

《温故知新プロジェクト》

食材の加熱処理によるコラーゲンの消化・吸収性の向上に関する研究

重村 泰毅*

Effect of Heat Treatment on Digestion and
Absorption of Collagen Peptides from Fish Muscle

Yasutaka SHIGEMURA

1. 諸 言

1) コラーゲン・ゼラチン・コラーゲンペプチド

近年、多くの健康食品の中でも原材料に「コラーゲン」の名称を含む食品が多く販売されており、ここ数年で関連商品の市場も拡大する一方である。

コラーゲンは細胞外マトリックスタンパク質の1つであり、体内では腱などの結合組織や、筋肉、骨などに広く存在する。また、コラーゲンは体内を構成するタンパク質の約1/3を占める事が知られており、20以上もの遺伝的に異なるコラーゲン種が存在し、ローマ数字と「型」で表される(I型、II型、…) ¹⁾。コラーゲン分子構造の一部は、三本のサブユニット鎖による三重らせん構造が形成されている。その分子はコラーゲン特有のアミノ酸であるヒドロキシプロリン(Hyp)を含んでおり、加えてグリシン(Gly)が総アミノ酸の約1/3を占める。コラーゲンは加熱により、三重らせん構造が崩壊して「ゼラチン」となる。高温の液体内でサブユニット鎖が溶解したゼラチンはゾル状となり、低温下ではサブユニット鎖が結合してゲルを形成する。上述のゾル・ゲルを形成するため、ゼラチンは溶解性と、摂取後の消化性が乏しいと予測される。溶解性と消化性の向上を目的として、ゼラチンを酵素で部分的に分解したペプチドが「コラーゲンペプチド」、「コラーゲン加水分解物」、「ゼラチン加水分解物」という名称で流通されている。

2) 摂取による体調改善効果

動物やヒト臨床試験によって、これまでにゼラチンやコラーゲンペプチド摂取後の体調改善効果が、学術的な論文等で報告されている。古くは1175年、ドイツのベネディクト会系女子修道院長であるヒルデガルト・フォン・ビンゲンによる書物には「食事からのゼラチン摂取は関節痛を緩和する」と記録されている ²⁾。それ以外にも、ゼラチン摂取による二枚爪の改善や、毛髪の直径が増加する事なども

報告されている ^{3), 4)}。しかしながら、これまでに報告されているゼラチン摂取後の体調改善効果機構は、完全には解明されていない。ゼラチン同様、コラーゲンペプチド摂取後、肌や関節を中心とした体調改善効果が報告されている。ヒトの肌の保水能改善、膝関節症の状態改善、そして関節痛の緩和が報告されている ^{5)~8)}。また、動物試験においても皮膚や軟骨に対する作用が報告されている ^{9)~11)}。

3) これまでに解明されている点

上述のとおり、コラーゲンペプチド摂取による体調改善効果のメカニズムは未解明なままであった。これまでに、摂取後のペプチドは消化され、ほとんどがアミノ酸にまで分解されて吸収されると考えられてきた。しかし、この10年間で新たな事が分かっている。コラーゲンペプチド摂取後のヒト血液で、数種のペプチド濃度が増加し、そのペプチドはいずれもHypを含んでいる事、さらにそれらペプチドが細胞等に対して生理作用を持つことが分かった ^{12)~18)}。これまでに検出・同定されたペプチドは、Pro-Hyp, Pro-Hyp-Gly, Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Ser-Hyp, Ser-Hyp-Gly, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp, そしてHyp-Glyがあり、中でもPro-Hypが最も多く、被験者によっては血中に約50 μ Mもの濃度が検出されている。さらに摂取から6時間後までヒト血液で検出された報告例もある。この濃度と血中での検出時間は、これまでに報告されているペプチドの中でも最も高い。そのため、これらの研究報告から、血液中に吸収されるHyp-ペプチドが有効成分として作用する事が、コラーゲンペプチド摂取による体調改善効果のメカニズムであると考えられている。

4) 本研究の目的

以上の事から、分解・吸収されたペプチドが有効成分として体調改善に働くメカニズムより、古くから伝えられているゼラチン食材からの体調改善メカニズムも同様であると考えられる。同時に、コラーゲンが豊富に含まれる食材を摂取することで、有効成分ペプチドを体内に吸収できる可能性が考えられるが、その点については明らかにされて

* 東京家政大学短期大学部 (Tokyo Kasei University Junior College)

いない。ゼラチンは食材を加熱抽出後に摂取されているため、加熱加工・調理方法次第では、効率的なペプチド吸収が可能であると考えられる。そこで本実験では、コラーゲンを含む食材を異なる加熱時間により処理し、続けて人工消化を行う。それによって、どの程度の分子サイズのペプチドが生成されるかを分析する。

本研究では、このように古くから伝えられているゼラチン体調改善効果と、最新の研究より導かれたメカニズムを重ね、食材の加熱処理と人工消化によって、吸収可能な有効成分ペプチドの生成が可能か？を明らかにする。これが明らかになれば、食材からの体調改善のために、どの程度の加熱処理が必要かについて明らかとなる。

2. 材料と方法

1) 材料

生食、加熱調理も可能な食材として、実験試料には鮭背部筋肉 5 g を使用した。

2) 試薬

HCl, NaOH, Tris; トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、ペプシン、パンクレアチン、トリフルオロ酢酸、アセトニトリル、酢酸アンモニウムはいずれも特級または1級を和光純薬工業(株)より購入。ロイシニアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、パンクレアチンはSIGMA社より購入。その他には、ハイパーリクロカート 250-4 スーパースフェア (関東化学(株))、トリエチルアミン (Waters 社)、superdex peptide 10/300GL (GE 社)等を使用。

3) 人工消化試験

試料を 1 cm 程度の厚さに切り、90~95°C に加熱したお湯の中で、30秒、1分、3分加熱した。加熱後の試料は包丁で細かく切り、ミンチ状にした。

試料を 100 mL の 0.1 M HCl に溶解し、ペプシン 50 mg を加えて 37°C で 3時間人工消化。人工消化後、0.6 mL の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加え、1 M NaOH で懸濁液を

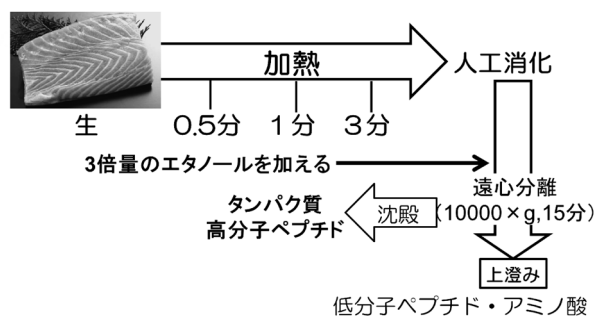


図1 人工消化までの加熱処理時間

pH 8.0 に調整。さらに試料懸濁液にロイシニアミノペプチダーゼ 20 μ L とカルボキシペプチダーゼ 20 μ L、パンクレアチン 2 mg を加えて 37°C で 24時間人工消化した。

4) コラーゲン由来 Hyp-ペプチドと遊離 Hyp 測定

人工消化後の懸濁液に 3倍量のエタノールを加えて酵素を失活させた。懸濁試料から、人工消化後の分解を評価するため、コラーゲン由来ペプチドである Hyp を含むペプチド (Hyp-ペプチド) と、遊離 Hyp を測定した。Hyp を含むペプチド濃度は、試料中の遊離 Hyp と、加水分解 (減圧下で、150°C、1時間加熱) した試料の総アミノ酸を、アミノ酸分析によって測定し、総アミノ酸中の Hyp 濃度から、試料中の遊離 Hyp 濃度を引くことで、Hyp-ペプチドを求めた (下記の式のとおりに)。

$$\text{Hyp-ペプチド濃度} = \text{総 Hyp 濃度} - \text{遊離 Hyp 濃度}$$

遠心濃縮によって試料を乾燥後、PITC 誘導化処理を行い、ハイパーリクロカート 250-4 を装着した HPLC により試料中の Hyp を分離した。分離条件は分離溶液 A; 150 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.0) 5% アセトニトリル、B; 60% アセトニトリルを使用し、流速 0.5 mL/min、カラム温度 45°C、UV254 nm で検出を行った。溶出は 100% A 液 (0%B) でスタートし、グラジエントは次のとおりに調整して分離を行った。0-1 min, 0% B; 1.0-1.01 min, 0-10% B; 1.01-20 min, 10-47.5% B; 20-25 min, 47.5-100% B; 25-37 min, 100% B; 37-37.1 min, 100-0% B; and 37.1-50 min, 0% B。

5) コラーゲン由来 Hyp-ペプチドの分子量別濃度測定

酵素失活後の試料を、superdex peptide 10/300GL により分子量別に分離した。分離条件は、流速 0.5 mL/min、UV 214 nm で検出した。溶出画分は 1分ごとに回収した。回収後の画分は、前述した同様の方法で Hyp 濃度を測定した。

6) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

未加熱・加熱後の魚肉コラーゲン分子の変化を観察するため、Laemmli の方法に従って実施した (Laemmli, 1970)。

試料は人工消化前の未加熱・加熱後の魚肉得を 0.1 M られたコラーゲン懸濁液に SDS-サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% グリセロール、6% メルカプトエタノール) を加えて 100°C で 2分間加熱した。加熱後の試料を 7.5% ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で分離し、コマシーブリリアントブルー R250 を用いて染色を行った。

7) 魚肉からのコラーゲン調製

SDS-PAGE 用試料調製として、未加熱・加熱後の魚肉からコラーゲン抽出を行った。加熱後の魚肉を0.1 M NaOH に混ぜ4°C 下で24時間攪拌した。攪拌後、懸濁液を遠心分離 (10,000×g、15 min) し、沈殿物を回収、再度0.1 M NaOH に混ぜ4°C 下で24時間攪拌した。この際得られる上澄画分は、主に筋原線維タンパク質である、コラーゲン以外のタンパク質である。この作業を1週間程度繰り返し、沈殿物をコラーゲンとして SDS-PAGE 用試料とした。

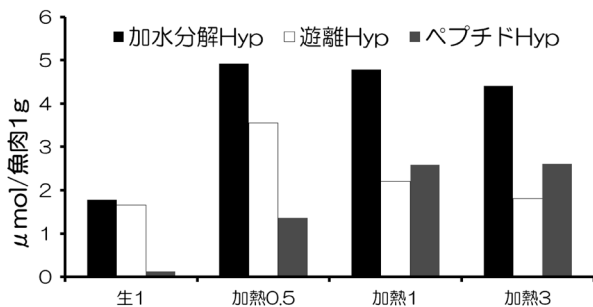
3. 結果

1) 加熱時間によって人工消化後の魚肉から生成されるコラーゲン由来ペプチドおよび Hyp の濃度変化

図2に未加熱、加熱0.5~3分後の魚肉を人工消化した後に生成する Hyp を含む低分子ペプチド (ペプチド Hyp) と遊離 Hyp 濃度を示す。

図2の結果は、未加熱・加熱後の魚肉を摂取した際に、魚肉中のコラーゲン由来のペプチド (ペプチド Hyp) とアミノ酸 (遊離 Hyp) どの程度生成されるか、という指標になっている。その結果から、コラーゲン由来低分子ペプチドの生成濃度が未加熱・加熱で大きく異なり、加熱していない魚肉からの低分子ペプチド濃度が非常に低いことが分かる。また、Hyp ペプチド濃度は加熱時間に伴って増加した。

この結果から、生の魚肉の人工消化では、タンパク質から低分子ペプチドへの分解が容易でないことが分かる。生理活性を持ち、血中へ吸収できる可能性があるペプチドを体内で生成させるには、加熱が必要である可能性が示唆された。一方で、コラーゲン加水分解物摂取後、人の血液中に吸収されるコラーゲン由来ペプチドとしては、3残基以下のアミノ酸が結合したものが検出されており、それ以上高分子のペプチドは発見されていない。そのため加熱と消化から、低分子ペプチドの中でも2~3残基のアミノ酸で構成されるペプチドが生成されなければ、生理活性が期待



未加熱 (生1) と0.5 (加熱0.5)、1 (加熱1)、3 (加熱3) 分加熱後の魚肉から人工消化によって生成されるHypを含むペプチドと遊離Hypの濃度

図2 人工消化後の魚肉由来 Hyp ペプチドと遊離 Hyp 濃度

されない。

2) 加熱魚肉を人工消化した後に生成されるコラーゲン由来ペプチドの分子量分布

そこで、図1で得られた試料をゲル濾過クロマトグラフィーによって分子量ごとに分画し、その分離パターンと、分離後分取した画分の Hyp 濃度を調べた。図3にはゲル濾過クロマトグラフィーの分離パターンを示す。

図3の⇔ (35~39分) は、2~3残基のアミノ酸で構成されるペプチドが分離される溶出時間である。パターンから加熱0.5分後の魚肉試料から、その時間帯ピークが大きく、溶出されるペプチド濃度が高い事が考えられた。この時間帯から溶出される画分を回収し、これまでと同様の方法で Hyp 濃度を測定した (図4)。

図4に示されるように、加熱時間が長くなると、低分子 Hyp ペプチド濃度が低下した。4残基以上のアミノ酸で構成される Hyp ペプチドが溶出している、ゲル濾過クロマトグラフィー溶出時間32~33分 (魚肉消化ゲル濾過33~34) のペプチド濃度は、加熱時間の延長とともに増加している。それに対して、加熱時間が短い程、2~3残基のアミノ酸で構成される Hyp ペプチドが溶出している、ゲル濾過クロマトグラフィー溶出時間34~39分 (魚肉消化

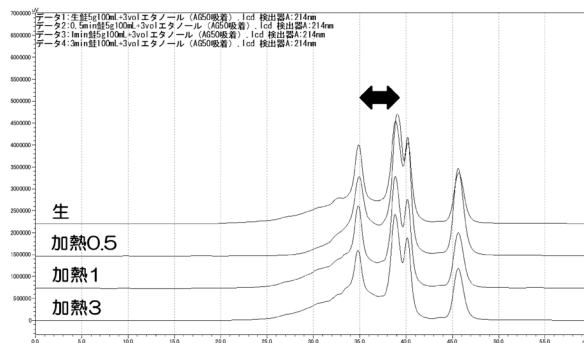


図3 人工消化後の魚肉懸濁試料のゲル濾過クロマトグラム

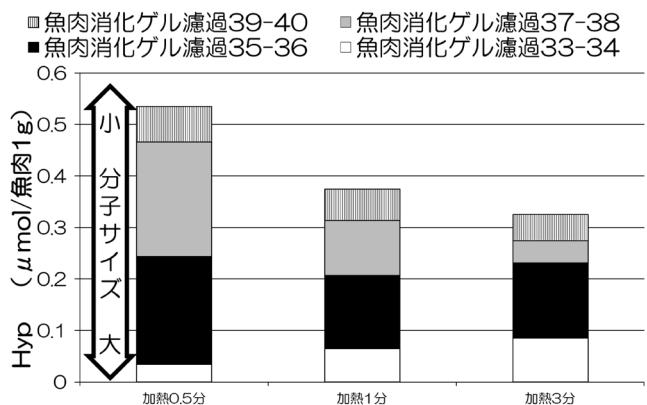


図4 加熱と人工消化後の魚肉から生成された分子量別低分子 Hyp ペプチド

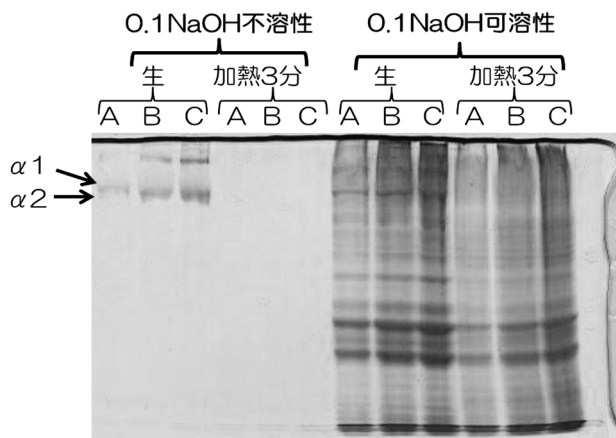


図5 加熱後の魚肉を0.1 M NaOH 可溶性と不溶性画分の SDS-PAGE
試料添加量：A; 5 μ L, B; 10 μ L, C; 15 μ L

ゲル濾過35~36 & 37~38) のペプチド濃度が高かった。これは加熱時間が長い程、高分子ペプチドやタンパク質が分解を受け、4残基以上のアミノ酸で構成されるペプチドが増加したと考えられる。その一方で、短時間である程、遊離アミノ酸への分解が抑えられるため2~3残基のアミノ酸で構成されるペプチドが増えたと考えられる。

これまでの結果からでは、分子構造の変化などは明確ではない。そのため次の試験では加熱後の魚肉からコラーゲンタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 分析によって変化を観察した。

3) 加熱後の魚肉中コラーゲン分子の変化

図5には、加熱後の魚肉を0.1 M NaOH で処理し、SDS-PAGE で分析した結果を示す。タンパク質分子構造を保持しているコラーゲンは0.1 M NaOH に対して不溶性であり、分子構造が崩壊したコラーゲン、または筋原線維タンパク質などは0.1 M NaOH に溶解する¹⁹⁾。図5に見られるように、未加熱魚肉 NaOH 不溶性画分にはコラーゲン分子サブユニット鎖の $\alpha 1$ と2のバンドパターンが確認された。それに対し加熱後の魚肉ではサブユニット鎖が確認されなかった。NaOH 可溶性画分には、未加熱と加熱魚肉試料に大きなパターンの違いは見られず、主に筋原線維タンパク質のバンドパターンで構成されると考えられる。加熱後の魚肉 NaOH 可溶性画分には、コラーゲン分子サブユニット鎖の $\alpha 1$ と2のバンドが見られないことから加熱によって魚肉中のコラーゲンサブユニットはさらに低分子化されたことが予想される。

図6には図5で得られた0.1 M NaOH 可溶性 SDS-PAGE (見加熱 & 加熱魚肉) パターンのデンシトグラムを示す。その結果、図5で見られた結果と同様、 $\alpha 1$ と2さらに、それ以上高分子のバンドが消失しており、低分子の

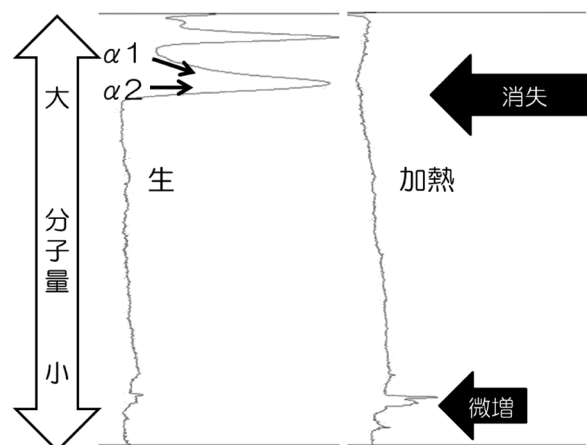


図6 未加熱・加熱後の魚肉0.1 M NaOH 不溶性画分の SDS-PAGE デンシトグラム

バンドの染色強度が微増していることが明らかとなった。この結果から、加熱により魚肉中のコラーゲン分子構造が崩壊し、サブユニット鎖が低分子化することが分かる。

4. 考 察

ここまでの結果から、加熱を行うことで低分子化したコラーゲン分子サブユニットが消失し、人工消化によって低分子ペプチドが生じることが分かった。また、未加熱魚肉からは低分子ペプチドがほぼ生成しない、つまり生の魚肉摂取からは、魚肉コラーゲン由来ペプチドが血液中に吸収されない事が推測される。魚肉から生じるペプチドの中で、ヒト血中に吸収されるサイズのペプチド濃度は、加熱時間によって異なることが明らかになった。加熱0.5分に最も濃度が高く、それ以降3分までは濃度が減少していた。

「にこごり」の現象からわかるように、魚肉を加熱し、煮汁を冷却するとゼリーを形成する。これは魚肉から分解したコラーゲン（ゼラチン）が流出し、冷却によってゲルを形成したものである。この現象から分かるように、加熱時間の延長によって、魚肉からのコラーゲン低分子化と魚肉からの分解物の流出の現象が、同時に生じている事が考えられる。

本研究の結論としては、加熱によって体調改善効果のあるコラーゲン由来ペプチドが魚肉から生成可能ではある。しかし、その方法によってその濃度が大きく変化することが予測される。つまり、今回は魚肉を「煮る」手法で実験を行ったが、「にこごり」が生じる事から、「焼く」または「蒸す」手法が、より効率的なペプチド生成だと考えられる。さらに、コラーゲン含量が魚肉よりも多い畜肉で試験を行い、その結果から、食事からの効率的なコラーゲンペプチド摂取方法が可能な加熱方法と加熱時間を明らかにすることが可能である。

謝 辞

本研究の一部は東和食品研究振興会の助成金により実施されました。ここに厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Veit, G., Zwolanek, D., Eckes, B., Niland, S., Kapyla, J., Zweers, M. C., Ishada-Yamamoto, A., Krieg, T., Heino, J., Eble, J. A., & Koch, M. (2011). Collagen XXIII, novel ligand for integrin alpha2beta1 in the epidermis. *J. Biol. Chem.*, **286**, 27804–27813
- 2) Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminar in Arthritis and Rheumatism*, **30**, 87–99
- 3) Rosenberg, S., Oster, K. A., Kallos, A., & Burroughs, W. (1957). Further studies in the use of gelatin in the treatment of brittle nails. *AMA Arch. Derm.*, **76**(3), 330–335
- 4) Scala J., Hollies N. R. S., & Sucher K. P. (1976). Effect of daily gelatine ingestion on human scalp hair. *Nutrition Reports International*, **6**, 579–592
- 5) Matsumoto, H., Ohara, H., Itoh, K., Nakamura, Y., & Takahashi, S. (2006). Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine*, **7**, 386–390
- 6) Clark, K. L., Sebastianelli, W., Flechsenhar, K. R., Aukermann, D. F., Meza, F., Millard, R. L., Deitch, J. R., Sherbondy, P. S., & Albert, A. (2008). 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Current Medical Research Opinion*, **24**, 1485–1496
- 7) Deal, C. L. & Moskowitz, R. W. (1999). Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, **25**, 379–395
- 8) Trc, T. & Bohmova, J. (2011). Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). *International Orthopaedics*, **35**, 341–348
- 9) Tanaka, M., Koyama, Y., & Nomura, Y. (2009). Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **73**, 930–932
- 10) Ohara, H., Iida, H., Ito, K., Takeuchi, Y., & Nomura, Y. (2010). Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2096–2099
- 11) Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., & Suzuki, H. (2009). Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10477–10482
- 12) Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., & Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6531–6536
- 13) Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., & Sato, K. (2007). Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1532–1535
- 14) Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxypropyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, **129**, 1019–1024
- 15) Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010). Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **61**, 52–60
- 16) Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C., Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2009). Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 444–449.
- 17) Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J., & Wada, M. (2009). Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*, **17**, 1620–1627.
- 18) Minaguchi, J., Tometsuka, C., Koyama, Y., Kusubata, M., Nagayasu, A., Sawaya, S., Shiga, T., Shima, H., Hara, T., & Takehana, K. (2012). Effects of collagen-derived oligopeptide prolylhydroxyproline on differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes. *Food Science and Technology Research*, **18**, 593–599
- 19) Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., & Ikeda, S. (1986). A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 889–893