

# 大豆サポニンの免疫調節機能：高親和性IgE受容体の発現抑制作用

立花宏文\*・藤村由紀・矢野知美・山田耕路

九州大学大学院農学研究院

## Immunological Modulative Activity of Soybean Saponins: Suppressive Effect of Soybean Saponins on High Affinity IgE Receptor Expression

Hirofumi TACHIBANA, Yoshinori FUJIMURA, Satomi YANO and Koji YAMADA

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

### ABSTRACT

We examined the effect of soybean saponins on the cell surface expression of high affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI) in human basophilic KU812 cells. Flow cytometric analysis showed that soybean saponin decreased the cell surface expression of Fc $\epsilon$ RI. Fc $\epsilon$ RI is a tetrameric structure comprising of one  $\alpha$  chain, one  $\beta$  chain, and two  $\gamma$  chains. The level of mRNA of each subunit in KU812 cells was not reduced by treatment with the saponin. Furthermore, immunoblot analysis revealed that total cellular expression of the Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  and  $\gamma$  chains were not affected by treatment with the saponin. However, the saponin treatment inhibited the Fc $\epsilon$ RI cross-linking-induced histamine release. The cross-linkage of Fc $\epsilon$ RI causes the activation of basophils, which leads to the secretion of inflammatory mediators including histamine. These results suggest that soybean saponins can negatively regulate basophil activation through the suppression of Fc $\epsilon$ RI expression. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 104-107, 2003.

Key words : soyasaponin, Fc $\epsilon$ RI, histamine, basophils

サポニンとはトリテルペノイドあるいはステロイドをアグリコンとする配糖体の総称で、種々の植物や海洋生物に多く存在している<sup>1)</sup>。サポニンは通常摂取する食品の中では大豆サポニンが主要な供給源の一つであり、その生理作用として、脂質酸化抑制作用<sup>2)</sup>、血清脂質改善作用<sup>3)</sup>、降コレステロール作用<sup>4)</sup>、肝障害抑制作用<sup>2)</sup>などが報告されている。一方、近年のアレルギー

一患者数の顕著な増加を背景として、日常的に摂取しても副作用がなく、安全な天然物である食品からの抗アレルギー因子の探索が活発に行われ、茶葉サポニンや薬用ニンジンジンセンシドの炎症物質遊離阻害に基づく抗アレルギー作用が明らかとなっている<sup>5, 6)</sup>。しかしながら、大豆サポニンについては、抗アレルギー的に作用するか否か興味もたれているが、この点に関する研究はほとんど進んでいない。花粉症に代表されるようなI型アレルギー反応には、IgE型抗体の

\*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

過剰産生とそれに続く高親和性IgE受容体活性化を介したマスト細胞や好塩基球からの炎症物質遊離が大きく関与する。そのため、炎症物質遊離阻害に基づいた抗アレルギー性評価は広く行われているが、高親和性IgE受容体の発現抑制に基づいた検討はほとんどなされていない<sup>7)</sup>。本研究では、ヒト好塩基球のモデル細胞であるKU812細胞を用い、高親和性IgE受容体の発現抑制を指標とした大豆サポニンの抗アレルギー活性の評価を行った。

## 方 法

### 実験材料と試薬

大豆サポニンはWakoより購入し、10% DMSO-PBSに溶解した。カルシウムイオノフォアA23187はSigmaより購入した。タイロード緩衝液 (pH7.4) は137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>となるように調製した。FcεRI特異的抗体 (CRA-1) は極東製薬より、ネガティブコントロール抗体のマウスIgG<sub>2b</sub>抗体はDakoより、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスIgG抗体はProtos Immunoresearchより購入した。フローサイトメトリー解析にはBecton DickinsonのFACS Caliburを用いた。

### 高親和性IgE受容体FcεRI発現の測定

KU812細胞を1 x 10<sup>6</sup> cells/mLに調整し、0, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20 μg/mLのサポニン添加RPMI-1640培地で24時間培養した。また、経時的影響を見るため、20 μg/mLのサポニン添加RPMI-1640培地で6, 12, 24時間培養した。これらの細胞を回収後、FcεRI特異的抗体 (CRA-1) を用いたフローサイトメトリー解析により細胞表面上のFcεRI発現量を検討した

### 高親和性IgE受容体FcεRI各鎖のmRNA発現およびたん白質量の測定

大豆サポニンを20 μg/mLで24時間処理した細胞からmRNAを回収し、各鎖特異的なプライマーを用いたRT-PCR法により検討した。検出にはそれぞれの鎖に特異的なプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより行った。たん白質量の測定では、24時間処理した細胞を溶解後、α鎖については抗α鎖抗体を結合させたProtein Aビーズを用いて免疫沈降し、γ鎖については全細胞溶解物を10% SDS-PAGEに供し、それぞれに特異的な抗体を用いたイムノブロット解析により行った。

### ヒスタミン放出能の測定

KU812細胞を1 x 10<sup>6</sup> cells/mLに調整し、20 μg/mL

の大豆サポニン添加RPMI-1640培地で24時間処理を行った。細胞を回収後、タイロード緩衝液で細胞を洗い、20 μg/mLの抗FcεRI抗体CRA-1および10 μM A23187で37°C, 30分間反応させた後、上清を回収し、ヒスタミン量を蛍光法により測定した。ヒスタミン放出量は、細胞中の総ヒスタミン量から抗FcεRI抗体あるいはカルシウムイオノフォアA23187を加えていないときの放出量を差し引いたものを100%としたときの相対放出量として表した。総ヒスタミン量の測定には細胞を超音波破碎して遠心分離した上清を用いた。

## 結果と考察

### ヒト好塩基球細胞表面における高親和性IgE受容体発現に対する大豆サポニンの効果

ヒト好塩基球様細胞株KU812を大豆サポニン添加培地で培養した後、FcεRIの細胞表面発現量をフローサイトメトリー解析により検討した。その結果、大豆サポニンは5.0 μg/mL以上の濃度でFcεRI発現を抑制した (Fig. 1A)。また、その抑制活性は12時間目以降で観察された (Fig. 1B)。

### 高親和性IgE受容体の架橋刺激によって誘導されるヒスタミン放出活性に対する大豆サポニンの効果

サポニンによるFcεRIの細胞表面発現の低下が、その架橋刺激によって誘導されるヒスタミン放出を低下させるかを検討した。サポニン20 μg/mLで24時間処理したKU812細胞をカルシウムイオノフォアA23187で刺激し、放出されたヒスタミン量を測定したが、その放出量に差は見られなかった (Fig. 2)。一方、FcεRIを抗体で架橋刺激することで誘導されるヒスタミン放出は大豆サポニン処理細胞で有意な低下を示した (Fig. 2)。

### 高親和性IgE受容体構成鎖のmRNA発現およびたん白質発現に対する大豆サポニンの影響

次に、大豆サポニンによるFcεRI発現抑制機構を明らかにするため、FcεRIの構成サブユニットであり、細胞表面への発現に必須であるFcεRIαおよびγ鎖のmRNA発現レベルに及ぼす影響をRT-PCRならびにサザンブロット法により検討した。Fig. 3に示すように、大豆サポニン処理によるFcεRIαおよびγ鎖mRNA発現への影響は認められず、FcεRI発現の抑制にこれらFcεRIサブユニットの転写レベルでの調節が関与しないことが示唆された。また、FcεRIαおよびγ鎖の総たん白質量においても影響は観察されなかった (Fig. 4)。このことから、大豆サポニンによる細胞表面のFcεRI発現レベルの減少は、αおよびγ鎖の遺伝

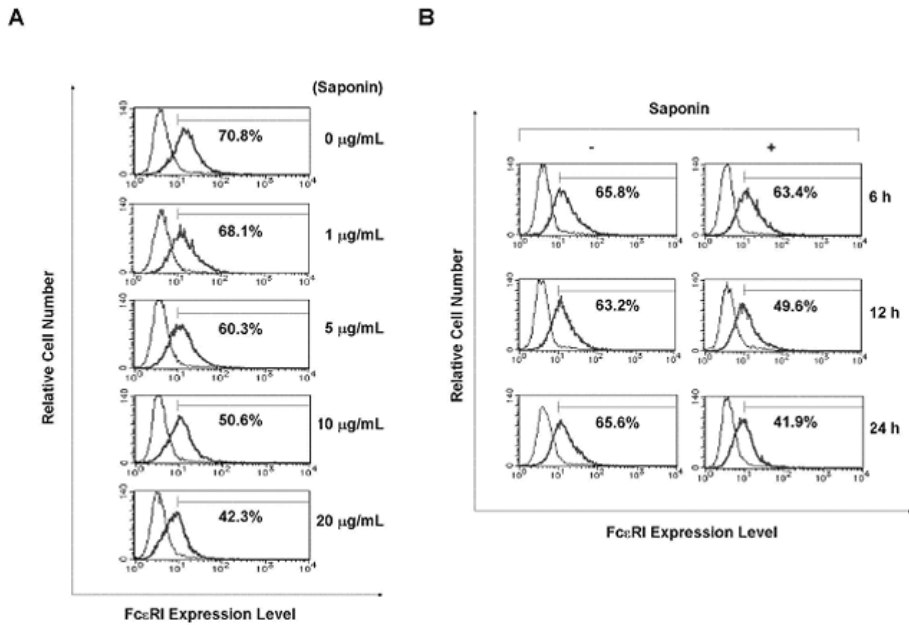


Fig. 1. Effect of soyasaponin on the cell surface expression of Fc $\epsilon$ RI in KU812 cells. (A) For dose-dependent test, KU812 cells were cultured in the presence of different concentrations of soyasaponin for 24 h. (B) For time-dependent test, KU812 cells were cultured with or without 20  $\mu$ g/mL soyasaponin for 6, 12 or 24 h. Then, cells were incubated with CRA-1 (solid line) or mouse IgG2b (thin line) as the isotype-matched negative control followed by staining with the FITC-conjugated goat anti-mouse IgG. The value indicated in the figure was the percentages of Fc $\epsilon$ RI positive cells within the indicated marker region.

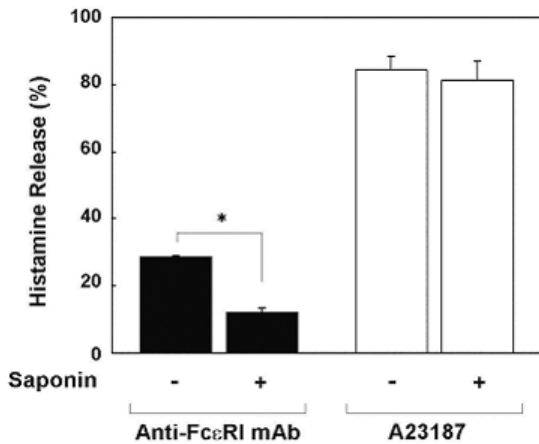


Fig. 2. Effect of soyasaponin on histamine release from KU812 cells stimulated with anti-Fc $\epsilon$ RI mAb and calcium ionophore A23187. Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). Asterisk indicates a significant difference from saponin non-treated cells (\* $P$ <0.05).

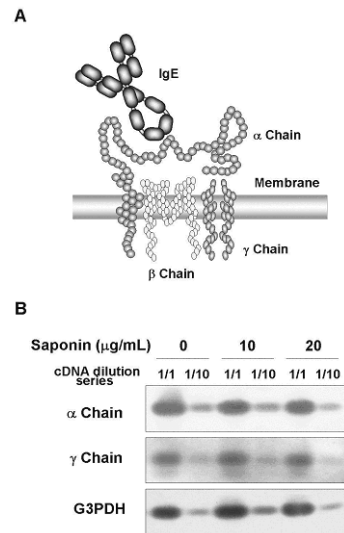


Fig. 3. Analysis of the mRNA level for Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  and  $\gamma$  chains in KU812 cells treated with soyasaponin. (A) Structure of Fc $\epsilon$ RI. (B) RT-PCR analysis. After treatment with 20  $\mu$ g/mL soyasaponin for 24 h, Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ ,  $\gamma$  and G3PDH mRNA were analyzed by RT-PCR followed by Southern blotting using specific probes for Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ ,  $\gamma$  and G3PDH.

子レベルや総たん白質レベルの低下が関与しているのではなく、FcεRI分子がインターナリゼーションにより細胞内に取り込まれた可能性などが考えられる。

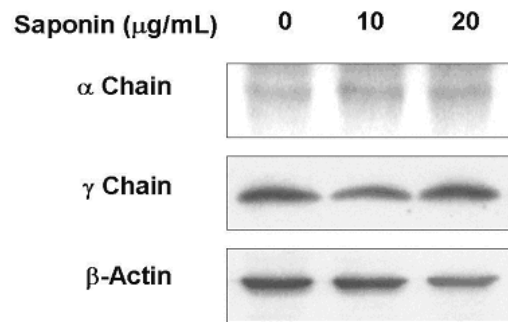


Fig. 4. Immunoblot analysis of the cellular FcεRI α or γ chain protein expression in KU812 cells treated with soyasaponin. Cells were treated with 20 μg/mL soyasaponin for 24 h. Immunoblot analysis was performed on whole cell lysates using the anti-FcεRI α or γ chain antibody.

## 要 約

マスト細胞や好塩基球の細胞膜上に発現し、IgEを介したアレルギー反応の引き金となる高親和性IgE受容体FcεRI発現に対する大豆サポニンの作用について検討した。大豆サポニンは5.0 μg/mL以上の濃度で、ヒト好塩基球様細胞株KU812の細胞表面におけるFcεRI発現を抑制し、その抑制活性は12時間目以降で観察された。また、ヒスタミン放出に及ぼす大豆サポニン処理の影響を検討したところ、カルシウムイオノフォアA23187で誘導されるヒスタミン放出への影響は認められなかったが、FcεRIの架橋刺激で誘導されるヒスタミン放出は大豆サポニン処理細胞で有意な低下を示した。次に、大豆サポニンによるFcεRI発現抑制機構を明らかにするため、FcεRIの構成サブユニットであり、細胞表面への発現に必須であるFcεRIαおよびγ鎖のmRNA発現レベルに及ぼす影響を検討した結果、大豆サポニン処理によるFcεRIαおよびγ鎖mRNA発現への影響は認められず、FcεRI発現の抑制にこれらFcεRIサブユニットの転写レベルでの調節が関与しないことが示唆された。以上の結果から、大豆サポニンはKU812細胞の細胞表面におけるFcεRI発現を抑制し、それによって、FcεRI架橋刺激で誘導されるヒスタミン放出を抑制することが明らかとなった。

## 文 献

- 1) 合谷祥一 (2001) : サポニンの界面科学的特性に関する研究。日本食品科学工学会誌, **48**, 8-13.
- 2) 大南宏治, 奥田拓道, 浜伊藤次郎, 北川勲, 吉川雅之, 有地滋, 林輝明 (1981) : 栄養と食糧, **34**, 105.
- 3) 有地滋, 戸田静雄 (1982) : 基礎と臨床, **16**, 135.
- 4) 大久保一良, 高橋勝美 (1982) : 食品と開発, **17**, 30.
- 5) Akagi M, Fukuishi N, Kan T, Sagesaka YM and Akagi R (1997): Anti-allergic effect of tea-leaf saponin (TLS) from tea leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). *Biol Pharm Bull*, **20**, 565-567.
- 6) Ro JY, Ahn YS and Kim KH (1998): Inhibitory effect of ginsenoside on the mediator release in the guinea pig lung mast cells activated by specific antigen-antibody reactions. *Int J Immunopharmacol*, **20**, 625-641.
- 7) 永井博式 (2001) : アレルギー治療薬の問題点。Molecular Medicine, **38**, 520-525.