

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580023

研究課題名（和文） リンゴ果実由来新規多糖の糖鎖微細構造と生理機能の解明

研究課題名（英文） Studied on the fine structure and functional role of novel polysaccharide obtained from apple flesh

研究代表者

加藤 陽治（KATO YOJI）

弘前大学・学内共同教育研究施設等・副学長

研究者番号：20194863

研究成果の概要（和文）：リンゴ果実に見いだされたガラクトグルコマンナンの生理機能性についてはこれまで十分な知見がなかった。リンゴガラクトグルコマンナン、コンニャクグルコマンナン、グアーガムおよびローカストビーンガムに由来するオリゴ糖によるヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1 および COLO201 の増殖におよぼす影響を調べた。リンゴガラクトグルコマンナンおよびグアーガムに由来するオリゴ糖の一部にヒト大腸ガン培養細胞 COLO201 の増殖抑制作用の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：There was no detailed information about physiological function of galactoglucomannan found in apple flesh. Different types of oligosaccharides prepared from apple galactoglucomannan, konjak glucomannan, guar gum and locust bean gum were tested for effects on the growth of COLO201 and DLD-1 human tumor cells. The cell growth of COLO201 was reduced by some oligosaccharides from apple galactoglucomannan and guar gum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：糖・農林水産物・食品・園芸学

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物細胞壁多糖のヒトへの栄養生理機能に関し、構造との関係で多くの研究が進められている。しかし、多糖糖鎖の平均的な構造でのみで議論されており、詳細な微細構造と機能の関連性についての研究例は少ない。生理機能と糖鎖構造の相関性を明確にすることは、糖のもつ機能を解明する上で非常に重

要である。

(2) 申請者はこれまで、各種野菜・果実・穀類の代表的な細胞壁多糖キシログルカンとフェノール酸含有グルクロノアラビノキシランの微細構造と機能について数多くの実績をあげてきた。

(3) これまでの研究実績を踏まえ、青森県の農産物を代表するリンゴ果実を用いて、リン

ゴ果実細胞壁多糖キシログルカンは生育、軟化の過程で分子構造が変化し、多糖のもつ機能性も変化することを明らかにした。

(4) リンゴ果実細胞壁のなかにはヘミセルロース性多糖として、キシログルカンの他にガラクトグルコマンナンが存在することを始めて明らかにした。さらに、本多糖由来オリゴ糖断片のあるものはヒト大腸ガン培養細胞 COLO201 に対して異なる増殖抑制率を示すことを予備実験で明らかにした。

(5) それまで、グルコマンナン系多糖あるいはグルコマンナン系オリゴ糖がどのような生理機能を有するかは不明であった。

2. 研究の目的

リンゴ果実ガラクトマンナン多糖からオリゴ糖を調製し、抑制効果を有するオリゴ糖の糖鎖配列とガン培養細胞増殖抑制の相関性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リンゴガラクトグルコマンナンの分離・精製
①リンゴ果肉のアルコール不溶性画分をシュウ酸アンモニウム、4%水酸化カリウム、24%水酸化カリウムで順次抽出分画した。

②24%水酸化カリウム抽出画分のヘミセルロースII画分を20 mM酢酸緩衝液で平衡化したDEAE Sephadex A-25カラムクロマトに供する。素通り画分(HC-II-1)を透析後、濃縮し、凍結乾燥した。
③数種の多糖類から構成されているHC-II-1は特にキシログルカンを多く含むので、これを除くため、キシログルカンに特異的な酵素キシログルカナーゼを作用させ、キシログルカン多糖をオリゴ糖化し、反応後、BioGel P-2のカラムにて高分子画分を集めた。

(2) リンゴガラクトグルコマンナンの構造解析

①構成糖分析: 2Mトリフルオロ酢酸で加水分解し、分解物をダイオネクス社の陰イオンクロマトグラフィー分析に供した。

②結合様式分析: 多糖を箱守法にてメチル化を行い、加水分解、還元の後、ガスクロマトグラフィー分析に供した。

③ガラクトグルコマンナンをセルラーゼで加水分解し、分解物をゲル濾過クロマトグラフィー等に供し分画した。

(3) リンゴガラクトグルコマンナン及びそれに由来するオリゴ糖のヒト各種ガン培養細胞の増殖に及ぼす影響

①ヒト大腸ガン細胞(DLD-1)を牛胎児血清10%含有するRPMI-1640培地で培養し、細胞密度が 1.0×10^4 個/mlになるように調製した。ガラクトグルコマンナン多糖及び各種オリゴ糖を種々の濃度で培地に添加する。それをCO₂インキュベータ

(37°C、5%CO₂条件下)で4日間培養して、MTT法にて生細胞数を計測し、試料のヒト大腸ガン細胞の増殖抑制に及ぼす影響を調べた。

②同様な実験を、ヒト大腸ガン細胞(COLO201)を用いて行った。

(4) コンニャクグルコマンナン及びオリゴ糖の調製

構造の異なるコンニャクグルコマンナン多糖およびそのオリゴ糖を文献に従い調製した。

(5) コンニャクグルコマンナン及びそれに由来するオリゴ糖のヒト各種ガン培養細胞の増殖に及ぼす影響

上述(3)と同様に行った。

(6) 市販グアーガムやローカストビーンガム由来オリゴ糖のヒト各種ガン培養細胞の増殖に及ぼす影響

①グアーガムおよびローカストビーンガムをそれぞれセルラーゼで加水分解したのちBio-Gel P-2で分画した。

②得られた各画分について構成糖を分析すると共に、上述(3)に従いヒト大腸ガン細胞(DLD-1およびCOLO201)の増殖に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) リンゴガラクトグルコマンナンの分離・精製

リンゴガラクトグルコマンナンオリゴ糖を調製するため、多糖画分の分離・精製について条件検討を行った。すなわち、リンゴ可食部より数段階の抽出工程を経て得られたヘミセルロースIIアルコール不溶性画分をイオン交換クロマトグラフィーに供し、素通り画分(図1. Fr.1)を回収した。続いてキシログルカナーゼを作用させ、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した(図2. Fr.1)。構成糖分析より、得られた多糖画分中のガラクトグルコマンナンはおよそ40%であることが示唆された。

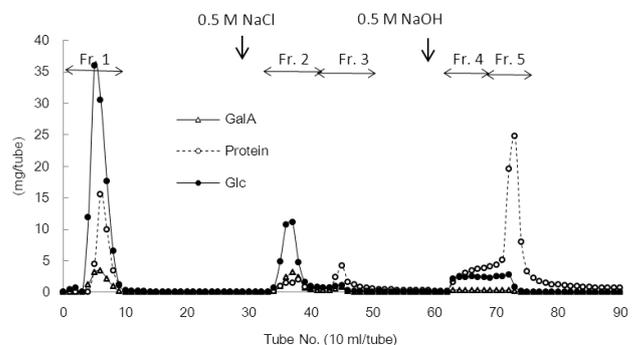


図1 リンゴ果実由来HC-II画分のイオン交換クロマトグラフィー

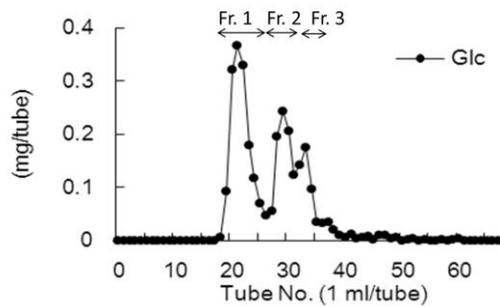


図2 中性多糖画分酵素処理分解物のBioGel P-2ゲルろ過クロマトグラフィー

(2) リンゴガラクトグルコマンナン¹の構造解析
マンノース：グルコース：ガラクトース＝6：3：1からなり、グルコースとマンノースがβ-1,4-結合した直鎖構造をとり、そのO-6位にガラクトースが結合した構造を有する。

(3) リンゴガラクトグルコマンナン及びそれに由来するオリゴ糖のヒト各種ガン培養細胞の増殖に及ぼす影響

ヒト大腸ガン細胞 (DLD-1) を牛胎児血清10%含有RPMI-1640培地で培養し、96ウェルのマイクロプレートに 3.0×10^3 個/ウェルとなるように調整した後、37°CのCO₂インキュベーターで24時間培養した。続いてリンゴガラクトグルコマンナンおよびそれに由来するオリゴ糖を1 ウェルあたりの最終濃度が12.5、25、50、100、200 μg/mlとなるように投与し、24時間培養した。MTT法により生細胞を計測したところ、いずれの場合もコントロールと同様の値 (100%前後) となり、DLD-1に対する増殖抑制活性は認められなかった。

(4) コンニャクグルコマンナン及びオリゴ糖の調製

コンニャクグルコマンナンから各種オリゴ糖の分離精製を、酸部分加水分解、セルラーゼ処理後、各種クロマトの組み合わせにより行った。グルコース (G) とマンノース (M) から構成されるオリゴ糖として、五糖 (M-M-M-M-G) 四糖 (M-M-M-M、およびM-M-M-G)、三糖 (M-M-M、およびM-M-G)、二糖 (M-M、およびM-G) の計七種を得た。

(5) コンニャクグルコマンナン及びそれに由来するオリゴ糖のヒト各種ガン培養細胞の増殖に及ぼす影響

ヒト大腸ガン細胞 (DLD-1) を牛胎児血清10%含有 RPMI-1640 培地で培養し、96 ウェルのマイクロプレートに 3.0×10^3 個/ウェルとなるように調整し、37°Cの CO₂ インキュベ-

ターで 24 時間培養した。続いて各種コンニャクマンナンオリゴ糖 (M-M、M-M-M、M-M-M-M、M-G、M-M-G、M-M-M-G & M-M-M-M-G) を 1 ウェルあたりの最終濃度が 50、100、200、400 μg/ml となるように投与し、24 時間培養した。MTT 法により生細胞を計測したところ、いずれの場合もコントロールと同様の値 (100%前後) となり、DLD-1 に対する増殖抑制活性は認められなかった。

(6) 市販グアーガムやローカストビーンガム由来オリゴ糖のヒト各種ガン培養細胞の増殖に及ぼす影響

増粘多糖類であるグアーガムおよびローカストビーンガムからオリゴ糖を調製し、ガン細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。

①グアーガムおよびローカストビーンガムにセルラーゼ (メイセルラーゼP) を作用させ、BioGel P-2カラムクロマトグラフィーによる分画を行った (図3、図4)。得られた各画分の糖組成を表1および表2に示す。

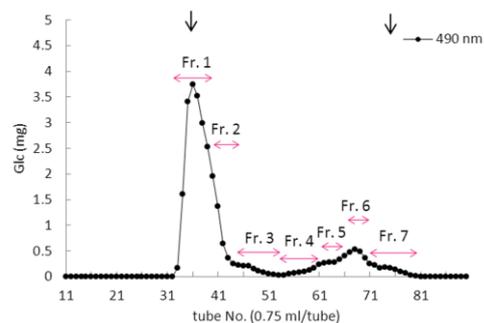


図3 グアーガム酵素処理分解物のBioGel P-2ゲルろ過クロマトグラフィー

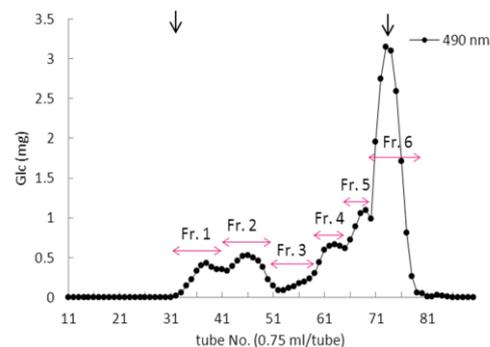


図4 ローカストビーンガム酵素処理分解物のBioGel P-2ゲルろ過クロマトグラフィー

Fr.	Yield (Total Sugar) (mg)	Ratio (%)	Sugar composition (wt%)								
			U.A.	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glu	Xyl	Man	
1	15.23	53.5	0.0	0.0	2.4	0.0	42.6	1.2	0.3	53.5	
2	6.42	22.5	0.0	0.0	2.0	0.0	42.1	1.1	0.4	54.4	
3	1.42	5.0	0.0	0.4	1.5	0.0	36.9	3.6	1.2	56.4	
4	0.61	2.2	0.0	0.2	1.2	0.0	30.5	12.0	1.8	54.3	
5	1.04	3.6	0.0	0.0	0.3	0.0	33.9	18.8	0.6	46.5	
6	2.78	9.8	0.0	0.0	1.0	0.0	32.1	33.4	1.0	32.5	
7	0.98	3.4	0.0	0.0	30.2	0.0	19.7	26.0	1.9	22.3	
Total	28.48	100									

表1 グアーガム由来オリゴ糖(図3 Fr. 1~Fr. 7)の全糖量および糖組成

Fr.	Yield (Total Sugar) (mg)	Ratio (%)	Sugar composition (wt%)								
			U.A.	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glu	Xyl	Man	
1	2.85	7.7	0.0	0.1	0.8	0.0	37.3	1.7	1.0	59.0	
2	4.40	11.8	0.0	0.0	0.0	0.0	37.3	1.2	0.0	61.5	
3	1.33	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	25.3	3.9	0.0	70.8	
4	4.07	10.9	0.0	0.0	0.0	0.0	23.1	10.4	0.0	66.5	
5	5.54	14.9	0.0	0.0	0.0	0.0	16.4	33.5	0.0	50.1	
6	19.02	51.1	0.0	0.0	0.7	0.0	2.8	82.9	0.0	13.6	
Total	37.20	100									

表2 ローカストビーンガム由来オリゴ糖(図4 Fr. 1~Fr. 6)の全糖量および糖組成

②得られた各種オリゴ糖画分を用いて、ガン細胞に対する活性試験を行った。ヒト大腸ガン細胞であるDLD-1およびCOLO 201を牛胎児血清10%含有RPMI-1640培地で培養し、96ウェルのマイクロプレートに 3.0×10^3 個/ウェルとなるように調製した後、37°CのCO₂インキュベーターで24時間培養した。続いて各種オリゴ糖画分を1ウェルあたりの最終濃度が12.5、25、50、100 μg/mlグルコース相当量となるように投与し、24時間培養した。MTT法により生細胞を計測したところ、グアーガムの7~8糖画分に相当するオリゴ糖画分のみ、COLO 201に対する濃度依存的な増殖抑制傾向が認められた。この画分の構成糖組成は、Fuc:Ara:Gal:Glc:Xyl:Man=0.2:1.2:30.5:12.0:1.8:54.3であり、わずかながらもフコースを含む画分であったことから、前述の活性発現にはガラクトグルコマンナン由来オリゴ糖の他に共存多糖の関与も示唆された。

(7) まとめ

リンゴガラクトグルコマンナン、コンニャクグルコマンナン、グアーガムおよびローカストビーンガムに由来するオリゴ糖によるヒト大腸ガン培養細胞 DLD-1 および COLO201 の増殖におよぼす影響を調べた。リンゴガラクトグルコマンナンおよびグアーガムに由来するオリゴ糖の一部にヒト大腸ガン培養細胞 COLO201 の増殖抑制作用の可能性が示された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
加藤 陽治 (KATO YOJI)
弘前大学・学内共同教育研究施設等・副学長
研究者番号：20194863

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：