

学 位 論 文 要 旨

氏 名	照屋 武志
題 目	<p style="text-align: center;">オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA) 由来アセチル フコイダンの構造特性と生理活性に関する研究 (Studies on structural characteristics and biological activities of acetyl fucoidan from <i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA)</p>
<p>フコイタンは褐藻類の細胞間マトリクスに見られる硫酸化多糖の一種である。オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA) は食用の褐藻で、沖縄周辺で養殖されている。先に沖縄県で養殖されているオキナワモズクからアセチルフコイタン (CAF) が分離された。本研究では CAF の構造特性とその生理活性について検討した。</p> <p>メチル化分析の結果から、主鎖は α-1\rightarrow3-結合の L-フコース残基で構成され、側鎖として D-グルクロン酸残基が主鎖の L-フコース残基の C-2 に置換し、また硫酸基およびアセチル基が D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換していることが明らかになった。</p> <p>CAF のマクロファージ活性化作用とそれに関わるシグナル伝達経路を、マウスマクロファージ細胞株である RAW. 264.7 細胞を用いて検討した。CAF は RAW. 264.7 細胞において NO、tumor necrosis factor-α および interleukin-6 の産生を誘導した。CAF の硫酸基およびアセチル基はその NO 産生誘導において何らかの関与をしていた。抗 Toll-like receptor 4 (TLR4)、抗 CD14 および抗 scavenger receptor class A (SRA) 中和抗体は、RAW. 264.7 細胞において CAF の誘導する NO 産生を阻害したが、抗 complement receptor type 3 中和抗体は阻害しなかった。CAF で処理した RAW 264.7 細胞では、mitogen-activated protein kinase (MAPK) である p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 および stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) の活性化を誘導した。SB203580 (特異的 p38 MAPK 阻害剤) および SP600125 (特異的 SAPK/JNK 阻害剤) は、CAF の誘導する NO 産生を阻害したが、U0126 (特異的 MAPK/ERK kinase 1/2 阻害剤) は阻害しなかった。以上の結果から、CAF は TLR-4、CD14 および SR-A と MAPK (p38 MAPK および SAPK/JNK) を介してマクロファージを活性化することが示された。</p> <p>フコイダンの生理活性とその硫酸化度の相関性が報告されている。そこで、CAF の過硫酸化物 (過硫酸化 CAF) を調製し、U937 細胞株において、ネイティブおよび過硫酸化 CAF の細胞傷害活性とその機構について検討した。ネイティブおよび過硫酸化 CAF の硫酸含量はそれぞれ 13.5% および 32.8% と算出された。過硫酸化 CAF は U937 細胞に対する細胞傷害活性が顕著に認められたが、ネイティブ CAF では僅かにしか認められなかった。過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞の形態変化や、APOPercentage アポトーシスアッセイの結果から、過硫酸化 CAF は U937 細胞にアポトーシスを誘導していることが分かった。また、過硫酸化 CAF で処理した U937 細胞では、カスパーゼ-3,7 の活性化および PARP の開裂が認められた。以上の結果から、過硫酸化 CAF は U937 細胞に、カスパーゼ-3,7 経路のアポトーシスを誘導したことが示された。</p> <p>本研究では CAF の構造特性とその生理活性について明らかにした。本研究が CAF の新たな利用法の創出や用途拡大への一助となることを期待する。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Takeshi Teruya
題 目	<p>Studies on structural characteristics and biological activities of acetyl fucoidan from <i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA (オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA) 由来アセチルフコイダンの構造特性と生理活性に関する研究)</p>
<p>Fucoidan is a sulfated polysaccharide found in the cell wall matrix of brown algae. <i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA is an edible brown alga that is commercially cultured around the Okinawa Island, Japan. Previously, acetyl fucoidan was isolated from <i>C. okamuranus</i> TOKIDA which is commercially cultured in Okinawa. In this study, the structural characteristics and biological activities of acetyl fucoidan from <i>C. okamuranus</i> (CAF) were investigated.</p> <p>From the results of methylation analysis, CAF consisted of α-1\rightarrow3 linked L-fucosyl residues, where D-glucuronic acid residues substituted at C-2 and sulfate and acetyl groups at C-4 on the main chain.</p> <p>The CAF-induced macrophage activation and its signaling pathways in murine macrophage cell line, RAW 264.7 were investigated. CAF induced production of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-α and interleukin-6 in RAW 264.7 cells. Sulfate and acetyl groups of CAF involved in CAF-induced NO production. Neutralizing anti-Toll-like receptor 4 (TLR4), anti-CD14 and anti-scavenger receptor class A (SRA) but not anti-complement receptor type 3 monoclonal antibodies decreased CAF-induced NO production. The results of immunoblot analysis indicated that CAF activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK). SB203580 (specific p38 MAPK inhibitor) and SP600125 (specific SAPK/JNK inhibitor), but not U0126 (specific MAPK/ERK kinase 1/2 inhibitor) decreased CAF-induced NO production. The results suggested that CAF induced macrophage activation through membrane receptors TLR4, CD14 and SRA, and MAPK signaling pathways.</p> <p>A relationship between the sulfate content of fucoidan and its biological activity was also reported. Therefore, CAF and its oversulfated derivatives (oversulfated CAF) were prepared, and investigated cytotoxic activity of native and oversulfated CAF and its mechanism in U937 cells. Sulfate contents of native and oversulfated CAF were estimated to be 13.5% and 32.8%, respectively. The oversulfated CAF had cytotoxic activity in U937 cells in a dose-dependent manner, but the activity of native CAF was weak. The result of morphological analysis and APOPercentage apoptosis assay showed that oversulfated CAF induce apoptosis in U937 cells. Oversulfated CAF treatment caused activation of caspase-3 and -7 and PARP cleavage. These results indicated that the oversulfated CAF induced apoptosis via caspase-3 and -7 activation-dependent pathways.</p> <p>In these studies, structural characteristics and biological activities of CAF were demonstrated. These studies are hoped to contribute to find a new way to use, and to expand application of CAF.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	照屋 武志
審査委員	主査 琉球大学 教授 田幸 正邦
	副査 琉球大学 准教授 建本 秀樹
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 琉球大学 教授 多和田 真吉
審査協力者	
題 目	オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA) 由来アセチルフコイダンの構造特性と生理活性に関する研究 (Studies on structural characteristics and biological activities of acetyl fucoidan from <i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA)
<p>オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA) は褐藻類の1種で、生育の北限が鹿児島県の奄美大島で南限が沖縄県の石垣島である。現在、沖縄県では養殖により、約8,000トン生産(2009年)されている。オキナワモズクは、生育の緯度が狭いことから沖縄県が誇る生物資源の1つである。しかしながら、ここ数年、過剰在庫により減産を与儀なくされているのが現状である(2007年には21,000トンを生産)。このような問題を解決する1つの方法としてアセチルフコイダンの機能性の開発がある。オキナワモズクに多量(約2.0%:対湿潤藻体)の酢酸基を置換するフコイダンが含まれていることを主査の研究室で10数年前に初めて明らかにして物質特許と製造特許を取得した(2002年11月)。一方、本藻にはアルギン酸はわずか0.2%しか含まれていない。現在、アセチルフコイダンは食品、健康補助食品および化粧品などに素材の1つとして加えられ、全国で販売されている。</p> <p>本研究は、アセチルフコイダンの構造と機能性を明らかにする目的で、メチル化分析による本多糖の化学構造の推定、過剰に硫酸基を置換した本多糖のヒトリンパ腫由来細胞(U937)のアポトーシス誘導、および本多糖のマウス腹腔内浸出マクロファージ由来細胞であるRAW 264.7の免</p>	

疫賦活作用などを検討したものである。得られた成果は以下のように要約される。

1. アセチルフコイダン (L-フコース : D-キシロース : D-グルクロン酸 : 硫酸 : 酢酸 = 4.0 : 0.03 : 1.0 : 1.8 : 1.0) のメチル化は箱守法で行った。これまで、ヤクルトおよびタカラバイオ株式会社の研究員によって化学構造の検討が行われているが、酢酸基の結合部位については不明であった。Nativeに加えて脱硫酸および脱酢酸化を行ったフコイダンのメチル化分析により、酢酸基は α -1,3-L-フカンのC-4に置換することがわかった。D-グルクロン酸を側鎖に、硫酸および酢酸基を置換するアセチルフコイダンの化学構造 (5糖の繰り返しユニット) を初めて推定した。

2. Nativeアセチルフコイダン (硫酸含量 : 13.4%) のU937細胞に対する増殖抑制力はそれほど高くなかった ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上)。また、脱硫酸化アセチルフコイダンは全く抑制力を示さなかった。そこで、三酸化硫黄により硫酸基を新たに置換して調製した過硫酸化アセチルフコイダン (32.8%) のU937細胞の増殖抑制力を調べた。なお、過硫酸化アセチルフコイダンの硫酸基はフコースのC-2に置換することを $^1\text{H-NMR}$ で確認している。過硫酸化アセチルフコイダンはU937細胞の増殖を濃度 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ で抑制した。この抑制はカスパーゼ3および7経路のアポトーシスを誘導することによるものであった。このような結果から、腫瘍細胞の増殖抑制に硫酸基が関与することが認められた。

3. アセチルフコイダンの免疫賦活活性作用とシグナル伝達系を、マクロファージを使用してインビトロで調べた。アセチルフコイダンはNO (一酸化窒素), TNF- α (腫瘍壊死因子) およびIL-6 (インターロイキン) の産生を誘導することを確認した。また、TLR4 (トール様受容体), CD14およびSRA (スカベンジャーレセプター) によって認識され、MARK (マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) シグナル伝達経路を介してマクロファージを活性化することを明らかにした。

以上のように、本研究ではメチル化分析によりアセチルフコイダンの化学構造を推定し、過剰の硫酸基を本多糖に置換することによって腫瘍細胞の増殖を抑制することを明らかにしている。また、アセチルフコイダンは免疫賦活活性を有することを明らかにしている。このような研究成果はアセチルフコイダンが新規の免疫賦活剤として利用の可能性があることを示唆するものである。従って、本論文は学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	照屋 武志
審査委員	主査 琉球 大学 教授 田幸 正邦
	副査 琉球 大学 准教授 建本 秀樹
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 佐賀 大学 教授 光富 勝
	副査 琉球 大学 教授 多和田 真吉
審査協力者	
実施年月日	平成21年 7月10日

試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)

 口答・筆答

主査および副査4名は、平成21年7月10日(金)の公開審査会において、学位申請者に対して学位論文について説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要なかつ十分な学力ならびに識見を有すると認めた。

学位申請者 氏名	照屋 武志
-------------	-------

[質問1]アセチルフコイダンの分子量は、マクロファージの活性化作用およびアポトーシス誘導作用に影響を与えるのか。

[回答1]アセチルフコイダンの分子量は約 600,000 である。アセチルフコイダンを部分加水分解して、分子量約 10,000 の部分加水分解物を調製し、これらのマクロファージ活性化作用を比較した。その結果、両者のマクロファージ活性化作用に大きな差は見られなかった。このことから、アセチルフコイダンのマクロファージ活性化作用は、分子量 600,000 から 10,000 までの範囲内では差が無いと考えられる。

アポトーシス誘導作用を有している過硫酸化アセチルフコイダンは、分子量約 12,000 の試料のみ評価しており、分子量の影響は分かっていない。

[質問2]アセチルフコイダンは脱硫酸化処理を行っても、マクロファージの活性化作用に大きな低下は見られない。脱硫酸化物の硫酸含量はどの程度か。またアセチルフコイダンのマクロファージ活性化作用は、硫酸基の存在に大きく依存しないと考えてよいか。

[回答2]脱硫酸化物の硫酸含量は約 0.6%程度であった。アセチルフコイダンのマクロファージ活性化作用は、硫酸基のみに依存するのではなく、アセチル基や立体構造にも依存しているのではないかと考えられる。

[質問3]過硫酸化アセチルフコイダンは天然物とみなせるか。もし天然物としてみなされなければ、その利用にあたって十分な安全性試験が求められる。

[回答3]過硫酸化アセチルフコイダンは、化学的処理を行っているため、天然物質とはみなせない。

[質問4]他のフコイダンにもマクロファージ活性化作用を有しているものはあるか。

[回答4] *Fucus vesiculosus* 由来のフコイダンにもマクロファージ活性化作用に関する報告がある。

[質問5]アセチルフコイダンや過硫酸化アセチルフコイダンを医薬品として用いる場合、それらの活性を評価している濃度より低い条件でも十分な活性が無ければならないのではないかと。

[回答5]これに関しては、今後、十分な検討をしたい。

[質問6]アセチルフコイダンは高分子であり、腸管から十分に吸収されないと考えられる。アセチルフコイダンを免疫賦活剤として利用するためには、どのような方法があるか。

[回答6]アセチルフコイダンを医薬品として用いる場合、注射によって体内に取り入れるなどの方法が考えられる。

[質問 7]アセチルフコイダンはマクロファージにおいて細胞傷害性が認められたか。

[回答 7]細胞傷害性は認められなかった。

[質問 8]アセチルフコイダンを過硫酸化することで、U937 細胞における細胞傷害活性が増大したが、マクロファージ活性化作用においてはどのような影響があるか。

[回答 8]アセチルフコイダンを過硫酸化すると、マクロファージの活性化作用は低下した。この結果から、アセチルフコイダンのマクロファージ活性化作用は硫酸基のみに依存するものではないと考えられる。

[質問 9]過硫酸化アセチルフコイダンはマクロファージにおいて細胞傷害性が認められたか。

[回答 9]細胞傷害性は認められなかった。

[質問 10]過硫酸化アセチルフコイダンは U937 細胞株においては高い細胞傷害活性が認められたが、マクロファージにおいてはそれが認められなかったのはなぜか。

[回答 10]U937 細胞株と RAW 264.7 細胞株の特性の違いによるものだと考えられるが、詳細は分かっていない。

[質問 11]アセチルフコイダンによるマクロファージの活性化作用は、どの程度持続するか。

[回答 11]本研究では、これに関しては評価していない。今後、検討したい。

[質問 12]アセチルフコイダンによるマクロファージ活性化作用には、膜レセプターやマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) である p38 MAPK、ストレス活性化タンパク質キナーゼ/c-Jun N-末端キナーゼ (SAPK/JNK) および細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2 (ERK1/2) が関与しているとのことだが、それらの上流のシグナル伝達因子については、何が関与していると考えるか？

[回答 12]MAPK の上流のシグナル伝達因子であるホスホイノシチド 3-キナーゼやプロテインキナーゼ C などのシグナル伝達因子が関与していると考えられる。p38 MAPK、SAPK/JNK および ERK1/2 以外のシグナル伝達因子については今後の課題としたい。

[質問 13]アセチルフコイダンによるマクロファージの活性化は、抗トール様受容体、抗 CD14 受容体および抗スカベンジャー受容体中和抗体により阻害されたとのことだが、トール様受容体、CD14 受容体およびスカベンジャー受容体がアセチルフコイダンの認識に関与したと考えてよいか。

[回答 13]認識に関与したと考えている。