

抗体ライブラリーを用いた生体分子の標的認識の分子機構データベースの構築

●林 宣宏

藤田保健衛生大学総合医学研究所

〈研究の目的と進め方〉

多種多様な外来抗原を漏れなく認識するために、抗体と抗原との分子間相互作用のレパートリーの中には、生物が有する標的分子認識機構が総動員されており、抗体の抗原認識の分子機構を網羅的に手にすることは、生命の有する標的分子認識の能力を総体として得ることと同等と考えられる。さらに、生化学反応の初段階は各反応に関わる分子間の相互作用なので、一つの細胞内の生化学反応を標的分子認識の観点から分子レベルで網羅的に扱うことにも繋がるのが期待できる。抗体の標的分子認識の分子機構を、抗体ライブラリー(黒澤ら(藤田保健衛生大学)によって開発)を使って網羅的に扱って、生物が有している標的分子の認識機構を総括的に解析し、生命分子の有する標的分子認識機構のデータベースを作成することを目的とする。最初の段階では[エピトープ]-[抗体の抗原認識部位]の相関データベースの構築を進める。ある程度データが蓄積されれば、機能が未知の遺伝子産物を抗原として使った抗体ライブラリーのスクリーニングにより得られた抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列から、当該データベースの検索により、その機能が未知の遺伝子産物に関わっている相互作用を抽出することができる。その結果から、その遺伝子の機能を類推する方法論の確立が当該研究の一つの成果として期待できる。また、既に抗原の機能に影響を与える抗体の単離に成功しているので、こういった抗体-抗原のデータの蓄積により、任意の遺伝子産物に適用可能な相互作用機能を制御する分子の設計方法(抗体分子をプロトタイプとして使用するドラッグデザイン)の研究開発を進める。

〈研究開始時の研究計画〉

抗体ライブラリーにより抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列を集積することで作成する標的分子認識部位アミノ酸配列相関データベースを構築する。これをリソースとして以下の項目を進める。

1) 機能が未知の遺伝子産物の機能を対応抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列から類推するためのアルゴリズムの開発：[エピトープ]-[抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列]の相関データベースを基盤として、機能が未知の遺伝子産物の機能を、抗体ライブラリーのスクリーニングにより得られた対応抗体の抗原認識部位から、当該データベースの検索により高精度で類推可能とするアルゴリズムを開発する。抗体ライブラリーを用いたスクリーニングでは、ひとつの抗原より複数の抗体が得られるが、その中には標的分子の機能を決めている部位をエピトープとするものが含まれている。機能が未知の抗原に対して抗体が得られて、その中に既知の機能部位をエピトープとする抗体、あるいは、そういった抗体と高い相同性を有する抗原認識部位を有する抗体が含まれていた場合には、その標的が相同の機能部位、さらには同様の機能を有している可能性がある。こういった解析を可能とするためには、すこしでも多くの[エピトープ]-[抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列]のセットを揃えてデータベース化

しておく必要がある。また、単に抗体の抗原認識部位を比較するのではなくて、機能既知の他のタンパク質とのアミノ酸配列の比較から機能的に重要な部位だと類推される領域に重みをつけた相同性の比較、類推される二次構造要素の配置の比較、予測三次元立体構造のトポロジーの比較、などの結果を総合的に踏まえて結論を出すことでその類推精度が向上すると考えられる。この目的のために、解析対象を増やしてデータの蓄積を進めるとともに、経験則をパラメータ化して取り込む事で各実験結果をフィードバックしながら、アルゴリズムの精度の向上を進める。

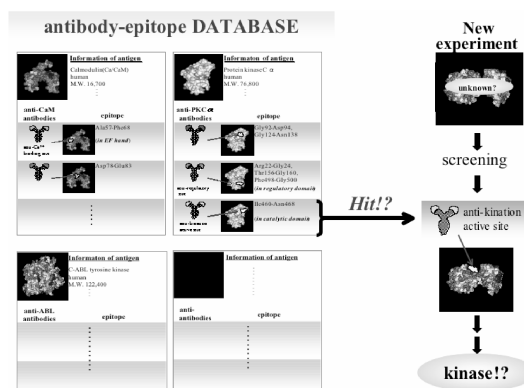


図1：機能が未知の遺伝子産物の抗体を用いた機能の類推法

2) 抗体を用いた機能ドメインプロテオミクス：抗原による刺激により体内で産出される抗体は抗原に対する高い特異性と強い結合力を有するのに対して、免疫系はあらかじめ幅広い標的認識の特異性を有する抗体群 (naive repertoire) を用意して外来異物の侵入に備えている。動物免疫法で得られるのは前者であり、さらに自己免疫を起こすようなエピトープに対する抗体は排除されている。それに対して、一旦、遺伝子を取り出した後に、分子間相互作用のみをクライテリアとして抗体をクローニングする抗体ライブラリー技術を用いると、後者も含めて、任意のエピトープに対して、様々な特異性と結合力の抗体が得られる。得られたものの中から、特定の機能部位をエピトープとする抗体を選び、それに結合する分子を網羅的に捕獲すれば、それらは同じ機能部位を有していることになる。プロテインキナーゼ、および、カルモジュリンを抗原として得られた抗体を用いたキナーゼ活性、および、カルシウム結合ドメイン (EFハンドモチーフ) を持つタンパク質の網羅的捕獲により、未知のキナーゼ、あるいは、カルシウム結合タンパク質を同定する。この方法は、任意の機能ドメインへの適用が可能である。

3) 任意の遺伝子に由来する遺伝子産物を抗原とする抗体の、網羅的かつ迅速な調製を支援する方法の開発：抗体の調製時に対象としている遺伝子産物そのものが単離されていない場合、抗体を調製するための抗原には、標的遺伝子産物の一部に相当するアミノ酸配列を持った合成ペプチドを使用する。その際、標的タンパク質のどの

領域のアミノ酸配列を使うのが適当かということが問題となる。この問題を解決するために、抗体ライブラリーを用いて始めて可能となる総括的かつ体系的なエピトープマッピングにより、[エピトープ]-[抗体の抗原認識部位]の相関データベースを作成する。[エピトープ]のデータは、抗体チップ、および、質量分析（抗体結合状態で溶媒の軽水を重水に置換し、その後部分分解した抗原を質量分析することにより、重水素交換が見られない部位をエピトープとして同定する）により取得、蓄積する。[抗体の抗原認識部位]のアミノ酸配列は、抗体ライブラリーの性格上、抗体がスクリーニングにより得られた時点で遺伝子として取得できる。次に、得られたデータベースを基盤に、既存の抗原決定部位類推プログラムや三次元立体構造のモデリングを活用し、ペプチド抗原の構造安定性も考慮に入れて、ペプチド抗原として使用する領域の決定支援プログラムのプロトタイプの開発を行う。このプログラムを用いてペプチド抗原を設計し、それに基づいて作成したビオチン化ペプチドをピアコアセンサーチップ上に提示し、これを用いて抗体-ペプチド抗原間相互作用の解析を行うことでその性能を評価し、得られた結果を随時フィードバックすることでプログラムの開発を支援する。必要な場合には、分子間相互作用の分子機構をNMRで詳細に解析する。さらに、ゲノム情報は日々増加していくので、その情報を取り入れつつ、段階的に支援プログラムの信頼度を上げていく。

4) 抗体の抗原認識の分子機構の網羅的解析から得られる知見を基盤とした、任意の遺伝子産物に適用可能な機能の制御法の開発：動物免疫法とは異なり任意の抗原の使用が抗体ライブラリーを用いると可能である。また、抗体ライブラリーを用いたスクリーニングにおける抗体の選択基準は、細胞内における抗体の発現とは異なり、抗体-抗原分子間相互作用のみに依存する。さらに、抗体ライブラリーのスクリーニングでは抗体と同時にその遺伝子も得る事ができ、これをもとに変異体抗体分子の作成が可能である（文献1：アミノ酸配列からの機能推定法について）。こういった特徴を活かして、抗体ライブラリーのスクリーニングにより得られる実験データを基盤にして、任意の標的分子に対して機能を制御する分子の創製を可能とするような、抗体分子をプロトタイプとしたドラッグデザイン法の開発を行う。酵素に対してはその作用部位に入り込み阻害活性を示し、遺伝子発現制御因子の場合にはその活性調節部位に結合して遺伝子発現のスイッチを入れたり切ったりすることが可能で、またレセプターに対してはリガンドのごとく振る舞う抗体が設計・作製できれば、得られた抗体分子は薬として使用可能である。これまでに複数のステロイド（低分子化合物）、病因毒素タンパク質（生体高分子）、ウイルス粒子（高分子構造体）に対して抗体ライブラリーを用いたスクリーニングが実施され、標的分子に結合する抗体がその遺伝子とともに単離されている。上述課題を達成するために、得られた抗体の遺伝子群の対応抗原の立体構造を考慮した相関解析を進め、"生物の有する標的分子認識機構のインデックスデータベース"の作成を行い、登録データを目的志向で活用することで機能性御分子の創成を行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) 約 6,000個の抗体遺伝子が登録された、当該研究で開発することを目的とする高次データベースのプロトタイプとなる "[抗体]-[抗原]データベース" を構築した。
- 2) いくつかの抗体に対して、抗原に対する結合定数とそ

のエピトープの決定、さらに、抗体による抗原の機能制御の分子機構の解析を体系的に行った。

●抗プロテインキナーゼC α (PKC α) 抗体：PKC α を抗原として6種類の抗体が得られ、その中で3種類の抗体がPKC α のタンパク質リン酸化を阻害した。抗体のCDR領域におけるアミノ酸配列の違いや、リン酸化反応への影響に優位な差が確認されたことから、得られた抗体はそれぞれ異なるエピトープを認識していると考えられ、BIACOREによる抗体-抗原の解離定数 (KD) の決定とペプチドアレイを用いたエピトープマッピングを行った。結合能に関して、抗体の抗原機能阻害能とKDとに相関が見られたが、抗原の機能を阻害しない抗体の中には阻害効果を示す抗体よりも抗原に対して強い親和性を持つものも存在し、KDだけで抗原機能の阻害能が決まるわけでは無いことが解った。エピトープ解析の結果、PKC α の活性を最も強く抑制した抗体は、PKC α の活性部位に直接作用してその活性を阻害するのではなく、PKC α の活性調節に関与する複数のドメインにまたがる領域に結合することで、二重三重にPKC α の活性化を阻害したことが示唆された。

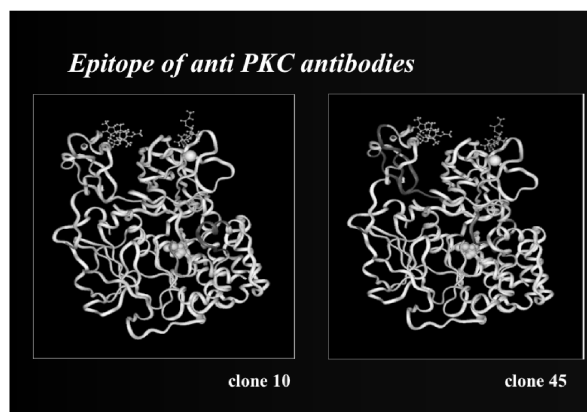


図2：PKC α の酵素活性を阻害する抗体（左）と阻害しない抗体（右）のエピトープ

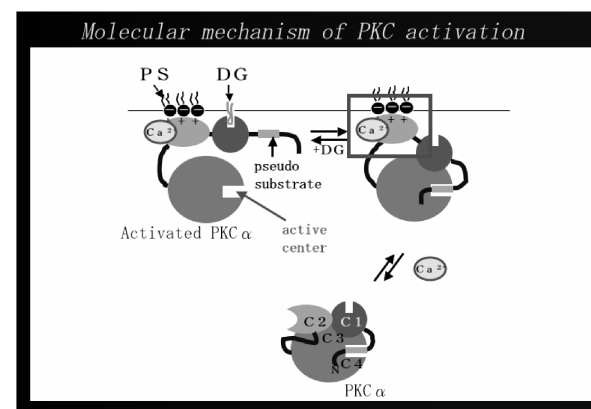


図3：PKC α の活性化メカニズム：clone 10（図2）は基質結合部位を遮蔽するのではなく、活性化段階におけるpseudo substrateの基質結合部位からの遊離を阻害することによりPKC α の活性化を妨げていることがエピトープの同定により解った。

●抗カルモジュリン抗体：ヒト由来リコンビナント Calmodulin (CaM) を抗原として、43種類の抗体をクローニングした。CaMの機能構造解析の知見（文献2）をもとに、得られた抗体の中には、カ

ルシウムイオンの有無によるCaMの構造変化を感知するものや、CaMと相互作用する特定の標的分子の制御のみを阻害するものが含まれていることが解った。例えば、カルシウムの結合したCaMのみを認識し、calcineurinへのCaMの作用を阻害する抗体のエピトープはGlu84からGly98の領域であることが解った。また、phosphodiesteraseへのCaMの作用を阻害する抗体のエピトープはAla103からGlu119の領域であった。さらに他のものも併せると、今回得られた抗体群のエピトープは抗原分子(CaM)表面の全領域をほぼ網羅していた。動物を免疫した場合に得られる抗体は特定の部位をエピトープとする数種類のものに限られるが、それは抗体の能力によるのではなく、自己免疫の回避などの生理的な制約の結果であり、ナノマシンとしての抗体そのものには識別できない形は無いことが強く示唆される。

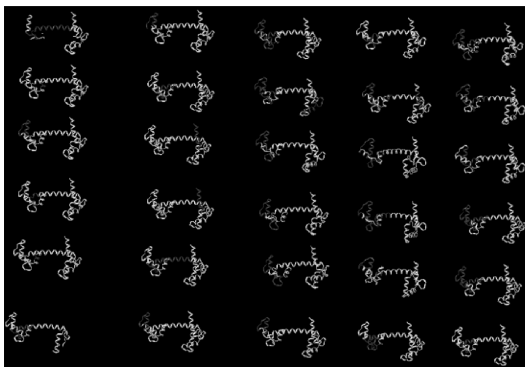


図4：抗体のエピトープを抗原(カルモジュリン)分子上に表示したもの

●抗アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)抗体：フェニルアラニン特異ARSとロイシン特異ARSを抗原としてクローニングされたそれぞれ14種類と6種類の抗体のエピトープの同定を、メンブレン上に配置した抗原由来のペプチド(ペプチドアレイ法)への抗体の結合、および、抗体の抗原への結合による交換性プロトンの交換阻害の検出(重水素置換法)により行った。tRNAをアミノアシル化するという共通の性質を有しながら、各tRNAとアミノ酸の違いを厳密に区別する20種類のARSには、共通の機能と異なる機能が混在している。20種類のARS全てに対する抗体を調製した場合にどのような抗体群が得られるのかは興味深い。

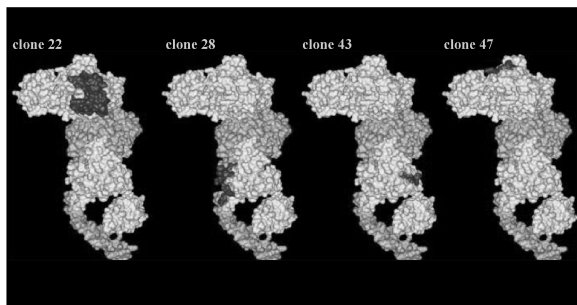


図5：抗フェニルアラニン特異ARS抗体のエピトープ

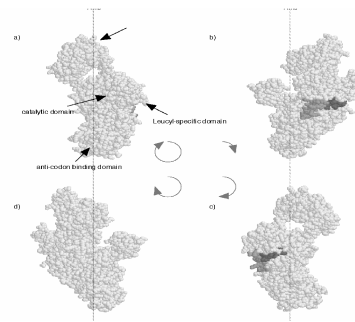


図6：抗ロイシン特異ARS抗体のエピトープ

抗体ライブラリー技術を用いることによって、体内では自己免疫疾患の原因となるような抗体も得る事ができた。体内では様々な基準により抗体は選択されるが、当該技術を用いた抗体の選択においては標的分子に対する結合能のみが選択基準となる。今回、例えば、カルモジュリンを抗原としてクローニングした抗体のエピトープは、抗原分子の全表面を網羅しており、タンパク質としての抗体には、どのような分子(表面)にでも結合できる能力があることが強く示唆している。

3) 抗体を用いた機能ドメインプロテオミクス

●抗カルモジュリン抗体：カルモジュリンを抗原とする抗体を用いた免疫沈降実験により、カルモジュリンと酷似した部分構造をエピトープとして有するタンパク質の捕獲に成功した。これは、本研究の理論的根拠(「免疫過程を経ていない抗体プールは抗原特異性の低い抗体からなり、そこに含まれる抗体を用いれば、機能構造が類似する一群の分子を網羅的に捕獲できる」)のひとつを裏付ける結果である。

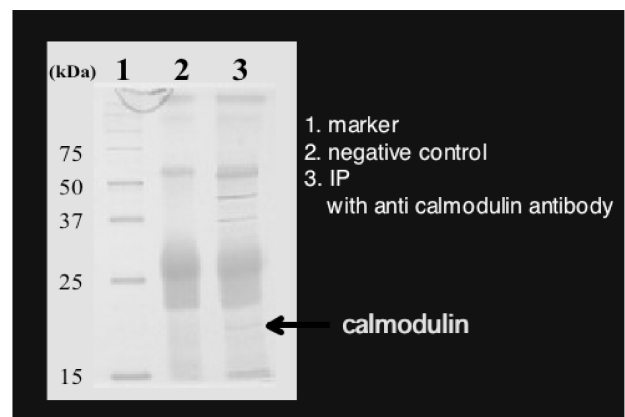


図7：抗カルモジュリン抗体を用いた免疫沈降の：抗原であるカルモジュリン以外にも複数の特異的なバンドが見られた。

●抗プロテインキナーゼC抗体：6つの抗プロテインキナーゼC抗体クローンをを用いた免疫沈降実験により、各クローンが特異的に捕獲するタンパク質が得られた。これらの分子は、それぞれの抗体のエピトープに対応した、抗原(プロテインキナーゼC)分子の機能構造の一部分となんらかの類似性を有している可能性が高い。新たなプロテインキナーゼの発見を期待して、得られたタンパク質のプロテオミクスの手法を用いた同定を進めている。

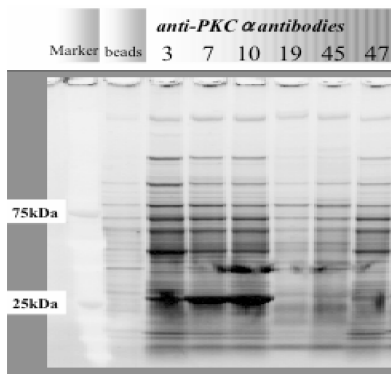


図8：抗プロテインキナーゼC抗体を用いた免疫沈降：クローン(3, 7, 10, 19, 45, 47)特異的なバンドが見られる

4) 抗体分子をプロトタイプとして用いるドラッグデザイン

標的分子認識に特化した分子機械である抗体を、制御因子として構成因子間の相互作用に作用させることによる対象系への介入法の開発を進めた。

●**酵素機能の制御**：慢性骨髄性白血病の病因遺伝子産物であるablプロテインキナーゼを標的として、そのタンパク質リン酸化活性を制御する抗体のクローニングを行った。これまでに複数の抗体クローンが得られているが、ablプロテインキナーゼの活性を抑えるものは未だ得られていない。

●**細胞内移行の制御**：複数の細胞内シグナル伝達系のクロストークにより、細胞の状態に応じて膜画分と細胞質間を動的に移行するミリスチル化（飽和脂肪酸修飾の一種）タンパク質の機能構造解析の結果をふまえて（文献3-5, 7, 9, 10）、これを適用対象のモデルケースとして使用した。カルモジュリンは細胞内で様々な分子の制御に関わっているが、ミリスチル化タンパク質にもカルシウム依存的に結合する。通常、カルモジュリンによる特定の相手への作用を遮断することは難しいが、ミリスチル化タンパク質-カルモジュリン間相互作用のみを阻害する抗体のクローニングに成功しているため、これを使えばカルモジュリンのミリスチル化タンパク質への作用だけを制御できる。他方、当該研究の過程で、細胞内には全タンパク質の数パーセントにもおよぶミリスチル化タンパク質が存在することが予想されたので（文献8）、ミリスチル基のみを認識する抗体のクローニングを行った。得られた抗体を用いた、がん、および、エイズの臨床応用研究が進行している。

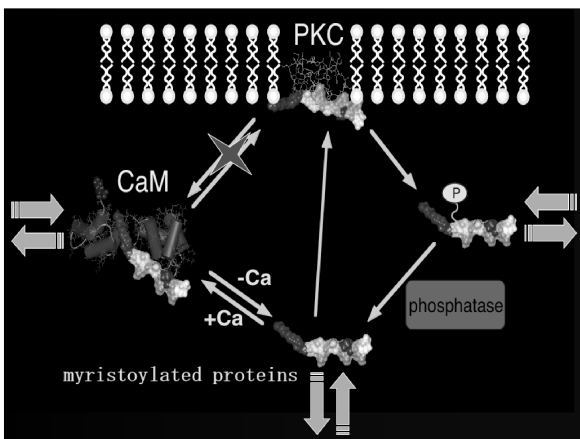


図9：ミリスチル化タンパク質の複数の細胞内シグナル伝達系のクロストークによる移行

5) 抗体の機能解析、抗原の捕獲・同定技術の応用

●**がん特異抗原の同定**：本研究で得られた知見やノウハウを（特許1）、臨床検体（細胞）を抗原として用いて得られた抗体クローンに適用し、これまでに3種類のがん特異抗原の同定に成功している（特許2）。今後も、その数は増える見込みである。

これまでの結果は、免疫系が最初は認識があいまいで抗原特異性がオーバーラップする抗体群（naive repertory）をあらかじめ準備して、何かしらの抗原が侵入してきたときには、一気に特定の抗体の抗原特異性をあげてそれに対処するというようにして、分子認識のあいまいな抗体と厳密な抗体を巧妙に使い分けられていることを分子レベルで示している。最初は標的認識があいまいな抗体の標的認識特異性を、生体がどのように高めているのかを学ぶことは、免疫学の見地からのみならず、バイオナノプローブの標的認識装置を設計するうえで大変に有効である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

現在、抗体ライブラリーを保有し扱える技術を有した研究室は、英国のウインターのグループ、他、技術的な問題から世界で数カ所しか存在しないが、すべてのグループにおいて創薬を念頭に置いた研究開発が進められており、技術開発競争は激化の一途をたどっている。従って、海外のグループにおいて基盤技術の開発・特許化が進む前に、国内においても国外のグループに競合し得る基盤技術を有する事が急務だと考えている。

本研究では[エピトープ]-[抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列]を基盤に、ゲノム研究への展開を目的として、その拡張および高度化を進めた。他方、当該研究期間中に始まった藤田保健衛生大学21世紀COEプログラム[超低侵襲標的化診断治療開発センター]におけるがん特異抗原の同定において当該研究のノウハウが活かされ、抗原、対象がん種、免疫組織化学的染色像、等を登録した高次抗体データベースが構築されて運用されている（非公開）。

当該データベースに登録されている抗体の種類は数千種類にのぼり、今後、抗体を用いた様々な研究開発の基盤リソースとして活用される予定である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

スクリーニングに使用する抗原の調製と得られた抗体の機能解析（抗原結合定数、エピトープ、抗原機能の制御能、など）は各論と成らざるを得ないので、本プロジェクト遂行の律速であり、抗体遺伝子データの蓄積スピードに追い付かなかった。そのために、実用レベルの任意の遺伝子に由来する遺伝子産物を抗原とする抗体の、網羅的かつ迅速な調製を支援する方法、および、機能が未知の遺伝子産物の機能に対応抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列から類推するためのアルゴリズムの完成には至れなかった。さらなるデータの蓄積が必要である。

〈今後の課題〉

当該研究の理論的根拠を裏付ける実験結果を得られたことは最大の成果のひとつである。この成果は今後の当該研究の推進の礎となるものであるが、目的達成のためには、抗体の機能解析に関するさらなるデータの蓄積を行い、実用レベルの任意の遺伝子に由来する遺伝子産物を抗原とする抗体の、網羅的かつ迅速な調製を支援する方法、および、機能が未知の遺伝子産物の機能に対応抗体の抗原認識部位のアミノ酸配列から類推するため

のアルゴリズムを完成させる必要がある。

免疫以前においても生体内には認識があいまいで抗原特異性がオーバーラップする抗体群が用意されていることを分子（遺伝子）レベルで始めて確認できたことは、当該研究の開始時には考えていなかった成果であり、限られたゲノム情報から生体がどのように無限の可能性を産み出しているかに関する研究への発展が期待できるものである。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文／プロシーディング

1.0111301442

Nakashima,A., Hayashi,N., Mori,K., Kaneko,YS., Nagatsu,T., Ota,A., Positive Charge Intrinsic to Arg37-Arg38 is Critical for Dopamine Inhibition of the Catalytic Activity of Human Tyrosine Hydroxylase Type 1, FEBS Lett., 465, 59-63 (2000).

2.0111301448

Matsushima,N.,Hayashi,N.,Jinbo,Y.,Izumi,Y.,"Structural Changes of Calcium-bound and Calcium-free Calmodulin Interacted with TFP as Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering in Solution", Biochemical J.,347,211-215. (2000)

3.0111301457

Hayashi,N.,Izumi,Y,Titani,K.,Matsushima,N.,"The binding of myristoylated N-terminal nonapeptide from neuron-specific protein CAP-23/NAP-22 to calmodulin induces a 'relaxed' globular structure different from the calmodulin-non-myristoylated peptide complex ",Protein Science,9,1905-1913. (2000)

4.0204051533

Hayashi,N.,Matsubara,M.,Jinbo,Y.,Titani,K.,Izumi,Y.,Matsushima,N.,"Nef of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) interacts directly with calcium-bound calmodulin", Protein Science, 11, 529-537 (2002).

5.0305131617

Hayashi,N., "Multifunctional posttranslational modification: N α -myristoylation of proteins regulates protein-protein/protein-lipid interactions and signaling pathway systems in the brain.2, Recent research developments in biophysics & biochemistry, 2, 33-45 (2002).

6.0307252021

Matsubara,M.,Hayashi,N.,Jing,T.,Titani,K., "Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C", J. Biochem., 133(6), 773-781 (2003).

7.0311270906

Matsubara,M.,Titani,K.,Taniguchi,H.,Hayashi,N.,"Direct Involvement of Protein Myristoylation in Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS)-Calmodulin Interaction," J.Biol.Chem., 278(49), 48898-48902 (2003).

8.0402201814

Maurer-Stroh,S.,Gouda,M.,Novatchkova,M.,Schleiffer,A., Schneider,G.,Sirota,FL.,Wildpaner,M.,Hayashi,N., Eisenhaber,F.,"MYRbase: Evaluation of genome-wide glycine myristoylation enlarges functional spectrum of eukaryotic myristoylated proteins",GenomeBiology,5,ArticleR21 (2004).

9.0405111959

Hayashi,N.,Nakagawa,C.,Takasaki,A.,Jinbo,Y.,Yamakawa,Y.,Titani,K.,Hashimoto,K.,Izumi,Y.,Matsushima,N.,"Myristoylation-regulated direct interaction between calcium-

bound calmodulin and N-terminal region of pp60v-src", J.Mol.Biol., 338, 169-180. (2004)

10.0501241755

Matsubara,M.,Jing,T.,Kawamura,K.,Shimojo,N.,Titani,K.,Hashimoto,K.,Hayashi,N.,"Myristoyl moiety of HIV Nef is involved in regulation of the interaction with calmodulin in vivo.", Protein Sci., 14, 494-503. (2005)

2) 特許

1. 名称：抗IgSF4抗体及びその利用、出願番号 特願20085-54624、出願人：株式会社抗体研究所、発明者：林宣宏、他
2. 名称：細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定、出願番号 特願2003-406554、出願人：エムビーエルベンチャーキャピタル株式会社、発明者：林宣宏、他

3) その他

1. 0111301434

林 宣宏, 第II部コンピューター第8章 "立体構造の描写と構造予測", 「基礎生化学実験法」(大島泰郎 編) 日本生化学会, 第1巻, p.98-118 (2001).