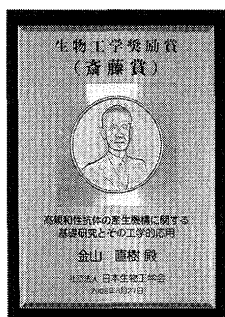
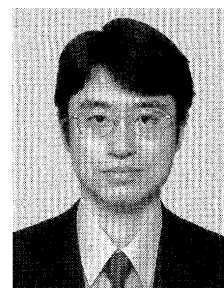


平成20年度 生物工学奨励賞（斎藤賞）受賞



高親和性抗体の産生機構に関する研究とその工学的応用

金山 直樹



Basic Research and Development on Generation Mechanism of High Affinity Antibodies

Naoki Kanayama (Department of Bioscience and Biotechnology, Okayama University Graduate School of Natural Science and Technology, 3-1-1 Tsushima-Naka, Okayama 700-8530) Seibutsu-kogaku 87: 116-122, 2009.

はじめに

抗体は標的抗原に特異的かつ高親和性に結合することにより、生体防御において重要な役割を果たす。この抗体の抗原に対する高い結合特異性を利用して、免疫組織化学、ELISA、ウェスタンブロットなど実験試薬、診断薬としてだけでなく、癌、自己免疫疾患、新興・再興感染症などの難治性疾患の治療薬、いわゆる抗体医薬としての開発が近年活発に展開されている。そうした抗体医薬となる高特異性・高親和性のモノクローナル抗体の効率的な作製技術の開発へのニーズの高まりから、生体内の抗体産生機構に関する基礎研究を基盤とした新規技術の開発がますます重要となってきた。本稿では、マ

ウスの高親和性抗体の産生過程に関して独自の解析手法の構築とその結果得られた成果を報告するとともに、生体内の抗体産生機構に着想を得て構築してきた新規な *in vitro* 抗体作製システムについて解説したい。

抗体の親和性成熟

抗原特異的な抗体の産生機構は、1957年に Frank MacFarlane Burnet が提唱したクローン選択説によってその概略が記述された¹⁾。その後、多くの実験的証拠に基づく修正を経て、現在、生体内の抗体産生は以下のように進むと考えられている（図1）²⁾。①個々のB細胞クローンは1種類の抗体を発現し、B細胞の発生段階で抗体可変部遺伝子の V(D)J 組換えによって多様な抗体レ

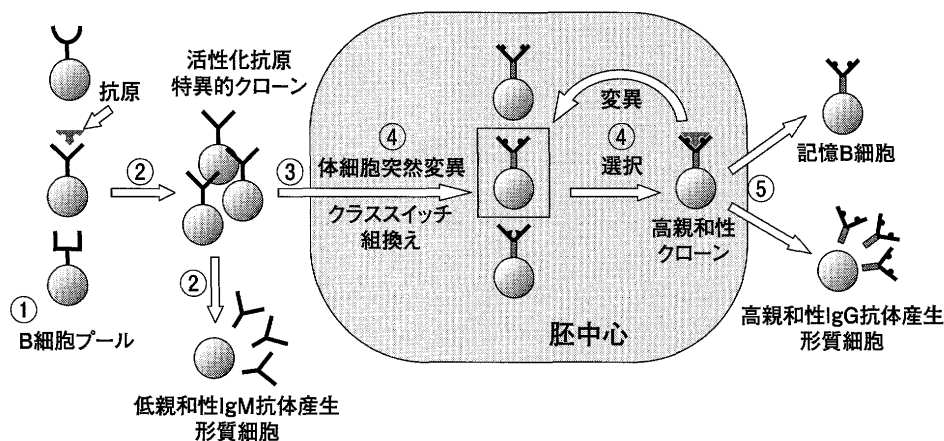


図1. 抗体の親和性成熟

パートリーが用意される。この段階で自己に反応性のクローンは除去される（自己免疫寛容）。②抗原に感作した特異的クローンは活性化して増殖し、抗体を大量産する形質細胞に分化する。③活性化B細胞の一部は、胚中心という微小環境をリンパ組織中に形成し、活発に増殖する。④胚中心B細胞の抗体可変部遺伝子に体細胞突然変異が導入され、抗原に対して高親和性を獲得したクローンが選択される。⑤高親和性クローンは形質細胞や記憶細胞に分化する。特に、②～⑤で高親和性抗体を産生する過程は親和性成熟と呼ばれ、液性免疫の重要な機構の一つである。この過程で、抗体の親和性の向上に伴って抗体定常部遺伝子が組換えられ、抗体アイソタイプがIgMからIgGやIgAなどにクラススイッチする。しかしながら、親和性成熟の一連の過程において、③胚中心への選択、④体細胞突然変異の誘導と高親和性クローンの選択、⑤記憶細胞や形質細胞への分化の振り分けに決定的な役割を果たす細胞レベルおよび分子レベルの制御因子は明らかになっていない³⁻⁶⁾。この解明のためには、膨大なレパートリーから抗原特異的クローンが選択される過程を明確にモニターできる*in vivo*解析系、および、胚中心における細胞の活性化や相互作用を精密に解析できる*in vitro*培養系が必要である。

QMマウスを用いた親和性成熟の解析

Quasimonoclonal mouse (QMマウス) は、1996年にUCSFのCasalhoとWablらによって樹立されたマウスであり、ハプテン 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) に特異的な抗体重鎖可変部遺伝子 ($V_H T$) が J_H 遺伝子座にノックインされており、 κ 軽鎖遺伝子がノックアウトされているため、 $V_H T$ 重鎖と $\lambda 1$ 軽鎖または $\lambda 2$ 軽鎖を発現する2種類のNP特異的B細胞がそのB細胞集団のほとんどを占める (図2A)⁷⁾。さらに、 $V_H T$ が本来の抗体重鎖遺伝子座の位置に挿入されていることから、正常に体細胞突然変異やクラススイッチが起こる^{7,8)}。

我々は、QMマウスB細胞 ($V_H T/\lambda 1$, $V_H T/\lambda 2$) の産生するNP特異的抗体が、NPの類縁帯である *p*-nitrophenylacetyl (*p*NP) に対してNPよりも1/20の低親和性を示すこと、 $V_H T/\lambda 2$ 抗体の方が $V_H T/\lambda 1$ 抗体よりも *p*NP に対して50倍ほど親和性が高くかつ特異性にも違いがあることを見いだした (図2B)^{9,10)}。そこで、特異性が明確で親和性の異なる2種類のB細胞クローンの競合をモニターすることによって、親和性成熟を含むさまざまなB細胞の選択機構を解析できると考えた。*p*NPを結合したニワトリγグロブリン (*p*NP-CGG) をQMマウスに免疫すると、血清中の抗*p*NP IgG抗体の抗体価と親和性が経時的に上昇し、*p*NP に対する親和性成熟が誘導可能で

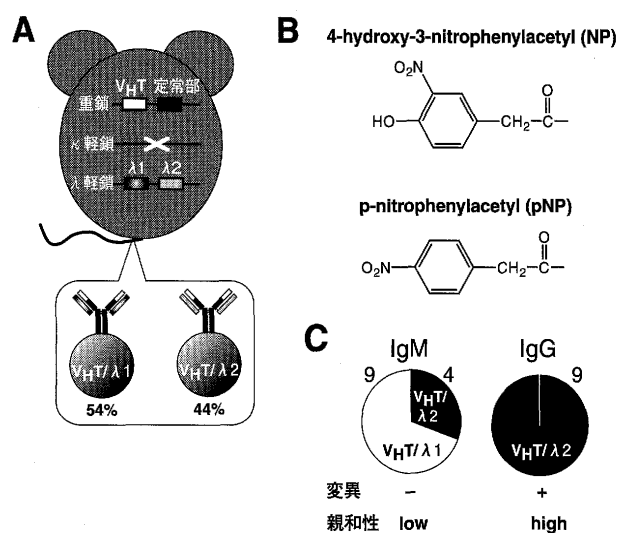


図2. QMマウスを用いた親和性成熟の解析。(A) QMマウスのB細胞レパートリー、(B) *p*NPハプテンの構造、(C) *p*NP-CGGを免疫したQMマウスリンパ球から作製した抗*p*NP抗体産生ハイブリドーマの解析結果。

あった⁹⁾。活性化しているB細胞クローンを、抗*p*NP抗体を産生するハイブリドーマを作製して解析したところ、 $V_H T/\lambda 1$ と $V_H T/\lambda 2$ の両方のクローンが活性化して低親和性IgM抗体産生細胞に分化していたのに対して、親和性成熟により高親和性IgG抗体産生細胞に分化したのは $V_H T/\lambda 2$ クローンのみであった (図2C)。すなわち、*p*NPに対する初期の親和性がより高い $V_H T/\lambda 2$ クローンの方が優先的に親和性成熟に動員されることが示唆された⁹⁾。高親和性抗体の重鎖可変部に導入された共通の変異 (T313A) が親和性成熟に重要であることも明らかになり、QMマウスの抗*p*NP抗体応答における $V_H T/\lambda 2$ の選択とT313A変異の導入をモニターすることにより、親和性成熟における初期親和性の寄与を詳細に解析できることが示された。まず、親和性成熟の場である胚中心領域への $V_H T/\lambda 1$ と $V_H T/\lambda 2$ の両クローンの移行能を比較した。蛍光標識した各B細胞を*p*NP化抗原により刺激し、あらかじめ免疫して胚中心を形成させておいたマウスに養子移入すると、 $V_H T/\lambda 2$ クローンの方がより効率よく胚中心に移行していることが免疫組織化学染色により示された¹¹⁾。このことは、 $V_H T/\lambda 1$ と $V_H T/\lambda 2$ の両クローンの比較では初期親和性のより高いクローンの方が胚中心への移行能が高いことが示唆している。次に、胚中心内における選択の動態を解明するために、胚中心B細胞の抗体遺伝子を単一細胞レベルでPCRにより解析する技術を開発した¹²⁾。胚中心B細胞は特有の細胞表面抗原を発現するので、それを指標に胚中心B細胞をセルソーターで単一細胞ごとに単離し、各細胞の抗体遺伝子をPCRによって解析することにより、免疫後の胚中心内での $V_H T/\lambda 1$ と $V_H T/\lambda 2$ の両クローンの存在比および変異導

入を経時的に観察した。その結果、胚中心内での $V_H T/\lambda 2$ の優先的選択、変異の蓄積、高親和性型変異の発生が段階的に起こっており、胚中心内での選択においても B 細胞の初期親和性の重要性が示された¹²⁾。QM マウス以外の抗体遺伝子導入マウスを用いた系においても、胚中心への動員や高親和性抗体産生形質細胞への分化における選択過程で、抗原に対する初期の親和性が重要であることを示唆する知見が蓄積されてきている¹³⁻¹⁵⁾。これら抗体遺伝子導入マウスを用いた今後の研究により、抗原に感作された特異的 B 細胞が一様に活性化して確率論的にその後の運命が決定されるのか、B 細胞クローンが有する固有の親和性がその後の運命に重要な役割を果たすのかが明らかになっていくものと期待される。

一方で、QM マウスと野生型マウスを掛け合わせて作製した B 細胞のレパートリーを限定したマウスを用いた解析系によって、1996年に疋田、大森らによって初めて発見された末梢 B 細胞における V(D)J 組換えが¹⁶⁾、親和性成熟に寄与していること見だし、体細胞突然変異以外の抗体遺伝子改変の親和性成熟への関与という新しい発見につながった¹⁷⁾。また、B 細胞の分化過程において、B 細胞の自己抗原に対する反応性によって、B1 細胞という通常の B 細胞とは異なる機能を担当する B 細胞亜集団へ振り分けられることが報告されている¹⁸⁾。QM マウスにおいても、抗原に対する反応性の異なる 2 つの B 細胞クローンが脾臓において異なる B 細胞亜集団に振り分けられることを見いだしており、QM マウスが B 細胞亜集団の分化機構の解析に利用できることが示された¹⁹⁾。以上のように、QM マウスの利用は、特定の特異性を示す B 細胞クローンの活性化や分化の過程での選択機構を解析する上で非常に有用であると考えられる。

In vitro 培養系による親和性成熟過程の再構築

親和性成熟が起こる胚中心には、抗原特異的な B 細胞の他にヘルパー T 細胞および濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell, FDC) などの B 細胞以外の細胞も少数存在し、親和性成熟に関与する⁵⁾。特に、FDC は、抗原を免疫複合体として細胞上に長期間保持する能力を有し、胚中心の形成に重要な役割を果たすだけでなく、胚中心内において体細胞突然変異により高親和性を獲得した抗原特異的 B 細胞の選択に関与すると考えられている⁶⁾。しかし、FDC 上の免疫複合体あるいは FDC そのものを欠損させるいくつかの実験系においても親和性成熟は起こることから、FDC の親和性成熟への関与について否定的な説明もなされている¹⁹⁾。FDC の機能を解明するには、*in vitro* 培養系を用いた実験系が有効であるが、FDC は組織中に少数しか存在しないために機能を保持した形で単離

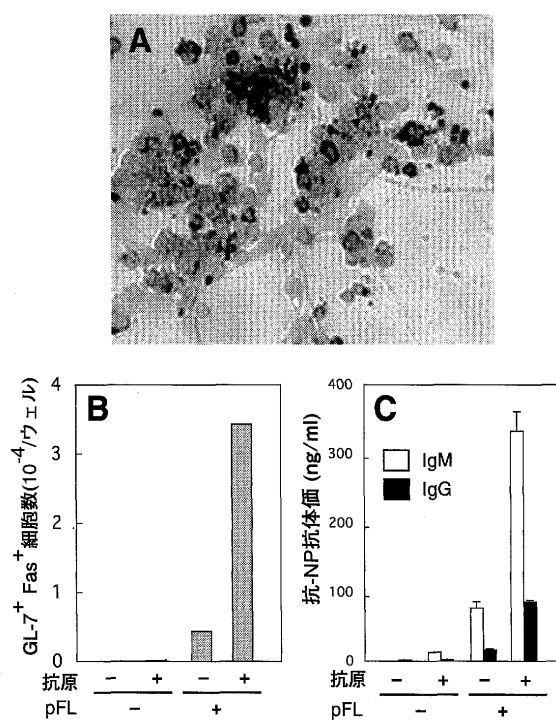


図3. FDC用細胞株を用いた *in vitro* 培養系による活性化B細胞機能の支持. (A) pFLは活性化B細胞とクラスターを形成する。多数ある小さな細胞はB細胞で、その背景にある樹状突起のある大型の細胞がpFLである。(B, C) NP特異的B細胞、CGG特異的ヘルパーT細胞、pFLの共培養系に、抗原としてNP-CGGを添加して培養すると、pFLおよび抗原に依存的に胚中心B細胞 (GL-7⁺Fas⁺) の表現型を示すB細胞が増加し (B)、抗体産生およびクラススイッチが亢進した (C)。

することが困難であること、FDCの表現型を有するマウス由来細胞株が樹立されていないことから、親和性成熟における FDC の役割について決定的な証拠は得られていない。我々は、FDCを単離して株化するためにさまざまな培養法を検討し、コラーゲンゲルにリンパ節断片を封入する3次元培養法を導入することによって、マウス由来の FDC 様の表現型を示す細胞株を樹立することに初めて成功した²⁰⁾。primary FDC like line (pFL) と名付けたこの細胞株は、FDC特有の細胞表面マーカーを発現し、抗原を細胞表面に保持可能であり、B細胞とクラスターを形成する樹状細胞である (図3A)。さらに、この細胞株から長期培養可能な細胞株 FL-Y を樹立した。pFLと抗原特異的B細胞およびT細胞からなる *in vitro* 細胞培養系を構築し、pFLの機能を評価したところ、活性化B細胞、特に胚中心B細胞の生存を維持すること (図3B)、抗体産生とクラススイッチを促進することが明らかになった (図3C)。すなわち、FDCの機能として想定される胚中心における活性化B細胞の生存および分化の支持能力の一部を、pFLを用いた *in vitro* 培養系により再現できることが示された。この FDC 様細胞株を用いた *in vitro* 培養系は、高親和性抗体産生細胞の選択機構や胚中心B細胞で選択的に起こる体細胞突然変異の誘導機構を

解明するのに有効な解析系となることが期待される。胚中心内での諸反応を *in vitro* 培養系で再現するために、B細胞、T細胞およびFDCの3者で必要十分なのか、他の細胞種や因子の関与があるかどうかを解明することは今後の課題の一つであろう。

変異能力を有した培養細胞を用いた *In vitro* 抗体産生システムの開発

KöhlerとMilsteinによって報告されたモノクローナル抗体作製法は、生体内での親和性成熟により高親和性抗体を取得するための有効な方法である²¹⁾。しかし、反復免疫により得られた高親和性抗体産生B細胞をミエロマ細胞と融合し、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドマクローンを得るには、時間と多大な労力を必要とする。また、抗体医薬の標的となるヒトのタンパク質の機能的に重要な抗原エピトープの多くは、種間での相同性が高く、免疫寛容のためにマウスを免疫しても高特異性抗体を得ることが困難な場合も多い。そこで、免疫寛容の制限を回避するために、ファージディスプレイ法に代表される *in vitro* 抗体作製システムが開発されているが^{22,23)}、この方法による抗体取得の成否は、用いたファージライブラリーの質に依存している。また、このシステムには変異機能が備わっていないため、得られた抗体の機能を改良するためには、選択したクローンへの人工的変異導入、変異遺伝子の発現と機能評価といった一連の操作が必要である。

我々は、これらの技術的課題を克服するものとして、培養中に抗体遺伝子を自発的に変異・多様化し、十分な規模の抗体レパートリーを内包するような培養B細胞集団を抗体ライブラリーとして利用することを発案した(図4A)。このような培養B細胞集団は、増殖過程で免疫寛容機構によるクローン除去を受けにくいと、広範な抗体ライブラリーを形成することが期待できる。あらかじめ用意された十分な規模の培養B細胞集団から目的抗体を産生する細胞を選択できれば、迅速かつ効率的な *in vitro* 抗体作製システムとなる。抗体遺伝子の高頻度変異機能を保持した培養可能なB細胞株としては、ヒト、マウス、ニワトリ由来のB細胞株がいくつか知られているが、ニワトリB細胞株DT40は、次のような優れた性質を持っている²⁴⁻²⁶⁾。1) 培養中に抗体遺伝子に変異を高頻度に導入し、多様な抗体ライブラリーを形成できる；2) IgM抗体を細胞表面に膜結合型として発現するとともに、一部を培養上清中に分泌している；3) 外来遺伝子を導入すると、動物細胞としては例外的に高い頻度で相同組換えされるので、遺伝子のノックアウトや特定部位への外来遺伝子の挿入による細胞機能の改変が容易に行

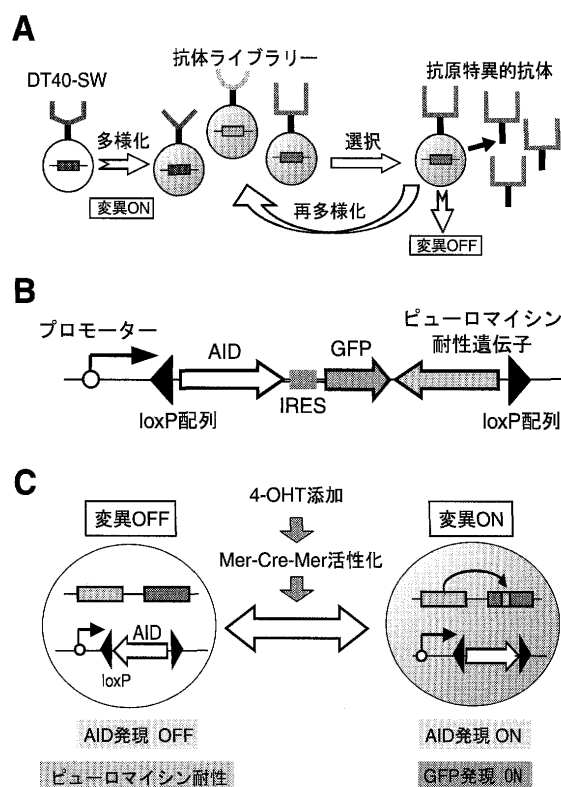


図4. (A) DT40-SWを用いた抗体作製システムの概要。(B) AIDの発現制御ベクターの構造。(C) Cre/loxPシステムによるAID発現の制御とモニター。

える；4) 細胞増殖が非常に早いので細胞の育種やクローン選択が迅速に行える。特に、3) は他の細胞株にはない決定的に重要な特長である。DT40細胞は抗体遺伝子への変異導入に必須のタンパクであるAID (activation-induced cytidine deaminase) を発現しており、AID依存的に遺伝子変換や点突然変異によって培養中に抗体V遺伝子を多様化し続ける²⁷⁻²⁹⁾。遺伝子変換は、ニワトリ、ウサギ、ウシなどに見られる抗体多様化機構であり、V遺伝子上の上流に存在する偽V遺伝子群の一部の配列がV遺伝子上のコピーされることによって起こる。長期培養することにより作製したDT40ライブラリーから目的抗体を産生するクローンを単離できたとしても、その変異機能が維持されていると、更なる変異導入によってその抗原特異性は失われる危険性がある。目的クローンを単離したら速やかに変異機能をOFFにして抗体遺伝子を安定化するために、我々は変異導入に必須のAIDの発現を可逆的にON/OFF制御できる仕組みを導入した細胞株DT40-SWを樹立し、抗体作製システムに利用した(図4)^{30,31)}。DT40-SWでは、2つあるAID遺伝子的一方を標的相同組換えによりノックアウトしておき、もう一方のAID遺伝子は、互いに逆向きに配置したloxP配列でAID cDNAを挟んだコンストラクトで置き換えた(図4B)。これにCreリコンビナーゼが働くとloxP間の組換え反応によりAID遺伝子の向きが反転し、AID遺伝子が

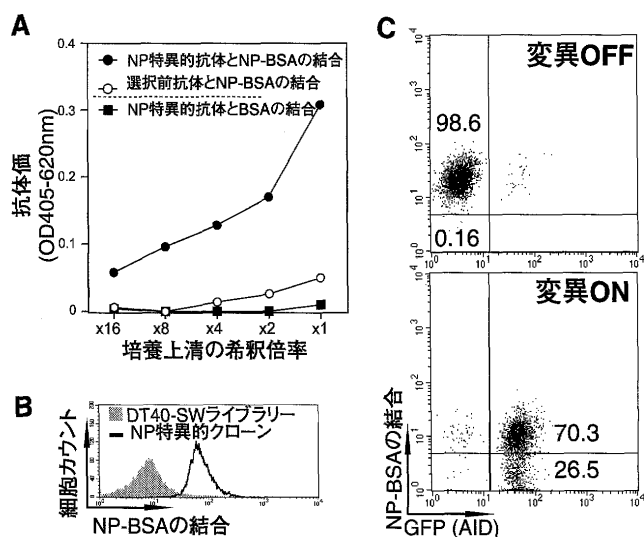


図5. DT40-SW抗体ライブラリーからの抗原特異的クローンの単離。(A) ELISAと(B) FACSによりNP特異的クローンの特異性を評価した。(C) 変異機能がONの状態では2ヶ月維持すると抗原特異性を失った集団が出現するが、OFFにすることによって特異性を安定に維持できた。

プロモーターと同方向の場合は転写されAIDが発現するが、逆方向の場合は転写がOFFとなって発現が停止する(図4C)。AID-ONの細胞は、IRESを挟んでAID遺伝子と同方向に組み込んだGFPを発現する。一方、AID-OFFの細胞では、ピューロマイシン耐性遺伝子が発現するので、両状態の細胞を識別することができる。Creは変異型エストロゲンレセプターとの融合タンパク質(Mer-Cre-Mer)としてDT40細胞に発現させてあるので、エストロゲン誘導体(4-ヒドロキシタモキシフェン, 4-OHT)を培地に添加するとMer-Cre-Merは核に移行してloxPに作用する³²⁾。DT40-SW細胞をAID-ONの状態では2ヶ月培養後、ライブラリーの半数のクローンに変異が導入されており、1年後ではすべてのクローンに変異が複数個蓄積していた。また、遺伝子変換が起こる部位、使用する偽V遺伝子に偏りが見られなかったことからDT40-SW抗体ライブラリーは十分多様なライブラリーを形成していると考えられる³³⁾。まず、モデル抗原としてNPハプテンに対する抗体を産生しているクローンをライブラリーから単離した³³⁾。単離方法としては、抗原を結合させた磁気マイクロビーズとライブラリーの細胞(約10⁸個)を反応させ、磁気ビーズと結合した細胞を磁石により分離する方法、蛍光標識した抗原を結合した細胞をセルソーターによって単離する方法を用いた。単離したクローンを培養し、培養上清に分泌された抗体をELISAで定量し、細胞表面に発現された抗体をFACSで評価して取得したクローンのNP特異性を確認した(図5A, 5B)。この一連の操作は約2週間で完了でき、得られた抗NP抗体の親和性は、 $K_D = 100$ nM程度であった。

最終的に得られたクローンはAIDをOFFにすることにより変異を停止させ、その形質を安定化させることができた(図5C)。一次スクリーニングで十分な親和性の抗体が得られなくても、さらに培養を続けて変異導入と選択を繰り返すことにより、親和性成熟の原理に基づいて、高親和性抗体が得られることも実証している。この抗体作製システムにより、各種タンパク質、低分子量のハプテンやペプチド、DNAなどの免疫原性の低い非タンパク性抗原といった種々の抗原に対する抗体の取得が可能であることを確認している。ニワトリにとっての自己抗原である卵白アルブミンやリゾチーム、ssDNAなどに対する抗体も得られているので、このシステムでは免疫寛容も回避できていると考えられる。

*In vitro*抗体産生システムの高機能化

上述のようにDT40-SW細胞は、*in vitro*抗体作製システムに利用できる有用な細胞株であることが示された。さらに、DT40細胞の遺伝子操作による機能改変の容易さを利用して、このシステムをより高機能化することを試みた。

抗体産生能の増強 DT40細胞の抗体産生量はマウスハイブリドーマに比べて1/2~1/10程度であるので、取得した抗原特異的抗体産生細胞の抗体産生量を簡便かつ安定的に増強するために、B細胞の分化を制御している転写因子Paired box gene 5 (Pax5)の遺伝子発現を部分的に抑制することを試みた。B細胞の発生に必須な転写因子Pax5は、未感作B細胞では、抗体産生細胞への分化に重要な転写因子であるX-box binding protein 1 (XBP-1)やB-lymphocytes-induced maturation protein 1 (Blimp1)を抑制するが、抗体産生細胞ではPax5の発現が低下してその抑制が解除される³⁴⁾。Pax5をノックアウトしたDT40ではXBP-1やBlimp1の発現が増大して抗体産生量は増大するが、細胞増殖が非常に悪いことが報告されており、複数あるPax5対立遺伝子のノックアウトを簡便に行うことはできない³⁵⁾。そこで、Pax5の対立遺伝子の一つを破壊することによってその発現量を部分的に抑制することを検討したところ、細胞増殖に影響を与えずに簡便な操作で抗体産生量を2~3倍程度高めることが可能であった³⁶⁾。

変異頻度の向上 迅速にライブラリーを作製したり、得られたクローンを親和性成熟させたりするには、変異頻度が高い方が効率的である。AIDは核内DNA鎖上のシトシンをウラシルに変換することによって変異導入を開始すると考えられているが³⁷⁾、そのAIDの機能発現の制御にはC末端に存在する核からの輸出シグナル配列が関与することが報告されている³⁸⁾。我々は、AIDの核

内での活性の増大を期待して、この部分を欠失させた変異AID遺伝子をDT40-SWのAID遺伝子と置き換えた細胞株DT40-SWΔCを樹立した。変異機能をONにして軽鎖への変異導入効率を評価したところ、DT40-SWと比べて3倍程度増加した³⁹⁾。また、DT40-SWと同様にV遺伝子上に偏りなく変異が導入されており、DT40-SWΔCにおいて抗体遺伝子の多様化の能力が強化されたと考えられる。別の方法としては抗体遺伝子座特異的な転写因子E2Aの大量発現や抗体遺伝子の組換えを誘導するトリコスタチンAの添加が変異頻度を増大させるとの報告があるが⁴⁰⁻⁴²⁾、導入される変異に偏りが生じる場合があることが分かっている⁴³⁾。抗体の作製システムにおいては変異頻度の向上のみならず生み出される抗体ライブラリーの多様性が重要であることから、今回、我々が試みた変異頻度の向上方法は、抗体の多様化の促進方法として有効であると考えられる。

遺伝子変換型から点突然変異型への転換 ニワトリでは、B細胞の発生段階においてV(D)J遺伝子再編成や遺伝子変換のような組換え反応により多様な抗体遺伝子が生成されて初期B細胞レパートリーが形成されるが、親和性成熟の過程では点突然変異が主に起こるようになる⁴⁴⁾。DT40では遺伝子変換が優位で点突然変異の頻度は低いが、生体内でみられる抗体の多様化機構の転換を*in vitro*で実現することは、一次スクリーニングで単離したクローンの抗体をさらに親和性成熟させる場合に有利である。遺伝子変換は相同組換え機構に依存していることから、相同組換えに関与するRad51パラログの一つをノックアウトすると点突然変異優位になる⁴⁵⁾。Rad51パラログノックアウト株は点突然変異型の細胞株として有用であるが⁴⁶⁾、この細胞は増殖速度が低く⁴⁷⁾、点突然変異のみでは抗体の多様化には不利であることから、初期ライブラリー構築において効率が落ちることが想定される。我々はRad51パラログの一つであるXRCC3遺伝子の一方の対立遺伝子を破壊し、発現を低下させるだけで、点突然変異優位となることを見いだした⁴⁸⁾。1次スクリーニングで得られた抗NP抗体産生クローンをXRCC3ヘテロノックアウト体にして親和性成熟を試みたところ、NPに対して結合性の高いクローンを取得可能であった⁴⁹⁾。この方法は簡便かつ細胞増殖に影響を与えないことから、必要に応じて変異様式を転換する方法として有効である。これらのDT40-SWの機能改良を組み合わせることにより、この抗体作製システムによる抗体取得をより効率化できると考えられる。

おわりに

抗体は、有顎類以降の生物種に見られる生態防御因子

である。親和性成熟は、体細胞突然変異という、厳密な制御がなければ発ガンリスクになる諸刃の剣を用いることによって、抗体の親和性を改良する機構であり、そこには免疫システムと病原体との闘争の歴史が刻み込まれていると考えられる。本稿で紹介した親和性成熟の解析系は、この学問的に興味の尽きない機構の一端を解明する有用なツールとなると期待される。また、*in vitro*培養系での親和性成熟の再構築が実現されれば、液性免疫応答を制御することによる自己免疫疾患や感染症の治療法の開発や、さらに本稿で紹介した抗体作製システムへの応用につながると考えられる。

DT40-SWを用いた抗体作製システムは、培養細胞を用いた*in vitro*系であるために免疫寛容の制限を受けず、従来の方法では取得が困難であった標的に対する抗体の取得に利用可能であると考えられる。DT40の高い増殖性により目的クローンの単離と評価を簡便かつ効率的に行えるという特長を生かして、現在いくつかの標的を設定して抗体医薬の候補を探索しつつある。さらに利用価値の高い抗体作製システムの構築に向けて、ニワトリIgM抗体を産生するDT40をヒトIgG産生型へ改変することが、今後の課題の1つであろう。これとは別に、我々は、DT40-SW細胞の抗体L鎖遺伝子座に非抗体タンパク質をコードする外来遺伝子を導入すると、それがAIDの標的となって変異を受けることを報告している⁵⁰⁾。異種動物由来の抗体の改良や、種々の非抗体タンパク分子の遺伝子レベルでの機能改変を行うための道具として利用するために、DT40-SW細胞を機能拡張することも興味深い研究課題である。

本研究は岡山大学工学部生物機能工学科細胞機能工学研究室で行った仕事です。岡山大学へ赴任以来、門外漢だった私を忍耐強くかつ温かくご指導いただきました大森 齊 教授、免疫学を一から手ほどきくださいました正田正喜 現京都大学准教授に深く感謝いたします。本研究の成果は、曲 正樹 助教、西川由美子 博士、藤堂景史 博士、池田美香 研究員をはじめ、多くの大学院生および学部学生の力によるものです。ここにあらためて感謝の意を表します。共同研究でお世話になりましたMichigan大学 Marilia Cascalho 准教授、岡山県立大学 森 将晏 教授、理化学研究所RCAI 黒崎知博 教授、北村 浩 博士、Max Plank研究所 Michael Reth教授に感謝いたします。本賞の受賞に際しまして、推薦いただきました宇都宮大学農学部の前田 勇 准教授に御礼申し上げます。研究者の道へ導いていただきました田中渥夫 京都大学名誉教授（現中部大学教授）、植田充美 京都大学教授、跡見晴幸 京都大学准教授に感謝申し上げます。本研究の一部は、科学研究費補助金、NEDO産業技術研究助成、JST シーズ発掘試験などの支援を受けて実施されました。

文 献

- 1) Burnet, F. M.: *Aust. J. Sci.*, **20**, 67–69 (1957).
- 2) Rajewsky, K.: *Nature*, **381**, 751–758 (1996).
- 3) MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C., and Vinuesa, C. G.: *Immunol. Rev.*, **194**, 8–18 (2003).
- 4) Calame, K. L., Lin, K. I., and Tunyaplin, C.: *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 205–230 (2003).
- 5) MacLennan, I. C.: *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 117–139 (1994).
- 6) Tew, J. G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A. K., and Qin, D.: *Trends Immunol.*, **22**, 361–367 (2001).
- 7) Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L., and Wabl, M.: *Science*, **272**, 1649–1652. (1996).
- 8) Cascalho, M., Wong, J., Steinberg, C., and Wabl, M.: *Science*, **279**, 1207–1210 (1998).
- 9) Kanayama, N., Kimoto, T., Todo, K., Nishikawa, Y., Hikida, M., Magari, M., Cascalho, M., and Ohmori, H.: *J. Immunol.*, **169**, 6865–6874 (2002).
- 10) Kanayama, N., Cascalho, M., and Ohmori, H.: *J. Immunol.*, **174**, 1438–1445 (2005).
- 11) Kouyama, E., Nishikawa, Y., Okazawa, T., Magari, M., Ohmori, H., and Kanayama, N.: *Immunol. Lett.*, **109**, 28–35 (2007).
- 12) Okazawa, T., Magari, M., Kimoto, T., Kouyama, E., Ohmori, H., and Kanayama, N.: *Immunol. Lett.*, **117**, 96–105 (2008).
- 13) Shih, T. A., Meffre, E., Roederer, M., and Nussenzweig, M. C.: *Nat. Immunol.*, **3**, 570–575 (2002).
- 14) Paus, D., Phan, T. G., Chan, T. D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R.: *J. Exp. Med.*, **203**, 1081–1091 (2006).
- 15) Phan, T. G., Paus, D., Chan, T. D., Turner, M. L., Nutt, S. L., Basten, A., and Brink, R.: *J. Exp. Med.*, **203**, 2419–2424 (2006).
- 16) Hikida, M., Mori, M., Takai, T., Tomochika, K., Hamatani, K., and Ohmori, H.: *Science*, **274**, 2092–2094 (1996).
- 17) Magari, M., Sawatari, T., Kawano, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Kanayama, N., Hikida, M., and Ohmori, H.: *Eur. J. Immunol.*, **32**, 957–966 (2002).
- 18) Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S. A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C. L., Silver, J., and Hardy, R. R.: *Science*, **285**, 113–116 (1999).
- 19) Kosco-Vilbois, M. H.: *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 764–769 (2003).
- 20) Nishikawa, Y., Hikida, M., Magari, M., Kanayama, N., Mori, M., Kitamura, H., Kurosaki, T., and Ohmori, H.: *J. Immunol.*, **177**, 5204–5214 (2006).
- 21) Kohler, G. and Milstein, C.: *Nature*, **256**, 495–497 (1975).
- 22) Smith, G. P.: *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
- 23) McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J.: *Nature*, **348**, 552–554 (1990).
- 24) Buerstedde, J. M., Reynaud, C. A., Humphries, E. H., Olson, W., Ewert, D. L., and Weill, J. C.: *EMBO J.*, **9**, 921–927 (1990).
- 25) Kim, S., Humphries, E. H., Tjoelker, L., Carlson, L., and Thompson, C. B.: *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3224–3231 (1990).
- 26) Buerstedde, J. M. and Takeda, S.: *Cell*, **67**, 179–188 (1991).
- 27) Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T.: *Cell*, **102**, 553–563 (2000).
- 28) Arakawa, H., Hauschild, J., and Buerstedde, J. M.: *Science*, **295**, 1301–1306 (2002).
- 29) Harris, R. S., Sale, J. E., Petersen-Mahrt, S. K., and Neuberger, M. S.: *Curr. Biol.*, **12**, 435–438 (2002).
- 30) 特開2006-1097111 (2006)
- 31) Kanayama, N., Todo, K., Reth, M., and Ohmori, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 70–75 (2005).
- 32) Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A. M., Sablitzky, F., Littlewood, T. D., and Reth, M.: *Nucleic Acids Res.*, **24**, 543–548 (1996).
- 33) Todo, K., Miyake, K., Magari, M., Kanayama, N., and Ohmori, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 478–481 (2006).
- 34) Shapiro-Shelef, M. and Calame, K.: *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 230–242 (2005).
- 35) Nera, K., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J. M., and Lassila, O.: *Immunity*, **24**, 283–293 (2006).
- 36) Magari, M., Aya, T., Ikeda, M., Todo, K., Kanayama, N., and Ohmori, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 206–209 (2009).
- 37) Di Noia, J. M. and Neuberger, M. S.: *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 1–22 (2007).
- 38) Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1975–1980 (2004).
- 39) 金広優一, 曲 正樹, 藤堂景史, 金山直樹, 大森 齊 : 日本生物工学会大会講演要旨集, p.109 (2008).
- 40) Seo, H., Masuoka, M., Murofushi, H., Takeda, S., Shibata, T., and Ohta, K.: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 731–735 (2005).
- 41) Conlon, T. M. and Meyer, K. B.: *Eur. J. Immunol.*, **36**, 139–148 (2006).
- 42) Schoetz, U., Cervelli, M., Wang, Y. D., Fiedler, P., and Buerstedde, J. M.: *J. Immunol.*, **177**, 395–400 (2006).
- 43) Lin, W., Hashimoto, S., Seo, H., Shibata, T., and Ohta, K.: *Genes Cells*, **13**, 255–268 (2008).
- 44) Arakawa, H. and Buerstedde, J. M.: *Dev. Dyn.*, **229**, 458–464 (2004).
- 45) Sale, J. E., Calandrini, D. M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M. S.: *Nature*, **412**, 921–926 (2001).
- 46) Cumbers, S. J., Williams, G. T., Davies, S. L., Grenfell, R. L., Takeda, S., Batista, F. D., Sale, J. E., and Neuberger, M. S.: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1129–1134 (2002).
- 47) Takata, M., Sasaki, M. S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L. H., and Takeda, S.: *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2858–2866 (2001).
- 48) 特願2007-231741 (2007)
- 49) 梶田真道, 藤堂景史, 曲 正樹, 金山直樹, 大森 齊 : 日本生物工学会大会講演要旨集, p.109 (2008).
- 50) Kanayama, N., Todo, K., Takahashi, S., Magari, M., and Ohmori, H.: *Nucleic Acids Res.*, **34**, e10 (2006).