

<平成26年度助成>

## コラーゲンの消化・吸収・排泄に関する基礎的研究

小 出 隆 規

(早稲田大学 先進理工学部化学・生命化学科)

### 1. 研究目的

健康増進を指向した食物やサプリメントの成分としてコラーゲンが注目されているが、経口摂取したコラーゲンの消化・吸収・代謝・排泄にかんする科学的な情報は少ない。生化学の分野では、コラーゲンの3重らせん構造は、一般的なプロテアーゼによる消化に強く抵抗することが知られているが、実際に経口摂取した3重らせんコラーゲンが、消化管においても難消化性であるのか否かについてはわかっていない。

本研究は、コラーゲンの消化、吸収、排泄においてその3重らせん構造がどのように影響するのかについて明らかにすることを目的とした。前半では、理想的な3重らせん構造をとるコラーゲンモデルペプチドをラットに経口投与し、その未変化体ペプチドの排泄率について、ランダム構造をとる類似のペプチドの排泄率と比較しつつ検討した。後半では、天然の3重らせんI型コラーゲンが胃内で変性・分解される可能性をさぐるため、人工胃液中で未変性コラーゲンおよび熱変性コラーゲンを処理し、その反応液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析することで、消化の程度を評価した。

### 2. 研究方法

#### 2.1. ラットに経口投与したコラーゲンモデルペプチドの排泄

##### 2.1.1. コラーゲンモデルペプチドの投与、排泄物の採取 前日から絶食したWister雄系ラット(215-265g)

に対して、4 mg/ラットとなるように、Table 1に示す4種のコラーゲンモデルペプチドをそれぞれ経口投与した。ここで、D-(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>は、D-アミノ酸残基からなるため消化されないペプチドとして用いた。投与直後から24時間後、24時間後から48時間後の間に排泄された排泄物(尿・糞便)をそれぞれ採取した。

Table 1 投与したコラーゲンモデルペプチドとその3重らせん形成率(37°C)

peptide	T <sub>m</sub> (°C)	Triple helical content at 37°C (%)
(Pro-Hyp-Gly) <sub>10</sub>	63	100
(Pro-Hyp-Gly) <sub>10</sub> *	64	100
D-(Pro-Pro-Gly) <sub>10</sub>	35	24
(Pro-Pro-Gly) <sub>10</sub>	35	24
(Pro-Hyp-Gly) <sub>5</sub>	< 4	0

\*at pH 1.8

##### 2.1.2. 糞便サンプルの前処理

糞便はハサミ、ピンセットを用いて細かく刻んだ後、0.05% TFA-10% MeCN/H<sub>2</sub>O(v/v)中で、氷冷下ポリトロンホモジナイザー(Kinematica, Luzern, Switzerland)を用いて粉碎した。得られた糞便粉碎液を80°Cで3分加熱することにより、プロテアーゼを失活させた。氷冷下チップ型ソニケーター(Misonix, Farmingdale, NY)を用いて、さらに細かく粉碎し、遠心(3500 rpm, 15°C, 5 min)することにより不溶物を除き、35 mL/gとなるようにメスアップし、第1抽出液とした。遠心後の沈渣に対して、再度0.05% TFA-10% MeCN/H<sub>2</sub>O(v/v)を加え、同様の抽出操作を行い、35 mL/gとなるように定容し、第2の抽出液とした。第1と第2抽出液を1:1で混合し、これを定量用サンプルとした。

### 2.1.3. 尿および糞便抽出液中のペプチド定量

1 mLの糞便抽出液または尿に対して、 $^{15}\text{N}$ -Glyで標識したペプチドを内部標準として添加し、InertSep RP1カラム (30 mg, GLサイエンス) にアプライし、0.05% TFA- 25 ~ 35% MeCN/H<sub>2</sub>Oによってペプチドを溶出した。さらに、逆相高速液体クロマトグラフィー (Cosmosil 5C18-AR-II, 4.6 x 250 mm, ナカライテスク) によって分離した。未変化体ペプチドを含む画分をMALDI-TOF MS (Autoflex III, Bruker Daltonics, USA) で分析し、得られたMSスペクトルをIsotopicaにより解析し、試料中の未標識コラーゲンモデルペプチドと内部標準ペプチドとの存在比を算出した<sup>1)</sup>。得られたデータを、別途同様の方法で作成した検量線にあてはめることで、サンプルに含まれるペプチド量を算出した。

## 2.2. 天然コラーゲンの *in vitro* 消化実験

### 2.2.1. 天然コラーゲンの人工胃液による処理

天然コラーゲンとして、酸可溶性ウシ真皮由来I型コラーゲン (collagen I-AC溶液 3 mg/mL, 高研) を用いた。また、これを95°Cで5分間処理したものを熱変性コラーゲンとした。人工胃液は、pHが2または3の塩酸水溶液とし、コラーゲンに対して、重量比で、1:0, 1:0.01, 1:0.1のブタ胃由来ペプシン (Sigma-Aldrich) を加えた。終濃度2.7 mg/mLのコラーゲンを上記人工胃液中37°Cで120分間処理した。

### 2.2.2. 消化コラーゲンの分析

各反応液中に含まれるコラーゲンおよびその断片を8% SDS-PAGEで分離し、クーマシー・ブルーリアント・ブルー染色により可視化した。

## 3. 研究成果、考察

### 3.1. ラットに経口投与したコラーゲンモデルペプチドの排泄

排泄物中に検出された未変化体のコラーゲンモデルペプチドの糞便および尿への排泄率をそれ

ぞれ Fig. 1, 2 に示す。Fig. 1 より、ラット体温 (37°C) で安定な3重らせん形成している (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> は、非消化性のコントロールである D-(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> 同様、投与量の約3/4が未変化体として糞便に排泄された。このことより、3重らせん構造はラット消化管内での消化に強く抵抗することが分かった。一方、体温でその三次構造が不安定な (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> や (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> は、糞便中に未変化体が検出されなかった。この結果は、3重らせんがほどけたコラーゲン様ペプチドは消化管内で分解されることを強く示唆した。また、尿中にも未変化体の (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> および D-(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> が検出されたが、この量は尿サンプルへの微細な糞の混入によって説明がつく微量であった (Fig. 2)。

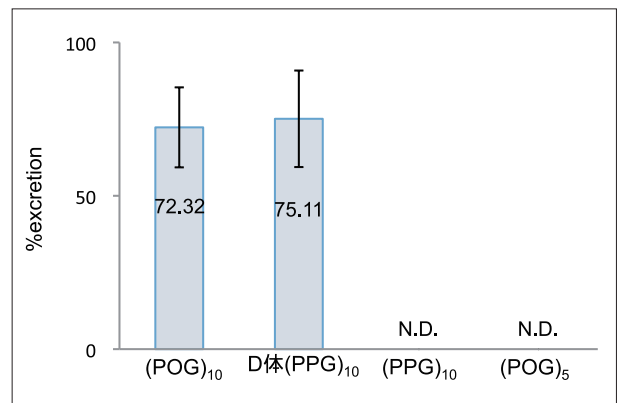


Fig. 1 糞便中の未変化体ペプチドの排泄率 (± S.D., n = 5)

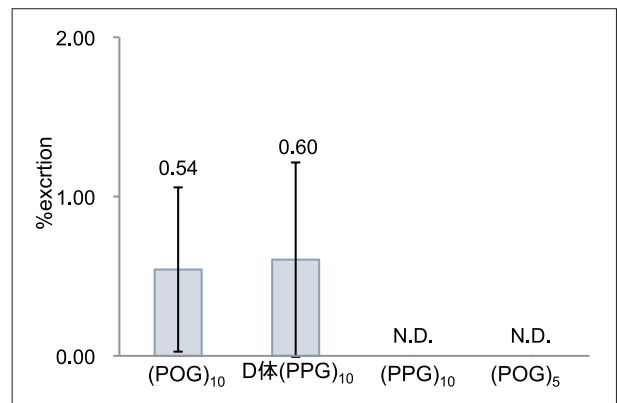


Fig. 2 尿中の未変化体ペプチドの排泄率 (± S.D., n = 5)

### 3.2. 天然コラーゲンの *in vitro* 消化実験

未変性または熱変性した天然I型コラーゲンの *in vitro* 消化実験を行った結果を Fig. 3 に示す。未

／熱変性コラーゲンのどちらの場合でも、ペプシン濃度が濃く、酸性度が高いほど分解が進行した。ここで、ペプシン非存在下の未／熱変性コラーゲンの消化に注目すると(レーン 2, 5, 9, 12)、いずれも pH3 ではほとんど分解しないが、pH2 ではわずかに分解していた。さらに、ペプシン存在下で pH3 における未／熱変性コラーゲンの消化パターンを比較すると、未変性コラーゲンはほとんど消化されず、熱変性コラーゲンのみが消化されていた(レーン 6, 7 および 13, 14)。したがって、天然コラーゲンの 3 重らせんは難消化性であるが、これを消化するにあたっては、胃内の酸性環境とペプシンが寄与していることが示唆された。また、同様の結果は、より多数の分子間クロスリンクが存在し、より難溶性なウシアキレス腱由来 I 型コラーゲンをもちいても得られた。

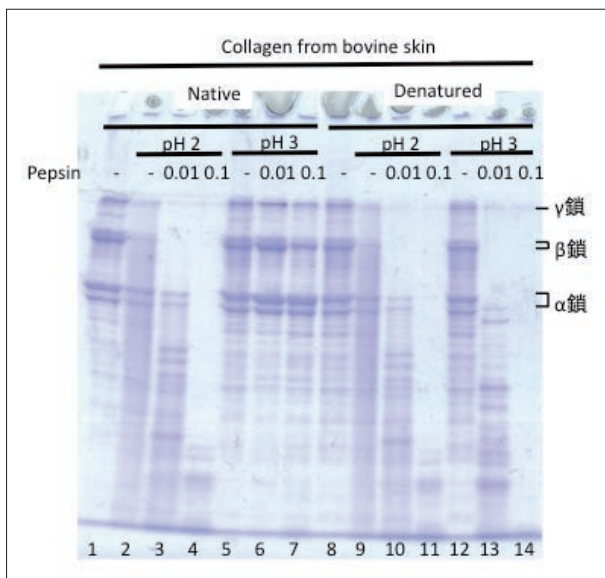


Fig. 3 人工胃液で処理した I 型コラーゲンの SDS-PAGE による分析

#### 4. まとめ、今後の展望

過去に、経口投与したコラーゲンの消化、排泄を調べた研究としては、1978年の Harkness らの研究があった。ここでは、ラット糞便から 5% トリ

クロロ酢酸中に抽出した上清を酸分解することによって生じたヒドロキシプロリンを定量しており、不溶成分中の量やその分子形態(ペプチドの状態が存在しているのか、それとも遊離アミノ酸なのか)が不明であった<sup>2)</sup>。本研究では、天然コラーゲンの消化、分布、排泄を知るための基礎として、3 重らせん構造の熱安定性が異なる種々のコラーゲンモデルペプチドを利用した *in vivo* 投与実験と、天然コラーゲンの *in vitro* 人工胃液中での消化実験を行った。これらの実験によって得られた結果は、3 重らせん構造が消化管内において難消化性であること、およびその消化には胃内環境が貢献していることが示唆された。おそらく、天然の 3 重らせん型コラーゲンは、まず胃内で変性・部分消化を受け、一本鎖になったのちに腸管での消化・吸収を受けるものと考えられる。現在、天然 3 重らせん型コラーゲンのラット腸管内での消化・吸収についてさらなる検討を進めている。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団及び関係者の皆様に御礼を申し上げます。

#### 文 献

- 1) Yasui H, Koide T *et al.*, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **100**, 705 (2013)
- 2) Harkness ML *et al.* *Gut*, **19**, 240 (1978)

#### [付記]

本研究の一部は、以下の学術雑誌および学会で公表、発表した。

1. T. Koide *et al.* *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 135(2016).
2. 第47回日本結合組織学会(品川)
3. 第52回ペプチド討論会(平塚)

## Basic research on the digestion, absorption and excretion of orally administered collagen

**Takaki Koide**

*Department of Chemistry and Biochemistry  
Waseda University*

### [Summary]

In this country, we can easily find many health foods and dietary supplements containing collagen or its derivatives. Is the collagen intake really good for your health? The answer is still unclear. The fate of orally administered collagen has not been well understood to date. In this research, we investigated digestion, adsorption and excretion properties of orally administered collagen-model peptides in rats, especially focused on the stability of their triple-helical structure. We further investigated the digestion of native and heat-denatured collagen I in artificial gastric juices to elucidate the contribution of the stomach condition to the metabolism of triple-helical collagen.

We orally administered several collagen-model peptides to rats and intact peptides excreted in urine and feces were analyzed by using MALDI-TOF mass spectrometry followed by quantitation using the Isotopica software. About three-fourths of (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>, forming a stable triple-helical structure at body temperature, were excreted intact in the feces, and the ratio is comparable to that of all-D-(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> used as an indigestible control. In contrast, (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> and (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>, the random coil conformations of which were dominant at body temperature, were not detected in the fecal samples, indicating that they were digested in the gastrointestinal tract.

Native and heat-denatured collagen I were treated with various concentrations of pepsin at pH 2 or 3. As expected, low pH and high concentration of pepsin were found to be effective in digesting the triple-helical collagen, even though the native collagen was less susceptible to degradation than the heat-denatured one. The results indicated that the first step of collagen metabolism would be partial denaturation of the triple-helices in the stomach followed by the pepsin digestion.