

氏 名	ふ ちゅう ひで たか 府 中 英 孝
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2138 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	STUDIES ON THE UTILIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN SERUM ALBUMIN (抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体の利用に関する研 究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 安 本 教 博 教 授 井 上 國 世 教 授 森 友 彦

論 文 内 容 の 要 旨

血漿の主要タンパク質である血清アルブミンは、種々の物質の輸送あるいは貯蔵タンパク質としての役割を持っている。血清アルブミンの持つこのような特異性の広い結合能は、環境に応じて柔軟に立体構造を変化させる構造適応性と、その分子表面に疎水領域が散在していることによるものと解釈される。血清アルブミン分子の表面構造を詳細に知ることは、これらの諸性質を理解する上で重要である。本論文では、ヒト血清アルブミン (HSA) を抗原として、タンパク質の表面構造や機能の解析に広く用いられているモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、その mAb の利用ならびに大量取得に関する研究を行っている。主な研究成果は次のとおりである。

1. 血清アルブミンの一次構造の相同性は哺乳類間で高いため、HSA の表面構造と機能の解析には、HSA に特異な領域に関する知見も不可欠である。そこで著者は、HSA で免疫化したマウスの脾細胞とマウスミエローマとのハイブリドーマを、常法どおり限界希釈まで行った後に無血清培地で培養することにより、ウシ血清アルブミン (BSA) とも交差性のある HSA に対する mAb を得た。また、HSA および HSA の臭化シアン分解断片 3 種それぞれと特異的に結合する mAb も取得した。

2. 著者は、取得した mAb を用いて、早期糖尿病性腎症の指標物質である尿中微量アルブミンの高感度検出系を構築した。特異性の異なる 2 種の mAb (1C7, 2C6) を用いたサンドイッチ ELISA 法による HSA の検出範囲は 0.8 から 50ng/ml であった。本法は尿中の夾雑物やアルブミンに吸着している脂肪酸の影響を受けず、健常者と患者の尿を明確に判別することができた。さらに著者は、本法に用いた mAb の認識部位を検索した。mAb1C7 のエピトープは Lys⁴³⁶-Cys⁴³⁷-Cys⁴⁴⁸-Pro⁴⁴⁷-Met⁴⁴⁶ であり、mAb2C6 のエピトープは HSA の Phe³³⁰ から Met⁴⁴⁶ の断片中に存在することを明らかにした。固相法で合成したピン結合型ペプチドとの反応性を基に mAb2C6 の認識するエピトープを探索した。9 残基をオーバーラップさせたデカペプチドとの反応性より、2C6 は一次構造上離れた 2 個のエピトープ [DYSVVLLRLAK (340-351), KFAQNALLVRYTK (402-413)] を認識することが判明した。おのおのエピトープについて N および C 末端側から連続的に Ala に置換したドデカペプチドを作製し、

mAb2C6 との反応性を調べた結果、Arg³⁴⁸ と Lys³⁵¹ および Leu⁴⁰⁸ と Arg⁴¹⁰ が結合に関与することが判明した。さらに、アミノ酸側鎖の影響をより明確にするために、エピトープ付近のアミノ酸残基を Ala または Gly に置換したペプチドを作製し、mAb2C6 との反応性を調べた結果、Asp³⁴⁰, Ser³⁴², Arg³⁴⁸, Lys³⁵¹, Lys⁴⁰², Gln⁴⁰⁴, Asn⁴⁰⁵, Arg⁴¹⁰, Lys⁴¹³ が結合に重要であることが判明した。以上の結果から、mAb2C6 との結合に深く関与する HSA のアミノ酸残基は Arg³⁴⁸XXLys³⁵¹ および Arg⁴¹⁰XXLys⁴¹³ であり、また、mAb2C6 の HSA に対する高い特異性は、Asp³⁴⁰, Ser³⁴², Lys⁴⁰², Lys⁴¹³ を認識することによることを明らかにした。

3. mAb の大量生産を可能ならしめるためには無血清培地系で抗体を産生することが不可欠である。著者は、mAb2C6 産生株を指標細胞とし、抗体産生を増強する物質を探索し、仔ウシ胸腺の生理食塩水抽出物中の分子量5,000以上の高分子画分 (HM) に抗体産生増強活性があることを見出した。この抗体産生増強は、主に細胞増殖促進によることが判明した。また、市販無血清培地だけでは増殖できない細胞数のハイブリドーマに HM を添加すると増殖可能となり、HM はクローニングファクターとしても利用できると考えられた。トリプシン処理した HM には細胞増殖促進活性が認められないこと、塩基性画分を除去した HM にも細胞増殖促進活性があることから、胸腺にはハイブリドーマの増殖促進活性を有する酸性もしくは中性のタンパク質が存在することを見出した。

論文審査の結果の要旨

血清アルブミン分子の表面構造を詳細に知ることは、その生理的諸性質を理解する上で不可欠である。本論文はヒト血清アルブミン (HSA) を抗原としてモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、その mAb の利用ならびに大量取得に関する研究を行ったものであり、評価すべきところは次の3点である。

1. HSA で免疫化したマウス脾細胞とマウスミエローマとのハイブリドーマを限界希釈後に無血清培地で培養することにより、ウシ血清アルブミン (BSA) とも交差性のある mAb を得た。また、HSA および HSA 臭化シアン断片 3 種それぞれと特異的に結合する mAb も取得した。これらの mAb は HSA の表面構造と機能の解析に有効なプローブとして利用できるものと考えられる。

2. 取得した mAb を用いて、早期糖尿病性腎症の指示物質である尿中微量アルブミンの検出系を構築した。特異性の異なる 2 種の mAb (1C7, 2C6) を用いたサンドイッチ ELISA 法による HSA の検出範囲は 0.8 から 50 ng/ml と高感度であった。本法は尿中の夾雑物ならびにアルブミンに吸着している脂肪酸の影響を受けず、健常者と患者の尿を明確に判別することができた。さらに mAb1C7 の認識するエピトープは Lys⁴³⁶-Cys⁴³⁷-Cys⁴⁴⁸-Pro⁴⁴⁷-Met⁴⁴⁶ であり、mAb2C6 では HSA の Phe³³⁰ から Met⁴⁴⁶ の断片中に存在することを明らかにした。固定法で合成したピン結合型ペプチドとの反応性を基に、mAb2C6 のエピトープを詳細に探査した結果、一次構造上離れた位置に 2 個のエピトープが存在することを明らかにした。また、mAb2C6 との結合に深く関与する HSA のアミノ酸残基は Arg³⁴⁸XXLys³⁵¹ および Arg⁴¹⁰XXLys⁴¹³ であることを示し、その高い特異性は Asp³⁴⁰, Ser³⁴², Lys⁴⁰², Lys⁴¹³ を認識することによると結論した。

3. mAb を安価にしかも大量に取得するため、無血清培地系で抗体産生増強物質を探索した。その結

果、仔ウシ胸腺の生理食塩水抽出画分中の分子量5,000以上の高分子画分(HM)に抗体産生増強活性があることを見い出した。さらに、この見かけの抗体産生増強は、主に細胞増殖促進によることを明らかにした。トリブシン処理 HM には細胞増殖促進活性が見られないこと、塩基性画分を除去した HM にも細胞増殖促進活性がみられることから、胸腺にはハイブリドーマの増殖促進活性を有する酸性もしくは中性のタンパク質が存在することを示唆した。

以上のように本論文は、HSA を抗原とし、他起源のアルブミンとも交差性のある mAb を取得し、その利用ならびに大量取得に関する研究を行ったものであり、免疫化学、タンパク質化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成9年2月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。