

牛乳由来蛋白・ペプチドによる細胞増殖、分化、アポトーシス誘導の分子機構

岐阜大学医学部生化学教室 教授 野澤義則

(要 旨)

牛乳は健康食品として古くより知られており、乳幼児の成長にとって必要な骨形成に重要な成分を含むことが知られている。また、栄養食品としてばかりではなく、主蛋白質カゼインやラクトフェリンの分解産物は多くの生理活性物質を含み、細菌感染防止、免疫賦活、細胞増殖・分化・アポトーシスに有効であることが報告されている(1-4)。しかし、それらの物質の化学的実体や作用機構については十分明らかにされていない。牛乳成分の有効性の検索には細胞レベルでの検討が重要であり、本研究では、各種細胞系を用いて細胞増殖・分化・アポトーシス誘導機構を検討した。牛乳蛋白カゼイン由来ペプチドは免疫賦活作用を有することを明らかにし、その有効成分の単離・精製および同定を行なった。カゼイン由来低分子ペプチドは顕著な免疫賦活作用を示し、また、がん細胞増殖抑制効果を認めた。さらに、牛乳蛋白のトリプシン分解物による細胞増殖・分化・アポトーシス誘導を各種細胞系を用いて検討し、骨芽様細胞MC3T3-E1の増殖抑制、分化誘導と、ヒト骨髄巨核芽球性白血病細胞株Meg-O1のアポトーシス誘導を示唆する所見が得られた。これらの細胞機能発現に関与する機構を明らかにするために、蛋白質リン酸化系を中心に細胞内情報伝達経について検討した。

(方 法)

1) 牛乳由来カゼインおよび乳清蛋白質加水分解物の精製と同定:

牛乳由来カゼインにトリプシンを添加し、37℃で一晩反応させる。反応後100℃で10分間加熱処理を行い、10,000rpmで1時間遠心し、上清画分を得る。得られた上清画分をセファデックスG-15によるカラムクロマトグラフィーを行い、低分子量ペプチドを分画した。各画分の抗体産生量を測定し、最大産生能を示す画分を集め、さらにDEAEセファデックスA-25で精製した。4つのペプチド画分が単一にまで精製され、アミノ酸配列を決定し、これらのペプチドを大量に合成した。

牛乳由来の乳清画分についても同様にトリプシン分解を行い、約5,000前後の分子量を含む分解産物を分画した。

2) 抗体産生能に対する効果:

マウス腹腔内に5%羊赤血球浮遊液0.5mlを投与後、4日目に脾臓を摘出し脾臓細胞浮遊液を調製する。この浮遊液に被験物質を添加し、37℃で24時間培養する。培養液中に産生される羊赤血球に対する抗体価を赤血球溶血反応で測定した。

3) ストレス負荷による免疫能低下に対するカゼイン加水分解物投与の効果:

Balb/c系雄マウスに30日間にわたってカゼイン加水分解物の水溶性画分(10mg/ml)を与えた後、

各群3匹を用い、ストレス無負荷群と羊赤血球投与1日前から2日後までに1~5回ストレス負荷を与えた群について、抗体産生能および血清中の抗体量に対する影響を検討した。ストレス負荷は、マウスを1匹ずつ金網性の狭いゲージに入れ、15℃の水中に首まで浸して1時間静置した(拘束水浸ストレス)。

4) がん細胞増殖に対するカゼイン加水分解物の影響:

ICR系雌マウス(6週齢)に、カゼイン加水分解物の水溶性画分(10mg/ml)を1週間与えた時点でがん細胞(サルコーマ180細胞) 1×10^6 個をソケイ部皮下に移植し、さらにカゼイン加水分解物の水溶性画分を与え2週間後に固形腫瘍を摘出し重量を測定した。

5) 骨芽様細胞MC3T3-E1の牛乳蛋白加水分解物の影響:

MC3T3-E1細胞(1×10^5)を α -MEM/10%FBS培養液中100mmディッシュで2日間培養後、FBSフリーの α -MEM培地に変換して24時間培養した。FBSフリー培地に各種牛乳蛋白分解産物(5~10mg/ml)を添加し、24時間培養した。形態の変化およびシグナル伝達系酵素活性の変化を調べる。

6) ヒト骨髓巨核芽球性白血病細胞Meg-O1の牛乳蛋白加水分解物の影響:

Meg-O1は武田製薬細胞工学研究所より購入した。細胞は20%FBSを含むDMEMで培養し、 5×10^5 個/mlを5%FBSを含むDMEMに移し、牛乳蛋白質分解産物を添加して、アポトーシス誘導を観察する。アポトーシスの変化は、核を特異的に染色するヘキスト33258を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

7) ウェスタンブロッティングによる酵素蛋白質量の変化:

MC3T3-E1細胞を牛乳蛋白分解産物で処理したものと、無処理細胞をlysis buffer(トリス緩衝液、PH7.4、1%Triton X-100、1%SDS、1%コール酸、 $20 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、1mM PMSF)に懸濁し、超音波で細胞を破壊する。蛋白質の一定量(50-100 μg)をSDSサンプル緩衝液で処理した後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳道(SDS-PAGE)を行ない蛋白質を分離した。分離した蛋白質はPVDF膜に転移後、各種抗体と反応させた後、アルカリホスファターゼ結合の抗ウサギ二次抗体と反応させECL検出試薬を用いてX線フィルム上に感光させた。

蛋白質の定量はBio-Rad試薬を用いて、Bradfordの方法に従って行った。

(結果/考察)

牛乳由来カゼイン加水分解物の抗体産生能に及ぼす影響

牛乳由来カゼインのトリプシンによる加水分解物は、セファデックスG-15を用いたカラムクロマトグラフィーを行ない、いくつかの画分に分離した。分画された低分子ペプチド(300-3,000)画分(1mg/ml)について抗体産生能を測定したところ、高い抗体産生能を示す8つの画分を得た(図1)。最も高い抗体産生能を示したFr. 4を、さらにDEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーで精製を行った。各画分(1mg/ml)について抗体産生能を測定したところ、未吸着画分に最も高い効果が認められた(図2)。

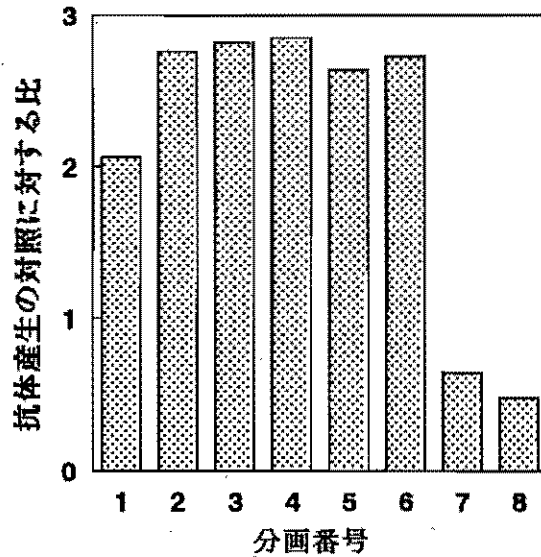


図1. セファデックスG-15による各画分の抗体産生能

脾臓細胞浮遊液に各画分 (1mg/ml) を添加し24時間培養後、培養液中に産生される抗体量を測定した。産生された抗体量は赤血球溶血反応により測定し、対照に対する比で現した。

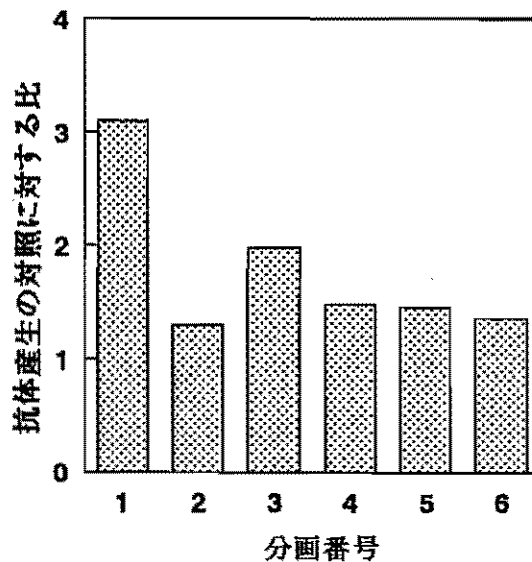


図2. DEAEセファデックスA-25による各画分の抗体産生能

脾臓細胞浮遊液に各画分 (1mg/ml) を添加し24時間培養後、培養液中に産生される抗体量を測定した。

この画分をさらに精製し、4つの単一なペプチドを得た (CP-1、-2、-3、-4)。これらのペプチドのアミノ酸配列を決定した。各合成ペプチド (1 mg/ml) の抗体産生能を測定したところ、CP-2に

高い抗体産生能が認められた (図3)。

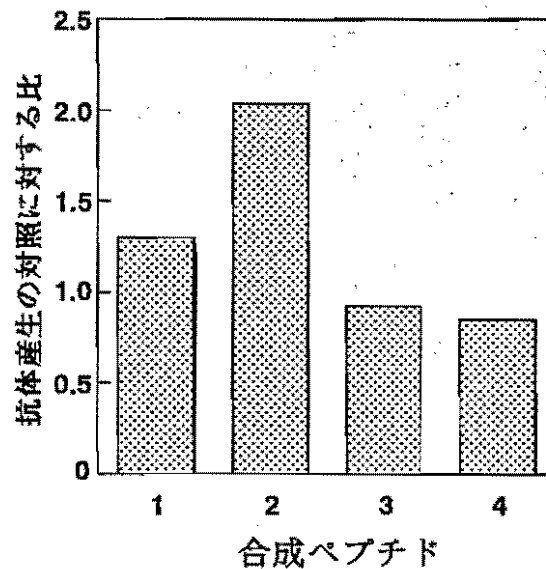


図3. カゼイン加水分解物由来合成ペプチドの抗体産生能
脾臓細胞浮遊液に各画分 (1mg/ml) を添加し24時間培養後、培養液中に産生される抗体量を測定した。

ストレスを負荷することにより、免疫能が低下することが知られている。マウスに拘束水浸ストレスを与え、免疫能低下に対するカゼイン加水分解物投与の効果について検討した。脾臓細胞当たりの抗体産生量に対するストレス負荷の影響は少なく、水を与えたマウス群との間に大差は認められないが (図4)、ストレス負荷を5回以上かけると、水摂取群では62.0%に低下したのに対して、カゼイン加水分解物の摂取群では80.0%に留まり、ストレスによる抗体産生能の低下がカゼイン加水分解物により軽減した。また、水摂取群では、ストレス負荷の回数に応じて血清中の抗体量は強い影響を受けて41%まで低下した。一方、カゼイン加水分解物の摂取群では、ストレス負荷回数2回までは殆ど低下せず、むしろ血清中の抗体量は増加した (図5)。このように、ストレスの回数を増加すると抗体量は低下するが、水摂取群に比べ明らかに強い抵抗性を示した。

カゼイン加水分解物投与によるがん細胞増殖の影響を検討した。マウスに移植したサルコーマ180細胞の増殖速度は、固形腫瘍重量の測定によって定量化した。水摂取群は固形腫瘍重量が 1.73 ± 0.97 gであったのに対して、カゼイン加水分解物摂取群では 0.36 ± 0.29 gと明らかにがん細胞の増殖が抑制された。したがって、カゼイン加水分解物を与えることにより、生体内の免疫能が賦活され、その結果がん細胞の増殖が抑制されたものと思われる。

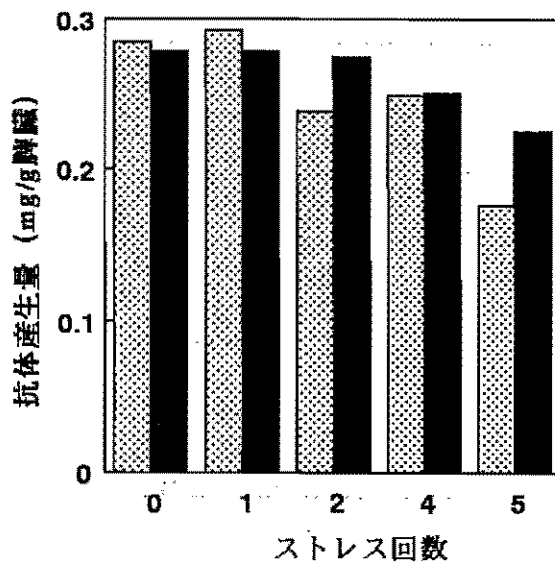


図4. ストレスによる抗体産生能低下に対するカゼイン加水分解物投与の影響

マウスに30日間カゼイン加水分解物水溶液(10 mg/ml)を与え、0, ストレス無負荷; 1, 羊赤血球投与1日前に1回ストレス負荷; 2, 1日前と同日の2回負荷; 4, 1日前、同日、1日後及び2日後の4回ストレス負荷; 5, 1日前、同日、1日後、2日後及び3日後の5回ストレスを負荷し脾臓細胞当たりの抗体量を測定した。

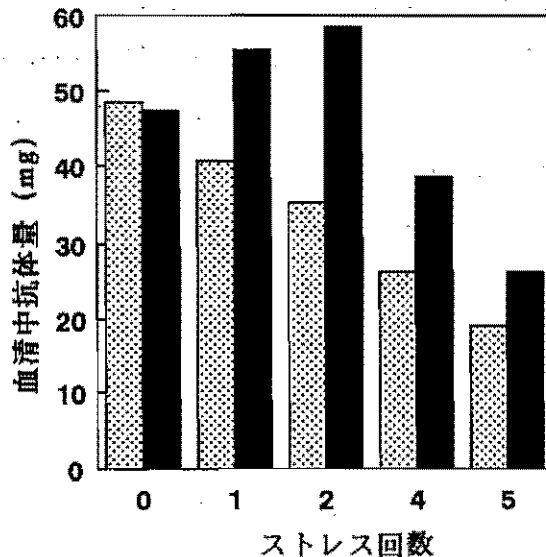


図5. ストレスによる抗体産生能低下に対するカゼイン加水分解物投与の影響

図4の説明と同様の方法でマウスにストレスを負荷した後血液を採取し、血清中の抗体量を測定した。

骨芽様細胞MC3T3-E1における牛乳蛋白分解物による形態およびシグナル伝達系の変動

牛乳由来蛋白質（カゼイン画分と乳清蛋白質画分）の酵素分解物の骨芽様細胞MC3T3-E1の増殖および分化誘導作用について検討した。

カゼイン加水分解物の細胞増殖に対する影響を検討するために、MC3T3-E1細胞に粗カゼイン加水分解ペプチドを添加し、 $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞への取り込みの時間経過を調べた。カゼイン加水分解物は1 mg/mlでは阻害の程度は僅かであるが、5 mg/mlで12時間処理すると完全に $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを阻害した（図6）。阻害の程度はFBSの濃度に依存して減少し、10%FBS存在下ではカゼイン加水分解物（5 mg/ml）による阻害は見られなかった。したがって、低濃度FBS培地ではカゼイン加水分解ペプチドは骨芽細胞の増殖を抑制する効果があることが示された。

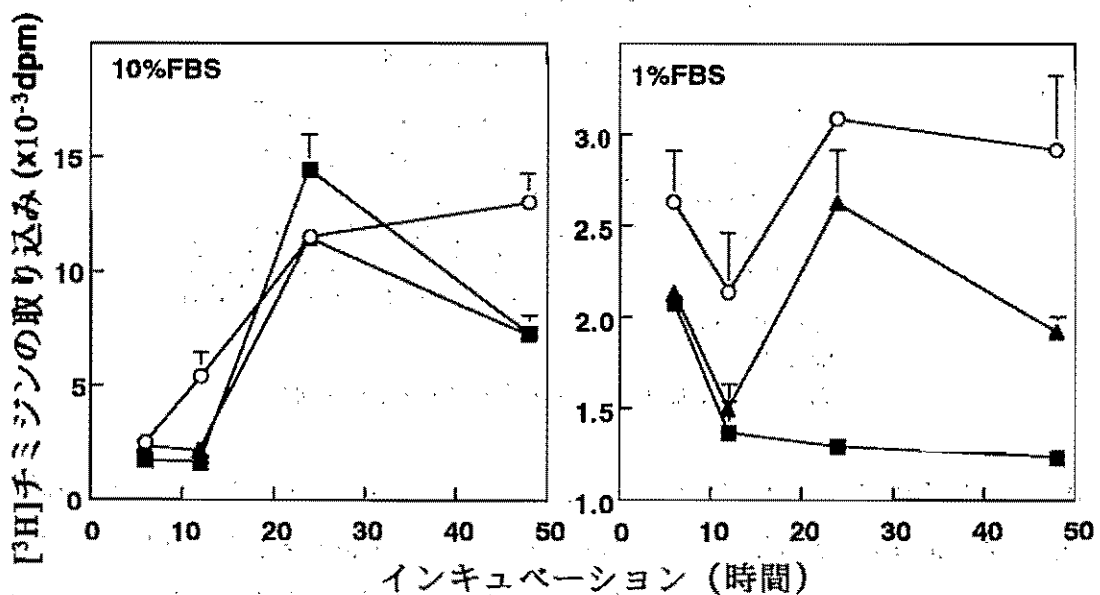


図6. 骨芽様細胞MC3T3-E1の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みに対するカゼイン加水分解ペプチドの影響

MC3T3-E1細胞を1%および10%FBSを含む培地で24時間培養後、カゼイン加水分解ペプチドを添加して2日間インキュベーションした。各時間における $[^3\text{H}]$ チミジン(2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 6時間の取り込みを測定した。

- 対照
- ▲ カゼイン加水分解ペプチド (1mg/ml)
- カゼイン加水分解ペプチド (5 mg/ml)

一方、MC3T3-E1細胞は骨への分化に伴い、アルカリホスファターゼ活性が増加することが知られている（5）。カゼイン加水分解物のMC3T3-E1細胞の骨への分化誘導能について調べた。カゼイン加水分解ペプチド（5 mg/ml）を1%FBS培地に添加し、アルカリホスファターゼ活性を測定した。対照細胞は1%FBS培地で48時間培養すると、アルカリホスファターゼ活性が約2倍増加するが、カゼイン加水分解ペプチド処理による影響は見られず、むしろ、48時間では酵素活性の低下が認められた（図7）。したがって、カゼイン加水分解ペプチドはMC3T3-E1細胞の骨への分化誘導には影響しないものと思われる。

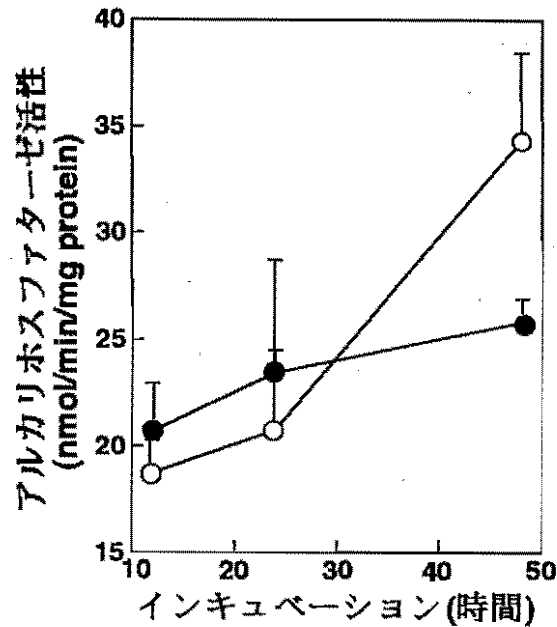


図7. 骨芽様細胞MC3T3-E1細胞におけるアルカリホスファターゼ活性に対するカゼイン加水分解ペプチドの影響

MC3T3-E1細胞(5×10^5 /ml)を1%FBSを含む α MEM培地で24時間培養後、カゼイン加水分解ペプチドの有無でインキュベーションし、各時間で細胞を採取し酵素活性を測定した。

○ 対照

● カゼイン加水分解ペプチド (5mg/ml) 添加

MC3T3-E1細胞は牛乳カゼインや乳清蛋白加水分解物 (5 mg/ml) により、著しい形態変化を示した。形態変化の誘導は無血清培地において顕著であり、血清の含量を増加するにつれて軽減した。無血清培地に分画した各画分 (1 mg/ml) を添加し、24時間後に形態の変化を観察したところ、対照細胞と比べて、カゼイン加水分解物Fr. 1、精製ペプチドCP-4、および乳清蛋白質加水分解画分のFr. 10による形態変化が認められた (図8)。とくに乳清蛋白加水分解画分Fr. 10による顕著な形態変化が認められた。

MC3T3-E1の形態変化に伴う細胞内情報伝達系の変化について検討した。乳清蛋白加水分解ペプチドによる蛋白質チロシンリン酸化の影響を調べるために、乳清蛋白加水分解物 (5 mg/ml) を添加した無血清培地で24時間培養後、抗ホスホチロシン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。無血清培地で24時間培養することにより幾つかの蛋白質のチロシンリン酸化が認められた (60kDa、70kDa、88kDa、100kDa、125kDa、130kDa) (図9)。乳清蛋白加水分解ペプチドを処理することにより、88kDa、55kDa、58kDa、100kDa蛋白質のチロシンリン酸化の増加が認められ、逆に125kDaと70kDa蛋白質のチロシンリン酸化の減少が観察された。125kDa蛋白質バンドはFAKであることが考えられたが、他の蛋白質バンドの同定は今後の課題である。

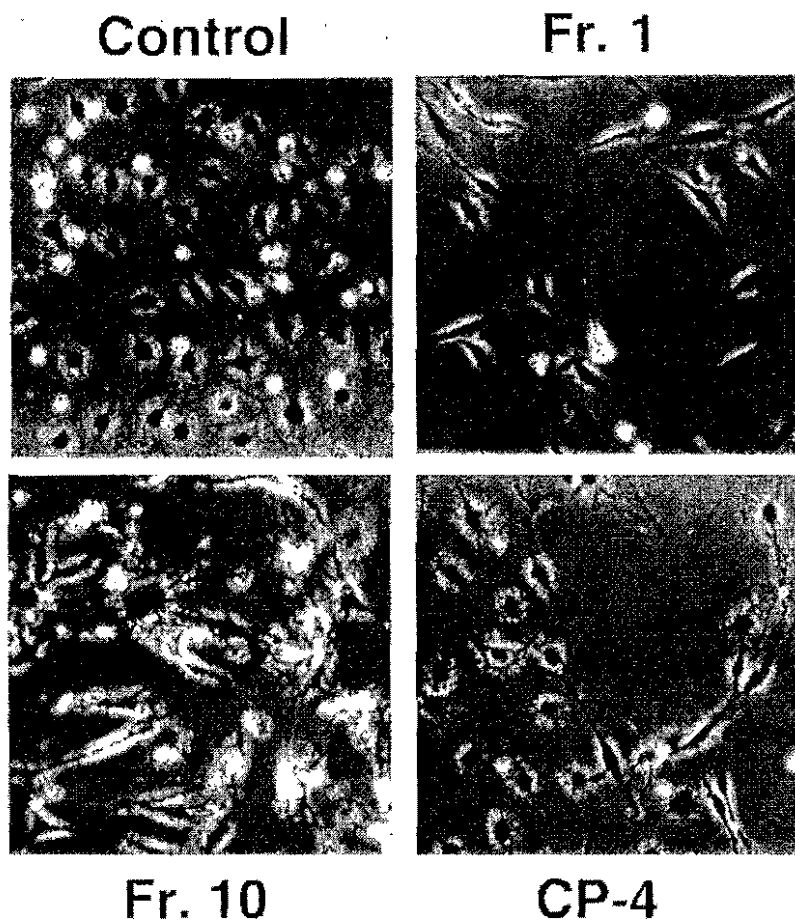


図 8. 骨芽様細胞MC3T3-E1の牛乳蛋白分解物による形態変化

MC3T3-E1細胞を0.3%BSAを含む培地で24時間培養後、カゼイン加水分解ペプチド(Fr.1), 乳清蛋白加水分解物(Fr. 10)および合成ペプチド(CP-4)5mg/mlをそれぞれ添加し、24時間後の形態変化についてを無添加の対照細胞と比較した。



図 9. 骨芽様細胞MC3T3-E1の蛋白質チロシンリン酸化に対する乳清蛋白分解物の影響

MC3T3-E1細胞を0.3% BSAを含む培地で24時間培養後、乳清蛋白加水分解物(Fr. 10)5mg/mlを添加し、24時間後の蛋白質チロシンリン酸化についてを抗ホスチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。

MC3T3-E1細胞の形態変化に伴うプロテインキナーゼC (PKC) の変動について、各種PKCアイソザイムの抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。MC3T3-E1細胞には各種PKCアイソザイムが存在し、PKC α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 θ が検出された。乳清蛋白分解物Fr. 10で24時間処理することによりPKC ϵ の特異的な減少が観察された (図10)。さらに細胞増殖、分化、アポトーシスにはMAPKファミリーの活性化が関与することが知られている (6)。MAPKファミリーの活性化はERK、p38MAPK、JNKの活性化のみを検出する抗体を用いて検討した。無血清培地で24時間培養した対照細胞では、ERKとp38MAPKのチロシンリン酸化の亢進が見られたが、乳清蛋白分解物処理細胞では両者のリン酸化は完全に消失していた (図11)。

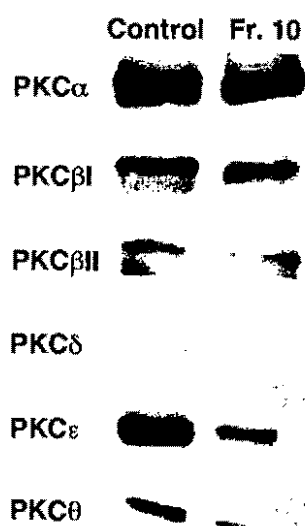


図10. 骨芽様細胞MC3T3-E1のPKCに対する乳清蛋白分解物の影響

MC3T3-E1細胞を0.3% BSAを含む培地で24時間培養後、乳清蛋白加水分解物(Fr. 10)5mg/mlを添加し、24時間後の細胞について、各種PKCアイソザイムの抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。

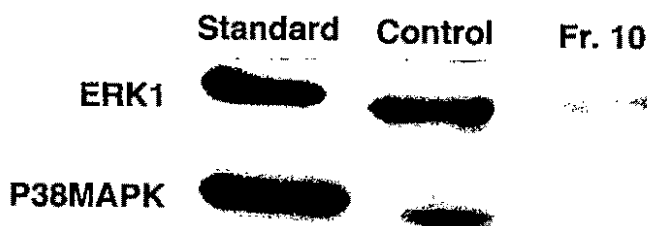


図11. 骨芽様細胞MC3T3-E1のMAPKファミリーの活性化に対する乳清蛋白分解物の影響

MC3T3-E1細胞を0.3% BSAを含む培地で24時間培養後、乳清蛋白加水分解物(Fr. 10)5mg/ml添加し、24時間後のMAPKファミリーの活性化について抗リン酸化MAPKファミリー抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。

以上の結果より、乳清蛋白加水分解産物は骨芽様細胞MC3T3-E1細胞の形態変化をもたらし、細胞増殖の低下を引き起こした。また、増殖阻害はMAPKファミリーのERK1 (p42MAPK)、p38MAPKの活性化の阻害、PKC ϵ の特異的減少が関連しているものと思われる。

一方、骨髓巨核芽球性白血病細胞Meg-O1はホルボールミリスチンアセテート (PMA) 処理により血小板に分化することが知られている (7)。本細胞を乳清蛋白加水分解物Fr. 10処理すると、急速な形態変化を引き起こすことを見出した (図12)。濃度依存的な形態変化を生じ、細胞数の減少を引き起こした (図13)。ヘキスト3358染色による核クロマチン分解が観察され、アポトーシス誘導が示唆された。最近、牛乳蛋白質ラクトフェリンB由来ペプチドは、ヒト白血病細胞HL60に対してアポトーシスを誘導することが報告されている (8)。牛乳上清蛋白質の加水分解産物もがん細胞に対して同様な効果を示すことが示唆された。また、Fr. 10には、骨髓巨核芽球性白血病細胞Meg-O1の巨核球および血小板への分化促進作用も認められ、血小板増加との関連性においても興味ある物質を含んでいる。さらに誘導物質の本体を明らかにするとともに、詳細な、分化およびアポトーシス誘導のメカニズムを解明することが今後の重要な課題である。

なお、本研究において牛乳カゼイン加水分解ペプチドの精製および免疫賦活作用に関する研究は、岐阜県衛生研究所の渡辺 豊博士との共同研究によるものである。

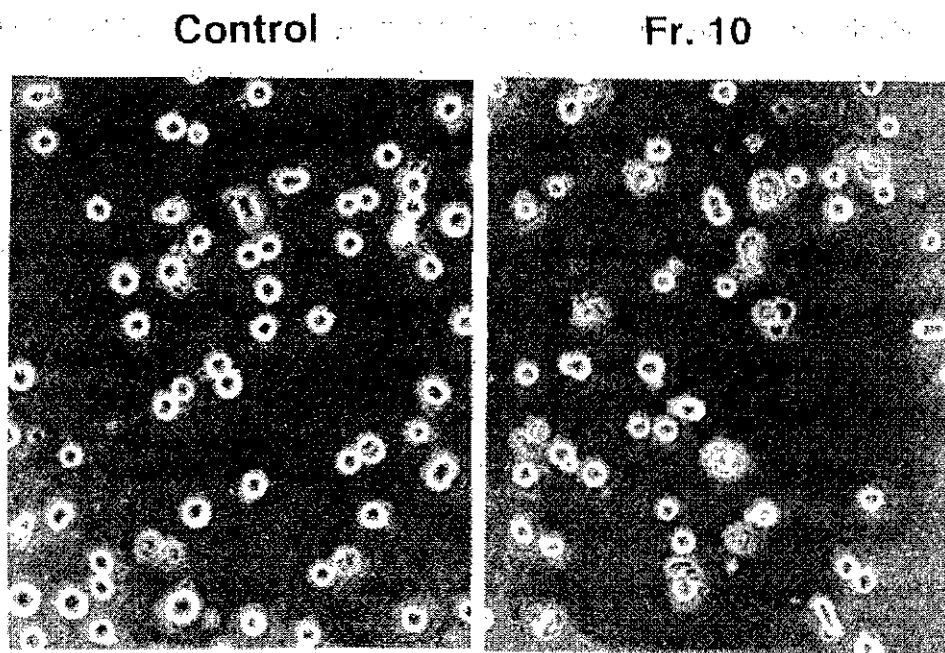


図12. 巨核芽球性白血病細胞Meg-O1の乳清蛋白分解物による形態変化

Meg-O1細胞を0.3%BSAを含むDMEM培地で24時間培養後、乳清蛋白加水分解物(Fr. 10)5mg/mlを添加し、6時間後の細胞形態について無添加の対照細胞と比較した。

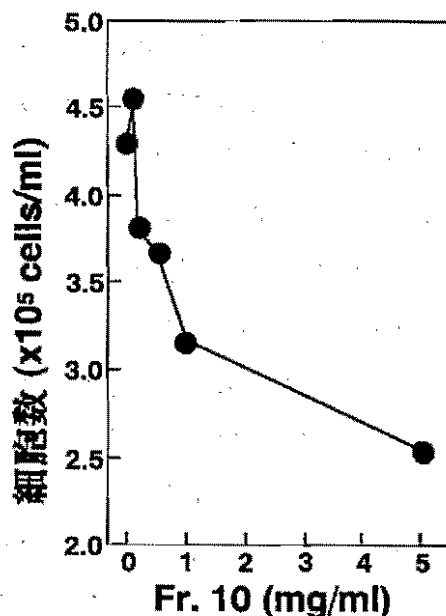


図13. 巨核芽球性白血病細胞Meg-O1における乳清蛋白分解物による細胞数減少の濃度依存性

Meg-O1細胞を5%FBSを含むDMEM培地で24時間培養後、各濃度の乳清蛋白分解物を添加し、6時間後に細胞数の変化を測定した。

参考文献

- 1) Fiat, A. M. and Jolles, P. Caseins various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects. *Mol. Cell. Biochem.*, 87, 5-30, 1989.
- 2) Cox, D. A., Burk, R. R. Isolation and characterization of milk growth factor, a transforming-growth-factor- β 2-related polypeptide, from bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, 23, 353-358, 1991.
- 3) Jin, Y., Cox, D. A., Knecht, R., Raschdorf, F., Cerletti, N. Separation, Purification, and sequence identification of TGF- β 1 and TGF- β 2 from bovine milk. *J. Protein Chem.*, 10, 565-75, 1991.
- 4) Soteriou, A. and Cryer, A. Distinct immunoreactivities suggest the existence of potential tissue variants in rat lipoprotein lipase. *Biochem. J.*, 299, 417-423, 1994.
- 5) Yada, M., Yamaguchi, K. and Tsuji, T. NGF stimulates differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 1187-1193, 1994.
- 6) Cohen, P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trend Cell Biol.*, 7, 353-361, 1997.
- 7) Ogura, M., Morishima, Y., Okumura, M., Hotta, T., Takamoto, S., Ohno, R., Hirabayashi, N., Nagura, H. and Saito, H. Functional and morphological differentiation induction of a human megakaryoblastic leukemia cell line (Meg-O1s) by Phorbol diesters. *Blood*, 72, 49-60, 1988.
- 8) Yoo, Y. C., Watanabe, R., Koike, Y., Mitobe, M., Shimazaki, K., Watanabe, S. and Azuma, I. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237, 624-628, 1997.