

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用した

バイオ素子・システムの創製」

研究課題「健康・福祉のためのナノバイオ材料および

バイオ素子としての「スーパー抗体酵素」の創製」

研究終了報告書

研究期間 平成13年12月～平成19年3月

研究代表者：宇田泰三

(県立広島大学・生命環境学部 教授)

1 研究実施の概要

「スーパー抗体酵素」は抗体でありながら酵素作用を有しており、その特徴は標的としたタンパク質をその抗体自身で完全に分解する事ができる点にある。つまり、「スーパー抗体酵素」は狙撃兵のように、例えばウイルスや細菌などに発現しているタンパク質を標的分子としてこれを選択的に破壊・分解する事ができる画期的なナノバイオ材料である。

代表研究者らは HIV の外膜タンパク質 gp41 分子を特異的にしかも完全に破壊する「スーパー抗体酵素」を世界に先駆けて開発した。そして「スーパー抗体酵素」は抗体の性質を維持しながら酵素作用を発揮する点で、天然の酵素とは性質が非常に異なっており、抗体と酵素の中間に位置づけられることを明らかにしつつある。この点を考え、本プロジェクトにおける研究構想は大きく分けて以下の2つに分かれる。

1)「スーパー抗体酵素」の基本的性質を明らかにする(基礎的研究)

2)国民の健康・福祉に役立つ「スーパー抗体酵素」を作製する(応用的研究)

上記1)では、なぜ抗体が酵素活性を持つのか、それはたまたま出来たものなのか、あるいは、ある確率で天然に存在するのか、生物進化(抗体進化)の過程と関係があるのか、さらには、抗体のどの部位が酵素作用を発揮するのか、生化学的・生理学的にどのような意義をもつのか、などの抗体酵素の本質を解明することである。

2)では、国民が悩まされている病気、例えば、感染症、ガン、アレルギーといった病気の治療、あるいは、予防に効果的な「スーパー抗体酵素」を作製する事であり、かつ、一般的な作製法を確立することである。また、抗体酵素のヒト型を作製して、その効能を探ることも重要な研究テーマとした。

このように、本研究では上記の2点に絞って研究を行った。スタートの平成13年12月には宇田グループと松浦グループで発足したが研究が進むに連れ、動物実験が必要になったことから、平成17年4月より西園グループが加わった。各グループの担当範囲は、宇田グループが上記1)を主とし、2)の一部、松浦グループは1)の一部と2)の一部、そして、西園グループは主としてピロリ菌に対する抗体酵素の *in vivo* 試験を宇田グループと共に担当した。

(1)基礎的研究で明らかとなった項目：

1-1)抗体酵素に共通して見られる立体構造上の特徴

本研究で多くの「スーパー抗体酵素」の作製に成功し、データが蓄積されるにつれて、この分子の大きな特徴が明らかになってきた。それは「スーパー抗体酵素」には共通して触媒三ツ組残基様構造が見られる点である。

抗体の構造中に触媒三ツ組残基様構造を持つことが「スーパー抗体酵素」の特徴であるなら、これまでに作製されたモノクローナル抗体はどのくらいその構造を有しているのだろうか？この点を明らかにするた

めに、これまでに世界で作製されたモノクローナル抗体について遺伝子レベルまで遡り、アミノ酸配列を基に立体構造解析を行って、触媒三つ組残基様構造を持つ抗体の割合を統計学的に検証した。その結果、93種類の germline (マウス由来のκ型軽鎖)のうち触媒三つ組残基様構造を持つのは、僅かに9種類であった。中でも cr1 と bb1 に由来する株の割合が高く、germline には明らかな偏りがあった。これら germline にコードされている触媒三つ組残基様構造を調べてみると、特に存在率の高い配置が存在した。Asp1, Ser27a, His93 より成る構造である。この構造は、bb1, bd2, cr1, cs1, bl1, bj2 という6種類の germline に存在すると推定された。これらの抗体は抗原を認識し、かつ germline の段階で抗原を酵素的に分解する潜在能力を有するので Antigenase と言うべきである。

1-2) Antigenase の一般的作製法

本研究で開発した「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の一般的作製法は、1) 標的タンパク質を決定、2) 標的抗原の免疫、3) 抗原特異的抗体産生細胞の取得、4) 抗体遺伝子配列の解析と germline の決定、5) 触媒三つ組み残基 (or 特定の germline) を持つ抗体軽鎖を分離精製、6) 活性試験

1-3) 抗体酵素と誘導期

抗体酵素は反応初期に誘導期という分解反応の遅い時期と高い活性を示す活性期という2相性の反応プロファイルを示すことが多い。誘導期がなぜ現れるか分光学的および速度論的解析を行った結果、Antigenase 41S-2-L は自身でコンフォメーション変化を起こしていることが明らかとなった。また、誘導期の長さは、抗原ペプチドの濃度が濃いほど短くなる傾向が観察され、おそらく抗原ペプチドとの結合 (induced fitting) が 41S-2-L のコンフォメーション変化を引き起こす一つの要因であると推測された。また、コンフォメーション変化の結果、SDS-PAGE で観察された高分子化や反応液の濁りの原因である凝集体 (multimer) を形成している可能性が考えられた。

(2) 応用的研究で達成した項目：

2-1) エイズウイルス (HIV) に関連した Antigenase

HIV 感染はヒトの白血球表面に存在している CD4 というレセプターに HIV の外膜タンパク質 gp120 が結合する事から始まり、この gp120 が次に CCR5 (あるいは CXCR-4) というケモカインレセプターに結合すると gp120 が外れ、その下にある gp41 が表面に出てきてヒト白血球の膜を貫通する。本研究では上記 CCR5 を破壊する「スーパー抗体酵素」の作製を行ったが、ふたつの標的領域を設定した。ひとつは CCR5 の第二細胞外領域 (ECL2B)、もうひとつ N 末端領域である。

2-1-1 CCR5 の第二細胞外領域 (ECL2B) を分解する Antigenase

ECL2B-2 抗体軽鎖は抗原である ECL2B peptide を約 100 時間で完全に分解した。MALDI-TOF-MS による抗原切断部位の解析結果から、ECL2B-2 抗体軽鎖はエンドペプチダーゼの性質を持つことが示唆され、CCR5 第二細胞外領域配列を分解する Antigenase であった。速度論的解析により

kat/Km=10⁴M⁻¹min⁻¹ (kat=2.2 min⁻¹と Antigenase としては非常に高いターンオーバー数)を示した。これはトリプシンとほぼ同等の酵素活性である。さらにこの Antigenase を牛血清を含む培地中で試験したところ、ほかの多くの培地成分であるタンパク質は分解せず、抗原ペプチドのみを特異的に分解していた

2-1-2 CCR5 の N 末端領域を分解する Antigenase

CCR5 の N 末ペプチドを KLH と conjugate し、上述したと同様な手法で8種類のモノクローナル抗体を作製した。そしてこれら抗体の塩基配列を解析した結果、いくつかのクローンに触媒三つ組み残基様構造が見いだされ、Antigenase の獲得に目途がついた。

2-2) *Helicobacter pylori* urease に対する Antigenase

Helicobacter pylori (*H.pylori*:ピロリ菌)は胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍といった潰瘍症、および胃癌と深く関係していることが明らかになってきた。ピロリ菌が強酸性下の胃内に住み着くにはウレアーゼが必須である。そこで、本研究ではピロリ菌のウレアーゼを破壊する「スーパー抗体酵素」の作製をいろんなアプローチで試みた。その結果、ウレアーゼの酵素活性サイトが存在するβ-subunit を選択的に破壊する、いくつかの Antigenase の取得に成功した。これらの Antigenase は、現在、動物実験を行う段階に達している。

2-3) インフルエンザウイルスに対する Antigenase の開発

インフルエンザウイルスの流行は世界的脅威であり、A,B,Cの3種類の型のうち、A型が大流行を引き起こしている。インフルエンザウイルスはその表面に感染に必須なヘマグルチニン (HA) および増殖に欠かせないノイラミニダーゼ (NA) という2種類の膜タンパク質を有している。本研究では、感染に必須であると言われている HA 標的にこの分子を破壊する「スーパー抗体酵素」の開発を行ったところ、インフルエンザウイルス (H1N1 型ウイルス、広島型:2001)の HA を選択的に分解する Antigenase の取得に成功した。

2-4) TNF-αを分解する Antigenase

慢性関節リウマチ (RA) は、多発性関節炎を主徴とする原因不明の慢性炎症性疾患である。日本全国でRA患者は70万人とも100万人ともいわれ、その数は高齢化に伴い年々増加する傾向がある。また、女性の患者が圧倒的に多く、RA患者の8割が女性といわれているが、その原因は十分には解明されていない。しかしながら、最近の研究でRAの病態には炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのアンバランスが原因であることが明らかにされている。さらに、その中心的役割をしているサイトカインは、腫瘍壊死因子 (tumour necrosis factor; TNF) の TNF-α であるといわれている。そこで本研究ではこの TNF-α を標的分子としてこれを分解する「スーパー抗体酵素」の作製を試みた。その結果、ETNF-6 抗体は触媒三つ組み残基様構造を有していた。そこでこの抗軽鎖 (L 鎖) に注目し、抗原分解活性を検討した。その結果、反応時間12時間でヒ TNF-α (18.0kDa) を分解し始め、この分解と共に 12.0 kDa 付近に新しいバンドが出現し始めた。反応時間74時間では 18.0kDa に現れるヒ TNF-α のバンドはほとんど消失した。一方、ヒ TNF-α と同様の分子サイズを有するミオグロビンでは全く分解は起こらなかった。ヒト血清アルブミンに対

しても分解活性を示さなかったことから、ヒト TNF- α に対する Antigenase を取得することができた。

2-5)ヒト IgE を分解する Antigenase

現在、アレルギー患者数は急激に増加しており、多くの人々が花粉症等のアレルギー性鼻炎、食物アレルギー、喘息等の症状に苦しんでいる。これらの症状はI型アレルギーに属し、体内に侵入したアレルゲンに対し産生されたIgE抗体により引き起こされる。そこで、本研究ではヒトIgE分子を破壊できる「スーパー抗体酵素」の作製を試みた。その結果、5H5抗体軽鎖は通常の抗体酵素に見られる誘導期、活性期の2相性を示しながら、TP41-1ペプチドを約100時間で完全に分解した。さらに、5H5軽鎖とヒトIgEを反応させたところ、5H5軽鎖はヒトIgEの重鎖側(Fc部分)を選択的に分解し、IgEの軽鎖側には全く分解活性を示さなかった。IgEがアレルギーの原因物質として働くためには、そのFc部分で肥満細胞などに結合するからであり、今回取得した抗体酵素はこのFcを切断する能力を有していた。

2-6)ヒト型抗体軽鎖(Bence Jones Protein:BJP)の基礎および応用研究

種々の病態の多発性骨髄腫患者の尿から精製したBJPをブタ正常腎細胞であるLLC-PK₁に加えたところ、重症腎障害を合併する患者から得たBJPではLLC-PK₁は細胞が萎縮していた。この細胞は核DNA断片化を示すTUNEL染色で陽性を示した。ミトコンドリア活性を示すWST法にて細胞生存率を算定したところ、LLC-PK₁はBJPの濃度依存性に低下していた。腎合併症を有する患者から得た一部のBJPおよび腎合併症を有しない患者から得たBJPはLLC-PK₁に対して形態上影響を示さず、TUNEL染色は陰性で、WST法においても影響を示さなかった。細胞傷害性を示すBJPのcatalytic potentialを基質にChromozym TRY(z-Val-Gly-Arg-pNA)を用いて測定したところ細胞傷害性のないBJPに比べ数十倍高い値を示した。細胞傷害を示さないBJPはcatalytic potentialは低いか認められなかった。このことから高い抗体酵素活性を有するBJPは腎細胞に傷害性を示し、腎合併症をもたらす可能性が示唆された。

また、ガン細胞に傷害性を示すBJPを見出すために、種々のガン培養細胞(HepG2, DLD-1, ACHN A549)を培養し12種類の抗体酵素活性を有するBJPを加え細胞の形態学的変化を観察した結果、BJP(YAG)を加えたA549(肺癌細胞)は細胞が縮小萎縮していた。患者から採取したBJP(YAG)およびrecombinantで作製したBJP(YAG)ともに正常細胞に対しては影響を与えず培養ガン細胞に傷害性を示すことが判明した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

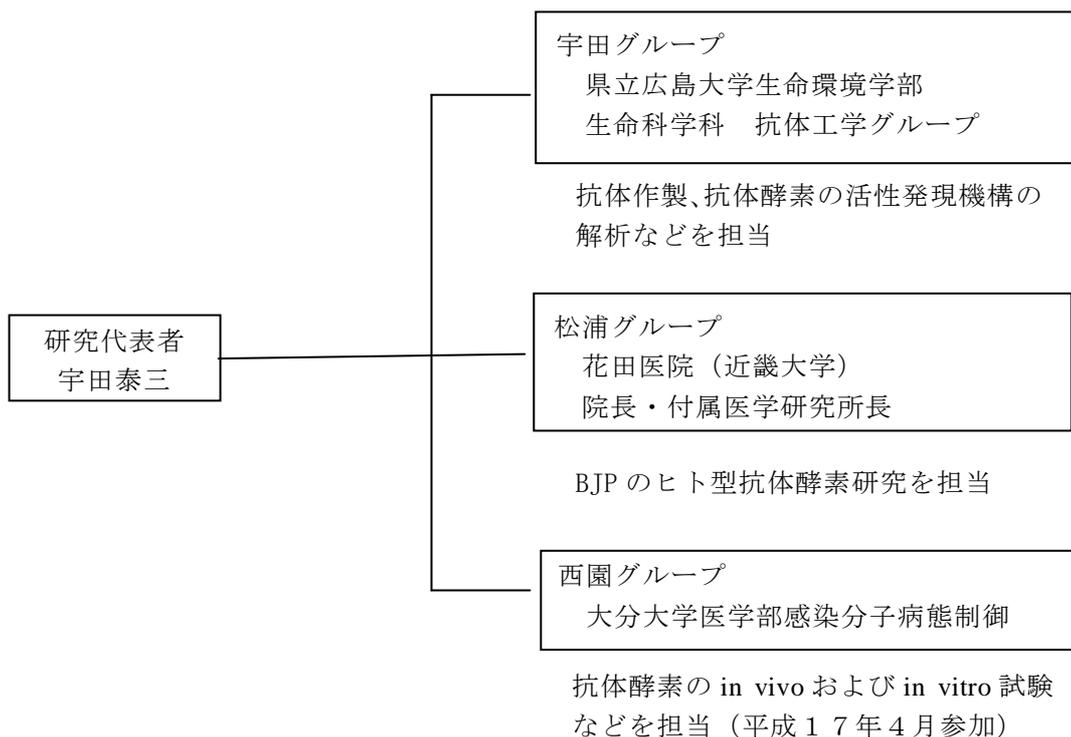
「宇田グループでは、なぜ、「スーパー抗体酵素」のような新機能を有する分子が自然に生成されてくるかの解明に取り組み、最終的に「スーパー抗体酵素」の応用展開にまでもって行くことを初期の研究構想として掲げた。その結果、「スーパー抗体酵素」の本質にせまる研究を行って、一般的作製法を見出すと共に、この方法に従って各種の標的タンパク質に対する「スーパー抗体酵素」の作製に成功した。さらに、

インフルエンザウイルスやピロリ菌に対する「スーパー抗体酵素」では in vitro および in vivo 試験にまで踏み込む事が出来た。

松浦グループでは、ある種の病気(多発性骨髄腫など)の患者の体液(血清あるいは尿)中に多く産生される Bence Jones Protein (BJP:ヒト抗体軽鎖)が、なぜ、アミダーゼあるいはペプチダーゼ活性を持つのか、また、それはどういった細胞にどのような影響を及ぼすのかの解明することを研究酵素として掲げた。その結果、ある種の BJP は酵素活性サイトを有し、そのアミノ酸配列のより、特異的に細胞を傷害することを明らかにした。

西園グループは CREST の後半から参加したが、抗体酵素の in vitro および in vivo 試験を行うと共に、ヒト型抗体の取得を研究構想に掲げた。その結果、小動物を用いた興味ある結果、ならびに、ヒト型の抗体ライブラリーの作製を行った。

(2) 実施体制



3・1 医療・福祉に役立つ「スーパー抗体酵素」の創製 (県立広島大学 宇田グループ;大分大学 西園グループ)

宇田 G 主要参加メンバー

県立広島大学生命環境学部:宇田泰三、一二三恵美、江頭直義
広島県立保健環境センター;高尾信一
(株)福山臨床検査センター:森原史子

西園 G 主要参加メンバー

大分大学医学部:西園晃

(1)研究実施内容および成果

1) はじめに

抗体という分子についての研究は過去何十年と行われてきており、免疫学的、生理学的、さらには生化学的性質など、ほとんど解明されていると行って良い。それらの性質を図1に示した。Fab ドメインに存在する可変領域(青丸)で抗原分子を認識すると、Fc ドメインが活性化され、エフェクター作用で抗原が破壊されるという機構で生体防御の一翼を担っている。しかし、図1の説明に赤字で示したが、「抗体には酵素作用はない」と言われてきた。

一方、よく知られているように酵素は、抗体で言えば抗原に相当する基質を化学変換して生成物に変える。しかし基質結合能力は抗体に比べれば、1万倍以上劣る。

長年、抗体と酵素の両方の性質を持つ分子はないかと、多くの研究者が挑んできたが誰も成功しなかった。唯一、Lerner 達の遷移状態アナログ法により作製された抗体触媒が例外である。しかし、この研究は、現在、ほとんど行われていない。ところが筆者らは天然に生成する抗体の中に抗原を酵素的に分解する「スーパー抗体酵素」の存在を見出した。ただし、どの抗体にもこの性質が備わっているわけではない。たまたま、そのような性質を有する抗体が存在するのか、あるいは、ある確率で生成してくるのか、また、それは意図的に作製できるのか、こうした事柄が全く解らない時点で、本研究が始まった。

以下に詳述するが5年間の CREST 研究を通じてこれらの不明なことがほとんど解明された。しかも、現時点ではほとんどの標的タンパク質に対して「スーパー抗体酵素」を作製できる一般的作製法を見出して、

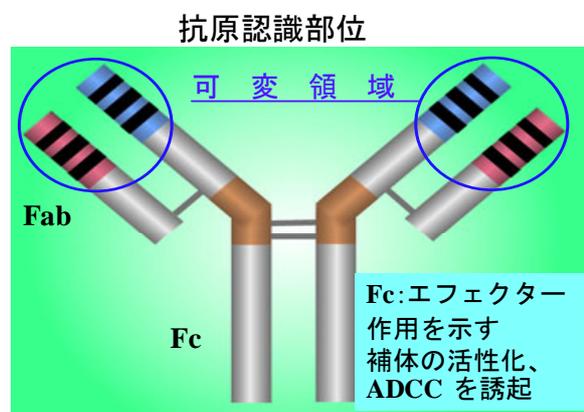


図1 抗体の特徴

1. 高い分子認識能 (高抗原特異性)
Fab領域
2. エフェクター作用 Fc領域;
例えば、補体の活性化
3. 酵素作用を持たない

悪性ウイルスや悪性細菌、さらには多くの国民が悩まされているアレルギーやリウマチの治療薬にまで焦点を当てた研究にまで発展してきた。

なお本研究が進展するにつれて、「スーパー抗体酵素」の本質が次第に明らかとなってきた。その結果、「スーパー抗体酵素」というのはこれまでの抗体の概念とは全く異なることが、明白になってきた。そこで、これまで「スーパー抗体酵素」と呼んでいたものを、新しく Antigenase (Antigen decomposing enzyme: 抗原分解酵素) と名付けた。以下の説明ではこの両者を使っているが、特別、使い分けているのではなく同一であると了解して頂きたい。

1) エイズウイルス(HIV)に関連した Antigenase

1-1 HIV の感染機構

HIV がどのようにヒトの細胞に感染、進入するかを図 2 に示した。HIV 感染はヒトの白血球表面に存在している CD4 というレセプターに HIV の外膜タンパク質 gp120 が結合する事から始まる。この gp120 が次に CCR5(あるいは CXCR-4) というケモカインレセプターに結合すると gp120 が外れ、その下にある gp41 が表面に出てきてヒト白血球の膜を貫通する。

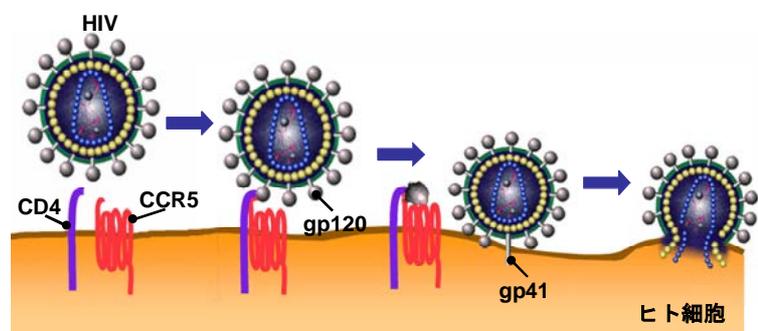


図2 エイズウイルスの感染機構

すると、HIV の内容物 (RNA, 逆転写酵素など) がヒトの白血球に注入されて感染が成立する。つまり感染に関与する分子は HIV 側では gp120 と gp41 の 2 種類であり、また、ヒト細胞側では CD4 と CCR5 (or CXCR4) の 2 種類である。ヒト細胞側の CD4 は生体防御に必須な分子であるのに比べ、CCR5 は欠損されていても健康に生活できる事が判っている。従って、感染に関与する分子として標的にし得るのは gp120、gp41、CCR5 の 3 種類である。つまり、これらのタンパク質のどれかあるいは全てを破壊すれば効率的に HIV 感染を抑制できるはずである。即ち、ウイルス側を攻撃すると同時に受容体の機能も破壊するという作戦である。「スーパー抗体酵素」(Antigenase) 研究のひとつの大きな課題として、この戦

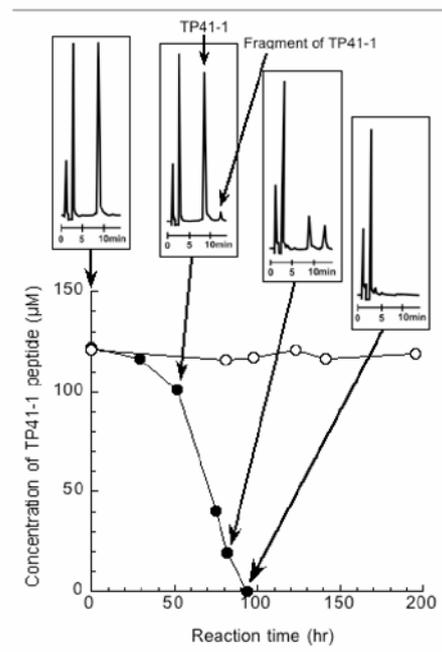


図3 「スーパー抗体酵素」41S-2-Lによる抗原ペプチド(TP41-1ペプチド)の酵素的分解反応

略に基づいて研究開発を行った。

1-2 HIV gp41 を破壊する Antigenase

我々は HIV 外膜タンパク gp41 の不変領域に着目し、この領域を構成するペプチド(RGPDRPEGIEEEGERDRD :TP41-1)を抗原としてマウスに免疫し、細胞融合により特異的に HIV gp41 に反応するモノクローナル抗体 (41S-2 mAb)を得た。この完全抗体より精製分離した軽鎖 (41S-2-L: Antigenase)は完全抗体である 41S-2 mAb と同じ特異性を示した。そして 41S-2-L を抗原ペプチド TP41-1 と混合すると、はじめはゆっくりとした速度で抗原ペプチドの分解が起こり、その後急速に分解される(図3)。はじめのゆっくりと分解の起こる期間を誘導期、高い活性を示す時期を活性期という。こうした2相性の反応プロファイルは抗体酵素特有のものであった。

さらに、この 41S-2-L を標的にした HIV-1 gp41 分子そのものと反応させたところ、約 14 時間で gp41 をほぼ完全に破壊した(図 4)。この時の条件は、Antigenase (0.6mM) . . gp41 分子 (1.8 mM)、反応温度 25°Cである。一方、HSA や BSA などは全く分解を受けなかった。狙ったタンパク質を完全分解した最初の Antigenase の例である。しかも通常の免疫法を用いて作製できたのである。この Antigenase の抗原ペプチドを分解する触媒効率は $k_{cat}/K_m = \sim 10^5 M^{-1} min^{-1}$ を示し、トリプシンの約 1/10 という高活性なものであった。

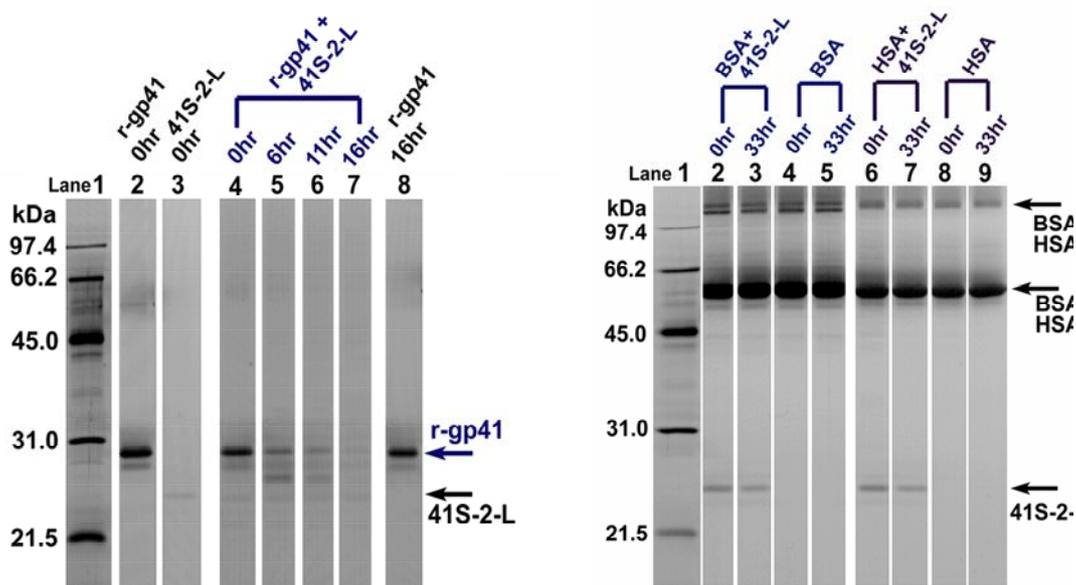


図4 Antigenase (41S-2-L)によるgp41の分解

r-gp41: recombinant gp41

BSA: Bovine serum albumin

HSA: Human serum albumin

先に述べたように、エイズウイルスの感染には HIV 側からみて gp120 と gp41 が深く関係している。我々は gp41 を破壊する Antigenase の作製にこのように成功したが、テキサス大学医学部の S. Paul らは gp120 を分解する抗体酵素を得ている。彼らの取得した方法は面白く、gp120 を抗原にして得たのではない。彼らは多発性骨髄腫やエイズウイルスに感染している患者血清から抗体を分離精製し、さらにそれを重鎖および軽鎖に分けて gp120 を分解する Antigenase を得たものである。不思議な事にエイズに感染した患者からではなく多発性骨髄腫(26例)の中から1例だけ gp120 に対する分解活性を有する Antigenase を見出した。得られた gp120 を分解する Antigenase (Laym と呼ぶ) は gp120 の 23-30 (Leu-Leu-Met-Ile-Cys-Ser-Ala-Thr) のアミノ酸配列を認識している。Laym はエイズウイルス(HIV-1)の MN, IIIB, SF2 株のどの gp120 に対しても同様の分解活性を示し、セリンプロテアーゼであると考えられている。

1-3 CCR5 を分解する Antigenase

図 5 に CCR5 の構造を示す。CCR5 の感染に深く関与している部分は第二細胞外領域(ECL2B)と N 末端である。従って、著者らはこれらのそれぞれに対する Antigenase の作製を進めている。

1-3-1 第二細胞外領域(ECL2B)を狙った Antigenase

CCR5 の第二細胞外領域の重要な配列を含む RSSHPYSQYQFWKNFQTLKG (ECL2B peptide) に BSA を conjugate して通常の免疫法および細胞融合法により6種類のモノクローナル抗体 ECL2B 系列を作製した。Antigenase の特徴として、その立体構造中に Asp、His、Ser からなる触媒三ツ組残基を持つことがあげられる。そこで、まず遺伝子解析により、得られた抗体の塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列から立体構造を分子モデリングにより構築した。この ECL2B 系列のうち、ECL2B-2 抗体軽鎖は Asp¹, Ser^{27a} (or Ser^{27e}), and His⁹³ (or His^{27d}) という触媒三ツ組残基を有していた。そこで精製した ECL2B-2 抗体を還元・アルキル化処理により重鎖

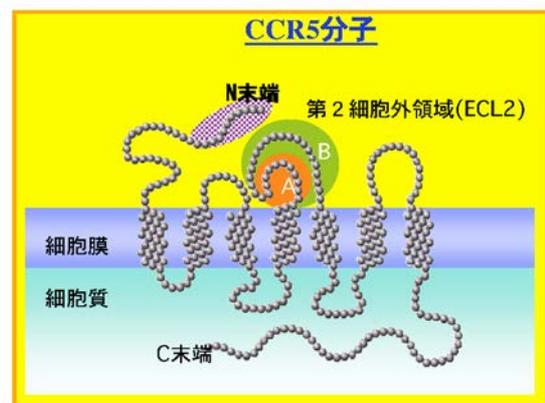


図5 CCR5分子の構造

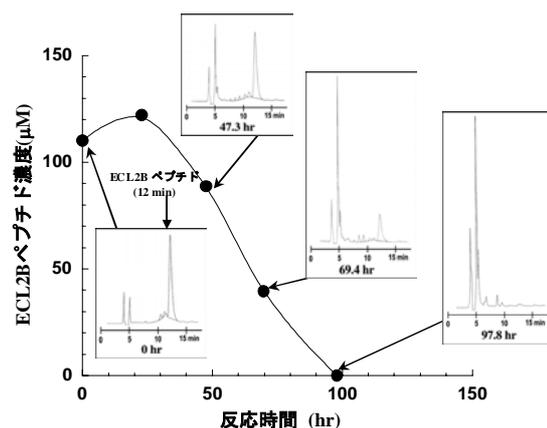
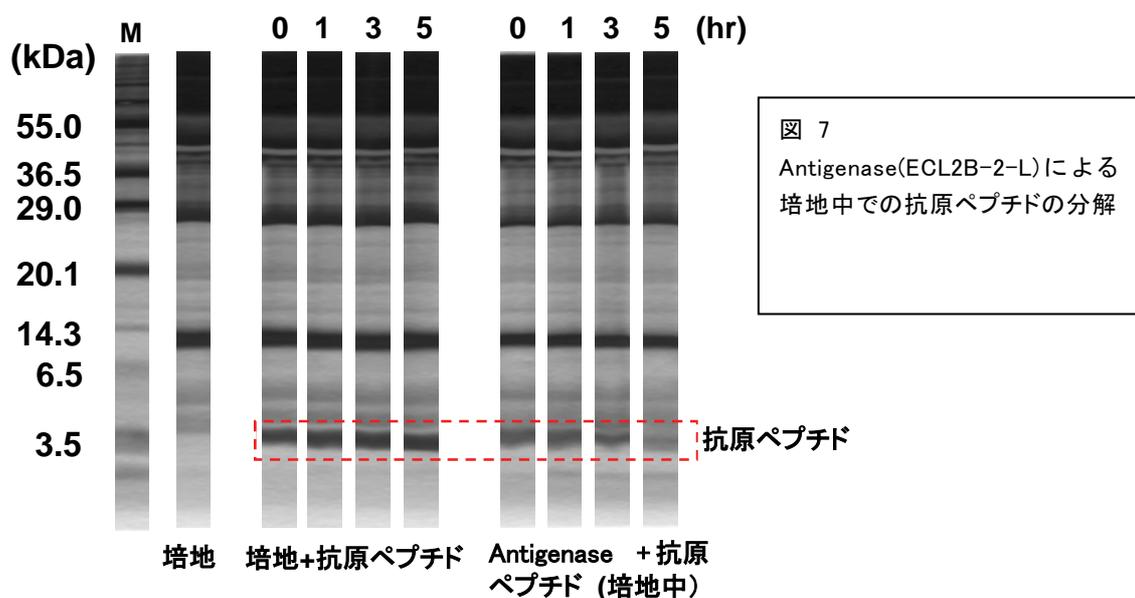


図6 Antigenase(ECL2B-2-L)による抗原分解反応

および軽鎖に分離し、サイズ排除 HPLC によって精製した。その後、透析によるリフォールディングを行って、抗原分解反応に用いた。反応に用いた上記の ECL2B peptide の変化は RP-HPLC で追跡した。その結果、予想通り抗原である ECL2B peptide の分解が始まり、最終的に ECL2B peptide は約 100 時間で完全

に消失した(図 6)。MALDI-TOF-MS による抗原切断部位の解析結果から、ECL2B-2 抗体軽鎖はエンドペプチダーゼの性質を持つことが示唆され、CCR5 第2細胞外領域配列を分解する Antigenase であった。速度論的解析により $k_{cat}/K_m=10^4 M^{-1} min^{-1}$ ($k_{cat}=2.2 min^{-1}$ と Antigenase としては非常に高いターンオーバー数)を示した。これはトリプシンとほぼ同等の酵素活性である。

この Antigenase を牛血清を含む培地中で試験したところ、ほかの多くの培地成分であるタンパク質は分解せず、抗原のみを特異的に分解していた(図 7)。



1-3-2 N 末領域を狙った Antigenase

CCR5 の N 末ペプチドを KLH と conjugate し、上述したと同様な手法で8種類のモノクローナル抗体を作製した。そしてこれら抗体の塩基配列を解析した結果、いくつかのクローンに触媒三つ組み残基様構造が見いだされ、Antigenase の獲得に目途がついた。

以上、所期の研究構想として立案してきた HIV の外膜タンパク質 gp41 およびヒト細胞上に発現しているケモカインセプター CCR5 の第2細胞外領域および N 末領域に対する Antigenase の作製が全て完成した。

今後、こうして開発した Antigenase をどのように効果的に使用するのが、もうひとつの課題である。筆者らは、現在、複数の Antigenase を同時に使用して、感染に関わる重要なタンパク質を一挙に、そして、全てを破壊するナノ標的高分子材料を考えている。そして、標的分子治療を志向したナノシステムの構築を図りたい。

2) *Helicobacter pylori* urease に対する Antigenase

2-1 ピロリ菌とは

通常、胃の中は強酸性下にあり細菌は生存しないと考えられてきた。しかし、1979年、オーストラリアの病理医 Warren は、多核白血球浸潤を伴う胃炎の前庭部粘膜表面には多数の螺旋菌が存在することを明らかにすると同時に、胃内が無菌ではないことを報告した。この菌は、冷却された状態では、蒸留水、生食水、海水中で数日間、室温下では1〜3日間で培養不可能となり、生存環境の悪化に伴い馬蹄型または球状型(coccioid form)へと変形する、などの理由から、分離培養は難しく、なかなか成功せずであった。ところが、1982年 Marshallらにより胃内の螺旋菌の分離培養が成功したことで、この菌と胃疾患の関連が世界的に注目されるようになった。1989年に Goodwinらにより *Helicobacter* 属が提唱・新設された後に *pylori* に分類され、*H.pylori* となった。その後、細菌学者の Annear により螺旋形を維持できる培養法が確立された。この菌は Gram 陰性に分類され、緩やかな右巻きの螺旋状桿菌である(図8)。一方の極に数本(4〜8本)の有鞘鞭毛を有し、その形態学的特徴が螺旋状であることから、ヘリコプターのヘリコにちなんで *Helicobacter* と名付けられ、最初の発見場所である胃の末端部分(幽門=*pylori*)に好んで生息することから、*H.pylori* と命名された。

この *H.pylori* の発見から約20年数の間に目覚ましい研究がなされ、*H.pylori* が、これまで胃酸の過分泌が主な原因とされてきた胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍といった潰瘍症に深く関係していることが明らかになった。さらに現在では、胃癌との関連性が強く示唆されている。

2-2 ピロリ菌の性質;

H.pylori がこのような疾患を引き起こす原因の一つとして同菌が産生する urease が重要であるとされている。urease は菌体表面と細胞質に存在し、菌体タンパクの約5〜6%を占める。この酵素は2つのはたらき

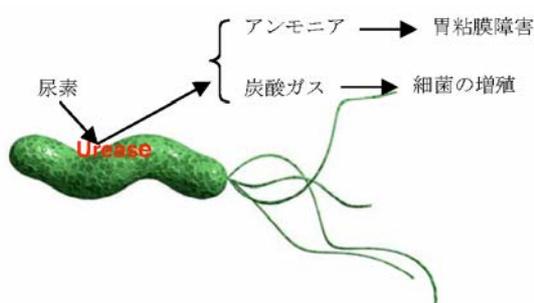
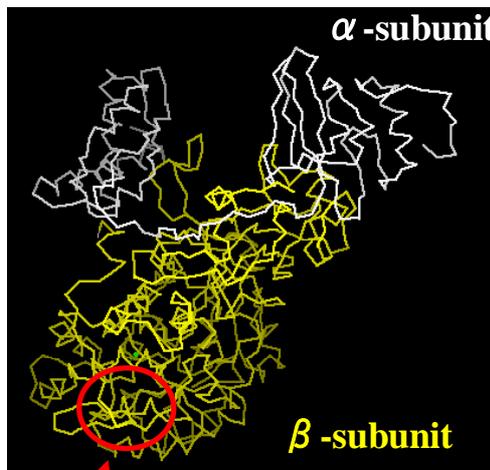


図8 *Helicobacter pylori* の Urease の生体内機能
H.pylori の図は www.hpylori.com.au/picturebook.html より転載

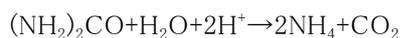


active site

図9 ヘリコバクターピロリ菌ウレアーゼの立体構造

をもつ。1 つは細菌が胃粘膜に到達する際に、胃酸の中和系としてはたらき、もう 1 つは胃粘膜組織を障害することにより細菌の増殖の場を拡大する際に作用する。urease は分子量がそれぞれ 26.6kDa (α -subunit)と 60.5kDa (β -subunit)の二つのサブユニットからなり(ヘテロダイマー)、これらが6つ重合し($\alpha_6\beta_6$)、530kDa のディスク状の巨大分子を形成している β -subunit にはニッケル(Ni)イオンを保持しており、ここが活性サイトであると考えられている(図 9)。

H. pylori urease は、胃に定着するために外膜やペリプラスムに多く存在しており、1 モルの尿素を加水分解して 2 モルのアンモニアと1モルの炭酸ガスを生じる反応を触媒する。



この反応により、1 モルの尿素が分解されると同時に2つの H^+ を補足すると共に、アンモニアを生成し胃酸を中和する。また、*H. pylori* urease により生じる NH_3 は周囲の胃液ムチンや粘膜細胞に直接作用をおよぼし、胃液ムチンの粘度を低下させることでムチナーゼのはたらきを助け、その粘膜保護作用を低下させる。このようにウレアーゼはピロリ菌の胃内の定着に深く関与している重要な酵素である。

2-3 ピロリ菌のウレアーゼを破壊する抗体酵素

前述したようにピロリ菌の胃内での生着を阻止するためにはピロリ菌が産生するウレアーゼを破壊すればよい。従って、この課題に取り組んだのでその結果を下記に記述する。

その β -subunit に活性サイトが存在するため、これを特異的に破壊するのが理にかなっている。

2-4 HpU-9 抗体の性質

精製した *H. pylori* urease を抗原としてマウスに免疫し、細胞融合法によりモノクローナル抗体を作製した。その中で HpU-9 抗体は面白い性質を示した。完全抗体である HpU-9 モノクローナル抗体(mAb)はウレアーゼの α -subunit に強く、 β -subunit に弱く反応した。ところが、その完全抗体から分離精製した重鎖(heavy chain) および軽鎖(light chain) は α -subunit に弱く、逆に、 β -subunit に強く反応した(図 10)。これは予想外の結果であるが、おそらく重鎖と軽鎖が接近したときには別の相互作用が働いて、特徴的な抗原特異性を発揮するものと思われる。

HpU-9 抗体軽鎖

HpU-9 抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の遺伝子配列解析から、この軽鎖は V κ germline gene cs1 に由来していて Asp1- Ser27a-His93 より成る触媒三ツ組残基様構造を持つ。そのアミノ酸配列を基に分子モデリングを行うと、この抗体軽鎖(HpU-9-L)には2種類の触媒三ツ組み残基が併存している可能性を示している(図 11:詳細は6)を参照のこと)。従って、この HpU-9-L には抗原分解活性が存在すると予測できる。

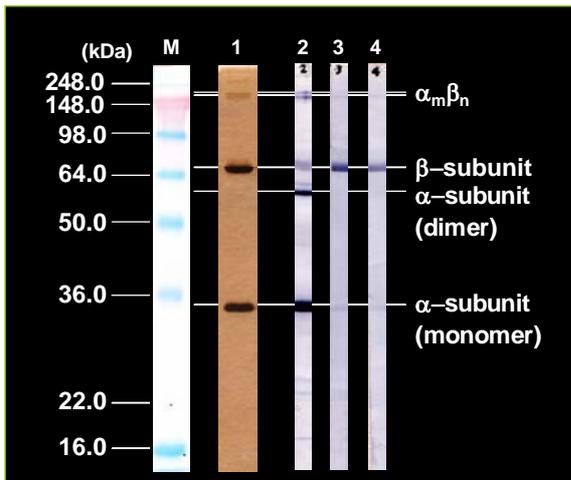


図10 HpU-9抗体およびその軽鎖の免疫学的特徴

SDS-PAGEの結果

Lane 1; urease, lane2; HpU-9 mAb, lane 3; heavy chain, lane 4; light chain

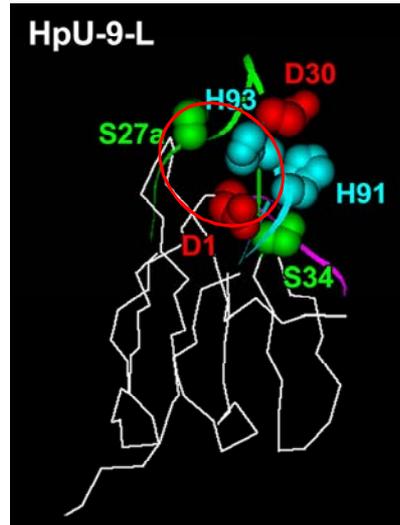


図11 HpU-9-Lの分子モデリング

4-1-1 ペプチド基質の分解

図 12a はペプチド基質 (SVELIDIGGNRRIFGFNALV D)を HpU-9-L と混合したときのグラフである。ペプチド基質は、反応初期にはゆっくりと(20-30時間くらいまで)、それから急速にペプチド基質を分解し、約70時間で完全に分解している。Antigenase はほとんどのケースでこうした初期の遅い反応(誘導期)とそれに次ぐ、早い反応(活性期)という2相性の反応プロファイルを示す。面白いことに、一度このように基質を分解してしまうと、図 12b に示す様に、この系に再度基質を添加すると、今度は誘導期を示さず、ただちに基

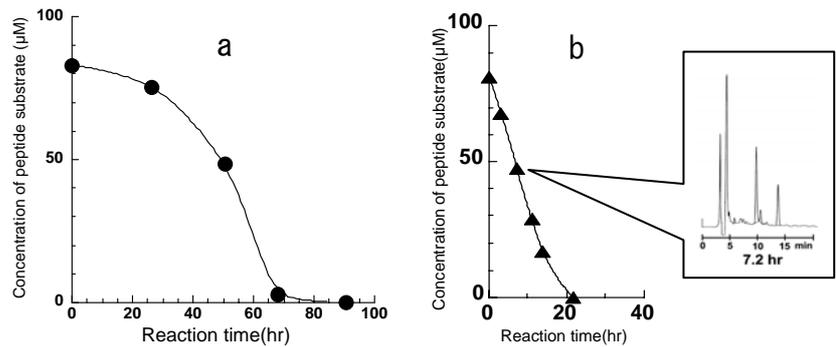


図12 HpU-9-Lによるペプチド基質の分解

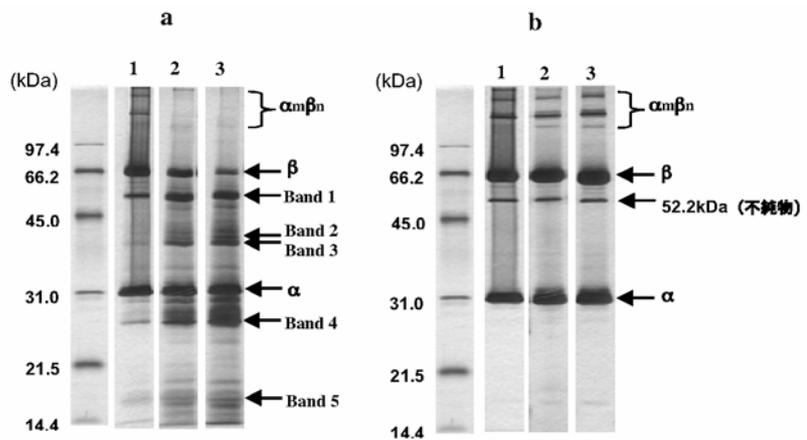


図13 HpU-9-Lによるピロリ菌ウレアーゼの分解 SDS-PAGEの結果〔銀染色〕

Lane 1; 0 hr, lane 2; 4 hr, lane 3; 8hr

質の分解を行う。最初の誘導期は、Antigenase が高い活性を獲得するために必要な期間である。この間に、Antigenase は単量体から多量体に移行する。実際に標的タンパク質を破壊するときには、一度、基質のペプチドを前もって、分解しておくのである。すると Antigenase はそのタンパク質と

```

MKKISRKEYV SMYGPTTGDK VRLGDTDLIA EVEHDYTIYG EELKFGGGKT LREGMSQSNN
PSKEELDII TNALIVDYTG IYKADIGIKD GKIAGIGKGG NKDMQDGVKN NLSVQPATEA
LAGEGLIVTA GGIDTHIHFI SPQQIPTAFA SGVTTMIGGG TGPADGTNAT TITPGRRLK
WMLRAAEYS MNLGFLAKGN ASNDANLADQ IEAGAIGFKI HEDWGTPPSA INHALDVADK
YLVQVAIHDT TLNEAGCVED TMAIAGRTM HTPHTEGAGG GHAPDIKVA GEHNILPAST
NPTIPFTVNT EAEHMDMLMV CHHLDKSIKE DVQFADSR PQTIAAEDTL HDMGIFSITS
SDSQAMGRVG EVITRTWQTA DKNKKEFGRL KEEKGDNDNF RIKRYLSKYT INPAIAHGIS
EYVGSVEVGK VADLVWSPA FFGVKPNMII KGGFIALSQM GDANASIPED QPVVYREMFA
HHGKAKYDANAITFVSOAAVDKGIKEELGLEARQVLPVKNCRA NITKKDMQFNADTTAHIEVNP
ETHVFDGKE VTSKPANKVS LAQLFSIF

```

図14 ウレアーゼのβ-subunitの配列とHpU-9-Lによる切断箇所

出会うと直ちに攻撃を開始し、完全分解へと向かう。因みに、Antigenase(HpU-9-L)のペプチド基質分解能を動力学的に求めたのが、反応速度定数(kcat)= 0.11 min⁻¹、ミカエリスメンテン定数(Km)= 1.6 x 10⁻⁵ Mであった。触媒効率(kcat/Km)は 7 x 10³ M⁻¹.min⁻¹となった。これはタンパク質やペプチドを無差別(非特異的)に切断するトリプシンと較べると約 1/10 に相当する活性である。以下に示すように標的タンパク質しか破壊しない Antigenase はゆっくりと確実に相手を破壊する能力を有している。この例を下記に示す。

2-5 *H. pylori* urease の分解

H. pylori 菌から urease を精製し、それを上記で説明したように活性化した HpU-9-L と反応させた結果を図 13 に示した。Urease と HpU-9-L を混合した直後(図 13a の lane 1)から Band 3, 4, 5 のような urease の分解断片が現れ始め、反応時間4時間後(lane 2)には、これらの band が非常に強くなる。と同時に(本来α₆β₆の形をとる urease が部分的に破壊されてより小さな形態の)α_mβ_nの band が消失している、また、8時間後にはこうした傾向がますます進んでいる事が、コントロール実験(図 13b)と比較すれば良く判る。反応時間8時間ではβ-subunit の band が薄くなっているのがはっきり判る。一方、α-subunit はほとんど変化していない。因みに8時間の反応でα_mβ_n はほとんどなくなっており、単量体のβ-subunit で65%が消失していた。これに対し、α-subunit は 10%しか分解されていなかった。同時に試験したウシ血清アルブミンやヒト血清アルブミンには変化は全く認められなかったことから、HpU 9-L は *H. pylori* urease のβ-subunit を特異的に分解する Antingenase であると言

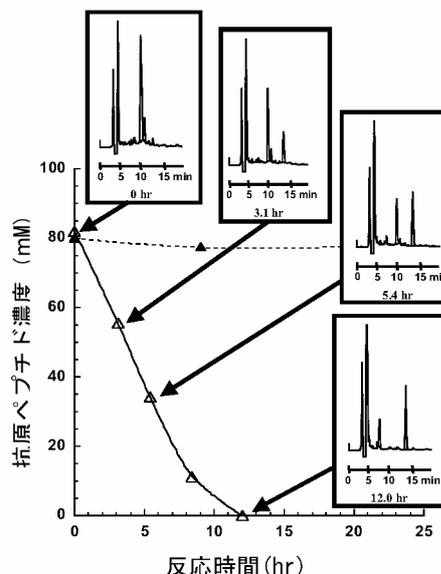


図15 HpU-2-Hによる抗原ペプチドの分解反応(ペプチド再添加後の反応プロファイル)

える。

HpU 9-L による β -subunit の分解断片を調べてみると、L121-A122, E124-G125, S229-A230, Y241-D242, M262-A263 のように矢印をつけたところが切断されていた(図 14)。なかでも E124-G125 は強い band(1)を与え、ここが最初に切断されたと推定された。

2-6 HpU-2 抗体重鎖 (HpU-2-H)

抗体の酵素活性は多くの場合軽鎖側にあるが、時に重鎖側にも出現する場合もある。

HpU-2 抗体は精製ウレアーゼをマウスに免疫して得たモノクローナル抗体であるが、そのエピトープはすでに決定している。アミノ酸配列は SVELIDIGGNRRIFGFNALVD である。このエピトープペプチドと HpU-2 抗体重鎖 (HpU-2-H)を混合すると、

通常のと相性の反応プロファイルを示しながら、エピトープペプチドを完全に分解する。図 15 には、この分解反応の後、再度、エピトープペプチドを反応系に添加したときの分解反応のプロファイルを示した。エピトープペプチドの分解断片が保持時間 13 min あたりに現れて、反応時間とともに変化して行く様子が良く解る。反応分解産物を解析したところ、エピトープペプチドの G15-F16 と R12-I13 間が切断されていた。

上記と同様な実験条件下で、HpU-2-H と *H. pylori* ウレアーゼとを混合した。その結果を図 16 に示す。図 16a がその分解結果であり、

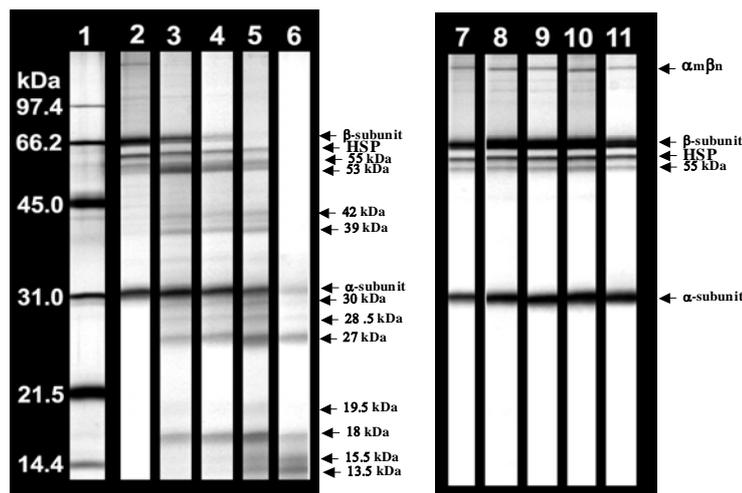


図16 HpU-2-Hによるピロリ菌ウレアーゼの分解

Lane 2-6; HpU-2-H + urease

Lane 7-11; urease

Lane 2&7; 0 hr, lane 3& 8; 4 hr, lane 4& 9; 8 hr,
lane 5&10; 20 hr, lane 6&11; 99 hr,

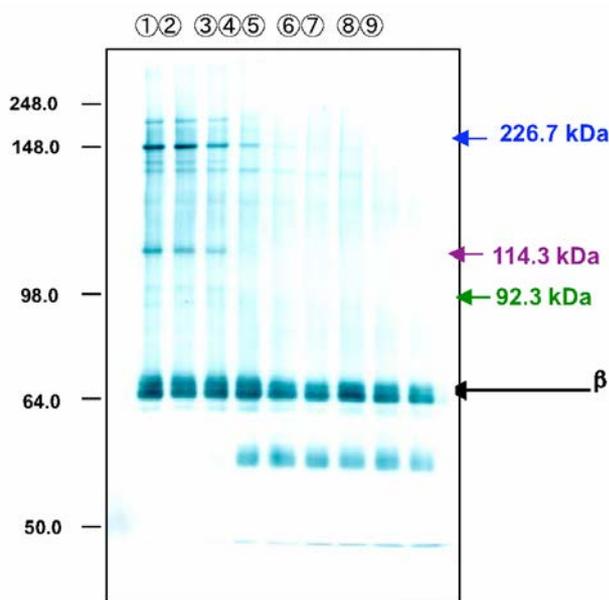


図17 ピロリ菌体とHpU-2-Hとの反応
(SDS-PAGE 後、western blot を行ったもの)

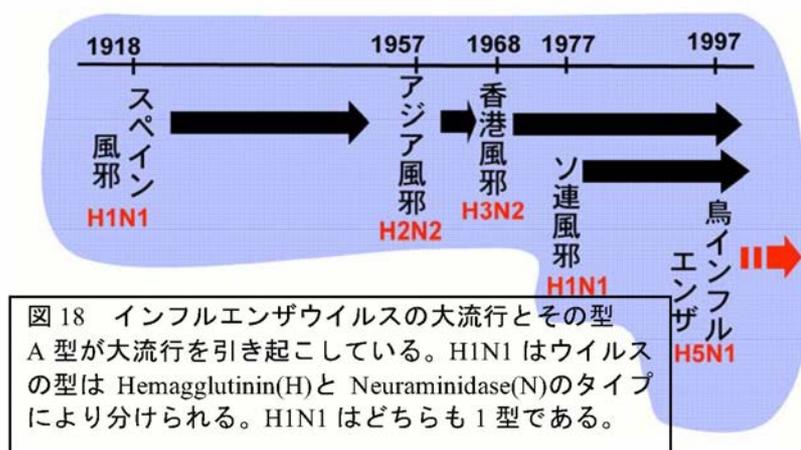
図 16b がコントロール実験である。Lane 2, 3, 4, 5, 6 がそれぞれ反応時間 0, 4, 8, 20, 99 時間に対応する。コントロールでは同じ反応時間が lane 7, 8, 9, 10, 11 である。

反応時間 0 時間 (lane 2)ではほとんど変化が見られないが、4 時間 (lane 3)で単量体の β -subunit が薄くなり、同時に 53, 42, 39, 28.5, 27, 19.5, 18.0 kD に新しい band が出現している(単量体の β -subunit のすぐ下の band は精製で十分に取り除かれなかった HSP である)。逆に、 $\alpha_m\beta_n$ の band はほぼ消失している。8時間(lane 4)では β -subunit の band がかなり薄くなり、20時間で完全に消失している。多くの新しく出現したバンドは、反応時間と共に濃くなり、その後、さらにそれらの分解が進み、15.5 や 13.5 kDa により小さな band が現れて、分解が逐次的に進行しているのが良くわかる。 β -subunit の消失に比べ、 α -subunit のそれは変化が少ない。この実験においても *H. pylori* ウレアーゼと関係のないウシ血清アルブミンやヒト血清アルブミンは同じ条件でほとんど分解を受けない。従って、HpU-2 抗体は重鎖側に特異的に抗原を破壊する能力のあることが判る。

精製ウレアーゼだけでなく、培養している *H. pylori*と HpU-2-H との反応を追跡したのが図 17 である。図中に示した反応時間は①: 0 hr, ②: 5 hr, ③: 10 hr, ④: 24 hr, ⑤: 48 hr, ⑥: 72 hr, ⑦: 96 hr である。この結果では、反応時間10時間あたりから単量体の β -subunit が分解され、その下に分解断片のバンドが明確に認められる。また、多量体である $\alpha_m\beta_n$ の分解もかなり進んでいる。抗体酵素が菌体に有効に作用することは、これまでの医薬品では到達し得なかった特徴ある性能を持つことを示している。

3) インフルエンザウイルスに対する Antigenase の開発

インフルエンザウイルスの流行は世界的脅威であり、A,B,C の3種類の型のうち、A型が大流行を引き起こしている(図 18)。インフルエンザウイルスはその表面に感染に必須なヘマグルチニン (HA) および増殖に欠かせないノイラミナーゼ (NA) という2種類の膜タンパク質を有している(図 19)。



本研究では、感染に必須であると言われている HA を破壊する「スーパー抗体酵素」の開発を行った。

3-1 インフルエンザウイルスのヘマグルチニンを分解する HA1-2-H

A型ウイルスでは16種類(H1~16)の亜型が存在しており、タイプによって抗原性が大きく異なる。これまでヒトからヒトへの感染を起こしているのはヘマグルチニンの型(HA型あるいはH型で表す)がH1, 2, 3型のウイルスである。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)は、ウイルスのヒト繊毛上皮細胞への感染初期に関与する外膜タンパク質であることは先に述べた。HAの構造を図に示す。HAは2つのサブユニットからできており、HA1およびHA2である。この両サブユニットには保存領域の存在することが知られている。

そこで、まず、H1およびH2型のHAを持つウイルスに効果的な「スーパー抗体酵素」の作製を試みた。H1型およびH2型のHAに共通して存在する2カ所の保存領域「TGLRN(HA1サブユニットの318-322)」および「GITNKVNSVIEK(HA2サブユニットの47-58)」を選び出した(図20)。この配列を環状に繋いだペプチドと直鎖状に繋いだペプチドを合成し、これらをハプテンとしてマウスに免疫し、細胞融合法によりモノクローナル抗体を作製した。得られたHA1-1, HA1-2抗体はインフルエンザウイルスA型のH1N1とは強く反応した。また、弱くではあるがH2N2とも反応している様子が伺えた。

これら両抗体であるHA1-1, HA1-2の遺伝子解析を行い、推定されたアミノ酸配列をもとに、立体構造の分子モデリングを行った。その結果、両抗体ともにH鎖の超可変領域近傍に触媒三ツ組残基様構造を持つと推定された。この抗体(HA1-2)のH鎖またはL鎖と抗原を無菌的に25℃で反応させて、抗原の変化を調べた結果、抗原ペプチド濃度は経時的に減少した。MALDI-TOF-MASSで解析したところ、複数の切断されたペプチドフラグメントを検出した。また、ウイルス粒子に対する分解実験ではH1N1型ウイルス(広島型:2001)のHAを選択的に分解した。

現在、この抗体酵素を使ってin vitro試験を実施しているところである。

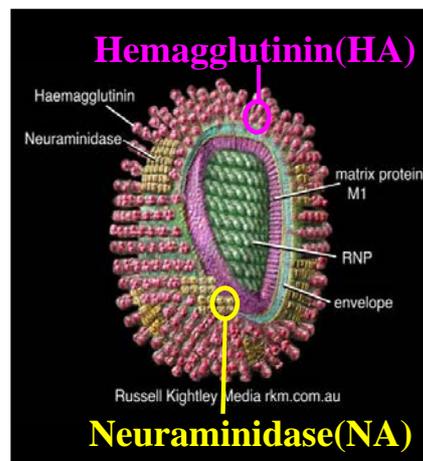


図19 インフルエンザウイルスの模式図
ウイルスの膜表面にHAとNAの2種類のタンパク質が存在する

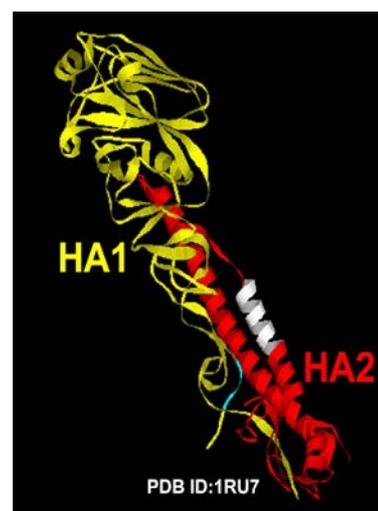


図20 ヘマグルチニンの構造
TGLRN-GITNKVNSVIEKが保存領域として知られている。

3-2 抗原の遺伝子発現

一方、本研究と関連して、上記抗体酵素の反応性を詳細に調べるために、ヘマグルチニンのHA-2ドメインを大腸菌で発現させ、かつ、この refolding を行って免疫学的にインフルエンザウイルスと変わらないHA-2分子を取得している。

4) TNF- α を分解する Antigenase

自己免疫疾患は、自己成分が異物として認識されることにより、自己抗体が産生されたり、自己反応性リンパ球が出現したりする状態(自己免疫と呼ばれる)によって引き起こされる病態である。通常、免疫系は体の中に侵入した細菌やウイルスを排除して体を防御するように働くが、自己に対して過剰な免疫応答を起こさない。つまり、自己成分は免疫寛容を獲得しているのである。しかし、自己免疫疾患では、免疫寛容に何らかの異常が生じ上記の病態が引き起こされる。

自己免疫疾患の代表的な疾患としては、例えば、慢性関節リウマチ、橋本病、全身性エリマトーデスなどがある。

慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)は、多発性関節炎を主徴とする原因不明の慢性炎症性疾患である。日本全国でRA患者は70万人とも100万人ともいわれ、その数は高齢化に伴い年々増加する傾向がある。また、女性の患者が圧倒的に多く、RA患者の8割が女性といわれているが、その原因は分かっていない。

RAの病因には、遺伝、免疫異常、内分泌、環境要因などが複雑に関与していると推測されている。しかし、はっきりとした病因は判明していない。病変の主座は関節滑膜であるが、進行すれば軟骨・骨を侵し、関節組織の破壊や変形へと至る。多くの関節が腫れ、そして痛みを伴い、歩くことをはじめ、日常生活動作が徐々に障害される難病である。関節以外に皮膚、肺、腎などの全身症状も伴うことも少なくない。病理組織学的には、リンパ球やマクロファージの炎症性細胞の浸潤、滑膜細胞の増殖などが起こるといわれている。

RAの関節液あるいは滑膜細胞を用いた研究において、RAの病態には炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのアンバランスが原因であることが明らかにされている。さらに、その中心的役割をしているサイトカインは、腫瘍壊死因子(tumour necrosis factor; TNF)のTNF- α であるといわれている。具体的には、RA患者の関節液では、TNF- α の濃度上昇が見られる。濃度が上昇したTNF- α は、(1)血管内皮細胞の接着分子の発現を誘導することにより、リンパ球などの白血球が炎症部位に浸潤するのを促進し、(2)滑膜細胞に作用して、様々な炎症性サイトカインを産生させ、(3)破骨細胞の分化・活性化を促進させることにより、関節破壊を誘発し、(4)線維芽細胞を活性化し、線維芽細胞を増殖させるといった作用を示すことにより、関節破壊、炎症の持続・慢性化を起こすと考えられている。

近年、自己免疫疾患ではT細胞、B細胞、マクロファージなどから様々なサイトカインが産生されている

ことが分かってきた。そのため、サイトカインを自己免疫疾患の治療に用いることに注目が集まっており、抗サイトカイン療法臨床応用が既に始まっている。例えば、サイトカインと特異的に結合し、その機能を阻害するモノクローナル抗体や、サイトカインの働きを阻害する可溶性受容体や拮抗物(アンタゴニスト)の利用が検討されている。また、サイトカインの産生異常との関連が知られている疾患は、自己免疫疾患だけではなく、例えば、慢性閉塞性肺炎疾患(COPD)についても、サイトカインの産生異常と疾患との関連性が知られている。このように、サイトカインは、様々な疾患の病態に関与しており、現在、サイトカインを標的分子とした疾患の治療や予防に関する技術の開発が求められている。

TNF- α を初めとする炎症性サイトカインは、毛細血管内皮細胞の接着分子を表面に出現させることで炎症性白血球の浸潤を促したり、関節の滑膜細胞に働きかけ軟骨や骨を破壊する matrix metalloproteinase の分泌を促すなど、リウマチ炎症病態のさまざまな過程に関与している。

本研究構想は、リウマチやCOPDのようなサイトカインの産生異常により発症する疾患を予防または治療する目的で用いることが可能な抗体酵素を作製することにある。本研究では、TNF- α をマウスに免疫し、通常の細胞融合法により抗ヒト TNF- α 抗体産生ハイブリドーマを得ることから取りかかった。その結果、表1に示す抗体産生ハイブリドーマ-ETNF 系列を得た。これらの抗体は TNF α とは関連しないタンパク質である TNF- β , H-IgA, H-IgM, H-IgE, HSA, H-hemo, BSA, KLH とは交差反応を起こさなかった。

表1 TNF α に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ

株名	アイソタイプ	株名	アイソタイプ
ETNF-1	IgG ₁ (κ)	ETNF-10	IgG ₁ (κ)
ETNF-2	IgG ₁ (κ)	ETNF-11	IgM(κ)
ETNF-3	IgG ₁ (λ)	ETNF-12	IgM(κ)
ETNF-4	IgG ₁ (κ)	ETNF-13	IgM(κ)
ETNF-5	IgG ₁ (λ)	ETNF-14	IgM(κ)
ETNF-6	IgG ₁ (κ)	ETNF-15	IgM(κ)
ETNF-7	IgG ₁ (κ)	ETNF-16	IgG ₁ (κ)
ETNF-8	IgG _{2b} ,IgM	ETNF-17	IgM(κ)
ETNF-9	IgG ₁ (κ)		

これらの中のいくつかの抗体について遺伝子配列の解析を行ってアミノ酸配列を推測した。そのアミノ酸配列を基に、抗体の3次元構造をコンピューターにより分子モデリングした。ETNF-6 抗体は触媒三つ組み残基様構造を有していた。そこでこの抗軽鎖(L鎖)に注目し、抗原分解活性を検討した。その結果、反応時間12時間でヒト TNF- α (18.0kDa)を分解し始め、この分解と共に 12.0 kDa 付近に新しいバンドが出現し始めた。反応時間74時間では 18.0kDa に現れるヒト TNF- α のバンドはほとんど消失した。一方、ヒト TNF- α と同様の分子サイズを有するミオグロビンでは全く分解は起こらなかった。ヒト血清アルブミンに対しても分解活性を示さなかったことから、ヒト TNF- α に対する Antigenase を取得することができた。将来、血中 TNF- α の検査と、リウマチなどの炎症に効く薬としての開発が待たれる。

5) ヒト IgE を分解する Antigenase

アレルギーは抗原と接触してから発症するまでの時間によって、即時型過敏症(immediate-type hypersensitivity)と遅延型過敏症(delayed-type hypersensitivity)との二つのグループに分類される。即時型過敏症は抗体により引き起こされる症状で、アレルギー発症の機構からI型からIII型に分類されている。

現在、アレルギー患者数は急激に増加しており、多くの人々が花粉症等のアレルギー性鼻炎、食物アレルギー、喘息等の症状に苦しんでいる。これらの症状はI型アレルギーに属し、体内に侵入したアレルゲンに対し産生されたIgE抗体により引き起こされる。

IgE抗体を介したアレルギーの発症機構はほぼ解明されている。まずアレルゲンが体内に侵入し、アレルゲンに特異的なIgEが産生される。IgE抗体値があるレベルまで上昇すると、IgE抗体のFc部分と結合するFc ϵ レセプターを持つ肥満細胞(mast cell)と好塩基球(basophile)という特殊な細胞にIgE抗体が結合しはじめ、長期にこれらの細胞と結合したまま血中に存在する。再度アレルゲンが侵入した場合、抗原抗体反応が惹起され、この刺激で肥満細胞や好塩基球からヒスタミンなどの化学伝達物質の入った顆粒が細胞外に放出される(脱顆粒反応(degranulation reaction))。

この脱顆粒反応により放出されたヒスタミン、SRS-A(slow reacting substance of anaphylaxis)や好酸球走化性因子等の化学伝達物質により血管の浸透性の増大、平滑筋の収縮、分泌液を分泌する機能の増大などが起こり、アレルギー症状を引き起こす。また、好酸球が反応局所に集積するので、アレルゲンが除去される。こうした機構からIgE抗体はアレルギーを引き起こすが、その障害反応を通じてアレルゲンの粘膜からの侵入や全身への拡散を防いだり、除去する為に働くと考えられている。

現在、I型アレルギーの治療法はいくつかあるが、その一つに脱感作療法がある。この方法は、アレルギーを誘発しない程の少量のアレルゲンを期間を置いて数回注射し、予めアレルゲンに対するIgG抗体を産生させておく。そして再度侵入したアレルゲンにこの抗体が結合することによって、IgE抗体のアレルゲンへの結合が阻害され、アレルギーが抑制される。その他に、脱顆粒を阻害する医薬や、放出された化学伝達物質の作用を阻害する医薬の研究がすすめられている。また、IgEと結合する抗IgE抗体をI型ア

ルギーの治療に用いることについても報告されている。

しかし、従来のヒトIgEを認識しヒトIgEの中和活性を有する抗IgE抗体においては、抗IgE抗体と抗原であるIgEとは最大で1:2の分子の量論比でしか結合しないため、使用する抗IgE抗体の量が必然的に多くならざるを得ないという問題がある。また、ヒトIgEを破壊して完全にその機能を失わせることは不可能であった。

本研究構想は、血中ヒトIgE両あるいはその機能を低減するためにこれまでの方法に比べ、使用する抗IgE抗体の量をかなり低減することが可能なヒトIgE抗体に対する抗体酵素をする事である。

ヒトIgEを免疫抗原に用いて、マウスに免疫後、スクリーニング、クローニングを繰り返し、表2に示す11種類の抗ヒトIgEモノクローナル抗体産生細胞を確立した。いずれもヒトIgEと特異的に反応し、他のタンパク質とは反応しなかった。

表2 ヒトIgEに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマー

株名	アイソタイプ	株名	アイソタイプ
5H5	IgG _{2a} (κ)	5H10	IgG _{2b} (κ)
1E3	IgG _{2a} (κ)	8F5	IgG _{2a} (κ)
10H10	IgG ₁ (κ)	6H9	IgG ₁ (κ)
5C4	IgG ₁ (κ)	3E8	IgG _{2b} (κ)
4C4	IgG _{2a} (κ)	4C5	IgG _{2a} (κ)
3F2	IgG _{2a} (κ)		

3E8,4C5 が human IgG に交差反応した以外はどれも human IgE に特異的であった。

次に、上記のいくつかの抗 IgE 抗体産生ハイブリドーマーより抗体遺伝子を抽出し、その塩基配列を決定した。推定されたアミノ酸配列を用いて抗体の立体構造を AbM、及び Insight II を用いて構築した。その結果、5H5 の軽鎖(L 鎖)に触媒三つ組残基様構造が見られた。そこで 5H5 抗体の L 鎖を分離精製し、TP41-1 ペプチドとの反応性を検討した。5H5-L 鎖は通常の抗体酵素に見られる誘導期、活性期の2相性を示しながら、TP41-1 ペプチドを約 100 時間で完全に分解した。さらに、5H5-L 鎖とヒト IgE を反応させたところ、5H5-L 鎖はヒト IgE の重鎖側(Fc 部分)を選択的に分解し、IgE の軽鎖側には全く分解活性を示さなかった。IgE がアレルギーの原因物質として働くためには、その Fc 部分で肥満細胞などに結合するからであり、今回取得した抗体酵素はこの Fc を切断する能力を有することから、将来展開が楽しみである。

所期の研究酵素の通りヒト IgE を分解する Antigenase を得た。この Antigenase は興味ある性質を有しており、将来、血中 IgE の簡易定量と、I型アレルギーの治療に使いたいと考えている。しかしながら、解決

しなければならない課題は抗原であるヒト IgE をもって短時間で分解する能力を付加する事である。

6) 「スーパー抗体酵素」の酵素活性発現メカニズムの解明と効率的作製法

6-1 抗体酵素に共通して見られる立体構造上の特徴

筆者らは上記の抗体酵素以外にも下記に示すようにいくつかユニークな「スーパー抗体酵素」の作製に成功している。

- 1) i41SL1-2; 41S-2 抗体の CDRL-1 部分のペプチドに対する抗体
- 2) i41-7; 41S-2 抗体に対する抗イディオタイプ抗体
- 3) HpU-18; *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) のウレアーゼに対する抗体

こうして多くのデータが蓄積されるにつれて、「スーパー抗体酵素」のひとつの大きな特徴が明らかになってきた。

それは「スーパー抗体酵素」には共通して触媒三ツ組残基様構造が見られる点である。図 21 には Paul らが報告している VIP (vasoactive intestinal peptide) を分解する抗体軽鎖 (VIPase) をも含め、筆者らが作製に成功した抗体軽鎖の立体構造モデルを示した。

6-2 触媒三ツ組残基様構造を有する germline と Antigenase

上記のように抗体の構造中に触媒三ツ組残基様構造を持つことが「スーパー抗体酵素」の特徴であるなら、これまでに世界で作製されたモノクローナル抗体はどのくらいその構造を有しているのだろうか？この点を明らかにするために、これまで世界で作製されたモノクローナル抗体についてアミノ酸配列を基に立体構造解析を行い、触媒三ツ組残基様構造を持つ抗体の割合を統計学的に検証した。

Protein Data Bank より無作為に抽出した 56 株のモノクローナル抗体では 15 株 (26.8%) が、また筆者らが所有するモノクローナル抗体 35 株では 15 株 (42.9%) が、触媒三ツ組残基様構造を持つと推定された。しかも、触媒三ツ組残基様構造の配置には大きな偏りがあり、重鎖上で認められたのは僅かに 3 株 (3.3%) であるのに対して、軽鎖は 29 株 (31.9%) であった。軽鎖での存在率は、触媒三ツ組残基様構造が免疫応答の結果として偶然に構築されたと解釈するには余りにも高すぎる値であることから、予めこの構造が用意されている軽鎖が存在するのではないかと考えた。

そこで、最も多くの触媒三ツ組残基様構造を認めたマウス由来の κ 型軽鎖について、更に V κ germline の同定を進めた。表 2 に示す様に、触媒三ツ組残基様構造を持つ 28 株の軽鎖が由来していたのは、93 種類の germline のうち僅かに 9 種類であった。中でも cr1 と bb1 に由来する株の割合が高く、germline には明らかな偏りがあった。これらの触媒三ツ組残基様構造を持つ株と germline のアミノ酸配列を比較すると、驚くべき事に 28 株中の 26 株 (germline として 7 種類) は germline に由来するアミノ酸残基によって触媒三ツ組残基を構築していると推定された。これは、酵素活性を持つ抗体が遺伝子レベルで用意されて

いることを示す重要な知見である。

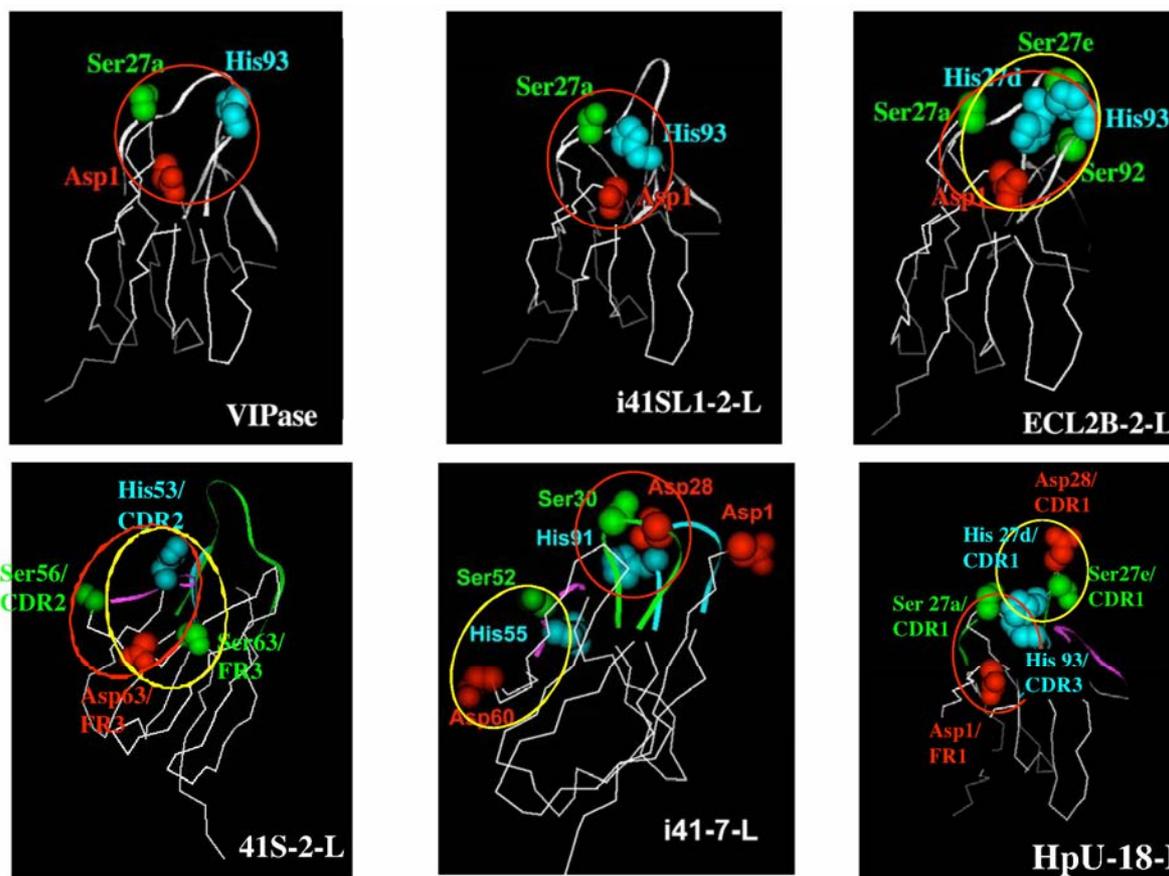


図21 酵素活性を有する抗体軽鎖の立体構造モデリング
(酵素活性を有す上記抗体軽鎖にはどれも触媒三つ組残基用構造が存在する)

6-3 Asp1, Ser27a, His93 より成る触媒三つ組残基様構造

germline にコードされている触媒三つ組残基様構造を調べてみると、特に存在率の高い配置が存在した。Asp1, Ser27a, His93 より成る構造である。これは、Paulらの anti VIP 軽鎖(VIPase)で活性部位として同定され、著者らの i41SL1-2 抗体軽鎖でも活性部位と推定された配置である。この構造は、上記 2 種類の抗体が由来する germline の bd2 に加えて bb1, cr1, cs1, bl1, bj2 と、合計 6 種類の germline に存在すると推定された。これらの抗体は抗原を認識し、かつ germline の段階で抗原を酵素的に分解する潜在能力を有するので Antigenase と言うべきである。

6-4 標的タンパク質に対する Antigenase の効率的作製法

本目的のためには、触媒三つ組残基様構造を有するモノクローナル抗体だけを作製するのが最も効果的である。しかしながら、そのような抗体のみを取得することは現時点では不可能である。また抗原サイドに

そういった構造を有する germline に由来する抗体のみを選択的に誘導する配列は、今のところ見出ししていない。ところが、筆者らは最近、標的を絞った抗原に対してかなりの高い確率で「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の取得に成功している(これまでに 10 種類を超える「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を作製している)。3節で説明したように、触媒三ツ組残基様構造を有する germline の種類は germline 全体の 10%前後だと推定されるが、この 10%前後の germline に由来する抗体の出現率は意外に高い。約 200 種類の κ 型軽鎖について調べたところ、Asp1, Ser27a, His93 を持つ germline に由来する株だけでも、約 20%の確率で出現している。触媒三ツ組残基様構造にはこれ以外の配置も存在するので、統計学的に言っても 10 種類の抗体を得れば、2 種類程度は目的とする Antigenase が含まれると考えて良い。現時点ではこれが最も効率的な作製方法である。

6-5 Antigenase の一般的作製法

筆者らが開発した「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の一般的作製法を以下にまとめた。

- 1 標的タンパク質を決定
- 2 標的抗原の免疫
- 3 抗原特異的抗体産生細胞の取得
- 4 抗体遺伝子配列の解析とgermlineの決定
- 5 触媒三つ組み残基(or 特定のgermline)を持つ抗体軽鎖 を分離精製
- 6 活性試験
- 7 有効性の評価

6-6 「スーパー抗体酵素」の特徴的性質

トリプシンとの比較

酵素の活性を論じるのに多くの場合、ターンオーバー(kcat)に注目する。いわゆるいかに素早く基質を生成物に変換するかである。しかしながら生体中で本当に重要なのは触媒効率(kcat/Km)である。なぜなら Km は分子を識別する指標であり、その分子をいかに確実に分解できるかの性能を示すからである。この例を通常よく用いられるトリプシンと筆者らの見出した「スーパー抗体酵素」41S-2-L との比較で見てみよう。図 22 に「スーパー抗体酵素」

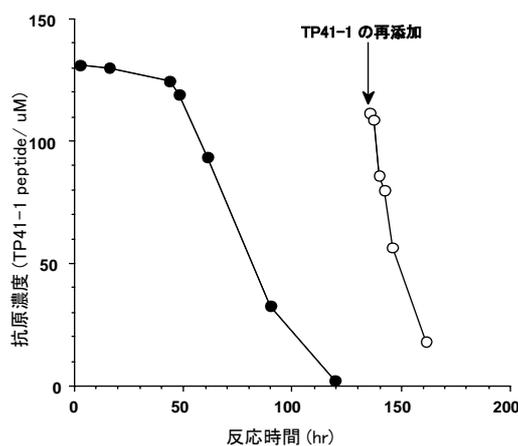


図22 「スーパー抗体酵素」41S-2-Lによる抗原分解反応のプロファイル

抗原(TP41-1): 120 μ M
 スーパー抗体酵素 41S-2-L: 0.8 μ M
 反応温度: 25 $^{\circ}$ C
 反応溶液: リン酸緩衝液(pH6.5)
 抗原再添加濃度: 120 μ M

41S-2-L による抗原分解反応の典型的なプロファイルを示す。抗原にはエイズウイルス外膜タンパク gp41 の不変領域である TPRGPD~~R~~PEGIEEEGERDRD(TP41-1)を用いた。

最初にこの反応に特徴的な誘導期が見られるが(反応時間約50時間まで)この後、活性期に入りここで抗原は急速に分解される。誘導期に比べ活性期の抗原分解速度は約20倍大きい。そして元の抗原は最終的に完全に分解される。また、一度抗原が完全分解された後、その反応系に再度抗原を添加すると今度は、誘導期は現れずただちに抗原の分解が始まる。これは誘導期において、「スーパー抗体酵素」のコンフォメーション変化が起こり活性な形へと変化するからだと推測される。一度活性化された状態になればそのコンフォメーションはその後も維持されると思われる。こうしたメカニズムでもって、「スーパー抗体酵素」は抗原を分解するが、強調したい点は、「反応に時間はかかっても抗原は確実に完全に分解される事実」である。

ではトリプシンを用いた場合はどうであろうか?。同じ抗原(基質)を用いて行った結果を図 23 に示す²⁹⁾。トリプシンは天然の酵素でありそのターンオーバーが大きいことは良く知られている。「スーパー抗体酵素」の反応プロファイルの横軸が時間単位であるのに対し、トリプシンの図 23 では分単位である。反応の初期から抗原は素早く消失し、抗原に対する加水分解速度は相当大きい事が判る。抗原の切断箇所は 41S-2-L が抗原ペプチドの EG 間であるのに対し、トリプシンは RG 間であった(前記抗原配列の下線部分)。両方の酵素とも Michaelis-Menten 式に従って抗原を分解していたが、その k_{cat} は 41S-2-L で $6.0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 、トリプシンで $2.1 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ となり、トリプシンの方が約3000倍も大きかった。このことがトリプシンが素早く抗原を分解できる理由である。ところが K_m を見てみると、41S-2-L では $2.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ に対し、トリプシンは $7.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ となり、逆に 41S-2-L の方がトリプシンよりも約 3000 倍も強く抗原に結合できるのである(一般的な酵素が持つ K_m 値は大体 10^{-4} M 程度である)。抗原認識において天然型抗体酵素はやはり抗体の性質をそのまま残しており、一般的な酵素より3オーダー程高い抗原認識能がある。これは抗原分解反応のどこに反映されるかというと、酵素が自分で自分を壊す(いわゆる自己消化の)速度と抗原を分解する速度の差になって現れる。図1では長い時間が経過しているのも拘わらず、抗原は100%完全に分解されている。ところが図2ではどうだろう?トリプシンは素早く抗原を分解しているが、約半分を分解したところでそれ以上分解をしなくなっている。これはトリプシンが自己消化を起こしているからである。つまりトリプシンは自分と分解すべき相手とが充分区別でき

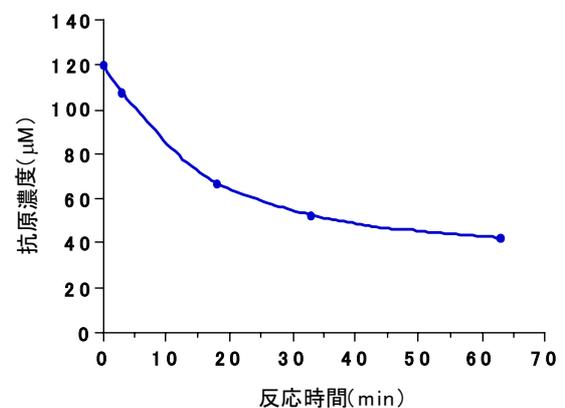


図23 トリプシンによるTP41-1の分解反応

抗原(TP41-1): 120μM
 トリプシン: 0.09μM
 反応温度: 25°C
 反応溶液: リン酸緩衝液(pH6.5)

ず、相手をおある程度分解したら今度は、トリプシン同志で破壊を始める。こうした事は消化酵素には良く見られる現象である。しかし、生体内でこのような非特異反応が無差別に起きるのは決して良くない。我々のからだはそのために(あるいはトリプシンが周囲の組織を壊し続けないうために)、トリプシンインヒビターなる強力なトリプシン活性抑制物質を用意しているのである。つまり、生体内での働きを考える際には酵素の性能評価に触媒の速さを示す k_{cat} だけを見るのではなく、触媒効率である k_{cat}/K_m を評価しなければならない。 k_{cat}/K_m 値は 41S-2-L で $2.8 \times 10^5 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ 、トリプシンで $2.9 \times 10^5 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ と両者とも似通った値を示した。場面に依じて生体にとってどちらが有用かである。遅いが確実性のあるものか、あるいは、速いのがよいかである。

6-7 誘導期の現れる理由

41S-2-L (lot. 23; 0.2 μM) と抗原ペプチド TP41-1 (120 μM) を反応させると、第 2 章でも述べた通り分解反応がゆっくりと進む誘導期(約 100 hr)と、分解反応が急激に進む活性期の二相性の分解曲線を描きながら、約 150 hr ですべての抗原ペプチドを分解した。そこへ、もう一度抗原ペプチドを再添加(120 μM)したときの抗原ペプチド濃度の経時変化を Fig. 3.2 に示す。抗原ペプチドを再添加すると、41S-2-L の濃度は希釈されて 0.1 μM になったにもかかわらず、誘導期はほとんど見せず、約 40 hr ですべての抗原ペプチドを分解した。どのロットの 41S-2-L でも、同じような現象が観察された。つまり、41S-2-L が抗原ペプチドを分解するための活性を発現するには誘導期が必要であるが、いちど誘導期を経たものは、その後、誘導期を必要としないと考えられる。おそらく、この誘導期は、41S-2-L が酵素活性を発現するための活性化の期間であると推測される。誘導期の中に形成された 41S-2-L の活性体は、安定に保たれるため、活性期に入った 41S-2-L に抗原ペプチドを添加しても、誘導期はもうほとんど必要なくなるのであろう。このように多くの場合に反応初期にあらわれる分解速度が非常に遅い誘導期と、急激に分解反応が進行する活性期の2相性を有する。この誘導期が現れる理由を解明した。以下にこれについて述べる。そこで、誘導期における抗体酵素の活性化を具体的に検証するため、41S-2-L を用いて反応中の挙動について検討した。

6-7-1 UV スペクトル測定(光散乱の測定):

41S-2-L (lot. 25; 0.8 μM) と抗原ペプチド TP41-1 (120 μM) を反応させた(15 mM PB (pH 6.5)中、25°C)。抗原ペプチドの分解の様子は、2.2.6 で述べたようにサンプルを処理し、逆相 HPLC で追跡した。また、抗原ペプチド分解反応中の反応液の UV スペクトル測定(紫外可視分光光度計 V-530, Jusco, Japan)を行ない、ベースラインの上昇を反応液中の凝集体による光散乱と考え、反応液の濁度(光散乱)の変化も併せて追跡した。UV スペクトル測定は、反応時間 1.3, 42.5, 113.6, 193.0, 285.0 hr の反応液をそれぞれ 400 μL 分取し、石英製の 1 cm 角のスタンダードセルを使用して測定した。測定条件は、走査範

囲:900~200 nm、走査速度:400 nm/min、レスポンス:Quick、バンド幅:2.0 nm、データ取り込み間隔:1 nm に設定した。コントロールとして、41S-2-L 単独、TP41-1 ペプチド単独の反応液の UV スペクトルも測定した。25°Cで同じ時間インキュベーションした 15 mM PB (pH 6.5)の UV スペクトルをもとにし、それぞれの反応液のスペクトルから差し引いた。そして、400 nm 時の吸光度(光散乱)を反応液の濁度として数値化した。

6-7-2 蛍光スペクトル測定:

41S-2-L (lot. 25; 0.8 μ M)と抗原ペプチド TP41-1 (120 μ M)を反応させた (15 mM PB (pH 6.5)中、25°C)。抗原ペプチドの分解の様子は、逆相 HPLC で追跡した。それと合わせて、抗原ペプチド分解反応中の 41S-2-L の構造変化を追跡するため、蛍光スペクトル測定 (分光蛍光光度計 FP-777, Jasco, Japan) を行ない、抗原ペプチド分解活性との関連を調べた。反応時間 2.7, 46.7, 116.6, 194.6, 286.5 hr の反応液をそれぞれ 330 μ L 分取し、全面透過性の 1 cm 角の石英製のマイクロセルを使用して蛍光スペクトルを測定した。測定条件は、走査範囲:400~650 nm、走査スピード:100 nm/min、レスポンス:1 sec、PMT Gain:Medium、Ex. SBW:10 nm、Em. SBW:10 nm、データ取り込み間隔:0.2 nm とした。励起波長 (Ex.) は、228 nm に設定して行なった。コントロールとして、41S-2-L 単独、TP41-1 ペプチド単独の反応液の蛍光スペクトルも測定した。

6-7-3 41S-2-L の濃度依存性についての検討:

41S-2-L (lot. 12; 25 pM, 250 pM, 2.5 nM, 5 nM, 7.5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM)と抗原ペプチド TP41-1 (120 μ M)を反応させた (15 mM PB (pH 6.5) 中、25°C)。抗原ペプチドの分解の様子は、上記と同様に逆相 HPLC で追跡した。抗原ペプチド TP41-1 の濃度の経時変化をグラフにし、誘導期の長さの 41S-2-L 濃度依存性について調べた。

6-7-4 誘導期中の 41S-2-L の速度論的解析:

誘導期の長さは、抗原ペプチド濃度の経時変化を示すグラフより、2 種類の法則に基づいて正確に算出した (図 24; Ind. 1, Ind. 2)。「Ind. 1」は、反応開始から、抗原ペプチドの初期濃度 (120 μ M) の横線と抗原ペプチド分解が 1 割未満の時の接線との交点まで (抗原ペプチド分解が 1 割未満までを誘導期) とした。「Ind.

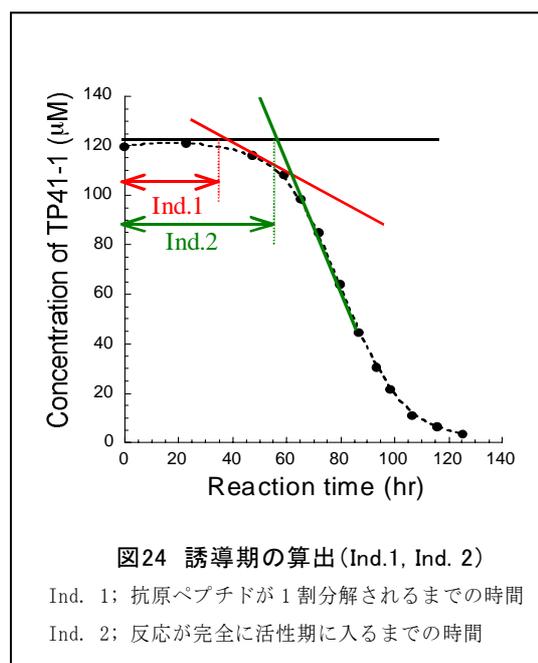


図24 誘導期の算出 (Ind.1, Ind. 2)

Ind. 1; 抗原ペプチドが1割分解されるまでの時間
Ind. 2; 反応が完全に活性期に入るまでの時間

2」は、抗原ペプチドの初期濃度 (120 μM) の横線と完全に活性期に反応が入った時の接線との交点まで (抗原ペプチド分解が完全に活性期に入るまでを誘導期) とした。誘導期中に、もし 41S-2-L 一分子内でコンフォメーション変化が起こっている場合、一次反応速度則に従うと考えられる。一方、もし 41S-2-L 二分子間の会合が起こっている場合、二次反応速度則に従うと考えられる。そこで、誘導期の長さ と 41S-2-L の濃度について、以下の公式を元に解析を行なった¹。

(i) 自身によるコンフォメーション変化の場合 (一次反応)



という不可逆な反応であるとする、速度式で表すと次のようになる。

$$-d[A]/dt = k[A]$$

まず変数分離をすると

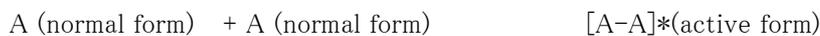
$$d[A]/[A] = -kdt$$

そして、両辺を積分すると

$$\log [A] = -kt + C \quad \dots(1)$$

(C は積分定数である。)

(ii) 二分子の会合の場合 (二次反応)



この反応を速度式で表すと、

$$-1/2 \times d[A]/dt = k[A]^2$$

となる。これを変数分離すると、

$$-d[A] / [A]^2 = 2kdt$$

となり、積分すると、

$$1/[A] = 2kt + C \quad \dots(2)$$

(C は積分定数である。)

[A]; 41S-2-L の濃度, $[A]_0$; 41S-2-L の初期濃度, $[A]^*$; 一分子内で活性化された 41S-2-L, $[A-A]^*$; 二分子の会合によって活性化された 41S-2-L, k; reaction rate, t; Ind. 1 または Ind. 2
6-7-5 抗原分解反応中の反応液の濁度変化

これまでに数多くのロットの 41S-2-L 活性試験において、活性期に入る頃から反応液がやや白濁してくる傾向が認められていた。そこで、その反応液の白濁の様子と抗原ペプチド分解活性の相関性について調べた。その結果を図 25 に示す。反応液の濁度は、抗原ペプチド分解反応が進むにつれ上昇しており、

分解反応が活性期に入るとやがてプラトーになった。濁度は誘導期中から上昇していた。一方、41S-2-L 単独ではわずかに濁度があるだけで、ほとんど変化はなかった。抗原ペプチド TP41-1 単独では、濁度はほとんどゼロに等しかった。さらに、抗原ペプチド分解活性を示さないロットの 41S-2-L では、抗原ペプチドと反応させていても、反応液の濁度にほとんど変化はなかった。反応液が濁るということは、反応液中に凝集物質が存在するということである。つまり、41S-2-L が抗原ペプチド分解活性を示すとき、反応液中には何らかの凝集体が存在していると言える。

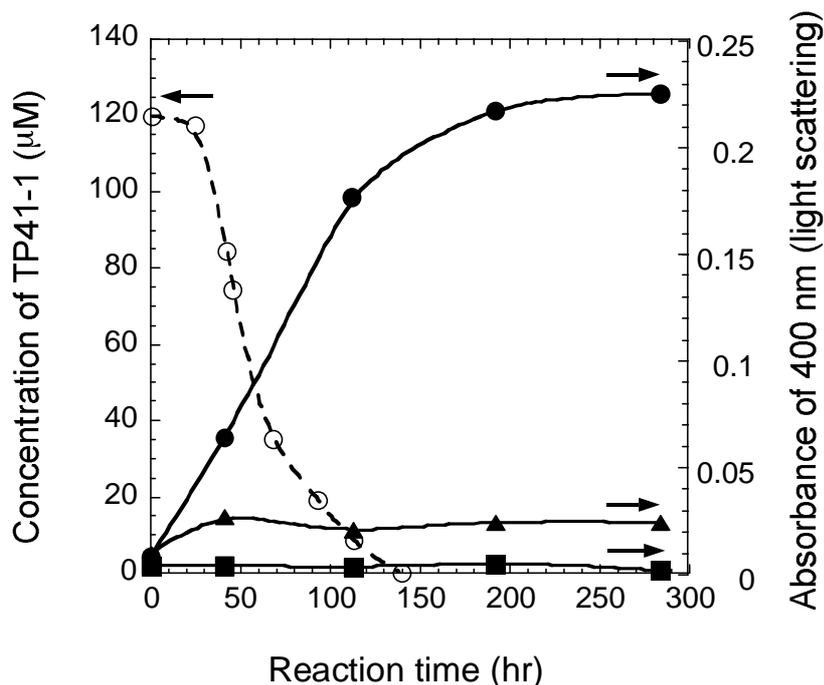


図25 抗原ペプチド分解反応中の反応液の濁度変化

25°C、15 mM PB pH6.5 中、TP41-1: 120 μM, 41S-2-L: 0.8 μM
 -○-; 41S-2-L と反応させた時の TP41-1 ペプチド濃度の経時変化
 -●-; 41S-2-L と TP41-1 ペプチドを反応させた時の反応液の濁度の変化
 -▲-; 41S-2-L 単独の時の濁度の変化
 -■-; TP41-1 ペプチド単独の時の濁度の変化

6-7-6 抗原分解反応中の 41S-2-L のコンフォメーション変化

タンパク質の蛍光スペクトルを測定すると、タンパク質内に含まれている蛍光性アミノ酸(内部プローブ; トリプトファン、チロシン)周辺の微環境の変化が推測できる。そこで、抗原ペプチド分解反応中の 41S-2-L のコンフォメーション変化について調べるため、反応中の 41S-2-L の蛍光スペクトルを測定した。光吸収スペクトルより、励起波長(Ex.)は 228 nm に設定した。結果を図 26 に示す。

励起波長 228 nm で 41S-2-L の蛍光スペクトルを測定したところ、約 336 nm に最大蛍光ピークが観察された。抗原ペプチド TP41-1 と反応させた場合、抗原ペプチドの分解反応が進むにつれて、蛍光強度は上昇し、蛍光ピークの波長はしだいに短波長側へ 9.3 nm ほどシフト(336.6 nm から 327.4 nm)していた。一方、41S-2-L 単独では、蛍光強度はまったく変化せず、蛍光ピークのシフトは観察されなかった。蛍光ピークの短波長側へ

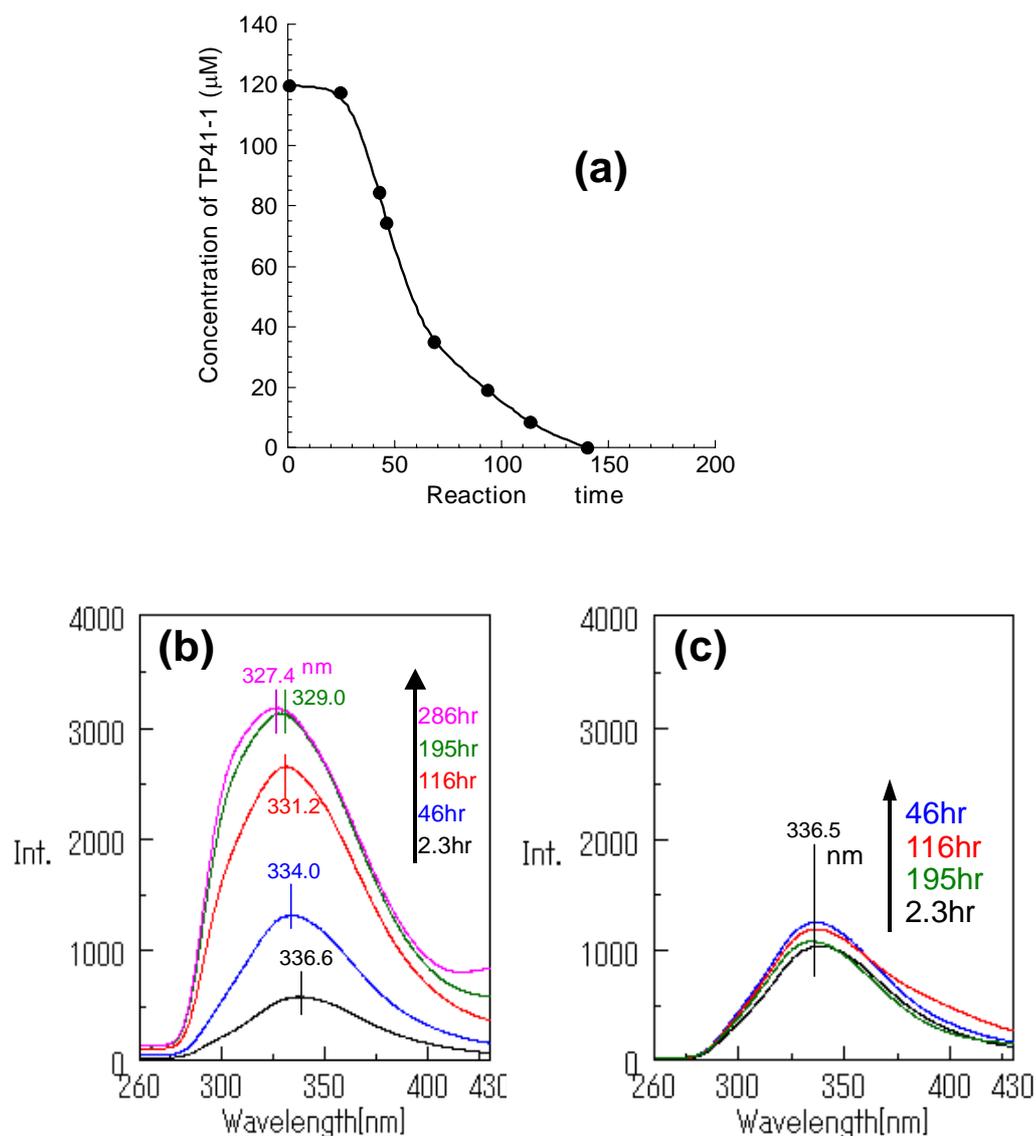


図26 抗原ペプチド分解反応中の41S-2-Lの蛍光スペクトルの変化

25°C、15 mM PB pH6.5 中、TP41-1: 120 μM, 41S-2-L: 0.8 μM

(a); 41S-2-L と反応させた時の TP41-1 ペプチド濃度の経時変化

(b); 41S-2-L と TP41-1 ペプチドを反応させた時の 41S-2-L の蛍光スペクトルの変化

(c); 41S-2-L 単独の時の蛍光スペクトルの変化

のシフトは、内部プローブ近辺の微環境が、コンフォメーション変化あるいは多分子間の会合などにより、親水性から疎水性環境へと変化したことを示している(ブルーシフト)。41S-2-L が酵素活性を発現するまでに、41S-2-L あるいは 41S-2-L の断片同士が多数会合している可能性を述べた。蛍光スペクトルの短波長側へのシフトは、この可能性を強く支持している。一方、蛍光強度の上昇については2つの可能性が考えられる。一つは、反応液中の凝集体による蛍光の散乱、もう一つは 41S-2-L の断片化に伴い、内部プローブがタンパク質表面に露出したため、より強く励起された可能性である。41S-2-L は、抗原ペプチドを分解する際に、抗原ペプチドと結合するだけでなく、コンフォメーション変化が起きているのは明らかであり、その結果、凝集体を形成している可能性が高いといえる。

6-7-7 速度論的解析による 41S-2-L の挙動の推測

41S-2-L (lot. 12; 25 pM, 250 pM, 2.5 nM, 5 nM, 7.5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) と抗原ペプチド TP41-1 (120 μM) を反応させ (15 mM PB (pH 6.5) 中、25°C)、3.2.6 で述べた法則のもと正確に誘導期 (Ind. 1, Ind. 2) を算出し、速度論的解析を行なった。横軸の Induction time (誘導期の長さ) に対して、縦軸に対数の 41S-2-L 濃度 (Log [41S-2-L] (μM)) あるいは 41S-2-L 濃度の逆数 (1/[41S-2-L] (μM⁻¹)) をプロットし、反応速度則の一次反応式 ($\log [A]_0 = -kt + C$; 41S-2-L 一分子内のコンフォメーション変化; C は定数)、二次反応式 ($1/[A]_0 = -2kt + C$; 41S-2-L 二分子の会合; C は定数)

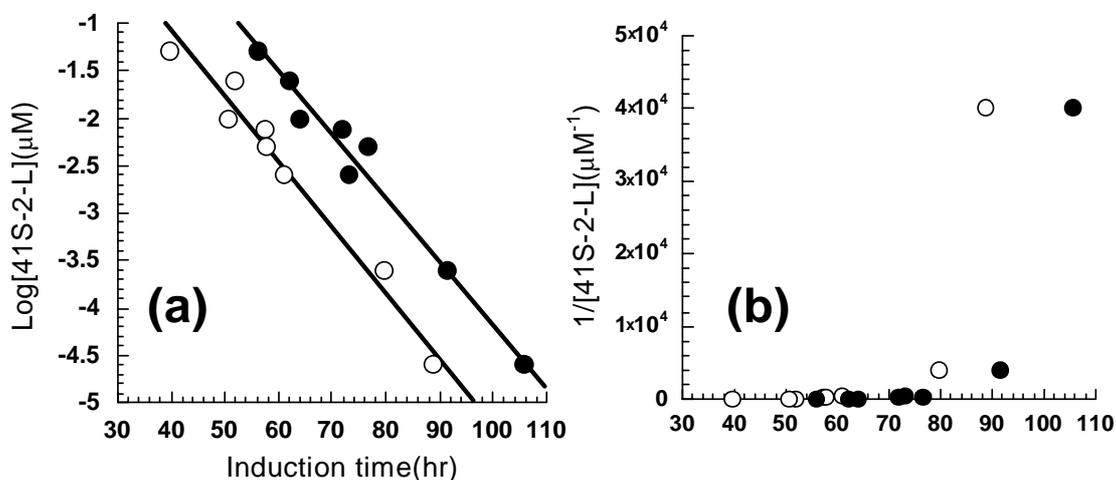


図27 誘導期中の41S-2-Lの速度論的解析

25°C、15 mM PB pH6.5 中、TP41-1: 120 μM, 41S-2-L: 25pM~50nM

●-; 誘導期を Ind. 1 (抗原ペプチドが一割分解されるまでの時間) とした場合

○-; 誘導期を Ind. 2 (分解反応が完全に活性期に入るまでの時間) とした場合

(a); 一次反応式 ($\log [A]_0 = -kt + C$; 41S-2-L 一分子内のコンフォメーション変化)

(b); 二次反応式 ($1/[A]_0 = -2kt + C$; 41S-2-L 二分子の会合)

C は定数

のどちらにあてはまるか検討したところ、プロットは一次反応式に従っていた(図 27a)。一方、二次反応式ではプロットがまったく式にあてはまらなかった(図 27b)。つまりこの解析の結果は、誘導期中の 41S-2-L の活性化において、二分子間の会合ではなく一分子内のコンフォメーション変化が起きていることを示唆している。ただし、三分子以上の会合の場合、この解析方法で判定することは難しい。また、コンフォメーション変化を起こした後に分子同士の会合がある可能性も十分に考えられた。

6-7-8 誘導期の抗体酵素および抗原ペプチド濃度依存性

【抗体酵素濃度依存性について】

41S-2-L の濃度を变化させ(25 pM, 250 pM, 2.5 nM, 5 nM, 7.5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM)、一定濃度に保持した抗原ペプチド TP41-1 (120 μ M)を反応させた(15 mM PB (pH 6.5)中、25°C)。そして、3.2.6 で述べた Ind. 2 の法則にもとづいて正確に誘導期を算出し、抗体酵素 41S-2-L の濃度と誘導期の長さの関係について検討した。それぞれの 41S-2-L 濃度における抗原ペプチド TP41-1 濃度の経時変化を図 28a に示す。また、誘導期の長さとは抗体酵素 41S-2-L の濃度の関係をグラフに表したものが、図 28b である。図 28b の結果より、41S-2-L の濃度が低くなればなるほど、誘導期は明らかに長くなる傾向が観察された。50 nM から 25 pM になると、誘導期は約 2 倍長くなっていた。しかしながら、活性期に入ってから抗原ペプチド分解速度は、それほど大きな違いは見られなかった。このことは、抗原ペプチド分解能を発揮する活性体の 41S-2-L の濃度は、反応液中において常に一定である可能性を示唆している。しかも、25 pM という非常に低濃度でも抗原ペプチド分解能を発揮していたことから、活性体の濃度は常に 25 pM 以下であると推測された。また、41S-2-L の濃度が低くなればなるほど誘導期が長くなるということは、41S-2-L 同士の接触も活性化に関連があるのではないかと考えた。

【抗原ペプチド濃度依存性について】

一定濃度の 41S-2-L (lot. 12; 0.8 μ M)と濃度を变化させた抗原ペプチド TP41-1 (120, 90, 60, 30, 15, 10 μ M)を反応させ(15 mM PB (pH 6.5)中、25°C)、Ind. 2 と同じ法則にもとづいて正確に誘導期を算出し、抗原ペプチドの濃度と誘導期の長さの関係について検討した。抗原ペプチドの濃度と誘導期の長さの関係を図 29 に示す。横軸に対数表示した抗原ペプチド濃度、縦軸に誘導期の長さをプロットすると、抗原ペプチド濃度が高くなればなるほど誘導期は短くなる傾向が明らかに観察された。この結果は、41S-2-L の活性化に抗原ペプチドとの結合(おそらく induced fitting⁸)が大きく関与していることを示唆するものである。Rosa らは、天然酵素 trypsin と基質の複合体(ES form)は、trypsin 単独(E form)の時よりも porous glass への吸着性が上昇すること示し、さらに porous glass のような固相へ吸着している trypsin と基質の複合体(ES form)は、吸着している trypsin 単独(E form)よりも活性が安定に保たれることを明らかにした。Rose ら

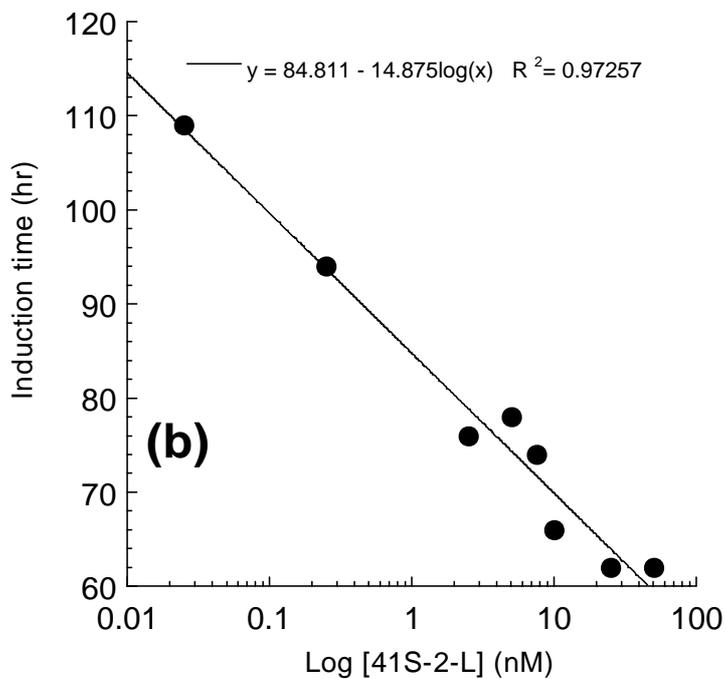
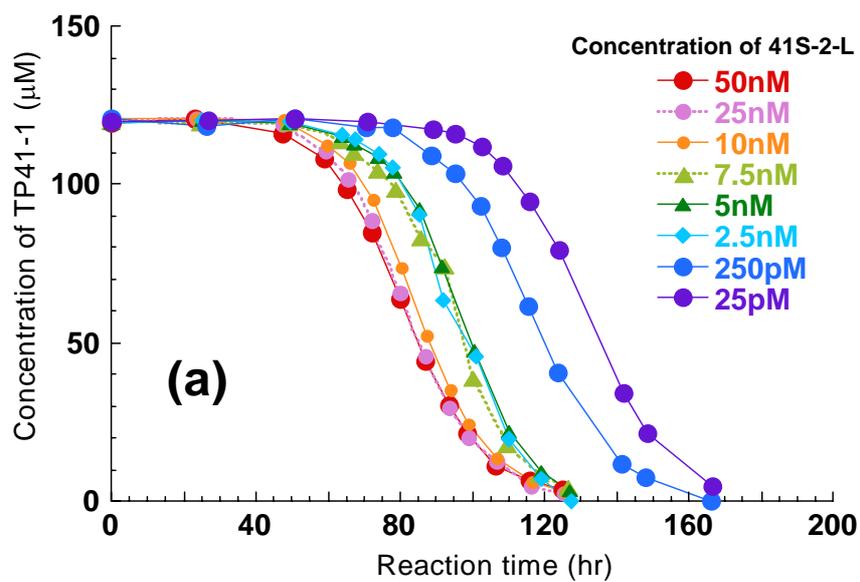


図28 誘導期の41S-2-L濃度依存性

25°C、15 mM PB pH6.5 中、TP41-1: 120 μM, 41S-2-L: 25pM~50nM

誘導期(Induction time)を分解反応が完全に活性期に入るまでの時間として算出

(Fig. 3.1の Ind. 2の法則)

(a); TP41-1 ペプチド濃度の経時変化

(b); 誘導期の長さと 41S-2-L の濃度の関係

は、これらの実験結果より、trypsin は基質との結合によってコンフォメーション変化を起こすが (induced fitting)、solid support へ接触している時、このコンフォメーションは安定に保たれると述べている⁶。41S-2-L が抗原ペプチド TP41-1 との結合によって起こるコンフォメーション変化により、41S-2-L 分子の表面の性質は大きく変化すると推測される。その結果、疎水結合などの非共有性結合によって、幾つかの分子が会合する(multimer の形成)とすれば、Rosa らが述べているようなコンフォメーションの安定化も考えられ、活性体が安定に保持されているのではないかと思われる。

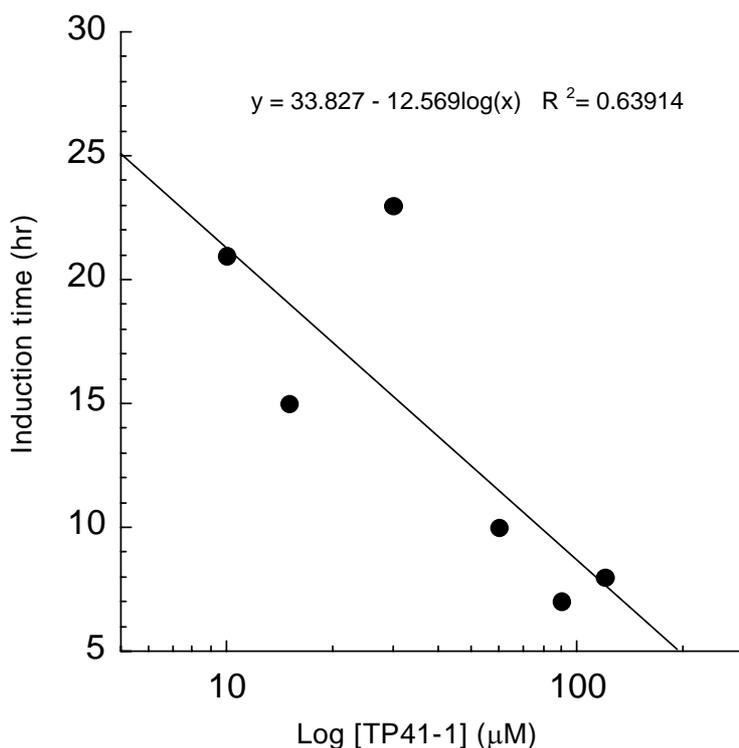


図29 誘導期の抗原ペプチドの濃度依存性

25°C、15 mM PB pH6.5 中、TP41-1: 120, 90, 60, 30, 15, 10 μM, 41S-2-L: 0.8 μM
 誘導期 (Induction time) を分解反応が完全に活性期に入るまでの時間として算出

6-7-9 結論

UV スペクトル変化から抗原ペプチド分解反応中の反応液の濁度変化と酵素活性の関連性が示唆された。蛍光スペクトルを測定では、抗原ペプチド分解反応中に蛍光スペクトルは短波長側へシフトしていた。このことは、41S-2-L 内部の蛍光性アミノ酸の周辺が疎水性環境になったことを示す。41S-2-L は、抗原ペプチド分解反応中に明らかにコンフォメーション変化を起こしていると言える。また、誘導期中の41S-2-L の挙動を速度論的に解析したところ、41S-2-L のコンフォメーション変化を意味する一次反応速

度則に従っていたことから、誘導期中に 41S-2-L が自身でコンフォメーション変化を起こしていることが明らかとなった。誘導期の長さは、抗原ペプチドの濃度が濃いほど短くなる傾向が観察されており、おそらく抗原ペプチドとの結合 (induced fitting) が 41S-2-L のコンフォメーション変化を引き起こす一つの要因であると推測した。また、コンフォメーション変化の結果、SDS-PAGE で観察された高分子化や反応液の濁りの原因である凝集体 (multimer) を形成している可能性が考えられた。

抗原ペプチド分解反応における誘導期の長さは、41S-2-L の濃度に依存しており、濃度が高いほど誘導期は短くなった。しかし、抗原ペプチド分解速度にはほとんど変化が見られなかった。このことは、酵素活性を示す 41S-2-L の活性体の濃度は 41S-2-L の濃度にかかわらず常に一定であることを示している。

41S-2-L の活性化が起こっていると思われる誘導期の長さは、41S-2-L を調製する水の種類で大きく変わった。水を分析した結果、誘導期が非常に長くなる水には、含まれている Fe や Zn の濃度が低かった。41S-2-L の酵素活性は EDTA で阻害されるという報告もあることから、これらの金属イオンも 41S-2-L の活性体形成に関与していると推測された。

7) 生体センシングためのバイオナノ材料／素子の開発(江頭担当)

7-1 抗体あるいはスーパー抗体酵素を利用する新規分析法の開発

センサとして抗体あるいはスーパー抗体酵素を活用するためには、それらの特性を活かしながら効果的に固定化する必要がある。本節では固定されながらも面方向への移動が可能であり、シグナル物質を内封することができるため高感度分析への展開が可能なりポソーム表面を固定場として選択した。続いてシグナル物質をルテニウム錯体として電解発光に基づく検出を行い、高感度化をさらに進めた。

7-2 抗体修飾りポソームに基づくタンパクの超高感度分析法

①はじめに

電解発光 (Electrogenerated chemiluminescence, ECL) は、温和な条件で測定可能であり、発光種である Ru 錯体を繰り返し使用でき、さらに高感度測定が可能などの利点を持っている。そのため電解発光に基づいて、シュウ酸、アミン、アミノ酸などの検出が報告されている。我々は、これまでに Ru 錯体／パーフルオロポリマー修飾電極を用いたシュウ酸センサや電解発光種の生成を利用する防かび剤チアベンダゾールの簡易定量法を開発を報告している。本研究では、免疫反応と ECL、シグナル増幅を意図するリポソームを組み合わせる手法で牛血清アルブミン (BSA) の高感度検出の開発を行った。この分析法の特長は、測定が短時間で終了し、前処理の問題も改善できると期待される点である。また、アミノ基およびチオール基末端の側鎖を有する Ru 錯体を合成し、その金電極への強い吸着を利用してさらなる高感度化を達成した。

②実験方法

イムノリポソームは以下のような手法で調製した。ホスファチジルコリン=ジパルミトイル、ホスファチジルエタノールアミン=ジパルミトイルおよびコレステロールを成分とする脂質2重膜リポソームに架橋剤 SPDP を用いて BSA 抗体を結合した。リポソーム内には 2,2'-トリスピリジンルテニウム(II)錯体 (Complex 1) を内封している。リポソーム表面の抗体は、HRP 修飾抗体を用いることにより酵素活性を測定して確認した。

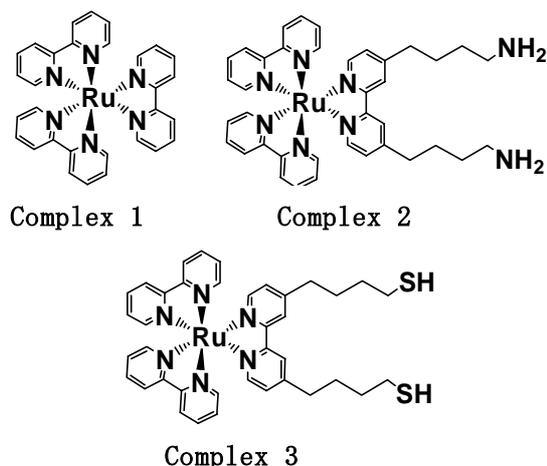
次に BSA 固定化電極作成方法を示す。ガラス基板 (20mm×40mm、厚さ 0.7mm) に真空蒸着した金電極を用い、ピラニア溶液 ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$) で金電極を洗浄後、ジチオジカルボン酸の EtOH 溶液中に 12 時間浸し単分子自己組織膜(SAM)を形成した。EtOH で洗浄した後、WSC と NHS で末端カルボキシル基を活性化した。この電極を BSA 溶液に 4℃で 15 時間浸し、残った活性部位はエタノールアミンでブロッキングした。

また、アミノ基やチオール基を側鎖に有するルテニウム錯体の合成を行った(それぞれ Complex2、Complex3とする)。側鎖にプロモ基を2つ有するビピリジン誘導体とビスビピリジンルテニウム錯体を反応し、側鎖にプロモ基を2つ有するルテニウム錯体(化合物 A)を得た。化合物 A を MeOH 中でヒドラジンと反応後シリカゲルカラムで分離精製し、Complex2を得た。また、化合物 A を窒素雰囲気下で硫化水素ナトリウムと反応し、溶媒留去後、アセトニトリルに溶解した。この溶液をクロロホルム/飽和 NaCl で抽出し Complex3を得た⁵⁾。

③結果と考察

リポソームの破壊に一般的に用いられている界面活性剤は ECL 強度を低下させることがわかった。そこで、疎水性相互作用のバランスを乱すと期待されるアルコールを用いて金電極に固定したイムノリポソームの破壊を検討した(図 30)。ECL 強度が強いほどリポソーム破壊が効率よく行われていることを示す。EtOH が最も良く破壊し、側鎖が長くなるにつれて効率は悪くなることがわかる。

図 31 は合成した3種類の錯体と金との結合力の強さを示している。発光値 A は $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$ の各錯体溶液を電極上で 5 分間静置したときの発光を、発光値 B は同様に 5 分間静置後十分に洗浄した吸着状態での発光を示している。発光値 A はほとんど差がないのに対し、発光値 B では Complex2、3は Complex 1 に比べてそれぞれ 6.0 倍、6.7 倍の値を示した。これにより強い吸着力を持ち脱着操作が容易な Complex2の使用が望ましい。



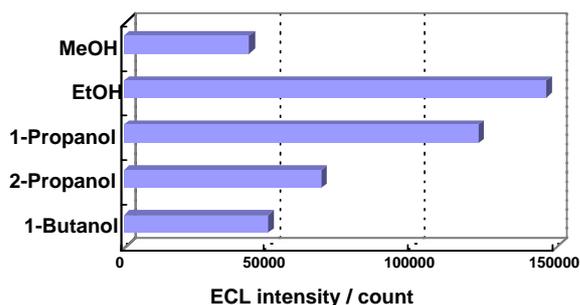


図30 ECL response of liposome by addition of each solvent

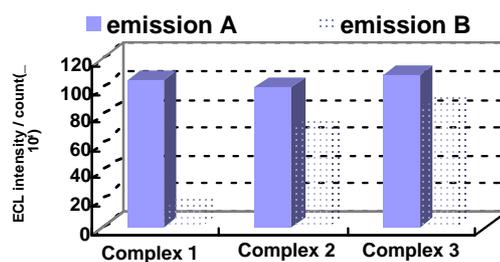


図31 Adsorption power of Ru complexes onto Au electrode

一定量のイムノリポソームと様々な濃度の BSA 抗体を混合し、上記の BSA 固定化電極上で 1 時間抗原抗体反応した。PBS で洗浄後、電極に結合したリポソームをエタノールで破壊した。60℃ 加熱後 PBS で洗浄し、電解液 (0.1M PBS, 0.1M TEA を含む) を 60 μ L 加え、ECL 測定 (印加電圧 1.3V vs. 金擬参照電極) した。

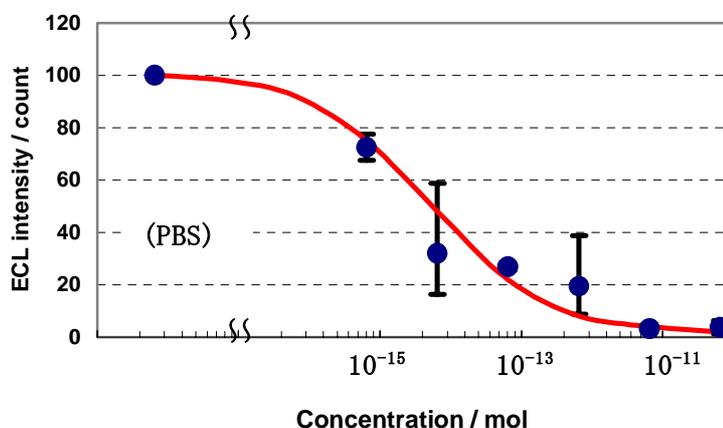


図32 Result of competitive reaction using immuno-liposome which encloses Complex 2

図 32 はイムノリポソームに

Complex2を内封したときの競合反応の結果である。10⁻¹⁵~10⁻¹²mol の測定が可能であった。一方、Complex1を内封した場合は 10⁻¹⁴~10⁻¹²mol の感度であったことから Complex2のほうが高感度であることが明らかになった。

(参考文献)

- 1) J.B. Noffsinger and N.B. Danielson, *Anal. Chem.*, **59**, 865 (1987).
- 2) S.N. Brune and D.R. Bobbitt, *Anal. Chem.*, **64**,166 (1992).
- 3) N. Egashira, H. Kumasako, and K.Ohga, *Anal.Sci.*, **6**, 903 (1990).
- 4) N. Egashira, Y. Mitoma, H. Ichikawa and T. Uda, *ITE Letters*, **5**, 545 (2000).
- 5) N. Egashira, S. Morita, H. Tashiro, Y. Mitoma and T. Uda, *ITE Letters* in pres

7-3 電解発光法による酵素あるいは抗体酵素の迅速活性評価の開発

①はじめに

多くの酵素あるいは抗体酵素はペプチドやタンパクを切断する能力を備えている。生じた断片ペプチドあるいはアミノ酸の定量は酵素活性の評価のために必要である。現在、そのような定量は主にHPLCを用いて定量されているが、操作が面倒であり長い測定時間を要す。我々は、アミノ酸の中プロリンが最大の発光強度を与える電解発光 (ECL) に着目して酵素活性の迅速評価を検討した。N-末端にプロリンを有するペプチドを選択し、酵素としてロイシンアミノペプチダーゼ (エキソペプチダーゼ) を使用して検討した。

②実験

エイズウイルス (HIV) の外皮タンパク gp41 の部分ペプチドとして TP41-1 (TPRGPDRPEGIEEEGGGERDRD) と N-末にプロリンを有する P41-1 (PRGPDRPEGIEEEGGGERDRD) をペプチド合成装置で合成したものを使用した。酵素反応は 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.4)、37°Cで行った。定めた時間間隔で酵素反応液の一部 (100 μ L) は電解発光及びHPLC分析のためサンプリングした。

電解発光装置はフロースルー型であり、金作用電極 (1.2 cm^2)、ステンレス対極及び Ag/AgCl 参照電極 (BSA, RE-1B) を備えている。金電極には 1.3V が印加された。また、使用された光電子増倍管 (浜松ホトニクス、R928) は 900V 印加し、作用電極と向き合うように配置されている。移動相には 1×10^{-4} M Ru(bpy)₃²⁺ を含む 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) をペリスタポンプにより 0.7 cm^3/min の速度で流した。すべてのECL強度は 1×10^{-4} M シュウ酸を標準試料として補正した。

HPLCによるペプチド分析においては、移動相として 13%アセトニトリル (0.05%の3フッ化酢酸を含む)、分析カラムとして water Puresil C₁₈ (4.6 x 150 mm) を使用し、サンプリングした酵素反応液の一部 20 μ L を注入した。

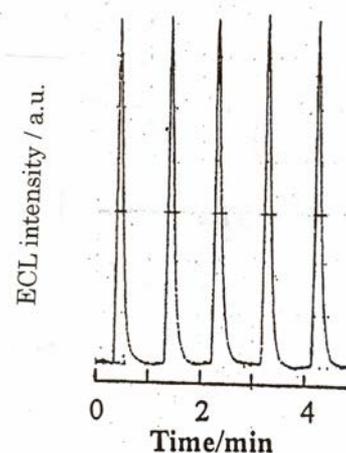


図33 0.1 mMプロリンECL応答

表3 1×10^{-4} M アミノ酸についてのECL発光強度

Amino acid	ECL intensity ^{a)}	Amino acid	ECL intensity ^{a)}
Proline	556	Tyrosine	11.7
Histidine	104	Phenylalanine	10.0
Methionine	36.1	Isoleucine	7.9
Lysine	17.4	Leucine	7.2

a) Each value was represented as ECL ratio of amino acid to 1×10^{-4} M oxalate.

③結果および考察

0.1mM プロリンを注入したときのECL応答は迅速であり、1分以内であった(図 33)。表 3 は種々のアミノ酸(1×10^{-4} M)のECL応答を示しており、プロリンが最も強いことが明らかである。ヒスチジン以外のアミノ酸が混在していても 10%以内の誤差でプロリンを定量できると推定される。酵素濃度を変化させたときの P41-1 ペプチドの加水分解に伴うECL強度の経時変化を図 34a に示す。P41-1 は N-末端プロリンを有することから、P41-1 とその酵素分解物であるプロリンはいずれもECLを与える。反応溶液のECLは両者が合わさった値となっているので、計算によりそれぞれの濃度を決定できる。検量線から各ECL相対強度は次のようになった。

$$\text{プロリンに対するECL強度} = 2450 \times [\text{P}] \quad (1)$$

$$\text{P41-1 に対するECL強度} = 211 \times [\text{P41-1}] \quad (2)$$

[P] 及び[P41-1]はプロリン及び P41-1 の濃度(mM)である。反応溶液のECL強度は、生じたプロリンと残存する P41-1 によるECLの強度の和となっている。従って、

$$\text{反応液のECL強度} = 2450 \times [\text{P}] + 211 \times [\text{P41-1}] \quad (3)$$

一方、生成物のプロリン濃度と残存する P41-1 の濃度の和が P41-1 の初濃度に等しいので、

$$[\text{P41-1}]_0 = [\text{P41-1}] + [\text{P}] \quad (4)$$

(3)式及び(4)式を組み合わせると各濃度を決定できる。

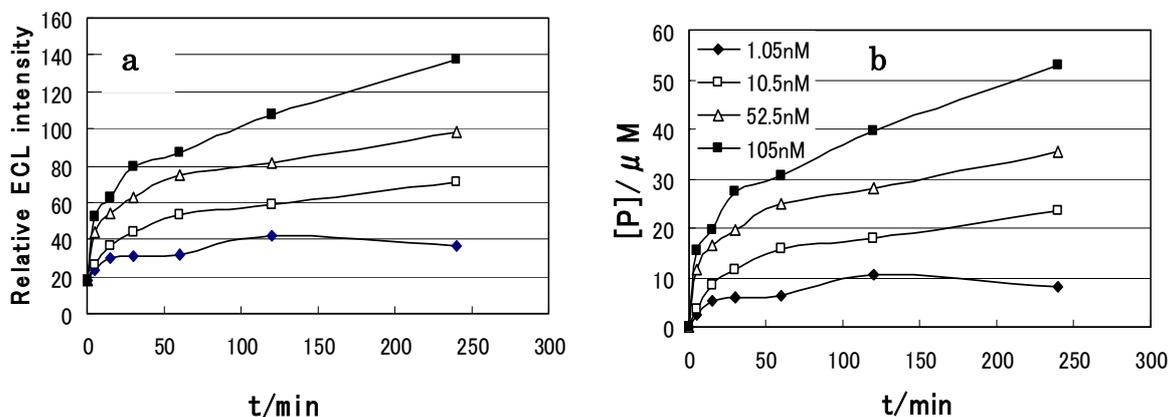


図34 種々の濃度のロイシニアミノペプチダーゼによる0.1mMP41-1の加水分解により生じた反応液のECL強度(A)と生じたプロリン濃度(B)

図 34b は、計算により求められたプロリン濃度の経時変化を示している。プロリン濃度は時間の経過及び酵素濃度の増加とともに増えている。15 分では P41-1 の濃度が約 10%なので最適な酵素濃度を 10.5nM とした。P41-1 濃度を変化させたときの典型的な酵素反応曲線を図 35a に示す。図 35b は種々の P41-1 濃度における生成プロリンの濃度経時変化であり、このデータを解析して初速度 v を求めた。ECL

による測定時間はHPLC測定の 1/10 程度であるため、ECL法によるペプチド加水分解のモニターリングは非常に簡単である。

次に、Lineweaver-Burk 逆プロット($1/v - 1/[S]$ プロット)により加水分解活性(解離定数、 K_m 及び酵素反応速度、 k_{cat})を評価することを試みた。(図 36、 $[S]$ は基質濃度) K_m 及び k_{cat} はそれぞれ $1.2 \times 10^{-4}M$ 、 $3.7s^{-1}$ であり、HPLCによって求められた値と良く一致した。(HPLC: $K_m=1.0 \times 10^{-4}, k_{cat}=3.5s^{-1}$)N-末端 T-P 部位は加水分解されにくいいため、予想通り k_{cat} の値は他のペプチドについて報告されている値より1桁小さかった。表2にでも同様にジペプト PG の K_m と k_{cat} は妥当な値が得られている。TP-41 ペプチド及び GP については、加水分解により生じるプロリンあるいはN-末端プロリンのみがECL応答を与えるため解析は容易であり、妥当な値が得られた。従って、本ECLセンサは、ペプチドに少し制限があるが、酵素あるいは抗体酵素による加水分解酵素活性評価の簡便で迅速な手法として使用可能であることが示された

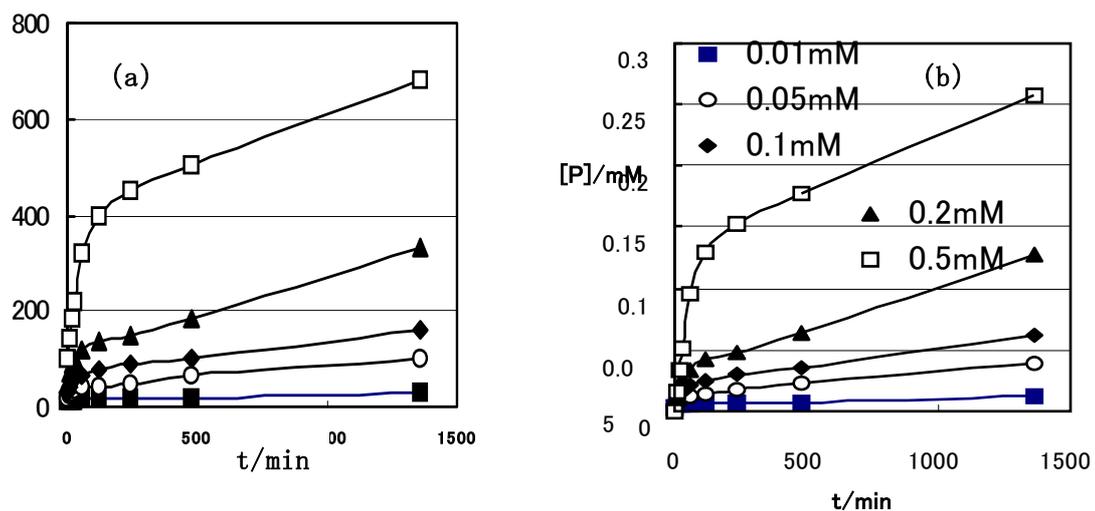


図35 10.5nMロイシンアミノペプチダーゼによる種々の濃度のP-41-1の加水分解による反応液のECL(A)と生成したプロリン濃度の経時変化(B)

8) 抗体酵素の起源について

これまで酵素は「酵素学」で、抗体は「免疫学」で主に学習してきた。しかしながら上述したように、通常の免疫によっても、あるいは、ある病気(主に自己免疫疾患)の患者血清中にも酵素活性(主にペプチダーゼ活性あるいはプロテアーゼ活性)を持つ抗体が次々に見出されてきている。なぜ抗体が酵素活性をもつのか? 抗体は酵素と何かの関係があるのか。あるいはその逆はどうなのかなど、本問題に対する筆者らの考え方の一部を概説したい。

8-1 解明されていない抗体の性質

抗体研究は何十年という年月をかけて免疫学者は勿論、生化学者や分子生物学者を含む数多くの研究者が世界的規模で取り組んできた。しかしながらいまだに解らない点が多い。例えば、

- 1) どうして抗体は2本鎖になっているのか？また、2本鎖でなければならない理由は多様性と親和性の説明だけで十分なのか？
- 2) 抗体といえどもこの地球上にいきなり2本鎖で現れたはずがない(実際ラクダは単鎖抗体を持っている)。どのようにして現在の2本鎖ができあがってきたのか、その時期はいつなのか？
- 3) 下等生物の海綿(スポンジ)には抗体のV領域(V-set:可変領域に相当)をドメインとして持つタンパク質が存在する。このV領域は一体何の役割を担っているのか？
- 4) 抗体の進化過程を追跡してゆくとC領域(定常領域)ドメインはV領域ドメインの後で現れているようである。なぜ多様性に優れたV領域ドメインの方が古いのか？
- 5) 抗体重鎖の定常領域が糖鎖を有していたり、補体の活性化などのエフェクター作用をもつことは良く解っているが、軽鎖の定常領域は何のために存在するのか、その機能は何なのか？

など、多くの疑問がある。一体、「酵素と抗体の境目は何か？」という点から考察したい。

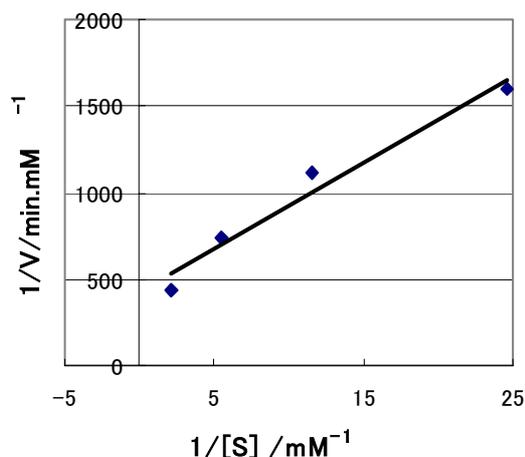


図36 P41-1の加水分解についてのLineweaver-Burk逆プロット

表4 抗体軽鎖の速度論的パラメーター

	Substrate (antigen)	K_m (M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
41S-2-L	gp41 peptide (TP41-1 or YP41-1)	2.1×10^{-7}	6.0×10^{-2}	2.8×10^5
i41-7-L		2.6×10^{-5}	2.4×10^{-1}	9.1×10^3
Trypsin		3.5×10^{-4}	1.1×10^2	3.1×10^5
Papain		1.6×10^{-4}	8.4×10^{-2}	5.2×10^2
i41SL1-2-L	CDRL-1 peptide	2.0×10^{-6}	6.1×10^{-1}	3.1×10^5
ECL2B-L	CCR5 peptide	3.3×10^{-5}	2.23	6.7×10^4
HpU-18-L ^a	Epitope peptide	5.3×10^{-5}	1.6×10^{-1}	3.1×10^3
VIPase (Anti VIP light chain) ^b	VIP	2.0×10^{-7}	1.1×10^{-2}	5.5×10^4
Trypsin*		3.8×10^{-4}	1.1×10^3	2.9×10^6

^a 未発表

^b Paul *et al.* *J. Biol. Chem.*, **269**, 32389(1994).

8-2 「スーパー抗体酵素」(Antigenase)

前述したように、筆者らはエイズウイルス(HIV)の外膜タンパク質 gp41 の中に存在する不変領域ペプチド(RGPDRPEGIEEEGERDRD)を抗原としてモノクローナル抗体 41S-2 を作製した。ところが不思議なことにこの抗体軽鎖(41S-2-L)は抗原ペプチドを酵素的に分解するだけでなく、gp41 分子をも特異的に破壊した。図 3 や図 22 で説明したように 41S-2-L による抗原の酵素的分解反応は誘導期と活性期の二相性を示す。また、一度抗原を完全に分解すると再度抗原を添加しても誘導期は見られない。即ち、高い抗原分解活性を持つためには何かの conformation 変化を起こすと考えられる。図 4 は 41S-2-L を用いて標的タンパク質を分解した世界最初の例である。HIV-1 gp41 分子が十数時間でほとんど破壊されている。一方、この 41S-2-L はヒト血清アルブミンやウシ血清アルブミンを全く分解しなかった。即ち、41S-2-L は標的タンパク質を特異的に分解する。

この 41S-2-L 以外にもいくつかユニークな「スーパー抗体酵素」が得られている。これらのデータが蓄積されるにつれて、「スーパー抗体酵素」の特徴が明らかになってきた。特に、速度論的解析の結果(表 4)は、スーパー抗体酵素と通常の酵素との性質の違いを示す興味深いものである。

抗体酵素の触媒効率(kcat/Km)は trypsin と同等か約 1/10 程度という高い値を示し、通常の酵素に匹敵する高い酵素活性を持つと言える。ところが、各パラメータを見ると基質(抗原)に対する親和性(Km)は抗体酵素が trypsin よりも強いのにに対して、反応速度(kcat)は抗体酵素が trypsin の約 1/200 の値を示し、両者の性質は大きく違う。つまり、抗体酵素は基質(抗原)に高い親和性を示すという抗体としての性質を残しながら酵素活性を発揮していると考えられる。つまり速度論的に抗体酵素は抗体と酵素の中間に位置する。

8-3 抗体遺伝子(germline) 解析とその共通性

筆者らが見出した「スーパー抗体酵素」を含む天然型抗体酵素には共通して触媒三ツ組残基様構造(Asp, Ser, His からなるセリンプロテアーゼタイプの酵素活性部位)が見られることは前に触れた(図 21)。そこで、世界で作製されたモノクローナル抗体についてアミノ酸配列を基に立体構造解析を行い、触媒三ツ組残基様構造を持つ抗体の割合を統計学的に検証した結果を再度、下記にまとめた。

8-3-1 触媒三ツ組残基様構造の存在確率

Protein Data Bank より無作為に抽出した 56 株のモノクローナル抗体では 15 株(26.8%)が、また筆者らが所有するモノクローナル抗体 35 株では 15 株(42.9%)が、触媒三ツ組残基様構造を持つと推定された。面白いことに重鎖上で認められたのは僅かに 3 株(3.3%)であるのに対して、軽鎖では 28 株(31.9%)であった。

そこで、マウス由来の κ 型軽鎖について(マウス抗体軽鎖では κ 型と λ 型が存在し、 κ 型が圧倒的に多い)、更に V κ germline の解析をおこなってみた。全部で 93 種類存在する germline のうち、触媒三ツ組残基様

構造を持つ 28 株の軽鎖は、僅かに 9 種類の germline に由来していた(9/93=9.7%)。この 9 種類の germline の中では cr1 と bb1 の割合が高かった。さらに、上記 28 株中の 26 株(26/28=92.8%)は germline の中に触媒三ツ組残基をコードしている。触媒三ツ組残基をコードしている抗体は抗原分解活性を有していると思われるので、この抗体は生まれながらにして酵素でもあるという興味ある事実が浮かび上がる。

8-3-2 Asp1, Ser27a, His93 より成る触媒三ツ組残基様構造

germline にコードされている触媒三ツ組残基様構造を調べてみると、特に存在率の高い配置が存在する。それは Asp1, Ser27a, His93 より成る構造である。これは、Paul らの anti VIP 軽鎖で活性部位として同定され、筆者らの i41SL1-2 や i41-7, HpU-18, ECL2-B などの抗体軽鎖でも活性部位と推定された配置である(図 21 参照)。こうした構造は、cr1 や bb1 に加え bd2, cs1, bl1, bj2 と、合計 6 種類の germline に存在する。これらの抗体は抗原を認識し、かつ germline の段階で抗原を酵素的に分解する潜在能力を有するので Antigenase と定義した。

8-4 定常領域除去による酵素活性の向上

研究分担者の松浦らはヒト患者血清から分離した Bence Jones Protein (BJP;ヒト型抗体軽鎖)がペプチダーゼ活性を持つことを世界で最初に報告した。その後多くの BJP が分離され酵素活性を持つものが見出されている。松浦らは、HIR と名付けたある患者から分離精製した BJP のアミノ酸配列解析を行った後、特殊な酵素でほぼ可変領域に相当する部分だけを切り出し、軽鎖全体および可変領域部分だけの酵素活性の速度論的解析を行った。すると、軽鎖全体(可変領域および定常領域の両者が存在)では $K_m=1.5 \times 10^{-4}M$, $k_{cat}=6.2 \text{ min}^{-1}$ に対し、定常領域を切断して可変領域だけにした軽鎖では $K_m=7.3 \times 10^{-4}M$, $k_{cat}=4.8 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ となった(基質は Chromozyme TRY)。これは実に興味ある結果である。良く知られているように K_m は低いほど基質特異性(抗原親和性)が強く、 k_{cat} は高いほど基質を早く分解する。つまり、軽鎖全体に較べて可変領域だけでは酵素活性が大幅に上昇し、逆に基質特異性は低下した。軽鎖の定常領域は可変領域の酵素活性を大幅に低下させているのである。

8-5 酵素活性の発現と消失

上記の実験結果は実に示唆に富んでいる。前述した「軽鎖の定常領域は何のためにあるのか?」の答えがひとつ導かれたと思える。つまり抗体軽鎖の定常領域は可変領域がもつ酵素活性を抑制しているのである。と同時により高い抗原特異性を獲得している。たったひとつのデータでは?と思われるかも知れないが、実は筆者らも同様な抗体軽鎖の現象をマウス抗体で確認している(未発表)。

なぜ生体防御に関与する酵素はその活性を犠牲にしたいのか?これは下等生物が自身の持つ酵素で敵(抗原)を酵素分解した時、生じた fragment が生体自身に毒性をもつケースがでてきたのではないかと考えられる。そうなる分解に向いていたベクトルはむしろ敵との特異的結合に向く方がその生物にとって

好都合であり、こうした時点で、いよいよ抗体としての性質が生まれ始めたと考えれば reasonable である。

酵素活性を犠牲にして抗原親和性を獲得する構図はこれに限らない。筆者らはマウス抗体の重鎖、軽鎖の酵素活性を多く報告しているが、実に不思議なのはこの重鎖、軽鎖が一緒になった完全抗体では酵素活性がほとんど見られないのである。最初は何かの間違いではないかと疑問を持ったが、詳細な実験を何度繰り返しても完全抗体は酵素活性を発揮しない。これは、酵素活性を有する重鎖あるいは/および軽鎖が一緒になることによりむしろ抗体は酵素活性を完全に消失する方向に向く、と考えた方が合目的的である。因みに抗原親和性を比較すると、完全抗体になると平均で重鎖の10倍から100倍、軽鎖の100倍から1,000倍もの抗原親和性を獲得している。こうした事実をみると抗体は酵素活性を犠牲にして高い抗原親和性獲得に必死になって進化してきたと見ることもできる。(勿論、軽鎖と重鎖が結合すればそれらに酵素活性がなくても抗原親和性が上昇すると考えられるが、この両者が結合する性質はこうした現象の後で発生したものではないかと考えられる。)

8-6 抗体の起源

抗体の起源については未だに充分解明されているとは言い難い。酵素と抗体の起源を遡って考える時、例えば大腸菌には多くの酵素が存在するが抗体は存在しない。従って、酵素の出現の方が抗体の出現より古いのは間違いない。

抗体は脊椎動物あたりから確認できるらしいが、それ以下の生物でも抗体の定常領域や可変領域のドメインとしてチラホラ現れている。海綿のような下等生物でも抗体の可変領域ドメイン様(VドメインあるいはV-set)の配列をもつタンパク質を有している。この可変領域ドメインは Tyrosin-kinase としての機能を発揮するドメインと結合して大きなタンパク質を形成し、全体としては Tyrosin-kinase 活性を有しているが、このVドメインの機能は現時点では解っていない。脊椎動物近くなると定常領域(Cドメイン)のC1やC2ドメインがVドメインに結合するようになってくる。この場合V-C結合は1本鎖である。2本鎖ができてくるのはその後の世代である。

問題は、「では、最初のVドメインはどこからきたのか？」である。海綿が有する上記のVドメインの性質が明らかになれば、話しはもっとはっきりすることになるろう。

抗体酵素ではV-Cを切断してVドメインだけにするとその酵素活性が数十倍上昇する事がある。この実験データは何のためにCドメインがVドメインに結合せねばならないのかを考えさせられる。遺伝子レベルではVドメインとCドメインは完全に別々にコードされている。だから、はじめはそれぞれ全く別のタンパク質であった可能性が高い。分子進化は近くにある分子を適当にうまく使うと言われているが、たまたまV-C結合を起こすことによって酵素活性を犠牲にし、抗原特異性を上昇させ、結果的に生体防御能を高めたのではないかと想像される。

初期の頃、Vドメインは酵素としての機能を持ち、それは生きてゆくための食物を手に入れて消化するだ

けの目的に使われていたものが、ある時代にいろんな生物が出現して外的から身を守る必要に迫られて、食べるだけでなく敵を分解する事に機能を変化させて行くとすると V ドメインの意義が合理的に解釈できる。また、V-C 結合がなぜ必要になったかの説明ができる。

マウス型抗体の germline 解析から全ての抗体遺伝子のうち約 20%あるいはそれ以上に触媒三ツ組み残基様構造がコードされている。こうした触媒三ツ組み残基構造(あるいは別のタイプの酵素活性構造)を持つ V ドメインは古くは主に酵素として作用していた可能性がある。とくに C ドメインが結合しなければ V ドメイン単独の酵素活性は通常の酵素と変わらないくらい強い。

もし V ドメインの源が酵素であり、現在の抗体(軽鎖は V-C、重鎖は V-C1-C2-C3 からなる)がその源を 1 部のドメインとして保持しているとの推論はある程度合理性があり、あるいは合目的的でもあるのではないだろうか？

最後に一言触れて置かねばならないことは、天然型抗体酵素でも完全抗体でありながら酵素活性を持つものがいくつか報告されている事である。抗体軽鎖と抗体重鎖が結合して完全抗体になれば酵素活性を失うと述べた。これは一見筆者らの説明と矛盾するように見えるかも知れないが、中にはそうした完全抗体も存在する。ただ、そうした酵素活性を持つ完全抗体の生体内での機能は現在のところあまり解明されていない。Kaveri らの血友病患者から取得した抗体酵素(血液凝固を司る第 VIII 因子を分解する)は、血友病患者に不利に働いている。完全抗体は下手に酵素活性を持たない方が良いケースがあることは確かなようだ。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究によって「スーパー抗体酵素」の基礎的部分の解明がかなり進んだ。あとやらなければならないのは抗体酵素の結晶構造解析である。これにより、真の活性サイトの特定と、この構造解析に基づく、より高活性、より高機能の「スーパー抗体酵素」の開発に結びつけて行くことである。

一方で、「スーパー抗体酵素」の実用的展開を図る必要が明白になってきた。すでに述べたように胃潰瘍や胃ガンの原因菌と言われている *H. pylori* に対する「スーパー抗体酵素」の開発に成功した。また HIV がヒトに感染する際には chemokine receptor CCR5 という受容体を介する必要があることから、この CCR5 分子を標的とする抗体酵素の作製にも成功した。さらに、インフルエンザウイルスをターゲットとする抗体酵素の作製にも成功しており、現時点で、所期の研究構想で目的とした抗体酵素の作製が行えた。これらの「スーパー抗体酵素」(Antigenase)のいくつかは in vitro, in vivo 試験に入る段階を迎えようとしている。これらの成果はこれまでにない新型医薬品、特に分子標的医薬品としての大きな期待が寄せられる。また、「スーパー抗体酵素」は機能を発揮するのに補体などの助けを必要としないために、生体外での使用も可能であり、大気中のインフルエンザウイルスの不活化・除去などに応用可能で、社会のニーズに合った製品開発へと結びつける事が出来る。

3. 2 ヒト型抗体軽鎖(Bence Jones Protein:BJP)の基礎および応用研究

(花田医院 松浦グループ担当)

3-2-1 腎障害とその予防

(1) 研究実施内容及び成果

種々の病態の多発性骨髄腫患者の尿から BJP を精製した。これらの BJP をブタ正常腎細胞である LLC-PK₁に加えた。その結果重症腎障害を合併する患者から得た BJPを加えた LLC-PK₁は細胞が萎縮していた。この細胞は核 DNA 断片化を示す TUNEL 染色で陽性を示した。ミトコンドリア活性を示す WST 法にて細胞生存率を算定したところ、LLC-PK₁は BJP の濃度依存性に低下していた。腎合併症を有する患者から得た一部の BJP および腎合併を有しない患者から得た BJP は LLC-PK₁ に対して形態上影響を示さず、TUNEL 染色は陰性で、WST 法においても影響を示さなかった。細胞傷害性を示す BJP の catalytic potential を基質に Chromozym TRY(z-Val-Gly-Arg-pNA)を用いて測定したところ細胞傷害性のない BJP に比べ数十倍高い値を示した。細胞傷害を示さない BJP は catalytic potential は低いか認められなかった。このことから高い抗体酵素活性を有する BJP は腎細胞に傷害性を示し、腎合併症をもたらす可能性が示唆された。また、重症腎障害を合併する骨髄腫患者から得た BJP であっても酵素活性が低いものは培養細胞傷害性は認めれず、その腎傷害性は他の機序が考えられた。

細胞傷害性 BJP の細胞局在を調べるために BJP を LLC-PK₁に加えた後 FITC ラベル抗ヒト κ 抗体にて染色し検討した。その結果細胞傷害性 BJP は細胞質内に蓄積していることが確認された。Fas などの TNF ファミリーは細胞表面でリガンドと結合し細胞死シグナルを伝達することからこの細胞傷害性 BJP はこれらの機序によるものではないと考えられる。

BJP の細胞傷害性と酵素活性の関連性を調べるために細胞傷害性 BJP の酵素活性を阻害しその細胞への影響を検討した。BJP の酵素活性阻害剤を見出すために、種々のプロテアーゼインヒビターを加え酵素活性を測定した。そのうちセリンプロアーゼインヒビターである Diisopropylfluorophosphate (DFP) は濃度依存性に BJP の酵素活性を阻害した。細胞傷害性 BJP に過剰の DFP を加え BJP と結合させた。未結合の DFP を除去するためにゲルろ過カラムに通し DFP 結合 BJP 画分を得た。この画分の酵素活性を測定したところ酵素活性は消失していた。DFP 結合 BJP を LLC-PK₁ 細胞に加えてその影響を検討した。DFP 結合 BJP は LLC-PK₁ に形態上何の影響も示さず、WST 法による細胞生存率の測定も影響を示さなかった。このことから細胞傷害性 BJP はその酵素活性が阻害されることにより細胞傷害性が消失することが判明した。つまり細胞傷害性 BJP の細胞傷害性はその酵素活性に起因する。

これにより現在まで考えられていた BJP の腎障害の機序では説明のつかなかった症例に BJP の抗体酵素活性が関与していることが明らかになった。

また、現在までも抗体酵素が疾患の病因に関与しているという報告は存在したが、抗体酵素活性が病因と直接関与していることを示したのはこれがはじめてである。

この抗体酵素活性が骨髄腫患者の腎障害の病因であることから、その酵素活性を阻害することにより治療へ応用できるかを検討した。

酵素活性を阻害するためにすでに臨床分野で膵炎や循環ショックなどの治療剤として用いられているウリナスタチンを用いた。ウリナスタチンはヒト尿中から単離された糖タンパクで Urinary Trypsin inhibitor といわれている。ウリナスタチンは濃度依存性に細胞傷害性 BJP の酵素活性を阻害した。ウリナスタチン結合 BJP を加えた LLC-PK1 は形態上変化を示さなかった。WST 法でもウリナスタチン結合 BJP は LLC-PK1 に対し影響を示さなかった。このことからウリナスタチンは細胞傷害性 BJP の酵素活性を阻害しその細胞傷害性を抑制しうることが判明した。ウリナスタチンを骨髄腫患者に投与することにより将来発生する腎障害を予防する薬剤として期待しうると考えられた。

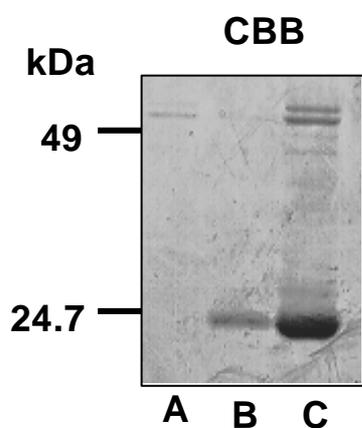
(2) 研究成果の今後期待される効果

多発性骨髄腫患者の主たる合併症である腎障害の発症・重症度予測が患者尿から得た BJP の酵素活性を測定することにより可能となる。またその場合、ウリナスタチンなどの BJP の酵素活性を阻害する蛋白分解酵素を投与することにより腎障害の発症・進展を抑制することが可能になり、骨髄腫患者の予後改善をもたらす。

3-2-2 BJP による癌治療

(1) 研究実施内容及び成果

癌細胞に傷害性を示す BJP を見出すために、種々の癌培養細胞 (HepG2, DLD-1, ACHN A549) を培養し12種類の抗体酵素活性を有する BJP を加え細胞の形態学的変化を観察した。BJP(YAG)を加えた A549(肺癌細胞)は細胞が縮小萎縮していた。



このことから、BJP(YAG)は肺癌細胞に傷害性を持つことが考えられた。

患者尿中から精製した BJP(YAG)には SDS 電気泳動でモノマーおよびダイマーの2つのバンドが認められた(図 37C)。

図 37

これをゲルろ過カラムにかけモノマー(図1B)またはダイマー(図37C)を含む画分に分けた(図38)。

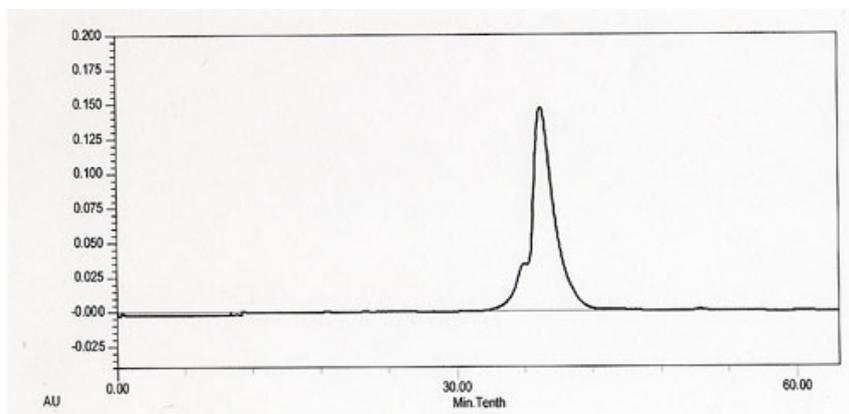
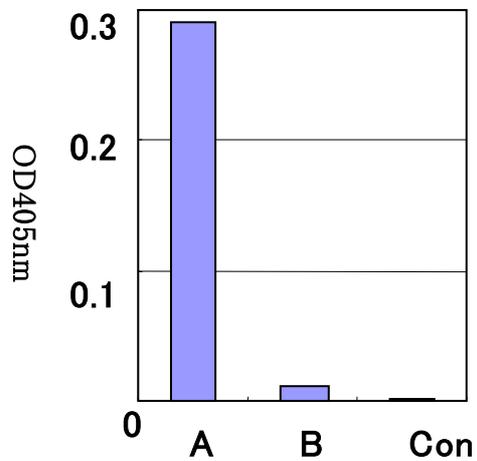


図 38



これらの画分の酵素活性を基質に Chromozym TRY(z-Val-Gly-Arg-pNA)を用いて測定した。モノマーを含む画分には酵素活性は殆ど認められず(図3B)、ダイマーを含む画分には高い酵素活性を認められた(図39A)。

図 39

このことから BJP(YAG)はダイマーのみが酵素活性を有することが判明した。BJP(YAG)ダイマーとモノマーを A549 細胞に加えその形態上の変化を観察した。BJP(YAG) ダイマーを加えた A549 は萎縮していたが(図 40)、BJP(YAG)モノマーを加えた A549 は何の変化も示さなかった(図 41)。BJP(YAG)ダイマーを HepG2, Hela, ACHN, DLD-1 に加えても形態上変化を示さなかった。

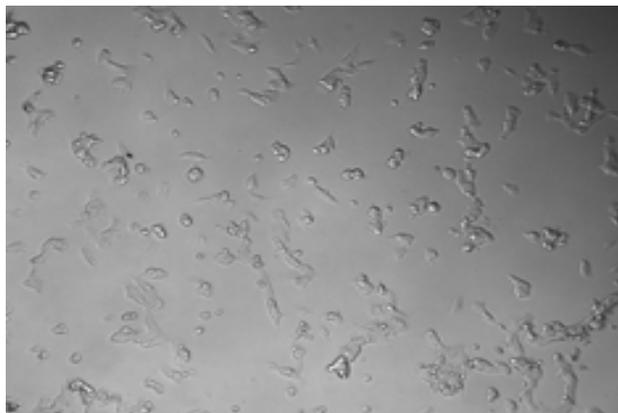


図 40

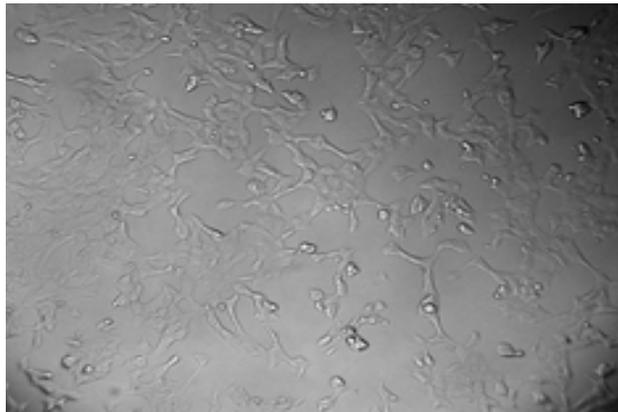
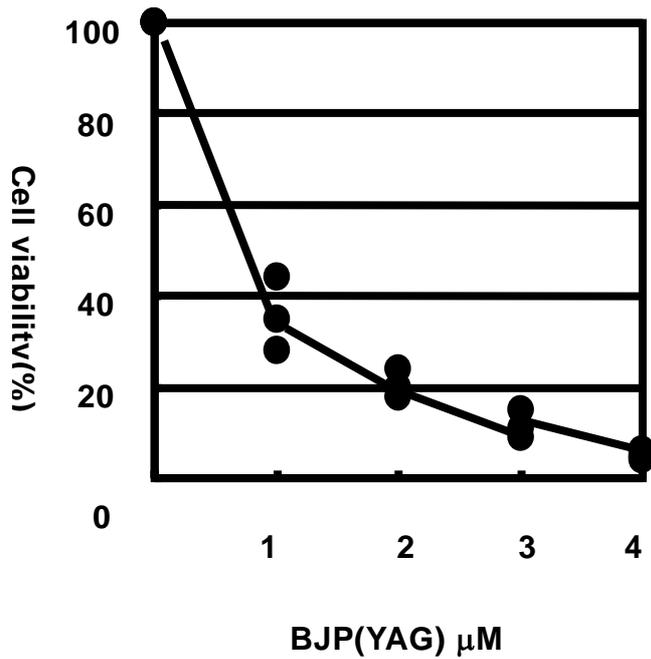


図 41



96well microplate の各 well に 5×10^4 cells の A549 を播いた。16 時間培養後 BJP(YAG)ダイマーを終濃度 1, 2, 3, 4 M となるように加えた。37°C、24 時間培養した後 WST を加え4時間後 450nm の吸光度を測定した。この結果 BJP(YAG)は量依存性に A549 に対して傷害性を示した(図 42)。

図 42

これらのことから酵素活性をもつ BJP(YAG)ダイマーは A549 に対して傷害性を示すことが判明した。

BJP(YAG)ダイマーの正常細胞に対しての影響を調べるため LLC-PK1 (ブタ腎正常細胞)(図 43), L-2 (ラット肺正常細胞)(図 44)を培養し BJP(YAG)ダイマーを加え形態変化を観察したが、変化は認められなかった。

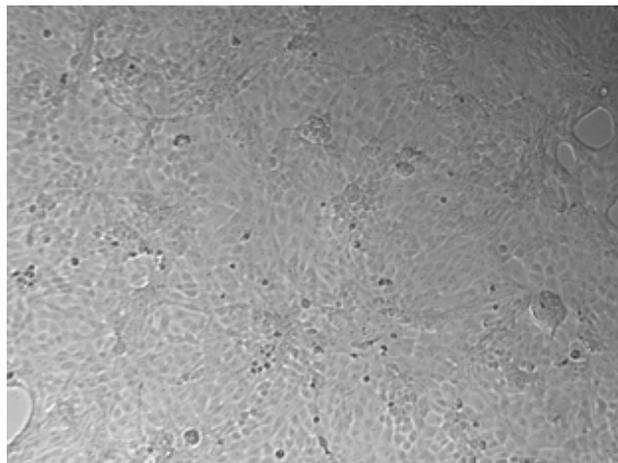


図 43

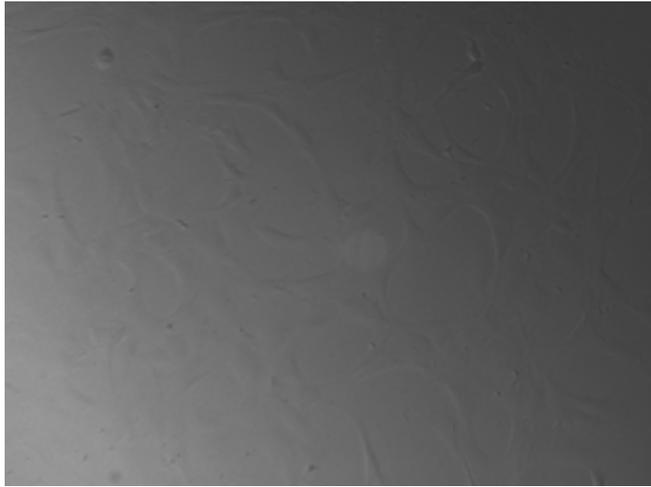


図 44

以上によ BJP(YAG)ダイマーは A549 を特異的に傷害することが確認された。

BJP(YAG)ダイマーに過剰量の Diisopropylfluorophosphate (DFP)を加え、5分間静置後 50mM Tris-HCl buffer, pH7.4, 0.15M NaCl で透析し 100 μ l とり、終濃度 100 μ M の Chromozym TRY を加え OD405nm を測定した。DFP に結合した BJP(YAG)は抗体酵素活性を失っていた。この DFP 結合 BJP(YAG)を A549 に加え形態変化を観察した。その結果 A549 は変化を示さなかった(図9)。

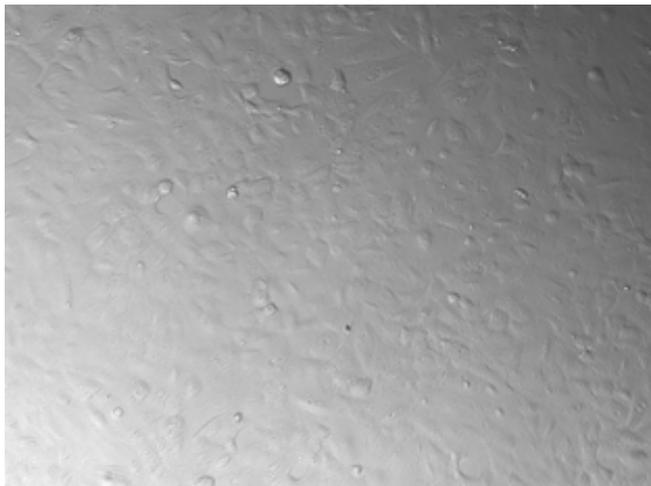


図 45

96well microplate の各 well に 5×10^4 cells の A549 を播いた。16 時間培養後 BJP(YAG)ダイマーを終濃度 1, 2, 3, 4 M となるように加えた。37°C、24 時間培養した後 WST を加え4時間後 450nm の吸光度を測定した。この結果 DFP-BJP(YAG)は A549 に対して影響を示さなかった。(図 46)

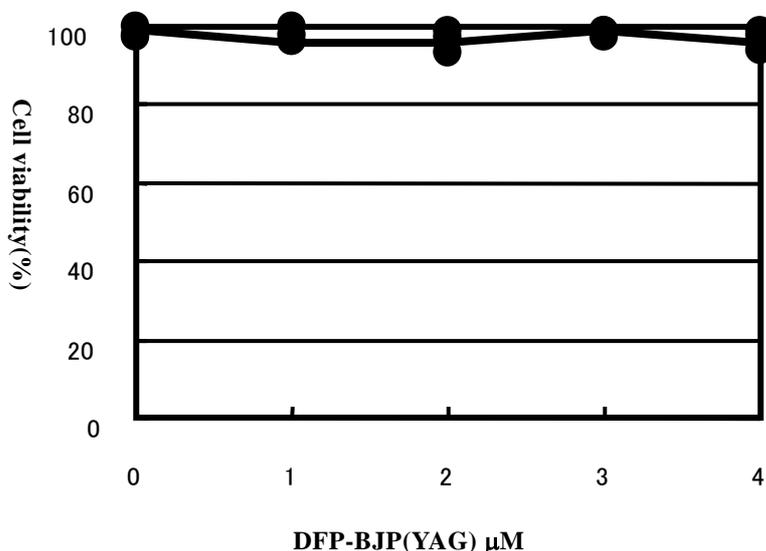


図46

これらのことから BJP(YAG)の肺癌細胞傷害性はその酵素活性に起因することが判明した。

BJP(YAG)ダイマー溶液に BJP 量の約 1/50 量の Lysyl endopeptidase, トリプシン またはプロテアーゼ V8 を加え 37°C で 24 時間後 HPLC 逆相カラム (C12) にかけて分画した。各画分をアミノ酸シーケンサーにかけ BJP(YAG)の可変部位及び定常部のアミノ酸配列を決定した。このアミノ酸配列から BJP(YAG)のアミノ酸配列をコードするコドンを推定し塩基を決定した。

BJP(YAG)をコードする塩基配列に両端に制限酵素サイト(NcoI, XhoI)を付加しオリゴヌクレオチドを人工合成した。このオリゴヌクレオチドを C 末端に His tag 配列を持つ pET20 b (+)のマルチクローニングサイトに組み込んだ後大腸菌にトランスフォームし recombinant-BJP(YAG)を発現させた。

大腸菌発現タンパクを Ni-agarose にかけて酸性バッファーで溶出させた。溶出液に 1M Tris 溶液を加え中性にした後再び Ni-agarose カラムにかけて溶出させた。

この溶出液を superose12 にかけて分画しダイマーとモノマーに分け、各画分から 200ml とり終濃度 100 μM の Chromozym TRY を加え酵素活性を測定した。

recombinant-BJP(YAG)は wild type と同様にダイマーに酵素活性が認められた。

subconfluent にまで培養した L-5, LLC-PK₁, A549 に 1mM recombinant-BJP(YAG)を加え、18 時間後形態を観察した。recombinant-BJP(YAG)は L-5, LLC-PK₁ 等の正常細胞群には影響を示さなかったが、肺癌細胞である A549 に対しては傷害性を示した。

96well microplate の各 well に 5×10^4 cells の A549 を播いた。16 時間培養後 recombinant-BJP(YAG) ダイマーを終濃度 1, 2, 3, 4 μ M となるように加えた。37°C、24 時間培養した後 WST を加え4時間後 450nm の吸光度を測定した。この結果 recombinant-BJP(YAG)は A549 に対して濃度依存性に傷害性を示した。

これらのことから BJP(YAG)および recombinant-BJP(YAG)は正常細胞に対しては影響を与えず培養癌細胞に傷害性を示すことが出来ることが判明した。

(2)研究成果の今後期待される効果

抗体酵素活性を有する BJP(YAG)および recombinant-BJP(YAG)はその抗原特異性と酵素活性により A549 という肺癌細胞にのみ傷害性を示すことから、肺癌患者に投与し抗癌剤として有用と考えられる。また、其の特異性から正常細胞に対しては何ら影響を示さないことから副作用が少ない抗癌剤として有用であると考えられる。また recombinant-BJP(YAG)の抗体酵素活性を変異体を作製することにより上昇させ、より細胞傷害性の強い製品が入手可能となる。

3-2-3 抗体酵素の活性向上法

(1)研究実施内容及び成果

BJP(HIR)のアミノ酸配列構造を調べるためにリシルエンドペプチダーゼを加え BJP を断片化した。この断片化された BJP の酵素活性を測定したところ、元の断片化していない BJP(HIR)に比べて数十倍高い酵素活性があるのを発見した。この BJP(HIR)のアミノ酸配列を調べるために BJP(HIR)をリシルエンドペプチダーゼ、プロテアーゼ V8 で消化し HPLC で分取しのアミノ酸シーケンサーで調べた。このことから BJP(HIR)で活性をもつ断片は N 末端から 103 番目までのアミノ酸を含む BJP(HIR)の V 領域(HIR-VL)であることが判明した。HIR-VL をコードする DNA をコドン表から決定し、DNA を合成した(HIR-VL-DNA)。この HIR-VL-DNA を発現ベクターにサブクローニングし大腸菌にトランスフォームした後 これが HIR-VL 蛋白を発現することを確認した。同様に full の HIR 蛋白を発現する系を樹立した。BJP の抗体酵素活性はリシルエンドペプチダーゼによる断片化で上昇する事が確認されたが、さらに IgG についてリシルエンドペプチダーゼによる抗体酵素活性(z-Val-Gly-Arg-pNA 切断活性)の影響について調べた。抗体酵素活性のない健常者 IgG はリシルエンドペプチダーゼによる断片化で抗体酵素活性に変化は認められなかったが、骨髄腫患者 IgG は断片化後抗体酵素活性が有意に上昇した。

(2)研究成果の今後期待される効果

抗体酵素を用いて標的分子を破壊し治療へ応用しようと試みがあるが、抗体酵素の酵素活性は一般にトリプシンなどの酵素に比べて遥かに弱い。この抗体酵素活性向上法により標的分子切断の効率化を図り抗体酵素が有効な治療剤になりうる可能性がある。

4 研究参加者

①宇田グループ(「スーパー抗体酵素」の基礎と応用に関する研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
宇田泰三	県立広島大	教授	反応解析・研究統括	平成13年12月～平成19年3月
江頭直義	県立広島大	教授	抗体によるバイオナノ材料作製	平成13年12月～平成19年3月
一二三恵美	県立広島大	助教授	Antigenase の設計・解析・応用展開	平成13年12月～平成19年3月
三苫好治	県立広島大	助教授	抗体の修飾およびリポソームの合成	平成17年4月～平成19年3月
岡村好子	県立広島大	助手	Antigenase の作製とターゲティング法の開発	平成17年4月～平成19年3月
田代秀樹	県立広島大	助手	抗体酵素によるバイオ素子の開発	平成18年4月～平成18年5月
光田有希恵	広島県大	大学院生	活性発現メカニズム解析と HIV 感染阻止抗体酵素の開発	平成13年12月～平成17年3月
鉢内健司	広島県大	院生・M2	ピロリ菌に対する Antigenase の取得	平成15年2月～平成16年3月
山田由紀子	広島県大	院生・M2	ピロリ菌に対する Antigenase の取得	平成15年2月～平成16年3月
城平直樹	県立広島大	大学院生	抗インフルエンザ抗体とその抗体酵素の取得	平成16年1月～平成17年8月
山口真史	広島県大(旧)	大学院生	CCR5/ECL2B 領域の抗体酵素	平成16年1月～平成18年3月
町元雄太	県立広島大	大学院生	活性発現機構の解明	平成18年4月～平成19年3月
加藤法弘	県立広島大	大学院生	抗体遺伝子の解析	平成18年4月～平成19年3月
鉢内健司	CREST	CREST 技術員	ピロリ菌に対する Antigenase の取得	平成16年4月～平成19年3月
山田由紀子	CREST	CREST 技術員	ハイブリドーマの作製と培養	平成16年4月～平成19年3月
奥田拓郎	CREST	CREST 技術員	ピロリ菌ウレアーゼの精製	平成15年5月～平成19年3月
高尾信一	広島県保健環境センター	主任研究員	インフルエンザウイルスの調製と試験	平成17年4月～平成19年3月
栢管敦史	CREST	CREST 技術員	抗体の遺伝子発現とマウスを用いた vivo 試験	平成16年4月～平成17年3月
山本和彦	近畿大工学部(東広島)	助教授	抗体遺伝子の解析と Antigenase の進化過程の解明	平成15年4月～平成17年3月
S.Paul	UTH	Prof.	情報交換・性能試験	平成13年12月～平成19年3月

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
光田有希恵	UTH	Post Doc.	抗体酵素の基礎的研究	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月
野田昌樹	島津製作所	課長	抗原設計	平成 13 年 12 月～平成 16 年 7 月
森原史子	福山臨床	研究員	<i>H.pylori</i> 菌の感染実験	平成 14 年 3 月～平成 19 年 3 月
S.Singh	CREST	PD	抗体の遺伝子解析と発現、効率的作製の開発	平成 14 年 9 月～平成 15 年 2 月
横道 博	CREST	CREST 研究補助員	反応解析の実験補助	平成 14 年 9 月～平成 16 年 3 月
山本剛史	CREST	CREST 研究補助員	抗体酵素固定化リボソームの作製と応用	平成 15 年 10 月～平成 19 年 3 月
林 仁美	CREST	CREST 研究補助員	事務	平成 14 年 4 月～平成 16 年 2 月
小笠原美紀	CREST	CREST 研究補助員	事務	平成 16 年 3 月～平成 19 年 3 月
篠原兵庫	老健美樹の園	院長	顧問	平成 13 年 12 月～平成 19 年 3 月
村山隆亮	CREST	CREST 研究補助員	抗体酵素固定化リボソームの作製	平成 14 年 5 月～平成 15 年 1 月
周 延	広島県大	院生・D3	抗体の取得	平成 13 年 12 月～平成 14 年 3 月

②松浦グループ (Bence Jones Protein に関する研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
松浦欽司	花田医院	院長	BJP の抗体酵素活性と細胞傷害、癌治療への応用	平成 13 年 12 月～平成 19 年 3 月
小原京子	花田医院	研究員	BJP の抗体酵素活性と細胞傷害、癌治療への応用	平成 13 年 12 月～平成 19 年 3 月

③西園グループ (マウスを用いた in vivo 試験)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
西園 晃	大分大学 医学部感染分子病態制御	教授	マウスを用いた in vivo での抗体酵素の効果確認	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月
山城 哲	大分大学 総合科学研究支援センター	助教授	ヒト型抗体ライブラリーからの抗体酵素の選別	平成 17 年 4 月～平成 18 年 3 月
伊波英克	大分大学 医学部感染分子病態制御	助教授	酵母発現系を用いた抗体酵素の大量発現システムの構築	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Aalin Friboulet (Prof.& Director CNRS University of Technology of Compiègne)	抗体酵素に関する 日仏シンポジウム	広島	平成16年9月20日～ 平成16年9月24日
Moncef Zouali (Professor INSERM Universite Pierr et Marie Curie)	抗体酵素に関する 日仏シンポジウム	広島	平成16年9月20日～ 平成16年9月25日
Srini Kaveri (Professor INSERM Universite Pierr et Marie Curie)	抗体酵素に関する 日仏シンポジウム	広島	平成16年9月20日～ 平成16年9月23日
Sudhir Paul (Professor University of Texas Houston Medical School)	抗体酵素に関する 日米露ワークショップ	広島	平成18年9月11日～ 平成16年9月15日
Georgy Nevinsky (Professor Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Division of Russian Academy of Sciences)	抗体酵素に関する 日米露ワークショップ	広島	平成18年9月11日～ 平成16年9月15日

6 成果発表等

《CREST研究に係わるものを全て記載。発行日等の順に並べてください。また公開に支障があるものは「その他 △件」としてまとめ、別紙の「非公開用報告書」に記載してください。》

(1) 原著論文発表 (国内誌 2件、国際誌 22件)

宇田グループ

1. Preparation and immunological features of syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody using complementarity determining region (CDR) peptide as the immunogen. Y. Zhou, E. Hifumi, Y. Niimi, T.Uda, *Lett. Peptide Science*, **7**(5), 299-310 (2001).
2. Simultaneous detection of two antigens by surface plasmon resonance sensor. T. Uda, K. Inoue, T.

- Nishimura, E. Hifumi, K. Shimizu, N. Egashira, *Electrochemistry*, **69**, 976–979(2001).
3. Presence of catalytic activity of the antibody light chain raised against complementarity determining region peptide of super catalytic antibody. Y. Zhou, E. Hifumi, H. Kondo, T. Uda, *Biological Systems Engineering, ACS symposium Series 830*, 200–208(2002).
 4. Elimination of ingredients effect to improve the detection of anti HIV-1 p24 antibody in human serum using SPR apparatus, E. Hifumi, N. Kubota, Y. Niimi, K. Shimizu, N. Egashira, T. Uda, *Anal. Sci.*, **18**, 863–867 (2002).
 5. Targeted destruction of the HIV-1 coat protein gp41 by a catalytic antibody light chain, E. Hifumi, Y. Mitsuda, K. Ohara, T. Uda, *J. Immunol. Methods*, **269**, 283–298(2002).
 6. Fabrication of a Trimethylamine gas sensor based on electrochemiluminescence of Ru(bpy)₃²⁺/nafion gel and its application to a freshness sensor for seafood. N. Egashira, H. Kumasako, T. Uda, K. Ohga, *Electroanalysis*, **14**(12), 871–875(2002)
 7. 新規ルテニウム(II)錯体/ナフィオン膜修飾電極の電解発光応答とその安定性、村山隆亮、三苦好治、大賀一也、宇田泰三、江頭直義、*分析化学*, **51**(12), 1187–1190(2002).
 8. Endopeptidase character of monoclonal antibody i41-7 subunits. Kenji Hatiuchi, Emi Hifumi, Yukie Mitsuda, and Taizo Uda, *Immunol. Lett.* **86**, 249–257(2003).
 9. Catalytic features of monoclonal antibody i41SL1-2 subunits. E. Hifumi, H. Kondo, Y. Mitsuda, T. Uda, *Biotechnol. Bioeng.*, **84**(7), 485–493(2003).
 10. Presence of a Power Function Rule in Molecular Recognition by Antibodies to the Antigens/Analogues. E. Hifumi, T. Usagawa, T. Uda *広島県立大学紀要*, 15 巻、第1号、11–23(2003).
 11. Determination of amino acids and peptides by flow-through detector on the basis of electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex from a Au electrode modified with albumin or lysozyme, P. Jinshun, Y. Mitoma, C. Zhao, E. Hifumi, T. Uda, N. Egashira, *ITE letters*, **4**(5), 606–609 (2003).
 12. Application of electrochemiluminescence sensor to a rapid method of estimating activity of enzyme in hydrolysis of peptides, P. Jinshun, Y. Mitoma, T. Uda, E. Hifumi, K. Shimizu, N. Egashira, *Electroanalysis*, **16**, 1262–1265 (2004).
 13. Epitope mapping and features of the epitope for MAbs inhibiting enzymatic activity of *H. pylori* urease. R. Fujii, F. Morihara, T. Oku, E. Hifumi, and T. Uda, *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 434–444(2004).
 14. A recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against *H. pylori* associated

- disease. R. Fujii F. Morihara, K. Fukushima, T. Oku, E. Hifumi and, T. Uda, *Biotechnol. Bioeng.* **86**(7), 737-747(2004).
15. Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant. *Biotechnol. Bioeng.* **86**(2), 217-225(2004). Y. Mitsuda, E. Hifumi, K. Tsuruhata, H. Fujinami, N. Yamamoto, T. Uda
 16. Improvement of catalytic antibody activity by protease processing. K. Ohara, H. Munakata, E. Hifumi, T. Uda, K. Matsuura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**(3), 612-616(2004).
 17. Determination of Thiabendazole on the basis of electrochemiluminescence generated from the reaction with a ruthenium complex. N. Egashira, Y. Mitoma, H. Ichikawa, T. Uda, *ITE Letter*, **5**, 545-547 (2004).
 18. Investigation of active form of catalytic antibody light chain 41S-2-L. Y. Mitsuda, K. Tsuruhata, E. Hifumi, M. Takagi, T. Uda, *Immunol. Lett.*, **96**(1), 63-71(2005).
 19. Broadly distributed nucleophilic reactivity of proteins coordinated with specific ligand binding activity. Y. Nishiyama, Y. Mitsuda, H. Taguchi, S. Planque, M. Hara, S. Karle, CV. Hanson, T. Uda, S. Paul, *J. Mol. Recognit.* **18**, 295-306(2005).
 20. Specific degradation of *H. pylori* urease by a catalytic antibody light chain. E. Hifumi, K. Hatiuchi, T. Okuda, A. Nishizono, Y. Okamura, T. Uda, *FEBS J. (Eur. J. Biochem.)*, **272**, 4497-4505(2005)
 21. Determination of nonionic surfactants by electrochemiluminescence of Tris(2,2'-bipyridine)-ruthenium complex leaked from destruction of a liposome. N. Egashira, Y. Mitoma, H. Tashiro, T. Uda, *ITE Lett.*, **6**(5), 444-448(2005).
 22. A catalytic antibody heavy chain HpU-2 degrading its epitope and *H.pylori* urease. E. Hifumi, Y. Yamada, T. Uda, *Immunol. Lett.*, **103**, 68-74(2006).
 23. Pathogenicity of catalytic antibodies: catalytic activity of Bence Jones proteins from myeloma patients with renal impairment can elicit cytotoxic effects, K. Matsuura, K. Ohara, E. Hifumi, T. Uda, *Biol.Chem.*, **387**, 543-548 (2006).
 24. Electrogenerated chemiluminescence from Ru(II) complex derivatives absorbed on Au electrodes, N.Egashira, S. Morita, H. Tashiro, Y. Mitoma, T. Uda, *ITE Lett.*, **7**(3), 276-280(2006).

(2) その他の著作物(総説、書籍などを記載してください。)

総説

1. 「スーパー抗体酵素」のチャレンジ、宇田泰三、一二三恵美、*バイオインダストリー*、**18**(8), 5-15(2001)
2. ナノ材料/素子としての人工抗体酵素への期待、宇田泰三、*バイオインダストリー*、**19**(3), 23-34(2002)

3. Antigenase としての「スーパー抗体酵素」とその効率的作製法、一二三恵美、*化学工業*、**54**, 368-372(2003).
4. 「スーパー抗体酵素」(Antigenase)は抗生物質を超えられるか？宇田泰三、*化学*、**58**(12), 26-28 (2003).
5. Super catalytic antibody and “Antigenase”, T. Uda and E. Hifumi, *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 143-152(2004).
6. 酵素と抗体は兄弟？宇田泰三、一二三恵美、*高分子*、**53**, 859-863(2004).
7. Antigenase (スーパー抗体酵素)による HIV の感染阻止を目指して、一二三恵美、宇田泰三、*未来材料*、**5**(7), 41-45(2005).
8. “抗原を分解する抗体”の展開、一二三恵美、岡村好子、宇田泰三、*科学*、**75**(11), 1254-1259(2005).
9. *H. pylori* ウレアーゼを破壊する「スーパー抗体酵素」(アンチゲナーゼ)、宇田泰三、一二三恵美、岡村好子、*日本臨床*、**64**(2), 286-292(2006).

著書

1. 最新酵素利用技術と応用展開 (バイオテクノロジーシリーズ)
(Advanced Enzyme-based Techniques with Comprehensive Applications)
第6章 「スーパー抗体酵素」のチャレンジ(p.57-70)
宇田泰三、一二三恵美(シーエムシー、2001年、10月)
 2. 第6版 化学便覧 応用化学編 II, 宇田泰三、「バイオセンサー」p1337-1342(2003)、丸善株式会社、東京 (2003.1)
 3. 高分子材料・技術総覧
第5章(第5節) 「バイオ触媒工学材料」(p608-614)、宇田泰三
産業技術サービスセンター発行(2004. 9)
 4. 第5版 実験化学講座、29 巻、バイオテクノロジーの基本技術、「免疫沈降法」、宇田泰三、2006年
- (3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)
- 平成14年度
1. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)天然型抗体酵素の特徴(広島県立大・生物資源)一二三恵美、光田有希恵、周延、宇田泰三
 2. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)「スーパー抗体酵素」41S-2-Lの超可変領域(CDR)ペプチドを分解する新たな天然型抗体酵素(広島県立大・生物資源)近藤博之、周延、一二三恵美、宇田泰三

3. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)「スーパー抗体酵素」の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体の性質(広島県大・生物生産)周延、一二三恵美、宇田泰三
4. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)マクロファージ指向性 HIV-1 のコレセプターCCR5 ペプチドに対するモノクローナル抗体の作製(広島県大・生物生産)藤波寛子、周延、一二三恵美、宇田泰三(東京医科歯科大)山本直樹
5. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)「スーパー抗体酵素」41S-2-L の反応メカニズムの解明:抗原分解反応中における構造変化(広島県立大・生物資源)光田有希恵、一二三恵美、宇田泰三
6. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)新規な天然型抗体酵素 i41-7 (広島県立大・生物資源)鉢内健司・周延・一二三恵美・宇田泰三
7. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)新規ルテニウム錯体修飾電極の電極発光を利用するアミノ基末端プロリンの検出(広島県立大・生物資源)村山隆亮、朴錦順、一二三恵美、宇田泰三、江頭直義
8. 日本化学会第81春季年会(2002年3月25~29、早稲田大学・東京)ルテニウム錯体の電解発光と抗体を組み合わせた分析法(広島県立大・生物資源)住友匡謙、朴錦順、一二三恵美、宇田泰三、江頭直義
9. センサ、マイクロマシン国際会議「招待講演」Proceedings of the 19th sensor symposium on sensors, micromachines, and applied systems. Taizo Uda, Emi Hifumi and Yukie Mitsuda(2002, 5,30-31, Kyoto)pp.123-130.
10. 第12回バイオ・高分子シンポジウム(2002年8月1-2日、上智大学)「スーパー抗体酵素」の一般的創製方の確率に向けて[[](広島県立大学・生物資源)一二三恵美、光田有希恵、宇田泰三
11. 第6回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2002年9月27~28日、大阪大学)天然型抗体酵素の性質と構造的特徴(広島県立大生物資源・CREST)一二三恵美、光田有希恵、宇田泰三
12. 第6回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2002年9月27~28日、大阪大学) *Helicobacter pylori* urease に対する活性抑制抗体のエピトープと免疫誘導能((株)福山臨床検査センター*、広島県立大学 生物資源学部、CREST)森原史子*、藤井亮治*、一二三恵美、宇田泰三
13. 第6回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2002年9月27~28日、大阪大学)proteaseによるベンス・ジョーンズ蛋白の抗体酵素の活性向上(花田医院・近大医・広島県立大・CREST)小原京子、宗像浩、一二三恵美、宇田泰三、松浦欽司
14. 第75回日本生化学会大会(2002.10.14~17,京都国際会議場)リシルエンドペプチダーゼ処理によるベンス・ジョーンズ蛋白の抗体酵素活性の上昇 小原京子、宗像浩、宇田泰三、松浦欽司
15. 平成14年度日本生物工学会(2002年10月27~30日、大阪国際会議場) *Helicobacter pylori* ウレア

ーゼの活性抑制抗体 HpU-2 のエピトープ解析と免疫応答誘導ペプチド(1 広島県立大・生物資源、2 榑福山臨床、)宇田泰三、一二三恵美、森原史子、藤井亮治

16. 平成14年度日本生物工学会(2002年10月27~30日、大阪国際会議場)天然型抗体酵素の特徴(II)ー触媒三ツ組残基と酵素活性の関係ー(広島県立大・生物資源)一二三恵美・宇田泰三
17. 平成14年度日本生物工学会(2002年10月27~30日、大阪国際会議場)新規な天然型抗体酵素 i41-7(第2報)(広島県立大・生物資源)鉢内健司・一二三恵美・宇田泰三
18. ナノインテリジェント材料システム国際シンポジウム(2002年10月30日、東京、タイム24ビル)「招待講演」New functional nano-biomaterial ~From super catalytic antibody to “Antigenase” ~ Taizo Uda, Emi Hifumi
19. IUPAC Polymer Conference on the Mission and Challenges of Polymer Science and technology, (2002.12.2~5,Kyoto)Features of some natural catalytic antibodies, Taizo Uda, Emi Hifumi, Yukie Mitsuda

平成15年度

1. 「招待講演」:「新しい人工酵素:アンチゲナーゼ (Antigenase)」(2003年3月7日、理化学研究所) 宇田泰三
2. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)Helicobacter pylori urease の活性抑制抗体 HpU-18 の天然型抗体酵素としての性質(広島県立大・生物資源、科技団 CREST)一二三恵美、山田由紀子、宇田泰三
3. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)「スーパー抗体酵素」41S-2-L の反応メカニズムの解明:構造の変化と抗原分解活性の関係(広島県立大・生物資源、科技団 CREST)光田有希恵、一二三恵美、宇田泰三
4. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)ヘリコバクター・ピロリ菌のウレアーゼに対する抗体 HpU-9 軽鎖のペプチダーゼ活性(広島県大・生物生産、科技団 CREST)山田由紀子、一二三恵美、宇田泰三
5. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)ケモカインレセプターCCR5に対する天然型抗体酵素(広島県大・生物生産、科技団 CREST)鶴端久美、一二三恵美、宇田泰三(東京医科歯科大)山本直樹
6. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)「ヘリコバクター・ピロリ菌のウレアーゼ分子をターゲットとするワクチン用ペプチド(広島県立大・生物資源、福山臨床、科技団 CREST)森原史子、藤井亮治、一二三恵美、宇田泰三
7. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)血栓の溶解を制御するペプチド

- (広島県立大・生物資源)山田学、堀内俊孝、早川知里、一二三恵美、宇田泰三
8. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)ビスフェナントロリン銅錯体の電界発光に基づくフロースルー型検出器によるアミンおよびアミノ酸の応答(広島県立大・生物資源)住友匡謙、弥永佳代、三苦好治、宇田泰三、江頭直義
 9. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18~21、早稲田大学・東京)リシルエンドペプチダーゼ処理によるベンス・ジョーンズ蛋白の抗体酵素活性の上昇(広島県立大・生物資源、花田医院、科技団CREST)小原京子、宗像浩、宇田泰三、松浦欽司
 10. Mini-symposium on catalytic antibodies. (2003.4.10, Houston, USA) “Common features of some natural catalytic antibodies.” Taizo UDA and Emi HIFUMI
 11. Mini-symposium on catalytic antibodies. (2003.4.10, Houston, USA) “Catalytic antibodies for *Helicobacter pylori* urease” Emi HIFUMI
 12. International Congress on Bio-Nano-interface. (2003.5.19-24, Tokyo) “Super Catalytic Antibody” Decomposing Antigen Molecules. Taizo Uda, Emi Hifumi, Yukie Mitsuda, Kenji Hatiuchi
 13. The 6th International Engelhardt Conference on Molecular Biology Session: Catalytic Antibody and Antibody Engineering (2003.6.30-7.5, Moscow) “Interesting characteristics of natural catalytic antibodies.” Taizo UDA and Emi HIFUMI
 14. The 6th International Engelhardt Conference on Molecular Biology Session: Catalytic Antibody and Antibody Engineerin (2003.6.30-7.5, Moscow) “Features of catalytic antibodies for *Helicobacter pylori* urease.” Emi HIFUMI and Taizo UDA
 15. 第13回バイオ・高分子シンポジウム(2003.7.31-8.1、上智大学)「スーパー抗体酵素」の一般的創製法の確立に向けて[II]—*Helicobacter pylori* urease に対する「スーパー抗体酵素」—(広島県立大学・生物資源、科技団CREST)一二三恵美、山田由紀子、光田有希恵、宇田泰三
 16. 平成15年度日本生物工学会(2003年9月16~18日、熊本大学)天然型抗体酵素と特定の germline—新しい概念 Antigenase について—(広島県立大・生物資源、科技団CREST)宇田泰三、一二三恵美
 17. 平成15年度日本生物工学会(2003年9月16~18日、熊本大学)*Helicobacter pylori* urease に対するいくつかの天然型抗体酵素(広島県立大・生物資源、科技団CREST)一二三恵美・山田由紀子、宇田泰三
 18. 平成15年度日本生物工学会(2003年9月16~18日、熊本大学)「スーパー抗体酵素」41S-2-Lが持つ誘導期の特徴(広島県立大・生物資源、科技団CREST)横道博、光田有希恵、一二三恵美、宇田泰三
 19. 第1回公開シンポジウム・「ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ」医療に向けた化学・生物分子を利

- 用したバイオ素子としての創製(2003年10月2日、未来科学館、東京) “健康・福祉のためのナノバイオ材料およびバイオ素子としての「スーパー抗体酵素」の創製” 宇田泰三、一二三恵美
20. 第136回日本獣医学会学術集会(2003年10月3~5日、青森市文化会館)血栓溶解を制御するウシ・ヘモグロビン由来のペプチド(広島県立大・生物資源)山田学、植木竜太、石井美都、堀内俊孝、矢間太、一二三恵美、宇田泰三
 21. 第136回日本獣医学会学術集会(2003年10月3~5日、青森市文化会館)血栓溶解過程における血栓の形態変化、血清中のHb量及び世線溶能との関連性(広島県立大・生物資源)植木竜太、宇田泰三、郷田典子、中島恵里、堀内俊孝、矢間太、山田学
 22. 「招待講演」北九州産学連携フェア(2003年10月9日)北九州学園都市セミナーおよびシンポジウム・バイオ分野における産学連携システムの構築とその成果「スーパー抗体酵素」ー新しい機能性分子認識素材の開発と展開ー 宇田泰三
 23. 第1回生体関連化学・バイオテクノロジー部会合同シンポジウム(2003年10月12~13日、熊本大学)天然型抗体酵素の性質と”Antigenase”の概念(広島県立大生物資源・CREST)宇田泰三、一二三恵美
 24. 第1回生体関連化学・バイオテクノロジー部会合同シンポジウム(2003年10月12~13日、熊本大学)*Helicobacter pylori* urease に対する天然型抗体酵素の特徴(広島県立大学 生物資源学部、CREST)一二三恵美、山田由紀子、鉢内健司、宇田泰三
 25. 第1回生体関連化学・バイオテクノロジー部会合同シンポジウム(2003年10月12~13日、熊本大学)自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎の抗体酵素活性について(花田医院・近大医・広島県立大・CREST)小原京子、宗像浩、一二三恵美、宇田泰三、松浦欽司
 26. “New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach” (October, 16-18, 2003, Okinawa) “New Frontier of functional protein, “Super catalytic antibody” Emi HIFUMI, Yukiko Yamada, Yukie MITSUDA, Taizo UDA,
 27. Sweden-Japan Bionanotechnology Workshop, (2003.11.9-11, Kyoto)Some unique characteristics of “Super Catalytic Antibody” (Antigenase) Taizo UDA,and Emi HIFUMI

平成16年度

1. 日本化学会第84春季年会(2004年3月26~29日、関西学院大学)*Helicobacter pylori*菌ウレアーゼに対するモノクローナル抗体 HpU-2 重鎖のプロテアーゼ活性(広島県立大・生物資源, 科技団CREST)山田由紀子, 一二三恵美, 宇田泰三
2. 日本化学会第84春季年会(2004年3月26~29日、関西学院大学)*Helicobacter pylori* ウレアーゼを認識する抗体 HpU-9 軽鎖のプロテアーゼ活性(広島県立大・生物資源, 科技団CREST)一二三

恵美, 山田由紀子, 宇田泰三

3. 日本化学会第84春季年会(2004年3月26~29日, 関西学院大学)Influenza A型 Hemagglutinin の保存領域に対するモノクローナル抗体の作製と抗体 軽鎖の抗原分解活性(広島県大・生物生産, 科技団 CREST)城平 直樹, 一二三恵美, 宇田泰三
4. 日本化学会第84春季年会(2004年3月26~29日, 関西学院大学)*Helicobacter pylori* 菌 Urease の active site に対する抗体 UA-15 軽鎖の活性(広島県大・生物資源, 科技団 CREST)矢野剛, 一二三恵美, 宇田泰三, (東京医科歯科大)山本直樹
5. 日本化学会第84春季年会(2004年3月26~29日, 関西学院大学)ケモカインレセプターCCR5 ペプチドに対する天然型抗体酵素(広島県立大・生物資源, 東京医歯大, 科技団 CREST)山口 真史, 光田 有希恵, 一二三 恵美, 宇田 泰三, 山本 直樹
6. 日本化学会第84春季年会(2004年3月26~29日, 関西学院大学)抗 *Helicobacter pylori* urease 抗体が有する ペプチダーゼ活性の動力学的解析(広島県立大・生物資源)鉢内 健司, 一二三 恵美, 宇田 泰三
7. 大学婦人協会守田科学研究奨励賞受賞講演(2004年5月8日, アルカディア市ヶ谷)標的タンパク質を破壊する抗体酵素の発見, その作製法と機能(広島県立大・生物資源)一二三 恵美
8. The Eighth World Congress on Biosensors. (2004.5.24-26, Granada, Spain,) “A new concept of enzyme; “Antigenase” (Super catalytic antibody)” T. Uda, Y. Mitsuda, E. Hifumi
9. The Eighth World Congress on Biosensors. (2004.5.24-26, Granada, Spain,) “Super catalytic antibodies cleaving antigenic molecules such as HIV-1 gp41, *H. pylori* urease and influenza virus” E. Hifumi, N. Johhira, T. Uda
10. The 10th international meeting on chemical sensors(2004.7.11-14, Tsukuba,) “Determination of Thiabendazole on the basis of electrochemiluminescence generated from the reaction with ruthenium complex” Chemical Sensors, vol. 20, Supplement B, 628-629 (2004) Naoyoshi Egashira, Yoshiharu Mitoma, Kousuke Shimizu, Taizo Uda
11. 第14回バイオ・高分子シンポジウム(2004年7月26~27, 上智大学)「スーパー抗体酵素」の一般的創製法の確立に向けて[III] ~*Helicobacter pylori* 菌の urease を分解する各種抗体酵素~(広島県立大・生物資源、科技団 CREST)一二三恵美, 鉢内健司, 山田由紀子, 宇田泰三
12. ICMEN2004(Canada Japan Nanopharmaceutical Symposium)(2004.8.25-27, Banff, Canada) “Antigenase:Antigen decomposing enzyme (“Super catalytic antibody”)” T. Uda, Y. Mitsuda, E. Hifumi
13. ICMEN2004(Canada Japan Nanopharmaceutical Symposium)(2004.8.25-27, Banff, Canada) “Super catalytic antibodies “ cleaving targeted molecules of viruses and bacterium” E. Hifumi, N.

Johhira, T. Uda

14. France-Japan Workshop on Catalytic antibodies and antibody engineering(2004.9.21-22,Hiroshima)
Catalytic antibodies against *Helicobacter pylori* urease . E. Hifumi, K. Hatiuchi, T. Okuda, T. Uda
15. France-Japan Workshop on Catalytic antibodies and antibody engineering(2004.9.21-22,Hiroshima)
New concept of Antigenase; Catalytic antibodies generated from some discrete germlines. T. Uda,
Y.Mitsuda, E. Hifumi
16. France-Japan Workshop on Catalytic antibodies and antibody engineering(2004.9.21-22,Hiroshima)
Investigation of active site form oof catalytic antibody light chain 41S-2-L, Y. Mitsuda, E. Hifumi, T.
Uda
17. France-Japan Workshop on Catalytic antibodies and antibody engineering(2004.9.21-22,Hiroshima)
Catalytic activity and pathogenesis of Bence Jones Proteins.K. Mastuura, K. Ohara, E. Hifumi, T.
Uda
18. France-Japan Workshop on Catalytic antibodies and antibody engineering(2004.9.21-22,Hiroshima)
Improvement of catalytic antidody activity by protease processing. K. Ohara, E. Hifumi, T. Usa, K.
Matsuura
19. France-Japan Workshop on Catalytic antibodies and antibody engineering(2004.9.21-22,Hiroshima)
“Novel determination of dioxins on the basis of electrochemiluminescence and antibody” Naoyoshi
Egashira, Takashi Hirata, Yoshiharu Mitoma
20. 日本化学会中国四国支部同九州支部(2004年10月31日、大分大学)金属カルシウムを用いた有害ハロゲン化合物類の無害化処理技術 三苫好治、増田泰三、江頭直義、柿並孝明
21. 日本化学会中国四国支部同九州支部(2004年10月31日、大分大学)電解発光ラベル化剤としてルテニウム(II)錯体を用いるタンパク質の定量 山本剛士、三苫好治、宇田泰三、江頭直義
22. 第8回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2004年11月6日、甲南大学)「スーパー抗体酵素」からAntigenase への考え(広島県立大学・科技団 CREST) 一二三恵美, 宇田泰三
23. 第8回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2004年11月6日、甲南大学)HIV-1 env gp41を破壊する「スーパー抗体酵素」(Antigenase) 41S-2-L の活性化メカニズムの解明(広島県立大学・科技団 CREST・北陸先端科学技術大学院大学) 光田有希恵, 一二三恵美, 高木昌宏, 宇田泰三
24. 第8回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2004年11月6日、甲南大学)「スーパー抗体酵素」(Antigenase) UA-15-L による *Helicobacter pylori* urease の特異的分解(広島県立大学・科技団 CREST) 奥田拓郎, 鉢内健司, 一二三恵美, 宇田泰三
25. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム(2004年11月15-16日、筑波)HIV env gp41を破壊する「スーパー抗体酵素 41S-2-L」(Antigenase)の活性化メカニズムの解明(広島県立大学・科技団 CREST・

北陸先端科学技術大学院大学)光田有希恵, 鶴端久美, 一二三恵美, 高木昌宏, 宇田泰三

26. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム(2004年11月15-16日, 筑波)「スーパー抗体酵素」(Antigenase)UA-15抗体軽鎖による *Helicobacter pylori* urease の特異的分解(広島県立大学・科技団 CREST)鉢内健司, 奥田拓郎, 一二三恵美, 宇田泰三

平成17年度

1. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)「スーパー抗体酵素」41S-2-Lの活性体の究明(広島県立大・生物資源, 科技団 CREST)光田有希恵, 一二三恵美, 宇田泰三
2. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)酵素により断片化された免疫グロブリン軽鎖の抗体酵素活性と細胞障害性について(花田医院附属医学研究所・広島県立大・生物資源, 科技団 CREST)小原京子, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司
3. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)ヒト型 Antigenase(「スーパー抗体酵素」)の開発に向けて(広島県大・生物生産, 科技団 CREST)一二三恵美, 門瀬浩二, 宇田泰三
4. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)セリンプロテアーゼ活性を有するヒト型 Antigenase(「スーパー抗体酵素」)作製法の一例(広島県大・生物生産, 科技団 CREST)門瀬浩二, 一二三恵美, 宇田泰三
5. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学) *Helicobacter pylori* urease に対する「Antigenase」HpU-9抗体軽鎖(広島県大・生物生産, 科技団 CREST)鉢内健司, 奥田拓郎, 一二三恵美, 宇田泰三
6. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)「Antigenase」UA-15抗体軽鎖による抗 *Helicobacter pylori* urease の特異的分解(広島県立大・生物資源, 大分大学・医学部, 科技団 CREST)奥田拓郎, 鉢内 健司, 一二三 恵美, 西園晃, 宇田 泰三
7. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)ヘリコバクター・ピロリ菌に対するワクチンの抗原設計とその抗血清誘導能(福山臨床検査センター, 広島県立大・生物資源, 科技団 CREST)森原文子, 一二三 恵美, 宇田泰三
8. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26~29日, 神奈川大学)リボソーム内封ルテニウム錯体の電解発光検出, 平田崇、三苫好治、宇田泰三、江頭直義、
9. International Conference “Biocatalyst” (2005.6.19-23, St. Petersburg, Russia)招待講演: Development of catalytic antibodies capable of cleaving of *Helicobacter pylori* urease. Emi HIFUMI, Kenji HATIUCHI, Takuro OKUDA and Taizo UDA,
10. International Conference “Biocatalyst” (2005.6.19-23, St. Petersburg, Russia)招待講演: Highly efficient preparation method of catalytic antibody light chain (Antigenase). Taizo Uda, Emi Hifumi,

11. 第15回バイオ・高分子シンポジウム(2005年8月1-2日、上智大学)ヘリコバクター・ピロリ菌に対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)、一二三恵美、鉢内健司、奥田拓郎、宇田泰三
12. 第15回バイオ・高分子シンポジウム(2005年8月1-2日、上智大学)ヒト型「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の開発、宇田泰三、一二三恵美、門瀬浩二、岡村好子
13. 酵素工学会第54回講演会(2005年10月25日、東京大学)*H.pylori*ウレアーゼの活性部位を破壊するAntigenase(スーパー抗体酵素)、一二三恵美、山田由紀子、宇田泰三
14. 酵素工学会第54回講演会(2005年10月25日、東京大学)(招待講演)*H.pylori*ウレアーゼの活性部位を破壊するAntigenase(スーパー抗体酵素)、宇田泰三
15. 平成17年度日本生物工学会(2005年11月14-17日、つくば国際会議場)ヒト型抗体酵素(Antigenase)の分子デザイン、岡村好子、足立克也、門瀬浩二、一二三恵美、宇田泰三
16. 平成17年度日本生物工学会(2005年11月14-17日、つくば国際会議場)HIV感染時に必要なケモカインレセプターCCR5を分解する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)、山口真史、光田有希恵、山本直樹、一二三恵美、宇田泰三
17. 平成17年度日本生物工学会(2005年11月14-17日、つくば国際会議場)Antigenase UA-15抗体軽鎖による*H.pylori* ureaseの特異的分解、奥田拓郎、鉢内健司、西園晃、一二三恵美、宇田泰三
18. 平成17年度日本生物工学会(2005年11月14-17日、つくば国際会議場)A型インフルエンザウイルスのhemagglutinin(HA)に対する「スーパー抗体酵素」、一二三恵美、山田由紀子、岡村好子、宇田泰三
19. 依頼講演:「スーパー抗体酵素」(Antigenase)について(2005年11月16日、日本原子力研究所)宇田泰三
20. PacifiChem 2005(環太平洋化学国際会議)(2005.12. 15-20,Honolulu) Catalytic antibody (antigenase) targeting hemagglutinin of influenza virus, E. Hifumi, N. Jhohira, Y. Okamura, S. Takao, T. Uda
21. PacifiChem 2005(環太平洋化学国際会議)(2005.12. 15-20,Honolulu)General preparation method of catalytic antibody light chain (antigenase), T. Uda, E. Hifumi,
22. PacifiChem 2005(環太平洋化学国際会議)(2005.12. 15-20,Honolulu)Development of human antigenase (super catalytic antibody) possessing serine protease-like activity. K. Adachi, Okamura, E. Hifumi, T. Uda
23. PacifiChem 2005(環太平洋化学国際会議)(2005.12. 15-20,Honolulu)Characteristic features of catalytic antibodies capable of cleaving of *Helicobacter pylori* urease. E. Hifumi, K.Hatiuchi, T. Okuda, Y. Yamada, Y. Okamura, T. Uda
24. PacifiChem 2005(環太平洋化学国際会議)(2005.12. 15-20,Honolulu)Investigation of the active

form of “super catalytic antibody” 41S-2-L, Y. Mitsuda, E. Hifumi, T. Uda

平成18年度

1. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)「ヒト IgE に対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)(広島県立大・生物資源, 科技団 CREST) 一二三恵美・山田由紀子・永森寛子・鉢内健司・宇田泰三¹
2. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)蛋白質分解酵素阻害剤によるベンス・ジョーンズ蛋白の細胞障害性抑制(花田医院附属医学研究所・広島県立大・生物資源, 科技団 CREST)小原京子, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司
3. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)炎症性サイトカイン TNF- α に対する Antigenase の開発(広島県大・生物生産, 科技団 CREST)岡本好子、松浦めぐみ、寺田江美子、鉢内健司、一二三恵美, 宇田泰三
4. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)A 型インフルエンザウイルスの HEMAGGLUTININ に対する「スーパー抗体酵素」(広島県大・生物生産, 科技団 CREST、広島県保健環境センター)一二三恵美, 城平直樹、山田由紀子、岡村好子、宇田泰三
5. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)ヒト抗体位遺伝子の特異的増幅による遺伝子再編成の多様性の検討(広島県大・生物生産, 科技団 CREST)足立克也, 岡村好子, 一二三恵美, 宇田泰三
6. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)HPU-20 抗体重鎖による抗 *Helicobacter pylori* urease の酵素的分解(広島県立大・生物資源, 大分大学・医学部, 科技団 CREST)鉢内 健司, 奥田拓郎, 岡村好子、一二三 恵美, 西園晃, 宇田 泰三
7. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)ヘリコバクター・ピロリ菌感染予防のための抗原ワクチンの分子設計(福山臨床検査センター, 大分大・医、広島県立大・生物資源, 科技団 CREST)森原史子, 藤井亮治、奥田拓郎、西園晃、一二三 恵美, 宇田泰三
8. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)ケモカインレセプターCCR5 に対する Antigenase 2B8 の性質(広島県立大・生物資源, 鹿児島大・医、科技団 CREST)山口真司, 山廣恭子、馬場昌範、岡村好子、一二三 恵美, 宇田泰三
9. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)抗体修飾リポソームを用いる電解発光法に基づく BSA の高感度定量, (県立広島大・生命システム科学)平田崇、三苫好治、宇田泰三、江頭直義
10. 日本化学会第86 春季年会(2006 年 3 月 27~30 日, 日本大学船橋)電解発光法による DNA の高感度検出, (県立広島大・生命システム科学)田代秀樹、三苫好治、宇田泰三、江頭直義

11. 第6回日本蛋白質科学会年会(2006年4月24~26日、国立京都国際会館)抗体酵素 aHA1-2mAb 由来 Fab-抗原ペプチド複合体の X 線結晶構造解析(原子力機構・量子ビーム応用研究部門、県立広島大・生命環境)新井栄揮、玉田太郎、岡村好子、一二三恵美、宇田泰三、黒木良太
12. 「招待講演」:ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ発表会(2006年7月14日、東京国際フォーラム)悪性の細菌・ウイルスを撃退する画期的なナノ分子~スーパー抗体酵素 (Antigenase)の開発~ 宇田泰三
13. ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ発表会(2006年7月14日、東京国際フォーラム)関節リウマチ治療を目指した TNFa を標的とする「スーパー抗体酵素」(antigenase)の開発. 岡村好子、松浦めぐみ、寺田江美子、鉢内健司、一二三恵美、宇田泰三
14. 「招待講演」:2006年度 第1回 生体ナノマシン構造研究会(2006年7月31日、新世代研究所、東京)「抗原分解能を有する Antigenase の特徴と新展開」 宇田泰三
15. 第16回バイオ・高分子シンポジウム(2006年8月1~2日、上智大学)HpU-20 抗体重鎖による *Helicobacter pylori urease* の酵素的分解、鉢内健司、奥田拓郎、岡村好子、一二三恵美、西園晃、宇田泰三
16. 第16回バイオ・高分子シンポジウム(2006年8月1~2日、上智大学)A型インフルエンザウイルスの hemagglutini に対する「スーパー抗体酵素」、一二三恵美、山田由紀子、岡村好子、高尾信一、宇田泰三
17. 「特別講演」:いのちを取り巻く化学(日本化学会中国四国支部、広島地区講演会、2006年8月7日、県立広島大学)ウイルスや細菌を撃退するナノ分子の開発~「スーパー抗体酵素」の驚くべき機能~ 宇田泰三
18. 平成18年度日本生物工学会(2006年9月11日~14日、大阪大学)「抗体酵素および抗体工学に関するシンポジウム」オーガナイザー:Antigenase(スーパー抗体酵素)の画期的な性質と医薬品展開(県立広島大学、CREST)宇田泰三
19. 平成18年度日本生物工学会(2006年9月11日~14日、大阪大学)Antigenase HpU-9 抗体軽鎖によ *Helicobacter pylori urease* の特異的分解 奥田拓郎・鉢内健司・西園晃・一二三恵美・宇田泰三
20. 平成18年度日本生物工学会(2006年9月11日~13日、大阪大学)シンポジウム「抗体酵素および抗体工学に新展開」;Bence Jones protein の抗体軽鎖活性と細胞傷害性、松浦欽司、小原京子、一二三恵美、宇田泰三、篠原兵庫
21. 平成18年度日本生物工学会(2006年9月11日~14日、大阪大学)ヘリコバクター・ピロリ菌に対する抗原ワクチンの分子設計 森原史子、藤井亮治、奥田拓郎、西園晃、一二三恵美、宇田泰三
22. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies(2006.9.12-13、広島インテリジェントホテル)Development of Antigenases as New Medicines. Taizo Uda, Emi Hifumi, Takuro Okuda, Kenji

Hatiuchi and Akira Nisizono

23. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies (2006.9.12-13、広島インテリジェントホテル) Protection from *Helicobacter pylori* infection by using a molecular designed ureB antigen. Fumiko Morihara, Ryoji Fujii, Emi Hifumi, Akira Nishizono and Taizo Uda
24. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies (2006.9.12-13、広島インテリジェントホテル) Preparation of Antigenases Capable of Cleaving the Hemagglutinin of Influenza Virus. Emi Hifumi, Shin-ichi Takao, Naoki Johira, Yukiko Yamada, Kyoko Yamahiro and Taizo Uda
25. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies (2006.9.12-13、広島インテリジェントホテル) Catalytic antibody activity and cytotoxic activity of Bence Jones proteins. Kyoko Ohara, Emi Hifumi, Taizo Uda, Hiroshi Munakata, Kinji Matsuura
26. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies (2006.9.12-13、広島インテリジェントホテル) Antigenase for TNF- α . Yoshiko OKAMURA, Emiko TERADA, Natsumi MURATO, Megumi MATSUURA, Kenji HATIUCHI, Emi HIFUMI and Taizo UDA
27. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies (2006.9.12-13、広島インテリジェントホテル)
28. 「招待講演」: BioJapan 2006 (2006年9月15日、大阪) 「スーパー抗体酵素(Antigenase)による薬剤開発」宇田泰三
29. 第42回化学センサ研究発表会 (2006年9月14-15日、同志社大学) ルテニウム錯体内封リポソームを用いたタンパク質の高感度定量 平田崇、三苫好治、宇田泰三、江頭尚義
30. 生体関連合同シンポジウム(第9回バイオテクノロジー部会) (2006年9月28-30日、京都大学) A型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン共通領域に対する Antigenase (スーパー抗体酵素) 一二三恵美、濱岡利亘、江頭直義、宇田泰三
31. 生体関連合同シンポジウム(第9回バイオテクノロジー部会) (2006年9月28-30日、京都大学) インフルエンザウイルス H1N1 に対する Antigenase (スーパー抗体酵素) 一二三恵美、岡村好子、高尾信一、宇田泰三
32. 生体関連合同シンポジウム(第9回バイオテクノロジー部会) (2006年9月28-30日、京都大学) ピロリ菌ウレアーゼに対する Antigenase (スーパー抗体酵素) の抗原分解と抗菌作用 奥田拓郎、鉢内健司、岡村好子、一二三恵美、宇田泰三、西園晃
33. 「招待講演」: 十四大都市立感染症指定医療機関等病院長・事務長協議会 (2006年10月12日、ウエルシティー広島) 抗菌・抗ウイルス作用を持つ画期的な分子: スーパー抗体酵素(Antigenase) 宇田泰三

- ① 招待講演 (国内会議 10 件、国際会議 9 件)
- ② 口頭発表 (国内会議 73 件、国際会議 19 件)
- ③ ポスター発表 (国内会議 10 件、国際会議 6 件)

(4) 特許出願

①国内出願 (17件)

1. 《発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号》

- 1. 発明の名称:ヘリコバクター・ピロリ菌に対するワクチン用ペプチド、それをコードする遺伝子、その遺伝子が導入された形質転換体、及びそれらの利用方法

発明者:宇田泰三、藤井亮治、一二三恵美、森原史子、池田義弘、近本肥干

出願人:科学技術振興事業団

出願日:平成 14 年 7 月 11 日

出願番号 特願 2002-203221、特開 2004-041084

- 2. 発明の名称:血栓の溶解を制御するペプチドおよびその利用

発明者:宇田泰三、山田学、堀内俊孝、一二三恵美、

出願人:科学技術振興事業団

出願日:平成 14 年 7 月 15 日

出願番号 特願 2002-206225、特開 2004-041142

- 3. 発明の名称:新規抗体酵素生産方法および新規抗体酵素

発明者:宇田泰三、一二三恵美

出願人:科学技術振興事業団

出願日:平成 14 年 7 月 19 日

出願番号 特願 2002-211756、特開 2004-097211

- 4. 発明の名称:抗体酵素の活性向上法

発明者:宇田泰三、松浦欽司、一二三恵美、

出願人:科学技術振興事業団

出願日:平成 14 年 7 月 15 日

出願番号 特願 2002-206284、特開 2004-041143

5. 発明の名称:ヘリコバクター・ピロリ菌のウレアーゼに対する抗体酵素、それをコードする遺伝子、その遺伝子が導入された形質転換体、及びそれらを利用したヘリコバクター・ピロリ菌感染患者の治療薬と感染予防剤
発明者:宇田泰三、一二三恵美、藤井亮治、森原史子、近本肥干
出願人:科学技術振興事業団
出願日:平成 14 年 7 月 19 日
出願番号 特願 2002-206284、特開 2004-097212

6. 発明の名称:ケモカインレセプターCCR5 に対する抗体酵素
発明者:宇田泰三、一二三恵美、山本直樹
出願人:科学技術振興事業団
出願日:平成 15 年 2 月 27 日
出願番号 特願 2003-51943

7. 発明の名称:ヘリコバクター・ピロリ菌に対するワクチン用タンパク質、それをコードする遺伝子、該タンパク質を利用したワクチン、及びそれらの利用方法
発明者:宇田泰三、一二三恵美、藤井亮治、森原史子
出願人:科学技術振興事業団
出願日:平成 15 年 2 月 28 日
出願番号 特願 2003-51943、特開 2004-261080

8. 発明の名称:ヒト型抗体酵素および生産方法
発明者:宇田泰三、一二三恵美
出願人:広島県
出願日:平成 16 年 12 月 22 日
出願番号 特願 2004-372206

9. 発明の名称:血栓の溶解を亢進するポリペプチド及びその利用
発明者:山田学、宇田泰三、堀内俊孝、矢間太一二三恵美、
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 16 年 12 月
出願番号 特願 2004-380892

10. 発明の名称:血栓の溶解を抑制するポリペプチド及びその利用
発明者:山田学、宇田泰三、堀内俊孝、矢間太一二三恵美
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 16 年 12 月
出願番号 特願 2003-51943
11. 発明の名称:ポリペプチド及びその用途
発明者:山田学、宇田泰三、堀内俊孝、矢間太一二三恵美
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 17 年1月
出願番号 特願 2005-001849
12. 発明の名称:インフルエンザウイルスに対する抗体酵素
発明者:宇田泰三、一二三恵美、高尾信一
出願人:広島県
出願日:平成 17 年 6 月 14 日
出願番号:特願 2005-174161
13. 発明の名称:ヒト抗体酵素およびその生産方法
発明者:宇田泰三、一二三恵美
出願人:広島県
出願日:平成 17 年 12 月 22 日
出願番号:特願 2005-370880
14. 発明の名称:ケモカインレセプターCCRのN末端領域に対する抗体酵素、およびその利用
発明者:宇田泰三、一二三恵美、岡村好子
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 18 年 1 月 31 日
出願番号:特願 2006-023638
15. 発明の名称:ヒトTNF- α に対する抗体酵素およびその利用
発明者:宇田泰三、一二三恵美、岡村好子

出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 18 年 1 月 31 日
出願番号:特願 2006-023665

16. 発明の名称:ヒト IgE に対する抗体酵素

発明者:宇田泰三、一二三恵美、岡村好子
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 18 年 1 月 31 日
出願番号:特願 2006-023677

17. 発明の名称 癌に対する傷害性を有する新規ペプチドおよびそのスクリーニング方法、なら
びにこれらの利用

発明者松浦 欽司、宇田 泰三
出願人 科学技術振興機構
出願日 平成18年9月6日
出願番号 特願 2006-242036

②海外出願 (2 件)

1. 発明の名称:新規抗体酵素生産方法、新規抗体酵素およびその利用

発明者:宇田泰三、一二三恵美
出願人:東和科学株式会社
出願日:平成 15 年 7 月 18 日
出願番号:国際特許 PCT/JP03/09147

2. 発明の名称:ポリペプチド及びその用途

発明者:山田学、宇田泰三、堀内俊孝、矢間太、一二三恵美
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 17 年 12 月 28 日
出願番号:国際特許 PCT/JP2005/024103

(5) 受賞等

① 受賞

一三恵美(県立広島大学助教授) 第1回生体関連化学・バイオテクノロジー部 会合同シンポジウム・講演賞

一三恵美(県立広島大学助教授) 日本大学婦人協会・守田研究技術奨励賞

② 新聞報道

1. 読売新聞、2003年1月8日、知の開拓者:偶然生まれた「夢の薬」
2. 日経先端技術 News フラッシュ:47巻、1-3頁(2003.10.13号)、「スーパー抗体酵素」
3. 産経新聞、2005年9月19日(1面)、「インフルエンザ感染阻止/県立広島大グループ」
4. 中国新聞、2005年10月9日(1面)、「インフルエンザウイルス抗体酵素開発/県立広島大」
5. 科学新聞2005年10月?日(2面)、「インフルエンザウイルス抗体酵素/県立広島大グループ」
6. 高知新聞、2005年(平成17年)11月7日、感染防ぐ抗体酵素発見 宇田教授(広島県立大)
7. 新潟日報、2005年(平成17年)11月7日、インフルエンザ 感染予防薬に道
8. 南日本新聞 [夕刊]、2005年(平成17年)11月9日、HA 壊す抗体酵素 発見
9. 岐阜新聞 [夕刊]、2005年(平成17年)11月10日、インフルエンザの感染防御「抗体酵素」を発見
10. 秋田さきがけ、2005年(平成17年)11月14日、インフルエンザウイルス感染力奪う酵素発見
11. 河北新報、2005年(平成17年)11月14日、インフルエンザ感染を予防?「抗体酵素」見つかる
12. 読売新聞、2005年(平成17年)12月14日、インフルエンザ「抗体酵素」開発
13. 熊本日新聞、2005年(平成17年)12月19日インフルエンザ感染防止抗体酵素を発見
14. 中国新聞、2006年(平成18年6月17日、インフルエンザ予防酵素

③ その他

テレビ:広島ホームテレビ(朝日系列)平成17年10月12日、インフルエンザウイルスに対する抗体酵素

ラジオ:RCC 中国 平成17年12月14日、インフルエンザウイルスに対する抗体酵素

松浦グループ

(1)原著論文発表 (国内誌 0件、国際誌 2件)

1. Matsuura K, Ohara K, Munakata H, Hifumi E, Uda T.

Pathogenicity of catalytic antibodies: catalytic activity of Bence Jones proteins from myeloma patients with renal impairment can elicit cytotoxic effects.

Biol Chem. 2006 May;387(5):543-8.

2. Ohara K, Munakata H, Hifumi E, Uda T, Matsuura K.

Improvement of catalytic antibody activity by protease processing.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Mar 12;315(3):612-6.

(2)その他の著作物

なし

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

平成13年度

1. 日本化学会第81春季年会(2002年3月26-29日, 早稲田大学・西早稲田キャンパス)リシルエンドペプチダーゼ処理によるベンス・ジョーンズ蛋白の抗体酵素(花田医院, 近畿大学)小原京子, 宗像浩, 松浦欽司

平成14年度

1. 日本化学会第6回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2002年9月27-28日, 大阪大学・豊中キャンパス)Proteaseによるベンス・ジョーンズ蛋白の抗体酵素活性の向上(花田医院, 近畿大学, 広島県立大学)小原京子, 宗像浩, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司
2. 第75回日本生化学会大会(2002年10月14-17日, 国立京都国際会館)リシルエンドペプチダーゼ処理によるベンス・ジョーンズ蛋白の抗体酵素(花田医院, 近畿大学, 広島県立大学)小原京子, 宗像浩, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司
3. 日本化学会第83春季年会(2003年3月18-21日, 早稲田大学・西早稲田キャンパス)重症多発性骨髄腫患者尿から得た Bence-Jones protein の抗体酵素活性と細胞毒性について(花田医院, 広島県立大学)小原京子, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司

平成15年度

1. Catalytic Antibody Mini-symposium(2003.4.10, The University of Texas) Pathogenesis of catalytic antibodies and L chains. Kyoko Ohara ,Hifumi Emi,Taizo Uda,Kinji Matsuura
2. 日本化学会生体機能関連化学部会(18回)・バイオテクノロジー部会(7回)合同シンポジウム(2003年10月12-13日, 熊本大学・工学部)自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎の抗体酵素活性について(花田医院, 広島県立大学)小原京子, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司

平成16年度

1. France-Japan Workshop on Catalytic Antibodies and Antibodies Engineerings(2004.9.21-22, かんぽヘルスプラザ広島) Improvement of catalytic antibody activity by protease processing. Kyoko Ohara , Hifumi Emi,Taizo Uda, Kinji Matsuura
2. 第8回バイオテクノロジー部会シンポジウム(2004年11月16日, 甲南大学・平生記念セミナーハウス)重症多発性骨髄腫患者から得た Bence Jones protein(抗体軽鎖)の酵素①活性と細胞毒性の関連について(花田医院, 広島県立大学)小原京子, 一二三恵美, 宇田泰三, 松浦欽司
3. 日本化学会第85春季年会(2005年3月26-29日, 神奈川大学・横浜キャンパス)酵素により断片化された免疫グロブリン軽鎖の抗体酵素活性と細胞傷害性について(花田医院, 県立広島大学)小原京子, 一二三 恵美, 宇田 泰三, 松浦 欽司

平成17年度

1. 第35回日本免疫学会総会(2005年12月13-15日, パシフィコ横浜)Bence Jones proteinsの抗体酵素活性と細胞傷害性について(花田医院, 県立広島大学))小原 京子, 一二三 恵美, 宇田 泰三, 松浦欽司
2. 日本化学会第86春季年会(2006年3月27-30日, 日本大学理工学部, 船橋キャンパス)蛋白分解酵素阻害剤によるベンス・ジョーンズ蛋白の細胞傷害性抑制(花田医院, 県立広島大学)小原 京子, 一二三 恵美, 宇田 泰三, 松浦 欽司

平成18年度

1. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress(2006.6.18-23, 国立京都国際会館)Catalytic antibody activity and cytotoxic activity of Bence Jones proteins. Kyoko Ohara, Hiroshi Munakata ,Hifumi Emi,Taizo Uda,Kinji Matsuura
2. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies(2006.9.12-13, 広島グランドインテリジェントホテル) Catalytic antibody activity and cytotoxic activity of Bence Jones proteins. Kyoko

Ohara, Hifumi Emi, Taizo Uda, Hiroshi Munakata, Kinji Matsuura

3. Japan-USA-Russia Joint Workshop on Catalytic Antibodies(2006.9.12-13, 広島グランドインテリジェントホテル) Antitumor activity of a catalytic Bence Jones. Kinji Matsuura
4. 第58回日本生物工学大会(2006年9月11日, 大阪大学豊中キャンパス) Bence Jones proteinの抗体酵素活性と細胞傷害性(花田医院, 近畿大学) 松浦欽司, 小原京子, 篠原兵庫

- ① 招待講演 (国内会議 0件、国際会議 0件)
- ② 口頭発表 (国内会議 6件、国際会議 4件)
- ③ ポスター発表 (国内会議 4件、国際会議 1件)

(4) 特許出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称 抗体酵素の活性向上法

発明者 松浦 欽司、宇田 泰三、一二三 恵美

出願人 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日 平成14年7月15日

出願番号 特願 2002-206284

2. 発明の名称 癌に対する傷害性を有する新規ペプチドおよびそのスクリーニング方法、ならびにこれらの利用

発明者 松浦 欽司、宇田 泰三

出願人 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日 平成18年9月6日

出願番号 特願 2006-242036

(6) その他特記事項

なし。

7 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年9月21-22日	抗体酵素および抗体工学に関する「日仏ワークショップ」	かんぼヘルスプラザ広島	約50名	参加研究者および招聘研究者による講演と討論
平成18年9月12-13日	抗体酵素に関する「日米露ワークショップ」	インテリジェントグランドホテル広島	約60名	参加研究者および招聘研究者による講演と討論

8 結び

本プロジェクトが発足した頃には抗体酵素という分子が、一体どうして天然から生成してくるのか、それは単なる偶然なのか、また、どういった免疫学的、あるいは、生化学的性質をもつのか、全く未知であった。それが5年間にわたる研究で、抗体酵素の本質のいくつかの部分が解明された。「スーパー抗体酵素」を発見した当時は、論文投稿してもそのほとんどが拒絶された。「自然から取れる抗体に酵素活性があるはずがない」というのが主な拒絶理由である。「RNA に触媒活性などあるはずがない」と言って拒絶を受けたりリボザイムと同じである。抗体酵素研究は今では米国、フランス、ロシアそして日本で中心的に行われている。しかしその広がりはずしも急速ではない。それは、実用的な抗体酵素がまだ得られていないからである。本 CREST でやっと動物実験の段階にまで達する抗体酵素が得られたが、その反応速度をさらに向上させなければならない。この9月に広島で開催した「抗体酵素に関する日米露ワークショップ」(JST 主催)では、抗体酵素の未来に対して2つの break through が必要であることが議論された。ひとつは安価な製造法をどのように構築するか、もう一つは、 k_{cat} 、 K_m 問題である。生体内投与した場合、共にさらなる改善が必要であるけれども、現時点で、その有効な解決策が提示できない事である。

しかしながら、5年前はまだ暗中模索であったことが、現時点で、将来の解決すべき目標が明確になった段階にまで来た。これは大きな進展である。日本の抗体酵素研究が果たした役割は大きいと評価され、JST が「スーパー抗体酵素」をひとつのプロジェクトに採択された事に心より感謝の意を表したい。

このプロジェクトに参加した教職員、研究員、技術員、院生はプライベートな時間を捨ててほとんどこの研究にその精力を傾注してきたと言っても過言ではない。必要な装置、機器類の整備がなされ、研究のスピードアップのために外注をも含めた予算の配分方式は実に有効であった。予算の使い方の柔軟さは、他省でみられるような、雑用の負担とイライラをかなり軽減し、早期の研究成果に結び付いたと思っている。

この研究を通して、若手はいろんな経験を積んだ。そして、抗体酵素研究の輪が拡がりつつある。この研究が評価されて教授に昇格する予定者もいる。また、本プロジェクトにメンバーとして参加した中には抗体酵素の面白さに、新しいアイデアで研究を立ち上げたいと考えている人も出てきた。

5年間の研究期間中、JST が広報活動までを一部手掛けて頂いたお陰で、企業からの訪問者が年を追って増えてきている。いよいよ企業化あるいは事業化を目指した方向に、今後、走り出さなくてはいけないが、これまで以上に苦勞が待ち受けているような気がする。

しかし、こうしたテーマに出会ったのも運の付きで、これを遂行する運命にあると感じている。

最後に、本研究を推進するにあたり、貴重な助言と指導を頂いた相澤益男研究統括に心より感謝申し上げます。(因みに、抗体酵素を Antigenase という表現にさせて頂いたのも相澤統括の助言です。)また、JST の事務所の山本参事や飯島参事には困ったときには常に助けて頂きました。アドバイザーの先生方からも貴重な助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。