

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350085

研究課題名(和文) インフルエンザウィルスの大流行を阻止するスーパー抗体酵素の創製

研究課題名(英文) Production of the super catalytic antibody inhibiting the pandemic of influenza virus

研究代表者

一三三 恵美 (HIFUMI, EMI)

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：90254606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウィルスに対して有効なヒト型スーパー抗体酵素の取得方法、精製方法、酵素活性、抗インフルエンザ活性などの諸問題に当初の画書に示した項目に従って取り組み、高純度抗体酵素の製法の大きな改良点を見出すと共に、抗インフルエンザ活性を有するスーパー抗体酵素クローンの取得にも成功した。これらに加えて、最近、世界的に問題となっている構造多様問題に取り組み、抗体酵素にも分子サイズと等電点において同一の問題が存在する事を突き止め、その解決策の発見にまで至った。

研究成果の概要(英文)：We have carried out to develop several items such as production method, purification method, enzymatic function, anti influenza activity of super catalytic antibody in accordance with the schedule planned in the application form. We have made a huge development in the production method as well as the anti influenza function of human catalytic antibody. Regarding the structural diversity of catalytic antibody, we have discovered the novel method to solve the difficult and long-term issue on diversity.

研究分野：バイオテクノロジー、抗体工学

キーワード：抗体酵素 インフルエンザウィルス 抗体軽鎖 構造多様性

1. 研究開始当初の背景

(1)現在、インフルエンザ治療薬として用いられているタミフルはインフルエンザ外膜タンパク質である Neuraminidase (NA)の阻害剤であり、感染細胞内で増殖したインフルエンザウィルスの細胞外への出芽を阻害することで、宿主体内でのウィルスの広がりを防ぐ。従って、ウィルスの細胞への感染そのものを防ぐことは出来ず、また感染初期でなければ効果が認められない。最近ではタミフル耐性ウィルスが出現し、H3N2 型ウィルス（香港型）で見られる NA の R292K 変異では効果が約十数万分の一に減弱し、同じく H3N2 型ウィルスの E119V 変異や H1N1 型ウィルス（ソ連型）の H274Y 変異では数百分の一に減弱すると報告されている。従って、これらの耐性ウィルスにも有効な新しい抗ウィルス剤の開発が急務となっている。現行のタミフルを始めとする拮抗阻害剤は、投与後短期間で耐性ウィルスの出現が見られ、この面からも根本的な解決とはならない。

(2)申請者は、これまで進めてきた抗体酵素研究の中で、抗体の中には重鎖と軽鎖のサブユニットに分けることで抗原分解活性を示すものがあること（「スーパー抗体酵素」と称す: Fig.1 参照）を見出し、ピロリ菌感染マウスに対して除菌効果を示すものや、インフルエンザウィルスの Hemagglutinin(HA)を分解し、同ウィルスの培養細胞への感染を阻止するマウス型スーパー抗体酵素の取得に成功した。抗体酵素研究は、米・仏・露・韓でも精力的に進められているが、申請者らのピロリ菌に対するスーパー抗体酵素は動物実験で効果を示した最初の例である。

(3)これまで手掛けてきたマウス型スーパー抗体酵素はヒトには異種タンパク質であるため、治療薬開発のためにはヒト型のスーパー抗体酵素を創成する必要がある。申請者は、マウス型スーパー抗体酵素遺伝子の解析結果から、ゲノム上の軽鎖遺伝子に酵素活性を発揮しやすいグループが存在することを見出した。ヒトの抗体遺伝子についても同様の解析を行うと **Subgroup II** に分類される **V_κ gene** のいくつか、上記マウス型スーパー抗体酵素と高い相同性を持ち、スーパー抗体酵素として機能を発揮すると予想され (Fig. 2 参照)、この知見に基づいて狂犬病ウィルスに対するスーパー抗体酵素の作製に成功した。

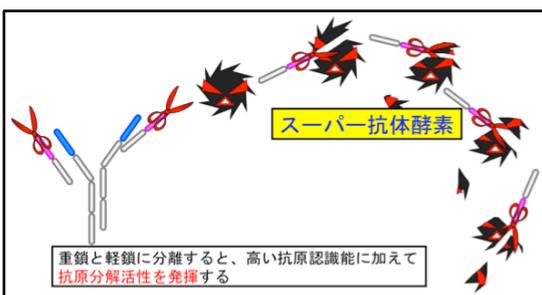


Fig.1 抗体とスーパー抗体酵素

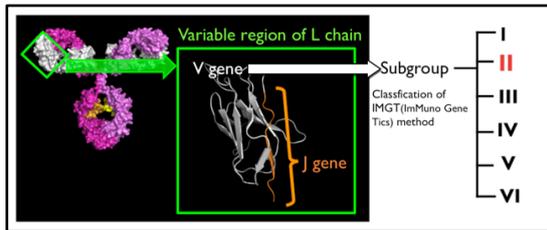


Fig. 2 V_κ gene, J_κ gene のコード領域とヒト V_κ gene の Subgroup

2. 研究の目的

マウス軽鎖型スーパー抗体酵素については、その作製方法を確立し、*in vivo*での効果も確認した。しかしながら、治療薬への応用を考えた場合の大きな課題は、マウス型スーパー抗体酵素のヒト型化であった。そこで、抗体遺伝子の特徴に着目する考え方をヒト抗体にも適用し、抗体酵素として機能する可能性が高いと考えられた「Subgroup II に分類される V gene を持つ、ヒト kappa 型軽鎖全長遺伝子」(以後、Subgroup II 遺伝子と略す)をライブラリー化する手法により、完全ヒト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創製に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究は、まず subgroup II 遺伝子ライブラリーの作製から着手した。これらの中から約 50 個を少量発現・精製して *in vitro* 感染抑制試験による初期スクリーニングを実施し、この結果を参考に効果的なクローンのアミノ酸配列を判断して、最終的には 200 種類程度のスクリーニングを実施した。

上記の検討を進める中で、抗体医薬品が抱える重要な問題、即ち「構造多様性問題」をスーパー抗体酵素も抱えていることが判明した。そこで、有望クローンを 10 種類程度に絞り込む当初の計画と併行して、この「構造多様性問題」の解決に全力を挙げた。手法は、構造を均一化できる化学物質の探索、遺伝子工学的改変による多様性構造形成の原因の究明と解決策の検討である。

(1) Subgroup II 遺伝子ライブラリーの作製と効率的クローニング

これまでは候補遺伝子ライブラリーから、クローニングベクターを介して発現用ベクターに組み換える手法を用いていた。この手法は確実であるが時間を要す。そこで、Subgroup II 遺伝子を PCR 増幅後、直接発現用の pET20b(+)ベクターに組み込む方法も取り入れた。

(2) Subgroup II タンパクの発現・精製方法

①小スケール発現・簡易精製の検討: Subgroup II タンパクの発現を誘導した大腸菌体 20 O.D. 分 (600 nm) を遠心して回収し、1 mL の HEPES で懸濁した。これを Promega 社 Maxwell 16 システム用の Polyhistidine Protein Purification Kit のマニュアルに従って同装置

にセットして、溶出液を回収した。続いて 0.15 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH8.5) に交換して限外濾過濃縮後、PBS に交換した。

②二段階精製：Subgroup II 遺伝子で形質転換した大腸菌 BL21(DE3)pLysS の発現を 10 μ M の IPTG で誘導し、18 $^{\circ}$ C で一晩培養した。回収した菌体を超音波破碎して可溶性画分を調製し、一次精製として Ni-NTA カラムクロマトグラフィー (QIAGEN) を実施した。Subgroup II タンパクを含む溶出画分は、50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) に交換後、SP-5PW カラム (TOSOH) を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。濃縮とその後の透析は前述の小スケール精製と同じ方法をとった。

(3)Subgroup II タンパクの機能評価

①プラークアッセイ (抗インフルエンザウイルス活性試験)：手法および操作の流れを Fig. 3 に示した。6 穴プレートに MDCK 細胞を播種 (6.0 x 10⁵ cells/well) し、2 日間培養して、単層の細胞シートを作製した。インフルエンザウイルスは、1%BSA を添加した 2x DMEM 培地で 1,000 PFU/200 μ L に希釈し、等量の Subgroup II タンパク液と混合して 25 $^{\circ}$ C で反応させた。反応終了後のウイルス溶液は、0.5% BSA, 2 μ g/mL Acetyl Trypsin / DMEM で適切な濃度になるよう希釈して、用意しておいた MDCK 細胞シートに添加して感染させた。ウイルス液を除去後、各ウェルに固形培地を重層して 2 日間、続いて色素含有固形培地を重層して 2 日間培養し、感染細胞によって形成されたプラーク数を計測した。

② Peptidase 活性試験：基質には各種 Peptidyl-MCA 基質 (ペプチド研究所) を用いた。50 μ M の基質と 5 μ M の Subgroup II タンパクを 0.05%Na₃ を含む PBS 中、37 $^{\circ}$ C で反応させて、生成する AMC の蛍光をモニターした。

③ Nuclease 活性試験：基質には pBR322 または pUC18 プラスミドを用い、100 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl buffer pH7.5 で 40 μ g/mL の溶液を調製した。Subgroup II タンパクは PBS にて 100 μ g/mL に調製後、2 mM EDTA と 20 mM MgCl₂ を加えた。これらのプラスミド DNA 溶液と Subgroup II タンパク溶

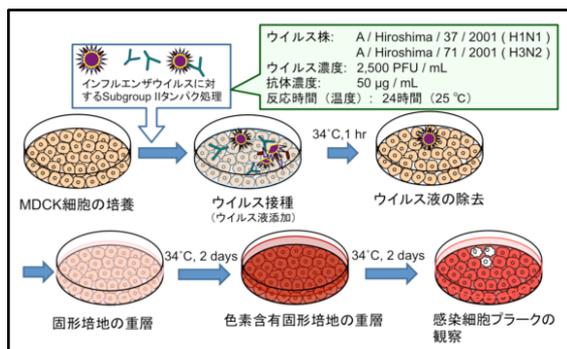


Fig.3 プラークアッセイの方法

液を 1 対 1 で混合後、37 $^{\circ}$ C で 24 hr, 48 hr インキュベーションし、アガロース電気泳動によりプラスミド DNA の変化を検出した。

4. 研究結果

(1)ヒト型軽鎖 Subgroup II ライブラリーの作製

本研究では既報の手法によって新たに T-series, S-series, W-series のヒト型抗体軽鎖遺伝子(Subgroup II)ライブラリーを作製した。T-series はクローニングの確実性を優先して、クローニングベクターを介して発現用ベクターの pET20b(+)に組み込んだ。S, W-series は効率を優先して直接 pET20b(+)ベクターに組み込み、それぞれ約 100 クローン、合計 300 クローンについて塩基配列を決定し、ライブラリーとして確立した。

(2)発現および精製

各 series の抗体軽鎖遺伝子は、大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用いて発現させた。これら Subgroup II タンパクの全てを、高純度・大量精製へと進める手法は非効率的であるため、スクリーニングや機能解析などの実験目的に合わせた精製方法の検討から開始した。

①簡易精製：小スケール(数十 mL スケール)で発現させ、それを半自動精製装置の Maxwell 16 (Promega 社)を用いる方法で確かめた。確かに短時間(1~2 時間程度)で、ある程度の精製はどのクローンでも可能であった。しかしながら、この方法ではスクリーニング実験で必要となる精製収量・純度で Subgroup II タンパクを得ることは難しく、この簡易精製方法は断念した。

②二段階精製：1 L スケールで培養した菌体可溶性画分を用いることで、90~95%の純度で subgroup II タンパクを得ることが出来 (Fig.4)、収量も 10~30 mg とスクリーニングやその後のキャラクタリゼーションを行うのに十分な量を得ることが出来た。しかしながら、陽イオン交換クロマトグラムが複数のピークに分かれ、SDS-PAGE の結果から、少なくとも単量体と二量体、これらが更に多量体化した構造の存在が示唆された。そこで、陽イオン交換クロマトグラフィーではフラクションを分画し、それぞれについて各種試験を実施すると同時に、構造を単一化するための検討を別途開始した。

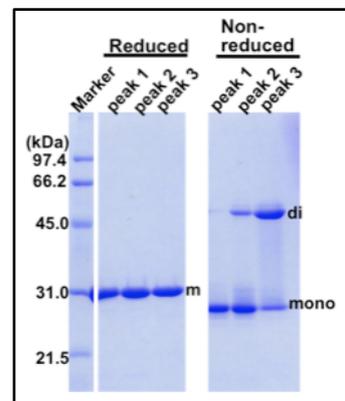


Fig. 4 Subgroup II タンパクの二段回精製結果 (典型的な例)

(3) Subgroup の拡大

当初の計画では、Subgroup II ライブラリーのみを作製する計画であったが、その意義を明確化するために、他の Subgroup(I or III) についてもライブラリーを作製した。

(4) 抗体酵素バンクの作製

上記で作製した各種抗体軽鎖ライブラリーを順次、大腸菌で発現させ、高純度に精製して冷蔵、あるいは凍結保存の精製したサンプルを冷蔵あるいは凍結保存し、タンパク質としてバンク化した。

(5) 抗インフルエンザウイルス活性 (in vitro 試験によるスクリーニング)

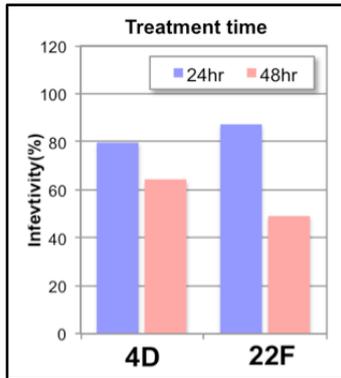


Fig.5 感染阻害効果の時間依存性

上述した抗体酵素バンクで精製した各クローンについて、クローンの種類のみならず、精製方法の違い、複数の精製画分のそれぞれ、数百種類についてプラークアッセイによる抗インフルエンザ活性のスクリーニングを実施した。MDCK 細胞に対して 20%以上の感染阻害を示したサンプルは約 3%に留まったが、23D4 クローンや 22F クローンは約 50%の阻害効果を示した。ライブラリー作製は、「人の健康は、あらゆる抗原に対応する抗体が入れ替わり、立ち替わり用意されていることで保たれる。従って、インフルエンザウイルスに反応するクローンは健康人から取得出来る。」という考え方に基いて健康人由来のリンパ球を用いているので、3%は妥当な数であり、この手法が他の抗原に対するヒト型スーパー抗体酵素の作製にも応用出来ることを示すことが出来た。

比較的強い感染阻害効果を示した 4D クローンと 22F クローンについて、H1N1 型ウイルスとの反応時間を変化させた場合の効果を比較した。この結果は抗体酵素と抗体の違いを明確に示している。抗体による免疫反応は数時間で完結するので、この様な差は現れない。抗体酵素はインキュベーション時間と共に反応が進行するので Fig.5 の結果を与える。また、T99 クローンは H3N1 型ウイルスに対して約 30%の感染阻害効果を示した。

(6) 抗インフルエンザウイルス活性を示したクローンの機能解析

①Peptidase 活性試験：peptidyl-MCA としては、ペプチド部分の配列として Serine protease 活性を念頭に EAR-, QAR-, VPR-, IGER-, EKK-, APA-などを用いた。一例とし Subgroup II の 23D4-C220A クローンの結果

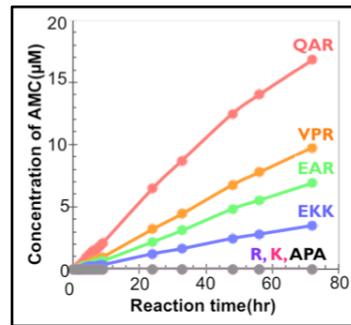


Fig.6 23D4-C220A クローンの peptidase 活性

を Fig. 6 に示した。この抗体酵素クローンは QAR に最も高い分解活性を示し (分解速度: 0.25 mM/hr at 5 mM light chain)、VPR、EAR と続いた。しかしながら R-, K-, APA-

に対しては全く分解活性を示さなかった。

23D4-C220A が分解した QAR-, VPR-, EAR-, EKK-はいずれも Serine protease 基質である。しかしながら、R-MCA や K-MCA、および Elastase の基質である APA-は分解しなかった。

②Nuclease 活性試験：抗体酵素の性能としてタンパク質の分解および DNA や RNA 等の核酸の分解は、世界的にも良く知られた事実である。これまで申請者らはタンパク質分に注力してきたが、インフルエンザウイルスを対象とする研究では核酸分解についても調べる必要が生じた。そこで核酸の基質として Nevinsky など、多くの研究者がプラスミドを用いているので、それを参考に pBR322 あるいは pUC18 を高純度に精製し、これを用いた核酸分解試験を実施した。一例として、前述した 23D4 C220A クローンの DNA 分解試験の結果を Fig.7 に示す。このクローンは、活性は低いながらも、プラスミドに nick を入れたり、linear にする活性を示した。先に述べた先行研究や、申請者が見出してきた核酸分解性クローンは DNase I 様の Nuclease 活性を示すものであり、Mg²⁺要求性で至適 pH は中性であった。23D4-C220A クローンも同じ特徴を有していたが、本クローンの場合には前述の Peptidase 活性も示しており、

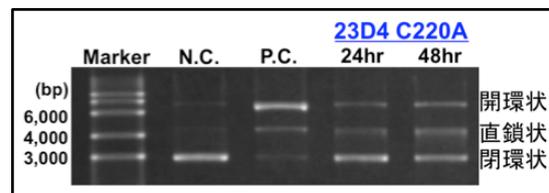


Fig.7 23D4-C220A クローンの DNase 活性

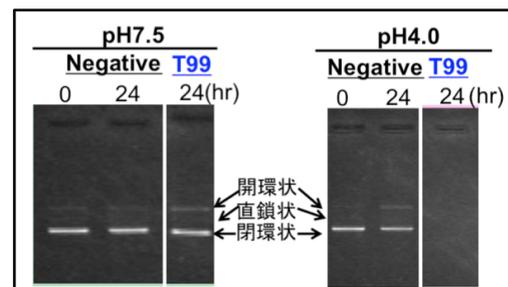


Fig.8 T99 クローンの DNase 活性における pH 依存性

ペプチドと核酸の両方を分解するという特徴的なクローンであった。

また、H3N2 型ウイルスに対して感染阻害効果を示した T99 クローンは、免疫学的にはウイルスの HA に反応することが明らかとなった(データは省略する)が、Peptidyl-MCA を使った試験では分解活性を認めず、これまでと同条件で実施した Nuclease 活性試験ではプラスミド DNA も分解しなかった。同ウイルスの感染機序を考慮して、酸性条件での Nuclease 活性試験を実施すると、酸性条件ではプラスミド DNA の分解が起こり、pH4 では Fragment の検出も出来なかった(Fig.8)。このことから、T99 クローンは、ウイルス HA に結合してエンドソーム内に取り込まれ、エンドソーム内の pH が酸性に傾くと HA から離れると同時に核酸分解能を発揮して、近くに存在するウイルス RNA を切断しているのではないかと考えられた。

③分子モデリングと活性サイトの推定：22F

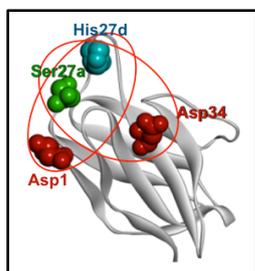


Fig.9 22F クローン可変領域ドメインの三次元構造

クローンのアミノ酸配列から分子モデリングにより、三次元構造を予測した。Fig.9 には可変領域の構造を示した。赤で囲んだ様に Asp1- Ser27a-His27d で触媒三つ組残基様構造を持つ可能性が示唆された (Asp34-Ser27a

-His27d の可能性もある)。こうした三つ組残基様構造が trypsin-like なセリンプロテアーゼ様活性を発現しているのではないかと推測される。

(7)構造多様性

抗体そのものが医薬品として実際に患者の用いられるようになり、世界的規模で各種の抗体が大量に製造されるようになった。そこで、最近大きく持ち上がっているのが抗体の構造多様性問題である。これは単一の抗体でありながら、製造した抗体が単一構造を取らないことによる (実際にはこの現象は 20 年以上も前に見出されていた)。単一の抗体でありながら、等電点や分子サイズが異なること、あるいはアミノ酸の予期しない修飾や糖鎖の付加など、いくつかの form を取ることが知られており、患者への投与には単一構造 (defined structure) であることが望まれる。

申請者らは、本研究で用いるスーパー抗体酵素にも同様の構造多様性が見られることは、平成 21 年日本化学会第 89 春季年会で発表している (Fig.10)。当時は原因も不明で、解決策も全く判らない状態であった。本研究でこの解決に全力を挙げた結果、以下に示すように、解決策と原因の究明が成された。

①スーパー抗体酵素の構造多様性：陽イオン

交換クロマトグラフィーや二次元電気泳動で抗体軽鎖の挙動を調べると、高純度に精製されたサンプルであっ

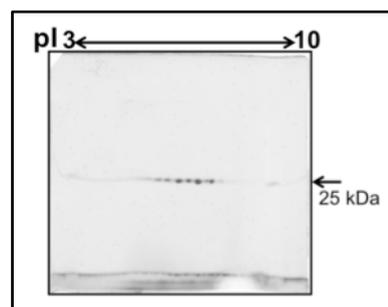


Fig.10 マウス軽鎖型スーパー抗体酵素の二次元電気泳動

ても、陽イオン交換クロマトで複数のピークが観察された。これは、これは等電点の異なる構造が存在することを意味しており、非還元条件で実施した二次元電気泳動では、同一の分子サイズに複数のスポットが現れた (データは省略する)。これらの結果から、スーパー抗体酵素の場合には、分子サイズおよび等電点において構造多様性が存在することが分かった。

②金属イオンの影響と多様性構造の均一化：申請者らは、あるきっかけで金属イオンと構造多様性の関連を調べ、特に Cu イオンが大きく影響することが分かった。そして、スーパー抗体酵素精製過程のある段階で Cu イオンを適切量添加すると、「異なる等電点を持つ構造体の混合物状態から、単一の等電点に収斂される」という興味ある現象を見出した。その結果を Fig.11 に示す。Fig.11A は Cu イオンを添加しない通常精製を行なった場合の陽イオン交換クロマトグラムで、4本のピークが観察された。これは少なくとも 4 種類の異なる等電点を有する構造が溶液中に存在していることを示している。ところが、銅イオンを適切量添加して精製した Fig.4B では、ほぼ単一のピークとなった。これは等電点が一つに揃ったことを意味しており、構造多様問題の解決に貴重な一つの手法を提供することになった。

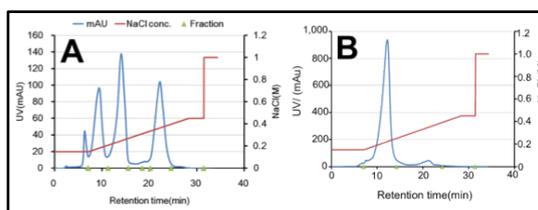


Fig.11 スーパー抗体酵素 (Subgroup II タンパク) 精製の陽イオン交換クロマトグラム
A: 通常精製, B: Cu イオン添加精製

③軽鎖定常領域の発現と機能解析：Subgroup I~III 抗体軽鎖、可変領域のアミノ酸配列はクローン毎に異なるが、定常領域の配列は共通である。前述の構造多様性は、クローン毎にパターンの違いはあるものの、全てのクローンで共通する現象であることから、定常領域の構造多様性への関与を調べた。定常領域のみのこの construct を作製し、軽鎖全長と同じ手法で発現と精製を実施した結果を Fig.12

に示す。前述した軽鎖型抗体酵素と同様に Cu イオンを使用しない通常精製では3つのピークが観察されているのに対し、Cu イオン添加精製では1本のピークに収斂した。このことから、軽鎖タンパクの構造多様性には、定常領域の関与が強いことが示唆された。

別の実験で、ペプチダーゼ活性試験を定常領域部分のみを用いて実施したところ、全く活性は認められなかった。これは定常領域に酵素活性サイトは存在しないというこれまでの予想を裏付けた。

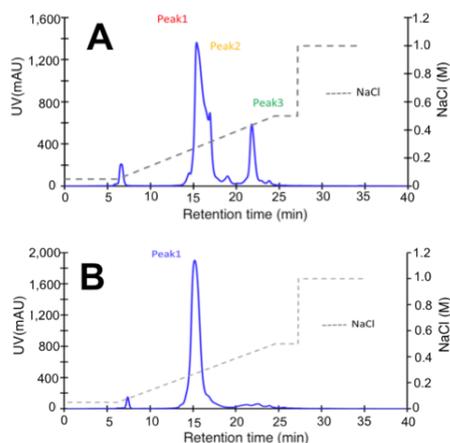


Fig.12 定常領域ドメインの陽イオン交換クロマトグラム

A: 通常精製, B: Cu イオン添加精製

(8)結論

インフルエンザウイルスに対する軽鎖型抗体酵素の作製について、取得方法、精製方法、抗インフルエンザ活性、機能解析など計画書に示した項目に従って取り組み、いくつかの不明な点を明らかにすると共に、抗インフルエンザ活性を有するスーパー抗体酵素クローンの取得に成功した。これらに加えて、最近、世界的に問題となっている構造多様問題に取り組み、抗体酵素にも同一の問題があり、それは分子サイズと等電点にあることを明らかにするとともに、さらにその解決策を見出した。

以上により、今後の抗体酵素の実用化は勿論のこと、基礎研究に大きな貢献ができる成果が得られたと思っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. (総説) 一二三恵美, 宇田泰三, スーパー抗体酵素(Antigenase)の抗ウイルス作用等の性質と今後の展開、ケミカルエンジニアリング, 61巻, 2月号, pp126-134, 2016年, 査読無し
2. E. Hifumi, S. Matsumoto, H. Nakashima, S. Itonaga, M. Arakawa, Y. Katayama, R. Kato, T. Uda, A novel method of preparing the mono-form structure of catalytic antibody light chain. *FASEB J.*, **30**, 895-908(2016). 査読有り
3. E. Hifumi, M. Arakawa, S. Matsumoto,

T. Yamamoto, Y. Katayama, and T. Uda, Biochemical features and anti-viral activity of a monomeric catalytic antibody light chain 23D4 against influenza A virus. *FASEB J.*, **29**, 2347-2358(2015). 査読有り

4. E. Hifumi, N. Fujimoto, M. Arakawa, E. Saito, S. Matsumoto, N. Kobayashi, T. Uda, Biochemical features of a catalytic antibody light chain, 22F6, prepared from human lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **288**, 19558-19568 (2013). 査読有り

〔学会発表〕(計22件)

1. S. Itonaga, T. Uda, E. Hifumi, Role of the constant region of human antibody light chain for the structural diversity. PacifiChem 2015, 15-20 December, 2015, Honolulu, (USA)
2. Emi Hifumi, Taizo Uda, Mitsue Arakawa, Super catalytic antibody light chains (Antigenase) capable of suppressing the infection of influenza virus. PacifiChem 2015(Honolulu), 15-20 December 2015
3. 招待講演：一二三恵美, 抗体酵素の多様性構造の制御、第64回高分子討論会, 2015年9月15-17日, 東北大学(宮城県仙台市)
4. 一二三恵美, 松本真吾, 中島弘貴, 糸永省吾, 宇田泰三, 抗体酵素の構造多様性を解決する一方法、第25回バイオ高分子シンポジウム, 2015年7月23日-24日, 東工大・大岡山キャンパス(東京都目黒区)
5. 特別講演：一二三恵美, スーパー抗体酵素の発見と展開, 第24回バイオ高分子シンポジウム, 2014年7月24日-25日東工大・大岡山キャンパス(東京都目黒区)
6. 学生ポスター賞: 友岡幸, 竹添文香, 藤本尚子, 一二三恵美, 宇田泰三, ヒト型スーパー抗体酵素 T99 クローンの性質, 第51回化学関連支部合同九州大会, 2014年6月28日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
7. N. Fujimoto, E. Hifumi, T. Uda, Suppression of the Infection of Influenza Virus Type A by Human Catalytic Antibody Light Chains (Human Antigenases), Conference on Antibody Engineering and Therapeutics 2013, December 8-10, 2013 (Los Angeles, USA)
8. 招待講演：一二三恵美, 抗体酵素(Antigenase)の深遠な特徴と性質～革新的医薬品を目指しマウス型からヒト型へ～, 第7回バイオ関連シンポジウム, 2013年9月27日-29日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一二三 恵美 (HIFUMI, Emi)

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：90254606