

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05821

研究課題名(和文) 魚由来線維芽細胞のコラーゲン産生を促進するオリーブ葉成分の同定と作用機構の解明

研究課題名(英文) Identification and mechanism of action of olive leaf components that promote collagen production in fish-derived fibroblast cell

研究代表者

小川 雅廣 (OGAWA, Masahiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10398034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オリーブ葉粉末の摂取によって養殖ハマチの筋肉コラーゲン量が増えるメカニズムを、金魚及びヒトの線維芽細胞を使って調べた。オリーブ葉粉末の抽出物を線維芽細胞に与えると、(1)細胞内のグルタチオン濃度が増加し、コラーゲン合成に必須のビタミンCを長時間細胞内に保持できること、(2)3種類のタンパク質(Ⅰ型コラーゲン、コラーゲンの翻訳後修飾に関わる酵素POLD1、コラーゲンの折り畳みを助けるタンパク質HSP47)をコードする遺伝子の発現が促進すること、(3)コラーゲン分解酵素の活性が低下することがわかった。上記3つの現象が複合的に起こり、養殖ハマチの筋肉コラーゲンが増えると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内でのコラーゲンの合成能力は年齢とともに衰えていく。コラーゲン合成を促進する物質はビタミンCなど数種類しか報告がない。オリーブ葉粉末の抽出物にもコラーゲン合成促進効果があること、その作用機序がビタミンCの作用機序とは異なるところに学術的な意義がある。オリーブ葉抽出物はヒト由来の線維芽細胞でもコラーゲン産生を促進することから、オリーブ葉抽出物は加齢によるコラーゲンの合成能力の低下を抑制できる可能性を秘めており、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the causes of the increase in muscle collagen content in cultured yellowtail muscle due to the ingestion of olive leaf powder using fibroblast cells. When olive leaf extract was added to fibroblast cells, the following three changes occurred: (1) the intracellular glutathione concentration was increased, and vitamin C, which is essential for collagen synthesis, was retained in high level for a long time, (2) the expression of genes coding the following three proteins was raised: type I collagen, enzyme involved in post-translational modification of collagen (POLD1), and protein involved in collagen folding (HSP47), (3) the activity of collagen-degrading enzymes was decreased. It was speculated that the intake of olive leaf powder to fish increases the amount of muscle collagen due to the combined effects of the above three factors.

研究分野：食品科学

キーワード：コラーゲン オリーブ葉 線維芽細胞 ポリフェノール オリーブハマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) オリーブ葉粉末を飼料に混ぜて飼育した養殖ハマチ(オリーブハマチ)の普通肉は、オリーブ葉粉末を無投与の養殖ハマチよりも歯ごたえがよく、コリコリした食感である。その違いはオリーブハマチの方が対照ハマチよりも筋肉コラーゲン量が高いことによる(野崎ら、2020)。オリーブ葉粉末給餌による筋肉コラーゲン量の増加は養殖マダイでも起こる(Arsyad ら、2018)。オリーブ葉粉末の摂取により養殖魚の筋肉コラーゲン量が増えるメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではオリーブ葉粉末の摂取によって筋肉のコラーゲンがどうして増えるのか、そのメカニズムを探ることを目的とした。筋肉のコラーゲンは筋肉組織内の線維芽細胞で合成されることから、オリーブ葉の成分と線維芽細胞との関係に的を絞って調べた。具体的には、線維芽細胞のコラーゲンを増やすオリーブ葉成分の特定と、線維芽細胞がコラーゲン産生量を増やすメカニズムの解析を行った。

3. 研究の方法

(1) オリーブ葉抽出液(OE)は、オリーブ葉乾燥粉末を80%メタノールで抽出したものを濃縮乾燥し、少量のDMSOに溶解後、純水に分散させて調製した。ポリフェノール(PP)の定量はGallic acidを標準物質としてFolin-Ciocalteu法で行った。

(2) 線維芽細胞としては金魚鱗由来線維芽細胞GAKS(RCB1452)を用いた。なお、遺伝子発現の解析にはヒト胎児由来線維芽細胞KMST-6(RCB1955)を使用した。細胞は37°C、5%CO₂濃度で培養した。コラーゲンの定量はDirect Red 80を用いた色素結合法と抗I型コラーゲン抗体を用いた間接ELISA法で行った。コラーゲン関連遺伝子の発現量はRT-qPCR法で調べた。

4. 研究成果

(1) OE添加した金魚線維芽細胞GAKSのコラーゲン産生量：GAKSの可溶性コラーゲン量と沈着コラーゲン量はOEを添加すると濃度依存的に増加した(図1)。5ppm OE添加で可溶性コラーゲン量は1.5倍に、沈着コラーゲン量は2倍に増えた。可溶性コラーゲンは線維を形成する前のコラーゲンであり、時間が経つにつれ線維を形成し沈着コラーゲンとなる。沈着コラーゲンだけでなく線維形成前の可溶性コラーゲンも増加したことから、細胞外へコラーゲンを分泌する前、すなわちタンパク質合成過程の翻訳後修飾よりも前の段階にOEは作用すると示唆された。

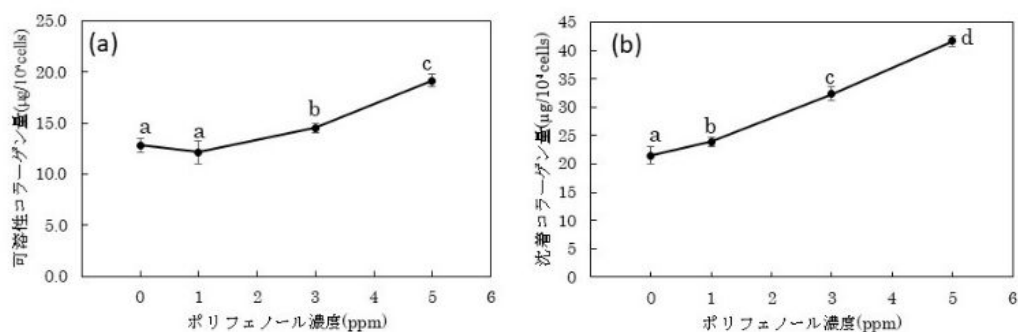


図1. GAKSのコラーゲン産生量へのOE添加効果

(a)可溶性コラーゲン量、(b)沈着コラーゲン量 ($P < 0.05$, $n = 3$, エラーバーは標準偏差を示す)

(2) メカニズムその1：コラーゲンの翻訳後修飾はコラーゲン合成の律速段階の一つである。その翻訳後修飾にビタミンC(VC)は必須の化合物である。GAKSのVC量を調べたところ、2.5ppm以上のOE添加により細胞のVC量は増加した(図2a)。OEそれ自体にはVCが含まれていなかったため、OEに含まれる化合物の働きにより細胞内でのVCの合成が促進すると推測した。細胞内のVC合成経路としては、D-グルクロン酸などの前駆体からのVC合成系と、使用済みのVCである酸化型VCを還元して利用する、いわゆるVC再生系の2つの経路があるが、金魚は前者のVC合成経路を持たないため、後者のVC再生系が促進された可能性が高い。そこで、VCの再生反応の基質であるグルタチオン(GSH)の細胞内濃度を調べた。2.5ppm以上のOE添加でGSH量は増加した(図2b)。細胞内のGSHは、細胞外からシスチン(Cyss)を取り込み、それを材料にして細胞内で合成される。Cyssの取り込みはシスチングルタミン酸トランスポーター(xCT)を介して行われ、xCTの働きがGSH産生の律速段階といわれている(Goutら、2001)。GAKSのxCT発現量を調べたところ、5ppm OEの添加でxCT発現量は38%増加していた(図3)。以上よりxCT発現量の増加、GSHの細胞内濃度の上昇、VC再生系から供給されるVC量の増加、翻訳後修飾の活性化により、コラーゲン合成が促進されコラーゲン量が増加すると示唆さ

れた。

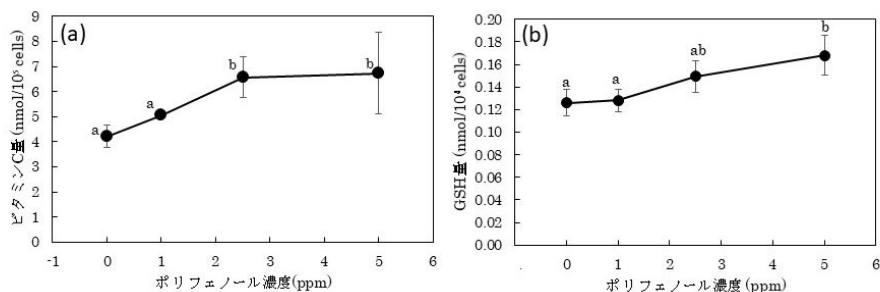


図 2. OE 添加した GAKS の VC 量(a)と GSH 量(b)
($P < 0.05$, $n = 3$, エラーバーは標準偏差を示す)

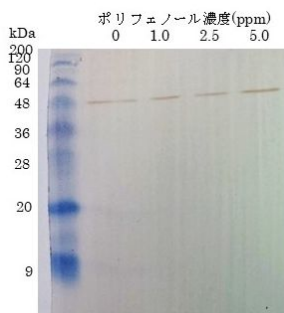


図 3. OE 添加した GAKS の xCT 発現量 (ウエスタンブロットティング)
抗ヒト xCT ポリクローナル抗体を使用。GAKS の xCT の分子量は 48kDa であった。

(3) メカニズムその 2 : GSH と VC の細胞内濃度が高くなることでコラーゲンが増えると(2)で報告したが、細胞外に分泌された後のコラーゲンの分解抑制がコラーゲン増に関与していることも否定できない。そこで OE のコラーゲン分解抑制への関与を調べた。ゼラチンゲイモグラフィーで調べたところ、GAKS のコラーゲン分解酵素の分子量は約 90kDa と約 70kDa であった (Data not shown)。ヒト線維芽細胞の MMP9 は分子量が 92kDa、MMP2 では 72kDa であることから、約 90kDa のバンドは MMP9、約 70kDa のバンドは MMP2 と推測した。GAKS の MMP の働きに OE が及ぼす影響を調べた。10 ppm 以上の OE は MMP の酵素活性を部分的に阻害した (図 4a)。一方、細胞の MMP 発現量に OE は影響を及ぼさなかった (図 4b)。以上より、細胞外に分泌された MMP の酵素活性を部分的に阻害することもコラーゲン増に寄与しているものと示唆された。

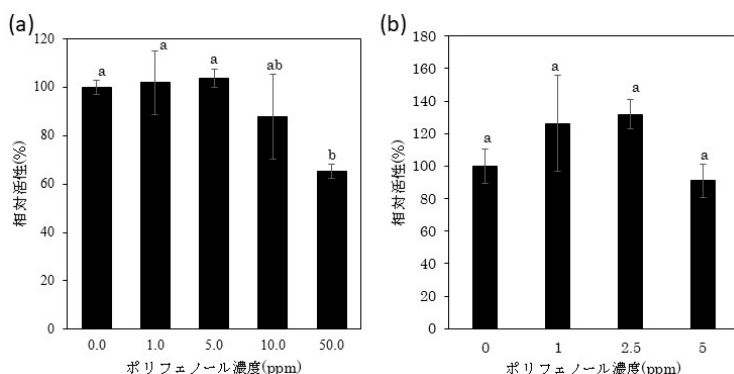


図 4. GAKS の MMP への OE 添加の影響

MMP の酵素活性は合成基質(MOCAc-PLGL(D)AR)を使って調べた。(a)は GAKS の培養上清に、各濃度の OE を添加して酵素活性を測定、(b)は各濃度の OE を細胞に添加し 24 時間培養後、上清を回収し酵素活性を測定 ($P < 0.05$, $n = 3$, エラーバーは標準偏差を示す)

(4) メカニズムその 3 : 金魚の遺伝子情報が不足していたので、ヒト線維芽細胞 KMST-6 を使って OE がコラーゲン関連遺伝子の発現に与える影響を調べた。まず、ヒトの線維芽細胞でコラーゲン量が増える OE 濃度を調べた。10ppm 以上の OE 添加でコラーゲン量が増加しており、25ppm OE では 5.2 倍に増えた (図 5)。15ppm OE を KMST-6 に添加しコラーゲン関連遺伝子の発現量を調べた。I型コラーゲン遺伝子 COL1A1、リシルヒドロキシラーゼ遺伝子 PLOD1、HSP47 遺伝子 SERPINH1 の発現量がそれぞれ 1.5 倍、2.2 倍、1.7 倍に増加した (図 6)。また、有意差はなかったもののIII型コラーゲン遺伝子 COL3A1 の発現量も増加傾向であった。一方、コラーゲン

分解酵素である MMP1 と MMP9 の遺伝子発現量は低下傾向であった。プロリル 4-ヒドロキシラーゼ遺伝子 P4HA1、xCT 遺伝子 SLC7A11、MMP の阻害剤遺伝子 TIMP1、TGF- β 遺伝子 TGFB1 については変化がなかった。以上より、遺伝子発現が明白に亢進するのは、COL1A1、PLOD1、SERPINH1 の 3 つの遺伝子であった。PLOD1 はコラーゲン α 鎖のリシン残基の水酸化修飾を触媒する酵素で、SERPINH1 は翻訳されたコラーゲンポリペプチド鎖の 3 重らせん構造への折りたたみを補助するタンパク質 HSP47 である。よって、OE はコラーゲン遺伝子の発現量を増やすだけでなく、ポリペプチド鎖の翻訳後修飾および 3 本鎖への折りたたみに関わるタンパク質の遺伝子発現も亢進することがわかった。これら遺伝子の発現亢進には、転写レベルでの活性化が関与しているものと考えられる。

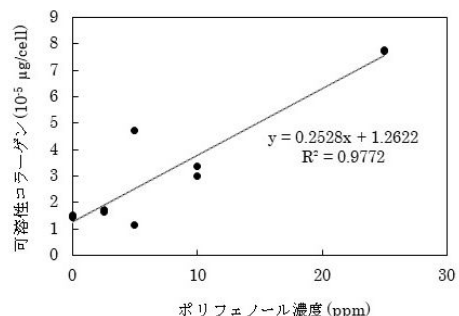


図 5. OE を添加した KMST-6 の可溶性コラーゲン量
図内の線は近似直線を示す。

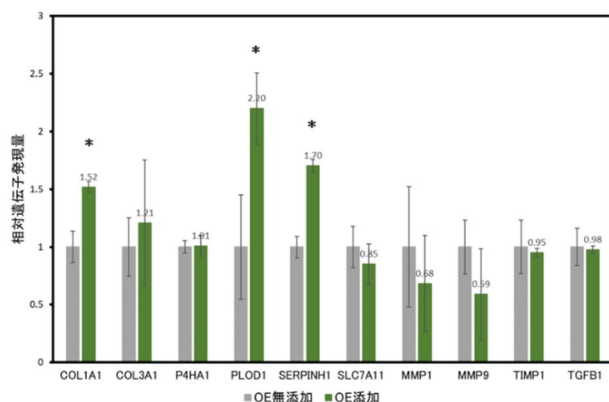


図 6 . OE 添加した細胞のコラーゲン関連遺伝子の発現量

15 ppmOE で KMST-6 を 24 時間処理した後、RT-qPCR 法で mRNA 量を測定した。定量解析は Ct 法で行い、OE 添加群における各遺伝子の発現量を OE 無添加群との相対値で示した。(* は $P < 0.05$ で有意差あり、 $n=3$ 、エラーバーは標準偏差を示す)

(5)コラーゲン量を増やす OE 成分の解析：オリーブ葉粉末には約 8%もの PP が含まれる。OE に含まれる PP を HPLC で分析したところ、6 つのピークが観察された。最も大きなピークは Oleuropein であった (図 7)。他の 2 つのピークは LC/MS 分析により Luteolin-7-glucoside と Verbascoside と推定された。これら OE の主要 PP である Oleuropein、Luteolin-7-glucoside、Verbascoside の標品をそれぞれ KMST-6 に添加し、可溶性コラーゲン量を調べた。いずれの PP を細胞に添加してもコラーゲンは増えなかった (図 8)。以上のことより、コラーゲン量を増やす OE 化合物は上記の 3 つの PP 以外の化合物であるとわかった。

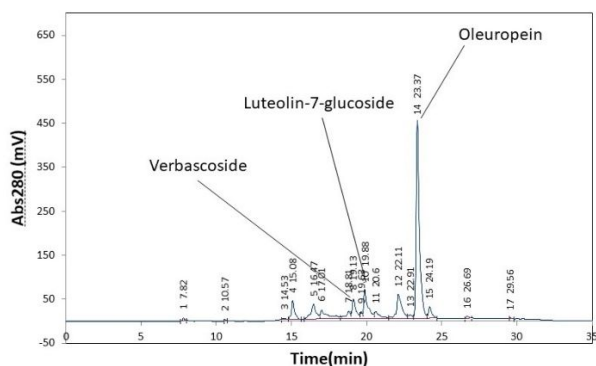


図 7 . OE 中の PP 分析 (HPLC クロマトグラム)

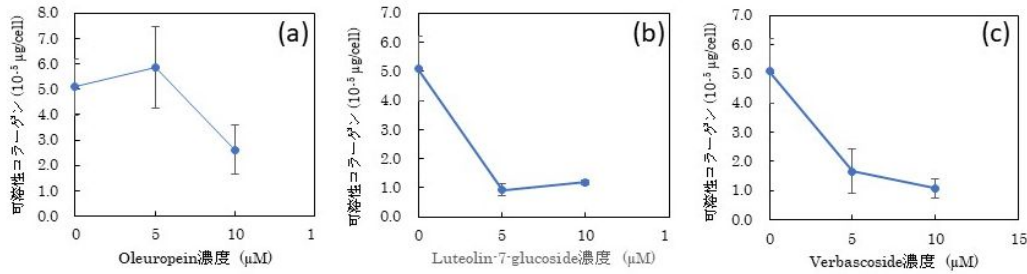


図8. オリーブ葉 PP を添加した KMST-6 の可溶性コラーゲン量
(a)Oleuropein、(b) Luteolin-7-glucoside、(c) Verbascoside (n=3 , エラーバーは標準偏差を示す)

(6)まとめ : OE 添加により金魚の線維芽細胞のコラーゲン産生量が増える要因の一つは、Cyss を細胞内に取り込むトランスポーター-xCT の発現が増えることである。これにより Cyss の細胞内への取り込み量が増え、GSH の細胞内濃度が高まる (図 8)。これにより VC の再生系が活性化し、細胞内の VC 濃度を長時間高い状態に保つことができる。VC はコラーゲン合成の律速段階である翻訳後修飾に必須の化合物であるので、VC の細胞内濃度が高く保たれることでコラーゲンの産生を持続的に行えるものと考えられる。一方、ヒトの線維芽細胞では xCT の遺伝子発現は起きなかったものの、コラーゲンをコードする遺伝子、それ以外のコラーゲン関連遺伝子 (翻訳後修飾に関わる酵素 PLOD1、3 重らせんへの折りたたみを助けるタンパク質 HSP47) の発現亢進も、コラーゲン量の増加に寄与することが示唆された。また、コラーゲン分解酵素の酵素活性が部分的に阻害されることも、コラーゲン量の増加に関わると示唆された。このように OE は細胞のコラーゲン合成と分解に関わる複数の過程に関与することで、コラーゲン産生量が増えるものと考えられる。コラーゲン量の増加に直接的に関わる OE の成分は、今回分析した 3 つの主要 PP ではなかったことから、複数の化合物が複合的に作用したものと考えられる。

本研究は、オリーブハマチの普通肉のコラーゲン量が増える要因を OE と線維芽細胞に絞って研究を行った。オリーブ葉に含まれる複数の化合物が、xCT トランスポーターの活性化、複数のコラーゲン関連遺伝子の発現亢進、コラーゲン分解酵素の活性阻害、複合的に担うことで筋肉のコラーゲンが増えるものと結論づけた。

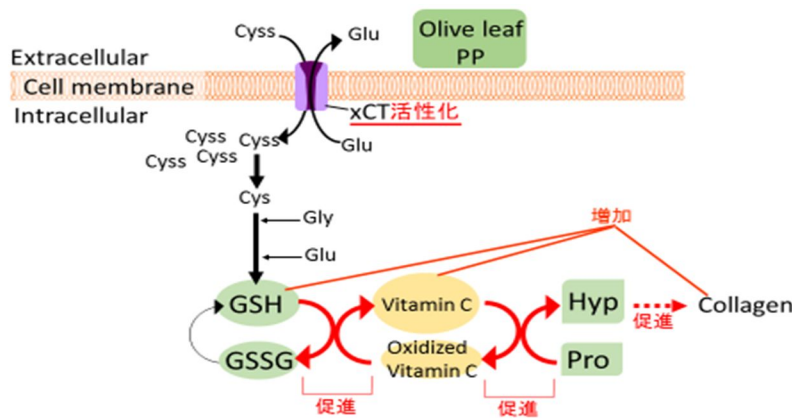


図 8. OE が金魚線維芽細胞のコラーゲン産生を促進させるメカニズム(仮説)

< 引用文献 >

- 野崎智絵, 日比光磨, 赤澤隆志, 西山智朗, 大山憲一, 吉田誠, 向井龍男, 早川茂, 小川雅廣 (2020) オリーブ葉粉末の給餌がブリ普通肉の歯ごたえに与える効果. 日本水産学会誌 86(6): 483-493.
- Arsyad MA, Akazawa, T, Nozaki C., Yoshida, M., Oyama, K., Mukai, T., Ogawa M (2018) Effects of olive leaf powder supplemented to fish feed on muscleprotein of red sea bream. Fish Physiol. Biochem. 44:1299–1308.
- Gout PW, Buckley AR, Simms CR, Bruchofsky N (2001) Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia* 15: 1633–1640.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩部璃音, 野崎智絵, 小川雅廣
2. 発表標題 オリーブ葉抽出液が線維芽細胞のコラーゲンと抗酸化物質に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会（例会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川雅廣
2. 発表標題 繊維状タンパク質の構造特性を活かした食品の開発
3. 学会等名 第 5 回繊維学会西部支部 若手講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川雅廣
2. 発表標題 オリーブ葉を活用した食品の社会展開
3. 学会等名 第6回黒潮カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Ogawa
2. 発表標題 Improvement in physical properties of fish fibrous proteins using olive polyphenols
3. 学会等名 Food Proteins: Properties, Functionalities, and Human Health, International University Consortium of Food Science and Nutrition（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田絵乃, 川村 理, 小川雅廣
2. 発表標題 線維芽細胞が産生するコラーゲンの高感度定量法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64回講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金久保 光央 (Kanakubo Mitsuhiro) (70286764)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------