

1Fp01 生物工学奨励賞（斉藤賞） 高親和性抗体の産生機構に関する基礎研究とその 工学的応用

○金山 直樹
(岡山大院・自・生体機能)

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。近年、危惧されているパンデミックに対応しうるワクチンの効率的な作製技術の開発や標的医薬として有用な抗体の効率的な作製技術の開発などへの社会的ニーズの高まりから、抗原特異的な高親和性抗体の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いる。本研究では、独自の手法を用いて高親和性抗体産生過程の詳細な解析を行い、その成果を発展させて新規なin vitro抗体作製システムを構築した。

(1) 抗体産生機構の解析系の構築と応用：抗体産生は、多様な抗体レパートリーの生成とそこから抗原特異的な高親和性抗体の選択として簡潔に記述されるが、実際には膨大な数の細胞が関与する複雑系である。演者らは、B細胞集団の大部分が既知の特異性を有する遺伝子組換えマウスを用いて、高親和性抗体の産生過程を明確にモニターできる実験系を構築した。このマウスのB細胞が低親和性を示す抗原に対する抗体応答をモデルとして、B細胞の活性化および抗体の親和性成熟を詳細に解析したところ、2種類のB細胞クローンの競合にまで抗体応答を簡素化して観察可能となり、抗原特異的なクローンの初期の親和性がその後の抗体親和性成熟過程への動員に重要であることが明らかとなった。

体細胞高頻度突然変異と高親和性抗体産生細胞の選択の繰返しによって起こる抗体の親和性成熟には、濾胞樹状細胞が重要な役割を果たすと考えられている。演者らはこれまで株化が困難であったこの細胞の株化に成功し、高親和性抗体産生をより生体内に近い状態でin vitro解析するための培養系の基盤を確立した。今後、濾胞樹状細胞が関与すると考えられる突然変異の誘導や高親和性抗体の選択の分子機構解明への応用が期待される。

(2) 変異能力を有するB細胞株を用いたin vitro抗体作製システムの構築：動物に免疫する抗体作製法では、免疫寛容による自己反応性クローンの除去により種間での保存性の高い標的分子に対する抗体が取得できないことがあるため、医薬として有用な抗体作製に向けて免疫寛容の制限を受けないin vitro系の開発がますます重要となっている。演者らは抗体遺伝子変異能力を有するニワトリB細胞株DT40に注目し、生体内での高親和性抗体生成をin vitro培養系で模倣した新規な抗体作製システムを構築した。その結果、次のような有用な特徴を備えた系の構築に成功した：1) 自発的な抗体遺伝子変異能力によってin vitro培養のみにより抗体ライブラリーが得られ、そのライブラリーは免疫寛容の制限を受けていないため自己抗体を含む広範なモデル抗原に対する抗体取得が可能であった、2) DT40の高い相同組換え効率を利用してその変異能力を可逆的にON/OFFできる機構を付与した細胞株を樹立することにより、抗体ライブラリーの形成時には変異機能をONにしておき、得られた目的クローンでは変異機能をOFFにしてその形質を安定化することが可能となった、3) 抗体遺伝子への高頻度変異と高親和性クローンの選択に基づく親和性成熟をin vitroで模倣することが可能であった。

複雑な免疫システムからは工学的に活用可能な細胞機能が今後も見いだされることが考えられる。構築した実験系を用いた高親和性抗体の生成機構の解析によりその分子機構の解明を進め、その知見を応用してin vitro抗体作製システムをさらに高機能化し、医薬を目指した抗体取得に向けての実用化を進めたい。また、DT40において非抗体タンパク質遺伝子への変異導入も可能であることも見いだしており、今後、タンパク質の新規な改変系としての応用を図りたい。

Basic Research and Development on Generation Mechanism of High Affinity Antibodies

○Naoki KANAYAMA
(Dept. Biosci. Biotech., Okayama Univ.)

Key words affinity maturation, antibody, DT40 cells, somatic hypermutation

1Fp03 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来の α -グルコース転移酵素 XgtA における S272 位の部位特異的変異によるグルコース転移活性の向上

○荒川 崇, 服部 貴澄, 桐村 光太郎
(早大・理工・応化)

【目的】*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来の α -グルコース転移酵素(XgtA)は、*L*-メントールやヒドロキノンなどのヒドロキシル基を有する化合物に対して高いグルコース転移活性を示し対応する α -グルコシドを選択的に生成する^{1,2)}。また、XgtAの触媒部位は、D201, E270, D331であることを特定している。そこで、本研究では、XgtAのS272位に部位特異的変異(saturation mutation)を導入し、作製した改変型XgtAのグルコース転移活性の向上について検討した。

【方法および結果】XgtAの触媒残基の1つであるE270位近傍のS272は、活性クレフト入口に存在する親水性アミノ酸で基質の取り込みに関与することが推定される。そこで、S272位を他のアミノ酸に置換した19種の改変型XgtAを創製した。改変型XgtAのグルコース転移活性は、ヒドロキノンからの α -グルコシル化活性として比較した。作製した改変型XgtAの中で、S272I, S272L, S272V, S272A ではグルコース転移反応の比活性がそれぞれ67.7, 54.9, 20.4, 19.9(U/mg)となり、野生型の9.50(U/mg)と比較して2~7倍に増大した。以上より、S272位を疎水性のアミノ酸に置換することにより、XgtAのグルコース転移活性を向上させることに成功した。

- 1) H. Nakagawa *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 138-144 (2000).
- 2) J. Kurosu *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 328-330 (2002).

Improvement of Transglucosylation Activity in α -Glucosyl Transfer Enzyme XgtA from *Xanthomonas campestris* WU-9701 by Site-Directed Mutagenesis in S272 Residue

○Takashi ARAKAWA, Takasumi HATTORI, Kohtarō KIRIMURA
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words α -glucosylation, site-directed mutagenesis, transglucosylation, *Xanthomonas campestris*

1Fp04 グルコースセンシングルシフェラーゼの構築

○津川 若子¹, 種岡 篤志¹, 山崎 智彦², 早出 広司¹
(¹東農工大・工・生体工, ²物質・材料研究機構)

ルシフェラーゼはL,S2つのドメインから構成されるタンパク質であり、各ドメインが会合することにより酵素活性が復活する。一方グルコース/ガラクトース結合タンパク質(GGBP)は、グルコースに対して高い親和性を有し、結合によって大きく構造が変化する。本研究では、GGBP融合ルシフェラーゼをタンパク質工学的手法により作製し、グルコースセンシング機能を有するルシフェラーゼの構築を試みた。

方法

X線結晶構造を参考に、大腸菌由来GGBPのN末端領域にルシフェラーゼのLドメイン、GGBP内部のループ領域にSドメインを挿入するように設計した遺伝子を構築し、高発現用ベクターを用いて大腸菌で組換え生産した。GGBP融合ルシフェラーゼのグルコースに対する結合性はルシフェラーゼの発光により評価した。

結果と考察

GGBP融合ルシフェラーゼは水溶性タンパク質として発現した。ATP,ルシフェリン存在下、GGBPリガンドであるグルコースの存在下では、非存在下と比較して発光強度は約5倍上昇した。発光強度は濃度依存的に増加し、グルコースに対するルシフェラーゼ活性を指標とする見かけのKm値は3 μ Mであった。以上の結果からルシフェラーゼに融合したGGBPはリガンドとの結合能を保持し、リガンドとの結合に伴いルシフェラーゼの2つのドメインが会合すると考えられた。GGBPとの融合によりグルコースセンシング機能を有する新しいルシフェラーゼ分子が構築できた。

Glucose sensing luciferase - split luciferase fused with glucose/galactose binding protein

○Wakako TSUGAWA¹, Atsushi TANEOKA¹, Tomohiko YAMAZAKI², Koji SODE¹
(¹Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²NIMS)

Key words luciferase, binding protein, glucose, luminescence