

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670046

研究課題名(和文) Fluorobodyを用いた植物細胞死の網羅的解析

研究課題名(英文) Exhaustive analyses of mechanism of plant cell death using fluorobody

研究代表者

森元 聡 (Morimoto, Satoshi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60191045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死に関与する因子cyclophilin D (CycD)、voltage-dependent anion channel (VDAC)、cytochrome c(Cytc)のモノクローナル抗体の作製を試みた。この結果、それぞれに対して特異性の高い抗体を産生していることを確認した。次いで、各抗体に対するscFVの作成を行い、それらを大腸菌で発現に成功した。なお、今回クローニングしたCycDは、細胞死には関与しない可能性が示唆されたので、別のCycDの遺伝子クローニングやモノクローナル抗体の作製を検討している。VDAC、CytcのscFVについてはfluorobodyの作製を進めている。

研究成果の概要(英文)：I cloned and expressed genes encoding three factors (cyclophilin D, CycD; voltage-dependent anion channel, VDAC; cytochrome c, Cytc), which are participated with plant cell death. To prepare the monoclonal antibodies against these factors, I injected these recombinant proteins. As a result, I could obtain the monoclonal antibodies, which highly specifically bind to each antigen. Next, I constructed the gene encoding scFV against these factors, and succeeded in the expression of these genes in E. coli.

CycD gene, which was cloned in this study, was found to be not involved in cell death, because the recombinant CycD did not bind to cyclosporine A. Therefore, I attempt to clone the genes encoding the CycD actually mediating cell death in plant and to prepare monoclonal antibody against this CycD. Now I attempt to construct fluorobody genes by connecting scFV genes with green-fluorescent-protein gene, and develop genetically engineered plant by introducing the fluorobody.

研究分野：生薬学

キーワード：細胞死 モノクローナル抗体 scFV fluorobody cytochrome c cyclophilin D VDAC

1. 研究開始当初の背景

植物におけるアポトーシスおよびネクローシスは下記の経路で誘導されると推定されている。

アポトーシス

i)ミトコンドリアから Cytochrome c (Cyt c) が放出される。)Metacaspase 系が活性化される。)Endonuclease による DNA 切断が起こる。

ネクローシス

i)Cyclophilin D (CycD) が MPT (Mitochondrial Permeability Transition) pore に結合した後、pore が開口する。)H⁺がマトリックスに流入しミトコンドリアの膨化が起こる。)膜電位の消失、外膜の破壊によりミトコンドリアの障害が起こる。

しかしながら、Cyt c や CycD が細胞死に関与しているかどうか実験的な証明はなされていない。当研究室ではアサに含まれる THCA が植物にアポトーシスやネクローシスを誘導することを明らかにすることに成功している。さらに、人為的にアポトーシスやネクローシスを植物に容易に誘導できる系に加え、研究課題の遂行に必要な fluorobody の作成系を確立していることから本研究の遂行を企図した。

2. 研究の目的

申請課題では、下記の項目を明らかにすることを目的としている。

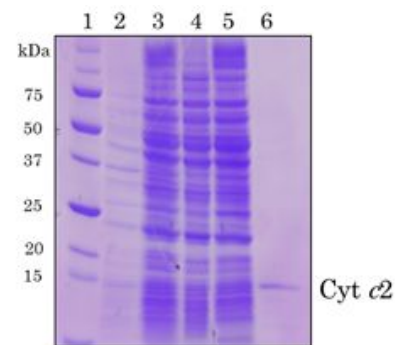
- (1) アポトーシス誘導に Cyt c の放出が必要であるかどうか。
- (2) Cyt c の放出に Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) が関与しているかどうか。
- (3) VDAC が MPTpore の構成タンパク質の一つであるかどうか。
- (4) CycD の結合が MPTpore の開口に必要であるかどうか。

3. 研究の方法

(1) 免疫原の調製

Cyt c の発現及び精製

Cyt c の遺伝子クローニングを PCR 法により行った結果、2 種の遺伝子 (Cyt c1 及び Cyt c2) の増幅に成功した。両遺伝子を pET28a(+) に導入し、大腸菌 (BL21 及び pCold) で発現した後、ニッケルカラムを用いて精製した (図 1)。



Lane1: Molecular protein marker
Lane2: Total protein before IPTG induction
Lane3: Total protein at 4 hr after IPTG induction
Lane4: Soluble fraction at 4 hr after IPTG induction
Lane5: Insoluble fraction 4 at hr after IPTG induction
Lane6: Elute fraction (200 mM imidazole)

図 1 .Cyt c2 の発現及び精製

VDAC の N 末端断片の発現及び精製

VDAC はミトコンドリアの外膜に存在するチャンネルで、その開閉には N 末端の ヘリックスを構成するアミノ酸残基が関与することが明らかとなっている。そこで、申請課題では、この N 末端の ヘリックスを認識する抗体の作製を行った。

はじめに、NtVDAC1 の N 末端ペプチド N-terminal NtVDAC1 C+ (NtVDAC1 の N 末端 18 アミノ酸残基の C 末端にシステインを付加したもの) を合成した。この合成ペプチドとキャリアタンパク質 KLH を MBS によって架橋させ、免疫原となるハプテン-キャリアタンパク質複合体を作製した。

CycD の発現及び精製

AtCYP21-3 および AtCYP21-4 が CypD 候補タ

ンパク質であると推定、されているので、両タンパク質をコードする遺伝子ローニングを PCR により行った。両遺伝子 pGEX-6P-1 に組み込み、GST 融合蛋白質として発現することに成功した(図2)。それぞれの融合蛋白質を 3C protease 処理した後、GST アフィニティークロマトグラフィーや陰イオンクロマトグラフィーに付すことにより、目的のタンパク質 AtCYP21-3、AtCYP21-4(図3)を得た。

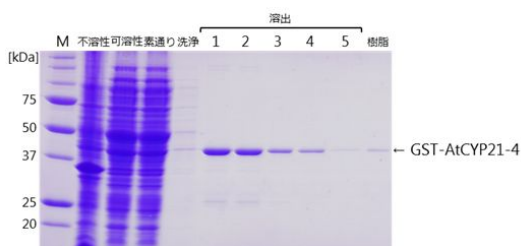


図2 . GST-AtCYP21-4 の発現・精製

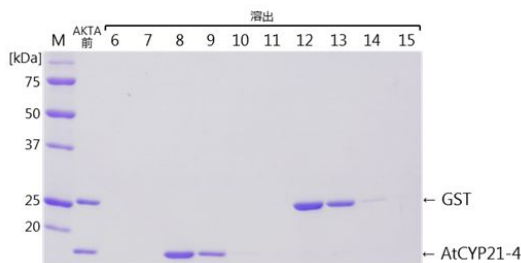


図3 . AtCYP21-4 の 精製

(2) マウスへの免疫モノクローナル抗体の作製(図4)

(1)で調製した各免疫原を BALB/c マウスにインジェクションした。なお、一次免疫から最終免疫までの免疫感作は以下のように行った。いずれも免疫効果を高めるため、一次免疫ではフロイント完全アジュバントを、二次免疫ではフロイント不完全アジュバントを使用した。

二次免疫から4日後に無麻酔下でマウス尾静脈から採血を行い、血清を用いて、indirect ELISAにより血中抗体価を測定した。三次免疫後から4日後にも採血を行い、血中抗体価を測定した。

(3) ハイブリドーマの作製およびクローン株の樹立(図4)

最終免疫後、マウスから脾臓を摘出することによって得られた脾細胞とミエローマ細胞 SP2/0 株を用いて、PEG 法による細胞融合を行った。融合細胞は、15%FCS 含有 E-RDF 培地に懸濁し、96 well 培養プレートに分注した後、5% CO2 インキュベーター内で約3週間培養した。その間、4、5日おきに HAT 培地を添加した。

約3週間後、indirect ELISAにより抗モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの一次スクリーニングを行った。そのうちより吸光度の高い well (405 nm の吸光度>2.0) を選抜し、スケールアップを行った。約1週間後、二次スクリーニングを行い、得られた陽性 well を用いて、それぞれ限界希釈法によるクローニングを2回行うことによりクローン株の選抜を行った。

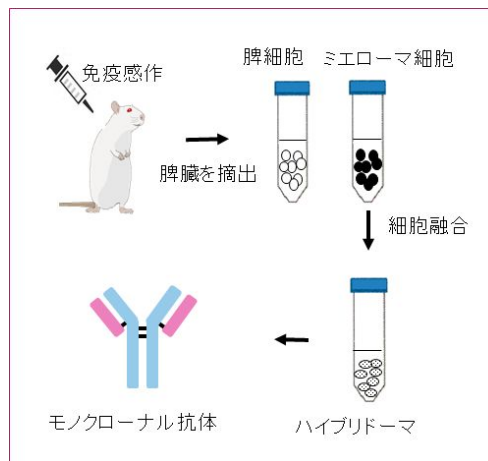


図4 モノクローナル抗体の作製スキーム

(4) scFV の作製

抗体産生ハイブリドーマから total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として Heavy chain の可変領域 (VH) に相補的なプライマーを用いて PCR を行い、VH 遺伝子を増幅し、目的とする遺伝子を増幅した。Light chain 遺伝子の増幅を試みた結果、目的とする約 700 bp の遺伝子を得ることができた。増幅した各遺伝

子のアガロース電気泳動を行い、約 300 bp、約 700 bp のバンドをゲルから抽出、精製することにより、VH、Light chain 遺伝子を作製した。作製した VH、Light chain 遺伝子は、それぞれ pGEM-T Easy Vector 及び pMD20-T Vector へ組み込み、大腸菌 JM109 株の形質転換を行った。Ampicillin を含む LB-plate で一晚培養後、得られた Ampicillin 耐性コロニーのインサートチェックを行い、VH、Light chain 遺伝子が正しく組み込まれていることを確認した。更に、Ampicillin を含む LB 培地で一晚培養後、得られた菌体よりプラスミドを抽出し、シークエンシングにより各塩基配列を決定した。

VDAC-scFv を作製するために、VH、Light chain 遺伝子の塩基配列を基に、ペプチドリンカー (Gly4Ser)₃、Sal I 認識配列を付加したプライマーあるいは Not I 認識配列を付加したプライマーを設計した (Fig.2-4)。これらのプライマーを用いて、VH、Light chain プラスミドをテンプレートに splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR) を行い、VDAC-scFv 遺伝子を増幅した。VDAC-scFv 遺伝子を組み込んだ pET28a(+) vector を大腸菌 JM109 株に導入し、発現を行った。

4. 研究成果

(1) Cytc2-MAb の性質

作製した Cytc2 に対するモノクローナル抗体 (Cytc2-Mab) の性質を調べた。タイピングの結果、Cyt c2-MAb のサブクラスは、IgG1 で、軽鎖が λ であることが判明した。

さらに本抗体の特異性について調べた。すなわち固相化抗原に Cyt c2、BSA、HSA、OVA、VDAC、一次抗体に Cyt c2-MAb を用いて直接的 ELISA を行った。その結果、Cyt c2-MAb は免疫原として用いた Cyt c2 を特異的に認識することが判明した (図 5)。従って、本抗体は目的の性質を備えていることが判明した。

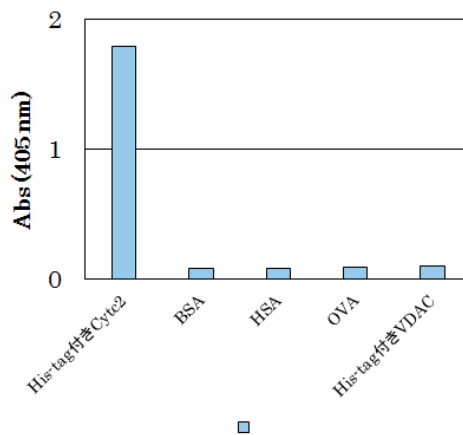


図 5 Cytc2-Mab の交差反応性。

(2) VDAC-MAb の性質

作製した VDAC に対するモノクローナル抗体 (VDAC-Mab) の特異性評価を行った。固相化抗原には、N-terminal NtVDAC1 C+の他に、N-terminal NtVDAC1 (NtVDAC1 の N 末端 18 アミノ酸残基) KLH、HSA、OVA、MSA、BSA を用いた。その結果、VDAC-Mab は N-terminal NtVDAC1 C+、N-terminal NtVDAC1 特異的に結合することが判明した (図 6)。このことから、ハイブリドーマ 2C2 株は NtVDAC1 の N 末端 18 アミノ酸残基を認識する抗 N-terminal NtVDAC1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローンであると言える (図 6)。従って、本抗体は目的の性質を備えていることが判明した。

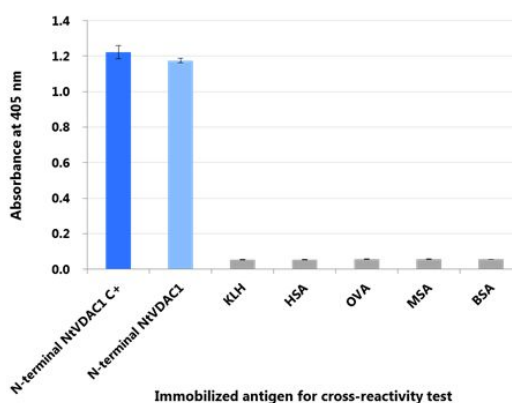


図 6 VDAC-Mab の交差反応性。

VDAC-Mab から scFv (VDAC-scFv) を作成し、その性質についても検討した。結果は図 7 に

示す通りで VDAC に特異的に結合することが確認された。現在 VDAC-scFV を利用して、fluorobody の作成を進めている

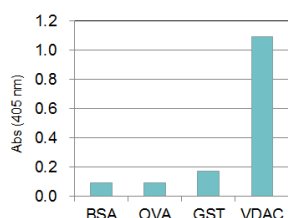


図7 VDAC-scFV の交差反応性

(3) CycD-MAb の性質

AtCYP21-3 および AtCYP21-4 を抗原として免疫を行うことにより、それぞれの抗原に反応するモノクローナル抗体 (CycD3-MAb および CycD4-MAb) を得た。そこで両モノクローナル抗体の特異性評価を行った。固相化抗原には、精製した 2 つの GST 融合 CycD 候補タンパク質、CypD 候補タンパク質の他に、GST、HSA、OVA、MSA、KLH、BSA を用いた。その結果、CycD3-MAb は GST-AtCYP21-3、AtCYP21-3 特異的に、CycD4-MAb は GST-AtCYP21-4、AtCYP21-4 特異的に結合することが判明した

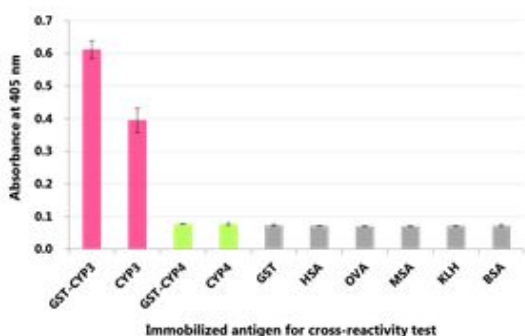


図8 CycD3-MAb の交差反応性

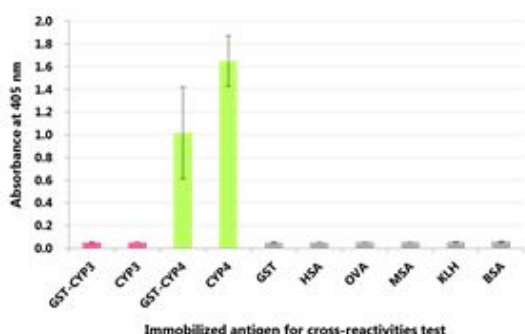
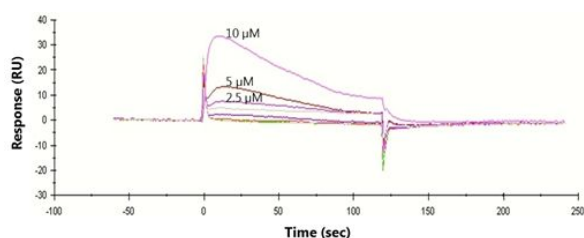


図9 CycD4-MAb の交差反応性

(4) AtCYP21-3 および AtCYP21-4 の性質
AtCYP21-3 および AtCYP21-4 は cyclophilin D の一種と推定されているが、実験的な証拠は報告されてない。そこで両タンパク質の性質を調べた。

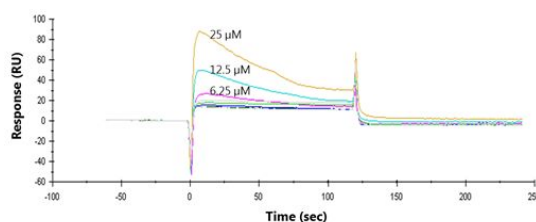
まず、THCA 処理によってミトコンドリアの MPTpore が開口することから、THCA と AtCYP21-3 および AtCYP21-4 は結合することが推察された。そこで、表面プラズモン共鳴を用いて、結合定数の算出を試みた。

結果は図10及び図11に示す通りでいずれの蛋白質も THCA と結合することが明らかとなった。



リガンド	固定化量(RU)	アナライト	K_d (μ M)
GST-AtCYP21-3	3336.9	THCA	13.2

図10 THCA と GST-AtCYP21-3 親和性解析センサーグラム



リガンド	固定化量(RU)	アナライト	K_d (μ M)
GST-AtCYP21-4	8280.4	THCA	19.8

図11 THCA と GST-AtCYP21-4 親和性解析センサーグラム

Cyclosporin A は cyclophilin D と結合することによって、MPTpore の開口を阻害することが知られている。実際に THCA 処理によって植物ミトコンドリアの MPTpore の開口が阻害されることを確認している。従って、AtCYP21-3

および AtCYP21-4 が cyclophilin D として機能するのであれば、両タンパク質は Cyclosporin A と結合すると推定される。そこで、この仮説を証明するために、表面プラズモン共鳴を用いて結合を調べてみた。この結果、図 12 に示すように AtCYP21-3 及び AtCYP21-4 は cyclosporin A と結合しないことが判明した。これらの結果は、AtCYP21-3 及び AtCYP21-4 が MPTpore の開口に関与していないことを示唆している。現在 MPTpore の開口に関与する cycD のクローニングを検討している。

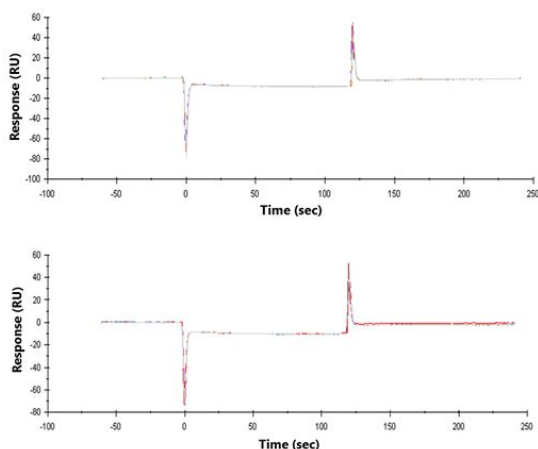


図 12 cyclosporin A と GST-AtCYP21-3 (上)・GST-AtCYP21-4 (下) 親和性解析センサーグラム

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 中島 由貴

植物アポトーシスにおけるシロイヌナズナ由来 Cytochrome c の機能解析日
日本生薬学会 第 61 回年会,
2014.09.13. (福岡)

(2) 加藤 梨那

植物ネクローシスにおける
cyclophilin D の機能解析と抗体作製
日本生薬学会 第 61 回年会,
2014.09.13. (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森元 聡 (MORIMOTO, Satoshi)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号: 60191045

(2) 研究分担者

田中 宏幸 (TANAKA, Hiroyuki)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号: 30253470

坂元 政一 (SAKAMOTO, Seiichi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号: 50610177