

ヘモグロビン分解ペプチドの腫瘍壊死因子産生に対する効果

八巻幸二・鈴木雅博・木村俊之・山岸賢治・鈴木重徳*・後藤真生*・石川(高野)祐子*

(東北農業研究センター・*食品総合研究所)

Effect of peptides released from bovine hemoglobin on TNF production in rat activated macrophages

Kohji YAMAKI, Masahiro SUZUKI, Toshiyuki KIMURA, Kenji YAMAGISHI, Masao GOTO, Yuko TAKANO-ISHIKAWA

(National Agricultural Research Center for Tohoku Region, *National Food Research Institute)

1 はじめに

食肉の副産物である血液や臓器は廃棄処分されることが多いが、それらを利用する方法を考案することによって、資源の有効な活用が可能となる。そこで牛ヘモグロビンを消化酵素で処理し、生理的な機能性を示す成分を作出することを目的とした。腫瘍壊死因子(TNF)は、炎症やアレルギー、自己免疫疾患等に関与しその中心となる役割を有する重要なタンパクで、医薬品等の開発のターゲットとしても注目を浴びている。このTNFは大腸菌細胞壁成分(LPS)刺激マクロファージ(MP)によって産生され、細胞培養系での試験に容易に利用することが可能である。これまで、MP系の細胞がペプチド性の物質によって制御される報告はほとんどない。そこで、赤血球の主要なタンパク成分であるヘモグロビンに注目し、消化酵素としてトリプシンを用い、得られたペプチド断片分画がMPのTNF産生に影響を及ぼすか否かについて検討を加えた。

2 試験方法

- (1) 牛ヘモグロビン(Sigma Co.)をアセトンで洗浄し、ヘム鉄を除去した後、トリプシン(キモトリプシンフリー、Sigma)で消化し、酵素分解物を採取した。
- (2) この酵素分解物を逆相系高速液体クロマトグラ

フィー、20-60%アセトニトリルの20分直線グラジェントで分画し、各分画は1mlで回収した。

- (3) 各分画は凍結乾燥後、既報¹⁾に従って、活性化MPのTNF産生活性を調べた。MPはバクトペプトンを投与したSD系雄性ラットの腹腔より回収し、24時間培養後、TNF産生試験に使用した。
- (4) 培養はRPMI1640(10%牛胎児血清含有)で行い、LPSで刺激した後、3時間の培養上清を、既報²⁾に従って酵素免疫測定法(R&D System)でTNF- α の含有量を測定した。
- (5) 活性分画のアミノ酸配列を決定し、その合成ペプチドを作成し、その活性を確認した。

3 結果及び考察

脱ヘム鉄の牛ヘモグロビンを消化酵素トリプシンで消化分解し、得られた1万以下ペプチド分画を、逆相系高速液体クロマトグラフィーで分画した(図1)。

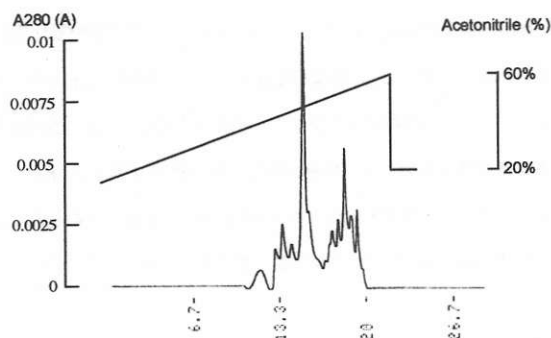


図1 トリプシン分解物のHPLCクロマトグラム

この分画を 1 ml ずつ採取し、各フラクションを凍結乾燥後、活性化ラット腹腔 MP の TNF 産生に対する効果を検討した。

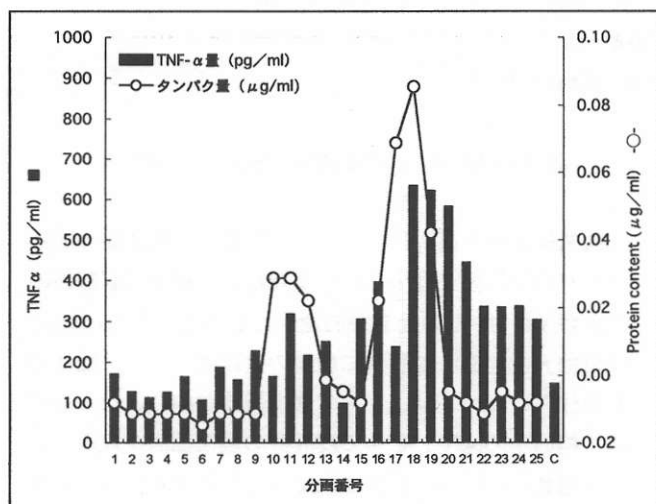


図 2 各分画の TNF 産生に対する効果

図 2 に示すように、分画 11、15-16、18-21 で産生増強効果が確認された。そこでこの 18-19 分画を回収し、アミノ酸分析を行った。その結果、VVAGVANALA の 10 残基を含むことが確認され、この配列は牛ヘモグロビンの β 鎖の N 末端から 132 番目からの 10 残基であることが確認された。そこでこの 10 残基ペプチドを合成し、MP の TNF 産生活性を検討した。

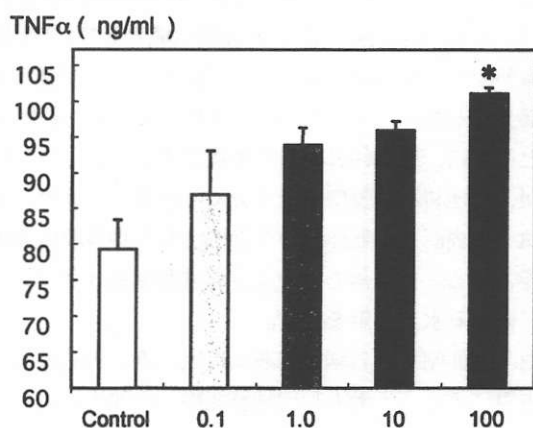


図 3 LPS 刺激時におけるペプチドの TNF 産生増強効果

(*: $p < 0.05$)

その結果、図 3 に示した様に、LPS で刺激した MP からの TNF 産生を用量依存的に増強した。

4 まとめ

牛ヘモグロビンからトリプシン処理により得られた活性ペプチドは、マクロファージの TNF 産生を増強した。この結果は、牛血液より、生理活性のあるペプチドを精製することを可能とし、食品廃棄物の活用となると考えられる。さらに、他の分画にも活性が確認されており、さらに他の活性も見つかる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Lee JW, Takano-Ishikawa Y, Watanabe J, Kobori M, Tsushida T, and Yamaki K. 2002. Effect of ginsenosides and red ginseng water extract on tumor necrosis factor- α production by rat peritoneal macrophages Food Sci Technol Res. 8(4):300-303
- 2) Herath MTH, Takano-Ishikawa Y, and Yamaki K. 2003. Inhibitory Effect of some flavonoids on the Tumor Necrosis Factor- α production in lipopoly-saccharides-stimulated mouse macrophage cell line J774.1 (J Med Foods in Press)