

# 魚類 I 型コラーゲンに関する研究

河村幸雄・田中照佳

(利用・安全グループ)

近畿大学大学院農学研究科

我々は、クロマグロ廃棄物である皮由来のコラーゲンに注目し、肝機能保護作用について検討中である。その過程において抽出したコラーゲンは精製し、品質評価しなければならない。これまで抽出したコラーゲンは、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによって評価してきたが、抽出したコラーゲンを定量する簡便な方法は確立されていなかった。

また、魚コラーゲンを含有した食品を目にする機会が増えているが、これらの増加に伴う魚コラーゲンアレルギー患者も増加すると考えられる。経験的に、魚コラーゲン患者において魚種間では交差するが、他の動物との反応は示さないことが知られているが、その詳細は不明である。さらに、水産養殖においてクロマグロの皮は弱いことが知られているが、その解明はされておらず、魚の I 型コラーゲンの一次構造についてもほとんど知られていない。したがって、水産養殖において魚種間のコラーゲンの構造的差異およびクロマグロ I 型コラーゲンの一次構造を検討することは重要である。

そこで、抽出・精製したコラーゲンを定量するため、市販されているサーモン I 型コラーゲンに対する抗体を作製し、ELISA によるアッセイ系の構築を試みた。また、魚種間での生物学的多様性を検討する目的で、様々な魚から抽出したコラーゲンを比較定量した。

## 材料と方法

**試薬** サーモンコラーゲンは Wako より購入した。これを用い、モルモットで抗体を作製した。得られた抗血清は、IgG 精製した。また、この抗体を HRP 標識するためを用いた。仔ウシコラーゲンは、Calbiochem より購入した。ブタおよびニワトリコラーゲンは、ニッピから入手した。

**コラーゲンの抽出** 魚(マグロ、ビワマス、ギンブナ、アユ、ハモ、ヒラメ、シロカレイ、アカエイ、スケソウダラ、サンマ、マイワシ、マダイ、イシダイ)の皮を約 3cm に切り、メタノール/クロロホルム (2:3) で脱脂した。メタノールと水で洗浄後、0.5M 酢酸中でホモジナイズした。その後、ペプシン(7μg/L)を加え、攪拌後、5% NaCl で塩析した。5,000g で 30 分遠心分離し、沈殿を 0.5M 酢酸に溶かした。再び遠心分離(100,000g, 60 分)し、上清を 5 日間透析した。その後、凍結乾燥し、魚コラーゲンのサンプルとした。

**直接 ELISA** 抽出した魚コラーゲンを PBS で希釈(1-10000ng/ml)して、ELISA プレートに 100μl ずつ分注し、4°C で一晩放置した。ブロッキング後、HRP 標識サーモンコラーゲン抗体(PBS で 1000 倍希釈)を 100μl ずつ加え、室温で 1 時間放置した。PBST で洗浄後、TMB 試薬を 100μl 加え、その後 1M リン酸 100μl を加えて反応を止めた。

Wallac Arvo SX を用い、波長 450nm における吸光度を測定した。

**サンドイッチ ELISA** サーマンコラーゲン抗体を PBS で希釈 (10 $\mu$ g/ml) して、ELISA プレートに 100 $\mu$ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。ブロッキング後、魚コラーゲンを PBS で希釈 (1-10000ng/ml) して、ELISA プレートに 100 $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間放置した。PBST で洗浄後、HRP 標識サーモンコラーゲン抗体 (PBS で 1000 倍希釈) を 100 $\mu$ l ずつ加え、室温で 1 時間放置した。PBST で洗浄後、TMB 試薬を 100 $\mu$ l 加え、その後 1M リン酸 100 $\mu$ l を加えて反応を止め、波長 450nm における吸光度を測定した。

**阻害 ELISA** サーマンコラーゲンを PBS で希釈 (10 $\mu$ g/ml) して、ELISA プレートに 100 $\mu$ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。ブロッキング後、HRP 標識サーモンコラーゲン抗体 (PBS で 1000 倍希釈) と抽出した魚コラーゲンを PBS で希釈 (1-10000ng/ml) を 200 $\mu$ l ずつ混合し、ELISA プレートに 200 $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間放置した。PBST で洗浄後、TMB 試薬を 100 $\mu$ l 加え、その後 1M リン酸 100 $\mu$ l を加えて反応を止め、波長 450nm における吸光度を測定した。

## 結果と考察

構築した直接 ELISA、サンドイッチ ELISA、阻害 ELISA の定量範囲は共に 30-3000nM で、比較的高感度なアッセイ系であることが示された。

構築した直接 ELISA を用いての魚種間での反応性の違いは、Fig.1 に示された。淡水魚でサーモンに比較的近い種であるビワマス、ギンブナ、

アユは非常によく交差反応した(A)。ハモ、ヒラメ、スケソウダラも比較的よい反応性を示した(B,C)。サーモンコラーゲン抗体とクロマグロコラーゲンの反応性は、同じスズキ目の魚であるマダイ、イシダイと同等またはそれ以下の反応性しか示さなかった。また、他の動物種である仔ウシ、ブタ、ニワトリとほぼ同じ反応性であった。しかし、直接 ELISA は定量するコラーゲンを直接 ELISA プレートに吸着させるため、サンプルのコーティング率が異なる可能性がある。そこで、サンドイッチ ELISA および阻害 ELISA にて、魚種間における反応性を検討した。

構築したサンドイッチ ELISA を用いての魚種間での反応性の違いを Fig.2 に示した。サーモン、ビワマス、ギンブナ、アカエイ、クロマグロの反応しか示していないが、直接 ELISA で反応が最もよかったビワマスは、予想通り最もよい反応を示した。ギンブナ、アユ、ヒラメ、スケソウダラなども若干反応した。しかし、その他の魚ではほとんど反応しなかった。したがって、構築したサンドイッチ ELISA では、サーモンと近い種の魚の定量に適するが、遠い種の魚では認識エピトープが1つしかないため定量に適さないことが示された。

構築した阻害 ELISA の結果は、Fig.3 に示した。サンドイッチ ELISA の時と同様にサーモン、ビワマス、ギンブナ、アカエイ、クロマグロの反応しか示していないが、直接 ELISA の結果とほぼ同様の結果が得られた。

これら構築した ELISA で抽出したコラーゲンの反応性を比較検討した結果、淡水魚でサーモンとよく似た一次構造を持っていると考えられる魚 (ビワマス、ギンブナ、アユ) は、よく交差反応することが示された。これら 3 つの ELISA 系において、サーモンと同じサケ目であるビワマスは、今回抽

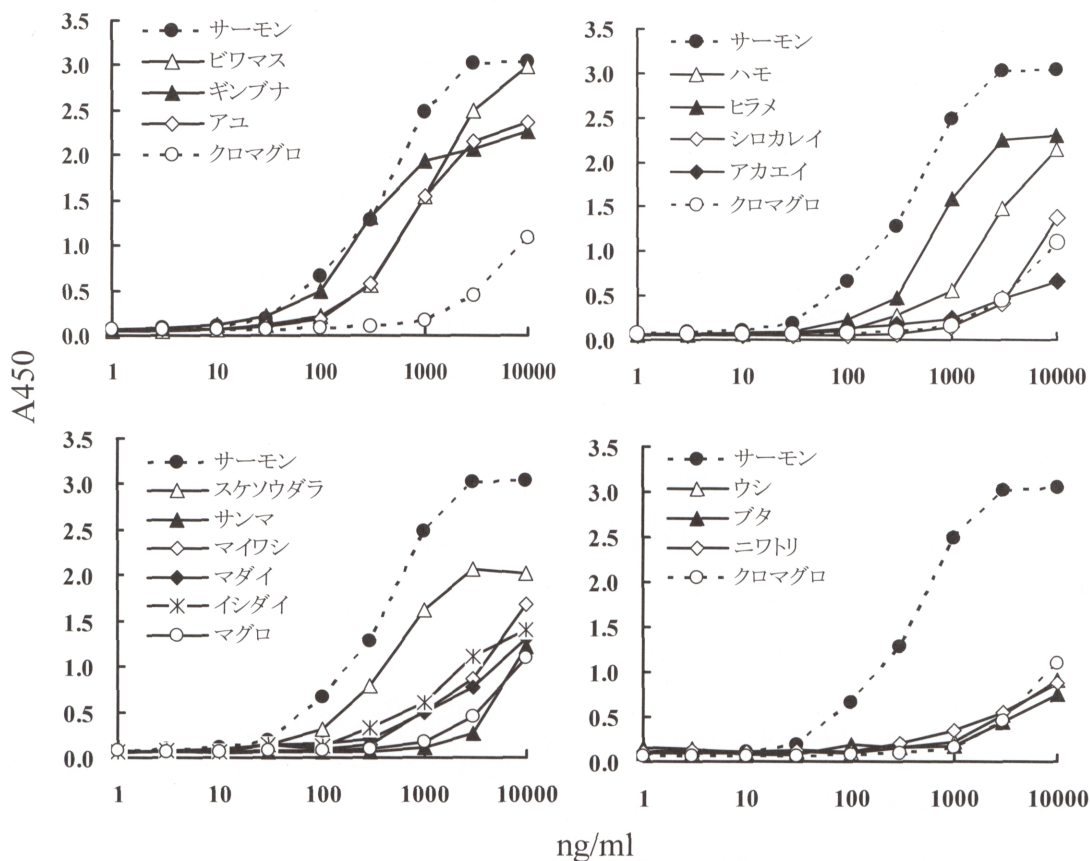


Fig.1 直接 ELISA による定量の検討

出を行った魚の中では最もよい反応であった。したがって、ビワマス I 型コラーゲンの一次構造は、サーモン I 型コラーゲンの一次構造と非常に類似していることが示唆された。軟体魚類であるアカエイや他の動物種では、交差反応性は乏しかった。このことから、サーモンコラーゲンとアカエイや他の動物種のコラーゲンの一次構造のホモロジーは低いことが示唆された。実際、配列が決定されている魚類(ゼブラフィッシュなど)と哺乳動物(マウスなど)を比較すると、C 末端および N 末端部分の配列の相同性は高いが、アテロコラーゲンの配列の相同性は高くない。

クロマグロコラーゲンのサーモン I 型コラーゲン抗体との反応性は、同じスズキ目のマダイ、インダイと比べて少し弱く、仔ウシ、ブタ、ニワトリと同等であった。したがって、クロマグロ I 型コラーゲン

の一次構造は、スズキ目の中でも特徴的な構造を持つてのかもしれない。

今後は、クロマグロ I 型コラーゲンのクローニングを検討する予定である。また、魚コラーゲンアレルギー患者 IgE の入手を計画しており、入手できた際には、今回抽出した様々なコラーゲンとの反応性を検討する予定である。

## 参考文献

- 1) S. Yunoki et al. Stabilization of low denaturation temperature collagen from fish by physical cross-linking methods. *J Biosci Bioeng.*, **96**, 575-577 (2003).
- 2) 森山達哉. バイオ実験で失敗しない! 検出と定量のコツ (森山達哉編), 羊土社, 東京, pp. (年).

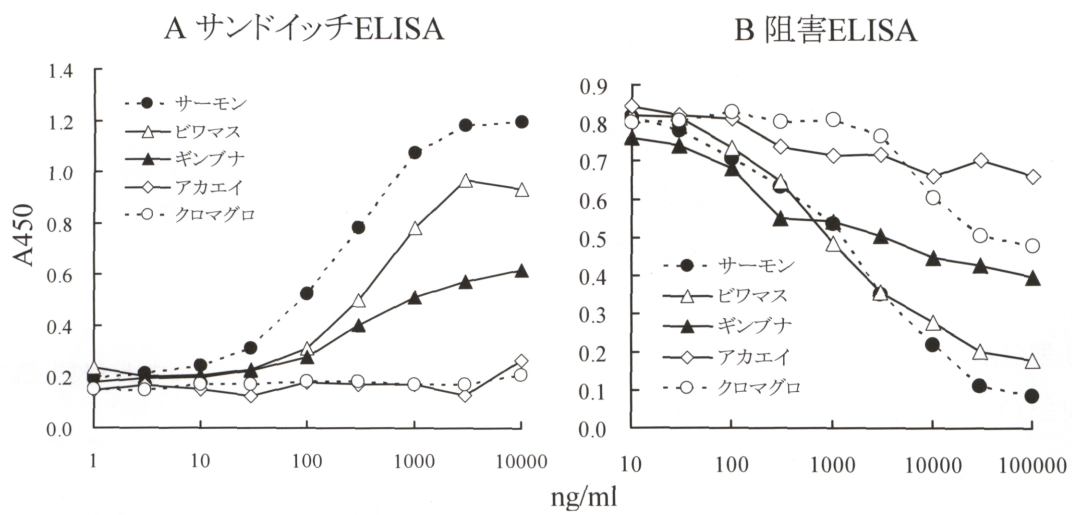


Fig.2 サンドイッチ ELISA(A)および阻害 ELISA(B)による定量の検討