

消化酵素処理後に生成する卵殻膜ペプチド配列の 網羅的検索とその機能性解析

東京家政大学家政学部栄養学科・准教授 重村 泰毅

■ 緒言

卵殻膜から生成されたペプチドは、関節痛^{1,2)}や創傷治癒³⁾への有益な効果が報告されている。また、ACE 阻害や抗酸化活性についても報告されている⁴⁾。そのため、ゆで卵などの副生成物である卵殻膜は、機能性食品素材として有効利用が期待される。しかし、今後の素材有効利用の展開において、詳細なメカニズムが解明されていないことが大きな障壁である。それは、どの卵殻膜成分が上記の【有益な効果】をもたらしているのか、つまり有効成分ペプチドのアミノ酸配列が不明な点である。卵殻膜は無数のアミノ酸から構成された不溶性のタンパク質である。酵素で卵殻膜を処理して、部分的にアミノ酸を切断した水溶性のタンパク質分解物が【卵殻膜加水分解物】である。この分解物に含まれているペプチドは、様々なアミノ酸配列や異なる数のアミノ酸から構成されているため、その中のどのペプチドが有益な効果のメカニズムに関与しているかが不明である。そこで、本研究では、卵殻膜加水分解物の主要ペプチドは、どのようなアミノ酸配列で構成されているかを調べる。まず、卵殻膜加水分解物に含まれるペプチドを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離する。HPLCの分離には疎水性カラムを使用して分離を行うことが多く、水溶性のアミノ酸やペプチドの細かい分離は困難である。そこでアミノ酸、ペプチドが保有するアミノ基(-NH₂)に疎水性の PTC を付加(PITC 誘導化)することで、疎水性が増したアミノ酸・ペプチドを HPLC で分離する。この手法から、アミノ酸を分離することで【卵殻膜加水分解物】に含まれる遊離アミノ酸とペプチドを構成する総アミノ酸も分析する。さらに、HPLC で分離された各 PTC-ペプチドを分離し、プロテインシーケンサーでペプチドのアミノ酸を N 末端から切断して配列を同定する。

一方で、この手法だけでは卵殻膜に含まれるペプチドが判明しても、それを摂取した後どのペプチドが体内で効果を発揮するかは分からない。まずは、体内に吸収されるペプチドの特徴をつかむ必要がある。そこで、マウスにこの卵殻膜加水分解物を摂取させて血中で増加するペプチド態のアミノ酸についても調べた。

■ 方法

【試料】

卵殻膜加水分解物は、0.01%の濃度になるように水に溶解した試料を使用した。

【アミノ酸分析】

卵殻膜加水分解物水溶液を減圧下で塩酸加水分解(150°C 1h)した試料と加水分解していない同試料を PITC 誘導化処理した。誘導化物である PTC-アミノ酸を HPLC によるアミノ酸分析を行い、得られた遊離アミノ酸と総(加水分解後の)アミノ酸濃度を算出した。この HPLC で、カラムは Kinetex EVO C18(Phenomenex)を 45°C 下で使用した。移動相は、A:150mM 酢酸アンモニウム+5%アセトニトリル混合液(pH6.0)、B:60%アセトニトリルを用い、0.5mL/分の速度で流した。移動相濃度勾配は次の通りである。(B 0%平衡)0-0.1min, 0%B;0.1-0.5min, 9%B;0.5-5.0min, 13%B;5.0-12.0min, 20%B;12.0-20.0min, 35%B;20.0-37.0min, 100%B;37.0-37.01min, 0%B。吸光度は 254nm に設定した。分析結果から、試料中のペプチドを構成するアミノ酸濃度は、加水分解後の総アミノ酸量から遊離アミノ酸量を差し引いた値として算出した。

【ペプチド分離・アミノ酸配列解析】

卵殻膜加水分解物に含まれるペプチドを分離するため、上記と同じように未加水分解試料に PITC 誘導を行った。40°C に保持した Inertsil ODS-3(GL サイエンス)カラムを用いて HPLC で分離した。移動相は A:0.01%TFA、B:60%アセトニトリルを用い、1ml/min の速度で流した。移動相濃度勾配は次の通りである。(B 15%平衡)0-30min, 15-75%B;30-35min, 75-100%B;35-40min, 100%B;40-40.1min, 100-15%B;40.1-50min, 15%B。この分離から単離されたペプチドピークを回収し、プロテインシーケンサーによるアミノ酸配列解析を行った。

【卵殻膜加水分解物摂取後のマウス血液調製】

ICR マウスメス 28 週齢に水、卵殻膜加水分解物水溶液をゾンデで 0.1ml/10g 投与した。投与から

1 時間後に、麻酔下で 2.5ml シリンジ(ヘパリン入)を用いて下大静脈から全採血して、血漿を調製した。調製した血漿は上記アミノ酸分析によって、摂取後血中で増加した遊離アミノ酸とペプチド態アミノ酸を測定した。

■ 結果

【卵殻膜加水分解物中の遊離アミノ酸とペプチドを構成するアミノ酸】

分析の結果、卵殻膜加水分解物の遊離とペプチド態のアミノ酸は、総量として同程度含まれていた(表 1)。卵殻膜中にはフェニルアラニン(Phe)、グルタミン酸(Glu)、プロリン(Pro)が遊離アミノ酸として多く含まれていた。ペプチドを構成するアミノ酸としては、Pro、Glu、グリシン(Gly)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)が多かった。卵殻膜に含まれるタンパク質としてはコラーゲンとエラスチンが報告されている。表 1 のペプチド中のアミノ酸含量から、コラーゲン特有のアミノ酸でありその分子の約 1/10 を占めるヒドロキシプロリン(Hyp)含量が低かったことから、含まれるコラーゲンは微量であることが分かる。それに対して、エラスチンは Pro、Gly、Val、アラニン(Ala)を豊富に含むことから、分析した加水分解物にはエラスチン由来ペプチドが多く含まれていると推察できる。そこで、卵殻膜加水分解物中にどのようなアミノ酸配列を有するペプチドが存在するか、HPLC によってペプチドを単離回収して分析した。

【卵殻膜加水分解物中のペプチドアミノ酸配列】

卵殻膜加水分解物を HPLC で分離し、図 1 のように検出されたペプチドピークを回収した。プロテインシーケンサーによってピーク中のペプチドアミノ酸配列を N 末端から解析した(表 2)。比較的面積の大きなピークから解析したところ全てジペプチド、トリペプチドであり、Pro、Gly、Val、Ala を多く含んでいた。この結果から、卵殻膜を形成するエラスチン由来のペプチドを多く含むことが考えられた。特に Gly-Thr-Pro と Gly-Gln-Pro が卵殻膜加水分解物に多く含まれていたが、Gly と Pro で構成されるペプチドはコラーゲンにも含まれる配列である。しかし Hyp を含むペプチドは見られず、コラーゲン由来の Hyp ペプチドは卵殻膜加水分解物中では微量成分として存在することが明らかとなった。さらに、コラーゲンとエラスチンに含まれないと考えられるアミノ酸配列も含まれているため、細胞外マトリックスタンパク質由来のペプチドも卵殻膜加水分解物には含まれていることが推測される。

【卵殻膜加水分解物摂取後のマウス血中遊離型とペプチドアミノ酸濃度】

卵殻膜加水分解物水溶液と水を摂取させたマウスの血液を分析し、血漿中の遊離型とペプチド型のアミノ酸を測定した(表 3)。水摂取群を卵殻膜加水分解物未摂取群として比較すると、卵殻膜加水分解物の摂取後に血中の遊離 Ala、Val、Thr が 1.5 ~ 2 倍増加していた。それに対して、全てのペプチド型アミノ酸は卵殻膜摂取後の血中で増加していた。特に、Pro を含むペプチドが高濃度で水摂取群に比べて 10 倍以上に増加した。それ以外にも Gln または Glu を含むペプチド、Gly、Ala、Leu が卵殻膜摂取後に血中で高濃度に増加した。またこれらに比べて高濃度ではないものの、血中ペプチド態 Val は卵殻膜摂取後に約 10 倍増加していた。このアミノ酸の特徴からは、エラスチンに多く含まれる Pro、Gly、Ala、Val から構成されるペプチドが吸収されたことが推察される。一方で、卵殻膜構成タンパク質の一つであるコラーゲン由来の Hyp は、血中で増加するペプチドには微量にしか含まれなかった。

■ 考察

当初本研究結果では卵から直接卵殻膜を回収し、様々な消化酵素による不溶性卵殻膜の分解後、卵殻膜加水分解物中ペプチドのアミノ酸配列同定を試みた。しかし、通常の消化酵素や植物由来のプロテアーゼでの処理した卵殻膜は、ほとんど分解されず、水溶液中でペプチドが検出されることはなかった。そこで、すでに消化酵素や植物由来酵素以外のプロテアーゼを使用した卵殻膜加水分解物を試験に使用した。その結果、今回の試料中のペプチドはほとんどジペプチドとトリペプチドで構成されている事が明らかとなり、多くが特定のアミノ酸で構成されていた。また、それを摂取させたマウス血中で大きく増加するペプチドにも特定のアミノ酸が多く含まれていた。しかし、卵殻膜加水分解物中ペプチドに多く含まれるアミノ酸種と、摂取後血中で増加するペプチドのアミノ酸種は一致していない。つまり、加水分解物中のペプチドには、Pro、Gly、Glu+Gln が同程度含まれているが、血中では Pro を含むペプチドが他アミノ酸に比べて大きく増加し、加水分解物中にはさほど多くない Ala を含むペプチドが血中で大きく増加していた。これは、Gly、Glu+Gln に比べて Pro、Ala を含むペプチドは摂取後の消化酵素で分解切断されにくいことが推察される。今後、今回明らかになったアミノ

酸配列のペプチドを合成して機能性評価を実施していく。それによって、これまでに報告されている卵殻膜の機能性作用に寄与する有効成分ペプチドを特定し、メカニズムの詳細を明らかにしていく。

当初の本研究では、生体内で作用する卵殻膜ペプチドの機能性メカニズム解明のために、消化酵素で分解される卵殻膜のペプチドを探索することであった。しかし、上述のとおり生体外での消化酵素分解が困難であったため、マウス摂取後に血中へ吸収されるペプチドの探索へと手法をシフトした。我々は過去の研究で、コラーゲンペプチドやエラスチンペプチド摂取後のヒト血中で増加するペプチドを検出・同定している^{5,6)}。コラーゲンペプチドではHypを含むペプチドが非常に高濃度で検出されており、エラスチンペプチドではPro-Glyのみが高濃度で検出されている。今回の結果から、摂取後のマウス血中でHypを含むペプチドがわずかにしか増加しなかったこと、さらにProとGly以外のGlu+Gln、Ala、Valを含むペプチドが大きく増加したことは、これまでの研究で検出されていないペプチド配列が卵殻膜加水分解物摂取後に吸収されている可能性がある。それは、摂取することで卵殻膜特有の体調改善やメカニズムが働くことが期待される。今後は動物試験で血中のペプチド配列を明らかにし、その動物の肝臓、腎臓や筋肉などの組織中への蓄積も調べる。

■ 要約

卵殻膜加水分解物の機能性についていくつかの報告があるが、加水分解物には様々なアミノ酸配列のペプチドを含んでおり、どの構造のペプチドが機能性を有するかといった具体的なメカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では卵殻膜加水分解物中のペプチドをそのアミノ酸組成と配列を明らかにした。さらに卵殻膜加水分解物を摂取させたマウス血中でどのようなアミノ酸配列を持つペプチドが増加するかについて調べた。その結果、エラスチンを構成するアミノ酸を含むペプチドが加水分解物中に豊富に含まれていた。さらに摂取後のマウス血中ではプロリンを多く含むペプチドが増加した。

■ 文献

1. Hewlings, S., Kalman, D., & Schneider, L. V. (2019). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Prospective Clinical Trial Evaluating Water-Soluble Chicken Eggshell Membrane for Improvement in Joint Health in Adults with Knee Osteoarthritis. *Journal of medicinal food*, 22(9), 875-884.
2. Ruff, K. J., Morrison, D., Duncan, S. A., Back, M., Aydogan, C., & Theodosakis, J. (2018). Beneficial effects of natural eggshell membrane versus placebo in exercise-induced joint pain, stiffness, and cartilage turnover in healthy, postmenopausal women. *Clinical interventions in aging*, 13, 285-295.
3. Jain, S., & Anal, A. K. (2017). Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. *Journal of food science and technology*, 54(5), 1062-1072.
4. Ahmed, T., Suso, H. P., & Hincke, M. T. (2019). Experimental datasets on processed eggshell membrane powder for wound healing. *Data in brief*, 26, 104457.
5. Shigemura, Y., Suzuki, A., Kurokawa, M., Sato, Y., & Sato, K. (2018). Changes in composition and content of food-derived peptide in human blood after daily ingestion of collagen hydrolysate for 4 weeks. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(5), 1944-1950.
6. Shigemura, Y., Nakaba, M., Shiratsuchi, E., Suyama, M., Yamada, M., Kiyono, T., Fukamizu, K., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2012). Identification of food-derived elastin peptide, prolyl-glycine (Pro-Gly), in human blood after ingestion of elastin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(20), 5128-5133.

表 1. 卵殻膜試料中アミノ酸濃度

μ mol/g 粉末	遊離アミノ酸	ペプチド態アミノ酸
Ala	98.52 ± 10.83	161.05
Arg	90.03 ± 6.83	165.17
Asp	18.69 ± 3.18	330
Cys	10.24 ± 2.38	94.84
Glu	381.98 ± 31.12	453.98
Gly	168.93 ± 13.96	406.73
His	42.51 ± 5.55	94.83
Hyp	4.29 ± 0.01	59.83
Ile	40.06 ± 3.3	85.15
Leu	44.29 ± 1.31	181.34
Lys	89.04 ± 6.43	89.39
Met	147.98 ± 11.99	118.71
Phe	1927.66 ± 264.64	0
Pro	332 ± 93.65	417.75
Ser	111.98 ± 16.13	244.51
Thr	76.52 ± 23.7	164.2
Tyr	48.17 ± 2.88	113.34
Val	95.22 ± 3.21	190.48

ペプチド態アミノ酸のGluとAspはそれぞれGlnとAsnのペプチド態も合算した値

ペプチド態アミノ酸は、加水分解後の総アミノ酸平均値から遊離アミノ酸平均値を引いて求めたため標準偏差なし

表 2. 卵殻膜加水分解物中のペプチドアミノ酸配列

ピークNo.	分取ピーク溶出時間(min)	配列
1	15.60	Gly-Gln-Pro
2	16.15	Val-Ser-Pro
3	16.60	Asn-Thr-Pro
4	17.00	Gly-Gln-Pro
5	18.25	Gly-Thr-Pro
6	19.60	Gly-Ala
7	20.40	Ala-Trp-Pro
8	24.49	Val-Gln
9	25.65	Val-Ile-Gln
10	26.25	Ala-Val-Pro
11	27.15	Val-Glu
12	22.75	Pro-Gly
13	27.60	Val-Ala
14	31.60	Gly-Leu

表 3. 水と卵殻膜摂取後のマウス血中アミノ酸

	遊離アミノ酸 nmol/mL 血漿		ペプチド態アミノ酸 nmol/mL 血漿	
	水摂取	卵殻膜摂取	水摂取	卵殻膜摂取
Ala	5.608	8.476	12.484	54.948
Arg	0.244	0.204	2.296	6.916
Asn	1.176	1.616	4.176	19.3
Asp	0.992	0.132		
Cys	0	0	0.68	1.78
Gln	12.984	14.516	8.564	66.588
Glu	1.892	1.024		
Gly	0	0	13.464	58.076
His	1.18	1.708	3.072	10.084
Hyp	0.46	0.576	0	1.732
Ile	1.452	2.552	0.62	11.62
Leu	0	0	12.356	46.412
Lys	1.472	4.492	6.184	32.176
Met	9.076	19.884	0	0
Phe	157.064	139.068	8.46	34.284
Pro	79.848	77.596	7.44	97.276
Ser	1.244	1.72	9.428	45.572
Thr	2.508	4.348	4.428	28.336
Tyr	3.052	2.224	0.78	12.096
Val	3.828	6.792	2.56	29.74

ペプチド態アミノ酸のGluとAspはそれぞれGlnとAsnのペプチド態も合算した値

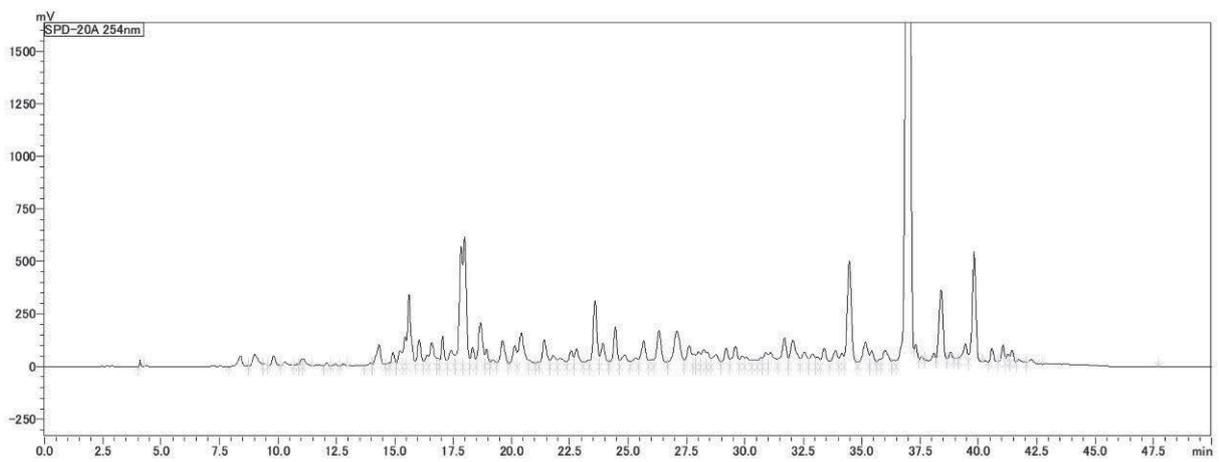


図1 HPLCによる卵殻膜加水分解物中のペプチド分離