

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871011

研究課題名(和文)天然化合物特異的モノクローナル抗体による生薬成分の標的分子解明

研究課題名(英文) Identification of direct target molecules of bioactive natural compounds using monoclonal antibodies against natural compounds

研究代表者

宇都 拓洋 (UTO, Takuhiro)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：90469396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：天然化合物特異的モノクローナル抗体をツールとして、生薬成分の細胞内への取り込みや局在、そして標的分子に至るまでの生薬成分の全体挙動解明を目的とした。1) バイカレインの持つ癌細胞増殖抑制能及び抗炎症能に注目し、バイカレインがオルガネラ中の約70kDaのタンパク質と結合していることを明らかにした。2) リクイリチン及びリクイリチゲニンが35-38kDaのタンパク質と結合しメラニン合成を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the series of behaviors of natural compounds in herbal medicines, such as accumulation, cellular localization, and binding to target molecules, using monoclonal antibodies against bioactive natural compounds. 1) Baicalein exerts anti-proliferation and anti-inflammatory activities by binding to a protein of approximately 70kDa in organelles. 2) Liquiritin and liquiritigenin activate melanin synthesis by binding to a 35-38kDa protein. These approaches may make it possible to determine the detailed mechanism of the action of bioactive natural compounds in herbal medicines.

研究分野：生薬学、天然物化学

キーワード：生薬成分 標的分子 モノクローナル抗体 オウゴン バイカレイン 甘草 リクイリチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年の予防医学や健康志向への関心の高まりから、生薬や機能性食品の需要が高まり、それに伴い活性成分の単離同定や天然化合物の多彩な機能解析研究が盛んに行われている。これまで申請者は天然化合物の機能解析を分子レベルで行っており、主にアジア諸国の生薬や食品成分を中心に、抗炎症・抗癌機能をマクロファージや癌細胞を用いて調べ、それらの成分が炎症マーカーを抑制することや、癌細胞内で活性酸素の制御やアポトーシスを引き起こすことを報告してきた。

近年の分子生物学的手法の発達や、種々のモデルマウスなどの利用、さらにケミカルバイオロジーの導入によって、生薬成分の作用機構や標的分子に関する研究報告は著しいが、一般に生薬含有成分の作用機序は、作用ポイントが単一でなくブロードであることや、いくつかの成分が相乗的に作用しあって一つの大きな効果を発揮している場合も考えられるため、天然化合物の細胞や組織内の全体挙動解析は困難を極めるケースが多く、未だ不明な点も多い。複雑な構造を有する天然有機化合物は、合成化合物と同様な解析を行っても結果が明瞭でない場合もあり、さらに代謝における構造変化や複数の標的分子を持つことを考慮した解析法が求められる場合がある。そこで本研究は、活性天然物に対する特異的モノクローナル抗体 (MAb) を利用することで、天然化合物機能解析における新たなモデル研究を提案できると考え研究に着手した。

## 2. 研究の目的

申請者が所属する正山研究室は、これまでに約 30 種類の活性天然物に対する特異的 MAb の作製に成功しており、それらを用いたアッセイ系の開発を中心に研究を行ってきた。申請者は、これら抗天然化合物特異的 MAb をツールとして、高感度 ELISA やドットプロットによる生薬成分定量法の開発、免疫染色による植物組織中の活性成分局在分布解明、主有効成分のみをアフィニティークラムで除去し、主要成分除去エキスをを用いた生薬成分の相乗効果解明を行ってきた。

本研究は、我々が確立した抗天然化合物特異的 MAb と分子生物学的手法をツールとし細胞内での生薬成分の全体挙動と真の作用ポイント解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) バイカレインの細胞内局在と標的分子同定

マウスマクロファージ様細胞 RAW264 及びヒト肝癌細胞 HepG2 を主に用いた。プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及び一酸化窒素 (NO) は ELISA 及び Greiss 法で測定した。細胞増殖抑制能は MTT 法を用いた。各種タンパク質の発現はそれぞれの特異的抗体を用いて Western Blotting 法 (WB) で検出し

た。細胞内バイカリン (BI) 及びバイカレイン (BE) の測定は、細胞回収後、抗 BI/BE-MAb を用いた ELISA で測定した。BE 結合タンパク質は、抗 BI/BE-MAb を一次抗体として WB で検出した。細胞分画は、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit を用いて調整した。細胞免疫染色 (ICC) は、BI 及び BE 処理細胞をチェンバースライドで培養後固定し、抗 BI/BE-MAb 及び Alexa488 標識二次抗体で処理し、核を DAPI で染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) リクイリチン (LQ) 及びリクイリチゲニン (LQG) の標的分子同定

マウスメラノーマ細胞 (B16-F1、B16-4A5) 及びヒトメラノーマ細胞 (HMV-II) を主に用いた。LQ または LQG で各細胞を 3 日間処理後、1N 水酸化ナトリウム溶液でメラニンを溶解し、415 nm の吸光度を測定することで細胞内メラニン量を評価した。チロシナーゼ活性は、L-ドパを基質としてドパクロム産生量を測定することで評価した。各種タンパク質の発現はそれぞれの特異的抗体を用いて WB で検出した。LQ 及び LQG 特異的 MAb の作製は、LQ-KLH コンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫することでハイブリドーマを樹立し、抗 LQ/LQG-MAb の作製に成功した。細胞内 LQ 及び LQG の測定と LQ 結合タンパク質の解析は、上述の BE 解析と同様に行った。

## 4. 研究成果

(1) バイカレインの細胞内局在と標的分子同定

オウゴン (黄芩) は漢方方剤の構成生薬のうちでも極めて重要な生薬の一つで、日本薬局方でシソ科のコガネバナの周皮を除いた根と規定されている。オウゴンは抗炎症、抗アレルギー、利尿作用など多くの薬効が認められており、その主薬効成分はフラボン誘導体のバイカリン (BI) 及びバイカレイン (BE) である。リポポリサッカライド (LPS) 刺激した RAW264 において、BE は BI より強い PGE<sub>2</sub> 及び NO 産生抑制能を示した。また、ヒト肝癌及び大腸癌などの各種癌細胞株において、BE は BI より強い癌細胞増殖抑制能を示した。さらに HepG2 を用いて分子機構を解析したところ、BE は p53 及び p21 の発現や Caspase-3 活性化を誘導したが、BI はこれらの現象を引き起こさなかった。申請者の研究室ではすでに BI 及び BE に対する特異的 MAb (抗 BI/BE-MAb) をすでに作製済みである (引用文献)。BE の抗炎症及び癌細胞増殖抑制能の作用機序解明のため、RAW264 及び HepG2 への BI 及び BE の蓄積量を抗 BI/BE-MAb ELISA で測定したところ、BI は細胞内に取り込まれにくい、BE は時間依存的に細胞内に取り込まれ、RAW264 では 6 時間、HepG2 では 2 時間で

最大濃度に達した。さらに、抗 BI/BE-MAb を用いた ICC により BE の細胞内局在を確認したところ、HepG2 において BE は細胞質内のオルガネラに局在することが示唆された ( 図 1 )

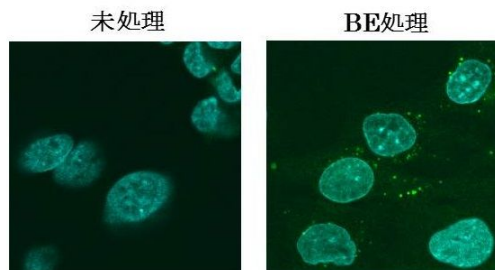


図 1 HepG2 における BE の細胞内局在

BE の標的分子同定を目的として、抗 BI/BE-MAb を一次抗体とした WB により、BE 処理した RAW264 及び HepG2 のセルライゼートの解析を行った。両細胞株の BE 処理細胞由来のセルライゼートにおいて約 70kDa の BE 結合タンパク質が検出された。さらに、BE 処理細胞から調整した細胞画分を用いた WB から、BE 結合タンパク質は主に膜/オルガネラ画分に局在していることが分かり、この結果は抗 BI/BE-MAb による ICC の結果と一致した ( 図 2 )。一方、BI 処理したセルライゼート及び細胞画分では、抗 BI/BE-MAb の結合タンパク質は検出されなかった。これらの結果から、BE は膜/オルガネラ画分に局在する約 70kDa のタンパク質 ( BE 標的タンパク質 ) と特異的に結合していることが示唆された。さらに我々は BE 標的タンパク質を同定するために、BE 結合セファロースを作製し、HepG2 由来セルライゼートとインキュベート後、プルダウン法により BE 結合タンパク質の回収し、電気泳動により分離することで BE 標的タンパク質の単離を試みた。しかしながら、CBB 染色の結果、約 70kDa にバンドは検出されなかったことから、in vitro 条件下では BE は BE 標的タンパク質に結合しないことが示唆された。

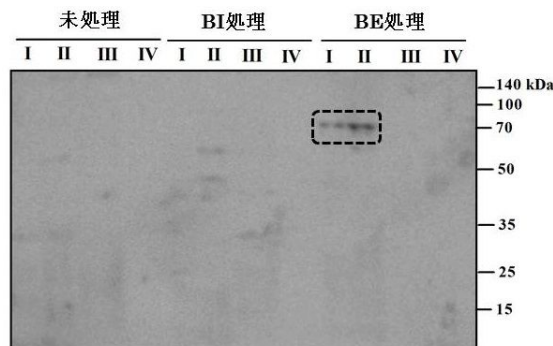


図 2 抗 BI/BE-MAb を用いた WB による BE 結合タンパク質の検出

( BI もしくは BE 処理した HepG2 由来細胞画分、I : 細胞質画分、II : 膜/オルガネラ画分、III : 核画分、IV : 細胞骨格画分 )

## ( 2 ) リクイリチン及びリクイリチゲニンの標的分子同定

甘草は全漢方処方約 7 割に配合される重要な生薬で、抗炎症、抗アレルギー、抗潰瘍など多くの薬効が知られている。また甘草は、味噌や醤油などに甘味料と用いられる他、健康食品にも利用されている。さらに最近、甘草エキスや甘草フラボノイドが配合されている化粧品、育毛剤、染毛剤などが多く市販され、甘草の持つ美容効果への関心が高まっており、甘草エキス成分の機能解析や作用機序に関する科学的エビデンスが求められている。申請者は、代表的な甘草フラボノイドであるリクイリチン ( LQ ) とそのアグリコンであるリクイリチゲニン ( LQG ) が、B16メラノーマ細胞においてメラニン合成誘導活性を持つことを見出した。そこで、LQ 及び LQG の作用機序解析とともに、細胞内挙動と標的分子の解析を行った。

LQ 及び LQG は、マウスメラノーマ細胞 ( B16-F1、B16-4A5 ) 及びヒトメラノーマ細胞 ( HMV-II ) においてメラニン合成を促進し、その効果は LQ より LQG が強かった。また、LQ 及び LQG はチロシナーゼ酵素活性に直接的に影響せず、Tyr、TRP-1、TRP-2 の発現を高めることでメラニン合成を促進していることが明らかになった。さらに転写因子・シグナル伝達系の解析や各種阻害剤による解析結果をまとめると、LQ と LQG は p38 及び PKA 活性化を引き起こし、CREB のリン酸化誘導を介する経路もしくは直接的に MITF の発現を誘導することで、Tyr、TRP-1、TRP-2 の発現を高めてメラニン合成を促進していることが示唆された。

さらに、LQ 及び LQG の細胞内での挙動・分布、標的分子の同定を目標として、特異的 MAb の作製を行った。LQ-KLH コンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫することでハイブリドーマを樹立し、抗 LQ/LQG-MAb の作製に成功した。本 MAb は、LQ と LQG に加えて Hesperetin と Naringenin に対して交差反応は示すが、その他の Flavone 類及び構造類似化合物に対しては交差反応を示さないことから、LQ 及び LQG の作用機序解析に有用なツールになりうる可能性が示唆された。抗 LQ/LQG-MAb を用いた競合的 ELISA を用いて、LQ 及び LQG 処理した B16-F1 細胞由来セルライゼート中の LQ 及び LQG 量を測定したが、LQ 及び LQG はほとんど検出されなかった。この結果は、セルライゼート中の LQ 及び LQG 量が ELISA の感度の 0.39 ~ 25 µg/mL ( 0.93 ~ 59.75 µM ) 以下であるため検出できなかったと考えられ、LQ 及び LQG は細胞内には多く取り込まれずに細胞膜表面のレセプター等に関与していると考えている。さらに抗 LQ/LQG-MAb を一次抗体とした WB の結果、LQ で 5 分処理した細胞由来のセルライゼートにおいて、35-38kDa 付近に LQ 結合タンパク質のバンドが検出された ( 図 3 )。これ

は p38、ERK、CREB がリン酸化された時間とも一致していることから、LQ 結合タンパク質のメラニン誘導機構への関与が示唆された。

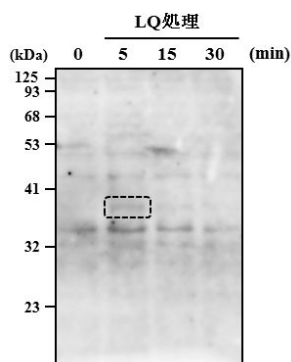


図3 抗LQ/LQG-MAbを用いたWBによるLQ結合タンパク質の検出

### (3) 考察

現在の天然化合物の標的分子解析法として、アフィニティークロマトグラフィー法や分子プローブ法が広く知られているが、これらの手法は種々のデメリットがあるため新しい手法が求められている。本研究内容の天然化合物特異的 MAb による手法は、生薬成分の構造を修飾する必要はなく、生細胞や組織での解析が可能という利点がある。しかしながら、目的成分と標的分子の結合部位と、抗体のエピトープが近い位置であれば抗体が結合できずに検出できない可能性がある。また、目的成分と標的分子間の結合様式が弱い場合は、ICC や WB では検出できない恐れもある。

本研究では(1)BEの抗炎症能及び癌細胞増殖抑制能における細胞内局在と標的分子同定と(2)LQ及びLQGのメラニン合成促進能における標的分子同定を中心に解析を行った。しかしながら抗LQ/LQG-MAbは、WBではLQ結合タンパク質を検出できたが、ICCでは良好な検出ができなかった。一方で、オウレン(黄連)やオウバク(黄柏)のベルベリンやニンジンのジンセノサイドM1においても同様な解析を行い、細胞内取り込みや局在解析等のデータが得られている。活性成分の作用ポイントの違いやMAbの交差反応性やアフィニティーの違いにより解析可能なツールは異なるが、検出が難しい場合は、エピトープの異なるMAbにより比較実験を行ったり、アフィニティークロマトグラフィー法や分子プローブ法と組み合わせたりすることで、解決できると考えている。抗天然化合物特異的MAbを利用した解析により、細胞及び生体内での生薬成分の作用機序に関する新たな発見に繋がることを期待している。

### <引用文献>

Kido K. *et al.*, *Talanta*, 77(1):346-350. 2008.

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計4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(5):1087-1089. 2016.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b04732>

Oiso S, Morinaga O, Goroku T, Uto T, Shoyama Y, Kariyazono H. Generation of an anti-dabigatran monoclonal antibody and its use in a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for serum dabigatran. *Therapeutic Drug Monitoring*, 査読有、37(5):594-599. 2015.

<http://journals.lww.com/drug-monitoring/pages/articleviewer.aspx?year=2015&issue=10000&article=00007&type=abstract>

Fujii S, Morinaga O, Uto T, Nomura S, Shoyama Y. Development of a monoclonal antibody-based immunochemical assay for liquiritin and its application to the quality control of licorice products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有、62(15):3377-3383. 2014.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf404731z>

宇都拓洋、天然物に対する特異的モノクローナル抗体を用いた生薬成分の機能解析、*薬学雑誌*、査読有、134(10):1061-1067、2014.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/134/10/134\\_14-00178/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/134/10/134_14-00178/_article/-char/ja/)

### [学会発表](計7件)

後藤綾、大久保伸哉、田中宏幸、宇都拓洋、森永紀、正山征洋、ベルベリンのがん細胞増殖抑制とその作用機序解析、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、横浜

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、日本生薬学会第62回年会、

2015年9月11日～12日、岐阜  
山下明寿、宇都拓洋、藤井俊輔、森永紀、  
正山征洋、第31回日本薬学会九州支部  
大会、2014年12月6日～7日、福岡

Uto, T., Morinaga, O., Shoyama, Y.  
Analysis of cellular localization and  
target molecules of natural compounds  
using monoclonal antibodies against  
natural compounds, 第19回日本フ  
ードファクター学会、2014年11月8日～  
9日、鹿児島

宇都拓洋、天然物に対する特異的モノク  
ローナル抗体を用いた生薬成分の機能  
解析、第30回日本薬学会九州支部大会、  
2013年12月7日～8日、長崎

宇都拓洋、Nguyen Huu Tung、森永紀、  
正山征洋、天然物特異的モノクローナル  
抗体を利用したバイカレインの細胞内  
局在及び標的分子同定、第5回食品薬学  
シンポジウム、2013年11月1日～2日、  
京都

宇都拓洋、Nguyen Huu Tung、森永紀、  
正山征洋、天然物特異的モノクローナル  
抗体によるヒト肝癌細胞でのバイカレ  
インの局在及び標的分子解析、第60回  
日本生薬学会年会、2013年9月7日～8  
日、北海道

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

受賞等

日本薬学会九州支部 学術奨励賞、天然  
物に対する特異的モノクローナル抗体  
を用いた生薬成分の機能解析、2013年  
12月

第5回食品薬学シンポジウム 優秀発表  
賞、天然物特異的モノクローナル抗体を  
利用したバイカレインの細胞内局在及  
び標的分子同定、第5回食品薬学シンポ  
ジウム、2013年11月1日～2日

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/>

長崎国際大学

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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇都 拓洋 (UTO, Takuhiro)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：90469396

(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, Yukihiro)

長崎国際大学・薬学部・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

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