

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657002

研究課題名（和文） 遺伝子変換と体細胞突然変異誘発の連係による抗体遺伝子の成熟

研究課題名（英文） Affinity Maturation of Antibodies by Induction of Gene Conversion or Somatic Hypermutation.

研究代表者

太田邦史 (Oota Kunihiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90211789

研究成果の概要（和文）：外来の異物を排除する獲得免疫系では、抗原に特異的かつ強固に結合する高親和性抗体への成熟が極めて重要な役割を果たす。今回、鳥類B細胞株 DT40 を用いて、成熟型抗体遺伝子が生成される一連の機構を、培養細胞系で実現した。具体的には、申請者らが独自に開発した抗体遺伝子組換え活性化系と、特定タンパク質の選択的分解を誘発するオーキシングロン系、体細胞突然変異誘発系の3者を組み合わせ、複合的な新規 *in vitro* 成熟型抗体作製系を構築した。その結果、*in vitro* で抗原に対してより強固に結合する抗体の獲得に成功した。この成果によって、成熟型抗体が生成される詳細な分子メカニズムが試験管内で実証された。また同時に、本課題で構築したシステムが高親和性抗体生体外作製系として優れていることも示された。

研究成果の概要（英文）：In adaptive immune system, somatic hyper mutation in hyper-variable regions of antibody loci leads to affinity maturation of antibodies that strengthens the antigen binding activities. We previously developed an *in vitro*-based antibody design system using chicken B cell line DT40. This system, referred to as “ADLib (Autonomously Diversifying Library) system”, allows very rapid monoclonal antibodies production (within a week). In this study, ADLib system is newly equipped with the somatic hypermutation process, which is regulated by AID (auxin-inducible degenron). In other words, affinity maturation is reconstituted *in vitro* by the use of DT40. Using this system, we can improve affinity of antibodies substantially.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：抗体遺伝子、突然変異、組換え、抗体工学、B細胞、親和性成熟

1. 研究開始当初の背景

鳥類や家畜の獲得免疫系では、多様な抗原に対する抗体遺伝子を、遺伝子変換という「組換え」と、「体細胞突然変異」によって創出する。また、外来の異物を排除する獲得免疫系では、抗原に特異的かつ強固に結

合する高親和性抗体への成熟が極めて重要な役割を果たす。しかし、「組換え」と、「体細胞突然変異」の連係による成熟型高親和性抗体の生成メカニズムについては実験的に検証されておらず、不明な点が多い。

申請者らは、鳥類B細胞株 DT40 の

抗体遺伝子組換えを人為的に活性化して得た多様化 B 細胞集団から特異抗体産生細胞を選別する「ADLib システム」を開発した(瀬尾ら, *Nature Biotech.*, 2005)。

一方、Sale らは相同組換え酵素 XRCC3 の変異株を用いて体細胞突然変異を誘発し、抗体の親和性向上に成功した(Sale ら, *Nature*, 2004)。

鐘巻らは、オーキシン依存的選択的タンパク質分解系を用いた任意タンパク質の分解制御系「オーキシンドグロン」を開発し(鐘巻ら, *Nature Method*, 2009)、DT40 に適用した。これにより、DT40 中の任意のタンパク質の消長をオーキシンで制御することが可能になった。

これらの技術の登場により、組換えと体細胞突然変異の連系の意義を実験的に検証する実験系の構築が可能になった。

2. 研究の目的

鳥類 B 細胞株 DT40 を用いて、成熟型抗体遺伝子が生成される一連の機構を、培養細胞系で実験的に検証する。

実験系としては、申請者らが独自に開発した抗体遺伝子組換え活性化系と、特定タンパク質の選択的分解を誘発するオーキシンドグロン系、体細胞突然変異誘発系の 3 者を組み合わせ、複合的な新規 *in vitro* 実験系を構築する。

この系により、成熟型抗体形成における「組換え」と「突然変異」の役割を実験的に明らかにする。また、申請者らが開発したキメラ IgG 抗体作製系と上記 *in vitro* 系を組み合わせ、成熟型高親和性 IgG 抗体の迅速作製も試みる。

3. 研究の方法

研究は以下のステップにしたがって実行した。

1) オーキシンドグロン系を用いて、オーキシンの有無で XRCC3 の発現量を厳密に制御することができる DT40 細胞株を構築した。

2) この細胞株に TSA を処理することで抗体遺伝子の多様化を促進し、ADLib システムを実施してモデル抗原に対する抗体を作製した。

3) 上記で獲得されたモデル抗体産生細胞について、オーキシン存在下、TSA 存在下あるいはオーキシン+TSA 存在下などの条件で抗体遺伝子の多

様化を行った。つまり、「組換え」と「体細胞突然変異」の優位性が異なると考えられる条件で多様化を行った。

4) それぞれの条件で多様化した細胞集団に蛍光標識したモデル抗原を反応させ、フローサイトメーターを用いて抗原とより強固に結合した細胞の割合を測定した。

4. 研究成果

内在性 XRCC3 を遺伝子ターゲティングにより欠失した DT40 株に、オーキシンドグロン・タグを連結した XRCC3、およびイネのオーキシンドグロン結合因子 OsTIR1 を発現するベクターを導入し、安定形質転換体を複数取得した。

形質転換体における XRCC3 の発現とオーキシン添加時の分解を確認したのち、抗体遺伝子突然変異頻度を指標に、タグ付き XRCC3 の機能の有無を調べ、最も XRCC3 の発現が顕著で、かつオーキシンドグロンの効果が明瞭な株を選別した。

上記の株を TSA 存在下・非存在下で一ヶ月培養を行い、ゲノム DNA から PCR により抗体可変領域部位を増幅し、その DNA 配列を解析し、可変領域に導入される変異部位のマッピングを行った。

その結果、上記細胞株では野生型細胞と同様に TSA 依存的に抗体遺伝子の多様化が促進していた。一方、コントロールとして用いた XRCC3 欠損株では、TSA 依存的に「体細胞突然変異」の蓄積が増えることが初めて明らかとなった。

これらの結果は、TSA が「組換え」と「体細胞突然変異」双方のメカニズムを活性化する働きを持つことを意味している。

次に、樹立した XRCC3 制御株を TSA 存在下で一ヶ月培養を行い、抗体遺伝子の多様化を促した。

その後、モデル抗原のウサギ IgG に特異的に結合する抗体発現細胞を ADLib システムで獲得した。

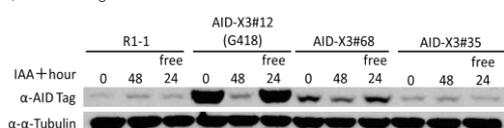
獲得したウサギ IgG 抗体産生細胞をオーキシン存在下、TSA 存在下あるいはオーキシン+TSA 存在下の条件で一ヶ月培養を行った。

その後、それぞれの細胞集団を蛍光標識した rIgG と反応させ、フローサイトメーターを用いて抗原とより強固に結合した細胞の割合を測定した。

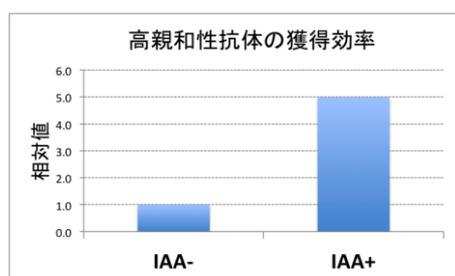
その結果、オーキシン依存的に結合が強固になった細胞の割合が増えていた。一方で、TSA 存在化では、結合が強固になった細胞の割合が増えることはなかった。

これらの結果から、成熟型抗体は「組換え」よりも「体細胞突然変異」が優位に働くことによって効率よく形成されることが、*in vitro* の実験系で明らかとなった。

また、TSA は「組換え」だけでなく「体細胞突然変異」の促進にも寄与することが初めて明らかとなり、XRCC3 の制御と TSA 処理を組み合わせることによって成熟型抗体を *in vitro* で効率よく作製できる可能性を示した。



(図1)オーキシン(IAA)添加によるXRCC3の分解と、IAA 除去によるXRCC3の再蓄積を確認した実験結果。XRCC3に融合したAIDタグを認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。AID-X3#12株では、IAAを培地に添加すると、48時間以内にXRCC3が消失することを確認した。また、培地からIAAを除去すると48時間以内にXRCC3の発現が完全に回復することを確認した。



(図2)XRCC3 制御による高親和性抗体の獲得効率をまとめたグラフ。抗ウサギ IgM 抗体を発現している XRCC3 制御株(AID-X3#12)を、IAA 存在化・非存在下で63日間培養した。その後、細胞をPEで標識したウサギ IgG 抗体および FITC で標識した抗ニワトリ IgM 抗体と反応させ、フローサイトメーターで各細胞の蛍光強度を測定した。その後、測定値を元にウサギ IgG への結合が特に強い細胞集団の割合を IgM 発現細胞の割合で標準化した。

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 6 件)

著者: Kurosawa K. and Ohta K.
論文表題: Genetic diversification mediated by unidirectional gene conversion.

雑誌名: Genes

巻・発行年・頁: 2・2011・48-58

著者: 太田邦史

論文表題: 環境応答とエヒ・ケ・ノム

雑誌名: Endocrine Disrupter News Letter

巻・発行年・頁: 14・2011・66-66

著者: 三好知一郎

論文表題: A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S phase checkpoint

雑誌名: Molecular Cell

巻・発行年・頁: 47・2012・722-733

著者: Josephine Galipon

論文表題: Stress-induced lncRNAs evade nuclear degradation and enter the translational machinery

雑誌名: Genes to Cells

巻・発行年・頁: 18・2013・353-368

著者: 山田真太郎

論文表題: Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast.

雑誌名: Nucleic Acids Res.

巻・発行年・頁: 41・2013・3504-3517

著者: 太田邦史

論文表題: 次世代シーケンサーによる非コート・DNA 配列解析

雑誌名: 実験医学 2012年9月号「ヒトケ・ノム中98%の"未踏領域"非コート・DNAに挑む

巻・発行年・頁: 30・2012・2209-2214

[学会発表] (計 13 件)

発表者: 太田 邦史

発表表題: 環境応答とエヒ・ケ・ノム

学会等名: 第5回環境ホルモン学会(招待講演)

発表年月日: 2011年6月16日

発表場所: 東京、東大(本郷)

発表者: 太田 邦史

発表表題: 大規模ケ・ノム再編成システム

学会等名: 第7回よこはまハ・イオマス研

究会(招待講演)

発表年月日: 2011年5月31日
発表場所: 神奈川、横浜市立大

発表者: 太田 邦史ら

発表標題: Gene regulation by lncRNAs in response to low glucose stress
学会等名: 分子生物学会(招待講演)
発表年月日: 2011年12月16日
発表場所: 神奈川、ハ・シフィコ横浜

発表者: 黒澤恒平、太田邦史

発表標題: The conserved N-terminus regions contribute to the functional differentiation of HDAC1 and HDAC2 at the immunoglobulin loci
学会等名: 分子生物学会
発表年月日: 2011年12月15日
発表場所: 神奈川、ハ・シフィコ横浜

発表者: 禅野かなみ、黒澤恒平、林和花、村山晃歩、加々谷英理、太田邦史
発表標題: 相同組換えと突然変異を連携させた抗体の高親和性化システムの開発
学会等名: 分子生物学会
発表年月日: 2011年12月15日
発表場所: 神奈川、ハ・シフィコ横浜

発表者: Ohta K., et al.

発表標題: Rec15/ Mer2 bridges meiotic recombination initiation sites to chromosome axes to facilitate the assembly of recombination initiation complexes
学会等名: EMBO workshop
発表年月日: 2011年9月19日
発表場所: イタリア、Paestum

発表者: 太田邦史

発表標題: Conditional induction of whole genome remodeling in plants and fungi
学会等名: EMBO Genetic Stability and Change Workshop(招待講演)
発表年月日: 2012年05月02日~2012年05月05日
発表場所: Roscoff(フランス)

発表者: 太田邦史

発表標題: Mde2 is a central coupler for meiotic recombination initiation that links chromosome architecture to S-phase checkpoint
学会等名: The 1st IGAKUKEN international symposium on "Regulation of Chromosome Cycle"(招待講演)
発表年月日: 2012年11月29日~2012年11月29日
発表場所: 東京都医学総合研究所(東京)

発表者: 太田邦史

発表標題: ADLib システムを用いたシース・抗体の開発
学会等名: 第12回日本蛋白質化学会(招待講演)
発表年月日: 2012年06月20日~2012年06月22日
発表場所: 名古屋国際会議場(名古屋)

発表者: 太田邦史

発表標題: A novel mediator for meiotic recombination initiation that links chromosome architecture to S-phase checkpoint
学会等名: The 8th 3R Symposium(招待講演)
発表年月日: 2012年11月25日~2012年11月28日
発表場所: 淡路夢舞台国際会議場(兵庫)

発表者: 太田邦史

発表標題: A novel mediator for meiotic recombination initiation links chromosome architecture to S-phase checkpoint
学会等名: The 2012 CSHL Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function(招待講演)
発表年月日: 2012年09月27日~2012年10月01日
発表場所: Cold Spring Harbor(アメリカ)

発表者: 黒澤恒平、橋本講司、村山晃歩、太田邦史

発表標題: ADLib システムを利用したモノクローナル抗体作製と迅速抗体エンジニアリング
学会等名: 日本生物工学会
発表年月日: 2012年10月26日
発表場所: 兵庫、神戸ポートアイランド

発表者: 橋本講司、黒澤恒平、村山晃歩、加々谷英理、太田邦史

発表標題: 抗体 Fc 領域自在改変システムの開発
学会等名: 分子生物学会
発表年月日: 2012年12月14日
発表場所: 福岡、マリンメッセ福岡

〔図書〕(計 1件)

著者名: 黒澤恒平、林和花、太田邦史
出版社: Springer
書名: "Chimeric antibodies" In "Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols"
発行年: 2013

総ページ数: 未定

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 非誘導体型 LPA に対して作製された抗 LPA 抗体

発明者: 太田邦史ら

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2012- 284612

出願年月日: 2012 年 12 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: タンハ・ク質の迅速改良法

発明者: 黒澤恒平、太田邦史、瀬尾秀宗

権利者: 東京大学、カイオム・バイオサイエンス

種類: 特許

番号: 特願特願 2012- 138293

出願年月日: 2012 年 06 月 20 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

特になし

[その他]

ホームページ等

東京大学大学院総合文化研究科太田研

[http:// www.ohta- lab.c.u- tokyo.ac.jp/ index.html](http://www.ohta-lab.c.u-tokyo.ac.jp/index.html)

太田邦史教授、親から子への遺伝子継承で

▪ 中心的な役割を果たす遺伝子を発見

[http:// www.c.u- tokyo.ac.jp/ info/ news/ topics/ 20120727095047.html](http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/20120727095047.html)

太田邦史教授が ▪ 平成 24 年度関東地方発明表彰・発明協会会長奨励賞を受賞

[http:// www.c.u- tokyo.ac.jp/ info/ news/ topics/ 20121206171324.html](http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/20121206171324.html)

太田邦史教授が ▪ 第 10 回産学官連携功労者表彰・文部科学大臣賞を受賞

[http:// www.c.u- tokyo.ac.jp/ info/ news/ topics/ 20121005114516.html](http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/20121005114516.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田邦史 (Oota Kunihiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号: 90211789

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし