

マクロファージからのリポポリサッカライド誘導NO産生に対する Asp-hemolysin 関連合成ペプチド P-21 の影響

堤 啓*, 熊谷 健, 蝦名 敬一, 横田 勝司

Effect of Asp-hemolysin related Synthetic Peptide P-21 on Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Production in Macrophages

Hiromu TSUTSUMI, Takeshi KUMAGAI, Keiichi EBINA and Katsushi YOKOTA

(Received November 22, 2004)

To clarify the effect of Asp-hemolysin-related synthetic peptide (P-21) on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in murine peritoneal macrophages ($M\phi$) was demonstrated this study. P-21 inhibited LPS (from *Escherichia coli* O111:B4)-induced NO production of $M\phi$ in a dose-dependent manner. P-21 slightly effected on NO production induced by LPS from *Klebsiella pneumoniae* in $M\phi$. The inhibition ability of the P-21 was influenced by differences of LPS from various strains. These results suggest that P-21 has effects on the bioactivity of LPS, such as NO production in $M\phi$.

Key words — Asp-hemolysin; Asp-hemolysin related peptide; lipopolysaccharide; nitric oxide; murine peritoneal macrophages

はじめに

Asp-hemolysin (AH) は、ペンギン肺から分離された *Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株の培養ろ液ならびに菌体から抽出・分離・精製された分子量約 16 kDa (SDS-PAGE) の易熱性タンパク質毒素であり、マクロファージ ($M\phi$) をはじめとする各種細胞に対して細胞毒性を示す。また、cDNA 塩基配列から成熟 AH は 126 個のアミノ酸残基から成ることが推定されている。¹⁾ 近年、Kudo らは、AH がアテローム性動脈硬化症の発症に関与している因子の 1 つである酸化修飾された低密度リポタンパク質 (oxidized low density lipoprotein, OxLDL) に対して特異的に結合すること、また OxLDL 粒子中のリゾホスファチジルコリンが AH の結合に関与することを示唆している。²⁻⁴⁾

一方、アテローム性動脈硬化症発生の機序において、血管内皮細胞の活性化に続き、単球お

よびリンパ球の内皮接着がおこり、さらには接着した単球の、血管内膜への遊走、 $M\phi$ への分化を経て、OxLDL を取り込み泡沫化することで脂肪線条が形成される。さらに、T リンパ球も集簇することが明らかにされ、炎症反応がアテローム性動脈硬化症の発症、進展に関与していることが強く示唆されている。^{5,6)} また、アテローム性動脈硬化症の病変部位の $M\phi$ では、TNF- α や IL-8 などの各種サイトカインや血管内皮細胞増殖因子や nitric oxide (NO) をはじめとする多種多様な生理活性物質を産生し、様々な細胞応答が誘導され、病態をより複雑化させると考えられている。NO は、NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) によって産生されるが、この NOS には 3 種類のアイソフォームの存在が知られており、中でも炎症部位における $M\phi$ では、炎症性サイトカインの刺激によって inducible NOS (iNOS) が誘導される結果、大量の NO を産生し、炎症を修飾するものと考えられている。また、 $M\phi$ からの

NO産生誘導物質として、各種炎症性サイトカインのほかにlipopolysaccharide (LPS) が知られている。⁷⁾ LPSは、実験的に各種細胞からNOをはじめとした各種生理活性物質放出因子として用いられるほか、臨床ではエンドトキシンショック起因物質として広く知られており、またLPSが免疫機構へ作用し動脈硬化症の進展に関与することも報告されている。⁸⁻¹⁰⁾

これまでに著者らはwestern blottingの実験結果からAHのLPS結合性を示唆する結果を観察していることから、本論文では、AHの活性部位と予想されるアミノ酸部分配列であるP-21ペプチドのLPS誘導M ϕ NO産生抑制作用をみいだしたので報告する。

実験の部

1. 試薬

LPSは*Escherichia coli* (*E.coli*) O26:B6, *E.coli* O55:B5, *E.coli* O111:B4, *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), *Salmonella typhimurium* (*S.typhimurium*) 由来のもの (Sigma, Continental, USA) を用い、注射用水 (桑名薬品工業社製, 大阪市, 大阪府) に溶解し、以下の実験に用いた。

2. 実験用動物

マウス (*ddY*系) 雄性 (4-5 weeks) は日本SLC (浜松市, 静岡県) から購入し、実験に供するまで、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ および明暗サイクル12 h (明期9:00-21:00, 暗期21:00-9:00) の一定環境下で飼育した。なお、使用動物には固形飼料 (SLC F2) および飲料水を自由に摂取させ、少なくとも2 d以上予備飼育した。

3. AH関連合成ペプチド

AHの部分アミノ酸配列であるI²¹KNASLSW-GKWKDGDGKDAEI⁴¹ (P-21) は、ペプチド研究所 (箕面市, 大阪府) に依頼し、固相合成したものをを用いた。このP-21は、用時注射用水 (桑名薬品工業社製, 大阪市, 大阪府) に溶解し、10 mg/mLに調整したものをを用いた。

4. マウス腹腔M ϕ の調製

マウス腹腔内に4.05% Brewer modified thioglycollate medium (Becton Dickinson, California, USA) を2 mL投与後,¹¹⁾ 4 d飼育し、Cohnらの方法¹²⁾ に準じた方法で腹腔M ϕ を回収した。すなわち、マウスを断頭脱血し、10 unit/mL heparine sodium salt (Nacalai tesque社製, 京都市, 京都府) および0.5% bovine serum albumin (Invitrogen, California, USA) を含むDulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Invitrogen, California, USA) を腹腔内投与後、開腹し、M ϕ を含むD-PBSを適量回収した。得られたM ϕ は4 $^\circ\text{C}$ にて700 rpm, 5 min遠心分離後、上層を除去し、D-PBSを加え洗浄した。この操作を3回繰り返し行い、得られた細胞を、10% fetal calf serum (Equitech-Bio, Texas, USA). 100 unit/mL penicillinおよび0.1 mg/mL streptomycin (Invitrogen, California, USA) を含むRPMI1640培地 (Invitrogen, California, USA) に再懸濁した。血球計算盤で細胞数を算出後、96 wellの tissue culture plate (Falcon, Liverpool, NSW, Australia) に 3×10^5 cells/mLに調整した細胞懸濁液を1 wellあたり100 μL 播種し、5% CO₂下で37 $^\circ\text{C}$ 、2 h培養後RPMI1640培地で洗浄し、実験に供した。またplateに付着した細胞は、ギムザ染色並びにラテックス粒子を用いた貪食能を測定することで97%以上がM ϕ であることを確認した。

5. M ϕ 細胞数の測定

RPMI1640培地で懸濁したM ϕ を96 well plateへ 3×10^5 cells/mLとなるように播種し、5% CO₂下で37 $^\circ\text{C}$ 、2 h培養後、さらに各濃度に調整したLPS添加培地に置換し必要時間培養後、上清を除去し細胞内脱水素酵素の基質となり還元を受け水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩であるWST-8 (cell counting kit-8; Dojindo社製, 益城町, 熊本県) を含むRPMI1640培地と交換し2 h培養後、450 nmの吸光度を直接測定し解析することによりM ϕ 生細胞数を算出した。

6. NOの測定

LPSまたはLPSとP-21ペプチド (終濃度 100

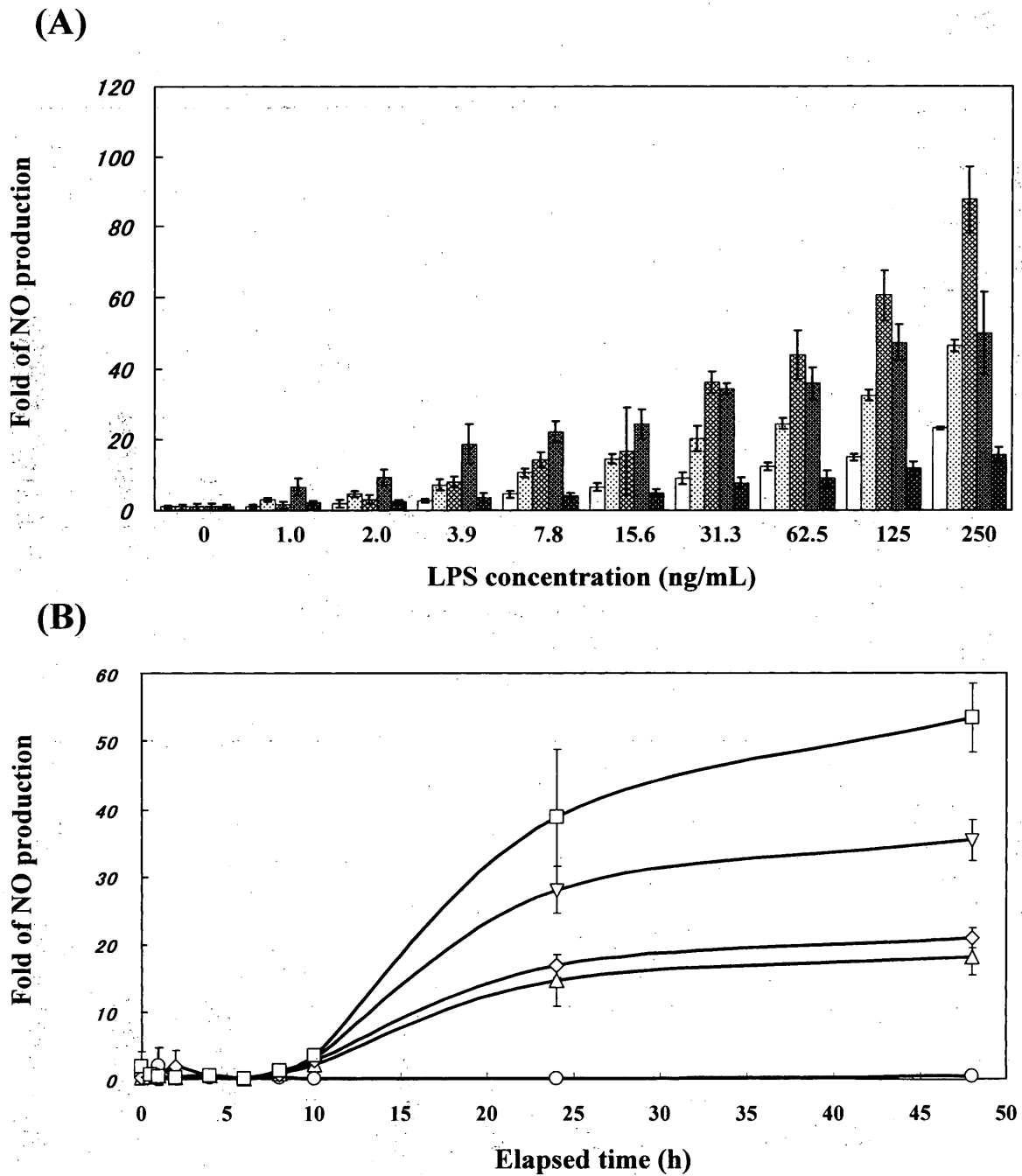


Fig. 1. LPS responsiveness in macrophages.

Murine peritoneal macrophages (3×10^5 cells/mL) were incubated with LPS. (A), Concentration dependence of LPS (0-250 ng/mL) on LPS-induced NO production with LPS from various strains in macrophages. □ : *E. coli* O26:B4. ▨ : *E. coli* O55:B5. ▩ : *E. coli* O111:B4. ▤ : *S. typhimurium*. ▥ : *K. pneumoniae*. (B), Time course of LPS (from *E. coli* O111:B4)-induced NO production. ○ : 0 ng/mL. △ : 31.3 ng/mL. ◇ : 62.5 ng/mL. ▽ : 125 ng/mL. □ : 250 ng/mL. NO production in macrophages was determined by measuring the accumulation of nitrites in culture medium. Values represent the fold increase compared with an unstimulated control and are the mean \pm standard deviations from five wells in three separate experiments.

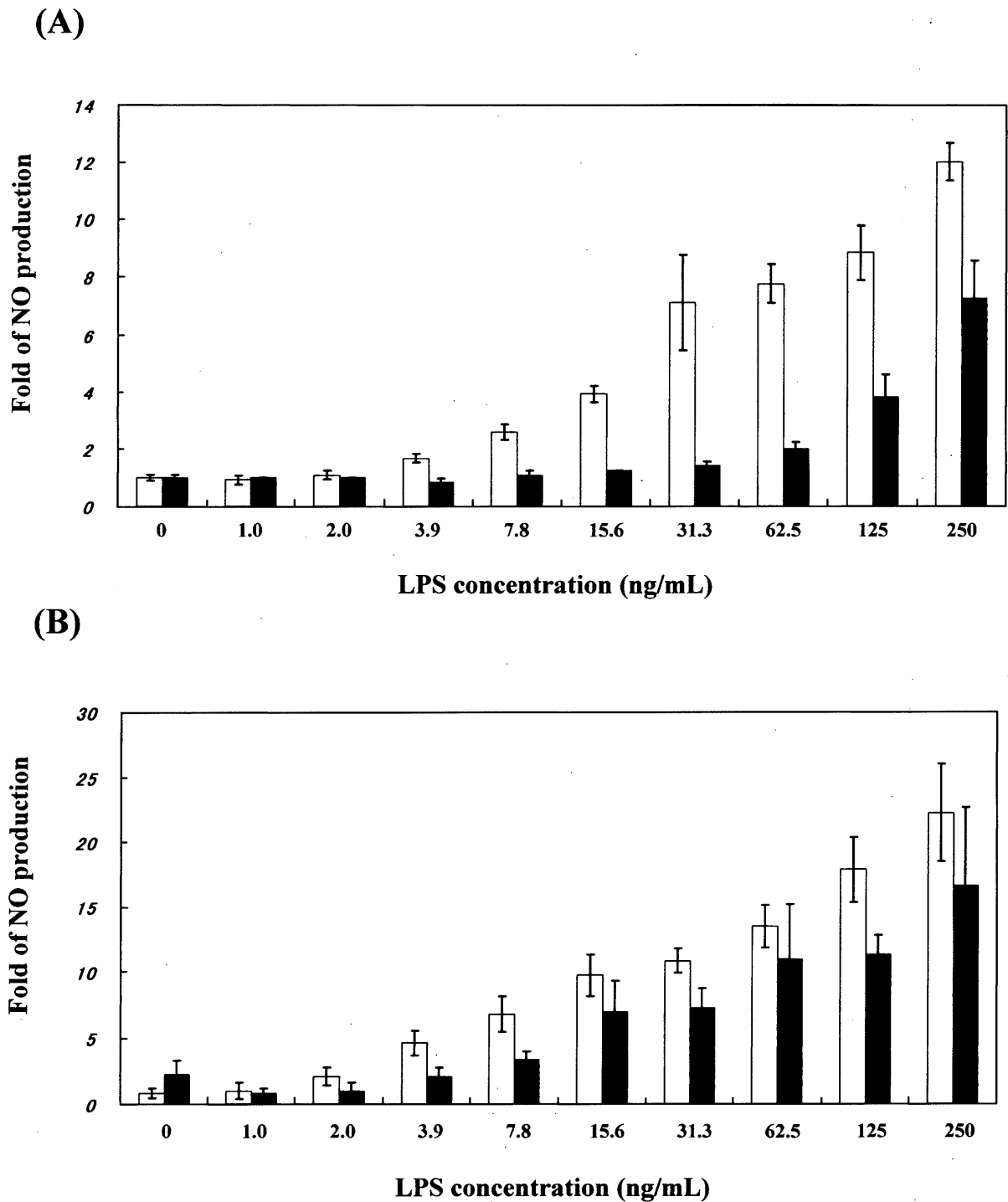


Fig. 2. Effect of P-21 on LPS induced NO production in macrophages. Murine peritoneal macrophages (3×10^5 cells/mL) were cultured with LPS from *E. coli* O111:B4(A) and *K. pneumoniae*(B) (varying concentrations) in the absence or presence of P-21 for 18 h. NO production in macrophages was determined by measuring the accumulation of nitrites in culture medium. □ : P-21(-). ■ : P-21(+). Values represent the fold increase compared with an unstimulated control and are the mean \pm standard deviations from five wells in three separate experiments.

$\mu\text{g/mL}$) をあらかじめ 37°C , 1h 反応させた反応混合液を含む培地で 18 h 培養後 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride, 2.5% H_3PO_4) を用いた分光学的手法により培地中の NO_2^- を測定することで, NO 産生を評価した. すなわち, 培養上清 $50\ \mu\text{L}$ を別の micro plate へ移し Griess reagent を等量添加し, 10 min 放置後, $540\ \text{nm}$ における吸光度を測定した.

7. 統計処理

有意差検定は Student's *t*-test により行った.

結果と考察

LPSはその由来菌株ごとに抗原性並びに反応性が異なっていることが知られていることから¹³⁾, はじめに各種グラム陰性菌由来LPSを用いM ϕ のNO産生に対する影響について検討した. その結果, Fig.1Aに示すように, 由来菌株の違いによりM ϕ に対して異なるNO産生誘導能が認められ, 本実験系においては*E. coli* O111:B4¹⁴⁾由来のLPSがもっとも強いNO産生誘導活性を示した. また, *E. coli* O111:B4由来のLPSを用い, M ϕ からのNO産生におよぼすLPS処理時間の影響について検討したところ, Fig.1Bに示すように, 各処理濃度で, 処理時間依存的にNO産生誘導が認められた. また, 同時にWST-8 assayを行うことで, このLPSによるNO産生量の増加がM ϕ 生細胞数の変化に起因していないことを確認した. これらの結果から以後の実験には*E. coli* O111:B4由来のLPSを用い, LPSが誘導するM ϕ からのNO産生におよぼすP-21ペプチドの効果を検討した.

LPSまたはLPSとP-21ペプチドの反応混合液を含む培地でM ϕ を18h培養後, 培地上清中のNOを測定した. その結果, Fig.2Aに示すようにLPS濃度62.5 ng/mLまではP-21ペプチドがLPS未処理時とほぼ同程度までNO産生を抑制し, より高濃度のLPS処理時においても, 約50%の抑制効果が認められた. 一般的に, LPSはLPS結合タンパク質によってCD14に効率的に転送

され, CD14とLPSの複合体が細胞膜に存在するToll-like receptor-4(TLR4)/MD-2によって認識され活性化シグナルが受容, 伝達されると考えられていることから,¹⁵⁾ P-21ペプチドのLPS刺激によるM ϕ からのNO産生増加抑制作用メカニズムとしてP-21ペプチドとLPSとの複合体形成によるLPSとLPS関連受容体との結合阻害, もしくはP-21ペプチドとLPS関連受容体との直接的相互作用が考えられた. 当然のことながらP-21ペプチドのNO産生抑制作用メカニズムが, LPS関連受容体との直接相互作用ならば, LPSの由来菌種あるいは菌株の違いに無関係に抑制することが予想される. しかしながら, *E. coli* O111:B4由来LPS (Fig.2A), *K. pneumoniae*由来LPS (Fig.2B)に対するP-21ペプチドのNO産生抑制効果に差が観察された. したがって, P-21ペプチドによる主なNO産生抑制メカニズムは, P-21ペプチドとLPSとの複合体形成によるLPSとLPS関連受容体との結合阻害であると考えられる.

さらに, 院内感染起因菌の一つとして知られている菌種である*K. pneumoniae*由来のLPSを用い, M ϕ からのNO産生誘導に対するP-21ペプチドの効果について同様に検討した結果, Fig.2Bに示すように, *E. coli* O111:B4由来LPS刺激時のNO産生に対する抑制効果よりも作用が弱いものの, 有意な抑制が認められた. これらのことから, P-21ペプチドが各種グラム陰性菌由来LPSのM ϕ に対するNO産生誘導活性を抑制することが示唆された.

今後は, P-21ペプチドのM ϕ におけるLPS誘導NO産生抑制メカニズムのさらなる解明, 他菌種, 菌株由来LPSとP-21ペプチドとの反応性の有無, LPSの有する他の生物活性に対するP-21ペプチドの反応性など, 幅広い検討を行い, LPS生物活性に対するP-21ペプチドの有用性を検討していく予定である.

REFERENCES

- 1) Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148-150 (1994).

- 2) Kudo Y., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol.Pharm.Bull.*, **22**, 549-550 (1999).
- 3) Kudo Y., Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1568**, 183-188 (2001).
- 4) Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol.Pharm. Bull.*, **25**, 787-790 (2002).
- 5) Garrity R.G., Naito H.K., Richardson M., Schwartz C.J., *Am.J.Pathol.*, **95**, 775-785 (1979).
- 6) Ross R., *N.Engl.J.Med.*, **340**, 115-126 (1999).
- 7) Chakravortty D., Koide N., Kato Y., Sugiyama T., Mu M. M., Yoshida T., Yokochi T., *J.Endotoxin Res.*, **6**, 243-247 (2000).
- 8) Funk J.L., Feingold K.R., Moser A.H., *Atherosclerosis*, **98**, 67-82 (1993).
- 9) Seitz C.S., Kleindienst R., Xu Q., *Lab.Invest.*, **74**, 241-252 (1996).
- 10) Netea M.G., Demacker P.N., Kullberg B.J., *Immunology*, **95**, 932-938 (1999).
- 11) Liu J., Batkai S., Pacher P., Harvey-White J., Wagner J.A., Cravatt B.F., Gao B., Kunos G., *J.Biol.Chem.*, **278**, 45034-45039 (2003).
- 12) Cohn Z.A., Benson B., *J.Exp.Med.*, **121**, 153-170 (1965).
- 13) Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J., *J.Biol.Chem.*, **264**, 10867-10871 (1989).
- 14) Morrison D.C., Leive L., *J.Biol.Chem.*, **250**, 2911-2919 (1975).
- 15) Da Silva C.J., Soldau U.K., Christen P., Tobias S., Ulevitch J.R., *J.Biol.Chem.*, **276**, 21129-21135 (1975).