

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780110

研究課題名（和文）ホスホリパーゼ A2 を用いた抗原の構造安定性と抗体産生の相関性の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the relationship between the conformational stability of phospholipaseA2 and the amount of IgG production.

研究代表者

大栗 誉敏 (OHKURI TAKATOSHI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70346807

研究成果の概要（和文）： 効率的な抗体作製を目的とし、筋壊死活性の高い PLA2 アイソザイムである BPII を抗原として、その構造安定性に対するマウスでの抗体産生の関係を調べた。BrCN 処理で N 末端の 1-8 残基を削除した BPII (BrCN-BPII) を調製しマウスに投与後、その抗体価を調べたが、抗体価の上昇は見られなかった。一方で、BrCN-BPII についてマウスの筋線維芽細胞である C2C12 に対する細胞死を調べたところ、細胞死を誘導しなかった。即ち、BPII の N 末端部分が細胞死誘導活性に重要な領域であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To examine relationship between the conformational stability of phospholipaseA2 isozyme (BPII) and the amount of IgG production, I prepared the destabilized BPII where the N-terminal region (amino acid position 1-8) was deleted by BrCN treatment (BrCN-BPII). As a result, BrCN-BPII could not lead to increase in the immune response. On the other hand, I examined the cell death activity of BPII against C2C12 cells (mouse myoblast cell line). When C2C12 cells were treated with intact BPII, the viability of the cells decreased. Interestingly, BrCN-BPII could not induce the cell death. It was suggested that the N-terminal region of BPII is an essential element for its cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

南西諸島に棲息するハブの咬傷治療薬に用いられるハブ毒抗血清は、咬傷患者の出血や溶血活性には効果的であるが、筋壊死にはほとんど効果がない。これは、ハブ毒の主要な成分であるホスホリパーゼ A2 (PLA2) に対する抗血清中の抗体価が著しく低いことが原因である。PLA2 は、グリセロリン脂質の

sn-2 位のエステル結合を加水分解する酵素で、アイソザイムが多いのも特徴である。奄美大島のハブ毒から中性の PLA2 である PLA2 と塩基性の PLA2 である BP I, II 等が単離されている。これらの PLA2 は約 14kDa と比較的小さな分子量に対し SS 結合が 7 つと比較的多く、高い構造安定性を持つ。即ち PLA2 の安定性が抗体価に影響を及ぼしている可能

性がある。咬傷治療において筋壊死を引き起こす PLA2 に対する抗体治療は重要であり、筋壊死に有効な抗体を得るには、抗原を改変して抗体価を高めることあるいは、抗原のどこにターゲットとした抗体をデザインできるかが重要であると考えられる。

一方で、これまでの研究で、リゾチームをモデル蛋白質とし安定性を変動させた種々の変異体を用いて、マウスでの抗体産生誘導を調べた結果、安定性が高いほど抗体産生量が下がり、蛋白質の熱力学的な安定性の指標となる自由エネルギー差と抗体産生量が相関することを証明していた。さらにリゾチーム以外の蛋白質でも実証するために、植物アレルゲン Phl p 7 の変異による安定化を行い抗体産生への影響を調べた。その結果、著しい安定化によって抗体産生はほとんど起こらなかった。これは改変蛋白質の医療への応用を考えた場合、アミノ酸変異で抗原性を引き起こす可能性がでてくるが、安定性を上げることにより抗原性の問題解決に期待ができる結果であった。これらの結果を考えると、抗原蛋白質の構造安定性の不安定化は、ワクチンなど抗体産生を引き起こしたい場合への応用も考えられる。しかし、不安定化による抗体産生量の変動をリゾチーム以外の蛋白質でまだ検証できていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、筋壊死活性の強い塩基性の PLA₂ アイソザイムである BP II を用いて、変異によって構造安定性を下げた抗原をマウスに投与した場合に抗体産生がどう影響するかを調べる一方で、BP II が及ぼす筋壊死のメカニズムを調べ、ハブの咬傷に対する抗体治療に対して有用な情報を得るとというのが目的である。

3. 研究の方法

(1) BP II の大腸菌による大量発現系の構築
BP II の大腸菌による発現系の構築を試みた。BP II 遺伝子を PCR により増幅させ大腸菌発現ベクター pET21 に組み込み、シーケンス確認を行った。作製した BP II 発現ベクターを大腸菌株 BL21 へ導入し、大量培養をおこない、IPTG によって発現を誘導した。培養後、菌体を集め、BP II を封入体として得た。

(2) BP II の封入体からの精製と巻き戻し
大腸菌培養により得られた BP II の封入体の精製を行った。封入体をグアニジン塩酸塩に可溶化後、システインに対して可逆的に反応し正の電荷を持つアルキル化剤の TAPS を用いて BP II を還元 TAPS し陽イオン交換により精製した。還元 TAPS 化 BP II を用いて、巻き戻しの検討を行った。6 M グアニジンを用いて変性剤中で還元剤/酸化剤を 3mM システアミン/1mM シスタミン加え、透析チューブに移した。透析外液には尿素を用いて 4 M → 2 M → 1 M → 0 M と段階的に透析を行った。透析外液には 0.3mM システアミン/0.1mM シスタミン加え、凝集抑制としてタウリンを加えた。巻き戻し後に、陽イオン交換クロマトグラフィーにより巻き戻り体を精製した。

(3) 不安定化 BP II の作製

構築した BP II リコンビナント体の調製法を元に、種々の BP II 変異体作製に取り組んだ。BP II に含まれる 7 つのジスルフィド結合を 1 組欠損させる変異体を 7 つ作製した。即ち、C26A-C116A 変異体、C28A-C44A 変異体、C43A-C96A 変異体、C49A-C122A 変異体、C50A-C89A 変異体、C57A-C82A 変異体、C75A-C87A 変異体である。これらの変異導入は PCR により部位特異的に行った。大腸菌発現ベクターに組み込み、それぞれシーケン

ス確認を行った。

一方で、ハブ毒素から抽出した BPII を用いて BrCN を用いた化学的切断による不安定化体の調製を行った。即ち、BPII を 70% 酢酸下で BrCN を加え 20 h 暗所で反応させた。BrCN 処理した BPII は透析し凍結乾燥させた。

(4) マウスへの免疫と抗体価の評価

調製した BrCN-BPII とインタクトの BPII を抗原としてそれぞれマウスに腹腔投与した。50ug/匹で一次免疫後に同投与量で 2 週間後に 2 次免疫を行い、それから 2 週間経過、即ち初回投与から 42 日後の血清を採取し、抗体価を ELISA によって評価した。

(5) BrCN-BPII の筋壊死活性の評価

調製した BrCN-BPII を用いて、細胞死実験を行った。マウス筋芽細胞 C2C12 を用い、BrCN-BPII を加えて 20 時間後の細胞の生死をトリパンブルー染色あるいは WST-8 試薬により生死を評価した。また、マウスを用いた筋壊死活性実験は、マウスの左下腿部に筋肉注射し、24 時間後の組織を切り出して HE 染色組織標本を作製した。

4. 研究成果

(1) BPII リコンビナント体の効率的な調製法の確立

PLA2 はアイソザイムを含めリコンビナント体の効率的な調製法が報告されていない。そこで大腸菌からの効率的な調製法の確立を試みた。大腸菌による発現系を構築し、大量発現を行った結果、BPII が封入体として大量に発現していることが SDS-PAGE により確認できた。得られた封入体について、効率的に安定供給できるよう精製を行った。その結果、1L 培養で 22mg の還元 TAPS 化 BPII を

凍結乾燥品として得ることに成功した。精製した還元 TAPS 化 BPII の透析による巻き戻しを試みた。BPII は 7 つのジスルフィド結合を有し、巻き戻しは大変困難であったが種々の巻き戻し条件の結果、イオン交換クロマトグラフィーで巻き戻り体が確認された。さらに CD によって 2 次構造を十分に保持していることも確認できた。巻き戻しの収率は約 10% であり、1L 培養あたり約 2mg のリコンビナント BPII を得ることに成功した。

(2) 不安定化 BPII の作製

BPII の変異導入による不安定化を目的として BPII に含まれる 7 つのジスルフィド結合を 1 組欠損させる変異体を 7 つ作製した。部位特異的な変異導入により 7 つの変異体が作製できた。上記のリコンビナント体の調製法が予想以上に困難であり、時間を要した為、これら変異体の発現調製には至らなかった。その一方で、BrCN 処理による BPII の不安定化を試みた。BrCN 処理により 2 カ所の Met (M8, M61) で切断され、N 末領域の 1-8 ペプチドが除去される BPII が調製できる。さらにこの N 末端は、 β ウィングと呼ばれる領域と相互作用しており、この欠損が不安定化を招くと予想された。調製した BrCN-BPII について CD 測定した結果、十分に立体構造を保持していることが分かった (Fig. 1)。即ち、native 様の立体構造をある程度保持した不安定な BPII の調製に成功した。

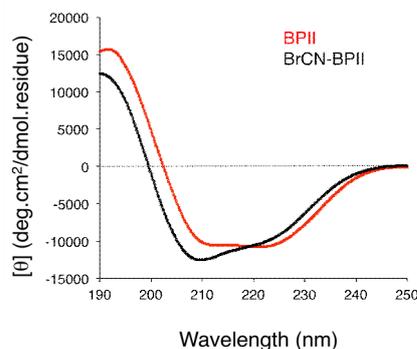
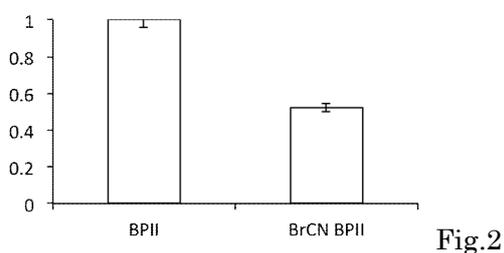


Fig.1

(3) 不安定化 BPII を用いたマウスでの抗体産生の評価

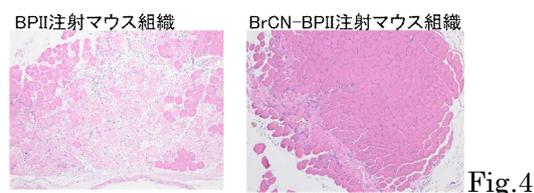
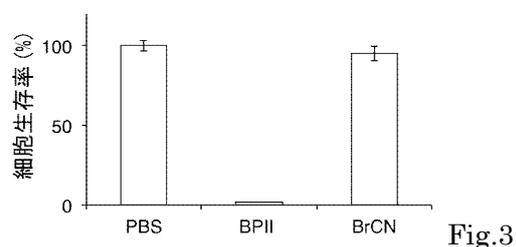
BPII 及び BrCN-BPII を抗原としてマウスにそれぞれ投与して血清中の抗体価を ELISA によって測定した (Fig. 2)。その結果、BPII の抗体価を 1 とした時に、BrCN-BPII はそれより低い数値となり期待した抗体価の増加は見られなかった。N 末端の削除されたペプチド領域が Tcell エピトープと重なった可能性も考えられた。



BrCN-BPII では抗原の安定性と抗体産生の相関性を検証することはできなかったが、今後、調製した変異体を用いて、抗体価との相関を調べることで、BPII の抗体価の上昇を達成できると期待される。

(4) BPII の筋壊死活性に重要な構造要素
筋壊死に有効な抗体を得るには、抗原のどこにターゲットとした抗体をデザインできるかという情報も重要であると考えられる。しかしながら BPII のどの構造要素が細胞死に重要であるかは全く分かっていない。そこで、BrCN 処理により N 末領域の 1-8 ペプチドが除去される BPII の細胞死誘導活性への影響を調べた。C2C12 に対する細胞死実験の結果、BPII は細胞死を強く誘導するのに対し、BrCN BPII は細胞死を起さなかった (Fig. 3)。また、マウスを用いた筋壊死活性実験において、BPII は十分に筋壊死活性が見られたのに対し、BrCN-BPII は筋壊死活性を失っていた (Fig. 4)。以上の結果から、

BrCN 処理で削除した N 末端およびその領域周辺が細胞死に関与することが明らかとなった。



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)

[学会発表] (計 3 件)

① 大栗誉敏、中村仁美、千々岩崇仁、服部正策、大野素徳、上田直子 The N-terminal region of [Lys49] phospholipase A2 from Protobothrops flavoviridis venom element for its cell death and myonecrotic activities 生化学会本大会 (福岡) 2012. 12. 16

② 大栗誉敏、中村仁美、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 BrCN 処理による PLA2 アイソザイムの細胞死誘導活性の消失 日本生化学会九州支部会 (福岡) 2012. 5. 22

③ 大栗誉敏、中村仁美、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 ハブ毒ホスホリパーゼ A₂ アイソザイムの細胞死誘導に関わる立体構造領域 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012. 3. 29

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大栗 誉敏 (OHKURI TAKATOSHI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70346807