

「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

大分大学工学部応用化学科・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

本研究は以下の 3 つの項目をそれぞれ確立することにより最終的にヒト型スーパー抗体酵素(Human Antigenase)を短期間で作製し、実用化するのが目的である。

項目 1 ; ヒト型「スーパー抗体酵素」の効率的作製技術開発

項目 2 ; 自動合成装置のための要素技術開発

項目 3 ; 大量製造とモデルマウスへの投与実験

平成 20 年度は上記 3 項目の本格的な研究に取り組んだ。その結果、項目 1 では狂犬病ウイルスを対象として、ヒト型抗体軽鎖ライブラリーに存在した 376 クローンを大腸菌に形質転換し極小スケールで発現させ、その培養液を使って発現の有無および狂犬病ワクチンとの反応性を検討した。その結果、有望な 7 クローンを選択した。この中の 3 クローンが subgroup II の germline gene に属していたためにこれらについて大腸菌と哺乳細胞を用いた発現系を試みた。また、ボランティアの白血球を用いて semi nested PCR 法で subgroup II のみを選択的に増幅させる方法論を確立した。この方法で得られた数種類のヒト型抗体軽鎖は数 mL スケールで大腸菌を用いての発現を試みた。各種の発現条件を検討した結果、将来、1 L 培養から約 10 mg 取得可能な道筋が判り、将来の大量製造に多いな可能性を見つけることができ、項目 3 は予想以上に進展した。一方、項目 2 は今年度から基礎的な検討に入った。あるメーカーの機種が技術開発の遅れで予定通り納入されないというマイナス面が生じたが、化学チップを使っての遺伝子やタンパク質の電気泳動を行う方法、あるいは、泳動の途中で回収する方法などの検討に取り組んだ。活性測定系は現在のイムノリポソームと電解発光を組み合わせた独創性のある手法のさらなる展開を視野に入れ、インフルエンザウイルスを用いたセンシングへの応用とフェロセンを付加したペプチドを用いて酵素活性を評価できる系の両面から取り組んでおり、共に次年度につながるデータを取得できた。

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 狂犬病ウイルスワクチン接種ボランティアからのヒト型抗体軽鎖の発現

1-1-1 ライブラリーからの適切な抗体軽鎖クローンの選択と大腸菌での発現

本課題の目的:

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クローニングし、抗 Fab 抗体と狂犬病ウイルス抗原に対する ELISA によるスクリーニングを行い、得られた軽鎖発現ベクターを大腸菌に形質転換し、抗体軽鎖タンパク質の大量発現および精製を行う。また、得られた抗体軽鎖の抗原特異性を解析する。

方法:

これまでの研究によって得られた抗体軽鎖発現ベクター (pET-LC23D4、pET-LC23F1、pET-LC22F6) を大腸菌 BL21 に形質転換し、IPTG 誘導による抗体軽鎖の発現を確認した後、狂犬病ウイルスに対する抗体軽鎖の抗原特異性の解析を Western Blotting で行った。

結果:

菌体破碎液の SDS-PAGE を行い大腸菌による抗体軽鎖の発現を確認したところ、ベクターのみを形質転換したものと比較して、抗体軽鎖発現ベクターを形質転換した大腸菌において抗体軽鎖の分子量 (28 kDa) 付近に IPTG 誘導によるバンドが認められたので、抗 F(ab) 抗体を用いて、Western Blotting を行ったところ、抗体軽鎖と同じ移動度に強いシグナルを確認した。即ち、すべての軽鎖発現ベクターで形質転換した大腸菌内での抗体軽鎖の発現が確認された。狂犬病ウイルスタンパク質に対する特異性を Western Blotting により解析したところ、ウイルス G タンパク質と同じ移動度にシグナルを確認することができた (Fig. 1)。

次に、His タグを用いて抗体軽鎖 (LC23D4) を精製し、抗原特異性の解析を行ったところ、抗体軽鎖のほぼ単一のバンドが得られたので、この抗体軽鎖 His タグ精製標品を用いた抗原特異性の解析をさらに Western Blotting により解析した。抗原サンプルとして、狂犬病ウイルスワクチン (VERO RAB) とホルマリン賦活化狂犬病ウイルス (CVS) を用いた結果、狂犬病ウイルス G タンパク質と同じ移動度にシグナルが認められた。これらの結果より、狂犬病ウイルスワクチン接種ボランティアよりスクリーニングされた抗体軽鎖遺伝子を、大腸菌により発

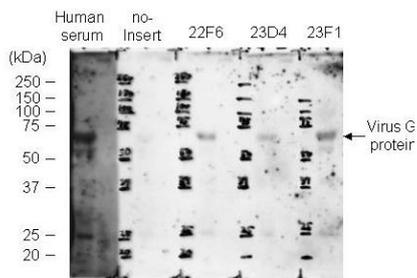


Fig.1 大腸菌ライゼートを用いたウイルスに対する特異性

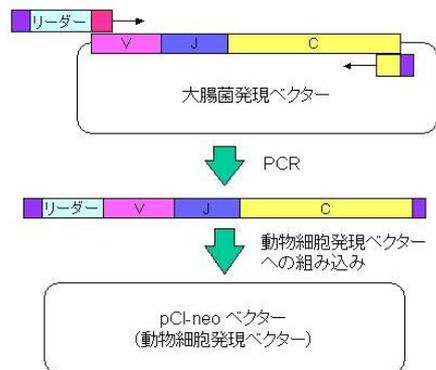


Fig. 2 抗体軽鎖の動物細胞発現ベクターの構築

現・精製して得られた抗体軽鎖標品の抗原特異性を解析した結果、狂犬病ウイルス G タンパク質に対して特異性を持つことが示唆された。

1-1-2 哺乳細胞系での発現

本課題の目的:

免疫グロブリンは糖鎖などの翻訳後修飾を受けることや大腸菌発現系による軽鎖の立体構造の変化の可能性、医薬品への応用などを考えると、動物細胞による発現系の確立が必要である。

方法:

Fig.2 の方法で PCR を行い、得られた PCR 産物を切り出し・精製した後、動物細胞発現ベクターである pCI-neo ベクター (Promega 社製) に組み込みこんだ。抗体軽鎖発現系にはヒト胎児腎細胞由来である HEK-293 細胞を無血清培地で順化した FreeStyle-293F 細胞 (Invitrogen 社製) を用いた。

結果:

pET-23D の軽鎖遺伝子を動物発現ベクターである pCI-Leader-23D4 に組み換え、FreeStyle-293F 細胞にトランスフェクト後、経時的に細胞および細胞培養上清を回収し、Western Blotting 法により抗体軽鎖の発現を確認した。その結果、細胞溶解液中、培養上清中双方において経時的な抗体軽鎖の発現が認められた。抗体軽鎖は細胞内と比較して培養液中に多く認められ、培養液中での総タンパク質量における抗体軽鎖の割合は培養 4-5 日目がピークであった。

結論からいうと、今回の手法で抗体軽鎖の動物細胞による発現系を確立することができた。またその精製は、多くのステップを経なくても比較的純粋な抗体軽鎖の精製ができる可能性が示唆された。抗体軽鎖の精製が容易であることは、今後精製によるタンパク質の変性やリフォールディングの問題を解決する上で有利に働くと考えられ、今回の動物細胞による発現系の確立は、当プロジェクトを推進するに当たって非常に大きなアドバンテージを与えると考えられる。

1-2 抗体酵素の培養、発現、精製条件の検討

1-2-1 ヒト抗体軽鎖の *germline gene Subgroup II* の特異的増幅

本目的を達成するために Semi-nested PCR を用いて、ボランティアの血液から白血球を分離し、total RNA を抽出後、抗体軽鎖をコードしている cDNA を合成した。ここから 2 段階 (semi nested) PCR 法を用いて目的とする抗体軽鎖のみを増幅させ、それぞれを TOPO vector にクローニングしたところ、合計で 18 クローンが得られた (大腸菌は TOP10)。興味あることにこれら 18 クローンのうち 17 クローン (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #18 and #19) が subgroup II に属しており、効率的に subgroup II だけを増幅させる手法を確立できた。これらのうち、#1(A18b), #7(A3/A19), #16(A17) の触媒三つ組み様構造を有する 3 つのクローン (括弧内は *germline gene* を表す) を発現ベクターに入れて大腸菌で発現させた (数 mL スケール)。これら 3 クローンはどれも培地と菌体不溶性画分 (ある条件では菌体可溶性画分) に抗体軽鎖と思われるバンド (31 kDa 付近) を検出した。この発現タンパク質を

ウエスタンブロットにより解析したところヒト型抗体軽鎖であることを確認した。培地中の発現量は培地 1 L に換算すると数 mg であった。現在は上記 3 クローン以外のものに取り組んでおり、今後は得られたクローン全てを発現させるように進めている。

1-2-2 ヒト型抗体酵素の大量合成

上記で目的とするヒト型抗体軽鎖（いくつかは抗体酵素となる）の subgroup II を遺伝子的に作製する事に成功したので、当初の計画「項目 3」の大量製造法の開発に取り組んだ。このために抗体遺伝子のクローニングから発現までを徹底的に細かい点にまで踏み込んで検討を行った。その結果、best な vector、温度、培養時間に加え、菌体の破碎方法および精製方法をほぼ決定した。その結果、まだ予備的段階であるが数 100mL スケールでの培養で、粗精製の抗体軽鎖が 5-10mg 程度というかなり大量に得られる条件等を見出した。今年度の残りの期間はこの方法での抗体軽鎖の取得量がどの程度になるのか確定させるつもりである。最終的な目標は 10 リットル培養を 10 回程度繰り返すことで、数 100mg の抗体酵素を得る手法を開発することである

1-3 自動合成装置作製のための取り組み（宇田 G）

1-3-1 Lab-on-Tip 上でのタンパク質などの回収

マイクロチップを用いた電気泳動装置（日立製、Cosmo-I;SV1210）を用いて、マウス腹水からの JN1-2 抗体（インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体：濃度 2.58 mg/mL）のクロマトグラフィーを測定した結果、両者とも同じ分子量のタンパクが分離・検出できている事が分かった。この市販の装置は、タンパクの混合物を短時間で分離・検出はできるものの、ある特定のタンパクを抽出する事は不可能である。そこで、マイクロチャンネルを用いて、1. 混合物からの分離、2. 目的の分子量のタンパクの抽出（切り出し）、3. 精製の一連の作業をする事を目指した。試料として、上述と同じマウス腹水からの JN1-2 抗体（濃度 2.58 mg/mL）を用いたが、蛍光像を得るために色素分子(PyMPO)をペプチド結合で抗体にラベル化することにより、サンプル溜めホール付近の黄色の蛍光が確認できた。これに電圧（+450V）を印加した直後では、ホールに繋がったマイクロ流路（幅 100 μm）にタンパク質が電気泳動で流れていることが確認できた。また、チャンネル部分に、試料を少量だけ電気泳動で流し、その後高電圧（+1250V）を印加することで、少量の試料を電気泳動的に分離でき、特に、泳動の後期（チャンネル出口付近）になると、2つのバンドが明確に確認できた。

1-3-2 活性測定系の開発

1-3-2-1 イムノリポソームと電解発光と組み合わせる新規手法によるタンパク検出

江頭らが見出した上記の超高感度分析法をさらに発展させた。従来、イムノリポソームを破壊することで信号を得ていたが、偶然にも、破壊しなくても測定できる方法を見出した（非破壊法：測定が簡素化される）。

・インフルエンザウイルスでの結果

ウイルス濃度を変化させると典型的なシグモイド応答が得られ、数 100 PFU のウイルスが 90 分以内で検出できることが確認できた^{1,5,6}。測定時間の短縮には非常

に有効であり、抗原抗体反応時間の短縮化と組み合わせ、さらなる迅速化を計りたい。

・ BSA タンパク質の結果

BSA についても同様な手法に基づきイムノリポソームを調製し、金電極には BSA を固定した。試料 BSA との競合反応によりシグモイド応答が得られ、 10^{-8} g/mL の検出が可能であった²⁾。この結果より様々なタンパクの検出に適用できることが示唆された。(感度が低いのは、抗体の性能あるいはタンパクの分散状態に依存すると考えられる。)

1-3-2-2 ペプチド修飾電極によるプロテアーゼ検出法の開発

電気化学応答を示すペプチドを設計・合成し、それを用いた基礎的データを収集しているところである。

2 Kaveri グループ

Kaveri group は平成 20 年度までの研究で、敗血症の治療や生理作用を解明する目的で IVIg からの抗体酵素を高濃度で取得するシステムを構築してきた。その概略を以下に示す。 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 antibodies with immunomodulatory potential in sepsis. It was demonstrated by us that the presence of antibodies with serine protease-like activity correlates with a favorable outcome of severe sepsis in humans (*PNAS*, 2005, 102, 4109-4113). In addition, we demonstrated recently that the prevalence of proteolytic antibodies in patients with kidney transplantation benefits the long-term survival of the graft by preventing development of the chronic allograft nephropathy (*J. Immunol.*, 2008 180, 8455-8460). Together, these findings indicate that the antibodies endowed with serine proteaselike catalytic activity *in vivo* could be implicated in the regulation of various inflammatory processes. We had observed that approximately 10% of the healthy blood donors naturally contain high levels of IgG endowed with proteolytic activity. This fact prompted us to develop a methodology that allows the enrichment of proteolytic IgG from the pool of therapeutic immunoglobulin preparations (IVIg). Once enriched, proteolytic IgG will be carefully tested for their ability to influence the survival of mice in an experimental model of severe sepsis.

3. 研究実施体制

(1)「宇田」グループ

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) ヒト型抗体軽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大量合成のための発現条件等の検討
- 7) 自動合成装置の開発

1)、2)、3)については終了した。4)については大腸菌や哺乳細胞系での検討を行っている。5)は基礎的研究テーマであり、試料の量的確保の見込みがきつきつある。6)については大いに進展しているところである。7)についてはもう一度研究戦略を立案する。

(2) 「Kaveri」グループ

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

②研究項目

- 1) 患者血清やIVIgからの抗体酵素の精製
- 2) 抗体酵素の高濃度化（疎水性クロマトの組み合わせによる）
- 3) 敗血症への効能研究

平成20年度年次計画に従って、1)、2)は予定通り行ったので今後は多量に取得する。3)の項目について次年度以降で取り組む。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表（原著論文）

1. Attomole detection of hemagglutinin molecule of influenza virus by combining an electrochemiluminescence sensor with a immunoliposome that encapsulates a Ru complex. N. Egashira, S. Morita, E. Hifumi, Y. Mitoma, T. Uda, *Anal. Chem.*, **80**, 4020-4025(2008).
2. Rapid detection of BSA protein by electrochemiluminescence sensor combining an immunoliposome which encapsulates a Ru complex, N. Egashira, T. Hirata, E. Hifumi, T. Ohta, T. Uda, *Electrochemistry*, **76**, 579-582(2008).
3. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. *Microbiol Immunol.* 2008; 52(4):243-9.
4. A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization. Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A. *Vaccine.* 2008 Sep 26:6441-6444.

5. Highly sensitive detection of influenza virus hemagglutinin by electrochemiluminescence using immunoliposome, N. Egashira, S. Morita, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda, *ECS Transactions*, **16**(11)115-121(2008).
6. ウイルス 1 粒子の超高感度計測に向けて、江頭直義、一二三恵美、宇田泰三、マテリアルインテグレーション、**21**(5)294-298(2008).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）