

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1．養成技術者氏名： 清水まゆみ 印 / 署名

2．養成カリキュラム名：コンビナトリアル技術を用いた機能性蛋白質の開発

3．養成カリキュラムの達成状況

コンビナトリアル化学を基盤とした生理活性蛋白質及びミニ蛋白質のペプチドの改変を行い、新バイオ分子の開発に取り組んだ。光感受性保護基を導入したアンギオテンシンⅠを合成し、保護基に対する抗体を組み合わせることで、アンギオテンシン変換酵素からの作用を遮蔽できた。光照射で保護基と抗体はアンギオテンシンⅠから切断され、アンギオテンシン変換酵素の作用を受けるようになった。つまり、光感受性保護基とその抗体を利用し、生理活性を光で制御するという新しい概念のバイオ分子の創製に成功した。

4．成果（A4版3枚程度）

4.1．研究開発業務の概要

生理活性蛋白質及びミニ蛋白質であるペプチドの積極的な改変による高機能性蛋白質の開発が産業的に望まれている。しかし従来の蛋白質工学に基づいたアミノ酸変異では、新規機能性蛋白質の効率的な創製は限界にきており、その代替技術としてコンビナトリアル化学を基盤とした蛋白質の改変技術、その中からスクリーニングする技術が重要な産業基盤として期待されている。本カリキュラムでは、遺伝子操作やペプチド合成といった手法によりランダムに蛋白質・ペプチドを改変する技術(コンビナトリアルバイオエンジニアリング技術)を用いて、産業的に有用な新バイオ分子(超安定化分子、高機能化分子、機能制御が可能な分子等)を開発し、その分子を実用化することを目的とした。

4.2．成果の概要

コンビナトリアルバイオエンジニアリング技術をもとに、生理活性蛋白質・ペプチド、光感受性保護基、抗体を組み合わせることで光制御性バイオ分子の創製を試みた。まず、血圧調節に関与するアンジオテンシン変換酵素の改変を行い、光感受性保護基の6-ニトロベラトリル(NV)基を化学修飾でアミノ基を導入することにより活性を遮蔽できた。また神経伝達物質の神経ペプチドYはNV基の導入のみでは改変できなかったが、NV基に対する抗体を作用させると活性が遮蔽される傾向がみられ、光で機能制御が可能な分子を創製できることを示した。しかしこの光感受性保護基 - 抗体による生理活性制御は、アンジオテンシン変換酵素阻害剤のdes-Pro²-ブラジキニンや溶菌活性を示すニワトリ卵白リゾチームでは効果がみられず、汎用性に課題が残された。この点を解決するためにはモノクローナル抗体の利

用が適当であると判断した。

4.2.1. モノクローナル抗体の作製

光感受性保護基の2-ニトロベンジル(NB)基をヘモシアニンのアミノ基(リジン側鎖あるいはN末端)に導入し、マウス(Balb/c)に免疫した。NB基を同様にアミノ基に導入した牛血清アルブミン(BSA)を用い、ELISAで血清の力価を測定した。数回の免疫後、力価が上昇したことを確認し、マウスの脾細胞とミエローマ細胞(P3-X63-Ag8-U1)を電気細胞融合法により融合した。この中から目的のハイブリドーマをスクリーニングし、無限希釈によりクローニング後、最終的に5株の陽性ハイブリドーマ(1-1D12、1-1F11、1-2F10、1-3G3、15-3B6)を得た。さらに腹水により各モノクローナル抗体を大量に取得した。ハイブリドーマあたり5匹のヌードマウス(Balb/c、6週令)を用い、1匹あたり 10^7 個のハイブリドーマ細胞を腹腔内に接種した。7日後に再び同数の細胞を接種し、その後8日目から17日目にかけて腹水を採取した。腹水中の抗体を硫酸塩析で精製し、蛋白質質量にして50-110 mgを得た。

4.2.2. 抗NBモノクローナル抗体の抗原認識性

これらモノクローナル抗体をさまざまな環境のNB基と反応させ、抗原認識性を調べた。NB基をアミノ酸(リジン、チロシン、システイン、セリン)の側鎖、あるいはアラニンとグリシンのペプチド結合部分に導入し、リンカーを介してBSAにコンジュゲートした標品(Lys(NBoc)-X-BSA、Tyr(NB)-X-BSA、Cys(NB)-X-BSA、Ser(NB)-X-BSA、Ala-(NB)Gly-X-BSA、Ala-(NB)Ala-X-BSA、Gly-(NB)Ala-X-BSA)7種を調製し、これらに対する反応性をELISAで確認した。各抗体は抗原と同じくNB基をリジン残基の側鎖に導入したLys(NBoc)-X-BSAとよく反応した他、Tyr(NB)-X-BSAとも同等に反応した。さらにCys(NB)-X-BSA、Ser(NB)-X-BSAともLys(NBoc)-X-BSAやTyr(NB)-X-BSAほど強くはないが反応性を示した(図1)。ペプチド結合部分にNB基を導入したAla-(NB)Gly-X-BSA、Ala-(NB)Ala-X-BSA、Gly-(NB)Ala-X-BSAとはどのモノクローナル抗体も反応しなかった。5種類の抗体を比較すると、15-3B6はLys(NBoc)-X-BSA、Tyr(NB)-X-BSAに対しては他の抗体と同程度に反応したが、Cys(NB)-X-BSA、Ser(NB)-X-BSAに対する反応性は特に低く、この抗体のみ異なった性質を持ち、他の4種の抗体は類似していることが示唆された。

4.2.3. 光感受性受容基-モノクローナル抗体による活性制御

5種類の抗体の中から1-1D12を用い、アンギオテンシン変換酵素とそのペプチド性基質のアンギオテンシンIの系への効果を検討した。アンギオテンシン変換酵素は10アミノ酸残基よりなるアンギオテンシンI(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)のC末端からジペプチドを切断し、アンギオテンシンII(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)を生成する。アンギオテンシンIIは強い昇圧活性を持ち、高血圧症の一因とされていることから、アンギオテンシン変換酵素の活性制御について盛んに研究されている。アンギオテンシンIにNB基を導入するにあたり、アンギオテンシン変換酵素の作用部位であるN末端から9番目のアミノ酸残基に、抗体と結合性が高いLys(NBoc)あるいはTyr(NB)の形で導入するのが好ましいと考えられる。したがって9番目のHisをLys(NBoc)に置換した[Lys(NBoc)9]アンギオテンシンI、Tyr(NB)に置換した[Tyr(NB)9]アンギオテンシンIを化学合成により調製した(図

2)。

NB基導入アンギオテンシンIにアンギオテンシン変換酵素を作用させると、[Lys(NBoc)9]アンギオテンシンIIはNB基を導入したにもかかわらずアンギオテンシン変換酵素が作用し、アンギオテンシンIIを生成した。1-1D12とインキュベートした後アンギオテンシン変換酵素を添加すると、アンギオテンシンII生成が抑制された。また、1-1D12とインキュベート後、UV照射してからアンギオテンシン変換酵素を添加するとアンギオテンシンIIの生成は元に戻った。これらの結果は[Tyr(NB)9]アンギオテンシンIでも同様であった(図3)。これらを考察すると、アンギオテンシンIにNB基を導入するだけでは遮蔽効果がなく、アンギオテンシン変換酵素の作用を受けるが、1-1D12がNB基に結合するとアンギオテンシン変換酵素が作用できなくなるため、アンギオテンシンIIの生成が抑えられる。NB基に結合した1-1D12は、UV照射によってNB基とともに切断され、もとどおりアンギオテンシン変換酵素が作用しアンギオテンシンIIを生成する。

4.3. まとめ

生理活性物質に光感受性保護基を導入してその活性を封じ込めたケージド化合物は、光照射によって保護基を切断すれば本来の活性を発現する。光を用いる方法は瞬時に局所的に行えることから、ケージド化合物は活性制御において非常に有効なツールとなり得る。ケージド化合物に求められる条件は光感受性保護基導入により生理活性を消失することであり、多くの生理活性物質はその活性中心に保護基を導入するだけで失活する。しかし物質によっては活性中心への保護基導入が困難であったり、保護基導入後も活性を保持している場合がある。本研究で用いたアンギオテンシンIも、光感受性保護基を導入してもアンギオテンシン変換酵素の作用に対する遮蔽効果を示さなかった。しかしs、保護基に対するモノクローナル抗体を組み合わせると遮蔽効果が得られた。本抗体は光照射により保護基とともに容易に除去され、アンギオテンシン変換酵素の作用を受けるようになった。つまり光感受性保護基の導入では不十分な場合に、保護基に対する抗体を組み合わせると遮蔽効果を得るといったまったく新しい概念のバイオ分子を開発し、活性制御に成功した。光感受性保護基とその抗体の組み合わせはアンギオテンシンIとアンギオテンシン変換酵素の反応系だけでなく、他の反応系にも応用でき、種々の反応制御に有用なツールになると考えられる。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済または、査読済を対象、コピーを添付)

準備中

(2) 口頭発表(発表済を対象、予稿集のコピーを添付)

準備中

(3) 特許等(出願番号を記載)

準備中

