

2009. 7

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第三十四号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *

高知大学学報

目次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲黒博第 9 号	木宮 隆	海洋深層水培養海藻からの抗アレルギー作用物質の探索	1
甲黒博第 10 号	宮川 亜利沙	海産珪藻の高効率な形質転換系の開発に関する研究	10

ふりがな	きみや たかし
氏名（本籍）	木宮 隆（東京都）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲黒博第9号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成21年3月23日
学位論文題目	海洋深層水培養海藻からの抗アレルギー作用物質の探索
発表誌名	Kimiya,T.,Ohtani,K.,SatoH,S.,Abe,Y.,Ogita,Y.,Kawakita,H.,Hamada,H., Konishi,Y.,Kubota,S.,Tominaga,A.:Inhibitory effects of edible marine Algae extracts on degranulation of RBL-2H3 cells and mouse eosinophils. <i>Fisheries Science</i> 74,1157-1165(2008)
	審査委員 主査 教授 富永 明 副査 教授 大谷 和弘 副査 教授 山岡 耕作 副査 准教授 久保田 賢

論文の内容の要旨

【目的】喘息，アレルギー性鼻炎，アトピー性皮膚炎，花粉症といったI型アレルギー性疾患は，世界中の国々，特に先進国に特徴的な疾患の一つである。日本人の約3人に一人が何らかのアレルギー性疾患を有しており，今後も増加傾向にあるとされている。アレルギー性疾患の多くは，直ちに生命を脅かすことは少ないが，患者の健康水準の低下，それに伴う医療費支出の増大をもたらし，生活の質の低下につながることから，社会生活上もはや無視できない問題となっている。しかしながら，アレルギー性疾患の病態は十分に解明されていないものも多く，効果的な対症療法はあるものの，根治的な治療法は確立されていない。

アレルギーとは，ある種の抗原に対する免疫系の過剰な，もしくは不適切な反応のことである。免疫グロブリン（Ig）E介在性のI型アレルギー反応は，二相性反応であることが知られている。すなわち，マスト細胞（肥満細胞）により引き起こされる「即時相反応」（～2時間；急性アナフィラキシー反応など）と，好酸球が中心的役割を果たす「遅発相反応」（～2-24時間；喘息，アトピー性皮膚炎，アレルギー性鼻炎などにおいて顕著）である（図1）。アレルギー性炎症反応においては，マスト細胞／好塩基球，好酸球をはじめとする種々の免疫細胞が，互いに影響し合いながら機能している。この事実から，マスト細胞／好塩基球および好酸球の脱顆粒を同時あるいは個別に制御できる抗アレルギー作用物質を探索することとした。

近年のアレルギー性疾患の増加には，産業化に伴う食生活の変化が影響しているとの指摘もある。そこで，日本で伝統的に食用とされる海洋資源の1つである海藻に着目した。他方，高知県では高知県海洋深層水研究所が，海洋深層水を用いた海藻の陸上培養技術を開発に成功していることから，それらの培養海藻は天然の海藻と比較して質・量ともに安定供給可能な海藻資源として期待される。

論文の内容の要旨

そこで本研究では、アレルギー反応に関連したマスト細胞/好塩基球および好酸球の両細胞に対する脱顆粒抑制作用の点から、海藻中の抗アレルギー作用物質を探索した。なかでも、すでに大量培養が可能となっているハバノリに着目し(図2)、脂溶性画分にマスト細胞/好塩基球および好酸球の脱顆粒を抑制する化合物が含まれることを明らかにした。

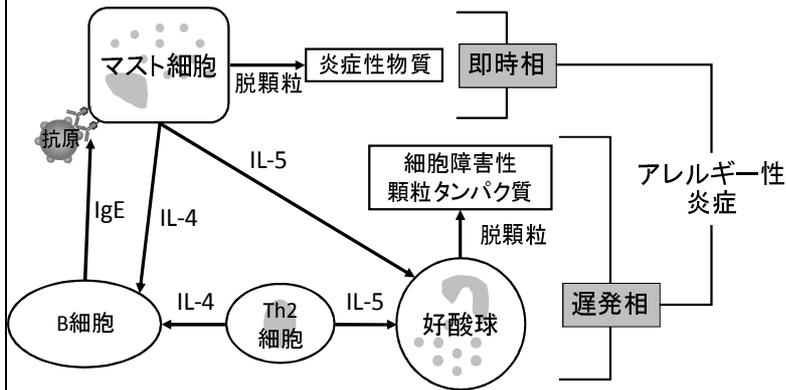


図1 I型アレルギー反応の機序



図2 培養ハバノリ

【方法】IgE 介在性の I 型アレルギー反応の即時相における炎症反応は、マスト細胞により惹起される。ある抗原によって感作された個体は、抗原特異的 IgE を産生する。マスト細胞表面の FcεRI に結合した抗原特異的 IgE と、再び進入してきた特異的抗原との結合により、FcεRI は架橋され、さらにそれらが凝集することで、細胞内へのシグナル伝達を開始され、マスト細胞は活性化される。活性化されたマスト細胞は、数分以内に細胞内の顆粒に蓄えられたヒスタミン、各種プロテアーゼなどを「脱顆粒」反応により細胞外に放出する。それに引き続き、アラキドン酸代謝の亢進により産生されるプロスタグランジン D₂、ロイコトリエン C₄ といった脂質メディエーターや、IL-4 などの各種サイトカインが放出される。このようなマスト細胞/好塩基球のモデルとして、好塩基球性白血病ラット由来の細胞株 RBL-2H3 細胞を用いて、海洋深層水培養海藻中の抗アレルギー作用物質をスクリーニングした。また、ハバノリのメタノール抽出物について、好酸球の脱顆粒に対する抑制作用を検討した。これまでに好酸球の脱顆粒抑制作用に関する報告は、陸上植物および海藻では見当たらない。

(材料) 実験に使用した海藻はすべて、高知県海洋深層水研究所において室戸岬(高知)沖の水深 320 m より汲み上げた海洋深層水中で培養した。用いた海藻は、カジメ *Ecklonia cava*, ホソメコンブ *Laminaria religiosa*, ハバノリ *Petalonia binghamiae*, カヤモノリ *Scytosiphon lomentaria*, ワカメ(幼体) *Undaria pinnatifida* の褐藻 5 種, タオヤギソウ *Chrysymenia wrightii*, オニアマノリ *Porphyra dentata* の紅藻 2 種, およびミル *Codium fragile*, スジアオノリ *Enteromorpha prolifera*, ヤブレグサ *Ulva japonica* の緑藻 3 種, 計 10 種である。

(抽出および分画) 凍結保存された培養海藻は、流水中で解凍、水洗した後、室温・送風下で乾燥させた。乾燥させた海藻を粉砕し、得られた乾燥海藻粉末 1-50 g を 20-50 倍量の熱水(沸騰下で 1 時間×3 回)または 3-10 倍量のメタノール(加熱還留下で 1 時間×3 回)で抽出した。水抽

論文の内容の要旨

出液は凍結乾燥，メタノール抽出液は溶媒を減圧留去して減圧乾燥させることにより，それぞれの抽出物を得た。メタノール抽出物は，さらに溶媒分配に供した。まず，それぞれのメタノール抽出物をメタノール-水（70：30）に懸濁後，ヘキサンで抽出してヘキサン層を得た。続いて，含水メタノール層に含まれるメタノールを減圧留去し，順次酢酸エチルおよびブタノールで抽出し，それぞれ酢酸エチル層およびブタノール層を得て，残りを水層とした。抽出は，それぞれの溶媒で3回ずつ，室温で行った。ハバノリ酢酸エチル層については，シリカゲルカラムクロマトグラフィー，ODS カラムクロマトグラフィーおよび ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離・精製し，活性化化合物を得た。

（RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制試験）脱顆粒抑制作用は，RBL-2H3 細胞から抗原抗体刺激により放出される顆粒内酵素 β -hexosaminidase の活性を測定することにより評価した。RBL-2H3 細胞を培地に懸濁し，96 穴平底マイクロプレートに細胞数 2×10^4 cells/80 μ L/well となるように播種した。RBL-2H3 細胞は，100 ng/mL のマウスモノクローナル抗 dinitrophenyl IgE 抗体とともに，炭酸ガス培養器（37°C，5% CO₂）で 16 時間培養することにより感作させた。各ウェルの培地を吸引により除去した後，37°C に加温した 120 mmol/L NaCl，5 mmol/L KCl，5.6 mmol/L グルコース，0.4 mmol/L MgCl₂，1 mmol/L CaCl₂ および 0.1% (w/v) ウシ血清アルブミンを含む 25 mmol/L HEPES 緩衝液（pH 7.4，緩衝液 A）100 μ L で 2 回洗浄した。緩衝液 A 40 μ L を各ウェルに加え，炭酸ガス培養器に 5 分間静置した後，海藻抽出物を含む緩衝液 A 40 μ L を加え，炭酸ガス培養器内で 30 分間プレインキュベートした。それぞれの試験における海藻抽出物の用量は，予備試験の結果に基づき，顕著な細胞毒性を示さない，できるだけ高い用量を選択した。プレインキュベーション後，終濃度 100 ng/mL となるよう抗原（DNP-BSA）溶液 40 μ L を加え，炭酸ガス培養器で 30 分間刺激した。氷冷した緩衝液 A 20 μ L を加えた後，遠心分離（450 \times g，4°C，10 分間）し，上清 50 μ L/well を新たな 96 穴平底マイクロプレートに移した。酵素反応の基質となる 2 mmol/L *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide を含む 100 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.5）10 μ L/well を加え，37°C で 1 時間反応させた。200 μ L の反応停止液〔100 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃（pH 10）〕を加えて混和した後，マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm における吸光度を測定した。それぞれの試験区につき，3 ウェルを使用した。RBL-2H3 細胞の総 β -hexosaminidase 活性は，Triton X-100（終濃度 0.1%）を加えて細胞膜を溶解させ，その上清を用いて測定した。海藻抽出物の脱顆粒抑制作用は，抗原抗体反応による脱顆粒に対する抑制率（%）として算出した。

（好酸球の脱顆粒抑制試験）好酸球は 25–40 週齢の IL-5 トランスジェニックマウスより調製した。マウス好酸球の脱顆粒は，顆粒内酵素好酸球ペルオキシダーゼの放出により評価した。上述の RBL-2H3 細胞と同様に，被検試料とのプレインキュベーションの後，カルシウムイオノフォアで脱顆粒を誘導した。細胞外に放出された好酸球ペルオキシダーゼの活性を *o*-phenylenediamine dihydrochloride を基質として測定した（492 nm の吸光度）。脱顆粒抑制率はカルシウムイオノフォア刺激による脱顆粒に対する抑制率（%）として算出した。

（統計解析）すべてのデータは，平均 \pm 標準誤差（ $n=3$ ）で示し，統計的な有意差は Dunnett test または Tukey-Kramer test により検定した。

【結果および考察】カジメおよびタオヤギソウの水抽出物（図 3），ハバノリ，カヤモノリ，ワカメ（幼体），オニアモノリ，ミルおよびヤブREGサのメタノール抽出物が RBL-2H3 細胞の脱顆粒

論文の内容の要旨

を顕著に抑制した (図 4)。溶媒分配後、メタノール抽出物の抑制活性の多くは酢酸エチル層およびヘキサン層といった脂溶性画分に集中した (表 1)。ハバノリの酢酸エチル層は RBL-2H3 細胞、ヘキサン層は好酸球の脱顆粒を抑制した (図 5)。ハバノリの酢酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、画分 E1-E8 を得た。RBL-2H3 細胞に対しては、E4 を除くすべての画分が、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で脱顆粒を 50%以上抑制し、特に E2, E6 および E7 は約 100%の脱顆粒抑制率を示した。一方、好酸球の脱顆粒に対してはいずれの画分も作用を示さなかった。好酸球に対して最も高い抑制作用を示した E5 でさえ、その抑制率はわずか 10.7%であった。より高濃度 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で用いた場合も、各画分は有意な抑制作用を示さなかった。また、それ以上の濃度では、抽出物が好酸球に対して毒性を示したため、脱顆粒試験を行うことができなかった。好酸球の場合、それぞれの試料の細胞毒性は、未刺激の状態でも各試料を加えた時の非特異的な好酸球ペルオキシダーゼの放出を通じて検出した。いずれの脱顆粒試験においても、細胞の生存率は試料の脱顆粒抑制作用に顕著な影響を及ぼさなかった。

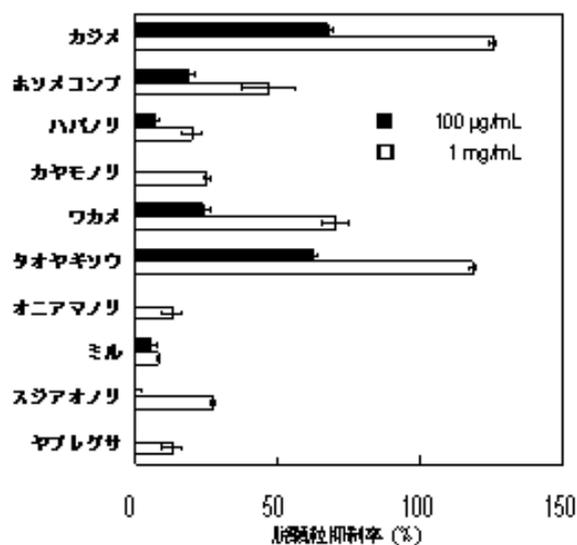


図 3 海藻水抽出物の RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制作用

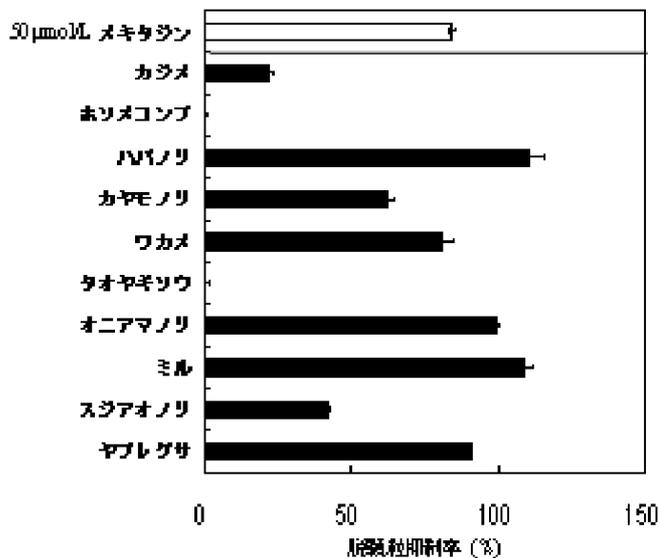


図 4 海藻メタノール抽出物の RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制作用

ハバノリ E1-E8 画分のうち、活性、収量、各種クロマトグラムを考慮し、RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制作用を指標として E1-E3 からの活性化化合物の単離を試みた。E1 から化合物 1-4 の 4 化合物、E2 から化合物 5-12 の 8 化合物、および E3 から化合物 13-18 の 6 化合物を得た (表 2)。以上、18 化合物の RBL-2H3 細胞の脱顆粒に対する抑制作用および同細胞に対する毒性を検討した結果、化合物 1, 4 および 9-12 が、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 80%以上、化合物 14 および 18 で 50%以上の脱顆粒を抑制し、顕著な毒性は認められなかった (表 2)。また、5 倍濃度の各化合物とともに 24 時間培養した場合にも、顕著な毒性は認められなかった。

一方、化合物 15-17 については、RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制試験において、著しく脱顆粒を促進する結果となった (表 2)。それら 3 化合物については、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とともに 2 時間培養した場合にも RBL-2H3 細胞の生存率が 15%以下となり、顕著な細胞毒性が認められた。脱顆粒試験後の

論文の内容の要旨

細胞を観察したところ、界面活性剤 Triton X-100 を添加した場合と類似の様相を呈したことから、化合物 15-17 は界面活性作用をもつ化合物であることが示唆された。

表 1 海藻メタノール抽出物の溶媒分配画分の RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制作用

	脱顆粒抑制率 [%] (200 µg/mL)		
	ヘキサン層	酢酸エチル層	ブタノール層
褐藻			
カジメ	26.8 ± 0.4 [†]	39.9 ± 1.7 [†]	31.4 ± 3.0 [†]
ホソメコンブ	87.3 ± 3.3 [‡]	23.4 ± 2.4 [‡]	1.3 ± 1.0 [†]
ハバノリ	26.5 ± 3.9 [†]	77.0 ± 2.4 [§]	9.5 ± 3.0 [†]
カヤモノリ	77.7 ± 4.0 [†]	93.9 ± 2.6 [†]	47.8 ± 3.3 [†]
ワカメ	10.7 ± 3.3 [†]	6.9 ± 0.9 [‡]	2.3 ± 4.6 [†]
紅藻			
タオヤギソウ	20.8 ± 4.8 [†]	40.8 ± 1.6 [†]	-2.8 ± 2.9 [†]
オニアマノリ	51.1 ± 1.0 [†]	98.2 ± 1.4 [¶]	91.0 ± 0.9 [¶]
緑藻			
ミル	85.3 ± 2.3 [‡]	96.9 ± 2.0 [¶]	64.6 ± 2.7 [§]
スジアオノリ	92.7 ± 1.4 [¶]	60.8 ± 3.8 [§]	0.8 ± 5.0 [†]
ヤブレグサ	83.7 ± 1.9 [†]	80.1 ± 3.5 [¶]	-22.8 ± 3.5 [†]

脱顆粒抑制試験後の RBL-2H3 細胞の生存率 (トリバンプルー染色) : [†]>90%, [‡]70-90%, [§]50-70%, [¶]<50%

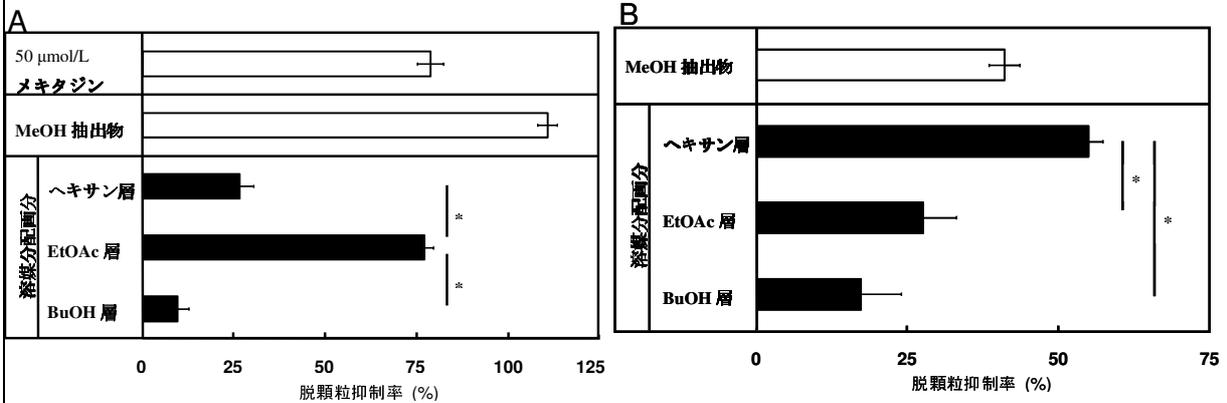


図 5 ハバノリメタノール抽出物および溶媒分配画分の RBL-2H3 細胞 (A) および好酸球 (B) に対する脱顆粒抑制作用
*有意差有 (P<0.05), MeOH: メタノール, EtOAc: 酢酸エチル, BuOH: ブタノール

論文の内容の要旨

表 2 化合物 1—18 の RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制作用と細胞毒性

化合物	収量 (mg)	脱顆粒抑制率 [%] (100 µg/mL)	生存率 [%] (500 µg/mL, 24 h)	物質群
1	1.6	97.3 ± 3.7	79.2 ± 2.0	ポリフェノール (フロログルシノール誘導体)
2	1.4	35.5 ± 2.5	—	
3	2.5	31.4 ± 0.9	—	
4	7.3	91.0 ± 2.6	79.0 ± 0.9	
5	6.8	4.1 ± 1.6	—	カロテノイド誘導体
6	7.0	6.6 ± 4.3	—	
7	7.5	8.2 ± 3.3	—	
8	4.1	38.4 ± 1.8	—	糖脂質
9	5.7	91.7 ± 1.8	76.2 ± 2.1	
10	6.8	90.1 ± 1.8	75.9 ± 2.5	
11	7.1	92.4 ± 1.3	83.7 ± 1.6	
12	2.3	88.8 ± 1.1	80.1 ± 2.4	
13	1.5	-9.8 ± 7.3	—	ポリフェノール (フェニルプロパノイド)
14	1.6	65.5 ± 3.6	68.2 ± 1.0	
15	4.6	-285.5 ± 5.0	7.3 ± 0.5	
16	2.4	-293.6 ± 4.3	6.5 ± 1.0	
17	4.3	-80.9 ± 5.3	3.2 ± 0.3	
18	15.4	59.0 ± 4.3	79.7 ± 1.1	

— : 未試験

以上得られた化合物の ¹H-核磁気共鳴スペクトルより、E1 由来化合物 (1-4) がポリフェノール (フロログルシノール誘導体)、E2 由来化合物 5-7 がカロテノイド誘導体、化合物 8-12 が糖脂質、および E2 由来化合物 13-18 がポリフェノール (フェニルプロパノイド) であることが示唆された (表 2)。同一画分由来の同一物質群の化合物であっても、その脱顆粒抑制作用や細胞毒性については大きな違いがあることが判明した。今後さらに詳細な構造解析により、構造と活性の関係を明らかにする必要がある。

結論として、RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制を指標とした場合、多くの食用海藻が抗アレルギー作用物質の良い供給源であった。本研究により、千葉県などで伝統的な特産として食されてきたハバノリが、マスト細胞/好塩基球および好酸球の脱顆粒を抑制する抗アレルギー作用物質を含むことが明らかとなった。この結果は、マスト細胞により誘発される即時相反応または好酸球が中心的役割を果たす遅発相反応を同時に抑制したり、それら細胞の活性化を個別に制御することを可能にするために、非常に有用であると考えられる。RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制化合物については、今後の *in vivo* での試験の結果次第では、マスト細胞/好塩基球の脱顆粒抑制型抗アレルギー作用化合物として非常に有望である。また、本研究により海藻 (ハバノリ) 中に初めて好酸球の脱顆粒抑制作用を見出した。今後は作用化合物の単離および構造決定を進める必要がある。材料が培養海藻でありその安定供給が確保しやすいことから、本研究の結果はマスト細胞により誘発される即時相反応または好酸球が中心的役割を果たす遅発相反応の抑制に基づく、種々のタイプのアレルギー性疾患を制御できる物質の発見、およびその供給源としての海洋深層水培養海藻の有効利用の一助となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者は、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症といった I 型(即時型)アレルギー疾患が、日本を含む先進工業国で増加傾向にあることから、この病気の予防や症状の緩和に有効な物質を食用海藻から探索することを試みた。

即時型アレルギー反応は、マスト細胞表面のFcεRIに結合した抗原特異的IgEと抗原がFcεRIを架橋することで、細胞内へのシグナル伝達が開始され、マスト細胞の脱顆粒が起きることから始まる。このマスト細胞の活性化がさらに好酸球の脱顆粒を引き起こして組織障害を引き起こす。したがって、マスト細胞/好塩基球および好酸球の脱顆粒を同時あるいは個別に制御できる抗アレルギー作用物質を探索した。

現在、マスト細胞と好塩基球は独立してアレルギー反応を引き起こしていることが報告されているが、FcεRIに結合した抗原特異的IgEと抗原がFcεRIを架橋すると誘導される脱顆粒のメカニズムは共通と考えられている。しかし、好酸球のFcεRIの働きは解明されていないことから、好酸球に関してはカルシウムイオンチャネルであるイオノマイシンで脱顆粒を誘導している。

食用海藻を用いた理由は、食事の変化がアレルギー疾患の増加を引き起こしている原因のひとつであること、および、食品による予防や症状の緩和が日常生活で利用しやすいことである。食事によるアレルギーの予防・症状緩和は医療費の削減につながる可能性もあり有意義なことと思われる。高知県では高知県海洋深層水研究所が、海洋深層水を用いた海藻の陸上培養技術の開発に成功しており、実験に使用した海藻はすべて、高知県海洋深層水研究所において室戸岬沖の水深 320 m より汲み上げた海洋深層水中で培養したもので、カジメ *Ecklonia cava*、ホソメコンブ *Laminaria religiosa*、ハバノリ *Petalonia binghamiae*、カヤモノリ *Scytosiphon lomentaria*、ワカメ(幼体) *Undaria pinnatifida* の褐藻 5 種、タオヤギソウ *Chrysymenia wrightii*、オニアモノリ *Porphyra dentata* の紅藻 2 種、およびミル *Codium fragile*、スジアオノリ *Enteromorpha prolifera*、ヤブレグサ *Ulva japonica* の緑藻 3 種、計 10 種である。

本研究では、アレルギー反応に関与するマスト細胞/好塩基球および好酸球の両細胞に対する脱顆粒抑制作用の点から、海藻中の抗アレルギー作用物質を探索し、ハバノリに着目して、脂溶性画分にマスト細胞/好塩基球および好酸球の脱顆粒を抑制する化合物が含まれることを明らかにしている。

マスト細胞表面のFcεRIに結合した抗原特異的IgEと特異的抗原との結合が、FcεRIを架橋し、細胞内顆粒に蓄えられた物質の放出を測定する実験には好塩基球性白血病ラット由来細胞株RBL-2H3細胞を使用した。RBL-2H3細胞脱顆粒抑制作用は、細胞から抗原・抗体刺激により放出される顆粒内酵素β-hexosaminidaseの活性を測定することにより評価している。RBL-2H3細胞を、100 ng/mLのマウスモノクローナル抗dinitrophenyl (DNP) IgE抗体とともに、炭酸ガス培養器で16時間培養することにより感作した後、緩衝液で洗浄し、海藻抽出物を含む緩衝液を加え、炭酸ガス培養器内で30分間プレインキュベートした。さらに、終濃度100 ng/mLとなるよう抗原(DNP-BSA)溶液40 μLを加え、炭酸ガス培養器で30分間刺激した後、放出されたβ-hexosaminidase活性を測定している。

β-hexosaminidaseの活性は特異的な基質であるp-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminideを用いておこなった(405 nmの吸光度を測定)。好酸球の脱顆粒抑制試験は好酸球をIL-5トランスジェニックマウスより調製し、その脱顆粒は、顆粒内酵素好酸球ペルオキシダーゼの放出により評価した。被検試料とのインキュベーションの後、イオノマイシンで脱顆粒を誘導し、細胞外に放出された

論文審査の結果の要旨

好酸球ペルオキシダーゼの活性を*o*-phenylenediamine dihydrochloride を基質として測定した(492 nmの吸光度)。今回、材料として使用した海藻エキスはこれら酵素の阻害活性を持たないと思われるが、海藻エキスがこれら酵素の活性を直接阻害しないことを確認しておく必要がある。

材料として用いた培養海藻は、乾燥・粉碎し、熱水またはメタノールで抽出した。カジメとタオヤギソウの熱水抽出物は50%のRBL-2H3細胞の脱顆粒抑制効果を示したが、今回は分離と構造解析が容易であることからメタノール抽出物の分離をさらに進めている。ハバノリ、カヤモノリ、ワカメ(幼体)、オニアマノリ、ミルおよびヤブレグサのメタノール抽出物がRBL-2H3細胞の脱顆粒を50%以上抑制した。溶媒分配後、ハバノリの酢酸エチル層がRBL-2H3細胞の、ヘキササン層が好酸球の脱顆粒を50%以上抑制した。さらに、ハバノリの酢酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、画分E1-E8を得て、RBL-2H3細胞と好酸球の脱顆粒抑制効果を比較した。RBL-2H3細胞に対しては、E4を除くすべての画分が、脱顆粒を50%以上抑制したのに対し、好酸球の脱顆粒に対してはいずれの画分もほとんど抑制効果を示さなかった。

ハバノリE1-E8画分のうち、RBL-2H3細胞の脱顆粒抑制作用を指標としてE1-E3からの活性化化合物の単離を試みた。E1から化合物1-4の4化合物、E2から化合物5-12の8化合物、およびE3から化合物13-18の6化合物を得ている。これら18化合物のRBL-2H3細胞の脱顆粒に対する抑制作用および同細胞に対する毒性を検討した結果、化合物1、4および9-12が、終濃度100 µg/mLで80%以上、化合物14および18で50%以上の脱顆粒を抑制し、顕著な毒性を示さなかった。

一方、化合物15-17については、RBL-2H3細胞の脱顆粒抑制試験において、著しく脱顆粒を促進する結果となった。それら3化合物については、終濃度100 µg/mLとともに2時間培養した場合にもRBL-2H3細胞の生存率が15%以下となり、顕著な細胞毒性が認められた。その顕微鏡像は、界面活性剤Triton X-100を添加した場合と類似であったことから、化合物15-17は界面活性作用をもつ化合物であると推測している。以上得られた化合物の¹H-核磁気共鳴スペクトルより、E1由来化合物(1-4)がポリフェノール(フロログルシノール誘導体)、E2由来化合物5-7がカロテノイド誘導体、化合物8-12が糖脂質、およびE2由来化合物13-18がポリフェノール(フェニルプロパノイド)であると予想している。

今後さらに詳細な構造解析により、構造と活性の関係を明らかにする必要があるが、ハバノリのメタノール抽出物に即時型アレルギー反応を抑制する有用な成分が含まれていることを明瞭に示している。

以上のように、申請者はハバノリがマスト細胞/好塩基球および好酸球の脱顆粒を抑制する抗アレルギー作用物質を含むことを明らかにした。この結果は、マスト細胞により誘発される初期の即時相反応と好酸球が中心的役割を果たす後期の遅発相反応を同時に抑制する、または、それら細胞の活性化を個別に制御することに道を開く可能性がある。これらの脱顆粒抑制化合物については、今後、動物を用いた経口投与での効果を確認することが必要であるが、ハバノリが即時型アレルギーの抑制物質を含むことを明らかにした点を評価したい。

千葉県などでは正月に、雑煮に火で焙ったハバノリをふりかけて食べる風習があり、ハバノリの記述は室町時代から見られる。このように食事の中に取り入れられたハバノリのような藻類を用いてアレルギー疾患を予防、あるいは、その症状を緩和することができれば、医薬品の使用を減少させることができ、医療費の削減につながる。

論文審査の結果の要旨

現在、先進工業国では、抗生物質の過剰な投与で耐性菌が蔓延している。新たな抗生物質を開発し、新たな耐性菌を生じさせる悪循環をたち、なるべく感染症でも抗生物質を使わずに、体の持っている免疫力を強めることで対応することが望まれている。本研究は、免疫の極性をアレルギーが起こらない方向に制御することが食事で可能であることを示唆している。したがって、申請者の研究は黒潮圏科学が目指す持続型社会のあり方のひとつを示すことにつながると考えられる。

ふりがな	みやがわ ありさ
氏名（本籍）	宮川 亜利沙（大阪府）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲黒博第10号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成21年3月23日
学位論文題目	海産珪藻の高効率な形質転換系の開発に関する研究
発表誌名	High efficiency transformation of the diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> with a promoter from the diatom <i>Cylindrotheca fusiformis</i> (珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> の珪藻 <i>Cylindrotheca fusiformis</i> 由来のプロモーターを用いた高効率形質転換) Arisa Miyagawa, Takuma Okami, Nozomu Kira, Haruo Yamaguchi, Kouhei Ohnishi and Masao Adachi Phycological Research, in press
	審査委員 主査 教授 奥田 一雄 副査 教授 足立 真佐雄 副査 教授 富永 明

論文の内容の要旨

珪藻は、単細胞性の藻類であり、海洋の炭素固定のおよそ20%を担う重要な一次生産者として知られている。本藻は、羽状目あるいは中心目に属する1万種以上から構成されているとされ、海洋の生態系における一大生物群である。これら珪藻は、種々の生理活性物質ならびに有用物質を生産することも知られており、また貝類や甲殻類の餌料として、あるいはナノテクノロジーの材料の面からも、極めて重要な生物群である。その一方で、本藻は赤潮や魚介類の毒化を引き起こすこともあることから、環境保全の面からも注目されている生物群である。よって、将来これらを有効利用する、あるいはこれらによる環境被害を未然に防止するために、本藻が持つ様々な生命機構を‘本質的に’理解することが重要になる。この生命機構を理解する上で重要と考えられるのが、ゲノムプロジェクトによるゲノム機能解析である。このゲノム機能解析を行う際に、最も重要な基盤技術となるのが形質転換技術である。本技術を用いることにより、細胞内の遺伝子を過剰発現させる、あるいは破壊・抑制することが可能となり、対象となる遺伝子の機能が決定できる。また、形質転換技術は、遺伝子機能解析のみならず、上述した有用物質の生産能や生物機能の改良技術としても極めて重要である。

海産珪藻類の形質転換法については、これまでパーティクルガン法を用いた例が数例報告されている。しかしながら、これらの既報の形質転換系には、以下に述べる2つの大きな問題点があると考えられる。まず、珪藻の大部分の種については、未だその形質転換が行えない現状にある。この原因として、これまでの研究では、使用されたプロモーター（導入遺伝子の発現の‘スイッチ’の役割を果たす）に問題があったと考えられる。すなわち、珪藻類全般に適用可能なプロモ

論文の内容の要旨

ーターは開発されておらず、自身の持つ内在性プロモーターを用いて形質転換を行う必要があった。この内在性のプロモーターを分離するためには、多大な時間と労力が必要となっていた。以上の点を踏まえ、より幅広い種に適用可能な形質転換系を開発するために、様々な珪藻種に対して‘普遍的に’働くプロモーターを探索・開発することが重要である。第2の問題点として、既報の珪藻の形質転換系により得られた形質転換効率が、他生物のそれと比べて著しく低いことを挙げることができる。本技術を用いて、多数の遺伝子の機能解析を行うためには、如何に高い効率にて形質転換が行えるかが、その網羅的解析の成否を握る鍵となる。よって、これらの遺伝子の機能解析を行うためには、形質転換効率を改善することが重要である。

そこで本研究では、種々の海産珪藻において、遺伝子機能解析や、有用物質の生産あるいは機能改良などを効率的に行うこと視野に入れ、本藻の形質転換系に関する上述した問題の解決を図り、“幅広い種に適用可能”かつ“高効率”な珪藻の形質転換系を開発することを目的とした。

本研究にて得られた成果は以下のように要約される。

1. 海産珪藻の異種由来プロモーターを用いた形質転換系の検討

まず、幅広い海産珪藻種に適用可能な形質転換系を簡便に開発するために、既報の形質転換系において用いられたプロモーターの適用範囲に関する知見を得ようとした。その際、珪藻が羽状目および中心目に大きく分かれることに注目して、それぞれの‘目’に属する珪藻種由来のプロモーターが、同目の珪藻種、あるいは‘目’を超えた珪藻種に利用可能か否かについて明かにしようとした。まず、羽状目 *Cylindrotheca fusiformis* 由来のプロモーターを含む pNICgfp を用いて、同目の *C. fusiformis* や *P. tricornutum*、中心目の *Skeletonema costatum* および同目 *Chaetoceros* sp. を、パーティクルガン法により形質転換させた。また、中心目の *T. pseudonana* 由来のプロモーターを含む pTpfcf/ble および pTpNR/GFP を用いて、羽状目の *C. fusiformis* および *P. tricornutum* を形質転換させた。さらに、中心目由来プロモーターを含む pTpfcf/nat および pTpNR/GFP を用いて、中心目の *S. costatum* および *Chaetoceros* sp. を同様に形質転換させた。その結果、羽状目 *C. fusiformis* 由来の fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein 遺伝子プロモーター (Cffcp プロモーター) を用いることにより、同目の *P. tricornutum* の形質転換が可能であることが判明した。この際得られた形質転換効率は、 650 ± 58 transformants/ 10^8 cells であり、既報の珪藻の形質転換効率と比較して、最も高い効率が得られた。しかし、本プロモーターを用いて、中心目 *Chaetoceros* sp. および同目 *S. costatum* の形質転換体は得られなかった。また、中心目 *T. pseudonana* 由来の Tpfcp プロモーターを使用することにより、同目の *Chaetoceros* sp. の形質転換が可能であることを、世界に先駆けて明かにした。しかし、この Tpfcp プロモーターを用いて、羽状目 *C. fusiformis* および同目 *P. tricornutum* の形質転換を行うことはできなかった。以上の結果より、羽状目に由来する Cffcp プロモーターおよび中心目に由来する Tpfcp プロモーターを用いた場合、それぞれ同目異種の形質転換が可能であることが判明した。その一方で、これらのプロモーターを、‘目’を超えて利用することはできなかった。

論文の内容の要旨

2. 海産珪藻のウイルス由来プロモーターを用いた形質転換系の検討

上記1.の結果を踏まえて、珪藻のいずれの目にも適用可能な形質転換系の確立を目指し、ウイルスプロモーターに注目した。植物や動物細胞の形質転換系では、これらに感染するウイルス由来の外来性プロモーターを用いることにより、幅広い種に対する形質転換系が確立されている。しかしながら、海産藻類に感染するウイルスについては、そのプロモーターを遺伝子導入系へ応用した研究は皆無である。そこで、珪藻感染性ウイルス *Chaetoceros debilis* DNA virus (CdebDNAV) の部分ゲノム DNA 配列情報を基にして、その遺伝子領域 (putative replication-associated protein) を推定し、プロモーターを含むと考えられるその上流域を PCR 法により増幅した。得られた増幅産物および抗生物質耐性遺伝子を、プラスミドに組み込み、形質転換用プラスミドを構築した。これらを用いて、中心目 *Chaetoceros* sp.、羽状目 *P. tricornutum* と同目 *C. fusiformis* を、パーティクルガン法によりそれぞれ形質転換させた。さらに、植物の形質転換系に広く利用されているカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) プロモーターを組み込んだプラスミドを用いて、同様に形質転換させた。その結果、CdebDNAV 由来のプロモーターを用いた場合、中心目 *Chaetoceros* sp.と羽状目 *P. tricornutum* では、それぞれ 1.0 transformants/10⁸ cells と 5.0 transformants/10⁸ cells の抗生物質耐性コロニーが得られた。また、CaMV プロモーターを用いた場合、*P. tricornutum* では 8.0 transformants/10⁸ cells の抗生物質耐性コロニーが得られたが、*Chaetoceros* sp.では耐性コロニーは得られなかった。また、いずれのウイルスプロモーターを用いた場合であっても、*C. fusiformis* については耐性コロニーは得られなかった。以上の結果より、珪藻ウイルス (CdebDNAV) 由来のプロモーターは、羽状目珪藻 *P. tricornutum* および中心目珪藻 *Chaetoceros* sp.に対して、‘目’を超えて有効であると考えられた。この結果は、海産藻類ウイルス由来のプロモーターの使用例として、世界初となる成果である。また、CaMV プロモーターは、羽状目珪藻 *P. tricornutum* に対して有効であり、中心目珪藻 *Chaetoceros* sp.に対しては有効でない可能性が示唆された。

3. 海産珪藻のアグロバクテリウム法による形質転換系の検討

上記2.の結果より、羽状目および中心目のいずれの珪藻においても働くプロモーターを用いた形質転換系を開発したが、その形質転換効率は、他生物と比較して依然低いものであった。そこで、さらに高効率な形質転換系を確立するため、植物の形質転換法として知られている土壌由来細菌 *Agrobacterium* 属を用いる方法に注目した。この *Agrobacterium* 法は、植物のみならず酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、糸状菌類 *Aspergillus awamori*、ヒトの HeLa 細胞など、系統的に多様な生物の形質転換にも応用可能であることが報告されている。近年、緑藻 *Chlamydomonas* 属にも利用可能であることが報告され、この際に得られる形質転換効率が、従来本藻に使用されてきたガラスビーズ攪拌法およびパーティクルガン法のそれと比較して、10~50 倍に達することが報告されている。これらの報告を踏まえ、本菌の海産珪藻に対する有効性について検討し、より高効率な本藻の新規形質転換法を確立することを目指した。まず、*Agrobacterium* を用いた形質転換に頻用されているプラスミド pCAMBIA2301 の T-DNA 領域に、*C. fusiformis* 由来の Cffcp プロモーター、抗生物質耐性遺伝子、同藻由来の Cffcp ターミネーターを組み込み、これを *A. tumefaciens* に形質転換させた後、本細菌を珪藻 *C. fusiformis* および *P. tricornutum* に感染させることにより、その形質転換を試みた。この *A. tumefaciens* の感染条件として、本菌を珪藻に直接接種するだけでなく、

論文の内容の要旨

パーティクルガン処理を行った後に本菌を接種する方法や、その後の共存培養条件を液体培地あるいは固相培地にて培養するなど、様々な条件を検討したが、いずれの方法を用いた場合であっても形質転換体は得られなかった。よって、*A. tumefaciens* を用いた遺伝子導入法は、珪藻の形質転換には適当でないと考えられた。

本研究では、羽状目 *C. fusiformis* のプロモーターを用いることにより、同目 *P. tricornutum* の高効率な形質転換に成功した。この形質転換系は、今後本藻の遺伝子の機能解析に威力を発揮することが期待される。また、今回新たに確立した *Chaetoceros* sp. の形質転換系は、貝類や甲殻類の餌料生物として重要な本藻のさらなる高付加価値化を行う上で、極めて有効な手段を提供すると考えられ、今後産業的な応用が期待される。また、本研究にて、海産藻類ウィルス由来プロモーターが、微細藻類の形質転換系へ応用可能であることを初めて明かにした。今回、これを用いて得られた形質転換効率は高いものではなかったが、本プロモーターは珪藻類の目を横断して働く可能性が示唆された。今後、本プロモーターが珪藻以外の微細藻類へ適用可能か否かについて検討することに加え、他の様々な藻類ウィルスプロモーターについても検討することにより、これが海産微細藻類全般に適用可能でありかつ高効率な形質転換系の開発につながることを期待される。近い将来、様々な微細藻類について、‘ゲノムの時代’が到来することが予測されており、今後本技術を基盤とした遺伝子機能解析法が開発され、その遺伝子機能が網羅的に解明されることにより、様々な微細藻類の生命機構の全容が解き明かされることが期待される

論文審査の結果の要旨

珪藻は、単細胞性の藻類であり、羽状目あるいは中心目に属する 1 万種以上から構成されるとされ、海洋の生態系における一大生物群である。これら珪藻は、種々の生理活性物質ならびに有用物質を生産することも知られており、極めて重要な生物群である。よって、将来これらを有効利用するために、本藻が持つ様々な生命機構を‘本質的に’理解することが重要になる。この生命機構を理解する上で重要と考えられるのが、ゲノムプロジェクトによるゲノム機能解析である。このゲノム機能解析を行う際に、最も重要な基盤技術となるのが形質転換技術である。本技術を用いることにより、細胞内の遺伝子を過剰発現させる、あるいは破壊・抑制することが可能となり、対象となる遺伝子の機能が決定できる。また、形質転換技術は、遺伝子機能解析のみならず、上述した有用物質の生産能や生物機能の改良技術としても極めて重要である。

海産珪藻類の形質転換法については、これまでパーティクルガン法（銃撃法）を用いた例が数例報告されている。しかしながら、これらの既報の形質転換系には、以下に述べる 2 つの問題点がある。すなわち、これまで珪藻自身の持つ内在性プロモーターを用いて形質転換が行われており、珪藻類全般に適用可能なプロモーターは未だ開発されていない。この内在性のプロモーターを、それぞれの種から分離するために、多大な時間と労力が必要となっている。さらに、第 2 の問題点として、既報の珪藻の形質転換系により得られた形質転換効率が、他生物のそれと比べて著しく低いことを挙げることができる。

そこで本研究では、種々の海産珪藻において、遺伝子機能解析や、有用物質の生産あるいは機能改良などを効率的に行うこと視野に入れ、本藻の形質転換系に関する上述した問題の解決を図り、“高効率かつ幅広い種に適用可能”な珪藻の形質転換系を開発することを目的としている。

本研究にて得られた成果は、次のように要約される。

1. 海産珪藻の異種由来プロモーターを用いた形質転換系の検討

まず、異種由来プロモーターとして、羽状目 *C. fusiformis* 由来のプロモーター（Cffcp プロモーター）を用いることにより、同目異種の *P. tricornutum* の形質転換が可能であることが判明した。この際得られた形質転換効率は、 650 ± 58 transformants/ 10^8 cells であり、既報の珪藻の形質転換効率と比較して、最も高い効率が得られた。しかし、本プロモーターを用いた場合、同目他種 *S. costatum* および異目の *Chaetoceros* sp. 形質転換体は得られなかった。また、中心目 *T. pseudonana* 由来の Tpfcp プロモーターを使用することにより、同目の *Chaetoceros* sp. の形質転換が可能であることを、世界に先駆けて明かにした。しかし、この Tpfcp プロモーターを用いた場合、同目異種 *P. tricornutum* および羽状目 *C. fusiformis* の形質転換を行うことはできなかった。以上の結果より、羽状目に由来するプロモーターおよび中心目に由来するプロモーターを用いた場合、それぞれ同目異種の形質転換が可能な場合があることが判明した。しかしながら、これらのプロモーターを、‘目’を超えて利用することはできなかった。

2. 海産珪藻のウイルス由来プロモーターを用いた形質転換系の検討

次に、珪藻の 2 目いずれにも適用可能な形質転換系の確立を目指し、ウイルスプロモーターに注目した。珪藻感染性ウイルス *Chaetoceros debilis* DNA virus (CdebDNAV) のゲノム DNA 配列情報を基にして、その遺伝子領域 (putative replication-associated protein) を推定し、プロモーターを含むと考えられる本遺伝子上流域を PCR 法を用い増幅した。これを組み込んだプラ

論文審査の結果の要旨

スミドを用いて、中心目 *Chaetoceros* sp.、羽状目 *P. tricornutum* と同 *C. fusiformis* を、パーティクルガン法によりそれぞれ形質転換させた。その結果、CdebDNAV 由来のプロモーターを用いた場合、中心目 *Chaetoceros* sp.と羽状目 *P. tricornutum* では、1.0 transformants/10⁸ cells と 5.0 transformants/10⁸ cells の抗生物質耐性コロニーがそれぞれ得られた。以上の結果より、珪藻ウイルス由来のプロモーターは、これらの珪藻の‘目’を超えて有効であると考えられた。一連の結果は、海産藻類ウイルス由来のプロモーターの使用例として、世界初となる成果である。

3. 海産珪藻のアグロバクテリウム法による形質転換系の検討

上記の結果より、珪藻のいずれの目においても働くプロモーターを開発したが、その形質転換効率、他生物と比較して低いものであった。そこで、さらに高効率な形質転換系を確立するため、植物の形質転換法として知られている土壌由来細菌 *Agrobacterium* 属を用いる方法に注目した。まず、*Agrobacterium* を用いた形質転換に頻用されているプラスミド pCAMBIA2301 の T-DNA 領域に、*C. fusiformis* 由来の Cffcp プロモーター、抗生物質耐性遺伝子、同藻由来の Cffcp ターミネーターを組み込み、これを *A. tumefaciens* に形質転換させた後、本細菌を珪藻 *C. fusiformis* および *P. tricornutum* にそれぞれ感染させることにより、その形質転換を試みた。その際、様々な感染条件について検討したが、いずれの方法を用いた場合であっても、形質転換体は得られなかった。よって、*A. tumefaciens* を用いた遺伝子導入法は、珪藻の形質転換には適当でないと考えられた。

以上のように、本学位論文は、まず珪藻類の異種由来プロモーターを用いることにより、簡便に形質転換系を開発する可能性を示した点で評価できる。この際、本研究において新たに開発した *Chaetoceros* sp.の形質転換系は、貝類や甲殻類の餌料生物として頻用されている本藻を、さらに高付加価値化させる上で、極めて有効な手段を提供するものと考えられ、特に評価に値する。また、本研究は、海産藻類ウイルス由来プロモーターが、微細藻類の形質転換系へ応用可能であることを、世界で初めて明かにした点で、極めて高く評価できる。さらに、これら海産藻類ウイルス由来プロモーターを用いた形質転換系は、黒潮に育まれた様々な植物プランクトンの形質転換系の開発の礎を築き、これらの有効利用への扉を開くものであり、この点からも高く評価できる。

学位論文公開審査会は、平成21年1月28日に高知大学朝倉キャンパス・メディアホールにおいて開催され、口頭論文発表と質疑応答が行われた。続いて、平成21年2月23日に高知大学物部キャンパス内にて学位論文審査会を開いて審査した結果、本論文が博士（学術）の学位を授与するに値するものと審査委員全員一致で判定した。