

ベロ毒素に対するハイブリッド IgA 抗体の植物での産生と性状解析

Production and analysis of hybrid-IgA plantibodies
against Shiga toxin1

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である。

2014 年 3 月
(March, 2014)

静岡県立大学大学院 薬学研究科
博士後期課程 薬学専攻 免疫微生物学教室

中西勝宏
Nakanishi, Katsuhiro

目次	
略語	1
序論	3
第1章 Stx1B に対する二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製	
1-1 目的	5
1-2 材料および方法	
1-2-1 材料	7
1-2-2 二量体ハイブリッド IgA 発現用バイナリーベクターの作製	12
1-2-3 二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製	16
1-2-4 二量体ハイブリッド IgA の発現解析	17
1-2-5 二量体ハイブリッド IgA の性状解析	20
1-3 結果	22
1-4 考察	31
第2章 Stx1B に対する分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製	
2-1 目的	34
2-2 材料および方法	
2-2-1 材料	36
2-2-2 分泌型ハイブリッド IgA 発現用バイナリーベクターの作製	37
2-2-3 分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製	42
2-2-4 分泌型ハイブリッド IgA の性状解析	43
2-3 結果	43
2-4 考察	50
第3章 Stx1B に対する分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの作製	
3-1 目的	53
3-2 材料および方法	
3-2-1 材料	54
3-2-2 分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの作製	55
3-2-3 分泌型ハイブリッド IgA の発現解析	55
3-3 結果	56
3-4 考察	59
総括	60
謝辞	63
参考文献	64

附表

本論文で用いた略語を以下に示す。

2-ME	2-mercaptoethanol
ABTS	2, 2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AP	alkaline phosphatase
BAP	6-benzylaminopurine
BSA	bovine serum albumin
CAB	chlorophyll <i>a/b</i> binding protein
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
DIG-Stx1B	digoxigenin-conjugated Shiga toxin1 B subunit
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EHEC	enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	ethidium bromide
FBS	fetal bovine serum
Gb ₃	globotriosylceramide
HC	hemorrhagic colitis
HRP	horseradish peroxidase
HUS	hemolytic uremic syndrome
Hyg	hygromycin B
Ig	immunoglobulin
Km	kanamycin
LB	Lunaria Bertani
Lb	left border of T-DNA
M199	medium 199
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
MS	Murashige and Skoog
NAA	1-naphthylacetic Acid
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pIgR	polymeric Ig receptor
PVDF	polyvinylidene fluoride
PVP	polyvinylpyrrolidone
Rb	right border of T-DNA
RT-PCR	reverse transcription- polymerase chain reaction
SC	secretory component
SDS	sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIgA	secretory IgA
Stx	Shiga toxin
Stx1B	Shiga toxin 1 B subunit
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol
TTP	thrombotic thrombocytopenic purpura
Tween 20	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UBQ	ubiquitin extension protein

序論

生体は消化管や肺などの粘膜組織や皮膚といった体表面を介して外界と接触しており、細菌やウイルスなどの病原体や毒素などの異物に常にさらされている。特に粘膜組織は栄養の取り込みやガス交換のような生命維持に重要な機能を担っているため、皮膚と比べて物質透過性が高く、表面積も広がっており、皮膚と比べて物理的障壁としては脆弱である [1]。そのため、粘膜組織は多くの病原体が宿主に感染する際の主な侵入経路となっていると考えられている。様々な病原体や毒素のような異物から生体を守る機構として免疫系が発達しており、その主要な因子の一つとして抗体が挙げられる。抗体は毒素の中和や他の免疫細胞による異物の貪食を促進するオプソニン化などの作用によって異物の排除を行う。抗体分子は、2本の重鎖 (heavy chain, H鎖) と2本の軽鎖 (light chain, L鎖) からなる4本のポリペプチド鎖で構成されており、ジスルフィド結合と非共有結合により高次構造を形成している。H鎖、L鎖ともアミノ末端 (N末端) 側には可変部と呼ばれる領域があり、アミノ酸配列の異なる可変部を持つ抗体のレパートリーを作ることで様々な異物を認識、排除することができる。抗体はH鎖のカルボキシ末端 (C末端) 側を構成する定常部のアミノ酸配列の違いにより、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEの5つのクラスに分類されている。これらの抗体のクラスのうちIgAは粘膜組織に主に存在し、病原体の主な侵入経路となっている粘膜組織における免疫防御機構の一端を担う重要な分子である。粘膜組織のIgAは、粘膜上皮細胞の下にある粘膜固有層に存在する形質細胞によって産生されている。形質細胞から産生されるIgAは、2分子の単量体IgAがJ鎖を介して結合した二量体IgAとして産生され、粘膜固有層へ分泌される。そして、分泌された二量体IgAは粘膜上皮細胞の基底膜側 (粘膜固有層側) に発現したポリIg受容体 (polymeric Ig receptor, pIgR) に結合し、トランスサイトosisにより上皮細胞を通過後、pIgRの細胞外領域である分泌成分 (secretory component, SC) が切断される。この切断されたSCはIgA抗体と結合した状態で粘膜表面上に分泌され、この二量体IgAとSCが結合した複合体は分泌型IgA (secretory IgA, SIgA) と呼ばれている [2]。SIgAはSCの存在によりタンパク質分解酵素へ抵抗性を示し、また粘膜上皮細胞の近傍に局在できるようになり、消化管で分解されることなく効率的に異物との結合、排除を行うことができる [3-5]。そのため、消化管などの粘膜を介して侵入するような病原菌、病原体やそれらが産生する毒素に対して、有効なSIgAをモノクローナル抗体として作製することができれば、経口投与可能な抗体医薬品としての応用が可能になると考えられる。

現在、多くの抗体医薬品が市場に出ており、高い治療成績を収めている。しかし、抗体は複数のタンパク質の複雑な組み立てや、翻訳後修飾が必要なタンパク質であるため、哺乳類細胞を用いて生産する方法が主流である。哺乳類細胞を用いた抗体の生産は、細胞培養のための特別な施設の建設、維持、管理のためのコストの高さが問題となっている [6, 7]。その解決策の1つとして、植物に医薬品として有用な抗体遺伝子を組み込み、生産させる方法が研究されており、植物で生産させた抗体は植物抗体、plantとantibodyを繋げてplantibodyと呼ばれている [6-10]。植物細胞は動物細胞と類似したタンパク質の組み立て、翻訳後修飾が行われ、また、組み換え遺伝子が環境中に飛散しない閉鎖的環境の他は、それほど特別な設備は必要としないため、低コストで抗体を生産できるといった利点を持っている。そして、可

食部に抗体を発現させれば、そのまま抗体を経口摂取することも可能である [11-13]。一方で、ヒトとの糖鎖修飾の違いによる抗体の機能の制限や、アレルギー反応が問題となっており、ヒトと同様の糖鎖修飾を行う遺伝子組換え植物の作製や、植物特有の糖鎖修飾を回避した抗体の発現などが研究されている [14]。

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 は食中毒の原因となる細菌であり、飲食物を介して経口感染する [15, 16]。EHEC による食中毒症状は水様性の下痢や、出血性大腸炎 (hemorrhagic colitis, HC) があり、血栓性血小板減少性紫斑病 (Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) や急性腎不全、溶血性貧血、血小板減少症を主徴とする溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome, HUS) や脳症などといった生命に関わる重篤な合併症を引き起こすこともある [17]。

これらの症状は EHEC の産生する Shiga toxin (Stx) と呼ばれる毒素によって引き起こされる。Stx は Stx1 と Stx2 の 2 つのサブタイプが存在することが知られている。Stx1 は志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* 1) の産生する毒素とアミノ酸配列が同一の毒素であり、Stx2 は Stx1 と一次構造は相同性が約 54% と低く抗原性が異なるが、その立体構造や作用機序は同じである [18, 19]。Stx は細胞内で毒性を発現する A サブユニット 1 分子と、細胞表面に結合し、細胞内への侵入に関わる B サブユニット 5 分子で構成されるタンパク質である [20]。B サブユニットによる細胞への結合、細胞内への侵入が起こらなければ、細胞内での A サブユニットの毒素活性の発現も起こらないため、B サブユニットの細胞への結合を阻害することが EHEC による食中毒の予防、治療の有効な手段になりえる。

当研究室では、これまでに Stx1 の B サブユニット (Stx1B) に特異的な IgA 型および IgG 型のエピトープの異なる 2 種類のモノクローナル抗体を作製している [21]。また、これらのモノクローナル抗体の性状の比較から、Stx1B の細胞への結合阻害活性は IgA 型より IgG 型のモノクローナル抗体の方が高いことが明らかにされている [21]。そこで、IgA 抗体の、SC と結合して分泌型となり、消化酵素の影響を受けず、粘膜上皮に局在でき、粘膜上で効率的に働くことができるという利点はそのままに、抗原のリガンドへの結合阻害活性の高い抗体を得るために、スタートコドンからヒンジ部までを IgG モノクローナル抗体、分泌片の結合部位として知られる Ca2 から Ca3 の C 末端までを IgA 抗体としたハイブリッド IgA 抗体 H 鎖遺伝子が作製されている [22]。

本研究では、このハイブリッド IgA を分泌型 IgA として発現させ、食事と共に摂取することで Stx1 による食中毒症状を予防、治療することができる遺伝子組換え植物を作製することを目的として、モデル植物であるシロイヌナズナと可食性の植物であるレタスを媒体としたハイブリッド IgA の発現を試み、発現した植物抗体の性状解析を行った。

第1章 Stx1B に対する二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製

1-1 目的

O157 や O111 といった腸管出血性大腸菌は飲食物を介して経口感染し、腸管内で Stx を産生することで、出血性の下痢を主症状とした食中毒や重篤な合併症を引き起こす [15, 16]。Stx は細胞内で毒性を発現する A サブユニット 1 分子と、細胞表面への結合、細胞内への侵入を担う B サブユニット (Stx1B) 5 分子からなる AB₅ 毒素である [23]。腸管に代表される粘膜組織では、Stx のような毒素や病原微生物への主要な防御因子として IgA 抗体が働いている [2]。粘膜組織では IgA は 2 分子が J 鎖を介して結合した二量体 IgA として形質細胞で産生され、粘膜上皮細胞を通過して粘膜表面へ分泌される際に SC が付加され SIgA として分泌される [3]。また、*in vitro* において二量体 IgA と SC を混合することで自発的に IgA と SC が結合し、SIgA を作製できる。SC が IgA と結合し分泌型となるには J 鎖の存在が不可欠であるため、SIgA を得るためには二量体 IgA を作製することが重要なステップとなると考えられる [24]。

当研究室ではこれまでに Stx のサブタイプの一つである Stx1 の標的細胞への結合を担う B サブユニット (Stx1B) に対する IgG モノクローナル抗体を獲得している [21]。また、獲得した IgG モノクローナル抗体の高い結合阻害活性を持ち、分泌型として、消化酵素によって分解されることなく粘膜組織で働くことができる抗体を得るために、IgA の可変部を含む Fab 領域の遺伝子を IgG モノクローナル抗体由来の遺伝子に組み換えたハイブリッド IgA H 鎖遺伝子も作製されている [22]。この Stx1B 特異的なハイブリッド IgA を分泌型として可食性植物に発現させることができれば、食事とともに抗体を摂取でき、Stx1 による食中毒を予防、治療できる経口投与可能な治療用抗体としての利用が期待できる。

本研究では食すことで抗体を経口摂取できる植物の作製を目指しており、植物に導入するフラグメントに細菌やウイルス由来のものが含まれていると、安全面、倫理面において問題がある。そこで抗体遺伝子の発現に使用するプロモーターとターミネーターには、タンパク質を高発現でき、2 つのタンパク質を同時に発現できるという利点から、モデル植物であるシロイヌナズナの Chlorophyll *a/b* binding proteins 1, 2 (CAB1, CAB2) の発現を制御する双方向性プロモーター (P_{CAB}) とターミネーター ($T_{CAB1,2}$) を用いることとした。

上記のように、生体における分泌型 IgA の産生には、二量体 IgA を産生する形質細胞と二量体 IgA に SC を付加する上皮細胞の 2 種類の細胞が関わっており、一つの細胞で分泌型 IgA を作製することは困難であり、植物においても分泌型 IgA 作製は難しいことが予想された。そのため、まず第 1 章では、ひとつの細胞でも作製可能な二量体ハイブリッド IgA を発現する植物を作製し、Stx1 の細胞毒性を中和できる抗体を植物で作製できるかどうかを検討した。これまでに当研究室で、ハイブリッド IgA の H 鎖、L 鎖の遺伝子と P_{CAB} 、 $T_{CAB1,2}$ を組み合わせたハイブリッド IgA 発現カセットの構築を目指し、プロモーターを挿入する前までのフラグメントを作製している (Fig. 1-1)。このフラグメントに P_{CAB} を導入してハイブリッド IgA 発現カセットを完成させ、当研究室で作製した J 鎖遺伝子を導入したバイナリーベクターへハイブリッド IgA 発現カセットを導入することで二量体ハイブリッド IgA 発現ベクターを作製した。そして、アグロバクテリウム法によりシロイヌナズナに遺伝子を導入することで二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナを作製し、発現した IgA の性状解析を行った。

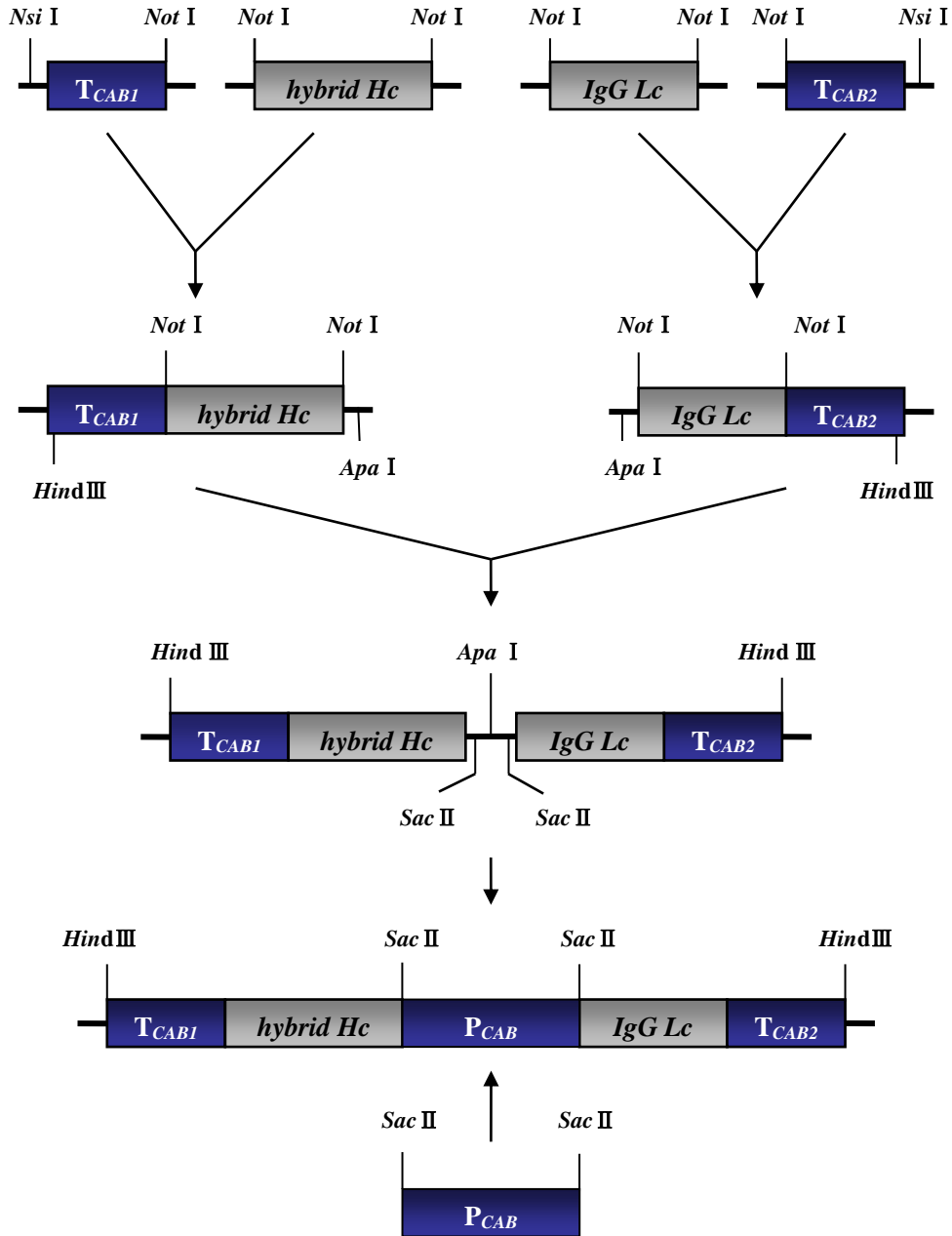


Fig. 1-1 Construction of Stx1B-specific Hybrid-IgA cassette

1-2 材料および方法

1-2-1 材料

植物

Arabidopsis thaliana Col-0 株 [25]

菌株

Agrobacterium tumefaciens GV3101 [25]

Competent high *E. coli* DH5 α (東洋紡)

培養細胞

Ramos cell (ATCC)

Vero cell (ATCC)

Vectors

pBCH1 [26]

pBCH1/Jc [27]

pGEM3zf/T_{CAB1}/hybrid Hc/IgG Lc/T_{CAB2} [28]

pGEM-5Zf (+) (Promega)

試薬

0.25% trypsin-EDTA (1 \times), phenol red (Gibco)

10 \times tris/glycine (premix buffer) (BIO-RAD)

2, 2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (和光純薬工業)
(ABTS) (生化学用)

2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol (Tris) (分子生物学研究用) (ナカライテスク)

2-mercaptoethanol (SIGMA)

20% glutaraldehyde solution (電子顕微鏡用) (和光純薬工業)

3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) (同仁化学研究所)

30 % hydrogen peroxide (H₂O₂) (特級) (和光純薬工業)

6-benzylaminopurine (和光純薬工業)

6 \times loading buffer (タカラバイオ)

99.8% methanol (特級) (和光純薬工業)

AccessQuik™ RT-PCR System (Promega)

AccessQuik™ Master Mix (2X)

AMV Reverse Transcriptase

Nuclease-Free Water (pH 7.0)

Agarose- I	(同仁化学研究所)
Ampicillin sodium salt	(SIGMA)
Bacto agar	(Becton Dickinson)
Bovine serum albumin (BSA) Fraction V	(SIGMA)
Can Get Signal solution 1 solution 2	(東洋紡)
Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) 10 × CIAP buffer	(タカラバイオ)
Citric acid monohydrate (特級)	(関東化学)
Digoxigenin-conjugated Stx1B (DIG-Stx1B)	[29]
Dipotassium hydrogenphosphate (K ₂ HPO ₄)	(和光純薬工業)
DNase I Buffer RDD Nuclease free water	(QIAGEN)
Ethanol (特級)	(和光純薬工業)
Ethidium bromide (EtBr)	(和光純薬工業)
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA · 2Na) (特級)	(関東化学)
Expanded vermiculite	(福島バーミ株式会社)
Fetal bovine serum (FBS)	(Hyclone)
Gellan Gum	(和光純薬工業)
Gentamycin sulfate	(和光純薬工業)
Globotriosylceramide (Gb3) from Porcine Erythrocyte	(ナカライテスク)
Glufosinate ammonium	(SIGMA)
Glycerol	(和光純薬工業)
Goat anti-mouse IgA	(Zymed)
Goat anti-mouse kappa	(Southern Biotech)
Hi Di™ Formamide	(Applied Biosystems)
HiMark Pre-stained Protein Standard	(invitrogen)
<i>Hind</i> III 10 × M buffer	(ニッポン・ジーン)
HRP-donkey anti-goat IgG	(Santa Cruz)
HRP-goat anti-mouse IgA (α chain specific)	(Southern Biotech)
HRP-sheep anti-digoxigenin Fab fragments	(Roche)
Hygromycin B (生化学用)	(和光純薬工業)
HYPONeX	(ハイポネックスジャパン)
Isopropanol	(和光純薬工業)
Kanamycin sulfate (生化学用)	(和光純薬工業)

KOD FX Neo (1.0 U/μl)	(東洋紡)
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	
2 mM dNTPs	
L-glutamine	(和光純薬工業)
MagicMark XP Western Protein Standard	(Invitrogen)
Medium 199 (M199)	(Gibco)
Mini-PROTEAN TGX gel (stacking; 4%, separating; 7.5 or 12%)	(BIO-RAD)
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	(日本新薬)
Nicotinic acid	(和光純薬工業)
OCT compound	(サクラファインテック)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	(タカラバイオ)
5 × PrimeSTAR Buffer	
dNTP mixture (2.5mM each)	
Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extract	(SIGMA)
Proteinase K	(Roche)
Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)	(SIGMA)
Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P transfer membrane)	(MILLIPORE)
Potassium hydroxide (KOH)	(和光純薬工業)
Potassium dihydrogenphosphate (KH ₂ PO ₄)	(和光純薬工業)
Purified Goat IgG	(invitrogen)
PVDF Blocking Reagent	(東洋紡)
Pyridoxine hydrochloride	(和光純薬工業)
Pyronin G (化学用)	(和光純薬工業)
Rabbit anti-goat IgG-AP	(invitrogen)
Rabbit anti-mouse J chain	(Santa Cruz)
RNase A	(QIAGEN)
RPMI1640	(Gibco)
<i>Sac</i> II	(タカラバイオ)
10 × T buffer	
SeaKem GTG agarose	(Cambrex)
Silwet-L77	(バイオメディカルサイエンス)
SOC medium	(東洋紡)
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (生化学用)	(和光純薬工業)
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃) (特級)	(関東化学)
Sodium hydroxide (NaOH)	(和光純薬工業)
Sodium hypochlorite solution	(関東化学)
Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate	(SIGMA)
Stx1B	[29]

Sucrose	(和光純薬工業)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	(Thermo Fisher Scientific)
Luminol/Enhancer Solution	
Stable Peroxide Solution	
Mouse IgA, κ (TEPC15)	(SIGMA)
Thiamine hydrochloride	(和光純薬工業)
Tris-Acetate-EDTA Buffer (10×)	(ナカライテスク)
Triton X-100	(SIGMA)
Trypton	(Becton Dickinson)
Wide-Range DNA Ladder	(タカラバイオ)
Yeast Extract	(Becton Dickinson)

Kit

APOPCYTO Intracellular Caspase-3 Activity Detection Kit	(MBL)
BCA Protein Assay Kit	(Thermo Fisher Scientific)
BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV	(Vector)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	(Applied Biosystems)
Big Dye terminator	
5 × Sequencing Buffer	
Cell Counting Kit-8	(同仁化学研究所)
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	(タカラバイオ)
FITC Apoptosis Detection Kit I	(Becton Dickinson)
MinElute Reaction Cleanup Kit	(QIAGEN)
PERFORMA® DTR Gel Filtration Cartridges	(Edge BioSystems)
QIAprep Spin Miniprep Kit	(QIAGEN)
QIAquick Gel Extraction Kit	(QIAGEN)
RNeasy® mini kit	(QIAGEN)

Primers

Gene	Name of primers	DNA sequence
<i>CAB</i> promoter	PCAB2F2- <i>Sac</i> II	5'-TTGTTGAGGCCCGCGGTGAAACTTTTTTGTGTT-3'
<i>CAB</i> promoter	PCAB1R2- <i>Sac</i> II	5'-TTGAGGCCCGCGGTGAGGTTGAGTAGTGC-3'
<i>CAB</i> promoter	P _{CAB1} F	5'-GTTTATTGCATCACTTTCCACGAAGCAC-3'
<i>CAB</i> promoter	P _{CAB2} F	5'-TAATAAGCCAATTCCAACGGCCACC-3'
<i>CAB</i> promoter	P _{CAB2} IV Nco	5'- TAACCATGGTTCGATAGTGTGGATTA-3'
<i>J chain</i>	JCF- <i>Xba</i>	5'-ACAGTCTAGACAAGATGAAG-3'
<i>J chain</i>	JCR	5'-CTAGTCAAGGTAGCAAGAAT-3'
<i>IgG H chain</i>	IgG Heavy <i>Not</i> F	5'-CACTGCGGCCGCTGACTCTAACCATGGGATGGAGC-3'

<i>IgA H chain</i>	IgA-H/NotR	5'-GGGCGGCCGCTCAGTAGCAGATGCCATCTCCCTC-3'
<i>IgG L chain</i>	IgGk NotF	5'-TGTGCGGCCGCAGCAGAAACATGAAG-3'
<i>IgG L chain</i>	IgGk NotR	5'-CGAGCGGCCGCTTCTAACACTCATTCC-3'
<i>ACTIN2</i>	actin2-F	5'-GTTGGTGATGAAGCACAATCCAAG-3'
<i>ACTIN2</i>	actin2-R	5'-CTGGAACAAGACTTCTGGGCATCT-3'
	M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
	M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

LB medium

1%	Tryptone (w/v)	滅菌液	5%	Sodium hypochlorite solution
0.5%	Yeast Extract (w/v)		0.05%	Tween 20
1%	NaCl (w/v)	溶媒		MilliQ water
溶媒	MilliQ water			

Murashige and Skoog medium (MS medium)

4.6 g/l	Murashige and Skoog Plant Salt Mixture
5 mg/l	Nicotinic acid
50 µg/l	Pyridoxine hydrochloride
3 mg/l	Thiamine hydrochloride
2%	Sucrose (w/v)
0.4%	Gellam Gum (w/v)
pH 調整 (pH5.8)	KOH
溶媒	MilliQ water

DNA 抽出 buffer 1

200 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0.5%	SDS
溶媒	MilliQ water

DNA 抽出 buffer 2

100 mM	Tris-HCl (pH 9.5)
1 M	KCl
10 mM	EDTA
溶媒	MilliQ water

Tris acetate EDTA buffer (TAE buffer)

40 mM	Tris
20 mM	Acetic acid
1 mM	EDTA
溶媒	MilliQ water

Lysis buffer

10 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
10 mM	EDTA
0.5%	Triton X-100
溶媒	MilliQ water

タンパク質抽出 buffer 1

10 mM	MOPS-KOH (pH 7.5)
150 mM	NaCl
0.5 mM	EDTA
0.17%	Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts
溶媒	MilliQ water

4 x SDS sample buffer

0.25 M	Tris-HCl (pH 6.8)
8%	SDS
40%	glycerol
20%	2-mercaptoethanol (2-ME (-) には加えず)
0.08%	pyronin G
溶媒	MilliQ water

Running buffer

25 mM	Tris
192 mM	glycine
0.1%	SDS

Blotting buffer

25 mM	Tris
192 mM	glycine
5%	methanol

1-2-2 二量体ハイブリッド IgA 発現用バイナリーベクターの作製**1-2-2-1 シロイヌナズナの栽培**

プラスチック製のバット内に土壤改良土 expanded vermiculite を 2 l 程度入れ、液体肥料 HYPONeX を 1,000 倍希釈したものを含む水を 2 l 程度加え、十分に吸水させた。吸水させた expanded vermiculite をポットに 100 ml 程度入れ、指で軽く押し固めた。1 l 程度の水を張った別のバットにポットを並べ、ポット 1 つにつき 2~30 粒のシロイヌナズナの種を、ポット全体に満遍なく広がるようにまいた。20°C、連続照明条件下で、2~3 日おきに水やりを行い、1 ヶ月程度栽培した。

1-2-2-2 PCR による P_{CAB} 遺伝子の増幅

1 ヶ月間栽培したシロイヌナズナの葉 1 枚をハサミで切り取り、1.5 ml チューブへ回収した。ペッスルを用いて葉をすりつぶし、DNA 抽出 buffer 1 を 200 µl 添加した。99.5%エタノールを 400 µl 添加し、ボルテックスで攪拌した。室温、21,500 × g で 5 min 遠心 (遠心機; HITACHI himac CT 15RE) し、上清を除去した。TE buffer を 200 µl 添加し、ボルテックスで 5 min 攪拌した。室温、21,500 × g で 5 min 遠心し、上清 100 µl を PCR 用プレートとして 1.5 ml チューブへ回収した。P_{CAB} 遺伝子 (FIN18 BAC clone, accession number AC008030 の 16,915 から 19,092 bp の位置) の塩基配列を元に作製し、制限酵素 Sac II の認識配列を付加したプライマーである PCAB2F2-SacII と PCAB1R2-SacII を用いて Table 1-1 の条件で PCR を行い、P_{CAB} 遺伝子を増幅した (MyCycler サーマルサイクラー; BIO-RAD)。

Table 1-1 Reaction mixture and cycling parameters for PCR

5 × PrimeSTAR Buffer	40 µl			
dNTP mixture (2.5 mM each)	16 µl	Pre-denature	94°C	5 min
Sample	4 µl	Denature	94°C	15 sec
PCAB2F2- <i>Sac</i> II (10 µM)	5 µl	Annealing	55°C	5 sec
PCAB1R2- <i>Sac</i> II (10 µM)	5 µl	Extension	72°C	2 min
PrimeSTAR HS	2 µl	Extension	72°C	10 min
DNA polymerase (2.5 u/ µl)				1 cycle
DNase free MilliQ water	up to 200 µl			

1-2-2-3 増幅された P_{CAB} 遺伝子断片の精製

P_{CAB} の PCR 増幅産物 191 µl と 10 × Loading Buffer 21 µl を混合し、1.5% アガロース (SeaKem GTG agarose) にて TAE バッファー中で 100 V、40 min 電気泳動を行った (Mupid[®]-2plus, TaKaRa)。1 µg/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射により DNA を視覚化し、2 kbp 付近のバンドを 80% ethanol で洗浄したカッターナイフとピンセットを用いて切り出し、15 ml ポリプロピレンチューブ (2059, Falcon) へ回収した。続いて QIAquick Gel Extraction Kit を用いて回収したゲルから DNA の抽出を、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

1-2-2-4 P_{CAB} 遺伝子の制限酵素処理

精製した P_{CAB} 遺伝子サンプルと pGEM-5Zf (+) をそれぞれ制限酵素 *Sac* II で処理した。まず、2 µg の DNA サンプルに 10 × T buffer 2 µl、0.1% BSA 2 µl、制限酵素 *Sac* II (15 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 µl とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。精製は MinElute Reaction Cleanup Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

1-2-2-5 プラスミドの脱リン酸化処理

制限酵素 *Sac* II で処理した pGEM-5Zf (+) において、セルフライゲーションを防ぐため、Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) により脱リン酸化処理を施した。*Sac* II 処理した pGEM-5Zf (+) 29 µl、10 × CIAP buffer 5 µl、CIAP (30 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を混和し全量 50 µl とした。50°C、1 hr インキュベーションした後、MinElute Reaction Cleanup Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って精製した。

1-2-2-6 P_{CAB} 遺伝子と pGEM-5Zf (+) のライゲーション反応

Sac II で制限酵素処理した P_{CAB} 遺伝子と、*Sac* II で制限酵素処理した後、脱リン酸化を行った pGEM-5Zf (+) のライゲーション反応を DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いて行った。インサートとベクターのモル比が 3:1 となるよう、P_{CAB} 遺伝子と pGEM-5Zf (+) を混合し、DNase free MilliQ 水で 10 µl にメスアップした後、Ligation Mix 10 µl を混合し、16°C で 30 min インキュベーションした。

1-2-2-7 Competent high *E. coli* DH5 α の形質転換

P_{CAB} 遺伝子と pGEM-5Zf (+) のライゲーション反応液を用いて Competent high *E. coli* DH5 α の形質転換を行った。Competent high *E. coli* DH5 α 20 μ l に、ライゲーション反応液 2 μ l を加え、氷上に 30 min 静置した。42°C で 30 sec ヒートショックを与えた後、氷中で 2 min 冷却した。SOC medium 200 μ l を加え、37°C で 1 hr 振とう培養した。100 μ g/ml ampicillin sodium salt 含有 LB プレート (LB/Amp) に形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、P_{CAB} 遺伝子の増幅に用いたプライマー PCAB2F2-SacII と PCAB1R2-SacII を用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Amp 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。

1-2-2-8 P_{CAB} 遺伝子のシーケンス解析

サイクルシーケンシング反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた。抽出したプラスミド溶液を鋳型として、M13F、M13R、P_{CAB2}F、P_{CAB1}F、P_{CAB2} rv Nco、PCAB1R2-SacII をプライマーとして用い、Table 1-2 の条件でサイクルシーケンシング反応を行った (MyCycler サーマルサイクラー)。PCR 終了後、反応溶液に 2.2% SDS 2 μ l を加え、98°C、5 min、25°C、10 min 反応させた (MyCycler サーマルサイクラー)。反応後、PERFORMA[®] DTR Gel Filtration Cartridges を用い、Kit 添付のマニュアルに従い精製した。精製後、遠心濃縮機 (CC-181, TOMY) を用い、減圧下、330 \times g で 1 hr 遠心濃縮により乾固させ、Hi Di[™] Formamide 20 μ l を加えボルテックスにより混合し、95°C、5 min 熱処理しシーケンスサンプルとした。

シーケンス解析には、ABI PRISM 3100-Avent (Applied Biosystems) を用いた。シーケンスサンプルは 10 μ l 使用した。Buffer には 1 \times Genetic Analyzer buffer (Applied Biosystems)、ポリマーには ABI PRISM POP4[™]、80 cm (Applied Biosystems) のキャピラリーを用い泳動した。得られたデータは DNA sequencing Analysis ソフトウェア Version 5.1 for Win XP and 2000 (Applied Biosystems) を使用して解析した。DNA 配列に変異のない P_{CAB} が挿入されていたプラスミドを pGEM5zf/P_{CAB} とし、以降の操作で使用した。

Table 1-2 Reaction mixture and cycling parameters for cycle sequencing

Big Dye terminator	2 μ l	Pre-denature	96°C	1 min	1 cycle
5 \times Sequencing Buffer	3 μ l	Denature	96°C	10 sec	25 cycles
Template (50 ng/ μ l)	5 μ l	Annealing	50°C	5 sec	
Primers (3.2 μ M)	1 μ l	Extension	60°C	4 min	
DNase free MilliQ water	9 μ l				

1-2-2-9 pGEM5zf/P_{CAB} の制限酵素処理

pGEM5zf/P_{CAB} を制限酵素 *Sac* II で処理した。反応液の調製は 1-2-2-4 と同様に行い、37°C で 3 hr インキュベーションした。*Sac* II 反応液 18 µl と 10× Loading Buffer 2 µl を混合し、1.5% アガロース (SeaKem GTG agarose) にて TAE バッファー中で 100 V、40 min 電気泳動を行った。1 µg/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射により DNA を視覚化し、2 kbp 付近のバンドを 80% ethanol で洗浄したカッターナイフとピンセットを用いて切り出し、1.5 ml チューブへ回収した。続いて QIAquick Gel Extraction Kit を用いて回収したゲルから DNA の抽出を、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

1-2-2-10 pGEM3zf/T_{CAB1}/hybrid Hc/IgG Lc/T_{CAB2} の制限酵素処理、脱リン酸化

pGEM3zf/T_{CAB1}/hybrid Hc/IgG Lc/T_{CAB2} を制限酵素 *Sac* II で処理した。反応液の調製は 1-2-2-4 と同様に行い、37°C で 3 hr インキュベーションした。QIAquick Gel Extraction Kit を用いて、Kit 添付の酵素反応液の精製方法のプロトコールに従って、*Sac* II 反応液を精製した。精製した DNA サンプルについて、1-2-2-5 と同様の方法で脱リン酸化処理を行い、QIAquick Gel Extraction Kit で精製した。

1-2-2-11 P_{CAB} と pGEM3zf/T_{CAB1}/hybrid Hc/IgG Lc/T_{CAB2} のライゲーション反応、形質転換

1-2-2-9 で制限酵素処理した P_{CAB} 遺伝子と、1-2-2-10 で制限酵素処理、脱リン酸化した pGEM3zf/T_{CAB1}/hybrid Hc/IgG Lc/T_{CAB2} のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5α の形質転換を行い、50 µg/ml の Kanamycin sulfate を含有した LB プレート (LB/Km) へ形質転換した菌液を 50 µl 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、PCAB2F2-*Sac*II と PCAB1R2-*Sac*II をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pGEM3zf/hybrid-IgA expression cassette とした。

1-2-2-12 hybrid-IgA expression cassette の制限酵素処理

pGEM3zf/hybrid-IgA expression cassette を制限酵素 *Hind* III で処理した。まず、2 µg の DNA サンプルに 10× M buffer 2 µl、制限酵素 *Hind* III (20 U/µl) 0.5 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 µl とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。*Hind* III 反応液 18 µl と 10× Loading Buffer 2 µl を混合し、1.5% アガロース (SeaKem GTG agarose) にて TAE バッファー中で 100 V、40 min 電気泳動を行った。1 µg/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射により DNA を視覚化し、6 kbp 付近のバンドを 80% ethanol で洗浄したカッターナイフとピンセットを用いて切り出し、1.5 ml チューブへ回収した。続いて QIAquick Gel Extraction Kit を用いて回収したゲルから DNA の抽出を、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

1-2-2-13 pBCH1/Jc の制限酵素処理、脱リン酸化

pBCH1/Jc を制限酵素 *Hind*III で処理した。反応液の調製は 1-2-2-12 と同様に行い、37°C で 3 hr インキュベーションした。QIAquick Gel Extraction Kit を用いて、Kit 添付の酵素反応液の精製方法のプロトコールに従って、*Hind*III 反応液を精製した。精製した DNA サンプルについて、1-2-2-5 と同様の方法で脱リン酸化処理を行い、QIAquick Gel Extraction Kit で精製した。

1-2-2-14 hybrid-IgA expression cassette と pBCH1/Jc のライゲーション反応、形質転換

1-2-2-12 で制限酵素処理した hybrid-IgA expression cassette と、1-2-2-13 で制限酵素処理、脱リン酸化した pBCH1/Jc のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で一晩インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5 α の形質転換を行い、LB/Km へ形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、PCAB2F2-*Sac*II と PCAB1R2-*Sac*II をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pBCH1/dimeric hybrid-IgA とした。

1-2-3 二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製

1-2-3-1 *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 の形質転換

pBCH1/dimeric hybrid-IgA を用いて *A. tumefaciens* GV 3101 のエレクトロポレーション法による形質転換を行った。菌液 40 μ l に pBCH1/dimeric hybrid-IgA 1 μ l を加え、あらかじめ氷冷しておいたエレクトロポレーション用キュベット (ギャップ; 0.2 cm) の電極の間へ入れた。キュベットを Gene pulser II (BIO-RAD) にセットした後、Volt を 2.5 kV、Capacitance を 25 μ F、Resistance を 200 Ω に設定し、通電した。菌液を 1 ml の SOC medium へ移し、28°C で 1 hr 振とう培養した。遺伝子導入した菌液を LB/Km プレートに 50 μ l 塗布し、28°C で 3 日間培養した。3 日後、得られたコロニーをテンプレートとして、JCF-*Xba* と JCR をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、28°C にて一晩振とう培養した。

1-2-3-2 花序浸し法によるシロイヌナズナへの H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子の導入

1-2-3-1 で形質転換した *A. tumefaciens* を用いてシロイヌナズナの形質転換を行った。BioPhotometer (eppendorf) を用いて OD₆₀₀ を測定した後、培養した菌液を 1.5 ml チューブに移し、21,500 \times g、1 min 遠心し、上清を除去した。液体 MS 培地を OD₆₀₀ が 1.0 となるように加えてペレットを再懸濁した。再懸濁した菌液に、終濃度がそれぞれ 0.05%、1 μ g/ml となるように界面活性剤である silwet L-77、合成サイトカインである 6-benzylaminopurine を加えた。1-2-2-1 のように 1.5 ヶ月栽培したシロイヌナズナのつぼみに調製した菌液を塗布し、菌を感染させた。バットに蓋をし、ラップで覆うことで 1 日間保湿した。同様の操作を 3 日おきに、更に 2 回、計 3 回行い、菌を感染させた。3 回目の感染から 1 週間後に水遣りをやめ、さ

やが十分に乾燥した後、1.5 ml チューブに種を回収した。菌の感染、シロイヌナズナの形質転換体の栽培は遺伝子組換え実験計画の学長承認のもと P1P 施設内で行った。

1-2-3-3 形質転換したシロイヌナズナの薬剤による選抜

1-2-3-2 で回収した種を 100 粒程度 1.5 ml チューブに入れ、80% ethanol を 1 ml 加えて転倒混和し、しばらく静置して種を沈めた後、デカンテーションにより上清を除去する洗浄操作を 2 回行った。滅菌液 1 ml を加え、ロータリーミキサー (RT-30mini, TAITEC) を用いて 10 min 転倒混和した。小型微量遠心機 (HF-120, TOMY) を用いて遠心し、上清を除去した。滅菌 MilliQ 水 1 ml 加えて転倒混和し、しばらく静置して種を沈めた後、上清を除去する洗浄操作を 5 回繰り返した。0.2% アガロース 1 ml で種を懸濁した後、20 µg/ml Hygromycin B を含む MS 培地 (MS/Hyg) にまき、20°C、連続照明で 2 週間培養した。薬剤に耐性を示した個体を新しい MS/Hyg に移し、更に 2 週間程度培養した。培地からシロイヌナズナを取り出し、流水で根を洗浄した後、1,000 倍希釈した HYPONeX を含む水を十分に吸水させた expanded vermiculite の入ったポットに植え替えた。水を張ったバットにシロイヌナズナを植えたポットを入れ、蓋をし、ラップで覆い 2 日間保湿した。ラップを外し、バットの水が枯れないよう 2~3 日おきに水やりを行い、栽培した。

1-2-4 二量体ハイブリッド IgA の発現解析

1-2-4-1 PCR による H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子の検出

1-2-3-2 で得られた個体から葉を先端から 3 mm 程度切り取り 1.5 ml チューブに採取した。DNA 抽出 buffer 2 を 100 µl 加え、ボルテックスで攪拌した後、10 min 煮沸した。ボルテックスで攪拌し、上清をテンプレートとして回収した。プライマーとして H 鎖には IgG Heavy *NotF* と IgA-H/*NotR*、L 鎖には IgGk *NotF* と IgGk *NotR*、J 鎖には JCF-Xba と JCR を用い、Table 1-3 の条件で PCR を行った。内部標準にはシロイヌナズナのハウスキーピング遺伝子である *ACTIN2* を用い、actin2-F、actin2-R をプライマーに使用した。PCR 産物 5 µl と 6 x loading buffer 1 µl を混合し、2% アガロースゲルに添加し、TAE バッファー中で 100 V、40 min 泳動した。1 µg/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射によりバンドを検出した。

Table 1-3 Reaction mixture and cycling parameters for PCR

2 x PCR Buffer for KOD FX Neo	10 µl			
2 mM dNTPs	4 µl			
Forward primer (10 µM)	1 µl			
Reverse primer (10 µM)	1 µl			
KOD FX neo (1.0 U/µl)	0.4 µl			
Sample	0.6 µl			
MilliQ water	up to 20 µl			
Predenature	94°C	2 min	1 cycle	
Denature	98°C	10 sec	30 cycles	
Annealing	55°C	30 sec		
Extension	68°C	2 min		
Extension	68°C	7 min	1 cycle	

1-2-4-2 RNA 抽出

1-2-4-1 で H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子の導入が確認された個体から RNA 抽出用サンプルとして葉を 20 mg 程度採取し、QIAshredder spin column、RNeasy[®] mini kit を用いて RNA を抽出した。まず、乳鉢へ葉を入れ、液体窒素を加えて凍結させた後、乳棒ですり潰した。RNeasy[®] mini kit 添付の Buffer RLT 450 μ l を加えて懸濁した後、QIAshredder spin column に添加した。室温下で 15,000 rpm、2 min 遠心 (MC-150, TMA-2, TOMY) し、フロースルー液 400 μ l を 1.5 ml チューブに回収した。回収したフロースルー液をサンプルとして RNeasy[®] mini kit を用いて、kit 添付のプロトコールに従って、RNA の抽出を行った。抽出した RNA 溶液から DNA を除去するために DNase I 処理を行った。RNA 抽出液に RNase free DNase I stock solution 2.5 μ l、Buffer RDD 10 μ l、RNase free water を加えて全量を 100 μ l とし、室温下で 10 min インキュベーションした。DNase I 処理した RNA 溶液を RNeasy[®] mini kit を用いて、kit 添付のプロトコールに従って精製した。

1-2-4-3 RT-PCR による H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子をコードした mRNA の検出

1-2-2-2 で得られた RNA 抽出液をテンプレートとして Table 1-4 の条件で RT-PCR を行った。プライマーとして H 鎖には IgG Heavy *NotF* と IgA-H/*NotR*、L 鎖には IgGk *NotF* と IgGk *NotR*、J 鎖には JCF-Xba と JCR、内部標準である *ACTIN2* には *actin2-F* と *actin2-R* を用いた。PCR 産物 5 μ l と 6 x loading buffer 1 μ l を混合し、2% アガロースゲルに添加し、TAE buffer 中で 100 V、40 min 泳動した。1 μ g/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射によりバンドを検出した。

Table 1-4 Reaction mixture and cycling parameters for RT-PCR.

Access Quick Master Mix	10 μ l	Reverse transcription	45°C	45 min	1 cycle
Forward primer (10 μ M)	0.4 μ l	RT inactivation and predenaturation	94°C	2 min	1 cycle
Reverse primer (10 μ M)	0.4 μ l				
Template (20 ng/ μ l)	2 μ l	Denaturation	94°C	30 sec	30 cycles
AMV Reverse Transcriptase (5 u/ μ l)	0.4 μ l	Annealing	55°C	1 min	
RNase Free Water		up to 20 μ l	Extension	68°C	
		Final extension	68°C	7 min	1 cycle

1-2-4-4 免疫染色による H 鎖タンパク質の検出

1-2-3-3 で得られた個体から葉を採取し、2% glutaraldehyde-0.1 M potassium phosphate buffer (pH7.2) の入った 1.5 ml チューブへ回収した。21,500 \times g、2 min 遠心し、葉を脱気した後、室温、2 hr 固定した。OCT compound を満たしたクリオモルド 2 号 (サクラファインテック) へ固定した葉を入れて包埋し、液体窒素で急冷し、凍結ブロックを作製した。クリオスタット (HM525, マイクロ・エッジ・インスツルメント) を用いて凍結ブロックを 10 μ m に薄切し、凍結切片を作製した。凍結切片をスライドガラス (松浪ガラス) へ載せ、風乾した後、パップペン (Dako) で切片を囲った。PBS へ 5 min 浸ける洗浄操作を 3 回行った。1% の BSA を含む

PBS (3% BSA-PBS) を 100 μ l/section で添加し、湿潤箱内で室温、1 hr ブロッキングした。PBS へ 5 min 浸ける洗浄操作を 3 回行い、0.3% BSA-PBS で 2 μ g/ml に調製した Goat anti-mouse IgA を 100 μ l/section で添加し、湿潤箱内で室温、1 hr 反応させた。PBS へ 5 min 浸ける洗浄操作を 3 回行い、0.3% BSA-PBS で 2 μ g/ml に調製した Rabbit anti-goat IgG-AP を 100 μ l/section で添加し、湿潤箱内で室温、1 hr 反応させた。PBS へ 5 min 浸ける洗浄操作を 3 回行った後、BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV を用いて、Kit 付属のプロトコールに従って染色を行った。100 mM Tris-HCl (pH9.5) に 5 min 浸けた後、回り水で洗浄した。50% グリセロールを滴下し、カバーガラス (松浪ガラス) を被せた後、光学顕微鏡 (BX51, オリンパス) で観察した。また、Goat anti-mouse IgA の代わりにアイソタイプコントロールとして同様に 2 μ g/ml に調製した Purified Goat IgG を反応させた切片も同時に用意した。

1-2-4-5 タンパク質抽出

1-2-3-3で得られた個体から葉を採取し、乳鉢へ入れ、液体窒素を加えて凍結させた後、乳棒ですり潰した。タンパク質抽出buffer 1を加えて懸濁した後、1.5 mlチューブに移し、4°C、21,500 \times gで10 min遠心し、上清をサンプルとして回収した。サンプルのタンパク質濃度の測定はBCA Protein Assay Kitを用い、Kit添付のプロトコールに従って行った。サンプルもしくは0.1~1.0 mg/mlに調製したBSA標準液25 μ lを96ウェルマイクロプレート (269620, Thermo Fisher Scientific) に添加した。BCATM Protein Assay Reagent A と BCATM Protein Assay Reagent Bを50 : 1で混合し調製したWorking Reagentを200 μ l/wellずつ添加した。37°Cで30 minインキュベーションして発色させ、562 nmにおける吸光度を測定した (SUNRISE Rainbow RC-R, Tecan)。BSA標準液の吸光度から検量線を作製し、サンプルの濃度を算出した。

1-2-4-6 Western Blotting による二量体ハイブリッド IgA の検出

1-2-3-3 で H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子の導入が確認された個体について、1-2-4-5 で抽出したタンパク質について western blot を行い二量体ハイブリッド IgA の検出を行った。サンプルを PBS で希釈し、総タンパク質濃度を 1.0 mg/ml (非還元条件) もしくは 1.5 mg/ml (還元条件) に揃えた。サンプル 10 μ l と 4 \times sample buffer 3.3 μ l とを混合し、5 min 煮沸した。Mini-PROTEAN TGX gel (stacking; 4%、separating; 7.5 (非還元) or 12 (還元) %) にアプライし、Running buffer 中で SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を 200 V、35 min 行った (Mini PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD)。ゲルから PVDF 膜への転写を Blotting buffer 中で 100 V で 40 min 通電して行った (Mini Trans Blot, BIO-RAD)。転写した PVDF 膜を SNAP i.d. Protein Detection System Blot Holder に固定し、SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore) にセットした。Blot Holder の well に PVDF Blocking Reagent を 15 ml 添加し、10 min インキュベーションした後、液を吸引してブロッキングした。0.05% Tween 20 を含む PBS (0.05% Tween 20-PBS) を well に添加し、吸引する洗浄操作を 3 回繰り返した。Can Get Signal solution 2 で 500 倍に希釈した HRP-Goat anti-mouse IgA を well に添加し、10 min インキュベーションした後、液を吸引した。0.05% Tween 20-PBS を well に添加し、吸引する洗浄操作を 3 回繰り返した。Blot Holder から PVDF 膜を取り出し、West Pico Luminol/Enhancer と West Pico Stable Peroxide を 1 : 1 で混合したものを PVDF 膜に加え、室温で 5 min インキュベーションし、LAS-3000 UV mini (FUJIFILM)

を用いてイメージングを行った。

これに加え、L鎖の検出には1次抗体として Can Get Signal solution 1 で 2 µg/ml に調製した Goat anti-mouse kappa、2次抗体に Can Get Signal solution 2 で 0.4 µg/ml に調製した HRP-donkey anti-goat IgG を使用し、J鎖の検出には1次抗体として Can Get Signal solution 1 で 1 µg/ml に調製した Rabbit anti-mouse J chain、2次抗体に Can Get Signal solution 2 で 500 倍に希釈した HRP-goat anti-rabbit IgG を使用し、同様の操作を行った。

1-2-4-7 Sandwich ELISA によるハイブリッド IgA 抗体の検出

EIA/RIA 96 ウェルプレート (9018, Corning) に、PBS で 1 µg/ml に調製した Goat anti-mouse kappa を 100 µl/well ずつ添加し、4°C で一晚コートした。コート液を除去し PBS で 3 回洗浄して、1% BSA-PBS を 200 µl/well ずつ添加し室温で 2 hr ブロッキングした。ブロッキング液を除去し 0.1% Tween 20-PBS で 3 回洗浄した。0.1% BSA を含む 0.1% Tween 20-PBS (0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS) で 5~25 ng/ml に調製した TEPC15 もしくは 1-2-4-5 で回収したサンプルを 100 µl/well ずつ添加し室温で 1 hr インキュベーションした。反応終了後、Sample 液を除去し 0.1% Tween 20-PBS で 3 回洗浄して、HRP-goat anti-mouse IgA を 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 1,000 倍に希釈して、100 µl/well ずつ添加し室温で 1 hr インキュベーションした。反応終了後、検出抗体溶液を除去し 0.1% Tween 20-PBS で 3 回洗浄した。1 mM ABTS を含む 0.1 M citrate buffer (pH 4.2) に 0.03% となるよう 30% H₂O₂ を加えて、100 µl/well ずつ添加し室温で発色させ、20 min 後に 405 nm における吸光度を測定した。各濃度に調製した TEPC15 の吸光度から検量線を作製し、サンプルの中の IgA 濃度を算出した。

1-2-5 二量体ハイブリッド IgA の性状解析

1-2-5-1 ELISA によるハイブリッド IgA の Stx1B への結合性の確認

EIA/RIA 96 ウェルプレート (9018, Corning) に 5 µg/ml Stx1B-PBS を 100 µl/well ずつ添加し 4°C で一晚コートした。以降は 1-2-4-7 と同様の操作を行い、Stx1B と結合した IgA の H 鎖を検出した。また、L鎖の検出には1次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 1 µg/ml に調製した Goat anti-mouse kappa、2次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 0.4 µg/ml に調製した HRP-donkey anti-goat IgG を使用した。サンプルについては、1-2-4-5 で抽出したタンパク質を IgA 量として 0.5、1.0、1.5、2.0 µg/ml (総タンパク質量として 0.45、0.9、1.35、1.8 mg/ml) となるように調製した。また、IgA のコントロールとして市販のマウス IgA である TEPC15 をサンプルと同様の IgA 濃度となるように調製し、シロイヌナズナから抽出したタンパク質のコントロールとして野生型のシロイヌナズナのタンパク質抽出液を総タンパク質濃度がサンプルと同じになるように調製した。

1-2-5-2 ハイブリッド IgA を用いた Stx1B とリガンドとの結合阻害活性の測定

MaxiSorp 96 ウェルプレート (Nunc) に、methanol で 4 nmol/ml に調製したブタ赤血球由来 globotriosylceramide (Gb₃) を 50 µl/well ずつ添加し、溶媒が完全に蒸発するまで 37°C でインキュベーションした。1% BSA-PBS を 200 µl/well ずつ添加し 4°C で一晚ブロッキングした。

25 ng/ml の DIG-Stx1B と 1, 2.5 もしくは 5 µg/ml のハイブリッド IgA を 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS 中で 4°C、1 hr 反応させた。一晩ブロッキングした 96 ウェルプレートからブロッキング液を除去し 0.1% Tween 20-PBS で 3 回洗浄した。DIG-Stx1B/ハイブリッド IgA 混合液を 50 µl/well ずつ添加し、室温で 1 hr インキュベーションした。反応終了後、DIG-Stx1B/ハイブリッド IgA 混合液を除去し 0.1% Tween 20-PBS で 3 回洗浄した。HRP-sheep anti-digoxigenin Fab fragments を 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 500 倍に希釈して、100 µl/well ずつ添加し室温で 1 hr インキュベーションした。反応終了後、抗体溶液を除去し 0.1% Tween 20-PBS で 3 回洗浄した。1 mM ABTS を含む 0.1 M citrate buffer (pH 4.2) に 0.03% となるよう 30% H₂O₂ を加えて、100 µl/well ずつ添加し室温で発色させ、20 min 後に 405 nm における吸光度を測定した。

1-2-5-3 MTT 法を用いたハイブリッド IgA による Stx1 細胞毒性の中和効果の検討

Vero 細胞を 10% FBS を含む M199 培地 (10% FBS-M199) で培養した。培養した Vero 細胞を 0.02% EDTA-PBS で洗浄し、吸引除去後、0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS を用いて細胞を剥がした。無血清 M199 に細胞を懸濁後、4°C、200 × g、5 min 遠心した。上清を除去後、10% FBS-M199 で再懸濁した。細胞数を計数後、96 well flat bottom plate (353072, Falcon) に 2 × 10⁴ cells/well でまき、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。粗精製 Stx1 を最終濃度 20 pg/ml になるように、ハイブリッド IgA を終濃度 10、30、100、300 ng/ml になるように混合後、37°C、5% CO₂ 存在下で 1 hr インキュベーションした。Vero 細胞にハイブリッド IgA で前処理した粗精製 Stx1 を添加し、37°C、5% CO₂ 存在下で 48 hr 培養した。培養終了後、培地を吸引除去し、M199 を 100 µl/well 加えた後、Cell Counting Kit-8 を 10 µl/well 添加した。37°C、5% CO₂ 存在下で 4 hr 培養した後、測定波長 450 nm、参照波長 650 nm での吸光度を測定した。

1-2-5-4 DNA ラダー法を用いたハイブリッド IgA による Stx1 細胞毒性の中和効果の検討

Vero 細胞を 1-2-5-3 と同様に調製し、6 well plate (3046, Falcon) に 1.5 × 10⁵ cells/well でまき、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。粗精製 Stx1 を最終濃度 10 pg/ml になるように、ハイブリッド IgA を終濃度 30、300 ng/ml になるように混合後、37°C、5% CO₂ 存在下で 1 hr インキュベーションした。Vero 細胞にハイブリッド IgA で前処理した粗精製 Stx1 を添加した。37°C、5% CO₂ 存在下で 48 hr 培養後、培養液を回収し、浮遊した死細胞を含む培養液を回収した。6 well plate に 0.02% EDTA-PBS を加えて、細胞を洗浄した後、洗浄液を回収した。さらに、6 well plate に 0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS を加え、37°C で 10 min 反応させて細胞をはがし、回収した。回収した細胞を全て一つのチューブにまとめ、4°C、200 × g、10 min 遠心した。上清を除去後、細胞を PBS へ再懸濁し、4°C、200 × g、10 min でもう一度遠心した。上清を除いた後、100 µl の Lysis buffer を加え、再懸濁した。氷上に 10 min 静置後、4°C、21,500 × g、10 min 遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブへ回収した。10 mg/ml の RNase A を 2 µl 加え、37°C で 1 hr 反応させた後、10 mg/ml の Proteinase K を 2 µl 加え、50°C、30 min 反応させた。最終濃度で 0.5 M NaCl と 50% isopropanol となるようそれぞれ加え、-30°C で一晩静置した。4°C、21,500 × g、10 min 遠心し、上清を除去した後、もう一度 4°C、21,500 × g、10 min 遠心して上清を完全に除去し、10 µl の TE buffer に溶解した。溶解したサンプル溶液 10 µl と 10 × loading buffer 2 µl を混合し、2% アガロースゲルに添加し、TAE バッファー中で 100 V、40 min 泳動

した。4 µg/ml EtBr 中で 15 min 振とう後、水道水へ 30 min 浸けて洗浄し、UV 照射によりバンドを検出した。

1-2-5-5 Annexin V を用いたハイブリッド IgA の Stx1 誘導性アポトーシスに対する阻害効果の検討

粗精製 Stx1 を最終濃度 10 pg/ml になるように、ハイブリッド IgA を終濃度 30、300 ng/ml になるように混合後、37°C、5% CO₂ 存在下で 1 hr インキュベーションした。10% FBS を含む RPMI1640 培地 (10% FBS-RPMI) で培養した Ramos 細胞を 15 ml チューブに回収し、4°C、200 × g、5 min で遠心した。上清を除去し、RPMI1640 を 10 ml 加えて懸濁し、4°C、200 × g、10 min 遠心した。上清を除去し、10% FBS-RPMI1640 で再懸濁した。細胞数を計数後、96 well round-bottom plate (351177, Falcon) に 2 × 10⁴ cells/well でまき、ハイブリッド IgA で前処理した粗精製 Stx1 を添加し、37°C、5% CO₂ 存在下で 5 hr 培養した。培養した細胞を 1.5 ml チューブに回収し、4°C、200 × g、5 min で遠心した。上清を除去し、1 ml の PBS で細胞を再懸濁し、4°C、200 × g、5 min で遠心した。上清を除去後、FITC Apoptosis Detection Kit I を用いて、Kit 添付のプロトコールに従って、Annexin V 陽性細胞の染色を行い、フローサイトメーター (FACSCanto™ II, BD) で解析した。

1-2-5-6 FITC-DEVD-FMK を用いたハイブリッド IgA の Stx1 誘導性アポトーシスに対する阻害効果の検討

1-2-2-5 と同様に Stx1/抗体混合液の調製、Ramos 細胞の調製、Stx1 処理を行った。その後、APOPCYTO Intracellular Caspase-3 Activity Detection Kit を用いて活性化 caspase-3 陽性細胞の検出を行い、フローサイトメーターを用いて解析した。

1-3 結果

1-3-1 二量体ハイブリッド IgA 発現植物の作製

本章ではアグロバクテリウム法を用いて二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製を行った。CAB1、CAB2 の発現を制御する双方向性プロモーター、ターミネーターを用いてハイブリッド IgA の H 鎖と L 鎖を同時に発現できるハイブリッド IgA 発現カセットを作製し、J 鎖遺伝子を組み込んだバイナリーベクターへ導入することで二量体ハイブリッド IgA 発現ベクターを作製した (Fig. 1-2)。作製したベクターを用いて花序浸し法によりシロイヌナズナの形質転換を行い、Hygromycin B による選抜を行ったところ、薬剤に耐性の個体を 5 個体得た。得られた 5 個体から DNA を抽出し、PCR により解析した結果、全ての個体で遺伝子が挿入されていることを確認した。これらの個体でハイブリッド IgA が発現しているかどうかを確認するため、タンパク質を抽出し、キャプチャー抗体に Goat anti-mouse kappa を、検出抗体に HRP-goat anti-mouse IgA を用いて sandwich ELISA を行った。5 個体全てで野生型と比較して高い発色が見られ、ハイブリッド IgA の発現が確認された。そのなかで IgA の発現が最も高かった個体について更に詳細な解析を進めることにした。H 鎖、L 鎖、J 鎖とハウスキーピング遺伝子である ACTIN2 にそれぞれ特異的なプライマーを用いて PCR により解析し

たところ、*ACTIN2* については形質転換体と野生型の両方で遺伝子の増幅が見られた一方、H鎖、L鎖、J鎖については形質転換体でのみ遺伝子の増幅が見られ、これらの遺伝子の導入が確認された (Fig. 1-3)。RT-PCR による解析でも、同様に形質転換体でのみ H鎖、L鎖、J鎖に特異的なバンドの増幅が見られ、3つの遺伝子の mRNA への転写が確認された (Fig.1-4)。この形質転換体 (dimer Tg) と野生型 (WT) のシロイヌナズナの形態を比較したところ、両者の形態に差はなく、導入した遺伝子がシロイヌナズナの生長を阻害しないことを確認した (Fig. 1-5)。

1-3-2 二量体ハイブリッド IgA の発現解析

Dimer Tg と WT の葉から凍結切片を作製し、抗 H鎖抗体を用いて免疫染色を行ったところ、dimer Tg でのみ H鎖に特異的な染色が見られ、dimer Tg の葉で抗体が発現していることが確認できた (Fig. 1-6)。Dimer Tg の葉からタンパク質を抽出し、抗 H鎖、抗 L鎖、抗 J鎖抗体を用いて非還元条件で Western Blot を行い、高分子量側に二量体ハイブリッド IgA と思われるバンドが検出され、二量体ハイブリッド IgA 発現を確認した (Fig.1-7A)。また、その他にも H鎖の二量体に J鎖が結合したタンパク質と思われるバンドや H鎖と L鎖が1本ずつ結合したヘテロ二量体、H鎖単量体や分解物と思われるバンドなど複数のバンドが確認された。還元条件下の Western Blot では H鎖、L鎖、J鎖の単独での分子量にそれぞれ相当するバンドが検出された (Fig.1-7B)。また、H鎖では 30 kDa 付近にも H鎖の分解物と思われるバンドが見られた。WT では非還元条件、還元条件にかかわらず、Western Blot でシグナルは検出されなかった。Dimer Tg から抽出したタンパク質中のハイブリッド IgA 量をキャプチャー抗体に抗 L鎖抗体を、検出抗体に抗 H鎖抗体を用いて sandwich ELISA で確認したところ、dimer Tg のハイブリッド IgA 発現量は総タンパク質量の 0.11%、葉 1 g 辺り 11 μ g であった (Fig. 1-8)。これらの結果から、dimer Tg で H鎖、L鎖、J鎖タンパク質が発現し、二量体ハイブリッド IgA として構築されていることを確認した。

1-3-3 ハイブリッド IgA 植物抗体による Stx1B の Gb₃ への結合の阻害

発現した植物抗体の Stx1B への結合性を確認するため、Stx1B を固相化して ELISA を行った。抗 H鎖抗体、抗 L鎖抗体のどちらで検出した場合においても、植物抗体の濃度依存的な吸光度の上昇が見られ、植物抗体が Stx1B と結合できることを確認した (Fig. 1-9)。WT や TEPC15 では吸光度の上昇が見られなかった。次に植物抗体が Stx1B のリガンドへの結合を阻害できるかどうかを検討するために、固相化した Gb₃ を用いた ELISA によって植物抗体で処理した DIG-Stx1B の Gb₃ への結合を検出した。処理した植物抗体の濃度依存的に DIG-Stx1B の Gb₃ への結合が阻害された (Fig. 1-10)。WT や TEPC15 は DIG-Stx1B の Gb₃ への結合を阻害しなかった。これらの結果から、発現した植物抗体が Stx1B への結合能を有し、Stx1B のリガンドへの結合を阻害できることが明らかとなった。

1-3-4 ハイブリッド IgA 植物抗体による Stx1 の細胞毒性の中和効果

Stx1 は Vero 細胞や Ramos 細胞といった Gb₃/CD77 を発現する細胞の細胞死を引き起こすことが知られている。そこで、この2種の細胞を用いて植物抗体の Stx1 に対する細胞毒性の中

和効果を検討した。20 pg/ml の Stx1 を 48 hr 処理したことで 60% の Vero 細胞が細胞死を起こしたが、Stx1 を植物抗体で前処理しておくことで死細胞の割合が濃度依存的に減少した。300 ng/ml の植物抗体の前処理により、細胞死は完全に抑制された (Fig. 1-11)。一方で、TEPC15 や WT のタンパク質抽出物ではこのような効果は見られなかった。Stx1 による細胞死は、Stx1 が細胞のアポトーシスを誘導することで起こることが知られている。そこで、植物抗体が Stx1 による細胞のアポトーシスを抑制できるかどうかを検討するため、アポトーシス時の細胞応答として知られる DNA の断片化、細胞膜の外層側へのホスファチジルセリンの露出、caspase-3 の活性化の 3 つをアポトーシスの指標として解析した。

10 pg/ml の Stx1 を Vero 細胞に 48 hr 処理することで DNA の断片化が見られたが、300 ng/ml の植物抗体を前処理することで DNA の断片化が完全に抑制された (Fig. 1-12)。WT のタンパク質抽出物や TEPC15 では DNA の断片化の抑制は見られなかった。次に、カルシウム依存的にホスファチジルセリンへ結合することが知られるタンパク質である Annexin V を用いてホスファチジルセリンの細胞膜外層への露出を検出したところ、10 pg/ml の Stx1 を Ramos 細胞に 5 hr 処理することで Annexin V と結合した Ramos 細胞の割合が上昇し、Stx1 による Ramos 細胞のアポトーシスの誘導が見られた。Stx1 を 30、300 ng/ml の植物抗体で前処理することで濃度依存的な Annexin V 陽性細胞の減少が見られた (Fig. 1-13)。また、同様に Stx1 処理により活性化 caspase-3 陽性の Ramos 細胞の割合も上昇したが、植物抗体を Stx1 に前処理しておくことで活性化 caspase-3 陽性細胞の割合が減少した (Fig. 1-14)。これらの反応は TEPC15 や WT のタンパク質抽出物では見られなかった。これらの結果より、植物抗体が Stx1 による Stx1 感受性細胞のアポトーシスを抑制できることを明らかにした。

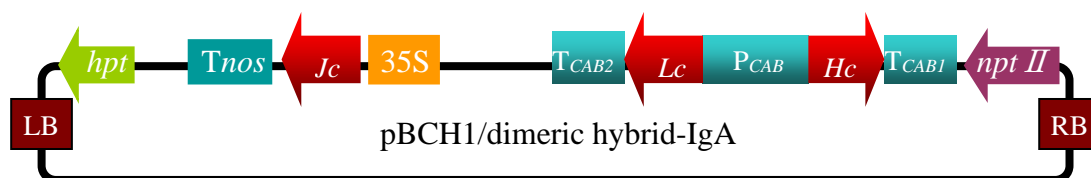


Fig. 1-2 Construction of binary vector pBCH1/dimeric hybrid-IgA.

LB; left border of T-DNA

hpt; hygromycin phosphotransferase (hygromycin resistance gene)

Tnos; terminator of a nopal synthase gene

Jc; immunoglobulin *Joining chain* gene

35S; cauliflower mosaic virus 35S promoter

T_{CAB1} and T_{CAB2}, chlorophyll *a/b*-binding protein terminators

Lc; hybrid-IgA light chain gene

P_{CAB}, chlorophyll *a/b*-binding protein promoter

Hc; hybrid-IgA heavy chain gene

npt II; neomycin phosphotransferase (kanamycin resistance gene)

RB; right border of T-DNA

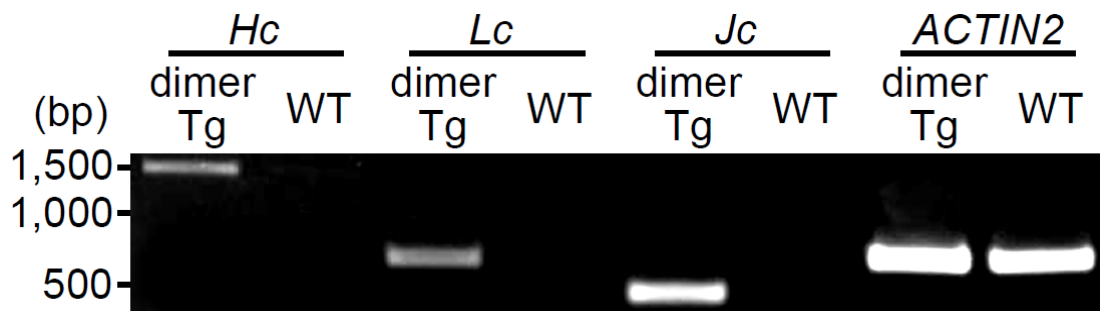


Fig. 1-3 Incorporation of the dimeric hybrid-IgA transgene into the genome of *A. thaliana*

Genomic DNAs were extracted from transgenic (dimer Tg) and wild type (WT) *A. thaliana*. And then, dimeric hybrid-IgA genes were amplified by PCR using gene specific primers. *ACTIN2* is a house-keeping gene of *A. thaliana*.

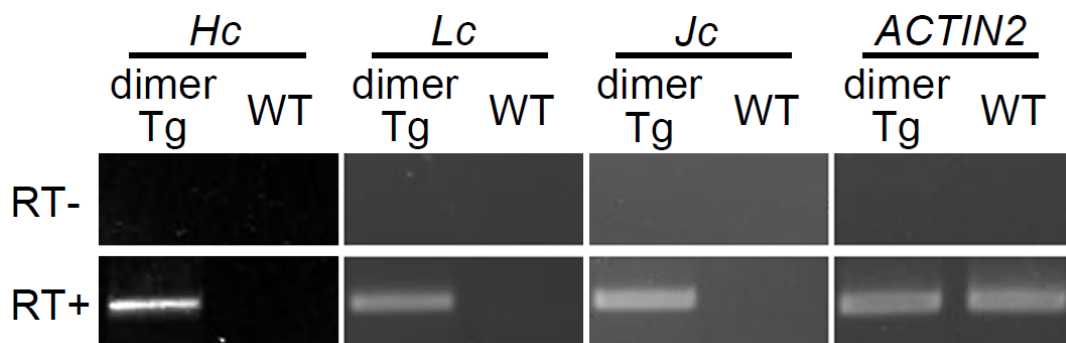


Fig. 1-4 RT-PCR analysis of the mRNA for the dimeric hybrid-IgA

The mRNAs in dimer Tg and WT were reverse transcribed, and then cDNAs of *Hc*, *Lc*, *Jc* and *actin2* (inner control) were amplified by PCR using gene specific primers.



Fig. 1-5 Appearance of a transgenic plant grown on soil for 7 wk

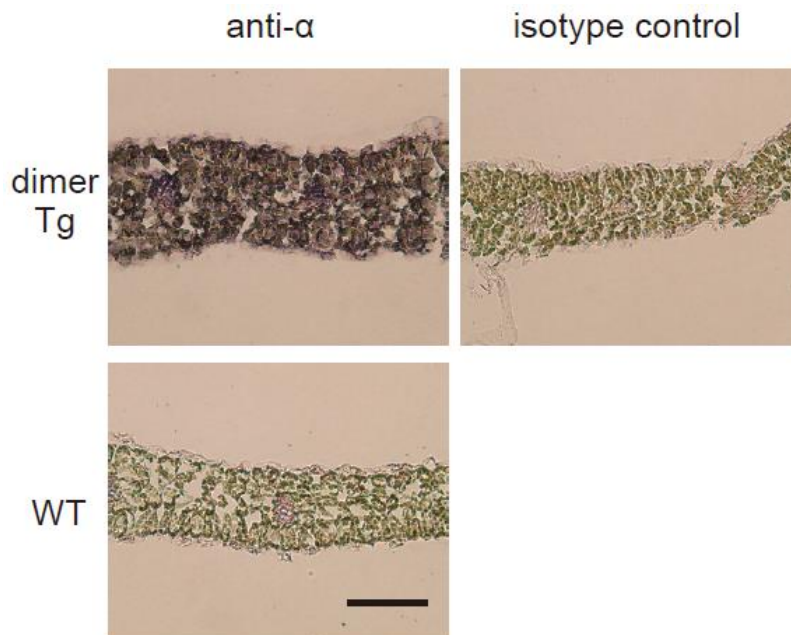


Fig. 1-6 Immunohistochemical analysis of leaf tissue sections

Frozen 10 μm sections of leaf tissue were stained with goat anti-mouse IgA (anti- α) or an irrelevant goat IgG (isotype control). Bars represent 100 μm .

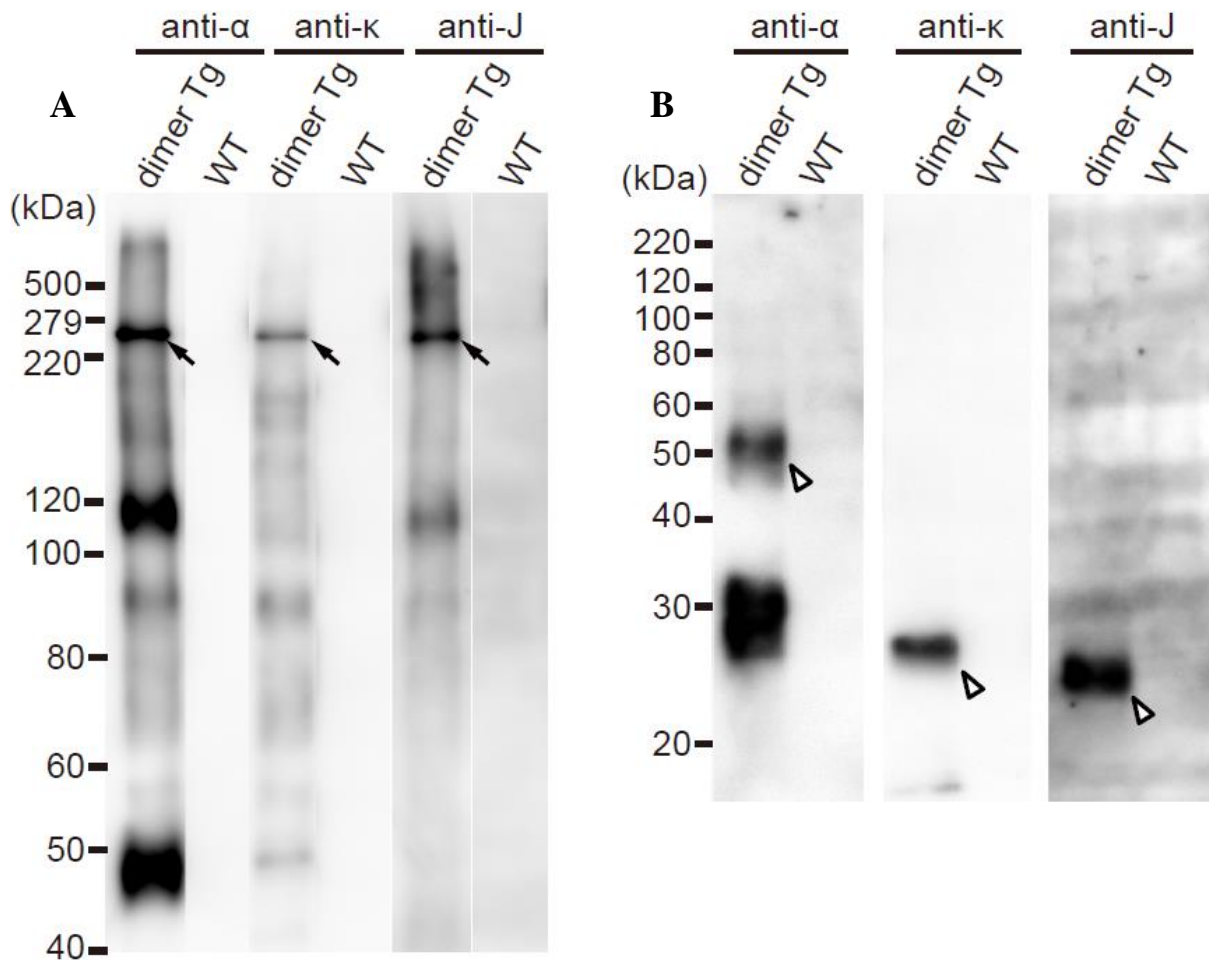


Fig. 1-7 Western blot analysis of proteins extracted from leaves of transgenic *A. thaliana*

Total protein extracts of leaves were separated by SDS-PAGE under non-reducing (panel A; 7.5% gel; 10 μ g protein/lane) or reducing (panel B; 12% gel; 15 μ g protein/lane) conditions, and then blotted onto a PVDF membrane. Each immunoglobulin chain of the hybrid-IgA was detected with goat anti-mouse IgA (anti- α), goat anti-mouse kappa (anti- κ), and rabbit anti-mouse J chain (anti-J) antibodies. Arrows indicate assembled dimeric hybrid-IgA (A), and arrowheads indicate each chain after reduction (B). The positions of molecular weight standards are shown on the left in kDa.

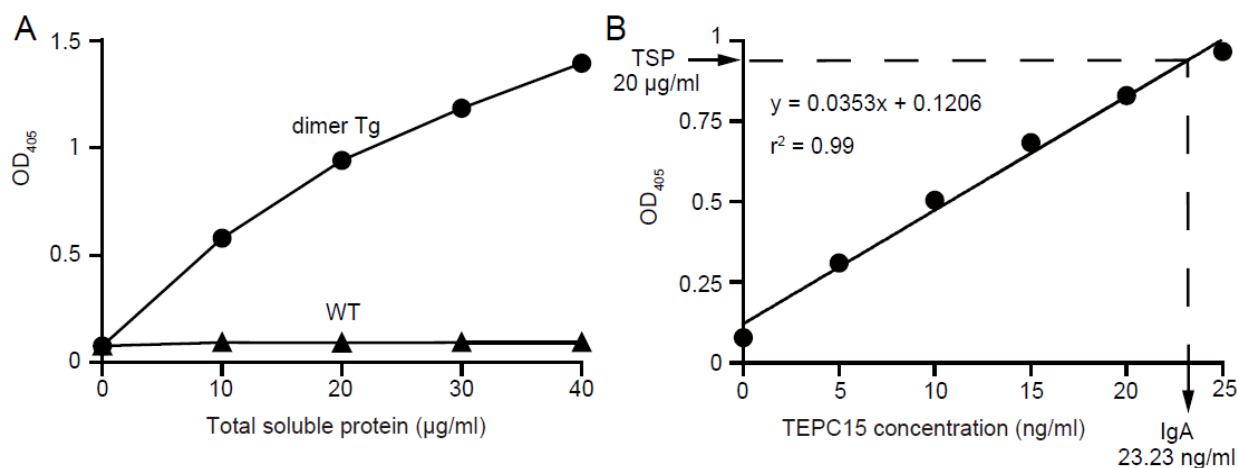


Fig. 1-8 Quantification of assembled hybrid-IgA on sandwich ELISA

(A) Hybrid-IgA in extracts of transgenic *A. thaliana* leaves, which contained the indicated amounts of total soluble protein (TSP), was captured with immobilized goat anti-mouse κ and then detected with HRP-goat anti-mouse IgA (α chain-specific). The samples were from dimer Tg plants (closed circles) or wild-type plants (closed triangles). (B) Standard curve for quantification of IgA. IgA molecules that had been captured by the immobilized goat anti-mouse κ chain were detected with HRP-goat anti-mouse IgA on ELISA. Various concentrations of purified mouse myeloma protein TEPC 15 were used to generate a standard curve. Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.

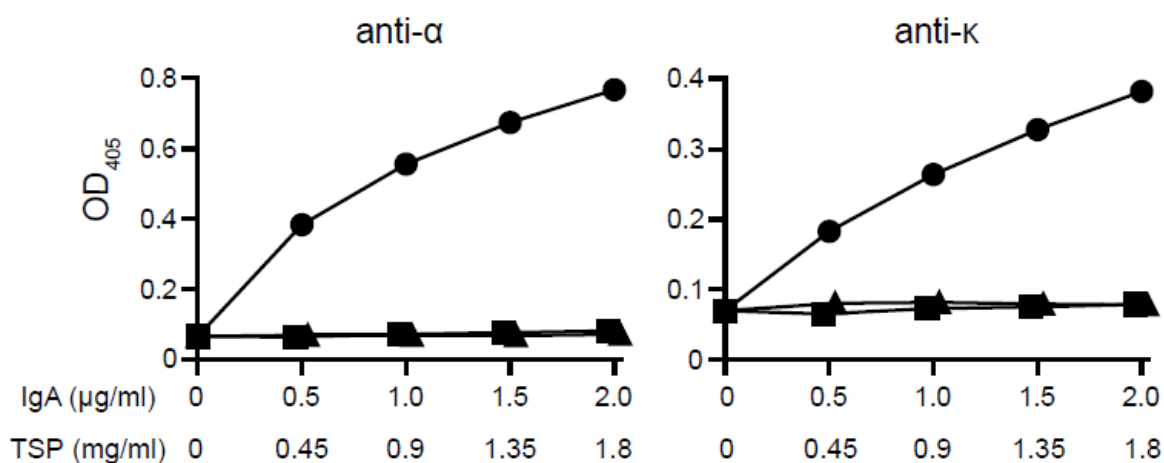


Fig. 1-9 Binding of the hybrid-IgA plantibodies to immobilized Stx1B

Extracts of dimer Tg plants (closed circles), ones of wild-type plants (closed triangles), or purified mouse IgA myeloma protein TEPC 15 (closed squares) were allowed to bind to immobilized Stx1B. The bound hybrid-IgA was detected with goat anti-mouse IgA (anti- α) or goat anti-mouse kappa (anti- κ). Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.

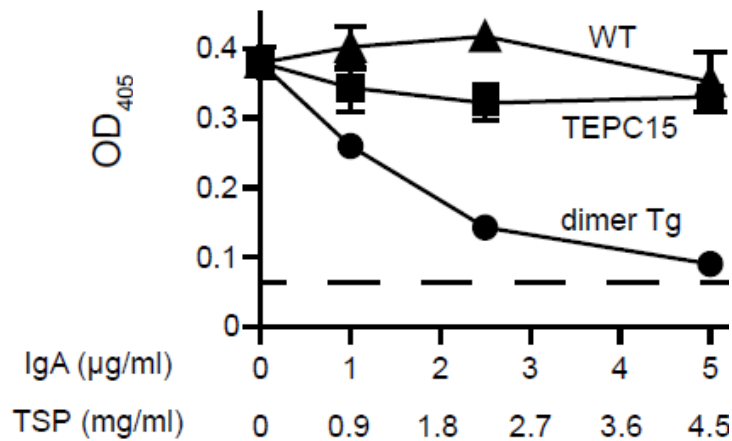


Fig. 1-10 Inhibition of the binding of DIG-Stx1B to immobilized Gb3

DIG-Stx1B was pre-treated with extracts of dimer Tg plants (closed circles), ones of wild-type plants (closed triangles), or purified mouse IgA myeloma protein TEPC 15 (closed squares), and then the mixture was incubated with immobilized Gb₃. The bound DIG-Stx1B was detected with sheep anti-DIG antibodies. The dashed line indicates the absorbance reading without DIG-Stx1B. Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.

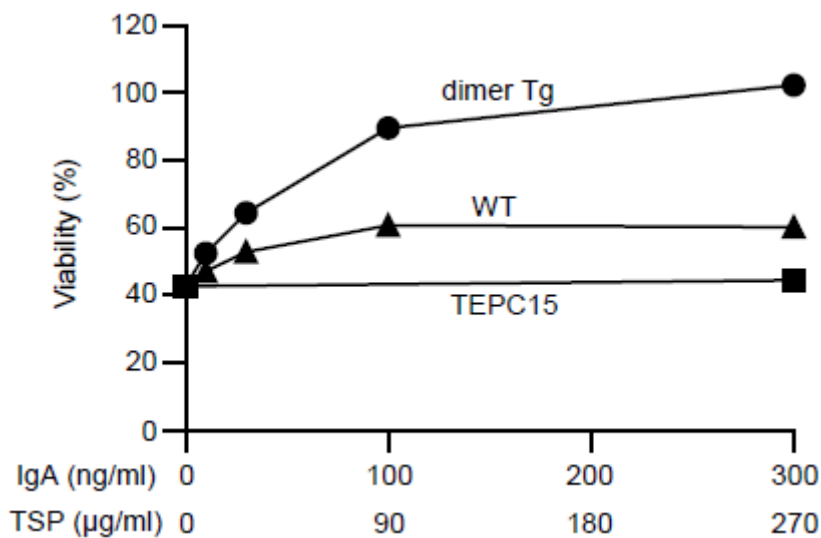


Fig. 1-11 Neutralization of Stx1 holotoxin by the plantibody

20 pg/ml of Stx1 holotoxin was pre-treated with an extract of dimer Tg plants, an extract of a wild-type plants (WT), or control IgA (TEPC 15) for 1 h, and then the mixture was added to Vero cell. After 48 hr incubation, cell viability was measured by a colorimetric cell viability assay. The IgA concentration is effective for Tg and TEPC 15, and TSP for Tg and WT. Cell viability was exhibited as a percentage of the control level (without toxin exposure). Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible.

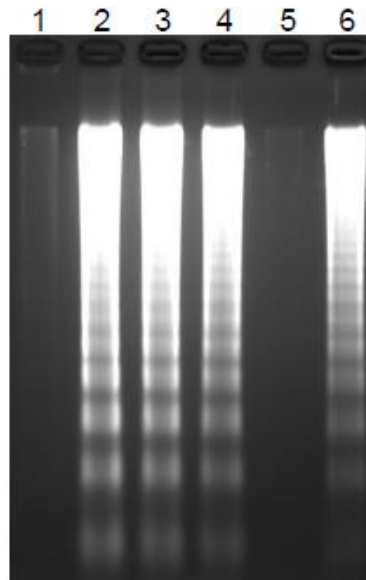


Fig. 1-12 Inhibition of Stx1-induced DNA fragmentation by plantibody

10 pg/ml of Stx1 holotoxin was pre-treated with an extract of dimer Tg plants, an extract of a wild-type plants (WT), or control IgA (TEPC 15) for 1 h, and then the mixture was added to Vero cell. After 48 hr incubation, DNA ladder formation was observed on agarose gel electrophoresis. Lane 1, untreated; lane 2, Stx1 only; lane 3, Stx1 + TEPC 15 (300 ng/ml IgA); lane 4, Stx1 + Tg (30 ng/ml IgA); lane 5, Stx1 + Tg (300 ng/ml IgA; 270 mg/ml TSP); lane 6, Stx1 + WT (270 mg/ml TSP).

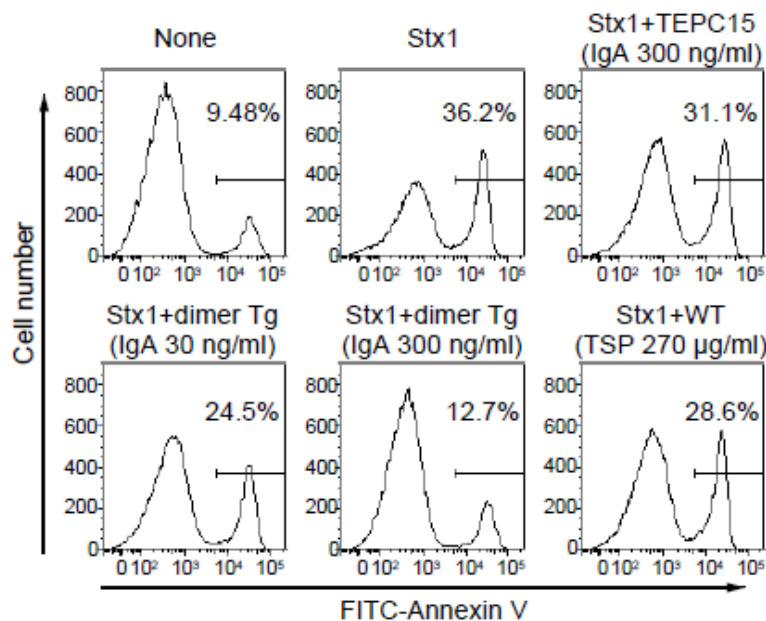


Fig. 1-13 Prevention of Stx1-induced apoptosis by plantibody

Ramos cells were cultured for 5 h in the presence of 10 pg/ml of Stx1 that had been pre-treated as indicated. The binding of FITC-annexin V revealed cell surface exposure of phosphatidylserine. The number in each graph indicates the percentage of cells labeled with annexin V. The results are representative of three experiments.

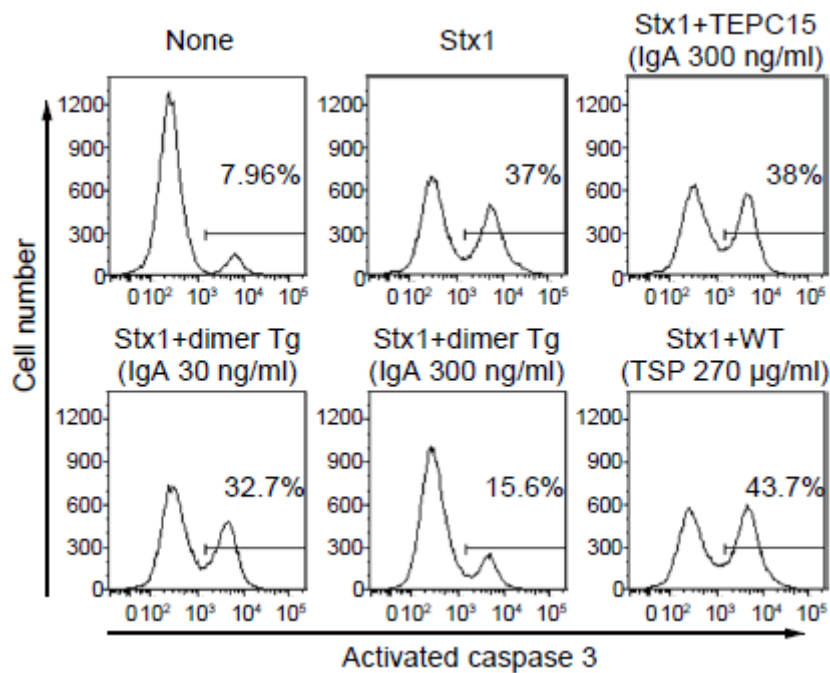


Fig. 1-14 Suppression of Stx1-caused caspase-3 activation in Ramos cell by the plantibody

Ramos cells were cultured for 5 h in the presence of 10 pg/ml of Stx1 that had been pre-treated as indicated. Activated caspase 3 was probed with FITCDEVD-FMK, and analyzed with a flow cytometer. The number in each graph indicates the percentage of cells with activated caspase 3. The results are representative of three experiments.

1-4 考察

本章では Stx1B に特異的な二量体ハイブリッド IgA を発現するシロイヌナズナを作製するために、花序浸し法によってハイブリッド IgA H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子を導入したシロイヌナズナを作製し、植物抗体の発現と性状解析を行った。

今回、ハイブリッド IgA を発現させるためのプロモーターとして CAB1、2 の発現を制御するプロモーターを利用した。このプロモーターは植物の葉においてタンパク質を高発現させるプロモーターの一つとして知られており、また、2 つの遺伝子を同時に発現させられる双方向性のプロモーターである [30]。そのため、このプロモーターを利用することでハイブリッド IgA の H 鎖、L 鎖を同時に高発現させられると考えた。今回作製したシロイヌナズナのハイブリッド IgA の発現量は葉 1 g に対して 11 µg、葉の総タンパク質の 0.11% に達し、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターなど一般的に利用されているプロモーターを用いた既報の文献のタンパク質発現量と同等レベルであった (Fig. 1-8) [31]。植物を利用した組換えタンパク質の産生は動物培養細胞を利用した場合に比べてコストが低いことが利点として知られている。実際に、ハイブリッド IgA を当研究室で産生する場合のコストをシロイヌナズナと COS-1 細胞で比較すると、1 mg の IgA を得るためのコストがシロイヌナズナが約 600 円なのに対し、COS-1 では 5 万円程となり、100 倍ほどの差となった。このコストの差は過去の文献でも報告されており、IgA を産生させる際でも植物を利用したタンパク質の産

生は動物培養細胞を用いるよりもコスト的に有利であることが示された [8, 10]。今回は用いていないが、植物において組み換えタンパク質の発現を上昇させる方法として、タンパク質に小胞体保持シグナルである KDEL 配列を付加する方法が知られており、ハイブリッド IgA の遺伝子にもこの配列を付加して発現量を増加させることで、より低コストでのハイブリッド IgA の産生が期待できる [32]。これらの結果から、CAB プロモーターは抗体のような 2 分子のタンパク質複合体を植物で産生させるのに有効なプロモーターであることが示唆された。

本章では、二量体ハイブリッド IgA を発現させることを目的としてシロイヌナズナに H 鎖、L 鎖、J 鎖の遺伝子を導入し、遺伝子組み換え植物を作製したが、発現したハイブリッド IgA を非還元条件で Western Blot により解析したところ、二量体以外の形の抗体も発現していることが示唆された (Fig. 1-7A)。また、還元条件での解析から H 鎖の分子量よりも小さいタンパク質が検出された (Fig. 1-7B)。これらのタンパク質が存在する理由としては、一つは植物細胞内でのタンパク質の分解が考えられる。これまでに、タバコにおいて発現させた IgA 抗体が液胞やアポプラストでプロテアーゼによる分解を受けていることが報告されており、シロイヌナズナでも同様の現象が起きていることが考えられる [33, 34]。また、別の可能性としては植物と動物のコドン利用率の違いから不完全な抗体が産生されている可能性が考えられる。異種タンパク質発現において、種間での縮重したコドンの利用率の違いが、翻訳の際のフレームシフトや終止コドン以外での翻訳停止、翻訳速度の低下によるタンパク質のミスホールディングの原因になることが示唆されている [35-37]。実際、今回用いたハイブリッド IgA の H 鎖遺伝子を見てみても、ロイシンをコードするコドンの内 58.5% が CTG を利用しており、H 鎖遺伝子全体を見ても 477 アミノ酸の内、26 アミノ酸は CTG になっている。一方、シロイヌナズナのゲノムにおいてはロイシンをコードするコドンの内 CTG の利用率は 10.5% であり、ゲノム全体を見ても 1,000 アミノ酸に 9.8 アミノ酸の割合でしか利用されていないため、このようなコドンが抗体遺伝子の翻訳を妨害している可能性も考えられる。ハイブリッド IgA を植物でより効率的に産生させるためにはこれらの問題を解決する必要があるかもしれない。

シロイヌナズナで発現させた植物抗体の活性を検討するために固相化した Stx1B を用いた ELISA により、抗原への結合性を測定したところ、Stx1B への濃度依存的な結合が見られた (Fig. 1-9)。また、DIG-Stx1B を植物抗体で前処理したところ、植物抗体の濃度依存的に DIG-Stx1B の固相化した Gb₃ への結合が阻害された (Fig. 1-10)。植物抗体による DIG-Stx1B の Gb₃ への結合の結合阻害曲線は、植物抗体の Stx1B への濃度反応曲線とよく逆相関していた。これらの結果から、植物抗体は Stx1B に結合することで Stx1B の Gb₃ への結合を阻害していることが示された。

次に、植物抗体が Stx1 の細胞毒性を中和できるかどうかを Stx1 に感受性の 2 種の細胞株、Vero 細胞と Ramos 細胞を用いて検討した。Vero 細胞や Ramos 細胞は細胞膜上に Gb₃ を発現しており、この Gb₃ を介して Stx1 が細胞内へ取り込まれアポトーシスを誘導する。Stx1 処理により、Vero 細胞や Ramos 細胞のアポトーシスが誘導されたが、Stx1 を植物抗体で前処理することでアポトーシスが抑制された (Fig. 1-11~14)。植物抗体が DIG-Stx1B の Gb₃ への結合を阻害することから、植物抗体による Stx1 の細胞毒性の中和効果は、植物抗体が Stx1B に結合することで、Stx1 が標的細胞上の Gb₃ と結合できなくなり、細胞内へ侵入できなくなることによると考えられる。

以上より、本章では、花序浸し法を用いて **Stx1B** 特異的な二量体ハイブリッド **IgA** を発現するシロイヌナズナを作製し、発現した植物抗体が **Stx1B** への結合性を保持していることを確認した。そして、発現した植物抗体が *in vitro* において **Stx1** の細胞毒性を中和できることを明らかにした。得られた二量体ハイブリッド **IgA** 発現シロイヌナズナを **SC** 発現シロイヌナズナと交配させることで **Stx1B** 特異的な **SIgA** を発現するシロイヌナズナの作製が可能であると考えられる。また、得られた植物抗体を用いて、動物細胞で発現させた抗体との比較研究や植物抗体の機能や構造についての更なる研究を行うことが可能となった。

第2章 Stx1B に対する分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製

2-1 目的

IgA は消化管のような粘膜組織に主に存在する抗体のクラスであり、粘膜からの病原性微生物や毒素の侵入を防いでいる。粘膜上の IgA は 2 分子が J 鎖を介して二量体を形成し、更に二量体 IgA の粘膜への輸送にかかわるタンパク質 poly-Ig Receptor (pIgR) の細胞外領域である SC が結合した SIgA として存在している [2]。SC が結合することで消化酵素による分解への抵抗性、粘膜上皮への滞留性の向上といった機能を獲得し、粘膜組織で十分に働くことができる [3-5]。Stx1 のような毒素や病原体に特異的な SIgA を作製できれば、粘膜組織上で異物を排除でき、毒素や病原体の生体内への侵入を防ぐことのできる抗体医薬品としての利用が期待できる。

本章では、第 1 章で用いた Stx1B に特異的なハイブリッド IgA の H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子に加えて、SC 遺伝子も植物に導入することで、分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナを作製した。J 鎖、SC の発現にも CAB プロモーターを利用して Jc-SC 発現カセットを作製した (Fig. 2-1)。そして、ハイブリッド IgA 発現カセットと共に一つのバイナリーベクターへ導入し、分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターを作製した。そして、アグロバクテリウム法によりモデル植物であるシロイヌナズナに遺伝子を導入することで分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナを作製し、発現した IgA の性状解析を行った。

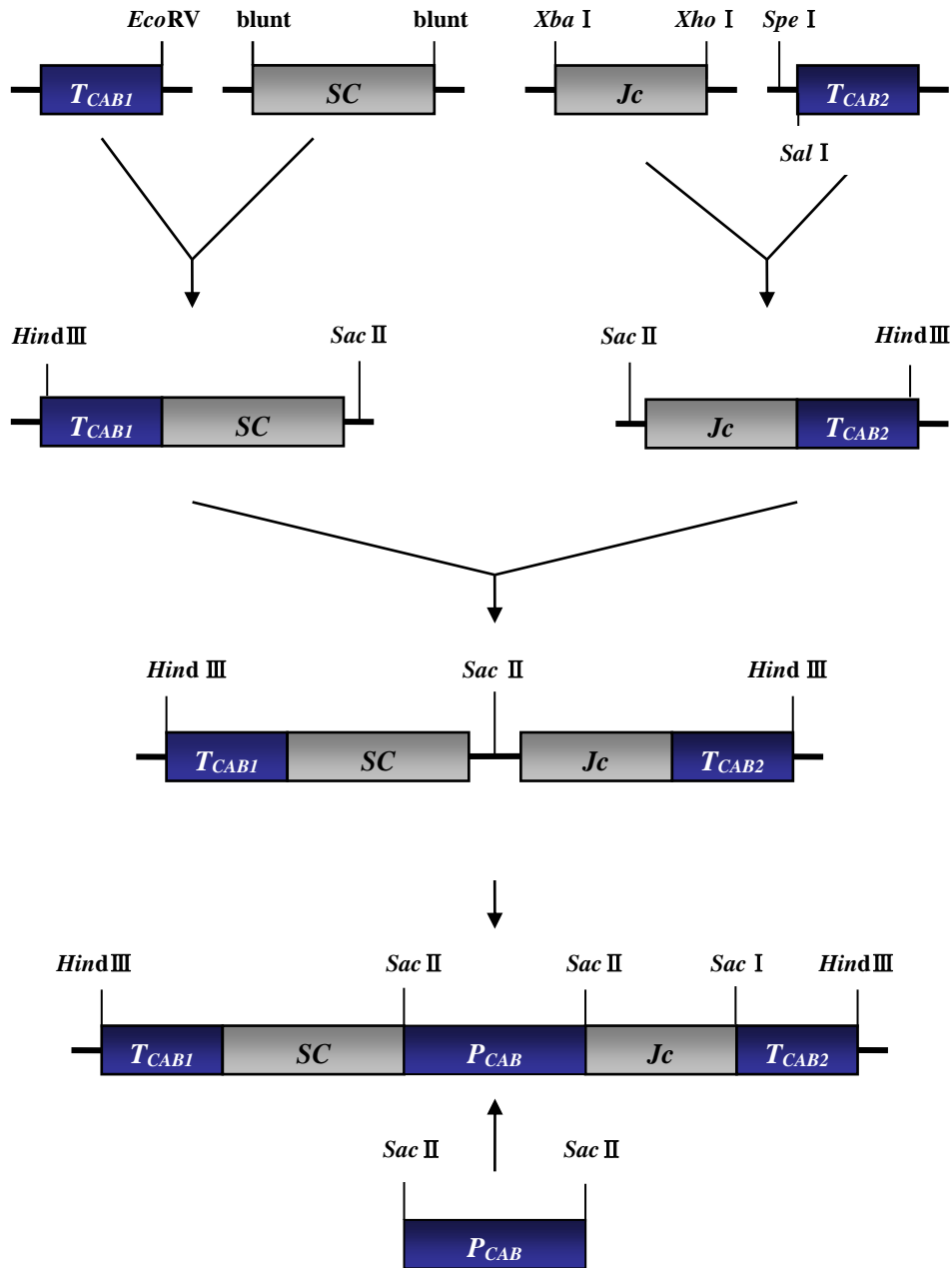


Fig. 2-1 Construction of Jc-SC expression cassette

2-2 材料および方法

2-2-1 材料

Vector

pcDNA3.1/Jc14	[27]
pcDNA3.1/SC	[38]
pGEM3zf/hybrid-IgA expression cassette	(第1章で作製)
pGEM5zf/P _{CAB1}	(第1章で作製)
pGEM5zf/T _{CAB1}	[28]
pGEM5zf/T _{CAB2}	[28]
pUC19	(タカラバイオ)

試薬

Acetic acid	(和光純薬工業)
<i>EcoR</i> V	(タカラバイオ)
10 × H buffer	
Mung Bean Nuclease	(タカラバイオ)
10 × Mung Bean Nuclease buffer	
Goat anti-mouse pIgR	(R&D Systems)
<i>Sac</i> I	(ニッポン・ジーン)
10 × L buffer	
<i>Sal</i> I	(タカラバイオ)
10 × H buffer	
<i>Sma</i> I	(タカラバイオ)
10 × T buffer	
0.1% BSA	
Sodium acetate	(和光純薬工業)
<i>Spe</i> I	(ニッポン・ジーン)
10 × M buffer	
<i>Xba</i> I	(ニッポン・ジーン)
10 × M buffer	
<i>Xho</i> I	(タカラバイオ)
10 × H buffer	

Primers

Gene	Name of primers	DNA sequence
CAB terminator	Hc-T1-PG rv	5'-GATGACTCTTCAGTTAAGC-3'
CAB terminator	Lc-T2-PG rv	5'-GCTAACATCCGAGAATC-3'
CAB promoter	P2-LcF	5'-AAACGCTTGGCTGCAAT-3'
35S promoter	35S-prom	5'-GGAAGTTCATTTTCATTTGGAG-3'
IgG L chain	IgAlcckr	5'-GTTGATGTCTTGTGAGTGGCC-3'
J chain	JCF15	5'-TCTTTCTAGAGTGAAGACAAGA-3'
SC	pIgR (seq) 2-R	5'-TTATTAGGAAAGGACAGTGG-3'
SC	SCF-Xho	5'-CCTCTCGAGTCTCTTTAGTTGGCAAAGGC-3'
SC	SCR-Xba	5'-CTTAATCTAGACAAGCAATGAGGCTCTACT-3'

タンパク質抽出 buffer 2

50 mM	Acetate buffer (pH 5.0)
0.5 M	NaCl
0.5 mM	EDTA
0.17%	Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts
溶媒	MilliQ water

その他の材料は 1-2-1 を参照

2-2-2 分泌型ハイブリッド IgA 発現用バイナリーベクターの作製

2-2-2-1 pcDNA3.1/Jc14 の制限酵素処理

pcDNA3.1/Jc14 を制限酵素 *Xba* I と *Xho* I で処理した。まず、4 µg の DNA サンプルに 10 × M buffer 3 µl、制限酵素 *Xba* I (20 U/µl) 0.5 µl、*Xho* I (10 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 30 µl とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。制限酵素反応液 18 µl と 10 × Loading Buffer 2 µl を混合し、1.0% アガロース (SeaKem GTG agarose) にて TAE バッファー中で 100 V、40 min 電気泳動を行った。1 µg/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射により DNA を視覚化し、500 bp 付近の *Jc* 遺伝子のバンドを 80% ethanol で洗浄したカッターナイフとピンセットを用いて切り出し、1.5 ml チューブへ回収した。続いて MinElute Reaction Cleanup Kit を用いて回収したゲルから DNA の抽出を、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-2-2 pGEM5zf/TCAB2 の制限酵素処理

pGEM5zf/TCAB2 を制限酵素 *Spe* I と *Sal* I で処理した。まず、1 µg の DNA サンプルに 10 × H buffer 2 µl、制限酵素 *Spe* I (10 U/µl) 1 µl、*Sal* I (12 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 µl とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。精製は MinElute Reaction Cleanup Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-2-3 *Jc* 遺伝子と pGEM5zf/T_{CAB2} のライゲーション反応、形質転換

Xba I と *Xho* I で制限酵素処理した *Jc* 遺伝子と、*Spe* I と *Sal* I で制限酵素処理した pGEM5zf/T_{CAB2} のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5 α の形質転換を行い、LB/Amp へ形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、JcF15 と Lc-T2-PG rv をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Amp 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pGEM5zf/Jc-T_{CAB2} とした。

2-2-2-4 pcDNA3.1/SC の制限酵素処理

pcDNA3.1/SC を制限酵素 *Xba* I と *Xho* I で処理した。まず、4 μ g の DNA サンプルに 10 \times M buffer 2 μ l、制限酵素 *Xba* I (20 U/ μ l) 0.5 μ l、*Xho* I (10 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 μ l とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。制限酵素反応液 18 μ l と 10 \times Loading Buffer 2 μ l を混合し、1.0% アガロース (SeaKem GTG agarose) にて TAE バッファー中で 100 V、40 min 電気泳動を行った。1 μ g/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射により DNA を視覚化し、2 kbp 付近の SC 遺伝子のバンドを 80% ethanol で洗浄したカッターナイフとピンセットを用いて切り出し、1.5 ml チューブへ回収した。続いて MinElute Reaction Cleanup Kit を用いて回収したゲルから DNA の抽出を、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-2-5 SC 遺伝子の平滑化

Xba I と *Xho* I で処理した SC 遺伝子を Mung Bean Nuclease で処理し、二本鎖 DNA 末端の平滑化を行った。SC 遺伝子サンプル 10 μ l に 10 \times Mung Bean Nuclease buffer 5 μ l、Mung Bean Nuclease (30 U/ μ l) 0.5 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 50 μ l とした。37°C で 10 min インキュベーションした。精製は MinElute Reaction Cleanup Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-2-6 pGEM5zf/T_{CAB1} の制限酵素処理、脱リン酸化処理

pGEM5zf/T_{CAB1} を制限酵素 *EcoR* V で処理した。まず、1 μ g の DNA サンプルに 10 \times H buffer 2 μ l、制限酵素 *EcoR* V (15 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 μ l とした。37°C で 3 h インキュベーションした。精製は MinElute Reaction Cleanup Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。精製した DNA サンプルについて、1-2-2-5 と同様の方法で脱リン酸化処理を行い、MinElute Reaction Cleanup Kit で精製した。

2-2-2-7 SC 遺伝子と pGEM5zf/T_{CAB1} のライゲーション反応、形質転換

Xba I と *Xho* I で制限酵素処理し、平滑化した SC 遺伝子と、*EcoR* V で制限酵素処理し、脱リン酸化した pGEM5zf/T_{CAB1} のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と

同様の方法で *E. coli* DH5 α の形質転換を行い、LB/Amp へ形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、pIgR (seq) 2-R と Hc-T1-PG rv をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Amp 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pGEM5zf/SC-T_{CAB1} とした。

2-2-2-8 pGEM5zf/Jc-T_{CAB2}、pGEM5zf/SC-T_{CAB1} の制限酵素処理

pGEM5zf/Jc-T_{CAB2}、pGEM5zf/SC-T_{CAB1} をそれぞれ制限酵素 *Hind*III と *Sac* II で処理した。pGEM5zf/Jc-T_{CAB2} は 4 μ g の DNA サンプルに 10 \times M buffer 2 μ l、制限酵素 *Hind*III (20 U/ μ l) 1 μ l、*Sac* II (15 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 μ l とした。pGEM5zf/SC-T_{CAB1} は 4 μ g の DNA サンプルに 10 \times M buffer 5 μ l、制限酵素 *Hind*III (20 U/ μ l) 1 μ l、*Sac* II (15 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 50 μ l とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。制限酵素反応液を 1.0% アガロース (SeaKem GTG agarose) にて TAE バッファー中で 100 V、40 min 電気泳動を行った。1 μ g/ml EtBr 中で 15 min 振とうした後、UV 照射により DNA を視覚化し、目的の分子量のバンドを 80% ethanol で洗浄したカッターナイフとピンセットを用いて切り出し、1.5 ml チューブへ回収した。続いて MinElute Reaction Cleanup Kit を用いて回収したゲルから DNA の抽出を、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-2-9 pUC19 の制限酵素処理、脱リン酸化処理

pUC19 を制限酵素 *Hind*III で処理した。2 μ g の DNA サンプルに 10 \times M buffer 2 μ l、制限酵素 *Hind*III (20 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 μ l とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。精製は MinElute Reaction Cleanup Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。精製した DNA サンプルについて、1-2-2-5 と同様の方法で脱リン酸化処理を行い、MinElute Reaction Cleanup Kit で精製した。

2-2-2-10 Jc-T_{CAB2}、SC-T_{CAB1}、pUC19 の 3 ピースライゲーション反応、形質転換

2-2-2-8、2-2-2-9 で作製した、Jc-T_{CAB2}、SC-T_{CAB1}、pUC19 の 3 つの DNA フラグメントを用いた 3 ピースライゲーション反応を行った。Jc-T_{CAB2}、SC-T_{CAB1}、pUC19 のモル比が 5:5:1 となるよう、Jc-T_{CAB2}、SC-T_{CAB1}、pUC19 を混合し、DNase free MilliQ 水で 10 μ l にメスアップした後、Ligation Mix 10 μ l を混合し、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5 α の形質転換を行い、LB/Amp へ形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、Lc-T2-PG rv と Hc-T1-PG rv をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Amp 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pUC19/T_{CAB2}-Jc-SC-T_{CAB1} とした。

2-2-2-11 pUC19/T_{CAB2}-Jc-SC-T_{CAB1} の制限酵素処理、脱リン酸化処理

pUC19/T_{CAB2}-Jc-SC-T_{CAB1} を制限酵素 *Sac* II で処理した。反応液の調製は 1-2-2-4 と同様に行い、37°C で 3 hr インキュベーションした。QIAquick Gel Extraction Kit を用いて、Kit 添付の酵素反応液の精製方法のプロトコールに従って、*Sac* II 反応液を精製した。精製した DNA サンプルについて、1-2-2-5 と同様の方法で脱リン酸化処理を行い、QIAquick Gel Extraction Kit で精製した。

2-2-2-12 P_{CAB} と pUC19/T_{CAB2}-Jc-SC-T_{CAB1} のライゲーション反応、形質転換

1-2-2-9 で制限酵素処理した P_{CAB} 遺伝子と、2-2-2-11 で制限酵素処理、脱リン酸化した pUC19/T_{CAB2}-Jc-SC-T_{CAB1} のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5 α の形質転換を行い、LB/Amp へ形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、P2-LcF と JCR をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Amp 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pUC19/Jc-SC expression cassette とした。

2-2-2-13 T_{CAB2} のライゲーション反应用サンプルの調製

4 μ g の pGEM5zf/T_{CAB2} に 10 \times M buffer 5 μ l、制限酵素 *Hind*III (20 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 50 μ l とした。37°C で 3 hr インキュベーションした。精製は QIAquick Gel Extraction Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。精製した DNA サンプルについて、2-2-2-5 と同様の方法で平滑化処理を行い、MinElute Reaction Cleanup Kit で精製した。精製したサンプル 8 μ l、10 \times L buffer 2 μ l、制限酵素 *Sac* I (10 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 μ l とした。37°C で 3 h インキュベーションした後、MinElute Reaction Cleanup Kit で精製した。

2-2-2-14 pBCH1 の制限酵素処理

pBCH1 を制限酵素 *Sma* I、*Sac* I で処理した。2 μ g の DNA サンプルに 10 \times T buffer 5 μ l、0.1% BSA 5 μ l、制限酵素 *Sac* I (10 U/ μ l) 1 μ l、*Sma* I (10 U/ μ l) 1 μ l、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 50 μ l とした。30°C で 3 hr インキュベーションした。精製は QIAquick Gel Extraction Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-2-15 T_{CAB2} と pBCH1 のライゲーション反応、形質転換

2-2-2-13 で調製した T_{CAB2} と、*Sma* I、*Sac* I で制限酵素処理した pBCH1 のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5 α の形質転換を行い、LB/Km へ形質転換した菌液を 50 μ l 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、35S-prom と Lc-T2-PG rv をプライマーに用いて、コロニーPCR によ

りインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pBCH1/T_{CAB2} とした。

2-2-2-16 pBCH1/Jc-SC expression cassette の作製

pUC19/Jc-SC expression cassette と pBCH1/T_{CAB2} を制限酵素 *Hind*III、*Sac* I で処理した。pUC19/Jc-SC expression cassette は 2 µg の DNA サンプルに 10 × M buffer 2 µl、制限酵素 *Hind* III (20 U/µl) 1 µl、*Sac* I (10 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 20 µl とした。pBCH1/T_{CAB2} は 2 µg の DNA サンプルに 10 × M buffer 5 µl、制限酵素 *Hind*III (20 U/µl) 1 µl、*Sac* I (10 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 50 µl とした。37°C で 2 hr インキュベーションした後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製した。精製した 2 種類の DNA サンプルを用いてライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で 30 min インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5α の形質転換を行い、LB/Km へ形質転換した菌液を 50 µl 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、P2-LcF と Lc-T2-PG_{rv} をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pBCH1/Jc-SC expression cassette とした。

2-2-2-17 pBCH1/Jc-SC expression cassette の制限酵素処理、脱リン酸化処理

pBCH1/Jc-SC expression cassette を制限酵素 *Hind*III で処理した。3 µg の DNA サンプルに 10 × M buffer 5 µl、制限酵素 *Hind*III (20 U/µl) 1 µl、DNase free MilliQ 水を加え、全量を 50 µl とした。37°C で 2 hr インキュベーションした。精製は QIAquick Gel Extraction Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。精製した DNA サンプルについて、1-2-2-5 と同様の方法で脱リン酸化処理を行い、QIAquick Gel Extraction Kit で精製した。

2-2-2-18 hybrid-IgA expression cassette と pBCH1/Jc-SC expression cassette のライゲーション反応、形質転換

1-2-2-12 で制限酵素処理した hybrid-IgA expression cassette と、2-2-2-17 で制限酵素処理、脱リン酸化した pBCH1/Jc-SC expression cassette のライゲーション反応を行った。反応液の調製は 1-2-2-6 と同様に行い、16°C で一晩インキュベーションした。ライゲーション反応液を用いて 1-2-2-7 と同様の方法で *E. coli* DH5α の形質転換を行い、LB/Km へ形質転換した菌液を 50 µl 塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、得られたコロニーをテンプレートとして、IgGk *Not*I と IgAlcrrkR をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、37°C にて一晩振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って培養した菌液からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを pBCH1/Secretory hybrid-IgA とした。

2-2-3 分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製

2-2-3-1 *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 の形質転換

1-2-3-1 と同様に、エレクトロポレーション法を用いて pBCH1/Secretory hybrid-IgA を *A. tumefaciens* GV 3101 へ導入した。遺伝子導入した菌液を LB/Km プレートに 50 μ l 塗布し、28°C で 3 日間培養した。3 日後、得られたコロニーをテンプレートとして、P2-LcF と Lc-T2-PG rv をプライマーに用いて、コロニーPCR によりインサートの有無を確認した。インサートを含んでいたコロニーは LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、28°C にて一晩振とう培養した。

2-2-3-2 花序浸し法によるシロイヌナズナへの H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の導入、選抜

2-2-3-1 で形質転換した *A. tumefaciens* を用いて、1-2-3-2 と同様の方法でシロイヌナズナの形質転換を行った。また、MS/Hyg を用いて 1-2-3-3 と同様の方法で、形質転換体の選抜を行った。

2-2-3-3 PCR による H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の検出

2-2-3-2 で得られた個体への H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の導入を 1-2-4-1 と同様の方法で PCR により確認した。プライマーとして H 鎖には IgG Heavy *Not*F と IgA-H/*Not*R、L 鎖には IgGk *Not*F と IgGk *Not*R、J 鎖には JCF15 と JCR、SC 遺伝子には SCF-Xho と SCR-Xba をプライマーとして使用した。

2-2-3-4 免疫染色による H 鎖、SC タンパク質の検出

2-2-3-2 で得られた個体から葉を採取し、1-2-4-4 と同様の方法で免疫染色を行った。SC の検出には、一次抗体として 0.3% BSA-PBS で 1 μ g/ml に調製した Goat anti-mouse pIgR を、二次抗体には 0.3% BSA-PBS で 1 μ g/ml に調製した Rabbit anti-goat IgG-AP を使用した。

2-2-3-5 タンパク質抽出

2-2-3-2 で得られた個体から葉を採取し、乳鉢へ入れ、液体窒素を加えて凍結させた後、乳棒ですり潰した。タンパク質抽出 buffer 2 を加えて懸濁した後、1.5 ml チューブに移し、氷上で 1 hr 静置した。4°C、21,500 \times g で 10 min 遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブへ回収後、上清の体積の 10 分の 1 量の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加し、Acetate buffer を中和した。4°C、21,500 \times g で 10 min 遠心し、上清をサンプルとして回収した。サンプルのタンパク質濃度の測定は 1-2-4-5 と同様の方法で BCA Protein Assay Kit を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

2-2-3-6 Western Blotting による分泌型ハイブリッド IgA の検出

2-2-3-5 で抽出したタンパク質を用いて 1-2-4-6 と同様の方法で western blot による分泌型ハイブリッド IgA の検出を行った。検出抗体には H 鎖の検出に Can Get Signal solution 2 で 500 倍に希釈した HRP-Goat anti-mouse IgA を使用し、SC の検出には 1 次抗体に Goat anti-mouse pIgR を Can Get Signal solution 1 で 1 μ g/ml に調製し、2 次抗体に HRP-donkey anti-goat IgG を

Can Get Signal solution 2 で 0.4 $\mu\text{g/ml}$ に調製して使用した。

2-2-3-7 Sandwich ELISA によるハイブリッド IgA 抗体の検出

2-2-3-5 で抽出したタンパク質を用いて 1-2-4-7 と同様の方法で sandwich ELISA を行い、発現したハイブリッド IgA の量を定量した。

2-2-4 分泌型ハイブリッド IgA の性状解析

2-2-4-1 ELISA による分泌型ハイブリッド IgA の Stx1B への結合性の確認

2-2-3-5 で抽出したタンパク質を用いて、1-2-5-1 と同様の方法で固相化した Stx1B を用いた ELISA を行い、発現した分泌型ハイブリッド IgA の Stx1B への結合性を確認した。H 鎖の検出には 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 1,000 倍に希釈した HRP-goat anti-mouse IgA を使用し、L 鎖の検出には 1 次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 1 $\mu\text{g/ml}$ に調製した Goat anti-mouse kappa、2 次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に調製した HRP-donkey anti-goat IgG を使用し、SC の検出には 1 次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に調製した Goat anti-mouse pIgR、2 次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に調製した HRP-donkey anti-goat IgG を使用した。サンプルについては、IgA 量として 0.1、0.3、1.0 $\mu\text{g/ml}$ (総タンパク質量として 0.09、0.27、0.9 mg/ml) となるように調製した。

2-2-4-2 MTT 法を用いたハイブリッド IgA による Stx1 細胞毒性の中和効果の検討

2-2-3-2 で作製したシロイヌナズナから産生された植物抗体が Stx1 の細胞毒性を中和できるかどうかを、1-2-5-3 と同様の方法で MTT 法により検討した。粗精製 Stx1 は最終濃度 10 pg/ml になるように、ハイブリッド IgA は最終濃度 100 ng/ml になるように混合して使用した。

2-3 実験結果

2-3-1 分泌型ハイブリッド IgA 発現植物の作製

本章ではアグロバクテリウム法を用いて分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナの作製を行った。本章では、 P_{CAB} 、 T_{CAB1} 、 T_{CAB2} を使用した Jc-SC 発現カセットを作製して、第 1 章で作製したハイブリッド IgA 発現カセットと共に、同一のバイナリーベクターに組み込むことで分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターを構築した (Fig. 2-2)。作製したベクターを用いて花序浸し法によりシロイヌナズナの形質転換を行い、Hygromycin B による選抜を行ったところ、薬剤に耐性の個体を 12 個体得た。得られた 12 個体から DNA を抽出し、J 鎖遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR により解析した結果、8 個体で遺伝子が挿入されていることを確認した。また、Hygromycin B 耐性の 12 個体から抽出したタンパク質を、抗 L 鎖抗体と抗 H 鎖抗体を用いた sandwich ELISA により解析したところ、遺伝子の挿入が確認された 8 個体でハイブリッド IgA の発現が確認された。そのなかで IgA の発現が最も高かった個体について更に詳細な解析を進めることにした。H 鎖、L 鎖、J 鎖と SC にそれぞれ特異的なプライマーを用いて PCR により解析したところ、形質転換体 (Secretory Tg) でのみ H 鎖、L 鎖、

J鎖、SC遺伝子の増幅が見られ、これらの遺伝子の導入が確認された (Fig. 2-3)。

2-3-2 分泌型ハイブリッド IgA の発現解析

Secretory Tg と WT の葉、茎から凍結切片を作製し、抗 H 鎖抗体、抗 SC 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Secretory Tg でのみ H 鎖、SC にそれぞれに特異的な染色が見られ、Secretory Tg の葉、茎で抗体が発現していることが確認できた (Fig. 2-4)。葉では組織全体で同程度の染色が見られたが、茎では皮層と維管束で特に強い染色が見られた。Secretory Tg の葉からタンパク質を抽出し、抗 H 鎖、抗 SC 鎖抗体を用いて非還元条件で Western Blot を行い、高分子量側に分泌型ハイブリッド IgA と思われるバンドが検出され、分泌型ハイブリッド IgA 発現を確認した (Fig. 2-5)。発現した分泌型ハイブリッド IgA の分子量はコントロールとして用いたマウス唾液中の分泌型 IgA より低かった。また、その他にも遊離型の SC や H 鎖の二量体、H 鎖単量体や分解物と思われるバンドなど複数のバンドが確認された。Secretory Tg から抽出したタンパク質中のハイブリッド IgA 量をキャプチャー抗体に抗 L 鎖抗体を、検出抗体に抗 H 鎖抗体を用いて sandwich ELISA で確認したところ、Secretory Tg のハイブリッド IgA 発現量は総タンパク質量の 0.063%、葉 1 g 辺り 13.9 μg であった (Fig. 2-6)。これらの結果から、Secretory Tg でハイブリッド IgA が発現し、分泌型として構築されていることを確認した。

2-3-3 分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体による Stx1 の細胞毒性の中和効果

発現した植物抗体の Stx1B への結合性を確認するため、Stx1B を固相化して ELISA を行った。抗 H 鎖抗体、抗 L 鎖抗体のどちらで検出した場合においても、植物抗体の濃度依存的な吸光度の上昇が見られ、植物抗体が Stx1B と結合できることを確認した (Fig. 2-7)。WT や TEPC15 では吸光度の上昇が見られなかった。また、抗 SC 抗体を用いた検出でも植物抗体の濃度依存的な吸光度の上昇が見られ、分泌型の植物抗体が Stx1B と結合できることを確認した。抗 SC 抗体を用いた ELISA では、WT や TEPC15 に加えて dimer Tg で発現させた植物抗体においても吸光度の上昇は見られなかった。次に、Vero 細胞を用いて植物抗体の Stx1 に対する細胞毒性の中和効果を検討した。10 pg/ml の Stx1 を 48 hr 処理したことで 30% の Vero 細胞が細胞死を起こしたが、Stx1 を 100 ng/ml の植物抗体で前処理しておくことで細胞死は完全に抑制された (Fig. 2-8)。一方で、TEPC15 や WT のタンパク質抽出物ではこのような効果は見られなかった。これらの結果より、発現した植物抗体が Stx1B と結合し、Stx1 による Vero 細胞の細胞死を抑制できることを明らかにした。

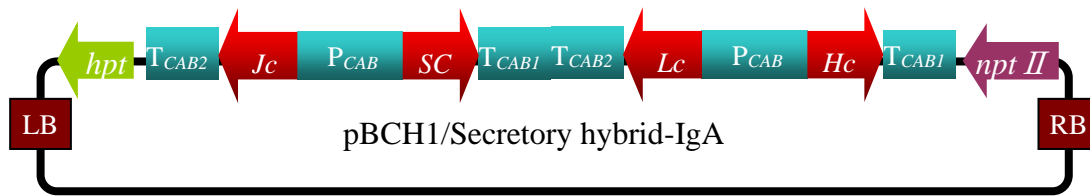


Fig. 2-2 Construction of binary vector pBCH1/Secretory hybrid-IgA

LB; left border of T-DNA

hpt; hygromycin phosphotransferase (hygromycin resistance gene)

T_{CAB1} and T_{CAB2} , chlorophyll *a/b*-binding protein terminators

Jc; immunoglobulin *Joining chain* gene

P_{CAB} , chlorophyll *a/b*-binding protein promoter

SC; *secretory component* gene

Lc; *hybrid-IgA light chain* gene

Hc; *hybrid-IgA heavy chain* gene

npt II; neomycin phosphotransferase (kanamycin resistance gene)

RB; right border of T-DNA

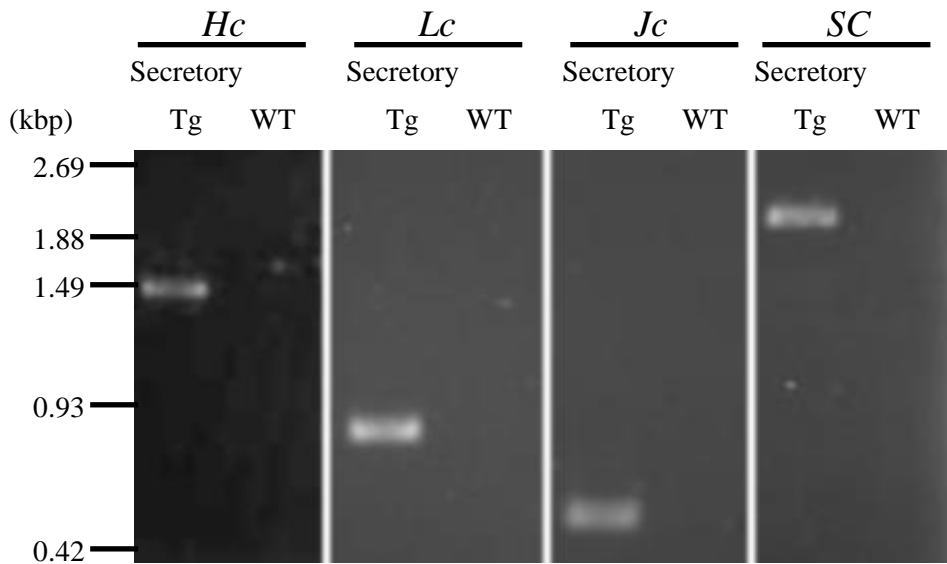


Fig. 2-3 Incorporation of the secretory hybrid-IgA transgene into the genome of *A. thaliana*

Genomic DNAs were extracted from transgenic (Secretory Tg) and wild type (WT) *A. thaliana*. And then, secretory hybrid-IgA genes were amplified by PCR using gene specific primers.

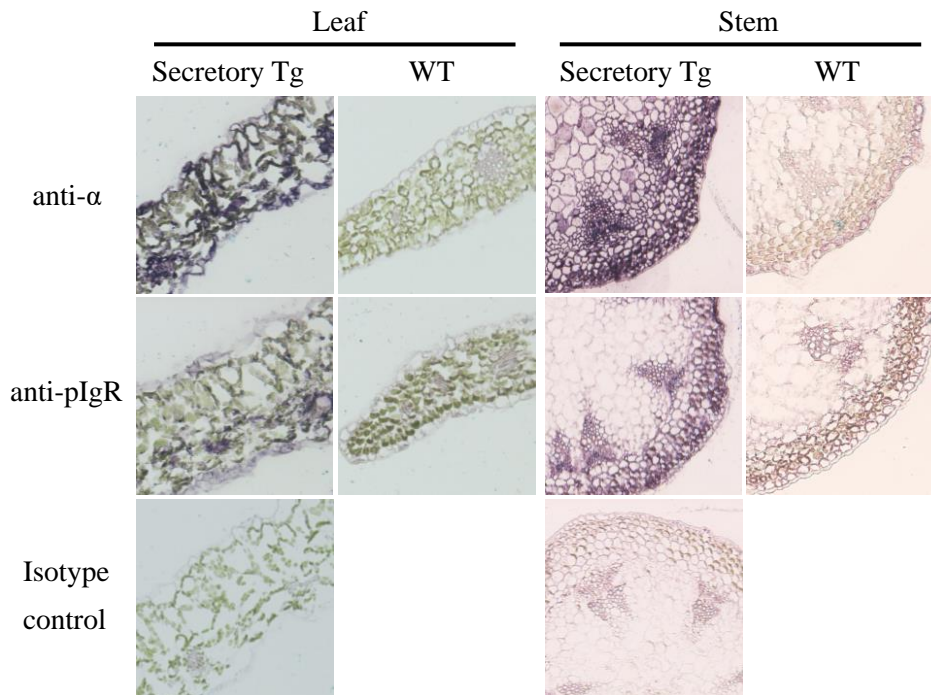


Fig. 2-4 Immunohistochemical analysis of leaf and stem tissue sections

Frozen 10 μm sections of leaf and stem tissue were stained with goat anti-mouse IgA (anti- α), goat anti-mouse pIgR (anti-pIgR) or an irrelevant goat IgG (isotype control). Bars represent 100 μm .

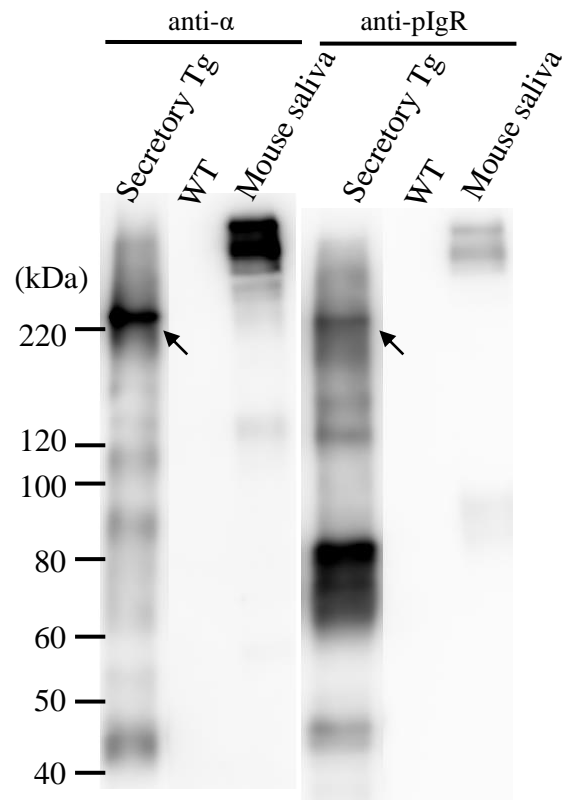


Fig. 2-5 Western blot analysis of proteins extracted from leaves of transgenic *A. thaliana*

Total protein extracts of leaves were separated by SDS-PAGE under non-reducing conditions (7.5% gel; 10 µg protein/lane), and then blotted onto a PVDF membrane. Each immunoglobulin chain of the hybrid-IgA was detected with goat anti-mouse IgA (anti-α) and goat anti-mouse pIgR (anti-pIgR) antibodies. Arrows indicate assembled secretory hybrid-IgA. The positions of molecular weight standards are shown on the left in kDa.

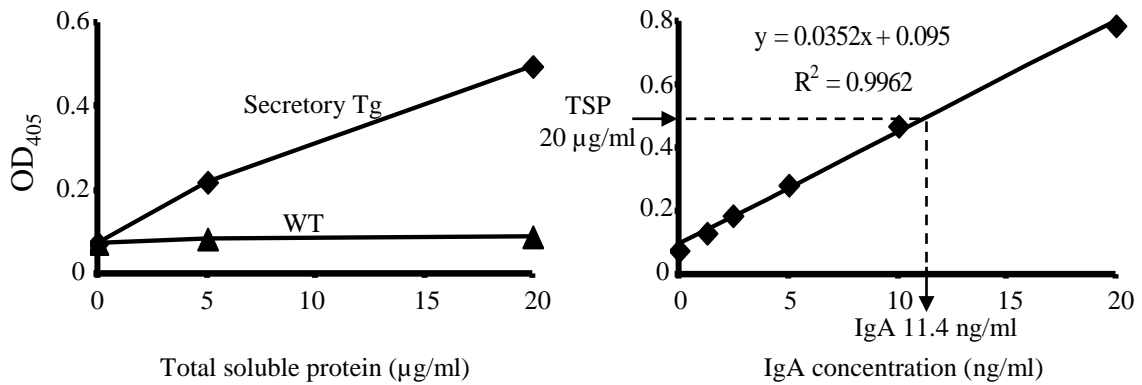


Fig. 2-6 Quantification of assembled hybrid-IgA on sandwich ELISA

(A) Hybrid-IgA in extracts of transgenic *A. thaliana* leaves, which contained the indicated amounts of total soluble protein (TSP), was captured with immobilized goat anti-mouse κ and then detected with HRP-goat anti-mouse IgA (α chain-specific). The samples were from Secretory Tg plants (closed diamonds) or wild-type plants (closed triangles). (B) Standard curve for quantification of IgA. IgA molecules that had been captured by the immobilized goat anti-mouse κ chain were detected with HRP-goat anti-mouse IgA on ELISA. Various concentrations of purified mouse myeloma protein TEPC 15 were used to generate a standard curve. Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.

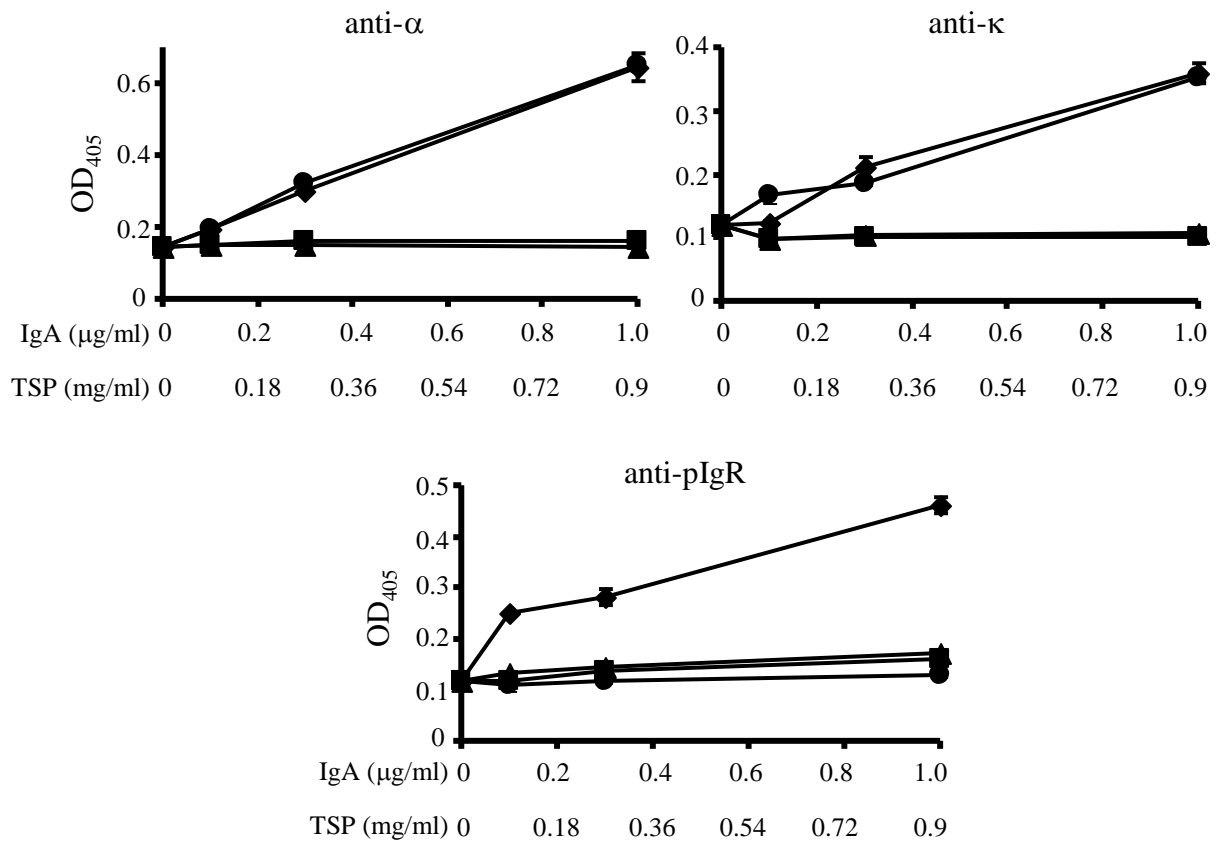
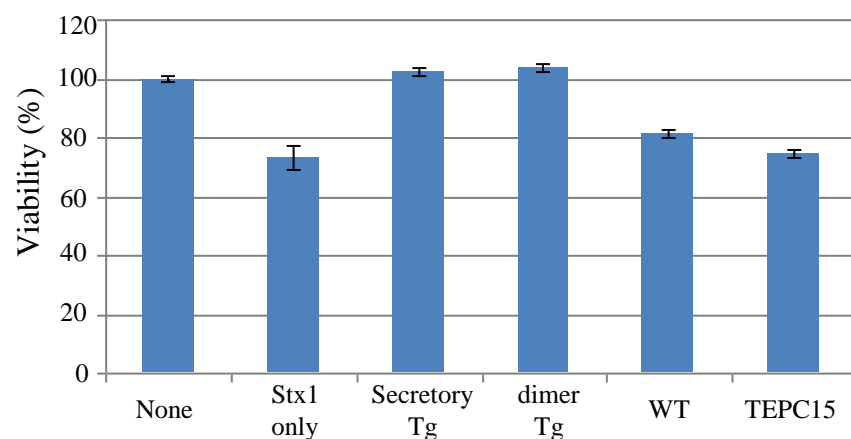


Fig. 2-7 Binding of the hybrid-IgA plantibodies to immobilized Stx1B

Extracts of Secretory Tg plants (closed diamonds), ones of dimer Tg plants (closed circles), ones of wild-type plants (closed triangles), or purified mouse IgA myeloma protein TEPC 15 (closed squares) were allowed to bind to immobilized Stx1B. The bound hybrid-IgA was detected with goat anti-mouse IgA (anti- α), goat anti-mouse kappa (anti- κ) or goat anti-mouse pIgR (anti-pIgR). Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.



Stx1 (10 pg/ml)	—	+	+	+	+	+
IgA (ng/ml)	—	—	100	100	—	100
Total protein (μg/ml)	—	—	0.14	0.24	0.24	—

Fig. 2-8 Neutralization of Stx1 holotoxin by plantibody

10 pg/ml of Stx1 holotoxin was pre-treated with an extract of Secretory Tg plants, an extract of dimer Tg plants, an extract of a wild-type plants (WT), or control IgA (TEPC 15) for 1 h, and then the mixture was added to Vero cell. After 48 hr incubation, cell viability was measured by a colorimetric cell viability assay. The IgA concentration is effective for Tg and TEPC 15, and TSP for Tg and WT. Cell viability was exhibited as a percentage of the control level (without toxin exposure). Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations.

2-4 考察

本章では Stx1B に特異的な分泌型ハイブリッド IgA を発現するシロイヌナズナを作製するために、花序浸し法によってハイブリッド IgA H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子を導入したシロイヌナズナを作製し、植物抗体の発現と性状解析を行った。

ハイブリッド IgA の発現に P_{CAB} を用いた第 1 章の結果から、 P_{CAB} は 2 種類のタンパク質を同時に高発現させるのに有効なプロモーターであることが示唆された。そのため、本章ではハイブリッド IgA の H 鎖、L 鎖に加え、J 鎖と SC も P_{CAB} を用いて発現させることにした。本章で作製したシロイヌナズナのハイブリッド IgA の発現量は葉 1 g に対して 13.8 μg、葉の総タンパク質の 0.063% となり、第 1 章で作製した二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナと同程度の発現量であった。これにより、カリフラワーモザイクウイルスプロモーターのようなウイルス由来プロモーターを全く用いずとも分泌型 IgA の発現ができた。現在、分泌型 IgA の量を正確に定量する方法がないため、植物抗体が分泌型としてどの程度存在しているかは不明であるが、SC 遺伝子の導入が植物抗体の発現量に影響しないことがわかった。SC タンパク質の C 末端側に KDEL 配列を付加することで分泌型 IgA の発現を上昇させることが

できるという報告がなされており、今回作製した分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターの SC の遺伝子に KDEL 配列を付加した SC の遺伝子に組み換えることで、分泌型ハイブリッド IgA の発現量を上昇させることができると考えられる [39]。

今回使用している P_{CAB} は光合成に関わるタンパク質の発現を制御しており、光誘導性のプロモーターとして知られている [30]。Secretory Tg の免疫染色を行ったところ、葉では組織全体で抗体に特異的なシグナルが検出されたのに対し、茎では皮層と維管束で強い抗体のシグナルが検出された (Fig. 2-4)。外界に近い皮層の細胞には葉緑体も存在しており、光合成を行うことができるが、外界から遠い中心部の髄では葉緑体が存在せず、光合成を行っていない。茎の皮層で抗体のシグナルが検出された一方で、髄ではほとんど検出されなかったという結果は使用した P_{CAB} の性質によるものと考えられる。一方、維管束組織は髄と同様に光合成は行っていないにもかかわらず、強いシグナルが観察された。今回使用した抗体の遺伝子にはタンパク質の N 末端側に、マウスのものであるが細胞外への分泌シグナルが付加されている。マウスの分泌シグナルが付加された抗体が植物においても細胞外への分泌シグナルとなることが報告されている [33, 34]。そのため、今回作製した Secretory Tg で発現した抗体が植物細胞外へ分泌され、維管束を通じて植物個体内を移動していることが示唆された。

本章では、分泌型ハイブリッド IgA を発現させることを目的としてシロイヌナズナに H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC の遺伝子を導入し、遺伝子組み換え植物を作製したが、発現したハイブリッド IgA を Western Blot により解析したところ、分泌型以外の形の抗体も発現していることが示唆された (Fig. 2-5)。そのため、分泌型ハイブリッド IgA も二量体と同様に、プロテアーゼによる分解や不完全な抗体が産生されている可能性が考えられた。分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体の分子量はマウス唾液中の分泌型 IgA より低かった。ハイブリッド IgA は IgA と比べて H 鎖の分子量が小さいことが既に分かっており、また、植物と動物の糖鎖修飾の違いにより植物で発現させた SC は動物細胞で発現させた SC よりも分子量が小さいことも分かっている [22, 40]。これらの理由により、分泌型 IgA 植物抗体はマウス由来の分泌型 IgA と比べて分子量が小さくなったと考えられる。非還元条件での検出において、抗 IgA 抗体と抗 pIgR 抗体で 220 kDa より高分子量のバンドは 1 つのみで、移動度は両方の検出抗体で一致していた。この結果は、高分子量のバンドは分泌型ハイブリッド IgA 由来のシグナルであり、二量体ハイブリッド IgA は検出されていないことを示している。つまり、植物細胞内で構築された二量体 IgA は全て SC と結合しており、植物での分泌型 IgA の発現において二量体 IgA の構築が律速段階であることを示唆している。

シロイヌナズナで発現させた分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体の活性を検討するために固相化した Stx1B を用いた ELISA により、抗原への結合性を測定したところ、Stx1B への濃度依存的な結合が見られた (Fig. 2-7)。抗 SC 抗体を用いた解析では Secretory Tg のタンパク質抽出液でのみ吸光度の上昇が見られ、Secretory Tg で発現した植物抗体が分泌型として構築され、抗原への結合性を保持していることが示された。また、植物抗体が Stx1 の細胞毒性を中和できるかどうかを、Vero 細胞を用いて検討したところ、Stx1 を植物抗体で前処理することで Stx1 による Vero 細胞の細胞死が抑制された (Fig. 2-8)。抗体の可変部は第 1 章の二量体ハイブリッド IgA と共通していることから、植物抗体による Stx1 の細胞毒性の中和効果は二量体ハイブリッド IgA と同様に、植物抗体が Stx1B に結合し Stx1 が標的細胞上の Gb₃ と結合で

きなくなり、細胞内へ侵入できなくなることによると考えられる。

以上より、本章では、花序浸し法を用いて **Stx1B** 特異的な分泌型ハイブリッド **IgA** を発現するシロイヌナズナを作製し、発現した植物抗体が **Stx1B** への結合性を保持していることを確認した。そして、発現した植物抗体が *in vitro* において **Stx1** の細胞毒性を中和できることを明らかにした。得られた分泌型ハイブリッド **IgA** 発現シロイヌナズナをマウスに食べさせ、*in vivo* における **Stx1** の毒性に対する中和活性を検討することで、抗原特異的な分泌型 **IgA** 発現植物が、実際に経口投与可能な抗体医薬品として利用できるかどうかの研究を行うことが可能となった。

第3章 Stx1B に対する分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの作製

3-1 目的

第1章、第2章において P_{CAB} 、 T_{CAB} をハイブリッド IgA H鎖、L鎖と組み合わせたハイブリッド IgA 発現カセットと、J鎖、SC と組み合わせた Jc-SC 発現カセットをそれぞれ構築し、これら2つの発現カセットを一つのベクターに導入した分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターを作製した。そして、アグロバクテリウム法を用いてモデル植物であるシロイヌナズナにこれらの遺伝子を導入することで、分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナ (Secretory Tg) を作製した。そして、作製した Secretory Tg がハイブリッド IgA を分泌型として発現し、発現した植物抗体が Stx1 の細胞毒性を中和できることを明らかにしてきた。これらの結果から、前章まではモデル植物であるシロイヌナズナを用いて Stx1 の中和活性を持つ分泌型 IgA が作製できることを示してきた。そこで第3章では、この植物抗体の実用化に向けて研究を進展させるため、可食性植物への H鎖、L鎖、J鎖、SC 遺伝子の導入を行うことにした。抗体はタンパク質であることから、加熱を必要とせず、生で食べられる植物にハイブリッド IgA を発現させる必要がある。

レタス (*Lactuca sativa* L.) は生で食べられ、また植物工場で栽培できるため、花粉の飛散を防げ、気候の影響を受けず一定の品質を保ちやすいといった利点から、抗体のような治療用タンパク質産生の媒体に適した植物と言われている [12, 41]。また、本研究で用いているプロモーターは光によって制御されており、また、第2章における茎の免疫染色の結果から、植物抗体は葉などの光合成を行うことのできる組織で発現すると考えられる [30]。そこで、葉野菜であり、治療用タンパク質発現に適した媒体であるレタスに、アグロバクテリウム法を用いて H鎖、L鎖、J鎖、SC 遺伝子を導入し、得られた形質転換体について分泌型ハイブリッド IgA の発現解析を行った。

3-2 材料および方法

3-2-1 材料

実験植物

Lactuca sativa L. cv. green wave (タキイ種苗)

試薬

1-Naphthylacetic Acid (NAA) (和光純薬工業)

3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (acetosyringone) (和光純薬工業)

Agar (Powder) (植物培地用) (和光純薬工業)

Polyvinylpyrrolidone (PVP) (和光純薬工業)

Meropenem Trihydrate (和光純薬工業)

Primers

Gene	Name of primers	DNA sequence
<i>UBQ</i>	UBQ-F	5'-GCAGATCTTCGTGAAAACCCCTAACGGGGA-3'
<i>UBQ</i>	UBQ-R	5'-GTAAACGTAGGTGAGTCCCACTTACCAC-3'

アグロ感染用培地

4.6 g/l	Murashige and Skoog Plant Salt Mixture
3%	Sucrose (w/v)
0.5 g/l	PVP
0.1 mg/l	NAA
0.05mg/l	BAP
1.6%	Agar (w/v)
pH 調整 (pH5.8)	KOH
溶媒	MilliQ water

カルス化、再分化培地

アグロ感染用培地に 12.5 mg/l の Meropenem Trihydrate を添加

ルート化培地

2.3 g/l	Murashige and Skoog Plant Salt Mixture
3%	Sucrose (w/v)
1.6%	Agar (w/v)
pH 調整 (pH5.8)	KOH
溶媒	MilliQ water

その他の材料は 1-2-1、2-2-1 を参照

3-2-2 分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの作製

3-2-2-1 レタスの播種

レタスの種 0.5 ml を 50 ml チューブに入れ、80% ethanol を 40 ml 加えて転倒混和し、しばらく静置して種を沈めた後、デカンテーションにより上清を除去する洗浄操作を 2 回行った。滅菌液 40 ml を加え、ロータリーミキサー (RT-30mini, TAITEC) を用いて 20 min 転倒混和した後、上清を除去した。滅菌 MilliQ 水 40 ml 加えて転倒混和し、しばらく静置して種を沈めた後、上清を除去する洗浄操作を 5 回繰り返した。0.2% アガロース 40 μ l で種を懸濁した後、MS 培地にまき、25°C、長日条件で 1 週間培養した。

3-2-2-2 アグロバクテリウム法によるレタスへの H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の導入

2-2-3-1 で形質転換した *A. tumefaciens* を LB/Km 液体培地 3 ml に植菌し、28°C にて一晩振とう培養した。BioPhotometer (ependorf) を用いて OD₆₀₀ を測定した後、培養した菌液を 1.5 ml チューブに移し、21,500 × g、1 min 遠心し、上清を除去した。100 μ M の acetosyringone と 10 μ M の 2-mercaptoethanol を含む液体 MS 培地を、菌液の OD₆₀₀ が 0.02 となるように加えてペレットを再懸濁し、感染液とした。レタスの子葉を無菌的に約 4×4 mm の大きさに切断し、感染液へ浸け、15 min インキュベーションした。滅菌したキムタオルで余分な水分を除去し、アグロ感染用培地へ 20 切片/プレートずつ並べた。25°C、暗条件下で 2 日間培養した。

3-2-2-3 形質転換したレタス葉片の薬剤による選抜、および再分化

3-2-2-2 で *A. tumefaciens* と共培養したレタス葉片を 50 mg/l の Kanamycin sulfate を含むカルス化、再分化培地へ移植し、25°C、長日条件で培養した。この際、2~3 日おきに新しい培地へ移植した。シュート化が見られた個体を 50 mg/l の Kanamycin sulfate を含むルート化培地へ移し、25°C、長日条件で培養した。ルート化培地へ移植以降は培地の交換は行わなかった。5 cm 程のルートの伸長が見られた個体をルート化培地から取り出し、流水で根を洗浄した後、水道水を十分に吸水させた expanded vermiculite の入った 2 号ポットに植え替えた。水を張ったバットにレタスを植えたポットを入れ、蓋をし、ラップで覆い 2 日間保湿した。ラップへ 1 ヶ所穴を開け、更に 2 日間栽培した。ラップを外し、蓋をしたまま更に 2 日間栽培した。蓋を外し、バットの水が枯れないよう 2~3 日おきに水やりを行い、栽培した。本葉が 2~3 枚ついたら 6 号ポットへ移し変え、栽培した。本葉が 5 枚ほどになったら培養土を敷き詰めた 12 号ポットへ移し、閉鎖系温室内で 25°C、長日条件で栽培した。

3-2-3 分泌型ハイブリッド IgA の発現解析

3-2-3-1 PCR による H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の検出

3-2-2-3 で得られた個体への H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の導入を 1-2-4-1 と同様の方法で PCR により確認した。プライマーとして H 鎖には IgG Heavy NotF と IgA-H/NotR、L 鎖には IgGk

NotF と *IgGk NotR*、J 鎖には *JCF15* と *JCR*、SC 遺伝子には *SCF-Xho* と *SCR-Xba* をプライマーとして使用した。内部標準にはレタスのハウスキーピング遺伝子であるユビキチン伸長酵素 (*UBQ*) を用い、*UBQ-F*、*UBQ-R* をプライマーに使用した。

3-2-3-2 タンパク質抽出

3-2-2-3 で得られた個体から葉を採取し、乳鉢へ入れ、液体窒素を加えて凍結させた後、乳棒ですり潰した。タンパク質抽出 buffer 2 を加えて懸濁した後、1.5 ml チューブに移し、氷上で 1 hr 静置した。4°C、21,500 × g で 10 min 遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブへ回収後、上清の体積の 10 分の 1 量の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加し、Acetate buffer を中和した。4°C、21,500 × g で 10 min 遠心し、上清をサンプルとして回収した。サンプルのタンパク質濃度の測定は 1-2-4-5 と同様の方法で *BCA Protein Assay Kit* を用い、Kit 添付のプロトコールに従って行った。

3-2-3-3 Sandwich ELISA によるハイブリッド IgA 抗体の検出

3-2-3-2 で抽出したタンパク質を用いて 1-2-4-7 と同様の方法で sandwich ELISA を行い、発現したハイブリッド IgA の量を定量した。

3-2-3-4 ELISA による分泌型ハイブリッド IgA の *Stx1B* への結合性の確認

3-2-3-2 で抽出したタンパク質を用いて、1-2-5-1 と同様の方法で固相化した *Stx1B* を用いた ELISA を行い、発現した分泌型ハイブリッド IgA の *Stx1B* への結合性を確認した。H 鎖の検出には 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 1,000 倍に希釈した HRP-goat anti-mouse IgA を使用し、SC の検出には 1 次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 0.5 µg/ml に調製した Goat anti-mouse pIgR、2 次抗体に 0.1% BSA-0.1% Tween 20-PBS で 0.5 µg/ml に調製した HRP-donkey anti-goat IgG を使用した。サンプルについては、IgA 量として 100、400 ng/ml となるように調製した。

3-3 実験結果

3-3-1 分泌型ハイブリッド IgA 発現植物の作製

本章では第 2 章で作製した分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターを用いて、アグロバクテリウム法により分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの作製を行った。*Kanamycin* による選抜と植物体への再分化を行ったところ、薬剤に耐性の個体を 5 個体得た。得られた 5 個体から DNA を抽出し、J 鎖遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR により解析した結果、全ての個体で遺伝子が挿入されていることを確認した。また、得られた 5 個体から抽出したタンパク質を、抗 L 鎖抗体と抗 H 鎖抗体を用いた sandwich ELISA により解析したところ、全ての個体でハイブリッド IgA の発現が確認された。そのなかで IgA の発現が最も高かった個体について更に詳細な解析を進めることにした。H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC とハウスキーピング遺伝子であるユビキチン伸長酵素 (*UBQ*) にそれぞれ特異的なプライマーを用いて PCR により解析

したところ、*UBQ* については形質転換体 (*Tg-Ls*) と野生型 (*WT-Ls*) の両方で遺伝子の増幅が見られた一方、*H* 鎖、*L* 鎖、*J* 鎖、*SC* 遺伝子については *Tg-Ls* でのみ増幅が見られ、これらの遺伝子の導入が確認された (Fig. 3-1)。

3-3-2 分泌型ハイブリッド IgA の発現解析

Tg-Ls から抽出したタンパク質中のハイブリッド IgA 量をキャプチャー抗体に抗 *L* 鎖抗体を、検出抗体に抗 *H* 鎖抗体を用いて sandwich ELISA で確認したところ、*Tg-Ls* のハイブリッド IgA 発現量は総タンパク質量の 0.0138%、葉 1 g 辺り 1.1 μg であった (Fig. 3-2)。続いて、発現した植物抗体の *Stx1B* への結合性を確認するため、*Stx1B* を固相化して ELISA を行った。抗 *H* 鎖抗体、抗 *SC* 鎖抗体のどちらで検出した場合においても、植物抗体の濃度依存的な吸光度の上昇が見られ、分泌型の植物抗体が *Stx1B* と結合できることを確認した (Fig. 3-3)。TEPC15 では吸光度の上昇が見られなかった。これらの結果より、*H* 鎖、*L* 鎖、*J* 鎖、*SC* 遺伝子を導入したレタスにおいて、植物抗体が *SC* の結合した分泌型として発現し、*Stx1B* との結合能を保持していることを明らかにした。

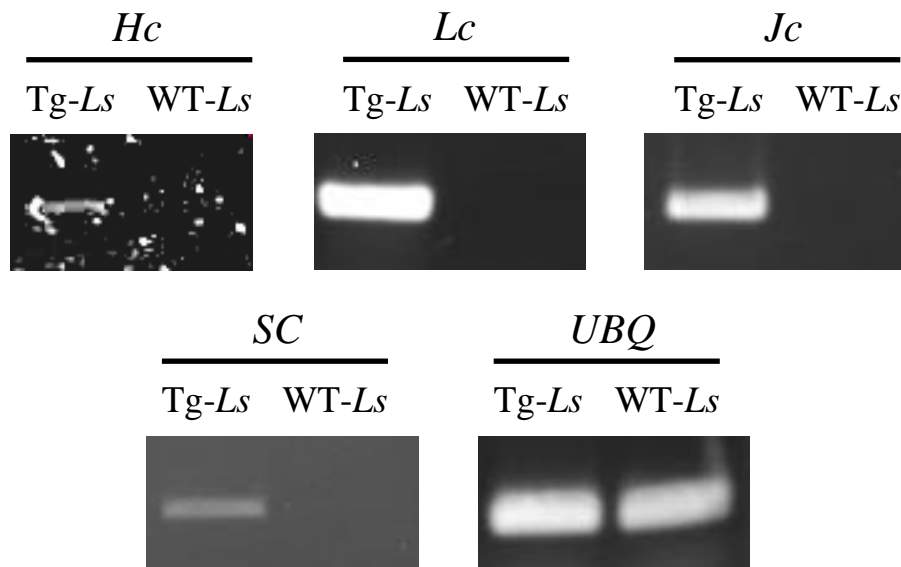


Fig. 3-1 Incorporation of the secretory hybrid-IgA transgene into the genome of *L. sativa* L.

Genomic DNAs were extracted from transgenic (*Tg-Ls*) and wild type (*WT-Ls*) *L. sativa* L. And then, secretory hybrid-IgA genes were amplified by PCR using gene specific primers.

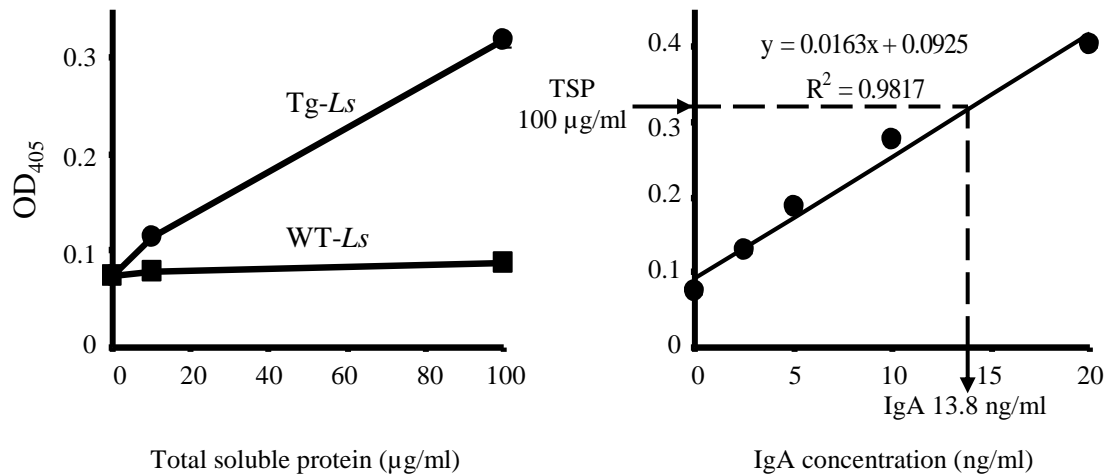


Fig. 3-2 Quantification of assembled hybrid-IgA on sandwich ELISA

(A) Hybrid-IgA in extracts of transgenic *L. sativa* L. leaves, which contained the indicated amounts of total soluble protein (TSP), was captured with immobilized goat anti-mouse κ and then detected with HRP-goat anti-mouse IgA (α chain-specific). The samples were from Tg-*Ls* plants (closed circles) or WT-*Ls* plants (closed squares). (B) Standard curve for quantification of IgA. IgA molecules that had been captured by the immobilized goat anti-mouse κ chain were detected with HRP-goat anti-mouse IgA on ELISA. Various concentrations of purified mouse myeloma protein TEPC 15 were used to generate a standard curve. Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.

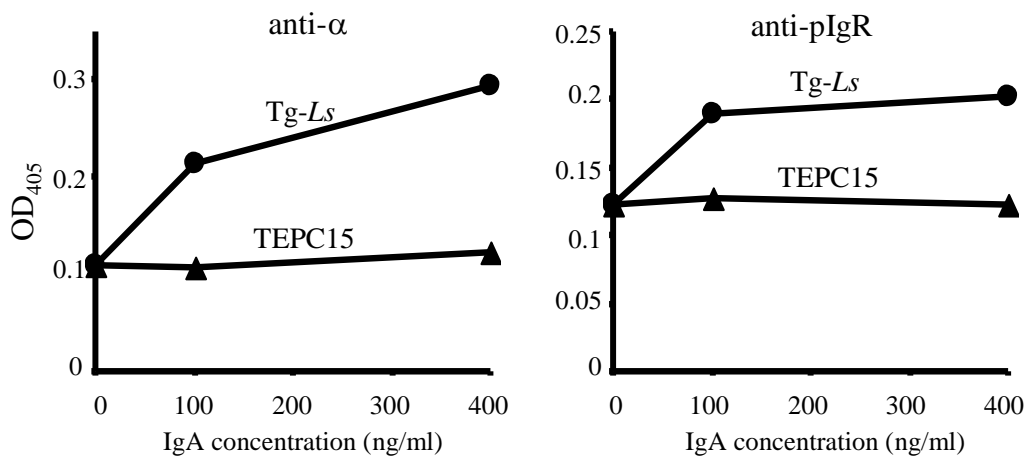


Fig. 3-3 Binding of the hybrid-IgA plantibodies to immobilized Stx1B

Extracts of Tg-*Ls* plants (closed circles) or purified mouse IgA myeloma protein TEPC 15 (closed triangles) were allowed to bind to immobilized Stx1B. The bound hybrid-IgA was detected with goat anti-mouse IgA (anti- α) or goat anti-mouse pIgR (anti-pIgR). Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations. Error bars underneath the symbols are not visible. The results are representative of three experiments.

3-4 考察

本章では、治療薬として実用可能な分泌型 IgA 発現植物の作製を目的として、アグロバクテリウム法により、レタスに Stx1B に特異的なハイブリッド IgA H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子を導入し、植物抗体の発現解析を行った。

第 2 章において、モデル植物であるシロイヌナズナで分泌型ハイブリッド IgA を発現させた実績のあるベクターである pBCH1/Secretory hybrid-IgA を本章でも使用した。本章で作製した遺伝子組み換えレタスのハイブリッド IgA の発現量は葉 1 g に対して 1.1 μ g、葉の総タンパク質の 0.0138% となり、第 1 章や第 2 章で作製したハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナと比べて 10 分の 1 程度の発現量であった。レタスは治療用タンパク質の産生に適した媒体と考えられているため、これまでも組み換えタンパク質の発現例がいくつも報告されている。これらの報告では、高いもので葉 1 g 辺り 0.8 mg の組み換えタンパク質を発現させており、分泌型ハイブリッド IgA についても今回作製したレタスよりも高発現の形質転換体を作製することは可能であると思われる。発現量を上昇させる手段としては、第 1 章や第 2 章でも述べた KDEL 配列の付加やコドンの最適化に加えて、翻訳エンハンサー配列の付加やレタスの生育に影響しないタンパク質を RNAi によってノックダウンすることで余分なタンパク質の発現を抑え、相対的に組み換えタンパク質の発現量を増大させる方法が考えられる [41, 42]。

レタスで発現させた分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体の活性を検討するために固相化した Stx1B を用いた ELISA により、抗原への結合性を測定したところ、抗 H 鎖抗体、抗 SC 抗体のどちらで検出した場合においても Stx1B への濃度依存的な結合が見られた (Fig. 3-3)。抗 H 鎖抗体での検出に比べ、抗 SC 抗体での検出では、IgA 濃度 100 ng/ml と 300 ng/ml の吸光度の上昇が緩やかになっている。この原因としては IgA の濃度が高濃度の領域では、分泌型ではない、単量体 IgA 等の他の形のハイブリッド IgA が抗原へ結合することで、競合的に分泌型ハイブリッド IgA の結合を阻害している可能性が考えられる。ELISA の結果より、レタスで発現した植物抗体が分泌型として構築され、抗原への結合性を保持していることが示された。

以上より、可食性植物であるレタスを用いて分泌型ハイブリッド IgA を産生させ、抗原への結合性を保持した分泌型ハイブリッド IgA を得ることに成功した。得られた抗体の Stx1 の細胞毒性に対する中和効果の解析や、レタスでの植物抗体の発現量の上昇方法を更に研究していくことが、治療薬として実用可能な植物抗体の開発にとって今後の重要な課題になると考えられる。

総括

本研究では、腸管出血性大腸菌 O157:H7 の産生する毒素である Shiga toxin1 の B サブユニットに特異的なハイブリッド IgA を分泌型として発現し、食事と共に Stx による食中毒症状を予防、治療することができる遺伝子組換え植物を作製することを目的として、二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナ、分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナ、分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの作製を行った。

第 1 章では分泌型 IgA の重要な構成因子である二量体ハイブリッド IgA を発現するシロイヌナズナの作製を行った。まず、シロイヌナズナの Chlorophyll *a/b* binding protein の発現を制御する双方向性プロモーター (P_{CAB}) とそのターミネーター ($T_{CAB1, 2}$) を用いてハイブリッド IgA の H 鎖と L 鎖を同時に発現するハイブリッド IgA 発現カセットを構築した (Fig. 1-1)。 P_{CAB} は 2 つの遺伝子を同時に高発現できるプロモーターとして知られており [30]、抗体遺伝子を 1 ステップで効率よく発現できると考え、ハイブリッド IgA の発現を制御するプロモーターとして利用した。ハイブリッド IgA 発現カセットを J 鎖遺伝子と共にバイナリーベクターに組み込み二量体ハイブリッド IgA 発現ベクターを作製し、花序浸し法によりシロイヌナズナに H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子を導入した (Fig. 1-2)。遺伝子を導入したシロイヌナズナについて解析を行い、H 鎖、L 鎖、J 鎖遺伝子の導入、mRNA への転写が確認された個体を得た (Fig.1-3, 4)。得られた個体から採取した葉を、抗 H 鎖抗体を用いて免疫染色を行ったところ、形質転換体 (dimer Tg) において抗体に特異的なシグナルが検出され、植物組織内での抗体タンパク質の発現が確認できた (Fig. 1-6)。Dimer Tg から抽出したタンパク質の western blot による解析で、非還元条件において高分子量側に二量体ハイブリッド IgA と思われるバンドが確認され、二量体ハイブリッド IgA の発現と組み立てが確認できた (Fig.1-7A)。また、その他にも H 鎖の二量体に J 鎖が結合したタンパク質と思われるバンドや H 鎖と L 鎖が 1 本ずつ結合したヘテロ二量体、H 鎖単量体や分解物と思われるバンドなど複数のバンドが確認された。還元条件下の Western blot でも H 鎖、L 鎖、J 鎖の単独での分子量にそれぞれ相当するバンドと共に、H 鎖では 30 kDa 付近に H 鎖の分解物と思われるバンドが検出された (Fig.1-7B)。これらのバンドが見られたことから組み立てが不十分な抗体、もしくは抗体の分解物が存在していることが考えられた。二量体ハイブリッド IgA 植物抗体の性状を解析するために、固相化した Stx1B に対する結合性の確認と、植物抗体による Stx1B の Gb₃ への結合阻害活性を ELISA により検討したところ、濃度依存的な Stx1B への結合が確認でき、その結合性は Stx1B の Gb₃ への結合阻害結合活性とよく相関した (Fig.1-9, 10)。Stx1 に感受性の 2 種の細胞株、Vero 細胞、Ramos 細胞を用いて植物抗体による Stx1 の細胞毒性に対する中和活性を検討したところ、Stx1 を植物抗体で前処理することにより、Vero 細胞、Ramos 細胞のアポトーシスが抑制された (Fig. 1-11~14)。これらの結果から、第 1 章では、二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナを作製することができ、発現した植物抗体が二量体として発現し、Stx1 の細胞毒性を中和できることを明らかにした。

第 2 章では、分泌型ハイブリッド IgA を発現するシロイヌナズナの作製を行った。第 1 章で用いた P_{CAB} を J 鎖と SC 遺伝子の発現にも利用するために Jc-SC 発現カセットを構築した (Fig. 2-1)。そして、構築した Jc-SC 発現カセットを第 1 章で作製したハイブリッド IgA 発現

カセットと共にバイナリーベクターに組み込み分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターを作製し、花序浸し法によりシロイヌナズナに H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子を導入した (Fig. 2-2)。遺伝子を導入したシロイヌナズナから抽出したゲノム DNA を用いて PCR 解析を行い、H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の導入を確認した (Fig. 2-3)。得られた個体から採取した葉と茎を、抗 H 鎖抗体、抗 SC 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、形質転換体 (Secretory Tg) において抗体に特異的なシグナルが検出され、植物組織内での抗体タンパク質の発現が確認できた (Fig. 2-4)。特に茎の染色像では、皮層で強い染色が見られ、光によって発現が制御されている P_{CAB} の性質をよく反映した結果となった。また、維管束でも強い染色が見られたことから、発現した抗体が細胞外へ分泌され、維管束へ流れ出ている可能性も考えられた。Secretory Tg から抽出したタンパク質の western blot による解析で、非還元条件において高分子量側に分泌型ハイブリッド IgA と思われるバンドが確認され、分泌型ハイブリッド IgA の発現と組み立てが確認できた (Fig. 2-5)。また、その他にも遊離の SC や H 鎖の二量体と思われるバンドなど複数のバンドが確認され、Secretory Tg においても組み立てが不十分な抗体、もしくは抗体の分解物が存在していることが考えられた。発現した分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体の性状を解析するために、固相化した Stx1B に対する結合性を抗 H 鎖抗体、抗 L 鎖抗体、抗 SC 抗体を用いて ELISA により確認したところ、濃度依存的な Stx1B への結合が確認できた (Fig. 2-7)。特に抗 SC 抗体を用いた ELISA では、dimer Tg においても吸光度の上昇が見られず、Secretory Tg でのみ吸光度が上昇したことから、分泌型ハイブリッド IgA が抗原への結合性を保持していることが確認できた。Secretory Tg で産生された植物抗体が Stx1 の細胞毒性を中和できるかどうかを、Vero 細胞を用いて MTT 法により検討したところ、Secretory Tg のタンパク質抽出液で Stx1 を前処理することで Vero 細胞の Stx1 による細胞死が抑制された (Fig. 2-8)。これらの結果から、第 2 章では、分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナを作製することができ、発現した植物抗体が分泌型として発現し、Stx1 の細胞毒性を中和できることを明らかにした。

第 3 章では、分泌型ハイブリッド IgA を発現するレタスの作製を行った。第 2 章で作製した分泌型ハイブリッド IgA 発現ベクターを用いて、アグロバクテリウム法によりレタスに H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子を導入した。遺伝子を導入したレタス (Tg-Ls) から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 解析を行い、H 鎖、L 鎖、J 鎖、SC 遺伝子の導入を確認した (Fig. 3-1)。Tg-Ls から抽出したタンパク質中に含まれるハイブリッド IgA 量を、キャプチャー抗体に抗 L 鎖抗体を、検出抗体に抗 H 鎖抗体を用いて sandwich ELISA で確認したところ、ハイブリッド IgA の発現量は葉 1 g に対して 1.1 μ g、葉の総タンパク質の 0.0138% であった (Fig. 3-2)。この発現量は第 1 章や第 2 章で作製したハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナと比べて 10 分の 1 程度の発現量であり、レタスでハイブリッド IgA を高発現させるためには KDEL 配列の付加など、導入遺伝子の改良が必要であると考えられた。Tg-Ls から産生された分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体の Stx1B への結合性を、固相化した Stx1B を用いた ELISA により、抗 H 鎖抗体、抗 SC 抗体を用いて確認したところ、濃度依存的な Stx1B への結合が確認できた (Fig. 3-3)。これらの結果から、第 3 章では、実用的な植物であるレタスにおいて、抗原結合性を保持した分泌型ハイブリッド IgA を産生させることに成功した。

以上から、本研究では Stx1B に特異的なハイブリッド IgA の遺伝子を植物に導入すること

で二量体ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナと分泌型ハイブリッド IgA 発現シロイヌナズナ、分泌型ハイブリッド IgA 発現レタスの 3 種の植物を作製することができた。さらに、これらの植物から発現した植物抗体が二量体、分泌型を形成し、*in vitro* において Stx1 の細胞毒性を中和し、標的細胞のアポトーシスを抑制することを見出した。これらの結果より、Stx1 に中和活性を持つ分泌型や二量体のハイブリッド IgA を植物で作ることに成功した。今回、分泌型ハイブリッド IgA 発現植物を作製できたことによって、分泌型ハイブリッド IgA 植物抗体の *in vivo* における Stx1 の細胞毒性中和や、経口投与した際の安全性についての研究など、生体を用いた解析が可能となり、EHEC による食中毒を予防、治療できる経口投与可能な抗体医薬品の実用化に向けて前進した。本研究では Stx1 に特異的なハイブリッド IgA をモデルとして使用しているが、ハイブリッド IgA の作製法を用いることで他の病原体に対する IgA も作製可能であるため、本研究で得られた成果は EHEC による食中毒のみでなく多くの粘膜への感染症に応用することができる。本研究が植物を媒体とした経口投与可能な抗体医薬の開発に繋がることを期待する。

謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始懇切丁寧なる御指導、御鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究科 免疫微生物学教室、教授 今井康之先生、准教授 川島博人先生、講師 三宅正紀先生、助教 黒羽子孝太先生ならびに食品栄養環境科学研究所 植物機能開発研究室、教授 小林裕和先生、助教 丹羽康夫先生に深く感謝致します。

また、本論文の作成にあたり、御高閲と御助言を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学教室、教授 伊藤邦彦先生、薬学研究科 生薬学教室、教授 野口博司先生に深く感謝致します。

本研究を行うに際し、数多くの御指導、御協力を頂きました免疫微生物学教室、食品栄養環境科学研究所植物機能開発研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

本研究は日本学術振興会特別研究員奨励費および静岡県立大学グローバル COE 若手研究者育成事業の助成を受けて実施しました。

最後に、このような機会をくださり、学生生活を支えて頂いた両親に感謝致します。

参考文献

- 1) Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT, Cano-Gauci DF, Huttner KM, Buick RN, Selsted ME. 1994. Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect. Immun.* 62, 5040–5047.
- 2) Snoeck V, Peters IR, Cox E. 2006. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res.* 37, 455–467.
- 3) Lindh E. 1975 Increased resistance of immunoglobulin A dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. *J Immunol.* 114, 284–286.
- 4) Crottet P, Corthésy B. 1998. Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding component F(ab')₂: a possible implication for mucosal defense. *J Immunol.* 15, 5445–5453.
- 5) Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthésy B. 2002. Secretory Component: A New Role in Secretory IgA-Mediated Immune Exclusion In Vivo. *Immunity.* 107, 107–115.
- 6) Kaiser J. 2008. Is the Drought Over for Pharming? *Science.* 320, 473–475.
- 7) Farid SS. 2007. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. *J. Chromatogr. B.* 848, 8–18.
- 8) Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6, 219–226.
- 9) Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv.* 29, 210–222.
- 10) Hood EE, Woodard SL, Horn ME. 2002. Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants - myths and realities. *Curr Opin Biotechnol.* 13, 630–635.
- 11) Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, Kiyono H. 2007. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10986–10991.
- 12) Lim S, Ashida H, Watanabe R, Inai K, Kim YS, Mukougawa K, Fukuda H, Tomizawa K, Ushiyama K, Asao H, Tamoi M, Masutani H, Shigeoka S, Yodoi J, Yokota A. 2011. Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts. *Plant Mol Biol.* 76, 335–344.
- 13) Phoolcharoen W, Dye JM, Kilbourne J, Piensook K, Pratt WD, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS, Herbst-Kralovetz MM. 2011. A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal Ebola virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20695–20700.
- 14) Gomord V, Sourrouille C, Fitchette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P and Faye L. 2004. Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol J.* 2, 83–100.
- 15) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2,

123–140.

- 16) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5, 607–625.
- 17) Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11, 142–201.
- 18) Jackson MP, Newland JW, Holmes RK, O'Brien AD. 1987. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 2, 147–53.
- 19) O'Brien AD, Holmes RK. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 51, 206–20.
- 20) Paton JC, Paton AW. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 11, 450–79.
- 21) Tanikawa T, Ishikawa T, Maekawa T, Kuronane K, Imai Y. 2008. Characterization of Monoclonal Immunoglobulin A and G Against Shiga Toxin Binding Subunits Produced by Intranasal Immunization. *Scand J Immunol.* 68, 414–422.
- 22) Tobisawa Y, Maruyama T, Tanikawa T, Nakanishi K, Kurohane K, Imai Y. 2011. Establishment of recombinant hybrid-IgG/IgA immunoglobulin specific for Shiga toxin. *Scand J Immunol.* 74, 574–584.
- 23) Ethan AM, Wim GJ H. 1995. AB5 toxins. *Curr Opin Struct Biol.* 2, 165–171.
- 24) Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P. 2001. The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J Immunol.* 167, 5185–5192.
- 25) Niwa Y, Goto S, Nakano T, Sakaiya M, Hirano T, Tsukaya H, Komeda Y, Kobayashi H. 2006. *Arabidopsis* mutants by activation tagging in which photosynthesis genes are expressed in dedifferentiated calli. *Plant Cell Physiol.* 47, 319–331.
- 26) Ito Y, Eiguchi M, Kurata N. 2001. KNOX homeobox genes are sufficient in maintaining cultured cells in an undifferentiated state in rice. *Genesis.* 30, 231–238.
- 27) 市川史織、2012. 二量体 IgA 構成成分である J 鎖の植物を用いた発現、修士論文、静岡県立大学
- 28) 成松三四郎、2008. 植物における抗 Stx1B モノクローナル抗体の発現の研究、修士論文、静岡県立大学
- 29) Miyashita S, Matsuura Y, Miyamoto D, Suzuki Y, Imai Y. 1999. Development of recombinant B subunit of Shiga-like toxin 1 as a probe to detect carbohydrate ligands in immunochemical and flowcytometric application. *Glycoconj J.* 16, 697–705.
- 30) Mitra A, Han J, Zhang ZJ, Mitra A. 2009. The intergenic region of *Arabidopsis thaliana cab1* and *cab2* divergent genes functions as a bidirectional promoter. *Planta.* 229, 1015–1022.
- 31) De Muynck B, Navarre C, Boutry M. 2010. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol J.* 8, 529–563.
- 32) Juárez P, Presa S, Espí J, Pineda B, Antón MT, Moreno V, Buesa J, Granell A, Orzaez D. 2012. Neutralizing antibodies against rotavirus produced in transgenically labelled purple tomatoes. *Plant Biotechnol J.* 10, 341–352.
- 33) Hadlington JL, Santoro A, Nuttall J, Denecke J, Ma JK, Vitale A, Frigerio L. 2003. The C-terminal

- extension of a hybrid immunoglobulin A/G heavy chain is responsible for its Golgi-mediated sorting to the vacuole. *Mol Biol Cell*. 14, 2592–2602.
- 34) Hehle VK, Paul MJ, Drake PM, Ma JK, van Dolleweerd CJ. 2011. Antibody degradation in tobacco plants: a predominantly apoplastic process. *BMC Biotechnol*. doi:10.1186 /1472-6750-11-128.
- 35) Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. 22, 346–353.
- 36) Kurland C, Gallant J. 1996. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol*. 7, 489–493.
- 37) Daniell H, Ruiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W. 2009. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnol*. doi:10.1186/1472-6750-9-33.
- 38) 笹沼康一、2011. 分泌型IgAを構成する組換え型分泌片の発現および性状解析、修士論文、静岡県立大学
- 39) Juarez P, Huet-Trujillo E, Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Granell A, Orzaez D. 2013. Combinatorial Analysis of Secretory Immunoglobulin A (sIgA) Expression in Plants. *Int J Mol Sci*. 14, 6205–6222.
- 40) 中西勝宏、2011. 植物を用いたペロ毒素に対するハイブリッドIgA抗体の発現、修士論文、静岡県立大学
- 41) Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino S, Hamabata T, Sawada K, Kato K. 2011. Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease. *Transgenic Res*. 20, 735–748.
- 42) Yuki Y, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Takahashi Y, Tokuhara D, Nochi T, Katakai Y, Kuroda M, Takeyama N, Kashima K, Abe M, Chen Y, Nakanishi U, Masumura T, Takeuchi Y, Kozuka-Hata H, Shibata H, Oyama M, Tanaka K, Kiyono H. 2013. Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification. *Plant Biotechnol J*. 11, 799–808.