

牛乳タンパク質による腸細胞増殖阻害と その感染予防及び治療への応用

岐阜大学農学部生物資源利用学科 金丸 義 敬

要 約

牛乳 α -ラクトアルブミンはラット小腸由来培養細胞であるIEC-6の増殖に対して用量依存的に顕著な阻害作用を示す。本研究は、この作用がアポトーシスを介した細胞死の誘導に起因することを明らかにした。また、すでに報告されている人乳 α -ラクトアルブミンと同様、市販の牛乳 α -ラクトアルブミン標品ばかりでなく通常の牛乳から抗体特異的に精製した α -ラクトアルブミンも同様の作用を示したことから、この作用は α -ラクトアルブミン固有の特性とすることが出来る。阻害作用は多量体を含むフラクションに認められ、また、加熱や還元アルキル化によって容易に消失することから、フォールディング変異体の関与が示唆される。我々が見出した牛乳 α -ラクトアルブミンの作用の意義は、不都合な状態に陥った腸の細胞の速やかな除去にあることが推察されることから、動物実験による効果の検討が望まれる。

キーワード：牛乳タンパク質、 α -ラクトアルブミン、フォールディング変異体、IEC-6細胞、細胞増殖、アポトーシス

目 的

①研究の背景 牛乳に含まれる種々の蛋白質が腸培養細胞の成長や機能発現に及ぼす影響を調べてみるところ、 α -ラクトアルブミン (α -LA) と β -ラクトグロブリン (β -LG) という二つの主要な乳清蛋白質がいずれも腸培養細胞の増殖を強力に阻害するという意外な性質を示すことが浮き彫りとなった。さらに興味深いことは、この二つの蛋白質の示す細胞増殖の阻害が作用上それぞれ全く異なっており、細胞の運命を反対方向へと決定付けるらしいことである。すなわち、 α -LAは細胞を傷害し、細胞死(アポトーシス)を誘導するのに対して、 β -LGは細胞の増殖を停止させる一方で、機能上の分化を誘導する働きを持つらしい。新生動物の腸細胞は機能的に未熟で、成長に伴って徐々に成熟へと向かうと考えられるが、その過程での乳蛋白質の影響は重大である。乳蛋白質は一方で未熟な細胞を速やかに成熟状態へと分化させる働きを持つことも要求されるであろうし、他方で未熟細胞が感染やがん化といった不都合な状態に陥った場合、それらを速やかに排除する働きを示すことも要求されるだろう。そういった観点から眺めた場合、我々が新たに見出した二つの主要牛乳蛋白質による腸細胞の成長調節は乳成分の作用としてきわめて合理的なものと考えられる。従来 α -LAや β -LGの乳における存在意義は、前者がすでによく知られているように乳糖合成における補助蛋白質として、後者は不明な点が

多いものの脂溶性成分の輸送体として位置付けられている。我々の発見はこの二つの乳蛋白質の機能に細胞成長調節作用という新たな側面を付加する必要性を強く示唆しており、乳蛋白質の生物機能を正しく理解する上できわめて重要と考えられる。

②研究の目的 本研究は α -LAと β -LGという二つの主要牛乳蛋白質の腸細胞成長調節作用を主として次のような二つの観点から検討しようとするものである。

- 1) 培養細胞系における活性・分子構造相関の検討：電気泳動やクロマトグラフィーなどの蛋白質分離技術や種々の生化学的手法を用いて分子レベルで、また共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメトリーといった手法を用いて細胞レベルで、腸細胞成長調節作用の特性を分子構造との関連から明らかにする。
- 2) 動物実験系における感染の予防及び治療に対する効果の評価：ヒトロタウイルス感染の動物実験系を用いて、感染前後の経口投与が下痢の発症及び下痢からの回復に及ぼす影響を具体的に評価する。

平成14年度は α -LAの腸細胞増殖阻害作用について生化学的な検討を行うことを目的とした。

2. 材料及び方法

2.1. 材料

(1) 細胞

ATCCより購入し、液体窒素中に保存されていたラット小腸由来株化細胞IEC-6を使用した。IEC6細胞は、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEMを用いて37°C、5%CO₂条件下で培養した。継代は、3~5日毎に行った。すなわち、コンフルエントに達した細胞表面を10mlのPBSで洗い、上清を吸引除去した後、5mlのPBSで細胞表面を再び洗った。4mlのトリプシン-EDTA-2Na溶液(0.25%のトリプシンと0.3%のEDTA-2Naを含むPBS溶液)を入れ、dishを静かに揺らして均一になるように攪拌し、細胞が円球化するのを顕微鏡で観察してから、DMEMを4ml添加した。メスピペットで繰り返し攪拌し、細胞懸濁液を50mlの遠心チューブに移した。再びメスピペットでよく懸濁した後、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引除去し、10%FCSを含むDMEMを10ml加えて懸濁した。攪拌後すぐに200 μ lをとり、Neubauer型血球計算盤を用いて細胞数を計算した。細胞の生死はトリパンブルー染色で調べた。

(2) タンパク質

α -LAはSIGMA社より購入した。

牛乳及び人乳からの低分子量乳清タンパク質濃縮物(bLWPC、bovine Low Molecular-weight Whey Protein Concentrate及びhLWPC、human Low Molecular-weight Whey Protein Concentrate)は、岐阜大学付属農場で飼育されている乳牛から得た乳、もしくは、公立学校共済組合病院東海中央病院において分娩後2~7日目の健康な複数の婦人から採取し、-40°Cにて凍結保存されていたものを原料とし

た。牛乳、人乳何れの場合も、まず、3000rpm、15min、5°Cで遠心分離を行い、脱脂乳を得た。1 N HClを加えてpH 4.6として、カゼインを凝固沈殿させた。次に、牛乳の場合、3000rpm、20min、20°Cの遠心分離を、人乳の場合、18000rpm、3hr、20°Cの遠心分離を行って、ホエーを得た。それを限外濾過（東ソー社UFLMS型装置、牛乳は100万cut off、人乳は30万cut offの限外濾過膜）し、低分子量タンパク質を含む透過液を回収し、蒸留水に対する48時間の透析を経て、凍結乾燥した。

2.2. 方法

(1) WST-1法

10cm dish中でコンフルエントになったIEC-6細胞をトリプシン処理し、10%のFCSを含むDMEMに懸濁した。1000rpmで5分間遠心して上清を吸引除去した後、 1×10^4 cells/cm²になるように細胞懸濁液を調製し、96穴プレートに100 μ lずつ播いた。5% CO₂、37°Cで5時間前培養し、細胞が接着したことを確認した後、100 μ lの試験培地に交換した。一日おきに培地交換した。測定日に試験培地を吸引除去し、10% FCSを含むDMEMを各ウェルに100 μ l、WST-1試薬（和光純薬工業（株）、Cell Counting Kit）を10 μ lずつ加え、37°Cで2時間、5% CO₂インキュベーターで培養した後、マイクロプレートリーダーにより450nmで吸光度を測定した。

(2) ³H標識チミジン取り込み

10%FCSを含むDMEM中でIEC-6細胞をサブコンフルエントになるまで培養した後、トリプシン処理し、DMEM培地に懸濁した後、 1×10^4 cells/cm²となるよう48穴プレートに播いた。37°C、5% CO₂条件下で必要時間前培養し、細胞がプレートに接着していることを確認した後、0.5mlの試験培地に交換してから更に必要時間培養した。測定日に試験培地を除去し、DMEM 400 μ lと³H標識チミジン溶液を0.1 μ Ci/mlとなるように各ウェルに加えた。37°C、5% CO₂条件下で必要時間チミジンの取り込みを行った後、4°C条件下、1.5ml、次に1mlのPBSで細胞表面を洗浄した。5% TCA溶液を0.5 ml加え、10分間静置後、吸引除去した。室温に戻してから1% SDS/0.1 M NaOHを1 ml各ウェルに加えてDNAを抽出した。これに液体シンチレーターをそれぞれ5 ml加え、ハンドミキサーでよく攪拌した後、放射エネルギーを測定した。

(3) 細胞死の評価法

細胞死の検出にはBOEHRINGERMANNHEIM社製の細胞死検出ELISAキット（Cell Death Detection ELISAPLUS）を用いた。簡単に述べると、96ウェルプレートに 1×10^4 cells/cm²となるように細胞を播き、5時間前培養してプレートに細胞を接着させた。試験培地を各ウェルに100 μ lずつ添加して、12時間細胞と反応させた。培養上清を吸引除去し、細胞溶解バッファー200 μ lを各ウェルに添加してからプレートごと遠心した（200×g、10min）。ペレットを混入させないように遠心上清を20 μ l各ウェルから採取し、直ちに専用プレート（ストレプトアビジンコート）の試験群、ネガティブコントロール群の各ウェルに入れた。ポジティブコントロール群にDNA・ヒストン複合体溶液20 μ l、ネガティブ

コントロール群にはインキュベーションバッファー20 μ lを各々加え、全ての試験群に各々80 μ lのイムノミックスを加えた後、500rpmで振とうしながら2時間常温でインキュベートした。各ウェル内の液体を除去し、1 well当たり250~300 μ lのインキュベーションバッファーで3回洗浄してから、各ウェルに100 μ lの基質溶液を加え、250rpm、10~20min振とうして発色させた。発色は405nmの吸光波長で測定した。

トリパンブルー色素排除法による細胞死判定も行った。すなわち、3日間でコンフルエントになるように培養した細胞に試験培地を加えて48時間インキュベートした。トリプシン処理によって細胞をプレートから剥がし、1000rpm、5 minの遠心の後、上清を吸引除去し、10mlの培地を加えて懸濁した。200 μ lを採って10 μ lの0.4%トリパンブルー溶液と混合した。その懸濁液をNeubauer血球計算盤に播き、生細胞、死細胞数それぞれをカウントした。

アガロース電気泳動は定法に従った。

(4) クロマトグラフィー

RESOURCE Q陰イオン交換クロマトグラフィー、Protein A-Sepharoseカラムクロマトグラフィー、HiTrap Affinityカラムによるクロマトグラフィー、Superdex 75及びSuperdex 200ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画は、いずれの場合もAKTA Explorer 10Sによって自動処理した。

(5) 加熱処理及び還元カルボキシメチル化

最終濃度の4倍になるように α -LA標品をMilli Q水に溶解し、一定温度に保たれているウォーターバス内で加熱処理を行った。処理後、その溶液に3倍量のDMEM培地を混合し、試験培地の調製を行った。コントロール用の試験培地は、Milli Q水に3倍量のDMEM培地を混合したものを使用した。

還元カルボキシメチル化では、3 mlの7 M Guanidinium塩酸塩及び10mM EDTAを含む0.5M Tris-HClバッファー (pH 8.5) に α -LA標品10mgを溶解した。ジチオトレイトール10mgを加えてよく混合し、室温で2時間還元処理した。ヨード酢酸2.5mgを加え、遮光下で30分間反応させた後、同じく遮光下で蒸留水で48時間透析を行った後、凍結乾燥した。

結果

3.1. α -LAによる細胞死誘導

これまでの研究で、ウシ α -LAがIEC-6の増殖を阻害することが分かっていたが、その現象がアポトーシスによるものかネクローシスなのか、また、分化の誘導によるものかを評価するために、96well plateもしくは10cm dish内でIEC-6細胞をコンフルエントになるように3日間培養した後、さらに48時間試験培地に曝した場合の増殖への影響を評価した。

Fig. 1は細胞死検出ELISAの結果を示している。アポトーシスによって生じた培養上清中の断片化し

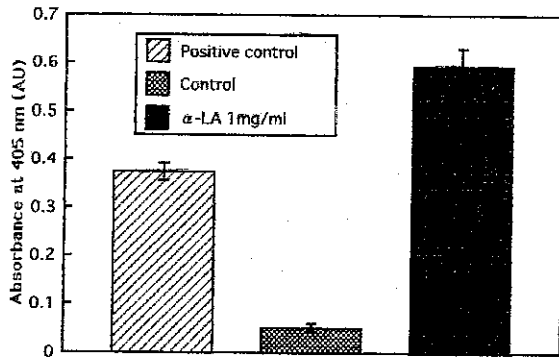


Fig. 1 Detective Cell Death ELISA for IEC-6. After reaching to confluent for 3 days in 96 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) α -LA for 48 hr. The absorbance at 405 nm attributed to POD-labeled DNA antibody was measured. The oligonucleosome preparation constituted in the kit was used as a positive control. Each bar represents the means \pm SD from four determinants.

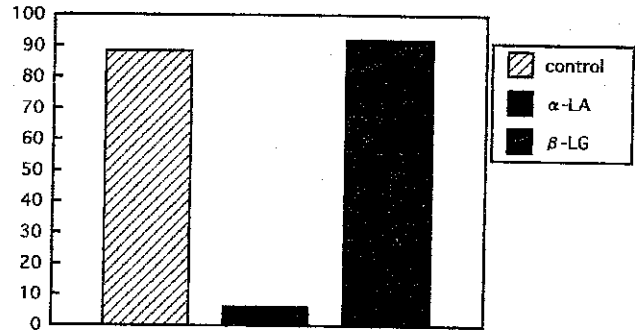


Fig. 2 Evaluation of IEC-6 cell death by Trypan Blue exclusion. After reaching to confluence for 3 days in 10cm dish, IEC-6 was exposed to the test medium for 48 hr. The concentration of Sigma α -LA was 10mg/ml and that of Sigma β -LG was 10mg/ml. Survival was calculated from the counted cell number as the percentage of viable cells in the total cell number.

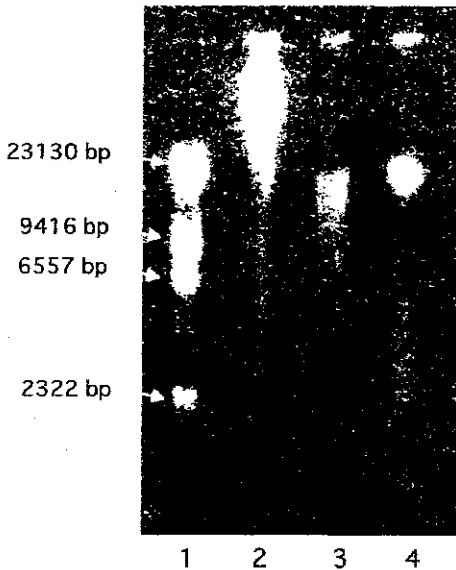


Fig. 3 The electrophoretic detection of apoptosis of IEC-6 cell induced by α -LA. For reaching to confluence for 3 days in 10cm dish, IEC-6 was exposed to test medium including 10 μ g/ml of Doxorubicin (Dox), 10mg/ml of Sigma α -LA for 48 hr. Nuclei extracts were dissolved in Tris-Borate-EDTA \cdot 4Na (TBE) buffer and 12.5 μ l aliquot was added to 2.5 μ l of Bromo Phenol Blue (BPB). The total 15 μ l was applied to 0.3% agarose gel. The electrophoresis was carried out at 100 V. Each bands attributed to EtBr was detected by UV transilluminator. Lane 1: λ -DNA digested by Hind III (DNA marker, TOYOBO, Cat. No. DNA-010); Lane 2: control; Lane 3: Dox treatment; Lane 4: α -LA treatment.

たヌクレオソームの存在によるPOD標識DNA抗体の発色は、ポジティブコントロールと同様、 α -LA (1mg/ml) 試験群で高い吸光度値が検出された。 α -LAを含んでいない培地で培養したコントロール群の値は α -LA試験群の1/10程度に留まっており、 α -LAで処理された細胞はアポトーシスを起こして培養上清中に断片化したヌクレオソームを放出したことが判明した。Fig. 2は、トリパンブルーを用いて、細胞の生存率を評価した結果である。 α -LAと同様に、可逆的な増殖抑制効果を示すことが分かっている β -LG (10mg/ml) を含む培地中で生育させた細胞は、90%以上の生存率を示したコントロール群と同じく、生存率は90%以上であった。これは、 β -LGを含む培地中で生育させた細胞が細胞死を起こさなかったことを意味するが、 α -LA (10 mg/ml) の試験群では細胞の生存率は10%未満と極めて低く、細胞死を引き起こしているのは明らかである。

DNAの状態を直接調べることの出来るアガロースゲル電気泳動 (Fig. 3) では、コントロール群の核抽出DNAによるバンド (lane 2) が最大の

分子量マーカー (lane 1) のDNAサイズである23130bpを示すバンドより上の広がった位置に確認され、DNAの断片化は生じていないことが認められた。これに比べると、市販 α -LA標品 (10mg/ml) で処理した細胞 (lane 4) や α -LAを含んでいるbLWPC (10 mg/ml) で処理した細胞由来の核抽出DNA (データは示していない) は、アポトーシス誘導効果を持つDoxorubicinで処理したポジティブコントロール群の核抽出DNA (lane 3) と同様に、分子量マーカーの23130 bpと類似の位置に顕著なバンドを示し、また、その下方にも分子量マーカーの2322 bpが示す低分子量域にまでバンドが確認されたことから、DNAの断片化の生じていることが実証された。即ち、これらの細胞ではアポトーシスが起ったものと考えられる。

3.2. 抗体カラムによる α -LAの単離とその細胞増殖阻害作用

これまでの研究で、市販の牛乳 α -LA標品がIEC-6細胞に対して増殖抑制効果を示すことが示されたが、その効果が α -LA自身によるものなのか、あるいは、標品に混入している残存不純物によるのかは不明であった。また、bLWPCは多種の低分子量のホエータンパク質を含んでいるために、効果を示す成分が α -LAかどうか全く不明確であった。そこで、自主作成した抗 α -LA抗体カラムを用いて特異的に α -LAを取り出し、その増殖阻害効果を検討した。

α -LA市販標品もしくはbLWPCを1mg/mlとなるようにTris-HClバッファーに溶解し、流速0.5 ml/min、分画サイズ2mlで分離を数十回繰り返すことによって、 α -LA市販標品とbLWPCから特異的に α -LAを取り出した。代表的な結果をFig. 4に示した。そのようにして単離した α -LAのRESOURCE Qカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーの分析結果がFig. 5 (市販標品) 及びFig. 7 (bLWPC) である。両図から、抗 α -LA抗体カラムによって単離された α -LAが複数のピークを示し、静電的性質

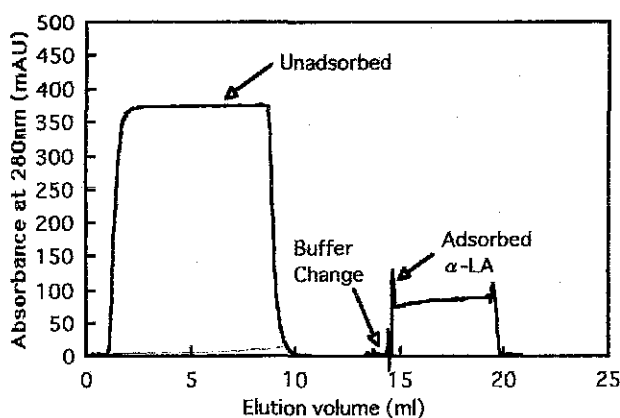


Fig. 4 Chromatography of anti- α -LA antibody column. Sigma α -LA was dissolved in Tris-HCl buffer (pH 8.0), to give 1 mg/ml and 10ml was applied to the column. The flow rate was 0.5ml/min. The fraction size was 2ml. The eluate was monitored at 280nm. The unadsorbed fraction was applied to this column repeatedly about 30 times.

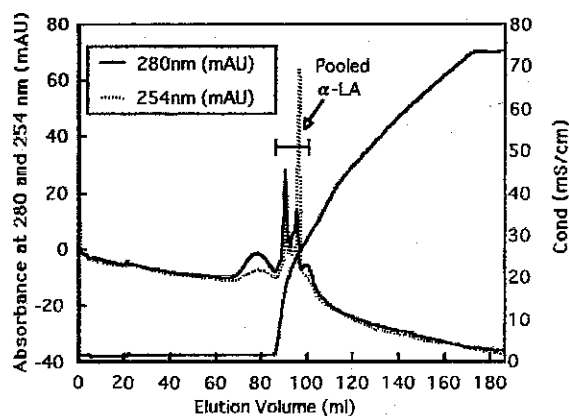


Fig. 5 Chromatography on RESOURCE Q of α -LA obtained from Sigma α -LA by anti- α -LA antibody column. The flow rate was 2ml/min. The fraction size was 2ml. The eluate was monitored at 280 and 254nm.

の異なる分子種を含むと考えられた。更に、図中に示した範囲をプールし、凍結乾燥後、DMEM培地に溶解し、IEC-6を18時間曝して、細胞増殖に対する影響を5時間の³H-thymidine取り込みにより調べた。Fig. 6 (市販標品由来 α -LA、0.5mg/ml) 及びFig. 8 (bLWPC由来 α -LA、0.476mg/ml) から分か

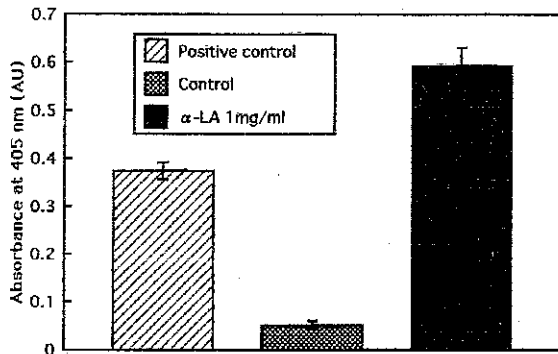


Fig 6 Effect of authentic α -LA obtained from Sigma α -LA by anti- α -LA antibody column on IEC-6 proliferation.

After preincubation for 5 hr in 48 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) α -LA (0.5mg/ml) for 18 hr. IEC-6 cells were further cultured in the medium containing ³H-thymidine for additional 5 hr and radioactivity of cell lysates was measured. Incorporation of ³H-thymidine was calculated as the percentage of radioactivity measured for α -LA treated cells compared to that for control cells. Each bar represents the mean \pm SD from two determinations.

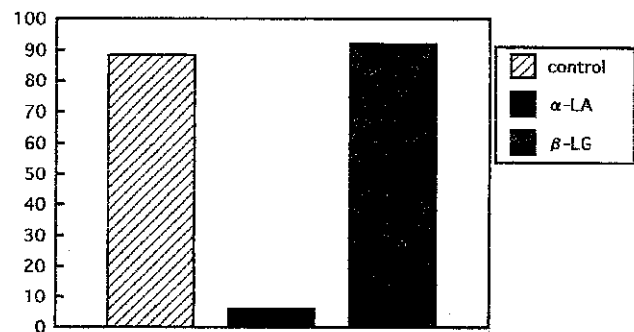


Fig. 7 Chromatography on RESOURCE Q of α -LA obtained from bLWPC by anti- α -LA antibody column.

The flow rate was 2ml/min. The fraction size was 2ml. The eluate was monitored at 280 and 254nm.

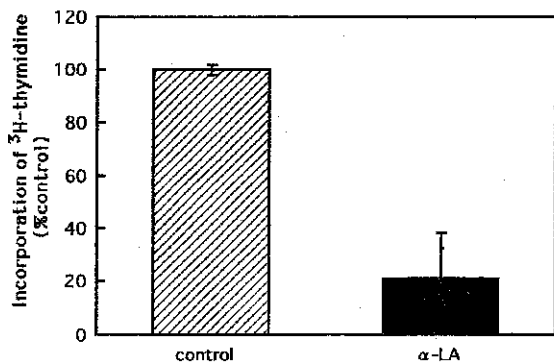


Fig. 8 Effect of α -LA obtained from bLWPC by anti- α -LA antibody column on IEC-6 proliferation.

After preincubation for 5hr in 48 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) α -LA (0.476mg/ml) for 18hr. IEC-6 cells were further cultured in the medium containing ³H-thymidine for additional 5hr and radioactivity of cell lysates was measured. incorporation of ³H-thymidine was calculated as the percentage of radioactivity measured for α -LA treated cells compared to that for control cells.

るように、何れの場合も、試験群では細胞増殖時のDNA合成に伴う³H-thymidineの取り込みによる放射エネルギーはコントロール群に比べて極めて低く、DNA合成の低下に伴う強い増殖阻害作用のあることが示された。

3.3. 増殖阻害作用に影響を及ぼす α -LAの物理的・化学的処理の影響

これまでの実験では α -LAの増殖阻害作用の特性を明らかにすることを目的としたが、ここでは分子を物理的・化学的に処理した場合にその作用にどのような影響が現れるか検討した。アポトーシス誘導作用を示すヒト α -LAはオリゴマーの状態であることが示されているので、ウシ由来 α -LAの分子サイズと阻害作用の関係について検討した。

Fig. 9は α -LA市販標品のSuperdex 200による分画結果を示している。吸光度280nmの測定において一つの主要なピーク (Main Peak) を検出し、

図中に示す範囲を回収した。同様にFig. 11はSuperdex 75の結果を示している。吸光度280nmにおいて一つの主要なピークと、その直前に小さいピークを検出した。図中のように、小さいピークを含む範囲をF1、主要なピークを含む範囲をF2として回収した。これら分画物のIEC-6に対する増殖阻害作用

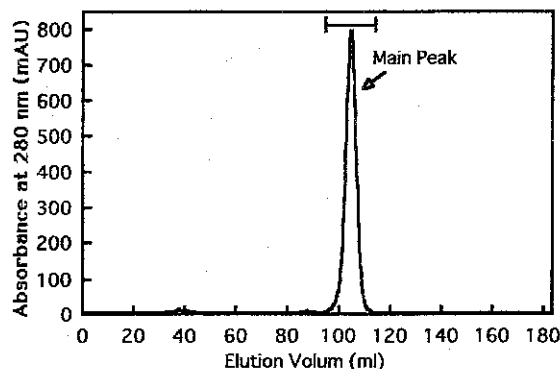


Fig 9 Chromatography of Sigma α -LA on Superdex 200 column.
 α -LA was dissolved in phosphate buffer (pH 6.0) to give 10mg/ml and 4ml was applied to the column. The flow rate was 1ml/min. The fraction size was 2ml. The eluate was monitored at 280nm.

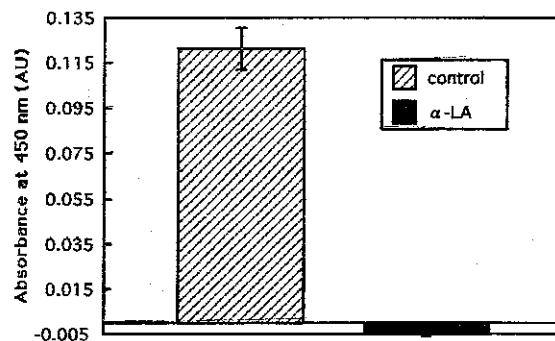


Fig. 10 Growth inhibition of α -LA fractionated by Superdex 200 from Sigma α -LA.
 After preincubation for 24 hr in 96 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) Main peak from Fig.9 (1mg/ml) for 5 hr. Then WST-1 reagent was added to each well for 2hr and absorbance was measured at 450nm.
 Each bar represents the mean \pm SD from four determinations.

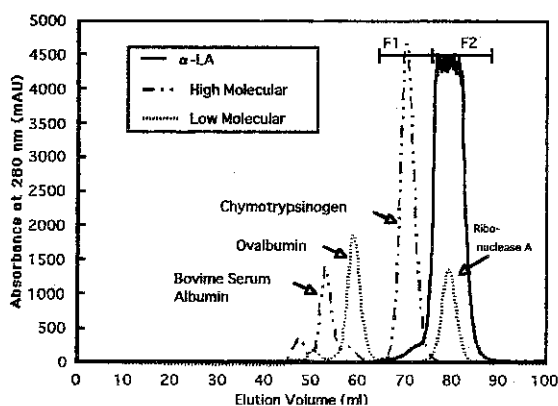


Fig. 11 Chromatography of Sigma α -LA on Superdex 75 column.
 The α -LA was dissolved in phosphate buffer (pH 6.0), to give 10mg/ml and 4ml was applied to the column. F1 and F2 indicate the pooled eluate. The flow rate was 1ml/min. The fraction size was 2ml. The eluate was monitored at 280nm. The molecular weight of each standard protein is; Bovine serum albumin 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa, Chymo-trypsinogen 25 kDa, Ribonuclease A 13.7 kDa. These standard were from Amersham Pharmacia Biotech (Cat. No. 17-0441, 0442-01)

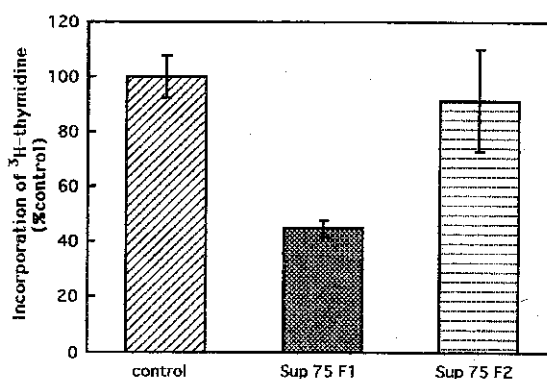


Fig. 12 Effect of α -LA fractionated by Superdex 75 from Sigma α -LA column on IEC-6 proliferation.
 After preincubation for 5 hr in 48 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) F1 and F2 from Fig. 11 (1mg/ml) for 18 hr. IEC-6 cells were further cultured in the medium containing 3 H-thymidine for additional 5 hr and radioactivity of cell lysates was measured. Incorporation of 3 H-thymidine was calculated as the percentage of radioactivity measured for α -LA treated cells compared to that for control cells.
 Each bar represents the mean \pm SD from three determinations.

をWST-1法または ^3H -thymidine取り込み法で調べた。96 well plate内でIEC-6を24時間前培養してから、Superdex 200の分画物を含む試験培地に5時間曝したところ、コントロールとは対照的にWST-1法における450nmの吸光度値がほぼ0となり、強力な増殖阻害作用を示した (Fig. 10、WST-1法)。一方、Superdex 75分画物のF1またはF2を含む試験培地にIEC-6を18時間曝し、5時間の ^3H -thymidine取り込みを行ったところ、F2を含む試験培地で培養した細胞はコントロールの細胞と同様の ^3H -thymidineの取り込みを示し、増殖阻害作用を示さなかった。一方、F1を含む試験培地で培養した細胞は ^3H -thymidineの取り込みによる放射エネルギーがコントロールの50%程度と低く、幾分弱いながらも増殖阻害作用を示した (Fig. 12)。

α -LA市販標品を40~70°C、10~30minの加熱処理または還元カルボキシメチル化処理して分子内部のSS結合を切断したときの増殖阻害作用を ^3H -thymidine取り込み法によって評価した結果が、Fig. 13 (還元処理) 及びFig. 14 (加熱処理) である。どちらの場合も48 well plate内で5時間前培養し、IEC-6細胞を試験培地に18時間曝した。Fig. 13では、何れの濃度でも ^3H -thymidine取り込みによる放射エネルギーが高い値を示し、細胞増殖の阻害は観察されなかった。Fig. 14では、40°Cの処理では何れの時間でも増殖阻害作用が見られたが、50°Cの処理をした試験群では処理時間に伴って作用が低下し、60°C以上では完全に作用が見られなくなった。つまり、還元処理や50°C以上の加熱によってインタクトな分子構造を失った α -LAは作用を示さなくなったものと考えられる。

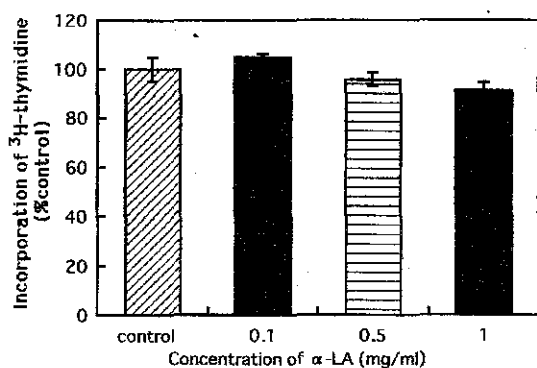


Fig. 13 Effect of the reduced and alkylated α -LA on IEC-6 proliferation. After preincubation for 5 hr in 48 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) α -LA (1mg/ml) for 18 hr. IEC-6 cells were further cultured in the medium containing ^3H -thymidine for additional 5 hr and radioactivity of cell lysates was measured. Incorporation of ^3H -thymidine was calculated as the percentage of radioactivity measured for α -LA treated cells compared to that for control cells. Each bar represents the mean \pm SD from four determinations.

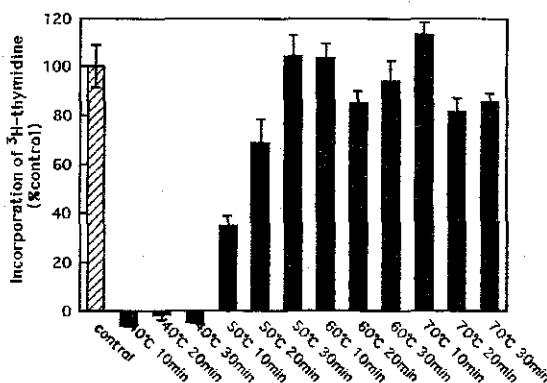


Fig. 14 Effect of heat treatment of α -LA on IEC-6 proliferation. Sigma α -LA was heated at 40-70°C for 10-30 min as indicated. After preincubation for 5 hr in 48 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) α -LA (1mg/ml) for 18 hr. IEC-6 cells were further cultured in the medium containing ^3H -thymidine for additional 5 hr and radioactivity of cell lysates was measured. Incorporation of ^3H -thymidine was calculated as the percentage of radioactivity measured for α -LA treated cells compared to that for control cells. Each bar represents the mean \pm SD from four determinations.

3.4. hLWPCによる増殖阻害作用の検討

これまでにウシ α -LAについて検討を重ねてきたが、既に幾つかの報告^{25) 26)}があるが、当研究室で調製したヒト α -LAを含むhLWPCを用いて、ヒト由来の成分についても著者独自で検討してみた。

Fig. 15はhLWPCをRESOURCE Qによる陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで分画したときに得られた溶出パターンである。吸光波長280及び254nmをモニターし、サンプル濃度は10mg/ml、流速は2ml/min、分画サイズは2mlで行った。溶出パターンに従って図中に示したように三つのフラクション(F1~F3)に分け、それらの成分分析を行うため一部をSDS-PAGEのサンプル(30mg/ml、アプライ量5 μ l)として供した。その結果がFig. 16 (lane 2-4)で、対照のbLWPCのRESOURCE Q分画物(10 mg/ml、lane 5-7)とは違い、何れのフラクションも市販の牛乳 α -LA (1 mg/ml、M.W. 14.2 kDa)

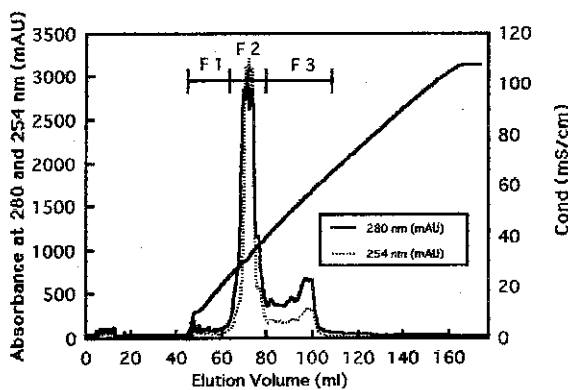


Fig. 15 Chromatography of hLWPC on RESOURCE Q. hLWPC was dissolved in 0.1M Tris buffer (pH 8.0) to give 10mg/ml and 10ml was applied to the column. The flow rate was 2ml/min. The fraction size was 2ml. The eluate was monitored at 280 and 254 nm

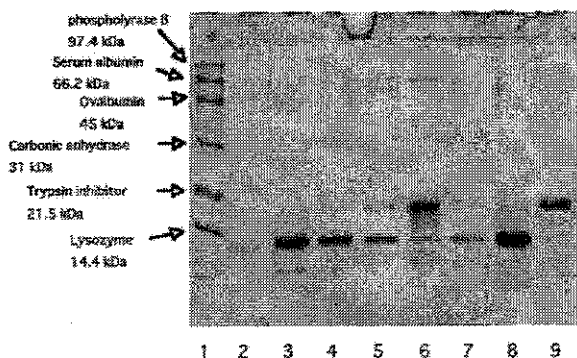


Fig. 16 SDS-PAGE analysis each fractions by RESOURCE Q column from hLWPC. After added 2-mercaptoethanol as reducing reagent, each samples were boiled for 5 min in water bath. 10 μ l was applied to each well. Lane 1 : Molecular Weight Standards (Low range, Bio-Rad. Cat. No. 161-0304); Lane 2: hLWPC F1 ; Lane 3: hLWPC F2; Lane 4: hLWPC F3; Lane 5: bLWPC F1 ; Lane 6: bLWPC F2; Lane 7: bLWPC F3; Lane 8: Sigma α -LA; Lane 9: Sigma β -LG.

のバンドと一致する位置に主要なバンドが確認された。一方、IEC-6を5時間前培養し、それら分画サンプル(10mg/ml)を含む試験培地に18時間曝したときの増殖阻害作用を³H-thymidine取り込み法によって評価した結果をFig. 17に示した。F2の阻害作用がコントロールと比べて40%程度に留まったものの、何れのフラクションにも作用が認められ、hLWPC中には静電的な性質の異なる複数の α -LAが存在することが示唆された。

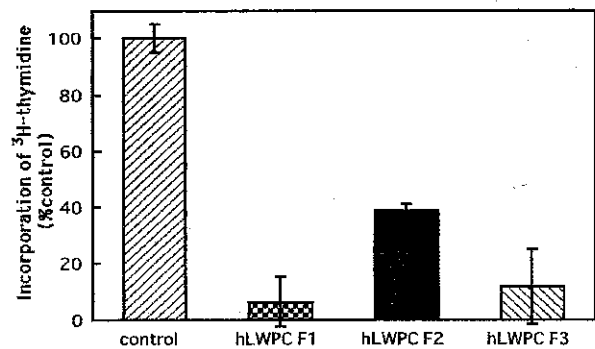


Fig. 17 Effect of hLWPC fractions obtained by RESOURCE Q column on IEC-6 proliferation. After preincubation for 5 hr in 48 well plate, IEC-6 was exposed to the test medium with or without (control) hLWPC fractions from Fig.18 (10mg/ml) for 18 hr. IEC-6 cells were further cultured in the medium containing ³H-thymidine for additional 5 hr and radioactivity of cell lysates was measured. Incorporation of ³H-thymidine was calculated as the percentage of radioactivity measured for α -LA treated cells compared to that for control cells. Each bar represents the mean \pm SD from three determinations.

考 察

これまでの研究で、牛乳 α -LAがラット小腸由来培養細胞に対して増殖阻害作用を示す結果が示されてきた。本研究では、この作用を更に詳しく検討してみた。

Fig. 1の細胞死検出ELISAでは、コントロールに比べて試験群ではポジティブコントロールと同様の高度発色を示した。これは、 α -LA標品を作用させた細胞の培養上清中に断片化したヌクレオソームが存在していることを示しており、 α -LAにより細胞がアポトーシス誘導を受けた結果であると推測できる。また、トリパンブルー染色では同様の増殖阻害効果を示す乳清タンパク質 β -LGと比較検討したが、 β -LGの影響を受けたものに比べて α -LAの効果影響を受けたもので生細胞数はほとんど認められず、 α -LAには β -LGとは阻害様式の異なる細胞死誘導効果があることが明らかである。これらの結果に基づいてFig. 3に示すアガロースゲル電気泳動を行ったが、 α -LA市販標品や α -LAを含むbLWPCの影響を受けた細胞の核抽出物（主に、DNA）には、コントロールに比べると、アポトーシス誘導剤であるDoxの影響を受けた細胞の核抽出物と同じく、長く拡散した泳動像が認められ、DNAのフラグメンテーションが起こっていることは明らかである。本論文に示すことはできなかったが、UVトランスイルミネーター上では肉眼で低分子量領域のラダーバンドが確認できた。このことから、報告されている人乳由来の多量体 α -LAのアポトーシス誘導効果と同様、ウシ α -LAによる細胞死もアポトーシスであることが実証された。また、ここにはデータを示さなかったが、ヒト結腸癌株化細胞Caco-2で検討してみたところ、トリパンブルー染色では細胞死を、アガロースゲル電気泳動ではDNAのフラグメンテーションを何れも確認できなかった。各種細胞がヒト α -LA誘導性アポトーシスに対して感受性が異なるのと同様に、ウシ α -LAに対しても感受性に違いがあるかもしれない。但し、ヒト α -LAに関しては、感受性があるのは変異細胞であり、正常細胞は感受性を持たないが、上述のようにウシ α -LAでは正常細胞由来のIEC-6に効果を示し、ガン細胞由来のCaco-2に効果を示さないという一見逆の結果を呈した。当研究室のこれまでの研究では、ウシ α -LAもCaco-2に対して増殖阻害作用を示す結果も得られており、細胞間の感受性の違いに関して更に検討が必要であろう。

上述の考察で述べた α -LA市販標品やbLWPCは通常の方法に従って調製されたものであるため、サンプル中に含まれる来雑物の影響が否定できなかった。そこで、抗 α -LA抗体特異的にサンプル中から α -LAを単離し、Fig.4-8に示す結果を得たわけであるが、そのように単離した α -LAも明らかに増殖阻害効果を示した。抗体特異的に単離したのであるから、Fig. 6及び8に表した効果を示したのはウシ α -LA自体であるとする事ができる。今回の実験で分離可能な α -LA量は限られていたもので、今後、更に効率的に抗体特異的な α -LAを大量に単離する方法を確立し、 α -LAのアポトーシス誘導作用を更に検討してみる必要がある。また、抗体カラム作成時に抗体の精製をするのにIgGクラスの抗体を吸着するProtein Aカラムを用いたが、Protein Gカラムを使用することにより、より多くの抗 α -LA抗体を単離出来るかもしれない。Superdex 200の分画（Fig.9）では一つの主要なピークが見られ、 α -LA標品は分子量的に均一なものと考えられたが、Superdex 75の分画（Fig. 11）では主要なピーク（F2）の

前に小さいピーク (F1) が現れ、必ずしも市販標品は均一なモノマーでないことが判明した。Fig. 11で、Ribonuclease Aの分子量が13.7 kDaであり、そのピークと α -LA (MW 14.2 kDa) の主要なピーク (F2) は溶出位置がほぼ一致していることから、F2はモノマーであり、F1は他の標準タンパク質の溶出位置と比較して、主にダイマー状態の α -LAであることが予想された。Fig. 12で、モノマーの α -LAを含むと考えられるF2が増殖阻害効果を示さなかったのに対し、ダイマーを含むと考えられるF1は効果を示した。アポトーシス誘導効果はヒトの α -LAの場合、モノマーにはなくてオリゴマーにあるという報告を考慮すると、ウシ α -LAにも同様のことがいえるかもしれない。但し、Superdex 200の分画で得られた主要なピークの効果と比較してみると (Fig. 10)、Fig. 12に示すF1の効果は幾分弱い。これは、Superdex 200ではカラムの性質上モノマーとオリゴマーの分離が困難で、その分画物中にはダイマーの他にトリマーやテトラマーなどのオリゴマーも含まれていると考えられる。逆にSuperdex 75分画物のF1は主にダイマーを含んでいると考えられる。即ち、強い効果を示すのはトリマーやテトラマーなどの大きなオリゴマーの方であり、Superdex 75のF1に主要なダイマーは効果が弱いのもかもしれない。この点は、抗体カラムで分画される α -LAをゲル濾過分離して得られるオリゴマーを用いて詳しく検討することが望まれる。

還元カルボキシメチル化を行ってS-S結合を切断したところ、Fig. 13に示すように α -LAによる増殖阻害効果は見られなくなった。このことはやはり、効果を示すのにインタクトな立体構造を維持していることが必要なのかもしれないことを示唆する。もしくは、トリプシン、キモトリプシン分解物のS-S結合を含むペプチドが抗菌作用を示すことが報告されているが、増殖阻害効果を示す場合にもS-S結合の存在が重要な要素になっているかもしれない。一方、加熱処理した場合、50°Cで効果が低下し始めた。人乳 α -LAでは効果を示す分子はモルテングローブル様の状態になっていることが報告されていることから、Fig. 14で50°Cに達する少し前の温度までインタクトな分子とモルテングロビュール状の分子が共存して効果が維持されていることが考えられる。また、加熱後に氷冷するか、もしくは、室温で放冷したが、何れの場合も阻害効果の傾向に違いは認められなかったことから、加熱の影響を受けた後の α -LAへのタンパク質分子構造が室温に戻ることによって加熱前の状態に戻ることはないように見える。しかし、この点ももう少し検討してみる必要があるように思われる。

α -LAに結合されている Ca^{2+} が、その立体構造の安定化に重要であることが幾つかの論文で報告されているが、分子内結合 Ca^{2+} が増殖阻害効果に対して如何なる寄与をしているかは報告が見られない。このことから、 α -LAタンパク質分子から Ca^{2+} を取り除き、アポ型タンパク質の効果を検討した (結果は示していない)。処理後も同様の増殖阻害効果を示したことから、 Ca^{2+} の存在は細胞への作用に不可欠なものではないことが示唆された。

人乳乳清中の主要なタンパク質は α -LAであるが、反芻動物、特にウシの乳清には α -LAの他に β -LGが含まれていて、 α -LAの比率は人乳に比べて低い。由来の異なるヒト α -LAについて、既に幾つかの報告があるが、著者も独自で解析を試みた。Fig. 18に示すクロマトで得られた三つの人乳タンパク質フラクションは何れも α -LAと思われる成分を主として含むことがFig. 19から分かるが、何れのフラク

ションも阻害作用を示した (Fig. 20)。各フラクションのバンドのパターンには多少の違いが認められる (Fig. 19) が、これが、Fig. 20に示すように阻害効果に多少差が生じた原因となっているかもしれない。オリゴマーのヒト α -LAにはアポトーシス誘導効果があることが既に報告されているが、効果が比較的強かったF1、F3にオリゴマーのヒト α -LAが多く含まれていたのかもしれない。また、報告されているアポトーシス誘導作用を示すヒト α -LAはカゼイン画分からイオン交換法によってのみ分離可能とされているが、本研究で作用が認められた画分は何れもホエー中に存在したものである。このことは、更に追求する価値がある。

以上をまとめると、これまでに報告のあるオリゴマーのヒト α -LAがアポトーシス誘導を示すのと同様に、牛乳由来の α -LAでも細胞死、即ちアポトーシスを引き起こすことが実証された。Superdex 75やSuperdex 200分画物の検討で、効果を示すにはオリゴマーであることが必要である可能性が考えられた。そして、抗 α -LA抗体カラムによって抗体特異的に単離された牛乳 α -LAが増殖阻害効果を示したことより、この効果は類似の性質を持つ他の成分による影響ではなく、 α -LA分子自体に起因することが強く示唆された。また、市販標品ばかりでなく、一般の牛乳から分画したbLWPCから単離した α -LAもまた効果を示したので、広く一般の牛乳中に含まれる α -LAがアポトーシス誘導作用を示すことも明確になった。

乳幼児は驚くべき早さで成長をしており、腸管組織のturnoverも例外ではない。この成長の過程で何らかの原因で腸管内に変異細胞ができあがってしまった場合、乳幼児の成長に必要な様々な機能を備えている乳に含まれる α -LAが腸管内に達し、アポトーシスを誘導することによって変異細胞の排除をする役割を担っているのかもしれない。

牛乳から調製される α -LAの腸細胞増殖阻害作用が明確に示され、また、この作用がアポトーシスを介するものであることも確認された。この作用は10%のFCS存在下で認められる。この培養条件は、正の成長因子の過剰な存在と抑制すなわち負の制御の不在という状況のモデルと考えられる。すなわち、このモデルでは、異常な増殖条件下にある細胞の過度の成長を妨げることによって組織のホメオスターシスを維持するという重要な作用に関して検討可能である。本年度の結果では、牛乳 α -LAが腸細胞のそういった異常な増殖を妨げる作用を持つ可能性が指摘された。本年度の最終段階で、ウィルス性下痢発症の動物モデルを用いてこの作用が生体でどのような意味を持つのかを検討したところ、予備的な段階ではあるが、非投与のものに比べて牛乳 α -LAの投与が下痢の持続期間を明らかに短縮することが示された。本報告で示している細胞レベルの結果とこの動物モデルの結果とが分子レベルの作用として直接結びつくかどうかについては今後詳細に検討する必要があるが、少なくとも牛乳の主要タンパク質が腸細胞の管理に重要な役割を持っていることが強く示唆される。