

論 文 要 旨

[学位論文の題名]

養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性に関する研究

[氏名] 山元 裕太

[学位論文の要旨]

本論文は、硫酸化多糖の一種であるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について研究した成果をまとめたものである。

海藻に含まれる硫酸化多糖は、褐藻類のフコイダンを始めとして、様々な研究が行われ、硫酸化多糖の多様な生理活性が報告されている。例えば、抗酸化活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性（抗炎症活性）、抗アレルギー活性、抗腫瘍活性、抗肥満活性、抗糖尿病活性、抗血液凝固活性及び抗ウイルス活性等がある。しかし、実際、硫酸化多糖の産業的利用は、増粘剤としてカラギーナン、抗血液凝固剤としてヘパリンが知られているのみで、それ以外の利用は少なく、硫酸化多糖の産業上の利用へ向けた新規利用方法の研究が望まれている。

硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性は、褐藻類のメカブやコンブに含まれるフコイダンや紅藻類チノリモ由来の硫酸化多糖で報告がされているが、緑藻類の硫酸化多糖については、ヒアルロニダーゼ阻害活性の報告はほとんどなく、その阻害機構についても詳細な研究は行われていない。そこで、緑藻類のヒトエグサに存在するラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について研究を実施した。

まず、養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の最適な抽出法について検討した。ラムナン硫酸の水抽出、酸処理抽出、酵素処理抽出及びオートクレーブ処理抽出を行い、得られた各抽出物の収率、

化学組成、分子量及び IR や NMR による構造解析の結果から、酵素処理抽出法が、ラムナン硫酸の硫酸基含有率及び分子量が最も大きく、灰分含有率の少ない有効な抽出法であることを明らかにした。

次に、酵素処理抽出法により得られた硫酸基含有率 20%(w/w)、ピークトップ分子量 700kDa のラムナン硫酸(以後、RS(20,700kDa)とする)を用い、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について調べた。その結果、まず、ラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)はヒアルロニダーゼ阻害活性を有することが明らかとなった。

更に、ラムナン硫酸の硫酸基含有率がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるため、ラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)を過硫酸化処理または脱硫酸処理により、硫酸基含有率 41%(w/w)、7%(w/w)及び 0.5%(w/w)のラムナン硫酸を調製し、RS(20, 700kDa)と共に、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、ラムナン硫酸の硫酸基含有率の増加とともにヒアルロニダーゼ阻害率は高くなった。

ラムナン硫酸の分子量がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるために、RS(20, 700kDa)の低分子化処理を行い、その硫酸基含有率はほとんど低下させず、ピークトップ分子量 200kDa 及び 50kDa のラムナン硫酸を調製し、RS(20, 700kDa)と共に、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、分子量の異なるいずれのラムナン硫酸においても、ヒアルロニダーゼ阻害率にほとんど差がみられなかった。

以上の結果より、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害には、ラムナン硫酸中の硫酸基含有率が重要であり、分子量の影響は少ないことを明らかにした。

続いて、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構について、より詳細な検討を行った。まず、ラインウィーバー=バーク式によりラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する酵素阻害様式を調べた。その結果、ラムナン硫酸がヒアルロニダーゼの活性部位に直接作用する拮抗阻害であることが確認できた。次いで、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは溶液中で白濁物質を生成することが確認されたため、この白濁物質の IR 及び NMR を用いた構造解析を行った。白濁物質の IR 分析により、白濁物質がラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体であることを確認した。また、この複合体の ¹H-NMR 分析により、ヒアルロニダーゼのリジン残基がラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成に関係していることを明らかにした。

さらに、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成によるヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるために、その複合体を除去したろ液にヒアルロン酸を加え、ろ液のヒアルロン酸分解率を求め、ラムナン硫酸の硫酸基含有率と複合体生成率の関係及び硫酸基含有率とヒアルロン酸分解率の関係を調べた。その結果、ラムナン硫酸はその硫酸基含有率に応じて、ヒアルロニダーゼと複合体を生成した。さらに、複合体の生成率が増加するほど、ろ液のヒアルロン酸分解率が低下した。すなわち、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは複合体を生成することで、ヒアルロニダーゼを不活性化することが分かった。即ち、ヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基の一つはリジン残基と考えられるので、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼの活性部位であるリジン残基の正電荷がイオン相互作用を通して複合体を生成し、ヒアルロニダーゼを不活性化し、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害が発現したと考えられた。

学位論文の題名・・・外国語の場合は、日本語訳を付すこと。
学位論文の要旨・・・2,000字程度。