

牛乳ラクトフェリン分解産物由来新規ガン細胞 アポトーシス誘導ペプチドの同定とその生理機能解明

岐阜大学医学部生化学教室 坂野喜子

要約

牛乳成分のラクトフェリンをペプシンで消化して生ずるペプチドのなかに、骨髄巨核芽球性白血病細胞Meg-01細胞に対して強力なアポトーシス誘導ペプチドを見出し、このペプチド(C1)を精製した。C1がMeg-01に作用すると各種細胞内シグナル伝達系が活性化された。特にホスホリパーゼDの活性化とMAPキナーゼのリン酸化が引き起こされ、これらのシグナル伝達経路がアポトーシス誘導と関連していることを示唆した。

また、ラクトフェリン・ペプシン分解ペプチド(LF2)は種々の口腔扁平上皮ガン細胞に対してアポトーシスを誘導した。LF2のがん細胞に対する作用機構を詳しく検索した。LF2は細胞外カルシウム依存性にホスホリパーゼDを活性化し、その活性化経路にMAPキナーゼの活性化が関与していることが分かった。また、がん細胞に対するLF2の作用は、リポポリサッカライド(LPS)の作用と拮抗することが判明した。

キーワード；ラクトフェリン由来ペプチド、白血病細胞、アポトーシス、がん細胞死、ホスホリパーゼD、MAPキナーゼ、抗LPS作用

概説

牛乳の有効成分に関する研究は古くより行われており、多くの研究の蓄積がある。牛乳の主蛋白質であるカゼインの分解産物が抗体産生の増強や抗菌作用に関与することが知られている¹⁾。ミルク由来の細胞増殖因子(MGF)の存在が知られおり、人乳からEGF様MGF-S1が単離され、他にもいくつかの生理活性因子の存在が示された^{2, 3)}。また最近、牛乳蛋白質の α -ラクトグロブリンやラクトフェリンB由来分解ペプチド(ラクトフェリシン)が、がん細胞に対する細胞死アポトーシスを誘導することが報告されている⁴⁾。一方、乳幼児のなかには牛乳アレルギーを引き起こすことが以前から知られていたが、この原因因子として β -ラクトグロブリンが同定され、これによるリンパ球細胞の異常増殖が報告されている⁵⁾。さらに、牛乳の主蛋白質カゼインや乳清蛋白などの胃や脾臓中の蛋白分解酵素による分解産物などに有効な多くの生理活性物質を含み、細菌感染防止、免疫賦活、細胞増殖に有効であることが明らかにされている⁶⁾。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、申請者らは、種々の細胞系を用いて牛乳由来蛋白・ペプチドによる細胞増殖、分化、アポトーシス誘導を検

討した。その結果、乳清蛋白質ラクトフェリン分解産物中に骨髓性巨核芽球性白血病細胞Meg-01の強力なアポトーシス誘導作用を示す物質が存在することを見いだした。ラクトフェリンのペプシン分解産物であるラクトフェリシンが殺菌効果をもつことは知られているが^{7,8}、我々は、ラクトフェリン分解ペプチド面分中に幾つかの別の細胞増殖シグナル活性化ペプチドやガン細胞死誘導ペプチドが存在することを見だし、その細胞内情報伝達機構を検討した。これらの新規物質を単離精製し、その本体を明らかにすることを試みた。また、ペプシン分解ペプチドの消化管系（口腔、胃）のガン細胞に対する細胞死誘導およびその情報伝達機構を検討した。

方 法

ラクトフェリンのペプシン加水分解物中のアポトーシス誘導因子の精製と固定

精製牛乳ラクトフェリン（和光社）5g/100mlを蒸留水に溶解し、1NHC1でpH3に調整後、ペプシン150mgを添加して37°Cで4時間インキュベーションした。反応後80°Cで15分間加熱処理を行い、1NNaOHで中和し、10,000rpmで1時間遠心して上清画分を得た。得られた上清画分をセントリコン3,000の膜を用いて濃縮し、セファデックスG-50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Meg-01に対するアポトーシス誘導能の判定は、細胞外への遊離乳酸脱水素酵素（LDH）の活性を測定することにより行った。誘導活性を示す2つのペプチド画分（LF1、LF2）を分離した。LF2はさらに、逆相カラム（C18）を用いて、水とアセトニトリルの0-30%の濃度勾配によりペプチドを溶出し、幾つかのペプチドが分離された。活性画分を集めて凍結乾燥により濃縮したものをサンプル（C1）として用いた。

培養細胞に対するラクトフェリン加水分解物の作用

ヒト骨髓巨核芽球性白血病細胞Meg-01は武田製薬細胞工学研究所より購入した。20%FBSを含むRPM11640で培養し、 $1-2 \times 10^5$ 個/mlを1%FBSを含む同培地に蒔き、ラクトフェリン分解産物C1を添加して、経時的にアポトーシス誘導を観察した。アポトーシスの程度は、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。また、培地に遊離したLDHの活性を測定することにより判定した。

固形腫瘍細胞（ヒト口腔由来扁平上皮ガン細胞、SAS、HSC-4）はHSRRBより、また、ラット骨肉腫細胞（UMR-106-01）はATCCより入手した。HSC-4およびUMR-106-01は10%FBSを含むMEM培地で、SAS細胞はF-12/DMEM培地で2-3日培養後、0.3%BSAの無血清培地で24時間培養後、ラクトフェリン分解物を処理した。

ヘキスト33258蛍光染色による核染の観察

24時間処理細胞を1500rpm、5分間の遠心にて回収後、生細胞を蛍光色素ヘキスト33258にて核染色を行い、蛍光顕微鏡（U領域）にて観察した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性測定による細胞死の測定

細胞破壊に伴う乳酸脱水素酵素 (LDH) の培地への漏出を、極東LDHテスト試薬 (極東製薬工業) を用いて検出し、以下の式に従って細胞障害性を検討した。

1%トリトンX-100にて全ての細胞を溶解したもの=陽性対照、0.3%BSA培地のみ=陰性対照とする。検体、陽性対照、陰性対照の吸光度 (560nm) から次式に従って算定した。

$$\text{細胞障害率} = (\text{検体の吸光度} - \text{陰性対照の吸光度}) / (\text{陽性対照の吸光度} - \text{陰性対照の吸光度})$$

ウエスタンブロッティングによるMAPキナーゼファミリーのリン酸化の検討

各種細胞をラクトフェリン分解産物で処理し、無処理細胞とともに可溶化緩衝液 (トリス緩衝液、PH7.4、1%トリトンX-100、1% SDS、1% コール酸、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、1 m MPMSF、ホスファターゼ阻害剤) 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動 (SDS-PAGE) を行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。

ホスホリパーゼ (PLD) 活性測定

PLD活性測定は、 ^3H パルミチン酸で12時間細胞を標識し、0.3%ブタノール存在下でラクトフェリン分解産物を処理した後、産生される ^3H ホスファチジルブタノールPButを含む脂質をBligh-Dyerの方法で抽出し、シリカゲルH-60TLCプレートで脂質を分離後、標準PButに相当するバンドを掻き取り、シンチレーションカクテルを加えて、放射活性を測定する。

結果/考察

骨髄巨核芽球性白血病細胞Meg-01のアポトーシス誘導能を有するラクトフェリン分解物の分離・精製

Meg-01細胞をラクトフェリン加水分解物で処理すると、急速な形態変化を引き起こした。濃度依存的 (1-5 mg/ml) な形態変化を生じ、細胞数の減少を引き起こした。ラクトフェリン分解物 (5 mg/ml) で2時間処理した細胞をヘキスト33258による核染色を行ったところ、顕著な核クロマチン分解が観察され、アポトーシスが誘導されていることが示めされた (図1)。また、ラクトフェリン分解物の濃度依存的に細胞外LDH活性の上昇が認められた。この結果より、ラクトフェリン分解物はMeg-01のアポトーシスを誘導し、核DNAの分解による細胞死をもたらすことが示めされた。

ラクトフェリン分解物の分離・精製を行った。まず最初に、分子量3000の膜を用いて分画したものを、セファデックスG50カラムクロマトグラフィーによりさらに数十画分に分画した。各画分について、Meg-01に対するLDH遊離活性を測定したところ、二つの活性画分 (LF1、LF2) が分離された。さらに、LF2画分を逆相カラムを用いてペプチドの分離を行い、幾つかのペプチドが分離された (図2)。それぞれの画分について、Meg-01に対するLDH遊離活性を測定したところ、Fr.48-52 (C1) に

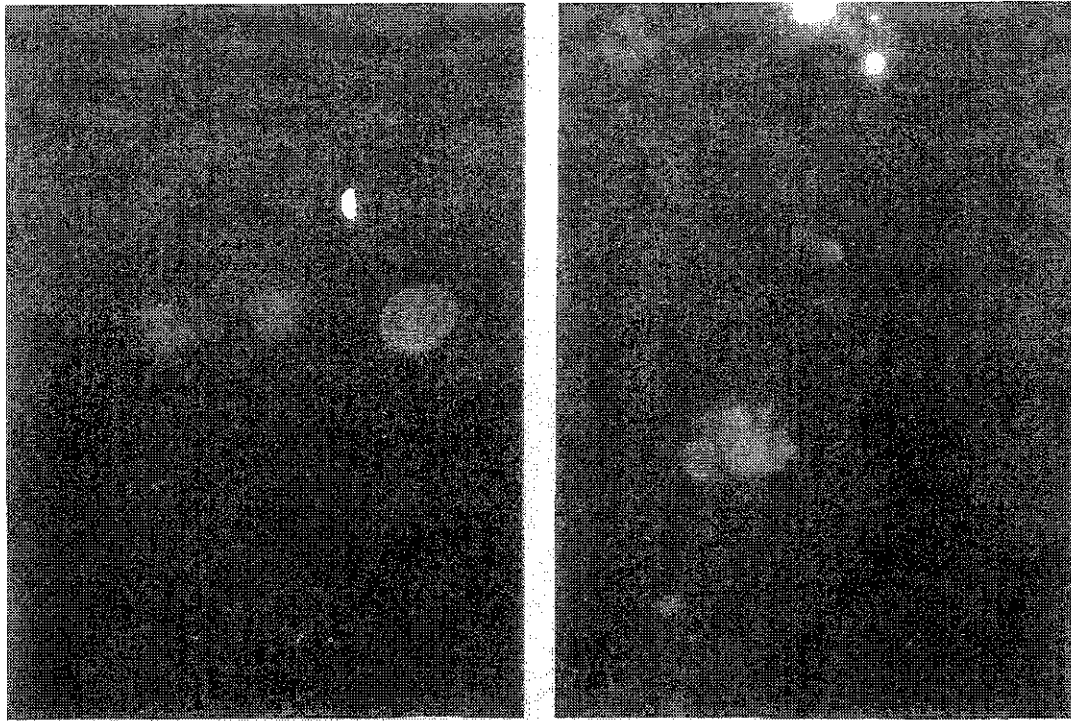


Fig. 1 Nuclear fragmentation of Meg-01 cells treated with pepsin-digested lactoferrin peptide
 Meg-01 cells were treated with or without pepsin-digested lactoferrin peptide (1 mg/ml) for 2 hr and stained with Hoechst 33258 and examined through fluorescent microscope. (A) control; (B) pepsin-digested lactoferrin peptide

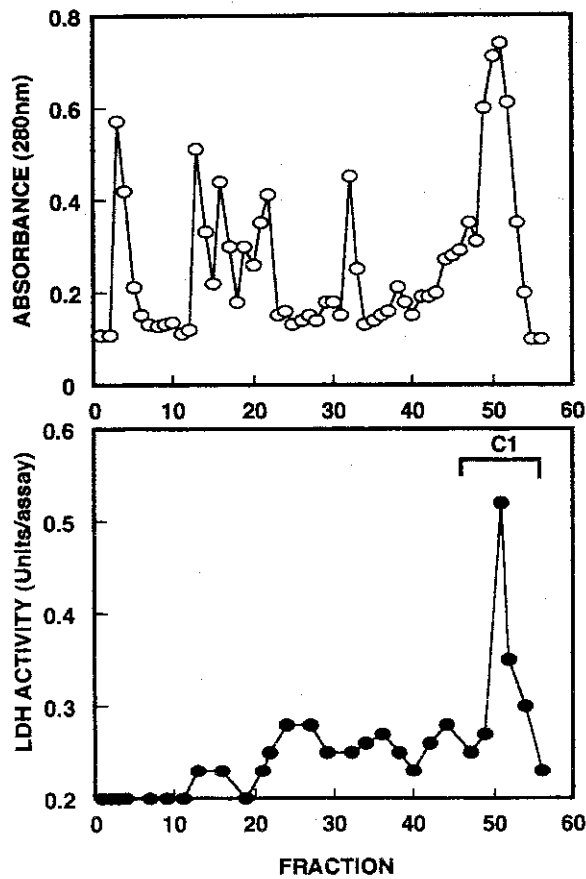


Fig. 2 Separation of lactoferrin pepsine-hydrolysed LF2 fraction by C18 reverse phase HPLC column chromatography
 Lactoferrin-pepsine hydrolysed LF2 fractions from Sephadex G50 column chromatography were then subjected to reverse phase C18 column chromatography and eluted with acetonitril gradient by using HPLC. The Meg-01 cells were incubated with each fraction (50 μ l) for 2 hr and the released LDH activities were measured as described in Materials and Methods.

強いLDH遊離活性の一つのピークが認められた。C1はさらに3000の分子量を分離するゲル濾過カラムで分離したところ、素通り画分に溶出され、分子量は3000以上のものであることが分かった。この活性画分を集めて濃縮したサンプルについて各種細胞に作用させ、細胞増殖、分化、アポトーシス誘導、および細胞内シグナル伝達系の影響について検討した。

骨髓巨核芽球性白血病細胞Meg-O1に対するラクトフェリン分解物によるシグナル伝達

ラクトフェリン分解物 (C1) をMeg-O1に作用させると、濃度依存的にLDHを遊離し、0.1mg/mlで最大の遊離活性を示した。また、時間依存的に遊離し、2時間でピークに達した (図3)。

ラクトフェリン分解物のMeg-O1における細胞内シグナル伝達系のホスホリパーゼD (PLD) 活性化

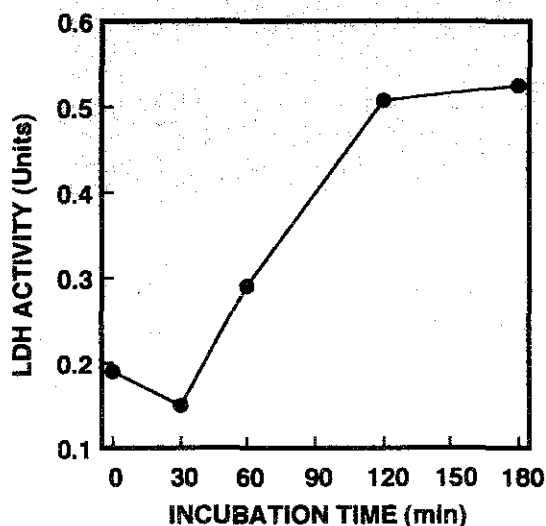


Fig. 3 Time-dependent LDH release in C1-stimulated Meg-O1 cells

Meg-O1 cells were incubated with lactoferrin-derived peptide C1 (0.5 mg/ml) and at indicated intervals the cultured medium were removed and the LDH activity were measured as described in Materials and Methods.

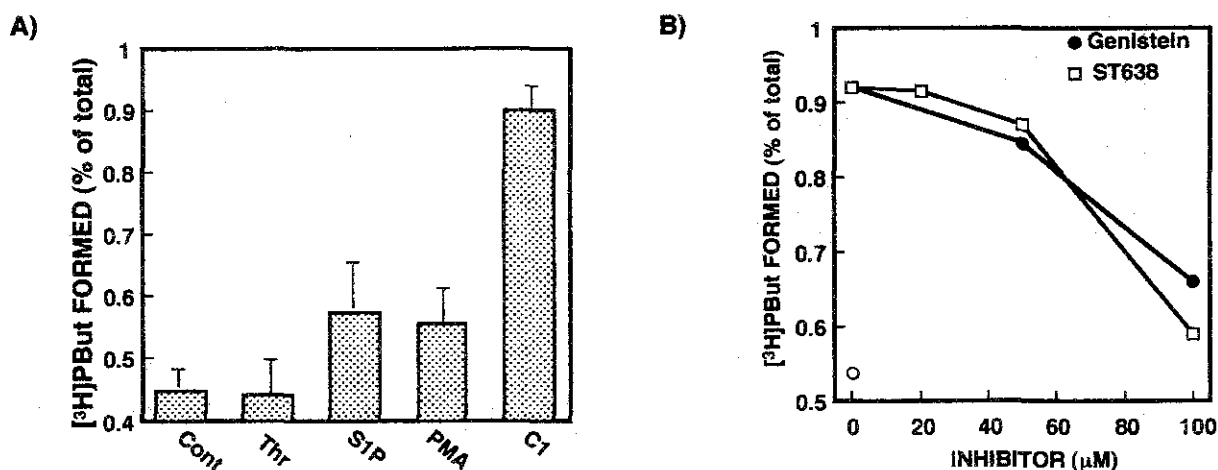


Fig. 4 PLD activation by various agonists and C1, and effect of tyrosine kinase inhibitors on C1-stimulated PLD activation in Meg-O1 cells.

A) Meg-O1 cells were stimulated with thrombin (Thr, 10 μg/ml), sphingosine 1-phosphate (SIP, 1 μM), phorbolmyristate acetate (PMA, 100nM) and lactoferrin-derived peptide (C1, 1mg/ml) and PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

B) Meg-O1 cells were pretreated with genistein (100 μg/ml) and ST638 (50 μM) and then stimulated with C1 (1 mg/ml) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

とMAPキナーゼの活性化について検討した。LF 2 (0.2mg/ml) をMeg-01に作用させるとPLDの活性化が引き起こされた。PLDの活性化は、他の各種アゴニスト (トロンビン、スフィンゴシン-1-リン酸SIP、PMA) に比べ、LF 2により最も強く活性化された (図4A)。また、このPLDの活性化はチロシンキナーゼの阻害剤であるgenistein、ST638により濃度依存的に抑制され、チロシンキナーゼが関与していることが示唆された (図4B)。さらに、LF 2により細胞増殖に関連するMAPキナーゼファミリーのERK1/2の活性化が時間依存的に起こった (図5)。処理後15分からERK1/2の活性化が顕著に見られ、60分をピークに減少し、120分まで活性化が認められた。ERKの活性化が減少することにより、LDHの遊離がみられ細胞死が誘導されるものと思われる。また、ストレスシグナルに関係するp38MAPキナーゼの活性化は弱く、15分で一過性の弱い活性化が認められたが、この場合は細胞死にあまり関与しないものと思われる。一方、アポトーシスに関連することが知られているJNKの活性化はほとんど認められなかった。以上の結果により、ラクトフェリン分解物は、時間依存的にMEG-01の細胞死を引き起こし、初期にPLDやERKの活性化がみられるが、これは細胞の抵抗性のためであり、ERK活性化の減少がアポトーシスを引き起こすものと思われる。あるいは、ERK活性化によりアポトーシス関連タンパクの誘導が起こり、細胞死が引き起こされることが示唆された。

ラクトフェリン分解産物による腫瘍培養細胞のアポトーシス誘導のシグナル伝達機構

ラクトフェリンのペプシン分解産物が固形ガン、特に口腔外科領域で多い扁平上皮ガン、および骨肉腫由来の培養細胞 (SAS、HSC-4 : ヒト舌扁平上皮ガン、UMR-106 : ラット骨肉腫) に及ぼす作用を検討したところ、これらの細胞間でラクトフェリン分解産物LF 2に対する作用が異なっていた。

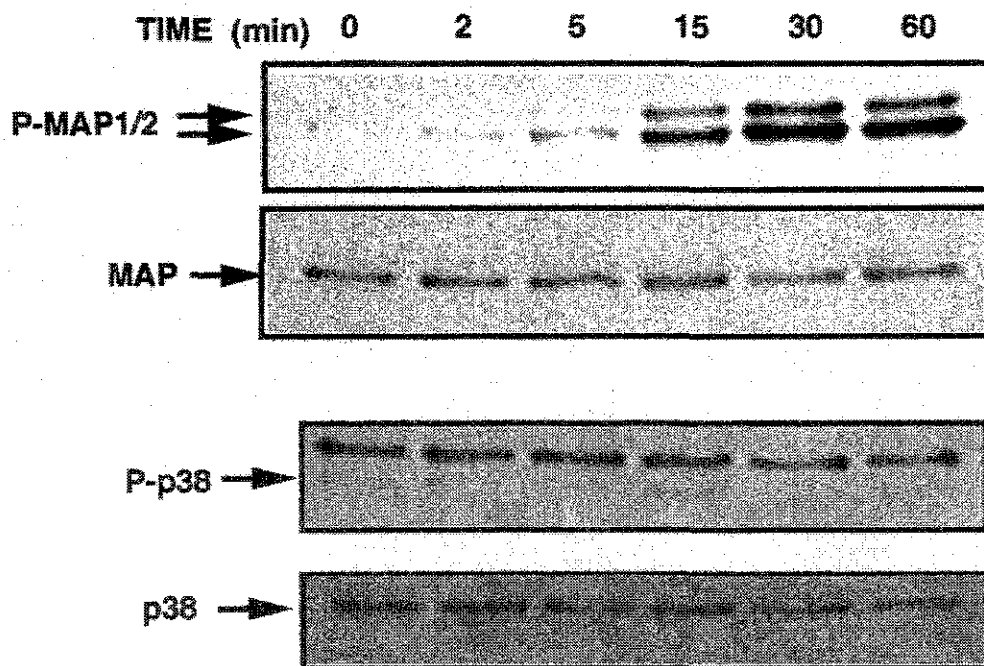


Fig. 5 Time-dependent phosphorylation of MAP kinases stimulated with Cl in Meg-O1 cells. Meg-O1 cells were stimulated with lactoferrin-derived peptide Cl (1 mg/ml). At indicated times the cells were lysed with lysis buffer and the lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with phospho-specific ERK, ERK, phospho-specific p38 MAP kinase and p38 MAP kinase antibodies.

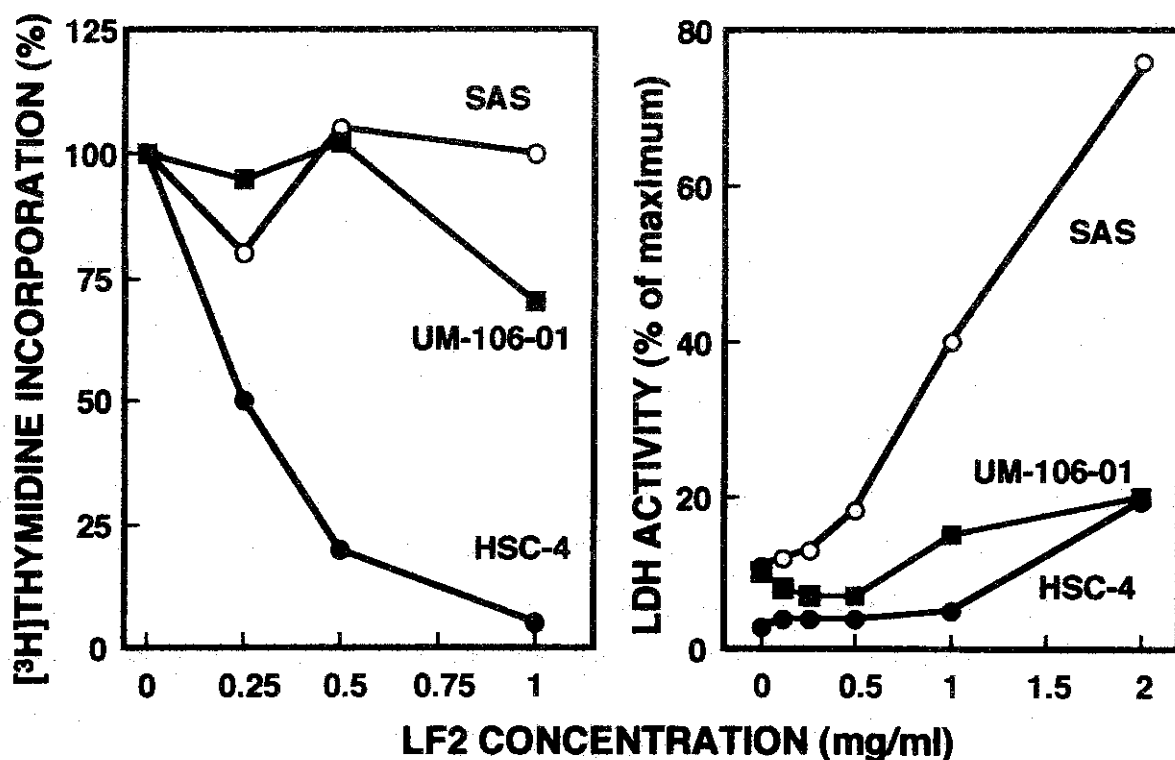


Fig. 6 Dose-dependent inhibition of thymidine incorporation and increase of released LDH activity by LF2 treatment in tumor cells

Three different type of tumor cells (SAS, UM-106-01 and HSC-4) were treated with various concentrations of LF2 for 24 hr and $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation and LDH activity in the cultured medium were determined as described in Materials and Methods.

たとえば、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みに対する影響を検討したところ、LF2は濃度依存的にHSC-4細胞への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを完全に抑制したが、SASやUM-106-01細胞に対する $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みへの影響は弱かった(図6)。また、LF2による細胞からのLDHの遊出を検討したところ、LF2はSASに対して濃度依存的な強い遊離LDH活性の増加を示したが、UM-106-01やHSC細胞に対する作用は弱かった(図6)。これらの細胞にLF2(2 mg/ml)を24時間処理し、ヘキスト33342蛍光染色で核クロマチンの変化を観察した。いずれのガン細胞も顕著な核の断片化が見られた。また、アガロース電気泳動によりDNAの断片化の程度を測定したところ、LF2(2 mg/ml)の処理時間に依存してDNA断片化の増加が観察され、アポトーシスが誘導されていると考えられた。しかし、LF2によるアポトーシス誘導の強さは細胞により異なり、SASが最も強くアポトーシスが誘導された。LF2処理による、MAPキナーゼの影響を検討した。HSC-4細胞にLF2(2 mg/ml)を処理すると、ERKおよびJNKの血清刺激によるチロシンリン酸化を延長させ、また、単独でERKのリン酸化を亢進させた。一方、SASではこのような変化はみられなかった。また、HSC-4細胞にLF2を処理すると、比較的短時間にホスホリパーゼD(PLD)の強い活性化が引き起こされた。一方、SASではこのようなPLDの活性化はみられなかった。以上の結果から、ラクトフェリン分解物は固形ガン細胞のアポトーシスを誘導するが、細胞により誘導の機構が異なることが示唆された。この機構の違いの一因としてp53

の発現の差が考えられ、SASではp53が正常であるが、HSC-4細胞ではp53の異常が報告されており、p53の発現がLFによるアポトーシス誘導と関連しているものと思われる。また、PLDの活性化はアポトーシス抑制に働くと思われ、LF2によるHSC-4細胞のアポトーシス誘導とPLDの活性化の逆の関係が認められた。そこで、LF2によるPLDの活性化機構について検討した。

ラクtofエリン分解ペプチドによるPLDの活性化機構

LF2はHSC細胞に作用させると時間依存的、用量依存的にPLDを活性化した(図7)。LF2(2 mg/ml)を作用させると60-120分をピークにPLDの活性化が起こり、PLDの活性化の減少に伴いアポトーシスが誘導された。LF2によるPLDの活性化機構について各種阻害剤を用いて検討した。MAPキナーゼの阻害剤(MEK1の阻害剤、PD98059、50 μ M; P38MAPキナーゼの阻害剤、SB202190、20 μ M)、チロシンキナーゼ阻害剤(genistein、100 μ M)、プロテインキナーゼC阻害剤(GO6976、1 μ M)、PI3キナーゼ阻害剤(wortmannin、100nM)により部分的に(40-50%)阻害された(図8)。また、カルシウムキレート剤(EGTA、3 mM)によりほぼ完全にPLDの活性化が抑制され、LF2によるPLDの活性化は、細胞外カルシウムが必須であることが示唆された。そこで、細胞内カルシウムの影響を検討した。細胞内カルシウムキレート剤(BAPTA/AM、5 μ M)によりPLDの活性化が抑制され、また、細胞外カルシウム除去下で細胞内遊離カルシウム増加を引き起こすtapsigarginを前処理してもPLD活性化が抑制された(図9)。これらの結果から、LF2によるPLD活性化には細胞内外のカルシウムが必須であることが示唆された。LF2によるPLDの活性化はPKC阻害剤で部分的に抑制

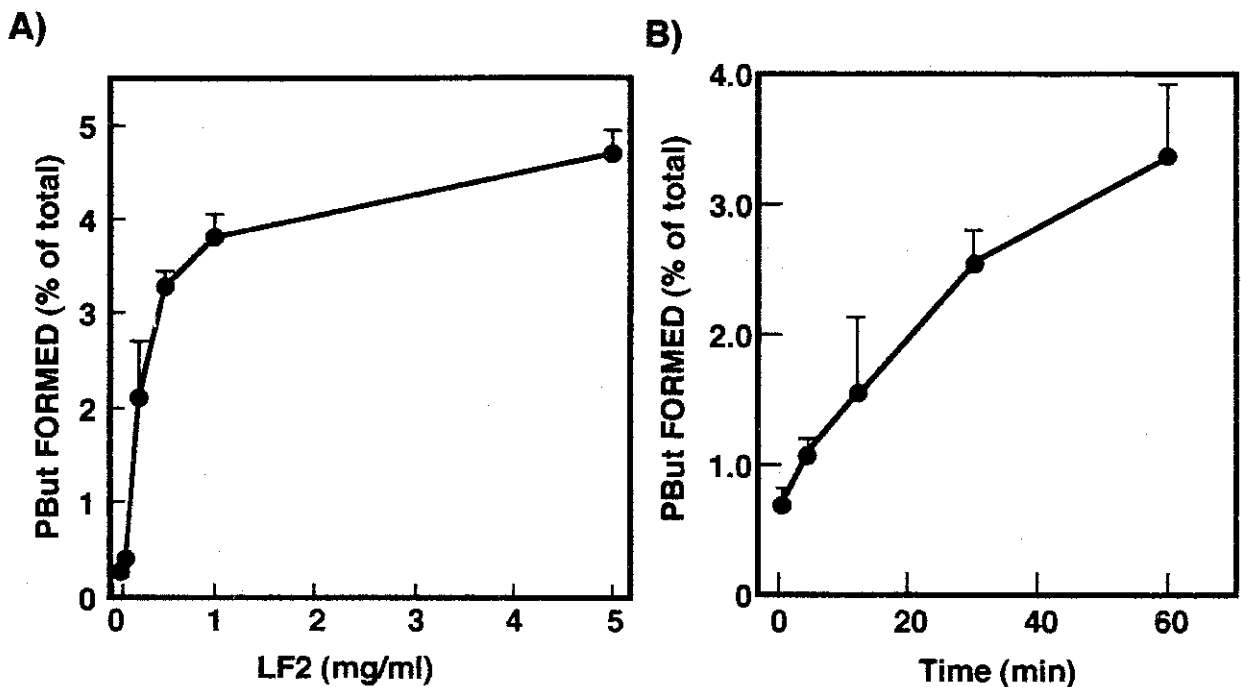


Fig. 7 Dose- and time-dependent PLD activation stimulated with LF2 in HSC-4 cells. HSC-4 cells were labeled with [3 H]palmitic acid for 24 hr and the labeled cells were stimulated with LF2 at indicated dose (A) and for various times (B). PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

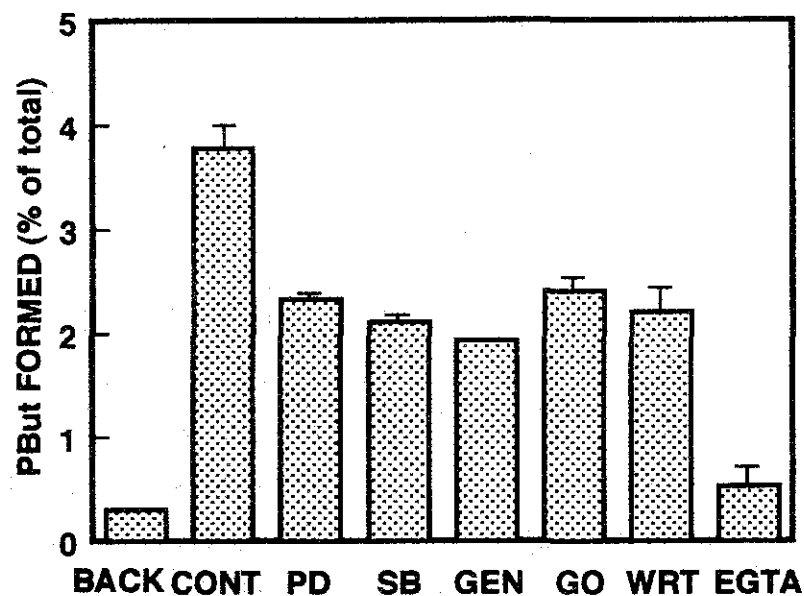


Fig. 8 Effect of various inhibitors on LF2-stimulated PLD activation in HSC-4 cells. HSC4 cells were labeled with [³H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were pretreated with or without various inhibitors (PD98059, PD 50 μ M; SB202190, SB 20 μ M; genistein, GEN 100 μ M; GO6976, GO 1 μ M; wortmannin, WRT 100 nM; EGTA 3 mM) and stimulated with LF2 (1 mg/ml) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

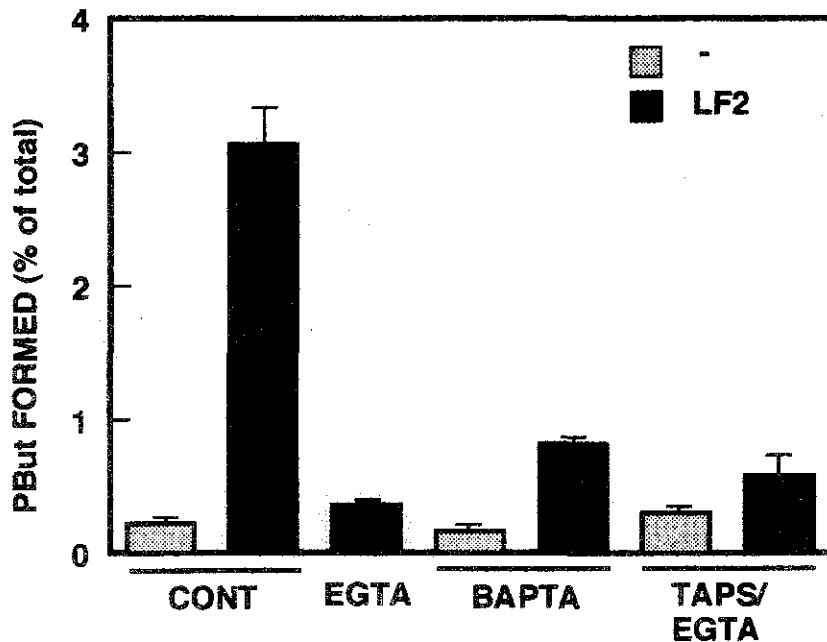


Fig. 9 Effect of calcium on LF2-stimulated PLD activation in HSC-4 cells. HSC4 cells were labeled with [³H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were pretreated with or without various inhibitors (EGTA, 3 mM; BAPTA/AM 5 μ M; Tapsigargin TAPS 1 μ M and EGTA 3 mM) for 10 min and stimulated with LF2 (1 mg/ml) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

された。PKCの活性化剤であるPMA刺激によるPLDの活性化とは相加的に作用するが、両者ともEGTAにより完全に抑制されることから、共通の経路を介するものと思われる (図10)。さらに、MAPキナーゼの阻害剤を用いて、LF2によるPLDの活性化の影響を検討した。MEK1の特異的阻害剤であるPD98059により濃度依存的なPLD活性化の抑制が見られた (図11)。また、p38MAPキナーゼの阻害剤SB202190やチロシンキナーゼの阻害剤genisteinとの組み合わせによりPLD活性化がほぼ完全に抑制された (図12)。また、LF2によりERKのリン酸化が引き起こされるが、PD98059により濃度依存的に抑制され、また、SBやgenisteinを加えることにより、ほぼ完全に抑制された (図13A)。また、JNKのリン酸化やAktの活性化はPD98059によって影響されなかった (図14)。これらの結果から、LF2刺激によりチロシンキナーゼ、p38MAPキナーゼ、ERKなどが相互に関連してPLDの活性化を引き起こすものと思われる。

さらに、LF2によるアポトーシス誘導に細胞内酸化物質が関与することが知られており⁴¹、抗酸化剤として知られているN-acety 1-cystein (NAC) の影響を検討した。LF2によるPLDの活性化はNACにより濃度依存的に阻害された。しかし、細胞内で生ずる酸化物のH₂O₂刺激ではPLDの活性化はほと

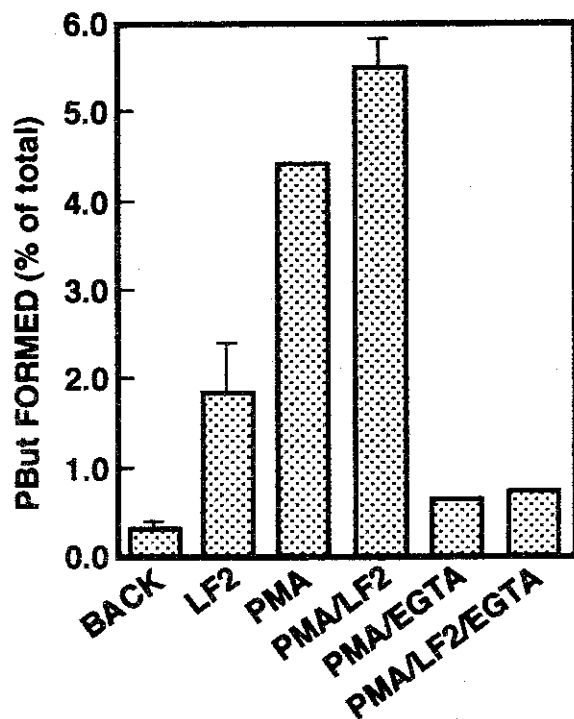


Fig.10 Effect of EGTA on PLD activation stimulated with LF2 and PMA in HSC-4 cells
HSC-4 cells were labeled with [³H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were pretreated with or without 3 mM EGTA for 10 min and stimulated with LF2 (1 mg/ml) or PMA (100 nM) or combination of LF2 and PMA for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

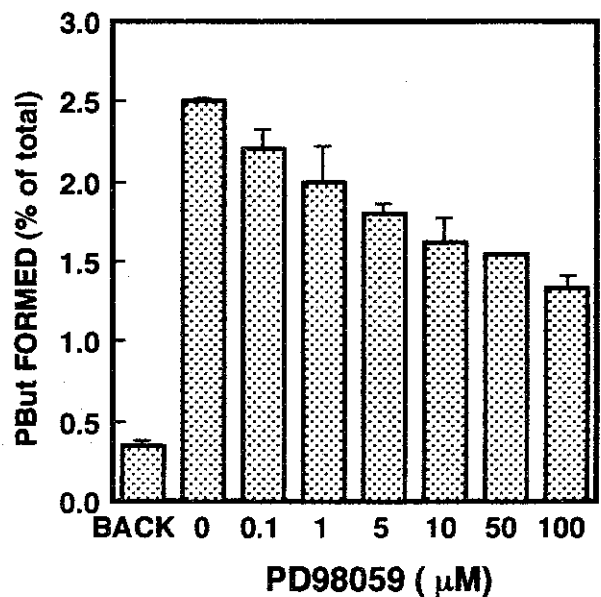


Fig.11 Effect of MAP kinase inhibitor on LF2-stimulated PLD activation in HSC-4 cells
HSC-4 cells were labeled with [³H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were pretreated with or without various concentrations of PD98059 for 10 min and stimulated with LF2 (1 mg/ml) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

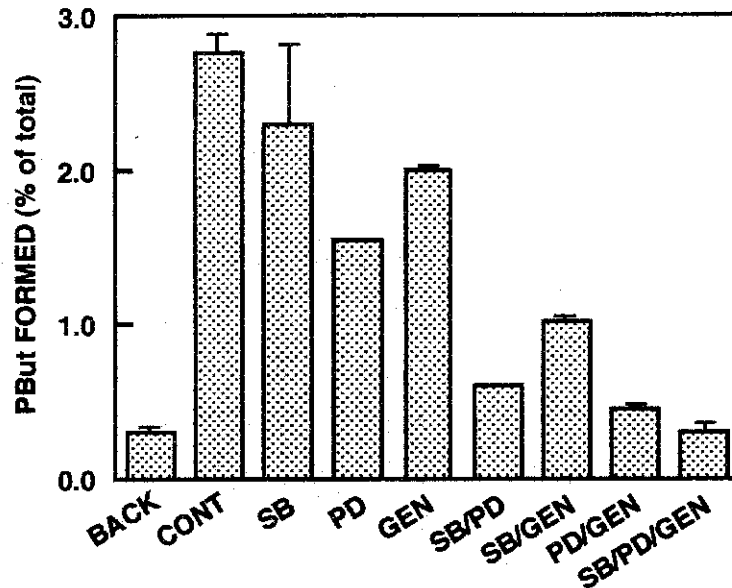


Fig.12 Effect of MAP kinase inhibitors on LF2-stimulated PLD activation in HSC-4 cells. HSC-4 cells were labeled with [³H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were pretreated with or without various inhibitors (PD98059, PD 50 μ M; SB20219, SB 20 μ M; genistein, GEN 100 μ M; combinations of SB and PD; SB and GEN; PD and GEN; SB and PD and GEN) for 10 min and stimulated with LF2 (1 mg/ml) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

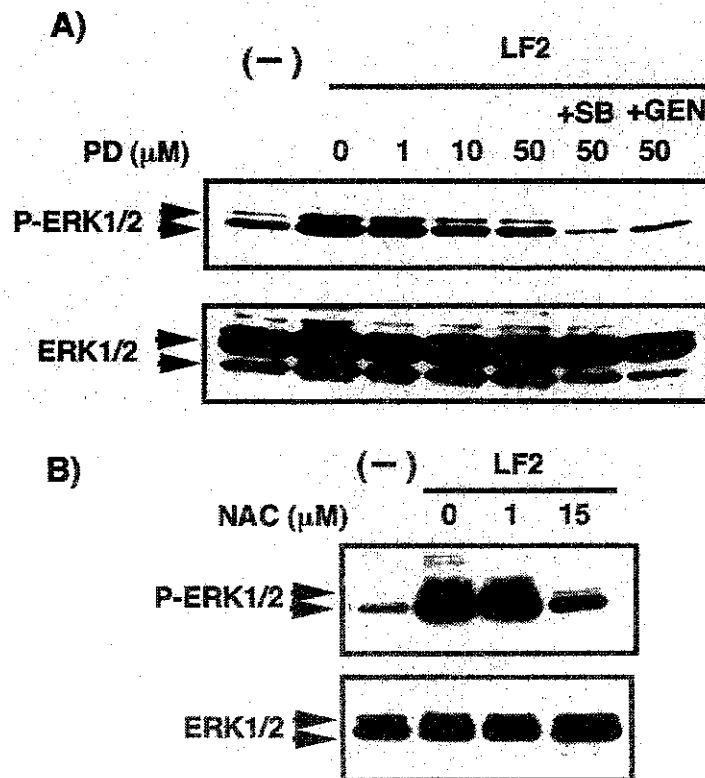


Fig.13 Effect of various inhibitors on LF2-stimulated ERK phosphorylation in HSC-4 cells HSC-4 cells were pretreated with (A) various concentration of PD98059 (PD) or combinations of PD and SB202190 (SB 20 μ M) or PD and genistein (GEN 100 μ M), or (B) N-acetyl-cysteine (NAC) for 10 min and stimulated with or without LF2 (1 mg/ml) for 30 min. The cells were solubilised with lysis buffer and the lysate were subjected to SDS-PAGE and blotted with phospho-specific ERK and ERK antibodies.

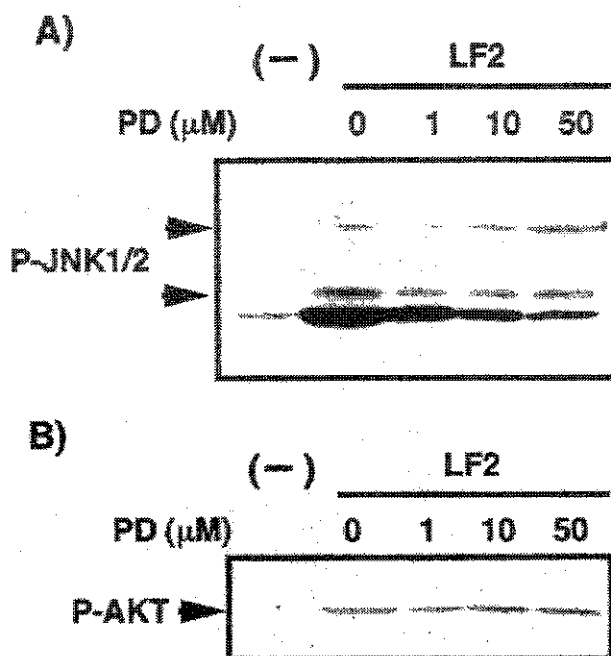


Fig.14 Effect of PD on LF2-stimulated JNK and Akt phosphorylation in HSC-4 cells
 HSC-4 cells were pretreated with various concentration of PD98059 for 10 min and stimulated with or without LF2 (1 mg/ml) for 30 min. The cells were solubilised with lysis buffer and the lysate were subjected to SDS-PAGE and blotted with phospho-specific JNK and Akt antibodies.

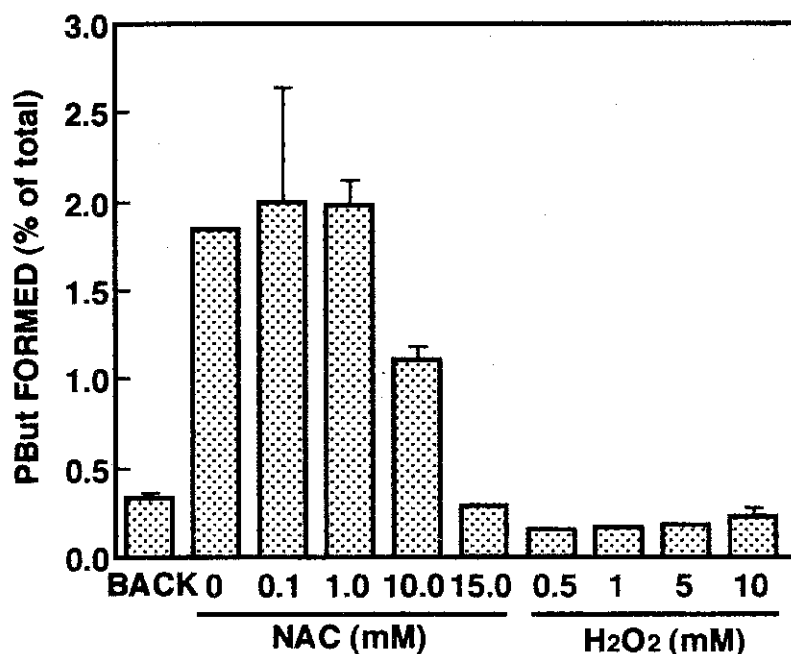


Fig.15 Effect of N-acetyl-cystein and H 202 on LF2-stimulated PLD activation in HSC-4 cells
 HSC-4 cells were labeled with [3H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were pretreated with or without various concentrations of N-acetyl-cystein (NSC) or H₂O₂ for 10 min and stimulated with LF2 (1 mg/ml) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

んど引き起こされなかった (図15)。一方、NACはERKのリン酸化を阻害することがわかった (図13B)。これらの結果から、NACによるPLDの阻害は、抗酸化作用としてよりもむしろPLDの活性化に関与す

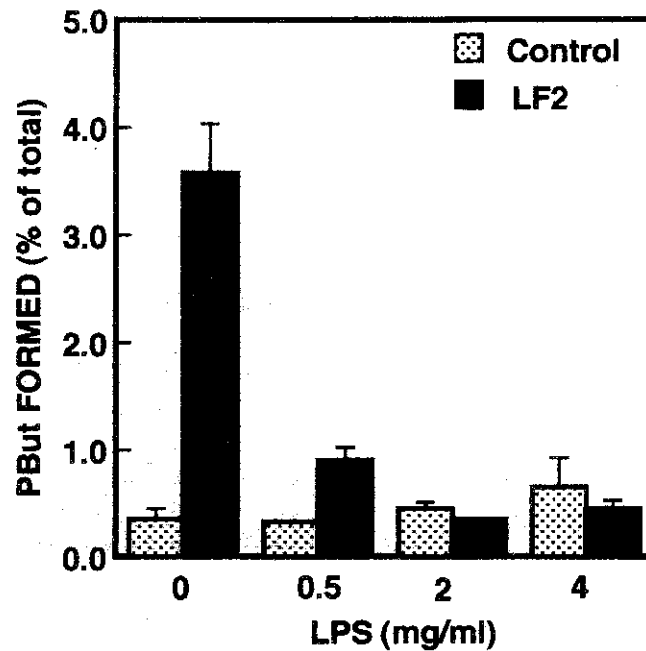


Fig.16 Inhibition of LF2-stimulated PLD activation by lipopolysaccharide.

HSC-4 cells were labeled with [³H]palmitic acid for 24 hr. The labeled cells were stimulated with or without LF2 (1 mg/ml) in the presence or absence of indicated concentration of lipopolysaccharide (LPS) for 30 min. PLD activity was assayed as described in Materials and Methods.

るERKのリン酸化を抑制するためであると思われる。

さらに、ラクトフェリンは細菌の産生するエンドトキシンとして知られている lipo-polysaccharide (LPS) と結合することや、細胞膜受容体結合においてLPSと競合することが示唆されている^{9, 10)}。そこで、LF2によるPLDの活性化に対するLPSの影響を検討した。LF2によるPLDの活性化はLPSにより濃度依存的に阻害された(図16)。この結果から、LF2はLPSと結合して細胞に結合する部位が阻害されるか、あるいは、LF2の細胞における受容体結合にLPSが競合するためと思われる。以上の結果から、LF2はHSC-4細胞に特異的に結合し、各種細胞内シグナル伝達経路を活性化して、最終的にアポトーシスをもたらすものと思われる。さらに、LF2の細胞への作用には細胞外カルシウムが必須であることが示唆された。

以上の結果より、ラクトフェリンのペプシン分解物は白血病細胞や口腔腫瘍細胞に対して顕著なアポトーシスを誘導することができることが判明した。アポトーシスシグナルの初期では、MAPキナーゼが活性化されるが、PLDの顕著な活性化も起こることが示された。したがってPLDの活性化はLF2の細胞内シグナル伝達を検索するのによい指標となることが判明した。また、細菌により産生されるLPSによりLF2作用が競合的に抑制されることが明らかにされた。このことは、逆にLPSの作用をLF2が抑制することも可能である。LPSはサイトカインなどを産生し、免疫細胞に抑制的に作用することが知られているが、LF2のLPS抑制作用としての重要性が考えられ、この点は今後さらに明らかにしたい。また、最近ラクトフェリンがヒト肝がん細胞におけるC型肝炎ウイルスの感染を阻害することも報告されており¹¹⁾、肝細胞に対するLF2の作用機構についても検討したい。

参考文献

- 1) Soteriou, A. and Cryer, A. Distinct immunoreactivities suggest the existence of potential tissue variants in rat lipoprotein lipase. *Biochem. J.*, 299, 417-423, 1994
- 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) 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.
- 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) Fiat, A.M. and Joltes, P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects. *Mol. Cell. Biochem.*, 87, 5-30, 1989.
- 7) Jones, E.M., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L. and Millar, M.R. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 208-214, 1994
- 8) Hwang, P.M., Zhou, N., Shah, X., Arrowsmith, C. H. and Vogel H. J. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide from bovine lactoferrin. *Biochemistry*, 37, 4288-4298, 1998.
- 9) Mattsby-Baltzer, I., Roseann, A., Motas C., Elverfors, J., Engberg, I, and Hanson, L.A. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res.*, 40, 257-262, 1996. Legrand,
- 10) Ellass-Rochard, E., Legrand, D., Salmon, V., Roseann, A., Trif, M., Tobias, P.S., Mazurier, J., and Spik, G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by colocalization with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.*, 66, 486-491, 1998.
- 11) Ikeda, M., Sugiyama, K., Tanaka, T., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K. and Kate, N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 549-553, 1998