

## 魚由来コラーゲンの化学修飾及び架橋による改質

常見崇史\*<sup>1</sup> 太田高敏\*\* 北村英三\*<sup>2</sup>

Changes of Fish Collagen by Chemical Modification and Enzymatic Cross Linkage

TSUNEMI Takashi\*<sup>1</sup>, OTA Takatoshi\*\*, KITAMURA Eizo\*<sup>2</sup>

### 抄録

養殖魚であるティラピア魚皮からコラーゲン(TC)を分離・精製して諸性質を調べると共に、サクシニル化による化学修飾及びトランスグルタミナーゼ(TG)による架橋を試みた。湿潤状態でのTCの変性温度は25~28であり、生育環境や種により異なった。サクシニル化物はpH4.8付近でイオン強度を増すと急速にゲル化し、その程度はサクシニル化率が低い方が高かった。ゼラチン化したサクシニル化物のTGによる架橋は可能であったが、未変性物では架橋されなかった。

キーワード：ティラピア、コラーゲン、サクシニル化、トランスグルタミナーゼ

### 1. はじめに

コラーゲンはバイオマテリアルとして、食品から化粧品に至るまで幅広い分野で用いられている。牛皮由来のものが最も多く供給されてきたが、BSE問題が発生してから、魚類や鳥類などの他原料への変換が迫られている。魚由来のコラーゲンの熱変性温度はその生育温度帯に影響され、鳥獣類に比べ低い<sup>1)</sup>ことから、製品の保存条件により物性が変化するなど、利用面での制約を受けてきた。そこで、本研究では食用養殖魚であり、皮の安定的供給が見込めるティラピア(*Oreochromis niloticus*, 和名:イヅミ鯛)を選択し、食用とする際に排出される魚皮からコラーゲンを抽出して、化学修飾及び酵素的架橋等により物性を改変・制御することを試みた。

### 2. 実験方法

#### 2.1 供試材料

北海道川湯温泉で養殖されたティラピアの皮を用いた。対照としてタイ産ティラピア及びその原種(ザ'ル'カ)並びにサメのコラーゲンをを用いた。

#### 2.2 精製魚皮の調整

約1cm角に切った肉付き魚皮と20倍量の0.5mol/Lの冷食塩水をミキサーに入れ、1分間ホモジナイズした後、袋状の不織布でろ過・遠心分離することを3回繰り返した。得られた沈殿物を冷水で水洗後、約20倍量の冷エタノール中に加え、24時間攪拌・脱脂を行い、沈殿物を遠心分離して、精製魚皮を得た。

#### 2.3 コラーゲンの抽出

精製魚皮を100倍量の0.5mol/l酢酸水溶液中に入れ、10℃で48時間攪拌・抽出を行った。得られた粘調な溶液を6000rpm・10分間遠心分離し、上清に塩化ナトリウムを5wt%になるように加えて白色沈殿を析出させた。沈殿を同様に遠心分離し、精製水で透析後、真空凍結乾燥を行い、コラーゲ

\*<sup>1</sup> 北部研究所 生物工学部

\*<sup>2</sup> 北部研究所 生物工学部  
(現 環境技術部)

\*\* 岡本化学工業(株)

ンを得た。アテロ化コラーゲンの抽出・分離は酢酸抽出時に魚皮湿重量の0.03%のペプシンを加え、同様に抽出した後、5mol/Lの水酸化ナトリウム溶液でpH10になるように調整し、24時間攪拌を続けてペプシンを不活性化し、同様に塩析、分離、透析及び乾燥処理を行った。

#### 2.4 サクシニル化

アテロ化コラーゲン凍結乾燥物を0.5mol/Lの酢酸に溶解し、水酸化ナトリウム溶液でpH10になるように調整した後、コラーゲンに対して重量比で等量<sup>2)</sup>の無水コハク酸を水酸化ナトリウム溶液でpH9~10に調整しながら約2時間かけて添加した。反応は10℃で行い、添加終了してから1日攪拌放置後、塩酸溶液でpH4.2付近に調整し、等電点沈殿させ、コラーゲン調整と同様に遠心分離、透析及び凍結乾燥処理を行った。低サクシニル化物は無水コハク酸添加量を重量比で2/5にして行った。

#### 2.5 SDS-PAGE

各種コラーゲン試料溶液と4%SDS及び5%メルカプトエタノール入りトリス塩酸バッファー(pH6.8)を1:1の割合で混合後、沸騰浴中で3分間加熱変性させた。電気泳動は5~8%のポリアクリルアミドゲル濃度(1%SDS含有)で、1枚あたり20mAの電流を流し1.5~2時間行った。

#### 2.6 ゲル濾過

各種コラーゲンまたはそれらを65℃で30分加熱しゼラチン化したものを1M塩化カルシウム0.2M酢酸ナトリウム溶液に溶解し、Sephacryl S-300HRカラム(26mm×600mm)に0.5ml注入して、2.5ml/minの流速で展開した。検出は230nmにおける吸光度により行った。

#### 2.7 変性温度及び粘度の測定

動的粘弾性測定装置(改造レオログラフマイクロ、東洋精機製)を用い、加熱過程の粘弾性挙動を調べるにより行った。即ち、真空凍結乾燥したコラーゲンを2wt%になるように0.5mol/Lクエン酸水溶液を加え、冷蔵庫中で2晩放置しゲル状コラーゲンを得た。10℃で30分間遠心濃縮器で減圧脱気を行った後、試料厚2mmで振幅40

μm、2Hzの正弦振動を与え10~45℃、昇温速度1℃/minで加温する間の動的ズリ弾性率G'から熱変性温度を推定した。粘度は芝浦システム製回転粘度計により測定した。

#### 2.8 トランスグルタミナーゼによる架橋

(株味の素社製トランスグルタミナーゼ(以下TGと略す)製剤アクティバTGSを10倍量の0.2Mトリスバッファーに溶解し酵素液とした。コラーゲン及びサクシニルコラーゲンまたはそれらの熱変性物(60℃、30分)を所定のpHの0.1Mトリス塩酸緩衝液に溶解し、TG酵素液を0.2U/mlとなるよう添加して、コラーゲンの場合は25℃、ゼラチンの場合は37℃で反応させた。反応後の溶液に電気泳動用サンプルバッファーを同量加え、沸騰浴中で3分間処理後、遠心分離(15000回転、5分間)した。架橋の有無は反応前後のSDS-PAGEパターンから推定した。TG活性の測定はCBZ-Gln-Glyとヒドロキシルアミンを用いたヒドロキサム酸法により測定した<sup>3)</sup>。

#### 2.9 理化学成分の分析

ヒドロキシプロリンの分析は、ヒドロキシプロリンとp-ジメチルベンズアルデヒドとを反応後発色させる比色法<sup>4)</sup>を用いて測定した。コハク酸の分析は6M塩酸加水分解液を試料溶液として、昭和電工製Shodex-OAシステムを用いたHPLC法で測定した。

### 3. 結果及び考察

酢酸抽出により精製魚皮湿重量の100g当たり約16gの白色乾燥コラーゲンが得られた。酢酸抽出時にペプシンを添加すると更に収量は増加するが、皮の微細な黒色素物が混入し、1.5万回転程度の遠心分離では完全に除去することが困難であったので、以下の試験では魚皮由来の微細黒色素物が少量混入したのも一部用いた。

#### 3.1 ティラピアコラーゲン及びサクシニル化物の性質

##### 3.1.1 電気泳動及びゲルろ過

図1にティラピアから分離・精製したコラーゲン、テロペプチドを除去したアテロ化コラーゲン並びにアテロ化物をサクシニル化したコラーゲン

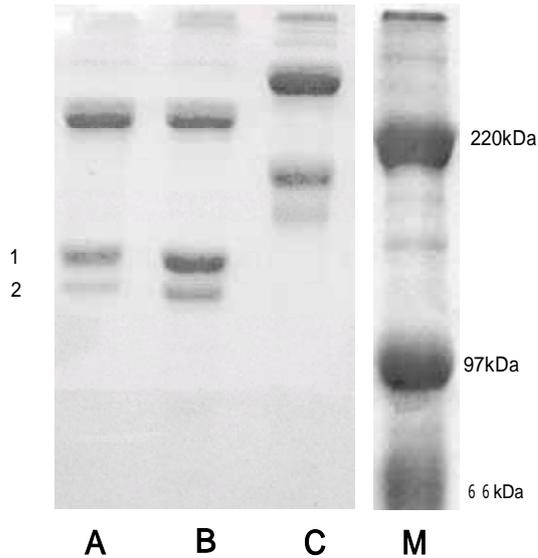


図1 ティラピア魚皮コラーゲンのSDS-PAGE

A: コラーゲン B: アテロコラーゲン  
C: サクシニルコラーゲン M: 分子量マーカー  
ゲル濃度: 8% 20mAで2時間泳動

の変性後の SDS-PAGE パターンを示す。一般的に魚由来に限らず、皮を構成するコラーゲンは型に属し、内部構造的には 1[ ]が 2 本組になった 鎖と 2鎖の 3 本鎖構造からなっていると言われている<sup>6)</sup>が、本試験で得られたコラーゲンも同様の泳動パターンを示した。サクシニル化コラーゲンでは 鎖及び 鎖の泳動距離が小さく、より高分子側に位置していた。また、 鎖の上側に若干の 鎖が観察されるが、量的には少なかった。サクシニル化物の泳動距離が小さかったのは

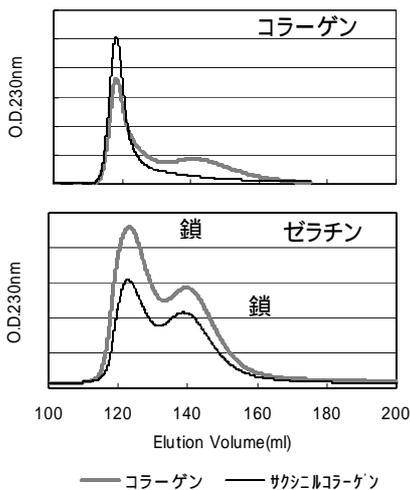


図2 ティラピアコラーゲン及びサクシニル化物のゲルろ過

Column : Sephacryl S300 26mm x 600mm  
Flow rate : 2.5ml/min , Injection : 500 μl  
Eluent : 1M CaCl<sub>2</sub>-0.2M NaAcetate  
ゼラチン化: 60 , 30分

サクシニル化によりリジン残基のアミノ基が減少し、SDS の結合量が減ってマイナス電荷が減少したのが原因と考えられ、SDS-PAGE を行うことによりサクシニル化の有無を容易に判断できることが分かった。図2に未変性コラーゲンと60で30分処理してゼラチン化させたコラーゲンのゲルろ過プロファイルを示す。未変性のコラーゲンはほぼ素通りして溶出した。ゼラチン区では 鎖成分と 鎖成分が分離し、サクシニル化物の方が若干早く溶出した。また、分離ピークの面積比からティラピア魚皮コラーゲンでは 鎖成分が多くなっていた。

### 3. 1. 2 変性温度

ティラピア種毎、サメのコラーゲン及びサクシニル化物について、湿潤試料を調整し、動的粘弾性を測定して、動的ズリ弾性率 G' の差 (温度変位) が最大になる温度を熱変性温度とした。

表1にコラーゲンの変性温度とヒドロキシプロリン量を示した。ティラピアコラーゲンは生育場所や、種の違いにより変性温度が変化し、また、概ね変性温度はヒドロキシプロリン量に依存していることが示唆された。一般に魚皮由来のコラーゲンの変性温度は30 以下であると言われているが、ティラピアコラーゲンでは25~28 にあったことから、魚類の中では比較的高い部類に位置すると考えられた。サクシニル化後の変性温度も大きな変化はなかった。

表1 ティラピアコラーゲンの変性温度とヒドロキシプロリン量

	変性温度( )	HyPro(%)
北海道産	27	9.19
タイ産	28	10.30
原種(サメ)	25	6.63
サメ	24	6.81
サクシニル化(北海道産)	29	

変性温度は1~2%の湿潤状態で測定。

### 3. 1. 3 粘度

粘度は pHや温度など測定条件により異なるが、

サクシニル化すると粘性が大幅に上昇した(表2)

表2 ティラピア魚皮コラーゲンの粘度

	測定条件	粘度 (mPa・s)
コラーゲン	0.3%溶液 (pH3.5)	100
サクシニル化コラーゲン	0.1%溶液 (pH6.0)	635

B型回転粘度計、20℃で測定。

### 3.2 サクシニル化コラーゲンのゲル化

通常のコラーゲンは中性塩が含まれる溶液中(pH7.5付近)において体温付近の温度で繊維化によりゲルを生成することが知られている<sup>6)</sup>ので、サクシニル化物でも同様にゲル化が可能であるか調べた。サクシニル化率の異なるコラーゲンを調製し(表3)、ゲル化速度の違いを調べた。各コラーゲン中のコハク酸含量の低い方を低サクシニル化コラーゲンとした。

表3 サクシニル化コラーゲン中のコハク酸含量

コラーゲン	コハク酸含量(%)
サクシニル化コラーゲン	6.10
低サクシニル化コラーゲン	3.57

110℃、24時間加水分解物をHPLCで分析した。

これらを濃度0.25wt%、イオン強度1.0とし、等電点付近のpH4.80になるように調整したところ、図3のように5℃で液体となり25℃で白濁ゲル状となる可逆的なゾル-ゲル転移が見られた。



図3 サクシニルコラーゲンの加温によるゲル化

図4にサクシニル化コラーゲン、低サクシニル化コラーゲン及び対照として(株)ニッピ社製牛コラーゲン溶液の加温による吸光度(波長350nm)の経時変化を示す。サクシニル化コラーゲンは25℃、

牛コラーゲンは37℃でゲル化させたところ、サクシニル化率が低いコラーゲンの白濁の度合いが高いことが分かった。また、牛コラーゲンと比べて、ゲル化のスピードが速く、短時間でゲル化が行われることが分かった。

図5にサクシニル化コラーゲンの粘弾性を示す。温度を10℃から昇温し、25℃に達したところで保温した。ゲル開始温度は20℃でサクシニル化率による差は見られず、ゲル化後は加温と共にゲル強度が増加することが分かった。また、25℃での保温時にはサクシニル化率が低い方がゲル強度が強いことが示された。

コラーゲン中のサクシニル基が繊維化を阻害し、サクシニル化率が少ない程コラーゲンの繊維化が起こりやすくなるものと考えられ、サクシニル化率を変えることによりゲル強度を制御できることが可能となった。

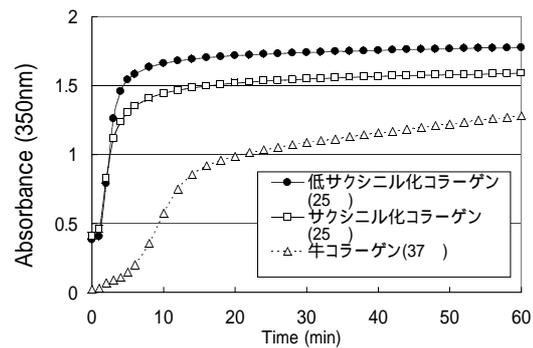


図4 各コラーゲンのゲル化速度

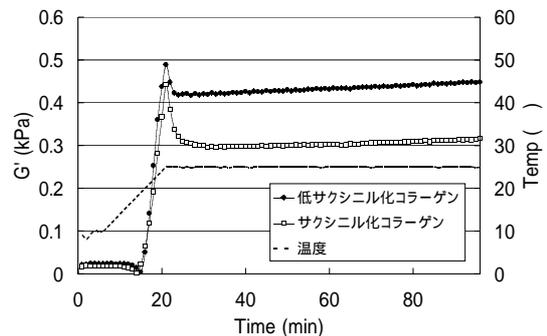


図5 サクシニル化コラーゲンの粘弾性

### 3.3 トランsgルタミナーゼ(TG)による架橋

TGはタンパク内にあるグルタミン残基の $\gamma$ -カルボキシアミド基とリジンの $\epsilon$ -アミノ基とを結合し、分子間あるいは分子内架橋を行う酵素で、

タンパク質同士の結合に広く用いられている。nomura 等<sup>7)</sup>は鮫皮コラーゲンに微生物由来の TG を作用させた結果、架橋により変性温度が 2 上昇したと報告している。そこで、サクシニル化率を変えたコラーゲンについて、反応の残存リジンとグルタミンとを分子間結合させることにより、コラーゲン同士が結合され変性温度が上昇すると共にサクシニル基による水溶性も維持できることを期待し、TG による架橋を試みた。対照として、コラーゲンを熱処理したゼラチンを用いた。架橋の有無は反応後の SDS-PAGE で調べた(図6)。

未変性の状態で TG を作用させた場合はサクシニル化の程度に関わりなく、24時間後も 及び鎖に由来するバンドが残っていることから、架橋結合は生じなかったものと思われた。一方、ゼラチン化した場合はそれぞれのバンドが消失または減少しており、架橋された。架橋の度合いは低サクシニル化の方が高かった。

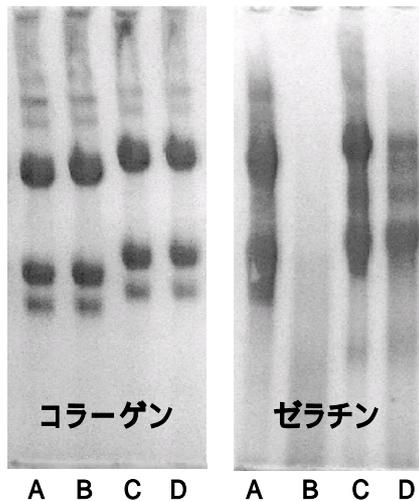


図6 トランスグルタミナーゼ処理による泳動パターンの変化

- A : 低サクシニル化物TG処理前
- B : 低サクシニル化物TG処理24時間後
- C : 高サクシニル化物TG処理前
- D : 高サクシニル化物TG処理24時間後

0.2%のコラーゲン及びゼラチンのトリス塩酸溶液(pH6)にトランスグルタミナーゼを0.2U/mlとなるよう加え、前者は25 で、後者は37 で反応させた。5%ゲル濃度、20mA/枚で泳動

#### 4. まとめ

ティラピア魚皮からコラーゲン(TC)を分離・精製して諸性質を調べると共に、サクシニル化による化学修飾及びトランスグルタミナーゼ(TG)による架橋を試みた。

(1) 電気泳動及びゲルろ過分析から TC は 鎖成分が多く含まれていた。

(2) 変性温度は25~28 で、ヒドロキシプロリン含量にほぼ比例しており、生育環境・種により異なった。

(3) サクシニル化物は pH4.8付近でイオン強度を増すと急速にゲル化し、その程度はサクシニル化率が低い方が高かった。

(4) ゼラチン化したサクシニル化物の TG による架橋は可能であったが、未変性物では架橋されなかった。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導をいただいた東京都中小企業振興公社、長南康正博士に深謝します。

#### 参考文献

- 1) Karl A. Piez and Jerome Gross : The Amino Acid Composition of Some Fish Collagens, *J. Biol. Chem.*, **235**(1960)995
- 2) 長南康正 : 化学修飾によるコラーゲンの改質, 東京都皮革技術センター, (1991)16
- 3) 本木政雄, 沖山敦, 野中雅彦 : 新規酵素及びそれを用いるタンパクゲル化物の製造方法, 特開昭64-27471
- 4) 荒巻秀俊, 田村久子 : ヒドロキシプロリンを指標としたソーセージ中の粗ゼラチン含量の測定法の検討, 農林規格検査所調査研究報告, 第9号, (1985)15
- 5) 藤本大三郎 : コラーゲン物語, 東京化学同人, (1999)106
- 6) Jerome Gross and David Kirk : The Heat Precipitation of Collagen from Neutral Salt Solutions, *J. Biol. Chem.*, **233**(1958)355
- 7) Nomura Y, Toki S and Shirai K : Effect of Transglutaminase on Reconstruction and Physicochemical properties of Collagen Gel from Shark type Collagen, *Biomacromolecules*, **2**(2001)105