

自然免疫を基軸にした食による生体防御

近澤 未歩

名古屋大学大学院生命農学研究科 博士課程
(現 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任助教)

緒言

免疫系は、病原体など外来異物の感染から生体を予防するシステムであり、自然免疫と獲得免疫(適応免疫)がある。自然免疫は病原体などの多様な抗原に対して発動する初期防御機構であるが、外来抗原のみでなく、自己由来の内因性抗原を認識することができる¹⁾。自然免疫系に認識される内因性抗原には、アポトーシス細胞、細胞内分子や炎症タンパク質、翻訳後修飾を受けた自己分子などが挙げられる。自然免疫系による内因性抗原の認識は重要なハウスキーピング機能であると考えられ、自己免疫応答の阻害にも重要である。病原体や微生物由来の外来抗原と自己由来の内因性抗原は、共通した分子(自然抗体やスカベンジャー受容体)により認識されることから、自然免疫系はこれら抗原の構造を厳密に見分けているのではなく、抗原に共通した何らかのパターンを感知し、結合することが予想される。

非酵素的な翻訳後修飾のひとつである糖化は、糖とタンパク質の反応であり、酵素的に起こるグリコシル化とは区別される²⁾。グルコースなどの還元糖はタンパク質、核酸、脂質などのアミノ基と反応し、シッフベース、アマドリ産物を生成し、最終的には最終糖化産物(Advanced Glycation Endproducts: AGEs)を生成する。AGEsは、糖尿病の際の高血糖状態や加齢により生体内に蓄積することが確認されており³⁾、糖化に伴う修飾、架橋形成、不溶化、機能の低下などは、組織の機能障害の一因であると予想されている。AGEsが抗原性を持つことや、獲得免疫系を活性化して抗体産生を引き起こすこと、自己免疫応答を誘発することが知られるが、自然免疫応答との関与については未解明な部分が多い。

老化や疾病時には自然免疫系の機能が低下することが知られるが、自然免疫系の機能を適切な活性化状態に維持することは、疾病の一次予防として重要であると考えられる。本研究課題では、自然免疫系分子である補体C1qのAGEs結合分子としての機能性解析、食品成分によ

る自然免疫活性化機構の解析を目的とし、検討を行った。

実験方法・結果

1. 修飾タンパク質結合因子としての補体C1qの機能性解析

過去の検討において、ブルダウンアッセイによるヒト血清中のAGEs結合タンパク質の探索を行ったところ、補体C1qが同定された。C1qは自然免疫系のエフェクター分子の一種であり、補体古典経路の開始因子である⁴⁾。コラーゲン様ドメイン、球状ドメインから成るユニークな構造を持ち、およそ410 kDaの巨大な分子を構成している。等温滴定型カロリメーターを用いた相互作用解析を行った結果、C1qとAGEs-BSAの間で相互作用に伴う発熱反応が確認され、直接的な相互作用が起こっていることを確認した(図1)。

また、C1q上のAGEs結合部位を明らかにするため、C1qペプチドを用いた競合アッセイを行ったところ、AGEs

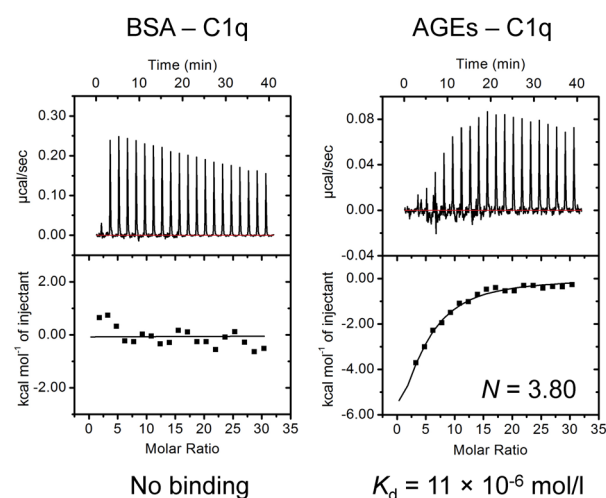


図1 等温滴定型カロリメーターによるAGEsとC1qの相互作用解析

BSAとC1qでは相互作用は認められないが、AGEsとC1qでは相互作用に伴う発熱が確認された。

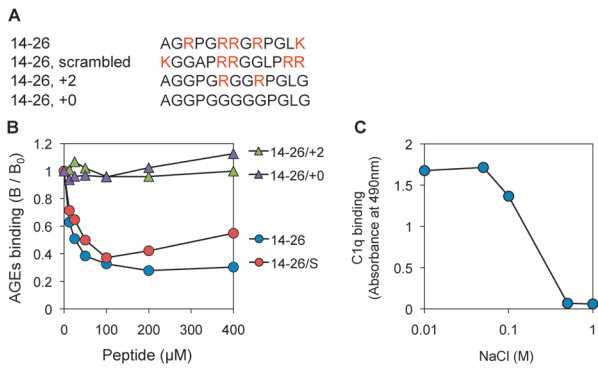


図2 AGEs-C1qの相互作用と電荷

A. Competitive Assayで用いたC1qA₍₁₄₋₂₆₎ ペプチド配列。B. C1qA₍₁₄₋₂₆₎ ペプチドを用いたCompetitive ELISA。C. NaCl添加によるAGEs-C1q相互作用阻害。C1qA₍₁₄₋₂₆₎ ペプチドの塩基性アミノ酸の数を減らすことで、AGEs-C1q相互作用の阻害活性が消失した。スクランブルペプチドは阻害活性を持つことから、C1qA₍₁₄₋₂₆₎ の配列は重要でないことがわかる。また、AGEs-C1q結合アッセイの際、Buffer中にNaClを添加することにより相互作用が阻害された。

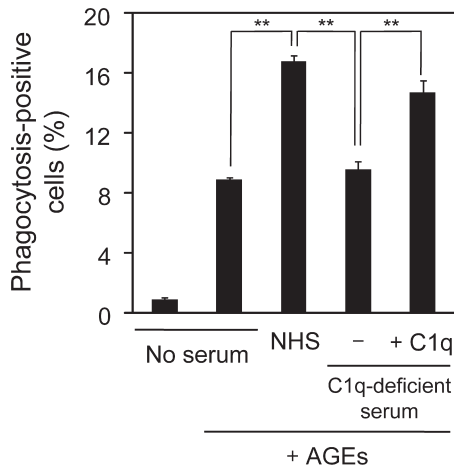


図3 マクロファージによるAGEs取り込み実験

THP-1細胞に蛍光標識したAGEsとヒト血清を共投与し、AGEsの取り込みをフローサイトメトリーで測定した。通常ヒト血清 (NHS) 添加によりAGEs取り込みは促進されるが、C1q除去血清 (C1q-deficient serum) では取り込みは促進されなかった。また、C1q除去血清に精製C1qを添加することでAGEs取り込み促進活性が回復した。***p*<0.01 (Tukey's test)

はC1qA鎖の14-26番目の領域 (C1qA₍₁₄₋₂₆₎) に結合することが明らかになった。C1qA₍₁₄₋₂₆₎ はリジン、アルギニンといった塩基性アミノ酸を豊富に含む領域であり、リガンドとの相互作用には電荷が重要であることが予想された。そこで、通常C1qA₍₁₄₋₂₆₎ に5個存在する塩基性アミノ酸を2個、0個に減らしたペプチドを作製し、競合アッセイを行った結果、塩基性アミノ酸が2個以下になることにより、結合阻害活性が完全に消失すること

が明らかとなった (図2B)。また、AGEsとC1qの結合アッセイの際、バッファー中にNaClを高濃度添加すると、結合はほぼ100%阻害されることから、相互作用には電荷が関与する可能性が高いと考えられた (図2C)。

次に、AGEsにC1qが結合することによる生体の機能性について明らかにするため、分化THP-1細胞に蛍光標識したAGEsとヒト血清を共投与し、AGEsの取り込みをフローサイトメトリーにて確認した結果、血清の投与によりAGEsの取り込みは大きく増加することが明らかとなった (図3)。C1q除去血清では取り込み促進は起こらないが、C1q除去血清に精製C1qを添加することで、通常血清と同程度まで取り込みが回復することから、血清によるAGEs取り込み促進におけるC1qの重要性が示唆された。

2. カテキン類による自然免疫系活性化の検討

これまでの検討により、緑茶中に含まれるフラボノイドの一種であるエピガロカテキンガレート (EGCG) とヒト血清アルブミン (HSA) をインキュベートすることにより、マウス血清中のIgM自然抗体との交差性が上昇することが確認された。また、EGCG-HSAの抗原性の上昇に伴い、酸化タンパク質の指標であるカルボニルタンパク質が生成していることも明らかとなり、EGCGはHSAと反応することで、内因性抗原と類似する特性を生み出し、自然免疫応答を活性化することが予想された。そこで、EGCGの自然免疫調節機能について解析を行った。

まず、EGCG摂取により、自然免疫応答が活性化されるかについて検討した。マウスにPBSで溶解したEGCG (1匹当たり10 mg) を経口投与し、24時間後に採血を行い、血中のIgM抗体量とカルボニルタンパク質量をELISAにより測定した。その結果、EGCG投与群はPlacebo投与群と比較し血中IgM抗体量の増加、カルボニルタンパク質量の減少傾向が確認された (図4)。

次に、タンパク質のEGCG処理により、タンパク質の構造変化が起きていると予想し、どのような構造が生成されているのか明らかにするため、LC-MS/MSによるアルデヒドの検出を試みた。アルデヒドは*p*-Aminobenzoic Acid (ABA) とNaCNBH₃を用いた還元アミノ化反応により標識し、LC-MS/MSによる検出を行った⁵⁾。その結果、EGCG-HSAより、Lysine残基由来のカルボニル化合物であるα-aminoadipic semialdehyde (AAS) が検出

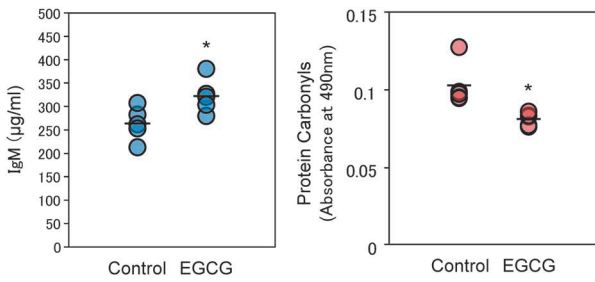


図4 EGCG投与マウス血清中のIgM抗体量、カルボニル量の変化

マウスにPBSに溶解したEGCGを経口投与し、24時間後に採血を行った。血清中のIgM抗体量、カルボニルタンパク質量をELISAにより測定した。 $*p < 0.05$ (Student's *t*-test)

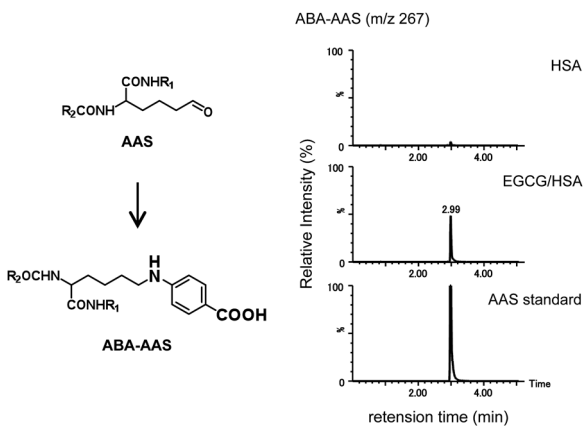


図5 EGCG処理HSA中のカルボニル検出

Lysine由来のカルボニルであるAASをABAにより標識し、LC-MS/MSにより検出した。結果、HSAをEGCG処理することにより、AASが生成することを確認した。

された(図5)。

考察

今回、内因性抗原のひとつであるAGEsの自然免疫系による認識や、生体内における機能性を明らかにするために検討を行った。AGEsの蓄積は、老化や糖尿病に伴う種々の機能変化に関与することが予想されるが、AGEs蓄積を防ぐための機構のひとつとして、補体C1qによるAGEsの認識、マクロファージによるAGEs除去促進が重要である可能性が示唆された。

また、食品成分であるEGCGがタンパク質の自然抗体に対する抗原性を増大させること、タンパク質のEGCG処理により、酸化修飾に伴い生成するカルボニル

構造が生成することを確認した。EGCG処理により、AGEsなどの翻訳後修飾と同様にタンパク質の構造変化が起こり、表面電荷が減少することで、自然免疫応答を活性化する性質が付与されることが予想される。マウスへの投与実験においても、EGCGによる自然免疫系活性化の可能性が示唆されたが、生体内でどのようなメカニズムで活性化が起こっているのかについては今後より詳細な検討が必要である。

これまでに得られた結果より、自然抗体やC1qによる抗原認識においては、糖化などの修飾やEGCG処理に伴うタンパク質の表面電荷の減少が重要であることが予想された。病原体や内因性抗原の特定の構造ではなく、電荷の変化を指標とする抗原認識は、多様な抗原に対して自然免疫系が速やかに対応するためのメカニズムのひとつであることが予想される。

要約

AGEsと相互作用する血清因子として補体C1qを同定し、その相互作用メカニズムや生体内における機能性について解析を行った。結果、C1qとAGEsは両者の表面電荷を介して直接的に相互作用すること、C1qがAGEsに結合することでマクロファージによるAGEsの取り込みを促進することを明らかにした。また、自然免疫系活性化に寄与することが予想される食品成分として、EGCGに着目し検討を行った。結果、EGCGはタンパク質のLysine残基を修飾することで、タンパク質の自然抗体に対する抗原性を上昇させ、自然免疫系を活性化させることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) C. J. Binder: *J. Clin. Immunol.*, **30**, 56–60, 2010.
- 2) R. Singh, et al: *Diabetologia*, **44**, 129–146, 2001.
- 3) J. A. Dunn, et al: *Biochemistry*, **28**, 9464–9468, 1989.
- 4) U. Kishore, U. B. M. Raid: *Immunopharmacology*, **49**, 159–170, 2000.
- 5) M. Akagawa, et al: *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 1059–1065, 2006.