

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 佐藤健司

副査 佐上郁子

副査 南山幸子

1 氏 名

室田 一貴

2 学位の種類

博士 (学術)

3 学位授与の要件

学位規程第3条第4項該当

4 学位論文題目

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)

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本論文では、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確認し、活性物質の同定を行っている。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ている。

第1章では本研究の背景として、サメとサメ軟骨の利用を概説し、さらに本研究が行われるきっかけとなったサメ軟骨プロテアーゼ分解物のラットでの血清尿酸低

下作用の発見について説明している。さらに高尿酸血症との関係、及び高尿酸血症の抑制メカニズムを概説している。

第2章では、オキソン酸カリウム配合食で誘発させた高尿酸血症ラットを用いてサメ軟骨プロテアーゼ分解物の経口摂取による血清尿酸低下を確認している。また、腹腔内へのオキソン酸カリウム単回投与で誘発させた短期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の用量依存的な血清尿酸値低下を確認している。一方、サメ軟骨プロテアーゼ分解物の主成分である精製コンドロイチン硫酸および牛軟骨プロテアーゼ分解物ではこのような効果を示さないことを見出し、活性成分はサメ軟骨由来の特異的なペプチドの作用であることを示唆している。

サメ軟骨のプロテアーゼ分解物は高粘度で摂取しづらい標品となっている。また経口摂取によりラット高尿酸血症の改善効果を示すための用量が比較的大きい(1 g/kg 体重)。そこで、第3章では、活性成分を食品に用いることのできる手法で濃縮し、容易に摂取できる標品を得ることを目的としている。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。99%のペプチドは、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(35.1 mPas →1.3 mPas)、さらに高い水溶性を示した(約 50%)。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 体重量であることを見出した。さらに、エタノール可溶性画分の経口投与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阻害活性が、Vehicle 群に対して有意に上昇することを見出した。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している。

第4章では、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することを目標としている。サメ軟骨水抽出物を、調製用等電点電気泳動、および調製用逆相液体クロマトグラフィーで分画し、各分画物を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ている。その結果、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すことを見出した。最終的な活性画分からは 18 種類のペプチドを同定した。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結果、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)により血清尿酸値の有意な低下作用を示すことを見出した。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 体重量で

あることを見出した。以上のことから、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、寄与していると結論している。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阻害活性を増加させる事を見出した。

第5章では、各章で得られた結果をまとめて総括としている。

本研究では、動物実験により経口摂取でサメ軟骨プロテアーゼ分解物が、血清尿酸値を低下させることをまず確認し、動物実験を用いて経口摂取で効果のあるペプチド (Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr) の同定に成功している。従来の消化・吸収過程での変化を考慮しない *in vitro* 試験による活性ペプチドの同定とは一線を画する研究となっている。活性を持つペプチド画分を食品加工に利用可能なエタノール分画で濃縮することにも成功している。またその活性メカニズムとして、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、経口摂取後に血清中のキサンチンオキシダーゼ阻害活性が上昇することを見出し、尿酸合成の律速酵素であるキサンチンオキシダーゼ阻害によると推定している。一方、Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr の代謝・吸収については未解明であり、今後この問題の解明が必要である。未解明の部分もあるが、本研究は優れた学術性と高い実用性を持ち、本研究科の博士の学位にふさわしいと考える。

## 6 最終試験の結果の要旨

平成 26 年 2 月 24 日午後 1 時より、図書館視聴覚教室において博士論文発表会を公開で開催し、口頭発表後に質疑応答を行った。質問内容は、Tyr-Leu-Asp-Asn-Tyr の作用メカニズム、その生体利用能、臨床への応用など多岐に及んだが、それぞれの質問に適切に回答していた。以上より、最終試験の結果については、審査委員全員一致で合格と判断した。

## 7 学力の確認の結果

別紙に記載するように、学力確認を行った結果、合格とした。