

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700748

研究課題名(和文) サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの消化管内における機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of function in gastrointestinal of salmon nasal cartilage proteoglycan

研究代表者

伊藤 聖子 (ITO SEIKO)

弘前大学・教育学部・研究員

研究者番号：70466506

研究成果の概要(和文)：サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの消化管内での分解や吸収過程における機能について調べた結果、プロテオグリカンはヒトの消化酵素によってコアタンパク質が分解され、オリゴ糖化する可能性が示された。また、グルコースを一時的に抱え込み、糖の吸収が緩慢になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Investigated the absorption process results in the decomposition of function in gastrointestinal of salmon nasal cartilage proteoglycan. Proteoglycan core protein is degraded by human digestive enzyme, suggesting a potential to slow the absorption of sugar.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養

1. 研究開始当初の背景

プロテオグリカンは、コアタンパク質と呼ばれるタンパク質に、糖側鎖としてコンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカン(Glycosaminoglycan: GAG)が共有結合した生体高分子である。これまでプロテオグリカンは、ウシやクジラの軟骨を原料に精製されていたが、高垣らによってサケ鼻軟骨由来のプロテ

オグリカンが初めて精製された。サケ鼻軟骨は、北海道・東北地方において郷土料理の一つ「氷頭なます」として正月に食されるなど、古くから食材として利用されていた。これをもとに、サケ鼻軟骨からのプロテオグリカン抽出工程には食品に使用される溶媒のみを用い、人体に安全な素材として医療品、化粧品および食品分野での幅広い応用が期待

されるようになった。

最近、難治性である炎症性腸疾患の実験腸炎モデル動物において、サケ鼻軟骨由来のプロテオグリカンが抗炎症作用を示し、構成糖鎖であるコンドロイチン硫酸よりも炎症応答の抑制効果が高いことが報告された。これよりプロテオグリカンは、近年増加傾向にある腸疾患を緩和する新たな機能性食品素材の可能性が大きくなった。炎症性腸疾患は腸内細菌が関与するともいわれ、治癒または予防に関して様々な研究・技術開発が行われており、腸内細菌は食物繊維との関わりが深い。食物繊維は食品の三次機能、すなわち生体調節機能を有する成分であり、近年の健康保持促進や生活習慣病予防に大きく関与するといわれている。そこで、難消化性成分のコンドロイチン硫酸を糖鎖にもつプロテオグリカンの食物繊維能を明らかにすることは、腸疾患のみならず各種疾病予防につながるものと期待する。

2. 研究の目的

食物繊維の生理機能として、腸内細菌に対する影響、血糖値の上昇抑制効果などが挙げられるが、いずれも消化管内でその機能は発揮される。そこで、本研究では、サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの消化管内での分解や吸収、結合に関わる作用成分を特定し、プロテオグリカンの新たな機能性および作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) サケ鼻軟骨からプロテオグリカンの調製

サケ鼻軟骨からのプロテオグリカン抽出は、従来の化学試薬による方法を用いた。すなわち、アセトンおよびクロロホルム-メタノール溶液で脱脂乾燥後、ブレンダーで微粉末化、その後、プロテアーゼ阻害剤を含む4Mグアニジン塩酸溶液にて24時間、4℃抽出を2回行った。抽出液に3倍量の食塩飽和エタノールを添加、遠心分離操作で得られた沈殿を蒸留水に対して透析した。透析内液は凍結乾燥し、これをプロテオグリカン画分として以下の実験に供した。

(2) プロテオグリカンの難消化性成分の分析

Proskey法に代表される酵素・重量法にて、プロテオグリカン画分を耐熱性 α -アミラーゼ、プロテアーゼおよびアミログルコシダーゼにて順次加水分解し、最終残渣重量を測定、これを難消化性成分含有量とした。

また、人工消化にはヒトの消化管内を模した疑似消化反応改変法を用い、同様に各種酵素(α -アミラーゼ、ペプシン、パンクレアチン)加水分解後の残渣重量を測定した。

プロテオグリカンの人工消化物の解析には、疑似消化を行った各酵素反応後の上清の糖量(グルクロン酸相当量)をカルバゾール硫酸法、タンパク質量をBradford法にて測定した。その後、各上清の一部をSephacryl CL-4Bゲル濾過クロマトグラフィーに供し、分子量分布をみた。溶出液は、カルバゾール硫酸法(530nm)と280nmのUV吸収を測定した。

(3) プロテオグリカンの保水力測定

人工胃液(pH 1.8)と人工腸液(pH 6.9)を調製し、プロテオグリカン画分を添加、室温で30分間混合して完全に溶解させた。各混合液は、37℃のインキュベーター内で2時間静置して恒温膨潤させた。その後、自然濾過して残分重量を測定し、保水率を算出した。

(4) プロテオグリカンのグルコース拡散速度に与える影響

1%グルコース溶液にプロテオグリカン溶液(1、2.5、5%)を加え、30分間攪拌し試料溶液を均一にした。試料溶液をセルロースチューブに詰め、蒸留水あるいは人工腸液(pH 6.9)に対して透析を行った。透析外液のグルコース量をフェノール硫酸法にて経時的に測定し、プロテオグリカン共存化でのグルコース拡散について調べた。

4. 研究成果

(1) プロテオグリカンの難消化性成分の分析

難消化性成分含有量を、Proskey法と疑似消化反応改変法を用い、各種酵素加水分解後の最終残渣重量を測定した結果、どちらも酵素消化

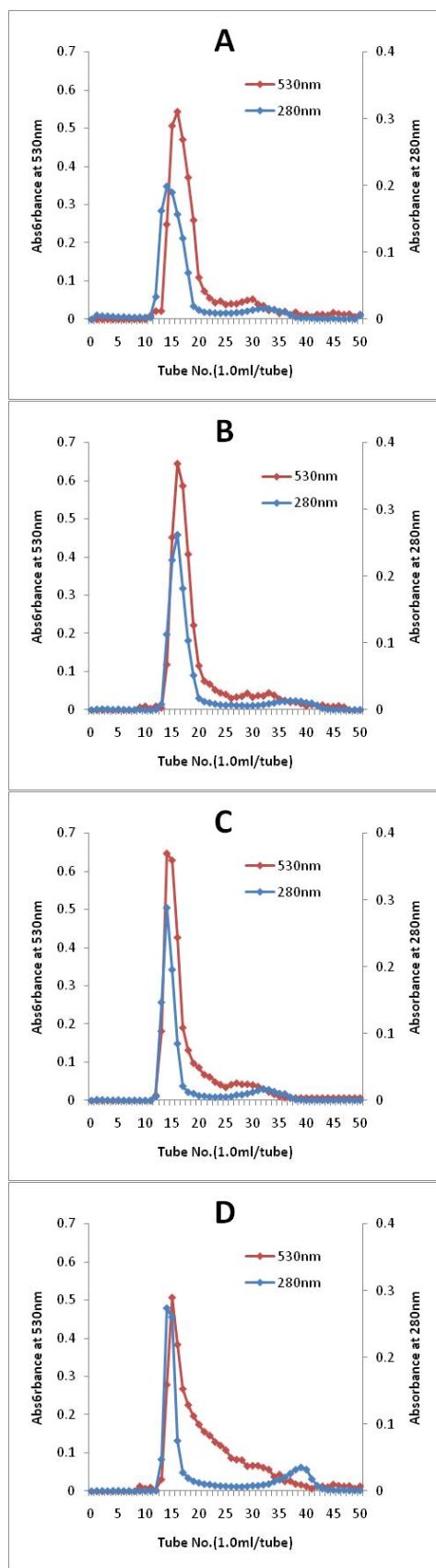


Fig. 1 各上清の分子量分布
(Sepharose CL-4B ゲル濾過クロマトグラフィー)

後に重量が 10~15%減少していた。これは、タンパク質分解による低分子化と推測された。

また、酵素・重量法と疑似消化反応改変法ともに、用いた各酵素反応における上清と消化後の糖量およびタンパク質含有量に大きな変化はなかった。そこで、酵素反応における分子量の変化をみるため、各上清を Sepharose CL-4B ゲル濾過クロマトグラフィーに供し、分子量分布を測定した。Fig.1 に、(A) 酵素反応前、(B) α -アミラーゼ反応液、(C) α -アミラーゼ+ペプシン反応液、(D) α -アミラーゼ+ペプシン+パンクレアチン反応液の各上清のクロマトパターンを示した。ペプシン分解反応後 (C) にタンパク質が分解されている傾向がみられ、その後のパンクレアチン分解反応 (D) でタンパク質の低分子化、それに伴う遊離糖鎖の生成が確認された。これより、プロテオグリカン はヒトの消化酵素によってコアタンパク質が分解され、オリゴ糖化する可能性が示された。

(2) プロテオグリカンの保水力測定

プロテオグリカン画分と人工胃液 (pH 1.8) および人工腸液 (pH 6.9) 混合液を恒温膨潤させた後に、濾過残分の重量測定から保水率を算出した。しかし、ブランクとの有意な差は得られなかった。

(3) プロテオグリカンのグルコース拡散速度に与える影響

1% グルコース溶液にプロテオグリカン (1、2.5、5%) を加え均一な溶液とし、蒸留水あるいは人工腸液に対して透析した。透析外液のグルコース濃度を経時的に測定した結果、プロテオグリカンは濃度依存的にグルコースの拡散速度を抑制する傾向が明らかとなった (Fig. 2)。人工腸液中の 5% プロテオグリカン溶液で特に効果が高く、プロテオグリカンがグルコースを一時的に抱え込み、糖質の吸収が緩慢になる可能性が示唆された。

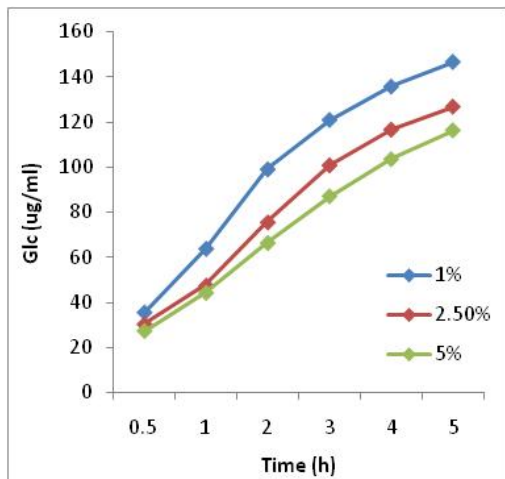


Fig.2 グルコース拡散速度

(4)まとめ

サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの消化管内での機能特性および作用機序を解明するため、疑似的に胃から大腸までの作用を検討した。人工胃液および腸液を用いた消化酵素分解物を解析することによって、プロテオグリカンの消化吸收の過程を考察できた。プロテオグリカンはコアタンパク質から分解されGAG糖鎖が生成し、これらが腸内で様々な機能を発現する可能性が示された。今回の保水力試験では、プロテオグリカンの効果は得られなかったが、グルコースの拡散試験によりプロテオグリカンは濃度依存的にグルコースを抱え込む可能性が示された。これより、プロテオグリカンを摂取することで、低分子糖の一部が消化管との接触が遅れ、その結果、糖の吸収が緩慢になり、食後の高血糖改善効果などの生理機能が今後期待される。また、プロテオグリカンの消化吸收の過程で生成したオリゴ糖類が、プレバイオティクスとして腸内フローラに影響を与え、腸内改善等の効果を発揮することも期待される。今後、本研究結果をもとに、さらに金属イオンを介したGAG糖鎖と植物糖鎖との結合や、機能性発現への研究に発展させたい。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 聖子 (ITO SEIKO)

弘前大学・教育学部・研究員

研究者番号：70466506