

細胞外マトリックス分解性微生物酵素を用いた動物原料から コスメトロジー素材への実用的アプローチ

京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

渡部 邦彦

Among those hard-to-degrade animal proteins, the most major proteins are extracellular matrix proteins (EMPs) and collagen is one of the representative components. Subsequently to EMPs, a large amount of keratins are also generated mainly from the poultry processing factories and leather industry. We have studied for collagen and keratin degradation by thermophilic bacteria. In this project, we investigated the possibilities of producing cosmetic materials by use of thermophilic bacteria we isolated and their enzymes as a practical approach. The main issues we challenged are (i) preparation of EMPs in lower molecular weight with collagenolytic enzymes, (ii) preparation of keratin fragments from poultry feathers with a thermophilic bacterium, and (iii) investigation of bioactivity for keratin fragments prepared.

1. 緒言

細胞外マトリックスタンパク質は、多細胞動物細胞にとって必要な成分で、動物細胞を外側からひとつずつ包みこむことで細胞の形状保護、内部機能の維持、そして細胞集合体である組織形成を可能にする。このタンパク質はいずれも難分解性動物タンパク質で、コラーゲンが最大成分である。表皮や羽毛等の主成分であるケラチンと共に動物由来の難分解性動物タンパク質では二大成分となっており、産業廃棄物として食品加工産業を中心に、国内だけでも年間200万トン以上排出される¹⁾。これらのタンパク質は、難分解性である上に現段階では付加価値のある再生利用先がなく、再生利用につながる研究も進んで来なかったため、大部分が焼却廃棄処分されている。この2つの主要タンパク質およびその分解物は、細胞発生・接着、ガン浸潤など生体内での多様かつ重要な役割に関わっていることが研究の進展と共に明らかになってきており、その生理作用を維持する付加価値の高い機能を持った化粧品や食品の基礎材料として再生利用の期待が高くなってきている (Fig. 1)。

我々は、自然界から難分解性動物タンパク質を強力に分解する新規好熱性細菌を独自に単離し、動物組織でもっとも多量に含まれるコラーゲンおよびトリ羽毛に含まれるケラチンに絞った分解に取り組んでいる²⁻³⁾。そこでは微生物本体あるいはこれらが生産する酵素タンパク質を用い、酸アルカリの過激な分解とは異なる微生物機能によるマイルドな難分解性動物タンパク質分解を実施し、これらの再生利用を可能にするための研究を展開している。一般に常

コラーゲン及びその分解物から期待される応用

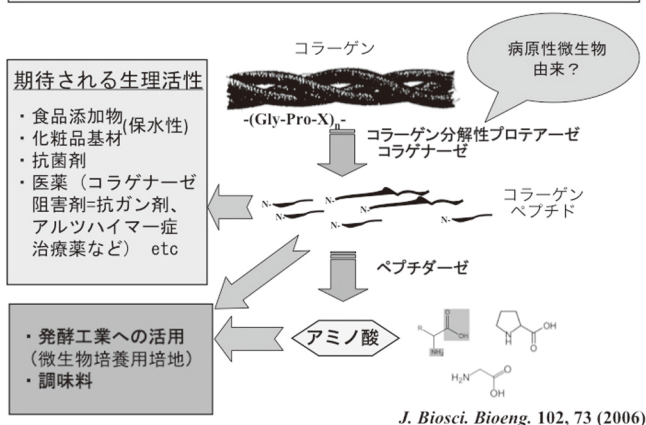


Fig. 1 コラーゲン及びその分解物から期待される応用

温で難分解性動物タンパク質に作用する微生物は病原性に関わるものが多いが、好熱性細菌は至適生育温度を60℃以上に持ち、その恐れがないため安全性の高いツールである。さらに好熱性細菌由来の酵素タンパク質は、常温由来の酵素タンパク質に比べ格段に安定である。本研究では、このような利点を生かし、コスメトロジー素材への応用を検討した。

2. 実験

2.1 コラーゲン分解系酵素群による細胞外マトリックス (コラーゲン) 分解と産物の解析

コラーゲン分解のため我々が京都市左京区から単離した好熱性細菌 *Geobacillus collagenovorans* MO-1 株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼ、および Pz-ペプチダーゼ (Pz-A, Pz-B) を精製した後に用いた²⁾。コラーゲン分解性プロテアーゼはコラーゲンを直接分解するエンドタイプの酵素で、オリゴペプチドへの低分化を調査し、Pz-ペプチダーゼは、コラーゲン特異繰り返し配列 (Gly-Pro-X) を認識し、Gly-Pro の直前で加水分解する特性を用いてさ



Practical applications for production of cosmetic materials from animal proteins by employing microbial enzymes that specifically degrade animal extracellular matrix proteins

Kunihiko Watanabe

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

らに短いペプチドの調製を検討した。コラーゲン分解は、総体積2.5ml (50mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM CaCl₂, 2.5 mg コラーゲン (豚 Type I)), 60°Cで適宜コラーゲン分解性プロテアーゼを加え0または4 h反応を行い、煮沸により反応停止した。さらにこの反応溶液に対しPzペプチダーゼの添加後、同温度同条件で二次反応を0または3 hを行い、同様に反応停止させた後、遠心分離 (10,000 xg, 5 min) 後の上清をサンプルとした。C₁₈カラム (逆相 (アセトニトリル/水)) による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でペプチドの分離・確認、さらに薄層クロマトグラフィー (TLC) によりアミノ酸検出を行った。

2.2 コラーゲン分解系酵素の1つ、Pz-ペプチダーゼ A (Pz-A) の構造解析

G. collagenovorans MO-1株が生産するコラーゲン分解酵素系には特色ある酵素が幾つもあり、その中で特にPz-ペプチダーゼ (Pz-A) を中心に、そのX線による結晶構造解析と特異的阻害剤との共結晶複合体のX線結晶構造解析により、反応機構の解析を行った。

2.3 ケラチン分解産物を用いたコスメトロジー素材の開発

トリ羽毛はケラチン蛋白質を90%以上含むが難分解性であるため、その分解物のコスメトロジー素材への検討は行われていなかった。神戸有馬温泉より単離した *Meiothermus ruber* H328株を用いてトリ羽毛ケラチンの分解系を構築し、この産物の有効利用を検討した。H328株によるトリ羽毛の分解の培養は、60°Cで振盪により、YS培地 (0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) sucrose) に、3% (w/v) トリ羽毛と、特に0.5% (w/v) CaCO₃を添加し0-6日間培養を行った。この培養液を遠心、濾過後、培養上清として得て、アミノ酸分析、MALDI-TOF-MS解析などを行った。

2.4 新素材のコスメトロジー素材としての検討

微生物由来の細胞外マトリックス分解性酵素群を用いた分解物に対し、化粧品、薬品、薬品素材としての価値を検証するため、2.2でトリ羽毛ケラチン分解物に対し、(i) 抗菌活性、(ii) 抗酸化、酸化抑制効果、(iii) 上皮細胞増殖活性化因子について効果を調査した。

2.5 ケラチン分解酵素の各種薬剤に対する耐性調査

M. ruber H328株が生産するケラチン分解酵素を、細胞培養液から抽出し、各種薬剤 (界面活性剤、有機溶媒など) に対する耐性を、60°Cで処理し、その残存する活性を測定することで調査した。

3. 結果および考察

3.1 コラーゲン分解系酵素群による細胞外マトリックス (コラーゲン) 分解と産物の解析

まず単離したコラーゲン分解性好熱菌 *G. collagenovorans* MO-1株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼを第1段階に用いてコラーゲンペプチドを調製し、さらに2段階目としてコラーゲンのトリペプチド特異配列を認識し、コラーゲン分解ペプチドをさらに小さく分解する同菌株の2つのPzペプチダーゼによる分解を行い、反応産物の解析を行った。

Fig. 2に見られるように、コラーゲン分解性プロテアーゼにより、HPLCで検出出来るコラーゲン由来のペプチドが増加していることが確認された。これは親水性の高い短い溶出時間帯 (Fig. 2A) だけでなく、アセトニトリルの割合を増加させた溶出画分でも確認された。また、この酵素の反応物に対し、さらにPzペプチダーゼの添加を行ったものでもいずれも顕著な増加が見られた。しかし、コラーゲンのアミノ酸一次配列は、決して単調な繰り返しではないため、極端に多いペプチドフラグメントに収束することはなかった。

続いて、HPLCで溶出されるペプチドを溶出時間により10画分に分け、遊離と酸加水分解後のアミノ酸をTLCで検出した。その結果、遊離アミノ酸は2つの酵素反応後も極めて少ない量しか検出されないものの、酸加水分解後は、Gly, Pro, Leu, Alaがこの順で顕著に検出された。さらにヒドロキシプロリンも著量観察された。このことは、酵素反応により遊離アミノ酸ではなく、ジペプチド以上の長さのオリゴペプチドに分解され、コラーゲンの成分比で50%近くを占めるGly, Proが最も多いことが判った。さらにコラーゲン分子上で翻訳後修飾により水酸化されたヒドロキシプロリンも確認できることから、ヒドロキシプロリン含有ペプチドも2つの酵素により断片化されることが示された。

3.2 コラーゲン分解系酵素:Pz-ペプチダーゼ A (Pz-A) の構造解析⁴⁾

G. collagenovorans MO-1株が生産するコラーゲン分解酵素系の中で、特にPz-ペプチダーゼ (Pz-A) について、そのX線による結晶構造解析と特異的阻害剤との共結晶複合体のX線結晶構造解析により、反応機構の解析を行った。

これまで、コラーゲンまたはコラーゲン分解物であるコラーゲンペプチドを、コラーゲン分解性酵素に添加して共結晶構造を解析したものは報告されていなかった。そこでコラーゲン特異配列 Gly-Pro を2回も含む Gly-Pro-(L,D)-Phe-(PO₂CH₂)-Gly-Pro-Nle を阻害剤に用いて、その共結晶構造の解析を行い、反応機構解析を行った。

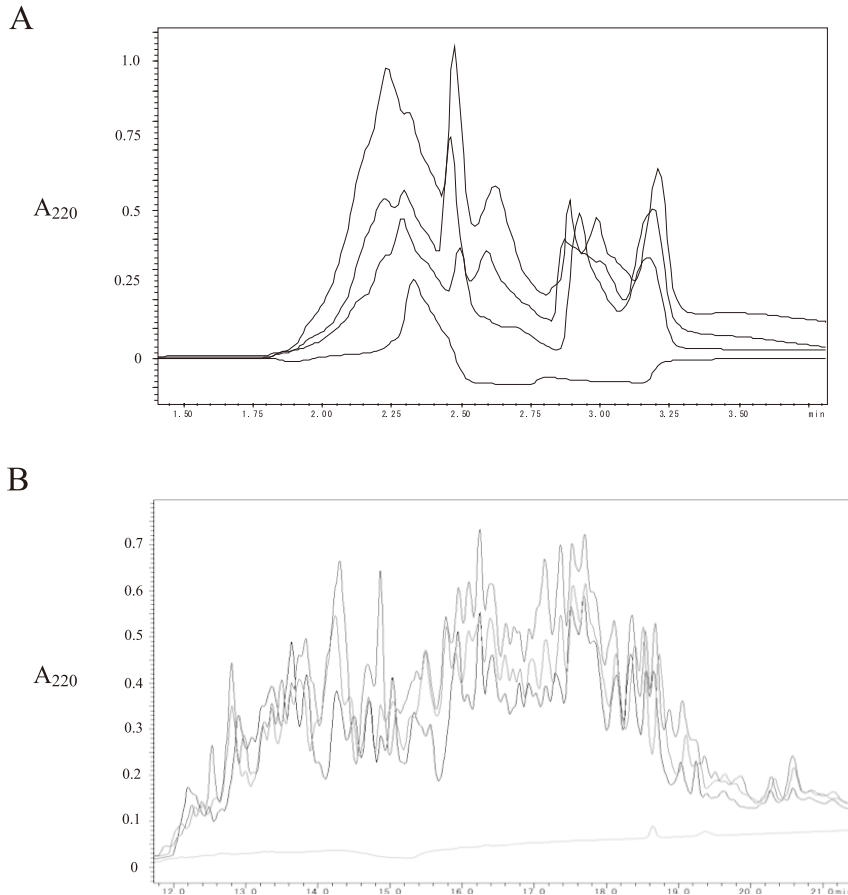


Fig. 2 コラーゲン分解物の逆相クロマトグラフ (A. 1.5-4 min 溶出; B. 12-21 min 溶出)
 — コラーゲン分解性酵素反応 0 h、— 同 4 h、— Pz-A 反応 0 h、— 同 3 h

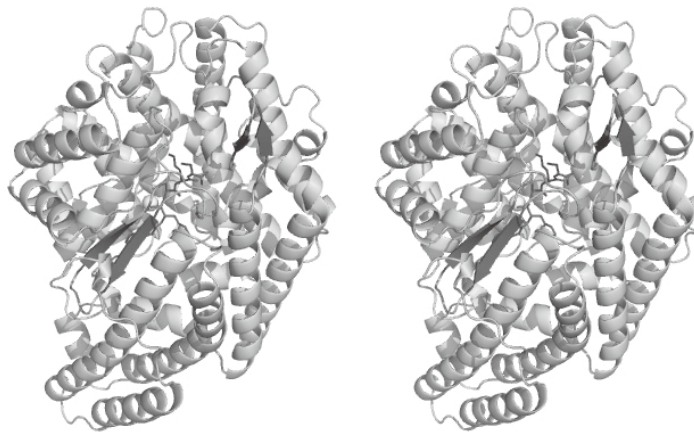


Fig. 3 Pz-ペプチダーゼAの結晶構造⁴⁾
 α ヘリックスをねじ状コイル、 β ストランドを矢印で表示した。中央のボールは活性中心の亜鉛原子を、活性中心には阻害剤 Gly-Pro-(L,D)-Phe-(PO₂CH₂)-Gly-Pro-Nle を含んだ複合体結晶となっている。

まず本酵素は、ほ乳類の類似酵素 thimet oligopeptidase (TOP) とは、二次構造的には多くの類似点を有しているながら、全体構造としては、大きく異なることが分かった。TOPは、共にメタロペプチダーゼM3に属する酵素でありながら2枚貝様の構造をしているのに対し、Fig. 3に示す

ように本酵素は基質が入り込むための顕著な溝はなく、球状タンパク質の形状を取る。さらに、共結晶に用いた阻害剤の構造から、側鎖を持たないGly残基と α 水素を持たないPro残基を活性中心にはめ込むために、他の残基は入り込めない立体構造をとることをつきとめた。そして、コラ

ーゲンペプチドの入口と出口を、基質の通るトンネル構造を明らかにすることによって特定した。これらの構造は、今後コラーゲンペプチドの酵素合成に有用な知見を与えるものと期待できる。

3.3 *Meiothermus ruber* H328 株を用いたトリ羽毛の液化分解

我々は、兵庫県神戸市にある有馬温泉から、難分解性タンパク質であるエラスチンを積極的に分解する *M. ruber* H328 株を単離している。この菌株は、グラム陰性、好気性、無孢子で、赤色の色素を生産し、至適生育温度と pH を、それぞれ 50–65 °C そして pH 7.5–10 付近にもつ桿菌である。*Thermus* 属細菌と近接する 16S rRNA を有するが、生育温度でやや低い温度帯を持つことが特徴である。これまで *Meiothermus* 属細菌には、強力なプロテアーゼ活性やトリ羽毛ケラチン分解を報告されているものはない。

トリ羽毛は、方法に記されている培養により、6 日間ではほぼ原形を留めることなく分解され泥状の形状になった (Fig. 4)。これを濾過により濾液と残渣に分け、濾液成分のアミノ酸・ペプチド量とアミノ酸組成を分析した。アミノ酸組成については遊離アミノ酸、加水分解アミノ酸組成を (株) 日本食品分析センターに分析依頼し、プロテインデータベースにあるトリ羽毛ケラチンタンパク質のアミノ酸組成比と比較し、よく近似した値が得られた。6 日間培養後の培養濾液中の遊離および加水分解アミノ酸が培養に伴い大きく増加した。加えて、培養上清 100 g あたりの遊離総アミノ酸が 432 mg、加水分解総アミノ酸が 1730 mg に達していることが判り、培養上清に含まれるアミノ酸が、羽毛分解に基づくこと、培地に添加した羽毛ケラチン重量の 14.4%、57.7% が、アミノ酸またはペプチドとして可溶化したことを示した。また培養濾液には、羽毛に多く含まれる Ser、Gly、Val が遊離アミノ酸として比較的多く存在しており、トリ羽毛ケラチンが H328 株の生産するプロテアーゼにより分解され、この菌株により資化され他の化学物

質に変換されたりすることのないことが示された。

この他、ブロイラー鶏の白色羽毛に対しても同様の分解反応を調査したところ、地鶏羽毛と遜色なく分解することが判った。

さらに、走査型電子顕微鏡により培養 12 日間にわたる羽毛の構造変化を観察したところ、著しい羽毛構造崩壊が培養と共に確認された。また、H328 株菌体の羽毛への吸着が観察され、この吸着が羽毛分解に効果的であることが示唆された。

培養濾液中に含まれるペプチド成分として、トリ羽毛ケラチンから得られる中間生成物を調査・解析するため、0–6 日間の培養濾液サンプルに対し、産業技術総合研究所関西センターの協力を得て、MALDI-TOF-MS 解析を行った。培養とともに、培養スタート時には見られなかった分子量 1000 以下のシグナルが見られた。しかし、特異なバンドが見られることはなく、アミノ酸レベルにまで分解されるものも少なくないことが判った。その中で、分子質量 656 付近のバンドが培養と共に上昇していることを見だし、これをトリ羽毛ケラチンのプロテインデータベースで検索を行ったところ、Ser-Ala-Pro-Thr-Pro-Leu-Ala という配列である可能性が最も高いことが判った。今後、これ以外のケラチン断片の単離を試み、大量生産の可能性を追究したい。また、実用的な分解への応用として、家庭用ゴミ処理機を用いたトリ羽毛の分解促進も可能であることを示している⁵⁾。

3.4 トリ羽毛分解物の生理活性検索

分解系の検討に引き続きトリ羽毛分解物の生理活性を検討した。

まず H328 株の 2, 4, 6 日間培養後の培養濾液を用いて、*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* の 3 菌株に対し、ペーパーディスクに培養濾液を加え、成育阻害を調べることにより抗菌活性試験を行った。しかし 100 倍希釈までのものには有意な成育阻害・抗菌活

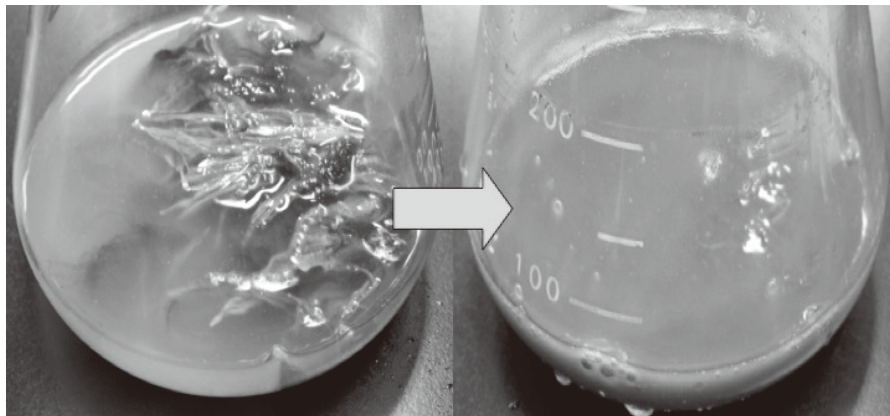


Fig. 4 *Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛の分解。培養前 (左図) と 60°C, 6 日間培養後 (右図) の培養液。

性は検出できなかった。

さらに、トリ羽毛ケラチンが皮膚細胞へ正の効果を持つ可能性を調査するため、H328株の0および10日間培養後の培養濾液を正常ヒト線維芽細胞 (NHDF) に加え、 $[^3\text{H}]$ -thymidineの取り込みを測定することにより細胞増殖効果を調べた。0.03%および $10^{-5}\%$ 添加したサンプルが、コントロールに対し30ないし60%程増殖効果を示した結果が得られたが、添加量に呼応したdosage effectが見られず、また0日培養濾液と有意な差が見られなかったため、本サンプルに含まれるトリ羽毛分解成分にNHDF細胞増殖に効果があるものは見いだせなかった。

過酸化水素によるラットPC12細胞死誘導に対して、予備実験からトリ羽毛から高温高压加工されたfeather mealのケラチン分解産物に弱い抑制効果が認められた。そこでトリ羽毛の直接分解物を含む培養濾液の効果を検討した。40倍希釈系列にすることにより、過酸化水素に対する効果は認められなかった。また、培養濾液で24h細胞を前処理した後、過酸化水素を加えてさらに24h培養後、MTT法で生細胞数を測定する系についても検討を行った。しかしながら、前処理することにより培養濾液での細胞毒性が強く認められ、過酸化水素に対する効果を見いだせなかった。予備実験では、同じPC12細胞で細胞毒性は認められておらず、10倍希釈でも効果が認められている。再び今度は20倍希釈で検討したが、培養濾液に含まれる成分が細胞毒性を示すと考えられた。このことからトリ羽毛分解物の細胞死誘導に対する抑制効果を認めることは出来なかった。

3.5 ケラチン分解酵素の各種薬剤に対する耐性調査

M. ruber H328株は、トリ羽毛を含む培地で培養すると著量のケラチン分解酵素を生産する。この培養液から硫酸分画で酵素を集めてくると、すでにかんりの精製度を持ったケラチン分解酵素が調製できる。このケラチン分解酵素は、すでに強力な界面活性剤でタンパク質変性剤でもあるSDSに対して、驚異的な耐性を有していることを見出している。そこでその他の各種薬剤(界面活性剤、有機溶媒など)に対する耐性を、60℃で処理し、その残存する活性を測定することで耐性を調査した。

基本的に60℃での処理も、常温処理に比べ相当過酷な条件である。それにも増して、界面活性剤 (Triton X100, Tween 20, CTAB) と有機溶媒 (メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、アセトニトリル、DMSO, ベンゼン、エチル酢酸、クロロフォルム) に対して、30-60%の高濃度で30 min以上、中には16日以上活性を保ち続けるということが判った。このような耐性を示すプロテアーゼは、報告例がない。今後、なぜこれほどに耐性なのか、その機構解明を進めると共に、応用面への検討を加えていきたい。

Table 1 ケラチン分解酵素の各種薬剤に対する耐性調査

界面活性剤/ 有機溶媒	濃度	処理時間	相対活性 (%)
none	-	-	100
SDS	30% (w/v)	4 hr	94
Triton X-100	30% (v/v)	30 min	92
Tween20	30% (v/v)	30 min	119
CTAB	30% (v/v)	30 min	99
methanol	60% (v/v)	30 min	114
ethanol	60% (v/v)	16 day	123
buthanol	60% (v/v)	30 min	102
acetone	60% (v/v)	30 min	127
acetonitril	40% (v/v)	30 min	108
DMSO	60% (v/v)	30 min	134
hexane	50% (v/v)	30 min	104
benzene	60% (v/v)	30 min	85
eathyl acetate	40% (v/v)	30 min	118
chloroform	60% (v/v)	30 min	137

(各処理は、酵素濃度 1 mg/ml で60℃の状態で行った。)

4. 今後の実用化への展望

難分解性動物タンパク質を分解する特異な好熱性細菌を単離し、これらがもつ分解系酵素群の生化学的性質を基礎に、細胞外マトリックスの分解生成物から化粧品等の素材開発へ目を向け、検討を行った。今回の研究ではまだその端緒に着いたばかりで、今後より多様な生理活性の調査・検討、再利用先の開発・追従が必要である。また化粧品素材に応用可能な難分解性動物タンパク質として、廃絹分解物の検討も行っており⁶⁾、今後継続していく計画である。本酵素群が産業廃棄物である難分解性動物タンパク質の分解・リサイクルのためのツールとして応用可能になれば、我々の提唱する「リサイクルバイオテクノロジー」の意義は益々大きいものとなる。

5. 謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団から御援助賜りましたこと深く感謝申し上げます。

(参考文献)

- 1) Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe, K. "Decomposition of Extremely Hard-to-Degrade Animal Proteins by Thermophilic Bacteria" J. Biosci. Bioeng., 102, 73-81 (2006)
- 2) Miyake, M., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, Y., Umekawa, M., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe,

- K. "Two thimet oligopeptidase-like Pz peptidases produced by a collagen-degrading thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1." *J. Bacteriol.*, 187, 4140-4148 (2005)
- 3) Matsui, T., Yamada, Y., Mitsuya, H., Shigeri, Y., Yoshida, Y., Saito, Y., Matsui, H., Watanabe, K. "Sustainable and Practical Degradation of Intact Chicken Feathers by Cultivating a Newly Isolated Thermophilic *Meiothermus ruber* H328." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 941-950 (2009)
- 4) Kawasaki, A., Nakano, H., Hosokawa, A., Nakatsu, T., Kato, H., Watanabe, K. "Exquisite Structure and Reaction Mechanism of Bacterial Pz Peptidase A Toward Collagenous Peptides" *J. Biol. Chem.*, 285, 34972-34980 (2010)
- 5) Shigeri, Y., Matsui, T., Watanabe, K. "Decomposition of Intact Chicken Feathers by a Thermophile in Combination with an Acidulocomposting Garbage-Treatment Process." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2519-2521 (2009)
- 6) Suzuki, Y., Matsui, H., Tsujimoto, Y., Watanabe, K. "Enzymatic Degradation of Fibroin Fiber by a Fibroinolytic Enzyme of *Brevibacillus thermoruber* YAS-1." *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 211-215 (2009)