

阿波晩茶由来抗アレルギー物質
ピロガロールの同定とその薬理機構の解明

2020

中野 友寛

第1章 緒言

アレルギー疾患は遺伝子発現異常を伴う難治性多因子疾患であり、異常発現した疾患感受性遺伝子を制御する薬物は、有効な抗アレルギー薬となることが期待される。我々は天然物から、このような疾患感受性遺伝子発現を制御する薬物の探索を行ってきた。

アレルギー性鼻炎は通年性のものと季節性のものに分類される。花粉症は代表的なアレルギー疾患の一つであり、樹木や草の花粉に誘発される季節性鼻過敏症で、日本人の約29.8%が罹患している国民病である¹⁾。我々はアレルギー症状と遺伝子発現状態が相関する遺伝子を疾患感受性遺伝子として位置付けており、これまでに花粉症のアレルギー疾患感受性遺伝子としてヒスタミンH₁受容体(H1R)遺伝子を見出した²⁻⁵⁾。一方、1型ヘルパーT細胞(Th1)/2型ヘルパーT細胞(Th2)バランスがTh2側に傾くと、鼻過敏症や喘息の症状を起こすことが知られている⁶⁾。それゆえ、インターロイキン4(IL-4)やIL-5、IL-9およびIL-13のようなTh2サイトカインはアレルギー性鼻炎において重要なメディエーターとなりうる⁷⁾。その中でもIL-4はB細胞におけるIgE産生やTh2反応の増大に中心的な役割を果たしている⁶⁾。

我々は、toluene 2,4-diisocyanate (TDI) 鼻過敏症モデルラットにおいて、抗ヒスタミン薬を一週間以上長期投与することにより、Protein kinase C δ (PKC δ) /heat shock protein 90 (HSP90) シグナルを介したH1R遺伝子発現がほぼ完全に抑制されることを明らかにした。しかし、抗ヒスタミン薬だけでは鼻アレルギー様症状を完全には抑制する事が出来なかった^{4),8)}。また、スギ花粉症患者に対する抗ヒスタミン薬の初期療法の影響に関する研究においても、初期療法によりH1R遺伝子発現が有意に抑制されているにもかかわらず、鼻症状が残る症例が見出された。このことから、H1Rの遺伝子発現亢進に関与する細胞内シグナルの他にも、アレルギー症状に深くかかわる細胞内シグナルが存在することが示唆された。

近年、我々はTDI鼻過敏症モデルラットにおいて、IL-9遺伝子がアレルギー感受性遺伝子であり、nuclear factor of activated T-cells (NFAT) シグナルがIL-9遺伝子発現に関与していることを明らかにしている⁹⁾。また、PKC δ /HSP90シグナルを介したH1R遺伝子発現、およびNFATシグナルを介したIL-9遺伝子発現をどちらも抑制する事で、モデルラットの鼻症状は著しく改善された。つまり、H1R遺伝子発現とIL-9遺伝子発現の両方を抑制することが、十分なアレルギー治療効果を得るために必要であると考えられる⁹⁾。

我々は様々な天然物の抗アレルギー作用に着目して研究を行ってきた。その中の一つ、徳島県特産である『阿波晩茶』は、徳島の山間部で生産されている後発酵茶である。一番茶のみを摘み取り釜茹でした後、桶で一か月以上漬け込み、乳酸発酵させるという独特な製法をとる。お茶にはカテキン類が含まれており、阿波晩茶にも抗アレルギー作用

や抗ガン作用があると考えられている。

我々は阿波晩茶の熱水抽出物が、toluene-2,4-diisocyanate (TDI) 感作ラットの鼻症状を緩和することを明らかにした¹⁰⁾。しかし、その抗アレルギー活性の根本的なメカニズムはまだ明らかでない。

そこで、阿波晩茶より抗アレルギー物質の単離・同定を試み、その有効成分の薬理作用の解明を目的として研究を開始した。この研究は H1R 遺伝子発現シグナル以外のアレルギーに重要なシグナルの一端を明らかにし、花粉症をはじめとしたアレルギー疾患の治療において重要な分子標的を見つけることにつながると考えられる。

第2章 実験方法

2.1 阿波晩茶抽出物の調製

茶葉 10 g を 90 °C の熱水 1000 mL で 5 分間抽出し、熱時ろ過後冷却した。その抽出液を真空凍結乾燥し、抽出物を得た。

2.2 阿波晩茶抽出物の分離・精製

2.2.1 溶媒間分配

阿波晩茶抽出物を水-酢酸エチル間で分配して酢酸エチル画分、水画分に分離した。さらに水画分を水-ブタノール間で分配し、水画分とブタノール画分を作製した。

2.2.2 カラムクロマトグラフィー

酢酸エチル画分をカラムクロマトグラフィーにより、さらに分離・精製した。酢酸エチル画分をカラム(内径 2.5 cm)、充填剤(Sephadex LH20)を用い、アセトンで溶出して3つのフラクションに分離した。

2.2.3 構造決定

得られた化合物は、1次元 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及び2次元 HH-COSY、HMBC、HSQC により構造決定した(日本ブルカー、Kanagawa; AV500)。内部標準として tetramethylsilane を用いた。

2.3 HeLa 細胞、RBL2H3 細胞および BHK21 細胞の培養

2.3.1 使用細胞

ヒト子宮頸ガン細胞 HeLa 細胞、ラット好塩基性白血病細胞 RBL2H3 細胞、およびシリアンハムスター腎由来細胞株 BHK21 細胞を用いた。BHK21 細胞は、NFATc1-GFP 融合タンパク質、および NFATc2-GFP 融合タンパク質をそれぞれ恒常的に発現させるよう、遺伝子導入されている細胞であり、puromycin によりセクションしている(広島大学原爆放射線医科学研究所疾患モデル解析研究分野 神沼修教授より供与)。

HeLa 細胞では Minimum Essential Medium-alpha (MEM-alpha) を、RBL2H3 細胞では Minimum Essential Medium (MEM) を、BHK21 細胞では Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (DMEM, high glucose) を用いてそれぞれ培養シャーレにまき、37°C、5%CO₂ インキュベータにて静置培養した。約 80% confluent の状態で実験を行った。

2.3.2 MEM-Alpha、MEM、および DMEM, high glucose の調整

約 800 mL の超純水に MEM-Alpha (Gibco Grand Island, NY, USA) の粉末と NaHCO_3 2.2 g を添加して完全に溶解させた後、超純水で最終液量を 1,000 mL とした。この溶液を濾過滅菌し、2 本の 500 mL 用培養瓶に 500 mL ずつ分注した。次に無菌的に抗生物質 (10,000 Units/mL penicillin G sodium, 10 mg/mL streptomycin in ultrapure water) を 6 mL と 56°C で 30 分間インキュベートし非働化した、ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma, MO, USA) を最終濃度が 8% となるように添加した。

約 800 mL の超純水に MEM (With Earle's salts, L-glutamine and non-essential amino acids without sodium bicarbonate) の粉末 (Sigma-Aldrich) と NaHCO_3 2.2 g を添加して完全に溶解させた後、超純水で最終液量を 1,000 mL とした。この溶液を濾過滅菌し、2 本の 500 mL 用培養瓶に 500 mL ずつ分注した。次に無菌的に抗生物質 (10,000 Units/mL penicillin G sodium, 10 mg/mL streptomycin in ultrapure water) を 6 mL と 56°C で 30 分間インキュベートし非働化した、ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma, MO, USA) を最終濃度が 10% となるように添加した。

約 800 mL の超純水に DMEM, high glucose (With L-glutamine, pyridoxine hydrochloride, 110 mg/L sodium pyruvate without sodium bicarbonate) の粉末 (Life Technologies) と NaHCO_3 2.2 g を添加して完全に溶解させた後、超純水で最終液量を 1,000 mL とした。この溶液を濾過滅菌し、2 本の 500 mL 用培養瓶に 500 mL ずつ分注した。次に無菌的に抗生物質 (10,000 Units/mL penicillin G sodium, 10 mg/mL streptomycin in ultrapure water) を 6 mL と 56°C で 30 分間インキュベートし非働化した、ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma, MO, USA) を最終濃度が 10% となるように添加した。さらに、NFATc1-GFP 融合タンパク質および NFATc2-GFP 融合タンパク質発現細胞を選択するために、puromycin を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように添加した。

2.3.3 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline (PBS(-))の調整

約 800 mL の超純水に試薬 (2.68 mM KCl, 136.1 mM KH_2PO_4 , 136.9 mM NaCl, 8.10 mM Na_2HPO_4) を添加し完全に溶解させた。その後、最終液量を 1,000 mL にあわせ、2 本の 500 mL 用培養瓶に 500 mL ずつ分注し、オートクレーブにかけ使用した。

2.3.4 細胞の継代

80% confluent な状態まで培養した細胞に trypsin- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 液 (GIBCO) を加え細胞を剥した後、チューブに移して 1,000 rpm で 3 分間遠心した。上清をぬきとり遠心管底部のペレット状の細胞に適量の MEM を加えて再懸濁し、シャーレに播種した。

2.3.5 細胞の凍結

80% confluent な状態まで培養した細胞に trypsin-EDTA 液を加え細胞を剥した後、チューブに移して 1,000 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去し、セルバンカー1 (十慈フィールド) を加えて $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL となるように希釈し、その細胞浮遊液を 1 mL ずつ 2 mL Self standing Cryogenic Vial に分注した。250 mL の isopropanol を入れた細胞凍結用容器 (NALGEN; Cryo 1°C Freezing Container) にバイアルをセットし、-80°C deep freezer にて overnight で緩やかに凍結させた後、液体窒素中で保存した。

2.3.6 細胞の解凍

細胞を保存したバイアルを deep freezer から取り出し、直ちに 37°C の恒温槽に入れて振り混ぜながら速やかに解凍した。その後、適当な濃度に希釈してシャーレに播種した。

2.4 鼻過敏症モデルラットの作製

動物実験：アレルギーモデル動物を用いたアレルギー性鼻炎発症機序の研究

承認番号 H22~H25, 徳動物 10103 号

H25~H26, 徳動物 13056 号

H26~H29, 徳動物 14055 号

H29~H32, T29-60 号

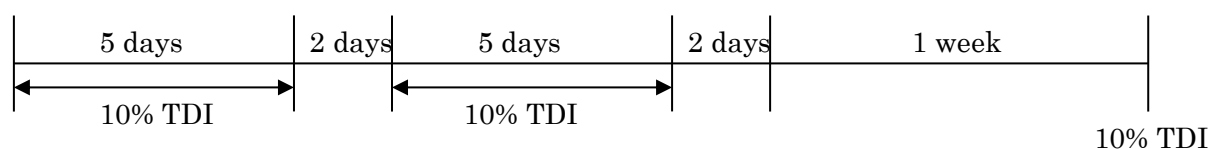
2.4.1. 実験動物

6 週齢 Brown- Norway 系雄性ラット (SLC, Hamamatsu, Japan) を使用した。動物は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ の室温で 12 時間毎の昼夜サイクルで飼育した。

2.4.2. TDI (toluene 2,4-diisocyanate) 感作

TDI (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) 感作は、Tanaka らの方法¹¹⁾ の変法を用いた。TDI 感作として、Brown- Norway 系雄性ラットの両側鼻前庭に極細耳鼻用綿棒を用い、10 μl の 10% toluene 2,4-diisocyanate (TDI)-酢酸エチル溶液を 1 日 1 回連日 2 週間塗布し (TDI 感作)、その後 1 週間無処置期間をおいた上で 10% TDI 溶液の鼻前庭塗布にて誘発した (Fig. 1)。

なお、以上の実験における症状の観察および実験結果の比較のため、TDI 塗布と同時に同回数酢酸エチルのみを塗布した対照動物を用いた。



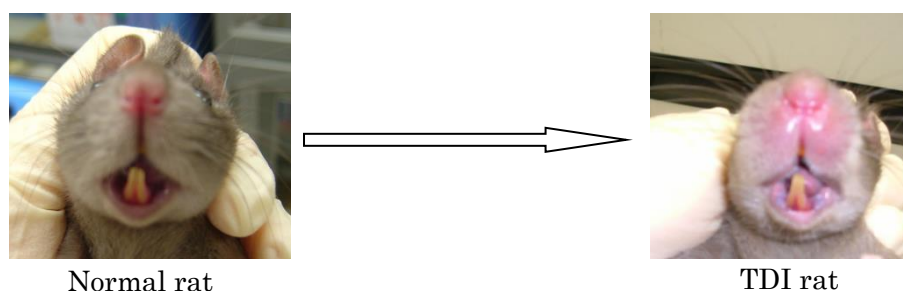


Figure 1. 鼻過敏症モデルラット作製スケジュール

2.4.3 ラット鼻粘膜組織の調整

TDI 感作 21 日目(TDI 誘発直前)、4 時間後に断頭し、鼻粘膜組織を採取して、mRNA の定量に供した。なお、採取した組織サンプルは後で処理するため、解剖後直ちに 500 μ L の RNA later (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)中に浸漬し、 -80°C で保存した。

RNA later は、非凍結細胞内の RNA を *in situ* で安定に保存するための毒性のない溶液状組織保存用試薬である。組織サンプルを採取してすぐに RNA later 中に浸漬することで、RNA の品質や量を損なうことなく保存することができる。

2.5 リアルタイム RT-PCR 法

2.5.1 ラット組織からの total RNA 抽出

RNA later に保存していたラット鼻粘膜組織を溶液から取り出し、組織量の 10 倍量の TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% sodium lauryl sulfate, 100 μ M 2-mercaptoethanol, 25 mM sodium citrate ; pH 7.0)または RNAiso (TaKaRa, Shiga)に浸漬し、直ちにホモジナイズ (POLYTRON RT10-35(Model PT-K; kinematica AG, Littau/Luzern, Switzerland)) して細胞を粉碎した後、遠心 (12,000 rpm, 10 min, 4°C) して、可溶化されないゴミを沈殿させて取り除き、上清を以下の操作に用いた。

TRIzol Reagent または RNAiso の 0.2 倍量 chlorform を加え、15 秒間強く振盪し二層に分離させた後、15,000 rpm, 15 分, 4°C で遠心した。RNA を含む上層を採取し、上層と同量の isopropanol を加え 15 秒間強く振盪し室温で 5 分間放置したものを 15,000 rpm, 10 分, 4°C で遠心すると RNA のペレットが得られた。これを 75% EtOH (-20°C) 500 μ L で洗浄するため vortex して 10 分室温で放置した。15,000 rpm, 10 分, 4°C で遠心後、得られたペレットに 20 μ l diethylpyrocarbonate (DEPC) 水を加え RNA solution とした。これを NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)により波長 260 nm, 280 nm で吸光度測定し、260nm の吸光度と 2 つの波長の比による検定で、それぞれ total RNA 濃度と純度を測定した。

2.5.2. RBL-2H3 細胞からの total RNA 抽出

PBS(-)で2回洗浄した後、RNAiso Plus を 700 μ L 加えかきとる。chloroform を 210 μ L 加え、15 秒間強く振盪し二層に分離させた後、15,000 rpm、15 分、4°Cで遠心した。RNA を含む上層を採取し、上層と同量の isopropanol を加え、15 秒間強く振盪し、15,000 rpm、15 分、4°Cで遠心することで、ペレット状の RNA を得た。このペレットに 75%エタノール (-20°C) を 0.5 ml 加え洗浄した。さらに、15,000 rpm、15 分、4°Cで遠心後、エタノールを除き、得られたペレットに diethylpyrocarbonate (DEPC) 水を加え、RNA solution とした。分光光度計 (Thermo : Nanodorop ND-1000) により、波長 260 nm、280 nm で吸光度を測定し、260nm の吸光度と 2つの波長の比による検定で、各サンプルの total RNA 濃度と純度を測定した。

2.5.3. cDNA 合成

サンプルチューブに total RNA 1.0 μ g 相当の RNA solution となるように DEPC 水を加え、全量を 5 μ L とした。PrimeScript® RT reagent Kit を用いてサーマルサイクラー (Biometra : T3000 thermocycler) で以下のプログラムにより逆転写を行った。

組成	Volume/Tube (μ L)
RNA solution (1.0 μ g/Tube 相当)	5.0
5 \times PrimeScript Buffer	2.0
Oligo dT Primer	0.5
Random 6 mers	2.0
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
Total	10.0

PrimeScript® RT reagent Kit を用いた逆転写プログラム

	Step1	Step2	Step3
Temperature(°C)	37	85	4
Time	15min	5sec	∞

2.5.4 リアルタイム PCR

Fast Start Universal Probe Master (ROX)(Roche, Mannheim, Germany)を含む以下の試薬を混合し、Micro Amp Optical 96-well Reaction Plate の 1 ウェル当たり 20 μ l の反応液を調製した。Sequence Detector (GeneAmp 7300 Sequence Detection System、Applied Biosystems) にて PCR 反応を行い、PCR 産物の増幅曲線をリアルタイムで検出し、Sequence Detection ソフトウェアを用いて解析、定量化した。

Rat H1R,IL-4,IL-9,IL-13 及び GAPDH

cDNA	2.0 μ L
DEPC 水	4.65 μ L
Forward primer	0.4 μ L
Reverse primer	0.4 μ L
probe	0.8 μ L
GAPDH For	0.275 μ L
GAPDH Re	0.275 μ L
GAPDH probe	0.8 μ L
ROX Reference Dye	0.4 μ L
Premix Ex Taq	1.0 μ L
total	20 μ L

human H1R 及び GAPDH

cDNA	2.0 μ L
DEPC 水	5.0 μ L
Forward primer	0.4 μ l
Reverse primer	0.4 μ l
probe	0.8 μ l
GAPDH probe+primer	1.0 μ l
ROX Reference Dye	0.4 μ L
Premix Ex Taq	1.0 μ L
total	20 μ l

なお、定量法としては Calibrator (陽性対象 ; Lot も含めてまったく同一の cDNA 溶液) を使用して mRNA 発現量の相対値を求める、Relative Standard Curve Method (Separate Tubes)を採用した。また、定量的 RT-PCR の主な変動の要因である RNA の純度や逆転写効率の差を補正する内部標準 (internal control) として、細胞の活性化あるいは増殖といった環境条件に伴う発現の変動が理論上なく、常に一定レベルで発現していると考えられているハウスキーピング遺伝子の GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子に特異的な TaqMan Probe と Primer (TaqMan rodent GAPDH Control Reagents) を用いた。

また、以下のプログラムで反応させる。

	Initial steps	Melt	Anneal/Extend
Stage	Hold	Cycle(40cycles)	
Temperature	95.0°C	95.0°C	60.0°C
Time(min)	0:30	0:05	0:31

用いた Primer 及び Probe を以下に示す。なお、rat GAPDH の primer 及び probe は市販の製品 (Applied Biosystems : TaqMan Rodent GAPDH control reagents)を用いた。

Primer/probe name		Sequence
human H1R mRNA	Sense primer	5'-CAGAGGATCAGATGTTAGGTGATAGC-3'
	Anti sense primer	5'-AGCGGAGCCTCTTCCAAGTAA-3'
	Probe	FAM-CTTCTCTCGAACGGACTCAGATACCACC-TAMRA
rat H1R mRNA	Sense primer	5'- TATGTGTCCGGGCTGCACT -3'
	Anti sense primer	5'- CGCCATGATAAAACCCAAGT -3'
	Probe	FAM- CCGAGAGCGGAAGGCAGCCA -TAMRA
rat IL-4 mRNA	Sense primer	5'- CAGGGTGCTTCGCAAATTTTAC -3'
	Antisense primer	5'- CACCGAGAACCCCAAGACTTG -3'
	Probe	FAM- CCCACGTGATGTACCTCCGTGCTTG - TAMRA
rat IL-9 mRNA	Sense primer	5'-GACGACCCATCATCAAATGC-3'
	Anti sense primer	5'-CTGTGACATTCCCTCCTGGAA-3'
	Probe	FAM-TTGTGCCTCCCCATCCCATCTGAT- TAMRA

rat IL-13 mRNA は primer probe キットを用いた (Applied Biosystems (Rn00587615-A1 1113)) GAPDH mRNA は Rodent GAPDH Control Reagents (VIC™ Probe) を用いた (Applied Biosystems) .

2.6 Calcineurin Activity Assay

Ca²⁺/calmodulin dependent Ser/Thr protein phosphatase 2B (PP-2B; calcineurin)の活性は、calcineurin cellular activity assay kit を用いて測定した。Calcineurin 活性は基質として RIIphosphopeptide 用い、遊離したリン酸の 620 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。なお、標準曲線として phosphate standard を用いた。

2.7 BHK21 細胞における緑色蛍光タンパク質の観察

BHK21 細胞を 35 mm glass dish (IWAKI) で培養し、刺激後 PBS(-)で 2 回洗浄した後 4% paraformaldehyde を含む PBS (-) を入れ、4°Cで 10 分間静置 (固定) した。PBS (-) で 5 分間洗浄した後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を 1% BSA、0.1% Tween20 in PBS (-) で希釈した溶液 (最終濃度 0.25 µg/mL) を入れ 10 分間静置し、核染色を行った。0.1% Tween20 in PBS (-) で洗浄後、PBS (-) で 5 分間洗浄し、95% glycerol in PBS (-) を滴下して、カバーガラスで封入した。封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510:ZEISS) で観察した。

2.8 Transient transfection

組換え DNA 実験： ヒスタミン受容体の分子レベルの研究

承認番号 第 23-94 号 (H23~H25)

第 25-163 号 (H25~H26)

第 26-31 号 (H26 ~H27)

第 27-167 号 (H27~R1)

2.8.1 NFAT 発現用プラスミド DNA

NFAT 発現用プラスミド DNA は、神沼修教授より供与していただいた。pEF6/His プラスミド DNA に NFATc1 (NM172390 (349-2601))、または NFATc2 (NM173091 (212-2942)) の領域を挿入しており、FLAG tag、および His tag を保有している¹²⁾。

2.8.2 Transformation

competent cell (JM109) 100 μ L を氷上で解凍した後、プラスミド DNA を適量加え氷上で 30 分間放置した。正確に 42°C とした温水中で 30 秒間ヒートショックを行った後、氷上で 2 分間放置した。そこに 900 μ L の ampicillin (-) LB 培地を加えて 37°C で 90 分間培養後、25°C、5,000 rpm で 5 分間遠心した。800 μ L の上清を捨て、ペレットを懸濁して ampicillin (nacalai tesque) (+) LB plate にまき、37°C で overnight 培養した。

2.8.3 プラスミド DNA の少量調製

LB plate 上にできたコロニーを pick up し、3 mL の ampicillin (+) LB 培地に入れ、37°C で overnight 培養した。培養液を 1.5 mL チューブに 1.4 mL 移し、4°C、15,000 rpm で 1 分間遠心して大腸菌を集菌した。得られたペレットに SolutionI (0.45% glucose、12.5 mM Tris-HCl pH 8、5 mM EDTA) を 100 μ L 加え vortex し懸濁した。SolutionII (0.2 N NaOH、1% SDS) を 200 μ L 加え、5 回穏やかに混和し 3 分間放置した後に SolutionIII (3 M 酢酸カリウム、11.5% 酢酸) を 150 μ L 加え穏やかに混和した後、4°C、15,000 rpm で 15 分間遠心した。新しい 1.5 mL チューブにカラムをセットし、上清をカラムに移して室温、15,000 rpm で 1 分間遠心した。チューブに溜まった濾液を捨て、750 μ L の Column Wash Solution (CWA (+EtOH)) をカラムに加えてさらに室温、15,000 rpm で 1 分間遠心、濾液を捨てて 250 μ L の CWA を加えて同一条件下でもう一度遠心を行い、カラムを洗浄した。新しい 1.5 mL チューブにカラムをセットし、Nuclease-Free Water を 30 μ L 加えて 3 分間静置し、室温、15,000 rpm で 1 分間遠心してプラスミド DNA 溶液を回収した。

2.8.4 プラスミド DNA の大量調製

大腸菌グリセロールストックを、少量爪楊枝を用いて ampicillin (+) LB 培地 100 mL に添加し、37°C で overnight 培養した。培養液を 50 mL コニカルチューブに移し、4°C、6,000 rpm で 15 分間遠心して集菌し、得られたペレットより NucleoBond PC100 (MACHERY-NAGEL) を用いてプラスミドを精製した。

2.8.5 transient transfection

調製したプラスミド DNA を PolyFect[®] Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて RBL2H3 細胞に一過性に導入した。RBL2H3 細胞を 100 mm dish で培養し、12~24 時間後に 60~80% コンフルエントになったところでプラスミド DNA を導入した。プラスミド DNA は 1 dish あたり 6.0 µg のプラスミド DNA が transfection されるようにした。血清及び抗生物質 (penicillin G + streptomycin (p+s)) を含まない EMEM でプラスミド DNA を 300 µL にメスアップし、PolyFect Transfection Reagent を 50 µL 加え、8 分間インキュベートした (溶液 A)。培養した RBL2H3 細胞は予め PBS (-) で洗浄し、FBS (+), p+s(+) の EMEM 7 mL を各 dish に加えておき、同培地を 1 mL 加えて希釈した溶液 A を全量、各 dish に添加し、6 時間インキュベートした。その後、FBS (+), p+s(+) の EMEM (+) と交換し、さらに 12 時間インキュベートした。

2.9 Western blot

2.9.1 タンパク質抽出

100 mm dish に RBL2H3 細胞、または BHK21 細胞を 24 時間以上培養した。80% confluent の状態になったのを確認、もしくは transfection 後に 18 時間経過したのち、ピロガロールを 10 分間処置した。その後、1 µM イオノマイシンで 30 分間刺激した。処置後、PBS で 2 回洗浄し、200 µL のプロテアーゼインヒビター (Complete Mini : Roche) およびフォスファターゼインヒビター (Phos STOP : Roche) を含む Tris Buffered Saline (TBS) (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.15 M NaCl) を加えてセルスクレーパーで細胞をかきとり、1.5 mL チューブに移し、3,000 rpm、10 分、4°C で遠心した。得られたペレットに lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X, プロテアーゼインヒビター、フォスファターゼインヒビター) を 100 µL 加え、ソニケーションにより細胞を破碎し、15,000 rpm、15 分、4°C で遠心、この上清を全細胞溶解液とした。この溶液のタンパク質濃度を BCA 法によって測定し、タンパク量が 40 µg/10 µL となるように全細胞溶解液を滅菌超純水で希釈したものと、SDS sample buffer (62.5 mM Tris HCl pH6.8, 10% Glycerol, 2% SDS, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 0.001% Bromophenol blue) を 1 : 1 で混合し、100°C で 3 分間処理したものをサンプルとした。

2.9.2 SDS-PAGE

以下の組成の分離ゲルをまずゲル板に流し込んで固化させ、その上に濃縮ゲルを流し込みコームをセットして固化させ、SDS-PAGE用のゲルを作製した。ゲルを泳動装置にセットし、サンプルをゲルにアプライした後、泳動 buffer (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS) 中、300 V、30 mA で電気泳動を行った。

	分離ゲル(10%)	濃縮ゲル
29%AA-1%BisAA 溶液	2 mL	300 μ L
1M Tris-HCl (pH 8.8)	2.25 mL	-
1M Tris-HCl (pH 6.8)	-	375 μ L
10% SDS	60 μ L	30 μ L
3% APS	190 μ L	95 μ L
滅菌超純水	1.5 mL	2.2 mL
TEMED	2.5 μ L	2.5 μ L

2.9.3 Western blot

SDS-PAGEにより分離したタンパクを Immun-Blot PVDF Membrane (BIO-RAD) に 300 V、160 mA の条件下で 60 分間転写した。メンブレンをブロッキング液 (3% Skim Milk を含む TBSt (20 mM Tris-HCl pH 8、0.15 M NaCl、0.1% Tween-20) に浸し、室温で 60 分間ブロッキングした。ブロッキング後、メンブレンを TBSt で 2 度洗浄した。続いて抗体希釈液 (1% BSA を含む TBSt) に一次抗体を適切な濃度に希釈したものにメンブレンを浸し、4°C で overnight インキュベートした。目的タンパク質の検出は 1 次抗体の動物に対する Horseradish Peroxidase (HRP) で標識した抗体 (2 次抗体) を抗体希釈液で 1:20000、または 1:10000 に希釈したものをを用いて行った。

2.10 *in vitro* カルシニューリン-NFAT バインディングアッセイ

2.10.1 RatCN α (1-347)-TF 組み換えタンパク質の発現

RatCN α の遺伝子配列を含む DNA を pColdTF Vector (TaKaRa) に組み込んだ、pColdTF-RatCN α cat(1-347) を BL21(DE3)pLysS Competent Cells (Novagen) にトランスフォーメーションし、LB プレートで培養後、2 mL の ampicillin 50 μ g/mL を含む LB 培地にて 37°C で overnight 振とう培養した。その後 ampicillin 50 μ g/mL を含む LB 培地 100 mL が入った 300 mL フラスコに菌液を全量移して 37°C で振とう培養し、OD₆₀₀ が 0.5 付近になった時点でフラスコを 15°C に移し、24 時間振とう培養を行った。培養後の大腸菌は 10,000 g、20 分、4°C で遠心して集菌し、-80°C で保存した。

2.10.2 RatCNa(1-347)-TF 組み換えタンパク質の精製

大腸菌のペレットを 5 mL の lysis buffer (50 mM Tris pH 7.0、150 mM NaCl) で懸濁し、ソニケーションにより細胞を破砕した。19,000 g、20 分、4°C で遠心し、上清を可溶性画分として回収した。ムロマックカラム S サイズ(室町化学工業)に TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を 1 mL 詰め、His-tag 精製用カラムを作成し、10 mL の lysis buffer で平衡化して、そこに可溶性画分をアプライした。可用性画分が全量流れ落ちたら、5 mL の lysis buffer でカラムを洗浄し、その後さらに 5 mL の wash buffer (50 mM Tris pH 7.0、150 mM NaCl, 10 mM imidazole) で洗浄した。カラムに吸着しているタンパク質は 10 mL の elution buffer (50 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl, 100 mM imidazole) で溶出し、Amicon Ultra-15 (MILLIPORE) で濃縮した後、Prepacked Disposable PD-10 Columns (GE healthcare) で脱塩し、Amicon Ultra-15 で再び濃縮して-80°Cで保存した。

2.10.3 Factor Xa Protease による His-TF タグの切断と RatCNa(1-347)の精製

反応バッファー 4 mL (20 mM Tris pH 7.0、50 mM NaCl、1 mM CaCl₂) 中にタンパク質が 1 mg 含まれるように調製する (最終濃度 0.25 µg/µL)。反応溶液 4 mL あたり 5 U の Factor Xa Protease (QIAGEN) を加え、10°C で 8 時間インキュベートした。反応後 Xa Removal Resin (QIAGEN) を加えて 10 分間 4°C でローテートし、1,000 g、10 分、4°C で遠心して上清を回収して、Factor Xa Protease を除去した。Factor Xa Protease 除去後のタンパク質溶液は Lysis buffer と 1:1 の割合で混合し、Lysis buffer で平衡化した His-tag 精製用カラムにアプライした。溶液が流れ落ちたら 12 mL の lysis buffer をカラムに流し、その後 10 mL の Elution buffer を流した。カラムから溶出した液は各フラクションに分けて全量回収し、SDS-PAGE と CBB Stain One (nacalai tesque) による染色により目的のタンパク質が含まれるフラクションを検出した。目的のタンパク質が含まれるフラクションは Amicon Ultra-15 で濃縮して-80°Cで保存した。

2.10.4 *in vitro* カルシニューリン-NFAT バインディングアッセイ

Binding buffer (50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、10 µM CaCl₂、0.25% NP-40、10 mM NaF、1 mM Na₃VO₄) で平衡化した Anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA) 20 µL に NFAT のカルシニューリン結合領域を含む GST、および FLAG 融合タンパク質 (NFAT-FLAG、CNBR-FLAG) (神沼修教授より供与) を 100 nM になるように加え、4°C で 2 時間ローテートした。ローテート後 6,000 rpm、2 分、4°C で遠心して上清を破棄し、beads を binding buffer で 1 回洗浄、NFAT-FLAG beads または CNBR-FLAG beads とした。NFAT との結合部位、および酵素活性部位を含む RatCNa(1-347) は 10 nM になるように調製し、そこに各インヒビターを DMSO 濃度が 0.1% になるように加え、4°C で 30 分間ローテートした。インヒビターを加えないサンプルも DMSO 濃度が 0.1% になるように DMSO を加え同様にローテートした。ローテート後、RatCNa(1-

347) を含む溶液は全量 NFAT-FLAG beads (20 μ L) に加え、10 分間 4°C でローテートした。ローテート後 6,000 rpm、2 分、4°C で遠心して上清を破棄した後、beads を binding buffer で 3 回洗浄し、40 μ L の SDS sample buffer (125 mM Tris HCl pH 6.8、20% Glycerol、4% SDS、0.2% 2-Mercaptoethanol、0.002% Bromophenol blue) で懸濁して 3 分間煮沸した。室温放冷後、6,000 rpm、2 分、室温で遠心して、上清をサンプルとして回収した。NFAT-FLAG、CNBR-FLAG 及び RatCN α (1-347) の結合量は western blot 法により検出、解析を行った。

2.11 DPPH ラジカル消去活性

2.11.1. 各試薬の濃度調製

各試薬 pyrogallol, gallic acid, catechol, resorcinol, phloroglucinol を超純水に溶解し、濃度が 0、1、2、5、10、20、40 μ M となるように調製した。また DPPH をエタノール溶解し 100 μ M に調製した。

2.11.2. ラジカル消去活性の測定

調製した各サンプルと L-cysteine 溶液を 100 μ L ずつ 96 wells プレートにアプライした後、100 μ M DPPH 溶液を各 well に 100 μ L ずつアプライした。10 分間室温で静置後、マイクロプレートリーダーで 520 nm の波長で吸光度を測定した。

ラジカル消去活性は (各サンプル群の吸光度) / (ピロガロール群の吸光度) \times 100 の計算式で導いた。また、各サンプルとピロガロールの濃度は 20 μ M を基準に比較している。

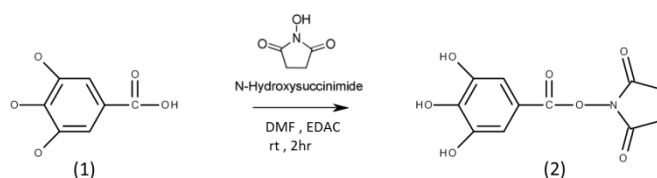
2.12 ピロガロールの標的タンパク質の探索

2.12.1 共免疫沈降法 (GFP-Trap-A kit (chromotek))

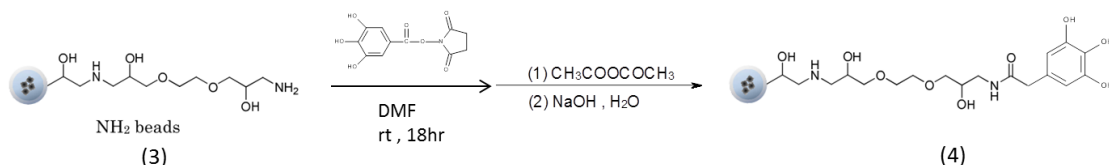
100 mm dish に BHK21 細胞を 24 時間培養した。80% confluent の状態になったのを確認し、ピロガロールを 10 分間処置した。その後、1 μ M イオノマイシンで 30 分間刺激した。5 mL の PBS で細胞を 2 回洗い、200 μ L のプロテアーゼインヒビター (Complete Mini : Roche) およびフォスファターゼインヒビター (Phos STOP : Roche) を含む TBS でかきとり、3,000 rpm、10 分、4°C で遠心した。上清を破棄し、lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA、0.5% NP40、プロテアーゼインヒビター、フォスファターゼインヒビター) を 200 μ L 加えて 10 分ごとにピペッティングしながら 30 分間氷上でインキュベートした。その後 15,000 rpm、15 分、4°C で遠心した。上清を回収し、BCA 法によりタンパク質濃度を測定し、Dilution-buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA、プロテアーゼインヒビター、フ

オスファターゼインヒビター)を加えて 1,000 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ となるように lysate を調製した (Sample を少量回収し、等量の 2 \times SDS Sample buffer を加えて熱処理し、これを input とする)。そこに氷冷した dilution-buffer で平衡化した GFP-Trap beads (50%懸濁液) を 20 μL 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 、120 分間ローテータで攪拌した。6,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 分遠心し、上清を破棄した (破棄する上清を少量回収し、等量の 2 \times SDS Sample buffer を加えて熱処理し、これを unbound とする)。残った beads を 1,000 μL の dilution-buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA) で 2 回洗浄した後、100 μL の 2 \times SDS sample buffer を加え、10 分間 95 $^{\circ}\text{C}$ で熱処理し、6,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 分間遠心した上清をサンプルとした。検出は銀染色、および western blot により行った。

2.12.2 没食子酸固定化ビーズの作製



没食子酸 (1)、N-ヒドロキシスルシンイミド、EDAC を 1 つの 1.5 mL チューブ中で 10 mM 等量となるように DMF に溶解させ、マイクロチューブミキサーにて室温で 2 時間反応させ活性化没食子酸 (2) を含む活性化 10 mM 没食子酸溶液を作成した。



次に 1.5 mL マイクロチューブに NH_2 beads (3) (多摩川精機) 0.5 mg / sample をとり、 $\text{N,N}'$ -ジメチルホルムアミド (DMF) で洗浄したのち DMF に分散させ、活性化没食子酸が 5 mM となるように活性化 10 mM 没食子酸溶液を加えて、マイクロチューブミキサーにて室温で 20 時間反応させた。その後 DMF、MeOH により計 3 回ずつ洗浄を行い、没食子酸固定化ビーズを作製した。

2.12.3 標的タンパク質のアフィニティー精製

没食子酸固定化ビーズの上清を取り除き、2.4.1 の方法で RBL-2H3 細胞より回収したタンパク質溶液 (15 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) を 200 $\mu\text{L}/1\text{sample}$ 加え 4 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間ローテートした。その後スピンドウンして磁気分離を行い、上清を廃棄したのち超純水により洗浄を行った没食子酸固定化ビーズに SDS sample buffer を 40 μL 加え、ヒートブロックにより 99 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間処理し、磁気分離後回収した上清をサンプルとし 2.4.2 の手順により電気泳動し、銀染色により検出を行った。

2.12.4 銀染色

SDS-PAGE を行ったゲルを、銀染色 MS キット (WAKO) を用いて検出した。電気泳動後のゲルを 50 mL の固定液 1 (MeOH 25 mL, Acetic acid 2.5 mL, 超純水 22.5 mL) に浸し、20 分間振盪した。固定液 1 を捨て、50 mL の固定液 2 (MeOH 25 mL, 超純水 25 mL) にゲルを浸し、10 分間振盪した。続いて固定液 2 を捨て、ゲルを 50 mL の超純水に浸し、10 分間洗浄した。超純水を捨て、ゲルを 50 mL の増感液 (増感原液 5 mL, 超純水 45 mL) に浸し、1 分間振盪した。増感液を捨て、ゲルを 50 mL の超純水に浸し、1 分間洗浄した。これを 2 度繰り返す。次に超純水を捨て、ゲルを 50 mL の染色液 (染色原液 5 mL, 超純水 5 mL) に浸し、20 分間振盪した。染色液を捨て (染色液は放置すると爆発性アミドを生ずる危険性があるので、使用後は直ちに塩酸を加え、塩化銀の沈殿物にする)、50 mL の超純水に浸し、1 分間洗浄した。この洗浄作業を 2 度繰り返す。超純水を捨て、50 mL の現像液 (現像粉末 0.5 g, 超純水 47.5 mL, 現像原液 2.5 mL) 中に浸し、適当な染色像が得られるまで浸透した。適当な染色像が得られた時点で 5 mL の停止液を加え、1 分間振盪した。その後、現像液を捨て、ゲルを 50 mL の超純水に浸し、1 分間洗浄した。この洗浄作業を 3 度繰り返す。

2.12.5 LC/MS/MS 分析によるタンパク質同定

銀染色によって検出したバンドを含むゲルを、質量分析受託サービス (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 総合研究支援センター 先端医療研究部門 佐川幾子様) に依頼し、タンパク質同定を行った。

2.13 shRAN による Aldolase A (Alda) 遺伝子ノックダウン RBL-2H3 細胞株の樹立

shRNA は市販されている Aldoa - Rat, 4 unique 29mer shRNA constructs in retroviral untagged vector (OriGene Technologies) を用いた。

RBL-2H3 細胞を 6 well plate に 2×10^5 cells/mL で播種し、24 時間培養した。作成したプラスミド溶液を、Lipofectamine® 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞内に導入した。Opti-mem (Thermo Fisher Scientific) をプラスミドに 125 uL 加え、さらに P3000™ Reagent を 2 uL/ug DNA となるよう加えた (溶液 A)。また別の 1.5 mm griner tube に 125 uL の opti-mem と Lipofectamine™ 3000 Reagent を 7.5 uL 加えたものを作成した (溶液 B)。溶液 A 及び B をサンプル数分作成し、等量加えて 10 分間室温でインキュベートし、250 uL ずつ dish にアプラインした。

Transfection の操作から 24 時間後、puromycin 1.0 µg/mL 濃度に調整した培地に交換して細胞培養し、ノックダウンした細胞をセクションした。ノックダウンの確認は western blot 法を用い、Aldolase A タンパク質の発現量を解析した。

2.14 CRISPAR-Cas9 による poly(U)-binding-splicing factor (PUF60) 遺伝子ノックアウト RBL-2H3 細胞株の樹立

2.14.1 gRNA 及び Cas9 プラスミドの作成

Cas9 vector は市販されている CMV-T7-hspCas9-T2A-GFP-H1-gRNA linearized SmartNuclease vector (SBI)を用いた。gRNA は PUF60 の遺伝子配列において、20 塩基の配列(-NGG は除く)を選択し Guide RNA Oligonucleotides をデザインした。Top strand(forward primer)の 5'末端側に ATCC- 塩基を、Bottom strand(reverse primer)の 5'末端側に AAAC- 塩基を加えたものを gene design にて作製し、10 uM 溶液に調整したのち等量を混合し、95°Cで 5 分間インキュベートした後、-1°C/min で室温まで冷却し Annealed oligo とした。

その後以下の組成溶液を作成し、室温で 5 分インキュベートし Cas9 プラスミド溶液を作成した。

組成	Volume/well (μL)
Linearized vector	1
Annealed oligo mix	3
5× ligation buffer	1
Fast ligase	0.25
Total	5.25

2.14.2 Cas9 プラスミドの導入

RBL-2H3 細胞を 6 well plate に 2×10^5 cells/mL で播種し、24 時間培養した。その作成した Cas9 プラスミド溶液を、Lipofectamine® 3000 Reagent(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞内に導入した。Opti-mem(Thermo Fisher Scientific)をプラスミドに 125 uL 加え、さらに P3000™ Reagent を 2 uL/ug DNA となるよう加えた(溶液 A)。また別の 1.5 mm griner tube に 125 uL の opti-mem と Lipofectamine™ 3000 Reagent を 7.5 uL 加えたものを作成した(溶液 B)。溶液 A 及び B をサンプル数分作成し、等量加えて 10 分間室温でインキュベートし、250 uL ずつ dish にアプライした。Transfection の確認は蛍光顕微鏡(キーエンス)を使用し、GFP の蛍光を用いた。

第3章 実験結果

3.1 阿波晩茶抽出物のインターロイキン(IL)-4 mRNA 発現抑制効果

阿波晩茶は摘み取った茶葉（チャノキ（学名：Camellia sinensis））を樽で漬け込み、乳酸発酵させるという独特な製法で作る。阿波晩茶抽出物の IL-4 遺伝子発現抑制活性を測定した。

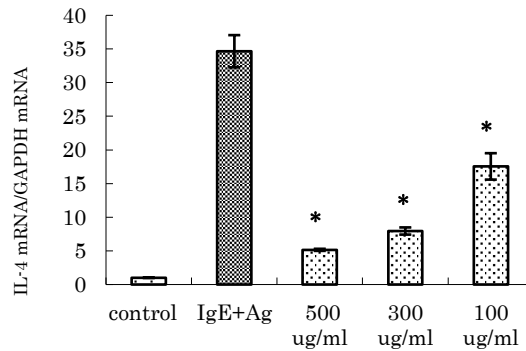


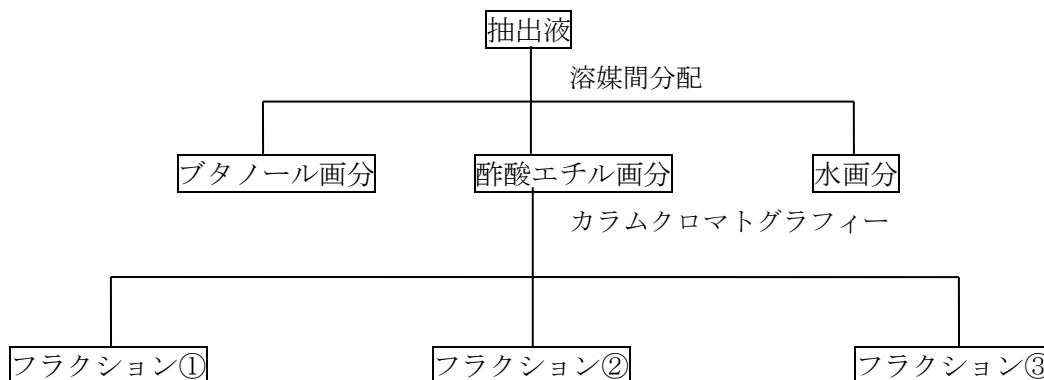
Figure 2. 阿波晩茶抽出物の IL-4 遺伝子発現抑制活性

RBL-2H3 細胞に anti-DNP IgE (100 ng/mL) 処置と同時に阿波晩茶抽出物を処置し、12 時間インキュベート後 DNP-albumin (100 ng/mL) で 1 時間刺激し total RNA を抽出した。IL-4 mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR 法により定量した。* $p < 0.01$ vs IgE+Ag (n=3)

3.2 阿波晩茶抽出物の精製

IL-4 遺伝子発現を抑制した阿波晩茶抽出物には、抗アレルギー物質が含まれていると考えられた。そこで阿波晩茶抽出物を分離・精製し、有効成分の同定を試みた。

(a) 精製スキーム



(b) 精製表

	IC50 (mg/ml)	Amount (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Total activity (Units)	Recovery (%)	Purification factor (%)
阿波番茶抽出物	0.10278	730	6.4863462	4735.033	100.000	100.000
酢酸エチル画分	0.042617	249	15.64321	3895.159	82.26256	241.17136
ブタノール画分		213				
水画分		257				
フラクション①	0.057228	52.74	11.649309	614.3846	12.9753	179.5974
フラクション②		64.06				
フラクション③	0.034938	98.69	19.0814	1883.145	39.77048	294.17826

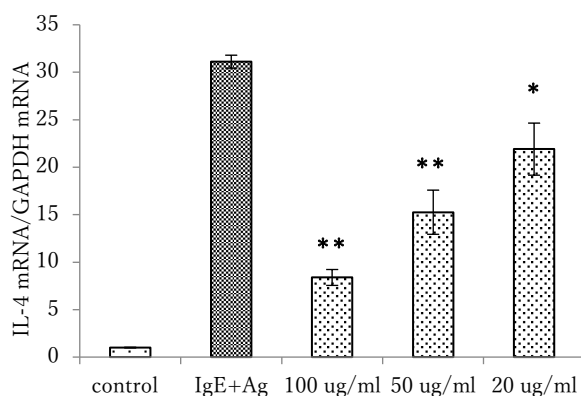
Figure 3. 阿波晩茶の精製スキームと精製表

3.2.1 各画分の IL-4 mRNA 発現抑制効果の測定

まず阿波晩茶抽出物を水-酢酸エチル間で分配して酢酸エチル画分、水画分に分離した。さらに水画分を水-ブタノール間で分配し、水画分とブタノール画分を作製した。それぞれの画分についてリアルタイム RT-PCR 法で IL-4 mRNA 発現抑制効果を測定した。

その結果、酢酸エチル画分は IL-4 遺伝子発現を有意に抑制し、ブタノール画分および水画分に抑制活性は見られなかった。

(a) 酢酸エチル画分



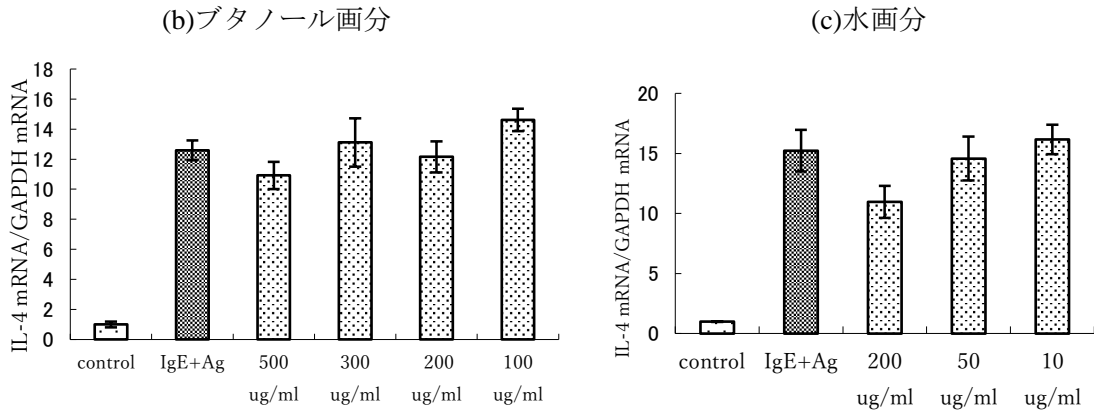


Figure 4. 溶媒間分配によって分離された各画分の IL-4 遺伝子発現抑制効果

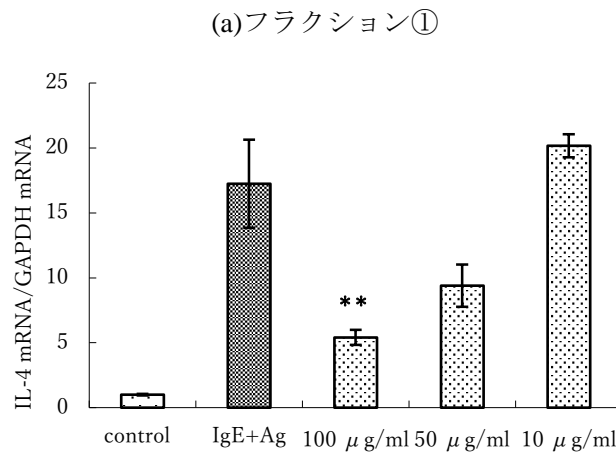
酢酸エチル、ブタノールを用いて溶媒間分配を行い、阿波晩茶抽出物を3つの画分に分離した。

RBL-2H3 細胞に anti-DNP IgE (100 ng/mL) 処置と同時に各画分を処置し、12 時間インキュベート後 DNP-albumin (100ng/mL) で 1 時間刺激し total RNA を抽出した。IL-4 mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR 法により定量した。*p<0.05 **p<0.01 vs IgE+Ag(n=3)

3.2.2 カラムクロマトグラフィー

酢酸エチル画分に強い抑制効果がみられ、この画分に有効成分が含まれることが示唆された。そこで有効成分を単離するために酢酸エチル画分をカラムクロマトグラフィーにより、さらに分離・精製した。

Sephadex LH20 を充填剤、アセトンを出溶溶媒として用い、酢酸エチル画分をカラム (内径 2.5 cm) で 5 分刻みに分画を回収し、TLC で展開して、同じ場所にスポットが見られた分画を統合した。その結果、3つのフラクションに分けられた。それぞれのフラクションの IL-4 mRNA 発現抑制効果を測定した結果、すべてのフラクションに活性がみられた。



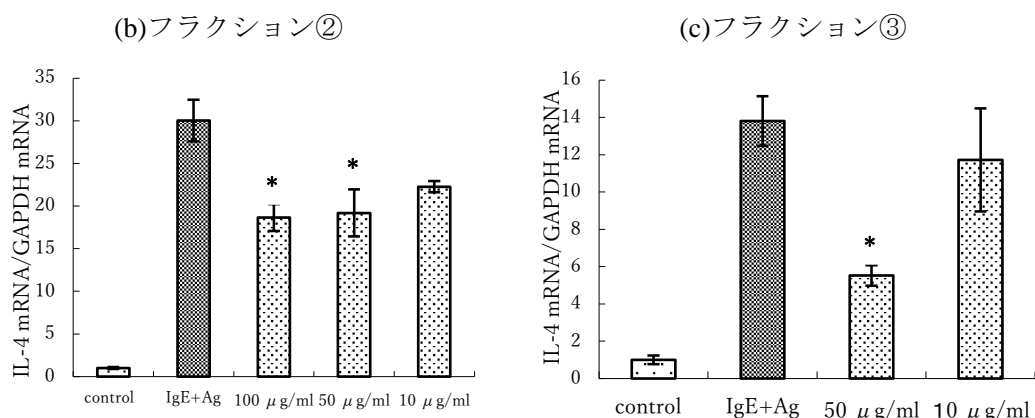


Figure 5. 酢酸エチル画分より分離された各フラクションの IL-4 遺伝子発現抑制効果

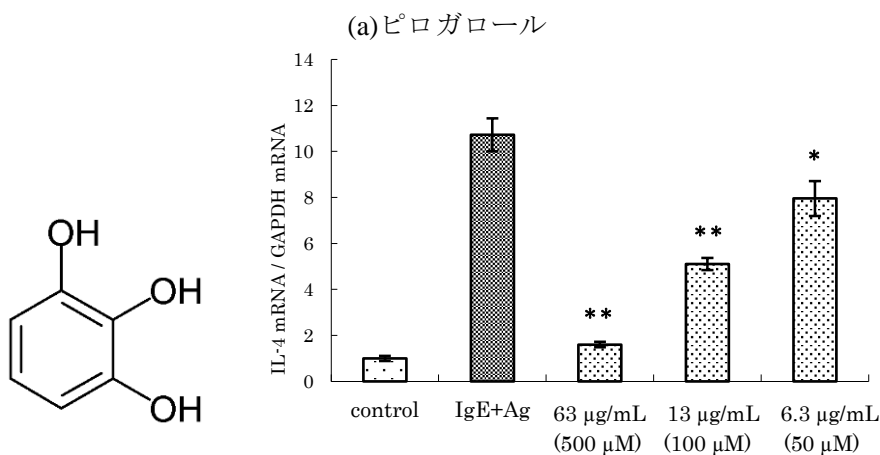
活性のあった酢酸エチル画分を、カラムクロマトグラフィーによって3つのフラクションに分離した。RBL-2H3細胞に anti-DNP IgE (100 ng/mL) 処置と同時に各フラクションを処置し、12時間インキュベートした後 DNP-albumin (100 ng/mL) で1時間刺激し、total RNAを抽出した。IL-4 mRNA 発現レベルはリアルタイム RT-PCR 法により定量した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs IgE+Ag (n=3)

3.2.3. 各フラクションの主要有効成分の同定

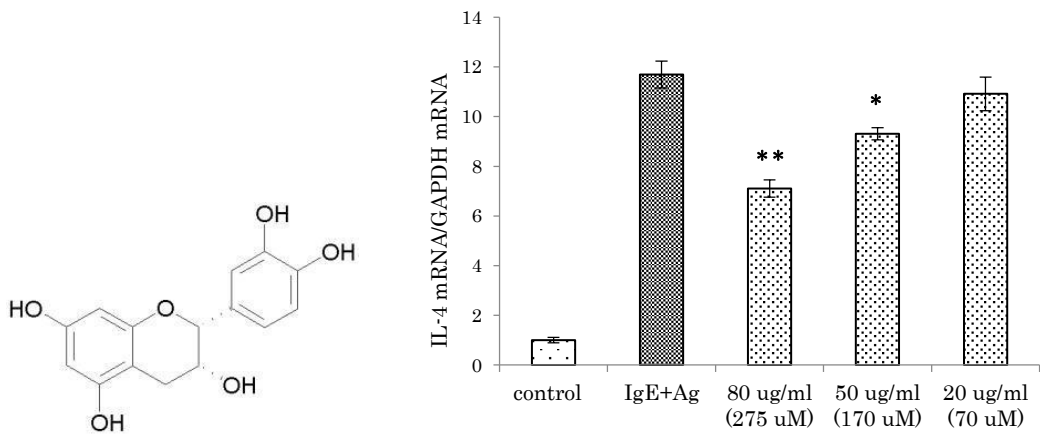
フラクション①からはピロガロール、フラクション②からはエピカテキン(EC)、フラクション③からはエピガロカテキン(EGC)を同定した。また、高速液体クロマトグラフィーによる阿波晩茶抽出物の定量結果から、エピガロカテキンガーレート (EGCG) も含まれていることがわかった。

以上の結果からピロガロールとこれらのカテキン類 (EGC、EGCG、EC) が阿波番茶の主要な有効成分であることがわかった。

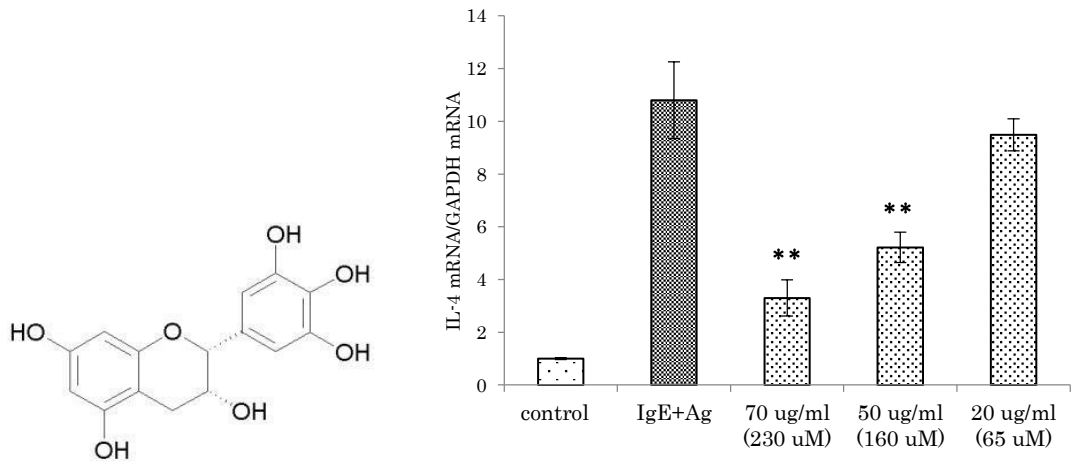
ピロガロールは発酵前の茶葉には含まれておらず、発酵後の阿波晩茶にだけ含まれており、乳酸発酵によって生成する化合物であると考えられた。このことから阿波晩茶特有であるピロガロールに着目し、その分子薬理機構の解明を行った。



(b)エピカテキン(EC)



(c)エピガロカテキン(EGC)



(d)エピガロカテキンガーレート(EGCG)

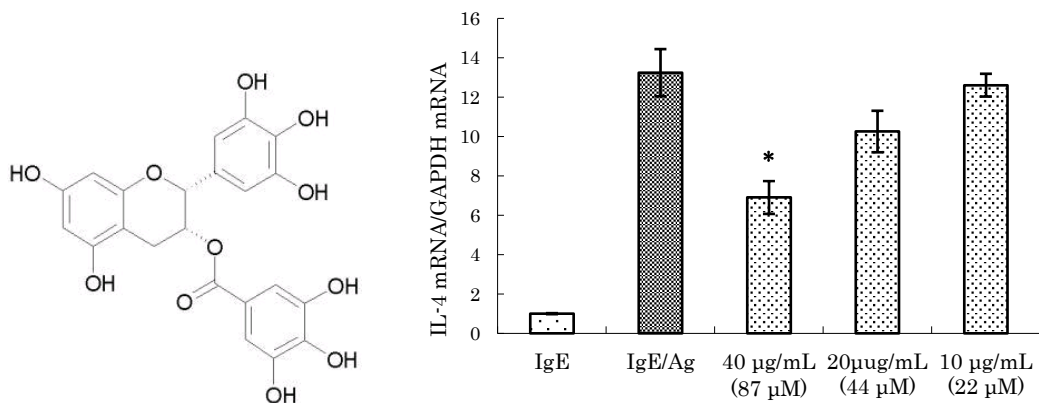


Figure 6. 阿波晩茶に含まれる有効成分の同定とその IL-4 遺伝子発現抑制活性

(a)ピロガロール、(b)エピカテキン(EC)、(c)エピガロテキン(EGC)、および(d)エピガロテキンガーレート(EGCG)を、RBL-2H3 細胞に anti-DNP IgE (100 ng/mL)処置と同時に各フラクションを処置し、12 時間インキュベーター

トした後 DNP-albumin (100 ng/mL) で 1 時間刺激し、total RNA を抽出した。IL-4 mRNA 発現レベルはリアルタイム RT-PCR 法により定量した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs IgE+Ag (n=3)

3.3 鼻過敏症モデルラットに対するピロガロールの効果

当研究室の以前の実験より鼻過敏症モデルラットにおいて TDI 誘発により鼻粘膜中の H1R および Th2 サイトカイン (IL-4) の遺伝子発現が亢進することがわかっている。

ピロガロール (6、3、1 mg/rat) を 3 週間連日経口投与することにより、TDI 誘発によるくしゃみ、鼻症状 (鼻漏、腫れ) や H1R、IL-4 mRNA レベル上昇が有意に抑制された。

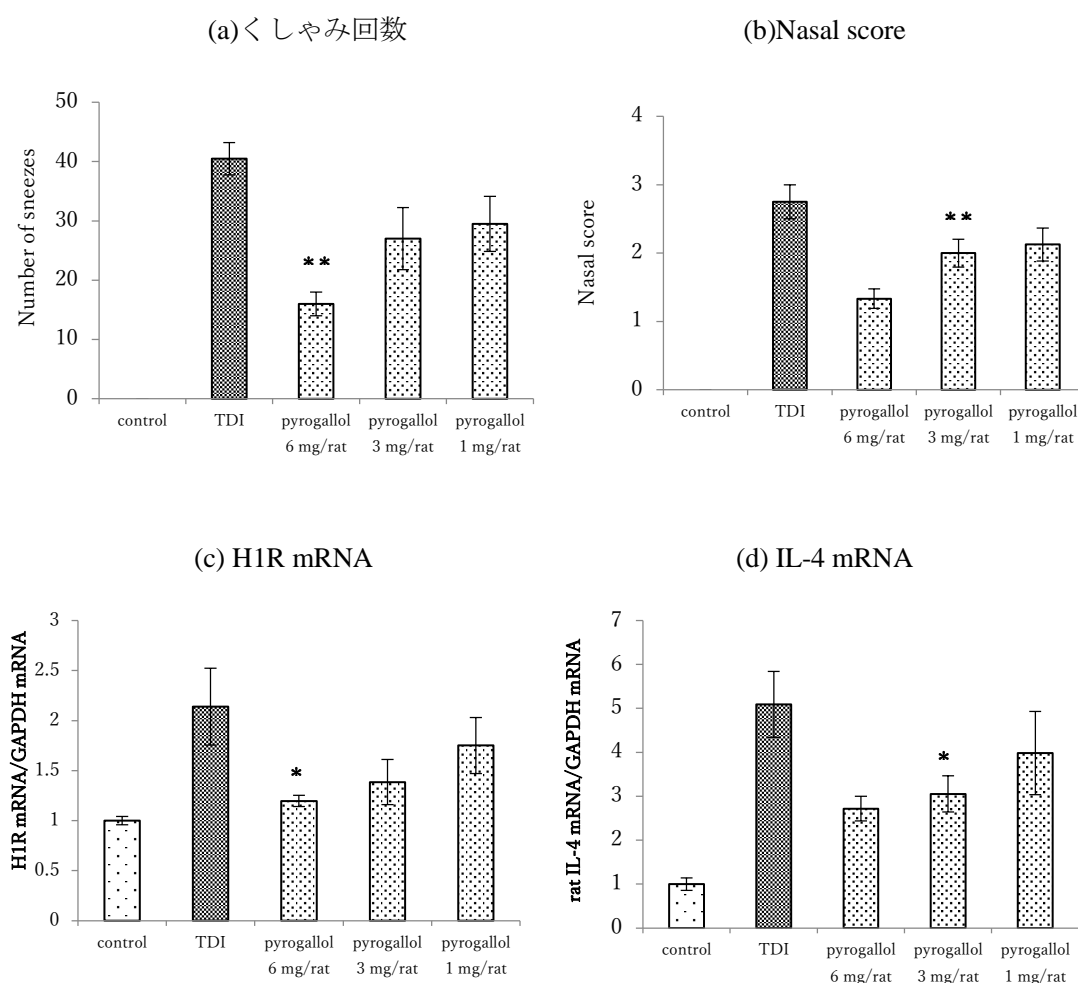


Figure 7. 鼻過敏症モデルラットに対するピロガロールの効果

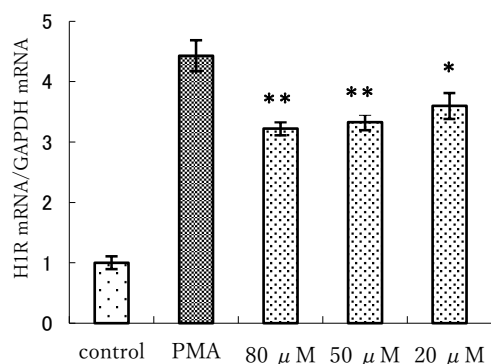
くしゃみ回数は TDI 誘発後、10 分間の回数、鼻症状は誘発 10 分後に観察した。鼻粘膜は TDI 感作の 4 時間後に採取した。H1R (c) および IL-4 (d) の mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR により定量を行った。ピロガロールは、ゾンデを用いてラットに経口投与した。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs TDI (n=3~4)

3.4 阿波晩茶由来化合物であるピロガロールの標的タンパク質の同定

3.4.1 ピロガロールによるアレルギー疾患感受性遺伝子発現抑制効果

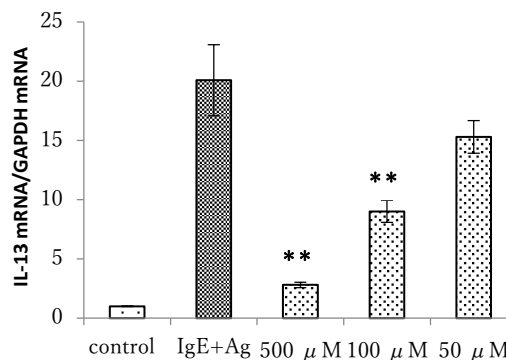
ピロガロールの薬理機構を解明するため、H1R、IL-13 および IL-9 に対して、ピロガロールの遺伝子発現抑制効果を測定した。各遺伝子に対する活性を比較したところ、ピロガロールは IL-9 遺伝子発現レベルの上昇を最も強く抑制することが明らかとなった。

(a) ヒスタミン H₁ 受容体(H1R) mRNA



*p<0.05 **p<0.01 vs PMA(n=3)

(b) インターロイキン-13(IL-13) mRNA



**p<0.01 vs IgE+Ag(n=3)

(c) インターロイキン-9(IL-9) mRNA

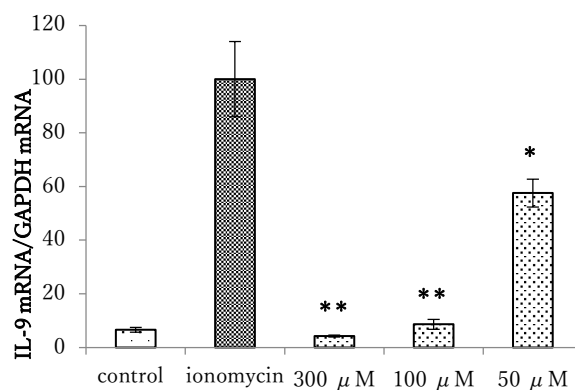


Figure 8. ピロガロールのアレルギー疾患感受性遺伝子発現に対する抑制活性

(a)は HeLa 細胞に Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)刺激 (100 nM)の 12 時間前にピロガロールを処置し、PMA 刺激 3 時間後に total RNA を抽出した。(b)は RBL-2H3 細胞に anti-DNP IgE (100 ng/mL)処置と同時に各フラクションを処置し、12 時間インキュベートした後 DNP-albumin (100 ng/mL)で 1 時間刺激し total RNA を抽出した。(c)はイオノマイシン刺激(1 μM)の 10 時間前にピロガロールを処置し、イオノマイシン刺激 2 時間後に total RNA を抽出した。それぞれの mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR により定量した。*p<0.05 **p<0.01 vs ionomycin (n=3)

3.4.2. IL-4 及び IL-9 遺伝子発現上昇に対するピロガロールの影響

イオノマイシン刺激による IL-4、IL-9 遺伝子発現上昇に対するピロガロールの影響を比較した。その結果、ピロガロールは IL-9 遺伝子発現に対して、より強い抑制作用を示すことが明らかとなった。この傾向は NFAT 阻害薬である INCA-6 と類似しており、ピロガロールは NFAT に関与していることが示唆された。

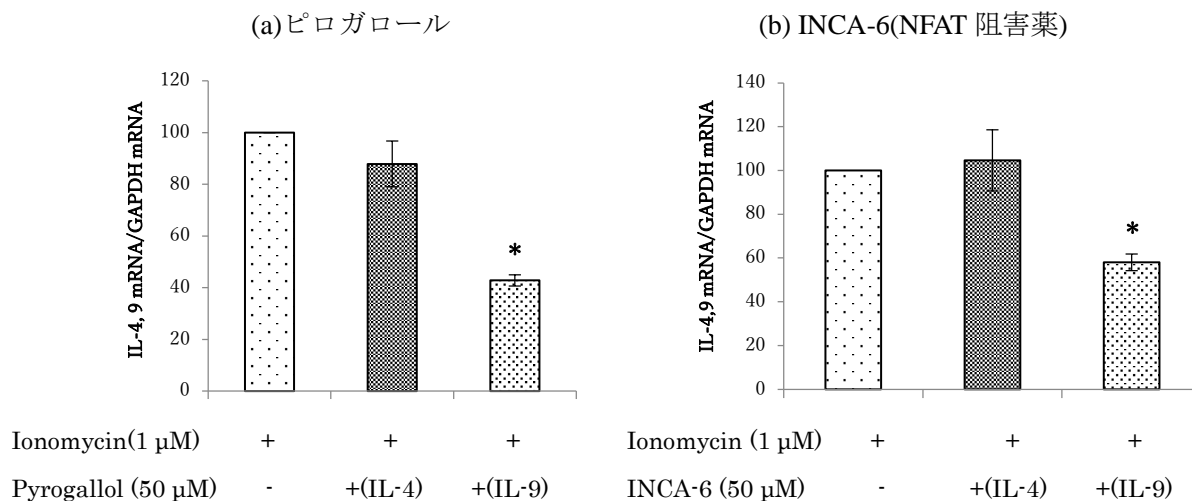


Figure 9. IL-4 及び IL-9 遺伝子発現上昇に対するピロガロールの効果

イオノマイシン刺激の 10 時間前にピロガロールを処置し、イオノマイシン刺激 2 時間後に total RNA を抽出した。それぞれの mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR により定量した。* $p < 0.05$ vs ionomycin (n=3)

3.5 ピロガロールのカルシニューリン活性への影響

NFAT シグナルにおいて、リン酸化状態の NFAT はカルシニューリン (CN) によって脱リン酸化され、活性化体となり核内へ移行し、遺伝子発現亢進に寄与する。CN のタンパク脱リン酸化酵素活性に対して、ピロガロールが関与するかを *in vitro* の系で検討した。

その結果、ピロガロールは CN に直接作用しないことが明らかとなった。

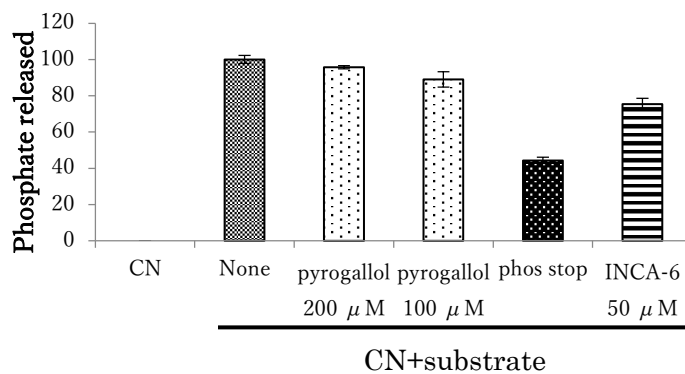


Figure 10. *In vitro* の系におけるピロガロールのカルシニューリン活性への影響

基質 (R11phosphopeptide)、カルモジュリン、カルシニューリン、ピロガロール、INCA-6 をそれぞれ直接

反応させて、カルシニューリンの活性を calcineurin cellular activity assay kit を用いて測定した。ポジティブコントロールとして phos stop (phosphatase inhibitor tablet (Roche))を用いた。

3.6 NFAT の核内移行に対するピロガロールの影響

NFAT は非活性化状態においてリン酸化されており、刺激に伴って活性化された脱リン酸化酵素であるカルシニューリンにより脱リン酸化を受けることで活性化され、核内へと移行し転写活性を示すことが知られている¹³⁾。そこで、イオノマイシン刺激に伴う NFAT の核内移行へのピロガロールの影響を検討した。

その結果、ピロガロールは NFATc1・NFATc2 とともに核内移行を抑制することが明らかとなった。

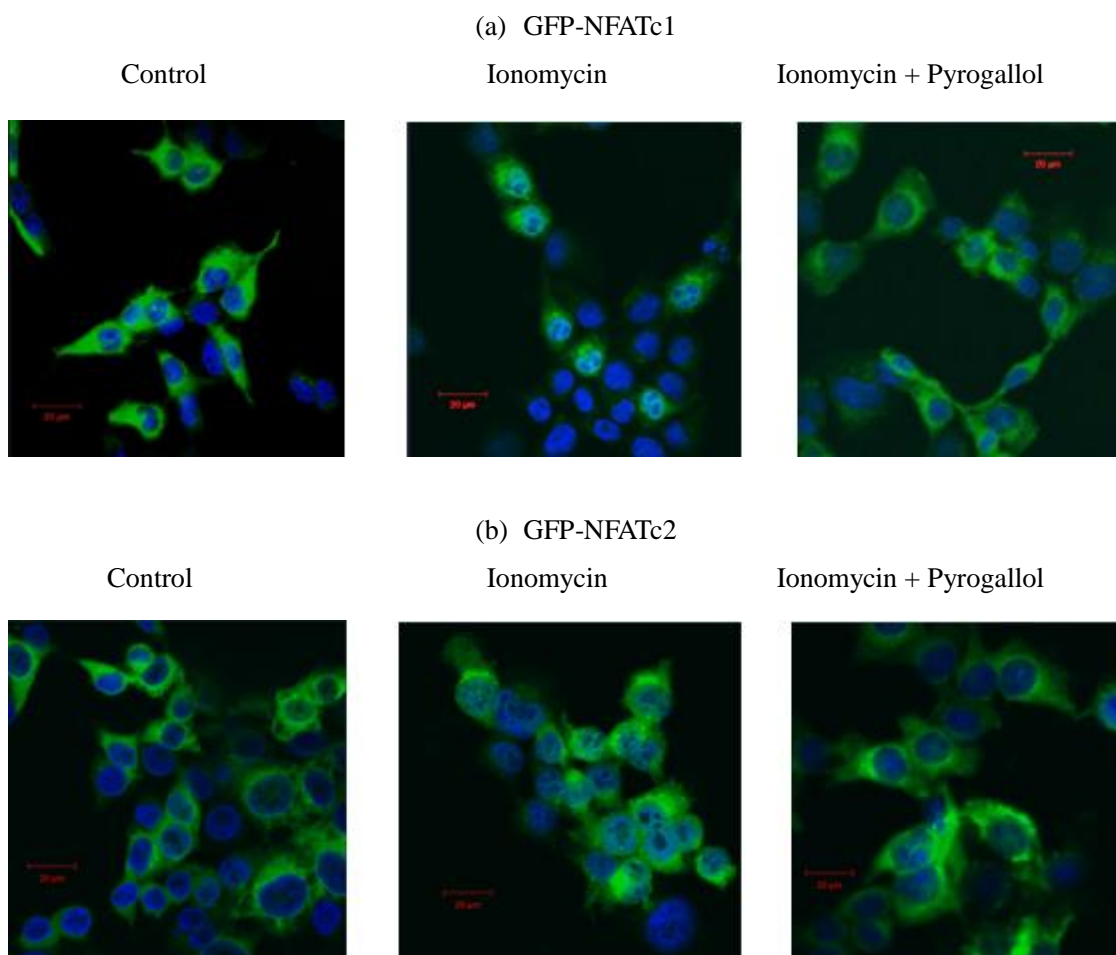


Figure 11. NFAT の核内移行に対するピロガロールの影響

NFATc1-GFP 融合タンパク質、および NFATc2-GFP 融合タンパク質をそれぞれ恒常的に発現させた BHK21 細胞に、100 μM のピロガロールを 10 分間処置し、1 μM のイオノマイシンで 30 分刺激したのち、核を DAPI で染めて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3.7 NFAT の活性化に伴う脱リン酸化に対するピロガロールの効果

NFAT の核内移行をピロガロールが抑制しているという結果が得られたため、NFAT シグナルの上流である NFAT の脱リン酸化に対するピロガロールの影響を western blot により検討した。

3.7.1 NFAT-FLAG 融合蛋白過剰発現系における検討

プラスミド DNA を RBL2H3 細胞にトランスフェクションし、NFAT-FLAG 融合タンパク質を過剰発現させた系を用いて、NFAT の活性化に伴う脱リン酸化に対するピロガロールの効果について検討した。

ピロガロールを 75 μM 処置したサンプルにおいて、NFAT の脱リン酸化抑制効果が明らかとなった。

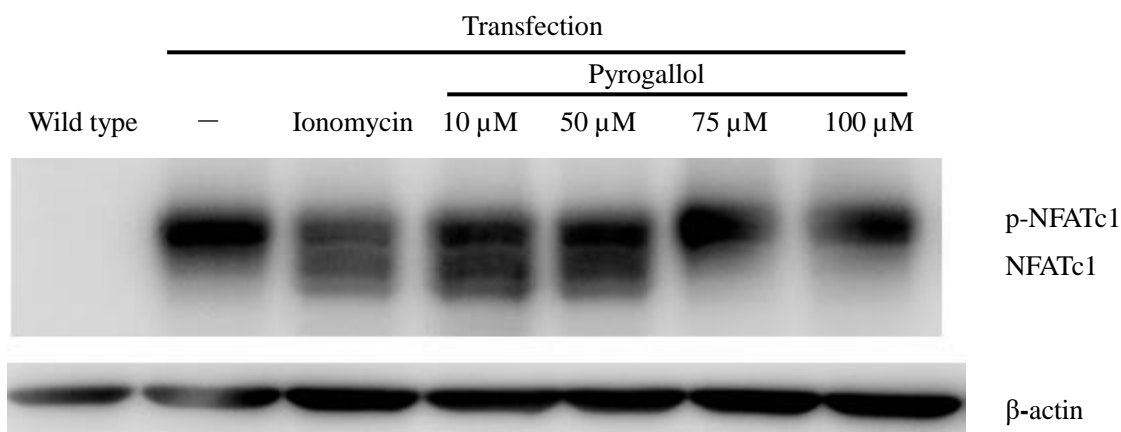


Figure 12. NFAT-FLAG 融合蛋白過剰発現系における検討

RBL2H3 細胞にプラスミド DNA をトランスフェクションし、6 時間後に培地交換を行う。更にその 18 時間後にピロガロールを 10 分間処置し、1 μM のイオノマイシンで 30 分刺激したのち、細胞を回収してタンパク質を抽出し、western blot にて検出した。

Western blot の条件は以下の通りである。

<一次抗体>

NFATc1 (H-110): sc-13033 (rabbit, santa cruz) 1:1000

β -actin (8H10D10) Mouse mAb (mouse, cell signaling) 1:2000

<二次抗体>

Goat Anti-Mouse HRP Conjugate (Bio-Rad) 1:20000

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate 抗体 (Bio-Rad) 1:10000

3.7.2 NFAT-GFP 融合蛋白過剰発現系における検討

NFATc1-GFP 融合タンパク質、および NFATc2-GFP 融合タンパク質をそれぞれ恒常的に発現させた BHK21 細胞を用いて、NFAT の活性化に伴う脱リン酸化に対するピロガロールの効果について検討した。

NFATc1、NFATc2 共に、ピロガロールを 100 μ M 処置したサンプルにおいて、NFAT の脱リン酸化抑制効果が明らかとなった。

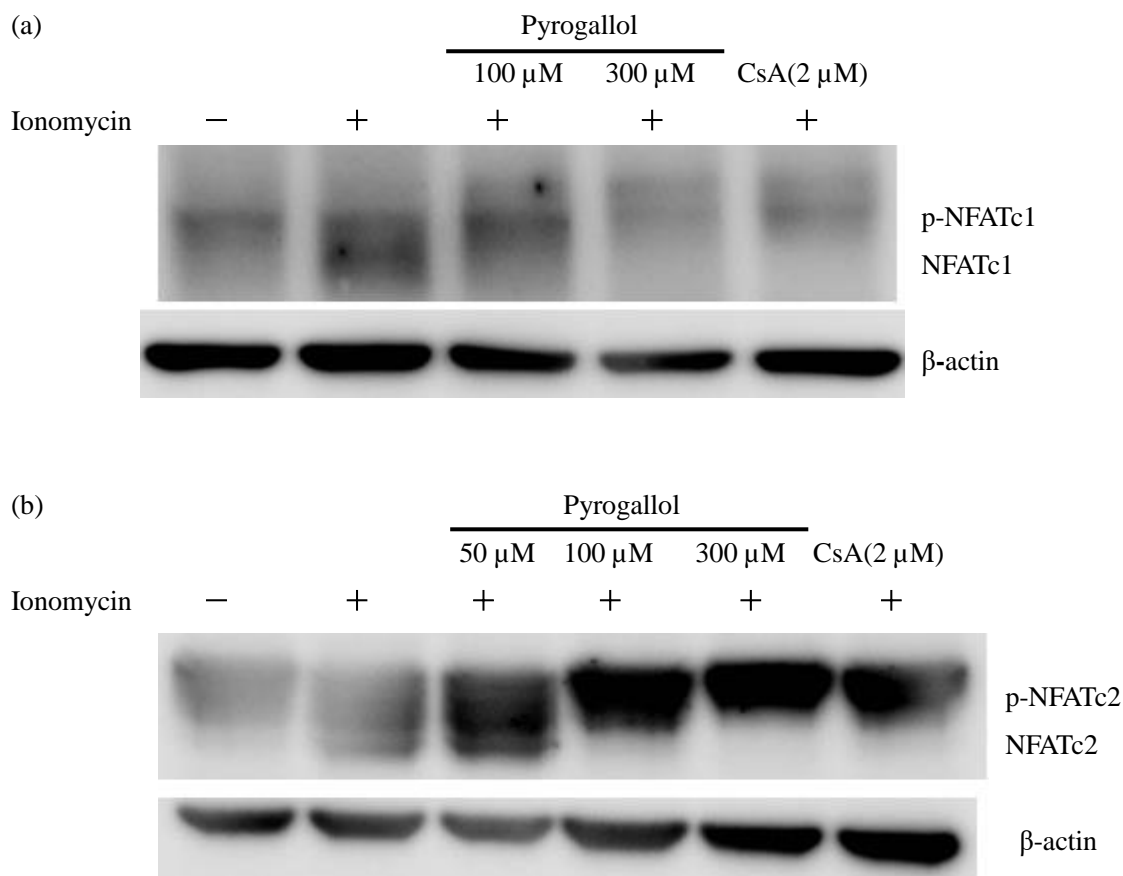


Figure 13. NFAT-GFP 融合蛋白過剰発現系における検討

NFATc1-GFP 融合タンパク質、および NFATc2-GFP 融合タンパク質をそれぞれ恒常的に発現させた BHK21 細胞にピロガロールを 10 分間処置し、1 μ M のイオノマイシンで 30 分刺激したのち、細胞を回収してタンパク質を抽出し、western blot にて検出した。ポジティブコントロールとしてシクロスポリン (CsA) を使用した。Western blot の条件は以下の通りである。

<一次抗体>

Monoclonal anti-GFP antibody (JL-8) (mouse、Bio-Rad) 1:1000

β -actin (8H10D10) Mouse mAb (mouse、cell signaling) 1:2000

<二次抗体>

Goat Anti-Mouse HRP Conjugate (Bio-Rad) 1:20000

3.8 *in vitro* でのカルシニューリンと NFAT の結合に対するピロガロールの効果

これまでの当研究室における研究により、ピロガロールはカルシニューリンの酵素活性を阻害しないこと、NFAT の脱リン酸化を阻害し、核内移行を抑制することが明らかとなっている。カルシニューリンの酵素活性を阻害することなく、NFAT の脱リン酸化を抑制する化合物としては、カルシニューリンと NFAT の結合を阻害する INCA-6 が報告されている¹⁴⁾。

3.8.1 カルシニューリンと NFAT の結合に対するピロガロールの効果

そこで、カルシニューリン、NFAT-FLAG の融合タンパク質、Anti-FLAG ビーズを用いて完全 *in vitro* でのカルシニューリンと NFAT との結合実験の系を作成し、これに対するピロガロールの影響について検討を行った。

その結果、NFATc2 に対しては影響を与えないが、NFATc1 に対しては濃度依存的にカルシニューリンと NFATc1 の結合を強めていることが明らかとなった。

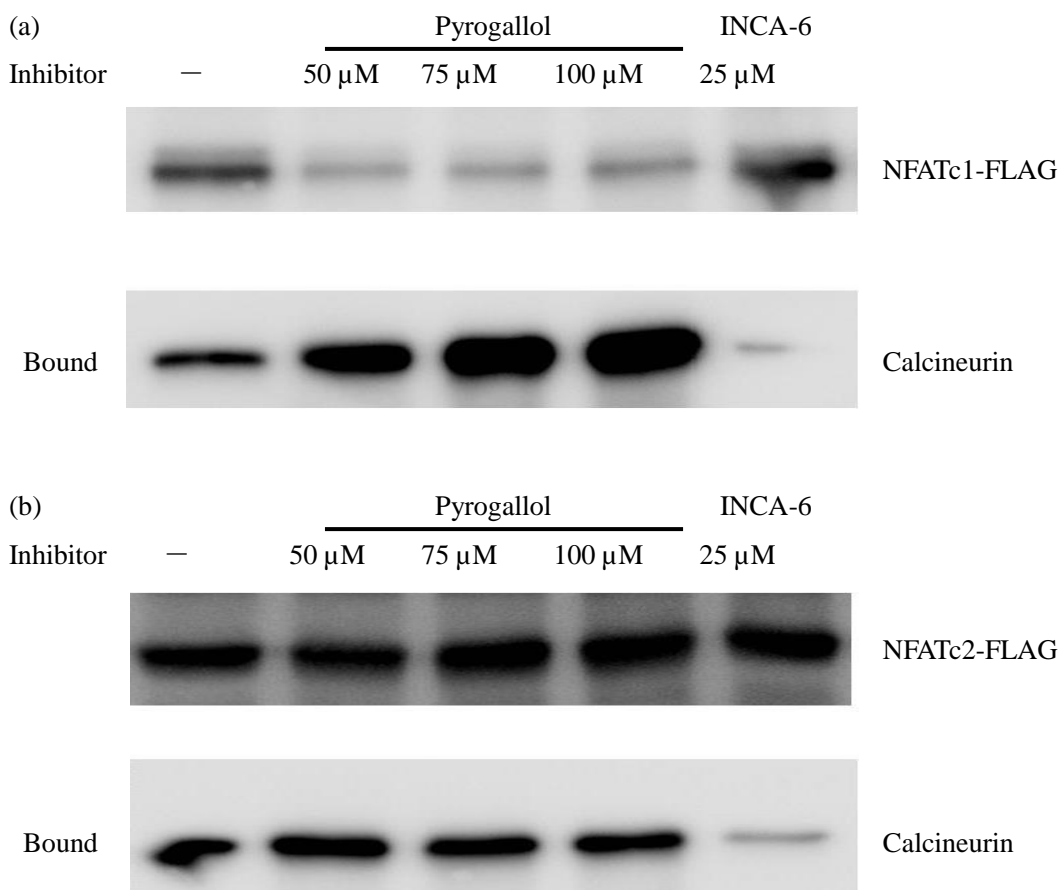


Figure 14. カルシニューリンと NFAT の結合に対するピロガロールの効果

インヒビター非存在下、ピロガロール存在下、INCA-6 存在下で *in vitro* カルシニューリン-NFAT バインディングアッセイを行った。NFATc1-FLAG(a)、または NFATc2-FLAG(b)に対するカルシニューリンの結合

量は、western blot 法により検出した。

Western blot の条件は以下の通りである。

<一次抗体>

Anti-Calceineurin A antibody [EP1669Y] (rabbit、abcam) 1:2000

GST(B-14):sc-138 (mouse、santa cruz) 1:1000

<二次抗体>

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate 抗体 (Bio-Rad) 1:10000

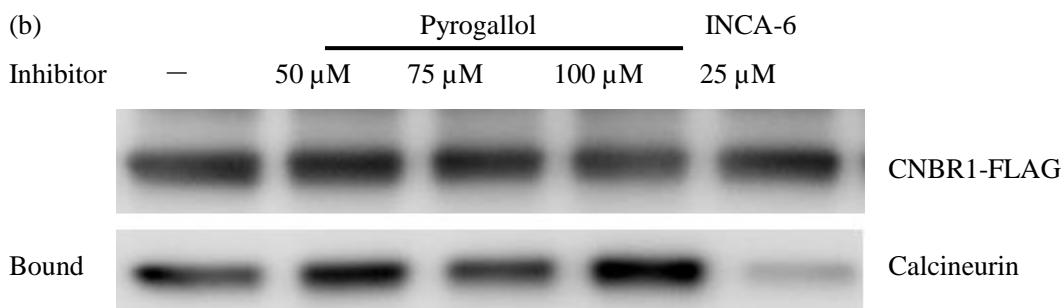
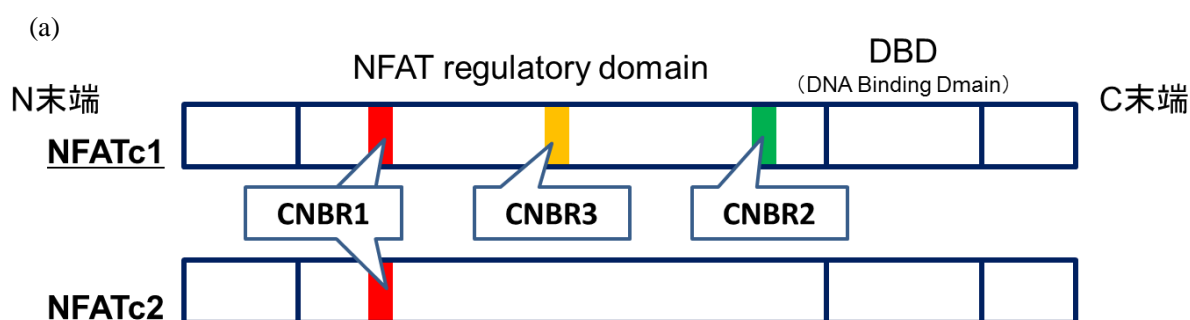
Goat Anti-Mouse HRP Conjugate (Bio-Rad) 1:20000

3.8.2 カルシニューリンと CNBR1~3 それぞれとの結合に対するピロガロールの効果

NFAT はその調節領域にカルシニューリンとの結合領域 (Calcineurin binding region : CNBR) を有している。NFATc1 はそれらの CNBR1~3 のすべての領域を活性状態で保っているが、NFATc2 には CNBR1 しか存在しない。

そこで、それぞれの CNBR のみを精製し、カルシニューリンとの結合実験を行った。

その結果、CNBR2・3 に関しては、濃度依存的にカルシニューリンとの結合が強くなるのに対し、CNBR1 ではピロガロールの影響は見られなかった。



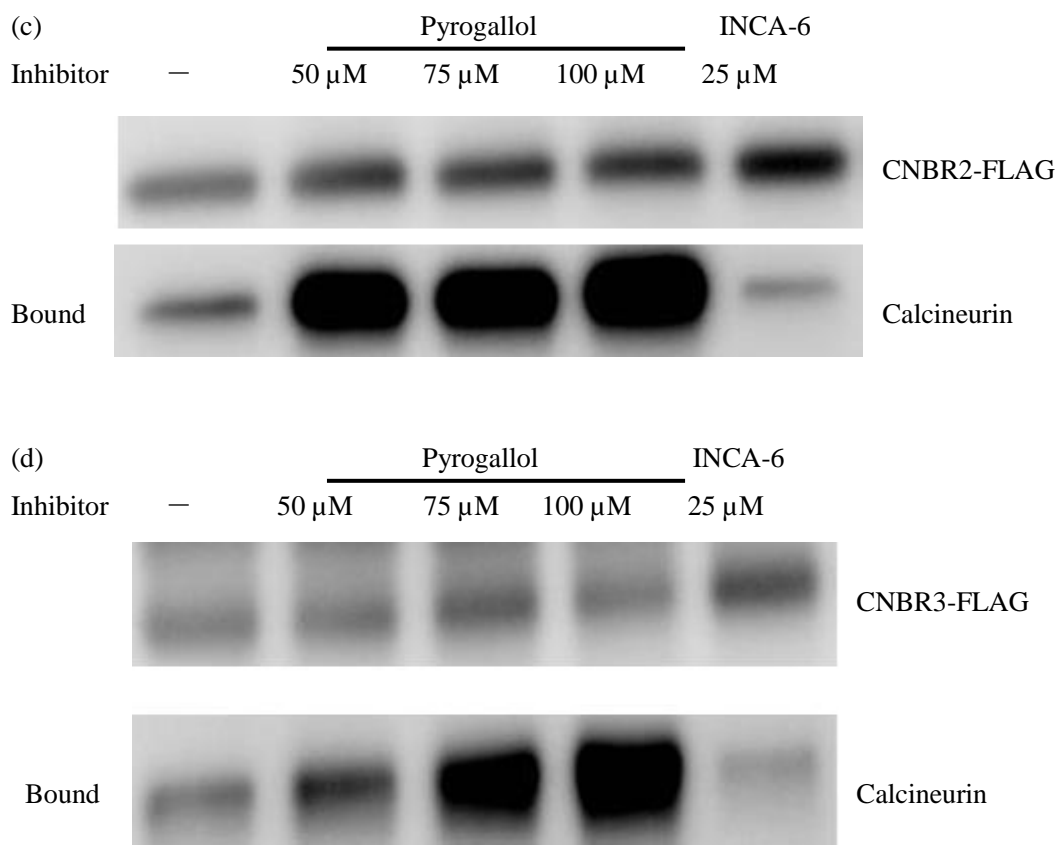


Figure 15. カルシニューリンと CNBR1~3 それぞれとの結合に対するピロガロールの効果

インヒビター非存在下、ピロガロール存在下、INCA-6 存在下で *in vitro* カルシニューリン-NFAT バインディングアッセイを行った。CNBR1-FLAG(a)、または CNBR2-FLAG(b)、CNBR3-FLAG(c)に対するカルシニューリンの結合量は、western blot 法により検出した

Western blot の条件は以下の通りである。

<一次抗体>

Anti-Calcineurin A antibody [EP1669Y] (rabbit、abcam) 1:2000

GST (B-14):sc-138 (mouse、santa cruz) 1:1000

<二次抗体>

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate 抗体 (Bio-Rad) 1:10000

Goat Anti-Mouse HRP Conjugate (Bio-Rad) 1:20000

3.9 ピロガロールの標的タンパク質の探索

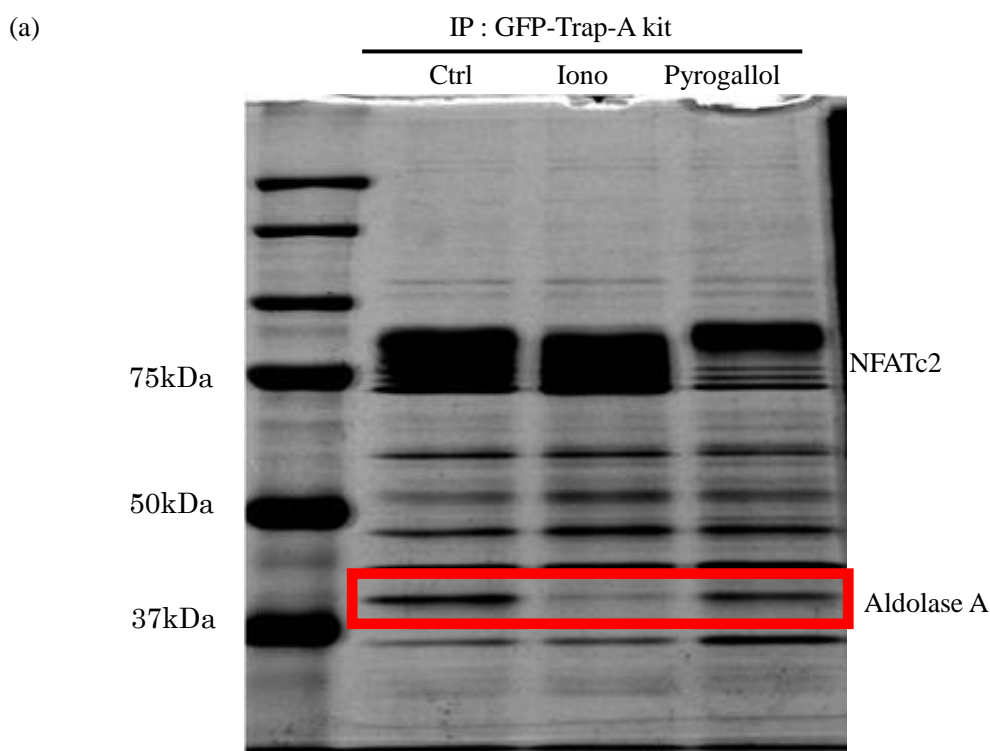
3.9.1 BHK-21 細胞を用いた共免疫沈降による探索

NFAT タンパク質は複数のタンパク質と複合体を形成しており、それらのタンパク質の働きによってリン酸化による非活性、脱リン酸化による活性を制御されているという報告がなされている¹⁵⁻¹⁹。我々は、ピロガロールが NFAT と複合体を形成しているタンパク質のいずれかに関係することで、抑制活性を示すのではないかと考えた。

そこで我々は、NFAT の核内移行抑制実験や脱リン酸化抑制実験で使用した、NFAT-GFP 融合蛋白を恒常的に発現する BHK-21 細胞を用いて、GFP タグを利用した共免疫沈降を行った。得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出した。

NFAT と結合し、かつイオノマイシン刺激やピロガロール処置に伴って結合量が変化するタンパク質を探索したところ、40kDa 付近のバンドを発見した。このタンパク質を LC/MS/MS によって解析したところ、解糖系の酵素である Aldolase A が同定された。

Western blot により追試を行ったところ、銀染色と同様の結果が得られたことより、40kDa 付近のバンドが Aldolase A であることが確認された。



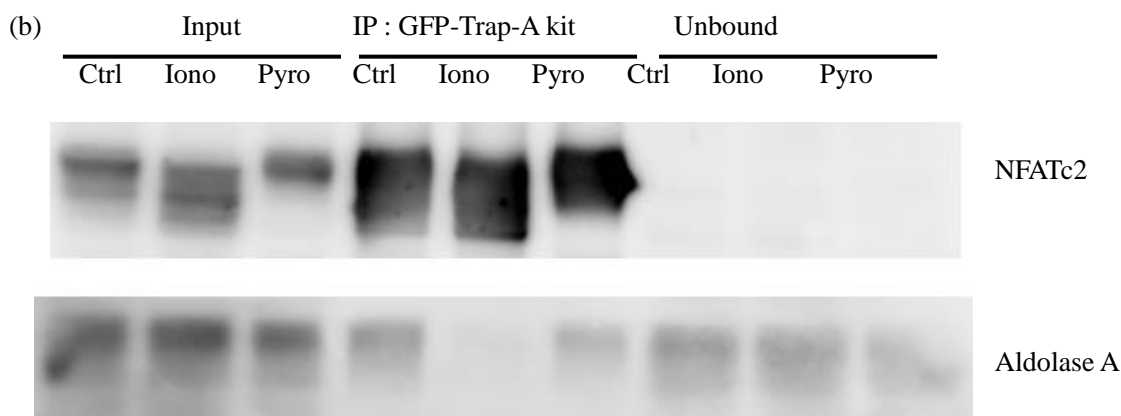


Figure 16. ピロガロールの標的タンパク質の探索

NFATc2-GFP 融合タンパク質を恒常的に発現させた BHK21 細胞に 300 μM のピロガロールを 10 分間処置し、1 μM のイオノマイシンで 30 分刺激したのち、細胞を回収してタンパク質を抽出し、GFP-Trap-A kit を用いて共免疫沈降を行った。サンプルは SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出した(a)。また、Aldolase A の確認のために、同一サンプルを western blot にて検出した(b)。

Western blot の条件は以下の通りである。

<一次抗体>

Monoclonal anti-GFP antibody (JL-8) (mouse、Bio-Rad) 1:1000

Aldolase A (N-15): sc-12059 (goat、santa cruz) 1:1000

<二次抗体>

Goat Anti-Mouse HRP Conjugate (Bio-Rad) 1:20000

bovine anti-goat IgG-HRP: sc-2384 (santa cruz) 1:10000

3.9.2 ピロガロールとその類似化合物の構造活性相関

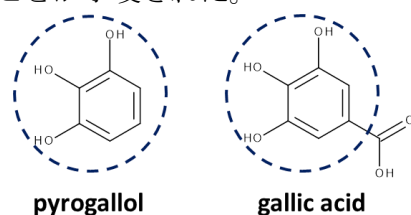
ピロガロール構造類似化合物のラジカル消去活性、NFAT 脱リン酸化抑制効果、IL-9 mRNA 発現抑制効果を下表に示す (Table. 1)。

	pyrogallol	catechol	gallic acid	resorcinol	phlorogrucinol
antioxidant activity (%)	100	60.3	113.5	7.0	18.8
inhibition of NFAT dephosphorylation	○	no effect	○	no effect	no effect
inhibition of IL-9 gene expression	○ IC ₅₀ 32.9 μM	no effect	○ IC ₅₀ 82.6 μM	no effect	no effect

Table 1. ピロガロール構造類似化合物のラジカル消去活性、NFAT 脱リン酸化抑制効果、IL-9 mRNA 発現抑制効果のまとめ

ピロガロールのラジカル消去活性を 100%としたとき、カテコールは 60.3%あったが、ピロガロールより高濃度処置を行ってもイオノマイシン刺激に伴う NFAT の脱リン酸化や IL-9 mRNA 発現亢進を抑制しなかった。また、gallic acid においてはラジカル消去活性 113.5%とピロガロールと同等以上の活性を有したが、IC₅₀ を比較すると IL-9 mRNA 発現抑制効果はピロガロールより小さいことが明らかとなった。

ラジカル消去活性と NFAT シグナル抑制効果にきれいな相関がみられないことから、ピロガロールの NFAT シグナル抑制効果にはラジカル消去活性以外の作用が働いていることが考えられた。また、5つの類似化合物の構造比較からピロガロールと gallic acid に共通である 1,2,3-Bebenetriol 構造が NFAT シグナル抑制効果に重要な役割を果たしていることが示唆された。



3.9.3 gallic acid 固定化ビーズを用いたアフィニティー実験

ピロガロールの標的タンパク質を同定するために gallic acid のカルボキシ基に NH₂ 磁気ビーズを結合させた gallic acid 固定化ビーズを用いてタンパク抽出液とアフィニティー実験を行い、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出した。gallic acid 未結合のビーズと比較して gallic acid 固定化ビーズにより回収されたサンプルの 60 kD 付近に特異的なバンドが検出されたため LC/MS/MS によって解析したところ、poly(U)-binding-splicing factor (PUF60)が同定された。

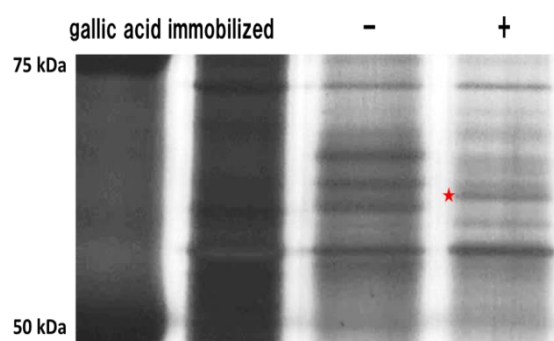


Figure 17. gallic acid 固定化ビーズを用いた標的タンパク質の探索

NFATc2-GFP 融合タンパク質を恒常的に発現させた BHK21 細胞を回収、タンパク質を抽出し、gallic acid 固定化ビーズを用いてアフィニティー実験を行った。サンプルは SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出した。

3.9.4 共免疫沈降法による PUF60 の検討

続いて我々は、NFAT-GFP 融合タンパク質を恒常的に発現する BHK-21 細胞を用い、GFP タグを利用した共免疫沈降を行った。得られたサンプルは SDS-PAGE で分離し、western blotting 法により検出した。

PUF60 は無刺激のコントロールにおいても NFATc2-GFP タンパク質に対する結合が確認されたが、その結合量はイオノマイシン刺激により増加しピロガロールの前処置により抑制されることが確認された。

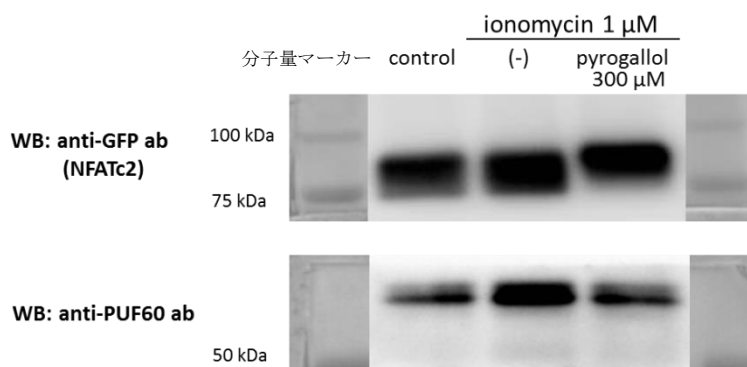


Figure 18. gallic acid 固定化ビーズによるピロガロール結合タンパク質の同定

NFATc2-GFP 融合タンパク質を恒常的に発現させた BHK21 細胞に 300 μM のピロガロールを 10 分間処置し、1 μM のイオノマイシンで 30 分刺激したのち、細胞を回収してタンパク質を抽出し、GFP タグを利用して共免疫沈降を行った。得られたサンプルは western blot 法にて検出した。

3.10 Aldolase A のノックダウンとその影響

3.10.1 Aldolase A ノックダウン RBL-2H3 細胞株の樹立

標的候補分子として同定された Aldolase A に対して、shRNA を用いてノックダウン細胞株の樹立を行った。Western blot 法により、Aldolase A の発現量が減少していることが確認できたため、その細胞を Aldolase A ノックアウト RBL-2H3 細胞株として用いた。

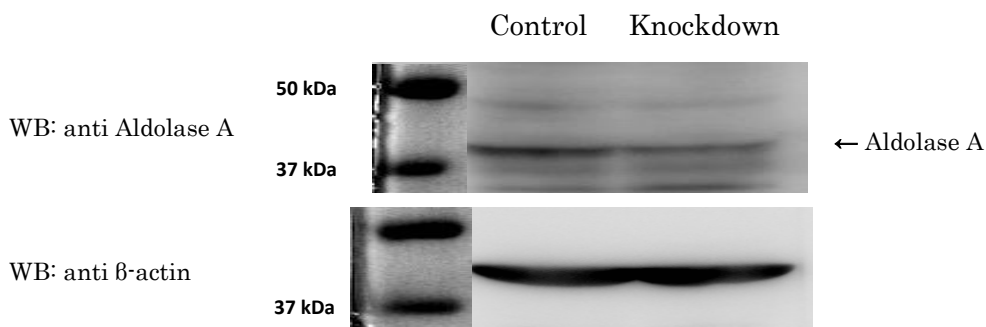


Figure 19. Aldolase A ノックダウン細胞の樹立

shRNA を導入した RBL2H3 細胞を、puromycin 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でセレクションし、培養した。Aldolase A のノックダウンは、ウエスタンブロット法により検討した。

3.10.2 Aldolase A ノックダウンによる NFAT シグナルへの影響

shRNA による Aldolase A ノックダウン RBL-2H3 細胞に対してイオノマイシン刺激を行い、IL-9 mRNA 遺伝子発現亢進への影響をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。その結果、通常の細胞群と比較して、ノックダウンを行うことでピロガロールの IL-9 遺伝子発現抑制作用が阻害された。

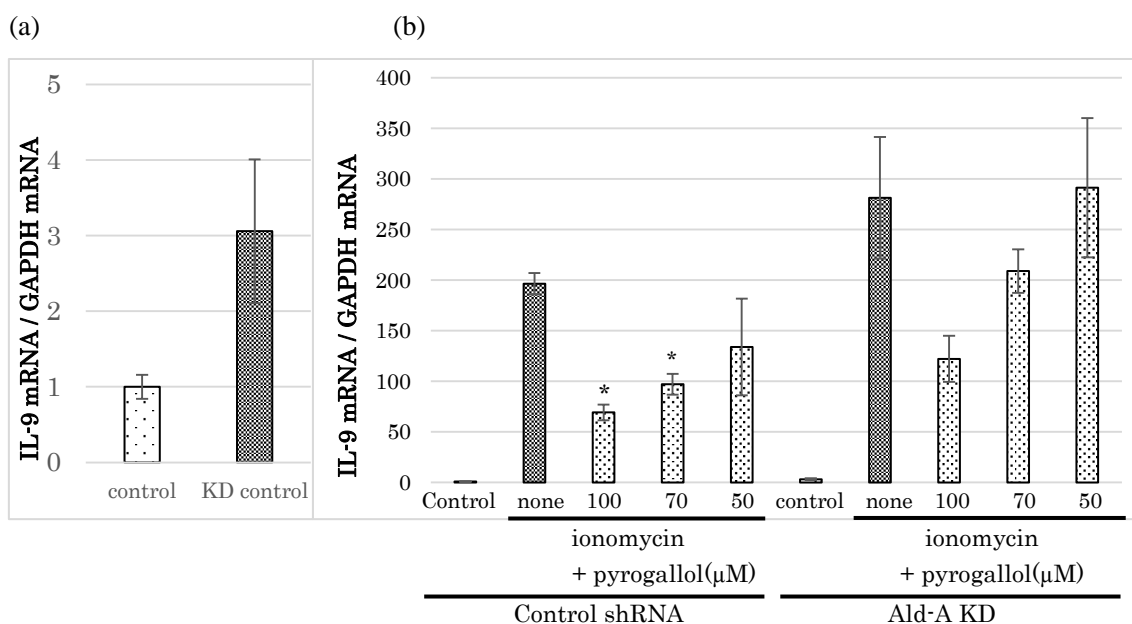


Figure 20. Aldolase A ノックダウン細胞における IL-9 遺伝子発現の変化

(a) Aldolase A をノックダウンした細胞、しなかった細胞を無刺激のまま回収し、total RNA を抽出した。(b) 各濃度に調整したピロガロールを 10 分間処置し、イオノマイシン刺激(1 μM) 2 時間後に細胞を回収して total RNA を抽出した。それぞれの mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR により定量した。

*P<0.05 vs ionomycin

3.11 PUF60 のノックアウトとその影響

3.11.1 PUF60 ノックアウト RBL-2H3 細胞株の樹立

標的候補分子として同定された PUF60 に対して、CRISPAR-Cas9 を用いてノックアウト細胞株の樹立を行った。用いたプラスミド(SBI)には GFP の遺伝子もコードされており、Lipofectamine3000 により導入された細胞は蛍光顕微鏡を用いることで緑色蛍

光を確認することができる。無処置の群と比較して transfection を行った細胞群では緑色蛍光の増加が確認できた。その後細胞を 96 well plate に 1 cell/well となるよう限界希釈にて細胞を播種し、モノクローニングを行った。その結果いくつかのサンプルで PUF60 のノックアウトが確認されたため、その細胞を PUF60 ノックアウト RBL-2H3 細胞株として用いた。

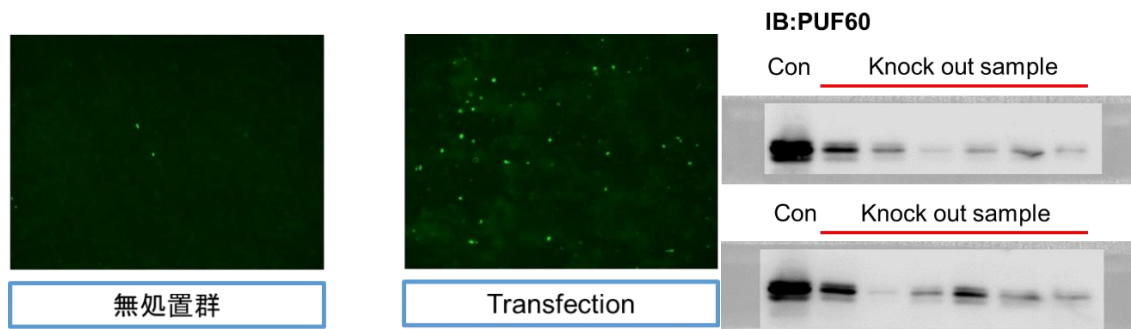


Figure 21. PUF60 ノックアウト細胞の樹立

CAS9 プラスミドを導入し、PUF60 をノックアウトした。プラスミドの導入は蛍光を観察することで検討し、PUF60 のノックアウトはウエスタンブロット法により検討した。

3.11.2 PUF60 ノックアウトによる NFAT シグナルへの影響

CRISPR-Cas9 による PUF60 ノックアウト RBL-2H3 細胞に対してイオナマイシン刺激を行い、IL-9 mRNA 遺伝子発現亢進への影響をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。その結果、通常の細胞群と比較して、ノックアウトを行うことで IL-9 の mRNA 遺伝子発現亢進が抑制されていることが分かった。

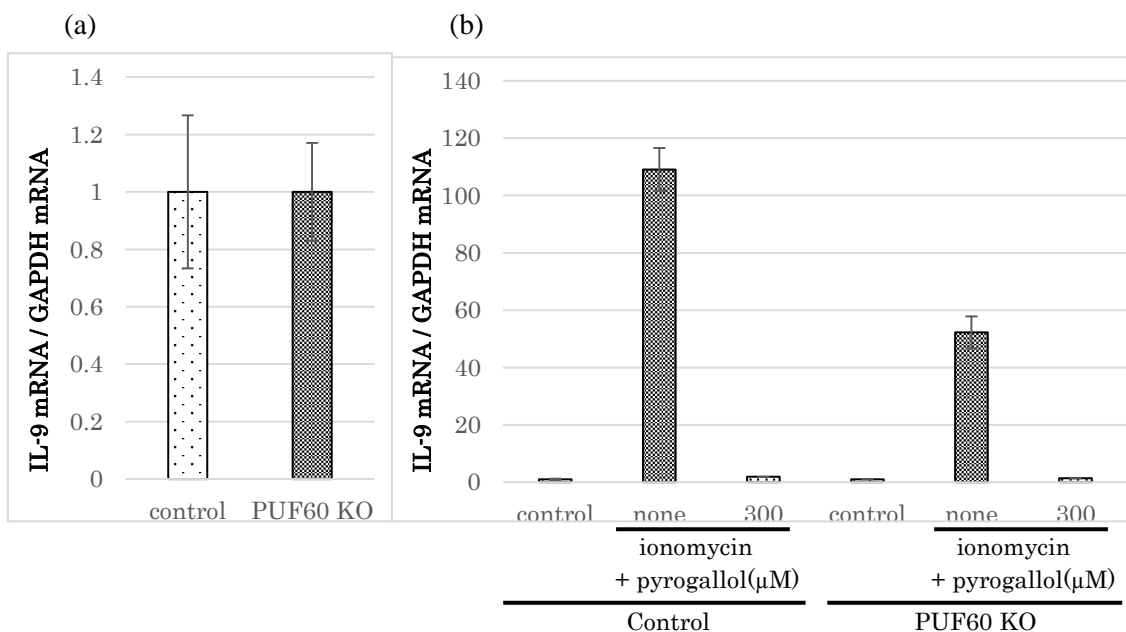


Figure 22. PUF60 ノックアウト細胞における IL-9 遺伝子発現の変化

- (a) PUF60 をノックアウトした細胞、しなかった細胞を無刺激のまま回収し、total RNA を抽出した。
- (b) 各濃度に調整したピロガロールを 10 分間処置し、イオノマイシン刺激 (1 μ M) 2 時間後に細胞を回収して total RNA を抽出した。それぞれの mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR により定量した。

第4章 考察

4.1 阿波晩茶に含まれる有効成分の単離・同定

阿波晩茶は、徳島県の山間部で生産されている後発酵茶で、乳酸発酵という独特な工程を経て作られる。阿波晩茶は昔から抗アレルギー作用を持つことが伝承されているが、その抗アレルギー活性の根本的なメカニズムはまだ明らかでない。我々は阿波晩茶の抗アレルギー効果を確認するため、阿波晩茶抽出物の IL-4 遺伝子発現抑制効果を測定したところ、有意な抑制効果がみられた (Fig. 2)。

以上の結果より、阿波晩茶には優れた抗アレルギー物質が存在すると考え、有効成分の単離、同定を行った (Fig. 3-5)。その結果、有効成分としてエピガロカテキンゲレート (EGCG)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキン (EC)、ピロガロールを同定した (Fig. 6)。

ピロガロールは発酵前の茶葉に含まれていないため、乳酸発酵時に生成したと考えられる。そこで阿波晩茶特有であるピロガロールに着目し、抗アレルギー作用について TDI 鼻過敏症モデルラットを用いて確認した。ピロガロール (6 mg/rat) を、TDI 鼻過敏症モデルラットに3週間連日経口投与したところ、くしゃみ回数、鼻症状、H1R mRNA、IL-4 mRNA レベル上昇を有意に抑制した (Fig. 7)。

ピロガロールの分子薬理機構に関しては報告がなく、その作用メカニズムは解明されていない。ピロガロールの分子薬理機構解明は、新規抗アレルギー薬の開発やアレルギー一症状悪化メカニズムの解明につながると考え、その標的タンパク質の同定を試みた。

まず、ピロガロールによる H1R、IL-13、IL-9 遺伝子発現に対する作用を、細胞実験で確認したところ、すべての遺伝子に対して抑制効果を示した。各遺伝子に対する抑制作用を比較すると、ピロガロールは IL-9 遺伝子発現に対して最も強い抑制作用を示した (Fig. 8)。

さらに、イオノマイシン刺激による IL-4、IL-9 遺伝子発現亢進に対するピロガロールの作用を比較した。その結果、IL-9 遺伝子発現に対するピロガロールの抑制作用は、IL-4 遺伝子発現に対してよりも強いことが明らかとなった (Fig. 9)。この抑制傾向は、NFAT 阻害薬である INCA-6 と類似しており、ピロガロールは NFAT シグナルに関与することで IL-9 抑制作用を示していることが示唆された。

4.2 ピロガロールの NFAT シグナルに対する影響

NFAT には5つのアイソフォームが存在しており、NFATc1、NFATc2、NFATc3、NFATc4 および NFATc5 が存在し、NFATc1~NFATc4 はカルシニューリンからの活性化を受けること、NFATc1、NFATc2、NFATc3 および NFATc5 は免疫に関与していることが報告されている²⁰⁾。NFAT は通常リン酸化されて細胞質内に存在するが、イオノマイシン刺激に伴い細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、活性化されたカルシニューリンによる脱リン酸化

を受けて活性化され、核内に移行して転写活性を示し、IL-9などの遺伝子発現を亢進することが知られている。そのため、ピロガロールの薬理作用点はこれよりも下流にあるという事が示唆された。また、免疫抑制剤として使用されるシクロスポリン A はカルシニューリンの酵素活性を阻害する事により NFAT の活性化を抑制するという報告がなされており²¹⁾、ピロガロールの作用点はシクロスポリン A と異なることが明らかとなった。

次に、NFAT の核内移行に対するピロガロールの影響について解析を行ったところ、ピロガロールは NFAT の核内移行を抑制した (Fig. 11)。また、NFAT の脱リン酸化をも抑制する事が判明した (Fig. 12, and 13)。以上より、ピロガロールの作用点はこれらの部位よりもさらに上流であるという事が示唆された。

NFAT のカルシニューリン結合領域 (CNBR) は現在までに、PxIxIT モチーフ (CNBR1) と LxVP モチーフ (CNBR2) の 2 か所が報告されており、NFATc1 では PRIEIT と LAVP、NFATc2 では PRIEIT と LLVP というアミノ酸配列で構成されている^{22, 23)}。また近年の研究により、CNBR1 と CNBR2 間の核移行シグナル近傍に、16 アミノ酸で構成される第三の結合領域 (CNBR3) が存在することが見出されている (Fig. 15(a))¹²⁾。NFAT には複数のサブタイプが存在しており²⁰⁾、それぞれに CNBR の親和性が異なっている²²⁾。たとえば NFATc1 は、CNBR1~3 の各領域をほぼ同程度使用することによりカルシニューリンと結合しているが、NFATc2 においては CNBR1 のみがカルシニューリンとの結合に関与しており、CNBR2・3 のカルシニューリンに対する親和性は NFATc1 のそれらと比較すると極めて低い。

NFAT 阻害薬である INCA-6 は CNBR1 とカルシニューリンの結合を阻害する事により、NFAT とカルシニューリンとの相互作用を阻害する^{14, 23)}。しかし、ピロガロールは NFATc2 には影響しなかったが (Fig. 14(b))、NFATc1 とカルシニューリンとの結合を強める効果を示した (Fig. 14(a))。そこで、NFAT のカルシニューリン結合領域について詳しく検討したところ、CNBR1 に関しては直接影響を与えず (Fig. 15(b))、また CNBR2・3 に関しては濃度依存的にカルシニューリンとの結合を強めることが明らかとなった (Fig. 15(c,d))。以上のことより、ピロガロールが INCA-6 とは異なる作用点を持つことが明らかとなった。

ピロガロールの影響を受けているのは CNBR2・3 であり、CNBR1 には影響しない。その事から、ピロガロールの作用は特異的なものと考えられる。またカルシニューリンと CNBR1 との結合量に対して影響を与えないという事から、ピロガロールはカルシニューリン側ではなく NFAT 側に何らかの影響を与えているのではないかと考えられる。

またピロガロールは、NFATc1 と NFATc2 両方の脱リン酸化を抑制し、核内移行を抑制するという事が分かっている (Fig. 11, and 13) が、カルシニューリンとの結合量の増加に関しては、NFATc1 にのみ影響を与えている。つまり、ピロガロールの作用点は

NFATc1 と NFATc2 において異なっており、それぞれに特異的ではないかという事が示唆される。

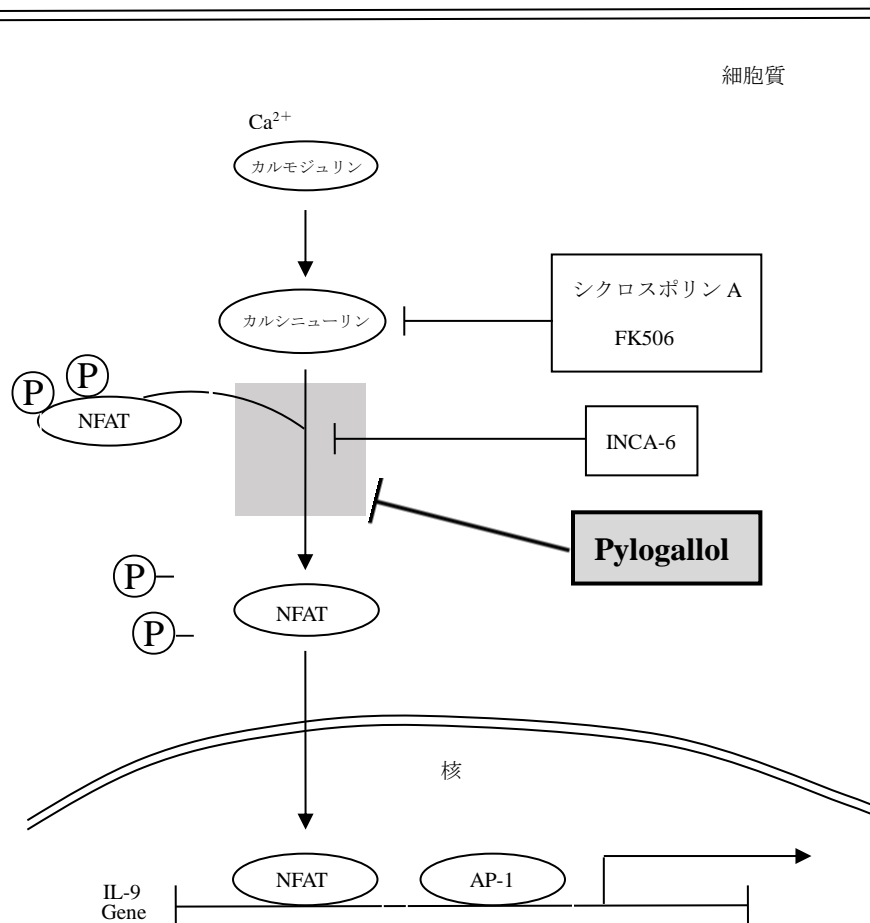


Figure 23. ピロガロールの IL-9 遺伝子発現抑制機構

ピロガロールの作用点は、斜線部近傍に存在していると示唆される。

4.3 ピロガロールの標的タンパク質の探索

NFAT は細胞質中において、多数のタンパク質や noncoding receptor of NFAT (NRON) と呼ばれる long intergenic noncoding RNA (lincRNA) などと複合体を形成しており、通常はそれらのタンパク質の働きによって脱リン酸化・再リン酸化の調整を受けることで活性が制御されている¹⁵⁻¹⁹⁾。我々は、ピロガロールがこれらの NFAT と複合体を形成しているタンパク質に働きかけることで、NFAT の脱リン酸化を抑制、もしくはカルシニューリンとの結合を抑制しているのではないかと考えた。また、カルシニューリンと NFATc1 の結合量が増加することによって、NFATc1 の脱リン酸化が抑制されるという事も、これらの複合体形成に影響を与える事による結果ではないかと考えた。

そこで、NFAT-GFP 融合タンパク質を共免疫沈降し、それらと複合体を形成するタンパク質を検出し、イオノマイシン刺激、ピロガロール処置により変化がみられるかどうか確認した。その結果、NFATc2-GFP 融合タンパク質で共免疫沈降したサンプルでのみ、Aldolase A という、解糖系の酵素として知られるタンパク質が同定された (Fig. 16(a))。

Aldolase A は糖新生、解糖系に働く酵素であり、アルドール反応を触媒することによって Glyceraldehyde 3-phosphate と Dihydroxyacetone phosphate の二つから Fructose 1,6-bisphosphate を生成し、かつアルドール反応の逆反応であるレトロアルドール反応を触媒することによって、Fructose 1,6-bisphosphate を Glyceraldehyde 3-phosphate と Dihydroxyacetone phosphate に分解する働きを持つ。また、Aldolase A は3つの Mg^{2+} が配位することで、アルドール反応を触媒する酵素活性を有しているという報告がなされているが²⁴⁾、 Ca^{2+} が酵素活性に影響しているという報告はない。

Aldolase A は無刺激状態では NFATc2 と結合状態にあるが、刺激によって NFATc2 との結合量が減少し、ピロガロール処置をしたサンプルでは結合量が回復している (Fig. 16(b))。このことから、Aldolase A は NFATc2 に結合することで、リン酸化状態での安定化に寄与しているのではないか、ということが示唆される。

また構造活性相関の結果 (Table. 1) から、ピロガロールは構造特異的な標的分子に作用することで、NFAT シグナルを抑制することが考えられた。そこでピロガロールのファーマコフォアと考えられる 1,2,3-Benzenetriol 構造を保持した gallic acid 固定化磁気ビーズを用いてアフィニティー実験を行った結果、poly(U)-binding-splicing factor (PUF60) が同定された (Fig. 17)。

共免疫沈降法の結果から、PUF60 はイオノマイシン刺激により NFATc2 への結合量が増え、その結合はピロガロールにより抑制されることが明らかとなった (Fig. 18)。このことから PUF60 は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により NFAT に結合して脱リン酸化を亢進する働きがあり、ピロガロールはその働きを PUF60 に直接結合することで阻害し、NFAT の脱リン酸化を抑制する作用機構が示唆された。

NFAT は細胞質中において、noncoding receptor of NFAT (NRON) と呼ばれる長鎖 RNA を足場としてリン酸化酵素を含む複数のタンパク質と複合体を形成しており、脱リン酸化されると同時にこれらの結合タンパク質がはずれて NFAT は核内へと移行することがわかっている¹⁵⁻¹⁹⁾。また PUF60 は RNA への結合能を有することが知られていることから²⁵⁾、PUF60 が NFAT へ関与するのであれば NRON を介して NFAT へと結合し、NFAT の脱リン酸化に寄与していることが考えられる。

4.4 Aldolase A ノックダウンによる NFAT シグナルへの影響

Aldolase A は糖新生、解糖系といった生命維持に関わる酵素であるため、これらへの関与は生体への悪影響につながるのではないかと懸念されるが、NFAT と結合している Aldolase A はごく一部であり、細胞質中に遊離している Aldolase A の量はほぼ変化し

ていないため (Fig. 16(b))、pyrogallol が NFAT と Aldolase A の結合に関与するとしても、解糖系には影響しないことが示唆される。

近年 Aldolase A は、解糖系の酵素活性に関連しない scaffold protein としての働きを持つ、という報告がされている²⁶⁾。基質と結合していない Aldolase A は、Sorting Nexin 9 や F-actin、 α -tubulin、WASP、glucose transporter 4 などといった複数のタンパク質と結合し、それらの働きを調節する役割を持つ。これらの働きは、Aldolase A の酵素基質反応によって阻害される。

shRNA による Aldolase A のノックダウンを行うことで、無刺激でも IL-9 遺伝子発現が亢進している (Fig. 20(a))。またイオノマイシン刺激に伴う IL-9 遺伝子発現亢進に対して、ピロガロールの IL-9 遺伝子発現抑制作用がノックダウン細胞において阻害された (Fig. 20(b))。以上より、ピロガロールは NFATc2 と Aldolase A の結合を強め、NFAT の脱リン酸化を抑制することが示唆された。

4.5 PUF60 のノックアウトによる NFAT シグナルへの影響

CRISPR-Cas9 による PUF60 のノックアウトを行うことで、無刺激では IL-9 遺伝子発現に変化はない (Fig. 22(a)) が、イオノマイシン刺激による IL-9 遺伝子発現亢進は抑制された (Fig. 22(b))。遺伝子発現は 50% 程の抑制がみられており、RBL-2H3 細胞には NFATc1 及び c2 の両タンパク質が存在していることから、PUF60 のノックアウトでは NFATc1 に対する抑制がないため、遺伝子発現亢進は部分的にのみ抑制されていたことが考えられる。

4.6 総括

これまでの研究により、ピロガロールの作用点は NFATc1 と NFATc2 において異なっており、それぞれに特異的ではないかという事が示唆された。

NFATc1 の脱リン酸化抑制には、カルシニューリンが関与している。ピロガロールによって CNBR2 を介したカルシニューリンと NFATc1 の結合が強化されることにより、NFAT の脱リン酸化が抑制されていると考えられる。

また NFATc2 の脱リン酸化抑制には、Aldolase A と PUF60 が関与している。NFAT は細胞内において複数のタンパク質と複合体を形成しており、それら調節因子の働きによって活性を調節されているという報告がなされている。同定された Aldolase A と PUF60 は NFAT 調節因子の一つであり、ピロガロールはこれらの因子を介して、間接的に NFATc2 脱リン酸化阻害作用を示すことが示唆された。

Aldolase A はリン酸化 NFATc2 と結合しており、通常はリン酸化安定化に寄与している。ピロガロールは両タンパク質の結合を強めることで、NFATc2 のカルシニューリンによる脱リン酸化を抑制していることが示唆された。

PUF60 はシグナルの活性化に伴って脱リン酸化 NFATc2 と結合し、IL-9 遺伝子発現亢

進に寄与している。ピロガロールは NFATc2 と PUF60 の結合を阻害する事で、NFATc2 のカルシニューリンによる脱リン酸化を抑制していることが示唆された。

現時点で、Aldolase A が NFAT シグナルに関与するという報告はされておらず、PUF60 においても、RNA または DNA に結合してスプライシングを調整する機能は知られているが²⁷⁾、タンパク質の脱リン酸化に関与するといった報告は見られない。今後は他のタンパク質との関係性の確認や、NFAT に存在する NRON と PUF60 が実際に結合しているかの確認等を行うことで、相互作用の確定を行うことが必要であると考ええる。

NFAT シグナルに関与するピロガロールを治療に活用できれば、花粉症のみならず、自己免疫疾患などの他の NFAT シグナルに関与する治療にも応用することが可能である。これまでに開発されてきた抑制薬と比較してシグナル下流を阻害する為、ピロガロールは様々なアレルギー疾患の治療に対して、より安全に使用することが出来ると考えられる。疾患の治療に応用するため、今後も更なる解明を検討していく必要がある。

第5章 参考文献

1. Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K: Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2011; 60:171-189.
2. Kitamura Y, Miyoshi A, Murata Y, Kalubi B, Fukui H, Takeda N: Effect of glucocorticoid on up-regulation of H1R mRNA in nasal mucosa of rats sensitized by exposure to toluene diisocyanate. *Acta Otolaryngol.* 2004; 124:1053-1058.
3. Murata Y, Miyoshi A, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H: Up-regulation of H1Rs in an allergic rat nasal mucosa model. *Inflamm. Res.* 2004; 53:11-12.
4. Mizuguchi H, Hatano M, Matsushita C, Umehara H, Kuroda W, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H: Repeated pre-treatment with antihistamines suppresses [corrected] transcriptional up-regulations of histamine H(1) receptor and interleukin-4 genes in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108:480-6.
5. Mizuguchi H, Kitamura Y, Kondo Y, Kuroda W, Yoshida H, Miyamoto Y, Hattori M, Fukui H, Takeda N: Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses nasal symptoms and expression of histamine H₁ receptor mRNA in the nasal mucosa of patients with pollinosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010; 32:745-8.
6. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:701-38.
7. Holgate S T: The 1992 Cournand Lecture. Asthma: past, present and future. *Eur Respir J.* 1993 Nov; 6(10):1507-20.
8. Fukui H: Progress in allergy signal research on mast cells: up-regulation of histamine signal-related gene expression in allergy model rats. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106:325-331.
9. Mizuguchi H, Orimoto N, Kadota T, Kominami T, Das AK, Sawada A, Tamada M, Miyagi K, Adachi T, Matsumoto M, Kosaka T, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H: Suplatast tosilate alleviates nasal symptoms through the suppression of nuclear factor of activated T-cells-mediated IL-9 gene expression in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci.* 2016; 130:151-158.
10. Islam R, Mizuguchi H, Shaha A, Nishida K, Yabumoto M, Ikeda H, Fujino H, Kitamura Y, Fukui H, Takeda N: Effect of wild grape on the signaling of histamine H1 receptor gene expression responsible for the pathogenesis of allergic rhinitis. *J Med Invest* 2018; 65:242-250.
11. Abe Y, Ogino S, Irifune M, Imamura I, Liu Y Q, Fukui H, Matsunaga T: Histamine content, synthesis and degradation in nasal mucosa and lung of guinea-pigs treated with toluene diisocyanate (TDI). *Clin. Exp. Allergy.* 1993; 23:512-517.
12. Kitamura N, Shindo M, Ohtsuka J, Nakamura A, Tanokura M, Hiroi T, Kaminuma O: Identification of novel interacting regions involving calcineurin and nuclear factor of activated T

- cells. *FASEB J.* 2020; 34:3197-3208.
13. Macian F: NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jun; 5(6):472-84.
 14. Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG: Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 18; 101(20):7554-9
 15. Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A: A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol.* 2004 May; 24(10):4184-95.
 16. Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A: A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature.* 2006 Jun 1; 441(7093):646-50.
 17. Willingham AT, Orth AP, Batalov S, Peters EC, Wen BG, Aza-Blanc P, Hogenesch JB, Schultz PG: A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science.* 2005; 309:1570-1573
 18. Sharma S, Findlay GM, Bandukwala HS, Oberdoerffer S, Baust B, Li Z, Schmidt V, Hogan PG, Sacks DB, Rao A: Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:11381-11386.
 19. Liu Z, Lee J, Krummey S, Lu W, Cai H, Lenardo MJ: The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat Immunol.* 2011 Oct 9; 12(11):1063-70.
 20. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991 Aug 23; 66(4):807-15.
 21. Martínez-Martínez S, Rodríguez A, López-Maderuelo MD, Ortega-Pérez I, Vázquez J, Redondo JM: Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem.* 2006; 281:6227-6235
 22. Aramburu J, Garcia-Cózar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG: Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell.* 1998; 1:627-637
 23. Kang S, Li H, Rao A, Hogan PG: Inhibition of the calcineurin-NFAT interaction by small organic molecules reflects binding at an allosteric site. *J Biol Chem.* 2005 Nov 11; 280(45):37698-706.
 24. Fushinobu S, Nishimasu H, Hattori D, Song HJ, Wakagi T: Structural basis for the bifunctionality of fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase. *Nature.* 2011 Oct 9; 478(7370):538-41.
 25. Page-McCaw P S, Amonlirdviman K, Sharp P A: PUF60: A novel U2AF65-related splicing

- activity. *RNA*. 1999; 5:1548-1560.
26. Rangarajan ES, Park H, Fortin E, Sygusch J, IZard T: Mechanism of aldolase control of sorting nexin 9 function in endocytosis. *J Biol Chem*. 2010 Apr 16; 285(16):11983-90.
 27. Hastings ML, Allemand E, Duelli DM, Myers MP, Krainer AR: Control of pre-mRNA splicing by the general splicing factors PUF60 and U2AF(65). *PLoS One*. 2007 Jun 20; 2(6):e538.

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し終始御親切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大谷大学薬学部薬理学講座 水口 博之 教授、医療法人錦秀会顧問 福井 裕行 先生、徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 武田 憲昭 教授、および徳島大学大学院医歯薬学研究部薬学域生命薬理学教室 藤野 裕道 教授に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究にご協力くださいました徳島大学大学院医歯薬学研究部薬学域生薬学教室 柏田 良樹 教授、広島大学原爆放射線医科学研究所疾患モデル解析研究分野 神沼修 教授。そして本研究に携わるにあたり、研究生活を共にした徳島大学薬学部分子情報薬理学教室の皆様方に、心より感謝致します。

2020 年
中野友寛