

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32657

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14372

研究課題名(和文) エピトープデータベース化による抗体リソースの実証研究

研究課題名(英文) Verification of the value of establishing a monoclonal antibody cDNA database with information of their precise epitopes

研究代表者

田中 真人 (TANAKA, Masat)

東京電機大学・理工学部・教授

研究者番号：30339072

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)：我々は5種の抗タンパク質モノクローナル抗体の抗原決定基をペプチドレベルまで新規に同定した。さらに、当該抗体が異種タンパク質に内在する同じ抗原決定基にも反応することを明らかにした。これは、生物が無限に存在しうる外来抗原に対して有限な抗体特異性レパートリーで対応しうることを意味し、抗原決定基データベースを構築する価値を示すことが出来たと考える。今後、多様なモノクローナル抗体のcDNAを分子クローニングし、抗原決定基情報と併せてデータベース化すれば、将来的に抗体の超可変領域のアミノ酸配列を参照し結合特異性の異なる人工抗体を自由にデザインが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed five monoclonal antibodies to identify their epitopes narrowing them down to the short peptide level. We found that each antibody detects the same peptide sequences in different proteins deriving from different species. This finding suggests that a precise database of paired antibody-epitope sequence sets will be useful for efficient manufacturing of desired antibodies regarding the astronomical number of possible antibody repertoires our immune-system can generate. We expect that accumulating data of antibody-epitope sequence set will enable us to design any artificial antibody against any target molecule whenever necessary with rapidness but without sacrificing animals

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：モノクロン抗体 エピトープ解析 組換え抗体 人工抗体のデザイン

### 1. 研究開始当初の背景

生命科学分野において抗体の重要性は極めて大きい。研究試薬や診断試薬として、多種類の抗体が必須であるばかりか、最近では臨床医学分野でもガンや難病の特効薬としてヒト化抗体を医薬として使用するようになってきている (例えば Weiner, L.M. et. al. *Lancet*. **373**, 1033-1040, (2009))。現在ゲノム科学の進展により、多くの生物の遺伝子配列が明らかになったが、今後の機能解析のためには、すべての生体高分子に対する抗体が供給されることが理想的である。一方、抗体の生産には多くの実験動物が必要なため、動物愛護の観点から実験動物の使用を最小限に抑制するように求められている。モノクローナル抗体の利用は一つの解決策だが、すべての研究対象をカバーするには作製の過程で今後も実験動物の使用を避けることができず、要する労力も多大である。

もしも、すべての抗体産生 B 細胞のハイブリドーマが単離されて、それぞれの抗体の抗原認識の構造、特にタンパク質の抗原認識配列が最小ペプチド配列まで同定されて公開されれば、その配列情報から必要な抗体をそのハイブリドーマの中から選び、利用すること可能となるはずである。その時には、抗体を作製するために犠牲となる実験動物は劇的に減少することになる。同時に、植物や細菌、昆虫など抗体資源のほとんど用意されていない分野へ抗体試薬を一挙に供給できる可能性を秘めている。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、モノクローナル抗体抗原決定基のデータベースを構築し、データベースと連携した抗体

リソース・バンクを作ることにある。もし、モノクローナル抗体の真の抗原決定基がペプチドレベルでデータベース化されれば、抗体を作製するために犠牲となる実験動物を劇的に減らすことができる。具体的には、膨大に蓄積され死蔵されている抗ヒト・タンパク質モノクローナル抗体のリソースとしての価値を高め、抗体がほとんど供給されていないタンパク質に対する種を超えた“ユニバーサル”抗体として再利用が可能となる。将来的には危険を伴うエボラ出血ウイルスのようなケースにおいても抗体供給が可能となる。

### 3. 研究の方法

既知のモノクローナル抗体のエピトープ解析を、通常の欠失法を用いて行った後、合成オリゴヌクレオチドを既知タンパク質 cDNA の複数の部位に挿入して融合タンパク質を発現 (田中真人、核局在化シグナル同定法、新生物化学実験講座 6、生体膜と膜輸送 (下) p705 ~ p715) し、ウェスタンブロッティング法によって短鎖の抗原ペプチドを正確に同定する。その後つなぎ目のアミノ酸を変更し、最も結合能の高い抗原決定ペプチドを推定する。このペプチドをデータベースで検索し、元の抗原の生物種のみならず、すべての生物のどのようなタンパク質に存在するかを特定する。その後、実際にこの抗体が反応するか否かを検証する。検証が終了した抗体をここではユニバーサル抗体と称する。この抗体とエピトープの組み合わせをデータベース化する事業を将来、共同研究事業として具体化するための方法の開発と戦略とを検討する。

#### 4. 研究成果

ヒト DNA トポイソメラーゼ II 抗体 (4E12b 抗体) の抗原決定基をペプチドレベルまでの詳細な解析を行い、4E12b 抗体の抗原決定基 (エピトープ) がヒト DNA トポイソメラーゼ II 配列中の特定の 6 アミノ酸残基のペプチドに存在することを明らかにした。網羅的な BLAST 検索から、多くの生物種で、この配列含むタンパク質が同定された。これらの生物種由来の細胞抽出物の 4E12b 抗体を用いたイムノプロットの結果、これらのタンパク質の推定分子量に相当する複数のタンパク質が抗原性を示した。さらにこのペプチドに隣接するアミノ酸残基の影響を調べるために N 端側、C 端側のアミノ酸残基を変更し、抗原性に与える影響を調べた。また、4E12b 抗体 L 鎖、H 鎖 cDNA クローニングを行い、動物細胞での発現を実施した。得られた組換え抗体は、4E12b 抗体と同じ特異性を示し。トリプシン分解ペプチドマッピング解析の結果はこの cDNA から予想される L 鎖、H 鎖のアミノ酸配列と一致した。

4E12b 抗体 L 鎖、H 鎖 cDNA から推定されたアミノ酸配列と既知のデータベース上の相同配列検索を行ったところ、L 鎖、H 鎖のそれぞれが極めて類似した IgG 分子が同定された。4E12b 抗体 L 鎖と最も高い相同性が見出された抗体は 4WEB で本来は C 型肝炎ウイルスの外被糖タンパクを認識する抗体である。4E12b 抗体 L 鎖と 4WEB 抗体 L 鎖のアミノ酸配列の置換は 6 か所存在するがほとんどが類似アミノ酸への置換であり、これらの部位のアミノ酸置換抗体を作製し、エピトープ配列への結合特性を調べるこ

とで、人工抗体のデザインが可能か否かを検討した。ほとんどの置換は特異性に大きな変化を与えなかったが、F122Y は抗原性を変更させる結果を得た。その他、4E12b 抗体の H 鎖、L 鎖の超可変領域のアミノ酸を変更した多くの変異体を作製し、4E12b 抗体の特異性に影響を与える部位の検索を実施した。

上述のように、4E12b 抗体の L 鎖に関しては極めて類似した抗体が複数見いだされた。しかも、これらの抗体は全く異なる抗原認識の抗体であった。これらの抗体については、当然のことながら、H 鎖には全く相同性が見られなかった。一方、H 鎖の相同配列検索では、可変領域に数残基からなるペプチドの挿入変異という結果が得られた。これらの抗体では H 鎖が抗原結合特異性を支配しているなど、いくつかの解釈が可能であるが、この結果は、抗体分子のアミノ酸配列を変更して新たな抗原決定基を有する組換え抗体をデザインしようとする立場からは、極めて魅力的な枠組みを入手したこととなる。

4E12b 抗体の解析に加えて、ラット抗 GFP モノクロン抗体についても同様のエピトープ解析を行い、短鎖ペプチド・エピトープを同定した。BLAST 検索の結果、4E12b 抗体と同様に多くの生物種の様々なタンパク質を認識する可能性が示された。詳細な抗原決定基解析が終了し、分子クローニングが完成した抗体は、8D2 および 7B9 抗ヒト DNA トポイソメラーゼ II 抗体に加えて、合計 5 種類となった。

これらの抗体のいくつかについては、異種タンパク質に内在する同じ抗原決定基にも反応することを明らか

にした。これは、生物が無限に存在しうる外来抗原に対して有限な抗体特異性レパートリーで対応しうることを意味し、抗原決定基データベースを構築する価値を示すことが出来たと考える。今後、多様なモノクローナル抗体の cDNA を分子クローニングし、抗原決定基情報と併せてデータベース化すれば、将来的に抗体の超可変領域のアミノ酸配列を参照し結合特異性の異なる人工抗体を自由に設計することが可能となる。

#### 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 1 件)

Oono, M., Yamaguchi, K., Rasyid, A., Takano, A., Tanaka, M. and Futai, N. (2017). Reconfigurable microfluidic device with discretized sidewall. *Biomicrofluidics* **11**, 034103

doi:

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4983148>

(査読あり)

[学会発表](計 13 件)

Ito, N., Tone, S. and Tanaka, M. (2017). C-terminal 15kDa fragment from  $\gamma$ -actin causes apoptotic cell death. Annual Meeting 2017 of American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB2017). Apr. 24-28, 2017, McCormick Place Convention Center, Chicago, U. S. A.

Ito, N., Honda, H., Tone, S. and Tanaka, M. (2016) Profilins suppress the apoptosis induced by cytoskeletal 15kDa  $\gamma$ -actin in cancer

cell lines. American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting 2016, Dec.3-7, 2016, Moscone Center, San Francisco, U. S. A.

大津景子、川島洋明、渋谷温、石井沙織、山崎太郎、田中真人 (2016): HS 症例のスペクトリンは赤血球のプロテアーゼにより分解されやすい (The characterization of membrane proteins of red blood cell of hereditary spherocytosis). 第 58 回 日本小児血液・がん学会学術集会、品川プリンスホテル、12 月 15 日(木)~17 日(日) (口頭発表)

川島洋明、渋谷温、杉山優介、大津景子、石井沙織、山崎太郎、田中真人 (2016): Detection of autoantibody (IgG) in erythrocytes from Coombs positive AIHA. 第 78 回 日本血液学会学術集会、パシフィコ横浜、10 月 13 日~15 日

伊東奈那子・本多弘幸・刀祢重信・田中真人 (2016) Effects of profilin isoforms on cytotoxicity of  $\gamma$ -actin C-terminal fragment. 第 89 回日本生化学大会、9 月 25 日~27 日、仙台、ポスター発表

高田 勇輝、松本 諒哉、高木 美香、高野 勇太、田中 真人 (2016) 蛍光タンパク質を用いた抗体を得にくいタンパク質の機能解析法 .日本農芸化学会 2016 年度大会、3 月 27 日~3 月 30 日、札幌コンベンションセンター

山田寛生、佐竹祐之介、杉山優介、田中 真人、村勢則郎 (2016) クモ糸の氷核活性と構成タンパク質の

MALDI-TOFMS 測定 . 日本農芸化学会 2016 年度大会、3 月 27 日 ~ 3 月 30 日、札幌 コンベンションセンター

木村賢仁、高木美香、高野勇太、川島洋明、田中真人、(2015) ヒト・プロトロンビンの分泌および活性に関する N 型糖鎖とプロリン残基の影響、(口頭発表) 第 38 回日本分子生物学年会、12 月 1 日 ~ 12 月 4 日、神戸ポートアイランド

伊東奈那子、本多弘幸、松本諒也、田中真人(2015) 蛍光タンパク質を用いたプロフィリン・アイソフォームの機能解析、第 88 回日本生化学大会、12 月 1 日 ~ 12 月 4 日、神戸ポートアイランド

北里茂彬、田中真人、川島洋明、長原礼宗 (2015) ミトコンドリア局在型 PKD によるアポトーシス抑制機構の解明、第 88 回日本生化学大会、12 月 1 日 ~ 12 月 4 日、神戸ポートアイランド

杉山優介、渋谷温、川島洋明、石井佐織、山崎太郎、松林正、田中真人(2015) Analysis of erythrocyte membrane protein in childhood hemolytic anemia by mass spectrometry. 第 57 回 小児血液がん学会学術集会、甲府富士屋ホテル、2015 年 11 月 27 日 ~ 29 日、(口頭発表)

杉山優介、渋谷温、川島洋明、石井佐織、山崎太郎、田中真人(2015) The effects of splenectomy in hereditary spherocytosis on the membrane proteins of erythrocyte、第 77 回日本血液学会学術集会、ANA クラウンプラザホテル金沢、2015 年 10 月 16 日 ~ 18 日、(口頭発表)

杉山優介、渋谷温、川島洋明、石井沙織、山崎太郎、田中真人(2015) 遺伝性球状赤血球症の赤血球膜タンパク質の特徴 (The characterization of membrane proteins of red blood cell of hereditary spherocytosis) . 第 118 回日本小児科学会学術集会、2015 年 4 月 17 日 (金) ~ 4 月 19 日 (日)、大阪国際会議場

[その他]

ホームページ等  
細胞分子生物学研究室 :  
<http://www.b.dendai.ac.jp/~cellmol/index.htm>

情報分子生物学研究室 :  
<https://sites.google.com/site/tdurbcompbio/home>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

東京電機大学 理工学部 教授  
田中 真人 (TANAKA Masato)

研究者番号 : 30339072

### (3) 連携研究者

東京電機大学 理工学部 准教授  
根本 航 (NEMOTO Wataru)

研究者番号 : 10455438

### (4) 研究協力者

東京電機大学 理工学部 研究員  
川島 洋明 (KAWASHIMA Hiroaki)