

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05765

研究課題名（和文）魚肉水溶性画分に含まれる抗炎症タンパク質の機能解析と非感染性疾患予防への活用

研究課題名（英文）Functional analysis of anti-inflammatory protein contained in fish meat water-soluble fraction and its utilization for prevention of non-communicable diseases

研究代表者

佐伯 宏樹（SAEKI, HIROKI）

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：90250505

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：In vitro研究において、スケトウダラ筋肉中の水溶性画分WSPの抗炎症作用は、原料鮮度や凍結貯蔵の影響を受けず、アルギン酸オリゴ糖修飾によって増強された。また、WSP中のアレルゲンタンパク質であるパルブアルブミンの除去は、WSPの抗炎症作用に大きな影響はないと思われた。In vivo実験においては、WSPはラットとマウスの食事誘導性肥満を効果的に抑制し、同時に脂肪組織におけるアディポカインの分泌バランスを維持した。アルギン酸オリゴ糖修飾は、この機能発現の増強には寄与しなかったものの、本研究の結果は、WSPが肝臓の脂質蓄積を抑制して非アルコール性脂肪肝の予防に寄与する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類筋肉の水溶性タンパク画分（WSP）は、長年の研究にもかかわらず、有効な活用法は提案されていない。本研究は、WSPが食事性肥満に起因する非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の予防に役立つ可能性を示した。また、その機能が原料の品質に影響を受けないことを確認した。これらの成果は、WSPの健康機能を動物実験で確認した初の事例であり、水産資源利用学分野での今後の学術的展開が期待される。そして、これまで廃棄されていたWSPに対し、「NASHを対象とした機能性食素材」としての産業利用の可能性を提示するものであり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In vitro studies of this project have demonstrated that the anti-inflammatory effects of the water-soluble fraction (WSP) derived from walleye pollock muscle were not influenced by the freshness of the raw material or by frozen storage. Additionally, these effects were enhanced by modification with alginate oligosaccharides. The removal of parvalbumin, a major allergenic protein present in WSP, appeared to have no significant impact on the anti-inflammatory properties. In vivo experiments further showed that WSP effectively inhibited diet-induced obesity in rats and mice, while maintaining the balance of adipokine secretion in adipose tissue. Although alginate oligosaccharide modification did not contribute to the enhancement of these effects, the findings of this study suggest that WSP could help prevent non-alcoholic fatty liver disease by suppressing lipid accumulation in the liver.

研究分野：水産食品科学

キーワード：魚肉タンパク質 抗炎症 炎症 肥満 肝障害

1. 研究開始当初の背景

近年、健康機能に着目した未利用食糧資源の利用研究が活発に行われている。重要な水産食品成分である魚肉タンパク質は、次の3種類に大別できる(落合, 2015): (a)水溶性の筋筋質タンパク画分(本研究対象の水溶性タンパク質(WSP)が該当)、(b)塩溶性の筋原線維画分(主にアクトミオシン)、(c)難溶性の筋基質画分(主にコラーゲン)。これらのうち(b)と(c)は、それぞれ水産食品素材や海洋性コラーゲンとして産業的に活用されている。しかし、魚肉タンパク質の20~40%を占めるWSPについては、長年の検討にもかかわらず、有効な活用方法は提案されていない。

WSPの最大の排出源は、冷凍すり身の製造段階で発生する魚肉の洗浄廃水であり、大規模工場では1日に優に100トンを越える(岡崎, 1994)。これについて我々は、WSPが魚類筋肉を構成するタンパク質中で、唯一明確に炎症性サイトカイン産生抑制効果を示す画分であることを、WSP消化ペプチドを用いた細胞実験と動物投与実験によって見いだした(Ono, 2023)。そこで、WSPの健康機能をより詳細に解析し、有益な学問的知見を収集することで、WSPの健康機能素材としての実用化に貢献できると判断し、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、スケトウダラWSPの健康機能を解析するとともに、それを安定的に供給する技術を実用化し、水産資源の高度利用に貢献することである。本研究では、研究成果の項で述べる複数の研究目標を設定したが、それらの目的は、「WSPが非感染性疾患の予防・寛解にとって有意義な食機能素材となりうるか? またその実現に、WSPの抗炎症機能の増強は必要か?」という学術的「問い」に一定の解答をもたらすことであった。

この目的のため本研究では、社会的に問題となっている非感染性疾患、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)にターゲットを絞ることとした。NASHは、「食事誘導性の肥満 非アルコール性脂肪肝(NAFI) 肝臓における慢性炎症の進行 NASHへの移行・増悪」という段階を経て進行するので、この流れに対するWSPの進行抑制と予防作用を検証した。

3. 研究の方法

3-1. スケトウダラ魚肉からのWSPの分画と機能解析に用いるWSPペプチドの調製

生鮮および-25℃で4~27ヶ月間貯蔵したスケトウダラの背筋肉を50 mM NaCl中で粉碎し、遠心分離によって水溶性画分を抽出・回収した。また、冷凍すり身工場の魚肉水晒し工程から排出された工場廃液(凍結保管)を遠心分離して、水溶性画分を回収した。これらの水溶性画分に1 M HClを加えてpH 4に調整し、12 h 攪拌後、続いて0.5 M Na₂HPO₄を用いてpH 7へ再調整した。そして、得られた沈殿画分をスケトウダラWSPとした。WSPはペプシン(pH 2)とトリプシン(pH 8)を用いた連続消化(それぞれ37℃で3 h)に供した。そして、沸騰水中で酵素を失活させた後、遠心分離上清として消化ペプチドを回収し、この凍結乾燥物を一連の実験に用いた。

動物実験用の試料は、次の方法で調製した。すなわち、300kgの冷凍スケトウダラ筋肉を連軸粉碎装置とスクリーブプレスに供し、抽出・回収した魚肉水溶性画分を得た。そして、二段階のpHシフト処理を経て得られた沈殿を、連続遠心分離機で回収後に酵素分解し、凍結乾燥WSPとして混餌試料の調製に用いた。

3-2. WSPへの糖鎖導入

魚肉タンパク質の抗炎症作用を強く増強するアルギン酸オリゴ糖(AO; Nishizawa, 2016)を用いて、WSPを糖修飾した。すなわち、1/2重量のAOを混合したWSP凍結乾燥物を、60%相対湿度65%に保持し、WSPのリジン残基とAOの還元末端間に起こるメイラード反応を利用してWSPにAOを導入した。未反応のAOは洗浄除去した。

3-3. 細胞系を用いたWSPペプチドの抗炎症機能の調査

マウス・マクロファージにおけるリポポリサッカライド(LPS)誘導性の炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6,)分泌能に対する阻害効果を測定することで評価した。マウスの腹腔から採取したマクロファージを 3.0×10^4 wells/cell濃度で96-well plateに播種した後、2h インキュベートした(37℃, 5% CO₂)。次に、0.1% FBSを含むRPMI1640培地に交換し、24 hの血清飢餓を行った。続いてWSPペプチド試料で3 hの前処理を行った後、試料濃度が変わらないように配慮しながらLPS(20 ng/mL)を添加して培養を継続した。そして、24 h後の培養上清を回収し、それぞれの濃度をELISAによって定量した。

3-4. WSP成分の分画と特定

WSPの主要成分は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(SDS-PAGE)によって分子量を測定後、分取電気泳動とDEAE-イオン交換クロマトグラフィーによって分離した。それぞれの成分は、トリプシンによるゲル内消化、MALDI-TOF-MS分析、LC-MS-MS分析、およびN末端アミノ酸配列分析によって同定した。なお一部の成分は、シロザケ・パルプアルブミン抗体を用いたイム

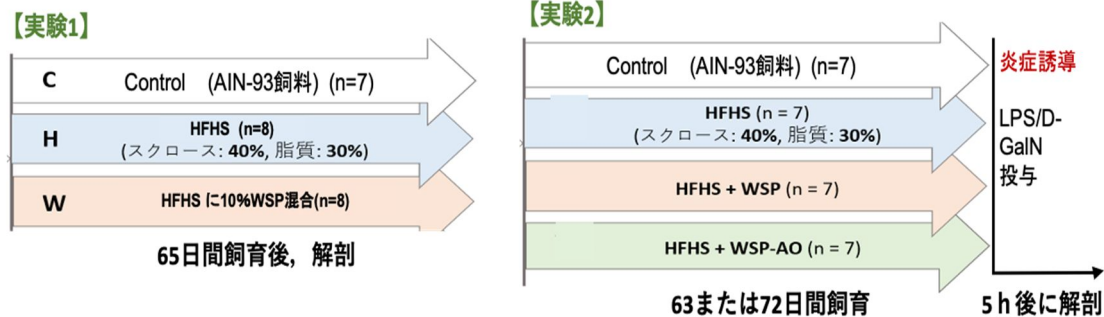
ノプロットイングによって特定した。

3-5. 非感染性疾患の予防効果に関する調査

WSP のもつ炎症抑制作用に関する知見 (Ono, 2023) を踏まえ、次の 2 実験をおこなうことで非感染性疾患の予防効果を検証した。

【実験 1】慢性炎症を誘導し、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) をもたらず食事誘導性肥満の抑制効果 (Wister ラット, 雄 6 週令を使用)

【実験 2】慢性炎症が誘引する非アルコール性脂肪肝 (NASH) の予防効果 (C57BL/6J マウス, 雄 6 週令を使用)。それぞれの実験デザインを下記に示す (図中の HFHS は高脂肪高糖質食)。本実験に用いた WSP-AO は、AO 修飾反応 4~6h の間に抗炎症作用の増強が強く起きた事実 (研究成果 4-2 の結果) を踏まえて、60% 相対湿度 65% に 6h 保持して調製した。

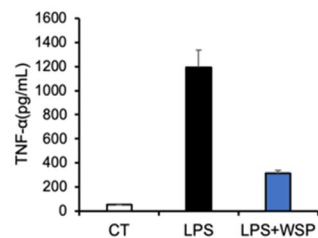


4. 研究成果

4-1. WSP ペプチドの抗炎症機能は、原料の鮮度・貯蔵条件に依存しない

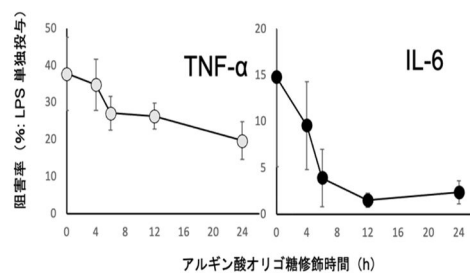
スケトウダラの生鮮と凍結筋肉、および冷凍すりみ工場の廃液から得た WSP のタンパク質組成には明瞭な差異は見られなかった。SDS-ポリアルリルアミドゲル電気泳動分析ではいずれの WSP においても主要 4 成分 (分子量 43K 付近の 2 成分と 17K および 14K 成分) が見られた。

各 WSP の消化ペプチドは、いずれも強い炎症性サイトカイン産生抑制効果を示した。一例として、本研究で用いた WSP の抗炎症作用 (TNF- α 産生抑制作用) を示す代表データを右図に示す (IL-6 や IL-1 も同様の傾向, Ono (2023))。さらに、凍結処理は WSP を含む水溶性画分の不溶化をもたらしたが、WSP 組成と抗炎症作用に顕著な相違が認められなかった。事実は、WSP の原料管理にとって有益な情報である。



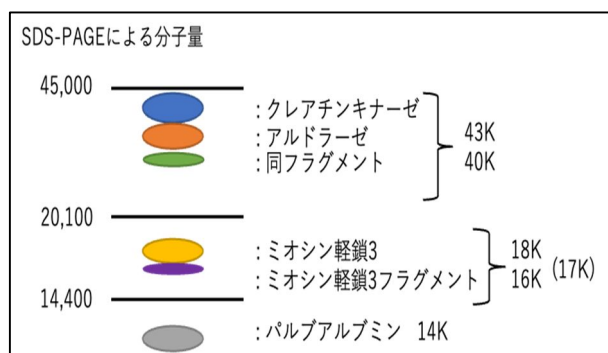
4-2. AO の導入は WSP の抗炎症作用を増強する

WSP と AO の凍結乾燥物混合物を 60% 相対湿度 65% に 0-24h 保持し、得られた WSP-AO 消化物 (終濃度 62 μ g/mL) をマウス腹腔マクロファージに作用させ、LPS 誘導性の TNF- α および IL-6 産生に対する阻害効果を調べた。その結果、AO 修飾の進行 6 時間までの間で、両炎症性サイトカインの経時的な産生抑制作用の増強が観察された (右図)。このように、細胞系では筋原線維画分 (Nishizawa, 2016) と同様に、AO 修飾による抗炎症作用の増強効果が認められた。



4-3. WSP に含まれる主要成分の分離と一部成分の抗炎症作用

(a) SDS-PAGE 分析によると、WSP の主要タンパク質は分子量 43K, 40K, 17K, および 14K であった (右図)。そのうち、43K と 40K は N 末端アミノ酸配列分析から、それぞれクレアチンキナーゼとアルドラーゼであると判断した。また 17K 成分は、分取 SDS-PAGE 分析によって 18K と 16K の 2 成分に分離できたが、LC-MS-MS の結果より 18K 成分をミオシン軽鎖 3 と判断した。また、ゲル内トリプシン消化と MALDI-TOF-MS 分析から、



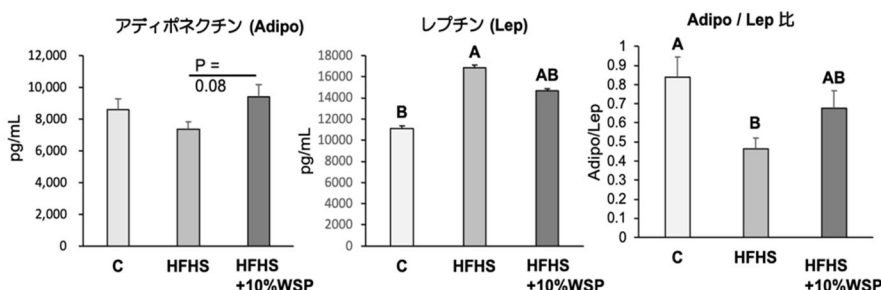
16K は 18K のフラグメントであることがわかった。さらに 14K 成分は、イムノブロッティングによってパルブアルブミンと同定した。SDS-PAGE パターンのイメージ分析 (IMAGE-J 使用) によると、WSP の全タンパク質を 100% とした際の各成分の含有率は、43K + 40K 成分：17%、17K 成分：13%、および 14K 成分で 17% であった。

(b) 分画した成分のうち 14K (パルブアルブミンと同定) を、細胞実験に供試可能なレベルまで精製した。これをマクロファージに作用させ、ILS 誘導性の TNF- α 産生に及ぼす影響を調べた。その結果、陽性対照として抗炎症作用を示した WSP (500g/mL) に含まれる量の 2 倍量を作用させても、顕著な抗炎症効果の増強は認められなかった。この結果は、14K が主要な抗炎症成分ではない可能性を示唆している。パルブアルブミンは魚肉の主要アレルゲンとして知られているが、その強い熱安定性や塩析特性を利用して他の WSP 成分と容易に分画できる。それゆえ本知見は、抗炎症機能を有する WSP の生産において、パルブアルブミン除去による低アレルゲン化が可能であることを示唆している。

4-4 . WSP による非感染性疾患の予防効果

【実験 1】非アルコール性脂肪肝 (NAFL) をもたらす食事誘導性肥満の抑制効果

高脂肪高シヨ糖食 (HFHS 食) でラットを 65 日間飼育して、食事誘導性肥満を惹起させた。その際、HFHS 食の全タンパク質の 1/2 を WSP に置換して終濃度を 10% (w/w) とした飼料で飼育し、WSP 投与が食事誘導性肥満の惹起とそれに伴う炎症の進行に及ぼす影響を調査した。得られた結果は次の通り：(1) HFHS 食摂取は肥満を誘導するが、総摂取カロリーが同等であっても WSP の含有は肝臓と脂肪組織重量の増加を抑制し、結果として体重増加が緩和された。(2) 食事誘導性肥満に伴って血中 TG と AST 濃度が上昇したが、この初期の脂質異常症と肝障害の進行は、WSP の継続摂取によって遅延する可能性が示された。(3) HFHS 食の継続摂取はアディポネクチンの減少とレプチンの増加を誘引したが、これらの分泌異常は、WSP の摂取によって増悪が抑制された。さらにこの時、脂肪組織における *Adipoq* 遺伝子および *Lep* 遺伝子発現量においても同様の増悪抑制傾向が見いだされた (下図)。



以上述べた【実験 1】の結果は、食事誘導性肥満を抑制する WSP が NAFL の進行を抑制することを示唆している。またこの作用には、脂肪組織におけるアディポカイン産生の増悪抑制が関与している可能性がある。

【実験 2-1】食事誘導性肥満・非アルコール性脂肪肝 (NAFL) の抑制効果と A0 修飾の影響に関する検証

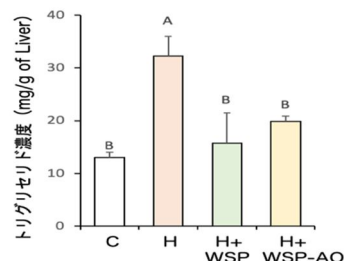
マウスに HFHS 食 (実験 1 と同じ) を 68 日間摂取させて肥満を誘導し、その際の WSP による NAFL 抑制効果を調査した (HFHS+WSP)。また、メイラード反応を介して WSP にアルギン酸オリゴ糖 (A0: 重合度 6) を結合させた WSP-A0 を調製し、HFHS 食の 50% タンパク源として混餌し、飼

	Control	HFHS	HFHS + WSP	HFHS + WSP-A0
総摂取量 (g / 匹)	208.93 ± 7.53 ^a	160.27 ± 4.39 ^b	148.79 ± 2.78 ^b	150.98 ± 3.44 ^b
総摂取カロリー (kcal)	714.54 ± 25.76 ^b	817.38 ± 22.38 ^a	758.83 ± 14.16 ^{ab}	770.01 ± 17.54 ^{ab}
体重 飼育開始時 (g)	20.14 ± 0.64	20.36 ± 0.88	20.44 ± 0.83	20.10 ± 0.31
飼育終了時 (g)	32.70 ± 1.24	34.03 ± 0.76	30.83 ± 0.96	31.94 ± 0.91
組織重量 (mg / g 体重)				
肝臓	38.54 ± 1.93	36.89 ± 0.87	41.14 ± 1.30	40.13 ± 1.23
腎臓	4.84 ± 0.33	4.68 ± 0.15	4.77 ± 0.23	4.89 ± 0.19
精巢上体脂肪組織	32.86 ± 2.59 ^b	50.96 ± 3.09 ^a	33.82 ± 4.86 ^b	44.49 ± 3.00 ^{ab}
腸間膜脂肪組織	13.71 ± 1.31	11.92 ± 1.06	9.60 ± 1.50	12.17 ± 1.19
後腹膜脂肪組織	11.04 ± 1.27	16.03 ± 1.06	11.38 ± 1.87	14.78 ± 1.51
総脂肪量	57.60 ± 4.64 ^{ab}	78.92 ± 4.68 ^a	54.81 ± 7.90 ^b	71.44 ± 5.58 ^{ab}

育試験をおこなった (HFHS + WSP-AO)。

飼育終了後における各実験群の生体データを前ページに示すが、【実験 1】の結果と同様、HFHS 食による肥満誘導 (体重増加、内臓脂肪の増加) が WSP または WSP-AO の摂取によって効果的に抑制された。

さらに WSP と WSP-AO 摂取群では、肝臓のトリグリセリド濃度 (右図参照) が HFSF 群 (右図の H) のように増加せず、Control 食摂取のレベル (図中 C) に近似した。しかしながら、WSP による食事誘導性肥満の抑制効果は、WSP に AO を導入しても効果を増強することはなかった。

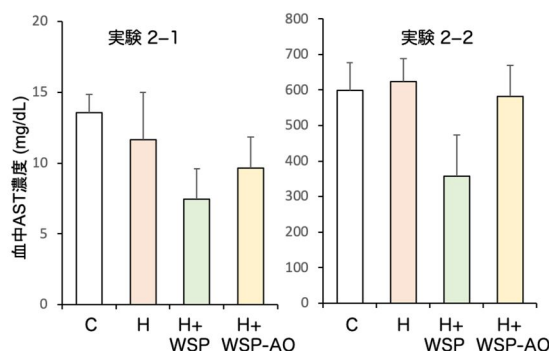


【実験 2-2】慢性炎症が誘引する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の予防効果

実験 2-1 と同様、WSP と WSP-AO を混餌した HFHS 食で 72 日間飼育して NAFL を誘導したマウスに、LPS と D-ガラクトサミンを腹腔投与して 5 時間保持し、肝炎を誘導した。そして血中 ALT と AST を測定することで、WSP の肝炎抑制作用 (NAFL から NASH への移行に対する予防効果) を検証した。まず、本飼育実験の終了直後 (実験 2-1) では、いずれの実験群でも血中 ALT の顕著な増加は見られなかった (図示しない)。

しかし右図 (実験 2-1) に示したように、HFHS 食とともに WSP を摂取したマウス (H+WSP) では、血中 AST が低減する傾向が見られ、そして、LPS と D-ガラクトサミン処理によって血中 AST 濃度が数十倍に増加しても (実験 2-2)、H+WSP 群の AST 濃度は、常に H 群よりも低値であった。

以上の結果は、高カロリー摂取を継続しても食事性肥満に伴う慢性炎症の進行が WSP によって緩和される可能性を示唆している。なお、右図に示すように、WSP を AO 修飾しても AST 低下作用のさらなる増強は見られなかった (H+WSP-AO)。それゆえ、非感染性疾患の予防効果増強を期待しての AO の導入は不要と判断した。



4-5. まとめ

本節で得られた WSP による肝臓脂質の蓄積抑制作用は、WSP が NAFL、ひいては肝障害の進行を遅延させ、NASH の予防に寄与する可能性を示唆している。また、WSP は食事誘導性肥満に伴う生体内炎症の増悪を抑制する可能性が示された。この事実は、WSP に非感染性疾患の予防的役割を期待させる。今後、WSP による脂肪肝の抑制と肝炎予防の関係を詳細に検証するには、最適な実験条件の立案とそれに基づいた動物実験の実施が必要である。

5. 文献

落合芳博 (2015), 最新水産ハンドブック (島 一雄ら編), 講談社サイエンティフィック, pp. 345-351

岡崎恵美子 (1994) すり身廃液工程で排出される魚肉筋形質タンパク質の回収と利用に関する基礎的研究. 中央水産研究所研究報告, 6, 79-160

Ono M et al. (2023) Water-soluble protein from walleye pollock (*Gadus chalcogrammus*) suppresses lipo-polysaccharide-induced inflammation by attenuating TLR4-MyD88 expression in macrophages, Food Chemistry: Molecular Sciences, 6, 100165

Nishizawa M et al. (2016) Conjugation with alginate oligosaccharide via the controlled Maillard reaction in a dry state is an effective method for the preparation of salmon myofibrillar protein with excellent anti-inflammatory activity. Fisheries Science, 82, 357-367.

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根崎 絢, 大野 雅貴, 趙 佳賢, 清水 裕, 佐伯 宏樹
2. 発表標題 すり身工場から排出される水晒し廃液に含まれる抗炎症成分の探索
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 東北支部(第55回大会)・北海道支部(第51回大会) 合同支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙佳賢
2. 発表標題 水産物における未利用資源活用の取り組み
3. 学会等名 帯広畜産大学産学連携センター, 未利用資源活用セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 趙 佳賢
2. 発表標題 健康機能から見た未利用・廃棄水産資源の高度利用
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 北海道支部 シンポジウム 「北海道におけるこれからの栄養・食糧学」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田 周, 趙 佳賢, 佐伯宏樹
2. 発表標題 スケトウダラ水溶性タンパク質の摂取による食事誘導性肥満の緩和
3. 学会等名 第77回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shu Shimada, Hiroki Saeki, Ga-hyun Joe
2. 発表標題 The water-soluble protein from walleye pollock attenuates obesity induced by high-fat, high-sucrose diet
3. 学会等名 The 10th international symposium of East Asia Fisheries Technologists Association
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	趙 佳賢 (Joe Gahyun) (80829052)	北海道大学・水産科学研究院・助教 (10101)	

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