

Development of immunochemically analyses for medicinal plants

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/5591

薬用植物資源の免疫化学的解析手法の開発

田中宏幸
九州大学大学院薬学研究院

Development of immunochemically analyses for medicinal plants Hiroyuki Tanaka

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi,
Higashi-ku, Fukuoka, Japan
e-mail: htanaka@phar.kyushu-u.ac.jp*

1. 抗 ginsenoside モノクローナル抗体を用いた免疫化学的解析法の開発

演者らは、これまで各種人参の組織培養による大量育苗法の開発、優良品種作出研究を展開してきた。近年、有効成分高含有品種作出を目的とした育種研究を展開しており、このような育種研究においては、脱分化、変異原による変異の拡大、再分化、再分化植物の含量調査、高含有株の大量増殖並びに栽培化という多くのステップが必要となってくる。上記育種研究においては、特に再分化植物の含量調査が重要なステップであり、一般に有効成分の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー (GC) 等の機器が使用されている。しかしながら、それら従来の方法は多数のサンプルを処理し、含量が極めて微量と考えられるインビトロの系から得られたサンプルの含量調査を行うには適切な方法とは言い難い。そこで、微量生体成分の測定を目的として近年広く開発され発展してきた免疫化学的解析手法に着目し、育種研究にも耐えうる十分な精度を有するスクリーニング法の開発を目的として、人参の主要なサポニンである ginsenoside Rb1 (G-Rb1)¹⁾, ginsenoside Rg1 (G-Rg1)²⁾ に対するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody: MAAb) の作製を行い、その抗体をもちいた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、Eastern blotting 等のアッセイ法の開発を行った³⁾。

1-1. Eastern blotting 法の確立

Western blotting 法は特定抗原タンパク質を検出、同定する最も一般的な技術で、高感度且つ選択的に多検体同時スクリーニング可能な方法としても有用である。これまで、低分子化合物はタンパク質のように膜に結合、固定化することは困難であり、免疫染色法の適用は困難とされてきたが、演者らはサポニンの糖部を NaIO_4 で開環しキャリアタンパクとコンジュゲートを形成し PVDF 膜に固定化後、抗原抗体反応を行う方法により、サポニンを対象とした免疫染色法の開発に近年成功している^{4,5)}。上記手法は ginsenoside の分析にも適用可能であり、続いて演者らは Eastern blotting による ginsenoside の一斉分析法の開発に着手した。

各種 ginsenoside 標品を TLC 板にスポットし、展開溶媒にて展開後、TLC 板から PVDF 膜に転写し、膜上で抗 G-Rb1 MAb を1次抗体として抗原抗体反応を試みた。その結果、同一アグリコンを持つ G-Rb1, Rc, Rd のスポットが強く発色した。当然ながら G-Rb1 が最も強く発色し、G-Rb1 の検出限界は 0.4 μg であった。競合的 ELISA では、MAb 9G7 は他の ginsenoside に対して極めて低い交差反応性を示したが、本 Eastern blotting においては同一アグリコンを有する G-Rb1, Rc, Rd が染色された。この結果は、ginsenoside を膜に固定するステップにおいて ginsenoside の糖部の開環を伴うため、抗原抗体反応における糖部分の関与がルーズになり、MAb は主にアグリコンを認識し競合的 ELISA とは異なった交差反応性を示したものと推察される。

続いて本 Eastern blotting を発展させた分析手法として、G-Rb1 を特異的に認識する抗 G-Rb1 抗体並びに G-Rg1 を特異的に認識する抗 G-Rg1 抗体を活用した二重染色法を検討した。まず各種サンプルを TLC 板にスポットし展開後、Eastern blotting の操作手順に従って TLC 板から PVDF 膜に成分を転写する。転写の後、膜をまず抗 G-Rg1 MAb 1F4 で処理し、続いて酵素標識二次抗体、基質(3-amino-9-ethylcarbazole)により検出した。次に、抗 G-Rb1 MAb 9G7 で処理し、酵素標識二次抗体、基質(4-chloro-1-naphthol)で膜を順次処理し分析を完了する。その結果、G-Rg1, Rc を含む 20(S)-protopanaxatriol 系 ginsenoside は赤色、G-Rb1, Rc, Rd を含む 20(S)-protopanaxadiol 系 ginsenoside は紫色に染色された。二重染色法により ginsenoside のアグリコンの同定が可能であり、また Rf 値を比較することによりアグリコンに結合している糖の結合数を予測できる。以上のように、ginsenoside の構造が容易に推定できる本法は資源探索研究においても有用なツールと考えられる。

2. 抗 sennoside モノクローナル抗体を用いた分析キットの作製

イムノクロマトグラフィー法は、臨床現場においてウイルス、細菌の感染の診断方法等に広く利用されている手法であり、簡便で迅速性に優れている。我々は、独自に作製した高い選択性を有する二種類の抗 sennoside 抗体^{6,7)}を活用し、本原理を応用した sennoside の簡易検出キットの開発を行った⁸⁾。

キットのニトロセルロースメンブラン上の異なる位置には、それぞれ sennoside A (SA)-HSA、sennoside B (SB)-HSA を塗布してあり、コンジュゲートパッドの位置に金コロイド標識抗 SA、SB 抗体の混合物を装着している。本キットの検出限界を測定した結果 SA 及び SB はそれぞれ 125 ng/ml であり、測定時間は 10 分間であった。実際に sennoside を含有する *Cassia* 属植物の小葉をアッセイした結果では、発色パターンは ELISA の測定結果とよく一致していた。以上の結果から本キットは定性的な分析のみならず、ある程度の半定量も可能な分析手法であり、極めて簡便且つ目視判定が容易で現場測定も可能な手法である。

3. まとめ

演者らは薬用植物の育種研究の一方向性として、有効成分高含有品種作出を指向した研究を展開しており、そのファーストステップとして各種有効成分に対するMAbを作製し、迅速且つ超高感度であり、加えて多検体同時分析可能な手法であるELISAを構築した。さらに、Eastern blottingは従来不可能とされてきた低分子化合物の検出を可能とする新規な分析手法であり、また最後に紹介したイムノクロマトグラフィー法を用いた分析キットは、その簡便さ、迅速性は特筆すべきものがある。本稿で紹介した免疫化学的な手法は何れも分析するサンプルの前処理を必要としない点、測定作業の煩雑さを解消できる点を特徴としている。さらに、分析に有機溶媒をほとんど必要としない環境にやさしい分析法であり、育種研究における分析法としてのみならず、今後需要の増加が見込まれる生薬製剤、健康食品等の品質評価法としても次世代を担う手法となることが期待される。

【文献】1)H. Tanaka, N. Fukuda and Y. Shoyama, *Cytotechnology*, **29**, 115-120 (1999). 2)N. Fukuda, H. Tanaka and Y. Shoyama, *Cytotechnology*, **34**, 197-204 (2000). 3)N. Fukuda, H. Tanaka and Y. Shoyama, *Analyst*, **125**, 1425-1429 (2000). 4)H. Tanaka, W. Putalun, C. Tsuzaki and Y. Shoyama, *FEBS Lett.*, **404**, 279-282 (1997). 5)S.J. Shan, H. Tanaka and Y. Shoyama, *Anal. Chem.*, **73**, 5784-5790 (2001). 6)O. Morinaga, S. Nakajima, H. Tanaka and Y. Shoyama, *Analyst*, **126**, 1372-1376 (2001). 7)O. Morinaga, H. Tanaka and Y. Shoyama, *Analyst*, **125**, 1109-1113 (2000). 8)P. Waraporn, O. Morinaga, H. Tanaka and Y. Shoyama, *Phytochem. Anal.*, accepted.

We have pursued the micropropagation of the medicinal plant with tissue culture aiming at the production of homogenous species, the promotion of superior species, and following the stable supply of crude drugs. In the breeding research of superior medicinal plants with high-yield bioactive natural products, the analytical methods of these compounds with highly sensitive and rapid characteristic are integral. We recently developed immunological methods that are convenient, highly sensitive, and reproducible, as well as being able to simultaneously analyze multiple samples in order to screen multiple samples in the above-mentioned breeding research.

Specifically, we have utilized monoclonal antibodies (MAbs) against major bioactive natural products, a total of about 20 MAbs, in the analytical methods. First of all, enzyme-linked immunosorbent method (ELISA) is developed for the qualitatively detection of these compounds with high sensitivity, reliability and simpleness. And we established a new immunostaining method named Eastern blotting, which is applicable to evaluate these low molecular weight compounds semiquantitatively. Moreover, immunochromatographic strip test which is known to be characteristic of rapid visual assay is presented in the latter half of this review. Based on verifications using a wide variety of procedures, our methods using these MAbs have been confirmed as a highly reliable screening method with sufficient accuracy to screen strains of medicinal plant. We are presently working around the clock using this assay to create new strains with high added values.