

エンド-β-グルコニダーゼを利用した生理機能を有する 新規ヒアルロン酸オリゴ糖などの開発とその応用-第二報- 抗腫瘍活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性および HA 摂取効果について

松江¹⁾、森永八江¹⁾、乗鞍敏夫¹⁾、岩井邦久¹⁾、今淳¹⁾、
市田淳治²⁾、内沢秀光²⁾

1) 青森県立保健大学大学院健康科学研究科、2) 青森県工業総合研究センター

Key Words ①エンド-β-グルコニダーゼ ②ヒアルロン酸 ③生理活性

I. はじめに

ヒアルロン酸 (HA と省略) は、高分子と低分子では生理活性が異なり、近年、低分子 HA オリゴ糖に抗腫瘍活性、樹状細胞の成熟活性化、HSP 発現増強やアポトーシスが示されたが、生理活性低分子 HA の構造は還元末端が GlcNAc で、還元末端に GlcU を持つオリゴ HA については報告がない。昨年度、鶏冠 HA を用い Milner-Avigad 法を利用した新規 endo 型酵素測定法により、チスイヒルのエンド型粗酵素で HA オリゴ糖の大量調製可能かを検討し、鶏冠 HA より GlcU を還元末端に持つオリゴ糖 HA GlcU が調製できることを示した。本年度は、オリゴ糖 HA の性状検討とそれらの利用の方向を探るためのいくつかの生理活性試験を試みた。

II. 目的

HA、HA オリゴ糖 GlcU、HA オリゴ糖 GlcNAc のヒト肝癌 (HepG2) 細胞の増殖抑制効果、I 型アレルギー抑制の指標のヒアルロニダーゼ阻害活性、さらに低分子 HA をラットに経口投与した際の血漿アミノ酸の変化について検討した。

III. 研究材料及び研究方法

1. HA オリゴ糖 GlcU、HA オリゴ糖 GlcNAc の調製

鶏冠 HA50mg とヒル由来 endo-β-GlcUase(14.5U/mg protein)300U を 0.2M Acetate, pH5.2, 30mL に溶解、38°C、24hr 反応後、同量の酵素を加え 24hr 反応後、加熱反応停止、10,000 x g で 30min 遠心上清を、Vo と Vt の検定した Sephadex G-25(superfin, 30mm x 120cm、流速 0.5mL/min、室温純水溶出、6.5mL/本分取) に供した。還元末端 GlcU と全 GlcU 量を初年度の方法で測定した。

2. Neutral red 法による HepG2 細胞増殖抑制活性試験

10%FBS 含有 DMEM 培地 (φ35 mmdish) に 4×10^5 個の HepG2 細胞を播き 24hr 前培養、細胞を dish に付着後、試料を水または DMSO に終濃度 50 又は 100 μg/mL に溶解した培地 (2.5 mL) で 2 日間本培養、吸引にて培地除去、Neutral Red の 150 mg/mL PBS 溶液の 1 mL で 90 分間培養後、1% CaCl₂ 含有 1% HCHO 溶液 1.5 mL で細胞固定、1%AcOH 含有 50% EtOH 液 1.5 mL で色素抽出後、540 nmO.D.測定生細胞を計数した。

3. ヒアルロニダーゼ阻害活性⁴⁾

牛睾丸ヒアルロニダーゼ 1.0mg/mL の 0.01M Acetate, pH3.50 溶液 0.2mL と各濃度の阻害剤溶液 0.2mL をとり、37°C、20 分間反応、これに HA 0.6mg/mL の 0.01M Acetate, pH3.50 溶液 1.4mL と 25mM CaCl₂ 0.2mL を加え混和後、37°C で 40 分間反応、4.0 N NaOH 20 μl にて反応停止後、還元末端糖を GlcNAc を測定した。

4. 低分子 HA 経口投与と血漿アミノ酸分析

10 週齢の雄 SD ラット 7 匹を対照群と HA 投与群 (HANa、平均 MW 7 万、紀文フードケミファ社) に分け、HA 群には HA 水 (1 g/L) を、対照群には蒸留水を自由飲水 8 週間飼育、市販固形飼

料 (MF、オリエンタル酵母) を自由摂食、飼育終了後 20hr 絶食、エーテル麻酔、鎖骨下大動脈より採血、3,000rpm, 10min 遠心分離で血漿を得た。アミノ酸分析は血漿 200 μ l をアミノ酸分析用緩衝液で 10 倍希釈、0.45 μ m HPLC フィルターでろ過、分画分子量 1 万の遠心限外濾過後、JLC-500 アミノ酸分析機 (Jeol 社製) で定量、統計は SPSS 14.0 を用い student's *t* 検定を行った。

IV. 結果および考察

①鶏冠 HA から還元末端に GlcU と GlcNAc を有する HA オリゴ糖 GlcU と HA オリゴ糖 GlcNAc が 80.4% および 77.4% の収量で得た。

表 1. HA オリゴ糖の

HepG2 細胞生細胞数減少活性.

試料	添加濃度 (μ g/mL)	生存細胞数* (% of Control)	標準偏差
Control	0	100.00	1.68
鶏冠 HA	100	94.00	6.85
	1000	117.75	3.45
鶏冠 HA オリゴ糖 GlcU(a)	100	93.75	6.25
	1000	126.29	1.91
鶏冠 HA オリゴ糖 GlcNAc(b)	100	92.04	4.99
	1000	120.55	3.65
リンゴ由来ペクチン DE70-75	100	97.17	4.98
りんご由来ペクチンオリゴ糖	50	114.05	3.68
サケヒズ ChS	100	99.10	4.31
イカスミ酸性多糖	100	91.26	3.52
ポタニボタケ EtOH 抽出物(陽性対照)	10	50.38	1.51

* 3 回の平均測定値。

表 2. HA オリゴ糖のヒアルロニダーゼ阻害活性

試料	IC50* (mM)	相対活性 (SCG に対する)
Sodium Cromoglycate (SCG)	0.056	1.00
鶏冠 HA	0.09	1.61
鶏冠 HA オリゴ糖 GlcU(a)	0.14	2.50
鶏冠 HA オリゴ糖 GlcNAc(b)	0.16	2.86
リンゴ由来ペクチン DE70-75	0.21	3.75
りんご由来ペクチンオリゴ糖(重合度 23)	0.56	10.0
りんご由来ペクチンオリゴ糖(重合度 11)	1.11	19.8
サケヒズ ChS	0.15	2.68
イカスミ酸性多糖	0.19	3.39

* 3 回の平均測定値。

表 3. HA 酸の経口投与における血漿アミノ酸の変化

	対照群			HA 投与群			p
	平均	±	SD	平均	±	SD	
Ser(P)	0.82	±	0.23	1.07	±	0.13	
Tau	18.65	±	3.48	23.38	±	10.87	
Pea	n.d.			n.d.			
Asp	1.09	±	0.43	1.25	±	0.58	
Ihr	20.87	±	3.19	15.76	±	1.08	*
Ser	24.05	±	1.62	20.20	±	0.44	*
Asn	6.57	±	1.23	5.63	±	0.79	
Glu	15.27	±	2.67	17.66	±	7.02	
Gln	102.26	±	10.26	97.80	±	4.67	
Sar	n.d.			n.d.			
AAA	n.d.			n.d.			
Gly	33.16	±	4.30	31.27	±	5.22	
Ala	51.04	±	10.25	38.73	±	5.21	
Cit	2.80	±	0.38	2.63	±	0.22	
a-ABA	7.19	±	0.73	7.51	±	1.16	
Val	23.40	±	3.34	19.44	±	0.79	
Cys	3.82	±	0.14	3.56	±	0.51	
Met	5.14	±	0.74	4.56	±	0.29	
Cys-thi	0.33	±	0.03	0.30	±	0.01	
Ile	10.29	±	1.60	8.64	±	0.24	
Leu	18.43	±	2.73	15.32	±	0.72	
Tyr	9.53	±	0.87	7.89	±	0.72	*
β -Ala	n.d.			n.d.			
Phe	8.51	±	1.25	7.30	±	0.88	
b-ABA	n.d.			n.d.			
GABA	n.d.			n.d.			
MEA	n.d.			n.d.			
Hylys	n.d.			n.d.			
Orn	4.94	±	0.28	4.09	±	0.48	*
1M-His	0.83	±	0.04	0.75	±	0.08	
His	5.10	±	0.65	4.57	±	0.32	
Lys	44.22	±	3.43	38.82	±	3.49	
3M-His	0.42	±	0.03	0.45	±	0.06	
Trp	10.93	±	1.14	9.87	±	0.81	
Ans	n.d.			n.d.			
Car	n.d.			n.d.			
Arg	14.98	±	1.76	12.68	±	0.59	*
Hypro	3.01	±	0.27	3.61	±	0.09	
Pro	13.57	±	1.30	11.23	±	0.28	
合計	461.22	±	54.98	415.05	±	37.10	
(Val+Leu+Ile)/(Phe+Tyr)	2.89	±	0.21	2.87	±	0.18	
(Phe/Val)+(Thr+Met+Orn)/(Pro+Gly)	1.03	±	0.01	0.95	±	0.04	**

p*<0.05. *p*<0.01

②GlcU や GlcNAc を還元末端に持つ HA オリゴ糖、関連酸性多糖のいずれにも、HepG2 細胞の成長を抑制する活性は認められなかった (表 1)。

③HA および GlcU や GlcNAc を還元末端に持つ HA オリゴ糖、リンゴペクチンやそのオリゴ糖、ChS いずれもヒアルロニダーゼ阻害活性を示したが、オリゴ糖にすると阻害活性が低下することが解った (表 2)。

④ラットへの HA 投与試験では二群間で体重や臓器重量に差はなく、アミノ酸としては Gln>Ala \approx Lys>Gly>Ser>Thr>Asp>Val>Leu の順に多く、HA 投与により Thr、Ser、Tyr、Orn および Arg の濃度の低下と、肝繊維症の指標で重症度に従って増加する (Phe/Val)+(Thr+Met+Orn)/(Pro+Gly) 値が有意に減少した¹⁾。一般に動物の血漿アミノ酸濃度パターンは種類および濃度ともに、常に一定割合を保とうとするが、近年、糖尿病などの血漿アミノ酸パターンが疾病特有の変化を示し、それが治療により元に回復することが報告されている。今回の結果が生体の何を反映するのかは今後の詳細な研究に待ちたい。

1) Zhang Q., Takahashi M ら: Hepatol. Res. Mar;34(3):170-7. 2006.