

<平成25年度助成>

温度依存的に凝集するエラスチンペプチドによる 新食品基材の開発

野 瀬 健
(九州大学基幹教育院)

1 はじめに

エラスチンは、私たちの身体になくてはならないタンパク質で、血管や肺、靭帯などの伸び縮みを必要とする部分に多く含まれている¹⁾。体内のエラスチンが減少すると、身体の組織が硬くなってしまふことや、動脈硬化などの病気とも関連することが指摘されている。このため、我々が健康な生活を送り続けるには、コラーゲンとともにエラスチンを維持し、増やしていくことが大切と考えられるようになってきた。近年、様々な動物組織からエラスチンが抽出され、健康食品や化粧品として利用され始めている。一方で、エラスチンはコアセルベーションという可逆的かつ温度依存性の自己凝集活性を持つため(図1)、バイオ素材としても注目を集めるようになった²⁾。

ところで、分子量の大きなタンパク質であるエラスチンのアミノ酸配列中に含まれる部分ペプチド断片も同様の自己凝集活性を持つことが明ら

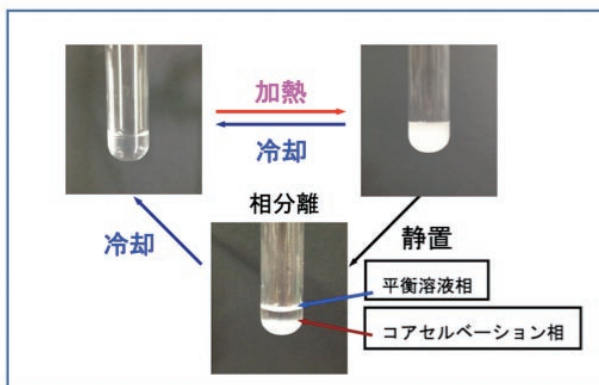
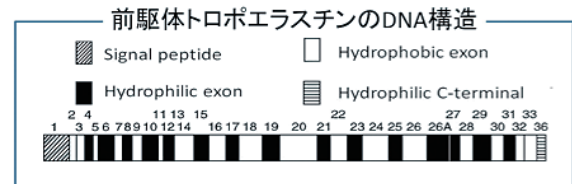


図1. エラスチンのコアセルベーション

エラスチンは温度可逆的に自己凝集を起こす。加熱すると白濁し、その後静置するとコアセルベートを形成するが、いずれも冷却すると元の透明溶液に戻る³⁾。



ペプタペプチドリピート: PG VPGAG VPGVG VPGAG IPV VPGAG IPG
ヘキサペプチドリピート: PG VGVAPG VGVAPG VGVAPG VGLAPG VGVAPG
ノナペプチドリピート: AGIPGLGVG VGVPLGVG AGVPLGVG AGVPLGVG

図2. エラスチンの分子中の繰り返し配列

エラスチンの分子内には、疎水性アミノ酸からなる複数の繰り返し配列が存在する³⁾。

かとなってきた。このアミノ酸配列は図2に示すように、疎水性アミノ酸の繰り返しにより構成されていることが、前駆体タンパク質トロポエラスチンの塩基配列解析から明らかとなった。我々はこの繰り返し配列に注目し、繰り返し配列中のアミノ酸を別のアミノ酸に置き換えたペプチド・置換ペプチドを合成したところ、低分子量のペプチドでも体温(37℃)付近でコアセルベーションを示すことを見出した(特願2013-95991)。天然には、バリン-プロリン-グリシン-バリン-グリシン(以下VPGVGと略)という配列が存在しているが、この配列中の1番目のアミノ酸であるバリン(Val:V)をフェニルアラニン(Phe:F)に置換し、FPGVGとすることで、低分子化が達成された⁴⁾。この研究において、ペプチド水溶液の温度が室温(25℃)から体温(37℃)へと上昇することで、ペプチドが水溶液状態から凝集したゲル状の構造を取ることが見出されたため、このゲル化を食品へと応用することを着想した。すなわち、保存、流通時(常温)には溶液状態で存在し、体内に取り込まれるとゲル化するというものである。もちろん、ペプチドは天然アミノ酸からなる高分子であ

り、いわゆるタンパク質と同様に安全に食品として用いることができるかと一般に考えられている。このペプチドを用いることで、例えば、ダイエット食品における満腹感が得られ腹持ちの良い食品の開発や、ペプチドと脂肪と結合させた複合体を作成しておき、これがゲル化するときに周囲の脂質を巻き込むようにすれば脂質の吸収を抑える機能性食品が得られると考えた。本研究では、これらのようなペプチドの機能化に取り組んだ結果について紹介する。

2. 研究方法

2.1 エラスチンペプチドの化学合成

エラスチンペプチドの化学合成は、一般的なFmoc-アミノ酸を用いる固相、液相合成法により、手動、もしくは全自動合成機(ABI 433A)により実施した。但し、ペプチド(アミド)結合の形成には、HBTU (2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)/HOBt (1-Hydroxybenzotriazole) 法とDMT-MM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride) を縮合剤に用いた方法をそれぞれ用いた。また、溶媒としては、NMP (N-Methyl-2-pyrrolidone) のみならず、EtOH (エタノール) や H₂O なども使用した。ジスルフィド結合の形成反応には、側鎖チオールフリーのペプチドを空気酸化することで実施した。合成ペプチドの精製は、逆相HPLCで行った。純度の確認は、分析HPLCおよびUPLC/MSにより行った。

2.2 コアセルベーション測定

合成ペプチドの自己凝集能(コアセルベーション能)を測定するため、溶液の濁度を測定した。温度可変セルチャンバーを装着した紫外可視分光光度計(Jasco-V660)に各種濃度のペプチドの水溶液をセットし、時間毎にセルの温度を変化させ、同時に濁度の変化を記録した。また、目視による白濁を簡易的なコアセルベーションの確認に用いた。

2.3 酵素分解抵抗性

エラスチンペプチドの酵素分解に対する抵抗性は、ペプチド水溶液に消化酵素(トリプシン(Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega)・キモトリプシン(α -Chymotrypsin from bovine pancreas, Sigma)・エラスターゼ(Elastase, Porcine Pancreas, High Purity, Crystallized, Calbiochem))を加え、ブロックインキュベーター((株)アステック製 BI-516S)上で反応させ、ペプチドの分解量をUPLCおよびHPLCで定量することで実施した。37℃でペプチド・酵素混合液をインキュベートし、一定時間毎に反応液から一部をとり煮沸、強酸性化処理によって酵素反応を停止させた。この溶液をUPLCにインジェクトしてペプチドの分解量を追跡した。

2.4 脂質付加エラスチンペプチドの油との反応性

エラスチンペプチドに脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸)を結合させたハイブリッドペプチドを合成した。これを水溶液とした後、この溶液に市販のコーン油(リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸を含有)を一定量加え、温度変化やソニケーション、長時間放置などの後、水溶液の状態変化を観察した。

3. 結果と考察

3.1 ペプチド合成

今日、ペプチドの化学合成はほぼ確立された感があるが、実際に数十個のアミノ酸を縮合して純粋なペプチドを作ることは、それほど容易ではない。しかしながら、本研究で用いるエラスチンペプチドは、その配列の特徴として疎水性アミノ酸であるPhe(フェニルアラニン:F)、Pro(プロリン:P)、Gly(グリシン:G)、Val(バリン:V)から主に構成されている。このため、反応性の高いアミノ基、カルボキシル基などをアミノ酸側鎖に有しないことから、側鎖保護アミノ酸の使用の回避が可能であり、また、固相合成法を用いた場

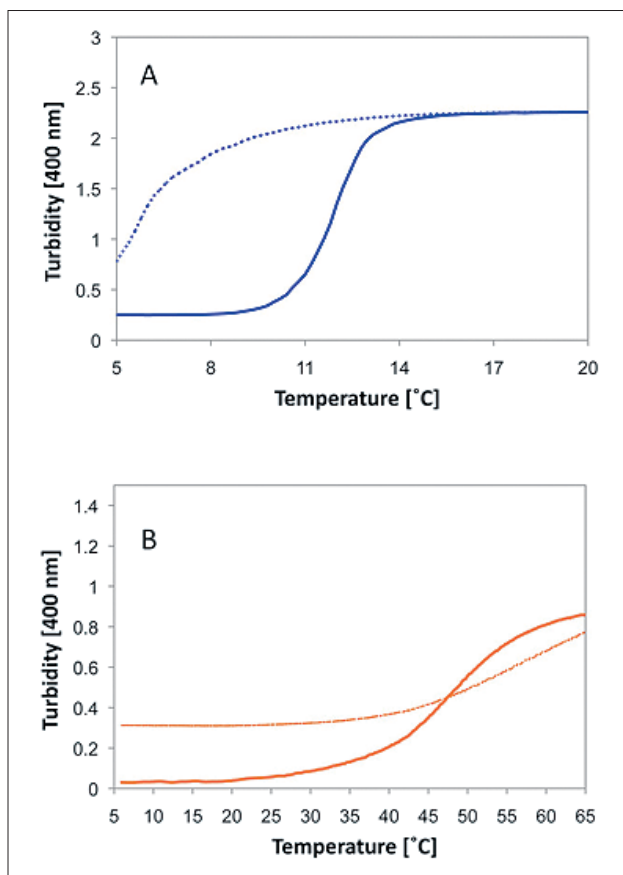


図3. エラスチンダイマーペプチドの温度依存的
コアセルベーション
A: (C-(FPGVG)₅)₂, B: (C-(WPGVG)₃)₂

合、最終脱保護は強酸処理 (95% Trifluoroacetic acid/H₂O) のみで可能であるため、合成が比較的容易である。本研究でも、一部で経験の浅い研究者により手動および全自動合成機を用いた化学合成を実施したが、99%以上の純度を持つペプチドを短期間のうちに調製可能であった。このため、通常のエラスチンペプチドの合成は実験室レベルにおいて問題無く遂行された。また、エラスチンペプチドは特徴的な繰り返し配列 (VPGVG など) を基本構造として有している。これを利用して、繰り返しのペプタペプチドをあらかじめ合成しておき、ペプタペプチドの縮合を繰り返して必要な長さのペプチドを得るフラグメント合成法の開発を行った。今回は、N末端をFmoc基で保護したFmoc-FPGVG-OHを合成し、フラグメント合成の原料とした。Fmoc-FPGVG-OHの合成は全自動合成機により実施し、続いて、別に合成したN

末端を脱保護したFPGVGをRink amide MBHA resin (Novabiochem) に繫留し、縮合剤としてDMT-MMを、溶媒としてNMPを用いて縮合後ピペリジンで脱保護、というステップを繰り返すことにより、(FPGVG)₅の合成を達成した。通常、Fmoc-アミノ酸を用いる固相合成法では、合成しようとするペプチドに対して4~10当量のアミノ酸が必要となるが、今回のフラグメント合成では1.1当量のFmoc-FPGVGを使用することにより、高効率の合成を可能とした。また、溶媒としてEtOHを用いての合成も実施した。

3.2 コアセルベーション測定

調製したペプチドについて、コアセルベーション活性を測定した。コアセルベーションはエラスチンの持つ特徴的な分子自己集合であり、生体内でエラスチンがその前駆体タンパク質トロポエラスチンから生じるのに必要な性質である。エラスチンの疎水性繰り返し配列であるVPGVGのポリマーがコアセルベーション活性を示すことが知られているが、その後の研究で(VPGVG)₂₀ (20回の繰り返し構造を持つ100アミノ酸残基からなる) が、数十mg/mlの濃度の水溶液としたときにコアセルベーションを起こすことが確認された。今回の研究では、エラスチンの疎水性繰り返し配列VPGVGを母体とした(FPGVG)₁₀、(FPGVG)₅、(WPGVG)₃などにコアセルベーション活性が確認された。特に、(FPGVG)₅、(WPGVG)₃をシステインを介してダイマー化した(C-(FPGVG)₅)₂や(C-(WPGVG)₃)₂は、それぞれ濃度10mg/mlおよび1mg/mlの濃度においてコアセルベーションを起こすことが観測された(図3)^{5,6)}。それぞれのコアセルベーションは約10°Cと30°Cから開始され、その溶液状態と自己集合状態の相転移温度は約14°Cと47°Cであった。これらの事実は、このエラスチン由来の合成ペプチドがそのアミノ酸組成、アミノ酸の数(基本配列の繰り返し数)、分子構造によって、自在に自己集合温度を変化させ

ることが可能であることを示した。したがって、エラスチンペプチドは食品に利用する時に、任意の温度に対して液体とゲル状態を変化させることができるユニークな基材となることが確認された。

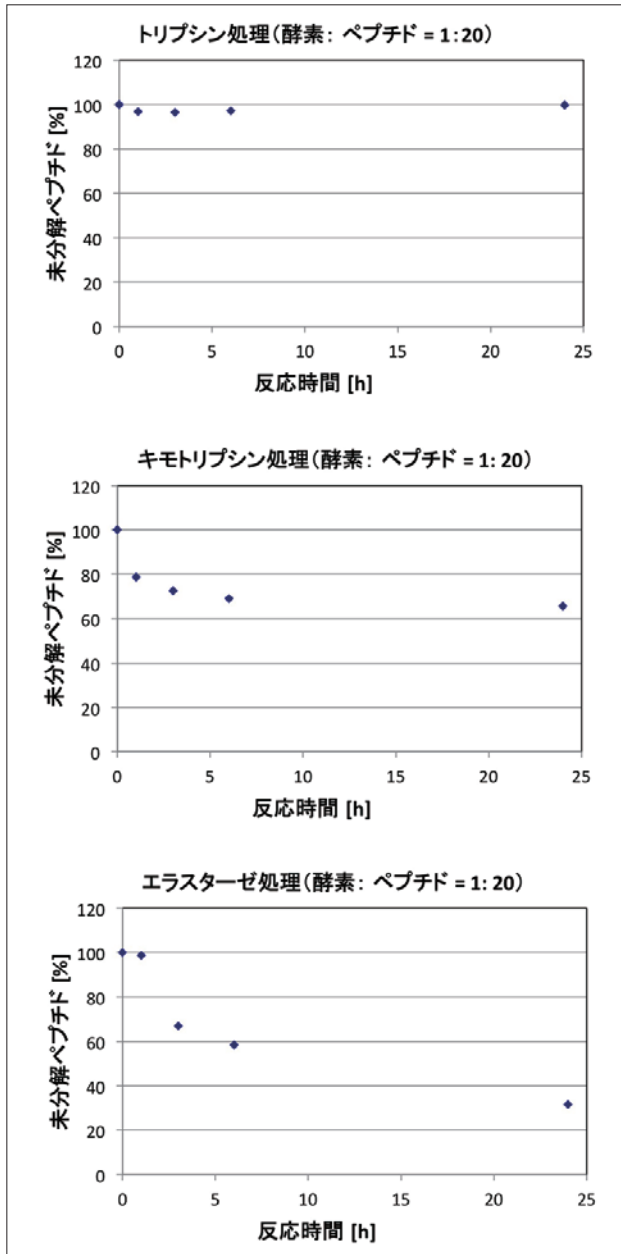


図4. エラスチンペプチドの酵素分解

上から(FPGVG)₅をトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼでそれぞれ処理した結果を示す。

3.3 酵素分解抵抗性

エラスチンペプチドを食品基材として利用する場合、その体内での安定性は一つの有用性の指標となる。そこで、主な消化酵素の中から、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼを取り上げ、

それらの酵素分解に対するエラスチンペプチドの抵抗性を調べた(図4)。主に塩基性のアミノ酸のC端側のペプチド結合を加水分解するトリプシンでの消化においては、ペプチドのアミノ酸配列から予想されるように、エラスチンペプチドはほとんど分解を受けなかった。一方で、疎水性アミノ酸であるバリン、フェニルアラニンやトリプトファンのカルボキシ末端側のペプチド結合を加水分解するキモトリプシンは、6時間の間に約30%のペプチドを加水分解した。しかしながら、この分解は限定的であった。一方で、エラスチンを分解する酵素エラスターゼは、キモトリプシンよりもペプチド分解能力が高く、6時間で約40%、24時間で約65%のエラスチンペプチドを分解した。そもそも、FPGVGのアミノ酸配列は天然のヒトエラスチンの内部にも存在しており、この部分が加水分解を受けるのは妥当であり、また、ゆっくりと適切に分解されることは食品基材としては相応しい性質であるとも考えられた。それは、分解物がアミノ酸やオリゴペプチドとなり栄養素とも成り得るからである。

一方で、ペプチド溶液温度を室温(25℃)から体温(37℃)へと上昇させコアセルベーションを起こし、ゲル化した状態のエラスチンペプチドにおいては、酵素の反応は著しく低下し、ほとんど分解物は生じなかった。これは、ある意味予想された結果ではあるが、ペプチドがゲル状となったため、酵素と基質であるペプチドが出会う頻度が低下したことが原因であるためと推定された。

3.4 脂質付加エラスチンペプチドの油との反応性

エラスチンペプチドを食品基材として用いる場合、ペプチドに様々な機能を搭載することにより高機能化を図ることで一層その価値を高めることが可能となる。本研究では、このペプチドが水溶性であることから、分子内に炭化水素鎖を導入することでペプチドの親水性と炭化水素鎖の疎水性を合わせ持った親媒性の分子を創製できると考え

た。炭化水素鎖は、ペプチドのアミノ末端にアミド結合の形で脂肪酸を導入すると容易に導入が可能である。このため、通常のペプチド合成に用いる脱水縮合剤により、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸を(FPGVG)₅に導入し、ペプチドと脂肪酸のハイブリッドペプチドを得た。ペプチドの合成反応は問題無く進行したが、分子疎水性が大きく、カラムへの吸着性が上昇したため、合成反応後の逆相HPLC精製に通常ではC₁₈カラムを用いるところ、より炭素鎖の短い(疎水性の低い)C₈カラムを用いる必要があった。

得られたハイブリッドペプチドは、温度の低い水には難溶であったが、加温すると溶解均一な溶液となった。この溶液は、通常の濁度法によるコアセルベーション能の測定においては濁度が上昇せず、コアセルベーションを示さなかった。ところが、水溶液に油(コーン油)を添加すると、まず、油/水界面を形成するが、その後、超音波を掛けて懸濁すると白色の沈殿を生じた(図5)。これは、ペプチドのみ、もしくは、ペプチド無し(油のみ)では見られなかった現象であり、ペプチドが油と結合して沈殿を生じたものと考えられた。また、ペプチドは油のみには溶解せず、この混合溶液に水を加えソニケーション処理を行うと、同様の沈



図5. ハイブリッドペプチドと油の反応

水に溶解した3mg/mlのハイブリッドペプチド(700μl)に対し10μl(右)および20μl(左)のコーン油を加えると白色沈殿を生じた。

殿を生じた。このようなハイブリッドペプチドの性質は、油をまとめて沈殿させる機能性物質としての応用の可能性を示唆した。

4. まとめ

以上の様に、本研究ではエラスチンペプチドについて、合成、コアセルベーション測定、高機能化に関する実験を行った。その結果、ペプチドのコアセルベーションを開始する温度が調整可能であることを明らかとするとともに、油を沈殿させる新規のペプチド/脂肪酸ハイブリッドペプチドの調製に成就した。これらのエラスチンペプチドは、食品工業への応用をはじめ、さまざまな分野での安全な基材としての応用が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団並びに関係者の皆様に心から御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Uitto J., Biochemistry of the Elastic Fibers in Normal Connective Tissues and its Alterations in Diseases *Invest. J. Dermatol.*, **72**, 1 (1979)
- 2) 前田衣織, しなやかな身体とエラスチン, pp. 266, 女性の疾患と美容のための機能性素材の開発 山地亮一監修 CMC出版 (2014)
- 3) Vrhovski B. *et al.*, Biochemistry of Tropoelastin, *Eur. J. Biochem.*, **258**, 1218 (1998)
- 4) Taniguchi S. *et al.*, Coacervation Properties of Short Elastin-derived Pentapeptide Analogues Containing Aromatic Amino Acids, *Peptide Science* **2013**, 433 (2014)
- 5) Suyama K. *et al.*, Coacervation Property and Secondary Structure of Synthetic Dimer Peptides of the Elastin-derived Pentapeptide Repeat-related Peptide, *Peptide Science* **2013**, 277 (2014)
- 6) Suyama K. *et al.*, Coacervation Property and Structural Analysis of Synthetic Dimer Peptides of Aromatic Amino Acid Containing Elastin-derived Peptides, *Peptide Science* **2014**, in press.

Development of the novel food materials based on elastin-derived peptides possessing temperature-dependent coacervation property

Takeru Nose

Faculty of Arts and Science

Kyushu University

We conducted synthetic and biochemical studies on elastin-derived peptides in this study and we believe that these can be used for the development of novel food materials with useful functions. Elastin is a fundamental protein that provides elasticity to the blood vessels, lungs, and ligaments. A partial pentapeptide of elastin, Val-Pro-Gly-Val-Gly, is considered to be one of the important elements for elasticity. In our previous studies, we developed Val-Pro-Gly-Val-Gly-related peptides, referred to as elastin-derived peptides. (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)_n and (Trp-Pro-Gly-Val-Gly)_n are examples of such a Val-Pro-Gly-Val-Gly-related peptides. These peptides can be easily prepared by conventional solid-phase peptide synthesis. In this study, we carried out the fragment-coupling method by using H-Phe-Pro-Gly-Val-Gly-OH as a monomer and DMT-MM as a coupling reagent to obtain (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)_n. DMT-MM can catalyze the coupling reaction in EtOH and H₂O, which ameliorates the need for hazardous organic solvents such as NMP, DCM, or DMF. It is advantageous to produce food materials without the use of organic solvents, because these solvents have residual toxicity. As a result of the synthesis of (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)_n, the fragment coupling could be easily performed and the repetitive peptide (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₅ was obtained effectively. Furthermore, dimer peptides of (Cys-(Phe-Pro-Gly-Val-Gly)_n)₂ and (Cys-(Trp-Pro-Gly-Val-Gly)_n)₂ (n = 3 or 5) were also prepared and their strong temperature-dependent coacervation activity was confirmed. These dimer peptides started coacervation at temperatures lower than the body temperature. This suggests that the dimerization of the peptide could move the onset temperature of coacervation to low temperature artificially. Moreover, these peptides are moderately digested by digestive enzymes, particularly by elastase, in the soluble state. However, in the coacervated state, (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₅ showed resistance to enzymatic digestion. This observation suggests that these peptides can be used as stable food materials that have resistance to enzymatic digestion. In this study, fatty acid conjugated (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₅-related peptides were also prepared and characterized. The fatty acid conjugated peptide showed surface activity. When corn oil was added to the aqueous solution of the peptide, the mixed solution was suspended and this promoted the precipitation of a white layer consisting of the peptide and the oil. This phenomenon showed a new characteristic of the peptides, which suggested that the peptides can be used as surfactants in food materials. In conclusion, we developed the elastin-derived peptides as novel food materials with some interesting characteristics. Our results indicate that the elastin-derived peptides are one of the promising food materials that are safe and have high functionality.