

生体制御分子探索と機能解析を基盤とする健康科学

研究代表者：長岡 康夫
研究担当者：下家 浩二・松村 吉信・福永 健治

I. 魚肉ペプチド給餌による免疫増強作用の検討

福永 健治*、細見 亮太**、吉田 宗弘***

これまでに魚肉あるいは魚肉ペプチドの腫瘍抑制効果を確認しているが、腫瘍抑制的に作用するサイトカインの定量、あるいはホルモンレベルの評価による統計学的再については傾向を確認しているものの明確な結果を得られていないのが現状であった。また、移植ガンモデルにおいて、離乳直後から8週例に達する5週間にわたり魚肉ペプチドを給餌することで、腫瘍の定着を抑制することが確認されている。そこで、本研究では魚肉ペプチドのガン抑制効果に関する研究の一環として、実験的免疫不全誘導マウスの抗体産生能に及ぼす影響について検討した。

実験動物

8週齢のBALB/cAJcl雄マウスを本実験に用いた。動物の飼育に関しては、移植ガン飼育実験と同様に、12時間おきの明暗サイクル、温度、湿度が制御された環境下で餌および水は自由摂取とし、1週間の馴化後、実験に供した。

本実験では免疫不全状態を作出するため、マイトマイシンC (MMC) の投与を実施した。8週齢のBALB/cAJcl雄マウスにMMC 1 mg/kg体重の用量で7日間連続腹腔投与した¹⁾。MMC製剤(協和発酵)は生理食塩水に溶解して全容を0.1mlとして注射した。対照群には等量の生理食塩水を投与した。1群20匹とし、MMC投与終了後2週目における脾臓重量の測定と抗体産生細胞(PFC)の検出を行った。

試験餌料は、離乳直後からAIN93Gをもとに魚肉ペプチド粉末を餌料重量に対して2.5および10%(w/w)となるように添加した餌料を給餌した。すなわちAIN93Gの標準タンパク質であるカゼインのうち1/8および1/2

を魚肉由来ペプチドに置換し、AIN93Gをコントロールとして8週齢になるまで飼育した。MMC処置後は、半数(n=10)に対照群用のAIN93Gを給餌し、残りの半数(n=10)には継続して同様の試験餌料を給餌した。これらをそれぞれMMC-1群およびMMC-2群とした。対照群、対照群MMCともにn=10とした。

本実験では、PFCの誘導にヒツジ赤血球を抗原として用いた。ヒツジ赤血球は、大過剰の生理食塩水で3回洗浄後、マウスに 1×10^8 個を尾静脈投与した。4日後、これらのマウス脾細胞は2回遠心(490g、5分)し、10% FCS-RPMI1640培地10mLで再度懸濁した。脾細胞数はチュルク染色液を用いて測定した。ヒツジ赤血球に対するPFCの測定はJerneらの方法によってに行った³⁾。脾細胞浮遊液100 μ Lにイーグル最小必須(Eagle's MEM)培地800 μ L、8%ヒツジ赤血球懸濁液100 μ Lおよびジエチルアミノエチル(DEAE)デキストラン100 μ Lを加えて、全容を1.1mLとした。これらを37℃、5% CO₂、2時間培養し、モルモット血清を加え、さらに1時間インキュベートした。シャーレ上に生じたヒツジ赤血球の溶血斑は目視で確認した。

結果および考察

本実験では、脾細胞(10^6 個)におけるPFC産生能におよぼす魚肉ペプチド給餌の影響を、MMC免疫抑制マウスを用いて評価した。予備実験から、PFCの産生能回復は、MMC投与後約2週間目からであることを確認しているため、PFCの産生能の測定はMMC最終投与から2週間目に行った。その結果、対照群におけるPFCは 552 ± 87 個検出されたに対して、対照群MMCは 104 ± 15 個で、MMCによる免疫抑制が確実に起こり、回復途中であると判断できる。ペプチド2.5および10% MMC-1群では、対照群MMCに比べ、有意に回復がはやく、10%でより回復早いことが分かる。これらの結果は、MMCによって低下したPFC産生能が魚肉をあらかじめ給餌することによって回復が早いことを示している。ま

* 化学生命工学部准教授

** 工学研究科PD

*** 化学生命工学部教授

表 1. MMC免疫抑制マウスにおける魚肉ペプチド給餌の脾臓重量および抗体産生能に及ぼす影響

	脾臓重量 (mg)	PFC (個/10 ⁶ 脾臓細胞)
対照群	81.6 ± 10.6	552 ± 87
対照群MMC	76.4 ± 12.9	104 ± 15
ペプチド2.5%MMC- 1	72.3 ± 12.3	187 ± 24a
ペプチド10%MMC- 1	84.2 ± 9.2	249 ± 27a
ペプチド2.5%MMC- 2	88.6 ± 14.2	223 ± 63a
ペプチド10%MMC- 2	84.7 ± 13.4	331 ± 67ab

n=10, a : 対照群MMCに対してp<0.01、b : 同用量MMC- 1に対してp<0.05

た、MMC処置後も各試験餌料を給餌したペプチド2.5% MMC- 2 およびペプチド10%MMC- 2 群では、MMC- 1 群に比べより回復が早いことがわかる。ペプチド10% MMC- 2 群は、ペプチドMMC- 1 群に比べても有意に回復が早く、魚肉ペプチドの免疫回復効果は、継続的給餌によってより高められることがわかった。一方、脾臓重量については各群間については、有意な差はみられなかった。

フルオロウラシルやアルキル化剤など古典的な化学療法剤でも、最新の化学療法剤でも、その副作用による免疫抑制状態は、深刻な問題の一つである⁴⁾。また、ガン性悪液質状態における免疫抑制状態は、癌の進行を早めるだけでなく、感染症の誘発因子でもあり、制御が難しい⁵⁾。本研究ではMMCによる免疫抑制モデルマウスを用いた。予備実験ではあるが、健常マウスでは魚肉ペプチドの摂取は免疫系にほとんど影響を与えないことを確認している。MMCによる免疫不全状態の誘導作用は、投与量、投与回数、投与間隔などで大きく変動することから、魚肉ペプチドの影響を検証するためには、確実な免疫抑制モデルマウスの作成が必要不可欠である。これも予備実験の結果であるが、PFC産生能は7日間のMMC腹腔投与により完全にみられなくなり、その状態は1週間続き、徐々に回復して行くことが分かった。これらの結果より、魚肉ペプチドの効果を検討するのに、MMCの最終投与後2週間目でPFCの解析を行うこととした。今後はその免疫賦活成分の特定と更なる作用機序の解明が必要であると思われる。

参 考 文 献

- 1) Kiyohara H, Matsumoto T, Takemoto N, Kawamura H, Komatsu Y, Yamada H. *Planta Med.* 61 (5): 429-434 (1995)
- 2) Takemoto N, Kiyohara H, Maruyama H, Komatsu Y, Yamada H, Kawamura H. *Int J Immunopharmacol.* 16 (11): 919-929 (1994)
- 3) JERNE NK, NORDIN AA. *Science* 26:140:405 (1963)
- 4) Edwards AJ, Bacon TH, Elms CA, Verardi R, Felder

M, Knight SC. *Clin Exp Immunol.* 58 (2): 420-427 (1984)

- 5) Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R, Rossi Fanelli F. *Eur J Cancer* 42 (1): 31-41 (2006)

Ⅱ. 自然界からのビスフェノールA分解菌の単離とその特性解析

松村 吉信*

ビスフェノールA (BPA) は生態系や内分泌系に悪影響を及ぼす環境汚染物質として知られているが、ポリカーボネートやエポキシ樹脂などの主原料として多量に使用されている。一般に、BPAは製品中では重合化されているために製品からの流出はほとんどないものと考えられていたが、近年、熱水中などで比較的容易に未重合のBPAが溶出されていることが見出され、さらに、廃棄物処理場や埋立て地から比較的高濃度のBPA汚染が報告されている。このようなことから、カナダでは乳幼児におけるBPA被害を未然に防ぐためにポリカーボネート製哺乳瓶の輸入・販売の禁止、日本では、製品からのBPA溶出量の上限を決めている。しかし、このような対応も環境に流出したBPAの除去には効果はなく、使用量が増加するポリカーボネートなどのプラスチック製品から流出するBPAによる環境汚染に対応できるものではない。そこで、我々の研究室では細菌細胞を用いたBPA処理技術の開発を行っている。これまでに、BPAを高効率に分解する細菌、*Sphingomonas bisphenolicum* AO 1 株を単離し、その分解経路の解析を行ってきた。これらの結果は、AO 1 株がBPAを二酸化炭素と水にまで短時間に完全に分解することを示していた^{1, 2)}。また、BPA分解の初期反応がBPA代謝の律速段階の一つとなり、その反応がチトクロムP450モノオキシゲナーゼによって触媒されていることを見出した^{1, 3)}。しかしながら、AO 1 株の分解能力は非常に不安定であり、容易にBPA分解能を失った自然突然変異株が出現することを報告している⁴⁾。このようなことから、新たなBPA分解能の安定した細菌が求められている。そこで、本年度の

* 化学生命工学部准教授

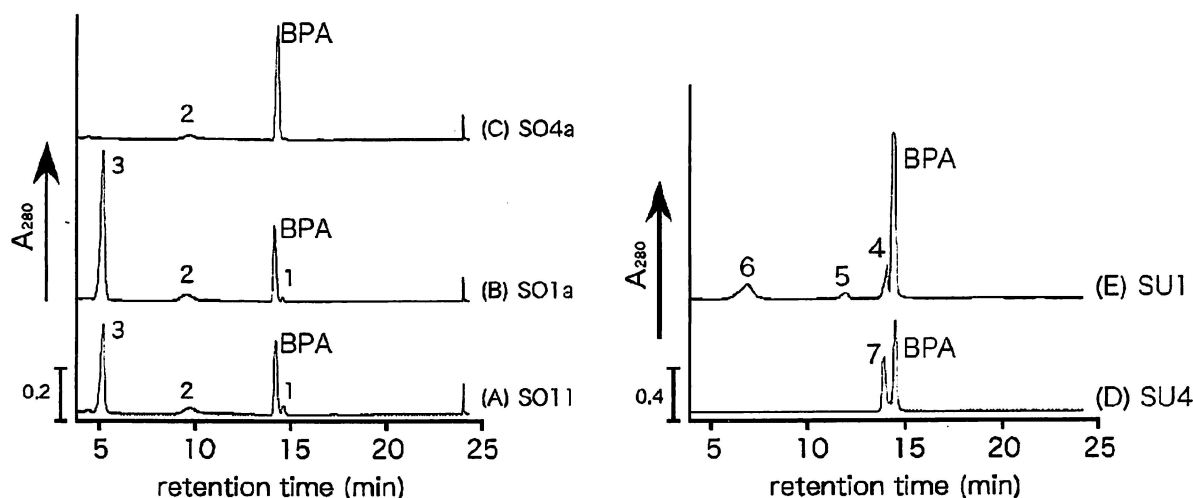


図1 新規BPA分解菌におけるBPA代謝産物解析

(A-C) は *Sphingomonas* 属細菌、(D-E) はその他のグラム陰性細菌のBPA分解産物のHPLC分析。ピーク1-3はAO1株で検出されたBPA分解産物。ピーク4-7は新たに検出されたBPA分解産物ピーク。

研究では、このBPA分解能の安定な細菌の単離を試みた。

分離源には、田畑、人工埋立て地、廃棄物処理場などの土壌を用いた。BPA分解菌の単離は、BPAのみを単一炭素源とする無機塩培地を用い、土壌を直接この無機塩培地に接種し、増殖した細胞の単離で試みた。また、同時に土壌におけるBPA分解能も測定した。その結果、約80%の土壌でBPA分解能を有していた。しかしながら、単一菌株でBPA分解活性を示したものは26株であった。これは、多くの土壌でBPA分解能を有する細菌が存在するものの、単一菌株ではBPAを無機化することが困難であることを示している。そこで、BPAの無機が可能であった26株の緒特性を解析した結果、ほとんどがグラム陰性菌であり、そのうち3株はAO1株の近縁種であることが明らかとなった。また、これまで報告の少なかったグラム陽性細菌においても3株を単離することができた。単離した分解菌のBPA分解特性を解析するため、BPA代謝中間体の構造分析を行った結果(図1)、3株の *Sphingomonas* 属細菌ではAO1株と同じ分解産物が検出され、これらのBPA代謝経路はAO1株と同一であると予想された。しかしながら、その他の菌株では、AO1株でのBPA代謝産物とは異なる物質が検出されていることから、その代謝経路も異なっていると予想される。これは、AO1株との混合利用においてBPA分解のより効率化が目標となるものと予想される。また、一部の単離菌ではBPA分解産物が検出されなかったことより、AO1株よりも分解速度の速い、菌株が単離されていると考えられた。しかしながら、AO1株で問題となったBPA分解能の安定性は単離したすべての菌株で低く、当初の目的が完全に達成されたものではなかつ

た。今後、AO1株を中心にBPA分解酵素遺伝子群の取得やその構造解析をととして、遺伝子工学的手法を用いた安定性向上を目指す予定である。

Ⅲ. 健康を害する小胞体ストレスとその防御機構

下家 浩二*

1. はじめに

実質的に高齢化社会を迎えた日本において、医療に関する問題が連日のように様々なメディアから指摘されている。その問題は、医療経済、医療体制、医療方法など、多方面にわたっている点に深刻さを感じさせられる。一方、医療にも関連することで注目すべき点として、現在、健康がブームとなり、健康に関わる商品(特保関連商品やサプリメントなどを含む健康商品)が開発され、販売されていることが挙げられる。健康商品の販売実績からも、多くの人が健康を望んでいると考えられることから、疾病を克服または予防し、健康維持する方法を様々な角度から科学的根拠に基づいて提示する重要性が存在すると思われる。

私は、脳神経系に関する疾患で、特に高齢者に罹患者数が多い神経変性疾患の進行過程と抑制方法を研究の対象の一つにしている。神経変性疾患の代表として、アルツハイマー病やパーキンソン病などがあり、それらの進行過程を神経細胞内の分子機構を明らかにし、その情報を基に、抑制方法を見出そうとしている。上記の疾患は、不可逆であり、現在の医療技術では、完全治癒させることは不可能である。それは、神経変性疾患において、神

* 化学生命工学部准教授

神経細胞が神経細胞死（アポトーシス）によって死滅することが理由となる。さらに、脳は、人を制御する重要な臓器でありながら、脆弱性を有している。これらの様な所に治癒させ得る方策を確立することが極めて困難な理由がある。さらに、患者は介護を必要とする場合が多く、介護する者への負担も大きいことから、患者以外の人の健康を害することもある。従って、神経変性疾患以外の介護者の健康保持を考慮しても、本疾患の治癒方策の確立が切に望まれている。

近年になり、アポトーシスの中でも小胞体ストレスという細胞のストレスが惹起され、このアポトーシス（小胞体ストレス誘導型アポトーシス）が進行することによって神経変性疾患が引き起こされることが明らかになった¹⁾。

さらに、特定の神経変性疾患患者の病理学的解析から、多くの原因遺伝子が同定されてきた²⁻⁵⁾。その分子機能の解析も世界中で行われており、治療法の確立に向けた基礎研究が進行している。そして、成果が見られ始めている。しかし、アルツハイマー病やパーキンソン病においては、患者の約8～9割は、個人の遺伝的背景に依存しない孤発的な発症形態をとるため、原因遺伝子の解析結果から得られる情報がどれだけの数の患者に対して有効であるかは不明な点が残されている。

本講演では、モデル神経であるPC12細胞を用い、各種薬剤を添加する実験系によって小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起させ、神経栄養因子（nerve growth factor）によってそのアポトーシスが抑制される分子機構を述べる。以上の研究結果は、孤発性の神経変性疾患に共通の現象として外挿できると考えられ、医療・健康分野での開発促進が期待される。

2. 小胞体ストレス誘導型アポトーシス

小胞体ストレス誘導型アポトーシスとは、細胞に負荷されるストレスを指し、細胞内小器官の一つである小胞体に異常構造タンパク質が過度に蓄積することによって引き起こされる。これまで知られていた通常のアポトーシスとは異なる刺激の入力によってアポトーシスが実行される。従って、小胞体ストレス誘導型アポトーシスに特異的な細胞内分子機構を介して細胞が死滅する。通常のアポトーシス進行の分子機構は、刺激を受けた後、細胞内小器官であるミトコンドリアの機能不全が起り、ミトコンドリア内からcytochrome cというタンパク質が細胞質内に放出される。その後、cytochrome c、Apaf-1、pro-caspase-9（不活性化型）、dATPによる複合体（apoptosome）が形成され、プロテアーゼ活性を有するcaspase-9（活性化型）を産生する。次に、このcaspase-9は、pro-caspase-3（不活性化型）を切断し、

caspase-3（活性化型）を産生する。最後に、caspase-3は、ICADとCADの複合体中のICADを切断し、DNA切断活性を有するCADを活性化させることによって、核内DNAの断片化を引き起こさせる。一方、本研究の課題である小胞体ストレス誘導型アポトーシスの場合、その実行と防御の相反する内在性の分子機構が同時に働くことが分かっている⁶⁻⁸⁾。まず、小胞体内腔に異常構造タンパク質が蓄積すると、細胞内では、小胞体膜上に存在している3種の小胞体ストレスセンサータンパク質（ATF6、Ire1、PERK）によって異常構造タンパク質の産生が感知される。この時、Ire1は、caspase-12を含む複合体を形成し、通常のアポトーシスの進行過程で見られたcaspase-9とcaspase-3の活性化を経て、核内DNAを断片化させる。この事実は、tunicamycin（Tm）や2-deoxy-D-glucose（2DG）を添加することによって小胞体ストレス誘導型アポトーシスをPC12細胞に惹起させることによっても検証された⁹⁾。次に、異常構造タンパク質の構造正常化（refolding）や新規タンパク質合成の停止を行うことによって小胞体ストレスの進行が防御されるのかを確認した。その結果、Tmや2DGを添加することによって小胞体ストレス誘導型アポトーシスをPC12細胞に惹起させると、GRP78が発現誘導された。Refoldingのためには、シャペロンが動員される。小胞体ストレスが惹起した時には、ATF6とIre1の下流の分子となる転写因子XBP1によって、主としてGRP78というシャペロンタンパク質が、発現誘導され、小胞体ストレスを緩和していると考えられる。

3. 神経成長因子による小胞体ストレス誘導型アポトーシスの抑制とその細胞内分子機構

小胞体ストレス誘導型アポトーシス惹起時においてGRP78が発現誘導し、内在性の防御（アポトーシス抑制）機構が存在していることを見出した。しかし、小胞体ストレス誘導型アポトーシスでは、内在性の防御機構では十分にアポトーシスを抑制することが出来ず、細胞は死滅する。

一方、本研究により、神経栄養因子の一つである神経成長因子（NGF）は、Tmや2DGによって惹起される小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することが明らかになった。NGFは、受容体TrkAを介して細胞内にリン酸化のシグナルを伝達させる。これまでに三種のシグナル伝達経路の存在が確認されているが、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの抑制には、phosphatidylinositol 3-kinase（PI3-K）シグナル伝達経路を利用していることも明らかになった（図1）。

さらに興味深いのは、このPI3-Kシグナル伝達経路の活性化によって、小胞体ストレスが負荷されている状

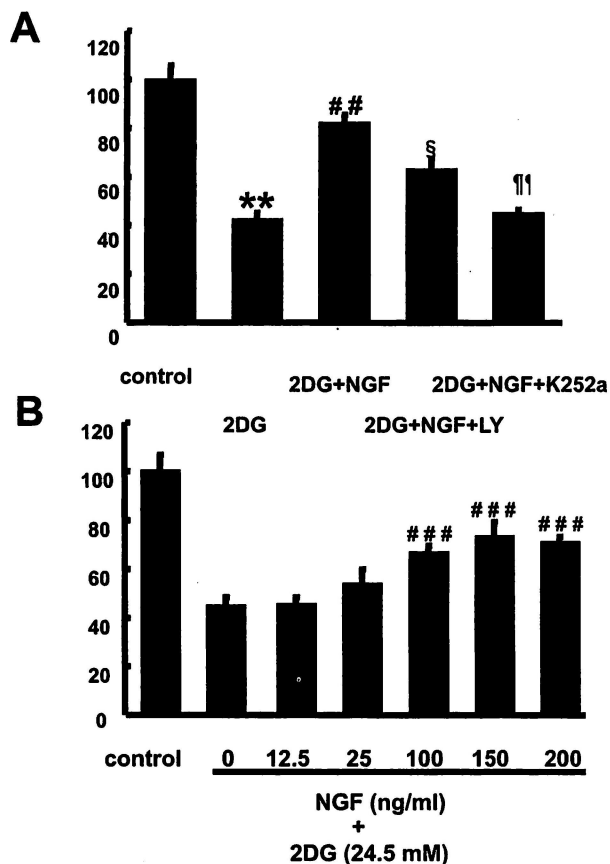


図1：NGFによる小胞体ストレス誘導型アポトーシス抑制作用 (A,B) MTT assayを用いた細胞生存率の測定結果。LYは、PI 3-Kの特異的阻害剤、K252aは、Trkのキナーゼ阻害剤を示す。縦軸は、controlに対する細胞生存率を%で示している。

態下でのみGRP78の発現が小胞体ストレス負荷時よりも上昇していることを見出したことである。つまり、過剰に発現誘導されたGRP78が小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制している可能性が示唆された (図2)。

この結果をさらに深く解析するために、GRP78の発現抑制剤であるversipelostatatin (VST) を2DGとNGFの存在下で添加したところ、細胞生存率が低下することが分かった。GRP78遺伝子の上流プロモーター領域の塩基配列を含むプラスミドを用いたレポーターアッセイを行った結果でも、2DGとNGFの存在下、PI 3-Kの特異的阻害剤を添加することにより値が低下していたことから、PI 3-Kシグナル伝達経路によってGRP78が過剰に発現誘導されていることが示された。このGRP78の過剰発現誘導の細胞内分子機構をさらに詳細に解析したところ、核内p50 ATF 6の産生と細胞質でのXBP 1 s mRNAの産生が亢進していることが明らかになったことから、小胞体ストレス時にのみ、これらの分子機構が働く新たな機構の存在も示唆された (図3)。

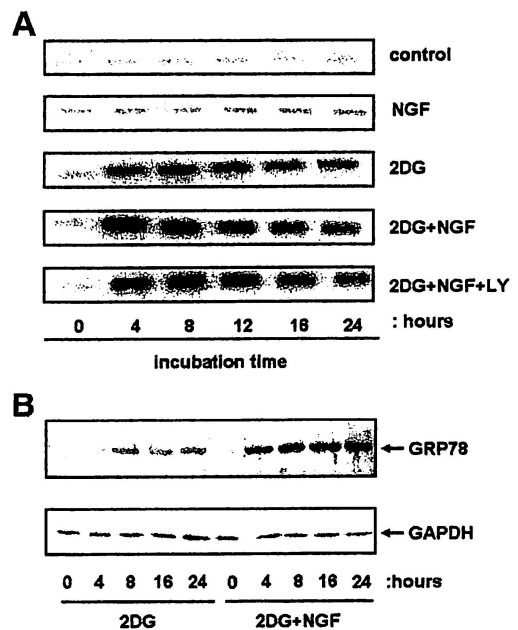


図2：小胞体ストレス時におけるPI 3-Kシグナル伝達経路を介したGRP78の過剰発現誘導 (A) 図中右記の薬剤を添加した後、経時的にPC12細胞中のRNAを回収し、GRP78に対する特異的probeを用いたNorthern blottingによって検出した。(B) 2DGあるいは2DG+NGFを添加した後、経時的にPC12細胞からタンパク質を回収し、抗GRP78抗体を用いたWestern blottingによって検出した。

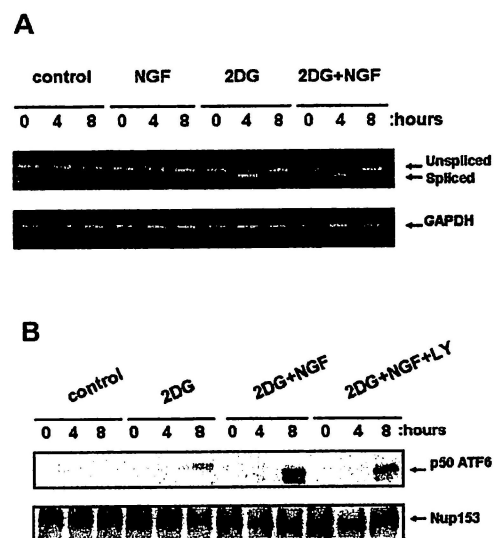


図3：PI 3-Kシグナル伝達経路を介したGRP78を過剰発現させる細胞内分子機構 (A) 図中に示した薬剤を添加後8時間までのRNAをPC12細胞から回収し、特異的primer setを用いてRT-PCRを行うことにより、XBP 1 s (spliced) とXBP 1 (unspliced) を検出した。(B) ヒトATF 6をコードするプラスミドをPC12細胞に遺伝子導入した。その後、図中に示した薬剤を添加し、同細胞から核画分を抽出した。抽出したサンプルは、SDS-PAGEにかけ、切断され活性化したATF 6 (p50ATF 6) を、抗tag抗体を用いたWestern blottingにより検出した。

4. PI3-Kシグナル伝達経路に関する知見を利用した神経変性疾患治療への応用の可能性・展望

今回得られた研究成果から、PI3-Kシグナル伝達経路を活性化する特定リン酸化酵素の活性化薬やGRP78発現上昇薬が、小胞体ストレス誘導型アポトーシスを介した神経変性疾患に対して有効となる可能性が示唆された。既に、NGFとファミリータンパク質群を形成している神経栄養因子brain-derived neurotrophic factor (BDNF)を用いた第三相試験が行われている。結果は、少なくともアルツハイマー病患者に対して有効ではなかったことから、本試験が中断された。GRP78発現上昇薬については、数多くのリード化合物群が見出されており、今後の進展に期待したい。

PI3-Kシグナル伝達経路の神経保護作用に対する重要性は、揺るぎがないことではあるが、短所を有しているのも事実である。例えば、PI3-Kシグナル伝達経路の特定タンパク質の活性化による癌化が最も大きな課題であろう。最近、再生医療分野で話題になっているiPS (induced pluripotent stem) 細胞も癌遺伝子を含む4遺伝子を導入することによって、万能細胞化させることが出来た一方で、無限増殖能をも獲得してしまったために癌化の問題をも抱えている。問題点は、同様であり、PI3-Kシグナル伝達経路上にある数々の分子群を利用しながら、今後どのように問題点を解決させるかによって実用化に向けた取り組みの方向性が決まってくると考えられる。本研究の成果が早期に実用化され、多くの人が

ちが健康を保つことが出来ることを願っている。

参 考 文 献

- 1) Katayama, T, Imaizumi, K, Sato, N, Miyoshi, K, Kudo, T, Hitomi, J et al., (1999) *Nat. Cell Biol* 1: 479-485.
- 2) Chartier-Harlin, MC, Crawford, F, Houlden, H, Warren, A, Hughes, D, Fidani, L et al., (1991) *Nature* 353: 844-846.
- 3) Sherrington, R, Rogaev, EI, Liang, Y, Rogaeva, EA, Levesque, G, Ikeda, M et al., (1995) *Nature* 375: 754-760.
- 4) Levy-Lahad, E, Wasco, W, Poorkaj, P, Romano, DM, Oshima, J, Pettingell, WH et al., (1995) *Science* 269: 973-977.
- 5) Kitada, T, Asakawa, S, Hattori, N, Matsumine, H, Yamamura, Y, Minoshima, S et al., (1998) *Nature* 392: 605-608.
- 6) Morishima, N, Nakanishi, K, Takenouchi, H, Shibata, T and Yasuhiko, Y, (2002). *J. Biol. Chem.* 277: 34287-34294.
- 7) Nakagawa, T, Zhu, H, Morishima, N, Li, E, Xu, J, Yankner, BA et al., (2000) *Nature* 403: 98-103.
- 8) Kaufman, RJ, (1999) *Genes. Dev.* 13: 1211-1233.
- 9) Shimoke, K, Amano, H, Kishi, S, Uchida, H, Kudo, M and Ikeuchi, T, (2004) *J. Biochem.* 135: 439-446.