

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14472

研究課題名(和文)蛋白質の特定部位に自在に抗体を産出させる新たな免疫法の確立

研究課題名(英文)A new method for producing site-specific anti-protein antibodies at will

研究代表者

内海 利男(Uchiumi, Toshio)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：50143764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体は基礎生命科学の研究や臨床医学の幅広い分野で活用されているが、有効な抗体が自在に作製されるわけではなく、困難な場合も多い。本研究では自己免疫疾患の免疫標的となるリボソームP蛋白質複合体の特徴的な構造を利用し、抗原とするアミノ酸配列をP蛋白質の一部に導入し、動物を免疫することで導入した抗原に特異的な抗体を産出することに成功した。これまでにリボソーム蛋白質S6のリン酸化部位、翻訳因子の一つであるHbs1の特定部位、およびRNA干渉に関わるZucchiniの特定部位に対する抗体の産出を検出し、この手法が多様な部位特異抗体の作製に広く利用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Antibodies are used in many research fields as useful tools. However, it is not so easy to produce antibodies that are useful for basic life science or clinical medicine in many cases. It has been suggested that the ribosomal P protein complex has unique structural features responsible for induction of anti-P autoantibody. In this study, I genetically added several kinds of amino acid sequences into a site of the P protein and immunized rabbits with the isolated chimeric proteins. As the results, I succeeded in producing site-specific antibodies, whose target sites were genetically induced to the P protein. So far, I detected productions of the following antibodies using this technique: antibodies to ribosomal protein S6, translation factor Hbs1, and Zucchini, an important factor involved in RNA interference. The results indicate that this technique could be used for productions of a variety of site-specific antibodies.

研究分野：蛋白質合成系の分子生物学・生化学

キーワード：生化学 自己抗体 自己免疫 抗P抗体 リボソーム蛋白質 抗原性

1. 研究開始当初の背景

今日、抗体は基礎生命科学や臨床医学を含む幅広い分野で活用されている。しかし、通常の抗体作成法では、機能面で重要で進化的に保存された機能構造に対する抗体の作成は困難な場合が多い。これに対し、自己免疫疾患では高度保存部位に対して抗体が産出される場合が多い。研究代表者らは、リボソームに含まれる約80種類の蛋白質成分のうちP0、P1、P2 (P蛋白質)の保存された共通C末端共通配列が、高頻度でSLE患者の自己免疫標的になることを報告した (Sato and Uchiyama *et al.*, [1994] *Clin. Exp. Immunol.* 98, 35-39)。また、これら抗原タンパク質はP0(P1-P2)₂の5量体を形成し (Hagiya and Uchiyama *et al.*, [2005] *J. Biol. Chem.* 280, 39193-39199)、C末端部位は柔軟でリボソーム表面を広範囲に運動することを示した (Lin and Uchiyama *et al.* *Nucleic Acids Res.* [2013] 41, 8776-8787 (2頁、図1参照))。自己抗体の産生の要因として、antigen driven 説が有力視されているが (Marrack *et al.* [2001] *Nat. Med.* 7, 899-905)、研究代表者らは、P0(P1-P2)₂複合体のユニークな構造と動態が抗原性に関係すると考え、P0(P1-P2)₂複合体で自己免疫モデルマウスを免疫化した。その結果、期待通り優先的に各成分の共通C末端部位に対する抗P抗体が産出した (Sato and Uchiyama *et al.* [2014] *Clin. Exp. Immunol.* in press)。さらに最近、真核生物のP1/P2の古細菌相同体 aP1 は自身で4量体を形成し、この4量体でウサギを一般的な方法により免疫化しても同様にC末端部位に対する抗体が優先的に産出することが判明した (未発表データ)。そこで、予備実験として、古細菌 aP1 のC末端部の特定配列をP蛋白質と無関係のウサギのリボソーム蛋白質 S6 の一部の配列と置換しウサギを免疫化したところ、驚くべきことに、置換したウサギ S6 配列に対する抗体が優先的に産出された (未発表データ、4頁、図3参照)。これより、抗P抗体産出はC末

端のアミノ酸配列に要因があるというより、むしろP蛋白質複合体の分子性状に起因すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、抗体作製が困難とされている蛋白質の特定部位に対して、優先的に特異抗体を産出させる簡便で有効な動物免疫系の確立を目的とする。この研究は自己免疫性疾患 (SLE) で強力な抗原となる抗リボソーム抗原 (P蛋白質) のユニークな構造と抗原性との関係に関するこれまでの研究代表者らの研究が基盤になっている。基本的手法はP蛋白質の優先的抗原部位となるC末端配列を他の任意の配列に置換し、これで動物を免疫化しC末端への導入配列に対する特異抗体を得るという新規な方法で、予備的実験では既に一部の導入配列に対する抗体の作製に成功している。本研究により、迅速かつ安価に様々な有用抗体を得る新たな免疫法が確立され、特異抗体産出をもたらす抗原P蛋白質の構造特性に関する情報が得られることになる。

本研究により通常の免疫法では得られにくい抗体を産出させる免疫法の確立が期待されるが、この方法と標的蛋白質の結晶構造データとを併用することで、天然の蛋白質の露出した機能構造を認識する抗体が自在に作製できことになり、蛋白質の様々な機能解析や診断医学等で利用されることが期待される。さらに、本研究により、「抗P抗体の優先的産出をもたらす要因として、抗原のオリゴマー形成、C末端部位の柔軟性、C末端が半径125Å程度で運動する性質がある」という仮説の検証がなされる。これら～の性質は、B細胞上の抗原リセプターを効率よく集合させB細胞の活性化に関与する可能性があり、本研究からの知見は基礎免疫学や自己免疫学の視点から重要で、新たな研究への展開も期待される。

3. 研究の方法

研究体制: 本研究代表者の内海はリボソームP蛋白質と抗P抗体に関する研究の実績があり、研究全体の企画・統括と得られるaP1変異体や抗体の生化学的評価を担当した。本学研究推進機構助教の三好智博は分子生物学の研究実績があり、遺伝子組み換え技法によりaP1のC末端への他の分子の配列導入やリンカー部位の長さの改変と蛋白質の発現・精製を担当した。本学医歯学系医員の佐藤弘恵は膠原病の専門医で、本研究では自己抗体産出系の特徴に関する情報の収集を担当した。また、本学大学院博士前期課程の須田真広は、三好助教と共に抗原蛋

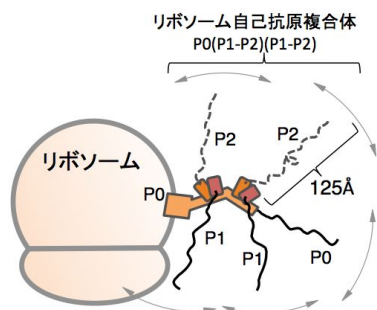


図1 リボソーム自己抗原の分子集合構造と動的性質

白質サンプルの発現・精製を行った。なお、ウサギの免疫化は民間企業に業務を委託した。

平成 27 年度：超好熱性古細菌 *P. horikoshii* の P 蛋白質 aP1 の大腸菌発現プラスミドを鋳型として、PCR 法を用いて aP1 の C 末端の特定配列をウサギリボソーム蛋白質 S6 の C 末端の配列と置換した aP1-S6 キメラ型遺伝子を構築し大腸菌を形質転換した。そして、キメラ蛋白質を大量調製・精製し、2 匹のウサギを免疫化した。抗体の産出は免疫プロット法により解析した。また、同様の方法により aP1 の C 末端を酵母の翻訳因子の一つである Hbs1 の配列の一部と置換したキメラ型タンパク質についても免疫化を行い、抗 Hbs1 抗体の産出を解析した。

抗原キャリアとして使用する aP1 が多量体を形成していることを、光散乱法を用いて解析・確認した。さらに、発現・精製した aP1 複合体の C 末端が複合体の分子表面に位置することを確認するため、C 末端部位と強く結合することが証明されている翻訳伸長因子 EF1A と EF2 との同時結合性をゲル電気泳動により解析した。

平成 28 年度：平成 27 年度に得られた動物リボソームタンパク質 S6 に対する抗 S6 抗体が非変性リボソーム小亜粒子と結合するかどうかを解析するため、得られた抗 S6 血清より IgG を調製し、ショ糖密度勾配を用いた超遠心分離法によりリボソーム結合性を分析した。さらに、平成 27 年度に行った抗体誘発法を用いて、RNA 干渉に関わるハエと蚕由来の Zucchini (Zuc) および前立腺腫瘍マーカーである Prostate-specific antigen (PSA)、の各一部部位に対する抗体の作製を試みた。

4. 研究成果

本研究で抗原のキャリアとなる古細菌 aP1 の精製サンプルの状態を探るため光散乱の実験により分子量の測定を行った。その結果、分子量が 46.5kDa であり、単量体の分子量 11.4kDa の約 4 倍であり、安定した 4 量体を形成することが確認された。また、この複合体の C 末端部位の状態を探るため、C 末端に強く結合することが知られている翻訳伸長因子 EF1A と EF2 の結合性を未変性ゲル電気泳動で分析した。その結果、4 量体に両因子が同時に結合することが示され、4 量体における C 末端部位は表面に露出していることが推察された。

aP1 の C 末端配列を、動物リボソームタンパク質 S6 のリン酸化部位と置換して aP1-S6 キメラ型タンパク質を調製し、2 匹のウサギに投与した。その結果、2

匹ともラットリボソーム中の S6 と反応する抗体産出が検出された(図 2)。2 匹とも同等の検疫プロットパターンが得られた。

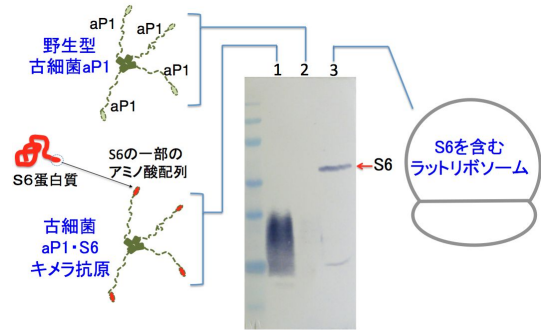


図 2 aP1-S6 キメラタンパク質に対する抗体の産出 レーン 1：aP1-S6 キメラタンパク質、レーン 2：野生型 aP1、レーン 3：リボソーム粒子からのタンパク質。それぞれのタンパク質を SDS ゲル電気泳動で分離し、ウサギから得られた抗血清を用いた免疫プロット法により生じた抗体を解析した。

同様に、aP1 の C 末端配列を、酵母の翻訳因子 Hbs1 の分子中央部の一部の配列と置換し aP1-Hbs1 キメラ型タンパク質を調製し、2 匹のウサギに投与した。その結果、2 匹とも Hbs1 と反応する抗体産出が検出された(図 3)。この場合も、2 匹とも同等の検疫プロットパターンが得られた。

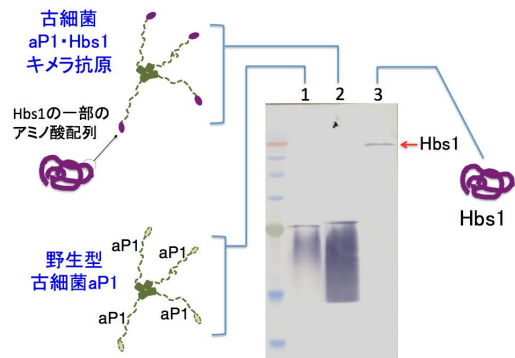


図 3 aP1-Hbs1 キメラタンパク質に対する抗体の産出 レーン 1：野生型 aP1、レーン 2：aP1-Hbs1 キメラタンパク質、レーン 3：Hbs1 タンパク質。それぞれのタンパク質を SDS ゲル電気泳動で分離し、ウサギから得られた抗血清を用いた免疫プロット法により生じた抗体を解析した。

その他、RNA 干渉に関わるハエと蚕由来の Zucchini (Zuc) の一部の配列を aP1 の C 末端に導入し同様に Zuc 配列に対す

る抗体の産出も検出した。一方、当初計画したPSAに対するタンパク質発現系の構築には失敗し、PSAに関する当初の目的は達成できなかった。

本研究で得られた抗体が、天然のサンプルと反応するかどうか確認することは重要である。本研究では、得られた抗S6抗体をラット肝より調製した40Sサブユニットと混合し、シヨ糖密度勾配遠心法により分析した結果、得られた抗体の40Sサブユニットとの結合性が確認された。一方、抗Zuc抗体と蚕細胞抽出液との反応性をイミュノプロット法で解析したが有意な反応性は検出できなかった。

二年間の研究結果を総括すると、古細菌aP1の構造基盤をキャリアとしてaP1のC末端部位と任意のアミノ酸配列を置換し、動物を免疫化することで、導入配列に対する抗体の産出が確認できた。この結果から抗P自己抗体の優先的産出の仕組みとして、抗原タンパク質のC末端配列自体の特徴より抗原タンパク質の高次構造的要因が起因することが明らかになった。さらに、本研究を総括し新規抗体作成法に関する特許申請を行っている(特願2016-120039)。この手法により得られた抗血清は反応特異性が高い反面、力価は低い場合が多い。抗原標的部位の選定やキャリア構造の改良など、今後の課題が残された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Honda, T., Imai, H., Suzuki, T., Miyoshi, T., Ito K, and Uchiyumi, T.; Binding of translation elongation factors to individual copies of the archaeal ribosomal stalk protein aP1 assembled onto aP0. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 483, 2017, 153-158.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.175.

Shigeno, Y., Uchiyumi, T., and Nomura, T.; Involvement of ribosomal protein L6 in assembly of functional 50S ribosomal subunit in *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 473, 2016, 237-242.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.085.

Nomura, T., Ito, M., Kanamori, M., Shigeno, Y., Uchiyumi, T., Arai, R., Tsukada, M., Hirabayashi, K., and Ohkawa, K.; Characterization of silk gland ribosomes from a bivoltine caddisfly, *Stenopsyche marmorata*: translational suppression of a silk protein in cold conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 469, 2016, 210-215.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.112.

Sato, H., Onozuka, M., Hagiya, A., Hoshino, S., Narita, I, and Uchiyumi, T.; Characterization of anti-P monoclonal antibodies directed against the ribosomal protein•RNA complex antigen and produced using MRL autoimmune-prone mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 査読有, 179, 2015, 236-44. DOI: 10.1111/cei.12460.

Imai, H., Miyoshi, T., Murakami, R., Ito, K., Ishino, Y., and Uchiyumi, T.; Functional role of the C-terminal tail of the archaeal ribosomal stalk in recruitment of two elongation factors to the sarcin/ricin loop of 23S rRNA. *Genes to Cells*, 査読有, 20, 2015, 613-624.

DOI: 10.1111/gtc.12256.

[学会発表](計8件)

内海 利男, 今井 大達, 三好 智博, 伊東 孝祐; 翻訳反応の各ステージで機能するリボソームストーク・翻訳因子間相互作用; 第39回日本分子生物学会、シンポジウム口頭発表《招待》; パシフィコ横浜(神奈川県横浜)2016年11月30日-12月2日.

今井 大達, 阿部 高也, 三好 智博, 伊東 孝祐, 内海 利男; 翻訳リサイクル反応におけるリボソームストークタンパク質P1の機能解析; 第39回日本分子生物学会、ポスター; パシフィコ横浜(神奈川県横浜)2016年11月30日-12月2日.

丸山 圭, 今井 大達, 三好 智博, 伊東 孝祐, 内海 利男; リボソームストークC末端部位と翻訳因子間の結合多様性; 第39回日本分子生物学会、ポスター; パシフィコ横浜(神奈川県横浜)2016年11月30日-12月2日.

今井 大達, 三好 智博, 伊東 孝祐, 内海 利男; 翻訳終結段階および異常停止時におけるリボソームストークタンパク質のはたらき; 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会大会合同大会、ポスター; 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸)2015年12月1日-12月4日.

須田 真広, 今井 大達, 三好 智博, 伊東 孝祐, 内海 利男; 古細菌リボソームにおける種特異的な翻訳因子受容性をもたらす分子要因; 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会大会合同大会、ポスター; 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸)2015年12月1日-12月4日.

丸山 圭, 三好 智博, 伊東 孝祐, 内海 利男; リボソームストークC末端と翻訳因子間の結合親和性の分析; 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会大会合同大会、ポスター; 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸)2015年12月1日-12月4日.

村上 僚、伊東 孝祐、Jacob Morris、

Leiming Tang、三好智博、浅野桂、内海利男；リボソームサブユニット会合における翻訳開始因子 IF5B とリボソームストーク間相互作用の構造・機能基盤；第 38 回日本分子生物学学会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、口頭；神戸ポートアイランド（兵庫県神戸）2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日。

村上 僚、Jacob Morris、Leiming Tang、三好智博、浅野 桂、伊東 孝祐、内海利男；リボソームストークタンパク質と eIF5B の相互作用は翻訳開始反応におけるサブユニット会合を促進する；第 17 回日本 RNA 学会年会、ポスター；ホテルライフォート札幌（北海道札幌）2015 年 7 月 15 日-17 日。

〔図書〕(計 1 件)

内海利男 共著、丸善出版、ハーパー・生化学（原書 30 版）、2016、pp. 475-521.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：抗原結合用キャリア及びその使用
発明者：内海利男、須田 真広、藤間 真紀、伊東孝祐

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-120039

出願年月日：2016 年 6 月 16 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biology/index/uchiumi-ito/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内海 利男 (Uchiumi, Toshio)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：5 0 1 4 3 7 6 4

(2) 研究分担者

三好 智博 (Miyoshi, Tomohiro)

新潟大学・研究推進機構・助教

研究者番号：6 0 5 3 4 5 5 0

(3) 連携研究者

佐藤 弘恵 (Sato, Hiroe)

新潟大学・保健管理センター・講師

研究者番号：8 0 7 0 5 9 6 3

(4) 研究協力者

須田 真広 (Suda, Masahiro)