

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 大福 美帆
Name

学位論文題目： 魚類内臓の有効活用を目指した機能性評価に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

1. 序論

魚のフィレ加工において排出される内臓や中骨、頭部の多くは、利用されずアラとして廃棄されている。廃棄処分されている魚の内臓に含まれる成分の保健機能を明らかにし、機能性食品として有効活用することができれば、水産資源の有効利用と水産業の効率化に寄与すると期待できる。そこで本研究では、廃棄処分されているアラのうち、ハマチ心臓とマグロ動脈球に着目し、その免疫促進効果を明らかにすることを目的とした。

2. 結果

2.1 ハマチ心臓加熱抽出液の免疫促進活性

ハマチ内臓の様々な部位ごとに水溶性成分の抽出液を調製し、免疫促進活性についてのスクリーニング試験を実施した。その結果、ハマチ心臓抽出液がヒト型ハイブリドーマ細胞株HB4C5細胞のIgM産生を促進することが明らかになった。抽出条件を検討した結果、ハマチ心臓を121℃、20分の条件で熱水抽出後、透析処理したときに最もHB4C5細胞のIgM産生が促進されることが明らかになった。加熱処理による比活性の上昇は、活性に関与しないタンパク質が不溶化して活性物質が精製されたためであると考えられる。よって、ハマチ心臓抽出液中の活性物質は熱に強い性質を持つことが示唆された。

また、ハマチ心臓加熱抽出液がマウス免疫系に与える影響について検討した。ハマチ心臓加熱抽出液は、培養細胞実験においてマウス脾臓由来リンパ球の抗体産生を促進した。一方、動物実験では、マウスに20日間ハマチ心臓加熱抽出液を経口投与した。その結果、ハマチ心臓加熱抽出液を投与した群では、血清中の抗体量の増加が認められ、培養細胞に対してだけでなく生体内においても免疫促進活性が確認された。

陰イオン交換クロマトグラフィーによりサンプルを分画したところ、33 kDaの主要バンドが観察される画分に免疫促進活性がみられた。そこで、33 kDaのバンドをゲル内消化の後、LC-MS/MSによって解析したところ、ゼブラフィッシュ由来のトロポミオン4と高い相同性があることが確認された。そこで市販のブタ筋肉由来のトロポミオシンの活性を評価したところ、HB4C5細胞の抗体産生を促進したことから、ハマチ心臓加熱抽出液に含まれる活性物質はトロポミオンであることが示唆された(図1)。

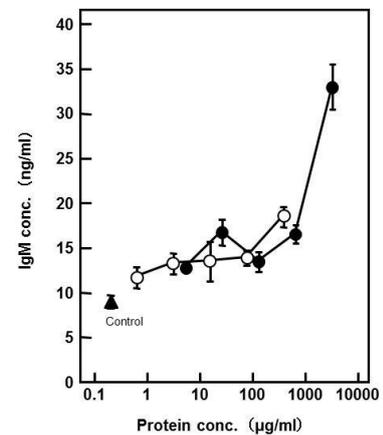


図1 ブタ筋肉由来トロポミオンがHB4C5細胞のIgM産生に与える影響 (○：ブタ筋肉由来トロポミオン、●：ハマチ心臓加熱抽出液、▲：コントロール)

2.2 マグロ動脈球抽出液の免疫促進活性

動脈球は、心臓とエラをつなぐ器官であり、エラスチンなどの機能性成分を含んでいることが知られている。本研究では、マグロ動脈球水溶性抽出液の免疫促進活性について評価した。HB4C5細胞のIgM産生を指標として免疫促進活性を評価したところ、マグロ動脈球抽出液はHB4C5細胞のIgM産生を約6.6倍促進することが確認された。マグロ動脈球を加熱抽出すると免疫促進活性が低下したことから、活性物質は熱に弱い物質であると推察された。マグロ動脈球抽出液の活性物質を特定するため、陰イオン交換クロマトグラフィーで分画したところ、非吸着画分に活性が認められた。非吸着画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで解析した結果、数本のバンドが確認された。それぞれのタンパク質をLC-MS/MS法で解析したところ、乳酸脱水素酵素(LDH)、トリオースリン酸イソメラーゼ、エノラーゼ、ヘモグロビンであると推定された。そこで、これらのタンパク質のHB4C5細胞に対する活性を検討したところ、いずれにも抗体産生促進活性があることが確認され、LDH、トリオースリン酸イソメラーゼ、エノラーゼ、ヘモグロビンがマグロ動脈球抽出液に含まれる活性物質であることが明らかとなった(図2)。また、マウスの脾臓由来リンパ球に対する作用を*in vitro*で検討したところ、LDHはIgA、IgG、IgM産生を、トリオースリン酸イソメラーゼはIgA、IgG産生を促進した。特に、LDHはHB4C5細胞と脾臓由来リンパ球に対して強い抗体産生促進活性を示した。

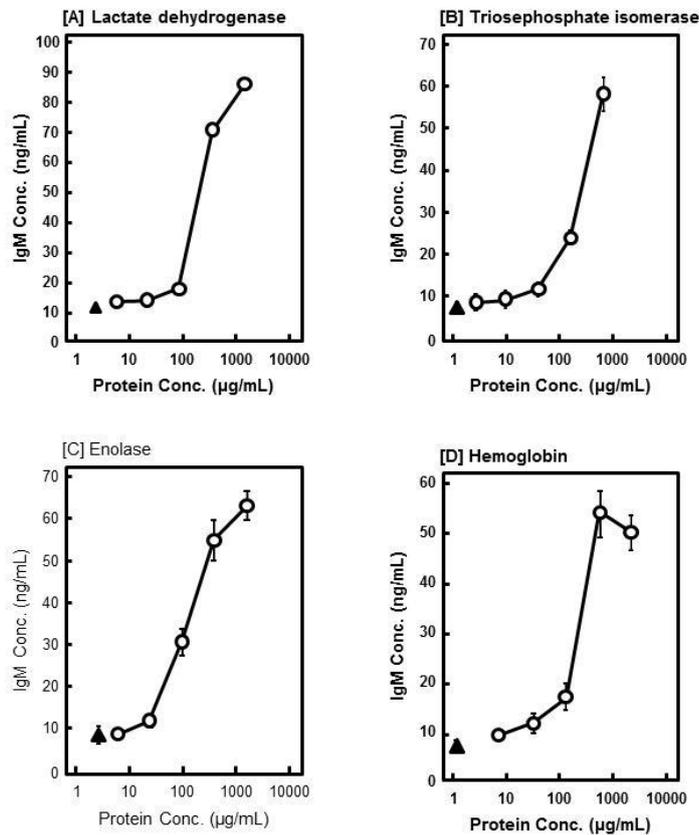


図2 マグロ動脈球抽出液の活性物質がHB4C5細胞のIgM産生に与える影響
(▲: コントロール、○: サンプル添加)

2.3 LDHがマウス免疫系に与える影響

マグロ動脈球に含まれる活性物質のうち、解糖系の酵素の一つである乳酸脱水素酵素 (LDH) に最も強い免疫促進効果が認められたことから、LDH の免疫促進効果について、さらに詳細に検討することとした。まず、LDH がマウスの免疫系に与える影響について *in vitro* 及び *in vivo* で検証した。LDH のマウス由来リンパ球に対する作用を *in vitro* で検討したところ、LDH は脾臓、腸間膜リンパ節及びパイエル板由来リンパ球の IgA、IgG 及び IgM 産生を促進した。そこで、生体内における LDH の免疫促進効果を検討するため、BALB/c マウスに LDH を 1.0 mg/kg/day もしくは 5.0 mg/kg/day の条件で2週間経口投与し、その影響について検討した。その結果、5.0 mg/kg/day 投与群において血清中の IgA 量が増加した。また、リンパ球の活性を *ex vivo* 法で評価したところ、1.0 mg/kg/day 投与群において、パイエル板由来リンパ球の IgA 及び IgM 産生が有意に促進された。また、脾臓由来リンパ球の IgA、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 産生の有意な促進が 5.0 mg/kg/day 投与群で認められた (図 3、4)。LDH の経口投与が生体内でリンパ球の抗体産生及びサイトカイン産生を促進することが明らかとなった。

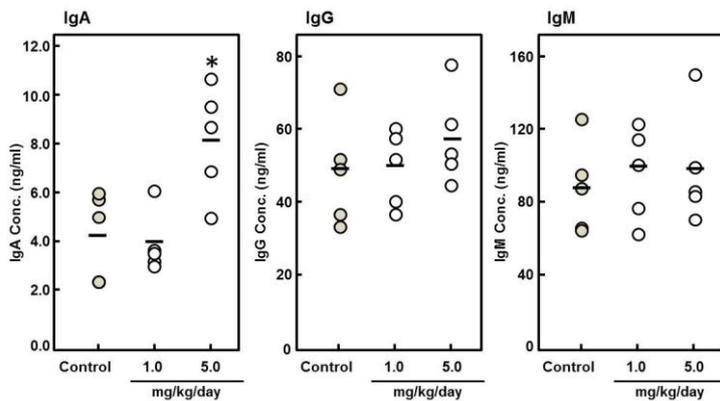


図3 LDHの経口投与がマウス脾臓由来リンパ球の抗体産生に与える影響

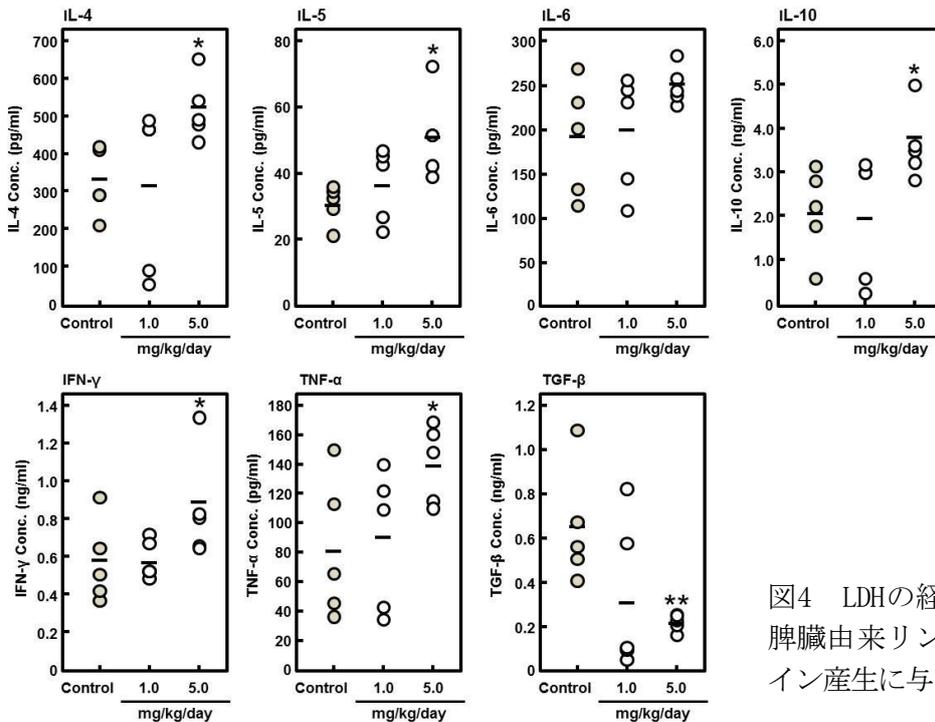


図4 LDHの経口投与がマウス脾臓由来リンパ球のサイトカイン産生に与える影響

2.4 LDHがマクロファージ様細胞株J774.1細胞に及ぼす影響

LDHが、リンパ球系の細胞に対し促進活性を示したことから、他の免疫細胞に対する効果について検討した。その結果、LDHは、マウスマクロファージ様細胞株J774.1細胞を活性化することが明らかになった。LDHはJ774.1細胞のIL-6及びTNF- α 産生を濃度依存的に促進した(図5)。LDHがマクロファージを活性化する作用機構を明らかにするため、イムノブロット法で転写因子のリン酸化レベルへの影響を検討した。その結果、LDHはMAPキナーゼの一つであるJNKのリン酸化を亢進することが確認された(図6)。続いてJNKの阻害剤を用いて検証した結果、LDHによるIL-6及びTNF- α の産生促進活性が、JNK阻害剤SP600125の作用によって濃度依存的に抑制されることが明らかになった。また、LDHは転写因子NF- κ Bの核内移行を亢進することが示唆された(図6)。これらのことから、LDHはJNKのリン酸化とNF- κ Bの核内移行を亢進することにより、J774.1細胞のサイトカイン産生を増加させていることが示唆された。

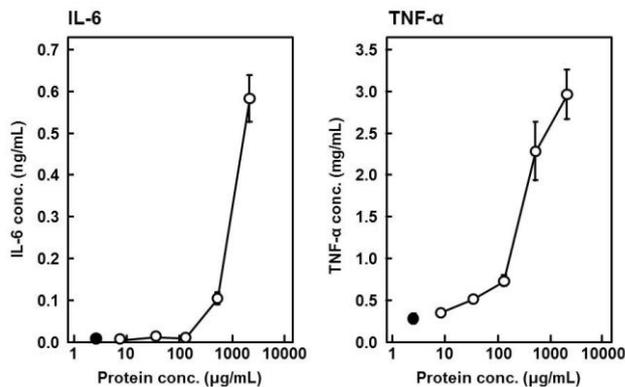


図5 LDHがJ774.1細胞のIL-6、TNF- α 産生に与える影響(●:コントロール、○:LDH添加)

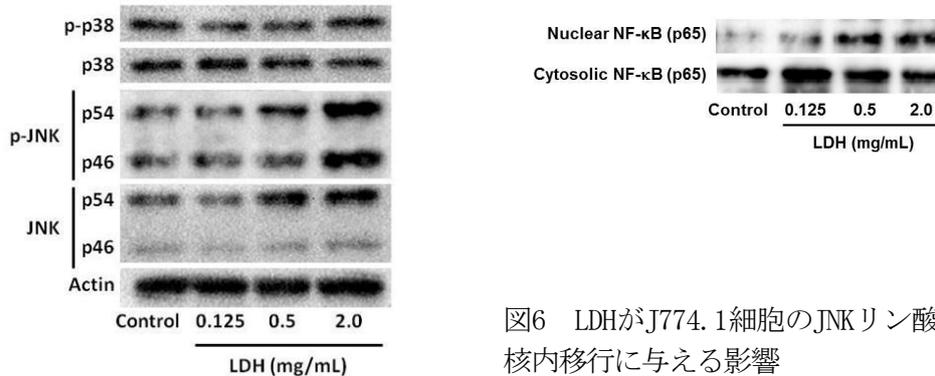


図6 LDHがJ774.1細胞のJNKリン酸化、NF- κ B核内移行に与える影響

3. 総括

ハマチ心臓やマグロ動脈球の魚類の内臓抽出液の免疫促進効果が確認された。これらの検証から、フィレ加工場で廃棄されるアラを免疫促進効果のある機能性素材として活用できることが期待される。未利用資源の有効利用や付加価値付与は地域産業の活性化のための重要な課題であり、今回の研究の結果は未利用資源の新たな活用法の創出につながると考えられる。