

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07101

研究課題名(和文) Pictet-Spengler反応を触媒する抗体の作製と薬用植物育種への展開

研究課題名(英文) Production of catalytic antibody for Pictet-Spengler reaction and its application to medicinal plant breeding

研究代表者

坂元 政一 (Sakamoto, Seiichi)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：50610177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストリクトシジン(SS)は、全てのテルペンインドールアルカロイドに共通の前駆体である。本研究では、SSを生成する反応を触媒する触媒抗体を作製すると共に触媒活性を持つ抗体の効率的なスクリーニング法の確立を目指した。本系の確立には抗SSモノクローナル抗体(SS-mAb)が必要不可欠である。そこで、まず、SS生成酵素(SSS)のクローニングを行い、SSを調製後、SS-mAbの作製を目指した。しかし、SSの安定性の低さからSS-mAbの作製には至らなかった。また、触媒抗体の作製においても免疫原の遷移状態アナログの安定性が問題と思われる現象が認められ、SS生成触媒抗体を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、天然由来化合物をリード化合物とする抗悪性腫瘍薬の価格が高騰する現状にある。SSの生合成を触媒する抗体の薬用植物育種における応用は、下流の希少TIAsの生合成効率を高める可能性がある。そのため、本研究の遂行は微量天然由来化合物であるが故に価格が高騰する抗悪性腫瘍薬の薬価の低下をもたらすことが期待される。

当該研究では、未だSS-mAbや触媒抗体の作製には成功していないもののSS-mAbが得られる可能性が示唆された。SS-mAbも触媒抗体と共にTIAsの生合成を促進させる可能性を秘めており、希少な天然物由来化合物の効率的な量産へ繋がる可能性もあることから、本研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： Strictosidine (SS) is a common precursor to all terpenoid indole alkaloids (TIAs). In this study, we aimed to produce catalytic antibodies that catalyze the reaction between secologanin and tryptamine to form SS, and to establish an efficient screening method for an antibody with catalytic activity. An anti-SS monoclonal antibody (SS-mAb) is essential for the establishment of this system.

Therefore, we first cloned SS synthase (SSS) to prepare SS antigen used to produce SS-mAb. However, due to the low stability of SS, we were unable to produce SS-mAb. Also, in the production of catalytic antibodies, a phenomenon was observed in which the stability of the transition state analog of the immunogen seemed to be a problem, and target catalytic antibodies could not be obtained as well. Catalytic antibodies for SS can be used as a tool for efficient production of TIAs, which are produced in low amounts in plants. Therefore, we will continue to work toward the completion of this project.

研究分野：薬用植物育種学

キーワード：ストリクトシジン モノクローナル抗体 ELISA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルカロイドは生体内分子、植物成分、海洋生物成分、抗生物質などに数多く見出され、多様な生物活性を有することから医薬品開発における重要なリード化合物となっている。特に、テルペンインドールアルカロイド(TIAs)は、トリプトファン由来のインドール骨格を持ち、現在までに約2,000種類以上が単離同定されている[Nat. Prod. Rep., 23(2006)532]。中でも、キョウチクトウ科ニチニチソウ由来のビンクリスチンやビンブラスチン、ミズキ科キジユ由来のカンプトテシンは、抗悪性腫瘍薬のリード化合物として臨床応用されている。しかしながら、それらの植物内における産生量は0.005%以下と極めて低く、抗悪性腫瘍薬の価格の高騰を引き起こす一因となっている。

ストリクトシジン(SS)は、全てのTIAsに共通の前駆体であり、ストリクトシジン合成酵素(SSS)がセコロガニン(SECO)とトリプタミン(TPA)のPictet-Spengler反応による縮合を触媒することで生合成される(図1)。そのため、この反応を制御する事が出来れば、下流経路に派生する多種多様なTIAsの含有量を向上させ、それらをリード化合物とする医薬品の低価格化をもたらす可能性がある。遷移状態アナログ(TSA)に対する抗体は遷移状態を安定化し、Pictet-Spengler反応の触媒活性を有する触媒抗体となり、更に、従来の酵素触媒反応を凌駕する可能性が有る。そこで、SSSを凌駕し得る触媒抗体の作製に着目した。

本課題は、触媒抗体の薬用植物育種への応用研究の観点からも興味深い。

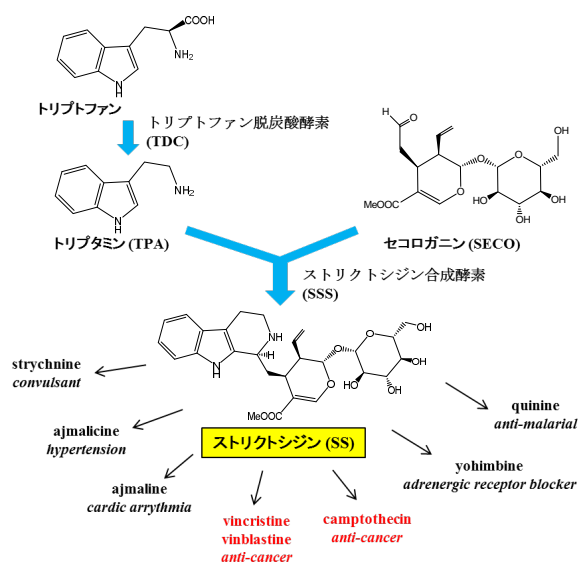


図1 TIAs originated from strictosidine (SS)

2. 研究の目的

上述した背景から本研究では、TIAsの前駆体SSの合成を触媒するPictet-Spengler反応の触媒抗体の作製を行うと共にマウスの免疫システムから生み出される膨大な抗体タンパク質のレパートリーから触媒活性の高い触媒抗体のみを効率的に選抜するスクリーニング法の開発を行うことを目的としている。本研究に必要なSSに対する抗体の作製に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1)SS-mAbの作製

SSSのクローニング

ニチニチソウ(*Catharanthus roseus*)の種子をMS培地に播種し、得られた葉及び根より、total RNAを抽出した。次に、cDNAを調製し、SSSのクローニングにおける鋳型とした。SSSのクローニングは、SSSに特異的なプライマーを用いて行い、大腸菌発現用ベクターpET28a(+)-ベクターへと導入した。

SSSの発現・精製検討

SSSを組み込んだpET28a(+)-ベクターは大腸菌BL21(DE3)株及びSHuffle株を用いて発現検討を行った。発現後、可用性画分と不溶性画分に分画し、目的とするSSSが可用性画分へ多く発現する菌体を発現宿主として選択した。

今回発現したSSS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SSSを得るため、Ni²⁺が固定化されているcComplete His-Tag Purification Resin (Roche)を用いて精製を行った。

SSSの機能解析

SSSの機能は、TPA (1 mM)及びSECO (1 mM)に対し、精製したSSS (200 μg)を37℃ 20分反応させることで行った。また、反応生成物は以下の条件下においてHPLC-UVを用いて解析した。(HPLC条件)

カラム: COSMOSIL Packed Column 5C₁₈-AR-II 4.6 ID×150 mm

移動相: 10→100% ACN/water (10-30 min), 0.1% HCOOH

フィルター: Cosmonice Filter S 0.45μm (injection)

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 280 nm

SS の安定性評価

SS の安定性の評価は、SS 含有反応溶液を Wakogel® 50NH₂ を充填剤としたカラムクロマトグラフィ（移動相: CHCl₃:MeOH:H₂O=8:2:0.2）で精製した後、SS を pH の異なる緩衝液(citrate buffer、MES buffer、H₂O、PBS、carbonate buffer)に溶解し、経時的（0, 15, 30, 60 min, 3, 6, 9, 24 hr）変化を追跡することで行った。

SS-mAb の作製及び血中抗体価の評価

SS-mAb 作製の免疫原には、クロスカップリング試薬のカルボニルジイミダゾール(CDI)を用いて調製した SS と BSA のコンジュゲートを用いた。

また、血中抗体価の評価は、SS と HSA とのコンジュゲート、SS-HSA により行った。

(2)SS 触媒抗体の作製

遷移状態アナログ(TSA)の調製

触媒抗体の触媒作用は酵素と同様に反応の遷移状態の安定化に基づいている [Science, 240(1988)426]。Maresh らの ab initio 解析により、SS 合成における SECO と TPA による Pictet-Spengler 反応の遷移状態は、イミニウムカチオンであることが判明している [J. Am. Chem. Soc., 130(2008)710]。加えて、その遷移状態アナログである化合物 1 は、SSS の強力なインヒビター (IC₅₀ = 3 nM)と成ることから、TSA に対する抗体はその遷移状態を安定化し、Pictet-Spengler 反応触媒活性を有するものと考えられる。

TSA の合成は、得られた SECO と TPA の存在下でシアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₃CN)を用いる Borch 還元により行った。

4. 研究成果

SSS をクローニング後、塩基配列を確認した結果、NCBI に登録されている塩基配列と一致し、352 アミノ酸をコードする 1056 bp を有することが判明した。続いて、本遺伝子を大腸菌発現用ベクター-pET28a(+)-ベクターへ組み込み、大腸菌 BL21(DE3)株及び SHuffle 株を用いて発現検討を行った結果、SSS は、BL21(DE3)株では主として不溶性画分へ、Shuffle 株を用いた場合には主として可能性画分に発現することが判明した。そこで、SSS を含む可溶性画分をカラムに付し、バッファーで洗浄後、90 mM imidazole を含むバッファーで溶出を行った(図 2)。精製後、Bradford 法により収量を測定した。その結果、LB-K broth 1 L あたり、SSS は約 16.2 mg 得られた。

組換え SSS 溶液を用いて TPA、SECO との反応を検討した。反作用緩衝液は 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) に PMSF (1 mM)、-ME (5 mM)、sodium chloride (100 mM) 及び Triton X-100 (0.1%) を含み、TPA (1 mM) と SECO (1 mM)、SSS (200 µg) を用いて 37 °C で 20 min インキュベーションして反応を行った反応停止後、ESI-MS で分析を行った結果、目的物である SS が生成していることが確認された。また、HPLC-UV によっても SS の存在が認められた(図 3)。

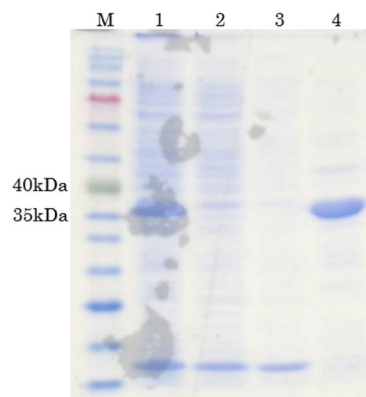


図 2 SDS-PAGE analysis of purified SSS.
LaneM: Protein Ladder One Plus, Triple-color for SDS-PAGE,
Lane1: Soluble fraction, Lane2: Flow-through fraction, Lane3:
Washing fraction, Lane4: Elution fraction

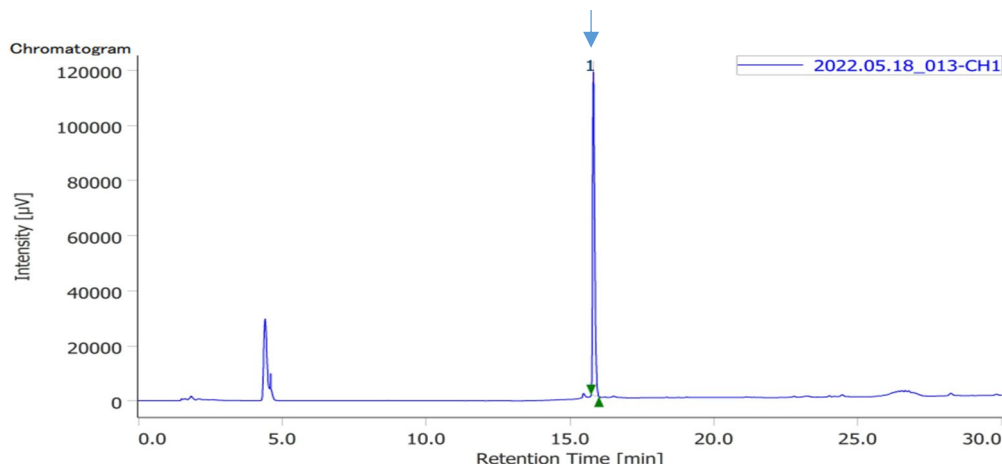


図 3 HPLC chromatogram of SS.

An arrow (RT: 16 min) indicates the presence of SS.

そこで、SS を精製後、CDI を用いて SS-BSA を調製し、マウスに腹腔内投与後、血中抗体価の評価を ELISA により行った。しかしながら、SS-HSA と反応する抗体の存在は認められなかった。SS の安定性を評価した結果、SS が日を追うごとに分解されているのが確認された。そこで、pH に対する安定性を経時的に検討した結果、carbonate buffer (pH 9.6) の弱アルカリ条件下では 1 hr を超えたところで分解が始まり、6 hr 後にはほとんど溶液中に存在しないことが判明した。また、PBS (pH 7.4) を用いた場合、ゆっくりだが確実に分解していくことが判明した。免疫原とした SS-BSA コンジュゲートの調製は、PBS を用いて行い、ELISA による血中抗体価の測定では、SS-HSA コンジュゲートの固定化に carbonate buffer (pH 9.6) を用いた。SS の安定性試験の結果より、SS の安定性の低さが免疫原性やその評価方法に影響を与えていたことが示唆された。そこで、改めて SS が安定な pH の条件下で SS-BSA を調製し、免疫感作を行ったところ、わずかではあるものの血清中に SS を認識する抗体が存在することが判明した。現在までに、SS の pH に対する安定性は検討したものの、有機溶媒に対する安定性については未検討である。有機溶媒に対しても SS の分解を誘発するものが存在する可能性があることから、種々の有機溶媒を用いて SS の安定性の評価を行う必要がある。

一方、SECO と TPA の Pictet-Spengler 反応の遷移状態アナログ(TSA)の調製を Borch 還元により行った。その結果、いくつもの反応生成物が得られ、カラムクロマトグラフィーによる精製後、目的とする TSA は 1 mg 以下であった。TSA に関しても、SS と同様に安定性が低いことが判明している。反応系のスケールアップを行い TSA を精製しても時間の経過とともに TSA の分解が進行し、SS 生合成触媒抗体の産生に必要な純度が高い TSA を十分量得ることが出来なかった。当該研究では、未だ SS-mAb や触媒抗体の作製には成功していないものの SS-mAb が得られる可能性が示唆された。SS-mAb も触媒抗体と共に TIAs の生合成を促進させる可能性を秘めており、希少な微量天然物由来化合物の効率的な量産へ繋がる可能性もあることから、本研究成果の社会的意義は大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------