薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (5) 447-451 (1982)

Chlorella vulgaris の抗腫瘍性糖タンパク質に関する研究 (第 1 報¹⁾)

松枝 澄,* 市田淳治, 阿部 馨, 唐沢 肇, 新保国弘

弘前大学数養部

Studies on Anti-tumor Active Glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. I¹⁾

SUMU MATSUEDA,* JUNJI ICHITA, KAORU ABE,

HAJIME KARASAWA, and KUNIHIRO SHINPO

Department of General Education, Hirosaki University,

Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori, 036, Japan

(Received October 19, 1981)

A glycoprotein was extracted from *Chlorella vulgaris* BEYERINCK and purified by gel filtration on Sephadex G-150. Its molecular weight was 1.21×10^5 and the composition ratio of sugar and protein was 1:1 (w/w). The content of α -helical structure was determined as 18.9% by CD. It was found to have an antitumor activity against sarcoma 180 implanted in mice and also against mouse lymphemia L-1210/v/c in culture.

Keywords—*Chlorella vulgaris*; glycoprotein; antitumor activity; sarcoma 180; lymphemia L-1210/v/c

クロレラ藻体およびその抽出物の生薬としての報告は多数ある。²⁾ 著者らは *Chlorella vulgaris* BEYERINCK から生物活性を有するシステインおよびエルゴチオニンなどを単離報告した。³⁾ その熱水抽出液中には熱にかなり安定な糖タンパク質 (I) が含有され, I は *in vitro* で阻害剤で活性低下したヒト赤血球コリンエステラーゼ (true-ChE) および血清コリンエステラーゼ (pseudo-ChE) の酵素活性を賦活することを,⁴⁾ また, *in vivo* でもこれら酵素活性賦活に関与していることを報告した。⁵⁾ 本報では I がマウスに移植した sarcoma 180 に対して, 腹腔内投与によって高い抗腫瘍性を示したことおよび I の構造的知見について述べる。

実 験 の 部

糖タンパク質 (I) の単離法 既報^{4a)} のようにして単離した糖タンパク質をさらに次のように精製した。700 mg の糖タンパク質をセファデックス-G 150 カラム (3.2×87 cm) を用い, pH 7.17 に調製した 1/15 モルリン酸緩衝液で毎時 10 ml の流速でゲル透過した。各フラクションは 10 ml ずつ採取し, 得られた Fr. 21-26 (Fig. 1) はセロファン膜 (三光純薬製; 36/32 型) を用いて 2 日間透析したのち凍結乾燥した。収量 44.2 mg。

I のワットマンに SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による検定⁶⁾ ワットマン電気泳動はセルローズ酢酸紙を用い, 0.1 モルベロナール緩衝溶液 (pH 8.6) 中 5 mA/cm で 80 分泳動させた。陽極泳動標品として bovine albumin および ovalbumin を, また陰極泳動標品として bovine γ -globulin をそれぞれ使用した。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 0.5×15 cm のカラムを用い, 0.5 モルリン酸緩衝溶液中 8 mA/カラムで常法⁶⁾ に従って泳動した。BPB を tracking dye として使用し, その泳動距離 11 cm で停止し, タンパク質は coomassie brilliant blue R-250 で,⁷⁾ また糖は PAS で,⁸⁾ それぞれ染色し, 標品として ovalbumin を使用した。

I の抗腫瘍効果の検定 5 週令の dd 系雌マウス 1 群 10 匹とし第 1 群 (コントロール), sarcoma 180 を 1 匹当たり 10^6 cells ずつ腹腔に移植; 第 2 群, sarcoma 180 を 1 匹当たり 10^6 cells 腹腔に移植した日を day 0 とし, 24 時間後に I を 250 mg/kg 当り腹腔に投与して, day 1 から day 5 まで毎日 1 回, 連続 5 日投与; 第 3 群, sarcoma 180 を 1 匹当たり 10^6 cells 腹腔に移植後 1 週間経た後, I を 250 mg/kg 当り day 7 より day 11 まで毎日 1 回, 連続 5 日腹腔に投与; 第 4 群, あらかじめ I の 250 mg/kg 当りを毎日 1 回, 連続 5 日腹腔投与してから 1 週間飼育した後, sarcoma 180 を 1 匹当たり 10^6 cells 腹腔に移植; 第 5 群, 第 2 群に準じるが, I の投与量を 1 匹当たり毎回 10 mg/kg に減じ, その後おのおのの群は毎日, コントロール群および normal 群の平均体重増加と比較することによって腫瘍重量を検定し生存日数を測定した。また, 生理食塩水のみ腹腔に投与した群を

normal 群とした。I は飽和溶液をオートクレーブで常法に従って 115°C, 30 分間滅菌して使用した。

I の *in Vitro* における L-1210/v/c に対する増殖阻止率の測定 (A) 浮遊培養法による測定——マウスリンパ性白血病培養確立株 L-1210/v/c の接種細胞数を 5×10^4 cells/ml になるように培地に植え込んだ。なお、L-1210/v/c は国立癌センター、下山正徳が培養確立した株を東北大学抗酸菌研究所肺癌部門を経て分与を受けたものを使用した。培地は 10% 仔牛胎児血清 (製造会社, Flow Lab.) を含む RPMI 1640 (製造会社, GIBCO) に 100 μ g/ml のストレプトマイシンと 100 unit/ml のペニシリンとを添加して pH 7.0 に調製した。培養は 37°C, 72 時間常法による suspension culture 法で行った。⁹⁾ この培地中に I をおのおの 1, 10, 100 および 500 μ g/ml になるように添加した各群および無添加コントロール群 (増殖率, 100%) の培養後の細胞数を比較判定した。Viable cell はトリパンブルーに不染である。この測定をそれぞれ独立に 3 回繰返し、平均増殖阻止率を算出してグラフを作成し外挿法によって I の IC₅₀ 値を求めた。

(B) 軟寒天培養法による定量——常法 (soft agar cloning assay 法¹⁰⁾) に従って I の L-1210/v/c 増殖阻止能力の定量を行った。浮遊培養法と同様に調製した培地にさらに bactoagar (製造会社, Difco) を添加したものを 3 ml ずつ、径 6 cm のシャーレに注加し、これに L-1210/v/c 10^3 cells および I をそれぞれ 1000, 100, 10 および 1 μ g/ml になるように添加し炭酸ガス培養器内で 11 日間培養し、コロニー形成数を肉眼で検定し、コントロール群のコロニー数を 100 として比較算定しグラフを作成し、外挿法によって IC₅₀ 値を求めた。測定はそれぞれ独立に 3 回繰返し平均値をとった。I は計算量の RPMI 1640 培地に溶解し、ミリポアフィルター (0.45 μ) で濾過滅菌した。

ウサギに対する I の投与と免疫電気泳動法による検定 常法に従って固形飼料 (製造会社, オリエンタル) で本学医学部飼育室において準備した雌ウサギを使用した。投与試験前尿中の pH, ブドウ糖, およびタンパク質同時検査法 (製造会社, 三共) を繰返し実施して環境を調えた。I は 10 mg/ml になるよう生理食塩水に溶解してオートクレーブで常法に従い 115°C, 30 分間滅菌調製した溶液をそれぞれ次の量を耳静脈より投与した。すなわち, (A), 1 回につき 15 mg の I (5 mg/kg 相当) を 1 日おきに連続 6 回投与; (B), 100 mg の I (33 mg/kg 相当) を投与して無処置飼育した後, さらに 100 mg の I を投与。採血はいずれも最終感作の後 1 週間および 3 週間後の 2 回耳静脈より 2 ml ずつ採り、常法に従って免疫電気泳動用血清を調製した。最終感作の 5 週間後に各臓器の剖検を行った。電気泳動は微量免疫電気泳動装置 (製造会社, 常光産業) を使用し, 1% 寒天ベロナール緩衝溶液 (pH 8.4) を支持体ゲルとし 3 mA/cm の電流によって泳動させた。方法は Scheidegger 法¹¹⁾ に従った。泳動後, 抗ウサギ全血清 (製造会社, MBL) を使用し 4°C で 3 日間沈降反応を行った。その後支持体ゲル中の過剰の血清タンパクを生理食塩水で除去し, ゲルを 37°C, 48 時間乾燥フィルム化し, アミドブラック 10B で染色した。¹²⁾

I のその他の物性および組成分析法 糖成分は常法に従って塩酸で 100°C, 3 時間加水分解し, 薄相および薄紙クロマトグラフィーとセルロースカラムクロマトグラフィー法¹³⁾ によって分離し, オルシノール硫酸法¹⁴⁾ によって定量した。その他, 自動アミノ酸分析器 (製造会社, 日立 KLA-3B 型), 赤外線分光器 (製造会社, 日立 Model 260-10 型), レーザーラマン分光器 (製造会社, 日本電子 JRS-U1-VV 型), 分析用超遠心器 (製造会社, 日立 282 型吸収走査記録装置 282-0060 型), 旋光分散分光器 (製造会社, 日本分光 VV-5 型) をそれぞれ使用した。方法は文献¹⁸⁻²¹⁾ によった。

結 果 と 考 察

I の等電点は pH 8.6 を示し, ゲル濾過 (Fig. 1) や分析用超遠心器の沈降パターンおよび SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示す糖タンパクである。電気泳動における平均分子量 (計算値) 1.28×10^5 であり, この値は分析用超遠心器により 1.21×10^5 とさらに確かめられた。I は糖とタンパク質の構成比が 1:1 (w/w) であり, Table I にその構成単糖類の含有率を, また, Table II にその構成アミノ酸残基の含有率を示した。そのいずれも特に特徴ある組成として注目されるものはない。

I の sarcoma 180 に対する抗腫瘍性の検定¹⁵⁾ において各群の延命効果を Fig. 2 に示した。移植日 (day 0) の 24 時間後 (day 1) より day 5 まで毎日 1 回連続 5 日 I を 250 mg/kg 投与した第 2 群の average survival days は 26.3 ± 12.8 日で第 1 群 (コントロール) のそれ 17.2 ± 3.13 日に比して increase of life span (ILS) は 53.4%, 別に同じスキームで I を 10 mg/kg 投与した第 5 群の ILS は 68.7% をそれぞれ示した。移植後 7 日間無処置で飼育し, day 7 より day 11 まで毎日 1 回連続 5 日 I を 250 mg/kg 投与した第 3 群は 23.8 ± 11.5 日でその ILS は 38.8% を示した。天然物の抗腫瘍性の判定は $ILS(=T/C-100) \geq 30(\%)$ が有効とされている。¹⁶⁾ 第 2 群

TABLE I. Sugar Composition (%) of Polysaccharide Moieties of I

Monosaccharides	%
Glucose	25.5
Galactose	16.4
Mannose	17.6
Rhamnose	14.0
Fucose	—
Ribose	20.3
Xylose	6.2

TABLE II. Amino Acid Composition (%) of Protein Moieties of I

Amino acid	%	Amino acid	%
Lys	6.6	Ala	10.5
His	2.3	Val	7.5
Arg	4.2	Cys	trace
Asp	13.2	Met	0.1
Thr	6.2	Ile	4.2
Ser	6.0	Leu	8.4
Glu	12.6	Tyr	4.2
Pro	4.5	Phe	4.0
Gly	5.5

Fig. 1. Molecular Sieve Chromatography of I

Column: Sephadex G-150 (3.2 × 87 cm).
 Eluant: 1/15 mol phosphate buffer, 10 ml/h.
 —○—, protein as determined by a Lowry-Folin reagent.
 —●—, sugar as determined by a phenol sulphuric acid.

Fig. 2. Effect of I on Survival of dd Mice after Inoculation of Sarcoma 180

- , I (250 mg/kg) was injected to dd mice intraperitoneally once per day for consecutive 5 d after 1 d of inoculation of sarcoma 180.
- △—, I (250 mg/kg) was injected to dd mice by the same procedure as the above experiment after 7 d of inoculation of sarcoma 180.
- , I (250 mg/kg) was injected to dd mice by the same procedure as the above experiment before 7 d of inoculation of sarcoma 180.
- , control.

と第5群で投与量比が 25:1 であったが ILS にそれ程差は認められない。第3群は第1群の平均生存日数より腫瘍の増殖はかなり進行していると判断され、一般に増殖阻止率は低下若しくは無効を示すことが多いのにもかかわらず、¹⁷⁾ I の ILS は 38.8 と有効値を示した。第4群は I の免疫賦活的抗腫瘍効果の有無を予測する目的で行った。すなわち、移植日の 11 日前より毎日 1 回連続 5 日 I を投与してから後、投与終了後 1 週間そのまま飼育してより sarcoma 180 を移植した場合、average survival days は 19.9 ± 13.8 日で、その ILS は 16 であり予防効果は認められなかった。なお、この実験系においてコントロール群より早期死亡例があったが、これは原因が不明であり、何等かの事故によるものと考えられる。また、第2群中 2 匹、第3群中 2 匹および第5群中 1 匹は day 50 まで生存し、当日培養したが腫瘍は排除されており、腹水のギムザ染色による検定でも腫瘍細胞は認められなかった。

マウスリンパ性白血病培養確立株 L-1210/v/c の IC_{50} 値は浮遊培養法¹⁰⁾ によつては $40 \mu\text{g/ml}$ を示した。また、この増殖阻止率定量法 (soft agar cloning assay 法¹¹⁾ は 1 個の生細胞が 1 つのコロニーを形成することを利用した定量法であるが I は本法においても前法と同じ値を示した。

ウサギ耳静脈より I を大量 (100 mg) 投与し、10 日後さらに I を 100 mg 投与してもアナフィラキシー様所見は見られず、また、1 回当たり 5 mg ずつ隔日連続 6 回投与したのも両者ともに免疫学的電気泳動¹²⁾ において正常ウサギと区別される沈降線は認められなかった。これより I は抗原性が低く、すなわち、I-抗体の抗体価も低い。また、溶血、凝固反応ともに認められなかった。

I の結晶状における構造を赤外線分光分析器 (IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$, cm^{-1}) によつて検討した。1640, 1550 および 1260 に α -helix のアミド I, II および III バンドに帰属される吸収が、また、1660, 1530 および 1240 にはランダムコイル構造のそれがそれぞれ認められた。¹⁸⁾ タンパク質の標品として albumin および α -globulin を、また、糖質の標品としては α - および β -homoglycans に dextran および cellobiose を、 α - および β -heteroglycans に melibiose および lactose をそれぞれ使用して変角振動領域 ($1000-650 \text{ cm}^{-1}$) に認められる吸収は糖の振動に帰属しうることを確認した後、I の 870 に α -glycan の C_1 -位の equatorial の H の変角振動を、800 に pyranose 環の呼吸振動を、906 に β -glycan の C_1 -位の axial の H の変角振動を、910 と 920 にこれら pyranose 環の C-O-C に関する非対称変角振動を、999 に β -glycan の特性吸収をそれぞれ認めた。¹⁹⁾

I の溶液状における構造をアルゴンレーザーラマン分光分析器 ($\nu_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}(D_2\text{O})}$, cm^{-1}) によつて検討した。1670 領域にポリペプチド鎖の β -構造は認められなかった。1642 に α -helix のアミド I, 1309 (E_2 対称種); 1294 (E_1 対称種); 1275 (A 対称種) にそれぞれ α -helix のアミド III バンドを認め後者は重水による重水素交換によって消失したことから確認された。²⁰⁾ また、1663 にランダムコイル構造のアミド I, および 1257 には重水素交換で消失したランダムコイル構造のアミド III バンドに帰属する吸収があった。556 または 528 の 1 つの吸収と 379 とはそれぞれ対称種 A または E_1 の重なりとアミド IV バンドの変角モードを示し、350 は疎水性アミノ酸による α -helix 構造の比較的分子量の大きい環の呼吸振動をそれぞれ示していた。すなわち、I は結晶状でも溶液状でも α -helix 構造保持の構造をとっている。

Fig. 3. Circular Dichroism of I ($6 \times 10^{-5} \text{ mol}$) in H_2O

I の α -helix 含量の概算値を円二色 (CD, 水溶液, pH 7.0) によつて求めた。Fig. 3 に示した I の CD カーブは 200 nm に crossover point を示し、209 nm; $[\theta] - 9500$ および 222 nm; $[\theta] - 7590$ に double minimum を示した。 α -Helix 含量は約 18.9% であった。²¹⁾ Table II より主要な疎水性アミノ酸群はアミノ酸残基中のほぼ 35% に相当し、糖成分も考慮すれば 1 分子中のほぼ 20% に当る。 α -Helix 構造が主として疎水性アミノ酸で構成されているとすれば、この α -helix は分子鎖の 1 ないし数個所に局在すると考えられる。上述のように、I が *in vitro* で L-1210/v/c に対して強い殺細胞作用を示すことは興味ある。*In vivo* で抗腫瘍性を示す多糖類には直接 *in vitro* で殺細胞作用を示さないものもあるから、I の β -glycan 部が L-1210/v/c に有効とは速断し難く、I の作用機序は

α -helix が腫瘍細胞の脂質層に取り込まれることも考えられ今後の課題である。

謝辞 本研究全般に御指導賜った明治薬科大、柴田承二教授、器機分析を担当戴いた東北大学非水研小倉研究室、本学理学部片桐研究室の諸氏に感謝致します。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第18回東北支部大会で発表, 東北薬科大, 仙台, 1979年10月.
- 2) 高田英夫, “クロレラその本性と応用,” 阿字万字館, 奈良, 1977.
- 3) S. Matsueda, M. Nagaki, T. Tsukada, K. Shinpo, *Sci. Rep. Hirosaki Univ.*, **22**, 37 (1975).
- 4) a) S. Matsueda, M. Nagaki, Y. Masuchi, K. Shinpo, *Sci. Rep. Hirosaki Univ.*, **24**, 26 (1977); b) S. Matsueda, M. Nagaki, K. Shinpo, M. Sato, *ibid.*, **23**, 17 (1976).
- 5) 松枝 澄, 増地矢恵子, 村山 淳, 里見建裕, 生化学, **50**, 323 (1978).
- 6) 林 健志, 大場義樹, 蛋白核酸酵素, **17**, 304 (1972).
- 7) F. Fairbanks, T.L. Steck, D.F.H. Wallach, *Biochem.*, **10**, 2606 (1971).
- 8) R.M. Zacharis, T.F. Zell, J.H. Morrison, J.J. Woodlock, *Anal. Biochem.*, **30**, 148 (1969).
- 9) 下山正徳, 木村禧代二, 最新医学, **28**, 1024 (1973).
- 10) 下山正徳, 最新医学, **28**, 850 (1973).
- 11) J.J. Scheidegger, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **7**, 103 (1955).
- 12) J. Clausen 著, 佐々木実, 村地 孝共訳, “免疫化学的同定法,” 東京化学同人, 東京, 1973, p.120.
- 13) 日本生化学会編, “生化学実験講座 4,” 山科郁男, 山川民夫, 鈴木 旺編集, 糖質の化学 (下), 東京化学同人, 東京, 1976, p.285, 300.
- 14) C. Francois, R.D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.*, **83**, 335 (1962).
- 15) C.C. Stock, *Adv. Cancer. Resear.*, **II**, 426, (1954).
- 16) 桜井欽夫, 塚越 茂, 田代田鶴子, 癌と化学療法, **7** (Sup. II), 6 (1980).
- 17) 吉田富三, “癌の化学療法,” 医歯薬出版, 東京, 1957, p.23.
- 18) 渡辺 格, 島内武彦, 京極好正, “生物物理化学入門 II,” 培風館, 東京, 1979, p.102.
- 19) 日本生化学会編, “生化学実験講座 4,” 山科郁男, 山川民夫, 鈴木 旺編集, 糖質の化学 (下), 東京化学同人, 東京, 1976, p.413.
- 20) B.G. Frushour, J.L. Koenig, *Biopolymers*, **13**, 455 (1974).
- 21) 爪谷郁三, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編集, 浜口浩三, 武貞啓子著, “生物化学実験法 4, 蛋白質の旋光性—ORD と CD—,” 東京大学出版会, 東京, 1971, p.63.