

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：42681
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700944
 研究課題名(和文) 結合組織タンパク質調製物の経口摂取による食事由来ペプチドの血中移行とその生理機能
 研究課題名(英文) Identification of food-derived peptide and its bioactivities after oral ingestion of hydrolysate prepared from connective tissues
 研究代表者
 重村 泰毅 (SHIGEMURA YASUTAKA)
 東京家政大学短期大学部・栄養科・講師
 研究者番号：20373178

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々はエラスチン加水分解物摂取後の血液より食事由来ペプチドとして Pro-Gly を検出した。健康な被験者にエラスチン加水分解物を摂取(10 g/60 kg 体重)して頂いた。摂取前後に採血を行い、その血液から血漿を調製した。固相抽出とサイズ排除クロマトグラフィー分画(SEC)によって血漿中のペプチドを分離した。SEC 画分中のペプチドをフェニルイソチオシアネート(PITC)で誘導化後、逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)によって分離した。摂取後、血中に特異的に検出された食事由来ペプチドは Pro-Gly であった。摂取から 30 分後に血漿中の濃度が最大値(18 μM)に到達した。摂取から 4 時間後には最大値の約 20%まで減少した。1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の Pro-Gly はヒト真皮正常線維芽細胞(NHDF)からのエラスチン合成を増加させた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we identified prolyl-glycine (Pro-Gly) as the food-derived peptide in human blood after oral ingestion of elastin hydrolysate. Following ingestion of elastin hydrolysate (10 g/60 kg body weight) by healthy human volunteers, peripheral blood was used to prepare plasma samples from which peptides were extracted by solid phase extraction and fractionated by size-exclusion chromatography (SEC). Peptides in the SEC fractions were derivatized with phenyl isothiocyanate (PITC) and resolved by reverse phase (RP)-HPLC. Pro-Gly was the major food-derived elastin peptide, reaching a maximum (18 μM) at 30 minutes after ingestion, and decreasing approximately 20% at 4 hours after ingestion. Finally, in cell culture, levels of Pro-Gly in the medium above 1 $\mu\text{g/mL}$ significantly enhanced elastin synthesis of normal human dermal fibroblasts (NHDF) without affecting the rate of cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ペプチド、エラスチン、Pro-Gly、食事由来ペプチド、プロテオグリカン

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループはこれまでにコラーゲンペプチド経口摂取後のヒト血液から、低分子化したコラーゲンペプチド由来（食事由来）のペプチドを検出し、その生理機能について報告している。コラーゲンペプチドと同じく、分子中にアミノ酸の繰り返し構造をもつエラスチンペプチドとプロテオグリカンの経口摂取によって肌の状態改善や、癌の進行抑制が報告されている。本研究では、コラーゲンペプチドの研究手法を基にエラスチンペプチドとプロテオグリカン経口摂取後のヒト血液から、有効成分となりうる食事由来ペプチドの検出と同定、そして生理機能の評価を行う。

2. 研究の目的

- I. エラスチンペプチドとプロテオグリカン経口摂取後のヒト血液中から食事由来ペプチドを検出・同定する。
- II. 食事由来エラスチンペプチドによる線維芽細胞と血管内皮細胞の増殖促進について検討する。

3. 研究の方法

本研究方法は、有効成分となりうる血中の食事由来ペプチドの検出をヒト試験によって行う。実験手法としては、申請者らのグループが既にコラーゲンペプチド摂取後のヒト血液から食事由来ペプチドの検出に成功しており、その手法を改良した高感度な検出方法を実施する。健康な被験者にエラスチン加水分解物を摂取（10 g/60 kg 体重）して頂いた。摂取前後に採血を行い、その血液から血漿を調製した。固相抽出とサイズ排除クロマトグラフィー分画（SEC）によって血漿中のペプチドを分離した。SEC 画分中のペプチドをフェニルイソチオシアネート（PITC）で誘導化後、逆相クロマトグラフィー

（RP-HPLC）によって分離した。摂取後特異的に検出されたペプチドピークをプロテインシーケンサーにより配列の同定を行った。検出した食事由来ペプチドの生理機能に関しては通常の細胞培養系に加えて、申請者らが構築した初代培養細胞を用いた細胞増殖評価法から検討することで、生体内の条件に近づけた評価を行った。

【2011 年度】ヒト血液からの食事由来エラスチンペプチドの検出・同定と生理機能評価

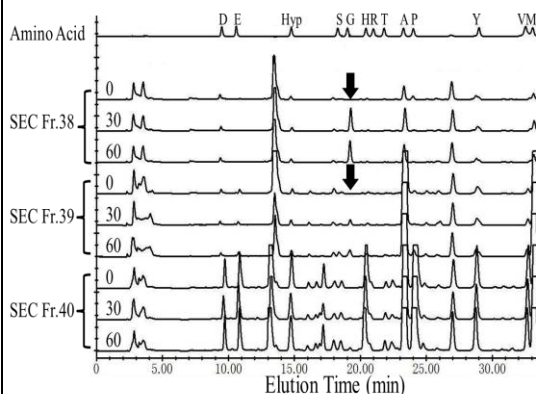
【2012 年度】ヒト血液からの食事由来プロテオグリカンペプチドの検出・同定と生理機能評価

4. 研究成果

【結果】

【2011 年度】エラスチン加水分解物摂取後、血中で Pro-Gly 濃度が増加していることが分かった（図 1）。これは、エラスチンタンパク

図 1 SEC 画分の PITC 誘導化逆相クロマトグラフィー



0, 30, 60 は摂取前, 摂取 30 と 60 分後の血液を分析
SEC Fr. は血液試料の SEC 画分

質には Pro-Gly の豊富な繰り返し配列が存在するため、この配列の分解物である、低分子ペプチドが血中へ吸収されたと考えられる。エラスチンペプチド摂取後（10g/60kg 体重）の Pro-Hyp の血漿中濃度は、30 と 60 分でそれぞれ 23.1 と 21.0 μM であった。これまでにコラーゲン加水分解物摂取後のヒト血中で、Pro が修飾を受けた Hyp を含む特殊な食事由来ペプチドが μM レベルで検出されている。今回、修飾を受けていない高濃度の食事由来ペプチドを血中から検出する事に初めて成功した。研究最終年度は、Pro-Gly の経時的な血中濃度変化と、細胞に対する生理活性について調べる。

【2012 年度】①エラスチン加水分解物摂取後、いずれの被験者（6 名）も摂取から 30 分後に血中 Pro-Gly が最大濃度（約 25 μM ）に達し、4 時間後まで検出されたが、7 時間後には摂取前と同程度であった（図 2）。また 50 代に比べて、20 代の被験者の Pro-Gly 血中濃度が高い傾向にみられた。エラスチンには Pro, Gly 以外にも Ala, Val といったアミノ酸も多く含まれる。そのため上記 4 つのアミノ酸の繰り返し配列が分子中に存在し、食事由来ペプチドとして Pro-Gly 以外が血液に吸収される可能性も考えられる。本研究では Ala, と Val を含む合成ペプチドを用いて、豚と魚由来エラスチン加水分解物摂取後の血中食事由来ペプチド検出を、LC-MS によって行った。その結果、Pro-Gly 以外に血液中で有意

に上昇するペプチドは検出されなかった。

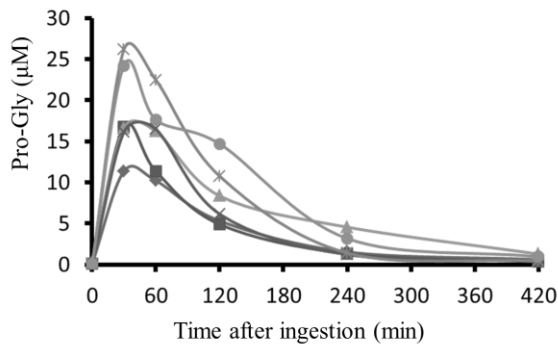


図2 線維芽細胞エラスチン産生(培養72時間後)

また、1 µg/mL 以上の Pro-Gly 添加によって培養72時間後のヒト真皮正常線維芽細胞からのエラスチン合成が上昇した(図3)。

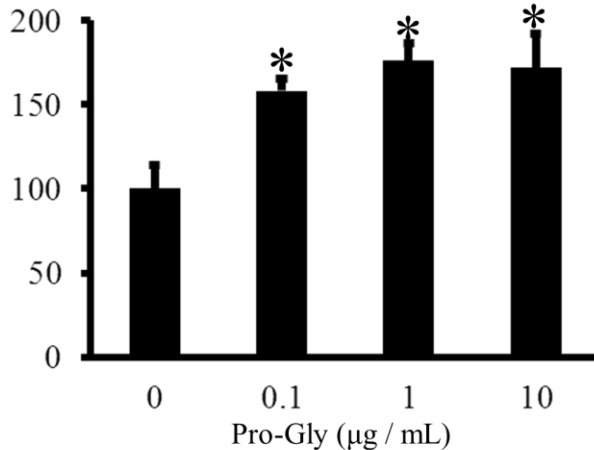


図3 線維芽細胞エラスチン産生(培養72時間後)

②AccQ誘導化を導入したHPLC血中ペプチド分離の結果、プロテオグリカン加水分解物摂取後の血液からは摂取前には検出されないピークが複数検出されたが、ペプチド配列の同定には至らなかった。このことから、検出ペプチドに糖が結合している可能性が考えられた。今後の解析では、糖の結合を切断したペプチドの配列解析を試みる。

本研究結果では、結合組織加水分解物摂取後のヒト血液から食事由来Pro-GlyがµMレベルで検出された。これまでに検出されている、修飾をうけていないアミノ酸を含む食事由来ペプチドとしては最も高い血中濃度であった。これより、本研究手法は今後、特殊なアミノ酸を含まないタンパク質加水分解物摂取後の血液から、食事由来ペプチドを検出方法として利用することが可能である。

本研究結果から、エラスチン加水分解物の摂取により、血液中にエラスチン由来のPro-Glyが吸収されることが明らかとなった。さらにPro-Glyが線維芽細胞のラズ合成を促進する事が細胞試験により明らかとなった。このことから、血中へ吸収されたPro-Glyが皮膚まで移行し、皮膚エラスチン合成を促進させる可能性が考えられた。エラスチン加水分解物のせつしゅにより肌の「キメ」・「ハリ」などの評価が向上することが報告されている。この肌への効果は、本研究から推測されるメカニズムが一因であると考えられる。

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2件)

1. Shigemura, Y.; Nakaba, M.; Shiratsuchi, E.; Suyama, M.; Yamada, M.; Kiyono, T.; Fukamizu, K.; Park, E. Y.; Nakamura, Y.; Sato, K., Identification of Food-Derived Elastin Peptide, Prolyl-Glycine (Pro-Gly), in Human Blood after Ingestion of Elastin Hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry* 60 (20), 5128-5133. 2012.

2. 重村泰毅・佐藤健司 ヒト血液中からの食事由来エラスチンペプチドの検出 食品加工技術 32(2), 10-18. 2012.

[学会発表] (計2件)

1. Yasutaka Shigemura, Eri Shiratsuchi, Kenji Sato Effect of ingestion of elastin hydrolysate on skin condition ISNFF 2012. サンフランシスコ ハワイ州 コナ 2012年12月

2. 重村泰毅、白土絵理、深水和菜、朴恩榮、中村考志、佐藤健司 ヒト血液中の食事由来エラスチンペプチド検出とそのペプチドが及ぼす線維芽細胞への影響 第58回食品科学工学会 仙台 2011年9月

[図書] (計1件)

Wiley-Blackwell. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*. Fish elastin hydrolysate -Development of product and its impact on skin and blood vessel. Eri Shiratsuchi, Misako Nakaba, Yasutaka Shigemura, Michio Yamada and Kenji Sato. chapter 23. 467-486

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

招聘講演

1. 重村泰毅ヒト血液からの食事由来エラスチンペプチドの検出 美容・アンチエイジング食品研究会&機能性食品用ペプチド研究会 合同研究会 2011年 9月 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重村泰毅 (SHIGEMURA YASUTAKA)

東京家政大学短期大学部・栄養科・講師

研究者番号：20373178