

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書（環境部門・継続研究課題）

研究期間（ 2年目/ 3年間）

研究者 又は 研究代表者	氏名	(ふりがな) たむら じゅんいち 田村 純一
	所属研究機関 部局・職	鳥取大学 地域学部 地域環境学科・教授 電話番号 0857-31-5108 電子メール jtamura@rs.tottori-u.ac.jp
研究課題名	野生の鹿角・鹿茸を活用した健康食品・機能性食品の研究開発	
研究結果	<p>二年目はまず、昨年度得た若桜町で捕獲された鹿の鞍子と三岔茸由来二次精製糖鎖をコンドロイチナーゼABCにより分解し、含有されるコンドロイチン硫酸の分子構造（硫酸化パターン）と鹿茸中のコンドロイチン硫酸の含有量を測定した。その結果、鹿茸の先端部には高い濃度でコンドロイチン硫酸が含まれていることが明らかになった。また、先端部と骨化しつつある根元部分では、コンドロイチン硫酸の硫酸化パターンが異なることも判明した。この結果は27年6月に開催された「地域環境調査実習発表会」で「鹿茸のコンドロイチン硫酸の含有量と組成分析」と題して、また28年3月に開催された日本農芸化学会2016年大会で「鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の分析」と題して、それぞれ発表した（別紙図1）。</p> <p>以上の実験では良好な結果を得たが、これらのサンプルは皮のついた鹿茸を用いており、産業利用のためには、組織の異なる「皮と鹿茸内部」の違いを明らかにする必要がある。そこで、若桜町エリアで季節別（袋角・鞍子・三岔茸）、年齢別に収集した鹿茸の真空冷凍保存サンプル（澤田により収集）を用い、コンドロイチン硫酸の単離と分析を行った。</p> <p>いずれのサンプルも皮を剥ぎ、皮と本体に分け、袋角の本体は1部位で、鞍子は先端から2部位に、三岔茸は10部位に分割した。各部位はそれぞれ賽の目状に切断し、脱脂乾燥を経て、タンパク質を酵素分解した。分解物の不溶物を濾過し、透析後エタノールを使い沈殿（一次精製糖鎖）を得た。昨年度、一次精製糖鎖をそのままコンドロイチナーゼABC処理しても二次精製糖鎖の結果と差がないことが判明したため、今年度は一次精製糖鎖をそのまま利用した。これらの基質（一次精製糖鎖）の酵素反応の結果から求めたコンドロイチン硫酸の糖鎖組成と含有量を別紙図2-4に示す。28年6月18日開催の「地域環境調査実習発表会」で結果を公表し、28年度内に国内で学会発表を行う予定である。（田村）</p> <p>鹿茸先端部からcDNAを抽出・精製し、不明であったコンドロイチン硫酸基転移酵素(CHSTs)の遺伝子配列の一部を決定した。検索対象はコンドロイチンをコンドロイチン硫酸(CS) Aに変換するChst11, CS AをCS Eに変換するChst15, コンドロイチンをCS Cに変換するChst3, CS CをCS Dに変換するUSTの4種の酵素である。得られた配列を他の動物と比較したところ、シカと同じ偶蹄目動物であるウシやヒツジと高い相同性を示した(90%以上)。得られた遺伝子配列は、DNAデータベース(DNA Data Bank of Japan: DDBJ)への登録作業を現在進めている（別紙図5）。</p> <p>この情報を元にプローブを作成し<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション (ISH) を行いシカ角C HSTs mRNAの組織的発現を検索した。検索部位は角の先端部、中部および基部とした。軟骨の多い先端部では、いずれの酵素も軟骨細胞でシグナル陽性であり、血管周囲組織での反応は弱かった。とりわけ、USTの反応が強くあらわれていた。軟骨から骨へと移行する中部では、CHST11は肥大軟骨で非常に強いシグナルが確認できた。また、CHST15は血管に隣接した軟骨細胞でのみ弱い反応が見られた。骨が形成されている基部では、検索したいずれの酵素も骨芽細胞でシグナル陽性であったが、USTはやや反応が弱かった。また、ラマン顕微鏡を用いて観察した鹿茸の先端部分には、CSが血管周囲の軟骨様細胞に多く分布していることが明らかとなった（別紙図6）。</p> <p>CHSTsおよびCSの組織分布を平成28年1月に開催された学内の獣医畜産集談会で公表した、また、平成28年9月に開催される日本獣医学会学術集会で発表する予定である。（保坂）</p>	

	<p>昨年度の結果，組織ごとのコラーゲンの定量および性質解明が必要と考え，若桜町で捕獲された鹿の鹿茸について，皮，軟骨，骨に分離してコラーゲンの抽出を行った。なお骨は硬組織を除去するために前処理として脱灰操作を行っている。また，使用するサンプルスケールを拡大することにより，コラーゲンの抽出のみならず，精製まで行うことが可能となった（別紙図7）。コラーゲンは皮および骨に多く含有されており，特に皮からは高効率で抽出することができた。また，II型コラーゲンは軟骨に比較的多く分布しているが，皮にも含まれていることを明らかにした。（清水）</p>	
研究成果	<p>コンドロイチン硫酸の糖鎖組成と含有量の結果は27年6月に開催された「地域環境調査実習発表会」で結果を公表し，28年3月に開催された日本農芸化学会2016年大会で発表した。また，28年6月18日に開催された「地域環境調査実習発表会」で結果を公表し，28年度内に国内での学会発表を行う予定である。</p> <p>コンドロイチン硫酸の組織分布については，平成28年1月に開催された学内の集会で結果を公表し，平成28年9月に開催される日本獣医学会学術集会で発表する予定である。</p> <p>本事業の取り組みについて，「資源の循環利用を考えるシンポジウム」（10月26日，鳥取市）において，県民一般向けに研究の状況に関して講演を行った。</p> <p>なお平成27年度の業績を別紙研究業績にまとめた。</p>	
次年度研究計画	<p>（田村）今回入手できた3～5歳の鹿のほか，捕獲した鹿を余すことなく利用できる可能性を探るため，老齢の鹿の鹿茸についても分析を進める必要がある。また，野生鹿の結果を飼育した鹿のそれと比較するため，韓国産の飼育鹿の鹿茸等について分析を行う。</p> <p>（清水）本年度得られたコラーゲンについて，ゲル形成能などの機能に関する研究を実施し，鹿茸のコラーゲンに関する知見を蓄積する。</p> <p>（保坂）引き続き角の構造を組織学的に検索するとともに，硫酸化糖の分布を詳細に解明し，角から抽出した硫酸化糖の機能を解明することで，角（骨や軟骨）の形成機構を明らかにする。そして，骨・軟骨形成制御物質としてのシカ角由来糖鎖の応用の可能性を探る予定である。</p> <p>（澤田）今後必用が生じると思われる鹿茸，鹿角の的確な保管等についてハンターに指導する。</p> <p>以上の結果をもとに，年齢の異なる鹿や，飼育鹿と野生鹿の鹿茸の成分や生物活性等の比較をすることにより，野生鹿の鹿茸の健康食品や機能性食品への産業利用の可能性を判断する。</p>	
報告責任者	所属・職氏名	<p>研究・国際協力部研究協力課・課員・朝野弘昭</p> <p>電話番号 0857-31-5494</p> <p>電子メール ken-jyosei@adm.tottori-u.ac.jp</p>

- 注1）表題には，環境部門，地域部門，北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。
- 2）「研究期間（ 年目/ 年間）」及び「次年度研究計画」は，環境部門のみ記載すること。
- 3）研究者の知的財産権などに関する内容等で，非公開としたい部分は，罫線を囲うなど明確にし，その理由を記すこと。
- 4）研究実績のサマリーを併せて提出すること。

【研究実績のサマリー】

若桜町で捕獲した鹿茸を季節別に収集し、コンドロイチン硫酸などの有用糖鎖とコラーゲンを単離する方法を確立し、組織学的実験系を確立した。今回「鹿茸」と「三岔茸（さんたじょう）」を部位ごとに分け、コンドロイチン硫酸の含有量と糖鎖組成を明らかにした。また、鹿茸先端部からcDNAを抽出・精製し、不明であったコンドロイチン硫酸基転移酵素(CHSTs)の遺伝子配列の一部を決定した。シカ角*CHSTs* mRNAの組織的発現を検索した結果、軟骨の多い先端部では、いずれの酵素も軟骨細胞でシグナル陽性であり、血管周囲組織での反応は弱かった。また、抗II型コラーゲン抗体によるウェスタンブロット法により、各サンプルともII型コラーゲンを含有していることを示す結果を得た。皮および骨はタンパク質が豊富であり、皮については大部分がコラーゲンで占められている予備的結果を得た。

鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の分析

図 1

～Analysis of chondroitin sulfates in deer antlers～

○¹武田尚子, ²上村明寿美, ²井之上侑雅, ²鎌田 和, ²杉田大輝, ²田村純一
1.鳥取大・産学連携, 2.鳥取大・地域環境

Introduction

シカの角は、毎年春先から生え始め、秋ごろには成長が止まり、骨化後、冬の終わりに落角するため、一年間で生え変わる。そのため、人間などに比べ非常に速い速度で軟骨組織から骨へと変化する特徴をもつ。

骨形成や細胞の分化、増殖の調整の役割を担う一つに細胞外マトリックスがある。細胞外マトリックスの主要成分の一つであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)は、骨化に関与している。ニワトリの肢や翼を形成する際、胚の間充織でCSの硫酸化パターンが変化することが知られている。CSは、D-グルクロン酸(GlcA)とN-アセチル-ガラクトサミン(GalNAc)の二糖単位の繰り返しによって構成された直鎖多糖であり、硫酸基の結合する位置や数によってA型やC型などに分類されている。天然に存在するCSは、複数の硫酸化パターンで構成されたヘテロな構造である。

シカの角に含まれるCSについてこれまでに報告されているが、含有量などの詳細が明らかでない¹⁾。本研究では成長初期段階にあるシカの角(鹿茸)中のCSの含有量と組成を明らかにすることとした。

1) P. Pothacharoen et al., *Glycoconj. J.*, **28**, 473 (2011).

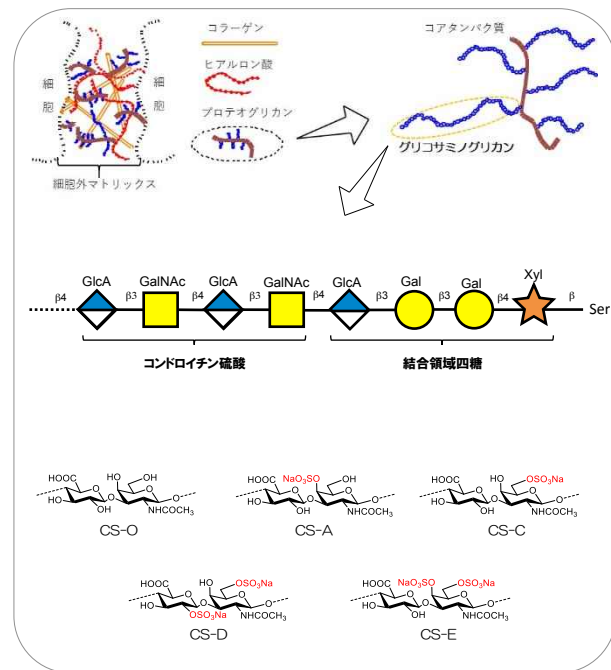
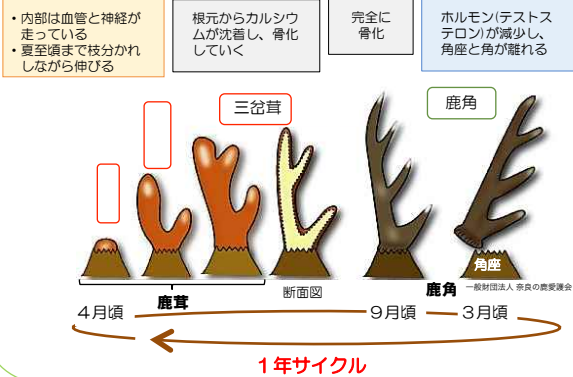
ニホンジカ (*Cervus nippon*)

分類 : ウシ目ウシ亜目シカ科
分布 : 日本、極東ロシア、中国、ベトナム、台湾などの東アジア・東南アジア
生息地 : 森林や草原など
体長 : 100~170 cm程度
体重 : 40~100 kg程度
角 : オスジカのみ
1年で生え変わる



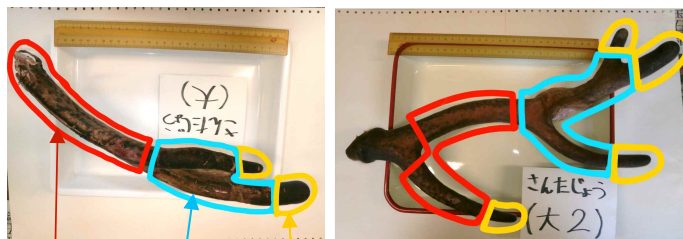
『シカの生態誌』/高橋成紀 一般財団法人 奈良の鹿愛護会

オスジカの角の一年



Materials

鳥取県若桜町で捕獲
(2013年5月頃)



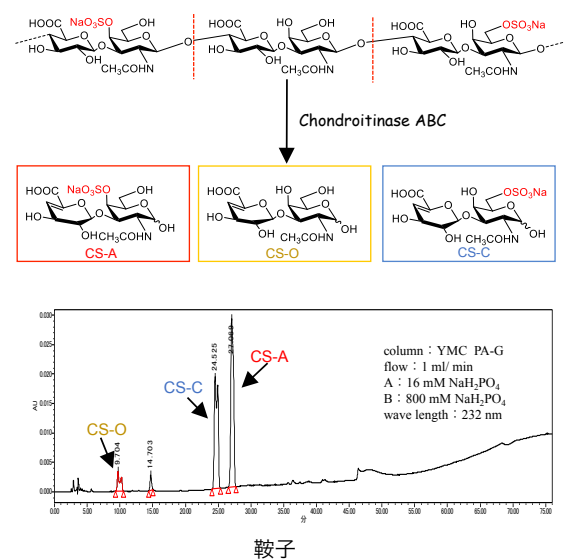
ミドル アッパー トップ

Isolation and purification of CS

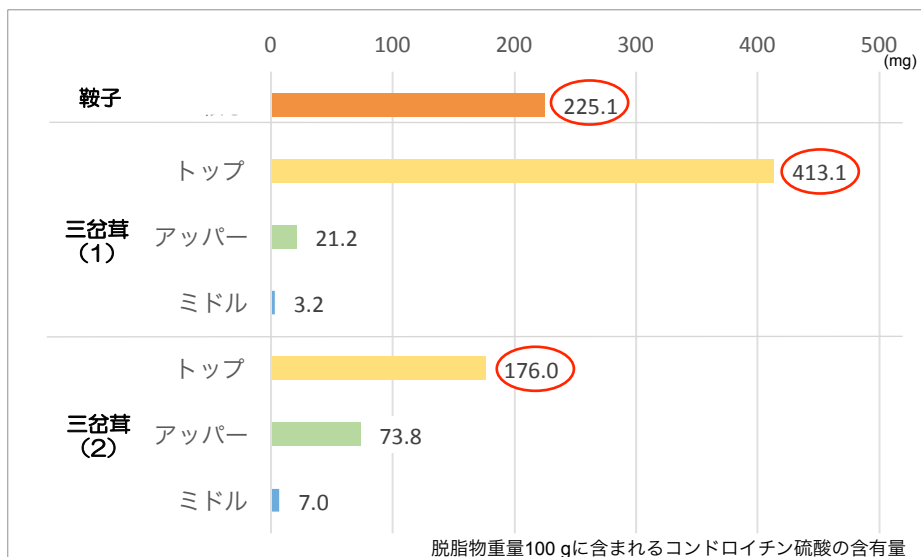
各部位	
行程	処理方法・試薬
①部位ごとに鋸や包丁で粉砕	
②脂質と水分を除去	アセトン
③タンパク質を分解	プロテアーゼ「アマノ」G, pH 7.0, 55 °C, 1週間
④アミノ酸・無機塩類除去(流水透析)	MWCO 12,000~16,000, 1週間
⑤糖鎖成分を沈殿させる	エタノール
一次精製精鎖	
⑥混在する核酸等の除去	DEAE-セルロースカラム (0.15, 0.5, 1.0, 2.0 M LiCl)
⑦脱塩処理(流水透析)	MWCO 12,000~16,000, 1週間
⑧脱塩処理(ゲルろ過)	LH-20, H ₂ O
二次精製精鎖	
⑨糖鎖分解	chondroitinase ABC, Tris-HCl (pH 8.0), BSA, 37 °C, 8h
⑩HPLC測定	PA-Gカラム, 232 nmで測定

糖鎖の含有量、組成の分析

Enzymatic digestion of CS



The amount of CS in deer antlers



The sulfation patterns of CS in deer antlers



Conclusion

含有量

成長途中である鞍子と三岔茸のトップは、他の部位に比べCS含有量が高い。

硫酸化パターン

成長途中である鞍子と三岔茸のトップは、三岔茸のアッパーとミドルとは組成が異なっていた。鞍子と三岔茸のトップ: 他の部位ではみられないCS-Oが含まれていた。また、CS-Cの割合も高い。ミドルやアッパー : CS-Aが全体の9割を占める。

謝辞

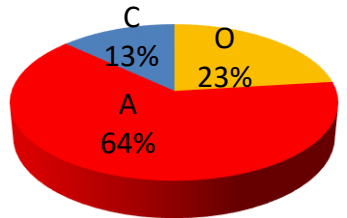
- ・天野エンザイム株式会社
- ・河戸 健 様 (猪鹿庵)
- ・保坂善真 教授 (鳥取大学 農学部 共同獣医学科)
- ・清水克彦 准教授 (鳥取大学 産学・地域連携推進機構)
- ・澤田麻路 特命准教授 (鳥取大学 地域学部 地域政策学科)

図2

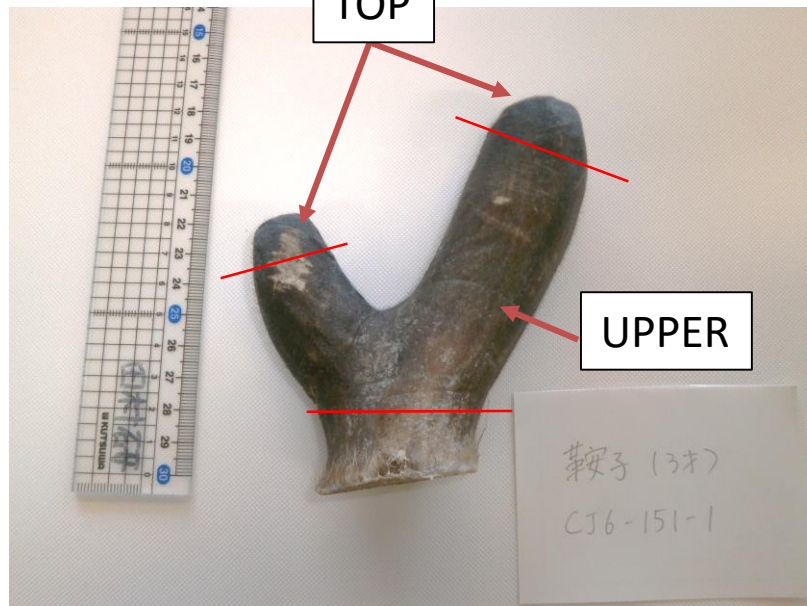
3歳鞍子CS

Skin

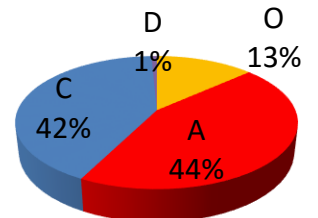
[SKIN]



247.0 mg

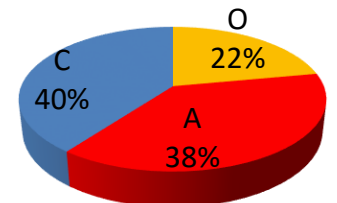


[TOP]



3096.6 mg

[UPPER]

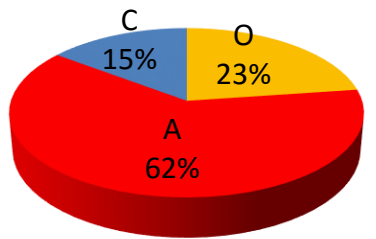


594.0 mg

4歳鞍子CS

Skin

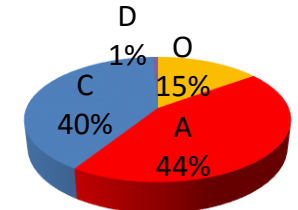
[SKIN]



281.1 mg

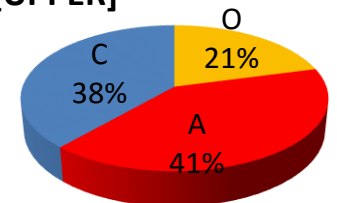


[TOP]



2446.7 mg

[UPPER]



673.1 mg

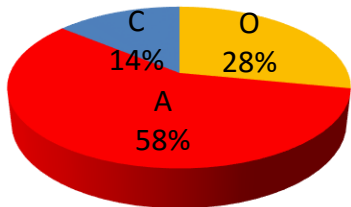
脱脂物100 gあたりのコンドロイチン硫酸(CS)の重量

図3

5歳鞍子CS

Skin

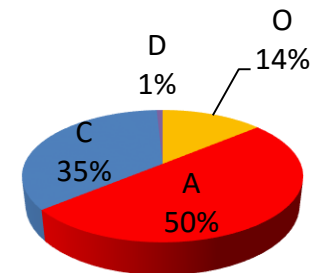
[SKIN]



TOP

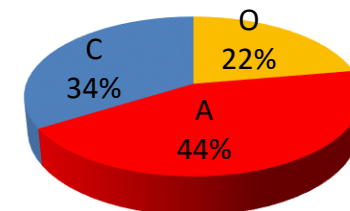


[TOP]



[UPPER]

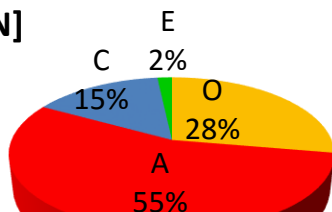
[UPPER]



3歳袋角CS

Skin

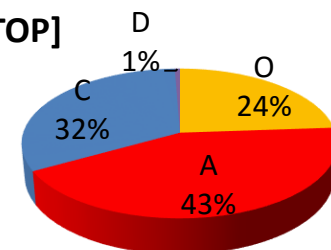
[SKIN]



[TOP]



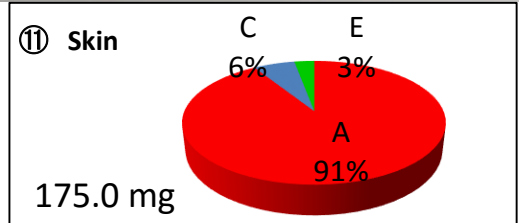
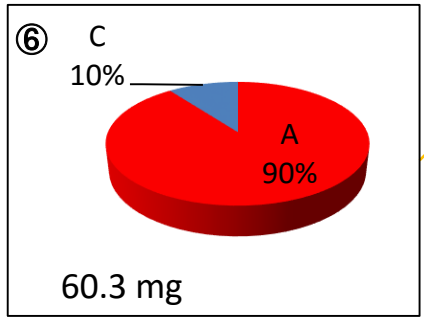
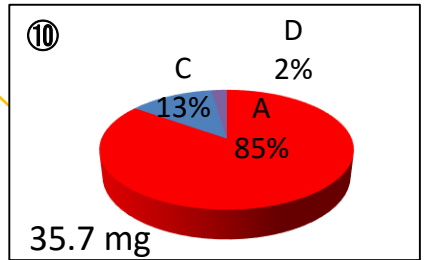
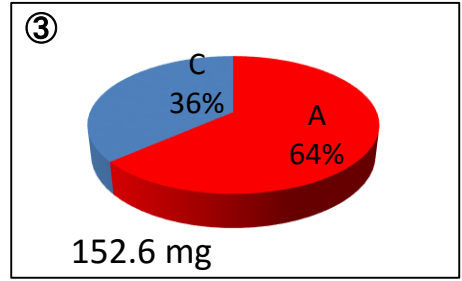
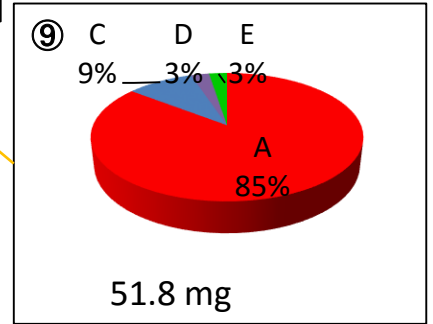
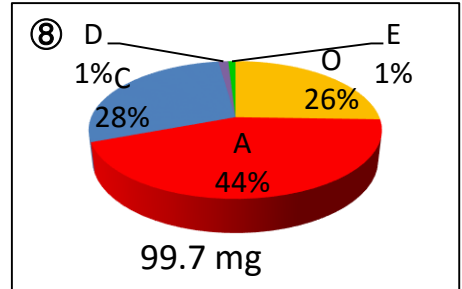
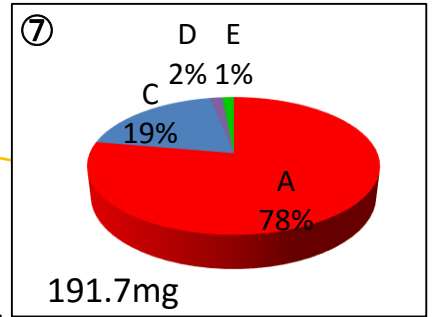
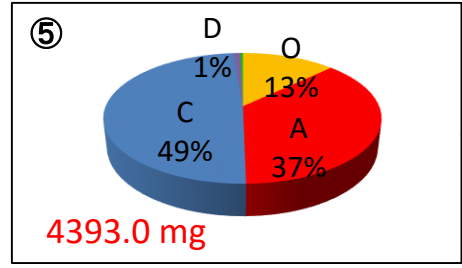
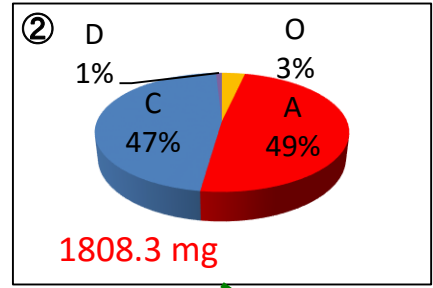
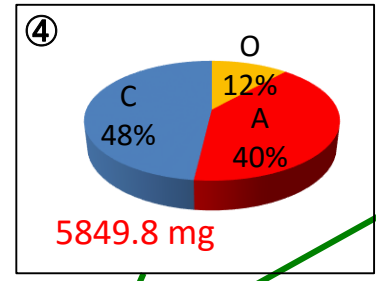
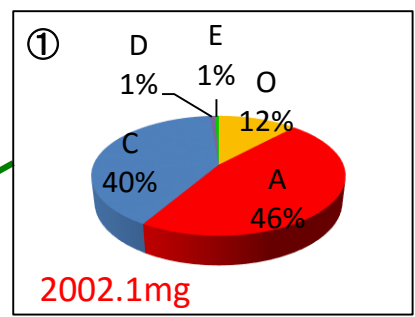
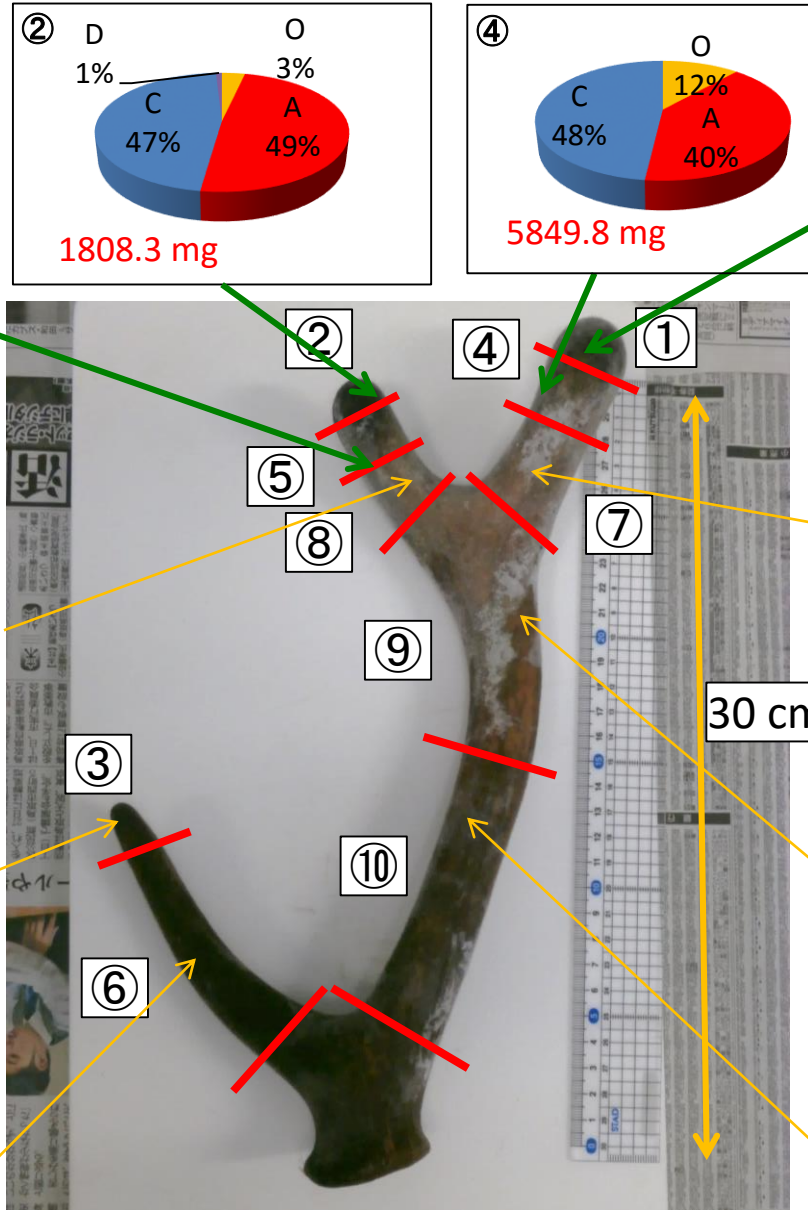
[TOP]



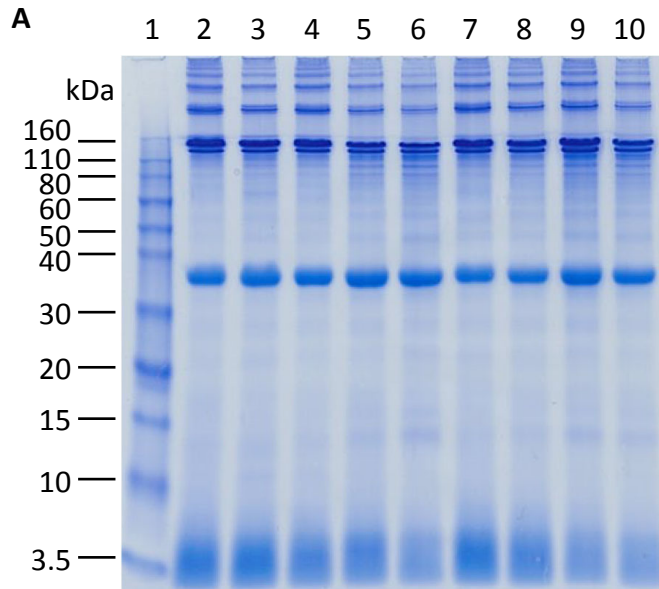
脱脂物100 gあたりのコンドロイチン硫酸(CS)の重量

図4

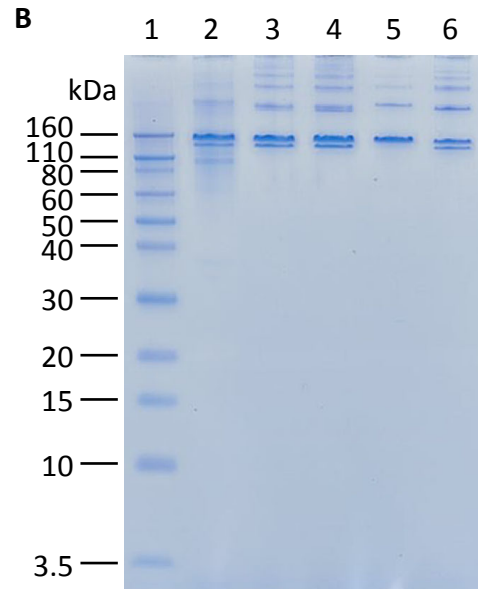
5歳三岔茸CS



脱脂物100 gあたりの
コンドロイチン硫酸(CS)の重量



- レーン1: 分子量マーカー
- レーン2: 鹿茸
- レーン3: 三叉茸、小、先端部
- レーン4: 三叉茸、小、上部
- レーン5: 三叉茸、小、中部
- レーン6: 三叉茸、小、下部
- レーン7: 三叉茸、大、先端部
- レーン8: 三叉茸、大、上部
- レーン9: 三叉茸、大、中部
- レーン10: 三叉茸、大、下部



- レーン1: 分子量マーカー
- レーン2: 鹿茸、軟骨
- レーン3: 鹿茸、骨
- レーン4: 鹿茸、皮
- レーン5: コラーゲンII型
- レーン6: コラーゲンI型

図7. 鹿茸から抽出したコラーゲンのポリアクリルアミドゲル電気泳動解析.

(A) 異なるステージおよび部位の鹿茸・三叉茸から抽出した試料(昨年度の結果).

(B) 鹿茸の皮、骨、軟骨から抽出、精製した試料(本年度の結果). 精製により、非コラーゲンタンパク質が除去された.