

卵殻膜ペプチドの抗炎症作用の評価とその作用機序の解明

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科・教授 高橋 信之

■ 緒 言

申請者は、抗炎症作用を有する食品成分の同定と脂質代謝異常に対するそれら食品成分の機能解析を行ってきた。特に現在は、動脈硬化性疾患の発症リスクを増大させるものとして近年注目を集めている、食後の血中中性脂肪濃度の異常増加、すなわち食後高脂血症悪化に着目して研究を進めている。これまでの研究で、高脂肪食、特に飽和脂肪酸の摂取による腸管炎症が食後高脂血症を悪化させること、ならびに腸管上皮細胞での脂質消費が増大することで食後高脂血症悪化が改善されることを見出した。そこで抗炎症作用を有する食品成分により、飽和脂肪酸で誘引された腸管炎症を抑えることで腸管上皮細胞での脂肪消費が回復し、その結果、食後高脂血症悪化が改善するのではないかと考え、腸管上皮細胞での脂質代謝を指標とした、食品成分の抗炎症作用を評価する実験系の確立を試みている。その評価系により、高脂肪食摂取による食後高脂血症悪化を改善する食品成分の同定が可能となる。

本申請研究では、卵加工品製造過程で廃棄となる卵殻に付着する卵殻膜タンパク質由来のペプチドの抗炎症作用に着目した。卵殻膜タンパク質を様々なタンパク質分解酵素により処理することで調製した卵殻膜ペプチドに抗炎症作用がないか、新たに構築した細胞評価系を用いて検討し、抗炎症作用がある場合、HPLCによる精製と質量分析装置を用いた精密質量決定とで、その活性ペプチドのアミノ酸配列を決定するとともに、その活性ペプチドの作用機序について腸管上皮細胞を用いて明らかにすることを目的とする。

■ 方 法

1. 抗炎症作用の評価(マクロファージ活性化の評価)

まず卵殻膜ペプチドに抗炎症作用があるかどうか、炎症反応の一般的な評価系であるマクロファージの活性化を指標として検討する。炎症誘導剤である細菌細胞壁成分のリポ多糖(LPS)でマクロファージを刺激すると、LPS受容体であるToll様受容体4(TLR-4)の活性化を介して、NF- κ B経路とAP-1経路という二つの細胞内情報伝達経路が活性化される(図1)。NF- κ BとAP-1は、遺伝子のオン・オフに関わる転写調節因子であり、最終的にこれら転写調節因子が活性化されることで、腫瘍壊死因子 α (TNF α)やインターロイキン1 β (IL-1 β)といった炎症性サイトカイン遺伝子の発現が誘導される。通常、これら炎症性サイトカインの遺伝子発現がオンになった細胞を活性化マクロファージと呼び、炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルが炎症反応の指標となっている。そこで申請者は、炎症反応により活性化される転写調節因子であるNF- κ BとAP-1の活性を簡便に評価するため、それぞれの転写調節因子に対する応答配列をレポーター遺伝子であるルシフェラーゼにつなげたレポータープラスミドDNAをマクロファージ培養細胞株であるRAW264.7細胞に安定導入したレポーターRAW細胞を作製した(図2)。まずこのレポーターRAW細胞を用いて、卵殻膜ペプチドの抗炎症作用を評価し、活性が認められた場合、実際に炎症性サイトカイン遺伝子の発現が抑制されているか、定量的PCR法を用いて検討する。さらに、細胞内情報伝達経路の活性化を検討するため、I κ Bのタンパク質量(NF- κ B経路)ならびに各種MAPキナーゼのリン酸化(AP-1経路)をウエスタンブロットティング法にて評価する。

2. 抗炎症作用の評価(腸管上皮細胞での評価)

腸管上皮細胞にLPSなどを添加すると、マクロファージと同様に炎症性サイトカイン遺伝子の発現が増加することが報告されている。腸管上皮細胞における炎症性サイトカインの産生は、脂質代謝異常や細胞間接着能変化などをもたらし、その結果、食後高脂血症悪化やリーキーガット(細胞間から非特異的に物質が生体内に浸潤する病態)が引き起こされる。そこで、腸管上皮細胞での炎症反応に対する卵殻膜ペプチドの作用を評価するため、腸管上皮細胞培養株であるIEC-6細胞に、RAW264.7細胞に導入したのと同じNF- κ BやAP-1の応答配列を上流に持つルシフェラーゼレポータープラスミドDNAを安定導入した。得られたレポーターIEC細胞を用いて、LPS刺激により活性化される転写調節因子の活性に対して、卵殻膜ペプチドが抑制作用を示すかどうか検討する。抑制作

用、すなわち抗炎症作用が認められた場合、マクロファージでの評価と同様に、炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量的 PCR 法にて、細胞内情報伝達経路の活性についてウエスタンブロッティング法にて評価する。

3. 活性ペプチドのアミノ酸配列の決定

卵殻膜タンパク質はキューピー株式会社から提供を受ける。その分解条件については、共同研究者である東京電機大学理工学部・半田明弘教授と検討する。また用いるタンパク質分解酵素については、ヒト消化酵素や腸内細菌産生酵素などを予定している。腸内細菌産生酵素などを用いた場合、食品として摂取した場合を考慮して、ヒト消化酵素による追加反応産物も必ず評価することとする。まず、それら卵殻膜ペプチドを上記 1 および 2 で確立した抗炎症作用の評価系を用いて検討した後、抗炎症作用が認められたペプチドについて、HPLC による分画で活性ペプチドを精製する。活性ペプチドの同定については、質量分析装置により精密質量を決定し、ニワトリの全ゲノム配列公開データベースを用いて、候補となるアミノ酸配列を決定し、その配列を用いて合成ペプチドを調製し、抗炎症作用を有する卵殻膜ペプチドを同定する。同定後、BLAST 検索により類似したアミノ酸配列を持つタンパク質を検索し、活性卵殻膜ペプチドの作用機序を予想し、その解明を試みる。

■ 結果

1. 抗炎症作用の評価(マクロファージ活性化の評価)

まず上述のレポーター RAW 細胞を用いて、LPS 刺激によって活性化される NF- κ B ならびに AP-1 の活性化を卵殻膜ペプチドが抑えるかどうか検討した。その結果、図 3 に示す通り、LPS 刺激により活性化した NF- κ B ならびに AP-1 を卵殻膜ペプチドは有意に抑制することが示された。また濃度についても、NF- κ B と AP-1 とともに検討したすべての濃度範囲において抑制作用が観察された。さらにデータには示していないが、より低濃度の 10 μ g/mL であっても抑制作用が認められた。したがって、卵殻膜ペプチドは抗炎症作用を示すことが示唆された。

そこで次に LPS 刺激による NF- κ B と AP-1 の活性化を抑制する作用が実際に抗炎症作用として観察されるかどうか、つまりマクロファージ活性化を抑制しうるかどうか、炎症マーカー遺伝子の発現レベルを定量的 PCR 法にて検討した。炎症マーカー遺伝子として、LPS 刺激によってマクロファージで発現が誘導される *TNF α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*MCP-1*、*iNOS* について、それらの mRNA 発現レベルを検討した。その結果、図 4 に示す通り、*IL-6* と *MCP-1* については増加させたものの、様々な代謝異常をもたらすことが報告されている *TNF α* 、*IL-1 β* や *iNOS* について、卵殻膜ペプチド添加により、LPS 刺激における発現誘導が抑制されることが示され、卵殻膜ペプチドに抗炎症作用があることが明らかとなった。以上の結果はすべて再現性の確認も行っており、再現良く観察されるため、卵殻膜ペプチドの抗炎症作用については明確に示されたと考えている。

さらに細胞内情報伝達経路に対する卵殻膜ペプチドの作用を明らかにするため、ウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果、図 5 に示す通り、LPS 刺激により増加した MAP キナーゼのリン酸化を卵殻膜ペプチドは明確に抑制した。MAP キナーゼはリン酸化されることで活性化されるため、卵殻膜ペプチドがそのリン酸化を抑えたことは、卵殻膜ペプチドによる AP-1 活性の抑制作用が、AP-1 活性化をもたらす MAP キナーゼの活性化抑制を介していることが示唆される。一方、NF- κ B 活性化をもたらす I κ B のタンパク質量の減少は、卵殻膜ペプチド添加によっても大きく回復することはなかった。

2. 抗炎症作用の評価(腸管上皮細胞での評価)

腸管上皮細胞を用いた抗炎症作用の評価を行うため、NF- κ B ならびに AP-1 に対するレポータープラスミド DNA を腸管上皮細胞培養株である IEC-6 細胞に導入した。安定導入株を得るために、ハイグロマイシン耐性遺伝子がレポータープラスミド DNA に既に組み込まれていることから、ハイグロマイシン添加を行い、ゲノム DNA にレポータープラスミド DNA が挿入されている細胞の選択を行った。しかし、薬剤選択された細胞が得られず、数回の試みの結果、LPS 刺激でレポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性が増加するレポーター IEC 細胞の確立に成功した (RAW264.7 細胞と異なり、なぜ IEC-6 細胞でレポーター細胞の確立が困難であったのか、その原因は不明である)。

そこで、レポーター RAW 細胞と同様に、IEC-6 細胞で LPS 刺激によって活性化される NF- κ B ならびに AP-1 の活性化を卵殻膜ペプチドが抑えるかどうか検討した。その結果、マクロファージでは抗炎症作用が認められた卵殻膜ペプチド 100 μ g/mL では作用が認められず、500 μ g/mL 以上の高濃度でのみ抗炎症作用が示された。この抗炎症作用を示す濃度差が、腸管上皮細胞特有のものであるのか、あるいはレポーター IEC 細胞の問題なのか明確ではないため、現在、炎症性サイトカインの遺伝

子発現など他の方法でも検討している(検討中のためデータは示していない)。

3. 活性ペプチドのアミノ酸配列の決定

マクロファージ活性化において卵殻膜ペプチドが抗炎症作用を示したため、HPLCによる分画を行い、卵殻膜ペプチドの活性ペプチド同定を試みた。C18逆相カラムを用いて、図6に示すようにアセトニトリルの濃度を段階的に変えていき、まずは6つの分画に分け、それぞれの分画についてNF- κ BならびにAP-1の活性化を抑えるかどうか、ルシフェラーゼアッセイを実施している。予備的な検討では、疎水性が高い分画でNF- κ BやAP-1の活性化を抑える作用が認められているが、再現性の確認とさらなる分画の準備を進めている。

■ 考 察

マクロファージを使った実験(結果1)において、LPS刺激による炎症性サイトカインの発現誘導を卵殻膜ペプチドが有意に抑制したため、抗炎症作用があることが示された。これまでに卵殻膜ペプチドの抗炎症作用は報告されておらず、本研究において初めて見出された卵殻膜ペプチドの生理作用である。予備的検討で、タンパク質分解酵素の処理時間を延ばした際、産生されるペプチドサンプルの抗炎症作用が減弱したため、長いペプチドが抗炎症作用に関与している可能性が考えられる。そのような長いペプチドが細胞内に取り込まれることは少ないと考えられるため、卵殻膜ペプチドの抗炎症作用は細胞外に作用点があると想定される。しかし、細胞内情報伝達系のどの部分に卵殻膜ペプチドが作用しているか検討するため行ったI κ BやMAPキナーゼリン酸化のウエスタンブロッティングの結果から、LPS刺激によるI κ Bのタンパク質量減少を回復させていないことが明らかとなった(図5)。このことは、I κ Bのタンパク質量が減少することでNF- κ Bが核内移行し、その応答配列に結合するまでに卵殻膜ペプチドの抗炎症作用の作用点があることを示唆している。したがって、長いペプチド以外にも細胞内に取り込まれるような短いペプチドが卵殻膜ペプチドの抗炎症作用に関わっている可能性がある。本研究では、そうした抗炎症作用の詳細なメカニズムまで明らかにすることができなかったことから、今後、卵殻膜ペプチドを食品成分として活用するためには、さらに検討を続ける必要があると考えられる。

また計画では、本共同研究期間中に活性ペプチドの同定まで行う予定であったが、HPLCの分画や細胞アッセイに用いることができる量の分画物を確保する条件設定に手間取り、分画を進めている途中である。今後、分画物の抗炎症作用を評価し、質量分析装置によるペプチドのアミノ酸配列決定まで進めていきたい。最終的には、マウスを用いた活性ペプチドの吸収実験を行いたい。しかし、共同研究では動物実験が認められないため、活性ペプチドが吸収されるかどうか不明であっても、必ず活性ペプチドにさらされることが予想される腸管上皮細胞での炎症に対する作用を検討したいと考えている。

■ 要 約

本研究において、卵殻膜タンパク質の分解産物である卵殻膜ペプチドサンプルが、マクロファージ活性化を抑制する抗炎症作用があることが初めて見出された。また腸管上皮細胞での炎症も抑える可能性が示唆され、腸管炎症による腸管上皮細胞での代謝異常やリーキーガットを卵殻膜ペプチド摂取により予防・改善できる可能性が期待される。

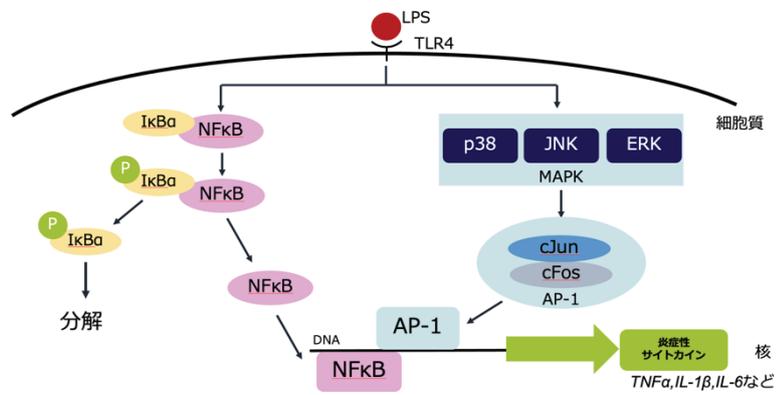


図1 LPSによる炎症刺激時の細胞内情報伝達経路

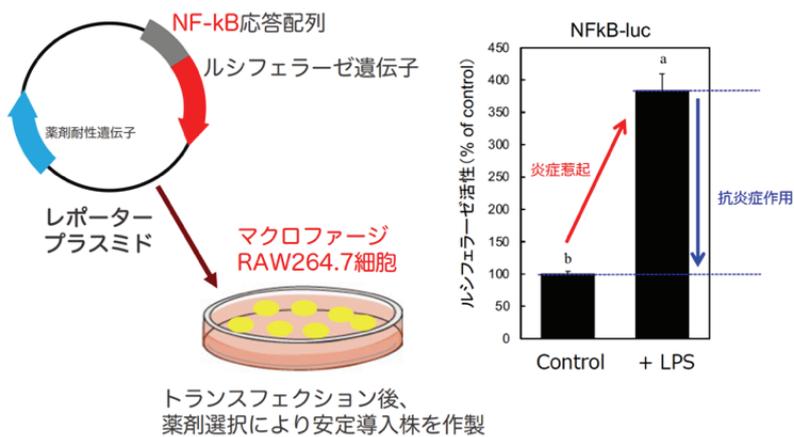


図2 レポーター RAW 細胞を用いた抗炎症作用の概要

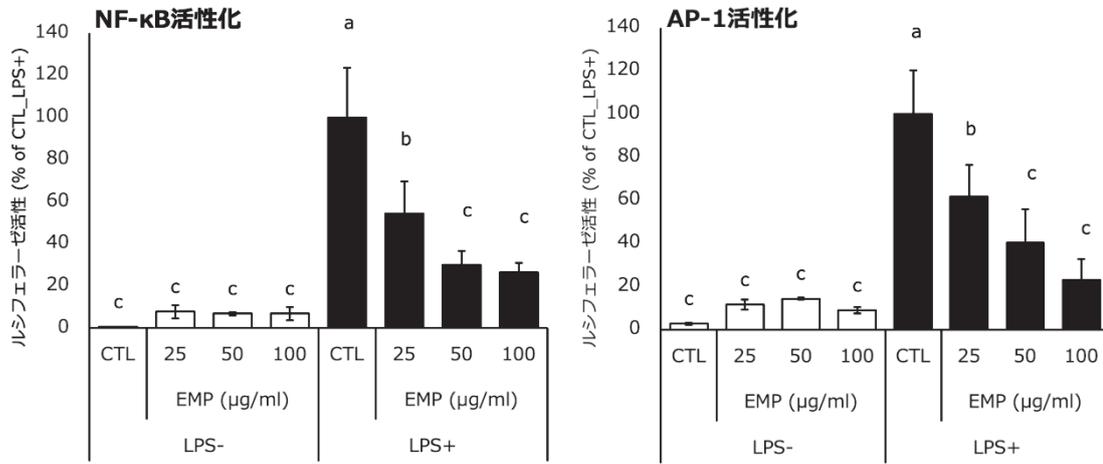


図3 卵殻膜ペプチド(EMP)の抗炎症作用の評価

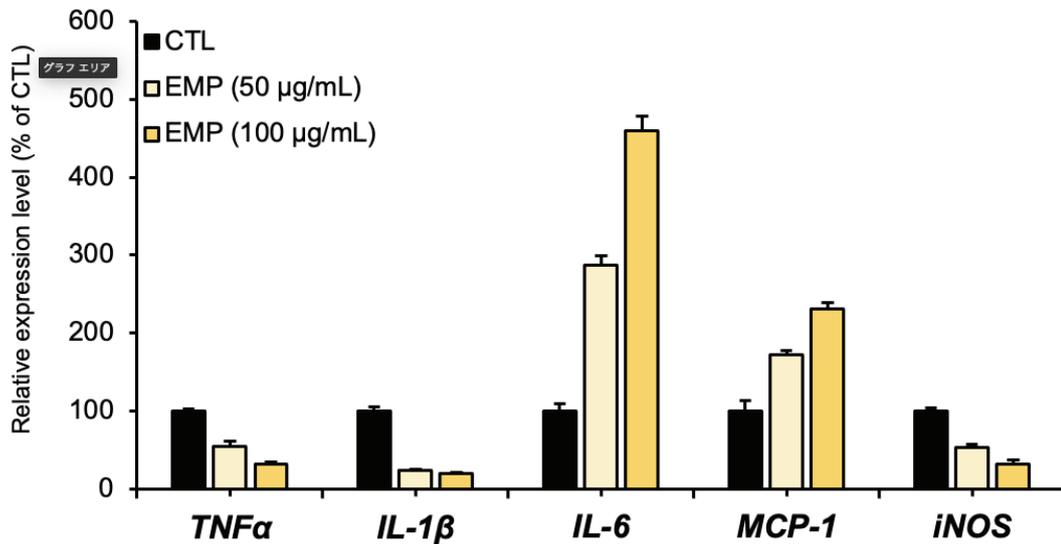


図4 卵殻膜ペプチドの炎症性サイトカイン発現に対する作用

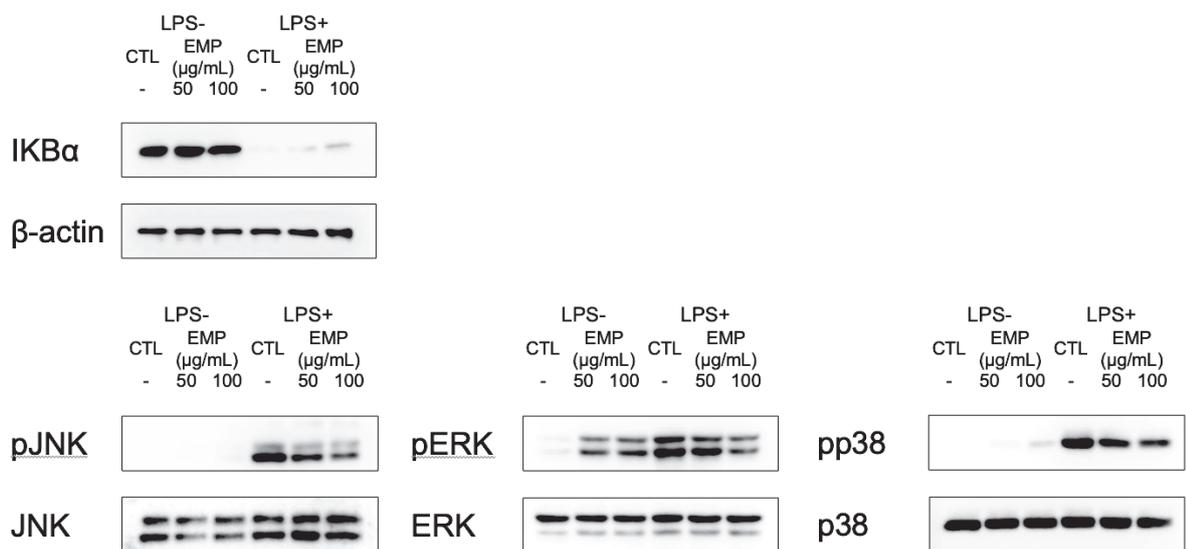


図5 卵殻膜ペプチドの細胞内情報伝達経路に対する作用

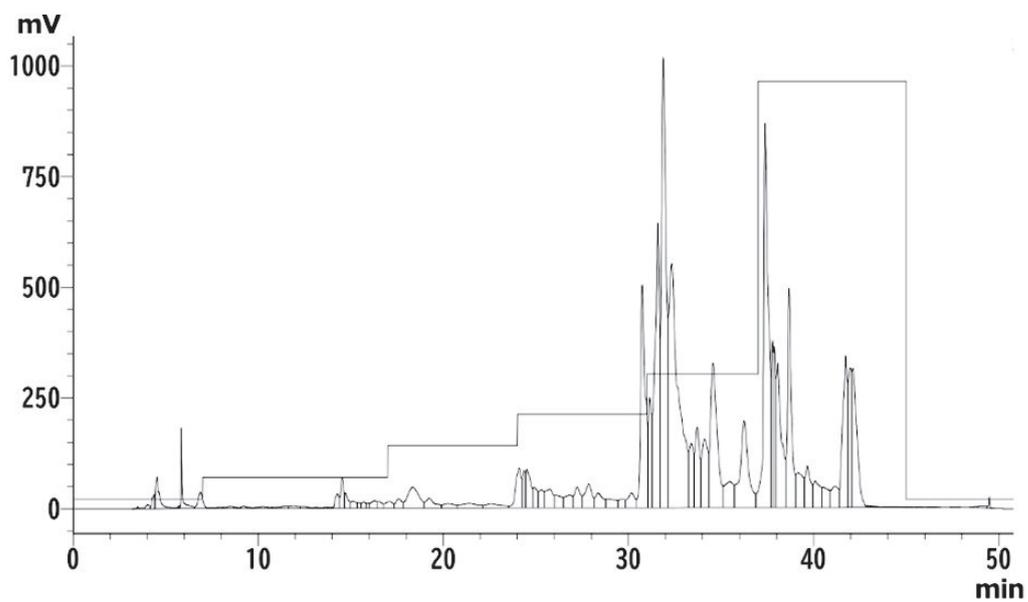


図6 HPLCによる卵殻膜ペプチドの分画