

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657087

研究課題名(和文)自己抗原複合体ユニットを利用するテーラーメイド抗体産出系の作成

研究課題名(英文)Creation of the tailor-made system for antibody production by using an autoantigenic complex

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、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、リボソーム自己抗原複合体(P0-P1-P2)の構造と抗原性との関係を探り、新規抗体産出系を開発することである。抗リボソーム自己抗体(抗P)の認識部位解析により、P0/P1/P2に共通のC末端3アミノ酸部位が同定された。さらに、隣接するセリン残基のリン酸化により抗体結合性が増強し、リン酸化と抗原性の関係が示唆された。また、P1/P2の古細菌相同体aP1が4量体を形成し、抗原に用いた際、C末端に対する抗体が産出されること、さらにC末端を他のリボソーム蛋白質の一部の配列に置換することで導入配列に対する抗体が産出されることが判明した。希望の配列に対する抗体産出系の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the relationship between the structure and antigenicity of ribosomal autoantigen (P0-P1-P2 complex), and to develop a useful antibody-production system. Epitope analysis of the ribosomal autoantigen identified the 3 amino acids at the C-terminus, which is shared by P0/P1/P2 and responsible for anti-P recognition. It was also found that phosphorylation at Ser residues adjacent to the 3 amino acids enhanced the anti-P binding, suggesting that phosphorylation of the autoantigen is related to the antigenicity. We also found that aP1, the archaeal homologue of human P1/P2, forms a stable tetramer and that immunization of this tetramer resulted in production of antibodies to the conserved C-terminal part. When the C-terminal amino acid sequence was replaced with a sequence of another ribosomal protein, the antibody specific to the introduced sequence was produced. We thus developed a novel method to produce efficiently the antibody for a desired sequence.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・免疫生化学

キーワード：リボソーム 抗P自己抗体 自己抗原 P蛋白質 自己免疫 抗体産出系 抗リボソーム抗体 国際情報交換、香港

1. 研究開始当初の背景

抗体は、基礎生命科学研究はもとより、臨床医療や検査診断等で広く利用されている。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、自己免疫により産出される抗体は高度に保存された部位に対して抗体が産出される場合が多い。申請者らはこれまで多くの SLE 患者血清中の抗リボソーム自己抗体を解析し、

80 種類のタンパク質成分と 4 種類の rRNA 成分から構成されるリボソームの主な自己免疫標的は P0, P1, P2 の 3 種のタンパク質 (P タンパク質) であること (Sato and Uchiumi *et al.*, [1994] *Clin. Exp. Immunol.* 98, 35-39) これらの抗原タンパク質は P0(P1-P2)₂ の 5 量体複合体を形成し rRNA と結合しリボソームの機能部位を形成すること (Hagiya and Uchiumi *et al.*, [2005] *J. Biol. Chem.* 280, 39193-39199) そして、エピトープは P0, P1, P2 に共通で進化的に高度に保存された C 末端アミノ酸配列中に存在し、P0(P1-P2)₂ の複合体構造では表面に露出していること等を示してきた (Naganuma and Uchiumi *et al.*, [2007] *Genes to Cells* 12, 501-510)。自己抗体の発生のしくみは明確にはされていないが、自己の抗原自体に対する免疫応答に起因するとする antigen driven 説が有力視されている (Marrack *et al.* [2001] *Nat. Med.* 7, 899-905)。申請者らはこの仮説に立脚し、SLE モデルマウス (MRL/lpr) に *in vitro* で調製した P0(P1-P2)₂ 複合体をアジュバントの非共存下で投与し、マウスのリンパ細胞をミエローマ細胞と融合後、自己抗体の発現を解析した。その結果、得られたハイブリドマクローンの 74% から抗 P 抗体を検出し、抗 P モノクローナル抗体を得る極めて有効な方法を確立した (内海ら、論文準備中)。以上のことから、高度に保存された C 末端部位に対する自己抗体の発現に P0(P1-P2)₂ の複合体構造が関与すると考え、C 末端部分を任意の配列に改変し、その配列に対して抗体を誘発させる、という着想に至った。

2. 研究の目的

申請者らは、全身性自己免疫疾患 (SLE) の患者が、リボソームの P0(P1-P2)₂ 複合体の高度保存部位に対して自己抗体を高頻度に産出することに着目し、P0(P1-P2)₂ 複合体の構造、エピトープの位置的性質、および抗原性の関係を明らかにするとともに、エピトープ部位のアミノ酸配列を任意の配列に置換し免疫原として用いることで、置換した配列に対する抗体を産出する系を構築する。この研究は超抗原性を発揮する免疫病理学的現象を利用した抗体産出系創作の試みであり、抗体産出が困難とされる配列に対する有効な抗体産出系となることが期待される。

3. 研究の方法

以下の実験手順で研究をすすめた。

(1) 抗原リボソームタンパク質の精製:

ヒト P0, P1, P2 および P1/P2 の古細菌相同体 aP1 を、大腸菌を用いて発現させ精製した。これまでに MRL/lpr マウスの免疫原として用いてきた P0(P1-P2)₂ 複合体を新たに調製し、抗 P 抗体との結合実験のサンプルとした。さらに古細菌 aP1-aP1 二量体はあらたな抗原サンプルとした。

(2) P0(P1-P2)₂ 複合体の機能と抗 P 阻害:

免疫原として使用してきた P0(P1-P2)₂ 複合体が機能を保持するかどうか、大腸菌リボソーム上の相同複合体である L10(L7/L12)₂ と置換し真核生物翻訳因子 eEF-2 の作用に依存する GTPase 活性を測定した。またこの活性が抗 P 抗体により阻害されるかどうか生化学的に解析した。

(3) 抗 P 抗体のエピトープ解析:

抗 P 抗体による活性阻害効果が各種合成ペプチドの添加により回避されるかどうかを解析し、抗 P 抗体のエピトープの解析を行った。使用した合成ペプチドには P0/P1/P2 に共通の C 末端 22 アミノ酸から成る C-ペプチドに加え、このペプチドの C 末端の 3 アミノ酸を欠いた 19 アミノ酸から成る 3-ペプチド、さらに C-ペプチドに含まれる 2 個のセリン残基がリン酸化を受けた P-ペプチドが含まれた。また、各合成ペプチドと抗 P 抗体 (Fab) との直接的結合性を native-gel 電気泳動で分析した。さらに、合成ペプチドと Fab 断片との複合体の結晶化によるエピトープ構造解析も試みた。

(4) P1-P2 二量体の NMR 解析:

C13/N15-標識 P1 と P2 の二量体、および P1 と C13/N15-標識 P2 から成る二量体を用いて二量体の構造を NMR 解析により分析した (Chinese University of Hong Kong の Wong 博士との共同研究)。

(5) 古細菌 aP1 の構造機能解析:

ヒト P1/P2 の古細菌 (*Pyrococcus horikoshii*) 相同体として知られる aP1 は構造・機能面で aP1 と類似することが知られているが、その詳細を生化学機的に解析した。

(6) 抗原試料の調製と動物の免疫化:

ヒト P1・P2 と類似の二量体構造をとる古細菌蛋白質 aP1・aP1 二量体を抗原として、ウサギを免疫化し、産出される抗体の反応性を解析した。さらに aP1 の C 末端部のアミノ酸を aP1 とは無関係の動物リボソームタンパク質の一部のアミノ酸配列と置換したキメラ型タンパク質を調製し、これを抗原としてウサギを免疫化し、産出される抗体の反応性も解析した。この結果を見て、MRL/lpr マウスの免疫化、およびモノクローナル抗体の調製の計画を立てていたが、研究はこの前段階で終了し、抗体のモノクローナ化は今後の課題として残された。

4. 研究成果

以下に示す様々な成果が得られ、自己抗体産出の特異性をもたらす抗原タンパク質の構造的要因に関する学術的知見、さらにこれを利用した新たな抗体産出系の基盤を確立することができた。

(1) ヒトリボソーム抗原複合体の再構成：

精製したヒト P0、およびリン酸化させた P1 と P2 を用いて抗原複合体を調製した。複合体は大腸菌リボソームに組み込み得られたハイブリッドリボソームの系を用いることで、その翻訳因子受容性の機能が検出された。また、P1/P2 のリン酸化によりその機能面の促進が見られた。以上の結果より、マウスの免疫化に用いられた P0(P1-P2)₂ 抗原複合体は機能を保持したものであることが確認された。

(2) 抗 P 抗体の作用とエピトープ解析：

P0(P1-P2)₂ 抗原複合体の免疫化によって得られた抗 P モノクローナル抗体はリボソーム上の P0(P1-P2)₂ の機能を効率よく阻害した。この阻害は P0/P1/P2 に共通の C 末端 22 アミノ酸から成る C-ペプチドの添加によりほぼ完全に回避されたが、このペプチドの C 末端の 3 アミノ酸を欠く 19 アミノ酸より成る 3-ペプチドではその阻害回避効果は見られなかった。これらの結果より、抗 P 抗体の主要認識部位は P0/P1/P2 に共通の C 末端の 3 アミノ酸部位であることが判明した。また、この C 末端の 3 アミノ酸と隣接する部位の 2 個のセリン残基がリン酸化を受けた P-ペプチドの阻害回避効果が C ペプチドより効率的であることより、C 末端部位のリン酸化が抗 P のエピトープ認識に一部関わることが示された。リン酸化が C 末端のエピトープ高次構造形成、または構造の安定性に関与すると考えられる。また、抗 P 抗体 (Fab) が C-ペプチドと P-ペプチドと強く結合し、3-ペプチドとは結合しないことは native-gel 電気泳動でも確認された (図 1)。一方、合成ペプチドと Fab 断片間の複合体の結晶化も試みたが、現在迄に、十分な構造データは得られていない。

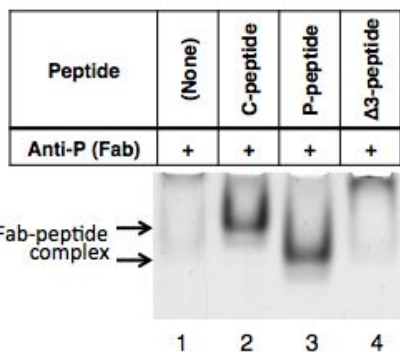


図 1 抗 P 抗体 Fab と P0/P1/P2 の C 末端合成ペプチド間複合体の電気泳動解析 抗 P と C-peptide (lane 2) や P-peptide (lane 3) との結合性を示す強いバンドが見られるが 3-ペプチド (lane 4) との結合は認められない。

(3) P1-P2 二量体の性状に関する NMR 解析：

ヒト P1-P2 二量体の NMR 解析の結果、両タンパク質の N 末端側の約半分は明確な高次構造を形成し二量体形成に寄与しているが、C 末端側半分は構造を取らず柔軟に運動する性質が示された。抗 P エピトープ部位である C 末端先端の運動範囲は N 末端部位の二量体部位を支点として半径約 125 オングストロームであることを明らかにした (図 2)。

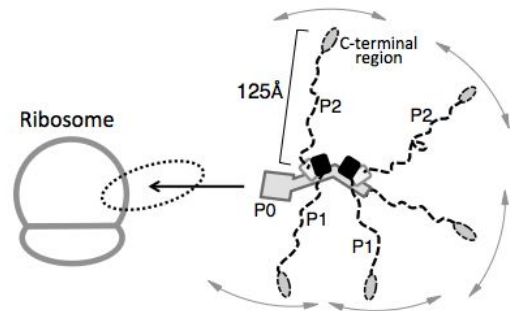


図 2 P0(P1-P2)₂ 抗原複合体の構造と性質

このモデルでは、リボソーム大亜粒子に存在する P0(P1-P2)₂ 複合体の分子構築の様子を右側に分離させて示している。2 個の P1-P2 二量体が P0 の C 末端部に隣接して結合してそれぞれ C 末端部位を外側に大きく広げ柔軟に運動する様子を描いている。

(4) 古細菌 aP1 と真核 P1/P2 二量体の比較：

真核生物 P1/P2 に対する古細菌 *P. horikoshii* の相合体である aP1 の構造面の性質を解析したところ、aP1 はホモ 2 量体を形成して他のタンパク質 aP0 に 3 対結合することが明らかにされた。しかしながら、大腸菌により発現し精製した aP1 は安定な 4 量体を形成することが判明した。aP1 の機能面を解析した結果、その C 末端配列が古細菌の翻訳因子 aEF-1α、aEF-2、IF5B と直接結合することを明らかにした。古細菌 aP1 はまた、リボソーム上では真核生物の翻訳伸長因子も受容し機能することが示され、真核生物 P1/P2 と古細菌 aP1 間の構造、動態、機能面において高度に保存されていることが示唆された。

(5) aP1 を用いた新規免疫系の開発：

当初はヒト P0, P1, P2 の共通 C 末端部位に希望するアミノ酸配列を導入し、この部位に対する抗体産出を試みる計画であったが、上述した研究成果を考慮し、より簡便な古細菌の aP1 を抗原基盤に用いることができる可能性が生じてきた。そこで aP1 の 4 量体でウサギを免疫化したところ効率的に aP1 の分子中でも特に進化的に保存されている C 末端配列に対する抗体が効率よく産出された。次に、aP1 の C 末端の一部のアミノ酸配列を、動物細胞リボソームタンパク質の一部の配列と置換したキメラ型抗原タンパク質を調製し、これでウサギを免疫化した。その結果、導入した動物リボソームタンパク質に対する抗体が効率よく産出されることが免疫プロット解析により判明した。

(6) 総括:

以上の結果より、SLE 患者において抗リボソーム P 自己抗体の産出が頻りに検出される要因の一つに抗原となる P0(P1-P2)₂ の特徴的な構造・性状があると考えられる。免疫標的となる C 末端が複数コピー存在し、さらにその部位が柔軟で広範囲の運動性をもつことも重要な要因と考えられる(図 2)。この点を考慮して、真核生物の P1/P2 と類似の性状を保持する古細菌 aP1 相同体を用いて簡便な抗体産出系を構築することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Lee, K.M., Yusa, K., Chu, L.O., Yu, C.W., Oono, M., Miyoshi, T., Ito, K., Shaw, P.C., Wong, K.B., and Uchiumi, T. (2013) Solution structure of human P1-P2 heterodimer provides insights into the role of eukaryotic stalk in recruiting the ribosome-inactivating protein trichosanthin to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* (査読有) 41, 8776-8787.

DOI:10.1093/nar/gkt636

Matsumoto, A., Shimizu, Y., Takemoto, C., Ueda, T., Uchiumi, T., and Ito K. (2013) Crystallization and preliminary X-ray analysis of peptidyl-tRNA hydrolase from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr. Sect F* (査読有) 69, 332-335.

DOI:10.1107/S1744309113003424

Baba, K., Tumuraya, K., Tanaka, I., Yao, M., and Uchiumi, T. (2013) Molecular dissection of the silkworm ribosomal stalk complex: the role of multiple copies of the stalk proteins. *Nucleic Acids Res.* (査読有) 41, 3635-3643.

DOI:10.1093/nar/gkt044

Ito, K., Murakami, R., Mochizuki, M., Qi, H., Shimizu, Y., Miura, K., Ueda, T., and Uchiumi, T. (2012) Structural basis for the substrate recognition and catalysis of peptidyl-tRNA hydrolase. *Nucleic Acids Res.* (査読有) 40, 10521-10531.

DOI:10.1093/nar/gks790

Mochizuki, M., Kitamyō, M., Miyoshi, T., Ito, K., and Toshio Uchiumi T. (2012) Analysis of Chimeric Ribosomal Stalk Complexes from Eukaryotic and Bacterial Sources: Structural Features Responsible for Specificity of Translation Factors. *Genes to Cells* (査読有) 17, 273-284.

DOI:10.1111/j.1365-2443.2012.01586.x

Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., Noda, M., Uchiyama, S., Tanaka, I., Yao, M., and Uchiumi T. (2012) Archaeal ribosomal stalk protein interacts with

translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (査読有) 109, 3748-3753.
DOI: 10.1073/pnas

[学会発表](計 16 件)

小野塚美穂、馬場健太郎、三好智博、伊東孝祐、内海利男: 真核生物リボソーム ストックタンパク質の C 末端領域におけるリン酸化が及ぼす翻訳反応への影響、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~12 月 6 日、神戸ポートアイランド

内海 利男: リボソーム stalk 複合体による翻訳因子とリボトキシンリクルート機構、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ: セントラルドグマの基盤をなす古典的 non-coding RNA の新展開(招待講演) 12 月 3 日~12 月 4 日、神戸ポートアイランド

小野塚美穂、馬場健太郎、三好智博、伊東孝祐、内海利男: ヒトリボソーム P0/P1/P2 ストックタンパク質が共有する C 末端部位と翻訳伸長因子間の相互作用、第 8 回無細胞生命科学研究会、2013 年 10 月 21 日~10 月 22 日、新潟大学

遊佐和之、三好智博、Ka-Ming Lee, Lai-On Chu, Conny Wing-Heng Yu, 大野萌、伊東孝祐、Pang-Chui Shaw, Kam-Bo Wong、内海利男: リボトキシン作用に關与するリボソーム P1/P2 ダイマーの柔軟な機能構造、第 8 回無細胞生命科学研究会、2013 年 10 月 21 日~10 月 22 日、新潟大学

伊東孝祐、村上僚、望月正弘、斉浩、清水義宏、三浦謹一郎、上田卓也、内海利男: Peptidyl-tRNA hydrolase の基質認識および触媒反応の構造基盤、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 24 日~7 月 26 日、愛媛県県民文化会館ひめぎんホール、松山

鈴木隆寛、本田貴嘉、村上僚、佐藤駿平、三好智博、伊東孝祐、内海 利男: 好熱性古細菌翻訳因子による *in vitro* 翻訳系の確立、日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、2013 年 7 月 19 日~7 月 20 日、東京工業大学

Uchiumi, T., Baba, K., Onozuka, M., Honda, T., Nomura, N., and Yao, M.: The ribosome has multiple "arm-like" structures to catch translation factors, International Conference on Nucleic Acid Enzymes and Enzymes in Human Diseases(招待講演), 2013 年 6 月 16 日-6 月 21 日, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong

内海利男、鈴木隆寛、本田貴嘉、馬場健太郎、田中勲、姚閔: 超好熱性アーキアの反応系を用いて見えてきたリボソームの翻訳因子リクルート機構、日本農芸化

学会 2013 年度大会 (招待講演)、2013 年 3 月 25 日~2013 年 3 月 27 日、東北大学川内北キャンパス

鈴木隆寛、本田貴嘉、村上僚、佐藤駿平、三好智博、伊東孝祐、内海利男:ハイブリッドリボソームを用いた古細菌翻訳因子による invitro ペプチド鎖伸長反応系の構築、第 35 回日本分子生物学会年会、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

遊佐和之、大野萌、三好智博、伊東孝祐、内海利男:動物リボソーム stalk タンパク質の hinge 領域はリボトキシンの効率的な作用に不可欠である、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

小野塚美穂、馬場健太郎、三好智博、伊東孝祐、内海利男:ヒトリボソーム P0/P1/P2 ストックタンパク質が共有する C 末端部位の翻訳伸長因子 aEF-1 /eEF-2 との相互作用、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

本田貴嘉、間瀬透、伊東孝祐、内海利男:古細菌リボソームストックタンパク質 aP1 ダイマーは二種類の翻訳因子 aEF-1 /aEF-2 を同時に結合する、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012 年 07 月 18 日~2012 年 07 月 20 日、東北大学百周年記念会館川内萩ホール

鈴木隆寛、本田貴嘉、佐藤駿平、内海利男:古細菌リボソームストックタンパク質 aP1 と翻訳伸長因子 aEF-1 間の相互作用と aEF-1 による調節、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012 年 07 月 18 日~2012 年 07 月 20 日、東北大学百周年記念会館川内萩ホール

内海利男、野村直子、本田貴嘉、馬場健太郎、長沼孝雄、田中勲、姚閔:リボソームには複数の"腕"がある、第 1 回 RIBOSOME MEETING (招待講演)、2012 年 3 月 15 日~3 月 16 日、広島大学生物生産学部

馬場健太郎、姚閔、田中勲、内海利男:真核リボソーム stalk に存在する 2 対のヘテロ二量体の翻訳伸長反応における機能の非等価性、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日~12 月 16 日、パシフィコ横浜

馬場健太郎、姚閔、田中勲、内海利男:動物リボソーム stalk ヘテロ二量体の分子集合モードの解析、第 11 回日本蛋白質科学学会年会、2011 年 6 月 7 日~6 月 9 日、ホテル阪急エキスポパーク・大阪

[図書](計 1 件)

内海利男、馬場健太郎、小野塚美穂:自己免疫標的部位の解析から見えてきたリ

ボソームの動的機能構造. 生化学 85 (2013), 10 号特集「リボソーム機能の調節と疾患」

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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/uchiimi-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: 50143764

(2) 研究分担者

伊東 孝祐 (ITO, Koshuke)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 20502397

青柳 豊 (AOYAGI, Yutaka)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 00142266

(3) 連携研究者