

Biological Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from Marine Algae

長崎大学大学院生産科学研究科
姜 澤東

海藻類中には、多くの有用な成分が含まれている。特にミネラル類が豊富に含まれている。さらに、海藻由来の多糖体が様々な生理活性を発現することが明らかにされている。近年、昆布やモズクに含まれる硫酸化多糖体であるフコイダンはアポトーシス誘導作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用、免疫賦活作用、血圧降下作用、血糖値降下作用など多彩な作用を示すことから、さまざまな利用法が期待されている。

アルギン酸の原料として用いられている褐藻類アスコフィラム・ノドサム (*Ascophyllum nodosum*) 粉末からフコイダンとは異なる硫酸化多糖体として未利用のアスコフィランが比較的高収率で得られる。本研究ではアスコフィランの生物活性について特に細胞レベルを中心に解析した。まず、アスコフィラム・ノドサム由来アスコフィラン、アルギン酸及びフコイダンの種々哺乳類細胞(CHO、XC、MDCK、Vero、PtK₁、HeLa) に対する影響を調べた。コロニー形成阻害による細胞毒性試験において、アスコフィラン及びフコイダンは Vero 細胞及び XC 細胞に対して強い毒性を示したが、CHO 細胞、PtK₁ 細胞及び HeLa 細胞に対しては顕著な毒性を示さないことがわかった。アルギン酸はいずれの細胞に対しても毒性を示さなかった。興味あることに、アスコフィランは MDCK 細胞の増殖を濃度依存的に促進することを見出した。一方、フコイダンは MDCK 細胞に対して逆に強い毒性を示した。

次にアスコフィランの免疫系に及ぼす影響について細胞レベルで検討した。マクロファージは重要な免疫担当細胞の1つであり、多くの免疫賦活剤の研究にはマウスマクロファージ株化細胞 RAW264.7 細胞が利用されている。そこで、アスコフィランの RAW264.7 細胞に対する一酸化窒素 (NO) 及びサイトカイン (TNF- α 及び G-CSF) 放出誘導活性について、フコイダン A (アスコフィラン・ノドサム由来) 及びフコイダン S (*Fucus vesiculosus* 由来) と比較した。アスコフィランとフコイダン A は 1000 $\mu\text{g/ml}$ まで RAW264.7 細胞に対して毒性を示さなかったが、フコイダン S は濃度依存的に細胞毒性を示した。アスコフィランはいずれのフコイダンより、RAW264.7 細胞に対して NO 及びサイトカイン放出誘導活性が高いことを見出した。また、いずれの活性もフコイダン S は A より強かった。100 $\mu\text{g/ml}$ のアスコフィランは RAW264.7 細胞に対して、iNOS mRNA 及び iNOS 蛋白質発

現を強く誘導し、その作用はフコイダンより強いことがわかった。さらに、ゲルシフトアッセイ解析において、100 $\mu\text{g/ml}$ のアスコフィランは RAW264.7 細胞における転写因子 AP-1 及び NF- κ B の活性化を誘導し、その作用はフコイダンより強いことが示唆された。また、MAPK 阻害実験及びウェスタンブロッティング法から、アスコフィランは特異的に JNK、p38 キナーゼシグナル経路を介して RAW264.7 細胞からの NO 産生を誘導すると推定された。以上より、アスコフィランはマクロファージに対してフコイダンに比べ、より強い NO 及びサイトカイン放出誘導を引き起こし、その機構には MAP キナーゼ系や転写因子 NF- κ B 及び AP-1 の細胞内シグナル伝達機構が関与すると推定された。

一方、*Porphyra yezoensis* はノリの一種であり、日本ではよく食べられている。近年、ノリに含まれて主要な硫酸化多糖体であるポルフィランはアポトーシス誘導、抗酸化、抗腫瘍、免疫賦活、血圧及び血糖値降下作用など多彩な生理活性を示すことが報告されている。そこでアスコフィランと類似の硫酸化多糖体であるポルフィランについても前述同様、細胞レベルでの解析を行った。ポルフィラン自体には RAW264.7 細胞からの NO 及びサイトカイン放出誘導作用は全く認められなかった。そこで、ポルフィランの LPS 刺激 RAW264.7 細胞から一酸化窒素 (NO) 放出に対する影響を調べた。ポルフィランは濃度依存的に LPS 刺激 RAW264.7 細胞からの NO 放出を抑制した。RT-PCR とウェスタンブロッティング法によって、ポルフィランは LPS 刺激 RAW264.7 細胞における iNOS mRNA 及び iNOS 酵素発現を抑制することが分かった。一方、ポルフィランは LPS 刺激 RAW264.7 細胞からの TNF- α 放出を抑制しなかった。従って、LPS 刺激 RAW264.7 細胞において、NO と TNF- α 産生放出は別々に調節されており、ポルフィランは特異的に NO 放出を司る細胞内シグナル経路を抑制すると推定された。また、ポルフィランは NF- κ B の阻害サブユニットの遊離と分解を抑制することで、NF- κ B の主要なサブユニット蛋白質 NF- κ B p65 の核への移行を阻害し、結果として iNOS の発現を阻害すると推定された。

以上、本研究により硫酸化多糖体であるアスコフィラン及びポルフィランの新たな作用機構について、特に細胞及び分子レベルで解明することが出来た。両者は硫酸基を有する点、構造的に類似しているが、作用は全く正反対であり、アスコフィランはマクロファージの活性化を、ポルフィランはマクロファージの活性化を抑制することを示す。これらの本研究の成果は、今後、両者の構造活性相関に関する重要な手掛りを与えると考えられる。