

## 学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 室田 一貴

題目 : Study on uric acid lowering peptides in proteolytic digest of shark cartilage.

(サメ軟骨のプロテアーゼ分解物に含まれる尿酸値低下ペプチドに関する研究)

本研究は、サメ軟骨プロテアーゼ分解物摂取による血清尿酸低下作用を動物実験により見出し、その活性物質の同定を行った。さらに作用機序および将来のヒトへの応用に関して考察を行った。

### Chapter 1. General introduction (序論)

サメは、軟骨魚綱板鰓亜綱に属する魚類であり、骨の全てが軟骨である。サメ軟骨はリュウマチや変形性関節症、創傷治癒の亢進や非腫瘍性の慢性炎症を伴う疾患に対する治療剤として用いられてきた。最近では、高純度のコンドロイチン硫酸やコンドロイチン硫酸塩の注射による腰痛、関節痛、肩関節周囲炎の治療や、点眼による角膜の表層の保護に用いられている。本研究は、サメ軟骨プロテアーゼ分解物の新規薬効を探索したところ、血清尿酸値の低下傾向が観察されたことに端を発する。

痛風は高尿酸血症を主因とする生活習慣病である。痛風の治療には医薬品（アロプリノールやベンズブロマロン、プロベネシド等）が用いられるが、これらの医薬品には副作用が起こる場合もあり、常用する上での障害となっている。高尿酸血症患者は低プリン体食品の摂取を推奨される。しかしながら、低プリン体食品を摂取することだけで血清尿酸値を制御することは困難である。本研究は、サメ軟骨プロテアーゼ分解物中の血清尿酸値低下ペプチドの同定を目的とした。

### Chapter 2: Uric acid lowering effect by ingestion of proteolytic digest of shark cartilage and its basic fraction. (サメ軟骨プロテアーゼ分解物およびその塩基性画分の尿酸低下作用)

オキソニン酸カリウム配合食で誘発させた高尿酸血症モデルラットにサメ軟骨プロテアーゼ分解物を食餌に 1.5%、または 2.5% 加えたところ、血清尿酸値が有意 (one-way ANOVA using Dunnett's post-hoc test ( $p < 0.05$ )) に低下した。一方、牛軟骨由来ではこのような効果は観察されなかった。腹空内へのオキソニン酸カリウム単回投与で誘発させた高尿酸血症モデルラットにおいても、サメ軟骨プロテアーゼ分解物は用量依存的に血清尿酸値を低下させた。サメ軟骨プロテアーゼ分解物を両性電解質として用いる調製用等電点電気泳動 (autofocusing) により等電点の違いで酸性、弱酸性、塩基性の画分に分画した。有意な血清尿酸値低下作用は、塩基性画分でのみ観察され、コンドロイチン硫酸単独では観察されなかった。本結果は塩基性の組成物、恐らくはペプチドが、血清尿酸値低下

作用に寄与している可能性を示唆する。

Chapter 3: Moderation of oxonate-induced hyperuricemia in rats via the ingestion of an ethanol-soluble fraction of a shark cartilage proteolytic digest. (サメ軟骨プロテアーゼ分解物のエタノール可溶性画分の摂取によるラットオキソン酸誘発性高尿酸血症の緩和)

サメ軟骨プロテアーゼ分解物にエタノールを終濃度 75%加え、可溶性及び沈殿画分を得た。ペプチドは、75%エタノール可溶性画分に回収された。エタノール可溶性画分は、分画前と比べて粘度が低く、さらに高い水溶性を示した。オキソン酸カリウム誘発高尿酸血症ラットに、28 日間、1 g/kg 体重量のエタノール可溶性画分を経口投与したところ、血清尿酸値が有意 (one-way ANOVA using Dunnett's post-hoc test( $p < 0.05$ )) に低下した。エタノール可溶性画分の単回投与でも、血清尿酸値を用量依存的に低下させ、その 50% 阻害用量は 262 mg/kg 体重量だった。さらに、エタノール可溶性画分を経口投与(1 g/kg 体重量)により尿酸生成の律速酵素であるキサンチンオキシダーゼの血清での活性が、Vehicle 群に対して有意(Student t-test ( $p < 0.05$ ))に低下した。これらの結果は、エタノール可溶性画分中のペプチド、またはその代謝産物がキサンチンオキシダーゼを阻害することを示唆する。

Chapter 4: Identification of anti-hyperuricemic peptides in the proteolytic digest of shark cartilage water extract by using in vivo activity-guided fractionation. (in vivo 活性を指標とした分画手法を用いたサメ軟骨水抽出物プロテアーゼ分解物中の抗高尿酸血症ペプチドの同定)

サメ軟骨水抽出物の微生物プロテアーゼ (アルカラーゼ) 分解物中の、血清尿酸値低下ペプチドを in vivo での活性を指標として同定した。サメ軟骨水抽出物を、autofocusing、および調製用逆相液体クロマトグラフィーで分画した。各分画物はアルカラーゼで分解後、オキソン酸カリウム誘発高尿酸血症ラットに経口投与した。塩基性画分、及び、疎水性画分のアルカラーゼ分解物が血清尿酸値低下作用を示した。最終的な活性画分からは 18 種類のペプチドが同定された。これらのペプチドを化学合成し、血清尿酸値低下作用を評価した。Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr と Ser-Pro-Pro-Tyr-Trp-Pro-Tyr は静脈内投与(5 mg/kg 体重量)により、血清尿酸値を有意 (one-way ANOVA using Scheffe's or Dunnett's post-hoc test( $p < 0.05$ )) に低下させた。さらに Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr は経口投与によっても、用量依存的に血清尿酸値低下作用を示し、その 50% 阻害用量は 39.3 mg/kg 体重量だった。これらのペプチドが、サメ軟骨のアルカラーゼ分解物が示す抗高尿酸血症活性に、少なくとも部分的には、寄与していると考えられる。また Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr 自体はキサンチンオキシダーゼ阻害活性を持たないが、経口投与後の血清キサンチンオキシダーゼ活性を減少させた。

Chapter 5: General discussion and conclusion. (総括と結論)

キサンチンオキシダーゼは尿酸合成系における重要な酵素である。ゆえに食品成分で

キサンチンオキシダーゼ活性を阻害するものについて探索がなされているが、摂取した食品成分でキサンチンオキシダーゼ阻害による尿酸値低下作用を得られたという報告はない。その1つの理由として、経口摂取後、消化・吸収を介してそれら成分の構造が変化することが挙げられる。そこで本研究では、動物実験により経口摂取で鮫軟骨酵素分解物が、血清尿酸値を低下させることをまず確認した。その後大量分画を行い、各画分を動物実験で血清尿酸値の低下を評価し、活性ペプチドの同定を試みた。その結果、経口摂取で血清尿酸値を低下させることのできるペプチドの同定に成功した。

本研究で同定された Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr のみでサメ軟骨プロテアーゼ分解物を摂取した際に観察される血清尿酸値低下作用の全てを説明することはできない。最終活性画分中の他のペプチドには単独では活性が認められなかったが、これらのペプチドの存在が Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr の活性を高める可能性が示唆される。さらに血清中のキサンチンオキシダーゼ活性阻害が、Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr の代謝産物による直接阻害によるものなのか、内因性のキサンチンオキシダーゼ阻害成分の産生を促すことによるものなのかは不明である。これらの点の解明には更に検討が必要である。

本研究により経口摂取で抗高尿酸血症活性を示すペプチドを食品製造に利用可能な手法により濃縮することが可能となった。これらの手法により用量を低下させる事に成功し、ヒトへの応用が促進できると考えられる。