

平成 20 年度 修士論文

ツルアラメ水溶性糖質の生理機能に関する研究

弘前大学大学院 教育学研究科 教科教育専攻

家政教育専修 食物学分野

07 GP220 楊 俊革

第 I 章	緒言	1
第 II 章	ツルアラメ水溶性糖質の抽出	4
第 1 節	目的	4
第 2 節	実験材料及び一般的な分析方法	4
2-1	実験材料	4
2-2	一般的な分析方法	4
第 3 節	実験方法と結果	11
3-1	ツルアラメ水溶性糖質の抽出	11
3-2	構成糖の分析	13
3-3	ヒト大腸ガン細胞の増殖に与える影響	14
第 4 節	考察	14
第 III 章	ツルアラメ水溶性低分子画分の Bio-Gel P-2 による分画 と得られた画分の分析	16
第 1 節	目的	16
第 2 節	実験方法及び結果	16
2-1	WS-L 画分の分子量分布と分析	16
2-1-1	WS-L の Bio-Gel P-2 による分画	16
2-1-2	構成糖の分析	18
2-1-3	ヒト大腸ガン細胞の増殖に与える影響	18
2-2	糖の精製及び分析	19
2-2-1	FrIV、FrV、FrVI、FrVII の精製	19
2-2-2	ヒト大腸ガン細胞の増殖に与える影響	21
第 3 節	考察	23
第 IV 章	ツルアラメ水溶性低分子画分 (WS-L) のイオン交換樹脂による分画 と得られた画分の分析	24
第 1 節	目的	24
第 2 節	実験方法及び結果	24
2-1	WS-L の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィーによる分画 及び Bio-Gel P-2 による脱塩	24
2-1-1	WS-L の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィーによる分画	24
2-1-2	WS-L の DEAE-Sephadex A-25 で得られた画分の Bio-Gel P-2 による脱塩	25
2-2	構成糖の分析	28
2-3	ヒト大腸ガン細胞の増殖に与える影響	29
第 3 節	考察	30
第 V 章	ツルアラメ水溶性高分子画分 (WS-H) 糖質の分画及び得られた画分の分析	31

第1節	目的	31
第2節	実験材料	31
第3節	実験方法と結果	31
3-1	WS-H 透析外液と透析内液の分析	31
3-1-1	WS-H の透析による分画	32
3-1-2	透析液のヒト大腸ガン細胞の増殖に与える影響	33
3-2	WS-H 糖の分離及び分析	33
3-2-1	WS-H の DEAE-Sephadex A-25 による分画	33
3-2-2	構成糖及び糖アルコールの分析	35
3-2-3	ヒト大腸ガン細胞の増殖に与える影響	35
第4節	考察	36
第VI章	まとめ及び総合考察	37

第 I 章 緒言

海藻類は緑藻、褐藻、紅藻の 3 種類に大別される。一般に海藻は野菜と比べて平均的にカロリーが少なく、特殊な脂肪酸や S-アミノ酸を含んでおり、水溶性食物繊維も多い⁽¹⁾。多種多様な栄養機能を持ち、非常に健康的なものであることから、昔から主に食用として利用されてきた。海藻が有する機能性成分についての研究は 1950 年頃から始められ、例えば、海藻の生理活性物質には次のようなものがある。赤血球凝集素（レクチン）、紫外線に対する生体防御物質（核酸系⁽²⁾、アミノ酸）、抗酸化物質（ポリフェノール⁽³⁾）、抗生物質（脂肪酸とその誘導体、フェノール類、イオウ化合物、テルペン、ハロゲン化合物、多糖類など抗菌性並び抗カビ物質⁽⁴⁾）、抗腫瘍成分（多糖類⁽⁵⁾、テルペノイド類）、抗がん成分（多糖類⁽⁶⁾、カラギーナン⁽⁶⁾、ジャスモン酸⁽⁷⁾、脂質⁽⁶⁾）、血圧低下成分（アミノ酸⁽⁸⁾、アルギン酸⁽⁹⁾）、コレステロール低下成分（アルギン酸）などである。海藻特有の多糖類の生理機能に着目した研究成果として抗腫瘍活性⁽¹⁰⁻¹¹⁾、アルギン酸のコレステロール低下作用・整腸作用⁽¹²⁾、フコイダンの抗潰瘍作用⁽¹³⁾・腎障害防止作用⁽¹⁴⁾等がこれまで確認されている。海藻の持つ機能の研究とともに、多方面での利用、応用研究が期待されている。海藻の生産は 1970 年以降世界全体的に増加傾向になっている⁽¹⁵⁾。

褐藻類のコンブ科カジメ属多年生海藻ツルアラメは、若狭湾の水深 199 メートルの海底から採集されたことがあり、最も深いところから採集された海藻として世界記録を持つことでも有名である。青森周辺から九州に分布する日本海特産のコンブ類であるが、独特のえぐみがあるため、食糧や飼料としての利用は限られており、大部分が廃棄されているのが現状である。

ツルアラメについての研究は、これまで生態⁽¹⁶⁾、除去の時期と方法⁽¹⁷⁾及び組織培養など⁽¹⁸⁾が知られている。また、ツルアラメのポリフェノール⁽¹⁹⁻²⁰⁾、ポリフェノールから分離された成分⁽²¹⁾及びポリフェノールの抗酸化作用や血糖上昇抑制作用⁽²²⁾、フコイダンの抗酸化、抗菌性などの研究も行われているが、ツルアラメの中に含まれる水溶性糖質の研究がほとんどなされていない。

本研究室の研究により、ツルアラメに含まれる多糖の種類はコンブのそれと類似しているが、構成単糖比率及び全糖量が異なることが明らかにされている。未利用海藻のツルアラメがヒトに対してマコンブなどと同じ生理機能があれば、機能性食品素材などとして有効活用が期待される。本研究ではツルアラメの中に含まれる水溶性単糖、オリゴ糖及び水溶性多糖に注目し、水又はアルコールで抽出した画分をさらに Bio-Gel P-2 を用いたゲルろ過法で分画して、得られた各画分の生理機能検索の一つとして、ガン培養細胞の増殖抑制作用を指標として調べた。これによりツルアラメの食品としての特性や有効活用の方向性を探ることを目的とした。

参考文献：

- (1) Kazutoshi N. et al : The Chemical Structure and Pharmaceutical Functions on Water-Soluble Dietary Fibers of Seaweeds, 日本食物繊維誌, Vol.8 No.1 P1-12 (2004)
- (2) 矢部和夫ら：北海道大学水産学部研究彙報, 15 P181-184 (1964)
- (3) 山田信夫ら：平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集, P178 (1996)
- (4) 蔵多一哉：海藻の抗生物質, P80-103 (1979) [海洋の生化学資源] 日本水産学会編, 恒星社厚生閣, P155 (1979)
- (5) Yamamoto I. et al : Cancer Letters, 26 P241-251 (1985)
- (6) Noda H. et al : Nippon suisan Gakkaishi, 55 (7) P1265-1272 (1989)
- (7) 梶原忠彦：オキシピリン類の機能, P157-159 [アオサの利用と環境修復] 能登谷正浩編著, 成山堂書店, P171 (1999)
- (8) 日本水産学会編, 海藻の生化学と利用, 恒星社厚生閣 (1983)
- (9) Tsuji K. et al: Abstracts of XIth ISS, Qingdao, China P244 (1983)
- (10) 酒井武ら：コンブフコイダンの機能性と健康食品への利用, New Food Industry, 43 (2) P8-12 (1998)
- (11) 山本一郎ら：海藻からの抗癌活性物質, 21世紀の海藻資源, 大野正夫編著, 緑書房, 東京, P235-248 (1996)
- (12) 浅岡力：低分子化アルギン酸ナトリウムの効能とその効果, NewFoodIndustry, 43 (2) P13-19 (1998)
- (13) Shibata H. et al: Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection, Biofactors, 11 (4) P235-245 (2000)
- (14) Zhang Q. et al: Effects of fucoidan on chronic renal failure in rats, Planta Med., 69 (6) P537-541 (2003)
- (15) FAO : FAO Fishery Statistics, P83 (1995)
- (16) 能登谷正浩：青森県沿岸のツルアラメ, 日本水産学会誌, 61 (1) P105-106 (1995)
- (17) 桐原慎二ら：青森県大間崎沿岸におけるツルアラメ卓越群落除去後に観察された海藻群落の遷移, 水産増殖, 54 P1-13 (2006)
- (18) Phaeophyta et al: Tissue culture from the explant of *Ecklonia stolonifera* Okamura, Jpn. J. Phycol, 36 (2) P175-177 (1988)
- (19) Hye Sook K. et al: A New Phlorotannin from the Brown Alga *Ecklonia stolonifera*, Chem. Pharm. Bull, 51 (8) P1012-1014 (2003)
- (20) Jormalainen V. et al: Induction of phlorotannin production in a brown alga, defense or resource dynamics Oikos, 103 P640-650 (2003)
- (21) JOE M. et al: The Inhibitory Effects of Eckol and Dieckol from *Ecklonia stolonifera*

on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Dermal Fibroblasts
(Miscellaneous), Biological & pharmaceutical bulletin, Vol. 29, No.8 P1735-1739
(2006)

(22)岩井 邦久: ツルアラメ (*Ecklonia stolonifera*)のポリフェノールに関する研究, 東北・北海道地域部会／研究論文集第4号, P127-128 (2005)

第Ⅱ章 ツルアラメ水溶性糖質の抽出

第1節 目的

ツルアラメの中に含まれる水溶性単糖、オリゴ糖及び水溶性多糖を分析するため、最初に、ツルアラメ粉末から水溶性画分を抽出し、得られた画分にアルコールを添加し、80% アルコール可溶性画分（水溶性低分子）と不溶性画分（水溶性高分子）を得た。得られた各画分の生理機能検索の一つとして、ガン培養細胞の増殖抑制作用を指標として調べた。

第2節 実験材料及び一般的な分析方法

2-1 実験材料

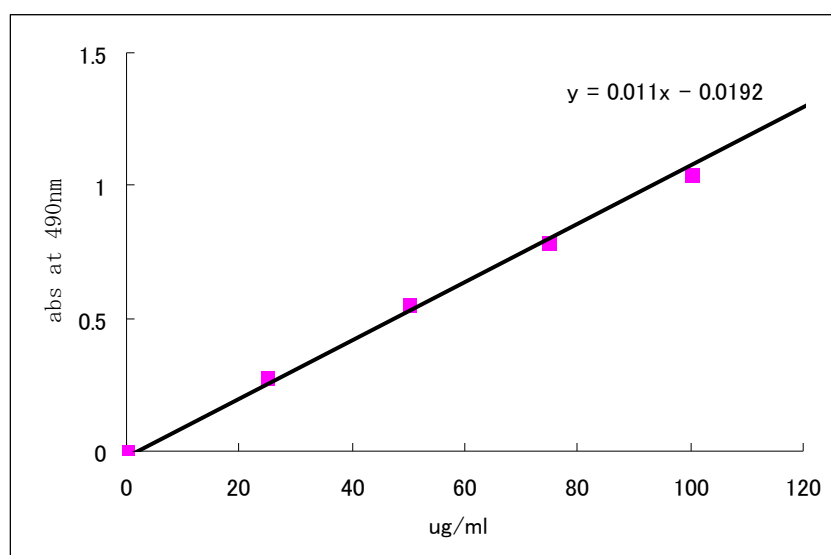
2006年5月採集乾燥された大間産ツルアラメを Retsch の超遠心粉砕機（ZM-100）で粉砕したものを材料とした。

2-2 一般的な分析方法

（1）全糖量の測定

全糖量の測定は、フェノール・硫酸法⁽¹⁻²⁾により行った。フェノール硫酸法は、試料 0.5 ml に 5%フェノールを 0.5 ml、特級濃硫酸 2.5 ml を加えて攪拌し、30分程度室温に放置して冷却した後、HITACHI 社の U-1500 レシオビーム分光光度計を用い 490 nm で測定した。

図Ⅱ-1 に標準曲線を示した。標準物質としてグルコースを用い、試料中の糖量は全てグルコース相当量で算出した。



図Ⅱ-1 フェノール・硫酸法（グルコース相当量）の標準曲線

(2) 酸性糖量の測定

酸性糖量の測定は、カルバズール・硫酸法⁽²⁻³⁾により行った。カルバズール硫酸法は、硼酸ナトリウム十水和物 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0.95 g を濃硫酸 100 ml に溶解させたもの (試薬 A) とカルバズール 125 mg をメタノール 100 ml に溶解したもの (試薬 B) を用いた。試薬 B は冷暗所に保存した。

まず、栓付試験管に入れた試料溶液 0.5 ml に試薬 A 2.5 ml を加え、栓をして攪拌し、沸騰湯浴中に 10 分置いた。冷水浴中で冷却した後、試薬 B 0.1 ml を加え、再び沸騰湯浴中に 15 分置いた。冷水浴中で冷却後、HITACHI 社の U-1500 レシオビーム分光光度計を用い 530 nm で測定した。

図 II-2 に標準曲線を示した。標準物質にはガラクトツロン酸を用い、試料中の酸性糖量は全てガラクトツロン酸相当量で算出した。

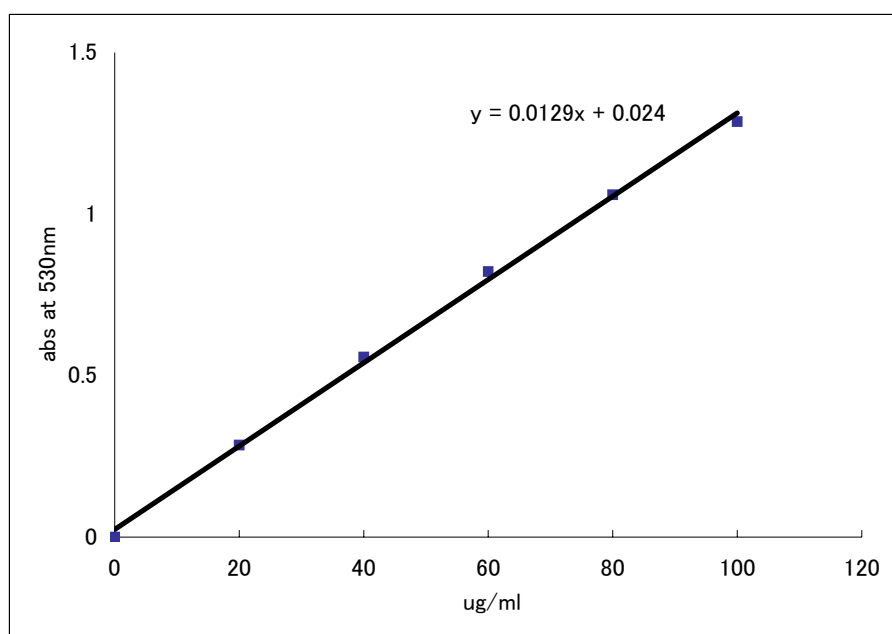


図 II-2 カルバズール・硫酸法 (ガラクトツロン酸相当量) の標準曲線

(3) ポリフェノールの測定

フォーリンチオカルト法⁽⁴⁾によるポリフェノール類の量を測定：

試験管に適度の濃度のサンプル 0.5 ml に 50 % フェーリンチオカルト試薬を 0.5 ml 加えて攪拌した、3 分後、0.4 M 炭酸ナトリウム 2.5 ml を加え攪拌した後、試験管を 5 分間 50 °C で、30 分後 HITACHI の U-3000 (U-3000/ U-3300 形分光光度計) を用い abs 765 nm で測定した。

図 II-3 に標準曲線を示した。標準物質にはクロロゲン酸を用い、試料中のポリフェノール含有量は全てクロロゲン酸相当量で算出した。

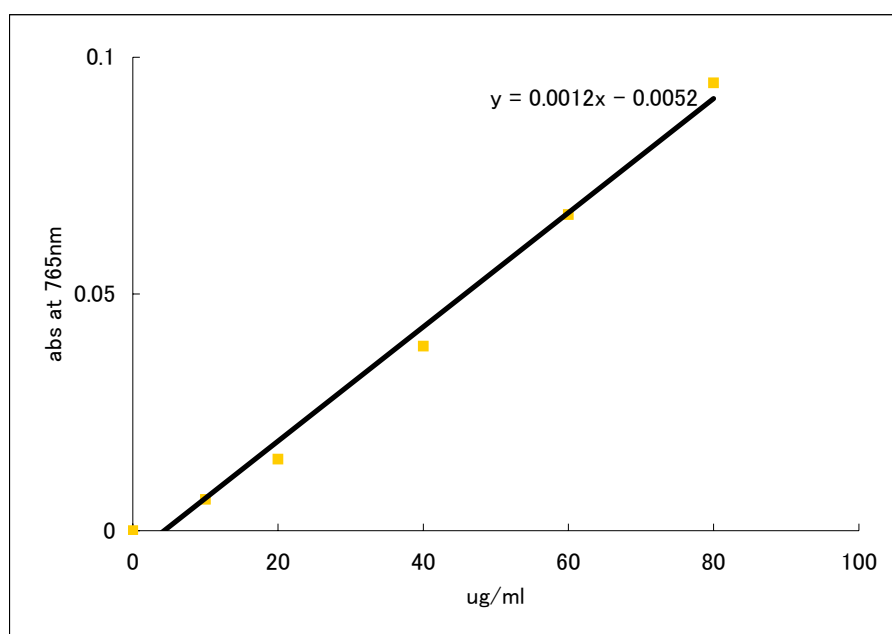


図 II-3 フォーリンチオカルト法 (クロロゲン酸相当量) の標準曲線

(4) イオン交換クロマトグラフィーを用いての分画⁽⁵⁾

適量のサンプルを、濃縮乾固後、酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-25 に供した。酢酸緩衝液、0.2 M NaCl、0.5 M NaCl、1.0 M NaCl を含む同緩衝液および 1.0 M NaOH で順次溶出した。適量の溶出液を試験管に回収した。そしてフェノール硫酸法にて全糖量、カルバゾール硫酸法にて酸性糖量を測定した。

(6) 構成糖の分析⁽⁷⁾

①試料の調製

試料を栓付き試験管 (20 ml) に適量 (2 ml 以下) 入れ、2M トリフルオロ酢酸 (TFA) を等量加えてキャップをし、よく攪拌して 100 °C で 3 時間、加水分解した。その後、試料を室温にて冷却し、別の試験管に移して試験管濃縮を行い乾固させた。それに、分析時の注入量 20 µl でおおよそ 10 µg の糖量 (フェノール硫酸法による) が含まれるように超純水を加え、同様に 1 mg/ml の 2-Deoxyglucose (2-DG) 溶液が 2 µg 以上含まれるように加えた。このように調製した試料を ultrafree-MC フィルター (MILLIPORE) (<0.5 µm) で濾過し、ディスポーザブルの 300 µl 容スナップバイアル (ジューエルサイエンス (株)) に入れた。

②試料の分析

調製した試料は、高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC=High Performance Anion-exchange Chromatography) (Dionex 社) により分析した。超純水で平衡化したカラムに、バイアルから適量 (糖量 10 µg 相当) を注入後、脱気した超純水を流して分析時間 50 分で行った。ピークの同定には、8 種類の標準物質 { 溶出順にフコース (Fuc)、2-DG、アラビノース (Ara)、ラムノース (Rha)、ガラクトース (Gal)、グルコース (Glc)、キシロース (Xyl)、マンノース (Man) } の混合物 (以下スタンダード) を用いた⁽⁸⁾。分析サンプルの本数が多くなるに従い、溶出時間が早くなる傾向が見られたため、スタンダードは分析の始めと分析試料のバイアルおおよそ 5 本おきに 1 本及び分析の最後に入れ、各糖の溶出時間を確認しながら同定した。分析条件は次のとおりである。

高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC=High Performance Anion-exchange Chromatography) (Dionex 社)

分析カラム	Carbopac PA 1
ガードカラム	Carbopac PA 1 GUARD

構成糖分析メソッド 溶離液 A 液: 超純水

「溶出グラジエント」

時間 (分)	流速 (ml/分)	A 液 (%)
0	1.0	100
50	1.0	100

構成糖割合の算出:

2-DG のピーク面積積分値から、試料中の中性糖 (2-DG を除く 7 種類の糖) の量とそれらの割合 (wt %) を算出した。真の酸性糖量は、{カルバゾール硫酸法による酸性糖量 (mg/ml) - 中性糖量 (mg/ml) x 0.23} で計算した。真の酸性糖量と中性糖量を足し値を 100 % (wt %) として、それぞれの構成糖の割合を算出した。

(7) 糖アルコール分析⁽⁷⁾ :

① 試料の調製

①-a. マンニトールの作り方

マンノース 1 mg/ml (H₂O 液) 1 ml に、水素化ホウ素ナトリウム 25 mg/ml (H₂O 液) 1 ml を加え、一晩放置して還元させた。これを Amberlite IR-120 (H⁺) にて処理し、濾過した後、1 ml を取り、メタノール 1 ml 加え、試験管濃縮にかけた。この操作を数回繰り返す。超純水 1 ml を加えたものをマンニトール (1 mg/ml) として使用した。さらに、サンプルに含まれる糖アルコール含有量は、この STD を基準として計算した。

①-b. 試料の調製

試料を栓付き試験管 (20 ml) に適量 (2 ml 以下) 入れ、2 M トリフルオロ酢酸 (TFA) を等量加えてキャップをし、よく攪拌して 100 °C で 3 時間、酸加水分解した。その後、試料を室温状態に置いて冷まし、別の試験管に移して試験管濃縮を行い乾固させた。それに、分析時の注入量 20 µl でおよそ 10 µg の糖量 (フェノール硫酸法による) が含まれるように超純水を加え、同様に 1 mg/ml の 2-Deoxyglucose (2-DG) 溶液が 2 µg 以上含まれるように加えた。このように調製した試料を ultrafree-MC フィルター (MILLIPORE) (< 0.5 µm) で濾過し、ディスポーザブルの 300 µl 容スナップバイアル (ジューエルサイエンス (株)) に入れた。

② 試料の分析

調製した試料は、高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC=High Performance Anion-exchange Chromatography) (Dionex 社) により分析した。480 mM NaOH で平衡化したカラムに、バイアルから 20 µl (糖量 10 µg---グルコース相当量) を注入後、480 mM NaOH 0.4 ml/min の流速で分析時間 50 分で行った。ピークの同定には、9 種類の標準物質 {溶出順にマンニトール (mannitol)、フコース (Fuc)、2-DG、アラビノース (Ara)、ラムノース (Rha)、ガラクトース (Gal)、グルコース (Glc)、キシロース (Xyl)、マンノース (Man)} の混合物 (以下スタンダード) を用いた。分析サンプルの本数が多くなるに従い、溶出時間が早くなる傾向が見られたため、スタンダードは分析の始めと分析試料のバイアルおよそ 5 本おきに 1 本、分析の最後に入れ、各糖の溶出時間を確認しながら同定した。分析条件は次のとおりである。

高速陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC=High Performance Anion-exchange Chromatography）（Dionex社）

分析カラム	Carbopac MA 1
ガードカラム	Carbopac MA 1 GUARD

糖アルコール分析メソッド 溶離液 480 mM NaOH

「溶出グラジエント」

時間（分）	流速（ml/分）	A液（%）
0	0.4	100
50	0.4	100

構成糖及び糖アルコール割合の算出

2-DG のピーク面積積分値から、試料中の中性糖（2-DG を除く 7 種類の糖）及びマンニトールの量とそれらの割合（wt %）を算出した。真の酸性糖量は、{カルバゾール硫酸法による酸性糖量（mg/ml）-中性糖量（mg/ml）x 0.23} で計算した。真の酸性糖量、中性糖量とマンニトール量を足した値を 100 %（wt %）として、それぞれの構成糖及び糖アルコールの割合を算出した。

(8) ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

①細胞培養

培養細胞:ヒト大腸ガン培養細胞、DLD-1 (接着系細胞) と COLO 201 (半浮遊系細胞) の2種類を用いた。

培地: 10 % FBS を含む RPMI 1640 培地を用いた。粉末 RPMI 1640 培地 1.04 g に蒸留水 100 ml を加え、よく攪拌した後、 NaHCO_3 0.135 g を入れ、よく攪拌し、0.22 μm フィルターでろ過滅菌し、11 ml FBS (牛胎児血清) を入れ、一晩冷蔵して、10 % FBS を含む RPMI 1640 培地として使用した。

②試料の添加:

96 wells シャレに 40 μl ずつ培地を入れ、計数板で計数した細胞数を 2×10^3 個/ml なるように 50 μl ずつに 96 wells シャレに植込んだ。継代直後、適当濃度で調節したサンプルを 10 μl ずつ添加した。

③細胞の生存率

細胞継代してから 3 日間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、インキュベーターで培養した。その後、細胞染色 WST-8 法⁽⁹⁻¹¹⁾で 3 時間染色後生細胞数をマイクロプレートリーダー MTP-450 (CORONA) を用い、測定波長 450 nm、対照波長 630 nm⁽¹²⁾ で吸光度を測定した。{(培地+試料+細胞の吸光度)-(培地+試料の吸光度)} / コントロールの吸光度 $\times 100$ % から細胞生存率を求めた。

第3節 実験方法と結果

3-1 ツルアラメ水溶性糖質の抽出

3-1-A. 図II-4に示す手順に従い5月採集乾燥された大間産ツルアラメを Retsch の超遠心粉砕機 (ZM-100) で粉砕した、粉末 500 g に蒸留水 5 L を加え、攪拌した後、遠心分離 (8000 rpm, 30 分, 4 °C) を行い、上清と沈殿に分けた。沈殿は再度蒸留水 5 L を加え、攪拌した後、遠心分離 (8000 rpm, 30 分, 4 °C) し、上清と沈殿に分けた。4 回同操作を繰り返した (合計 5 回)。全てのの上清を合わせ水溶性画分 (WS) とした。沈殿は回収した後、凍結乾燥し、水不溶性画分 (WIS) とした。そして、各画分から一部を採取し、フェノール硫酸法にてグルコース量として全糖量を、カルバゾール硫酸法にてガラクトツロン酸として酸性糖量を測定した。

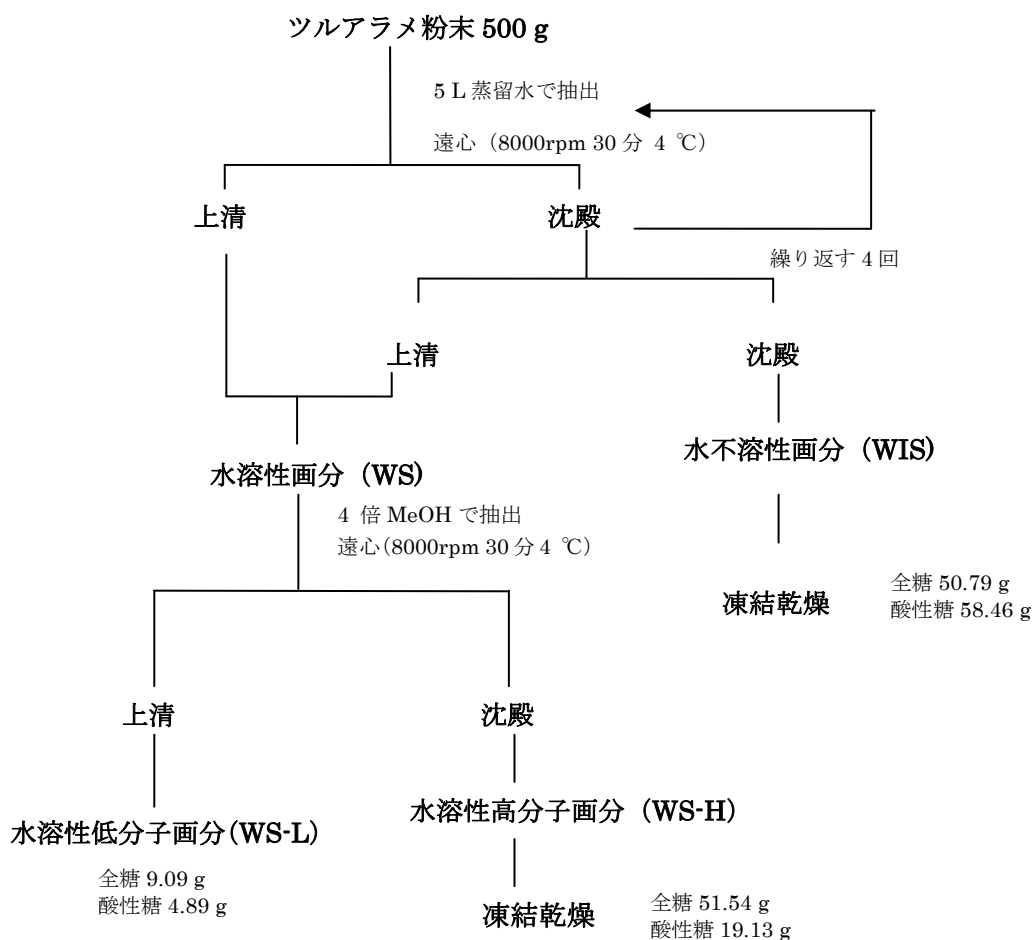


図 II-4 ツルアラメ水溶性糖質の抽出操作手順

3-1-B. 上述 3-1-A で得られた水溶性画分 (WS) を水溶性低分子画分 (WS-L) と水溶性高分子画分 (WS-H) を分けるためエバポレーターを用いて、一定量まで濃縮した後、4 倍量メタノールを加え、低温室にて半日ほど攪拌した。その後、遠心分離機にて遠心分離 (8000 rpm, 30 分, 4 °C) し、上清と沈殿とに分離した。上清は濃縮乾固後、一定量の蒸留水に溶解し、低分子画分 (WS-L) とした。一方、沈殿は凍結乾燥したところ、固型物として得られたので、固型物をミキサーで粉砕してから、適量の蒸留水に溶解し、高分子画分 (WS-H) として回収した。そして、水溶性画分より得られた低分子画分 (WS-L) 及び高分子画分 (WS-H) もまた同様にして全糖量と酸性糖を測定した。

水不溶性画分 (WIS) の糖量を測定するため、乾燥試料 10 mg を栓付き試験管にいれ、72 % 硫酸 0.5 ml を加え、ソニックバス中で一時間放置した。その後、硫酸濃度が 1.5 M になるように蒸留水を 4.5 ml 加え希釈した後、100 °C、3 時間加水分解した。室温で冷却後、遠心 (3000 rpm, 30 分, 室温)、遠心上清を適量取って、全糖量と酸性糖量を測定した。

表 II-1 ツルアラメ粉末 (500 g) に含まれる水溶性画分と水不溶性画分の糖量

	全糖量 (g)	酸性糖量 (g)
水溶性低分子 (WS-L)	9.09	4.89
水溶性高分子 (WS-H)	51.54	19.13
水不溶性画分 (WIS)	50.79	58.46

3-2 構成糖の分析

WS-L、WS-H 及び WIS を加水分解して構成糖を分析した。構成中性単糖の分析結果 (表 II-2) より、WS-L、WS-H 及び WIS のいずれもグルコースが主な構成中性糖成分として存在していることがわかった。また、水溶性高分子 (WS-H) は中性糖としてフコース、水不溶性画分 (WIS) はキシロースを、構成成分として比較的多く含むことがわかった。

表 II-2 ツルアラメに含まれる WS-L、WS-H 及び WIS 構成糖分析

Fraction	Sugar composition (wt %)						
	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
WS-L	7.3	0.5	1.2	6.0	83.4	0.1	1.4
WS-H	11.3	0.1	0.0	2.8	83.6	1.2	1.0
WIS	2.2	0.0	0.0	5.2	82.3	10.3	0.0

3-3 ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

ツルアラメ粉末から得た水溶性画分 (WS)、水溶性低分子画分 (WS-L)、及び水溶性高分子画分 (WS-H) それぞれを全糖 0.5 mg/ml の濃度でヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1 と COLO 201 に投与し、増殖に与える影響を調べた。結果を図 II-5 に示した。全糖 0.5 mg/ml の濃度で、水溶性画分 (WS)、水溶性低分子画分 (WS-L)、水溶性高分子画分 (WS-H) のいずれも DLD-1 及び COLO 201 の細胞増殖に対し強い抑制作用が認められた。

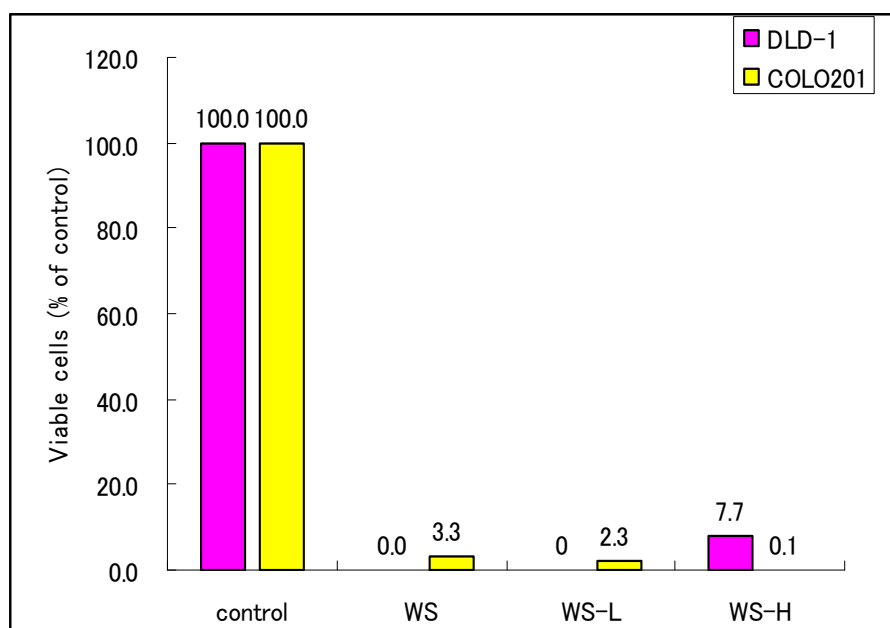


図 II-5 WS、WS-L 及び WS-H の大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響 (WS、WS-L 及び WS-H それぞれ全糖 0.5 mg/ml の濃度で投与し、3 日間培養後の生存細胞数から求めた。)

第 4 節 考察

1. ツルアラメに含まれる糖を、水溶性低分子画分 (WS-L)、水溶性高分子画分 (WS-H) 及び水不溶性画分 (WIS) の 3 画分に分けた。全糖含有率はそれぞれ粉末乾燥重量の 1.8%、10.3%、10.1%、酸性糖含有率はそれぞれ粉末乾燥重量の 0.98%、3.8%、11.7% であった。
2. 構成糖の分析により、ツルアラメの水溶性及び水不溶性糖質ともグルコースを主要構成成分としていることがわかった。
3. 水溶性画分、水溶性低分子画分及び水溶性高分子画分のいずれも全糖濃度 0.5 mg/ml でヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1、COLO 201 の両者の増殖に対して強い抑制作用をもつことがわかった。

参考文献：

- (1) Dubois M. et al: Anal. Chem, 28, P350(1956)
- (2) 桜井直樹ら：「植物細胞壁と多糖類」, 倍風館(1991)
- (3) Bitter T. and H. M.: Muir Anal, Biochem, 4 P330(1962)
- (4) 木村英生ら：地域農産素材等の機能性解明と高付加価値製品の開発, 山梨県工業技術センター, 研究報告, No.20 (2006)
- (5) 加藤陽治：杜仲葉の炭水化物組成, 弘前大学紀要, P164-171(2002.3)
- (6) 加藤陽治ら：リンゴ果実中のデンプン, 弘前大学教育学部教科教育紀要, 25 P13-21(1997)
- (7) HPAE-PAD 法による糖質の分析(第4版), 日本ダイオネクス株式会社(1999)
- (8) 加藤陽治ら：植物細胞壁多糖構成中性糖及び各種グルコ二糖の陰イオンクロマトによる分析, 弘前大学教育学部紀要, 94 P47-51(2005)
- (9) Kato Y. et al: Structural analysis of the oligosaccharide units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells., International Congress Series, 1223 P161-164(2001)
- (10) Tominaga H. et al: A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay, Anal. Commun., 36 P47(1999)
- (11) Miyamoto T. et al: Lymphocyte Proliferation Response During Eimeria tenella Infection Assessed by a New, Reliable, Nonradioactive Colorimetric Assay, Avian Dis, 46 P10(2002)
- (12) Yoshimura K. et al: Shiga toxin 1 and 2 Induce Apoptosis in the Amniotic cell line WISH, J. Soc. Gynecol. Investig, 9 P22(2002)

第Ⅲ章 ツルアラメ水溶性低分子画分の Bio-Gel P-2 による分画と得られた画分の分析

第1節 目的

第Ⅱ章でツルアラメ水溶性低分子画分(WS-L)はヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用が強いことを示した。本章では Bio-Gel P-2 によるゲルろ過法で分子の大きさによって分画して、得られた画分のヒト大腸ガン培養細胞の増殖抑制活性を調べた。

第2節 実験方法及び結果

2-1 水溶性低分子画分の分子量分布と分析

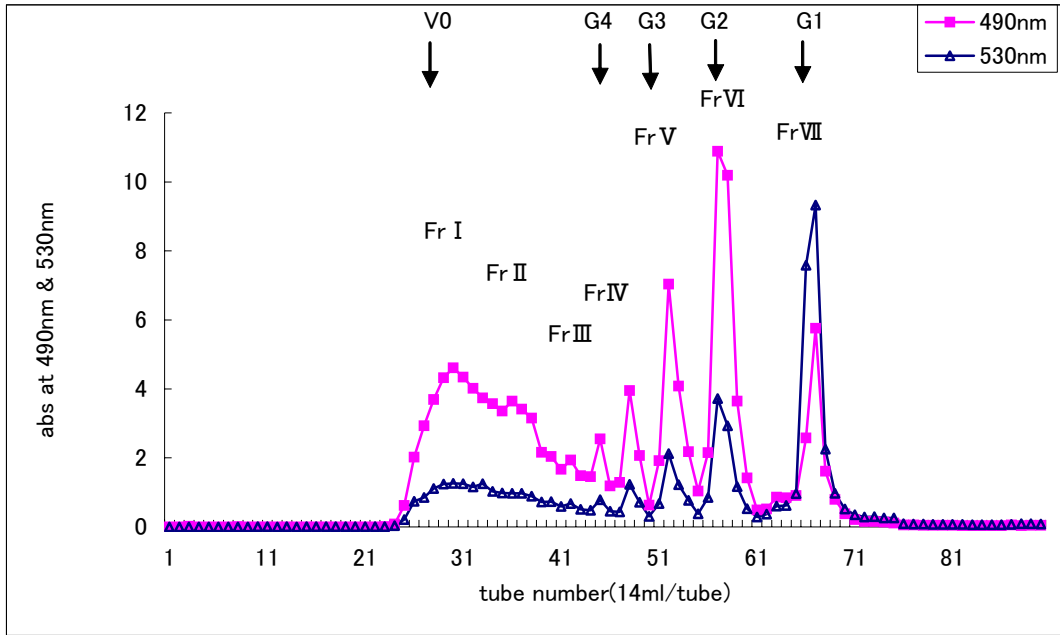
2-1-1 WS-L の Bio-Gel P-2 による分画

WS-L 10 ml、全糖 265.3 mg (グルコース相当量)、酸性糖 93.0 mg (ガラクトロン酸相当量)をあらかじめ蒸留水で平衡化しておいた Bio-Gel P-2 カラム (5×66 cm)にのせ、蒸留水で溶出した。溶出液は 13.6 ml ずつ集め、その中から適当量を取り、フェノール硫酸法によって全糖量とカルバゾール硫酸法によって酸性糖量を測った。結果を図Ⅲ-1 に示す。

WS-L の Bio-GelP-2 は図Ⅲ-1 に示すように、Bio-Gel P-2 による溶出順 (分子の大きい順) で Fr I ~FrVIIに分けた。それぞれ標準糖溶出位置から、Fr I の分子量は 2000 以上、FrVIIは 200 ぐらいである。FrIV、V、VI、VIIの溶出位置はマルトテトラオース (Maltotetraose) 4 糖、マルトトリオース (Maltotriose) 3 糖、シュクロース (Sucrose) 2 糖及びグルコース (Glucose) 単糖の溶出位置とほぼ同じなので、FrIV、V、VI及びVIIはそれぞれ 4 糖、3 糖、2 糖及び単糖と考えられた。

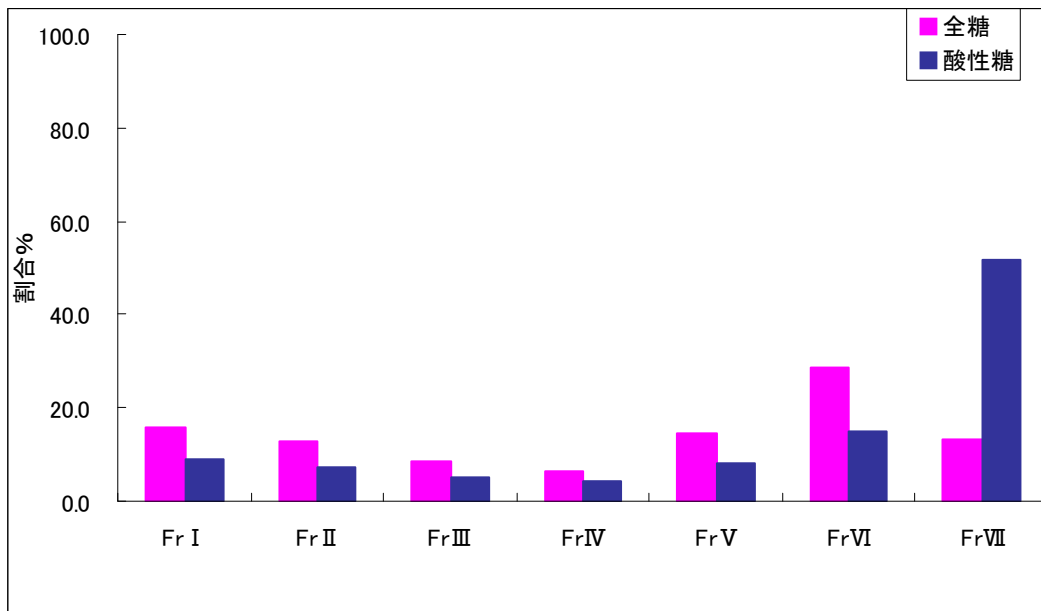
1 回での分画量には限界があるので、多量の分画試料を得るため、WS-L の Bio-GelP-2 の溶出は 13 回を行った、13 回それぞれのフラクションを集め、全糖量と酸性糖量を測定した。Fr I、Fr II、Fr III、FrIV、Fr V、FrVI、FrVII全糖量はそれぞれ 337.7mg、272.2 mg、183.5 mg、142.2 mg、315.5 mg、618.2 mg、280.3 mg で、酸性糖量はそれぞれ 81.8 mg、65.7 mg、45.3 mg、37.3 mg、72.4 mg、135.8 mg、472.5 mg であった。

図Ⅲ-2 に示すように、各画分全糖量の比率は Fr I : Fr II : Fr III : FrIV : FrV : FrVI : FrVII = 15.7 : 12.7 : 8.5 : 6.6 : 14.7 : 28.8 : 13.0 であった、FrVI の全糖量は WS-L 全糖量の約 1/4 を占めた。酸性糖の比率はそれぞれ 9.0 : 7.2 : 5.0 : 4.1 : 7.9 : 14.9 : 51.9 を占め、FrVIIは酸性糖の含有量も一番多く、WS-L 全部の酸性糖の約 1/2 を占めた。



図III-1 WS-LのBio-Gel P-2による分画

(試験管番号 24-35、36-39、40-46、47-50、51-55、56-61、62-72 をそれぞれ集め、Fr I、Fr II、Fr III、Fr IV、Fr V、Fr VI、Fr VIIをとした。図に示す G4、G3、G2、G1 はそれぞれ標準糖の 4 糖、3 糖、2 糖、単糖の溶出位置を示す。)



図III-2 WS-LのBio-Gel P-2にて分画後得られた各画分の全糖、酸性糖の割合

2-1-2 構成糖の分析

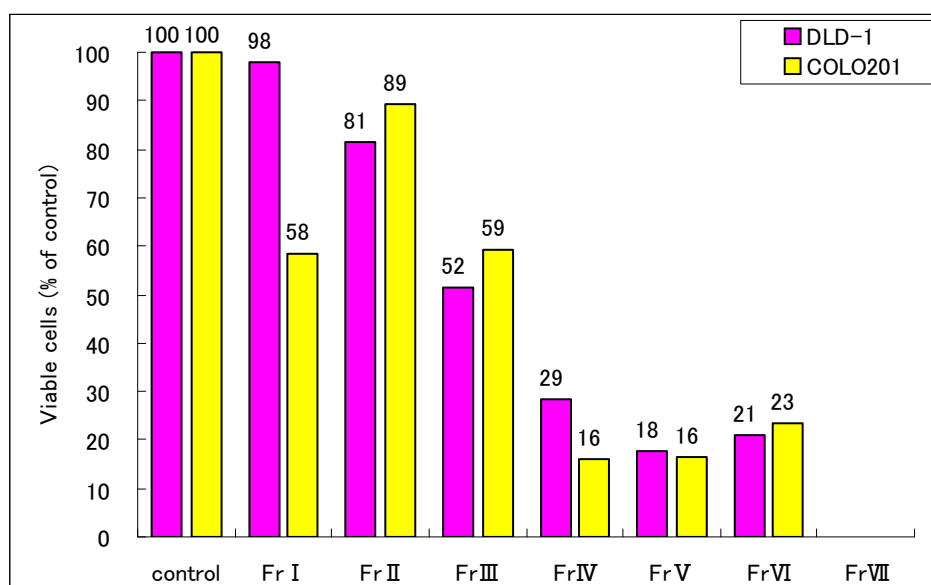
ツルアラメ WS-L の Bio-Gel P-2 による分画画分加水分解構成糖分析の結果を表Ⅲ-1 にまとめた。結果より、Fr I、Fr II、Fr III、Fr IV はグルコースの量が全中性糖の 95 % 以上を占めて、Fr V、Fr VI はグルコースのほか、ガラクトースが 10 % 以上を占めて、マンノース、フコースも含んでいる。Fr VII はフコースが 56 % で、グルコース、ガラクトース、アラビノース、ラムノース、マンノースも有していることがわかった。

表Ⅲ-1 ツルアラメの WS-L の Bio-Gel P-2 による分画で得られた画分の構成糖分析

Fraction	Sugar composition (wt %)						
	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
Fr I	1.7	0.0	0.7	0.4	95.0	0.7	1.5
Fr II	0.0	0.0	0.4	0.3	99.0	0.0	0.3
Fr III	0.0	0.0	0.1	0.0	99.9	0.0	0.0
Fr IV	0.2	0.0	0.2	0.2	98.9	0.1	0.4
Fr V	0.0	0.1	0.0	18.6	80.7	0.1	0.5
Fr VI	0.5	0.0	0.0	14.3	84.7	0.2	0.3
Fr VII	56.2	3.9	1.6	5.2	32.3	0.0	0.8

2-1-3 ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

得られた各画分 Fr I、Fr II、Fr III、Fr IV、Fr V、Fr VI、Fr VII について、全糖濃度 1 mg/ml によるガン培養細胞 DLD-1 と COLO 201 増殖への影響を調べた。



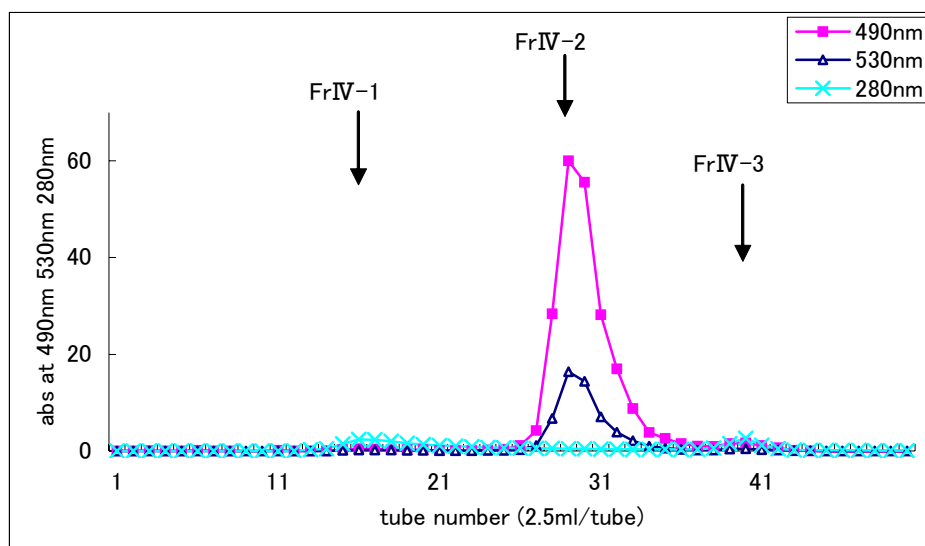
図Ⅲ-3 Fr I ~ Fr VII の大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

結果を図III-3に示した、図III-3より、分子量小さい画分 (FrIV、FrV、FrVI、FrVII)の方が増殖抑制活性が強い傾向にあると認められた。特にFrVIIは投与すると、ガン培養細胞は全部死滅してしまった。

2-2 糖の精製及び分析

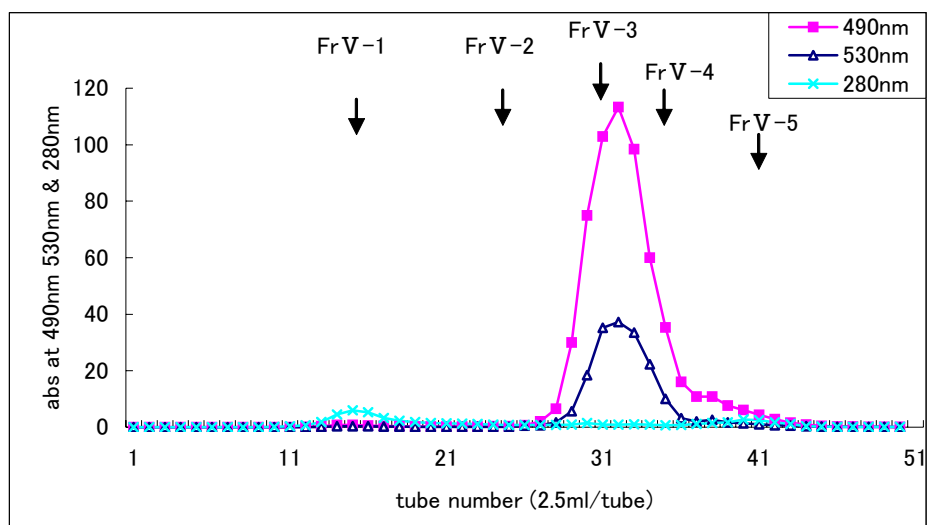
2-2-1 FrIV、FrV、FrVI、FrVIIの精製

WS-LのBio-GelP-2 (5×66 cm)の分画で得られた画分FrIV、FrV、FrVI、FrVIIはヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制が強いことがわかった。しかしオリゴ糖分析により、これらの画分はまだ単一でなく、混合物が入っていることが確認されたので、詳しく分析するために、再度Bio-Gel P-2 (2.5×20 cm)により精製した。溶出液は2.5 ml ずつ集め、その中から適当量取り、全糖と酸性糖の量によって集めた、結果を図III-4、図III-5、図III-6、図III-7に示した。

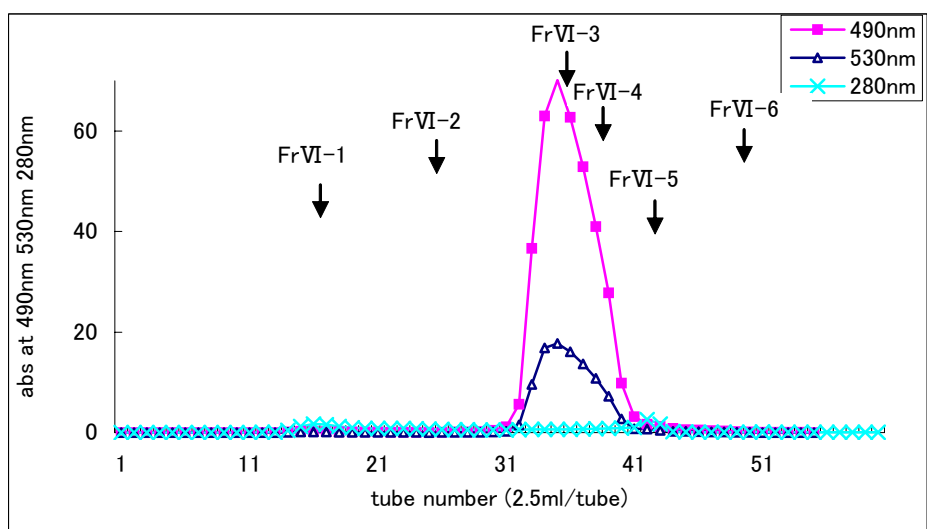


図III-4 FrIVのBio-Gel P-2による精製

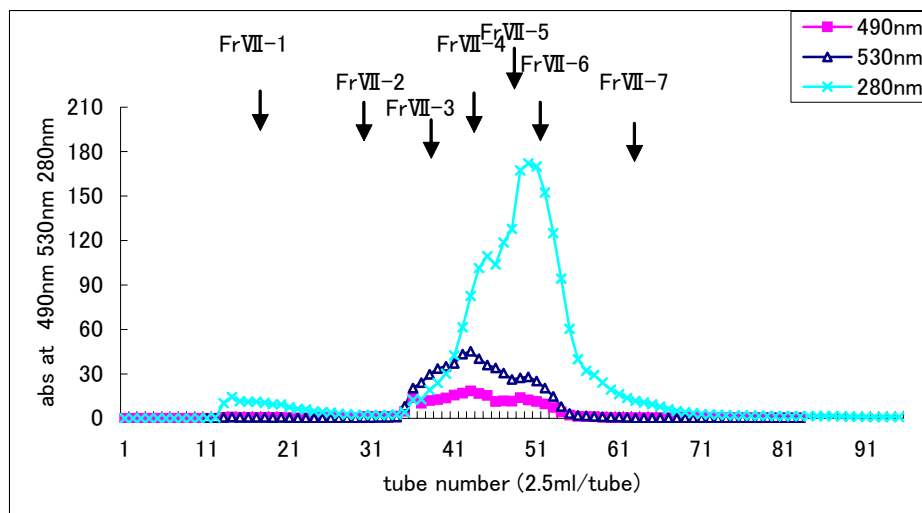
(試験管番号 13-23、24-37、38-43 をそれぞれ集め、
FrIV-1、FrIV-2、FrIV-3 をとした。)



図III-5 Fr Vの Bio-Gel P-2 による精製
 (試験管番号 13-18、22-28、29-34、35-37、38-46
 をそれぞれ集め、Fr V-1、Fr V-2、Fr V-3、
 Fr V-4、Fr V-5 をとした。)



図III-6 Fr VIの Bio-Gel P-2 による精製
 (試験管番号 14-20、21-29、29-34、30-33、34-38、
 39-41、42-46 をそれぞれ集め、Fr VI-1、Fr VI-2、
 Fr VI-3、Fr VI-4、Fr VI-5、Fr VI-6 をとした。)



図III-7 FrVIIのBio-Gel P-2による精製

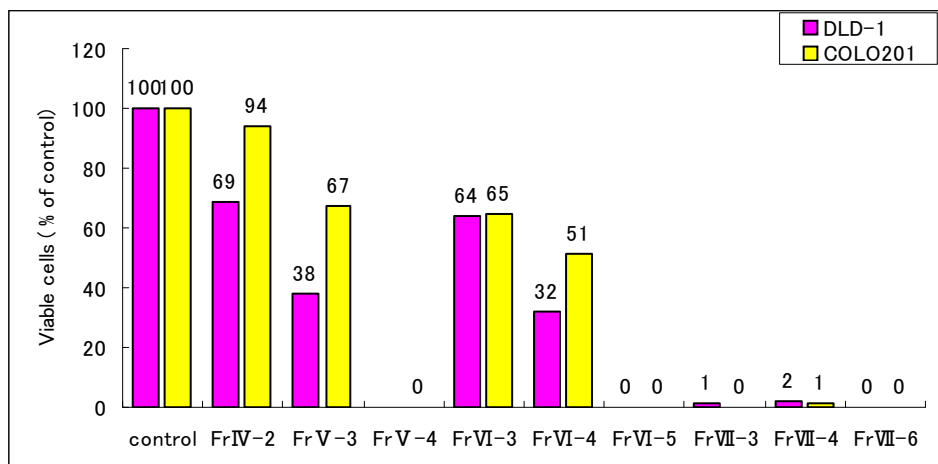
(試験管番号 12-35、 36-37、 38-41、 42-46、 47-48、
49-54、 55-70 をそれぞれ集め、FrVII-1、FrVII-2、
FrVII-3、 FrVII-4、 FrVII-5、 FrVII-6、 FrVII-7 をとした。)

各々の図から判るようにFrIVはFrIV-2(図III-4)を、FrVはFrV-3、-4(図III-5)を、FrVIはFrVI-3、-4及び-5(図III-6)を、FrVIIはFrVII-3、-4、-5及び-6(図III-7)をそれぞれ主要画分として得られた。

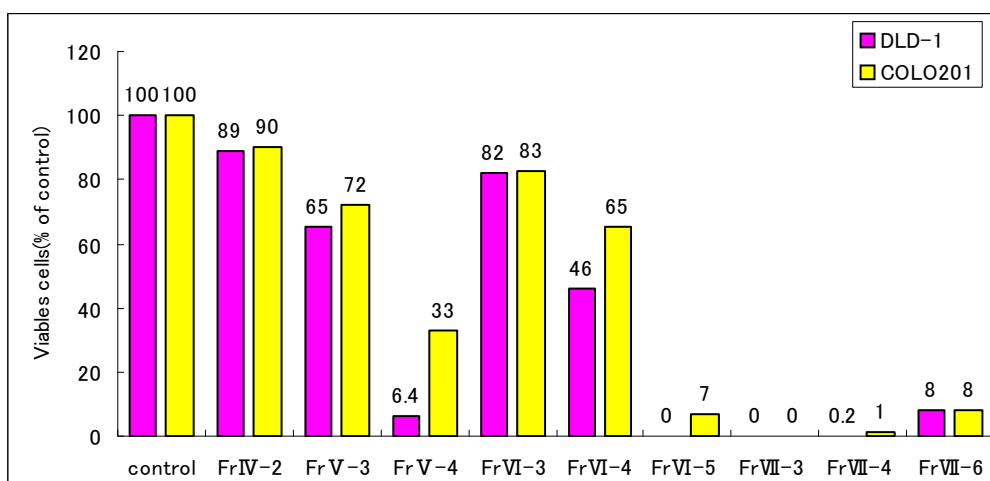
2-2-2 ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

FrIV、FrV、FrVI、FrVIIのBio-Gel P-2(2.5×20 cm)により精製した得られた主要画分FrIV-2、V-3、V-4、VI-3、VI-4、VI-5、VII-3、VII-4、及びVII-6について、全糖濃度1 mg/ml、0.5 mg/mlによるガン培養細胞DLD-1とCOLO 201増殖への影響を調べた。

全糖濃度1 mg/mlでFrIII-2~FrVII-6ガン培養細胞増殖に与える影響を調べた結果を図III-8に、全糖濃度0.5 mg/mlでの結果を図III-9に示した。FrIV、V、VI、VIIをBio-Gel P-2で精製して得られた主要画分それぞれを1 mg/mlの濃度でFrV-4、FrVI-5、FrVII-3、-4及び6は強い増殖抑制活性を示した。濃度を半分して0.5 mg/mlの投与でも強い増殖抑制活性を示した。特に、FrVIIから精製した画分FrVII-3、FrVII-4、FrVII-6は細胞に投与すると、細胞はほとんど死滅した。



図III-8 精製した主要画分 FrIV-2~FrVII-6 (1 mg/ml) のガン培養細胞増殖に与える影響



図III-9 精製した主要画分 FrIV-2~FrVII-6 (0.5 mg/ml) のガン培養細胞増殖に与える影響

第3節 考察

一般に褐藻類に含まれる多糖は細胞壁多糖として、(1)セルロース： β -D-グルコースが1,4-結合したグルカン系多糖、(2)アルギン酸： β -D-マンヌロン酸と α -L-グルロン酸が種類の割合で結合した多糖、(3)フコイダン：褐藻類に属する海藻に含まれる硫酸化多糖の総称で、それらの構成糖には硫酸化L-フコースが含まれ、種類によって組成が異なりウロン酸やガラクトースも含み、少量のキシロース、マンノース、ラムノースなども含む多糖。貯蔵多糖として、ラミナラン： β -D-グルコースが主に1,3-結合した多糖、(1,6)結合も存在、マンニトールも結合が知られている。

ツルアラメ WS-L のゲルろ過分画で得られた Fr I、Fr II、Fr III、Fr IV はグルコースの量 95% 以上を占めているので、Fr I、Fr II、Fr III、Fr IV はグルコースを主鎖としたグルカン系オリゴ糖が主に存在することが考えられた。Fr V、Fr VI はグルコースのほか、ガラクトースは 10% 以上を占めて、マンニトール、マンノース、フコースなども存在している。Fr VII はフコースが 56% で、グルコース、ガラクトース、アラビノース、ラムノース、マンノースも有していることがわかった。これより Fr V、Fr VI、Fr VII はグルカン系オリゴ糖のほか、フコイタン系オリゴ糖なども存在していると考えた。

これらの画分をヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1 と COLO 201 に投与した結果、水溶性低分子画分の中でもより低分子量の糖質がヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用を持つことがわかった。

第IV章 ツルアラメ水溶性低分子画分 (WS-L) のイオン交換樹脂による分画 と得られた画分の分析

第1節 目的

第III章において分子量によって分けた各画分の分析により、低分子量画分（グルカン系オリゴ糖、フコイダン系オリゴ糖を含む）はヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1 及び COLO 201 増殖抑制活性が強いことがわかったが、低分子量のグルカン系オリゴ糖、フコイダン系オリゴ糖どちらが活性を持つのかを確認するため、本章では DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィーにて、吸着画分と非吸着画分とに分け、ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響及び糖の分析を進めた。

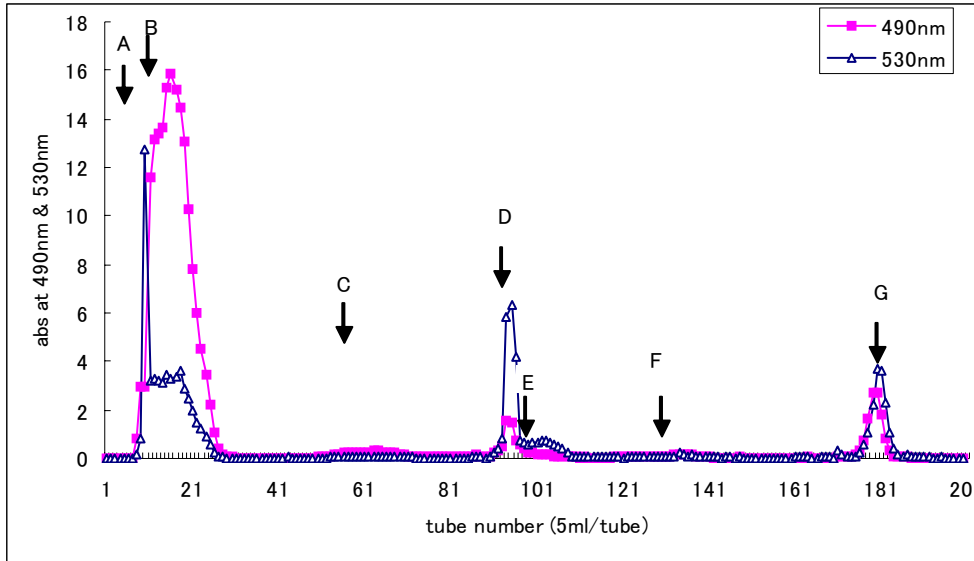
第2節 実験方法及び結果

2-1 WS-L の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィーによる分画及び Bio-Gel P-2 による脱塩

2-1-1 WS-L の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィーによる分画

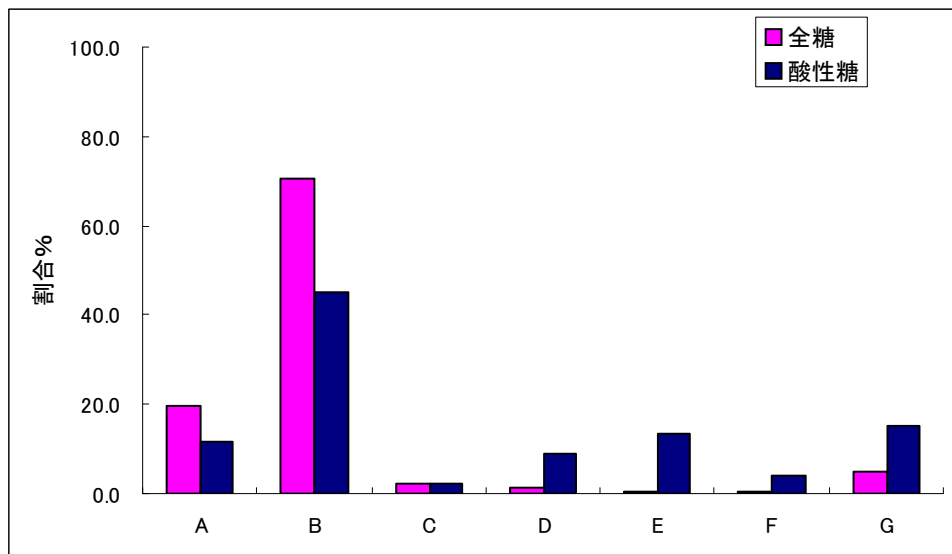
適量の WS-L を濃縮乾固させた後、適量の NaOAc で溶解した後、遠心 (4500 rpm, 30 分, 20 °C) した、遠心上清 5 ml、全糖 86.6 mg (グルコース相当量)、酸性糖 35.8 mg (ガラクトン酸相当量) を、あらかじめ 50 mM NaOAc (pH 5.5) で平衡化しておいた DEAE-Sephadex A-25 (2.5 × 20cm) に乗せ、200 ml の 50 mM NaOAc 緩衝液で非吸着成分を溶出した後、200 ml の 0.2 M NaCl、200 ml の 0.5 M NaCl、200 ml の 1.0 M NaCl、200 ml の 1.0 M NaOH で吸着成分を順次に溶出した。試験管に 5 ml ずつを集め、この中から適量を取って、全糖量及び酸性糖量を測った。結果を図IV-1 に示した。各画分 A、B、C、D、E、F、G 収量、全糖それぞれ 8.1mg、29.2 mg、1.0 mg、0.6 mg、0.2 mg、0.2mg、2.1 mg で、酸性糖それぞれ 1.7 mg、6.7 mg、0.3 mg、1.3 mg、2.0 mg、0.6 mg、2.2 mg であった、各画分糖量の割合を図IV-2 にまとめた。

非吸着画分 (A、B) が全糖量は約全体の 91 % を占め、酸性糖量は約 56 % を占め、吸着画分より多いことがわかった。



図IV-1 WS-L DEAE-Sephadex A-25 による分画

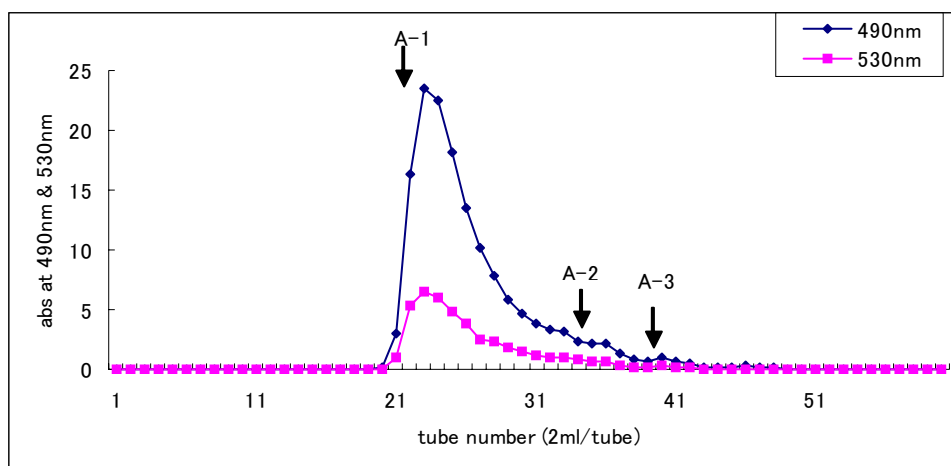
(試験管番号 7-14、15-27、50-73、91-97、98-107、130-141、
及び 175-185 を、それぞれを集め、画分 A~G をとした。)



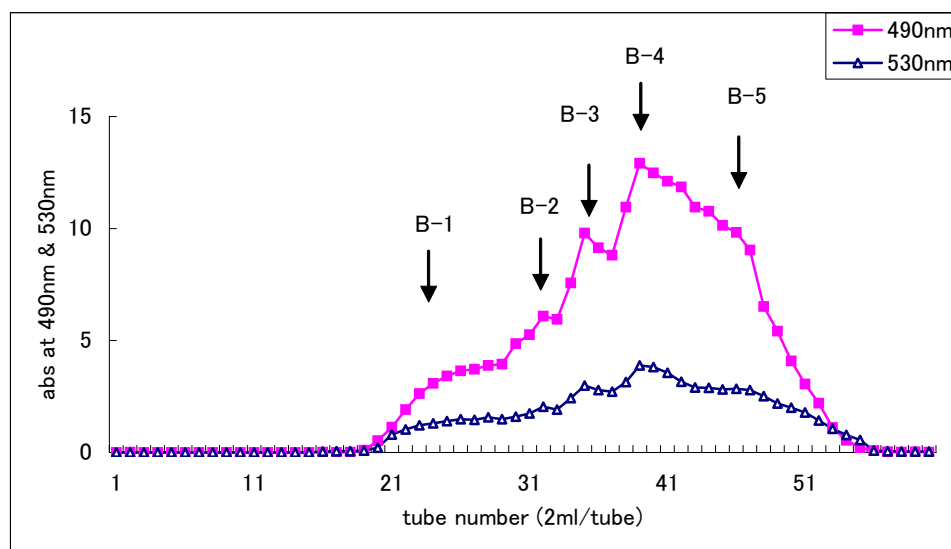
図IV-2 WS-L の DEAE-Sephadex A-25 分画にて得られた画分全糖及び酸性糖量の割合

2-1-2 WS-L の DEAE-Sephadex A-25 で得られた画分の Bio-Gel P-2 による脱塩

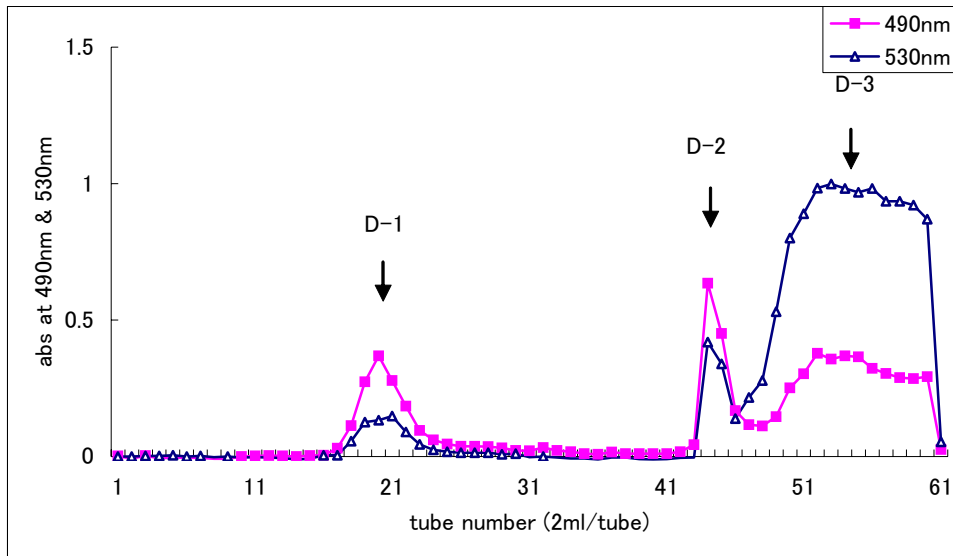
WS-L の DEAE-Sephadex A-25 で得られた主要画分 A、B、D、E、G ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響及び構成糖を分析するため、DEAE-Sephadex A-25 の分画で得られた各画分に含まれる緩衝液及び食塩等を除くこととした。各画分をそれぞれ Bio-Gel P-2 (2.5×25 cm) にかき、蒸留水で溶出した。溶出液は 2 ml ずつを集めた。結果をそれぞれ図IV-3、IV-4、IV-5、IV-6、IV-7 のように集めた。



図IV-3 画分AのBio-Gel P-2による脱塩
 (試験管番号 19-39、40-44、45-49 をそれぞれ集め、
 画分 A-1、A-2、A-3 をとした。)

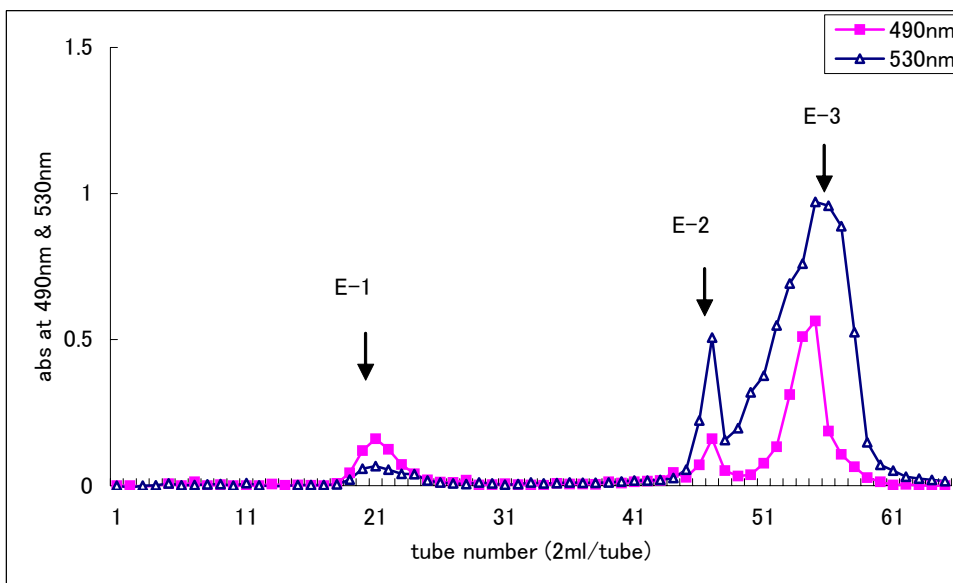


図IV-4 画分BのBio-Gel P-2による脱塩
 (試験管番号 19-29、30-33、34-37、38-56 を
 それぞれ集め、画分 B-1、B-2、B-3、B-4 をとした。)



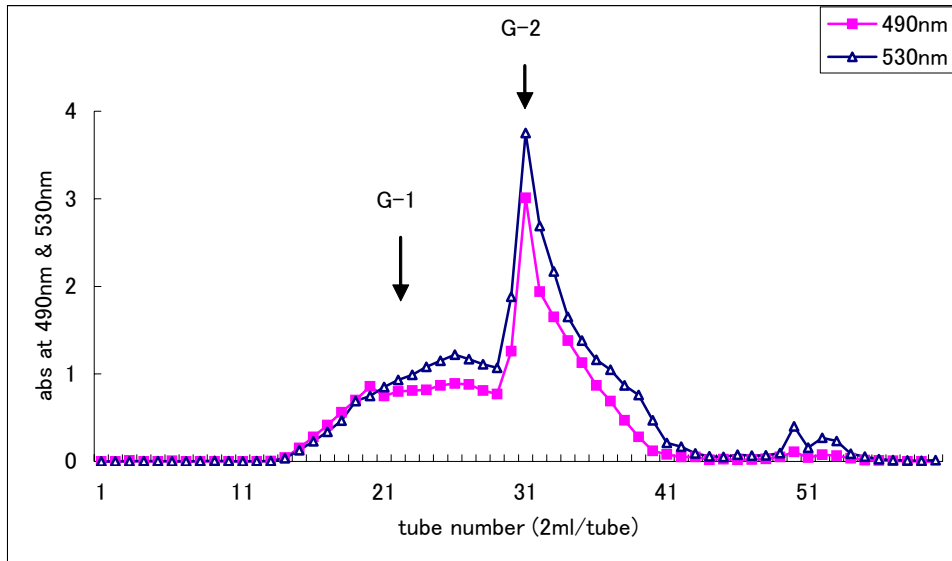
図IV-5 画分D Bio-Gel P-2による脱塩

(試験管番号 16-24、43-46、47-60 をそれぞれ集め、画分D-1、D-2、D-3をとした。)



図IV-6 画分EのBio-Gel P-2による脱塩

(試験管番号 19-24、44-49、50-60 をそれぞれ集め、画分E-1、E-2、E-3をとした。)



図IV-7 画分 G の Bio-Gel P-2 による脱塩

(画分 G を酢酸で中和した後、Bio-Gel P-2 に供した。試験管番号 14-29、30-42 をそれぞれ集め、画分 G-1、G-2 をとした。)

2-2 構成糖の分析

WS-L の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィーによる分画して得られた画分を、さらに Bio-Gel P-2 により脱塩して得られた主要画分 A-1、B-1～-4、D-3、E-3、及び G-1～G-2 を加水分解して構成糖を分析した。結果を表IV-1 に示す。

表IV-1 WS-L の DEAE Sephadex A-25 クロマトグラフィー分画で得られた主要画分の構成糖分析

Fraction	Sugar composition (wt%)							
	Mannitol	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
A-1	9.8	0.0	0.0	0.0	0.3	89.9	0.0	0.0
B-1	8.7	0.0	0.1	0.0	0.4	90.5	0.0	0.2
B-2	20.5	0.0	0.1	0.0	0.1	79.3	0.0	0.0
B-3	31.1	0.0	0.0	0.0	4.2	64.8	0.0	0.0
B-4	74.2	0.0	0.1	0.0	2.3	23.4	0.0	0.0
D-3	0.0	0.0	0.0	9.3	21.3	44.0	0.0	25.3
E-3	99.5	0.0	0.0	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0
G-1	0.0	3.2	2.2	0.0	10.0	72.0	12.6	0.0
G-2	47.9	0.0	0.0	0.0	0.3	51.7	0.1	0.0

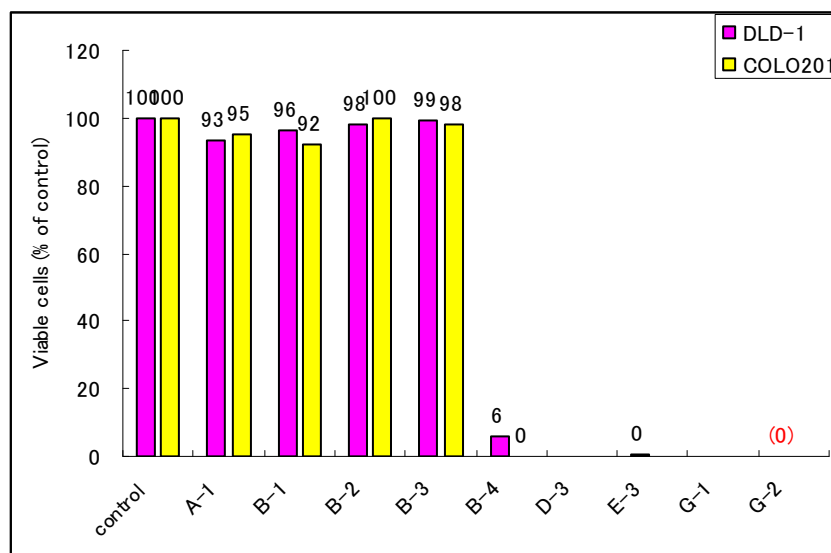
表IV-1 より、非吸着画分 A-1 及び B-1、-2、-3、-4 の構成糖は主にグルコースで、マンニト

ール、ガラクトースも含まれることがわかった。0.5 M NaCl で溶出の画分 D-3 の構成糖はグルコース、ガラクトースのほか、マンノース、ラムノースも非常に多く含むことがわかった。G-1、-2 はグルコース以外に、フコース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、ラムノースなども含まれることがわかった。

2-3 ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

次に得られた主要画分 A-1, B-1, -2, -3, -4, D-3, E-3, G-1, -2 それぞれを全糖 1 mg/ml の濃度でヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1 と COLO 201 に投与し、増殖に与える影響を調べた。

結果を図IV-8 に示した。結果より、全糖 1 mg/ml の濃度で、B-4, D-3, E-3, G-1, -2 が DLD-1 及び COLO 201 に対する細胞増殖抑制作用が非常に強いことがわかった。



図IV-8 A-1～G-2 の大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

第3節 考察

WS-L の DEAE-Sephadex A-25 による分画で得られた非吸着画分 (A、B) の全糖量は約全体の 91% を占め、構成糖は主にグルコースで、マンニトール、ガラクトースも含まれることがわかった。この画分はガン培養細胞 DLD-1 及び COLO 201 の増殖に対して、全糖 1 mg/ml の濃度で活性が認められなかった。

WS-L の DEAE-Sephadex A-25 による分画で得られた吸着画分の全糖と酸性糖の比率から、吸着画分はほぼ酸性糖であることがわかった。ヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用活性も強かった。酸性糖のほか、構成中性糖から見ると、0.5 M NaCl で溶出の画分 D-3 の構成糖はグルコース、ガラクトースのほか、マンノース、ラムノースも非常に多く含むことがわかった。G-1、-2 はグルコース以外に、フコース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、ラムノースも含まれることがわかった。

これらの結果より、WS-L の中に含まれるヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用をもつ糖質は、酸性オリゴ糖即ちフコイダン系オリゴ糖の可能性が示唆された。

第V章 ツルアラメ水溶性高分子画分(Ws-H)糖質の分画及び得られた画分の分析

第1節 目的

ヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用を調べたところ、ツルアラメ水溶性高分子画分(Ws-H)を全糖 1 mg/ml の濃度で投与すると、強い増殖抑制作用が認められた(第II章)。Ws-Hのどの成分が活性作用を有するのかを調べることにした。

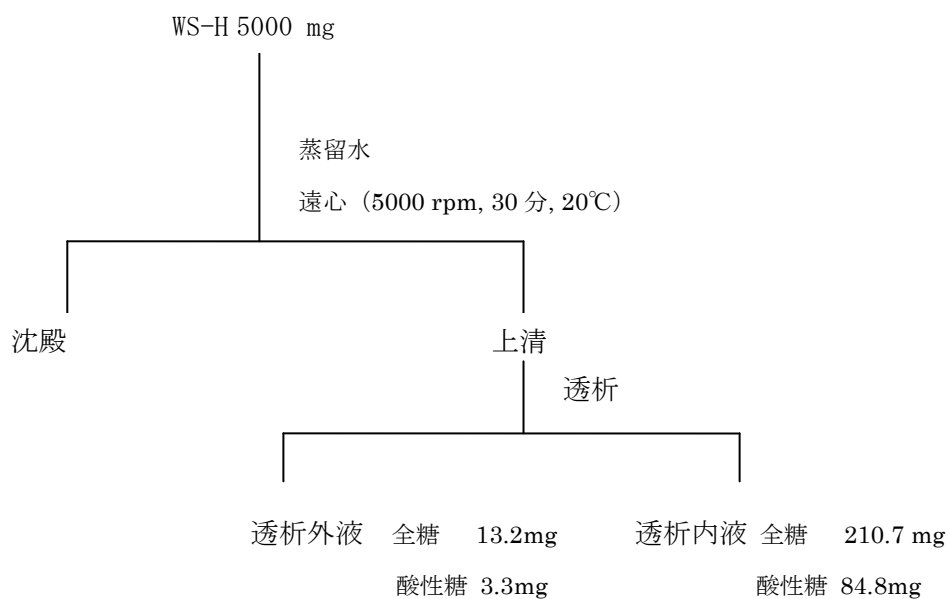
第2節 実験材料

Ws-Hの凍結乾燥物をミキサーで粉末して、適量蒸留水に溶解し、遠心(5000 rpm, 3分, 20℃)、遠心上清を材料とした。

第3節 実験方法と結果

3-1 Ws-H透析外液と透析内液の分析

3-1-1 Ws-Hの透析による分画



図V-1 Ws-Hの透析手順

図V-1 の手順のようにツルアラメ水溶性高分子画分 (WS-H) 5000 mg に 30 ml 蒸留水を加え、攪拌した後、遠心分離 (5000 rpm, 30 分, 20 °C) を行い、上清と沈殿に分けた。上清の全糖と酸性糖量を測ってから、VISKASE SALES CORP の透析膜 (Sea mless Cell ulose Tubing 24/32) で 300 ml 蒸留水の中に透析 (低温室、12 時間) をした。透析は全部で 4 回を行った、それぞれの外液を合わせ、透析外液とした。透析膜内の液は透析内液をとした。そして、透析外液と透析内液の一部をとって、フェノール硫酸法にてグルコース量として全糖量とカルバゾール硫酸法にてガラクトロン酸として酸性糖量を測定した。

表V-1 ツルアラメ WS-H 5000 mg 透析外液 (低分子) と透析内液 (高分子) の糖量及び割合

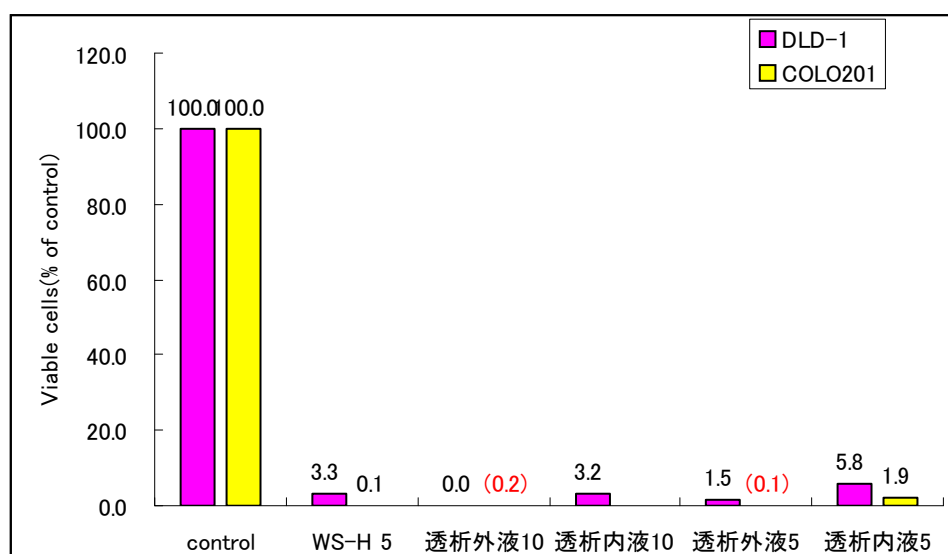
	全糖量 mg	全糖割合%	酸性糖量 mg	酸性糖割合%
透析外液	13.2	5.9	3.3	3.7
透析内液	210.7	94.1	84.8	96.3

ツルアラメ水溶性高分子画分 (WS-H) 5000 mg 透析外液と透析内液の糖量及び割合は表V-1 に示す。

表V-1 により WS-H の中に透析外液全糖と酸性糖の比率はそれぞれ 5.9 %、3.7 %であった、透析内液 (高分子画分) 全糖と酸性糖の比率はそれぞれ 94.1 %、96.3 %を占め、透析内液方が全糖、酸性糖量ともが高いことが確認された。

3-1-2 透析外液と透析内液ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

得られた透析外液と透析内液は全糖の濃度によって、ヒト大腸ガン培養細胞の増殖抑制作用の全糖濃度依存性を調べた、結果は図V-2 に示す。



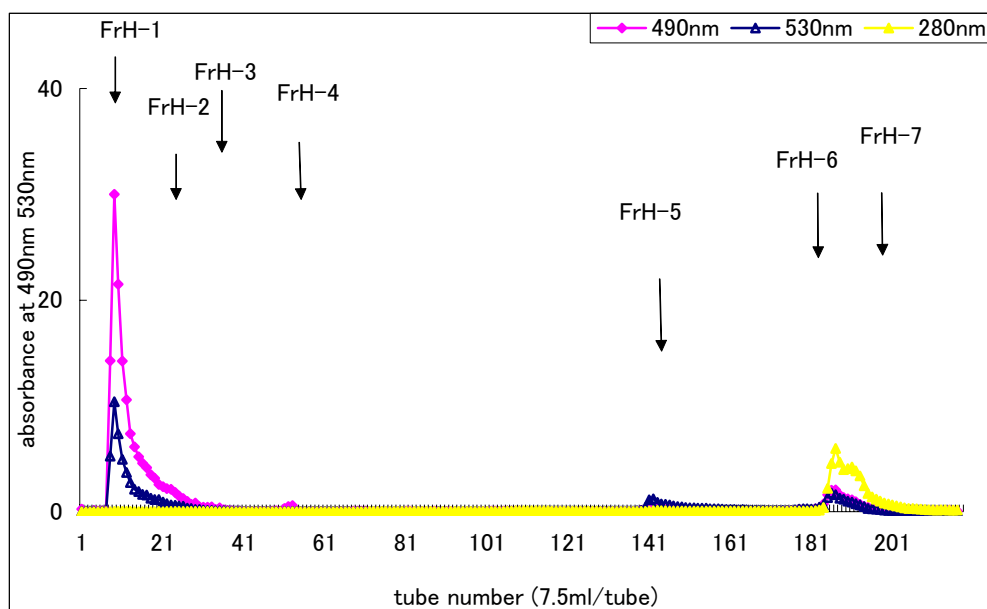
図V-2 透析内液、透析外液ガン培養細胞増殖に与える影響

図V-2により、0.5 mg/mlの全糖濃度で投与しても、WS-H及び透析外液、透析内液ともガン培養細胞増殖抑制作用が強いことが示された。収量の多い透析内液、即ち低分子物質を除去した高分子画分を用いて以下実験を進めた。

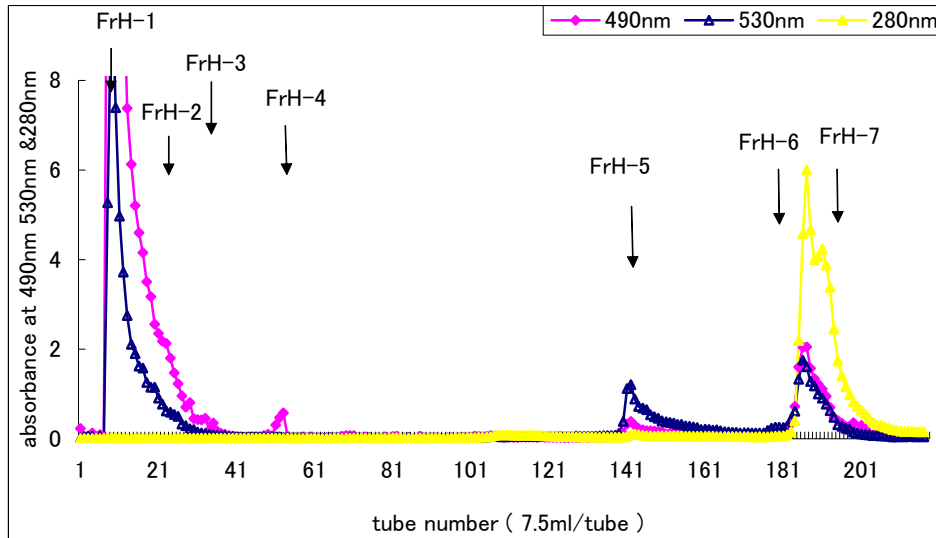
3-2 WS-H糖の分離及び分析

3-2-1 WS-HのDEAE-Sephadex A-25による分画

分析を進めるため、DEAE-Sephadex A-25による分画を行った。適量のWS-H透析内液、全糖100.0 mg(グルコース相当量)、酸性糖40.67 mg(ガラクトツロン酸相当量)をDEAE-Sephadex A-25(2.5×29cm)にかけて、50 mM NaOAc、0.2 M NaCl、0.5 M NaCl、1.0 M NaCl、1.0 M NaOH 300 mlずつ、順番に溶出した。溶出液は7.5 mlずつを集め、この中から適量を取って、全糖及び酸性糖量を測った。その結果を図V-3に示す。

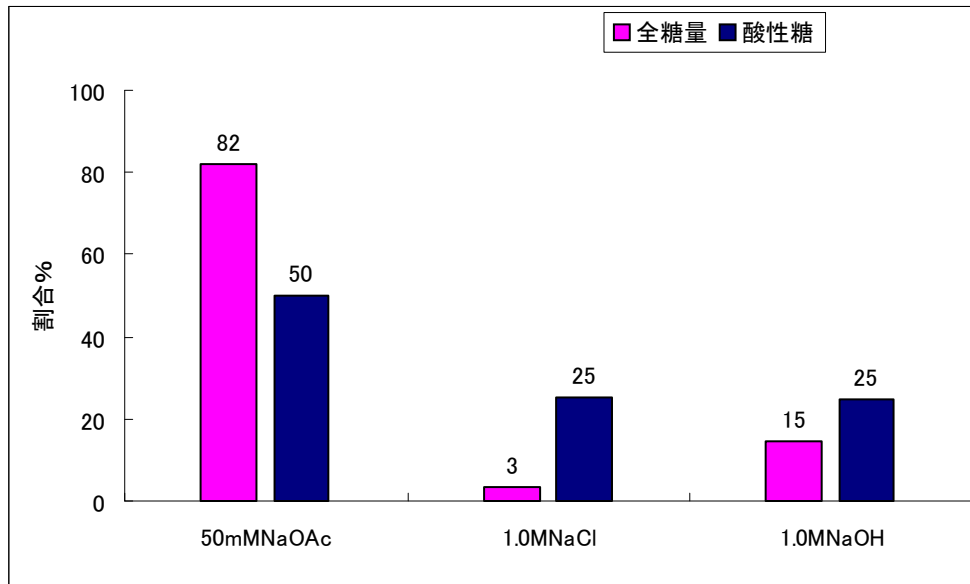


図V-3 WS-HのDEAE-Sephadex A-25による分画



図V-4 WS-H の DEAE-Sephadex A-25 による分画図の拡大
 (試験管番号 8-20、21-28、29-38、48-54、138-174、175-181
 及び 182-198 をそれぞれ画分 FrH-1、FrH-2、FrH-3、FrH-4、
 FrH-5、FrH-6、FrH-7 をとした。)

さらに得られた各画分の糖量を調べた結果を図V-5 に示した。



図V-5 WS-H DEAE-Sephadex A-25 による分画画分糖の割合

図V-5 より、DEAE-Sephadex A-25 カラムに非吸着画分(50 mM NaOAc の溶出液で溶出画分 FrH-1、FrH-2、FrH-3)が全糖量の約 81.9 % を占めた。酸性糖から見ても非吸着画分の方の割合は大きく、約 50 % を占めた。吸着画分の酸性糖が全糖より割合が高いことがわかった。

3-2-2 構成糖及び糖アルコールの分析

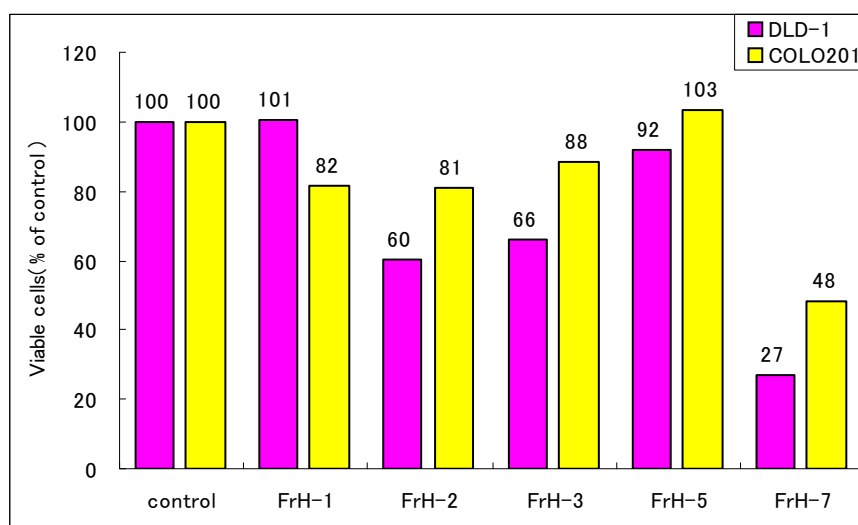
WS-H の DEAE-Sephadex A-25 により分画して得られた各画分を加水分解して、構成糖及び糖アルコールの分析を行った、その結果を表V-2 にまとめた。

表V-2 WS-H の DEAE-Sephadex A-25 による分画で得られた画分の構成糖の分析

画分	Sugar composition (wt %)							
	Mannitol	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
WS-H	10.9	6.5	0.1	0.0	1.5	78.7	1.9	0.4
FrH-1	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	98.8	0.0	0.0
FrH-2	2.5	0.8	0.8	0.0	1.1	93.4	1.4	0.0
FrH-3	0.0	12.3	0.0	0.0	0.2	85.9	1.6	0.0
FrH-5	31.7	19.0	0.0	0.0	0.0	35.6	10.3	3.5
FrH-7	0.0	64.3	0.0	0.0	11.5	19.2	5.0	0.0

画分の中性構成単糖及び糖アルコールの分析結果(表V-2)より、非吸着画分 FrH-1、FrH-2、FrH-3 は中性糖としてグルコースが 85%以上を占め、マンニトール、フコース、ガラクトース、キシロース、なども含んでいることがわかった。吸着画分 FrH-5 のマンニトール、グルコース、フコース、キシロース、の比率は 3 : 3 : 2 : 1 であった。FrH-7 はフコース含有量非常に高く、グルコース、ガラクトース、キシロースも構成成分として存在しているとわかった。

3-2-3 ヒト大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響



図V-6 WS-H の各画分 (1mg/ml) の大腸ガン培養細胞の増殖に与える影響

ツルアラメ水溶性高分子画分(WS-H)の DEAE-Sephadex A-25 による分画で得られた FrH-1、FrH-2、FrH-3、FrH-5、FrH-7 を透析膜で脱塩した後、ガン培養細胞増殖への影響を調べた、図 V-6 に示したように全糖 1 mg/ml の濃度で FrH-7 にガン培養細胞増殖抑制作用が認められた。

第 4 節 考察

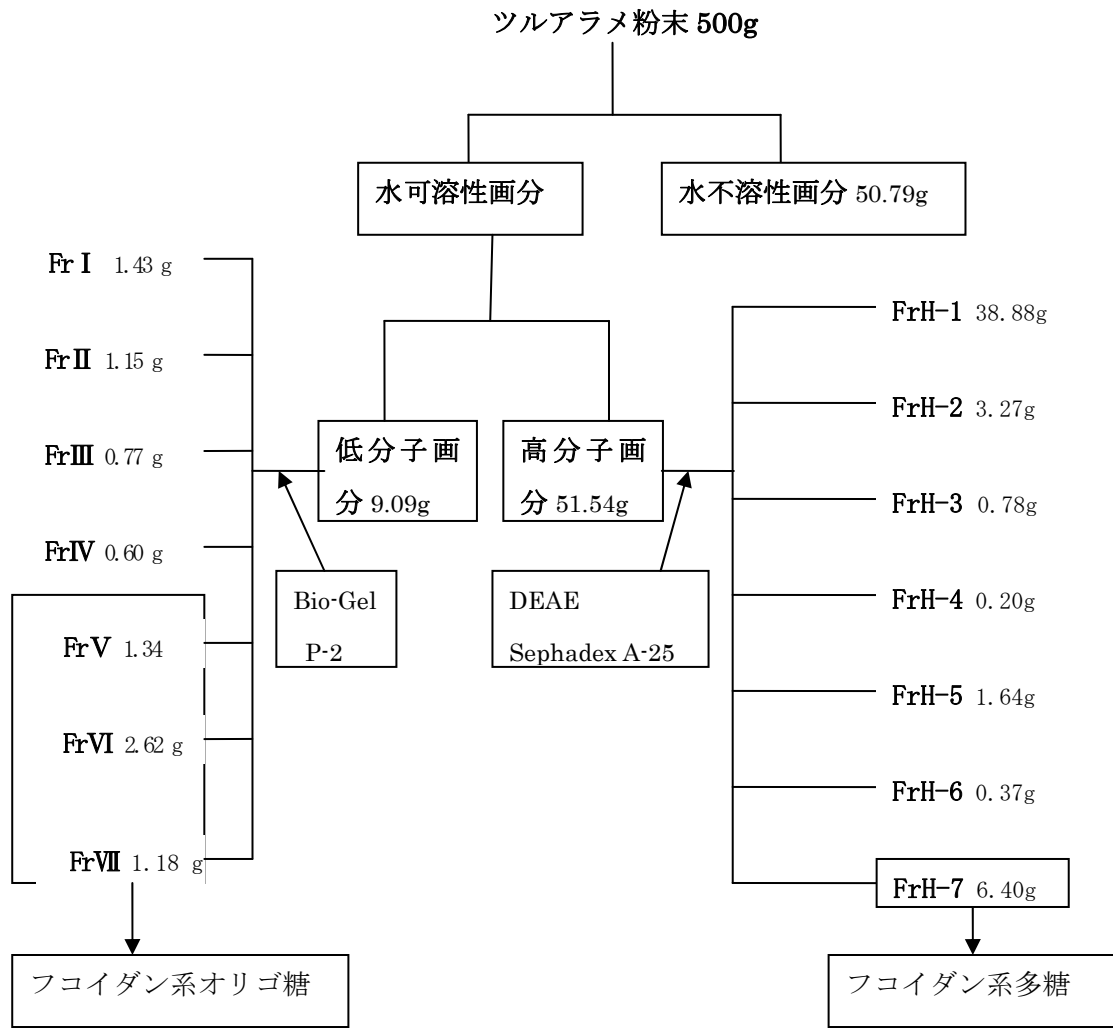
構成糖の分析により、非吸着画分はグルコースを主鎖とする、グルカン系多糖が主に存在していることが考えられた。吸着画分の構成中性糖としてフコースが非常に多く (64 %を占め)、グルコース、ガラクトース、キシロースなども含まれているので、吸着画分はフコイダン系多糖が主に有することが考えられた。

WS-H はガン培養細胞増殖抑制作用が強いことが第 II 章の実験で示唆された。今回 WS-H を透析に供し、低分子 (透析外液) と高分子 (透析内液) とに分け、ガン培養細胞増殖抑制作用を調べた結果、高分子画分が増殖抑制の主体であることがわかった。

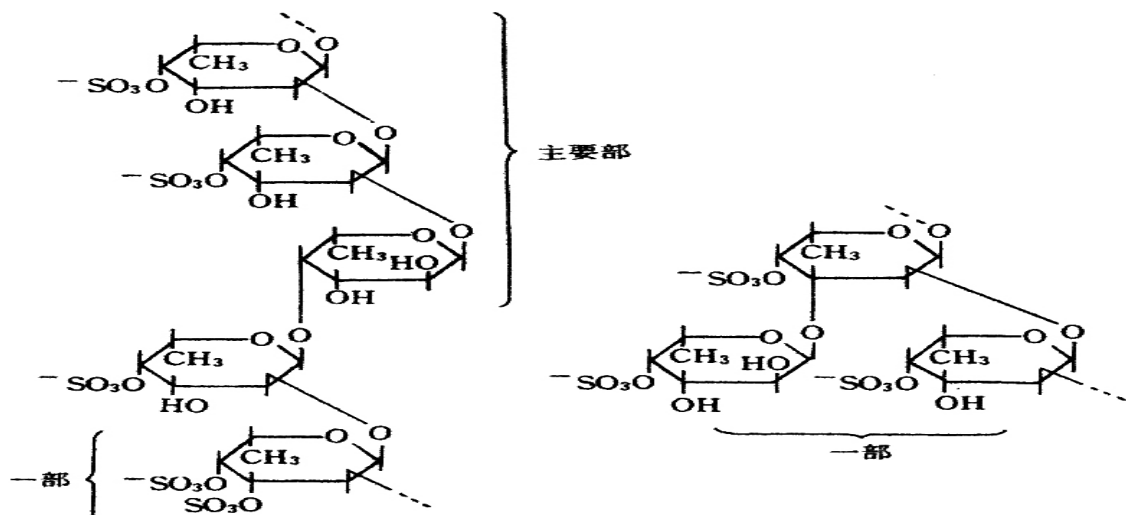
さらに、WS-H を DEAE-Sephadex A-25 による分画で得られた非吸着、吸着画分の構成糖分析と増殖抑制活性から、吸着画分即ちフコイダン系多糖が増殖抑制活性に寄与していることが明らかとなった。

第VI章 まとめ及び総合考察

1. ツルアラメ粉末を分画して得られた各画分の糖量の分布を図VI-1 にまとめると以下の通りである、このうち、ガン培養細胞 DLD-1、COL0201 の両者の増殖抑制作用を 1mg/ml の濃度で示したのは図III-3 の FrV、VI、VIIである、図V-6 の FrH-7 である。従って、ツルアラメに含まれる糖質（フェノール硫酸法よりグルコース相当量）の約 19.3% がヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用を有する糖質と考えられる。



図VI-1 ツルアラメ含まれるヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制糖質の分布



図VI-2 フコイダンの推定構造⁽¹⁾

(L-フコースを主な構成糖とする重合体で、L-フコース4硫酸の1,2-結合を主体としているが、1,3-、1,4-結合も含む。)

2. ツルアラメの水溶性低分子画分（グルカン系オリゴ糖、フコイダン系オリゴ糖などを含む）ではフコイダン系オリゴ糖が、高分子画分（グルカン系多糖、フコイダン系多糖などを含む）ではフコイダン系多糖が、それぞれヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制効果を有することがわかった。これまでの研究により、総ての褐藻類にフコイダンが含まれるが、同じ海藻でも、生育場所や生育度合いによりフコイダンの含有率が変化することが示されている。また、一種の海藻にそれぞれ数種類の化学構造の異なるフコイダンが含まれ⁽²⁾、海藻の種類によってフコイダンの含有率が著しく異なることも知られている⁽³⁾。すなわち、フコイダンと呼ばれる分子の中にはL-フコースの結合様式の違いに始まり、構成糖や、硫酸化度、分子量等が異なる多くの種類の分子種がある(図VI-2)。フコイダンの種によって、生物活性も違いがある。フコイダンが多様な生物活性を持つことを示す研究報告は非常に多い。しかし、研究用途で使用されているフコイダンのほとんどは *Fucus vesiculosus* 由来するのみに限られている。本研究により、青森県大間産のツルアラメに由来するフコイダン系オリゴ糖、フコイダン系多糖にはヒト大腸ガン培養細胞（接着系細胞 DLD-1、半浮遊系細胞 COL0201 いずれも）増殖抑制作用があることが明らかにされた。今後詳細な構造解析が必要ではあるが、ツルアラメは健康食品素材や薬品としての有効活用が期待される。

参考文献：

- (1) 山田信夫：海藻利用の科学，成山堂書店，(2000)
- (2) 酒井武ら：バイオサイエンスとインダストリー，60，No. 6，23(2002)
- (3) 富士川龍郎ら：日本農芸化学会誌，49，No. 9，455(1975)

謝辞

本研究を進めるに当たり、並びに本修士論文を執筆するに当たり、お忙しい中終始適切な温かいご指導と励ましをいただきました弘前大学教育学部食物学講座加藤陽治教授に心より感謝申し上げます。

また、修士論文の審査を務めて下さいました齋藤尚子先生、森崎真奈美先生に感謝いたします。

本研究を進めるに当たり、同研究室の연구원や先輩方には機械の使い方から、考え方まで様々なことをご指導いただき、本当に感謝しています。また日本語がうまくいけない、とても戸惑いましたが加藤教授や皆さんのおかげで、なんとか研究を進めることができました。

本研究を通し、学び、考えた多くのことは私にとってとても大切な経験になりました。食物学研究室の皆様深くに感謝いたします。