

エラスチンペプチド摂取後の ヒト血液からの食事由来ペプチド検出

Identification of Food-derived Peptide in Human Blood after Oral Ingestion of Elastin Hydrolysate

重村泰毅*

エラスチンペプチドは健康食品素材として注目されている。一方で、摂取後どのような形でペプチドが体内に吸収されるかは明らかにされていない。そこで筆者らは、ヒト血中から摂取物由来ペプチドの検索を行った。手法としては、プレカラム誘導化を導入したHPLCによって血中のペプチドを分離後、プロテインシーケンサーやMSによる配列同定を試みた。その結果、エラスチンペプチド摂取後のヒト血液から高濃度のPro-Glyが検出された。

1. はじめに

エラスチンはコラーゲン同様、細胞外マトリックスの主要タンパク質である。コラーゲンを酵素などで部分的に分解したコラーゲンペプチドは、健康食品素材として広く流通している。コラーゲン以外にも、ペプチドはタンパク質分解物として多くの食品に含まれており、それらの機能性について多くの研究が進められている。イワシ筋肉ペプチド、大豆ペプチド、そしてグロビンペプチドの摂取によって、それぞれ血圧上昇抑制、血中コレステロール値上昇抑制、血中脂質上昇抑制といった体調調節作用が報告され、それらは「特定保健用食品」の成分として認められている。エラスチンペプチドについても、本特集で摂取後の体調改善作用が紹介されている。また、細胞試験などからエラスチン中の繰り返しアミノ酸配列であるVal-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG) に生物学的活性が報告されている^{1~3)}。一方で、摂取後

に体調改善作用を示す食品ペプチドの中には、体内でどのような形で有効成分として作用するかが明らかになっていないものもある。それは、分子量やアミノ酸配列が異なる様々なペプチドが、消化後にどのような形で吸収されるかが不明な上、それらと生体内のペプチドとの区別が困難な点が原因である。ペプチドの体調改善メカニズムを解明することは、より効果的な体調改善の開発につながることを期待されている。そのためには、摂取後体内に吸収され、有効成分となりうるペプチドの分子サイズやアミノ酸配列を特定する必要がある。

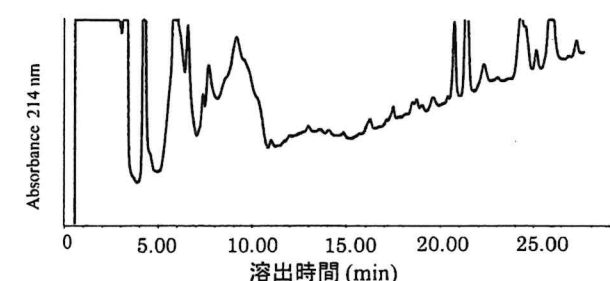
消化によって低分子化されたペプチドは小腸のペプチドトランスポーターより血中へと吸収される。吸収されるペプチドの検出法としては、摂取前のペプチドを酵素分解し、得られる低分子ペプチドを候補として解析する人工消化法も一つの手段ではあるが、そこには無数の候補が挙げられ、さらには実際に吸収されないペプチドを検出する

リスクが存在する。無駄な検出を避けるためには、摂取後のヒト血液からペプチドを検出する方法が確実である。近年、食品成分の簡便かつ正確な検出と定量がLC-MS/MSによって可能になっているが、本研究のような未同定物質の検出においては容易ではない。本稿では、筆者が高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やプロテインシーケンサーを使用し、コラーゲンペプチドを中心にを行ったヒト血中の食事由来ペプチド検索法^{4~6)}を用いて、エラスチン摂取後に検出した血中食事由来ペプチド、Pro-Glyについて紹介する。

2. コラーゲンペプチド摂取後のヒト血液からの食事由来ペプチド検出

血中からペプチドを検出するためには、それ以外の成分であるタンパク質、脂質、糖質の除去が必要である。まず①タンパク質の除去のために、採血後に調製した血漿に3倍量のエタノールを添加後、遠心分離によって血漿中のタンパク質を沈殿除去する。②続けて、得られたエタノール可溶性画分を強イオン交換樹脂で処理することで脂質・糖質を除去し、吸着したアミノ酸やペプチドを回収する。この2つの処理を通して得られたコラーゲンペプチド摂取後のヒト血液試料を、逆相

HPLCで分離した⁷⁾。その結果、アミノ酸とペプチドをピークとして単離するには、この段階では不十分であることがHPLCクロマトグラムからわかる (図1)。この結果から、多くのペプチドが親水性であり (実験にはGLサイエンス社 ODS-3 カラムを使用)、アミノ酸と多くのペプチドが混在し、その中から摂取由来のペプチドの同定は困難であることがわかる。そこで、コラーゲンペプチド摂取前後のヒト血液から、上記と同様の方法でアミノ酸・ペプチドを調製し、試料として次の試験を進めた。試料をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって分子量ごとに分画後、回収 (流速 0.5mL, 1分ごとに回収) 画分をフェニルイソチオシアネート (PITC) プレカラム誘導



J. Agric. Food Chem., 2006, 54 (15), pp 5261-5266

図1 コラーゲンペプチド摂取後のヒト血液エタノール可溶性画分の逆相 HPLC クロマトグラム

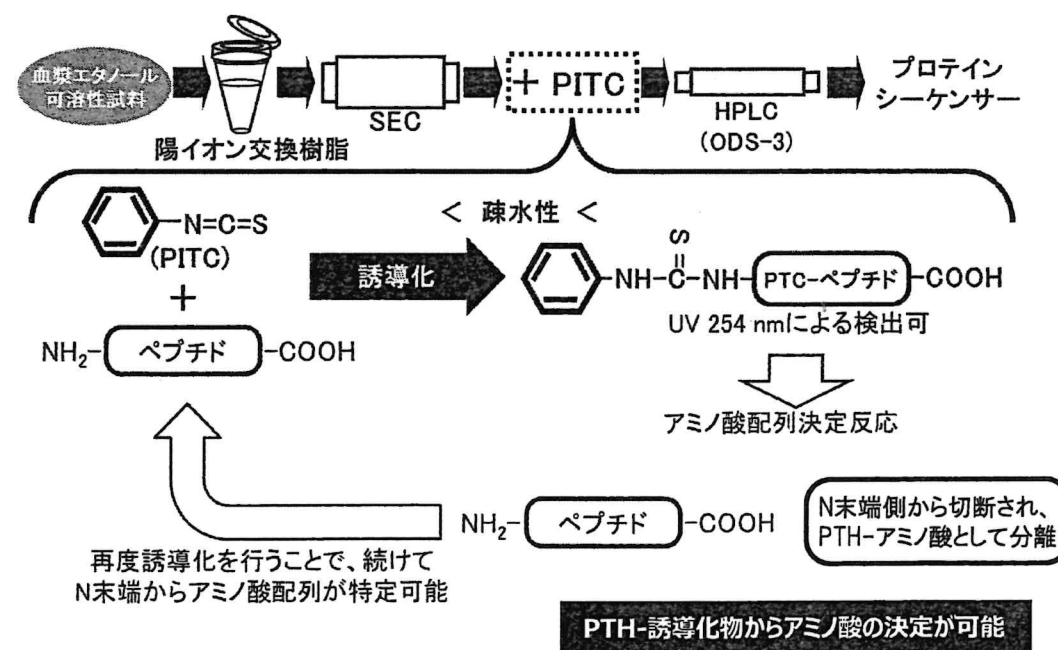


図2 ペプチド分離手順と PITC 誘導化

*Yasutaka Shigemura 東京家政大学 栄養学科 食品機能学研究室 講師

化法を導入した逆相 HPLC によって分離した (図 2)^{7,8)}。図 3 は、SEC より溶出した 1 画分を PITC 誘導化後に逆相 HPLC によって分離した結果である。この結果に見られるように、分子量分画と PITC 誘導化の導入によるペプチドの疎水性を増強することで、分離能が改善された。また、PITC 誘導化ペプチドが保有するベンゼン環が UV 254nm を吸収するため、本法はペプチドの高感度検出を可能にした。また、摂取前後の血液を試料とすることで、摂取後のみに見られたピーク (図 3 中 a, b) が血中へ吸収した成分と考えられた。PITC 誘導化は図 2 に示すようにエドマン分解法の一過程であり、カラム通過後は PTC-ペプチドとして溶出される。そのため、エドマン分解法を基にしたアミノ酸配列分析装置によって、溶出後の試料を直接解析することが可能である。分析結

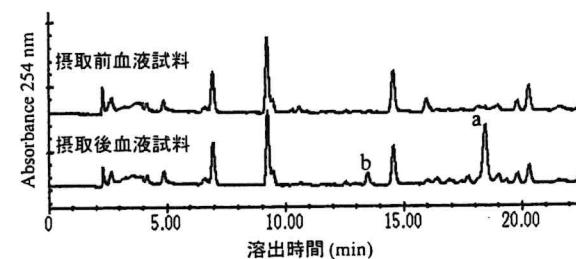


図 3 コラーゲンペプチド摂取前後のヒト血液エタノール可溶性画分の PITC 誘導化逆相 HPLC クロマトグラム

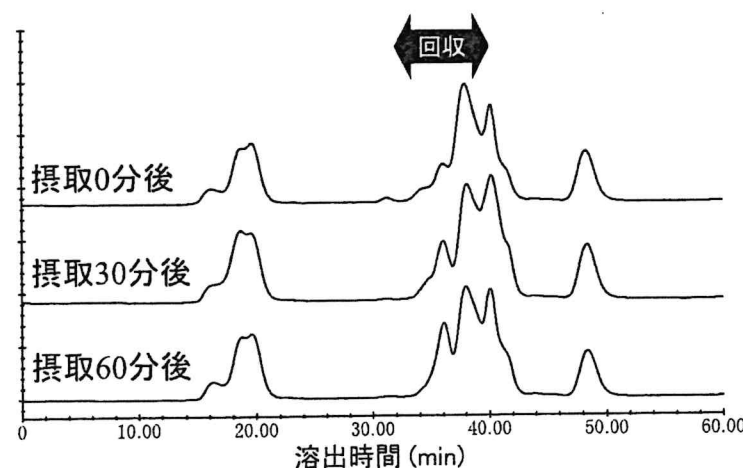


図 4 AG50 吸着画分の SEC 分画
Superdex Peptide 10/300 GL カラムを使用。0.1%TFA 含む。30%アセトニトリル溶液で溶出 (流速 0.5mL/min) し、UV 214nm で検出。

果から、図 3 の a と b はそれぞれ Pro-Hyp と Hyp-Gly であることがわかった。筆者らは、この方法によってコラーゲンペプチド摂取後の血液から、少なくとも 9 種類のジペプチドまたはトリペプチドを検出した。

3. PITC 誘導化法を導入したエラスチンペプチド摂取後の血中食事由来ペプチドの検索

コラーゲンペプチド摂取試験同様、エラスチンペプチド摂取・採血試験から血液試料を調製した。被験者には 12 時間絶食後、体重 60kg あたりエラスチンペプチド (カツオ動脈球由来) 10g を摂取して頂いた。摂取前と摂取 30 分後と 60 分後に採血を行い、血漿を調製した。血漿から調製したエタノール可溶性画分を SEC によって分画する手順は前述のとおりである。図 4 の SEC クロマトグラムの通り、この段階では摂取前後に変化は見られない。コラーゲンペプチド試験で、ヒト血中からはテトラペプチド以上の食事由来ペプチドは検出されていない。これより図 4 のクロマトグラムのジペプチド、トリペプチドが溶出される SEC Fr.35~40 (溶出時間 34~40 分) までは 1 分ごとに回収した。回収した各画分を PITC 誘導化処理後、逆相クロマトグラフィーによって分離した (図 5)。その結果、SEC から分離された Fr.37~

39 にかけて摂取 30, 60 分後に出現するピークが確認された。その他の SEC 画分には、摂取後特異的に出現する PTC-ペプチドピークは見られなかった。図 5 のピークを回収し、エドマン分解法を基にしたプロテインシーケンサーによって解析を行った (図 6)。その結果、ペプチドのアミノ酸配列の 1 残基に Pro, 2 残基に Gly であり、3 残基以降にはアミノ酸が存在しないことがわかつ

た。この結果からエラスチンペプチド摂取後血中で Pro-Gly (PG) が増加することが明らかとなった。さらに、エラスチン摂取量を体重 60kg あたり 10g から 20g に変更して同様の試験を行った結果、摂取濃度依存的に血中ペプチド最大濃度が約 2 倍に上昇した (図 6)。

エラスチンのアミノ酸組成としては、Pro (P), Ala (A), Val (V), Gly (G) が豊富であり、分

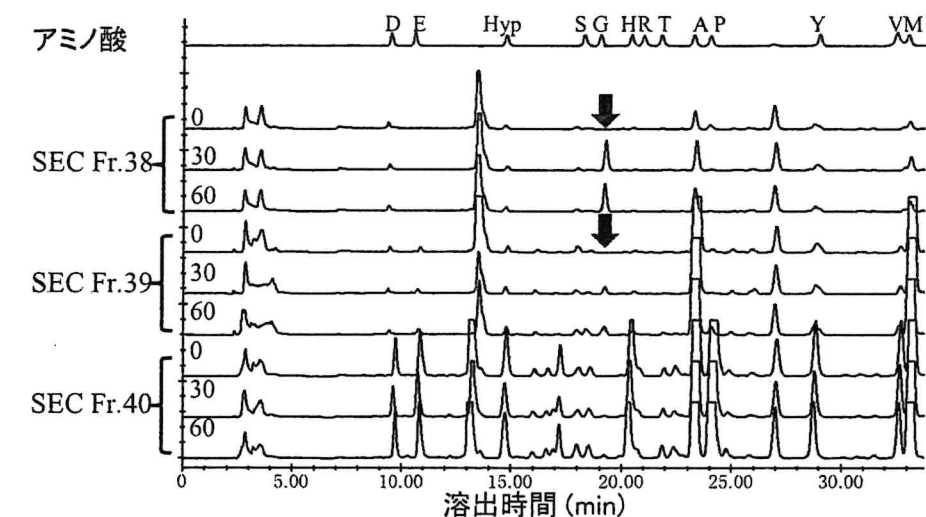
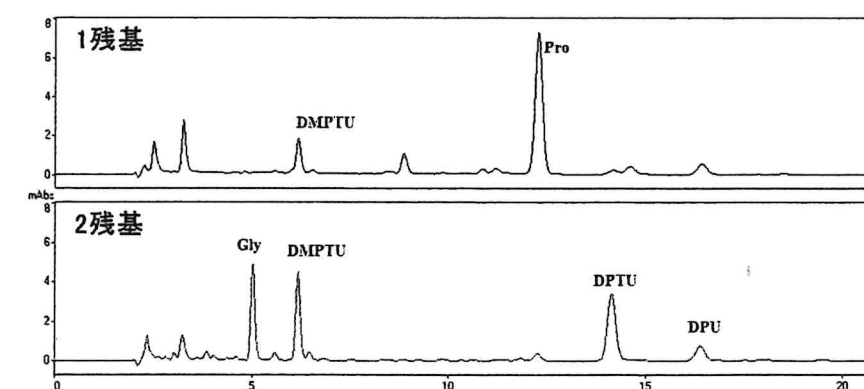


図 5 SEC 画分中の PITC 誘導化物質の RP-HPLC 分離
Inertsil ODS-3 カラムを使用。0.01%TFA と 60%アセトニトリルの濃度勾配によって PITC 誘導化物を分離 (流速 1.0mL/min) し、UV 254nm で検出。
SEC Fr. は 1 分ごとに回収した SEC 画分、0; 摂取前、30; 摂取 30 分後、60; 摂取 60 分後。



摂取ペプチド量	摂取後時間	Pro-Gly濃度 (μM)
10 g / 体重 60 kg	30 min	23.10
	60 min	21.08
20 g / 体重 60 kg	30 min	27.75
	60 min	45.84

図 6 プロテインシーケンサーによる RP-HPLC 溶出画分の配列解析
図 5 で回収したピーク (↓) を解析。

子中には GVGVP と VGVAPG の繰り返し配列が存在している。今回検出された PG は、分子中の繰り返し配列の一部であることが考えられる一方で、それ以外の GV, VG, VA, VP, AP は検出されなかった。コラーゲンペプチド中の最も豊富なアミノ酸は Gly であるが、摂取後の血中主要ペプチドは Pro-Hyp であった。さらに豚小腸上皮を用いた実験では、コラーゲン分子中の配列である Pro-Hyp-Gly が Pro-Hyp と Gly に切断されて小腸上皮トランスポーターを通過することが報告されている⁹⁾。これは、繰り返し配列の全ての短鎖ペプチドが血液中へ移行するのではなく、その配列の中でも酵素耐性が高いペプチドが血中へ移行することを示唆している。このことから、エラスチンペプチドの酵素耐性は、特に Gly の C 末端で弱く、Pro の C 末端で強いことが推測される。イワシ筋肉ペプチド摂取後、今回検出されなかった Val を含む Val-Tyr が血中から検出されている¹⁰⁾。このことから、Val の C 末端よりも Tyr の N 末端の酵素耐性が高いことが考えられる。筆者らは、コラーゲンペプチド摂取後の血中からエラスチン PG と同程度の濃度の Hyp を含むペプチドを検出している。これまで報告されている血中食事由来ペプチドは nM レベルであり¹¹⁾、PG は Hyp を含まないペプチドとしては血中で検出された最大濃度の食事由来ペプチドである。以上の結果から、エラスチンペプチド摂取後の体調改善作用において、PG が有効成分である可能性が考えられる。また、図 6 に見られるように本試験の摂取量内では Pro-Gly の吸収限界は見られず、摂取量の増加、または少量で効率的な吸収方法が開発できれば、より効果的な体調改善方法が期待できる。

4. AccQ 誘導化法を導入した LC-MS/MS による血中食事由来エラスチンペプチドの検索検出法

前述した PITC 誘導化法を導入した HPLC による検出方法のデメリットとしては、複数回の分離のため試料の損失や、多くの試料を誘導化しなく

てはならず、非常に手間のかかる点が挙げられる。特に前述の試験では、被験者 (n=5) 血漿を混合しており、膨大な試料数になることから各被験者血漿ペプチドを定量することは困難である。一方で、すでにアミノ酸配列を同定済みのペプチドに関しては MS による検出・定量が可能と考えられる。MS による PTC-ペプチドの分析を試みたが、検出感度が低い上に、PTC-ペプチドが不安定なため、期待されるような結果が得られなかった。そこで、MS による高感度血中ペプチド検出法として、6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ) 誘導化を導入した MS 分析を行った⁹⁾。図 7 に見られるように、血漿エタノール可溶性画分中のペプチドを AccQ 誘導化後に HPLC で分離した。結果のクロマトグラムに見られるように、PITC 誘導化法同様に摂取後に出現するピークが確認された。さらに、このピークを回収して MS/MS 分析を行った (図 8)。回収されたピークの分子量が 342.93 であり、それが AccQ 誘導化された PG の分子量とほぼ一致した。加えて、MS/MS から得られたフラグメントの分子量が AccQ の 171.13、そして複数の AccQ-PG の一部であった。これより、図 7 の摂取後特異的なピークが Pro-Gly であることが特定された。以上の結果から、AccQ 誘導化法の導入によって LC-MS/MS による直接的な血漿試料からの食事由来ペプチドの定量が可能と考えられた。

5. 年齢別被験者の血中食事由来エラスチンペプチド動態

血中食事由来エラスチンペプチド濃度の測定は、これまでに摂取から最大で 60 分後までしか測定していない。また、被験者条件がペプチドの血中移行にどのような影響を及ぼすかについても明らかにされていない。そこで次の試験では、20 歳代と 50 歳代の被験者 3 名ずつに参加して頂き、体重 60kg あたり 10g のエラスチンペプチドを摂取する前と、摂取から 30, 60, 120, 240, 420 分後に採血を行った。調製した血漿エタノール可溶性画分を AccQ によって誘導化し、LC-MS/MS

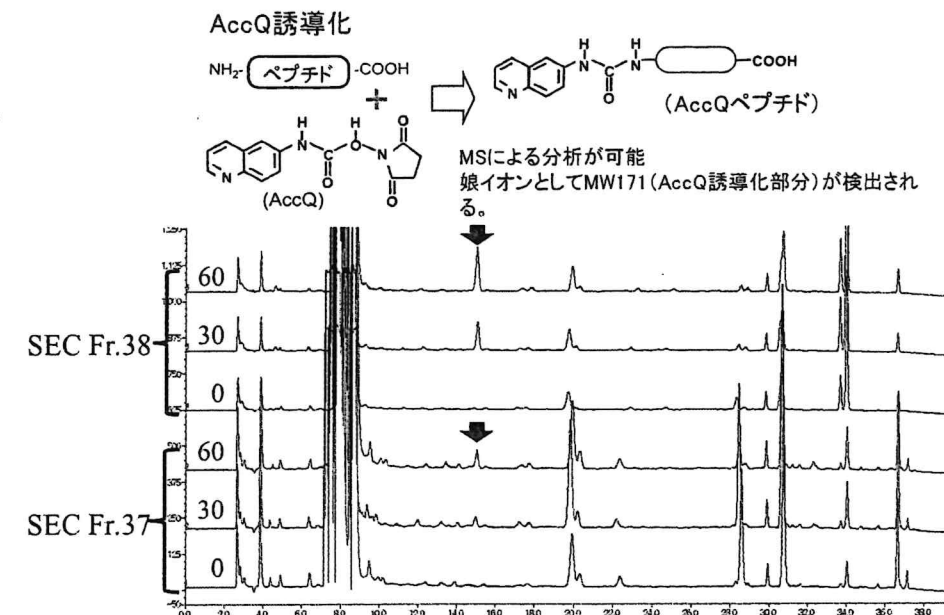


図 7 AccQ 誘導化を導入した HPLC による血中ペプチドの分離
Inertsil ODS-4 カラムを使用、0.1% ギ酸と 0.1% ギ酸を含む 80% アセトニトリルの濃度勾配によって AccQ 誘導化物を分離 (流速 1.0 mL/min) し、UV 254nm で検出。SEC Fr. は 1 分ごとに回収した溶出画分 (SEC Fr. 35 は溶出時間 34~35 分間の溶出液)。0: 摂取前, 30: 摂取 30 分後, 60: 摂取 60 分後。

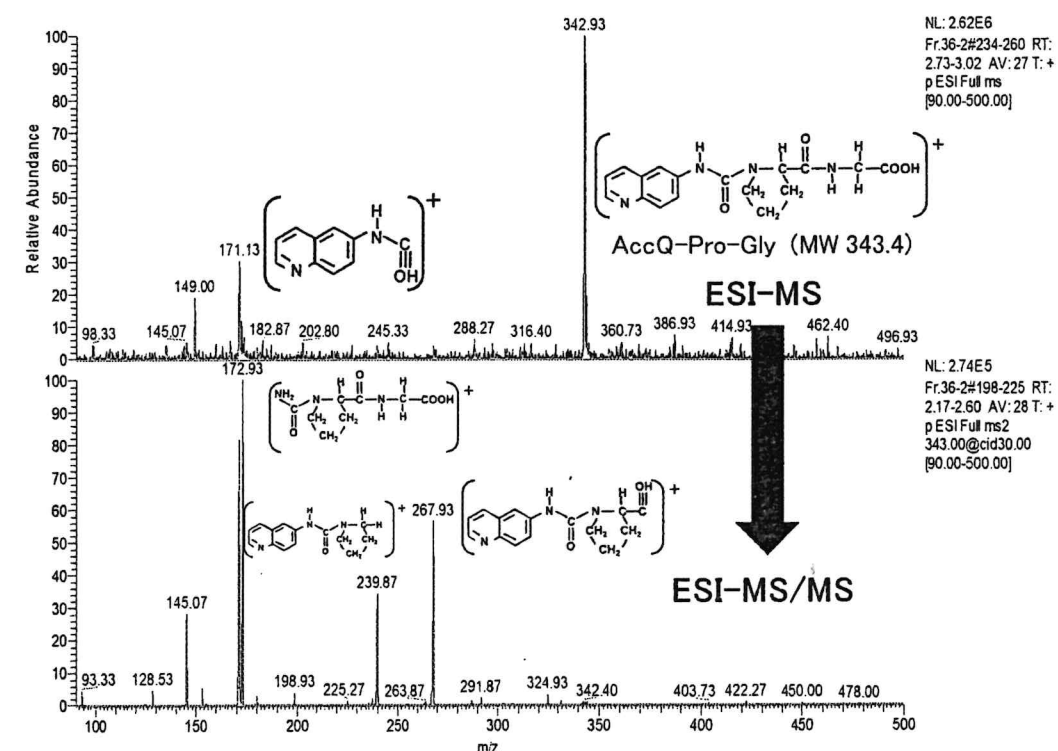


図 8 RP-HPLC 溶出画分の ESI-MS (上) および ESI-MS/MS (下) 分析

によって定量を行った。図 9 に示されるように、摂取から 4 時間後には摂取前と同程度であった。両年代ともに摂取から 30 分後に最大値に到達し、前述のとおり、摂取量依存的に血中最大濃度が上

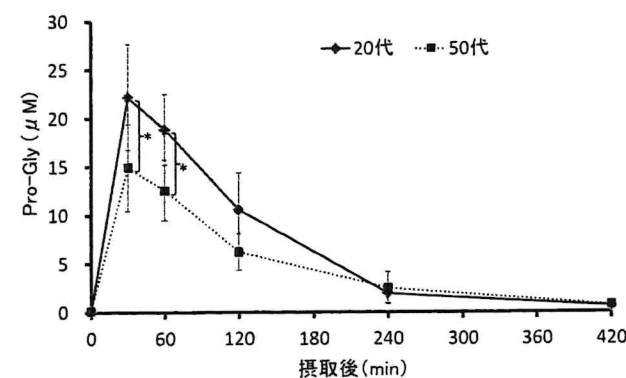


図9 エラスチン加水分解物摂取後の血漿中 Pro-Gly 濃度
* 同時時間帯で有意差有 (各年代 n=3)

昇するため、摂取量増加により血中ペプチド濃度検出時間は延長されることが予想される。今回の試験では被験者が3名ではあるが、被験者年齢が低いほど血中移行ペプチド濃度が高い傾向が見られた。被験者の条件だけではなく、被験者の体調もペプチドの血中移行に影響することが考えられる。また、健康食品素材としてのペプチドの多くは粉末状で流通されているため、溶解する溶媒のマトリックスによって血中移行ペプチド濃度が変化することも推測できる。

6. おわりに

本試験から、魚類動脈球由来エラスチンペプチド摂取後のヒト血液から、Pro-Gly が主要食事由来ペプチドとして検出された。摂取前にはその存在がほぼ確認されなかったことから、Pro-Gly が体調改善作用の有効成分であることが考えられる。データは記載していないが、前述した手法によってブタ由来エラスチンペプチドを摂取したヒト血液からのペプチド検出を行った。その結果、Pro-Gly 濃度は魚類エラスチンペプチド摂取後よりも低かったが、新規に数 μM の Leu (または Ile)-Leu (または Ile) が検出された。このように、魚や豚以外の摂取ペプチド動物種を変えることで、配列の異なるペプチドが検出される可能性が示唆され、各メーカーによって製造されるペプチドの分子量の違いも大きく影響すると考えられる。エラスチンには、特有のアミノ酸であるデスモシン、

イソデスモシンが存在することが知られている。今回、ヒト血中からこれらアミノ酸を含む食事由来ペプチドが検出されなかったことは、長鎖ペプチドの小腸トランスポーター通過が困難であることを裏づけている。

Pro-Gly による線維芽細胞の増殖には影響を及ぼさなかったが、筆者らは Pro-Gly による皮膚線維芽細胞のエラスチン合成の促進を報告している¹²⁾。エラスチン分子中の繰り返し配列である Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly が線維芽細胞のエラスチン合成を促進することも報告されている²⁾。これは、線維芽細胞のエラスチン合成促進に関わる重要な配列が Pro-Gly である可能性を示唆している。Pro-Gly は線維芽細胞の増殖に対して影響を及ぼさなかったのに対して、Pro-Hyp はコラーゲンゲル上で線維芽細胞の増殖を促進する⁶⁾。コラーゲンとエラスチンの混合物を摂取すると、エラスチン無添加群に比べて肌の状態が改善されたとの報告がある¹³⁾。これは、加水分解物摂取後血中へと移行した Pro-Hyp が真皮中の線維芽細胞の増殖を促し、さらに Pro-Gly が増殖した線維芽細胞のエラスチンの合成を促進するため、混合した加水分解物摂取による相乗的な効果の可能性が考えられる。

今後は、他細胞に対する Pro-Gly の影響についても検討する予定である。さらに、エラスチンペプチド摂取後に吸収される Leu (または Ile)-Leu (または Ile) のような微量ペプチドが、強い生理活性を示す可能性も残されている。そのため、さらに高感度な検出法から微量食事由来ペプチドの検出も試みる。

文 献

- 1) A. Gigante *et al.*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 14, 717 (2003)
- 2) S. Tajima *et al.*, *Arch. Dermatol. Res.*, 289, 489 (1997)

- 3) R. M. Senior *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 66, 859 (1980)
- 4) K. Iwai *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6531 (2005)
- 5) Y. Shigemura *et al.*, *Food Chem.*, 129, 1019 (2011)
- 6) Y. Shigemura *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 444 (2009)
- 7) M. Aito-Inoue *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5261 (2006)
- 8) B. A. Bidlingmeyer *et al.*, *J. Chromatogr.*, 336, 93 (1984)
- 9) M. Aito-Inoue *et al.*, *J. Pept. Sci.*, 13, 468 (2007)
- 10) T. Matsui *et al.*, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29, 204 (2002)
- 11) M. Foltz *et al.*, *J. Nutr.*, 137, 953 (2007)
- 12) Y. Shigemura *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5128 (2012)
- 13) M. Nakaba *et al.*, *J. New Rem. & Clin.*, 56, 1881 (2007)

機能性ペプチドの開発最前線

監修: 有原圭三 (北里大学)

- ★食品・化粧品・ペットフードに利用される機能性ペプチドの最新応用展開を記載!
- ★化粧品・オーラルケア分野での最新開発動向を詳述!
- ★製法、特許、商品開発事例など、貴重な情報を掲載!

【第I編 総論】		第15章	毛髪表面構造に着目して開発した植物ペプチド由来のヘアコンディショニング成分
第1章	機能性ペプチドの科学	第16章	コメ由来生体防御ペプチドの多機能性を活用した素材の開発
第2章	食品・ペットフードにおける機能性ペプチドの利用	【第IV編 製品開発事例】	
第3章	化粧品分野におけるペプチド	第17章	イワシ由来ペプチド
第4章	ペプチド医薬品	第18章	ペプチド配合ミルク
第5章	家畜生産とペプチド	第19章	大豆ペプチドの血圧降下作用を活用した「まめちから大豆ペプチドしょうゆ」の開発
第6章	機能性ペプチドの探索技術	第20章	メイラードペプチド
第7章	特許情報から探る機能性ペプチドの研究開発動向	第21章	ペプチドを利用した機能性と嗜好性に優れたペットフードの開発
【第II編 食品】		第22章	コラーゲンペプチド
第8章	食品の熟成・発酵における機能性ペプチドの生成	第23章	界面活性作用を有する環状リポペプチド「サーファクチン」
第9章	食品で注目されるペプチドの機能	第24章	食欲抑制素材「酵母ペプチドDNF-10」の抗肥満作用
第10章	腸管バリア保護ペプチド	第25章	Perfection Peptide P3
第11章	ペプチドに由来する味と香り	第26章	一皮膚を若返らせる生体模倣落屑作用ペプチド
第12章	ナイシンと抗菌ペプチドとしてのリゾチーム		化粧品素材としてのマリンジェンペプチドMP(PF)
【第III編 化粧品・オーラルケア】			
第13章	界面活性ペプチド		
第14章	アンチエイジング効果と抗菌作用を併せ持つ機能性ペプチド素材の開発		

■体裁/B5判・240頁 ■発行/2015年4月 ■本体/62,000円+税

申込 FAX: 03(3293)2069 <http://www.cmcbooks.co.jp/>

シーエムシー出版