

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)	氏名	BUENDIA KATHLEEN KAY MARUNDAN
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
論 文 題 目 Isolation, Characterization, and Applications of Lectins from Edible Red Algae (食用紅藻由来レクチンの単離、性状評価および応用に関する研究)			
論文審査担当者			
主 査	講 師	平 山 真	
審査委員	教 授	島 本 整	
審査委員	教 授	鈴 木 卓 弥	
審査委員	教 授	川 井 清 司	
審査委員	准教授	LIAO, Lawrence Manzano	
〔論文審査の要旨〕			
<p>海洋は広大で多様な生態系を持ち、豊富な海洋生物を支えている。海藻は栄養と健康に役立つ重要な生物活性成分を含み、さらに潜在的な新規機能性成分のソースとして注目される。糖結合性タンパク質「レクチン」は、細胞内外の複合糖質と協働して免疫、感染、受精など様々な生命現象に関与している。複合糖質糖鎖は、生物グループや細胞種、病態によって特徴的な構造を示すことが知られ、これら糖鎖構造を特異的に認識し結合するレクチンは、これらを標的とした医薬素材や健康食品素材として有望である。これまでに食用紅藻の一部に多量のレクチンが含まれることが明らかとなり、しかしながら、これらが摂取後にヒトの体内でどのような挙動を示すのか明らかになっていない。一方、紅藻はタンパク質を多く含むため、人口増加に対応する有益な代替タンパク質源としても期待されているが、アガロースやカラギーナンなどの粘性多糖を多く含む、これらの物性等により従来の抽出方法ではタンパク質の効果的な可溶化が困難で、レクチンを含む機能性タンパク質の獲得や代替タンパク質源としての利用が制限されている。そこで本論文は、紅藻由来レクチンおよびレクチンを含む紅藻タンパク質に関して、その有効活用に焦点を当てた5つの章から構成される。</p> <p>第1章では、上記を含む本研究の背景および目的について述べられている。</p> <p>第2章では、これまでに含有レクチン情報が未知であった食用紅藻ホソバノトサカモドキから新規レクチンを単離し、その性状を明らかにした。すなわち、各種クロマトグラフィーを駆使することで精製された同藻由来レクチン CjL は、SDS-PAGE において、約 10 kDa の単一成分として認められた。糖化合物を用いた赤血球凝集阻害試験の結果、CjL の活性は試験したいずれの単糖でも阻害されず、一方、糖タンパク質、特にアシアロ体により強く阻害され、糖鎖の非還元末端ガラクトースを認識する可能性が示された。これらの性状は CiJ が新規レクチンであることを示唆した。</p> <p>第3章では、食用紅藻由来レクチンの摂取後の挙動を調べるため、消化酵素に対する耐性と抗腫瘍効果について調べた。対象として、既知食用紅藻由来レクチンであるトサカノリ由来レクチン MPL-1、トゲキリンサイ由来レクチン ESA-2、およびカギイバラノリ由来レクチン HypninA-2 を用いた。消化試験は、ペプシンを含む人工胃液 (pH 2.0) およびト</p>			

リプシン、キモトリプシンを含む同腸液 (pH 7.0) とレクチンを様々な時間インキュベートして行った。また、アクチナーゼ E、プロテイナーゼ K、およびパパインを含むタンパク質分解酵素を用いた試験も行った。対照として、大豆由来レクチン SBA、マッシュルーム由来レクチン ABA、およびインゲンマメ由来レクチン PHA-E を用いて同様に試験し、血球凝集活性と SDS-PAGE における対応バンドのシグナルを指標としてレクチンの消化耐性能を評価した。その結果、MPL-1 が消化酵素やその他プロテアーゼ処理によるタンパク質分解に対して顕著な抵抗性を示すことが明らかとなり、同レクチンは摂取後も活性を維持したまま腸まで到達することが示唆された。腸内での機能性を推定するために、ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を用いて、トサカノリレクチンの増殖抑制効果を *in vitro* で検討したところ、強い抑制能を示し ($IC_{50}=4.5 \mu\text{g/mL}$)、さらに同レクチンの阻害糖であるイーストマンナンの添加によりその抑制能はキャンセルされた。この結果は、トサカノリレクチンが細胞表面の糖鎖に結合することにより HT-29 の増殖を抑制していることを示唆した。以上、トサカノリレクチンの頑健性と抗腫瘍作用は、機能性食品への応用などに有益な知見を与えるものと期待される。

第 4 章では、紅藻多糖分解酵素を用いた抽出法を適用し、紅藻からのタンパク質抽出効率に与える影響を評価した。まず、海洋性細菌由来アガラーゼ (rAgaAc)、 κ -カラギナーゼ (rCgkA)、および ι -カラギナーゼ (rCgiA) につき、大腸菌発現系を用いて組換え体を調製した。次に、3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法により、多糖の分解によって生じた還元糖を測定することで組換え酵素の活性を評価した。これら組換え酵素の至適温度および同 pH を調べたところ、いずれも 30-40°C および pH 8-9 で高い活性を示した。これら組換え酵素を用いて紅藻試料からタンパク質抽出操作を行い、酵素添加の有無による粘度、タンパク質収量、および赤血球凝集活性の相違を評価することにより、タンパク質抽出における有意性を評価した。すなわち、組換え酵素を添加により抽出液の粘度が著しく低下し、一方、タンパク質収量は、一部の紅藻を除き、酵素添加区で有意な増加が観察された。一方、血球凝集活性は酵素添加区で顕著な増加が認められた。すなわち、紅藻多糖分解酵素を用いた抽出法は、レクチンを含む紅藻タンパク質の利用可能性を高めるのに有効であることが示唆され、省エネルギー作用、コスト低減、バイオマス糖化への応用などの工業的応用において価値があると考えられた。

最後に、第 5 章において上記の研究結果を総括した。

以上、本論文は食用紅藻由来レクチンに関する 3 つの研究により、新たな紅藻資源の新規有用性と紅藻由来レクチンの特殊性および頑健性を明らかにし、さらに効率的有効利用法を提示したもので、審査の結果、本論文は統合生命科学研究所科学学位論文評価基準を満たし、著者は博士 (学術) の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。