

カツオエラスチンの製造技術と機能性

Production Technique of 'Bonito Elastin' and Its Health Function

白土絵理*

エラスチンは組織・臓器へ弾性を与える重要なタンパク質であり、基礎から応用まで様々な研究が進められている。しかし、魚類由来エラスチンに関しては研究例が少ない。その中で我々は、カツオ動脈球から産業規模でのエラスチンペプチド「カツオエラスチン」の製造に成功し、食品素材としての機能性を追求している。

1. はじめに

エラスチンは、大動脈、皮膚、項靱帯、肺など、弾性を必要とする組織や臓器の主要な構成成分である弾性線維のコアタンパク質である^{1,2)}。エラスチンは組織中では不溶性で、ゴムのように伸縮性に富み、全身の組織や臓器へ弾性を付与している。エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンは、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、弾性軟骨の軟骨細胞等で産生される分子量約 68kDa の可溶性の線維状タンパク質であるが、弾性線維形成までの過程の中で、分子間架橋(デスモシン、イソデスモシン)がなされ不溶性のエラスチン線維となる³⁾。この不溶性エラスチンが煮沸処理に抵抗し、残渣として残ることが初めて報告された⁴⁾のは 1902 年であり、1941 年に Lowry ら⁵⁾がエラスチンを組織から可溶化しようと試みた。次いで Lancing ら⁶⁾がこの方法を改良し、現在最もポピュラーに用いられている hot-alkali 法を開発した。Li ら⁷⁾のトロポエラスチン遺伝子欠損マウスを用いた試験により、エラスチンは臓器や組織

の弾性だけでなく形態維持にも重要であり、生命維持においても必要不可欠であることが証明された。また、エラスチン由来ペプチドが elastin binding protein (EBP) 等を介し、線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞などと相互作用をすることも報告されている⁸⁻¹⁰⁾。

エラスチン研究は現在でも発展途上であるが、生体内にとって重要でありユニークな物性をもつことから医療材料等への応用研究が進められており、近年では機能性食品素材としても注目を集めている。

本稿では、我々が「カツオエラスチン」を開発するに至るまでのプロセスと産業規模での製造技術について述べ、その機能性に関してヒトへの経口摂取試験結果を中心に紹介する。

2. 魚類エラスチンの探索と製造

我々がエラスチンに着目したのは 2002 年のことであるが、当時、化粧品などのエラスチン素材の原料の主流はウシ項靱帯であった。しかし、牛海綿状脳症 (BSE) などの家畜伝染病の影響から、

*Eri Shiratsuchi 林兼産業(株) 開発部 開発課

ウシ項韌帯由来エラスチンが敬遠される傾向にあり、より安全な海洋性原料由来のエラスチンが望まれるようになっていた。

そこで我々は、エラスチンを単離する海洋性原料を探索するにあたり、魚類の動脈球、皮、血合筋、心筋、筋肉、腎臓、肝臓、脾臓、腸管、卵巣、幽門垂および胃を採取し、アミノ酸組成およびエラスチンの指標としてデスモシン、イソデスモシン含量を測定した。魚種は、研究対象として安定かつ大量に入手できるカツオ (*Katsuwonus pelamis*)、ハマチ (*Seriola quinqueradiata*)、マグロ (*Thunnus thynnus*)、サケ (*Salmo salar*) を選択した。アミノ酸分析の結果、動脈球にのみデスモシン、イソデスモシンの検出が認められた。動脈球 (図1) とは弾性に富む魚類に特有の組織であり、海綿構造を有し血流速度の調整に関与していることが知られている。一方、他の組織からはデスモシン類は検出されず、エラスチンが非常に少ないかほとんど含まないことが推定され、原料として不適であることが明確となった。各魚種に

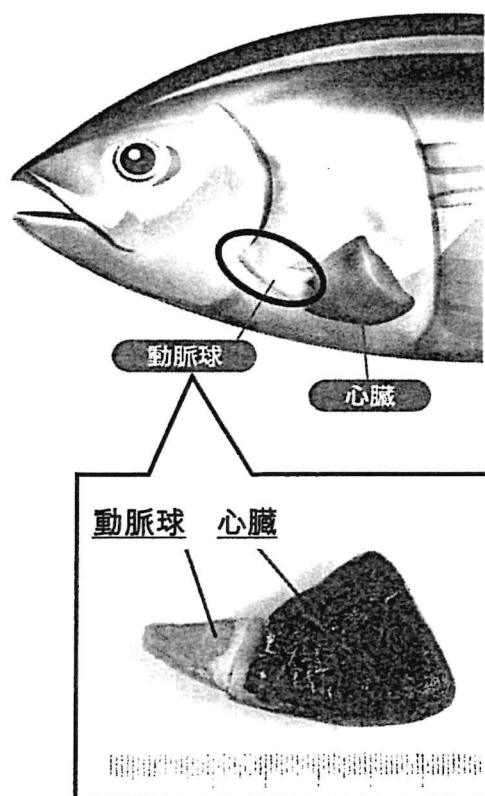


図1 カツオ動脈球

おける動脈球中のデスモシン、イソデスモシン、ヒドロキシプロリン含量を表1に示す。動脈球中にはヒドロキシプロリン (コラーゲンに多く含まれる) はほとんど含まれず、ほぼ弾性線維で構成されていることが推定された。続いて、動脈球および皮膚の組織切片を常法により作製し Elastiva van Gieson (EVG) 染色を行った結果、動脈球組織は濃紫色に染まる弾性線維部分が多くを占め、皮膚組織は赤色に染まる膠原線維が大部分であった。このように、EVG 染色によっても動脈球が弾性線維を豊富に含む組織であることが確認できた。

以上の検討により、将来性および生産性などを考慮し、エラスチンの原料としてカツオ動脈球を選択した。その後、hot-alkali 法を参考に、ラボスケールでのカツオ動脈球由来エラスチンペプチドの調製検討を経て、産業規模での「カツオエラスチン」製造法を確立した¹¹⁾。まず、カツオ動脈球を 0.01M NaOH (4℃) に浸漬し、加熱によってコラーゲンを除去した。残渣に対し、2種の酵素 (プロチン SD-AC10F : 大和化成, プロテアーゼ N-G : 天野エンザイム) を用いて加水分解し、抽出液を層濾過にて精製、スプレードライ乾燥後、カツオエラスチン粉末を得た。得られたカツオエラスチンについて、アミノ酸分析を行い、アミノ酸組成を確認した (表2)。カツオエラスチンのアミノ酸組成は、構成アミノ酸総数を1,000残基としたときグリシンが440残基、疎水性アミノ酸であるアラニンが85残基、バリンが72残基、ロイシンが37残基、プロリンが102残基であり、デスモシン、イソデスモシンを含んでいた。また、ヒドロキシプロリンをほとんど含まなかった。すなわち、本エラスチンペプチドは一般的なエラス

表1 各魚類動脈球組織中のデスモシン (Des), イソデスモシン (Ide) 含量 (mg/g)

アミノ酸	カツオ	ハマチ	マグロ	サケ
Des	0.6	0.4	0.4	0.5
Ide	0.5	0.6	0.4	0.5
Hyp	4.1	3.5	6.5	5.1

表2 カツオエラスチンのアミノ酸組成
(mol/1,000mol)

	カツオ エラスチン	文献値 (from yellow tail)
Asp	21	18
Thr	68	63
Ser	25	32
Glu	37	33
Gly	440	400
Ala	85	130
Val	72	57
Cys	1	<0.6
Met	4	6.4
Ile	12	12
Leu	37	37
Tyr	30	38
Phe	21	31
Hyl	0	0
His	3	3.5
Lys	8	11
Ide	0.3	0.4
Des	0.2	0.4
Arg	25	21
Hyp	7	8.5
Pro	102	99

チンのアミノ酸組成の特徴を有しており、Sageら¹²⁾が報告しているハマチ動脈球の組成とも一致していた。このことより、カツオエラスチンは高純度で製造されていることが示唆された。

物理的性状に関する試験も実施している。カツオエラスチンは淡黄色粉末で可溶性（50%まで溶解）に優れ、1%水溶液では臭いや味はほとんど感じられなかった。さらに pH3.5, 121°C, 15分といった過酷な条件でもアミノ酸組成に変化は見られず、デスモシン、イソデスモシンの残存率にも影響は見られなかった。これより、カツオエラスチンは pH および熱安定性に優れた素材であることが判明した。また、分子量分布をゲル濾過クロマトグラフィーにより確認したところ、1,000 残基以下の画分が約 80% を占める低分子ペプチドであり、優れた吸収性が期待できた。

カツオエラスチンの安全性については、急性経口毒性試験や変異原性試験¹³⁾、皮膚一次刺激性試

験、眼粘膜刺激性試験により異常所見がないことを確認している（試験依頼先：（一財）日本食品分析センター）。また、ヒトでのカツオエラスチン高用量長期摂取試験（13ヵ月間、400mg/日）¹⁴⁾によっても異常所見はなく、ウシ項靱帯由来エラスチンに代わる安全な素材であると結論づけられた。

3. カツオエラスチンの機能性

機能性食品として、比較的研究が進んでいる素材の一つにコラーゲンペプチドが挙げられる。コラーゲンペプチドについてはヒトでの経口摂取試験結果が報告されており、皮膚の水分、弾力改善¹⁵⁾や関節痛改善¹⁶⁾などが得られている。このようなヒトへの有効性を説明できるメカニズムとして、コラーゲンペプチドの摂取によって Pro-Hyp などのジペプチドがヒトの末梢血中へ増加し、これらのペプチドが各細胞の増殖や細胞外マトリックス成分の産生促進を引き起こす可能性が示唆されている¹⁷⁾。

コラーゲンと同様に、生体にとって重要な細胞外マトリックスであるエラスチンについても経口摂取による有効性が期待されたが、開発当初そのような報告はなかった。そこで我々は、エラスチンが重要であると考えられる部位をターゲットとして、カツオエラスチンの機能性検討のため様々なヒト試験や細胞試験を実施してきた。その検討の中で、カツオエラスチン経口摂取後の末梢血中よりジペプチドであるプロリルグリシン（Pro-Gly）を見出すことに成功している¹⁸⁾。

初めに皮膚への効果を紹介したい。皮膚組織にはコラーゲンが70%以上含まれるのに対し、エラスチン含量は2~4%と少ない。しかし、この微量のエラスチンが皮膚に弾性を与え、ハリを保つ重要な働きをしている。皮膚真皮層のエラスチンは、加齢や長期の紫外線への暴露によって減少や変性が起こり、これらが皮膚のシワやたるみなどの質的变化と密接に関わっていると考えられる。そこでカツオエラスチンの皮膚への有用性を検証するため、プラセボ群を対照としたカツオエラスチン含有サプリメント（カツオエラスチン75mg

配合) 摂取群との二重盲検並行群間試験を実施した¹⁹⁾。試験の対象は「30歳代の日本人女性で、右目尻にシワがあり、かつ肌のたるみに悩んでいる、冷え性を自覚している」という条件を満たす者とし、10名ずつの2群に分けた(エラスチン群: 平均年齢 35.7 ± 3.2 歳, プラセボ群: 平均年齢 35.6 ± 3.0 歳)。その結果、皮膚弾性を示す戻り率について、摂取前からの有意な改善(図2)、頬血流量の低下抑制、アンケート調査による皮膚状態、特にプラセボ群との比較においては「メイクのノリ」、「メイクの持ち」、「目元・口元のかさつき」について有意な体感改善が得られた(図3)。正常ヒト皮膚線維芽細胞培養試験により、Pro-Gly の $0.1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の添加による有意なエラスチン産生促進を確認した¹⁸⁾。

次に、膝関節痛および膝靱帯への効果について紹介する。膝靱帯は関節を支持し膝を安定化させ、その張力によって関節の正常な動きを制御している。しかし、靱帯の最大荷重は加齢とともに低下し、張力が失われ関節の可動域・伸展性が低下することで関節への負荷が増大することとなり、変形や損傷が進んでいく^{20,21)}。靱帯組織は主にI型、III型コラーゲン、エラスチン、細胞で構成されているが、靱帯機能や張力低下の原因の一つとして、皮膚におけるシワやたるみと同様にエラスチンの変性、減少が考えられる。そこで、膝関節靱帯の

機能改善といった観点から、対象を45歳以上75歳以下の男女(平均年齢 53.8 ± 7.2 歳)で「膝関節痛の自覚症状のある者」とし、試験群をカツオエラスチン配合サプリメント(カツオエラスチン75mg 配合)摂取群、カツオエラスチン+グルコサミン塩酸塩配合サプリメント(カツオエラスチン75mg, グルコサミン塩酸塩1,000mg 配合)摂取群、プラセボ群とした各群7名の3群間並行比較による二重盲検法にてヒト試験を実施した²²⁾。その結果、JKOM アンケート(変形性関節症患者の患者立脚型疾患特異的QOL評価尺度)により、Visual Analogue Scale (VAS) による「膝の痛みの程度」および膝の痛みに関するスコア合計につ

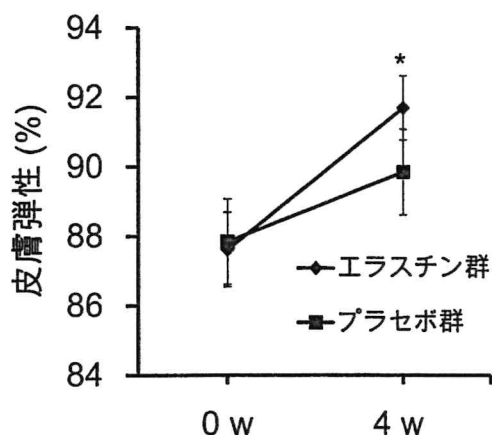


図2 皮膚弾性測定結果

Paired *t* test (0 w vs. 4 w) *: $p < 0.05$ (Mean $\pm$ SE)

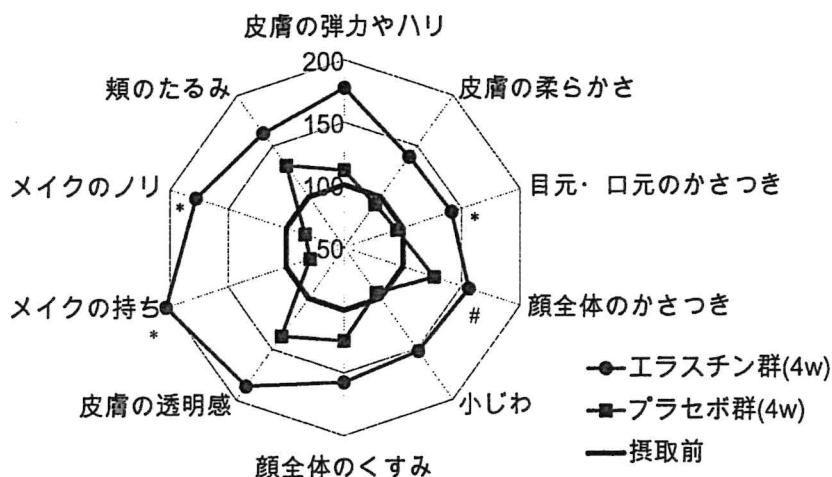


図3 体感アンケートによる皮膚状態の改善(摂取前; 100)

unpaired *t* test (プラセボ群 vs. エラスチン群) *: $p < 0.05$, #: $p < 0.1$

いて、エラスチン群およびエラスチン+グルコサミン群では経時的な改善が得られ、12週間後にはプラセボ群と比較して有意な改善が確認できた(図4)。また、膝状態に関するアンケート調査より、特に「しゃがみ込みや立ち上がり」、「階段昇り降り」といった靱帯の張力が重要であると考えられる項目では有意な改善が確認できた(図5)。この2つの項目についてはエラスチン単剤でも効果が得られたことから、カツオエラスチンが靱帯の機能向上に有効であることが期待できた。ヒト膝前十字靱帯由来細胞培養試験により、カツオエラスチンおよびPro-Glyの50, 500ng/mLの添加によるI型、III型コラーゲン mRNA およびエラスチン mRNA の有意な発現促進を確認した。

以上、カツオエラスチン経口摂取により、エラスチンが重要かつ加齢によりその機能低下が引き起こることが報告されている組織に対して、その機能を維持または改善を示唆する結果が得られた。今回詳しい紹介はしないが、カツオエラスチン経口摂取により血管弾性を改善する効果も得られている¹⁹⁾。このようなヒトへの効果の説明として、細胞試験の結果から、コラーゲンペプチドと同様、血中へ移行したPro-Glyなどのペプチドが、必

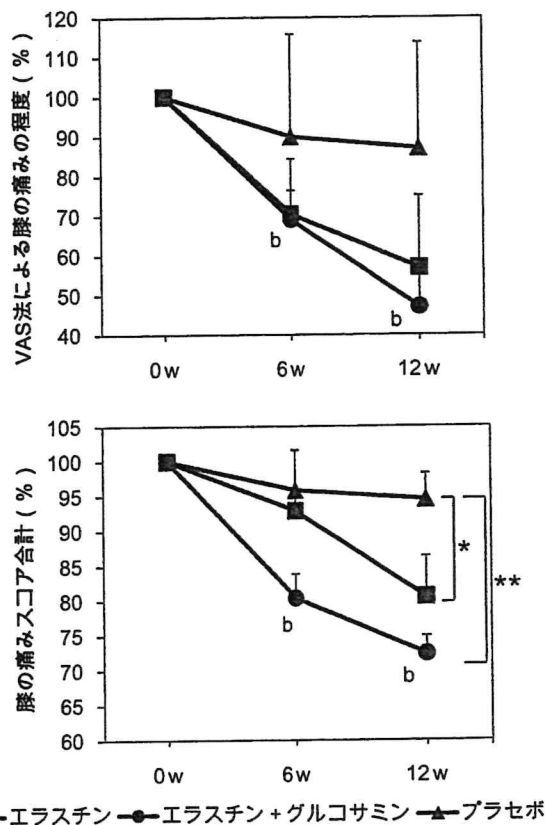


図4 JKOM アンケート結果

群間比較: unpaired *t* test (vs. プラセボ) *: $p < 0.05$,
*: $p < 0.01$, 経時比較: Dunnett の検定 (vs. 0w)
b: $p < 0.01$ (Mean $\pm$ SE)

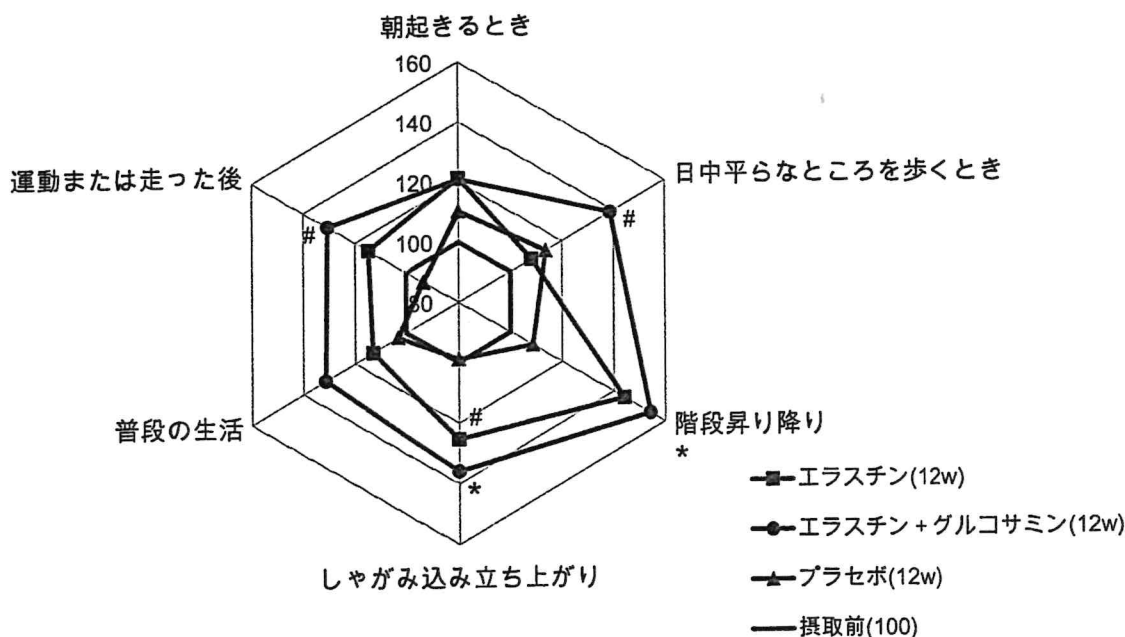


図5 体感アンケートによる膝状態の改善
#: $p < 0.1$, *: $p < 0.05$ vs. プラセボ

要とされる組織の細胞へ作用している可能性が示された。しかし、これらのペプチドがどのように作用しているか詳細は不明であり、今後さらなる検討が必要であると考えられる。また、我々は現在、ヒトへの効果と細胞試験とのギャップを埋めるため、家兎の膝靱帯組織の外傷性損傷モデル（内側側副靱帯部分切断）を作製し、カツオエラスチン経口摂取によって組織における遺伝子発現や組成、形態へどのような影響を与えるかについて検証中である。

4. まとめ

我々はエラスチンを効率的に単離する原料として動脈球を見出し、安全かつ高純度カツオ動脈球由来エラスチンペプチドの大量製造方法を確認させ、「カツオエラスチン」の上市に至った。それ以降、皮膚、靱帯、血管など様々な組織へのカツオエラスチンの機能性に関する検討を進めてきており、現在もなお進行中である。

将来、カツオエラスチン経口摂取によるヒトへの効果のメカニズム研究が進み、細胞の活性発現機構などが解明することで、カツオエラスチンが単なる機能性食品素材に留まらず、多様な分野への応用への足掛かりとなり、我々の豊かでしなやかな人生をサポートする素材として活躍することを期待したい。

文 献

- 1) 岡元孝二ほか, 蛋白質・核酸・酵素, 24, 1471 (1979)
- 2) B. Vrhovski & A. S. Weiss, *Eur. J. Biochem.*, 258, 1 (1998)
- 3) M. Hirai *et al.*, *J. Cell Biol.*, 176, 1061 (2007)
- 4) A. N. Richards & W. J. Gies, *Amer. J. Physiol.*, 7, 93 (1902)
- 5) O. H. Lowry *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 139, 795 (1941)
- 6) A. I. Lansing *et al.*, *Anat. Rec.*, 114, 555 (1952)
- 7) D. Y. Li *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 102, 1783 (1998)
- 8) R. P. Mecham *et al.*, *J. Cell Biol.*, 113, 187 (1991)
- 9) A. Hinek *et al.*, *Science*, 239, 1539 (1988)
- 10) A. Hinek *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 203, 344 (1992)
- 11) M. Nakaba *et al.*, *Fisheries Sci.*, 72, 1322 (2006)
- 12) H. Sage & W. R. Gray, *Comp. Biochem. Physiol.*, 64B, 313 (1979)
- 13) 中場操子, 応用薬理, 77, 115 (2009)
- 14) 白土絵理, 応用薬理, 83, 23 (2012)
- 15) H. Matsumoto *et al.*, *ITE Lett.*, 7, 386 (2006)
- 16) A. G. Schauss *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 4096 (2012)
- 17) Y. Shigemura *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 444 (2009)
- 18) Y. Shigemura *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5128 (2012)
- 19) 白土絵理, 食品加工技術, 32, 28 (2012)
- 20) S. L.-Y. Woo *et al.*, *Am. J. Sports Med.*, 19, 217 (1991)
- 21) 石井慎一郎, 月刊スポーツメディスン, 7, 6 (2012)
- 22) 白土絵理, FoodStyle21, 8, 31 (2014)

