

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15765

研究課題名(和文) 多様な自然抗体と食を起源とする抗原の相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Investigations of interactions between various natural antibodies and food-derived antigens

研究代表者

佐々木 栄太 (Sasaki, Eita)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・特任講師

研究者番号：00803157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食品成分に含まれる抗酸化作用をもつポリフェノール類が、酸化的条件下、生体内のタンパク質に非可逆的に結合する反応に着目し、それらタンパク質修飾体が生体機能、特に自然免疫に与える影響を解明することを目的とした。タンパク質修飾体と相互作用する抗体の部分配列をファージディスプレイ法によって探索した結果、アルギニンリッチなペプチド配列が見出された。したがって、ポリフェノール修飾タンパク質は、生体内に存在するアルギニンリッチなタンパク質と相互作用することで、生体機能を調整する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸化作用をもつポリフェノール類は、一般的に健康に良い作用があると信じられているが、生体内での真の作用機序については未解明な点が多く残されている。本研究は、ポリフェノールによって化学修飾されたタンパク質に着目することで、食による生体機能調節の新たな分子メカニズムを探究した。ポリフェノールによる免疫賦活その他の生体防御メカニズムの解明は、人々の健康な生活に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Polyphenols, which are known to have antioxidative activities, react with proteins under oxidative conditions, resulting in generation of various modified proteins. We aimed to discover biological effects of the polyphenol-modified proteins with a special focus on natural immunity. Phage-displayed single-chain variable fragment (scFv) and peptide libraries were constructed and selected against the polyphenol-modified proteins as the interaction partners. We found that peptides/proteins with arginine-rich motifs generally interact with the modified proteins. Thus, the results suggest that the polyphenol-modified proteins might have roles to regulate functions and/or activities of proteins with the arginine rich motifs.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：自然免疫 ポリフェノール 修飾タンパク質 ファージディスプレイ 抗体 EGCG ピセアタンノール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品成分は生体内において、さまざまなタンパク質表面を化学修飾することが知られている。例えば、還元糖アルデヒド基とタンパク質アミノ基との結合に始まるメイラード反応や、リノール酸などの不飽和脂肪酸の過酸化とタンパク質との反応などがこれに該当する。従来、これらの反応によって生じる AGEs (advanced glycation end products; 終末糖化産物) や酸化 LDL (low density lipoprotein; 低密度リポタンパク質) などのタンパク質修飾体は、加齢、生活習慣病、自己免疫疾患などに関連する異常な細胞や組織との関わりにおいて活発な研究が進められてきた。一方、近年では、食を起源とする修飾タンパク質が、健康維持に不可欠な自然免疫系などに対し何らかの影響を与える可能性が示唆されている。例えば、ポリフェノールなどの抗酸化物質がタンパク質表面を化学修飾することで、生体内に自然に存在する抗体によって認識される性質を示す例が報告されている。これらの自然抗体は、ウイルスや細菌に特徴的な分子構造や、AGEs や酸化 LDL などを含む内因性の炎症因子とも交差性を示す可能性があると考えられているが、詳細については不明であり、その生理的な意義も未解明であった。

2. 研究の目的

本研究は、タンパク質表面を化学修飾することによって自然抗体に作用し、有害抗原に対する備えとして働く食品成分およびその機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ポリフェノールによって化学修飾されたタンパク質と相互作用する自然抗体の配列の特徴を明らかとするために、ファージディスプレイ法を用いた自然抗体ライブラリーを構築した。ライブラリーの作製は、成書 (Michael Hust and Theam Soon Lim (eds.), *Phage Display: Methods and Protocols*, Humana Press, 2018 など) を参考に、以下の手順によって行った。まず、抗原感作をしていない BALB/c マウス (8 週齢) の脾臓細胞から mRNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を合成した。これを鋳型とした polymerase chain reaction (PCR) によって、マウス自然抗体 IgM の重鎖・軽鎖の可変領域の DNA 断片を増幅し、ファージミドベクター pSEX81 (PROGEN) のクローニングサイトに挿入した。これを用いて大腸菌株 TG-1 の形質転換と、それに続くヘルパーファージ (M13K07) によるレスキューを行うことで、マウス由来の一本鎖抗体 (scFv: single-chain variable fragment) を提示する M13 ファージライブラリーを構築した。

次に、ポリフェノール修飾タンパク質の調製を行った。具体的には、緑茶に含まれるポリフェノール的一种であるエピガロカテキンガレート (EGCG) (終濃度 1 mM) とヒト血清アルブミン (HSA) (終濃度 1 mg protein/mL) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液中に混合し、37 °C で一晩インキュベートした。得られた溶液から PD-minitrapp G-25 (GE Healthcare Life Sciences) を用いたゲル濾過によって、低分子化合物を取り除くことによって、EGCG 修飾 HSA を調製した。同様にして、赤ワインに含まれるポリフェノール代謝物として知られるピセシアタンノールや、大豆由来のポリフェノールであるイソフラボン類など、様々なポリフェノール修飾 HSA (または BSA) を調製し、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)、Native PAGE による分析や、吸収・蛍光スペクトルの測定を行うことで、ポリフェノールによる化学修飾を確認した。

さらに、抗体提示ファージライブラリーの中からポリフェノール修飾タンパク質と相互作用するものを選別するために、バイオパンニングと呼ばれる一連の操作を繰り返し行った。すなわち、免疫プレートに吸着させた EGCG 修飾 HSA に自然抗体提示ファージライブラリーを加え、親和性の低いファージを洗浄後、トリプシンを加えて 37 °C で 30 分間インキュベートした。このようにして選別したファージを大腸菌株 TG1 に感染させ、続いてヘルパーファージ (M13K07) によるレスキューを行うことで、ポリフェノール修飾タンパク質に対して親和性の高い scFv を提示したファージライブラリーを得た。バイオパンニング前後の抗原に対する親和性は、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって評価した。

このようにして得られたポリフェノール修飾タンパク質に高い親和性を示す scFv 提示 M13 ファージを感染させた大腸菌コロニーを無作為に選び、96 穴のディープウェルプレートを用いて 37 °C で一晩振盪培養した。得られた培養液 50 μ L を 950 μ L の培地に加え、37 度で 2 時間振盪培養した。遠心後、ペレットを 50 μ M のイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を含む培地で再懸濁し、30 °C で一晩振盪培養することで、scFv を培地中に分泌させた。これを再度遠心し、得られた上清を用いて、EGCG 修飾 HSA を抗原とする ELISA を行った。また、ファージミドを内包させた大腸菌コロニーを 37 °C で一晩振盪培養した後、ファージミドを単離精製し、抗体遺伝子の 5' 末端に設計したプライマーを用いて遺伝子配列を解析した。

(2) 次に、ランダムな 15 アミノ酸を提示した T7 ファージライブラリーを構築した。具体的な手順としては、ランダムな 15 アミノ酸をコードする (NNK)₁₅ を含めたオリゴ DNA を設計し、Klenow 酵素によって二本鎖 DNA とした後に、T7Select10-3 Kit (Novagen) のベクター制限酵素サイトを

に挿入し、T7 Packaging Extracts と混合した。続けて大腸菌株 BLT5403 に感染させることで、目的とする T7 ファージライブラリーを調製した。

(1) の手順で作製したポリフェノール修飾タンパク質を抗原としてイムノプレートに吸着させ、ランダムな 15 アミノ酸を提示した T7 ファージライブラリーを用いたバイオパンニングを行った。抗原に結合した T7 ファージは、1%の SDS を含んだ TBS(Tris-buffered saline)で溶出した後に、大腸菌株 BLT5403 に感染させることで、より高い抗原親和性をもつ集団からなるファージライブラリーをえた。

次に、それぞれのファージが提示しているアミノ酸配列を解析するために、ファージライブラリーを大腸菌株 BLT5403 に感染させた後、寒天培地上に形成したプラークからそれぞれのファージを抽出し、65°Cで 10 分間加熱した。これを鋳型とした PCR によって、15 アミノ酸をコードする領域を含む DNA 断片を増幅し、その配列を解析した。

(3) (2) で得た 15 アミノ酸ペプチドを緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) のカルボキシル末端に融合した。具体的には、pTXB1-sfGFP プラスミド (Addgene: #51562) と pET-28 ベクターから assembly PCR によって pET-28_His₆-TEV-sfGFP プラスミドを作製した。さらに sfGFP 遺伝子の下流にある制限酵素サイトに、GGs リンカー配列をコードする DNA 配列および (2) で得たペプチド配列をコードする DNA を挿入することで、His₆-TEV-sfGFP-GGS-peptide を発現するプラスミドを構築した。

作製したプラスミドを用いて大腸菌株 BL21 (DE3) の形質転換を行った。得られたコロニーを抗生物質 (カナマイシン) を含む LB 培地で OD₆₀₀ が 0.6 付近になるまで 37 °C で振盪培養し、IPTG (終濃度 0.1 mM) を加えてさらに 26.5 °C で 20 時間振盪培養した。遠心分離後、大腸菌ペレットを超音波破碎し、Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーによる精製を行うことで、目的とする sfGFP-peptide を得た。

ポリフェノール修飾タンパク質をイムノプレートに吸着させ、sfGFP-peptide を用いた ELISA を行うことで、これらの融合タンパク質とポリフェノール修飾タンパク質の親和性を解析した。

4. 研究成果

(1) scFv 提示 M13 ファージライブラリーを用いた解析: マウス脾細胞由来の自然抗体遺伝子を元にした scFv 提示 M13 ファージライブラリーを作成した。形質転換後に得られた大腸菌のコロニーの数から、得られたライブラリーのサイズは 2.0×10^6 と見積もられた。また、ポリフェノール修飾タンパク質としては、EGCG 修飾 HSA を調製した。修飾タンパク質の吸光スペクトルを測定すると、未修飾の HSA と比較して 250-500 nm の吸光度が顕著に増大していた。また、280 nm で励起した時のトリプトファン由来の蛍光は、EGCG 修飾によって消失していた。さらに、SDS-PAGE および Native-PAGE による移動度の変化も観察した。これらの結果は、EGCG による HSA の化学修飾を支持する。次に、EGCG 修飾 HSA を抗原とし、scFv 提示ファージライブラリーを用いたバイオパンニングを行った。バイオパンニングによって、EGCG 修飾 HSA に対してより親和性の高い抗体が選別された。

次に、EGCG 修飾 HSA に対する数度のバイオパンニングを行なった後のファージライブラリーを大腸菌に感染させ、得られたコロニーから 94 個を無作為に選び、96 穴プレートで培養することで、それぞれのコロニー由来の scFv 抗体を得た。このようにして得たモノクローナルな scFv 抗体を用いて、EGCG 修飾 HSA に対する ELISA を行い、EGCG 修飾 HSA に対して高親和性を示すものを 6 種検出した。これらの遺伝子配列を解析すると、それらは全て同一の重鎖・軽鎖の配列を有していた。BLAST (basic local alignment tool) 検索の結果、得られた V_H 配列は、抗リポタイコ酸抗体の V_H 配列と高い相同性を示すことがわかった (Identities 340/368 (92%))。リポタイコ酸はグラム陽性菌の細胞壁の主要成分である。したがって、ポリフェノール修飾タンパク質を認識する抗体が、外来性抗原にも交差性を示す可能性が示唆された。

さらに、バイオパンニング前後のライブラリーから無作為に選んだ scFv の重鎖・軽鎖配列を複数解析し、EGCG 修飾 HSA に対して高い親和性を示したクローンのライブラリー全体における位置付けを系統樹解析によって表した (図 1)。

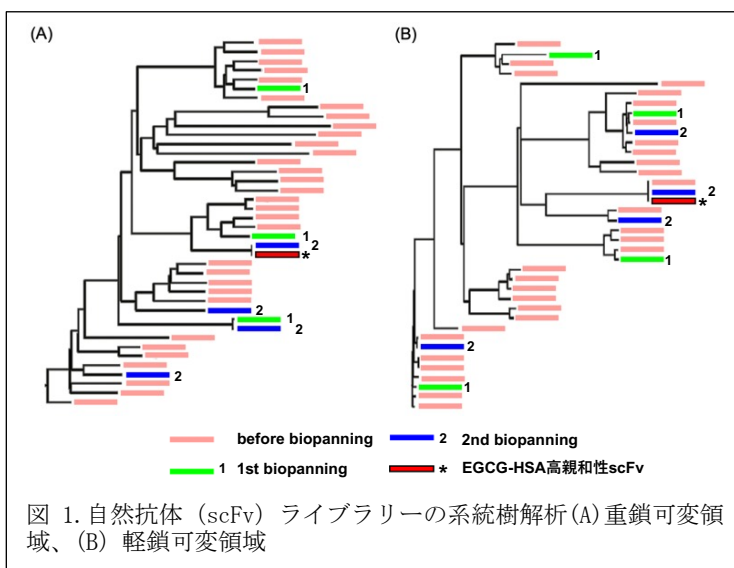


図 1. 自然抗体 (scFv) ライブラリーの系統樹解析 (A) 重鎖可変領域、(B) 軽鎖可変領域

(2) ランダムな 15 アミノ酸を提示した T7 ファージライブラリーを用いた解析: (1) の研究結果からは、ポリフェノール修飾タンパク質に対して親和性を示す「多様な」scFv 配列を得ることはできず、ポリフェノール修飾タンパク質に親和性を示す scFv 配列の特徴を明らかにするには不十分であった。そこで、一般的に抗体の抗原特異性は 5-10 アミノ酸残基程度の相補性決定領域の組み合わせによって決まることに着目し、ポリフェノール修飾タンパク質に親和性を示す「ペプチド配列」を決定することで、目的とする抗体配列の特徴の解明につなげることを試みた。そのために、ランダムな 15 アミノ酸を提示した 2×10^8 サイズの T7 ファージライブラリーを構築した。EGCG 修飾 HSA またはピセアタンノール修飾 BSA に対して 3~4 ラウンドのバイオパンニングを行ったところ、ラウンドを重ねるごとにポリフェノール修飾タンパク質に対して親和性の高いペプチドを提示しているファージが濃縮されたことが ELISA によって確認された。

次に、バイオパンニングによって親和性濃縮を完了した T7 ファージライブラリーから、任意のプラークを 100 個程度選び出した後に大腸菌に感染させ、ファージを増幅・単離した。EGCG 修飾タンパク質、ピセアタンノール修飾タンパク質に対する親和性を ELISA によって評価したところ、特に高い親和性を示すペプチドを提示するファージを複数得た。これらの配列を解析したところ、いずれにおいてもアルギニンの出現率が有意に高い結果を得た (図 2)。

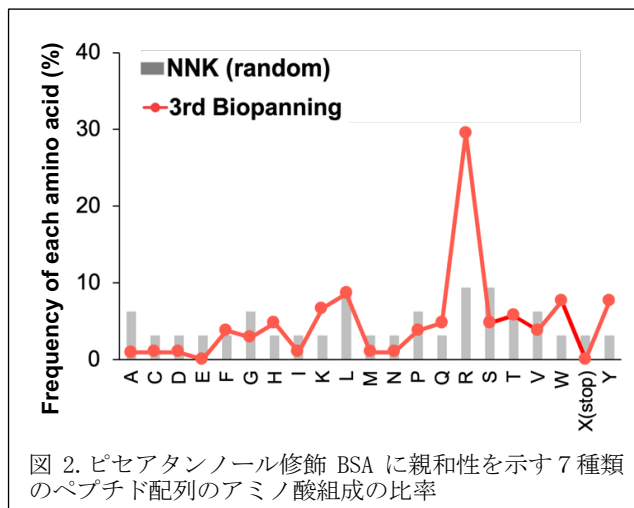


図 2. ピセアタンノール修飾 BSA に親和性を示す 7 種類のペプチド配列のアミノ酸組成の比率

(3) ペプチド融合 GFP を用いた解析: (2) で得られたペプチドとポリフェノール修飾タンパク質の親和性を確認するために、それぞれのペプチド配列を GFP のカルボキシル末端に融合したタンパク質を作製した。これを用いて ELISA による解析を行うことで、確かにポリフェノール修飾タンパク質と相互作用することを確かめた (図 3)。

本結果から、ポリフェノール修飾タンパク質と自然抗体の相互作用には、抗体の抗原認識部位においてアルギニンリッチな配列が重要であることが示唆された。また、生体内のアルギニンリッチな配列をもつタンパク質の中に、ポリフェノール修飾タンパク質と相互作用するものが存在するのではないかという新たな着想をえた。そこで、ヒトのタンパク質データベースからアルギニンリッチなペプチドを複数種選び出し、GFP との融合タンパク質を作製したのちにポリフェノール修飾タンパク質を抗原とした ELISA を行ったところ、その多くがポリフェノール修飾タンパク質と相互作用することを確かめた。

以上の結果から、ポリフェノール修飾タンパク質は、当初考えていた自然抗体に加えて、アルギニンリッチ配列をもつ生体内タンパク質にも作用することで生体機能を調整している可能性が示唆された。今後は、ポリフェノール修飾タンパク質とアルギニンリッチペプチドまたはアルギニンリッチ配列を含むタンパク質間の結合力や、結合が生体内タンパク質の機能に与える影響についての解析を進めていく必要がある。

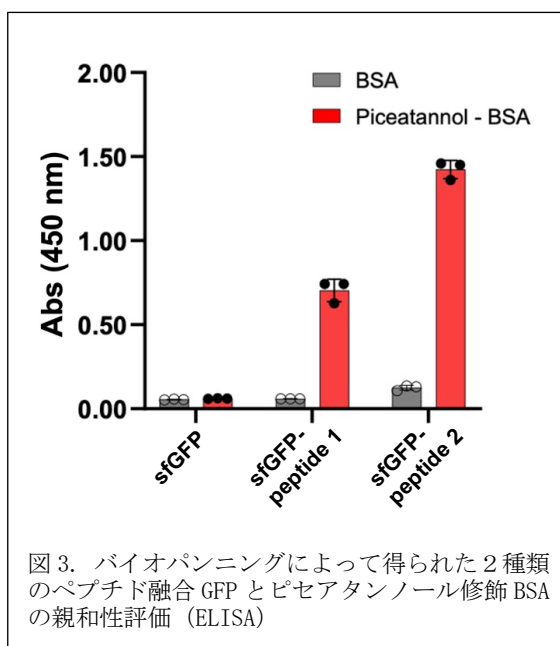


図 3. バイオパンニングによって得られた 2 種類のペプチド融合 GFP とピセアタンノール修飾 BSA の親和性評価 (ELISA)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 広史、佐々木 栄太、板倉 正典、内田 浩二
2. 発表標題 ファージディスプレイ法によるポリフェノール修飾タンパク質結合ペプチドの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本広史, 佐々木栄太, 阿南優佑, 板倉正典, 内田浩二
2. 発表標題 ポリフェノール修飾タンパク質に対する高親和性ペプチドの解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿南優佑、佐々木栄太、板倉正典、上田宏、内田浩二
2. 発表標題 抗体工学を利用した抗DNA自己抗体の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本広史, 佐々木栄太, 板倉正典, 内田浩二
2. 発表標題 ポリフェノール修飾タンパク質に対する高親和性ペプチドの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------