

微生物由来エラスターゼによる卵殻膜の 加水分解と可溶性ペプチドの生理活性評価

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)があると言われており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、処理後の中和や再現性よく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)}。

卵殻膜を分解する微生物酵素として *Pseudomonas aeruginosa* 由来 LasB_ME4 が得られているが⁹⁾、同細菌は日和見菌であることから、我々はこれに置き換わる微生物酵素を検索した¹⁰⁾。*P. indica* 由来同酵素(LasB_indica)は、LasB_ME4 と比較し 11 倍の可溶性ペプチドやタンパク質を得られる¹⁰⁾。本研究では、生理活性ペプチドの構造解析や大量取得を最終目標とし、化学・酵素処理によって調製された卵殻膜ペプチドとも比較しながら生理活性とペプチドのサイズや相関を考察することを目的とした。

■ 方 法

(1)rLasB_indica の調製

既報の方法に従い¹⁰⁾、rLasB_indica 発現大腸菌を培養し、終濃度 0.1mM となるように IPTG を加え、さらに 20°C、140rpm にて培養した。回収した菌体を微量超音波ホモジナイザー Q125(QSonica L.L.C., Newtown, CT) で 1 分間超音波破碎し、菌体破碎液にアセトンを終濃度 25% (v/v) となるように添加し、30°C、70 rpm の条件下で 15 時間インキュベートすることで封入体の再活性化を行なった。つづいて、透析を行った後、DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーに供し、SDS-PAGE にて単一バンドの画分を卵殻膜分解用 rLasB_indica 酵素液とした。

(2)rLasB_indica による卵殻膜の加水分解

20mM Tris-HCl buffer (pH8.0) (26.9ml) に対して、卵殻膜粉体(450mg)、精製酵素(17U)を添加し 30ml にした後、45°C、140rpm、15 時間の条件下でインキュベートした。得られた卵殻膜加水分解産物は遠心分離(13,000rpm、10min、4°C)で上清を回収し、フィルターろ過(0.2 μ m)および遠心ろ過(3 kDa)後のサンプルについて可溶性ペプチド画分(以下、Fraction A)とした。加水分解に与えるピロ亜硫酸ナトリウムや有機溶媒(ethanol、acetone、2-propanol、ethyl acetate、hexane)の影響試験は、上述の反応系に 1 から 50mM および 25% (v/v) の各試薬を添加することで調べた。最適条件下での加水分解および分画についてのステップは、Fig. 1 に示した。

また、本研究では、上述のフィルターろ過液およびキユーピー株式会社により開発された卵殻膜ペプチド(以下、WP)との比較(可溶性ペプチド / タンパク質の分子量分布や生理活性等)を適宜行なった。

(3)可溶性ペプチドおよびタンパク質の定量および電気泳動による解析

可溶性ペプチドは、ニンヒドリン反応(GlyGlyGly 換算)にて定量するとともに、Tricine SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにて定性分析した。一方、タンパク質は、Lowry 法(BSA 換算)にて定量するとともに、SDS-PAGE に供した。電気泳動は、ATTO 社製の既製ゲル(P-T16.5S および E-12.5%L)および泳動用緩衝液(AE-1415 EzRunT および AE-1410 EzRun)を

用い、同社提供のマニュアルに従って行った。

(4)ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画と SEC および逆相クロマトグラフィーによる分析

遠心濾過(3.0kDa)によって得られた通過液(Fig. 1, Fraction A)をロータリーエバポレーターにて乾固した後、10mM 酢酸アンモニウム溶液 2ml にて完全に溶解後、同溶液にて平衡化した Toyopearl HW-40F(2.5×50cm 東ソー株式会社、東京) にアプライした。同溶液を用い、流速 19.5ml/min で可溶性タンパク質およびペプチドを溶出した。得られた画分(5ml/tube)について以下で述べる生理活性試験を行った。また、WP についても同様に 160.5mg を酢酸アンモニウム溶液に溶解し、フィルターろ過を行った後、分画した。SEC および逆相クロマトグラフィーによる分析条件を以下に述べる。(WP の使用量は、rLasB_indica によって加水分解して得られたサンプルと同量のタンパク質量である。)

[SEC: サイズ排除クロマトグラフィー]

カラム: YMC-Pack Diol-60(4.6×300mm) (株式会社ワイエムシィ、京都)

溶離液: 100mM KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH7.4)-アセトニトリル(80:20, v/v)

流速: 0.25ml/min、検出: UV₂₁₆

[逆相クロマトグラフィー]

カラム: COSMOSIL 5C18-AR-II(4.6×250 mm、ナカライテスク)

溶離液: Solvent A: 5mM TFA 溶液および Solvent B: 5mM TFA-アセトニトリル(4:6, v/v) (Gradient, Sol. A-Sol. B(100:0, v/v)→(75min)→Sol. A-Sol. B(0:100, v/v))

流速: 0.5ml/min、検出: UV₂₁₆

(5)生理活性試験

- チロシナーゼ阻害活性試験: L-チロシンまたは L-DOPA を基質として、チロシナーゼのモノフェノラーゼ反応またはジフェノラーゼ反応を波長 450nm または 475nm における吸収を測定することで調べた。また、本研究においては、マッシュルーム由来のチロシナーゼ(Tyrosinase from *Agaricus bisporus*, AbTyr, Sigma)を使用した。
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) ラジカル消去活性試験: Malunga & Beta の方法に従った¹¹⁾。
- DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性評価: Veenashri & Muralikrishna の方法に従った¹²⁾。
- 第二鉄還元力(FRAP, ferric ion reducing antioxidant power)試験: Benzie & Strain の方法に従った¹³⁾。
- L6 筋管細胞へのグルコース取り込み試験¹⁴⁾: 脱感作した L6 筋管細胞に卵殻膜由来ペプチドを 4 時間作用させ、次いで、グルコースアナログである 2-デオキシグルコース(2DG)を 1mM で 20 分間作用させた。細胞内への 2DG の取り込み量は酵素法を用いて測定した。陰性対照としては、同量の滅菌水を、陽性対照としては 100nM インスリンを細胞に作用させた。

■ 結 果

(1)卵殻膜分解に与えるピロ亜硫酸ナトリウムおよび各種有機溶媒の影響

ピロ亜硫酸ナトリウム添加効果は、終濃度 10mM までは濃度依存的に可溶性タンパク質量の増大が見られた。一方、分解に与える有機溶媒の影響試験では、hexane を添加した反応系では有機溶媒無添加のコントロールとほぼ同量の可溶性タンパク質およびペプチド量が得られたが、ethanol、acetone、2-propanol、ethyl acetate は添加することによって生成量は低下した(Table 1 & Fig. 2)。

(2)ゲル濾過クロマトグラフィーによる可溶性ペプチドの分画と SEC サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量分布の解析

Fraction A および WP 中の可溶性ペプチド/タンパク質の分布を SEC サイズ排除クロマトグラフィーにて調べた(Fig. 3(a) & (b)、黒実線および破線)。形状から、Fraction A には未分解の可溶性ポリペプチドが多く含まれるのに対し、WP は分子質量 5kDa 前後を境にポリペプチドおよびオリゴペプチドが偏りなく含まれているのがわかった。Fraction A および WP の遠心濾過膜通過液をゲル濾過に供し(Fig. 4(a) & (c))、得られたフラクションについて生理活性を評価した(Fig. 4(b) & (d)、Table 2)。その結果、Fraction A には、抗酸化活性を示すペプチドが多く含まれていることがわかった。また、高活性画分については、SEC サイズ排除クロマトグラフィーにて調べた結果、0.5kDa から 5kDa のペプチドであることがわかった(Fig. 3(a) & (b))。

(3)可溶性ペプチド/タンパク質の同定

Fraction A を SDS-PAGE および Tricine SDS-PAGE に供した結果、3.5kDa から 10kDa の範囲に 4 つのバンドが見られたことから(Fig. 5, bands a-d)、ニワトリのゲノム情報を基に LC-MSMS-Mascot

解析を行った。その結果、卵殻特異的なマトリックスタンパク質である ovocalyxin (NP_990831.2) および卵白タンパク質の一種である Cystatin (NP_990831.2) の一部が Fraction A に含まれていることが明らかとなった。なお、バンド a-d いずれにおいてもケラチン (type II cytoskeletal cochlear, NP_990263.1) が検出された。ニワトリ由来ケラチンは *Homo sapiens* 由来同タンパク質 (NP_004684.2) とアミノ酸レベルで 66% (307/462 a.a.) であるが、サンプル調製時のコンタミの可能性も考えられる。

(4) 逆相クロマトグラフィーによるペプチドマッピング

抗酸化活性が見られた画分 (Frac. No. 25, 28, 36 in Fig. 6(a) & No. 21 in Fig. 6(b)) について調べた結果、Frac. No. 25, 28, 36 には種々のペプチドが含まれていることがわかった。そこで、溶出時間 40 分まで 5 分おきに分画し、濃縮乾固後、抗酸化活性を調べたが、高活性画分は見いだせなかった。一方、No. 21 には主要なピークは 5 つ程度であった。

(5) 筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進活性

WP をろ過することにより得られた EMP は、10 および 20 meq/L の濃度で有意に L6 筋管細胞へのグルコース取り込みを促進させる (Fig. 7(a))¹⁴⁾。Fraction C について 5、50、500、5,000 meq/L で L6 筋管細胞へのグルコース取り込み効果を調べた。高濃度下では、細胞死が見られ、グルコース取り込みの有意さを明らかにすることができなかった (Fig. 7(b))。

■ 考 察

新たに取得した卵殻膜分解酵素 (*P. indica* NBRC 103045) を用いて卵殻膜分解の条件をさらに検討するとともに得られた可溶性ペプチド/タンパク質の分子量分布や生理活性を WP ペプチドと比較した。

ピロ亜硫酸ナトリウムは還元性物質であることから、羽毛や毛髪構成タンパク質のジスルフィド結合を切断し、プロテアーゼの作用を促進する。同結合の開裂による可溶化促進を検討した結果、同化合物は 10 mM までは濃度依存的に加水分解を促進したが、それ以上の濃度では効果は見られなくなった。LasB にはタンパク質内にジスルフィド結合が 2 箇所あり、残存するピロ亜硫酸ナトリウムが酵素を失活させることが予想される。また、残存する同化合物は続く生理活性試験にも影響をおよぼすことから、LasB *indica* による酵素処理前に除去や何らかの酸化剤による処理が必要と思われる。*Pseudomonas* 属由来 LasB は、LasB *indica* を含めて有機溶媒耐性を示す。そこで、有機溶媒存在下で反応を行うことで卵殻膜の構造を変化させ、水系では遊離しないような可溶性ペプチド/タンパク質の遊離を期待した。対照と比較して遊離量は少ないが、酢酸エチルを添加した反応系では、特徴あるピークが観察された (Fig. 2)。また、Log P が正になり、その値が大きくなるにつれて生成するタンパク質およびペプチド量も増加した (Table 1)。

Fraction A および WP 中の可溶性ペプチド/タンパク質について比較した。精製ペプチドの分子量分布から、WP は特定の分子質量のペプチドが含まれていることに対し、Fraction A は分子質量が大きいものが含まれていることが予想される。本研究では、Fraction A 中の可溶性ペプチドについてタンパク質同定を行い、卵殻膜に含まれると考えられるタンパク質を少なくとも 2 種類同定することができた (Table 3)。Collagen type I (e.g. Accession no. P02467) を trypsin で消化した際、理論上最長 38 a.a. residue までのペプチドが生じることから、LasB *indica* によってコラーゲンが限定分解を受けていれば、LC-MSMS-Mascot 解析で検出可能と思われるが、同一の鎖長のペプチドの生成が少ないのかもしれない。

抗酸化活性やチロシナーゼ活性試験から、Fraction A の可溶性ペプチド/タンパク質のほうが活性に寄与するペプチドが多く含まれていることが考えられる。しかしながら、上述のように残存するピロ亜硫酸ナトリウムが生理活性試験の阻害となることがあり、添加量の調整や化学的除去が課題である。

卵殻膜消化物の生理活性作用とペプチド構造 (配列決定) の解明は、卵殻膜消化物全体としての付加価値の訴求することにつながることから、現在進行中ではあるが、SOD 様活性画分の検索や *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属細菌の生育促進効果についても今後明らかにしたい。

■ 要 約

新たに見出した *P. indica* 由来 LasB を用いて卵殻膜分解に与える影響を調べ、卵殻膜タンパク質のジスルフィド結合を開裂するピロ亜硫酸ナトリウムの効果を明らかにした。一方、有機溶媒は、可溶性ペプチド/タンパク質の生産性を促進しなかった。得られた可溶性ペプチド/タンパク質画分 (Fraction A) と WP に含まれるペプチドの分子量分布や生理活性を比較した。WP と比較し、Fraction

Aにはより高分子の可溶性ペプチド/タンパク質が含まれていることがわかった。それぞれについて分画を行って生理活性を調べた結果、Fraction Aにおいてチロシナーゼ活性や抗酸化活性を示すフラクションが多いことがわかった。

■ 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. *Bioresource. 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, M. Yokoyama, Y. Kimura, Y. Yamashita, and H. Ashida. 2019. Characterization of an organic-solvent-stable elastase from *Pseudomonas indica* and its potential use in eggshell membrane hydrolysis. *Process Biochem.* 85:156-163.
11. L.N. Malunga, and T. Beta. 2015. Antioxidant capacity of arabinoxylan oligosaccharide fractions prepared from wheat aleurone using *Trichoderma viride* or *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Food Chem.* 167:311-319.
12. B.R. Veenashri, and G. Muralikrishna. 2011. In vitro anti-oxidant activity of xylo-oligosaccharides derived from cereal and millet brans-A comparative study. *Food Chem.* 126:1475-1481.
13. I.F. Benzie, and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma(FRAP)as a measure of “antioxidant power”:The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.
14. 芦田 均. 2018. 抗糖尿病効果をもつ卵殻膜に含有する新規活性ペプチドの単離とその作用機構解明. 2017 年度旗影会特別助成報告書.

Table 1. Effect of organic solvent on ESM hydrolysis

Organic solvent	Log P ^{a)}	Protein (mg/ml)	Peptide (mM)
None	—	1.3±0.011	1.1±0.011
Ethanol	-0.24	0.25±0.020	0.068±0.0050
Acetone	-0.24	0.17±0.054	0.023±0.0016
2-Propanol	+0.05	0.11±0.0047	0.025±0.0062
Ethyl acetate	+0.73	0.44±0.025	0.27±0.0090
Hexane	+3.5	1.2±0.031	1.1±0.037

^{a)} reference (B. Jaouadi et al, Int. J. Biol. Macromol., 60: 165-177, 2013)

Table 2. Antioxidant activity in Toyopearl HW-40 fractions from EMS hydrolysate by LasB_indica (a) and WP hydrolysate (b).

(a) Fraction no.	ABTS (mM)	DPPH (mM)	FRAP (mM)	Tyr (mM)
25	1.09±0.04	1.07±0.01	0.14±0.003	0.24±0.02
28	0.31±0.02	N.D.	0.21±0.004	0.10±0.01
36	0.97±0.05	0.22±0.004	0.46±0.006	0.29±0.01
(b) Fraction no.	ABTS (mM)	DPPH (mM)	FRAP (mM)	Tyr (mM)
21	0.28±0.003	0.29±0.002	N.D.	0.08±0.007
34	0.31±0.004	N.D.	N.D.	0.16±0.008
39	0.18±0.014	N.D.	N.D.	0.08±0.008
45	0.12±0.007	N.D.	N.D.	< 0.005

Table 3. Identification of soluble peptide/protein from EMS hydrolysate by LasB_indica

Band no.	Protein	Accession no.
a	Not identified	
b, c	Ovocalyxin	NP_989865.1
	Cystatin precursor	NP_990831.2
d	Not identified	

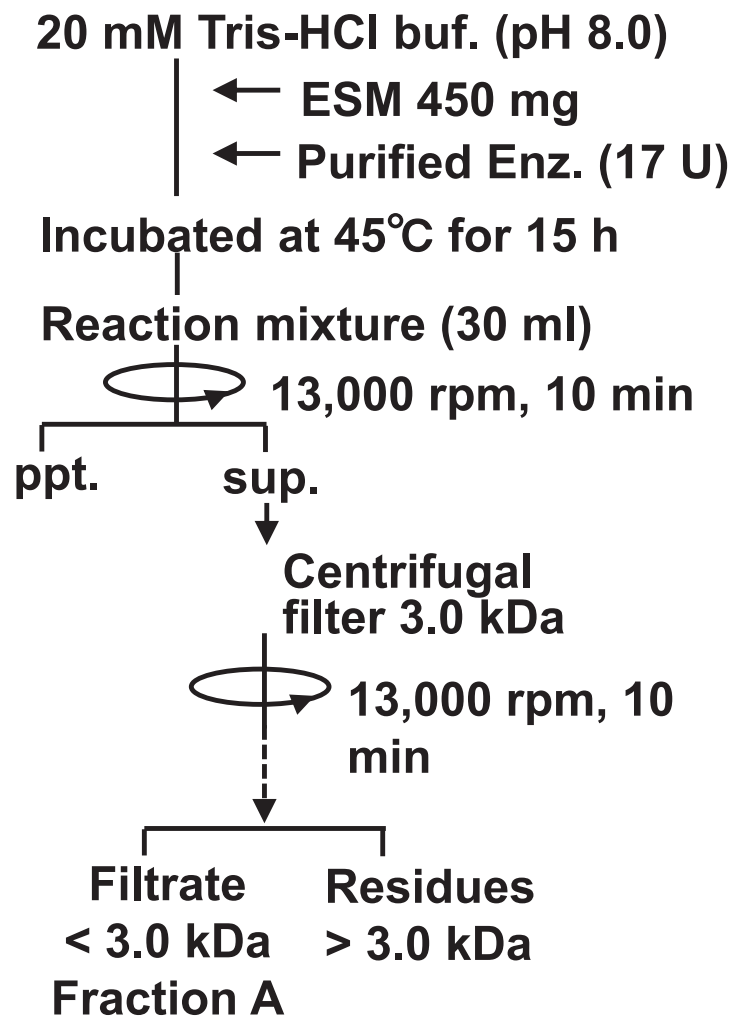


Fig. 1. Procedure for preparation eggshell membrane hydrolysate by LasB_indica

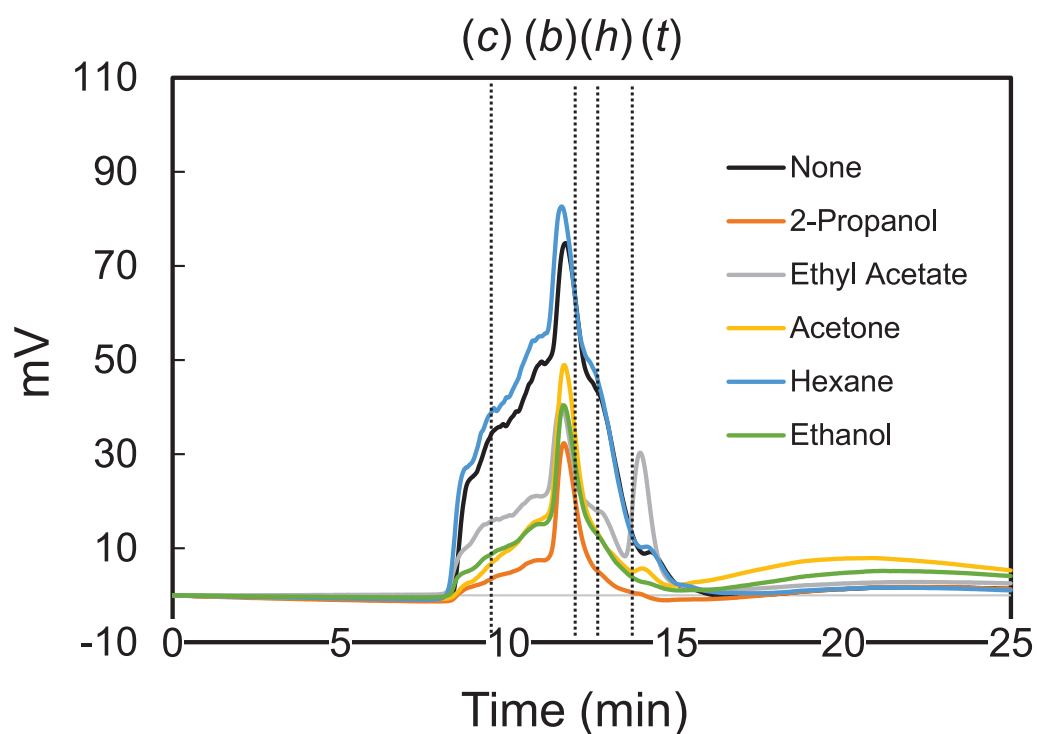


Fig. 2. Size exclusion chromatogram of soluble peptide from eggshell membrane. Eggshell membrane was hydrolyzed by LasB_indica without and with organic solvent, such as 2-propanol, ethyl acetate, acetone, hexane, ethanol. The soluble peptide fraction (Fraction A, see Fig. 1) was fractionated by size exclusion chromatography on a YMC-Pack Diol-60 (4.6 x 300mm; YMC CO., LTD., Kyoto). The HPLC column was equilibrated with 20% (v/v) acetonitrile in 100mM K-Phosphate buffer (pH 7.4); peptides were separated at a flow rate of 0.25ml min⁻¹. The peptides were detected at 216nm. The molecular weight maker is cytochrome *c* (*c*, M.M.=12.4 kDa; Rt=9.7min), bacitracin (*b*, 1.45 kDa; 12.1min), *N*-Hippuryl-His-Leu (*h*, 430Da, 12.8min), and Tyr (*t*, 181Da, 13.8min).

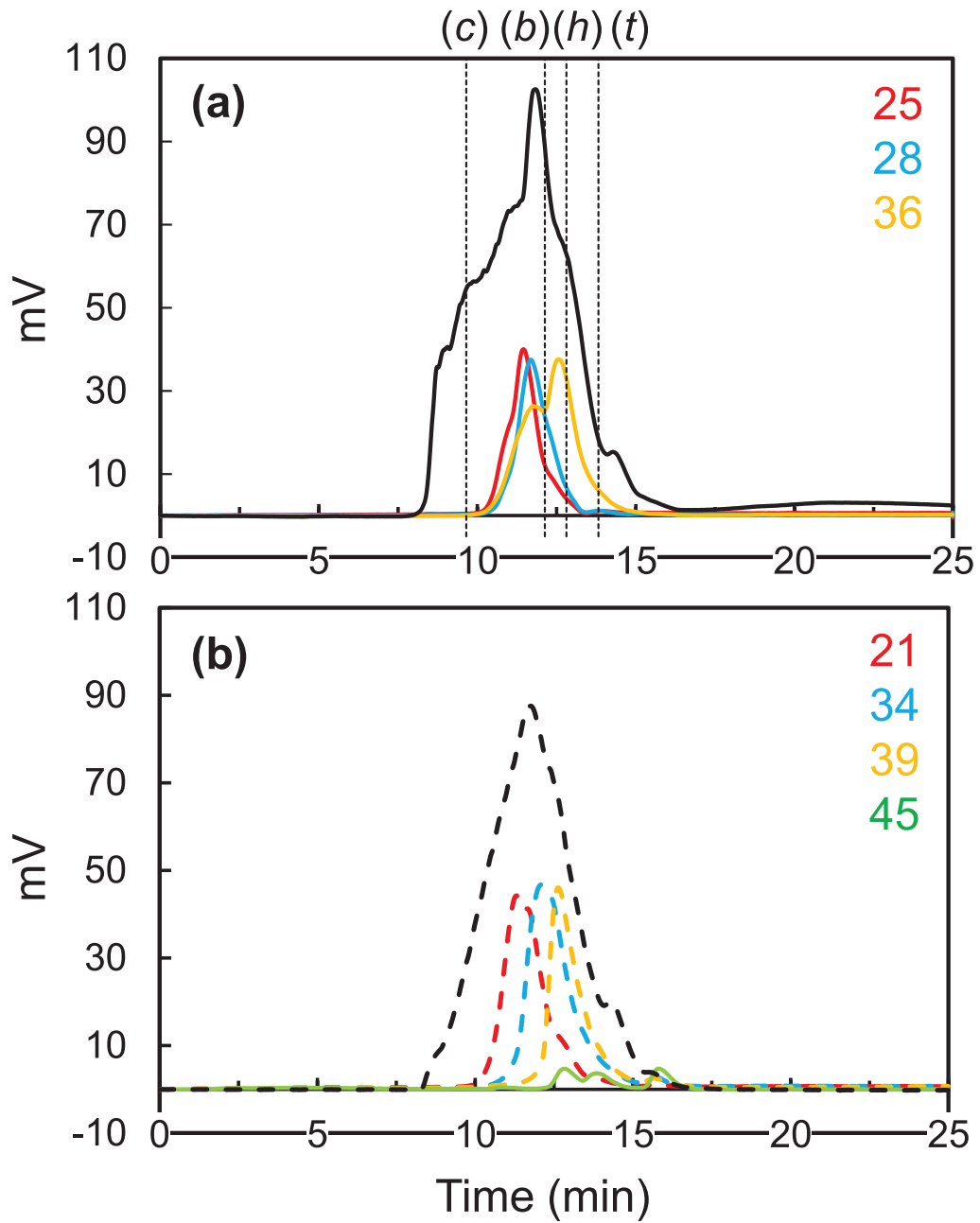


Fig. 3. Size exclusion chromatogram of soluble peptide fraction (Fraction A) (a) and WP peptide fraction (b).

The hydrolysate by *LasB_indica* and WP peptide and their fractions by Toyopearl HW-40 gel filtration (see Fig. 2(a) and (c)) were analyzed by size exclusion chromatography on a YMC-Pack Diol-60. The molecular weight marker is cytochrome *c* (*c*, M.M.=12.4kDa; Rt=9.65min), bacitracin (*b*, 1.45kDa; 12.3min), *N*-Hippuryl-His-Leu (*h*, 430Da, 12.8min), and Tyr (*t*, 181Da, 13.8min)

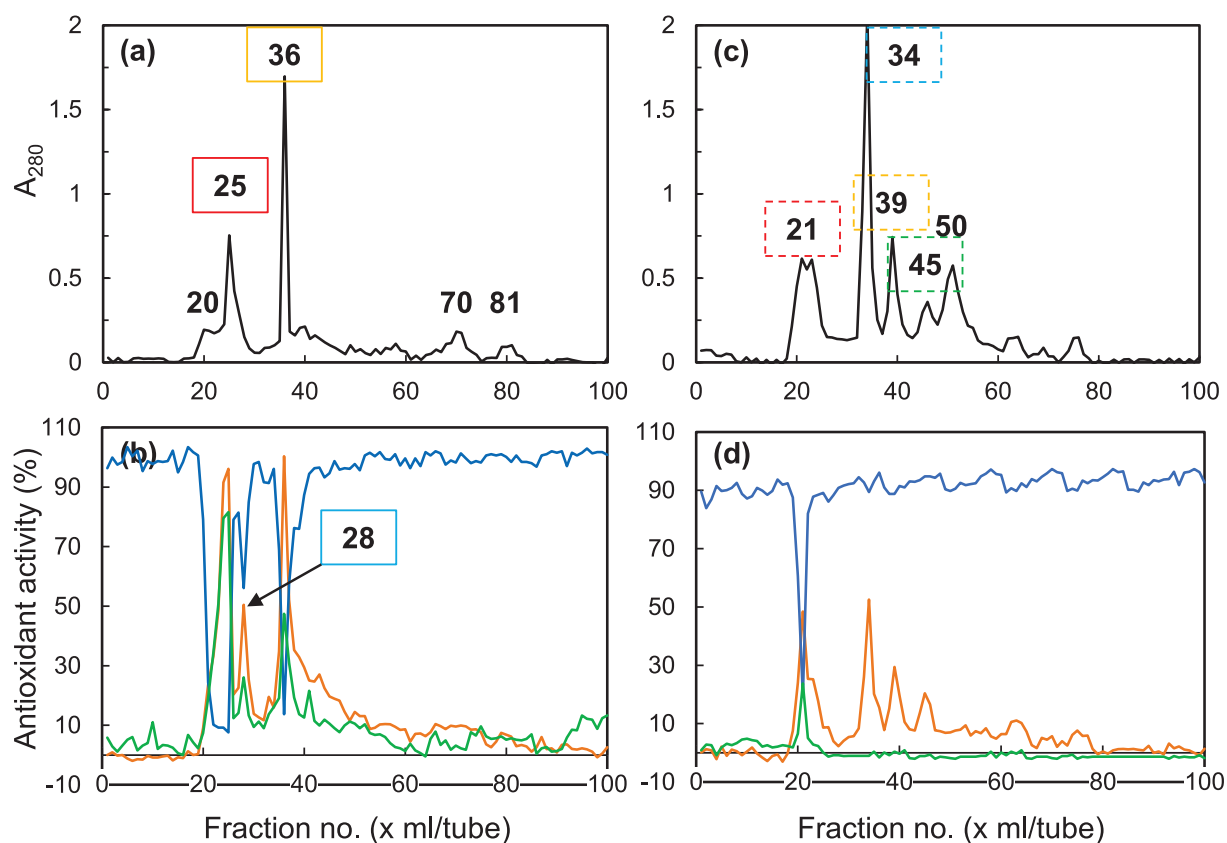


Fig. 4. Fractionation of the hydrolysate from eggshell membrane on a Toyopearl HW-40 column for further assay of the bioactive peptides.

The concentrated peptide fractions, soluble peptide fraction (Fraction A) (a) and WP peptide fraction (c) was loaded on a gel filtration chromatography column. Every fractions were used for further bioactive assays.

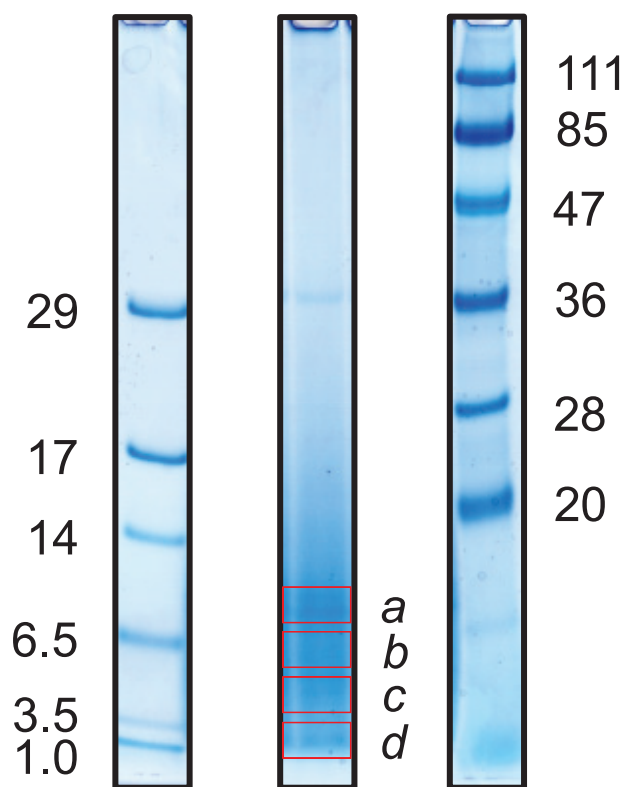


Fig. 5. Tricine SDS-PAGE of soluble peptide fraction (Fraction A). Sliced bands, a to d were used for LC-MSMS mascot analysis.

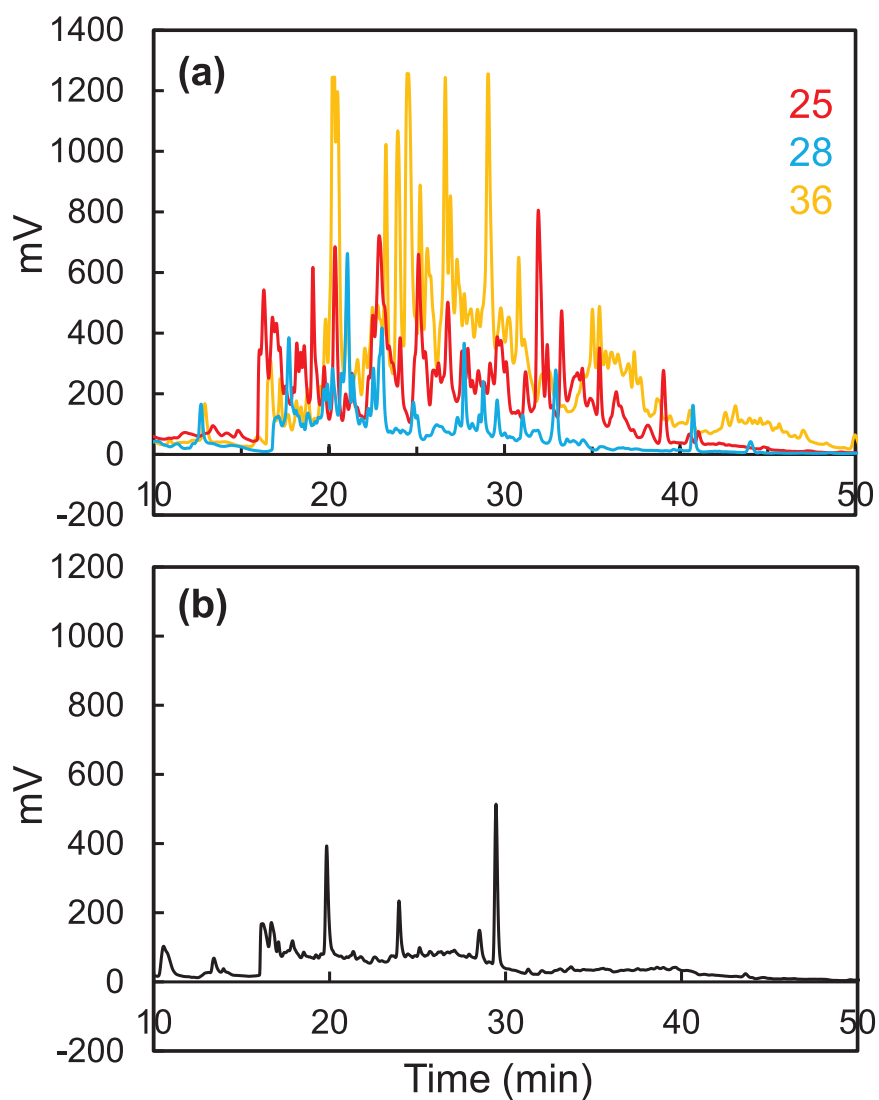


Fig. 6. Reverse phase chromatograms of fractions separated by Toyopearl HW-40
 The soluble peptide fractions that were separated by Toyopearl HW-40 gel filtration were analyzed by reversed-phase HPLC on a Cosmosil 5C18 AR-II column (4.6 x 150mm; Nacalai Tesque, Kyoto). The fractions, no. 25, 28, and 36 derived from Fraction A and no. 21 derived from WP were loaded. The HPLC column was equilibrated with 5mM trifluoroacetic acid in H₂O; peptides were separated with a linear gradient of acetonitrile at 0.8% per min at a flow rate of 0.50ml min⁻¹. The peptides were detected at 280nm.

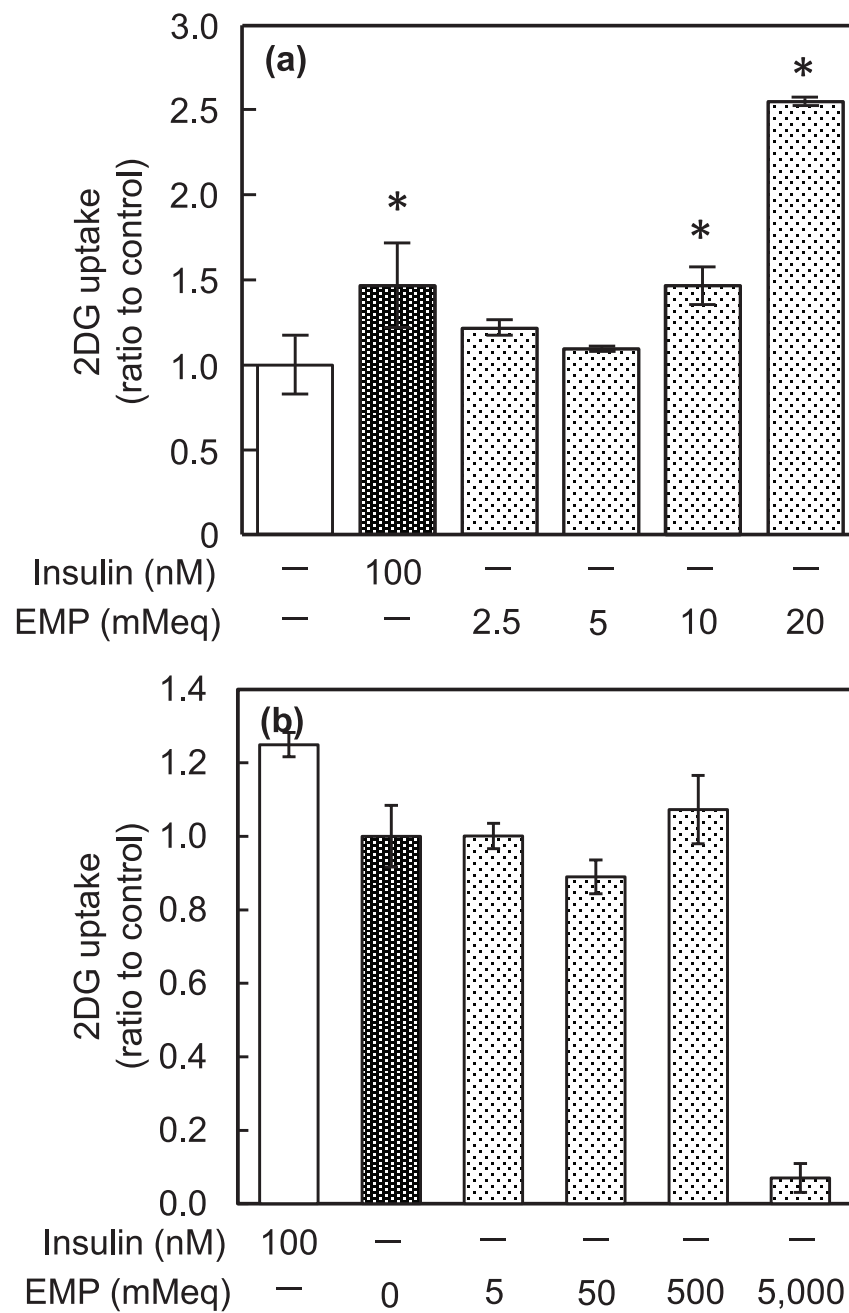


Fig. 7. Effect of Fraction A and WP on glucose uptake in L6 myotubes.