

短 報

タンパク質栄養のラット皮膚コラーゲンおよび
ヒアルロナン量に与える影響

大石 祐一, 奥地 玲奈

中部大学応用生物学部

はじめに

皮膚は、動物体の境界に存在し、体内水分の蒸散抑制および体外物質の体内への侵入を防御する非常に大きく、重要な器官である。その構造は、基底膜 (basement membrane) をはさんで、真皮 (dermis) と表皮 (epidermis) に分けられる。表皮は、表皮細胞 (keratinocyte) の集合体であるが、細胞間には、ヒアルロナン (hyaluronic acid, hyaluronan) や、細胞間脂質であるセラミド (ceramide) などが存在し、蒸散を防いでいる。一方、真皮には線維芽細胞が存在し、コラーゲン (collagen)、ヒアルロナン、エラスチン (elastin) などを合成し、細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) を構成する。これらのECMは、細胞間の物質の輸送、細胞の移動、皮膚の弾力性、「はり」、「くすみ」、「しわ」、「たるみ」などに関わっていると言われている。たとえば、真皮で最も多いコラーゲンが部分的に異常に分解されるとそこが窪み、「しわ」になる。コラーゲンは、体内で最も多いタンパク質であり、真皮の乾燥重量の70%以上になると言われている (Uittoら, 1999)。また、ヒアルロナンは1gで何リットルもの水分を保持できる能力を有し、そのため、細胞間での物質の輸送、免疫細胞の移動に大きく関わっており、皮膚ヒアルロナン量が減少すると、免疫細胞の移動が減少することが明らかとなっている (Mummertら, 2000)。また、年齢とともに減少することもわかっている。

筆者らは、タンパク質栄養により1週間で皮膚コラーゲン代謝およびヒアルロナン代謝が大きな影響を受けることを明らかにした (Oishiら, 2002, Oishiら, 2003)。

本稿では、これら代謝に関わる物質がタンパク質栄養を変化させてからどのくらいの時間をかけて影響を受けるのかについて18日間飼育したラットを用いて検討したので報告する。

方 法

Wistar系雄性ラット6週齢を12%カゼイン食で予備飼育後、3群に分け、さらに1,8および18日間飼育した。すなわち、アミノ酸バランスの良い食餌、12%カゼイン食群 (C群)、アミノ酸バランスの悪い食餌、12%グルテン食群 (G群)、無タンパク質食群 (PF群) の3群を設け、10:00~18:00の制限給餌を行った。0, 1, 8および18日後、屠殺し、背面より皮膚を採取した。

試料はトロポコラーゲンを分画後、IおよびIII型コラーゲンタンパク質量を測定した。すなわち、皮膚を氷冷生理食塩水中でホモゲナイズ後、20時間4℃にて振盪した。遠心して上清と沈殿物に分画し、上清をトロポコラーゲン画分とした。コラーゲン量測定は、ウエスタンブロッティング法を用いた。 (Oishiら, 2002)

ヒアルロナン量測定に関しては、試料はプロテアーゼによってタンパク質を分解後、ヒアルロニダーゼ処理し、限外濾過膜に供した。下層液中のウロン酸量をヒアルロナン量として算出した。また、HAS2および3のmRNA量は、定量性PCR法を用いて測定した。 (Oishiら, 2003) なお、n=5で行った。

結 果

①体重変化および皮膚重量

皮膚重量は、従来どおり、12%カゼイン食群 (C群) で増加、12%グルテン食群 (G群) でほとんど増減無し、無タンパク質食群 (PF群) で減少した (図1)。また、皮膚単位面積あたりの重量は、C群でほとんど増減なしなのに対して、G群およびPF群において経日的に減少した (図2)。

②トロポコラーゲン量

トロポコラーゲン量は、I型コラーゲンとIII型コラーゲンに分けて測定した。0日目に対す

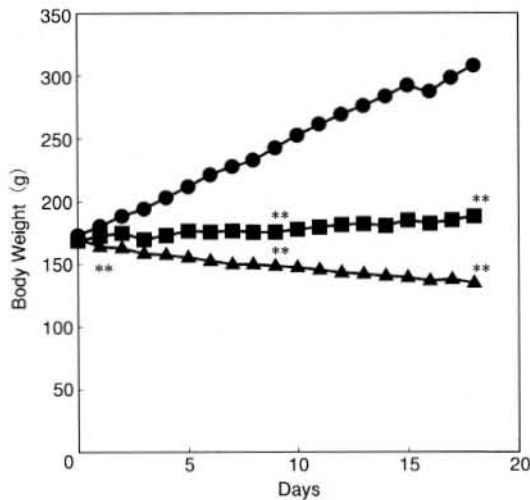


図1 タンパク質栄養の違いによるラット体重の変化
 ●: 12%カゼイン食群,
 ■: 12%グルテン食群,
 ▲: 無タンパク質食群, n=5
 *, **: $p < 0.05, 0.01$

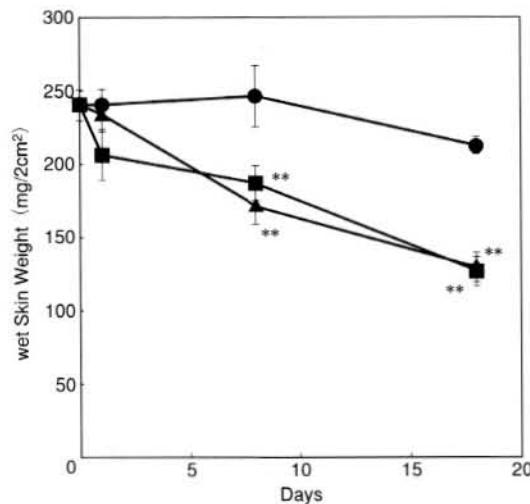


図2 タンパク質栄養の違いによるラット皮膚湿重量の変化
 ●: 12%カゼイン食群,
 ■: 12%グルテン食群,
 ▲: 無タンパク質食群, n=5
 *, **: $p < 0.05, 0.01$

る1日目, 8日目, 18日目の皮膚単位面積あたりのI型トロポコラーゲン量を図3に, III型トロポコラーゲン量を図4に示した。なお, 各図では, それぞれのトロポコラーゲン量は, 0日目におけるIあるいはIII型トロポコラーゲン量を1としたときの割合で表した。

I型トロポコラーゲンでは(図3), 無タンパク質食群(PF群)において1日目で急激にコラーゲン量が減少し, 8日目まで徐々に減少した。

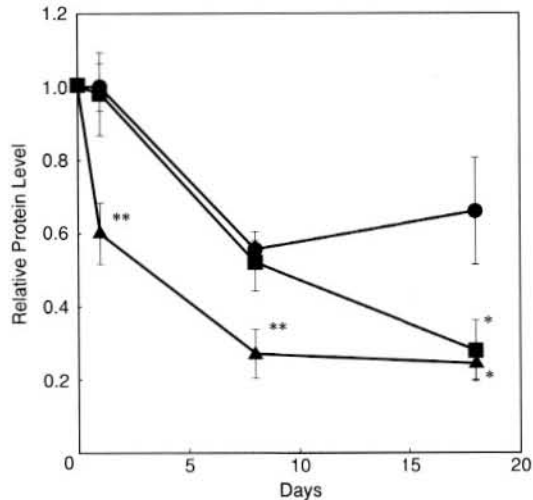


図3 タンパク質栄養の違いによるラット皮膚I型トロポコラーゲン量の変化
 ●: 12%カゼイン食群,
 ■: 12%グルテン食群,
 ▲: 無タンパク質食群, n=5
 *, **: $p < 0.05, 0.01$
 それぞれのトロポコラーゲン量は, 0日目におけるI型トロポコラーゲン量を1としたときの割合で表した。

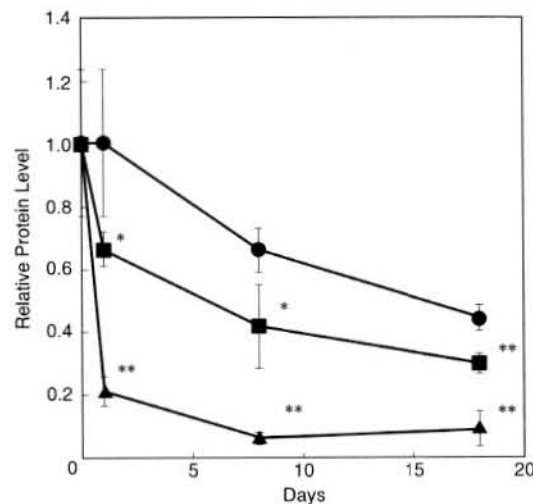


図4 タンパク質栄養の違いによるラット皮膚III型トロポコラーゲン量の変化
 ●: 12%カゼイン食群,
 ■: 12%グルテン食群,
 ▲: 無タンパク質食群, n=5
 *, **: $p < 0.05, 0.01$
 それぞれのトロポコラーゲン量は, 0日目におけるIII型トロポコラーゲン量を1としたときの割合で表した。

それ以降の減少は, ゆるやかになった。一方, リシン, トレオニンが制限アミノ酸となっているアミノ酸バランスの悪い食餌12%グルテン食群(G群)では, 1日目では, 12%カゼイン食群

(C群)とほとんど変化なかったが、8日目まで急激に減少し、18日目ではPF群とほとんど同じコラーゲン量になった。

Ⅲ型トロポコラーゲンでは(図4)、G群およびPF群ともに1日目から減少し8日目、18日々と徐々に減少した。

I型およびⅢ型トロポコラーゲンのC群において、0日目に対して8日目、18日目の量が減少した。

③ヒアルロナン量

ヒアルロナン量は、1日目においては、タンパク質栄養による違いは認められなかった(図5)。しかし、ヒアルロナン合成酵素2および3のmRNA量は、劇的に変化し、有意にG食およびPF食によって減少した(図6および7)。8日目においては、ヒアルロナン量は有意にC食に比して、G食およびPF食によって減少した。mRNA量もC食に比して、G食およびPF食は減少した。さらに18日目におけるヒアルロナン量は、より顕著にその差が認められ、mRNA量は8日目と同様の結果を得た。

考 察

今回経目的にタンパク質栄養の異なる食餌を給餌した場合の体重変化、皮膚重量変化とともに皮膚トロポコラーゲン量およびヒアルロナン量を測定した。

体重変化は、1日目には、12%カゼイン食群(C群)に比して12%グルテン食群(G群, $p < 0.05$)および無タンパク質食群(PF群, $p < 0.01$)は有意であった。また、皮膚重量においては、8日目以降C群に対してG群およびPF群ともに有意に減少した。

トロポコラーゲンは、架橋などが入った線維性コラーゲンとは異なり、合成されて間もない分子である。I型トロポコラーゲン量は1日目から12%カゼイン食群(C群)に比して無タンパク質食群(PF群)で有意に減少した。8日目でも同様の結果を得、18日目には、12%グルテン食群(G群)においてもC群と比して有意に減少した。一方、Ⅲ型トロポコラーゲン量はG群およびPF群ともに1日目より有意に減少した。

このことは、食餌中のアミノ酸バランスは比較的迅速に皮膚コラーゲン合成に大きな影響を

与えることを示唆した。特にⅢ型トロポコラーゲンは創傷治癒過程において重要な役割を果たしているといわれているが、アミノ酸バランスの悪い食餌給餌直後から量が減ることは非常に興味深い。また、皮膚重量の減少は、トロポコラーゲン量の減少と一致していた。しかし、トータルコラーゲン量に対するトロポコラーゲン量は数%といわれており、皮膚に存在するほとんどが線維性コラーゲンである。よって、栄養条件の悪化による皮膚重量の減少はコラーゲン代謝で説明できないと考えられた。

I型およびⅢ型コラーゲンのC群において、0日目に対して8日目、18日目の量が減少している。これは、成長期のラットにおいて徐々に皮膚コラーゲン合成量が減少している可能性があると考えられた。

ヒアルロナンは、コラーゲンに比して少なく、皮膚において0.5-1.0mg/gであるが、水保持能が大きく、体積的に大きな割合を占める。ヒアルロナンはヒアルロナン合成酵素であるHASにより合成される。ヒアルロナンの半減期は皮膚においては半日と言われており(Brownら, 1991; Laurentら, 1991; Laurentら, 1992)。また合成酵素HASタンパク質の半減期はさらに短く数時間である(Mian, 1986)。このことは、ヒアルロナン量の増減について、合成酵素の発現あるいは量が非常に大きな影響を与えることを示唆している。そこで、今回は、合成系について検討することにより、皮膚ヒアルロナン量の増減の原因について検討した。合成酵素は、現在3種類知られているが(Weigelら, 1997)、真皮においてはおもにHAS1およびHAS2がヒアルロナンを合成し、表皮においてはHAS3が合成しているといわれている(Zhangら, 2000; Sayoら, 2002)。さらに、真皮においては、HAS2の方がHAS1よりも活性が高く(Itanoら, 1999)、mRNA量も3倍以上多い(Zhangら, 2000)。各合成酵素のノックアウトマウスの結果は、HAS1およびHAS3では、目立った異常は認められておらず、HAS2においては、胎生9.5から10日目で致死になる(木全ら, 2001; Camenischら, 2000)。このことから、HAS1よりもHAS2の方が真皮においてヒアルロナン合成に大きく関与していると考えられる。

また、ヒアルロナンの変動に関する研究は古

くから多くされているが、HASの遺伝子が同定されたのは最近なので、mRNAレベルでの検討はまだ非常に少ない。特にタンパク質栄養条件との関連でHAS遺伝子の制御を調べた報告は皆無である。

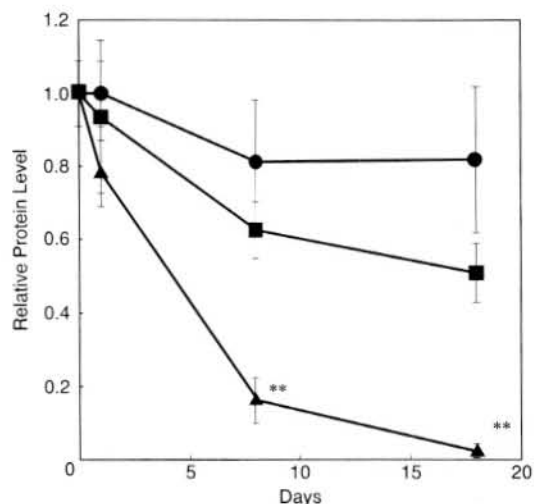


図5 タンパク質栄養の違いによるラット皮膚ヒアルロナン量の変化

●：12%カゼイン食群，
■：12%グルテン食群，
▲：無タンパク質食群，n=5

＊，＊＊：p<0.05, 0.01

それぞれのヒアルロナン量は、0日目におけるヒアルロナン量を1としたときの割合で表した。

以上のことから、本研究においては、タンパク質栄養条件の悪化が皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響を検討すべく、C食、G食およびPF食を1～18日間給餌したラットから皮膚を採取し、皮膚中のヒアルロナン量および $rhas2$ 、および $rhas3$ mRNA量を測定した。

ヒアルロナン量は、タンパク質栄養条件を悪化させた場合、すなわちC食をコントロールとしたとき、リシンとトレオニンが制限アミノ酸となっているG食およびPF食給仕後8日目以降ラットの皮膚において有意に減少した(図5)。

1, 8および18日目のG食およびPF食摂食において、 $rhas2$ および $rhas3$ mRNA量は減少あるいは減少傾向を示した(図6および7)。このことは、タンパク質栄養条件の悪化がヒアルロナン合成酵素を減少させ、それがヒアルロナン量の減少(図5)に関わっていることを示唆した。これらの結果から、タンパク質栄養条件の影響は、ヒアルロナン合成に比較的早い時期に現れ、持

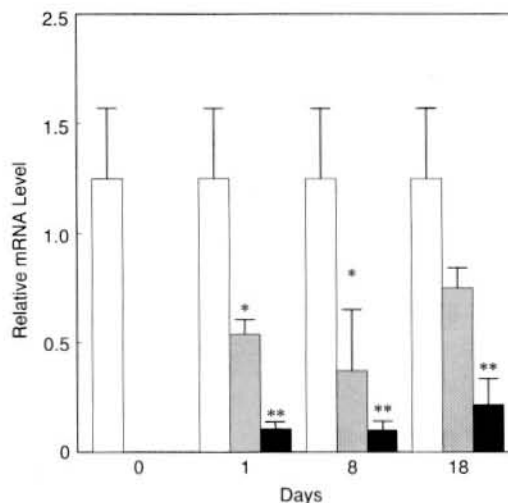


図6 タンパク質栄養の違いによるラット皮膚has2 mRNA量の変化

●：12%カゼイン食群，
■：12%グルテン食群，
▲：無タンパク質食群，n=5

＊，＊＊：p<0.05, 0.01

それぞれのhas2 mRNA量は、0日目におけるhas2 mRNA量を1としたときの割合で表した。

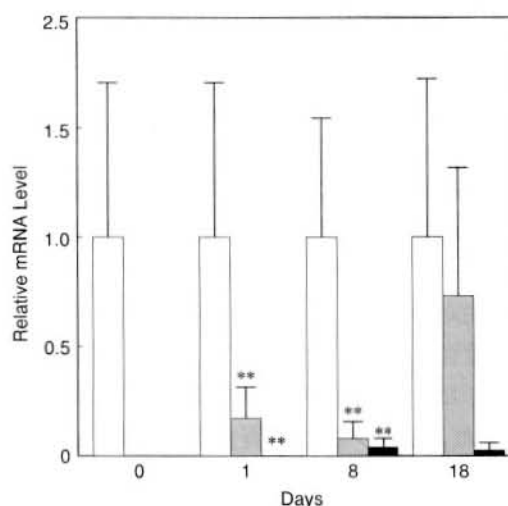


図7 タンパク質栄養の違いによるラット皮膚has3 mRNA量の変化

●：12%カゼイン食群，
■：12%グルテン食群，
▲：無タンパク質食群，n=5

＊，＊＊：p<0.05, 0.01

それぞれのhas3 mRNA量は、0日目におけるhas3 mRNA量を1としたときの割合で表した。

続的に続くことがわかった。

G食やPF食給餌8日目以降、皮膚重量は減少した。この原因としてコラーゲン量の変化では説明がつかなかった。ヒアルロナンは非常に保

水性のよい物質で、1gで何リットルもの水が保持できるといわれている (Hascallら, 1997)。よって、タンパク質栄養条件の悪化によって、皮膚重量が減少したのは、ヒアルロナン量の減少により、皮膚水分保持能が減少したことが一因と考えられた。

今後は、タンパク質栄養がどのような機構でコラーゲン合成あるいはヒアルロナン合成に影響を与えるのか検討する予定である。

謝 辞

本稿作成するにあたり、研究を支援していただきました中部大学応用生物学部教授野口忠先生、東京大学大学院農学生命科学研究科助教授加藤久典先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Brown, T. J., Laurent, U. B., and Fraser, J. R. 1991. Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit. *Exp. Physiol.* 76, 125-134.
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A. J., Kubalak, S., Klewer, S. E., and McDonald, J. A., 2000. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 106, 349-60.
- Hascall, V. and Laurent, T., Hyaluronan: structure and physical properties. 1997. In *Science of Hyaluronan Today*, Edt. Hascall, V., and Yanagishita, M.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hmaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki Y., Miyauchi, S., Spicer A. P., McDonald, J. A., and Kimata, K. 1999. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 274, 25085-25092.
- Laurent, U. B. G. and Reed, R. K. 1991. Turnover of hyaluronan in the tissues. *Adv. Drug Delivery Rev.* 7, 237-256.
- Laurent, T.C., and Fraser, J.R. 1992. Hyaluronan. *FASEB J.* 6, 2397-2404.
- Oishi, Y., Fu, Z. W., Ohnuki, Y., Kato, H., & Noguchi, T. 2002. Effects of Protein Deprivation on $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen and Its Degradign system in Rat Skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 117-126.
- Oishi Y, Kato H, and Noguchi T: *Biochem. Biosci. Biotech.* 2003. Dietary protein as a potent regulator of the hyaluronan synthase gene in rat skin., 67, 736-742.
- Mian, N. 1986. Analysis of cell-growth-phase-related variations in hyaluronate synthase activity of isolated plasma-membrane fractions of cultured human skin fibroblasts. *Biochem. J.* 237, 333-342.
- Mummert, M. E., Mohamadzadeh, M., Mummert, D. I., Mizumoto, N., and Takashima, A. 2000. Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking. *J. Exp. Med.* 192, 769-779.
- Sayo, T., Sugiyama, Y., Takahashi, Y., Ozawa, N., Sakai, S. 2002. Ishikawa, O., Tamura, M., and Inoue, S. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 118, 43-48.
- Uitto, J., Pulkkinen, L., and Chu, M.L. 1999. Collagen in Biology of extracellular matrix, blood vesseles, and nerves. In "Dermatology in general medicine, 5th edn.", eds Fitzpatrick, T.B., Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolff, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., and Katz, S.I. The McGraw Hill, New York,

pp.245-259.

Weigel, P. H., Hascall, V. C., and Tammi, M. 1997.
Hyaluronan synthases. J. Biol. Chem., 272,
13997-14000.

Zhang, W., Watson, C.E., Liu, C., Williams, K.J.,
and Werth, V.P. 2000. Glucocorticoids induce a
near-total suppression of hyaluronan synthase
mRNA in dermal fibroblasts and in
osteoblasts: a molecular mechanism con-
tributing to organ atrophy. Biochem. J., 349,
91-97.

木全弘治, 卓 麗聖. 2001. 遺伝子を用いたヒア
ルロン酸リッチマトリックスの構造と機能
の解析, 生化学, 73, 429-438.

Title : The effect of dietary protein on collagen
and hyaluronan metabolism in rat skin.

Author : Yuichi Oishi, Rena Okuchi

Keywords : tropocollagen, hyaluronan