

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16225

研究課題名(和文)モノクローナル抗体を研究基盤とした甘草機能性フラボノイドの作用機序の徹底的究明

研究課題名(英文) Investigation for action mechanism of licorice functional flavonoids using a monoclonal antibody.

研究代表者

藤井 俊輔(藤井俊輔)(Fujii, Shunsuke)

長崎国際大学・健康栄養学科・助教

研究者番号：10610165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：モノクローナル抗体(mAb)を研究基盤として、甘草含有化合物が有する機能性解析を試みた。種々の甘草フラボノイドを用いて、前駆脂肪細胞3T3-L1の分化抑制作用についてスクリーニングを行い、さらに、甘草の主要成分であるグリチルリチン(GL)や、その代謝物であるグリチルレチン酸(GA)との相乗効果についても検討した。また、GAに対するmAbの作成に成功し、抗GA mAbを用いたenzyme-linked immunosorbent assayを確立し、GAの定量分析を可能とした。また、GLと甘草の主要フラボノイドであるリクイリチンの視覚的な検出が可能なイースタンブロットティングの開発を達成した。

研究成果の概要(英文)： We attempted to analyze for action mechanism of licorice components using monoclonal antibody as research foundation. The 3T3-L1 cell were treated to screen for inhibition of differentiation to adipocytes using various licorice flavonoids and then it was also investigated the synergistic effect with glycyrrhizin (GL) and glycyrrhetic acid (GA). Moreover, the anti-GA mAb were prepared and developed to enzyme-linked immunosorbent assay which can be quantitative analysis. In addition, the eastern blotting technique was achieved for GL and licorice major flavonoid, liquiritin (Liq) which can detect visually using anti-GL and anti-Liq mAbs.

研究分野：食品化学、天然物化学

キーワード：モノクローナル抗体 甘草 甘草フラボノイド リクイリチン グリチルリチン グリチルレチン酸 3T3-L1

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年における一次予防への関心の高まりや、生活様式の欧米化に伴うメタボリックシンドロームを契機とした各種慢性疾患罹患患者数の増加を背景として、サプリメント等を含む健康食品や天産物、食品中の様々な三次機能成分に関心が高まっており、広義では生薬とも言える天産物を食品として摂取している。一方で、「天産物は副作用がなく安全である」といった誤った認識や危険意識の低さから、重度の健康障害の発生も危惧されている。さらに、天然成分を配合した健康食品等の生産原料には、原料植物を野生種から賄われているものも多く、その品質が全く異なるケースもあり、品質管理が極めて重要となっている。一般的に、食品中の機能性成分の分析方法として、高速液体クロマトグラフィー等の機器分析法が汎用されているが、多種多様な成分から構成されている健康食品中の目的成分を迅速に検出、定量するには難点を残すことが多い。即ち、目的とする成分の含有量を簡便、迅速且つ、精密に分析する手段が必要である。

そこで、申請者はこれまでに機器分析法に替わる新分析法の開発を目的として、天然化合物に対する特異的モノクローナル抗体（mAb）を作製し、mAbを用いた各種免疫化学的手法によるアッセイ系の確立を中心に研究を行い、マメ科「甘草」の主要フラボノイドであるリクイリチンに対する mAb（抗 Liq mAb）の作製に成功している。申請者は mAb 作製に加え、抗 Liq mAb を研究基盤とした、enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）によるリクイリチンの定量分析法の確立している（J. Agric. Food Chem., 62 3377-3383, 2014）。

また、様々な機能性成分の効果や安全性はこれまでの食経験や疫学調査、介入研究、細胞を用いた種々のアッセイ系によって評価されているが、それと同時に作用機序の解明や標的分子の同定といった、詳細な科学的エビデンスの構築が切望されている。

そこで本研究は、これらの機能性成分に対する mAb を利用することで、機能性成分の細胞内への取り込みや蓄積、挙動、代謝物のモニタリング、標的分子の同定等、詳細な作用機序の解明へ応用することが可能ではないかと考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究課題は、申請者がこれまで積み重ねてきた天然物特異的 mAb 作製の経験と、申請者らの研究グループの天然物機能性解析

に関する豊富な知見をバックグラウンドとして可能となる。したがって、本研究では、mAb を研究基盤として、これまで解析が困難であった食品成分等の天然物が有する機能性の詳細な解析を行い、標的タンパク質の同定、分子レベルでの作用機序の解明を目指す。即ち、無数に存在するタンパク質側から探索するのではなく、ターゲットとなる機能性成分を指標とした作用機構の解析を行うことを究極的な目的として設定した。さらに、本研究の基盤となる mAb の作製と、mAb を用いた各種免疫科学的分析手法の確立についても同時に検討した。

3. 研究の方法

(1) 甘草フラボノイドの抗肥満作用機序の解析

マウス胎児線維芽細胞株 3T3-L1 を用いて、脂肪細胞への分化誘導抑制能を調べた。即ち、イソブチルメチルキサンチン、インスリンおよび、デキサメタゾンを用いて 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を誘導し、その際、種々の甘草フラボノイドを用いて細胞を処理し培養を行った。その後、Oil Red O を用いて、細胞内に蓄積した中性脂肪の染色・検出を行った。また、ミカン科のキハダから単離されるベルベリンをポジティブコントロールとして用いた

(2) グリチルレチン酸 (GA) に対する mAb の作製と高感度 ELISA への応用

免疫源として GA-キャリアタンパク質（ウシ血清アルブミン（BSA）キープホルリンベットヘモシアニン（KLH））複合体を調製した。調製した免疫源を用いて、マウスに免疫感作を行った。マウス尾静脈より採血を行い、間接 ELISA にて GA に対する血清中の抗体誘導を確認した。

次にマウスから脾臓を摘出し得られた脾細胞と、マウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコール (PEG) を用いて細胞融合を行った。クローニングを経て、GA に対する mAb を産生するハイブリドーマ細胞を樹立した。

(3) 天然物特異的 mAb を用いたイースタンプロットティングの開発

TLC 上で、サンプルを展開し、加熱、加圧することでポリエーテルスルホン膜（PES 膜）へ成分を転写した。過ヨウ素酸ナトリウムで PES 膜を処理後、BSA を添加し反応させることで膜上で配糖体成分を、BSA を介して固定化した。ブロッキング後、1 次抗体、2 次抗体、基質を反応させ検出を行った。

4. 研究成果

(1) 甘草フラボノイドの抗肥満作用機序の解析

甘草は、味噌や醤油、菓子類、清涼飲料水、たばこ等の甘味料や食味を改善するための矯味剤として、主に食品加工分野において汎用されている。一方、甘草は医療用および、一般用漢方製剤の70%以上に配合されている。さらに、肝炎やアレルギーの治療薬等の医薬品原料や化粧品原料等、その用途は多岐にわたる。さらに近年、甘草のフラボノイド成分などを配合した健康食品（サプリメント）等も市場に流通している。

本研究では、甘草エキスや甘草フラボノイドの抗肥満作用の作用機序の解明を目的として、3T3-L1細胞を用いた実験系により、その作用機序に関するエビデンスを構築するために研究を行った。甘草の主要フラボノイド成分であるLiqとそのアグリコンであるリクイリチゲニン(LG)をはじめとした、種々の甘草フラボノイド成分を用いて3T3-L1細胞を処理することで、3T3-L1細胞の分化抑制能および、中性脂肪蓄積抑制作用について網羅的にスクリーニングを行った。しかしながら、3T3-L1細胞の脂肪細胞分化抑制、中性脂肪抑制作用を示す甘草フラボノイド成分を見出すことが出来なかった。申請者が所属する研究グループでは、甘草の主要成分であるGLを除去したエキスとオリジナルの甘草エキスの抗炎症作用について評価を行ったところ、GLを除去したエキスでは、オリジナルの甘草エキスと比較して、その作用が減弱するという現象を見出している。次にGL除去エキスにGLを添加したところ、抗炎症作用が回復したにも関わらず、GL単独の処理では、顕著な抗炎症作用を認めなかった。したがって、本研究においても複数成分間における相乗効果があるのではないかと考え、GLおよび、GLの生体内代謝物であるGAとの同時処理による活性の有無の検討を企画した。GLおよび、GAいずれもトリテルペノイド成分であり、細胞毒性を示す可能性が十分に考えられることから、現在、最適な処理濃度の検討を継続中である。

(2) グリチルレチン酸(GA)に対するmAbの作製と高感度ELISAへの応用

申請者が所属する研究室において、甘草の主要成分であるGLに対するmAbはすでに作製済みであり、抗GL mAbを用いたELISAによる定量分析法や、GLの糖部をモチーフとした免疫染色法であるイースタンプロットティングを確立するに至っている。GLは生体内で腸内細菌によって、その糖部が加水分解を受けGAへと代謝されることから、GLが有する種々の機能性の活性本体はGAであ

ると目されている。したがって、GAの体内挙動を精査することは、今後の研究を展開するにあたって必要不可欠であると考えられる。そこで、GAの生体内での蓄積、分布を解析するための研究基盤を構築すべく、抗GA mAbの作製に着手した。

まず、調製したGA-BSAコンジュゲートを抗原としてマウスに対して免疫感作を行ったが、GAに対する抗体誘導を認めなかった。そこで、BSAよりも分子量が大きいKLHをキャリアタンパク質として用いたGA-KLHを抗原とし、マウスに免疫感作を行ったところGAに対する抗体誘導を確認した。抗体誘導を確認したマウスの脾細胞とマウスミエロマ細胞をPEGを用いて細胞融合を行い、抗GA mAbを産生するハイブリドーマ細胞G-2A8の樹立に成功した。

次に、抗GA mAbのELISAへの応用について検討を行った。GA-ヒト血清アルブミン(HSA)を固相化抗原として、抗GA mAbとサンプル中のGAを競合反応させ、酵素標識二次抗体、基質を添加し、405 nmにおける吸光度を測定した。抗GA mAbを用いたELISAにおける定量域は3.91-125 ng/mL(8.32-265.96 nM)であった。また、GAの配糖体や、種々の構造類縁化合物に対する交差反応性を調べたところ、本mAbは特異的にGAを認識することが明らかとなった。各種バリデーション試験の結果、抗GA mAbを用いたELISAは、再現性、精度に優れた定量分析法であることを確認した。さらに、ヒト血清中におけるGAの検出においても有用な分析法であることが示唆された。本研究において確立したELISAによるGAの定量分析法は、in vivoおよび、in vitroでのGAの蓄積、分布等の挙動を探求する際の強力な分析ツールになり得ることが期待された。

(3) 天然物特異的mAbを用いたイースタンプロットティングの開発

申請者らはこれまでに甘草の主要成分であるGLと、甘草主要フラボノイドの一つであるLiqに対するmAbの作製に成功している。これらの成分は、甘草の品質管理に用いられる品質評価マーカーとして知られており、甘草の多彩な機能性を担うプロドラッグでもある。そこで本研究では、GLとLiqの視覚的な検出を可能にするイースタンプロットティングの開発に取り組んだ。

両成分をPES膜上でBSAとの複合体を形成させることで、GLとLiqの視覚的な検出が可能となりGLおよび、Liqの検出限界はともに、0.63 µgであった。また、種々の甘草エキスをイースタンプロットティングを用いて検出を行ったところ、バンドサイズや染色の強さと、GLおよびLiq含量は良好な相関性を

示した。さらに、甘草の主根部の切片表面成分を直接 PES 膜へ転写し、抗 GL および、抗 Liq mAb を用いたイースタンブロットングで検出を行った結果、両成分は、甘草の根の同一部位（髄質および、師部）に局在していることを視覚的に明らかにした。また、抗 GA mAb を一次抗体として用いたイースタンブロットングにおいても、GA の検出が可能であることを確認している（unpublished data）。

本研究で得られた成果は、目的成分に特別な化学修飾を施すことなく、生細胞や組織における遊離状態の GL、GA および、Liq の検出や定量的解析の可能性を示唆している。また、アルブミンとの複合体の状態であっても GL、GA、Liq に対する mAb を用いたイースタンブロットングでこれらの成分の検出が可能であったことから、生体内において標的タンパク質と結合状態であっても検出が可能であることが示唆された。今後、機能性成分に対する特異的な mAb を用いて、細胞、組織内に無数に存在するタンパク質側から作用機序の解析を行うのではなく、目的となる成分を目印とした作用機序解析モデルの構築を引き続き検討していく。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

Fujii S, Morinaga O, Uto T, Nomura S, Shoyama Y./Development of double eastern blotting for major licorice components, glycyrrhizin and liquiritin for chemical quality control of licorice using anti-glycyrrhizin and anti-liquiritin monoclonal antibodies. / Journal of Agricultural and Food Chemistry. /査読有 /64:1087-1093 2016.

Fujii S, Tung NH, Uto T, Tanaka H, Li XW, Cai SQ, Putalum W, Shoyama Y./ Quality control of natural products by fingerprinting of eastern blotting. / Pharmaceutica Analytica Acta, 7:494. doi: 10.4172/2153-2435.1000494. 2016.

Tung NH, Tanaka H, Tsujimura A, Miyagawa Y, Wada M, Fujii S, Uto T, Shoyama Y./In vitro fertilization with mouse sperm activated by components of licorice root extract. /Natural Products Chemistry &

Research. /査読有 /doi:10.4172/2329-6836.1000217. 2016.

Fujii S, Morinaga O, Uto T, Nomura S, Shoyama Y./ Simultaneous determination of glycyrrhizin and liquiritin in licorice roots and Kampo medicines by combination enzyme-linked immunosorbent assay using antiglycyrrhizin and anti-liquiritin monoclonal antibodies. /Journal of Immunoassay and Immunochemistry. / 査読有/28 : 1-14 2016 .

藤井 俊輔、宇都 拓洋、正山 征洋/甘草含有成分に対するモノクローナル抗体を用いた甘草の品質評価法の開発/アグリバイオ（北隆館）/4 : 72-75. 2017.

藤井 俊輔、宇都 拓洋、正山 征洋/天然物特異的モノクローナル抗体を用いた薬用植物の品質評価法～甘草をモデル植物として～/アグリバイオ（北隆館）/1 : 72-75. 2017.

Fujii S, Morinaga O, Uto T, Nomura S, Shoyama Y./Preparation of anti-glycyrrhetic acid monoclonal antibody for application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. /査読有 /51:1147-1162. 2018.

〔学会発表〕（計 3 件）

宇都 拓洋、山下 明寿、藤井 俊輔、森永 紀、正山 征洋/リクイリチン及びリクイリチゲニンのメラニン合成誘導能とその作用機序解析/第 62 回日本生薬学会/2015 年 9 月 11 日～9 月 12 日/長良川国際会議場（岐阜）

藤井 俊輔、森永 紀、野村 秀一、宇都 拓洋、正山 征洋/天然化合物に対する特異的モノクローナル抗体を用いた甘草の品質評価法の開発 ～グリチルリチンとリクイリチンをモデル化合物として～/第 14 回長崎栄養改善学会/2015 年 11 月 7 日/長崎国際大学（長崎）

藤井 俊輔、宇都 拓洋、野村 秀一、正山 征洋/グリチルレチン酸に対するモノクローナル抗体の作製と高感度 ELISA への応用/第 64 回日本生薬学会/2017 年 9 月 9 日～9 月 10 日/東邦大学習志野キ

キャンパス(千葉)

〔図書〕(計1件)

Tanaka H, Wada M, Tung NH, Fujii S, Uto T, Shoyama Y./Chapter title: In vitro fertilization activators for future. "Research of licorice in the past, present and future - Preparation of various bioactive extracts as alternative medicines" ISBN: 978-953-51-5195-1, page 107-117. InTech, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

長崎国際大学 薬学部 薬品資源学研究室
<http://niu.pharmacog.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 俊輔 (Fujii Shunsuke)

長崎国際大学・健康管理学部・助教

研究者番号: 10610165

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

正山 征洋 (Shoyama Ykihiro)

長崎国際大学・薬学部・名誉教授

研究者番号: 70037604

森永 紀 (Morinaga Osamu)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60465771

宇都 拓洋 (Uto Takuhiro)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号: 9046396