深海生物由来コラーゲンを活用した化粧品基材への応用研究

高知大学農学部
足立　亨介

A partial length cDNA of the Type I procollagen α1 helical was determined using cDNA from muscle of deep see fish Coryphaenoides yaquinae. The helical region was composed of Gly-X-Y repeats; the conserved triplets within the same molecule in higher vertebrates. The number Ser residues in the helix were quite high compared to other vertebrates including fish.

The amino acid composition of purified Type I collagen from Coryphaenoides acrolepis shows also high contents of Ser residues among other fishes. These facts indicates that Ser is a key amino acid in Type I collagen in deep sea adaptation such as high pressure, low temperature and etc.

緒　言

コラーゲンは40年以上前から化粧品の配合材料として用いられているコスメ業界には非常になじみ深い成分である[1)]。本分子は、3つのサブユニット遺伝子群がトリプルヘリックスを構成している。哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類では2本のα1鎖と1本のα2鎖が（$(\alpha1)_2\alpha2$の形で存在しているが[1)]、魚類ではこの3つが全て異なった鎖（α1α2α3）である種が報告されている（図1）[2)]。

このⅠ型コラーゲンの各サブユニットの両端には、N末端側には外側からシグナルペプチド、プロペプチドおよびテロペプチドが、同様にC末端側にはプロペプチドおよびテロペプチドが存在するが、シグナルペプチドおよびプロペプチドはコラーゲンが成熟する過程で切断されることが分かっている。またテロペプチドの間は各サブユニットにおいて［Gly- X- Y］トリプレット構造をとっており、3残基ごとにグリシンが338回繰り返す一次構造をとることが分かっている（図1）[1, 2)]。このアミノ酸XおよびYには、各々プロリンおよびヒドロキシプロリンが存在することが多く、これらはイミノ酸とも呼ばれ、コラーゲンの主要構成アミノ酸であることが知られている（図1）。イミノ酸はイミノ基とカルボキシル基を持ち、このうちヒドロキシプロリンのもつOH基がトリプルヘリックスを安定化させていると一般には考えられている[1, 2)]。このコラーゲン分子は1/4ずつずれた形で規則正しく会合し（1/4ずれ会合モデル）、コラーゲン繊維を作り上げている。コラーゲン繊維はさらに重合することによりハイドロゲルを形成することが知られる[1)]。コラーゲンが化粧品の材料として用いられる理由の一つとして、その「保水効果」が挙げられるが、これはこの水分子を繊維中に封じ込めたハイドロゲルの効果を利用したものである[1)]。

一方で我々は深海に生息する魚類であるシンカイヨロイダラ*Coryphaenoides yaquinae*（生息水深約6000m）およびイバラヒゲ*Coryphaenoides acrolepis*（生息水深約1000m）のコラーゲンの特質を生化学的に研究している。本種は深海中で10－60MPaにも及ぶ圧力、および通年1－2℃程度の低水温に適応して生きているが、これらの環境を直接的に受けとめているのは表皮・真皮であり、その主要な構成成分はコラーゲンである。このため深海動物のコラーゲンはその環境に適応した構造･機能･物性を分子内で進化させていると考えられる。しかしながら、これまでにその構造と機能は解析された例がなく、詳細は未解明のままである。

上述のようにコラーゲンを化粧品基材に用いる場合はその「保水効果」が鍵になるが、これまでに用いられている素材としては哺乳類由来のもの、ティラピアなど浅海性の魚類由来のものが中心である[1)]。しかしながらこれらの素材はコラーゲンの分子としての性質が似通っており劇的な効果の違いを見ていない。

そこで本研究ではその生息環境から従来のコラーゲンとは全く異なる物性を有する可能性のある深海魚のⅠ型コラーゲンのまずは構造に着目し、そのcDNA配列からアミノ酸配列を類推することでその特性を検討する。

試料および方法

シンカイヨロイダラI型コラーゲンα1サブユニットのcDNA断片配列の決定

試料となるシンカイヨロイダラ（学名：*Coryphaenoides yaquinae*、英名：Rattail fish）は、採取後、－80℃にて凍結保存した筋肉を用いた。TRIzol（Life Technologies）およびNucleoSpin RNA（Takara）にて全RNAの調製を行い、Rever Tra Ace（TOYOBO）にて逆転写した産物をEx

The application of collagen from deep sea animals to cosmetic vehicle
Kohsuke Adachi
Kochi University

Taqにて PCR で増幅した。PCR に用いたプライマーは 5 種類の硬骨魚種（タイセイヨウダラ、キンギョ、ゼブラフィッシュ、ティラピア、ヒラメ）、の I 型コラーゲンの各塩基配列をマルチプルアラインメントし、保存性が高い部分をもとに、得られる断片が 50 − 100bp オーラップさせるように設計した。増幅した PCR 断片を Mighty TA-cloning Kit（TaKaRa）を用いてライゲーションし、サブクローニングし得られたプラスミドを、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）に供し、配列解析を行った。

イバラヒゲ I 型コラーゲンの精製

試料となるイバラヒゲ（学名：*Coryphaenoides acrolepis*、英名：Pacific grenadier）は採取後、−50℃で保管したものを用いた。解凍後細切した皮から、コラーゲン以外のタンパク質および脂質を除去するために 10 倍量の 0.1M NaOH を添加し、並列スターラー SRS360YA（アドバンテック東洋株式会社）を用いて 1 日間攪拌後、日立冷却遠心機 himac CR 21E（株式会社日立製作所）を用いて 10,000×g で 10 分間遠心分離するアルカリ処理を 2 回繰り返した。ここで沈殿に 10 倍量の純水を添加し、30 分間攪拌することで沈殿を洗浄後、10,000×g で 10 分間遠心分離した。この純粋による洗浄を上清の pH が中性付近になるまで繰り返した。洗浄後の沈殿に 10 倍量の 0.5M 酢酸を添加し、3 日間攪拌後 10,000×g で 10 分間遠心分離し、上清を布で濾過した。この際得られた上清に終濃度 0.9M となるよう NaCl を添加し、完璧に溶けるまで攪拌後、10,000×g で 30 分間遠心分離を行った。その後デカントにより上清を除き、沈殿を 10ml の 0.5M 酢酸に完璧に溶解した。これを透析用セルロースチューブ UC30-32-100（三光純薬株式会社）に密封し、0.1M 酢酸中で 2 日間透析（2 回交換）後、pH が中性付近になるまで純水中で透析し、3 回ほど交換した。透析後、凍結乾燥機 FD-1（東京理科器械株式会社）を用いて凍結乾燥したものを酸可溶性コラーゲン（Acid Soluble Collagen：ASC）とした。全ての操作は 5℃で行った。

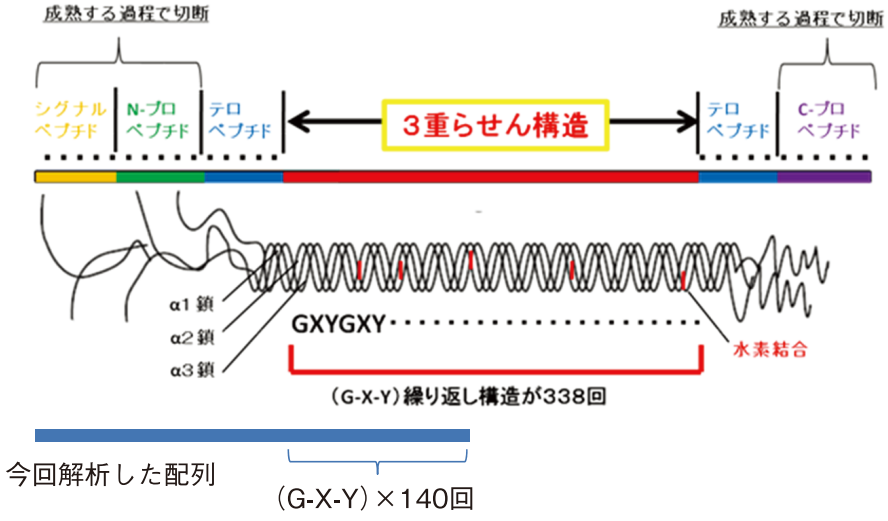
精製コラーゲンのアミノ酸分析

凍結乾燥したコラーゲン試料 1 mg に蒸留水を 2 ml、濃塩酸を 2 ml 添加した後、ソノクリーナー 200D（株式会社カイジョー）中でソニケーションしながら、循環アスピレーター WJ-20（柴田科学株式会社）を用いて 10 分間吸引・脱気した。脱気後、ミニバキュームチューブをドライサーモユニット DTU-1C（タイテック株式会社）中で 110℃，24 時間インチュベートすることで試料を加水分解した。放冷した後、試料をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーター（東京理化器機株式会社）を用いて試料を完全に乾燥させた。そこに、0.02M HCl を 3 ml 添加し、完全に溶解するまで攪拌した後、この溶液をマイクロシリンジで 1 ml とり、孔径 0.02 μm のディスポーザブルフィルターユニット DISMIC-13cp（アドバンテック東洋濾紙株式会社）を用いてアミノ酸分析用ガラス瓶に濾過し、これをアミノ酸分析用試料としてアミノ酸分析に供した。

結　果

シンカイヨロイダラ I 型コラーゲン α1 サブユニット cDNA 断片配列とそれより類推されるアミノ酸組成

得られた 4 つの PCRcDNA 断片を連結することで塩基配列 1935bp を決定し、582 残基のアミノ酸配列を推定した。同断片配列は、N 末端側のシグナルペプチド領域、テロペプチド領域および三重らせん構造の一部を具体的には［Gly-X-Y］のトリプレット構造を 140 組含むことが判明した（図 1）。cDNA 配列から予想される同遺伝子のアミ



3 つの異なるサブユニットが 3 重らせんを構成している。シグナルペプチド、N-プロペプチドおよび C-プロペプチドは、コラーゲンが成熟する過程で切断される領域。Gly-X-Y トリプレットの X および Y の位置には各々 Pro および Hyp が多く見られる。

図 1　魚類 I 型コラーゲン構造の模式図

ノ酸組成を同じく配列の明らかになっている他種生物の同領域と比較し、表1に示した。結果、同断片配列においても他種生物と同じく、Glyがおおよそ1/3の割合を占める結果が得られた。またProの含有量が他生物よりも低く、Serの含有量が多い傾向があった。特にSerの多さは顕著であり、同じ魚類であるゼブラフィッシュ同遺伝子との比較では約4.6倍、ヒト同遺伝子の約2.8倍含まれていることが分かった。

イバラヒゲ皮由来のI型コラーゲンの精製とそのアミノ酸組成

イバラヒゲの皮4.8g（湿重量）から、上記の手法にて59.5mgの酸可溶性コラーゲン（ASC）を精製することが出来た。表2に各試料から精製したASCのアミノ酸組成を示した。イバラヒゲⅠ型コラーゲンを構成するアミノ酸はGlyが全体の1/3を占め、Proは100アミノ酸残基あたり7.5、Hypは4.8残基、Serは7.3残基含まれていることが明らかになった。これまでに精製タンパク質アミノ酸組成の報告がある他魚種[3-5]と比べても深海魚であるイバラヒゲでSerの含量が最も多く、Pro、Hyp量は最も少ないことが明らかになった。

考　察

本研究ではシンカイヨロイダラのⅠ型コラーゲンのα1サブユニットの断片配列を決定し、それから得られるアミノ酸配列から同遺伝子中にSer残基が多く含まれていることを明らかにした。その逆にProは表1で比較した生物中最も少ない値を示した（15.5残基）。緒言で述べたように本分子にはProの水酸化されたHypが含まれると予想されるが、これは翻訳後修飾であるため、cDNA配列のコドンからアミノ酸を推測する方法ではHypの含量は分からない。それ故ここでのProの量は実際タンパク質におけるProとHypの合計と考えるべきである。尚、著者らはⅠ型コラーゲンを構成するα2および3鎖においても同様の解析を行っているが、結果がα1鎖に追従するものであることを付記しておく。

一方で我々はシンカイヨロイダラよりやや浅い水深に生息するイバラヒゲよりⅠ型コラーゲンを精製し、そのアミノ酸組成を検討した。その結果、実際のタンパク質を対象としても深海魚Ⅰ型コラーゲンは高いSer含量を持つこと

表1　シンカイヨロイダラⅠ型コラーゲンα1サブユニットcDNA断片配列より類推されるアミノ酸組成

	シンカイヨロイダラ	ゼブラフィッシュ	アフリカツメガエル	ニワトリ	ラット	ヒト
Ala(A)	9.5	14	10	12.4	11.4	11.2
Arg(R)	5.7	5.7	5	5.2	5.2	5.2
Asn(N)	2.9	1.9	2.1	1.4	1.7	1.4
Asp(D)	1.9	1.9	2.4	2.1	2.4	2.4
Cys (C)	0	0	0	0	0	0
Gln (Q)	1.9	1.9	3.1	3.1	2.6	2.6
Glu (E)	5.5	5.5	5	4.8	5	5
Gly (G)	35.5	34.3	34.1	33.3	33.6	33.8
His (H)	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Ile (I)	0.7	0.5	0.2	0.5	0.2	0.2
Leu (L)	1.9	0.7	1.4	1.9	1.9	1.9
Lys (K)	3.8	3.8	4.3	4	4	4
Met (M)	1.2	1.7	1.2	1.2	1.2	1.2
Phe (F)	1.7	1.7	1.4	1.4	1.4	1.4
Pro (P)	15.5	20.7	20.3	22.6	22.4	23.1
Ser (S)	8.8	1.9	6.7	3.3	3.6	3.1
Thr (T)	1.4	2.1	1.2	1.7	1.9	1.7
Trp (W)	0	0	0	0	0	0
Tyr (Y)	0	0	0	0	0	0
Val (V)	1.7	1.4	1.2	0.7	1.2	1.4
Pyl (O)	0	0	0	0	0	0
Sec (U)	0	0	0	0	0	0
Total	100	100	100	100	100	100

表2　イバラヒゲ精製Ⅰ型コラーゲンのアミノ組成

	イバラヒゲ
Ala(A)	9.8
Arg(R)	5.2
Asn(N)	-
Asp(D)	5.9
Cys (C)	0.2
Gln (Q)	-
Glu (E)	8.7
Gly (G)	32
His (H)	1.1
Ile (I)	1.5
Leu (L)	3
Lys (K)	3
Met (M)	1.4
Phe (F)	1.6
Pro (P)	7.5
Ser (S)	7.7
Thr (T)	2.8
Trp (W)	-
Tyr (Y)	0.9
Val (V)	2.8
Hyp	4.8
Hylys	0.1
	100

が明らかになった。また同実験ではcDNAの解析と異なり、Hypの量も実際に測定することが出来る。その結果、ProおよびHyp含量はともに他魚種に比して低いという結果が得られた（表3)。これもシンカイヨロイダラの遺伝子配列から予想される結果に一致する。

Proはそれが水酸化されたHypとともにはイミノ酸とも呼ばれる。これらイミノ酸は側鎖がアミノ基と結合して環状になっている故、立体配置座に大きな制限を与える。この制限によってコラーゲンの三重らせんは安定化するともいえるし、柔軟性を失うとも考えることが出来る。またHyp中の水酸基は（議論は分かれるようだが）それの作りだす水素結合によって三重らせんを安定化させると考えられている。今回の解析によって深海魚類であるシンカイヨロイダラ・イバラヒゲⅠ型コラーゲンは陸上生物や他魚種に比してより少量のPro、Hypを持ち、より多くのSer残基を有することが、明らかになった。上記の事実に照らし合わせて考えると、イミノ酸の減少によって構成するアミノ酸の立体配置座の制限が減る一方で、Serを増やすことで水素結合による三重らせんの安定化を保持していると考えられる。

上記のことは深海魚I型コラーゲン分子の低水温・高水圧の深海環境への適応の結果と考えられる。低水温のみに対する魚類タンパク質の適応として酵素の活性中心付近での構造を少ないエネルギーで動かせるように柔軟化させているとの報告がある。また、高い水圧下への適応として分子が“柔軟化”するというのは一つの戦略であると考えられるが、深海魚ミオシンのロッド構造などではその構造をコンパクトにして固くしていると考える例もある。

これらコラーゲン分子の構造の適応がいかに本分子の構造に影響しているのかを検討し、化粧品基材への応用をはかることが今後の課題である。

総　括

本研究において深海魚のⅠ型コラーゲンは陸上動物や浅海性の魚類と比べて、ProおよびHypのイミノ酸含量を減らし、Serを増やす傾向にあることが明らかになった。今回、検討を行ったコラーゲンが、特有の物性や保湿効果を示すことが分かれば化粧品基材としての応用も大いに考えることが出来る。しかしながら、深海魚のコラーゲンの研究でネックになるのが、その入手できる量である。バイオマスとしての深海生物は莫大なものがあるが、6000mもの深海となるといまだ手軽なアクセス方法は確立されておらず、試料としてのコラーゲンをグラム単位で調製することは、ティラピアや畜産物のコラーゲンに比べて大きな壁になる。コラーゲンは構造が特殊なことや、翻訳後修飾が必要なこともあって組換えタンパク質の研究は他の分子に比べ立ち遅れている現状があるが、Pinkas 2011らによって大腸菌で作出に成功した例もある。また近年は人工遺伝子は以前よりも安価で作出できるようになってきた。今回得た内容を基盤にして深海から得たコラーゲンの構造をミミックした分子を組換えタンパク質にて作り出し、化粧品基材としての可能性を探ることも考えてみたい。

表3　イバラヒゲ精製Ⅰ型コラーゲンのPro、Hyp、Ser含量の他魚種との比較

	Pro	Hyp	Ser
イバラヒゲ	8.4	4.9	7.3
マイワシ	11.1	8.6	4.1
マダイ	10.9	8.7	3.9
スズキ	10.8	8.5	4.2
ニジマス	11.2	7.2	2.3
ソウギョ	12.1	6.5	3.9
キンセンフエダイ	11.6	7.7	3.6
トラフグ	10.3	6.7	4.8

(引用文献)

1）コラーゲンの製造と応用展開Ⅱ：　谷原正夫監修，シーエムシー出版

2）海洋性コラーゲンを探る：　木村茂，五曜書房

3）Nagai T, Izumi M and Ishii M,: Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. International Journal of Food Science and Technology, 39, 239–244, 2004.

4）Shahiri Tabarestani H, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Sadeghi Mahoonak AR, Rostamzad H,: Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (Onchorhynchus mykiss). International Food Research Journal, 19, 251-257, 2012.

5）Zhang Y, Liu W, Li G, Shi B, Miao Y, Wu X,: Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (Ctenopharyngodon idella). Food Chemistry, 103, 906–912, 2007.

6）Fields PA.; Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. Comp. Biochem. Physiol. A 129, 417-431, 2001.

7）Morita T,: Comparative sequence analysis of myosin heavy chain proteins from congeneric shallow- and deep-living rattail fish (genus Coryphaenoides). The Journal of Experimental Biology, 211, 1362-1367, 2008.

8）Pinkas DM, Ding S, Raines RT, Barron AE,: Tunable, post-translational hydroxylation of collagen Domains in Escherichia coli. ACS Chem Biol. 6, 320-324, 2011.