



# ペプチド特異的な新規蛍光反応によるヒト生体試料中のコラーゲンの定量

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻  
発明者 甲斐 雅亮 発表者 梶島 力

## 新規コラーゲン定量法

コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、ヒト全タンパク質の約30%を占める。最近の研究で、老化した皮膚においてコラーゲンの産生が低下していること、特定の疾病においてコラーゲンの分解や蓄積が見られること、などが明らかになっている。従って、コラーゲンを正確に定量する技術は、健康維持や疾病診断において重要なツールである。

我々は最近、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DHPAA)による、N末端にグリシンを有するペプチドに選択的な、新規蛍光反応を開発した(Figure 1)。本研究では、3,4-DHPAAを用いて、ヒト生体試料に含まれるコラーゲン量を簡便かつ高感度に定量する技術を開発した。

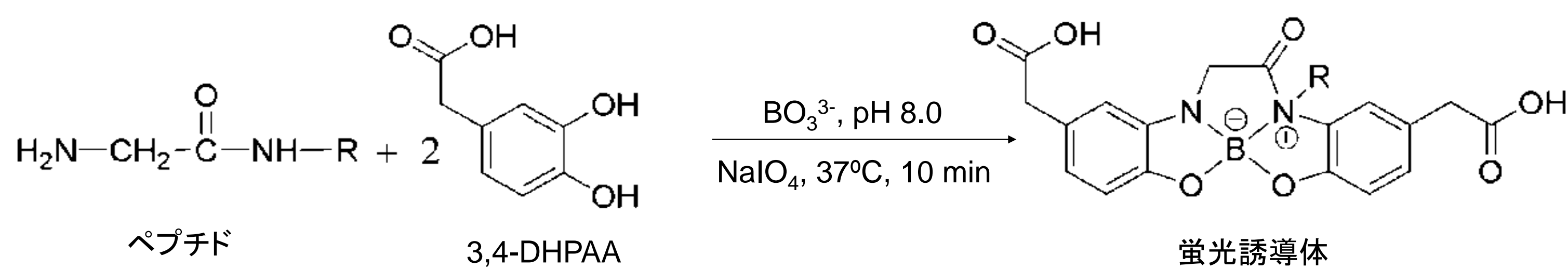


Figure 1. 3,4-DHPAAを用いたN末端グリシン含有ペプチドの蛍光反応

コラーゲンは、Gly-X-Y(X, Yは主にプロリン、ヒドロキシプロリン)という3アミノ酸残基の繰り返し配列を持つ。コラーゲンを微生物由来コラーゲナーゼで分解すると、N末端にグリシンを有するペプチドフラグメントを大量に生成する。これを、3,4-DHPAAによって選択的に蛍光体に変換することで、コラーゲン由来の検出シグナルを増幅でき、蛍光分光光度計にて蛍光強度を測定するだけでコラーゲンの定量が可能となる(Figure 2)。

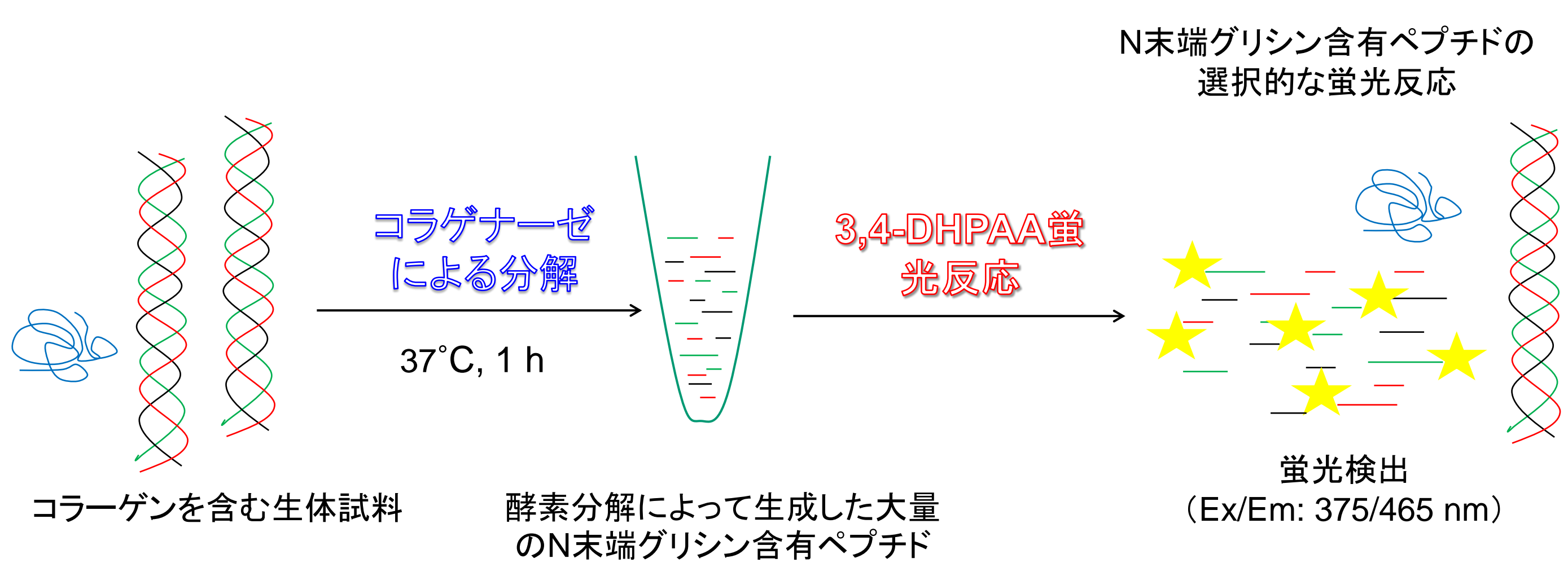


Figure 2. 新規コラーゲン定量法の原理図

## 3,4-DHPAA蛍光反応のペプチド選択性

### Procedure

40 μMペプチド 250 μL  
0.75 mM 3,4-DHPAA 250 μL  
125 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 250 μL  
1.25 mM NaIO<sub>4</sub> 250 μL

37°C 10 min → On ice ~10 min → 蛍光測定 (Ex/Em: 375/465 nm)

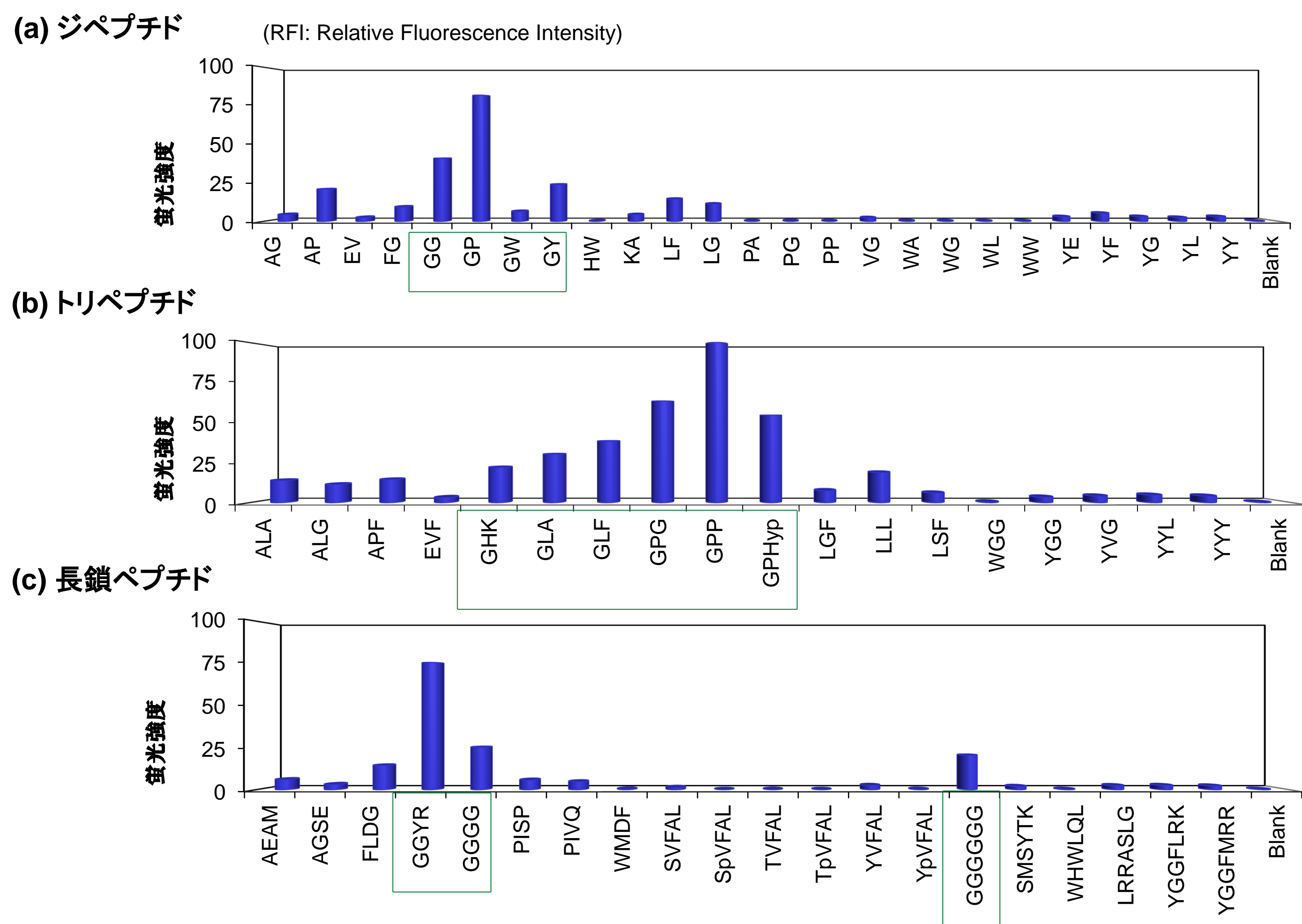


Figure 3. 3,4-DHPAA蛍光反応のペプチド選択性

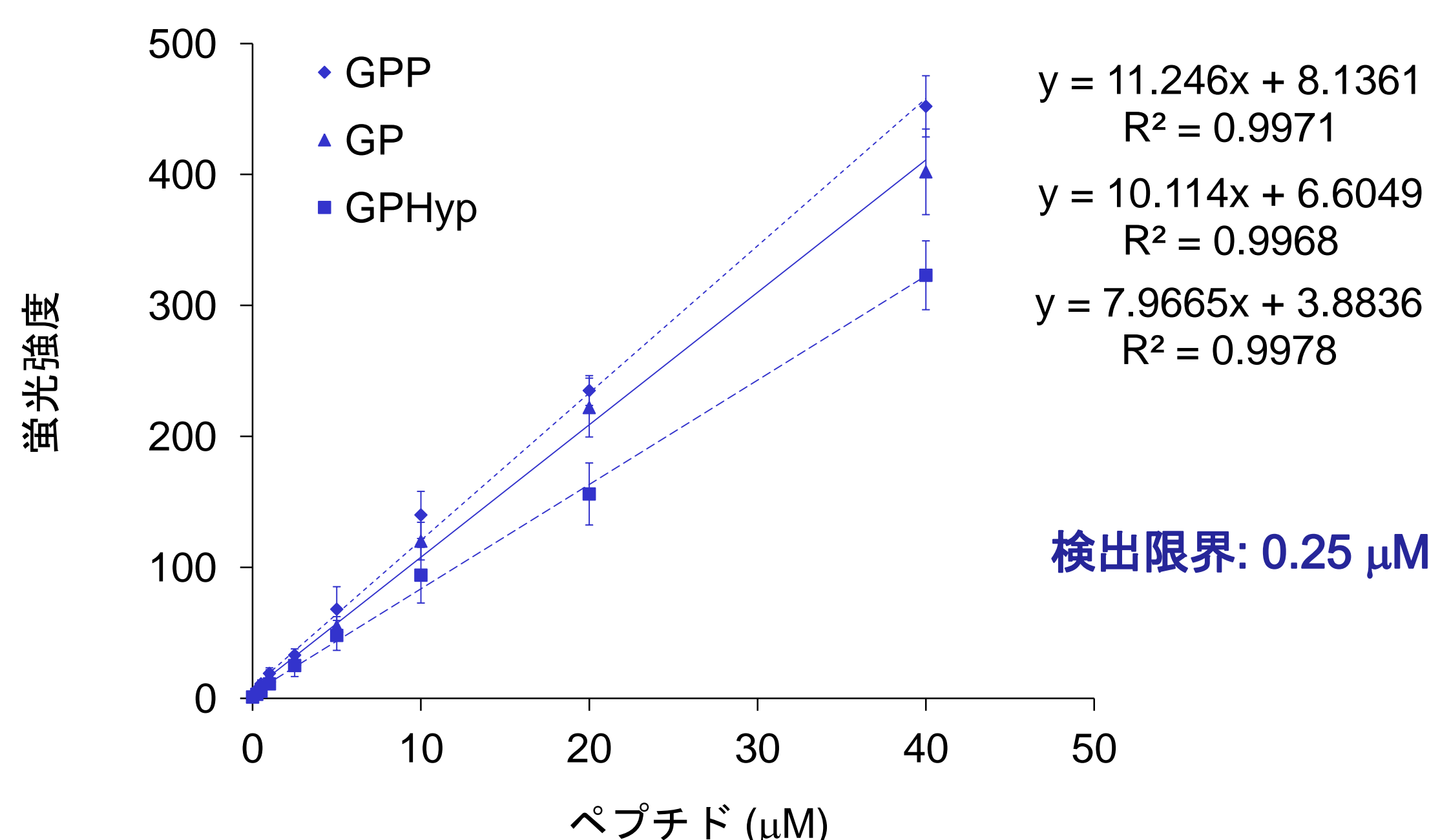


Figure 4. N末端グリシン含有ペプチドの検量線

## ヒト試料中のコラーゲンの定量

### コラーゲン定量の操作手順

**コラーゲナーゼによる酵素分解**  
コラーゲン標品 / 細胞抽出液 130 μL  
1 μM 微生物コラーゲナーゼ 20 μL  
5 mM CaCl<sub>2</sub>を含む125 mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.5) 100 μL

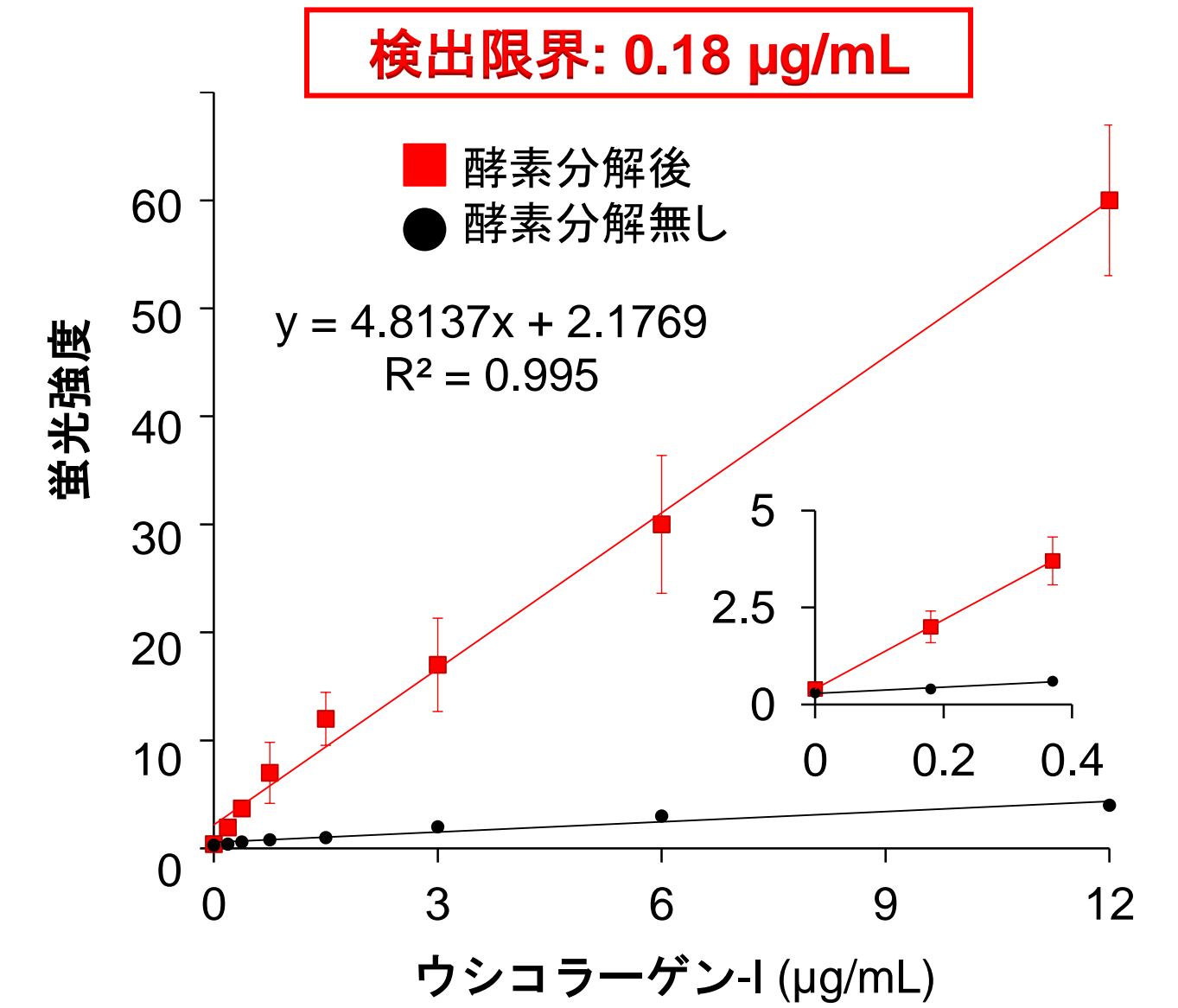
↓ 37°C, 1 h

**3,4-DHPAA蛍光反応**  
0.75 mM 3,4-DHPAA 250 μL  
125 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 250 μL  
1.25 mM NaIO<sub>4</sub> 250 μL

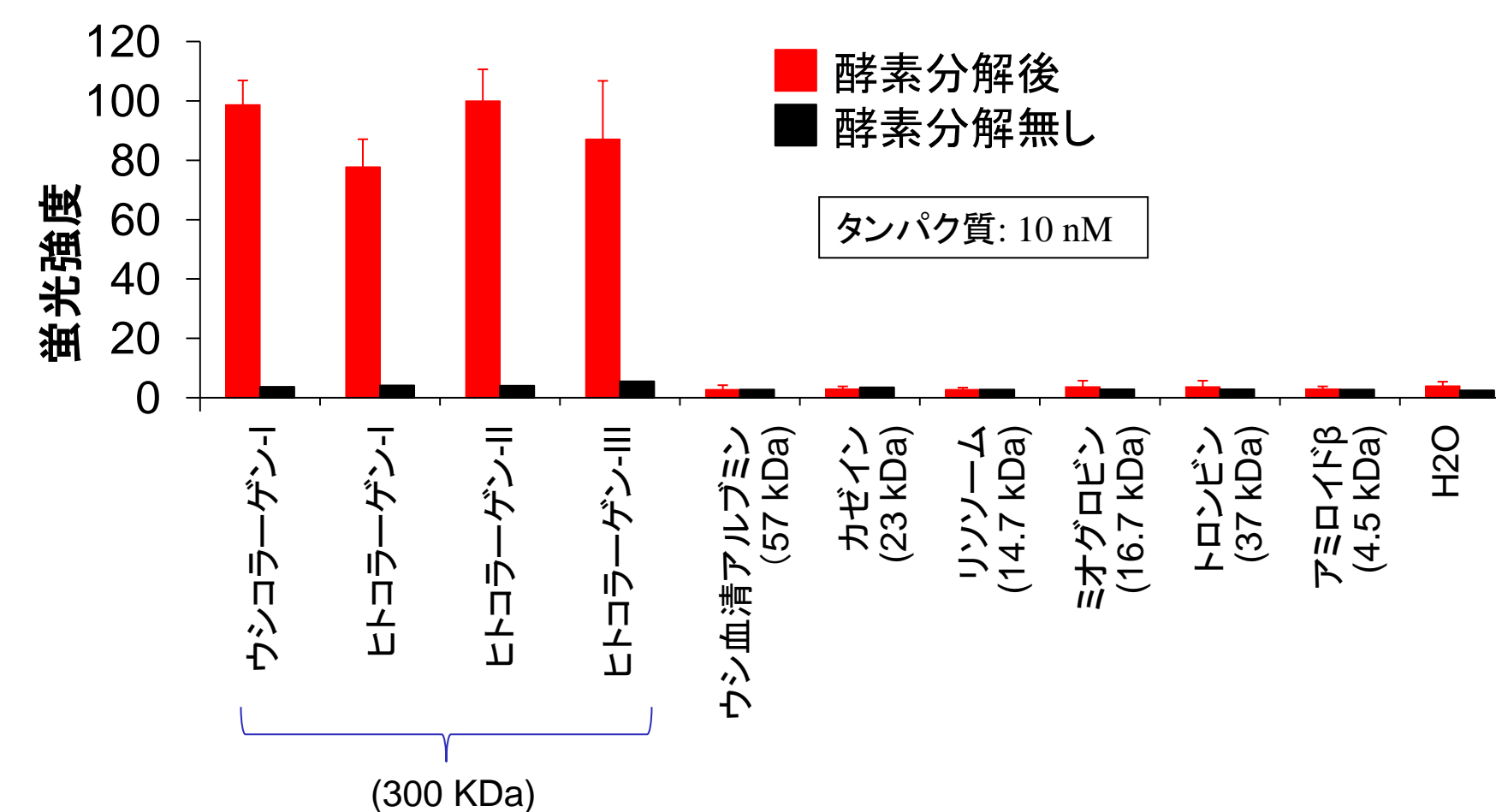
↓ 37°C, 10 min

蛍光測定 (Ex/Em: 375/465 nm)

### (a) 3,4-DHPAAによるコラーゲンの定量



### (b) 本技術のコラーゲン選択性



### (c) 生体試料を用いたコラーゲン定量

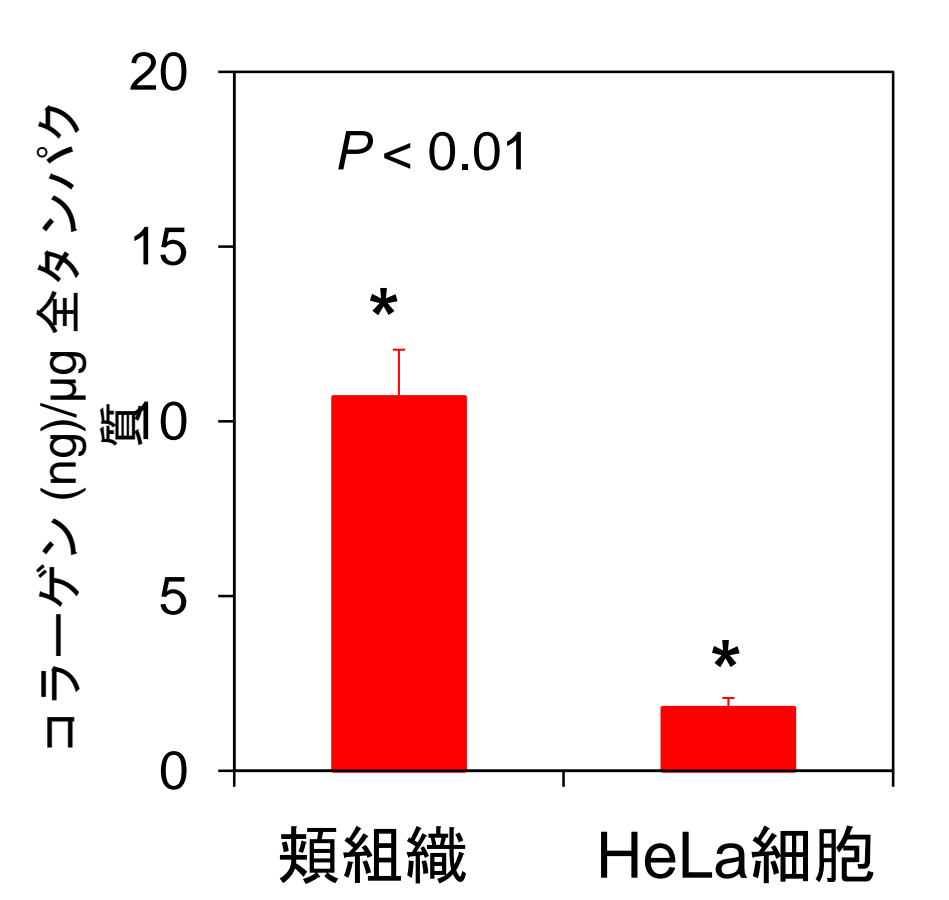
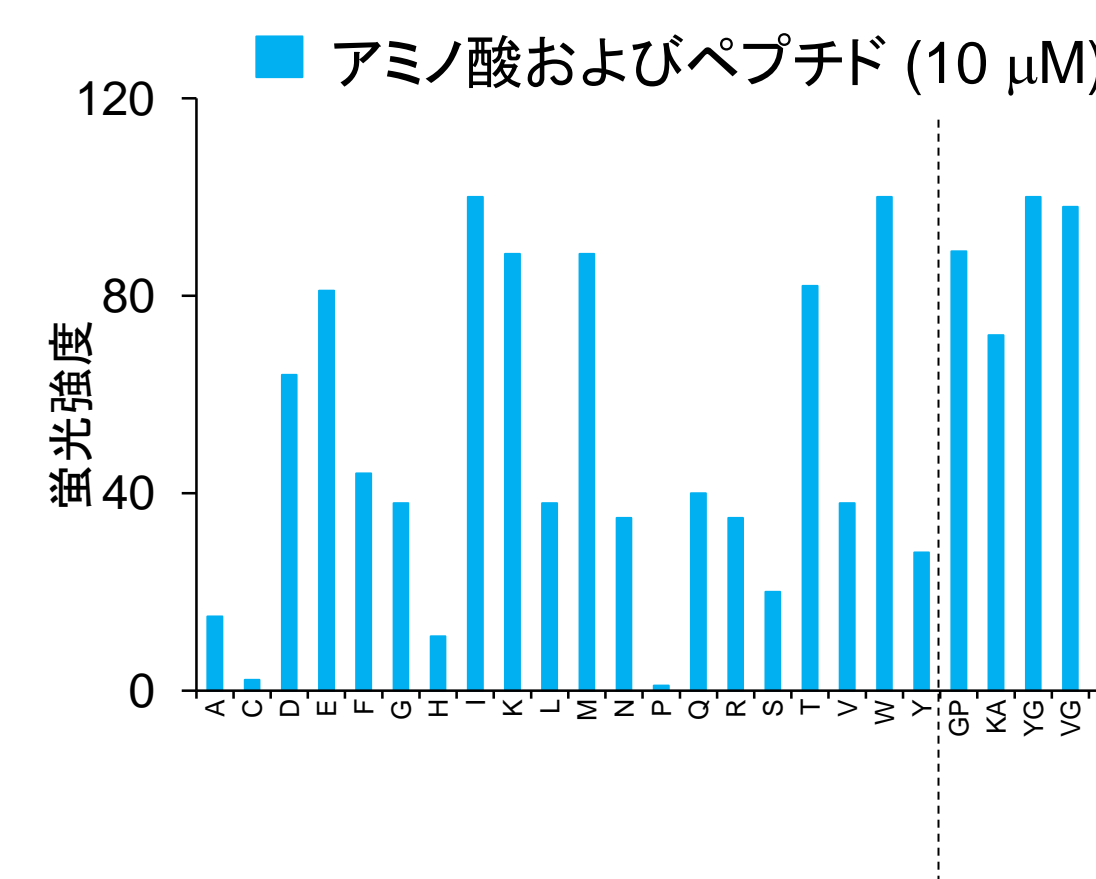


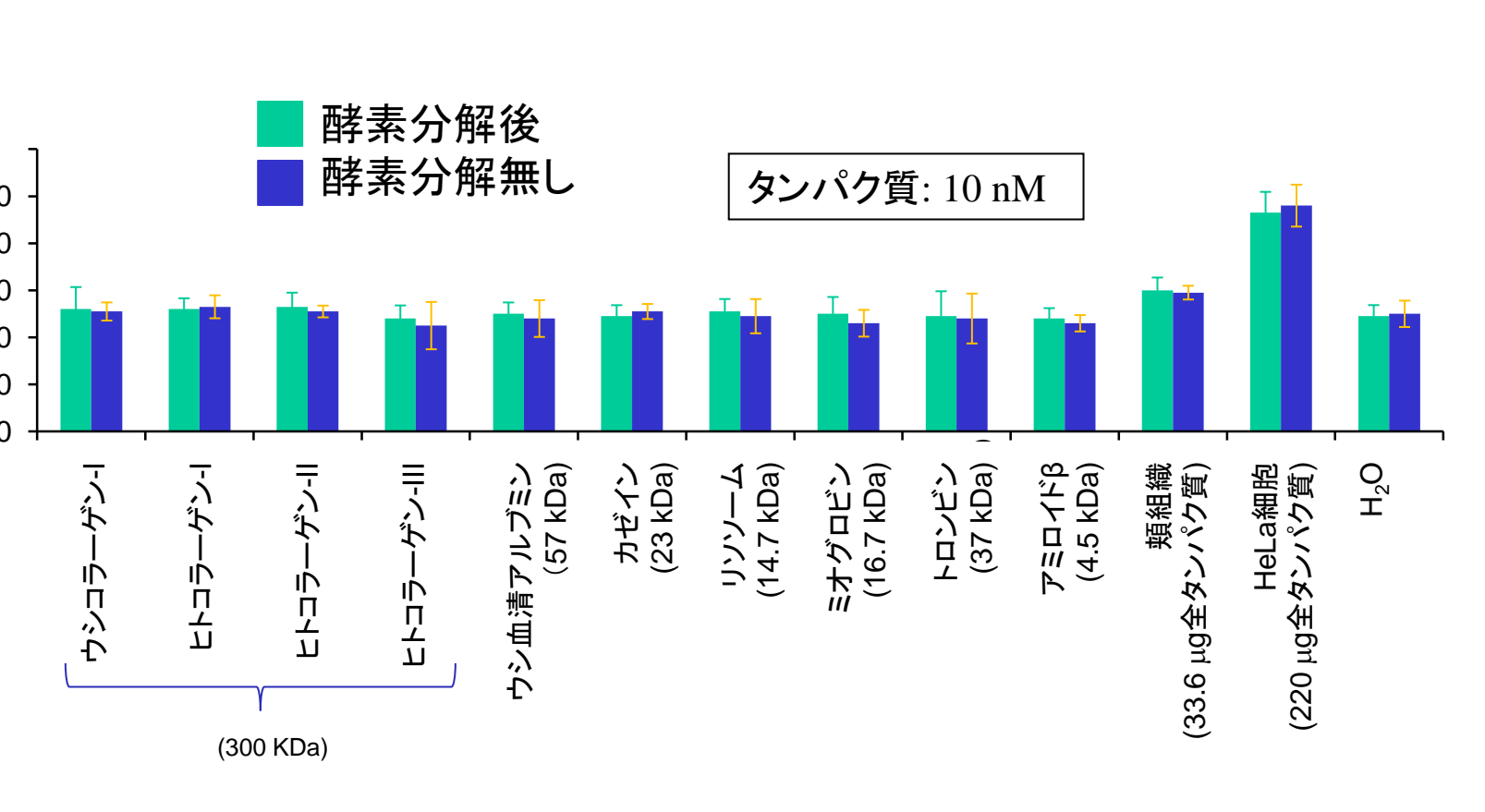
Figure 5. (a) ウシ由来コラーゲン-Iの検量線(挿入図は低濃度領域を示す) (b) 各種コラーゲンと他のタンパク質の比較 (c) ヒト試料中のコラーゲンの定量

## 現行法との比較

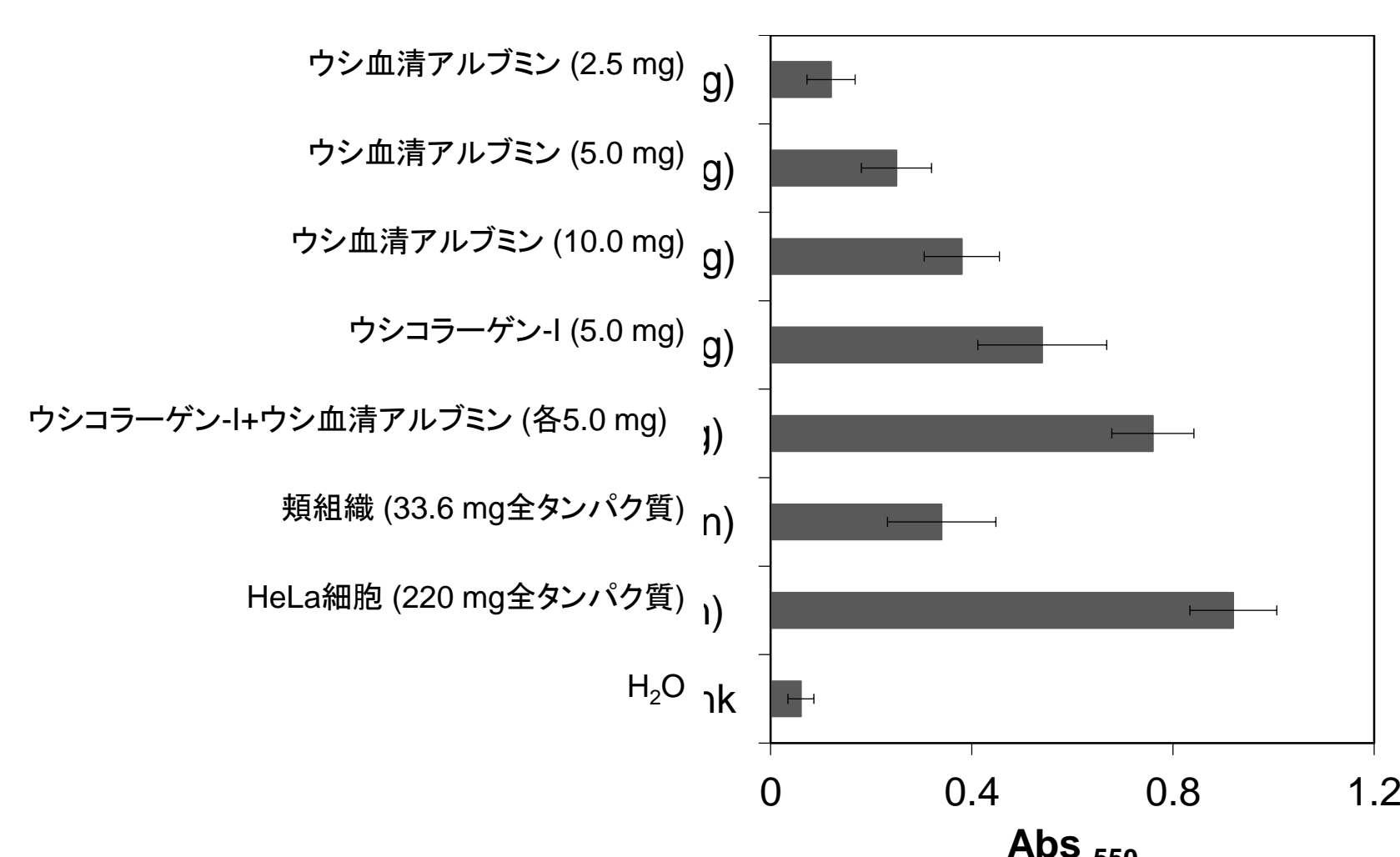
### (a) o-フタルアルデヒド(OPA)を用いたアミノ酸、ペプチドの蛍光反応



### (b) OPAを用いたコラーゲンおよび他のタンパク質の検出



### (c) SIRCOL®コラーゲンアッセイキットを用いたコラーゲンの定量



### (d) 本技術とコラーゲン検出キット(ELISA法)の比較

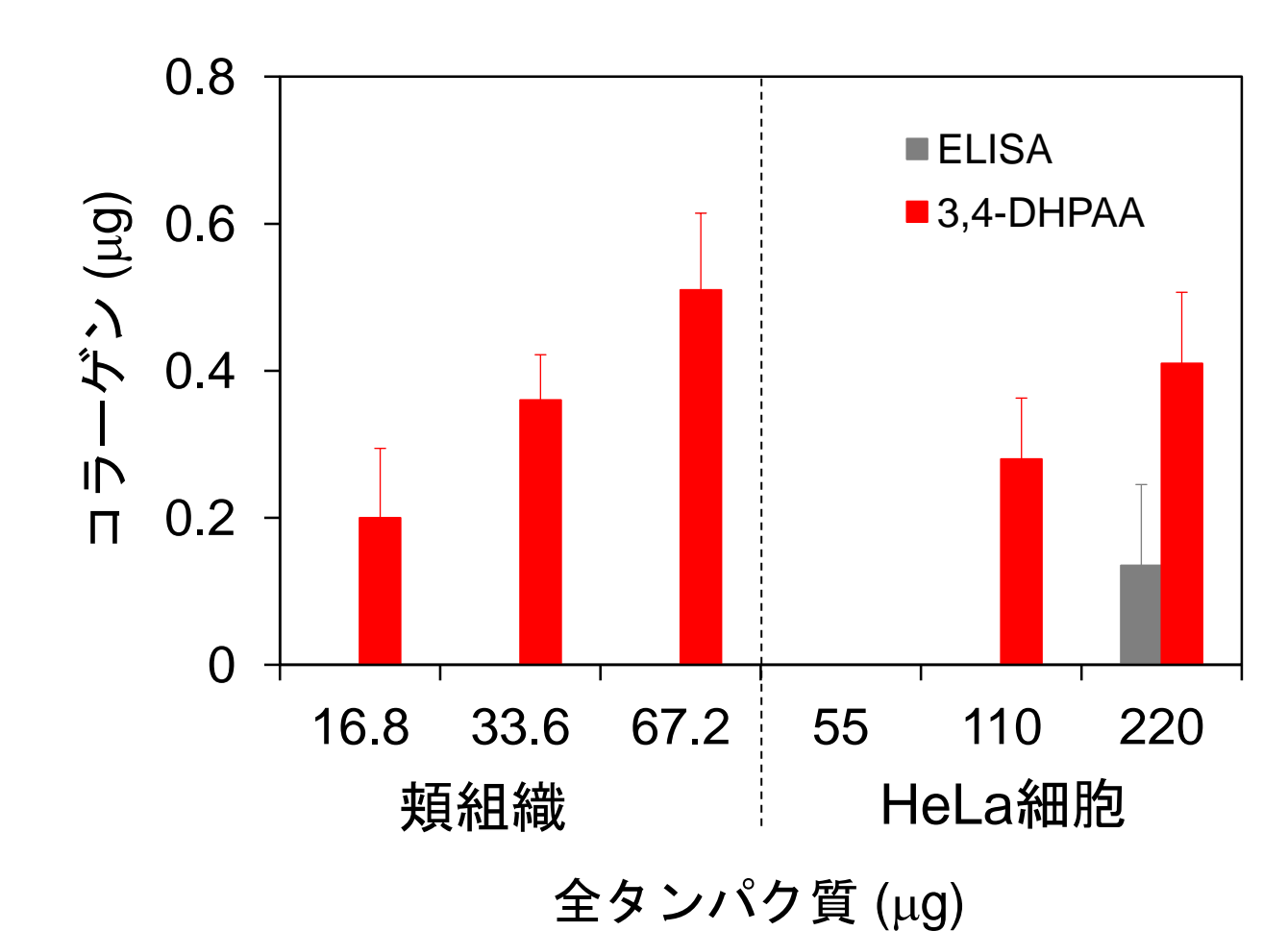


Figure 6. (a) o-フタルアルデヒド(OPA)を用いたアミノ酸とペプチドの蛍光検出 (b) OPAを用いたコラーゲンと各種タンパク質の検出 (c) SIRCOLコラーゲンアッセイキットを用いたコラーゲンの定量 (d) 3,4-DHPAAを用いた本技術と市販のコラーゲン検出キット(ELISA法)との比較

## 本技術の利点と応用例

本技術は、組織学や疾病診断を目的とした簡便かつ高感度なコラーゲンの定量法として有用である

### <利点>

- 簡便で迅速、安価であり、特別な装置を必要としない。
- 既存の方法と比較して、コラーゲン選択性が高く、かつ、高感度(OPA法の約60倍、Sircolコラーゲンアッセイキットの約5倍、ELISA法の約10倍)である。
- 培養細胞や組織中のコラーゲンを前処理なしで測定できる。

### <応用例>

- 個人のコラーゲン発現量を低侵襲的かつ日常的にチェック
- 微量の組織標本から疾病マーカーとしてコラーゲン量を検査
- コラーゲン関連食品添加物などの安全性試験を指向したコラーゲンおよびコラーゲン代謝物のハイスループット分析

## 参考文献

1. Kabashima T, Yu Z, Tang C, Nakagawa Y, Okumura K, Shibata T, Lu J, Kai M. (2008) Peptides 29: 356-363
2. Yu Z, Kabashima T, Tang C, Shibata T, Kitazato K, Kobayashi N, Lee MK, Kai M. (2010) Anal Biochem 397: 197-201.
3. Yasmin H, Shibata T, Rahman MS, Kabashima T, Kai M. (2012) Anal Chim Acta 721: 162-166.
4. 甲斐雅亮, 梶島力, 柴田孝之: ペプチドの検出方法, 特願2011-045491 (2011年3月2日出願)
5. 甲斐雅亮, 梶島力, 柴田孝之: ウイルスの識別方法, 特願2011-045488 (2011年3月2日出願)
6. 甲斐雅亮, 梶島力, 柴田孝之: ペプチドの検出方法(コラーゲン定量法), 特願2011-187969 (2011年8月30日出願)