

2P-069 天然小分子化合物ゼンボンによる Hsp90 の活性化

○仲本 準¹, 小松 太和¹, 天谷 洋介¹, 鈴木 健裕², 堂前 直³,
Vigh László³
(¹埼玉大院・理工・分生, ²理研・環資科研セ, ³Inst. Biochem.,
Biol. Res. Centr.)
nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp

【背景と目的】ハナショウガ (Zingiber zerumbet Smith)由来のゼンボン (Zerumbone) は、抗炎症効果や抗腫瘍効果を有するとの報告があるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。この天然小分子化合物が、原核生物及び真核生物の分子シャペロン Hsp90 の構造や機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。真核生物の Hsp90 は、がんの増殖・生存に関わる多くのタンパク質の機能維持に必須であることが知られている。

【方法】シアノバクテリア (Synechococcus elongatus)、大腸菌、ヒト及び分裂酵母の Hsp90 を高度に精製し、実験に用いた。質量分析によってゼンボンによって修飾されるアミノ酸残基を解析した。Hsp90 の ATPase 活性を、ビルビン酸キナーゼ及び乳酸脱水素酵素反応に共役させて、分光光度計を用いて経時的に測定した。Hsp90 の分子シャペロン活性の一つである変性タンパク質凝集阻止機能を、熱変性したリンゴ酸脱水素酵素の凝集に伴う光散乱強度の増大を解析することにより評価した。

【結果】ゼンボンは、S.elongatus の Hsp90 の ATPase 活性を増大させた。この活性化は、Hsp90 の中間ドメインのシステイン残基の修飾を伴っていた。中間ドメインにシステイン残基をもつヒト及び分裂酵母の Hsp90 の ATPase 活性もゼンボンによって活性化された。この小分子化合物によって、これらの Hsp90 の凝集阻止活性も活性化された。

Activation of Hsp90s by zerumbone extracted from a southeast asian ginger

○Hitoshi Nakamoto¹, Taiwa Komatsu¹, Yosuke Amaya¹, Takehiro Suzuki²,
Naoshi Dohmae³, László Vigh³
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., ²Biomol. Unit. RIKEN, ³Inst. Biochem., Biol.
Res. Centr.)

Key words heat shock protein, chemical modification

2P-070 ニワトリ B 細胞株における BCR シグナル依存性アポトーシスの制御による高親和性抗体の作製

○金山 直樹, 古賀 舞, 池田 美香, 小嶋 宏侑, 曲 正樹, 徳光 浩,
大森 斉
(岡山大院・自科)
nkanayam@okayama-u.ac.jp

当研究室では抗体遺伝子への変異導入を任意に ON/OFF 可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、*in vitro* 抗体作製システムを構築してきた。本システムでは、抗体ライブラリーを作製して任意の抗体を取得できるほか、既存の抗体遺伝子を DT40-SW に導入してその変異能力によって親和性成熟させることが可能である。一方、目的抗原に対する抗体発現細胞を取得する際、細胞表面の抗体(B細胞抗原レセプター; BCR)が抗原により強く架橋されると、そのシグナルによる目的細胞の増殖抑制やアポトーシスが懸念される。本研究では、BCR シグナルによる増殖抑制を低減する方法として、BCR シグナル分子である Syk のノックアウトと抗アポトーシス因子 Bcl-2 の過剰発現を検討した。ハブテン NP に特異的な抗体を産生する DT40 細胞は、NP 化抗原の存在下で培養すると増殖抑制を示す。NP 特異的 DT40 細胞株において Syk を欠損した細胞株および Bcl-2 を過剰発現させた細胞株を作製し、NP 化抗原に対する応答を検討したところ、Syk ノックアウトおよび Bcl-2 過剰発現ともに BCR 架橋依存的な増殖抑制を低減させた。さらに、これらの改変 DT40 細胞を用いて変異と選択を繰り返すことでより NP に対して高い親和性を獲得したクローンを取得することを試みたところ、野生型に比べてより効率的に高親和性クローンを取得することに成功した。以上の結果より、Syk ノックアウトおよび Bcl-2 過剰発現は、高親和性クローンの取得効率の向上に有用であると考えられる。

High-affinity antibody generation by regulating BCR signal dependent apoptosis in the chicken B cell line

○Naoki Kanayama, Mai Koga, Mika Ikeda, Hiroyuki Kojima, Masaki Magari,
Hiroshi Tokumitsu, Hitoshi Ohmori
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words antibody, DT40 cells, affinity maturation, B cell antigen receptor

2P-071 ニワトリ B 細胞株 DT40 におけるヒト型抗体の産生増強

○中谷 耕治, 檀上 悟史, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹
(岡山大院・自科)
nkanayam@okayama-u.ac.jp

厳密な抗原特異性を持つ抗体は、近年医薬品としての応用が進んでいる。当研究室においてニワトリ B 細胞株 DT40 から開発した DT40-SW-hg 細胞は、ニワトリ IgM 可変部とヒト IgG1 定常部のヒト型キメラ抗体を発現することから、DT40-SW-hg 細胞から取得したヒト IgG 1 型抗体は医薬品としての機能評価が可能である。しかし、DT40-SW-hg 細胞は抗体産生量が低いと、本研究では、分泌型抗体 mRNA 発現を促進させるポリアデニル化促進因子 CstF-64、転写伸長因子 ELL2、小胞体シャペロン分子 Bip に着目し、これらの因子を DT40-SW-hg 細胞に過剰発現させて抗体分泌の増強を試みた。各因子の発現量と抗体産生量の相関性を確認した結果、各因子のタンパク質発現に応じて、抗体産生量の向上が確認できた。特に、ELL2 過剰発現においては選択的スプライシングの変化により膜結合型抗体 mRNA に比べて分泌型抗体 mRNA が増加しており、分泌抗体量も約 3 倍に増加した。Bip 過剰発現細胞においては約 2 倍に抗体分泌量を増加させることに成功した。一方、これらの因子と抗アポトーシス因子 Bcl-2 をコトランスフェクションすると、過剰発現細胞の取得効率が増上した。これらは、DT40-SW-hg 細胞においてヒト型抗体産生を増強する方法として有効であると考えられる。

Enhanced production of humanized antibody in the chicken B cell line DT40

○Koji Nakatani, Satoshi Danjo, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu,
Naoki Knyama
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words antibody, DT40 cells, alternative splicing, molecular chaperon

2P-072 核酸結合部位を用いた光化学修飾法による Quenchbody の構築

○ジョン ヒジン¹, 松本 健司², 板山 修也³, 阿部 亮二⁴, 董 金華¹,
新藤 充³, 上田 宏¹
(¹東工大・資源研,²九大・先導研,³東大院・工・化生,⁴ウシオ
電機)
heejin@pe.res.titech.ac.jp

最近当研究グループで、抗原結合により光る蛍光抗体 Quenchbody (Q-body) の動作原理が見出され、それを用いた簡便迅速な免疫測定法が開発された。その動作原理は、抗体の可変領域内部に存在するトリプトファン残基と、可変領域の N 末端近傍に部位特異的に標識された蛍光色素が相互作用することで抗原非存在時には色素の蛍光が消光されているが、抗原結合により色素が外部に放出されることで消光が解除し蛍光する、というものである。しかしこれまで Q-body を構築するためには、組み換え抗体技術の利用が必須であり、もし天然抗体を Q-body 化できれば、汎用性の高い免疫測定法としての応用範囲が飛躍的に広がると期待される。そこで今回、多くの抗体の可変領域内部に存在する、核酸結合部位 (NBS) を利用した、光化学修飾法による Q-body の構築を試みた。まず NBS に親和性を持つインドール酪酸 (IBA) と、蛍光色素 TAMRA をリンカーを介して架橋したプローブ IBA-C8-TAMRA を合成した。次に、このプローブと、骨疾患診断マーカー BGP 認識一本鎖抗体を UV クロスリンクし、抗原存在下での蛍光強度を測定した。反応および精製条件の最適化を行った結果、従来の方法で構築した Q-body の性能を上回る、抗原濃度依存的な、最大約 9 倍の蛍光応答が観察された。現在、Fab 断片ならびに各種全長抗体について、それらの Q-body 活性を評価している。

Construction of Quenchbody by photochemical crosslinking method using nucleotide binding site

○Heejin Jeong¹, Kenji Matsumoto², Shuya Itayama³, Ryoji Abe⁴, Jinhua Dong¹,
Mitsuru Shindo², Hiroshi Ueda¹
(¹Chem. Res. Lab., Tokyo Tech, ²Inst. Mater. Chem. Eng., Kyushu Univ., ³Dept.
Chem. Biotechnol., Sch. Eng., Univ. of Tokyo, ⁴Ushio Inc.)

Key words Quenchbody, nucleotide binding site, fluorescence quenching, photochemical crosslinking