

博士学位論文

養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸の
ヒアルロニダーゼ阻害活性に関する研究

2018年2月

九州産業大学大学院

工学研究科産業技術デザイン専攻

博士後期課程産業技術デザイン分野

山元 裕太

第一章 緒言	1
1-1 多糖及び硫酸化多糖	1
1-2 硫酸化多糖に関する既存の研究報告と本研究の目的	3
1-3 本論文の概要	5
第二章 養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の有効な抽出方法の検討	7
2-1 序論	7
2-2 実験	11
2-2-1 抽出試料	11
2-2-2 養殖ヒトエグサからの水、酸、酵素及びオートクレーブ処理に よる硫酸化多糖の抽出	11
2-2-3 各抽出物の化学組成分析(全糖量、ウロン酸、硫酸基及び灰分含有 率)及び分子量測定	13
2-2-4 各抽出物の IR、 ¹ H-NMR 及び ¹³ C-NMR 測定	16
2-2-5 酵素処理抽出物の構成糖分析	17
2-3 結果及び考察	18
2-3-1 ラムナン硫酸の抽出方法の比較	18
2-3-2 各抽出物の IR、 ¹ H-NMR 及び ¹³ C-NMR 測定結果	21
2-3-3 酵素処理抽出物の構成糖分析	22
2-4 小括	28
第三章 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性	30
3-1 序論	30
3-2 実験	32
3-2-1 試料	32
3-2-2 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性	33
3-2-3 ラムナン硫酸と他の硫酸化多糖とのヒアルロニダーゼ阻害比較	36

3-2-4	ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基の影響	36
3-2-4-1	ラムナン硫酸の過硫酸化処理による高硫酸基含有ラムナン硫酸の調製	36
3-2-4-2	ラムナン硫酸の脱硫酸処理による低硫酸基含有ラムナン硫酸の調製	37
3-2-4-3	硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性	39
3-2-5	ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の分子量の影響	39
3-2-5-1	ラムナン硫酸の低分子化処理	39
3-2-5-2	分子量の異なるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性	42
3-3	結果及び考察	42
3-3-1	ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性	42
3-3-2	ラムナン硫酸と他の硫酸化多糖とのヒアルロニダーゼ阻害の比較	45
3-3-3	ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基の影響	47
3-3-4	ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の分子量の影響	47
3-4	小括	51
第四章	ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構	53
4-1	序論	53
4-2	実験	56
4-2-1	試料	56
4-2-2	ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式の検討	56
4-2-3	ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の IR 及び $^1\text{H-NMR}$ 測定	57
4-2-3-1	ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の IR 分析	57
4-2-3-2	ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の $^1\text{H-NMR}$ 分析	58
4-2-4	ラムナン硫酸の硫酸基含有率、ヒアルロニダーゼ阻害率及びラム	

ナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体生成率との間の三者の関係の検討 …	58
4-2-4-1 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体生成の検討 ……………	58
4-2-4-2 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体をろ過したろ液のヒアルロン酸分解能力の検討 ……………	60
4-3 結果及び考察 ……………	61
4-3-1 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式 ……………	61
4-3-2 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の IR 及び ¹ H-NMR 測定結果 ……………	63
4-3-3 ラムナン硫酸の硫酸基含有率、ヒアルロニダーゼ阻害率及びラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体生成率との間の三者の関係 ……………	67
4-4 小括 ……………	69
第五章 総括 ……………	72
引用文献 ……………	77
謝辞 ……………	85

第一章 緒言

1-1 多糖及び硫酸化多糖

多糖類はグリコシド結合により単糖分子が重合した高分子多糖体であり、生物により生合成される生体高分子の一つとして様々な用途に利用されている。動物ではヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、キチン、グリコーゲン、植物のうち陸上植物ではセルロース、デンプン、ペクチン、海藻ではアルギン酸やフコイダンなど自然界に幅広く存在する¹⁾。食品では増粘安定剤として、キサントガム、カルボキシメチルセルロース、ゲル化剤としてアガロース、ペクチン、ジェランガム、免疫賦活剤として β -グルカン、繊維では紙パルプとしてセルロースが利用されている^{1,2,3)}。多糖類の構造は、それを構成する単糖の種類、結合様式、置換基、配列、アノマー炭素原子上の水酸基の配置及び置換基の荷電状態によって決定され、これらは物理化学的、生理化学的特性に極めて重要な影響を与える。特に置換基の影響は大きく、硫酸基、カルボキシル基が結合したものはアニオンポリマー、アミノ基が結合したものはカチオンポリマー、メチル基やアセチル基などが結合したものは非イオン性のノニオンポリマーとなる。アミノ基の付いたアミノ糖の多くは、アセチル化、硫酸化、グリコシド化されて生体中に存在する。

多種多様な多糖類の中で、硫酸基を置換基として有する多糖は硫酸化多糖と

呼ばれる。硫酸化多糖は動物では一般にヘパリン、コンドロイチン硫酸の形で存在し、植物のうち陸上植物には、ほとんど存在せず、海藻類に広く存在する。海藻は大きく緑藻類、褐藻類、紅藻類に分けられ、緑藻類に属するのはアオサ、アオノリ、ミル、イワズタ、カサノリ、ヒトエグサ等、褐藻類に属するのはメカブ、コンブ、ワカメ、アラメ、カダメ、ホンダワラ、モズク、ヒジキ等、紅藻類に属するのはカダノリ、アマノリ、アオクサノリ、オゴノリ、チノリモ等である^{4,5,6)}。

海藻に含まれる多糖の種類は、その存在する部位により細胞壁骨格多糖、貯蔵多糖及び細胞間粘質多糖の3つに分けられる。細胞壁骨格多糖は、細胞壁を構成する多糖であり、緑藻類ではセルロース、 β -1,3 キシラン、 β -1,4 キシラン、褐藻類ではセルロース、ヘミセルロース、紅藻類ではセルロース、ヘミセルロース、 β -1,3 マンナン、 β -1,4 キシラン等がある。貯蔵多糖は細胞質内に含まれる多糖であり、緑藻類ではアミロース、アミロペクチン、褐藻類ではラミラン(ラミナリンとも呼ぶ)、紅藻類では紅藻デンプン等がある。細胞間粘質多糖は細胞間を充填している多糖であり、緑藻類ではラムナン硫酸、ガラクトサン硫酸、褐藻類ではアルギン酸、フコイダン、紅藻類では寒天、カラギーナン、ポルフィランなどがあり、アルギン酸以外の細胞間粘質多糖はすべて硫酸化多糖である^{4,7,8,9,10)}。

現在、硫酸化多糖の産業的利用価値は、増粘剤としてカラギーナン、抗血液凝固剤としてヘパリンが用いられているのみで、それ以外の利用用途は少なく、硫酸化多糖の産業上の利用へ向けて、更なる研究やその新規利用方法の開発が必要である。

1-2 硫酸化多糖に関する既存の研究報告と本研究の目的

海藻に含まれる硫酸化多糖については、褐藻類のフコイダンをはじめとし、様々な研究が行われ、硫酸化多糖の多様な生理活性が報告されている。例えば、抗酸化活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性（抗炎症活性）、抗アレルギー活性、抗腫瘍活性、抗肥満活性、抗糖尿病活性、抗血液凝固活性及び抗ウィルス活性等がある^{1,4,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20}。

褐藻類のアルギン酸、フコイダン、紅藻類の寒天やカラギーナンなどは産業的に広く利用されているが^{4,5,6}、緑藻類の硫酸化多糖の有効な利用はほとんどされておらず、未利用資源と言える。代表的な緑藻としては、アオサ、アオノリ、ヒトエグサがあるが、アオサ、アオノリのほとんどが二層の細胞が並んだ膜あるいは筒状の構造をしているのに対し、ヒトエグサ（一重草、*Monostroma nitidum*）は一層の細胞の膜からなるため、硫酸化多糖の抽出はアオサ、アオノリより容易であると考えられる。ヒトエグサの細胞間粘質多糖として存在する硫酸化多糖はラムナン硫酸である。ヒトエグサはアオサ藻綱ヒビミドロ目ヒトエグサ科

に属し、暖流の潮間上帯部で生育する²¹⁾。以前は、日本で養殖されているヒトエグサの種類は *Monostroma nitidum* (ヒトエグサ) と *Monostroma latissimum* (ヒロハノヒトエグサ) の 2 種類に区別されていたが、現在では研究が進み、同種として扱われている^{22,23)}。ヒトエグサは 1950 年代から三重、沖縄、四国で養殖されており、全国の生産量は年間 3000~5000t で推移している^{22,24)}。そのヒトエグサに含まれるラムナン硫酸の研究の始まりは 1980 年代になってからであり、ヒトエグサからラムナン硫酸の分離・同定が行われ、その後、ヘルペス単純ウィルス II 型に対する抗真菌活性²⁵⁾、抗血液凝固作用^{26,27,28)} 及びヒト及びラットにおける血糖値上昇抑制作用²⁹⁾ が報告され、近年ではラムナン硫酸の詳細な構造³⁰⁾ について報告された。

硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性については、褐藻類のメカブやコンブに含まれるフコイダン³⁷⁾ や紅藻類チノリモ由来の硫酸化多糖³⁸⁾ で報告がされているが、緑藻類の硫酸化多糖を用いたヒアルロニダーゼ阻害活性の報告はほとんどなく、その阻害機構の詳細な研究は行われていない。

本研究の目的は、まず、ヒトエグサからのラムナン硫酸の最適な抽出方法を決定すること、次に抽出したラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性の有無を確認すること、最後に、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構を明らかにすることである。

1-3 本論文の概要

本論文は硫酸化多糖の一種であるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について研究した結果をまとめたものである。

第二章では、養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の抽出法について検討した。ラムナン硫酸はヒトエグサ中で細胞間粘質多糖として存在しており、これを効率良く抽出する方法を決定するために、水抽出、酸処理抽出、酵素処理抽出及びオートクレーブ処理抽出を行い、比較検討した。抽出物の収率及び性状を調べることにより、ラムナン硫酸の最適な抽出法を決定した。

第三章では、第二章で決定した最適な抽出法によりヒトエグサからラムナン硫酸を抽出し、これを用いて、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。さらに、このラムナン硫酸と他の硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性との比較を行った。また、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害における硫酸基含有率および分子量の影響を調べた。

第四章では、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構について、より詳細な検討を行った。まず、ラインウィーバー=バーク式によりラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する酵素阻害様式を調べた。次いで、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは溶液中で白濁物質を生成することが確認されたため、この白濁物質の IR 及び NMR を用いた構造解析を行い、ヒアルロニダーゼ阻害機構につ

いて詳細な議論を行った。

第五章では、二、三、四章の議論を踏まえ全体の総括を行い、今後期待される緑藻類の新規利用法についての可能性を述べた。

第二章 養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸の

有効な抽出方法の検討

2-1 序論

緑藻類のヒトエグサは、細胞が平面状に並んだ一層の構造をしており、ヒトエグサに含まれる多糖の種類としては、細胞壁骨格多糖のセルロース、貯蔵多糖のデンプン、細胞間粘質多糖のラムナン硫酸である(Fig. 1)。硫酸化多糖の研究は、フコイダンをはじめとして、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸及びヘパラン硫酸等で盛んに行われてきたが、それらに比べて、ラムナン硫酸の研究報告は少ない。

ラムナン硫酸の構造は、L-ラムノースと硫酸基を置換基として有する硫酸化L-ラムノースの重合体を主鎖とし、側鎖の末端がD-グルクロン酸であることが分かっている^{30,39,40}(Fig. 2)。ラムナン硫酸の硫酸基の置換位置は、ラムノースの2位、3位または4位であるが、その置換位置はヒトエグサの産地によって異なることが報告されている^{30,41}。

本章では、熊本県産の養殖ヒトエグサからラムナン硫酸を如何に有効に抽出するか検討した。ラムナン硫酸の抽出方法としては、水抽出法、酸処理抽出法、酵素処理抽出法及びオートクレーブ処理抽出法の4種類を比較検討した。各処理法によって得られた抽出物の収率、その化学組成及びGPC分析により抽出物

のピークトップの分子量(プルラン相当分子量)を調べ、さらに IR 及び NMR による構造解析により最適な抽出方法を決定した。

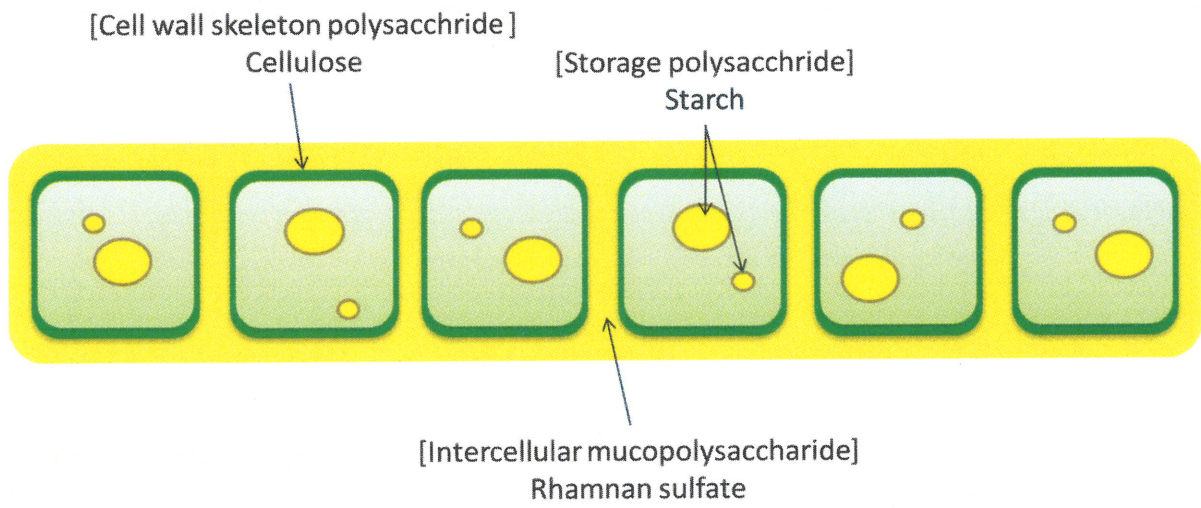


Fig. 1 The cross section of leaf of *Monostroma nitidum*.

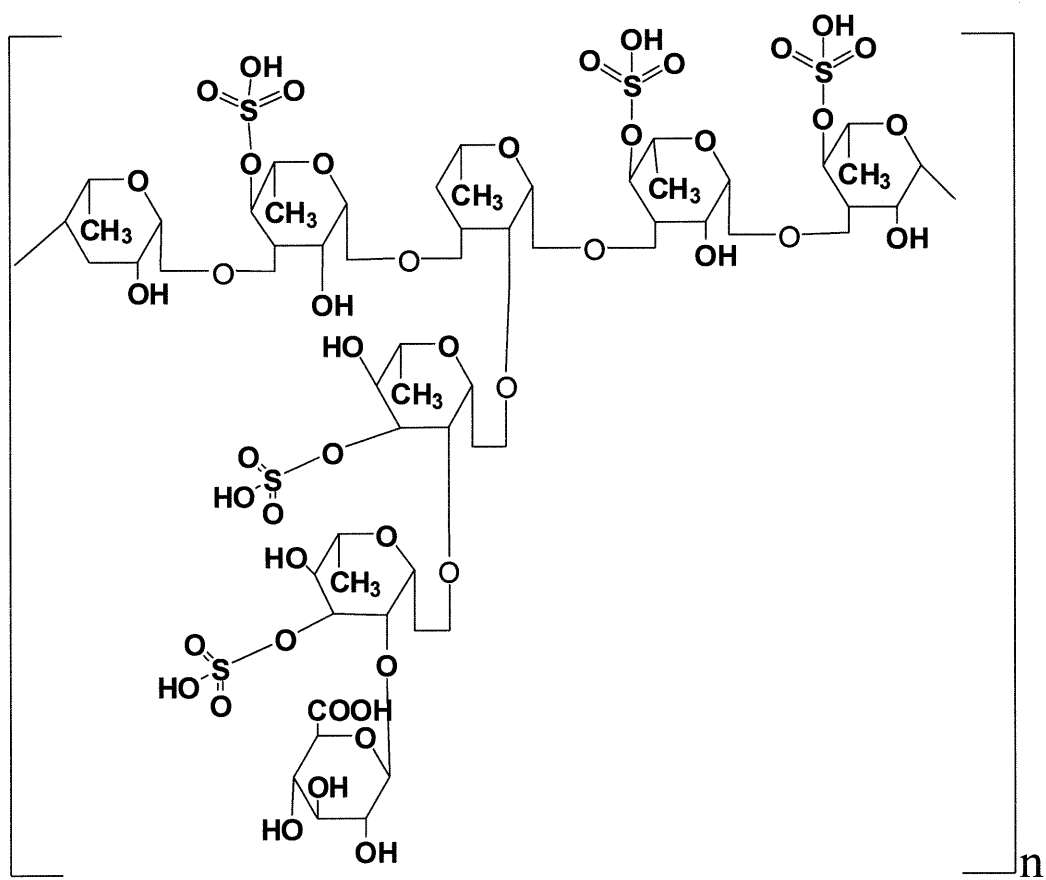


Fig. 2 Chemical structure of rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*.

2-2 実験

2-2-1 抽出試料

熊本県東村漁業協同組合から供与された乾燥養殖ヒトエグサを、37°Cで24時間、再度乾燥後、細断し、試料として実験に供した。

2-2-2 養殖ヒトエグサからの水、酸、酵素及びオートクレーブ処理による硫酸化多糖の抽出

(1) 水抽出

乾燥ヒトエグサ 20g を蒸留水 600mL に分散させ、24 時間攪拌し、抽出液をセライト 545 層で吸引濾過し、濃縮後に 2 倍量のエタノールを加え、エタノール不溶物を沈殿させた。沈殿物を回収し、超純水に再度溶解後、一晚透析を行った。透析膜は日本メディカルサイエンスのヴィスキングチューブ(分画分子量 12000~14000)を使用した。次にその透析内液を凍結乾燥させ、得られた凍結乾燥粉体を水抽出物とし、以後の実験に使用した。

(2) 酸処理

酸によるラムナン硫酸の抽出は中村らの方法³⁰⁾に従って行った。即ち、乾燥ヒトエグサ 20g を蒸留水 600 mL に分散させ、pH 3.0 になるように 1mol/L 塩酸

溶液で調整し、60℃で3時間攪拌した。0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、中和し、2-2-2(1)の水抽出と同様、ろ過、エタノール添加、透析及び凍結乾燥により得られた粉体を酸処理抽出物とし、以後の実験に使用した。

(3)酵素処理

乾燥ヒトエグサ 20g を蒸留水 600mL に分散させ、セルラーゼ TP-5(協和化成)を 0.2g 加え、45℃で 24 時間攪拌した。得られた抽出液を 2-2-2(1)と同じ方法で、ろ過、エタノール添加、透析及び凍結乾燥し、得られた凍結乾燥粉体を酵素処理抽出物とし、以後の実験に使用した。

(4)オートクレーブ処理

乾燥ヒトエグサ 20g を蒸留水 600 mL に分散させ、オートクレーブにより 121℃、15 分加熱後、室温まで冷却した。抽出液を 2-2-2(1)と同じ方法でろ過、エタノール添加、透析及び凍結乾燥し、得られた凍結乾燥粉体をオートクレーブ処理抽出物とし、以後の実験に使用した。

2-2-3 各抽出物の化学組成分析（全糖量、ウロン酸、硫酸基及び灰分含有率）及び分子量測定

(1) 全糖量

各抽出物の全糖量はフェノール硫酸法により定量した⁴²⁾。抽出物 20mg を精秤し、蒸留水 100mL に溶解し、試料溶液とした。試料溶液 1mL に 5%(w/w)フェノール溶液 1mL を加え、よく混合した。これに濃硫酸 5mL を加え、室温で 30 分放置した後、分光光度計 (U-2000 Spectrophotometer, HITACHI)を用い、490nm の波長で吸光度を測定した。L-ラムノースを標準品として用い、同様の操作により 50、100、150、200 μ g/mL の濃度の吸光度を求め、検量線を作成し、各抽出物の全糖量を求めた。

(2) ウロン酸含有率

各抽出物のウロン酸含有率はカルバゾール硫酸法により求めた⁴³⁾。抽出物 10mg を精秤し、蒸留水 100mL に溶解し、試料溶液とした。試料溶液 1mL に 0.025mol/L となるよう四ホウ酸ナトリウム十水和物を濃硫酸(和光純薬工業 特級)に溶解した溶液 5mL を冷却しながら加え、10 分間煮沸した。室温まで冷却後、カルバゾール試薬を 0.2mL 加え、15 分間煮沸した。冷却後、530nm の波長

で吸光度を測定した。D-グルクロン酸を標準品として用い、4、8、16、24、32、40 μ g/mL の濃度の検量線を作成し、各抽出物のウロン酸含有率を求めた。

(3) 硫酸基含有率

各抽出物の硫酸基含有率はロジゾン酸法により求めた⁴⁴⁾。抽出物 10mg を精秤し、1mol/L 塩酸 2mL に溶解し、沸騰水中で 5 時間加水分解した。これを真空乾燥機で、60 $^{\circ}$ C で乾固させ、少量の超純水に溶解後、再度乾固した。この操作を 5 回繰り返した乾固物に所定量の超純水を加え、溶解させたものを試料溶液とした。試料溶液 0.5mL に 99.5%エタノール 2mL を加え、さらに、塩化バリウム緩衝液(2mol/L 酢酸 10mL、0.01mol/L 塩化バリウム 2mL、0.02mol/L 炭酸水素ナトリウム 8mL を超純水で 100mL メスアップした溶液)を 1mL とロジゾン酸試薬(ロジゾン酸ナトリウム 12.5mg を超純水 50mL に溶解し、さらに、L-アスコルビン酸を 250mg 加え、99.5%エタノールで 250mL にメスアップした溶液)を 1.5mL 加え、攪拌後、10 分間、室温暗所で放置し、520nm の波長で吸光度を測定した。標準品として硫酸ナトリウム(和光純薬工業 特級)を用い、硫酸基(SO₄)が 4.8、9.6、14.4、19.6、24 μ g/0.5mL の濃度で検量線を作成し、各抽出物の硫酸基含有率を算出した。

(4) 灰分含有率

五酸化リンを入れたデシケータ中で無水状態にした各抽出物 100mg をるつぼに精秤し、電気炉にて 700°C で恒量となるまで灰化させ、放冷後、重量を測定した。灰化前後の重量差から抽出物の灰分含有率を求めた。

(5) 分子量測定

GPC 分析により各抽出法による抽出物のピークトップの分子量 (Mp) を求めた。Toyopearl HW-60 及び Toyopearl HW-70(東ソー社製)を充填したカラム(内径 7.5mm×長さ 600mm)を二本連結し、カラム温度 30°C、流量 1.3mL/min で 0.2mol/L 塩化ナトリウムを溶離液として HPLC(L-6000 Pump, HITACHI)測定を行った³⁰⁾。抽出物は 0.2mol/L 塩化ナトリウム溶液に溶解した。検出器は RI(L-3300 RI Monitor, HITACHI)を使用した。Table 1 に示す標準物質のプルラン(Shodex STANDARD pullulan 及び Shodex STANDARD P-82、昭和電工製)を用い、各抽出物のピークトップの分子量をプルラン相当量として算出した。以後、ピークトップ分子量を分子量とする。

Table 1 Molecular weight of standard pullulan.

Shodex STANDARD pullan	Mp 1.22×10^6
Shodex STANDARD P-82 P-800	Mp 70.8×10^4
Shodex STANDARD P-82 P-400	Mp 34.4×10^4
Shodex STANDARD P-82 P-100	Mp 10.7×10^4
Shodex STANDARD P-82 P-20	Mp 2.11×10^4
Shodex STANDARD P-82 P-5	Mp 0.61×10^4

※Mp: Peak Top Molecular Weight

2-2-4 各抽出物の IR、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 測定

(1) IR 分析

各抽出物の IR 分析は臭化カリウム法によりフーリエ変換赤外分光光度計(日本分光 FT/IR-470Plus 型)を用いて行った。

(2) ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 分析

各抽出物の ¹H-及び ¹³C-NMR スペクトルは核磁気共鳴装置(BRUKER 社製 600MHz スペクトロメーター)を用いて測定した。抽出物 10mg を重水 500 μ L に溶解し、60 $^{\circ}$ Cで測定した。内部標準として Sodium 3-(trimethylsilyl) propionic-2, 2,

3, 3-*d*₄ acid (TSP, 0.00 ppm)を用い、化学シフトは ppm で表示した^{30,45)}。

2-2-5 酵素処理抽出物の構成糖分析

酵素処理抽出物 200mg を超純水 20mL に溶解し、濃硫酸を終濃度 2mol/L になるように加え、100°C で 3 時間加熱し、加水分解した。その後、炭酸バリウムで中和し、ろ過により沈殿物を除去し、加水分解によって生成した糖を含むろ液を得た^{30,45)}。このろ液中の加水分解によって生成した糖のうち中性糖の同定及び定量は LC-MS(島津製作所 LCMS-8040)、酸性糖は HPLC(RI 検出)(JASCO HPLC ChromNavi)を用い、分析を行った。それぞれの分析条件を以下に示す。

LC-MS の分析条件については、カラムは UK-Amino (内径 2.0 mm×長さ 250mm)、カラム温度は 55°C、移動相 A は 5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 B は アセトニトリル、溶出条件は 0 分(B 液 91%)-3 分(B 液 89%)-17 分(B 液 89%)-20 分(B 液 91%)-25 分(B 液 91%)でのグラジエント、流量は 0.2mL/min、注入量は 1μL、イオン化法は ESI で行った。HPLC(RI 検出)の分析条件については、カラムは Grand SCR-102H SZ(内径 8.0mm×長さ 300 mm)、カラム温度は 60°C、移動相は 0.2% 過塩素酸溶液、流量は 0.8mL/min、注入量は 20μL で行った。また、酵素処理抽出物を 2-2-3(5)の GPC 分析と同条件で測定を行い、その溶出液を 1 分毎にフラクションコレクターにより回収し、各フラクションの糖濃度をフェノール硫酸法によって定量分析を行った。

2-3 結果及び考察

2-3-1 ラムナン硫酸の抽出方法の比較

熊本県産養殖ヒトエグサの処理法を変えてラムナン硫酸の抽出を行い、各抽出物の収率と化学組成分析(全糖量、ウロン酸、硫酸基、灰分含有率、ピークトップ分子量(プルラン相当分子量))を行った。各処理法による抽出物の収率及び化学組成分析の結果を Table 2 に示す。処理方法を変えた各抽出物の収率は、オートクレーブ処理抽出 24%(w/w)が最も高く、次いで、酸処理、酵素処理、水抽出であった。水抽出は抽出段階のろ液にエタノールを添加した際に沈殿物が析出せず、多糖の抽出はできなかった。また、ヨウ素デンプン反応からオートクレーブ処理抽出物にはデンプンが含まれており、オートクレーブ処理抽出物の収率が高かったのはデンプンが含まれていたためであった。酸処理及び酵素処理抽出物のヨウ素デンプン反応は陰性であった。また、Bradford 法⁵¹⁾による各抽出物の蛋白質呈色反応は陰性であり、すべての抽出物に蛋白質は含まれていないことを確認した。いずれの抽出物も全糖量及びウロン酸含有率には処理法による差はなかった。硫酸基含有率が最も高く、灰分含有率が最も低いのは酵素処理抽出物であった。即ち、酵素処理が硫酸基の脱離が最も少なく、灰分の含有率も少ない抽出方法であるといえる。

各抽出物の GPC による分子量測定の結果を Table 2 に示す。各抽出物で分子量 (プルラン相当分子量) が最も大きかったのは、酵素処理抽出物で 700kDa であった。即ち、オートクレーブ処理や酸処理は、抽出時に多糖の加水分解が進み、分子量が小さくなったと考えられる。

Table 2 Comparison of extraction methods for recovering rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*.

	Water extract	Acid treatment	Enzyme treatment	Autoclave treatment
Yield %(w/w)	0	20.0	16.0	24.0
Carbohydrate %(w/w)	-	64.5	64.3	66.0
Uronic acid %(w/w)	-	12.4	12.1	11.4
Sulfate group %(w/w)	-	17.0	20.0	18.0
Ash %(w/w)	-	28.0	19.1	21.0
Peak top molecular weight*	-	500kDa	700kDa	200kDa

*Reduced molecular weight calculated as pullulan by GPC

2-3-2 各抽出物の IR、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 測定結果

各抽出物の IR スペクトルの結果を Fig.3 に示す。すべての IR スペクトルにおいて、 3400cm^{-1} 付近に水酸基の O-H 伸縮振動、 2900cm^{-1} 付近にメチル基の C-H 伸縮振動、 1650cm^{-1} 付近にウロン酸由来カルボキシル基の O-C=O 非対称伸縮振動及び 1250cm^{-1} 付近に硫酸基の O=S=O 非対称伸縮振動の吸収が確認できた^{30,46,47,48})。また、各抽出物の ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルを Fig.4 及び Fig.5 に示す。すべての ¹H-NMR スペクトルで 1.4ppm 付近にラムノースの C6 位のメチル基由来のシグナルが確認できた^{49,50})。同様にすべての ¹³C-NMR スペクトルで 19.8ppm 付近にラムノースの C6 位のメチル基由来のシグナルが確認できた。C6 位がメチル基である糖は、ラムノース及びフコースの 2 種類が考えられるが^{30,45})、ラムナン硫酸の構造は L-ラムノース、硫酸化 L-ラムノース及び D-グルクロン酸からなる硫酸化多糖であり、さらに、ヒトエグサにフコース及びその重合体であるフコイダンは含まれていないため、いずれの抽出物もラムナン硫酸の構造を有することが確認できた。

2-3-3 酵素処理抽出物の構成糖分析

抽出物の構成糖を調べるため、最も灰分の少ない酵素処理抽出物を試料とし、その構成糖分析を行った。酵素処理抽出物の構成糖の種類及びモル比を Table 3 に示す。酵素処理抽出物の構成糖は中性糖としてラムノース、グルコース、キシロース、ガラクトース、酸性糖としてグルクロン酸を検出した。グルクロン酸のモル数を 1 とした時の各中性糖のモル比は 5.13、0.53、0.15、0.05 であり、この結果から、酵素処理抽出物はラムノースとグルクロン酸を主とする多糖体であり、ラムナン硫酸であることを確認した。さらに、GPC 分析の溶出液を 1 分毎にフラクションコレクターに回収し、各フラクションの糖濃度をフェノール硫酸法によって定量分析の結果から、酵素処理により得られたラムナン硫酸の精製度の評価を行った。その結果を Fig.6 に示した。フラクション No. 25 付近にピークトップ分子量 700kDa の成分を中心とする大きなピークが観察され、他は、フラクション No.10、No.14、No.31~36 に小さなピークが見られたが、ピーク面積比より求めたフラクション No.20~30 に含まれるピークの糖量は全体の 98.6%であり、この結果から、酵素処理により得られたラムナン硫酸はかなり分子量の揃ったラムナン硫酸であることが確認できた。

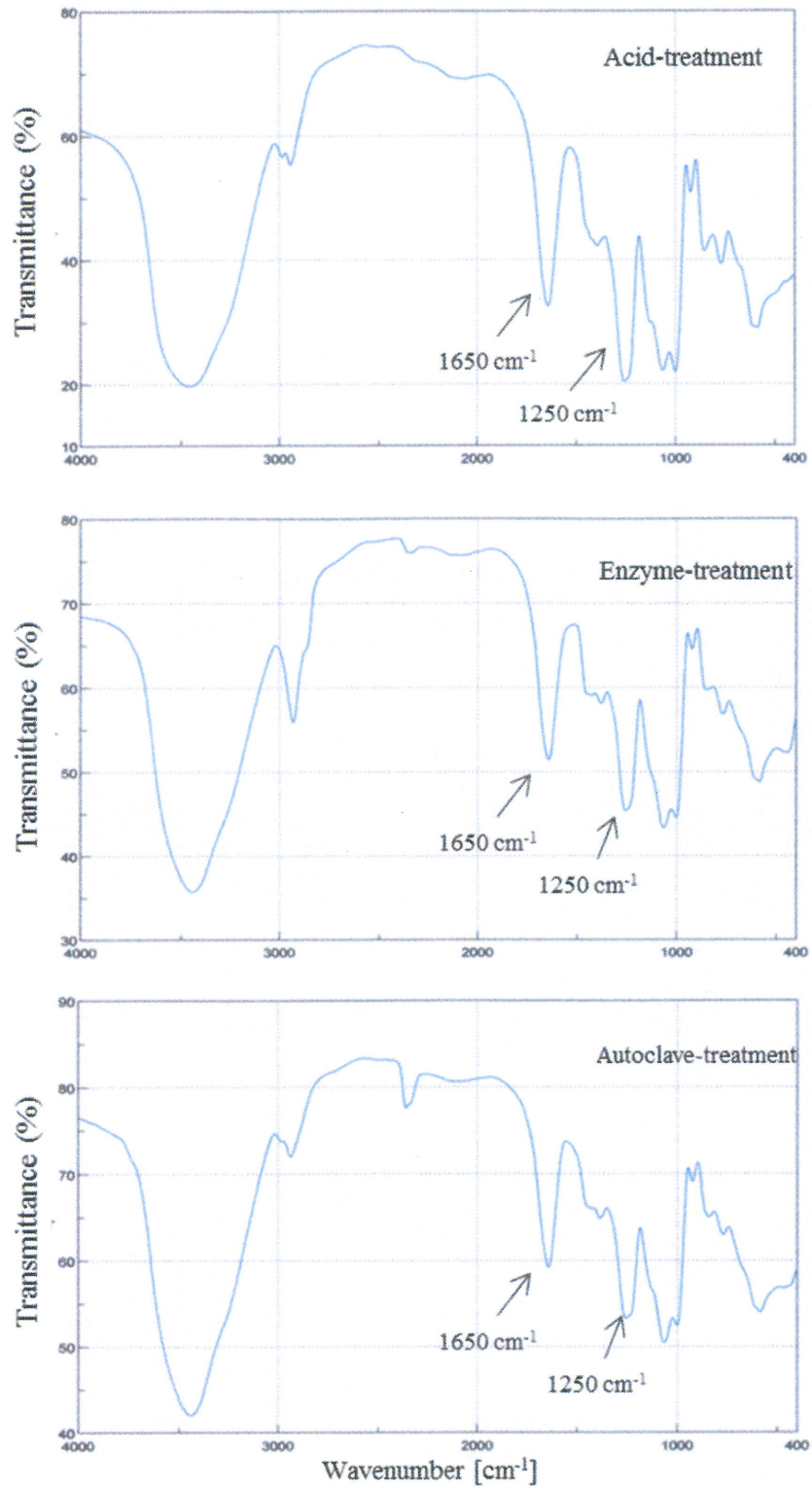


Fig. 3 Infrared Spectra of the extracts obtained by acid-, enzyme- and autoclave-treatment.

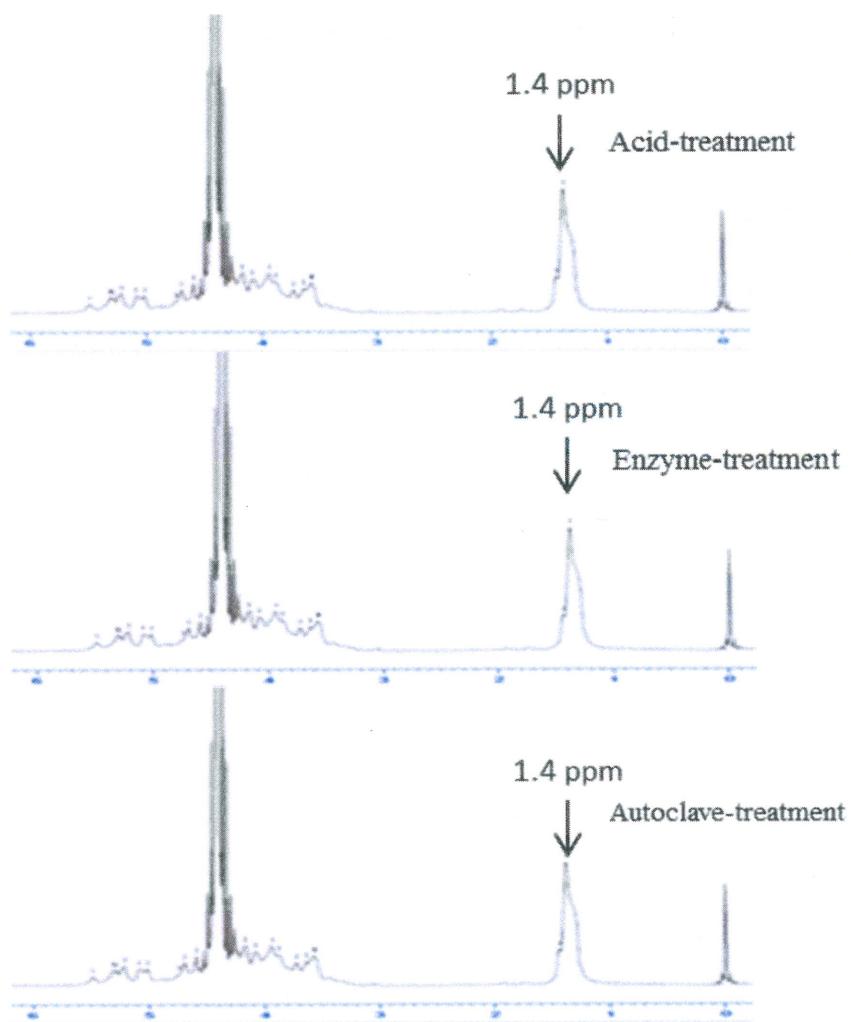


Fig. 4 ¹H-NMR spectra of the extracts obtained by acid-, enzyme- and autoclave-treatment.

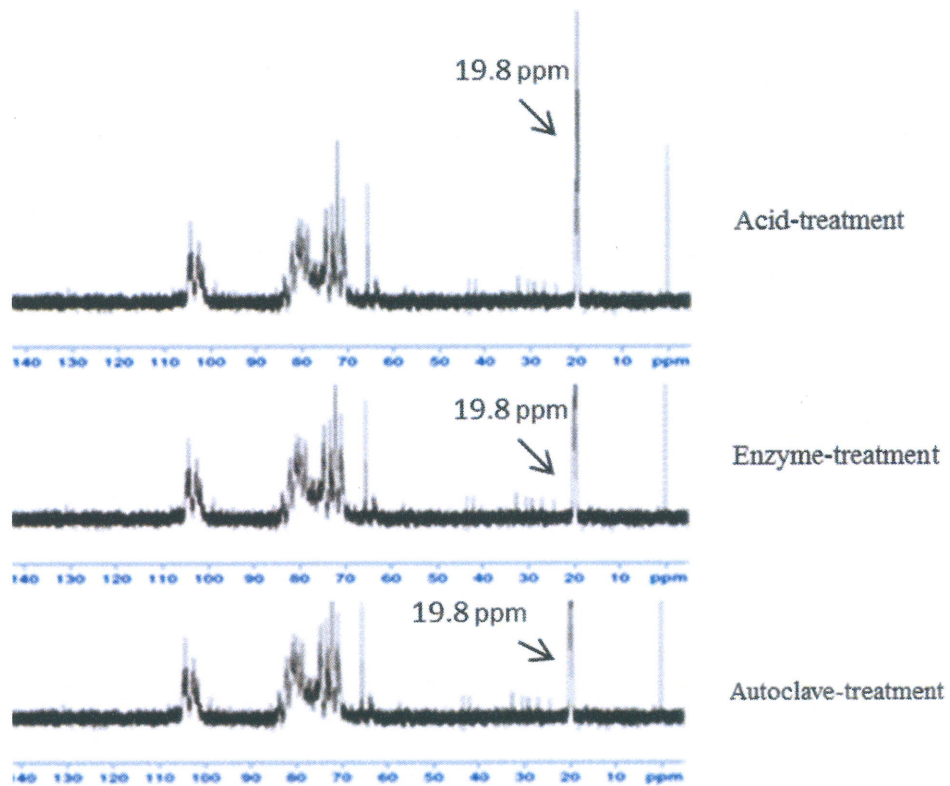


Fig. 5 ^{13}C -NMR spectra of the extracts obtained by acid-, enzyme- and autoclave-treatment.

Table 3 Constituent sugars of purified polysaccharide obtained by enzyme-treatment of *Monostroma nitidum*.

Constituent sugar	Molar ratio(-)*
L-Rhamnose	5.13
D-Glucose	0.53
D-Xylose	0.15
D-Galactose	0.05
D-Glucuronic acid	1.00

* Molar ratio of each sugar against Glucuronic acid

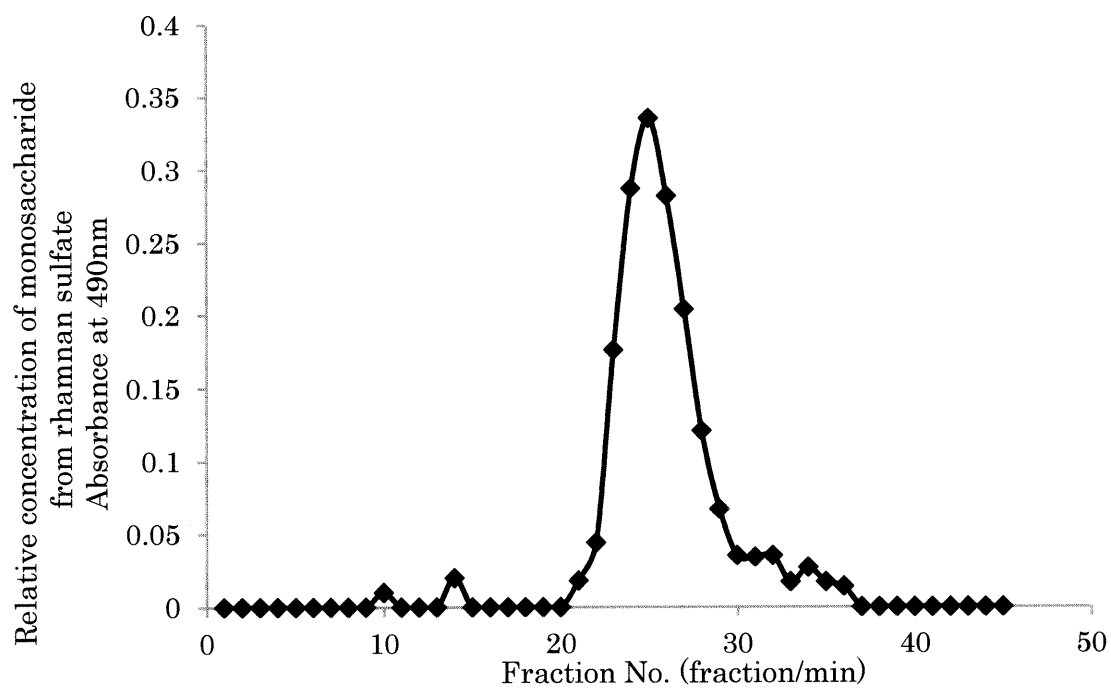


Fig. 6 Estimation of purity and its molecular weight of rhamnan sulfate obtained from *monostroma nitidum* by enzyme treatment using GPC method. This figure shows the relative concentration of monosaccharide analyzed by Phenol-sulfuric acid method.

2-4 小括

養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の有効な抽出方法を検討するため、水抽出法、酸処理抽出法、酵素処理抽出法及びオートクレーブ処理抽出法の検討を行った。その結果、水抽出法では多糖は得られず、酸処理抽出法、酵素処理抽出法及びオートクレーブ処理抽出法で得られた各抽出物は、IR、¹H-NMR 及び¹³C-NMR の結果から、すべて硫酸化多糖の構造を有することが確認できた。ただし、酸処理抽出物は灰分含有率が最も高く、オートクレーブ処理抽出物にはデンプンが含まれていた。また、酸処理抽出物及びオートクレーブ処理抽出物は酵素処理抽出物に比べ、分子量の低下がみられた。さらに、酵素処理抽出物の構成糖分析の結果から、酵素処理抽出物の構成糖は、ラムノース及びグルクロン酸を主とする多糖体であり、酵素処理抽出物はラムナン硫酸であることが確認できた。さらに、GPC 分析の溶離液をフェノール硫酸法で、糖濃度を測定した結果、このラムナン硫酸はフラクション No.25 付近にピークトップ分子量 700kDa の成分を中心とする大きなピークをもち、他は、フラクション No.10、No.14、No.31~36 に小さなピークが見られたが、ピーク面積比より求めたフラクション No.20~30 に含まれるピークの糖量は全体の 98.6%であり、酵素処理抽出により得られたラムナン硫酸の分子量はかなり揃ったラムナン硫酸であることが確認できた。したがって、ヒトエグサからラムナン硫酸を抽出する最も有

効な抽出法は、硫酸基含有率及び分子量が最も高く、さらに、灰分含有率が最も低く、デンプン及び蛋白質の混入がない酵素処理法であることが分かった。

第三章以降の実験の試料として、酵素処理法で得られた硫酸基含有率20%(w/w)、ピークトップ分子量700kDaのラムナン硫酸をRS(20, 700kDa)とし、ヒアルロニダーゼ阻害活性に関する種々の検討を行った。

第三章 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性

3-1 序論

ヒトの場合、皮膚のシワやたるみの形成は皮膚の弾力低下や水分保持能力の低下が原因と考えられているが、これらは真皮中のコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸等の細胞間マトリクス成分の減少が関わっている。特にヒアルロン酸は結合組織に広く分布する高分子多糖体として知られており、皮膚中の水分を保持する役割を担っている³¹⁾。従って、ヒアルロン酸の減少を抑制することは皮膚の健康維持において重要である。このヒアルロン酸の減少を抑制するためにはヒアルロン酸の分解を防ぐ必要があり、ヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼの活性を阻害する物質が注目されている。

ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸を D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンに加水分解する酵素であり¹²⁾、ヒアルロニダーゼの活性を阻害することは、ヒアルロン酸の過剰な分解を防ぎ、皮膚の老化を予防する方法の一つとして重要である。さらに、ヒアルロニダーゼは炎症反応に関わる酵素として知られており³²⁾、この酵素の阻害はアレルギー症状 I 型に関与する肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制と正の相関にあることが分かっている^{33,34,35)}。即ち、ヒアルロニダーゼ阻害活性を示す物質は、ヒアルロニダーゼの活性を阻害することにより、間接的に抗アレルギー、抗炎症作用を示す。このことからヒアルロ

ニダーゼ阻害物質の探索は有用である。現在、発見されているヒアルロニダーゼ阻害物質の総数は110であり、その内訳はタンパク質が2(1.8%)、グリコサミノグリカンが5(4.6%)、多糖類が10(9.1%)、脂肪酸が3(2.7%)、アルカロイドが3(2.7%)、フラボノイド・テルペノイドが22(20%)、抗酸化物質・ポリフェノールが17(16%)、抗炎症薬が8(7.3%)、抗アレルギー薬が4(3.7%)、合成化合物が24(21.9%)及びグリコシド・サポニンが4(3.7%)である。これらは由来別にすると植物由来が61(56%)、合成・半合成が37(34%)、動物由来が9(8%)及び微生物由来が3(2.8%)であり、植物由来のヒアルロニダーゼ阻害物質が最も多く、天然資源の中から新たなヒアルロニダーゼ阻害物質を探索することは、天然資源の新規利用法の開発において有効である。³⁶⁾

硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性は褐藻類、紅藻類の硫酸化多糖で報告されているが、緑藻類の硫酸化多糖については、ほとんど報告されていない。そこで、本章では、第二章で述べた方法により、ヒトエグサから抽出したラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性を調べ、他の硫酸化多糖との比較を行い、さらに、ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基含有率及び分子量の影響を調べた。

3-2 実験

3-2-1 試料

第二章でヒトエグサの酵素処理法により抽出した硫酸基含有率 20%(w/w)及び分子量(プルラン相当分子量)700kDa のラムナン硫酸を RS(20, 700kDa)とし、以降の実験に供した。その詳細は前章の 2-2-2 (3)に示したが、その抽出方法を改めて Fig. 7 に図示した。

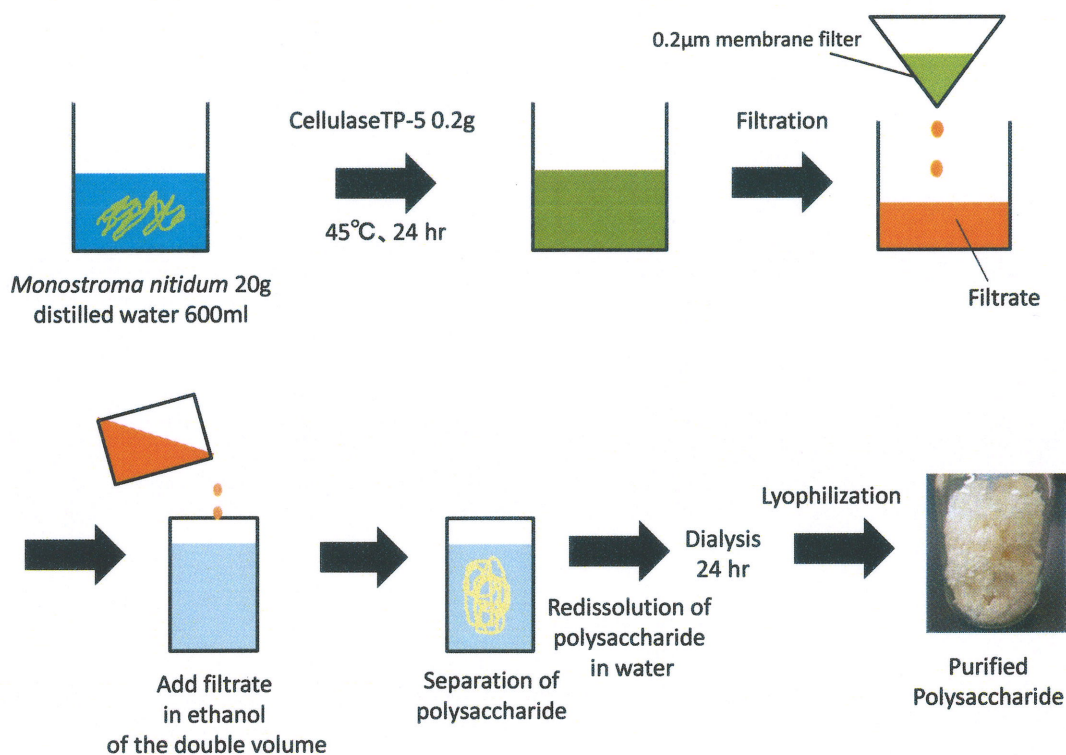


Fig. 7 Experimental procedure for enzyme treatment of *Monostroma nitidum*.

3-2-2 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性

ヒアルロニダーゼ阻害試験は Kakegawa らの方法^{33,52)}を参考に行った。その実験手順を Fig. 8 に示す。0.8mg/mL 基質酢酸緩衝液(ヒアルロン酸ナトリウム、和光純薬製)を加えた時の試料濃度(以降、終濃度とする)が、それぞれ 0.10、0.12、0.16、0.18、0.20mg/mL になるよう、0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に RS(20, 700kDa)を溶解したものを試料溶液とした。この試料溶液 100 μ L に 4mg/mL 酵素酢酸緩衝液(ヒアルロニダーゼ Type IV-S from Bovine Testes(3000U/mg)、シグマ社製)50 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間加温した。次に、Compound 48/80(シグマ社製)⁵²⁾2mg と塩化カルシウム・二水和物⁵³⁾15mg を同じく 0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)4mL に溶解した酵素活性化剤 100 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分加温した。0.8mg/mL 基質酢酸緩衝液 250 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 40 分間加温し、酵素反応後、0.4mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 μ L と 0.4mol/L 水酸化カリウム-0.8mol/L ホウ酸溶液 100 μ L を加え、酵素反応を停止させた。沸騰水浴中で 3 分間加熱し、冷却後、p-ジメチルベンズアルデヒド試薬(p-ジメチルベンズアルデヒド 5g を氷酢酸 44mL、10mol/L 塩酸 6mL に溶解し、使用時に氷酢酸で 10 倍希釈した溶液)3.0mL を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間加温後、585nm で吸光度(U-2000 Spectrophotometer, HITACHI)を測定した。試料溶液を添加した場合の吸光度を試料溶液吸光度(S)とした。試料溶液の代わりに純水を用い、測定したものをコン

トロール溶液吸光度(C)とした。試料溶液及び酵素酢酸緩衝液の代わりに酢酸緩衝液を用い、測定したものをコントロールblank溶液吸光度(CB)とした。酵素酢酸緩衝液の代わりに酢酸緩衝液を用い、測定したものを試料blank溶液吸光度(SB)とした。それぞれの吸光度を用い、ヒアルロニダーゼ阻害率(%)を以下の式により算出した。

$$\text{ヒアルロニダーゼ阻害率(\%)} = 1 - \left(\frac{S-SB}{C-CB} \right) \times 100 \dots (1)$$

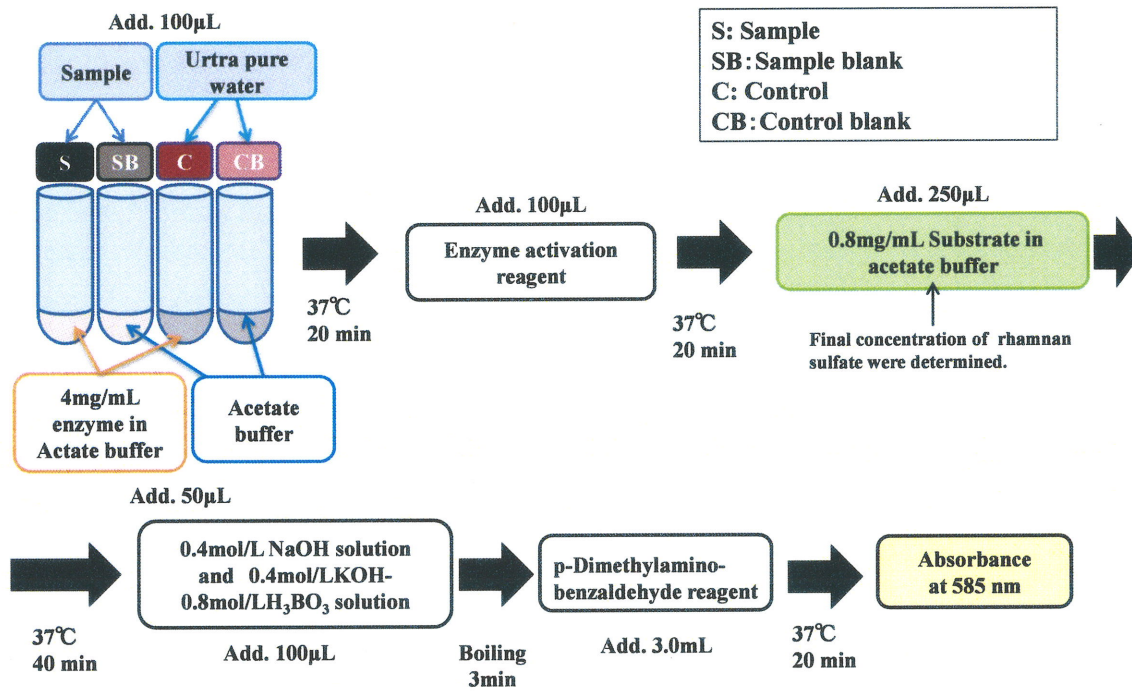


Fig. 8 The process of hyaluronidase-inhibitory activity test.

3-2-3 ラムナン硫酸と他の硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害比較

ラムナン硫酸と他の種類の硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性を比較するため、硫酸化多糖のフコイダン、ポルフィラン、κ-カラギーナン、λ-カラギーナン及びRS(20, 700kDa)を3-2-2項と同様の方法で、終濃度0.10mg/mLの時の各硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害率を求めた。

3-2-4 ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基の影響

ヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基の影響を調べるため、RS(20, 700kDa)に対して、過硫酸化及び脱硫酸処理を行い、硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸の調製を行った。

3-2-4-1 ラムナン硫酸の過硫酸化処理による硫酸基高含有ラムナン硫酸の調製

RS(20, 700kDa)の過硫酸化処理はSoedaら⁵⁴⁾の方法で行った。RS(20, 700kDa) 200 mgを超純水50mLに溶解させ、水酸化テトラブチルアンモニウムで中和し、凍結乾燥後、得られた粉末は五酸化二リンを入れたデシケーター中で無水状態にした。これを10 mLのジメチルホルムアミドに分散させ、その後、三酸化硫黄-トリメチルアミン複合体667 mgを加え、50°Cで24時間静置反応させた。冷却後、飽和酢酸ナトリウムエタノール溶液を2~3 mL加えた。さらに冷エタノー

ルを添加し、沈殿物を回収した。回収物を蒸留水に溶解し、アンバーライト (IR120B NA)で脱塩後、凍結乾燥を行い、RS (20, 700kDa) の過硫酸化物を得た。過硫酸化物の硫酸基含有率をロジゾン酸法により求めた結果、硫酸基含有率は41%(w/w)であった。以後、この過硫酸化ラムナン硫酸を RS (41) とする。

3-2-4-2 ラムナン硫酸の脱硫酸処理による硫酸基低含有ラムナン硫酸の調製

RS(20, 700kDa)の脱硫酸処理はソルボリシス法により行った^{54,55,56}。RS (20, 700kDa) 100 mg を 50 ml の蒸留水に溶解後、陽イオン交換樹脂(Dowex 50W×4, Dow Chemical Co.)に供し、溶出液をピリジンで中和し、流水中で 24 時間透析を行った。その後、内液を凍結乾燥し、RS (20, 700kDa) のピリジニウム塩を調製した。これを 90%ジメチルスルホキシド-10%メタノール 50 mL に溶解し、窒素雰囲気下 80°C、4 時間又は 70°C、20 分間加熱した。これらを流水中で 24 時間透析後、透析膜内液を凍結乾燥して 2 種類の RS (20, 700kDa) の脱硫酸化物を得た。脱硫酸化物の硫酸基含有率はロジゾン酸法により求めた。それぞれの硫酸基含有率は 0.5% (w/w)[反応時間 80°C、4 時間]、7% (w/w)[反応時間 70°C、20 分間]であった。以降、硫酸基含有率 0.5% (w/w)の脱硫酸化ラムナン硫酸を RS (0.5)、7% (w/w)のものを RS (7) とする。RS (20, 700kDa) の過硫酸化処理ま

たは脱硫酸処理で得られた硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸の反応条件及び硫酸基含有率を Table 4 に示す。

Table 4 Content of sulfate group of oversulfated or desulfated polysaccharides from RS(20, 700kDa). The figure in parenthesis denotes the content rate %(w/w) of the sulfate group in oversulfated and desulfated polysaccharides.

○ **Oversulfated treatment**

	Oversulfated treatment
Sample	RS(41)
Reaction condition	50°C 24hr
Sulfate group %(w/w)	41 %(w/w)

○ **Desulfated treatment**

	Desulfated treatment	
Sample	RS(7)	RS(0.5)
Reaction condition	70°C 20min	80°C 4hr
Sulfate group %(w/w)	7 %(w/w)	0.5 %(w/w)

3-2-4-3 硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性

硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸 RS(0.5)、RS(7)、RS(20, 700kDa)及び RS(41)を用い、3-2-2 項と同様の方法で、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。基質酢酸緩衝液を加えた時のそれぞれのラムナン硫酸の終濃度が、それぞれ 0.10、0.12、0.16、0.18、0.20mg/mL になるよう 0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に溶解したものを試料溶液とし、それぞれのラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害率(%)を 3-2-2 項の(1)の式から求めた。

3-2-5 ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の分子量の影響

ヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼすラムナン硫酸の分子量の影響を調べるため、RS(20, 700kDa)の低分子化処理を行い、低分子化ラムナン硫酸の調製を試みた。

3-2-5-1 ラムナン硫酸の低分子化処理

ラムナン硫酸の低分子化処理は Wen-Jun らの方法⁵⁸⁾を参考に行った。RS (20, 700kDa) 1g を 5%または 10%過酸化水素水に溶解し、50°Cで 30 分、加水分解後、これを透析膜により 24 時間透析し、凍結乾燥を行い、低分子化したラムナン硫酸 2 種類を得た。これら 2 種類のラムナン硫酸の硫酸基含有率及び分子量を

2-2-2(3)硫酸基含有率及び(5)分子量測定の方法により求め、その結果を Table 5 に示す。以降、[5%過酸化水素水-50°C-30 分]の反応条件で得られた低分子化ラムナン硫酸を RS(18, 200kDa)、[10%過酸化水素 50°C-30 分]の反応条件で得られた低分子化ラムナン硫酸を RS(17, 50kDa)とする。

Table 5 Peak top molecular weight and content of sulfate group of hydrolyzed polysaccharides from RS(20, 700kDa).

	RS(20, 700kDa)	RS(18, 200kDa)	RS(17, 50kDa)
Reaction conditions		5% hydrogen peroxide solution 50°C, 30min	10% hydrogen peroxide solution 50°C, 30min
Peak top molecular weight*	700kDa	200kDa	50kDa
Sulfate group %(w/w)	20 %(w/w)	18 %(w/w)	17 %(w/w)

* Reduced molecular weight calculated as pullulan by GPC

3-2-5-2 分子量の異なるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性

RS(20, 700kDa)と2種類の低分子化ラムナン硫酸RS(18, 200kDa)及びRS (17, 50kDa) を用い、3-2-2 項と同様の方法で、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。基質酢酸緩衝液を加えた時の各試料の終濃度が、それぞれ0.04、0.08、0.12 及び0.16mg/mL になるように、0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に溶解したものを試料溶液とし、RS (20, 700kDa)、RS (18, 200kDa) 及びRS (17, 50kDa) のヒアルロニダーゼ阻害率(%)を3-2-2 項の(1)の式から求めた。

3-3 結果及び考察

3-3-1 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性

硫酸基含有率20%(w/w)のラムナン硫酸RS(20, 700kDa)の終濃度が0.10、0.12、0.16、0.18、0.20mg/mL となるように試料溶液を調製し、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。横軸をRS(20, 700kDa)の終濃度、縦軸を阻害率とした時の両者の関係をFig.9に示す。RS (20, 700kDa) が0.10mg/mL での阻害率は35%を示し、さらに、RS(20, 700kDa)の濃度上昇に従い、阻害率は高くなった。0.20mg/mL での阻害率は69%となり、ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼ阻害活性を有することが示された。

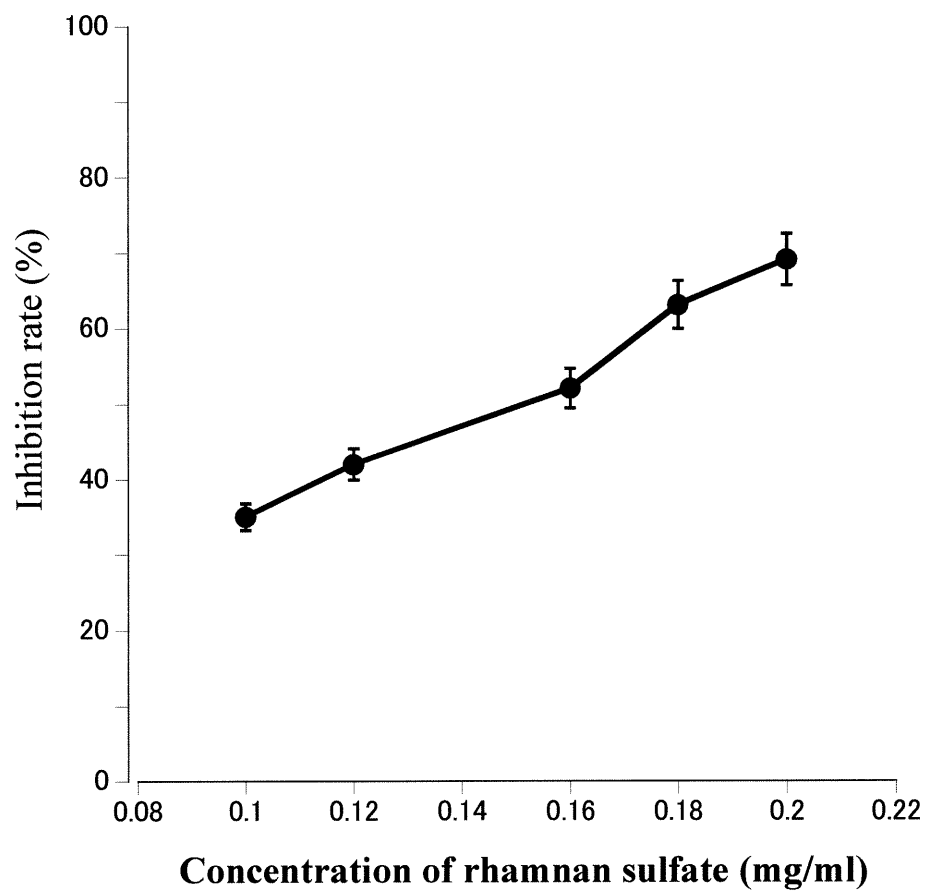


Fig. 9 Relation between rate of hyaluronidase-inhibitory activity and concentration of RS(20, 700kDa). Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean \pm SD.

3-3-2 ラムナン硫酸と他の硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害の比較

RS(20, 700kDa)と他の硫酸化多糖であるフコイダン(硫酸基含有率 29%(w/w))、ポルフィラン(硫酸基含有率 11%(w/w))、κ-カラギーナン(硫酸基含有率 22%(w/w))及びλ-カラギーナン(硫酸基含有率 31%(w/w))を用い、終濃度 0.10mg/mLにおける、それぞれのヒアルロニダーゼ阻害試験を行い、その結果を Fig. 10 に示す。それぞれの硫酸化多糖の主な構成糖の種類はフコース(フコイダン)、ガラクトース(ポルフィラン、κ-カラギーナン、λ-カラギーナン)、ラムノース(ラムナン硫酸)と異なるが、いずれの硫酸化多糖もヒアルロニダーゼ阻害活性を有し、阻害率は硫酸基含有率が高くなるに従って、上昇する傾向が見られ、硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性には硫酸化多糖の硫酸基含有率が強く影響していると考えられる。ただし、κ-カラギーナンの硫酸基含有率は22%(w/w)であり、ラムナン硫酸の20%(w/w)より高いが、阻害率はラムナン硫酸より低い値を示した。これはラムナン硫酸とκ-カラギーナンの糖鎖構造の違いが関係すること考えられる^{6,30)}。

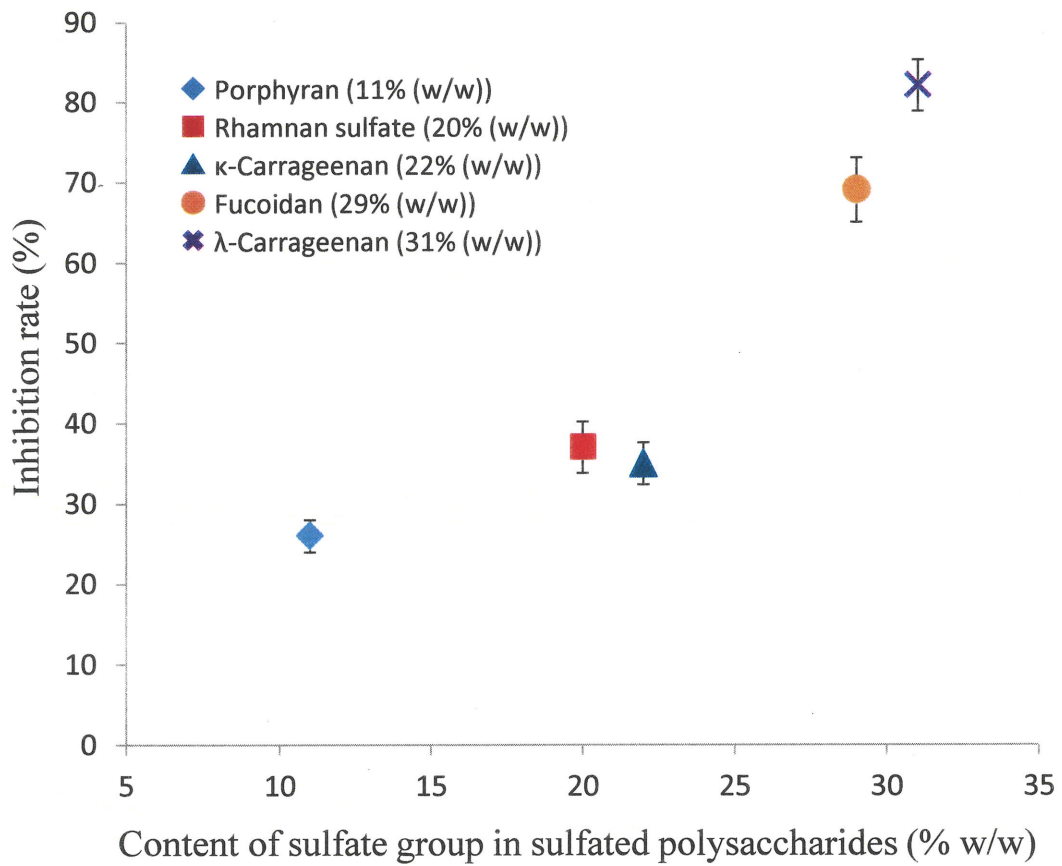


Fig. 10 Hyaluronidase-inhibitory activity of various sulfated polysaccharides. The contents of sulfate group in sulfated polysaccharides are shown in parenthesis. Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean±SD.

3-3-3 ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基の影響

ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼ活性に及ぼす影響を検討した。RS(20, 700kDa)を過硫酸化処理又は脱硫酸処理することで得られた硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸 RS(0.5)、RS(7)及び RS(41)及び RS(20, 700kDa)を試料とし、試料濃度を変えてヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。それぞれのラムナン硫酸の試料濃度において、横軸を硫酸基含有率、縦軸を阻害率とした時のヒアルロニダーゼ阻害試験の結果を Fig.11 に示す。いずれの試料濃度でも、硫酸基含有率の増加とともに阻害率は高くなった。即ち、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害は、ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼに作用することで発現すると考えられた。

3-3-4 ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の分子量の影響

RS(20, 700kDa)を低分子化した2種のラムナン硫酸の分子量は、200kDa及び50kDaであり、硫酸基含有率は18%(w/w)及び17%(w/w)であったことから、RS(20, 700kDa)の過酸化水素水を用いた低分子化処理では、硫酸基の脱硫酸化はほとんど起こらなかったと考えられる。これら3種類のラムナン硫酸を用い、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行い、ラムナン硫酸の分子量がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を検討した。縦軸を阻害率、横軸をラムナン硫酸の濃度とした時の

ヒアルロニダーゼ阻害試験の結果を Fig.12 に示す。すべての分子量のラムナン硫酸で濃度の増加とともにヒアルロニダーゼ阻害率は上昇したが、各濃度における RS(20, 700kDa)、RS(18, 200kDa)及び RS(17, 50kDa)の阻害率に大きな差は見られなかった。この結果は、ヒアルロニダーゼ阻害試験の各 RS の終濃度を 0.04, 0.08, 0.12 及び 0.16mg/mL としており、各濃度における試料溶液中の RS(20, 700kDa)、RS(18, 200kDa)及び RS(17, 50kDa)のラムナン硫酸の硫酸基の絶対量がほとんど変わらないため、ラムナン硫酸の分子量に関わらず、阻害率に差は見られなかったと考えられる。

即ち、3-3-3 項及び上記の結果から、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害にはラムナン硫酸の硫酸基含有率は大きく影響するが、分子量の影響は小さいことが明らかとなった。

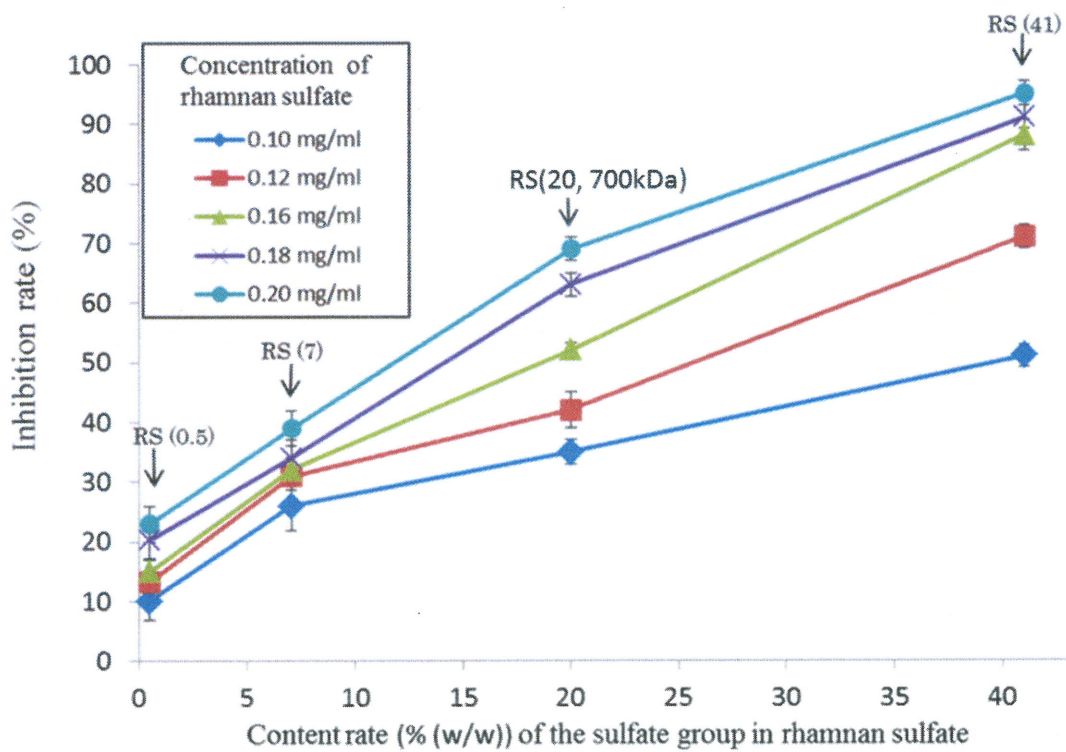


Fig. 11 Effect of content of sulfate group on hyaluronidase-inhibitory activity of rhamnan sulfate. Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean±SD.

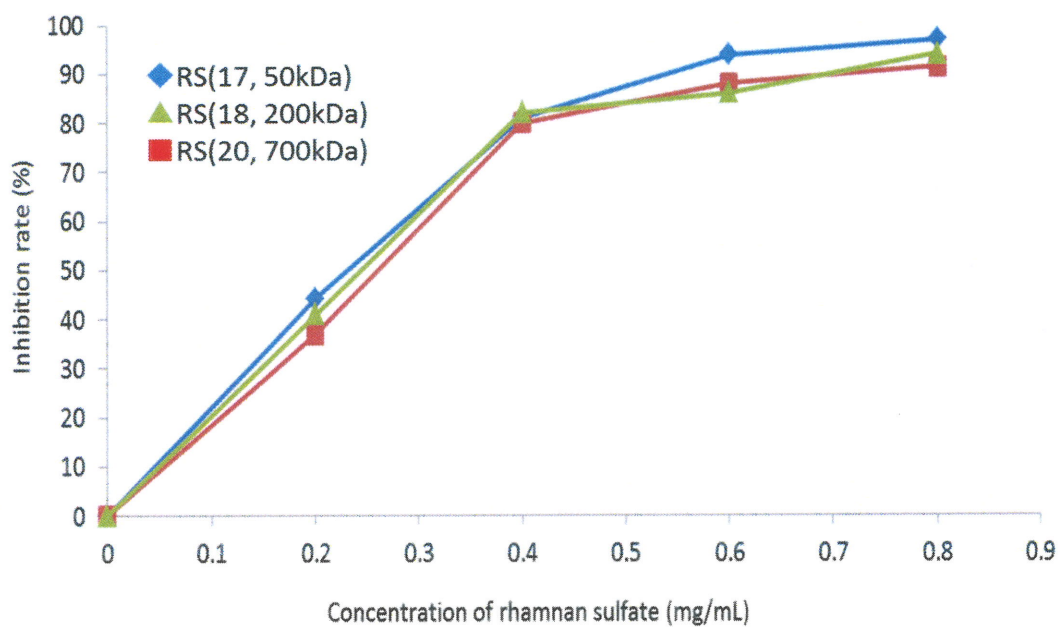


Fig. 12 Effect of molecular weight on hyaluronidase-inhibitory activity of rhamnan sulfate. Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean \pm SD.

3-4 小括

酵素処理法で得られたラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)のヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。また、ヒアルロニダーゼ阻害に及ぼすラムナン硫酸の硫酸基含有率及び分子量の影響を調べた。

ヒアルロニダーゼ阻害試験は、濃度の異なるラムナン硫酸(0.1、0.12、0.16、0.18、0.2 mg/ml)と一定量のヒアルロニダーゼ及びヒアルロン酸に対し、37°C、40 分間酵素反応を行った時のラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害率を求めた。RS(20, 700kDa)の濃度上昇に従い、ヒアルロニダーゼに対する阻害率は高くなったことから、ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼ阻害活性を有することが明らかとなった。

また、一定量の RS(20, 700kDa)と他の種類の硫酸化多糖であるフコイダン(硫酸基含有率 29% (w/w))、ポルフィラン(硫酸基含有率 11% (w/w))、κ-カラギーナン(硫酸基含有率 22%(w/w))及びλ-カラギーナン(硫酸基含有率 31% (w/w))のヒアルロニダーゼ阻害活性の比較を行った。ヒアルロニダーゼ阻害活性において、ラムナン硫酸が他の硫酸化多糖と比較して特異的な効果を示すことはなく、いずれの硫酸化多糖もヒアルロニダーゼ阻害活性を有し、その阻害率は硫酸化多糖中の硫酸基含有率が高くなるに従って、上昇する傾向が見られたことから、硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性には硫酸化多糖の硫酸基含有率が影響

していることがわかった。

そこで、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす硫酸基の影響を調べるため、RS(20, 700kDa)を過硫酸化処理または脱硫酸化処理することで、硫酸基含有率の異なる RS(0.5)、RS(7)及び RS(41)を調製し、硫酸基含有率 20 %(w/w)のラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)とともに、それぞれの濃度を変えて、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、ラムナン硫酸の硫酸基含有率の増加とともにヒアルロニダーゼ阻害率は高くなった。また、ラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)と、これを 5%及び 10%濃度の過酸化水素水により加水分解し、得られた RS(18, 200kDa)及び RS(17, 50kDa)のラムナン硫酸を用い、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、分子量の異なるいずれのラムナン硫酸においても、ヒアルロニダーゼ阻害率に大きな差は見られなかった。これは、阻害試験における試料溶液中の分子量の異なる各ラムナン硫酸の硫酸基の絶対量がほとんど変わらないため、ヒアルロニダーゼ阻害率に差が見られなかったと考えられた。

以上の結果から、ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼ阻害活性を有しており、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害に関わる要因としては、ラムナン硫酸中の硫酸基が重要であり、分子量の影響は少ないことが分かった。

第四章 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構

4-1 序論

ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害にはラムナン硫酸中の硫酸基が影響することが、第三章で明らかとなった為、本章では、ヒアルロニダーゼ阻害機構にラムナン硫酸の硫酸基がどのように作用するのか、より詳細に検討を行った。

一定量のラムナン硫酸とヒアルロニダーゼを 0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に溶解すると、Photo.1 に示すように白濁物質の生成が観察され、白濁物質の生成の程度は硫酸基含有率の高いラムナン硫酸ほど多かった。このような現象について、Tomita、Kurinomaru ら^{59,60,61,62,63,64)}は負電荷を持つ高分子と正電荷を持つ酵素(蛋白質)が静電氣的相互作用により複合体を生成し、その結果、酵素活性を増加または減少させることを報告している。

また、動物の生体内に存在する硫酸化多糖のヘパリンの抗血液凝固作用機構は、ヘパリンの硫酸基及び硫酸アミド基の持つ負電荷が抗凝血タンパク質であるアンチトロンビンⅢのリジン側鎖のアミノ基の正電荷とイオン相互作用により結合することで抗血液凝固作用を示し、ヘパリンの硫酸基含有率が増加すると抗血液凝固作用が高まることがわかっている⁶⁵⁾。

そこで、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼも同様のイオン相互作用によりラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体を生成していると考えた。さらに、この複

合体の生成がヒアルロニダーゼの基質であるヒアルロン酸の分解の阻害にどのように影響しているかを詳細に検討した。具体的には、まず、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する阻害様式を Lineweaver-Burk の式により決定した。次に、白濁物質の IR 分析から白濁物質がラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体であることを確認し、さらに、複合体の $^1\text{H-NMR}$ 分析からラムナン硫酸とヒアルロニダーゼのイオンの相互作用を確認した。最後に、ラムナン硫酸中の硫酸基含有率と複合体生成率およびヒアルロニダーゼ阻害活性との関係を求め、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構を総合的に考察した。

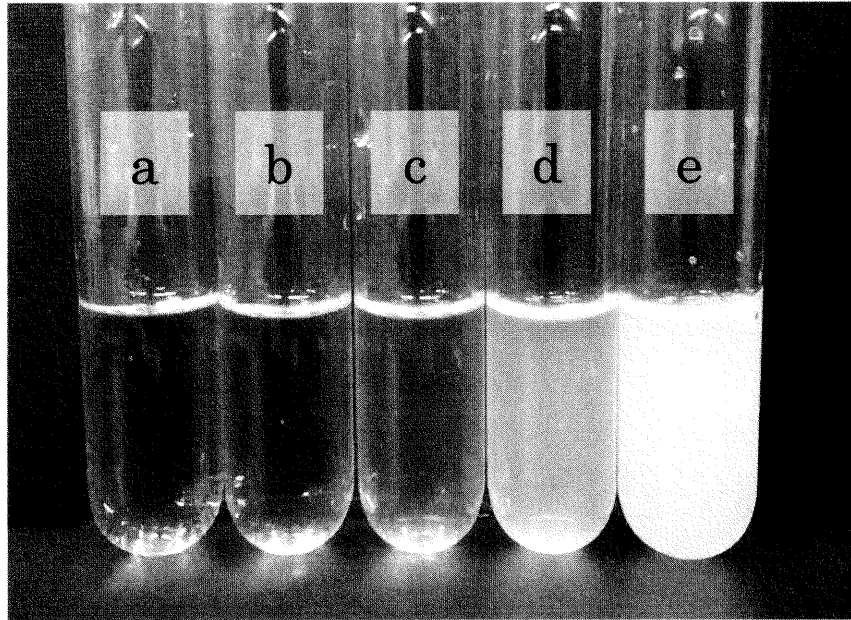


Photo. 1 Appearances of the 0.1 mol/L acetate buffer solutions (pH: 4.0) containing hyaluronidase alone or RS with different content rates of the sulfate group plus hyaluronidase. (a) Hyaluronidase alone, (b) RS (0.5) + hyaluronidase, (c) RS (7) + hyaluronidase, (d) RS (20, 700kDa) + hyaluronidase, (e) RS (41) + hyaluronidase.

4-2 実験

4-2-1 試料

第二章の酵素処理抽出で得られたRS(20, 700kDa)及びRS(20, 700kDa)の過硫酸化及び脱硫酸処理により得られた硫酸基含有率の異なるRS(41)、RS(7)及びRS(0.5)の4種のラムナン硫酸を実験に供した。

4-2-2 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式の検討

ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式を調べるため、RS(20, 700kDa)を0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に0.25、0.50及び0.75mg/mLの濃度となるように溶解し、試料溶液とした。ヒアルロニダーゼ(ヒアルロニダーゼ Type IV-S from Bovine Testes(3000U/mg)、シグマ社製)は0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に1mg/mLとなるように溶解し、酵素溶液とした。ヒアルロン酸ナトリウム(和光純薬製)は0.1mol/mL 酢酸緩衝液に0.100、0.125、0.250、0.500及び1.00mg/mLの濃度となるように溶解し、基質溶液とした。試験管に酵素溶液100 μ Lとcompound 48/80溶液(Compound 48/80(シグマ社製)2mgと塩化カルシウム二水和物15mgを0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)4mLに溶解)を100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間加温した。次に、試料溶液100 μ Lと基質溶液(0.10、0.125、0.250、0.500及び1.00mg/mL)250 μ Lをそれぞれ試験管に加え、37 $^{\circ}$ C、10分間酵素反応させた。酵素反応後、0.4mol/L

水酸化ナトリウム溶液と 0.4mol/L 水酸化カリウム-0.8mol/L ホウ酸溶液を各 100 μ L ずつ加え、沸騰水中で 3 分間煮沸した。その後、室温まで冷却し、p-ジメチルベンズアルデヒド試薬(p-ジメチルベンズアルデヒド 5g を氷酢酸 44mL、10mol/L 塩酸 6mL に溶解し、使用時に氷酢酸で 10 倍希釈した溶液)を 3mL 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間加温し、その後更に、室温まで冷却後、585nm で吸光度を測定した。測定した吸光度と基質濃度の逆数の関係を Lineweaver-Burk の式に従ってプロットし、阻害様式を求めた。

4-2-3 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の IR 及び $^1\text{H-NMR}$ 測定

4-2-3-1 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の IR 分析

ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼを混合すると白濁物質が生成し、それを次の操作により精製し、IR 分析を行った。0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に RS(20, 700kDa)の濃度が 1mg/mL となるように溶解した溶液 1.0mL と 0.1mol/L 酢酸緩衝液にヒアルロニダーゼの濃度が 4mg/mL となるよう溶解した溶液 0.5mL を混合し、白濁物質の懸濁液を調製後、遠心分離を行い、上澄みを捨て白濁物質の沈殿物を得た。さらに酢酸緩衝液を取り除くため、70%エタノール水溶液で 3 回洗浄し、乾燥させたものを IR 分析に供した。IR 測定は RS(20, 700kDa)、ヒアル

ロニダーゼ及び白濁物質を試料として用い、それぞれ臭化カリウム法でフーリエ変換赤外分光光度計(日本分光 FT/IR-470Plus 型)を用い、測定した。

4-2-3-2 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の¹H-NMR 分析

瓜生らの方法⁶⁵⁾を参考に、RS(20, 700kDa)100mg を重水 1mL に溶解させ、RS(20, 700kDa)溶液を調製し、これを母液として所定量を計り取って重水で希釈し使用した。ヒアルロニダーゼ 100mg を重水 4mL に溶解させ、ヒアルロニダーゼ溶液を調製した。NMR 用測定試料は、所定濃度に希釈した RS(20, 700kDa)溶液 200 μ L とヒアルロニダーゼ溶液 250 μ L を濃度比[RS(20, 700kDa)/ヒアルロニダーゼ]=0.1、0.2 及び 0.25 となるように NMR 管中で混合し、調製した。この NMR 管を 35 $^{\circ}$ C の恒温器中で一晩静置し、複合体を生成させたものを測定に用いた。調製した複合体の¹H-NMR(BRUKER 社製 600MHz スペクトロメーター)を測定した。

4-2-4 ラムナン硫酸の硫酸基含有率、ヒアルロニダーゼ阻害率及び複合体生成率との間の三者の関係

4-2-4-1 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体生成の検討

白濁物質の生成率は白濁物質生成後の溶液中に残存するヒアルロニダーゼ(蛋白質)の濃度を Bradford 法により測定することで求めた。硫酸基含有率の異なる

RS(0.5)、RS(7)、RS(20, 700kDa)及びRS(41)のラムナン硫酸を用い、0.1mol/L 酢酸緩衝液(pH4.0)に、それぞれ 0.20mg/mL になるように溶解したものを試料溶液とした。この試料溶液 0.5mL 及び 0.1mol/L 酢酸緩衝液 0.5mL(コントロール溶液)に 4mg/mL 酵素酢酸緩衝液(ヒアルロニダーゼ Type IV-S from Bovine Testes(3000U/mg)、シグマ社製)0.25mL を加え、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの白濁物質の懸濁液を得た。この懸濁液を 0.2 μ m メンブレンフィルターろ過により白濁物質を除去して得たろ液の一部を実験に供した。それぞれのろ液中の酵素(蛋白質)残存率を Bradford 法により調べた。それぞれのろ液 120 μ L に Bradford 試薬 3mL を加え、10 分後に 595nm の吸光度を測定したものを試料溶液吸光度(Sp)とした。0.1mol/L 酢酸緩衝液に酵素のみを溶解したものをコントロール溶液とし、上記と同様の操作を行ったものをコントロール溶液吸光度(Cp)とした。酵素残存率は(2)式、複合体生成率は(3)式により求めた。

$$\text{酵素残存率(\%)} = 1 - \left(\frac{\text{試料溶液吸光度(Sp)}}{\text{コントロール溶液吸光度(Cp)}} \right) \times 100 \dots (2)$$

$$\text{複合体生成率(\%)} = 100 - \text{酵素残存率(\%)} \dots (3)$$

4-2-4-2 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体をろ過したろ液のヒアルロン

酸分解能力の検討

4-2-4-1 項の操作により得たそれぞれのろ液の一部を試料溶液として用い、ろ液にヒアルロン酸ナトリウムを加え、それぞれのろ液のヒアルロン酸分解率を求めた。それぞれのろ液 150 μ L に対し、Compound 48/80 溶液 100 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分加温した。次いで、0.8mg/mL 基質酢酸緩衝液(ヒアルロン酸ナトリウム、和光純薬製)250 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 40 分間加温し、酵素反応後、0.4mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 μ L と 0.4mol/L 水酸化カリウム-0.8mol/L ホウ酸溶液 100 μ L を加え、酵素反応を停止させた。沸騰水浴中で 3 分間加熱し、冷却後、p-ジメチルベンズアルデヒド試薬 3.0mL を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間加温後、紫外可視分光光度計(U-2000 Spectrophotometer, HITACHI)で 585nm の吸光度を測定し、これを試料溶液吸光度(S_d)とした。さらに、試料溶液の代わりに 0.1mol/L 酢酸緩衝液に酵素のみを溶解したコントロール溶液を、上記と同様の操作を行い、コントロール溶液吸光度(C_d)とした。ヒアルロン酸分解率(%)を(4)式により算出した。

$$\text{ヒアルロン酸分解率(\%)} = \left(\frac{\text{試料溶液吸光度}(S_d)}{\text{コントロール溶液吸光度}(C_d)} \right) \times 100 \dots (4)$$

4-3 結果及び考察

4-3-1 ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式

RS(20, 700kDa)を試料として用い、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する酵素阻害様式の検討を行った。阻害様式は基質濃度の逆数($1/S$) に対して反応速度の逆数($1/V$)をプロットする Lineweaver-Burk の式を用い、決定した^{66,67)}。結果を Fig. 13 に示す。酵素阻害様式としては大きく分けて拮抗阻害(各直線が y 軸上で交差する場合)、非拮抗阻害(各直線が x 軸上で交差する場合)及び不拮抗阻害(各直線が平行で交差しない場合)に分けられる。Fig.13 に示すように、RS(20, 700kDa)の濃度を 0.00、0.25、0.50 及び 0.75mg/mL とした各直線が y 軸上で交差していることから、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式はヒアルロニダーゼの活性部位にラムナン硫酸が直接作用する拮抗阻害であることが明らかとなった。第三章の結果も合わせて考えると、ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼの活性部位に直接作用する阻害様式と考えられる。

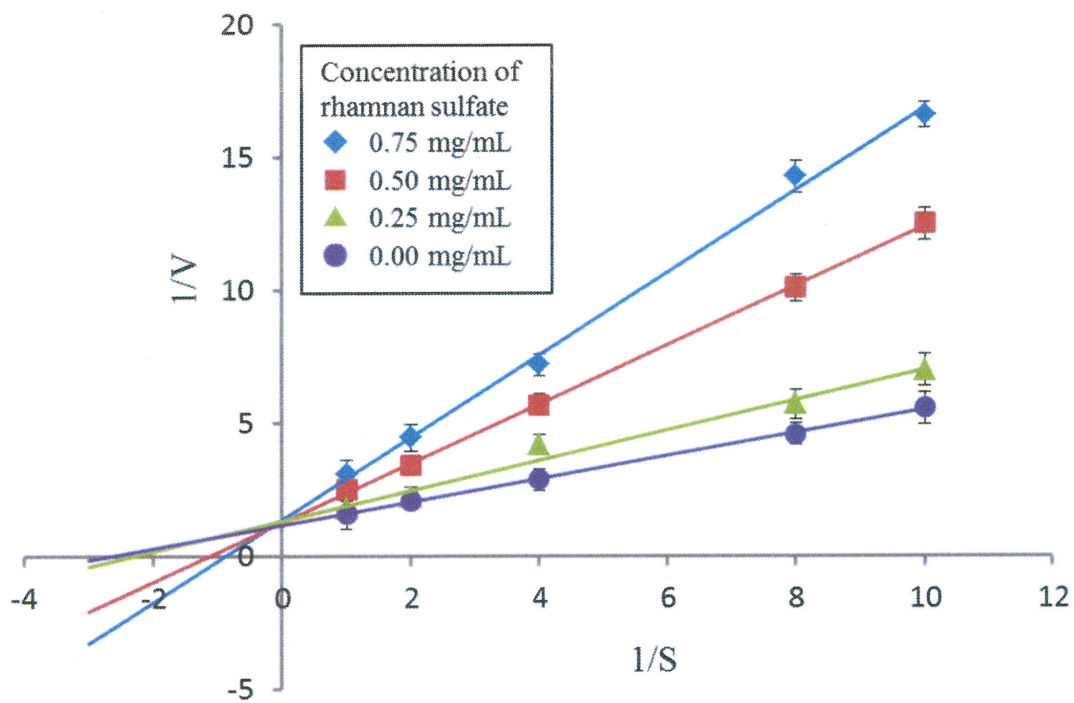


Fig. 13 Lineweaver-Burk plot for the hyaluronidase reaction inhibited by different concentration of rhamnan sulfate. Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean \pm SD.

4-3-2 ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の IR 及び $^1\text{H-NMR}$ 測定結果

RS(20, 700kDa)、ヒアルロニダーゼ及び白濁物質のそれぞれの IR 分析の結果を Fig. 14 に示す。白濁物質の IR スペクトルでは 1540cm^{-1} 及び 1260cm^{-1} に特異的な吸収を示し、RS(20, 700kDa)及びヒアルロニダーゼの IR スペクトルと比較すると 1540cm^{-1} の吸収はヒアルロニダーゼのアミド II バンド⁴⁷⁾に由来し、 1260cm^{-1} の吸収はラムナン硫酸の硫酸基に由来していることがわかる。即ち、この白濁物質はラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼの複合体であることが確認できた。

また、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成機構を調べるため、複合体の $^1\text{H-NMR}$ 測定分析を行った。RS(20, 700kDa)とヒアルロニダーゼの複合体の $^1\text{H-NMR}$ 測定の結果を Fig. 15 に示す。ヒアルロニダーゼの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから 3.05ppm にリジン残基の $\epsilon\text{-CH}_2$ のシグナルが確認でき、RS(20, 700kDa)の濃度が増加すると共に 3.05ppm のシグナルが減少し、2.78ppm に新たなシグナルが確認された。これは瓜生らが報告しているカードラン硫酸の硫酸基の負電荷とポリリジンのリジン残基の正電荷のイオン相互作用による複合体生成時のピークシフトと同じ現象であると考えられる^{65,68,69,70)}。さらに、実験に供したヒアルロニダーゼの等電点はアミノ酸配列から等電点 7.94 であり、pH4.0 の条件下

でのヒアルロニダーゼのリジン残基は正に荷電した状態となる。即ち、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは水溶液中(pH4.0)でラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼのリジン残基の正電荷がイオン相互作用することにより複合体が生成したと考えられる。

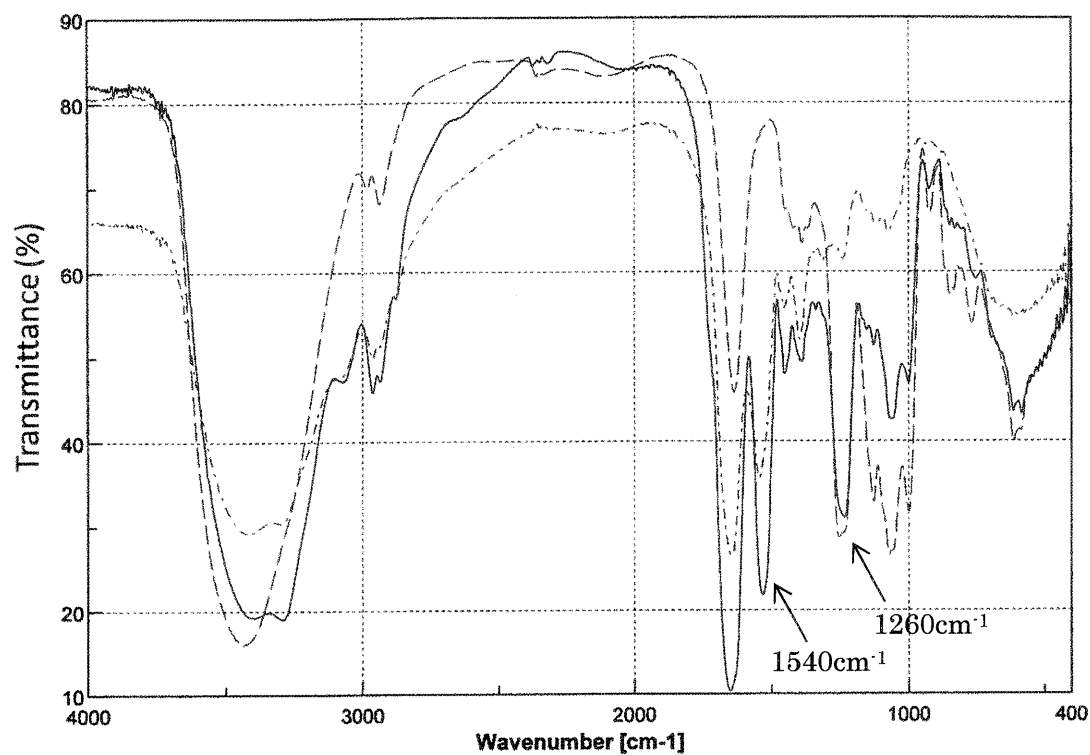


Fig. 14 Infrared spectra of the RS (20, 700kDa)-hyaluronidase complex, RS (20, 700kDa) and hyaluronidase.

———— RS(20, 700kDa)-hyaluronidase complex, - - - - - RS(20, 700kDa), - · - · - · - Hyaluronidase

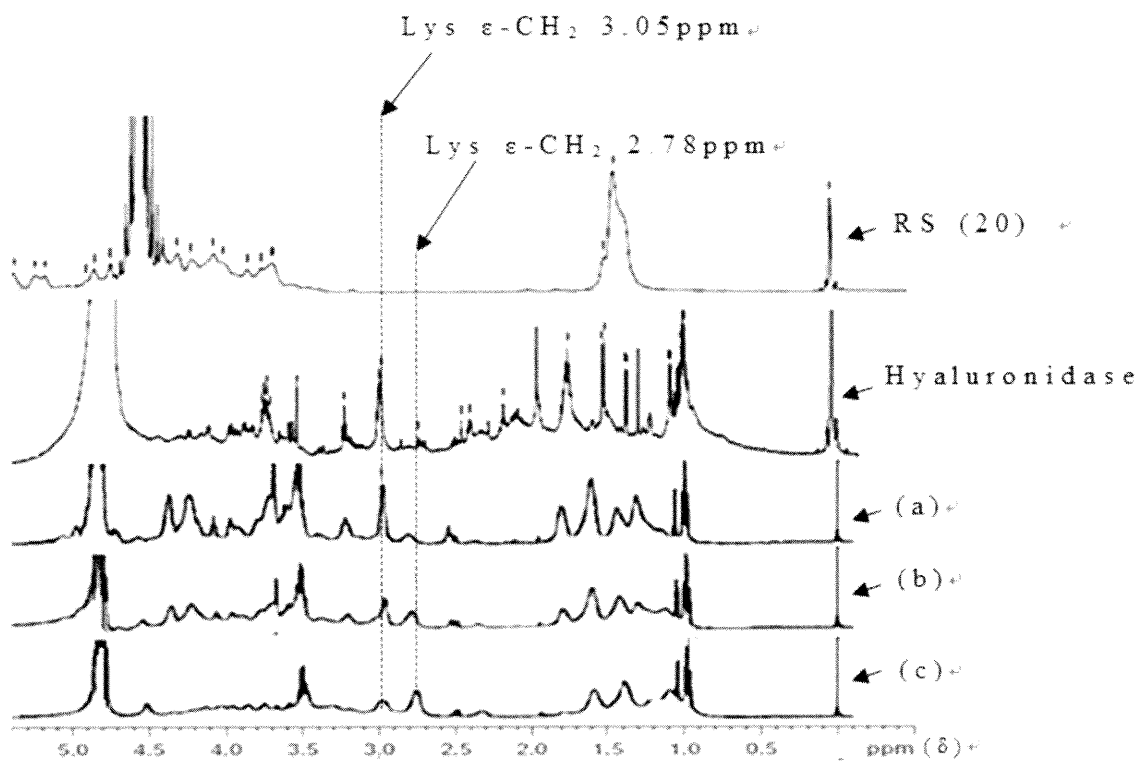


Fig. 15 Change in the ¹H-NMR spectrum of the RS (20, 700kDa)-hyaluronidase complex with the combination ratio ((a) 0.1, (b) 0.2 and (c) 0.25.) of the RS(20, 700kDa)-to-hyaluronidase.

4-3-3 ラムナン硫酸の硫酸基含有率、ヒアルロニダーゼ阻害率及び複合体生成率の三者の関係

複合体はラムナン硫酸とヒアルロニダーゼから生成しており、不溶解性の複合体をろ過によって除去し、ろ液中の蛋白質(ヒアルロニダーゼ)濃度から複合体生成率を求めた(式(3))。さらに、複合体を除去したろ液は遊離のヒアルロニダーゼが減少するので、このろ液を用い、4-2-4-2 項に示す操作によりヒアルロン酸分解率を求めた(式(4))。ろ液中に残存する遊離のヒアルロニダーゼのヒアルロン酸分解率と複合体生成率及びラムナン硫酸の硫酸基含有率の三者の関係を Fig. 16 に示す。横軸はラムナン硫酸の硫酸基含有率、縦軸(左)は複合体生成率、縦軸(右)はヒアルロン酸分解率を表す。ラムナン硫酸の硫酸基含有率の増加に従い、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成率は増加し、それに伴い、ヒアルロン酸分解率は減少した。このことより、実際に複合体が存在するヒアルロニダーゼ阻害試験の反応溶液中においても、硫酸基含有率の高いラムナン硫酸ほど多くのヒアルロニダーゼと複合体を生成し、より多くのヒアルロニダーゼを不活性化するためヒアルロニダーゼ阻害活性が高くなると考えられる。

即ち、硫酸基含有率の高いラムナン硫酸ほど、ヒアルロニダーゼと複合体を多く生成し、複合体生成量が多いほど、ろ液中のヒアルロニダーゼ含有量が減少し、ヒアルロン酸の分解が抑制された。

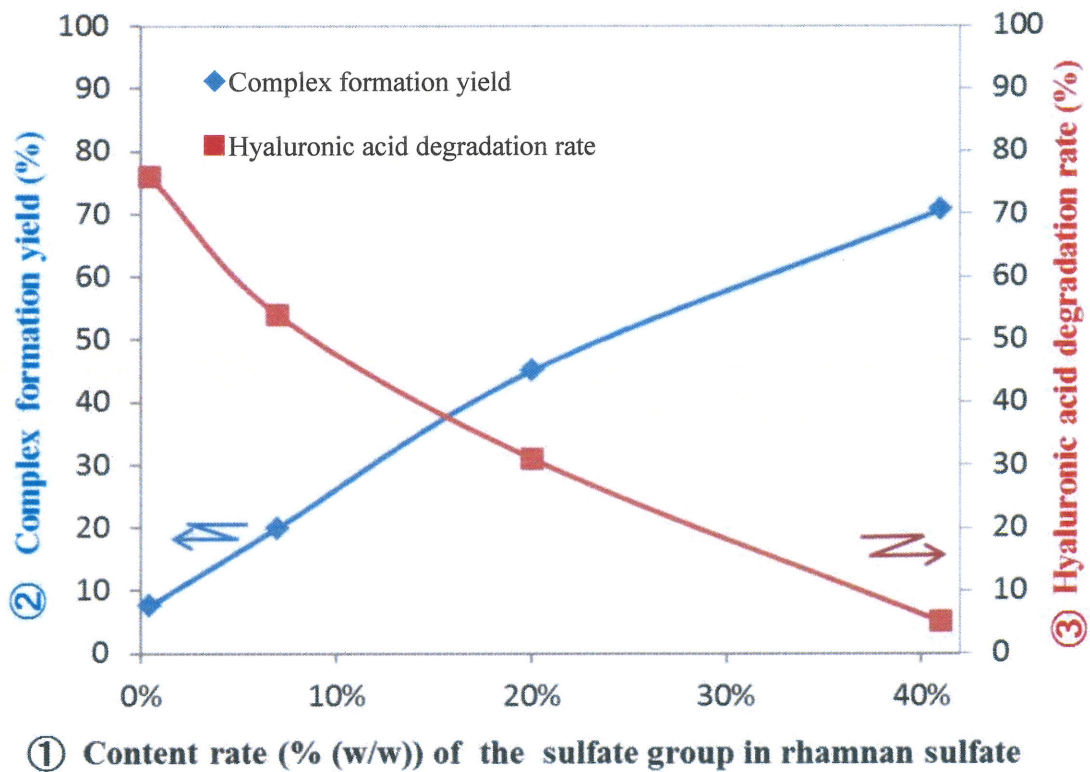


Fig. 16 Effects of the content rates of the sulfate group in rhamnan sulfate on the formation yield of the RS-hyaluronidase complex and on the degradation rate of hyaluronic acid in the complex-removed filtrate. Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean \pm SD.

4-4 小括

ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構をより詳細に調べるため、まず、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する酵素阻害様式を調べた。次に、水溶液中(pH4.0)でラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは白濁物質を生成することが観察されたので、IR 分析により、その白濁物質の構造解析からラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体であることを確認し、また、¹H-NMR 測定分析でラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成機構を検討した。最後に、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成とヒアルロニダーゼ阻害の関係についても検討を行った。

ラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)のヒアルロニダーゼ阻害様式は Lineweaver-Burk の式から、拮抗阻害であることが確認できた。拮抗阻害の酵素阻害メカニズムは、酵素の活性に関係する数種のアミノ酸残基で構成される活性部位に阻害物質が直接作用する阻害様式である。即ち、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害は、ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基に影響を与えることで阻害すると考えられた。白濁物質は IR スペクトルより、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体であることが確認できた。また、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の ¹H-NMR 分析により、ヒアルロニダーゼのリジン残基が複合体の生成に影響していることが確認できた。即ち、

ヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基の一つはリジン残基と考えられ、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼの活性部位を構成するリジン残基の正電荷がイオン相互作用によって結合し、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体が生成すると考えられた。

さらに、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成量がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるために、複合体を除去したろ液にヒアルロン酸を加え、ヒアルロン酸分解率を求め、ラムナン硫酸の硫酸基含有率及び複合体生成率との三者の関係を調べた。その結果、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成量の増加は、ろ液中のヒアルロニダーゼを減少させ、その複合体の生成量はラムナン硫酸の硫酸基含有量とともに増加した。ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼとラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体を生成することにより、ヒアルロニダーゼを不活性化したことが確認できた。

以上の結果から、ヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基の一つはリジン残基と考えられ、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼの活性部位を構成するリジン残基の正電荷がイオン相互作用により結合し、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体を生成し、ヒアルロニダーゼを不活性化し、Fig.17に示すようなヒアルロニダーゼ阻害が発現していると結論された。

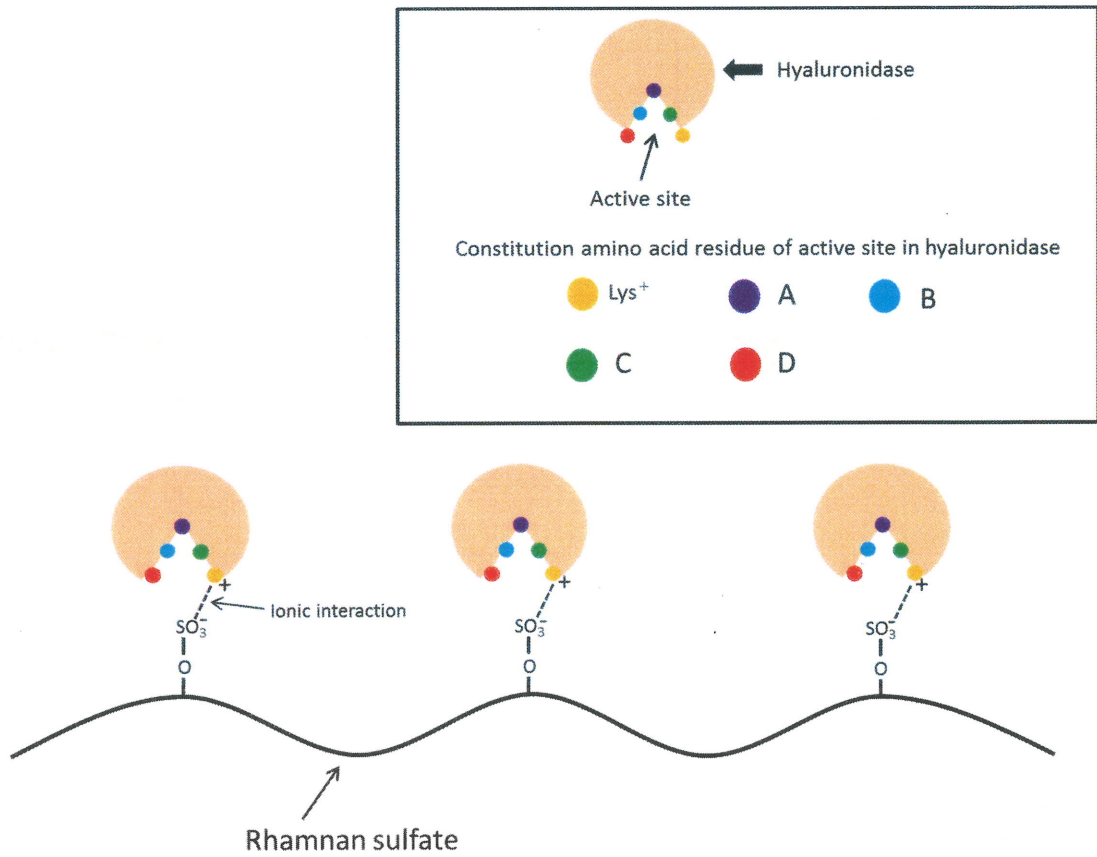


Fig. 17 Ionic interaction between rhamnan sulfate and hyaluronidase by rhamnan sulfate.

第五章 総括

海洋資源の一つである褐藻、紅藻、緑藻類等の海藻に含まれる細胞間粘質多糖の硫酸化多糖は、さまざまな生理活性を有することが報告されている。これらの硫酸化多糖が有する生理活性としては、例えば、抗酸化活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性(抗炎症作用)、抗アレルギー活性、抗腫瘍活性、抗肥満活性、抗糖尿病活性、抗血液凝固活性及び抗ウィルス活性¹⁾等がある。ヒアルロニダーゼ阻害活性については、褐藻類のメカブやコンブに含まれるフコイダンや紅藻類チノリモ由来の硫酸化多糖で報告されているが、緑藻類ヒトエグサに含まれる硫酸化多糖のラムナン硫酸については報告されていない。そこで、本研究では、養殖ヒトエグサからラムナン硫酸を抽出し、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性を詳細に検討した。

まず、第二章では、養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の有効な抽出方法を検討した。ラムナン硫酸の抽出方法としては水抽出法、酸処理抽出法、酵素処理抽出法及びオートクレーブ処理抽出法の4種類の方法を比較、検討した。水抽出法では多糖は得られず、酸処理抽出法、酵素処理抽出法及びオートクレーブ処理抽出法で得られた各抽出物は、IR、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 分析の結果から、すべて硫酸化多糖の構造を持つことが確認できた。ただし、酸処理抽出物は灰分含有率が高く、オートクレーブ処理抽出物はデンプンが含まれていた。

また、Bradford 法⁵¹⁾による各抽出物の蛋白質呈色反応は陰性であり、すべての抽出物に蛋白質は含まれていないことを確認した。酸処理抽出物及びオートクレーブ処理抽出物は、酵素処理抽出物に比べ、抽出時の加水分解により多糖の分子量の低下がみられた。さらに、酵素処理抽出物の構成糖分析の結果から、この抽出物がラムナン硫酸であることを確認した。

以上の結果から、養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の有効な抽出方法は、ラムナン硫酸の硫酸基含有率及び分子量の低下が最も少なく、さらに、デンプン及び蛋白質を含まない酵素処理抽出法であることが分かった。

第三章では、酵素処理抽出法によりヒトエグサから抽出したラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)を用い、そのヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。その結果、RS(20, 700kDa)の濃度上昇に従い、ヒアルロニダーゼに対する阻害率は高くなったことから、ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼ阻害活性を有することが明らかとなった。また、ラムナン硫酸と他の種類の硫酸化多糖であるフコイダン、ポルフィラン、k-カラギーナン及びλ-カラギーナンの一定濃度におけるヒアルロニダーゼ阻害試験を行い、阻害率の比較を行ったところ、いずれの硫酸化多糖もヒアルロニダーゼ阻害活性を有し、その阻害率は、それぞれの硫酸化多糖中の硫酸基含有率が高くなるに従って、上昇する傾向が見られ、硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性には硫酸化多糖の硫酸基含有率が影響していると考えら

れた。そこで、ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるため、ラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)を過硫酸化処理または脱硫酸処理により、硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸 RS(40)、RS(7)、RS(0.5)を調製し、RS(20, 700kDa)とともに、それぞれの濃度を変えて、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、ラムナン硫酸の硫酸基含有率の増加とともにヒアルロニダーゼ阻害率は高くなった。

また、RS(20, 700kDa)を用い、これを 5%及び 10%の過酸化水素水により低分子化処理を行い、RS(18, 200kDa)、RS(17, 50kDa)を調製し、RS(20, 700kDa)とともに、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、阻害率は分子量の異なるいずれのラムナン硫酸においても、大きな差がみられなかった。以上の結果からラムナン硫酸はヒアルロニダーゼ阻害活性を有しており、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する阻害には、ラムナン硫酸中の硫酸基含有率が重要であり、分子量の影響は小さいことがわかった。

第四章では、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構をより詳細に調べるため、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する酵素阻害様式を調べ、その結果、ラムナン硫酸がヒアルロニダーゼの活性部位に直接作用する拮抗阻害であることが確認できた。

次に、ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼと水溶液中(pH4.0)で白濁物質を生成

することが観察されたため、この白濁物質の生成がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べた。まず、白濁物質の IR 分析により、白濁物質がラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体であることを確認した。また、複合体の $^1\text{H-NMR}$ 分析によりヒアルロニダーゼのリジン残基がラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成に関係していることが確認できた。即ち、ヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基の 1 つはリジン残基と考えられ、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼのリジン残基の正電荷がイオン相互作用を通して、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体を生成すると考えられた。

さらに、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成によるヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるために、複合体を除去したろ液にヒアルロン酸を加え、ヒアルロン酸分解率を求め、ラムナン硫酸の硫酸基含有率及び複合体生成率との三者の関係を調べた。その結果、ラムナン硫酸はその硫酸基含有量に応じて、ヒアルロニダーゼと複合体を生成することで、ヒアルロニダーゼを不活性化したことが確認できた。

以上の結果から考察すると、ヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基の一つはリジン残基と考えられ、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼの活性部位であるリジン残基の正電荷がイオン相互作用を通して複合体を生成し、ヒアルロニダーゼを不活性化することで、ラムナン硫酸のヒ

アルロニダーゼ阻害が発現していると結論された。

本研究の結果は、海洋資源であるヒトエグサに含まれるラムナン硫酸の利用促進に役立つと考えられるが、今後は医薬品、化粧品、機能性健康食品への利用及び実用化のために、体内で吸収できるオリゴ糖まで低分子化したラムナン硫酸の *in vivo* 試験での検討が必要となるであろう。

引用 文献

- [1] Toida, T., Amornrut, C., Robert, L., TIGG, **15**, 29-46 (2003).
- [2] 国崎 直道, 佐野 征男. 食品多糖類-乳化・増粘・ゲル化の知識, 幸書房, 東京都, p11-23 (2001).
- [3] 岩瀬 仁勇, 木曾 真, 山本 憲二, 大西 正健, 平林 義雄. 糖鎖の科学入門, 培風社, 東京都, 応用糖質科学, **43**, 149-153(1994).
- [4] 山田 信夫. 海藻フコイダンの科学, 成山堂書店, 東京都 2-18(2006).
- [5] 今田 節子. 海藻の食文化, 成山堂書店, 東京都, 5-17(2003).
- [6] 山田 信夫. 海藻利用の科学, 成山堂書店, 東京都, (2001).
- [7] Kylin, *Z. Physiol. Chemi.*, **83**, 171(1913).
- [8] Kylin, *Z. Physiol. Chemi.*, **94**, 357(1915).
- [9] 小林 良生. 海藻パルプとアルギン酸繊維の紙, 緑書房, 東京都, 260(1996).
- [10] 野田 宏行. 水産利用化学, 恒星社厚生閣, 東京都, 403 (1992).
- [11] 能登谷 正浩. 海藻利用への基礎研究その課題と展望, 成山堂書店, 東京都 88-98(2003).
- [12] Gruneald, N., Groth, I., Alban, S., *Biomacromolecules*, **10**, 1155-1162(2009).
- [13] Synytsya, A., Kim, W., Kim, S., Pohl, R., Synytsya, A., Kvasnicka, F., Copikova, J., Park, Y., *Carbohydrate polymers*, **81**, 41-48 (2010).

- [14] Lim, S., Aida, W., Maskat, M., Mamot, S., Ropien, J., Mohd, D., *Food Hydrocolloids*, **42**, 280-288(2014).
- [15] Hayakawa, Y., Hayashi, T., Lee, J., Srisomporn, J., Maeda, M., Ozawa, T., Sakuragawa, N., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 86-94(2000).
- [16] Sokolova, E., Byankina, A., Kalitnik, A., Kim, Y., Larisa N., Tamara, Yermak., *Society for Biomaterials*, **102A**, 1431-1438(2014).
- [17] Cassolato, J., Nosedá, M., Pujol, C., Pellizzari, F., Damonte, E., Duarte, M., *Carbohydrate Research*, **343**, 3085-3095 (2008).
- [18] 松田太一, 佐々木甚一, 栗原秀幸, 羽田野六男, 高橋是太郎. 北海道大学水産科学研究彙報, **56**, 75-86(2005).
- [19] Vo, T., Ngo, D., Kang, K., Jung, W and Kim, S *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**, 129-138(2015).
- [20] Matsuhiro, B., Conte, A., Damonte, E., Kolender, A., Matulewicz, M., Mejias, E., Pujol, C and Zuniga, E., *Carbohydrate research*, **340**, 2392-2402(2005).
- [21] 能登谷 正浩.アオサの利用と環境修復(改訂版), 成山堂書店, 東京都, 4-5 (2001).
- [22] 渡邊 信. 藻類ハンドブック, NTS, 東京都, 565-567(2014).
- [23] 喜田和 四郎, 前川 行幸. 藻類, **42**, 1351 (1994).

- [24] 大野 正夫. 有用海藻誌, 内田老鶴圃(2004).
- [25] Lee, J., Hayashi, K., Hayashi, T. and Maeda, M. *Planta Med.*, **65**, 439-441(1999).
- [26] Harada, N., Maeda, M. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **62**, 1647-1652(1998)
- [27] Tamaki, Y., Konishi, T., Fukuta, M and Tako, M. *Food Chemistry*, **107**, 352-361(2008).
- [28] Maeda, M., Uehara, T., Harada, N., Sekiguchi, M and Hiraoka, A. *Phytochemistry*, **30**, 3611-3614(1991).
- [29] 上村 祐也, 橋口 健司, 長田 裕子, 坂 智秀, 吉田 睦子, 牧野 陽介, 天野 秀臣. 日本食品科学工学会誌, **57**, 441-445(1991).
- [30] 中村 昌弘, 山城 陽一, 小西 照子, 花城 勲, 田幸 正邦. 日本食品科学工学会, **58**, 245-251(2011).
- [31] Hayashi, S., Nemoto, K and Watanabe, M., (1991) *Connective Tissue*, **22**, 147-148.
- [32] C. Yang and P. N. Srivaatava. *J. Biol. Chem.*, **250**, 79 (1975).
- [33] 増田 勝己, 石原 良子, 今川 ゆかり, 谷 政八. 仁愛女子短期大学研究紀要, **37**, 47-51(2005).
- [34] Asada, M., Sugie, M., Inoue, M., Nakagomi, K., Hongo, S., Murata, K., Irie, S., Takeuchi, T., Tomizuka, N. and Oka, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **61**, 1030-1032 (1997).

- [35] 大澤 謙二、宮崎 都子、今井 啓二、荒川 勉、安田 英之、竹谷 孝一. *Natural medicines*, **53**, 188-193 (1999).
- [36] Girish, K., Nagaraju, S and Vishwanath, S. *Curr. Med Chem.*, **16**, 2261-2288(2009).
- [37] 室田 明彦. 明治大学科学技術研究所年報, **53**, 59-60(2011).
- [38] Mase, T., Yamauchi, M., Kato, Y., Esaki, H. and Isshiki, S. 椋山女学園大学研究論集, **44**, 105-113(2013).
- [39] Hayashi, T. *Yakugaku Zasshi*, **128**, 61-79(2008).
- [40] Li, H., Mao, W., Hou, Y., Gao, Y., Qi, X., Zhao, C., Chen, Y., Li, N. and Wang, C., *Bioresource Technology*, **114**, 414-418(2012).
- [41] Lee, J., Koizumi, S., Hayashi, K. and Hayashi, T. *Carbohydrate Polymers*, **81**, 572-577(2010).
- [42] Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., and Smith, F., *Analytical Chemistry*, **28**, 351-356(1956).
- [43] Bitter, T. and Muir, H., *Analytical Chemistry*, **4**, 330-334(1962).
- [44] Silvestri, L., Hurst, R., Simpson, L. and Settine, J., *Analytical Biochemistry*, **123**, 303-309(1982).
- [45] Tako, M., Takeda, S., Teruya, T., and Tamaki, Y. 日本食品科学工学会, **57**,

495-502(2010)

[46] Patankar, S., Oehninger, S., Barnett, T., Williams, L., Clark, F., *J. Biol. Chem.*, **268**,

21770-21776(1993)

[47] 中西 香爾, P・H・ソロモン, 古館 信生. 南江堂, 東京都, (1985).

[48] Tsubaki, S., Hiraoka, M., Hadano, S., Nishimura, H., Kashimura, K. and Mitani, T.

Carbohydrate Polymers, **107**, 192-197(2014).

[49] Chizov, O., Dell, A., Morris, R., Haslam, M., Mcdowell, A., Shashkov, S., Nifatev,

E., Khatuntseva, A. and Usov, L. *Carbohydr. Res.*, **320**, 108-119(1999).

[50] Tako, M., Teruya, T., Tamaki, Y. and Konishi, T. *Colloid Polym. Sci.*, **287**,

1445-1454(2009).

[51] Bradford, M., *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254(1976).

[52] Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 642-646

(1976).

[53] Sawabe, Y., Nakagomi, K., Iwakami, S., Suzuki, S., Nakazawa, H. *Biochim.*

Biophys. Acta., **1137**, 274-278(1992).

[54] Soeda, S., Sakaguchi, S., Shimeno, H. and Nagamatsu, A. *Biochemical*

Pharmacology, **43**, 1853-1858(1992).

[55] Nagasawa, K., Inoue, Y and Tokuyasu, T. *J.Biochem.*, **86**, 1323-1329(1979).

- [56] Percival, E., *Method In Carbohydrate Chemistry*, 281-285(1980).
- [57] Nagasawa, K. and Inoue, Y. *Method In Carbohydrate Chemistry*, 287-289(1980)
- [58] Zhang, H., Mao, W., Fang, F., Li, H., Sun, H., Chen, Y. and Qi, X., *Carbohydrate Polymer*, **71**, 428-434(2008).
- [59] Tomita, S and Shiraki, K. *Polymer Chemistry*, **49**, 3835-3841(2011).
- [60] Kurinomaru, T., Tomita, S., Kudo, S., Ganguli, S., Nagasaki, Y. and Shiraki, K. *Langmuir*, **28**, 4334-4338(2011).
- [61] Ganguli, S., Yoshimoto, K., Tomita, S., Sakuma, H., Matsuoka, T., Shiraki, K. and Nagasaki, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6549-6553 (2009).
- [62] Tomita, S., Ito, L., Yamaguchi, H., Konishi, G., Nagasaki, Y. and Shiraki, K. *Soft Matter*, **6**, 5320-5326(2010).
- [63] Gao, G. and Yao, P. *J. polym chem.*, **46**, 4681-4690(2008).
- [64] Gao, G and Yan, Y., Pispas, S., Yao, P. *Macromol Biosci.*, **10**, 139-146(2010).
- [65] 瓜生 敏, 鬘谷 要, 全寛 俊, 奥山 光作, Huricha Baigude, 松井 崇博, 小俣 拓. 帝京科学大学紀要,**3**, 45-53(2007).
- [66] 古川 真一. 比治山女子短期大学紀要, **30**, 49-53(1995).
- [67] Yu, P. and Sun, H., *Carbohydrate Polymers*, **99**, 278-283(2014).
- [68] Jeon, K., Katsuraya, K., Inazu, T., Kaneko, Y., Mimura, T. and Uryu, T. *J. Am.*

Chem. Soc., **122**, 12536-12541(2000).

[69] Jeon, K., Katuraya, K., Kaneko, Y., Mimura, T. and Uryu, T. **30**, 1997-2001(1997).

[70] Jeon, K., Katuraya, K., Kaneko, Y., Mimura, T. and Uryu, T. *Sen-i Gakkaishi*, **53**,
533-539(1997).

本論文に関連した報文

第三章

(1) 山元 裕太, 大菌 紅葉, 大石 智博, 大島 賢治, 満生 慎二, 柿原 秀己, 迎 勝也. 日本食品科学工学会誌. **63**, 545-549 (2016).

(2) 山元 裕太, 佐田 宏子, 森 健二, 高橋 芳弘, 満生 慎二, 柿原 秀己, 迎 勝也. 九州産業大学工学部研究報告. **53**, 33-38 (2017).

第四章

(3) 山元 裕太, 佐田 宏子, 森 健二, 大島 賢治, 高橋 芳弘, 満生 慎二, 柿原 秀己, 迎 勝也. 日本食品科学工学会誌. **64**, 429-436 (2017).

謝 辞

九州産業大学大学院工学研究科産業技術デザイン専攻社会人博士前期及び後期課程において、迎 勝也教授より終始、懇切なるご指導賜りましたことに、心より厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、御指導御助言を賜りました添嶋康廣博士、元産業技術総合研究所、柴田昌男氏、坂木剛氏に深く御礼申し上げます。また、NMRの解析法についてご指導賜りました熊本高等専門学校八代キャンパス生物化学システム工学科・大島賢治教授に深く御礼申し上げます。

最後に、九州産業大学大学院工学研究科の社会人博士前期ならびに後期課程への入学を御承認いただき、終始御支援、御助言を賜りました株式会社ゼンシン柿原秀己代表取締役にご深く感謝申し上げます。また、本研究の実施に際し、同社の赤司俊博部長をはじめ社員の皆様の多大なる御支援に深く御礼申し上げます。