

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05771

研究課題名（和文）食用紅藻由来レクチンの抗腫瘍作用に関する研究

研究課題名（英文）Study on antitumor effects of lectins from edible red algae

研究代表者

平山 真（Hirayama, Makoto）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・講師

研究者番号：40535465

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）：本研究は糖結合性タンパク質「レクチン」を多量に含有する食用紅藻および同レクチンを対象に、摂食後の機能特性とその分子メカニズムの解明を目的とした。実際の食事モデルを模した試験により、これらレクチンは消化酵素による分解を免れ、機能性を保ったまま腸まで届くことが示唆され、さらにこれらレクチンががん細胞表面の膜タンパク質と相互作用し、抗腫瘍作用を示す可能性が示された。一方、紅藻類からの機能性成分の抽出・精製法を検討するため、海洋性細菌由来紅藻多糖分解酵素の大腸菌組換え体を調製し、これらにより試料の粘性を減少させることで、レクチンをはじめとする機能性水溶性成分を効率的に抽出可能となることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻類は我が国の食文化の大きな特徴の一つであり長寿食としても注目されるが、本研究は、食用紅藻由来レクチンの摂取後の挙動を体系的に解析することを特色としたもので、同レクチンによる機能性およびそのメカニズムの一端を明らかにした。また、本研究で対象としたような糖鎖結合特異性の高いレクチンの栄養学的特性についての研究は報告が少ないことから、本成果は水産学をはじめ食品科学ならびに糖鎖科学分野にも資するものである。さらに、本成果の発展により、海藻レクチンによる健康寄与効果の詳細が明らかになることで、将来的な海藻の消費量拡大に寄与できると期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the functional properties and molecular mechanisms of lectins from edible red algae after ingestion. Tests using a dietary model suggested that these lectins could escape degradation by digestive enzymes and reach the intestine while retaining their functionality, and that they could interact with membrane proteins on the surface of cancer cells and exert anti-tumour effects. In addition, in order to investigate methods for the extraction and purification of functional components from red algae, Escherichia coli recombinants of carrageenan- and agarose-degrading enzymes from marine bacteria were prepared, and it was found that by reducing the viscosity of the samples with these, functional water-soluble components, including lectins, could be extracted efficiently.

研究分野：海洋生物資源化学

キーワード：レクチン 糖鎖 食用紅藻 抗腫瘍作用

1. 研究開始当初の背景

2013年、ユネスコ無形文化遺産に登録された我が国の食文化「和食」は健康食としても注目されているが、その特徴の1つとして海藻食が挙げられる。四方を海に囲まれた我が国では、古くから海藻を食材として利用し、コンブやヒジキなどの褐藻類や海苔などの紅藻類、アオサなどの緑藻類が日常的に食材・食品として食されてきた。これまでにフコイダンやフコキサンチンなどの海藻に含まれる多糖類・脂質成分の生理作用が解析され、我々の健康に寄与することが明らかになりつつあるもの、タンパク質成分についてはほとんど着目されていない。和食ならびに海藻食が注目されるなか、本成分の機能性の解明が求められる。

糖結合性タンパク質「レクチン」は、細胞内外に存在する複合糖質と協働して、免疫、感染、受精など、種々の生命現象に関与する。その重要性から、レクチンはウイルスからヒトに至るまで全ての生物が持つと考えられ、これまでに一次構造・認識糖鎖構造が異なる種々レクチンファミリーが様々な生物から見出されている。複合糖質糖鎖は生物グループや細胞種、病態によって特徴的な構造を示すことが知られ、これら糖鎖構造に特異的に認識・結合するレクチンは、それらをターゲットとした試薬・医薬素材、健康食品素材として有望である。

食用紅藻由来レクチンの栄養学的特性に関するこれまでの研究により、複数の食用紅藻において、加熱調理後も高濃度のレクチンが活性を維持して残存していることを見出され、また、興味深いことに、刺身のツマや海藻サラダなどで馴染みのある紅藻トサカノリ *Meristotheca papulosa* に含まれるレクチンは極めて強い消化酵素耐性を示し、他レクチンも比較的強い消化酵素耐性を示すものがみられた。加えて、*in vitro* 試験によりこれらレクチンが種々がん由来培養細胞に対して増殖抑制能を示すことが明らかになっている。このようにトサカノリレクチンをはじめ、食用紅藻由来レクチンは活性を維持したまま腸管に届き機能する可能性が期待される。

ここで、本研究で対象としたトサカノリ由来レクチン (MPL)、トゲキリンサイ *Eucheuma serra* 由来レクチン (ESA)、およびバギイバラノリ *Hypnea japonica* 由来レクチン (HypninA) が結合する糖鎖構造を図1に示す。MPLは糖タンパク質上のN結合型糖鎖のうち高マンノース型糖鎖のD3アーム非還元末端に α 1-2マンノース (Man) 残基 (図1実線) が付加された糖鎖構造に、ESAは同糖鎖のD2アームの α 1-3 Man 残基が露出した糖鎖構造 (図1破線) に、HypninAはN結合型糖鎖のうち複合型糖鎖の還元末端N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に α 1-6フコース (Fuc) 残基が付加された構造 (コア α 1-6 Fuc、図1点線) にそれぞれ特異性を示す (Hori and Hirayama, 2012; Hori et al., 2007; Okuyama et al., 2009)。一方、近年の研究において、正常組織/細胞の細胞表面にあまりみられない高マンノース型糖鎖が多くのがん組織もしくはがん由来培養細胞上に多くみられ、複合型糖鎖においてもその多くがコア α 1-6 Fuc 構造を含有することが報告されている。

一方、紅藻類が多量に含有するカラギーナンやアガロースなどの多糖類に着目すると、これらはヒトの消化酵素により分解されず、摂食後に水溶性食物繊維として機能するが、これら自体が紅藻に含有されるレクチンを消化から守っている可能性が大いに考えられる。また、紅藻多糖は水溶液中で高い粘性を与え、レクチンを含むタンパク質などの水溶性成分の抽出効率を低下させる。これまでに粘質多糖を多量に含む試料から水溶性成分を抽出するためには、アルコールやその他有機溶剤を用いる手法が適用されてきたが、目的成分の変性や失活などに注意が必要であり、より温和で効果的な抽出方の開発が求められる。

参考文献

- Hori et al. (2007) *Glycobiology* 17:479-451.
 Hori and Hirayama (2012) JP Pat Appl 2012-213382.
 Okuyama et al. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:912-920.

2. 研究の目的

本研究では、食用紅藻由来レクチンの抗腫瘍作用をはじめとする摂食後の機能特性とその分子メカニズムの一端を明らかにすること、および紅藻からの効果的な機能性水溶性成分の抽出・精製法を開発することを目的とし、1) 実際の食事モデルにおける藻体自体によるレクチンの消化酵素保護効果、2) がん由来培養細胞上の紅藻由来レクチン結合分子 (レセプター) の検索、3) 未検索食用紅藻からのレクチン探索、4) 紅藻多糖分解酵素の大腸菌組換え体調製とそれを適

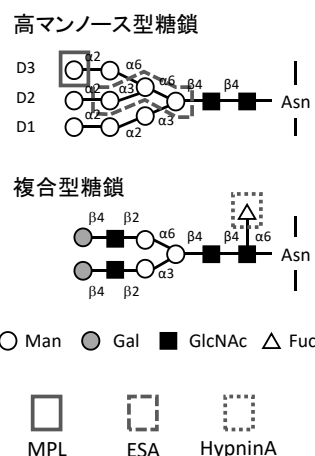


図1. 各レクチンの糖鎖認識

用した抽出法の開発を試みた。

3. 研究の方法

1) 実際の食事モデルにおける藻体自体によるレクチンの消化酵素保護効果

上述の3種食用紅藻の凍結藻体を粉碎し、篩を用いてヒトの嚥下サイズを想定した5 mm程度の切片を作成した。各藻体試料5 gに50 mLの人工胃液(0.85%NaCl、0.04%ペプシン、pH2.0)を添加し、37°C下で緩やかに転倒混和して1、2および3時間後に回収後、直ちにプロテアーゼ阻害剤を添加して酵素反応を停止させた。胃液処理後の藻体片を回収し、凍結乾燥後に粉末化し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁して4°C下で一晩攪拌抽出した。抽出操作後、遠心分離に付し、上清に回収し赤血球凝集活性試験およびSDS-PAGEに供した。対照として、各藻体試料5 gを用いて抽出操作および70%飽和硫酸沈殿操作に供し、各硫酸沈殿画分(粗精製レクチン画分)を得て、これらについても同様にして人工胃液処理を行ない、赤血球凝集活性試験およびSDS-PAGEに供し、凝集活性および泳動像を指標に、藻体片を用いた画分のものとレクチン残存量を比較し、藻体自体によるレクチン保護効果を評価した。

2) がん由来培養細胞上の紅藻由来レクチン結合分子(レセプター)の検索

食用紅藻レクチンがヒト結腸由来培養がん細胞HT-29の膜レセプターに結合能を有することを定性的に確認するため、まずレクチン染色に供した。すなわち、セミコンフルエントとなるよう播種したHT-29を一晩培養後、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、10%ヤギ血清を含むPBSで一晩ブロッキング後、MPL-1、HypninA-2およびオオキリンサイ属紅藻由来レクチンKAA-1(ESAと99%アミノ酸同一率を示す)の各Hisタグ融合組換え体で処理後、一次抗体として抗His-tag抗体(ウサギ)または各レクチンに対する特異抗血清(ウサギ)、二次抗体としてAlexa Fluor® 488標識抗ウサギ抗体(ヤギ)を用いてラベルし、4',6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を含むマウント剤で処理後に蛍光顕微鏡で観察した。

次に、食用紅藻由来レクチンの細胞表面レセプターを検索するため、まずHypninA-2を対象とし、ビオチン化HypninA-2をHT-29細胞に添加後、細胞溶解用緩衝液(RIPA)を用いて細胞を溶解し、ストレプトアビジン固定化磁性ビーズで処理した。磁性ビーズは洗浄後に回収し、98°C5分間処理することで結合成分を遊離し、レクチンを用いずに同様に処理した画分をコントロールとして、これとともにSDS-PAGEに供し、レクチン添加区と非添加区間で差の見たれたタンパク質バンドを対象に、ゲルからの切り出し、ゲル内消化に供し、質量分析によるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析によりタンパク質の同定を試みた。

3) 未検索食用紅藻からのレクチン探索

日本国内で多く流通・食される紅藻として、上述のトサカノリをはじめ、ホソバノトサカモドキ、スギノリおよびツノマタなどが挙げられる。トサカノリ以外のこれら食用紅藻に含まれるレクチンは未知のため、これらレクチンの単離および性状解析を試みた。まず、これら3種紅藻の乾物を対象にPBSを用いて抽出操作ならびに硫酸沈殿によりタンパク質画分を得て、赤血球凝集活性(レクチン活性)を調べた。次に、ホソバノトサカモドキおよびスギノリ由来画分を対象に糖化合物を用いた赤血球凝集阻止試験に供した。ここでホソバノトサカモドキ由来画分を対象に凝集阻止能が認められた単糖を固定化したアガロース担体を用いて、アフィニティークロマトグラフィーによるレクチン単離を試みた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなど、各種クロマトグラフィーを用いた精製に供した。

4) 紅藻多糖分解酵素の大腸菌組換え体作製とそれを適用した抽出法の開発

紅藻類からの効果的な機能性水溶性成分の抽出・精製法を開発するため、大腸菌発現系を用いて既知海洋性細菌由来カラギーナン分解酵素およびアガロース分解酵素の調製を試み、 κ カラギナーゼ、 ι カラギナーゼ、およびアガラーゼの各組換え体の調製を試みた。調製した各組換え酵素の活性を3,5-ジニトロサリチル酸(DNS)法を用いて測定し、さらに組換え酵素の最適温度・最適pHなどの生化学的特性を調べた。これらの組換え酵素を用いて、実際の紅藻藻体からのタンパク質抽出を試み、その収量と粘度変化を評価することにより、タンパク質の抽出効率を評価した。

4. 研究成果

1) 実際の食事モデルにおける藻体自体によるレクチンの消化酵素保護効果

粗精製レクチン画分の人工胃液処理後、トサカノリおよびカギイバラノリの赤血球凝集活性は維持されたが、トゲキリンサイのもので有意に減少した。一方、藻体片の胃液処理後では3種藻体いずれにおいてもレクチン活性の減少はほとんどみられず、SDS-PAGEにおいても各レクチン由来バンドが明瞭に認められた。すなわち、藻体自身が消化酵素からレクチンを保護する効果を有していることが示され、ヒトがこれら食用紅藻を生で喫食後、機能を保ったレクチンが腸まで届いていることが示唆された。

2) がん由来培養細胞上の紅藻由来レクチン結合分子(レセプター)の検索

レクチン染色の結果、いずれのレクチンを用いた場合においても細胞膜領域が染色され、これらレクチンが HT-29 細胞に直接結合することが確認され、腸に届いたレクチンが接触可能と考えられる腸上皮由来腫瘍組織に結合して機能を示す可能性が示唆された。一方、各レクチンの結合糖鎖構造は異なるものの、染色像に明瞭な違いは認められなかった。

PMF 解析による HypninA-2 の HT-29 細胞上のレセプター検索を試みたところ、細胞膜上に局在し、N 結合型もしくは O 結合型糖鎖を持つ複数のレセプター候補が見出された。その中には未分化細胞マーカーやがんマーカーとして知られるポドカリキシンや、細胞-細胞間接着に関与するインテグリンなどが含まれ、HypninA-2 がこれら分子をレセプターとして認識・結合し、抗腫瘍作用をもたらす可能性が示された。

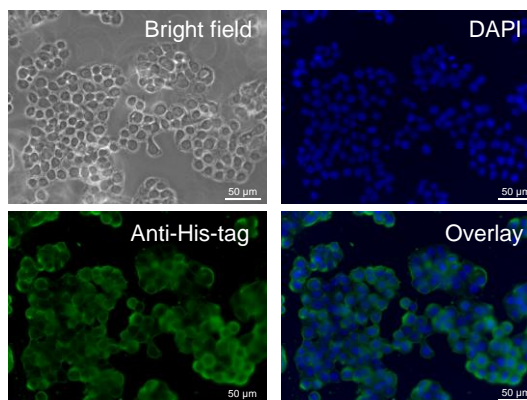
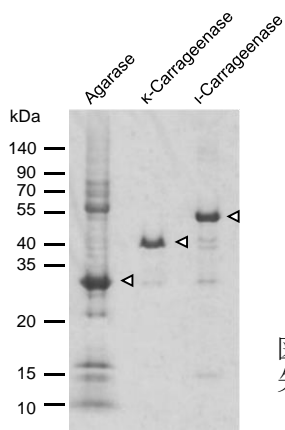


図 2. His-rHypninA-2 を用いた HT-29 細胞のレクチン染色結果

3) 未検索食用紅藻からのレクチン探索

食用紅藻ホソバノトサカモドキ、スギノリ、およびツノマタの各硫酸沈殿画分について赤血球凝集活性を調べたところ、ホソバノトサカモドキ由来画分において非常に強い活性が認められ、スギノリ由来画分で強い活性が示されたが、ツノマタ由来画分で弱い活性がみられた。比較的強い活性を示したホソバノトサカモドキおよびスギノリ由来画分を対象に糖化合物を用いた赤血球凝集阻止試験に供したところ、いずれも同じ単糖 1 種による阻害が認められ、また同単糖残基を非還元末端に有する糖鎖を有する糖タンパク質により強く阻害される傾向を示したことから、これら 2 種紅藻はともに同単糖結合性レクチンを有することが示唆された。そこで、ホソバノトサカモドキ由来画分を対象に、同単糖固定化アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーによるレクチン単離を試みたところ、予想を反して同単糖を含む溶出液により溶出されなかったことから、各種クロマトグラフィーを用いた精製に供することで、SDS-PAGE 上で単一バンドを示すレクチン画分が得られた。今後、本レクチンの詳細な性状把握を試みる。



4) 紅藻多糖分解酵素の大腸菌組換え体調製とそれを適用した抽出法の開発

調製した紅藻多糖分解酵素の各組換え体の活性を測定したところ、いずれも明瞭な活性が確認された。紅藻試料からのタンパク質抽出時にこれらの組換え酵素を適用して処理したところ、抽出液の粘性が顕著に低下し、加えてタンパク質の抽出量が増加した。今後、これら酵素を適用することにより、紅藻試料からの効率的な機能性水溶性成分の抽出が可能と考えられた。

図 3. 大腸菌発現系を用いて調製した組換え紅藻多糖分解酵素。矢尻は目的産物由来バンドを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Kathleen Kay Buendia, Nana Kameda-Migita, Hideyuki Teruya, Kanji Hori, and Makoto Hirayama	4. 巻 -
2. 論文標題 Lectin from Edible Seaweed <i>Meristotheca papulosa</i> Exhibits a High Digestion-Resistant Property	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 -
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 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kathleen Kay M. Buendia, Kanji Hori and Makoto Hirayama
2. 発表標題 HIGH-MANNOSE SPECIFIC LECTIN FROM EDIBLE SEAWEED <i>Meristotheca papulosa</i> EXHIBITS HIGH PROTEINASE-RESISTANT PROPERTY
3. 学会等名 26th International Symposium on Glycoconjugates (GLYC026)（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------