

「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

H22 年度 実績報告

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22年度は引き続き項目1に力を入れるとともに、高純度で取得したヒト型抗体酵素のキャラクタリゼーションを行い各クローンの特徴を明確にした。項目3には今年度、特に力を入れて取り組んだ結果、マウスへの投与実験でヒト型「スーパー抗体酵素」の有効性を見出した。

項目2ではマイクロチップ上での定温 PCR 反応の最適条件が見つかり、抗体軽鎖遺伝子 (660bp)の増幅に成功した。一方、イムノリポソームと電解発光を組み合わせた系ではさらなる高感度を目指して、リポソーム内の錯体内包率の最適化を行った結果、C16 のリン脂質のリポソームにジアミノプロピル基を有する錯体を内包するのが最良であった。

項目3の大量製造については大量の高純度精製品の製造にも目処が立った。また、今年度、特に力を入れて取り組んだ結果、マウスへの投与実験でヒト型「スーパー抗体酵素」の有効性を見出した。さらには、Waldenström マクログロブリン血漿患者から得たモノクローナルな抗体酵素遺伝子の取得とベクターへの組み込みに成功した。

§ 2. 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(大分大学工学部応用化学科、教授)

② 研究項目

- ・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
- ・ワクチン接種者からのヒト型抗体軽鎖遺伝子の取得
- ・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)
- ・構造と活性の基礎的検討
- ・ヒト型抗体軽鎖遺伝子の大量合成のための発現条件等の検討
- ・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
- ・自動合成装置の開発

(2)「Kaveri」グループ(フランス:INSERM)

① 研究分担グループ長:Srini Kaveri (INSERM、Professor&Director)

② 研究項目

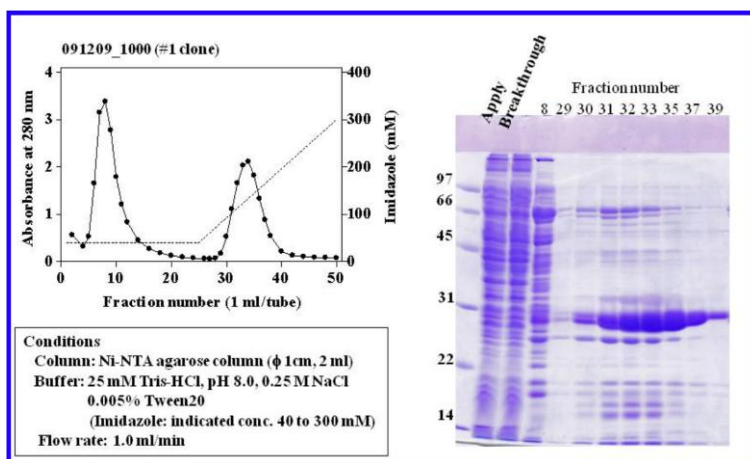
- ・患者血清や IVIg からの抗体酵素の精製
- ・抗体酵素の高濃度化(疎水性クロマトの組み合わせによる)
- ・敗血症への効能研究
- ・患者からのモノクローナルなヒト型 IgM 抗体酵素の取得

§ 3. 研究実施内容

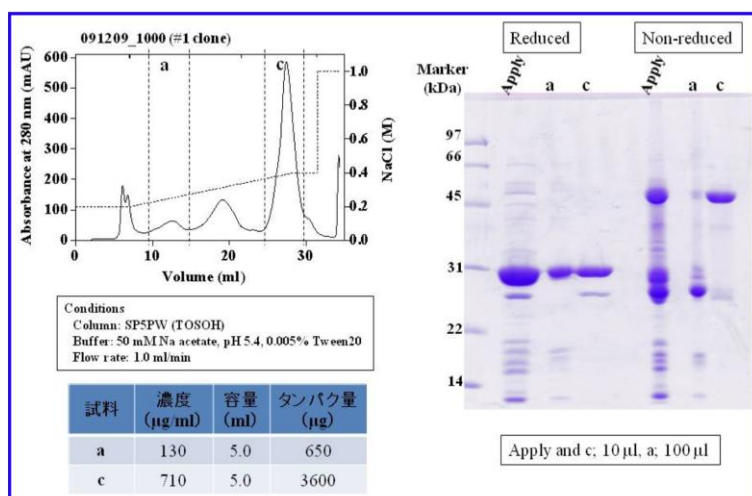
(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

3. 1 宇田グループ

3. 1. 1 取得したサブグループ II のヒト型抗体軽鎖遺伝子と発現状況 (概要の項目1および項目3に対応)



Ni-NTAカラムクロマトグラム及びSDS-PAGE分析



陽イオンクロマトグラム及びSDS-PAGE分析

図1 発現したヒト型抗体酵素の2段階精製とその純度
Ni-NTA カラムでは単量体がかかり取れているが、純度的に不十分。これを陽イオンカラムに掛けるとかなりきれいな2量体を取得できる(一番右端の「c」のレーン)

より Ala に変異させた(18 クローン全て)。一例として、#1クローンの発現後の精製の状況を図1に示す。精製は菌体回収後、超音波破碎を経て可溶性画分のみを取り出し、His-tag を利用したニッケルカラム精製してから陽イオンクロマトグラフィーに掛けるという、2段階精製法を採用した。

目的:昨年度報告書の A 法(18クローン)およびB法(3クローン)により取得したヒト型抗体軽鎖(k 型)のサブグループ II の合計21クローンのヒト型抗体軽鎖遺伝子についてどの程度発現し易いか、また、どの程度の高純度品が取得できるかを検討した。

結果:A 法では 1 クローン(#3)の遺伝子が完全ではなく(7-10 塩基分が欠落)、廃棄した。また、1 クローンは 1 塩基が欠落していたために修復した。また他の 1 クローン(#15)は発現はしたものの、その量が極端に低く、大量発現はあきらめた。結果として、取得した 21クローンの内、今後の実験に使用可能なのは 18 クローンであった。

この 18クローンについて単量体および二量体としてそれぞれ取得するために wild type の 220 番目のアミノ酸である Cys を点突然変異に

3. 1. 2 抗体酵素の *in vitro* での抗ウイルス活性試験のための条件検討

抗ウイルス試験(*in vitro* 試験)の詳細

国際標準法に準拠して狂犬病ウイルスに対する抗ウイルス活性を検討した。図2に示すように蛍光法で行い、フォーカス(focus)の形成(forming)された数(unit)を、あらかじめ混合し反応させた抗体酵素がどの程度抑制したかで判断した(フォーカスの数を ffu と表示する)。1フォーカスが1ウイルス由来と考えればよい。図2で出現フォーカス数が少ないほど抗ウイルス活性が強いことを意味する。最初に#1 クローン

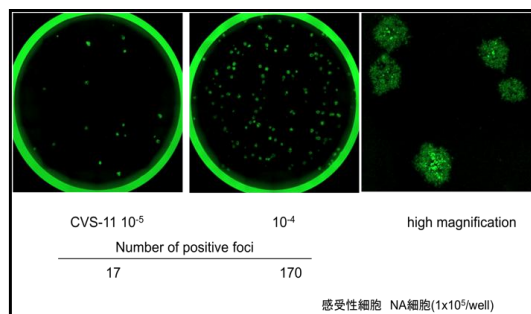


図2 狂犬病ウイルス (CVS-11 株) 感染による Focus の形成

(germline: A18b)について検討したが、事前にエンベロープを有する狂犬病ウイルスが、長時間抗体酵素とのみ接触している温度条件化で、ウイルスが受ける「感染性の低下」との相関関係を調べた。その結果、抗体酵素は 10~50 時間で目に見える効果を発揮するので、適切な培養温度は 20~25℃であると結論づけた。

3. 1. 3 各種抗体酵素のクローンの *in vitro* での抗狂犬病ウイルス活性の検討

高純度に精製した 15 種類の抗体軽鎖の狂犬病ウイルス CVS 株に対するウイルス増殖抑制活性について検討したところ、数種類のクローンで強いウイルス増殖抑制活性を示した。

3. 1. 4 その他の生理活性分子などに対する抗体酵素のキャラクタリゼーション

インフルエンザウイルス²⁾、日本脳炎ウイルス、ヒト TNF α ¹⁾等に対する試験を順次実施した。#11 クローンが TNF α 分子に対する分解活性を持つと推測されたが認められなかった。

3. 1. 5 マウスを用いた抗体酵素の *in vivo* での抗狂犬病ウイルス活性の検討

狂犬病ウイルスは、CVS 株で乳飲みマウス脳内で 3 代継代し、その後マウス神経芽腫細胞株 (NA 細胞) で 1 代継代したものをを用いた。ウイルスの感染力価は 3.3×10^7 FFU/ml で、ウイルスの希釈液には 10%・FCS EMEM 培養液を用いた。Vivo 試験にはマイクロシリッジと二段針を用いて、麻酔下のマウス脳内に 1 匹あたり抗体酵素混合液を 0.03ml 接種し、投与後 14 日間マウスの生存を観察し、致命率(生存率)を評価した。その結果、興味あるデータを得た。

3. 1. 6 遺伝子合成のマイクロチップ開発および電解発光型高感度検出法

遺伝子合成に向けてマイクロチップ上で恒温 PCR を行い、最適条件を見出し 660bpを持つ DNA の増幅に成功した。高感度検出ではリポソーム内の錯体内包率の最適化を行った結果、C16 のリン脂質のリポソームにジアミノプロピル基を有する錯体を内包するのが最良であった。

3. 2 Kaveri グループ

3. 2. 1 マクログロブリン血症患者からの IgM 型抗体酵素の取得

敗血症や Waldenstöm 症マクログロブリン血症患者などの自己免疫患者からの血清から IgG や IgM の抗体を分離し、その酵素活性 (Factor VIII に対する活性) を検討した。患者からの血清では約 10% が Factor VIII を分解した (図 3)¹⁰⁾。

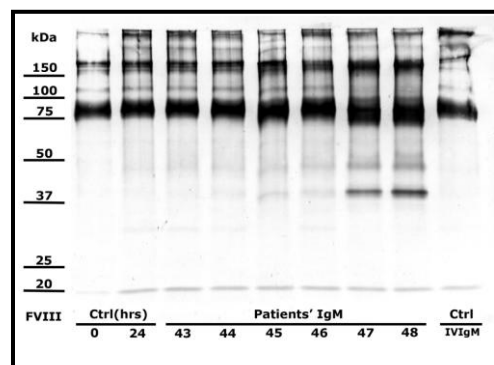


図3 Waldenstöm 症マクログロブリン血症患者から取得したポリクローナル IgM の酵素活性。47、48 の患者血清が酵素活性を示した。

3. 2. 2 モノクローナルな抗体酵素遺伝子のクローニング

Waldenstöm 症マクログロブリン血症患者の骨髓細胞から取得した IgM に対する抗体酵素遺伝子のクローニングに成功し、現在、それらについて合成基質を用いての酵素活性スクリーニングを行っており、いくつかの興味あるクローンを特定する事ができた。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Emi Hifumi, Kyouhei Higashi and Taizo Uda, “Catalytic digestion of human TNF-alpha by antibody heavy chain”, *FEBS J*, **277**, 3823-3832(2010) (DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07785.x)
2. Emi Hifumi, Naoko Fujimoto, Kazuya Ishida, Hirokazu Kawawaki and Taizo Uda, “Characteristic features of InfA-15 monoclonal antibody recognizing H1, H3 and H5 subtypes of hemagglutinin of influenza virus A type”, *J. Biosci. Bioeng.*, **109**(6), 598-608(2010) (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.11.020)
3. Naoyoshi Egashira, T. Yamamoto, Tomio Itani, Yoshiharu Mitoma and Taizo Uda, “Salt stress sensor for rice plants on the basis of electrochemiluminescence”, *Anal. Sci.*, **26**, 371-373 (2010)
4. 塩田星児, Kamruddin Ahmed, 三舟求真人, 西園晃, “日本製狂犬病ワクチン皮内接種法による曝露前免疫の有効性の検討”, 感染症学会雑誌, **84**巻(1), 9-13 (2010) (DOI:)
5. Kamruddin Ahmed, Selim Ahmed, Marcelo Takahiro Mitui, Aminur Rahman, Luthful Kabir, Abdul Hannan, Akira Nishizono and Osamu Nakagomi. “Molecular

- characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh”, *Virus Genes.*, **40**(3), 347-356(2010) (DOI: 10.1007/s11262-010-0463-x)
6. Takashi Matsumoto, Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Kantou Nakajima, Kenzo Takada, Pakamat Khawplod and Akira Nishizono. “Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus”, *Microbiol Immunol.*, **54** (11), 673-683(2010) (DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00262.x)
 7. 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, “Factor VIII-hydrolyzing IgG in acquired and congenital hemophilia”, *FEBS Lett.*, **583**, 2565-2572(2009). (DOI:10.1016/j.febslet.2009.07.009)
 8. Moazzem Hossain, Tania Bulbul, Kamruddin Ahmed, Ziauddin Ahmed, Mohammad Salimuzzaman, Mohammad Shahidul Haque, Ajmat Ali, Shohrab Hossain, Kentaro Yamada, Kazuhiko Moji and Akira Nishizono. “Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh”, *Vaccine.*, (2011) in press. (DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.052)
 9. Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Kentaro Yamada, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake and Akira Nishizono. “Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka”, *Arch Virol.*, (2011) in press.
 10. Bharath Wootla, Olivier D. Christophe, Ankit Mahendra, Jordan D. Dimitrov, Yohann Repesse´ , Ve´ronique Ollivier, Alain Friboulet, Annie Borel-Derlon, Herve´ Levesque, Jeanne-Yvonne Borg, Sebastien Andre, Jagadeesh Bayry, Thierry Calvez, Srinivas V. Kaveri, Se´bastien Lacroix-Desmazes, “Proteolytic antibodies activate factor IX in patients with acquired hemophilia”, *Blood*, (2011) in press.

(4－2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 2件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 8件)