

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

インフルエンザウィルスを計測・除去可能な「スーパー抗体酵素」

### 2. 氏名

一三三 恵美

### 3. 研究のねらい

抗体は免疫系の働きを担うタンパク質である。これまでの理解では、抗体は異物(抗原)を認識して結合することで他の免疫系を活性化し、これを除去するとされてきた。ところが 1990 年代になって、単独分子として酵素作用を示す抗体や抗体軽鎖(Bence-Jones protein)の存在が報告されるようになった。これらの多くは自己免疫性疾患の患者サンプルから精製した抗体(あるいは抗体軽鎖)である。我々はマウスに抗原を免疫して作製したモノクローナル抗体や抗体鎖にも抗原に対する特異的な分解活性を持つものが存在することを見出した。そして、これを「スーパー抗体酵素」と名付けて作製方法の確立を進めてきた。一連の研究では、完全抗体・重鎖・軽鎖の中では軽鎖型の「スーパー抗体酵素」の割合が高く、軽鎖型では抗原認識部位をコードしている遺伝子に特徴があることを見出した。具体的に述べると、ある特殊な V<sub>K</sub> germline gene を持つ抗体鎖の場合に、酵素活性を示す確率が高くなると推定している。

これらの知見をもとに、本研究では2つの研究項目を柱にインフルエンザウィルスを特異的に計測・除去する性能を持つ「スーパー抗体酵素」の作製に取り組んだ。第1の項目は、全ての A 型インフルエンザウィルスに対して効果的な「スーパー抗体酵素」を作製すること、第2の項目は、酵素活性作用のメカニズムを解明するとともに、酵素活性を向上させて、実用に近い「スーパー抗体酵素」を作製することである。

### 4. 研究成果

#### (1) A 型インフルエンザウィルスに対する「スーパー抗体酵素」の作製

「スーパー抗体酵素」の作製方法としては、これまでの研究結果から最も効率的であると考えられる方法、すなわち、先ず標的分子に対する特異的なモノクローナル抗体を作製し、その中から着目する遺伝子(V<sub>K</sub> germline gene)を持つものを抽出する方法をとった。

A型インフルエンザウィルスを計測するために、ウィルス表面に存在するタンパク質を認識する抗体を得る必要がある。A型インフルエンザ

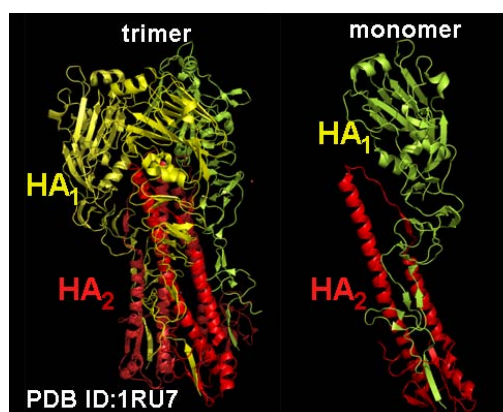


図1 インフルエンザウィルス H1 型ヘマグルチニンの構造, 左: 三量体, 右: 単量体

ウィルス外膜上のヘマグルチニンはHA<sub>1</sub>(図中黄で示した)とHA<sub>2</sub>(図中赤で示した)の2つのサブユニットから成る三量体として存在している。

ウィルスの場合、外膜タンパク質としてHemagglutinin(HA)とNeuraminidase(NA)の 2 種類が存在しており、本研究ではウィルスの感染時に主要な役割を担うHAを標的とした。このHAは、HA<sub>1</sub>とHA<sub>2</sub>の2つのサブユニットから成る分子で(図 1)、16 種類(H1~H16)の亜型が存在する。そこで、Flu database(NCBI)に登録されている配列データを用いて各亜型のconsensus配列を抽出し、亜型間の相同性と立体構造を考慮して 4 種類の抗原を用意した。まず初めに、HA<sub>1</sub>サブユニットとHA<sub>2</sub>サブユニットのそれぞれについて、H1 からH16 の亜型間で保存されている配列を選び、これを繋いだ 19 merのペプチド(IH peptide)を合成してペプチドハプテンとした。次に、これまでに大流行を起こしたH1 型(スペイン風邪)、H2 型(アジア風邪)、H3 型(香港風邪)と鳥インフルエンザのH5 型の間で高度に保存されている配列を選び、それぞれのペプチド(InfA, InfB, InfC peptide)を合成してIH peptideと同様にペプチドハプテンとして用いた。

これらの抗原を Balb/c マウスに免疫すると、InfA peptide >> InfB peptide > IH peptide の順で抗ペプチド抗体が誘導された。特に InfA peptide は、タンパク抗原に匹敵する強さでペプチド特異抗体を誘導するという大きな特徴があった。そこで、IH peptide 免疫マウスと InfA peptide 免疫マウスについて PEG 法による細胞融合を行い、前者からは 3 種類(IHB1, IHB2, IHK)、後者からは 6 種類(InfA-3, -6, -9, -10, -15, -18)のモノクローナル抗体産生細胞株を樹立した。

続いてこれらの抗体について可変領域のアミノ酸配列を解析し、Ig BLAST(NCBI)による相同性検索によって V<sub>k</sub> germline gene を推定するとともに、分子モデリング(ソフトウェアは AbM, プラットフォームは SG 社のワークステーション Octane2)によって立体構造を予測した。各抗体軽鎖の V<sub>k</sub> germline gene を表 1 に示した。これらの中で着目する遺伝子型を示したのは、InfA-3, -6, -9, -10 および-15 抗体の 5 種類であった(表 1)。

各抗体の免疫学

的反応性を調べると、IHシリーズでは IHB1 抗体がH1N1 型ウィルスのHAに弱く反応したものの、H3N2 型ウィルスには反応しなかった。一方、InfAシリーズについては、InfA15 抗体がH1N1 型ウィルスとH3N2 型のウィルスHA (HA<sub>2</sub>サブユニット)に反応し、他の 5 種類の抗体は H1N1 型の HA (HA<sub>2</sub>サブユニット)

表 1 各抗体軽鎖が属していた V<sub>k</sub> germline gene

clone	IHB1	IHB2	IHK, InfA-18	InfA-3, 6, 9, 10	InfA-15
V <sub>k</sub> germline	ce9	19-23	8-21	cr1	bl1

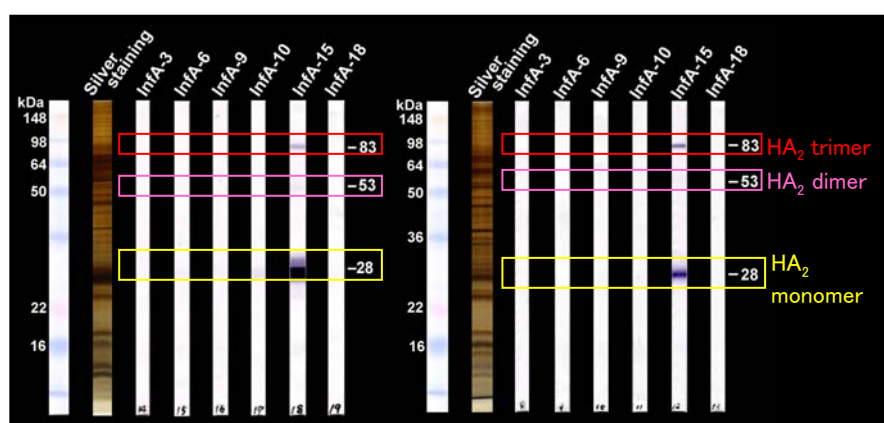


図 2 InfA 抗体のインフルエンザウィルスに対する反応性  
左: H1N1 型ウィルスに対する反応性, 右: H3N2 ウィルスに対する反応性

InfA15 抗体は H1N1 型ウィルスHA, H3N2 型ウィルスHAの両方に反応し、その他の抗体は H1N1 型ウィルス HA にも弱く反応した。

にのみごく僅かに反応した(図 2)。

A 型インフルエンザウィルスの HA は、構造の特徴から系統的に H1 グループと H3 グループに分けられ、H2 型と H5 型は H1 グループに含まれる。HA に対するモノクローナル抗体では両方のグループに渡って反応するものの報告は無く、InfA15 抗体は特徴的な反応性を有していた。ウィルスの取扱い規制により H2N2 型ウィルスに対する反応性を調べることは出来なかった。しかし、H2 型は H1 型との相同性が最も高く、InfA15 抗体は recombinant の H5 型 HA とも反応することを確認しているため、本抗体は重要なウィルスの全ての型に反応するものと考えている。

一方、超高感度カロリーメーターで抗原に対する親和性を測定すると、InfA15 抗体は他の抗体と比較して抗原ペプチドに対する親和性が 1 桁低いことが分かった。このことが、免疫に用いたペプチド抗原のみならず、タンパク抗原との反応も可能にしたのであろう。

この InfA15 抗体については、完全抗体・重鎖・軽鎖について酵素活性の検討を進めており、予備的な段階ではあるが良好な結果を得ている。

## (2)「スーパー抗体酵素」の活性向上

当初は、新規な「スーパー抗体酵素」の作製と並行して、既已取得している「スーパー抗体酵素」を精製抗体から調製し、高い酵素活性を発揮させるための条件の絞り込みを進める計画であった。しかし、研究環境の変化により、十分量の抗体を得るために必要となるマウス大量飼育が困難になった。大腸菌を用いる発現は以前から手掛けていたテーマではあったが、機能する形で十分量の抗体鎖を得ることに成功しておらず、加えて、将来的には遺伝子工学的な抗体タンパクの改変も必要になることから、本格的に大量発現系の検討に入った。

発現用ベクターは 2 種類使い、発現の形態も軽鎖完全長に His-tag を付けものと、さらに Protein A-tag を付加した形の 2 通りを試した。遺伝子は InfA15 抗体軽鎖(InfA15L)を用いた。

InfA15L 遺伝子、もしくは InfA15L-ProteinA 遺伝子を組み込んだ発現用プラスミドベクターを使って、大腸菌 BL21(DE3)pLysS(Novagen)を形質転換した。それぞれについて複数のコロニーを拾い、各コロニーの発現量を比較しながら培養条件を最適化した。その結果、抗体鎖単独、ProteinA 付加分(InfA15L-ProteinA)ともに、培養液 1 ml あたり約 40  $\mu\text{g}$  を可溶化した状態で発現させることが可能となった。

次に、より高い発現効率を示した InfA15L-ProteinA について、培養スケールを拡大して調製を進めた。まず、培養液から大腸菌を回収して、菌体を破碎後、可溶性画分を調製した。InfA15L-ProteinA の精製は、抗体(マウスまたはウサギ製)をリガンドとするアフィニティー精製により実施した。これは、リガンドとして用いた抗体の Fc 部分と発現タンパクの ProteinA 部分との特異的な結合を用いる方法である。これにより 200 ml の培養液から約 10 mg (濃度 1.5 mg/ml) の発現タンパク質(recInfA15L-ProteinA)を得ることが出来た。完全抗体から軽鎖を分離・精製する従来法と比べると、1 回の調製で得られる抗体鎖は濃度・量ともに 10 倍以上、向上した。

酵素免疫測定法によって、精製した recInfA15L-ProteinA の免疫学的反応性を、抗体や抗体から分離・精製した InfA15 抗体軽鎖と比較した。図 3 に示すように、InfA15 抗体軽鎖の抗原ペプチドに対する反応性は検出限界以下であったのに対し、recInfA15L-ProteinA は抗原ペプチドとも反

応し、これと同等の親和性で組み換え H3 型 HA(recH3/HA)とも反応した。従来の方法では完全抗体から分離した抗体鎖を変性条件下のサイズ排除クロマトグラフィーによって精製するので、変性過程を経ずに調製した recInfA15L-ProteinA の方が、より高い免疫学的反応性を発揮したものと考えている。

recInfA15L-ProteinA についてはさらに精製度を上げるための第二段階のアフィニティー精製システムを構築中である。

#### 参考文献

1. Paul S et al., *Science*, **244**,1158(1989)
2. Shuster AM et al., *Science*, **256**,665(1992)
3. Matsuura K et al., *Biophys. Res. Commun.*, **204**, 57-62(1994).
4. Paul S et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 15257(1995)

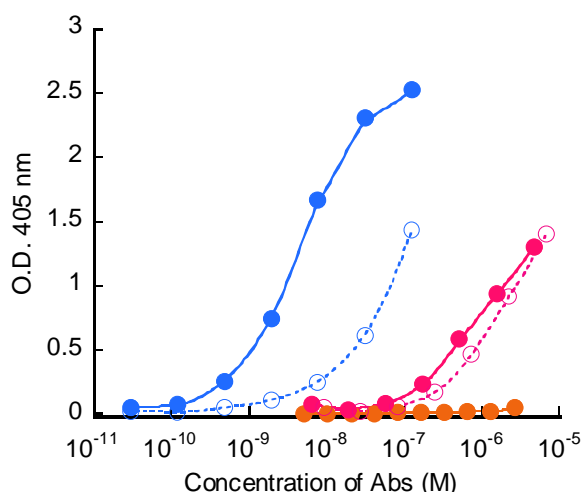


図3 InfA15 抗体および軽鎖の免疫学的反応性

- :完全抗体の抗原ペプチドに対する反応性
- :完全抗体の recH3/HA に対する反応性
- :recInfA15L-proteinA の抗原ペプチドに対する反応性
- :recInfA15L-proteinA の recH3/HA に対する反応性
- :InfA15L (抗体から調製)の抗原ペプチドに対する反応性

#### 【謝辞】

本研究を進めるにあたり、インフルエンザウィルスの取扱いについてご指導・ご協力頂きました大分大学医学部・西園晃教授、広島県総合技術研究所保健環境センター・高尾信一博士に厚く御礼申し上げます。

#### 5. 自己評価

1996年に所有していたモノクローナル抗体の軽鎖が抗原特異的な分解活性を持つことを見出して以来、『狙ったタンパク質を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」』を作製するための手法の確立に取り組み、遺伝子型に着目して酵素活性を示す抗体鎖を抽出するという現在の方法を見出した。この考え方に基づいて酵素活性の検討はまだ不十分であるものの、特徴的な反応性を示す InfA15 抗体 (軽鎖) を得た。研究目標の1つの柱であった「A型インフルエンザウィルスに対するスーパー抗体酵素」の作製については、おおむね目標を達成したと考えている。

一方、「スーパー抗体酵素」の活性と構造の関係については、計画を変更せざるを得なかった事情もあり、材料の調製方法の確立に留まった。しかし、完全抗体から抗体鎖を分離・精製する従来法と比較して、原材料の調製期間が10分の1になり、収量は絶対量、濃度ともに約10倍向上した(濃度はまだ上限に達してはいない)。tagとして ProteinA を共発現させたことで、結果的に軽鎖を可溶化した状態で安定に保つことが出来たものと考えている。

免疫学的に機能する構造を取った状態で mg/mL オーダーの抗体鎖を得たことの意義は大きく、当初の目的であった活性や構造の検討に本格的に着手する環境が整った。

## 6. 研究総括の見解

抗体でありながら抗原を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」の創製を目指す極めて独創性の高い研究である。インフルエンザウイルスを標的とし、酵素性を有する抗体の系統的な導出に挑戦した。主たる成果は次の2点である。

- ①インフルエンザウイルスのHA抗原のコンセンサス配列を基にいくつかの抗原モデルを見出し、A型インフルエンザウイルス全般に反応可能な抗体酵素の導出に成功した。
- ②抗体酵素を大量に取得できるベクターを見出すとともに、これを用いた大量発現系により抗体酵素の効率的調製法を確立した。

また、上述のように抗体酵素-インフルエンザウイルスの反応性を確保するとともに、軽鎖の特殊な配列から酵素活性の高い抗体酵素を選択するプロセスを創案し、これにも予備的な見通しを得ている。

これらの研究成果は1篇の原著論文、1件の学会招待講演にまとめられている。

免疫工学、タンパク質工学、遺伝子工学的手法を駆使して、数多くの試行錯誤から広範囲のインフルエンザウイルスに対応できる抗体酵素を作成したことは高く評価できる。また、新しいベクターにより研究開発を加速するなどの基盤技術を着実に蓄積する努力も高く評価できる。近年大きな話題となっているエイズウイルス、ピロリ菌なども対象とする研究であり、実現した場合、科学技術のみならず産業へ与えるインパクト、また日本発の「分析試薬」として意義は大きいと考えられる。今後、酵素活性のメカニズムを明らかにする研究をさらに深化させ、この成果が「スーパー抗体酵素」に結実することを強く期待する。

## 7. 今後の展開

さきがけ研究以前には、様々なスーパー抗体酵素の作製に取り組んできたものの、抗体酵素そのものを大量に得ることが出来なかったことに加え、病原性の細菌やウイルスの取り扱いに制限があったため、酵素活性の評価を *in vivo* に近い状態で行うことは困難であった。本報告書には記載していないが、研究期間中に recombinant HA タンパクの発現系の構築と、インフルエンザウイルスを使う実験系を立ち上げることが出来たので、これまでより一歩進んだ *in vivo* に近い実験系を用いる酵素活性の評価が可能となった。実用に近い条件で酵素活性を評価しながら、活性を向上させるための条件検討を行い、構造解析に着手したいと考えている。

また、今回免疫に用いた InfA peptide は非常に高い抗体誘導能を持っていた。得られた抗体には H1 型と H3 型のウイルス HA と反応するものが含まれていたことから、このペプチド配列をもとにワクチン化を視野に入れた抗原設計を進めて行きたい。

## 8. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国内)

- ・ 一二三恵美, 宇田泰三, “酵素活性と抗体機能を持つ分子ナノマシン アンチゲナーゼ”, *現代化学*, No.8, 43-50(2007)

(2)特許出願

発 明 者:一二三 恵美, 宇田泰三  
発明の名称: 抗原ペプチドおよびその利用  
出 願 人: 科学技術振興機構  
出 願 日: 2007 年 7 月 18 日  
出 願 番 号: 特願 2007-187324

(3)学会発表

**口頭発表(国内)**

- ・ 一二三恵美, 吉田沙希, 宇田泰三, “インフルエンザウィルスの hemagglutinin に対するスーパー抗体酵素 (Antingease)”, 第 17 回バイオ・高分子シンポジウム, 2007

**ポスター発表(国際)**

- ・ Emi Hifumi, Kyoko Yamahiro, Shin-ichi Takao, Taizo Uda, “Antigenases (catalytic antibody subunits) cleaving hemagglutinin of influenza virus-type A”, The 21st European Conference on Biomaterials, 2007

(4)招待講演

**招待講演(国内)**

- ・ 一二三恵美, “アンチゲナーゼの機能と応用”, 第 3 回産業用酵素シンポジウム, 2008

(B) その他の主な成果

なし