

SOS 応答生理機能によるヒトの遺伝子を守るタマゴ食品

千葉大学大学院医学研究院環境影響生化学・教授 鈴木 信夫

■ 緒言

ヒトにおいて、変異の発生を抑制する生理機能(SOS 応答)が存在することを申請者は発見している^{1,2)}。そこで、食用鳥卵の新機能を見出すことを目的として、遺伝子の突然変異発生を抑制するヒト SOS 応答生理機能への活性化作用を検証した。

■ 実験方法

1. 実験材料

鶏卵とウズラ卵は、株式会社栗駒ファームより購入した。卵白タンパク質であるオボアルブミン(catalog No. A5376)、コンアルブミン(オボトランスフェリン)(catalog No. C7786)、シスタチン(catalog No. C0408)および卵黄レシチン(L- α -Phosphatidylcholine, catalog No. 61755)は、Sigma-Aldrich 社より購入した。ヒト培養細胞は、ヒト胎児由来線維芽細胞から樹立された Rsa 細胞株³⁾を使用した。基本最小培地(MEM)は日水製薬より、仔牛血清(CS)は Invitrogen 社より購入し、その他の化学試薬類は、既報⁴⁾に準じて購入した。

2. 細胞に添加する卵試料の調製

卵白水溶液は、0.7g/100ml 純水の割合で NaCl を少しずつ加え、卵白成分を可溶化した。卵黄けん濁液は、卵白と分離した卵黄を 5 倍容のリン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS、10mM リン酸ナトリウム、137mM NaCl、2.7mM KCl、pH7.4)を加えけん濁した。オボアルブミンは、純水に 50mg/ml の濃度になるよう溶かし、コンアルブミンとシスタチンは、血清を含まない MEM 培地に溶かした。卵黄レシチンは、ジメチルスルフォキシド(DMSO)中に 10mg/ml の濃度になるように溶解した。卵油は、卵黄をフライパン中で加熱して生じたものを DMSO 中に 10mg/ml の濃度になるよう混合した。

3. 細胞培養と卵および紫外線(UVC)処理

Rsa 細胞は、5% (v/v) の仔牛血清(CS)を含む MEM 培地中で、95% 空気/5% 炭酸ガス、37°C の条件下で培養、継代を行った。また、細胞の卵成分試料処理は、MTT アッセイを除いて、直径 60mm のシャーレに 5×10^5 個の細胞を撒き、24 時間培養した。翌日、卵成分試料をシャーレに添加し、さらに 24 時間培養した。細胞の紫外線(UVC)処理は既報⁵⁾に従い行った。

4. 細胞毒性テスト

96 穴培養プレートを用い、1 穴中に 5×10^3 個の Rsa 細胞を、卵試料成分と 5% CS を含む MEM 培地 100 μ l 中で 48 時間培養した。培養後、既報⁴⁾に従い、MTT 法にて細胞毒性を卵成分の未処理の細胞と比較した。

5. ドットプロット解析による遺伝子変異の検出

UVC 処理後、または Mock 処理後、既報⁶⁾の方法に従って、細胞より DNA を抽出し、K-ras 遺伝子のコドン 12 近傍を PCR 増幅し、ドットプロットハイブリダイゼーション法を用いて K-ras コドン 12 変異型遺伝子を検出した。

6. ウワバイン耐性を指標とした形質変異頻度の測定

UVC 処理、または Mock 処理後、既報⁶⁾に従い、次式のように変異コロニー出現頻度を求めた。

$$\text{変異コロニー出現頻度} = (\text{ウワバイン耐性コロニー数}) / [100 \times (\text{形成率判定用コロニー数})]$$

7. ウエスタンブロッティング解析

既報⁵⁾に従い、目的タンパク質の細胞内含有量について、ウエスタンブロッティング解析法にて測

定した。

8. アネキシン II の細胞内代謝の解析

既報⁵⁾に従い、PCR 増幅したアネキシン II cDNA を、RSa 細胞に導入し、48 時間後、細胞内に発現した Halo-アネキシン II を蛍光色素 (HaloTag TMR) で共有結合標識した。UVC 照射後の標識 Halo-アネキシン量は、蛍光標識 Halo-アネキシン II バンドの蛍光強度をクマシーブルー染色によるゲル内総タンパク質量で補正し、UVC 照射直後を 100% とした相対蛍光強度で表した。

9. データの処理

結果は、3 回の独立した実験データの平均値 +/- 標準偏差で表した。

■ 結果

1. 卵成分の細胞増殖に及ぼす影響

卵白水溶液、卵黄けん濁液を培地に添加したところ、10mg タンパク質/ml まで、細胞増殖に影響を及ぼさなかった(データ省略)。オボアルブミンは、5.0mg/ml まで増殖に影響を及ぼさなかった(図 1)。コンアルブミンは、50% 増殖阻害濃度 (ID₅₀) が 2.0mg/ml であった(図 1)。シスタチンは、100 μ g/ml まで増殖に影響を及ぼさなかった(データ省略)。卵黄レシチンは、ID₅₀ が 59 μ g/ml であった。卵油は 5 μ g/ml まで細胞毒性を示さなかった(データ省略)。

2. 卵成分添加による紫外線誘発遺伝子変異への影響

(1) ドットプロットテストによる解析

このアッセイでは、変異があるとドットの発色が濃くなる(図 2)。コンアルブミン (1-2mg/ml) 処理細胞では、紫外線誘発変異が未処理細胞と比べ抑制されていた(図 2)。シスタチン (5 μ g/ml)、および卵油 (5 μ g/ml) 処理細胞でも同様に、紫外線誘発変異が抑制された(データ省略)。一方、卵白 (10mg タンパク質/ml)、卵黄 (5mg タンパク質/ml)、オボアルブミン (0.5-5mg/ml)、レシチン (0.2 μ g/ml) では、紫外線誘発変異は、無添加サンプルと同等であった。

(2) ウワバイン耐性テストによる解析

コンアルブミン (1-2mg/ml)、シスタチン (5 μ g/ml) 処理では、変異誘発頻度が低下した。図 3 には、コンアルブミンの例を示してある。一方、オボアルブミン (0.5-5mg/ml)、卵黄 (5mg タンパク質/ml) および卵黄レシチン (0.2 μ g/ml) 処理では、逆に変異誘発頻度が若干上昇した(データ省略)。

3. 卵成分添加によるシャペロンタンパク質発現変化の解析

卵成分 24 時間処理では、卵黄処理により、GRP94 および GRP78 タンパク質の量が処理濃度依存的かつ顕著に減少した(図 4A)。また、卵白タンパク質であるオボアルブミンおよびコンアルブミン処理により HSP27 タンパク質の量が処理濃度依存的かつ顕著に減少した(図 4B)。その他のシャペロンタンパク質は、多少変動する傾向が見られたが、その変動の幅は小さかった。

4. シスタチン投与による、アネキシン II の細胞内代謝への影響

紫外線照射後、蛍光標識 Halo-アネキシン II 量が減少したが、シスタチンを紫外線照射前 24 時間処理しておく、減少は観察されなかった(図 5)。

■ 考察

今回の試験では、鶏卵の粗抽出物と卵白タンパク質、卵黄脂質について、RSa 細胞における紫外線照射による変異誘導に及ぼす影響を調査した。粗抽出物では、変異誘導の抑制も促進も観察されなかった。うずら卵でも特異な影響は見られなかった。

ところが、卵白タンパク質において、コンアルブミンおよびシスタチンが変異誘導を抑制することが見出された(表 1)。卵黄脂質については、ドットプロットテストで卵油が変異誘導を抑える傾向が観察されたがウワバインテストでは差が見られなかった(表 1)。

コンアルブミンは、オボトランスフェリンとも呼ばれ、細胞の鉄代謝やトランスフェリン受容体を介した情報伝達に影響を及ぼすことが考えられる。研究者らは以前に、細胞表面のトランスフェリン受容体数が紫外線致死抵抗性に関与することを報告している⁷⁾。従って、オボトランスフェリンの添

加は、RSa 細胞の鉄代謝変化またはトランスフェリン受容体の情報伝達経路を活性化して変異誘発を抑制した可能性が考えられる。

システインプロテアーゼ阻害剤であるシスタチン前処理により、紫外線照射後のアネキシン II 分解が抑えられた(図 5)。著者らは、紫外線照射後のアネキシン II 量減少を抑制すると細胞が紫外線致死抵抗化することを見出しており⁵⁾、これが変異抑制に関わる可能性はあると考えている。

■ 要 約

卵白タンパク質において、コンアルブミンおよびシスタチンが変異誘導を抑制することが見出された。シャペロン結合タンパク質の安定化という複合作用が、変異抑制効果に結びついた可能性があり、その抑制メカニズムの解明が今後の課題である。

■ 参考文献

1. 鈴木信夫(分担)(1999)NHK スペシャル驚異の小宇宙・人体 III 遺伝子 DNA ② つきとめよ、ガン発生の謎。NHK 出版, 98-100.
2. 鈴木信夫(2005)放射線による遺伝子変異の誘導を抑制するヒトの新規生理機構。原案協だより, 203, 12-15.
3. 鈴木信夫, 喜多和子, 菅谷茂, 鈴木敏和, 一村義信(2005) 基本研究所の展開—突然変異のアンチテーゼから進化医学の創造へ(ストレス状態によるヒト遺伝子構造の変動調節機能の発見)。千葉医学, 81, 223.
4. Dong M, Chen SP, Kita K, Ichimura Y, Guo WZ, Lu S, Sugaya S, Hiwasa T, Takiguchi M, Mori N, Kashima A, Morimura K, Hirota M, Suzuki N, Chen Z, Nomura J, Suzuki T, Suzuki N.(2009) Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from Sarcodon scabrosus in HeLa cells. Int. J. Oncol., 34, 201-207.
5. Jin Y-H, Kita K, Sun Z, Tong X-B, Nie H, Suzuki N.(2009) The roles of HSP27 and annexin II in resistance to UVC-induced cell death-comparative studies between the human UVC-sensitive and -resistant cell lines, RSa and AP^r-1. Biosci. Biotech. Biochem., 73, 1318-1322.
6. Hirano J, Kita K, Sugaya S, Ichimura Y, Yamamori H, Nakajima N, Suzuki N.(2008) Down-regulation of molecular chaperone 78-kd glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein expression involved in enhancement of human RS cell mutability. Pancreas, 36, e7-14.
7. Chen Z, Nomura J, Suzuki T, Suzuki N.(2005) Enhanced expression of transferrin receptor confers UV-resistance in human and monkey cells. J. Radiat. Res., 46, 443-451.

表 1 RSa 細胞の紫外線誘発変異に及ぼす卵成分の抑制効果の有無

成分	紫外線誘発変異抑制効果		
	ドットプロットテスト	ウワバイン耐性テスト	
粗抽出物	卵白	なし	なし
	卵黄	なし	なし
卵白	オボアルブミン	なし	なし
	コンアルブミン	あり	あり
	シスタチン	あり	あり
卵黄	レシチン	なし	なし
	卵油	あり	なし

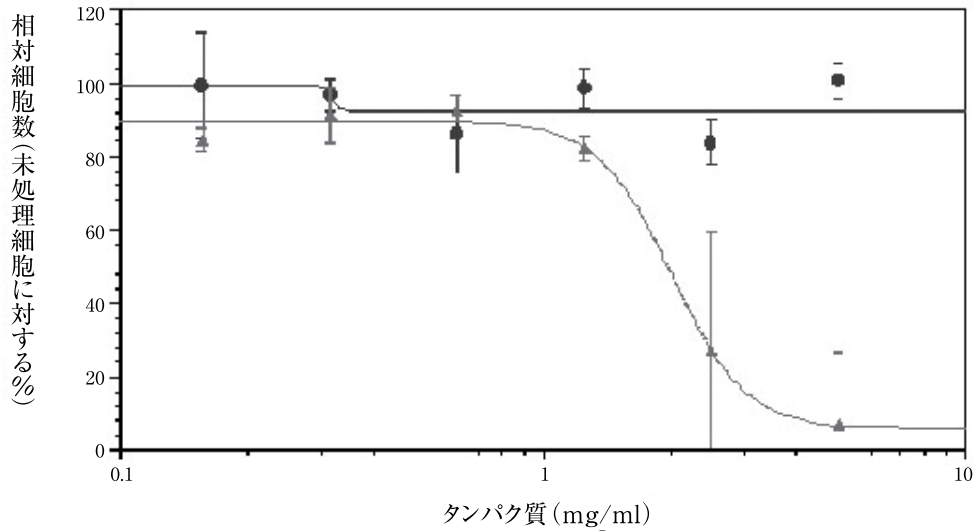
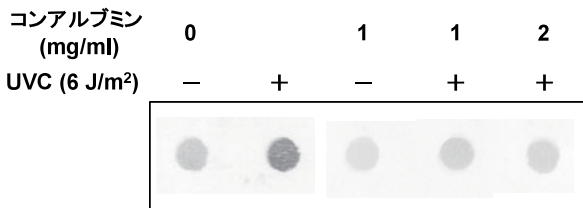


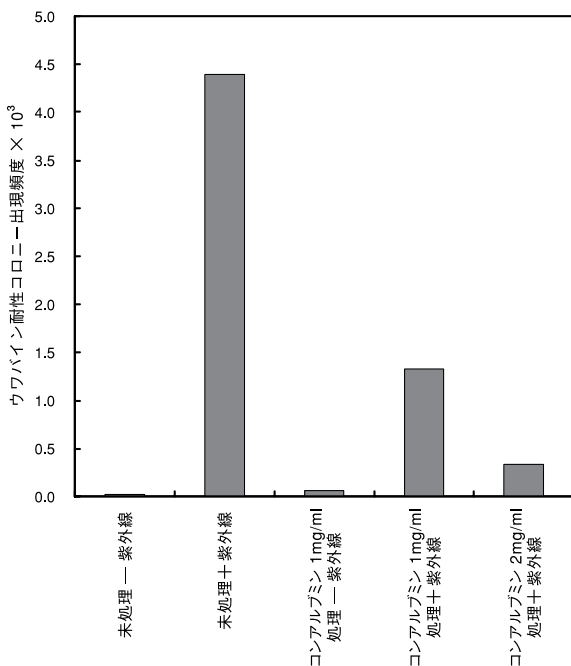
図1 オボアルブミンおよびコンアルブミン投与による R5a 細胞の増殖への影響

0.19 ~ 5.0mg のタンパク質存在下、または非存在下で R5a 細胞を 48 時間培養し、ウエルあたりの相対細胞数をクリスタルバイオレット染色法により求めた。●：オボアルブミン、▲：コンアルブミン。



R5a 細胞をコンアルブミン存在下で 24 時間培養後、6 J/m² の紫外線(UVC)照射を行った。照射後 48 時間目に細胞より DNA を回収し、コドン 12 変異の K-ras 遺伝子を認識するオリゴヌクレオチドプローブを用いてドットプロット解析を行った。

図2 コンアルブミン処理による紫外線誘発 K-ras 遺伝子コドン 12 変異の抑制



R5a 細胞をコンアルブミン存在下で 24 時間培養後、紫外線(UVC)照射を行った。照射後 48 時間目に細胞を新しいシャーレへ撒きなおし、ウバインを添加した培地中で 3 週間培養した。

図3 コンアルブミンの紫外線誘発ウバイン耐性コロニー出現頻度抑制効果

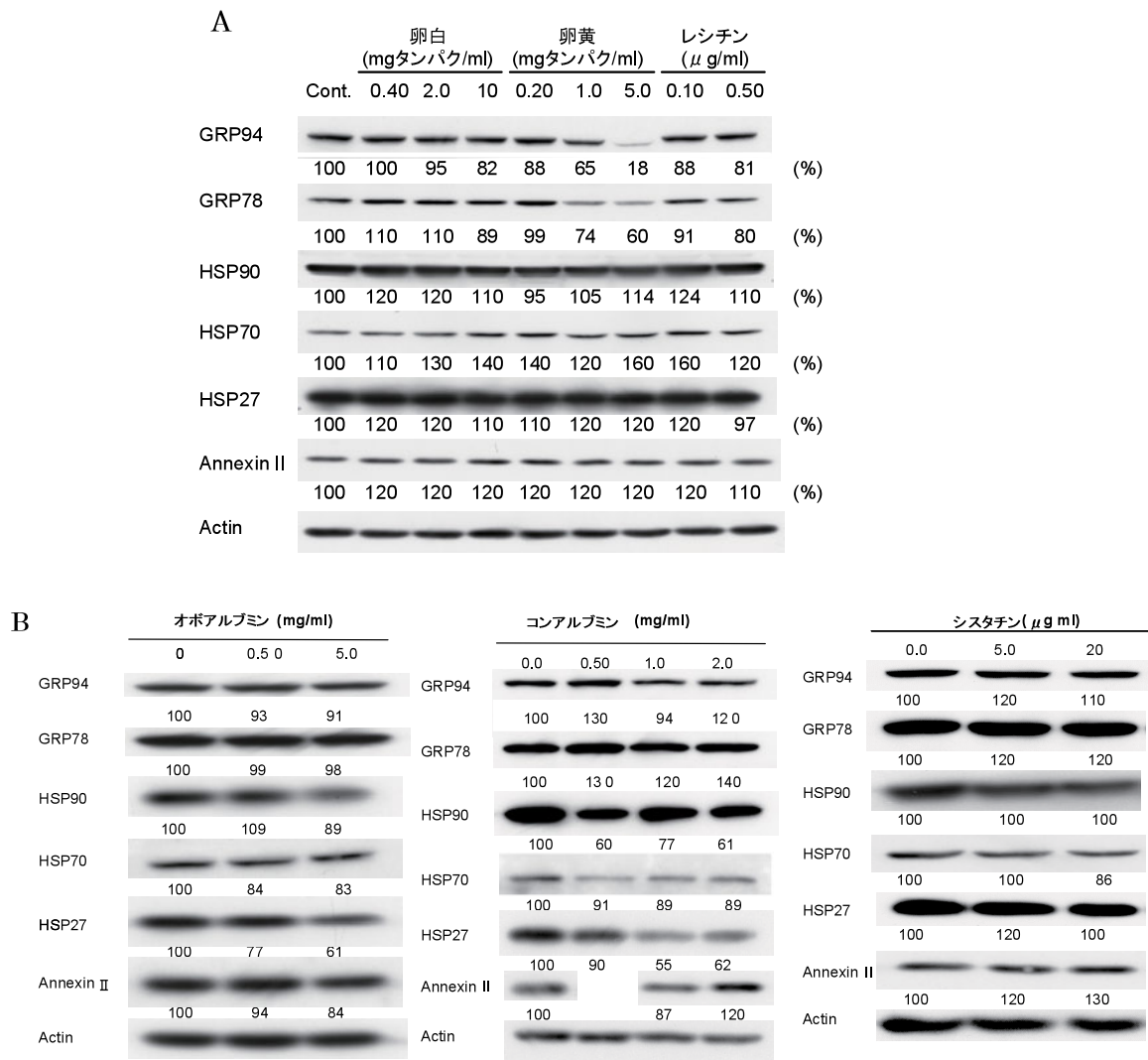


図4 シャペロンタンパク質の発現量に及ぼす卵成分の影響

RSa細胞を卵成分存在下24時間培養した後、細胞タンパク質を回収し、ウエスタンブロット解析によりシャペロンタンパク質の発現を調べた。

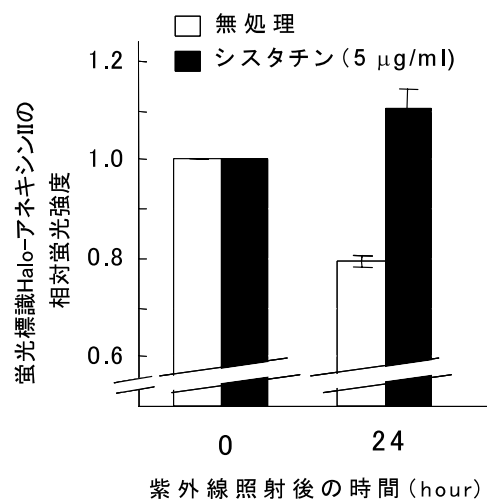


図5 紫外線照射後のアネキシンII分解へのシスタチンの抑制作用

シスタチン(5 μ g/ml)を24時間処理した後、12 J/m²の紫外線(UVC)照射を行った。