

卵殻膜由来ペプチドによる 腸内細菌叢の改善

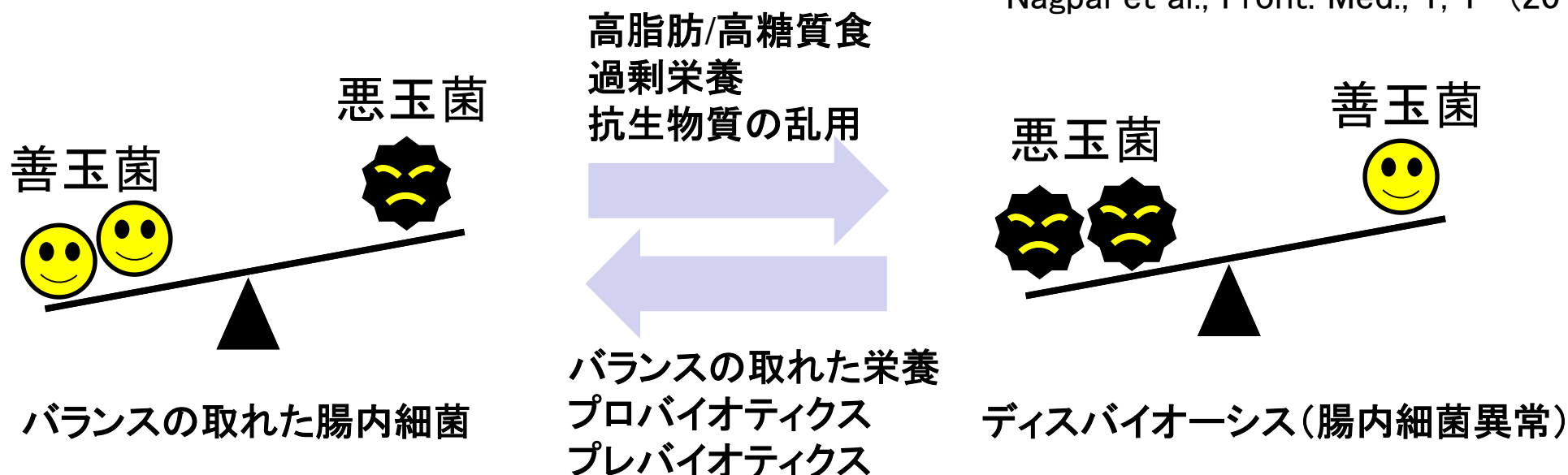
神戸大学 大学院農学研究科
助教 福田 伊津子

2024年10月17日

大腸管内の腸内細菌叢:

- 40兆個以上(500~1,000種類)の常在細菌
- 栄養、代謝、免疫、疾患、老化などへの関連が指摘

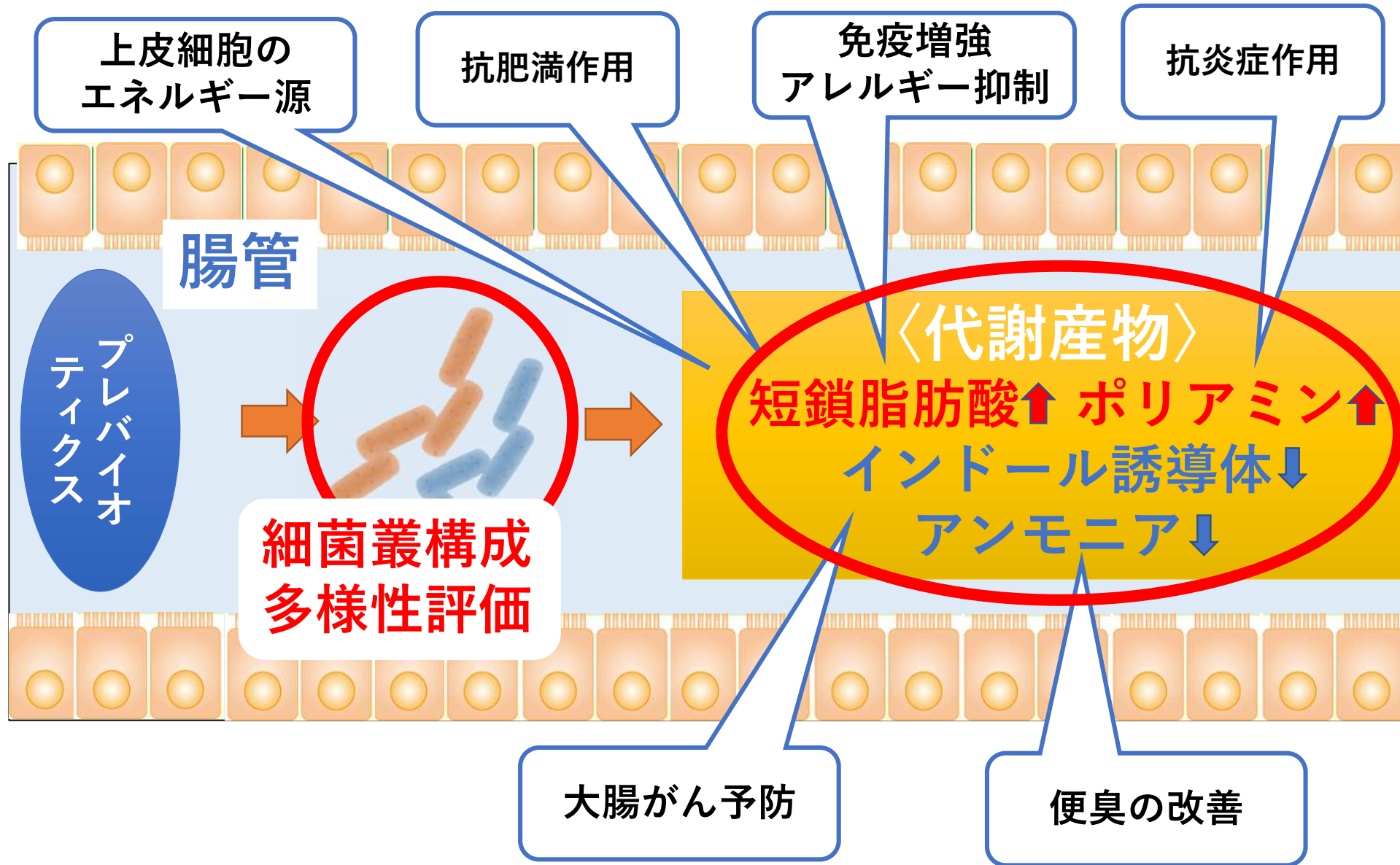
Nagpal et al., Front. Med., 1, 1- (2014)



バランスの取れた栄養と腸内細菌叢が重要！

ディスバイオーシス(腸内細菌異常)がもたらすもの...

腸管透過性↑、内毒素症、敗血症、系統的な炎症、インスリン抵抗性、肥満、
心血管疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、炎症性腸疾患



プレバイオティクスとプロバイオティクス

プレバイオティクス prebiotics

経口摂取したときに、生体に有益な作用が期待される腸内細菌を選択的に増やしたり活性化したりすることのできる難吸収性食品成分（腸内細菌叢のエサ）

プロバイオティクス probiotics

腸内細菌叢のバランス改善により宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物

従来技術とその問題点

既に実用化されているプレバイオティクスには、糖質由来のオリゴ糖や食物繊維等があるが、

- 食品の三大栄養素であるタンパク質・脂質由来成分のプレバイオティクス評価はあまり進んでいない
- 健康志向の上昇によりプロテインサプリメント等の市場が拡大している

等から、タンパク質由来成分のプレバイオティクス評価を行った。

鶏卵の卵殻膜を微粉末化した卵殻膜粉末 (EMP, キューピー株式会社製)

生理活性

- ・損傷治癒
- ・コラーゲン産生促進

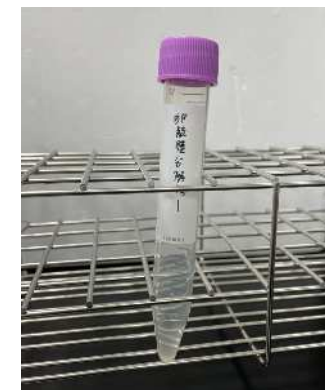


腸内での作用に関しては明確でない

エラスターゼ
処理



エラスターゼ
分解物
(ELA)



- ・プロテアーゼの1つで、弾性繊維を切断
- ・水溶性を高めることで、加工しやすくする
- ・ヒト膵臓からも分泌されており、腸内動態に近づけられる



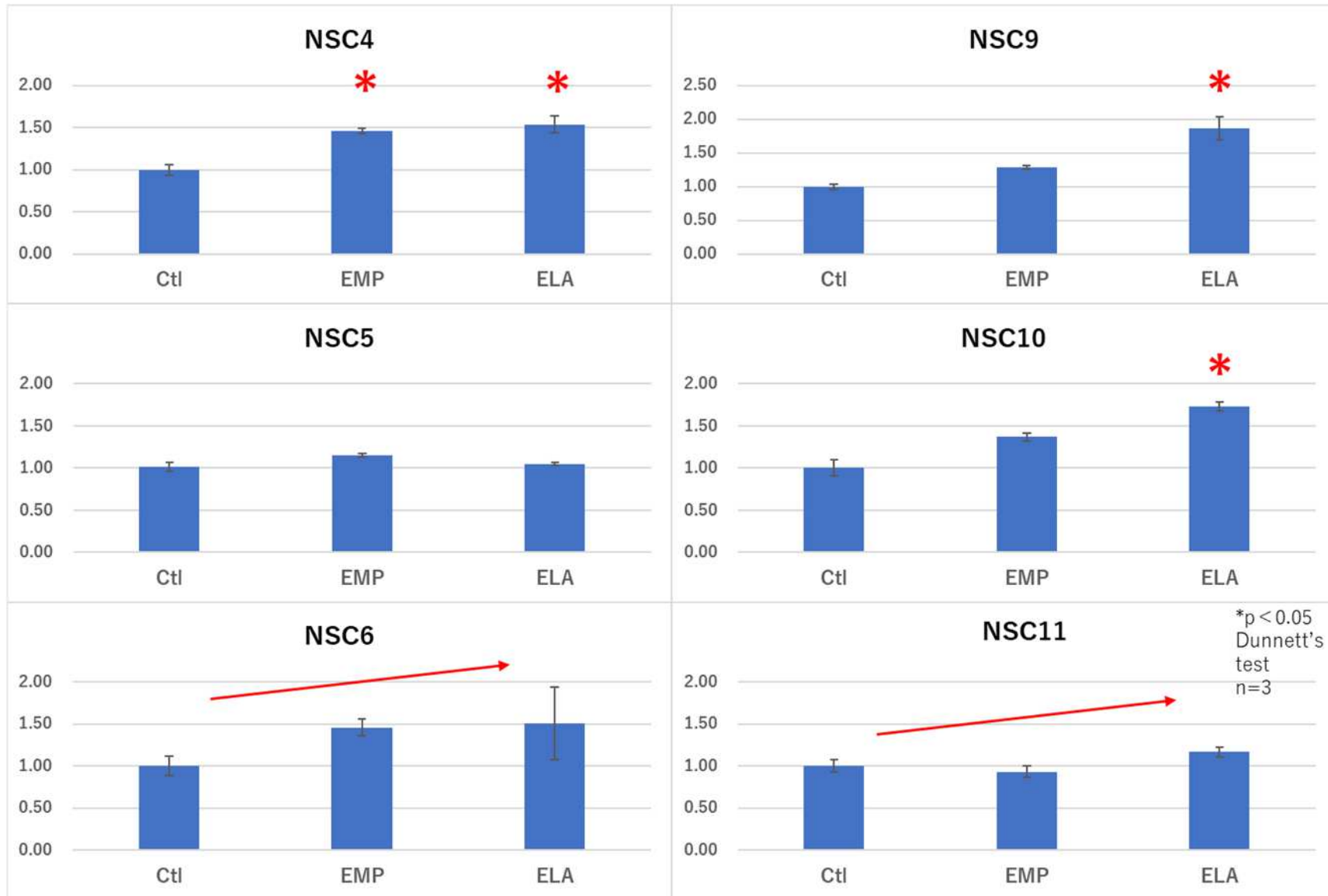
GAM培地+glu 0.5 g/L 20 mL
健常成人由来凍結スターター上清50 μ l
N₂ (78%)+ CO₂(20%) + H₂(2%) 充填

サンプル1	サンプル2	サンプル3
コントロール (滅菌水200 μ l)	卵殻膜粉末(EMP) 一日摂取量0.83g/lを 水に溶かして添加	エラスターゼ分解物 (ELA) 同量のEMPから生成

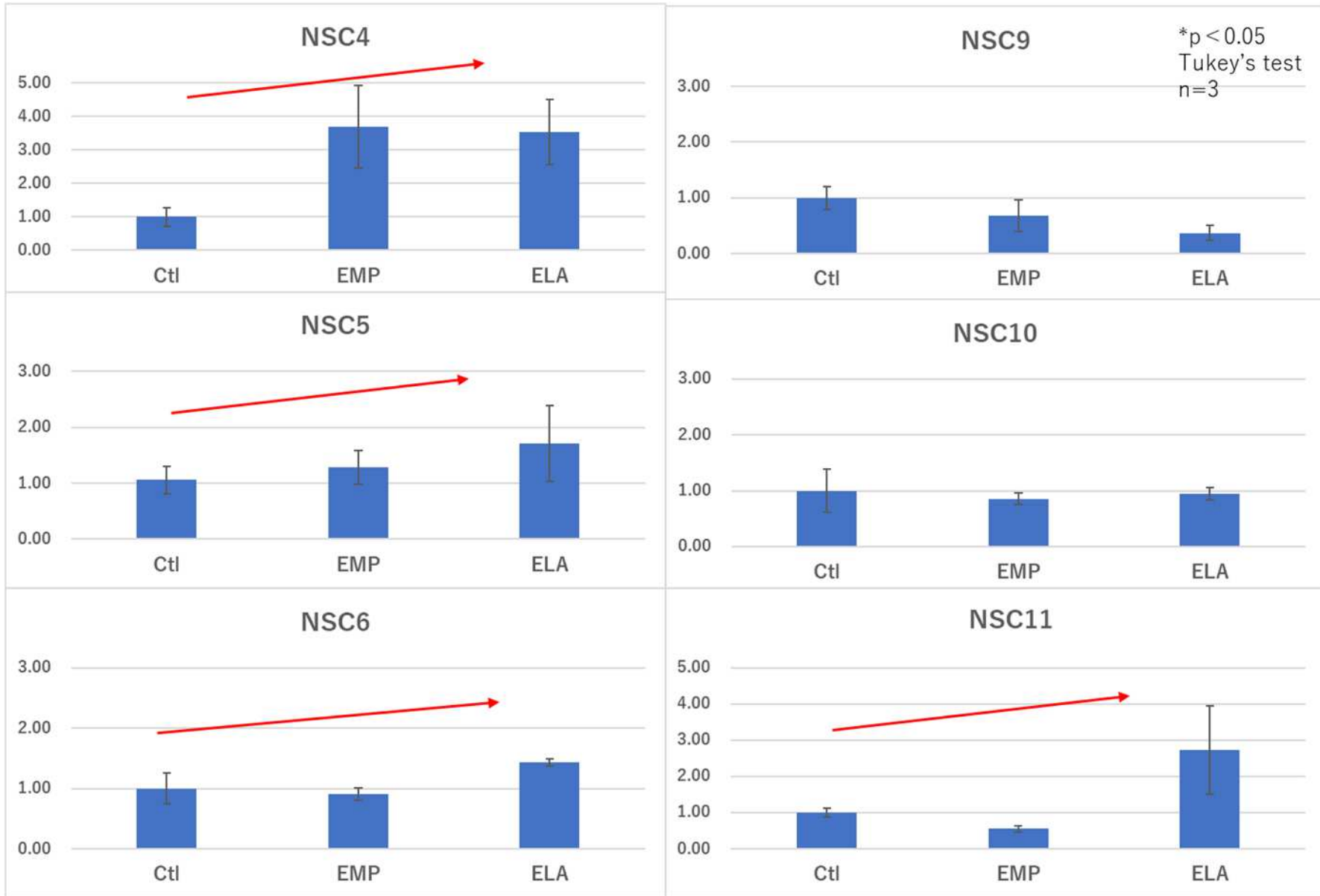
30時間 37°C 振盪培養 (85 strokes/min) 試験区：6被験者× N=3 で実施

〈分析項目〉

- ・細菌叢定量
- ・短鎖脂肪酸量測定
- ・インドール類測定
- ・pH測定
- ・アンモニア量測定
- ・多様性評価 (メタ16S解析)

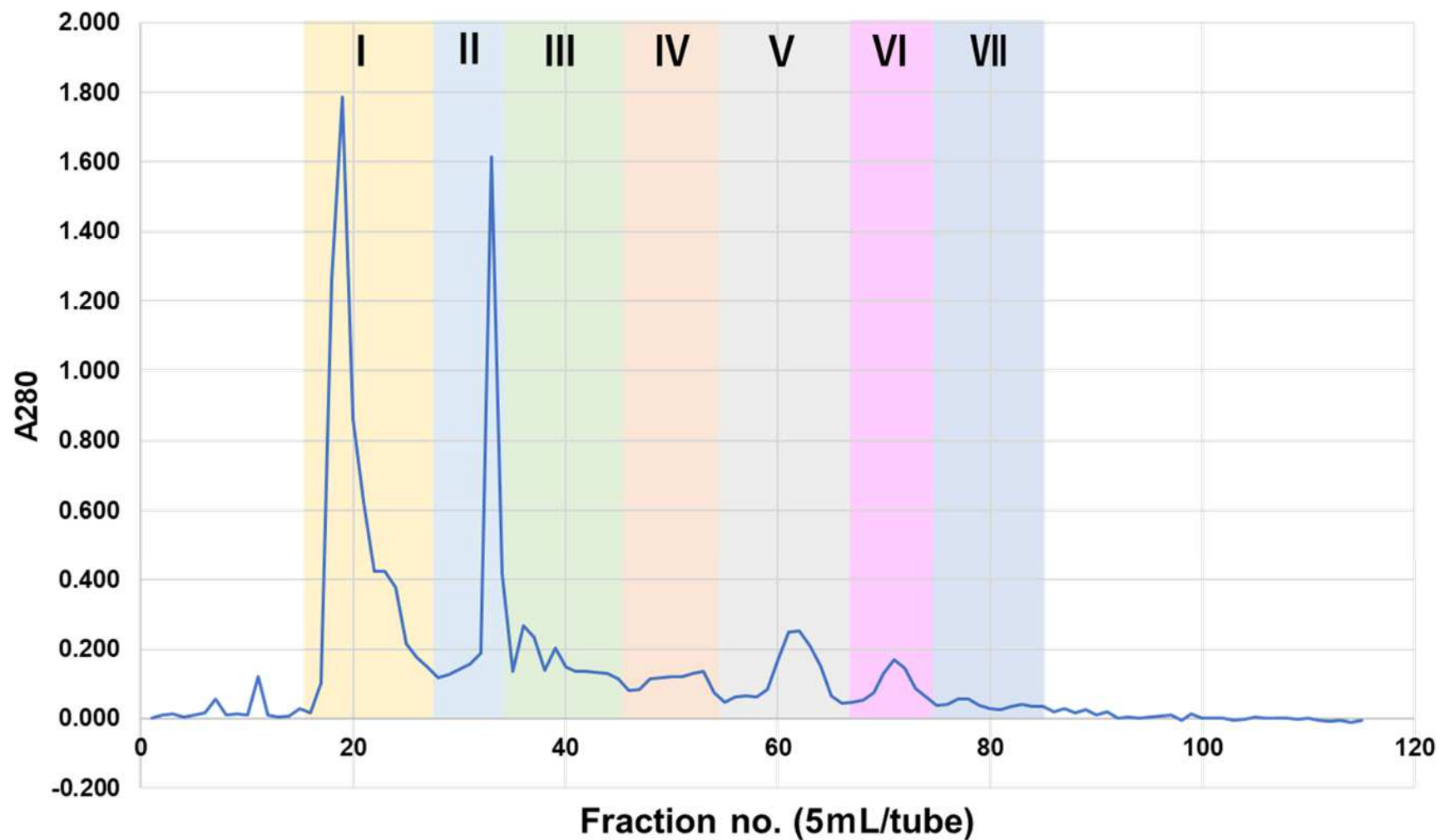


Bifidobacterium(ビフィズス菌)の増殖促進効果



Lactobacillus(乳酸菌)の増殖促進効果

Toyopearl HW-55ゲル濾過クロマトグラフィー



ELAの分画:画分I~VIIを調製



2倍濃度GAM培地+glu 0.5 g/L 100 μ L
健常成人由来凍結スターター上清5 μ L
N₂ (90%)+ CO₂(5%) + H₂(5%) 充填

サンプル1	2	3	4	5	6	7	8	9
コントロール	ELA	I	II	III	IV	V	VI	VII
滅菌水100 μ l	前回濃度 (0.34 mg/ml)	前回ELA濃度の半分濃度である0.17 mg/mlのペプチド換算量をそれぞれ添加						

30時間 37°C
嫌気チャンバー内で培養

試験区：3被験者 × N = 3
で実施

*Bifidobacterium*の有意な増加が見られた
検体4,9,10

〈分析項目〉

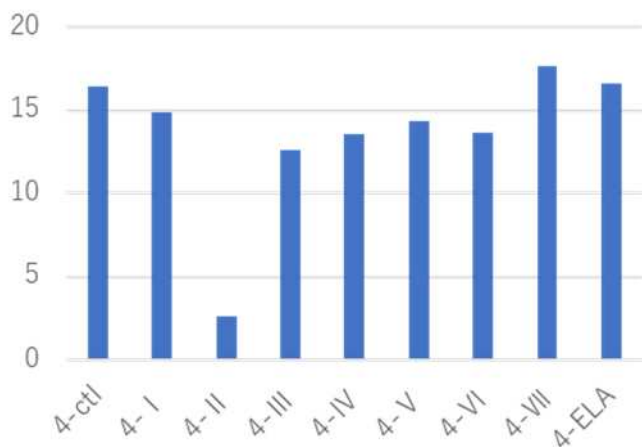
- ・細菌叢定量(qPCR)
- ・メタ16S解析

検体 画分	All			<i>Bifidobacterium</i>			<i>Lactobacillus</i>		
	nsc4	nsc9	nsc10	nsc4	nsc9	nsc10	nsc4	nsc9	nsc10
I		*	*	**	**	**	**	**	
II	**	**	**		**	**	**	*	*
III	*	*	*	*			*		
IV	*	**		*		**			
V	**	**	**	**		**			
VI	*	**		**		**	**		
VII		*							

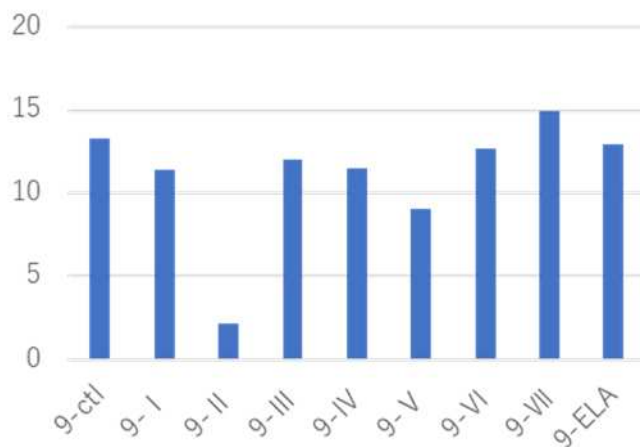
*p < 0.05, **p < 0.01
Dunnett test
n=3

ELA画分I、II、V、VIの有用菌増殖促進効果

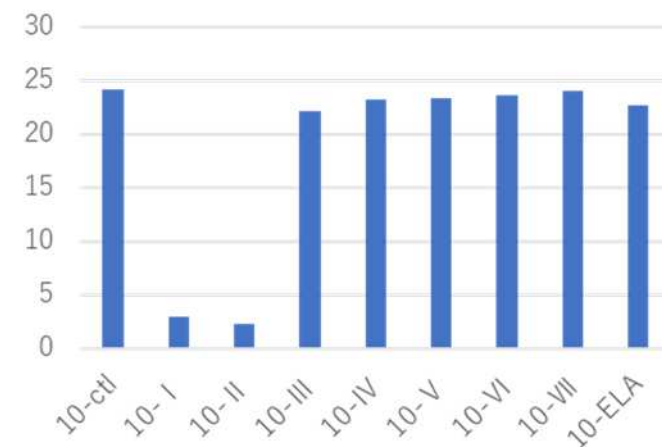
Enterobacteriaceae (%);
NSC4



Enterobacteriaceae (%);
NSC9



Fusobacteriaceae (%);
NSC10



ELA画分IIのEnterobacteriaceae(大腸菌)と
Fusobacteriaceae(フソバクテリウム菌)の増殖抑制効果

	R.t. (min)		MW
Frac. Ia	8.8	10.61977038	40,936
Frac. Ib	11.1	8.38198093	4,368
Frac. II	12.65	6.873905429	967
Frac. IIIa	13.05	6.484724655	655
Frac. IIIb	13.8	5.755010702	316
Frac. IIIc	15.99	3.624245962	37
Frac. IVa	12.81	6.718233119	827
Frac. Ivb	14.11	5.453395602	234
Frac. Ivc	16.03	3.585327885	36
Frac. Va	12.76	6.766880716	869
Frac. Vb	13.94	5.618797431	276
Frac. Vc	14.6	4.976649154	145
Frac. Vd	15.91	3.702082117	41
Frac. Via	12.75	6.776610235	877
Frac. Vib	13.93	5.628526951	278
Frac. Vic	15.92	3.692352598	40
Frac. VIIa	12.71	6.815528313	912
Frac. VIIb	14.06	5.502043199	245
Frac. VIIc	15.91	3.702082117	41
Frac. VIId	17.1	2.544269313	13

➤ 画分I: 高分子のポリペプチドが多い

➤ 画分II: オリゴペプチドが含まれる

➤ 画分V以降:
ペプチドが含まれる可能性は低い
アミノ酸が多く含まれる

ELA画分I～VIIの含有タンパク質・ペプチドの分量推定

検出数	由来タンパク質
54	コラーゲンタイプX
10	リジンオキシダーゼ
4	コラーゲンタイプXIV
4	コラーゲンタイプI
3	コラーゲンタイプIX
3	コラーゲンタイプXII
3	コラーゲンタイプXVII
3	オボクレイジン
43	その他タンパク質 (略)

→127の同定ペプチド中54がコラーゲンタイプX由来
ELA画分I中のペプチド同定

検出数	由来タンパク質
84	コラーゲンタイプX
4	コラーゲンタイプXVII
4	リジンオキシダーゼ
32	その他タンパク質 (略)

➡124の同定ペプチド中84がコラーゲンタイプX由来

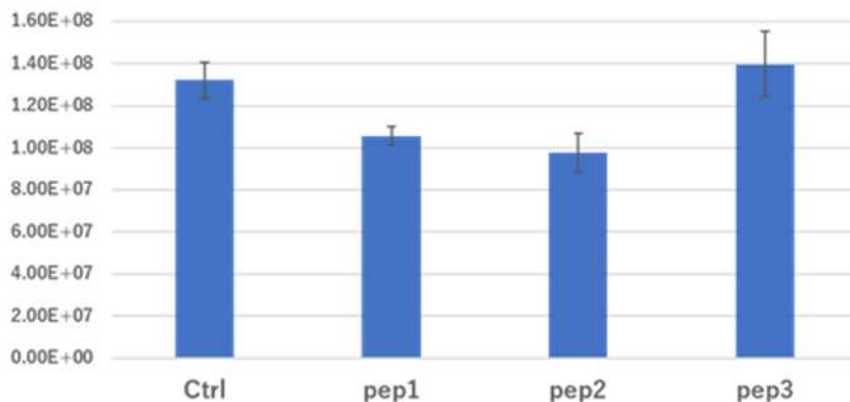
ELA画分II中のペプチド同定

表記	観測数	配列	アミノ酸残 基数
pep1	23		15
pep2	18		13
pep3	17		14

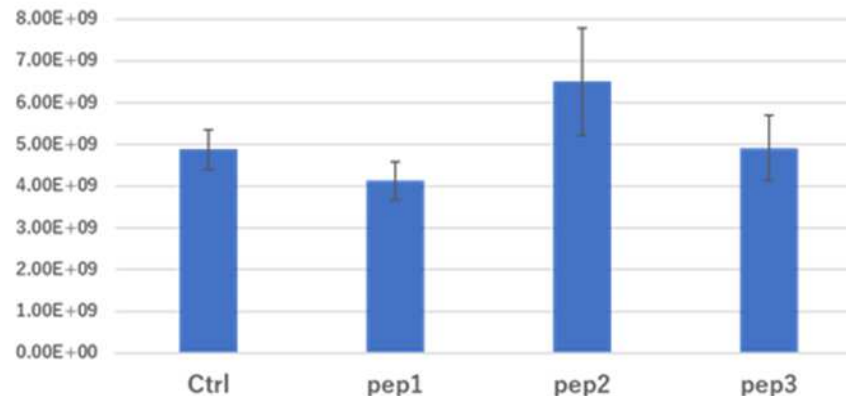
赤字はプロリンの修飾（ヒドロキシル化）を示す

画分Ⅱ中のカラーゲンタイプX由来ペプチド

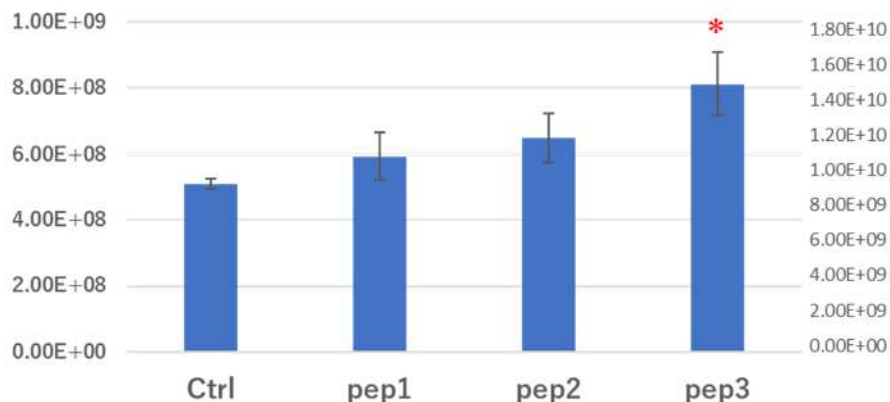
Bifidobacterium nsc4



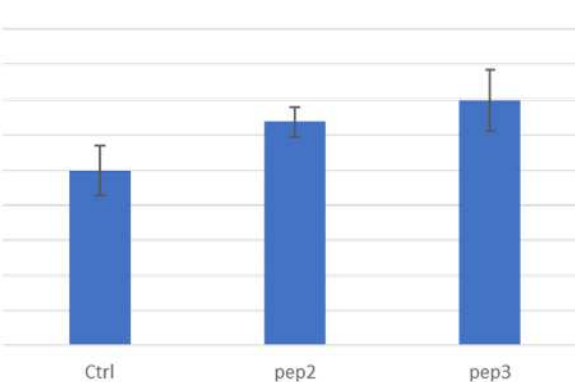
Bifidobacterium nsc9



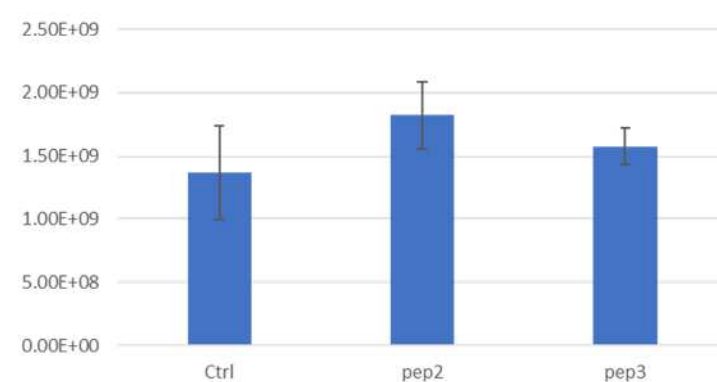
Bifidobacterium nsc10



nsc18

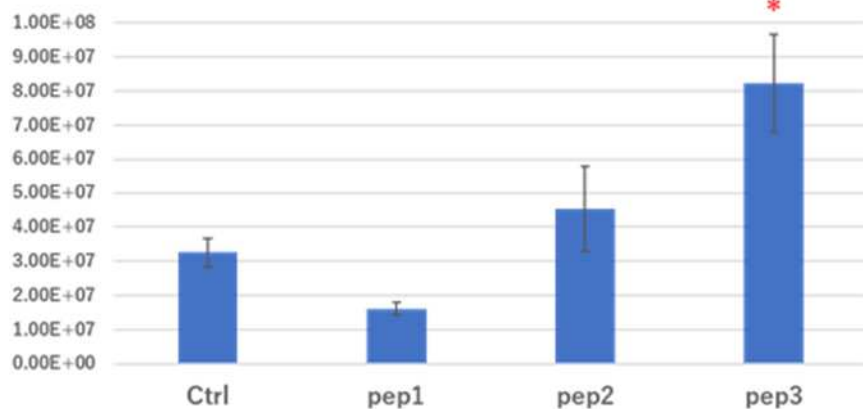


nsc6

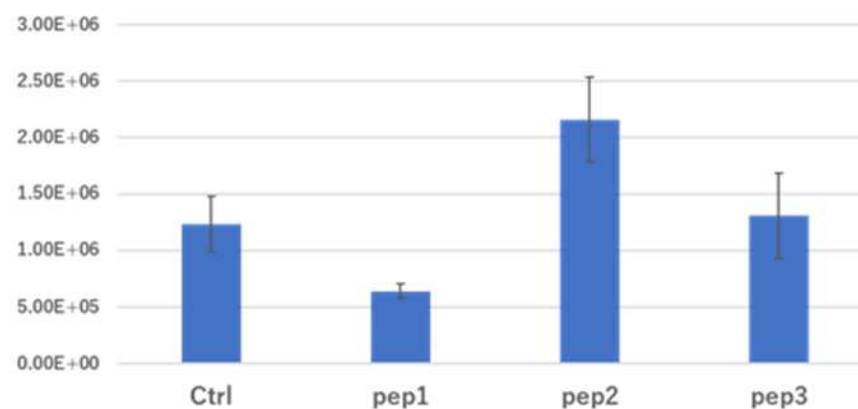


コラーゲンタイプⅩ由来ペプチドの*Bifidobacterium*
(ビフィズス菌)増殖効果

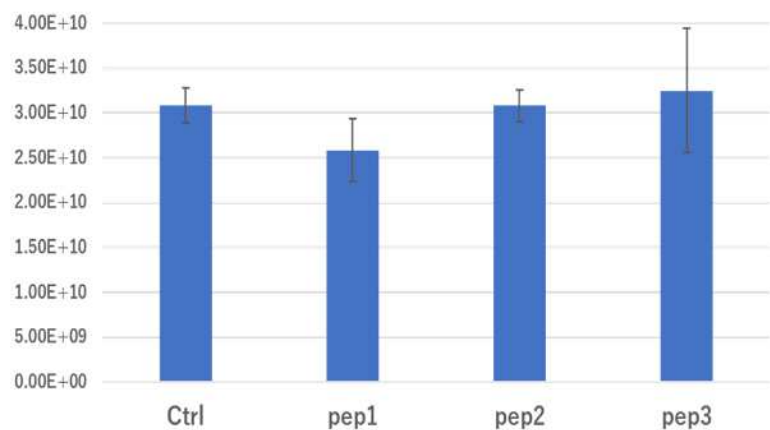
Lactobacillus nsc4



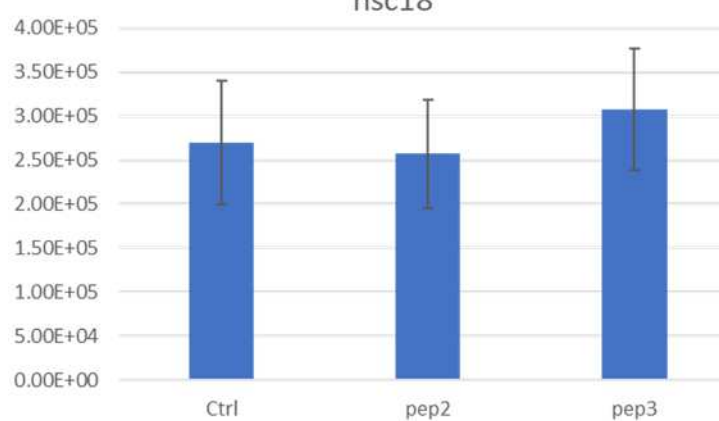
Lactobacillus nsc9



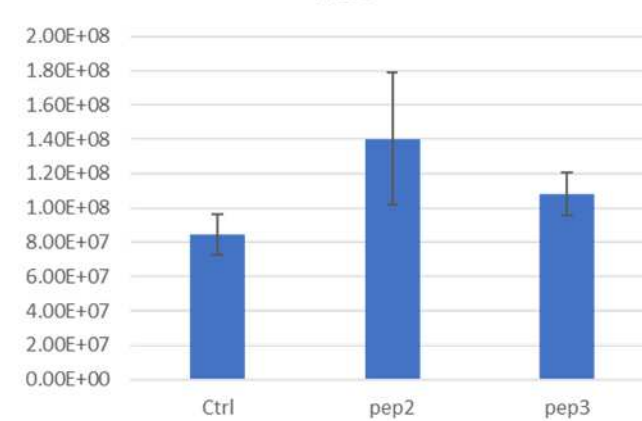
Lactobacillus nsc10



nsc18



nsc5



コラーゲンタイプⅩ由来ペプチドの*Lactobacillus*
(乳酸菌)増殖効果

新技術の特徴・従来技術との比較

- これまで未解明であった、タンパク質由来プレバイオティクス成分を見出すことに成功した。
- 従来は難消化性食物繊維やオリゴ糖等の糖質由来成分に限られていたが、難消化性タンパク質として卵殻膜に着目し、神戸大学ヒト腸内細菌叢モデルでプレバイオティクス効果を評価した。
- これまで抗菌性ペプチドの報告はあるが、有用細菌の増殖を認めた例はないことから、タンパク質由来プレバイオティクスの市場拡大が期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かして、卵殻膜をプレバイオティクス製剤（食品素材またはサプリメント等）として活用できる。従来、糖質由来成分のプレバイオティクスが多いが、タンパク質由来成分に新たな市場価値を見出した。
- 上記以外に、未使用資源の利活用の点からも価値の創造性の高さが考えられる。

実用化に向けた課題

- 現在、卵殻膜分解物画分の有用菌増殖促進効果と病原菌増殖抑制効果、また卵殻膜由来ペプチドの有用菌増殖促進効果を確認している。
- プレバイオティクス製剤として使用する際は、ペプチド単位まで精製するとコストが高まる可能性がある。
- 実用化に向けて、卵殻膜分解物がどこまで作用を維持しているか確認する必要がある。

企業への期待

- 未解決の卵殻膜分解物の作用を明らかとすることを目的とした共同研究への発展を期待している。
- プレバイオティクスの開発を目的とした共同研究や、卵殻膜廃棄物の食品素材開発を目的とした共同研究も可能性が高いと考えている。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は卵殻膜の新たな利活用という点で企業に貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- タンパク質由来プレバイオティクス商品の開発の可能性についても期待している。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 腸内菌叢改善剤
- 出願番号 : 特願2024-092576
- 出願人 : 神戸大学
- 発明者 : 福田伊津子、白井康仁、
竹中慎治

本研究の経歴

- 2021年度 一般社団法人旗影会 特別助成に採択
「卵殻膜およびその分解物が腸内生態系におよぼす
影響の解明」

→その後は校費・奨学寄附金等で研究を継続

お問い合わせ先

神戸大学 産官学連携本部

TEL 078 - 803 - 5945

e-mail oacis-sodan@office.kobe-u.ac.jp