

水圏動物皮から抽出された糖ペプチドの抗アレルギー活性

倉員 貴昭・石崎 松一郎*・長島 裕二
 東京海洋大学 海洋科学部 食品生産科学科 生体物質化学研究室
 * ishizak@kaiyodai.ac.jp

研究背景

糖鎖は核酸およびタンパク質に次ぐ「第三の生命鎖」として注目されており、医療への応用および発展が期待されている。しかし、糖鎖構造の複雑さなどの理由から糖鎖に関する研究の推進は遅れている。また、既報の糖鎖に関する研究では陸上動物に焦点を当てたものがほとんどであり、水圏動物の糖鎖における機能性を調べた研究例は極わずかである。そこで、本研究では水圏動物の糖鎖を対象とし、その機能性の解明を行うこととした。さらに、ゼロエミッションの観点から試料には水圏動物の皮を用いることとし、水産未利用資源の有効利用を目指すこととする。現在、日本人の3人に1人が何らかのアレルギー症状を抱えており、糖鎖の抗アレルギー作用への関心も高まっていることから、水圏生物由来糖鎖の新規の機能性の探索において一次スクリーニングとしてヒアルロニダーゼ阻害活性を調べ、さらに肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を調べることとした。

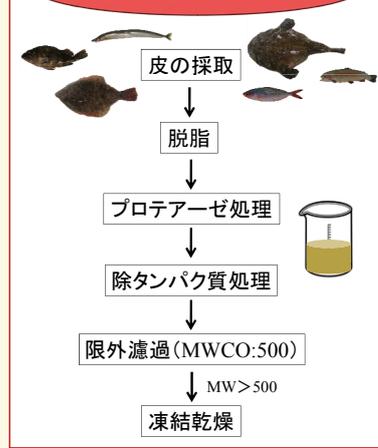
糖鎖の利用

- ① ABO式血液型
糖鎖構造の違いで血液型を決定
- ② 病気の診断に用いられるバイオマーカー
腫瘍マーカーの半数以上は糖鎖
- ③ 機能性素材
コンドロイチン硫酸の抗関節炎作用
β-グルカン免疫賦活作用

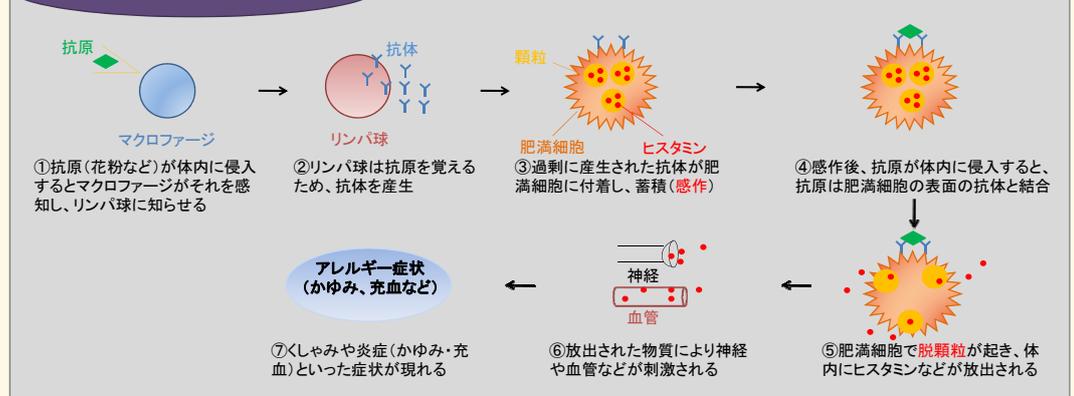
糖鎖研究の問題点

- ① 糖鎖は単糖の配列、結合様式、分岐様式および高次構造を持つ。
 - ② 生体内では微量成分であること。さらに、DNAやタンパク質を酵母や大腸菌で増やすような糖鎖を増殖する方法が確立されていない。
- 複雑かつ多様な構造 → 量の確保が困難

試料調製スキーム



アレルギー反応機構の概略



ヒアルロニダーゼ阻害活性 (アレルギー反応機構の⑦をターゲット)

ヒアルロニダーゼ阻害活性は抗アレルギー活性を評価するための一次スクリーニングによく用いられる。ヒアルロニダーゼは炎症作用があるため、ヒアルロニダーゼを阻害することで炎症によるかゆみや痛みを抑えることが出来る。また、ヒアルロニダーゼ阻害活性はヒスタミン遊離抑制活性と相関性が高いとされている。

本研究では、ヒアルロン酸とアルブミンの複合体形成による比濁法によって評価している。

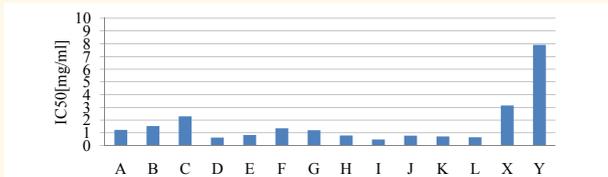


Fig. 1 各種水圏動物におけるヒアルロニダーゼ阻害活性

A: オオナゴ, B: カサゴ, C: クロマグロ, D: コイ, E: ソディカ, F: タカサゴ, G: ニジマス
 H: ホンアンコウ(背側), I: ホンアンコウ(腹側), J: マコガレイ(背側), K: マコガレイ(腹側)
 X: ニワトリ, Y: プタ

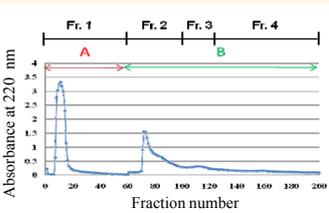
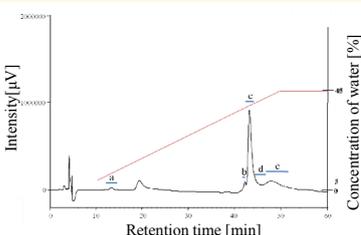


Fig. 2 Con Aアフィニティークロマトグラフィー
 Column: Con A-sepharose 4B (φ15 × 300 mm)
 A: 10 mM AcONH₄ (pH 7.0)
 B: 0.5 M α-D-mannopyranoside-10 mM AcONH₄ (pH 7.0)

Table 1 Con Aアフィニティークロマトグラフィーの各画分におけるヒアルロニダーゼ阻害活性

Before elution	IC ₅₀ [mg/ml]			
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4
0.48	0.81	0.038	0.0053	0.13

Fig. 3 Con AアフィニティークロマトグラフィーのFr. 3におけるHILIC分析
 Column: TOSOH TSKgel Amide-80 (φ4.6 × 250 mm)
 A: 0.1% トリフルオロ酢酸-97% アセトニトリル
 B: 0.1% トリフルオロ酢酸-55% アセトニトリル



水圏動物は陸上動物に比べてヒアルロニダーゼ阻害活性が高かった (Fig. 1)。さらに、最も活性が高かったホンアンコウ腹側をCon Aアフィニティークロマトグラフィーに供した結果、IC₅₀値を0.48 mg/mlから0.0053 mg/mlへと高めることが出来た (Fig. 2およびTable 1)。また、その高い活性には最低でも2つ以上の物質が関与していることが示唆された (Fig. 3)。

ヒスタミン遊離抑制活性 (アレルギー反応機構の③~⑤をターゲット)

ヒスタミンはアレルギー反応時に肥満細胞から遊離するケミカルメディエーターとして広く知られている。

本研究では、ヒスタミン遊離誘発物質による培養肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制試験によるヒスタミン遊離抑制活性を評価している。

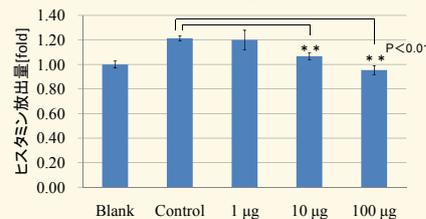


Fig. 4 クロモグリク酸ナトリウムにおけるヒスタミン遊離抑制活性

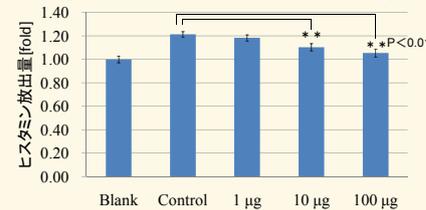


Fig. 5 ホンアンコウ腹側中抽出物におけるヒスタミン遊離抑制活性

ヒスタミン遊離抑制物質として既報されているクロモグリク酸ナトリウムおよびヒアルロニダーゼ阻害活性が最も高かったホンアンコウ腹側を試料として試験を行った (Fig. 4およびFig. 5)。その結果、ホンアンコウ腹側試料を100 μg添加した際に、クロモグリク酸ナトリウム10 μg添加時程度の遊離抑制作用を示すことが明らかとなった。

まとめ

ヒアルロニダーゼ阻害物質の報告は植物または人工由来がほとんどであり、水圏動物の皮由来のヒアルロニダーゼ阻害物質の報告は本研究が初めてである。さらに、水圏動物の皮は陸上動物の皮よりも高いヒアルロニダーゼ阻害活性を有し、その高い活性には2つ以上のN型糖ペプチドが関与していることが見出された。さらに、ホンアンコウ腹側試料においてヒスタミン遊離抑制作用が新たに確認された。

新規の抗アレルギー薬としての可能性を考えると、本研究におけるヒアルロニダーゼ阻害活性物質の構造と機能の関係は非常に興味深い知見である。また、ヒスタミン遊離抑制活性も確認されたことから、即時型アレルギー薬としての応用が期待される。