

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500754

研究課題名（和文） 大豆由来の新規食素材の生体利用性評価に関する研究

研究課題名（英文） Bioavailability evaluation on a new food component from soybeans

研究代表者

矢野 友啓（YANO TOMOHIRO）

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50239828

研究成果の概要（和文）：大豆由来の主要な抗がん成分である Bowman-birk protease inhibitor (BBI) の生体内動態の解析を可能にするために、新たに BBI を選択的に定量するために新規 ELISA 法を構築することを目的にした。新たに作成した BBI のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いて、ELISA の検出感度を上げるために、いろいろな条件検討を行い、最終的に血清存在下での検出感度が、他の市販のタンパクの定量検出感度と同等か、それ以上の感度が得られ、BBI の生体内動態の解析が可能になった。

研究成果の概要（英文）：In order to evaluate bioavailability of Bowman-birk protease inhibitor (BBI), a major anticancer agent involved in soybeans, we tried to establish a new ELISA system which can selectively BBI level *in vivo* with a high sensitivity. We established a new ELISA system for BBI detection, using monoclonal and polyclonal antibodies towards BBI. To improve detection sensitivity in the system, we changed several points in the system such as determination of blocking agent. As a result, the system had equal or higher detection sensitivity compared to other established protein detection ELISA systems, indicating that this system could detect BBI level *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：大豆由来成分、BBI、生体利用性、ELISA法

1. 研究開始当初の背景

BBI とは、分子量 8 kDa のタンパク質で、大豆ホエータンパク中に存在する。強いがん抑制作用があることが報告されて以来、そのがん予防作用について精力的に研究され、毒性がほとんど認められないことから、臨床応用が可能ながん予防成分として期待されている物質である。しかし、体内動態が殆んど明らかにされていない。

2. 研究の目的

BBI の体内動態を明らかにするための有効な方法として、BBI を定量できる ELISA 法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ELISA による BBI タンパクの定量

次の方法で捕獲抗体を作った。PBS を 5.397ml 取り、MOUSE 抗 BBI モノクローナル抗体 (2.6 mg/ml) を 63 μ l 入れて 30 μ g/ml を作った。PBS を 3.2ml 取り 30 μ g/ml を 1.6ml 入れて 10 μ g/ml を作った。PBS を 2.4ml 取り 10 μ g/ml を 1.2ml 入れて 3 μ g/ml を作った。4, 5 列に 30 μ g/ml, 6, 7 列に 10 μ g/ml, 8, 9 列に 3 μ g/ml を各 well に 100 μ l 入れ、1 日静置した。TBS-T を各 well に 200 μ l 入れて 1 回洗浄し、1%ゼラチンを各 well に 150 μ l 入れてブロッキングし、室温で 1 時間以上静置した。TBS-T を各 well に 200 μ l 入れて 2 回洗浄し、次の方法で抗原 (Fuji-BBI) を作った。PBS を 20ml 取り 10%BSA を 200 μ l 入れて、0.1%BSA を作った。0.1%BSA を 3.15ml 取り 10pmol/100 μ l を 350 μ l 入れて 1pmol/100 μ l を作った。0.1%BSA を 2.16ml 取り 1 pmol/100 μ l を 1ml 入れて 0.3pmol/100 μ l を作った。0.1%BSA を 2.16ml 取り 0.3pmol/100 μ l を 1ml 入れて 0.1pmol/100 μ l を作った。0.1%BSA を 2.16ml 取り 0.1pmol/100 μ l を

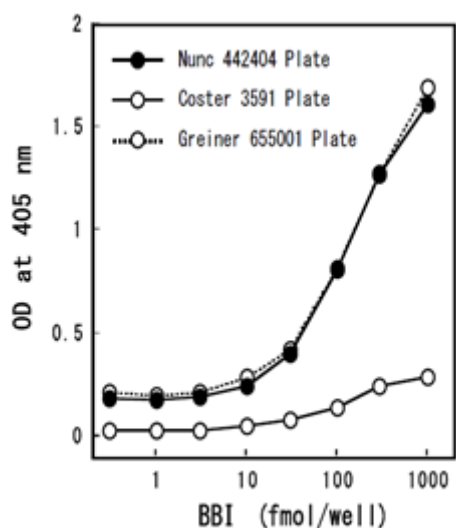
1ml 入れて 0.03pmol/100 μ l を作った。0.1%BSA を 2.16ml 取り 0.03pmol/100 μ l を 1ml 入れて 0.01pmol/100 μ l を作った。0.1%BSA を 2.16ml 取り 0.01pmol/100 μ l を 1ml 入れて 0.003pmol/100 μ l を作った。0.1%BSA を 2.16ml 取り 0.003pmol/100 μ l を 1ml 入れて 0.001pmol/100 μ l を作った。1 ~ 0.001pmol/well を横 1 列に 100 μ l 入れた。0 は 0.1%BSA を 100 μ l 入れ、37°C で 1 時間以上静置し、TBS-T を各 well に 200 μ l 入れて 4 回洗浄した。1%ゼラチンを 4ml 取って 36ml の PBS で薄めて、0.1%ゼラチンを作った。0.1%ゼラチンで抗 BBI ウサギ血清 (1 次抗体) を 2500 倍に希釈した溶液を、各 well に 100 \cdot 1 ずつ入れ、37°C で 1 時間以上静置し、TBS-T を各 well に 200 \cdot 1 入れて 4 回洗浄した。0.1%ゼラチンで抗ウサギ IgG-AP (2 次抗体) を 300 倍に希釈した溶液を、各 well に 100 \cdot 1 入れ、37°C で 30 分以上静置し、TBS-T を各 well に 200 \cdot 1 入れ、4 回洗浄した。各 well に 50 \cdot 1 ずつ発色基質液 (Atto Phos) を添加した。その後、プレートリーダーで蛍光強度 (ex: 435 nm, em: 555 nm) を測定した。

(2) プレートの検討

上記の方法で Nunc MaxiSorp 442404, Greiner High binding, Coster 3591 の 3 種類のプレートを使用し、検討を行った。Nunc 製のプレートの方が Greiner 製よりバックグラウンドが低く、検出限界値が 10fmol/well であった。

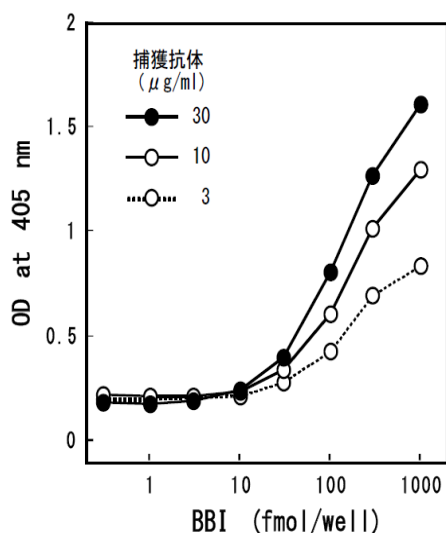
ゼラチン 20ml に抗 BBI ウサギ血清 (1 次抗体) を 8 μ l 入れて 2500 倍希釈したものを、各 well に 100 μ l 入れ、37°C で 1 時間以上静置し、TBS-T を各 well に 200 μ l 入れて 4 回洗浄した。0.1%ゼラチン 20ml に抗ウサギ IgG-AP (2 次抗体) を 67 μ l 入れて 300 倍希釈

したものを、各 well に 100 μ l 入れ、37°C で 30 分以上静置し、TBS-T を各 well に 200 μ l 入れて 4 回洗浄した。各 well に 50 μ l ずつ発色基質を入れた。



(3) 捕獲抗体の検討

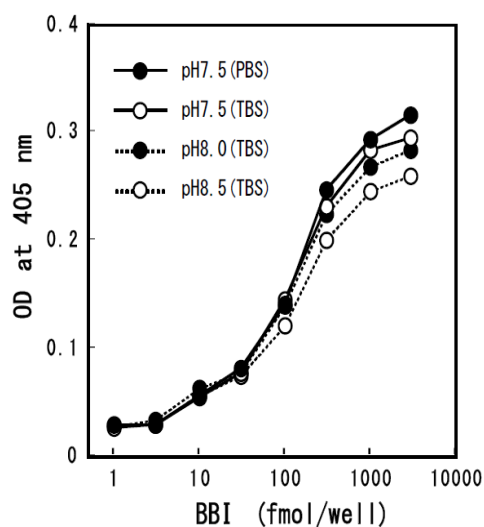
上記の方法で 30 μ g/ml, 10 μ g/ml, 3 μ g/ml の 3 種類の捕獲抗体の濃度を使用し、検討を行った。3 つともバックグラウンドはあまり変わらないが、30 μ g/ml が高濃度領域で測ることが出来、検出感度が高くなる。



(4) 捕捉抗体の結合条件の検討

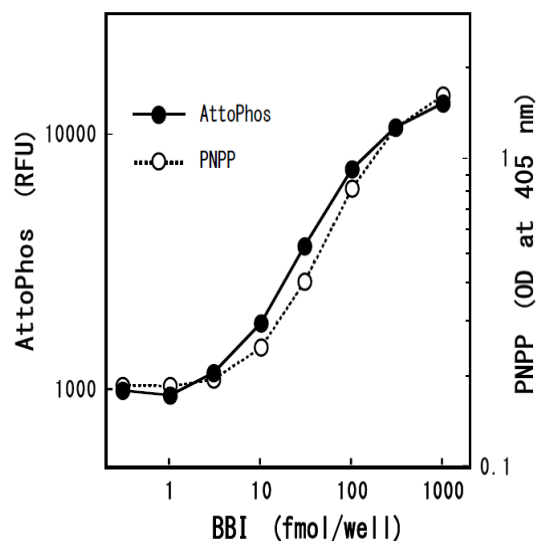
上記の方法で pH7.5(PBS), pH7.5(TBS),

pH8.0(TBS), pH8.5(TBS) の 4 種類で行った。4 つともあまり変わらないが、アルカリ性になると吸光度の増加が少なくなった。アルカリにすることによって抗体が変性している可能性がある。中性に近い pH7.5(PBS) で実験を進めて行くことにした。



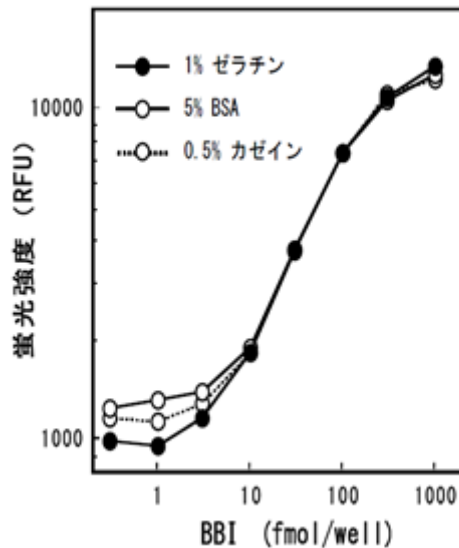
(5) 発色基質の検討

上記の方法で AttoPhos, PNPP の 2 種類で行った。PNPP の検出限界値が 10 fmol/well に対し AttoPhos は 3 fmol/well である。



(6) ブロッキング液の検討

上記の方法で1%ゼラチン, 5%BSA, カゼインの3種類で行った. 1%ゼラチンがバックグラウンドが低く高感度検出に適している.



4. 研究成果

ELISA 法の条件検討の結果から、プレートは Nunc MaxiSorp 442404, 捕獲抗体濃度は $30 \mu\text{g/ml}$, 捕捉抗体の結合条件は pH7.5 (PBS), 発色基質は AttoPhos, ブロッキング液は 1%ゼラチンが最適であり, 3 fmol/well (0.24ng/ml) が検出限界値であった. 今回使用した BBI より少し大きくて分子量 20KDa のリゾチームの体内動態を調べた例がある. リゾチームは 1.7ng/ml の血中濃度になることが報告されている. BBI の検出限界値が 0.24ng/ml なので, 十分測定に耐えられると考えられる. また, 他のサイトカインのような代表的な ELISA 法と比べても検出感度に大きな差異はないので, この構築した ELISA 法で BBI の生体内動態の解析は可能と考えられる.

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 3 件)

①Sato A, Sekine M, Virgona N, Ota M, Yano T. Yes is a central mediator of cell growth in malignant mesothelioma cells. *Oncol Rep.* 2012, 28, 1889-1893. 査読有
doi:10.3892/or.2012.2010.

②矢野友啓, 大豆由来の Bowman-birk protease inhibitor (BBI) の抗がん作用について, イルシー, 査読無, 2011, 104, 17-21.

③Kashiwagi K, Virgona N, Yamada J, Sato A, Ota M, Yazawa T, Yano T. Bowman-Birk protease inhibitor from soybeans enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human mesothelioma cells. *Exp Ther Med.* 2011, 2, 719-724. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①佐藤綾美、矢野善久、矢野友啓、キモトリプシン阻害活性を指標とする大豆食品中の BBI の定量, 2012 食品分析研究会, 2012.9.5, 東洋大学白山キャンパス (東京)

②矢野友啓、佐藤綾美、関根美季、太田昌子、Bowman-birk protease inhibitor による中皮腫の持つシスプラチン耐性改善効果, 第 132 回日本薬学会, 2012.3.29, 北海道大学 (札幌)

③柏木維人、矢野友啓、BBI による中皮腫の薬剤耐性改善作用, 第 69 回日本癌学会総会, 2010.9.23, 大阪国際会議場 (大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.toyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 友啓 (YANO TOMOHIRO)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50239828

(2) 研究分担者

矢野 善久 (YANO YOSHIHISA)

京都学園大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：20230287

(3) 連携研究者 (0)