

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617002

研究課題名(和文) コラーゲン由来ペプチド・アミノ酸の栄養生理機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of physiological and nutritional features of collagen derived peptides

研究代表者

蕪山 由己人 (Kabuyama, Yukihiro)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：20285042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンは細胞外に存在し、動物体内に最も多く含まれる蛋白質である。食肉の加工過程で不可食分として多くが処理される一方で、近年機能性食品の素材として注目されている。本研究では、コラーゲンを加水分解して食しやすいように加工したコラーゲンペプチドの栄養生理機能を解析した。その結果、皮膚再生を促進し、また血中コレステロール抑制効果があることを明らかにした。さらにコラーゲンのアミノ酸配列上多く存在するペプチドに強い抗酸化作用があることも明らかとなった。以上より、コラーゲンはメタボリックシンドロームなど現代社会で問題となっている様々な疾病に対して栄養補助食品として利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Collagen is the most abundant protein within extracellular matrix. Generally, collagen is thought to be inedible because it is fibrous protein. However, recent research has demonstrated that collagen could be one of the functional foods. In this study, we analyzed the physiological and nutritional features of collagen hydrolysates. The results showed that ingestion of collagen hydrolysates stimulated wound healing process in skin. Also, collagen has been shown to suppress blood cholesterol levels. Finally we found strong anti-oxidative activity one of the collagen-derived tripeptide. Together, these results suggested that collagen have excellent potential as functional food ingredients, effective for management and treatment of chronic diseases of the modern age.

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは動物体内に最も多量に存在するタンパク質であり、組織の構造・強度維持に機能する。研究開始当初(2013年)の背景としては、コラーゲンを加水分解して得られたいわゆる“コラーゲンペプチド”に様々な栄養生理的な効果があることが謳われ、サプリメントとして社会的な注目を浴びている時期であった。具体的には、皮膚の潤いやひざ関節の痛みを軽減できるなど、QOL改善に大きく貢献できることが期待されていた。一方で、臨床例や詳細なメカニズム解析が進んでいなかったこと、科学的な実証がまだ少なかったことや、食品として見た場合のコラーゲンについての誤解から、コラーゲンやその加工産物をサプリメントとして摂取することへの疑問も呈されており、学術的な作用機構の評価や解析が求められていた。

2. 研究の目的

このような背景から本研究では“補助食品”としてのコラーゲンに注目し、その栄養生理効果を検証する事を目的とした。特に研究代表者の研究背景を踏まえ、障害を受けた組織や、疾患予防に着目し、皮膚再生作用、血中コレステロール低減作用、抗酸化作用を指標として、コラーゲンの栄養生理効果を評価した。更に、その作用機構を細胞や、生化学的な解析手法を用いて分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

コラーゲン摂取が皮膚再生過程に対して与える影響の解析。実験動物を用いた皮膚再生モデルを利用し、皮膚再生時に鍵因子として機能する MMP9 (matrix proteinase 9) の発現量と発現部位を、それぞれウェスタンブロット法や免疫組織染色法で明らかにする。更に培養細胞を用いた解析により、摂取したコラーゲンが直接皮膚の細胞に働きかけるか、免疫系の細胞に働きかけるかなど、その作用機構を明らかにする。またコラーゲンに多く含まれるペプチド配列を基に、合成ペプチドを作製し、コラーゲンを食した場合の活性分子の同定を試みる。

血中コレステロール量低減作用に関する研究。高コレステロール食を与えた実験動物を用いた高コレステロール血症モデルを用いる。血中のコレステロールはリポプロテインの中に含まれ、善玉コレステロールとよばれる HDL、悪玉コレステロールとよばれる LDL など様々な形態をとる。従って、各種リポプロテインを分離・定量する必要があるため、ポストカラムラベル法を用いた HPLC 分析法を確立しこれを用いて解析する。各種のコラーゲンや、水酸化プロリンなどコラーゲンに多く含まれるアミノ酸の効果を検証する。

安全性が高く、効能の高い抗酸化ペプチドの開発。コラーゲンを構成する主要アミノ酸であるプロリンと水酸化プロリン、及びコラーゲン中に多く含まれるペプチド配列を基に合成したペプチドを用いて、生化学的な手法により抗酸化活性を評価する。具体的には、電気化学的な手法であるサイクリックボルタンメトリ、脂質酸化アッセイ、ラジカル補足アッセイ等を実施する。

4. 研究成果

ラット皮膚回復モデルを用いた解析では、コラーゲン摂取時に皮膚の上皮部位の再生に必須の役割を果たす MMP9 の発現量が著しく上昇する事が明らかとなった。更に免疫組織染色法による解析では、上皮と真皮の境界領域に MMP9 の発現量が特に高いことが判明した。以上の結果はコラーゲン摂取が皮膚再生に対して MMP9 発現の亢進を介して、治癒を促進する効果があることを示していた。

本結果を受け、皮膚角化細胞、繊維芽細胞にコラーゲン由来の各種合成ペプチドを添加し、MMP9 の発現が誘導されるか検討した。その結果、各種合成ペプチドの単独添加では MMP9 の発現誘導は認められなかった。従って、MMP9 の皮膚組織における発現誘導には、コラーゲン由来のペプチド以外に炎症に關与する細胞から分泌されている炎症性サイトカイン等も關与しており、これらの因子が相乗的に皮膚細胞の活性化を誘導している可能性が考えられた。また別の可能性として、コラーゲン由来のペプチドが炎症反応に係る細胞を活性化し、その結果多くの炎症性サイトカインが分泌され、皮膚細胞における MMP9 の発現誘導が行われている可能性もある。これらの詳細なメカニズムに関しては今後の研究課題である。

以上の結果を総合すると、コラーゲンを摂取することにより、皮膚細胞における MMP9 の発現が誘導され、皮膚再生は促進される事が明らかとなった。詳細なメカニズムは現在解析中であるが、おそらく炎症性サイトカインとの相乗効果、あるいは炎症性サイトカイン自体の発現誘導や活性化にコラーゲンの消化吸収物が關与すると考えられる。

血中の各種コレステロール含量を定量的に解析する為に、陰イオン交換カラムによるリポプロテインの分離とポストカラムラベル法によるコレステロールのオンライン定量系を構築した。

ラットに高コレステロール食を与え、血中コレステロール含量が上昇する、高コレステロール血症モデルを構築した。血液中のコレステロール含量を計測したところ、特に悪玉コレステロールとも呼ばれる、LDL が上昇している事が判明した。このモデルを用いて、食餌にコラーゲンの加水分解物、あるいはコラーゲンに特有に含まれる水酸化プロリンを添加し、その影響を解析した。その結果、

コラーゲンの加水分解物を添加した場合では血中コレステロール量や各種リポ蛋白質の比率に大きな変化は認められなかった。

一方で水酸化プロリンを食餌に添加したところ、血中コレステロール量が有意に減少し、LDL 量に特に大きな減少が認められた。これらのラットの糞中の胆汁酸量を測定したところ、対照と比較して排泄された胆汁酸量が有意に多いことが明らかとなった。

以上の結果は、水酸化プロリンには血中コレステロール値の改善効果があること、特に様々な疾病の原因となる LDL の抑制機能があることが明らかとなった。またその作用機作の一つとして、肝臓における胆汁酸合成が活性化され、個体全体として見た場合にコレステロールを排泄する方向に代謝反応がシフトしている可能性が考えられた。今後、より詳細な LDL 低下機構を明らかにすることで、メタボリックシンドローム抑制に向けて有効なサプリメント開発の基礎的な情報が得られると考えられる。

コラーゲンを素材とした、効果的な抗酸化剤を創出する為の予備実験として、コラーゲンを構成する主要なアミノ酸である、プロリンと水酸化プロリン、および他の 19 種類のアミノ酸の電気化学的な特性を解析した。サイクリックボルタンメトリによる解析では、溶液として与えたアミノ酸に対して、電圧をかけ微弱電流が流れるか判定することで、アミノ酸自体が電子の享受を行いやすいか評価できる。この解析により、プロリンや水酸化プロリンは、非常に電子の享受を行いやすいアミノ酸であり、酸化還元反応に関与する事が良く知られているシステインやヒスチジンと似た特性を持つことが明らかになった。この結果を基に、プロリンや水酸化プロリンを含む合成ペプチドを作製し、サイクリックボルタンメトリ、脂質酸化抑制アッセイ、ラジカル補足アッセイを行ったところ、プロリンや水酸化プロリンを N 末端に有するペプチドに非常に強い抗酸化性が認められることが明らかとなった。

これらの結果を受け、 型コラーゲン 1 鎖のアミノ酸配列中に潜在的に多く含まれるペプチド配列であり、かつプロリンや水酸化プロリンを N 末端にもつペプチドを 2 種類合成し、それらの酸化還元特性を解析した。その結果、一つの合成ペプチドに非常に強力な抗酸化活性が認められ、その強度はビタミン E に匹敵していた。各種の活性酸素種に対する抗酸化効果を詳細に検討したところ、スーパーオキシドに対しては弱い効果が認められたのに対して、過酸化水素に対しては強めの抗酸化効果が認められた。培養細胞を用いた細胞毒性試験や、抗酸化性テストを行ったところ、このペプチドには大きな細胞毒性はなく、過酸化水素などの酸化剤に対して強い抗酸化作用を示した。更に実験動物を用い

た実験により、炎症部位に見られる生体酸化反応に対して、当該ペプチドが抑制的に作用する事が認められた。この場合でも、動物個体に対して炎症が悪化する等の症状は認められなかった。

以上の結果は、コラーゲンは抗酸化性を有する機能性食品の素材として大変有力であることを示している。今後、コラーゲンの消化実験を行うことで、強い抗酸化性が認められたペプチドを効率的に得る条件を設定できれば、極めて安価で効果的な栄養機能補助食品の開発につながる事が期待される。またこれらのアミノ酸やペプチドが抗酸化剤として機能したあと、どのような構造変化を起こしたか解析する事は非常に大きな課題となる。コラーゲンの酸化による機能不全は、肺線維症をはじめとした多くの組織繊維化に基づく疾病の基盤となっており、早期発見の疾患マーカーの開発の為の基礎的な情報を発信できる可能性が高く、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Chen Z, Nihei K, Tanaka H, Uda Y, Kabuyama Y. Identification of a nitric oxide generation-stimulative principle in *Scutellariae radix*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読あり 2013;77(3):657-9.

[学会発表](計 6 件)

鈴木稔朗, 安保充, 田中秀幸, 吉村悦郎, 蕪山由己人 コラーゲン由来抗酸化ペプチドの創製, 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会
大澤吉弘, 田中秀幸, 蕪山由己人 ラットにおけるコラーゲンペプチドの腸管吸収動態 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会

大澤吉弘, 蕪山由己人 ラットにおけるコラーゲンペプチドの腸管吸収動態 日本アミノ酸学会第 6 回学術大会

松崎史絵, 早川薫, 蕪山由己人 皮膚創傷回復モデルにおける魚由来コラーゲンペプチドの投与効果 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会

濱田珠世, 蕪山由己人 コラーゲンペプチドによる皮膚培養細胞における MMP-9 の発現誘導 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会
大澤吉弘, 蕪山由己人 ラットにおけるコラーゲンペプチドの消化吸収及び代謝動態 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会

[図書](計 1 件)

小野寺一清, 蕪山由己人 講談社 生化学, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蕪山由己人 (KABUYAMA, Yukihiro)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：20285042