

卵白タンパク質由来ペプチドの神経変性疾患などの 小胞体ストレス緩和効果の検証

鹿児島大学大学院連合農学研究科・教授 杉元 康志

■ 緒言

アミロイド病はアミロイド線維といわれるタンパク質の不良化したものが何らの原因で細胞・組織内外に蓄積し、組織・臓器不全となり深刻な病症となるもので、アルツハイマー病、プリオン病やパーキンソン病などの神経変性疾患や全身性のアミロイドーシスなどが知られている。これら病症を引き起こすタンパク質には共通性がなく、多くのタンパク質が原因となっていることから線維形成の機構や発症のメカニズムについては解明されておらず、こうした病気の治療・予防剤の開発が遅れている。

アルツハイマー病の原因にはいくつかの要因が関係していると考えられており、アミロイドベータ(A β)が凝集して不溶性の線維形成がなされてアミロイドとなり脳に沈着することが最も一般的である。A β の前駆体APPが β -および γ -セクレターゼで分解されることからこれらを制御する分子がアルツハイマー病発症を抑制すると期待されている。

全身性アミロイドーシスにはトランスサイレチン(TTR)やリゾチームなどが原因となって全身にアミロイドが沈着して臓器機能障害を引き起こす難病となっている。これらの原因となるタンパク質は遺伝的にアミノ酸の変異により、タンパク質の構造が凝集体を作りやすいものとなり、分解されずに蓄積してしまう。TTRやリゾチームは分泌タンパク質であり、変異体は分泌が低下し小胞体内での蓄積が小胞体ストレスを引き起こし、長期の異不良タンパク質の蓄積とストレスが細胞への障害となり、最終的には全身性アミロイドーシスになると考えられている。この不良タンパク質の蓄積を抑制する食品由来成分の探索も行われている。

本研究では卵白タンパク質由来ペプチドが神経変性疾患などの原因となる不良タンパク質の凝集に抑制効果が見られるか、また不良タンパク質の細胞内への蓄積による小胞体ストレスに対して緩和効果あるかを検証する目的で行った。

■ 方法

500 μ gのA β -42をDMSO40 μ lに溶解した後、50mMリン酸緩衝液(pH7)で50 μ Mとなるように調製した。分注したペプチド溶液に50 μ MのThTとペプチド添加試料(50mg/ml, 150mg/ml)を混合し、200 μ lにして37 $^{\circ}$ Cでインキュベートしてアミロイド線維形成の実験を行った。アミロイド線維の形成は時間経過ごとに観察した。リゾチームのアミロイド線維形成はリゾチーム(3mg/ml)を50mM glycine-HCl 緩衝液(pH2)で溶解し、ペプチド添加試料(50mg/ml, 150mg/ml)を加え、55 $^{\circ}$ Cで所定の日数インキュベートしてアミロイド線維の形成を観察した。アミロイド線維はThTの蛍光強度の上昇と蛍光顕微鏡、線維形態は電子顕微鏡にて行った。卵白ペプチドの細胞内への不良タンパク質の蓄積はヒトリゾチーム変異体をHEK293細胞に導入した細胞で解析した。小胞体ストレスはGRP78/BiPおよびXBP1Sを定量することで判定した。

■ 結果

1 アミロイドベータ(A β)-42凝集抑制効果

1-1 卵由来ペプチドのアミロイドベータ(A β)-42凝集体の抑制効果

A β -42単独では3時間インキュベート後にはThTの蛍光強度は上昇していた(図1)。また、その後の時間経過によってさらに強くなっていることが観察された。24時間~それ以上では蛍光強度は定常状態になり、上昇はなくなった。これに卵由来成分を添加した試料では卵白ペプチドと卵殻膜ペプチドについてはA β -42単独に比べ、高い蛍光強度を示した。一方、卵黄ペプチドとカラザペプチドはA β -42による蛍光強度の上昇を明らかに抑制する効果が見られた。それは24時間経過後も続いていた。ポジティブコントロールであるケルセチンにはA β -42の蛍光強度の上昇を抑制していた。

1-2 ThTポジティブ凝集体の蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡による観察ではA β -42単独では3時間インキュベート後から凝集物が観察され、時間の経過と共に、凝集物の量は増加していた(図2, ThT)。卵殻膜ペプチドは可溶化後にはすでに凝集

物と思われるものが観察され、凝集物はA β -42によるものか区別がつかなかった。卵白ペプチドには凝集体が観察され、抑制効果はなかった。一方、カラザおよび卵黄ペプチドは僅かな凝集物は観察されたが、A β -42 単独や他のペプチドに比べて抑制されていた(図 2, ThT)。ケルセチンにも抑制効果がみられた。

1-3 電子顕微鏡による線維の観察

A β -42 単独で 12 時間インキュベートした場合、アミロイド線維特有の線維状物を観察した。一方、カラザでは殆ど線維は観察されず、卵黄ペプチド添加試料も線維化は阻止されおり、それらの抑制効果は ThT 蛍光強度の抑制を裏付けた(図 2, EM)。卵白ペプチドも線維はやや減少していたが、卵殻膜ペプチドは線維が見られた。

2 卵由来ペプチドのリゾチームの線維形成抑制効果

2-1 蛍光強度上昇の抑制効果

ヒトおよび卵白リゾチームを pH2、55°C でインキュベートすると 7 日目から急激な蛍光強度の上昇が観察され、線維形成進行していると推定された。ヒトリゾチームでは 14 日目に更に強い蛍光強度の上昇が見られた(図 3)。一方、卵白リゾチームは 14 日目頃に定常状態になっていた(図 4)。カラザおよび卵白ペプチドの添加(50 μ g/ml)によりヒトおよび卵白リゾチームの蛍光強度の上昇はほとんど見られなかった。一方、卵黄および卵殻膜ペプチドにはあまり抑制効果は観察されなかった。ケルセチンも同様の抑制効果を示した。

2-2 ThT ポジティブ凝集体の蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡による観察ではリゾチーム単独で 7 日目から凝集物が観察され、ヒトおよび卵白リゾチームは 10 日目には多くの凝集物が検出された(図 5 と図 6, ThT)。一方、ヒトリゾチームではカラザ、卵白および卵黄ペプチドの添加によって凝集物は明確に減少していた。ケルセチンと卵黄ペプチド(卵白リゾチーム)には凝集物が見られた。

2-3 電子顕微鏡による線維の観察

リゾチームを単独で 10 日間インキュベートした場合、図 5B と図 6B に示すようにやや太い線維が観察された(図 5 と図 6, EM)。一方、カラザペプチド添加試料では殆ど線維は観察されず、卵白、卵黄および卵殻膜ペプチドでは凝集物と思われるものが見られたが、線維は観察されなかった(図 5 と図 6, EM)。ケルセチンには凝集物および線維が見られた。

3 卵白ペプチドのヒトリゾチーム変異体の細胞内蓄積抑制効果

3-1 卵白ペプチドがリゾチーム変異体の蓄積に及ぼす効果

野生型リゾチームあるいはリゾチーム変異体 I56T を導入した HEK293 細胞に卵白ペプチドを 0、1、5、10、50、100 μ g/ml 添加した後、72 時間培養して、培地上清、細胞可溶成分および不溶成分のリゾチームの量をウエスタンブロットで見た。卵白ペプチド添加量を増加するにつれて野生型では分泌量、細胞可溶成分の量が増えており(図 7)、卵白ペプチドは発現を助長する効果があると推定される。一方、変異体では分泌はやや増加するが、細胞不溶成分は添加なしに比べ、100 μ g/ml 以上添加試料で減少していた(図 7)。

3-2 卵白ペプチドの小胞体ストレス緩和効果

変異体リゾチームは小胞体内に蓄積することにより小胞体ストレスを誘導し、IRE1-XBP1-GRP78/BiP 経路を活性化する。卵白ペプチドの添加により細胞内蓄積が抑えられたことから小胞体ストレスが緩和されたかを観察した。野生型では GRP78/BiP と XBP1S が卵白ペプチド添加でやや上昇していた。一方、変異体では GRP78/BiP 量が卵白ペプチド 50 μ g/ml 以上添加で減少傾向が見られたが、XBP1S には変化がなかった(図 8)。GRP78/BiP の減少は異常タンパク質の蓄積が減少した結果と考えられる。

■ 考 察

何らかの原因でタンパク質が凝集し、アミロイド線維化して細胞に損傷を与え、疾患を引き起こし、重大な障害となっている。タンパク質の凝集は遺伝的な変異、ストレス、老化や生活習慣が深く関わっていると思われ、多くのタンパク質が疾患と関係している。これを防ぐには異常タンパク質の生成の阻害、正しいフォールディングの促進、異常タンパク質の分解の促進および異常タンパク質によるストレス緩和が考えられ、治療薬・予防薬の開発が進められている。また、ポリフェノールをはじめ食品の成分においてアルツハイマー病の予防・治療に効果あるとされ、効果のある食品成分が探索されている。

今回、卵由来のペプチドを用いてアミロイド線維形成抑制効果および細胞内蓄積と小胞体ストレス

緩和効果について調べた。A β -42は時間経過と共に自己凝集し、アミロイド線維形成するペプチドであるが、カラザが高い抑制効果を示した。その阻害機構は不明であるが、A β -42の分子間相互作用にペプチドが妨害していると思われる。カラザペプチドはカラザタンパク質を酵素処理して生じたペプチドで、多くのペプチドのミクスチャーであるため、効果あるペプチドの同定が急がれる。卵白ペプチドや卵殻膜ペプチドには抑制効果が明確ではなかった。卵殻膜ペプチドは溶解した時点で凝集物が見られたので凝集形成抑制効果についてはさらなる検討が必要である。カラザペプチドはリゾチームのアミロイド線維形成にも顕著な効果を示した。カラザペプチドはタンパク質の凝集阻止に有効と考えられる。卵白ペプチドにも凝集抑制効果を認めた。卵黄と卵殻膜ペプチドには明確な抑制効果は認められなかったため、カラザペプチドが最も効果あるものとして評価できる。

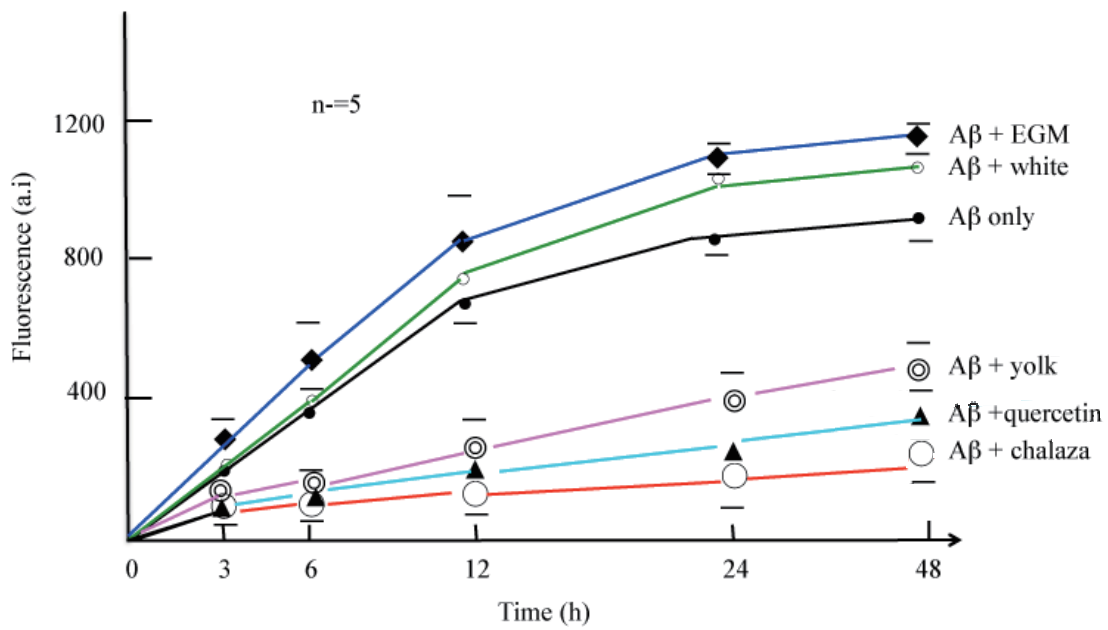
リゾチーム変異体発現細胞において変異タンパク質の細胞内蓄積を卵白ペプチドが抑制し、細胞外への分泌を促進したことから、ペプチドの変異タンパク質のフォールディングの補助あるいは凝集阻止効果などが推定される。しかし、この機序については不明な点が多く、さらなる検証が必要である。卵白ペプチド以外のペプチドについてはカラザペプチドが期待されるが、今後研究を進めていく必要がある。卵由来のペプチドは多くの分子集からなっていることから効果あるペプチドを単離・同定することは作用機序の解明や有効活用に重要となる。卵由来ペプチドにはアミロイド病の予防効果が期待され、さらに抗ウイルス作用や抗感染症効果も認められていることから今後のさらなる研究が待たれる。

■ 要 約

卵由来ペプチドのA β -42およびリゾチームの線維抑制効果を検証した。カラザペプチドは両者の線維形成を抑制した。卵白および卵黄にも一部、抑制効果が認められたが、これらのペプチドは未精製であるため、機能あるペプチドを同定する必要がある。また、卵白ペプチドに細胞内での異常リゾチームの蓄積を緩和する効果が認められた。小胞体ストレスも軽減することから細胞内ストレスにも有効と考えられた。

■ 文 献

1. Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils. *Int J Biol Sci.* 9:219-227. 2013
2. Kamada Y, Kusakabe T, Sugimoto Y. Amyloidogenic lysozymes accumulate in the endoplasmic reticulum accompanied by the augmentation of ER stress signals. *Biochim Biophys Acta.* 1850:1107-1119. 2015
3. Kamada Y, Nawata Y, Sugimoto Y. Lysozyme Mutants Accumulate in Cells while Associated at their N-terminal Alpha-domain with the Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP. *Int J Biol* 12:184-197. 2016.



● Lz only, ◆ +EGM, ◎ +yolk, ○ +EW, ○ +chalaza, ▲ +quercetin

図1 アミロイド β -ペプチド 42(A β -42)のアミロイド線維形成における卵由来ペプチドの阻害効果

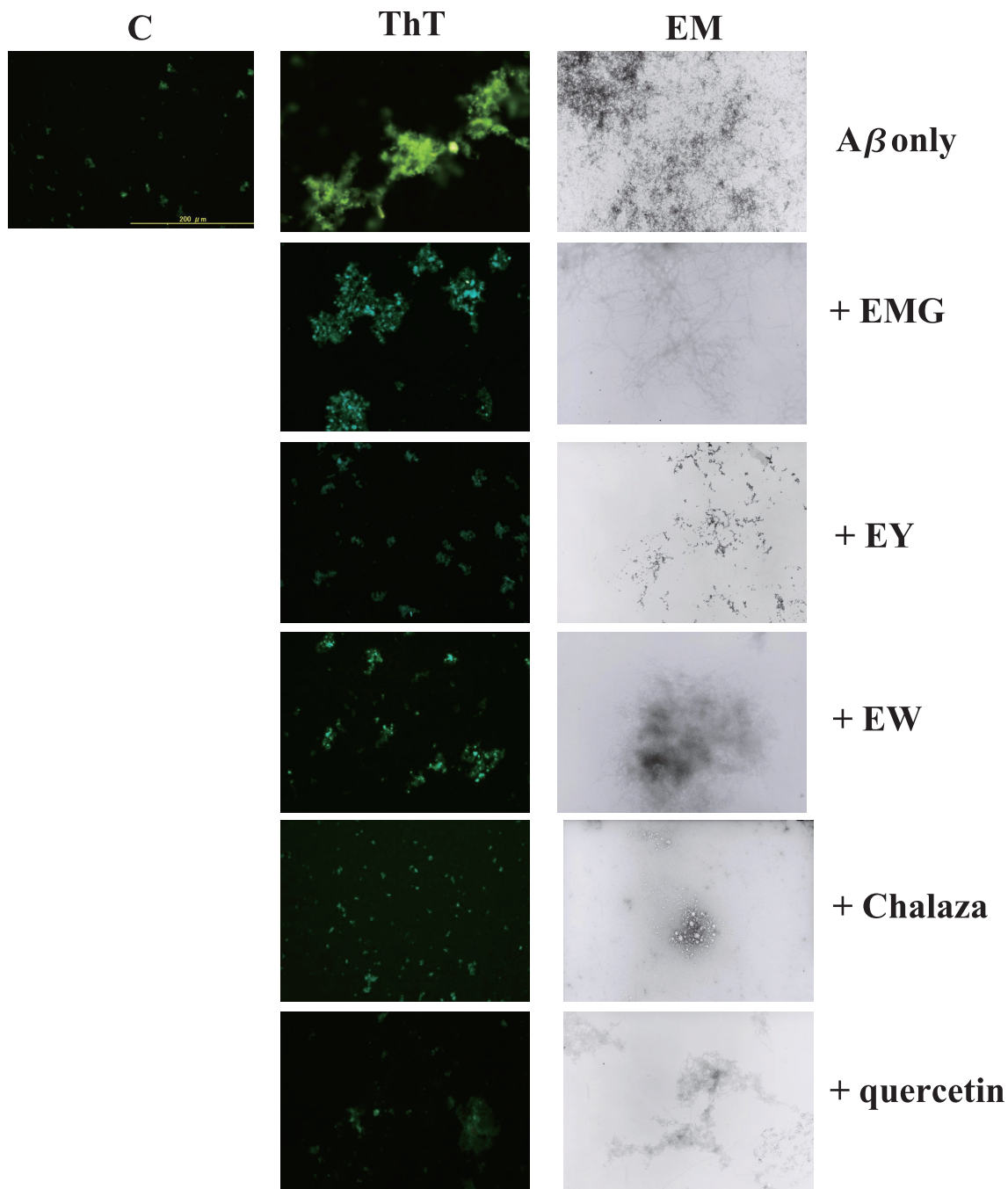


図2 卵由来ペプチドによる Aβ-42 の凝集抑制効果
 C: Aβ, 0 時間 ThT: 蛍光顕微鏡による観察、EM: 電子顕微鏡による観察

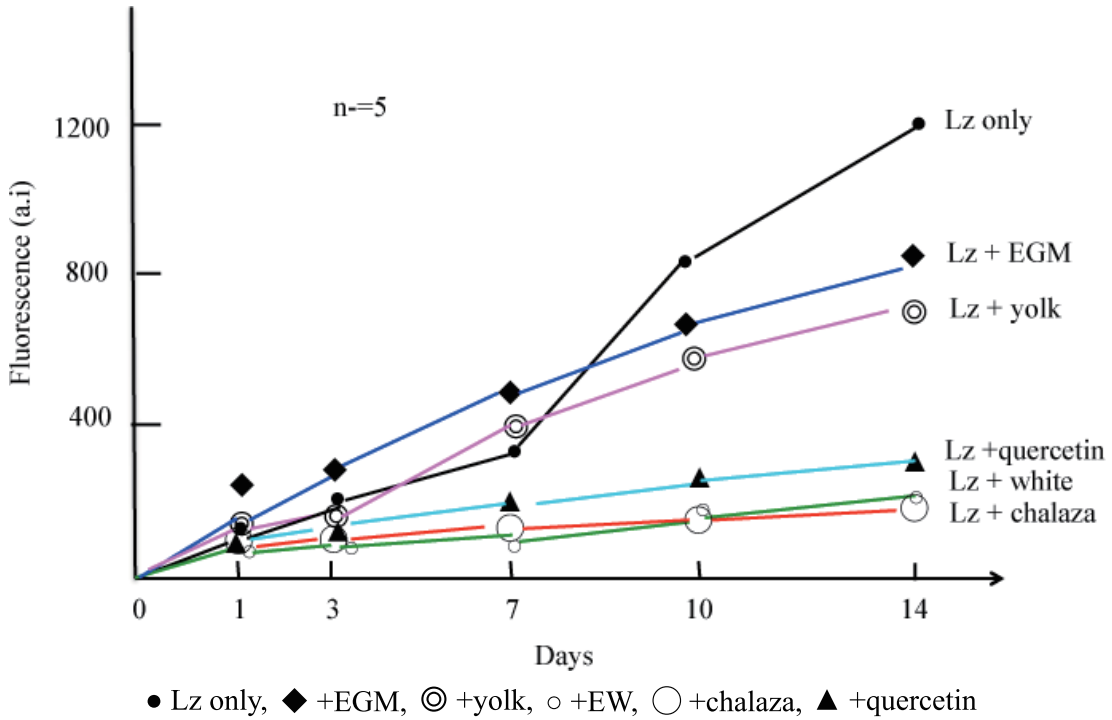


図3 ヒトリゾチームのアミロイド線維形成における卵由来ペプチドの抑制効果

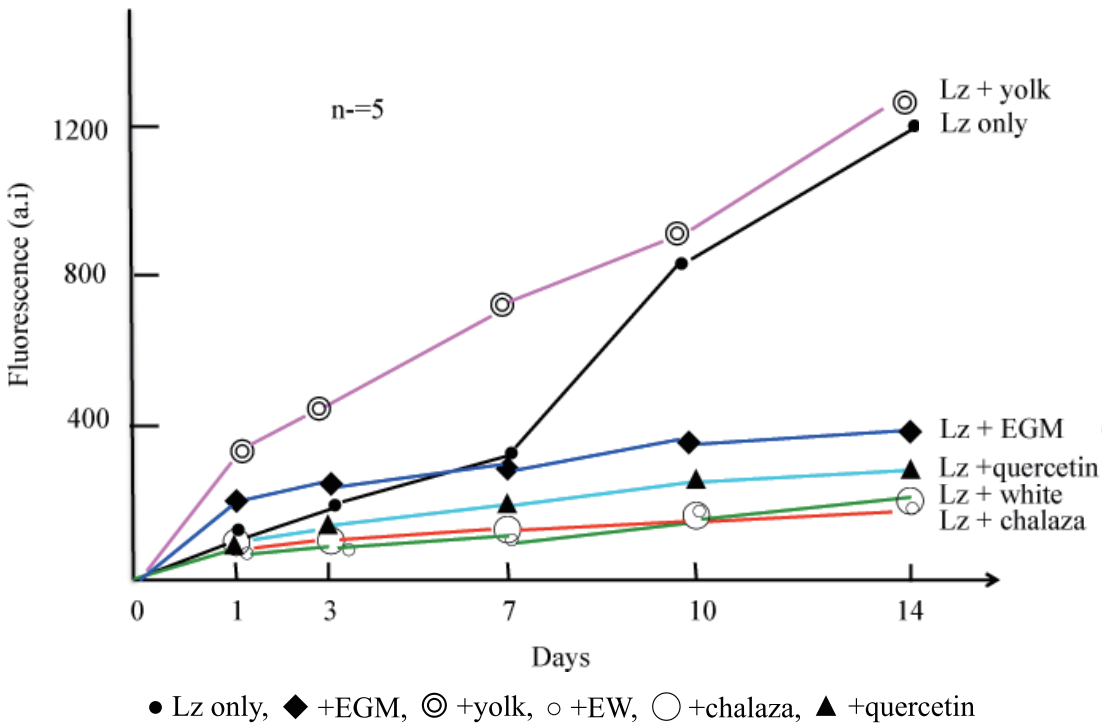


図4 卵白リゾチームのアミロイド線維形成における卵由来ペプチドの抑制効果

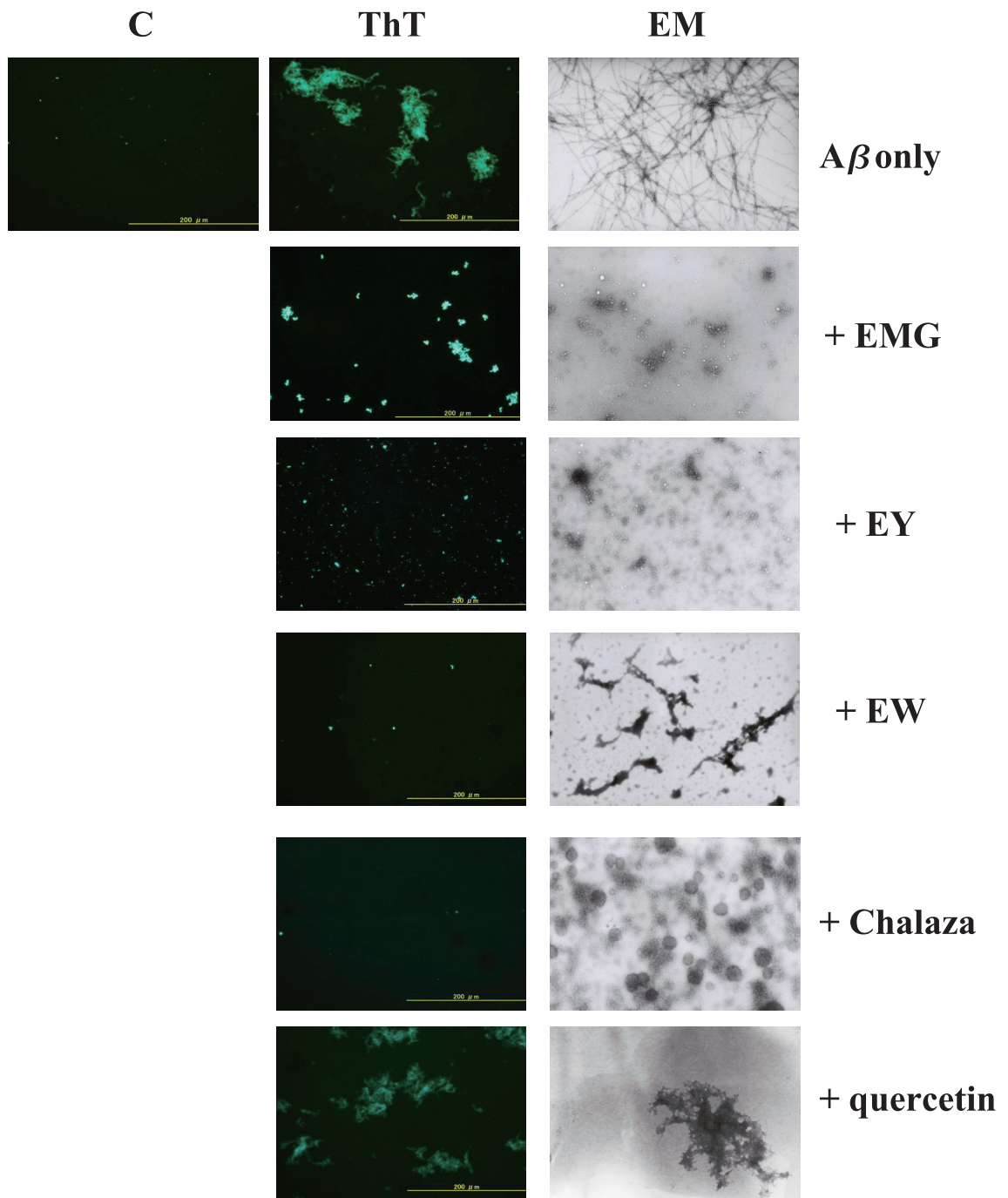


図5 卵由来ペプチドによるヒトリゾチームの凝集抑制効果
 C:リゾチーム, 0時間 ThT:蛍光顕微鏡による観察、EM:電子顕微鏡による観察

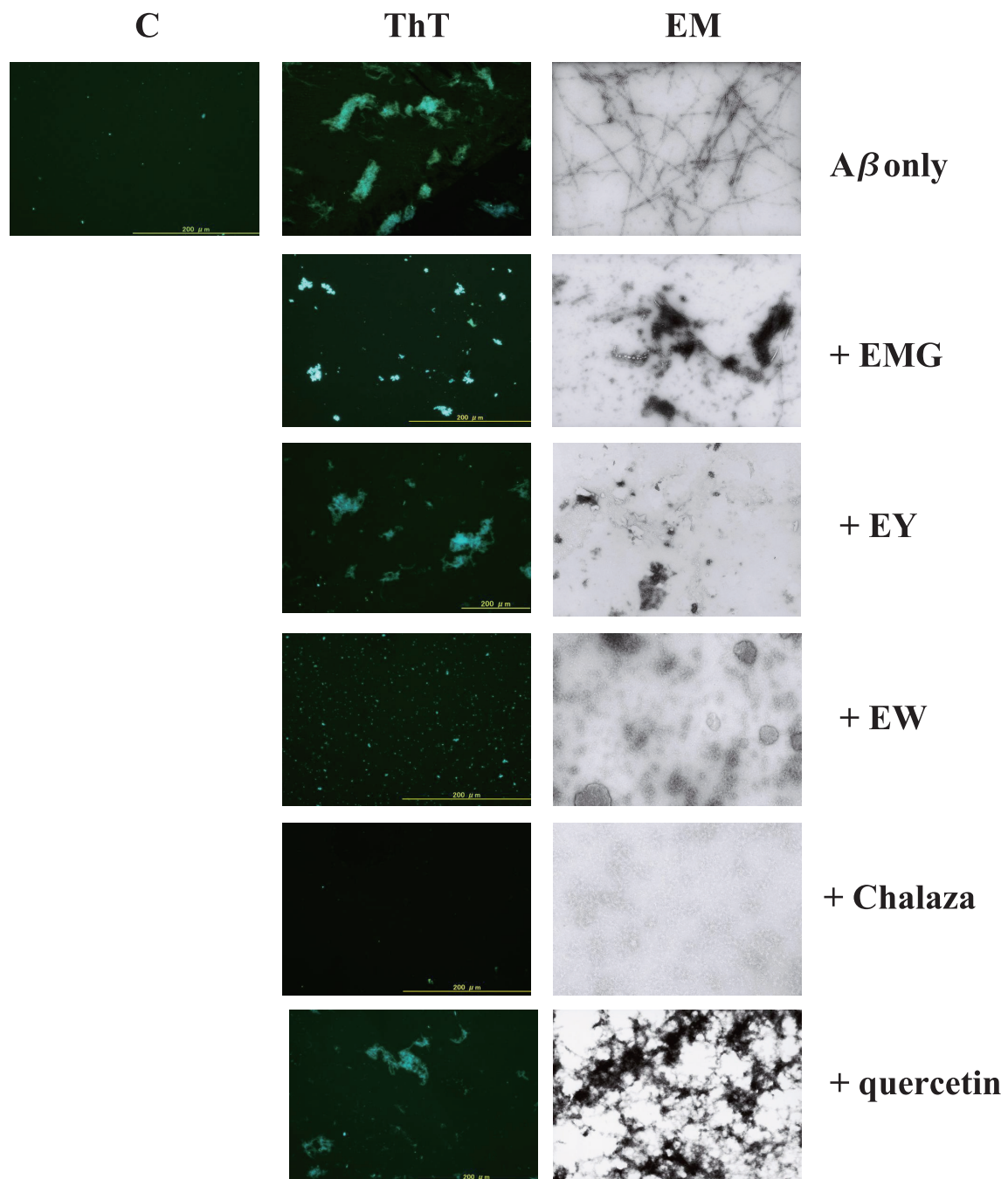


図6 卵由来ペプチドによる卵白リゾチームの凝集抑制効果
 C:リゾチーム, 0時間 ThT:蛍光顕微鏡による観察、EM:電子顕微鏡による観察

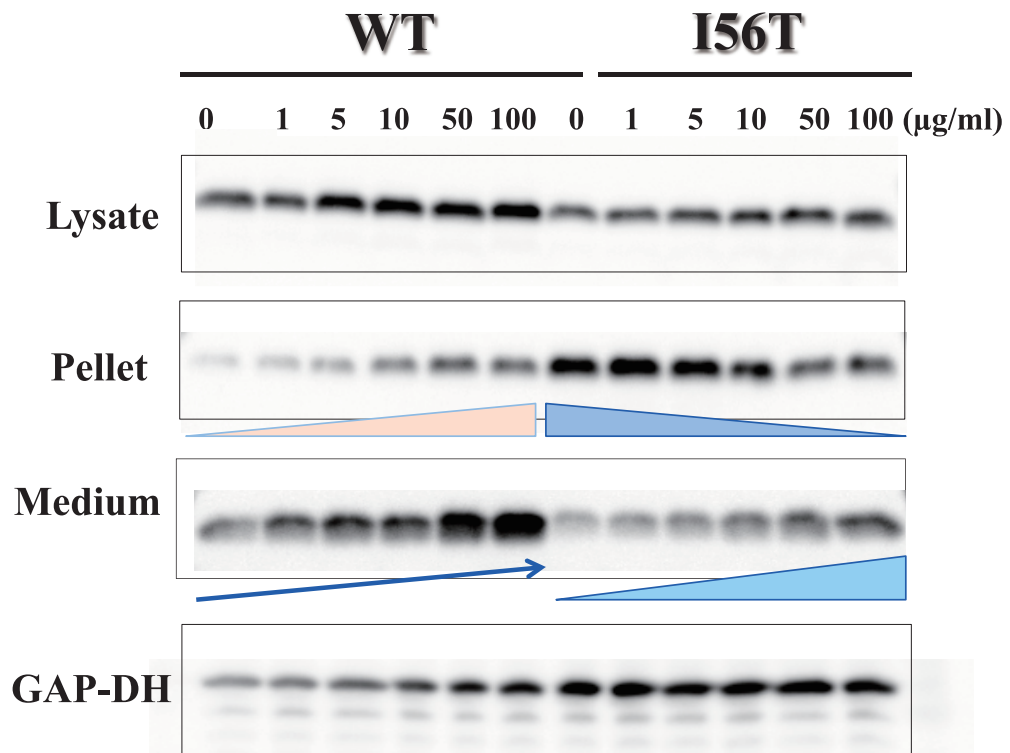


図7 卵白ペプチドのリゾチーム変異体の細胞蓄積を抑制する効果

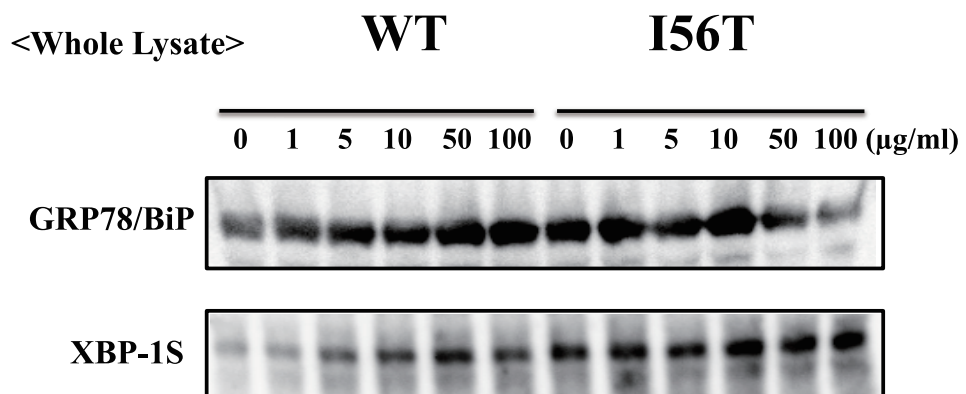


図8 リゾチーム導入 HEK293 細胞における卵白ペプチドの GRP78/BiP の抑制および小胞体ストレスの緩和効果