

1129 フルオレsein応答性増殖スイッチの創製

○木村寛子¹, 河原正浩¹, Tomlinson Ian², 上田 宏³, 長棟輝行¹ (¹ 東大・工・化生, ²MRC, ³ 東大・新領域・先端生命)

【目的】血球系疾患の治療において遺伝子治療効果を向上させるには、造血幹細胞をターゲットとして効率よく遺伝子導入が行われる必要があるが、遺伝子導入効率は低いのが現状である。そこで、治療遺伝子とともに増殖シグナルが伝達できるような受容体の遺伝子を導入することで、治療遺伝子導入細胞のみを選択的に増殖させることを考えた。しかし、天然の受容体を用いると、その受容体を発現している他の細胞の増殖を促進してしまうという副作用が危惧される。そこで、受容体のサイトカイン結合部位を抗体の抗原結合部位で置換した抗体 / 受容体キメラを構築し、その応答性を検証した。

【方法及び結果】Erythropoietin 受容体 (EpoR) のリガンド認識部位 (N 末端から Val118 まで) を *in vivo* で免疫原性がないと考えられる小分子の Fluorescein (Fl) に対する抗体の抗原結合部位 (ScFv) に置換し、その細胞内ドメインを IL-6 受容体 β 鎖 gp130 に置換したキメラ受容体を作製した。ベクターには、このキメラ受容体遺伝子とともに EGFP 遺伝子を組み込んだ。レトロウィルスで、このベクターを IL-3 依存性血球細胞である Ba/F3 に導入し、EGFP 発現を指標にキメラ受容体発現細胞のみを Sorting した。回収した細胞に、まず Fl 間距離が多様であると考えられる Fl 標識 BSA (BSA-Fl) を添加したところ、Fl 応答性があることが確認できた。続いて回文配列の 1 本鎖 DNA の 5' 末端を Fl 修飾し、それをアニーリングさせることで Fl dimer を作製した。リンカー長としては、細胞外ドメイン EpoR の Val118 間が 35Å であることを指標に 8 ~ 14mer (30 ~ 52.5Å) の 7 種類を試みた。その結果、10 ~ 13mer においてほぼ大差は無く、0.5 ~ 1μM の濃度で、キメラ受容体発現細胞のみを選択的に増殖させることに成功した。

Construction of a proliferation switch responsive to fluorescein

○ Hiroko Kimura¹, Masahiro Kawahara¹, Ian Tomlinson², Hiroshi Ueda³, Teruyuki Nagamune¹ (¹Dept. Chem. Biotechnol., Univ. Tokyo, ²MRC, ³Dept. Front. Sci., Univ. Tokyo)

Key words antibody variable region, chimeric receptor, growth control, gp130, hapten, hematopoietic cell

1131 B 細胞多様性の限定されたマウスにおける抗体の親和性成熟機構の解析

○藤堂景史, 木本崇文, 曲 正樹, 金山直樹, 大森 斉 (岡山大学・工・生物機能)

免疫後、産生される抗体の抗原に対する親和性は時間と共に上昇し、これは親和性成熟と呼ばれる。この親和性成熟機構を詳細に検討するために、我々は B 細胞レパトアの限定された Quasimonoclonal(QM) マウスを用いて解析を行ってきた。このマウスの B 細胞の多くは、NP 特異的な可変部領域 (VHT) を持つ H 鎖と、 $\lambda 1$, $\lambda 2$ のいずれか一方の L 鎖を発現している。我々は、QM B 細胞に対して低親和性の、NP 類縁体である *p*-nitrophenylacetyl(*p*NP) をこのマウスに免疫した際に、*p*NP に対する親和性成熟が起こることを見出し出している。VHT⁺ 抗体の解析から、抗 *p*NP 抗体応答のうち IgM クラスでは VHT/ $\lambda 1$ 及び VHT/ $\lambda 2$ B 細胞が応答しているが、IgG クラスでは VHT/ $\lambda 2$ B 細胞のみが応答し、その H 鎖可変部領域に共通の変異が導入されていることが確認された。そこで抗 *p*NP 応答における VHT/ $\lambda 2$ IgG の選択および親和性成熟を詳しく解析するために、様々な VHT⁺H 鎖/L 鎖の組み合わせを持った recombinant 抗体を作成し、*p*NP に対する特異性の解析を行った。その結果 *p*NP への特異性を獲得した変異 VHT⁺ IgG 抗体重鎖は、 $\lambda 1$, $\lambda 2$ 軽鎖の両方に会合して抗体を形成するが、 $\lambda 2$ ⁺ 抗体のみが *p*NP に対して高親和性であり、 $\lambda 1$ ⁺ 抗体は *p*NP に対する親和性をほとんど持たないことが明らかになった。さらに H 鎖可変部領域における共通変異、Y101N、A102T のみを導入した抗体の解析から、Y101N 変異が *p*NP への親和性獲得に重要であり、A102T 変異や他の変異の蓄積により *p*NP に対して高親和性、高特異性を獲得していく過程が示唆された。

Analysis of antibody affinity maturation in the mice with restricted B cell

○ Kagefumi Todo, Takafumi Kimoto, Masaki Magari, Naoki Kanayama, Hitoshi Ohmori (Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words 抗体親和性成熟, 体細胞突然変異, レパトリー選択, recombinant 抗体

1130 RAG 発現細胞の新規蛍光標識法による検出

○三木貴雄, 西川恵美子, 曲 正樹, 疋田正喜, 金山直樹, 大森 斉 (岡山大学・工・生物機能)

骨髄中の未成熟 B 細胞において、recombination activating gene(RAG)-1、RAG-2 の遺伝子産物が抗体の可変領域をコードする V(D)J 遺伝子断片の再構成を行い、多様な抗原レセプターを持つ B 細胞クローンが生み出される。一方我々は、RAG の発現を末梢リンパ組織の B 細胞においても確認している。本研究では、分化段階により変動する RAG の発現を可視化して観察するために、RAG による V(D)J 組換えが行われた細胞において、RAG による遺伝子組換えが起こった場合にのみ、ある蛍光蛋白が発現する人工基質を作製した。人工基質上には、V(D)J 組換えにおける RAG の認識配列 (RSS) の間に、二つの蛍光蛋白遺伝子 (DsRED, EGFP) を互いに逆方向に挿入した。この人工基質をレトロウィルスベクターにより細胞に導入すると赤色蛍光蛋白である DsRED が発現されるが、RAG を発現させると蛍光蛋白遺伝子の向きが逆転し、DsRED に代わって GFP の緑色蛍光蛋白が発現されるように変化するよう設計した。このベクターを用いて数種の細胞株において RAG の発現に対応して緑色蛍光を発する細胞を検出できた。さらに RAG 陽性細胞の存在する胸腺の組織切片において赤色蛍光を発する細胞と共に緑色蛍光を発する細胞も検出することができた。これは、RAG の発現に依存して人工基質が組換えられ、発現する蛍光蛋白が変化し、RAG 発現細胞を可視化できることを示唆している。

Detection of RAG expressed cells by a new fluorescence-labeling method

○Takao Miki, Emiko Nishikawa, Masaki Magari, Masaki Hikida, Masaki Kanayama, Hitoshi Ohmori (Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words recombination activating gene(RAG), レトロウィルスベクター, GFP, DsRED, V(D)J recombination, RSS

1132 ヒト Fc 融合タンパク質の鳥類卵への移行

安藤尚子, 松本浩之, 小野健一郎, ○西島謙一, 上平正道, 飯島信司 (名大院・工・生物)

【目的】トランスジェニック鳥類による卵中への有用タンパク質生産は、時間とコストのかかる大型哺乳類に替わる新たなタンパク質生産法として期待されている。我々はこれまでにレトロウィルスベクターを用いてトランスジェニック鳥類の作製が可能であることを示してきた。実際の生産においては、ニワトリ体内で生産させた目的タンパク質を卵へ効率よく回収することも必要である。鳥類では母鳥の血清中の抗体が卵黄中に高濃度で蓄積することから、本研究では Fc 融合タンパク質の卵黄移行について検討した結果を報告する。

【方法及び結果】産卵ニワトリの静脈にヒト IgG 抗体を注入した後、放卵された卵を経時的に回収した。サンプル中のヒト抗体量を ELISA 法によって測定した結果、ヒト IgG 抗体が卵黄でのみ検出された。この際の移行に重要な部位を決定するために、ヒト IgG 抗体の Fab、Fc フラグメントをそれぞれニワトリに注入した。その結果、Fab フラグメントはほとんど検出されず、Fc フラグメントのみが卵黄中に移行することが明らかとなった。そこで、様々なタンパク質をヒト Fc 部位と融合発現させたタンパク質が卵黄へ移行するかどうかを検討した。その結果、試みたすべてのタンパク質で血中から卵黄への移行が観察された。これらのタンパク質は卵白では検出されなかったことから、Fc 融合タンパク質を卵黄特異的に蓄積回収することが可能であるものと考えられた。

Transfer of Fc-fused proteins into avian egg yolk

Naoko Ando, Hiroyuki Matsumoto, Kenichiro Ono, ○ Kenichi Nishijima, Masamichi Kamihira, Shinji Iijima (Nagoya Univ.)

Key words Fc-fused protein, avian egg, egg yolk