

ニワトリ卵白オボセルピンの免疫調節機能の解明と食品科学的応用

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻・教授 谷 史人

■ 緒 言

「卵」は最も栄養価に優れた食品の一つとされている。日本人国民1人あたりの卵の消費量は世界のなかでも多く、1日1個食べているといわれている。また、卵の用途も拡大しており、その内容も多様化している。加工卵は、製菓、製パン、乳肉製品などさまざまな加工食品の原料として用いられている¹⁾。鶏卵は卵白、卵黄、卵殻に大別される。卵の重さにより多少の違いはあるが、全卵の重さに占める構成割合は、卵白が57.0～63.4%、卵黄が28.0～30.6%、卵殻が8.1～12.4%といわれている²⁾。鶏卵の卵白タンパク質の約半分を占めるタンパク質は卵白アルブミン(OVA)と呼ばれるもので、これまでは栄養価に優れた食品タンパク質の代表とされてきた。しかし、鶏卵の卵白容量の半分も占めているにもかかわらず、その真の生理機能についてはこれまで明らかにされてこなかった。一般の生化学実験などにおいて、OVAは標準あるいは対照のタンパク質として専ら利用されてきていることが多い。そもそも「卵」自体は生命体であり、卵白は胚の発生や雛の発達過程における栄養物として存在する意味をもつ。胚や雛の成長において、個体やその消化管における生体防御系は未発達であり不完全なものであろう。言い換えれば、雛の消化管や個体全体の生体防御系を調節する機能が卵白に存在しても不思議ではない。

一方近年、卵やその主成分には食物アレルギーを引き起こすアレルゲンが含まれているとされ、卵は負の注目を浴びることもある。しかし、卵白が胚の発生や雛の成長過程における栄養物であることを考えると、本来、ニワトリの消化管生体防御系に対して生理作用をもつことが予期できる。最近、卵白タンパク質中のヘパリンに結合する画分に抗菌活性を示すタンパク質が見出され、OVAと関連するOv-serpin(オボセルピン)の一つであるOVAXが同定された³⁾。この報告は、上述したように、卵白中には雛の消化管生体防御系を調節する機能が存在することを物語っている。消化管組織には、多様なはたらきをもつT細胞が存在することを鑑み、本課題においては、卵または卵白中に含まれるOVAやその関連タンパク質オボセルピンのT細胞に対する生理機能について検討した。もし、免疫制御作用が鶏卵中に存在するのであれば、T細胞の過剰な活性化が原因となる炎症性疾患やアレルギー疾患などの予防に繋がることも期待される。

■ 方 法

1. 実験材料

鶏卵は、産卵直後の新鮮な卵を京都養鶏生産組合より購入して用いた。ヘパリンカラムおよびHeparin Sepharose 6 Fast Flowは、GEヘルスケアジャパンより購入した。細胞磁気分離試薬、標識抗体とサイトカイン定量用ELISAキットは、それぞれミルテニー株式会社とeBioscience社より購入した。細胞増殖BrdU発色ELISAキットは、ロシュ・ダイアグノスティック株式会社より購入した。硫酸アンモニウムやプロテインアッセイBCAキットなどの試薬は、特級あるいはクロマトグラフ用グレードのものを和光純薬やナカライテスクより購入した。

2. Sørensenの方法を用いた塩析によるOVAの結晶化

Sørensenの常法に従いOVAを精製した。割卵後、卵40個分の卵白をガーゼで濾し、卵白溶液を攪拌しながら等容量(1200mL)の飽和硫酸アンモニウム溶液を徐々に加えて攪拌した。グロブリン画分を沈殿させた後、6,000rpm, 10分間遠心し、上清を回収した。上清を攪拌しながら、飽和硫酸アンモニウム溶液を徐々に滴下し、わずかな濁りが出たところで滴下を終了し、硫酸を加えてpH4.9に調整した。得られた結晶を遠心にて回収した。OVAの結晶を蒸留水に懸濁し、上記の操作を5回繰り返すことによって再結晶化を行った。

3. ヘパリンセファロースカラムによるオボセルピンの分離

割卵後、卵30個分の卵白をガーゼで濾し、卵白溶液を攪拌しながら等容量(900mL)の飽和硫酸アンモニウム溶液を徐々に加えて攪拌した。グロブリン画分を沈殿させた後、6,000rpm, 10分間遠心し、上清を回収した。アルブミン画分を含む上清を蒸留水に対して徹底的に透析した。透析物に、終濃度20mMになるようにリン酸緩衝液(pH 7.0)を加えた。10mL容ヘパリンセファロースカラムを

20mM リン酸緩衝液で平衡化した後、試料をカラムに供した。素通りした画分を回収し、カラムを 10 倍容量のリン酸緩衝液で洗浄した。その後、カラムに結合した画分は 2M NaCl を含むリン酸緩衝液を 5mL ずつ加えて溶出し回収した。

4. T 細胞活性化に対する増殖抑制試験

マウスから脾臓を摘出し、RPMI1640 5mL を入れた 60mm シャーレの中で、スライドガラスを用いて磨り潰した。懸濁液の上清を回収し、1,500rpm、5 分間遠心し細胞ペレットを得た。ACK Lysing Buffer で溶血し細胞を洗浄後、懸濁液をセルストレーナーで濾過し、脾細胞を得た。脾細胞 10^7 個に対して Biotin-Antibody Cocktail と Biotin-抗 CD25 抗体 および MACS Buffer を加えて懸濁し、4°C で 20 分間インキュベートした。MACS Buffer で洗浄後、ペレットを回収し、抗 Biotin MicroBeads および MACS Buffer を加え、4°C で 15 分間インキュベートした。再度、洗浄後、ペレットを回収し、細胞懸濁液を LS Column に通してネガティブセレクションを行い $CD4^+ CD25^-$ T 細胞を回収した。 $CD4^+ CD25^-$ T 細胞 (10×10^4 cells/well) を、抗 CD3 および抗 CD28 抗体 (抗 CD3/28 抗体、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下において、OVA やオボセルピンのタンパク質 ($50 \sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$) とともに 48 時間培養した (37°C , 5% CO_2)。培養の終わり 6 時間は BrdU 標識液を終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように添加して培養した。培養後、96 穴平底プレートを遠心し上清を回収した。上清中の産生サイトカイン量を ELISA 法によりプロトコルに従って定量した。遠心後、平底プレートを PBS で洗浄後、細胞の固定化および DNA の変性を行った。POD 標識抗 BrdU 抗体を加えて 90 分間反応させ、洗浄後、TMB 液を加えて反応させた。硫酸を混和し反応を停止させ、発色を 450nm における吸光度値として測定した。

■ 結果

1. Sørensen の常法により精製した OVA に含まれるオボセルピン

通常、OVA の精製には、古来からの Sørensen の方法が用いられている。本法で調製される OVA は、SDS-PAGE においては 95% 以上の純度を示す。実際、卵 40 個分から調製した OVA の SDS-PAGE を図 1 に示す (左パネル、lane 2)。しかし、図 1 の右パネルの lane 2 で示されるように、大過剰の OVA を電気泳動に供すると、OVA より僅かに分子サイズが大きいタンパク質の存在が認められた。

そこで、混入タンパク質の性質を明らかにする目的の一環として、Sørensen の従来法で精製した OVA にヘパリン結合タンパク質が混入しているか否かの検討を行った。カラム容量 1mL のヘパリンセファロースに Sørensen 法により調製した OVA を供したところ、ヘパリン結合画分として 2 つのピークが検出された (図 2)。この結果は、従来の Sørensen の常法を用いた場合では、OVA に構造の非常に良く似たタンパク質オボセルピンが含まれる可能性があることを示唆している。

2. ヘパリンセファロースカラムによるオボセルピンの分離

OVA と卵白に含まれるオボセルピンのそれぞれの生物機能を調べるために、卵白から各々の画分を精製することを試みた。卵 30 個分の卵白溶液に等容量 (900mL) の飽和硫酸アンモニウム溶液を徐々に加えて攪拌しグロブリン画分を沈殿させ、6,000rpm、10 分間の遠心後、上清を回収した。アルブミン画分を含む上清を蒸留水に対して徹底的に透析し、透析物に、終濃度 20mM となるようにリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えた。10mL 容のヘパリンセファロースカラムを 20mM リン酸緩衝液で平衡化した後、試料をカラムに供した。素通りした画分を回収し、カラムを 10 倍容量のリン酸緩衝液で洗浄した。カラムに結合した画分には、黄色を示す物質が含まれていた。2M NaCl を含むリン酸緩衝液を 5mL ずつ加えて結合画分を溶出した。ヘパリンカラムの素通り画分 (through:th) およびカラムからの溶出画分 (C および D) に含まれるタンパク質濃度を BCA 法により測定した結果、th 画分では $16.0 \text{mg}/\text{mL}$ 、溶出画分 C と D では各々 $1.94 \text{mg}/\text{mL}$ と $1.39 \text{mg}/\text{mL}$ であった。溶出画分 C と D については膜濃縮を行った後、T 細胞増殖抑制試験に供した。

3. T 細胞活性化に対するオボセルピンの増殖抑制作用

増殖試験に用いたレスポンドー T 細胞は、マウス脾臓由来の $CD4^+ CD25^-$ T 細胞とした。T 細胞の増殖抑制にかかわる $CD4^+ CD25^+$ 制御性 T 細胞は、精製過程において Biotin-抗 CD25 抗体を添加することによって除去した。精製した $CD4^+ CD25^-$ T 細胞の純度は、細胞表面抗原の解析から、>96% $CD3^+ CD19^-$ T cells, >99% $CD11b^- CD11c^-$ T cells, >96% $CD8^-$ T cells, >97% $CD4^+ CD25^-$ T cells であった。 $CD4^+ CD25^-$ T 細胞 (10×10^4 cells/well) を、抗 CD3/28 抗体 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下において、卵白の各画分のタンパク質 ($50 \sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$) とともに 48 時間培養した結果、添加濃度依存的に、分画前の卵白成分ならびにヘパリンカラム素通り画分に T 細胞増殖抑制活性が見出された (図 3)。

また、T 細胞の活性化に伴うサイトカイン IL-2 の産生に対する影響を腸間膜リンパ節由来のレスポンドー T 細胞を用いて解析したところ、Sørensen の従来法で精製した OVA に 0 ~ 70.5% の範囲で

IL-2 産生の抑制が観察された。

■ 考 察

以上の結果から、本研究において、ニワトリ卵白には T 細胞の活性化増殖を抑制する生理活性が存在することを明らかにした。卵白中にはヘパリンに結合するタンパク質が存在し、そのなかには、卵白タンパク質の約半分を占める OVA と相同性の高いオボセルピンの一つである OVAX がある。近年、OVAX は抗菌活性を示すことが報告されている³⁾。当初、OVAX などのヘパリン結合活性を示すタンパク質が免疫抑制を示す本体ではないかと予想したが、ヘパリンカラムによる分離の結果から、ヘパリン結合画分に T 細胞の活性化増殖抑制は見られなかった。一方で、Sørensen の従来法で精製した OVA にはヘパリン結合タンパク質のオボセルピンが僅かながらも混入していた。Sørensen 法による精製 OVA においても T 細胞の活性化増殖の抑制および IL-2 サイトカイン産生の抑制が見られることから、ニワトリ卵白中に存在する T 細胞増殖抑制の活性本体は OVA である可能性が高い。本研究では、Sørensen の従来法で精製した OVA において IL-2 産生の抑制が検出されたが、ヘパリン結合画分および素通り画分個々についての IL-2 産生への作用は現在検討中である。OVA はリン糖タンパク質であり、分子種としては複数存在する。今回見出された T 細胞増殖抑制活性がどの分子種に起因するのか、T 細胞増殖抑制活性と IL-2 産生抑制とが相関するのか否か、オボセルピン存在下において抗 CD3/28 抗体で活性化された T 細胞はどのような表現型をもっているかについても興味ある課題であり解析を進めている。

タンパク質の約半分を占める OVA は、栄養価に優れた食品タンパク質の代表である。OVA は、その一次構造ならびに立体構造の相同性から、 α_1 -アンチトリプシンやアンチトロンビン III といった血漿プロテアーゼ阻害剤と共通祖先をもつセリンプロテアーゼ阻害剤 (Serpins: セルピン) のスーパーファミリーに属するタンパク質として分類されているが、貯蔵タンパク質としてはたらき以外の生理機能については過去一世紀にもわたり明らかにされてこなかった。しかし今回、鶏卵卵白に T 細胞の活性化増殖を抑制する生理活性が存在することを明らかにしたことは、胚発生や雛の発達過程における卵白の生理的意義の一端を解明することにつながり、ひいては、食が本来もっている生理機能の解明にも役立つと期待できる。オボセルピンの免疫制御活性の存在は、従来までの単にアレルゲン性物質としての位置づけだけではなく、炎症性疾患や II 型糖尿病などの生活習慣病の蔓延を防止する可能性をもつ物質として予防医学へ大きなインパクトを与えることも期待したい。

■ 要 約

本研究は、OVA やその関連セルピンを含めた Ov-serpin (オボセルピン) の免疫調節機能という新たな視点に着目し、ニワトリ卵白由来オボセルピンが T 細胞の活性化増殖に対する抑制作用について明らかにすることを目的として行った。その結果、ニワトリ卵白には T 細胞の活性化増殖を抑制する生理活性が存在することを明らかにした。当初、OVAX などのヘパリン結合性を示すタンパク質が免疫抑制の本体ではないかと予想したが、ヘパリンカラムによるタンパク質分離の結果から、ヘパリン結合画分に T 細胞の活性化増殖抑制は見られなかった。一方で、Sørensen の従来法で精製した OVA にはヘパリン結合タンパク質のオボセルピンが僅かながらも混入していたが、この OVA においても T 細胞の活性化増殖の抑制と IL-2 サイトカイン産生の抑制が見られることから、ニワトリ卵白中に存在する T 細胞増殖抑制の活性本体は OVA である可能性が示唆された。

■ 文 献

- (1) 中村 良 編集(1998)シリーズ「食品の科学」*「卵の科学」*、朝倉書店(東京)
- (2) 一般社団法人 日本養鶏協会 <http://www.jpa.or.jp/>
- (3) S. Réhault-Godbert, V. Labas, E. Helloin, V. Hervé-Grépinet, C. Slugocki, M. Berges, M.-C. Bourin, A. Brionne, J.-C. Poirier, J. Gautron, F. Coste, & Y. Nys (2013) Ovalbumin-related Protein X Is a Heparin-binding Ov-serpin Exhibiting Antimicrobial Activities. *J. Biol. Chem.* 288, 17285-17295.

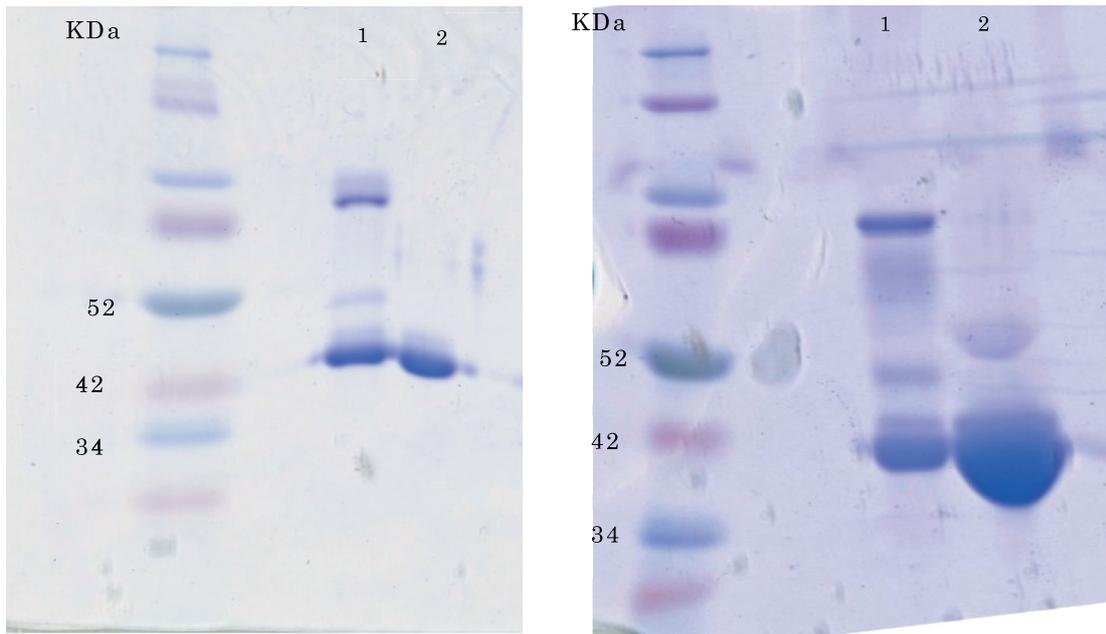


図1 Sørensen の常法により精製した OVA の SDS-PAGE
Lane 1 は卵白タンパク質、lane 2 は再結晶操作を 5 回繰り返すことによって精製された OVA

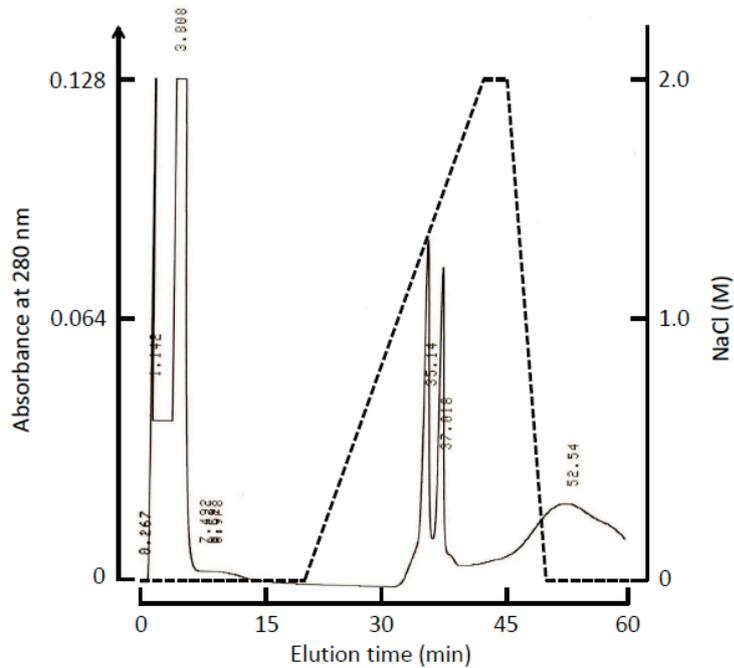


図2 Sørensen の常法で精製した OVA に含まれるヘパリン結合タンパク質
クロマトグラムにおいて、実線は 280nm における吸光度を、破線は NaCl の濃度を示している。

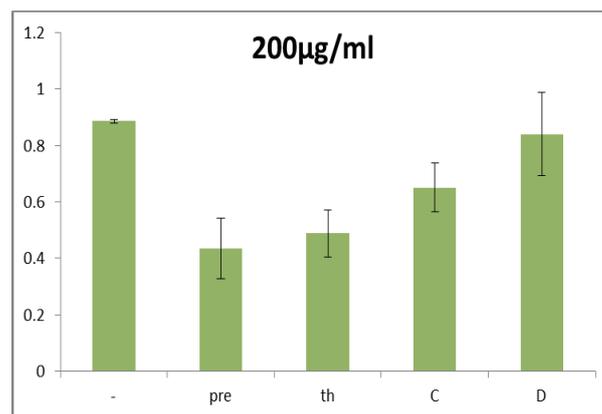
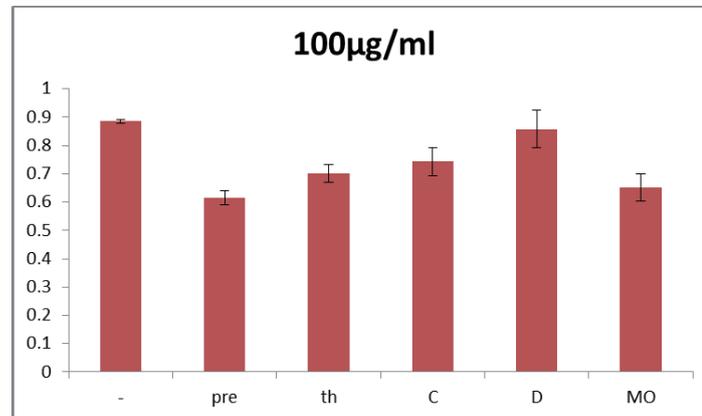
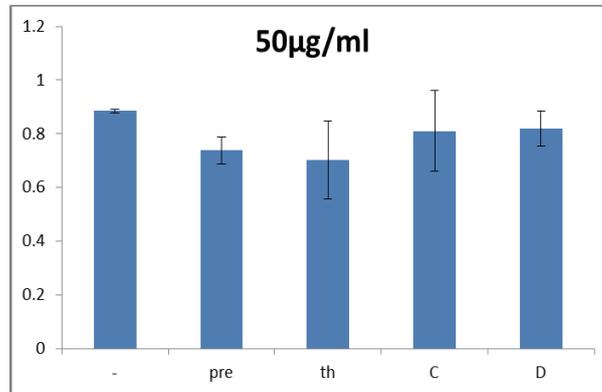


図3 抗 CD3/28 抗体による CD4⁺ CD25⁻ T 細胞増殖に対する卵白画分の抑制活性
 Pre : 分画前の卵白成分、th : ヘパリンカラム素通り画分、C : ヘパリン結合画分 1、D : ヘパリン結合画分 2、MO : マウス Hsp60。縦軸の値は ELISA における 450nm の吸光度を示している。