

抗体遺伝子導入によるウイルス病抵抗性植物の創出

佐賀大学農学部植物ウイルス病制御学教室
北海道大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座

おお しま かず さと
大 島 一 里
し へい し
四 方 英 四 郎

はじめに

抗体は抗原（異物等）の刺激による免疫応答の結果、脊椎動物の生体内で産生され抗原と特異的に結合する活性を持つタンパク質の総称である。その抗体を heterologous な系で発現させる試みは、大腸菌（HUSE ら, 1989; McCafferty ら, 1990; BUCHNER and RUDOLPH, 1991; Plückthun, 1991）、酵母（WOOD ら, 1985; HORWITZ ら, 1988）、そして非リンパ系細胞（WEIDLE ら, 1987; De Sutter ら, 1992）などで行われた。抗体の H 鎖及び L 鎖はそれぞれリーダーペプチドを有することから、動物細胞内の小胞体で両鎖が結合しゴルジ体を経て成熟した抗体になるが、植物細胞の小胞体及びゴルジ体が動物由来の抗体成熟に機能し得るのかなどが不明であったことから、活性抗体を植物体内で発現させることが難しいと言われてきた。

Hiatt ら (1989), Hiatt (1990) そして Hiatt and Ma (1992) は phosphonate ester に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの mRNA から抗体遺伝子（リーダーペプチド領域を含む）の全長 cDNA をクローニングし、H 鎖及び L 鎖を別々のタバコに導入後交配させ、活性抗体を産生することに成功した。その後、抗体遺伝子の全部あるいは一部を植物体で発現させる試みが DURING ら (1990), Benvenuto ら (1991), Owen ら (1992) そして De Neve ら (1993) により行われた。植物ウイルスに対する抵抗性植物を創出する目的で多くの研究者が植物ウイルスに対する抗体遺伝子のクローニングや植物体への導入を試みた (Jordan and Di Nola-Baron, 1991; 大島ら, 1992; Korschineck ら, 1993; Saunal ら, 1993; Sherwood ら, 1993; Xial ら, 1993; Ohshima, in press)。Tavladoraki ら (1993) は artichoke mottled crinkle virus (ACMV) 外被タンパク質に対するモノクローナル抗体遺伝子の H 鎖及び L 鎖の可変部領域のみ（リーダーペプチド領域を含まない）をリンカーペプチドで連結し (single-chain antigen-binding protein; scFv) (Bird ら, 1988; Winter and Milstein, 1991), これを *Nicotiana bentamiana* に導入しウイルス抵抗性植物を育成することに初めて成功した。本稿ではそれらの研究

を紹介するとともに基本的な抗体の構造、発現の様式、さらに我々の行ってきた研究結果（大島ら, 1992）の一部を紹介する。

I 抗体の構造

抗体 (IgG) の構造を図-1 に示した。H 鎖と L 鎖の N 末端部分はアミノ酸配列の変異に富む部分で可変領域 (V 領域) と呼ばれており、H 鎖と L 鎖の可変領域それぞれを V_H 領域及び V_L 領域と呼んでいる。残りの部分は、アミノ酸の変異の少ない部分で定常領域 (C 領域) と呼ばれ、L 鎖の定常構造部分を C_L 領域と呼んでいる。H 鎖の定常領域はさらに三つの独立した領域、 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} に分けることができる。これらの球状に折りたたまれた領域には、それぞれ一つの鎖内に S-S 結合が存在し高次構造の安定化に寄与している。この様な領域をドメインと呼び、抗体の抗原結合部位は可変領域ドメインにある。糖鎖は C_{H2} ドメインの表面に結合している。H 鎖の分子量は約 50,000~70,000, L 鎖の分子量は約 25,000 である。免疫グロブリン (IgG) はこのような 2 本の相同な H 鎖と 2 本の相同な L 鎖から成り立っており、両鎖が非共有結合と共有結合で 4 本鎖の基本構造を形成している。詳細は、坂野 (1982), 荒田 (1986) そして Roitt ら (1989) を参考にされたい。

II 免疫グロブリンの産生様式

B 細胞の分化過程で H 鎖及び L 鎖の生殖細胞胚型 DNA が組み換えを起こし B 細胞 DNA となり、再構成

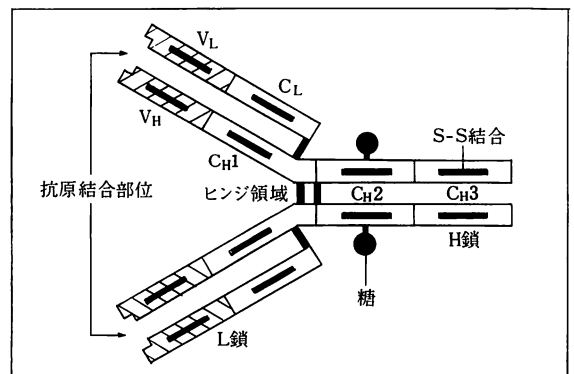


図-1 免疫グロブリン (IgG) の基本構造

された DNA から未熟型 RNA (mRNA 前駆体) が転写され、その RNA がスプライシングにより mRNA となる。これらの詳細は、SAKANO ら (1980)、TONEGAWA (1983) そして ROITT ら (1989) を参照されたい。分泌型免疫グロブリンの産生様式を図-2 に示した。免疫グロブリン両鎖の mRNA は核内で転写され、細胞質に移行しリボソームと結合する。リーダーペプチド領域が翻訳されると、そこに「シグナル認識粒」が結合して翻訳を一時的に阻害する。この認識粒とリボソームの複合体は粗面小胞体上に移動し、結合タンパクを介して粗面小胞体に結合する。この段階になって再びタンパク質の翻訳が開始され、生合成されたポリペプチド鎖は粗面小胞体の膜を経由して腔内へ移送される。ここでリーダーペプチド領域は除かれ、H 鎖と L 鎖は結合して免疫グロブリンサブユニットを構成する。粗面小胞体からゴルジ体へ移行する間に酵素 (E_1) が働いて免疫グロブリンに糖鎖を結合し、ゴルジ体では、別の酵素 (E_2) がさらに糖鎖に修飾を加え完全な形の免疫グロブリン分子として細胞外に分泌される。詳細な免疫グロブリンの産生様式は、H ONJO ら (1989)、ROITT ら (1989) のほかに多くの免疫学書に記載されているので参照されたい。

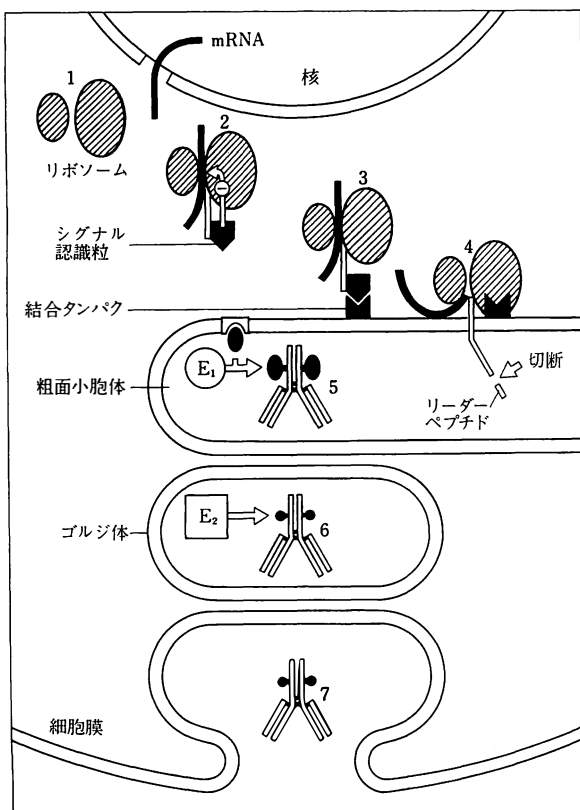


図-2 分泌型免疫グロブリンの産生様式

III 抗体遺伝子のクローニングと遺伝子構造

リーダーペプチド領域を必要としない場合は、H 鎖及び L 鎖の可変部及び定常領域の遺伝子にある程度の保存配列が見いだされるので、両鎖の一部の合成 DNA を作製後抗体産生ハイブリドーマの mRNA を鋳型として逆転写 polymerase chain reaction (RT-PCR) 法 (SAIKI ら, 1988) によりクローニングすることが可能である (CHIANG ら, 1989; LARRICK ら, 1989; WEISSENHORN ら, 1991)。

一方、リーダーペプチド領域を含んでクローニングする場合はその領域は抗体によって多様であるため、抗体産生ハイブリドーマの遺伝子ライブラリーを作製しなければならない。我々 (大島ら, 1992) は、ジャガイモ Y ウイルス (PVY) 外被タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製してきたが、PVY の普通系統及びえそ系統の両方に反応し、4 種類の異なる ELISA 法、ウェスタンブロットング法さらに微量沈降反応法等の血清学的手法において良好な反応を示した 42C07 モノクローナル抗体 (IgG₃ 型) を用いた。まず、42C07 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから全 RNA を抽出後 mRNA を精製し、それを鋳型として GUBLER and HOFFMAN 法 (1983) により cDNA を合成後、 λ ZAP II ベクターに組み込み抗体産生ハイブリドーマの遺伝子ライブラリーを作製した。次に KABAT ら (1983) を参考にして H 鎖及び L 鎖の可変領域及び定常領域一部の合成 DNA を作製し、その合成 DNA をプライマー、ハイブリドーマの mRNA を鋳型として RT-PCR 法により DNA を増幅した。増幅した DNA の塩基配列を決定した結果、抗体遺伝子と思われる配列が認められたので、これらをプローブとしてブラークハイブリダイゼーションにより遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行い抗体遺伝子を選抜後、pBluescript にクローニングした。以上のクローンについて塩基配列を決定したところ、5' 末端に抗体遺伝子のリーダーペプチド領域、3' 末端にポリ A 配列が見いだされ、両鎖ともに全長の遺伝子であることが確認された (図-3)。

IV 抗体遺伝子の植物体への導入

抗体遺伝子の植物体への導入方法は H 鎖及び L 鎖それぞれを別々の植物体に組み込み交配により活性のある抗体を作出する方法 (HIATT ら, 1989) と、一つの植物発現ベクターに両鎖をリンカーペプチドで連結 (scFV) し植物体へ導入する方法が報告されている (OWEN ら, 1992; TAVLADORAKI ら, 1993) (図-4)。植物ウイルスに対して植物体が抵抗性を示したことを報告したのは後者であるが、共に活性のある抗体の作出に成功している。植物体への抗体遺伝子の導入方法として、HIATT ら (1989)

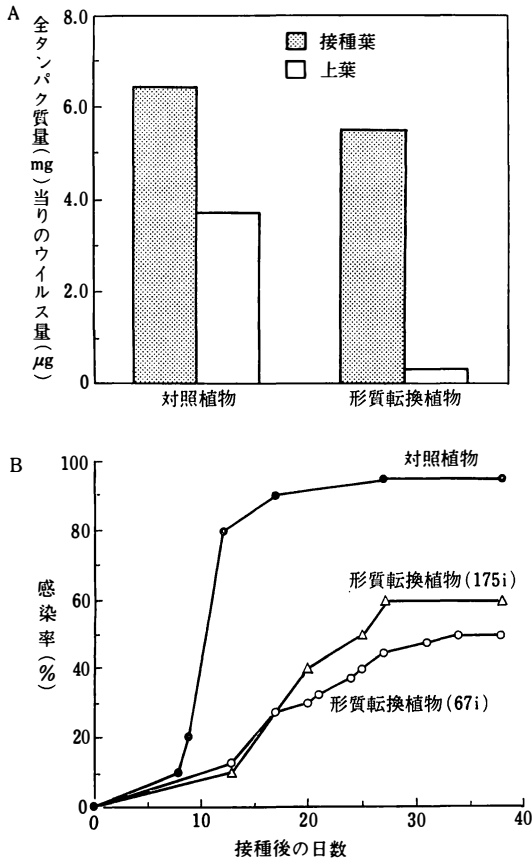


図-5 形質転換植物 (自殖第1世代) の ACMV の蓄積 (A) と感染率 (B) (TAVLADORAKI ら, 1993 より引用)

付与するためには、モノクローナル抗体の性状が大きな鍵を握る。TAVLADORAKI ら (1993) は、AMCV 外被タンパク質の Ca^{2+} 結合部位に対するモノクローナル抗体を導入したが、この他にウイルスの複製と増殖に関与するタンパク質、例えばゲノム結合タンパク質、ヘリカーゼ、RNA 依存 RNA 合成酵素、ウイルスの移行に関する酵素さらにタンパク質分解酵素を中和するモノクローナル抗体などが考えられる。

抗体を植物体で発現させる目的は、①植物ウイルスに対して抵抗性を付与するだけにとどまらず、②植物病原糸状菌や細菌に対する抵抗性の付与、③有害な土壤汚染物質からの保護、④ホルモンに対する抗体を発現させることで生合成経路における代謝の制御を行うことや⑤医学・薬学に必要なモノクローナル抗体を大量に圃場で生産することなどが考えられ、現在主流であるウイルス外被タンパク質を導入した抵抗性植物に代わって、近い将来抗体産生植物が大きな役割を果たすことが期待される。

ここに掲載した結果の一部は、北海道大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座において行われ、現在も継続して研究中である。特にご指導いただいた札幌医科大学第

一病理学教室教授菊池浩吉博士、北海道大学農学部教授木村郁夫博士、また共同研究していただいた札幌医科大学第一病理学教室講師松浦晃洋博士、さらに現在研究を継続中の北海道大学農学部助手畑谷達児氏に厚くお礼を申し上げる。

引用文献

- 1) 荒田洋治 (1986) : 蛋白質 核酸 酵素 31 : 782~797.
- 2) BENVENUTO, E. et al. (1991) : Pl. Mol. Biol. 17 : 865~874.
- 3) BIRD, R. E. et al. (1988) : Science 242 : 423~426.
- 4) BUCHNER, J. and R. RUDOLPH (1991) : Bio/Technology 9 : 157~162.
- 5) CARPITA, N. et al. (1979) : Science 205 : 1144~1147.
- 6) CHIANG, Y. L. (1989) : Biotechniques 7 : 360~366.
- 7) DE NEVE, M. et al. (1993) : Trans. Res. 2 : 227~237.
- 8) DE SUTTER, R. et al. (1992) : Gene 113 : 223~230.
- 9) DÜRING, K. et al. (1990) : Pl. Mol. Biol. 15 : 281~293.
- 10) GUBLER, U. and B. J. HOFFMAN (1983) : Gene 25 : 263~269.
- 11) HIATT, A. (1990) : Nature 344 : 469~470.
- 12) ——— and J. K-C. MA (1992) : FEBS LETTERS 307 : 71~75.
- 13) ——— et al. (1989) : Nature 342 : 76~78.
- 14) HONJO, T. et al. (1989) : Immunoglobulin Genes, Academic Press, London, 410pp.
- 15) HORWITZ, A. H. et al. (1988) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 8678~8682.
- 16) HUSE, W. D. et al. (1989) : Science 246 : 1275~1281.
- 17) JORDAN, R. and L. DI NOLA-BARON (1992) : Phytopathology (Abstracts) 81 : 1174.
- 18) KABAT, E. A. et al. (1983) : U. S. Dept. Health and Human Services. 323pp.
- 19) KORSCHINECK, I. et al. (1993) : IXth Int. Cong. Virol. (Abstracts) p 361.
- 20) LARRICK, J. W. et al. (1989) : Bio/Technology 7 : 934~938.
- 21) 町田泰則 (1989) : 植物細胞工学 1 (1) : 19~33.
- 22) McCafferty, J. et al. (1990) : Nature 348 : 552~554.
- 23) OHSHIMA, K. (1994) : "Monoclonal Antibody : Viruses" Advanced Methods in Plant Pathology. CRC Press, New York (in press).
- 24) 大島ら (1992) : 日植病報 (講要) 58 : 637.
- 25) OWEN, M. et al. (1992) : Bio/Technology 10 : 790~794.
- 26) PLUCKTHUN, A. (1991) : ibid. 9 : 545~551.
- 27) 坂野仁 (1982) : 蛋白質 核酸 酵素 27 : 1021~1037.
- 28) ROITT, I. M. et al. (1989) : Immunology, Gower Medical Publishing Ltd. London (多田富雄監訳, 免疫学イラストレイテッド, 南江堂), 358pp.
- 29) SAIKI, R. K. et al. (1988) : Science 230 : 1350~1354.
- 30) SAKANO, H. et al. (1980) : Nature 286 : 676~683.
- 31) SAUNAL, H. et al. (1983) : J. Gen. Virol. 74 : 897~900.
- 32) SHERWOOD, J. L. et al. (1993) : IXth Int. Cong. Virol. (Abstracts) p 361.
- 33) TAVLADORAKI, P. et al. (1993) : Nature 336 : 469~472.
- 34) TONEGAWA, S. (1983) : ibid. 302 : 575~581.
- 35) 内宮博文 (1990) : 植物遺伝子操作マニュアル, 講談社サイエンティフィック, 138 pp.
- 36) WEIDLE, U. H. et al. (1987) : Gene 51 : 21~29.
- 37) WEISSENHORN, W. et al. (1991) : ibid. 106 : 273~277.
- 38) WINTER, G. and C. MILSTEIN (1991) : Nature 349 : 293~299.
- 39) WOOD, C. R. et al. (1985) : ibid. 314 : 446~449.
- 40) XIAL, X. W. et al. (1993) : IXth Int. Cong. Virol. (Abstracts) p 342.
- 41) 山田康之編著 (1992) : 植物分子・細胞工学マニュアル, 講談社サイエンティフィック, 228pp.