

大豆由来リン脂質ならびに糖たん白質糖鎖による
神経変性疾患予防効果

長井 薫*

山梨大学大学院医学工学総合研究部

**Protective Effects of Soybean Phospholipids and N-glycans from Soybean Lectin
on Endoplasmic Reticulum Induced Neuronal Cell Death**

Kaoru NAGAI

Department of Epigenetic Medicine, Interdisciplinary graduate school of Medicine and
Engineering, University of Yamanashi, Chuo 409-3898

ABSTRACT

In many neurodegenerative diseases, neuronal cell death is caused by endoplasmic reticulum (ER) stress. ER stress is mainly induced by the accumulation of unfolded or misfolded proteins. In this study, we examined whether soybean phospholipids reduce ER stress induced neuronal cell death, and high-mannose type N-glycan from soybean lectin inhibits the amyloidogenesis of amyloid- β peptide which causes Alzheimer disease. First, we analyzed the effect of total phospholipids extracted from soybean on tunicamycin induced ER stress dependent mouse neuroblastoma Neuro2a cell death. More than 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the phospholipids significantly reduced tunicamycin induced Neuro2a cell death. We then analyzed structure-function relationships of phospholipids on ER stress induced Neuro2a cell death. ER stress was induced by tunicamycin or thapsigargin, and the cell viability was evaluated by MTT assay. Dilinoleoylphosphatidylethanolamine (DLPE) and soybean phosphatidylserine (DLPS) significantly protected the Neuro2a cells from ER stress induced cell death, while dilinoleoylphosphatidylcholine (DLPC) did not. With regard to the acyl chains, DLPE and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) showed significant protective effects, while dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) did not. These data suggest that phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine with unsaturated acyl chains have protective effects on ER stress induced neuronal cell death. Next, we analyzed anti-amyloidogenesis effect of N-glycan from soybean lectin. The $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide from soybean lectin inhibited amyloidogenesis of amyloid- β 1-42 peptide dose dependently. Smaller oligosaccharide

* 〒409-3898 中央市下河東1110

mannopentaose inhibited the amyloidogenesis, while mannotriose and mannose did not. These data indicates that sugar chains from soybean glycoproteins reduce the amyloidogenesis. Our data suggest that consumption of phospholipids or sugar chains from soybean may reduce the risk of neurodegenerative diseases. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 147-152, 2008.

Key words : Neurodegenerative disease, ER stress, phospholipid, mannose oligosaccharides, amyloidogenesis

認知症や運動失調を呈する神経変性疾患は、その疾患としての特徴から、日常生活での疾患の予防も重要であり、食品からの有効成分の摂取も有効な方策であると考えられている。これに関わる大豆成分の効果として、近年、大豆リン脂質をホスファチジルセリンに変換したものが、脳の老化による認知機能の低下を防ぐ作用があることが報告された¹⁾。しかし、その脳機能改善効果の作用分子メカニズムに関しては明らかにされていない。従って、本研究では、神経変性疾患の原因である神経細胞死に注目し、大豆リン脂質による神経細胞死抑制効果の有無と、その保護効果に必要なリン脂質の構造について解析を行った。

アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経変性疾患では、小胞体ストレスという共通の機構で神経細胞死が誘導される²⁾。小胞体ストレスは、異常な立体構造のたん白質が凝集し、細胞内の小胞体機能に障害をきたすことにより誘導される。このことから、一般的に小胞体内糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシン (TM) や小胞体内カルシウム枯渇作用のあるタブシガルギン (TG) 処理が小胞体ストレス誘導細胞障害モデルとして用いられる。本研究では、TM, TG 処理を行った神経芽細胞腫Neuro2a細胞を用い、リン脂質の神経細胞死抑制効果の解析を行った。

神経変性疾患における小胞体ストレス誘導の主な原因は、アルツハイマー病におけるアミロイド化したアミロイド- β ペプチドの様なたん白質の凝集・沈着であると考えられている³⁾。従って、アミロイド化の抑制が神経細胞死を防ぐことにつながる。大豆レクチン由来の高マンノース型糖鎖が、たん白質の正しいフォールディングを誘導することがこれまでに報告されている⁴⁾。しかし、このような糖鎖が、アミロイド化を含む異常な立体構造の形成を防ぐという報告はない。従って、アルツハイマー病の原因となるアミロイド- β 1-42ペプチドのアミロイド化をこのような糖鎖が抑制し得るか否かについて検討を行った。

本研究では、細胞死抑制とアミロイド沈着に着目し、大豆成分による神経変性疾患予防の可能性について検

討を行った。

方 法

小胞体ストレス誘導細胞死抑制効果の解析

Neuro2a細胞に、TMまたはTGを添加することで小胞体ストレスによる細胞死誘導を行った。そこにリン脂質を添加することで、細胞死抑制効果の判定を行った。細胞生存率の判定は、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を用い、570 nmの吸光度による比色定量法により行った。細胞死抑制効果の確認は、Calcein-AM/Propidium iodide (PI) を用いた生死細胞染色法により行った。

アポトーシス抑制効果については抗一本鎖DNA (ssDNA) 抗体を用いた細胞染色法と、カスパーゼ-3の活性測定により行った。カスパーゼ-3の活性測定は、細胞抽出液を合成基質であるAc-DEVD-MCAと反応

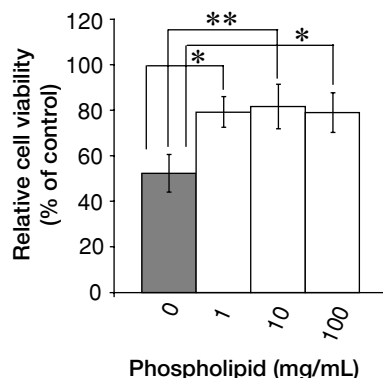


Fig. 1. Effect of soybean phospholipid on tunicamycin induced Neuro2a cell death. Neuro2a cells were treated with 1, 10, 100 μ g/mL of soybean phospholipid in the presence of tunicamycin. The cell viability was analyzed by MTT assay. The values are represented as the mean \pm SD of the relative percentage of surviving cells. * p <0.05, ** p <0.01.

後、励起波長380 nm、蛍光波長460 nmの蛍光測定により活性定量を行った。

糖鎖によるアミロイド-βペプチドのアミロイド化抑制解析

アミロイド-β 1-42ペプチド溶液中にマンノースオリゴ糖を添加しアミロイド化反応後、チオフラビンTを添加し、励起波長445 nm、蛍光波長490 nmの蛍光測定によりアミロイド化の定量を行った。

結 果

リン脂質による小胞体ストレス誘導神経細胞死予防効果

大豆由来リン脂質の、TM誘導Neuro2a細胞死に対する効果を解析したところ、1, 10, 100 μg/mLの濃度において細胞保護効果が観察された (Fig. 1)。このことから、細胞保護効果を有するリン脂質構造の解析を行った。まず、リン酸エステル部分に関して解析を行った。10, 100 μMジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン (DLPE) と10, 100 μg/mLの大豆由来ホスファチジルセリン (DLPS) に関しては、TM、

TGによる小胞体ストレス誘導細胞死に対し有意な細胞保護効果が観察されたのに対し (Fig. 2A, B)、ジリノレオイルホスファチジルコリン (DLPC) には細胞保護効果は認められなかった (Fig. 2C)。次に、脂肪酸エステル部分について検討を行った。不飽和結合が1か所であるオレイン酸を有するジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) は100 μMで有意な細胞保護効果を示したが、10 μMでは保護効果がなかった (Fig. 2D)。飽和脂肪酸を有するジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) には細胞保護効果は認められず、むしろ細胞死を誘導するという結果となった (Fig. 2E)。これらの結果から、細胞保護効果は不飽和度の数に依存することが分かった。

保護効果の確認されたリン脂質DLPEに関し、実際にアポトーシスに伴う反応を抑制しているのか解析を行った。まず、Caicein-AM/PIを用いた生死細胞染色法により死細胞数の減少効果の確認を行ったところ、TM、TG処理によりPI染色により赤い蛍光を発する死細胞数の増加が確認されるが、DLPEによりPIで染色

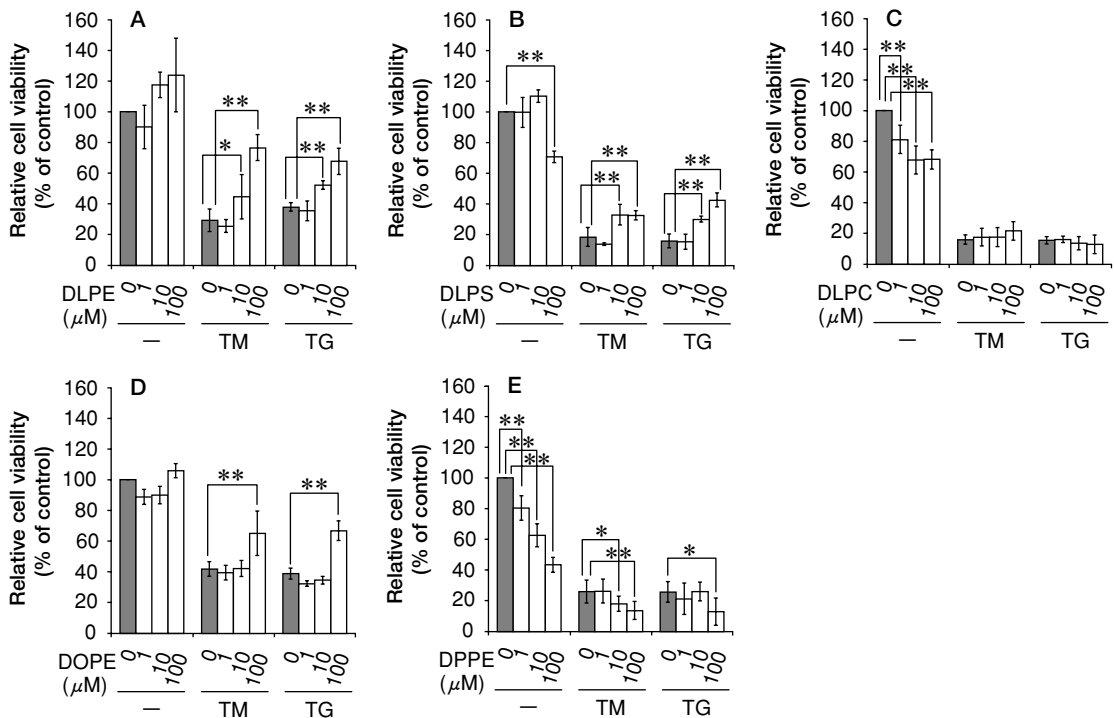


Fig. 2. Effects of phospholipids on ER stress induced Neuro2a cell death. Neuro2a cells were treated with DLPE (A), DLPS (B), DLPC (C), DOPE (D), or DPPE (E) in the presence or absence of tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG). The cell viability was analyzed by MTT assay. The values are represented as the mean ± SD of the relative percentage of surviving cells. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

される死細胞数の有意な減少が認められた (Fig. 3).

次に、アポトーシスに伴う核DNAの切断へのDLPEの作用について、抗ssDNA抗体による細胞染色により確認を行ったところ、DLPEがTM、TGによるDNA断片化を有意に減少させることが分かった (Fig. 4). さらに、カスパーゼ-3の活性化に対するDLPEの作用について検討を行ったところ、TM、TG処理によるカス

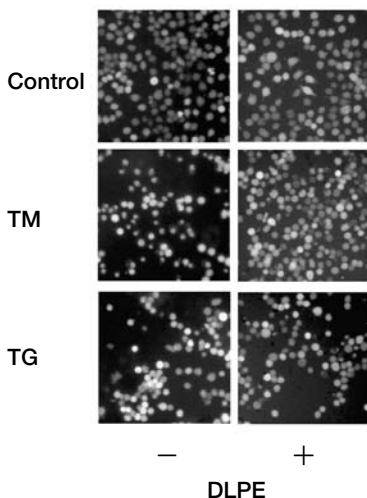


Fig. 3. Effect of DLPE on ER stress induced cell death. Neuro2a cells were incubated with 100 μ M of DLPE in the presence or absence of tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG). The cells were then stained with Calcein-AM/PI for live/dead analysis. The live cells were stained with Calcein (dark), and the dead cells were stained with PI (bright).

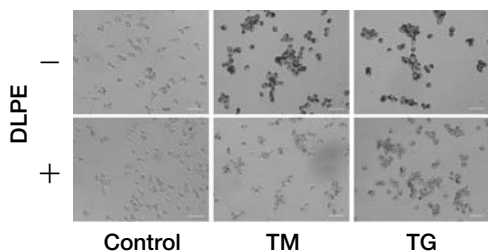


Fig. 4. Effect of DLPE on DNA degradation induced by ER stress in Neuro2a cells. Neuro2a cells were incubated with 100 μ M of DLPE in the presence or absence of tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG). The cells were then stained with anti-ssDNA antibody.

パーゼ-3の活性化をDLPEが有意に抑制した (Fig. 5).
大豆レクチン由来糖鎖のアミロイド- β 1-42のアミロイド化に対する作用

アミロイド- β 1-42ペプチドのアミロイド化に対する大豆レクチン由来糖鎖Man₉GlcNAc₂の効果について解析を行ったところ、1, 10, 100 μ Mにおいて濃度依存的に、有意にアミロイド化を抑制した (Fig. 6A). オリゴ糖のサイズとアミロイド化の関連について解析したところ、N-結合型糖鎖に見られるマンノペンタオースには同様のアミロイド化抑制効果が認められたが、マンノトリオースやマンノース単糖には作用は認められなかった (Fig. 6B).

考 察

本研究では、小胞体ストレスが原因となる神経細胞死に注目し、大豆リン脂質の神経細胞死抑制効果、ならびに大豆レクチン糖鎖のアミロイド化抑制効果に関する解析を行った。

リン脂質の構造と機能に関する解析から、リン酸エステル部分はエタノールアミンとセリン、脂肪酸は不飽和脂肪酸であることが保護効果に必要なことが分かった。エタノールアミンとセリンに活性があり、コリンに活性が無かったことからアミノ基の存在が重

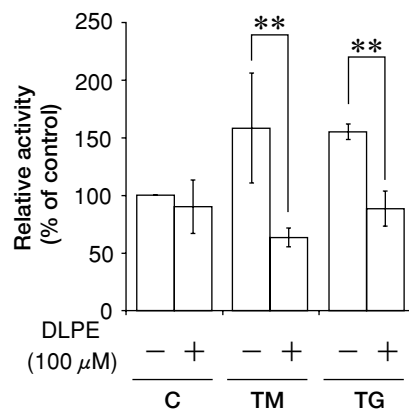


Fig. 5. Effect of DLPE on caspase-3 activation induced by ER stress in Neuro2a cells. Neuro2a cells were incubated with 100 μ M of DLPE in the presence or absence of tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG). The cell lysates were incubated with synthetic substrate Ac-DEVD-MCA, and the activity was evaluated by fluorescent intensity. The values are represented as the mean \pm SD of the relative percentage of caspase-3 activity. ** $p < 0.01$.

要であることが示唆される。これまで、脳機能の改善効果に関しては、そのほとんどがセリンに関するものであるが、本研究の結果からエタノールアミンにも同等以上の効果が期待される。

アミロイド化に対する糖鎖の抑制効果に関しては、以前報告のある正しいフォールディングの促進効果だけでなく、アミロイド化のような異常な立体構造形成を抑制する効果があることが明らかとなった (Fig. 6)。本研究では、大豆レクチンの糖鎖を用いて解析を行っ

たが、植物由来の糖たん白質糖鎖は動物と比較して、非還元末端にマンノース残基を有する割合が高いため⁵⁾、また、マンノペンタオースにも同様の活性が認められたことから、多くの糖たん白質糖鎖に同様の活性が期待できる。

本研究の結果から、大豆由来リン脂質ならびに糖たん白質糖鎖が神経細胞死抑制効果を有することが明らかとなった。本成果により、大豆の摂取により認知症などの神経変性疾患を予防する効果が期待される。

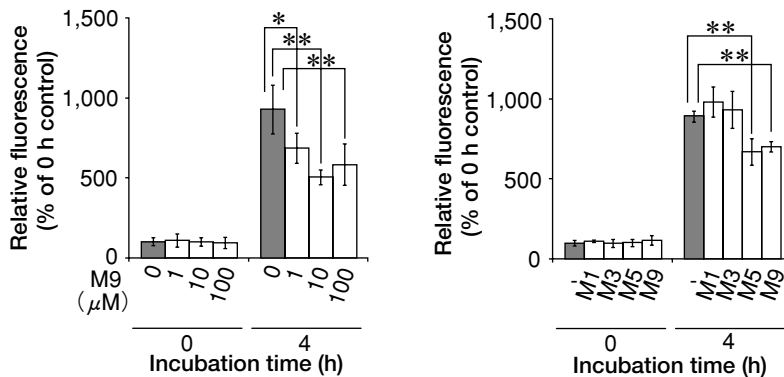


Fig. 6. Effects of mannose oligosaccharides on amyloidogenesis of amyloid- β 1-42. (A) Amyloid- β 1-42 peptide was incubated with 1, 10, or 100 μ M of Man₉GlcNAc₂ (M9) for 4h. (B) Amyloid- β 1-42 peptide was incubated with 10 μ M of mannose (M1), mannotriose (M3), mannopentaose (M5), or M9 for 4h. The amyloidogenesis were evaluated by thioflavin-T fluorescence. The values are represented as the mean \pm SD of the relative percentage of thioflavin-T fluorescence. * p <0.05, ** p <0.01.

要 約

認知症などの神経変性疾患は、その特性から食品からの有効成分の摂取など日常生活における予防も重要である。神経細胞死は、異常たん白質の蓄積による小胞体ストレスが原因である。従って、アミロイド化など異常たん白質の沈着阻害、および小胞体ストレスによる細胞死の抑制が神経変性の予防に有効である。本研究では、大豆リン脂質の小胞体ストレス誘導細胞死抑制効果と、大豆たん白質由来糖鎖によるアミロイド化抑制効果について検討を行った。まず、リン脂質構造と細胞死抑制効果について検討を行った。神経系培養細胞に対する小胞体ストレスに対し、リン酸エステル部分はエタノールアミンとセリンに、脂肪酸エステル部分に関しては不飽和度に依存した保護効果が認められた。次に、アミロイド沈着予防効果に関して解析を行ったところ、大豆レクチンの糖鎖がアルツハイマー病の病因となるアミロイド化を有意に抑制した。今回の結果から、大豆の摂取により認知症などの神経変性疾患のリスクを低減する効果があることが示唆された。

文 献

- 1) Kataoka-Kato A, Ukai M, Sakai M, Kudo S and Kameyama T (2005): Enhanced learning of normal adult rodents by repeated oral administration of soybean transphosphatidylated phosphatidylserine. *J Pharmacol Sci*, **98**, 307-314.
- 2) Yoshida H (2007): ER stress and diseases. *FEBS J*, **274**, 630-658.
- 3) Ghribi O (2006): The role of the endoplasmic reticulum in the accumulation of β -amyloid peptide in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med*, **6**, 119-133.
- 4) Jitsuhara Y, Toyoda T, Itai T and Yamaguchi H (2002): Chaperone-like function of high-mannose type and complex type N-glycans and their molecular basis. *J Biochem*, **132**, 803-811.
- 5) Ueda H and Ogawa H (1999): Glycobiology of the plant glycoprotein epitope: structure, immunogenicity and allergenicity of plant glycotopes. *Trends Glycosci Glycotech*, **11**, 413-428.