

カイコフィブロインペプチド混合物の
老化マウスに対する
アンチエイジング機能の解析

2012. 3

岩手大学大学院
連合農学研究科

山本 圭一郎

目次

緒言.....	1
謝辞.....	5
第1章 カイコフィブロインペプチド混合物 (FPM) が D-galactose 誘導性	
脳老化マウスの学習・記憶能に及ぼす影響.....	6
I. 材料及び方法.....	8
1. 供試試薬.....	8
2. 電気泳動.....	8
3. アミノ酸分析.....	11
4. MALDI-TOF MS によるシルクペプチドの分子量測定.....	11
5. 実験動物.....	13
6. 薬物の調製及び投与.....	13
7. Step-through 型受動回避実験.....	15
8. Morris 水迷路実験.....	19
9. 老化誘導マウス海馬切片の神経病理学的診断.....	20
10. クレアチンキナーゼ (CK) アイソザイムによる老化改善効果の検討.....	22

11. 統計処理.....	23
II. 結果.....	24
1. フィブロインペプチド混合物の電気泳動.....	24
2. フィブロインペプチド混合物のアミノ酸分析.....	24
3. MALDI-TOF MS によるシルクペプチドの分子量測定.....	25
4. 実験動物の体重, 飲水量, 摂食量及び排泄量の推移.....	30
5. Step-through 型受動回避実験.....	30
6. Morris 水迷路実験.....	30
7. 老化誘導マウス海馬切片の神経病理学的診断.....	31
8. CK アイソザイムパターンの電気泳動による分析.....	32
III. 考察.....	43
IV. 摘要.....	46
第2章 カイコフィブロインペプチド混合物の LC-MS/MS 解析と	
D-galactose 誘導性老化マウスに対する毛質改善機能の解析.....	47
I. 材料及び方法.....	48
1. 供試試料.....	48
2. LC-MS による分子量測定およびペプチドの配列決定.....	48
3. 摩擦係数の測定.....	50

4. 体毛の観察.....	51
II. 結果.....	53
1. ESI-LC-MS によるシルクペプチドの分子量測定及び配列決定.....	53
2. 体毛の摩擦測定.....	53
3. 体毛表面の電子顕微鏡観察.....	59
4. 皮脂腺の組織化学実験.....	59
III. 考察.....	62
IV. 摘要.....	66
総合考察.....	67
引用文献.....	71

緒 言

人間と有用昆虫の関わりの歴史を紐解けば、その起源はおよそ 9000 年前までさかのぼることができる。紀元前 7000 年のものとされるスペイン東部・アラーニャ洞窟の壁画には、野生のセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) の巣から採蜜する人が描かれている。これは、我が国の縄文時代に相当する新石器時代に、すでにミツバチ生産物を利用する文化が存在していたことを示唆する世界最古の記録である。一方、ミツバチと双壁をなす有用昆虫のカイコ (*Bombyx mori*) は、5000 年前に存在した中国の殷王朝においてすでに家畜化され、養蚕業が営まれていたことが明らかになっている。我が国でも弥生時代には養蚕技術が伝わり、絹糸を被服素材として利用していたとされる (松本, 1996)。

その後、2000 年をかけて日本人はカイコの品種改良に取り組んできた。商品経済の進展した江戸時代中期には、養蚕業もめざましく発展し、カイコのみならず飼料となるクワ (*Morus alba*) の品種改良も進められた。明治時代には、我が国の養蚕業は大きな転換をむかえ、生糸は重要な輸出品となり、養蚕業・製糸業は国の基幹産業として手厚い保護を受けた (村上ら, 1992)。当時の国家総輸出額の約 50% を生糸類が占め、絹が日本の近代化を支えたといっても過言ではない。

日本の蚕糸学研究は、産業的な発展と連動するように明治期に大きく進展した。外山亀太郎博士が 1906 年に世界で初めて 1 代雑種が両親より格段に多収になることをカイコで発見し、それ以降多くの食糧生産植物・動物の品種改良で利用されてきた (小林, 1996)。また、今日生物起源農薬として用いられている BT 剤は石渡 (1901) によってカイコの卒倒菌として見つけられ、後にドイツの研究者によって命名された *Bacillus thuringiensis* が産生する毒素である。この他にも眼色・卵色を決定する化学的因子の存在、前胸腺の発見、真核生物における初めての糖アルコールの発見などが挙げられる

(鈴木, 1997).

その後、合成繊維の普及や服飾文化の変化に伴う和服離れから、絹の需要は減少し続け我が国の養蚕業は衰退の一途をたどってきた (小野, 1996).

蚕糸学研究・昆虫学研究に携わる人々は、カイコの新たな利用法の模索を求められてきた。韓国では、古来から伝わる漢方薬の知識をもとに、カイコから医薬品候補物質となる成分を探索し、その一部を健康サプリメントとして販売している。羽化直前のカイコ雄蛹抽出物には、男性の勃起不全を改善し、滋養強壮にも効果があることが明らかになり (Ryu *et al.*, 2002), ヌエグラという商品名で販売され大きな成功をおさめている。これらの研究には、国家プロジェクトとして予算が配分され、多くの博士研究者らが専従している。一方我が国では、前田らによりバキュロウイルス科に属するカイコ核多角体病ウイルスの遺伝子の一部を、ヒトの α -インターフェロン遺伝子に置換した組み換えウイルスが作製され、カイコ幼虫に注射することでインターフェロンを大量に体液中に分泌させることに成功した (Maeda *et al.*, 1985)。これは、昆虫の体を有用物質の生産工場に変えた画期的な研究である。また、最近絹を繊維としてのみでなくタンパク質素材として捉え、その化学的性質に着目した研究が進められている。絹タンパク質は物理化学的な処理で構造を自由に変化させることができ、粉末状やフィルム状に加工することも容易となった。また、含有するアミノ酸から、多様な生化学的特性にも注目され、被服素材以外の利用技術の研究開発が進められている (塚田, 1997)。

絹タンパク質は大別すると二種類のタンパク質によって構成されている。すなわち、絹の70~80%を占める繊維状のフィブロインタンパク質と、残る20~30%に相当する膠状のセリシンタンパク質である。これら二種のタンパク質については、遺伝子クローニングも行われており、一次構造はほぼ明らかにされている (Oshima *et al.*, 1977; Okamoto *et al.*, 1982)。フィブロインは分子質量が350~370kDaの巨大タンパク質で、アミノ酸組成は、グリシン、アラニン、チロシン、セリンの4種がおおよそ90%を占め

る。一方、セリシタンパク質は様々なタンパク質の複合体であると考えられており、アミノ酸組成はセリン、アスパラギン酸、グルタミン酸に富んでいる（桐村，1962）。

被服素材以外の利用技術や、紡績時に生じるくず繭の処理を研究する中で、フィブロインタンパク質のアミノ酸組成に着目し、『食べる絹』について研究する動きが生じた。栄養学的には必須アミノ酸含量が 12%と低いフィブロインタンパク質を食べる価値は見出せないが、アミノ酸組成の特殊さから生理活性機能を有していると考えられた（Chen *et al.*, 1991, 1993）。そこで巨大なフィブロイン分子を、塩化カルシウムや塩酸による酸加水分解することで低分子化した食品である、フィブロイン粉末（一般名シルクパウダー）が製造されるにいたった。フィブロイン粉末をラットに経口投与した実験がおこなわれ、その結果、血中アルコール濃度およびコレステロール濃度の低下（Chen *et al.*, 1991, 1993 ; Hirao *et al.*, 1999）、インスリン濃度の上昇を含む糖尿病の改善効果（Nahm *et al.*, 1995 ; Hyun *et al.*, 2004）、血圧の低下（Igarashi *et al.*, 2006）などが報告されている。また、認知症を予防するといわれるチロシンが 10%以上含まれることから、認知改善効果が期待され、実際マウスに経口投与した実験で効果が認められた（大内，2002）。

その後、機能性食品としてのフィブロイン研究は、韓国で著しい発展を遂げている。カイコ蛹と繭から得られたペプチド混合物である、BF-7 と呼ばれる分子量 500～5,000 のフラクションは、25 人の高齢者を対象としたヒト試験において、学習・記憶能を改善することが報告され（Kim *et al.*, 2004）、ラットを用いた実験では、アルツハイマー型認知症の原因の 1 つと考えられているアミロイド β の神経毒性から神経を保護し、また認知症患者の脳内で低下することが知られているアセチルコリン濃度を高めることも明らかにされた（Kim *et al.*, 2005）。すなわち、アルツハイマー型認知症を含む、様々なタイプの認知症に対して、フィブロインペプチド混合物が有効な素材である可能性が示唆されている。近年では、子供の認知機能や注意力を高めることも確かめられて

おり (Kim *et al.*, 2009), フィブロインペプチド混合物は年齢や動物種を超えて, 脳神経系の保護や認知機能の改善をもたらすと考えられる.

また, フィブロインの生体適合性や保湿能の高さから, フィブロイン粉末は食品分野のみならず化粧品分野にまで応用されている. ヒト皮膚繊維芽細胞は, 増殖することで肌の弾力性や保湿性を高めることが出来る細胞だが, フィブロインペプチド混合物の添加が繊維芽細胞の増殖を強めることが確認された (Yamada *et al.*, 2004).

これまでの研究で用いられたフィブロインペプチド混合物の多くは, 製造に際して塩酸を用いた酸加水分解反応が利用されている. 我が国では食品の製造過程で塩酸を使用しても, 水酸化ナトリウムで中和し, 脱塩することで塩化ナトリウムを排除出来るため, 食品の製法として認可されている. しかし, 米国食品医薬品局 FDA の基準においては, 変異原性などの観点から食品加工のプロセスにおいて塩酸を使用することは認められていない. すなわち, フィブロインペプチド混合物中から認知改善活性を有する物質を発見しても, 日本国内でしか利用できない可能性がある. そこで, 酵素加水分解をおこない, 食品用フィブロイン粉末を製造する方法の構築が試みられている.

本研究では, 第 1 章として食品工業分野で用いられているプロテアーゼ消化によって得られたフィブロイン酵素分解物, すなわちフィブロインペプチド混合物を脳老化モデルマウスに摂取させ, 行動実験系による記憶・学習能の評価をおこない, 第 2 章としてフィブロインペプチド混合物の LC-MS/MS 分析と記憶・学習能の改善以外のアンチエイジング活性についてスクリーニングをおこなった.

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始懇切なる御指導や御鞭撻を賜った岩手大学農学部農業生命課程応用昆虫学研究室教授・鈴木幸一博士，ならびに帯広畜産大学畜産学部地域環境学研究部門教授・倉持勝久博士，弘前大学農学生命科学部教授・比留間潔博士，岩手大学農学部応用生物化学課程食品工学研究室准教授・三浦靖博士に深甚なる感謝の意を表します。

さらに、実験を進める上で多大な援助を賜った岩手大学農学部獣医学課程基礎獣医学講座名誉教授・小林晴男博士，獣医病理学研究室教授・御領政信博士，応用生物化学課程生物化学研究室教授・平秀晴博士，准教授・山下哲郎博士，工学部機械システム工学科教授・岩淵明博士，助教・内舘道正博士，地域連携推進センター客員教授・首藤文榮博士に甚大なる謝意を表します。

また、常にご指導と励ましを下さった田中弘正博士，岩手大学農学部農業生命課程応用昆虫学研究室講師・安 嬰博士，大阪大学理学研究科特任研究員・藤田幸輔博士，応用昆虫学研究室プロジェクト教員・石黒慎一博士をはじめとする研究室諸氏に深く感謝いたします。

そして、試料を提供して下さったながすな繭株式会社ファウンダー・永砂 修氏，代表取締役・堀井和輝氏に心よりお礼申し上げます。

最後に、常に惜しめない愛情で支援して下さいました両親に心より感謝いたします。

第 1 章 カイコフィブロインペプチド混合物 (FPM) が

D-galactose 誘導性脳老化マウスの学習・記憶能に及ぼす影響

マウスやラットを用いて記憶・学習を評価するための主な実験法には、受動的回避実験法、能動的回避実験法、迷路実験法、スキナー箱によるオペラント学習装置などがある。これらの実験法は、抗認知症薬の効果を評価する際に必ず用いられる。しかし、評価対象以外の要因の影響が考えられるため、行動実験では一種類だけの実験方法で効果を判定することはできない。

本研究では、文脈学習課題のステップスルー型受動的回避実験法(McGaugh & Landfield, 1970)と、主に空間記憶を調べるモリス水迷路実験法(Morris, 1981)の2つを用いることにする。

また、近年の脳神経系疾患研究においては、遺伝的に代謝経路の異常を抱えた、様々な病態モデルマウスを利用している。しかしながら、これらのモデルマウスにおいては本来の老化のメカニズム、すなわち、加齢によって神経原線維変化とそれに伴う神経細胞脱落が海馬傍回で引き起こされた結果とは異なる様相を呈している。

そこで、本研究室では本来の老化に伴う認知低下メカニズムに近い、D-galactose 誘導性脳老化モデルマウスを用い、行動実験をおこなっている。D-galactose 誘導性脳老化マウスを用いた研究は 2000 年代に入ってから中国を中心におこなわれてきた。2005 年におこなわれた Wei らの研究によると、50 mg/kg D-galactose を長期間皮下注射することで、脳老化が進行することが報告されている (Wei *et al.*, 2005)。過去の研究において、ランの一種であるアオチドリ (*Coeloglossum viride* var. *bracteatum*) のメタノール抽出物 (Zhang *et al.*, 2006) や、冬虫夏草の熱水抽出物 (Ji *et al.*, 2009; Tsushima *et al.*, 2010) を投与した D-galactose 誘導性脳老化マウスの

脳機能が行動実験や形態学的な手法により、回復していることが確認できた。

本章では、フィブロインペプチド混合物 (FPM) を D-galactose 誘導性脳老化モデルマウスに投与し、*in vivo* での脳神経系へ影響を評価するために行動実験をおこなった。また、行動実験に先立ち FPM の成分分析をおこなった。

I. 材料及び方法

1. 供試試料

FPM はながすな繭株式会社から提供されたものを使用した。

具体的には、カイコ繭を 5 mm 角に粉碎した後、綿状に加工し、3 時間煮沸して加熱溶解させた。一夜放置した後、加水し、重量対比 2.5 倍量にした。これに、タンパク質分解酵素である市販の食品加工用アルカリプロテアーゼを加えて、pH 9~10 の弱アルカリ性、反応温度 48°C~51°C、反応時間は 16 時間以上で分解した後、置換剤（リン酸）を添加し、一夜放置した。その後、プレスろ過し、減圧濃縮法で 500~650 mmHg の範囲に圧力を調節しながら濃縮した。得られた濃縮物を食添用活性炭で脱色し、灰分 6% 以下まで脱塩し、pH を 4.8~5.0 に調整した。さらに、120°C で殺菌し、スプレードライ加工することでパウダー状のシルクペプチド（水分 8% 以下、灰分 6% 以下、粗タンパク 85% 以上）を得た。FPM は、使用するまで乾燥剤を入れたデシケーターに入れ、室温で遮光保存した。

2. 電気泳動

1) BCA 法によるタンパク質の定量

1. の FPM 中のタンパク質濃度を求めるため、BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce 社) を用い、添付されたプロトコルに従い、試料溶液を調製した。37°C で 30 分間反応させた後、波長 562 nm における吸光度を測定し、ウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質溶液を用いて作成した検量線から、FPM 溶液の

タンパク質濃度を算出した。

2) TCA 沈殿と重量法によるタンパク質の定量

FPM 1 g をマイクロチューブに秤量し、MQ で最終容量を 1 ml に調製した。同様に MQ で調整した 0.15%(w/v) デオキシコール酸ナトリウム (Wako) 溶液 100 μ l を FPM 溶液に添加し、混和後、室温で 10 分間静置した。100%(w/v) のトリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を 100 μ l 添加し、ボルテックスした。これを室温で 5 分間静置した後、マイクロ遠心機を用いて、15,000 \times g、室温で 15 分間遠心分離した。ペレットを乱さないように、注意深くサンプルの上清をパスツールピペットで除去し、冷アセトンでペレットをよく洗い、予め秤量した定性ろ紙 No.2 (ADVANTEC) 上に回収した。これを 60°C の乾燥機内で乾燥させ、乾いたろ紙とペレットの重量を測定し、事前に測定したろ紙の重量との差をタンパク質量として求めた。

3) トリシン SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Trisine SDS-PAGE)

タンパク量が 5 μ g と 25 μ g になるよう、FPM 試料溶液を 2 \times サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 8 % SDS, 24% glycerol, β -mercaptoethanol, 0.04% Serva blue G) と 1:1 の体積比で混合し、100°C で 3 分間熱処理した。泳動用ゲルは、Schagger and von Jagow (1987) の方法に準じ、16.5% T, 6% C 分離ゲル (15.5% acrylamide, 1% BIS, 1 M Tris-HCl pH 8.45) に、4% T, 3% C 濃縮ゲル (3.9% acrylamide, 0.12% BIS, 0.75 M Tris-HCl pH 8.45) を重層した垂直型平面ゲル (7.5 cm x 9.0 cm) を用いた。電気泳動槽 (AE 6500, ATTO) にゲルを

セットし、陽極用電極液 (0.2 M Tris-HCl, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS) 及び陰極用電極液 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS) を満たした。ゲルに試料を添加し、定電圧 (濃縮ゲル 30 V, 分離ゲル 100 V) で泳動をおこなった。色素がゲルの下端まで到達した時点で通電を停止した。泳動後のゲルの銀染色は Modified Oakley's Method (井上ら, 1986) に従っておこなった。

4) Blue Native-PAGE (BN-PAGE) 電気泳動

Blue Native-PAGE 電気泳動は、タンパク質の高次構造や複合体構造を維持したまま、分子全体の大きさによる分離をおこなう電気泳動法の1つである。NativePAGE™ビストリスゲル (Invitrogen 社) を袋より取出し、ゲルカセット外側をキムワイプでよく拭いた。外側の板に、白色マジックを用いて各レーン位置を示す線を標識した後、ゲルカセットの白色テープを剥離し、泳動槽にセットした。MQ 200 ml, ランニングバッファー (Invitrogen 社) 1 ml, カソードバッファー添加剤 (Invitrogen 社) 1 ml を混合して調製した青色の陰極バッファーを、ゲル板とダミー板で挟まれたスペースに注ぎ、MQ 400 ml, ランニングバッファー 2 ml を混合して調製した無色透明の陽極バッファーをゲル板の外側、少なくともゲル板の半分の高さまで注いだ。泳動用試料は、4 × サンプルバッファー (Invitrogen 社) 2.5 µl, 5% ジギトニン (Invitrogen 社) 2.0 µl, G-250 Sample Additive (Invitrogen 社) 0.5 µl を混合したものに、FPM 溶液を 5.0 µl 添加し、終濃度 60 µg/10 µl に調製した。分子量マーカーには、NativeMark (M.W. Range 1,236,000 ~ 20,000, Invitrogen 社) を使用した。サンプルとマーカーをロードした後、泳動槽にパワーサプライを接続し、150 V 定電圧, 30 mA の条件で通電を開始した。120 分後、パワーサプライを停止し、ゲルを切り出した。これを 100 ml の固定液

(40%メタノール, 10%酢酸)に浸した。電子レンジで45秒温めた後, シェーカーで室温, 5分震盪し, 固定液を捨てた。続いて, 100 mlの脱色液(8%酢酸)を加え, 再度電子レンジで45秒温めた。その後, バックグラウンドが鮮明になるまでシェーカーで震盪した。

3. アミノ酸分析

FPM 1 mg を, 6 N 塩酸 1 ml に混合溶解し, 1.0 mg/ml になるように調製した。混合液をミニバキュームチューブ ($\phi 10 \times 150$ mm, Pierce) に移し, アスピレーター (EYELA A-3S, 東京理科器械) を用いて真空状態にした。これをドライサーモユニット (DTU-2C, TAITEC) 中で 110°C , 24 時間加熱分解し, 室温に戻ったところでチューブを開栓して常圧に戻した。その後, 予め P_2O_5 と NaOH を入れておいたデシケーター内に, すみやかにチューブを移し, 真空乾燥した。乾燥したサンプルは Lithium citrate サンプルバッファー (pH 2.2) 1 ml で溶解し, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター (Millipore) でろ過した。ろ液をサンプルバッファーで 10 倍希釈したものを分析サンプルとし, アミノ酸アナライザー (JLC-500/V, 日本電子) に注入し, アミノ酸組成を測定した。

4. MALDI-TOF MS によるシルクペプチドの分子量測定

1) 中圧液体クロマトグラフィーによるシルクペプチドの精製

FPM に含まれるペプチドの分子量を測定するため, 中圧クロマトグラフィーシステムの一つである ÄKTA purifier 10/100 システム (GE ヘルスケアサイエンス)

による精製をおこなった。ノート PC にインストールされた専用の解析ソフトウェア UNICORN 5.11 (Build 407) で分離プログラムを構築し、ペプチドの検出には、UV モニター (UV-900) を用いて 215 nm と 280 nm の 2 波長でおこなった。溶出液は、自動フラクションコレクター (Frac-920) で分取した。ノート PC 以外の一連の機器は 4°C の低温室内で操作した。

FPM を 0.1 M 酢酸に溶解し、1 mg/ml に調製した。孔径 0.22 μm のフィルター (Millex®-GV, MILLIPORE) でフィブロインペプチド混合物溶液をろ過後、ゲルろ過カラムである Superdex peptide 10/300 GL (GEヘルスケアサイエンス) を用いて分離した。サンプル溶液を ÄKTA システムに 250 μl インジェクトし、溶離液には 0.1 M 酢酸を用い、流速は 0.5 ml/min, 1 サイクル 1 時間のプログラムで分離をおこなった。溶出液は 1 ml ずつ分取し、MALDI-TOF MS で分子量を測定した。

2) MALDI-TOF MS による分子量測定

ゲルろ過で分離したフラクション 18~20 の 3 画分について、MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometers) 質量分析機 (Voyager RP BioSpectrometry; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) を使用し、ペプチドの分子量を測定した。陽イオン化マトリクスとして、0.1% TFA を含む 50% アセトニトリルに飽和させた 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) を同じ組成の溶媒で 3 倍に希釈し、Hillenkam ら (1991) の方法に準じ測定した。

5. 実験動物

5 週齢の C57BL/6J 雄マウス (21.10 ± 2.52 g) を日本 SLC から購入し, Normal Control (NC), Aging Control (AC), 1.0%(w/w)フィブロインペプチド混合物 (FPM 1.0%) 群, 2.0%(w/w) フィブロインペプチド混合物 (FPM 2.0%) 群の 4 群に分け, 1 ケージにつき 5 ~ 6 頭を多頭飼育した. マウスは 12 時間明, 12 時間暗 (照明点灯時間: 7:00 ~ 19:00), 室温 24 ± 1°C の条件下におき, 餌 (MEQ, オリエンタル酵母社) と水を自由に摂取させた. ケージ内のマウスを個体識別するために, 小動物イヤーパーチ (室町機械) で各個体の耳に穿孔した. マウスを 10 日間飼育環境に慣れさせてから, Fig. 1 に示すスケジュールに従って実験を開始した. 実験開始後は体重を毎日, 摂食量及び飲水量を隔日, 排泄量 (床敷の重量) を週に 2 回計測した. 本研究は, 動物愛護法並びに実験動物のケア及び使用に関するガイドラインに従うとともに, 岩手大学動物実験委員会の承認を受け, おこなわれた.

6. 薬物の調製および投与

1) D-galactose の過剰投与による脳老化の原理

マウスに長期にわたり D-galactose を投与することにより, 生体内の老化が誘導されることが知られている (Wei *et al.*, 2005). マロンジアルデヒドの増加, グルタチオンペルオキシダーゼとスーパーオキシドジスムターゼの減少による脳内の酸化ストレスが示唆されており (Gong *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 2003), これらの酸化ストレスは脳老化の重要なファクターの 1 つである (Droge, 2003). 50 mg/kg 体重/日, 100 mg/kg 体重/日, 200 mg/kg 体重/日の各濃度にな

るよう調製した D-galactose 溶液をマウス (C57BL/6J 系統) に皮下注射すると、50 mg/kg 体重/日で明確な老化・記憶障害と運動能力の低下が起こり、100 mg/kg 体重/日以上での投与では運動能力が低下することが報告されている (Wei *et al.*, 2005). 一般に記憶・学習能を判定するためにおこなう行動実験において、運動能力が低下する薬剤を使用することは正確な評価を困難にするため、好ましくない。本研究室の C57BL6/J 系統を用いた行動実験において、D-galactose 溶液を 100 mg/kg 体重/日の濃度で 8 週間皮下注射したにもかかわらず、運動能力の有意な低下は認められなかった (Tsushima *et al.*, 2010). そこで、本研究では実験動物への D-galactose 投与量は 100 mg/kg 体重/日とした。

2) D-galactose 誘導性脳老化モデルマウスの作成

AC 群, FPM 1.0%群, FPM 2.0%群の 3 群のマウスに対して、脳の老化誘導を目的として、100 mg/kg 体重/日の D-galactose 溶液を 8 週間皮下注射をした (Fig. 1). 一方、対照区として NC 群に生理食塩水を 8 週間、皮下注射した。注射期間中は全群同じ餌 (MEQ, オリエンタル酵母社) と滅菌水を与えた。

3) フィブロインペプチド混合物の投与

8 週間の皮下注射後、FPM 1.0%群では滅菌水を用いて溶解した 1%(w/w)フィブロインペプチド混合物溶液を、FPM 2.0%群では同様に 2%(w/w)フィブロインペプチド混合物溶液を行動実験終了時までの 7 週間自由に摂取させた。一方、NC 群と AC 群にはペプチド混合物を含まない滅菌水を与え続けた。

7. Step-through 型受動回避実験

1) 装置

装置（小原医科産業）は逆台形型の明室と暗室（明室：上面 100 x 130 mm，底面 42 x 130 mm，高さ 90 mm，暗室：上面 100 x 160 mm，底面 42 x 160 mm，高さ 90 mm）の二室から構成されている。二室の床は，ともに直径 2 mm のステンレス棒が 6 mm 間隔で並べられているが，暗室の床のみ通電される。また，二室は実験者が上下に自由に開閉できる仕切りドアで隔離されている（Fig. 2）。明室のみ白色蛍光灯（15 W）で照らされており，暗室内にはマウスの入室を検知するための赤外線センサーが設置されており，暗室への進入までに要した時間（反応潜時）の計測や電気刺激発生トリガーに用いた。

2) 手順

本実験の前にマウスの異常個体を選別するために，前獲得試行をおこなった。Step-through 型受動回避実験は，マウスの負の走行性を利用したものであるため，明室におかれたマウスが 60 秒以上明室にとどまるようであれば，異常個体と判断し，実験に使用しなかった。前獲得試行は，仕切りドアを開けたままマウスを明室に入れ，暗室に入るまでの時間を測定した。

実験 1 日目に前獲得試行をおこない，その後獲得試行をおこなった。獲得試行は，仕切りドアを閉めた状態でマウスを明室に入れ，30 秒後に仕切りドアを開け，マウスが暗室に入るまでの時間（反応潜時）を測定した。マウスの後ろ足が暗室に入った，または暗室の中の赤外線センサーに反応した時点で，仕切りドアを閉め，

0.3 mA の電気ショックを 4 秒間与えた。

実験 2 日目（獲得試行から 24 時間後）に再生試行をおこなった。再生試行は獲得試行と異なり、電気ショックを流さなかった。それ以外の操作は、獲得試行と同様におこなった。反応潜時は最大 300 秒として計測した。

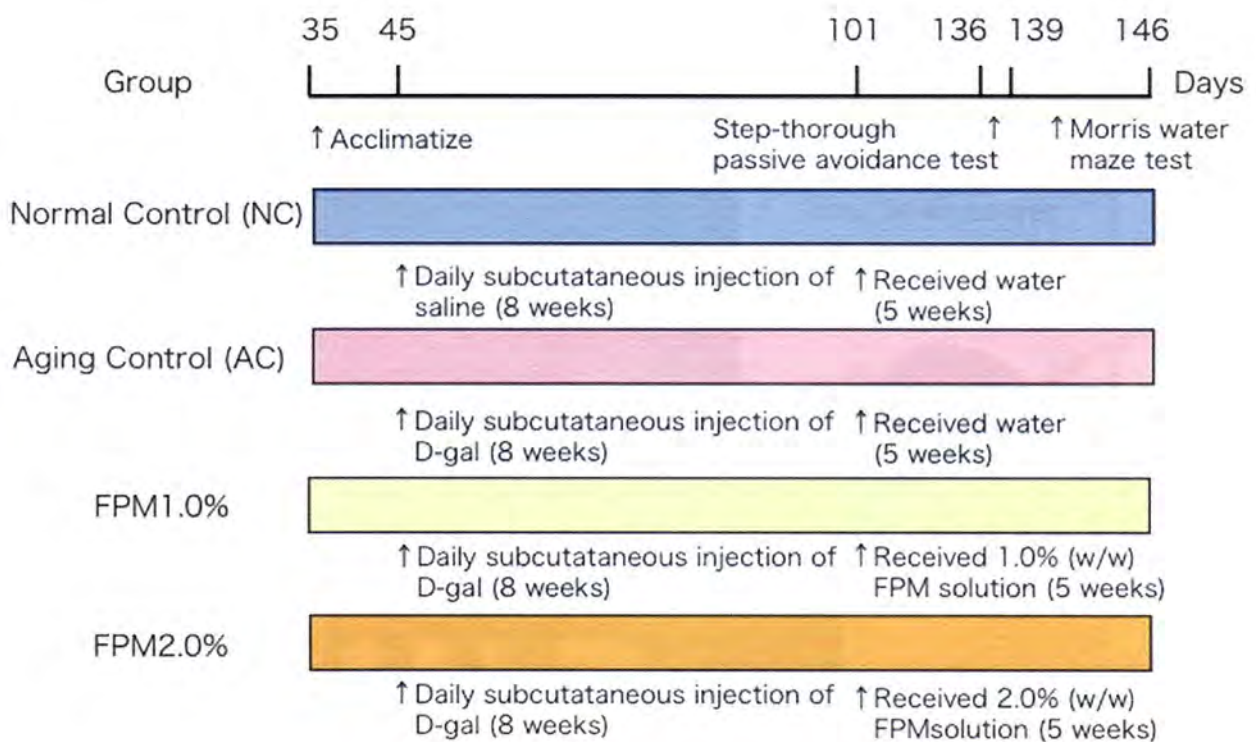


Fig. 1. An experimental schedule of behavioral studies performed by step-through passive avoidance and Morris water maze tests. Brains were promptly dissected and used for assay after two behavioral studies.

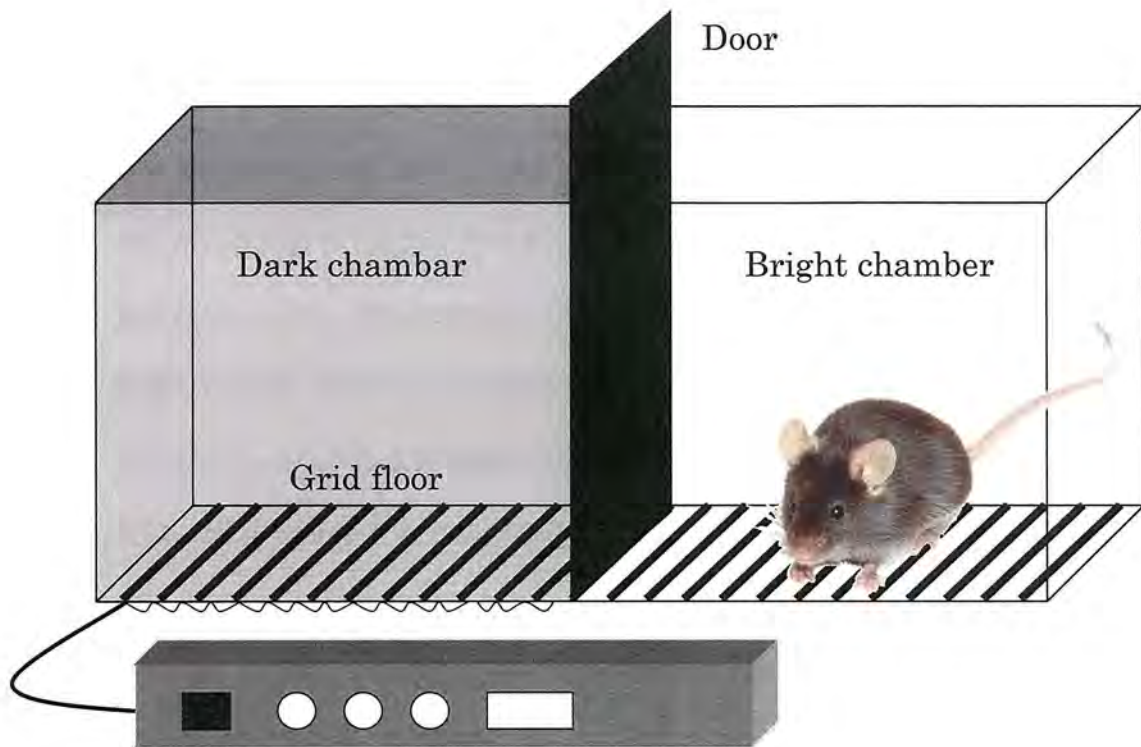


Fig. 2. Equipment of a passive avoidance test. The apparatus consists of a chamber illuminated (top ; $300 \times 98 \times 90$ mm, bottom ; $120 \times 42 \times 90$ mm) by fluorescent light of 15 W and dark chamber ($180 \times 125 \times 115$ mm). The floor of the cage was made of metal rods, spaced at 6 mm. When a mouse entered the dark chamber, the door between two chambers was closed and foot shock (0.3 mA, 4 sec) was delivered through the grill floor of the dark chamber. The presence of the passive avoidance was 24 h later. The mouse was placed on the illuminated chamber once more and the latency to enter the dark chamber was measured with the cutoff time of 300 sec.

8. Morris 水迷路実験

1) 装置

装置は Fig. 3 に示した円形プール（直径 100 cm, 深さ 30 cm）を用いた。このプールに深さ 20 cm まで水（25 ± 1°C）を入れ、透明なプラットフォーム（高さ 19 cm）が水面下に沈むようにセットした。プラットフォームが水泳中のマウスに見えないように、市販のポスターカラーでプールの水を白濁させ、プールの上方に設置した白黒 CCD カメラで認識できるようにした。コンピュータとカメラは連動しており、マウスの水泳軌跡を 0.5 秒間隔で保存した。水泳軌跡の記録と画像解析は、NIH Image をもとに作られた Image WMH 2.08（小原医科産業）を使用した。

2) 手順

Morris 水迷路実験は 9 日間、毎日同じ時間から開始した。1 日目にマウスをプールに慣れさせるため、各々 1 回ずつ 1 分間泳がせた。その際、プラットフォームに高さ 10 cm の目印をセットし、マウスにプラットフォームの存在を認識させた。また、マウスをプールに入れる際、コンピュータに指示されたポイントから壁向きに入水させ、実験者は速やかにマウスから見えない位置に退避した。マウスが 60 秒以内にプラットフォームに到達したとき、その場で 15 秒間静置させた後救出した。60 秒間の水泳でプラットフォームに到達できなかった場合、実験者の手でマウスをプラットフォーム上に移動させ、その時点から 15 秒間静置させた後救出した。

2 ～ 8 日目は、マウスにプラットフォームの位置を記憶させるトレーニングをおこなった。トレーニングはマウス 1 匹につき連続して 1 日に 4 回おこなった。トレーニングの方法は、1 日目の操作と同様におこない、プラットフォームに到達した時間を記録した。なお、60 秒で到達できなかった場合は、到達時間を 60 秒とした。

9 日目にプローブテストをおこなった。プローブテストはプールからプラットフォームを取り除き、マウスを 60 秒間泳がせ、元々プラットフォームがあった場所を横切った回数 (Crossing)、平均水泳速度、そして、各 Quadrant (円形のプールの 4 分円) の滞在率を測定した。また、プローブテストは 1 匹につき、1 回ずつおこなった。

9. 老化誘導マウス海馬切片の神経病理学的診断

病理診断では、空間記憶に関わる海馬の CA1 野を中心に観察することを目的として、脳を左右の半球に二分割した上で、切断面に平行に薄切した標本を用いた。具体的には、行動実験終了後、ジエチルエーテルで深麻酔下のマウスを解剖ばさみで断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は直ちに 0.1 M 冷 PBS 中で洗浄し、4 %PFA/PBS (pH 7.4) 溶液中で 4 °C、overnight 固定した。以下の標本作製は、岩手大学農学部獣医学課程・御領政信准教授に依頼した。全ての脳サンプルは、一般的な方法に従ってパラフィンワックスに包埋し、マイクロトームで薄切した後、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色法とホルツァ染色法により染色した。なお、H-E 染色法は核染色の一種であり、ホルツァ染色は損傷神経再生を阻止するグリオーシス (神経膠症) 観察を目的とした染色法である。

作製した切片は、光学式倒立顕微鏡 (OLYMPUS, BH-2, 対物レンズ倍率: ×4, ×20) に接続したデジタルカメラで撮影し、診断をおこなった。

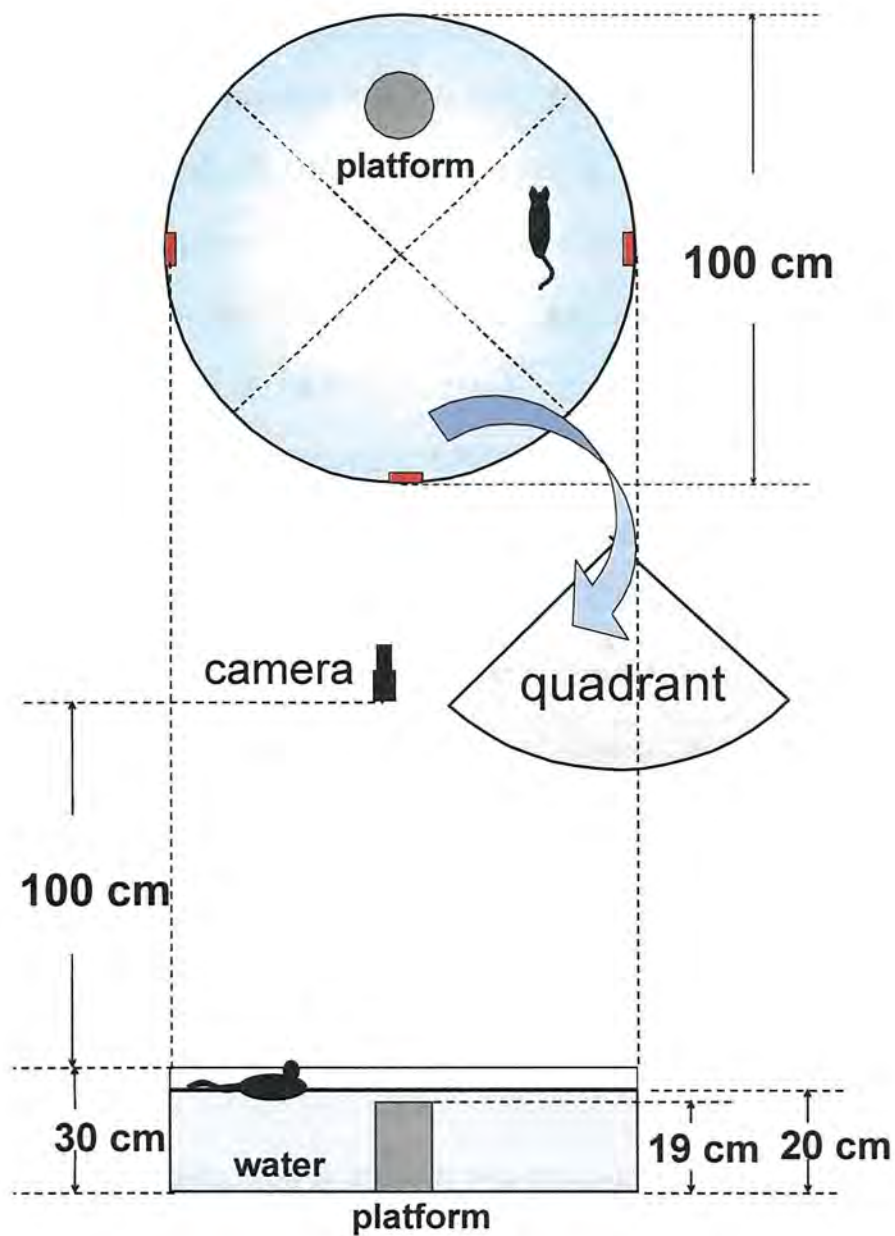


Fig. 3. Equipment of Morris water maze. The pool was filled to depth of 20 cm, so that the mouse could either escape over the edge of the tank nor balance its tail on the bottom of the tank. White paint was added into the water and the temperature controlled at $25 \pm 1^\circ \text{C}$. A video camera was mounted above the tank. Red rectangles indicate start location.

10. クレアチンキナーゼ (CK) アイソザイムによる老化改善効果の検討

上記各群 4 匹のマウスから採血をおこなった。採血は、エーテル麻酔後、注射針をつけた 1 mL シリンジを用いた心臓尖刺法によりおこない、さらに血液から血清を分離した。そして、上記各群のマウスの血清中の CK アイソザイムを測定した。

ここで、CK は 2 つのサブユニットからなる二量体のタンパク質であり、このサブユニットには B (脳型) と M (骨格筋型) がある。この組み合わせによって、CK-MM, CK-BB, CK-MB のアイソザイムとして存在することが知られている。電気泳動において、3 つのアイソザイムは等電点の違いによって、陽極側から CK-BB, CK-MB, CK-MM に分離することができる。そして、各アイソザイムは、主として、CK-BB は脳および平滑筋に、CK-MB は心筋に、CK-MM は骨格筋および心筋に存在し、例えば、老化に伴う脳障害が起こった場合には、CK-BB が血液中に漏出することが予想されるため、上記各群のマウスの CK-BB の値を測定することで、フィブロインペプチド混合物による老化改善効果を評価することができる。

具体的な測定方法は、株式会社ヘレナ研究所製タイタンジェル CK (QG) に添付のプロトコルに従って電気泳動を行い、発色試薬によるパターンをデンストメーターによって測定した。

次に、CK の総活性に対する CK-BB の比率を比較した。一群 4 頭とし、CK-BB Ratio(%) = $BB / (BB + MB + MM) \times 100$ として数値化することで、フィブロインペプチド混合物による効果を検討した。

11. 統計処理

マウスの体重等, Step-through 型受動回避実験と Morris 水迷路実験において, JMP® 8 (SAS Institute Inc.) を用いて, 分散分析 (ANOVA) をおこなった. その結果, 有意差が認められた場合のみ Dunnett の方法で事後検定 (Post-hoc test) をおこなった.

II. 結果

1. フィブロインペプチド混合物の電気泳動

ながすな繭提供のフィブロインペプチド混合物 (FPM) を MQ 水に溶解し, BCA 法によりタンパク質を定量した. その結果, サンプル乾燥重量に対して 54.1% がタンパク質であると算出された. この結果を元に Tricin SDS-PAGE を試みたところ, 全くバンドが検出されなかった (Figs. 4A and B). これは, フィブロインが非常に偏ったアミノ酸を持っているために, 比色法によるタンパク質定量が正確におこなえない結果だと考えられた (Bensadoun *et al.*, 1976). そこで, 重量法によるタンパク質の定量を試みた. その結果, タンパク質量は乾燥重量に対して 1 ~ 2% であることがわかった. すなわちフィブロインタンパク質の 98% 以上がペプチドに分解されていると考えられた. 重量法の結果に基づき, Blue Native-PAGE をおこなったところ, 約 60 kDa の位置にタンパク質と思われるバンドが確認された. 本来, ペプチドの分析が可能な Tricin SDS-PAGE でバンドが検出されなかったのは, 酵素分解が進み, 個々のペプチドの濃度が低かったためだと考えられる. また, Blue Native-PAGE では重量法の結果から FPM の乾燥重量ベースで考えると高濃度のサンプルを流したことで, わずかに含まれていたタンパク質が検出できたものと考えられる.

2. フィブロインペプチド混合物のアミノ酸分析

FPM を 6 N 塩酸で酸加水分解し, アミノ酸組成を分析した. その結果, 多量に含まれるアミノ酸としてグリシン 42.7%, アラニン 28.6%, セリン 9.8%, チロシン 4.5% が

検出された。カイコフィブロインタンパク質そのものを、同様に酸加水分解した結果と比較したところ、ほぼ同様のアミノ酸組成が得られた。ただし、FPM においてプロリン、システイン、メチオニン、ヒスチジン、リジン、トリプトファンは検出することができなかった (Table 1)。これは、元々フィブロイン中の含有量が 0.5%以下のアミノ酸群であったためであると考えられる (Shimura *et al.*, 1976)。また、この偏重したアミノ酸組成を示す結果は、1. の電気泳動の結果を支持すると考えられる。

3. MALDI-TOF MS によるシルクペプチドの分子量測定

2. の結果を踏まえて、AKTA purifier 10/100 システムに、ゲルろ過カラムである Superdex peptide 10/300 GL カラムを接続し、FPM 中のペプチドの精製を試みた。その結果、シルクペプチドは推定分子量 200 ~ 3,000 の範囲に広く分布していることが明らかになった (Fig. 5)。これは、FPM の製造過程で用いられた酵素分解の結果として想定される範囲内であった。

得られた 31 フラクシヨンの内、MALDI-TOF MS で分析が可能と考えられる分子量 700 ~ 3,000 程度のペプチドにターゲットを絞り、フラクシヨン 18 ~ 20 の 3 つのフラクシヨンを以降の測定に供した (Fig. 5, 下線部)。

DHB をマトリクスに用いた MALDI-TOF MS で分子量を測定したところ、分子量は小さい方から順に、807, 843, 879, 1143, 1255, 1604, 1674, 1731, 2079 と推定された (Fig. 6)。

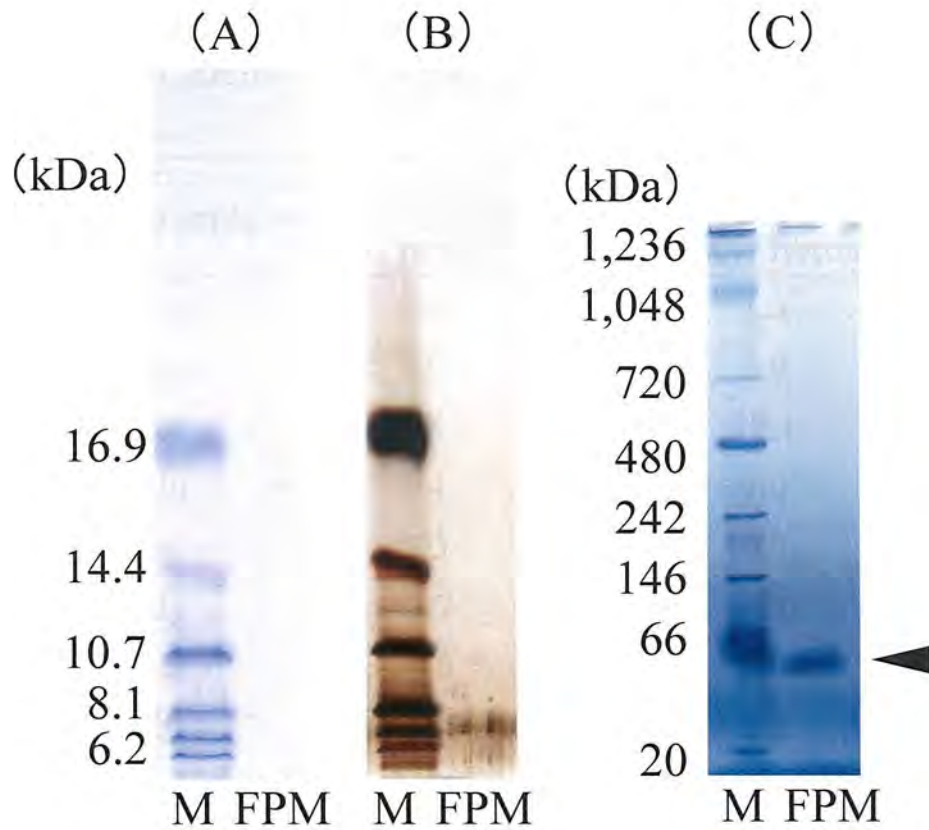


Fig. 4. Tricine SDS-PAGE and Blue Native-PAGE of fibroin peptide mixture. Tricine SDS-PAGE (A and B) : lane M, low molecular weight of peptide markers; lane FPM, fibroin peptide mixture. A, stained by CBB staining (25 μg proteins per lane). B, stained by silver staining (5 μg proteins per lane). Blue Native-PAGE (C) : lane M, NativeMark Standard; lane FPM; fibroin peptide mixture (60 μg proteins per lane). Arrow indicates 60 kDa protein.

Table 1. Amino acid composition of fibroin peptide mixture.

Amino acids	Mol %	
	Silk powder	<i>B. mori</i> fibroin ^a
Asp	1.6	1.3
Thr	1.0	0.9
Ser	9.8	12.1
Glu	1.4	1.0
Pro	ND	0.3
Gly	42.7	44.0
Ala	28.6	29.3
Val	2.2	2.2
Cys	ND	0.2
Met	ND	0.1
Ile	0.7	0.7
Leu	0.8	0.5
Tyr	4.5	5.2
Phe	0.7	0.6
His	ND	0.2
Lys	ND	0.3
Trp	ND	0.2
Arg	0.4	0.5

^a Data cited from Shimura *et al.* (1976)
 ND, Not determined.

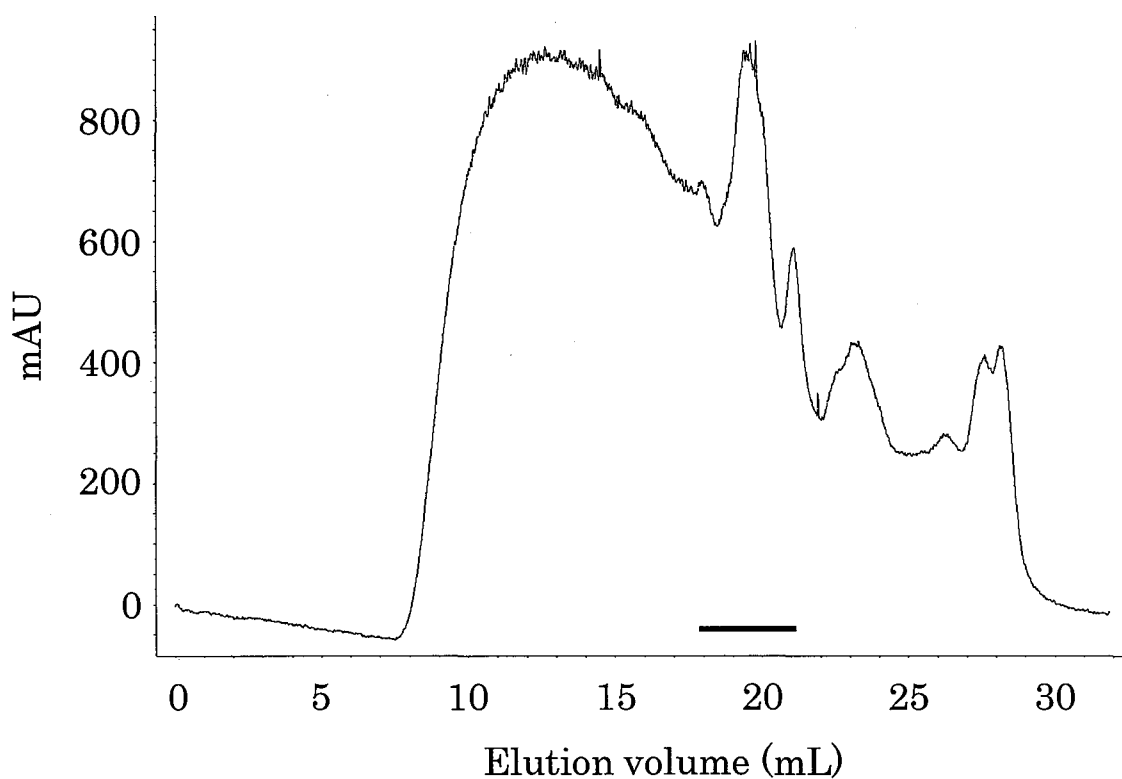


Fig. 5. Gel filtration FPLC on Superdex peptide 10/300 column of the fibroin peptide mixture solution. The fibroin peptide mixture was dissolved in 0.1 M acetic acid and separated by fast protein liquid chromatography (FPLC; ÄKTA purifier, GE Healthcare) at 4° C with 0.1 M acetic acid at a flow rate 0.5 mL/min on a column packed with Superdex peptide 10/300 GL resin (GE Healthcare) and equilibrated with the same solution. The elution profile was monitored by UV absorbance at 215 nm. Bar indicates the fraction analyzed by MALDI TOF-MS.

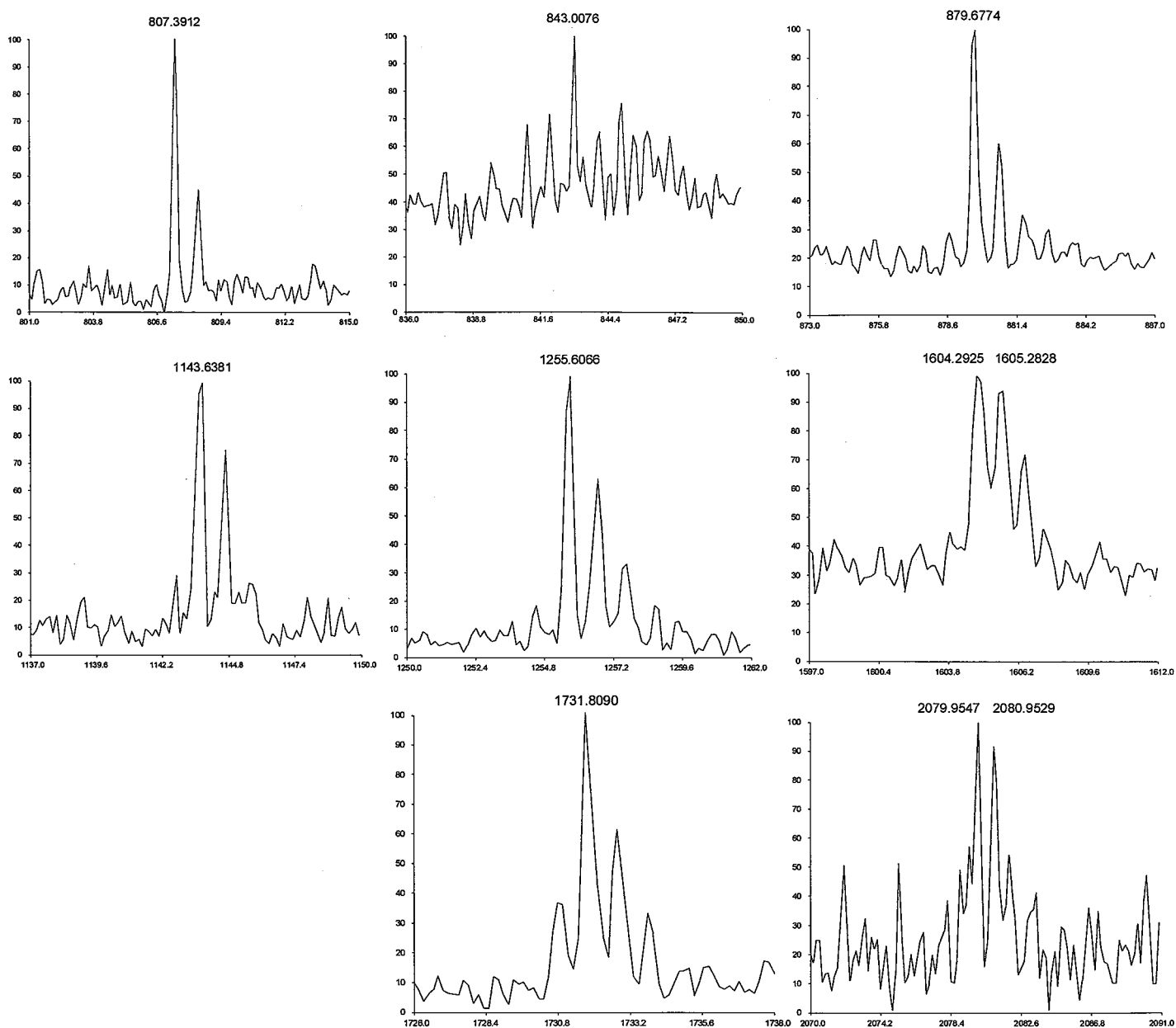


Fig. 6. MALDI TOF-MS of peptides separated by gel filtration.

4. 実験動物の体重, 飲水量, 摂食量及び排泄量の推移

45 ~ 101 日齢 (D-galactose 注射期間) と 101 ~ 136 日齢 (サンプル投与期間) での体重 (Figs. 7 and 8), 飲水量, 摂食量と排泄量 (データ省略) の推移を調べた. 分散分析 (ANOVA) の結果, いずれの期間においても 4 群間に有意な差は認められなかった. すなわち, 摂取したサンプルに対する嗜好性や, サンプルによるマウスの基本的な代謝機能には影響が出なかったと結論づけられる.

5. Step-through 型受動回避実験

4 群のマウスにおける文脈課題記憶の強度を調べるために Step-through 型受動回避実験をおこなった (Fig. 9). ANOVA の結果, 獲得試行 (Acquisition trial) 及び再生試行 (Post-shock trial) のいずれにおいても 4 群間に有意な差は認められなかった. このことから, FPM は文脈課題記憶には影響を及ぼさない可能性が考えられる.

6. Morris 水迷路実験

4 群のマウスにおける空間記憶能力を調べるために, Morris 水迷路実験をおこなった. トレーニング期間における 4 群のマウスのプラットフォームまでの平均到達時間 (Fig. 10), プローブテストにおける 4 群のマウスの Crossing 回数 (Fig. 11A), 平均水泳速度 (Fig. 11B), そして各 Quadrant の滞在率 (Fig. 12) を測定した.

トレーニング期間での各群における日数と平均到達時間の差の検定を ANOVA で解析した結果, 有意な差が認められたので, 事後検定 (Post-hoc test) をおこなった. 訓練 1 日目をコントロールとし, 訓練開始から何日目に平均到達時間が有意に短縮する

かを検定した。事後検定の結果、NC 群は3日目および5～7日目、FPM 1.0%群は3～5日目および7日目、FPM 2.0%群は5～7日目で平均到達時間の有意な短縮が認められた。

プローブテストにおいて、NC 群を除いた3群間の Crossing 回数の差を ANOVA で解析した結果、有意な差が認められたので、Post-hoc test をおこなった。AC 群をコントロールとし、どの群と Crossing 回数で有意な差が出るかを検定したところ、FPM 投与群はいずれも Crossing 回数が AC 群より有意に多くなった。さらに、プローブテストにおける各群の Target quadrant の滞在率の差を ANOVA で解析した結果、有意な差が認められたので、Post-hoc test をおこなった。Quadrant 0 (Target quadrant) をコントロールとし、それぞれの Quadrant の滞在率との間に有意な差が認められるかを検定した。Post-hoc test の結果、NC 群の Target quadrant 滞在率が他の2つの Quadrant 滞在率 (Quadrant 1 and 3) より有意に高くなり、FPM 1.0%群の Target quadrant 滞在率が他の3つの Quadrant 滞在率 (Quadrant 1, 2 and 3) より有意に高くなった。また、ANOVA の結果、プローブテストの水泳速度においては4群間に有意な差は認められなかった。

7. 老化誘導マウス海馬切片の神経病理学的診断

行動実験終了後、麻酔下のマウスを断頭し、脳を摘出した。長期記憶に関連する海馬の CA1 野・CA3 野、特にアンモン核と錐体細胞の形態に注目して観察をおこなった。HE 染色で核染色した標本を観察したところ、NC 群では錐体細胞が密に並んでいる様相が観察できた (Fig. 13)。また、核も明るい紫色に染まっていることが確認できた。これは正常な細胞の特徴である。一方、AC 群では錐体細胞同士の間には間隙が目立ち、核も暗い紫色に染まっていた。これは、D-galactose によって誘導された酸化状態によ

って、細胞が損傷を受けたためだと考えられる。FPM 投与群では、1.0%群の方が錐体細胞の染まり方が NC 群に近かった。このことから、FPM の神経細胞に対する有効濃度は必ずしも濃度依存的な挙動を示さないと考えられる。

また、過去に神経細胞の損傷があった痕跡を示す、グリオシスを判定できるホルツァ染色をおこなったところ、D-galactose 投与をおこなった全ての群において、グリオシスが観察された (Fig. 14)。NC 群のみグリオシスが全く観察されなかった。また、HE 染色の結果とは逆に、FPM 2.0%群で AC 群・FPM 1.0%群よりもグリオシスの程度が比較的低い結果となった。

8. CK アイソザイムパターンの電気泳動による分析

行動実験終了後、マウスから採血し、CK-アイソザイムの分析をおこなった。NC 群では、CK-BB について、すべてのマウスでほぼ均一な濃さの発色パターンが確認されたのに対し、AC 群では、NC 群に比べ相対的に濃い発色パターンが確認された (Fig. 15)。これは、AC 群に老齢性の脳疾患（脳機能障害）が生じていることを示している。

そして、FPM 群では、AC 群と比較して、CK-BB の発色パターンが薄くなったことが確認され、さらに FPM 群では、NC 群と同程度にまで、CK-BB の発色パターンが薄くなったことが確認された。すなわち、フィブロインペプチド混合物の投与によって、AC 群で確認された脳疾患が改善されたことを示している。

AC 群では、NC 群に対して CK-BB の比率が増加しており、脳疾患が生じていることが確認される。一方、FPM 1.0%群、FPM 2.0%群では、AC 群と比較して CK-BB の比率が抑制されている。これは、フィブロインペプチド混合物の投与によって、AC 群で確認された脳疾患が改善されたことを示している。

このように、クレアチンキナーゼ (CK) アイソザイムによる評価によって、老齢性

の脳疾患をフィブロインペプチド混合物によって改善することができることが示された。

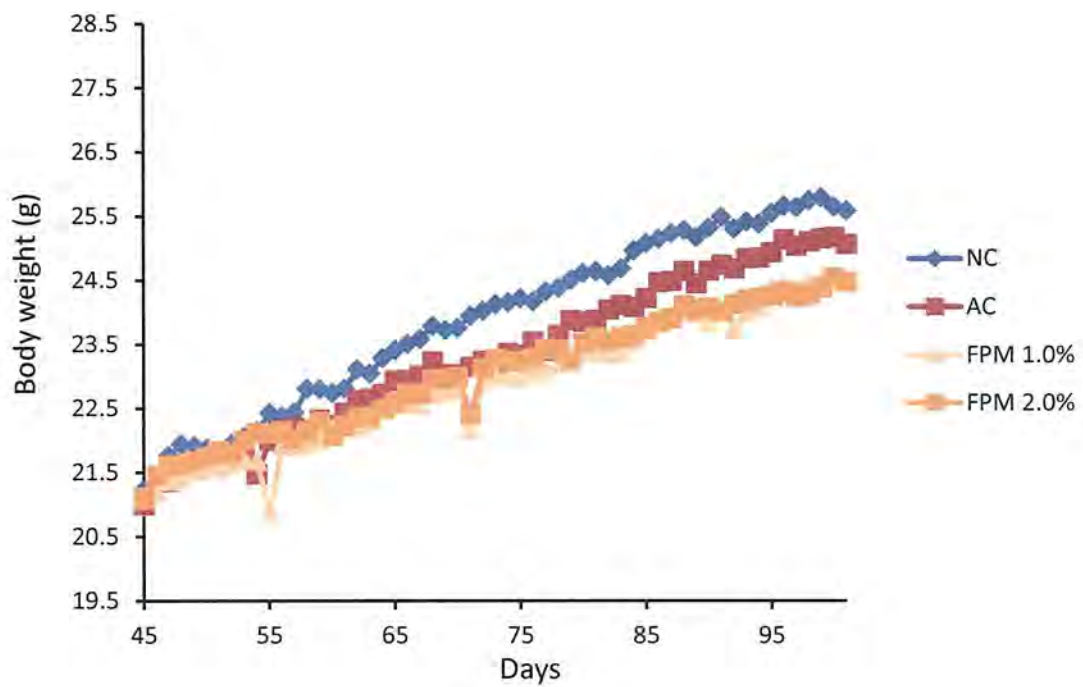


Fig. 7. Body weights of four groups in mice aged from 45 to 101 days. Blue bar, NC group (n = 16); Red bar, AC group (n = 16); Yellow bar, FPM 1.0% group (n = 16); Orange bar, FPM 2.0% group (n = 16). They were measured everyday. Weight was not significantly different among four groups by ANOVA ($P < 0.05$).

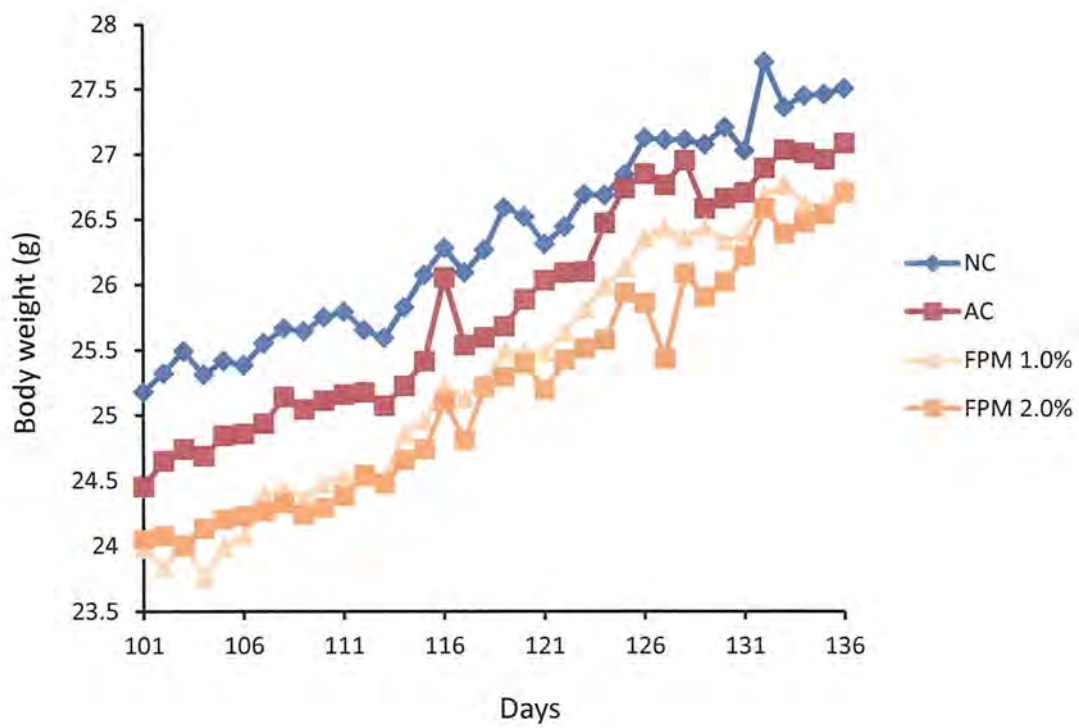


Fig. 8. Body weights of four groups in mice aged from 101 to 136 days. Blue bar, NC group (n = 16); Red bar, AC group (n = 16); Yellow bar, FPM 1.0% group (n = 16); Orange bar, FPM 2.0% group (n = 16). They were measured everyday. Weight was not significantly different among four groups by ANOVA ($P < 0.05$).

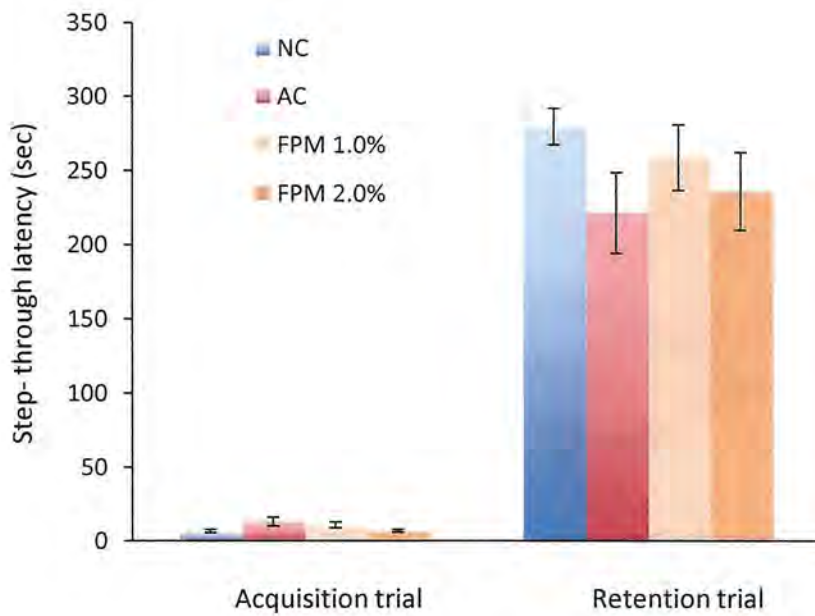


Fig. 9. Step-through latency in a passive avoidance task. Mice were divided into four groups. Blue bar, NC group (n = 16); Red bar, AC group (n = 16); Yellow bar, FPM 1.0% group (n = 16); Orange bar, FPM 2.0% group (n = 16). Mean step-through latency time in both acquisition and retention trial were significantly different among four groups by ANOVA ($P < 0.05$). The results were shown as mean \pm SE.

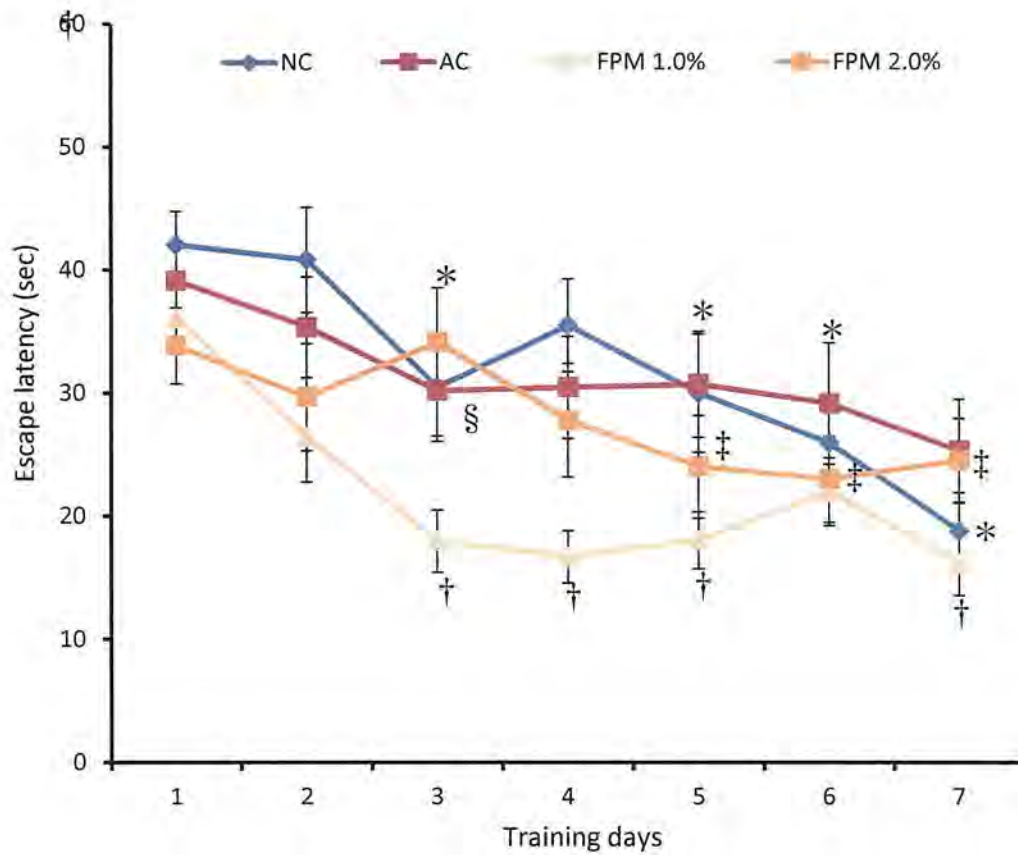


Fig. 10. Escape latency in a Morris water maze test training session. Mice were divided into four groups. Blue bar, NC group (n = 16); Red bar, AC group (n = 16); Yellow bar, FPM 1.0% group (n = 16); Orange bar, FPM 2.0% group (n = 16). Mean escape latency times of NC in days 3, 5, 6 and 7 were significantly lower than NC in day 1. (* $P < 0.05$). Mean escape latency times of AC in day 3 were significantly lower than AC in day 1 ([§] $P < 0.05$). Mean escape latency times of FPM 1.0% in days 3, 4, 5, and 7 were significantly lower than FPM 1.0% FPM in day 1 ([†] $P < 0.05$). Mean escape latency times of FPM 2.0% in days 5, 6 and 7 were significantly lower than FPM 2.0% in day 1 ([‡] $P < 0.05$). The results were shown as mean \pm SE.

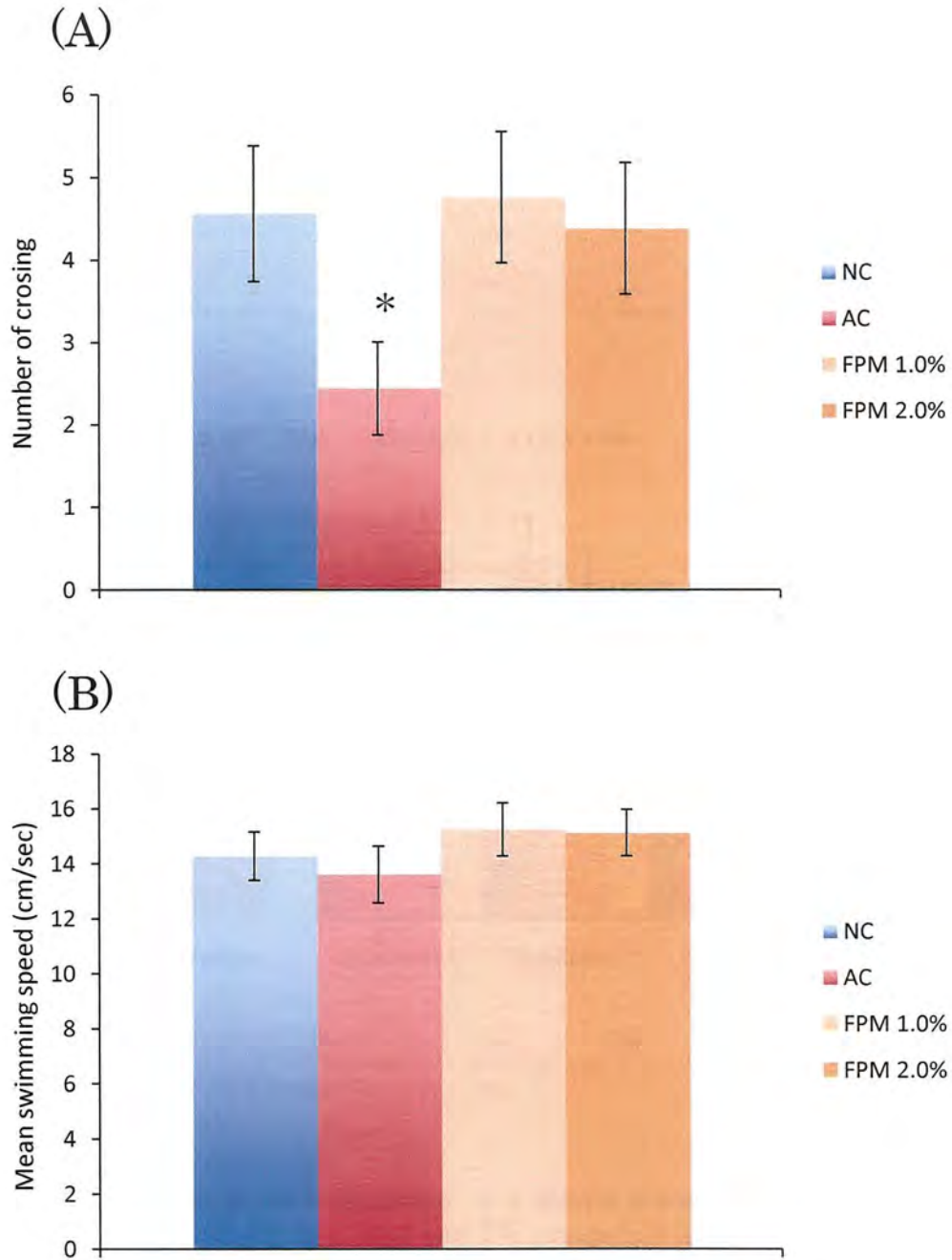


Fig. 11. Probe test in a Morris water maze test. Number of center crossings (A) and swimming speeds (B) were recorded by a camera. Mice were divided into four groups. Blue bar, NC group (n = 16); Red bar, AC group (n = 16); Yellow bar, FPM 1.0% group (n = 16); Orange bar, FPM 2.0% group (n = 16). Mean number of center crossings of FPM 1.0% was significantly higher than AC (* $P < 0.001$).

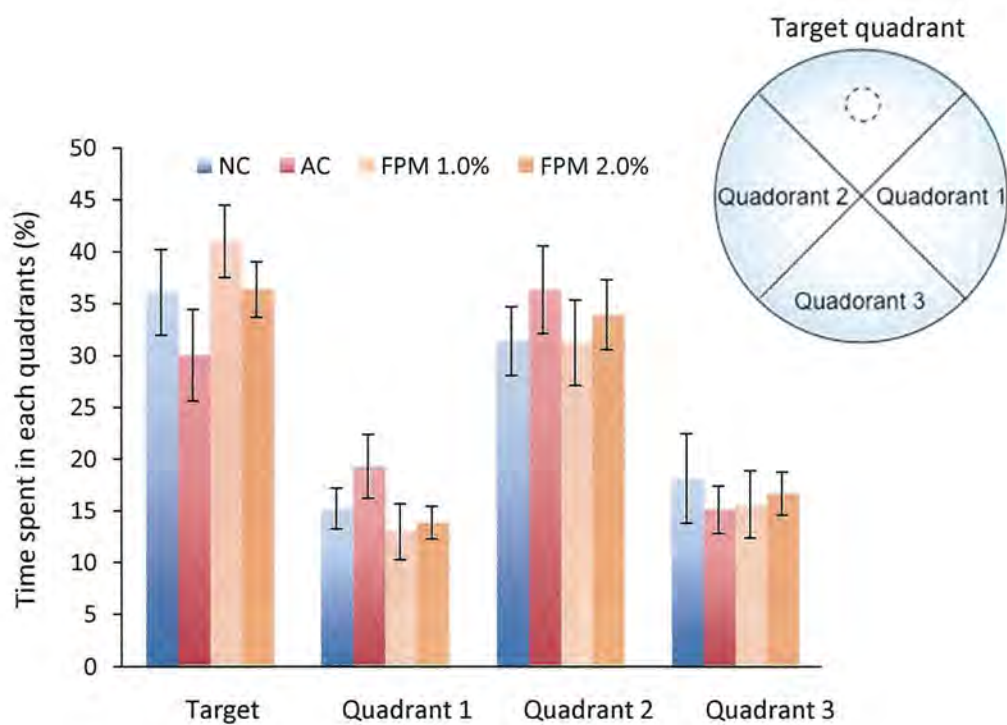


Fig. 12. Time spent in each quadrant in a Morris water maze probe test. Mice were divided into four groups. Blue bar, NC group ($n = 16$); Red bar, AC group ($n = 16$); Yellow bar, FPM 1.0% group ($n = 16$); Orange bar, FPM 2.0% group ($n = 16$). The target quadrant and the other quadrants were inserted in a swimming pool. Mean time in zone (%) of NC in Quadrants 1 and 3 was significantly lower than NC in Quadrant 0 ($*P < 0.05$). Mean time in zone (%) of FPM 2.0% in Quadrants 1, 2 and 3 was significantly lower than NC in Quadrant 0 ($\#P < 0.05$). The results were shown as mean \pm SE.

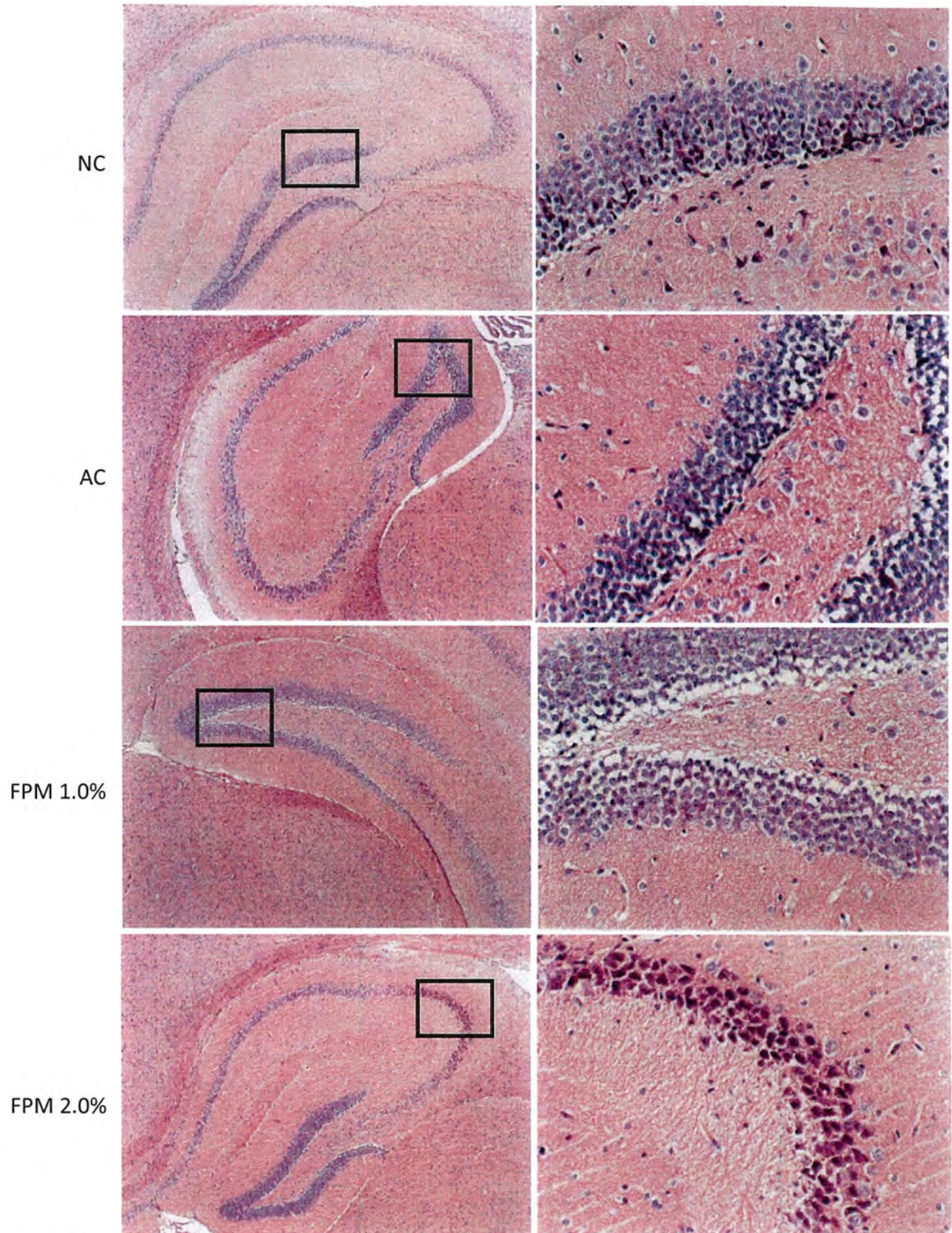


Fig. 13. Hippocampal structures of the mice aged with D-galactose by HE staining. The left column is whole structures of cornu ammonis. The right column is detailed structures of pyramidal cells. In NC group, neurons are full and arranged tightly and nuclei light stained. In AC group, neuronal cytoplasm is shrunken and nuclei are side-shifted and dark-stained, and many vacuoles are observed. In 1.0% and 2.0% silk groups, neurons and normal nuclei are light and arranged tightly.

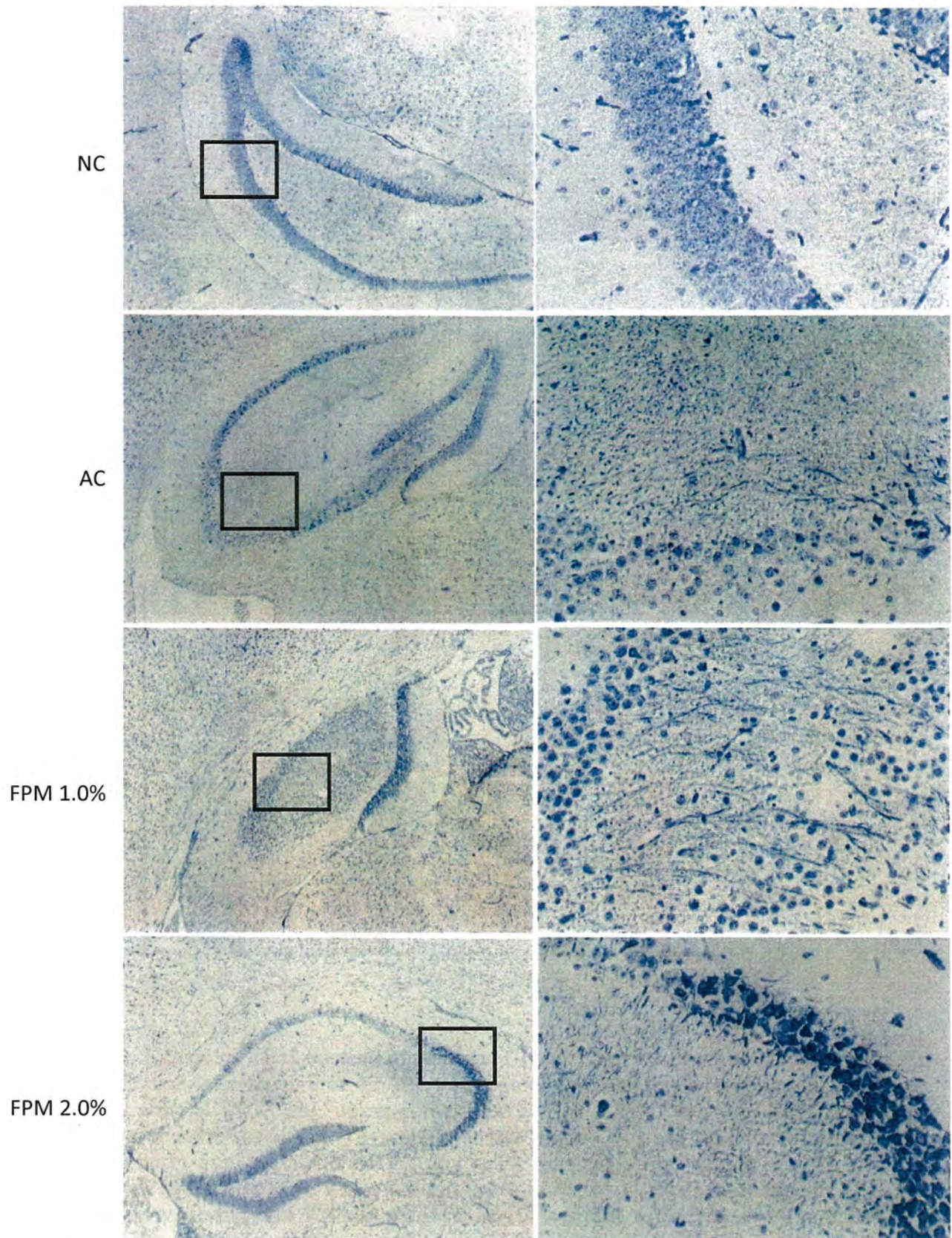


Fig. 14. Hippocampal structures of the mice aged with D-galactose by Holzer staining. The left column is whole structures of cornu ammonis. The right column is detailed structures of pyramidal cells. In AC group, the many gliosis are observed. In 1.0% and 2.0% silk groups, gliosis are also observed.

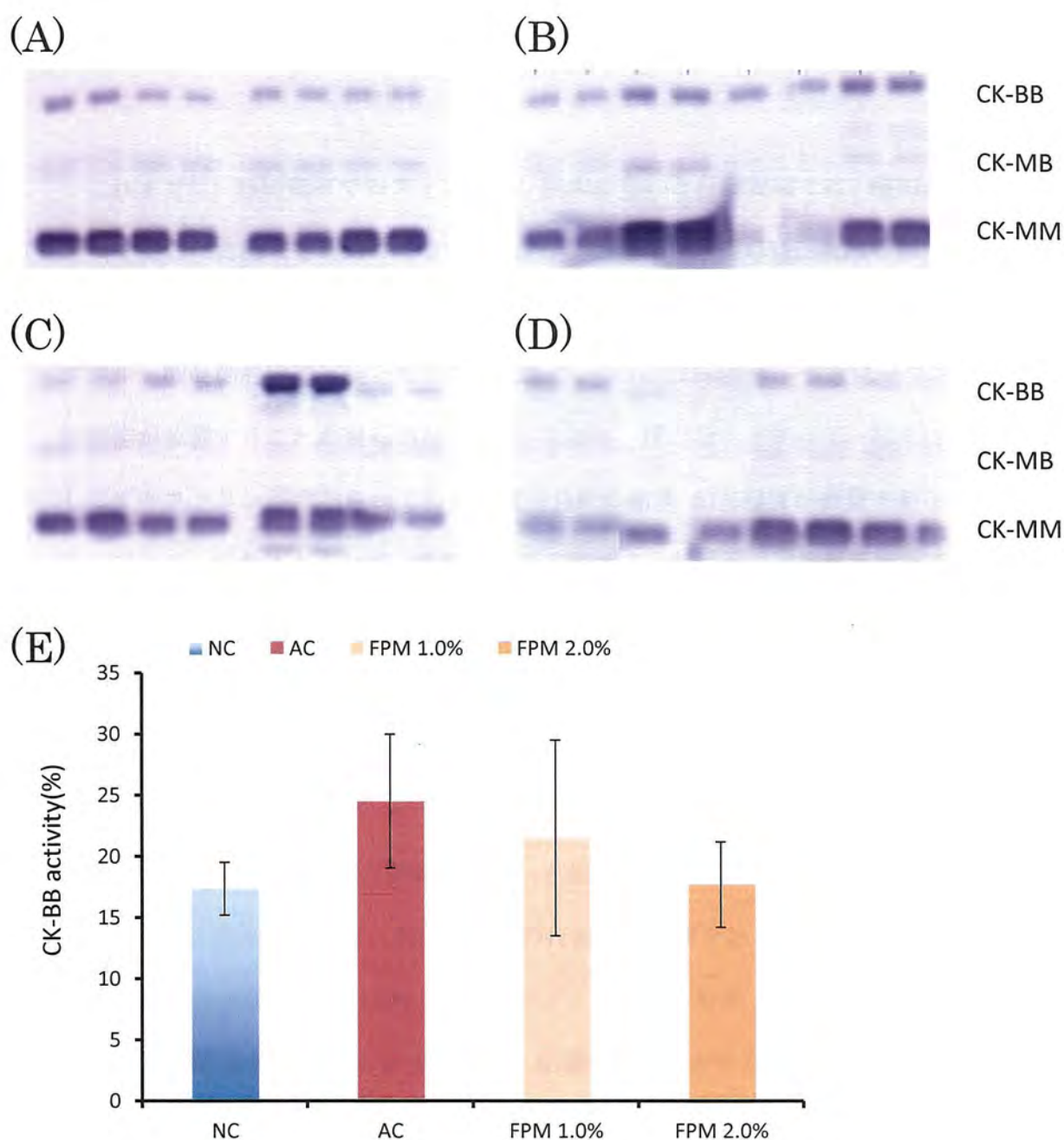


Fig. 15. Effects of FPM feeding on specific CK-BB activity. Results of (A) to (D) are CK isozymes from four groups separated by agarose electrophoresis. (A), normal control (NC); (B), aging control (AC); (C), FPM 1.0%; (D), FPM 2.0%. (E) Data of analysis of CK-BB activity in feeding FPM. Data obtained from the densitometry analysis of CK-BB content in NC (n = 4), AC (n = 4), FPM 1.0% (n = 4) and FPM 2.0% (n = 4). Their serums were used for calculation of specific CK-BB activity. Individual CK-BB activity/CK-BB content ratio was averaged, and the results are mean \pm SE.

Ⅲ. 考 察

これまでに、当研究室でのフィブロイン粉末を用いた行動実験では、酸加水分解法によって得られた粉末を利用してきた（大内, 2002; 山本, 2005）。大内の報告では、フィブロイン粉末を 1% (w/w) の水溶液としてマウスに自由摂取させることで、ステップスルー型受動的回避実験とモリス水迷路のいずれにおいても、有意にマウスの学習・記憶能が改善することが明らかとなった。しかし、用いたフィブロイン粉末は賦形剤としてデキストリンが添加されており、成分分析の結果 57%程度が糖質であることがわかっている。デキストリンは、澱粉から麦芽糖への分解過程で得られる糖質であり、生体内において最終的にグルコースへと代謝される。グルコースは、海馬に到達し、神経伝達物質であるアセチルコリンの放出を増大させ、結果的に記憶能が向上すること（Ragozzino *et al.*, 1996）が既に知られている。したがって、デキストリン添加されたフィブロイン粉末の効果については、グルコースの影響を排除し切れないと考えられた。

山本は 2005 年の報告で、デキストリンを添加せず、ほぼペプチドのみで構成されるフィブロイン粉末を用いて、大内と同様の行動薬理実験をおこなった。その結果、デキストリンを含まなくとも 1.0% (w/w) のフィブロイン粉末（フィブロインペプチド混合物；FPM）を投与することで、学習・記憶能の改善がもたらされることを明らかにした。

大内や山本の先行研究では、健常マウスに対してムスカリン性アセチルコリン受容体の阻害剤であるスコポラミンや、グルタミン酸の NMDA 型受容体阻害剤である MK-801 を投与することで、一過性の認知症様の症状を引き起こし（Harris *et al.*, 1984）、フィブロイン粉末や FPM が抗認知活性をもたらすか試験していた。近年、単糖の 1 つである D-galactose を実験動物に長期投与し、老化誘導させ記憶・学習に有効な漢方薬をスクリーニングするに関する研究が、中国で盛んにおこなわれている。老化を

引き起こすために本研究で用いた、100 mg/kg 体重/日 の D-galactose 皮下注射による体重や摂水量等の変化は認められなかった。また、試料を摂取させたことによる体重の変化や個体の衰弱や死亡も認められなかった。試料を摂取することで体重等のパラメータが変化しないことにより、今回の投与濃度における D-galactose がマウスに急性毒性や栄養状態の悪化を示さないことが確認された。

以上のことから、フィブロインペプチド混合物の経口投与は何らかの形で、D-galactose により老化を引き起こされた脳に作用し、学習速度の上昇や記憶の形成に関与していることが示唆される。フィブロインペプチド混合物 (FPM) は、老化マウスにおける空間学習・記憶の低下を改善させた。この FPM のポジティブな効果では、プラットホームに到達するまでの潜時、クロッシング回数、ターゲットクワドラントに滞在した時間で 1%(w/w)の低濃度が望ましく、老化マウスと有意な濃度であった。さらに、行動実験終了後に各群のマウスの血液をサンプリングし、脳損傷のマーカである CK-BB の相対濃度を測定したところ、老化促進マウスでは CK-BB 濃度が有意に高くなっており、老化促進後に FPM を摂取したマウスでは、コントロールと同程度の CK-BB 濃度であった。もっとも、今回の実験で設定した濃度は、D-galactose によって老化したマウスを用いてフラボノイドのケルセチン (Zhang *et al.*, 2006) やハナサナギタケ抽出物 (Tsushima *et al.*, 2010) を与えた際の 5 mg/(kg-day) と 25 mg/(kg-day) に比べてはるかに高い。FPM と同様に、フィブロイン分解物を含むペプチド混合物の BF-7 も、ヒトへの投与量が 200 mg/(kg-day) と 400 mg/(kg-day) で有意な認知機能の改善が認められている (Kim *et al.*, 2005)。従って、Crude である本研究の FPM がマウスにおける認知機能の改善に高い濃度を要求するのも当然のことである。このため、FPM 中の生物活性ペプチドの単離と構造解析と脳疾患の改善は将来の目標とすべきである。

フィブロインペプチド混合物を除けば、昆虫資源由来であり、ほ乳類の脳機能を改

善させる有用な生物活性物質は、キイロスズメバチワーカー成虫から調製した抽出物 (Fujiwara *et al.*, 2007)、チョウ目昆虫に対する寄生菌である冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*)・ハナサナギタケ (*Paecilomyces tenuipes*) の熱水抽出物 (CSE と PTE) (Ji *et al.*, 2009; Tsushima *et al.*, 2010)、そしてカイコの飼料植物である桑葉の抽出物 (Niidome *et al.*, 2007) などが含まれる。我々の発見は、加齢に伴う学習・記憶低下を改善するために治療薬の開発を容易にする可能性がある。

IV. 摘 要

食品工業用の酵素を用いた加水分解処理で得られるフィブロインペプチド混合物 (FPM) が, D-galactose 誘導性脳老化マウスに及ぼす影響を調べるために FPM の成分分析と行動実験をおこなった.

その結果, 酵素分解においてもフィブロインタンパク質は 98%近くがペプチドに分解され, 分解前のアミノ酸組成に比較して大きな変動が認められなかった. FPM のマウスへの投与による顕著な体重・摂食量の変化は確認できなかった. また, 空間記憶能を評価する行動実験の Morris 水迷路実験において, FPM を投与した群では, D-galactose により引き起こされた脳老化による学習速度の低下が, 回復した. 脳老化対照区である AC 群において, ターゲットクアドラントと他のクアドラントの滞在時間に有意な差は認められなかったが, 1%FPM 群においてターゲットクアドラントの滞在時間は, 他の 3 つのターゲットクアドラントの滞在時間に有意な差が認められた.

また, 脳の組織切片の観察では, FPM の顕著な効果は認められなかったものの, マウスから採血し, 血清中に含まれる脳神経細胞の損傷のマーカータンパク質である CK-BB の濃度を測定したところ, AC 群は NC 群よりも高い値を示した. また, D-galactose の投与後に FPM を摂取していた群では, 濃度に関わらず CK-BB 濃度の上昇が抑制される傾向が認められた.

したがって, 酵素加水分解処理で得られたフィブロインペプチド混合物は, *in vivo* の動物試験において, マウスの脳機能を回復させることが示唆された.

第 2 章 カイコフィブロインペプチド混合物の LC-MS/MS 解析と

D-galactose 誘導性老化マウスに対する毛質改善機能の解析

第 1 章では、フィブロインタパク質の酵素加水分解によって得られたペプチド混合物をマウスに投与し、行動薬理実験をおこなった。その結果、学習・記憶能の向上が認められた。しかし、カイコ蛹やフィブロインタパク質を酸加水分解することで得られたペプチド混合物からなる画分、BF-7 を動物やヒトに投与した先行研究 (Chae *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004, 2005, 2009) に比較して、その効果は顕著なものでなかった。

そこで、本章では分解方法によって得られるペプチドの配列・組成に差異が認められるのではないかと考え、酵素加水分解によるカイコフィブロインペプチド混合物 (FPM) の成分をより詳細に分析することを目的とし、近年プロテオミクス研究分野で利用されている、高分解能の LC-MS/MS を用いたペプチドの配列決定をおこなった。

加えて、FPM の抗老化作用を検討するため、引き続き D-galactose 誘導性老化モデルマウスにペプチド混合物を投与し、記憶・学習能の低下以外の老化現象に対する抗老化機能の探索を試みた。特に、加齢に伴って劣化することが知られている体毛の毛質に対して物理学的なアプローチでペプチド混合物投与の影響を評価した。

I. 材料及び方法

1. 供試試料

フィブロインペプチド混合物は第1章と同様にながすな繭株式会社から提供されたものを用いた。

2. LC MS による分子量測定およびペプチドの配列決定

LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific)を用いた ESI-LC MS システムでフィブロインペプチド混合物の分子量を測定し、PEAKS Studio 4.5 によるタンパク質同定と de novo 解析をおこなった。de novo 解析を考慮し、MS/MS スペクトル取得にはペプチド由来のフラグメントイオンが観測される条件 (HDC35%) と構成アミノ酸由来の immonium ion が観測されやすい条件 (HCD45%) を組み合わせたメソッドを採用した。

【測定条件】

Auto Sampler Micro AS (Thermo Fischer Scientific)

Injection volume : 20 ul (1ug/ul)

HPLC Surveyor (Thermo Fischer Scientific)

Trap column: Hypersil Gold C18, 2 x 50 mm (Thermo Fischer Scientific)

Mobile A: 100% H₂O, 0.1 % Formic Acid

Mobile B: 20 % H₂O/ 80 % MeCN, 0.1 % Formic Acid

Gradient: 5%B(0min)-5%B(2min)-40%B(40min)-100%B(40. 1min)-
100%B(45min)-5%B(45. 1min)-5%B(60min)

Pump flow: 200 ul/min

MS LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific)

Ion source: ESI source

Spray voltage: 5 kV

Capillary temp: 350 C

Instrument method: 下記参照

Charge state: +1, +2, +3

解析対象がペプチドであることから多価イオンとして観測されると想定し, Full MS scan で 2 価・3 価イオンが検出された場合 MS/MS をおこなう流れにしたが, 実際のベースピーククロマトグラムでは 1 価イオンが多く観測された (Fig. 16). そこで, 以下の条件での解析から Full MS scan で 1 価・2 価・3 価イオンが検出された場合 MS/MS をおこなう流れに変更した.

【解析条件】

Software PEAKS Studio 4.5 (Thermo Fischer Scientific)

Parameters Protein ID

Parent mass tolerance: ± 5 ppm

Fragment mass tolerance: ± 0.01 da

Enzyme : No enzyme

Database: Uniprot より下記 3 つのタンパクを抽出し再構築した

Database

FIBH_BOMMO P05740 Fibroin heavy chain

FIBL_BOMMO P21828 Fibroin light chain

SI25_BOMMO P04148 Fibrohexamerin

DeNovo Sequencing

Parent mass tolerance: ± 5 ppm

Fragment mass tolerance: ± 0.01 da

同じ Precursor mass に対して HCD35%と HCD45%で取得した MS/MS スペクトルを 1 枚の MS/MS スペクトルに merge したものを解析に用いた。また、Raw file より検出されたペプチドの Precursor mass に対して ± 5 ppm のマスクロマトグラムを描き、ピーク強度を求めた。

3. 摩擦係数の測定

第 1 章の行動実験後、Normal Control (NC), Aging Control (AC), 1.0% (w/w) フィブロインペプチド混合物溶液 (1%FPM) 群, 2.0% (w/w) フィブロインペプチド混合物溶液 (2%FPM) 群の各々のマウスの体毛の摩擦係数を測定した (Fig. 17)。摩擦係数は、毛の表面のキューティクルの状態を示し、キューティクルの剥がれ度合いが大きい程、摩擦係数が大きいと考えることができる (Bhushan *et al.*, 2005)。静動摩擦測定器は、株式会社トリニティーラボ製、ハンディラブテスター TL701 を使用した (Fig. 18A)。本機は、動物やヒトの体毛・毛髪を皮膚から生えている状態のまま測定するこ

とができる機器である。また、体毛・毛髪のみならず、皮膚や複雑な曲面を有する材料表面の摩擦測定も可能である (Uchidate *et al.*, 2008)。

エーテル麻酔下のマウスの両耳の間を通る、額から頸部までの距離 3 cm の箇所において、体毛表面の摩擦係数を計測し平均値を得た。TL701 の測定子表面には人工皮膚を貼り付け、約 0.3 N の荷重をかけつつ測定子を動かした。なお、その他の体部位では、湾曲した背骨の存在とマウスの体の大きさから正確な摩擦係数が計測できないため、上記箇所での測定とした。

4. 体毛の観察

3. で摩擦測定をおこなったマウスをジエチルエーテルで深麻酔し、マウスの背側の皮膚を解剖バサミで切除し、0.1 M PBS 中で洗浄した。固定液には 2.5% グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸バッファーを用い、4°C, overnight で固定した。固定した皮膚を蒸留水で洗浄後、2 枚のカミソリをスライドさせ、前後方向 1 cm, 左右方向 0.5 cm の長方形に切り出した。これをさらに左右方向にスライスし、水分を除去した後、体毛が水平方向を向くように導電性のカーボンテープを用いて試料台に貼付けた。イオンスパッタ (E-102, Hitachi) で試料に白金パラジウム被膜化処理を施し、走査型電子顕微鏡 (JSM-6510LA, JOEL) で観察、デジタル撮影した。加速電圧 5.0 kV, 倍率は 1,500 倍で観察をおこなった。

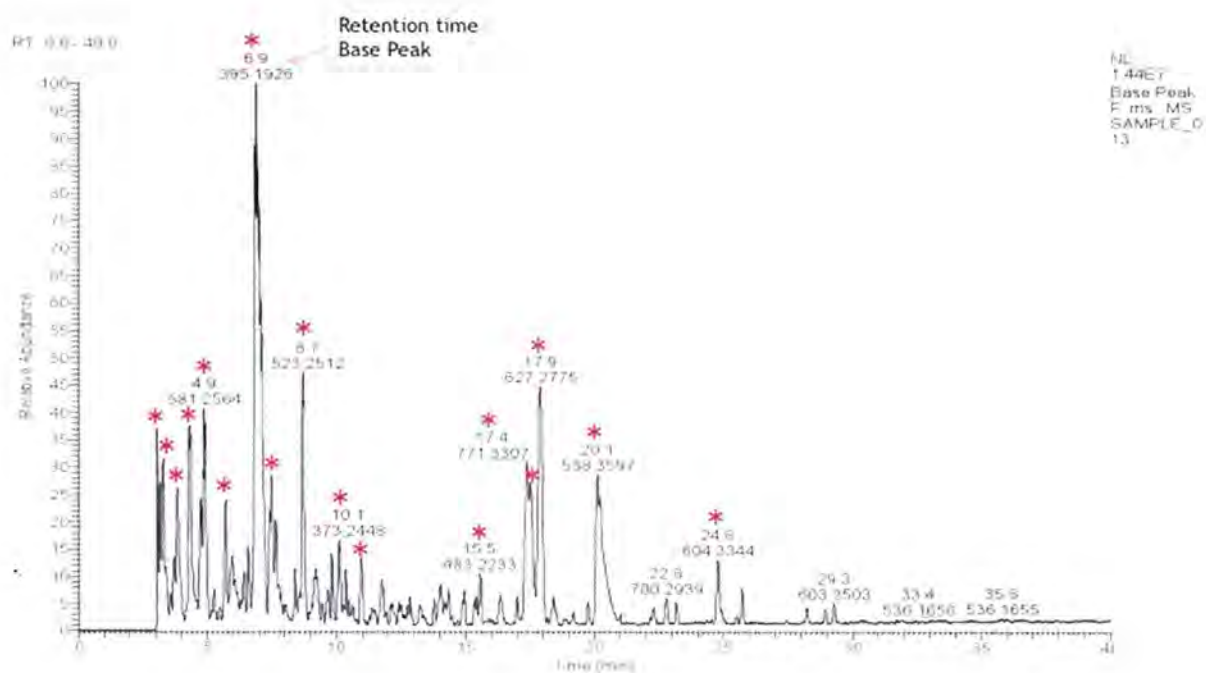


Fig. 16. ESI-LC/MS chromatogram of the crude silk powder separated by reverse phase partition chromatography on a Hypersil Gold C18 column. The chromatogram was obtained with LTQ orbitrap XL. Asterisks (*) show the singly charged ion peaks. Double asterisk (**) indicates retention time base peak.

II. 結 果

1. ESI-LC MS によるシルクペプチドの分子量測定および配列決定

MS/MS 解析の結果, 1 価イオンのピークとして 26 種類のペプチドの分子量とアミノ酸配列候補を得ることができた (Fig. 16 and Table 2). このうち, 20 種類はカイコフィブロイン由来の配列であることがデータベース検索の結果明らかになった. また, 繊維タンパク質であるフィブロインを束ねる接着分子タンパク質である P25 由来のペプチドも 2 種類明らかになった. 残る 4 種類はデータベースに存在しない配列であった.

マスクロマトグラムから, フィブロインペプチド混合物中における存在量が少ないと考えられる多価イオンのピークについては, 12 種類のペプチドの推定アミノ酸配列を得ることができた (Fig. 16 and Table 3). その内 8 種類のペプチドのアミノ酸配列はデータベースに登録されたカイコフィブロインタンパク質のアミノ酸配列と一致した. 残る 4 種のペプチドはデータベース上に一致する配列が存在しなかった.

2. 体毛の摩擦測定

第 1 章で用いた 4 群のマウスについて, エーテル麻酔した後, 頭頂部から背部にかけての体毛の摩擦測定をおこなった. その結果, 摩擦係数は, NC 群 : 0.23, AC 群 : 0.37, 1.0% (w/w) フィブロインペプチド混合物溶液群 : 0.23, 2.0% (w/w) フィブロインペプチド混合物溶液群 : 0.23 であった (Fig. 18B).

すなわち, NC 群に比べて AC 群は摩擦係数が約 1.6 倍大きく, さらに, AC 群に

比べて、フィブロインペプチド混合物溶液群（1.0%，2.0%）の摩擦係数は小さかった。

Table 2. Fibroin-peptide mixture sequences of singly charged ion identified by LC-MS/MS and their occurrences in the known sequence of fibroin.

RTc	Precursor m/z	Charge state	Peptide MW	Sequence	Original Protein	Peak Intensity
4.1	367.1614	1	366.1542	SGFG	FIBH_BOMMO	1.00E+06
11.7	374.2286	1	373.2213	EII or EIL	FIBL_BOMMO	1.10E+06
10.2	459.1875	1	458.1802	GYGY	NA	1.00E+06
6.6	459.2349	1	458.2277	FGHV	FIBL_BOMMO	2.90E+06
4.7	581.2567	1	580.2495	VADGGY	NA	6.00E+06
7.1	509.2352	1	508.228	VNGGY	FIBH_BOMMO	3.70E+05
10.9	596.2929	1	595.2857	VLDSY	NA	2.00E+06
25.4	617.3299	1	616.3226	WDAIL	FIBL_BOMMO	7.30E+05
17.3	714.31	1	713.3027	SSGFGPY	FIBH_BOMMO	3.90E+06
3.5	423.1876	1	422.1804	SGPY	FIBH_BOMMO	2.30E+06
19.9	538.3601	1	537.3528	LLPPV	FIBL_BOMMO	5.40E+06
12.7	551.2826	1	550.2754	GVGVGY	FIBH_BOMMO	1.30E+06
17.2	737.4566	1	736.4494	LLPPVAQ	FIBL_BOMMO	1.30E+06
6.7	395.1927	1	394.1853	GVGY	FIBH_BOMMO	1.90E+07
17.7	627.2778	1	626.2705	SGFGPY	FIBL_BOMMO	7.90E+06
17.7	929.4011	1	928.3939	GTGSSGFGPY	FIBH_BOMMO	5.50E+06
8.6	638.2787	1	637.2715	SQSGPY	FIBH_BOMMO	2.00E+06
5.6	583.2358	1	582.2286	SDFGTG	FIBH_BOMMO	3.90E+06
10	373.2447	1	372.2375	AGII	FIBL_BOMMO	2.80E+06
15.4	483.2235	1	482.2162	FGPY	FIBH_BOMMO	1.10E+06
17.2	771.3314	1	770.3242	GSSGFGPY	FIBH_BOMMO	6.00E+06
17.3	540.2453	1	539.238	GFGPY	FIBH_BOMMO	4.60E+06
24.4	604.3346	1	603.3273	EIPVF	SI25_BOMMO	1.90E+06
5.6	670.2681	1	669.2609	SDFGTGS	FIBH_BOMMO	1.00E+06
28.9	603.3504	1	602.3432	GGLPIF	SI25_BOMMO	9.50E+05

Table 3. Fibroin-peptide mixture sequences of divalently charged ion identified by LC-MS/MS and their occurrences in the known sequence of fibroin.

Precursor m/z	Charge state	Peptide MW	Sequence	Original Protein	Peak Area (Auto detection)
354.1956	2	706.3766	GFRQSL	FIBL_BOMMO	6.20E+05
365.7265	2	729.4386	ITDLLR	FIBL_BOMMO	7.00E+05
366.2134	2	730.4124	VISRAW	FIBL_BOMMO	2.30E+06
369.2314	2	736.4484	LLPPVAQ	FIBL_BOMMO	3.40E+06
402.7216	2	803.4288	RQSLGPF	FIBL_BOMMO	5.20E+06
409.7295	2	817.4445	SVISRAW	FIBL_BOMMO	7.30E+05
415.7034	2	829.3924	SDNEIPR	FIBL_BOMMO	4.70E+06
482.2347	2	962.455	VDDTDKSI	FIBL_BOMMO	2.40E+06
416.1956	2	830.3766	SDDELPR	NA	7.50E+06
479.7328	2	957.451	SDNELPRQ	NA	2.10E+06
562.7824	2	1123.5503	VLDSYTDGVR	NA	2.10E+06
641.3818	2	1280.749	APPAPAPVAPLLPA	NA	3.40E+06

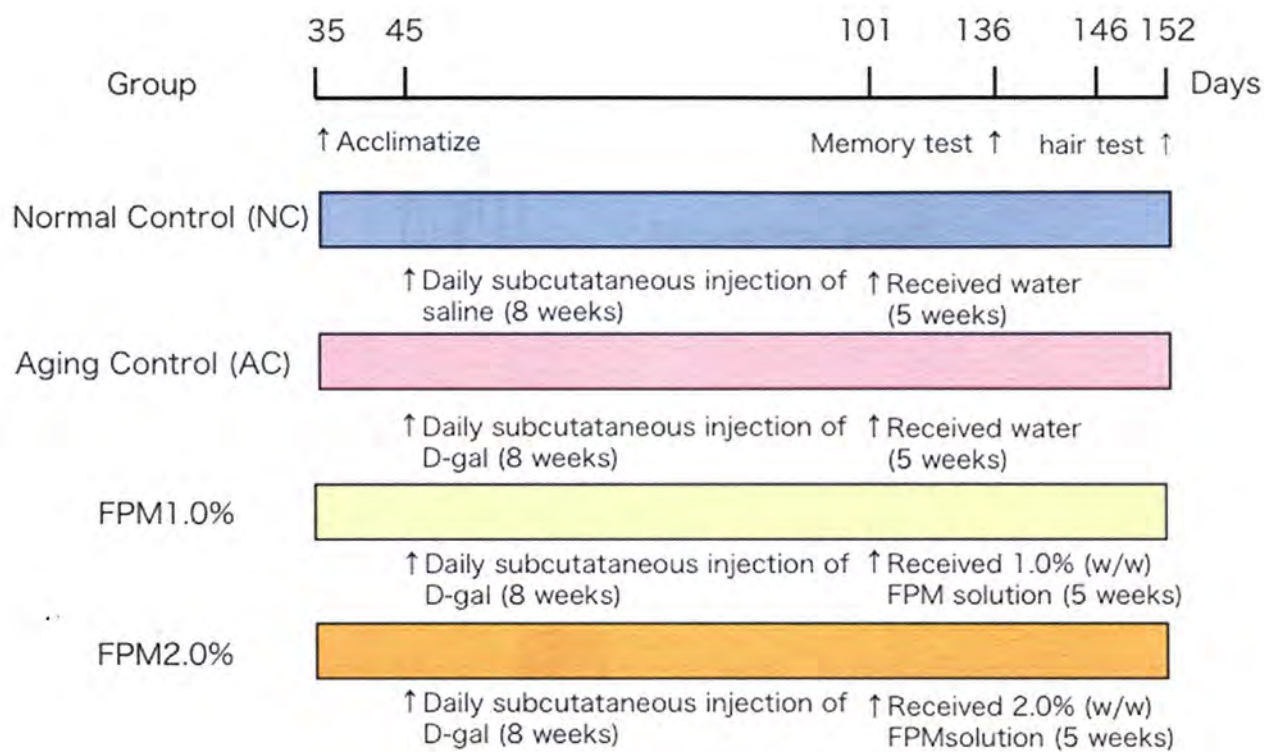


Fig. 17. An experimental schedule of fibroin peptide feeding and hair friction measurement in the mice aged with D-galactose.

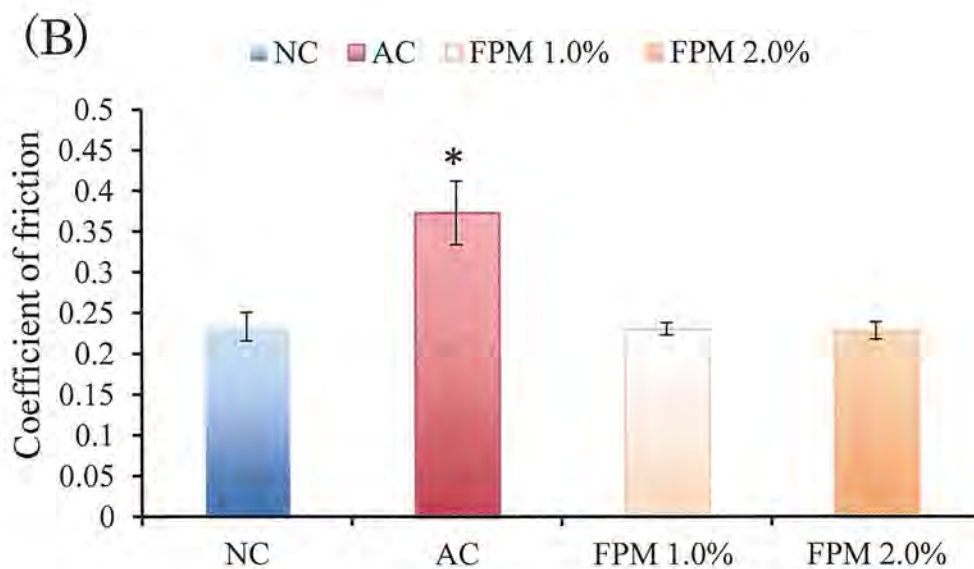
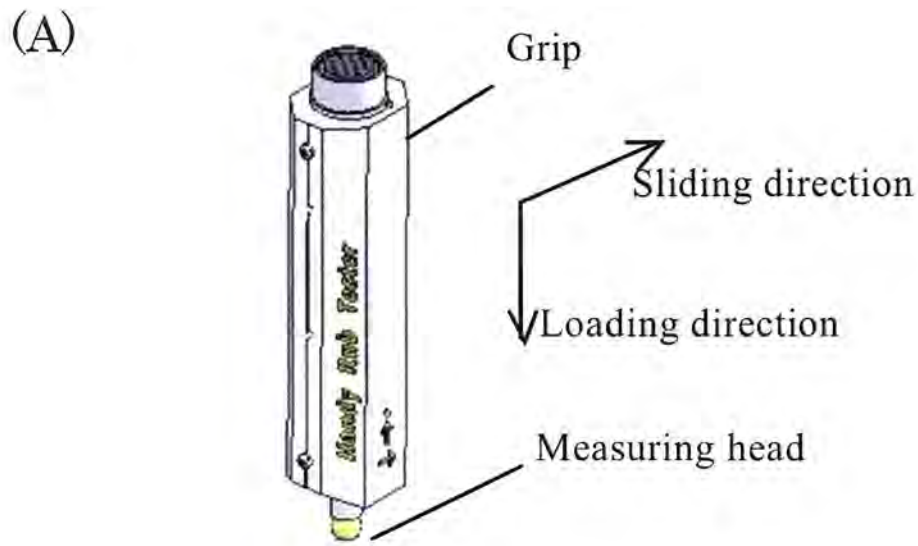


Fig. 18. Hair friction measurement and effect of fibroin peptide mixture (FPM) on coefficient of friction (COF) of mice hair. (A) Schematic drawing of a portable tribometer developed by Uchidate *et al.* (2008). The measuring head of the tribometer was covered with an artificial skin made of a polymer and being slid against the back of the mice at a load of approximately 0.3 N. Mice were anesthetized with diethyl ether throughout measuring. (B) COF was obtained as the ratio of the frictional force to the applied load. NC, normal control; AC, aging control. Results are mean \pm SEM (n = 8). The mean COF was significantly higher in AC than in NC (a 1.6-fold difference), yet returned to NC level (\sim 0.23) in the FPM groups. * $P < 0.0001$ by Tukey–Kramer HSD test.

3. 体毛表面の電子顕微鏡観察

摩擦測定の結果、4群間に有意な差が認められたため、各群のマウスを解剖し、背側の体毛を含む皮膚を摘出・固定したものをを用いて電子顕微鏡用の標本を作製した。これをSEMで観察したところ、AC群ではNC群よりもキューティクルのリフトアップが顕著であり、毛質が劣化していることが確認された (Fig. 19)。一方、シルク投与群ではいずれの投与濃度においてもAC群の毛より表面が滑らかであり、キューティクルのリフトアップがほとんど認められなかった。

4. 皮脂腺の組織化学実験

各群のマウスの背側の体毛を含む皮膚を摘出・固定したものをを用いて、皮脂腺の組織化学実験をおこなった。染色にはヘマトキシリン-エオシン染色を用いた。その結果、NC群、AC群、フィブロインペプチド混合物投与群の3群間に形態学的な差異は認められなかった (Fig. 20)。

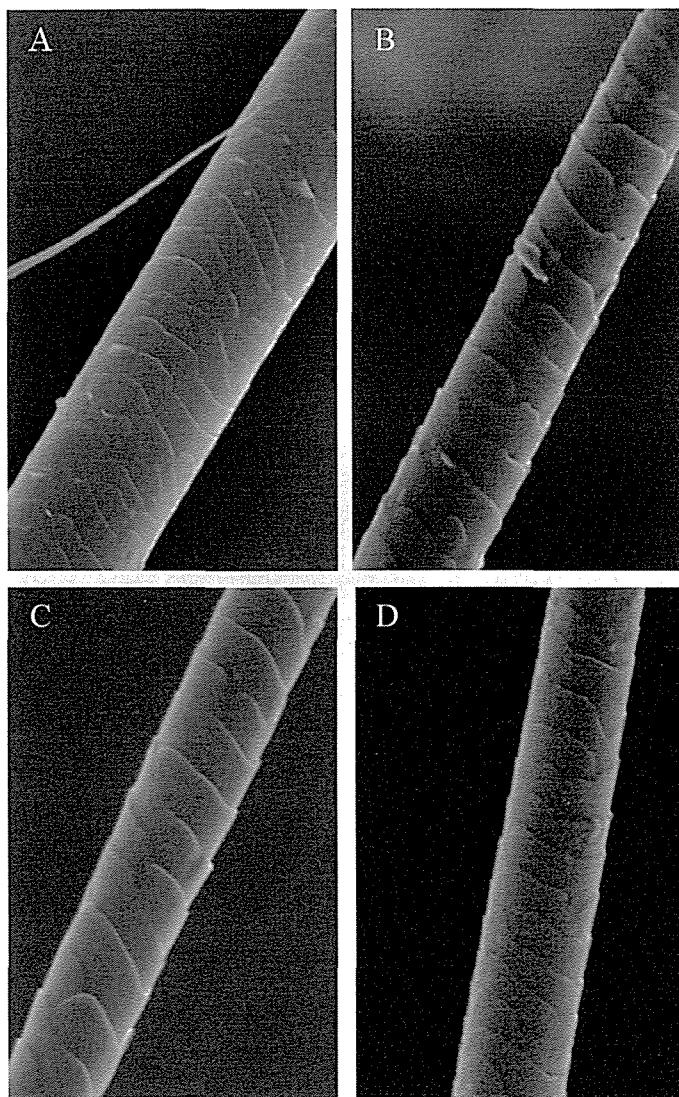


Fig. 19. SEM photographs of hair cuticles of mice. Hairs were observed by SEM (JOEL, JSM-6510 LA). Skin tissue was biopsied from the mid-back region of anesthetized mice and placed in a fixative solution of glutaraldehyde (2.5%) in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) for 24 h. The specimens were sectioned into 0.5-mm \times 10-mm slabs and washed in Milli Q water. The slabs were sliced longitudinally and attached to conductive carbon tape on the specimen mounting stage. They were coated with palladium–platinum in an ion sputter coater (Hitachi, E-102) and examined under the SEM. A, normal control (NC); B, aging control (AC); C, FPM 1.0%; D, FPM 2.0%. SEM showed that 2% FPM improves the hair cuticle to the quality of NC, but AC causes rough wear. These results corresponded to the COF measurement.

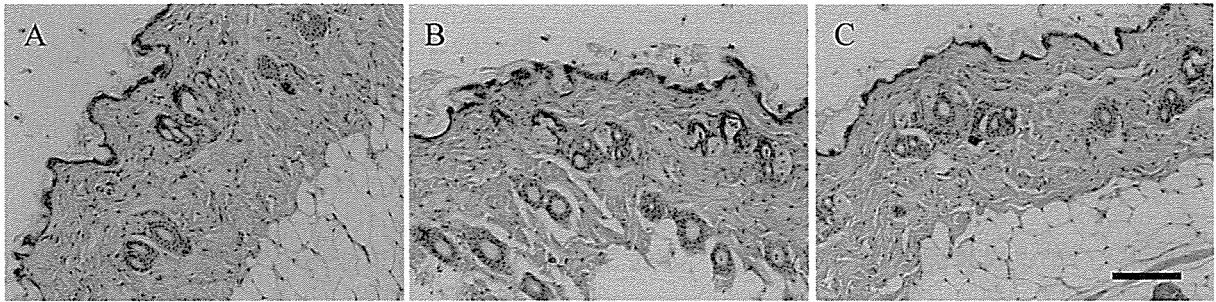


Fig. 20. HE-stained sebaceous glands of mice. Mice were deeply anesthetized with diethyl ether and decapitated. The sebaceous glands in the skin were dissected out and washed in cold 50 mM phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4). They were fixed in paraformaldehyde (4.0%) in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) at 4° C overnight. Samples were embedded in paraffin wax, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (HE). A, normal control (NC); B, aging control (AC); C, FPM 2.0%. Scale bar, 100 μ m.

Ⅲ. 考 察

第1章では、フィブロインペプチド混合物をカラムクロマトグラフィーで精製し、そのごく一部のみを MALDI TOF-MS で解析した。しかし、本章においてはペプチド混合物を精製することなく、その全てを LC-MS/MS に供した。通常、タンパク質分解物の LC-MS/MS 解析では、分解の際に用いる酵素はトリプシンであることが多い。今回の分析に用いたフィブロインペプチド混合物は、食品工業用の酵素製剤として市販されているアルカリプロテアーゼの一種で分解された。

これまで、フィブロインタンパク質の分解・低分子化研究は盛んに進められてきてはいるものの、ペプチドの配列を解析した例は少ない。韓国の Jeong ら(2010)は、パパイヤ由来のプロテアーゼである、パパインによるフィブロインの分解をおこない、本研究同様に TOF-MS や LC-MS による解析を試みている。興味深いことに、パパインによるフィブロイン分解物は AGAG, SGAGAG などのアラニン・グリシン反復配列をもつペプチドがほとんどであった。グリシン・アラニンの反復配列は、フィブロインタンパク質に特徴的な配列ではあるものの、パパインがアルギニン、リジン、グルタミン、ヒスチジン、グリシン、チロシンのアミノ酸部位でタンパク質・ペプチドを加水分解するシステインプロテアーゼであるため、GA の順ではなく AG の順に並んだペプチドが生じたものと考えられる。一方、本研究における分析では GA や AG 配列が骨格となるペプチドはわずかにしか認められず、LLPPV や VNGGY の様に分枝鎖アミノ酸から始まる配列のペプチドが多数見られた。酵素の固有の切断部位に起因するものではあるが、どのような酵素で切断するかによって、得られるペプチド配列に相当な幅が生じることが示唆された。

今回の分析では、全部で 37 種類のペプチドを配列を得ることができたが、その多くは繭タンパク質を構成するフィブロインか P25 タンパク質由来であることが確認され

た。通常、FPM の製造工程においては精錬後のフィブロインを材料とするため、セリン由来のペプチドがほぼ検出されなかったのも妥当な結果だと思われる。また、いずれの絹糸タンパクにも帰属されなかったペプチドが存在したが、反応に用いた酵素由来自体が自己分解して生じたペプチドではないかと考えられる。

また、老化に伴い、記憶能が低下することはよく知られているが、動物個体の全身に様々な変化が起こることが想定されたため、本研究ではマウス体毛の毛質について物理学的な評価を試みた。具体的には、本学工学部が開発に関わったハンディータイプの摩擦測定器 (Uchidate *et al.*, 2008) を用い、麻酔下のマウス体表における摩擦データをサンプリングした。その結果、老化促進マウスの体毛表面の摩擦係数が他の3群に比べて有意に大きいことが明らかになった。毛髪の摩擦係数は、測定対象表面の構造が粗ければ大きな値が得られ、表面の構造が滑らかであれば小さな値が得られることが知られている (Bhushan *et al.*, 2005)。このことから、フィブロインペプチド混合物の経口摂取により老化促進群の体毛表面には正常マウスには認められない、何らかのポジティブな構造変化が生じていることが示唆された。

ほ乳類の体毛は大きく分けて、外層のキューティクル、内層のコルテックス、中心部のメデュラの3層から構成されている。特に、外層を形成するうろこ状のキューティクルは、体毛内部の水分を保つ上で必要不可欠な存在であり、体毛の物理的強度、くし通りなどの質感の主たる要因となっている。しかし、キューティクルは物理的・化学的ダメージや加齢とともに損傷し、内層のコルテックスから剥離してしまう。その結果、体毛の水分を保持できず、物理的強度の減少が引き起こされ、質感や毛艶が損なわれることになる (Kiso *et al.*, 2009)。そこで、マウス体毛表面の摩擦係数の差異は、キューティクルの剥離に起因するという仮説を立て、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察をおこなった。その結果、コントロール群では正常なキューティクルが観察されたものの、老化促進マウスのキューティクルはコルテックスから剥離し、リフトアップしているこ

とを確認した。この構造的変化が摩擦係数の上昇に結びついたと考えられる。一方、老化促進マウスと同様に D-gal 注射を続け、その後に FPM 溶液を投与したグループでは、いずれの濃度においてもコントロール群と同様の正常なキューティクルが観察された。このことから、1%(w/w)以上のフィブロインペプチド混合物の経口摂取が、体毛の質的改善を促す可能性が示唆された。これら2つの実験から、AC 群の毛の摩擦係数が改善され、NC 群と同程度の毛質（毛艶）に改善されたことが示された。この結果は、Fig. 19 に示す体毛観察結果と一致していた。

一般に、ヒトの毛髪を含む体毛のキューティクルが損傷した場合、自然回復は難しく、脂肪酸を有効成分とするコート剤、毛髪化粧品を直接塗布することで損傷の補修や柔軟性を与えることが可能である。これは、健康な毛髪において根元付近の皮脂腺から油分が分泌され、被覆されることに基づいた処置である。キューティクルの表面を覆う細胞膜複合体（CMC）が体毛・毛髪内部の水分や栄養素の流出を防いでいる。ヒトの場合、CMC を構成する脂質の 58%がイソロイシンの誘導体である 18-メチルエイコサン酸であり、加齢とともに減少し、外部から補ってやれば毛質が改善する（Jones and Rivett, 1997）。したがって、毛質の改善に深く関わる器官として皮脂腺が重要であると考え、皮膚の切片を作製して皮脂腺の形態比較をおこなった。しかしながら、NC 群、AC 群、FPM 群の3群間に差異は認められなかった。すなわち皮脂腺の基質的变化から AC 群の体毛の毛質が劣化したわけではないと考えられた。

また、シルクタンパク質やシルクアミノ酸を含有するシャンプー・毛髪化粧品もキューティクルの損傷に有効であると考えられ、すでに市場に商品が出回っている。これは、シルクタンパク質が保湿機能を有していることが大きい（Hyun *et al.*, 2008）。タンパク質とアミノ酸組成の観点から見れば、毛髪のタンパク質もフィブロイン同様アミノ酸組成が偏っていることが特徴である。体毛は爪や皮膚と同じケラチンタンパク質から構成されており、プロリンやシステイン、分枝鎖アミノ酸の摂取によりアミノ酸のターン

オーバーが促進され、毛髪健康状態が改善されることが明らかになってきている。

本研究においてはフィブロインペプチド混合物の経口摂取で毛艶の改善傾向が認められた。これは、従来の直接塗布を必要とする毛髪化粧品に比べて簡便に毛艶の改善効果を得られる、昆虫機能利用の新しい分野を開拓する素材の発見だと考えられる。今後は、本研究において直接定量することが出来なかった皮脂の分泌量と生体内でのアミノ酸の変動を追跡することで、FPM が毛質に関わるこれら2つの重要なファクターの内、どちらに影響し今回の結果をもたらしたのかを解析する必要がある。Jeongら(2010)は得られたペプチド混合物について、バイオアッセイにより生理活性を確認する実験をおこなっておらず、文献検索で生理活性の確認がとれているペプチドの含有に言及していた。これに対し、本研究では第1章・第2章のいずれにおいても動物実験によりフィブロインペプチド混合物の生理活性を確認しており、今後は得られたLC-MS/MS解析で得られたペプチドの配列情報をもとに合成ペプチドによる様々なバイオアッセイを推し進め、機能性ペプチドの同定の必要があると考えられる。

IV. 摘 要

プロテオミクス解析でも用いられる、高分解能 LC-MS/MS を用いて、酵素分解で得られたフィブロインペプチド混合物 (FPM) のアミノ酸配列を分析した。その結果、37 個のペプチドの配列を読むことができ、フィブロインに特徴的な GAGA (AGAG) の反復配列よりも、分枝鎖アミノ酸から始まるペプチドの配列を多数得ることができた。また、いずれの絹糸タンパク質にも由来しないペプチド配列が得られたが、これは分解に用いた酵素由来のものだと考えられる。

また、第 1 章の結果を踏まえ、FPM が老化にともなって衰える認知機能の改善以外のどのようなアンチエイジング機能を有しているかを調べるべく、体毛の毛質の物理学的分析を試みた。摩擦測定器を用いた非侵襲測定の結果、AC 群のみ有意に摩擦係数が高いことが確かめられた。ついで、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察をおこなったところ、AC 群はキューティクルのリフトアップ (起立) が他の 3 群に比べて顕著であった。FPM 投与群では、D-galactose 処理を経たにも関わらず、リフトアップが目立たなかった。

最後に、毛質に重要な皮脂分泌を担う皮脂腺の形態学的観察をおこなったが、いずれの群においても顕著な差異が認められず、高濃度のペプチド混合物摂取によるアミノ酸のターンオーバー促進が、毛質の改善をもたらしたのではないかと考えられた。

総合考察

高齢化は QOL 低下そのものにつながり、高齢化と密接な関係にある認知症も QOL 低下を招く。認知症は、65 歳から指数関数的に増加することが知られている。2000 年には、世界で 2,500 万人が認知症を患っていると推計され、そのうちアジアは 46%、ヨーロッパ 30%、北アメリカ 12%、その他が 12% となっており、全体の認知症患者の 52% は発展途上国である。2000 年だけでも、認知症患者は 460 万人増え、2030 年には 6300 万人（うち発展途上国 4100 万人）、2050 年には 1 億 1400 万人（うち発展途上国 8400 万人）に達すると推計されている (Wimo *et al.*, 2003)。

一概に認知症と言っても、原因により症状も様々である。我が国ではアルツハイマー型認知症、脳血管型認知症、レビー小体型認知症が認知症全体の 9 割を占め、これらを合わせて三大認知症と呼んでいる。アルツハイマー型の場合は、脳内のアセチルコリンの分解を防ぐために、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤を投与することで症状が改善する (Smith *et al.*, 1997)。脳血管型は、脳血管の詰まりが大部分の原因であるので、脳血流改善薬や脳血管拡張薬を投与される (Jonas, 1988)。レビー小体型に至っては、他の認知症の薬物投与により、逆に症状の悪化を招くことがある (Frank, 2003)。しかし、これらの薬物を用いても認知症は進行の停止、もしくは遅延することしかできず、根本から完全に治療することは困難であり、副作用のリスクも背負わなければならない。また、世界で最も症例が多く確認されているアルツハイマー型認知症は、比較的緩やかに病状が進行するが、進行具合によっては、患者自身だけでなく、介護者に肉体的・精神的な負担をかけることになる。

経口摂取で機能性食品が、生体機能の調節などの活性を発揮するためにクリアせねばならない課題は大きく 2 つある。1 つは、食品の消化過程である。消化は多種多様な酵

素反応や消化液による急激な pH 変動などが関わる、ダイナミックな生化学反応である。

これまで、D-galactose 誘導性脳老化マウスの認知機能を改善するサンプルとしての報告は、ほぼ植物由来のポリフェノールやフラボノイド系化合物が多かった。これは、植物由来の生理活性物質が強力な抗酸化活性を有し、老化メカニズムの中核を成す酸化ストレス低減をもたらすことによるものと考えられる。その一方で、フィブロインペプチド混合物のようにタンパク質・ペプチドを主成分とするサンプルでの研究報告例は極めて少ない。タンパク質・ペプチド系の生理活性物質は、経口摂取しても唾液中に含まれる α -アミノペプチダーゼによる分解を受けるため、機能性食品・医薬品候補物質としての応用が難しいことが原因であろう。しかしながら、短いペプチドの経口摂取で血圧の低下作用や脂肪燃焼の促進などの生理活性が報告されており、必ずしもペプチドが機能性食品・医薬品候補物質として利用価値が低いわけではないことが証明されつつある。例えば、乳酸菌の一種である *Lactobacillus helveticus* とコウジカビ *Aspergillus oryzae* に牛乳由来のカゼインタンパク質を分解させることで得られる 2 種類のトリペプチド、VPP と IPP は経口摂取で血圧を上昇させるアンギオテンシン変換酵素 (ACE) I 型の阻害活性を有し、これらのトリペプチド投与後のラットの血液をサンプリングし、LC-MS 解析を試みたところ、血中においても分解されることなくトリペプチド構造を保っていることが確認されている (Seppo *et al.*, 2005)。さらに、トリペプチド投与ラットの DNA マイクロアレイ解析の結果、ACE のみならず SOD 活性の上昇や COX 活性の低下などの抗酸化や炎症反応に関わるキーエンザイムの発現量の変化すら引き起こすことが明らかにされている (Yamaguchi *et al.*, 2009)。

また、スクアリン酸はカルボン酸の等価体として注目を集め、医薬農薬開発に盛んに利用されている化合物であるが、N 末端アスパラギン酸部位を、スクアリン酸含有アミノ酸にて置換することで、アミノペプチダーゼによる N 末からの酵素分解を阻害する。スクアリン酸はカルボン酸の等価体として機能し、生理活性の向上と高度化に寄与する

ことが明らかになっている (Ishida *et al.*, 2005).

したがって、FPM の経口摂取が有効であることを証明するためには、FPM 投与後のマウスから採血し、LC-MS による血中における FPM の動態を今後解析する必要もあると考えられる。

また、*in vivo* では *in vitro* は異なり、抗認知症物質として脳で機能するためには、避けては通れない壁、すなわち血液脳関門を通過しなければならない。血液脳関門は毛細血管の内皮細胞の間隔が極めて狭いことによる物理的な障壁であるが、グルコースやアミノ酸などの必須内因性物質の取り込みと異物の排出は輸送担体によっておこなわれる。ドーパミンは血液脳関門を通過できないが、前駆体である L-ドーパは通過できるので、パーキンソン病の薬として用いられている (Wahl and Nahmias, 1996)。このような事例があるため、*in vivo* での影響を確認しない限り、QOL 向上を目的とした食品にはなり得ない。

血液脳関門と FPM 中の生理活性物質の関係も重要であり、ベンゼン環やイソプレノ骨格、セスキテルペン骨格を有する植物由来の成分に比べて、ペプチドやその消化物である遊離アミノ酸の方が血液脳関門を越えて脳神経までたどり着きやすいと考えられる。フィブロインペプチド混合物中のどのような成分が血液脳関門を通過するのか、また、脳への作用として、神経伝達物質を増加させるのか、神経伸長因子を活性化させているのか等、作用機構を調べる必要がある。ヤマブシタケのエタノール抽出物のように、それ自体が神経伸長因子として脳内で機能することが困難ではあるものの、神経伸長因子を生産するアストロサイト細胞を活性化させること (Mori *et al.*, 2008) など、脳に影響を与えるメカニズムは複雑であり、より詳細な実験系を構築する必要がある。

また、第 2 章で新たに発見した FPM による体毛の毛質改善効果は従来のシルク成分を含有する化粧品とは異なるアプローチで研究を進めており、より学際的な研究展開を

必要とする。くわえて、高い分解能の機器分析で明らかにした FPM 中のペプチド配列の情報を活用する必要がある。配列情報を元に合成ペプチドを作ることで、天然物から試料を集めて研究を進める負担が軽減され、よりスピーディーに本研究で見いだした現象の本質に迫る研究が可能になると思われる。本研究が東日本大震災で傷ついた東北の地から、新しい養蚕業の応用発展へとつながることを祈ってやまない。

引用文献

- Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D. A., and Markesbery, W. R. (2002) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.*, **74**, 2520-2527.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, **70**, 241-250.
- Bhushan, B., Wei, G. and Haddad, P. (2005). Friction and wear studies of human hair and skin. *Wear*, **259**, 1012-1021.
- Chae, H.-S., Kang, Y.-K., Shin, Y.-K., Lee, H.-J., Yu, J.-I., Lee, K.-G., Yeo, J.-H., Kim, Y.-S., Sohn, D.-S., Kim, K.-Y., Lee, W.-B., Lee, S.-H. and Kim, S.-S. (2004) The role of BF-7 on neuroprotection and enhancement of cognitive function. *Kor. J. Physiol. Pharmacol.*, **8**, 173-179.
- Chen, K., Takano, R. and Hirabayashi, K. (1991) Production of soluble fibroin powder by hydrolysis with hydrochloric acid and physical properties. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **60**, 358-362 (In Japanese with English summary).
- Chen, K., Iura, K., Takano, R. and Hirabayashi, K. (1993) Effect of fibroin administration on the blood cholesterol level of rats loaded with cholesterol. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **62**, 56-60 (In Japanese with English summary).

Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L. and Liu, J. (2006) Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R- α -lipoic acid. *J. Neurosci. Res.*, **83**, 1584-1590.

Dröge, W. (2003) Oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **543**, 191-200.

Frank, C. (2003) Dementia with Lewy bodies. Review of diagnosis and pharmacologic management. *Canadian family physician Medecin de Famille Canadien*. **49**, 1304-1311

Fujiwara, Y., Kobayashi, H., Kawai, S. and Suzuki, K. (2007) The effect of *Vespa simillima* extracts on long-term memory and MK-801-induced learning disability in mice. *Int. J. Indust. Entomol.*, **15**, 39-45

Gan, M., Wan, D., Qin, X., and Gao, P. (2006). Pharmacological study on *Samia cynthia ricini* in old female mice. *J. Ethnopharmacol.*, **105**, 210-4.

Guang, H.-M. and Du, G.-H. (2006) Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **542**, 77-83.

- Hirao, K., Tukakoshi, S. and Igarashi, K. (1999) Effects of fibroin foam powder prepared from silk yarn on serum cholesterol concentration in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.*, **52**, 219–223 (In Japanese with English summary).
- Ho, S., Liu, J. and Wu, R. (2003) Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*, **4**, 15-18.
- Hsiao, J.-F., Ning, H.-C., Gu, P.-W., Lin, W.-Y., and Chu, P.-H. (2008) Clinical role of recurrently elevated macro creatine kinase type 1. *J. Clin. Lab. Anal.*, **22**, 186-91.
- Hyun, C.-K., Kim, I.-Y. and Frost, S.-C. (2004) Soluble fibroin enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.*, **134**, 3257–3263.
- Hyun, J.-W., Lee, K.-G., Yeo, J.-H. and Choe, T.-B. (2008) Hair care effects of hair cosmetics including low molecular weight silk peptide component and micro structure analysis. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 439-444.
- Ichai, C., Chevallier, N., Delaere, P., Dournaud, P., Epelbaum, J., Hauw, J. J. Vincent, J. P. and Checler, F. (1994) Influence of region-specific alterations of neuropeptidase content on the catabolic fates of neuropeptides in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **62**, 645-655.

Igarashi, K., Yoshioka, K., Mizutani, K., Miyakoshi, M., Murakami, T. and Akizawa, T. (2006). Blood pressure-depressing activity of a peptide derived from silkworm fibroin in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 517–520.

井上勤, 朝賀宏照, 田村真弓 (1986) 銀染色による微量タンパク質の検出法. 生物物理化学. **30**, 229-238.

Ishida, T., Shinada, T. and Ohfuné, Y. (2005) Synthesis of novel amino squaric acids via addition of dianion enolates derived from N-Boc amino acid esters. *Tetrahedron Lett*, **46**, 311-314.

石渡繁胤 (1901) 激烈なる一種の軟化病 (卒倒病) に就て (第一), 大日本蚕糸会報, **114**, 1-5.

Jaeho, J. and Won, H. (2010) Even-numbered peptides from a papain hydrolysate of silk fibroin. *J. Chromatogr. B*, **878**, 836-840.

Ji, D.-B., Ye, J., Li, C.-L., Wang, Y.-H., Zhao, J. and Cai, S.-Q. (2009) Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract. *Phytother. Res.*, **23**, 116-122.

Jonas, S. (1988) Anticoagulant therapy in cerebrovascular disease: review and meta-analysis. *Stroke.*, **19**, 1043-1048.

Kim, D.-K., Lee, J.-Y., Sung, J.-J., Kim, E.-T., Kim, Y.-S., Kwon, O.-S., Lee, T.-J., Kang, Y.-K., Chung, Y.-H., Kim, S.-S., Kim, K.-Y., Lee, W.-B. (2004) The role of BF-7 on enhancement of memory and cognitive function. *Kor. J. Anat.*, **37**, 519–527.

Kim, D.-K., Kang, Y.-K., Lee, M.-Y., Lee, K.-G., Yeo, J.-H., Lee, W.-B., Kim, Y.-S. and Kim, S.-S. (2005) Neuroprotection and enhancement of learning and memory by BF-7. *J. Health. Sci.*, **51**, 317–324.

Kim, K., Park, S., Yoo, H.-K., Lee, J.-Y., Jung, H.-Y., Kim, D.-H., Lee, H.-J., Kim, J.-Y., Youn, Y.-C., Marshall, M. R., Kim, S.-S. and Jeong, Y. (2009) Brain factor-7 extracted from *Bombyx mori* enhances cognition and attention in normal children. *J. Med. Food.*, **12**, 643–648.

桐村二郎 (1962) 微生物法による絹糸タンパク質のアミノ酸組成と化学構造に関する研究.

蚕糸試験場報告. **17**, 447-521.

Kiso, M., Tanaka, S., Saba, R., Matsuda, S., Shimizu, A., Ohyama, M., Okano, H. J., Shiroishi, T., Okano, H. and Saga, Y. (2009) The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 9292-9297.

小林勝利 (1996) 温故知新-蚕糸科学技術, 日本蚕糸学会第 66 回大会特別講演, 農林水産技術会議筑波事務所 (4月)

Liu, C.-Y., Lai, Y.-C., Wu, Y.-C., Tzeng, C.-H., and Lee, S.-D. (2010). Macroenzyme creatine kinase in the era of modern laboratory medicine. *J. Chin. Med. Assoc.*, 73, 35-39.

Lu, J., Wu, D.-M., Zheng, Y.-L., Hu, B. and Zhang, Z.-F. (2010) Purple sweet potato color alleviates D-galactose-induced brain aging in old mice by promoting survival of neurons via PI3K pathway and inhibiting cytochrome C-mediated apoptosis. *Brain Pathol.*, 20, 598-612.

Lu, J., Zheng, Y.-L., Luo, L., Wu, D.-M., Sun, D.-X. and Feng, Y.-J. (2006) Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behav. Brain Res.*, 171, 251-260.

Maeda, S., Kwai, T., Obinata, M., Fujiwaara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M. (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315, 592-594.

松本 義明 (1996) 新応用昆虫学 三訂版 (斉藤哲夫ら著), p1, 朝倉書店.

Mori, K., Obara, Y., Hirota, M., Azumi, Y., Kinugasa, S., Inatomi S. and Nakahata, N. (2008) Nerve growth factor-inducing activity of *Hericium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1727-1732.

Morris R. G. M. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.*, **12**, 239-260.

村上 毅, 加藤 弘, 栗林茂治, 村野圭市 (1992) 蚕糸学入門 (日本蚕糸学会編), pp. 1-19, pp.269-276, pp. 329-339,大日本蚕糸会.

Nahm, J. H., Oh, Y. S. (1995) A study of pharmacological effect of silk fibroin. *Agric. Sci.*, **37**, 145-157.

Niidome, T., Takahashi, K., Goto, Y., Goh, S., Tanaka, N., Kamei, K., Ichida, M., Hara, S., Akaike, A., Kihara, T. and Sugimoto, H. (2007) Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity. *Neuroreport*, **18**, 813-816.

小野直達 (1996) 現代蚕糸業と養蚕経営—日本養蚕は生き残れるか—, pp. 4-27, 農林統計協会.

- Okamoto, H., Ishikawa, E. and Suzuki, Y. (1982) Structural analysis of serisin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* **257**, 15192-15199
- 太田静香 (2009) クリキュラ繭からの機能性物質の解析. p. 81, 岩手大学大学院農業研究科農業生命科学専攻修士論文.
- 大内 順子 (2002) カイコシルクパウダーによるマウスの抗痴呆効果作用の解析. P. 44, 岩手大学大学院農学研究科修士論文.
- Oshima, Y. and Suzuki, Y. (1977) Cloning of the silk fibroin gene and its flanking sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5363-5367.
- Park, K.-J., Jin, H.-H., and Hyun, C.-K. (2002). Antigenotoxicity of peptides produced from silk fibroin. *Process Biochem.*, **38**, 411-418.
- Piao, C., Tachikawa, E., Hu, Y., Sato, Y., Yang, P., Yamamoto, K., Shinada, T. and Suzuki, K. (2009) *In vitro* pharmacological activities of the extracts from red ant *Formica aquilonia* as potential therapeutic agents. *J. Trad. Med.*, **26**, 61-67.
- Ragozzino, M. E., Unick, K. E. and Gold, P. E. (1996) Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 4693-4698.

Reisinger, V. and Eichacker, L. A. (2006) Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Pract. Proteomics*, 1–2, 6–15.

Ryu, K. S., Ahm, M.Y., Lee, H. S., Kim, I., Kim, J. W., Kim, S. H and Cjoi, J.H. The tonic effect of the extract from male silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae on rats. *Int. J. Indust. Entomol.*, 5, 123-126

斉藤哲夫, 松本義明, 平嶋義宏, 久野英二, 中島敏夫 (2005) 新応用昆虫学 三訂版. pp. 1-6, 朝倉書店.

Schagger, H. and Jagow, G. V. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368-379.

Secchi, G. (2008) Role of protein in cosmetics. *Clin. Dermatol.*, 26, 321–325.

Shimura, K., Kikuchi, A., Ohtomo, K., Katagata, Y. and Hyodo, A. (1976) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Biochem.*, 80, 693–702.

Shin, S., Yeon, S., Park, D., Oh, J., Kang, H., Kim, S., Joo, S.-S., Lim, W.-T., Lee, J.-Y., Choi, K.-C., Kim, K.-Y., Kim, S.-U., Kim, J.-C. and Kim, Y.-B. (2010) Silk amino acids improve physical stamina and male reproductive function of mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 273-278.

Skogseid, I. M., Nordby, H. K., Urdal, P., Paus, E., and Lilleaas, F. (1992). Increased serum creatine kinase BB and neuron specific enolase following head injury indicates brain damage. *Acta Neurochir.*, 115, 106-111.

Smith C. P., Bores, G. M., Petko, W., Li, M., Selk, D. E., Rush, D. K., Camacho, F., Winslow, J. T., Fishkin, R., Cunningham, D. M., Brooks, K. M., Roehr, J., Hartman, H. B., Davis, L. and Vargas, H. M. (1997) Pharmacological activity and safety profile of P10358, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280, 710-720.

鈴木幸一, 山本圭一郎, 満月眞寿, 大内順子 (2006) 地域と QOL 向上のための昆虫バイオテクノロジー. 蚕糸・昆虫バイオテック. 75, 97-102.

鈴木幸一, 伴戸久徳 (1997) 昆虫機能利用学 (鈴木幸一ら著), pp. 2, pp. 78-79., 朝倉書店

塚田益裕 (1997) 昆虫産業—地上最大の未利用資源の活用— (梅谷献二編) , pp. 122-132, 社団法人農林水産情報技術協会.

Tsushima, M., Yamamoto, K., Goryo, M., Suzuki, F. and Suzuki, K. (2010) Hot-water extract of *Paecilomyces tenuipes* from the silkworm pupae improves D-galactose-induced brain aging in mice. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 79, 45-51.

- Uchidate, M., Iwabuchi, A., Sato, J., Nomura, T. and Nomura, S. (2008) Development of the portable tribometer, Proceedings of JAST Tribology Conference Nagoya, 455-456 (in Japanese).
- Wahl, L. and Nahmias, C. (1996) Modeling of fluorine-18-6-fluoro-L-Dopa in humans. *J. Nucl. Med.*, **37**, 432-437.
- Wahrendorf, M.-S. and Wink, M. (2006). Pharmacologically active natural products in the defence secretion of *Palembus ocularis* (Tenebrionidae, Coleoptera). *J. Ethnopharmacol.*, **106**, 51-56.
- Wei, H., Li, L., Song, Q., Ai, H., Chu, J. and Li, W. (2005) Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.*, **157**, 245 -251.
- Wimo, A., Winblad, B., Aguero-Torres, H. and von Strauss, E. (2003) The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **17**, 63-67.
- Yamada, H., Igarashi, Y., Takasu, Y., Saito, H., and Tsubouchi, K. (2004) Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *Biomaterials*, **25**, 467-472.

Yamaguchi, N., Kawaguchi, K. and Yamamoto, N. (2009) Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, **620**, 71-77

山本圭一郎 (2005) カイコフィブロインペプチド混合物からの抗痴呆活性物質の同定と機能解析. p. 68, 岩手大学大学院農学研究科修士論文.

Yamauchi, C., Okazaki, W. Inoue, K. and Sakaino, A. (2007) Enzymatic method for assessing hair damage with reduction and subsequent oxidation. *SENTI GAKKAISHI*, **63**, 33-38.

Yanai, T., Suzuki, Y. and Sato, M. (2003) Prolyl endopeptidase inhibitory peptide in wine. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **67**, 380-382.

Zhang, D., Liu, G., Shi, J., and Zhang, J. (2006). *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates D-galactose and NaNO₂ induced memory impairment in mice. *J. Ethnopharmacol.*, **104**, 250-256.

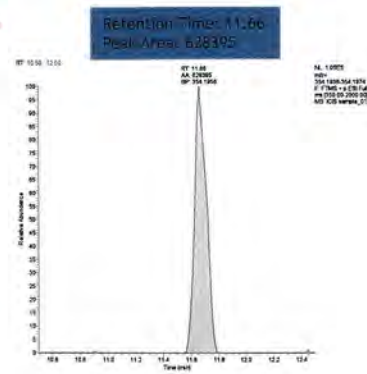
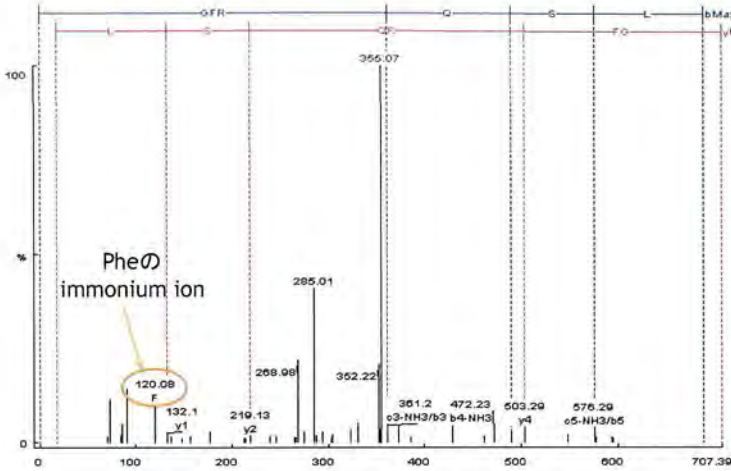
Appendix

FPM の LC - MS/MS 分析で
得られたペプチドのマスクロマト
グラムとアミノ酸配列

m/z 354.1956, +2, GFRQSL

- Peptide Candidates
- Manual De Novo
 - PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - GFRQSL 43.8%
 - GFRGASL 15.6%
 - GFRAGSL 15.6%
 - FGRQSL 3.7%
 - GFRASL 2%
 - PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)
 - GFRQSL 99%

- タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#121-126に相当するGFRQSLと同定された
- DeNovo sequencingでもGFRQSLが候補配列の一つだった



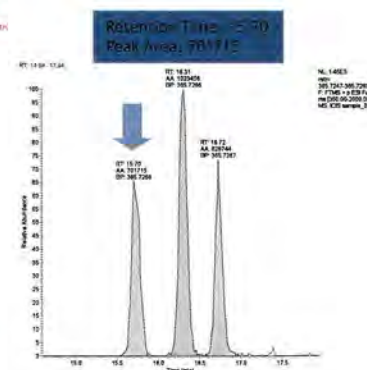
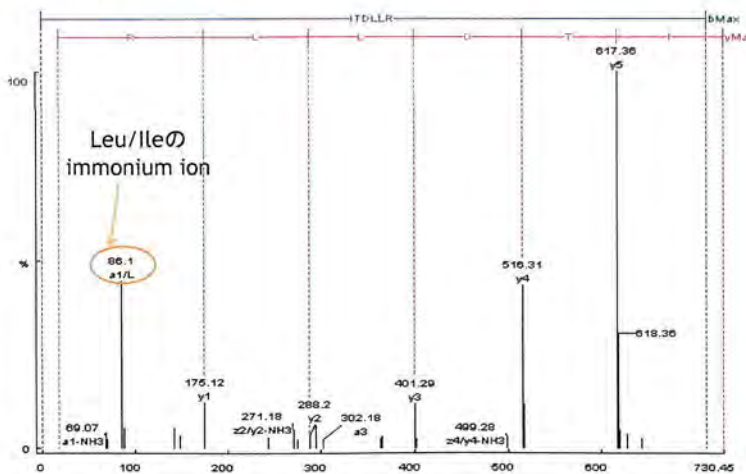
m/z 354.1956 ±5ppmのマスクロマトグラム

上記候補のうち、黄色でハイライトした配列のアライメントを示している(以下同様)

m/z 365.7265, +2, ITDLLR

- Peptide Candidates
- Manual De Novo
 - PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - LTDLLR 94.9%
 - LTDLLR <1%
 - LTDLLR <1%
 - LDTLLR <1%
 - LTDLLR <1%
 - PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)
 - ITDLLR 99%

- タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#229-233に相当するITDLLRと同定された
- DeNovo sequencingではLTDLLRが候補配列の一つだった(LとIは区別不可)
- 同じ質量をもつピークが三本確認された



m/z 365.7265 ±5ppmのマスクロマトグラム

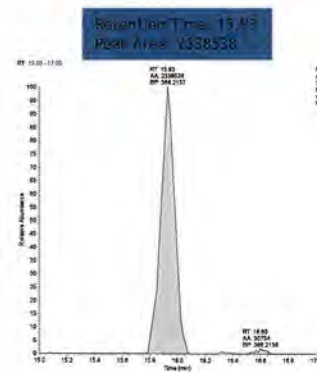
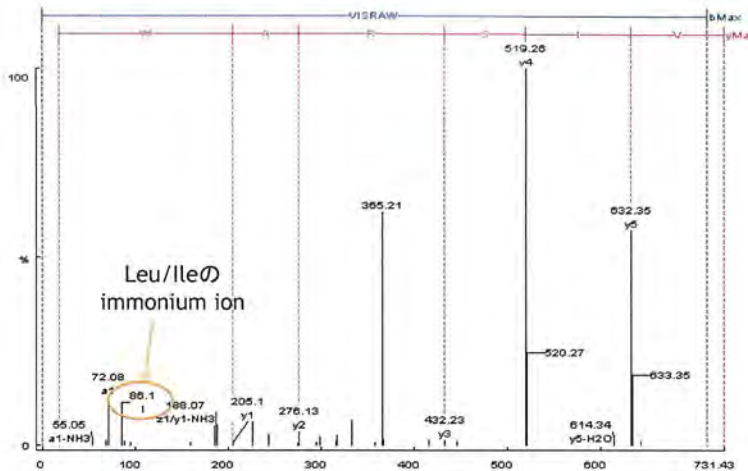
m/z 366.2134, +2, VISRAW

Peptide Candidates

- ⊖ PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - VLSRAW 99%
 - VLSRAW <1%
 - VLSRAW <1%
 - VLSRAW <1%
 - VLSRAW <1%
- ⊖ PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)
 - VISRAW 99%

➤ タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#42-47に相当するVISRAWと同定された

➤ DeNovo sequencingでもVLSRAWが候補配列の一つだった (LとIは区別不可)



m/z 366.2134 ± 5ppmの
マクロマトグラム

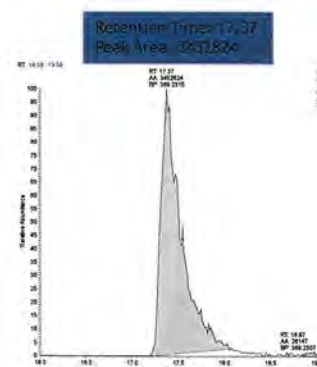
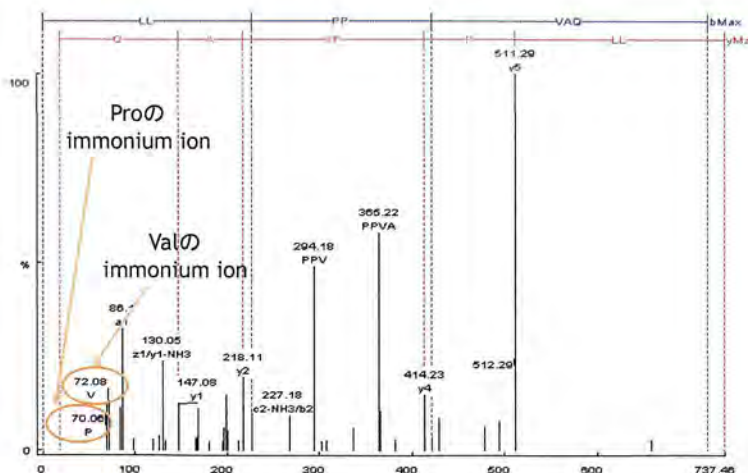
m/z 369.2314, +2, LLPPVAQ

Peptide Candidates

- ⊖ PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - LLPPVAQ 75.7%
 - LLPPVAGA 9.5%
 - LLPPVAAG 9.5%
 - LLPPVAQ 3.7%
 - LLPPVAGA <1%
- ⊖ PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)
 - LLPPVAQ 99%

➤ タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#214-220に相当するLLPPVAQと同定された

➤ DeNovo sequencingでもLLPPVAQが候補配列の一つだった



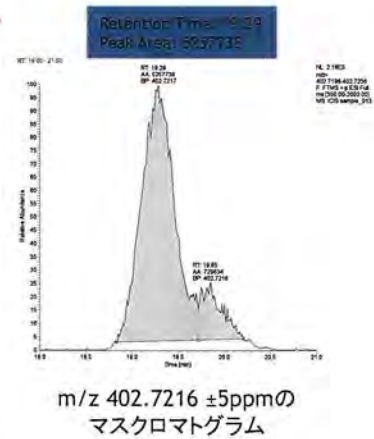
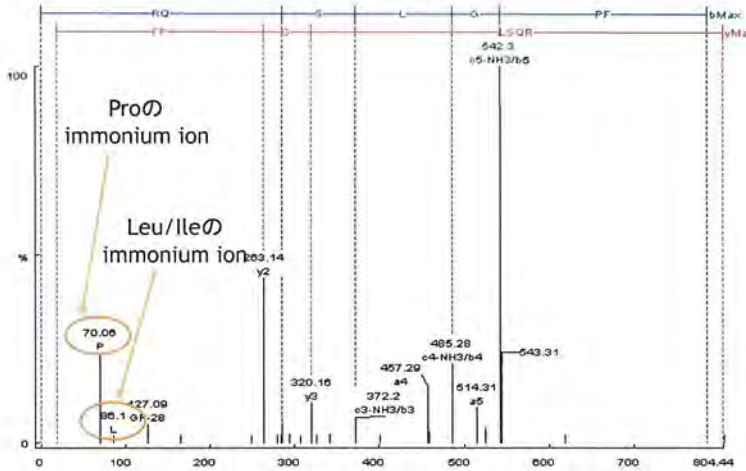
m/z 369.2314 ± 5ppmの
マクロマトグラム

m/z 402.7216, +2, RQSLGPF

Peptide Candidates

- PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - LSRQGF 3.1%
 - LSRQGF 3.1%
 - LSRQGF 3.1%
 - LSRQGF 3.1%
 - LSRQGF 3.1%
- PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)
 - RQSLGPF 67.6%**

- タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#123-129に相当するRQSLGPFと同定された
- 同定の信頼性はやや劣るが、immonium ionの存在から少なくともProとLeu/Ileは含むペプチドであると推測される
- DeNovo sequencingでは有意な候補が得られなかった

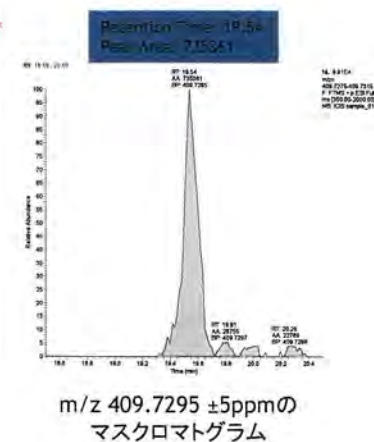
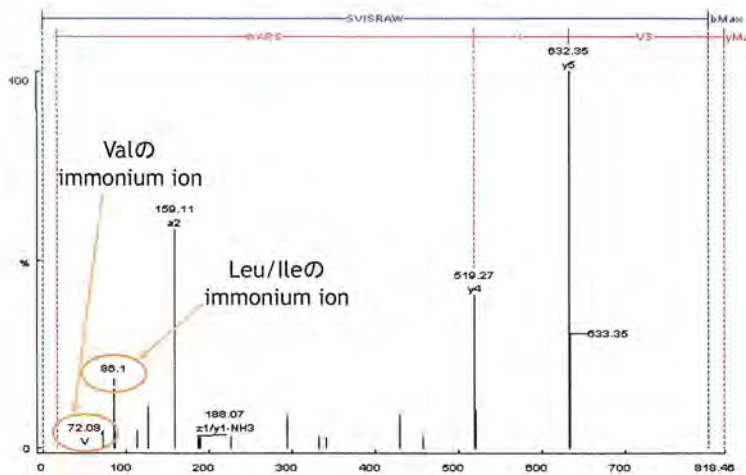


m/z 409.7295, +2, SVISRAW

Peptide Candidates

- PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - SVLWARS 11.6%
 - SVLWASK 11.6%
 - VSLWARS 11.6%
 - VSLWASK 11.6%
 - SVLWSRA 2.6%
- PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)
 - SVISRAW 83%**

- タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#41-47に相当するSVISRAWと同定された
- 同定の信頼性はやや劣るが、immonium ionの存在から少なくともValとLeu/Ileは含むペプチドであると推測される
- DeNovo sequencingでは有意な候補が得られなかった



m/z 415.7034, +2, SDNEIPR

Peptide Candidates

☑ PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)

SDNELPR 96.7%

SDGGELPR 3.3%

SDNELRP <1%

SDGGELRP <1%

SDNERPL <1%

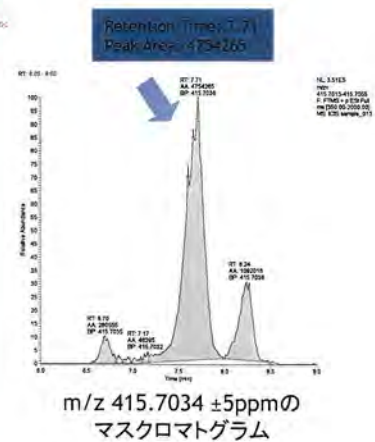
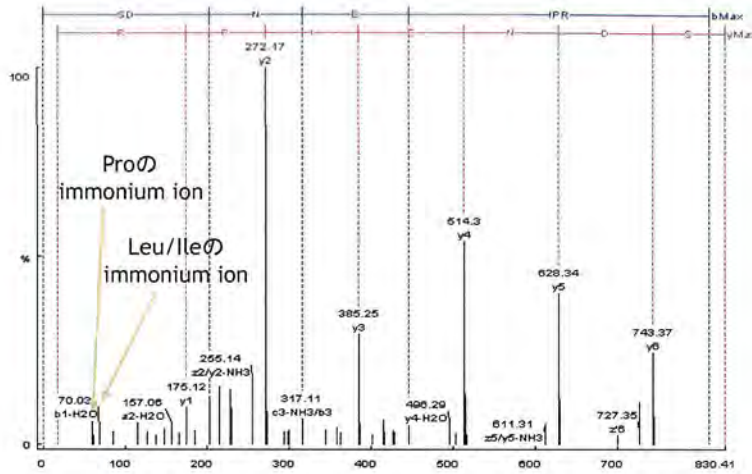
☑ PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)

SDNEIPR 99%

➤ タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#26-32に相当するSDNEIPRと同定された

➤ DeNovo sequencingでもSDNELPRが候補配列の一つだった(LとIは区別不可)

➤ 同じ質量を持つピークが複数観測された



m/z 482.2347, +2, VDDTDKISIA

Peptide Candidates

☑ Manual De Novo

☑ PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)

VDDTKDTAV 11.9%

VDDTKDTGL 11.9%

VDDTKDTVA 11.9%

VDDTKDTLG 11.9%

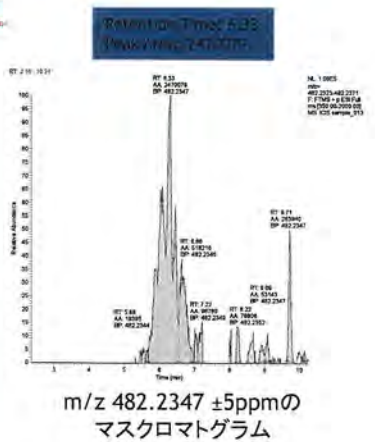
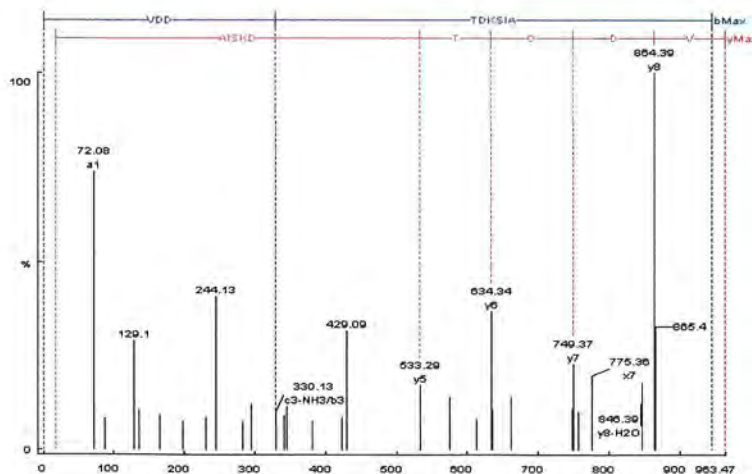
VDDTKDTAV 11.9%

☑ PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)

VDDTDKISIA 99%

➤ タンパク同定の結果、FIBL_BOMMO由来のAA#50-58に相当するVDDTDKISIAと同定された

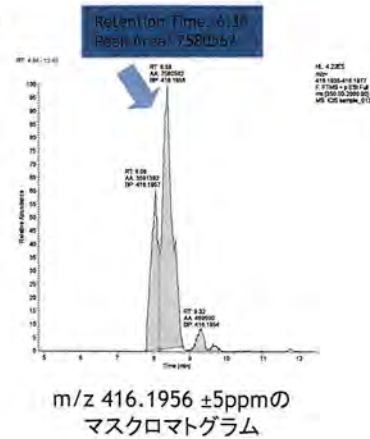
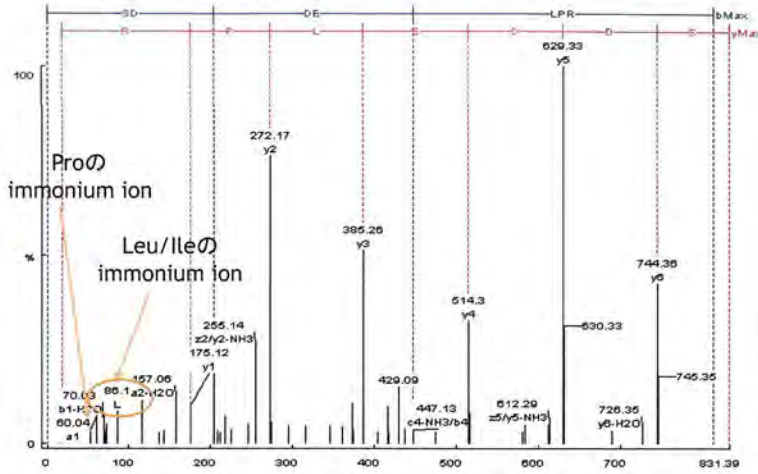
➤ DeNovo sequencingではVDDTの部分配列が得られた



m/z 416.1956, +2, SDDELPR

Peptide Candidates
 ☒ Manual De Novo
 ☒ PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 SDDELPR 39%
 SDELPR <1%
 SDELPR <1%
 SDELPLR <1%
 DDELPR <1%

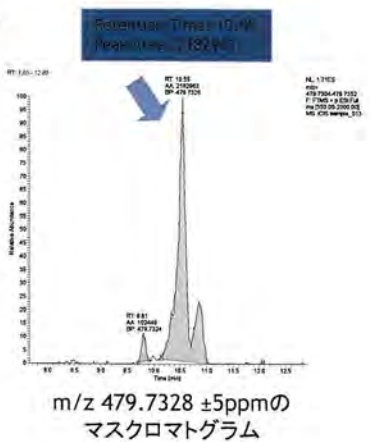
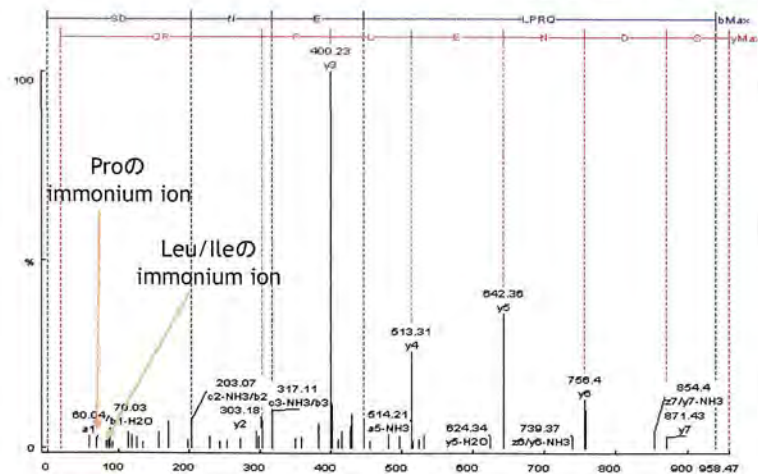
- タンパク同定では、登録したタンパク質と一致する配列が存在しなかった
- DeNovo sequencingによりSDDELPRと読むことができた
- ProとLeu/IleのImmonium ionが観測された
- 同じ質量を持つピークが複数観測された



m/z 479.7328, +2, SDNELPRQ

Peptide Candidates
 ☒ PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 SDNELPRQ 83%
 SDNELPRAG 3.7%
 SDNELPRGA 3.7%
 SDGGLPRQ 3.7%
 SDNELPQR <1%

- タンパク同定では、登録したタンパク質と一致する配列が存在しなかった
- DeNovo sequencingによりSDNELPRQと読むことができた
- ProとLeu/Ileのimmonium ionが観測された
- 同じ質量を持つピークが複数観測された

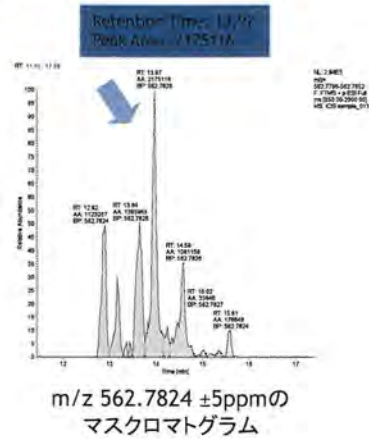
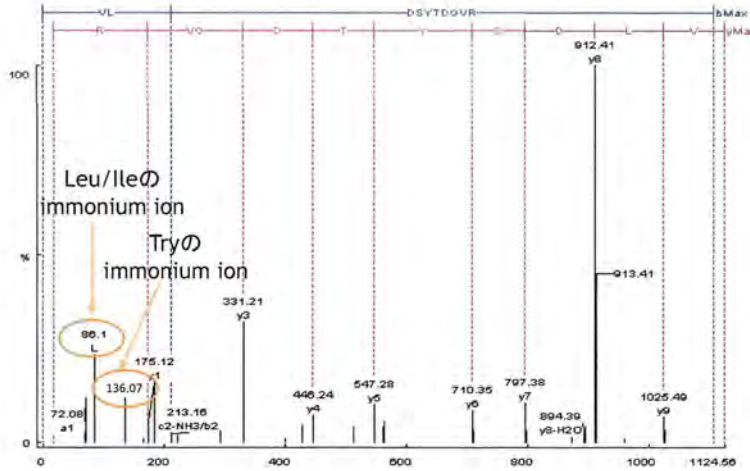


m/z 562.7824, +2, VLDSYTDGVR

Peptide Candidates

- PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - VLDSYTDGVR 49.9%
 - VLDSYTDVGR 49.9%
 - VLDSEYDVR <1%
 - VLDSEYDGR <1%
 - VLDSEYDVRG <1%

- タンパク同定では、登録したタンパク質と一致する配列が存在しなかった
- DeNovo sequencingによりVLDSYTDGVRと読むことができた
- TyrとLeu/Ileuのimmonium ionが観測された
- 同じ質量を持つピークが複数観測された



m/z 641.3818, +2, APPAPAPVAPLLPA

Peptide Candidates

- PEAKS Auto De Novo (5.0 0.01 None)
 - APPAPAPVAPLLPA 20.5%
 - APPAPAPVALPLPA 20.5%
 - APPAPAPVAPLLPA 20.5%
 - APPAPAPVALPLPA 20.5%
 - PAPAPAPVAPLLPA 2.4%

- PEAKS DB Search (Uniprot_BOMMO 5.0 0.01 None)

- タンパク同定では、登録したタンパク質と一致する配列が存在しなかった
- DeNovo sequencingによりAPPAPAPVAPLLPAと読むことができた
- ProとLeu/Ileuのimmonium ionが観測された

