

ホタテ貝に含まれるIGF様の骨牙細胞増殖因子と 食品としての機能性

青木 央, 宮崎俊一

IGF-1 like Osteoblast Growth Factors in the Adductor Muscle of Giant Ezo-scallop (*Patiopecten yessoensis*) and its functional Ability as Food Factors

Hiroshi Aoki and Syun-ichi Miyazaki

要 旨

ホタテガイの貝柱の中に、インスリン様成長因子(IGF-1)に良く似たペプチドがあり、このペプチドには、正常ヒト骨牙細胞を増殖させる活性のあることが分かった。このことは、ホタテガイがヒトの体をつくる優良な食品であることを示している。

1. 緒 言

ホタテガイは、養殖事業の成功により北海道の水産業の重要品種となっている。閉殻筋といわれる骨格筋の一種である貝柱が、他の貝類と比較して特に発達しているのが特徴である。生物の発生の過程を考えてみると、骨格筋は中胚葉から筋牙細胞の増殖と分化を経て、多核細胞となり筋管を形成する。この筋牙細胞の増殖と分化の制御に関わる因子のひとつとして、インスリン様成長因子(Insulin like Growth Factor, IGF)がある¹⁾。インスリン様成長因子の発見は1978年で、IGF-1とIGF-2が発見されている²⁾。ホタテガイは、大きな貝柱を発達させている特徴から、このような骨格筋をつくる成長因子が発達していることが十分期待される。そして、IGFは骨の形成に大変かわりが深く³⁾、骨牙細胞の成長因子でもあることから、この関連のペプチドと類似の機能性ペプチドがホタテガイの貝柱から多く見つかることが期待できる。

著者は既に、IGFの発見につながる研究の事例になったソマトメジン(Somatomedin)⁴⁾とMSA(Multiplication Stimulation Activity)⁵⁾の方法を

参考にして、IGF様ペプチドの抽出を行い、細胞培養系によって機能の検討をした⁶⁾。

その後、抽出されたフラクションのペプチドマッピングをIGF-1と比較した。また、正常ヒト骨牙細胞に増殖効果があるかどうかについて検討を加え、増殖活性を示す機能性ペプチドが存在することが確かめられた。さらに、経口モデルとして、ペプシン⁷⁾による酵素分解を行った。貝柱の酵素分解液から生じるペプチドには、正常ヒト骨牙細胞の増殖活性が維持されていることが分かった。

2. 試験方法

2.1 抽出前処理

ホタテガイ試料60gに対して2.0M酢酸, 75mM塩化ナトリウム溶液150mlを加え、ワーリングブレンダーで、氷冷しながら、試料をホモジナイズした。この2回分の懸濁液を遠心分離(Hitachi RPR9-2, 5000 rpm, 15min, 4°C)した上清をNo. 2のろ紙で吸引ろ過し、そのろ液を超遠心分離(Beckman, 45Ti, 35000 rpm, 30min, 4°C)した上清を0.1M酢酸溶液(4°C) 5ℓに2回、透析(スペクトラポア3, 巾54mm)した。透析を終了した試料は、6本の100ml三角フラスコに

40ml毎分注し、凍結乾燥した。このときの各フラスコには約0.8gの凍結試料を得た。

2.2 イオン交換樹脂を用いた精製⁸⁾

凍結乾燥した透析試料0.8gを1M酢酸20mlで溶解し、超遠心分離(Beckman 70.1Ti, 48000rpm, 60min, 4°C)で上清を取った。Bio-Rex70(50~100mesh, R-COONa型)10mlを、0.1M酢酸で予備洗浄しておき、上清を加えて成分を吸着させた。さらに0.1M酢酸を加えて、全量を50mlにした後、遠心分離(3000rpm, 10min)し、上清は捨てた。同様の操作を50%エタノール溶液で行い、イオン交換樹脂を洗った。最後に0.1M塩酸、80%エタノール溶液で樹脂に吸着していた成分を脱着した。40°Cでエタノールを留去し、再び1M酢酸、10%ショ糖溶液に溶解、遠心分離(3000rpm, 10min)、上清を蛋白質低吸着タイプのメンブレンフィルター(EBデスク、関東メルク)でろ過し、約6ml~8mlの溶液を得た。

2.3 ゲルクロマトグラフィーを用いた分画

バイオゲルP-10(Bio-GelP-10medium, 150-4140, 25mmID×100cm)を用いて、0.1M酢酸溶液で分子量ごとに時間単位で10ml毎分画した。カラムへの付加量は一回に2mlとした。分画した試料は-20°Cで凍結保存し、使用時に凍結乾燥して用いた。

2.4 ドットプロット間接抗体法による検出

ニトロセルロース膜(1.0μm, 47mm径, アドバンテック東洋)に試料を数μl直接ドットプロットし、1%BSA/Tween-PBSにてブロッキング、検出には、1次抗体にAnti-Human IGF-1, rabbit(PeproTech EC Ltd, England)を用い、2次抗体及び発色には、Anti-rabbitIgG(H+L)AP Conjugate(1:5000)の入ったProtBlot II AP System with Stabilized Substrate(Promega Corporation, USA)試薬キットを用いた。

2.5 電気泳動によるIGF様物質の分子量測定

電気泳動装置Phast System (Amersham Pharmacia Biotech, England)に、泳動ゲルとしてSDS-PAGEプレキャストゲル(PhastGel Homogeneous High Density, 17-0679-01)を使用し、分子量の測定を行った。試料は、10mMTrisHCl(pH6.8)、8M尿素、0.1%メルカプトエタノールで処理し、染色は銀

染色を行った。

2.6 セミマイクロHPLCによるペプチドマッピング^{9)~12)}

62.5mMTrisHCl, 5%メルカプトエタノール溶液50μlに、1μg/μl V8プロテアーゼ(*Staphylococcus aureus* Protease, PIERCE, No. 20195) 20μlと試料30μlを加えて100μlとし、40°C, 1時間限定酵素分解した後、2μl(3μg)を分析した。ペプチドフラグメントの分析にはアセトニトリル濃度勾配(A液0.05%TFA, B液0.045%TFA, 50%アセトニトリル溶液, アセトニトリル濃度0%-50%(0-35min) 50%-0%(35-45min), 0%hold(45-60min))によるセミマイクロODS系カラム(MightysilRP-18GP, 100mm×2.0mmID, 3μm, No. 25472-96, 関東メルク)をカラム温度40°Cで用いた。流速は0.2ml/min, 検出はUV215nmで行った。

2.7 正常ヒト骨牙細胞への増殖効果

正常ヒト骨牙細胞(NH0st Cell CC-2538, Clonetics, BioWhittaker, Inc, USA)は、指定の10%FBS含有改変MCDB131培地(Osteoblast Growth Medium BulletKit CC-3207, BioWhittaker, Inc, USA)を用い、コラーゲンタイプIでコートしたカルチャウエア(FALCON, BIOCOCAT T-25No. 354531, 96wellNo. 354407, BD Bioscience, USA)を用いて培養した。XTT法(Cell Proliferation Kit II, No. 1465015, Roche Diagnostics GmbH, Germany)により増殖活性を測定した。

2.8 蛋白質消化酵素を用いた分解

ヒトの消化モデルとなる酵素としてペプシンを選定した¹³⁾。1mgペプシン(3300units/mg, EC3.4.23.1, ブタ由来, WAKO No. 165-18711)を1M酢酸, 10%ショ糖溶液1mlに溶解し、分画試料2mlに加えて3mlとし、20°Cで酵素分解させた。反応停止には1mgペプスタチンA(WAKO No. 165-15293)を1mlDMSOに溶解し¹⁴⁾, 40μlを用いた。

2.9 HPLCによる分析

ペプチド分析にはアセトニトリル濃度勾配(A液0.05%TFA, B液0.045%TFAアセトニトリル, アセトニトリル濃度25%-80%(0-44min, 1.25%/min) 80%hold(44-50min) 80%-25%(50-55min) 25%hold(55-6

5min) 合計分析時間65分によるODS系カラム (Lichrospher100RP-18(e), 250mm×4mmID, 10 μm, No. 860717, ガードカラム4-4Lichrospher100RP-18(e), 5 μm, No. 50962) を40℃で用いて行った。流速は1ml/minで検出はUV220nmを使った。この分析の標準物質としてインスリン (WAKO, No. 096-03443)は14~16分後, IGF-1 (SIGMA, I-3769)は, 11~13分後に検出された。

2.10 類骨の観察

正常ヒト骨芽細胞が, ホタテガイから抽出された機能性ペプチドによって刺激され, 骨基質を形成するかどうか, 吉木法^{15), 16)}より観察した。プレコートスライドグラス (FALCON, BIOCOAT カルチャースライド2 ウェルNo. 354627, BD Bioscience, USA) に, 30000Cells/1ml/4cm²/wellの密度ではん種した。分画した試料を凍結乾燥後, ダルベッコのPBS(-)150 μlで溶解, 低吸着フィルター (Millex-GV, SLGV004SL, ミリポア) で濾過滅菌した後, 50 μlを添加し, 3日間培養した。骨芽細胞は, 2.5%グルタルアルデヒド含有ダルベッコPBS(-)溶液で固定し, 塩化シアヌル液で再固定後, EDTAで脱灰した。マイヤのヘマトキシリンで10分間染色, さらに酢酸の無い0.5%エオシンB溶液で短時間(約30秒)染色を行った。

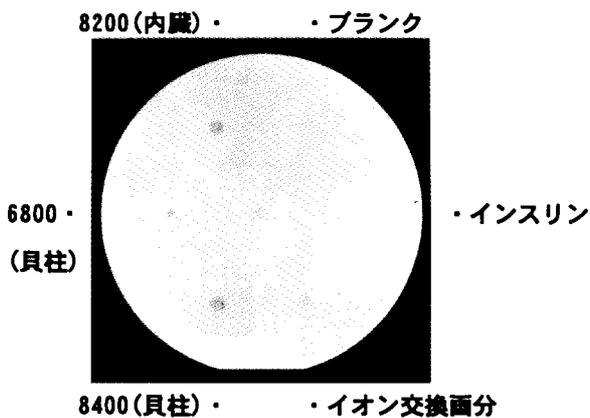


写真1 ドットプロット間接抗体法によるホタテガイのIGF様物質画分の検定結果

写真の中心がIGF-1の陽性反応, 周囲に試料を6点プロットしてある。ブランク(Globin)とインスリンは陰性。

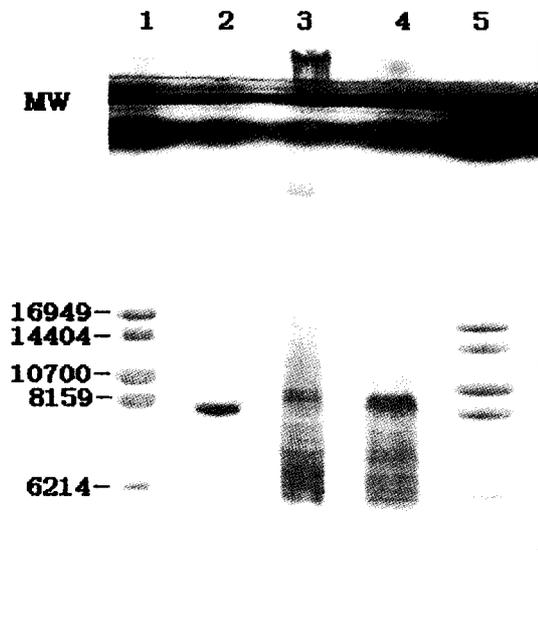


写真2 ホタテガイIGF様物質画分の電気泳動の例

レーン1と5:ペプチドマーカー(Globin)

レーン2:IGF-1(SIGMA, MW7649)

レーン3:8400 (貝柱), ゲルクロマトグラフ法

レーン4:イオン交換画分

3. 結果

2.9のHPLC分析の結果, インスリンとIGF-1の溶出時間の近傍にピークの認められた3画分について, 2.2のイオン交換樹脂を用いた試料と2.3のゲルクロマトグラフィで分画した試料を2.4の間接抗体法で調べた結果が写真1である。写真中心がIGF-1の陽性反応, 他に, ブランクとインスリンは陰性であるが, 周りにプロットした分子量6800画分と8400画分に陽性反応がある。また, 貝柱を除く内臓部分の分子量8200画分にも陽性反応の認められることが分かった。2.5の電気泳動による分子量の比較をした結果を写真2に示した。IGF-1(分子量7649)よりもやや分子量の大きいところに, やや濃いバンドが認められることが分かった。ゲルクロマトグラフ法とイオン交換法のどちらの方法でも, 同じ位置にバンドが確認された。⁶⁾ 写真1からイオン交換法で分画された試料は, ゲルクロマトグラフィによる方法の画分3点よりも, IGF-1と同等の反応濃度なので, このイオン交換法で得た試料を2.6のペプチドマッピングして, IGF-1と比較した。図1に示したように, この条件では

IGF-1 から生じるはずの溶出時間33.28分のピーク*が無く、代わりにインスリンの最初のピークに近い14.76分(↑)と37.17分(↓)にピークがあるのが特徴で、他の残りのペプチドは、IGF-1と対応するピークが8本あることが分かった。このことは、IGF-1ときわめて良く似たペプチドが抽出されていることを示している。

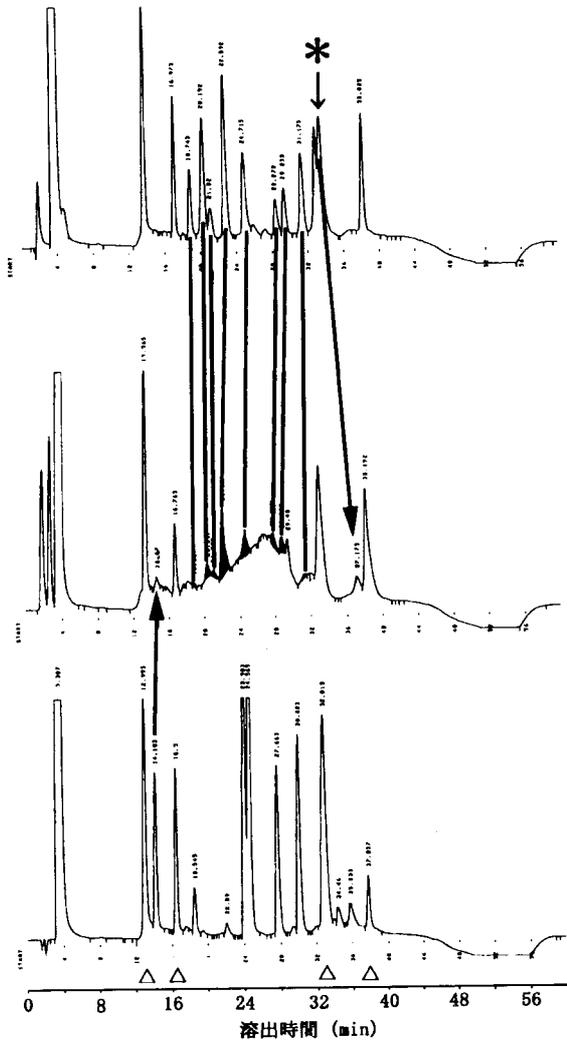


図1 ホタテガイIGF様物質のV8プロテアーゼによるペプチドマッピング

上段は IGF-1 のペプチドをマッピング。中段は、ホタテガイ IGF 様物質のマッピングの例。下段は、インスリンのマッピング。実線で IGF-1 と一致するペプチドを結んだ。↓は代替する対応を推定。IGF-1 の*に相当するピークがホタテガイにはない。△は、試薬由来で共通するピーク。

このIGF様物質が、骨芽細胞の増殖活性を持つかどうかを調べるため、2.2のイオン交換法で抽出精製した試料をさらに2.3のゲルクロマトグラフィ

で精製分画した。その時のクロマトグラフを図2に示した。分子量が高い方から、時間区分で分画番号を付けてある。試料の負荷量は一回に2mlの分画で、流量は15ml/h。恒温室温度20℃。このゲルクロマトグラフィでは27時間～40時間の間に不純物が溶出されるので、次回に分画は翌々日からになる。分画試料は凍結乾燥させ、150 μl の培養培地に溶解、各ウェル2000Cells/100 μl の96穴マイクロプレートに、濾過滅菌しておいた試料を各ウェルに10 μl を分注した。2.7の方法によりXTT法で、細胞の増殖活性を比較した結果が、図3である。分画番号2番と6番の区分に増殖活性の高いことが分かった。

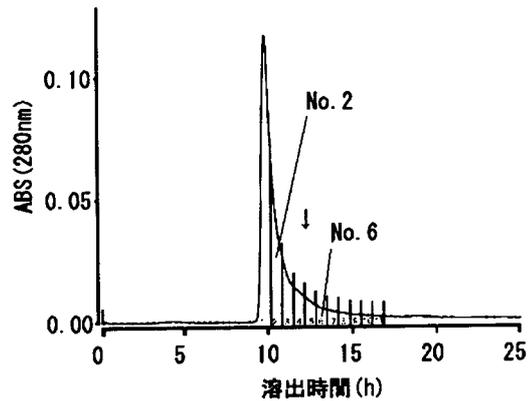


図2 ゲルクロマトグラフィによるIGF様物質の精製ホタテ貝の酢酸抽出成分の再精製、分画の例。印はインスリンの溶出位置、No.2 (IGF様因子画分)とNo.6 (低分子化IGF様因子画分)に骨芽細胞の増殖活性がある。カラム：バイオゲルP-10(2.5cm,100cm、流速15ml/h)

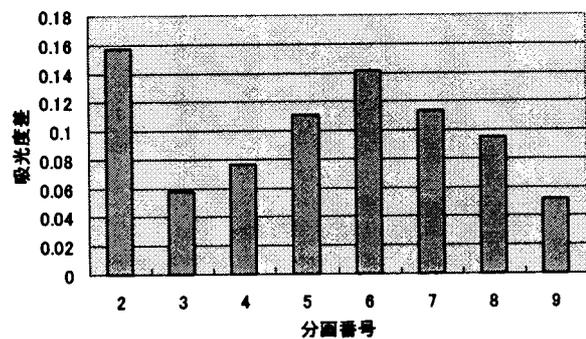


図3 XTT法による骨芽細胞の増殖効果 No.2 (IGF様因子画分)とNo.6 (低分子化IGF様因子画分)に骨芽細胞増殖活性がある。吸光度差は490nm-655nm で見たABSでの培地のみ培養時との差分。

この時、XTT反応液を除去したウェルに残る骨
 牙細胞の様子を撮影したのが写真3である。下は
 ブランク、上は抽出分画因子No. 6が添加されてい
 る。ブランクは細胞単位もまばらであるのと比較
 して、抽出分画因子が添加された方は、細胞数も
 多く、まとまった細胞の増殖も認められる。増殖
 因子としての機能の他に、分化因子としての機能
 も示唆された。分画番号No. 2は、分子量マーカと
 して用いたインスリンよりも高い分子量を持ち、
 分画番号No. 6は、やや低い分子量を持つ。この低
 分子量ペプチドの増殖活性をIGF-1と比較すると
 画分あたり16.5ng~25.5ng相当の力価を持つこと
 が分かった。また、No. 2の区分は、同様か10%程
 度高い力価をもつ画分であることが分かった。

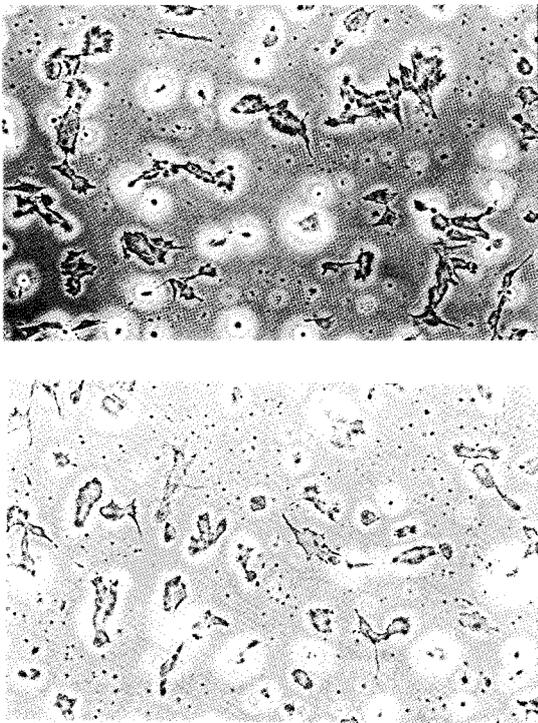


写真3 増殖したヒト骨牙細胞の様子

ホタテ貝の酢酸抽出成分を加え、培養した正常ヒト骨
 細胞の増殖の様子(上段)。XTT測定後、培地を除いてウ
 エルを観察。ブランク(下段)は、細胞単位が疎らであ
 るのと比較して、上段写真は細胞数も多く、まとまった
 細胞の増殖が認められる。増殖因子としての機能のほか、
 分化因子としての機能が示唆される。

ヒトの経口消化モデルとして、ペプシンを選定
 し、消化に対する抵抗性を比較した結果が図4で
 ある。上段は阻害剤ペプスタチンAが働いていな
 い時、限定分解されていた過程の時で、中段は、
 4時間酵素分解を行い、ペプスタチンA (M. W. 685.

9)により酵素反応を停止した例である。下段は
 阻害剤の使用が無く、酵素反応が進行している。
 このクロマトグラフから読み取れるように、この
 試料は、酵素消化に対して構造的な抵抗性があ
 って、アミノ酸に完全に分解されない。ペプチドと
 して多くが吸収されることが分かった。泳動マー
 カとして用いた分子量1355のビタミンB12は、溶
 出時間が26.5h付近であるので、酵素分解された
 試料の多くは、アミノ酸残基10数個以上のペプチ
 ドになると判断された。そして、この分解ペプチ
 ドの画分を、XTTでの細胞増殖活性で調べた結果
 を図5に示した。棒グラフがIGF-1と同等の活性値
 を示す量として表示した。依然として分画番号2
 (F. 2A)付近に増殖活性とさらに分画番号6(F. 6A)
 付近と分画番号9(F. 9A)付近に活性の残ることが
 分かった。折れ線はインスリンに換算したした時
 のペプチド量で、ゲルクロマトグラフと一致して
 いる。

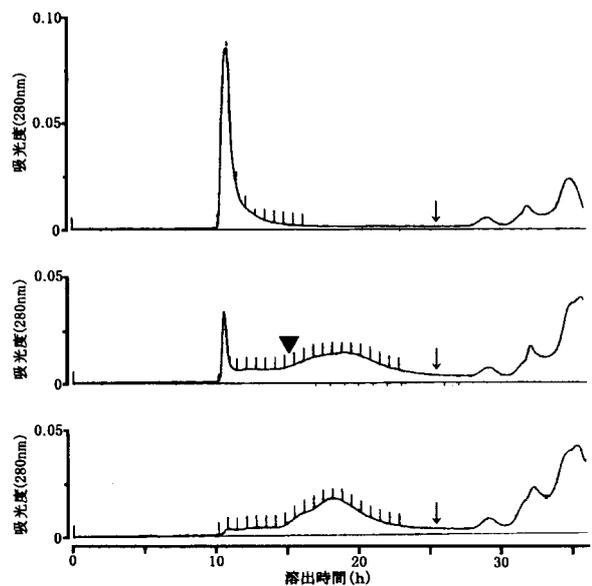


図4 ペプシン消化によるペプチドの生成を示すゲル
 クロマトグラフの比較

冷凍ホタテ貝の酢酸抽出成分の再精製と酵素消化による
 分画分子量の変化を示す。上段は、酵素消化前のクロマ
 トグラフ。中段はペプシン消化4時間の場合で、阻害剤
 により酵素反応を止めてある。下段は、阻害剤の使用が
 ない。カラムの溶出時間もさらに消化が進行している場
 合である。注入蛋白質量は同じ、面積では、ほぼ同等で
 低分子化しているのが判る。↓印は分子量1355 (V. B12)
 の溶出位置。グラフ中段の▼は、分画番号F. 9Aに当たる。
 この▼付近に高いIGF-1活性が認められた。

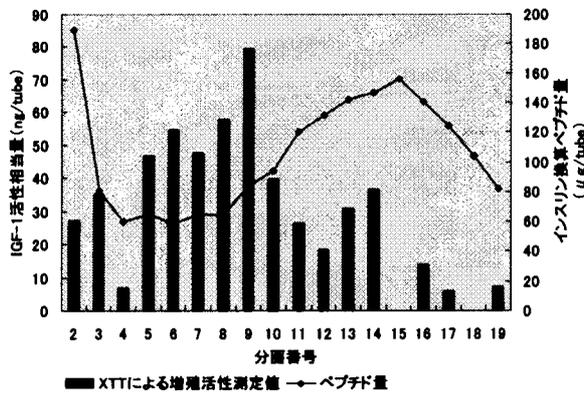
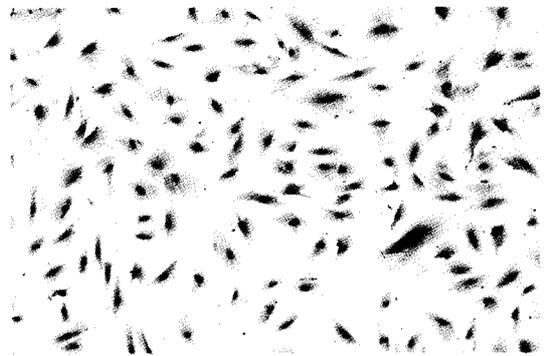


図5 ペプシン消化ペプチドのヒト骨牙細胞の増殖活性
 図4のクロマト上の▼が分画番号9 (F.9A) である。分画番号15付近はペプチド量多いが、増殖活性はない。

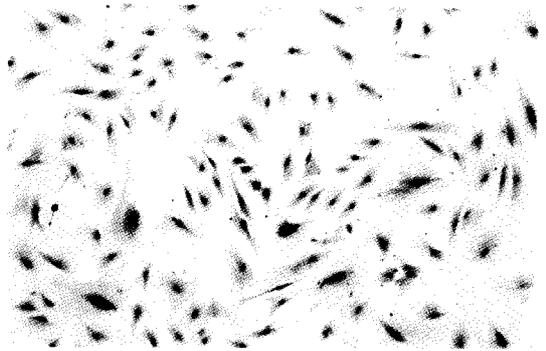
類骨の観察では、写真4に示したように、ホタテガイの分画番号9 (F.9A) と共に培養した場合、紫赤色がやや強いが、分画番号15 (F.15A) と共に培養した場合、赤桃色がやや強くなる。どちらも、骨牙細胞の成長は、正常であった。XTTでは、F.15Aは、IGF-1活性は無いという結果であるが、染色の結果からは、類骨の形成が進むと見られる。図5に示す分画全体として、骨牙細胞の生育密度など観察結果は良好で、このホタテガイの成分が骨の形成に有効であることを示していると考えられる。

4. 考 察

クロマトグラフィ、電気泳動、ペプチドマッピングや間接抗体法の結果から、インスリン様成長因子ときわめて良く似た性質のペプチドが、ホタテガイに存在することが明らかになった。しかも、そのペプチドの性質として、正常ヒト骨牙細胞に増殖活性を示し、類骨の形成作用があることも分かった。そして、消化酵素に分解抵抗性を示し、経口で効能を発揮する可能性があることが注目し値する。しかも、HPLCの分析から、骨牙細胞への増殖活性を示す成分の構成が複数ある可能性がある。また、ウェスタンブロットでペプチドの同定を試みたが、ヒトIGF-1と同一であるという結果は得られなかった。ということは、外来性のヒトIGF-1の持つ作用や血中濃度の維持についての問題が生じないという利点が発見される余地を残し



F.9A のペプチドと培養した結果



F.15A のペプチドと培養した結果

写真4 ヒト骨牙細胞への類骨形成の観察

どちらも骨牙細胞の成長は、正常。XTT では、F.15A は、IGF-1 活性はないという結果であるが、微妙に赤桃色が強く類骨の形成が進むと見られる。

ている。

骨の成長や骨粗鬆症の問題を解決するためには、かなり全体的な骨の成長因子¹⁷⁾ と骨の形成を取り巻くホルモンのバランスやカルシウム、ビタミンDやKなど栄養素の循環環境^{18), 19), 20)} を考慮する必要がある。しかしながら、ホタテガイの持つ食品としての機能性を考えたとき、この骨牙細胞への増殖効果をもたらすIGF様のペプチドが含まれていることは意義深く、食品素材としての優れた特徴を示す結果であった。近年、健康に老いるという命題がますます重要視されているなか、この結果は、骨粗鬆症の進行を抑制する加工食品への利用を期待させる。また、ホタテガイが成長期の子供の発育を促進する食材として優れていることも示している。

参考文献

- 1) 吉田松生, 鍋島陽一:細胞工学, Vol. 14, No. 7 (1995), P781-788
- 2) 高橋伸一郎, 竹中麻子, 野口忠:蛋白質・核酸・酵素, Vol. 41, No. 3(1996), P267-280
- 3) 田中弘之:CLINICAL CALCIUM, Vol. 7, No. 4 (1997), P534-539
- 4) Marjorie E. Svoboda, Judson J. Van Wyk, David G. Klapper, Robert E. Fellows, Felix E. Griessom and Robert J. Schlueter:Biochemistry 19(1980), P790-797
- 5) Hans Marquardt, George J. Todaro, Louis E. Henderson and Stephen Oroszlan:J. Biological Chemistry, Vol. 256, No. 13(1981), P6859-6865
- 6) 青木央:第12回食品加工関係試験研究機関合同成果発表会要旨集, 北海道, (2000), P32-35
- 7) 丸尾文治, 田宮信雄監修:酵素ハンドブック, 朝倉書店(東京), (1982), P561-562
- 8) C. George-Nascimento, J. Fedor:Protein purification Applicatins -a practical approach-, IRL PRESS, Oxford University Press, (1989), P128-137
- 9) 佐々英徳:岡田雅人, 宮崎香編, タンパク質実験ノート(下), 羊土社(東京), (1996), P53-56
- 10) 中澤美紀:岡田雅人, 宮崎香編, タンパク質実験ノート(上), 羊土社(東京), (1996), P133-138
- 11) 日本生化学会編:新生化学実験講座タンパク質II, 東京化学同人(東京), (1990), P113-133
- 12) 岩松明彦:細胞工学, Vol. 16, No. 2(1997), P269-281
- 13) 鶴大典, 船津勝編:生物化学実験法31蛋白質分解酵素II, 学会出版センター, (1993), P1-6
- 14) R. J. Beyon, J. S. Bond ed:Proteolytic enzymes -a practical approach-, IRL PRESS, Oxford University Press, (1989), P206-207
- 15) 川原元:新染色法のすべて, 医歯薬出版(東京), (1999), P130-131
- 16) 山本格士:新染色法のすべて, 医歯薬出版(東京), (1999), P3-6
- 17) 松本俊夫:代謝, Vol. 28, No. 1 (1991), P27-31
- 18) 木戸慎介, 井上大輔:CLINICAL CALCIUM, Vol. 13, No. 1 (2003), P14-18
- 19) 佐藤七枝, 江指隆年:国立健康・栄養研究所編, 健康・栄養-知っておきたい基礎知識-, 第3版, 第一出版(東京), (2003), P75-76
- 20) 野村慎太郎, 東端祐司:化学と生物, Vol. 41, No. 5(2003), P293-298