

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660094

研究課題名(和文)初の抗カロテノイド抗体の作製と組織・細胞内局在の可視化による作用点の解明

研究課題名(英文)Preparation of the first antibody against carotenoids and elucidation of their target molecules in tissues and cells by visualization

研究代表者

山下 まり (Yamashita, Mari)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50192430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カロテノイドの作用メカニズムは未解明な場合が多い。我々は、抗体を用いてカロテノイドを定量や、免疫染色で可視化して作用の解明を目指した。まず、初の抗カロテノイド抗体として、抗フコキサンチンポリクローナル抗体を作製した。本抗体は、フコキサンチンに対して特異性を示した。また、レチノイン酸に対する抗体も作製し、レチノイン酸に対して高い反応性と特異性が示された。神経細胞にレチノイン酸を添加して突起伸長させ、本抗体でレチノイン酸の細胞内分布を免疫染色で調べ、細胞質が染色されることが示された。

研究成果の概要(英文)：We prepared antibodies against carotenoids to quantify them and to elucidate their target molecules by visualization of them in tissues and cells. The anti-fucoanthin and anti-retinoic acid antibodies were prepared by immunization of rabbits by their protein conjugates. These antibodies individually showed specific reactivities to fucoxanthin or retinoic acid. The localization of retinoic acid in mouse neuroblastoma cell line was visualized using this anti-retinoic acid antibody. Retinoic acid was specifically detected in cytoplasm by this antibody when the neuroblastoma cell was treated with retinoic acid to promote neurite outgrowth.

研究分野：天然物化学

キーワード：カロテノイド 抗体 フコキサンチン レチノイン酸 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは、植物の光合成に必須の天然色素であるとともに、動物では主として食品中から摂取されて、抗酸化、抗腫瘍、免疫の賦活化、美容など多くの生理作用を示す。小腸から吸収され組織中への移行後、一部化学構造が変換されて、蓄積される。国内外で活発に多くの研究がなされている。しかし、吸収、局在などの研究では、主として、組織や細胞より抽出して HPLC や LC/MS など分析する方法が主流で、直接染色により局在を可視化した例はない。そのため、生理作用の発現機構の詳細については、未解明な点も多く残されている。細胞内や組織内に存在するカロテノイドを、高感度で可視化できれば、作用点に関する情報が得られると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、未だ報告されていないカロテノイドに対する抗体を作製し、まず特異性を確認することを目的とする。その過程で、抗原作製の手法についても検討する。また、その抗体を用いた免疫染色で、組織、細胞内でのカロテノイドを高感度で可視化する手法を開発する。さらに、実際に培養細胞で、カロテノイドの局在を免疫染色で明らかにし、その結果からカロテノイドの作用を推定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) フコキサンチン抗体の作製と特異性の評価

フコキサンチン分子(図1)には2つのヒドロキシ基が存在するが、二級ヒドロキシ基は一つであるので、これを選択的にヘミスクシニル化し、担体タンパク質の Keyhole Limpet Hemocyanine (KLH) に結合して抗原とした。これをウサギに投与してポリクローナル抗体を作製した。抗体価の上昇を確認後、抗血清から IgG を精製し、フコキサンチン、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -カロテン(図1)との競合 ELISA を行なって、フコキサンチンに対する特異性を評価した。

(2) レチノイン酸に対する抗体の作製と評価

レチノイン酸(図2)は、 β -カロテンなどの炭素 20 個からなるカロテノイドの半分ほどの大きさの分子であり、これをハプテンとした場合に、 β -カロテンを認識するのか興味もたれた。また、レチノイン酸はカルボキシル基をもっているため、リンカーを用いないで直接担体タンパク質に結合できると考えられた。フコキサンチン抗体ではリンカーを用いたので、リンカーを用いない場合に、抗体の認識の強さが変わるのかどうかにも興味もたれた。そのため、レチノイン酸を直接担体タンパク質の KLH に結合し、それを抗原としてウサギを免疫した。作製した抗血清よ

り IgG を精製して、 β -カロテンなど4種のカロテノイドと競合 ELISA を行い、特異性を評価した。

(3) 抗レチノイン酸抗体を用いたレチノイン酸処理後の神経細胞におけるレチノイン酸の局在の可視化

レチノイン酸は、成長や発達、分化に必要なビタミン A の機能をもち、抗腫瘍作用や、神経突起成長作用も報告されている。本研究で作製した抗レチノイン酸抗体を用いて、レチノイン酸によって神経突起を伸長させた、Neuro2A 細胞(マウス神経芽細胞腫、理研より分譲)においてレチノイン酸を免疫染色し、その局在を調べた。

Neuro2A の培養液に、最終濃度 10 μ M になるようにレチノイン酸を DMSO 溶液で加え、その培養液にスライドガラスを沈めた。Neuro2A の細胞懸濁液を加えて、5% CO₂、37 °C、48 時間培養した。培地からスライドガラスを取り出し、緩衝液で洗浄後に固定操作を行い、ブロッキングを行なった。その後、本研究で調製した抗レチノイン酸ポリクローナル抗体精製 IgG を一次抗体とし、適宜希釈して 4 °C、加湿条件で放置し、洗浄後に、二次抗体として、Anti-Rabbit IgG (H+L), CF[™]488A antibody produced in F(ab')₂ fragment of goat (Sigma) を用いて 適宜希釈して染色した。また、核染色には DAPI を用いた。対照には、抗体作製時の免疫前のウサギの血清から IgG を精製して、同様にレチノイン酸で処理した Neuro2A の免疫染色を行なった。作製した標本は、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 抗フコキサンチン抗体の作製

フコキサンチンの二級ヒドロキシ基を、無水コハク酸を用い選択的にヘミスクシニル化できた。次に、このフコキサンチン-ヘミスクシニル体をいかに効率よくタンパク質に結合できるかが課題となった。カロテノイド類は極めて極性が低く、タンパク質は水を含む緩衝液にしか解けないためである。そこでまず、抗原の担体タンパク質として用いた KLH の代わりに、Bovine Serum Albumin (BSA) を用いて検討した。BSA は分子量は約 66,000 で MALDI-TOF MS で容易に測定できること、さらに溶解性が優れているからである。種々、コンジュゲート作製の条件を検討した。その結果、ヘミスクシニル化フコキサンチンを、極性有機溶媒中、硫酸化 *N*-ヒドロキシスクシンイミド (Sulfo-NHS) と水溶性カルボジイミドで活性化し、一方、緩衝液に BSA を溶解して、最適の割合で混合することにより、フコキサンチン-BSA コンジュゲートを作製できることがわかった。この方法で作製したコンジュゲートを、MALDI-TOF MS を測定すると、約 *m/z* 69,000 にピークが得られ、BSA には 1 分子当たり 36 個の反応可能なリジン残基のアミノ基が存在するが、約 4.7 個のフコキサ

ンチンが、結合したことが示された。同様の手法で、フコキサンチン-KLH コンジュゲートを作製し、抗原としてウサギに免疫した。約 8 週間、静脈および皮下注射でこの抗原を投与し、フコキサンチン-BSA コンジュゲートを用いた ELISA によって、抗体価を測定した。十分に抗体価が上昇したことを確認後、全採血を行い抗血清を得た。その抗血清から、Protein A カラムを用いて、IgG 画分を得た。

(2) フコキサンチン抗体の特異性の評価

得られた抗フコキサンチン抗体の IgG 画分を用いて、フコキサンチン、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -カロテンに対する競合阻害実験を行った。それぞれのカロテノイドの構造を図 1 に示す。抗原には、フコキサンチン-BSA コンジュゲートを用いた。その結果、本抗体は、約 1 μ M のフコキサンチンで 50%阻害する (IC_{50}) ことが示された。一方、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -カロテンは、10 μ M でも 5-20%しか阻害を示さなかった。このことから、フコキサンチンの特異的に認識する抗体を作製できたことが示された。

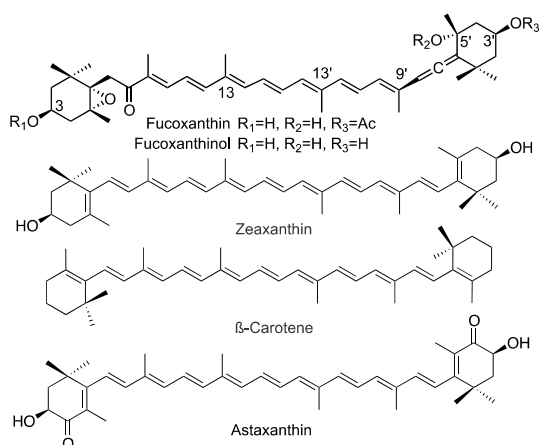


図 1 フコキサンチン及び競合 ELISA に用いたカロテノイドの構造

(3) レチノイン酸に対する抗体の作製

抗フコキサンチン抗体の作製においては、コハク酸リンカーを用いたが、反応性を向上させるために効果を期待して、タンパク質とハプテンを直接結合させた抗原を作製した。レチノイン酸をフコキサンチンの場合と同様の方法でまず BSA と結合した。

BSA と結合後に MALDI-TOF-MS で分子量を測定すると、 m/z 71,500 に分子イオンが検出され、この結果から、BSA の 36 個の反応可能なリジン残基のうち、半数の 18 個にレチノイン酸が結合できたと考えられた。

同様に KLH を担体タンパク質として抗原を作製し、ウサギに皮内投与および静脈投与を 6 週間行ない、抗血清を得た。抗体価の上昇は遅かったが、最終的に上昇は認められた。その抗血清より、IgG 画分を精製した。その IgG 画分を用いて、レチノイン酸 BSA コンジ

ュゲートをプレートに固定して、レチノイン酸、 β -カロテン、レチノール、アスタキサンチン、 α -イオノン(図 2)と競合 ELISA を行った。その結果、レチノイン酸の半阻害濃度 IC_{50} は約 100 nM であり、レチノイン酸を比較的強く認識することがわかった。一方、 β -カロテン、レチノール、アスタキサンチン、 α -イオノンの IC_{50} は 10 μ M 以上であり、本抗体はレチノイン酸を特異的に認識することが示された。類似の方法で作製された、レチノイン酸を認識する抗体についての報告があるが(Conrad, D. H., Wirtz, G. H. *Immunochemistry*, 1973, 10, 273-275.)、本研究で作製した抗体の方が、レチノイン酸に対する特異性が高かった。本抗体がレチノイン酸を強く認識し、高い特異性が示された理由として、抗原を調製時により多くのレチノイン酸を担体タンパク質である KLH に結合できたことが考えられる。これが可能であったのは、レチノイン酸を KLH と結合する反応条件を試行錯誤して、最適化した結果と思われる。また、Sulfo-NHS を用いてタンパク質と脂溶性の化合物の両方を溶かすことができるような条件に設定できたためと思われる。BSA とレチノイン酸を結合して、SDS-PAGE でその結合を確認した場合にも、泳動中にタンパク質コンジュゲートが、レチノイン酸の黄色で着色して高分子領域に目視で確認できた。これは、先に MALDI-TOF-MS の結果とともに、十分な数のレチノイン酸がタンパク質と結合できたことを証明していた。

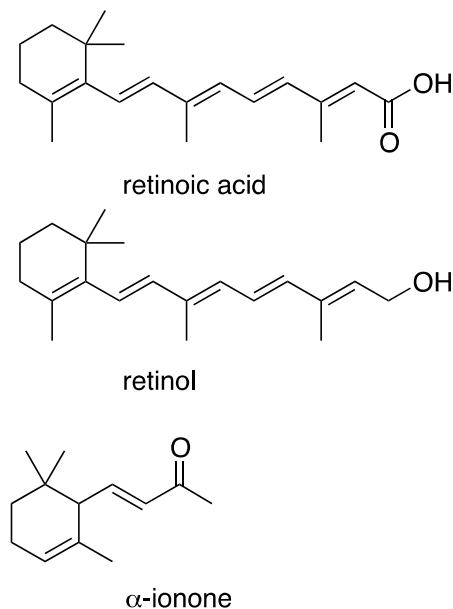


図 2 レチノイン酸(retinoic acid)、レチノール(retinol)、 α -イオノン(ionone)の構造

(4) 抗レチノイン酸抗体を用いた、レチノイン酸で処理した神経細胞におけるレチノイン酸の局在の可視化

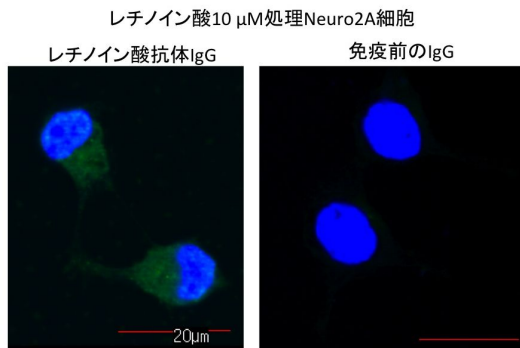


図3 本研究で作製した抗レチノイン酸抗体(IgG)で、レチノイン酸10 μ Mで処理して突起伸長したマウス神経芽細胞腫Neuro2A細胞の免疫染色

本研究で作製した抗レチノイン酸抗体(IgG)を用いて、レチノイン酸10 μ Mで処理して突起を伸長した状態のマウス神経芽細胞腫Neuro2A細胞を免疫染色した。その結果を図3(左図)に示す。右図は、同様に処理した細胞を、免疫前の血清より調製したIgG画分を1次抗体として、同様の処理した対照実験の結果である。抗レチノイン酸抗体を用いた場合は、細胞質が緑色に染色され、レチノイン酸が細胞質に局在することが示された。核はDAPIで青く染色されている。対照の右図では、緑色の染色は見られず、核のみDAPIで青く染色されていた。

この結果から、本研究で作製した抗レチノイン酸抗体で、神経細胞においてレチノイン酸が突起を伸長させる場合に、レチノイン酸が細胞質内に存在することが明らかになった。また、本研究で目的とした、カロテノイドの細胞内局在を可視化することが可能であった。これは今回作製した抗レチノイン酸抗体のレチノイン酸の認識能が高く、また特異性があるために可能であったと思われる。今後は、核内の分布調査や、高分解能の検出を目指した実験へ移行したい。また、レチノイン酸抗体で、このように細胞染色の手法についても確立できたので、フコキサンチン抗体についても今後、実験条件の最適化を経て、このような実験を行なう。

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)

[学会発表](計2件)

上野美紗、野村駿、南條光香、長由扶子、此木敬一、山下まり、抗カロテノイド抗体の作製と評価、日本ケミカルバイ

オロジー学会 第10回年会 2015年6月10日~12日 東北大学 川内キャンパス 東北大学百周年記念会館 川内萩ホール
上野美紗、野村駿、長由扶子、此木敬一、山下まり、フコキサンチン及びフコキサンチノールに対するポリクローナル抗体の作製と性状、日本農芸化学会2015年度大会、岡山大学津島キャンパス(岡山市)、2015年3月26-29日

[その他]

ホームページ：
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/about/organization/graduate/bukka/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下まり(MARI YAMASHITA)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50192430

(2)連携研究者

此木敬一(KEIICHI KONOKI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40292825

長由扶子(YUKO CHO)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：60323086