

# 有明海産エイ類の酸可溶性コラーゲン及び ゼラチン分解酵素の生化学的利用に関する研究

長崎大学大学院生産科学研究科 裴 仁佑

コラーゲンは多細胞生物に特有のタンパク質であり、細胞外マトリックスの重要構成成分である。主に組織や臓器を支えながら、体表を囲んでいて体形を維持させる役割がある。特に皮膚、軟骨、骨など結合組織に多く存在し、その他血管や内臓など広く分布している。構造特性並びに多様な機能を利用して再加工することによって食品、化粧品、医薬品の分野など、その用途は非常に広範囲に及ぶ。コラーゲンは牛、豚、鳥、魚などの真皮や骨などを原料にして得ることができる。その中でも魚は人獣共通感染症の例がほとんどないため、安全なコラーゲン原料として魚類コラーゲンに関する研究が求められている。

一方、エイ類は独特な形態や不快臭をもっているため食品としてあまり利用されていない。その中でも有明海に棲息するナルトビエイは二枚貝の食害魚であるため、その食害対策として大量駆除が行われている。従って、産業規模での利用が可能な資源であるが、エイ類の生物資源としての利用に関する研究は不十分なのが現状である。そこで、本研究ではそれらの有効利用の一環として有明海産エイ類の皮より酸可溶性コラーゲン(ASC)を抽出し、その生化学的性質の解明及び有効利用法について検討することを目的とした。

第1章では、本研究に関連した従来のコラーゲンに関する研究及び本研究の目的と概要について記述した。

第2章では、有明海に生息するエイ類3種(ナルトビエイ、アカエイ、シロエイ)の皮から酸可溶性コラーゲンを抽出し、その生化学的性質を調べた。抽出精製したコラーゲンをSDS-PAGE(還元下)に供した結果、エイ類のASCは2本の $\alpha$ 1鎖と1本の $\alpha$ 2鎖の分子構成を示し、I型コラーゲンが調製できたと考えられた。しかし、対照のトラフグI型コラーゲンの分子量とは若干異なり、 $\alpha$ 2鎖と考えられるタンパク質は116 kDaより少し低分子側(112-114 kDa)に検出され、これは板鰓類由来I型コラーゲンの特有なパターンと考えられた。アミノ酸組成は試料魚によって若干差が見られたが、コラーゲンの特徴である、GlyやPro、Hypの含量は高かった。特に熱変性温度に関わると考えられるイミノ酸(Pro+Hyp)の含量が硬骨魚類より高かった。更に、魚類由来コラーゲンの熱変性温度が30℃以下であるのに対して、エイ類は32-34℃であり、比較的高い熱変性温度を示した。pH及びNaCl濃度に対する相対溶解度は全ASCがpH 1-4と4%以下のNaCl濃度で高かった。以上のように、エイ類からのASCは比較的高い熱変性温度を示したことから哺乳動物由来コラーゲンの代替としての利用が期待される。

第3章では、コラーゲン原料として第2章で抽出したエイ類コラーゲン(アカエイ、ナルトビエイ)を使用し再線維化によるコラーゲン線維ゲルの調製を行った。また、エイコラーゲンゲルの性質を調べ細胞培養用基質への利用を検討した。両コラーゲンを50mM酢酸に溶解し、その後NaClを含む中性付近のpHに調整した。ついで、25℃で加温することによりコラーゲンを再線維化し、全体が均一に白濁したコラーゲンゲルを形成した。コラーゲン再線維化過程においてコラーゲン線維形成度は、pHの上昇と共に増加し、pH 6.8以上で2種ともASCの90%以上が再線維化した。また、pH 7.4、NaCl 35mMの条件で調製した両コラーゲンゲルの熱安定性を示差走査熱量測定(DSC)で評価したところ、形成したコラーゲンゲルの融解温度は約44℃であり、コラーゲンの変性温度である約33℃より上昇した。さらに、これらのコラーゲンゲルを用いた37℃での細胞培養においてもゲルは溶解せず、マウス肝間質細胞(FLS 5)の成長が確認された。これらの結果から、アカエイ及びナルトビエイコラーゲンゲルが細胞培養基質として利用できる可能性を示唆した。

第4章では、アカエイ皮由来ゼラチン(熱変性コラーゲン)のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の基質としての有効性を検討した。MMPの活性測定方法としてよく用いられるゼラチンザイモグラフィに着目し、通常基質として広く用いられる牛ゼラチンと今回調製したアカエイゼラチンとの比較を行った。ヒト組換MMP-9に対する両ゼラチンの感度を調べた結果、アカエイゼラチンでは37℃、2時間反応で82kDaの活性型と93kDaの潜在型のMMP-9が確認できたが、牛ゼラチンを用いた場合には6時間反応後に薄い活性バンドとして検出された。引き続き24時間反応させた場合においても、アカエイゼラチンの方が明瞭な活性バンドとして検出でき、アカエイゼラチンがMMPの基質として有効であると考えられた。

第5章では、アカエイ筋肉中のゼラチン分解酵素の検索及び精製を試みた。これは産業規模でのゼラチン分解酵素の利用及びコラーゲン分解機構の解明につながると考えられる。アカエイ筋肉からのゼラチン分解酵素の精製は、以下の方法で行った。まず、30-60%飽和硫酸塩析により得られた組酵素液をQ Sepharoseカラムに供したところ、ゼラチンザイモグラフィ(非還元下)により少なくとも4種類のゼラチン分解酵素が検出された。そのうちゼラチン分解活性の強かったA1(約97kDa)、A2(約66kDa)に関してPhenyl Sepharoseカラムに供しさらに精製を進めた。この部分精製酵素を用いてプロテアーゼインヒビターの影響を調べたところ、A1、A2は共にセリンプロテアーゼであると考えられた。また、両酵素は中性pH(pH 7-8)、30-50℃の温度域で最も強い活性を示し、pH 7.5、37℃においてゼラチンと反応させると、反応6時間後にはほぼ完全にゼラチンを分解した。今後これらの酵素を単離精製し更なる性質を調べるのが課題である。

以上の結果から有明海産エイコラーゲンは比較的高い熱安定性を持つ魚類コラーゲンとして酵素細胞培養基質やMMPの基質としての有効性が期待される。