

「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

平成 21 年度実
績報告

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

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21年度は項目1について特に力を入れて取り組んだ。即ち、狂犬病ウイルスワクチン接種者の白血球からヒト型スーパー抗体酵素になる確率が高いと思われる subgroup II の germline gene (胚細胞遺伝子)を2つの手法(A 法および B 法)を用いて特異的に増幅させた。A 法では取得した 17 クローン全ての germline gene が subgroup II に属していた。B 法では376クローンが得られ、その全てを大腸菌に形質転換し、抗原との反応性の検討を行って有望な7クローンを選択し、subgroup II に属していた3クローンを活性試験用に発現させた。

A 法により取得したクローンは順次、大腸菌に形質転換し、発現、回収、精製を行い、ヒト型抗体軽鎖であることを確認した。大腸菌からの発現方法に改良を加えているのと、精製にいくつかの方法を試みており、高純度精製や大量精製の手法がほぼ出来上がった。一方、B 法では取得した3クローンについては、将来の事を考慮して哺乳細胞を用いた発現系を試みた結果、この系での発現がうまく行くことを確認した。しかしながら、大量取得には不利である事が判明したために、この系での発現実験は pending にした。

大腸菌で発現させたヒト型軽鎖のいくつかはアミダーゼ活性を示し、さらにバイオアッセイ(狂犬病ウイルスに対する感染抑制実験)を行う段階に至っており、現時点で、いくつかの興味ある結果を得ている。

項目2は今年度から本格的な検討に入り、マイクロチップ上でどのようにしたらPCR 反応過程とPCR 産物分離過程の一体化が可能になるか詳細に実験した。その結果、新しい concept を提案することに至り、

その実現化に向けて作業中である。活性測定系は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を用いて、インフルエンザウイルスの超高感度センシングの開発に主体をおいた研究を行い、「1ウイルス検出」に向けた成果が得られた。

項目3の大量製造に目途が立った。

§ 2. 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(大分大学、教授)

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)ワクチン接種ボランティアより構築された軽鎖ライブラリーから抗原特異的結合・分解活性を有するクローンの選別と大量培養、これを用いた in vitro および in vivo での抗ウイルス活性試験
- (8)自動合成装置の開発
- (9)抗体酵素20種類の発現と精製

(1)、(2)、(3)については H20 年度に終了し、(4)については H21 年度にプラスミド、大腸菌ともに最適発現系を決定した。(5)は試料の量的確保の見通しがついたので H22 年度から取り掛かる。(6)についても最適発現条件をほぼ決定した。(7)については本格的な研究段階に突入しいくつかの興味ある結果が出始めた。(8)については PCR 反応および PCR 産物をチップ上で分離する手法を開発する事としたまた、(9)については、今年度の途中から追加し、21年度後半で精力的に取り組んだ。その結果、上述した17クローン以外の新たな3クローンも加えて、合計20種類におよぶ抗体酵素の発現と精製を行った。その結果、これまでに作製した抗体酵素の生化学的性質の解析に大幅な進展が見られた。

(2)「Kaveri」グループ

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

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

(4)患者からのモノクローナルなヒト型 IgM 抗体酵素の取得

(1)、(2)は予定通り行ったので今後は多量に取得し、(3)の項目の課題と併せて、生物学的活性試験(in vivo を含む)に進む。(4)は新たに取り組み始めた課題である。

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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 ヒト型抗体軽鎖の発現、精製および生化学的諸性質(項目1)

1-1-1 ヒト型抗体軽鎖(germline gene Subgroup II)の発現と精製

Subgroup II の germline gene (胚細胞遺伝子)を特異的に増幅させるのに2つの手法(A 法および B 法)を用いた結果、最終的にそれぞれ、17クローンおよび7クローンを取得した。そして、これらのクローン(抗体軽鎖遺伝子)を順次、発現ベクター(pET, pIg or pCI)に挿入し、大腸菌(BL21)や哺乳細胞系(HEK293F)での発現を試みた。大腸菌での発現は培地、可溶性および不溶性画分で目的タンパク質が認められた。図1に培地で発現された目的タンパク質の SDS-PAGE およびその Western blot の結果を示す。この結果より、ヒト型抗体軽鎖が約 31kDa 付近に産生されているのが判る。この大腸菌の系では 100mL 培養で数 mg~10 mg 程度の発現したヒト型抗体軽鎖が得られた。また、哺乳細胞系では量的に大腸菌の 1/10 あるいはそれ以下の量であったが発現を確認した。今後、生物学的活性試験(バイオアッセイ)を行うにあたり、哺乳細胞系では目的とする量の抗体軽鎖が得られない事が判明したので、この実験は一時中断し、大腸菌での発現系に集中することにした。

次に発現させたヒト型抗体軽鎖の精製方法を検討した。いくつかの手法があるがここでは抗体カラムによる一次精製、これに続いて行う His-tag を利用したニッケルカラム精製について述べる。培地あるいは可溶性画分に発現させた目的タンパク質はヒト型抗体 F(ab)₂ に対するヒソジ製の抗体をゲルに結合させることにより作製した抗体アフィニティーカラムを用いて一次精製を行い、引き続き通常のニッケルカラムを用いての二次精製を行った。結果を図2に示す。銀染色を行っても一次精製だけでかなりきれいに精製できていることが判る。これにさらに二次精製を行うと目的タンパク質(矢印で示す)以外にはほとんど狭雑タンパク質が見られず高純度に精製され

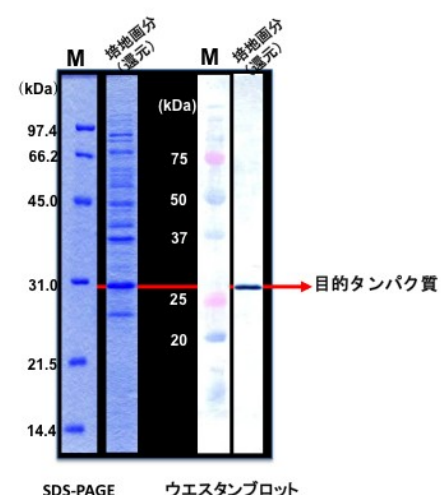


図1 発現タンパク質の培地画分の SDS-PAGE(CBB染色)とWestern blot

M: 分子量マーカー
25°C, 24 hr 培養
IPTG濃度: 1 mM

標識抗体:
Goat Anti-Human IgG F(ab)₂
Fragment Specific, Peroxidase Conjugated

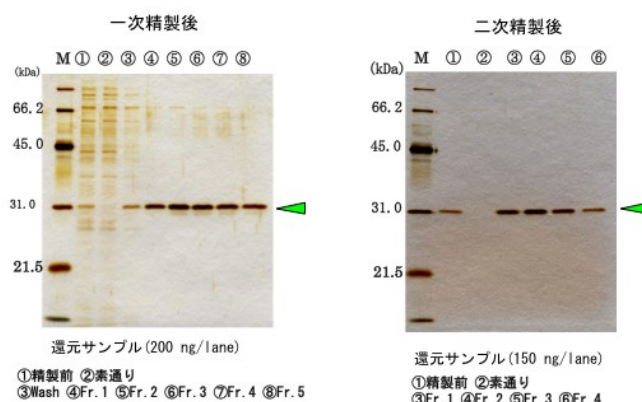


図2 発現させたヒト型抗体軽鎖の一次精製および二次精製後の SDS-PAGE(銀染色)

ていることが判る。

上記の方法とは別に His-tag 精製を一次とし、引き続いて陽イオンクロマトグラムを二次精製とした場合についても検討している

1-1-2 ヒト抗体軽鎖の諸性質

上記で述べたように高純度に精製されたヒト型抗体軽鎖を用い、また、合成基質としてペプチド-MCA を用いて分解試験を実施したところいくつかのヒト型抗体軽鎖が合成基質を分解し、アミダーゼ活性を有することが判った。同じ事は哺乳細胞を用いて発現させたケースについても言えた。

1-2 ヒト型抗体軽鎖の生物学的活性(項目1)

まず、抗体酵素の抗原特異性やタンパク質分解活性を解析する系を構築するために、抗原として用いた狂犬病ウイルスの高純度精製標品の作成を行った。さらに今回、狂犬病ワクチンで過免疫したボランティアリンパ球から樹立された抗体酵素の各種ウイルスに対する抗ウイルス活性を検討した結果、今回得られた抗体酵素が抗ウイルス作用を示す可能性が示唆された。

1-2-1 動物細胞発現系を用いた抗体酵素の大量精製およびペプチド基質分解活性

抗体酵素の候補としてクローニングされた 23D4, 22F6 および 23D4 の変異体 23D4Y35H 遺伝子をヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を無血清培地に馴化し浮遊細胞化した HEK293F 細胞 (invitrogen 社製) にトランスフェクションし、培養 5 日後に培養液を回収した。回収した培養上清を抗ヒト IgG, F(ab')₂ 抗体結合カラムを用いたアフィニティーカラム精製とゲル濾過精製の二段階精製したものを精製 LC とした。抗体酵素の回収量は培養液 150 mL から約 100・g であった。この精製産物を用いて人工基質によるペプチド分解活性を測定したところ抗体酵素濃度と時間に依存したペプチド分解活性が認められた。しかしながらこの系で取得できる抗体酵素量は少なく、この研究は一時的に pending とした。

1-2-2 抗体酵素評価系の構築

ウイルスサンプルの超遠心分離精製によって高純度のウイルス精製標品が得られた。この標品をもちいた ELISA では、今まで以上に大きなシグナルを得られることから、抗体軽鎖の抗原特異性を高感度な検出が可能と考えられる。今後は得られた高純度精製ウイルスの精製度をより厳密に確認する。

狂犬病ワクチンを複数回接種し、十分に免疫されたヒトボランティアの末梢血リンパ球から得られた mRNA を基に構築された抗体軽鎖ライブラリーから、我々の注目する特定の germline (A18b, A3/A19、いずれも subgroup II) に由来する抗体軽鎖遺伝子を大腸菌発現プラスミドに挿入し、組み換え蛋白として発現・精製した標品の抗ウイルス活性を in vitro で培養細胞を用いたウイルス感染系で評価した結果、いくつかの抗体軽鎖のクローンで狂犬病ウイルス等のウイルスに対して強力な増殖抑制活性を認めた。

1-3 自動合成装置作製のための取り組み(項目2)

1-3-1 マイクロチップ上での PCR 反応および PCR 産物の分離

本研究はマイクロチップ上で PCR を行うとともに、その後、連続して PCR 産物を分離することを目指している。このために H21 年度は、これまで経験のある JN1-2 抗体遺伝子 (インフルエンザウイルスに対

するモノクローナル抗体)をPCRの template に用いていくつかの基礎実験を行った。

1-3-1-1 チューブ方式によるPCR反応

マイクロチップ上での系を想定して、まず、細い径をもつチューブ(テフロン製、内径:0.5 mm)に 5-20・L のPCR反応液を入れ、チューブの1セクション(約5cm)を95℃、別の1セクションを約70℃、もうひとつのセクションを60℃に保ち、反応液をポンプで連続的に回すことにより30サイクルの反応を行い、PCRがうまく行くことを確認した。次には、この方式をマイクロチップで行う予定である。

1-3-1-2 マイクロチャネル中でのPCR産物の分離

マイクロチップ上でPCR反応を行った後、そのまま連続してPCR産物の分離が行えるようにすることが目的である。実験は、前処理したガラスビーズをダム付きマイクロチャネル(マイクロ化学技研, ICC-2CSK)に充填し(図3参照)、PCR産物を流速10mL/minで流したところ、フラクション3と4に目的産物670bpの増幅された遺伝子を分離できた。

以上の実験により、マイクロチップを使った抗体酵素遺伝子の増幅および回収に目途が立った。

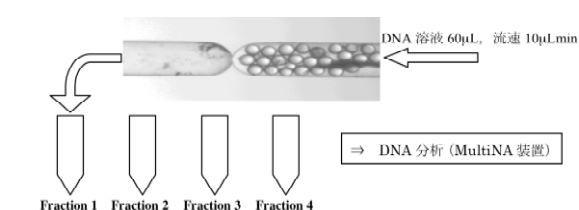


図3 ダム付きマイクロチャネルに充填したガラスビーズによる分離

1-3-2 活性測定系の開発

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インフルエンザウイルスの検出及び装置改良に取り組み、江頭らが開発した超高感度分析法について実用化を目途に入れて破壊法と非破壊法について詳細に検討した。

1-3-2-1 破壊法での結果

インフルエンザウイルスA型H1N1については、濃度変化させると典型的なシグモイド応答が得られ、数100～数1000 PFUのウイルスが90分以内で検出できた。コントロール実験により本応答が抗原抗体反応によるものであることを確認した。本手法は現行の迅速判定法よりも100倍以上の感度でウイルスを検出できることが明らかとなった。

1-3-2-2 非破壊法での結果

非破壊法では70分以内で全測定が完了した。応答も数100 PFU検出が可能であった。しかし、応答強度は1/3程度に減少し、低濃度域ではバラツキが認められた。測定時間の短縮化を図れることが判ったため、非破壊法による応答機構を今後詳細に検討していく予定である。

1-3-2-3 装置の改善

感度を向上させるために2号機の機械的な検出機構及び電極基盤を改良して3号機を製作した。2号機に較べて10倍以上の感度向上を確認した。

2 Kaveri グループ(項目3)

平成21年度はこれまでの敗血症患者からの天然型抗体酵素(ポリクローナル)の取得に加え、別な患者からの直接採取によるヒト型モノクローナル抗体(IgG)を得る事に成功した。また、ある種の血液病

(Waldenstrom's macroglobulinemia) モノクローナルはヒト型 IgM であり、この研究にも踏み出した。

During the year 2009, we made progress on several fronts important for the project.

First, we ensured that we can isolate catalytic antibodies from pools of normal therapeutic immunoglobulins called intravenous immunoglobulin (IVIg). As described below, we continued purification of human catalytic antibodies using different approaches.

We screened human monoclonal IgGs and IgMs for catalytic activity. We have obtained a repertoire of 140 human monoclonal IgG antibodies isolated from two individuals. The 140 mAb IgG have been characterized for their binding to a large array of self and foreign antigens, and genes encoding the variable regions have been sequenced and identified. Interestingly, all 140 mAb IgG possess the same heavy chain (g1) and differ only by the nature of their variable regions, thus offering an extraordinary tool for studying the catalytic properties of human immunoglobulins.^{1,2)}

Alternatively we have also gathered a large array of IgM antibodies isolated from patients with Waldenstrom's macroglobulinemia.

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1) Varied immune response to FVIII: presence of proteolytic antibodies directed to factor VIII in different human pathologies. Wootla B, Rao DN, Friboulet A, Uda T, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV., Clin Rev Allergy Immunol. 7(2), 97-104(2009). [DOI 10.1007/s12016-009-8116-3]

2) Factor VIII-hydrolyzing IgG in acquired and congenital hemophilia. B. Wootla, A. Mahendra, J. D. Dimitrov, A. Friboulet, A. Borel-Derlon, D. N. Rao, T. Uda, J-Y Borg, J. Bayry, S. V. Kaveri, S. Lacroix-Desmazes, FEBS Lett. 583, 2565-2572(2009). [DOI:10.1016/j.febslet.2009.07.009]

3) Hirano S, Etoh T, Okunaga R, Shibata K, Ohta M, Nishizono A, Kitano S. Reovirus inhibits the peritoneal dissemination of pancreatic cancer cells in an immunocompetent animal model. Oncol Rep. 21(6), 1381-1384(2009). [DOI: 10.3892/or_00000364]

4) Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, Yamada K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Khawplod P, Gotoh K, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. J Virol Methods. 161(1), 58-62(2009). [DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.05.018]

5) Mitui MT, Bozdayi G, Dalgic B, Bostanci I, Nishizono A, Ahmed K. Molecular characterization of a human group C rotavirus detected first in Turkey. Virus Genes. 39, 157-164(2009). [DOI: 10.1007/s11262-009-0420-8]

6) Inoue K, Shiota S, Yamada K, Gotoh K, Suganuma M, Fujioka T, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. Evaluation of a new tumor necrosis factor- α -inducing membrane protein of *Helicobacter pylori* as a prophylactic vaccine antigen. Helicobacter. 14, 135-143(2009). [DOI: 記載なし]

7) A characteristic monoclonal antibody against hemagglutinin molecule of influenza virus A type, E. Hifumi, N. Fujimoto, S. Yoshida, T. Uda, J. Biosci. Bioeng. 6, (2010). [DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.11.020]

8) Salt stress sensor for rice plants on the basis of electrochemiluminescence, N. Egashira, T. Yamamoto, T. Itani, Y. Mitoma, T. Uda, Anal. Sci. 26, 371-373 (2010).[ISSN; 0910-6340] ([DOI: 記載なし])

(4-2) 知財出願

① 平成 21 年度特許出願件数(国内 6 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 6 件)