

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K00805

研究課題名(和文)調理操作後も残存したレクチンの免疫賦活作用とそれを応用した新規調理法

研究課題名(英文)Lectins isolated from foods after cooking exert immunostimulatory effects and inhibit cell proliferation in some cancers

研究代表者

畦 五月 (Une, Satsuki)

香川大学・教育学部・教授

研究者番号：60169620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レクチンは主に生の食品から精製され、加熱して後、つまり食用の食品からのレクチンの精製やその生物学的性質の研究は管見の限りみられない。そこで、材料にキントキマメ、ナタマメ、サトイモを選択し、加熱後も食品中に残存するレクチンを精製しその性質を、食品として摂取した場合に期待できるガン細胞抑制作用及び、免疫賦活作用の両側面から明らかにした。

加熱したキントキマメとサトイモにはレクチンが失活せずに残存し、タンパク質分解酵素にも耐性を示した結果から、人体に取り込まれた場合の機能性を検討した。その結果、一部のガン細胞に対する増殖抑制作用並びに、免疫賦活作用を有することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加熱後も食品中に残存するレクチンを精製し、その性質を、食品として摂取した場合に期待できる機能性を、ガン細胞増殖抑制作用及び、免疫賦活作用の両側面から明らかにした。

地球温暖化に伴い食糧危機も危惧されていく中で、マメ科やイモ科の植物は幅広い環境に適応して生育するものも多い。収量が多い利点もあり、救荒作物として食糧源としたとき、その機能性が少しでも明らかになっている方が食品としては望ましい。本研究により、加熱した食品の中にもレクチンが残存し、微量に摂取した場合には、一部のガン細胞に対する増殖抑制作用並びに、免疫賦活作用を有することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Lectins are mainly purified from raw foods. To date, studies on the biological properties of edible lectins purified after heating have been inconclusive. In this study, kintoki beans and taro tubers were selected as the materials. The lectins remaining in the foods after heating were purified and their effects on the immune system and proliferation of cancer cells were investigated.

Lectins remained in heated kintoki beans and taro tubers. These lectins showed resistance to proteolytic enzymes in vitro and were expected to show the same functionality in the human body. The results showed that, when ingested, these lectins inhibited cell proliferation of some cancer cells and had immunostimulatory effects.

研究分野：食品の機能性

キーワード：レクチン 加熱 キントキマメ サトイモ ナタマメ B16メラノーマ細胞 免疫機能増強作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

元々タンパク質含有量の高いマメ科植物でのレクチンの含有量が特に多い傾向がみられる。そのため精製量も自然と多くなるので、これまでマメ科植物のレクチンの持つ毒性についても多くの研究がされてきた。たとえば、加熱不十分な状態のマメを摂取した場合の消化管に与えるネガティブな影響がその内容である。つまり、これまでレクチンは抗(反)栄養物質と認識されてきていた。この理由として、マメ科レクチンは、消化酵素の影響を受けず小腸からダイレクトに吸収される。そのため、不十分に加熱したレクチンを含むマメを多量に摂取した場合、人体へ嘔吐・下痢等の消化器症状を示すことがある。

平成 18 年、ダイエットに効果があるとのタイトルでテレビ放送された、軽く煎った白花マメ粉末をご飯にかけて食べた後、数百人が吐き気・嘔吐・下痢などの中毒症状を示した事件が起こった。活性を有したままの多量のレクチンを食用とした結果、食中毒様症状を起こした代表的な事件である。この事件によって、不十分に加熱したマメの摂取に関する注意が一層喚起されることになった。しかしその後、レクチンに脚光が当たることになる。その理由は、レクチンの持つ糖鎖認識能力を生かして、微量のレクチンに関する研究が進展し始めたからである。

つまり、今度は微量なレクチンを細胞と反応した場合に起こる、ポジティブな機能性に関する研究が進展している。いわゆる毒も微量であれば、薬として利用できるということである。

レクチンを少量摂取した場合には、免疫機能に有益な影響を及ぼす点や、レクチンの持つ特異性により、特定のガン細胞の増殖抑制作用や、ガン細胞をアポトーシスに至らす効果があることが *in vitro* で明らかになってきた。これらの結果を利用して、一部のレクチンでガン患者へ投与する臨床応用がされ始めている。このような背景のもと、本研究は、食事として微量に摂取したレクチンの持つ機能性について明らかにすることを目的としている。

2. 研究の目的

従前より筆者は、植物性食品(トラマメ、サトイモ、ブロッコリーなど)のレクチンの精製を行ってきた。これらの精製されたレクチンをマウスへの腹腔内、あるいは経口投与することにより、非投与群より有意に脾臓肥大が観察された。この結果により、レクチンが免疫系に何等かの作用を及ぼし、何がしかの有益な機能を人体に及ぼす可能性があることを推察していた。

この仮定のもとに、植物性食品から得たレクチンの免疫系に与える影響についての研究に着手することにした。しかし、レクチンは元来生(加熱を施さない)試料から精製されている。実際、生活では生食する食品数は少なく、特にマメ類やイモ類は、加熱してはじめてやわらかくなり、しかも様々な毒性も消失して食用となる。そこで、本研究では、加熱して食用となる植物性食品(マメ類のキントキマメとナタマメ、イモ類のサトイモ)に含まれるレクチンに着目し研究をスタートした。

生の状態ではこれらの食品中に高含有量存在した耐熱性のあるレクチンが、加熱し調理を施した状態(食用とする状態)でもなお且つ食品中に存在するかどうかをまず検討した。次に加熱処理後もなお食品に残存するレクチンを精製し、このレクチンは免疫賦活作用を持つのか、あるいはガン細胞増殖抑制作用があるかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)レクチンの精製について

生のナタマメからのレクチンの精製は Kojima らの方法(1991)で、生のキントキマメからのレクチンの精製は Hamaguchi らの方法(1977)で行った。

生マメから精製したナタマメからのレクチンは、強力な赤血球凝集活性を有していたが、加熱したナタマメから精製したレクチンの活性は加熱により失活した。つまり、マメの状態での加熱で、失活する耐熱性の弱いレクチンであった。

生のキントキマメに含まれるレクチンは、強力な赤血球凝集活性を有していたが、加熱を施してもなおキントキマメ中には強力な赤血球凝集活性を有するレクチンが含有されていた。そこで加熱したキントキマメからレクチンを CM セファロースカラムクロマトグラフィーで精製した。

生のサトイモからのレクチンの精製は紙谷らの方法(1897)で実施した。加熱したイモにもレクチンが含有されていたので、加熱したサトイモからのレクチンの精製を DEAE セファロースカラムクロマトグラフィーに負荷して行った。

(2)赤血球凝集活性(HA 活性)の測定

レクチンは血球特異性を有するため、2%マウス赤血球、同羊赤血球、及び同ウサギ赤血球を使用し、マイクロタイターを使用し、試料液の倍々希釈により赤血球凝集活性の測定を行った。凝集の判定は肉眼により行った。

(3)糖類による凝集抑制作用について

レクチンは糖(単糖あるいは、糖タンパク質など)により凝集阻害を起こす。そこで各種の糖を使用しての凝集阻害活性について検討した。最小凝集濃度の 2 倍濃度のレクチン溶液に各種糖液を添加して、糖液の倍々希釈を行い、マイクロタイターを使用して凝集活性の糖による阻害濃度を測定した。

(4)ガン細胞の増殖抑制作用について

マウス B16 メラノーマ細胞、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞、マウス骨肉腫由来の LB8 細胞の三種のガン細胞を使用し、各種レクチンを添加した後のガン細胞の増殖抑制作用を *in vitro* で検討した。判定は、MTT 法を用い 595nm の比色で測定した。

(5)マクロファージによる免疫賦活作用

マウス腹腔内からマクロファージを採取し、レクチンによる刺激群と無刺激群を設定し、それぞれの群の炎症に關与する遺伝子の発現の抑制度を Real-time qPCR 法にて測定した。

4. 研究成果

(1)ナタマメから精製されたレクチンについて

ナタマメ(*Canavalia gladiata*)は、特別に種皮が硬い。そのために、一般に豆の調理で予め実施される浸漬で十分に吸水されない欠点があった。この打開策として、種皮に傷をつける手法や、ローストする方法などにより、吸水率の改善を図った。元々赤ナタマメは種皮や胚乳にポリフェノール類を含むが、この成分は豆に傷をつけることにより浸漬液に抽出された。そのため浸漬液には、抗酸化物質が多い傾向が認められた。しかしこの物質は渋みを呈し、食用利用は難しかった。

ナタマメの種皮に傷をつけず湿熱加熱した場合でも、HA 活性は急激に低下し消失した。また生マメから精製したレクチン自体も耐熱性が弱い性質を持っていた。

岡山県産赤ナタマメから精製されたレクチンは、分子量約 3 万であった。このナタマメレクチンの N 末端のアミノ酸配列は、同属である ConA (*Canavalia ensiformis*)とアミノ酸配列が 20 残基まで完全に一致した。

生のナタマメから精製したレクチンは、マウス、羊、ウサギ赤血球に対して特異性を示した。最も高い特性を示した赤血液はウサギ赤血球であり、ウサギ赤血球では ConA よりも強力な HA 活性を示した。このレクチンは、ConA と非常に似通った血球特異性や阻害糖の特徴を示した。また、現在マイトジェン促進剤として使用されている ConA よりも、ナタマメレクチンは強力なマイトジェン活性を示した。このマイトジェン活性はグルコースの添加により活性が阻害されたことより、活性にはグルコースのバインディングサイトが関連すると考えられた。同様に、ConA よりもナタマメレクチンは、強力なナチュラルキラー活性、及びマウス B16 メラノーマ細胞に対する増殖抑制作用を示す特徴がみられた。

以上の結果から、ナタマメレクチンは抗ガン作用を持つ試薬として使用できる可能性が示唆された(Une ら, 2017)。中国産ナタマメから精製されたレクチンの生物活性に関する報告(Wong ら, 2005)がみられるが、生物活性の観点から日本産ナタマメレクチンとは糖に対する特異性や酵素耐性などの性質を異にした。同種のマメでも産地により、生物的性質を異にする場合があることが判明した。

(2)加熱したキントキマメ及び、サトイモから精製されたレクチンの生物活性

生のキントキマメ(*Phaseolus vulgaris*)及び、生のサトイモ [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]の両試料から精製されたレクチンは強力な耐熱性を示した。そこでこれらの耐熱性の高いレクチンを含む両食品について、日常調理で食用とする柔らかさまでに試料の加熱を実施後、レクチンを精製して、生試料から精製したレクチンとの生物活性について比較した。

キントキマメから精製されたレクチン

加熱マメからの抽出液を DEAE セファロースカラムクロマトグラフィーに負荷し精製したレクチンは、未吸着画分、0.1 から 0.5M の塩化ナトリウムを含んだステップワイズ法での各溶出画分に検出された。使用する個々のマメの重量が異なった場合には、加熱時間を一定としてもマメの柔らかさにばらつきがあり、カラムクロマトグラフィーでの溶出状態に差異が認められたので、マメの産地、ロット、重量をほぼ一定にして加熱後、カラムクロマトグラフィーに試料溶液を負荷した。

キントキマメレクチンは、加熱前後でレクチンの HA 活性は大幅には変化しなかった。しかしながら、加熱前後の画分から得られたそれぞれのレクチンの生物活性は大きく変化した。たとえば、HA 活性を阻害する糖について検討した結果、生豆からのレクチンに対する阻害糖である N-アセチル-ガラクトサミン以外の糖にも、加熱した豆から得られたレクチンは阻害活性を示した。また、レクチンにプロテアーゼを反応させた結果、生豆から精製したレクチンはプロテアーゼに耐性を示したが、加熱豆から精製したレクチンは、カラムクロマトグラフィーから溶出した画分ごとにプロテアーゼに対する耐性が異なる結果を得た。

生のマメから精製したレクチンは、80 から急激に HA 活性は低下しはじめ、100 では、10 分の加熱で失活した。

サトイモから精製されたレクチン

加熱したサトイモからの抽出液を DEAE セファロースカラムクロマトグラフィーに負荷し、レクチンを精製した。HA 活性は、未吸着画分、0.1M、0.2M 塩化ナトリウム溶出画分それぞれに検

出された。

生のサトイモから精製したレクチンは、チオグロブリンとフェツインの糖タンパク質に阻害活性を示した。この結果に対して加熱した試料から精製したレクチンは、これらの糖タンパク質に加えてシアル酸にも阻害を示した。生サトイモからのレクチンはプロテアーゼ耐性を示したが、加熱芋からのレクチンは、画分ごとにその耐性が異なった。

(3) キントキマメ及び、サトイモから精製したレクチンのガン細胞への増殖抑制作用

キントキマメから精製されたレクチン

生試料から精製されたレクチン及び、加熱した試料から精製したレクチンの DEAE カラムクロマトグラフィーでの未吸着画分が、有意に B16 細胞に対して増殖抑制を示した。添加するレクチン量に依存して増殖抑制作用は濃度依存性を示した。

さらに、生マメから精製したレクチンは、HeLa 細胞及び、LM8 細胞に対して増殖抑制を示し、対照と比較して有意な差が確認された。加熱した試料から精製したレクチンに関しては、HeLa 細胞及び、LM8 細胞に対して、増殖抑制作用を示した画分と示さない画分が存在し、画分ごとに作用特異性が確認された。

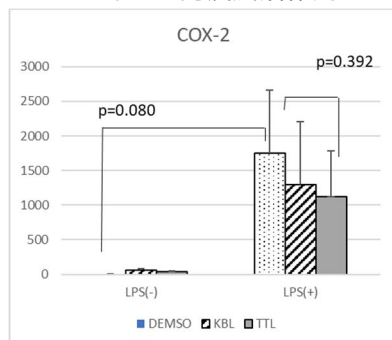
サトイモから精製されたレクチン

生レクチン及び、加熱した試料から精製したレクチンは、B16 細胞に対して有意に増殖抑制作用を示さなかった。

しかし、LM8 細胞に対して生レクチン及び加熱試料からの精製画分の一部が有意に増殖抑制作用を示した。また、HeLa 細胞に対しては、生マメからのレクチンは増殖抑制作用を示さなかったが、加熱した試料から精製したレクチンの一部が、有意に増殖抑制作用を示した。

これらの結果は、加熱によるレクチンの持つ糖鎖認識能力の変化によるためと考えられる。

(4) 加熱を施したキントキマメ及び、サトイモから抽出したレクチンのマウス腹腔内マクロファージに与える免疫賦活作用



加熱したキントキマメから抽出した粗抽出レクチン(硫酸分画後)とマウス腹腔内マクロファージとを反応させた結果、コントロールと比較して炎症性サイトカインである IL-6 及び、IL-1 の両者は低下したものの、対照と比較して有意な差は見られなかった。

この結果に対して、加熱したサトイモから抽出した粗抽出レクチン(硫酸分画後)は、COX-2($p < 0.05$)、TNF- $(p < 0.01)$ 、IL-6($p < 0.05$)の三種のサイトカインを有意に低下させる結果を得た。

(5) まとめ

加熱してもなおキントキマメとサトイモにレクチンが含有されていた。生と加熱した試料から精製したレクチンとでは、レクチンの糖の種類による認識能力が変化した場合がみられた。これらのレクチンを精製して各種ガン細胞と反応した結果、増殖抑制作用が確認された画分もあり、反応させるガン細胞、精製したレクチンの画分により増殖抑制作用は異なった。この結果は、レクチンの持つ糖鎖認識能力の差異により抑制作用に差がみられたと推察する。

レクチンはダイレクトに小腸から吸収される。加熱してもなおかつ、レクチンが含有されている加熱したキントキマメや加熱したサトイモを食事として摂取した場合に、少量の摂取であれば、免疫機能にポジティブな影響を与える可能性が示唆された。

参考文献

- Haraguchi, Y., et al. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 23, 525-534 (1977)
- 紙谷五月ら、日本家政学会誌 38, 455 - 464 (1987)
- Kojima, K., et al. Carbohydrate Research, 213, 275-282 (1991)
- Wong, J. H., et al. Archives of Biochemistry and Biophysics. 439, 91-98 (2005)

図 マウス腹腔内マクロファージによる免疫賦活作用

KBL : キントキマメレクチン, TTL : サトイモレクチン

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Une Satsuki, Nonaka Koji, Akiyama Junich	4. 巻 83
2. 論文標題 Lectin Isolated from Japanese Red Sword Beans (<i>Canavalia gladiata</i>) as a Potential Cancer Chemopreventive Agent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 837 ~ 843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1750-3841.14057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Satsuki Une, Koji Nonaka, Junichi Akiyama	4. 巻 81
2. 論文標題 Effect of Hull Sxrching, Soaking, and Boiling in Antinutrients in Japanese Red Sward Bean (<i>Canavalia Gladiata</i>)	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 C2398-2404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1750-3841.13441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畦五月, 秋山純一, 野中 紘士, 森秀治, 豊村隆男, 渡邊正博, 中田理恵子
2. 発表標題 加熱したキントキマメレクチンがマウスガン及び免疫細胞へ与える影響
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畦五月, 秋山純一, 野中 紘士, 森秀治, 豊村隆男, 渡邊政博, 中田理恵子
2. 発表標題 加熱調理したキントキマメレクチンのマウス細胞への影響
3. 学会等名 日本家政学会第59回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 畦五月、野中紘士、秋山純一
2. 発表標題 赤ナタマメの皮処理、浸漬、加熱が抗栄養物質の含有量に与える影響
3. 学会等名 日本家政学会中四国支部研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 畦五月、野中紘士、秋山純一
2. 発表標題 加熱による各種植物性食品中のレクチンの変性
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 畦五月
2. 発表標題 マウス脾細胞を使用したマイトジェン活性とNK活性
3. 学会等名 日本家政学会大会
4. 発表年 2015年～2016年

1. 発表者名 畦五月
2. 発表標題 加熱による各種植物性食品中のレクチンの変性
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2016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
研究 分担 者	中田 理恵子 (Nakata Rieko) (90198119)	奈良女子大学・生活環境科学系・准教授 (14602)	