

平成 30 年 5 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15131

研究課題名(和文)抗体工学を応用した有用薬用植物の作出研究

研究課題名(英文)Development of useful medicinal plant using antibody-based technology

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物中で有効成分の代謝を触媒する酵素の活性を阻害することによってその成分の含量が増大した植物の作出を検討した。酵素活性を阻害する方法として、中和抗体を使用することにした。コガネバナはbaicaleinを生産しているが、この成分はperoxidase類によって分解することが知られている。peroxidase遺伝子を大腸菌で発現させたが、不活性なタンパク質として発現したので、heminと尿素の存在下で巻き戻しを行った結果、peroxidase活性を有する組換え酵素の調製に成功した。現在本酵素を抗原としてマウスに投与している。同様にケシにおいてmorphineの代謝に関わる酵素の大量調製に成功した。

研究成果の概要(英文)：To develop the medicinal plants containing large amounts of useful metabolites, in this study I attempted to increase the contents of medicinally-important compounds in the plants by inhibiting the activity of metabolic enzyme through the expression of their neutralizing antibodies.

I first prepared the antigen Scutellaria peroxidases 1 and 2 which metabolite baicalein in Scutellaria baicalensis. Scutellaria peroxidases 1 and 2 were expressed in E.coli. Because the recombinant Scutellaria peroxidases 1 and 2 lacked the enzyme activity, refolding of the recombinant proteins was conducted. When the recombinant proteins were refolded in the presence of hemin and urea, the refolded proteins showed peroxidase activity. Now, I injected the refolded proteins into mice to prepare monoclonal antibodies. In addition, I conducted the expression of morphine peroxidase which degrades morphine in opium poppy, and started to prepare its antibodies.

研究分野：生薬学

キーワード：パーオキシダーゼ コガネバナ ケシ 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

近年の健康ブームを反映して、植物由来の医薬品に注目が集まっており、日本での需要は著しく増大している。しかしながら、植物由来の医薬品の多くは、海外からの輸入に依存しているのが現状である。

上記の問題の問題を解決するために、優良品種の開発が行なわれてきた。その一つとして、有効成分の含量を高めた薬用植物の作成研究が行われている。例えば、植物成分の生合成経路を活性化することにより、有効成分の高含量株の作出を試みているが、成功した例は極めて少ないのが現状である。生合成酵素の活性化により、二次代謝産物の含量を増やす方法は、生合成段階の律速酵素を決定し、その酵素が発現しているオルガネラを明らかにしなければならない。さらに植物に存在している酵素の遺伝子を人為的に導入しても、野生型植物より酵素の発現量が減る現象も知られている。即ち gene-silencing が起こることが知られている。

そこで、申請課題では、生合成酵素を活性化するのではなく、代謝酵素を中和抗体によって阻害する方法の確立を企図した。

2. 研究の目的

当該研究計画の目的は、「先端的な抗体作成技術が、有効成分高含有植物の作出に有用であることを証明する」ことである。具体的には下記の項目を達成することを目的とする。

- (1) Baicalein 代謝酵素の中和抗体を作成し、baicalein 高含量コガネバナを作出する。
- (2) Morphine 代謝酵素の中和抗体を作成し morphine 高含量ケシを作出する。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの抽出

当研究室で構築されていた pET28a(+) / SP1 および pET28a(+) / SP2 から AccuPrep®

Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER) を用いてプラスミドを抽出した。

(2) 形質転換 (大腸菌 BL21 (DE3) 株)

氷上で解凍した大腸菌 BL21 (DE3) コンピメントセル 100 μ L に、抽出したプラスミド (pET28a(+)/SP1 および pET28a(+)/SP2) を 2 μ L 加えて穏やかに混和し、氷上で 30 分間静置した。続いて 37 $^{\circ}$ C で 90 秒間ヒートショックを与え、静置した。これを 37 $^{\circ}$ C の SOC medium 3 mL に加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間振とう培養した。培養後、菌液を濃縮、または TE buffer を用いて希釈した後 ($\times 5$, $\times 1$, $\times 1/5$, $\times 1/25$)、LB-K plate に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

(3) 発現誘導

形質転換後の pET28a(+)/SP1 および pET28a(+)/SP2 を 3 mL の LB-K broth を用いて 37 $^{\circ}$ C で一晩前培養し、これを 40 mL の LB-K broth に加え、OD₆₆₀=0.6 付近になるまで 37 $^{\circ}$ C、140 rpm で培養した。その後 IPTG を最終濃度 1 mM になるように添加し、37 $^{\circ}$ C、140 rpm で培養した。

(4) SP1 及び SP2 の精製

カラムに TALON Metal Affinity Resin を 1 mL 充填し、蒸留水 (5 mL) で洗浄した。続いて可溶性 Binding buffer (10 mL) を加えレジンを平衡化した後、目的タンパク質を含む不溶性画分をカラムに付した。可溶性 Binding buffer (5 mL) でカラムを洗浄した後、imidazole により目的タンパク質の溶出を行った。

(5) SP1 及び SP2 の巻き戻し

以下の濃度となるように巻き戻しバッファーを調製した。4 $^{\circ}$ C で 5 日間静置することで巻き戻しを行った。

- ・タンパク質溶液 (0.1 mg/mL)
- ・巻き戻しバッファー
20 mM Tris - HCl, 10% Glycerol, 3 μ M Hemin,
1 M Urea

・Cystamine/Cysteamine 濃度

SP1 の巻き戻し

Cystamine 5 mM , Cysteamine 1 mM

SP2 の巻き戻し

5 mM Cystamine , 1 mM Cysteamine

5 mM Cystamine , 2 mM Cysteamine

5 mM Cystamine , 5 mM Cysteamine

1 mM Cystamine , 5 mM Cysteamine

(6) SP1 及び SP2 の活性測定

透析後のタンパク質溶液を酵素溶液として 20 μ L と基質溶液(200 mM Citrate buffer containing 0.006% H_2O_2 , 0.0024% ABTS) 80 μ L と混合し、25 $^{\circ}C$ で 15 分間インキュベートした後、反応液の吸光度 (405nm) を測定した。

4 . 研究成果

(1) コガネバナパーオキシダーゼの発現系の確立

当研究室において構築されていた SP1 遺伝子および SP2 遺伝子をそれぞれコードした発現ベクター pET28a(+) (Novagen) (pET28a(+) / SP1 および pET28a(+) / SP2) を用いて、発現用大腸菌 BL21 (DE3) 株の形質転換を行った。形質転換後、25 μ g/mL Kanamycin 含有 Luria-Bertani plate (LB-K plate) で一晩培養し、得られたコロニーのインサートチェックにより peroxidase 遺伝子が組み込まれていると予想される発現菌株を得た。

得られた発現菌株を 3 mL の 25 μ g/mL Kanamycin 含有 LB broth (LB-K broth) で一晩前培養し、これを 40 mL の LB-K broth に加え、660 nm における optical density (OD₆₆₀)が 0.6 付近になるまで 37 $^{\circ}C$ 、140 rpm で培養した。ここに最終濃度 1 mM になるように isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、37 $^{\circ}C$ 、140 rpm で 24 時間培養した。この時、経時的に同数の菌体を回収し、発現誘導に最適な培養時間

を検討した。

回収した菌体を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に付すことでタンパク質の発現量を比較した。目的タンパク質は約 40 kDa と予想され、SDS-PAGE の結果からその発現が確認された。さらにその最適発現誘導時間を 18 時間と決定した。

(2) 不溶性 peroxidase の精製

(1) において決定した培養条件で peroxidase の発現誘導を行った。形質転換後の発現菌株を 5 mL の LB-K broth で一晩前培養し、これを 1 L の LB-K broth に加え、OD₆₆₀ = 0.6 付近になるまで 37 $^{\circ}C$ 、140 rpm で培養した。その後 IPTG を最終濃度 1 mM になるように添加し、37 $^{\circ}C$ 、140 rpm で 18 時間培養した。この培養液を遠心分離後、菌体を回収し細胞分画を行った。菌体を Binding buffer (20 mM tris (hydromethyl) aminomethane (Tris) - HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) に懸濁し、10 mg/ml リゾチーム、10 % Triton X-100 を添加後、超音波破碎した。遠心分離により得られた上清を可溶性画分とした。次いで沈殿に、変性剤として Urea を加えた可溶化 Binding buffer (20 mM Tris - HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M Urea) を加え、超音波破碎し、遠心分離後に得られた上清を不溶性画分とした。これらを SDS-PAGE に付すことにより SP1、SP2 はともに不溶性画分に含まれていることを確認した。

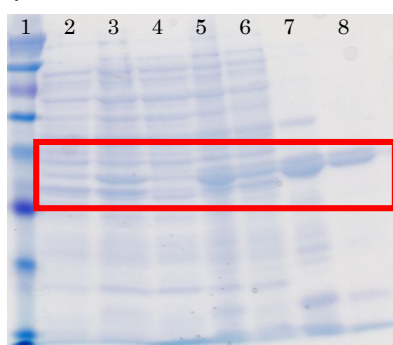
今回発現した peroxidase は N 末端側に His6-Tag を有するように設計した。これにより金属イオンとキレートを形成する。本実験においては、より高純度の peroxidase を得るため、Co²⁺をチャージした TALON Metal Affinity Resins (Clontech) を用いて精製を行った。

Peroxidase を含む不溶性画分をカラムに付し、それぞれ imidazole を含むバッファー

を用いて、洗浄、溶出を行った。SP1 では 40 mM imidazole を含むバッファーで洗浄後、90 mM imidazole を含むバッファーで溶出した (図 1 A)。SP2 では 50 mM imidazole を含むバッファーで洗浄後、200 mM imidazole を含むバッファーで溶出した (図 1 B)。

精製後、Bradford 法により収量を測定した。その結果、LB-K broth 1 L 当たり、SP1 は約 3.0 mg、SP2 は約 0.75 mg を得られることが判明した。

(A) SP1



(B) SP2

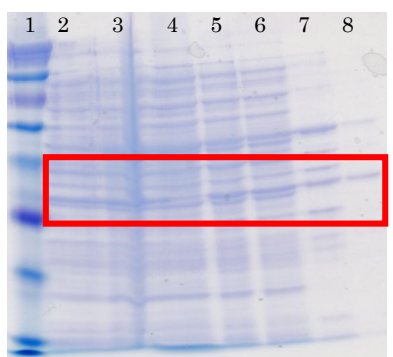


図 1 SDS-PAGE analysis of purified SP1 (A) and SP2 (B).

Lane1: Markers, Lane2: Protein before IPTG induction, Lane3: Protein 18 hr after IPTG induction, Lane4: Soluble fraction, Lane5: Insoluble fraction, Lane6: Flow-through fraction, Lane7: Washing fraction, Lane8: Elution fraction.

(3) SP1 の巻き戻しおよび活性測定

SP1 は封入体として発現した。従って、不活性状態であるため活性体への巻き戻しを要すると考えられた。適切な巻き戻しが行われるためには正確なジスルフィド結合の形成が重要である。また、peroxidase はヘムタンパク質であり、その活性中心に

heme が必要不可欠である。そのため、Hemin を加えた溶液で巻き戻しを検討した。さらに酸化剤、還元剤として、Cystamine、Cyateamine を、変性剤として Urea を加えた巻き戻しバッファーを調製した。ここに精製した SP1 溶液を加え希釈し、4 で 5 日間静置することで巻き戻しを促した。

5 日間静置後、添加剤を除去するため透析を行った。透析バッファー (20 mM Tris - HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl) 中で 4 、一晩透析を行うことで添加剤を除去した。その後、溶液を回収し、ABTS を基質とした SP1 の酸化活性を 405 nm の吸光度を指標に評価した。その結果、SP1 の酸化活性が確認され、正しく巻き戻されていることが明らかとなった (図 2)。

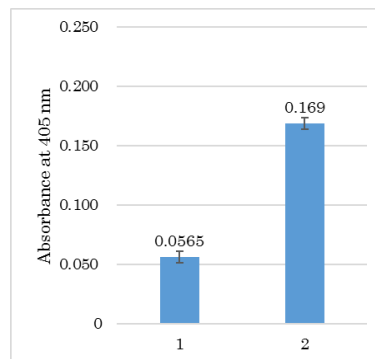


図 2 Oxidative activity of SP1 after refolding. Column 1: SP1 before refolding, Column 2: SP1 after refolding.

(4) SP2 の巻き戻しおよび活性測定

SP2 も SP1 と同様に不活性状態のため、巻き戻しが必要である。巻き戻しバッファーに Hemin を添加し、酸化剤、還元剤、変性剤としてそれぞれ Cystamine、Cyateamine、Urea を用いた。このバッファーに精製した SP2 溶液を加え、4 で 5 日間静置することで巻き戻しを行った。

巻き戻し後の透析により、赤色の凝集物が大量に生じた。そのため、遠心分離後、その上清を回収し、活性測定に用いた。Cystamine : Cyateamine = 5 : 1 として巻き戻しを行った結果、酸化活性が確認され、

SP2が正しく巻き戻されていることが明らかとなった(図3)。

続いて、凝集を改善するため、酸化剤、還元剤の濃度を検討した。その結果、Cystamine : Cyateamine = 5 : 2 の巻き戻し条件の時に高い酸化活性が得られた。

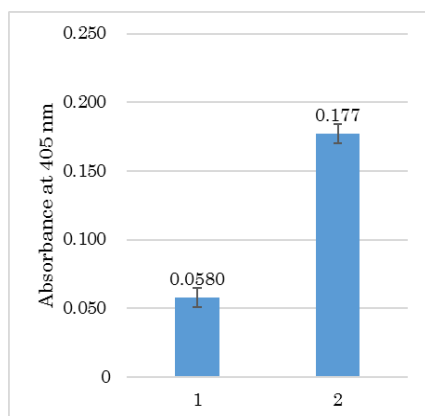


図3 Oxidative activity of SP2 after refolding.
Column 1: SP2 before refolding
Column 2: SP2 after refolding.

(5) ケシパーオキシダーゼ(OP1, OP2, OP3)の発現

ケシには morphine を代謝する酵素として、peroxidase が存在していることが知られており、当研究室ではケシから3種の peroxidase 遺伝子(OP1, OP2, OP3)をクローニングしている。このうち OP2 については発現系の確立まで成功している。

そこで、OP2に加え、OP1およびOP3の大腸菌を用いた発現系の確立を検討した。この結果、OP1-3はBL21(DE3)内に封入体として発現した。精製操作によりOP1, OP2, OP3は培養液1Lからそれぞれ1.48, 4.97, 2.23 mgの組換えタンパク質として得られた。組換えOP類は巻き戻し操作によって、いずれもABTSに対してperoxidase活性を示すことを確認した。

(6) ケシパーオキシダーゼ(OP1, OP2, OP3)の基質特異性

OP1はABTS, *o*-phenylenediamine, guaiacol, pyrogallol, 3,3',5,5'-tetra-

methylbenzidine (TMB)といった一般的 peroxidase 基質に対して酸化活性を示した。OP2, 3はABTS, TMBへの活性は確認されたが、他の基質への活性は確認されなかった。

OP1, 2, 3すべてにおいて、morphineを基質として bismorphine の生成反応が確認された(図4)。またポジティブコントロールとして使用した horseradish peroxidase (HRP)において、一般的基質に対する触媒濃度では bismorphine 生成を触媒しなかったが、酵素濃度を高くすることで同反応を触媒することが確認された。

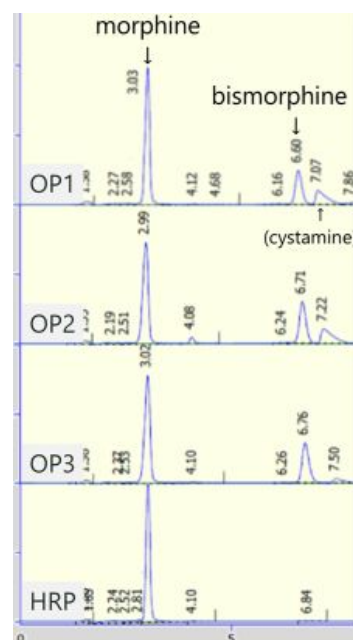


図4 HPLC analyses of reactions catalyzed by recombinant enzymes (OP1, OP2, OP3) and horseradish peroxidase (HRP)

(7) ケシパーオキシダーゼ(OP1, OP2, OP3)速度論的解析

Morphine, ABTS 両基質に対して、基質濃度依存的な生成物の増加が確認された。Morphine との反応では、どの酵素も morphine 10 mM ではプラトーに達しなかった。ABTS と反応では OP2,3 のみ、ABTS 1 mM でプラトーに達した(図5)。

Bismorphine 生成反応は OP2 に特異的な反応であると考えられてきたが、本研究によ

って OP1 及び OP3 によっても触媒される反応であることが示された。しかしながら、OP2 は他の OP よりも高い morphine 代謝触媒活性を示し、ケシ中での bismorphine 生成に中心的な役割を担っている可能性が強く示唆された。また、3 種の OP が HRP と比較して著しく高い morphine 代謝触媒活性を示したことから、bismorphine の生成反応は OP 類の特徴の一つであると考えられる(図 5)。

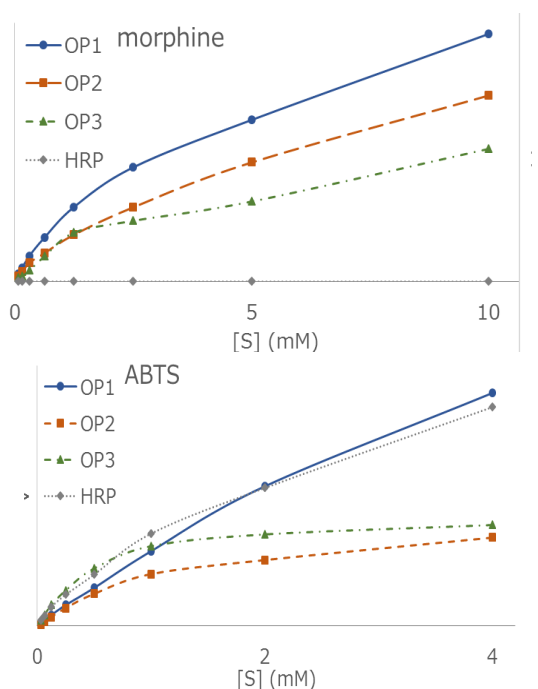


図 5 Kinetic analyses of recombinant enzymes (OP1, OP2, OP3) using morphine and ABTS.

(8) マウスへの抗原投与

コガネバナ由来のパーオキシダーゼに関しては、巻き戻しを行ってない不活性な SP1 および SP2 を免疫したが、抗原を認識するものの、抗原の酵素活性を阻害するいわゆる中和抗体を得ることができなかった。

また、グルタチオンを用いて巻き戻した活性型パーオキシダーゼ (SP1, SP2,) を投与しても、目的の抗体を得るには至らなかった。現在、Cystamine-Cyateamine 系で巻き戻した SP1, SP2, の免疫を行っている。併せて、組換え OP1, OP2, OP3 の免疫も

検討している。

中和抗体が得られ次第、それらの scFV や fluorobody の作成を行い、それらの遺伝子を用いてコガネバナやケシの形質転換実験を行う計画である。

5. 主な発表論文等

該当なし

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