

最近の研究

ヒト血液中からの食事由来エラスチンペプチドの検出

重 村 泰 穀*
佐 藤 健 司**

1. はじめに

エラスチン加水分解（エラスチンペプチド）の経口摂取によって肌の状態改善が報告されており、その効果のメカニズムの解明を目的として本研究はスタートした。同じ細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲン加水分解物（コラーゲンペプチド）の経口摂取によっても健康状態の改善が報告されており、部分的ではあるが、近年このメカニズムについて明らかになってきている。これらの研究では、コラーゲンペプチドの経口摂取後に採血を行い、血液から摂取コラーゲン由来の低分子ペプチド（食事由来コラーゲンペプチド）を検出し、そのペプチドの生理活性を明らかにした。加水分解物摂取後の血液から有効成分と考えられる低分子分解物を検索し、その生理活性を明らかにする研究方法を基に、エラスチン加水分解物摂取後に血液中へ移行する摂取エラスチン由来低分子ペプチド（食事由来エラスチンペプチド）を検出し、そのペプチドの生理活性について調べた。

本章ではまず、これまで報告されてきた血中食事由来ペプチドの検出研究として、コラーゲンペプチド摂取後の血中食事由来ペプチドの検出と、そのペプチドの線維芽細胞に対する効果について紹介する。続いてエラスチンペプチド摂取後の血中食事由来ペプチド検出方法と、ペプチドの生理活性について紹介する。

2. コラーゲン加水分解物後の血中食事由来ペプチドとその生理活性

エラスチンとは細胞外マトリックスに存在するタンパク質の一つである。エラスチンはグリシン（Gly）、プロリン（Pro）、バリン（Val）、アラニン（Ala）といったアミノ酸を豊富に含んでおり¹⁾、エラスチン

特有のアミノ酸であるデスモシン、イソデスモシンの存在も報告されている²⁾。組織中のエラスチンは分子集合によってエラスチン線維を形成し、真皮、血管、腱、肺などに組織や器官に分布している。真皮中の線維成分として、コラーゲンが70%存在するのに対し、エラスチンは2～4%と僅かである³⁾。真皮中ではコラーゲンが肌に伸縮性を与え、微量成分であるエラスチンがコラーゲンの間に存在し肌の弾力性を与えて「ハリ」を保つ働きに関わるといわれている。

エラスチンと同じ細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンは健康食品として扱われており、商品名として「コラーゲンペプチド」がよく知られている。これは生体試料中のコラーゲンを熱処理と酵素処理によって得られるコラーゲンの加水分解物であり、これを経口摂取すると肌や関節の状態が改善するといった報告がある⁴⁻⁶⁾。長年この効果に関するメカニズムは解明されず、被験者による主観的な体感に基づくデータが多かった。そのため、コラーゲン加水分解物摂取による効果は、学術的な論文よりもメディアや商品広告で取り上げられることが多かった。近年、コラーゲン加水分解物摂取後のヒト血液中で低分子化した数種食事由来コラーゲンペプチドが検出されている。これらはPro-Hyp（プロリルヒドロキシプロリン）を主要成分とし、その他にPro-Hyp-Gly, Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Ser-Hyp, Ser-Hyp-Gly, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp, Hyp-Gly などである⁷⁻⁹⁾。これらペプチドはいずれも、コラーゲン特有のアミノ酸であるプロリン（Pro）が水酸化されたヒドロキシプロリン（Hyp）を含んでいた。また、豚、魚、鶏、いずれの動物種由来のコラーゲン加水分解物を摂取しても、血液中にPro-Hypが主要成分として存在することが分かっている。コラーゲンペプチド摂取後（10g/体重60kgあ

*Yasutaka Shigemura: 東京家政大学短期大学部栄養科講師, 〒173-8602 東京都板橋区加賀1-18-1, TEL 03(3961)5629, **Kenji Sato: 京都府立大学大学院生命環境科学研究科教授, 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5, TEL 075(703)5405

たり) Hyp ペプチドの検出濃度は、摂取から1~2時間後に最大値に達し、7時間後まで検出され、24時間後には摂取前と同程度へと戻っていた(図1)。これらペプチドが血中で存在することが明らかになったことから、このペプチドの生理活性を明らかにすることがコラーゲン加水分解物摂取による効果のメカニズム解明につながるが考えられた。

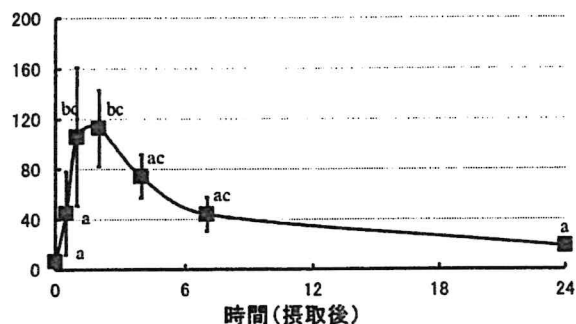


図1 魚由来コラーゲンペプチド摂取後のヒト血液中 Hyp ペプチド濃度
同じアルファベットを含む値には有意差が見られない

そこでマウス皮膚線維芽細胞を用いて、次の実験を行った。5週齢の Balb/c マウス皮膚を、10%FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 内で組織培養し、そこから遊走する初代皮膚線維芽細胞を調製した。初代マウス皮膚線維芽細胞をコラーゲンゲルとプラスチックシャーレ上に播種後、37℃・5% CO₂ の条件下で、Pro-Hyp 添加 (終濃度200nmol/mL) と無添加群に分けて培養を行った。プラスチックプレートに比べて、コラーゲンゲル上では線維芽細胞の増殖が抑制されることが報告されており¹⁰⁾、今回も同様の傾向が見られた(図2)。Pro-Hyp 添加と無

添加群の線維芽細胞増殖について比較した結果、プラスチックシャーレ上では有意な変化は見られなかった。それに対し、コラーゲンゲル上で線維芽細胞を培養した結果、Hyp 添加群、Pro と Hyp の混合添加群、そして無添加群に比べて Pro-Hyp 添加群のみに線維芽細胞の増殖が有意に促進された(図2)。

以上の実験結果から、Pro-Hyp はコラーゲンゲル上で皮膚線維芽細胞の増殖を促進させることが分かった。コラーゲンゲル上での線維芽細胞培養は皮膚の損傷のモデルとして考えられる。そのため、皮膚損傷時に血液中に食事由来 Pro-Hyp が存在すると、損傷による出血とともに Pro-Hyp がコラーゲンと線維芽細胞が分布する真皮へ流出し、細胞増殖が促進される仮説が考えられる(図3)。線維芽細胞の増殖は生体の創傷治癒において重要な役割を果たすことが知られている。そのため、コラーゲン加水分解物摂取が、皮膚の創傷治癒を促進する可能性が考えられる。Pro-Hyp は FBS 添加条件で線維芽細胞の増殖を促進するが、FBS 無添加条件では促進しなかった。これは Pro-Hyp が増殖因子のように働くのではなく、コラーゲンゲル上での線維芽細胞増殖の抑制を解除するような作用が考えられる。

近年になって食事由来コラーゲンペプチドの生理作用に関する報告が増えており、これら研究はコラーゲン加水分解物摂取が皮膚だけでなく軟骨¹⁰⁾ や血管¹¹⁾ の状態改善に関わる可能性が示唆されている。部分的ではあるが、これらのことからコラーゲン加水分解物摂取による健康状態改善のメカニズムが解明されている。

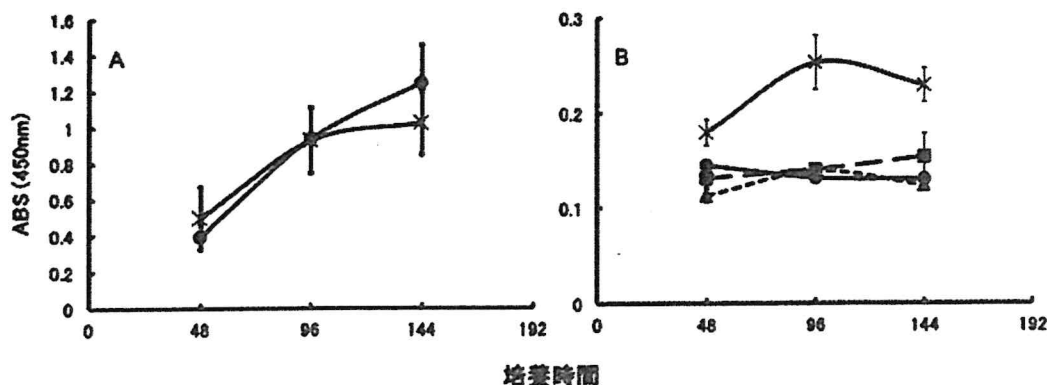


図2 プラスチックシャーレ上(上)とコラーゲンゲル上での線維芽細胞の増殖
増殖は Cell Counting Kit-8 を用いて即例を行った
縦軸の吸光度 (ABS) は細胞数に比例する

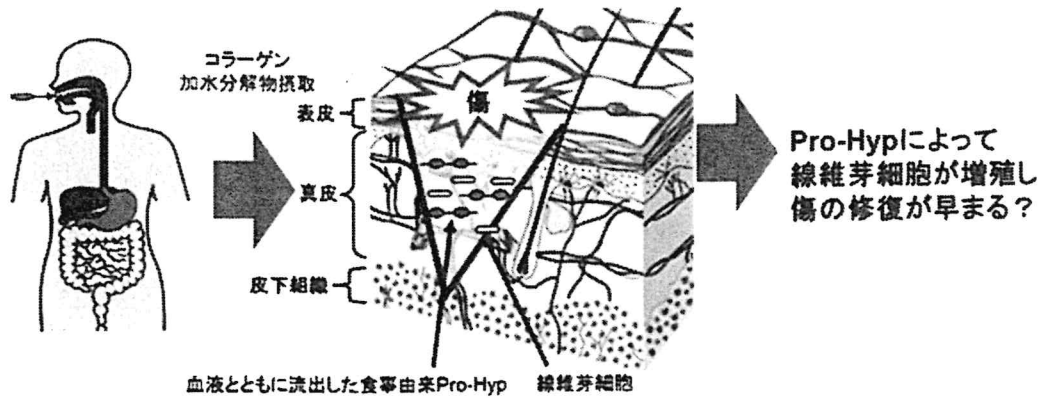


図3 コラーゲン加水分解物摂取による創傷治療促進（仮説）

3. エラスチン加水分解物摂取後の ヒト血液からの食事由来ペプチド検出

コラーゲンとエラスチンの混合加水分解物を摂取すると、エラスチン無添加群に比べて肌の状態が改善されるとの報告がある¹²⁾。同じ細胞外マトリックスタンパク質の加水分解物であることから、コラーゲンと同様にエラスチン加水分解物摂取後のヒト血液にも食事由来エラスチンペプチドが存在し、有効成分として働くのではないかと予想された。そこで、コラーゲンの研究と同様の手法で下記の実験を行った。

被験者・採血・血漿調製 被験者4名（平均年齢50.5 ± 7.9歳）の方々に對して12時間の絶食後に採血を行い、その直後エラスチン加水分解物を摂取して頂いた。さらに摂取から30と60分後に採血を行った。血漿に3倍量のエタノールを加え、遠心分離によって血漿エタノール可溶性画分を調製した。この際、エタノールによって血漿中のタンパク質が沈殿除去された。

エラスチン加水分解物 エラスチン加水分解物はカッオ動脈球より調製した。加水分解物は20%水溶液になるように水に溶解後、被験者体重60kgあたり10gを摂取して頂いた。

食事由来エラスチンペプチド分画 血漿から調製したエタノール可溶性画分は被験者4人分を同量ずつ混合し、フィルター付きエッペンを用いて強陽イオン交換樹脂（AG50）で処理された。この操作によってエタノール可溶性画分中のタンパク質やアミノ酸がイオン交換樹脂に吸着し、糖質や脂質は未吸着として除去された。樹脂へのアルカリ性溶液添加とエッペンの遠心分離によってアミノ酸とペプチドが回収され、続けてサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による分子量別の分画を行った（図4）。その結果、分画後のSECクロマトグラムには摂取前後では変化は見られなかった。同条件でSEC分画を行ったコラーゲンの研究から、ペプチドやアミノ酸が溶出時間30～40分の間に分離されることが報告されている。（図4）に見

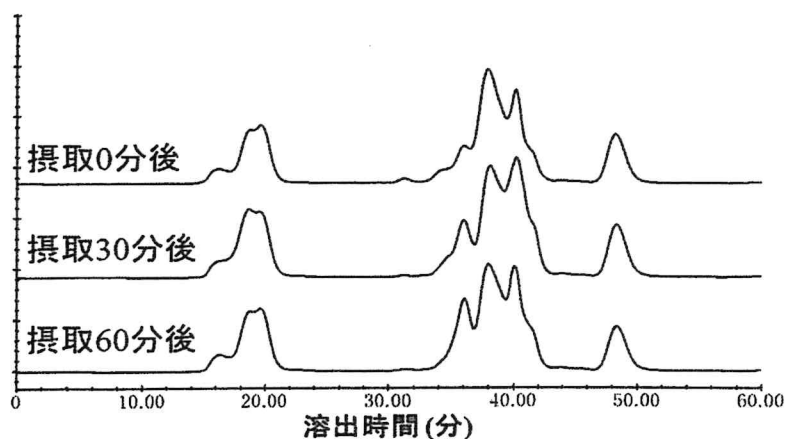


図4 AG50吸着画分のSEC分画
Superdex Peptide 10/300 GL カラムを使用。0.1%TFA 含む
30%アセトニトリル溶液で溶出（流速0.5mL/min）し、UV214nm で検出

られるように、その溶出時間帯のピークは単離されておらず、ペプチドとアミノ酸が混合した状態であることが分かった。食事由来ペプチド分離のためには、より分離能の高い条件によって SEC 溶出時間30~40分の画分からペプチド分離を行う必要がある。

SEC 溶出時間30~40分を1分ごとに分画し、N末端誘導化試薬である phenyl isothiocyanate (PITC) による処理を行った。この処理によって誘導化された PTC-ペプチドや PTC-アミノ酸は疎水性が増し、逆相カラムによる分離能が上昇する。加えて、PTC 誘導化物質は UV254nm による高感度な検出が可能である。以上のことから PITC 誘導化と逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 分離によって、クロマトグラム上に単離した PTC-ペプチドや PTC-アミ

ノ酸の単離ピークが得られる。

(図5)に見られるように、SEC 溶出時間34~40分 (SEC Fr. 35~40) に PTC 誘導化ピークが検出された。その中で、SEC Fr. No. 37~39の RP-HPLC 溶出時間20分あたりに、加水分解物摂取後のみに検出される特異的なピークが検出された。SEC Fr. 39以降には血漿 PTC-アミノ酸のピークが溶出されたことが、標準アミノ酸の溶出パターンから分かる。そのため SEC Fr. No. 37-39の特異的に検出されたピークはアミノ酸ではなく、ペプチドである可能性が考えられたため、そこで、ピーク箇所の溶出液を回収後プロテインシーケンサー (島津 PPSQ-21) により配列を同定した。PITC 誘導化はタンパク質やペプチド配列同定法であるエドマン分解法の一環であるため、回収さ

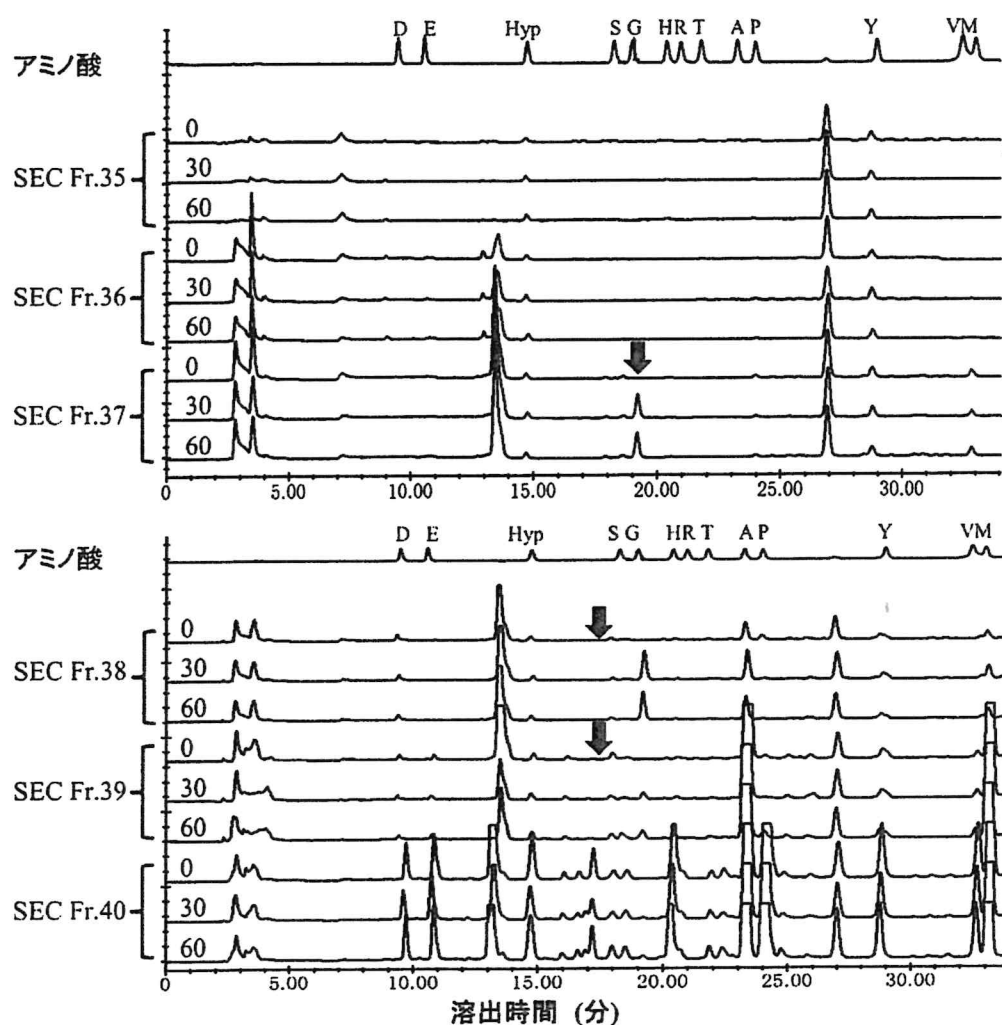


図5 SEC 画分中の PITC 誘導化物質の RP-HPLC 分離
Inertsil ODS-3 カラムを使用, 0.01%TFA と60%アセトニトリルの濃度勾配によって PITC 誘導化物を分離 (流速1.0mL/min) し, UV254nm で検出
SEC Fr. は1分ごとに回収した溶出画分 (SEC Fr. 35は溶出時間34~35分間の溶出液)
0 ; 摂取前, 30 ; 摂取30分後 60 ; 摂取60分後

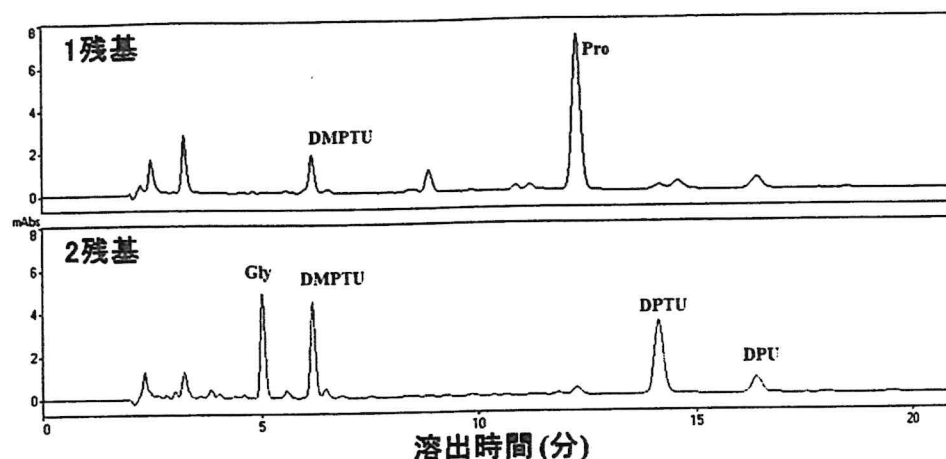


図6 プロテインシーケンサーによる PR-HPLC 溶出画分の配列解析

れた PTC 誘導化物質はエドマン分解法を基にしたシーケンサーで直接分析することができる。(図6)に見られるように分析結果から1, 2残基それぞれがProとGlyであり, 3残基以降にはアミノ酸が検出されなかった。そのため, SEC Fr. No. 37-39内の摂取後特異的に検出されたピークはPro-Glyであることが分かった。加水分解物摂取量を被験者体重60kgあたり20gに増加し, PITC 誘導化法を用いて同様に血液を調べたところ, Pro-Gly 以外の食事由来ペプチドは検出されなかった。

PTC-Pro-Gly のピーク面積を基に, 血漿中の Pro-Gly 濃度を求めたところ, 体重60kgあたり10gの加水分解物摂取から30分後に最大濃度に達し, 60分後はやや減少していた(表1)。摂取量を倍に増加して測定したところ, 摂取から1時間後に Pro-Gly 濃度は最大値に達し, 濃度もおよそ倍に増加した。最も高濃度の血液中食事由来ペプチドとしてこれまで報告されているのは, μM レベルの Hyp を含む食事由来コラーゲンペプチドであった。今回検出された Pro-Gly は食事由来コラーゲンペプチドと同レベルの μM レベルで検出された。Hyp を含まない食事由来ペプチドとしてはイワシ筋肉由来 Val-Tyr や乳タンパク由来 Ile-Pro-Pro がそれぞれ $1.934 \text{ nM}^{19)}$ と $0.897 \text{ nM}^{20)}$ 検

出されている。エラスチン加水分解物摂取後の血液中 Pro-Gly は, それらの1000倍以上の濃度が検出され, Hyp を含まない血液中食事由来ペプチドとしては最大濃度であった。

4. AccQ 誘導化法による血液中食事由来エラスチンペプチドの検出

コラーゲン加水分解物摂取後のヒト血液中で Pro-Hyp 以外に, 他数種類の食事由来ペプチドが微量成分として検出されている。エラスチン加水分解物摂取後もヒト血液中に Pro-Gly 以外の食事由来エラスチンペプチドが微量成分として存在する可能性が考えられる。プロテインシーケンサーは, 微量で短鎖ペプチドの配列解析には不向きであることが知られている。より高感度な分析方法としては, マススペクトロメトリ (MS) による分析が考えられるが, PTC 誘導化物質はイオン化され難いため MS 検出が困難であることが報告されている¹³⁾。

そこで, 同じN末端誘導化物質であり, 誘導化物質が MS で分析可能な 6-aminoquinolyl - N - hydro-succinimidyl carbamate (AccQ) を用いて血液中の食事由来ペプチド検出を試みた(図7)。被験者数, 加水分解物摂取量, 血漿エタノール可溶性画分の陽イオン交換樹脂と SEC による分画は上記と同様に行い, SEC 溶出画分 Fr. No. 35~40を AccQ で誘導化した。SEC 画分中の AccQ 誘導化物質を RP-HPLC で分離したところ SEC Fr. No. 37~30の溶出時間14分付近に, 取後特異的に単離したピークが検出された(図8)。

この出時間帯の画分を回収し ESI-MS で分析したところ, 画分中に分子量342.93と171.13の物質が含まれ

表1 エラスチン加水分解物摂取後の血漿 Pro-Gly 濃度
摂取ペプチド量 摂取後時間 Pro-Gly 濃度(μM)

10 g / 体重60kg	30min	23.10
	60min	21.08
20 g / 体重60kg	30min	27.75
	60min	45.84

ることが分かった (図9上). 342.93と171.13がそれぞれ AccQ 誘導化 Pro-Gly と AccQ がイオン化された分子量に一致した. MS/MS 分析により得られた分子量342.93の物質の娘イオンが分子量267.93, 239.87, 172.93であり, いずれも AccQ 誘導化 Pro-Gly のフラグメントであることが分かった (図9下). AccQ 誘導化を導入した方法によって, Pro-Gly 以外の食事由来ペプチドは検出されなかった.

エラスチン分子には, 哺乳類の多くに発見されている Val-Pro-Gly-Val-Gly と鶏以外の哺乳類で見つ

ている Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly といったアミノ酸の繰り返し配列が報告されている^{14,15)}. また, 動物種でその組成割合は異なるが, Val, Gly, Ala, Pro が多く存在する. 以上の事より, エラスチン加水分解物中の繰り返し配列が消化・吸収の過程で低分子化された結果, 比較的高濃度の Pro-Gly が摂取後血液中へ移行したと考えられる. 誘導化法を導入した上記の食事由来ペプチド検索では, Pro-Gly 以外の繰り返し配列中のペプチドは見つかっていない. 今回被験者が摂取した魚類動脈球エラスチンペプチドは, 哺乳類韧带

PITC誘導化



AccQ誘導化

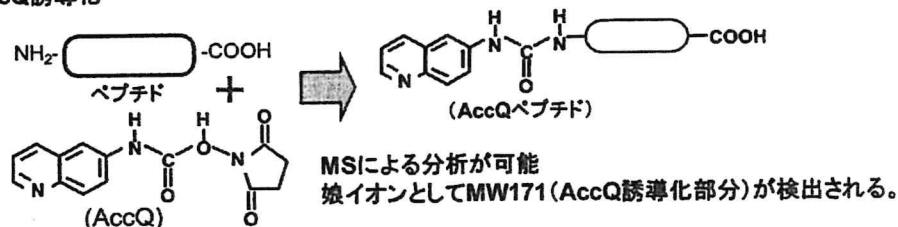


図7 PITC と AccQ 誘導化

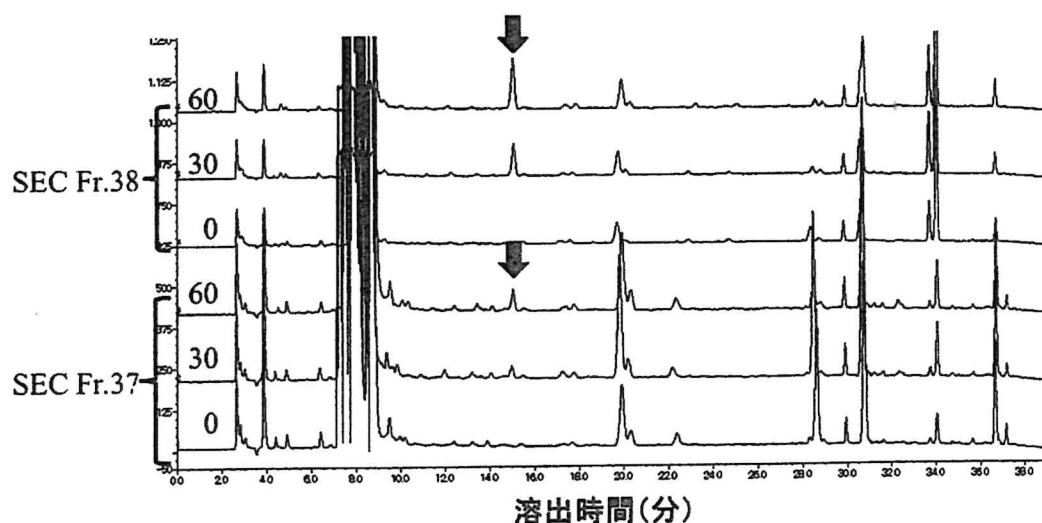


図8 SEC 画分中の AccQ 誘導化物質の PR-HPLC 分離

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1.0mL/min) し, UV254nm 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

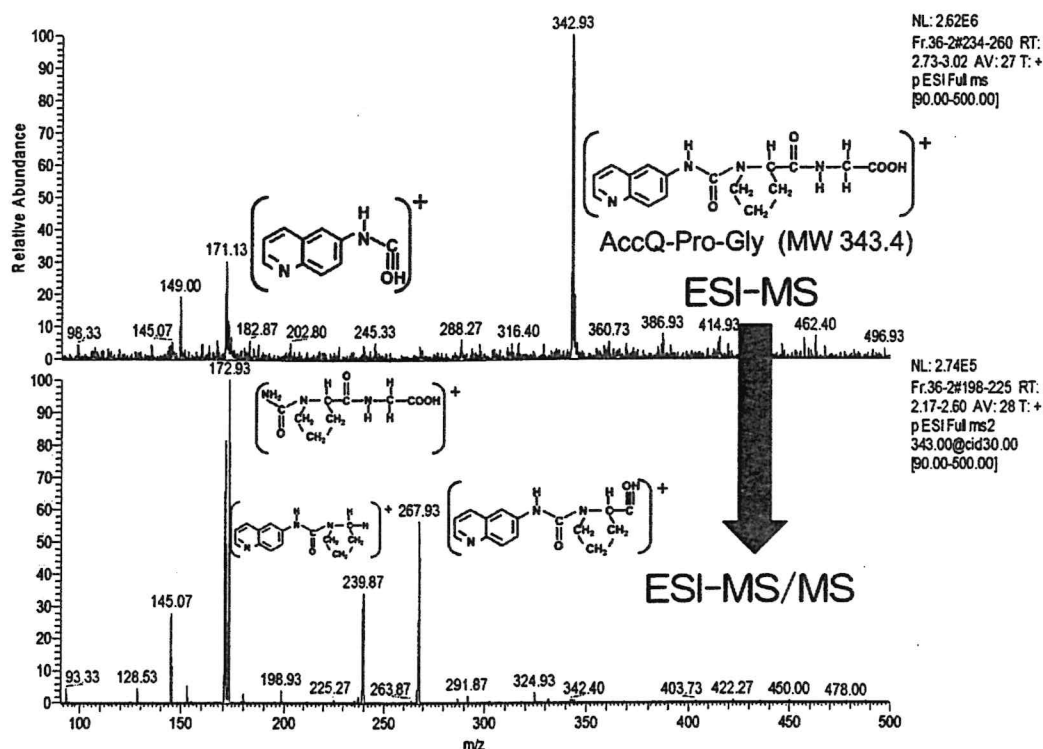


図9 RP-HPLC 溶出画分の ESI-MS (上) および ESI-MS/MS (下) 分析

エラスチンに比べて Gly のアミノ酸組成が非常に高い (表 2)¹⁶⁾。そのため、魚類動脈球由来エラスチン加水分解物摂取後、Pro-Gly が優先的に血液中に移行し、それ以外のペプチドは非常に微量な濃度で移行した可能性が考えられる。そこで、魚類以外の動物種から調製したエラスチン加水分解物を摂取すれば、Pro-Gly 以外の血液中食事由来ペプチド濃度が上昇する可能性が考えられた。

そこで、豚血管から調製されたエラスチン加水分解物の摂取後、上記の実験同様に AccQ 誘導化と MS を導入した方法により血液中の食事由来ペプチドの検

索を行った。MS 分析結果から、エラスチンペプチド摂取後の血漿から Pro-Gly と Leu-Leu または Ile-Ile, Leu-Ile, Ile-Leu (Leu と Ile は分子量が同じため) が検出された。

5. 血液中食事由来エラスチンペプチドの定量

前述した様に、食事由来 Pro-Gly がエラスチン分子の繰り返し配列から由来したペプチドであれば、Pro-Gly 以外の繰り返し部分が血液中で食事由来エラスチンペプチドとして検出される可能性が考えられる。しかし、豚血管由来そして魚類動脈球由来エラスチン加水分解物摂取後、血液中から Pro-Gly 以外の Gly-Val, Val-Gly, Val-Ala といった繰り返し配列のペプチドは検出されなかった。これまでに紹介した食事由来ペプチド検索方法は数段階の分離を経るため、血漿中に含まれる微量な食事由来ペプチドを検出しそこねている可能性がある。さらに上記の方法は加水分解物摂取から 30 と 60 分後の血漿しか分析しておらず、それ以降に検出される可能性も考えられる。そこで、繰り返し配列中のジペプチド 4 種類に特定し、エラスチン加水分解物摂取 7 時間後までの血漿中のペプチドを LC-MS/MS によって濃度を測定した。

被験者・採血・血漿調製 被験者は計 6 名 (平均年齢 37.4 ± 14.8 歳) で、20 と 50 代の各 3 名の方々から

表 2 エラスチン中の Pro, Gly, Ala, Val の組成比較

	ウシ靱帯 ¹	ハマチ動脈球 ² (/1000 残基)
Pro	115.5	94.8
Gly	328.1	430.1
Ala	227.0	96.9
Val	131.6	54.5

1, Fields et al. Arch. Biochem. Biophys. 1978, 191, 7075-713

2, Nakada et al. Fisheries Sci. 2006, 72, 1322-1324

構成される2グループの被験者に対して12時間の絶食後に採血を行い、その直後エラスチン加水分解物(カツオ動脈球由来)を体重60kgあたり10g摂取して頂いた。さらに摂取から30, 60, 120, 240, そして420分後に採血を行った。血漿に3倍量のエタノールを加え、遠心分離によって血漿エタノール可溶性画分を調製した。血漿から調製したエタノール可溶性画分は、フィルター付きエッペンを用いて強陽イオン交換樹脂(AG50)で処理された。強陽イオン交換樹脂に吸着したアミノ酸・ペプチドをAccQ誘導化試薬で処理し、ODS-3カラムを装着したLC-MS/MS(Q-TRAP 3200 ABCIEX)によってペプチド濃度を測定した。Pro-Gly, Gly-Val, Val-Gly, Val-Ala濃度は各標準ペプチド濃度を基に定量した。

その結果、加水分解物摂取前後の血漿中でGly-Val, Val-Gly, Val-Alaは検出されなかったのに対し、Pro-Glyは全ての被験者において検出された(図10)。摂取後の同時間帯で、血漿中Pro-Gly濃度は被験者間で最大で2.5倍もの差がみられた。その濃度は摂取から30分後に最大値に達し、その後は減少傾向を見せたが摂取1, 2, 4時間後まで検出され、摂取から7

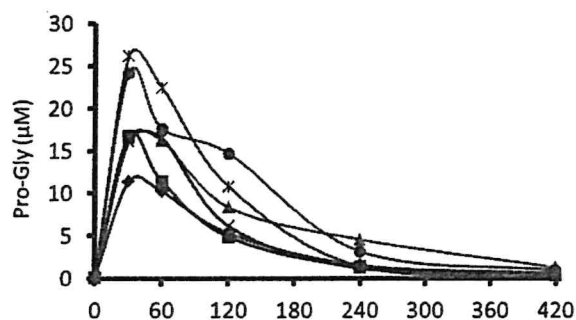


図10 エラスチン加水分解物摂取後の血漿中Pro-Gly濃度

表3 被験者別血漿中Pro-Gly(μM)

分(摂取後)	20代	50代
0	0.10	0.14
30	22.18*	14.92
60	18.85*	12.59
120	10.53	6.19
240	1.93	2.47
420	0.61	0.74

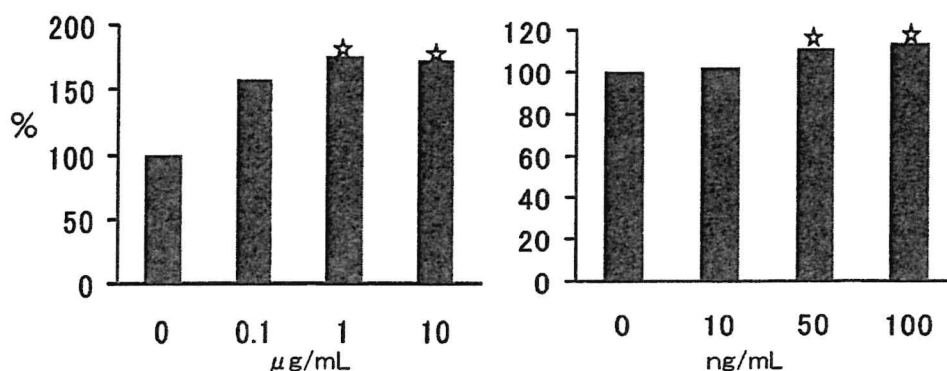
★, 同じ時間帯で年代別血漿中Pro-Gly濃度に有意差有り

時間後には摂取前と同レベルまで低下した。被験者の年代別にPro-Gly濃度を比較したところ、摂取から2時間は20代の被験者において高い傾向が見られた(表3)。各年代の被験者が3名ではあるが、50代に比べて20代の被験者血漿中Pro-Gly濃度は摂取30と60分後において有意に高かった。

6. Pro-Glyが及ぼす細胞への影響

食事由来コラーゲンペプチド, Pro-Hypはコラーゲンゲル上でマウス皮膚線維芽細胞の増殖を促進する。同様の手法によって、コラーゲンゲル上でのマウス皮膚線維芽細胞の増殖に対するPro-Glyの影響について調べたが、培地中へのPro-Gly添加による増殖の有意な変化は見られなかった。そこで、Pro-Glyが及ぼす線維芽細胞のエラスチン産生と血管内皮細胞への影響について調べた。

1%FBSを含むD-MEM内に正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を懸濁し、96wellプレートに播種後、5%CO₂下、37°Cで培養した。24時間後、培養上清をPro-Glyを添加したD-MEM(1%FBS)に交換した。被験物を添加後3日間培養したのち、培養上清を回収し、Prosserらの方法¹⁷⁾を基にELISA法によ



Pro-Gly添加濃度
☆: Pro-Gly非添加群に対して有意な変化が見られた(p>0.01)

図11 Pro-Gly添加による細胞への影響

て培養上清中に産出されたトロポエラスチン濃度の定量を行った。Pro-Gly 未添加でのエラスチン産生量を100とし、Pro-Gly 添加区の相対値を求めた。その結果、Pro-Gly の添加によって培地中のトロポエラスチン濃度が増加しており、添加濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 以上でエラスチン産生を有意に促進した (図11)。

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を EG-2 培地に懸濁し、96well プレートに 1×10^3 cells 播種した。同時に Pro-Gly を溶解させた PBS を培地に $1/10$ 量添加した。コントロールは PBS のみ添加した。5% CO_2 , 37°C で培養し、4 日後に Cell Counting Kit-8 で測定した。コントロールの吸光度を100とし、Pro-Gly 添加区の相対値を求めた。その結果、培養96時間後に 50ng/mL 以上の Pro-Gly 添加によって有意な細胞増殖作用が見られた。

7. おわりに

本研究においてエラスチン加水分解物摂取後のヒト血漿から食事由来ペプチドとして、Pro-Gly と微量であったが Leu-Leu (Leu が Ile の可能性もある) を検出した。Pro-Gly 血中濃度は加水分解物摂取から30分後に最大値に達し、4 時間後まで検出された。さらに、被験者の年齢が若いほど加水分解物摂取後の Pro-Gly の血中移行濃度が高い傾向に見られた。

摂取された加水分解物は消化器官で分解され、さらに小腸上皮のトランスポーター通過前にも分解を受ける可能性が報告されている¹⁸⁾。毛細血管へ移行したペプチドは、さらに血中で酵素による低分子化を受ける。そのため、高濃度で血中へ移行する食事由来ペプチドの条件としては酵素に対する耐性が強いことが考えられる。前述したように、これまで食事由来コラーゲンペプチドが血液中で μM と、高濃度で検出されている。これら食事由来コラーゲンペプチドはいずれも配列中に Hyp を含んでおり 2~3 残基と短鎖ペプチドである。そのため Pro が水酸化した Hyp のペプチド結合が酵素に対する耐性が強く、ペプチド中の Hyp の存在が高濃度で血中へと移行する食事由来ペプチドの条件として考えられた。しかし、本研究で食事由来エラスチンペプチドとして μM レベルの Pro-Gly が検出されたことから、高濃度食事由来ペプチド中の Hyp の存在は絶対条件ではないことが分かった。コラーゲン分子には Pro-Hyp-Gly の繰り返し配列を含んでおり、その加水分解物摂取後の血液から Pro-Hyp が食事由来ペプチドの主要成分として同定され

ている。今回検出された食事由来 Pro-Gly もエラスチン分子内の繰り返し配列、Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly と Val-Pro-Gly-Val-Gly に含まれている。このことから、高濃度食事由来ペプチドの血中移行条件としては加水分解物中に繰り返し配列が存在することが考えられる。本研究で、PITC と ACCQ 誘導化の導入に加えて LC-MS を用いたペプチド定量の結果から、Pro-Gly 以外の繰り返し配列中のペプチドが検出されなかった。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¹⁹⁾。これは、繰り返し配列中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に対する耐性が強いペプチドが血液中へ移行することを示唆している。高濃度の Pro-Hyp と Pro-Gly が血中で検出されていることから、Pro ペプチドの N 末端側に比べて C 末端側の結合が生体のペプチダーゼ耐性が強く、その結果として繰り返し配列中の Pro ペプチドが高濃度で血中へ移行したと考えられる。以上のことから、コラーゲンやエラスチン以外の加水分解物中にもアミノ酸配列の繰り返し構造が存在し、その配列に強い酵素耐性をもつ 2~3 残基のペプチドが存在すれば、食事由来ペプチドとして高濃度で血中へ移行する可能性が考えられる。

培地中への微量な Pro-Gly 添加は線維芽細胞の増殖には影響しなかったが、皮膚線維芽細胞のエラスチン合成と血管内皮細胞の増殖を促進した (図11)。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が報告されている¹⁹⁾。これより、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 である可能性が考えられる。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 (図2)。コラーゲンとエラスチンの混合加水分解物を摂取すると、エラスチン無添加群に比べて肌の状態が改善されるとの報告がある¹²⁾。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。

本研究結果は部分的ではあるが、エラスチン加水分解物摂取による肌の状態改善メカニズムについて明らか

にした。今後は微量成分として検出した Leu-Leu (Leu が Ile の可能性もある) の生理機能について、また他細胞に対する Pro-Gly の影響についても検討する予定である。

謝辞

本研究の推進にあたり、血液試料を御提供頂いた林兼産業株式会社、日本ハム株式会社の関係各位に深謝いたします。

参 考 文 献

- Field, J. M., Rodger, G. W., Hunter, J. C., Serafini-Fracassini, A., Spina, M. : Isolation of elastin from bovine auricular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1978, 191 (2), 705-13.
- Gunja-Smith, Z. : An enzyme-linked immunosorbent assay to quantitate the elastin crosslink desmosine in tissue and urine samples. *Anal Biochem* 1985, 147 (1), 258-64.
- Weinstein, G. D., Boucek, R. J. : Collagen and elastin of human dermis. *J Invest Dermatol* 1960, 35, 227-9.
- Matsumoto, H., Ohara, H., Itoh, K., Nakamura, Y., Takahashi, S. : Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE. Lett.* 2006, 7, 386-390.
- Trč, T., Bohmová, J. : Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). *Int. Orthop.* 2010, 35 (3) 341-348.
- Deal, C. L., Moskowitz, R. W. : Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1999, 25, 379-395.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., Ohtsuki, K. : Identification of food-derived peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 6531-6536.
- Ohara, H., Matsumoto, H., Itoh, K., Iwai, K., Sato, K. : Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1532-1535.
- Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, EY., Nakamura, Y., Sato, K. : Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chem.* 2011, 129 (3), 1019-1024.
- Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J., Wada, M. : Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis. Cartilage.* 2009, 12, 1620-1627.
- 岩井浩二, 張有做, 河口友美, 雑賀 (江草) 愛, 清水宗茂, 大森丘, 高畑能久, 森松文毅 : 鶏コラーゲン加水分解物摂取後のヒト血中ペプチドの動態と ACE 阻害作用. *日本食品科学工学会誌* 56 (6), 326-330, 2009.
- Nakaba, M., Koikeda, T., Saitou, Y. : Effect of the elastin peptide derived from fish species for human skin. *J. New Rem. & Clin.* 2007, 56, 109-115.
- Urado, D., Park, EY., Nakamura, Y., Sato, K. : Identification of food-derived peptides in human blood by peptide derivatization and mass spectrometric analysis. *J. Japn. Soc. Food Eng.* 2009, 29 (4), 175-184.
- Bressan, G. M., Argos, P., Stanley, K. K. : Repeating structure of chick tropoelastin revealed by complementary DNA cloning. *Biochemistry* 1987, 26 (6), 1497-1503.
- Foster, J. A., Bruenger, E., Gray, W. R., Sandberg, L. B. : Isolation and amino acid sequences of tropoelastin peptides. *J. Biol. Chem.* 1973, 248 (8), 2876-2879.
- Nakaba, M., Ogawa, K., Seiki, M., Kunitomo, M. : Properties of soluble elastin peptide from bulbus arteriosus in fish species. *Fish. Sci.* 2006, 72 (6), 1322-1324.
- Prosser, I. W., Whitehouse, L. A., Parks, W. C., Stahle-Backdahl, M., Hinek, A., Park, P. W., Mecham, R. P. : Polyclonal antibodies to tropoelastin and the specific detection and measurement of tropoelastin in vitro. *Connect. Tissue Res.* 1991, 25 (3-4), 265-279.
- Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K., Mine, Y. : Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J. Pept. Sci.* 2007, 13 (7), 468-74.
- Tajima, S., Wachi, H., Uemura, Y., Okamoto, K. : Modulation by elastin peptide VGAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 1997, 289, 489-492.

食の機能と安全研究会メンバー募集 (若干名)

世話人代表 : 泉 秀 実先生 (近畿大学生物理工学部教授)

<お問合せ> 日本食品・機械研究会 TEL06 (6654) 1801

E-mail : nishoku@nifty.com