

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月30日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658105

研究課題名（和文） 抗体可変領域を用いた誘導物質を自由に設定できる新規遺伝子発現調節システムの創製

研究課題名（英文） Development of a novel gene expression system with antibody transcription factors

研究代表者

乾 秀之（INUI HIDEYUKI）

神戸大学・自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター・講師

研究者番号：90314509

研究成果の概要（和文）：

遺伝子発現制御システムは、特定の時期に目的の遺伝子の発現を可能にすることから、分子生物学の分野で広く利用されてきた。しかし、本システムは生物が本来持っている化学物質受容体などを利用していることから、その化学物質を自由に設定して遺伝子発現調節システムを構築することはできない。そこで我々はポリ塩化ビフェニルに対する抗体の可変領域と DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメインを組み合わせた人工転写因子「抗体転写因子」を構築し、抗体が作製できるならばどのような化合物に対しても構築可能な遺伝子発現調節システムを創製した。

研究成果の概要（英文）：

A gene expression system has been used in the field of molecular biology because it enables genes of interest to express at desired period. However, only ligands for receptors derived from organisms are utilized, and compounds not to bind receptors are not suitable as a ligand. In this study, variable regions of the antibody toward polychlorinated biphenyls, DNA-binding domain, and transactivation domain were fused to construct an artificial transcription factor, we call antibody transcription factor. These fused proteins were produced in the recombinant yeast cells to create a novel gene expression system, which is applied for all compounds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境分析

1. 研究開始当初の背景

生物は内因性、外因性を問わず様々な刺激を常に受け、それに対応するための遺伝子を迅速に転写し、発現する能力を有している。その中でも、化学物質に応答する遺伝子発現調節系は、特定の時期に目的の遺伝子の発現を可能にすることから、恒常的に発現すると致命的となる遺伝子などの発現時期を制御する手法として広く用いられ、様々な遺伝子発現調節システムが開発された。一方、我々はこれまでに、エストロゲン受容体やアリルヒドロカーボン受容体を用いた遺伝子発現制御システムを開発し、それらに結合するエストロゲン様化合物やダイオキシン類による環境汚染をモニタリングする遺伝子組換え植物の創製に成功した。しかしながら、既存の遺伝子発現調節システムは、生物が本来持っている遺伝子発現制御系をそのまま異種細胞に再現したにすぎず、即ち、誘導因子となる物質はこれまでに発見された遺伝子発現制御系が応答するものに制約され、我々が自由に設定することはできない。また、タンパク質を誘導剤として利用できる系は未だ開発されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、抗体の重鎖可変領域 (V_H, H) 並びに軽鎖可変領域 (V_L, L) 断片を連結した一本鎖可変領域断片抗体を構築し、モノクローナル抗体と同様に機能的であることを示した。理論上、抗原の存在下特異的に V_H と V_L が強く会合し、三者が複合体を形成する特性を利用することにより、遺伝子誘導発現系を構築することができる。即ち、抗体の V_H にプロモーター領域に結合できるタンパク質 (LexA 等) を連結し、V_L に転写活性化に関与するタンパク質 (VP16 等) を連結した 2 種類の組換えタンパク質 (V_H-LexA 及び V_L-VP16) を創製し、同時に酵母に導入することにより、抗体の抗原が細胞内に存在するときだけ両者が会合し、

あたかも一つの転写因子のように振る舞って、特定の遺伝子の発現を制御できる可能性がある (図 1)。そこで、我々はポリ塩化ビフェニル (PCB) に対する抗体を例にして、新規遺伝子発現調節システムを創製することを目的とした。

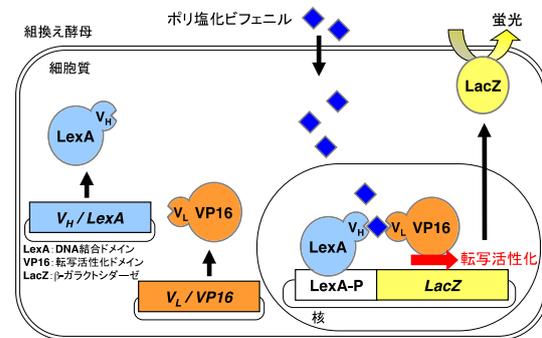


図 1 抗 PCB モノクローナル抗体可変領域を用いた人工転写因子による遺伝子発現調節システム

3. 研究の方法

(1) 抗体遺伝子を含む組換え型転写因子遺伝子の構築

PCBの一種であるPCB80 (3, 3', 5, 5'-テトラクロロビフェニル) に対する抗体転写因子を構築するために、Mab-4444のV_HとV_Lを用いた。DNA結合ドメイン (LexA, X)、転写活性化ドメイン (VP16, V)、核移行シグナル (NLS, N) をV_H並びにV_Lと組み合わせさせた組換え型転写因子を9種構築した。

(2) 組換え型転写因子の酵母発現プラスミドへの導入と酵母の形質転換

構築した9種の抗体転写因子を組合せて組換え型転写因子を導入した7種の組換え酵母を作製した (図2、アルファベットはそれぞれの機能ドメインを示す、XL/HV、XLN/NHV、XHN/NLV、NXH/NLV、XNH/NVL、XL/NHV、XHN/NVL)。組換え酵母へのプラスミドの導入は、それぞれの機能ドメイン特異的プライマーを用いて確認した。

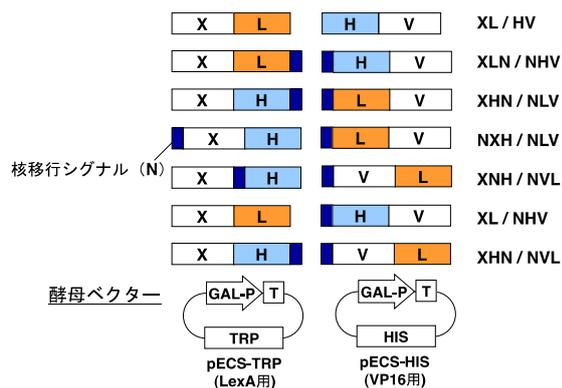


図2 抗体可変領域を用いた人工転写因子「抗体転写因子」遺伝子を発現するための発現プラスミド
H, VH; L, VL; X, LexA DNA結合ドメイン; V, VP16 転写活性化ドメイン

(3) β-ガラクトシダーゼ (LacZ) 活性の測定

組換え酵母の単一コロニーをグルコース培地にて一晩から二晩30℃で培養し、この培養液の一部をガラクトース培地に添加した。PCB、もしくはその溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO) を添加し、さらに一晩30℃で培養した。培養液を遠心分離後、沈殿をZバッファーに懸濁し、クロロホルムとSDSを添加した。さらに、LacZの基質である4-メチルウンベリフェリル-β-Dガラクトピラノシドを添加し、30℃で反応させた。励起波長360nm、発光波長460nmの蛍光を測定し、以下の式を用いてLacZユニットとLacZユニット増加量を求めた。

$$\text{LacZユニット} = \frac{\text{蛍光強度}}{(\text{OD}_{600} \times \text{培養液量 (ミリリットル)} \times \text{反応時間 (分)}) \times 1000}$$

$$\text{LacZユニット増加量} = \text{PCB処理時のLacZユニット} - \text{DMSO処理時のLacZユニット}$$

4. 研究成果

(1) PCB80を添加した組換え酵母におけるLacZ活性の測定

7種の組換え酵母にPCB80を添加して、LacZ活性を測定したところ、XL/NHVが最も高い活性を示した (図3A)。7種のPCB80組換え型転写因子のLacZ活性と同じ組合せをもつ

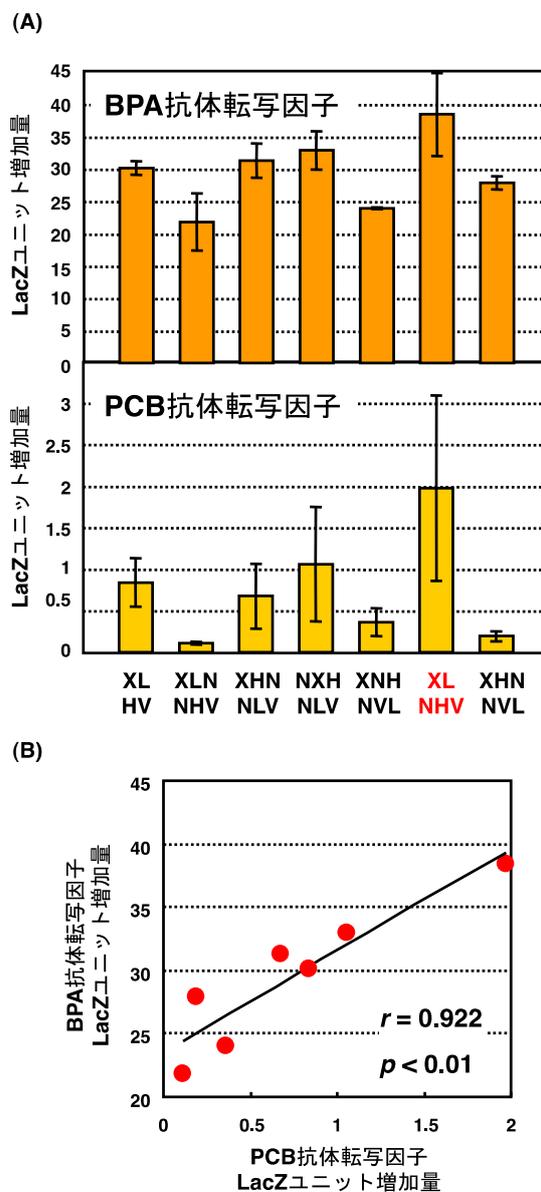


図3 ビスフェノール A (BPA) 並びに PCB 抗体転写因子を導入した組換え酵母におけるLacZ活性の比較 (A) とLacZ活性の相関 (B)

、以前に構築したビスフェノールA (BPA) 組換え型転写因子のBPAに対するLacZ活性とを比較すると、正の相関が見られた (図3B)。これは、特定の機能ドメイン (XL/NHV) の組合せを用いるとどの様な抗体であっても高いレポーター誘導活性を示す遺伝子

発現調節システムを構築できることを示している。

(2) 抗体転写因子を導入した組換え酵母によるPCB検出条件の最適化

PCBを検出するための最適条件をPCB80を用いて行った。PCBは極めて脂溶性の高い化合物であることから水に溶解させるためにDMSOなどの有機溶媒を溶液に添加する必要がある。組換え酵母XL/NHVにDMSO濃度を0.1%から8%まで変化させてPCB80を処理した結果、0.1%DMSOを添加したときに最も高いLacZ活性を示した(図4A)。また、LacZ

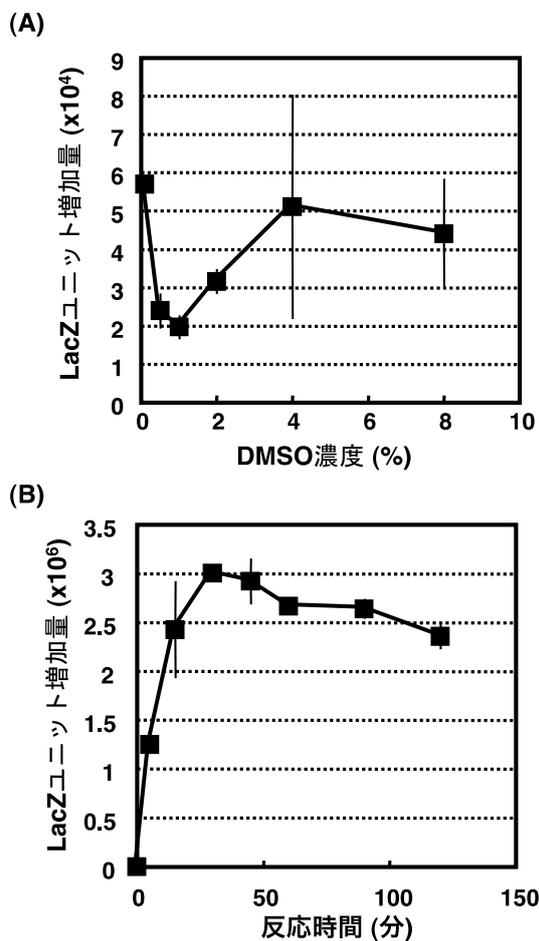


図4 LacZ活性測定条件の最適化
DMSO濃度 (A)、反応時間 (B)

の基質との反応時間は30分のときにその活性が最大となった(図4B)。最適化した条

件をもとに本システムによるPCB80の検出限界を調べたところ、0.1ppbであった(図5)。

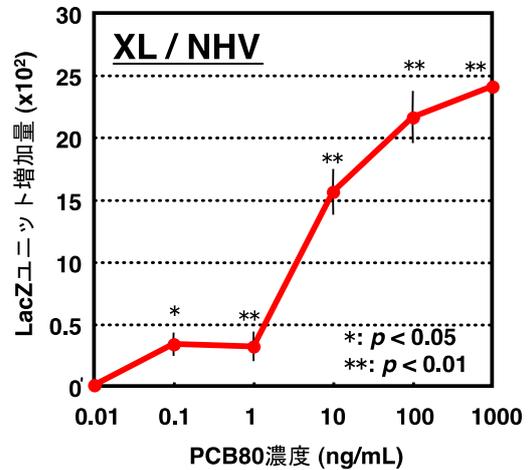


図5 XL/NHV組換え酵母を用いたPCB80濃度依存的なLacZ活性

(3) 各種PCB同族体を処理した組換え酵母におけるLacZ活性の測定

組換え酵母XL/NHVにPCB126 (3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル)、PCB169 (3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル)並びにPCB180 (2,2',3,4,4',5,5'-ヘプタクロロビフェニル)をそれぞれ処理し、LacZ活性を測定したところ、ほとんど差がなかった(図6)。本抗体転写因子を作製するもとなったモノクローナル抗体Mab-4444のこれらPCB同族体に対する交叉反応性はPCB169が最も高く、次いでPCB126であった(表1

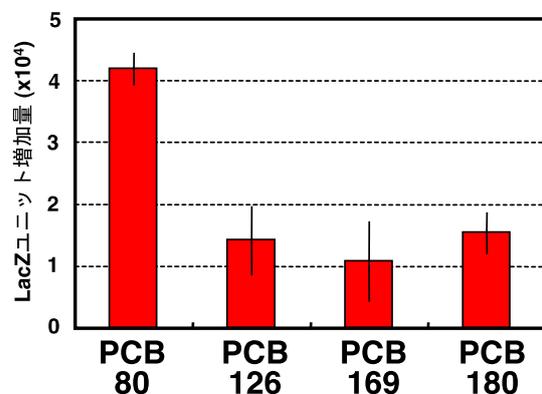


図6 XL/NHV組換え酵母を用いたPCB同族体に対するLacZ活性

PCB180はモノクローナル抗体とは反応しなかった。組換え酵母における反応性はモノクローナル抗体のそれと大きく異なっていた。これはPCB同族体の脂溶性がそれぞれ異なり、酵母細胞膜への透過性が異なったためと考えられる(表1)。脂溶性の高い化合物に対して本系を構築する際には、酵母細胞内への化合物の取り込みに留意する必要がある。

表1 抗 PCB80 モノクローナル抗体 Mab-4444 の PCB 同族体への反応性と各同族体の脂溶性度

化合物	IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	モノクローナル 抗体の 交叉反応性(%)	水:オクタノール分配係数対数 値(LogK _{ow})
PCB80	0.46	100	6.48
PCB126	2.3	20	6.89
PCB169	0.63	73	7.42
PCB180	>1000	<0.1	7.36

以上の結果から、抗体可変領域を用いた遺伝子発現調節システムの開発のための基礎的知見が得られたとともに、どのような抗体を用いても本系を開発できることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Hideyuki Inui, Tetsuya Takeuchi, Akari Uesugi, Fumito Doi, Mikio Takai, Kosuke Nishi, Shiro Miyake, and Hideo Ohkawa, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Monoclonal and Single-Chain Variable Fragment Antibodies Selective to Coplanar Polychlorinated Biphenyls, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 査読有, 60, 2012, 1605-1612

[学会発表] (計5件)

- ① 乾秀之、どんな物質でも誘導剤にできる抗体可変領域を用いた新規遺伝子発現調節シ

ステム、生物化学的測定研究会 第16回学術シンポジウム(招待講演)、2011年11月2日、京都

- ② 河野実織、櫻井由季、祇園景子、乾秀之、抗体可変領域を用いた抗体転写因子の高感度化に影響を与えるドメイン配列、第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸

- ③ 乾秀之、抗体可変領域を用いた新規遺伝子発現調節システムの創製と応用、第1回フォローアップ勉強会(招待講演)、2010年9月27日、大阪

- ④ 乾秀之、イムノアフィニティーカラムを利用した水環境中有害化学物質の高感度分析、第13回日本水環境学会(招待講演)、2010年9月8日、京都

- ⑤ 乾秀之、どんな物質でも誘導剤にできる抗体可変領域を用いた遺伝子発現調節システム、第24回バイオテクノロジー産業化のための技術シーズ公開会(招待講演)、2010年8月27日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 秀之 (INUI HIDEYUKI)

神戸大学自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター・講師

研究者番号: 90314509