

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：42681

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00906

研究課題名(和文) タンパク質加水分解物摂取後のヒト血液からの環状ペプチド検出

研究課題名(英文) detection of cyclic peptide from human blood after oral ingestion of protein hydrolysate

研究代表者

重村 泰毅 (Shigemura, Yasutaka)

東京家政大学短期大学部・短期大学部・准教授

研究者番号：20373178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンペプチド摂取後のヒト血漿と尿から、ヒドロキシプロリン(Hyp)を含む食事由来環状ペプチドを検出することができた。これらHypを含む食事由来環状の主要成分としては環状Pro-Hypであることが分かり、LC-MSを使用して濃度を算出した。環状Pro-Hypはコラーゲンペプチド摂取後に血漿と尿中で有意に増加し、それぞれ1時間と2時間後に最大値に到達した。それら最大濃度は、血漿中と尿中でクレアチニンあたり10.1と2.32mmol/molであった。それらは、血漿中と尿中で鎖状Pro-Hypの5と2%に相当する値であった。7 nmol/mLの環状Pro-Hypは皮膚線維芽細胞の増殖を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで食品中に環状ペプチドが存在することは知られていなかった。本研究では食品ペプチド摂取後に、それらが血中に吸収されて尿へと排出されることを初めて明らかにした。医薬品として環状ペプチドが流通しているが、食品としても機能性が明らかになれば食品への新たな付加価値の寄与に貢献が可能となる。また本研究から、摂取後に体内で食事由来環状ペプチドの濃度が増加し、被験者間で体内での食事由来環状ペプチド吸収もしくは形成が異なる可能性について見出した。これが環状ペプチドの機能性の個人差を及ぼすことも推測される。本成果から、今後の研究推進によって学術面だけでなく、健康寿命延伸に貢献できる社会的貢献にも大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrates the presence of a novel food-derived collagen peptide, cyclic Hydroxyproline containing (Hyp) peptides, in human blood and urine from 5 subjects after the ingestion of collagen hydrolysate. Among the peptides, cyclic Pro-Hyp was identified as major components and levels of that in plasma and urine samples were estimated by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). Cyclic Pro-Hyp levels significantly increased in the plasma and urine after ingestion of collagen hydrolysate, reaching T max at 1.20 h and 2.00 h respectively. The maximum levels of cyclic Pro-Hyp in plasma and urine were 10.1 and 2.32 (mmol/mol Creatinine), representing approximately 5 and 2 % of linear Pro-Hyp in plasma and urine after ingestion of collagen hydrolysate respectively. Addition of cyclic Pro-Hyp in medium at 7 nmol/mL significantly enhanced the growth rate of mouse skin fibroblasts on collagen gel more extensively compared to linear Pro-Hyp.

研究分野：食品機能学

キーワード：コラーゲン 環状ペプチド ヒドロキシプロリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品に含まれるタンパク質とその加水分解物(ペプチド)は、味だけでなく体調調節機能も有し、近年その効果に注目が集まっている。特定保健用食品関与成分として認められている、イワシ筋肉ペプチドには血圧上昇抑制作用があり、またリン脂質結合大豆ペプチドには血中コレステロール上昇抑制効果が認められている。近年、コラーゲンやエラスチン加水分解物においても、摂取後に肌や関節の状態が改善すると多くの人臨床試験結果として報告されている。これまでに我々の研究グループは、コラーゲン、エラスチン、大豆加水分解物を摂取したヒト血液中へ吸収される低分子分解物を特定し、その生理活性について調べてきた(Shigemura et al. J. Agric. Food Chem.2009)。これら一連の研究から、加水分解物が摂取後に消化吸収過程を経て、血中へ吸収される低分子ペプチドが体調改善の有効成分であることを明らかとした(Shigemura et al. Food Chem.2011, Shigemura et al. J. Agric. Food Chem.2012, 2011 年度科研費研究課題)。これら加水分解物の中でも、コラーゲンとエラスチン加水分解物摂取後のヒト血液中では、**Pro-Hyp**(プロリルヒドロキシプロリン)と **Pro-Gly**(プロリルグリシン)がそれぞれ高濃度で吸収されることが明らかとなった。**Pro** や **Hyp** を含むジペプチドは、**N** 末端と **C** 末端が結合した環状ペプチドを容易に形成することが知られているが、それらが食事由来としてヒト血液中で検出された報告例は無い。

2. 研究の目的

医薬品であるが環状ペプチドの中でも環状 **Hyp-Ser** には、抗肝炎作用が認められているため、コラーゲンやエラスチン摂取後のヒト血液中環状 **Pro-Hyp** や環状 **Pro-Gly** が検出されれば、体調改善作用機構の新たな解明の手掛かりとなり得る。研究代表者らは、これまでに標準 **Pro-Hyp** と **Pro-Gly** を含む数種合成鎖状ペプチドから環状ペプチドの生成に成功している。

本研究では、作成した環状ペプチドを標準として、本申請期間ではコラーゲンとエラスチン加水分解物摂取後のヒト血液それぞれにおいて、環状ペプチドが出現、またはその濃度が増加するかについて調べる。申請期間内でそれら検出が可能となれば、細胞を使用した生理活性の有無についても明らかにする。各年度計画通り成果が得られれば、タンパク質加水分解物摂取後に生じる環状ペプチドの体調改善作用機構が明らかになる

3. 研究の方法

実施方法：摂取・採血試験(本学大学院倫理委員会承認済)には、健康な被験者5名に試験に参加して頂いた。被験者には、前日から12時間絶食して頂いた後に、コラーゲンペプチド(体重60kgあたり4.5g)を摂取して頂いた。

摂取前、そして摂取から1, 2, 4時間後に採血を行い、採取した被験者血液から血漿を調製し、エタノールを添加する事で血漿からタンパク質を除去した。エタノール可溶性血漿画分を強陽イオン交換樹脂で処理した。

ここで、N末端が開放されている鎖状ペプチドは強陽イオン交換樹脂に吸着するが、N末端が封鎖された環状ペプチドは吸着しない。これは合成ペプチドを用いた予備試験で実施・確認済みである(図1)。得られたヒト血漿を強陽イオン交換樹脂未吸着画分から、合成した環状ペプチドを標準として、逆相HPLCによる環状Pro-Hypの分離を行った。

HPLCによって分離・溶出された環状Pro-Hyp画分は、回収後に加水分解した。加水分解処理によって環状ペプチドはアミノ酸へ分解するため、アミノ酸分析でProとHyp濃度を測定した。ここで、コラーゲン加水分解物摂取前後の回収血漿画分中ProとHyp濃度が増加していれば、摂取後ヒト血液中での食事由来環状Pro-Hypの存在が確認できる。さらに、HPLCから分離・回収した画分中の環状Pro-Hyp濃度をLC-MSによって測定する事で、ヒト血中環状Pro-Hyp濃度の定量が可能である。

この手法から、コラーゲンペプチド摂取後の血中で環状Pro-Hypの存在と濃度増加を確認することが可能であるが、定量はできない。この環状ペプチド濃度を測定するためには、標準として使用する同ペプチド調製が必要である。鎖状Pro-Hypは、アルカリ性条件下で50℃で一晩加熱すると、環状形成する事が報告されている。同様の手法から、0.02Mアンモニアに鎖状Pro-Hypを溶解して50℃で一晩加熱した。加熱前後の試料から、ODS-3(ジーエルサイエンス)を装着したHPLC、そして溶離液に0.01%TFAと60%アセ

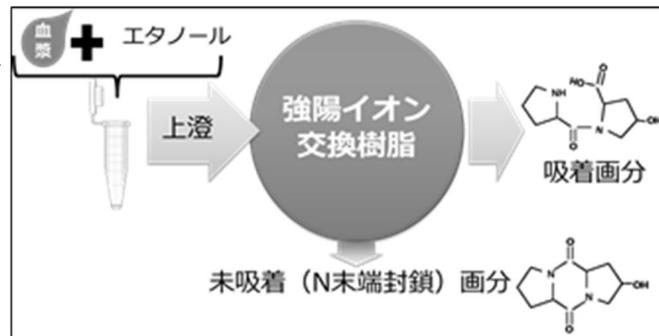


図1. 強陽イオン交換樹脂による環状ペプチド分離

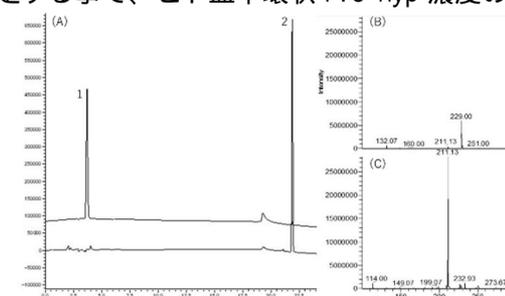


図2. アルカリ性条件下で加熱前後の鎖状Pro-HypのHPLC分離(A)とMS分析(B&C)

ト

ニトリルを流速 1.0mL/min で使用して鎖状型と環状型の Pro-Hyp を分離し、214nm で検出した。その結果、加熱前の鎖状 Pro-Hyp (図 2) とは異なる溶出時間にピーク (図 2(A)2) が検出され、これが環状ペプチドであると推察されたため、それぞれのピークを分取後に質量分析 (MS) によってその分子量を測定した。その結果、予想通り鎖状 Pro-Hyp からは 229.00 m/z が検出され (図 2(B))、図 2(A) のピーク 2 から鎖状 Pro-Hyp から脱水した 211.13 m/z が検出された (図 2(C))。この結果から、加熱後の試料が環状 Pro-Hyp である事が確認できた。

4. 研究成果

ヒト血漿からの環状 Pro-Hyp 検出と定量

分析の結果、血漿中環状ペプチド画分の Hyp と Pro のピークが、摂取前に比べて摂取 1 時間後と 2 時間後に増加していることがクロマトグラムより明らかとなった (図 3)。

次に、調製した環状 Pro-Hyp と鎖状 Pro-Hyp を標準ペプチドとして、血漿試料中の両ペプチド濃度を LC-MS を使用して測定した。鎖状 Pro-Hyp は AccQ で誘導化後に分析を行った。LC-MS の LC 条件は、ODS-3 カラムを装着した LC-MS2020 (島津 Prominence LC-20 シリーズ) そして溶離液に 0.01% TFA と 100% アセトニトリルを流速 0.2mL/min で使用し、254nm で UV 検出を行った。MS 分析の条件は、ネブライザーガス流量とドライガス流量をそれぞれ 1.5 L/min と 15 L/min、ESI 電圧を 1.8 kV、250 に設定し、各標準ペプチドから検出された m/z を選択イオン検出 (SIM) モードに設定し検出を行った。

図 4 に示す通り、各被験者の血漿中環状 Pro-Hyp 濃度はコラーゲンペプチド摂取後に増加し、2 時間後に最大濃度に達した。コラーゲンペプチド摂取後にヒト血漿で増加する鎖状 Pro-Hyp の濃度は、被験者によって個人差を示すことが過去に報告されており、環状 Pro-Hyp も同様に最大濃度が 0.1413-0.3443 nmol/mL と被験者間で大きな差が見られた。またその濃度は 4 時間後以降には摂取前と同程度の濃度まで減少した。さらに同試料中の鎖状 Pro-Hyp の被験者平均濃度を測定し、環状 Pro-Hyp の濃度と比較した結果、両ペプチドとも 2 時間に最大値に到達するパターンは類似していたが、環状 Pro-Hyp 濃度は鎖状型のわずか 5%程度であった。

また同様の手法から、エラスチンペプチド摂取後のヒト血漿からの環状 Pro-Hyp の検出を試みたが、検出されなかった。この結果から、摂取後のペプチドは体内の消化過程でペプチド結合の切断を受ける際にジペプチドの環状化が生じ、Pro-Gly は Pro-Hyp に比べて環状形成率が低く、検出が困難であった可能性も考えられる。

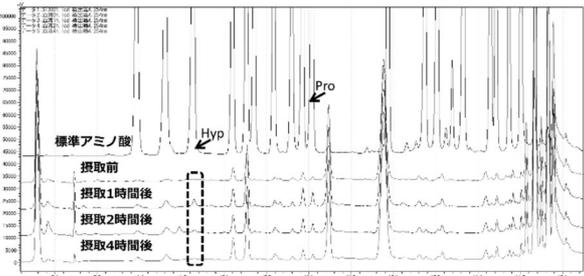


図 3. AG50 未吸着血漿画分加水分解後のアミノ酸分析

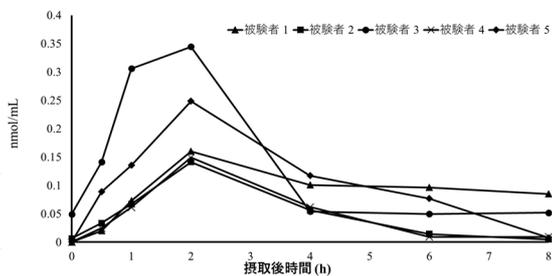


図 4. 各被験者血漿中環状 Pro-Hyp の濃度変化

同一被験者からの血漿中と尿中环状 Pro-Hyp 濃度の定量

上記成果から吸収された環状 Pro-Hyp の排出についても調べるため、コラーゲンペプチド摂取後の同一ヒト被験者血漿と尿から、ヒドロキシプロリン (Hyp) を含む食事由来環状ペプチドの検出を試みた。その結果、これら Hyp を含む食事由来環状の主要成分としては環状 Pro-Hyp であることが分かり、LC-MS を使用して濃度を算出した。環状 Pro-Hyp はコラーゲンペプチド摂取後に血漿と尿中で有意に増加し、それぞれ 1 時間後と 2 時間後に最大値に到達した。それら最大濃度は、血漿中と尿中でクレアチニンあたり 10.1 と 2.32mmol/mol であった。それらは、血漿中と尿中で鎖状 Pro-Hyp の 5 と 2%に相当する値であった。7 nmol/mL の環状 Pro-Hyp は皮膚線維芽細胞の増殖を促進した。

本研究成果から、初めて食事由来の環状ペプチドがヒト血中から検出された。一方で、この環状 Pro-Hyp は、どのような経路で血中移行したかという疑問が生じる。動物へ経口投与した後に環状 Hyp ペプチドが小腸のペプチドトランスポーター (PEPT1) を通過することが報告されていることから、鎖状ペプチドと同じ経路で吸収されているであろう。血清アルブミンを DPP- で酵素処理を行うと、環状 Asp-Ala が増加する。さらにショウガ酵素によってコラーゲンペプチドを分解すると環状 Hyp ペプチドが増加することも報告されている。この報告や、発酵食品に環状ペプチドが含まれることから、酵素によるタンパク質・ペプチド分解から環状ペプチドが生成すると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasutaka Shigemura, Yu Iwasaki, Mana Tateno, Asahi Suzuki, Mihoko Kurokawa, Yoshio Sato, Kenji Sato	4. 巻 10(10)
2. 論文標題 A Pilot Study for the Detection of Cyclic Prolyl-Hydroxyproline (Pro-Hyp) in Human Blood after Ingestion of Collagen Hydrolysate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1356-1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu10101356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 重村泰毅 岩崎優	4. 巻 64(1)
2. 論文標題 コラーゲンペプチド摂取後のHypペプチド血中移行	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 皮革科学	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigemura Y, Suzuki A, Kurokawa M, Sato Y, Sato K.	4. 巻 98(5)
2. 論文標題 Changes in composition and content of food-derived peptide in human blood after daily ingestion of collagen hydrolysate for 4 weeks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Sci Food Agric.	6. 最初と最後の頁 1944-1950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsfa.8677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yuki Taga*, Yu Iwasaki, Yasutaka Shigemura, and Kazunori Mizuno	4. 巻 67(16)
2. 論文標題 Improved in Vivo Tracking of Orally Administered Collagen Hydrolysate Using Stable Isotope Labeling and LC-MS Techniques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 4671-4678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b00571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomoko T. Asai; Kazunobu Yoshikawa; Kazuhiro Sawada; Kazuna Fukamizu; Yoh-ichi Koyama; Yasutaka Shigemura; Shiro Jimi; Kenji Sato	4. 巻 66
2. 論文標題 Mouse skin fibroblasts with mesenchymal stem cell marker p75 neurotrophin receptor proliferate in response to prolyl-hydroxyproline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods Volume 66, March 2020, 103792	6. 最初と最後の頁 103792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2020.103792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 重村 泰毅、岩崎優、鈴木 朝日	4. 巻 39(4),
2. 論文標題 コラーゲンペプチド摂取後のヒト血中からの環状Pro-Hypの検出	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 食品加工技術	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 6件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yasutaka Shigemura, Yuki Taga, Yu Iwasaki, Yoshio Sato, Kenji Sato
2. 発表標題 Detection of cyclic hydroxyproline-containing peptides in human plasma and urine after oral ingestion of collagen hydrolysate
3. 学会等名 ISNFF2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasutaka Shigemura, Kenji Sato
2. 発表標題 Occurrence of cyclic peptides in human blood after collagen hydrolysate ingestion
3. 学会等名 AOCS 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重村泰毅・石渡加奈子・折戸美月・青木里紗・佐藤吉朗
2. 発表標題 コラーゲン加水分解物摂取後にヒト血漿中および尿中へ移行したヒドロキシプロリンペプチド濃度の変化
3. 学会等名 第71回 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasutaka Shigemura, Kanko Ishiwata, Mistuki Orito, Risa Aoki, Yoshio Sato, Kenji Sato
2. 発表標題 Detection of food-derived Hydroxyproline peptides in human urine after ingestion of collagen hydrollysate
3. 学会等名 ISNFF2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重村泰毅
2. 発表標題 コラーゲンペプチド摂取後にヒト血中および尿中へ移行するHypペプチド
3. 学会等名 第71回日本栄養食糧学会大会 関連学術集 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重村泰毅
2. 発表標題 コラーゲンペプチド摂取後の有効成分の吸収とその評価
3. 学会等名 兵庫県バイオポリマー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasutaka Shigemura, Yuki Taga, Yu Iwasaki
2. 発表標題 Effects of yogurt fermentation on absorption of food-derived collagen peptides in human blood
3. 学会等名 ICoFF2019/ ISNFF2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重村泰毅 野口未歩 三好都貴 岩崎優
2. 発表標題 ゼラチンとコラーゲンペプチド摂取後の血中ペプチド移行比較 -低分子信仰への挑戦-
3. 学会等名 第16回ファンクショナルフード学会 学術集会
4. 発表年 2020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