

ヒト完全長 cDNA を用いた遺伝子免疫による抗体作製

Antibody production using cDNA immunization

局在解析グループ 伊藤巧一

Koichi Ito

Antibodies (Ab) are useful tools for detecting or isolating specific proteins by various immunological methods. Conventional methods for making antibodies requires a large amount of antigen protein that can be produced in bacterial cells using recombinant technology. This antigen preparation needs a time-consuming process and laborious work even if cDNA can be used, besides it is often difficult to get it owing to troublesome features of the protein. Instead, we have tried a genetic immunization method capable of omitting the antigen preparation. First, we examined various factors affecting the Ab and cellular immune responses using a green fluorescent protein expression vector. Two methods for inoculating the expression vector to a mouse were compared: (1) the injection of a DNA solution with a syringe; (2) DNA-coated gold particle bombardment using a gene gun. When the injection was used, the Ab response was host strain- and antigen-dependent. The gene gun-based immunization showed satisfactory results for Ab response and cellular immune one. So we applied the gene gun-based one to prepare Ab using expression vectors carrying human full-length cDNAs. Out of a total of 15 cDNAs encoding proteins including membrane, secreted, cytosolic, nuclear, and mitochondrial ones, the inoculation of 11 cDNAs could induce Ab responses against their encoding proteins. The obtained antisera were able to be used for immunostaining and immunoprecipitation. Two cDNAs, which had failed to induce Ab production, also could induce Ab response by fusing a transmembrane domain of type II membrane protein to the N-terminal of the target protein. These results imply that the cDNA immunization is expected to become a useful method for Ab production.

1. はじめに

蛋白質の機能解析において抗体は最も強力な道具の一つである。この抗体を作製するのに、抗原蛋白質をコードしている遺伝子を有している場合には、大腸菌で発現させた組み換え蛋白質でマウス等の動物を免疫する方法がとられてきた。我々はすでに完全長 cDNA クローンを有しているので、組み換え蛋白質を調製することは可能である。しかし、組み換え蛋白質の生産には、多大な時間と労力を要するし、蛋白質によっては、分解しやすかったり、精製が難しいなどで入手困難なものも多い。そこで、このプロジェクトでは、抗原蛋白質をコードする完全長 cDNA を組み込んだ発現ベク

ターを動物に直接接種する遺伝子免疫によって、抗体作製が可能かどうかを検討することにした。遺伝子免疫には、プラスミドDNA溶液を筋肉に注射によって投与する直接注射法とプラスミドDNAをコーティングした金粒子を遺伝子銃で皮内に打ち込む遺伝子銃法の2つの方法がある。まず、両者についてモデル蛋白質を用いて予備的な検討を行った後、実際のヒト完全長cDNAクローンをを用いて抗体作製を試みた。

2. 直接注射法による抗体産生

免疫源として、クラゲ由来 (*Aequorea victoria*) の緑色蛍光蛋白質 (GFP) cDNA が組み込まれた発現ベクター (CMV プロモーターを所有、クロンテック社製) と GFP cDNA を大腸菌由来 (*Escherichia coli*) の β -ガラクトシダーゼ (β -gal) cDNA で置き換えた発現ベクターを用いた。免疫動物として、免疫応答性を規定する組織適合性抗原 (H-2) が同じ、もしくは異なる5種類の近交系マウス (C57BL/6, C57BL/10, A/J, C3H/He, BALB/c)、3種類の H-2 類似遺伝子型系統マウス (B10.A, B10.BR, B10.D2)、2種類の非近交系マウス (ICR, ddY) の合計10系統のマウスを選択した。毎週各々のプラスミドDNA 100 μ g を合計5回、マウスの大腿部筋肉に注射筒で接種し、同時に血液も採取した。血清中の GFP および β -gal に対する抗体産生を酵素免疫アッセイ (ELISA) で検出した (図1)。結果は、各系統のマウス3匹の平均吸光度 (O.D) で表わした。GFP cDNA を接種した ICR および ddY の非近交系マウスでは、免疫2回以降の血清中に GFP に対する抗体が産生されていた (図1A)。しかし、他のすべての近交系マウス および H-2 類似遺伝子型系統マウスでは、どの時期に採取した血清中にも抗体産生は認められなかった。また、これら抗体産生の検出できなかったマウスの遺伝子免疫した大腿部筋肉を調べたところ、GFP 蛋白質の発現は認められた。一方、 β -gal cDNA を接種した場合は、すべての系統のマウスで免疫2回以降から抗体産生が誘導されており、H-2^k ハプロタイプを持つ C3H/He と B10.BR および H-2^a ハプロタイプを持つ A/J と B10.A は、 β -gal cDNA 免疫で高抗体産生能を示し、H-2^b ハプロタイプを持つ C57BL/6 と C57BL/10 および H-2^d ハプロタイプを持つ BALB/c と B10.D2 は低抗体産生能を示した (図1B)。これらの結果から、直接注射法を用いた遺伝子免疫による抗体作製は可能であるが、抗原蛋白質の種類あるいは各系統のマウスが所有する H-2 抗原が抗体産生能に影響することがわかった。

3. 遺伝子銃法による抗体産生

a. 直接注射法と遺伝子銃法での抗体産生の比較

最初に、GFP cDNA を ICR (非近交系) に直接注射法または遺伝子銃法で免疫し、抗体産生能を ELISA 法で比較した。直接注射法では、毎週 100 μ g のプラスミドDNA をマウスの大腿部筋肉に注射筒で、一方、遺伝子銃法では、毎週、金粒子に吸着させた 1 μ g のプラスミドDNA をマウスの腹部皮内に遺伝子銃 (バイオ・ラッド社) で合計5回、1週間間隔で接種した。血液は、免疫施行前と各免疫施行時に採取した。どちらの免疫法を用いても免疫2回目以降で GFP に対する抗体産生が検出されたが、

直接注射法に比較して、遺伝子銃法では 100 分の 1 の抗原量で 2 倍以上の抗体産生を誘導できた (図 2)。

b. 遺伝子銃法により誘導される免疫の特性

直接注射法による GFP cDNA 免疫で抗体産生が誘導できなかった BALB/c 系統に対し、遺伝子銃法で GFP cDNA 免疫を試みた。毎週、金粒子に吸着させた $2 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA をマウスの大腿部筋肉または腹部皮内に 1 週間間隔で合計 5 回遺伝子銃で射入し、血清中の GFP に対する抗体産生 (体液性免疫) ならびに BALB/c マウスの脾臓およびリンパ節に誘導される GFP 特異的細胞傷害性 T 細胞 (細胞性免疫) 活性について検討した。

i) 皮内および筋肉組織での GFP の発現

BALB/c の皮内および筋肉に $2 \mu\text{g}$ の GFP cDNA を遺伝子銃で射入し、2 日後、免疫した部位の組織を取り出した。次に、凍結標本作製用のコンハウンド溶液に摘出した組織を浸し、液体窒素で凍結した後、薄切切片を作製した。蛍光顕微鏡下で凍結切片を観察したところ、金粒子の存在する周辺部の組織で緑色発光が認められた。これら局所の細胞内で発現した GFP 蛋白質が 体液性免疫および細胞性免疫を誘導するための免疫源になると考えられる。

ii) 体液性免疫

経時的に採取した血清中の GFP に対する抗体濃度を ELISA 法で決定した (図 3)。皮内および筋肉接種により誘導された特異的抗体の濃度は、ほぼ同程度であったが、皮内接種の方が効率よく抗体が産生される傾向であった。また、直接注射法では BALB/c に誘導できなかった抗 GFP 抗体が、この遺伝子銃法では容易に誘導することができた。この結果は、遺伝子銃法がいかに直接注射法に比べてプラスミド DNA を効率よく細胞内に取り込ませ、多くの抗原蛋白質を発現して免疫系に供給しているかを示唆している。また、これら皮内および筋肉接種で誘導された抗 GFP 抗体の免疫グロブリンの性状を調べたところ、免疫回数にともない IgG1 へのクラス・スイッチングが認められた (表 1)。これは遺伝子銃法が、主に抗体産生を誘導する Th2 タイプのヘルパー T 細胞を活性化した結果だと考えられる。

iii) 細胞性免疫

5 回免疫終了後、マウスの脾臓およびリンパ節に存在する GFP 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) をクロミウム遊離アッセイで検出した。標的細胞として、抗原提示能を有する BALB/c 由来の腫瘍性 B 細胞 (A20.2J) に GFP cDNA をトランスフェクション法で導入した A20.10.4.7 細胞を用いた。細胞傷害活性は、脾臓およびリンパ節から採取した CTL とクロミウムを細胞内に取り込ませた A20.10.4.7 を混合培養し、細胞傷害によりどのくらい A20.10.4.7 に取り込ませたクロミウムが培養上清中に放出されるかで判定した。免疫経路では、皮内接種のほうが筋肉接種に比較して脾臓およびリンパ節中により高い細胞傷害活性を示す CTL を誘導することがわかった (図 4A と 4B)。また、どちらの免疫経路を介して脾臓よりもリンパ節に約 4 倍の GFP 特異的

CTL が集まっていることもわかった。

4. ヒト完全長 cDNA 免疫による抗体作製

これまでの予備実験の結果から、遺伝子免疫法において高免疫応答性を誘導するには遺伝子銃を用いて皮内接種するのが現時点で最も有効な手段であると結論づけられた。そこで、ヒト由来組織および細胞株より単離した 13 種類の蛋白質をコードする完全長 cDNA の発現ベクター (SV40 プロモーターを所有) を遺伝子銃を用いてマウスに免疫した。免疫は、 $2 \mu\text{g}$ の DNA を付着した金粒子をマウス鼠径部の皮内に合計 5 回、1 週間間隔で射入して行った。血液は、免疫施行前と 5 回免疫終了後にマウスから採取し、特異的抗体産生の有無をフローサイトメトリー、免疫沈降および免疫染色によって検出した。

i) 免疫源

以下に遺伝子免疫に用いた 15 種類のヒト完全長 cDNA を示す。

抗原名	分子量 (kDa)	局在部位
① $\beta 2$ マイクログロブリン	12	分泌型
② ウロキナーゼ	49	分泌型
③ 組織適合性抗原 (HLA-A2)	45	細胞膜
④ 組織適合性抗原 (HLA-A24)	45	細胞膜
⑤ IFN γ レセプター	90	細胞膜
⑥ CD90 (Thy-1)	18	細胞膜
⑦ CD1B	37	細胞膜
⑧ カルネキシン	68	ER 膜
⑨ CD44	39	細胞膜
⑩ RANTES	17	細胞膜
⑪ La 抗原	47	核
⑫ Nps20	18	核
⑬ チトクローム c	12	ミトコンドリア
⑭ ガレクチン-1	15	細胞質
⑮ ガレクチン-3	26	細胞質

ii) フローサイトメトリー

ヒト末梢血あるいはヒト由来培養細胞に、採取した血清を加えて反応後、フルオレセインイソチオシアネート (FITC: 緑黄色発光物質) でラベルしたヤギ抗マウス IgG 抗体 (2 次抗体) を反応させて染色した。次に染色した細胞をフローサイトメトリーに流し、その細胞の緑黄色発光度から抗体産生の有無を判定した。その結果、15 種類中、ウロキナーゼ、Nps20、チトクローム c、ガレクチン-3 を除いて 11 種類で抗体産生が認められた。図 5 にヒト末梢血のリンパ球表面を $\beta 2$ マイクログロブリン、HLA-A2, HLA-A24, HLA-A24, CD44 遺伝子免疫マウスの血清で染色した結果を示す。また、細胞内に存在する蛋白質について染色を行ったところ、カルネキシンおよび La

抗原に対する抗体産生が U937（組織球性リンパ腫）または Molt-4（急性リンパ芽性 T 細胞）の内部染色によって確かめられた（図 6）。

iii) 免疫沈降

例として、 $\beta 2$ マイクログロブリン遺伝子免疫マウスの血清とヒト末梢血細胞ライセートとを混合し、血清中に産生された抗体が、実際に $\beta 2$ マイクログロブリン分子を沈降してくるかをゲル電気泳動で調べた（図 7）。その結果、 $\beta 2$ マイクログロブリン分子の沈降を示す 12kDa のバンドとこの分子に結合しているクラス I 分子の沈降を示す 45kDa のバンドの両方が認められた。

iv) 免疫染色

$\beta 2$ マイクログロブリン、カルネキシンおよび La 抗原 cDNA を免疫したマウスの血清と FITC ラベルした 2 次抗体で Molt-4 細胞の表面または内部を染色し、共焦点顕微鏡でその局在性を観察した（図 8）。 $\beta 2$ マイクログロブリン血清では細胞表面が、カルネキシン血清では小胞体が、La 抗原血清では細胞核が染色されており、この結果はすでに知られている局在性と一致していた。

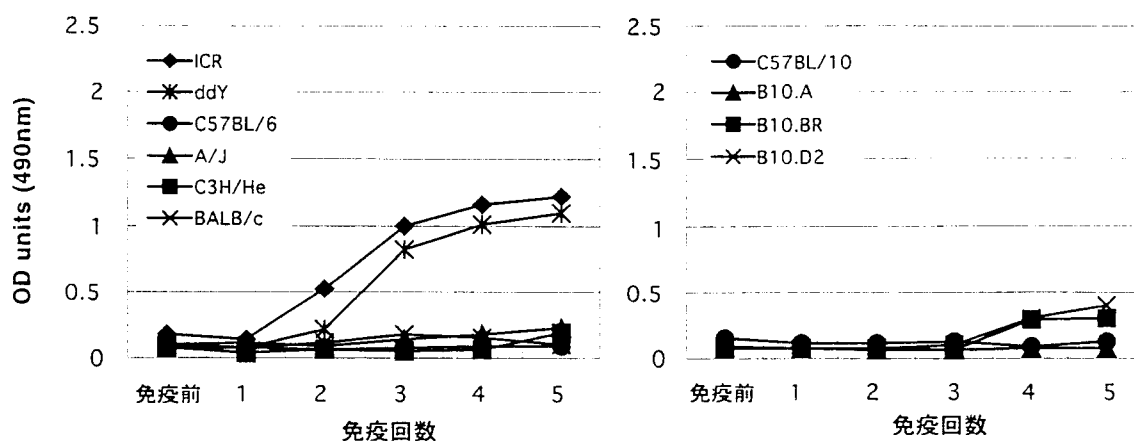
5. 融合遺伝子による免疫

cDNA 免疫によって抗体産生が認められなかったウロキナーゼについて、抗体を産生させるための方法を種々検討した。その結果、ウロキナーゼの N 末端に II 型膜蛋白質の膜貫通ドメインを融合させた蛋白質を発現するベクター（本報告書研究成果集「膜蛋白質のトポロジー解析」参照）を用いて、遺伝子銃により皮下に接種すると、ウロキナーゼに対する抗体産生が認められるようになった。同様の実験を、やはり抗体産生が認められなかった核蛋白質 Nps20 についても試みたところ、ウロキナーゼほど高くはないが、明らかに抗体産生が認められた。したがって、そのままの形で発現させたのでは抗体産生が認められないものでも、膜型にすることによって、抗体産生能が向上することが期待される。

6. おわりに

以上の実験結果から、ヒト完全長 cDNA を免疫源として用いた遺伝子免疫法でもそれぞれの cDNA がコードしている蛋白質に対する特異的な抗体が作製でき、かつ得られた抗体は種々のアッセイに使用できることが示された。また必要であれば、モノクローナル抗体の作製も可能であると考えられる。今後の課題としては、抗体産生が誘導できなかったものについて、その原因を突き止めることと、高力価の抗体を産生するための方法の開発があげられる。今後、従来法に代わってこの遺伝子免疫法が抗体作製の新しい方法として広く浸透していくことが期待される。特に、新規ヒト完全長 cDNA がコードする蛋白質に対する抗体の獲得は、新規蛋白質の機能を探る上での大きな助けとなるであろう。

(A)



(B)

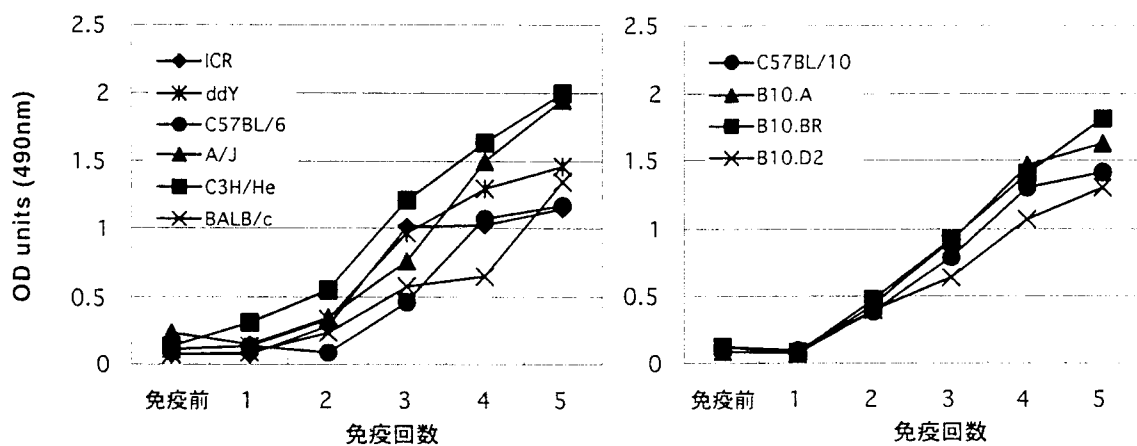


図1. 直接注射法により誘導された種々の系統マウスにおける抗GFP抗体と抗 β -gal抗体産生の経時的変化. リコンビナントGFPおよび β -gal蛋白を抗原としたELISA法にて、血清中の抗GFP抗体 (A) と抗 β -gal抗体 (B)産生を検出した。結果は、各系統の3匹のマウスの平均値 (O.D)で表わした。

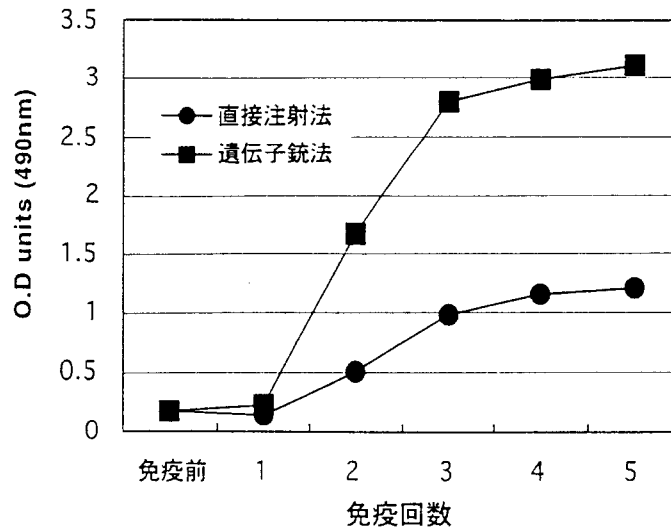


図2. 直接注射法と遺伝子銃法での抗GFP抗体産生の比較. ICR 系統に対し各遺伝子免疫法を施行し、経時的に採取した血清中の抗GFP抗体産生をELISA法にて検出した。結果は、3匹のマウスの平均値 (O.D) で表わした。

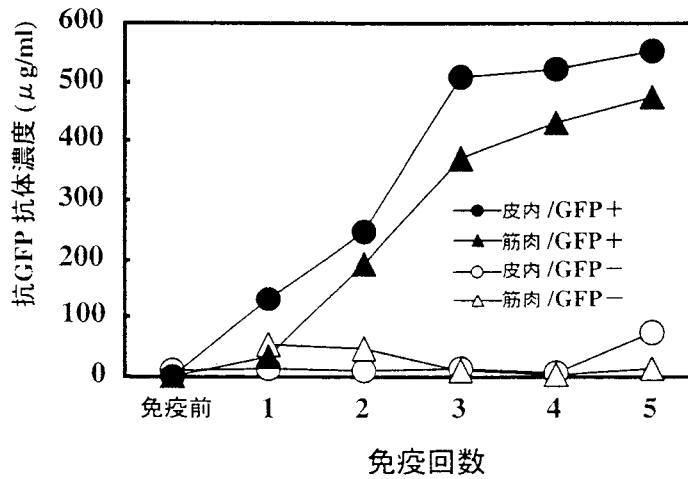


図3. 遺伝子銃により誘導された抗GFP抗体産生. 経時的に採取した血清中の抗GFP抗体濃度をELISA法にて測定した。濃度既知の抗GFP抗体をスタンダードとして用いた。抗体の濃度は、5匹のマウスの平均値で表わした。
 皮内: 皮内接種
 筋肉: 筋肉接種
 GFP+: GFP cDNAを含んだプラスミドDNAを免疫した。
 GFP -: GFP cDNAを含まないプラスミドDNAを免疫した。

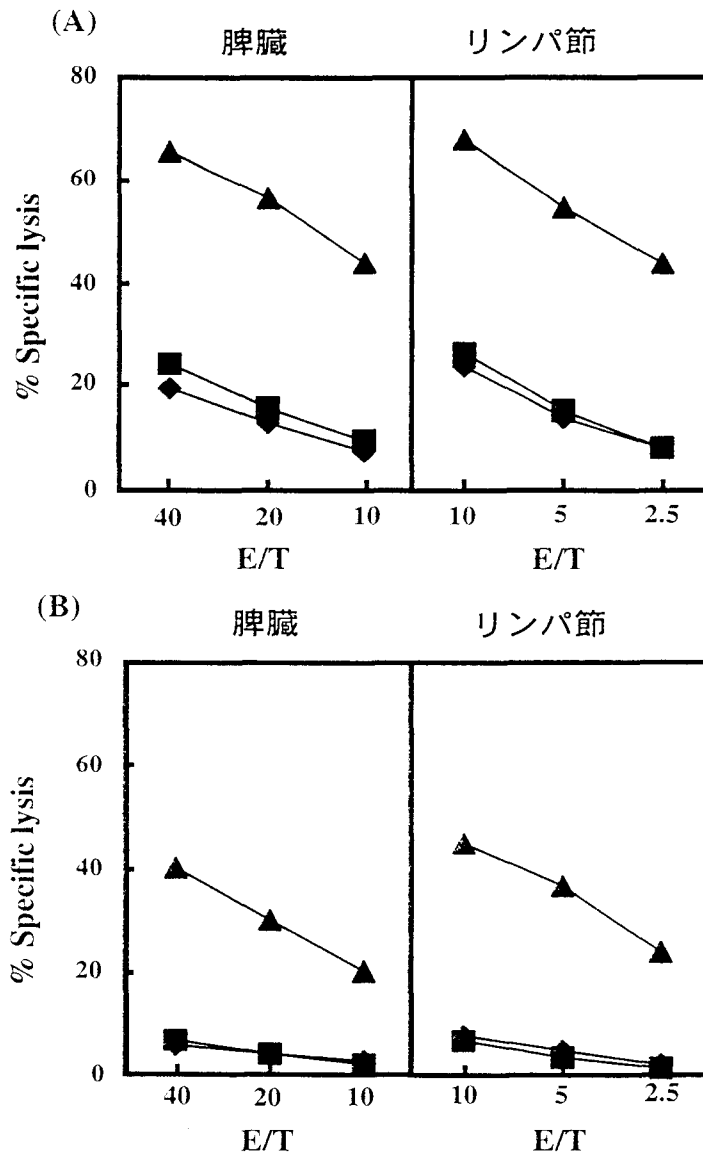


図4. 遺伝子銃により誘導されたGFP特異的細胞傷害T細胞 (CTL). 遺伝子銃によりプラスミドDNAをマウスの腹部皮内 (A) または大腿部筋肉 (B) に免疫した。5回の免疫終了後、脾臓およびリンパ節からリンパ球を分離し、その中に含まれているCTLをインビトロで増殖させた。そのCTLとクロミウムを細胞内に取り込ませた標的細胞を混合培養し、培養上清中に放出されたクロミウムの量からCTLの細胞傷害活性を算出した。細胞傷害活性は5匹のマウスの平均値で表わした。

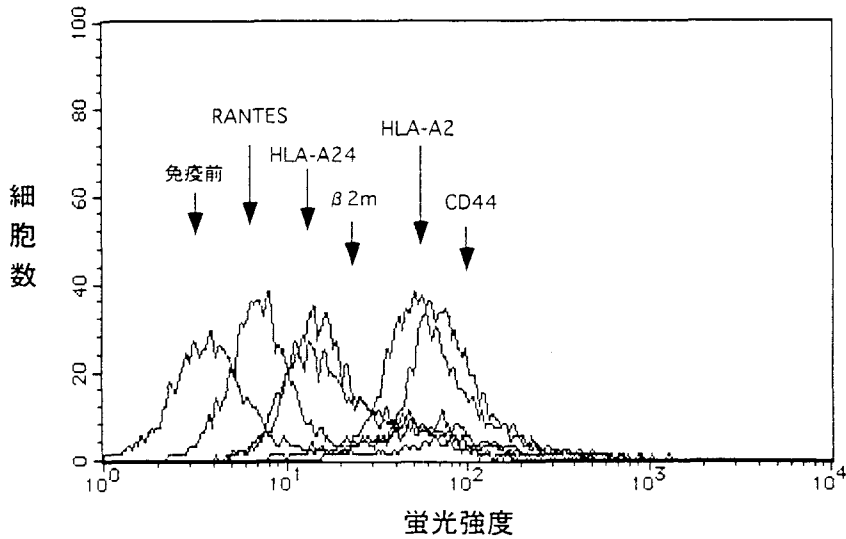
(標的細胞)

(▲) : A20.GFP (GFP cDNAを含んだプラスミドDNAをトランスフェクトしたもの)

(■) : A20.ΔGFP (GFP cDNAを含んでいないプラスミドDNAをトランスフェクトしたもの)

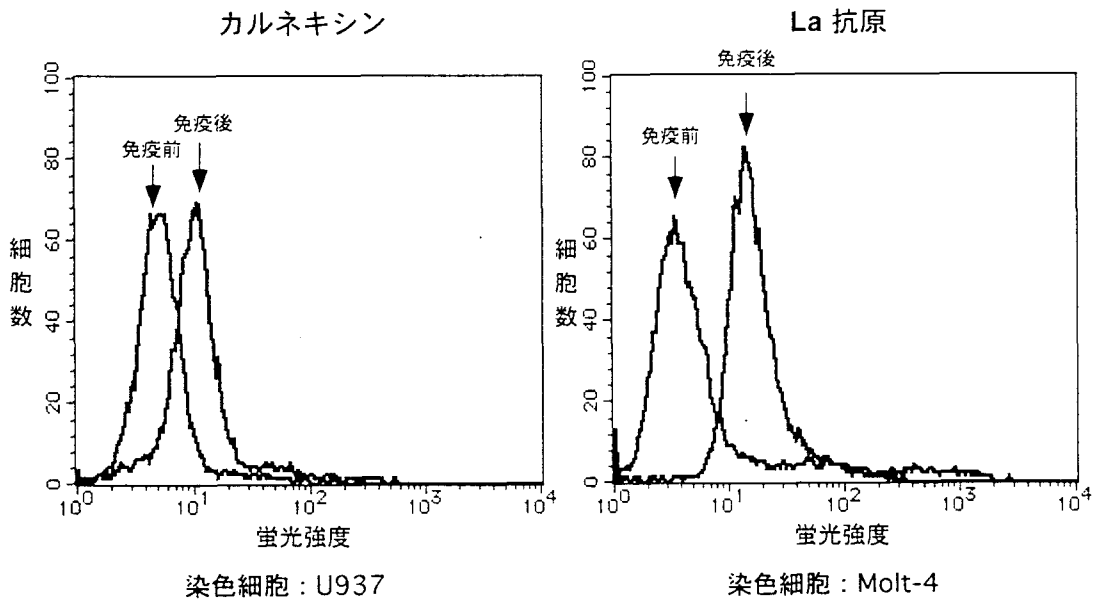
(◆) : A20.2J (何もトランスフェクトしていないもの)

E/T : 混合培養での標的細胞数に対するCTL細胞数の比率。



染色細胞：ヒト末梢血リンパ球

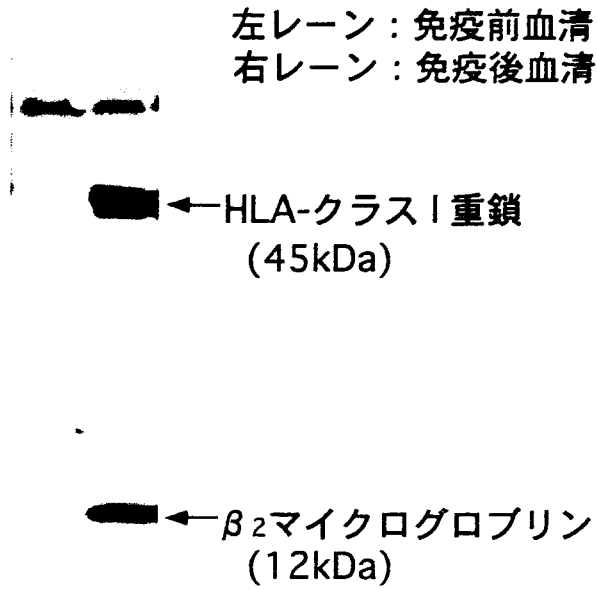
図5. 遺伝子免疫により得られた抗体による細胞表面染色. 採取された抗体およびFITCラベルした2次抗体でヒト末梢血リンパ球を染色し、フローサイトメトリーで解析した。



染色細胞：U937

染色細胞：Molt-4

図6. 遺伝子免疫により得られた抗体による細胞内部染色. U937細胞およびMolt-4細胞をホルマリンで固定し、採取した血清に含まれるカルネキシン抗体およびLa抗原抗体を各々反応させた。さらに、FITCラベルした2次抗体を加え、フローサイトメトリーで解析した。



細胞ライセート：ヒト末梢血リンパ球

図7. 遺伝子免疫により得られた抗体による免疫沈降.
 β_2 マイクログロブリンを遺伝子免疫したマウスの血清をヒト末梢血リンパ球の細胞ライセートと反応させ、その沈降物をゲル電気泳動した。

β_2 マイクログロブリン

カルネキシン

La 抗原

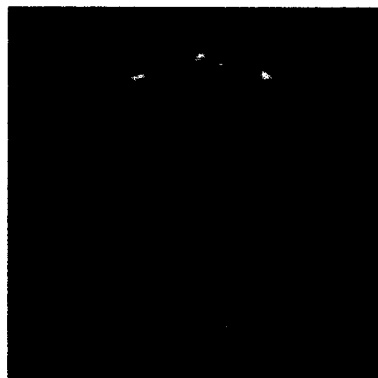
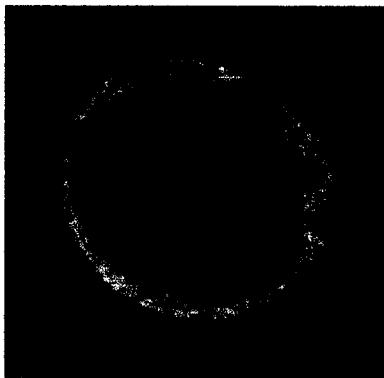


図8. 共焦点顕微鏡による局在解析. 採取した血清でMolt-4細胞を染色し、共焦点顕微鏡でその局在性を観察した。 β_2 マイクログロブリン血清では細胞表面を、カルネキシンおよびLa抗原血清では細胞内部を染色した。

表 1. 遺伝子銃により誘導された抗 GFP 抗体の IgG サブクラス

免疫経路	IgG1/IgG2a					
	免疫前	1 回後	2 回後	3 回後	4 回後	5 回後
皮内	1.1	6.1	11.1	13.5	15.3	19.0
筋肉	1.2	4.0	12.8	20.8	23.8	21.3

採取した血清中の抗 GFP IgG1 抗体と抗 GFP IgG2a 抗体の相対比は、各マウス IgG サブクラス特異的 2 次抗体を用いた ELISA から得られた O.D 値で算出した。相対比の算出方法は IgG1(O.D 値)/ IgG2a(O.D 値)である。各時点で得られた血清中の IgG1 / IgG2a 比は、5 匹のマウスの平均値で表わした。