

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14943

研究課題名(和文)モノクローナル抗体を利用した香気性化合物の作用点の同定および革新的定量法の開発

研究課題名(英文)Preparation anti-fragrant compound monoclonal antibody and its application for detection of those compounds using ELISA and dot blot methods

研究代表者

小川 鶴洋(Kakuyou, OGAWA)

第一薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40781646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗ベンジルアセトンモノクローナル抗体(MAb)の作製に成功したが、このMAbを用いた競合的ELISA法では交差反応の影響で、高精度かつ高感度な分析法を開発することは適わなかった。一方、3-フェニルプロパン酸(3PPa)やtrans-ケイヒ酸(CA)の2種類のみを検出し、分子量200未満の超低分子化合物をメンブレン上で選択的に可視化することに成功した。シナニッケイの枝の切片をメンブレンに圧着して転写し、これを免疫染色(IS)した結果、樹皮周辺が染色されており、そこにCAが局在していることが明らかとなった。分子量200未満の化合物に対するISを用いた免疫組織学的手法への応用に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は分子量200未満の低分子化合物をメンブレン上で染色することに成功しており、植物組織からの転写でもこれを成功させている。このような染色法は大まかな化合物がどのような部位に局在しているかを視覚的に認識できるようにするだけでなく、染色に用いる発色剤を変えるれば、より細かな分布を顕微鏡で観察したり、どのあたりにどれだけの量が存在しているかを予想することに用いることができる。このような発見は今後植物における生合成の研究や医薬品の研究で抗体の対象となる化合物がどのあたりにいるかを顕微鏡を使って視覚的に観察でき、そのような医薬品が働いている組織から作用メカニズムの解明の一助になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Anti-benzylacetone monoclonal antibody (MAb) was successfully prepared in this study. However, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) owning high accuracy and sensitivity was not developed enough, because of the MAb's cross-activities against wide range compounds not only phenylpropanoids but also alkaloid, flavonoids and aromatic terpenes. On the other hand, only 2 compounds, 3-phenylpropanoic acid (3PPa) and trans-cinnamic acid (CA) were detected using dot blot-immunostaining method. This method using the MAb successfully visualised those small molecule compounds having molecular weight lower than 200 g/mol. In applied dot blot method, slice of Cinnamomum cassia's branch was blotted to the membrane and then immunostained. It was resulted in the bark part of the branch slice was clearly coloured, and the immunostaining was detected the localisation of CA. I have succeeded to develop a histochemical analysis against low molecule compounds using immunostaining.

研究分野：生薬学

キーワード：香気性化合物 モノクローナル抗体 免疫染色

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

香気性化合物の吸入投与により鎮静、抗鬱、抗不安や摂食促進作用が報告されてきている。特に、鎮静と摂食促進作用でポジティブコントロールとして利用されている benzylacetone (BA) は非常にシンプルな構造を持つ香気性化合物で、沈香に含まれるクロモン類が加熱により分解することで加熱香気中に出現する化合物であることが報告されている。

BA のような香気性化合物をガラスケージの中で自然蒸散させ、これを吸入投与させた際の行動を調査する方法でこれまでに研究を進めてきた。

この手法では蒸散させる化合物量はごく微量で作用を示すため、SPME-GC-MS などを用いて化合物の検出を試みたがいずれも失敗している。そのため、一定容積あたりに存在する化合物量を指標としてこれまでの研究を進めてきたが、可能であれば実際の吸入量などを定量的に測れることが望ましい。例えば、BA が摂食促進作用及び鎮静作用を示す投与量  $4.5 \times 10^{-4}$  mg/cage は  $4.5 \times 10^{-4}$  mg の BA が 61.2 L の容積に存在する状態となっており、BA が全て蒸散していると仮定しても 1 L あたりの化合物量は 7.4 ng/L であり、SPME のように空気中の分子を捕獲できる容積が小さい場合、pg オーダーか、それ未満の化合物しか捕獲できていない可能性がある。そのような微量の分子を定量するためには別の手法が求められている。

### 2. 研究の目的

液体であれば、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) のように抗体を用いた手法が非常に量の少ない、例えばピコグラムオーダーの化合物を定量的に測定できているという例もある。香気性化合物に対するモノクローナル抗体 (MAb) は少数であるが作製されており、BA に対するモノクローナル抗体も作れる可能性がある。BA は分子量 148.20 g/mol であり、この化合物は免疫原性のないハプテンであるため、HSA, KLH, OVA など分子量の大きいタンパク質いわゆるキャリアタンパク質にこれを結合させて免疫原とする必要がある。BA にはタンパク質に結合させる官能基、例えば糖鎖やカルボキシル基などがなく、容易に反応させることが困難である。そこで、BA の位にあるメチル基を水酸基に置換した 3-phenylpropanoic acid (3PPa) をハプテンすると、タンパク質上のアミノ基あるいは水酸基とのアミド/エステル結合を形成し、BA のカルボニル基からフェニル基までの構造が付加されたコンジュゲートができる。このコンジュゲートを用いて ELISA や免疫染色に用いることができるモノクローナル抗体を作製し、まず ELISA 法と免疫染色法を確立させ、それぞれの手法での抗体の認識する分子の特徴について検討した。

### 3. 研究の方法

5 mg の 3PPa を 0.5 mL のメタノールに溶解し、これに 0.5 mL の 0.1 M MES buffer と混和させ、*N*-ヒドロキスクシニミド法により 3PPa のカルボキシル基を活性させた。KLH は MES buffer に溶解させ 5 mg/mL の溶液とした。KLH 溶液、HSA 溶液または OVA 溶液と 3PPa 溶液を 1:1 で混和し、室温で 15 時間攪拌しながら反応させた。反応溶液は透析膜を用いて約 4 °C で 2 日間に亘って透析した。透析後の溶液を凍結乾燥させ、3PPa-KLH、3PPa-HSA ならびに 3PPa-OVA を得た。

3PPa-HSA 複合体のハプテン結合数は MALDI-TOF mass spectrometer を用いて決定した。3PPa-HSA 複合体を蒸留水に溶かし段階希釈して少量 (1-10 pmol) の複合体溶液を調製し、これをマトリックス溶液 (1000 倍モル過剰量のシナピン酸を溶かした 30% (v/v) acetonitrile および 0.1% trifluoroacetic acid を含んだ水溶液) と混ぜ合わせた。この混合溶液を MTP 384 ground steel target plate (Bruker Daltonics) 上にスポットした。その後、混合溶液を完全に風乾させ、プ

レートに窒素レーザー (337 nm, 200 Hz の最大発射周期) の照射で MALDI-TOF-MS での測定を実施した。スペクトルは flexControl (Bruker Daltonics) を用いて解析した。

動物実験は第一薬科大学動物実験委員会の指導(実験に対する認可番号は 18007 であった)に基づき計画・実行した。6 週齢雌性 Balb/c マウスは日本 SLC より購入し、ケージに入れ環境温度  $25 \pm 2$ 、明暗周期 12 時間の環境で飼育した。マウスは飼料および水を自由に得ることができるようにした。

免疫惹起は 2 週間の間隔で実施した。初回投与では、Balb/c 雌性マウスに PBS に懸濁させた 50  $\mu$ g の 3PPa-KLH と同容積の Freund ' s complete adjuvant を混和して腹腔内に投与した。2 回目は PBS に懸濁させた 50  $\mu$ g の 3PPa-KLH と同容積の Freund ' s incomplete adjuvant を混和して腹腔内に投与した。3 回目以降は 100  $\mu$ g の PBS に懸濁させた 3PPa-KLH を腹腔内に投与した。3 回目の免疫惹起以降、マウスの尾静脈より採血して血清を得て、抗 3PPa 抗体の産生を確認した。最終免疫である 8 回目の 3PPa-KLH 腹腔内投与から三日後に、マウスを頸椎脱臼させて脾臓を摘出して脾臓細胞を採取し、これを hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 感受性ミエローマ細胞 SP2/0 株とポリエチレングリコール法で細胞融合させた。融合細胞は aminopterin, hypoxanthine, および thymidine を含んだ eRDF 培地 (HAT-eRDF) で選抜を行い、3PPa-HSA に反応する抗体を産生するハイブリドーマ IXF1 株を得た。さらに限界希釈法を 2 回実施することにより IXF1 株から単一クローンである IXF1-A7Bf12 を得た。IXF1-A7Bf12 株は 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 環境下で 10% ウシ胎児血清 (FBS) を用いた eRDF 培地中で培養した。ハイブリドーマは段階的に 5% ウシ胎児血清含有 eRDF とし、最終的に RD-1 添加剤 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd) を加えた eRDF で 2 週間培養し、MAb 含有無血清培養上清を得た。

得られた MAb は Protein G Sepharose 4 Fast Flow カラム (GE Healthcare) を用いて精製した。800 mL の immunoglobulin G (IgG) を含む培養上清を 3000 rpm で 15 分間遠沈させ、その上清をグラスファイバープレフィルター (2  $\mu$ m pore) およびポリエーテルスルホン膜フィルター (0.22  $\mu$ m pore) でろ過した。この培養上清を 4 °C 条件下で 1 晩かけてペリスタポンプを用いてカラムを通過させ、その後 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。吸着させた IgG を 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 2.7) で溶出し、IgG 含有画分に Tris-HCl (pH 9.0) 緩衝液を加えて中性化した。その後、透析 2 日間実施し、これを凍結乾燥させ 72.2 mg の抗体含有画分を得た。

得られた MAb の純度はサンドイッチ ELISA 法で以下のように算出した。抗マウス IgG 抗体 (H+L ヤギ由来; MP Biochemicals) を炭酸緩衝液で 1000 倍希釈し、100  $\mu$ L/well で 1 時間処理した。その後、5% スキムミルク PBS 300  $\mu$ L/well で 1 時間処理した。次に、T-PBS に溶解させた pure マウス IgG を標準物質として 100 ng/mL から段階希釈し、検量線を作成した。同時に 5 mg/mL の抗 3PPa MAb を 100  $\mu$ g/mL に希釈しこれを段階希釈して 100  $\mu$ L/well で 1 時間処理した。その後、1000 倍希釈したシロツメクサペルオキシダーゼ結合型抗マウス IgG (Fc) (goat) で 1 時間処理し、T-PBS で洗浄後 100  $\mu$ L の基質 (ABTS) 溶液を加え、15 分間放置した。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて主波長 405 nm, 副波長 492 nm で測定した。純度は検量域にはいった吸光度を示す希釈倍率の結果の平均をとり、平均値を検量線に代入して各希釈液に含まれた MAb の量を算出した。これに希釈倍率を乗じて 5 mg/mL MAb 溶液中の IgG 濃度を算出し、これに 100 を乗じ、5 mg で除して純度を算出した。

固相化抗原である 3PPa-HSA および HSA, BSA, MSA, KLH, OVA, 3PPa-OVA に対する得られた MAb の反応性を直接 ELISA 法で確認した。前述の固相化抗原を 1000 倍希釈したものを 100  $\mu$ L/well で入れ、1 時間処理した。その後、5% skim milk PBS で 1 時間ブロッキングし、T-PBS で洗浄した。18  $\mu$ g/mL から 10% DMSO-PBS で段階希釈した MAb 溶液を 100  $\mu$ L/well で入れ 1 時間処理

した。その後、Can Get Signal Solution 2 (Toyobo)で 5000 倍希釈したシロツメクサペルオキシダーゼ結合型抗マウス IgG (Fc) (goat)で 1 時間処理した。3 回の洗浄の後、TMB 溶液を 100  $\mu$ L 加え、5 分の反応の後、50 M 硫酸溶液を加え、反応を停止させた。その後、主波長 450 nm, 副波長 630 nm で吸光度を測定した。

競合 ELISA 法による分析は以下の通り実施した。50 mM 炭酸緩衝液中に溶解した 3PPa-OVA(100  $\mu$ L, 1  $\mu$ g/mL)を 96 ウェルプレートに吸着させ、1 時間放置した。その後 T-PBS で洗浄し、300  $\mu$ L の 5%スキムミルク PBS 溶液でブロッキングを実施した。T-PBS で 3 回洗浄した後、50  $\mu$ L の 10% DMSO-PBS に溶解させた様々な濃度のフェニルプロパノイドや低分子化合物を加え、同様に 10%DMSO-PBS に溶解させた MAb 溶液 (0.6  $\mu$ g /mL)を 50  $\mu$ L 加え、一晩 4 °C 条件で放置した。反応条件による差の検討においては室温で 1 時間放置した。これ以後の操作は直接 ELISA 法と同様に実施した。BA に関連した、あるいはその他の化合物の溶液は 10% DMSO-PBS で調製した。得られた MAb のフェニルプロパノイドやその他の化合物に対する交差反応性は Weiler and Zenk の式に基づき算出した。

Dot blot 法は以下の通り実施した。標準化合物は基本的にメタノールに溶解させ 10 mM の溶液とした。L-Tyr のみ 0.1% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を用いて同様に溶解した。調製した溶液 2  $\mu$ L をポリエーテルスルホン (PES) 膜上にスポットし、風乾させた。風乾させた PES 膜はトレーに入れ、2% EDC および 1% NHS を含んだ 0.1 M MES buffer で浸し、1 時間室温で放置した。1 時間後、溶液を捨て 1% BSA-PBS 溶液を加えて室温で振盪しながら 3 h 放置した。その後、メンブレンは PBS で洗浄し、ブロッキングのため、5%スキムミルク PBS 溶液に浸し、一晩振盪しながら室温で放置した。メンブレンを PBS で洗浄し、1 次抗体として T-PBS または PBS に溶解させた得られた MAb (2.3  $\mu$ g/mL)と 3 時間振盪しながら反応させた。反応の後、MAb 溶液を除き、2 回 T-PBS で洗浄した後、T-PBS で 500 倍希釈した 2 次抗体 (anti-mouse IgG (H+L), goat)を加え 1 時間振盪しながら反応させた。2 次抗体溶液を除き、T-PBS で 2 回、PBS で 1 回洗浄して、10 mg/mL 4-chloro-1-naphthol (4C1N)のメタノール溶液を 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS に 1:10 で混ぜた反応溶液に浸し、室温で 20 分間反応させた。蒸留水で洗うことにより反応を止め、免疫染色したメンブレンを乾燥させ、その後直ちに写真をとるかスキャナで画像として保存した。

#### 4 . 研究成果

HSA, KLH, OVA と 3PPa(1:1, w/w)とのハプテン-キャリアタンパク複合体反応の結果、3PPa-HSA 複合体は 4.0 mg, 3PPa-KLH 複合体は 2.8 mg, 3PPa-OVA 複合体 5.5 mg が得られた。

キャリアタンパクに結合したハプテン数を決定するため、3PPa-HSA 複合体を MALDI-TOF-MS で計測したところ、3PPa-HSA 複合体の分子量は 68211.9 m/z であり、調製に使った HSA の分子量は 66625.1 m/z であった。これらの分子量の差は 1586.8 であり、3PPa の分子量(150.18 g/mol)から結合により除された水分子の分子量(18.02 g/mol)の差でこれを除すると、12.0 となるので、1 モル HSA には 12 モルの 3PPa が結合していると決定された。これまでの研究で crocin に関しては 3 個のハプテンが結合している免疫原で免疫感作が成功している例もあり、今回作成した 3PPa のコンジュゲートを用いて免疫感作を実施することが可能と考えられる。

3PPa-KLH で免疫処置を施した Balb/c マウスから脾臓細胞を採取し、これらを SP2/0 ミエローマ細胞と融合させ、培養および選別を繰り返し 1 種のハイブリドーマ IXF1-A7Bf12 株を得た。IXF1-A7Bf12 株を培養し、無血清培地を 400 mL 得た。この無血清培地 400 mL から Protein G を用いたアフィニティカラムで抗体を抽出し、72.2 mg の MAb 含有画分が得られた。得られた MAb の型は Antibody Isotyping Kit (Mouse)を用いて調査した。調査の結果、MAb は 型の軽鎖を持つ IgG1 サブクラスの抗体であることが明らかとなった。

精製抗体の純度を決定するため、マウス IgG に対するサンドイッチ ELISA 法を用いて抽出した抗体中の IgG 含量を測定した。その結果、精製抗体中の IgG 含量は  $9.16 \pm 0.28\%$  であった。次に、3PPa 複合体やキャリアタンパクなどに対する抗体の反応性を抗体濃度を変えて実施した直接 ELISA 法で分析した。その結果、 $2.29 \mu\text{g/mL}$  ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) 以上の濃度では吸光度がいずれのキャリアタンパク質でも上昇することが確認された。また、MSA は他のキャリアタンパク質と比較して約 10 倍高い吸光度を示した。3PPa-HSA および 3PPa-OVA はいずれも  $0.14 \mu\text{g/mL}$  以上で吸光度の上昇がみられた。3PPa-HSA ではより低い抗体量での反応においても 3PPa-OVA の約 2 倍の吸光度を示していた。そのため、ELISA における固相化抗原としては 3PPa-OVA が適切であると考えられる。3PPa-OVA を固相化抗原とした際に 1.0 の吸光度を示す抗体濃度は  $0.69 \mu\text{g/mL}$  であったが、基質との反応が早く、適切に分析ができなかったため、0.5 程度の吸光度を示す  $0.5 \mu\text{g/mL}$  を競合的 ELISA 法で利用した。

BA はケトン基及びフェニル基を有する単純な化合物で、官能基が僅かにことなる *trans*-cinnamaldehyde (CA) や benzalacetone (BzA) など構造の類似した化合物が多く存在する。このような化合物間では交差反応性が観察される可能性があるため、今回得られた MAb がどのような構造を認識するかを既報の手法を用いて検討した。MAb の交差反応性は競合的 ELISA で調査し、Weiler と Zenk の手法を用いて算出した。当初の検出目標である BA の反応性を 100% としたところ、MAb は BzA, CA, *trans*-cinnamyl alcohol, *N*-benzylacetamide に対してそれぞれ BA より 9.91 倍, 1.16 倍, 31.72 倍, 5.44 倍高い反応性を示した。また、3-phenylpropanal, *trans*-cinnamic acid (CA), 2-phenylethylamine など BA と比較的近い反応性を示した。また、フラボノイドの quercetin にも BA の 2.8 倍高い反応性を示し、他に berberine, thymol のようなベンゼン環構造を有する化合物を広く認識している可能性が示唆された。以上の結果より、3PPa-KLH を免疫原として目標である抗 BA-MAb を得ることに成功した。

Dot blot 法を用いた PES 膜上での化合物の染色では、3PPa および CA が強く染色され、カルボキシル基を持たない化合物や、Tyr, Phe のようなアミノ酸、また脂肪族鎖長の短い benzoic acid は染色できなかった。また、3PPa-HSA および 3PPa-OVA は染色されたが、キャリアタンパク質のみでは染色されなかった。1 次抗体である抗 benzalacetone-MAb を希釈する際に T-PBS を用いると弱く染色され、PBS で希釈した場合は強く染色することができた。段階希釈をした 3PPa 及び CA を dot blot 法で免疫染色したところ、濃度依存的にスポットの染色強度が異なることが観察された。3PPa は  $6.25 \times 10^{-1}$ -20 mM、CA は 2.5-20 mM で目視により観察できる染色が観察された。本研究と同様に 4C1N を用いたこれまでの報告の中で最小の分子は aristolochic acid II (m.w. 311.25 g/mol) であった。CA (m.w. 148.16 g/mol) は aristolochic acid II の半分以下の分子量であり、同一色素を用いた染色を実施した化合物の中では最も低分子量の化合物を染色したと考えられる。また、D-Ala は組織切片の染色であったが、PES 膜のようなメンブレンに転写しての染色では CA が最小の分子であると考えられる。また、段階希釈によりスポットの色調が変化することから、今後は化学発光法を用いた半定量的分析への応用も検討していく。免疫染色の応用として、第一薬科大学薬用植物園で栽培している *Cinnamomum cassia* (Lauraceae) の枝を垂直、および水平方向に切り、これを PES 膜上に圧着させ、転写したのちに免疫染色法を行った。その結果、垂直方向に切ったものでは一部が僅かに染色されたが、水平方向に切ったものは樹皮が染色されていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 鶴洋
2. 発表標題 抗香気性化合物(benzylacetone)モノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森永 紀  (Morinaga Osamu)	第一薬科大学薬学部・和漢薬物学分野・教授	モノクローナル抗体作製に関する指導
研究協力者	田中 宏幸  (Tanaka Hiroyuki)	山口東京理科大学・生薬学・漢方分野・教授	MALDI-TOF-MSによる質量分析における協力
研究協力者	森元 聡  (Morimoto Satoshi)	九州大学大学院薬学研究院・生薬学分野・教授	MALDI-TOF-MSによる質量分析における協力

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------