



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アルギン酸オリゴ糖修飾を利用した抗炎症魚肉タンパク質の開発に関する食品生化学的研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	西澤, 瑞穂
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第12214号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61627
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mizuho_Nishizawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：西 澤 瑞 穂

学 位 論 文 題 目

アルギン酸オリゴ糖修飾を利用した抗炎症魚肉タンパク質の開発に関する 食品生化学的研究

魚肉は古来より人類の重要なタンパク質供給源の一つであり、水産資源の持続的かつ効率的な利用は、自給可能な食糧資源を安定供給する上で重要な課題の一つである。そこで著者は、水産物に新たな価値を付与して有効活用を促進する要素として、健康機能性、特に生活習慣病予防効果に注目した。生活習慣病の発症には、食習慣やストレスなどの関与が知られているが、近年、過剰な炎症反応が生活習慣病の発症と悪化に深く関わっていることが明らかとなり、日常の食事を通して過剰な炎症反応を緩和しようという機運が高まっている。これまで抗炎症機能を持つ成分が様々な食品から見いだされてきたが、水産タンパク質の抗炎症機能に関する知見はほとんどない。それゆえ、低利用水産物から抗炎症機能を有するタンパク質素材が開発できれば、水産タンパク質の高付加価値化と新しい利用機会の開拓に貢献すると考えた。

本研究で利用する低利用水産資源には、河川遡上シロザケの筋肉タンパク質を選定した。シロザケは、大規模なふ化放流事業によって長期に渡って安定した資源量が確保されているが、採卵・採精後のシロザケの肉質は著しく劣化し、食用としての利用価値が低いため大部分が廃棄されている。しかし主要タンパク質含量は摂餌回遊期のそれとほとんど差異がない。また本研究では、魚肉タンパク質に優れた抗炎症機能を付与する方法として、メイラード反応を介したタンパク質への糖鎖導入技術（以下、糖修飾）に着目した。メイラード反応は、タンパク質のアミノ基（主にリジン残基のε-アミノ基）と糖の還元末端の間で起こる脱水縮合を開始反応とした複雑な連鎖反応であり、物性変化や呈味の付与など食品の品質に大きな影響を及ぼす。魚肉タンパク質については、アルギン酸オリゴ糖（AO）修飾による複数の加工特性（水溶性、pH 安定性、乳化安定性、熱安定性）の同時改変が報告されている（Takeda et al. 2007）。そこで本研究では、メイラード反応を介した AO 修飾を利用して、優れた抗炎症機能を有するシロザケ筋肉タンパク質素材の創出を試みた。

第 1 章では、AO 修飾がシロザケ筋肉タンパク質の抗炎症機能の増強に有効な手段であることを示した。まず、60 °C、相対湿度 35 % の条件下で、AO 修飾の進行度合いが異なる AO 修飾魚肉タンパク質を調製後、ペプシン-トリプシン消化して消化ペプチド（以下、Meat-AO peptide）を得た。次に Meat-AO peptide を細胞に作用させ、抗炎症機能を調べた。抗炎症機能は、マウス・マクロファージ様細胞株 RAW 264.7 が産生する炎症メディエータ

(一酸化窒素：NO，炎症性サイトカイン：TNF- α ，IL-6)の産生抑制能を指標として評価した。Meat-AO peptide では，AO 修飾 4 時間まで経時的に炎症メディエータの産生抑制効果の増強傾向を認めた。また，最も抗炎症機能が強かった AO 修飾 4 時間の Meat-AO peptide は，濃度依存的に炎症メディエータの産生を抑制した。

第 2 章では，経口摂取した Meat-AO peptide が局所炎症反応を効果的に抑制することを示した。Meat-AO peptide を炎症強度の異なる 3 種類の動物モデル（カラゲニン足蹠浮腫，マスタート足蹠浮腫，アジュバント関節炎）に経口投与し，炎症の増悪抑制効果を調べたところ，Meat-AO peptide は，急性炎症モデルであるカラゲニン足蹠浮腫の顕著な増悪抑制効果を発現した。また，この抗炎症機能は，ペプシン-トリプシン消化前の AO 修飾魚肉タンパク質でも確認できた。これらは，メイラード反応を介した AO 修飾が抗炎症魚肉を製造するための有効な手段であることを示す重要な知見である。

第 3 章では，Meat-AO peptide の作用機序を細胞レベルで検討し，抗炎症機能が RAW264.7 細胞の炎症メディエータの分泌に関わるシグナルカスケードの活性化抑制に起因することを示した。まず，LPS 刺激によって誘導される遺伝子（iNOS，TNF- α ，IL-6，COX-2）とタンパク質（iNOS，COX-2）の発現量を測定したところ，Meat-AO peptide は，iNOS，TNF- α ，IL-6，COX-2 遺伝子とタンパク質発現を有意に抑制した。次に，転写因子 NF- κ B の活性化について，タンパク質のリン酸化を指標に調べたところ，Meat-AO peptide は NF- κ B とその活性化に関わる IKK α/β と I κ B α のリン酸化を抑制した。以上の結果から，Meat-AO peptide の抗炎症機能は NF- κ B 活性化の抑制によって発現していると結論づけた。

第 4 章では，Meat-AO peptide に含まれている機能ペプチドの性質を明らかにした。まず，Meat-AO peptide を等電点によって 20 分画し，各画分の抗炎症機能を調べたところ，主に酸性ペプチドに強い炎症メディエータ産生抑制効果を認めた。また，画分ごとに産生抑制される炎症メディエータの種類が異なっており，Meat-AO peptide 中には複数の機能ペプチドが存在していることが明らかとなった。さらに，各画分の炎症メディエータ抑制効果は全画分のそれよりも弱かった。以上の結果から，Meat-AO peptide の抗炎症機能は，単体で非常に強い効果を持つペプチドに依存するのではなく，様々な機能ペプチドが複合的に作用し，全体として強い抗炎症機能を発現していると考えられる。続いて，酸性等電点画分から，アミノ酸 20 残基からなるミオシン重鎖由来の機能ペプチドの配列を明らかにした。しかし，このペプチドは AO 修飾していないシロザケ筋肉タンパク質からも生成可能なペプチドであり，今回同定したペプチド配列だけでは，AO 修飾による抗炎症機能の増強効果について十分説明することができなかった。ただし，強い抗炎症機能を有していた酸性ペプチドを含む画分に AO が多く含まれていたことから，AO 修飾による抗炎症機能の増強には，AO 結合ペプチドが関与している可能性が高いと考えられる。今後，AO 修飾によって新たに生じた物質の実態を明らかにすることによって，抗炎症機能の増強メカニズムが明らかになると判断した。

第 5 章では，将来の産業利用化の初期検討として，食品製造用酵素を用いた Meat-AO peptide の調製とニワトリ筋肉タンパク質に対する AO 修飾の効果について検討した。食品製造用酵素を用いて調製した Meat-AO peptide と AO 修飾ニワトリ筋肉タンパク質から調製した Chicken-AO peptide は，マウスのカラゲニン浮腫の増悪を有意に抑制した。糖修飾を

行っていないニワトリ筋肉タンパク質には抗炎症機能が認められず、AO修飾によって浮腫増悪抑制効果が発現したことから、AO修飾は抗炎症機能を付与する手段として、シロザケ以外のタンパク質に対しても有効であることを示した。

本研究では、メイラード反応を介したAO修飾を利用して、優れた抗炎症機能を有する魚肉タンパク質素材の創出に成功した。本研究の一連の成果は、魚肉タンパク質に新機能を付与するという従来にない利用方法の提案である。本研究の知見をさらに深めることで、魚肉タンパク質を含む各種未利用タンパク質資源の高度利用への貢献が可能になる。