

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」  
平成 19 年度採択研究代表者

宇田 泰三

大分大学工学部・教授

高機能分子「スーパー抗体酵素」の自動合成装置と大量合成

## 1. 研究実施の概要

初年度は研究期間も短いし、平成 20 年 4 月から本研究を本格的に立ち上がるため、平成 19 年度年次計画に示したように主として研究環境の整備を行った。並行して新テーマを迅速に走らせるための予備的実験および先行実験に取り掛かった。まず、ヒト型スーパー抗体酵素として活性を有する分子を選択的かつ特異的に選別する系を構築するための初期段階として、ヒトの軽鎖部分を包括的にカバーできるような軽鎖遺伝子の大腸菌発現ライブラリを構築し、特異的なクローンのスクリーニングに取り掛かった。また、堀池研究統括から指示されたように、抗体酵素の自動合成のための戦略を練り直すとともに、共同研究相手先の選別を行った。チーム内の情報の共有化および目指す方向性のベクトル合わせを行うための小ミーティングを繰り返し行った。これらの事により、本研究を実施する実験室の整備、平成 20 年度 4 月から雇用する研究員の確保、細胞への抗体酵素の影響を視覚的に捉える顕微鏡の設置、ヒト型抗体酵素取得の先行実験、自動合成装置の研究戦略立案などに取り組み、計画の通りにほぼ推移した。平成 20 年 4 月から本格的な研究開発に移行する体制が整った。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は4.(1)に対応する)

### 本年度の研究実施内容とその概要

#### 1 宇田グループ

1-1 ワクチン接種者（狂犬病など）からの血液採取，ヒト型抗体軽鎖のライブラリー化，ヒト抗体軽鎖遺伝子の直接増幅法およびヒト型抗体軽鎖遺伝子の取得

狂犬病ワクチンを接種し、十分に免疫されたヒトボランティアの末梢リンパ球から抗体遺伝子の cDNA を作成し、ライブラリー作成のための鋳型とした。軽鎖の多様性を確保するため、報告されているヒト抗体遺伝子の軽鎖部分の遺伝子配列情報を元に、これらのすべてを網羅的に増幅できるようなプライマー配列を設計した。このプライマーと上述の鋳型を用いて、PCR 法により軽鎖遺伝子断片を増幅し、大腸菌発現ベクターに挿入し、LCA ライブラリーを構築した。さらに触媒三つ組様アミノ酸残基を分子内に有し、酵素活性を持つ可能性が高いとされる軽鎖が属する germline のサブグループ 2 のみに対応する LC2 ライブラリーを構築した。

2つのライブラリーそれぞれについて大腸菌を形質転換し、目的の軽鎖を効率良く発現させてランダムに選んだ約 800 クローンをスクリーニングした。第 1 スクリーニングでは ELISA 系を用いて、軽鎖発現と狂犬病ウイルスウイルスへの結合活性を有するクローンを LCA と LC2 ライブラリーからそれぞれ 20 クローン、23 クローンを選択した。さらに、培養のスケールを上げ、2 段階目のスクリーニングを行い、それぞれ 3 クローン (LCA)、4 クローン (LC2) を選別した。これら 7 クローンの塩基配列を確定しアミノ酸配列を推定し、軽鎖サブグループおよび germline を確定すると共に、培養スケールを上げ His タグを利用して精製し、狂犬病ウイルス抗原との親和性を調べた。

その結果 LCA ライブラリーは  $1.35 \times 10^5$  CFU、LC2 は  $2.58 \times 10^4$  CFU のサイズがあり、十分に多様性を有していると考えられた。それぞれのライブラリーより 400 クローンをランダムに選んで合計 800 クローンをスケールアップしながら 3 段階のスクリーニングにかけたところ、有望なクローンが LCA ライブラリーより 3 クローン、LC2 ライブラリーより 4 クローンが選別できた。Germline 解析から、酵素活性を有するクローンの可能性も示唆されたので、今後 *in vitro* での抗原特異性と酵素活性について検討を進める。

1-2 マウス型抗体の重鎖遺伝子を用いての最適発現系の探索、発現系の条件検討、構造と活性の基礎的検討（先行実験課題）

これまでマウス腹水から分離精製して酵素活性が存在すると考えられた抗体（の重鎖）を遺伝子的にクローニングし、ベクターに組み込んでその組み換え体が大腸菌で発現させた。この時、用いるベクターの種類、発現させる抗体酵素の分子サイズ、前培養および本培養の時間、温度、IPTG 濃度、発現誘導時間、精製法などを検討した結果、40mL 培養から約 0.7mg の抗体重鎖が取得できた。この結果を 1.0L 培養に単純に当てはめると 10-20mg/L

となり、大量製造に目途がつく。今後、この条件を実際に実施して、抗体軽鎖あるいは抗体重鎖が高い純度でそして大量に製造できるかの確認実験をおこなう。

### 1-3 自動合成装置作製のための取り組み

今後の進め方を含む研究戦略を立案し、まず最低限必要な機器類を借り入れにより調達した。また、抗体の酵素活性の検出法や他への展開<sup>1)</sup>などについて意見を出しあって議論を深めた。

### 1-4 その他

本 CREST では抗体酵素に実用化のために、*in vitro*, *in vivo* 試験が多くなる。ターゲットは違うがこれまでのピロリ菌ウレアーゼに対する抗体酵素の *in vitro*, *in vivo* 試験の手技をひとつ確立できた<sup>2)</sup>。

## 2 Kaveri グループ (および宇田グループ)

「スーパー抗体酵素」の実用化には動物を用いての実験（主にマウスあるいはラットを使用する）で「スーパー抗体酵素」の生理・薬理を含む生体内動態を明らかにする事が肝要である。平成19年度は研究戦略の立案と（以下に示す）、平成20年度から本格的に取り掛かるための研究室整備を行った。

Sepsis is an extremely serious health disaster due to infections that are either community- or hospital-acquired, or due to the exposure to biological weapons. Sepsis is a very common cause of deaths every year. Currently available therapeutic strategies are not satisfactory. There is an urgent need for improving the currently available therapeutic strategies to counter these problems. Conception and designing of next generation immunoglobulin (Ig) preparations is a critical necessity. To meet these needs, the French group is planning to develop a series of novel technologies to isolate catalytic antibodies with immunomodulatory potential in sepsis. The French group has planned to use a chromatography matrix with specific affinity for the serine protease enzymatic site of catalytic IgG to enrich catalytic IgG antibodies from commercially available Ig preparations. The other ‘modified’ preparations include acid-treated and UV-treated immunoglobulin preparations and also IgG exposed to reactive oxygen species (ROS).

The research effort of the French group has focused on the design of improved immunoglobulin preparations to be tested in animal models of sepsis.

### **Conception of immunological and biochemical tools**

Several sources of catalytic antibodies will be isolated from pools of immunoglobulins.

***Natural polyclonal human catalytic antibodies:*** Spontaneous allo-immunization against the protease inhibitor aprotinin leads to the generation of antibodies directed against its active site,

in patients with cardiac transplantation. The serine protease activity of such antibodies has not been examined. An affinity matrix of aprotinin-sepharose is being designed to isolate anti-aprotinin antibodies from pools of IgG and IgM. An enrichment of catalytic antibodies in the purified fractions will be examined by PFR-MCA cleavage assays described below.

***Evaluation of the effect of catalytic and of modified antibodies in biological systems:*** We have previously obtained preliminary data in our laboratory, which indicate that the presence of catalytic Ig correlates with survival from sepsis in human patients. To confirm this hypothesis, we intend to administer catalytic Ig or modified IVIg to mice before subjecting them to CLP and study their survival.

Septic shock will also be induced in mice by injecting *E. coli* or *Candida albicans*. Multiple organ dysfunction will be induced by i.p. injection of zymosan. Efficacy of different Ig preparations will be tested by upon intravenously injection. Control Igs include non-catalytic polyclonal and monoclonal Ig and Ig treated with suicide protease inhibitors such as PMSF or di-isopropyl fluorophosphate (DFP).

### **Experimental models of sepsis**

Several models of murine sepsis will be used: injection of LPS, of live bacteria and ligature and puncture of caecum (CLP). Two strains of mice will be used: Balb/c and MRL/lpr. The latter generate more catalytic antibodies when immunized with transition state analogs of different chemical reactions. The presence, evolution and characteristics of catalytic antibodies at various time points following induction of sepsis in mice will be determined and correlated with the clinical chemistry and survival of animals.

Mice will be bled and the state of the complement and blood clotting cascades will be analyzed. Groups of animals will be sacrificed and the number of viable bacteria will be determined in spleens, livers, kidneys and brains (when appropriate). Histological evaluation will be carried out after standard hematoxylin-eosin staining. Spleen cells will be cultured and the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in the supernatant will be determined using commercial kits. The CytoKine Antibody Array (Raybiotech) that permits the simultaneous quantitative determination of 62 different cytokines and other molecules implicated in inflammation will also be used. The survival curves will be compared to that of the mice treated with the same doses of native IVIg or with PBS alone.

## **3. 研究実施体制**

(1)「宇田」グループ(大分大学)

① 研究分担グループ長: 宇田 泰三(大分大学、教授)

## ② 研究項目

- (1) ワクチン接種者（狂犬病など）からの血液採取
- (2) ヒト型抗体軽鎖のライブラリー化
- (3) ワクチン接種者からのヒト型抗体軽鎖遺伝子の取得
- (4) マウス型抗体重鎖遺伝子を用いての最適発現系の探索（プラスミド、宿主など）
- (5) 構造と活性の基礎的検討
- (6) ヒト抗体軽鎖遺伝子の増幅および発現条件等の検討
- (7) 自動合成装置の開発

(1)、(2)、(3)については予定通り遂行できた。(4)については大量発現への目途を立てつつある。(5)は基礎的研究テーマで5年間続けるが、装置類のセットアップを行っている。(6)についてはいくつかの基礎的データを採取した。(7)については研究戦略を立案し、次年度以降の取り組み方を決定した。

## (2) 「Kaveri」グループ (フランス:INSERM)

① 研究分担グループ長: Srinivasa Kaveri (INSERM, Prof. & Direct.)

## ② 研究項目

- (1) 使用する小動物の探索
- (2) 抗体酵素の準備
- (3) 実施計画の作成

平成19年度年次計画に従って、(1)、(2)、(3)の項目を準備した。

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

1) Naoyoshi Egashira, Shin-ichi Morita, Emi Hifumi, Yoshiharu Mitoma, Taizo Uda, Attomole detection of hemagglutinin molecule of influenza virus by combining an electrochemiluminescence sensor with a immunoliposome that encapsulates a Ru complex. *Anal. Chem.*, accepted, (2008).

2) Emi Hifumi, Fumiko Morihara, Kenji Hattuchi, Takuro Okuda, Akira Nishizono and Taizo Uda, Catalytic features and eradication ability of antibody light chain UA15-L against *H. pylori*, *J. Biol. Chem.*, **283**(2), 899–907(2008).