

SWATH 質量分析法によるマンゴー葉抽出物の抗炎症作用の分子機構の解明の試み

吉元健人¹, 黒川萌音², 近江響², 川端里佳², 皆本裕貴², 岸田邦博^{1,3}, 松川哲也^{1,4}, 永井宏平^{1,2}

要旨

機能的食品成分は、標的分子を事前に予測することが困難であり、また複数の成分が異なる標的に作用する可能性があることから、機能的発揮の分子機構を完全に解明することは困難である。そのため、食品成分が細胞に与える影響を包括的にとらえる手法の開発が求められている。本研究では、まず、大腸菌由来リポ多糖 (LPS) で活性化したマクロファージ様 Raw264.7 細胞を用いて、マンゴー葉のメタノール抽出物 (MLE) の抗炎症作用の詳細を解析した。さらに、細胞内のタンパク質変動を SWATH 質量分析法で解析することで、MLE の抗炎症作用の分子機構を解明できるか試みた。1.0 ng/mL の LPS で活性化した Raw264.7 細胞に MLE を添加すると、培養上清中の NO と IL-6 濃度は MLE 0.56 µg/mL で、TNFα 濃度は 2.3 µg/mL で有意に減少し、18 µg/mL でいずれの物質も検出限界以下にまで低下した。同様に、iNOS の発現量は MLE 2.5 µg/mL で、TNFα, IL-6, IL-1β の発現量は 10 µg/mL で有意に減少し、40 µg/mL で、いずれの遺伝子の発現量も LPS 未処理のレベルにまで低下した。順相クロマトグラフィーで MLE を分画したところ、NO 産生抑制作用は濃縮されず、全ての画分に弱い作用が確認された。ここから、MLE 中の複数の成分が複数の受容体に作用することで、協奏的に強い抗炎症作用を呈すると考えられた。SWATH 質量分析法で得たタンパク質定量データを主成分判別分析 (PC-DA) にかけて、未処理の細胞 (LPS-群)、10 ng/mL の LPS で刺激した細胞 (LPS+群)、LPS に加えて、10 µg/mL の MLE で処理した細胞 (MLE 群) の 3 群に明確に分離され、それぞれ特徴的なタンパク質プロファイルを有していることが示された。その中でも、細胞の恒常性を保ち、炎症を収束へと導く Annexin A1 や Annexin A2 が MLE 群で増加していた。また、LPS-activated MAPK signaling 経路に関連する因子に注目すると、LPS+群に比べて、MLE 群では、抗炎症に関わる SQSTM1 が増加し、経路の中心因子である p38MAPK や、ERK1/2 が減少していた。これらの因子が MLE の抗炎症作用と関わっていると考えられた。

キーワード：SWATH 質量分析法、定量プロテオミクス、抗炎症作用、マンゴー

1. 緒論

メタボリックシンドロームは内臓脂肪蓄積による腹部肥満に、耐糖能異常や糖質異常症、高血圧などが集積した状態を示す疾患概念であり、該当者は生活習慣病である糖尿病や心血管疾患、動脈硬化などを罹患する確率が高いとされている⁽¹⁾。このメタボリックシンドロームの基盤病態として慢性炎症が報告されている⁽²⁾。

慢性炎症は肥満動物や肥満病例において、マクロファージが脂肪細胞と相互作用することで引き起こされる (図 1)。脂肪細胞の肥大化に伴う Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) の産生増加によって、脂肪細胞へマクロファージの浸潤が起こる。この浸潤したマクロファージ細胞膜表面の Toll-like receptor 4 (TLR4) に肥大化した脂肪細胞から分泌された飽和遊離脂肪酸が結合して活性化させ⁽³⁾、TNFα や IL-6 などの炎症性サイトカインの分泌を促進させる。この炎症性サイトカインが慢性炎症の要因である。TNFα には

受付日 2021 年 12 月 20 日、受理日 2022 年 2 月 16 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.16-II-1, 2018, No.18-III-12, 2019 の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学生物理工学部食品安全工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
4. 近畿大学生物理工学部生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

脂肪細胞に作用して脂肪分解を促進させ、遊離脂肪酸の分泌を増加させる作用があり、この遊離脂肪酸が TLR4 を介して再びマクロファージを活性化し、TNF α の分泌を促すという悪循環を形成し、炎症反応が増強していく。その結果、脂肪組織から溢れ出た飽和脂肪酸や炎症性サイトカインが全身臓器に波及、拡大して脂肪肝、動脈硬化、糖尿病などさまざまな病態が引き起こされる。以上のことから脂肪組織における慢性炎症を抑制することができれば生活習慣の予防につながる可能性がある。

マンゴー (*Mangifera indica*) は、ウルシ科マンゴー属の果樹であり、世界中で 1000 種類以上の品種が栽培されている。マンゴー果実の栽培には剪定が不可欠であるが、剪定された葉は有効な利用法が存在せず、そのまま廃棄されている。近年、このマンゴー剪定葉のメタノール抽出物 (Mango leaf extract, MLE) に、膵臓リパーゼ阻害効果⁽⁴⁾、終末糖化産物 (AGEs) の形成阻害作用^(5, 6)、抗酸化作用⁽⁷⁾などの健康促進作用が存在することが明らかになっている。近年、我々は TLR4 を刺激する大腸菌由来リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) によって活性化したマクロファージ様 Raw264.7 細胞を用いて、MLE に非常に強い抗炎症作用があることを予備的な実験により見出した。そこで、本研究において、MLE の抗炎症作用を詳細に解析し、その分子機構に関わる情報を取得することを目指した。

LPS によるマクロファージの活性化は、細胞表面の TLR4 が LPS を認識した後に、nuclear factor kappa B (NF- κ B) を中心とする因子群が活性化することで起こる。本実験系での抗炎症の作用機序を解析する際には、この NF- κ B 経路に関与する因子の増減やリン酸化などの翻訳後修飾の変化をウエスタンブロット法によって評価する機会が多い。しかし、LPS が TLR4 に結合することで活性化されるシグナル伝達系の全体像は非常に複雑であり、NF- κ B 経路以外にも活性化シグナルを伝えるサブ経路が複数存在するとされている⁽⁸⁾。特定の分子を標的として開発される医薬品と違い、食品機能性成分が標的とする分子を事前に予測することは非常に困難であることから、食品成分の抗炎症作用の全体像をウエスタンブロット法のみで理解することは非常に困難である。そこで、本研究では、細胞などに含まれるタンパク質を網羅的に定量可能な SWATH 質量分析法を用いた。

SWATH 質量分析法は、高性能の TripleTOF 型質量分析計を含む LC-MS システムを用いた網羅的なタンパク質量法である^(9, 10)。本方法を使用すると細胞や組織に存在する数百〜数万のタンパク質を同時に定量可能である。本研究では、SWATH 質量分析法を用いて、MLE によって引き起こされる、Raw264.7 細胞内のシグナル伝達関連タンパク質の増減を網羅的に検出、解析してとらえることで、MLE の抗炎症作用の分子機構を解明することが可能かどうかを検討する。

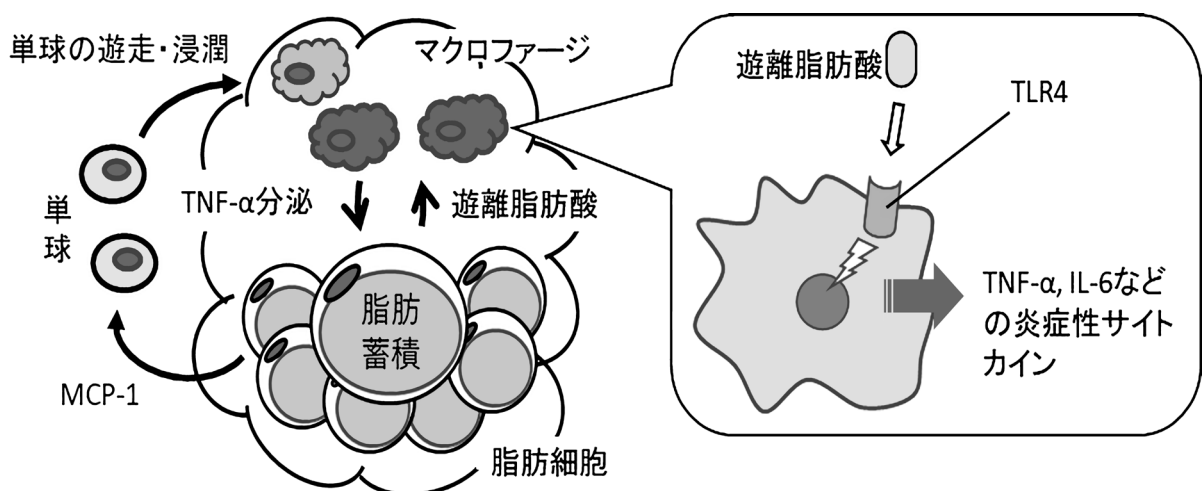


図 1. 肥満した脂肪組織における慢性炎症の模式図

2. 材料と方法

2.1 材料

マンゴー葉メタノール抽出物 (MLE), 及び, その粗分画面分 (Fr1–Fr5) は, 伊藤らにより, マンゴー (品種名アーウィン) の剪定葉から調製したものを使用した⁽⁴⁾. 近畿大学附属農場 (和歌山県湯浅町) において 2013 年 7 月と 2015 年 8 月に採取されたマンゴー剪定葉のうち, 濃い緑をした成熟葉を 50°C で 72 時間乾燥させた. 10 g の葉の粉末に対して 200 mL のメタノールを加え, 72 時間室温で抽出し, 得られた抽出液を減圧下で乾燥させて MLE を得た. MLE 5.44 g をシリカゲルクロマトグラフィー (Wakogel C-100, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪市, 125 g, 37 mm x 205 mm) にかき, それぞれ 1.2 L ずつの CHCl₃/MeOH (10 : 0 v/v), (30 : 1 v/v), (10 : 1 v/v), (5 : 1 v/v), (0 : 10 v/v) を用いて, ステップワイズに溶出し, 5 つのフラクションを減圧下で乾燥させ, 得られた粉末を Fr1–Fr5 とした.

Mouse leukemic monocyte cell line, Raw264.7 細胞 (RCB0535) は理研バイオリソースセンターより提供を受けた. Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5 は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) より, mangiferin は, 富士フィルム和光純薬株式会社 より, リアルタイム PCR 用のプライマーは北海道システム・サイエンス株式会社 (札幌市) より購入した.

2.2 細胞実験

Raw264.7 細胞は, 200 units/mL ペニシリン, 0.20 mg/mL ストレプトマイシン, 10% 非動化ウシ胎児血清を加えた DMEM 培地を用い, 37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した. 培養上清中の炎症性関連因子の測定による MLE の抗炎症作用の評価は, 96-well plate を用いて以下のように行った. 1.6×10^6 個/ml の密度になるように血清抜き培地で懸濁した Raw264.7 細胞を, 100 μ L ずつ各 well に加え, 24 時間培養した. 各ウェルに血清抜き培地を 80 μ L 加えた後, DMSO に溶解した被験物質 (MLE, mangiferin, もしくは, MLE 粗分画) を終濃度が 0–72 μ g/mL となるように 0.4 μ L 加えた. 最後に, 血清抜き培地に溶解した LPS を 20 μ L 加えて, LPS の終濃度を 1.0 ng/mL とし, 再び 24 時間培養した. 培養上清を回収し, NO 濃度を Griess 法⁽¹¹⁾ によって測定した. TNF α と IL-6 は eBioscience 社 (San Diego, CA, USA) の ELISA Kit を用いて測定した. 培養上清を除去した後の細胞は, 100 μ L の PBS で 2 回洗浄した後に, 血清抜き培地 100 μ L と MTS 試薬 (Promega, Madison, WI, USA) 20 μ L を加えて 1 時間培養した. 培養後の 490 nm の吸光度を測定することで Cell viability を評価した. リアルタイム PCR 解析のための mRNA の回収をする際には 12 well plate を用い, LPS 濃度 1.0 ng/mL, MLE 濃度 2.5–40 μ g/mL の条件で行った. LC-MS 解析のためのタンパク質の回収をする際には 60 mm のシャーレを用いて LPS 濃度 10 ng/mL, MLE 濃度 10 μ g/mL の条件で行った.

2.3 リアルタイム PCR

Raw264.7 細胞からの RNA の抽出は, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い, 得られた総 RNA から iScript RT supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて cDNA を合成した. mRNA 発現量の解析は, SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) を用い, MiniOpticon リアルタイム PCR システム (Bio-Rad 社) を使って実施した. PCR 反応は各サンプル triplicate で実施した. 解析した遺伝子, 使用したプライマーの配列, 予想される増幅配列の塩基数を表 1 に示した. mRNA 発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法を用い, EF1 α の発現量に対して標準化した.

2.4 LC-MS/MS 解析

60 mm シャーレ上の Raw264.7 細胞をセルスクレイパーを用いて回収し, 氷冷した PBS で 3 回洗浄した. シャーレ 5 枚分の細胞を 1 本のチューブに集め, 100 μ L の RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM EDTA,

150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% CHAPS, 0.1% SDS, cOmplete protease inhibitor cocktail (Roshe), DTT, phosphatase inhibitor cocktail III (Sigma-Aldrich)) を加えて溶解させ、抽出液を得た。等量の 30% TCA 溶液を加えて、氷上で 30 分間置いた。14,000 rpm×10 分、4°C で遠心して生じた沈殿を、500 μ L のアセトンで洗浄し、風乾させた。沈殿を 100 μ L の溶解液 (8M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS) で溶解した後に、Bradford protein assay (Bio-rad) を用いてタンパク質の濃度測定を行った。30 μ g のタンパク質を既報⁽¹⁰⁾ の通りに Sequence Grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA) によって消化し、Ziptip (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) で脱塩した。LC-MS/MS 測定は、Eksigent nanoLC system に接続した TripleTOF5600+ system (Sciex, Framingham, MA, USA) を用いて行った。Ion library 作成用の information dependent analysis (IDA) 測定は 3–5 μ g のタンパク質を使用し、既報⁽¹⁰⁾ の通りの条件で行った。定量用の SWATH 測定では、Q1 window 数を 50 個に設定し、各 window の m/z 範囲を、IDA 測定の結果を基に SWATH Variable Window Calculator (SCIEX) を用いて設定した。それ以外の条件は既報の通り⁽¹⁰⁾ に設定した。1 回の測定に 5 μ g のペプチド溶液を使用し、SWATH 測定は 1 つのサンプルについて 3 回行った。

表 1. リアルタイム PCR で使用したプライマー

Name	Sequences	Sizes (bp)
EF1 α	Forward: 5'-ACACGTAGATTCCGGCAAGT-3'	119
	Reverse: 5'-AGGAGCCCTTTCCCATCTC-3'	
iNOS	Forward: 5'-CCTGGTACGGGCATTGCT-3'	90
	Reverse: 5'-GCTCATGCGGCCTCCTT-3'	
TNF α	Forward: 5'-GGGTGATCGGTCCCCAAAGG-3'	95
	Reverse: 5'-TTGAGAAGATGATGAGTGTGAGG-3'	
IL-6	Forward: 5'-AAGAAATGATGGATGCTACCAAAGT-3'	79
	Reverse: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGGAAATT-3'	
IL-1 β	Forward: 5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3'	89
	Reverse: 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'	

2.5 定量解析

IDA 測定によって得られた MS/MS スペクトルのデータを、Protein Pilot software ver 4.5 (Sciex) を用いてデータベース検索にかけた。検索対象のデータベースは UniProt (<http://www.uniprot.org/>) の *Mus Musculus* のデータを用いた。信頼度 95%以上で同定されたペプチドを有意とみなした。また、False discovery rate (FDR) を計算し、FDR 1%以下で同定されたタンパク質を有意とみなした。得られたタンパク質同定データを基に SWATH 測定に用いる Ion library を作成した。SWATH 質量分析法で得られたデータの分析は、Peak view software ver 2.1 (Sciex) を用いて行った。Ion library に登録された溶出時間と m/z 値に基づいた各ピークの帰属、ピークの定量、および定量結果の False discovery rate (FDR) と欠損値の存在割合を示す Gap 値の計算はソフトウェアによって自動的に行われた。1 つのタンパク質に帰属されたペプチドの中から、Gap 値 (%) が 0 であり、フラグメントイオンのピークの形状が整い、ノイズピークの少ないものを最大で 5 個選択した。同一ペプチドに由来するフラグメントイオンの面積値を、全て合計してペプチドの定量値とした。さらに、1 つのタンパク質に複数のペプチドが選択されている場合には、これらのペプチドの定量値を全て合計し、タンパク質の定量値とした。ESI のスプレーの状態などを補正することを目的に、常法に従い、全タンパク質の定量値の合計に対する相対値を計算することで標準化を行った。

2.6 定量データの解析

Peak view で算出した各タンパク質の定量値をエクスポートし、Marker view software (SCIEX) を用いて、教師ありの多変量解析である principal component discrimination analysis (PC-DA) を行った。データの標準化方法として pareto 法を用いた。シグナル伝達系に関連する因子の発現を調べるために、Ingenuity pathway analysis (IPA, Qiagen) を用いて解析を行った。2.5 で取得した SWATH 定量分析の結果から、定量されたタンパク質の uniprot ID、群間の定量比率、t 検定の p 値を抜き出し、IPA ソフトウェアに読み込ませた。t 検定の p 値が 0.05 以下のタンパク質を IPA の expression analysis に使用した。IPA に最初から用意されている Canonical pathway の一つである LPS-activated MAPK signaling pathway を中心に解析を進めた。IPA の機能である Grow ツールを用いて、経路に含まれる因子に直接関係する因子を表示させ、SWATH の定量結果を Overlay することで、MLE の添加によって増減するタンパク質を探索した。

3. 結果

3.1 サイトカイン遺伝子発現変化による細胞実験の条件検討

細胞実験の条件を検討するために、Raw264.7 細胞に 0–100 ng/ml の LPS 処理を行い、6 h、12 h、24 h 後に mRNA を回収し、TNF α と IL-6 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定した (図 2)。

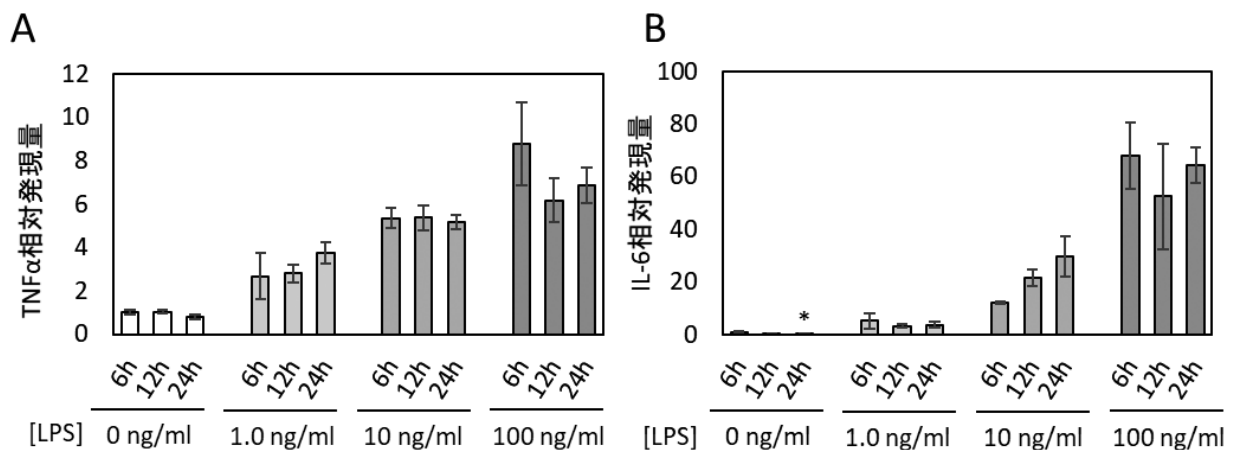


図 2. Raw264.7 細胞における炎症性サイトカイン遺伝子発現量の LPS 濃度、および反応時間依存性。Raw264.7 細胞を 0–100 ng/mL の LPS で処理し、6 h、12 h、24 h 後に細胞から mRNA を回収し、TNF α (A)、および IL-6 (B) 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR によって、各サンプル triplicate で測定した。遺伝子発現量は、LPS 未処理 6 時間後の遺伝子発現を 1 とした相対値で表し、平均値±標準誤差で示した。* $P < 0.01$ to 6 h by ANOVA-Tukey.

LPS 濃度 1.0 ng/ml の処理では、6 h から発現が見られ、LPS 未処理に比べ、TNF α で 2–4 倍、IL-6 の方では約 3–5 倍発現量が増加していた。また、TNF α 、IL-6 のどちらも 24 h での発現量の減少は見られなかった。LPS 濃度 10 ng/ml 処理では、1 ng/mL の時よりもさらに発現量が増加したが、TNF α の発現量は時間によって変化せず、IL-6 の発現量は時間が経つにつれて増加する傾向が見られた。LPS 濃度 100 ng/ml 処理では発現量は更に増加し、TNF α 、IL-6 のどちらも 6 h から 12 h 間で発現量が少し減少し、24 h で 12 h より少し増加する傾向が見られた。本研究は慢性炎症という弱い炎症反応に対する抑制効果を評価することが目的であるため、本結果より、以降の実験は、LPS 濃度を 1.0 もしくは 10 ng/mL とし、反応時間を TNF α 、IL-6 の発現が維持されている 24 h とした。

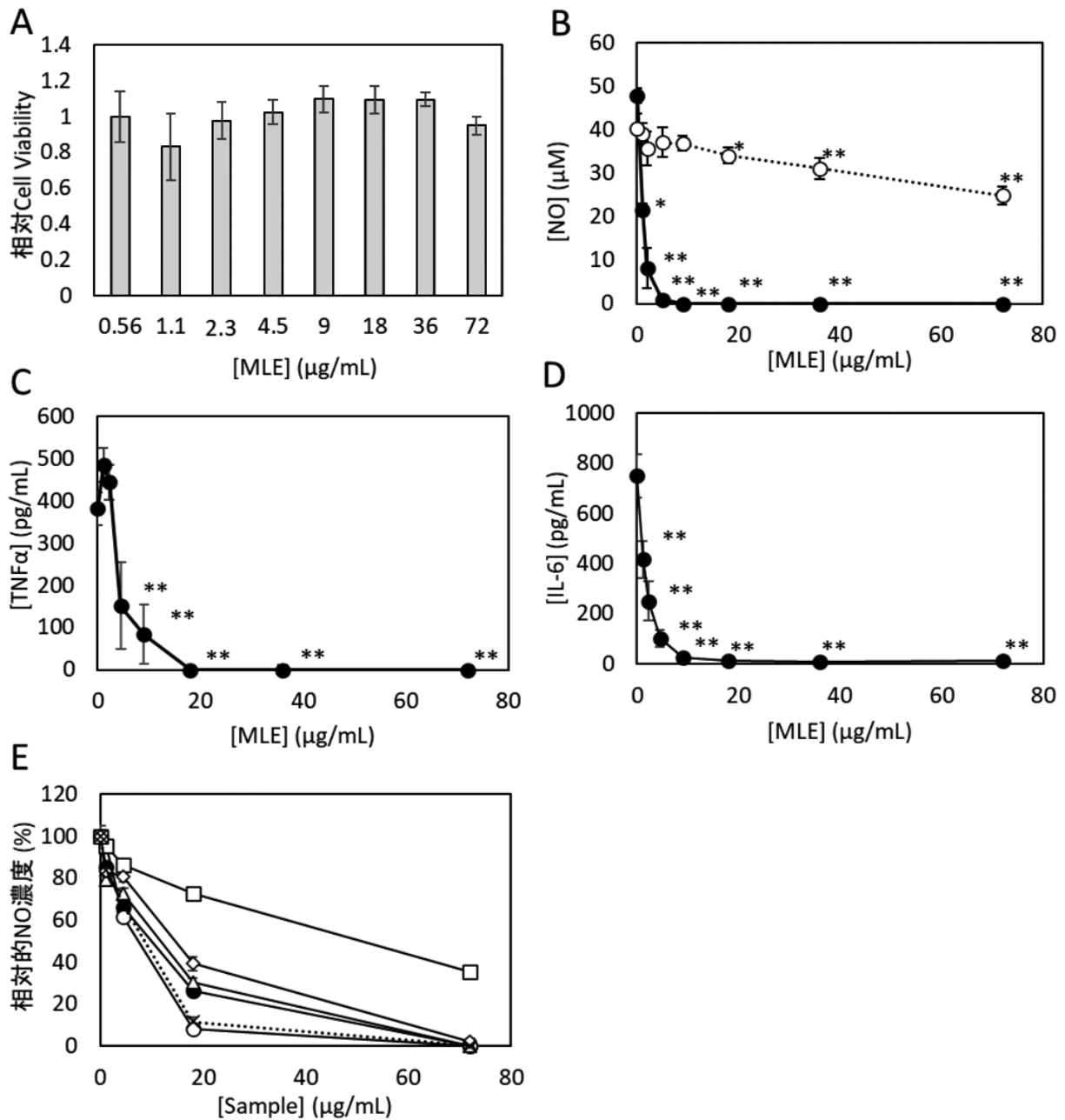


図3. 培養上清の炎症関連因子の定量による MLE の抗炎症作用の評価. Raw264.7 細胞を 1.0 ng/mL の LPS, および, 0–72 µg/mL の MLE, mangiferin, MLE 画分で処理し, 24 時間後の培養上清を測定に用いた. A: Cell viability. [MLE] = 0 µg/mL での値を 1 とした時の相対値で示した. B: NO 濃度. ●は MLE, ○は mangiferin の結果を示す. C: TNFα 濃度. D: IL-6 濃度. E: MLE 画分が NO 濃度に与える影響. ●, F1; ○, F2; △, F3; □, F4; ◇, F5; ×, MLE. 全ての実験は triplicate で行い, 値は平均値±標準誤差で示した. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ to [sample] = 0 µg/mL by t-test.

3.2 MLE の抗炎症作用の解析

Raw264.7 細胞を 1.0 ng/ml の LPS, および, 0–72 µg/ml の MLE, MLE の主成分である mangiferin, または, MLE の画分で処理し, 24 時間後の Cell viability, 培養上清の NO, TNFα, IL-6 濃度を測定した (図 3). 0–72 µg/ml のどの MLE 濃度でも Cell viability に変化はなかった (図 3A). NO 濃度は, 0.56 µg/mL の MLE の添加

で有意に減少し, 2.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で NO 濃度が検出限界以下にまで減少した. それに対し, mangiferin では 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度でしか有意な減少を示さず, 測定した範囲内で NO 濃度を検出限界以下にまで抑制することはなかった (図 3B). また, TNF α 濃度は, 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MLE で有意に減少し, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の MLE 濃度で検出限界付近にまで減少した (図 3C). IL6 濃度は, 0.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MLE から有意に減少し, 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の MLE で検出限界付近まで減少した (図 3D). LPS 刺激 Raw264.7 細胞に MLE の画分をそれぞれ投与すると, NO 濃度は, すべての画分で減少する傾向を見せたが, 分画前の MLE を大きく超える効果を持つ画分は見られなかった (図 3E).

次に LPS 刺激 Raw264.7 細胞に対する MLE の抗炎症作用をさらに評価するために, 炎症関連因子のリアルタイム PCR を行った. Raw264.7 細胞を 1.0 ng/ml の LPS, および 0, 2.5, 10, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MLE で処理し, 24 時間後の iNOS, TNF α , IL-6, IL-1 β の発現量を測定した. iNOS の発現量は, MLE 濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から有意に減少した. MLE 濃度が増えるにつれて, 発現量は更に減少し, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で LPS 未処理と同程度まで減少した (図 4A). TNF α の発現量は MLE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意に減少し, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で LPS 未処理と同程度まで減少した (図 4B). IL-6 と IL-1 β の発現量は 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MLE 処理で MLE 未添加よりも有意に増加したものの, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では減少に転じ, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で LPS 未処理と同程度まで減少した (図 4C, D).

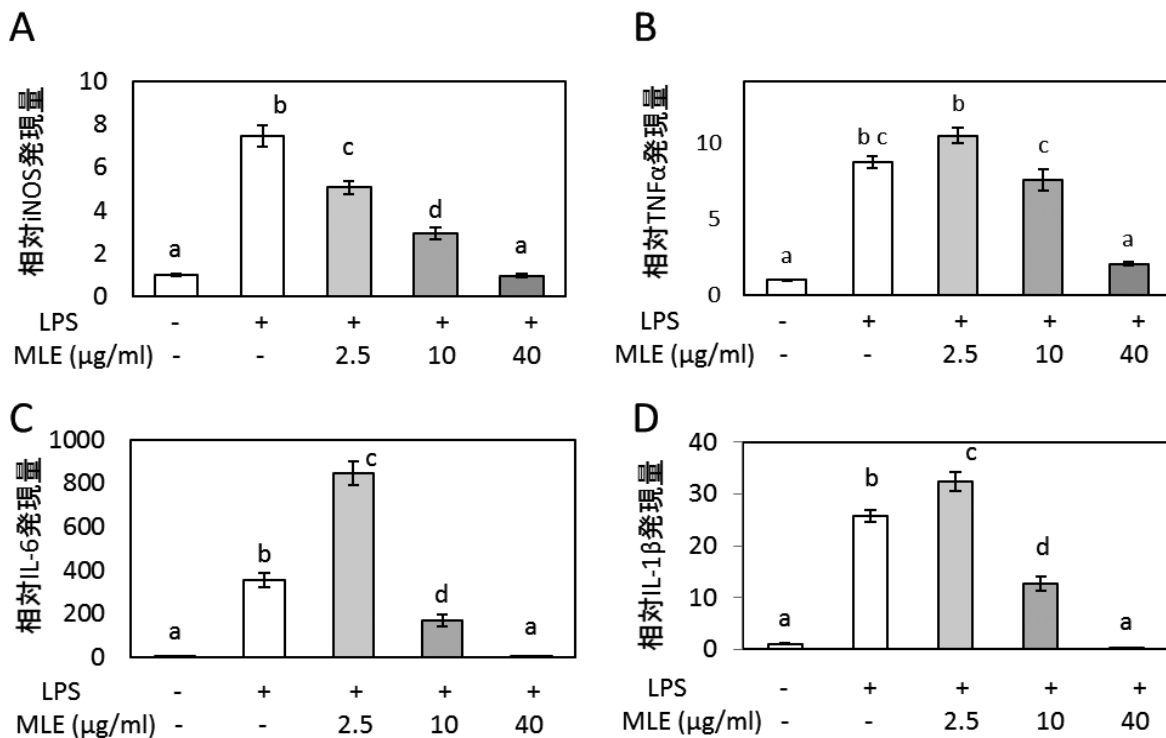


図 4. 炎症性関連因子の発現量に基づく MLE の抗炎症作用の評価. Raw264.7 細胞を 1.0 ng/mL の LPS, および 0, 2.5, 10, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MLE で処理し, 24 時間後の iNOS (A), TNF α (B), IL-6 (C), IL-1 β (D) の発現量を測定した. 測定は各サンプル triplicate で行った. 発現量は LPS 未処理の細胞におけるそれぞれの遺伝子発現を 1 とした時の相対値とし, 平均値 \pm 標準誤差で示した. 異なるアルファベット間で有意な差が見られた ($P < 0.01$ by ANOVA-Tukey).

3.3 Ion library の作成と SWATH 法によるタンパク質の定量

10 ng/mL の LPS で活性化した Raw264.7 細胞 (LPS+), 活性化していない Raw264.7 細胞 (LPS-), LPS による活性化を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MLE によって防いだ Raw264.7 細胞 (MLE) の 3 種類の細胞から抽出してきたタンパク質をそれぞれ SWATH 質量分析法で分析し, 含まれるタンパク質の網羅的な定量を試みた. 本実験で

使用した Raw264.7 細胞は、事前に行った NO 産生量の LPS 濃度依存性の解析で、LPS に対する反応性が、若干低下しており、LPS 濃度 1 ng/mL の条件では、十分な活性化が見られなかった (Data not shown). そこで、LPS 濃度を 10 ng/mL にあげその他の条件は変えずに実験を行った. なお、本実験においても MLE の抗炎症作用が示されることを、24 時間後の培地の NO 濃度を指標に確認している (Data not shown).

SWATH 質量分析法を行う前に、各群 3、もしくは 5 μg のタンパク質を IDA 法で分析し、データベース検索によって、Ion Library の作成を行った. 次に各群 5 μg のタンパク質を用いた SWATH 測定により Fragment ion の網羅的定量データを取得し、ion library と照らし合わせることで、Raw264.7 細胞内の網羅的タンパク質の定量をおこなった. 全部で 769 個のタンパク質が同定され、そのうち 368 個が定量可能だった. さらに、定量データを LPS+群と LPS-群間、および MLE 群と LPS+群間で比較した. t 検定の結果、発現量に有意差が見られたタンパク質数は、LPS+/LPS-間で 289 個、MLE/LPS+間で 306 個であった. このうち、マクロファージの炎症反応に関わる 3 つの因子、ERK1, RALA, ACOD1 を例に挙げ、3 群間で定量値を比較した結果を図 5 に示した. 標準化前の定量値 (図 5A) と比べて、全タンパク質の定量値の合計で割ることで標準化した値 (図 5B) を見ると、3 群間の大小関係は変わらないまま、標準偏差が減少する傾向が見られた. ここから、標準化によって、ESI のスプレー状態など、測定機器の状態に基づく測定誤差が補正されていることが示唆された.

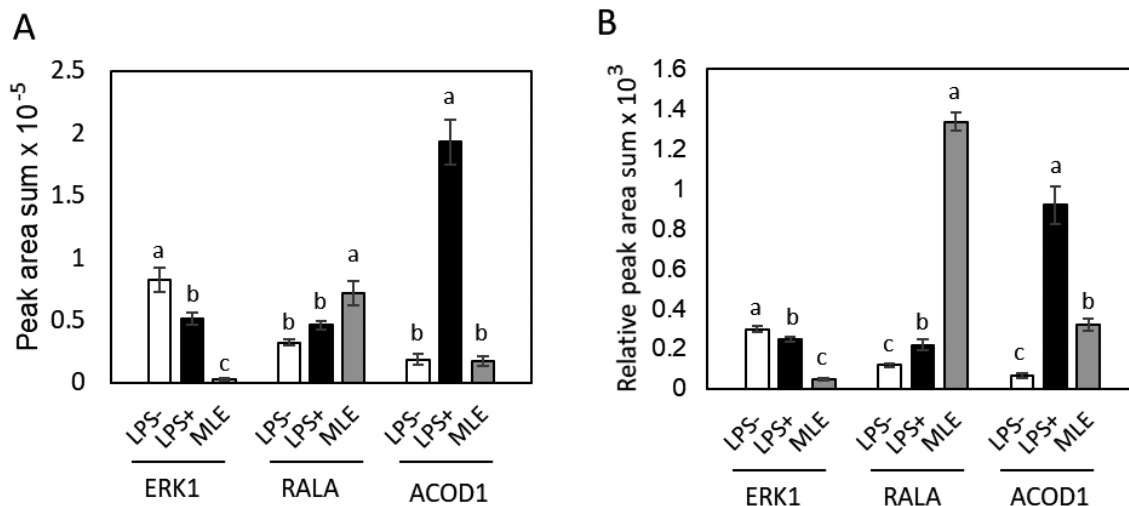


図 5. 炎症関連因子 ERK1, RALA, ACOD1 の定量値の比較. SWATH 質量分析計によって定量されたタンパク質のうち、ERK1, RALA, ACOD1 の 3 つを選び、定量値を LPS-群, LPS+群, MLE 群間で比較した. A: 標準化前の定量値の比較. B: 全タンパク質の定量値の合計に対して標準化した値の比較. 1 つのサンプルについて 3 回の測定を行い、値は平均値 \pm 標準偏差で示した. 異なるアルファベット間で有意な差が見られた ($P < 0.05$ by ANOVA-Tukey).

教師ありの多変量解析である PC-DA 解析を行ったところ、3 群は明確に分離され、それぞれ特徴的なタンパク質プロファイルを有することが示された (図 6A). 作成された二つの主成分の内、第一主成分 (D1) は、MLE 群が負の値、LPS-群が正の値を示し、これら 2 群の分離に有効であることが示された. また第二主成分は、MLE 群が負の値、LPS+群が正の値を示し、これら二群の分離に有効であることが示された.

MLE の抗炎症作用を解析するためには、第二主成分について解析することが有効であることが示された. そこで、D2 の loading score の上位 20 個、下位 20 個のタンパク質の機能について調べた (表 2A, B). D2 の loading score の上位 20 個 (寄与度 0.25–0.13) のタンパク質は LPS+群よりも MLE 群で減少しているタンパク質であるが、主に ROS 消去、細胞骨格、糖代謝に関連するタンパク質であり、特に解糖系などの嫌気

呼吸に関わるものが多かった (表 2A, 図 6B). また, D2 loading score の下位 20 個は (寄与 -0.15 – -0.070) は LPS+群よりも MLE 群で増加しているタンパク質であるが, Annexin A1, A2, A5 などの Annexin ファミリータンパク質や, 好機呼吸のタンパク質が多く含まれていた (表 2B, 図 6B). D2 loading score の上位, 下位のタンパク質の中には, シグナル伝達系の因子は Rac1 の 1 つしか含まれていなかった.

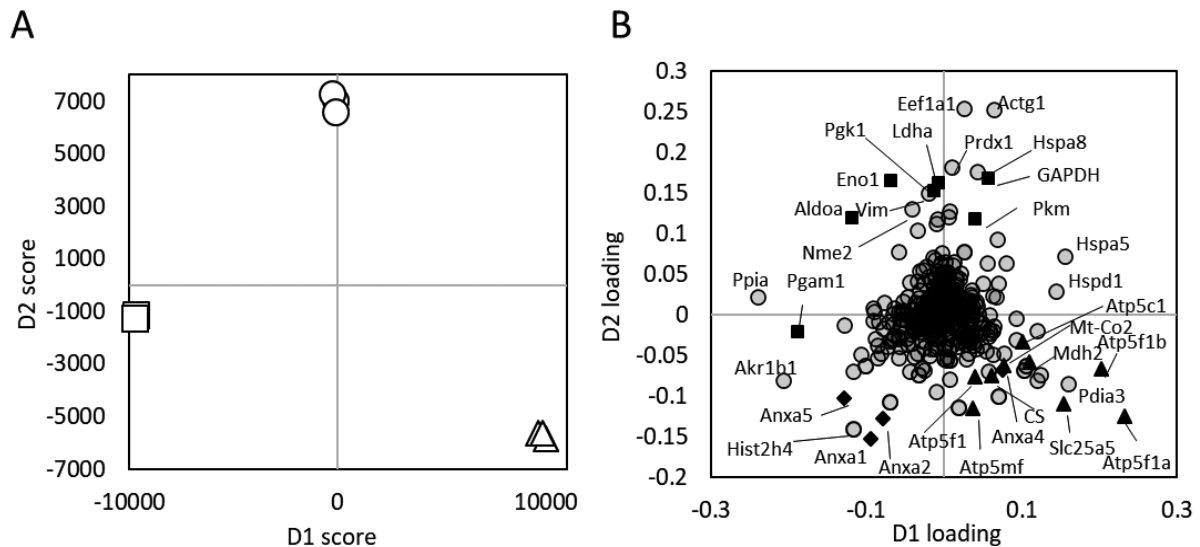


図 6. SWATH 定量データの PC-DA 解析. Pareto-scaling の条件で実施した. A: Score scatter plot. ○: LPS+群, □: LPS-群, △: MLE 群. B: Loading plot. ■: 嫌気呼吸に関わるタンパク質, ▲: 好気呼吸に関わるタンパク質, ◆: Annexin ファミリータンパク質

3.4 IPA 解析

SWATH 定量分析の結果から, 定量されたタンパク質の uniprot ID, 定量比率, p 値を IPA ソフトウェアに読み込ませた. まず, LPS によって発現増加することが報告されている因子の増減について調べた (図 7A, B). LPS+群と LPS 群を比較することによって, LPS 処理が与える影響を調べたところ, LPS 処理によって増加するものもあれば, 減少するものも見られた (図 7A). 次に, MLE 群と LPS+群を比較することによって, MLE の添加が LPS 処理に与える影響を調べたところ, 多くの因子が MLE の添加によって大きく減少することが示された (図 7B). 次に, 同様の方法で, LPS 刺激 Raw264.7 細胞における主要な炎症シグナル経路である LPS-activated MAPK signaling 経路のタンパク質を解析したところ, 経路にかかわる多くの因子の増減を測定できた (図 8A, B). また, 本経路の主要な因子と 3 倍以上増減した因子に注目すると, LPS の添加によって, 上流部分の Ras と, CREB/ATF1 や NF- κ B によって発現制御されている下流因子の増加が見られるが, その中間に存在する p38MAPK や ERK が大幅に減少していた. また, SQSTM1 や ACOD1 という炎症を抑える方向へ作用することが報告されている因子が 10 倍以上増加していた (図 9A). また, MLE の添加によって, Ras, SQSTM1 は更に増加し, p38MAPK, ERK, ACOD1 は更に減少することが示された (図 9B).

4. 考察

平成 27 年度の「機能性表示食品」制度の開始以来, 食品の健康促進作用 (機能性) の研究が盛り上がりを見せている. 機能性表示の申請には, 機能性に係る作用機序の考察が求められるが, 食品の機能性は, 標的分子が事前に予測できないこと, 複数の成分が様々な標的に作用する事によって効果を発揮している可能性があることから, ウェスタンブロットを用いた従来の方法で, その作用機序を完全に解明することは困難である. 我々は, これまでに高脂肪食誘導や高フルクトース条件下での各種の脂肪摂取がマウスの

肝臓に与える影響を SWATH 質量分析法で解析し^(10,12), 本手法の持つ, 非常に高い実験再現性により, 試料中のわずかなタンパク質発現量の変動を網羅的に捉えうることを示した. そこで, この SWATH 質量分析法が我々の研究している MLE の抗炎症作用の分子機構の解明に寄与するのではないかと考えた. 本研究では, LPS 刺激 Raw264.7 細胞に MLE を処理した後, 採取したタンパク質を SWATH 質量分析法で解析し, MLE の抗炎症作用の分子機構の解明が可能かどうかを試みた.

表 2A. MLE 群に比べ LPS+群で増加するタンパク質 (D2 loading score 上位 20 タンパク質)

No	Uniprot ID	Gene Name	Protein Name	D1 score	D2 score	Function
1	Q58E64_MOUSE	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha	0.025	0.255	Translation
2	Q4KL81_MOUSE	Actg1	Actin, gamma, cytoplasmic 1	0.064	0.252	Cytoskeleton
3	PRDX1_MOUSE	Prdx1	Peroxiredoxin-1	0.009	0.181	Protection against oxidative stress
4	Q3TZJ3_MOUSE	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	0.042	0.177	Molecular chaperone
5	D2KHZ9_MOUSE	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.058	0.168	Glycolysis (Anaerobic respiration)
6	Q5FW97_MOUSE	Eno1	Enolase 1, alpha non-neuron	-0.069	0.164	Glycolysis (Anaerobic respiration)
7	A0A1B0GSR9_MOUSE	Ldha	L-lactate dehydrogenase	-0.007	0.162	Anaerobic respiration
8	PGK1_MOUSE	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	-0.013	0.152	Glycolysis (Anaerobic respiration)
9	Q5FWJ3_MOUSE	Vim	Vimentin	-0.020	0.150	Cytoskeleton
10	Q5NC82_MOUSE	Nme2	Nucleoside diphosphate kinase	-0.042	0.130	Nucleic acid metabolism
11	TBB5_MOUSE	Tubb5	Tubulin beta-5 chain	0.007	0.128	Cytoskeleton
12	Q8C153_MOUSE	Eef2	Elongation factor 2	0.005	0.121	Translation
13	Q5FWB7_MOUSE	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase	-0.118	0.119	Glycolysis (Anaerobic respiration)
14	Q71LX8_MOUSE	Hsp90ab1	Heat shock protein 84b	-0.009	0.118	Translation
15	KPYM_MOUSE	Pkm	Pyruvate kinase PKM	0.040	0.117	Glycolysis (Anaerobic respiration)
16	Q8CEH8_MOUSE	Pfn1	Profilin	-0.011	0.113	Cytoskeleton
17	Q9CWK0_MOUSE	Rpl14	60S ribosomal protein L14	-0.035	0.103	Translation
18	LMNA_MOUSE	Lmna	Prelamin-A/C	0.067	0.094	Component of nuclear lamina
19	Q3U6Z1_MOUSE	Lcp1	Plastin-2	-0.059	0.077	Cytoskeleton
20	RACK1_MOUSE	Rack1	Receptor of activated protein C kinase 1	0.026	0.077	Signal transduction

表 2B. LPS+群に比べ MLE 群で増加するタンパク質 (D2 loading score 下位 20 タンパク質)

No	Uniprot ID	Gene Name	Protein Name	D1 score	D2 score	Function
1	Q4FJV4_MOUSE	Anxa1	Annexin A1	-0.094	-0.154	Phospholipid-binding protein
2	B2RTM0_MOUSE	Hist2h4	Histone H4	-0.117	-0.142	Component of nucleosome
3	Q542G9_MOUSE	Anxa2	Annexin A2	-0.078	-0.129	Phospholipid-binding protein
4	ATPA_MOUSE	Atp5f1a	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0.233	-0.126	ATP synthesis (aerobic respiration)
5	ATPK_MOUSE	Atp5mf	ATP synthase subunit f, mitochondrial	0.037	-0.116	ATP synthesis (aerobic respiration)
6	Q4KL76_MOUSE	Hspe1	Heat shock protein 1 (Chaperonin 10)	0.019	-0.114	Molecular chaperone
7	Q545A2_MOUSE	Slc25a5	ADP/ATP translocase 2	0.154	-0.111	ATP synthesis (aerobic respiration)
8	Q921L4_MOUSE	LOC665622	Histone H2B	-0.071	-0.107	Component of nucleosome
9	ANXA5_MOUSE	Anxa5	Annexin A5	-0.129	-0.104	Phospholipid-binding protein
10	ERP29_MOUSE	Erp29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	0.070	-0.100	Protein transport
11	VATE1_MOUSE	Atp6v1e1	V-type proton ATPase subunit E 1	-0.011	-0.094	Proton pump
12	PDIA3_MOUSE	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	0.160	-0.084	Protein folding
13	Q3THH1_MOUSE	Pdia6	Protein disulfide-isomerase A6	0.119	-0.081	Protein folding
14	Q3UDY1_MOUSE	Akr1b3	Aldo-keto reductase family 1 member B1	-0.208	-0.081	Reductase
15	Q9D6X2_MOUSE	Prdx5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	0.007	-0.079	Protection against oxidative stress
16	Q5I0W0_MOUSE	Atp5f1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	0.040	-0.077	ATP synthesis (aerobic respiration)
17	CISY_MOUSE	Cs	Citrate synthase, mitochondrial	0.061	-0.076	TCA cycle (aerobic respiration)
18	F8WI35_MOUSE	H3f3a	Histone H3	-0.033	-0.074	Component of nucleosome
19	Q3UBY9_MOUSE	P4hb	Protein disulfide-isomerase	0.124	-0.074	Protein folding
20	Q5XJF6_MOUSE	Rpl10a	Ribosomal protein	-0.045	-0.070	Translation

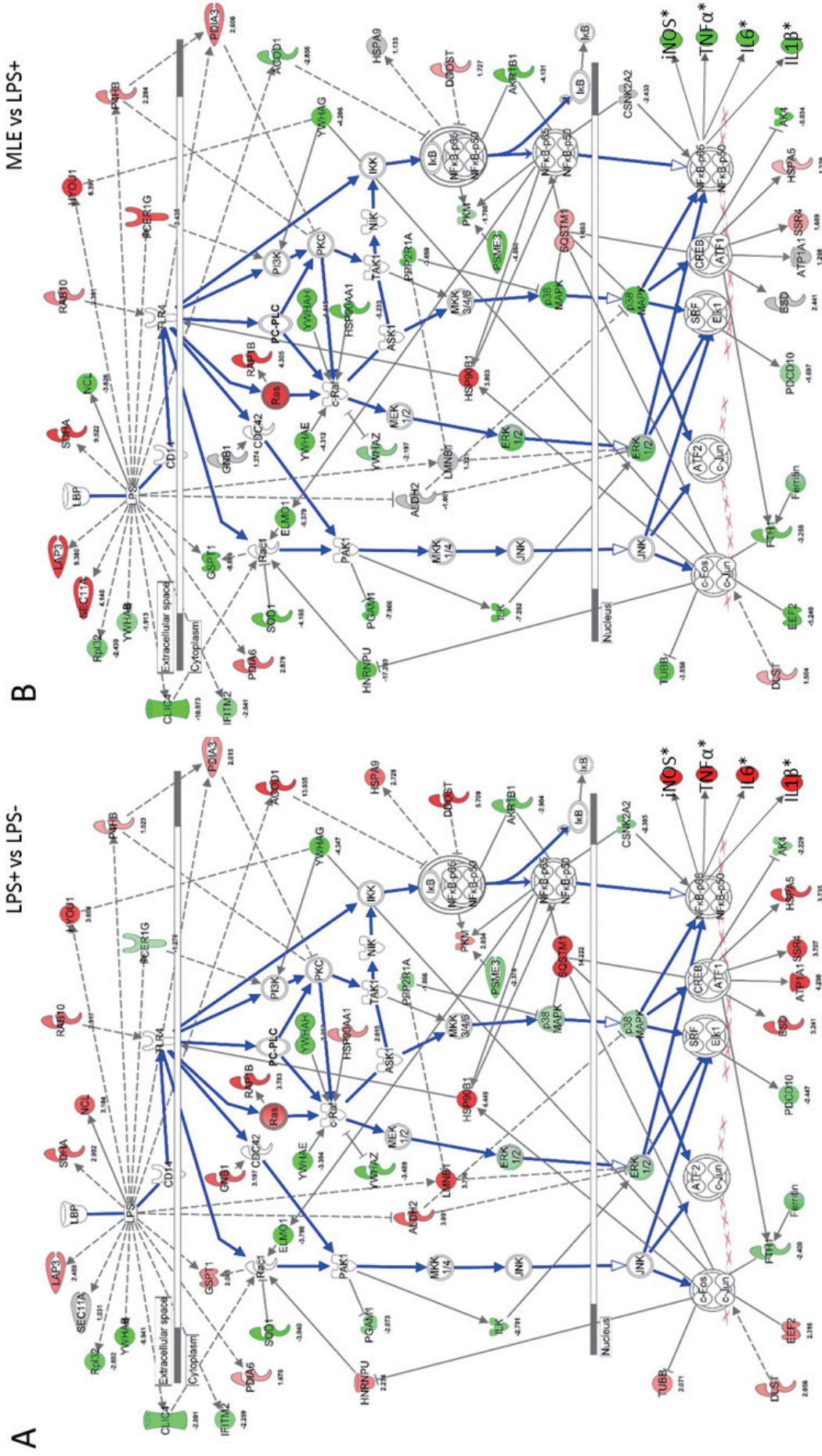


図9. LPS-activated MAPK signaling pathway (抜粋図). 図8A, Bの図からPathwayの主要経路(青の太字)と3倍以上変動が
 あった因子を抜粋した.Aでは,LPS-群に比べてLPS+群で増加している因子を赤で,減少している因子を緑で示した.BではLPS+群に比べてMLE
 群で増加している因子を赤で,減少している因子を緑で示した.各因子の下の数字は,存在量の比率を示す.*リアルタイムPCRで定量化した結果を
 反映している(図3)

初めに、LPS 活性化 Raw264.7 細胞を用いて MLE の抗炎症作用の詳細を解析した。培養上清中の NO, TNF α , IL-6 の量は、2.25 $\mu\text{g/ml}$ という低い MLE 濃度で有意な減少が見られ、18 $\mu\text{g/mL}$ ではほぼ検出限界以下にまで減少した (図 3B-D)。また、iNOS, TNF α , IL-6, IL1- β という測定したすべての炎症性関連因子の発現が 10 ng/ml の MLE で有意に減少し、40 $\mu\text{g/mL}$ では、LPS 未添加のレベルにまで減少していた (図 4)。MLE 中の最も多い成分はマンゴー果実にも含まれる mangiferin であるが⁽⁴⁾、同じ実験系で mangiferin の NO 産生に与える影響を評価しても、18 $\mu\text{g/ml}$ という比較的高い濃度でしか有意な減少が見られず、抑制される NO 量も僅かであった。また、mangiferin⁽¹³⁾ や他の植物性成分である punicalajin⁽¹⁴⁾ や cimifujin⁽¹⁵⁾ などの抗炎症作用を評価した既報と比較しても、MLE は強い抗炎症作用を示すことが分かった。この強い抗炎症作用から、MLE は慢性炎症抑制による生活習慣病予防効果や、関節リウマチなどのマクロファージの関与が強い炎症性疾患に対して治療効果を示す可能性がある。今後、動物実験によって、これらの疾患の予防・治療効果を評価する必要がある。さらには、MLE の安全性の評価や、臨床試験を実施することで将来的に機能性表示食品としての利用を目指したい。一方、2.5 $\mu\text{g/mL}$ の低濃度の MLE 処理によって、IL-6 や IL-1 β の発現量が逆に上昇する傾向が見られたことから、MLE には炎症を促進させる成分も含まれている可能性が示された。低濃度処理では抗炎症作用よりも炎症促進作用の方が発揮されるのかもしれない。MLE を機能性食品として利用する上で、抗炎症作用を示す分子の絞り込みと、不必要な成分の除去が必要であると考えられる。

また、我々は、MLE の機能性物質を特定するために、順相クロマトグラフィーで MLE を 5 つの画分に分けて、それぞれの抗炎症作用を評価した (図 3E)。その結果、抗炎症効果は全ての画分に確認され、特定の画分に濃縮することはなかった。このことは、MLE は単一の化合物が抗炎症作用を呈するのでなく、複数の因子が異なるターゲットに作用することで、協奏的に強い抗炎症の効果を発揮している可能性を示唆しており、その作用機序を解明するには細胞全体の変動を網羅的に捉える解析が必要であると考えられた。そこで、我々は未処理 (LPS-群)、LPS で活性化した (LPS+群)、もしくは、LPS とともに MLE を添加し、活性化を抑制した細胞 (MLE 群) を用意し、細胞内のタンパク質の変動を SWATH 質量分析法で解析した。まず、PC-DA 解析と IPA 解析を用いて、LPS+/LPS-間の変化を SWATH 質量分析法でとらえることができたか確認した。まず、PC-DA 法では、LPS+/LPS-間で変化のあるタンパク質を明確に区別にできた。LPS+で増加が確認できたタンパク質 (表 2A) は解糖系や乳酸代謝に関わるものが多かった。これは本来、炎症がおり、酸素濃度の薄い環境下でもマクロファージが活動できるように代謝が解糖系に偏ると言われていることと一致する。しかし、炎症に直接関わるタンパク質や、シグナル伝達系に関わるタンパク質はほとんど見られなかったため、IPA 解析を用いて、LPS-activated MAPK signaling 経路に関わる因子の増減を調べた。その結果、本シグナル伝達に関わる因子を多く測定できたが、LPS 刺激 Raw264.7 細胞で増加するはずである ERK1/2, p38MAPK のタンパク量が減少するなど、LPS 刺激によって活性化や発現上昇が示唆される因子が多く減少していた (図 7A, 8A, 9A)。また、主要な経路に作用し、10 倍以上増加している因子として、SQSTM1 と ACOD1 が検出された。SQSTM1 は一般的にはユビキチンを認識して特異的なタンパク質や細胞小器官をオートファジーへと導く受容体タンパク質として知られている⁽¹⁶⁾。SQSTM1 の炎症に関わる機能として、TRAF6 と結合することで、NF- κB の発現を亢進する⁽¹⁷⁾ という報告もあるが、ケラチノサイトにおける炎症は SQSTM1 を欠くと炎症を抑える効果が少なくなる⁽¹⁸⁾、非ステロイド系糖質コルチコイド受容体リガンドである CpdA は SQSTM1 がなければ炎症を抑えられない⁽¹⁹⁾ など、全体的には SQSTM1 は炎症を抑制する方向に作用すると思われる。ACOD1 は炎症や免疫代謝において注目されている因子で、ACOD1 を介して A20 を発現することで、NF- κB の負のフィードバックとして働くことが報告されている⁽²⁰⁾。このように LPS によって、本来ならば増加するはずの因子のいくつかは減少し (図 7A)、LPS-activated MAPK signaling 経路における主要な因子を抑える方向にあるとされているタンパク質も増加していた (図 8A,

9A). Oishi らは, TLR4 刺激によって活性化したマクロファージ細胞が, 脂質代謝の変化を通して, 12–24 時間後に炎症終結フェイズに移行することを示した⁽²¹⁾. 今回は TNF α と IL-6 の発現が減少していない (図 2) という理由から, LPS 添加から 24 時間後のタンパク質の変動を解析した. TLR4 刺激の条件などは異なるものの, 今回の実験条件でも炎症を終結するためのプロセスがすでに開始している可能性がある. 食品機能性成分の分子機構を解明するためには, より短い時間で解析する必要があると考えられた.

次に, SWATH 解析の結果をもとに MLE の抗炎症作用の作用機序を推定した. PC-DA 法によって, LPS+群に比べて, MLE の添加によって増加するタンパク質が示された (図 6). その中で抗炎症作用をもつタンパク質として Annexin A1, Annexin A2 に着目した. Annexin A1 は糖質グルコシルコイドのエフェクター分子として働き, 細胞の恒常性を維持するシグナル伝達をすることにより, 結果として炎症の収束を促進する⁽²²⁾. Annexin A2 においては, Annexin A2 欠損マウスが肺炎菌に感染すると炎症性サイトカインが大幅に上昇し, 100%死亡することや, Annexin 欠損マクロファージにおいてはインターロイキン-1 β 分泌, カスパーゼ-1 活性化, NLRC4 オリゴマー化が減少するという報告がされており, 免疫の調整に重要な因子であることが報告されている⁽²³⁾. MLE がこの Annexin A1 と Annexin A2 を上昇させることで, 細胞内の恒常性を維持する方向へ進行させ, 炎症を抑える効果の一因になっていると考えられる. また, MLE 処理によって, ATP 合成酵素, ADP/ATP translocase, Peroxiredoxin-5, Citrate synthase などの多くのミトコンドリア酵素の増加が見られた. このことは, 前述した LPS 処理による好気呼吸から嫌気呼吸への移行が MLE によって妨げられたことを示している可能性がある. また, 近年, ミトコンドリア機能の低下が NLRP3 インフラマソームの活性化を通じて, IL-1 β の発現を促進することや⁽²⁴⁾, NF- κ B が損傷したミトコンドリアを除去して, インフラマソームの活性化を抑制することが報告されるなど⁽²⁵⁾, ミトコンドリア機能と炎症の間に深い関係があることが示されている. MLE によって多くのミトコンドリアタンパク質が増加したことから, ミトコンドリア機能を維持, もしくは再生することで, 抗炎症作用を発揮している可能性も考えられる.

更に, IPA によって, LPS によって発現上昇することが報告されている因子群の増減を調べると, HYOU1, FCER1G などの一部を除いて, ほとんどの因子が MLE によって減少していた (図 7B). また LPS-activated MAPK signaling 経路に与える影響を調べると, LPS+群で観察された, Ras の増加, p38MAPK や ERK1/2 の減少, SQSTM1 の増加などの現象が更に強調される方向に変化した (図 8B, 9B). ACOD1 は LPS+群との比較だと減少しているが, LPS-群と比べて 5 倍程度増加していた. このうち, Ras の増加以外の現象は炎症を抑制する方向に機能すると考えられることから, MLE が炎症の終結反応を促進することで炎症を抑制している可能性が考えられた. 前述したように, MLE 中には抗炎症成分に加えて, 炎症を促進する成分が含まれている可能性が示されている. HYOU1, FCER1G, Ras の増加などの炎症方向の変化は, この MLE 中の炎症促進成分によって引き起こされている可能性も考えられる.

以上のことより, 本研究によって MLE の抗炎症作用 (マクロファージの活性化抑制作用) の作用機序に関するいくつかの知見を得られ, 食品由来成分の抗炎症作用の分子機構の解明に SWATH 法が一定の有用性を持つことが示された. Annexin A1 や SQSTM1 などの主要なシグナル伝達経路から外れた炎症関連因子の増減を見出すことができ, 一定の成果を得ることはできたと考えている. その反面, 主要経路の因子は定量できず, MLE が複数の作用点を有することの証明や, 当初の目標であった作用標的の同定, 影響を受けるシグナル伝達系の絞り込みには至らなかった. 本実験の条件では, シグナル伝達系の主要経路をなす因子はほとんど定量されていなかったことから, 細胞からのタンパク質抽出条件の検討, 分画処理の導入, LC-MS の条件の改良などにより, より多くのタンパク質の定量ができる手法を開発することが必要である. また, 細胞内シグナル伝達系においては, リン酸化などの翻訳後修飾の変化や細胞内局在の変化が重要な役割を果たしている. リン酸化タンパク質を標的としたプロテオミクスや, 核画分やミトコンドリア画分など, 細胞の器官ごとのプロテオミクスの導入が有効であると考えられる. また, 本実験の条件では,

Raw264.7 細胞が活性化を終え、炎症終結に向け動き始めている傾向が見られており、事前の実験条件の検討が重要であることが示された。LPS 処理の時間を短くした実験区を複数設定し、細胞内のタンパク質プロファイルの時間経過を追うことで、抗炎症作用の機序に関するより詳細な解析が可能になると思われる。以上のような改良を施すことで、SWATH 法による細胞内シグナル伝達系のモニタリング技術を完成させ、食品機能性成分の分子機構を解明する実験プラットフォームの確立を目指したい。

5. データ利用可能性

質量分析データ、同定結果、定量解析データ、PC-DA 解析データは PRIDE⁽²⁶⁾パートナーリポジトリを介して ProteomeXchange コンソーシアムに寄託されている。(dataset identifier: PXD030564)。

6. 参考文献

- (1) 小川佳宏 真鍋一郎 編 『慢性炎症と生活習慣病』 2013
- (2) Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*.444, 860–867.
- (3) Huang, S., Rutkowsky, J.M., Snodgrass, R.G., Ono-Moore, K.D., Schneider, D.A. Newman, J.W., Adams, S.H., Hwang, D.H. (2012) Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 53, 2002–2013.
- (4) Itoh, K., Murata, K., Nakagaki, Y., Shimizu, A., Takata, Y., Shimizu, K., Matsukawa, T., Kajiyama, S., Fumoro, M., Iijima, M., Matsuda, H. (2016) A pancreatic lipase inhibitory activity by mango (*Mangifera indica*) leaf methanolic extract. *J. Plant Stud.* 5, 72–78.
- (5) Itoh, K., Murata, K., Sakaguchi, N., Akai, K., Yamaji, T., Shimizu, K., Isaki, K., Matsukawa T., Kajiyama, S., Fumuro, M., Iijima M., Matsuda, H. (2017) Inhibition of advanced glycation end products formation by *Mangifera indica* leaf extract. *J. Plant Stud.* 6, 102–107.
- (6) Itoh, K., Matsukawa, T., Minami K., Okamoto, M., Tomohiro, N., Shimizu, K., Kajiyama, S., Endo, Y., Matsuda, H., Shigeoka, S. (2020) Inhibitory effect of several *Mangifera indica* cultivar leaf extracts on the formation of advanced glycation end products. *J. Plant Stud.* 9, 33–38.
- (7) Itoh, K., Matsukawa, T., Okamoto, M., Minami, K., Tomohiro, N., Shimizu, K., Kajiyama, S., Endo, Y., Matsuda, H., Shigeoka, S. (2020) In vitro Antioxidant Activity of *Mangifera indica* Leaf Extracts. *J. Plant Stud.* 9, 39-45.
- (8) Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 42, 145–151.
- (9) Anjo, S.I., Santa, C., Mandas, B. (2018) SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics.* 17, 3–4.
- (10) 太田汐海, 西端智也, 山脇瑛也花, 淡路智貴, 大世渡勇紀, 坂上綾花, 岸田邦博, 永井宏平. (2018) SWATH 質量分析法による高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓の定量プロテオミクス. 近畿大学生物理工学部紀要. 42, 15–31.
- (11) Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun.* 201, 748–55.
- (12) 大嶋 萌永, 鈴木 絵莉花, 井原 勇人, 永井 宏平, 岸田 邦博. (2021) 高フルクトース食に含まれる油脂の違いがラット脂質代謝および肝臓タンパク質発現プロファイルに与える影響の比較. 日本栄養・食糧学会誌 74, 155–169.
- (13) Zhao, Y., Wang, W., Wu, X., Ma, X., Qu, R., Chen, X., Liu, C., Liu, Y., Wang, X., Yan P., Zhang H., Pan J., Li, W. (2017) Mangiferin antagonizes TNF- α -mediated inflammatory reaction and protects against

- dermatitis in a mice model. *Int Immunopharmacol.* 45, 174–179.
- (14) Cao Y., Chen J., Ren, G., Zhang Y., Tan, X., Yang, L. (2019) Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting FoxO3a/Autophagy Signaling Pathway. *Nutrients.* 11, 2794.
 - (15) Han B., Dai Y., Wu, H., Zhang Y., Wan, L., Zhao, J., Liu, Y., Xu, S., Zhou, L. (2019) Cimifugin Inhibits Inflammatory Responses of RAW264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide. *Med. Sci Monit.* 25, 409–417.
 - (16) Katsuragi, Y., Ichimura, Y., Komatsu, M. (2015) p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 282, 4672–4678.
 - (17) Zhang, X., Jin, J.Y., Wu, J., Qin, X., Streilein, R., Hall, R. P., Zhang, J.W. (2015). RNA-Seq and ChIP-Seq reveal SQSTM1/p62 as a key mediator of JunB suppression of NF- κ B-dependent inflammation. *J Invest Dermatol.* 135, 1016–1024.
 - (18) Lee, H.M., Shin, D.M., Yuk, J.M., Shi, G., Choi, D.K., Lee, S.H., Huang, S.M., Kim J.M., Kim C.D., Lee, J.H., Jo, E.K. (2011). Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *J Immunol.* 186, 1248–1258.
 - (19) Mylka, V., Deckers, J., Ratman D., Cauwer, L.D., Thommis J., Rycke, R.D., Impens, F., Libert, C., Tavernier, J., Berghe, W.V., Gevaert, K., Bosscher K.D. (2018) The autophagy receptor SQSTM1/p62 mediates anti-inflammatory actions of the selective NR3C1/glucocorticoid receptor modulator compound A (CpdA) in macrophages. *Autophagy.* 14, 2049–2064.
 - (20) Wu, R., Chen F, Wang, N., Tang, D., Kang, R. (2020) ACOD1 in immunometabolism and disease. *Cell Mol Immunol.* 17, 822–833.
 - (21) Oishi, Y., Spann, N.J., Link, V.M., Muse, E.D., Strid, T., Edillor, C., Kolar, M.J., Matsuzaka, T., Hayakawa, S., Tao, J., Kaikkonen, M.U., Carlin, A.F., Lam, M.T., Manabe, I., Shimano, H., Saghatelian, A., and Glass, C.K. (2017) *Cell Metab.* 25, 412–427.
 - (22) Perrtti, M., D'Acquisto, F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 9, 62–70.
 - (23) Dallacasagrande, V., Hajjar, K.A. (2020) Annexin A2 in Inflammation and Host Defense. *Cells.* 9, 1499.
 - (24) Swanson, K.V., Deng, M., Ting, J.P.Y. (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 477–489.
 - (25) Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S.R., McGeough, M.D., Ellisman, M.H., Seki, E., Gustafsson, A.B., Hoffman, H.M., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Karin, M. (2016) NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 164, 896–910.
 - (26) Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A.F., Ternent, T., Brazma, A., Vizcaíno, J.A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 47, D442–D450.

英文抄録

Elucidation of the molecular mechanism of anti-inflammatory effect of mango leaf extract by a SWATH acquisition method

Kento Yoshimoto¹, Mone Kurokawa², Hibiki Oomi², Rika Kawahata², Yuki Minamoto², Kunihiro Kishida^{1,3},
Tetsuya Matsukawa^{1,4}, Kouhei Nagai^{1,2}

It is often difficult to fully elucidate the molecular mechanism of functional foods, since foods generally contain multiple functional substances, which may act on different targets. Therefore, there is a need to develop a method that comprehensively captures the effects of food ingredients on cells. In this study, we first analyzed the details of the anti-inflammatory effect of mango leaf ethanol extract (MLE) using macrophage-like Raw264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS). Secondary, we attempted to elucidate the molecular mechanism of the anti-inflammatory effect of MLE by analyzing intracellular protein fluctuations by SWATH mass analysis. Addition of MLE to Raw264.7 cells activated with 1.0 ng/mL LPS significantly reduced the concentrations of NO and IL-6 in the culture supernatant at 0.56 µg/mL, and that of TNFα at 2.3 µg/mL. All of them decreased to below the detection limit at 18 µg/mL of MLE. Similarly, the expression level of iNOS was significantly reduced at 2.5 µg/mL of MLE, and that of TNFα, IL-6, and IL-1β was at 10 µg/mL. At 40 µg/mL of MLE, the expression level of all genes was reduced to the level of LPS-untreated cells. When MLE was fractionated by normal phase chromatography, the NO production inhibitory effect was not concentrated, and weak effects were detected on all fractions. This indicated that multiple components in MLE may act on multiple receptors to exert a strong anti-inflammatory effect. When the quantitative data obtained by SWATH-MS was analyzed by PC-DA, it was clearly distinguished into three groups, untreated cells (LPS -), those treated with 10 ng/mL LPS (LPS+), and those treated with LPS and 10 µg/mL MLE (MLE), indicating that the three groups possess distinctive proteome profiles. Among them, Annexin A1 and Annexin A2, which have been reported to maintain cell homeostasis and contribute to the termination of inflammation, were increased in the MLE group. Focusing on the factors related to the LPS-activated MAPK signaling pathway, SQSTM1 involved in anti-inflammation increased, and p38MAPK and ERK1/2, which are the central factors of the pathway, decreased. These factors were thought to be involved in the anti-inflammatory effect of MLE.

Keywords: SWATH mass spectrometry, quantitative proteomics, anti-inflammatory effect, mango

Received 20 December 2021, Accepted 16 February 2022.

1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

4. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan