

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580306

研究課題名(和文) 魚類コラーゲンの架橋形成機構の解明—各LH分子種の水酸化作用部位と発現特性の解明

研究課題名(英文) Relationship between the hydroxylated part of collagen molecules and expression properties of each LH molecules in fish

研究代表者

横山 芳博 (YOKOYAMA, Yoshihiro)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：90291814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コイ、マアナゴ、トラフグおよびヒラメの各種組織を用いて、コラーゲンの酸溶解性を測定するとともに、リジリヒドロキシラーゼ(LH)1、LH2およびLH3のcDNAをクローニングした。さらに、各種組織におけるLH1、LH2およびLH3の発現特性等を検討した。その結果、コラーゲンの酢酸溶解率が低い組織において、LH2の発現量が低いことが明らかとなった。従って、LH2のmRNA発現量の違いが各種組織に由来するコラーゲンの酢酸溶解率および架橋程度の変化に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Using several kinds of tissues from carp, conger eel, tiger puffer and olive flounder, cDNAs of lysyl hydroxylase (LH) 1, LH2 and LH3 were cloned, and those expression levels were examined by quantitative real-time PCR. The solubility of collagen derived from each fish tissues to dilute acetic acid was also determined. As a result, it was revealed that the expression level of LH2 was low in the tissue which shows the lower solubility of collagen. It became clear that the differences in the expression levels of LH2 participated in the differences in collagen solubility to dilute acetic acid and also participated in the degree of cross linkage between collagen molecules.

研究分野：水圏生産化学

キーワード：コラーゲン リジリヒドロキシラーゼ 架橋

1. 研究開始当初の背景

魚類コラーゲンの酢酸溶解性 (酢酸などの弱酸および希薄な強酸などに対する溶解率) が哺乳類のものと比較して極めて高いこと、さらに、酢酸溶解性は魚種間で異なることが知られている。魚類コラーゲンの酸に対する高い溶解性、すなわち化学的な不安定性の原因の1つとして、コラーゲン分子間架橋の量や質が哺乳類と異なることが予想されている。しかし、魚類ではコラーゲンの架橋に関する研究はほとんどなく、その架橋形成機構の詳細は全く不明であった。

2. 研究の目的

哺乳類実験動物を用いた研究より、リジルヒドロキシラーゼ (LH) は、架橋形成機構の初期段階でコラーゲン分子間に化学的安定架橋を形成するための前初発反応とも呼ぶことができるリジン残基の水酸化を触媒すると考えられている。本研究では、魚類コラーゲンの架橋形成機構を明らかにすることおよび化学的不安定性の解明を目標とし、コイ (*Cyprinus carpio*)、マアナゴ (*Conger myriaster*)、トラフグ (*Takifugu rubripes*) およびヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) の組織を用いて各 LH 分子種 (LH1、2 および 3) mRNA 発現量およびコラーゲンの酢酸溶解性を明らかにし、その相互関係の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 材料: コイより 13 組織 (心臓、鰓、腎臓、脾臓、肝臓、脳、胆嚢、眼、普通筋、血合筋、皮、尾鰭および鰾)、およびマアナゴ、トラフグとヒラメより 3 組織 (普通筋、皮および鰾) を採取し、全 RNA を抽出した後、発現解析に用いた。また、コイ、マアナゴ、トラフグおよびヒラメの普通筋および皮をコラーゲンの酢酸溶解性の測定に用いた。

(2) 各魚種における LH1 および 2 の cDNA 断片クローニング: ヒト、ウシおよびマウスなどの LH1、LH2 および EF-1 に保存されているアミノ酸配列を基に合成した縮重プライマーを用いて、各魚種の普通筋より調製した全 RNA を鋳型にし、RT-PCR 法によってコイ、マアナゴ、およびヒラメの各 LH 分子種および EF-1 cDNA 断片配列を得た。

(3) 遺伝子特異的プライマー (GSP) の作製: cDNA 断片の塩基配列を基にリアルタイム PCR 用の GSP を作製した。また、トラフグ GSP については、先に我々の研究室において得た遺伝子配列を基に作製した。

(4) 各魚種における LH1 および 2 の mRNA 発現解析: EF-1 を内部標準遺伝子として定量的リアルタイム PCR 法により、コイ、マアナゴ、ヒラメおよびトラフグの組織における LH1 および 2 の mRNA 発現量を検討した。

(5) 各魚種の組織における酢酸溶解性の測定: 操作は全て 4 の低温下で行った。回収した各組織を 0.1M NaOH 中で攪拌し、非コラーゲン性タンパク質を除去した。水洗した残渣を 0.5M 酢酸に懸濁させ、酸可溶性コラーゲン (ASC) を調製した。その後、水洗した残渣を熱水抽出により不溶性コラーゲン (ISC) を調製した。アミノ酸分析: PITC 誘導体化法により ASC および ISC のアミノ酸組成分析を行った。また、アミノ酸組成を基に、コラーゲン中のヒドロキシプロリン含量からコラーゲン係数を算出した。

(6) コラーゲン含量の測定: ASC および ISC のヒドロキシプロリン含量を測定し、コラーゲン係数を乗じてコラーゲン量を算出した。

(7) コラーゲン溶解率の算出: ASC および ISC のコラーゲン含量より、次の式でコラーゲン溶解率を示した。溶解率 (%) = ASC / (ASC+ISC) × 100

4. 研究成果

(1) 各魚種における LH1 および 2 の mRNA 発現解析: 定量的リアルタイム PCR の結果、全ての魚種 (マアナゴ、トラフグおよびコイ) の組織 (普通筋および皮) において、

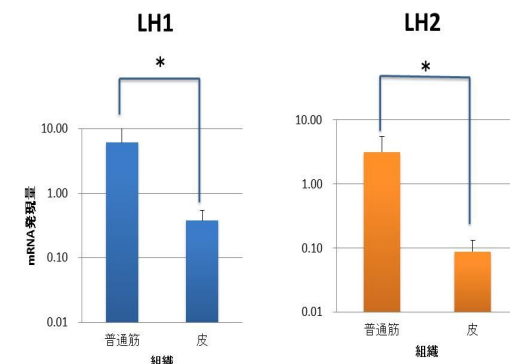


図1 マアナゴ普通筋および皮におけるLH1・LH2 mRNA発現量

LH1 および LH2 mRNA の発現が確認された。マアナゴ LH1 および LH2 の mRNA 発現量は、普通筋に対して皮で有意に少なかった (図 1)。

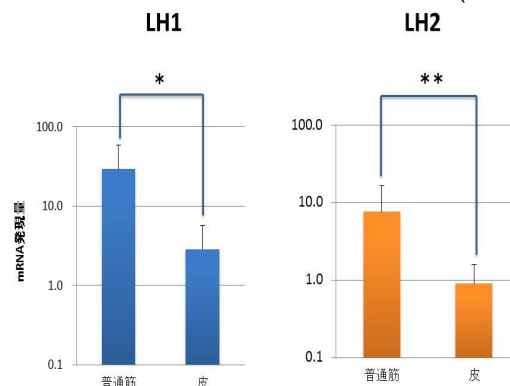


図2 トラフグ普通筋および皮におけるLH1・LH2 mRNA発現量

また、トラフグ LH1 および LH2 の mRNA 発現量は、普通筋に対して皮で有意に少なかった (図 2)。コイ LH2 の発現量については、普通筋に対して皮において有意に少なかったが、一方で LH1 については有意な差が認められなかった (図 3)。

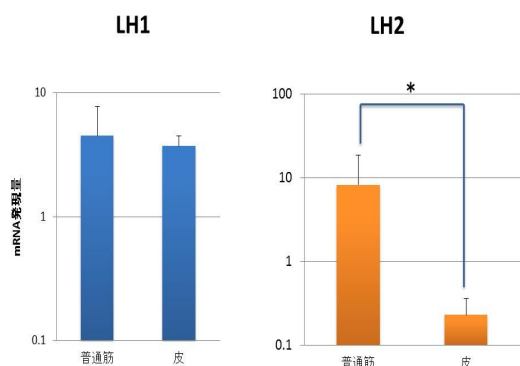


図3 コイ普通筋および皮におけるLH1・LH2 mRNA発現量

(2) コラーゲン含有率および酢酸溶解率：マアナゴの普通筋を除く実験に供した全ての魚種の組織について、ASC に対して ISC のコラーゲン含有率が低かった (表 1)。また、マアナゴ、コイおよびヒラメの普通筋由来コラーゲンの酢酸溶解率は、魚種間に顕著な差がみられたが、一方で、皮由来コラーゲンの酢酸溶解率は、魚種間に有意な差が認められなかった (表 1)。ヒラメは、普通筋に対して

表1 普通筋および皮由来ASCおよびISCにおけるコラーゲン含有率および酢酸溶解率

魚種	組織	湿重量あたりのコラーゲン(%)			酢酸溶解率 (%)
		ASC	ISC	Total	
マアナゴ	普通筋	0.47±0.29	0.90±0.49	1.37±1.10	34.3
	皮	8.68±1.30	0.80±0.56	9.78±1.02	88.7
コイ	普通筋	0.30±0.40	0.25±0.09	0.55±0.31	55.2
	皮	8.64±3.05	0.59±0.76	9.23±2.33	93.6
ヒラメ	普通筋	1.31±0.81	0.32±0.25	1.63±1.05	80.3
	皮	8.08±4.58	2.64±0.68	10.72±3.95	75.4

皮由来コラーゲンの酢酸溶解率が低かったが、一方で、マアナゴおよびコイは、普通筋に対して皮の方が高かった (表 1)。

以上の結果より、コラーゲンの酢酸溶解率が低い組織において、LH2 の発現量が低いことが明らかとなった。従って、LH2 の mRNA 発現量の違いが組織コラーゲンの酢酸溶解率の変化に関与している可能性が示唆された。

## 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 3 件)

W. Yamagishi, M. Hosoi, S. Mizuta and Y. Yokoyama. (2012) Structure and expression of lysyl hydroxylase in carp and conger eel.

*Proceedings of 14<sup>TH</sup> International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources*, 2012; p56-57.

Hiroshi Tsukamoto, Yoshihiro Yokoyama, Tohru Suzuki, Shoshi Mizuta, Reiji Yoshinaka and Yoshiaki Akahane (2013) : Cloning and expression of cDNA encoding lysyl hydroxylase 1, 2 and 3 in tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 166, 123-132.

Hiroshi Tsukamoto, Yoshihiro Yokoyama, Tohru Suzuki, Shoshi Mizuta, Reiji Yoshinaka and Yoshiaki Akahane (2013) Isolation of collagen from tiger pufferfish parts and its solubility in dilute acetic acid. *Fish. Sci.*, 79, 857-864.

[学会発表](計 5 件)

山岸和希子・細井公富・水田尚志・横山芳博：アナゴリジルヒドロキシラーゼ 1、2 および 3 の断片クローニング，平成 24 年度日本水産学会秋季大会，下関，水産大学校(2012 年 9 月)

山岸和希子・細井公富・水田尚志・横山芳博：マアナゴリジルヒドロキシラーゼ(LH1、2 および 3)の cDNA クローニングと発現解析、第 5 回 北陸合同バイオシンポジウム、福井、福井県民ホール (2012 年 11 月 2、3 日)

W. Yamagishi, M. Hosoi, S. Mizuta, Y. Yokoyama: Structure and expression of lysyl hydroxylase in carp and conger eel. 14<sup>TH</sup> International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources. Fukui, Japan, 2012.11.

横山芳博・山岸和希子・細井公富・水田尚志・鈴木徹：コイおよびマアナゴ組織におけるリジルヒドロキシラーゼの発現、第 6 回 北陸合同バイオシンポジウム、七尾、2013 年 11 月 7-8 日

横山芳博・山岸和希子・細井公富・水田尚志・鈴木徹：数種魚類における各 LH 分子種の発現とコラーゲンの酸溶解性 第 7 回 北陸合同バイオシンポジウム、富山、

八尾ゆめの森ゆうゆう館 (2014年11月  
28-29日)平成26年11月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

横山 芳博(YOKOYAMA, Yoshihiro)  
福井県立大学・海洋生物資源学部・教授  
研究者番号：90291814

##### (2)研究分担者

細井 公富(HOSOI, Masatomi)  
福井県立大学・海洋生物資源学部・講師  
研究者番号：70410967

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：