

## 食品や化粧品業界の素材開発に新材料！ 独自開発の「高温焼成シリカゲル」で、抗菌ペプチド見つかる

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院工学研究科の本多 裕之 教授らの研究グループは、独自に開発したシリカゲルを、タンパク質加水分解物に混ぜるだけで抗菌ペプチド<sup>注1)</sup>が選択的に分離濃縮でき、新しい抗菌ペプチドも見つかりました。

生理活性ペプチドを食品や化粧品に使うためには、食材由来のタンパク質を酵素で加水分解した分解物から、多段階の精製工程を通して分離濃縮する必要があります。そのため、分離精製の技術等のノウハウを持っている企業しか商品化できませんでした。また、食材のタンパク質混合物から、唯一のペプチドのみを製品化すると、タンパク質の1000分の1から1万分の1程度の量しか得られません。

本研究では、富士シリシア化学株式会社と共同で、ペプチドを吸着できる無毒な高温焼成シリカゲル<sup>注2)</sup>を開発しました。

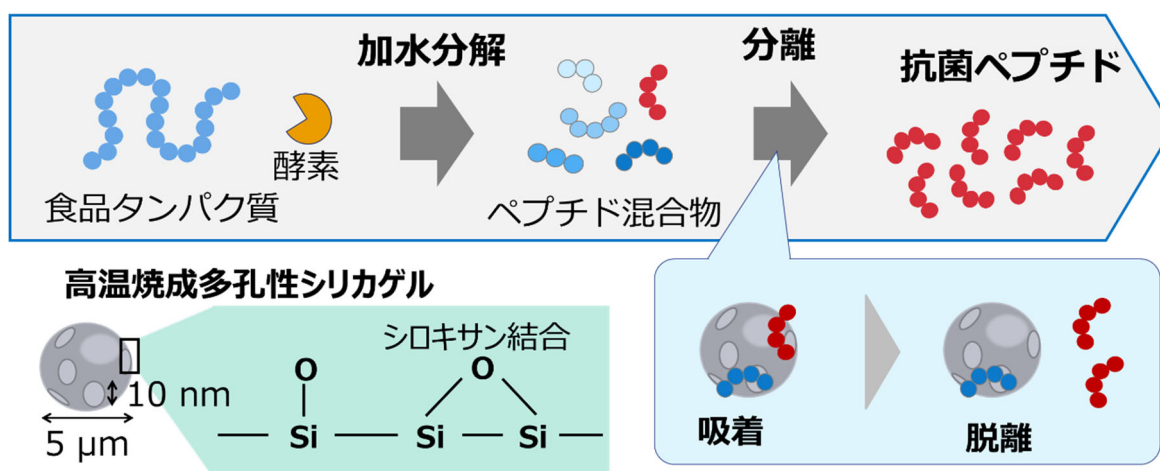
コメ粉末<sup>注3)</sup>からアルカリ抽出法<sup>注4)</sup>でタンパク質を回収し、ペプシン<sup>注5)</sup>で加水分解して得られるペプチド混合物を、高温焼成シリカゲルに吸着し、塩基性・疎水性のペプチドが濃縮された混合物を作製したところ、ニキビの原因と言われるアクネ菌に対して抗菌活性を示すことが分かりました。さらに、このペプチド混合物から質量分析<sup>注6)</sup>で新規の5種類の抗菌ペプチドを特定し、このうち2種類は、アクネ菌<sup>注7)</sup>だけでなく、歯周病菌<sup>注8)</sup>、虫歯菌<sup>注9)</sup>、大腸菌<sup>注10)</sup>に対しても抗菌力を示すことが分かりました。

高温焼成シリカゲルは、特殊な化学的修飾がなく毒性がないため、食品業界や化粧品業界など、ヒトに対して効果を示す素材開発の分野で広く使える新材料になります。

本研究成果は、2021年11月27日付けで学術雑誌「Journal of Bioscience and Bioengineering」に掲載されました。

## 【ポイント】

- ・コメタンパク質加水分解物を、高温焼成シリカゲルに吸着させ、抗菌ペプチドの濃縮に成功。
- ・コメタンパク質から、ニキビの原因のアクネ菌に対する抗菌ペプチド5種類を同定。
- ・新規抗菌ペプチドはアクネ菌だけでなく、歯周病菌、虫歯菌、大腸菌にも抗菌作用を示した。
- ・高温焼成シリカゲルによる抗菌ペプチド濃縮法は、特殊な分離装置は使用せず簡便で汎用性もある。
- ・高温焼成シリカゲルは毒性がなく、食品・化粧品業界などの素材開発の分野で広く使える新材料。



## 【研究背景と内容】

### 生理活性ペプチド

ペプチドは20種類の天然アミノ酸が2から30個程度連なったポリマーです。このため無数の配列の可能性があります。糖類のような親水性分子から脂質のような疎水性分子まで、電荷も酸性から塩基性まで幅広く分布します。認識できる相手分子を選ばず、生体内であらゆる反応に関与します。近年では、生活習慣病の予防・改善を目的とした生理活性ペプチドが注目されており、実際に血圧降下、抗酸化作用などの生理活性ペプチドが発見されています。

### 可食性タンパク質からの生理活性ペプチドの探索

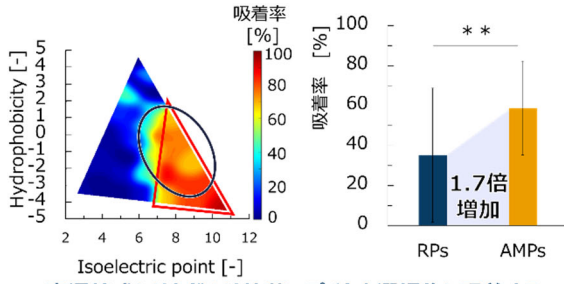
食品添加物として生理活性ペプチドを利用するためには、乳・卵・魚介類・豆類・穀類・海藻類など、食経験のある毒性のない食材由来のタンパク質を加水分解することで探索・製造されます。しかし、食品分野で使用する生理活性ペプチドの製品化は、従来、食材を粉碎・脱穀・脱脂などの前処理をしたのち可食性タンパク質のみを抽出し、動植物あるいは微生物由来の産業用酵素で分解し、カラムクロマトグラフィーなどで精密分画ののち、細胞試験や動物試験で生理活性画分を同定し、ペプチドを特定、大規模製

造の可能性や経済性を精査したうえで産業応用の可能性を追究するという、非常に多くの工程と時間と人手をかける方法によってのみ実現されてきました。ペプチドの機能はタンパク質の状態では不明で、加水分解して初めて顕在化するためです。ペプチドは無数の配列可能性があり、幅広い特性を持つため、認識できる相手分子を選ばず、生体内であらゆる反応に関与する可能性があります。これらのペプチドを産業利用するためには、高速探索法、簡便濃縮、そして同じ生理活性を持つペプチドの混合物としての利用が非常に重要です。

### 抗菌ペプチド

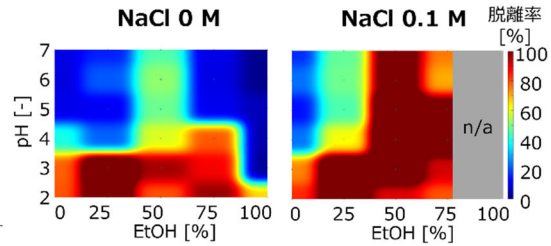
感染症、特に微生物感染症に対する警戒心から、抗菌ペプチドが注目されています。抗菌ペプチドは、環境中に生息する微生物の攻撃から自らを守るため、多くの生物が生産しています。抗菌ペプチドの最大のデータベースとして The Antimicrobial Peptide Database (APD3 : <https://aps.unmc.edu/>) があります。このデータベースには、2021年11月現在で約3,000種類の抗菌ペプチドが登録されており、その内訳は、動物起源2,431種類、植物起源406種類、微生物起源366種類およびその他となっています。これらの抗菌ペプチドは、抗酸化、プロテアーゼ阻害、抗炎症、創傷治癒促進（血管新生、細胞遊走、細胞増殖が促進されて傷がはやく治癒すること）など、他の生理活性を兼ね備えることが報告され、食品ばかりでなく、化粧品、スキンケア製品、医薬品、医薬部外品の新しい素材として注目を集めています。ヒトも生体防御のために、多くのペプチドを生産しています。例えば、唾液中の histatin、好中球などの細胞が産生する LL-37 や  $\beta$ -defensin など、抗炎症作用な抗菌作用を示すペプチドです。抗菌ペプチドの歴史は古く、構造と活性に関してもかなり整理されて考察されてきました。これまで発見された抗菌ペプチドは、主に10~50残基のアミノ酸から構成され、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が含まれていること（両親媒性であること）、 $\alpha$ -helix や  $\beta$ -sheet などの2次構造を有するといった類似した特性が報告されてきました。しかし、これらの共通点があるにも関わらず、それらを効率的に濃縮する方法はありませんでした。

**A) 高温焼成シリカゲルへの抗菌ペプチド(AMPs)とランダムペプチド(RPs)の吸着挙動 (pH 7.4)**



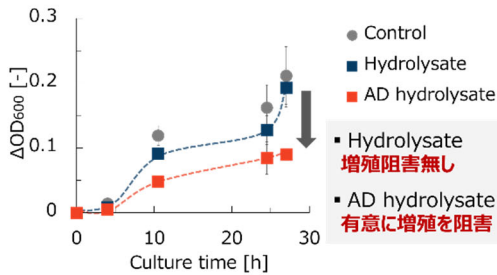
高温焼成シリカゲルは抗菌ペプチドを選択的に吸着する

**B) 吸着ペプチドの脱着のためのリリースバッファー(脱離溶液)の最適化**



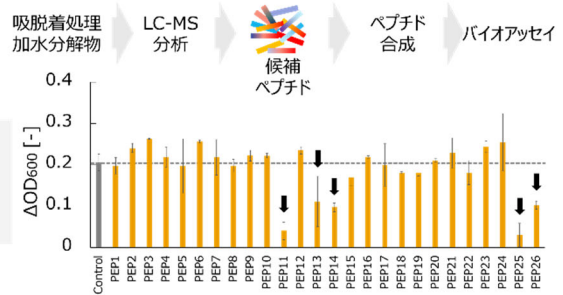
25% エタノールを加えた0.1 M NaCl (pH 3) を脱離溶液として選定

**C) 吸脱着処理加水分解物 (AD hydrolysate) による抗菌活性**



加水分解物の抗菌活性は高温焼成シリカゲルへの吸脱着操作で向上する

**D) 高温焼成シリカゲルで濃縮されたペプチド混合物から抗菌活性を持つペプチドの同定**



26種のうちの5種が抗菌活性を示した!

図 1 研究成果の概要

- A) ペプチドは親水性から疎水性、酸性から塩基性まで広く分布するが、開発した高温焼成シリカゲルは、図中のオレンジのペプチドを吸着する。抗菌ペプチドはこの領域に入るため、ランダムペプチドに比べて 1.7 倍吸着率が高い。
- B) 塩濃度と混和した溶媒で吸着したペプチドの脱離が可能。25%エタノールを加えた 0.1M NaCl 溶液を脱離溶液とする。
- C) ペプシンで加水分解して得たペプチド混合物を、高温焼成シリカゲルに吸着／脱離操作をしただけで、抗菌活性が向上した。抗菌ペプチドが濃縮された可能性を示唆。
- D) 吸脱着処理 (AD: Adsorption/Desorption) したペプチド混合物 (AD hydrolysate) を LC-MS で分析した。同定できた 26 種のペプチドを化学合成し、抗菌活性を調べた結果、そのうち 5 種でニキビの原因菌であるアクネ菌に対して抗菌活性を示した。

得られた成果

まず、APD3 のデータベースサイトを使って、抗菌ペプチドと予想できる 32 種類の 12 残基ペプチドを合成しました。同時に 32 種類のランダムペプチドも合成し、高温焼成シリカゲルへの吸着率を調べました。その結果、予想通り、抗菌ペプチドのほうが吸着率が高く、平均で 1.7 倍高くなることがわかりました。

次にシリカゲルからの脱離条件の最適化を検討しました。疎水性相互作用を緩和するためエタノールを加え、塩濃度を上げて pH を低下させて静電的相互作用を低下させることで、脱離率が向上しました。最終的に 25%エタノールを含む 0.1M NaCl 溶液を pH3 で処理することとしました。

コメ粉末からアルカリ抽出法でタンパク質を回収し、ペプシンで加水分解して得られるペプチド混合物を調整しました。このペプチド混合物を、高温焼成シリカゲルに吸

着 (Adsorption) させ、最適化した溶液で脱離 (Desorption) させることで、塩基性かつ疎水性のペプチドが濃縮された混合物を作製しました。この吸脱着処理した加水分解物の抗菌活性を調べたところ、ニキビの原因と言われるアクネ菌に対して有意な増殖阻害作用を示しました。さらに、実際の抗菌ペプチドの配列を特定するため、高温焼成シリカゲルで処理する前と後のペプチド溶液を LC-MS 分析し、濃縮されたペプチドを特定したところ、26 種類のペプチドが特定できました。このペプチドを実際に化学合成し、抗菌活性を調べたところ、新規の 5 種類の抗菌ペプチドが特定できました。そのうちの 2 種類は、アクネ菌だけでなく、歯周病菌、虫歯菌、大腸菌に対しても抗菌力を示すことがわかりました。最終的に 50g のコメ粉末から 0.17g の混合物が回収できました。

ペプチド	由来のタンパク質	<i>C. acnes</i> (ニキビ菌)	<i>P. gingivalis</i> (歯周病菌)	<i>E. coli</i> (大腸菌)	<i>S. mutans</i> (虫歯菌)
WLGYPRTPTRGH	Seed allergenic protein RAG2	++	±	+	±
IIGLPANLCNESI	Os12g0102400 protein	+	±	±	±
IQGRSRVQVVSNFGKTVFDGVL RPGQL	Glutelin type-B 1	++	++	+	+
IQQSRVQVVSNFGKTVFDGVL RPGQL	Glutelin type-B 2	+	++	+	+
RAGRITRLNSQKF	Glutelin type-B 4	+	±	+	+

±: 抗菌作用なし(増殖抑制 10%以下)、+: 抗菌活性あり(増殖抑制 11%から 60%、++: 強い抗菌活性あり(増殖抑制 60%以上)

表 1 同定された抗菌ペプチドの配列と抗菌活性

今回の方法は、抗菌ペプチドが塩基性かつ疎水性のペプチドであることを利用しています。これは開発した高温焼成シリカゲルが、この特性のペプチドを効率よく吸着できるという特性を持っているためです。このシリカゲルは、動物細胞に対して増殖抑制を示さず、無毒でした。また特殊な化学的な修飾も行っていないため、食品業界や化粧品業界など、ヒトに対して効果を示す素材開発の分野で広く使える新材料になります。

### 【成果の意義】

食品分野や化粧品分野など、ヒトに直接作用する生理活性ペプチドを開発するためには、食経験のあるタンパク質が原料になります。このタンパク質を産業用のプロテアーゼで加水分解し、多段階の分離精製工程を経て、高活性を示すペプチドをほんのわずかに得ることになります。生理活性ペプチドは、加水分解されたときにはじめてその機能を顕在化するため、事前に予想することは困難で、加水分解一分離分画一活性測定を繰り返し、試行錯誤で探索するよりありませんでした。しかし、今回開発した高温焼成シリカゲルは、多種多様なペプチド混合物の中から、化学的特性に分けて分離することが可能です。注目しているペプチドの化学的特性がわかれば、目的の生理活性ペプチドを簡便に濃縮分離することができます。この研究では、抗菌ペプチドは塩基性かつ疎水性という化学的特性をもつことに注目しました。この特性を持つペプチドを高温焼成シリカゲルで選択的に濃縮できることを示し、その結果、抗菌

ペプチドを簡単に取り出し、新規抗菌ペプチドを特定しました。この方法は、生理活性ペプチドの探索、濃縮、製造において大きなブレイクスルーになる可能性を秘めています。また特殊な化学的な修飾も行っていないため、食品業界や化粧品業界など、ヒトに対して直接作用する生理活性ペプチドの探索の分野で広く使える新材料になることを示した重要な成果です。

### 【用語説明】

注 1) 抗菌ペプチド：

生物の生命活動に影響する生理活性ペプチドの 1 つ。進化的に保存された自然免疫反応の 1 種として機能するペプチドの総称であり、あらゆる種類の生物で認められる。主に 10~50 残基のアミノ酸から構成され、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が含まれていること（両親媒性であること）、 $\alpha$ -helix や  $\beta$ -sheet などの 2 次構造を有するといった類似した特性がある。

注 2) 高温焼成シリカゲル：

10nm の平均細孔径をもつ多孔性シリカゲルをナトリウムイオン存在下、600°C、2 時間焼成し、シリカゲル表面のシラノール基をシロキサン結合に変化させた新材料。シリカゲルは親水性であるが、この条件で焼成させることにより、酸性条件下でも酸性かつ疎水性のペプチドを吸着させることができる。一方、中性条件下では、塩基性かつ疎水性のペプチドを吸着可能で、pH 条件によって特製の違うペプチドを効率的に吸着できる。ペプチド吸着材として非常にユニークな特性をもつ。特殊な化学的官能基を持たないため、毒性がなく、食品分野や化粧品分野などヒトに直接接触れる材料開発でも使うことができる。苦味ペプチドは塩基性かつ疎水性のペプチドが多いため、ペプチド混合物にこのシリカゲルを作用させることで、苦味ペプチドの除去も可能である。

注 3) コメ粉末：

コメ種子（もみ）を脱穀（もみの除去）したものが玄米であり、玄米は将来発芽する原基のある胚芽と澱粉とタンパク質を含む胚乳に分けられ、表面がぬか層に包まれている。玄米を精米したものが白米で、精米中にぬか層と胚芽部分が除去される。コメ種子は重量としては澱粉が多いが、米ぬかや胚乳、胚芽部分にはタンパク質も多く含まれる。コメ 100 g に約 6g のタンパク質があると言われる。この研究では、新潟製粉から恵与いただいたコシヒカリ 100%、精米歩合 10% の白米を粉末にしたコメ粉を使用している。コメ粉から抽出したタンパク質は、学術的には、コメ胚乳タンパク質と呼ばれる。

注 4) アルカリ抽出法：

穀類のタンパク質の主成分はグルテリンと総称され、希アルカリ・希酸溶液に溶ける。小麦のグルテニン、コメのオリゼニンなどである。核酸などの他の生体成分と分け

るため、アルカリ抽出法が多用される。粉末の粉状の原料に 0.2%程度の NaOH を加えて可溶化したタンパク質を不溶物と分け、中和して得る。

注 5) ペプシン :

食物の消化を助けるため胃で分泌される代表的なタンパク質加水分解酵素。アミノ酸のポリマーであるタンパク質のペプチド結合を加水分解し、低分子のペプチドやアミノ酸にしてタンパク質の吸収を促す。体内では他に、膵液中に分泌されるトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼなどのプロテアーゼがある。

注 6) 質量分析 :

分析したいサンプル中の分子をイオン化し、その m/z を測定することによってイオンや分子の質量を測定する方法である。MS (マスもしくはエムエス) 分析と呼ばれる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やガスクロマトグラフィー (GC)、キャピラリー電気泳動 (CE) に直結し、移動相を導入することで分析性能を向上できる。その場合、LC-MS などと称される。質量分析を複数組み合わせ、混合物の詳細分析や生体分子の構造解析などに使う分析法を MS/MS 分析と呼ぶ場合もある。

注 7) アクネ菌 :

学名、*Cutibacterium acnes*。皮膚の常在菌で、大腸菌と同じで酸素のないところを好む通性嫌気性菌。ホルモンバランスの乱れで、毛穴の奥の皮脂腺から皮脂が過剰に分泌されたり、ストレスや生活習慣の乱れで角質が肌に残り、皮脂とともに毛穴に詰まると、皮脂を栄養とするアクネ菌が毛穴の中に繁殖する。毛穴の内部で繁殖したアクネ菌や雑菌に対抗するため、皮膚が炎症を起こしてニキビと呼ばれる症状になる。

注 8) 歯周病菌 :

学名、*Porphyromonas gingivalis*。口腔細菌で、学名は歯肉 (gingiva) に由来する。偏性嫌気性 (酸素のある環境では生育できない) で、糖を栄養源として利用できず、もっぱら生育域にあるタンパク質を分解して栄養源とする。40 代以降の慢性歯周炎の歯周局所、特に酸素の少ない歯周ポケットから分離されることが多い。

注 9) 虫歯菌 :

学名、*Streptococcus mutans*。大腸菌と同じ通性嫌気性菌。レンサ球菌の一種で、ヒトの口腔内にも存在し、う蝕の原因菌のひとつ。この菌の定着は歯の萌出とともに開始され、母親由来が 51.1%、父親由来が 31.4%、その他 18.6%で唾液を介して感染する。直接の口移しや、食べ物の噛み与えのみならず、スプーンなどの食器の共有でも伝搬する。糖を原料に粘性物質グルカンを生産し、歯の表面に歯垢 (プラーク) を形成する。乳酸を生産し pH を下げることでう蝕を進行させる。

注 10) 大腸菌 :

学名、*Escherichia coli*。最も研究が進んでいる微生物で、遺伝子組換えや遺伝子導入など分子生物学の研究で頻用される。酸素のないところを好む通性嫌気性菌。病原性を持つ株もある。大腸菌を代表とする通性嫌気性菌は腸内微生物叢の約 0.1%を構成する。腸内の大腸菌は、糞便を通じて外環境に排出され、糞便から口腔への感染（糞口経路）は、細菌の病原性株が疾患を引き起こす主な経路となる。

#### 【論文情報】

掲載紙 : Journal of Bioscience and Bioengineering, in press (2021)

論文タイトル : Selective concentration of antimicrobial peptides to heat-treated porous silica gel using adsorption / desorption,

著者 : Hitomi Hagawa<sup>a</sup>, Kento Imai<sup>a</sup>, Ziwei Gao<sup>a</sup>, Masayuki Taniguchi<sup>b</sup>, Kazunori Shimizu<sup>a</sup>, Hiroyuki Honda<sup>a</sup>

a: 名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻

b: 新潟青陵大学短期大学部人間総合学科

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.11.002

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172321002954?via%3Dihub>