

果実類の水可溶性画分由来オリゴ糖の大腸ガン培養細胞に対する影響

Effect on colon cancer cell culture of oligosaccharides in the water-soluble fractions of some fruits

伊藤 聖子**・太田 敬子*・加藤 陽治*
Seiko ITO・Keiko OHTA*・Yoji KATO

要 旨

日常、食に供する機会の多い果実から6種(リンゴ, キウイフルーツ, イチゴ, アボカド, バナナおよびパイナップル)を選び, それぞれの可食部から水可溶性画分を調製し, オリゴ糖の分析および生理機能検索の一つとして, ヒト大腸ガン培養細胞 COLO201 に対する影響について調べた。各水可溶性画分はゲル濾過クロマトグラフィーでさらに数画分に画分し, 最終糖濃度1 mg/mL に調製してガン細胞 COLO201 に添加, 4日後の生細胞数から生存率を求めた。キウイフルーツ, イチゴおよびバナナは, いずれの画分もコントロールと比較してガン細胞 COLO201 の生存率にあまり影響がみられなかった。それに対してリンゴはオリゴ糖画分ⅡおよびⅢで, アボカドはオリゴ糖画分ⅡおよびⅤ, パイナップルはオリゴ糖画分Ⅰにおいてガン細胞増殖の抑制効果が示された。活性画分のオリゴ糖の構成糖分析を行った結果, リンゴの画分ⅡおよびⅢには, フコース, キシロース, グルコース, ガラクトースの比率から, キシログルカンオリゴ糖の八糖, 九糖, 十糖が含まれていることが示唆された。また, アボカドは, ガラクタン系多糖, キシラン系多糖あるいはアラビノキシランなどに由来するオリゴ糖の存在も示唆された。パイナップルはアラビノガラクトタンやアラビノキシランに由来するオリゴ糖, また, フコース, キシロース, ガラクトース, グルコースなども含まれていたことから, 微量ではあるがキシログルカンオリゴ糖も含まれる可能性が示された。

キーワード : 果実類, 水可溶性食物繊維, オリゴ糖, 抗腫瘍性

1. 緒 言

近年, 生活習慣が原因で発症するといわれる糖尿病, 心疾患, 循環器疾患, 骨代謝疾患, 肥満症, 感染症, アレルギーやガン等の疾病を, 日常の食生活のなかで未然に防ぎたいという強い社会的願望がうまれている。生活習慣病と栄養素・食物摂取の関連については, 多岐に及ぶ研究報告があり¹⁻³⁾, 食品成分中のなかでも食物繊維の摂取と生活習慣病とは深い関連があるとされている^{4, 5)}。食物繊維の給源となる食品は, 穀類, 豆類, 野菜, 果実, 海藻類など, 植物起源のものがほとんどで, 我々が摂取している食物繊維は植物細胞壁に由来することが多い。一般に, 植物は生長・成熟の過程においてその細胞壁多糖成分が加水分解酵素によって分解され, 低分子化などの修飾が起きていることが知られている。生長・成熟に関わる壁多糖

の構造変化として, 果実は成熟の際に果肉組織において細胞壁成分に変化がみられることがわかっており, 特にペクチンとペクチン分解酵素の関連性から研究が進められてきた^{6, 7)}。しかし, 我々はペクチン以外にも細胞壁由来のキシログルカン多糖がリンゴ果実の成熟の際に一部分解され, キシログルカン多糖の低分子化(水可溶化)が起きていることを示唆した⁸⁾。また, 加藤らは, 野菜類の炭水化物組成に関する一連の研究から, 可食部水可溶性画分にはシヨ糖やグルコース以外のオリゴ糖が含まれていることを示唆している^{9~11)}。このことは, 植物性食品中には種々の細胞壁多糖断片, すなわちオリゴ糖などが微量ではあるが存在している可能性を示す。

果実類の炭水化物組成はシヨ糖や果糖が主となるが, 果実は水溶性ならびに水不溶性食物繊維を同時に

* 弘前大学教育学部家政学科教室食物学研究室
Laboratory of Food Science, Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University
** 静岡県立大学食品栄養科学部
School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

含有しており¹²⁾，果実を食すことは食物繊維の摂取に有効である。しかし，果実類の生理機能（生体調節機能）成分としては，ポリフェノール（フラボノイド系）の抗腫瘍性などに関する研究が多く¹³⁻¹⁷⁾，オリゴ糖などの機能性評価に関する報告は少ない。食品中のオリゴ糖などの多糖断片は難消化性であり，小腸で吸収されずに大腸まで達すると考えられる。したがって，大腸における難消化性オリゴ糖の機能解明研究として，果実類の水可溶性画分のヒト大腸ガン培養細胞に対する影響について検討することは，果実の新たな機能性の発見につながるものと考えられる。

本研究では，日常生活で食に供する機会の多い果実類（リンゴ，キウイフルーツ，イチゴ，アボカド，バナナおよびパイナップル）の可食部から水可溶性画分を調製し，オリゴ糖の分析および生理機能検索の一つとして，ヒト大腸ガン培養細胞に対する影響について検討した。

2. 実験材料および方法

2-1. 材料

弘前市内のスーパーマーケットで購入したリンゴ，キウイフルーツ，イチゴ，アボカド，バナナおよびパイナップルを用い，各果実の可食部を試料とした。各可食部は重量測定後，同量のメタノールを加えてミキサーで磨砕，磨砕物を吸引濾過にて濾液と残渣に分けた。残渣は50%メタノールとともにさらに磨砕して吸引濾過を行い，この操作を2回繰り返した全濾液を混合し，アルコール可溶性画分とした。アルコール可溶性画分は濃縮乾固後，蒸留水に溶解し，遠心分離で得られた上清を「水可溶性画分」とした。

2-2. 水可溶性画分中のオリゴ糖分析

パルスドアンペロメトリー検出陰イオンクロマトグラフィー（HPAEC分析）を行った。HPAECには，パルスドアンペロメトリー検出（金電極）付きのイオンクロマト DX-300（日本ダイオネクス社）を用い，分離カラムはCarboPac PA1を，ガードカラムはCarboPac PA1 GUARDを用いた。溶離液にはA（100mM水酸化ナトリウム）とB（500mM酢酸ナトリウム/100mM水酸化ナトリウム）を用い，0分時にA液100%，50分時にA液80%になるよう流速1.0mL/分でグラジエント溶出した^{8,12)}。

2-3. 水可溶性画分中のキシログルカンオリゴ糖存在の有無

水可溶性画分にキシログルカンオリゴ糖の存在の有無を調べるため，*Aspergillus oryzae* sp. イソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素（IPase）の部分精製酵素を40°Cで24時間作用させた。酵素分解物は，実験方法2-2同様，パルスドアンペロメトリー検出陰イオンクロマトグラフィー（HPAEC分析）に供した。

2-4. 水可溶性画分のゲル濾過クロマトグラフィーによる分画

各水可溶性画分（500~1,000mg グルコース相当量）を，蒸留水で平衡化したBio-Gel P-2カラム（7cm×50cm）のゲル濾過クロマトグラフィーに供した。蒸留水で溶出し，溶出液はフラクションコレクターにて20mLずつ試験管に集め，その中から相当量をとって全糖量（グルコース相当量）をフェノール・硫酸法¹⁸⁾にて測定した。糖の溶出パターンから，I~Vの画分に分けた。

2-5. 水可溶性画分添加による細胞生存率への影響

細胞はヒト大腸ガン培養細胞 COLO201を用い，10%FBS（牛胎児血清）を含むRPMI-1640培地5mL，φ60mmディッシュで培養した。増殖活性期にある細胞をトリプシン消化により回収し，同培養液で 20×10^4 cells/mLに調整した。初期細胞数を2万個（ 2.0×10^4 cells/D）としてφ35mmディッシュにCOLO201細胞を播種し，水可溶性画分を最終濃度1.0, 5.0, 10.0mg（全糖量）になるよう添加，4日間CO₂インキュベーターで培養した（各画分4検体）。ゲル濾過クロマトグラフィーで分画した各画分については，最終濃度を1.0mg（全糖量）になるよう添加し，同様に培養した。

各画分を添加し培養開始から4日後，生細胞数を血球計算盤で計測した。試料無添加のディッシュをコントロールの生細胞数（生存率100%）とし，コントロールに対する各画分添加ディッシュのCOLO201細胞の生存率を求めた。

2-6. 構成糖分析

COLO201細胞の増殖に対して影響がみられた画分について，試料1mL（150μg グルコース相当量）に同量の2Mトリフルオロ酢酸を添加して100°Cで2時間加水分解した。加水分解物を減圧乾固し，200μLの超純水に溶解して中性糖の組成をHPAECにて分析した。HPAECはオリゴ糖分析と同じイオンクロマト DX-300（日本ダイオネクス社），CarboPac PA1カラムおよび

CarboPac PA1 GUARD を用い、超純水を溶離液として流速1.0mL/分で溶出した¹²⁾。

3. 結果および考察

リンゴ、キウイフルーツ、イチゴ、アボカド、バナナおよびパイナップルの可食部100g から得られた水可溶性画分はそれぞれ、9.88, 8.00, 11.03, 8.70, 11.23および10.40g であった。

我々は、リンゴは成熟の過程で細胞壁多糖の一部が酵素などによって分解され、ペクチンのみならずキシログルカン多糖の低分子化（水可溶化）が起こっていること⁸⁾を示唆しており、低分子化されたオリゴ糖断片は水可溶性画分に存在すると考えられる。そこで、リンゴ可食部の水可溶性画分について、オリゴ糖分析することとした。水可溶性画分の一部をHPAEC分析に供した結果（図1-(1)）、グルコースやスクロース（ショ糖）以外に、キシログルカンオリゴ糖の溶出位置（25~40分）にピークがみられた。これらのピークがキシログルカン由来のオリゴ糖であるか調べるため、*Aspergillus oryzae* sp. 部分精製 IPase を作用させた後に、同様の HPAEC 分析を行った。この酵素は部分精製酵素であるが、キシログルカンオリゴ糖をイソプリメベロース（IP: α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose）単位に分解する酵素である。酵素処理後

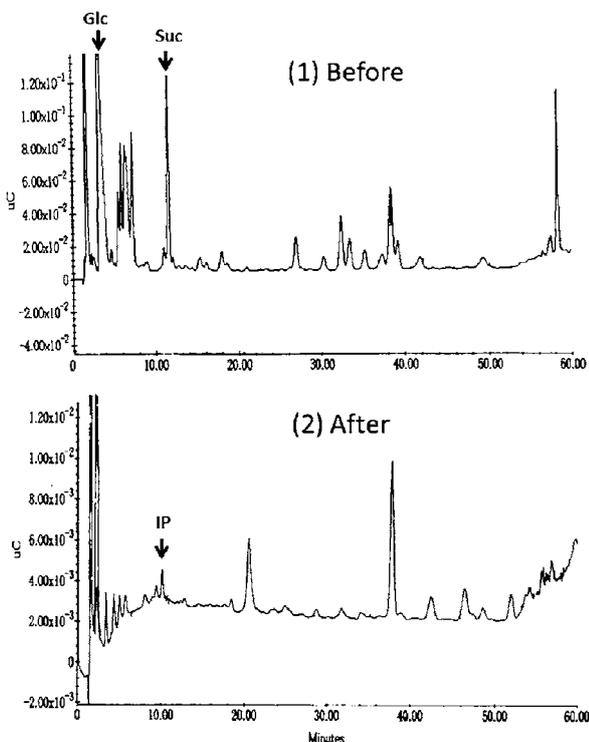


図1 リンゴ可食部水可溶性画分のイソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素分解前後の陰イオンクロマトグラフィーによるオリゴ糖分析
(1) 酵素処理前、(2) 酵素処理後

の HPAEC 分析の結果（図1-(2)）、酵素処理前にみられたピークが分解され、いくつかのオリゴ糖断片のピークと、IP の溶出位置に微量ではあるがピークが確認された。オリゴ糖断片について、何に由来するかは特定できなかったが、IP はキシログルカンオリゴ糖から遊離したものと考えられ、水可溶性画分にキシログルカンオリゴ糖断片が存在する可能性が示唆された。

キシログルカンの抗腫瘍性について、我々は大豆から抽出調製したキシログルカン多糖およびオリゴ糖の、ヒト大腸ガン培養細胞 COLO201 に与える影響を検討し、キシログルカン多糖はガン細胞の増殖を抑制する可能性があることを報告した¹⁹⁾。これより、多糖由来と考えられるオリゴ糖を含むリンゴの水可溶性画分も同様の機能性を示す可能性があり、COLO201 細胞に対する影響を調べた。リンゴの水可溶性画分は、糖量1 mg/mL 濃度ではコントロールに対して生存率が75.3%、5 mg/mL、10 mg/mL 濃度では55.0%、44.5%となり、濃度依存的にガン細胞の増殖を抑制する傾向があることがわかった（図2）。

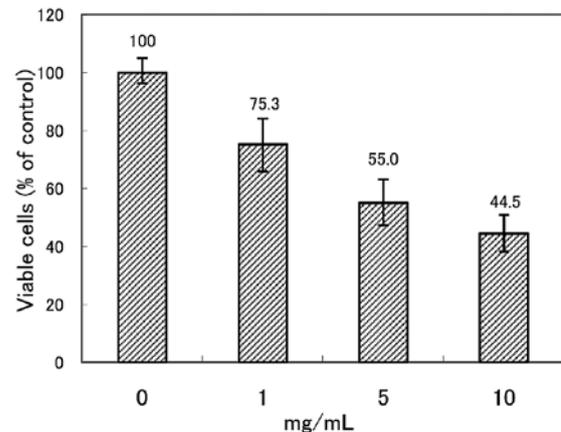


図2 リンゴ可食部水可溶性画分の大腸ガン培養細胞 COLO201 に対する影響

リンゴの水可溶性画分に大腸ガン培養細胞 COLO201 の増殖を抑制する傾向がみられたので、活性成分を特定するため、Bio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーに供し、オリゴ糖などの分画を行った。リンゴ以外の果実の水可溶性画分も同様に Bio-Gel P-2で分画を行った。各溶出液はフェノール・硫酸法による糖の溶出パターンから、リンゴの水可溶性画分は試験管番号19~23, 24~38, 39~47, 48~51, および52~60を回収し、それぞれ、画分 I, II, III, IV および V とした（図3-(1)）。キウイフルーツの水可溶性画分は試験管番号44~49, 50~53, 54~57, 58~

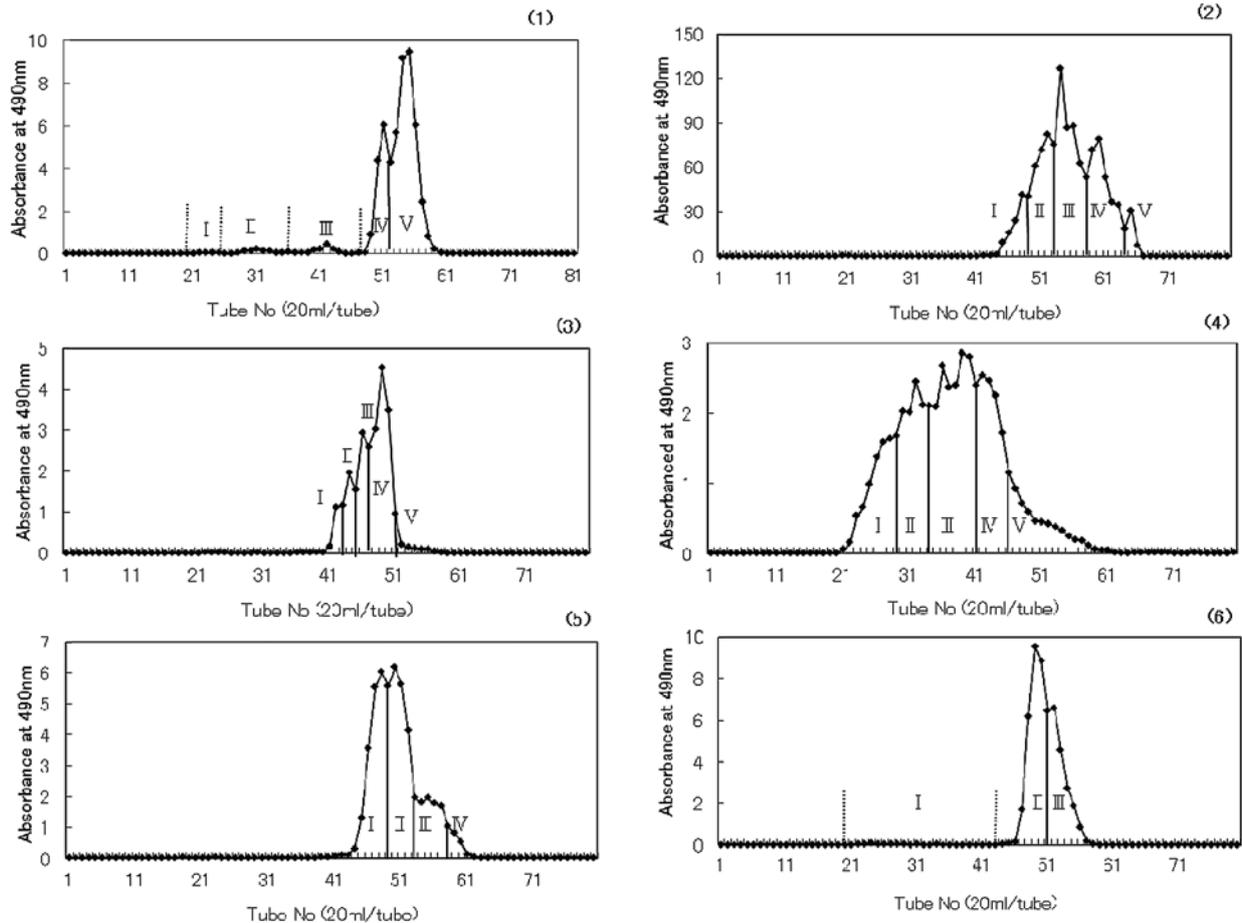


図3 水溶性画分のゲル濾過クロマトグラフィー
 (1) リンゴ, (2) キウイフルーツ, (3) イチゴ, (4) アボカド, (5) バナナ, (6) パイナップル

63, および64~68を回収し, それぞれ, 画分 I, II, III, IV および V とした (図 3-(2))。イチゴの水溶性画分は, 試験管番号41~43, 44~45, 46~47, 48~52, および53~60を回収し, それぞれ, 画分 I, II, III, IV および V とした (図 3-(3))。アボカドの水溶性画分は, 試験管番号20~29, 30~35, 36~41, 42~47, および48~61を回収し, それぞれ, 画分 I, II, III, IV および V とした (図 3-(4))。バナナの水溶性画分は, 試験管番号41~48, 49~53, 54~57, および58~62を回収し, それぞれ, 画分 I, II, III および IV とした (図 3-(5))。パイナップルの水溶性画分は, 試験管番号20~43, 44~50, および51~60を回収し, それぞれ, 画分 I, II および III とした (図 3-(6))。

各画分はフェノール・硫酸法によって糖量を測定し, 最終糖濃度1 mg/mL に調製して大腸ガン細胞 COLO201 に添加, 4 日後の生細胞数から生存率を求めた。キウイフルーツ (図 4-(2)) とイチゴ (図 4-(3)) およびバナナ (図 4-(5)) は, コントロールと比較してガン細胞 COLO201 の生存率にあまり影響が

みられなかったのに対し, リンゴは画分 II および III で, 増殖が抑制される傾向がみられた (図 4-(1))。また, アボカドは全体的にどの画分においてもガン細胞 COLO201 の増殖を抑制する傾向がみられたが, 特に増殖抑制効果を示したのが画分 II と画分 V だった (図 4-(4))。パイナップルでは, 画分 I においてガン細胞増殖の抑制効果が示された (図 4-(6))。

増殖抑制効果が示された画分に含まれるオリゴ糖を解析するため, リンゴ, アボカドおよびパイナップル各画分の構成糖分析を行った (表 1)。リンゴの画分 II および III は, フコース (Fuc), アラビノース (Ara), キシロース (Xyl), グルコース (Glc), ガラクトー

表 1 大腸ガン培養細胞 COLO201 の増殖に影響した各画分の構成糖

Fruits	Fraction	Sugar composition [%]					
		Fuc	Ara	Xyl	Glc	Gal	Man
Apple	II	6.3	0.3	26.5	39.8	18.0	9.1
	III	7.0	0.4	14.3	41.4	36.6	0.3
Avocado	II	0.3	0.6	22.1	17.4	59.6	trace
	V	1.5	2.0	60.5	30.9	5.1	trace
Pineapple	I	3.0	32.9	36.2	20.1	6.1	1.7

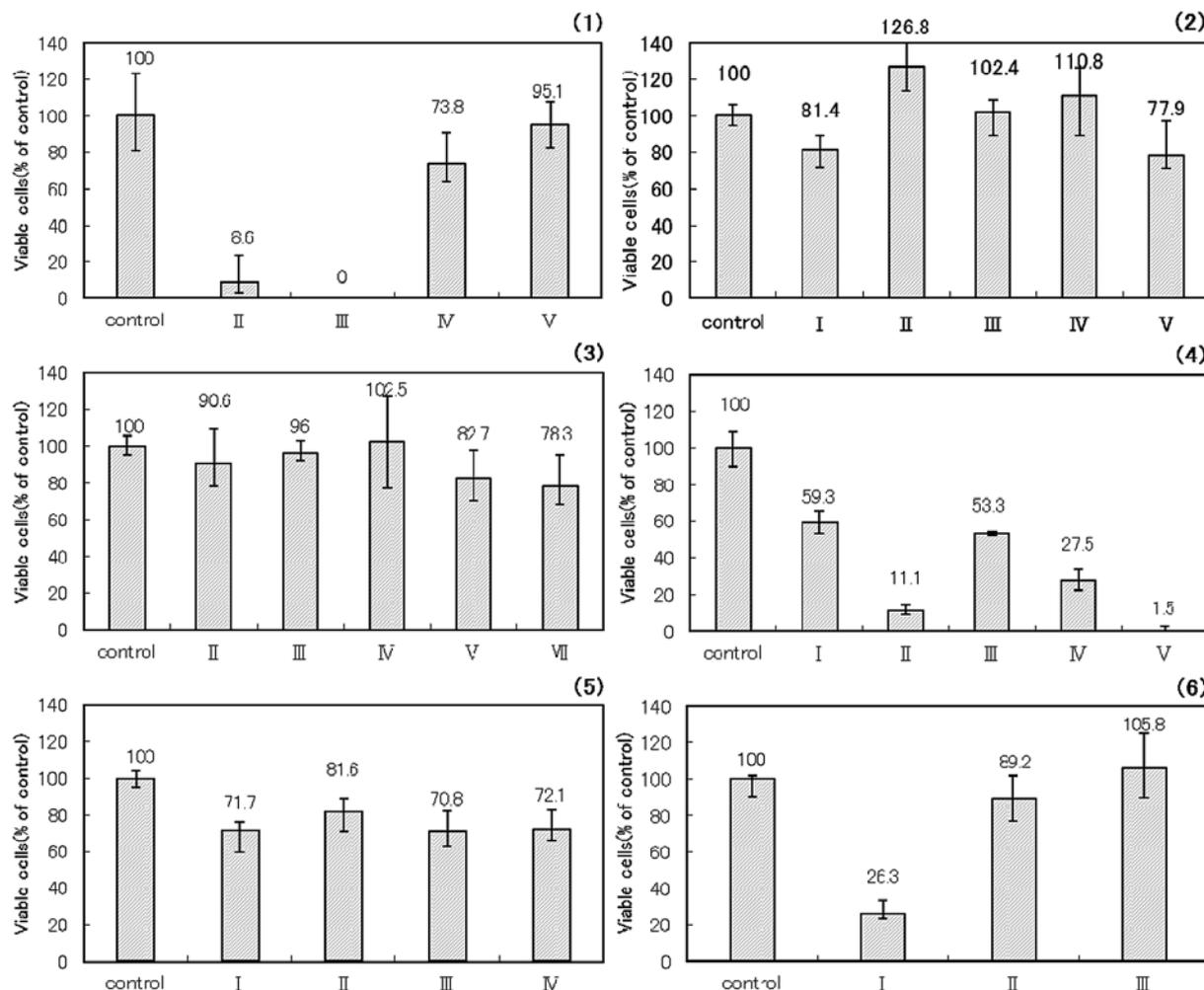


図4 各画分の大腸ガン培養細胞 COLO201に対する影響
 (1) リンゴ, (2) キウイフルーツ, (3) イチゴ, (4) アボカド, (5) バナナ, (6) パイナップル

ス (Gal) およびマンノース (Man) から構成されていた。リンゴの画分 II は、フコース、キシロース、グルコース、ガラクトースの比率が約 1 : 3 : 4 : 2 となっており、キシログルカンのオリゴ糖である九糖 XXFG (Glc:Xyl:Gal:Fuc= 4 : 3 : 1 : 1) や十糖 XLFG (Glc:Xyl:Gal:Fuc= 4 : 3 : 2 : 1), 九糖 XLLG (Glc:Xyl:Gal= 4 : 3 : 2) が含まれていることが示唆された。アボカドの画分 II は、顕著な量のガラクトースが含まれており、ガラクトタン系多糖、また、画分 V はアラビノースや顕著な量のキシロース含有量から、キシラン系多糖あるいはアラビノキシランなどに由来するオリゴ糖の存在も示唆された。パイナップルの画分 I は、アラビノース、キシロース、ガラクトースが含まれることから、アラビノガラクトタンやアラビノキシラン由来のオリゴ糖、また、フコース、キシロース、ガラクトース、グルコースなども含まれていたことから、微量ではあるがキシログルカンオリゴ糖も含

まれる可能性が示された。活性画分の詳細について、リクロマトによる精製や構造解析をさらに行う必要があること、また、果実の種類によって効果が異なっていることから、その違いは果実を扱うにあたり考慮しなければならない成熟度の違い、壁多糖から遊離した断片の重合度の違い、あるいはその側鎖構造の違い、オリゴ糖とともに共存する可能性のあるフェノール性物質など糖質以外の成分の違いなのかは今後検討が必要と考える。しかし、本研究によって、果実の水溶性画分には細胞壁多糖から遊離したオリゴ糖断片が含まれ、水溶性画分がガン細胞 COLO201 の増殖を抑制する傾向をもつことが明らかとなり、オリゴ糖断片の新たな生理機能の可能性が示唆された。

引用文献

1) Mensink RP, Katan MB.: Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: A meta-analysis of 27 trials,

- ArteriosclerThromb.*, **12**, 911-919 (1992)
- 2) Klag MJ, Ford DE, Mead LA, et al.: Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 313-318 (1993)
 - 3) 中本真理子, 酒井徹, 船木真理 他: 食物摂取および生活習慣とアレルギー疾患との関連について, *J. Rehabil. Health. Sci.*, **8**, 15-21 (2010)
 - 4) Pereira MA, O'Reilly E, Augustsson K. et al.: Dietary fiber and risk of coronary heart disease, *Arch. Intern. Med.*, **164**, 370-376 (2004)
 - 5) Schulze MB, Schulz M, Heidemann C, et al.: Fiber and magnesium intake and incidence of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis, *Arch. Intern. Med.*, 956-965 (2007)
 - 6) 吉岡博人: 果実・野菜組織の軟化とペクチン及びペクチン分解酵素, 日本食品科学工学会誌, **39(8)**, 733-737 (1992)
 - 7) Yoshioka H, Kashimura Y and Kaneko K.: Solubilization and neutral sugar residues distribution of polyuronides during the softening in apple fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **63(1)** 173-182 (1994)
 - 8) Ito S, Mitsuishi Y, Okuno T and Kato Y.: Changes in the structure of xyloglucan of apple fruit during development, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **73(1)** , 51-56 (2004)
 - 9) 加藤陽治, 松倉純子: 主要葉菜類の炭水化物組成, 弘前大学教育学部紀要, **71**, 61-71 (1994)
 - 10) 加藤陽治: 主要根菜類の炭水化物組成, 弘前大学教育学部紀要, **74**, 37-47 (1995)
 - 11) 加藤陽治: 主要果菜類の炭水化物組成, 弘前大学教育学部紀要, **78**, 99-107 (1997)
 - 12) Ito S and Kato Y.: A study of the structures of xyloglucans from the fruit cell walls of strawberry, persimmon, prune and banana. *J. Appl. Glycosci.*, **49(4)**, 501-504 (2002)
 - 13) Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyama, M., Teshima, R. and Saito, Y.: Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62(7)**, 1284-1289 (1998)
 - 14) Harrington, ME., Flynn, A. and Cashman, KD.: Effects of dietary fibre extracts on calcium absorption in the rat. *Food Chemistry*, **73(3)** , 263-269 (2001)
 - 15) Saito, T., Miyake, M., Okamatsu, H., Shimizu, S. and Noda.: Minhibition by apple polyphenols of ADP-ribosyltransferase activity of cholera toxin and toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol Immunol.*, **46(4)**, 249-255 (2002)
 - 16) Bandoniene, D. and Murkovic, M.: On-Line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L). *J. Agr. Food Chemistry*, **50(9)**, 2482-2487 (2002)
 - 17) Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Bernalier, A., Morand, C., Remesy, C. and Demigne, C.: Apple pectin and polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rat. *J. Nutr.*, **133(6)**, 1860-1865 (2003)
 - 18) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.*, **28**, 350 (1956)
 - 19) Kato Y, Uchida J, Ito S and Mitsuishi Y.: Structural analysis of the oligosaccharide units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells. *New Developments in Glycomedicine*, pp.161-164 (2001)

(2014. 1. 14 受理)