

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380065

研究課題名(和文) イムノモジュレーションを用いた植物細胞膜タンパク質の網羅的機能解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of plasma membrane protein functions by immunomodulation

研究代表者

鈴木 義人 (Suzuki, Yoshihito)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90222067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円、(間接経費) 3,990,000円

研究成果の概要(和文)：抗体を用いて植物の生長・発達を制御するイムノモジュレーションの技術を細胞膜タンパク質に適用した。ファージ提示型抗体ライブラリーより得たブラシノステロイド受容体BR11に対する抗体を小胞体に蓄積させた結果、矮性などのブラシノステロイド欠損の形質が認められた。細胞膜タンパク質に対して親和性を示す抗体をファージ提示型抗体ライブラリーから得て、網羅的なイムノモジュレーションを試みたが、認められた変異形質と導入抗体との因果関係の証明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Immunomodulation study was applied to plasma membrane proteins. ER-targeted accumulation of an antibody against brassinosteroid receptor BR11 resulted in transformants showing brassinosteroid-defective phenotype like dwarfism. Random introduction of antibodies, which were selected by the affinity to a plasma membrane protein fraction from a phage-display antibody library, gave some phenotypes to plants, which have yet to be related to the introduced antibodies.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：イムノモジュレーション 植物 ブラシノステロイド 細胞膜

1. 研究開始当初の背景

(1) イムノモジュレーション

抗体の抗原捕捉能を利用して、生物個体の中で抗体を発現させ、個体に新たな機能を付与することをイムノモジュレーションと呼ぶ。先駆的な研究としては、植物ホルモンであるアブシジン酸にたいする抗体を用いて、アブシジン酸の作用を抑制する研究などが知られていた。

(2) 目的に対する技術的基盤

イムノモジュレーションを成功させるには抗体の安定的な蓄積が必要である。植物では一般に抗体を小胞体に局在させた時に安定に蓄積するのに対し、他の細胞内区画における蓄積量は小胞体に劣る。本研究では、受容体やチャンネル分子など、重要な機能性分子が多く含まれる細胞膜タンパク質を標的にしたイムノモジュレーションを想定したが、細胞膜タンパク質は小胞体を経由するため、細胞膜上で細胞外ドメインとして存在する領域に対する抗体を小胞体内腔に蓄積させることにより、細胞膜タンパク質の細胞膜への輸送を阻害することが可能である。

また、小胞体に蓄積させる抗体としては、ファージ提示型の抗体ライブラリーの利用が可能である。このライブラリーは 10^8 という極めて高い多様性を有しているため、いかなる抗原構造に対する抗体をもほぼ含んでいると考えられる。しかしその一方で、このライブラリーの抗体をそのまま植物に導入しても、植物内生物質に対する抗体が導入される頻度は極めて低く、非現実的である。ファージ提示型ライブラリーの場合、パニング操作によって標的に結合する抗体を提示するクローンを濃縮することが可能であり、細胞膜画分に対して親和性のあるファージ提示抗体を濃縮し、目的に合う抗体サブライブラリーを調製できる可能性が考えられた。

(3) 既往成果

研究代表者は、低分子化合物に対する抗体を用いたイムノモジュレーション研究を推進し、研究開始時点でジベレリン(GA、植物ホルモンの一種)を対象とし、GAの作用発現や生合成を抑制するイムノモジュレーションにより、GA機能が低下した植物の作出に成功していた。また、除草剤に対する抗体を用いた除草剤抵抗性植物の作成という新しい概念のイムノモジュレーションにも成功していた。この様な研究を推進する過程で作成した抗体発現植物の中に、抗体が本来のリガンドとは異なる生体物質を捕捉したために生じたと考えられる変異形質を複数見

出した。この様な経験をきっかけに、ランダムな抗体を植物に生産させる網羅的な植物の機能解析法としてイムノモジュレーションを利用するという着想に至った。

2. 研究の目的

新たな機能性成分に対するイムノモジュレーションを行う。特に細胞膜タンパク質を標的にした網羅的なイムノモジュレーションを行う。形質変化の見られた系統に関して、抗体の標的となるタンパク質を特定し、本研究系の有効性を評価する。それに至る段階的な目的として以下のことを設定する。

(1) 膜タンパク質に対する抗体サブライブラリーの評価

細胞膜画分に対する抗体をファージ提示型ナープ抗体ライブラリーから濃縮してサブライブラリー化するが、サブライブラリー化が首尾良く進行していることの評価系を構築する。

(2) 膜タンパク質に対する抗体サブライブラリーを用いたイムノモジュレーションの評価

抗体サブライブラリーを植物にランダムに導入した際、抗体遺伝子の導入効率や発現効率などの評価系を構築する。また、抗体の標的タンパク質の同定法を確立する。

(3) 抗 BRI 抗体を用いたイムノモジュレーション

代表的な重要膜タンパク質として、ブラシノステロイドの受容体である BRI1 に対する抗体を導入し、その効果を評価する。

(4) その他の機能性成分に対するイムノモジュレーション

3. 研究の方法

(1) 植物細胞膜画分に対する抗体ライブラリーの作成に関する検討

デキストラン-ポリエチレングリコール2層分配法により、シロイヌナズナロゼット葉から細胞(PM)膜画分を調製する。得られた細胞膜成分へ親和性を持つ抗体を提示するファージを濃縮する。細胞膜結合性と非結合性のファージの分離は、超遠心により行う。この濃縮操作を繰り返し、ファージ提示抗体のサブライブラリーを得る。この操作においては、元の抗体ファージライブラリーに、既にクローニング済みの抗 BRI1 抗体を提示するファージを混入させ、濃縮された抗体サブライブラリーに効率よく抗 BRI1 抗体提示ファージが回収されていることを確認する。その際、PCRによりその他の抗体クローンと容

易に区別が出来るよう、抗 BRI1 抗体遺伝子を発現するファージミドベクター内に、特異的な配列を導入しておく。この検討を通して、濃縮操作を何回繰り返すべきかの評価も可能となる。また、得られたサブライブラリーの中からランダムに選抜した抗体を用いて、ウェスタン解析等により細胞膜タンパク質を認識する抗体がどれ位得られているかを確認する。

(2) 抗 BRI1 抗体の植物への導入

既に取得済みの抗 BRI1 抗体を GFP との融合タンパク質として小胞体で生産するシロイヌナズナを作成する。この植物体を用いて、抗体の発現状況を確認した上で、BRI1 が小胞体で捕捉され蓄積していること、及び細胞膜への輸送阻害が生じていることを確認する。また、ブラシノステロイドの情報伝達が抑制されていることを、変異形質の精査、およびブラシノステロイド応答性遺伝子の発現変化を解析することにより確認する。すなわち、明所での矮小化や暗所での光形態形成（緑化、子葉の展開等）の促進、ブラシノステロイドに対する感受性の低下等を変異形質として確認する。また、ブラシノステロイドによりフィードバック阻害を受ける生合成酵素遺伝子が高発現し、内生ブラシノステロイドが蓄積していることを明らかにする。

(3) 細胞膜画分に対する抗体ライブラリーの植物への導入

抗体サブライブラリーのファージから抗体遺伝子を回収し、植物導入用ベクターへサブクローン化する。[シグナルペプチド-GFP-一本鎖抗体-小胞体残留シグナル] の融合タンパク質となるようにベクターを構築する。アグロバクテリウムへ導入後、フローラルディップ法によりシロイヌナズナの形質転換を行う。約 1,000 ラインを目途に形質転換体を作成する。

得られた形質転換体について、後代の調製を行いつつ、形態変化等の形質の観察を行う。

変異形質を示すラインが見出された場合は、形質が後代に遺伝すること、優性であることなどを確認するとともに、バッククロスにより抗体導入と変異形質との相関性を確認する。

さらに、導入された抗体遺伝子を回収し、抗体を大腸菌で生産し、抗体と結合性のある植物細胞膜成分の探索を行う。抗体との結合性を指標に、抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー、その他の各種精製により、

ターゲットの単離・同定を行う。

決定した抗体捕捉抗原について、その遺伝子欠損株、過剰発現体の形質解析、遺伝子発現様式の解析等を行い、その生理的役割を追求する。

(4) その他の重要分子に対するイムノモジュレーション

植物ホルモンに関連した重要分子に対するイムノモジュレーションを適宜行う。

4. 研究成果

(1) 植物細胞膜画分に対する抗体ライブラリーの作成

タバコの葉 170 g を破砕し、ナイロンスクリンでろ過後、超遠心を行って膜小胞画分を取得した。その後、Larsson らの方法に従って 6.2% (w/w) PEG/6.2% (w/w) Dextran で二層分配を行ったが、PM 画分である PEG 層から葉緑体膜を完全に除去できなかったため、ここで膜小胞画分の一部を用いて二層分配のポリマー濃度の検討を行った。PEG および Dextran 濃度 6.4% PEG/6.4% Dextran の条件でチラコイド膜の除去ができることが判明した。PEG 層を回収し、超遠心により PM 由来膜小胞を回収し、PM タンパク質溶液とした。PM タンパク質の収量は 0.54 mg protein/100 g fresh weight であった。

PM 小胞に結合性を示す抗体提示ファージを Tomlinson I + J scFv ファージライブラリーから調製した。洗浄方法も検討したが、最終的に数回の超遠心によって回収する方法を採用した。2 回のパニングにより、回収されたファージ数は 6.64×10^7 から 8.90×10^{10} へ増加したことから、PM 小胞に結合する scFv が取得できたと考えられた。そこでこのファージ溶液を anti-PM scFv サブライブラリーと名付け、PM への結合性を検証した。得られた anti-PM サブライブラリーと PM 小胞との直接の結合を確認するために Western blotting を行ったが、PM タンパク質と思われるバンドを検出することはできなかった。これはサブライブラリーファージ溶液中の個々のファージ数が少なかったためと考えられた。そこで 10 種類のシングルクローンを取得して再度 Western blotting を行ったが、やはり検出できなかった。そこで Western blotting で結合が確認できない理由は、PM タンパク質の量が検出限界以下であると推測された。

そこで、既にパニングによって取得済みだったブラシノステロイドの膜貫通型受容体 BRI1 に対する抗体をライブラリーに混ぜて、

サブライブラリー化を通して濃縮させているかどうかを検討した。抗 BRI1 抗体の存在量を簡単に検出できるように、抗体遺伝子にタグを付加し (anti-BRI1-tA), PCR によって確認した。PCR の条件検討から、ライブラリー中の anti-BRI1-tA が 10^6 以上にまで増加すれば、PCR で明瞭なバンドとして検出できることが分かったため、ライブラリーの全ファージ数 10^{12} に対して anti-BRI1-tA を 10^4 混入し、スクリーニング操作を行った。選抜されたファージ全体の数は 5.7×10^7 から 1.8×10^{11} へ増え、もし PM 小胞上に 10^6 以上の anti-BRI1-tA を捕捉できるだけの BRI が存在していれば、anti-BRI1-tA も他の scFv と同時に濃縮されているはずだと思われたが、PCR によるタグ検出では anti-BRI1-tA が 10^6 以上に増加したことは確認できなかった (下図)。PM 画分に含まれる BRI1 タンパク質の存在量が極めて低いことが原因である可能性が考えられた。

0 10^4 10^6 10^8 マーカー 1st 2nd



(2) 抗 BRI1 抗体の植物への導入

二種の抗 BRI1 抗体 (anti-BRI1-A および anti-BRI1-B) の小胞体残留型発現用に、発現カセット (下図) を作成した。恒常的に発現するプロモーターを用い、分泌シグナルと小胞体残留シグナル、さらに検出、精製用に GFP, His-tag と c-myc-tag を融合させた。



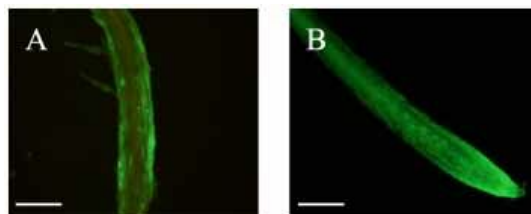
この植物発現用ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* GV3010 (pMP90) に導入し、floral dip 法でシロイヌナズナへ形質転換を行った。形質転換を行った世代を第 0 世代 (T0) とし、T0 を自家交配させて得た形質転換体第 1 世代 (T1) の種子を MS/Km 培地に播種して、Km 耐性を示す個体を選抜した。anti-BRI1-B に関しては、植物の生育が悪く、1 ラインしか確保できなかった。

A, B 両ラインにおいて T1 世代の形質を観察したところ、Km による選抜を行っているため WT と直接比較はできないが、形質転換体のロゼット葉の大きさは、A, B 共に全体的に小さくなった。しかし BRI1 欠損変異体である *bri1* に特徴的なカールしたロゼット葉や非常に強い矮性形質は示さなかった (下図、

上段左：野生型；上段右：*bri1* 変異体，中段および下段：抗 BRI1 抗体発現ライン。

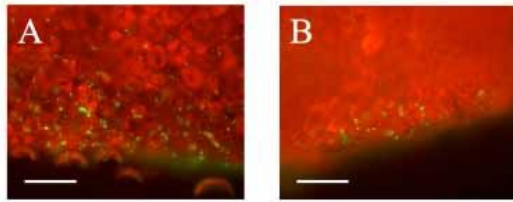


続いて蛍光顕微鏡を用いて、形質転換体 T1 世代の GFP 蛍光の観察を行った。A ラインおよび B ラインの根の蛍光を、GFP フィルターを用いて観察したところ、GFP 蛍光が明瞭に確認できた (下図)。



さらに A ラインの子葉およびロゼット葉では、小胞体の一形態である ER body が紡錘形の GFP 蛍光として観察された (下図、A：子葉、B：ロゼット葉)。このことから発現タンパク質が確かに小胞体に残留していることが確認された。ER body は外敵や環境変化に対応するための防御応答システムに関与することが示唆されており、またブラシノステロイド生合成阻害剤の処理によって、ER

body がロゼット葉で大量に見られようになることから、抗体の作用によって、ブラシノステロイドの情報伝達が抑制によって防御応答システムが応答している可能性が考えられた。



(3) 細胞膜画分に対する抗体ライブラリーの植物への導入

(1)においては、PMタンパク質に対する抗体がサブライブラリー化されていることを支持する結果は得られなかったが、それらの結果が必ずしもそれを否定するものではなく、タイターが上昇している点を考慮して、得られたサブライブラリーの植物への導入を試みた。抗 BRI1 抗体と同様にシグナルペプチドと小胞体残留シグナルを融合させ、抗体を小胞体で蓄積させることにより、膜への輸送を阻む様に発現ベクターを設計した。アグロバクテリウムを用いた floral dip 法でシロイヌナズナへ形質転換を行った。

T0 世代に関しては、通常の生育条件下で矮性や頂芽優勢の低下を示すライン(下図)が認められた他、ストレス性と思われる赤みがかかった植物が得られた。

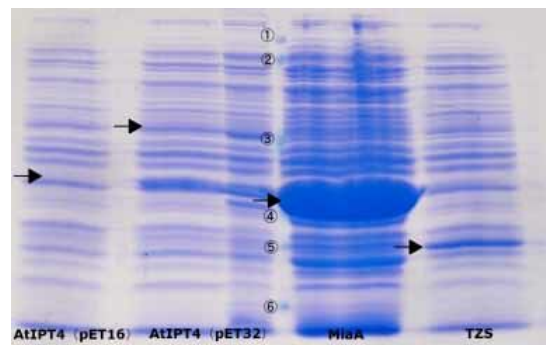


形質転換体のうち、矮性などの異常を示し植物の多くからは種子が得られなかったが、

得られたものに関しても、次世代(T1)において安定な形質の発現が認められないものが多く存在した。1ラインは頂芽優勢の低下が後代に伝達されたが、以降の作業において scFv の導入が確認できなかった。32のラインについて、ゲノムDNAを抽出し、scFv 遺伝子部位をPCRにより増幅したところ、28ラインから scFv とと思われるサイズのバンドが得られた。これらをファージディスプレイ用のファージミドベクター(pHEN2)に導入し、ファージ提示抗体を作成した。これらを用い、シロイヌナズナから調製したタンパク質に対してウェスタン解析をおこなったが、明瞭なバンドは得られなかった。

(4) その他の重要分子に対するイムノモジュレーション

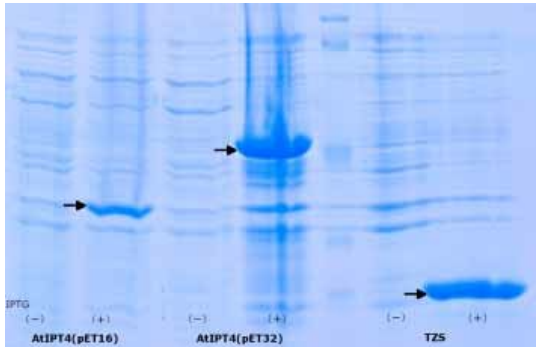
サイトカニン合成の鍵酵素である、イソペンテニルトランスフェラーゼについて、基質の異なる AMP 型、ATP/ADP 型、tRNA 型の3種の酵素遺伝子を用いて、大腸菌での発現を行った。AMP 型としては、Agrobacterium 由来の TZS を、ATP/ADP 型としては、シロイヌナズナ由来の AtIPT4、tRNA 型としては、大腸菌由来の MiaA をもちいた。各種大腸菌宿主および培養条件を検討した結果、tRNA 型は可溶性タンパク質として、それ以外の2つは不溶性タンパク質として大量調製することに成功した(下図)。



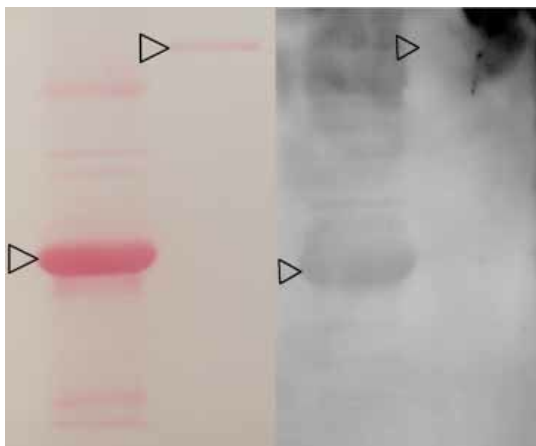
MiaA は、His-tag カラムによるアフィニティー精製を行ったところ、目立った夾雑物も確認されず、純度の高い MiaA を回収することができた。MiaA についてはここで得られた溶液を抗体の調製に利用した。

MiaA 以外は発現量が必ずしも十分ではなかった。発現条件(培養温度、IPTG 濃度)を検討したが、大幅な改善は認められなかつ

た。IPT4 および TZS については、僅かな可溶性画分に含まれるタンパク質を用いて、放射性標識された基質を用いた活性検定を行ったところ、IPT 活性が認められた。そこで大腸菌宿主を検討したところ、Rosetta-gamiB 株を用いたときに、比較的大量の酵素の発現が認められた（下図）。



これらの IPT は可溶性画分としては回収できなかったため、ウレア等で可溶化して、アフィニティー精製を試みたが、うまく回収できなかった。そこで、可溶性として得られた tRNA 型はポリスチレン容器へコートし、それ以外は電気泳動後メンブレンへプロットティングしたのち、ファージ提示型抗体ライブラリーをもちいたパニングを行った。タイターの上昇を確認後、得られた抗体で大腸菌発現タンパク質に対するウェスタン解析を行った結果、TZS に対する抗体で、バンドが認められた（下図、左：ボンソーによる染色像、右：ウェスタンプロットティング）。



十分な特異性があるとは言えず、また、シグナル強度も低かったが、植物への導入を試みたが、十分な解析には至っていない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 義人 (SUZUKI YOSHIHITO)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90222067

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし