

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05423

研究課題名（和文）キャピラリー電気泳動法に基づく天然硫酸化多糖類の品質および機能評価

研究課題名（英文）Study on the analytical assay system using capillary gel electrophoresis method for quality and functional evaluation of natural sulfated polysaccharides

研究代表者

宮崎 義之（Miyazaki, Yoshiyuki）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40380779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：天然物由来の高分子多糖類は、健康の維持に有効な生理活性を持つことが知られる一方で、食品中の含有量を測定する分析法が未だ確立していない。そこで本研究では、天然硫酸化多糖類の安全かつ効果的な食品利用を実現するため、キャピラリーゲル電気泳動の分析原理に基づき硫酸化多糖類を測定する新たな分析法の開発研究に取り組んだ。

その結果、十分な分子量分離およびキャピラリー壁への固定が達成できず構築には至らなかったものの、ポリアクリルアミドゲルを用いた硫酸化多糖の泳動と検出が可能であることを確認した。また、海藻に含まれる硫酸化多糖フコイダンが、免疫機能制御を介して、癌転移や感染症に予防効果を発揮する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻のヌメリ成分であるフコイタンは、水溶性食物繊維の一種であり、食事として摂取された際に腸管免疫系の活性化ならびに腸内細菌叢の改変に寄与し、本研究では、感染病原体の侵入に対する生体防御応答ならびに感染症で生じる病態の緩和に働く可能性を見出した。一方、多糖類を種類別に測定可能な技術は、未だ確立されていないのが現状である。従って、高分子多糖の定量分析法の開発研究は大きな学術的価値を有し、フコイタン含有食品の品質および生理学的機能性の正確な評価試験法を構築することで健康の維持・向上に効果的な食品成分の利用法を社会に提案することができる。

研究成果の概要（英文）：High molecular weight polysaccharides derived from natural products are known to have physiological activities suitable for supporting health, but analytical methods for measuring their content in foods have not yet been established. Therefore, this research focused on the development of a new analytical method to measure sulfated polysaccharides in foods based on the analytical principle of capillary gel electrophoresis to ensure the safe and effective use of natural sulfated polysaccharides in foods.

As the results, it was confirmed that the sulfated polysaccharides could be successfully migrated and detected in polyacrylamide gels, although their detection could not be achieved due to insufficient separation by molecular weight and fixation to the capillary wall. In addition, the sulfated polysaccharide fucoidan in brown seaweeds probably has preventive effects on cancer metastasis and infectious diseases by regulating immune function.

研究分野：食品科学

キーワード：硫酸化多糖類 キャピラリーゲル電気泳動 分別定量分析 免疫調節

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品に含まれる難消化性多糖類は、腸内環境の改善や生活習慣病の予防をはじめとする健康効果が期待されている。中でも、硫酸化多糖(構成分子として硫酸基を含んでいる一連の多糖類)は、抗がん作用や抗ウイルス作用および免疫調節作用などにおいて、他の一般的な多糖に比べてより強い生理機能を発揮することが報告されている。

我々が実施した先行研究では、食用海藻のヌメリを構成する硫酸化多糖であるフコイダンの生理機能を検証し、オキナワモズク由来のフコイダンが乳がん細胞株のアポトーシス(プログラム細胞死)を誘導すること<sup>(1)</sup>、メカブ由来のフコイダンがマウス脾臓細胞による抗体産生を増加させること<sup>(2)</sup>などを報告してきた。また、マウスを用いた動物試験を実施し、フコイダンの摂取によってNK細胞やT細胞などの免疫細胞が活性化し、腫瘍形成を抑制することを明らかにしてきた(当研究成果は、国内外の学会において報告)。さらに、健常者を対象としてフコイダンの飲用効果を検証し、外敵侵入のバリアとしてはたらく唾液分泌型IgA抗体の産生量を増加させるなど、免疫力の向上に寄与する可能性を見いだしてきた<sup>(3)</sup>。

一方、多糖類は、分子の大きさや構造および構成糖の含有比が一定しておらず、各種多糖に対応する公的な定量分析法が未だ定められていない。また、動物細胞を用いた培養試験において、フコイダンによる免疫細胞の活性化やがん細胞のアポトーシス死誘導には、細胞表面受容体を介した相互作用が関与していることが示されているもの<sup>(4, 5)</sup>、構造-活性相関に関する確証的データの取得には至っていない。そうした状況を踏まえて、先の研究課題では、核磁気共鳴(NMR)分光分析装置を用いたフコイダン中の硫酸基含有量を非破壊的に測定する手法を構築したが<sup>(6, 7)</sup>、フコイダンの機能的品質を評価するためには、分子構造を維持した状態で各種の硫酸化多糖類を分別定量可能な新規分析法の開発とより詳細な作用機構の解明が必要とされる。

#### <引用文献>

1. Yamasaki-miyamota *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **57**:8677-8682, 2009
2. Takai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**:1743-1747, 2014
3. 宮崎ら, *FoodStyle21* **18**:21-25, 2014
4. Teruya *et al.*, *Glycoconj. J.* **26**:1019-1028, 2009
5. Yamasaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**:1163-1168, 2012
6. Bak *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.* **27**:505-510, 2021
7. Bak *et al.*, *Anal. Sci.* **36**:1269-1274, 2020

### 2. 研究の目的

上記の知見および検討課題に基づき本研究では、海藻由来硫酸化多糖フコイダンによる免疫調節機構の解明と、健康維持に資するフコイダンの効果的な食品利用法の創出と機能的品質管理に必要な分析法の確立に向けて、(1)分子量に応じた硫酸化多糖の分画定量法の構築と(2)フコイダンの新たな生理機能の解明を目的として、以下の研究に取り組んだ。

(1) キャピラリーゲル電気泳動法による硫酸化糖分析：硫酸化多糖が生理機能を発揮するためには、一定の糖鎖長と硫酸基が必要である。本研究では、多糖類の構造および化学的特徴(糖鎖長や硫酸基修飾)によって分画分析するため、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の原理を適用したキャピラリーゲル電気泳動装置 Wes を用いた定量法の開発を試みた。

(2) フコイダンの生理機能発現機構：フコイダンは免疫増強作用によって腫瘍形成の抑制に働く一方で、過剰な免疫応答によって引き起こされる炎症病態を緩和する働きを持つとされている。本研究では、免疫制御に中心的な役割を果たすマクロファージおよび樹状細胞に対するフコイダンの生理学的効果を中心に、生体内外におけるフコイダンによる免疫制御に関する作用機序を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) キャピラリーゲル電気泳動装置 Wes を用いた硫酸化多糖分析：①一定の分子量を有する市販の多糖(デキストランおよびデキストラン硫酸)および食品素材のフコイダンエキスをを用い、キャピラリーカラムを搭載したポリアクリルアミドゲル電気泳動装置 Wes (プロテインシンプル社製)により、分子量分画を行った。②電気泳動の前処理において多糖検体をビオチン標識した後、Wes による解析を行った。③従来のポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)を用いて、多糖類の電気泳動による分子量分画の可否を検証した。

(2) フコイダンの生理機能発現機構: ① マウス小腸から採取した免疫細胞およびマクロファージ様細胞株 RAW264 を用いて、フコイダンによる免疫増強作用の作用機序を検証した。② RAW264 に病原体成分を作用させることで炎症状態を誘導し、フコイダンによる炎症抑制作用を検討した。また、上気道ウイルス感染で生じる劇症肺炎のモデル動物を作製し、フコイダンの経口投与による肺炎発症予防効果を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) キャピラリーゲル電気泳動装置 Wes を用いた硫酸化多糖分析

① 装置 (Wes) 適用性の検討: タンパク質の電気泳動および検出を目的として開発された Wes を用いて多糖類の分析が可能か否かを検証するため、市販の多糖類(デキストラン, 分子量 40,000; デキストラン硫酸, 分子量 6,500-10,000 または 9,000-20,000) およびオキナワモズク由来フコイダンの測定を実施したが、明瞭な分画像を観察することが出来なかった。

② 検体前処理法の検討: 検出感度を上昇させるビオチン (Biotin) で上記多糖を標識して再度測定を試みた。その結果、食品素材であるフコイダン製品 3 点でバンドが検出されたものの、デキストラン硫酸の検出は達成できなかった。

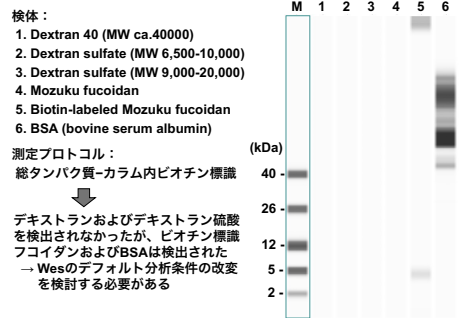
③ PAGE による硫酸化多糖の分離・検出の検証: Wes は、PAGE の原理を応用した自動測定装置であり、大きく 4 つの工程 (ゲル電気泳動による分画、キャピラリーカラム壁への分子固定、固定した分析対象分子の検出試薬による修飾、定量分析) がプログラムされている。上記の結果から、泳動分画、カラム固定および検出試薬修飾の何れかに問題があると考えられたため、従来法である PAGE による確認試験を実施したところ、ゲル濃度や電気泳動に使用する緩衝液などの分析条件を変更することで、硫酸化多糖の泳動が可能であることが確認できた。しかしながら、分子量に応じた明瞭な分画の達成には至らず、分離能を向上させる更なる分析条件の検討が必要であると判断された。

##### (2) フコイダンの生理機能発現機構

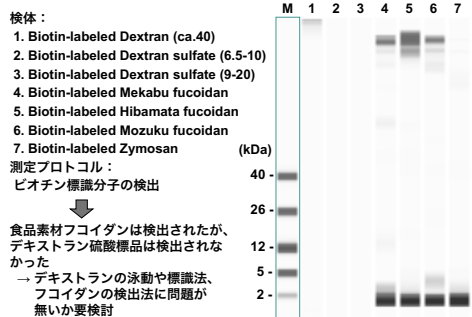
① フコイダンの免疫増強効果: 先行研究の結果から、経口摂取されたフコイダンは腸管免疫系を活性化することで、がんや感染病原体の排除に関わる細胞性免疫応答を増強することが推察されている。本研究では、フコイダンが腸管免疫組織から採取した免疫細胞 (特に、マクロファージや樹状細胞) と相互作用することで、病原排除に働く免疫細胞の機能を強化することが示された。また、免疫応答の司令塔として働く免疫細胞であるマクロファージ (RAW264

細胞を用いて検討) を、病原体成分と共にフコイダンで処理すると相乗的な活性化が認められたことから、感染症に対する免疫 (生体防御) 機能の向上・維持にフコイダンが有効であることが示唆された。

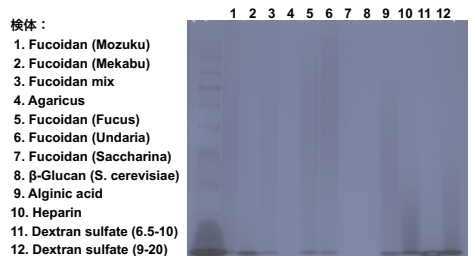
##### 解析1-①: デキストラン硫酸の泳動解析



##### 解析1-②: ビオチン化多糖の泳動解析

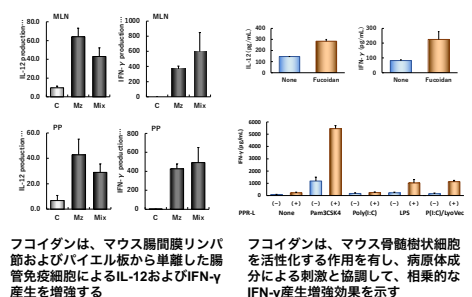


##### 解析1-③: PAGEによる多糖の泳動解析



➡ 各種フコイダンが検出されたものの、分子量に応じた分画には至らなかったため、更なる測定条件および感度向上の検討が必要

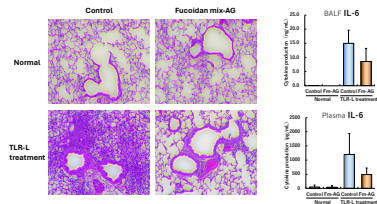
##### 解析2-①: フコイダンの免疫活性化作用



② フコイダンの炎症抑制作用：フコイダンは、免疫増強効果だけでなく、アレルギーや腸炎などの過剰な免疫応答（炎症）を抑制する生理作用を有することが知られている。この免疫バランス維持効果に関して、RAW264 細胞を用いて検証したところ、病原体刺激によって予め活性化された RAW264 細胞による炎症誘導因子の産生が、フコイダン処理によって緩和されることが示された。

また、上気道ウイルス感染症の重症例でみられる肺炎およびサイトカインストームに対するフコイダンの効果を動物試験で検証したところ、肺における炎症病態や炎症関連サイトカイン IL-6 の産生量および血中 IL-6 濃度について、フコイダン投与マウスにおいて緩和・低減が観察された。これらの結果から、フコイダン摂取がウイルス感染における重症肺炎の発症予防に効果を発揮する可能性が示された。

#### 解析2 - ②：フコイダンの炎症抑制作用



フコイダンは、SARS-CoV-2などの上気道ウイルス感染で生じる重症肺炎やサイトカインストームの発症予防に有効である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宮崎 義之	4. 巻 61
2. 論文標題 海藻由来硫酸化多糖類の食品機能性：フコイダンの免疫制御作用を中心に	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 539-546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Toshiya Satoyama, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Amelioration of lung inflammation induced with viral infectious stimulation by a high-molecular weight sulfated polysaccharide compound, Fucoidan mix-AG
3. 学会等名 Immunology2024 Annual Meeting of The American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮崎義之、里山俊哉、中野勇人、立川大介、松井利郎
2. 発表標題 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の原理を応用した硫酸化多糖類 の分画定量法の構築
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第73回沖縄大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮崎義之
2. 発表標題 海藻由来硫酸化多糖フコイダンの免疫力向上作用
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第71回大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮崎義之、中野勇人、竹内秀吾、竹内秀晃、立川大介
2. 発表標題 海藻由来硫酸化多糖フコイダンの感染免疫応答における樹状細胞の相乗的活性化機序
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第70回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎義之、里山俊哉、中野勇人、立川大介、松井利郎
2. 発表標題 シンプルウェスタンシステムを用いた硫酸化糖の分子量分画定量法の開発
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第72回熊本大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Toshiya Satoyama, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Elucidation of regulatory mechanisms in the activation of dendritic cells by combined stimuli with PRR ligands and sulfated polysaccharide fucoidan
3. 学会等名 Immunology2023 Annual Meeting of The American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎義之、里山俊哉、中野勇人、竹内秀吾、竹内秀晃、立川大介
2. 発表標題 高分子フコイダンによる樹状細胞の活性化における病原体刺激との相乗効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Toshiya Satoyama, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Amelioration of inflammatory innate immune responses by a high-molecular weight sulfated polysaccharide Fucoidan
3. 学会等名 日本免疫学会第51回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Toshiya Satoyama, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 The anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide Fucoidan in innate immune cells
3. 学会等名 Immunology2022 Annual Meeting of The American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Juneha Bak, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Anti-angiogenic effect of fucoidan-mix AG via improvement of tumor microenvironment in a mouse melanoma model
3. 学会等名 日本免疫学会第50回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎義之, 朴俊夏, 中野勇人, 竹内秀吾, 竹内秀晃, 立川大介
2. 発表標題 がん性血管新生および腫瘍の形成に及ぼすフコイダン - アガリクスミックス (CUA-フコイダン) の摂食効果
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Juneha Bak, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Regulatory mechanism of fucoidan-mix AG in intestinal mucosal immune cells
3. 学会等名 Immunology2021 Annual Meeting of The American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食品免疫機能分析学寄附講座  
<https://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/bapsa/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------