

学 位 論 文 題 名

ホタテガイ外套膜由来コラーゲンの性状・特徴
および利用に関する研究

学位論文内容の要旨

コラーゲンとゼラチンは牛骨、牛皮、豚皮などを原料として生産されてきたが、牛海綿状脳症(BSE)、口蹄疫などの問題で家畜系コラーゲンが敬遠されるようになり、水産系コラーゲンへの転換が試みられてきている。ホタテガイ(*Patinopecten yessoensis*)は天然貝及び養殖貝とも盛んに生産されており、特に北海道における生産は40万トンにも及ぶ。しかし、ホタテガイの加工においては貝柱のみを利用することが多く、外套膜や内臓の多くは廃棄され、外套膜だけでも年間30,000トンにも及ぶ。北海道のホタテガイ外套膜は6～10月にかけて、コラーゲンを1.3～2.0%の範囲で安定的に含むことが明らかとなり、コラーゲンの安定供給源として有望であることが判明した。これまで無脊椎動物コラーゲンに関する研究は哺乳類動物コラーゲンに比べて著しく少なく、コラーゲンの有効利用を目的に、その特性を分析した例はほぼ皆無である。本研究では北海道で大量かつ安定的に原料を確保できるホタテガイ外套膜のコラーゲンの性状・特徴を明らかにし、食品、化粧品及び医療素材としての基礎特性を評価した。

第1章では、ホタテガイ外套膜から純度の高いコラーゲンを得るために、コラーゲンの抽出と精製を行った。はじめに、酢酸抽出を行った結果、コラーゲンの抽出量は外套膜総コラーゲン当たり0.45 %と低く、得られたコラーゲンの純度も低かった。しかし、ペプシンを用いてコラーゲン両末端のテロペプチドを切る方法によって、コラーゲンの抽出率を高めることができた。両末端のテロペプチドを取り除いたコラーゲンを通常アテロコラーゲンと言う。アテロコラーゲンは酵素分解を受けてないコラーゲンとほぼ同様な諸性質を示す。抽出したアテロコラーゲンを塩析、酵素失活、超遠心分離を行って精製した結果、純度の高い透明なコラーゲン溶液を得ることができた。ペプシン限定分解(ペプシン酵素分解抽出)後、精製して得られたコラーゲン(SMPC)の抽出率は26%に達した。コラーゲンの有効利用の観点から、ペプシン酵素分解抽出法で抽出で

きなかった部分は熱水でコラーゲンを変性させることによって抽出した。熱水抽出コラーゲン(SMHC)の抽出率は70 %であった。

第2章では、SMPCを用い、アミノ酸組成、V8プロテアーゼ分解性、コラーゲン繊維の透過型電子顕微鏡観察、及び吸湿性の評価を牛コラーゲンと比較しながら行った。その結果、SMPCは牛胎盤由来タイプVコラーゲンとほぼ同じ分子量の α 鎖を持ち、アミノ酸組成も共通の特徴を持つことが判明した。しかし、酵素分解においては牛タイプVコラーゲンとは異なる電気泳動パターンを示し、一次構造が異なることが示唆された。コラーゲングル繊維の太さはSMPCの方が細く、牛皮タイプIコラーゲン繊維の約半分であった。また、ゲル形成能は牛皮タイプIコラーゲンの方が高いことを認めた。高湿度下ではSMPCの方が牛タイプIコラーゲンよりも高い吸湿性を示すことが明らかになった。さらに、ホタテガイ外套膜コラーゲン中には分子種の異なるMajorコラーゲンとMinorコラーゲンが含まれていることも判明した。

第3章では、SMPC分子を構成している α 鎖の分離を行った。SMPCの α 鎖の分離はタイプIコラーゲンの分離に一般的に用いられている陽イオン交換クロマトグラフィーでは分離が困難であった。試行錯誤の末、この原因はSMPCの等電点がタイプIコラーゲンの等電点よりも低い事にあることが明らかになった。そこで陰イオン交換クロマトグラフィー、及びゲルろ過クロマトグラフィーを行い、これによって3つの α 鎖を分離することに成功した。

第4章では、熱水抽出ホタテガイ外套膜コラーゲン(SMHC)の加水分解物のアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性を調べた。その結果、サーモリシン加水分解物に高いACE阻害性を認めた。ODSカラムによる分離を行った後、分子量が2000以下のペプチドを分離してACE阻害性を調べたところ、既に報告されている遼上シロサケ筋肉ペプチドよりは低い阻害性であったが、1つの利用方途には成り得るものと思われた。

第5章では、SMHCをヘアケア材として利用することを目的に、SMHCの加水分解物を用いて、起泡力、吸水性、及び傷んだ毛髪のキューティクル修復作用を牛ゼラチン加水分解物と比較しながら評価した。その結果、SMHC加水分解物の方が牛ゼラチン加水分解物よりもキューティクル修復作用が高いことを認めた。さらに、SMHC加水分解物の方が吸水性及び起泡力とも牛ゼラチン加水分解物よりも高い値を示すことも明らかになった。SMHC加水分解物は泡の均一性のみが牛ゼラチン加水分解物よりも、劣っていた。

第6章では、SMPCのバイオマテリアルとしての利用を目的に、化学修飾コラーゲンの性質を調べた。これまで多くの魚種からコラーゲンが抽出、精製され、食品や化粧品への機能素材として幅広く利用されるようになった。しかし、魚類コラーゲンをを用いたバイオマテリアルに関する研究は極めて少ない。これは魚類由来コラーゲンの低い変性温度による。魚類はヒトに比べて低温環境で生息する低体温動物であり、魚類コラーゲンの変性温度は5～30℃と動物由来の40℃前後に比べてかなり低い。魚類コラーゲンの変性温度がヒトを含む哺乳類の生体内温度である37℃よりも低いことは、バイオマテリアルとして用いた場合に組織中に溶解しやすく、且つ生体内プロテアーゼの消化を受けやすいことを意味する。そこで、魚類由来コラーゲンをバイオマテリアルとして用いる場合、架橋処理による安定化が必要である。SMPCの化学修飾に架橋剤として1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide (EDC)を使用した。EDCはペプチド合成の縮合剤として用いられる架橋剤である。その主な利点は、反応終了後の過剰試薬および反応生成物である尿素誘導体を容易に洗浄除去でき、分子内にそれらが残らないので細胞毒性が小さいことにある。5.0 mM濃度のEDCを用いてSMPCスポンジを4 h修飾することで、変性温度を31.3℃から57.9℃にまで高めることが出来た。修飾したSMPCスポンジは吸水性が高く、EDC濃度を変えることで、コラーゲナーゼによる分解を制御することが出来る素材であることが分かった。修飾したSMPCスポンジ上でヒト正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)を培養した結果、スポンジ上に細胞が安定して増殖することが認められ、このことから、今後、創傷被覆材などに利用できる可能性が示唆された。

以上のように、本研究では、ホタテガイ外套膜のコラーゲンの性状・特徴を明らかにし、食品、化粧品、再生医療などに幅広い利用されている脊椎動物タイプⅠコラーゲンとは異なる特徴を有することを示した。また、ホタテガイ外套膜由来コラーゲンはいくつかの利用方途において、脊椎動物タイプⅠコラーゲンの代替物として利用し得る可能性があること、さらに、一部においては牛コラーゲンを凌ぐ優位性があることも明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 是太郎

副 査 教 授 関 伸 夫

副 査 助教授 栗 原 秀 幸

学 位 論 文 題 名

ホタテガイ外套膜由来コラーゲンの性状・特徴 および利用に関する研究

コラーゲンとゼラチンは牛骨、牛皮、豚皮などを原料として生産されてきたが、牛海綿状脳症(BSE)、口蹄疫などの問題で家畜系コラーゲンが敬遠されるようになり、水産系コラーゲンへの転換が試みられてきている。しかし、これまでの水産系コラーゲンは何れも供給量が少なく、また漁獲時期も限定されていることから、牛由来のコラーゲンの代わりになるまでには到底至っていない。これに対し、ホタテガイ(*Patinopecten yessoensis*)外套膜の排出量は年間 30,000 トンにも及び、コラーゲンの供給源として有望である。それにも拘わらず、これまでホタテガイをはじめとする無脊椎動物コラーゲンに関する研究は哺乳類動物コラーゲンに比べて著しく少なく、無脊椎動物コラーゲンの有効利用を目的に、その特性を解析した例に至っては皆無であった。このような背景から、本研究では北海道で大量かつ安定的に原料を確保できるホタテガイ外套膜コラーゲンの性状・特徴を明らかにし、食品、化粧品及び医療素材としての基礎特性を評価した。

初めに申請者の申はホタテガイ外套膜から純度の高いコラーゲンを得るために、コラーゲンの抽出と精製を行った。当初は外套膜総コラーゲン当たり、収率が 0.45%と低く、得られたコラーゲンの純度も低かったが、ペプシンを用いてコラーゲン両末端のテロペプチドを切る方法によって、コラーゲンの抽出率を高めることに成功した。最終的にペプシン限定分解(ペプシンによるテロペプチド分解抽出)後、精製して得られたコラーゲン(SMPC)の抽出率は 26%に達した。コラーゲンの有効利用の観点から、ペプシン限定分解法で抽出できなかった残存コラーゲンは熱水で残存コラーゲンを変性させることによってゼラチンの形態で約 70%まで抽出することができ、量的な確保に一定の成果を得ることに成功した。同氏はま

た、SMPC のアミノ酸組成、V8 プロテアーゼ分解性、コラーゲン繊維の透過型電子顕微鏡観察、及び吸湿性の評価を牛コラーゲンと比較しながら行い、SMPC は牛胎盤由来タイプ V コラーゲンとほぼ同じ分子量の α 鎖を持ち、アミノ酸組成も共通の特徴を持つことを明らかにすると共に、酵素分解においてはむしろ牛タイプ V コラーゲンとは異なる電気泳動パターンを示すこと、及び一次構造が異なることを明らかにした。そしてコラーゲン繊維の太さは SMPC の方が細く、牛皮タイプ I コラーゲン繊維の約半分であること、ゲル形成能は牛皮タイプ I コラーゲンの方が高いこと、高湿度下では SMPC の方が牛タイプ I コラーゲンよりも高い吸湿性を示すこと、さらにはホタテガイ外套膜コラーゲン中には分子種の異なる Major コラーゲンと Minor コラーゲンが含まれていることも明らかにした。続いて同氏は SMPC 分子を構成している α 鎖の分離を試み、陰イオン交換クロマトグラフィー、及びゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることによって、3つの α 鎖に分離することにも成功した。一方同氏は熱水抽出ホタテガイ外套膜コラーゲン(SMHC)の加水分解物の有用性についても検討を加え、サーモリシン加水分解物のうち分子量が 2000 以下のペプチドにアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)阻害性があることを認めた。これは河川遡上 シロサケ筋肉ペプチドよりも低い ACE 阻害活性ではあったが、SMHC の1つの利用方途に成り得ることを示した。

同氏は SMHC の利用方途についてさらに研究を進め、SMHC 加水分解物が泡の均一性の特性では牛ゼラチン加水分解物より劣るものの、SMHC 加水分解物の方が牛ゼラチン加水分解物よりもキューティクル修復作用が高いこと、及び吸水性、起泡力ともに牛ゼラチン加水分解物よりも高い値を示すことを明らかにした。

最後に同氏は SMPC のバイオマテリアルとしての利用を念頭に、化学修飾コラーゲンの性質について調べ、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)を用いて SMPC スポンジを 4 時間化学修飾することにより、変性温度を 31.3 °C から 57.9 °C にまで高めることに成功した。修飾した SMPC スポンジは吸水性が高く、EDC 濃度を変えることによってコラーゲナーゼによる分解を制御できることを示し、修飾した SMPC スポンジ上でヒト正常皮膚繊維芽細胞を培養することにより、スポンジ上に細胞が安定して増殖することも明らかにした。これによって、今後、化学修飾 SMPC を創傷被覆材などに利用できる可能性が開かれた。

以上のように、同氏は、本研究によってホタテガイ外套膜のコラーゲンの性状・特徴を明らかにし、牛などの脊椎動物のタイプ I コラーゲンとは異なる特徴を有すること、いくつかの

利用方途において、牛のタイプⅠコラーゲンの代替物として利用し得る可能性があること、さらに、牛コラーゲンを凌ぐ優位性が一部にはあることも明らかにした。

よって、申請者の研究成果は水産廃棄物タンパク質の高度利用に新たな方向を切り開くことに大きく貢献したものであり、審査員一同は本研究の申請者が博士(水産科学)の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。