

学位論文題名

イカ墨汁由来抗腫瘍活性画分の糖鎖部分の構造

学位論文内容の要旨

イカ墨汁の生理活性についてはこれまで、抗菌活性、胃液分泌調節作用等が知られているが、いずれもその活性本体についての構造的知見はほとんど得られていない。

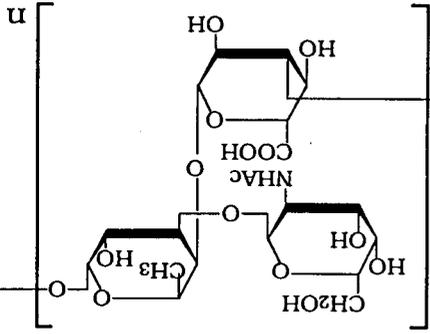
今回、イカ墨汁抽出物をDEAE Sephacel陰イオン交換カラム、およびSephacryl S-300ゲルカラムクロマトグラフィにより分画した標品についての抗腫瘍活性試験を行った。分子量の大きな、陰イオン性画分は、BALB/cマウスの腹腔内に移植したMeth-A腫瘍細胞に対し最高64%の強い治癒活性を示した。この画分には腫瘍細胞に対する直接殺細胞性は認められないが、マクロファージの活性化が認められた。従って、この画分は腫瘍細胞に直接作用せず、生体の免疫機構を介した間接的な機構で抗腫瘍性を発揮するものと、現段階では推定される。糖、アミノ酸などの化学組成分析および<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析結果から、この画分はグルクロン酸、N-アセチルガラクトサミン、およびフコースを主成分とする糖鎖がタンパク質あるいはペプチドに結合した、プロテオグリカンタイプの化合物であると推定された。そこでこの抗腫瘍活性物質の活性本体の構造を明らかにするため、その糖鎖構造について検討した。

抗腫瘍活性画分をアクチナーゼEを用いてタンパク質部分を分解することにより、粗グリコサミノグリカンを得た。このグリコサミノグリカンにDEAE Sephadex A-50陰イオン交換カラムクロマトグラフィを用いて分離することにより、illexin A (ILX-A), illexin B (ILX-B)およびillexin C (ILX-C)と命名した3つの画分を得た。セルロースアセテート膜電気泳動においてこれらの画分は単一なバンドを与えた。また、これらの見かけの分子量はSephacryl S-300ゲルカラムクロマトグラフィの結果よりそれぞれ、約50000、50000~80000および80000であった。しかし、これらの画分には抗腫瘍活性は見られなかった。このことより、活性発現には糖鎖およびペプチドあるいはタンパク質等が必須であるものと考えられる。

化学組成分析の結果から、ILX-A, B, Cともに主成分の糖鎖は、等モルのグルクロン酸、N-アセチルガラクトサミン、およびフコースを含んでいることがわかった。従って、この糖鎖は、今回得られた抗腫瘍活性画分由来であると考えられた。さらに、<sup>1</sup>H NMRスペクトルにおいてこれら3つの物質はほとんど同一のスペクトルを与えた。このことより、これらは分子量が異なるのみではほぼ同組成の物質であると考えられた。またこれらをコソノイチナーゼABCや、 $\alpha$ -L-フコシナーゼ等の酵素による分解に對し抵抗性であり、構造研究に適したオリゴ糖を得ることができなかった。そこで、ILX-Cを弱酸による部分加水分解を行い、生成したオリゴ糖の構造を検討した。<sup>1</sup>H NMRを経時的に測定し $\alpha$ -フコシ結合の加水分解に伴う、フコースの $\alpha$ -Hシグナルの消失から、最適な分解時間を決定した。酸による加水分解生成物をケルカラムクロマトグラフィーで分離、精製後、トリシルミン化(PA化)により蛍光標識し、<sup>1</sup>H NMRスペクトルおよびFABマススペクトルを測定することにより、この生成物は3糖および6糖であることがわかった。さらにDQF-COSY, HOHAHAを測定し、PA化3糖の各糖残基の全てのフロプトンを帰属した。この結果より、ILX-Cは3糖の繰り返し構造を有していることがわかった。次に $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミンニターゼおよび $\beta$ -グルクロニターゼを作用させ分解することにより、この糖鎖の繰り返し構造はGAINAc $\alpha$ -GlcA $\beta$ -Fuc $\alpha$ の直鎖の構造であると考えられた。しかし、この場合NOEの情報より考えられるコソノイチナーゼ $\alpha$ -シグマにいくつかの矛盾点が見られたため、MS/MS分析を行ったところ分岐構造を取っていることが明らかとなった。更に各種化学的、分光学的なデータより、本糖鎖の構造は、図-1に示したような繰り返し構造であると結論した。

本研究の結果から、イカ墨汁中に抗腫瘍活性物質が含まれていることが明らかとなり、さらにその糖鎖は、新規な構造を有することがわかった。その構造にはフコースが糖鎖の繰り返し構造の中に含まれており、生体に広く分布する、一般的なグリコサミノグリカドとは異なるものであった。さらに、グリコサミノグリカド関連の糖鎖としては、この様な3糖で繰り返し構造を取る糖鎖は極めて稀なものであり、大変興味を持たれるものである。

図-1 ILX-Cの構造



# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 村 井 章 夫  
副 査 教 授 東 市 郎  
副 査 教 授 荒 木 義 雄  
副 査 助 教 授 中 村 英 士

## 学位論文題名

### イカ墨汁由来抗腫瘍活性画分の糖鎖部分の構造

本論文は総ページ数94の和文論文であり、イカ墨汁の抗腫瘍活性画分の糖鎖部分の構造について論述されており、別に参考論文7編が添えられている。

イカ墨汁の生理活性についてはこれまで、抗菌活性、胃液分泌調節作用等が知られているが、いずれもその活性本体についての構造的知見はほとんど得られていない。申請者は今回、イカ墨汁抽出物を陰イオン交換カラムおよびゲルカラムクロマトグラフィにより分画した標品についての抗腫瘍活性試験を行った。分子量の大きな、陰イオン性画分は、BALB/cマウスの腹腔内に移植したMeth-A腫瘍細胞に対し最高64%の強い治癒活性を示した。この画分は腫瘍細胞に直接作用せず、生体の免疫機構を介した間接的な機構で抗腫瘍性を発揮するものと、現段階では推定される。糖、アミノ酸などの化学組成分析および、<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析結果から、この画分はグルクロン酸、N-アセチルガラクトサミン、およびフコースを主成分とする糖鎖がタンパク質あるいはペプチドに結合した、プロテオグリカンタイプの化合物であると推定した。そこで申請者はこの抗腫瘍活性物質の活性本体の構造を明らかにするため、その糖鎖構造について検討した。抗腫瘍活性画分をアクチナーゼEを用いてタンパク質部分を分解することにより、粗グリコサミノグリカンを得た。このグリコサミノグリカン陰イオン交換カラムクロマトグラフィを用いて分離することにより、illexin A (ILX-A), illexin B (ILX-B), およびillexin C (ILX-C)と命名した3つの画分を得た。セルロースアセテート膜電気泳動においてこれらの画分は単一なバンドを与えた。しかし、これらの画分には抗腫瘍活性は見られなかった。このことより、活性発現には糖鎖およびペプチドあるいはタンパク質等が必須であるものと考えられる。

申請者は化学組成分析の結果から、ILX-A, B, Cともに主成分の糖鎖は、等モルのグルクロン酸、N-アセチルガラクトサミン、およびフコースを含んでいることを明らかにした。従って、この糖鎖は、今回得られた抗腫瘍活性画分由来であると考えた。さらに、<sup>1</sup>H NMRスペクトルにおいてこれら3つの物質はほとんど同一のスペクトル

を与えたことより、これらは分子量が異なるのみでほぼ同組成の物質であると考えた。またこれらはコンドロイチナーゼA B Cや、 $\alpha$ -L-フコシダーゼ等の酵素による分解に対し抵抗性であり、構造研究に適したオリゴ糖を得ることはできなかった。そこで、ILX-Cの弱酸による部分加水分解を行い、 $^1\text{H}$  NMRを経時的に測定しながら、最適の分解時間を決定した。申請者は酸による加水分解で生成したオリゴ糖をゲルカラムクロマトグラフィで分離精製後、ピリジルアミノ化 (PA化) により蛍光標識し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよびFABマススペクトルを測定することにより、この生成物が3糖および6糖であることを明らかにした。さらに DQF-COSY, HOHAHAを測定し、PA化3糖の各糖残基の全てのプロトンを帰属した。この結果より、ILX-Cが3糖の繰り返し構造を有していることを明らかにした。次に $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼおよび $\beta$ -グルクロニターゼを作用させ分解することにより、この糖鎖の繰り返し構造は GalNAc $\alpha$ -GlcA $\beta$ -Fuc $\alpha$ の直鎖の構造であると考えた。しかし、この場合NOEの情報より考えられる立体配座にいくつかの矛盾点が見られた。そこでMS/MS分析を行なった所、分岐構造を取っていることが明らかになった。更に各種化学的、分光学的データより、申請者は本糖鎖の構造をFuc $\alpha$ -GlcA $\beta$ の繰り返し構造を主鎖とし、そのフコースにGalNAcが結合した繰り返し構造であると結論した。

本研究の結果から、申請者はイカ墨汁中に抗腫瘍活性物質が含まれていることを明らかにし、さらにその糖鎖は、新規な構造を有することを明らかにした。その構造にはフコースが糖鎖の繰り返し構造の中に含まれており、生体に広く分布する一般的なグリコサミノグリカンとは異なるものである。さらに、グリコサミノグリカン関連の糖鎖としては、この様な3糖で繰り返し構造を取る糖鎖は極めて稀なものであり、大変興味を持たれるものである。本研究は糖鎖を化学的、酵素的および分光学的に裏付けしながら、特にNMRにおいて全てのシグナルを帰属し構造を決定したという点において、とかく経験則に基づいていたこれまでの糖鎖構造の解析法にはなかった新規かつ独特な方法であると考えられる。今回得られた糖鎖部分の構造研究の成果が、イカ墨汁由来の抗腫瘍活性物質の糖鎖以外の成分との関連等、抗腫瘍活性発現と構造との関連における研究の突破口になると考えられ極めて注目されるものである。審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 高谷芳明が博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。