研究領域2

高次機能性食品をめざした植物抗体の研究 Studies on 'plantibodies' as refined functional food

今井 康之 Yasuyuki IMAI 薬学研究科薬学専攻免疫微生物学教室 教授

Professor, Laboratory of Microbiology and Immunology, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka



Profile 2007-静岡県立大学大学院薬学研究科長 2011年

1998年 静岡県立大学薬学部教授 1997年 東京大学大学院薬学系研究科助教授 1989年 カリフォルニア大学サンフランシスコ校訪問研究員

1983年 東京大学薬学部助手

1982年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了

1977年 東京大学薬学部卒業

Dean, Graduate School of Pharmaceutical Sciences. 2007-2011 1998

Jniversity of Shizuoka Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University 1997

Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo Visiting Scholar, Department of Anatomy and Program in Immunology, University of California, San Francisco Research, Associate, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Kesearen Associate, raculty of rharmaceutical sciences, University of Tokyo Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo Graduate from Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo 1982 1977

ken.ac.ip/bisei/English/

Contact

index html

+81-54-264-5716

e-mail imai@u-shizuoka-ken.ac.jp

URL http://w3pharm.u-shizuoka-

T E L 054-264-5716

■序論

高次機能性食品として、「食べられる抗体 | の作製を目指してい る。がん・慢性炎症性疾患・臓器移植・感染症に対する治療に「抗体 医薬」が注目されてきたが、生産コストに課題がある。解決策の一つ として、植物に抗体を発現させる「植物抗体」の取り組みがある。そ のためには、抗原特異的な抗体の遺伝子を取得し植物で発現させ る必要がある。具体的なモデルとして、O157:H7に代表される腸管 出血性大腸菌の病原因子であるベロ毒素(Stx)に対するIgAモノク ローナル抗体に取り組んだ。食べられる抗体には、病原体や毒素の 粘膜表面からの侵入を防ぎ、免疫力の弱い高齢者や小児を中心 に、感染症の予防や治療に役立つことが期待される。

■ 成果

粘膜表面は分泌型免疫グロブリンA(S-IgA)によって防御されて いる。これは、粘膜固有層でBリンパ球が産生する2量体IgAおよび 粘膜表面への輸送に働くポリIg受容体の細胞外ドメインで構成され ている。後者は粘膜上皮細胞の産物である。我々はベロ毒素の糖 鎖結合サブユニット(Stx1B)に対するIgAおよびIgGモノクローナル 抗体を、マウスにStx1Bを経鼻免疫して作製した。得られた抗体の ベロ毒素中和活性を調べるとIgG抗体が勝っていたため、IgGの可 変部(抗原結合部位)とIgAの定常部からなるH鎖をもったハイブ リッド抗体の作製をめざした(図1)。まずIgA抗体およびIgG抗体の H鎖、L鎖およびI鎖のcDNAをクローニングした。組換えPCR法を用 いて、IgG抗体のVH, CH1およびヒンジ領域をIgA抗体のCH2, CH3領 域と連結させたハイブリッドH鎖cDNAを得た。ハイブリッドH鎖、IgG 由来のL鎖、J鎖のcDNAを同時に動物細胞で発現させ、ベロ毒素 特異的2量体のハイブリッドIgAの発現に成功した。実際、ELISAプ レートに固相化したStx1BへのハイブリッドIgAの結合は、抗マウス IgAあるいは抗マウスIgGのいずれによっても検出された(図2)。次 に抗体の植物化をめざした。すなわち、ハイブリッドH鎖、L鎖、I鎖の cDNAをそれぞれバイナリーベクターに組み込み、アグロバクテリウム 法によってモデル植物のシロイヌナズナに遺伝子導入した(図3)。遺 伝子の組み込み、mRNAおよびタンパク質の発現を確認した後、各 抗体遺伝子を発現する植物を交配して、ハイブリッドH鎖、L鎖、J鎖 を同時に発現した植物を得ることに成功し、Stx1Bへの結合を確認 した。

展望

現在、作製した植物抗体の生物活性を評価し、ベロ毒素に対す る中和活性を保持しているかどうかを調べている。植物から抗体を 精製する方法、分泌型ハイブリッドIgA抗体の作製と分離、より効率 的な植物での発現方法の開発が短期的な目標である。さらに、実際 に食べられるという目標のため、リーフレタスを用いた抗体の発現もめ ざしている。なお、ハイブリッドIgAの利点は、困難なIgAモノクローナ ル抗体の作製に挑戦せずとも、既存のIgG抗体の抗原結合部位を 利用できることである。応用として、インフルエンザウイルスに対するハ イブリッドIgAの作製にも成功している。

Introduction

We aimed to produce "edible antibodies" as refined functional foods. Although researchers are working on therapeutic antibodies to treat cancer, chronic inflammatory diseases. transplantation and infectious diseases, there is still a challenge to reduce production costs. One solution is "plantibodies", the expression of genes of antibodies by plants. As a model of plantibodies, we made IgA monoclonal antibodies (mAbs) against Shiga toxin (Stx), which is a virulence factor of enterohemorrhagic Escherichia coli (e.g. serotype O157:H7). Edible therapeutic antibodies have the potential for preventing and/or treating infection by inhibiting entry of infectious agents and toxins through mucosal surfaces. They would be especially useful for elderly people and children with weakened immune systems.

Results

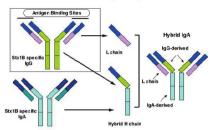
Secretory immunoglobulin A (S-IgA) protects mucosal surfaces. S-IgA is composed of dimeric IgA, a product of B-lymphocytes in the mucosal lamina propria, and extracellular domains of poly-lg receptor, which is responsible for transport to the mucosal surface. The latter is a product of mucosal epithelial cells. We intranasally immunized mice with the carbohydrate binding subunit of Shiga toxin (Stx I B) to produce IgA and IgG mAbs against Stx IB. Because the toxin neutralization activity of the IgG mAbs was superior, we made hybrid antibodies in which the variable regions of IgG and the constant region of IgA were utilized (Fig. 1). We cloned complementary DNAs (cDNAs) encoding for heavy (H) chain, light (L) chain and joining (I) chain from hybridomas that produce the IgA or IgG mAbs. We made a cDNA for a hybrid H chain in which VH, CHI and hinge regions of IgG mAb and CH2 and CH3 of IgA mAb were joined by means of a recombinant polymerase chain reaction method. We were able to express the hybrid H chain, IgG-derived L chain and I chain simultaneously in mammalian cells, and show binding of the hybrid IgA to immobilized StxIB with either anti-IgA or anti-IgG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 2).

We then moved on to the production of 'plantibodies' . cDNAs encoding hybrid H, L and I chains were subcloned into binary vectors, and then each construct was introduced into Arabidopsis thaliana by means of Agrobacterium methods (Fig. 3). After confirming gene integration, mRNA transcription and protein expression, we crossed plants expressing each antibody gene. We confirmed simultaneous expression of hybrid H. L and I chains. and demonstrated the binding of 'plantibodies' to StxIB by ELISA.

Perspectives

We are now investigating whether 'plantibodies' retain toxin neutralization activity. Immediate goals include the purification of 'plantibodies' from extracts, establishment of secretory hybrid IgA and its separation, and the development of more efficient systems for expression in plants. We also aim to produce 'plantibodies' in leaf lettuce to provide edible 'plantibodies' for humans. One of the advantages of hybrid IgA is that the antibody binding sites of established IgG can be utilized without challenging the production of IgA mAb, which is a more difficult procedure. As one possible application, we also succeeded in producing a hybrid IgA against influenza virus.

Production of hybrid IgA



ハイブリッド抗体の作製 IaG由来の可変部(抗原結合部位) とIgA由来の定常部をもつようにハイブリッドH鎖のcDNAを 作製した。これとIgG由来のL鎖のcDNAを共に発現すること で、単量体のハイブリッドIgAが構築される。

Production of hybrid antibodies

We constructed cDNA for a hybrid H chain with a variable region of IgG and constant region of IgA. Simultaneous expression of this cDNA and that for L chain of IgG yielded a monomeric hybrid lgA.

anti-lgA anti-laG lgG mAb hybrid-laG/la/ IgG mAb 50 75 100 Immunoglobulin conc. (ng/ml) Immunoalobulin conc. (ng/ml)

ハイブリッド抗体の抗原結合活性 固相化したStx1Bへの結 合性を抗マウスIgA(左図)と抗マウスIgG(右図)を用いて評 価した。ハイブリッド抗体のStx1Bへの結合は、どちらの2次抗 体によっても検出された。白抜きのシンボルは、Stx1Bをコー トしていないウェルに結合していないことを示す。

Antigen binding activity of the hybrid antibodies.

We used anti-mouse auchain (left nanel) or anti-mouse v-chain (right panel) to detect binding of antibodies to immobilized Sty I.B. Open symbols indicate no binding of antibodies to Sty I Runcoated wells

tumefaciens Tissue Culture

植物を用いた抗体の発現 抗体遺伝子のシロイヌナズナへの 道入によって、ハイブリッド抗体のH鎖を発現する個体が得ら

Expression of antibodies by plants.

We expressed hybrid H chain in Arabidopsis thaliana. Integration of the hybrid H chain gene into the plant genome, and expression of the hybrid H chain are shown.

■ 代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

- I. Y. Tobisawa, T. Maruyama, T. Tanikawa, K. Nakanishi, K. Kurohane, Y. Imai: Establishment of recombinant hybrid-IgG/IgA immunoglobulin specific for Shiga toxin. Scand. J. Immunol., 76, 574-584 (2011)
- 2. Y. Ohmichi, J. Hirakawa, Y. Imai, M. Fukuda, H. Kawashima: Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. J. Exp. Med., 208, 1015–1025 (2011)
- 3. J. Hirakawa, K. Tsuboi, K. Sato, M. Kobayashi, S. Watanabe, A. Takakura, Y. Ito, M. Fukuda, H. Kawashima: Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated N- and O-glycan in lymphocyte homing. J. Biol. Chem., 285, 40864-40878 (2010)
- 4. Y. Tobisawa, Y. Imai, M. Fukuda, H. Kawashima: Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. I. Biol. Chem., 285, 6750-6760 (2010)
- 5. T. Tanikawa, T. Ishikawa, T. Maekawa, K. Kurohane, Y. Imai: Characterization of monoclonal immunoglobulin A and G against Shiga toxin binding subunits produced by intranasal immunization. Scand. J. Immunol., 68, 414-422 (2008)

12 13