ遷移していることを裏付けた。

また、DSC の T_m 値の分析により、HEWL は発生の進行に従って、変性温度はやや低下し、不安定になることが明らかになった (**Fig. 2.7**)。

ANS による表面疎水性の変化を調べると、発生の進行するに従って表面疎水性が増加していることを確認できた (**Fig. 2.8**)。表面疎水性の増加と変性温度の低下は関連があると推定される。

全ての HEWL は電気泳動 (**Fig. 2.3, A,B**) およびゲル濾過 (Sugimoto *et al*, 未発表) においてパターンの変動は見られなかったので、大きな分子の修飾や他の分子との相互作用、あるいは 2 量体の形成などはないと結論された (Sophianopoulos, 1964)。

発生が進むと卵白が減少していき、特に発生後期では著しい。しかし、そうした卵白からの HEWL でも酵素および抗菌活性がやや低下しているものの活性を維持しており、HEWL の生理的機能は働いていると考えられる。つまり、構造解析での変化に拘わらず、酵素活性部位周辺の構造は保持されており、基質を捉えて反応する触媒機能は十分働いている。酵素活性と抗菌活性は互いに独立しているという報告 (Ibrahim *et al*, 1996; Düringetal, 1999) があるが、本研究では、両活性ともに発生に従って同じような挙動を取ることから独立しているような裏付けは得られなかった。また、HEWL は不可逆的な変性あるいは他の分子による修飾により、大腸菌に対しても抗菌性を示すことや熱変性で酵素活性を失っても抗菌作用は維持しているとの報告 (Ibrahim *et al*, 1996; Düringetal, 1999) もあるが、発生過程の HEWL にはそのような効果や現象は見られないことから、基本的には分子構造は維持されていると推測された。

しかし、酵素活性には変動があった。酵素と基質の親和性の指標である K_m 値と V_{max} 値 (最大反応速度) の値が変化していた。インキュベーション期間の中期から 18 日目には、基質に対する親和性がやや低下してことが確認された。さらに、酵素活性自体は 18 日目に低下した (Fig. 2.1)。これらの結果について明確ではないが、11 日目以降、活性型リゾチームと不活性のリゾチームが混在していることや、あるいは、活性部位の領域で何らかの構造変化が起こっている

可能性も考えられる。

発生の進行における HEWL のトリプトファン (Trp) の動きを知るために、蛍光スペクトル (**Fig. 2.8**) およびアクリルアミドによる Trp 蛍光の消光 (**Fig. 2.9**) の実験を行い、Trp がやや表面に露出している結果を得た。これは恐らく触媒作用に関連する Trp68 がより表面に表れていると考えられる (Ueda *et al*, 1990; Rothwarf and Scheraga, 1996; Ookuri *et al*, 2005)。CD スペクトルの解析では二次構造にも変化が見られ、発生が進行にするにつれて α -ヘリックスが増加していることが示唆されたが、詳細は不明である。

オボアルブミンの場合は発生過程で、RCL がタンパク本体へ部分的にループを挿入 partial loop insertion するという明確な構造変化が見られるのに対し、HEWL は、僅かな表面疎水性の増加やトリプトファンの表面移動が認められたに過ぎなかった。発生過程における HEWL の変化は長期間の 38°C の保温では、高温による変性などの不可逆的な変化に比べると、はるかに小さいものである。しかしながら、熱安定性、表面における疎水性とプラス電荷の増加は、胚発生の進行と平行して起こっていると考えられる。

HEWL の胚発生での役割は、胚を外敵微生物から守ることが最も重要と思われる、胚発生の長時間においてやや構造変化するものの、これは機能を維持できる変化であると考えられる。ここでは胚発生における HEWL の機能の変化を全

て追跡したのではなく、例えば、発生過程中に *S. aureus* 以外に対しても抗菌作用が出現するとか、未受精卵の HEWL の場合は長時間の保存において同様な変化があるかどうかを調べる必要がある。また、このように HEWL は胚発生中でも安定になっており、それは HEWL の構造自体の安定性に基いているのか、あるいは卵内に安定化に関与する因子が存在するのかに興味を持たれる。一方、リゾチームはアミロイド線維を形成するタンパク質である。これまでの研究ではアミロイド線維は形成されてない。第 3 章では何故、アミロイド線維が形成されないのかという課題に取り組んだ。つまり、アミロイド線維形成を阻止する因子を探索した。

2.5 小括

発生過程で卵白タンパク質の機能が維持されているかどうかは非常に興味深いことである。卵白オボアルブミンが胚発生中に熱安定になることが報告されている。ここでは、卵白の総質量とその総タンパク質含有量が発生過程に応じて減少することを明らかにした。以前の研究とも一致して、総溶菌活性も低下した。発生過程において、精製されたリゾチームタンパク質は、*Micrococcus lysodeikticus* に対する酵素活性および溶菌活性、ならびに *Staphylococcus aureus* に対する増殖阻害能を有することが認められた。胚発生が進行するにつれて、精製されたリゾチームは、 K_m と V_{max} の変化、変性温度のわずかな低下、および表面疎水性の増加を示した。また、トリプトファン環境にも変化が認められた。これらの結果は、リゾチームタンパク質がインキュベーションの後期までその酵素活性および抗菌活性を維持しながら、多少の構造変化が生じていると結論した。

第3章 鶏卵タンパク質の安定性に関わる要因の探索

-リゾチームのアミロイド形成を抑制するペプチド-

3.1 目的

第2章では、発生過程の HEWL の安定性に関して研究を行い、HEWL は僅かな構造変化をするが、機能を保持していることが確認された。従って、発生過程の卵タンパク質を安定化させている要因があると推測される。そこで、本章では、リゾチームのアミロイド形成を抑制する因子を探索し、安定性に寄与するペプチドの同定を目指した。

アミロイド線維は、不良タンパク質が細胞の内外に不溶性の線維化凝集体となり、その結果、組織・臓器に沈着して細胞機能を損ない、さまざまな種類のアミロイドーシスの発症を引き起こす原因となっている。(Knowles *et al*, 2014; Chiti and Dobson, 2017)。これらのアミロイド線維が原因とされるアミロイドーシスには、アルツハイマー病、II型糖尿病、海綿状脳症などの多くの疾患が知られ、ほとんど決定的な治療法がないのが現状である(Levy, 2007; Chatterjee and Mudher, 2018; Kupfer *et al*, 2009)。アミロイド線維は、 β -クロス構造と呼ばれる特徴ある規則的な構造から出来ており、最終的には線維となり、特定の組織や多くの組織に沈着して、機能障害をもたらす (Nelson *et al*, 2005; Fitzpatrick *et al*, 2013)。アミロイド線維を形成するタンパク質間には、共通のアミノ酸配列や立

体構造の共通性はなく (Yoon and Welsh, 2004)、どのようなタンパク質も線維化する能力を有していると考えられている。一旦、線維化したタンパク質は分解されにくく、そのまま組織に留まっていることが多い。このようなアミロイド線維が原因となるアミロイドーシスの発症を抑える手段の1つは、アミロイド線維の形成を阻害するシステムの確立である(Ow and Dunstan, 2014)。アミロイドーシスの発症と進行の要因には、遺伝的および物理化学的要因だけでなく、食物摂取、ライフスタイルおよび加齢が関与していると考えられている (Gomez *et al*, 2018)。したがって、食品の選択はアミロイドーシスを予防するに有効であると考えられている。実際、活性酸素を除去する機能を有するポリフェノール (カテキン、ミリセチンなど) にタンパク質の凝集を抑制する効果が報告されているが(Choi *et al*, 2014; Stefanescu *et al*, 2020)、それ以外の食品素材においてもアミロイドーシスを予防するものが探索されている。

食品素材の中のペプチドには血圧を下げたり、抗菌作用を示したり、あるいはオピオイド効果を示すなどの機能を有するものが多く見つかっており、病気の治療・予防に適用されているものもある。鶏卵には卵白、卵黄、カラザと卵殻膜に良質なタンパク質が豊富に含まれ、有効に利用されているが、タンパク質としての機能でなく、それらの加水分解物、ペプチドに新しい機能としてアミロイド線維の形成を抑制するものがないかに焦点を当てた。本研究では、

卵白、卵黄、カラザと卵殻膜からのプロテアーゼ加水分解物について、アミロイド線維形成タンパク質であるリゾチームの線維形成を抑制する効果を観察した。リゾチームはムラミダーゼ活性と抗菌活性を持つタンパク質であり (Skujinšetal, 1973)、ヒトではリゾチームの変異体がアミロイドーシスを引き起こすことが知られ、そのため HEWL はアミロイド線維形成のモデルタンパク質として広く研究されている (Yonezawa *et al*, 2002; Merlini and Bellotti, 2005)。リゾチームにはアミロイド線維形成に必要である β -ドメイン内に疎水性に富んだコア領域の 9 個からなるアミノ酸配列があり、ヒトのアミロイドーシスを起こす遺伝変異はコア領域の中や周辺においてアミノ酸置換が見つかっており、それが原因でタンパク質の不安定化を誘発すると考えられている (Pepys *et al*, 1993; Sugimoto *et al*, 2012; Tokunaga *et al*, 2013)。リゾチームのアミロイドーシスではこの領域の管理と制御が重要であると推定される。したがって、本章では鶏卵タンパク質の加水分解物のアミロイド線維形成抑制能を見るために HEWL に加えて、ヒトリゾチーム (h-Lz) およびヒトのアルツハイマー病の原因とされるアミロイド β -ペプチド 1-42 ($A\beta$ 1-42) を用いて、研究を進めた。その結果、鶏卵タンパク質加水分解物にこれらの線維形成に対して阻害効果を示すものを見出した。特に、カラザタンパク質の加水分解物 (C-ペプチド) が最も高い阻害能を示した。C-ペプチドはリゾチームだけでなく、 $A\beta$ 1-42 にも効果があることから C-

ペプチドはアミロイド線維形成抑制に普遍的に効果があると期待される。

3.2 材料および実験方法

3.2.1 卵白、卵黄、カラザおよび卵殻膜のタンパク質の加水分解物の調製

卵白、卵黄、カラザおよび、卵殻膜からの粗タンパク質の酵素加水分解物は、以下のように、キューピー株式会社の R&D 部門で調製されたものを使用した。卵白分解物を EW-ペプチド、卵黄分解物を EY-ペプチド、カラザの分解物を C-ペプチド、卵殻膜の分解物を EMS-ペプチドとした。EW-ペプチド、EY-ペプチドおよび C-ペプチドは、酵素 *Bacillus subtilis* プロテアーゼおよびパパイン

(Biocatalysts 社、USA) で加水分解した。EMS-ペプチドは、バチルスプロテイナーゼ (Nagase ChemteX、大阪、日本) で加水分解して調製した。卵白の場合、水で希釈したものを使用した。卵黄は脱脂したものを試料に用いた。カラザは卵白を除き、水で十分に洗浄した後、シアル酸を Juneja (1991) らの方法で除去したものを使用した。卵殻膜タンパク質は、卵殻膜乾燥 (Lot, No, LSP030) を用いた。これをリン酸緩衝液 pH 7.0 で溶解し、バチルスプロテアーゼで消化した。それぞれのタンパク質試料を 8%(w/v)濃度になるように調製し、酵素 (酵素/タンパク質=0.001) を添加し、50°C で 24 時間反応させた。その間、pH 7.0 にキ-

プし、反応は、85°C で 30 分間加熱して終了させた。これらの加水分解物をアミロイド線維形成抑制実験に用いた。

3.2.2 卵白・ヒトリゾチームの線維化分析のインキュベーション条件

リゾチームの線維形成のために、HEWL および h-Lz をそれぞれ 3 mg/mL の濃度で 50 mM グリシン-HCl 緩衝液、pH 2.0 に溶解し、55°C で 14 日間インキュベートした (Tokunaga *et al*, 2013)。ヒトアミロイドβペプチド 1-42 (Aβ 1-42) の線維化では、溶液をそれぞれ 100%ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 2 mg/mL になるように希釈し、試料を 37°C で 48 時間インキュベートした。

卵タンパク質加水分解物が線維化に及ぼす影響を観察するために、EW-ペプチド、EY-ペプチド、C-ペプチド、および ESM ペプチドをそれぞれ、1~10 mg/mL の濃度になるようにリゾチームあるいは Aβ 1-42 溶液に添加して、線維形成抑制効果を見た。ケルセチン (1 mM) は、線維形成を抑制効果のポジティブコントロールとして使用した。

また、2 価の金属イオンがアミロイド線維の形成を促進するという報告がなされているので (Hane *et al*, 2013)、本研究では亜鉛 (ZnCl₂)、カルシウム (CaCl₂)、コバルト (CoCl₂)、マンガン (MnCl₂) および鉄 (FeCl₂) と 3 価のイオンのアル

ミニウム (AlCl_3) を使用して、これらの金属が線維形成の促進および、卵ペプチドによる線維形成の抑制効果を観察した。線維形成にはリゾチームを用い、それぞれの金属塩溶液を最終濃度 1 mM になるように調製し、55°C、pH 2.0 で 10 日間インキュベートした。

3.2.3 チオフラビン T (ThT) 蛍光の測定と蛍光顕微鏡および透過電子顕微鏡 (TEM) による観察

線維形成実験は蒸発を防ぐために、シール付きの黒い 96 マイクロウェルプレートを用いた。試料液 (1 mM ThT を含む 200 μL) を所定の温度でインキュベートし、蛍光強度の変化を測定した。ThT 蛍光強度は、Corona MTP900Lab マルチマイクロプレートリーダー (日立、東京) を用いて、励起波長 440 nm、蛍光波長 482 nm で測定した。凝集物および線維の確認はそれぞれ蛍光顕微鏡 (Nikon 蛍光顕微鏡 E800) と透過電子顕微鏡 (TEM、モデル 7600、日立) で行った。蛍光顕微鏡での凝集物は上記の試料から一部を取り出し、ThT の蛍光を蛍光フィルター (B-2A, excitation; 470nm, emission; 520nm) を使用して、観察した。TEM の観察は、試料 2 μL (ThT なし) を formvar /カーボンフィルム (Sigma-Aldrich) でコーティングされた 200 メッシュの銅グリッド上に配置して行った。2% リンタングステン酸/ H_2O (w/v) で 2 分間ネガティブ染色した後、銅グリッドを室

温で乾燥させ、透過型電子顕微鏡 80 kV で観察した。

3.2.4 統計解析

すべての実験を 5 回繰り返した。統計分析は、IBM SPSS Statistics を使用して行った。データは Turkey の多重比較検定によって分析され、平均 ± 標準偏差 (SD) として表された。統計的有意性は、 $P < 0.05$ に設定した。

3.3 結果

3.3.1 HEWL および h-Lz 繊維形成に対する鶏卵タンパク質の加水分解物の効果

2つのリゾチーム、HEWL と h-Lz の線維形成をインキュベーション時間経過における ThT 蛍光の増加で評価した。その結果を HEWL は **Fig. 3.1** に、h-Lz は **Fig. 3.2** に示した。

両タンパク質（コントロール；卵ペプチド無し）とも、インキュベーションの7日目から ThT による蛍光強度が顕著な増加を示し、14日目にほぼ最大に達した。次に、HEWL および h-Lz に4つの卵タンパク質加水分解物を添加した ThT 蛍光発光を見ると、両リゾチームに対して C-ペプチドが最も強い抑制効果を持っていることが判明した（**Fig. 3.1**、**Fig. 3.2**）。EW-ペプチドは2番目に強い抑制活性を示し、一方、EY-ペプチドによる抑制効果は低かった。ESM-ペプチドは、HEWL に対してはケルセチンと同等の抑制効果を示したが、h-Lz に対してはほとんど効果を示さなかった。

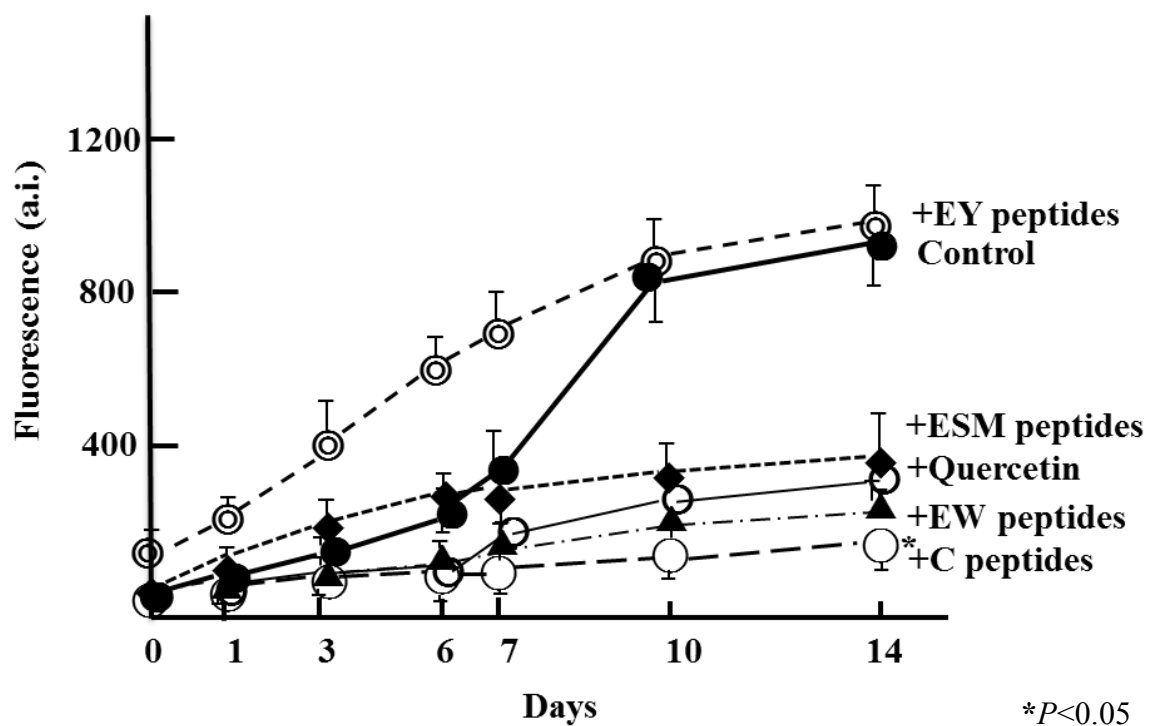


Fig. 3.1. The repression effects of egg-protein hydrolysates on fibrosis.

The ThT assay for the emission of fluorescence by conducted by incubation at pH 2.0 and 55°C for up to 14 days with the egg-protein hydrolysates (EW peptides etc., each at the concentration 2.5 mg/ml in the incubation mixture). Other details were as described in the text. Quercetin was used as a positive reference.

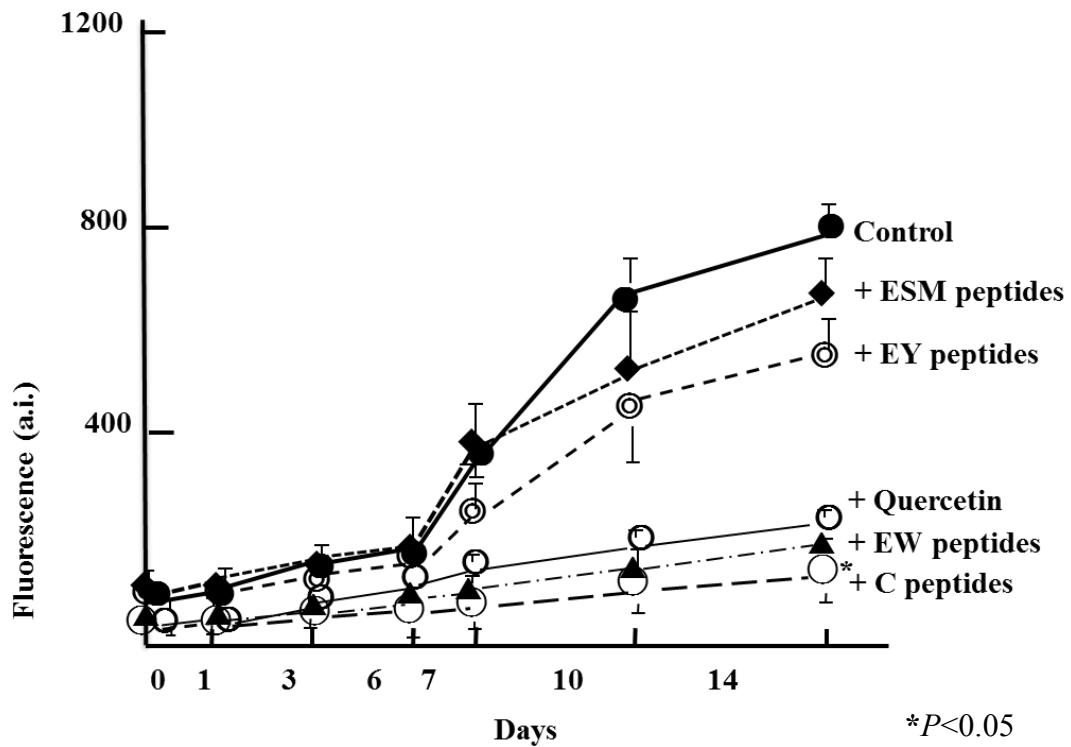


Fig. 3.2. The repression effects of egg-protein hydrolysates on h-Lz fibrosis. The ThT assay for the fluorescence emission by h-Lz conducted by incubation with egg-protein hydrolysates (EW peptides etc., each at the concentration of 2.5 mg/ml in the incubation mixture) under the same conditions as those described in the Fig. 3.1 legend.

従って、最も顕著に抑制するのは C-ペプチドであり、その阻害効果は、ポジティブコントロールとして適用されたケルセチンの効果と同程度の効果を示した。また、C-ペプチドは、**Fig. 3.3** および **Fig. 3.4** に示すように、濃度依存的に HEWL および h-Lz のアミロイド線維形成の指標である ThT 蛍光強度の増加を抑制した。

ThT による蛍光の変化を観察後、蛍光顕微鏡と TEM を使用してタンパク質凝集体・線維の解析を行った。HEWL および h-Lz の両コントロール(リゾチームのみ)は 10 日間インキュベートにおいて、試料に蛍光顕微鏡で凝集体が確認され、さらにその凝集体を TEM で観察したところ明確な線維形成を確認した (**HEWL: Fig. 3.5**、**h-Lz: Fig. 3.6**)。

卵ペプチドを添加した場合、EY ペプチドを除いて他のペプチドでは凝集体は少なく、明確な線維も見つからなかった (**HEWL: Fig. 3.5**、**h-Lz: Fig. 3.6**)。特に C-ペプチドは凝集体も線維もほとんど見られず、ThT 蛍光の結果と併せ、C-ペプチドにはアミロイド線維の形成を抑制する因子が含まれていると結論した。

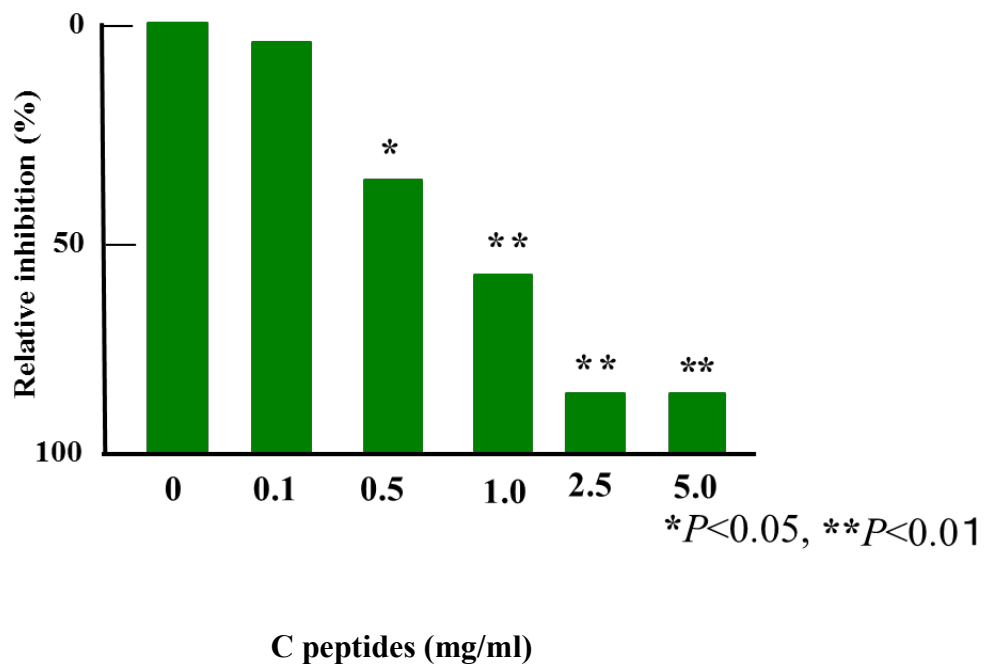


Fig. 3.3. The effects of various concentrations (0–5 mg/ml) of C peptides in the ThT assay for the fluorescence emission by for 10 days under the above conditions. In panel each value (a.i.=arbitrary intensity) is the average of five independent experiments; mean \pm SE (n=5), and the control assay was done without peptides. *, $P < 0.05$ (vs. control) **, $P < 0.01$ (vs. control).

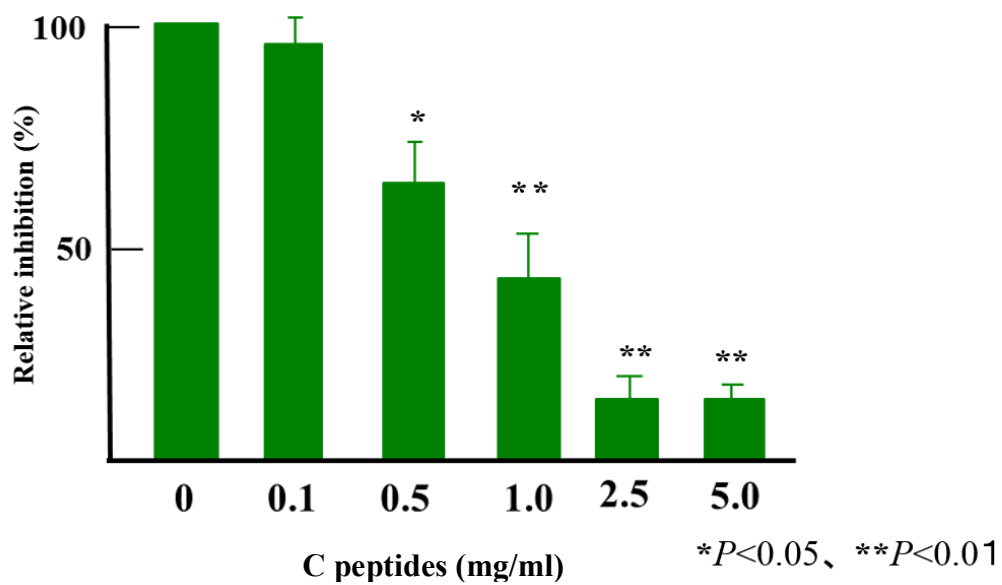


Fig. 3.4. The effects of various concentrations (0–5 mg/ml) of C peptides on the ThT assay for fluorescence emission by h-Lz for 10 days under the above conditions. In panel each value is the average of five independent experiments; mean \pm SE (n=5), and the control assay was done without peptides.

*, $P < 0.05$ (vs. control) **, $P < 0.01$ (vs. control).

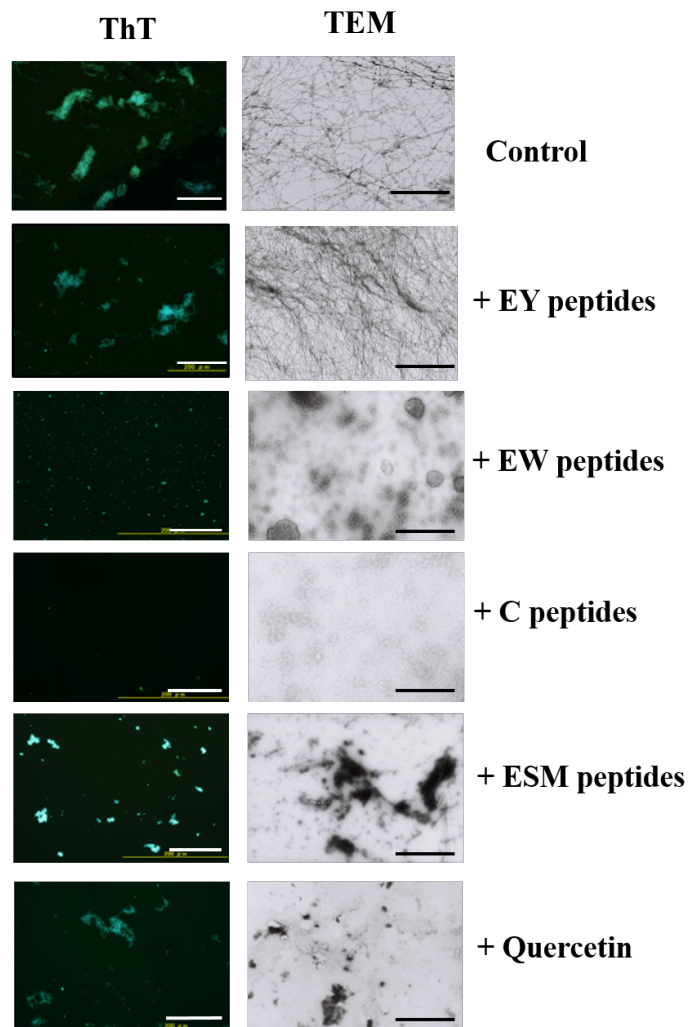


Fig. 3.5. Features of HEWL fibrosis the products observed by ThT fluorescence emission microscopy (ThT) and TEM after 14 days of incubation. In panel the control was used without egg-protein hydrolysates.

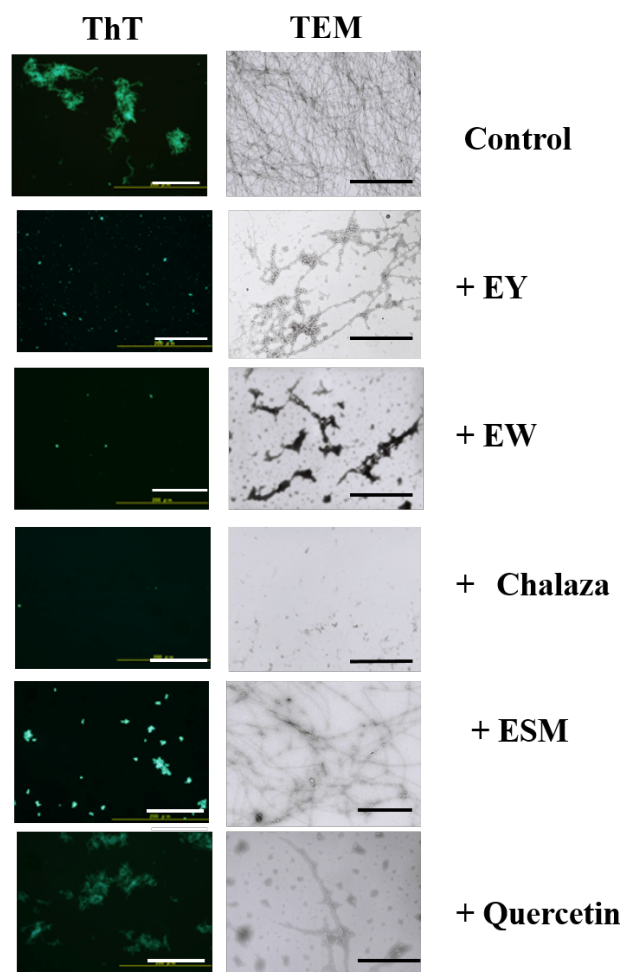


Fig. 3.6. Features of h-Lz fibrosis the products observed by ThT fluorescence emission microscopy (ThT) and TEM after 14 days of incubation. In panel the control was done without egg-protein hydrolysates.

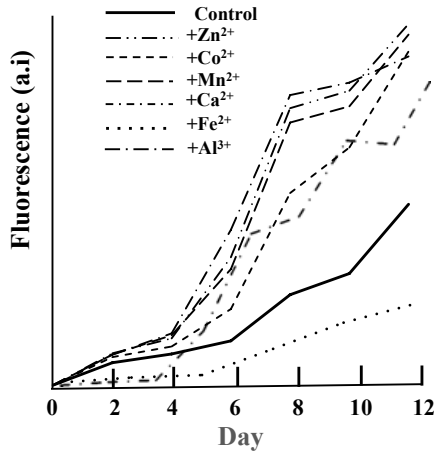
3.3.2 h-LzによるThT蛍光発光および卵タンパク質加水分解物による相互作用に対する金属イオンの影響

Zn²⁺などの金属イオンがアミロイドの線維形成の促進を促す報告 (Innocenti *et al*, 2010) から、h-Lzにおいても金属イオンによってアミロイド線維の形成を促進するかどうかを検証した。その結果、h-Lz コントロール (金属無し) に比べ、Fe²⁺を除く金属イオン存在下ではアミロイド線維の指標であるThT 蛍光強度は明らかに増大し、時間においても加速していた (Fig. 3.7A)。

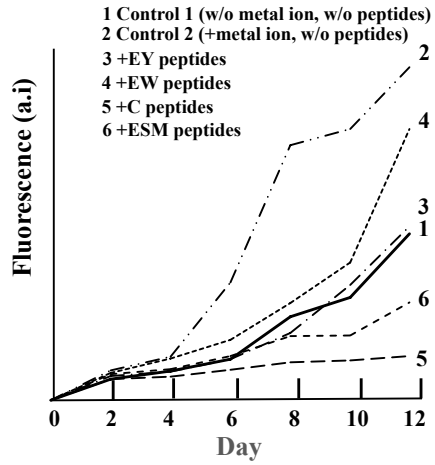
Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺およびAl³⁺は、3倍量程度の促進効果が見られた。一方、Na⁺などの1価イオンは線維形成を促進しなかった (未発表)。

次に、Zn²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Mn²⁺またはAl³⁺の存在下でh-LzによるThT 蛍光発光を分析した。ここで、4つの卵タンパク質加水分解物すべてを各分析混合物に別々に添加した(Fig. 3.7 B-F)。カラザ由来のC-ペプチドが、ThT分析で金属イオンの影響を大幅に抑制したのに対し、他の3つの卵タンパク質加水分解物は中程度にしか抑制できなかった。また、h-LzのThT 蛍光発光に対する金属 (Zn²⁺またはMn²⁺) による促進効果は、C-ペプチド濃度依存的に抑制された。TEM観察により、C-ペプチドは金属促進条件下でもh-Lzによる繊維形態の発生を抑制し、他の卵タンパク質加水分解物はほとんど示さなかったことが明らかになった

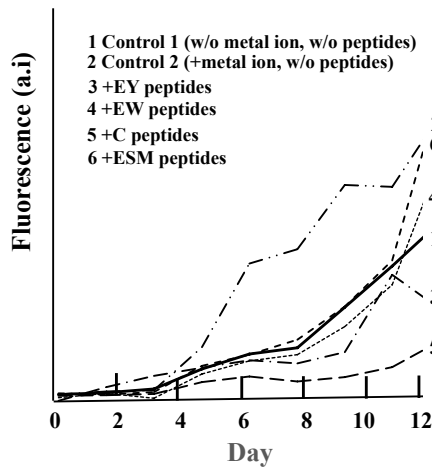
A: h-Lz fibrosis



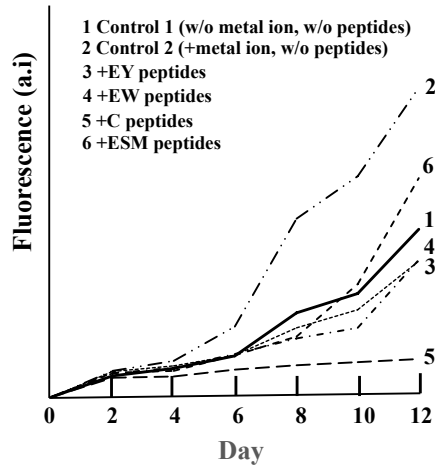
B: h-Lz fibrosis with Zn²⁺



C: h-Lz fibrosis with Ca²⁺



D: h-Lz fibrosis with Co²⁺



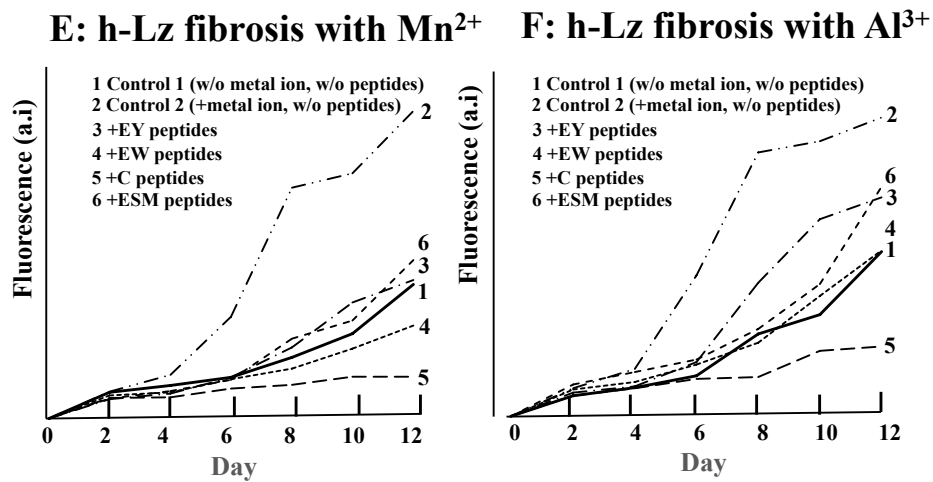


Fig. 3.7. The promotion of h-Lz fibrosis by metal ions and its repression by egg-protein hydrolysates (EW peptides etc., each at the concentration of 2.5 mg/ml in the incubation mixture). The ThT assay was performed by incubation at pH 2.0 and 55°C for up to 12 days with Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Al³⁺, or Fe²⁺ at the concentration of 1 mM. For other details see Materials and Methods. Each value is the average of three independent experiments. **A:** The effects on the ThT assay by the metal ions without egg-protein hydrolysates. The control was without an additional metal ion. The metal ions except Fe²⁺ showed efficient promotive effects. **B–F:** The ThT assay in the presence of the promoting metal ions Zn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, and Al³⁺, respectively. A series of tests was performed so that each metal ion could meet every egg-protein-hydrolysate specimen. Two controls were made: (1) without the addition of a metal ion, and (2) with a metal ion but without egg-protein-hydrolysates.

3.3.3 A β 1-42 に対する鶏卵タンパク質加水分解物の効果

卵タンパク質加水分解物がアルツハイマー病の原因の1つと考えられている A β 1-42 の線維形成に抑制効果を及ぼすかどうかを調べた。A β 1-42 は短期間で線維を形成することが知られ、時間単位で観察した。ThT 蛍光分析では、C-ペプチドが最も顕著な阻害を示し、次いで EY-ペプチドは中程度の阻害性を示し、他の2つはほとんど効果が認められなかった (**Fig. 3.8**)。さらに、蛍光顕微鏡法および TEM による形態学的観察でも C-ペプチドには明確な凝集体や線維は見られなかったのに対し、他のペプチドでは凝集体や線維が観察された (**Fig. 3.9**)。

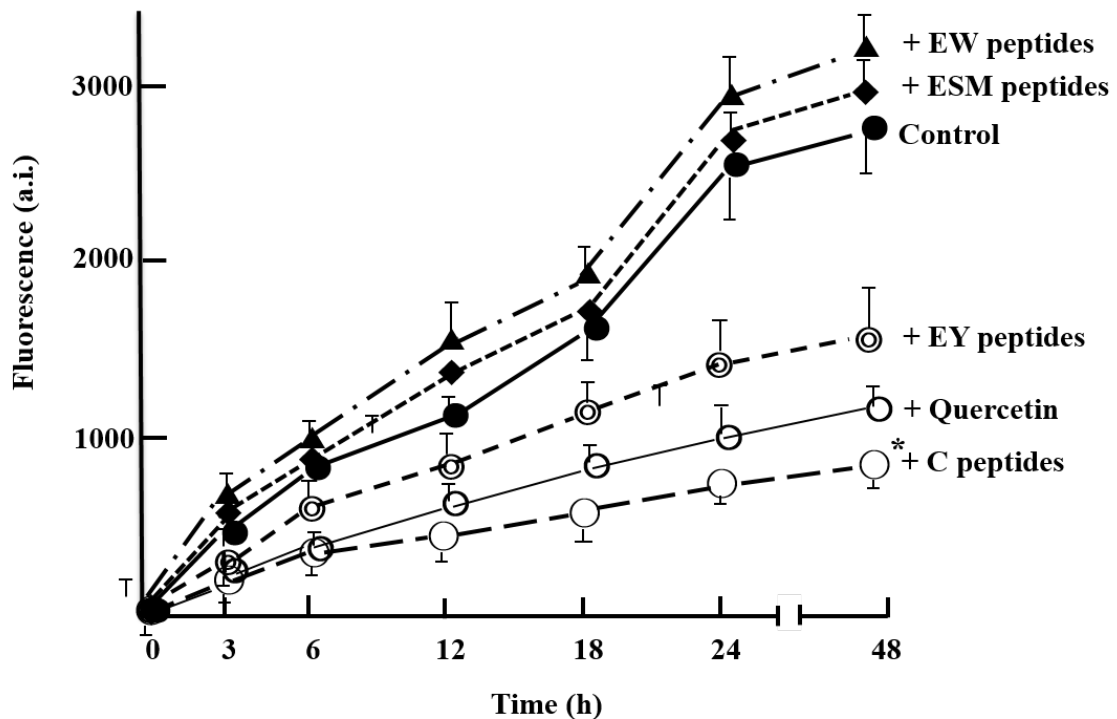


Fig. 3.8. The repression effects of egg-protein hydrolysates on A β 1-42 fibril formation.

The ThT assay for the fluorescence emission by A β 1-42 by incubation with egg-protein hydrolysates (EW peptides etc, each at the concentration of 2.5 mg/ml in the incubation mixture) for up to 48 h at pH 7.0 and 37°C. Details are as described in Materials and Methods. Each value is the average of five independent experiments; mean \pm SE (n=5), and the control assay was done without peptides.

*, $P < 0.05$ (vs. control).

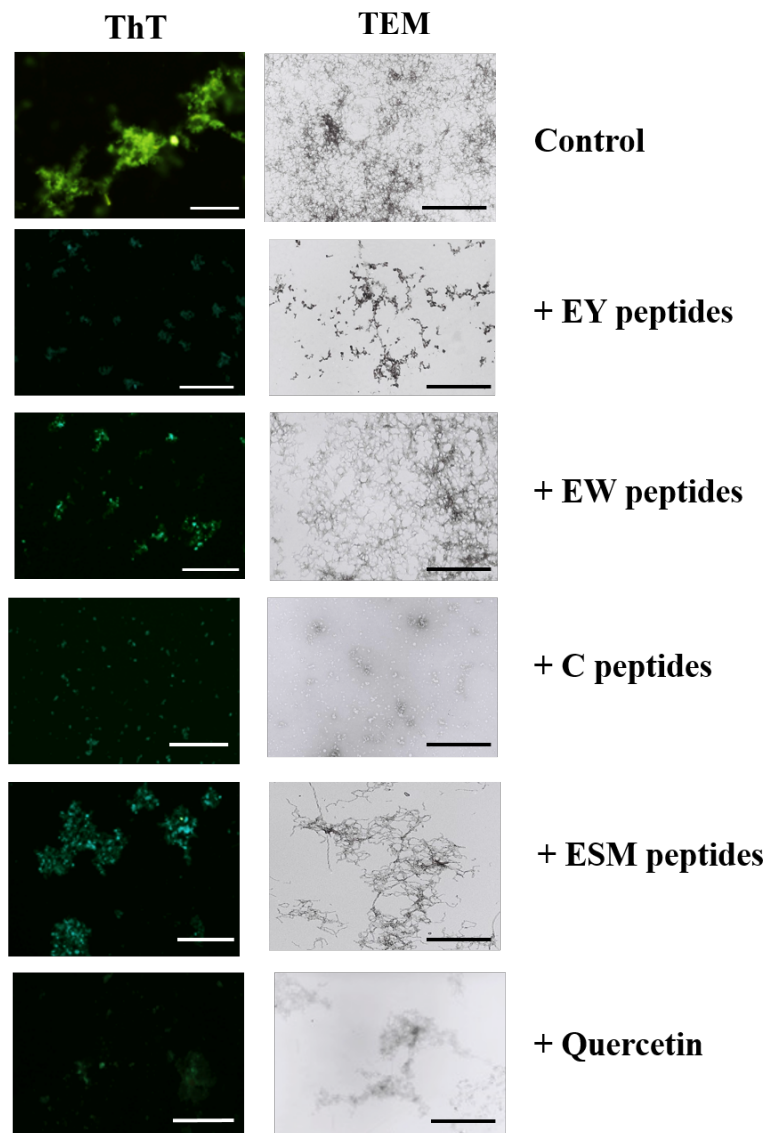


Fig. 3.9. The features of A β 1-42 fibrosis the products observed by ThT fluorescence emission microscopy (ThT) and TEM after 24-h incubation. In panels A and B, the control was without peptides.

3.4 考察

アルツハイマー病をはじめ多くのアミロイド病は不良なタンパク質がアミロイド線維を形成し、体内の組織に沈着することで、発症し、深刻な病症となる。これらを予防する方法には、生活習慣の改善であり、特に、食生活の改善が求められ、毎日摂取する食品素材が重要となり、疾患予防効果が期待できる食材が求められる。これまで多くの食品素材に疾患予防や治療に有効とされるものが報告されてきたが、アミロイド病に関しては数少ない。そうした中で鶏卵は安価で豊富な栄養素を有する食材であると共に、機能成分を多く含むことから加工品や医療などに用いられ、今後さらなる応用が期待されている。

ニワトリ発生卵は長時間 38°C で保温され、タンパク質にとっては過酷な条件と言える。リゾチームをモデルタンパク質とした第2章の実験でリゾチームは、僅かな構造変化は見られるものの機能は十分に維持していたことから、鶏卵にはタンパク質の安定化に寄与するもの（因子）が含まれていると推察した。この仮説に基づいて、第3章では発生に重要な栄養源あるいは多様な機能性を有する卵タンパク質の加水分解物であるペプチドの機能に注目した。特に、タンパク質が不良化すると凝集や線維化が起こることから、アミロイド線維形成を抑制する因子として卵白、卵黄、カラザおよび卵殻膜のそれぞれのタンパク質加水分解物（EW-ペプチド、EY-ペプチド、C-ペプチドおよびESM-ペプチド）

に着目して、凝集や線維化を阻害するものを探索した。HEWL、h-Lz および A β 1-42 を使ったアミロイド線維形成実験では ThT 蛍光分析とそれぞれに線維の形成を確認することが出来、4 つの卵タンパク質加水分解物を使った抑制実験では、カラザ由来の C-ペプチドに最も顕著な効果が認められ、カラザ加水分解物に有力なペプチドが存在することが期待された。しかし、EW-ペプチドにも効果があることから共通のペプチドである可能性もある。

二価および三価の金属イオン (Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} および Al^{3+}) が h-Lz の線維化を促進する効果があることを示した。これらの結果は Zn^{2+} を含む特定の金属イオンが、タンパク質のアミロイド症の線維化を助長するという報告と類似している (Bolognin *et al*, 2011; Huang *et al*, 2004)。しかし、 Fe^{2+} に関して本研究のように、金属イオンが線維化のプロセスを遅らせるという報告がある

(Abelein *et al*, 2015; Innocenti *et al*, 2010)。金属によるアミロイド線維形成の促進についてはまだ不明な点が多いが、金属が不良タンパク質同士の会合をクロスブリッジすることで、会合を促進していると推察される。

金属の線維形成促進におけるペプチドの抑制効果は、線維形成に金属イオンは分子同士の架橋に効果を持つことが考えられ、それをペプチドが弱減化させているのではないかと推論した。その中でも C-ペプチドによる金属イオンの架橋効果の抑制が最も強く、それはペプチドの配列が関係していると考えられる。

タンパク質のアミロイド線維形成の過程は、構造変化→会合→凝集→前線維化→線維の段階を経て行われている。この過程の中でC-ペプチドがどの段階を抑制しているのかは不明である。C-ペプチドを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）逆相カラムクロマトグラフィーで分画すると、線維形成抑制効果を示す複数のピークが観察された。鶏卵のカラザは中央に卵黄を吊るした一対の帯で、卵白に似た豊富なタンパク質とシアル酸からなっている（Juneja *et al*, 1991; Nakano *et al*, 1994）。本研究で使用したカラザは、材料と実験方法で述べたように加水分解前に脱シアル酸を行って調製したことから、シアル酸の影響は小さいと考えられる。

興味深いことに、Lin のグループはプロテアーゼ A で消化した鶏卵カラザ加水分解物にはラット肝臓における線維形成抑制効果があると報告し（Lin *et al*, 2021）、また、*in vitro* で抗酸化能力を発揮することが報告されている（Chang *et al*, 2020）。Yan ら（2014）は、鶏のカラザ分解物には、抗酸化ジペプチドに加えてフリーラジカル除去能や金属のキレート活性を抑制する遊離アミノ酸（ロイシン、アルギニン、フェニルアラニン、バリン、リジン）が豊富であると報告した。これらは、アミロイドβペプチドの線維化を阻止する可能性があり、アルツハイマー病の発症予防に何らかの貢献をしていると考えられる。したがって、C-ペプチドは混合物であることから、どのペプチドあるいはアミノ酸単独が線

維形成の抑制に有効であるかを単離して、特定する必要がある。C-ペプチドが脳疾患に有効であるとすれば、脳関門を通過しなくてはならないため、線維化の抑制メカニズムもまた、重要な今後の研究課題である。

要約すると、鶏卵タンパク質加水分解物（特にカラザからのもの）は、アミロイド関連の変性疾患を予防するための治療因子の宝庫であると結論付けられる。動物実験や人間の介入実験でそれらの効果をさらに実証していく必要である。

3.5 小括

ニワトリ胚発生における鶏卵における安定性に関わる要因について追究した。その要因の1つとして卵白、卵黄、カラザおよび卵殻膜のタンパク質の加水分解物に注目した。

鶏卵タンパク質のプロテアーゼ消化物つまりペプチドにアミロイド線維抑制効果があるかを調べた。アミロイド線維形成タンパク質である HEWL に対してペプチドに効果を観察した結果、卵白 (EW-ペプチド) およびカラザペプチド (C-ペプチド) に強い抑制効果を認めた。さらにヒトリゾチーム (h-Lz) およびヒトアミロイド β ペプチド 1-42 (A β 1-42) の線維形成に対しても C-ペプチドは強い抑制効果を示した。また、アミロイド線維形成を促進する 2 価の金属イオンの効果を減少させる効果を持つことも確認された。C-ペプチドは HEWL の線維形成抑制だけでなく、h-Lz および A β 1-42 にも効果があることから、多くのアミロイド形成タンパク質の線維化を抑制する効果があると期待される。

第4章 総合考察

タンパク質はネイティブな構造を維持することで機能を保持して、生命現象に関わることが出来る。しかし、タンパク質を取り巻く環境の変化やタンパク質の役割が終了した場合、タンパク質は構造が変化し、再生か分解の選択を受ける。再生の場合は分子シャペロンの働きによって正しい構造が形成され、機能が回復する (Kim *et al.*, 2013)。しかし、再生が不能となった場合にはタンパク質は速やかに分解され、アミノ酸となる。この場合、ユビキチン-プロテオソーム系が主な機動手段となっている (Thibaut *et al.*, 2019)。この分解を逃れた場合、タンパク質は細胞内外に蓄積し、細胞に影響を与えることが知られている。現在、ほとんどのアミロイドーシスと呼ばれている疾患はこのような分解を免れたタンパク質が細胞内外に蓄積して起こるとされている。不良化したタンパク質は分子同士で会合して凝集し、それらが何故か β -クロス構造という整列した構造を持つ細い線維状の構造体、いわゆるアミロイド線維を作る。ほとんどのタンパク質はアミロイド線維を形成すると考えられているが、共通のアミノ酸配列はない。分子構造の変化、特に疎水性に富んだ内部構造の表面への露出がタンパク質間の相互作用を助長することにより、最終的にアミロイド線維を形成していくものと思われる。

こうしたアミロイド線維の形成を抑制する生体機能もあるとされる。アンフォ

ールドしたタンパク質を再フォールドする分子シャペロンがその主役であるが、他の機構によってフォールドされ正常な構造に再生されるケースも考えられる。一方では構造変化しやすい状況になった場合、アンフォールドを阻止するような因子の存在やアンフォールドしたタンパク質の会合を阻止したり、線維化を抑制する因子の存在も推測される (Sack, 2018)。

本研究ではニワトリの発生過程において、長時間 38 日に晒される母性由来の卵白リゾチーム (HEWL) に注目して、本タンパク質がこの過程でどのような変化を受けるのか、また、機能を維持することが出来るならばどのようなしくみが発生卵に備わっているのかを検討した。その結果、HEWL は変化を受けにくいタンパク質であることが確認された。自体の構造の強さと考えられるが、基本的構造を維持しており、発生過程ではほとんど機能には変化はない。

卵白タンパク質の安定性には 55% を占めるオボアルブミンが大きな役割を果たしていると考えられる。オボアルブミンはセルピンファミリーに属しており、プロテアーゼに対してある程度の抵抗性を示すことから他のタンパク質の保護に役立つものと考えられる。HEWL の安定性にオボアルブミンの関与が予想されたが、この両者はある条件で会合し、凝集して HEWL のムラミダーゼ活性を消失してしまう (Sugimoto *et al*, 2007)。つまり、オボアルブミンの分子内領域と HEWL のアミロイド様線維形成コア領域が相互作用し、線維状の凝集体を形成

する。両者のタンパク質もアミノ酸源として利用されることから分解を受け、凝集関連ペプチド同士の反応が起こる可能性は大きい。しかしながら、これまで観察した範囲では発生卵の卵白には凝集体は見られない。今回の実験でカラザのペプチドにアミロイドの線維化を阻害するものを見出した。カラザタンパク質自身が阻害効果を示すかは今後の課題であるが、発生卵にはタンパク質同士による会合・凝集・線維化を抑制する環境が備わっていると推測される。このことが発生を正常に進行させ、母性由来の栄養素を有効に利用できるシステムになっている。

カラザペプチドはヒトリゾチームやアミロイド β の凝集・線維化抑制にも有効であった。また、アミロイド線維の形成を助長する金属に対しても抑制効果があることから注目できるペプチドと考えられる。それ故に、カラザペプチドは発生卵だけでなくもっと広いタンパク質の凝集・線維化を抑制するものと結論した。アミロイド線維が原因の疾患は多くあり、高齢化社会において重大な問題となっている。それに対する効果的な治療薬はあまりなく、開発が望まれている状況である。また、予防薬の開発も進められているが、その決定的効果については疑問が多いのが現状である。特に食事における予防は強く期待され、カテキンやケルセチンなどのポリフェノール類などが候補に挙げられている (Hu *et al*, 2018; Townsend *et al*, 2018)。そうした中で、カラザペプチドは比較的調製し

やすく、安価であるため有効利用が期待される。今回使用したカラザペプチドはサーチライシンとパパインを用いた調製物であり、逆相 HPLC では 30 種以上のピークを確認した。まだ予備実験の段階ではあるが、いくつかの画分に線維抑制効果を確認したことから複数存在することが予想された。また、卵白タンパク質の分解物にもカラザペプチドと同様の効果が見られることからアミロイド線維形成に抑制に有効と考えられる。カラザタンパク質と卵白タンパク質の組成は非常に類似していることから共通の機能ペプチドもあると期待された。これらの活性ペプチドの単離・同定を行う必要がある。しかしながら、これらのヒトへの応用にはいくつかの課題があると思われる。カラザペプチドは再現性よく調製できるか、経口接種したときペプチドが目的の組織に到達されるかどうかなどクリアしなくてはならない問題がある。例え、血中に入ったとしても脳関門を通過できるかという問題もある。これを越えなければアルツハイマー病などの脳疾患への利用は難しい。一方、脳以外のアミロイド病には有効の可能性があると思われる。カラザペプチドの抑制効果の再現性は今回確認出来た。別々に調製したサンプルでもそれぞれにアミロイド線維形成を抑制できたことで再現性ある調製は可能であると思われる。さらに有効性を確実にするためには、生体内でのカラザペプチドの効果を、動物実験やヒト介入実験を行うことによって検証する必要がある。

もう1つの問題はカラザペプチドのアミロイド線維形成抑制効果のメカニズムである。この問題についてはまだ、推定の域を超えてないが、アミロイド線維の形成にはいくつかの過程があり、いずれかの段階で線維形成タンパク質とカラザペプチドが相互作用し、タンパク質の会合や凝集を防ぎ、線維化を抑制していると考えている。ペプチドの同定が出来れば、線維形成タンパク質との相互作用の研究を通じて理解することが出来ると思われる。

本研究では鶏卵リゾチーム (HEWL) を使って、本タンパク質の発生過程での安定性について観察し、HEWL は発生後期でも十分機能を保持しており、タンパク質の役割を果たしていることと、その安定性に寄与している要因の1つとして、鶏卵タンパク質の加水分解物 (ペプチド) についてまとめた。これらの結果はタンパク質科学に貢献するだけでなく、アミロイド病という人類にとって深刻な疾患に対する予防にも寄与出来るものと考え、さらなる研究の発展が期待される。

References

- Abelein A, Gräslund A, Danielsson J. Zinc as chaperone-mimicking agent for retardation of amyloid β peptide fibril formation. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112: 5407–5412.
- Bolognin S, Messori L, Drago D, Gabbiani C, Cendron L, Zatta P. Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid-A β (1-42) aggregation and toxicity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011; 43: 877–885.
- Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R. Amyloid β -Peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013; 19: 823–835.
- Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Bioscience* 2010; 35: 127–160.
- Chang C-J, Tseng J-K, Wang S-Y, Wang S-Y, Lin, Y-L, Wu Y-H-S, Chen J-W, Chen Y-C. Ameliorative effects of functional chalaza hydrolysates prepared from protease-A digestion on cognitive dysfunction and brain oxidative damages. *Poultry Science* 2020; 99: 2819–2832.
- Chatterjee S, Mudher A. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: A critical assessment of the shared pathological traits. *Frontiers in Neuroscience* 2018; 12: 383. doi:

10.3389/fnins.

Chen G-F, Xu T-H, Yan Y, Zhou, Y-R, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. Amyloid beta:

Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta*

Pharmacologica Sinica 2017; 38: 1205–1235.

Chen Y, Barkley MD. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins.

Biochemistry 1998; 37: 9976-9982.

Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, amyloid formation, and human

disease: A summary of progress over the last decade. *Annual Review Biochemistry*

2017; 86: 27–68.

Choi S-M, Kim BC, Cho Y-H, Choi K-H, Chang J, Park M-S, Kim M-K, Cho K-H,

Kim J-K. Effects of flavonoid compounds on β -amyloid-peptide-induced neuronal

death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam Medical Journal* 2014; 50: 45–

51.

Cunningham FE. Changes in egg white during incubation of the fertile egg. *Poultry*

Science 1974; 53: 1561-1565.

Derde M, Lechevalier V, Guerin-Dubiard C, Cochet MF, Jan S, Baron F, Gautier M,

Véronique V, Nau F. Hen egg white lysozyme permeabilizes *Escherichia coli* outer

and inner membranes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2013; 61: 9922–9929.

Dobson CM, Evans PA, Radford SE. Understanding how proteins fold: The lysozyme story so far. *Trend in Biochemical Sciences* 1994; 19:31-37.

Düring K, Porsch P, Mahn A, Brinkmann O, Gieffers W. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. *FEBS Letters* 1999; 449: 93-100.

Fitzpatrick AWP, Debelouchina GT, Bayro MJ, +16 and Dobson CM. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110: 5468–5473.

Freeman BM. Development of the Avian Embryo. eds, Freeman, B.M., and M.A.Vince. Chapman and Hall, London. 1974; 160-188.

Fukamizo T. Chitinolytic enzymes: Catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein & Peptide Science*. 2000; 1: 105-124.

Gomez G, Beason-Held LL, Bilgel M, An Y, Wong DF, Studenski S, Ferrucci L, Resnick SM. Metabolic syndrome and amyloid accumulation in the aging brain. *Journal of Alzheimer's Disease* 2018; 65: 629–639.

Grisham CM, Garrett RH. "Chapter 14: Mechanism of enzyme action". *Biochemistry Australia: Thomson Brooks/Cole*. 2007; 467–469.

Hane F, Tran G, Attwood SJ, Leonenko Z. Cu²⁺ Affects Amyloid- β (1–42)

Aggregation by Increasing Peptide-Peptide Binding Forces. Plos One 2013

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059005>

Hu B, Shen Y, Adamcik J, Peter Fischer P, Schneider M, Loessner MJ, Raffaele

Mezzenga R. Polyphenol-Binding Amyloid Fibrils Self-Assemble into Reversible

Hydrogels with Antibacterial Activity. ACS Nano 2018

<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08969>

Huang X, Atwood CS, Moir RD et al. Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's Aβ peptides.

Journal of Biological Inorganic Chemistry 2004; 9: 954–960.

Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA and Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. Nature Reviews Molecular Cell

Biology 2018; vol. 19: 755–773.

Ibrahim HR, Higashiguchi S, Juneja L, Kim M, Yamamoto Y. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. Journal of Agricultural

Food Chemistry 1996; 44: 1416-1423.

Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of

lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Letters. 2001; 506:27-32.

Ibrahim HR. On the novel catalytically-independent antimicrobial function of

henegg-white lysozyme: A conformation-dependent activity. *Nahrung* 1998; 42: 187-193.

Imoto T, Johnson LN, North ATC, Phillips DC, Rupley JA. *The Enzymes* ed. Boyer, P.D. Vol. 7, Academic Press, New York. 1972; 665-868.

Imoto T, Yagishita K. Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzymes preparation and properties. *Agricultural Biological Chemistry* 1973; 37: 465-470.

Innocenti M, Salvietti E, Guidotti M Casini Angela, Bellandi S. Foresti ML, Gabbiani C. Pozzi, A, Zatta P, Messori L. Trace Copper (II) or zinc (II) ions drastically modify the aggregation behavior of amyloid- β 1–42: An AFM study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010; 19: 1323–1329.

Juneja LR, Koketsu M, Nishimoto K, Kim M, Yamamoto, Itoh T. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg yolk membrane. *Carbohydrate Research* 1991; 214: 179-186.

Kahn MS, Singh P, Azhar A, Naseem A, Rshis Q, Kabir MA and Jairajpuri MA. Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. *Journal of Amino Acids* 2011; 606797.
doi: 10.4061/2011/606797

Kim EY, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone

functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 2013; 82: 323-355.

Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15: 384–396.

Kupfer L, Hinrichs W, Groschup MH. Prion protein misfolding. *Current Molecular Medicine* 2009; 9: 826–835.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Levitt M, Gerstein M, Huang E, Subbiah S, and Tsai J. Protein Folding: The Endgame 1997 *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 66, 549-579.

Levy DE. Type 2 diabetes and Alzheimer's disease: From common pathologies to potential new therapeutics. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2007; 1: 590–594.

Lewis UJ, Cheever EV, Seavey BK. Purification of bovine growth hormone and prolactin by preparative electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 1968; 24: 162-175.

Lin Y-L, Lu C-F, Wu Y-H S et al. Protective effects of crude chalaza hydrolysates against liver fibrogenesis via antioxidation, anti-inflammation/anti-fibrogenesis, and

- apoptosis promotion of damaged hepatocytes. *Poultry Science* 2021; 10: 101175.
- Luo J, Wärmländer SKTS, Gräslund A, Abrahams JP. Human lysozyme inhibits the in vitro aggregation of A β peptides, which in vivo are associated with Alzheimer's disease. *Chemical Communications* 2013; 49: 6507–6509.
- Manchenko GP "Lysozyme". *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. 1994; 223.
- Merlini G, Bellotti V. Lysozyme: A paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clinica Chimica Acta* 2005; 357: 168–172.
- Molla AR, Maity, SS, Ghosh S, Mandal DK. Organization and dynamics of tryptophan residues in tetrameric and monomeric soybean agglutinin: Studies by steady-state and time-resolved fluorescence, phosphorescence and chemical modification. *Biochimie* 2009; 91: 857-867.
- Nakano K, Nakano T, Ahn DU, Sim JS. Sialic acid contents in chicken eggs and tissues *Canadian Journal of Animal Science* 1994; 74: 601–606.
- Nash JA, Ballard TNS, Weaver TE, Akinbi HT. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. *Journal of Immunology* 2006; 177: 519-526.
- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riekkel C, Grothe R, Eisenberg D.

- Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 2005; 435: 773–778.
- Ohkuri T, Shioi S, Imoto T et al. Effect of the structure of the denatured state of lysozyme on the aggregation reaction at the early stages of folding from the reduced form. *Journal of Molecular Biology* 2005; 347: 159-168.
- Ow SY, Dunstan DE. A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease. *Protein Science* 2014;; 23: 1315–1331.
- Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, Soutar AK, Totty N, Nguyen O, Blake CCF, Terry CJ, Feest TG, Zalin AM, Hsuan JJ. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 1993; 362: 553–557.
- Picken MM. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematologica* 2020 ; 143:322–334.
- Ragland A and Criss K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLOS pathogens* 2017;
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>.
- Remold-O'Donnell E. The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Letters* 1993; 315: 105-108.
- Rothwarf DM, Scheraga HA. Role of non-native aromatic and hydrophobic interactions in the folding of hen egg white lysozyme. *Biochemistry* 1996; 35: 13797-13807.

Sack GH. Serum amyloid A-a review. *Molecular Medicine* 2018; 24: 46. DOI

<https://doi.org/10.1186/s10020-018-0047-0>

Sassi P, Onori G, Giugliarelli A, Paolantoni M, Cinelli S, Morresi A. Conformational changes in the unfolding process of lysozyme in water and ethanol/water solutions. *Journal of Molecular Liquids* 2011; 59: 112– 116.

Journal of Molecular Liquids 2011; 59: 112– 116.

Schön A, Clarkson BR, Jaime M et al. Temperature stability of proteins: Analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry. *Proteins* 2017; 85:2009-2016.

Shih P, Holland DR, Kirsch JF. Thermal stability determinants of chicken egg-white lysozyme core mutants: Hydrophobicity, packing volume, and conserved buried Page 20 of 41 water molecules. *Protein Science* 1995; 4:2050-2062.

Shinohara H, Horiuchi M, Sato M, Kurisaki J, Kusakabe T, Koga K, Minami Y, Aoki T, Kato I, Sugimoto Y. Transition of ovalbumin to thermostable structure entails conformational changes involving the reactive center loop. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1770:5-11.

Shinohara H, Iwasaki T, Miyazaki Y, Matsuo K, Aoki T, Matsumoto M, Oka T, Kurisaki J, Mizumachi K, Kusakabe T, Koga K, Sugimoto Y. Thermostabilized ovalbumin that occurs naturally during development accumulates in embryonic tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1723:106-113.

Skujiņš J, Puķīte A, McLaren AD. Adsorption and reactions of chitinase and lysozyme on chitin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1973; 2: 221–228.

Stefanescu R, Stanciu GD, Luca A, Paduraru L, Tamba BI. Secondary metabolites from plants possessing inhibitory properties against beta-amyloid aggregation as revealed by thioflavin-T assay and correlations with investigations on transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biomolecules* 2020; 10: 870–891.

Sophianopoulos AJ, Vanholde KE. Physical studies of muramidase (Lysozyme) II. pH-dependent dimerization. *Journal of Biology Chemistry* 1964; 239:2516-2524.

Sugimoto Y, Sanuki S, Ohsako S, Kondo M, Kurawaki J, Ibrahim HR, Aoki T, Kusakabe T, Koga K. Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. *Journal of Biology Chemistry* 1999; 274: 11030-11037.

Sugimoto Y, Kamada Y, Tokunaga Y, Shinohara H, Matsumoto M, Kusakabe T, Ohkuri T, Ueda T. Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. *Biochemistry and Cell Biology* 2011; 89:533-544.

Swaminathan R, Ravi VK, Kumar[†] S, Kumar MVS, Chandra N. Lysozyme: A model protein for amyloid research. 2011; 84: 63-111.

Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook, ver. 2. Thermo Scientific,

2010.

Thibaudeau TA and Smith DM. A Practical Review of Proteasome Pharmacology.

Pharmacological Reviews 201; 71: 170-197.

Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils. International Journal of Biological Sciences 2013; 9: 219-227.

Townsend D, Hughes H, Akien J, Stewart KL, Radford SE, Rochester D, Middleton DA.

Epigallocatechin-3-gallate remodels apolipoprotein A-I amyloid fibrils into soluble oligomers in the presence of heparin. Journal of Biological Chemistry 2018; 293: 12877-12893.

Ueda T, Yamada H, Aoki H, Imoto T. Effect of chemical modifications of tryptophan residues on the folding of reduced hen egg-white lysozyme. Journal of Biochemistry 1990; 108:886-892.

Yang KT, Lin C, Liu CW, Chen YC. Effects of chicken-liver hydrolysates on lipid metabolism in a high-fat diet. Food Chemistry 2014; 160: 148–156.

Yonezawa Y, Tanaka S, Kubota T, Wakabayashi K, Yutani K, Fujiwara S. An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained

from a small-angle X-ray and neutron scattering study. *Journal of Molecular Biology* 2002; 323: 237–251.

Yoon S, Welsh WJ. Detecting hidden sequence propensity for amyloid fibril formation. *Protein Science* 2004; 13: 2149–2160.

Zhang X, Jiang A, Yu H, Xiong Y, Zhou G, Qin M, Dou J, Wang J. (2016) Human lysozyme synergistically enhances bactericidal dynamics and lowers the resistant mutant prevention concentration for metronidazole to *Helicobacter pylori* by increasing cell permeability. *Molecules* 2016; 21:1435-1445.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文をまとめるにあたり、終始ご親切なるご指導・ご鞭撻を賜りました琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科 和田 浩二先生、九州栄養福祉大学食物栄養学部食物栄養学科 杉元 康志教授に心より感謝の意を表します。また、ご指導とご協力を頂きました琉球大学農学部亜熱帯生物資源科 高良 健作先生、琉球大学熱帯生物圏研究センター 屋 宏典先生、並びに、鹿児島大学連合農学研究科 大塚 彰先生、佐賀大学農学部生物資源化学学科生命機能科学コース 濱 洋一郎先生、九州栄養福祉大学食物栄養学部食物栄養学科の 渡邊 啓一先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を行うにあたり、快く実験に参加頂いた九州栄養福祉大学食物栄養学部食物栄養学科 助手 油屋 和先生、院生 島 拓郎さんに感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり終始、ご支援・ご鞭撻を頂きました九州栄養福祉大学 室井 廣一学長および関係者の方々に心より御礼を申し上げます。本論文を仕上げるにあたり暖たく見守ってくれました家族に感謝致します。