



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the efficient utilization of better sturgeon by-products [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	孟, 大威
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13737号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75837
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Meng_Dawei_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：孟 大威

学位論文題目

Studies on the efficient utilization of bester sturgeon by-products

(ベステルチョウザメ由来廃棄物の有効利用)

高級食材であるキャビアや食用肉の生産を目的として、チョウザメ養殖が世界的に拡大されてきた。しかし日本においては、キャビア採取までの長期間養殖に伴う高い養殖コストやリスク等の問題から、大規模養殖業の確立には至っていない。キャビアや食肉加工後には頭、皮、鰭、浮袋、脊索、内臓などが副生物として生じ、これらは現在廃棄されている。これまでの研究では、これらの廃棄物にはコラーゲンが含まれていることが明らかにされている。そのため、廃棄物中に含まれるコラーゲンを機能性食品、化粧品、医療用材料等に利用することができれば、チョウザメに大きな付加価値をつけることが可能となり、日本におけるチョウザメ養殖産業の発展に大きく貢献できる。そこで本研究では、チョウザメ廃棄物由来のコラーゲンを製品へと応用するための基盤として、効率的抽出精製方法と、医療用材料、化粧品・食品向けの利用法についての検討をおこなった。

チョウザメ廃棄物から得られるコラーゲンを産業化するには、質のよい非変性コラーゲンを大量に効率的に精製する必要がある。しかし、これまでの研究ではチョウザメの浮袋からのコラーゲンの収率は乾重量ベースで約 65.4%と高いものの、組織量が多い皮膚からの収率は 34.1%、市場での流通量が少ない貴重な II 型コラーゲンを採取できる脊索からの収率は 5.1%と、他魚種に比べて低い値であった。そこで、ベステルチョウザメを材料とし、まず皮膚、脊索から非変性コラーゲンの効率的精製方法を開発するとともに、精製された非変性コラーゲン分子の性状、特にその原線維形成能についての検討をおこなった。非変性コラーゲン分子は適当なイオン強度と pH 溶液中に分散させることで自己会合し、原線維を形成する。原線維形成能はコラーゲンを組織工学用の足場材料等、医療用材料として利用する場合に重要な能力である。その結果、抽出前の処理や抽出回数、塩析回数な

どを工夫することで、収率を皮膚Ⅰ型コラーゲンで 64.2%，脊索Ⅱ型コラーゲンで 37.5% に上昇させることに成功した。また、前処理としてアルカリ処理（0.1 M NaOH 処理）を施すことで、収率は若干低下するものの、抽出回数を減らして短時間で抽出できることを示した。加えて、SDS-PAGE および CD スペクトル分析を用いて、アルカリ処理がコラーゲンの三重らせん構造に影響を与えず、良質な非変性コラーゲンの抽出に適することを示した。さらに、アルカリ処理はⅡ型コラーゲンの線維形成及び線維形態に影響をおよぼさない一方で、Ⅰ型コラーゲンの線維形成速度を抑制し、特に太い線維の形成を抑制することを示した。このように、本研究ではチョウザメの非変性コラーゲンの抽出効率を大幅に上昇させることに成功するとともに、アルカリ処理が魚類コラーゲンの性状、特に線維形成能におよぼす影響をはじめて明らかにした。

コラーゲンの高付加価値利用法の一つとして、組織工学用の細胞足場材料への応用が注目されている。組織工学とは幹細胞と足場材料、サイトカインを組み合わせることで三次元組織を生体外で合成する技術であり、合成された人工組織は再生医療に用いることが可能である。生体組織の細胞足場材料であるコラーゲン原線維は、組織工学用の人工足場材料としても優れているとされる。また、細胞の増殖や分化はコラーゲン原線維の太さや配向によっても制御されるため、人工足場材料を合成するにあたってはコラーゲン原線維の太さや配向を制御し、効率的に細胞を増殖・分化させることが重要になる。そこで、まずコラーゲン分子と結合することが知られるリン酸塩イオン（Pi）を用い、その原線維形成溶液中の濃度が、皮膚および浮袋由来のⅠ型コラーゲンの原線維形成過程及び原線維形態におよぼす影響を調べた。その結果、同じ反応条件では皮膚と浮袋コラーゲンは異なる線維化速度、線維形成量、線維形態を示すものの、どちらも Pi 濃度が高いと原線維形成速度および形成量が抑制されるとともに、太い原線維の形成が促進されることを明らかにした。また、線維の変性温度は Pi 濃度の増加により高くなることを示した。本実験の結果は、原線維形成時の Pi 濃度の制御によってチョウザメのコラーゲン原線維形態が制御できる可能性を示すものである。そこで、Pi 濃度を変えることで形成される形態の異なるコラーゲン原線維が、マウス線維芽細胞（L929）の接着、形態、増殖にどのような影響をあたえるかを調べた。まず、様々な Pi 濃度の原線維形成溶液を用いてコラーゲン原線維を細胞培養ウェルの表面にコーティングし、SEM 観察によりコーティングされた原線維の形態を確認したところ、原線維は一方向に配向して培養ウェル表面に付着し、その形態は溶液中に形成された原線維と同じく Pi 濃度が高いと太かった。さらに、L929 を異なる形態の原線維上

に播種して細胞接着と形態、増殖を観察し、細い原線維上では細胞が接着後に伸展しやすく、増殖が速いことを明らかにした。一方で、太い原線維上では細胞は原線維の走行方向に沿って伸展することが明らかになった。また、皮膚コラーゲンに比べて浮袋コラーゲンの方が線維形態の違いが顕著であり、足場材料として汎用性が高いことを示した。このように本研究では、原線維形成溶液の Pi 濃度を調整することで異なる形態のチョウザメコラーゲン原線維を細胞培養ウェルにコーティングし、細胞の形態や増殖を調節することに成功した。

最後に、チョウザメコラーゲンを化粧品や食品用の天然抗酸化成分として利用することを企図し、3 種類のラジカル（ヒドロキシ、DPPH、ABTS ラジカル）を用いて、精製した皮膚 I 型、脊索 II 型コラーゲンペプチドと、皮膚、脊索組織加水分解物の抗酸化能を比較した。その結果、皮膚、脊索どちらの場合でも、組織加水分解物の方がコラーゲンペプチドより高い抗酸化能を示し、非コラーゲン性タンパク質由来のペプチドも高い抗酸化能を持つことを明らかにした。また、どちらの組織でも分子量 3 kDa 以下のフラクションが最も高い抗酸化能を示した。このように、本研究ではチョウザメ組織加水分解物、特に低分子の加水分解物が高い抗酸化能を持つことを示すとともに、その抗酸化能がコラーゲンペプチドのみならず非コラーゲン性タンパク質由来ペプチドに由来することを明らかにした。

以上のように、本研究ではベステルチョウザメ廃棄物から三重らせんコラーゲンの効率的な精製方法を開発した。また、Pi 濃度がコラーゲン原線維形態の制御因子として優れており、浮袋コラーゲンが組織工学用の足場材料への応用に優れていることを明らかにした。また、チョウザメ廃棄物由来の低分子ペプチドが優れた抗酸化性を示し、天然抗酸化成分として化粧品および健康食品に応用できることを示した。キャビア採取後のチョウザメの体がほとんどそっくり廃棄され有効に利用されていない現状は、日本のみならず世界的な問題でもある。本研究の成果をもとにチョウザメ廃棄物からのコラーゲン製品が実用化できれば、チョウザメ養殖産業が抱える世界的な課題の解決に一步近づくものと期待される。