

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06569

研究課題名(和文)細胞の分化や増殖におけるコラーゲン由来オリゴペプチドの作用機序の解明

研究課題名(英文)The mechanism of action of collagen-derived oligopeptides on cell differentiation and proliferation

研究代表者

錦見 昭彦(Nishikimi, Akihiko)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究推進基盤センター・室長

研究者番号：70404019

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)：コラーゲンを摂取したり、炎症等で組織が損傷したりすることにより、水酸化プロリンを含むオリゴペプチドが血中に生じること、これらのオリゴペプチドが生理活性をもち、損傷修復や炎症制御に寄与していることが知られている。本研究では、代表的なコラーゲン由来のオリゴペプチド、プロリン-水酸化プロリンジペプチド(Pro-Hyp)と相互作用する分子を同定し、その作用機序解明を試みた。その結果、Jakキナーゼやスフィンゴシン1リン酸受容体(S1PR)がPro-Hypと会合し、活性が亢進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、経口摂取したコラーゲンペプチドが、アミノ酸レベルまで分解されることなく、オリゴペプチドとして吸収されること、これらオリゴペプチドが細胞の分化や増殖に影響を与え、損傷修復や炎症制御に関与していることが示されるようになってきた。しかしながら、その作用機序がほとんど解明されていなかったため、コラーゲン分解産物の生理活性に対して懐疑的な意見も多い。本研究により、具体的な標的分子が示されたことで、コラーゲンペプチドの効果に科学的な根拠を与えることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：After ingestion of collagen peptides or tissue damage, oligopeptides containing hydroxyproline (Hyp) are detected in peripheral blood. These peptides have some physiological activities and contribute to the tissue repair and regulation of inflammation. In the present study, we tried to identify molecules that interacted with prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) and analyzed the effects of the peptide on these factors. As a result, we identified Jak kinases and sphingosine-1-phosphate receptors, which increased activities in the presence of the oligopeptides.

研究分野：免疫学、生化学

キーワード：コラーゲン オリゴペプチド シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは、多数のプロリン残基が水酸化されているため、消化酵素などによるタンパク分解を受けにくい。その結果、経口摂取したコラーゲンは、プロリン-水酸化プロリンジペプチド(Pro-Hyp) など、水酸化プロリンを含むオリゴペプチドとして体内に取り込まれる。また、炎症など組織の損傷によりコラーゲンが分解することにより同様のオリゴペプチドが生ずる。近年、これらのオリゴペプチドが細胞の分化や増殖に影響を及ぼす生理活性を有することが明らかになりつつあるが、その作用機序はほとんど明らかになっていない。このような科学的根拠の脆弱さから、コラーゲン分解産物の生理活性に対して懐疑的な意見も多いのが現状であり、その解明が待たれている。

### 2. 研究の目的

コラーゲンの分解産物が組織の修復や炎症を制御するメカニズムを分子レベルで明らかにするために、コラーゲン由来のペプチドと相互作用する分子を同定し、これらペプチドが生理活性を發揮する分子メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Pro-Hyp に結合するタンパクの精製と同定

Pro-Hyp もしくはグリシン-グリシンジペプチド(Gly-Gly)を共有結合させた磁気ビーズとマウス脾細胞の可溶化液を混合し、ビーズに結合したタンパクを精製した。精製したタンパクを SDS-PAGE で分離後、銀染色により可視化した。Pro-Hyp 結合画分に特異的に認められるバンドを切り出し、LC-MS/MS で同定した。

#### (2) JAK1 キナーゼに対する Pro-Hyp の効果

Jurkat 細胞を Pro-Hyp もしくは Gly-Gly 存在下で培養し、インターフェロン $\gamma$  で刺激後に可溶化し、ウエスタンブロットングによりリン酸化 Jak1 を検出した。リコンビナント Jak1 キナーゼドメイン、もしくは、HEK293 に発現させた全長 Jak1 を免疫沈降により精製したものに、Pro-Hyp もしくは Gly-Gly を加えた際のキナーゼ-活性を、ADP-Glo キナーゼアッセイで測定した。

#### (3) S1PR に対する Pro-Hyp の効果

HEK293 細胞を Pro-Hyp もしくは Pro と Hyp 存在下で培養し、スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)で刺激後に可溶化し、ウエスタンブロットングによりリン酸化 ERK を検出した。S1P に対する細胞遊走について検討するため、Pro-Hyp もしくは Gly-Gly 存在下で培養した胸腺細胞を用いてトランスウェルアッセイを行った。

#### (4) 繊維芽細胞の遺伝子発現における Pro-Hyp の効果

NIH3T3 細胞を Pro-Hyp 存在下、あるいは、非存在下で培養し、RNA を抽出後に、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により発現遺伝子の差異について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) Pro-Hyp に結合するタンパクの同定

Pro-Hyp を結合させたビーズと会合するタンパクを電気泳動し、銀染色した。その結果、図 1 に示すように Pro-Hyp 特異的に結合するタンパクのバンドが複数認められた。これらのバンドを切り出し、LC-MS/MS により同定したところ、ELM01, Jak1/2/3, Rac, Cdc42, PhoA, S1PR などのシグナル伝達に関わる因子が同定された。

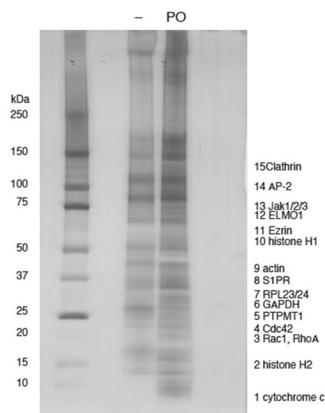


図 1 Pro-Hyp(PO)と会合するタンパク

## (2) JAK1 キナーゼに対する Pro-Hyp の効果

インターフェロンの刺激に応答した JAK1 のリン酸化について検討したところ、Pro-Hyp 存在下で JAK1 のリン酸化が濃度依存的に上昇することが明らかになった (図 2)。Gly-Gly 存在下ではこのようなリン酸化の上昇が認められなかった。JAK1 のキナーゼ活性に対する Pro-Hyp の効果について、*in vitro* キナーゼアッセイで検討したところ、キナーゼ活性への影響は認められなかった。したがって、Pro-Hyp が間接的に JAK1 の活性を亢進させていることが示唆された。

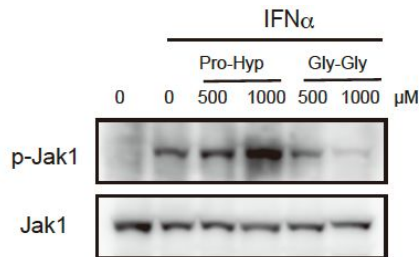


図 2 Pro-Hyp による Jak1 リン酸化の亢進

## (3) S1PR に対する Pro-Hyp の効果

S1P 刺激した HEK293 細胞における ERK のリン酸化を検討したところ、Pro-Hyp 存在下でリン酸化が亢進することが明らかになった (図 3)。しかしながら、S1P に応答した細胞遊走に、Pro-Hyp の効果は認められなかった。したがって、Pro-Hyp による S1PR の効果は限定的であると考えられる。

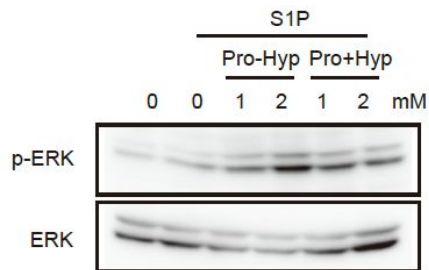


図 3 Pro-Hyp による S1P シグナルの亢進

## (4) 繊維芽細胞の遺伝子発現における Pro-Hyp の効果

Pro-Hyp 存在下、あるいは、非存在下で培養した繊維芽細胞株の遺伝子発現を、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析で比較したところ、図 4 に示すように複数の遺伝子の発現が上昇していた。しかしながら、Jak キナーゼや S1PR が関与するシグナルに直接関与するものは認められなかった。

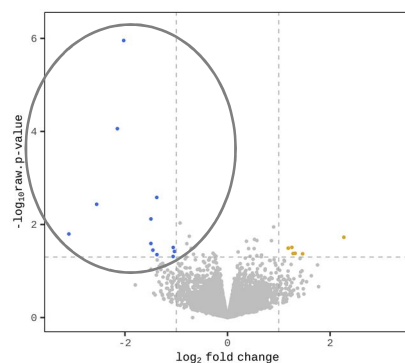


図 4 Pro-Hyp により発現が上昇した遺伝子群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 錦見昭彦、丸山光生
2. 発表標題 新規老化細胞可視化マウスの作製と老化細胞における糖鎖の発現パターン
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 錦見昭彦，小山洋一，楠畑雅，服部俊治，片桐晃子
2. 発表標題 コラーゲン由来のペプチドによるCD4陽性T細胞分化の制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立長寿医療研究センター研究所 バイオセーフティ管理室 <a href="https://www.ncgg.go.jp/research/organization/biosafety.html">https://www.ncgg.go.jp/research/organization/biosafety.html</a>
--

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

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
---------	---------