

卵白リゾホスファチジン酸とその産生酵素の健康機能

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 徳村 彰

■ 緒言

鶏卵は高い栄養価値を有する主要成分に加えて、微量ながら抗菌作用、抗ウイルス作用、免疫調節作用や抗癌作用を持つ成分を含む¹⁾。すでに、ニワトリの卵白リゾチームやアビジンおよびニワトリ卵黄 IgY は工業的スケールで利用されている。レシチンをはじめ、高い栄養価値を有するニワトリ卵黄脂質も広範囲の食品や化粧品素材として利用されている。しかし、ニワトリ卵白脂質の機能や工業的利用に関する研究は現在までに報告されていない。我々は、ニワトリ無精卵の卵黄と卵白が数 μM のリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) を含むことを初めて報告した²⁾。驚いたことに、卵黄 LPA は飽和脂肪酸を含有する分子種で構成されているのに対し、卵白 LPA の主要構成脂肪酸は、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸であった。LPA はリゾリン脂質メディエーターファミリーの中心に位置する重要な生理活性脂質であり、7 種の G タンパク共役受容体を介して繊維芽細胞の増殖や創傷治癒など多岐にわたる生理作用を示す³⁾。これらの LPA 受容体のリガンド選択性は微妙に異なっており、例えば、LPA₃ は多価不飽和脂肪酸含有 LPA により高い親和性を示す³⁾。卵白には LPA 以外のリゾリン脂質としてリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine, LPC) が存在する。その構成脂肪酸は多価不飽和脂肪酸に富んでおり、LPA の前駆体と予想された。我々は、ニワトリ卵白を 37°C で保温すると LPA 含量が増加することから解析を進め、リゾリン脂質から LPA を産生するリゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) 活性が存在することを明らかにした⁴⁾。すでに、我々は、血漿や卵胞液など哺乳類体液が lysoPLD 活性を有することを報告しており⁵⁾、ヒト血漿から高度に精製した lysoPLD 活性を持つ分子量 10.5 万のタンパクが、それまでに腫瘍細胞運動性促進タンパクとして知られていたオートタキシン (autotaxin, ATX) と同一のタンパクであることを明らかにした⁶⁾。ATX は細胞外でヌクレオチドを分解する酵素ファミリー (ecto-nucleotide pyrophosphatase family, NPP) の一員 (NPP-2) であったが、その主要な活性はヌクレオチド分解よりは LPA 産生によることが確認された⁷⁾。卵白の lysoPLD も血漿 ATX と同じ酵素学的性質や性状を有することを明らかにした⁴⁾。ニワトリ卵白は重要な生理活性リン脂質 LPA を含んでおり、高い付加価値のある食品素材であるとともに、化粧品などのヘルスケア製品の原料として開発可能である。また、高い LPA 産生酵素活性も有しており、有用な酵素含有生物素材でもある。このような観点からの卵白有効利用を促進するためには、卵白に含まれている高度多価不飽和脂肪酸を含む LPA の生理的役割に関する基礎的検討および lysoPLD による LPA 産生機構の検討が肝要と考え、以下に示すような実験を同時に進めることにした。

■ 方法

1. LC-MS-MS によるニワトリ受精卵の卵白リゾリン脂質の分子種分析

ニワトリ受精卵 (0 日、赤玉) を 39°C で 7 日間、孵卵後、卵白を取り出し、直ちに、2 段階の Bligh と Dyer 法で脂質抽出を行った。中性脂質画分を LC-MS-MS にかけて、LPC、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) 由来の陽イオンを測定し分子種分析を行った。酸性リゾ脂質画分も LC-MS-MS で分析し、LPA とリゾホスファチジルセリン (LPS) 由来の陰イオンの分析を行った。内部標準品には 17:0-LPC と 17:0-LPA を使い、エレクトロスプレーイオン化を行い Multiple Reaction Monitoring モードで定量を行った。

2. ニワトリ有精卵の漿尿膜における血管網構築の誘導作用の評価法

有精卵を転卵しながら 37.8°C で 3 日間インキュベートした。その後、卵に穴を明け卵白を約 4ml 吸引後、穴をふさぎ 39°C で 24 時間、インキュベートした。2-3cm 生長している漿尿膜の中心にシリコニングを乗せ、その中に試験液 10 μl を添加し、更に 2 日間、インキュベートした。約 1ml のイントラリポスを漿尿膜に注入し、血管網形成の程度を評価した。

3. 水浸拘束ストレス負荷ラットにおける胃潰瘍に対する LPA の抑制作用の評価法

7 週齢の Wistar 系雄ラットを 24 時間、絶食させ、ゾンデ針を用いて LPA の生理食塩水溶液 6ml/kg を胃内に注入 (ストレス負荷 2 時間前、直前、30 分後の 3 回) した。対照ラットには同容量の生理食塩水を 3 回、注入した。ストレスケージに入れたラットを、胸骨が浸る程度の水位で 23°C の水中に 1.5

時間浸し、ストレスを負荷した。ラットを麻酔後、胃を摘出し、2%ホルマリン液に15分間浸した。胃を大湾部から切開し、広げて固定後、拡大鏡の下で潰瘍の長さを0.5mm単位で測定し、合計を算出した。

■ 結果

1. 有精卵における卵白 LPA の生成機構

少量の採取卵白から脂質を抽出後、LC-MS-MSによりLPAとLPCの分子種分析を行った。出荷されたニワトリ有精卵(0日)より採取した新鮮卵白の主要なリゾリン脂質はLPCとLPAであった。量は少ないがリゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)も存在していた。図1に示すように、卵白LPAとLPCの主要分子種はリノール酸(18:2)とアラキドン酸(20:4)-含有種であった。卵白の保温により、どちらのLPA分子種量も増加し、対応するLPC分子種濃度は減少した。オレイン酸(18:1)、ステアリン酸(18:0)やパルミチン酸(16:0)を含有する量的に少ないLPAやLPC分子種も保温後に類似の量的変動を示した。しかし、インキュベート3日目以降は、すべてのLPAとLPC分子種の濃度はゆっくりと減少していった。

2. LPA 受容体アンタゴニストによるニワトリ胚子の漿尿膜(CAM)血管網形成促進作用

LPA₁/LPA₃受容体アンタゴニストであるKi16425⁹⁾は濃度依存的にCAMの血管形成を抑制したが、別のLPA₁/LPA₃受容体アンタゴニストDGPP¹⁰⁾(diacylglycerol pyrophosphate)は効果を示さなかった(図2)。LPAの血小板凝集作用を選択的に抑制するNASPA(N-palmitoyl-serine phosphoric acid, NASPA)¹¹⁾も濃度依存的な抑制作用を示した(図2)。

3. LPA のラット胃粘膜の保護作用

ヒトにおけるストレス性胃潰瘍のモデルとされる水浸拘束ストレス負荷ラットを用いた評価系で、多価不飽和脂肪酸を含有するLPA[1-オレオイル(18:1)、1-リノレオイル(18:2)、1-リノレノイル(18:3)]の胃内投与が胃潰瘍を有意に抑制することが明らかとなった。18:2-LPAで得た結果を図3に示す。18:2-LPAは卵白LPAの約1/3を占めており、頻繁な食事での卵白摂取は、上部消化管や胃粘膜保護に寄与しうるものと思われる。

■ 考察

本研究結果より、ニワトリ有精卵の孵卵初期では、多価不飽和脂肪酸を含むLPCを好む卵白リゾホスホリパーゼDの作用によるLPA産生が優勢であり、卵白LPA濃度が上昇していくことが推定された。孵卵3日目以降では、LPAやLPCの分解反応が優勢となり、両リゾリン脂質の濃度が徐々に減少していくのであろう。本研究結果は、卵白中のLPAがCAMの血管網の形成に寄与していることを示唆している。DGPPが無効なのでLPA₁とLPA₃の関与の可能性は低いと思われる。Ki16425はLPA₁/LPA₃受容体アンタゴニストとして報告されているが、血小板のLPA受容体アンタゴニストとされるNASPAと同様に、ニワトリ卵では新規なLPA受容体を介して抑制作用を発揮している可能性が考えられる。

卵白LPAに最も多く含まれているLPA分子種(リノール酸含有種)を水浸拘束ストレス負荷ラットの胃内投与が胃潰瘍を抑制したので、日常的なニワトリ卵白の摂取は、ヒトの胃粘膜保護に有効かもしれない。

■ 要約

ニワトリ有精卵を39°Cで数日間、保温すると、生理活性リン脂質LPAの濃度が上昇し、その前駆体LPCの濃度が減少した。これら卵白の主要分子種は多価不飽和脂肪酸を含有する分子種であった。本研究結果より、ニワトリ卵白中のLPAは新規なLPA受容体を介してニワトリ漿尿膜の血管網発達という生理的に重要な役割を果たすこと、LPAに富む卵白の経口摂取がストレス性胃潰瘍の抑制に有効であることが示唆された。

本研究の成果により、ニワトリ卵白が生理活性リン脂質LPAやその前駆体や産生酵素を含む有用な生物素材であることが立証され、新規な有効利用の基盤が形成された。

■ 文献

1. Mine Y and Kovacs-Nolan J(2004)Biologically active hen egg components in human health and Disease. *J. Poul. Sci.* **41**, 1-29.
2. Nakane S, Waku K, Tokumura A and Sugiura T(2001)Hen egg yolk and white contain high amounts

of lysophosphatidic acids, growth factor-like lipids: distinct molecular species compositions. *Lipids* **36**, 413-419.

3. Choi JW, Lee C and Chun J(2008)Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: An update. *Biochim. Biophys. Acta* **781**, 531-539.
4. Morishige J, Touchika K, Tanaka T, Satouchi K, Fukuzawa K and Tokumura A (2007)Production of bioactive lysophosphatidic acid by lysophospholipase D in hen egg white. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 491-499.
5. Tokumura A(2002)Physiological and pathphysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 18-25.
6. Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K and Fukuzawa K(2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J. Biol. Chem* **277**, 39436-39442.
7. Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Ioue K, Aoki J and Arai H(2002)Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* **158**, 227-233.
8. 徳村彰(2006)細胞外でリゾ脂質メディエーターを産生するホスホジエステラーゼ, *生化学* **78**, 1141-1154.
9. Ohta H, Sato A, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, Kon J, Kimura T, Tobo M, Yamazaki Y, Watanabe T, Yagi M, Sato M, Suzuki R, Murooka H, Sakai T, Nishitoba T, Im, D, Nochi H, Tamoto K, Tomura H and Okajima F.(2003)Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **64**, 994-1005.
10. Fischer DJ, Nusser N, Virag T, Yokoyama K, Wang D, Baker DL, Bautistra D, Parill AL and Tigyi G.(2001)Short-chain phosphatidates are subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol.* **60**, 776-784.
11. Sugiura T, Tokumura A, Gregory L, Nouchi T, Weintraub ST and Hanahan DJ(1994)Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: comparison with platelet activating factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 358-368.

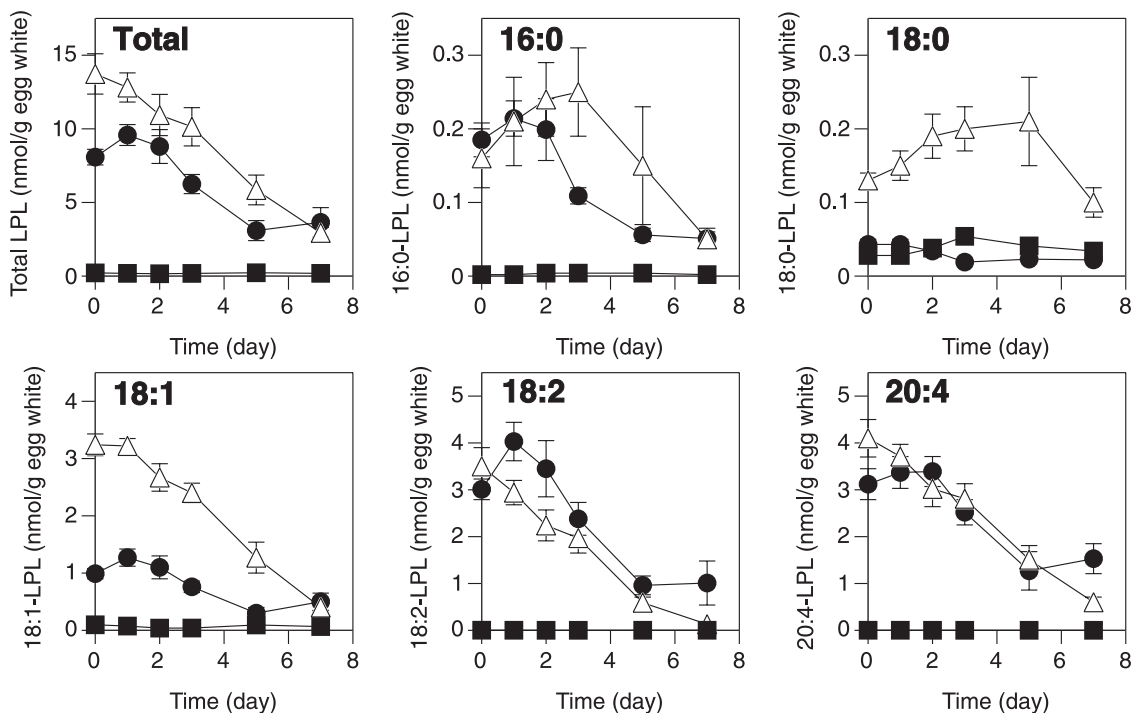


図1 ニワトリ有精卵の保温に伴う卵白リゾリン脂質の量的および質的変動
LPL: lysophospholipid: LPA(●)、LPC(△)、LPE(■)

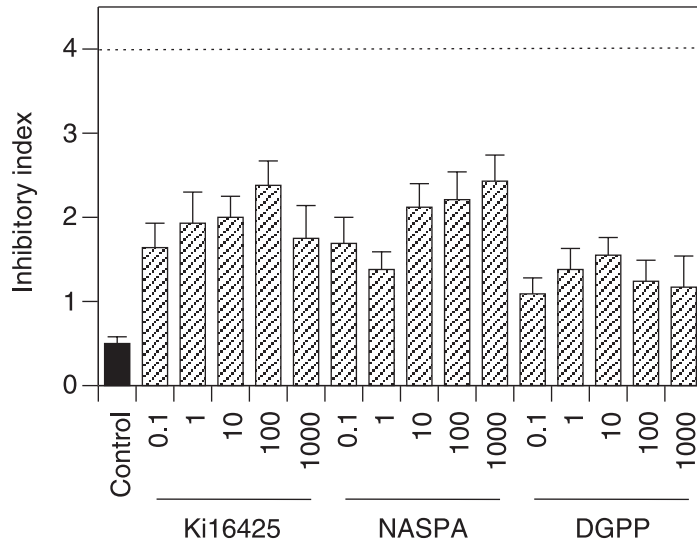


図2 ニワトリ漿尿膜における血管網形成に及ぼすLPA受容体アンタゴニストの抑制作用

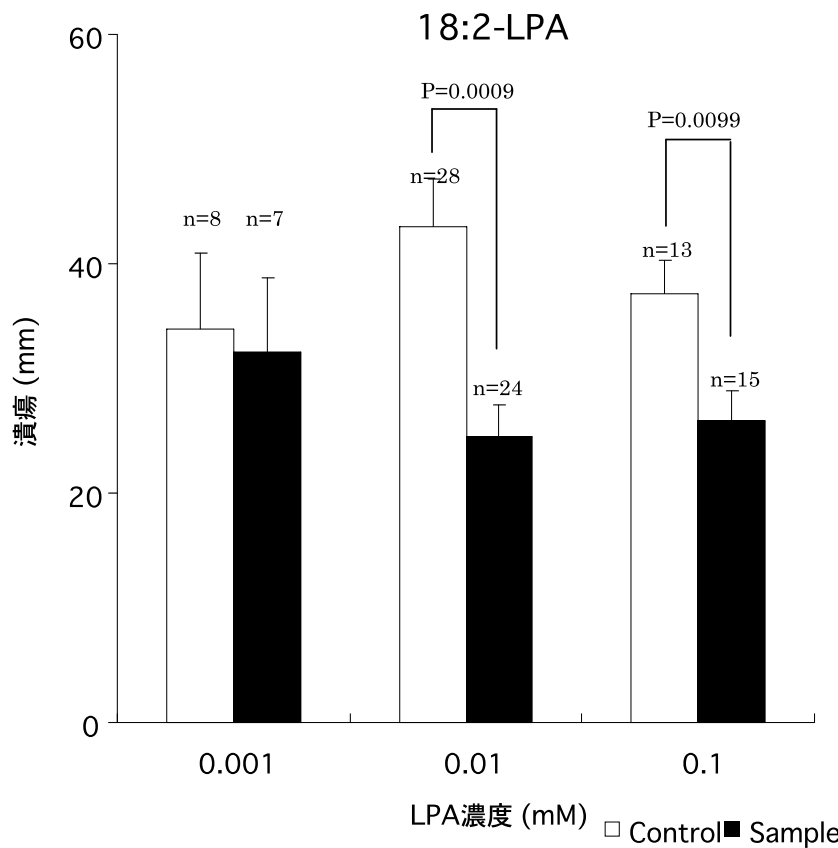


図3 水浸拘束ストレス負荷ラットにおける18:2-LPA胃内投与による胃潰瘍抑制効果