

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660104

研究課題名(和文)水酸化プロリン異性体，誘導体の栄養生理学的解析

研究課題名(英文)Nutritional and physiological analysis of derivative of hydroxyproline

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) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コラーゲンを構成するアミノ酸である水酸化プロリンに注目し、その誘導体や誘導体を含む低分子ペプチドに特殊な生理機能がないか検討した。水酸基数が通常より多いジヒドロキシプロリン、および水酸化プロリンを脱水した構造をN末端に有するトリペプチドの生理活性評価を行った。これらの分子について生化学的評価を行ったところ、ジヒドロキシプロリンには脂質過酸化を抑制する活性が認められた。またピロールカルボン酸構造をアミノ末端に持つトリペプチドにも同程度の抗酸化活性が認められた。以上の結果より、新たな抗酸化ペプチドや線維症などの疾病の早期診断マーカーの開発に向けて有効な情報が提出できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have analyzed the physiological function of derivatives of hydroxyproline, a major amino acid in collagen. We have prepared di-hydroxyproline, which is synthesized by hydration of hydroxyproline. We also prepared derivative of tri-peptide, which is synthesized by the dehydration of hydroxyprolyl-glycyl-proline, whose amino acid sequence is most frequently appeared in type 1 collagen. We carried out biochemical evaluation of these compounds especially with respect to anti-oxidative activity and toxicity to cancer cells. The results have shown that di-hydroxyproline have significant anti-oxidative activity which is evident by suppressing oxidation of linoleic acid. Also, novel tri-peptide have shown anti-oxidative activity. Together, we this study have shown the novel anti-oxidative reagent and potential diagnostic marker to fibrotic diseases.

研究分野：生物化学

キーワード：コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、コラーゲンを構成するアミノ酸である水酸化プロリン (Hyp) に注目した。コラーゲンは動物体内に存在する量が最大のタンパク質であるが、皮膚や骨といった非可食部に存在するため、食肉加工過程で大部分が廃棄されている現状があった。一方で、その熱変性物であるゼラチンはゲル化する特性を持つため、写真や食品の素材として古くより利用されてきた経緯がある。しかし、コラーゲンのアミノ酸バランスには偏りがあり、そのためアミノ酸スコアが極めて低く、栄養的な価値は低いとみられていた。近年、このコラーゲンに着目し、ペプチド化したものがサプリメントとして広く販売されており、肌や骨の機能改善効果が報告され始めていたのが、研究当初の背景となる。

## 2. 研究の目的

コラーゲンは、ビタミン C の還元力を利用する形で合成されるため、直接的あるいは非直接的に物質を還元する性質を有する化合物と考えられる。コラーゲンそのものに関してこのような面に着目した研究は少ないが、分解物中にある程度の抗酸化活性が存在することは一部報告されてきた。合わせて、本研究の先行研究において、水酸化プロリンに抗酸化活性が存在すること、そして、このアミノ酸が N 末端に存在することが、ペプチドに強い抗酸化活性を与えることを見出していた。これを受け、本研究ではさらに強い抗酸化活性を期待し、水酸化プロリンにさらに一つ水酸基を導入した di-hydroxyproline を合成し、生理活性を明らかにすることを主目的とした。また、同時に先行研究で明らかになっていた、コラーゲン配列中にもっとも多く含まれる反復配列である hydroxyprolyl-glycyl-proline (OGP) の抗酸化活性に注目し、この N 末

端部分を脱水した誘導体などを合成し、その生理活性を明らかにすることも目的の一つとした。

## 3. 研究の方法

有機合成により、水酸化プロリンに水酸基をさらにひとつ導入した、di-hydroxyproline を調整する。さらに OGP のアミノ末端の hydroxyproline に対して、脱水を行った化合物やさらに酸化を進めた化合物の合成をおこなう。これらの化合物に対して、サイクリックボルタンメトリー、ABTS ラジカル補足アッセイ、脂質酸化抑制アッセイなどの生化学的な抗酸化活性測定系で機能性を評価する。

## 4. 研究成果

本研究では、コラーゲンを構成するアミノ酸である水酸化プロリン (Hyp) に注目し、その誘導体や誘導体を含む低分子ペプチドに特殊な生理機能がないか検討した。研究開始年度は、おもに誘導体やペプチドの有機合成に注力し、最終年度となる今年度は、合成した化合物の生化学的な活性の評価に重点的に行った。昨年度までに合成されたアミノ酸は、Hyp に対して、さらに水酸基が導入された di-Hyp である。di-Hyp は一部の珪藻の構造タンパク質の構成アミノ酸となっていることが報告されているが、我々の知る限りそれ以外の生理機能の報告はない。また合成されたペプチドは、Hydroxyprolyl-glycyl-proline (OGP) をリード化合物として、その N 末端の Hyp 部分を脱水した化合物 (化合物 A) さらに脱水素を進めた化合物 (化合物 B) である。OGP は我々の先行研究により、強い抗酸化活性を有することが明らかになっているが、化合物 A, B は新規であり、その生理活性等はまったく不明である。di-Hyp に関しては、まずサイクリックボルタンメトリーによる

電気化学的な解析をおこなった。この解析においては、活性測定をする際の pH を弱酸性 (pH6) から弱塩基性 (pH8) の範囲において複数条件下で検討した。いずれの pH においても、Hyp は電圧値 1.5V 以下の領域で電子の放出が認められ、一般的に電子の授受が容易なアミノ酸と同等の酸化還元能があると思われた。一方期待に反し、di-Hyp はいずれの pH においても電子の放出は認められず、酸化還元能は必ずしも高くないと考えられた。また、安定ラジカルである ABTS を用いて、ラジカル補足能を検定したが、これも Hyp に比べ、特に強い活性を認められなかった。しかし一方で、リノレン酸を用い脂質の過酸化を抑制する検定を行ったところ、di-Hyp には、Hyp に比べても強い活性が認められた。以上より、生理的な生体物質の酸化現象にたいしては、このアミノ酸は極めて抑制効果が高く、将来的な抗酸化サプリメントの原料として有効である可能性が示された。この結果は水酸基が二つ存在することによって考えられ、酸化後の化合物の構造解析を行うことで、抗酸化活性とその応用利用について、今後より具体的な情報が得られると考えられる。また、従来研究により強い抗酸化活性が認められていたトリペプチド (OGP:hydroxyprolyl-glycyl-proline) のアミノ末端を脱水した誘導体型のペプチド (化合物 A) にも一定の抗酸化活性が認められた。現在、その活性強度を再度詳細に検討中であるが、化合物 A や B に至る経路が OGP の酸化パスウェイである場合、新規化合物は酸化後の代謝物として、コラーゲンの変性が主因となる線維症などの疾病マーカーになり得る。また、化合物 A に認められる抗酸化活性やその半減期が十分な強度を有している場合、新規の抗酸化サプリメントとしての可能性が強く示唆される。また、これらの化合物の一部はヒト由来の

正常細胞に添加しても毒性を示さないことも明らかになった。しかし、癌細胞 (メラノーマ皮膚がん細胞) に添加した場合でも大きな、増殖抑制等は認められず、皮膚がんに対する抗がん作用は明らかにできなかった。以上の結果のうち一部は現在論文を作成中であるが、2016 年日本農芸化学会大会において、トピックス賞を受賞するにいたった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

コラーゲンペプチド酸化体の化学合成と生理活性評価、三井美彩、三田千鶴、木村駿介、寺内達彦、燕山由己人、二瓶賢一

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hp/deptj/chemj/seimei\\_hp/index\\_seimei.htm](http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hp/deptj/chemj/seimei_hp/index_seimei.htm)  
|

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

燕山由己人 (KABUYAMA, Yukihito)  
宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：20285042

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

二瓶賢一 (NIHEI, Kenichi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：10307209