

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」  
平成13年度採択研究代表者

宇田 泰三

(広島県立大学大学院生物生産システム科 教授)

「健康・福祉のためのナノバイオ材料および  
バイオ素子としての「スーパー抗体酵素」の創製」

#### 1. 研究実施の概要

「スーパー抗体酵素」(Antigenase)は抗体でありながら標的とするタンパク質抗原を酵素的に分解(破壊)することのできるユニークな性質を有している。本研究では悪性細菌や悪性ウイルスに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を意図的に作製できるのか、また、作製できた「スーパー抗体酵素」(Antigenase)はどの程度の酵素活性や抗原認識能をもつのか、さらには悪性細菌や悪性ウイルスに対してどの程度の有用性を示すのかを解明し応用することにある。

15年度は*Helicobacter pylori*菌のureaseに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)のHpU系列およびUA系列についてペプチダーゼ活性の速度論的解析を行い、どの「スーパー抗体酵素」(Antigenase)が最も高い反応性を示すか検討した。結果的にHpU-17およびUA-15を今後のin vitro およびin vivo試験に主に使う事を決定した。

HIVの感染に深く関与するchemokine receptor CCR5の第2細胞外領域を標的にした「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の作製を済ませているが、今年度は新たに、CCR5のN末端領域を狙った抗体作製に取りかかり、将来的にCCR5分子の第2細胞外領域およびN末端領域の2カ所を同時に攻撃できるいわゆる「ナノ攻撃システム」の構築に着手した。さらに、初年度に計画していたインフルエンザウイルスに対する抗体酵素の取得に成功した。

今年度発見した新たな「スーパー抗体酵素」(Antigenase)をデータとして追加し、PCT特許として米国および欧州に出願した。論文的にもAntigenaseの概念を広く世界に知らしめる努力を行った。特に「抗体酵素は生物の進化過程において酵素と抗体の中間的な時期に出現したのではないか」との、大胆な仮説を提案した。

抗体酵素の臨床学的な検討を進めた結果、自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎の病態と抗体酵素の活性とが非常に良い相関をなしており、生理学、病理学および診断学的に重要であることを見出した。

## 2. 研究実施内容

### 研究目的：

エイズウイルスやインフルエンザウイルス、さらには胃潰瘍（or 胃ガン）の原因菌とされるピロリ菌などの悪性ウイルスや悪性細菌をターゲットに、感染に関与している分子を標的にした抗体を作製する。そして、抗原である標的分子を破壊するAntigenaseを取得し、新規医薬品開発の道を切り拓く。また、複数の標的分子（あるいは標的部位）に対して攻撃可能な複数のAntigenaseの取得も目指す。また、学問的にはAntigenaseの本質にせまることと、さらには抗体酵素の臨床学的意義を明らかにする。

### 方法：

#### 抗体の作製

モノクローナル抗体はBalb/cマウスを使って通常の細胞融合法により行った。抗原であるペプチドはポリペプチド自動合成装置を用いてFmoc法により行い、多くの場合C末端にCys付加生成物として合成した。上記ペプチドをKLH, BSAなどのタンパク質と結合させたものを免疫原に用いた。タンパク抗原はintactのまま免疫した。細胞融合後HAT選択及びスクリーニングを行って、クローニングの後に抗体産生ハイブリドーマを確立し、大量の抗体はマウス腹水より採取した。

#### H鎖およびL鎖の分離と精製

精製したモノクローナル抗体に対して0.2 Mβ-メルカプトエタノールによる還元反応と、0.3 Mヨードアセトアミドによるアルキル化反応を行い、H鎖とL鎖に分離した。引き続き、6 M Guanidiniumを溶離液とするサイズ排除HPLCによりH鎖とL鎖に精製した。この精製したH鎖およびL鎖溶液は、PBSに対する透析によってRefoldingした後に、反応条件に合わせてbuffer交換した。

#### 基質に対する分解反応

合成ペプチドを基質として使用した場合は、滅菌済みの試験管内にペプチド（60～120 μM）とH鎖またはL鎖（0.4～0.8 μM）を加えて25℃で反応させ、ペプチドの濃度変化を逆相HPLCで分析した。タンパク質抗原の場合はSDS-PAGE（silver-staining）でその分解過程を追跡した。

#### 抗体の三次元立体構造解析

抗体可変領域の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。このアミノ酸配列、またはProtein Data Bankに登録されている抗体のアミノ酸配列を元に、ソフトウェアAbM（Oxford Molecular社）を使って三次元構造を構築した。続いてDiscover（Molecular Simulations社）を用いてエネルギーの最小化を行った。

### germline geneの解析

マウスのκ型L鎖については、Ig BLAST (National Center for Biotechnology Information)を使ってgermline geneとのホモロジーをアミノ酸レベルで検索した。

結論：

- ①エイズウイルスの感染に重要であり、ヒト細胞上に発現しているchemokine receptor CCR5に対して数種類の「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を作製する事に成功した。そのなかでECL2B-2抗体軽鎖は非常に高い酵素活性 ( $k_{cat}=2.3 \text{ min}^{-1}$ ) を発揮した。
- ②*Helicobacter pylori* ureaseに対してはHpU系列およびUA系列の抗体についてそれぞれ数種類の「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を得ることが出来た。そしてこれらは*Helicobacter pylori* ureaseを特異的に分解する事を確かめた。
- ③抗原分解活性を示したものは抗体の構造中に触媒三つ組み残基の存在すると推測されたものが大半であった。
- ④ある特定のgermlineに属する抗体は生まれながらにして酵素活性を有しているとの結論に至り、これをさらに展開し、「抗体酵素は生物の進化の過程で酵素の誕生後、抗体の誕生前に生まれたはずである。」との仮説を持つに至った。
- ⑤抗体酵素の臨床的意義の一面が明らかとなった。即ち、自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎において、その病態と血清中の抗体酵素の活性とが非常に良い相関をなすことを見出した。

### 3. 研究実施体制

#### 1) 宇田グループ (研究分担グループ長：宇田泰三)

| 研究者名        | 所属                  | 役職    | 研究項目                  |
|-------------|---------------------|-------|-----------------------|
| 宇田泰三        | 広島県立大学              | 教授    | 反応解析・研究統括             |
| 江頭直義        | 広島県立大学              | 教授    | センサ材料作製               |
| 一二三恵美       | 広島県立大学              | 助手    | 抗体酵素の設計               |
| 光田有希恵       | 広島県立大学              | 大学院生  | 酵素活性の解析               |
| 山田由紀子       | 広島県立大学              | 大学院生  | ピロリ菌に対するAntigenaseの取得 |
| 鉢内健司        | 広島県立大学              | 大学院生  | 速度論的解析                |
| 城平直樹        | 広島県立大学              | 大学院生  | 新規Antigenaseの開発       |
| 奥田拓郎        | CREST               | 技術員   | ピロリ菌の感染実験             |
| 野田昌樹        | 島津製作所               | 課長    | 免疫抗原の設計               |
| 山本 剛        | CREST               | 研究補助員 | センシングの応用技術開発          |
| 横道 博        | CREST               | 研究補助員 | 抗体酵素の活性獲得要因の解析        |
| 森原史子        | 福山臨床                | 研究員   | ワクチン化への展開             |
| Sudhir Paul | Univ. Texas-Houston | 教授    | 情報交換・性能解析             |
| 篠原兵庫        | 老健美樹の園              | 院長    | 顧問                    |

(2) 松浦グループ (研究分担グループ長：松浦欽司)

| 研究者名 | 所 属      | 役 職           | 研究項目          |
|------|----------|---------------|---------------|
| 松浦欽司 | 花田医院・近畿大 | 院長・非常勤<br>研究員 | BJPの取得        |
| 小原京子 | 花田医院・近畿大 | 研究職員・研<br>究生  | BJPの精製および活性評価 |

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Kenji Hatiuchi, Emi Hifumi, Yukie Mitsuda, and Taizo Uda, Endopeptidase character of monoclonal antibody i41-7 subunits, *Immunol. Lett.* **86**, 249-257(2003).
- E. Hifumi, H. Kondo, Y. Mutsuda, T. Uda, Catalytic features of monoclonal antibody i41SL1-2 subunits, *Biotechnol. Bioeng.*, **84**(7), 485-493(2003).
- 一二三恵美, Antigenaseとしての「スーパー抗体酵素」とその効率的作製法, *化学工業*, **54**, 368-372(2003).
- 宇田泰三, 「スーパー抗体酵素」(Antigenase)は抗生物質を超えられるか? *化学*, **58**(12), 26-28 (2003).
- T. Uda, E. Hifumi, Y. Mitsuda, K. Hatiuchi, "Super catalytic antibody" decomposing antigen molecules, ICBN 2003 Tokyo, The First International Congress on Bip-Nanointerface, pp83, 2003, Tokyo.
- Yukie Mitsuda, Emi Hifumi, Kumi Tsuruhata, Hiroko Fujinami, Naoki Yamamoto and Taizo Uda, Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant. *Biotechnol. Bioeng.* **86**(2), 217-225(2004).
- Kyoko Ohara, Hiroshi Munakata, Emi Hifumi, Taizo Uda, Kinji Mastuura, Improvement of catalytic antibody activity by protease processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**(3), 612-616(2004).
- T. Uda and E. Hifumi, Super catalytic antibody and Antigenase, *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 143-152(2004).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件 国際出願/PCT 特許 (CREST研究期間累積件数：8件)