

(1) 研究テーマ ラッキョウ抽出物の細胞培養因子への適用

(2) 研究代表者及び分担者（職・氏名）

代表者 工学研究科 生物応用化学専攻 ・ 准教授 ・ 寺田 聡

分担者 福井県 食品加工研究所 ・ 主任研究員 ・ 小林 恭一

(3) 研究成果の概要

【緒言】 タンパク質医薬品など、高純度でかつ高品質な生理活性因子を生産するために、動物細胞培養が行われており、培養系には増殖因子として哺乳動物由来因子が添加されている。また、有用細胞を凍結保存する際にも、凍結液に細胞保護材として動物由来因子が加えられている。そしてこのような因子として、特にウシ胎仔血清（FBS）が有効であり、汎用されている。しかしながら人畜共通感染症が懸念されるため、医薬品生産・再生医療目的での培養では哺乳動物因子の代替が強く望まれている。そこで我々は、植物であるラッキョウに由来するフルクタンを動物細胞培養に対して有効な添加因子とすべく検討した。

フルクタンはフルクトースをモノマーとする多糖であり、 β -2,6 結合のレバンと β -2,1 結合のイヌリンに分類される。われわれが利用したラッキョウフルクタンは、レバン型とイヌリン型がほぼ 3 : 1 の割合で混じった独特の組成に特徴がある。

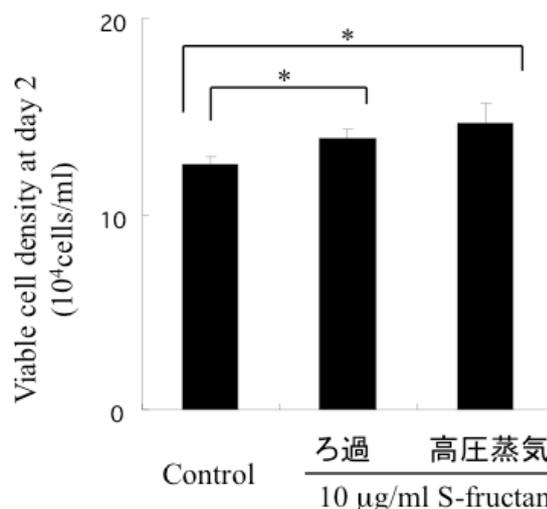
前年度はラッキョウフルクタンがさまざまな細胞株の増殖を促進できることを報告した。これを踏まえ、今年度はフルクタンの精製・分画により、いっそう効果的なラッキョウフルクタンの調製を第一の課題とした。さらに、フルクタンは「多糖」であるため熱に強いことが期待された。そこで高圧蒸気滅菌（120℃、2 atm、20 分）処理を行い、細胞増殖促進活性に影響しないか検討した。

【方法】 現在用いているラッキョウフルクタン標品に含まれる不純物となるタンパク質・核酸を、それぞれ、色素法と吸光度法にて定量した。続いて、エタノールに対する溶解度の差を利用して分画し、それぞれの画分での増殖促進活性を検討した。

【結果】 細胞増殖促進活性が確かにラッキョウフルクタンに由来することをまずはじめに検討した。すなわち、現在用いているラッキョウフルクタン標品（分子量分布：6 k Da～100 k Da）に含まれる不純物となるタンパク質・核酸を定量し、その可能性を検討した。その結果、ラッキョウフルクタン標品 1 g あたりタンパク質はおよそ 560 μ g 含まれており、核酸は 3 μ g であった。とくにタンパク質は微量でも細胞増殖促進活性を示すものがあり、本当に活性がラッキョウフルクタンに由来することを確かめるために、120℃に加熱処理（この処理により、タンパク質は活性を消失する）して細胞増殖促進

活性を検討したところ、右図のように活性が残存していた。すなわち、細胞増殖促進活性はラッキョウフルクタンに由来すると考えられる。

続いて、エタノール水溶液に対する溶解度の差を利用して3つの画分に分け、それぞれの活性を比較検討し、最良の画分を探索した。



【展望】

エタノール抽出法により、ある程度フルクタンが分画され、有効性が見出せた。一層の改善を目指し、液体クロマトグラフィー法などを用いてラッキョウフルクタン標品の分画をすすめ、さらに有効な画分を同定する。これにより細胞培養へ実用し、あわせて市販できる細胞凍結液を開発する。

(4) 配分額及び経費の支出額内訳 配分額 円
内訳 円、 円

(5) その他特記事項

※ 研究費の申請 JST シーズ発掘試験研究申請申請

「ラッキョウ由来多糖を用いた、安全性の高い細胞保存液の開発」 (円)

【原著論文】 1 件

・ Fructan as a novel effective factor for mammalian cell culture. Cell Technology for Cell Products, *in press*.

【国際学会発表】 2 件

- ・ Rakkyo graminan as a novel mitogenic factor for mammalian cell culture. 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, Faro, Portuguese, September 2008
- ・ Fructan as a novel effective factor for mammalian cell culture. 20th Meeting of European Society for Animal Cell Technology, Dresden, Germany, June 2007

【国内学会発表】 3 件

- ・ 日本農芸化学会 2008年3月名古屋 ラッキョウフルクタンを用いた動物細胞培養
- ・ 日本生物工学会年会 2007年9月広島 植物に由来する、動物細胞培養の新規添加因子フルクタン
- ・ 日本動物細胞工学会年会 2007年7月高崎 植物由来多糖を用いた細胞培養技術