

マウスのガン化繊維芽細胞の増殖抑制を示す海藻成分の検索

近畿大学・農学部・応用生命化学科
河村 幸雄

海藻は古来体に良いと言われているが確実な実証研究が少ないのが現状である。一方、最近海洋深層水が利用可能となり、高知県、富山県、沖縄県などくみ上げ可能地域の深層水が注目されている^{1,2)}。本研究では一般の表層水で生育した海藻と高知県沖合で汲み上げた海洋深層水で培養した海藻から、抗腫瘍物質を見出すことを目的として、ガン抑制遺伝子産物の機能不全によるマウスガン化細胞に特異的な細胞死³⁻⁵⁾を引き起こす成分の検索と分離を行った。15年度の結果では、ワカメ (*Undaria pinnatifida*)、スジアオノリ (*Enteromorpha clathrata*)、アオサ、(*Ulva pertusa*) コンプ (*Laminaria japonica*)、ミリン (*Solieria robusta*) の中で、スジアオノリ (*Enteromorpha clathrata*) のエタノール抽出物にガン化細胞選択的な細胞毒性が認められた。

この結果に基づいて、今年度はスジアオノリのガン細胞選択的致死因子の分離をさらに試みるとともに、今年度新たに海洋深層水研究所から供与された深層水で培養された海藻、カズノイバラ、トゲキリンサイ、スジアオノリ、ワカメについて、また昨年度の試料の中で少しの活性の認められたハバノリとヤブレグサについては作用の確認を行った。

実験材料と方法

1. 材料

市販品および高知県より提供された海洋深層水養殖のワカメ (*Undaria pinnatifida*)、スジアオノリ (*Enteromorpha clathrata*)、アオサ、(*Ulva pertusa*)、コンプ (*Laminaria japonica*)、ミリン (*Solieria robusta*) の5種類の海藻⁶⁾が用いられた。乾燥した海藻試料は細かく裁断後、ホモジナイザーで30メッシュ以下の粉末に粉碎した。10

倍量のエタノール (99.9%) と蒸留水で室温下に抽出した海藻エキスをエバポレーターで乾固あるいは凍結乾燥したものを実験に供した。細胞については、マウスの繊維芽細胞の野生型である3T3細胞と、それをガン抑制遺伝子p53とpRBを不活性化するウイルスSV40でガン化したSV-T2細胞を使用した⁷⁻⁹⁾。

1-1. 試料の抽出

水抽出：試料をはさみで細かく切り、ホモジナイザーで粉碎した後ふるいにかけてメッシュ以下の大きさにした。試料に10mlの水を加えてホモジナイザーで抽出、ろ過した。ろ液を50ml遠沈管に移し、4℃で10分間、10,000回転で遠心分離を行った。重量を測定したナス型フラスコに上清液を移し凍結乾燥した。この重量を測定した後遠沈管に移して冷蔵保存した。

エタノール抽出：試料をはさみで細かく切り、ホモジナイザーで粉碎しふるいにかけて30メッシュ以下の大きさにした。

試料1gに10mlのエタノールを加えてホモジナイザーで抽出、ろ過し、4℃で10分間、10,000回転で遠心分離を行った。重量を測定したエバポレーター用のフラスコに上清液を移し、エバポレーターでエタノールを蒸発させた。この重量を測定した後、1mlのエタノールでフラスコ内の固体を溶かし、エッペンドルフチューブに移し-20℃で保管した。

2. 細胞培養

3T3細胞とSV-T2細胞は、10%のFCSを含むDMEM培地中37℃、5%CO₂存在下で3日間培養後、継代した。細胞数は、細胞計数盤あるいはMTT法¹⁰⁾にて計測した。試料の添加は計数板で計数した3T3細胞とSV-T2細胞を 1.5×10^5 個/mlになるように90μlずつに96穴シャーレにまいた。継代直後、または継

代から24時間後にサンプルを10 μ l (0~1000 μ g/ml 穴) ずつ添加した。細胞の生存率は、サンプルを継代直後に添加する場合は継代から24時間後、継代から24時間後にサンプルを添加する場合は継代から48時間後に、MTT法によって細胞数を測定し、コントロールに対する細胞の生存率を算出した。

3. ゲルろ過クロマトグラフィー

活性を示した水抽出物については50mg/mlのトリスバッファー、pH7.2、溶液、エタノールでの抽出物については飽和状態のトリスバッファー、pH7.2、溶液をそれぞれ2ml、同緩衝液で平衡化したSephadex G-25のカラム (2.2 \times 90cm) にかけた。トリスバッファー (pH7.2) で4 $^{\circ}$ Cの低温室中、流速5.0ml/hでクロマトグラフィーを行い、溶出画分の210nmと280nmの吸光度を測定した。さらに、細胞致死活性を示したピーク画分を集め、約2mlまで濃縮した。濃縮画分を、Sephadex G-50のカラム (2.2 \times 90cm) にかかけ、4 $^{\circ}$ Cでトリスバッファー (pH7.2) を用いて流速5.0ml/hで溶出した。分子量を推定するために、標準物質として、Neurotensin (0.26mg/ml)、Cytochrome C (1mg/ml)、Bz-Gly-His-Leu (1mM/ml) を用いた。

結果と考察

1. 海藻抽出物の細胞増殖に対する影響

1-1 水抽出物の影響

今年度新たに、表層水と深層水で培養された、アマノリ、カヤモノリ、コンブ、キリン、ミル、カズノイバラ、スジアオノリ、ワカメ、トゲキリンサイ (深層水のみ)、ハバノリ、ヤブレグサについて、ガン細胞選択的致死活性を測定した結果、前年度と同じくスジアオノリでは3T3とSVT2で差が認められなかった。新たなサンプルのカズノイバラ、トゲキリンサイではカズノイバラには選択毒性はなかったが、深層水培養トゲキリンサイには強い細胞毒性が認められた (Fig. 1 & 2)。ただし、表層水で生育した試料がないため選択性については判断できないが、検討する価値があると考えられる。

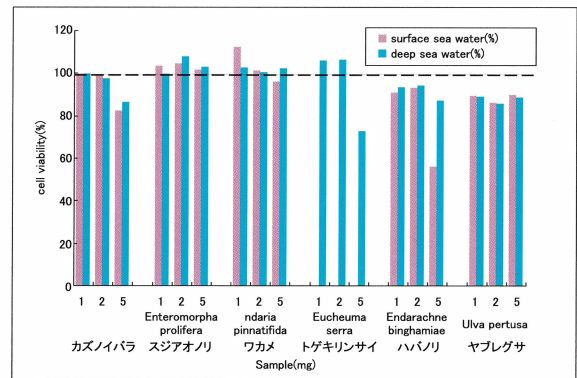


Fig. 1 Effects of water extracts of seaweeds on viability of 3T3 cell

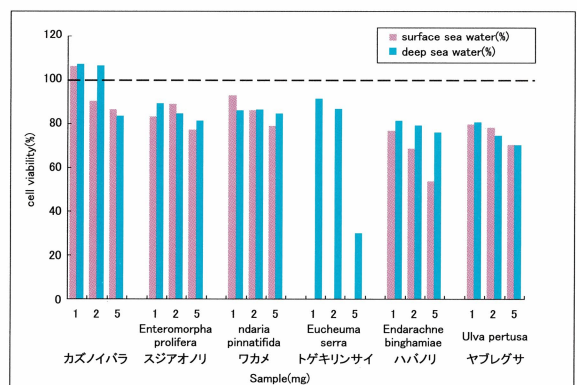


Fig. 2 Effects of water extracts of seaweeds on viability of SVT2 cell

1-2 エタノール抽出物の影響

水抽出物と同じく、カズノイバラ、スジアオノリ、ワカメ、トゲキリンサイ (深層水のみ)、ハバノリ、ヤブレグサのエタノール抽出物につき表層水と深層水培養海藻のガン細胞選択的致死活性を測定した結果、昨年と同様に深層水培養スジアオノリに選択的な細胞毒性が認められた。それ以外の海藻では、表層水、深層水培養海草類の間で差は認められなかった (Fig. 3 & 4)。また、トゲキリンサイにも細胞致死作用は認められなかった。従って、トゲキリンサイの細胞致死作用は、水溶性物質であると推定できる。

2. スジアオノリとトゲキリンサイの濃度依存的なガン細胞選択的致死作用

水抽出物ではトゲキリンサイ (表層水培養標品のみに) に弱いながらもガン細胞選択的致死作用が、

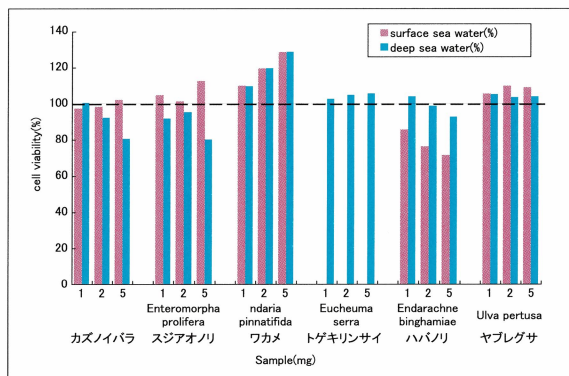


Fig. 3 Effects of ethanol extracts of seaweeds on viability of 3T3 cell

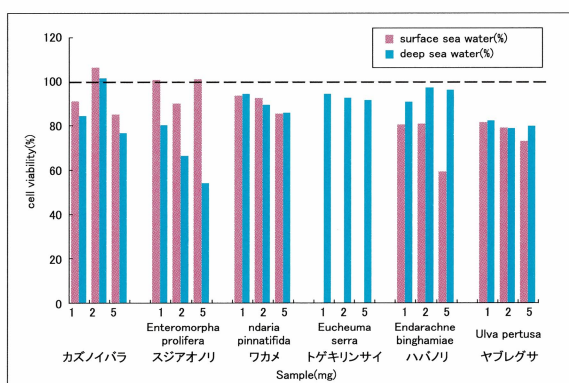


Fig. 4 Effects of ethanol extracts of seaweeds on viability of SVT2 cell

またアルコール抽出物では深層水培養スジアオノリにガン細胞選択的致死作用が認められたので、それらの濃度依存性について検討した。深層水培養トゲキリンサイ標品を終濃度0.1、0.2、0.5mg/mlで細胞に添加し24時間後の細胞生存率は、濃度依存的な選択性を示し、0.5mg/mlでは3T3細胞が80%近く生存していたのに対して、SVT2細胞は生存率が30%であった (Fig. 5)。今後、トゲキリンサイの選択的細胞致死作用物質の分離・精製と作用機構の解明に興味を持たれる。

エタノール抽出物では、スジアオノリに昨年同様、深層水培養標品にガン細胞選択的致死作用が認められた。培地に対してスジアオノリ濃度、0.5mg/mlの添加で、3T3の生存率は80%、SVT2のそれは55%であった (Fig. 6)。表層水生育スジアオノリは細胞致死作用が弱いのに対して、深層水培養スジアオノリではガン細胞選択が認められたこ

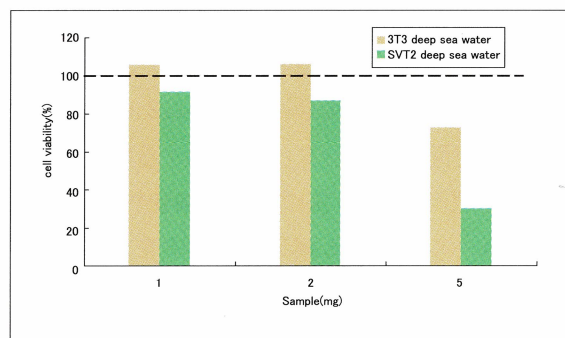


Fig. 5 Effect of water extracts of Eucheuma serra on viability of 3T3 and SVT2 cell

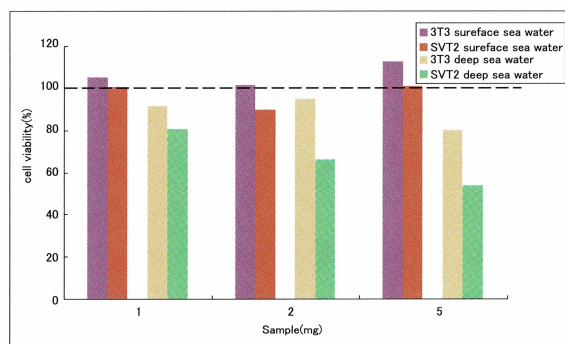


Fig. 6 Effects of ethanol extracts of Enteromorpha prolifera on viability of 3T3 and SVT2 cell

とは、興味のある点である。

3. スジアオノリのエタノール抽出物中のガン細胞選択的致死作用物質の分離

スジアオノリのエタノール抽出物中のガン細胞選択的致死作用物質の大きさを推定するために、Sephadex G-25、Sephadex G-50、Sephadex G-200を使用するゲル濾過クロマトグラフィーで活性物質の分離を試みた。Sephadex G-25、及びSephadex G-50では、ガン細胞選択的致死活性は、大部分がボイドボリューム (排除体積) 付近に溶出し、低分子画分にも若干の活性が認められた。後者の低分子画分の活性については、前年度部分的に精製し、その分子サイズ等を明らかにした。今回、Sephadex G-25、及びSephadex G-50 両クロマトグラフィーでは、大部分の活性がボイドボリューム付近に溶出したことから、Sephadex G-200 による分

離をおこなったところ、細胞致死活性は、二つの210と280nmに吸収を示すピーク部分に認められた (Fig. 7)。その溶出位置から分子量が、おおよそ10万ダルトンと5000-8000ダルトンの物質であると推定された。分子量の大きい物質の作用の方が、すぐれたガン細胞選択的致死活性を示し、最終濃度0.8mg/mlでガン化細胞はほとんど完全に死滅したが、正常細胞は約50%が生存していた。分子量の小さい画分も0.8mg/mlで選択性を示し、正常細胞は約90%が生存しガン化細胞は40%の生存率であった。

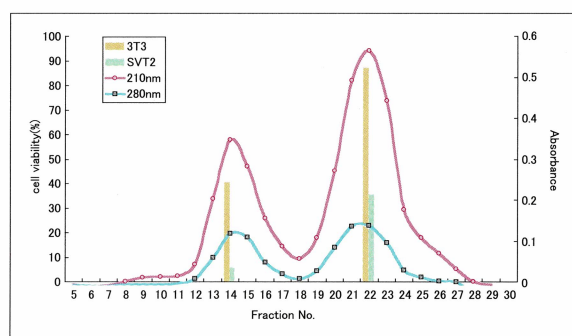


Fig. 7 Effect of active fractions from Sephadex G-200 gel chromatography of *Enteromorpha prolifera* ethanol extract on viability of 3T3 and SVT2

まだ、精製度が低いいためさらに精製を進め、純度の高い標品での選択性を確認しすることが必要と考えられるが、スジアオノリ特に深層水で培養されたスジアオノリにおいて活性の認められたことは、深層水培養することで生理機能を賦与したスジアオノリ標品を生産することが、可能なことを示している。今後、どのような機構で深層水培養でそのような活性が発現されるかを明らかにすることが、将来的に利用を考えると重要である。

参考文献

- 1) 中谷三男、海洋深層水沿岸水域のパイロトリーダー、東京水産社
- 2) 中島敏光、海洋深層水の利用21世紀の循環型資源、緑書房
- 3) A.J. Levine, J. Momand, and C. A. Finlay, *Nature* 351, 453-456 (1991)
- 4) A.J. Levine, *Cell* 88, 327-331 (1997)
- 5) L. J. Ko. and C. Previs. *Genes Dev.*, 10, 1054-1072 (1996)
- 6) 新崎 盛敏、原色海藻検索図鑑
- 7) Y. Kawamura, M. Manabe, K. Kitta *J. Biol. Macromol* 2, 52-58. (2002)
- 8) Y. Kawanura, M. manabe. and K. Kitta, *Bio-Factors*, 12, 157-160 (2000)
- 9) David Wan-Cheng Li and Abraham spector *Molecular and Cellular Biochemistry* 173, 59-69 (1997)
- 10) Mosmann, T *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63 (1983)