

アコヤ貝真珠層タンパク質を配合したスキンケア商品の開発 アコヤ貝真珠層タンパク質の機能に関する解析

食品・環境科 専門研究員 晦 日 房 和
長崎大学水産学部 教 授 原 研 治
長崎大学水産学部 教 授 長 富 潔
長崎大学 先導生命科学研究支援センター 教 授 松 田 尚 樹
広島大学薬学部 教 授 杉 山 政 則

長崎県の真珠生産量は全国でもトップレベルである。しかしながら、養殖後のアコヤ貝貝殻が大量に排出され、その有効利用が望まれている。本研究では、貝殻真珠層に着目してその成分や真珠層タンパク質の生理作用について調べた。真珠層成分を分析したところ、無機成分 90%以上、有機成分は約 4%含まれることがわかった。さらに、真珠層タンパク質のアミノ酸分析から、グリシンが最も多く存在した。一方、真珠層粉末からタンパク質を抽出しエラスターゼ活性を調べた結果、その阻害作用は濃度依存的に起こり、125 μ g で最大 62%の阻害効果が認められた。

1. 緒言

長崎県の真珠生産量は 8.9 トン (H17 年) と全国第 2 位で、年間約 2700 万個のアコヤ貝が養殖されている。その結果として 500 トン以上の貝殻が排出されるが、殆ど利用されていないのが現状である。

真珠及び貝殻真珠層は炭酸カルシウムを主成分としている。一部コンキオリンと呼ばれるタンパク質をはじめ多糖などの有機物質を含んでおり、それらはアコヤ貝外套膜からその成分が分泌される。貝殻の構造学的には外側の稜柱層は方解石 (calcite)、一方、内面の真珠層はアラレ石 (aragonite) という結晶構造をなしており後者は真珠と同様である。これらの結晶の形成はコンキオリンタンパク質によって制御されていると考えられている。

一方、コンキオリンのその他の作用として、その加水分解したアミノ酸は保湿性などの作用があることから化粧品原料として使用されている。また、ホタテ貝の貝殻タンパク質にはいくつかの生理活性があることが報告されている [1,2]。このように、アコヤ貝貝殻真珠層を構成するタンパク質などの有機物質の中には多種の生理作用を示すものが存在している可能性が考えられる。

そこで本研究では養殖後のアコヤ貝貝殻の有効活用を目的に、真珠層タンパク質の機能を調べ化粧品原料などへの展開について検討する。今回、皮膚を構成するタンパク質の 1 つであるエラスチンを分解するエラ

スターゼを対象としてその作用を調べた。

2. 方法

2-1 研究材料

研究材料となるアコヤ貝貝殻は養殖後のものを使用した。貝殻外側の稜柱層を研磨した真珠層を粉碎して試料とした。

2-2 アコヤ貝貝殻真珠層タンパク質の抽出

透析チューブに 12.5 g (4 つで計 50g) の真珠層粉末を入れ 3N-HCl を少しずつ加え粉末をほぼ溶解した。直ちに H₂O を入れた 5L の三角プラスコ (2 つ) に 2 チューブずつ移し 4℃ で透析を行った。外液 H₂O で 1 日 2 回交換し透析した。4 日間透析を行い、遠心して上清の可溶性タンパク質を回収した。これを限外ろ過 (アミコン社製) で濃縮しサンプル溶液とした。

2-3 タンパク質の定量

定量は、BSA をスタンダードとする BioRad 社のプロテインアッセイ Kit で行った。

2-4 エラスターゼ活性測定法

蛍光合成基質 Suc-Ala-Ala-Ala-MCA (ペプチド研究所) を DMSO に溶解し (10mM) 保存液とした。使用時に H₂O で 200 倍に希釈してその 20 μ l 用いた。

エラスターゼ (ナカライテスク社製 : 75 units/mg)

を 50mM HEPES-buffer, pH7.5 で 0.5 mg/ml に溶解し、使用時に同 buffer で 2 倍希釈して使用した。

反応液は 200 μ l スケールで行った。コントロール (C) とテスト (T) は 60 μ l の 50mM HEPES-buffer, pH7.5 と酵素液 20 μ l を混合し、C に 100 μ l の H₂O、T に 100 μ l アコヤ貝可溶性タンパク質の H₂O 希釈液を加え 37 $^{\circ}$ C で 1 分間プレインキュベートした。その後、基質溶液 20 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。これにメタノール：ブタノール：H₂O = 7：6：7 混合液を 300 μ l 加え、反応を停止した。また、ブランク (B) は 60 μ l の HEPES-buffer、酵素液 20 μ l、100 μ l の H₂O を混合し 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、反応停止液を 300 μ l 加え、反応を停止した後、基質溶液 20 μ l を加えた。その後、反応液を全て 14000 rpm、5 min. 遠心した上清を回収し遊離した蛍光強度をマイクロプレートリーダー（励起波長 380nm、蛍光波長 470nm）で測定した。

エラスターゼ阻害活性は相対比として以下のように算出した。コントロール (C) とテスト (T) の値からブランク (B) 値を差し引いたコントロール (C1) とテスト (T1) 値を得る。

$$\text{エラスターゼ阻害活性 (\%)} = \{(C1 - T1) / C1\} \times 100$$

3. 結果および考察

貝殻真珠層粉末の成分を分析したところ、無機成分 90% 以上、有機成分は約 4% 含まれることがわかった。無機成分のほとんどは炭酸カルシウムであり、有機成分の約半分はタンパク質であった。真珠層タンパク質のアミノ酸組成はグリシン 35%、アラニン 15%、アスパラギン酸 11% と 3 種のアミノ酸で約 60% を占めるという特徴がある。グリシンを多く含むタンパク質としてはコラーゲンが知られているが、コラーゲンに特有なヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンが真珠層には含まれていないことから異なる種類のタンパク質であると考えられた。

真珠層粉末 50g の溶解には約 400ml の 3N-HCl を要し、さらに H₂O に対する透析により体積が約 700ml となった。透析中、不溶性タンパク質の沈殿が生じたため、遠心することにより上清の可溶性タンパク質を回収した。さらに上清のタンパク質濃度が低かったため限外ろ過により濃縮し以降のサンプルとした。

エラスチンはコラーゲンと共に皮膚を構成するタンパク質であり、そのエラスチンを分解する酵素がエラスターゼである。そのため、その阻害作用は皮膚の弾力保持に関与していると考えられる。そこで、エラス

ターゼ活性を調べた結果を図 1 に示す。真珠層水透析可溶性タンパク質濃度に依存してエラスターゼ阻害活性が認められた。その活性は濃度 125 μ g 付近で最大 62% であった。

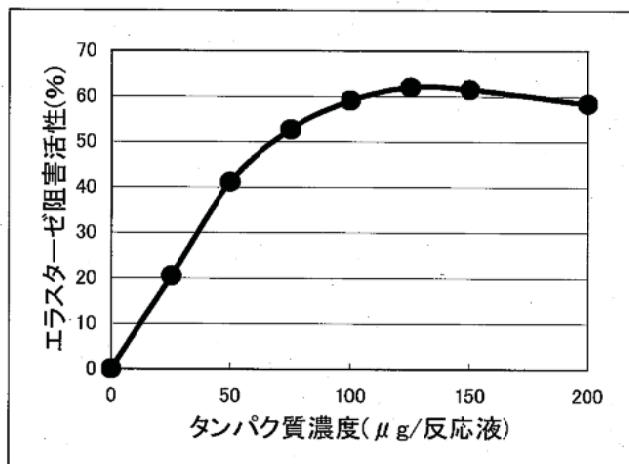


図 1 真珠層タンパク質によるエラスターゼ阻害活性

アコヤ貝真珠層可溶性タンパク質については、トロンビン活性、ACE 活性（アンジオテンシン I をアンジオテンシン II に変換する酵素）が存在することを報告した [3]。一方、ホタテ貝の貝殻タンパク質においてもエラスターゼやトリプシン阻害活性をはじめ線維芽細胞および表皮角化細胞増殖促進作用について報告されている [1, 2]。このように、アコヤ貝貝殻にも種々の機能があることが考えられ、それらの解明により未利用資源であるアコヤ貝貝殻の有効活用を検討していく予定である。

4. 結 言

真珠層の酸抽出水透析の可溶性タンパク質にエラスターゼ阻害作用があることが判明した。今後、その他の機能について検討する。

5. 参考文献

- [1] Y. C. Liu, K. Uchiyama, N. Natsui and Y. Hasegawa ; Fisheries Science, vol. 68, 1330-1336(2002)
- [2] A. Torita, Y. C. Liu and Y. Hasegawa ; Fisheries Science, vol. 70, 910-915(2004)
- [3] 晦日房和 ; H19 長崎県工業技術センター研究報告 No.37, pp46-51 (2008)

6. 謝 辞

終わりに臨み、研究材料であるアコヤ貝貝殻を提供して頂きました田崎真珠 (株) の合田昌一氏と金子克彰氏及び関係の方々へ厚くお礼を申し上げます。