

平成21年12月28日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19589003
 研究課題名（和文）トリカフェオイルキナ酸-モノクローナル抗体作成および植物中含量の簡易検出法の作出
 研究課題名（英文） Production of 3,4,5-tri-*o*-caffeoylquinic acid monoclonal antibody and the simple detection method of the content in the plant.
 研究代表者
 倉田 理恵（KURATA RIE）
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 九州バイオマス利用研究チーム 主任研究員
 研究者番号：00315384

研究成果の概要：サツマイモ茎葉由来の3,4,5-トリカフェオイルキナ酸に対する抗3,4,5-トリカフェオイルキナ酸抗体の作出を試みた。抗原は3,4,5-トリカフェオイルキナ酸+ウシ、ヒト、トリアルブミンで作成することができた。抗体はマウス及びラットで試みたが、モノクローナル抗体は作成できなかった。しかし、3,4,5-トリカフェオイルキナ酸+ウシアルブミンを抗原にし、マウスに免疫させることで微量ながら抗体を作出していることは確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：園芸利用

1. 研究開始当初の背景

植物には多くの抗酸化物質が含まれており、人がそれらを食事で摂取することにより健康増進に寄与することが明らかにされている。特に作物に含まれるビタミン類、ポリフェノール類は含量も高く、その種類も多く、摂取しやすいため特に注目を集めている。サツマイモの可食部は塊根が中心であるが、茎葉も夏野菜として利用可能で、近年茎葉利用のための品種もいくつか開発されている

(Ishiguro et al., *Acta Hort.* 2004 637:339-345)。

これまでに実施した研究から、サツマイモ茎葉には、ポリフェノール類が多く含まれており、それらの中心はカフェオイルキナ酸誘導体と呼ばれるキナ酸にカフェ酸が結合した化合物であることを分離・精製し、同定した。カフェオイルキナ酸誘導体でよく知られているクロロゲン酸（キナ酸の3-位にカフェ

酸が結合しているもの；モノカフェオイルキナ酸)については、抗酸化能や高い機能性を有することが明らかにされている (Bernard et al., *Food Chemistry* 1994 51:399-403)。サツマイモ茎葉にはカフェ酸やクロロゲン酸が多く含まれるが、最も高含量であるのがキナ酸の3-, 5-位両方にカフェ酸が結合した3, 5-ジカフェオイルキナ酸 (3, 5-DCQA) である。また、その異性体である3, 4-と4, 5-ジカフェオイルキナ酸 (3, 4-, 4, 5-DCQA) も多い。さらに、キナ酸の3, 4, 5-の3つの位置にカフェ酸が結合した3, 4, 5-トリカフェオイルキナ酸 (TCQA) が少量存在することも明らかにした。

これらカフェオイルキナ酸誘導体は、モノ-, ジ-, トリ-とカフェ酸結合量が増加するにつれて機能性が高くなることが判明している (Yoshimoto et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002 66:2336-2441)。

また機能解析を行った結果、抗変異原性活性や抗がん作用 (がん細胞増殖抑制活性)、抗糖尿病作用 (インシュリン分泌促進活性)、美白作用 (チロシナーゼ阻害活性およびB16メラノーマ細胞におけるメラニン産生抑制活性) を確認している。さらに、TCQAにおいては、HIVなどのウイルスの増殖阻害活性も報告されており (Mahmood et al., *Antiviral Chem. Chemother.* 1993 4:235-240)、その機能性はとても高いものであることが認められている。

これらの結果より、TCQAが特に機能性活性が高く、健康維持・増進に十分役立つことが期待できる。そこでTCQA含量が高いサツマイモ遺伝資源の探索を試みようとした。しかし、サツマイモ遺伝資源は現在1500以上 (品種を含む) あり、今後も収集・保存系統数が増加していく。また、TCQAの分析には通常高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いるが、

その解析時間は90分を要するため、同時期のプロファイル解析は難しい。そこで、これらを克服することができる簡易な多検体検定法を確立することを目的に、酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) の開発を行った。その結果、TCQA-ポリクローナル抗体の作成に成功した。また、キナ酸やジカフェオイルキナ酸とのクロスリンクが認められたことから、サンドイッチ法で検出ができるよう改良した。

しかし、作成したポリクローナル抗体はTCQAの検出は可能であるが、定量は難しい。このため、TCQA高含量のサツマイモ品種の探索に用いることができる、感度が高く、定量が可能なモノクローナル抗体の作成が求められる。

2. 研究の目的

サツマイモ茎葉中に含まれる TCQA に対するモノクローナル抗体をマウスより作成し、その抗体特性を詳細に調査する。作出された抗体と ELISA 法を使用し、TCQA 簡易定量法を開発する。開発した簡易測定法にて、サツマイモ茎葉の TCQA 含量を調査し、高含量サツマイモ品種の抽出、ならびに高含量品種を育成するための基礎データを得る。また、作物や加工食品中の含量が調査できる汎用性のある簡易定量法を確立し、さらに、TCQA の生合成に関する生化学的な機構解明を目標とする。

3. 研究の方法

- (1) サツマイモ葉に含まれるTCQA (ポリフェノール類：物質) は、逆相カラム樹脂 MCIgel CHP20 (フジシリシア社製) およびゲルろ過カラム樹脂セファデックスLH-20 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) のオープンカラムクロマトグラフィーにより精製し、回収した。

(2) TCQAをタンパク質の抗原として認識させるため、キャリアープロテインと結合させた。TCQAはカルボキシル基を有するため、1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC) を使用しキャリアープロテインを結合させる方法 (EDC法; PIERCE社、Imjet Immunogen EDC Kit使用) を試みた。キャリアープロテインは、市販 (PIERCE社製) のウシアルブミン (BSA)、ヒトアルブミン (HSA)、卵白アルブミン (OVA)、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) を使用し、TCQAとキャリアープロテインが結合した物のみを抗原として、ゲル濾過カラムにより精製し、高純度の抗原を回収した。

(3) 5週令に調整したマウス (BALB/c ; 雌、1処理区3匹以上) に各抗原を免疫させ3週間ほど飼育した。その後採血を行い、TCQAを認識する抗体価をELISA直接法にて調査したが、抗体価が低かったため、同じマウスに2度目の免疫 (追加免疫: ブースター) を行った。追加免疫の2週間後に採血を行い、抗TCQAの抗体価をELISA法にて再検査した。

最終的には28週まで飼育し、4週間ごとにブースターをかけ、抗体価の調査を続けた。最終的には全採血をし、血清のみを回収した。

(4) 5週齢に調整したラット (Wistar ; 雌、3匹) に抗原を免疫させ、3週間程飼育した。採血を行い、TCQAを認識する抗体価をELISA法にて調査したが、抗体価が低かったため、同じラットに追加免疫を行った。追加免疫の3週間後に採血を行い、TCQAを純粋に認識する抗体価をELISA法にて調べた。免疫が上がらなかったため、もう一度ブースターをかけ、最終的には13週まで飼育し、全採血を行った。

(5) 全採血後の血清中に含まれる抗体

特性は、抗IgGペルオキシダーゼ標識二次抗 (Jackson社製) を使用したELISA直接法により調査した。

4. 研究成果

(1) TCQA は十分な量及び精度で回収できた。

(2) TCQA 抗原は BSA、HSA、OVA に関しては順調に作成できた (TCQA+BSA、TCQA+HSA、HAS+OVA)。これらは精製純度も高く、1mg/ml 濃度の液を回収することができた。しかし、KLH に関しては KLH と TCQA を結合させることにより凝集 (アグリゲーション) を起こしてしまい、精製することができなかった。よって動物への免疫抗原としては TCQA+BSA、TCQA+HSA、HAS+OVA の 3 種類で行った。

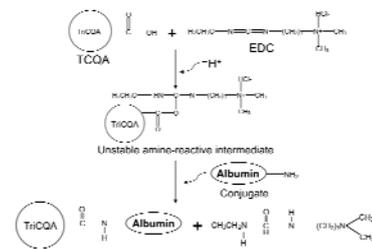


図 1. TCQA 抗原作製法

(3) ①マウスに対する抗原: TCQA+BSA、TCQA+HSA、TCQA+OVA の免疫 (各雌 3 匹) では、弱い抗体産出が確認できた。しかし TCQA+HSA、TCQA+OVA では TCQA+BSA 程は免疫が上がらず、追加免疫による抗体価の増加が低かったため、このまま追加免疫回数を追加し抗体を回収するよりも再試を選択した。更に TCQA+BSA を免疫させた個体についてはこの時点で脾臓を回収し、抗体産出能力は低いながらもハイブリドーマ作成を試みたが、やはり選抜できなかった。

②抗原を TCQA+BSA に限定し、免疫を行った（雌 4 匹）。しかし前回と同様に、1 回目の追加免疫 3 週後に免疫が上昇しなかったため、継続して 4 週間ごとの追加免疫と飼育を行った。追加免疫を行う前には抗体価を測定したが、若干の上昇しか認められなかったため、28 週で全採血を行い安楽死させた。

全採血された血清の抗体特性を調査したところ、抗体価が低く（100 倍希釈使用）、カフェオイルキナ酸類に対する基質選択を調査した結果、図 2 のように幅広くクロスリンクを示した。雌 4 匹にて作成したうちの iv は全体的に抗体価が低く、目的抗体産出そのものがほとんどなかった。また i ~ iii では産出した抗体に違いが認められ、i は TCQA と CA 以外に広くクロスリンクを示し、ii は 3,4-DCQA と CA 以外に広くクロスリンクをした。iii は i, ii よりも活性が少なく、QA と 4,5-DCQA にクロスリンクを示した。抗 TCQA 抗体を作成したにも関わらず、TCQA を認識する抗体の生産が少なく、非常に残念な結果となった。

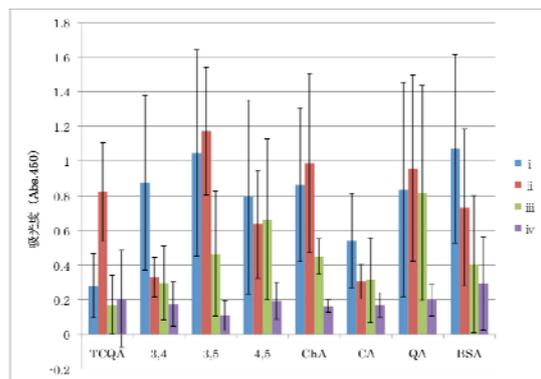


図 2. マウス血清に含まれる抗体のカフェオイルキナ酸類に対する抗体特性

(4) マウスでの免疫があまり良くなかったため、ラットでの免疫を試みた。これも抗原を TCQA+BSA に限定し、免疫を行った（雌 4 匹）。しかしマウスと同様に、1 回

目の追加免疫 3 週後に免疫が上昇しなかったため、さらなる追加免疫と飼育を行った。追加免疫を行う前には抗体価を測定したが、若干の上昇しか認められなかったため、13 週で全採血を行い安楽死させた。

全採血の抗体特性を調査したところ、ラットも抗体力価が低く（100 倍希釈使用）、カフェオイルキナ酸類に対する基質選択を調査した結果、図 3 のように広く一定のクロスリンクを示した。雌 4 匹より回収された血清 I ~IV は、QA への親和性が若干高いようで、TCQA 特異的もしくは、カフェオイルキナ酸特異的なクロスリンクは得られなかった。また I ~IV に大きな違いはなく、全体的に抗体価が低く、目的抗体産出そのものがほとんど認められなかった。

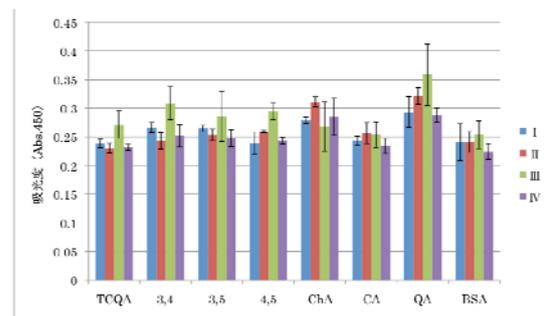


図 3. ラット血清に含まれる抗体のカフェオイルキナ酸類に対する抗体特性

(5) 残念ながら 2 年間の研究からは抗 TCQA モノクローナル抗体は作成することができなかった。しかしこの 2 年間の研究により、抗原は OVA や HSA よりも BSA が効果的であったこと、ラットよりもマウスでのモノクローナル抗体作成の可能性があることが示唆された。また最近、同じポリフェノール的一种であるケルセチンの抗ケルセチンモノクローナル抗体作成が成功し、その抗原は KLH をキャリアープロテインとしていた。本研究では KLH をキャリ

アープロテインとしたときにアグリゲーションを起こしたが、アグリゲーションを起こさない方法を再検討し、抗原を作成することにより、解決するかもしれない。

近年ますます高齢化は進み、食事と健康の関係性や適切な食事の重要性についての報告が増えてきている。その中でも野菜に多く含まれるポリフェノール摂取は多方面より研究が進み、健康へ寄与するメカニズムが次々と明らかになっている。今回ターゲットにしているカフェオイルキナ酸は、コーヒーやカカオ等にも含まれており、徐々に脚光を浴び始めつつあり、今後の研究の発展からも、モノクローナル抗体は必ず必要となるだろう。よって今後も今回のデータを元に改良し、モノクローナル抗体を得たいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. Rie Kurata, Masaru Adachi, Hirofumi Kurata, Makoto Yoshimoto. Anti tri-o-caffeoylquinic acid polyclonal antibody. I. Preparation and properties of polyclonal antibodies to covalently coupled tri -o-caffeoylquinic acid -albumin. Acta Hort. 2008 (770) 59 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 倉田理恵、倉田裕文、吉元誠、足立勝 抗3,4,5-トリカフェオイルキナ酸抗体の特性 園芸学会 2008.9.27-29 三重大学
2. Rie Kurata, Masaru Tanaka, Nao Tanaka, Makoto Yoshimoto,. Enzy-

matic synthesis of caffeoylquinic derivatives from sweetpotato leaf (Ipomea batatas L.), XXIVth International conference on polyphenols 2008. 7. 8-11 Salamanca, Spain

3. Rie Kurata., Masaru Adachi., Hirofumi Kurata. and Makoto Yoshimoto. Production of 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid polyclonal antibody - Measurement of 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid in leaves of sweetpotato genotype uses 2-type anti 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid polyclonal antibody-, ICPH2007 - 3rd International Conference on Polyphenols and Health - 2007. 11. 25-28 Kyoto, Japan

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 理恵 (KURATA RIE)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・九州沖縄農業研究センター・九州バ
イオマス利用研究チーム・主任研究員
研究者番号：00315384

(2) 研究分担者

足立 勝 (ADACHI MASARU)

宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：40353354