

「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

(県立広島大学 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)を意図的に作製可能なのか、また、作製した「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。

16年度は*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)菌のureaseに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)のHpU系列(HpU-2, -9および-20)および、UA系列(UA-15)について精製した*H. pylori* ureaseに対して分解試験を実施した。その結果、HpU-2では重鎖、HpU-9では軽鎖、HpU-20では重鎖、そしてUA-15では軽鎖が*H. pylori* ureaseを特異的に分解する性能を有していることが判明した。また、これら抗体subunitのいくつかは*H. pylori*菌を使っての分解試験においてもureaseを特異的に破壊した。

昨年度までに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った。その結果、CCR5分子のN末端領域を特異的に破壊する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の取得に成功した。これにより、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「複合ナノターゲティングシステム」の構築が可能になったと考えている。

インフルエンザウイルスに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)については、2種類のモノクローナル抗体を取得し、その重鎖あるいは軽鎖を使った実験を実施した。

Antigenase 41S-2-L等の酵素活性発現メカニズムの解明と効率的作製法についての検討では、Antigenase 41S-2-Lが抗原と出会ってinduced fittingによりコンフォメーション変化を起こし、抗体軽鎖の疎水性部分が表面に露出することにより、軽鎖自身がmultimer(凝集体)になることで強い酵素活性を発揮すると結論した。

昨年度に引き続き、今年度もAntigenaseの概念を広く世界に知らしめる努力を論文およ

び学会発表を通して行った。

ヒト抗体酵素軽鎖(Bence Jones Protein : BJP) を用いた研究で、BJPには正常腎培養細胞に傷害性を有し、病原性を示すものがあることが現在までの研究で判明した。このBJPの酵素活性を抑制すると細胞への傷害性が消失した。このことから抗体酵素活性を阻害剤によって抑制することにより抗体酵素の病原性を低下させ、臨床への応用をはかることが可能となる事が示した。

さらに、BJPの中には抗原特異性（基質特異性）の違いにより他の細胞にも傷害性を示すものがあると考えられる。種々のBJPを用いて細胞傷害性をスクリーニングした結果、正常細胞に傷害性を示さず癌細胞に特異的に傷害を与えるBJPを取得した。

また、抗体修飾リポソームと電解発光を組み合わせた新規センシング法を構築し、抗体酵素を用いたバイオ素子への展開も図っているところである。

2. 研究実施内容

研究目的：

- 1, 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取り上げ、感染に深く関与している分子を標的にして抗体を作製する。そして、これらの抗体subunitから標的分子を酵素的に破壊する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の取得を行い、複合ナノターゲティング材料の開発も視野に入れる。また、学問的にAntigenaseの本質を解明する。
- 2, BJP（ヒト抗体軽鎖）の酵素活性が細胞傷害性や臨床的に病原性を有するかを明らかにする。病原性を有する場合、そのBJPの酵素活性を阻害することにより病原性を低下させ臨床的応用可能かを試みる。また、プロセッシングにより活性を上昇させたBJPが細胞にどのような影響をもたらすかを検討する。
- 3, 癌細胞を傷害する抗体軽鎖を見出し臨床的に応用可能かを検討する。
- 4, 抗体酵素を用いたバイオ素子を構築する。

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末端あるいはN末端にCysを付加したものを合成した。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の状態免疫した。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、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 M β -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 グアニジンを用いた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。

・分解反応試験

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 μ M) とH鎖またはL鎖 (0.4–0.8 μ M) を加えて25°C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) またはwestern blottingにより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解析

マウスおよびヒトの抗体遺伝子については、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。

・プロテアーゼインヒビターによる抗体酵素活性阻害のスクリーニング

臨床では抗炎症作用、抗酵素作用などを目的にすでに種々のプロテアーゼインヒビターが使用されている。これらの中には広範囲に酵素活性を阻害するものがあり、これらを抗体酵素軽鎖に加え酵素活性を阻害するかを検討した。またその活性阻害による細胞への影響の変化を検討した。

・抗体酵素活性の向上

種々の抗体酵素軽鎖をリシルエンドペプチダーゼによってプロセッシングし、抗体酵素活性の変化を調べた。プロセッシングされた抗体酵素軽鎖断片を培養細胞に加え細胞への影響を観察した。

・細胞障害性

種々の培養癌細胞に抗体酵素活性の認められる抗体酵素軽鎖を加え細胞の変化を観察しスクリーニングした。

・抗体修飾リポソームの調製

ホスファチジルコリンジパルミトイル (DPPC) 、コレステロール、活性化型ホスファチジルエタノールアミンを用いて超音波法によりルテニウム錯体内封活性型リポソームを調製した。この活性型リポソームにBSA抗体を結合し、ゲルろ過して抗体修飾リポソームを精製した。

・電極反応

種々の濃度のBSA溶液と抗体修飾リポソームの一定量をBSA修飾金電極チップ上に加え、競合反応をさせた。その後、電極チップ上の溶液を除き、緩衝液で洗浄した。金電極チップ上にエタノールを加え、加熱（60℃）し、結合したリポソームを破壊した。漏れ出したルテニウム錯体は金電極に吸着しているので、この電極を再度緩衝液を洗浄後、電解発光測定装置にセットした。続いて、電圧を印加（+1.2 V vs. Ag/AgCl）し、発光強度を測定した。

結論：

- ① エイズウイルスの感染阻止を計るために、ヒト細胞上に発現しているchemokine receptor CCR5分子の第2細胞外領域およびN末端領域のそれぞれを標的とする「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を作製する事に成功した。
- 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、これらは*Helicobacter pylori* ureaseを特異的に分解するだけでなく、*Helicobacter pylori*菌を使った実験においても、特異的にureaseを分解した。
- ③ インフルエンザウイルスに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の取得に成功した。
- ④ ヒトおよびマウスのgermline解析から、ヒト型Antigenaseの効率的作製法を見いだした。
- ⑤ プロセッシングを受け酵素活性が発現・上昇した抗体軽鎖は、細胞傷害性も獲得することを解明した。
- ⑥ 正常細胞への細胞傷害性を持つ抗体酵素軽鎖は腎障害などの病気を惹起する可能性があるが、この抗体酵素軽鎖に対する蛋白分解酵素阻害剤を投与することにより病気の発症や進展を抑制することが可能になる事を見出した。
- ⑦ 特定の抗体酵素軽鎖にはある種の癌細胞に対して特異的に傷害性を示すものが存在する事を認めた。
- ⑧ バイオ素子の実験では、電解発光種であるルテニウム錯体を内封したリポソームを調製後、表面に抗BSA抗体を固定化した金電極チップ上で、 $10^{-12} \sim 10^{-18}$ molのBSAを測定できることを明らかにした。

3. 研究実施体制

宇田グループ

- ① 研究分担グループ長：宇田 泰三（広島県立大学生物資源学部、教授）
- ② 研究項目：新しい「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の開発とその応用展開

松浦グループ

- ① 研究分担グループ長：松浦 欽司（花田医院；院長 近畿大学；非常勤講師）
- ② 研究項目：ヒト型抗体軽鎖(Bence Jones Protein：BJP)の取得と断片化による酵素活性向上法の検討およびBJPの培養癌細胞への影響

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

- Epitope mapping and features of the epitope for MAbs inhibiting enzymatic activity of *H. pylori* urease. R. Fujii, F. Morihara, T. Oku, E. Hifumi, and T. Uda, *Biotechnol. Bioeng.* 86, 434-444(2004).
- A recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against *H. pylori* associated disease. R. Fujii F. Morihara, K. Fukushima, T. Oku, E. Hifumi and, T. Uda, *Biotechnol. Bioeng.* 86(7), 737-747(2004).
- Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant. Y. Mitsuda, E. Hifumi, K. Tsuruhata, H. Fujinami, N. Yamamoto, T. Uda, *Biotechnol. Bioeng.* 86(2), 217-225(2004). (April 20).
- Improvement of catalytic antibody activity by protease processing. Kyoko Ohara, Hiroshi Munakata, Emi Hifumi, Taizo Uda, Kinji Matsuura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315(3), 612-616(2004).
- Application of electrochemiluminescence sensor to a rapid method of estimating activity of enzyme in hydrolysis of peptides, P. Jinshun, Y. Mitoma, T. Uda, E. Hifumi, K. Shimizu, N. Egashira, *Electroanalysis*, 16, 1262-1265 (2004).
- Super catalytic antibody and “Antigenase”, T. Uda and E. Hifumi, *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 143-152(2004).
- Possibility of “Super catalytic antibody” (Antigenase) as a sensing molecule, Taizo Uda, Yukie Mitsuda, Emi Hifumi, The Tenth International Meetings on Chemical Sensors, pp344-345, July 11-14, 2004, Tsukuba, Japan
- Determination of thiabendazole on the basis of electrochemiluminescence generated from the reaction with ruthenium complex. N. Egashira, Y. Mitoma, K. Shimizu, T. Uda, The Tenth International Meetings on Chemical Sensors, pp628-629, July 11-14, 2004, Tsukuba, Japan

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：9件）