

ポリフェノールによる血清アルブミンの酸化と 化学修飾をシグナルとした自然免疫活性化分子機構の研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科
佐々木 栄太

1. 研究の目的と背景

ポリフェノールは同一分子内に複数のフェノール性水酸基を持つ化合物の総称であり、食品に含まれる代表的な機能性分子の一つである。多種多様な構造を持つポリフェノール類には、抗酸化作用を始めとして多くの生理活性が報告されている。例えば、緑茶に含まれるポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレート (EGCG) は、ウイルス凝集作用などの効果によって抗ウイルス活性を示し¹、あるいはガン細胞に高発現している受容体 (67 laminin receptor) と結合することで抗ガン活性を発揮することが見出されている²。さらに近年、EGCGが酸化されることによって生じる酸化体は、容易にタンパク質と反応することがわかってきており、ポリフェノール修飾タンパク質のもつ新たな生理機能の発見が期待されている^{3,4}。少なくとも一部のポリフェノール修飾タンパク質は自然抗体によって認識されるため、自然免疫系の維持や調節に関与する可能性が示唆されている。これまでのところ、自然抗体とポリフェノール修飾タンパク質との相互作用には、タンパク質表面電荷の変化や³、重合化が影響することが示唆されているが⁴、その詳細は明らかとなっていない。そこで、本研究では様々な部分構造を持ちうる血清アルブミンの酸化/修飾体が自然抗体によって認識される分子レベルでのメカニズムの解明を目指し、ウシ血清アルブミン (BSA) をモデルタンパク質として、その化学修飾体や重合体と自然抗体との相互作用の有無について検討を行うこととした。

2. 研究の方法

2-1. 修飾タンパク質の調製

EGCG-BSA: BSA (終濃度 1 mg/mL) と EGCG (終濃度 1 mM) を PBS 中 37°C で 24 時間インキュベートした。**Acetyl BSA:** BSA 溶液 (1 mg/mL) 1 mL に無水酢酸 14 μ L を加え、室温で 24 時間インキュベートした。**Amino BSA:** BSA 1 mg を 1 mL の 0.1 M MES buffer に溶解し、15 mg のエチレンジアミンと 1 μ L のカルボジイミド架橋剤 (EDC) を加え、室温で 3 時間インキュベートした。それぞれの修飾タンパク質反応液から PD-minitrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) を用いたゲル濾過により、未反応の低分子化合物を取り除いた。

2-2. EGCG-BSA 親和性モノクローナル抗体 (mAb) の調製

液体窒素中に凍結保存していた抗体産生ハイブリドーマ SBM1-5⁴ を解凍し、20% FBS HAT-DMEM 培地中 37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。十分に細胞が増殖した後に、mAb SBM1-5 を含む培養上清を回収した。

2-3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC システム (日本分光) に水系ゲル濾過カラム PROTEIN LW-803 (Shodex) を接続し、目的とするタンパク質の分析および分取を行なった。溶出には 0.3 M の NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液を 1 mL/min の流速で用いた。タンパク質の検出は 280 nm の吸光度を測定することで行なった。また、タンパク質の分取は 30 秒ごとのフラクションに分画して行なった。

2-4. ELISA

修飾タンパク質をイムノプレート (Maxisorp, Thermo Fisher Scientific) に吸着させ (5 μ g protein/well)、ブロッキング溶液 (ケー・イー・シー) でブロッキングした。一次抗体として、mAb SBM を含む培地上清を用い、二次抗体として Anti-mouse IgM-HRP (SouthernBiotech) を用いた。発色反応には TMB 溶液 (Invitrogen) を用い、2 N の硫酸で反応を停止した後、450 nm の吸光度をプレートリーダー 2030 ARVO X3 (PerkinElmer) で測定した。

2-5. 抗体遺伝子配列の解析

培養した SBM1-5 をトリプシン処理によって回収し、PBS(-) で洗浄後に ISOGEN (ニッポンジーン) で RNA を抽出した。さらに PrimeScript RT Master mix (タカラバイオ) を用いて cDNA を合成した。Mouse Ig Primer set (Novagen) の配列を元に作製したプライマーと上記 cDNA を用いた PCR を行い、それぞれのハイブリドーマ由来の抗体遺伝子を増幅した。増幅遺伝子はファージミドベクター pDong1⁵ の制限酵素サイトの間に挿入し、大腸菌株 DH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換した。得られたコロニーをクローニングし、FASMAC による DNA シークエンス解析に供した。

3. 研究内容

3-1. 修飾 BSA と自然抗体の相互作用

SBM は EGCG-BSA に親和性のある自然抗体 (mAb SBM) を産生するハイブリドーマである。EGCG 以外の複数のポリフェノール修飾 BSA にも交差性を示すことがわかっており、ピセアタンノール-BSA と mAb SBM の相互作用には、BSA の重合化が関与することが報告されている⁴。本研究では、この SBM に注目し、EGCG 修飾、アセチル化あるいはアミノ化反応などによって表面電荷を変化させた BSA との相互作用を検討した。また、今回 EGCG 修飾 BSA においてもタンパク質の重合化が観察されたため、EGCG 修飾 BSA 由来の重合化タンパク質と SBM の相互作用の評価も行なった。

3-2. SBM 産生抗体の遺伝子配列解析

ポリフェノール修飾タンパク質と自然抗体の相互作用の分子レベルでのメカニズムを解明するためには、抗体の抗原結合部位 (パライトープ) の配列や構造の解析も重要である。その足がかりとして mAb SBM1-5 の遺伝子配列の解析と比較を行なった。

4. 研究の実施経過

4-1. 修飾 BSA と自然抗体の相互作用

BSA 表面の化学修飾として、1) EGCG 修飾、2) アセチル化、3) アミノ化を検討した。修飾タンパク質による構造あるいは電荷の変化は、Native-PAGE によって確認した。これらの修飾 BSA または未反応の BSA を抗原として、mAb SBM1 あるいは mAb SBM3 を用いた ELISA を行なった (Fig. 1)。EGCG-BSA に対する mAb SBM1 および mAb SBM3 の親和性は確認されたが、アセチル化 BSA とアミノ化 BSA に対する親和性は未反応の BSA に対するものと有意な差が観測されなかった。

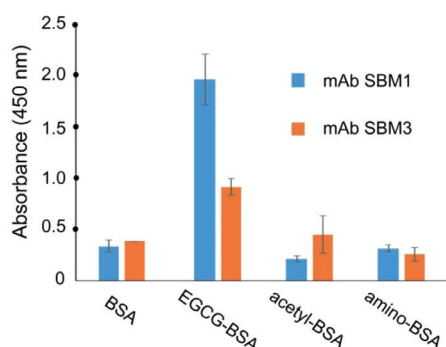


Fig. 1 BSA の化学修飾と mAb SBM の親和性解析。

BSA、EGCG-BSA、アセチル化 BSA、アミノ化 BSA を抗原とし、1 次抗体に mAb SBM1 または mAb SBM3、2 次抗体に抗マウス IgM 抗体-HRP を用いた ELISA を行なった。

次に EGCG 修飾 BSA をゲル濾過カラムを用いた HPLC で解析したところ、タンパク質の重合化が観察された (Fig. 2A)。そこで、重合度の異なるフラクションで分画し、Native-PAGE による確認を行なった (Fig. 2B)。それぞれの画分の 280 nm における吸光度を測定し、同一濃度になるように調製した後に、mAb SBM1 を用いた ELISA を行なった (Fig. 3)。それぞれの画分を抗原とした時の ELISA のシグナル強度に変化は見られなかった。

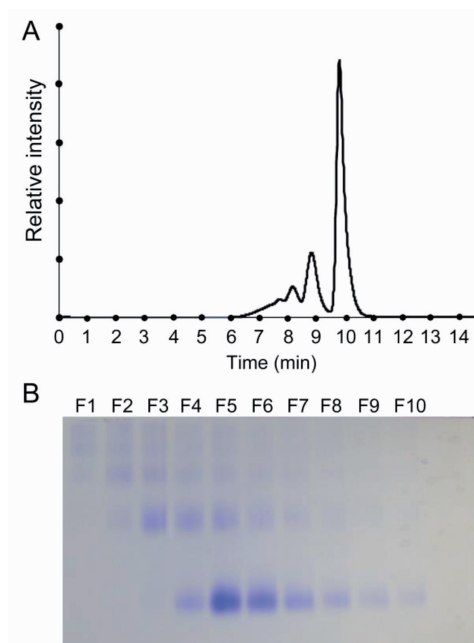


Fig. 2 EGCG 修飾 BSA の重合化。

(A) EGCG 修飾 BSA の HPLC による分析。溶出時間 7 分から 30 秒ごとに分取を行なった。

(B) HPLC によって分取した画分 (F1-F10) ごとの Native-PAGE による分析。それぞれの画分と (A) の溶出時間の関係は、F1: 7.0-7.5 分、F2: 7.5-8.0 分、F10: 11.5-12.0 分である。F2 は三量体、F3-F4 は二量体、F5-F10 は単量体が主であることが見て取れる。

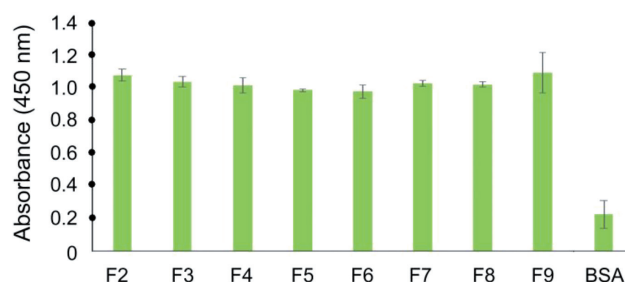


Fig. 3 EGCG 修飾 BSA の重合化と mAb SBM1 の親和性解析。

HPLC で分取した EGCG 修飾 BSA の画分 (F2-F9, Fig. 2) または未修飾の BSA を抗原とし、1 次抗体に mAb SBM1、2 次抗体に抗マウス IgM 抗体-HRP を用いた ELISA を行なった。

抗原のタンパク質濃度はフラクションごとに同じになるように調製した。

4-2. SBM 産生抗体の遺伝子配列解析

凍結保存していたハイブリドーマ SBM1-5 のうち、SBM2 は細胞が増殖しなかったために実験から除外した。SBM1, 3, 4, 5 は正常に増殖したため、それぞれの抗体重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) をマウスの免疫グロブリン M (IgM) に対して設計されたプライマーによって増幅した。クローニング後に得られた配列を解析した結果、VH 配列は、SBM1, 3, 4, 5 の全てにおいて同一であることが判明した。また、VL 配列については、SBM1 と 5 が同一 (タイプ I) であったが、SBM 4 はそれとは異なる配列 (タイプ II) を有していた。SBM3 の VL 遺伝子は複数のプライマーの組み合わせで増幅され、それぞれの配列をクローニング後に解析したところタイプ I とタイプ II の二種類の配列が得られた。

5. 研究から得た結論・考察

5-1. 修飾 BSA と自然抗体の相互作用

これまでの研究で EGCG の分子内に含まれるピロガロール構造が酸化して生じる *o*-ベンゾキノン構造がタンパク質の求核性側鎖と反応することがわかっている⁶。この時リジン残基が反応すると脱アミノ化が起こり、アルデヒド基へと変換されるため、タンパク質表面の電荷は相対的に負に帯電する³。また、無水酢酸を用いたアセチル化はリジンのアミノ基やチロシンのフェノール性水酸基を標的とし、タンパク質表面電荷は相対的に負に帯電する。これに対し、アスパラギン酸やグルタミン酸のカルボキシル基とエチレンジアミンの結合によるアミノ化 BSA の表面電荷は相対的に正に帯電する。ELISA の結果、mAb SBM1 と mAb SBM3 のいずれを用いた場合でも、アセチル化 BSA、アミノ化 BSA に対する有意な親和性が観測されなかったことから、mAb SBM とポリフェノール修飾タンパク質の相互作用は単純な静電相互作用ではないことが示唆された。また、EGCG 修飾 BSA の重合化フラクションを用いた ELISA によって、mAb SBM1 との親和性は重合化の程度によらないことが観測されたため、mAb SBM とポリフェノール修飾タンパク質の相互作用は、単純なタンパク質の重合化によるものでもないことが示唆された。

5-2. SBM 産生抗体の遺伝子配列解析

SBM1-6 の産生するモノクローナル抗体の EGCG-BSA 抗原に対する ELISA のシグナルに差が見られたため⁴、mAb SBM1-6 は異なる遺伝子配列を持つことが予想された。本研究において、mAb SBM1, 3, 4, 5 の抗体配列を明らかにした結果、mAb SBM1 と mAb SBM5 の抗体配列は同一であり (タイプ I)、mAb SBM4 はそれらとは異なることを確認した (タイプ II)。一方、SBM3 の産生する抗体からはタイプ I とタイプ II のどちらの抗体配列も存在したため、SBM 3 は 2 種のハイブリドーマの混ざりである可能性が示唆された。また、VH 配列につい

ては、mAb SBM1, 3, 4, 5 の全てにおいて同一であることが明らかとなったため、EGCG-BSA 抗原に対するパラトープとして特に重要であると推測している。

6. 残された問題、今後の課題

本研究によって、mAb SBM1 と mAb SBM4 は異なる VL 配列を持つことが明らかとなったが、それぞれの抗体の EGCG 修飾 BSA に対する親和性を厳密に比較するためには、抗体を精製・定量して ELISA に用いる必要があり、今後の課題である。また、本研究で試験された mAb SBM によるポリフェノール修飾 BSA の認識メカニズムは、単純な静電相互作用やタンパク質の重合化に拠らない結果となったため、ポリフェノール修飾 BSA のエピトープについてはさらなる詳細な解析が必要である。最後に、引き続き残された課題に取り組み、ポリフェノール修飾タンパク質と抗体の相互作用の生理的意義を解明することで、人々の健康に貢献したい。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびにご関係の皆さまに厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T. & Steinmann, E., Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea., *Br. J. Pharmacol.*, **168**, 1059-1073 (2013)
- Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y. & Yamada, K., A receptor for green tea polyphenol EGCG., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380-381 (2004)
- Hatasa, Y., Chikazawa, M., Furuhashi, M., Nakashima, F., Shibata, T., Kondo, T., Akagawa, M., Hamagami, H., Tanaka, H., Tachibana, H. & Uchida, K., Oxidative deamination of serum albumins by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: A potential mechanism for the formation of innate antigens by antioxidants., *PLoS One*, **11**, 1-19 (2016)
- Furuhashi, M., Hatasa, Y., Kawamura, S., Shibata, T., Akagawa, M. & Uchida, K., Identification of polyphenol-specific innate epitopes that originated from a resveratrol analogue., *Biochemistry*, **56**, 4701-4712 (2017)
- Dong, J., Ihara, M. & Ueda, H., Antibody Fab display system that can perform open-sandwich ELISA., *Anal. Biochem.*, **386**, 36-44 (2009)
- Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji,

R., Kumazawa, S., Nakayama, T. & Akagawa, M.,
Covalent modification of proteins by green tea
polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate through
autoxidation., *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 1384-
1394 (2008)