

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

唐 漢 軍²⁾, 井 上 真美子¹⁾, 鵜 澤 有 希¹⁾, 河 村 幸 雄^{1), 2)}

(¹⁾近畿大学・農学部・食品栄養学科*, ²⁾近畿大学大学院・農学研究科・応用生命化学**)

Screening and partial purification of substances in some sea weeds which exert growth-suppressing action against mouse transformed fibroblasts

Thang Jun HANG²⁾, Mamiko INOUE¹⁾, Yuki UZAWA¹⁾, and Yukio KAWAMURA^{1), 2)}

¹⁾Dept. of Food Science and Nutrition, School of Agriculture,

²⁾Dept. of Applied Life Chemistry, Graduate School of Agriculture Kinki University

Anti-cancer action of the extracts of five kinds of sea weeds which were harvested from sea water and cultivated in the deep sea water was measured by using mouse fibroblast cells (wild type) and the phenotype transformed with SV-40 virus. The ethanol extracts of the most sea weeds showed relatively high cytotoxic action to the fibroblast comparing with the aqueous extracts. The extracts of *Ulva pertusa* (or *Ulva* sp.) and *Enteromorpha clathrata* expressed high cytotoxic activity. Among them, the extracts from *Enteromorpha clathrata* cultivated in the deep sea water showed relatively selective cytotoxic action to the transformed cell. By gel filtration analysis, the cytotoxic activity was eluted in bimodal fractions with molecular weight around 2-3 kDa and 500Da.

海藻は一般的に体に良いと言われ、食品と健康という観点から多くの研究がなされてきている。最近、海洋深層水と言われる海水が注目されている。海洋深層水には以下のような特徴がある。まず、その富栄養性である。地球上に存在するほとんどの元素が含まれており、元素の組成比が生物体の組成比に類似しているといわれている。次に清浄性である。水質を悪化させる粒状物質やお溶存態の可分解性の有機物が少ない。また疾病などを引き起こす病原菌や細菌類が少なく、有害な寄生虫や付着生物が少ない。そして、周年を通して水温が低い低水温特性を有している。最後にそのような特性の安定性である^{1, 2)}。現在、海洋深層水が物理・化学的および微生物学的に安定な特質から、何らかの形で活用できないかが期待されている。そこで、本研究では一般の海藻と海洋深層水で養殖した海藻から、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り形質転換を起こしているマウスガン化細胞に特異的な細胞死^{3~5)}を指標として抗腫瘍成分の検索と分離を行った。

実験材料と方法

1. 材料

市販品および赤穂化成(株)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* sp. or *pertusa*) コンブ (*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抽出物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。

*所在地：奈良市中町 3327-204 (〒631-8505)

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で形質転換したSV-T2細胞を使用した⁷⁻⁹⁾。

他の試薬と培地はすべて特級あるいは一級の市販品を用いた。

1-1. 海藻成分の抽出

a. 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所定のメッシュ以下の大きさにした。試料1 gに10 mlの水を加えてホモジナイザーで破碎抽出後、ろ過した。ろ液を50 ml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。重量を測定した後プラスチック遠沈管に移し、使用まで冷蔵保存した。

b. 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3メッシュ以下の大きさにした。試料1 gに10 mlのエタノールを加えてホモジナイザーで抽出後ろ過した。ろ液を50 ml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蒸発除去した。この重量を測定した後、1 mlのエタノールでフラスコ内の固形物を溶かし、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。

3. 試料の添加

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90 μ l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1穴あたり10 μ lずつ添加した。

4. 細胞の生存率

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、対照区を100として細胞の生存率を算出した。

5. 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50 mg/mlのトリス緩衝液、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緩衝液、pH7.2、溶液をそれぞれ2 ml、同緩衝液で平衡化したSephadex G-25のカラム (2.2 $\times$ 90 cm) にかけた。トリス緩衝液 (pH7.2) で4℃の低温室中、流速5.0 ml/hでクロマトグラフィーを行い、溶出画分の210 nmと280 nm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2 mlまで濃縮した。濃縮画分を、Sephadex G-50のカラム (2.2 $\times$ 90 cm) にかかけ、4℃でトリス緩衝液 (pH7.2) を用いて流速5.0 ml/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 (0.26 mg/ml)、Cytochrome C (1 mg/ml)、Bz-Gly-His-Leu (1 mM/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

継代から24時間後に抽出物を添加し、さらに48時間培養後、MTT法により細胞生存率を測定した。コンブの市販品、ワカメの市販品と深層水で培養したそれらの海藻は活性を示さなかった。また、逆にミリンの深層水養殖は細胞生存率を高める (増殖促進) という結果となった。アオサは市販品も深層水養殖藻も活性を示したが、3T3とSV-T2細胞にたいして、同様の細胞死の抑制活性を示した。一方、スジアオノリは市販品も深層水養殖も3T3細胞よりSV-T2細胞に対して高い細胞死抑制活性を示した (Fig. 1)。

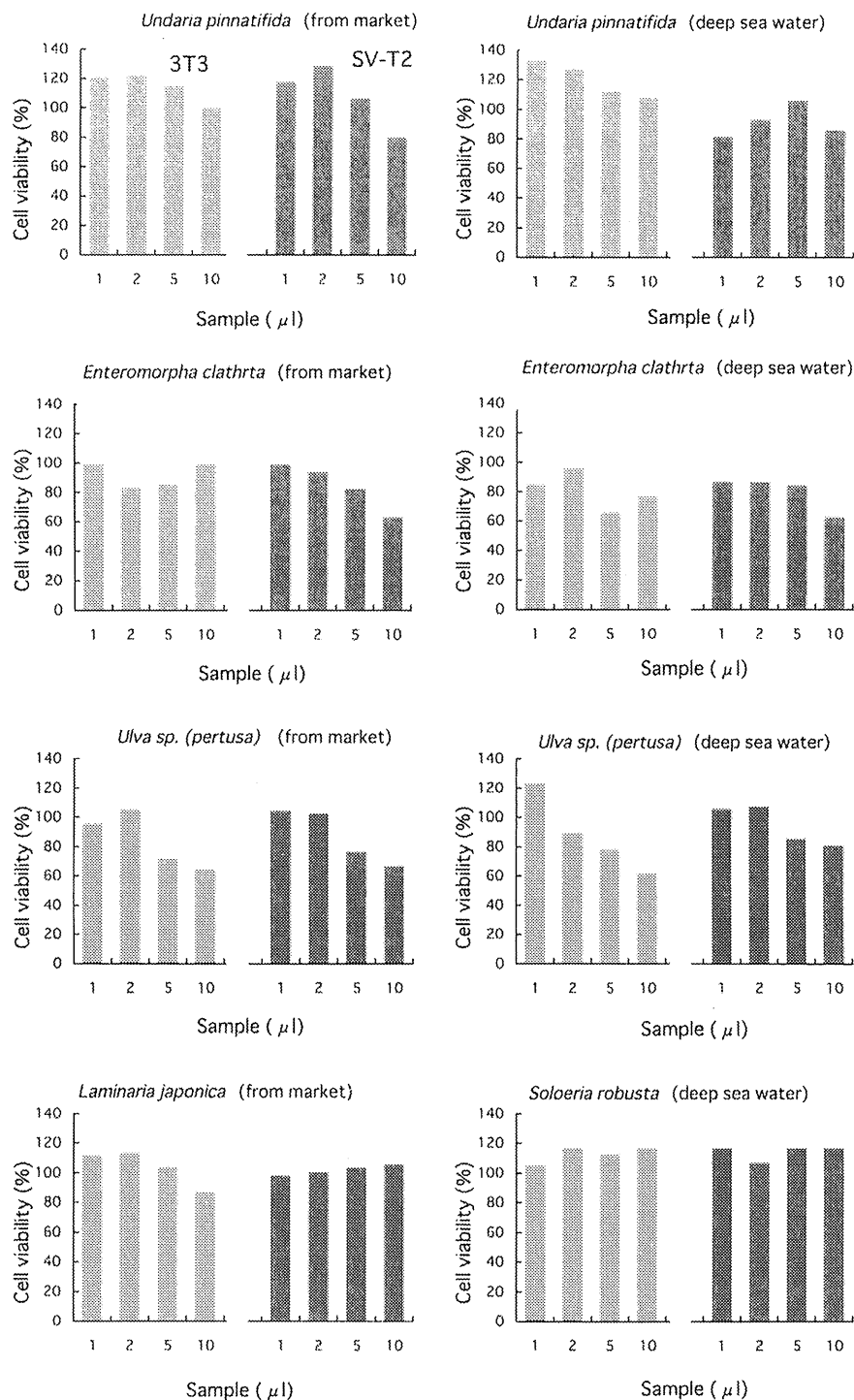


Fig. 1 Effect of water extracts on viability of 3T3 and SV-T2 cells (simultaneous addition).

継代直後に抽出物を添加し、さらに24時間培養した場合では、コンブ、ワカメ、ミリンは継代後と翌日添加では、類似した結果が見られた。一方、アオサの市販品はほとんど細胞死抑制活性を示さなかったが、深層水養殖はSV-T2の細胞生存率を高めた。スジアオノリは3T3とSV-T2細胞に対して高い抑制活性を示した (Fig. 2)。

1. 2 エタノール抽出物の影響

継代後翌日添加の場合では、コンブの市販品抽出物は水抽出物と同様に活性を示さなかった。ミリンの深層水養殖藻の抽出物は細胞生存率を高めるという結果となった。ワカメは市販品および深層水養殖藻からの抽出物のどちらも

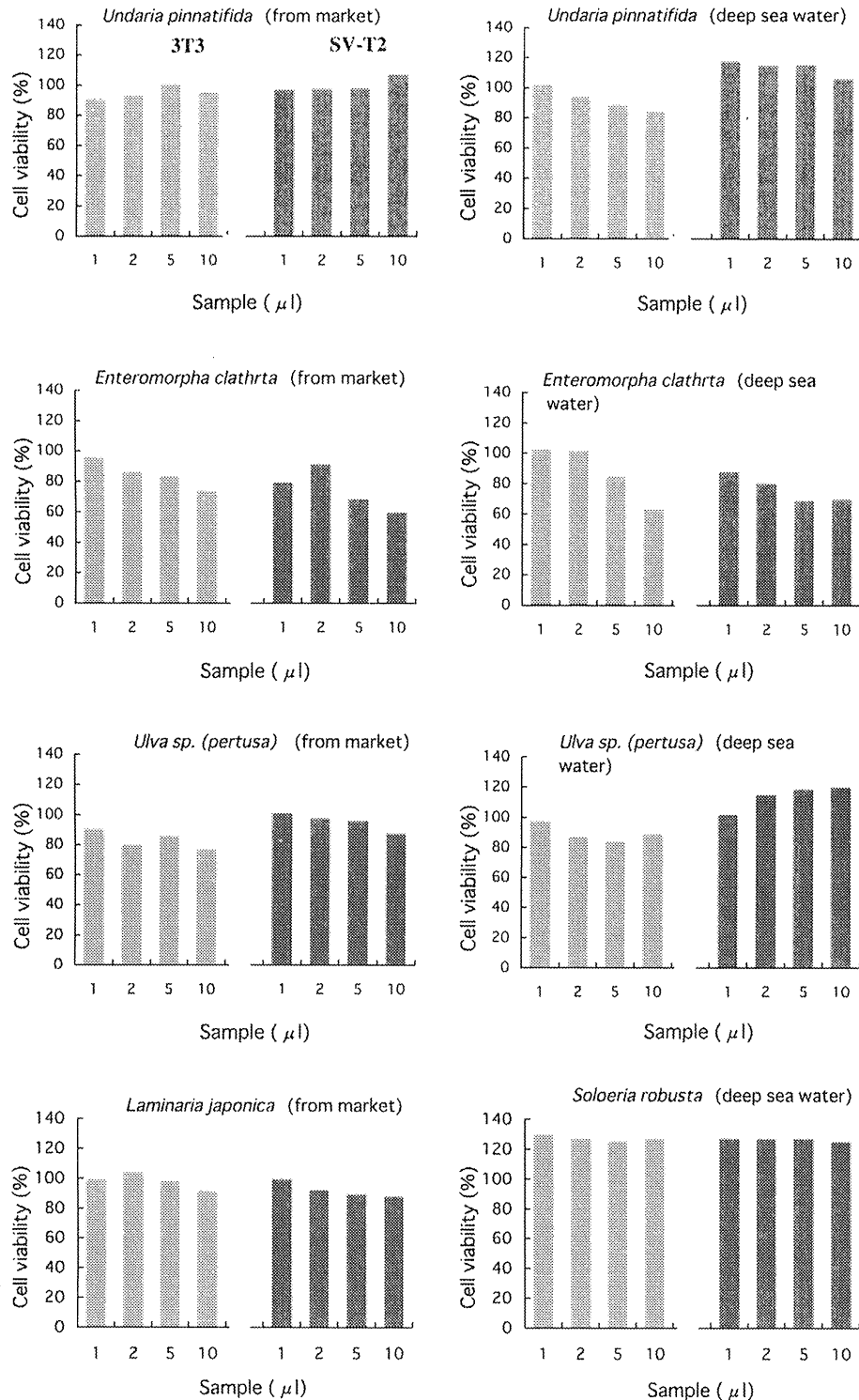


Fig. 2 Effect of water extracts on viability of 3T3 and SV-T2 cells (addition after 24 hr).

SV-T2細胞に対して低い抑制活性を示した。アオサは市販品と深層水養殖藻の抽出物のどちらも抑制活性を示したが、3T3とSV-T2の両細胞に同様の強さの活性であった。スジアオノリは市販品と深層水養殖藻の両方の抽出物が水抽出物と類似した高い抑制活性を示した (Fig. 3)。

継代直後添加の場合では、ワカメ市販品の抽出物には活性が認められなかったが、深層水養殖藻からの抽出物には低いながらも抑制活性を示した。コンブの市販品とミリンの深層水養殖藻からの抽出物は、3T3細胞において抽出物を

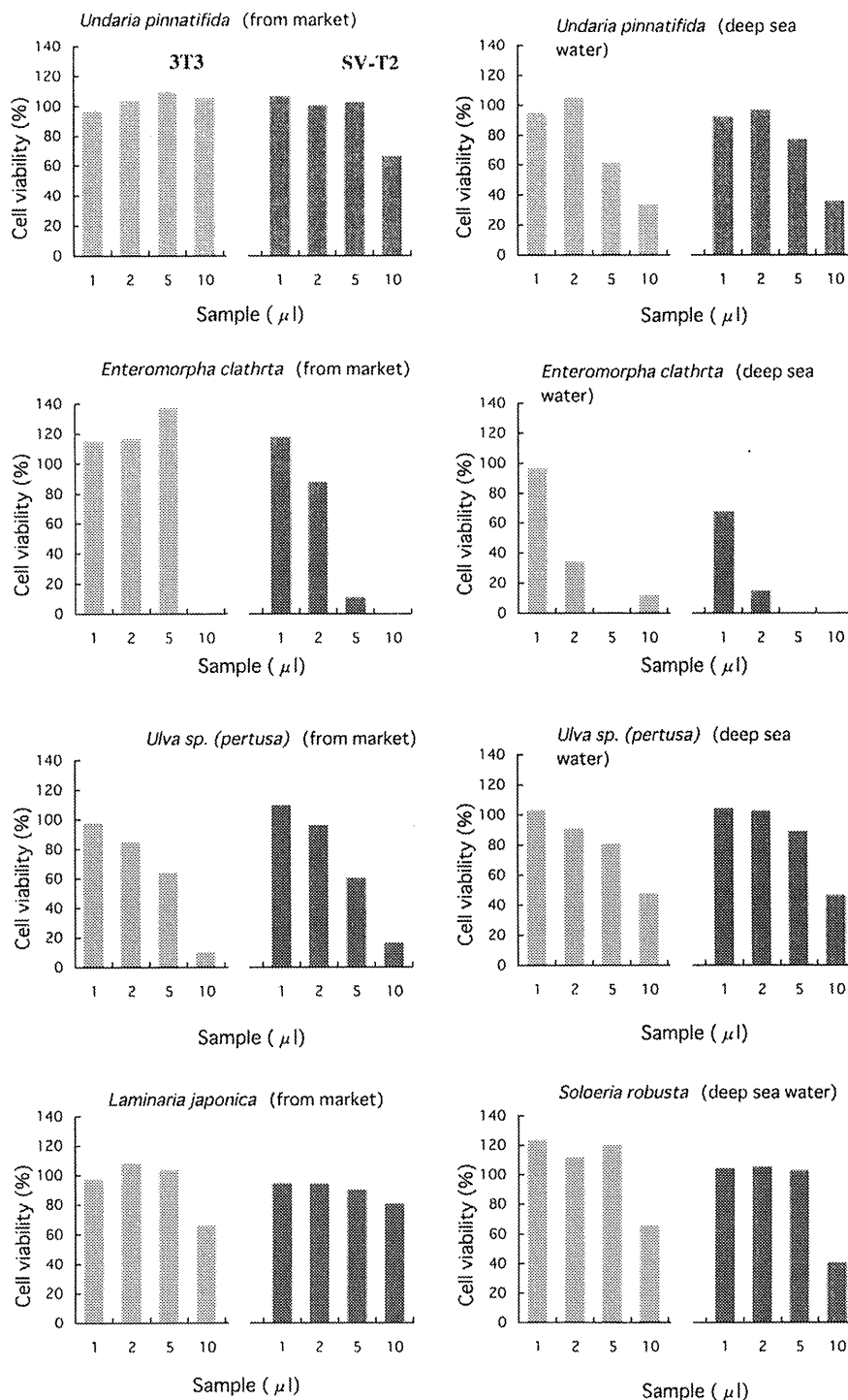


Fig. 3 Effect of ethanol extracts on viability of 3T3 and SV-T2 cells (simultaneous addition).

添加すると添加前より細胞生存率が大きく上昇した。しかし、アオサとスジアオノリは市販品と深層水養殖藻の抽出物のどちらも添加量を増加させるとともに、3T3細胞とSV-T2細胞ともに細胞生存率は低下した (Fig. 4)。

2. 細胞増殖抑制活性を有する抽出物の成分の分離精製

5種類の海藻抽出物に対して、3T3とSV-T2細胞を用いた実験結果より、スジアオノリの深層水養殖藻のエタノール抽出物が最も高い抑制活性成分を含有することが考えられた。そこで、その活性成分を分離するために、まず、Sephadex G-25カラムで分画した。その結果39番目と85番目の画分に波長210 nmの吸収ピークが、また37番目の画

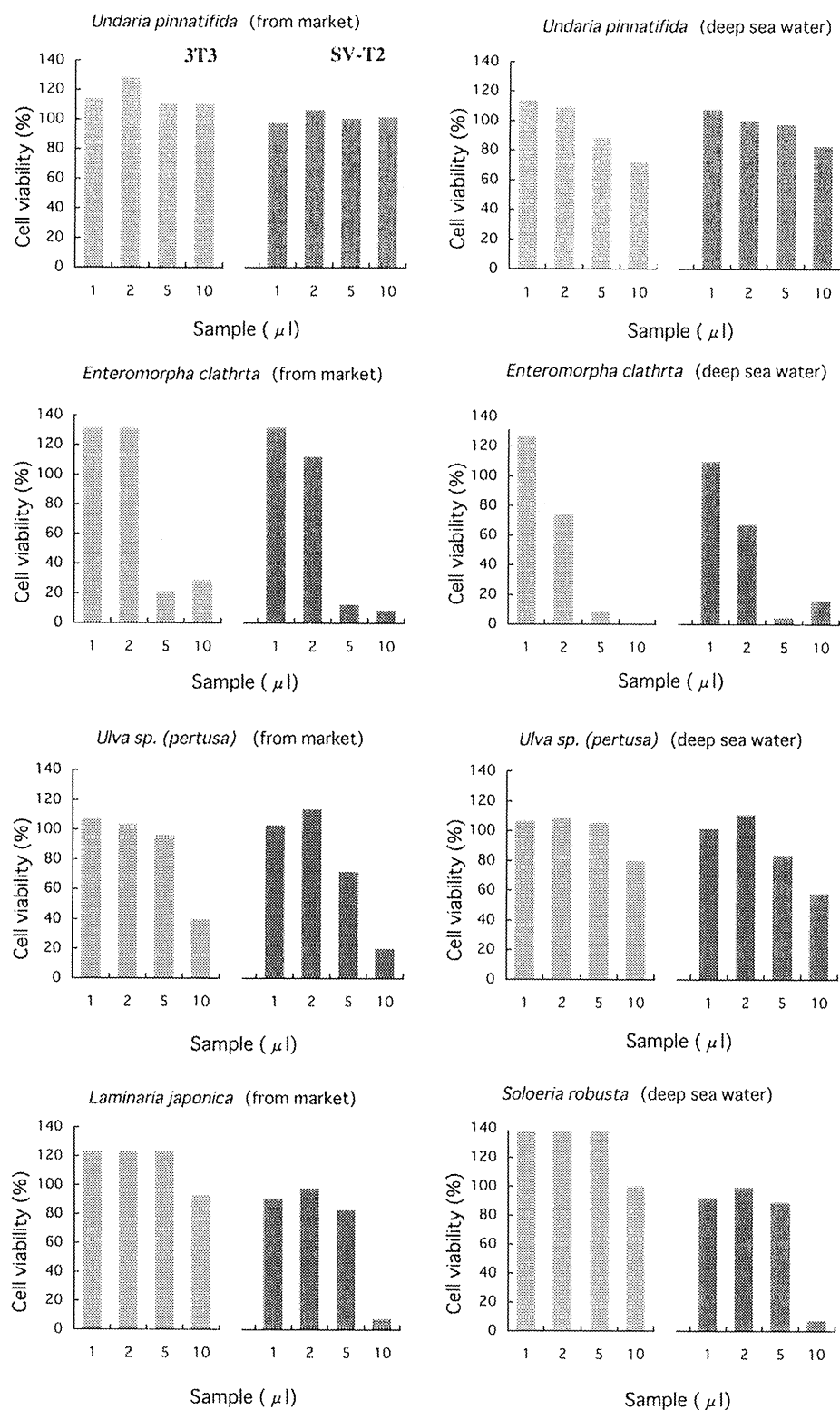


Fig. 4 Effect of ethanol extracts on viability of 3T3 and SV-T2 cells (addition after 24 hr).

分に波長 280 nm の吸収を示すピークがそれぞれ認められた。これら画分をそれぞれ濃縮した後、継代後翌日に細胞に添加した結果、ボイドボリューム付近に溶出される分子量の大きいピークに細胞増殖抑制活性が認められた (Fig. 5)。

この画分を濃縮後さらに Sephadex G-50 ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。その結果、波長 210 nm に吸収のある二つのピークが現れ検出された (Fig. 6)。これらの画分の濃縮物を細胞に添加したところ、どちらのピーク画分に

も細胞生存率を低下させる活性が見られ、3T3細胞よりSV-T2細胞の方に若干高い活性を示した (Table 1)。

Sephadex G-50 クロマトグラフィーで得られた活性画分の分子量を推定するために、Neurotensinと Cytochrome と Bz-Gly-His-Leu の3標準物質を同じゲルカラムを用いてクロマトグラフィーを行った。これらの標準物質の溶出位置から、Sephadex G-50からの2つのピーク画分の分子量はそれぞれ2~3kDaの高分子物質と分子量約500 Daの低分子物質であることが推定された (Fig. 6)。

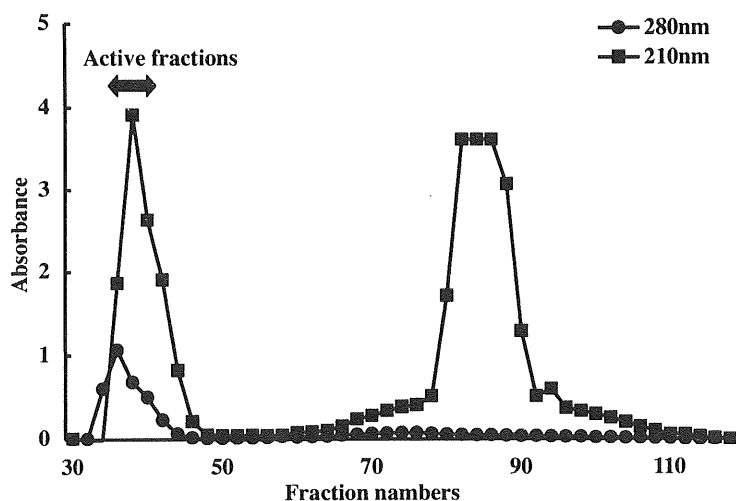


Fig. 5 Gel filtration chromatography (Sephadex G-25) of ethanol extract from enteromorpha clathrata (deep sea water).

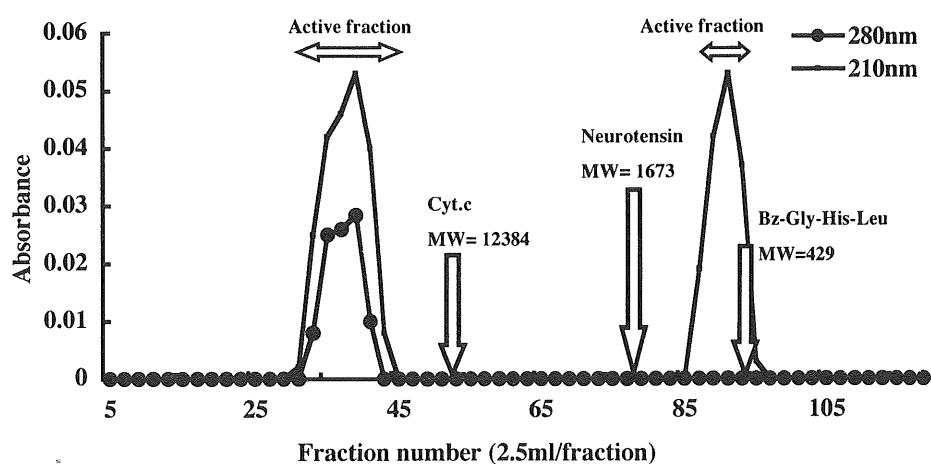


Fig. 6 Gel filtration chromatography (Sephadex G-50) from active fractions on Sephadex G-25.

Table 1 Effect of fraction of gel filtration chromatography (Sephadex G-50) on viability of 3T3 and SV-T2

Fractions	Viability (%)	
	3T3	SV-T2
31 ~ 43	85.4	73.0
87 ~ 95	88.7	77.8

参考文献

- 1) 中谷三男 (2002) 海洋深層水 沿岸水域振興のパイロットリーダー, 東京水産社.
- 2) 中島敏光 (2002) 海洋深層水の利用 21世紀の循環型資源, 緑書房.
- 3) Levine A.J., Momand J., and Finlay C.A. (1991) Nature 351, 453 - 456.
- 4) Levine A.J. (1997) Cell 88, 327 - 331.
- 5) Ko, L.J., and Previs C. (1996) Genes Dev. 10, 1054 - 1072.
- 6) 新崎盛敏 (1981) 原色海藻検索図鑑.
- 7) Kawamura Y., Manabe M., and Kitta K. (2002) J. Biol. Macromol 2, 52 - 58.
- 8) Kawamura Y., Manabe M., and Kitta K. (2000) BioFactors 12, 157 - 160.
- 9) Cheng Li D.W. and Abraham Spector A. (1997), Molecular and Cellular Biochemistry 173, 59 - 69.
- 10) Mosmann, T. J. Immunol. Meth (1983), 65, 55 - 63.

謝 辞

この研究の一部は、高知県「海洋深層水培養海藻抽出成分を利用した機能性健康食品の開発」プロジェクトおよび赤穂化成(株)からの研究助成金に依った。ここに感謝の意を表する。