

卵殻膜由来生理活性ペプチドの効率的生産を目指した 卵殻膜分解酵素の大量発現

神戸大学大学院農学研究科・教授 竹中 慎治

■ 緒言

鶏卵は、身近な動物性タンパク質の一つで、栄養価も高く、私たちの健康に大きく寄与している。一方、鶏卵の外側を覆う卵殻部は、卵重量の約 10% [卵殻(9.1%)、卵殻膜(0.9%)] を占めており、その多くは不可食部として埋め立てや焼却廃棄されている¹⁾。そこでこれまでに、未利用な資源である卵殻部の有効利用の確立を目指した研究が行なわれてきた。卵殻膜の有効利用に関する先行研究として、膜を機能性基材として利用する試みが挙げられるが^{2,3)}、「卵殻膜の限定分解」や「分解物の有効利用」に関する研究およびその実用化を目指した研究は少ない。卵殻膜は切り傷ややけどの治癒、保湿効果などに効能(生理作用)があるとされており⁴⁾、化粧品や医薬品およびサプリメントを開発する分野において潜在的な利用価値があると期待されるが、あまり利用されていないのが現状である。その要因の一つとして卵殻膜が水に不溶なことが挙げられ、有効利用には温和な条件で簡便に卵殻膜を処理できる方法の開発が必要である。卵殻膜の可溶化法として酸やアルカリによる化学的処理^{5,6)}が試みられているが、処理後の中和や加水分解を進めて特定の可溶性タンパク質やペプチド類を再現性よく取得することは難しいと思われる。そこで、市販のプロテアーゼや微生物酵素による卵殻膜の加水分解が検討されてきた^{7,8)}。

Pseudomonas aeruginosa ME-4 は卵殻膜を分解する細菌として分離され、本菌の生産する卵殻膜分解酵素(金属プロテアーゼ、以下、ME4_プロテアーゼ)の特性解析、遺伝子クローニングおよび大腸菌での発現がなされてきた⁹⁾。また、親株由来酵素および組み換え酵素を用い、卵殻膜の分解条件の検討もなされてきた¹⁰⁾。これを基に、旗影会の助成を受け、芦田・竹中らは卵殻膜分解物の分画条件の検討および得られた画分の生理活性試験を行った^{11,12)}。その結果、筋肉細胞への糖の取り込みを指標として高血糖予防効果が見られた^{12,13)}。本研究では、生理活性ペプチドの構造解析と大量取得を最終目標とし、*Bacillus* 属細菌による組み換え ME4_プロテアーゼの効率的発現法の確立と生理活性ペプチドの構造解析を目的として研究を進めた。

■ 方法

(1) *P. aeruginosa* ME-4 からの ME4_プロテアーゼ遺伝子のクローニング

既報の方法に従い¹⁰⁾、ME-4 株からゲノム DNA を調製し、PCR にて ME4_プロテアーゼ遺伝子のプロ-成熟タンパク質領域を増幅後、*Bacillus* 属細菌の宿主ベクター系にて発現させることにした。つまり、*B. subtilis* RIK1285-pBES 発現系と *B. choshinensis*-pBIC1 ~ pBIC4 発現系を用いた。同遺伝子の増幅および発現用ベクターとのライゲーションに用いた PCR プライマーを Table 1 に示す。(操作の詳細については、メーカー提供の操作法を参照^{13,14)}。)

(2) 形質転換株の取得

B. subtilis RIK1285 および *B. choshinensis* SP3 の形質転換および形質転換株の選別はカナマイシン (10 microG/ml) またはネオマイシン (50microG/ml) を添加した LB 培地 (0.1% (w/v) スキムミルク含有) を用い、コロニー周辺のハローの大きさから高発現と思われる形質転換株を選んだ。

(3) 形質転換株の培養

B. subtilis RIK1285 の形質転換株の培養は、カナマイシン (10microG/ml) を添加した LB 培地 (3ml/tube および 50ml/500ml 坂口フラスコ) を用い、37°C で振とう培養して培養上清を回収した。*B. choshinensis* SP3 の形質転換株の培養は、ネオマイシン (50microG/ml) を添加した 2SY 培地または TM 培地 (3ml/tube および 50ml/500ml 坂口フラスコ) を用い、30°C で振とう培養して培養上清を回収した。

(4) 培養上清中の組み換え ME4_プロテアーゼの精製

培養上清 (50ml) に対して 2 倍量のアセトンを下し、組み換え酵素を沈殿として得た。沈殿を 20

mM Tris-HCl buffer (pH8.0) 10ml にて溶解し、同緩衝液で一晩透析した。つづいて、同緩衝液で平衡化した DE52 セルロースカラム (1.5×20cm) にアプライし、洗浄後、0 から 0.4 M NaCl を含む同緩衝液にてリニアグラジエント法によりタンパク質を溶出した。各溶出フラクション (5ml/tube) についてプロテアーゼ活性を測定し、高活性画分については、SDS-PAGE により純度を調べた。プロテアーゼ活性測定は既報の方法によった¹⁰⁾。

(5) 精製酵素による卵殻膜の可溶化と可溶化ペプチドおよびタンパク質の回収

卵殻膜加水分解反応は既報の方法を参考に行った¹⁰⁾。つまり、150ml の 10mM Sodium-potassium phosphate buffer (pH6.5) に卵殻膜粉末 (750mg) と 5ml の ME4_プロテアーゼ液 (60U/ml) を加えて、pH 6.5、50°C、140rpm にて 12 時間インキュベートした。遠心分離 (16,440×g、10min、4°C) した後、得られた上清をフィルターろ過 (吸引、0.45μm) した (Fraction 1-1)。つづいて、Amicon Ultra Centrifugal Filter (Ultracel®-3K) にて遠心分離し、通過液 (Fraction 1-2) と膜上の残渣 (Fraction 1-3) を回収した。通過液を逆相クロマトグラフィーに供し、分画した。HPLC の条件は以下に示した。タンパク質量は、Lowry 法によって定量し、BSA 換算で濃度を算出した。可溶性ペプチド量は、ニンヒドリン法によって定量し、GlyGlyGly 換算で濃度を算出した。

[HPLC 条件]

- ・カラム: COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6×250mm、ナカライテスク)
- ・移動相: 5mM トリフルオロ酢酸
- ・流速: 0.5ml/min
- ・検出: UV 215nm

(6) 分取サンプルの分析

サンプル分析はプロテインシーケンサーおよび GC-MS 分析によった。それぞれの条件を以下に示す。

[プロテインシーケンサー]

- ・装置: ABI ProCise 492 プロテインシーケンサー

[GC-MS 分析]

- ・誘導体化: *N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide : acetonitrile (100:2, v/v) (BSTFA) にて 150°C、3 時間処理
- ・装置: 島津 GC-MS-QP2010 Ultra
- ・カラム: InertCap 1MS (0.25mm I.D.×30 m, GL サイエンス, 東京)
- ・INJ/ イオン源温度: 280°C
- ・カラムオープン温度: 80°C (4min) → (5°C/min) → 300°C (30min)
- ・検出: MS (ionization, 70eV)

■ 結 果

(1) ME4_プロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現系の構築

Bacillus 属細菌を宿主とする組み換えタンパク質の生産を検討した。まず、*B. subtilis* RIK1285-pBE-S 発現系では、培養上清中にプロテアーゼ活性はわずしか見られず、SDS-PAGE の結果から C 末端側が加水分解されていることが分かった (data not shown)。同発現系ではシグナルペプチドのスクリーニングにより分泌生産に適した配列を選択できるが、これ以上の検討はやめることとした。続いて、*B. choshinensis* SP3-pBIC1 ~ pBIC4 発現系にて同プロテアーゼの発現を行った。得られた形質転換株 (14 株) の中から発現ベクター毎に発現量を比較すると pBIC4 ベクターを用いた際に最大となった (Table 2)。以後は、pBIC4-ME_プロテアーゼベクターを有する形質転換株 L-4-3 を用いて培養量のスケールアップと酵素精製を行うことにした。

(2) 組み換え ME4_プロテアーゼの生産と精製

培養容器を 500ml 坂口コルベンに固定し、培地量を検討した結果 50ml 添加時が最大となり、発現には通気が重要な要素であった。また、TM 培地および 2SY 培地にてそれぞれ L-4-3 を培養し、得られた培養上清中の組み換え ME4_プロテアーゼを回収後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。Table 3 に各段階での酵素活性 (総活性、U) をまとめた。また、高活性画分について SDS-PAGE にて純度を調べ、単一であることを確認した (Fig. 1)。

(3) 組換え卵殻膜分解酵素による卵殻膜の可溶化試験

2013年度竹中および2014年度芦田の旗影会報告書^{11,12)}にあるように、卵殻膜由来ペプチド(分画範囲3.0kDa以下の画分)をHPLCにて分画すると、ODSカラムにはほとんど非吸着のペプチドサンプルについて生理活性が見られている。本研究では、加水分解反応・遠心分離後、上清について0.45microMのフィルターにてろ過することで卵殻膜由来微細物を除去して可溶性ペプチドとタンパク質を回収することにした。続いて、既報通り分画範囲3.0kDa以下の画分を得た。各段階でのペプチド量とタンパク質量をTable 3にまとめた。酵素反応開始直後に回収したコントロールと比較してペプチドおよびタンパク質の可溶化ができた。また、SDS-PAGEにて卵殻膜由来可溶性タンパク質を調べたところ、卵殻膜分解酵素(33kDa)以外にもタンパク質のバンドが見られた。

(4) 逆相HPLCによる可溶性ペプチド画分の分取と解析

2014年度芦田の旗影会報告書¹²⁾にあるように、ODSカラムにはほとんど非吸着のペプチドサンプルについて生理活性が見られた。そこで、本研究では非吸着画分のみ(Fig. 3(A), Frac. 1)を回収し、機器分析することとした。同サンプルを、プロテインシーケンサーにて解析した結果、1サイクル目にアラニン、バリン、ロイシン由来ピークが顕著にみられた(Fig. 3(B))。2サイクル目以降にも別のアミノ酸由来ピークが観察されたが、アラニン、バリン、ロイシンと同程度の濃度のアミノ酸由来ピークがほとんど見られなかった。つづいて、トリメチルシリル化した後にGC-MSにて分析すると、確かに、アラニン、バリン、ロイシン由来ピークが8.6分、12.1分、13.8分に観察された。よって、同フラクション(Fig. 3(A), Frac. 1)には、主要なアミノ酸としてアラニン、バリン、ロイシンが含まれると考えられる。

■ 考 察

P. aeruginosa ME-4株の生産するプロテアーゼは水に難溶な卵殻膜を加水分解できることから、可溶性ペプチドを調製可能である。しかし、ME-4株は日和見感染症を引き起こす常在菌としても有名であり、親株を大量培養してME4_プロテアーゼを得ることは避けることが望ましい。そこで本研究では、組み換え酵素を菌体外に分泌できる発現系の構築を検討した。*B. subtilis* RIK1285においてアルカリセリンプロテアーゼ(Apr)と金属プロテアーゼ(Npr)両遺伝子が発現しなくなっているが、同宿主はその他にも菌体内・菌体外プロテアーゼ遺伝子を有していることから、組み換えタンパク質の翻訳・フォールディングの過程で他の宿主由来プロテアーゼが働いたと考えられる¹⁶⁾。一方、*B. choshinensis* SP3では、4種の発現ベクターを検討した結果、細胞壁タンパク質の分泌シグナルを有するベクターが最もよかった。培養系を50ml/500ml 坂口フラスコに変更して、親株の分泌量(76U/100ml 培養上清)⁹⁾と比較すると39.5±1.0/50ml 培養上清(Table 3)であった。ME4_プロテアーゼの発現は、大腸菌ですで行っているが、不溶性組み換えタンパク質を可溶化する必要があった¹⁰⁾。培養後、培養上清からアセトンにて目的酵素を高収率で回収できる方法として、当初の目的を達したと思われる。今後、1L以上のスケールアップ培養を検討したい。

卵殻膜を加水分解して得られた加水分解物の生理活性は、これまでに芦田らとの共同研究を行ってきた。その結果、マウスに卵殻膜(および加水分解物)を投与してグルコース負荷試験を実施し、卵殻膜に高血糖予防効果を有することが示されている^{12,18)}。特に、我々が可溶性ペプチド画分と命名し、さらにHPLCにて分画して得られた画分(Fig. 3(A), Frac. 1)が最も効果が見られた。活性試験結果は、再現性があったことから、本研究において同画分について調べることにした。低分子ペプチドであることを想定し、プロテインシーケンサーにて配列解析(5残基分)をした結果、解析1サイクル目にアラニン、バリン、ロイシンが含まれていることがわかった。2サイクル目以降も種々のアミノ酸由来ピークが観察されたが、1サイクル目に見られたピーク(面積)ほどではなかった。そこで、GCMSにて同画分のアミノ酸を調べたところ、3つとも含まれていることがわかった。よって、Frac. 1には主要なアミノ酸としてアラニン、バリン、ロイシンが含まれると結論した。筋収縮による骨格筋糖輸送活性化とそのシグナル伝達におけるロイシンの調節作用の検討がなされている。つまり、ロイシンが筋収縮によって活性化される骨格筋糖輸送をさらに促進するとともに、その作用発現にはp70S6キナーゼを介したAMPKの活性調節が関与することが考察されている¹⁷⁾。今後、共同研究者とともにアラニン、バリン、ロイシンが与える高血糖予防効果を検討する予定である。

本研究の最終目標は、卵殻膜を温和な条件で限定分解することで再現性良く生理活性のある可溶性ペプチドやタンパク質を得ることにある。Fig. 2(lane 1-3)の結果から、我々がこれまでに検討し

ていなかった可溶性タンパク質も調製できることがわかった。今後は、有効分画範囲の異なるろ過フィルター等を用いてより高分子のペプチドやタンパク質の取得を試みる予定である。

■ 要 約

P. aeruginosa ME-4 株の生産する ME4_プロテアーゼは水に難溶な卵殻膜を加水分解できることから、可溶性ペプチドを調製可能である。また、可溶性ペプチド混合物および HPLC 分画フラクションには、生理活性が認められた。本研究では、ME4_プロテアーゼの効率的な調製法の検討と生理活性を示す画分について調べた。*Bacillus* 属の宿主ベクター系にて発現を検討した結果、*B. choshinensis* SP3-pBIC4 発現系を用いることで親株と同程度の酵素量を得ることが可能となった。我々が報告した大腸菌宿主ベクター系での発現と比較して、同方法では活性体で成熟タンパク質を得られことやアセトン分画にて回収できることから効率的な組み換えプロテアーゼ調製法となると思われる。スケールアップが今後の課題である。組み換え ME4_プロテアーゼを用いて卵殻膜を加水分解した後、既報の方法を改変して可溶性タンパク質画分と 3.0kDa のフィルターろ過 通過液を得た。SDS-PAGE の結果可溶性タンパク質画分には分子量の異なるタンパク質が含まれていることがわかった。通過液をさらに HPLC にて分画し、生理活性を示す画分についてプロテインシーケンサーおよび GCMS にて調べた。その結果、同画分には主要なアミノ酸としてアラニン、バリン、ロイシンが含まれることがわかった。今後は、有効分画範囲の異なるろ過フィルター等を用いてより高分子のペプチドやタンパク質の取得を試み、生理活性を調べるのが課題である。得られた成果は、2016 年度日本農芸化学会(北海道)にて発表した¹⁸⁾。

■ 文 献

1. 中村良・1998. 「卵の科学」, 朝倉書店, pp. 1-9.
2. S. Ishikawa, K. Suyama, K. Arihara, and M. Itoh. 2002. Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. *Bioresour. Technol.* 81:201-206.
3. D. Xiao, and M. M. F. Choi. 2002. Aspartame optical biosensor with bienzyme-immobilized eggshell membrane and oxygen-sensitive optode membrane. *Anal. Chem.* 74:863-870.
4. T. Ino, M. Hattori, T. Yoshida, S. Hattori, K. Yoshimura, and K. Takahashi. 2006. Improved physical and biochemical features of a collagen membrane by conjugating with soluble egg shell membrane protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:865-873.
5. K. Takahashi, K. Shirai, M. Kitamura, and M. Hattori. 1996. Soluble egg shell membrane protein as a regulating material for collagen matrix reconstruction. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:1299-1302.
6. F. Yi, J. Yu, Z. X. Guo, L. X. Zhang, and Q. Li. 2003. Natural bioactive material: a preparation of soluble eggshell membrane protein. *Macromol. Biosci.* 3:234-237.
7. 早瀬基、青木健次 2008 卵殻膜タンパク質の分解能を有する微生物 特開 2008-61514.
8. 平松肇、山田有砂、堀池俊介、坂本和加子 2009 新規な可溶性卵殻膜の製造方法 特開 2009-132661.
9. M. Cheng, S. Takenaka, S. Aoki, S. Murakami, and K. Aoki. 2009. Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *J. Biosci. Bioeng.* 107:373-378.
10. S. Takenaka, S. Hano, M. Cheng, K. Yoshida, and K. Aoki. 2012. Organic solvent-tolerant elastase efficiently hydrolyzes insoluble, cross-linked, protein fiber of eggshell membranes. *Biotechnol. Lett.* 34:949-955.
11. 竹中慎治 2013 微生物由来加水分解酵素を用いた卵殻膜分解と分解物中の生理活性ペプチドの検索. 旗影会報告書 48-56.
12. 芦田均 2014 卵殻膜由来ペプチドの肥満・高血糖予防効果の可能性探索. 旗影会報告書 59-66.
13. 芦田均ら、2015 卵殻膜由来ペプチドによるグルコース取り込み促進効果について、日本食品科学工学会 第 62 回大会 講演要旨集、2lp2.
14. http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/3380_j.pdf
15. http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/hb300_hb310_j.pdf
16. 関口順一、2013 細菌細胞壁溶解・修飾酵素群の総合的研究、生物工学会誌、91 巻、50-72.

17. N. Iwanaka, T. Egawa, N. Satoubu, K. Karaike, X. Ma, S. Masuda, and T. Hayashi. 2010. Leucine modulates contraction- and insulin-stimulated glucose transport and upstream signaling events in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 108:274-282.
18. 竹中慎治ら、2016 卵殻膜分解酵素の異種発現と同酵素を用いた卵殻膜からの生理活性ペプチドの取得、日本農芸化学会 2016 年度大会 講演要旨集、3F188

Table 1 Host strains, plasmids, and PCR primer in this study.

| Host | Expression vector | Primer |
|--|---|---|
| <i>B. subtilis</i> RIK1285 (<i>trpC2</i> , <i>lys1</i> , <i>aprE</i> Δ3, <i>nprR2</i> , <i>nprE18</i>) | pBES | 5'-GCGGCCGCCGAGGCGGGCGGCCCGG-3' 5'-TTT TAGATCTTTACAACGCGCTCGGGCAGG-3' |
| | (Ap ^r , Kn ^r , ColE1 ^{ori} , pUBori, <i>aprE</i> promoter) | |
| <i>B. choshinensis</i> HPD31-SP3 | pBIC1 | 5'-AACGTGGTATCGGCTGCTTTTGCCGCCGACCTGAT-3' 5'-CATCCTGTTAAGCTTTTACAACGCGCTCGGGCAGG-3' |
| | pBIC2 | 5'-CCCATGGCTTTCGCT GCTTTTGCCGCCGACCTGAT-3' 5'-CATCCTGTTAAGCTTTTACAACGCGCTCGGGCAGG-3' |
| | pBIC3 | 5'-AGTTCCGCATTCGCT GCTTTTGCCGCCGACCTGAT-3' 5'-CATCCTGTTAAGCTTTTACAACGCGCTCGGGCAGG-3' |
| | pBIC4 | 5'-CCCATGGCTTTCGCT GCTTTTGCCGCCGACCTGAT-3' 5'-CATCCTGTTAAGCTTTTACAACGCGCTCGGGCAGG-3' |

Table 2 Expression of ME4_{protease} in *Brevibacillus* transformants

| Transformant (expression vector) | TM medium | 2SY medium |
|-------------------------------------|------------|------------|
| L-1-1 | 0.50±0.011 | 0.69±0.004 |
| L-2-4 | 0.51±0.014 | 0.84±0.005 |
| L-3-3 | 0.68±0.034 | 0.92±0.024 |
| L-4-3 | 0.72±0.009 | 0.96±0.034 |

Table 3 Summary of recombinant ME4_{Protease}

| Fraction | TM medium | 2SY medium |
|---------------------|-----------|------------|
| Supernatant (50 ml) | 39.5±1.0 | 41.5±0.25 |
| Acetone | 31.6±1.4 | 33.0±0.50 |
| DE52 | 26.0±0.90 | 17.7±0.34 |

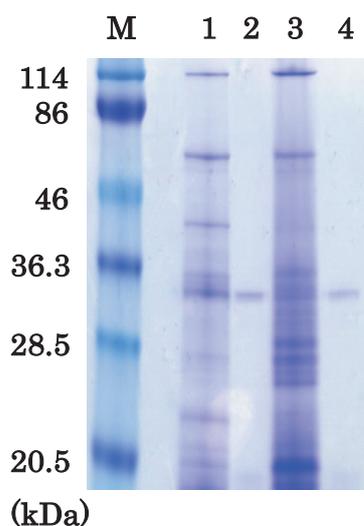


Fig. 1 SDS-PAGE of the purified recombinant ME4_protease.

Recombinant ME4_protease was expressed in the *Brevibacillus* transformants on TM and 2SY media. After collection of the cultural supernatants, the recombinant protease was precipitated by acetone fractionation; the crude precipitate was dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and loaded on DE52 column. Lanes: M, middle range molecular markers; 1, the cultural supernatants from TM medium; 2, the active fraction; 3, the cultural supernatants from 2SY medium; 4, the active fraction.

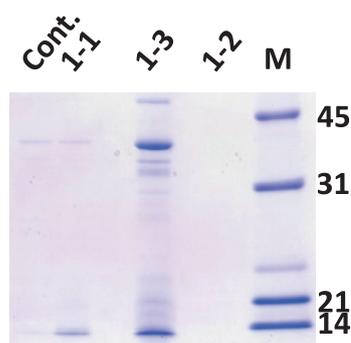
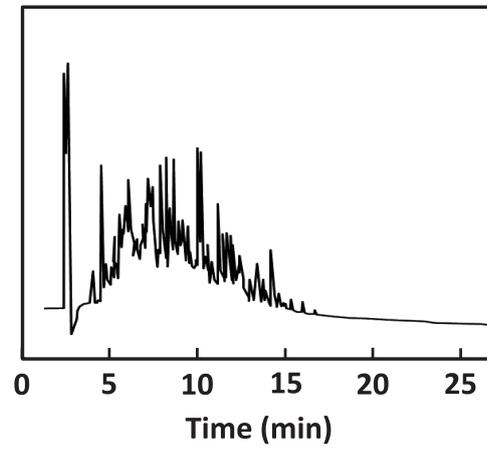


Fig. 2 SDS-PAGE of the fractionated soluble proteins from eggshell membrane.

Hydrolysis of eggshell membrane by recombinant ME4_protease was carried out according to previously reported procedures¹⁰. The reaction mixture was centrifuged. The supernatant was filtrated through an 0.45 microM filter (Millipore); the filtrated solution was collected (fraction 1-1). The solution was filtered through an ultrafilter (Millipore) that excludes substances > 3kDa. The filtrated solution was collected (fraction 1-2); the residues on the membrane (fraction 1-3) were dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH7.5). Lanes: M, middle range molecular markers; 1-1, fraction 1-1,; 1-2, fraction 1-2; 1-3, fraction 1-3.

(A)



(B)

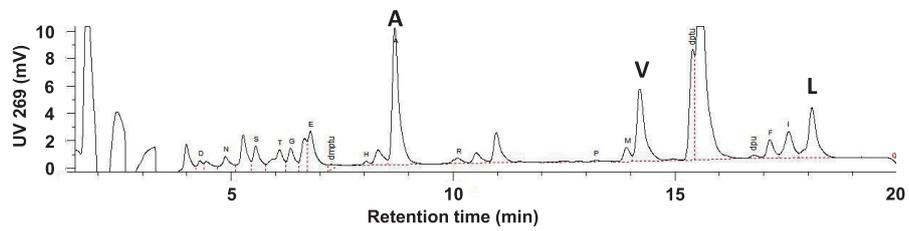


Fig. 3 Fractionation of fraction 1-3 by HPLC and its analysis by protein sequencer.

(A) Fraction 1-3 was fractionated by a HPLC system. The peaks (retention time was around 3 min) was collected and concentrated. (B) The concentrate was analyzed by ABI Procise 492.