

# *Stichopus japonicus* (ナマコ) 抽出物中の細胞増殖抑制活性成分

若 生 豊\*・黒 澤 夏 美\*\*・佐 藤 慎 也\*\*\*

## Cell Growth Suppressive Compound from *Stichopus japonicus*

Yutaka WAKO\*, Natsumi KUROSAWA\*\* and Shinya SATOH\*\*\*

### Abstract

Namako is common name of *Stichopus japonicus* Selenka (SC) and which has been cultivated in Japan as traditional sea food. Aomori Prefecture is one of the chief Namako-producing districts. We found that the extract of SC have cell growth suppressive effect against for HL-60 human leukemia cell. The caspase activity rises in the cell death induction. Extract of SC has also the hemagglutination activity. To determine the active substance is composed of the proteinaceous component, protease hydrolysis of SC extracts was carried out. SDS page showed that high molecular substances are hydrolyzed into low molecular substances. By hydrolysis small part of activity was lost but most activity remained. Active substance would be suggested that glycoprotein which resists hydrolysis.

**Key words:** *Stichopus japonicus* Selenka, cell growth suppressive effect, pronase, lectin, HL-60

### 1. 緒 言

青森県はナマコ (*Stichopus japonicus* Selenka) の主産地のひとつであり、特に中華料理の高級食材として用いられる乾しナマコには定評があり、国内で使用されるほか、輸出もされている。

一方、漢方薬では、ナマコに滋養強壮などの効能が伝えられている。ナマコからは種々の生理活性成分が報告されており<sup>1)</sup>、テルペン化合物では、水虫の治療薬にも応用されている holotoxin をはじめ、抗菌性や細胞毒性などの成分について報告がなされている。また、レクチンでは、キンコ科の非食用のグミから、強い細胞毒性を示す CEL-I などが発見されている<sup>2)</sup>。この他、スフィンゴ糖脂質などの報告がある。現在、ナマコの食品機能を考察する目的で抗腫瘍活性およびレクチン活性について検討を続けており、本小論では、可食部の水溶性成分に見出した細胞増殖抑制活性とその活性成分の特徴等について検討した結果を報告する。

### 2. 実験材料および方法

1) 試料, 試薬 ナマコ (*Stichopus japonicus* Selenka) は水産会社より直接購入し直ちに  $-80^{\circ}\text{C}$  に冷凍し使用まで保存した。がん細胞 HL-60 は東北大学細胞資源センターより供与を受けたものを使用した。

2) 試料調製 ナマコの抽出は、内臓を除く筋肉部分を 2 溶の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) で、氷零下でホモジ

ナズし、その遠心上清を限外ろ過にて分子量 10,000 以上部分に濃縮の後、それを 0.01 M Tris-HC へ透析し試料とした。以後 SC extract と呼ぶこととする。主成分はタンパク質と糖であり、糖の比率はタンパク質の約 20% 程度であった。

3) 細胞活性評価 Cell viability 活性は、ホルマザン試薬を用いた、ミトコンドリアの代謝活性を調べる MTT 法 (Cell Counting Kit-8, ドージン)、および細胞内 ATP 濃度の化学発光測定法 (Cell Titer-Glo, Promega) により、それぞれキットを用いて評価した。

4) カスパーゼ活性 基質として XEXD-aminolusiferin を用い反応の結果生ずるルシフェリンを化学発光法で分析し酵素活性の評価を行う、カスパーゼ活性測定キット (Caspase Glo, Promega) を使用し活性測定した。

5) 電気泳動による DNA の断片化観察 市販のキット (アポトーシスアッセイキットテストワコー、和光純薬) を用いた。被験試料で処理した細胞  $1\sim 100\times 10^4$  個を遠心 ( $800\times g$ ) により集め、それを Protein digestion enzyme solution で細胞溶解した後核 DNA を抽出した。イソプロパノールを加えて DNA を沈殿させ回収しエタノールで洗浄の後、電気泳動用のサンプルとした。1.5% アガロースゲルの各ウェルに DNA サンプル  $10\mu\text{l}$  と Loading buffer  $2\mu\text{l}$  を入れ、TAE 緩衝液中で 100 V、40 分間泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイドにより DNA の染色を行い、UV トランスイルミネーター (Kodak 製) 上で、検出波長 312 nm で観察した。

6) がん細胞抑制作用の評価 がん細胞 HL-60 は 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で前培養を行い、対数増殖期の細胞を収穫し実験に供した。細胞密度  $10^4$  から  $10^5/\text{ml}$  の細胞懸濁液をマイクロプレートへ播種し、各段階に濃度調整した試料を加え  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の環境下で

平成 21 年 1 月 5 日受理

\* 生物環境化学工学科・教授

\*\* 生物環境化学工学科平成 19 年度卒業

\*\*\* 機械・生物化学工学専攻前期課程

培養し、48 時間後に、細胞の ATP 量あるいはミトコンドリアの代謝活性の測定結果より、相対的な生細胞数変化を推定し増殖抑制活性を評価した。

7) 血球凝集活性 凝集反応はヒツジ赤血球を用いた。96 穴タイタープレート (U 底) のウェル内で、2 倍ずつ段階希釈した試料 50  $\mu$ l および 4% (V/V) ヒツジ赤血球生理食塩水懸濁液 50  $\mu$ l を混和し室温で 60 分放置の後、上部より目視で穴内の血球の広がりの様子を観察して、凝集の有無を判定した。

### 3. 実験結果と考察

#### 1) SC extract のがん細胞増殖抑制作用

Fig. 1 へがん細胞 HL-60 の培養の経時変化を示した。増殖の程度は細胞の ATP 量 (Cell viability) から推定し、縦軸に示した。何も加えない対照群の増殖に比べ、培養液に SC extract を添加した群では増殖が抑えられた。低濃度では一定期間増殖は抑制されるが、その後増殖は回復する傾向を示すが、ある濃度以上では、細胞数が経時的に減少し続け死滅した。そこで、本実験では増殖に対する抑制作用を基本的に培養 24 時間の測定結果で判定することとした。培養液へ添加した試料濃度に対する抑制作用の比較を Fig. 2 へ示す。増殖 (Cell viability) は試料添加濃度の増加に従って減少することが観察された。培養液へ添加した試料濃度と増殖抑制の関係、以下の式で求めた細胞増殖抑制率<sup>3)</sup> (縦軸) で整理し、がん細胞を 50% 抑制する試料濃度の  $GI_{50}$ 、ならびに 100% 抑制するときの濃度の TGI を求めた (Fig. 2b)。

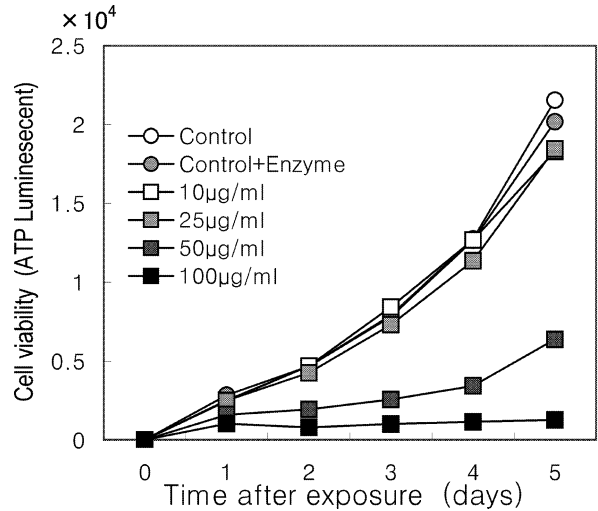


Fig.1 Time course analysis of cell growth suppressive activity of SC extracts toward HL-60. HL-60 cells were cultured with varying concentration of SC extract in the growth medium at 37 for 5 days. The Cell growth suppressive activity was determined by the quantitation of ATP present in culture cell with the Cell Titer-Glo Assay. Each point represents the average of triplicate measurements.

細胞増殖抑制率 =

$$\frac{\text{対照群の増殖値} - \text{試料添加群の増殖値}}{\text{対照群の増殖値}} \times 100$$

その結果、SC extract の  $GI_{50}$  は約 50  $\mu$ g/ml, TGI は約 90  $\mu$ g/ml と計算された。抑制作用は強いもの、抗腫瘍活性を有することを確認した。試料を加えて培養し増殖抑制が認められた細胞の写真を示す (Fig. 3)。細胞の形態が崩れ、細胞同士が集合していた。また、細胞が

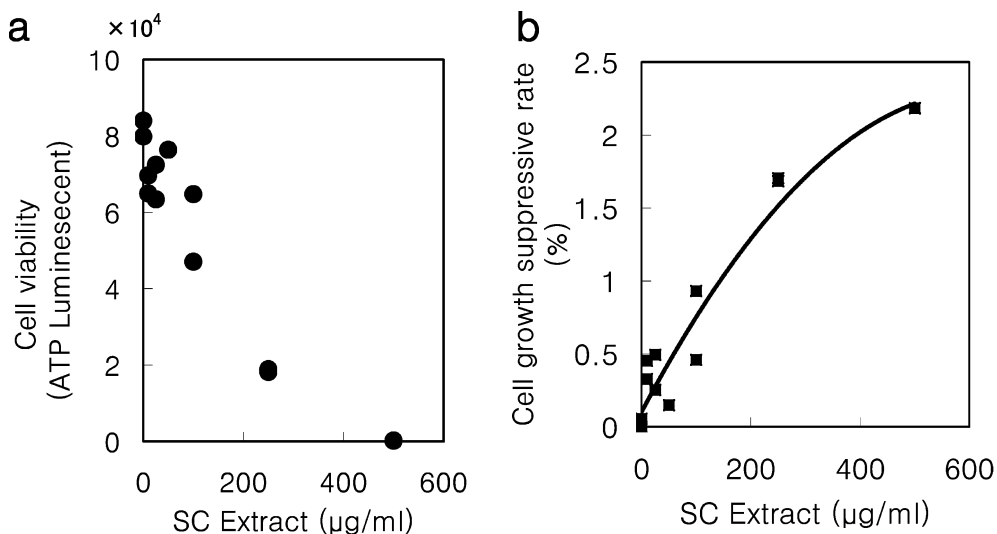
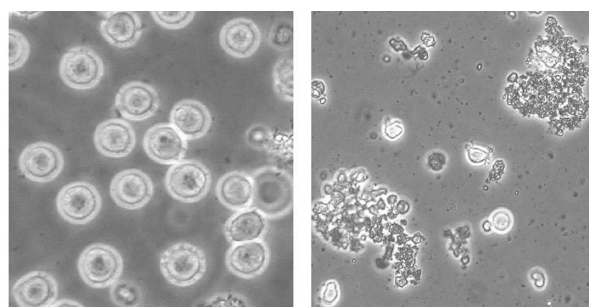


Fig. 2 Dose-response curve of the inhibition of cell growth (a) and cell growth suppressive rate (b) of SC extract toward HL-60. HL-60 cells were cultured with varying concentration of SC extract in the growth medium at 37 for 24 h. The Cell growth suppressive activity was determined as described in Fig. 1. The cell growth suppressive rate was calculate by the equation as described under “Materials and Methods”. Each point represents the measurements independently.



Control HL-60 Cells

SC Extract (100 µg/ml)

Fig. 3 Morphological differences between control HL-60 Cells and the cells treated with 100 µg/ml SC Extract. HL-60 cells were cultured with 100 µg/ml of SC extract in the growth medium at 37 for 48 h.

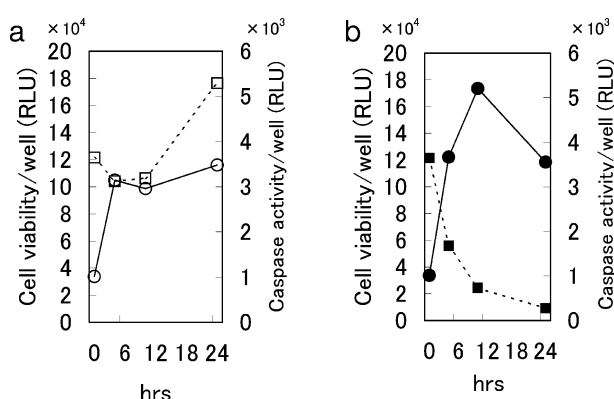


Fig. 4 Changes of caspase 3/7 activity of HL-60 cultured with (b) or without (a) SC extract. HL-60 cells were cultured with 300 µg/ml of SC extract in the growth medium at 37 for 24 h. Cell viability (circle) and caspase 3/7 activity (square) was determined as a function of time. Each point represents the average of two determinations. Each point represents the average of two determinations.

小断片へ分裂して崩壊している像も多数観察された。この結果より試料はアポトーシス細胞死を誘導することが考えられた。

## 2) SC extract の細胞死誘導

アポトーシス細胞死は様々なシグナルを原因として生物が計画的に細胞の死を引き起こす一連の現象である。アポトーシス細胞死を特徴づけるものとして、死誘導に先立って生ずるカスパーゼ活性の一過的な活性上昇がある。そこで細胞死の内容を検討する目的で、経時的なカスパーゼ活性の変動を観察した。300 µg/ml の試料を含む培地で細胞を培養し、Cell viability とカスパーゼ活性変動を 24 h まで観察した結果を Fig. 4 に示す。左の対照群では Cell viability は 24 h まで増加を示し細胞は正常に増殖したことが確認された。カスパーゼ活性を示す発光強度は培養開始直後からは一旦上昇するが、6 h, 12 h, 24 h の間はほぼ一定の値を示した。右の試料添加群では

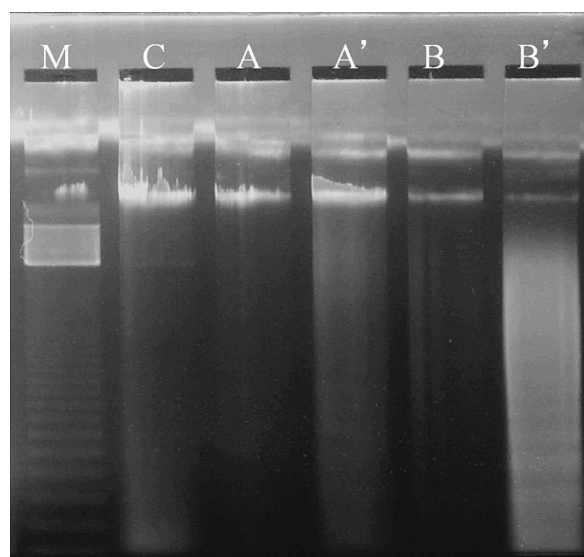


Fig. 5 Fragmentation of DNA from HL-60 cells treated with SC extract. HL-60 cells were cultured with none (lane C), 100 µg/ml (lane A), 300 µg/ml (lane A') of SC extract, and 1 mM (lane B), 5 mM (lane B') staurosporine. DNA ladder formation in lane A' and B'. M, DNA size marker.

Cell viability は 6 h には顕著に減少し、その後も減少し続け細胞死の進行する経過が観察された。カスパーゼ活性は 6 h から 12 h の間に明瞭な活性上昇が認められ、その後 24 h では 6 h と同じレベルに戻り、細胞死の進行する過程で一過的なカスパーゼ活性の上昇が示唆されたことより、細胞死がアポトーシス死誘導によるものと考えられた。

試料を含む培地で培養した細胞より DNA を抽出しアガロース電気泳動に付し、DNA の小断片化の観察を行った (Fig. 5)。各レーンの内容は A, A' は試料を 100, 300 µg/ml 添加した群, C は対照の無添加群, B, B' は陽性対照のアポトーシス誘導に用いられる抗癌剤のスタウロスポリンを 1, 5 mM 添加した群, M はサイズマーカーである。C の対照では原点付近に巨大サイズの DNA バンドのみが観察され、低分子化の起きていないことが確認された。試料添加群の A は C と同様に原点付近のみにバンドが観察されたが、A' では原点付近のバンドから先端に渡って薄くではあるが DNA の蛍光が不連続に続くラダーが観察された。B' のスタウロスポリン処理群ではレーン全体に蛍光が観察され小断片化が認められた。この結果より SC extract 試料処理群で DNA の小断片化が起きていることが示され、この観察からも細胞死がアポトーシス死であることが示唆された。

## 3) 細胞増殖抑制活性に及ぼすプロナーゼ処理の影響

細胞増殖抑制活性に、タンパク成分が関与しているか否かを検討する目的で、試料をタンパク質分解酵素 (プロナーゼ) で加水分解し、活性が失われるかどうかを検

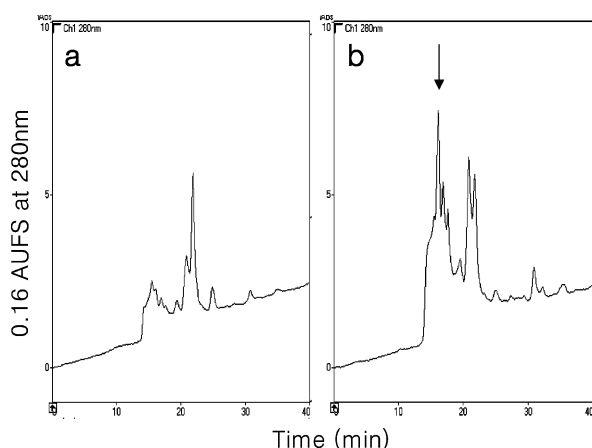


Fig. 6 Comparing HPLC profiles of intact SC extract (a) and hydrolyzate of SC extract (b) with Protein-Pak DEAE 8 HR.

Column: Protein-Pak DEAE 8 HR 10 mm×100 mm

Buffer A: 10 mM Tris-HCl pH 7.5 B: Buffer A with 0.5 M NaCl

Gradient: A for 10 min, 0 to 80% B over 40 min, 0.7 ml/min, 280 nm

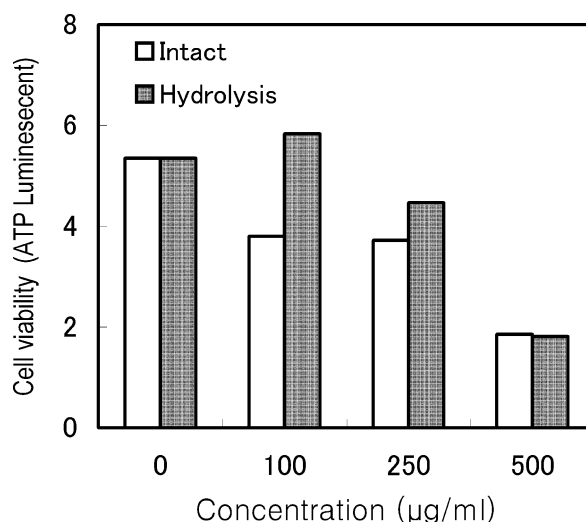


Fig. 8 Effects of proteolytic hydrolysis on the cell growth suppressive activity of SC extracts toward HL-60. HL-60 cells were cultured with varying concentration of SC extract (open bar) and its hydrolyzate (stippled bar) in the growth medium at 37 for 24 h. The Cell growth suppressive activity was determined as described in Fig. 1. Each data represents the average of two determinations.

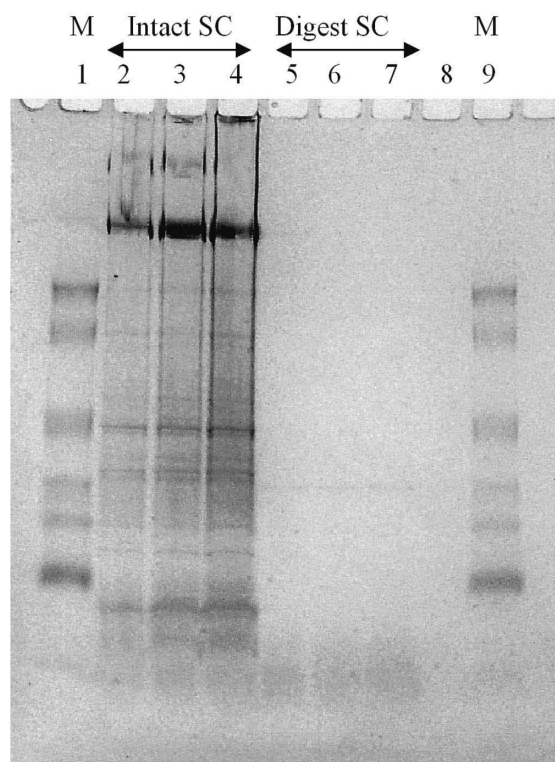


Fig. 7 SDS-PAGE of intact and digest SC extract. Intact (lane 2-4), and digest (lane 5-7) SC extract were subjected to SDS-PAGE electrophoresis and stained with coomassie blue. M, size marker.

素を失活させた。酵素による加水分解の状況を確認するため、加水分解試料 (hydrolyzate of SC extract) をイオン交換クロマトグラフィーにより分離し 280 nm でモニターした溶出プロフィールを Intact な試料のそれと比較した。HPLC によるイオン交換クロマトグラムのパターンを Fig. 6 に示す。加水分解した試料のクロマトグラムは Intact な試料のそれと比べ、図中に矢印で示した早い流出位置のピーク面積の比が増大し、タンパク成分が加水分解されていることが示唆された。さらに、SDS 電気泳動により同様に加水分解試料と Intact な試料の泳動パターンを比較した (Fig. 7)。Intact な試料ではクマジーブルーによりタンパク染色されたバンドが見えるのに対し、加水分解したレーンには目視で判明できるバンドは観察されず、タンパク質が十分加水分解されていることが確認された。

プロナーゼで加水分解した試料の細胞増殖抑制活性を Intact な試料のそれと比較し、結果を Fig. 8 に示す。白抜きバーの Intact な対照群と比べ、灰色の棒グラフで示した加水分解物添加群では、100  $\mu\text{g/ml}$  や 250  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では、Cell viability は高く、活性の低下が認められ、細胞増殖抑制活性にはタンパク成分が関与することが考えられた。しかし、500  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では強い活性が認められ対照と差は認められなかった。酵素による加水分解を徹底して行っても、一定程度の活性は残存することが示された。これらの結果より、活性成分はタンパク質から構成される物質であることが示唆され、また、タンパク分解酵素に対し抵抗性を示す物質であることも示唆された。

討した (Fig. 8)。10 mg/ml の濃度の試料に対し濃度 1 mg/ml になるようにプロナーゼ (Calbiochem, 65,868 PUK/g, from *Streptomyces griseus*) を過剰に加え、37°C, 24 hr 加水分解し、その後 98°C, 10 min 加熱し、酵

#### 4) SC Extract 加水分解物の PSM-agarose Affinity Chromatography による分離

加水分解物から活性成分の分離精製を目的として、加水分解物のアフィニティークロマトグラフィーを試みた。活性成分はタンパク質分解酵素に対し抵抗性を示すことや、後述するように細胞凝集活性を有することなどから糖質に親和性をもつ物質である可能性が示唆された。糖質に親和性を示す物質には、特異的な糖質をリガンドとして樹脂に結合させたアフィニティークロマトグラフィーが効果的な分離をもたらす場合が多い<sup>4)</sup>。活性成分は顕著な親和性を示す特定の糖質を認めていないことより、ブタ胃ムチンをリガンドとするアガロースのアフィニティークロマトグラフィーを用い、分離を試みた (Fig. 9)。カラムを 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  を含むトリス緩衝液生理食塩水で平衡化した後、加水分解物を乗せたところ、試料は吸着せず溶出し、溶出した各フラクションに増殖抑制活性が確認された。EDTA のバッファーに切り替えても新たに溶出される活性は観察されず、この条件ではブタ胃ムチンに対する吸着は認められないことが判明した。従って、活性成分の精製には別の分離手段を検討する必要がある。

#### 5) SC Extract 加水分解物のタンパク成分と糖成分への分離と細胞増殖抑制活性比較

細胞増殖抑制活性にはタンパク成分が係わることが推察されたが、タンパク質に含まれる糖質成分、あるいは糖ペプチドなどが種々の活性を発現する場合が多い。SC Extract 加水分解物は糖質が多量含まれることから、次に活性に対して、糖質が関与するか否かについて調べた。

セルロースカートリッジカラムで、糖ペプチドや糖質成分が含まれる部分と主にタンパク質からなる部分とに

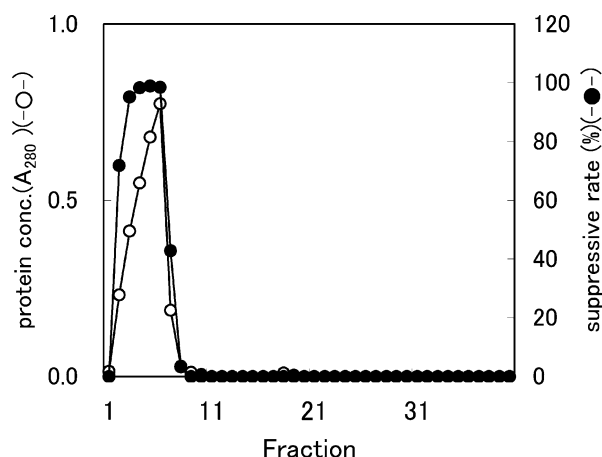


Fig. 9 PSM-agarose Affinity Chromatography Profiles. SC Extracts digests was applied to PSM-agarose column equilibrated with TBS containing 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . After washing, the column was eluted with TBS containing 5 mM EDTA. Closed circle represent cell suppressive rate of each fraction.

分離し、それらの部分の活性を比較し、活性所在について検討した (Fig. 10)。分離は、特殊な処理を施した微結晶セルロースを用いた市販のカートリッジカラムを用いた。0.5 ml のプロナーゼ加水分解した SC Extract 加水分解物をカートリッジに流しブタノール：エタノール：水=4:1:1 でタンパク質やその他の成分を流出し、この画分を P とした。次いで、エタノール：水=1:1 を流し糖ペプチドや糖質成分を回収し、この画分を G とした。Fig. 10b は各分画を、シリカゲルの薄層クロマトで確認した結果である。分離前の加水分解物には、ブタノール：酢酸：水=2:1:2 で展開されるニンヒドリン陽性のタンパク質と原点付近に留まるオルシノール硫酸陽性の糖ペプチドや糖質成分が存在していることが分かる。P 画分には原点付近の糖質成分は無く、タンパク質成分である

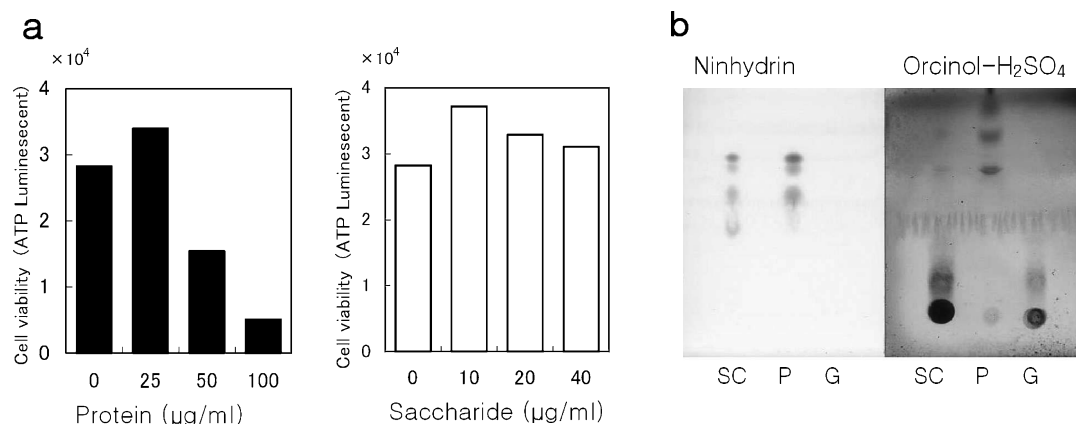


Fig. 10 Comparing cell growth suppressive activity found in fractions of protein and saccharide components (a). Thin-layer chromatography of proteinaceous (P) and glycan (G) fractions of SC extract (b). SC extract was separated into proteinaceous (P) and glycan (G) fractions with cellulose column. Cell growth suppressive effects of proteinaceous (closed bar) and glycan (open bar) fractions were determined as described in Fig. 1. Each data represents the average of two determinations.

ことが分かるが、タンパク質成分が展開された位置はオルシノール硫酸陽性を示し、糖タンパク質が若干含まれていることが示された。一方、糖ペプチドや糖質成分はG画分へ回収されていることが確認された。

PおよびG画分の細胞増殖抑制活性をFig. 10aへ示す。タンパク質成分のP画分の抑制活性をタンパク質濃度として0~100  $\mu\text{g/ml}$ の範囲でそれぞれ調べた結果、濃度に従ったCell viabilityの減少が認められ、抑制活性の存在が示された。一方、糖ペプチドや糖質成分が含まれるG画分では糖濃度40  $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで添加した群にはCell viabilityに変化は認められず、活性は示されなかった。この結果から、細胞増殖抑制活性に関与する成分としては、糖ペプチドや糖質成分が直接活性を示していることは考えにくく、タンパク質を主成分とする画分に活性が存在していることが示唆された。ただし、この各分のタンパク質には糖質が一定程度含まれていることが示されており、糖鎖などが活性に係わっている可能性は考えられる。

#### 6) SC Extractの細胞凝集活性

ナマコをはじめとする海産生物からは種々の生理活性成分が報告されているが、非食用のナマコである、樹手目キンコ科のグミからは、強い細胞毒性を示すレクチンが明らかにされている。検討している成分の細胞増殖抑制活性もこのようなレクチンに由来することが考えられる<sup>5)</sup>ことから、SC Extractについてレクチンの特徴であ

る細胞凝集活性が認められるかを検討した。羊血球に対するIntactなSC Extractの凝集活性をFig. 11へ示す。赤血球が底部全体に広がっている状態が凝集活性が現れていることを示している。SC Extractに凝集活性が確認され、活性を示す最小濃度は70  $\mu\text{g/ml}$ であった。食用のナマコである*Stichopus japonicus* Selenkaからは、レクチンが分離精製され報告されており、本研究で調製したSC Extract中にも何らかのレクチンの存在することが考えられた。次に、本研究で検討対象としている細胞増殖抑制活性が細胞凝集活性とどのように関連するかを考察する目的から、細胞凝集活性に対するプロナーゼ加水分解の影響を検討した。プロナーゼの加水分解物の群では560  $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも凝集活性は認められず、酵素消化によるタンパク質分解によって凝集活性が消失することが示された。しかし、先に示したように同濃度(500  $\mu\text{g/ml}$ )においてプロナーゼ加水分解物は対照と同程度の細胞増殖抑制活性を示しており、細胞増殖抑制活性と細胞凝集活性はプロナーゼ加水分解に対し、必ずしも一致した挙動は示さないことが分かった。本研究で観察された細胞増殖抑制活性はアポトーシス誘導死が原因となっていることが示唆されたが、強い細胞毒性を示すCEL-Iのメカニズムはアポトーシス誘導死ではないことが報告されており、今回検討対象としている細胞増殖抑制活性成分はレクチンとは異なる物質の可能性も考えるがさらなる検討が必要である。また、SC Extractの示す細胞凝集活性について、認識糖鎖の特異性を検討する目的で、0.2 Mのマンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンを加え活性を観察したが、これらの糖による凝集阻害は観察されず、明瞭な認識糖鎖を認めることは出来なかった。

#### 4. 要 約

- 1) *Stichopus japonicus* Selenka (ナマコ)の抽出物から、HL60細胞に対する増殖抑制活性を見出し、その活性は約GI<sub>50</sub>; 50  $\mu\text{g/ml}$ , TGI; 90  $\mu\text{g/ml}$ であった。
- 2) 細胞増殖抑制に伴う一過的なカスパーゼ活性の上昇が認められ、抽出物はアポトーシス死を誘導することが考えられた。
- 3) 増殖抑制活性は抽出物中のタンパク成分を含む画分に認められ、糖質および糖ペプチド画分には無く、活性物質は糖タンパク質である可能性が示唆された。
- 4) プロナーゼによるタンパク質加水分解処理によって活性低下するが一定程度の活性は保持されることから、活性物質はプロテアーゼ消化に抵抗を示すタンパク質と考えられる。
- 5) 抽出物は血球凝集活性を示し、その最小濃度は70

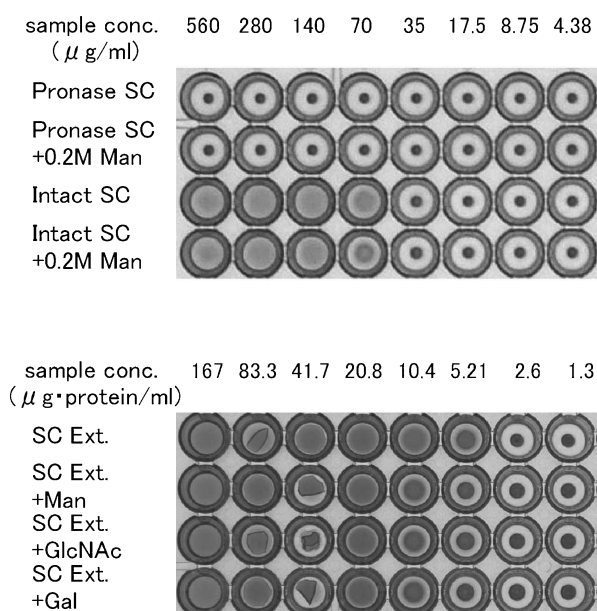


Fig. 11 Hemagglutination induced by intact SC extract (a). Inhibition of SC extract induced hemagglutination by carbohydrates (b). Hemagglutination assay was performed with goat erythrocytes. The minimum concentration required for hemagglutination by SC extract was 70  $\mu\text{g/ml}$ . Inhibition of hemagglutination was determined with 0.2 M Man, GlcNAc, and Gal.

$\mu\text{g/ml}$ であった。プロナーゼによるタンパク質加水分解により活性は失われる。細胞増殖抑制活性と細胞凝集活性はプロナーゼ加水分解に対し、必ずしも一致した挙動は示さず細胞増殖抑制活性成分はレクチンとは異なる物質の可能性も考えるが、さらなる検討が必要である。

## 文 献

- 1) 山田耕史：薬学雑誌, 122, 113 (2002)
- 2) Kuramoto T., Uzuyama H. *et al.* : J. Biochem., 137, 41 (2005)
- 3) Ukiya M., Akihisa T. *et al.* : Cancer letters, 177, 7 (2002)
- 4) Matsui T., Ozeki Y. *et al.* : J. Biochem., 116, 1127 (1994)
- 5) Gonzalez E., Bradford T. *et al.* : Nutrition reviews, 61, 239 (2003)