鶏卵卵黄リポタンパク質の培養ヒト 細胞株の増殖促進作用

鈴木道子*・新本洋士**・米倉政実*・堤 将和*・篠原和毅**

Growth Promoting Effect of Chicken Egg Yolk Lipoproteins on Human Lymphocytic Cell Lines

Michiko SUZUKI*, Hiroshi SHINMOTO**, Masami YONEKURA*,
Masakazu TSUTSUMI* and Kazuki SHINOHARA**

* School of Agriculture, Ibaraki University, 3-21-1, Ami,
Ibaraki 300-03

** National Food Research Institute, The Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305

The promoting effect of chicken egg yolk lipoprotein (YLP) on the growth of a human histocytic lymphoma cell line (U-937), a human monocytic leukemia cell line (THP-1), a U-937-derived macrophage-like cell line (U-M), and three human-human hybridomas was examined. YLP was found to have the promoting activity on the growth of U-937, THP-1, U-M and hybridomas. YLP was separated into four fractions by an ultracentrifugation. Among them, YS-1 fraction which was shown to be composed of LDL and a small amount of protein promoted the growth of U-937 cells most significantly. From these results, one of promoting principles of YLP on the growth of human lymphocytic cell lines was suggested to be LDL fractions of YS-1. (Received Aug. 4, 1993)

鶏卵中には、培養動物細胞の増殖を促進する数種類の成分が含まれていることが報告されている¹⁾。このうち、卵黄に含まれるリポタンパク質 (Yolk lipoprotein; YLP) は細胞増殖を強く促進する成分として知られている。MURAKAMI²⁾らは、ヒト由来の細胞株を用いた実験により、YLPが血球系を含む広範な細胞株の無血清培養条件下での増殖を促進することを報告しており、クロマトフォーカシングおよびゲルろ過による分画によって等電点 7.5 の画分に増殖促進作用があることを報告している。

このように YLP の培養動物細胞に対する種々の作用が報告されているが、YLP の細胞増殖促進における作用機構はいまだほとんど解明されていない。近年、食品成分中に含まれている細胞機能調節因子に興味もたれ

ており³⁾、この意味においても YLP の作用機構解明が望まれている。

本研究では YLP の細胞増殖促進作用機構を明らかにすることを目的とし、YLP 中の有効成分を超遠心分離によって分画した画分の細胞増殖促進作用について検討した結果を報告する。

実験方法

1. YLP および YLP 分画物の調製

市販鶏卵から卵黄を分離し、卵黄膜を除去したのち、等量の 1% 塩化ナトリウム溶液を添加して混和した。この卵黄溶液を 20 000×g で 30 分間、4℃ にて遠心した上清を YLP 画分とした²⁾。YLP の分画は、超遠心分離によって行った。YLP 画分に塩化ナトリウムを終濃度

* 茨城大学農学部 (〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1)

** 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

10% になるように添加し、78 000×g で 18 時間、4℃ にて遠心した⁴⁾。比重の小さい順に YS-1, YS-2, YS-3 および YS-4 とした。YS-1 はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁し、また、YS-2 および YS-3 は PBS に対して透析し、実験に供した。YS-4 画分は収量が少なかつたため以後の実験には用いなかった。

各画分の蛋白含量は色素結合法 (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories)⁵⁾ により、総脂質量は FOLCH 法⁶⁾ によって測定した。中性脂質量はゼオライトによりリン脂質を除去後けん化し、FLETCHER-松宮法⁷⁾ により測定した。リン脂質は灰化した試料の総リン含量から算出した⁸⁾。また、コレステロールは不けん化物をトリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフィーによって定量した⁹⁾。脂質中の構成脂肪酸はけん化物を酸性下でヘキサン抽出し、ジアゾメタンでメチル化後、ガスクロマトグラフィーによって定量した¹⁰⁾。

2. 供試細胞株

ヒト単芽球様細胞 U-937, THP-1 および U-937 よりフォルボルエステル (TPA, 12-0-tetradecanoyl phorbol 13-acetate) 処理によって分化誘導し、樹立されたマクロファージ様細胞株 U-M¹¹⁾ を用いた。また、B リンパ球系のヒト-ヒトハイブリドーマ細胞として、ヒトの肺癌に対するモノクローナル抗体を産生する HB4C5, HF10B4¹²⁾、およびヒトの乳ガンに対するモノクローナル抗体を産生する SI102¹³⁾ を用いた。U-937 および THP-1 は、市販合成培地 eRDF 培地 (極東製薬) に成長因子として 5% の牛胎児血清を添加して培養した。ハイブリドーマ細胞および U-M 細胞は、eRDF 培地に培地用添加剤 RD-1 (インスリン (I) 5 µg/ml, トランスフェリン (T) 10 µg/ml, エタノールアミン (E) 1.53 µg/ml, 亜セレン酸ナトリウム (s) 4.3 ng/ml を含有) を加えた無血清培地 (eRDF-ITES)¹⁴⁾ にて培養した。

3. 細胞増殖効果の検定

細胞増殖活性は、細胞浮遊液 (2×10⁴ Cells/ml) 1 ml を、24 穴マイクロカルチャープレート (CORNING, 25820) を、所定の濃度になるよう添加した YLP または YLP 分画物とともに 37℃, 5% CO₂, 95% 空気インキュベーター内で培養したのち、細胞数をセルカウンター (Micro-cell counter CC-130, 池本理化学工業) にて計測した。

測定では 4 連で行い、測定結果は平均値および標準誤差として表示した。試料添加区と無添加区間の有意差は Student の t 検定法によって検定した。

4. 電気泳動

YLP および YLP 分画物 (YS-1, YS-2, および YS-3) に含まれる蛋白質を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した。5% 2-メルカプトエタノールによって還元し、SDS 処理した試料をゲル濃度 10% のポリアクリルアミドゲルに負荷し、0.1% SDS を含む 0.375 M トリス塩酸緩衝液中で泳動した。泳動終了後、分離したタンパク質を Coomassie Brilliant Blue R-250 にて染色した¹⁵⁾。

結果および考察

1. ヒト単芽球系細胞に対する YLP の増殖促進作用

血清中のコレステロールや低密度リポ蛋白質 (Low Density Lipoprotein, LDL) は血球系細胞、なかでもマクロファージ関連細胞の増殖を調節していることが知られている¹⁶⁾。そこで筆者らはまずヒト単芽球系細胞株 U-937 および THP-1 細胞に対する YLP の増殖促進作用を検討した。YLP は増殖因子を含まない eRDF 培地に添加し、培養 4 日後の細胞密度を測定した。Fig. 1 に示すように、0.5 mg/ml 以下では U-937 の増殖は YLP 添加量の増加に伴って促進された。0.5 mg/ml 以上の YLP 添加で細胞増殖はプラトーに達した。

これに対して、THP-1 では 4 mg/ml の高濃度まで細胞増殖促進効果がみられ、実験に供した YLP の濃度範囲では細胞増殖が平衡に達することはなかった。

U-937 由来の U-M 細胞に対する YLP の作用は U-M 細胞が eRDF 培地のみではほとんど増殖できないため、増殖因子 ITES 存在下で測定した。Fig. 2 に示すように、U-M 細胞に対する YLP の至適濃度は 60 µg/ml であり、U-937 あるいは THP-1 に比べて低濃度の YLP で増殖促進効果がみられた。

2. YLP のヒト-ヒトハイブリドーマに対する増殖促進作用

3 種類のヒト-ヒトハイブリドーマに対する YLP の細胞増殖促進作用を検討した。これらの細胞の場合、eRDF-ITES 培地に YLP を添加し、5 日間培養して細胞密度を測定した。Fig. 3 に示すように、HF10B4 および SI102 では YLP の添加によって細胞増殖が促進され、0.1~0.3 mg/ml の添加濃度でもっとも高い細胞増殖がみられた。HB4C5 では、低濃度 (125 µg/ml) の添加で若干の増殖促進作用が見られたが、高濃度の YLP の添加は逆に細胞増殖を抑制した。

3. YLP の超遠心分離による分画

YLP 中の有効成分を分画する目的で、YLP の超遠心分離を行った。その結果、Fig. 4 に示したように、YLP

Fig. 1 Effect of YLP on growth of U-937 and THP-1 cell

The cells were cultured in eRDF medium for 4 days.

Fig. 2 Effect of different concentration of YLP on growth of U-M cells

The cells were cultured in eRDF-ITES medium for 4 days.

Fig. 3 Effect of different concentration of YLP on growth of hybridoma cells

The cells were cultured in eRDF-ITES medium for 5 days.

HF10B4 : (●), HB4C5 : (▲), SI102 : (■)

Fig. 4 Separation of YLP by ultracentrifugation

YLP was centrifuged at $78\,000 \times g$ for 18 hr.
1, YS-1 ; 2, YS-2 ; 3, YS-3 ; 4, YS-4

は4つの画分 (YS-1, YS-2, YS-3 および YS-4) に分画された。YS-1 画分は完全に浮上した層として得られた。YS-2 画分は黄色のごく微量の画分であり、YS-3 画分は分画画分のほとんどを占める可溶性画分である。また YS-4 はごく微量の沈殿画分であった。

各画分の蛋白質含量および総脂質含量を Table 1 に示す。YLP の脂質含量は乾物重量で約 60%、蛋白質は約 40% であった。YS-1 画分は約 85% の脂質を含み、YLP 中の脂質の大部分が YS-1 に含まれていた。YS-1 の蛋白質量は約 15% であった。YS-2 画分には約 80% の脂質が含まれていた。これに対して YS-3 および YS-4

画分には脂質はほとんど含まれてなかった。各成分の脂質成分組成を Table 2 に示す。脂質の大部分は中性脂質（トリグリセリド）であり、リン脂質およびコレステロール含量は数%以下であった。

YS-1 および YS-2 画分の脂質酸組成を Table 3 に示す。パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸およびリノール酸が全脂肪酸の 90% 以上を占め、市販卵黄 LDL とほぼ同じ組成を示した。

YLP の超遠心分離画分の 2-メルカプトエタノール存在下での SDS-PAGE による分離結果を Fig. 5 に示す。YS-1 画分に含まれる蛋白質バンドは卵黄 LDL に一致しており、この YS-1 画分は市販卵黄 LDL（レーン 6）と一致するものが多く、卵黄 LDL を主成分とすると考えられた。またこの画分には卵黄 LDL の他にもいくつかの蛋白質成分が認められた。YS-2 および YS-3 には、卵黄 LDL と一致するバンドは見られず、このことから、YLP 中の卵黄 LDL はほとんどが YS-1 に移行したと考えられた。YS-2 および YS-3 には、リベチン¹⁷⁾と考えられるバンドがみられた。

YS-2 画分は脂質が比較的多く含まれているにもかかわらず、SDS-PAGE では卵黄 LDL 構成蛋白質が検出されなかった。従ってこの画分は卵黄 LDL のアポ蛋白質を含まない脂質とリベチン等の卵黄蛋白質の混合物と

考えられた。

4. U-937 に対する YLP 分画画分の増殖促進作用

得られた超遠心分画画分の U-937 に対する細胞増殖促進作用を検討した。Fig. 6 に示すように、卵黄 LDL と考えられる YS-1 画分に強い細胞増殖促進作用が見られた。YS-2 および YS-3 画分には細胞増殖促進作用はほとんどみられなかった。Fig. 7 に各画分の添加濃度と U-937 の増殖の関係を示す。YLP (Fig. 1) に比べ、YS-1 画分は低濃度の添加で著しい細胞増殖促進作用が見られた。同様な YS-1 による細胞増殖促進活性は、他の細胞株でも認められた。

以上の結果より、粗 YLP 画分中のヒト血球系細胞に対する増殖促進作用は、卵黄 LDL による作用であると考えられる。MURAKAMI らはクロマトグラフィーを繰り返すことによって YLP から等電点 7.5 の有効画分を得ている²⁾。MURAKAMI らの画分は本研究で得た YS-1 画分に比べ、複雑な電気泳動パターンを示しており、細胞増殖促進に無関係な成分を含んでいると思われる。本研究において YLP の細胞増殖促進活性は、簡便・かつ短時間で YLP 中の活性画分を得られ、またその細胞増殖

Table 1 Protein and lipid contents of YLP and its components

YLP and its components	Protein (%)	Lipid (%)
YLP	37.5	62.5
YS-1	14.8	85.2
YS-2	21.3	78.7
YS-3	>99.0	Trace
YS-4	>99.0	Trace
LDL	31.3	68.8

Table 3 Fatty acid composition of YLP and its components

Fatty Acids	YLP (%)	YS-1 (%)	YS-2 (%)	LDL (%)
14:0	0.7	0.6	0.8	0.7
16:0	23.4	23.4	21.9	24.4
16:1	Trace	Trace	Trace	Trace
18:0	10.3	10.3	13.2	9.9
18:1	40.8	40.9	35.2	44.0
18:2	19.1	19.1	21.5	16.0
18:3	0.9	0.9	1.2	1.0
20:4	1.9	2.0	3.0	1.4
22:6	2.8	2.8	3.2	2.6

Table 2 Lipid composition of YLP and its components

YLP and its components	Triglyceride (%)	Phospholipid (%)	Cholesterol (%)	Total (%)
YLP	94.1	1.5	4.4	100.0
YS-1	93.6	1.7	4.7	100.0
YS-2	93.5	2.1	4.5	100.0
YS-3	Trace	Trace	Trace	—
YS-4	Trace	Trace	Trace	—
LDL	93.6	1.1	5.3	100.0

Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of YLP and its components

Electrophoresis was carried out with in 10% polyacrylamide gel in the presence of 0.1% SDS. The gel was stained with coomassie brilliant blue R-250.

Lane 1, Marker ; Lane 2, YLP ; Lane 3, YS-1 ; Lane 4, YS-2 ; Lane 5, YS-3 ; Lane 6, Yolk LDL

Fig. 6 Effect of YLP and its components on growth of U-937 cells in eRDF medium

The cells were cultured in the presence of 0.25 mg/ml of YLP and its components for 5 days.

促進活性は、十分に高いものであったことから、筆者らは YS-1 画分が培養動物細胞の無血清培養の際の添加剤として有用であると考えている。

一方、YS-1 画分の細胞増殖促進機構については明らかではないが、血漿 LDL と類似したレセプターを介した作用が推定される。現在レセプターバインディング

Fig. 7 Effect of different concentrations of YS-1, YS-2 and YS-3 fraction on growth of U-937 cells

The cells were cultured in the presence of different concentrations of YS-1, YS-2 or YS-3 fraction for 5 days.

YS-1 : ($\bullet$), YS-2 : ($\blacktriangle$), YS-3 : ($\blacksquare$)

アッセイ等の手法を用いて増殖促進の作用機作について検討を行っている。

要 約

鶏卵黄リポタンパク質 (Yolk lipoprotein, YLP) の、単球系細胞株 U-937, THP-1, U-M 細胞および 3 種のハイブリドーマ細胞に対する増殖促進効果を調べた。その結果、いずれの細胞についても YLP は増殖促進効果を示した。

YLP を超遠心分離によって分画し、比重の小さいほうから YS-1, YS-2, YS-3, YS-4 の 4 画分を得た。YS-1 の主成分は LDL で、わずかに他の蛋白質成分が含まれていた。また、脂質成分が乾燥重量の約 80% を占めていた。YS-2, YS-3 はリベチンを主成分とし、脂質はほとんど含まれていなかった。

YS-1 は強い細胞増殖促進活性を持ち、YLP よりも低濃度で増殖効果が見られた。YS-2, YS-3 には細胞増殖効果はほとんど見られず、YLP の細胞増殖作用は YS-1 に含まれる LDL によると結論した。

おわりに、本実験の遂行にあたり、脂肪酸分析を指導をいただきました食品総合研究所の村田昌一博士に深謝いたします。

なお、本研究の概要は、第 40 回日本食品工業学会大会 (平成 5 年 3 月、神戸) で発表した。

文 献

- 1) FUJII, D.K. and COSPODROWICZ, D. : *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **19**, 811 (1983).
- 2) MURAKAMI, H., OKAZAKI, Y., YAMADA, K. and OMURA, H. : *Cytotechnology*, **1**, 159 (1988).
- 3) 新本洋士・篠原和毅 : バイオサイエンスとインターナショナル, **51**, 30 (1993).
- 4) SHINOHARA, K., FUKUSHIMA, T., SUZUKI, M., TSUTSUMI, KOBORI, M. and KONG, Z-L. : *Cytotechnology*, **11**, 149 (1993).
- 5) BRADFORD, M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 6) FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.A. : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 7) 赤沼安夫・脊山洋右・永井克孝・山本 章 : 脂質 I, p. 78, (東京化学同人, 東京), (1993).
- 8) BARTLETT, G.R. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).
- 9) 藤野安彦 : 脂質分析法入門 (学会出版センター) (1990).
- 10) REITZ, R.C., HAMILTON, J.G. and COLE, F.E. : *Lipids*, **2**, 381 (1967).
- 11) KONG, Z-L., MIWA, M., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K. : *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **26**, 949 (1990).
- 12) MURAKAMI, H., HASHIZUME, S., OHASHI, H., SHINOHARA, K., YASUMOTO, K., NOMOTO, K. and OMURA, H. : *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **10**, 593 (1985).
- 13) MURAKAMI, H. : *Advance in Biotechnological Processed*, **11**, 107 (1989).
- 14) 村上浩紀・下村 猛・中村卓二・大橋秀哉・篠原和毅・木村浩久 : 農化, **58** (1984).
- 15) LEAMMLI, U.K. : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 16) WIKLUND, O., LILLEMOR, M., BJORNHEDEN, T., CAMAJO, G. and BONDJERS, G. : *J. Lipid Res.*, **32**, 55 (1991).
- 17) HATTA, H., SIM, J.S. and NAKAI, S. : *J. Food Sci.*, **53**, 425 (1988).

(平成 5 年 8 月 4 日受理)