

Table 3 Observed m/z values and carbohydrate compositions of peaks A-P in base peak chromatogram of lpr/lpr and +/- mice kidneys-soluble (Fig. 2A) and -insoluble (Fig. 2B) fractions

Peak No. in Fig.2	Compositions ^a	Theoretical mass ^b	Observed m/z											
			Soluble fraction						Insoluble fraction					
			lpr/lpr		+/+		Ratio		lpr/lpr		+/+		Ratio	
M ⁺	M ²⁺	M ⁺	M ²⁺	[M+H+NH ₄] ²⁺	[M+H+NH ₄] ²⁺	(d ₀ /d ₄)	S.D.	M ⁺	M ²⁺	[M+H+NH ₄] ²⁺	[M+H+NH ₄] ²⁺	(d ₀ /d ₄)	S.D.	
A	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	1475.35	1475.57	738.28	1479.59	740.29	1.40	0.23	1475.57	1479.59	1475.57	1479.59	0.70	0.04
B	[Fuc] ₃ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆	2888.69	1445.04	1447.09					1445.06	1447.09				
B2	[Fuc] ₃ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆	2888.69							1445.04	1447.09				
C	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1313.21	1313.51	1317.54										
D	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₇	2475.32												
D2	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₇	2475.32												
E	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2361.22	1180.98	1189.48	1183.00	1191.50	2.01	0.27	1180.97	1182.98	1189.47	1191.48	0.68	0.27
E2	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2361.22	1180.98	1189.48	1182.99	1191.49	1.34	0.32	1180.97	1182.98	1189.47	1191.48	0.68	0.27
F	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1135.07	1135.45	1139.48					1180.97	1182.98	1189.47	1191.48	0.66	0.03
F1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₂	1135.07	1135.45	1139.48					1180.97	1182.98	1189.47	1191.48	0.66	0.03
G	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2216.08	1008.45	1110.46	1110.46	1118.46	1.98	0.29			1116.44	1118.46	0.76	0.04
G2	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	2216.08	1008.45	1110.46	1110.46	1118.46	1.98	0.29			1116.44	1118.46	0.56	0.03
H	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	2158.02							1108.44	1110.44	1116.45	1118.46	0.80	0.08
H1	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	2158.02							1108.44	1110.44	1116.45	1118.46	0.80	0.08
I	[Hex] ₁₀ [HexNAc] ₂	2123.91									1087.93	1089.95	0.83	0.18
I1	[Hex] ₁₀ [HexNAc] ₂	2123.91									1087.93	1089.95	0.83	0.18
J	[Fuc] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	2052.94									1035.42	1037.43	0.55	0.02
J1	[Fuc] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	2052.94									1035.42	1037.43	0.55	0.02
J2	[Fuc] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	2052.94							1026.91	1028.92	1035.42	1037.43	0.70	0.07
K	[Hex] ₉ [HexNAc] ₂	1961.77									989.88	991.89	0.49	0.18
K1	[Hex] ₉ [HexNAc] ₂	1961.77									989.88	991.89	0.49	0.18
K2	[Hex] ₉ [HexNAc] ₂	1961.77									989.87	991.89	0.65	0.09
L	[Fuc] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₂	973.07	973.40	977.43										
L1	[Fuc] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₂	973.07	973.40	977.43										
M	[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	1906.79									962.38	964.39	0.56	0.02
M1	[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	1906.79									962.38	964.39	0.56	0.02
N	[Hex] ₈ [HexNAc] ₂	1763.60									908.85	910.86	0.68	0.38
N1	[Hex] ₈ [HexNAc] ₂	1763.60									908.85	910.86	0.68	0.38
N2	[Hex] ₈ [HexNAc] ₂	1763.60									908.85	910.86	0.67	0.03
O	[Hex] ₂ [HexNAc] ₂	827.04									827.35	831.37	1.83	0.05
O1	[Hex] ₂ [HexNAc] ₂	827.04									827.35	831.37	1.83	0.05
P	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	1565.43									827.82	829.84	1.38	0.30
P1	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	1565.43									827.82	829.84	1.38	0.30

^a [Fuc], fucose; [Hex], hexose; [HexNAc], N-acetylhexosamine; [NeuNAc], N-acetylneuraminic acid. ^b Monoisotopic values of dDPA-N-linked oligosaccharide.

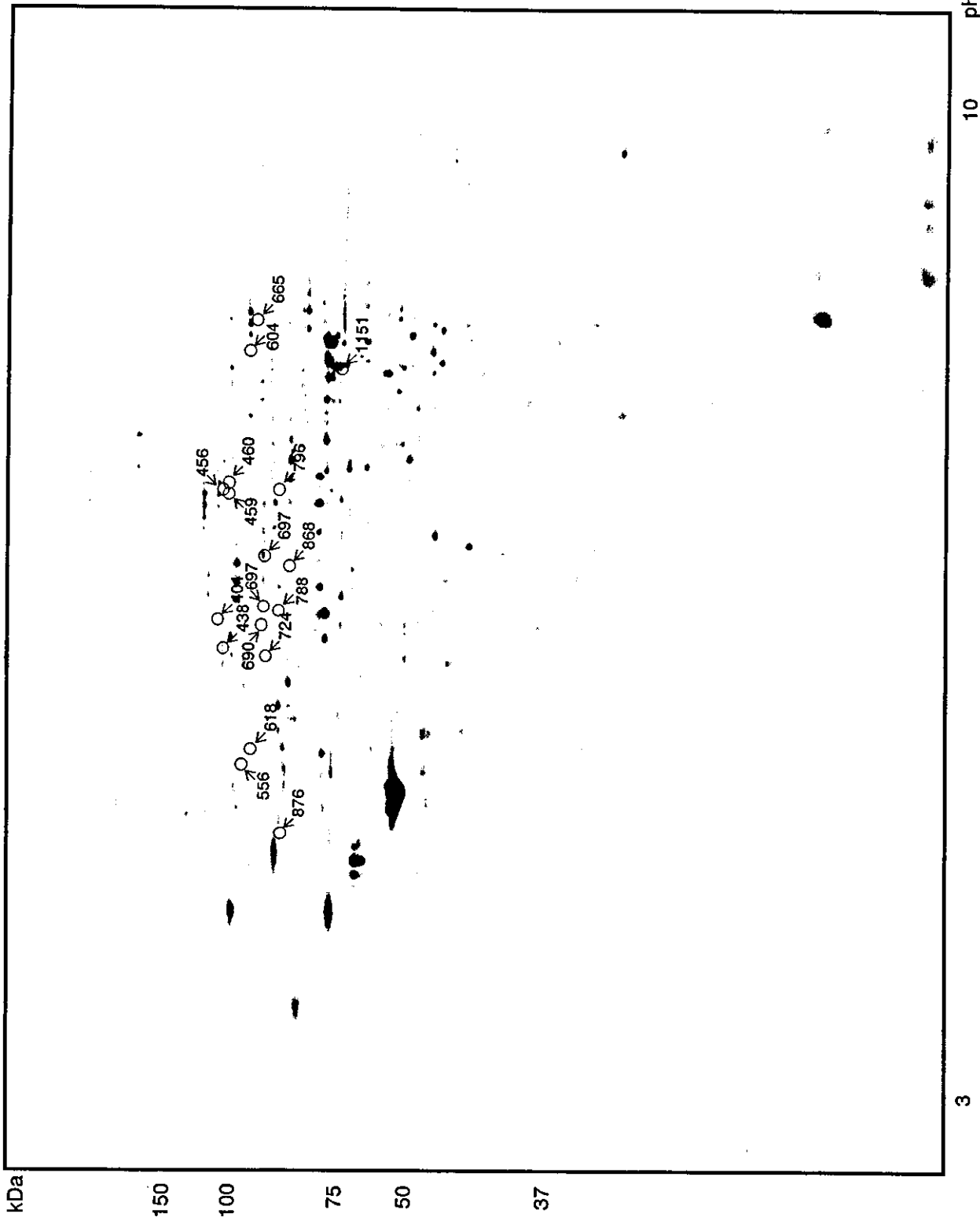
Table 4 Deduced structures of the oligosaccharides from lpr/lpr and +/+ mice kidneys-soluble (Fig. 2A) and -insoluble (Fig. 2B) fractions

Peak No.	Composition ^a	Deduced structure ^b	Peak No.	Composition	Deduced structure
A A1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂		H H1	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	
B B1	[Fuc] ₃ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆		I I1	[Hex] ₁₀ [HexNAc] ₂	
B2	[Fuc] ₃ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆		J J1	[Fuc] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	
B C1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂		J2	[Fuc] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	
D D1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₇		K K1	[Hex] ₉ [HexNAc] ₂	
D2	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₇		K2	[Hex] ₉ [HexNAc] ₂	
E E1	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅		L L1	[Fuc] ₁ [Hex] ₂ [HexNAc] ₂	
E2	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅		M M1	[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	
F F1	[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₂		N N1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	
G G1	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅		N2	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	
G2	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅		O O1	[Hex] ₂ [HexNAc] ₂	
			P P1	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	

^a[Fuc], fucose; [Hex], hexose; [HexNAc], N-acetylhexosamine; [NeuNAc], N-acetylneuraminic acid.

^bProduct ion spectra of B1, B2, D1 and D2 were not acquired by data-dependent CID MS/MS scan.

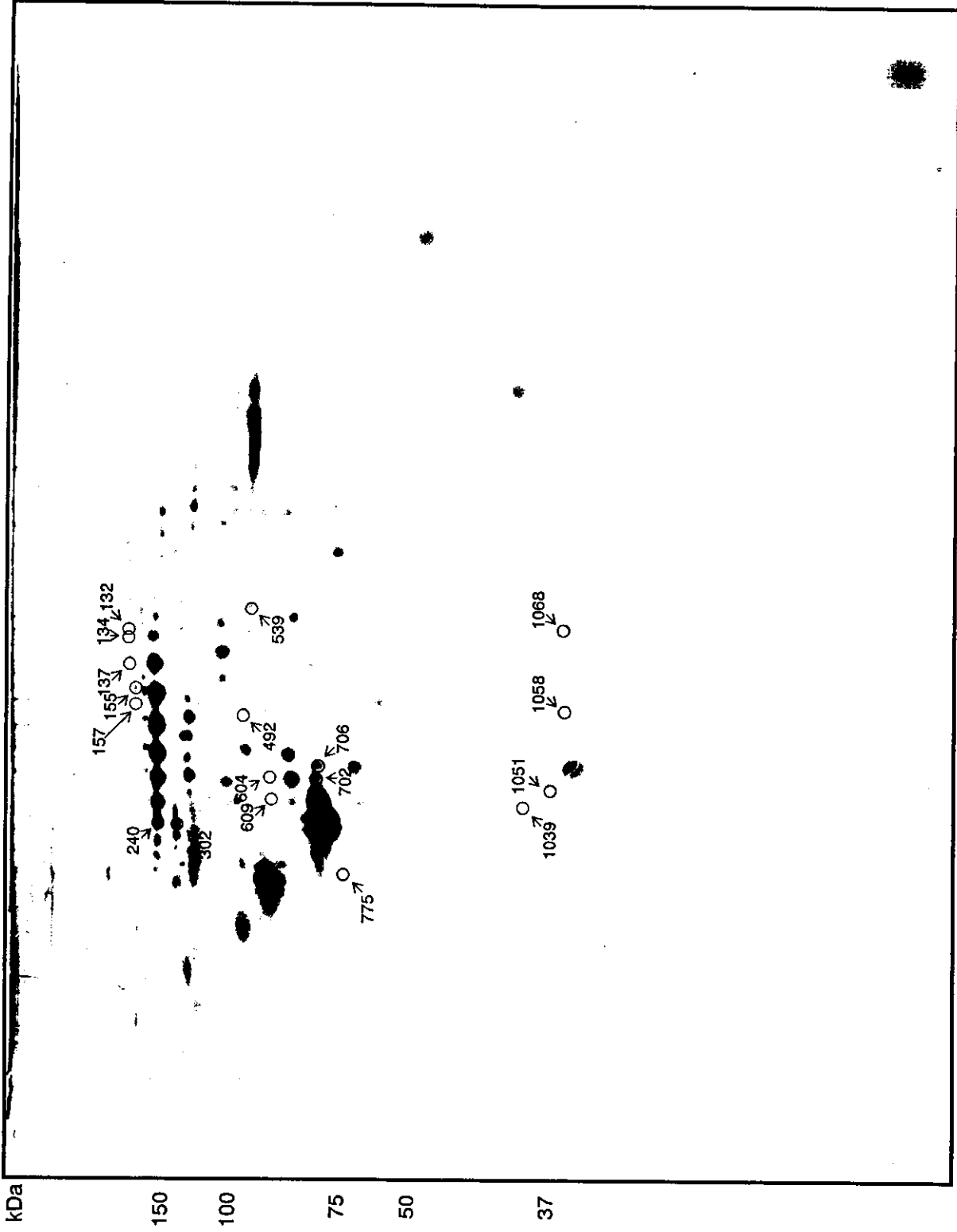
○ Gal ○ Man ■ GlcNAc △ Fuc ● Glc



3
 Figure 5. 2D image of protein expression differences between soluble fractions from lupus model mice (MRL-1pr/1pr) and control mouse (MRL-+/+) kidneys. Black highlights indicate protein spots, which were up- or down-regulated in MRL-1pr/1pr mice compared to MRL-+/+ control mice.

Table 5 Differentially expressed protein spots in lpr/lpr mouse soluble fraction compared to +/- mouse

Spot No.	Protein Name	NCBI accession No.	t-test ($p < 0.05$)	Average Ratio
404	α -glucosidase II α -subunit	6679891	0.0230	-1.30
438	α -glucosidase II α -subunit	6679891	0.0470	-1.20
459	oxoglutarate dehydrogenase	15489120	0.0080	1.35
460	oxoglutarate dehydrogenase	15489120	0.0045	1.26
556	interferon-inducible protein 10 receptor	20984919	0.0240	1.21
604	aconitase II	18079339	0.0450	1.41
665	metastasis-associated protein MTA1	28411669	0.0180	-1.24
690	thimet oligopeptidase I	31981237	0.0019	1.15
693	ezrin	6678571	0.0230	1.15
697	ezrin	6678571	0.0010	1.10
788	transglutaminase type 1	7081495	0.0053	1.39
796	β -glucuronidase precursor	114964	0.0049	-1.09
868	unnamed protein product	26336937	0.0220	-1.27
876	PDZ domain containing I	10946938	0.0460	1.19



3
 Figure 6. 2D image of protein expression differences between insoluble fractions from lupus model mice (MRL-lpr/lpr) and control mouse (MRL-+/+) kidneys. Black highlights indicate protein spots, which were up- or down-regulated in MRL-lpr/lpr mice compared to MRL-+/+ control mice.

Table 6 Differentially expressed protein spots in lpr/lpr mouse insoluble fraction compared to +/+ mouse

Spot No.	Protein Name	NCBI accession No.	t-test ($p < 0.05$)	Average Ratio
132	nidogen1	6754854	0.016	1.28
134	nidogen1	6754854	0.006	1.40
137	nidogen1	6754854	0.045	1.48
155	α -glucosidase II α -subunit	6754854	0.033	-1.19
162	α -glucosidase II α -subunit	6679891	0.019	-1.31
240	meprin	6679891	0.042	-1.53
302	NADH dehydrogenase Fe-S protein 1	31982199	0.048	1.25
492	vacuolar H ⁺ -ATPase	21704020	0.022	1.23
539	D-lactate dehydrogenase	162723	0.017	1.24
604	ATPS	23506790	0.011	-1.29
609	ATPS	2623222	0.034	-1.13
702	laminC	2623222	0.015	1.20
775	tropomoduline3	1794159	0.041	1.31
1039	metaxin2	8394460	0.001	1.36
1051	NADPH dehydrogenase	13124347	0.022	1.39
1058	glutathion peroxycdase 3 (GPx3)	20900762	0.018	2.30
1068	glutathion peroxycdase 3 (GPx3)	25011841	0.012	2.34



Figure 7 Biosynthetic pathway of N-linked oligosaccharide. P; phosphate, Dol; dolichol, A; α-glucosidase I, B; α-glucosidase II, C; α-mannosidase, D; N-acetylglucosaminyltransferase I, E; α-1,6-fucosyltransferase, F; α-mannosidase II, G; N-acetylglucosaminyltransferase II, H; β-1,4-galactosyltransferase

疾患関連たんぱく質の機能解析基盤と有効活用技術の確立

分担研究者:堤 康央

(国立医薬品食品衛生研究所大阪支所医薬基盤研究施設・副プロジェクト長)

研究要旨:

本年度は、I)数多くの疾患関連たんぱく質の中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を迅速に絞り込んでいく技術といった「効果的かつ効率的な疾患プロテオーム解析基盤」を確立していくため、①白血病患者と健常人由来の臨床検体(細胞、血清、尿など)の供給・受入体制の確立、②組織・細胞レベル及び細胞小器官レベルでのたんぱく質の分離・抽出を行うための条件検討、③2DLC及び2DGEによるたんぱく質の分離・精製システムの立ち上げ、④たんぱく質間相互作用解析のための疾患関連たんぱく質ライブラリの構築と、II)絞り込まれてきた疾患関連たんぱく質の機能解析とその有効活用を図っていくため、①種々たんぱく質に対する抗体を簡便に作製できる基盤技術の確立、②たんぱく質の構造・活性相関を高速解析するための基盤技術の開発、③医薬品シーズとして利用可能なたんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤技術(動態制御技術)の創出、④疾患関連たんぱく質の細胞内局在性を感度良く解析する技術の基礎検討を行った。

協力研究者:

竹田武弘 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所医薬基盤研究施設基盤研究第二プロジェクトチーム・主任研究官)

角田慎一 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所医薬基盤研究施設基盤研究第二プロジェクトチーム・主任研究官)

鎌田春彦 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所医薬基盤研究施設基盤研究第二プロジェクトチーム・主任研究官)

水口裕之 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所医薬基盤研究施設基盤研究第三プロジェクトチーム・副プロジェクト長)

質的、量的に変動するたんぱく質(疾患関連たんぱく質)を探索すること、これらの機能を解析して疾患の発症や悪化、治癒などに関わるたんぱく質を絞り込むこと、そして絞り込んだたんぱく質自体を医薬品シーズとして有効活用するか、あるいはその活性を制御する分子を選択、最適化することによって新規医薬品の開発などを達成することにある。しかし現状では、効果的かつ効果的に疾患プロテオミクスを推進できる研究基盤や、これにより得られた情報を医薬品開発などへ有効活用していくための基盤技術が十分に整備されていない。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、疾患組織・細胞などの臨床検体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行うための研究基盤に加え、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の有効活用法に関する研究を行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを目指し、以下の研究を行った。

A. 研究目的

ポストゲノム時代の最重要課題の1つは、健常状態と比較して、疾患状態で時空間的、

I) 効果的かつ効率的な疾患プロテオーム解析基盤の確立

- ①臨床検体の受入体制の確立
- ②組織・細胞などからのたんぱく質の分離・抽出を行うための条件検討
- ③2DLC 及び 2DGE によるたんぱく質の分離・精製システムの立ち上げ
- ④疾患関連たんぱく質ライブラリの構築

II) たんぱく質の機能解析とその有効活用法の開発

- ①種々たんぱく質に対する抗体を迅速かつ簡便に作製できる基盤技術の確立
- ②たんぱく質の構造-活性相関を高速解析するための基盤技術の開発
- ③たんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤(動態制御)技術の創出
- ④たんぱく質の細胞内局在性を解析するための基盤技術の検討

B. 研究方法

I)-① 臨床検体の受入体制の確立

解析対象疾患として、成人T細胞白血病リンパ腫(adult T-Cell leukemia-lymphoma; ATL)を選択した。ATL は、予後不良ながんのひとつとして知られ、ヒトT細胞白血病ウイルス I 型(human T-cell leukemia virus type I; HTLV-I)の感染により発症することが明らかとなっているものの、ATL 発症に至るまでの分子メカニズムはほとんど明らかにされておらず、また有効な治療方法も確立されていない。ATL は世界の中でも我が国において頻度が高い疾患であり、特に九州・沖縄など南西日本で患者が多いことが特徴である。そこで ATL の分子病態をたんぱく質レベルで解明し、疾患マーカーや医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を絞り込んでいくことを目的に、患者由来試料のプロテオーム解析を行うことにした。本年度は、患者から試料の提供を受けるための倫理申請手続きを行い、試料の確保と受入体制の整備を行った。

試料は鹿児島大学医学部附属病院より提供を受けることとした。解析対象として ATL 患者、HTLV-1 キャリア、および対照としての健

常人ボランティアを選定し、尿および血液の提供を受ける。ATL 患者には急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型、急性転化型の細分類があり、それぞれの違いを分子レベルで明らかにするため、各病型の患者試料を確保する。試料採取後、尿は速やかに凍結し、また血液は血漿および単核球を分離後に凍結した後、当研究施設に輸送する。試料とともに診療情報(性別、年齢、主疾患名、合併症、薬物治療の情報、各種血液生化学検査値)の提供を受け、プロテオーム解析結果と統合して分析を行う。なお、本研究はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針が適用されるものではないが、本指針に準じて実施するものとする。試料および診療情報の匿名化は、鹿児島大学医学部に置く個人情報管理者により行う。ATL 患者および HTLV-1 キャリア由来試料は、病期の経過を追跡可能とするために連結可能匿名化とし、健常人ボランティアの試料については連結不可能匿名化とする。以上の研究計画を国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会および鹿児島大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会に申請し、承認(国立衛研については条件付き承認)を得た。

I)-② 組織・細胞などからのたんぱく質の分離・抽出を行うための条件検討

培養細胞の細胞質由来たんぱく質を分離・抽出・精製し、プロテオーム解析を行っていくにあたり、次年度以降、ATL を解析対象とすることから、モデル細胞としてヒト T 細胞白血病由来の T cell line である Jurkat 細胞を用いた。Jurkat 細胞は、10% FBS RPMI-1640 培地にて経代培養した Jurkat 細胞を、1mM EDTA/PBS にて洗浄し、1,000 rpm にて 5 分間遠心し、細胞塊を得た。細胞を PBS(-)にて再度懸濁し、細胞数を測定した(8×10^6 cells)。この細胞を、細胞溶解液(20 mM HEPES-NaOH, 0.25 M Sucrose, 1.0% Triton-X, Protease Inhibitor cocktail (Roche 社))にて細胞を溶解し、室温で 20 分間、反応させた。反応後、ピペットにて強くピペティングし、不溶物を懸濁した。この反応液を、14,000rpm, 4°Cで遠心し、残存する沈殿物を除去した。この上清を細胞質由来のたんぱく質液として、たんぱく定量(BCA™ Protein Assay Kit: PIERCE 社)した。得られたたんぱ

く質溶液の濃度は、約 1.2 mg であった。

I)-③ 2DLC 及び 2DGE によるたんぱく質の分離・精製システムの立ち上げ

上記 I)-②にて得られたたんぱく質溶液に、4倍容のアセトンを添加し、-80°Cで1時間放置し、たんぱく質を沈殿させた。この沈殿を 4°C、14,000 rpm、30 分間遠心し、たんぱく質を回収した。この沈殿を Invitrogen 社製の泳動バッファー (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 1% ZOOM Carrier Ampholytes 3-10) にて再溶解し、Invitrogen 社製 ZOOM IEF Fractionator にて異なる pI 分画に精製した。この精製したたんぱく質溶液を、Amersham Biosciences 社製の Ettan IPGphor II にて、1 次元目の電気泳動を行った。電気泳動後のストリップをポリアクリルアミドゲルにて再度電気泳動し、2次元に展開した。反応後のポリアクリルアミドゲルをクマシーブルーにて染色し、スポットを確認した。

I)-④ 疾患関連たんぱく質ライブラリの構築

疾患関連細胞で発現しているたんぱく質を網羅的にライブラリ化することで、疾患関連たんぱく質間の相互作用解析や疾患関連たんぱく質に対する抗体作製、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の迅速単離とその機能解明を効率よく進めていくため、現在 2 種類のファージディスプレイ cDNA ライブラリの構築を進めている。「M13 ファージディスプレイ cDNA ライブラリ」に関してはまず、炎症系細胞や白血病細胞、HTLV-1 感染細胞といった疾患関連細胞から mRNA を調製し、これらをテンプレートにランダムプライマーを用いて cDNA の合成を行った。今後、制限酵素 NotI, NcoI により cDNA およびファージミドベクター pY02 を切断後、これらのライゲーションを行い、ファージコートタンパク質 g3p 遺伝子上流側に cDNA が挿入されたファージミドライブラリとしていく。このライブラリを用いて大腸菌 TG1 をエレクトロポレーションにより形質転換し、ヘルパーファージ M13KO7 を感染させることにより、cDNA にコードされたたんぱく質を g3p 融合たんぱく質としてファージ表面へ網羅的に提示させることができ、かつ、ヘルパーファージを感染させない場合にはたんぱく質を可溶型として得られるものと考えている。一方で、「T7 ファージ

ディスプレイライブラリ」に関しては、M13 ファージと同様に、疾患関連細胞から mRNA を調製し、それをテンプレートにオリゴ dT プライマーまたはランダムプライマーを用いて cDNA の合成を行っている。このシステムでは、末端に EcoRI サイト、および HindIII サイトを有するアダプターを付加した後、T7-Select ベクターに挿入することで、10B キャプシドタンパク遺伝子下流側に cDNA が挿入されたファージミドライブラリを現在、調整段階である。本ファージミドベクターを in vitro packaging を行い、大腸菌 BLT5403 あるいは BLT5645 に感染させることにより、cDNA を 10B との融合たんぱく質として表面に発現したファージを得ることができると考えている。

II)-① 種々たんぱく質に対する抗体を迅速かつ簡便に作製できる基盤技術の確立 <マウス cDNA の作製>

BALB/c マウス、B16BL6 マウス、C3H マウス(雌 6~8 週齢)の脾臓及び大腿骨由来の骨髓を回収後、PBS にて洗浄した。TRIzol Reagent を 1g の脾臓に対し 20mL 加え、また骨髓細胞 1×10^7 cells/mL に対し 2mL を添加した。ホモジナイズ後、室温にて 5 分間放置し、TRIzol Reagent 1mL に対し、クロロホルムを 0.2mL 加え、15 秒間激しく混和した。3 分間放置後、4°C、12,000rpm で 15 分間遠心し、回収した水層に対して等量のイソプロパノールを添加した。室温で 10 分間放置した後、4°C、12,000rpm で 15 分間遠心し、上清を除いた。得られた沈殿に 0.7mL の 99.9%エタノール、0.3mL の分子生物学グレードの蒸留水 (D.W.) と 0.01mL の 3M Sodium Acetate を加えた。十分に懸濁処理した後 4°C、12,000rpm で 15 分間遠心し、上清を除いて沈殿を乾燥させ、1mL の D.W. に沈殿を溶解することで total RNA とした。この total RNA から Amersham Biosciences 社製の mRNA Purification Kit を用いて mRNA を分離・精製し、Invitrogen 社製の SUPER SCRIPT First Strand Synthesis System を用いて cDNA を random hexamers プライマーで作製した。

<マウス scFv 遺伝子の作製>

上記で作製した cDNA を鋳型(テンプレート)として、表 1 で示したオリゴプライマーセットと、校正活性に優れた Taq polymerase を用

い、以下の条件で PCR を行い、マウス由来のタイプ VL 遺伝子及びタイプ VH 遺伝子を増幅した(図 1)。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 55°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返す】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

得られた PCR 産物は QIAGEN 社製の PCR purification kit により精製した。また図 2 に示したように、増幅した VL 遺伝子と VH 遺伝子は以下の条件で assemble PCR を行い、VL 遺伝子と VH 遺伝子を連結し、マウス由来のタイプ scFv 遺伝子を得た。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 20 サイクル繰り返す】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

得られた PCR 産物は、5'-gcc aag ctt tgg agc ctt ttt ttt gga gat ttt caa cgt gaa aaa att att att cgc aat tcc ttt agt tgt tcc ttt cta tgc ggc cca gcc ggc cat ggc c-3'及び 5'-cgc cgg cgt cca cgc ggc cac ggc ata ggc cta ggc gac ctt ggc gca cgg cgt atc tga caa ctt tca aca aat cgt ttt gga gta tgt ctt tta agt aaa tg-3'の両プライマーを用い、下記の条件で PCR を行い、scFv 遺伝子を増幅した。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 63°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 20 サイクル繰り返す】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

最終的に増幅した scFv 遺伝子は、PCR purification kit による精製およびアガロースゲ

ル精製を行った。

<タイプ scFv・ファージライブラリの作製>

図 3 に示したように、増幅したマウス scFv のライブラリ遺伝子を制限酵素 Sfi I と Not I で処理し、インサートとした。また pY02 ベクターも同様に、Sfi I と Not I で処理した。なお、この pY02 は、ファージ外殻たんぱく質 g3p と挿入遺伝子の産物(本研究では、マウス scFv のライブラリ)との融合たんぱく質を大腸菌に発現させるためのベクターである。ベクターと scFv インサートを T4 DNA ligase を用いて 16°C で 16 時間ライゲーションした。得られたライゲーション産物は PCR purification kit にて精製した。一方、エレクトロポレーションに用いる大腸菌(TG1)は、予め 30mL の 2YT 培地で OD600=0.4 まで培養し、ミリ Q で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール水溶液で 200µL に懸濁した後、氷冷し保存した。この TG1 に対して、精製したライゲーション産物溶液を 10µL 添加し、2.5kV、0.25µF、2000 でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を 790µL 添加し、1 時間プレ培養した後、一部(50µL)を下記のライブラリサイズの測定用に回収し、残りについては 50µg/mL アンピシリン、2%グルコース含有 LB-Agar プレートに播種し、37°C で 12 時間培養した。

<ライブラリサイズの測定>

エレクトロポレーション後の TG1 プレ培養溶液から 50µL を回収し、100µg/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を用いて 10 倍で段階希釈し、各 TG1 希釈溶液 450µL に対して 800µL の 100µg/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、全量を Clontech 社製のクローンディスクに播種し、37°C で一晩培養した。ライブラリサイズは 10 の n 乗希釈したところで計数されたコロニー数 (m) から、ライブラリサイズ = $m \times 10 / 9 \times 2 \times 10^n$ CFU/mL として算出した。

<フィンガープリント解析>

クローンディスク上に形成されたモノクローナルな TG1 コロニーをピックアップし、Taq DNA Polymerase を用いて、scFv 遺伝子部分をダイレクト PCR した。尚、ダイレクト PCR で用いたプライマーは、5'- caa cgt gaa aaa att att att cgc -3'及び 5'- gta aat gaa ttt tct gta tga gg-3'であり、以下の条件で PCR を行

った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 57°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返す】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

得られた PCR 産物 10 μ L を、制限酵素 BstNI で処理し、アガロース電気泳動によりその消化パターンを観察した。

<ナイーブ scFv を表面提示したファージライブラリの作製>

50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 LB プレートに播種し、37°Cで一晩培養したプレートから、コロニーをバルク回収し、100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を加えて、250rpm、37°Cで OD600=0.3 まで振盪培養した。50 μ L の M13KO7 ヘルパーファージを添加し、37°C、110rpm、30 分間、続いて 37°C、250rpm、30 分間培養した後、1,700 \times g、15 分間遠心し、得られた大腸菌ペレットに対して 100 μ g/mL アンピシリン、50 μ g/mL カナマイシン含有 2YT 培地を添加して 12 時間培養することで、ナイーブ scFv を表面提示したファージライブラリを培養上清中に誘導した。

<ファージの精製>

ファージライブラリを誘導させた TG1 培養液を氷冷し、1,700 \times g、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 20,000 \times g で 15 分遠心し、回収した上清に氷冷した 20%PEG8,000、2.5M NaClを加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。次いで 20,000 \times g で 15 分間遠心して得られたペレットを NTE Buffer(100mM NaCl、10mM Tris、1mM EDTA)に懸濁し、精製ファージ溶液とした。

<ルシフェラーゼに対するパンニング>

Carbonate-Bicarbonate 緩衝液でルシフェラーゼを 10 μ g/mL に希釈し、Nalge Nunc 社製のイムノチューブに 1mL 添加し、一晩 4°C で静置することで抗原を固相化した。イムノチューブを Phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄後、大日本製薬株式会社製の 2% Block Ace を 5mL 加え、37°C、2 時間静置す

ることでブロッキングした。PBS でさらに 3 回洗浄後、精製したナイーブ scFv ファージライブラリをインプット(input)ファージ溶液として 1mL を添加し、4°C、1 時間静置した後、0.05% Tween 含有 PBS(PBST)にて 5~20 回洗浄した。次に 100mM HCl を 1mL 添加し、4°C、10 分間静置後、回収し、500 μ L の Tris-HCl Buffer pH8.0 と混和し、アウトプット(output)ファージ溶液とした。この抗原への結合、洗浄、ファージ溶出、TG1 に感染させることでのファージ増幅といった一連の操作(パンニング)を複数回繰り返すことで、特定の抗原に高親和性な scFv を表面提示したファージクローンを選択・濃縮した。

<ファージタイターの計測>

インプット(input)ファージ溶液及びアウトプットファージ溶液中のファージ粒子数を計測するため(パンニング効率および特定抗原に結合するファージクローンの濃縮程度を観察するため)、各々の溶液を段階希釈した。この希釈溶液 100 μ L に、予め 2%グルコース含有 2YT 培地で OD600=0.3 に達するまで培養しておいた TG1 溶液を 300 μ L 添加し(合計 400 μ L)、37°Cで 1 時間培養した。培養液に 100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地 800 μ L を添加し、クロニディスクに播種し、一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測し、計数された希釈段階 10 の n 乗のコロニー数 (m) から、ライブラリサイズ = $m \times 10 \times 10^n$ CFU/mL として算出した。インプットファージ数とアウトプットファージ数から、 $ratio = (\text{アウトプットファージ数}) / (\text{インプットファージ数})$ を算出した。

<ファージ ELISA>

クロニディスクからモノクローナルな大腸菌コロニーをピックアップし、100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地入りの 96 穴プレートに各々播種し、各ウェルの OD600=0.3~0.6 に達するまで培養した。続いて、M13KO7 ヘルパーファージ原液を予め 100 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で 10 倍希釈しておいた溶液を、20 μ L/well で添加した。1 時間 37°C で静置培養し、1,700 \times g、10 分間遠心後、上清を除き 2%グルコース、100 μ g/mL アンピシリン、50 μ g/mL カナマイシン含有 2YT 培地 150 μ L を添加し、37°Cで一晩培養した。その後、

1,700×g、10 分間遠心し、96 穴プレートの上清をモノクローナルな scFv 提示ファージ溶液とした。ルシフェラーゼ、もしくは Ovalbumin を 10µg/mL に Carbonate-Bicarbonate 緩衝液で希釈し、100µL/well で添加し、4°C で一晩放置することで、固相化した。PBS で 3 回洗浄後、2% Block Ace を 200µL 加え、37°C で 2 時間静置することによりブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、96 穴プレートの上清サンプル(モノクローナルな scFv 提示ファージ溶液)を 100µL/well で添加した後、室温で 2 時間静置した。その後、PBST で 3 回、PBS で 3 回洗浄した。0.4% Block Ace で 3000 倍希釈した HRP した抗ファージ抗体(ファージ外殻たんぱく質の一種である g8p を認識する抗体: Anti-M13 Monoclonal Conjugate ;) を 100µL/well で添加し、室温 2 時間静置した。その後、PBST で 3 回、PBS で 3 回、再度洗浄操作を行い、基質溶液(TMBZ)を加え、発色させた後、2N 硫酸にて反応停止を行った。吸光度(測定波長 450nm、対照波長 655nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。

<シーケンス解析>

ファージ ELISA で抗原に対する特異性が認められたクローンなどについては、96 穴プレートから大腸菌モノクローンを回収し、100µg/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で一晩培養した後 QIAGEN 社製の QIAprep Miniprep Kit で用いてファージミドベクター(モノクローナルな scFv 遺伝子を含むプラスミド)を回収し、5'-caa cgt gaa aaa att att att cgc-3'及び 5'-gta aat gaa ttt tct gta tga gg-3'をプライマーとして使用し、DNA シーケンス解析を行い、scFv 遺伝子の配列と scFv のアミノ酸配列を決定した。

<種々抗原に対するパンニング>

血管内皮増殖因子受容体 2 型、血管内皮増殖因子、腫瘍壊死因子(TNF-α)及び緑膿菌由来のたんぱく質合成阻害因子を Carbonate- Bicarbonate 緩衝液で 10µg/mL に希釈し、イムノチューブに固相化した。その後、前述したパンニングやファージ ELISA、シーケンス解析を行い、ナイーブ scFv ファージライブラリの有用性評価を行った。

II)-② たんぱく質の構造・活性相関を高速解析するための基盤技術の開発

<wild-type TNF-αとファージ外殻たんぱく質 g3p との融合体を発現させるファージミドベクターの作製>

疾患関連たんぱく質の機能解析の一つとして、たんぱく質の構造・活性相関を高速解析するための基盤技術を開発していくため、炎症性サイトカインの一種である腫瘍壊死因子(TNF-α)をモデルたんぱく質に検討を行った。ここではまず、コントロールベクター等の作製を行った。Sfi I サイト及び Not I サイトを付加した 2 種類のプライマー(5'-CGC AAT TCC TTT AGT TGT TCC TTT CTA TGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC CAT GGT CAG ATC ATC TTC TCG AAC CCC GAG-3'及び 5'-ATC CGG ATA CGG CAC CGG CGC ACC TGC GGC CGC GGA TCC ACC ACC ACC CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG-3')を用い、ヒト TNF-α の cDNA をテンプレート(テンプレート)として以下の条件で PCR した。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 72°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 72°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

得られた PCR 断片を Sfi I 及び Not I で処理し、予め Sfi I 及び Not I 処理したファージミドベクター(pY02:ファージ外殻たんぱく質 g3p と挿入遺伝子の産物との融合たんぱく質を大腸菌に発現させるためのベクター)とをライゲーションすることにより、TNF-αをコードするファージミドベクター(pY02-TNF)を作製した。得られた pY02-TNF を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションで導入後、100 µg/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む 2YT 培地に懸濁し、37°C にて 1 時間振盪培養を行った後、100 µg/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む LB プレートに播種し、一晩培養した。プレートよりコロニーをモノクローナルにピックアップした後、100 µg/ml アンピシリン及び 2%グルコースを含む 2YT 培地に懸濁し、37°C にて振盪培養を行った。その後 OD600=0.5 となったときに M13KO7 ヘルパーファージを加え 1 時間、

37°Cにて緩やかに振盪培養を行った。遠心後、100 µg/ml アンピシリン及び 50 µg/ml カナマイシンを含む 2YT 培地にて 6~8 時間、37°Cにて振盪培養を行うことで wild-type TNF-α (wtTNF-α) 発現ファージを産生させた。

<wtTNF-α発現ファージの精製>

wtTNF-α発現ファージを含んだTG1 培養液を氷冷し、1,000×g、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに、20,000×g、15 分間の遠心した後、回収した上清に氷冷した 20% PEG8,000、2.5 M NaClを 1/5 量加え、氷上で 2~3 時間冷却した。20,000×g で 20 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、精製 wtTNF-α発現ファージ溶液とした。

<ファージ粒子数(ファージタイター)の測定>

2% グルコースを含む 2YT 培地で、OD600=0.3 まで培養した TG1 に対して、段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C、1 時間培養した。その後、100 µg/ml アンピシリン及び 2% グルコースを含む LB プレートに播種し、一晚培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージ粒子数を算出した。

<Surface Plasmon Resonance (SPR 法: BIAcore) による wtTNF-α 発現ファージの TNFR1 への結合特性評価とそのパンニング条件の最適化>

ピアコア株式会社製の BIAcore biosensor を用いて以下のようにパンニングを行った。ヒト TNF レセプター-1 (TNFR1) の Fc キメラのセンサーチップ F1 への固定化は、以下のようにアミンカップリングキットを用いて行った。32.5 mg/ml の EDC、5.75 mg/ml の NHS (N-hydroxysuccinimide) 溶液を 120 µl (12 分間) インジェクションし、センサーチップ上の CM-デキストランのカルボキシル基を活性化した。その後、10 mM の酢酸緩衝液 pH 4.0 で 50 µg/ml に調整した TNFR1 を 110 µl (11 分間) インジェクションした。続いて、1M の Ethanolamine hydrochloride (pH 8.5) 溶液にて残存している活性化 NHS 基をブロックした。さらに再生溶液 (10 mM Glycine-HCl 緩衝液 pH 2.0) により、非特異的に結合している TNFR1 などを洗浄した。その後、種々濃度 (タイター、ファージ粒子数) に調製した wtTNF-α発現ファージ溶液を 3 µl/min で 30 分間添加し、TNFR1 への結合特性などを評

価した。パンニング効率を検討するために、CD22 に対する一本鎖抗体 (scFv) を発現するファージに対して、粒子数として終濃度 10% となるように wtTNF-α発現ファージを混合し、インプットファージ混合溶液とした。このインプットファージ混合溶液を、HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20) をランニングバッファーとして、流速 3 µl/min で 50 µl インジェクションした。リンスコマンドを用い、非特異的に結合したファージを除去した後、再生溶液を 20 µl/min で 1 分インジェクションし、その溶出液を回収した。パンニングで溶出されたアウトプットファージ混合溶液を TG1 に感染させ、得られたコロニーに対して wtTNF-α遺伝子を同定するためのダイレクト PCR (667bp の PCR 断片として検出できる) を行い、BIAcore パンニングによる wtTNF-α発現ファージの濃縮 (選択) 効率を判定した。ダイレクト PCR は、プライマーとして 5'-CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3' 及び 5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3' を使用して、KOD Taq polymerase を用い、以下の条件で行った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
 - 2) 96°C 1 分間 (Denature)
 - 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
 - 4) 68°C 1 分間 (Extension)
- 【(2)→(3)→(4)→(2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 68°C 4 分間
 - 6) 4°C Hold

アウトプットファージ混合溶液中の TNF-α 発現ファージの割合を算出し、インプットファージ混合溶液中の TNF-α発現ファージの割合 (10%) を比較することで、パンニング効率を測定した。

<TNF-αの構造-活性相関の高速解析を目的とした網羅的な構造変異 TNF-αを表面提示したファージライブラリの作製>

本検討では TNF-αをモデルたんぱく質として、その構造-活性相関を高速解析できる研究基盤を確立していくことを目指し、TNF-α中のリジン残基 (一般にたんぱく質中のリジン残基は、たんぱく質の立体構造の形成や安定化、レセプターや基質との結合などに重要な役割を担っていると考えられており、他のアミノ酸へ

の置換は活性の減弱などを招いてしまうと考
えられている。)を最初のターゲットに絞り込み、
TNF- α 中の全 6 個のリジン残基が他のアミノ
酸に置換された構造変異体ライブラリの作製
を行った。図 4 に示したように、3 回の PCR に
よって、TNF- α のリジン残基をコードするコドン
(配列)をすべてのアミノ酸をコードするランダム
コドン、NNS 配列(NはA/T/G/Cのいずれかを
、SはG/Cのいずれかをコードする)に変換した。
まず、5'-TC TAC TCC CAG GTC CTC
TTC NNS GGC CAA GGC TGC CCC TCC
ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC
CAG-3'及び 5'-GGC CTC AGC CCC CTC
TGG GGT CTC CCT CTG GCA GGG GCT
SNN GAT GGC AGA GAG GAG GTT GAC
SNN GGT CTG GTA GGA GAC GGC GAT
GCG-3'を用い、KOD Taq polymeraseを用い、
以下の条件で PCR を行った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
- 2) 96°C 1 分間 (Denature)
- 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
- 4) 68°C 30 秒間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 68°C 4 分間
- 6) 4°C Hold

PCR purification kit 及び Sigma 社製の
GeneElute Agarose Spin Columns で精製した
162bp の PCR 産物及び 5'-TA GTC GGG
CCG ATT GAT CTC AGC GCT GAG TCG
GTC ACC SNN CTC CAG CTG GAA GAC
CCC TCC CAG ATA GAT GGG CTC ATA
CCA GGG SNN GGC CTC AGC CCC CTC
TGG GGT-3'を用い、以下の条件で PCR を行
った。

- 1) 96°C 4 分間 (Predenature)
- 2) 96°C 1 分間 (Denature)
- 3) 60°C 1 分間 (Annealing)
- 4) 72°C 1 分間 (Extension)
- 【2)→3)→4)→2)を 35 サイクル繰り返し】
- 5) 72°C 4 分間
- 6) 4°C Hold

PCR purification kit 及び GeneElute

Agarose Spin Columns で精製した 251bp の
PCR 産物及び 5'-TA GTT GTT CCT TTC
TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC
ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC
CCG AGT GAC NNS CCT GTA GCC CAT
GTT GTA GCA-3'をプライマーとし、
pY02-TNF をテンプレートとして用い、前記の
条件で KOD Taq polymerase を用いて PCR
を行った。以上の 3 回の PCR によって、
TNF- α 中に含まれる 6 個のリジンアミノ基をコ
ードするコドンを NNS 配列に置換した。得られ
た 463bp の PCR 産物(TNF- α の構造変異体
ライブラリ遺伝子;TNF- α 中に含まれる 6 個の
リジンアミノ基を他の 20 種類のアミノ酸に置換
した TNF- α の構造変異体をコードした遺伝子
ライブラリ)を PCR purification kit 及び
GeneElute Agarose Spin Columns で精製し
た後、前記 PCR 条件でプライマーとして
5'-GCC CAG ACT CGG CAA AGT CGA
GAT AGT CGG GCC GAT TGA TCT CAG
CGC T-3'及び 5'-GTT GTT CCT TTC TAT
GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC-3'を
用い、KOD Taq polymerase で増幅した。そ
の後、Sfi I 及び Eco 47III で処理し、予め Sfi I,
Eco47III 処理した pY02-TNF と T4 ligase を
用いて 16°C にて 16 時間のライゲーションを行
った。得られたライゲーション産物は PCR
purification kit で精製した。予め 2YT 培地 30
ml で OD600=0.4 まで前培養し、ミリ Q で 3
回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で
200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に
対して、精製したライゲーション溶液 10 μ l を添
加し、2.5 kV, 0.25 μ F, 200 Ω の条件でエレクト
ロポレーションした。その後、2%グルコースを
含む 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、
一部を取って、100 μ g/ml アンピシリン及び
2%グルコースを含む LB プレートに播き一晚培
養した。得られたコロニー数を計測することで、
ライブラリサイズを算出した。また、残りのサン
プルに関しては、ファージ産出及び精製を行う
ことで、TNF- α の構造変異体を網羅的に表面
提示したファージライブラリを得た。

<構造変異 TNF- α 発現ファージライブラリを 用いた構造-活性相関研究の基礎検討>

構造変異 TNF- α をファージ g3p 先端に提
示したライブラリを用いて、前述した BIAcore
解析 (SPR 法) の手法を用い、TNFR1 や TNF

レセプター2(TNFR2)、TNF- α 中和抗体に対するパンニングを行い、その結合特性を評価した。また複数回のパンニング後に得られたアウトプットファージライブラリから、各構造変異TNF- α モノクローンを96穴プレートなどへピックアップし、培養上清中に可溶性構造変異TNF- α や構造変異TNF- α 発現ファージを誘導し、ELISAや種々バイオアッセイにより、種々機能を評価するとともに、DNAシーケンス解析することで構造変異TNF- α の1次構造を決定した。

II)-③ たんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤技術の創出

<リジン欠損TNF- α 発現ベクターの構築>

リジン欠損TNF- α をコードする遺伝子は、Nde I サイト及び、EcoR I サイトを付加したプライマー(5'-GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT G-3'及び5'-CTT CCT TTC GGG CTT TGT TAG CAG CCG AAT TCT TAC AGG GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TG-3')を用い、PCRにて増幅した。PCR purification kit で精製後、Nde I 及び EcoR I によって処理した。予め、Nde I、EcoR I で処理した pYas-1(T7プロモーター支配下に組み込んだ遺伝子産物を大腸菌にて発現させるベクター)にライゲーションし、リジン欠損TNF- α 発現プラスミドを構築した。

<リコンビナントたんぱく質の産出>

構築したリジン欠損TNF- α 発現プラスミドをヒートショック法で大腸菌 BL21DE3(IPTG添加によりT7RNAポリメラーゼを細胞内産生する大腸菌株)に形質転換し、2YT培地で1時間培養後、100 μ g/mlアンピシリン含有LBプレートに播種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。プレートからコロニーをバルクで回収し、0.4% Glucose、1.68 mM MgSO₄、100 μ g/mlアンピシリン含有Terrific Broth培地に加え、37 $^{\circ}$ Cで振盪培養した。OD600=3.0になった時点で最終濃度1 mMのIPTGを加え、さらに4時間培養することで、リコンビナントたんぱく質をインクルージョンボディとして産出した。

<インクルージョンボディの回収>

IPTGにてリコンビナントたんぱく質を誘導した大腸菌の培養液を3,000 rpm、10分間遠心し、大腸菌ペレットを回収した。TES buffer

(50 mM Tris-HCl pH 8.0、40 mM EDTA、250 mM NaCl)にて沈殿を懸濁し、終濃度0.23 mg/mlとなるようにLysozyme(Roche)を加え、室温で1時間振盪した。その後、終濃度0.5 M及び2.5%となるようにNaCl及び、Triton X-100をそれぞれ添加し、室温でさらに1時間振盪した。続いて4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm、40分遠心した。得られた沈殿を、再度TES bufferに懸濁し、同様の操作を3回行った後、TES bufferで3回洗浄操作を行い、4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm、40分遠心し、得られた沈殿をインクルージョンボディとして回収した。

<インクルージョンボディの可溶化>

得られたインクルージョンボディを秤量し、湿重量1.8 gあたり10 mlのGTE buffer(6 M Guanidine HCl、100 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA)に懸濁し、2時間室温にて静置した。その後、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm、40分遠心し、不溶物を除去した。上清を回収し、Pierce社製のCoomassie-Blue Plus Protein Assay Reagent Kitを用い、BSAをスタンダードとしてたんぱく質濃度をBradford法で定量し、終濃度10 mg/mlにGTE bufferで調製した。Dithioerythritolを終濃度10 mg/mlとなるように添加し、4時間室温で静置した。

<Refolding及び精製>

pH 9.5に調整したrefolding buffer(100 mM Tris、2 mM EDTA、1 M Arginine)を氷冷し、酸化Glutathioneを551mg/refolding bufferで添加後、激しく攪拌しながら可溶化したインクルージョンボディ/GTE溶液に加え、4 $^{\circ}$ Cで30時間静置した。SPECTRA/POR Membrane MWCO 6-8,000を用い、透析buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.4、100 mM Urea)に対して計6回、4 $^{\circ}$ Cで透析した。得られた透析液を、0.2 μ mのMembrane Filtersを用いて不要物を除去した後、buffer A(20 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA)で平衡化したQ sepharose(Pharmacia biotech社製)に添加し、0.3 M NaCl含有buffer Aで溶出させることによりリフォールディング後のリコンビナントたんぱく質を濃縮した。得られた濃縮液を、PBSで平衡化したSuperose 12 HR 10/30(Pharmacia biotech社製)にて、三量体形成しているヒト天然型TNF- α と同じ分画である約40 kDa(GFC用Protein標準品によるスタンダードからの算出分子サイズ)のピー

クを分取し、精製リコンビナント TNF- α を得た。

<SDS-PAGE>

各試料と 2XSDS protein gel loading solution を等量混合し、終濃度 5%となるように 2-Mercaptoethanol を添加後、95°Cで 10 分間処理した。各試料を、第一化学社製の PAG ミニ「第一」15/25 にアプライし、SDS-PAGE 用緩衝液(25 mM Tris、192 mM Glycine、10% SDS)を用い、ゲル 1 枚当たり 40 mA の定電流で 1 時間電気泳動を行った。泳動後、Coomassie Brilliant Blue を用いて染色した。また Amersham Biosciences 社製の LMW Calibration Kit を分子量マーカーとして用いた。

<マウス LM 細胞を用いた TNF- α の比活性 (TNFR1 を介した生物活性)の測定>

マウス L929 細胞の無血清培養亜株(LM 細胞)は 1%ウシ胎仔血清(FBS)を含む Eagle's minimum essential medium (MEM)で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。予め 96 穴培養プレートで段階希釈したサンプル 100 μ l に、2 μ g/ml のアクチノマイシン D(終濃度 1 μ g/ml)含有 1% FBS-MEM で希釈した LM 細胞を 1×10^4 cells/100 μ l/well で添加した。細胞播種後 37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下 24 時間培養した。その後、25%グルタルアルデヒド 20 μ l で生細胞を固定し、洗浄により死細胞を除去した。0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度(吸収波長 655 nm、対照波長 415 nm)を測定し、比活性を評価した。

<ヒト Hep2 細胞を用いた TNF- α の TNFR1 を介した生物活性の測定>

Hep2 細胞は 10%FBS 及び抗生物質を含む RPMI-1640 で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴培養プレートにて 10% FBS 含有 RPMI で 4×10^4 cells/100 μ l/well に希釈した Hep2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 3 時間培養を行った後、予め 100 μ g/ml シクロヘキシミド(終濃度 50 μ g/ml)含有の 10%FBS-RPMI にて段階希釈したサンプル 100 μ l を加えた。37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 18 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドで生細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、プ

レートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度(吸収波長 655 nm、対照波長 415 nm)を測定し、生物活性を評価した。

<ヒト TNFR2 を介した in vitro 活性測定>

PC60 細胞及びヒト TNFR2 (hTNFR2) を強制発現させた PC60 細胞【PC60(+)細胞】は 10%FBS、1 mM sodium pyruvate、 5×10^{-5} M の 2-ME と、適量の抗生物質を含む RPMI-1640 で継代培養し(PC60(+)細胞には 3 μ g/ml puromycin も添加)、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。 1×10^6 cell/ml に調整した細胞を 96 穴培養プレートに 50 μ l/well で播種し、予め 4 μ g/ml のヒトリコンビナント interleukin-1 β を含む培養液で段階希釈したサンプルを 50 μ l/well 加えた。37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養後、培養上清中に分泌されたラット GM-CSF を ELISA にて定量した。

<一級アミン量の定量>

作製したリコンビナント TNF- α の一級アミン量は、フルオレスカミン法を用いて測定した。0.1% PEG(平均分子量 20,000 を含むホウ酸緩衝液(pH 8.5)490 μ l にサンプル 10 μ l を加え混合した後、fluorescamine/dioxan 溶液(0.3 mg/ml)を 500 μ l 添加混合した。10 分後、蛍光強度(励起波長 390 nm、蛍光波長 475 nm)を測定した。

<SPR 法(BIAcore)を用いた TNFR1 及び TNFR2 に対するアフィニティの測定>

前述したようにセンサーチップ CM5 に対して、TNFR1 の Fc キメラ及び TNFR2 の Fc キメラを固定化した。各 TNF- α サンプルは、たんぱく濃度として 2 μ g/ml から 62.5 ng/ml にランニングバッファーで希釈し、インジェクションした。各パラメータの算出は、BIA evaluation 3.0 program により行った。

<Meth-A 固形がんの作製>

Meth-A fibrosarcoma(マウス繊維芽肉腫)は、実験に供するまで BALB/c マウス(雌 4 週齢)を用い、腹腔内継代で維持した。腹水より採取した Meth-A 細胞懸濁液を溶血・洗浄後、生細胞数を trypan blue 法により計測した。細胞を PBS で懸濁し、 1×10^6 cells/ml に調整した。BALB/c マウスの腹部を除毛した後、Meth-A 懸濁液 200 μ l を腹部皮内移植し、固形がん直径が約 7 mm に達したマウスを実験

に供した。

＜たんぱく質の in vivo 有用性 (in vivo 抗腫瘍効果) の評価＞

in vivo 抗腫瘍効果は PBS で種々の濃度に希釈したサンプルを Meth-A 担がんマウスに単回尾静脈内投与することで行った。コントロール群は PBS を投与した。抗腫瘍効果の指標として投与 24 時間後の腫瘍出血壊死を測定した。腫瘍出血壊死作用は全腫瘍面積に対する出血壊死部の面積により評価した。

＜たんぱく質の in vivo 安全性 (LD50 値) の評価＞

LD50 値の算出は、PBS で種々の濃度に希釈したサンプルを Balb/c マウス (雌 4 週齢) に単回尾静脈内投与し、投与後 24 時間のデータを基に LD50 値を算出した。

＜体内動態の検討＞

TNF- α などのたんぱく質サンプルを PBS で 5 μ g/ml に希釈し、Balb/c マウスに 200 μ l/mouse で尾静脈内投与を行い、経時的に採血した。血清を回収し、以下のように抗 TNF- α 中和抗体を用いたサンドイッチ ELISA を行った。PBS で 4 μ g/ml に希釈した抗 TNF- α 中和抗体で 96 穴 ELISA プレートに固相化した。4% Block Ace 含有 PBS で 2 時間ブロッキングを行い、適宜希釈したサンプルを添加した。室温で 2 時間静置し、洗浄操作を 3 回行った後、200 ng/ml に希釈したビオチン化抗 TNF- α 抗体を添加した。室温で 2 時間静置し、洗浄操作を 3 回行った後、1/2,000 希釈したアビジン HRP を添加し、室温で 1 時間静置した。洗浄操作を 3 回行った後、基質溶液 TMBZ を加えて発色させ、2 N 硫酸を添加することで反応停止を行った。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。サンプル毎にスタンダードを作製し、血中濃度を算出した。

＜たんぱく質の体内挙動制御方法の開発 I : チオール基を標的とした部位特異的 PEGylation : N-cys-TNF- α 発現ベクターの構築＞

N 末端にシステイン残基を新たに導入した TNF- α 変異体 (N-cys-TNF- α) をコードする遺伝子は、Nde I サイト及び EcoR I サイトを付加したプライマー (5'-GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG TGC GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC-3'

及び 5'-CTT CCT TTC GGG CTT TGT TAG CAG CCG AAT TCC AGG GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TG-3') を用い、前記の条件で PCR を行うことで増幅した。PCR purification kit で精製後、Nde I 及び EcoR I によって処理した。予め、Nde I と EcoR I で処理した pYas-1 に組み込むことで発現プラスミドを構築した。

＜たんぱく質の体内挙動制御方法の開発 II : N 末端アミノ基を標的とした部位特異的 PEGylation : リジン欠損 TNF- α の PEG 化＞

TNF- α の PEG 化は、分子量 5,000 の直鎖状の mPEG-SPA (methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate) を用い、TNF- α の 1 級アミンに対して 5 倍モル量又は 50 倍モル量の mPEG-SPA を添加し、37°C、30 分反応させることにより行った。 ϵ -アミノカプロン酸をそれぞれ mPEG-SPA の 10 倍モル量添加することにより、反応を停止させた。得られた PEG-TNF- α は Q セファロースによるアニオン交換クロマト及びゲル濾過 HPLC により、分取・精製した。

＜PEG 化 TNF- α の in vivo 有用性 (in vivo 抗腫瘍効果) の評価＞

Meth-A 担がんマウスに対し、PBS で種々濃度に希釈したサンプルを単回尾静脈内投与することによって抗腫瘍効果を評価した。経日的に腫瘍径を測定し、以下に示す方法によって腫瘍体積を算出した。

$$(\text{腫瘍体積}) = 1/2 (a \times b^2) - 1/2 (a_n \times b_n^2)$$

a; 腫瘍の長径、b; 腫瘍の短径

a_n; 壊死部長径、b_n; 壊死部短径

腫瘍増殖阻害効果は、腫瘍移植後 7 日後 (投与開始日) の腫瘍体積に対する相対比較により評価した。延命効果は各群の平均生存日数により算出した。なお、腫瘍移植後 30 日以上生存し、かつ腫瘍の痕跡が認められないマウスについては完全治癒とみなした。

II)-④ たんぱく質の細胞内局在性を解析するための基盤技術の検討

＜半導体量子ドット (QD) による標識法の確立と蛍光標識特性の評価＞

Hela 細胞 (JCRB) および Hep3B 細胞 (ATCC) を 2-well チャンバースライド (Nunc)

に 5×10^5 cell/well で播種し、24 時間培養した後 3.7%ホルムアルデヒド/PBS 溶液で 20 min 固定した。0.5% Triton-X/PBS で 10 min 浸透化処理 (permeabilization) 後、5xBlocking Buffer (シグマ) でブロッキングを行った。次に 2% BSA/0.05% Triton-X/PBS (PBST) で 100 倍希釈した biotin-mouse anti-atubulin (Molecular Probes) を 60 min 作用させ、PBS により洗浄後 PBST で希釈した Qdot605-streptavidin (Quatumdot) を 30 min 作用させた。PBS により洗浄後、DAPI あるいは CytoxGreen (MolecularProbes)/50% glycerol によりカバーガラス下に封入して蛍光顕微鏡観察に供した。

QD 染色標本の観察・イメージングには落射蛍光顕微鏡 (IX71, オリンパス) を使用し、冷却 CCD カメラにてイメージを取得した。蛍光フィルターキューブは、Qdot605 の観察には Ex 450nm short pass/DC 470/Em 605±10nm band pass (Choroma) を使用した。取得したイメージは画像解析ソフトウェア (Isis, MetaSystems) により処理を行い画像化した。

QD の光安定性を比較評価するため、Hela 細胞の tubulin を Qdot605 により、actin を Alexa488 により染色した。作製した標本に蛍光顕微鏡下で UV 励起光を照射し、一定時間ごとに各蛍光イメージを取得した。得られたイメージを画像解析ソフトウェア (Adobe Photoshop) で解析することにより蛍光強度の変化を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ条約に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ遂行されたものである。また本研究の遂行には、組換え DNA 実験を避け得ないが、「組換え DNA 実験指針 (平成 14 年文部科学省告示第 5 号)」などに基づき、機関承認実験として承認を受けている (No.330、No.331、No.332、No.333、No.334、No.366、No.367)。また、次年度より実施するヒト由来試料を用いる実験に関して、鹿児島大学医学部および国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会の承認を得た (国立衛研に関しては条件付き承認【112: 成人 T 細胞白血病 (ATL) の疾患プロテオミク

スに関する研究])。

C. 研究結果

D. 考察

ゲノム研究は収穫期を迎え、創薬を指向したライフサイエンス研究は、疾患の発症や悪化・治癒、さらには発生・分化といった様々な生命現象で生じるたんぱく質の時空間、質的・量的な変動を包括的に解明しようとするプロテオミクス、たんぱく質の立体構造やたんぱく間相互作用と生命現象との連関を理解しようとする構造ゲノミクスなどへと集約されつつある。これは、ゲノムが単なる情報 (遺伝型) に過ぎず、そのままでは何ら機能を発揮し得ないこと、転写した RNA が機能する一部の例外を除き、このゲノム情報に基づき、多様なたんぱく質群 (プロテオーム; 表現型) が翻訳され、その機能を発揮することで初めて多様な生命現象が認められることに因る。以上のポストゲノム研究の中でも創薬を指向した領域においては、

- (A) 疾患の発症や悪化、治癒で、時空間的、質的、量的に変動する“疾患関連たんぱく質”の探索と、これら疾患関連たんぱく質の中から「そのまま医薬品シーズとなるたんぱく質」や「創薬ターゲットとなるたんぱく質」を絞り込む (同定すること)
- (B) 絞り込んだたんぱく質自体を医薬品シーズとして有効活用していくか、あるいは逆に絞り込んだたんぱく質を制御する薬剤を選択、最適化していくことによって新規医薬品を開発していくこと、及びそのための創薬基盤技術を開発すること

が、重要課題となっている。この研究の流れは、がんや種々感染症、自己免疫疾患などに対する抗体療法やサイトカイン療法といったたんぱく療法や siRNA などを用いた遺伝子治療などが台頭してきたことも相俟って、「それ自体が医薬品シーズとなるたんぱく質」や「創薬ターゲットとなるたんぱく質」を有効活用しようとするプロテオーム情報を利用した創薬 (プロテオーム創薬) への期待を高めている。しかし、疾患関連たんぱく質を探索するための効率的かつ効果的な研究基盤や、疾患関連たんぱく質

の中から「それ自体が医薬品シーズとなるたんぱく質」や「創薬ターゲットとなるたんぱく質」を絞り込み、これを医薬品開発などへ有効活用していくための基盤技術が未だ十分に整備されていないのが現状である。例えば、「それ自体が医薬品シーズとなるたんぱく質」を医薬品として適用しようとした場合、過去の多くの事例が示しているように、たんぱく質は一般に、体内安定性に極めて乏しいため、臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、往々にして重篤な副作用を招いてしまう。なかでもサイトカインなどは、多彩な細胞上の複数のレセプターを介して、多様な *in vivo* 生理活性を示すため、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる他の作用までも同時に発揮してしまう。そのため周知のように、医薬品化されたたんぱく質は極一部にすぎないのが現状である。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質の機能解析基盤と有効活用技術の確立を推進するため、以下の研究を行った。

1)-① 臨床検体の受入体制の確立

ATL は予後不良ながんのひとつであり、HTLV-1 ウイルスの感染が発症の原因となっていることが明らかにされている。しかし、その発症のメカニズムや、HTLV-1 に感染してから ATL を発症する人と発症しない人の違いなど未だ多くが不明であり、有効な治療法も確立されていない。したがって ATL の適切な診断法、有効な治療法の確立が望まれている。そこで我々は ATL 患者のプロテオーム解析を行うことにより、ATL の分子病態の解明と、疾患マーカー・医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の同定を行い、診断・治療に有用な情報を得るための基礎検討を開始した。本研究は、近未来的に HIV や肝炎ウイルスなどのウイルス性疾患の対するプロテオミクス、白血病をはじめとするがんに対するプロテオミクスへと直結するものと位置づけている。

解析対象として ATL を選択する意義として以下の点も重要となる。まず、白血病発症の起点が HTLV-1 の感染であり、他の多くのがんと比較して、明確であることである。すなわち他の多くのがんにおいては、発がんのイニシエーションが不明であるのに対し、ATL ではそれが明確であることは、がん化のメカニズムを

解明するうえで有利な点が多い。すなわち、がん化に至るまでの生活環境や SNPs などの影響を比較的受けにくいと、解析する上で個体差や日内変動などの影響を受けにくいものと考えられる。次に、ATL の患者分布は全世界的にみても日本を含む一部の地域に限られており、先進国では日本以外ではほとんどみられないことがあげられる。すなわち ATL 患者由来のサンプルを入手し、解析できる研究者に限られているために、難治性の疾患であるにもかかわらず、本疾患に関する研究はほとんど進展していない。一方で、ATL が稀な疾患であったとしても、ウイルス感染から白血病に至る過程は他のがんにも広く共通するものと考えられ、ATL の研究から他のがん研究にも有用な多くの知見を得られるものと期待される。さらに、多様な比較試料の採取が可能であることがあげられる。たとえば同一患者の薬物治療前、治療後の血液(病態組織)試料、薬物治療で寛解に至った患者あるいは無効であった患者、の試料などが入手可能であり、比較検討が可能となり、疾患プロテオミクス研究の可能性・有用性を最大限に引き出せるものと考えられる。

本年度は ATL 患者、HTLV-1 キャリアからインフォームドコンセントに基づいて血液・尿の提供を受け、試料を確保するための態勢を整えた(図5)。ATL は九州・沖縄地方において患者が多いことから、鹿児島大学医学部と提携し、同附属病院で受診している患者から試料提供者を募ることとした。ATL には病型として急性型・リンパ腫型・慢性型・くすぶり型・急性転化型がある。また、HTLV-1 に感染していても、ATL を発症していないキャリアがいる。それら病態の違いとプロテオームとの関係を調べるため、病型ごとに10症例の試料の確保を目指すこととした。また、薬物治療の奏功性、病型の転化などとプロテオームとの関係を見出すため、同一患者をフォローアップして試料を採取することも試みる予定である。なお、これらの患者試料を用いた研究を進めるにあたり、インフォームドコンセント、個人情報管理・匿名化について十分に配慮する必要があることから、国立医薬品食品衛生研究所および鹿児島大学医学部附属病院において研究倫理審査委員会に申請を行い、承認を得ることができた(国立衛研に関しては条件付き承