

令和5年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	マダイコラーゲンの新規機能性とアレルギー性の検討	
研究者所属・氏名	研究代表者：農学部水産学科 田中照佳 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

本研究の目的は、マダイ（真鯛、*Pagrus major*）皮コラーゲンの肝機能保護効果の作用物質とアレルギー性の検討である。コラーゲンは、真皮、靭帯、腱、骨、軟骨を構成する主要タンパク質で、多細胞動物の細胞外基質の主成分でもある。その特異構造とアミノ酸組成およびアミノ酸の特性から、新規な生理機能が期待される。現在、魚類廃棄物の有効利用法として、皮や鱗から精製した魚類コラーゲンが商品化されているが、必ずしも科学的な根拠に基づいたものではない。申請者らは、 CCl_4 誘導性肝障害モデルマウスを用い、マダイコラーゲンの経口摂取により、 CCl_4 による肝細胞壊死が有意に抑制されることを明らかにした。しかし、その作用物質は明らかでない。そこで、本研究では、マダイコラーゲンの肝機能保護効果の作用物質を検討することを目的とした。一方、コラーゲンなど有益な機能性を有するタンパク質は、アレルギー性を有することも多い。事実、コラーゲンは魚肉タンパク質の中では、パルブアルブミンについてアレルギー性が高いとされる。そこで、抽出・精製したマダイコラーゲンのアレルギー性を解明した。

一方、コラーゲンは魚肉タンパク質の中で、パルブアルブミンについてアレルギー性が高い。そこで、マダイコラーゲンを肝機能保護効果をもつ機能性食品として適用させるため、マダイコラーゲンのアレルギー性を検討した。

2. 研究経過及び成果

コラーゲンの経口摂取によりプロリン (Pro)、ヒドロキシプロリン (Hyp) や Pro-Hyp 等のペプチドが血中に移行することが報告されている (Ohara et al. 2007)。そこで、本研究では、マグロコラーゲンの肝機能保護効果の作用物質を検討することを目的に、Pro/Hyp/Pro-Hyp の DPPH およびヒドロキシラジカル消去活性を比較した。その結果、ラジカル消去活性は Pro-Hyp > Pro > Hyp の順に高かった。そこで、次に Pro-Hyp がマダイコラーゲンの肝機能保護効果の作用物質であることを仮定し、Pro-Hyp の肝機能保護効果を検討した。

肝障害の病態として生体内の酸化ストレスによる代表的なものは、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性肝障害でモデル化されている。CCl₄ はミクロソームのチトクロム P450 やミトコンドリアの電子伝達系で 1 電子還元を受け、トリクロロメチルラジカル ($\cdot\text{CCl}_3$) を発生して広汎なラジカル反応、脂質過酸化反応を誘発し、ネクローシスや Caspase-3 依存性のアポトーシスを惹起する (Basu, 2003; Packer et al., 1978; Mico and Pohl., 1983; Forni et al., 1983)。そこで、このようなモデル動物に対する Pro-Hyp の効果を検討した。10 週齢の雄性マウスをコントロール群 (Vehicle 投与群、n=8)、CCl₄ 投与群 (n=8)、CCl₄+Pro-Hyp 群 (n=8) に分けた。コントロール群と CCl₄ 投与群には普通食を CCl₄+Pro-Hyp 群には 0.1% Pro-Hyp 含有食を 3 週間摂取させた。3 週間後、CCl₄ を 40 $\mu\text{L}/\text{kg}$ body weight の用量で腹腔内投与し、24 時間後マウスを屠殺した。静脈より採血を行い、遠心分離により血清を得た後、使用するまで -80°C で保存した。血清を用いて血中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ALT および AST) 活性の測定を行った。その結果、CCl₄ 暴露により血清 AST と ALT 活性はコントロール群と比較し有意に増加したが、Pro-Hyp の投与により CCl₄ によって増加した血清 AST と ALT 活性は有意に減少した。また、肝臓を摘出し 4% - パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液にて固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行うことで肝臓の細胞壊死の観察を行った。その結果、Pro-Hyp の投与は CCl₄ 暴露によって誘導される肝臓の細胞壊死を有意に改善した。このように Pro-Hyp は肝機能保護効果を示したことから、コラーゲンの肝機能保護効果の作用物質の少なくとも一つは Pro-Hyp でラジカル消去活性が作用機構に関与することが示唆された。

魚類コラーゲンの IgE エピトープの解析は、ニジマスコラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をモデルとして報告されており (Shiomi et al. 2009)、エピトープは 941~960 残基の領域に含まれると推定された。この領域のアミノ酸配列をシロザケの配列と比較したところ、同配列であった。そこで、本研究ではマダイ I 型コラーゲンの一次構造を Iso-seq 解析により明らかにし、エピトープ配列を比較した。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

肝機能保護効果の作用機構や有効作用量を知るうえで、コラーゲンの摂取により Pro/Hyp/Pro-Hyp がどの程度肝臓に蓄積されるかを検討することは重要である。そこで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、肝臓中におけるこれらの蓄積を定量することを計画している。一方、現在、魚アレルギー患者血清の入手を計画中である。入手の折には、魚アレルギー患者血清を用いて、ウエスタンブロッティングを行い、マダイ魚肉抽出物中のどのタンパク質と反応するかを検討する。これにより、魚アレルギー患者がどのくらいの割合でマダイコラーゲンを認識するかが明らかとなる。また、患者抗血清を用いた ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) を構築し、多種の天然魚や養殖魚、陸生動物由来コラーゲンとの交差反応性が明らかとなる。さらに、種々のマダイ等の水産加工品の抽出物を作製し、構築した ELISA にてアレルギー性を評価する。これにより、どのような処理を行った加工品でコラーゲンのエピトープが残っているかが明らかとなる。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日 (予定を含む)
日本栄養・食糧学会	口頭発表	2024 年 5 月 25 日
Journal of Nutritional Science and Vitaminology	雑誌	投稿中
Fisheries Science	雑誌	投稿予定