

オイスターエキス中の核酸関連物質の血小板凝集能に与える影響

野村 潤一郎¹⁾・太田 隆 男¹⁾・中塚 正 博¹⁾・柴田 幸 雄¹⁾

朝賀 昌 志²⁾・毛利 威 徳²⁾・白石 節 子³⁾・古武 彌 三⁴⁾

(¹⁾愛知医科大学学生化学教室*, ²⁾東洋食品工業短期大学**, ³⁾藍野学院短期大学***, ⁴⁾元神戸学院大学****)

Platelet Aggregation Control Effect of Nucleic Related Substances in Oyster Extract

Jun-ichiro NOMURA¹⁾, Takao OHTA¹⁾, Masahiro NAKATSUKA¹⁾, Yukio SHIBATA¹⁾

Masashi ASAKA²⁾, Takenori MOURI²⁾, Setsuko SHIRAISHI³⁾ and Yazo KOTAKE⁴⁾

¹⁾Department of Biochemistry, Aichi Medical University

²⁾Toyo Junior College, ³⁾Aino Gakuin Junior College

⁴⁾Formerly Kobe Gakuin University

Ohta et al. have already reported that the low molecular fraction (L.M.F.) of the oyster extract possessed inhibitory effects on platelet aggregation. Some fractions of L.M.F. indicating such strong effects included nucleic substances, i.e. 5'-AMP, Inosine and cyclicAMP. In this study, we investigated and focused on the type and amount of the nucleic related substances in O.E. and their corresponding biological effects. The O.E. was abundant in 5'-AMP, 5'-IMP, Inosine, 5'-GMP, Adenosine and Guanosine. The inhibiting effects on the platelet aggregation of 5'-AMP, Adenosine and Inosine were confirmed. From the results it was suggested that at least the structure of the purine base plus ribose was needed to exhibit such effect.

太田らはマガキ (*Crassostrea gigas*) のさまざまな成分について、その生理活性研究を実施してきた。その中で不飽和脂質の他にオイスターの熱水抽出画分について血小板凝集抑制効果があることを明らかにし、さらにその抽出液の低分子画分を細分画すると、特に活性の強い画分には多くの5'-AMP、イノシンとわずかのCyclic-AMPが含まれていることを報告した¹⁾。サイクリックヌクレオチドの血小板凝集抑制機構については詳細に研究されているが²⁾、他の核酸関連物質についての報告は少ない。一方、

*所在地：愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 (〒480-11)

**所在地：兵庫県川西市南花屋敷4-23-2 (〒666)

***所在地：大阪府茨木市東太田4丁目5-4 (〒567)

****自 宅：大阪市淀川区三国本町3-33-6 (〒532)

早川らはシイタケの水抽出液のGMPがトロンピン惹起血小板凝集に対して抑制効果があることを報告している³⁾。また毛利らはキノコ類やトマトやイカの足の熱水抽出エキスの核酸画分のうち5'-AMP画分に強い抑制効果があることを報告している⁴⁾。今回はオイスター熱水抽出エキス中の核酸成分について、核酸標品と比較しながらその血小板凝集抑制効果を検討した。

実験材料および方法

1) 試料

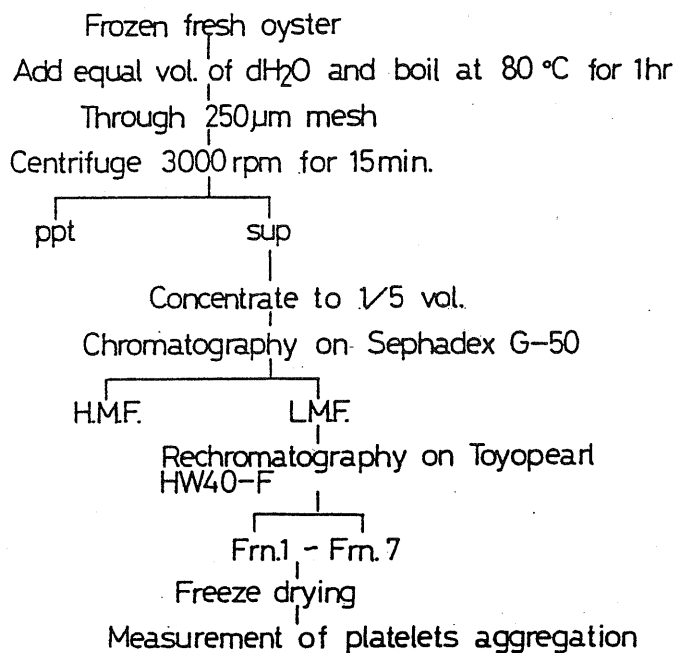
試料のマガキは広島産（昭和62年5月）の養殖ガキを脱殻後、すぐ凍結したものを使用した。

2) 抽出および分画

オイスターエキスの抽出および分画の方法はScheme 1に示した。今回は、Sephadex G-50で分画した小分子画分(L.M.F.)をToyopearl HW-40F (gel bedsize $\phi 2.2 \times 80\text{cm}$)にて再分画し、それを凍結乾燥したものを血小板凝集抑制試験のサンプルとした。核酸関連物質の抽出は、毛利らに準じて行った⁵⁾。概要はScheme 2に示した。

3) 核酸関連物質の測定および分画

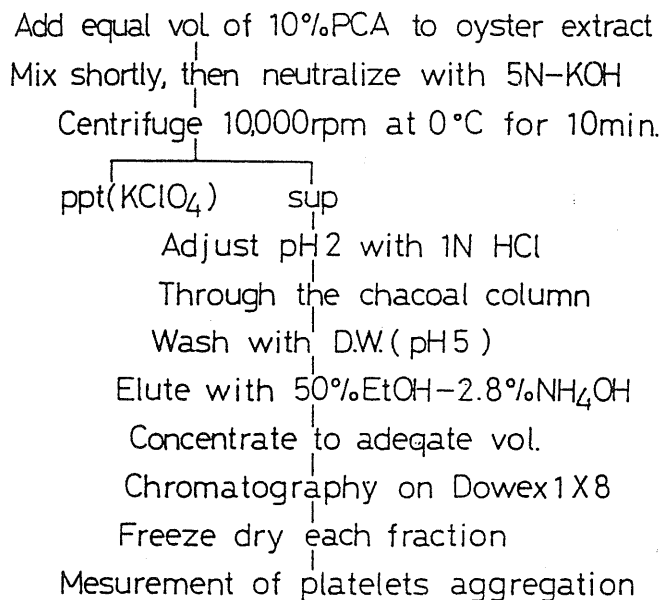
核酸関連物質の測定は島津高速液体クロマトグラムシステム(LC-3A, LC-6A type)を使用し、カラムはWAX-1 ($\phi 4\text{mm} \times 5\text{cm}$), Shode \times OH pack B-804 ($\phi 8\text{mm} \times 50\text{cm}$)を用いた。オイスターエキス中の核酸成分の分画には、ギ酸型にかえたDowex 1 \times 8陰イオン交換樹脂(200~400mesh)を用い溶離液はギ酸-ギ酸ナトリウム系を使用した⁵⁾。



Scheme 1. Scheme for the fractionation of oyster extract.

4) 血小板凝集測定法

太田らの方法に準じて実施した。血小板は食事前の空腹状態にある健常な男性の全血から調製し惹起物質は $3\mu\text{l}$ ADP (アグリパック, 京都第一科学) を用いた。なお核酸標品15種類 (和光純薬) は一定量を蒸留水または少量の0.01M HCl に溶解し蒸留水でメスアップした後, 吸光度を測定し再度濃度を確認し用いた。また測定の際, コントロールは生理食塩水を用い, 供試サンプルの pH と合うよう調整した。



Scheme 2. Method for extraction of nucleic related substances in oyster extract.

Table 1. Nucleic related substances composition in oyster extract

Nucleic acids	Content $\mu\text{g/ml}$	Nucleic acids	Content $\mu\text{g/ml}$
ATP	3.30	5'-UPM	71.80
ADP	36.40	Urd	83.15
UDP	18.45	Ino	373.25
5'-GMP	189.10	Adn	152.45
5'-IMP	559.15	Guo	116.75
5'-AMP	727.95	Hyp	61.40
5'-CMP	43.90	Ura	47.75

(Abbreviations) Urd: Uridine, Ino: Inosine, Adn: Adenosine, Guo: Guanosine, Hyp: Hypoxanthine, Ura: Uracil.

結果および考察

Table 1 に HPLC で測定したオイスターエキス中の核酸含量を示した。5'-AMP, 5'-IMP イノシンがとくに多く、5'-GMP, アデノシン, グアノシンが次に多く含まれていた。ATP, ADP, UDP はそれに比較すると少量であり、これは煮出し操作の際に分解されるためであると思われた。Fig. 1 にオイスター

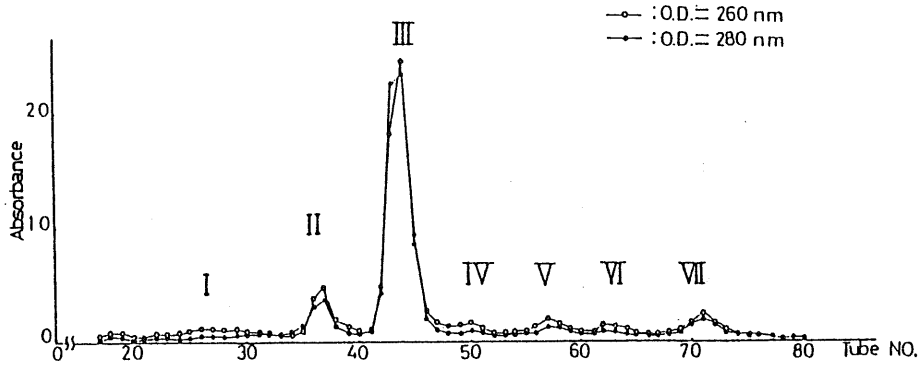


Fig. 1. Gel chromatography of low molecular fraction in the oyster extract on Toyopearl HW40-F.

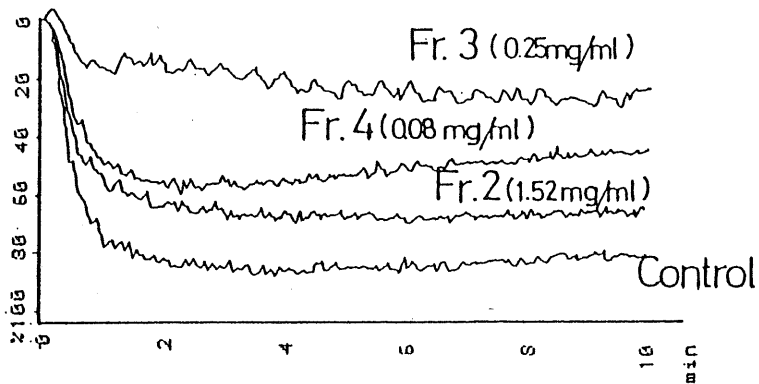


Fig. 2. Platelet aggregation control effect of the fraction 2, 3, 4 (Toyopearl HW40-F).

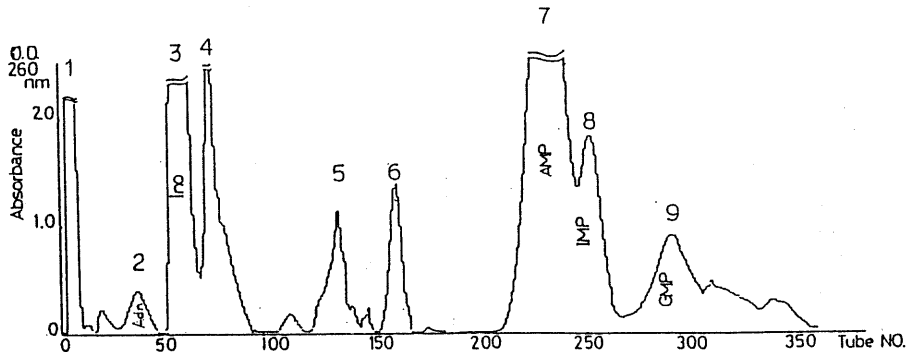


Fig. 3. Dowex 1 x 8 ion exchange chromatography of the nucleic related substances in the oyster extract.

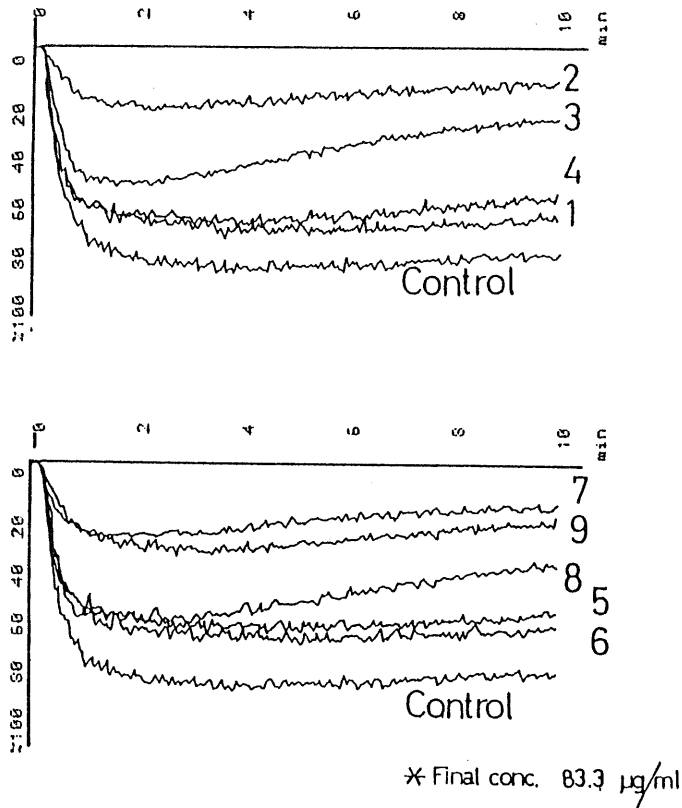


Fig.4. Platelet aggregation control effect of the every fraction (Dowex 1 × 8).

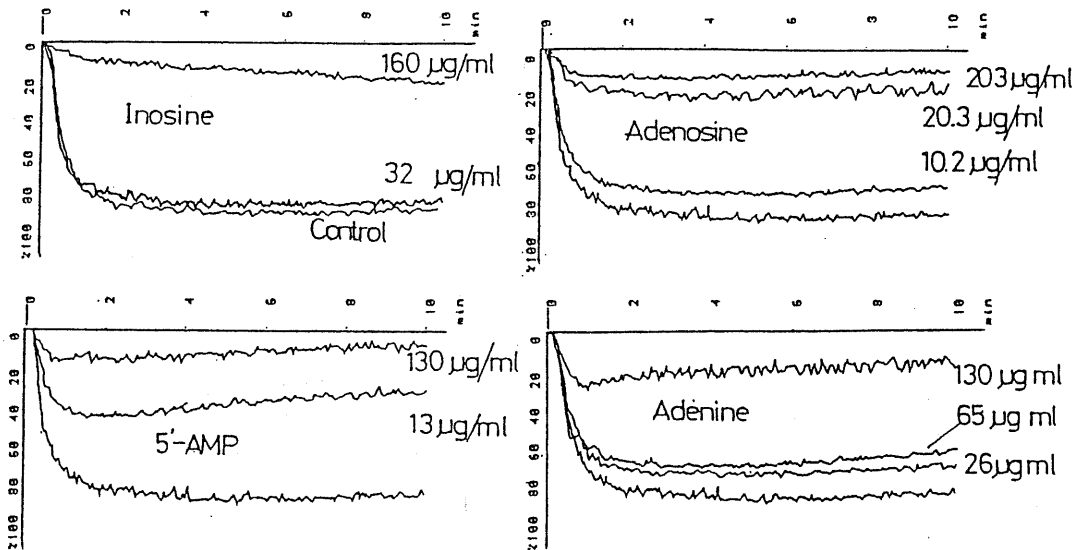


Fig.5. Platelet aggregation control effect of authentic nucleic acids.

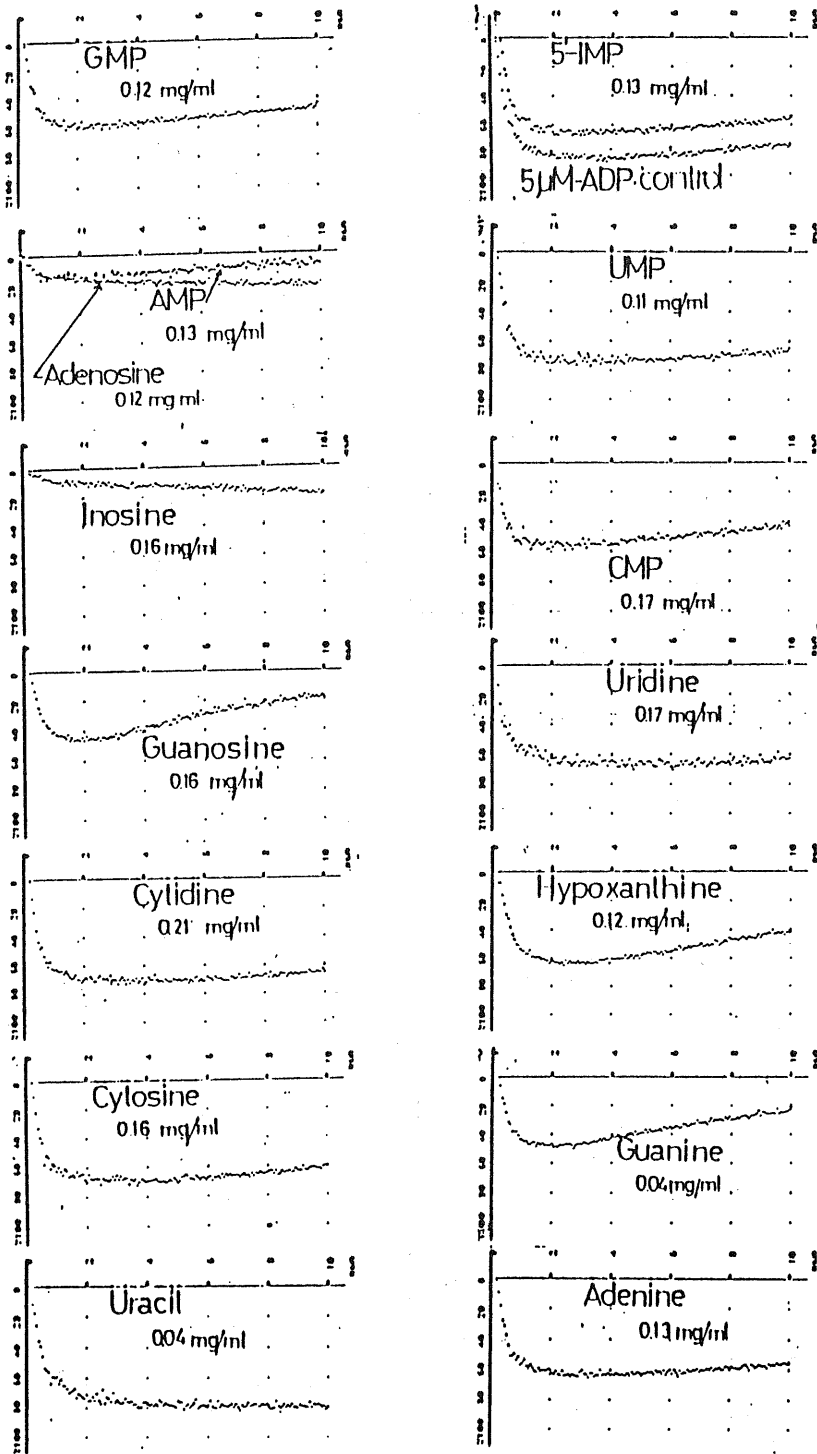


Fig.6. Platelet aggregation control effect of authentic nucleic acids.

エキスの小分子画分 (L.M.F.) を Toyopearl HW-40F により再度分画した結果を示した。1~7ピークにわかれ、この各分画には TLC および HPLC で確認すると Fr.2には5'-AMP と少しのアデノシン、Fr.4にイノシン、Fr.6にヒポキサンチン、Fr.7にアデニンが含まれていた。Fr.3にはアデノシンと多量のホマリンが含まれていたが、c-AMP の存在は確認できなかった。Fr.2, 3, 4に血小板凝集抑制効果がみられた (Fig. 2)。オイスターエキス中の核酸成分の分画の結果は Fig. 3 に示した。同定された分画について ADP 凝集に対する抑制効果をみたところ、AMP, アデノシン, イノシン, GMP にその効果が認められた (Fig. 4)。核酸標品 (AMP, アデノシン, イノシン, アデニン) のコントロールの最大凝集に対する50%抑制濃度をこの表をもとに計算で求めると、AMP $14 \mu\text{g/ml}$, アデノシン $17 \mu\text{g/ml}$, イノシン $57 \mu\text{g/ml}$, アデニン $70 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 5)。他の核酸標品15種類についても抑制効果をみたところ、グアノシン, グアニン, 5'-GMP にも効果が認められた (Fig. 6)。早川らはシイタケ水抽出エキスと血小板凝集に関する研究から、トロンピンによる抑制作用の出現にはグアノシンとリン酸基1個の存在が必要であり、トロンピンに結合して不活化するかあるいはトロンピン受容体を抑制すると推察されたと報告している³⁾。ADP 凝集はこれが血小板膜上の受容体へ結合することにより生じるとされている。そのためには2価の陽イオンを必要とし、 θ -クロロアデノシンなどにより阻害され⁶⁾、またアデニンヌクレオチドの affinity analogue である FSBA (5'-p-フルオロスルホニルベンゾイルアデノシン) も ADP による凝集を阻害すると報告されている⁷⁾。本実験においてはオイスターエキス中の核酸成分と核酸標品の凝集抑制作用を比較した結果、プリン骨核よりピリミジン骨核をもつものとともに5'-AMP, アデノシンに強い抑制作用がみられたことから、ADP 凝集に対する抑制の発現にはプリン骨核+リボースの形態が必要であると推察された。

文 献

1. WOLFE, S. M. and N. R. SHULMAN (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35 : pp.265-272
2. 太田隆男, 大久保雅啓, 奥村重雄, 毛利威徳, 秋山弘, 服部雅康 (1985) 微量栄養素研究第2集 : pp.169-180
3. 早川道彦, 葛谷文男 (1985) 日本老年医学会誌22巻2号 : pp.151-158
4. 毛利威徳, 今倉京子, 太田隆男, 大久保雅啓, 網島勇, 田中達郎, 奥村重雄 (1986) 微量栄養素研究第3集 : pp.49-59
5. 毛利威徳, 平井厚子, 川崎陽子, 宮本陽子, 橋田度 (1974) 日本食品工業学会誌 21 : 367
6. NICHMAN, R. L. et al. (1974) *J. Biol. Chem.* 249 : 704
7. FIGURES, W. R. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 7789