

沖縄生物資源から得られるスフィンゴ糖脂質の生理作用に関する研究

鎌田靖弘、平良淳誠、蓋盛直哉¹

本研究では、沖縄生物資源から得られるスフィンゴ糖脂質を利用した健康食品の開発を目標とし、スフィンゴ糖脂質の生理作用、すなわち神経成長因子様作用の指標となる神経突起様伸長活性および美白効果の指標となるメラニン産生抑制活性の有無を検索した。その結果、6種類の素材の内、1種類に神経突起様伸長活性が認められた。

1 はじめに

本研究は平成16年度沖縄産学官共同研究推進事業「沖縄生物資源から得られるスフィンゴ糖脂質の生理機能を応用した機能性食品の開発」というテーマで、図1のような研究体制と役割の下、沖縄に存在する生物資源から得られるスフィンゴ糖脂質を利用した製品開発を目指して研究を行った。

スフィンゴ糖脂質は生体膜の重要な構成成分の一つとして、昨今注目されている物質であり、機能的にがん研究や脳研究の分野で将来性を有している。中でも糖脂質セラミド及びガングリオシドは、次々発表される研究成果において需要も急激に高まってきており、その市場価格も大変高価である。セラミドは人の皮膚の角質層に存

在している脂質であり、皮膚の保湿性を高め、美白にも効果があることや経口投与による皮膚水分量の上昇効果も確認されていることから、近年では化粧品原料のみならず美容食品素材としても注目されている有用物質である。スフィンゴ糖脂質は元来、脳から単離発見され、現在まで多くの実験はウシ脳から抽出されたものを利用されている。しかしながら、現在話題となっている狂牛病問題等から、安全性が重要視されるに伴い、植物性由来のスフィンゴ糖脂質の必要性が急速に高まってきた。

一方、国立社会保障・人口問題研究所の調査結果によると、老年人口は2025年には全人口の27.4%、2050年には35.0%以上に達するという推計になっており、超高齢化社会に突入しようとしている。またそれに伴い、認知

プロジェクト概要図

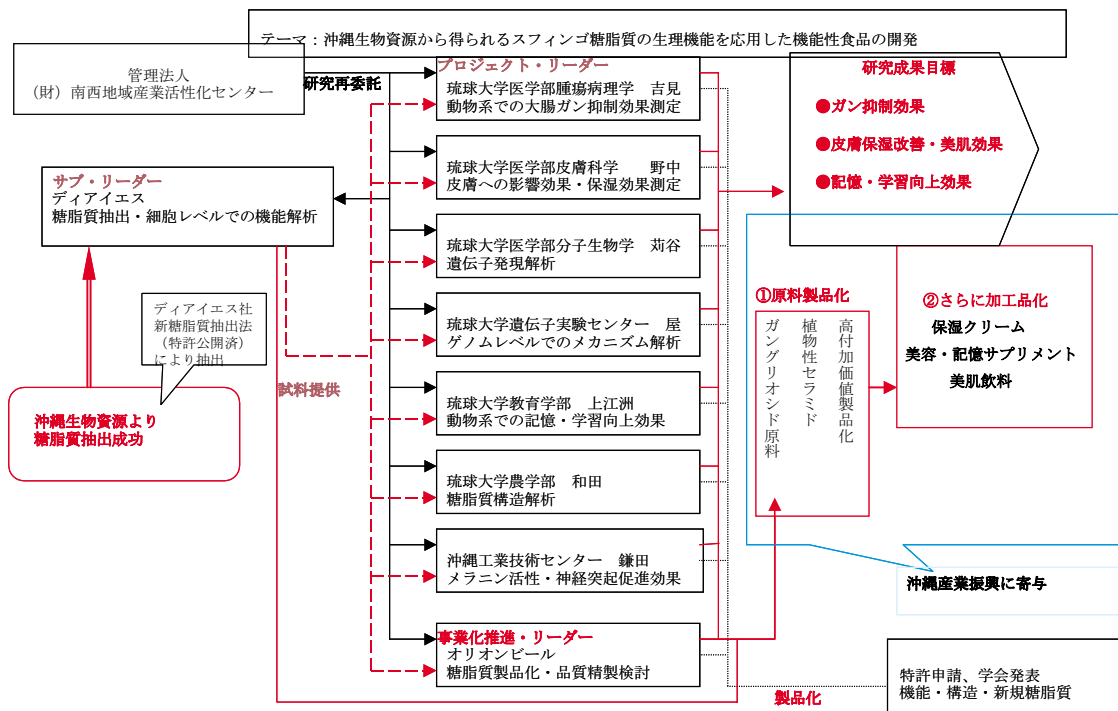


図1 本研究開発における研究体制と役割

1 (財) 南西地域産業活性化センター

症に悩む日本人は約160万人、アルツハイマー型痴呆症の占める割合は約32%と、3人に1人である。痴呆性老人の将来推計数は、2000年では老人人口の7.1%（156万人）、2025年には8.1%（262万人）、2035年には10.1%（337万人）に推定されており、認知症や脳機能の改善または予防に関する医薬品・健康食品メーカー間の熾烈な開発競争が行われている。

これらの問題解決を踏まえて共同研究体である（株）ディアイエスが選択した素材に関し、神経成長因子（以下NGFと称す）様作用の指標となる神経突起様伸長活性および美白効果の指標となるメラニン産生抑制活性の有無を検索した。

2 実験方法

2 - 1 用いたサンプル

（株）ディアイエスで0.5mg/mlに調製された5種類のサンプル、麦芽、紅イモおよびシモンイモ由来の各グリコシルセラミドのエタノール（以下EtOHと称す）溶液、また生豆由来トリゴネリン水溶液およびブタ脳由来グリコシルセラミド水溶液と琉球大学遺伝子実験センターより調製された麦芽由来のグリコシルセラミド精製物の計6種類のサンプルを用いた。

2 - 2 PC12（ラット副腎褐色細胞腫細胞）を用いた神経突起様伸長活性評価法の確立

PC12を用いた神経突起様伸長活性をマイクロプレート上で評価できる系をShibaharaらの報告¹⁾を参照して検討した。フィブロネクチンコートした96穴のマイクロプレート（写真）上に 2.0×10^5 cells/mlで調製した細胞を添加後、コントロール及びサンプル添加をし、3-4日間培養する。神経様突起の状態を位相差顕微鏡で観察した。最終日に培地を除去し、5.6mMacetyl thiocholine iodide 溶液およびHepes緩衝液（50mM、pH7.5）（0.12MNaCl、0.2%TritonX-100、1mMEDTA含有）を加え、室温で2時間細胞を溶解する。次に、この細胞遊離液に酢酸緩衝液（50mM、pH5.0）（0.2%TritonX-100、1mMEDTA含有）と0.4mMCPMを添加させ、神経突起様伸長の指標となるアセチルコリンエステラーゼ活性を蛍光マイクロプレートリーダーにて、励起光360nm、測定光460nmを測定した。NGFを入れたポジティブコントロールは、神経突起様の確認と共に、アセチルコリンエステラーゼ活性も増加した。なお、評価系においてアラマブルー法により細胞毒性の指標となる細胞増殖活性を測定し、細胞毒性がないことを確認した。

2 - 3 B16F0（マウス黒色腫瘍細胞）を用いたメラニン合成抑制活性評価法の確立

B16FOを用いたメラニン産生抑制活性をプレート上で評価できる系を豊川らの報告²⁾を参照して確立した。10%牛胎児血清（FBS）の含有するD-MEM培地で培養したB16FOを、24穴プレートに 3.2×10^5 cells/wellで調製した細胞を添加し、24時間培養した。培地除去後、5mMのL-Dopa含有PBS溶液と同時にサンプル添加をし、5.5時間培養した。細胞回収後、1NNaOHで細胞を溶解し、溶液中のメラニン含量は波長405nmを測定した。その結果、ポジティブコントロールであるコウジ酸ではメラニン含量が濃度依存的に低下を示した。なお、評価系においてアラマブルー法により細胞毒性の指標となる細胞増殖活性を測定し、細胞毒性がないことを確認した。

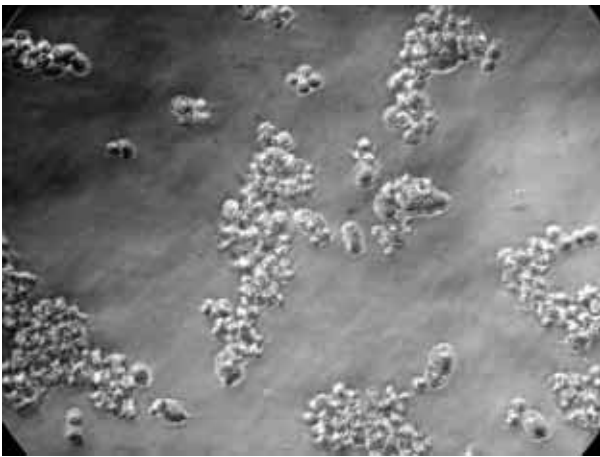
3 結果と考察

3 - 1 神経突起様伸長活性の1次スクリーニング

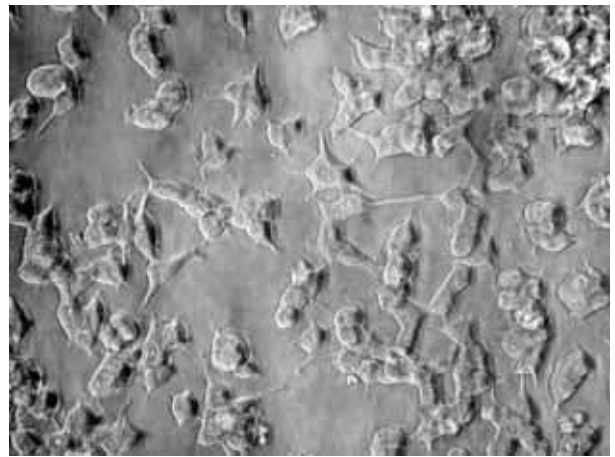
麦芽、紅イモおよびシモンイモ由来の各グリコシルセラミドEtOH溶液、生豆由来トリゴネリン水溶液とブタ脳由来グリコシルセラミド水溶液の5種類について、神経突起様伸長活性を観察した。観察結果を図2に示した。突起様の伸長はシモンイモ>麦芽、紅イモ>トリゴネリンの活性順位であった。活性が見られたサンプルの中には、細胞毒性も見られたため、希釈して再試験を行った。

3 - 2 麦芽および麦芽由来グリコシルセラミド精製物、紅イモ、トリゴネリン、豚脳サンプルを希釈した場合の神経突起様伸長活性

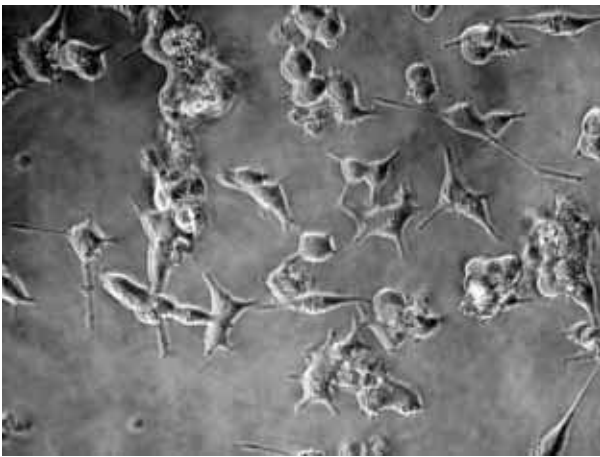
観察で細胞毒性の強かったサンプルについて希釈して活性を測定した。またその際、麦芽由来のグリコシルセラミド精製物も活性検索を行った。EtOH毒性を考慮し100%EtOHで再抽出させて希釈し、神経突起様伸長活性を測定した。観察の結果、図3に示すように、コントロールと比較して神経突起様伸長は、大きな変化はなく活性は低かった。



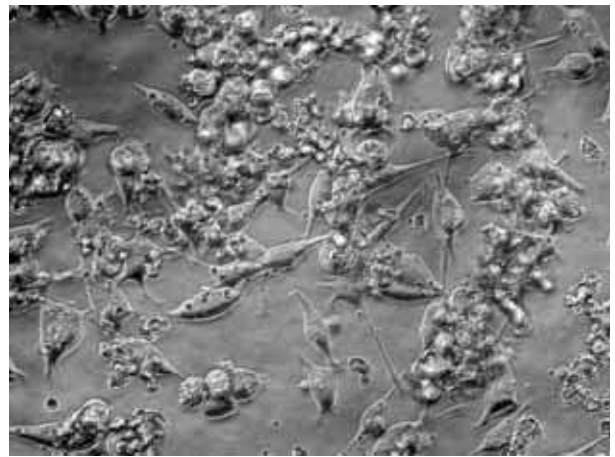
(A)



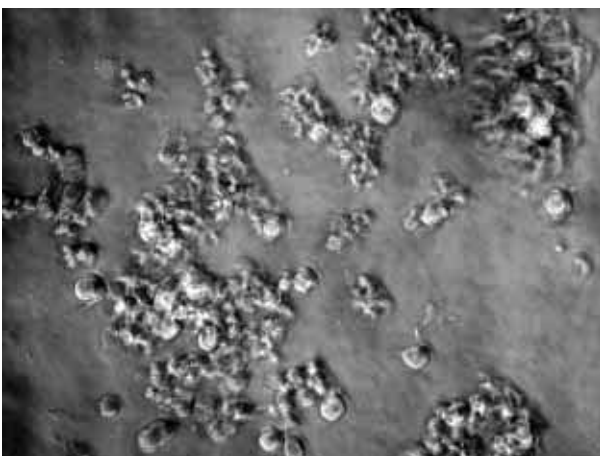
(B)



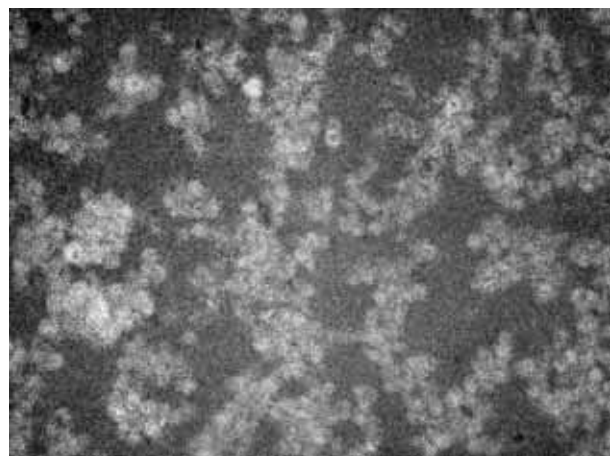
(C)



(D)



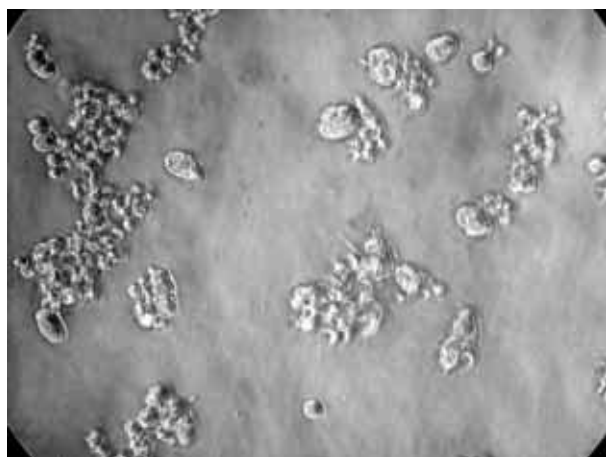
(E)



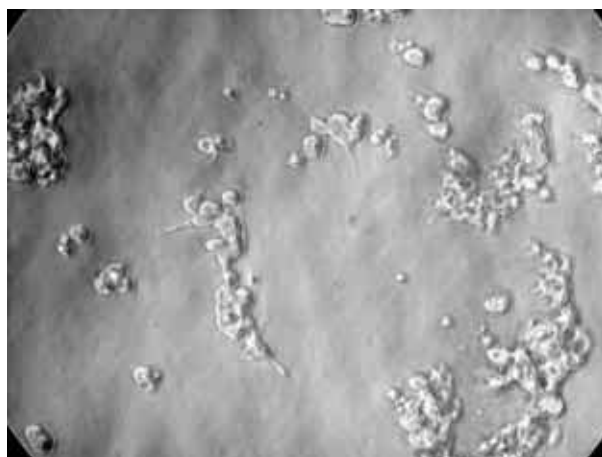
(F)

図2 PC12に各原液サンプルを添加した場合の神経突起成長活性（添加後4日目の細胞の状態）

A：水（コントロール）添加時，B：NGF添加時，C：シモンイモ添加時，
D：紅イモ添加時，E：生豆トリゴネリン添加時，F：麦芽添加時
（倍率は麦芽添加時は200倍、それ以外は400倍）



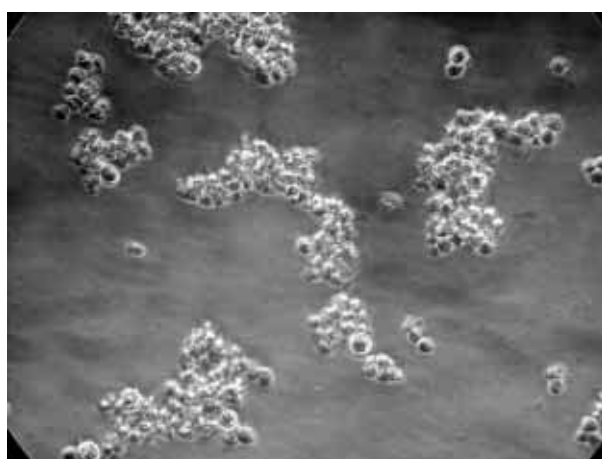
(A)



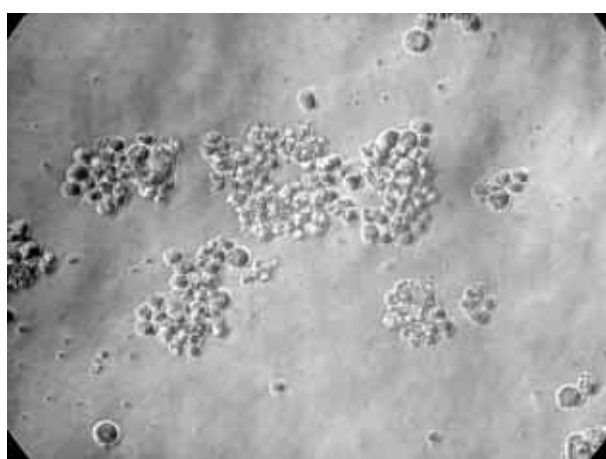
(B)



(C)



(D)



(E)

図3 PC12に各希釈サンプルを添加した場合の神経突起成長活性（添加後4日目の細胞の状態）

A：200倍希釈麦芽再抽出，B：200倍希釈麦芽由来精製物，
C：200倍希釈紅イモ再抽出，D：2倍希釈生豆トリゴネリン，
E：2倍希釈ブタ脳（倍率はいずれも400倍）

また、アセチルコリンエステラーゼ活性も図4及び図5に示すように、コントロール(水)と比較し、有意差が生じたのは麦芽由来のグリコシルセラミド精製物の1000倍希釈時と生豆由来トリゴネリン水溶液の10倍希釈時だけであった。また、生豆由来トリゴネリン水溶液は希釈に従って活性が高くなっていることから、10倍以上の再検討も必要であると考えられた。麦芽および紅イモ再抽出は、有意差は認められなかったが、濃度依存的な活性傾向を示したことから、これも再度、希釈検討が必要である。

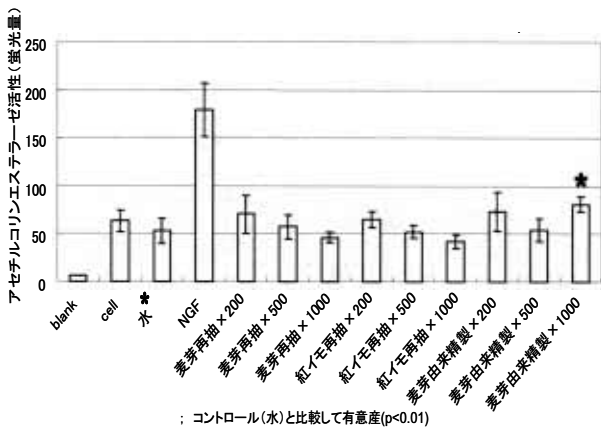


図4 各サンプル希釈時の神経突起様伸長活性(1)

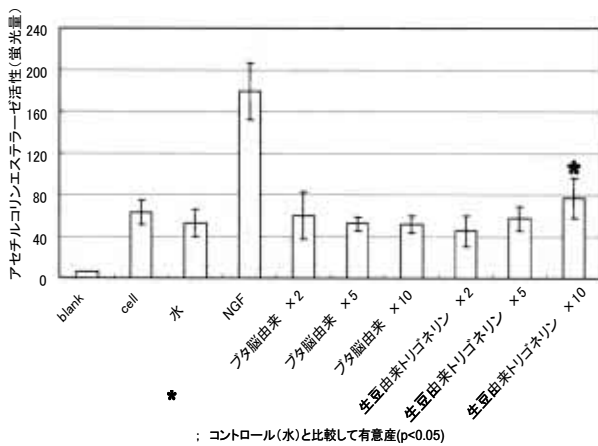


図5 各サンプル希釈時の神経突起様伸長活性(2)

次に、アラマーブルー法による細胞増殖活性を調べた。その結果、図6に示すように、コントロール(水)と比較して、麦芽再抽出の200倍希釈時の細胞増殖活性は有意に高く、1000倍希釈時では有意に低い値を示した。この結果から、麦芽由来について希釈検討が必要であると考えられた。一方、図7に示すように、ブタ脳および生豆由来トリゴネリンの水抽出液では、各希釈いずれもコントロール(水)と比較して、有意に低い値を示し、細胞増殖抑制活性を示したことから、細胞毒性を有するこ

とが分かった。ブタ脳および生豆由来トリゴネリンの水抽出液においても再度希釈を行い、検討が必要である。

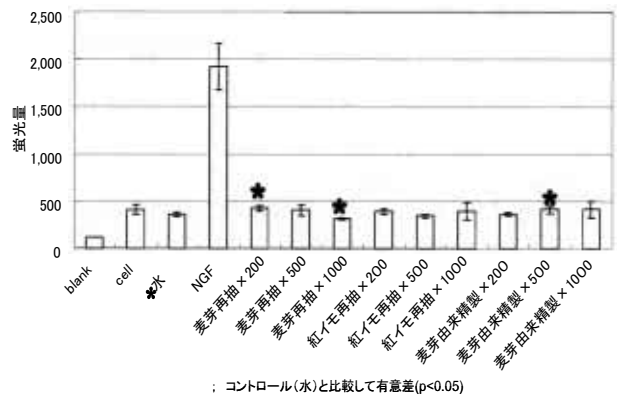


図6 各サンプル希釈時の細胞増殖活性(1)

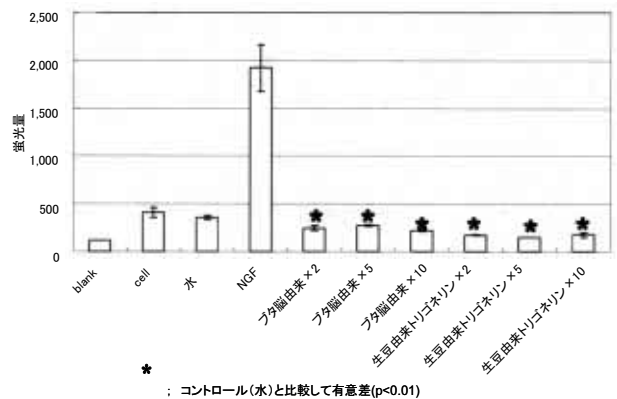


図7 各サンプル希釈時の細胞増殖活性(2)

3-3 シモンイモにおける神経突起様伸長活性

観察で活性の強かったシモンイモに関し、希釈して神経突起様伸長活性の観察とアセチルコリンエステラーゼ活性を測定した。図8にシモンイモのグリコシルセラミドEtOH溶液を2,4及び8倍に希釈した場合のアセチルコリンエステラーゼ活性の結果を示した。コントロール(水)と比較して、いずれの希釈時でも有意(p<0.01)に増加を示し、増加の程度は用量依存的であった。また、コントロール(水)時のアセチルコリンエステラーゼ活性を1とした場合、ポジティブコントロールのNGF(10ng/ml終濃度)では2.5であり、2倍希釈時では1.5、4倍希釈時では1.2となった。この結果から、シモンイモのグリコシルセラミドEtOH溶液(0.5mg/ml)の2倍希釈溶液は、NGF換算で6.1ng/ml終濃度と同程度の活性を有すると推察された。PC12のNGFに対する作用機構の一つに、MAP-kinase等のシグナル伝達系が報告されていることから^{3,4)}、今後はシモンイモのグリコシルセラミドについて作用機構解明を行う必要があると考えられた。

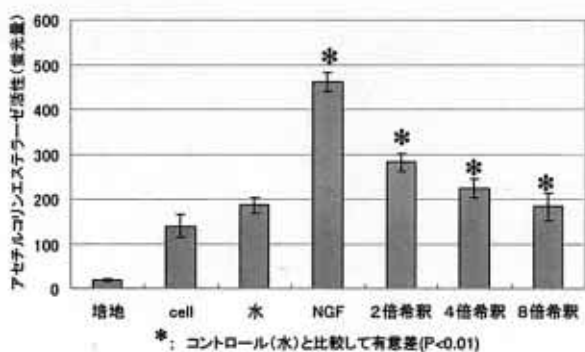


図8 シモンイモ抽出液中の神経突起様成長活性

次に、アラマブルー法による細胞増殖活性を調べた。図9にシモンイモのグリコシルセラミドEtOH溶液(0.5mg/ml)を2,4及び8倍に希釈した場合の細胞増殖活性の結果を示した。コントロール(水)時と比較して、いずれの希釈時でも細胞増殖活性は有意(p<0.01)に増加を示し、その増加の程度は用量依存的であった。この結果から、シモンイモの抽出液はPC12に対して、細胞増殖促進活性を有することが分かった。なお、データには示さないが、シモンイモ抽出原液は、コントロール(水)と比較して、細胞増殖活性は有意(p<0.01)に低下を示し、細胞増殖抑制活性を示したことから、細胞毒性を有することが分かった。

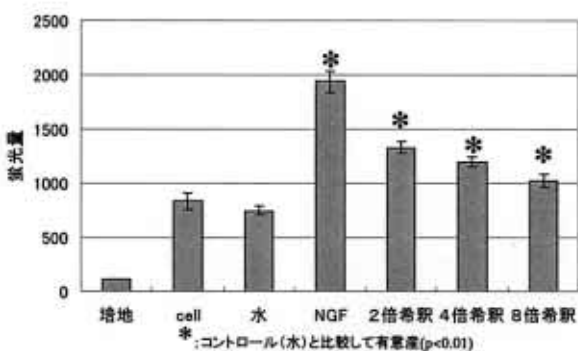


図9 シモンイモの細胞増殖活性

3 - 4 メラニン産生抑制活性の検索

麦芽、紅イモおよびシモンイモ由来の各グリコシルセラミドEtOH溶液、また生豆由来トリゴネリン水溶液とブタ脳由来グリコシルセラミド水溶液、更に麦芽精製物の6種類について、メラニン産生抑制活性を測定した。図10~11に示したように、ポジティブコントロールである5mMコウジ酸は、コントロール(50%EtOH)と比較して有意(p<0.05)に低下を示した。麦芽および麦芽由来精製物はコントロール(50% EtOH)

と比較して、有意(p<0.05)に増加を示した。この結果から、麦芽にはメラニン産生促進活性を有することが推察された。

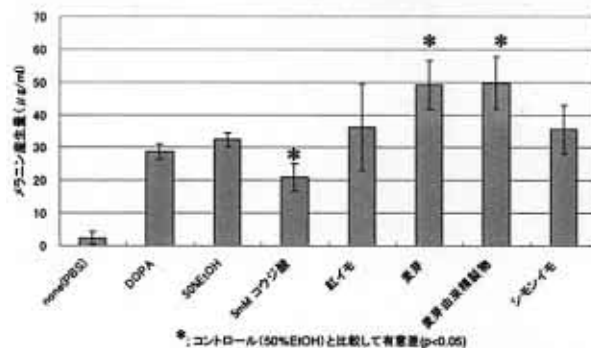


図10 各サンプル中のメラニン産生抑制活性(1)

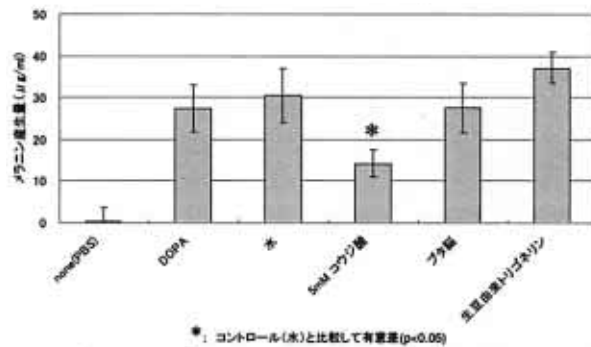


図11 各サンプル中のメラニン産生抑制活性(2)

また麦芽、紅イモおよびシモンイモ由来の各グリコシルセラミドEtOH溶液に関し、EtOH濃度を一定にするために、50%EtOH再抽出液を調製し、再試験を行った。図12に示したように、コントロール(50%EtOH)と比較して有意差はないが、麦芽以外に紅イモおよびシモンイモも高くなる傾向を示した。この結果から、これらの素材にもメラニン産生促進活性の可能性が分かった。

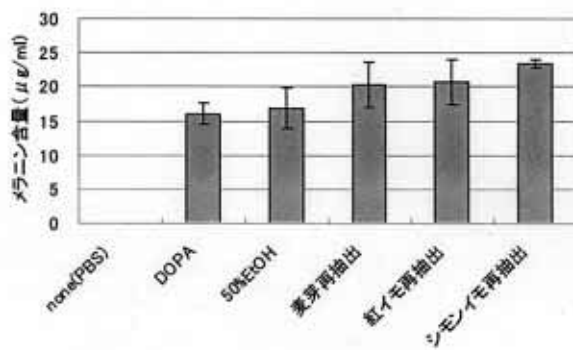


図12 麦芽、紅イモ、シモンイモの50%EtOH再抽出液中のメラニン産生抑制活性

4 まとめ

以上の結果をまとめると、0.5mg/mlの麦芽、紅イモおよびシモンイモ由来の各グリコシルセラミドEtOH溶液、生豆由来トリゴネリン水溶液とブタ脳由来グリコシルセラミド水溶液および麦芽精製物の6種類について、神経突起様伸長活性およびメラニン産生抑制活性の有無を検索した。その結果、シモンイモに神経突起様伸長活性が認められた。

参考文献

- 1) Miki shibahara, Xiaoxian Zhao, Yoko Wakamatsu, Nobuhiko Nomura, Tadaatsu Nakahara, Chunyuan Jin, Hideyuki Nagaso, Takehide Murata, and Kazunari K. Yokoyama, Cytotechnology, 33, 247-251, 2000
- 2) 豊川哲也, 鎌田靖弘, 与座江利子, 沖縄県工業技術センター研究報告, 2, 35-57, 2000
- 3) Anne P. Barrie, Anna M. Clohessy, Charito S. Buensuceso, Mark V. Rogers, and Janet M. Allen, J.B.C., 272(32), 19666-19671, 1997
- 4) Masahisa Tsuji, Osamu Inanami, and Mikinori Kuwabara, J.B.C., 276(35), 32779-32785, 2001

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。