

二つの非相同タンパク質を認識する抗体の分子認識機構に関する研究

-Bcnt タンパク質と glutamine synthetase とを共通認識する抗体の解析から-

2020 年

中島 健太郎

目次

略語一覧	1
概要	3
序論	5
第1章 転移因子により生み出された Bcnt 遺伝子ファミリー	
1-1. 抗 BCNT-C 抗体の作製と特異性の評価	8
1-2. 抗 BCNT-C 抗体を用いた Western blotting による発現解析	8
1-3. 抗 BCNT-C 抗体を用いた免疫組織学的解析	8
1-4. 抗 p97Bcnt 抗体を用いた Western blotting による発現解析	9
1-5. 抗 p97Bcnt 抗体を用いた免疫組織学的解析	9
1-6. 抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体による免疫組織学的解析	10
1-7. <i>in situ</i> hybridization による Bcnt mRNA の局在	10
小括	11
第2章 二つの非相同タンパク質を認識する抗体の抗原認識機構	
2-1. 抗 BCNT-C 抗体特異的な 43/45 kDa タンパク質の検出	12
2-2. 抗 BCNT-C 抗体と交差反応する 43 kDa タンパク質の同定	12
2-3. 抗 BCNT-C 抗体による glutamine synthetase の認識	13
2-4. 抗 BCNT-C 抗体と交差反応する GS のエピトープ解析	14

2-5. 抗 BCNT-C 抗体の GS と Bcnt に対する親和性の評価	15
2-6. GS エピトープと BCNT-C 抗原との立体化学的環境の類似性	16
小括	18
総括	19
実験材料と方法	25
参考文献	37
表	43
図	46
補足情報	70
謝辞	78

略語一覽

- Ab : antibody
- APE : apurinic/apyrimidinic endonuclease domain
- Bcnt : Bucentaur
- BCNT-C : Bcnt C-terminal region
- CBB : coomassie brilliant blue
- Cfdp1 : craniofacial developmental protein 1
- Chr : chromosome
- Da : dalton
- DIG : digoxigenin
- emPAI : exponentially modified protein abundance index
- F-mBcnt : N-terminal Flag-tagged mouse Bcnt
- F-mGS : N-terminal Flag-tagged mouse GS
- GFAP : glial fibrillary acidic protein
- GI : GenInfo identifier
- Gr. : granular layer
- GS : glutamine synthetase
- HRP : horse radish peroxidase
- IHC : immunohistochemistry
- IR : intramolecular repeat
- KLH : keyhole limpet hemocyanin
- L. : lumen of seminiferous tubule
- Ley. : Leydig cell
- LINE : long interspersed nuclear element
- LTR : long terminal repeats
- m* : mass
- mBcnt : mouse Bcnt

mGS : mouse GS
Mol. : molecular layer
NI : non-induced
P : postnatal
Pur. : Purkinje cell
Rec. : recombinant
RIPA : radioimmunoprecipitation assay
RT : reverse transcriptase domain
RTE-1 : retrotransposable element-1
SINE : short interspersed nuclear element
Uch-L1 : ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1
WT : wild-type

概要

二つの非相同タンパク質を認識する抗体の分子認識機構に関する研究

–Bcnt タンパク質と glutamine synthetase とを共通認識する抗体の解析から–

臨床応用可能な高品質の抗体の開発には、標的分子に対して極めて特異的な免疫反応性を示す抗体を生成できる免疫原を設計するだけでなく、副作用を引き起こす可能性のある標的外分子に対する交差反応性を正確に予測し、排除することも重要である。本論文では、構造的・機能的に全く異なる二つのタンパク質 Bcnt と glutamine synthetase (GS) とを共通に認識する抗体のエピトープ解析を通して、抗体の分子認識機構におけるエピトープの立体化学的・物理化学的環境の重要性について報告する。

我々が見出した Bcnt 遺伝子は、種を越えて普遍的に存在しており、反芻動物においてはさらに、遺伝子の重複と転移因子の一つであるレトロトランスポゾン由来配列のタンパク質コーディング領域への挿入により生み出された二つの側系遺伝子を有している。転移因子により創出されたこれらの Bcnt 遺伝子ファミリーは、分子進化の観点から非常に興味深い、その詳細な機能およびファミリー分子間の相互関係は明らかになっていない。Bcnt の機能解析を目的とし、Bcnt の C 末端領域由来の抗原ペプチドを用いて作製したポリクローナルペプチド抗体 (抗 BCNT-C 抗体) を用いた解析では、その免疫活性は脳のアストロサイトと精巣のライディッヒ細胞の細胞質に局在していた。しかしながら、抗 BCNT-C 抗体とは異なる Bcnt の N 末端領域や C 末端に対するペプチド抗体ではこうした免疫活性が認められず、マウス脳の *in situ* hybridization による発現解析では、Bcnt mRNA の発現はアストロサイトではなく神経細胞に認められたことから、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は標的外分子との交差反応であることが示唆された。そこで、この抗 BCNT-C 抗体と交差反応する分子を単離精製し、LC/MS-MS により解析した結果、Bcnt とは構造的・機能的に全く異なる GS であることが明らかとなった。さらに、この交差反応の詳細なエピトープ解析の結果、抗 BCNT-C 抗体の GS との交差反応が、Bcnt と GS のエピトープの立体化学的・物理化学的環境の類似性により引き起こされたことが明らかとなった。

これらの結果は、標的分子の非常に特異的なアミノ酸配列を免疫原として用いた場合でも、エピトープの立体化学的・物理化学的環境についても考慮しない限り、標的外分子との交差反応を回避できないことを示している。したがって、高い特異性を持ち、副作用のない治療用抗体やワクチンの開発には、標的分子だけでなく、標的外分子を含めたエピトープ-パラトープ境界面の物理化学的環境の包括的な理解とデータの蓄積が極めて重要であると考えられる。

序論

抗体は、基礎研究だけでなく、癌（文献 1、2、3）や自己免疫疾患である関節リウマチ（文献 4、5）などの分子標的療法の臨床応用においても非常に強力なツールである。抗体医薬は急速に成長している生物医薬品の一つであり、がん治療に用いられる免疫チェックポイント阻害剤であるニボルマブやペンブロリズマブなどの新しい有望な抗体医薬品が近年、登場している。抗体医薬やワクチンを効率的に開発するには、標的分子に対して極めて特異的な免疫反応性を持つ抗体を生成する免疫原を設計するだけでなく、治療において副作用を引き起こす可能性のあるオフターゲット（標的外分子）に対する抗体の交差反応性をより正確に予測することも重要である（文献 6）。標的分子と抗体との特異的な免疫反応の主要な基盤は、抗体の認識部位であるエピトープのアミノ酸配列であると考えられてきた。しかし、タンパク質に対する抗体に加えて、抗 DNA 抗体や抗リン脂質抗体などの非タンパク質分子に対する抗体もよく知られている（図 1）。一方、完全に異なる線形エピトープ配列を高い親和性で認識する多重特異性モノクローナル抗体が、最近報告されており（文献 7）、そのような二重特異性抗体を意図的に使用した治療法の開発が進められている（文献 8）。これらの例は、アミノ酸配列のみに基づくエピトープの単純な解釈では理解することは困難である。エピトープは、一般的に連続的な線型または不連続的な立体構造型の 2 つのグループに分類されている（図 1、文献 9、10）。アミノ酸配列に基づくこのような従来の分類は、タンパク質のエピトープを簡単に説明するには有用だが、上記のような抗原-抗体反応のエピトープをより正確に理解するには不十分である。これらの例では、標的分子のエピトープの物理化学的環境を抗体が認識していると解釈するべきであり、必ずしもそれらの線形アミノ酸配列に依存するわけではない。したがって、エピトープの物理化学的特徴に基づいて、抗体の特異性をより包括的に理解することが重要である。本論文では、構造的にも機能的にも全く異なる Bcnt (Bucentaur) /Cfdp1 (Craniofacial developmental protein 1) と GS (glutamine synthetase) の二つのタンパク質を共通に認識する抗体の分子認識様式の解析を通して、抗体の分子認識機構におけるエピトープの立体化学的・物理化学的環境の重要性について報告する。

我々は、これまでに、Bcnt 遺伝子ファミリーを同定し、その遺伝子構造解析や遺伝子産物の機能解析に取り組んできた（文献 11）。Bcnt 遺伝子は、種を越えて普遍的に存在している遺伝子であり、反芻動物においては、遺伝子の重複と転移因子由来配列のアミノ酸コーディング領域への挿入により生み出された p97Bcnt 遺伝子と p97Bcnt-2 遺伝子の二つの側系遺伝子を有している（図 2、文献 12、13、14）。ヒトゲノムプロジェクトにより、ヒトゲノムの約 45%もの部分が転移因子に由来する反復配列によって占められていることが明らかとなっており（文献 15）、近年では、ヒトゲノムの 66%以上が転移因子由来の配列であると考えられている（文献 16）。転移因子を介する遺伝子の重複は、生物が進化の上で新しい遺伝子を生み出す一つの方法であり、多くのファミリー遺伝子を生み出し、飛躍的な進化の源動力となったと考えられている（図 3、文献 17）。実際、ヒトゲノム解析の結果、このような転移因子由来の遺伝子がいくつも見つかっており（文献 18）、近年では、転移因子のがん（文献 19）や精神疾患（文献 20）への関与なども示唆されている。このように、転移因子により創出された Bcnt 遺伝子ファミリーは、分子進化の観点からも非常に興味深いのが、それらの詳細な機能およびファミリー分子の相互関係は明らかになっていない（図 4）。Bcnt の機能解析を目的とし、その発現様式を明らかにするため、我々は、酵母からヒトまで進化的によく保存されている BCNT 特有の C 末端領域（BCNT-C）のペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した（図 5、文献 12）。この抗 BCNT-C ポリクローナル抗体（抗 BCNT-C 抗体）を用いた発現解析では、ラットの脳と精巣で強い免疫活性が認められ、それぞれアストロサイトとライディッヒ細胞の細胞質に主に局在していた（文献 13、14）。一方で、抗 p97Bcnt モノクローナル抗体（抗 p97Bcnt 抗体、文献 21）を用いた解析では、その免疫活性は、反芻動物であるヤギの多くの臓器に認められ、脳の神経細胞と精巣の成熟の進んだ精子の核に局在していた（文献 14）。これらファミリー分子間での発現様式の明らかな違いから、Bcnt と p97Bcnt タンパク質の機能的差異が推察されたが、*in situ* hybridization による Bcnt mRNA の発現解析に加え、抗 BCNT-C 抗体とは異なる Bcnt の N 末端領域や C 末端に対するペプチド抗体を用いた解析の矛盾する結果から、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は、この抗体特有の標的外分子との交差反応である可能性が示唆された。そこで、免疫沈降によってそれらを

単離し、質量分析によってそれらを特定した結果、驚くべきことに、抗 BCNT-C 抗体により強い免疫活性を示す 43 kDa 相当のタンパク質が、glutamine synthetase (GS : NP_001035564.1、EC 6.3.1.2、文献 22、23)であるという予期しない結果が得られた (文献 24)。GS は、グルタミン酸-アンモニアリガーゼとしても知られ、グルタミン酸とアンモニアの ATP 依存性縮合によるグルタミン合成を触媒する、Bcnt とは構造的にも機能的にも全く異なるタンパク質である。この抗 BCNT-C 抗体は、組換え GS だけでなく、ラット脳の内在性 GS も特異的に検出可能であった。全く異なる二つのタンパク質をそれぞれ検出するこの抗体の特異的な反応性から、我々は、その分子認識様式を明らかにするために、GS と Bcnt の間の共通エピトープを探索した。その結果、この交差反応を引き起こす共通エピトープのコアアミノ酸が、GS では『GYFE』、Bcnt では『GYIE』であることが明らかとなった。本論文では、エピトープ-パラトープ (文献 10) またはタンパク質-タンパク質相互作用 (文献 25) の分子認識における物理化学的または立体化学的環境の重要性と、エピトープの包括的なプロテオーム解析に関する知見について議論する (文献 9)。

第 1 章 転移因子により生み出された Bcnt 遺伝子ファミリー

1-1. 抗 BCNT-C 抗体の作製と特異性の評価

Bcnt タンパク質の C 末端領域には、p97Bcnt および p97Bcnt-2 タンパク質には存在しない高度に保存された 82 アミノ酸の領域 (BCNT-C) があり、その中の 18 アミノ酸 (EELAIHNRGKEGYIERKA) を免疫原としてモルモットに免疫し、得られた抗血清から抗原ペプチドを用いたアフィニティ・カラムにより、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体を精製した (図 5、文献 12)。ウシおよびマウス脳抽出物とマウス Bcnt を強制発現させた動物培養細胞 (HEK293T 細胞) の抽出物を用いた Western blotting により、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性、特異性を評価した。抗 BCNT-C 抗体は、Flag-tag 標識の有無に関わらず、マウス Bcnt を単一のバンドとして特異的に認識したのに加え、ウシおよびマウス脳抽出物において、分子サイズ 45 kDa 相当に非常に強い免疫活性を示した (図 6)。この 45 kDa 相当のバンドは、泳動時間を長くした Western blotting では、43/45 kDa の二本のバンドとして検出された (補足図 1)。

1-2. 抗 BCNT-C 抗体を用いた Western blotting による発現解析

成獣ラット全身臓器のタンパク抽出物を用いた抗 BCNT-C 抗体による Western blotting により、Bcnt タンパク質の発現分布を調べた (図 7)。非常に特異的な免疫活性が見られ、特に脳と精巣で強い免疫活性が認められた。60 kDa 付近に見られるシグナルは、二次抗体による非特異的反応であった。非常に強い免疫活性の見られたラット脳の、生後発達過程における Bcnt タンパク質の発現変動を調べるため、生後 0 日から 56 日までのラット大脳皮質と小脳のタンパク抽出物を用いた Western blotting を行った。その結果、抗 BCNT-C 抗体による免疫活性は、大脳皮質と小脳の両方で、生後発達に伴い増大していくことが明らかとなった (図 8)。これらの結果から、Bcnt タンパク質の脳の構造維持や高次脳機能への関与が推察された。

1-3. 抗 BCNT-C 抗体を用いた免疫組織学的解析

脳に強く認められた抗 BCNT-C 抗体の免疫活性の局在を明らかにするため、成獣ラ

ット脳の免疫組織学的解析を行った。小脳では、大型の神経細胞であるプルキンエ細胞に隣接するバグマングリアの細胞体とその突起に強い免疫活性が認められ、プルキンエ細胞のマーカーである Spot35 (Calbindin) とバグマングリアを含むアストロサイトのマーカーである GFAP (Glial fibrillary acidic protein) に対する抗体との二重染色では、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は、Spot35 免疫活性とは重ならず、GFAP 免疫活性と共局在していた (図 9A~F)。また、ヤギ大脳の線条体でも同様に、神経細胞のマーカーである Uch-L1 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydroxylase L1) に対する抗体の免疫活性とは重ならず、GFAP 免疫活性と共局在していた (図 9G~L)。これらの結果は、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性が、脳内において神経細胞ではなくアストロサイトに局在していることを強く示唆している。

1-4. 抗 p97Bcnt 抗体を用いた Western blotting による発現解析

Bcnt タンパク質と反芻動物特異的な p97Bcnt の発現様式を比較するため、抗 p97Bcnt モノクローナル抗体を用いた Western blotting により、成獣ヤギ全身臓器における、p97Bcnt タンパク質の発現分布を調べた (図 10)。抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性は、97 kDa 付近に非常に特異的なシグナルが認められ、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性と比較して、全身の幅広い臓器でその活性が認められた。脳と精巣での抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性は、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性とは対照的に、全身臓器の中で相対的に低かった。これらの結果から、レトロトランスポゾン由来配列のアミノ酸コーディング領域への挿入により、p97Bcnt が Bcnt とは異なる機能的役割を獲得した可能性が期待された。

1-5. 抗 p97Bcnt 抗体を用いた免疫組織学的解析

抗 BCNT-C 抗体の免疫活性と比較するため、抗 p97Bcnt モノクローナル抗体によるヤギ脳の免疫組織学的解析を行った。抗 BCNT-C 抗体の場合と同様に、ヤギ小脳を抗 p97Bcnt 抗体と抗 Spot35 抗体または抗 GFAP 抗体と二重染色した結果、抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性は、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性とは全く異なり、プルキンエ神経細胞の核に局在していた (図 11)。Western blotting の結果に加え、これらの結果からも、Bcnt と p97Bcnt タンパク質の機能的差異が示唆された。

1-6. 抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体による免疫組織学的解析

抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性の局在を比較するため、ヤギの臓器の中で、抗 BCNT-C 抗体の強い免疫活性の認められた脳と精巣を用いて、抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体による免疫組織学的解析を行った。ヤギ小脳において、抗 BCNT-C 抗体は、ラット小脳と同様にプルキンエ細胞に隣接するバークマングリアとその突起に免疫活性を示し、抗 p97Bcnt 抗体は前述の結果と同様に神経細胞の核に免疫活性を示した (図 12A~C)。ヤギ精巣では、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は、精細管の間質に存在するライディッヒ細胞の細胞質に主に認められた一方で、抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性は、精細管の中の成熟した精子の核に明瞭に観察された (図 12D~G)。これらの結果は、抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性の局在が、明らかに異なっていることを示しており、遺伝子の重複とレトロトランスポゾン由来配列の挿入により、これら Bcnt ファミリーの機能的役割に明確な違いが生み出された可能性が強く示唆された。

1-7. *in situ* hybridization による Bcnt mRNA の局在

抗 BCNT-C 抗体によるアストロサイトでの免疫活性の局在を確認するため、マウス小脳における Bcnt mRNA の局在を、マウス Bcnt mRNA に相補的な DIG (Digoxigenin) 標識 RNA (mBcnt antisense probe) を用いて、*in situ* hybridization によりその局在を調べた (図 13)。陰性対照としてマウス Bcnt mRNA と同一配列の DIG 標識 RNA (mBcnt sense probe) を用い、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗 DIG 抗体とビオチン化チラミド、Cy3 標識ストレプトアビジンにより検出した。また、*in situ* hybridization による検出後に、対比染色として抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織染色を行った (図 13B、E)。その結果、mBcnt antisense probe を用いた *in situ* hybridization で主に神経細胞に特異的なシグナルが検出され、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性が認められたアストロサイトでは、そのシグナルはほとんど検出されなかった (図 13C)。これらの結果は、マウス小脳において Bcnt mRNA が神経細胞に優位に発現していることを示唆している。

小括

抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体を用いた Bcnt と p97Bcnt タンパク質の発現解析では、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は、ラットの脳と精巣に強く認められ、それぞれアストロサイトとライディッヒ細胞の細胞質に主に局在していた。一方、反芻動物であるヤギまたはウシの検体を用いた p97Bcnt タンパク質の発現解析では、抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性は多くの臓器に認められ、脳と精巣におけるその局在は、それぞれ神経細胞の核と成熟した精子の核であった。ヤギの小脳と精巣を用いた免疫組織学的解析により、抗 BCNT-C 抗体と抗 p97Bcnt 抗体の局在を比較した結果、それらの局在は全く異なっており、進化の過程における遺伝子の重複とレトロトランスポゾン由来配列の挿入により、これら分子間に機能的差異が生じたものと考えられた。しかしながら、*in situ* hybridization によるマウス脳における Bcnt mRNA の発現解析では、その発現は神経細胞に認められ、抗 BCNT-C 抗体を用いた免疫組織化学的解析とは異なる結果であった。これらの結果は、脳のアストロサイトと精巣のライディッヒ細胞の細胞質に認められた抗 BCNT-C 抗体による非常に特異的な免疫活性が、標的外分子との交差反応である可能性を示唆している。

第2章 二つの非相同タンパク質を認識する抗体の抗原認識機構

2-1. 抗 BCNT-C 抗体特異的な 43/45 kDa タンパク質の検出

第1章で示した抗 BCNT-C 抗体による結果は、2回の独立した抗体作製において、合計8匹中7匹のモルモットから産生された抗体で同様に確認されることから、偶発的に起こった交差反応とは考えにくい(補足図1)。そこで、この免疫活性が抗 BCNT-C 抗体に特異的なものか確認するため、マウス Bcnt の進化的に保存されている C 末端の 10 アミノ酸 (抗 Bcnt-Cter 抗体) と、N 末端領域の 14 アミノ酸 (抗 mBcnt-N 抗体) のペプチドを抗原として、抗 BCNT-C 抗体の抗原とは異なる新たなポリクローナル抗体を二つ作製した (表1)。抗 Bcnt-Cter 抗体と抗 mBcnt-N 抗体の両ポリクローナル抗体は、抗 BCNT-C 抗体と同様に HEK293T 細胞に強制発現させたマウス Bcnt を良好に検出したが、43/45 kDa のバンドは検出しなかった (図14)。これらの結果は、43/45 kDa のタンパク質が、抗 Bcnt-Cter 抗体と抗 mBcnt-N 抗体ではなく、抗 BCNT-C 抗体のみによって特異的に検出されることを明確に示している。抗 BCNT-C 抗体による免疫活性が、標的外分子との交差反応である可能性が非常に強くなったが、再現性良く得られる抗 BCNT-C 抗体の非常に強いこれらの免疫活性の分子基盤に興味を持ち、我々は、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体によって検出される 43/45 kDa のタンパク質を、分子レベルで明らかにすることにした。

2-2. 抗 BCNT-C 抗体と交差反応する 43 kDa タンパク質の同定

我々はこれまでに、一般的な RIPA バッファーを用いた抗 BCNT-C 抗体による 43/45 kDa のタンパク質の免疫沈降に失敗していたが、SDS を加えて一度加熱変性した場合に、43 kDa のタンパク質がウシ脳とラット嗅球 (文献26) の抽出物から免疫沈降できることを見出した (補足図2)。この方法により、我々は、硫酸アンモニウム沈殿とフェニルセファロースカラムを用いて精製したウシ脳抽出物から (補足図3A)、抗 BCNT-C 抗体を結合させたアガロースビーズを用いた免疫沈降により、43 kDa のタンパク質を単離することに成功した (補足図3B)。抗 BCNT-C 抗体により免疫沈降されたタンパク質の SDS-PAGE において、43 または 55、65 kDa の CBB 染色される 3 本

のバンドが検出された (図 15)。それぞれのバンドに含まれるタンパク質を、LC-MS/MS により解析したところ、驚くべきことに、Bcnt のフラグメントは、抗 BCNT-C 抗体を結合させたアフィニティビーズから結合タンパク質を溶出するために用いた抗原ペプチド由来の”GKEGYIER”を除き検出されなかった。一方で、3 つ全てのバンドにおいて、glutamine synthetase (GS) が検出された。計算分子質量 42 kDa の GS は、GS 分子カバー率 76.9%で、gamma actin や alpha skeletal muscle actin、tubulin alpha-1B chain とともに主要構成成分として検出された (表 2、補足図 4)。これら 3 つのバンドが検出されたのは、恐らくユビキチン修飾による移動度のシフトが原因だと考えられる (文献 27)。これらの結果は、Bcnt と非相同なタンパク質である GS が、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体によって検出された 43 kDa のタンパク質の最も有力な候補であることを示唆している。

2-3. 抗 BCNT-C 抗体による glutamine synthetase の認識

抗 BCNT-C 抗体の GS との交差反応を確認するため、以下の 2 つの検体、1) His-tag 標識したヒト GS を強制発現させた大腸菌のタンパク抽出物、2) GS の発現増大が知られている FOXO1 トランスジェニックマウスの骨格筋からのタンパク抽出物 (文献 28)、を用いて Western blotting を行った。これらの結果は、抗 BCNT-C 抗体が標準の抗 GS 抗体と同等の強さで同一サイズのバンドを検出することを示した (補足図 5)。組換えタンパク質に付加された His-tag の影響を考慮して、Flag-tag や緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、mCherry など様々な tag 標識に加え、tag 標識無しの GS と Bcnt 組換えタンパク質を HEK293T 細胞に強制発現させた。これら細胞とそのタンパク抽出物を用いた細胞免疫染色と Western blotting により、抗 BCNT-C 抗体と GS との交差反応を多面的に調べた結果、tag の種類や tag 標識の有無にかかわらず、抗 BCNT-C 抗体が GS を認識した。図 16 に、tag 標識無し、または Flag-tag により標識したマウス由来 GS (mGS) と Bcnt (mBcnt) の代表的な結果を示す。これらの結果は、抗 BCNT-C 抗体が、特異的に Bcnt と GS の両方を認識することを明確に示している。さらに、細胞内の GS との交差反応が、抗 BCNT-C 抗体に特異的かどうかを、抗 Bcnt-Cter 抗体と抗 mBcnt-N 抗体を用いた細胞免疫染色により調べた。HEK293T 細胞で強制発現さ

せた GS が、抗 BCNT-C 抗体により特異的に検出される一方で、他の 2 つの抗 Bcnt 抗体では検出されなかった (図 17)。GS がアストロサイトのマーカーであるというこれまでの報告と一致して (文献 29)、ラット小脳を用いた免疫組織染色において、アストロサイトの一つであるバグマングリアに免疫活性を示すように (図 18B)、抗 BCNT-C 抗体は、生体試料においても強い免疫活性を示した (図 18)。これら抗 BCNT-C 抗体によって認識される免疫反応物の特徴は (図 7、8、9)、これまでに報告された GS の特徴とよく一致していた (文献 30、31)。抗 BCNT-C 抗体が、Bcnt と相同性の無い GS を認識していることが明らかとなったが、この独特な交差反応のメカニズムに興味を持ち、さらに GS のエピトープ解析を進めた。

2-4. 抗 BCNT-C 抗体と交差反応する GS のエピトープ解析

まず、我々は、抗 BCNT-C 抗体が認識する GS の領域を同定するため、大腸菌を用いていくつかの GS の欠損変異体を作製した。代表的な Western blotting の結果を図 19 に示す。N 末端側のほぼ半分を欠失した GS 欠損変異体 (D2) では明確な陽性反応が見られた一方で、C 末端側の 332 番目から 373 番目のアミノ酸を欠失した GS 欠損変異体 (D1) では、反応が確認されなかった。これらの結果は、抗 BCNT-C 抗体との交差反応のためのエピトープが GS の C 末端領域に局在していることを強く示唆している。さらに、予想されるエピトープを絞り込むために、GS の C 末端領域由来の短い重複部分を持つ 4 つのペプチド (図 20 の P1-P4) を用いた競合実験を行った。それぞれのペプチドおよび抗 BCNT-C 抗体の抗原ペプチドと抗 BCNT-C 抗体とを事前に反応させて行った Western blotting では、4 つのペプチドのうち P1 ペプチドだけが抗原ペプチドと同様に GS との交差反応を強力に阻害した (図 20、下図)。これらの結果は、P1 ペプチドの配列の中にエピトープが含まれていることを強く示唆している。さらに、交差反応に必須なアミノ酸を同定するため、P1 ペプチドのアミノ酸配列を段階的に欠失させた GS の欠損変異体を作製し、抗 BCNT-C 抗体との交差反応性を Western blotting により調べた。図 21 に示すように、338 番目以降を欠失した変異体 (Del-338 変異体) で観察されたその交差反応は、Del-336 では明らかに消失した。この結果は、この交差反応に重要なアミノ酸が、P1 ペプチドのアミノ酸配列中の

『RTVGQEKKGYFE』に局限していることを示している。我々は、P1 ペプチド配列中の『KKG YFE』と抗 BCNT-C 抗体の抗原ペプチド配列中の『KEGYIE』、特に、GS の『GYFE』と Bcnt の『GYIE』が似ていることに気づき (図 21、左図の赤字)、GS の『GYFE』のアラニン置換変異体を作製し、その交差反応性を調べた。F337A 変異体では、弱いながらも明らかな反応性が見られた一方で、E338A 変異体を含む他のアラニン置換変異体では反応性が見られなかった (図 22)。これらの結果は、抗 BCNT-C 抗体の GS との交差反応には、『GYFE』 (以後、コアアミノ酸と呼ぶ) が必須であることを明確に示している。図 22 に示すように、コアアミノ酸を囲むの両側の 4 アミノ酸残基をアラニンに置換した A4A 変異体でも抗 BCNT-C 抗体との反応性が見られなかった。図 21 の Del-338 変異体では、抗 BCNT-C 抗体との交差反応が見られたことから、K333 と K334 の両方または、そのどちらかがエピトープに含まれる可能性が考えられる。

2-5. 抗 BCNT-C 抗体の GS と Bcnt に対する親和性の評価

次に、我々は、抗 Flag-tag 抗体を用いて標準化した Flag-tag 標識マウス GS (F-mGS) と Bcnt (F-mBcnt) を用いて、抗 BCNT-C 抗体の GS と Bcnt に対する親和性を半定量的 Western blotting により評価した。まず、GS と交差反応性を示す抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団を、大腸菌で発現させた全長の野生型 GS と All-Ala 変異体を用いた、メンブレン上でのアフィニティ精製により単離した (図 23)。GS の All-Ala 変異体を用いて単離した抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団は、F-mGS と F-mBcnt のどちらとも免疫活性を示さなかったが、野生型 GS により単離した亜集団は、両分子と同等の反応性を示した (図 23、下図)。この結果は、GS と交差反応性を示す抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団が、Bcnt と GS の両方と同等の親和性で反応することに加え、GS のコアアミノ酸がそのエピトープの主要な構成成分であることを示唆している。さらに、GS と交差反応性を示す抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団を詳細に調べるため、コアアミノ酸 (GYFE) を含む GS(332-346)ペプチドをクロスリンクしたアガロースの担体により、その亜集団を分画した (表 3)。カラムへ結合した抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団 (GYFE fraction) は、約 20%

(w/w) の収率で回収されたことから、GS のコアアミノ酸である『GYFE』と交差反応を示す抗体の亜集団が、全体の約 1/5 を占めていることが示唆された。これらの結果と一致して、抗 Flag-tag 抗体を用いて標準化された F-mGS と F-mBcnt の半定量的 Western blotting において、F-mGS に対する抗 BCNT-C ポリクローナル抗体 (図 24 の Whole) の免疫反応性は、メンブレン上でのアフィニティ精製の結果 (図 23、下左図) と同様に、F-mBcnt のおよそ 1/5 であった (図 24、左図)。さらに、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の『GYFE』と交差反応性を示す亜集団である GYFE fraction が、F-mGS と F-mBcnt を同等の免疫活性で反応した (図 24、右図) 一方で、素通り画分 (Flow Through) は、F-mBcnt に免疫活性を示したが、F-mGS には示さなかった (図 24、中央図)。これらの結果は、GS と交差反応する抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団が、コアアミノ酸 (GYFE) を含むエピトープを認識する抗体分子のみに由来していることを示唆している。一方で、この GYFE fraction の免疫活性は、抗 BCNT-C 抗体の抗原ペプチドである『EELAIHNRGKEGYIERKA-NH₂』 (BCNT-C (GYIE)) により阻害されるが、『GYIE』をアラニンに置換したペプチド (BCNT-C (All-Ala)) では阻害されなかった (図 25)。この結果は、GS の『GYFE』と交差反応する抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団が、Bcnt の『GYIE』と特異的に反応することを示している。これらの結果は、GS と Bcnt の両タンパク質と同等の免疫活性を示す一定の亜集団が、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体中に存在していることと、GS の『GYFE』が、抗 BCNT 抗体との交差反応に必要なエピトープの主要な配列を構成していることを明確に示している。GS の『GYFE』のフェニルアラニン (Phe、F) と Bcnt の『GYIE』のイソロイシン (Ile、I) の違いにもかかわらず、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の亜集団が、両分子を同等の免疫活性で認識することは注目すべきである。

2-6. GS エピトープと BCNT-C 抗原との立体化学的環境の類似性

コアアミノ酸配列の 1 アミノ酸残基の違いにもかかわらず、GS と Bcnt の両タンパク質に対する抗 BCNT-C 抗体の同等の免疫活性を理解するため、我々は、この交差反応が、GS の『GYFE』を含む領域と BCNT-C 抗原ペプチドとの立体化学的環境の類似性により引き起こされている可能性を考えた。上述したように、GS のフェニルア

ラニン (Phe、F337) のアラニン置換変異体 (F337A) において、弱いながらも明らかな免疫活性が検出されたが、他のアラニン置換変異体では免疫活性が認められなかった (図 22)。これらのことから、GS のフェニルアラニン (Phe、F337) が、GS と抗 BCNT-C 抗体との抗原抗体反応の境界面に直接関与していないのではないかと推測した。実際にフェニルアラニン (Phe、F337) が、この抗原抗体反応にどのように関与するのか調べるために、我々は、GS のフェニルアラニン (Phe、F337) を異なる立体的嵩高さ (アミノ酸側鎖の原子が占める空間の量) や極性を持った様々なアミノ酸に置換した変異体を作製し、これら置換変異体の GS の立体化学的・物理化学的変化に与える影響を、Western blotting により半定量的に解析した。図 26 に示すように、イソロイシンからアラニンへと嵩高さの異なる分枝鎖を持った疎水性アミノ酸へ置換すると、抗 BCNT-C 抗体は、置換したアミノ酸の嵩高さに依存的した交差反応性を示したが、完全に消失することはなかった。この結果は、GS のフェニルアラニン (Phe、F337) がエピトープ-パラトープ境界面での直接的な分子間相互作用に関与しているわけではないが、エピトープの立体化学的環境の重要な構成要素であるという我々の推測を支持するものであった。図 27 は、GS の X 線構造解析データを元に描いた GS の共通エピトープの GYFE 周辺領域の 3 次元配置図を示している (PDB コード: 2OJW、文献 32)。フェニルアラニン (Phe、F337) は、隣接するチロシン (Tyr、Y336) とグルタミン酸 (Glu、E338) の反対側にあり、その芳香環によってかなりのスペースを占めていることに注目すべきである。フェニルアラニン (Phe、F337) の空間的配置は、このフェニルアラニン (Phe、F337) がエピトープ-パラトープ境界面での直接的な分子間相互作用に関与しているわけではなく、その立体的嵩高さによりエピトープの立体化学的環境へ影響を与えるという、上述した我々の推測を支持している。その一方で、F337Y 変異体は、野生型の GS (F337) と比較してほぼ同等の交差反応性を示した (図 26)。これらのデータは、フェニルアラニンの水酸基付加体であるチロシンの極性がこのエピトープの立体化学的環境に大きな影響を与えないこと示唆している。結論として、これらの得られた結果は、GS と Bcnt の共通エピトープのコアアミノ酸により形成された立体化学的環境の空間的類似性が、抗 BCNT-C 抗体と GS の交差反応において非常に重要であることを強く示唆している。

小括

我々は、抗 BCNT-C 抗体を用いた Western blotting により 43 kDa 相当に見られた分子をウシ脳より単離・精製することに成功し、続く LC-MS/MS による解析により、その分子が、Bcnt とは全く異なる glutamine synthetase (GS) であると同定した。GS と Bcnt の組換えタンパク質を用いた検証実験から、43 kDa 相当に見られた抗 BCNT-C 抗体の免疫活性が標的外分子との交差反応であることが明らかとなった。GS は、アストロサイトのマーカーとしても知られており、抗 BCNT-C 抗体による免疫組織学的解析で観察された脳のアストロサイトでの免疫活性は、標的外分子である GS である可能性が強く示唆された。Bcnt と構造的にも機能的にも全く異なる GS と抗 BCNT-C 抗体との交差反応の分子認識機序を明にするため、GS の詳細なエピトープ解析の結果、抗 BCNT-C 抗体の抗原ペプチドに含まれる『GYIE』と類似性のある、GS の C 末端領域の『GYFE』が、そのエピトープの主要な構成成分であり、そのエピトープを認識する抗体の重集団が、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体に 20%程度含まれていることが明らかとなった。また、GS と Bcnt のそれぞれのエピトープを構成するコアミノ酸に隣接する親水性アミノ酸と、フェニルアラニン (Phe、F) とイソロイシン (Ile、I) の立体化学的嵩高さに起因するエピトープ表面の立体化学的・物理化学的環境の類似性により、抗 BCNT-C 抗体と標的外分子である GS との交差反応が引き起こされたと、我々は結論付けた。

総括

第1章では、酵母からヒトまで広い生物種で保存されている **Bcnt** タンパク質と、**Bcnt** 遺伝子の重複とレトロトランスポゾン由来配列の挿入により創出されたと考えられている **p97Bcnt** タンパク質に対する抗体を用いた生化学的・免疫組織化学的解析結果について述べた。抗 **BCNT-C** 抗体の免疫活性は、ラットでは脳と精巣に強く認められ、それぞれアストロサイトとライディッヒ細胞の細胞質に主に局在していた。一方、抗 **p97Bcnt** 抗体の免疫活性は、反芻動物であるヤギでは多くの臓器に認められ、ヤギ脳とウシ精巣におけるその局在は、それぞれ神経細胞の核と成熟した精子の核であった。このように、抗 **BCNT-C** 抗体と抗 **p97Bcnt** 抗体の免疫活性の発現様式が全く異なるという結果は、これら遺伝子産物に機能的違いがある可能性が非常に高いことを示唆している。遺伝子重複による分子進化において、重複遺伝子の安定性とゲノムへの固定・保持は、その遺伝子が有益な機能を獲得するかどうか依存しており、側系遺伝子同士が同一機能を保持する場合、リボソームやヒストンのような遺伝子産物の量的有益性がなければ、重複した遺伝子が偽遺伝子となる可能性が非常に高いと考えられている（文献 33、34、35）。反芻動物において **Bcnt** 遺伝子と **p97Bcnt** 遺伝子が共に発現可能な遺伝子として保存されてきた事実は、両者の遺伝子構造が大きく異なることも踏まえると、遺伝子重複により生み出された遺伝子が、元の遺伝子と異なる機能を獲得した可能性が非常に高いと考えられる。上記の結果はこの考察と一致することからも、遺伝子の重複とレトロトランスポゾン由来配列の挿入により生み出されたと考えられる **p97Bcnt** 遺伝子が、**Bcnt** 遺伝子とは異なる新たな機能を獲得したと推察した。しかしながら、*in situ* hybridization による発現解析では、マウス脳における **Bcnt** mRNA の発現は神経細胞に認められ、抗 **BCNT-C** 抗体を用いた免疫組織化学的解析とは異なる結果であったことから、抗 **BCNT-C** 抗体の特異性と発現解析の信憑性を検証する必要があると考えられた。一方、酵母やショウジョウバエ、ヒト由来培養細胞を用いた研究から、**Bcnt** タンパク質が、SRCAP complex (Snf2-related CBP activator protein complex、酵母のホモログは SWR-C complex) の構成因子との相互作用により、クロマチンリモデリングに関与していることが示唆されている（文献 36、37、38）。

SRCAP complex は、クロマチン構造の動的変動を調節するクロマチンリモデリング複合体の1つで、ヒストン H2A とそのバリエーションであるヒストン H2A.Z との交換反応に関与することが報告されている（文献 39）。これらの報告は、内在性の Bcnt タンパク質が核内に局在している可能性が高いことを示唆している。さらに、Bcnt を強制発現させた HEK293T 細胞での Bcnt タンパク質の核への局在（図 17D、H、L）と、*in situ* hybridization による Bcnt mRNA の神経細胞への局在（図 13C）とを合わせて考察すると、脳における Bcnt タンパク質の局在はこれまで報告が無いが、神経細胞の核である可能性が非常に高いと推察される。抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性が、神経細胞の核に優位に局在していた一方で、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性がアストロサイトの細胞質に局在していた結果は、こうした推察と明らかに異なる。また、劇的な形態学的変化を伴う精子形成過程では、ヌクレオソームの主要構成成分であるヒストンが精子核クロマチンの高度の凝集に必要なプロタミンへと段階的に置換される過程において、クロマチンリモデリング複合体が重要な機能的役割を果たすことが知られている（文献 40）。成熟精子の核で検出された抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性はこの報告と一致する一方で、主に精細管間質のライディッヒ細胞の細胞質に観察された抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は、BCNT の機能に関する上記の推察からは理解が困難である。これらの結果を総合的に考え、抗 BCNT-C 抗体による Western blotting で検出された 45kDa 付近の非常に強い免疫活性と、免疫組織化学で観察された脳のアストロサイトと精巣のライディッヒ細胞の細胞質での免疫活性の妥当性について、再度検証する必要があると判断した。

上記の一連の考察に基づいて、第 2 章では抗 BCNT-C 抗体の交差反応物を単離・精製し、LC-MS/MS により同定した結果、抗 BCNT-C 抗体が、標的分子に加えて、Bcnt と全く相同性の無いタンパク質である glutamine synthetase (GS) と極めて特異的に交差反応することが明らかとなった。GS は、主として脳に存在し、グルタミン酸の代謝制御に関与している（文献 23、41）。抗 BCNT-C 抗体は、HEK293T 細胞で強制発現させた GS を認識し、さらに、これまでに報告されている GS の脳内での局在（文献 30）と一致して、ラット小脳ではアストロサイトに強い免疫活性を示した（図 18）。これらの結果から、これまでに我々がウシ精巣のライディッヒ細胞や（文献 14）、ラ

ット脳のアストロサイトで検出してきた抗 BCNT-C 抗体の強い免疫活性は、内在性の GS に対する免疫活性（文献 30、42）である可能性が最も高いと考えられた。こうした強い免疫活性に加えて、抗 BCNT-C 抗体は、様々な変性条件下での GS を検出する。Western blotting では加熱・還元的に変性した GS を、免疫細胞化学と免疫組織化学的解析では化学的に固定された生体内の GS を、そして免疫沈降においては水溶液中のより naïve な GS を検出する。我々は、抗 BCNT-C 抗体との交差反応に必要な GS の C 末端領域に局限するコアアミノ酸（GYFE）を同定することができた（図 21）が、これらの実験的事実は、抗 BCNT-C 抗体と反応する『GYFE』を含むエピトープが、未変性状態の GS の分子表面に位置していることを示唆している。Bcnt と GS の間にアミノ酸配列の相同性が全くないにもかかわらず抗 BCNT-C 抗体が GS と強い反応性を示すことから、我々は、この『GYFE』を含む配列が、抗 BCNT-C ポリクローナル抗体作製に用いた抗原ペプチドに含まれる『GYIE』を認識する抗体の亜集団によって共通認識されているのではないかと考えた。この推測は、『GYFE』のフェニルアラニン（Phe、F）をイソロイシン（Ile、I）に置換しても、エピトープの抗原性が維持されることを意味している。実際に、野生型 GS のフェニルアラニン（Phe、F337）を、立体化学的嵩高さの類似したイソロイシン（Ile、I）やロイシン（Leu、L）、チロシン（Tyr、Y）に置換した GS 変異体が、野生型 GS と同等の反応性で抗 BCNT-C 抗体により認識された一方で、より小さなアミノ酸であるバリン（Val、V）やアラニン（Ala、A）に置換した GS 変異体では、その反応性が低下した（図 26）。この結果は、抗 BCNT-C 抗体と GS との交差反応には、GS のフェニルアラニン（Phe、F337）の立体的嵩高さが重要であることを示している。さらに、野生型 GS のフェニルアラニン（Phe、F337）をチロシン（Tyr、Y）へ置換した変異体（F337Y 変異体）でも野生型 GS と同等の反応性が観察されたことから、フェニルアラニンへの水酸基付加による極性変化は、抗 BCNT-C 抗体と GS との交差反応に影響を与えないことを示している。これらの結果は、GS の『GYFE』のフェニルアラニン（Phe、F）と Bcnt の『GYIE』のイソロイシン（Ile、I）が、エピトープ-パラトープ境界面での直接的な分子間相互作用に関与するのではなく、共通エピトープの空間的配置の維持に重要であることを強く示唆している。この推測は、GS 複合体の活性部位において ATP と GS の基質であるグルタミ

ン酸との結合にそれぞれ関与しているチロシン (Tyr、Y336) とグルタミン酸 (Glu、E338) の反対側に、隣接するフェニルアラニン (Phe、F337) があるというこれまでの報告 (文献 32) と一致している (図 27)。GS の活性部位のフェニルアラニン (Phe、F337) は、種間で非常によく保存されているにもかかわらず、結核菌ではロイシン (Leu、L) に、ネズミチフス菌ではイソロイシン (Ile、I) に置換されているという報告 (文献 22、32) からも、たとえフェニルアラニン (Phe、F337) がロイシン (Leu、L) やイソロイシン (Ile、I) に置換されたとしても、GS の活性部位の立体化学的環境が保持されることにより、その機能が維持されていると推察される。これらの報告は、GS の活性部位に位置する『GYFE』と Bcnt の『GYIE』の共通エピトープのコアアミノ酸が、類似した立体化学的環境を構成しているという我々の推測と一致する。また、これらコアアミノ酸が、リジン (Lys、K) やアルギニン (Arg、R)、グルタミン酸 (Glu、E) のような電荷を持ったアミノ酸に囲まれていることにも注目すべきである (図 21)。これらの電荷を持った親水性アミノ酸残基 (GS : KK/DR、Bcnt : KE/ER) が、抗 BCNT-C 抗体による交差反応に重要であることは、これら両側の 4 つのアミノ酸のアラニン置換変異体でその交差反応性が失われることから明らかである (図 22)。ただし、GS の C 末端側からの欠損変異体を用いた Western blotting では、コアアミノ酸の C 末端側の二つの親水性アミノ酸残基 (アスパラギン酸とアルギニン、DR) を欠失しても抗 BCNT-C 抗体の交差反応性は減弱しなかったこと (図 21)、また、コアアミノ酸の N 末端側の 1 つのアミノ酸残基が、塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸 (GS : リジン、K、Bcnt : グルタミン酸、E) でその電荷が異なっていることから、このコアアミノ酸を囲む両側の親水性アミノ酸残基は、パラトープとの分子間相互作用ではなく、コアアミノ酸のタンパク表面への誘導において重要であると考えられる。また B 細胞エピトープの網羅的解析から、エピトープの中心には疎水性残基 (特にチロシン残基) があり、その周りを荷電アミノ酸残基が囲んでいる頻度が高く、フェニルアラニンとイソロイシンは、アラニンやバリン、ロイシンほどではないがその頻度が低いことが報告されており (文献 43)、GS と Bcnt の共通エピトープの構造とも類似している。分子間相互作用における物理化学的要素の中では静電的な力が最も支配的だと考えられるが、上記の様なエピトープ環境の類似性に加え、疎水性 (非極性) アミノ酸で

あるフェニルアラニンとイソロイシンによる立体化学的類似性は、抗 BCNT-C 抗体と GS との強い（標的分子である Bcnt と同等の）免疫反応を引き起こす上で、決定的とは言えないまでも、極めて重要な補完要素だと考えられる。

標的分子と構造的に関連の無い標的外分子と抗体との交差反応は、小さなペプチドを用いた抗体の結合アッセイではしばしば起こるが、タンパク質断片を用いた結合アッセイや Western blotting ではほとんど発生しないことは、今日ではよく知られている（文献 9）。SDS-PAGE の変性条件下では、抗体は標的分子の直鎖状エピトープを認識すると一般的には信じられているが、いくつかの抗体は、SDS-PAGE において変性させた後でも、転写したメンブレン上でのタンパク質の高次構造の復元に依存して、立体構造的なエピトープを介してタンパク質と反応できることが報告されている（文献 44、45）。GS の『GYFE』のグリシン（Gly、G）やチロシン（Tyr、Y）、グルタミン酸（Glu、E）のアラニン置換変異体では抗 BCNT-C 抗体との免疫反応性が消失した（図 22）のとは対照的に、フェニルアラニン（Phe、F）の様々な嵩高さのアミノ酸への置換変異体では反応性が消失することなく、それぞれの変異体は立体的嵩高さ依存的に抗 BCNT-C 抗体と反応した（図 26）。これらの結果は、『GYFE』のそれぞれのアミノ酸が、抗 BCNT-C 抗体とのエピトープ-パラトープ境界面に存在している（Gly、Tyr、Glu）か、存在していない（Phe）かの違いを反映していると考えられる。この結果は、GS の 3 次元構造に示されたコアアミノ酸の立体配置（図 27）と一致し、Western blotting のメンブレン上において、GS と Bcnt の高次構造が部分的に復元、維持されていることを示唆している。このような Bcnt と GS の立体構造の再生が、Western blotting により Bcnt の『GYIE』と GS の『GYFE』との立体化学的環境の類似性を明らかにすることのできた一つの理由と考えられる。

本論文の主要な結果はポリクローナル抗体によって得られたものであるが、BCNT-C ペプチドにより単離精製された抗 BCNT-C 抗体から、GS (332-346) ペプチドを用いて GS の『GYFE』と Bcnt の『GYIE』の両方を同等の反応性で共通認識する抗体亜集団（GFYE fraction）が単離できたこと（図 24、25）は、抗 BCNT-C 抗体に、両分子と反応する抗体のクローンが含まれていることを示している。従って、本論文の抗体と標的外分子との交差反応における分子認識様式についての考察は、ポリクロ

一ナル抗体のみならず、モノクローナル抗体においても同様に起こり得る問題であると考えられる。

本論文を含む最近の報告では、如何に特異的なアミノ酸配列を抗原に選んだとしても、抗体と標的外分子との交差反応は避けることができないことが示されている（文献 46）。従って、抗体は標的分子だけを認識するのではなく、標的分子と類似した立体化学的・物理化学的環境を含む標的外分子とも潜在的に反応するという事実に注意を払わなければならない。エピトープ-パラトープ境界面での大規模に蓄積されたデータを使用した計算科学およびバイオインフォマティクス分析の最近の進歩により、パラトープホットスポットによるリンパ球相互作用のグループ化アルゴリズムを用いて共通特異性の T 細胞受容体をグループ化することが可能になっている（文献 47）。これらの進歩は、抗原交差反応に関与するアミノ酸残基レベルでの、物理化学的類似性に基づくエピトープの機能的冗長性も明らかにしている（文献 48）。これらの蓄積されたデータに加え、標的分子と標的外分子の両方のエピトープ-パラトープ境界面の物理化学的環境をさらに包括的に理解することで、抗原性や免疫原性をより正確に評価・予測できるようになり、副作用のない高い特異性を持った医療用抗体やワクチンの開発に繋がると考えられる。

実験材料と方法

・倫理面での承認

本論文の図 2 と 4 は、「Multiple duplication of the bucentaur gene family, which recruits the APE-like domain of retrotransposon: Identification of a novel homolog and distinct cellular expression.」*Gene* **435**, 88-95 (2009)の Fig. 2 と 4、ならびに図 6、9、14~27 は、

「A spatial similarity of stereochemical environments formed by amino acid residues defines a common epitope of two non-homologous proteins.」*Sci. Rep.* **9**, 14818 (2019) の Fig. 1~6、S1~S7、S10、S11 と同じである。これら図は全て、上記論文の出版社 Elsevier と Springer Nature、および共著者全員から本学位論文での使用許可を得ている。

本研究での全ての遺伝子組換え実験および動物実験は、徳島文理大学の遺伝子組換え実験委員会、実験動物委員会の承認を受けた。(許可番号; 25P-10、28P-10、30P-1、KP14-81-002、KP14-81-005、KP15-81-004、KP15-81-005、KP16-81-005、KP16-81-007、KP17-81-004、KP17-81-008)

・機器

タンパク質、RNA の定量にはそれぞれ SpectraMax M5TB (Molecular Devices)、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) を、塩基配列の解析には ABI PRISM 3130/3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を、蛍光法、化学発光法によるイムノブロットティングのデジタルイメージングにはそれぞれ Odyssey (LI-COR Biosciences)、LAS-3000 (GE Healthcare Life Sciences) を用いた。上記の機器は、徳島文理大学香川薬学部中央機器センターに設置されているものを使用した。これら以外の使用機器は、各実験方法に記載する。

・試薬および抗体

Flag tag (DYKDDDDK tag; 014-22383) および GS (GTX109121) に対する抗体はそれぞれ、和光純薬および GeneTex から入手した。未染色、染色済みの SDS-PAGE 分子量標準マーカー (Bio-Rad) は各実験で使い分けた。His-tag の 20 アミノ酸と N 末

端で融合した組換えヒト・グルタミン合成酵素タンパク質 (enz-544) は、ProSpec から入手した。Western blotting で用いた標識二次抗体を以下に列挙する。HRP 標識抗モルモット IgG 抗体 (706-035-148、Jackson ImmunoResearch)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (715-035-151、Jackson ImmunoResearch)、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (711-036-152、Jackson ImmunoResearch)、IRDye700TMDX 標識抗モルモット IgG 抗体 (606-130-129、Rockland Immunochemicals)、CF680 標識抗モルモット IgG 抗体 (20241、Biotium)、CF770 標識抗ウサギ IgG 抗体 (20078、Biotium)、CF770 標識抗マウス IgG 抗体 (20077、Biotium)

・抗 BCNT-C 抗体、抗 Bcnt-Cter 抗体および抗 mBcnt-N 抗体の作製

抗 BCNT-C 抗体の作製には、ヒト BCNT の C 末領域の 18 アミノ酸残基 (259-276) に対応するペプチド『EELAIHNRGKEGYIERKA』を抗原として用いた。抗原ペプチドは、N 末端にシステインを付加して合成し、純度は 93% であった。N 末端のシステインを介してキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させ、完全フロイントアジュバントを加えた抗原ペプチドを、2 匹または 6 匹のハートレーモルモット (生後 5-6 週齢の雄) に、それぞれ 0.2 mg と 0.25 mg を 2 回皮下注射した。代表的な例では、最初の免疫から 14 および 28 日目に 2 回、不完全フロイントアジュバントを用いた追加免疫を行った。38~52 日目に全採血し、血清を調製した。これらの全工程はタカラバイオに外注した。抗 Bcnt-Cter 抗体および抗 mBcnt-N 抗体も同様にして、それぞれ 3 匹のモルモットに BCNT の C 末端の 10 アミノ酸『RDLRLSKMKP-COOH』に N 末端にシステインを付加したペプチド、マウス Bcnt の N 末端領域の 16 アミノ酸、『acetyl-GEEQAEKTKGKRRKAQ』に C 末端にシステイン付加したペプチドを抗原として用いて作製した。これらのペプチドは AnyGen で合成された。動物の免疫と全採血はタカラバイオに外注した。抗 BCNT-C 抗体は、それぞれのモルモットの血清から、抗原ペプチドを結合させた HiTrap NHS 活性化 HP カラム (GE Healthcare Life Sciences) を用いてアフィニティ精製した。抗 Bcnt-Cter 抗体と抗 mBcnt-N 抗体は、それぞれの血清から、抗原ペプチドへ付加したシステインを介して結合させた SulfoLink Coupling Resin (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。

・マウス GS、マウス Bcnt の発現ベクターの構築

Myc-tag 標識マウス GS 発現ベクター（文献 20）は、荒木敏之博士（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）から供与された。マウス GS とマウス Bcnt cDNA は、成熟雄 C57BL/6 J マウスの脳的全 RNA からの dT-プライマーを用いた逆転写反応と、それに続くクローニング・プライマー（補足表 1 を参照）を用いた PCR により増幅した。PCR 産物は、3'端は制限酵素 *Bgl*III または *Bam*HI を、5'端は *Xho*I を用いて以下の 3 種類の哺乳類発現ベクターにクローニングした。: BsrGI-MCS-pcDNA3.1 (Accession No. LC311017)、Flag-MCS-pcDNA3.1 (Accession No. LC311018)、Flag-mCherry-MCS- pcDNA3.1 (Accession No. LC311020)構築した全てのプラスミドは、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing キット（Thermo Fisher Scientific）を用いて、挿入配列の確認を行った。

・マウス GS の欠失、置換変異体の発現ベクターの構築

マウス GS の欠失、置換変異体の発現ベクターは、PrimeSTAR GXL DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ）、または KAPA HiFi HotStart DNA ポリメラーゼ（KAPA Biosystems）を用いた PrimeSTAR mutagenesis basal キット（タカラバイオ）のプロトコルに従って、マウス GS を発現する pCold II DNA プラスミドから構築した。PCR はそれぞれ 0.3 μ M の変異生成プライマーセット（補足表 2）を用いて、以下の 2 つの条件のいずれかで行った。1) A4 (AAGYFEAA) 変異体を作製する場合は、KAPA HiFi HotStart DNA ポリメラーゼを用いて、95°C で 3 分の初期変性、および 35 サイクルの 98°C で 20 秒の変性、72°C で 3 分のアニーリングおよび伸長反応を、2) 他の変異を作成する場合は、PrimeSTAR GXL DNA ポリメラーゼを用いて、95°C で 3 分の初期変性、および 35 サイクルの 98°C で 10 秒の変性、60°C で 15 秒のアニーリングおよび 68°C で 2 分の伸長反応を行った。これらの PCR 産物は、0.8%TAE-アガロースゲル電気泳動で増幅産物のサイズを確認し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega）によって精製した後、大腸菌 XL1-Blue の形質転換に用いた。得られたすべての発現ベクターは、翻訳領域およびプロモーター領域の塩基配列を設計したプライマー（補足表 3）と BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing キット（Thermo Fisher Scientific）

を用いて確認した後、BL21 (DE3) 細胞 (Delphi Genetics) で発現させた。マウス GS 変異体のうち、F337A および 355–358 (GYFE) のアラニン置換変異体 (AlI-Ala) は、Asp-N プロテアーゼまたはトリプシンで消化した後、MALDI-TOF MS および LC-MS/MS で確認した。

・細胞培養とトランスフェクション

HEK293T 細胞は、10%ウシ胎児血清、50 mg/L ゲンタマイシンを含む高グルコース (4.5 g D-glucose/L) DMEM-GlutaMAX-I 培地 (Thermo Fisher Scientific) 中で、37 °C、5%CO₂ で継代した。トランスフェクションは、HEK293T 細胞を 6-well プレートに密集度~60%で培養し、発現ベクターDNA (0.5 µg/well)、PLUS 試薬 (0.5 µL/well)、リポフェクタミン LTX 試薬 (1.2 µL/well) (いずれの試薬も Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

・GS とその変異体を発現する大腸菌抽出物の調製

大腸菌の培養と pCold II ベクター中の cDNA でコードされる分子の発現誘導は既報のとおりに行った (文献 11)。大腸菌を集菌して PBS で洗浄し、5,000 × g で 5 分間遠心した。培養液 1 mL から得られた沈渣あたり 50 µL の水を加えた後、再懸濁した細胞に等量の 2 倍濃縮溶菌緩衝液 (2%SDS を含む 40 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.6) と混合し、直ちに 3 分間、100°C で加熱した。抽出物は冷水中で Bioruptor (ビーエム機器) で超音波破碎 (10 秒間のパルス を 10 秒間隔で 15 回) し、28,000 × g で 10 分間遠心した後、その上清を Western blotting に用いた。

・Western blotting

SDS-PAGE およびメンブレンへのブロッティングは、蛍光法において低蛍光メンブレン (Immobilon-FL、Merck) を用いた以外は、基本的に既報 (文献 11) と同じ手法で行った。抗体反応の検出は、化学発光法、比色法、蛍光法を用い、それぞれホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識、蛍光色素標識二次抗体を用いた。用いた二次抗体は試薬および抗体の項に一覧表示さ

れている。0.1% Tween 20 を加えた Tris-HCl 緩衝生理食塩水 (pH 7.6) (TBT) は、これら三つの方法全てで、洗浄用緩衝液として用いた。化学発光法では、抗体との反応は5%または10%スキムミルクを含むTBT中で行い、免疫反応は Immobilon (Merck)、ImmunoSTAR Zeta または LD (和光純薬) を基質としてイメージスキャナー (GeneGenome、Syngene) で検出した。比色法では抗体との反応は 0.2%カゼイン (I-Block、Thermo Fisher Scientific) を含む TBT 中で行い、免疫反応は 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich) を発色色素として、イメージアナライザーLAS-3000 (富士フイルム) で検出した。蛍光法では抗体との反応は0.2%カゼインを含むTBT中で行い、免疫反応は近赤外蛍光スキャナー Odyssey 700 CLX (LI-COR Biosciences) で検出した。リプロービングには、62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS および 100 mM 2-メルカプトエタノールを含む 70°C の反応液中で 1 時間、メンブレンを振盪して結合した抗体を剥離させた。化学発光法での酵素反応産物によるリプロービング抗体の検出阻害を回避するために、リプロービングは蛍光法で検出した場合にのみ行った。

・抗 BCNT-C 抗体結合アガロースの調製

抗 BCNT-C 抗体結合アガロースは、公開されているプロトコール (Abcam ; www.abcam.com/technical) に従って、400 µg の抗 BCNT-C 抗体を 250 µL アガロース (プロテイン A/G PLUS-アガロースのビーズを充填したもの、Santa Cruz Biotech) と混和し、ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩 (Sigma-Aldrich) により結合させることで調製した。対照となるアガロースには、上記のアガロースのビーズを HEPES 緩衝液 (HB、HEPES-NaOH pH 7.5) で 5 分間、100°C で加熱したものを使用した。また Bcnt とは無関係のカルモジュリン結合アガロース (Sigma-Aldrich) も使用した。

・ウシ、マウス、ラット臓器のタンパク抽出物の調製および入手

剖出して細片にしたウシ脳 (生後 2 年齢の雌)、マウス脳 (生後 6 月齢から 1 年齢の C57Bl/6J マウス) を液体窒素で凍結し、使用するまで -80°C で保存した。組織細片は液体窒素を入れたシリンダー内で破碎し、得られた細顆粒を、プロテアーゼ阻害剤

カクテル（ナカライテスク）とフォスファターゼ阻害剤（10 mM NaF、1 mM バナジン酸ナトリウム、12.5 mM β -グリセロフォスフェート）を添加した HEPES 緩衝生理食塩水（10 mM HEPES-NaOH（pH 7.5）、150 mM NaCl）中で、ダウンス型ホモジナイザーを 40 回上下してホモジナイズした。粗抽出物は 4°C で 15 分、20,000 x g で遠心し（日立 PA50、ローター AG-6512C）、上清（S-20）を集めた。ラット嗅球（文献 26）、FOXO1 トランスジェニックマウスおよび同腹の野生型マウスの骨格筋の抽出物（文献 28）は、以前に報告された試料をそれぞれ浦山修博士、亀井康富博士より享受した。

・抗 BCNT-C 抗体による 43 kDa タンパク質の免疫沈降

未加熱変性条件での免疫沈降は、ウシ脳 S-100 抽出物（文献 12）に、プロテアーゼとフォスファターゼ阻害剤を添加した等量の 2 倍濃縮 RIPA バッファー（最終濃度：10 mM HEPES-NaOH（pH 7.4）、150 mM NaCl、1%デオキシコール酸ナトリウム、1% Triton X-100、0.1% SDS、5 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、2.5 mM エチレンジアミン四酢酸（EGTA））を添加し、混和した。混和物は冷水中で Bioruptor（ビーエム機器）により超音波破碎（10 秒間のパルスをもとに 10 秒間隔で 15 回）し、28,000 x g で 10 分間遠心した。20 μ L の黄色ブドウ球菌懸濁液（IgG-Sorb、The Enzyme Center、再構成液 1 mL あたり 1.9 mg の IgG 抗体結合能）を抽出液 1 mL に加え、ロータリーシェーカーを用いて 30 分間反応させ、12,000 x g で 30 分間遠心した。上澄み液はを二分し、それぞれを抗 BCNT-C 抗体結合アガロース（充填容量 10 μ L）、またはコントロールアガロースとロータリーシェーカーを用いて 2 時間反応させた。遠心後、上清は非結合分画として保存し、ペレットは RIPA バッファーで 3 回洗浄した。最終的に結合したタンパク質は、100 μ M 抗原ペプチド（抗 BCNT-C 抗体の抗原）を含む 20 μ L の HB によって 2 回、アガロースから溶出した。一方、加熱変性条件での免疫沈降は、上述のウシ脳 S-100 抽出物に 1 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM EDTA、1% SDS（w/v、最終濃度）を含む 120 μ L HB を添加し、4 分間、100°C で加熱した。そして、Nonidet P-40（以下、「NP40」と呼ぶ）を加え、次いで HBS を追加することで、NP40 と SDS の最終濃度をそれぞれ 0.1% にした（文献 49）。IgG-Sorb による処理後に、RIPA バッファー中で行ったのと同じ方法で免疫沈降を行った。

・ウシ脳抽出物から 43 kDa タンパク質の単離

ウシ脳の S-20 抽出物（タンパク質濃度：2.4 mg/mL）は、4°Cで 20-55%硫酸アンモニウム（AS）沈殿により分画し、ペレットは 0.5 mL の 1 M AS を含む 10 mM HB（pH 7.5）に懸濁した。検体は、1 mL フェニル-セファロース CL-4B（GE Healthcare Life Sciences）を充填したカラムに添加し、重力により流下させた。5 mL の 1 M AS で担体を洗った後に、結合したタンパク質は、2%*n*-オクチル-β-D-グルコシド（同仁化学研究所）を含む HB で重力流下により溶出・収集した（1 チューブあたり 1 mL）。溶出開始後、3 本目から 5 本目のチューブの分画は、アセトン沈殿によりタンパク質を回収し、ペレットはアセトンと水（4:1）の混合物で 3 回洗浄し、真空濃縮器（Speedvac Concentrator、Savant）で 5 分乾燥させた。得られたペレットは、1%SDS（w/v）、1 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM EDTA を含む 120 μl の HB に再溶解し、100°Cで加熱後、上述のように NP40 を添加して免疫沈降を行った。タンパク質が結合したアガロースは、0.1%NP40 を含む HBS で 3 回、HB で 2 回洗浄し、10 μM の抗原ペプチドを含む HB（50 μL）で溶出した。溶出は 3 回繰り返し、溶出物はアセトン沈殿により濃縮し、その後に SDS-PAGE を行った。

・ラット嗅球のタンパク抽出物からの 43 kDa タンパク質の免疫沈降

-80°Cで保存していた 0.25 M ショ糖を含むラット嗅球の抽出物（上記参照）を融解し、ショ糖を取り除くために 60%AS 沈殿によって濃縮し、一度 HBS に溶解してからアセトン沈殿を行った。ペレットの溶解と免疫沈降は、ウシ脳抽出物からの免疫沈降で記載したのと全く同じ方法で行った。

・Western blotting でのペプチドを用いた競合実験

抗 BCNT-C 抗体（2 nM）は、水に溶解した 5 μM の抗原ペプチド、または DMSO に溶解した各 GS ペプチド（図 20 に記載した P1-P4、JPT Peptide Technologies）とブロッキング試薬（0.2%カゼインを含む TBT）中で 1 時間、室温であらかじめ反応させた。His-tag 標識された野生型 GS を強制発現させた大腸菌抽出物を 100 ng/レーンで SDS-PAGE を行い、このペプチド-抗体混合液を用いて Western blotting を行った。

・GS と交差反応する抗 BCNT-C ポリクローナル抗体亜集団の単離

GS と特異的に反応する抗体分子を、既報の方法（文献 50）に従って抗 BCNT-C ポリクローナル抗体から単離した。野生型または All-Ala 変異体の GS を強制発現させた大腸菌の抽出物を使って SDS-PAGE を行った（1 レーンあたり 20 μg ）。転写後のメンブレンを、各レーンの分子量 37~50kD タンパク質を含む短冊(1 枚 1 cm \times 1.5 cm) に切り分けた。短冊状のメンブレンは 5% スキムミルクを含む TBT 中で、室温で 1 時間、さらに 4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間ブロッキングした後に、4 $^{\circ}\text{C}$ で一夜、抗 BCNT-C 抗体（ブロッキング溶液 1.25 mL あたり 2.5 μg ）と反応させた。TBT で 3 回洗浄後、結合した抗体は、冷却した 50 μL の 100 mM グリシン-HCl 緩衝液（pH 2.5、50 μL ）を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間メンブレンに載せることでメンブレンから回収し、ただちに 1.5 μL の 2 M Tris で中和した。この操作を 3 回繰り返す、集めた溶液に 10 倍濃縮 TBS を添加することで、TBS 組成の抗体溶液を調製した。

・コアアミノ酸を含む GS 由来ペプチドを用いた抗 BCNT-C ポリクローナル抗体からの GYFE fraction の単離

GS (332-346) ペプチド『アセチル-EKKG YFEDRRPSANC -COOH』（0.75 mg、純度 91.2%、AnyGen）は、製造会社のプロトコールに従って、カラム（MoBiTec）に充填した 1 mL の SulfoLink Coupling Resin（Thermo Fisher Scientific）に結合させた。10 mL の結合/洗浄用緩衝液（0.05% アジ化ナトリウムを含む 20 mM PBS、pH 7.0）に希釈した 4.45 mg の抗 BCNT-C 抗体をカラムに 5 回通過させ、流下分画を得た。50 mL の結合/洗浄用緩衝液で担体を洗浄した後、結合分画（GYFE fraction）を 6 mL の 100 mM グリシン液（pH 3.0）で溶出し、直ちに中和緩衝液（1.5 M NaCl、5 mM EDTA を含む 1 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.5）で中和した。結合分画（GYFE fraction）および流下分画（Flow Through）のタンパク質濃度は、緩衝液交換およびアミコンウルトラ-4（分画分子量 30 kDa、Millipore）を用いた限外濾過による濃縮後、ウシ血清アルブミンを標準試料としてビスニコニン酸（BCA）アッセイキット（Thermo Fisher Scientific）で測定し、それぞれ 0.78 mg および 2.80 mg で全体の回収率は 80.7%であった。

・ Bcnt の『GYIE』に対する GYFE fraction の特異性を評価する競合実験

Flag-tag 標識マウス GS (F-mGS) または Flag-tag 標識マウス Bcnt (F-mBcnt) を強制発現させた HEK293T 細胞の抽出物を、抗 Flag-tag 抗体に対して同等の免疫反応性を示すように、トランスフェクションしていない (未処置の) HEK293T 細胞抽出物を用いてそれぞれの組換えタンパク質濃度を調整し、Western blotting に使用した。Flag-tag 免疫活性の同等性を確認するために、メンブレンはまず抗 Flag-tag 抗体と反応させ、蛍光法により検出した。反応した抗体を除いたメンブレンを、最終濃度 25 μ M の BCNT-C ペプチド (BCNT-C (GYIE)、NH₂-EELAIHNRGKEGYIERKA-NH₂、純度 92.3%、AnyGen) または BCNT-C ペプチドの GYIE を全てアラニンに置換したペプチド (BCNT-C (All-Ala)、NH₂-EELAIHNRGKEAAAARKA-NH₂、純度 98.3%、AnyGen) とあらかじめ反応させた GYFE fraction (IgG として 1.33 nM) とリプロービングした。

・ 質量分析

ゲル中の CBB 染色されたタンパク質のバンドを切り出し、脱色した。そのバンドに含まれるタンパク質を 37 °C に温めた 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で、12 時間、トリプシン (TPCK 処理済み、Worthington Biochemical) で消化した。消化物は既報 (文献 11) と全く同じように、Q Exactive マススペクトロメーターを用いてナノ LC-MS/MS による解析を行った。

・ 免疫組織化学

生後 56 日齢のラットはジエチルエーテルにより麻酔し、血液凝固を抑制するために 50 unit/L のヘパリンナトリウム (Novo Nordisk) を含む 37°C に温めた生理食塩水によって経心臓的に前灌流を行い、氷冷した 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (PB、pH 7.2) を灌流して全身臓器を固定した。固定された脳を取り出して切り分けた後、同じ固定液で一夜、後固定を行った。0.1 M PB で 3 回洗浄した後、脳は凍結保護のために 4°C で一夜、20% ショ糖を含む 0.1 M PB に浸漬し、O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetechnical) に包埋し、ドライアイスとアセトンの混合物で冷却することで凍結した。8 μ m の凍結切片を作製し、シラン・コートしたスラ

イドガラスに融かして貼り付けた。切片は抗 BCNT-C 抗体 (1:100) と抗 GS 抗体 (1:400、GeneTex)、アストロサイトのマーカーである抗 GFAP 抗体 (1:400、DAKO)、またはニューロンのマーカーとして抗 Spot 35 抗体 (1:400、文献 51、山國徹博士から供与) と組み合わせて、間接二重免疫蛍光法により染色した。ブロッキング血清、抗体、核染色用色素はすべて、0.2% Triton X-100 を含む 0.01 M PBS で示された倍率に希釈して使用した。切片は 5% 正常ロバ血清 (Jackson ImmunoResearch) を用いて室温で 30 分間ブロッキングし、抗 BCNT-C 抗体を 4°C で一夜、反応させた。抗 BCNT-C 抗体免疫活性は FITC または Alexa488 標識ロバ抗モルモット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) で可視化した。次に、これらの切片は抗 GS 抗体、抗 Spot 35 抗体、または抗 GFAP 抗体と同様に反応させた。これら 2 つの抗体の免疫活性は、Cy3 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) で可視化した。最後に TO-PRO-3 (1:500、Thermo Fisher Scientific) で核染色を行った。免疫染色した切片は共焦点レーザーสキャン顕微鏡 (FV1000、オリンパス) で観察・撮影した。

・免疫細胞化学

遺伝子導入した HEK293T 細胞 (「細胞培養とトランスフェクション」を参照) をポリ-D-リジンで被覆したスライドガラス (Millicell EZ 4-well glass slides、Millipore) 上で 30 時間培養後、氷冷した 4% PFA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 15 分間固定し、二重免疫染色を行った (「免疫組織化学」を参照)。細胞は、抗 BCNT-C 抗体 (1:500) と反応させ、FITC 標識ロバ抗モルモット IgG 抗体 (1:50) で可視化した後、抗 GS 抗体 (1:1000、GeneTex) と反応させ、Cy3 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:200) で可視化した。免疫染色した細胞は共焦点レーザー스キャン顕微鏡 (FV1000、オリンパス) で観察・撮影した。

・ *in situ* hybridization

マウス脳由来 cDNA からマウス *Bcnt* のほぼ全長 (終止コドンを含む翻訳領域の 13-888 base) を増幅するプライマーを用いて、PrimeSTAR HS polymerase (タカラバイオ) により、PCR (初期変性: 95°C で 3 分、以下を 35 サイクル; 変性: 98°C で 10 秒、

アニーリング : 60°Cで 20 秒、伸長反応 : 72°Cで 1 分) を行った。増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、T4 polynucleotide kinase (東洋紡) により 5'末端のリン酸化処理を行った。制限酵素 *EcoRV* で直鎖化した pSP72 ベクター (Promega) の 5'末端を Calf intestine alkaline phosphatase (東洋紡) により脱リン酸化した後、リン酸化処理をした PCR 産物を加え、Ligation high ver.2 (東洋紡) により 4°Cで一晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応物を大腸菌 XL1-Blue (Agilent technologies) に添加し、42°Cで 45 秒のヒートショックにより遺伝子導入し、形質転換を行った。得られたシングルコロニーを LB 培地で一晩培養し、PureLink Quick plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) によりプラスミド DNA を単離・精製した。得られたプラスミド DNA は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、ABI PRISM 3130/3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により塩基配列の確認を行った。pSP72 ベクターの T7 プロモーターの下流にクローニングされたマウス *Bcnt* は、DIG RNA Labeling Kit (Roche) を用いて、T7 RNA polymerase により DIG 標識 RNA プローブを調製した。4%PFA で灌流固定された生後 57 日齢のマウス脳を O. C. T.コンパウンドで包埋・凍結し、12 μ m の凍結切片を作製した。凍結乾燥状態の切片を 4%PFA に 30 分間浸漬し、0.3% Triton X-100 を含む PBS で透過処理した後、1 μ g/mL Proteinase K を含む 37°C の PBS 中で 5 分間の賦活化処理を行った。PBS で洗浄後、再度 4%PFA に 5 分浸漬し、2 mg/mL のグリシンを含む PBS (15 分 x 2 回) で反応性アルデヒドの不活性化を行った。50%ホルムアミドを含む 2x SSC (300 mM NaCl、30 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。90°Cで 2 分間加熱変性した DIG-RNA プローブを、50%ホルムアミドと 2%Blocking reagent (Roche) を含む 5x SSC (750 mM NaCl、75 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) に加え、45°Cで一晩ハイブリダイゼーションさせた。5x SSC (45°Cで 5 分)、50%ホルムアミドを含む 2x SSC (45°Cで 1 時間)、500 mM NaCl を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) (溶液 B) (37°Cで 10 分) の順で洗浄し、20 μ g/mL RNase A を含む溶液 B に浸漬し、余分な DIG-RNA プローブを除去した。続いて溶液 B (37°Cで 10 分)、2x SSC (45°Cで 20 分)、0.2x SSC (45°Cで 20 分)、TBS2-T (50 mM Tris-HCl、pH7.6、300 mM NaCl、0.1% Tween-20) (室温で

5分、3回)の順で洗浄した。3%過酸化水素を含む TBS2-T (室温で 30分) で内在性ペルオキシダーゼを不活性化し、Avidin/Biotin blocking kit (VECTOR) を用いて内在性の Avidin と Biotin をブロッキングし、0.5%Casein sol. (100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、300 mM NaCl、0.5%カゼイン) (室温で 10分) で抗体反応のためのブロッキング処理を行った。0.5%Casein sol.で 400 倍に希釈した HRP 標識抗 DIG 抗体 (Roche) と室温で 30 分間反応させた。TBS2-T (室温で 5 分、3 回) で洗浄後、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific) と Tyramine-HCl (T2879、Sigma-Aldrich) を反応させて得た Biotynyl-Tyramide (約 7 μ M) を 0.7 μ M、1%過酸化水素、20%デキストラン硫酸ナトリウムを含む 0.2 M Tris-HCl (pH 8.8) と室温で 15 分間反応させた。TBS2-T (室温で 5 分、3 回) で洗浄後、0.5%Casein sol.で 1,000 倍希釈した Cy3 標識ストレプトアビジン (Jackson ImmunoResearch) と室温で 1 時間反応させた。TBS2-T (室温で 5 分、3 回) で洗浄後、5%ロバ正常血清を含む抗体希釈液 (0.2% Triton X-100、10 mM PBS) でブロッキング処理 (室温で 30 分) を行い、抗体希釈液で 400 倍に希釈した抗 GFAP 抗体 (DAKO) と 4°C で一晩反応させた。10 mM PBS (室温で 5 分、3 回) で洗浄後、抗体希釈液で 200 倍に希釈した FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) と反応させた。プレパラートは共焦点顕微鏡 (FV1000、オリンパス) で観察・撮影した。

参考文献

1. Chiavenna, S. M., Jaworski, J. P. & Vendrell, A. State of the art in anti-cancer mAbs. *J Biomed Sci* **24**, 15 (2017).
2. Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56-61 (2015).
3. Thomas, A., Teicher, B. A. & Hassan, R. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol* **17**, e254-e262 (2016).
4. Rossi, D., Modena, V., Sciascia, S. & Roccatello, D. Rheumatoid arthritis: Biological therapy other than anti-TNF. *Int Immunopharmacol* **27**, 185-188 (2015).
5. Zampeli, E., Vlachoyiannopoulos, P. G. & Tzioufas, A. G. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *J Autoimmun* **65**, 1-18 (2015).
6. Feyen, O., Lueking, A., Kowald, A., Stephan, C., Meyer, H. E., Göbel, U. & Niehues, T. Off-target activity of TNF-alpha inhibitors characterized by proteinbiochips. *Anal Bioanal Chem* **391**, 1713-1720 (2008).
7. Mahmud, M. N., Oda, M., Usui, D., Inoshima, Y., Ishiguro, N. & Kamatari, Y. O. A multispecific monoclonal antibody G2 recognizes at least three completely different epitope sequences with high affinity. *Protein Sci* **26**, 2162-2169 (2017).
8. Koenig, P., Sanowar, S., Lee, C. V. & Fuh, G. Tuning the specificity of a Two-in-One Fab against three angiogenic antigens by fully utilizing the information of deep mutational scanning. *MAbs* **9**, 959-967 (2017).
9. Forsström, B., Axnäs, B. B., Stengele, K. P., Bühler, J., Albert, T. J., Richmond, T. A., Hu, F. J., Nilsson, P., Hudson, E. P., Rockberg, J. & Uhlen, M. Proteome-wide epitope mapping of antibodies using ultra-dense peptide arrays. *Mol Cell Proteomics* **13**, 1585-1597 (2014).
10. Peng, H. P., Lee, K. H., Jian, J. W. & Yang, A. S. Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E2656-2665 (2014).
11. Iwashita, S., Suzuki, T., Yasuda, T., Nakashima, K., Sakamoto, T., Kohno, T., Takahashi,

- I., Kobayashi, T., Ohno-Iwashita, Y., Imajoh-Ohmi, S., Song, S. Y. & Dohmae, N. Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and Ser250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions. *Biosci Rep* **35**, e00228 (2015).
12. Iwashita, S., Osada, N., Itoh, T., Sezaki, M., Oshima, K., Hashimoto, E., Kitagawa-Arita, Y., Takahashi, I., Masui, T., Hashimoto, K. & Makalowski, W. A transposable element-mediated gene divergence that directly produces a novel type bovine Bcnt protein including the endonuclease domain of RTE-1. *Mol Biol Evol* **20**, 1556-1563 (2003).
13. Iwashita, S., Ueno, S., Nakashima, K., Song, S. Y., Ohshima, K., Tanaka, K., Endo, H., Kimura, J., Kurohmaru, M., Fukuta, K., David, L. & Osada, N. A tandem gene duplication followed by recruitment of a retrotransposon created the paralogous bucentaur gene (bcntp97) in the ancestral ruminant. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 798-806 (2006).
14. Iwashita, S., Nakashima, K., Sasaki, M., Osada, N. & Song S. Y. Multiple duplication of the bucentaur gene family, which recruits the APE-like domain of retrotransposon: Identification of a novel homolog and distinct cellular expression. *Gene* **435**, 88-95 (2009).
15. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
16. Jason de Koning A. P., Gu, W., Castoe, T. A., Batzer, M. A. & Pollock, D. D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.* **7**(12): e1002384 (2011).
17. Cordaux, R. & Batzer, M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 691-703 (2009).
18. Ayarpadikannan, S., Lee, H. E., Han, K. & Kim, H. S. Transposable element-driven transcript diversification and its relevance to genetic disorders. *Gene* **558**, 187-94 (2015).
19. Jang, H. S., Shah, N. M., Du, A. Y., Dailey, Z. Z., Pehrsson, E. C., Godoy, P. M., Zhang, D., Li, D., Xing, X., Kim, S., O'Donnell, D., Gordon, J. I. & Wang, T. Transposable elements drive widespread expression of oncogenes in human cancers. *Nat. Genet.* **51**,

- 611-617 (2019).
20. Erwin, J. A., Marchetto, M. C. & Gage, F. H. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 497-506 (2014).
 21. Nobukuni, T., Kobayashi, M., Omori, A., Ichinose, S., Iwanaga, T., Takahashi, I., Hashimoto, K., Hattori, S., Kaibuchi, K., Miyata, Y., Masui, T. & Iwashita, S. An Alu-linked repetitive sequence corresponding to 280 amino acids is expressed in a novel bovine protein, but not in its human homologue. *J. Biol. Chem.* **272**, 2801-2807 (1997).
 22. Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. & Rotstein, S. H. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 122-45 (2000).
 23. Rose, C. F., Verkhratsky, A. & Parpura, V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem Soc Trans* **41**, 1518-1524 (2013).
 24. Nakashima, K., Iwashita, S., Suzuki, T., Kato, C., Kohno, T., Kamei, Y., Sasaki, M., Urayama, O., Ohno-Iwashita, Y., Dohmae, N. & Song, S. Y. A spatial similarity of stereochemical environments formed by amino acid residues defines a common epitope of two non-homologous proteins. *Sci. Rep.* **9**, 14818 (2019).
 25. Peri, C., Morra, G. & Colombo, G. Surface energetics and protein-protein interactions: analysis and mechanistic implications. *Sci Rep* **6**, 24035 (2016).
 26. Urayama, O., Murakoshi, T. & Ikawa, Y. K rev-1 protein is abundantly expressed in the rat spinal cord. *Biochem Biophys Acta* **1243**, 446-452 (1995).
 27. Saitoh, F. & Araki, T. Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates Schwann cell differentiation. *J Neurosci* **30**, 1204-1212 (2010).
 28. Kamei, Y., Hattori, M., Hatazawa, Y., Kasahara, T., Kanou, M., Kanai, S., Yuan, X., Suganami, T., Lamers, W. H., Kitamura, T. & Ogawa, Y. FOXO1 activates glutamine synthetase gene in mouse skeletal muscles through a region downstream of 3'-UTR: possible contribution to ammonia detoxification. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, E485-E493 (2014).
 29. Norenberg, M. D. & Martinez-Hernandez, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* **161**, 303-310 (1979).

30. Kulijewicz-Nawrot, M., Syková, E., Chvátalm, A., Verkhatsky, A., & Rodríguez, J. J. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro* **5**, 273-282 (2013).
31. Huyghe, D., Nakamura, Y., Terunuma, M., Faideau, M., Haydon, P., Pangalos, M. N. & Moss, S. J. Glutamine synthetase stability and subcellular distribution in astrocytes are regulated by γ -aminobutyric type B receptors. *J Biol Chem* **289**, 28808-28815 (2014).
32. Krajewski, W. W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T. A., Karlberg, T. & Mowbray, S. L. Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J Mol Biol* **375**, 217-228 (2008).
33. Ohno, S. *Evolution by Gene Duplication*, Springer (1970)
34. Zhang, J. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 192-198 (2003).
35. Andersson, D. I., Jerlström-Hultqvist, J. & Näsvall, J. Evolution of new functions de novo and from preexisting genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **7**, a017996 (2015).
36. Messina, G., Damia, E., Fanti, L., Atterrato, M. T., Celauro, E., Mariotti, F. R., Accardo, M. C., Walther, M., Vernì, F., Picchioni, D., Moschetti, R., Caizzi, R., Piacentini, L., Cenci, G., Giordano, E. & Dimitri, P. Yeti, an essential *Drosophila melanogaster* gene, encodes a protein required for chromatin organization. *J. Cell Sci.* **127**, 2577-2588 (2014).
37. Sun, L. & Luk, E. Dual function of Swc5 in SWR remodeling ATPase activation and histone H2A eviction. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9931-9946 (2017).
38. Messina, G., Atterrato, M. T., Prozzillo, Y., Piacentini, L., Losada, A. & Dimitri, P. The human Cranio Facial Development Protein 1 (Cfdp1) gene encodes a protein required for the maintenance of higher-order chromatin organization. *Sci. Rep.* **7**, 45022 (2017).
39. Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R. & Peterson, C. L. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 407-422 (2017).

40. Hao, S. L., Ni, F. D. & Yang, W. X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* **706**, 201-210 (2019).
41. Jayakumar, A. R. & Norenberg, M. D. Glutamine synthetase: role in neurological disorders. *Adv Neurobiol* **13**, 327-350 (2016).
42. Holash, J. A., Harik, S. I., Perry, G. & Stewart, P. A. Barrier properties of testis microvessels. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11069-11073 (1993).
43. Kringelum, J. V., Nielsen, M., Padkjær, S. B. & Lund, O. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. *Mol. Immunol.* **53**, 24-34 (2013)
44. Forsström, B., Axnäs, B. B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A. & Uhlen, M. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One* **10**, e0121673 (2015).
45. Zhou, Y. H., Chen, Z., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous. *Immunol Cell Biol* **85**, 73-78 (2007).
46. McIntush, E. W. Response: ‘Antibody crossreactivity between the tumour suppressor PHLPP1 and the proto-oncogene β -catenin’ *EMBO reports* **14**, 494-496 (2013).
47. Glanville, J., Huang, H., Nau, A., Hatton, O., Wagar, L. E., Rubelt, F., Ji, X., Han, A., Krams, S. M., Pettus, C., Haas, N., Arlehamn, C. S. L., Sette, A., Boyd, S. D., Scriba, T. J., Martinez, O. M. & Davis, M. M. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* **547**, 94-98 (2017).
48. Caoili, S. E. Expressing redundancy among linear-epitope sequence data based on residue-level physicochemical similarity in the context of antigenic cross-reaction. *Adv Bioinformatics* 1276594 (2016).
49. Kaspersen, J. D., Søndergaard, A., Madsen, D. J., Otzen, D. E. & Pedersen, J. S. Refolding of SDS-unfolded proteins by nonionic surfactants. *Biophys J* **112**, 1609-1620 (2017).
50. Kurien, B.T. Affinity Purification of Autoantibodies from an Antigen Strip Excised from a Nitrocellulose Protein Blot. *Protein Blotting and Detection. Methods in*

Molecular Biology (Methods and Protocols) (eds. Kurien, B., Scofield, R.) vol. 536 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009).

51. Yamakuni, T., Usui, H., Iwanaga, T., Kondo, H., Odani, S. & Takahashi, Y. Isolation and immunohistochemical localization of a cerebellar protein. *Neurosci Lett* **45**, 235-240 (1984).

Properties of three types of anti-Bcnt Abs

Ab or Fraction name	Immunized animal	Property
Polyclonal anti- BCNT-C Ab	Guinea pig	An Ab raised against a peptide derived from C-terminal region of Bcnt.
	Sequence of the antigen peptide NH ₂ - CEELAIHNRGKEGYIERKA -COOH	
Polyclonal anti- Bcnt-Cter Ab	Guinea pig	An Ab raised against a peptide derived from C-terminus of Bcnt, which is different from the antigen peptide for the polyclonal anti-BCNT-C Ab.
	Sequence of the antigen peptide NH ₂ - CRDLRLSKMKP -COOH	
Polyclonal anti- mBcnt-N Ab	Guinea pig	An Ab raised against a peptide derived from N-terminal region of mouse Bcnt, which is different from the antigen peptide for the polyclonal anti-BCNT-C Ab.
	Sequence of the antigen peptide CH ₃ CO- GEEQAETK GKRRKAQC -COOH	

表1 抗原の異なる3種類の抗-Bcnt 抗体の概要

本研究で使われた抗BCNT-Cポリクローナル抗体、抗Bcnt-Cter抗体、および抗mBcnt-N抗体の抗原情報と特徴を示す。Bcntのコアアミノ酸『GYIE』、抗体作製時のKLH、または抗体精製時のアフィニティ・カラム担体との結合のためのシステインは、それぞれ緑、青色の文字で示す。

List of the identified proteins in 43 kDa band by LC-MS/MS

GI number	Protein name	Mascot Score	Number of matched peptides	Coverage (%)	emPAI
gil95006991	glutamine synthetase	5,925	31	76.9	68.59
gil75812932	actin, cytoplasmic 2	1,401	18	58.4	5.55
gil27819614	actin, alpha skeletal muscle	700	12	33.4	1.93
gil741897519	PREDICTED: beta-actin-like protein 2	425	10	38.0	1.21
gil168804008	tubulin alpha-1B chain	96	3	8.4	0.20
gil262073106	cathepsin D precursor	82	2	6.3	0.15
gil28849933	craniofacial development protein 1	62	2	2.7	0.20

表2 LC-MS/MSにより検出・同定されたタンパク質のリスト

リストには、単離した43 kDaバンドからLC-MS/MSによって同定されたタンパク質のGI (GenInfo Identifier) ナンバー、名称、Mascotスコア、一致したペプチドの数、カバー率およびexponentially modified protein abundance index (emPAI)を示す。43 kDaバンドの主要タンパク質は、Mascotスコア5925、emPAI 68.59を示したGSであった。

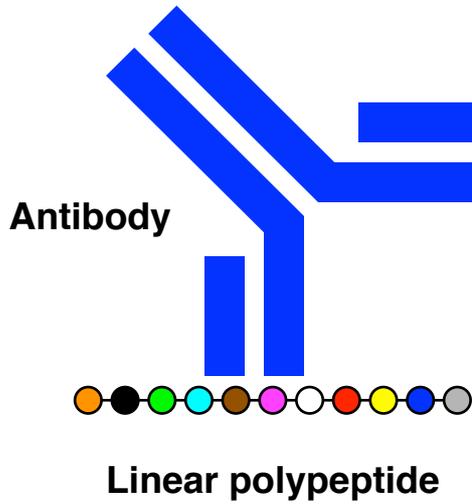
Property of GYFE fraction of anti-BCNT-C Abs

GYFE fraction of the polyclonal anti-BCNT-C Ab	A subpopulation of the polyclonal anti-BCNT-C Ab cross-reacting with "GYFE" of GS, which is isolated by affinity-column using GS(332-346) peptide.
	Sequence of GS(332-346) peptide CH ₃ CO- EKKGYFEDRRPSAN C-COOH

表3 GS由来ペプチドを用いた抗BCNT-Cポリクローナル抗体亜集団の単離

GSと交差反応性を示す抗BCNT-Cポリクローナル抗体のGYFE fractionの単離と、その単離に用いたコアアミノ酸を含むGS由来のペプチドの配列を示す。GSのコアアミノ酸『GYFE』、アフィニティ・カラム担体との結合のためのシステインは、それぞれ赤、青色の文字で示す。

Linear epitope



Conformational epitope

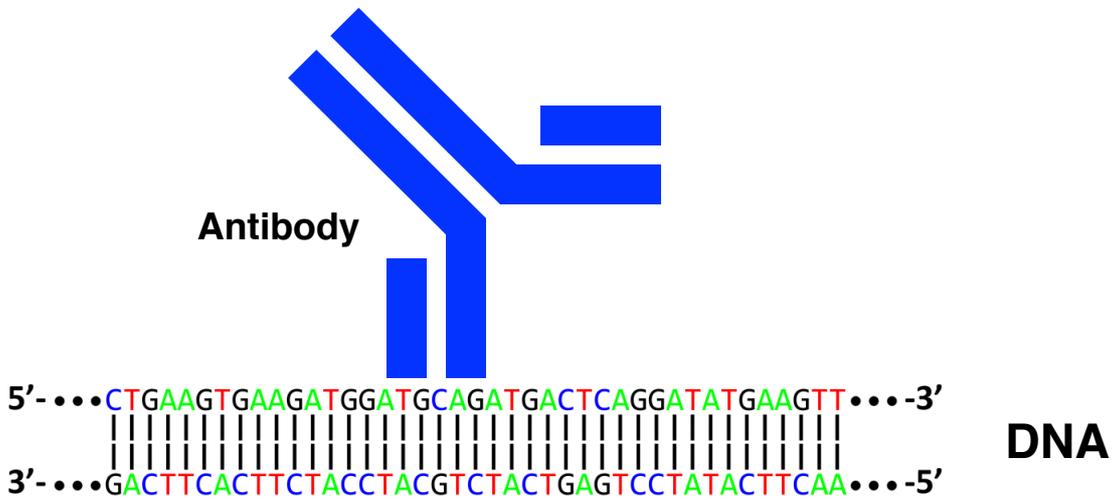
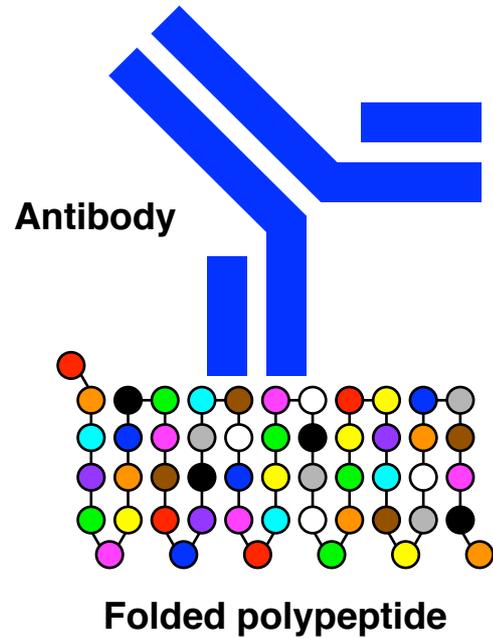


図1 一般的なエピトープの分類と核酸を認識する抗体の模式図

タンパク質に対する抗体のエピトープは、その認識様式により一般的に線形（連続）エピトープと立体構造エピトープ（非線形、不連続）に分類される。また、抗体は、アミノ酸を構成分子とするペプチド・タンパク質だけでなくDNAの様な分子も認識する。

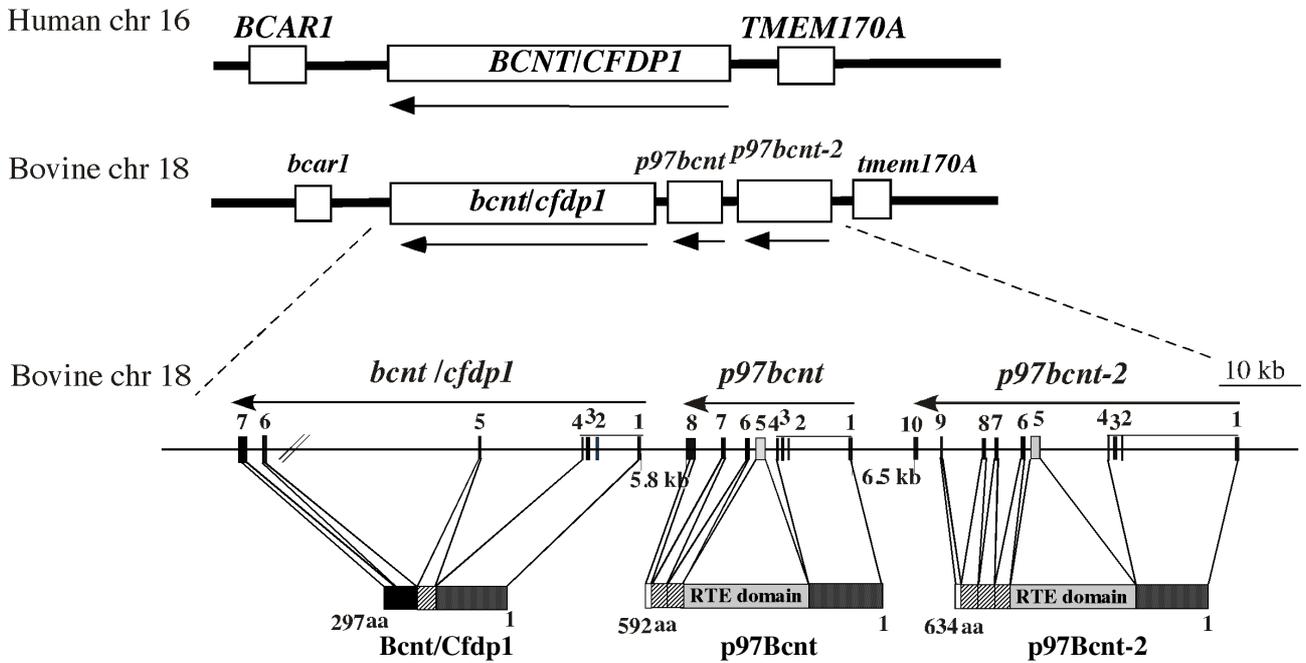


図2 Bcnt遺伝子ファミリーとその構造

ヒトでは、16番染色体にBCNT遺伝子のみが存在する。一方、ウシでは、18番染色体（ヒト16番染色体と相同領域）にBcnt遺伝子ファミリーのBcntとp97Bcnt、p97Bcnt-2遺伝子が並んで存在している。ヒトBCNT遺伝子とウシBcnt遺伝子ファミリーはそれぞれBCAR1（breast cancer anti-estrogen resistance 1）遺伝子とTMEM170A（Transmembrane protein 170A）遺伝子の間に位置している。Bcnt、p97Bcnt、p97Bcnt-2遺伝子はそれぞれ7個、8個、10個のエクソンから構成されており、エクソン1～4によりファミリー遺伝子間で相同性のあるN末端領域を持つ。Bcnt遺伝子のエクソン5とp97Bcnt遺伝子のエクソン6、7、p97Bcnt-2遺伝子のエクソン6、7、8は相同性のある遺伝子内繰返し配列である。Bcnt遺伝子はエクソン6と7により構成される、種間で非常に保存された82個のアミノ酸をコードするC末端を持つ。

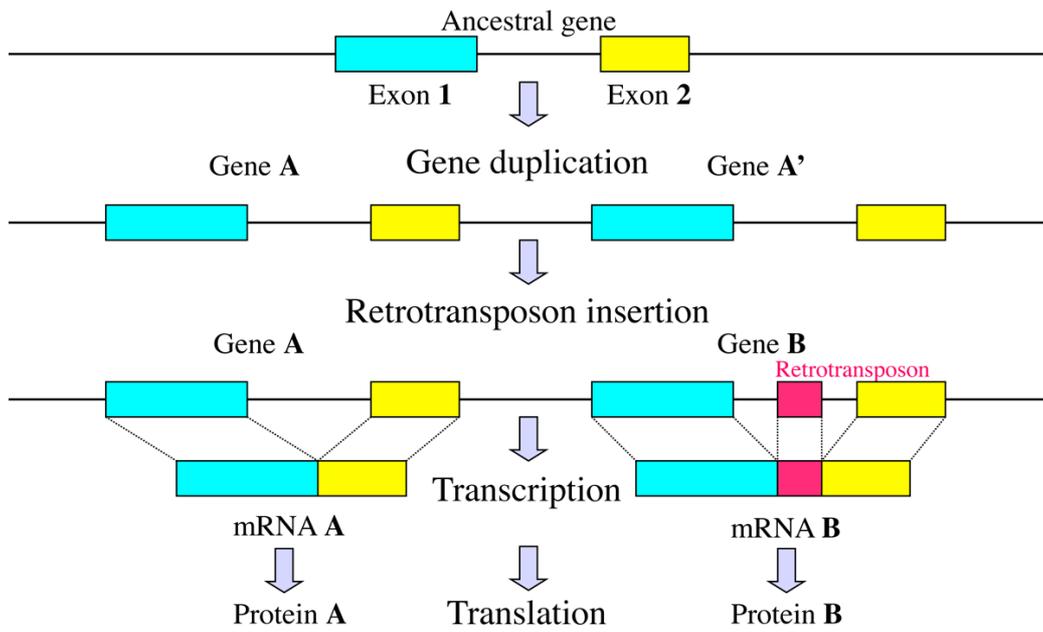


図3 遺伝子重複による新たな遺伝子の創出モデル

遺伝子の重複とレトロトランスポゾンの挿入により新たな遺伝子が生み出され、その遺伝子産物であるタンパク質が異なる機能を獲得することにより、先祖型遺伝子とともにその側系遺伝子が新たな機能遺伝子として誕生する。

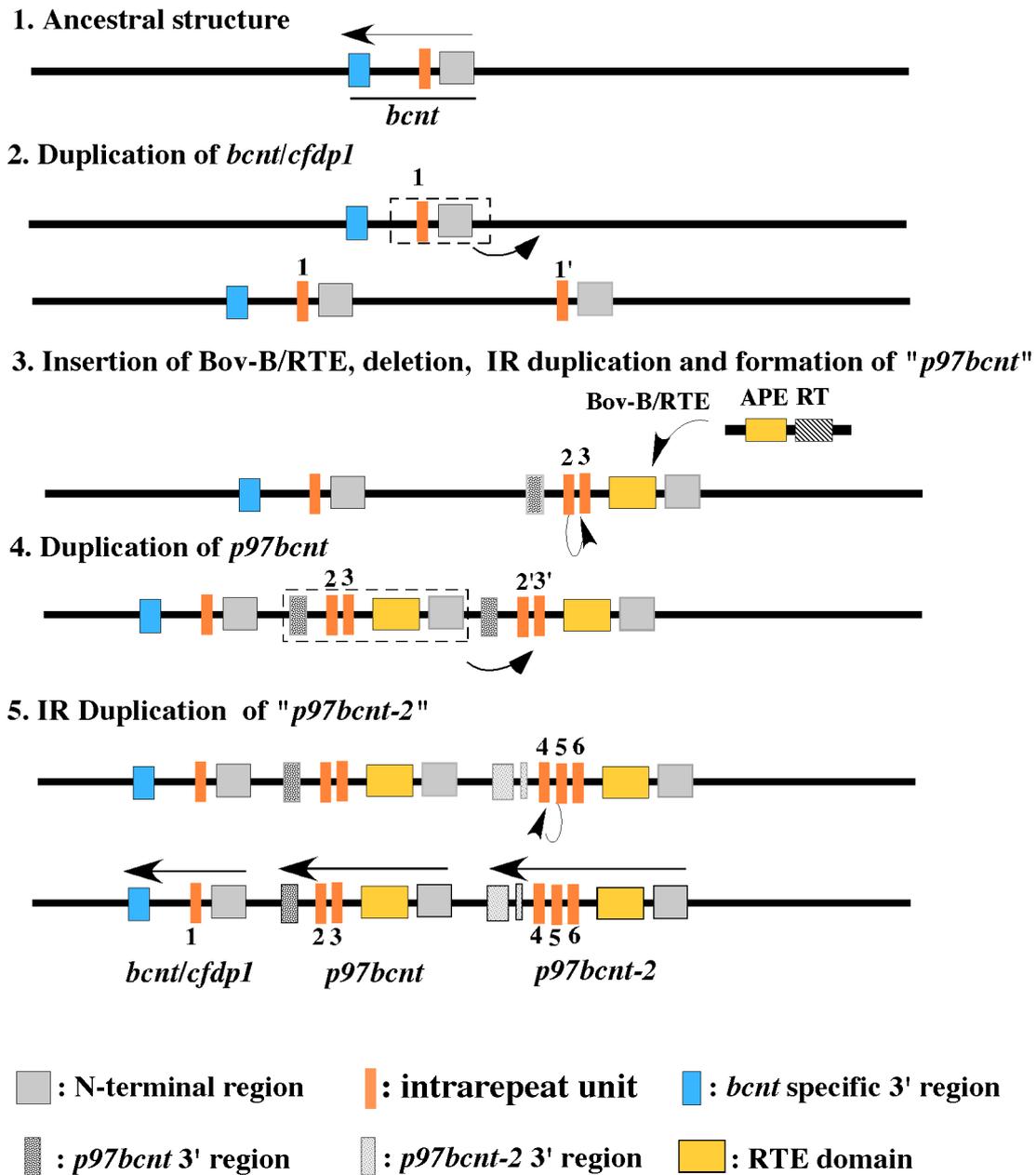


図4 遺伝子重複によるウシBcntファミリー遺伝子の創出モデル

(1) 先祖型Bcnt遺伝子。(2) 先祖型Bcnt遺伝子のエクソン1~5が同一染色体の近隣に直列重複。(3) エクソン5のさらなる重複と反芻動物特異的レトロトランスポゾン (Bov-B/RTE; Bovine-B / Retrotransposable element) の脱プリン-脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ領域の挿入によりp97Bcntが生み出される。(4) p97Bcnt遺伝子の重複。(5) 分子内繰返し配列 (intramolecular repeat unit) の重複。

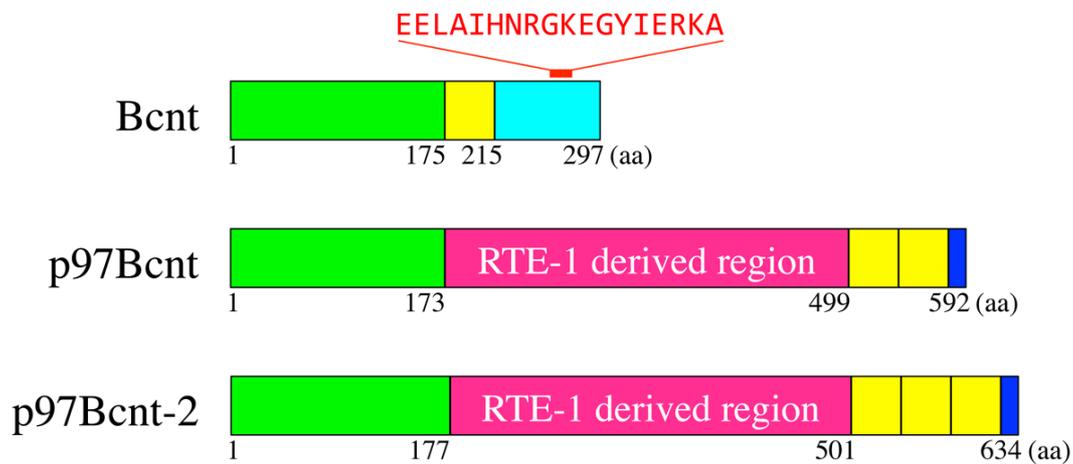


図5 ウシBcntファミリータンパク質の構造

先祖型Bcntタンパク質は、175アミノ酸のN末端領域と40アミノ酸の分子内繰返し配列、82アミノ酸のC末端領域から成る（上図）。p97Bcntタンパク質は、173アミノ酸のN末端領域と326アミノ酸のレトロトランスポゾン由来領域、2つの40アミノ酸の分子内繰返し配列、13アミノ酸のC末端領域から成る（中図）。p97Bcnt-2タンパク質は、177アミノ酸のN末端領域と324アミノ酸のレトロトランスポゾン由来領域、3つの40アミノ酸の分子内繰返し配列、13アミノ酸のC末端領域から成る（中図）。Bcntタンパク質のC末端領域は、種間で非常に良く保存されており、この中の赤線と赤字で示す18個のアミノ酸残基（EELAIHNRGKEGYIERKA）の合成ペプチドを抗原として、モルモットを用いて抗BCNT-C抗体を作製した（抗BCNT-C抗体）。

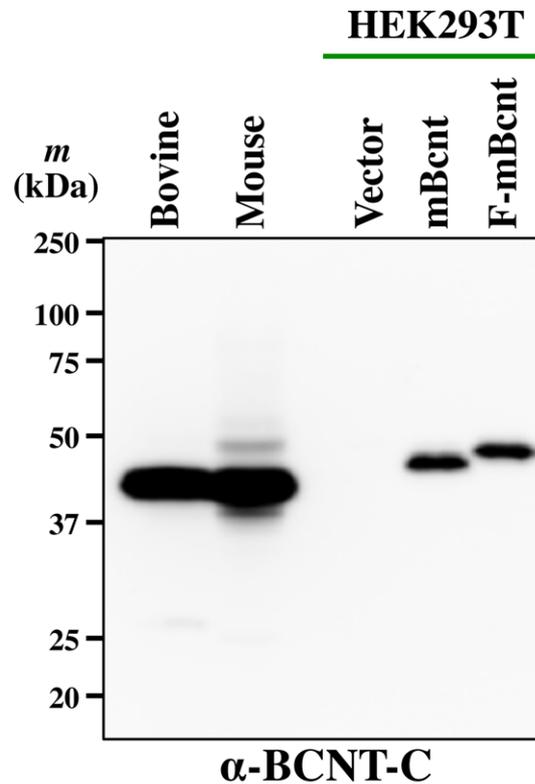


図6 抗BCNT-Cポリクローナル抗体のWestern blottingによる評価

ウシ (Bovine)、マウス (Mouse) 脳抽出物、発現ベクターのみ (Vector) およびマウスBcnt (mBcnt)、Flag-tag標識マウスBcnt (F-mBcnt) を強制発現させたHEK293T細胞の抽出物を用いて、化学発光法によるWestern blottingにより抗BCNT-C抗体の特異性を評価した。抗BCNT-C抗体は、タグの有無にかかわらず、非常に特異的な強い免疫活性で組換えBcntタンパク質を認識した。ウシ、マウス脳抽出物において45 kDa付近に非常に強い免疫活性が認められた。このバンドは43/45 kDaの二本のバンドとして検出された (補足図1も参照)。

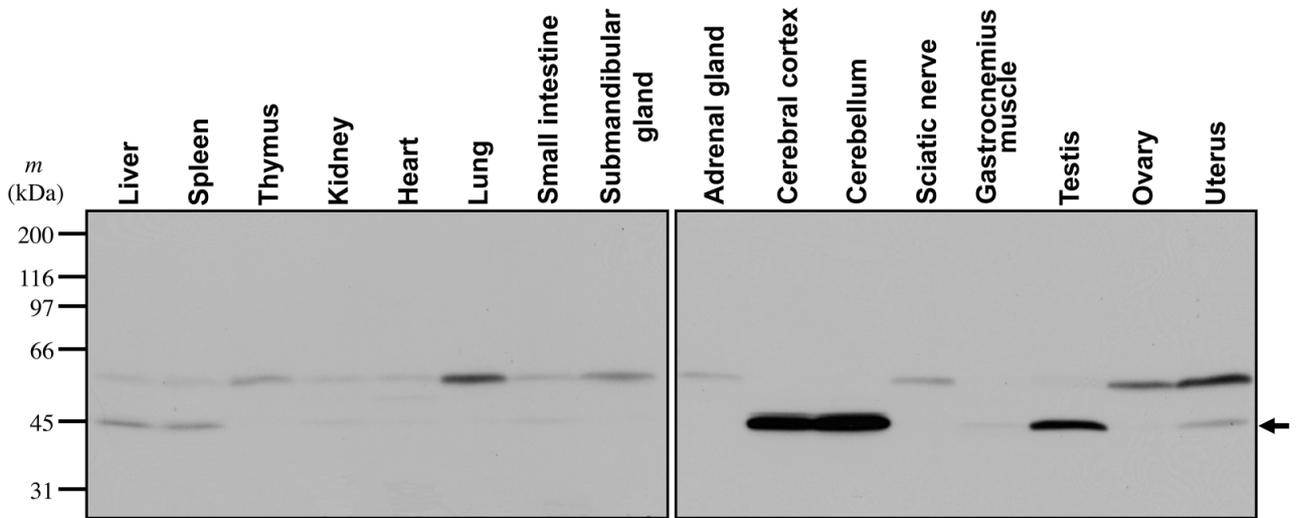


図7 ラット全身臓器抽出物の抗BCNT-C抗体によるWestern blotting

ラット全身臓器における抗BCNT-C抗体の免疫活性を、化学発光法によるWestern blottingにより調べた。抗BCNT-C抗体の免疫活性は、他の臓器に比べ、脳と精巣で非常に強く発現していた。60 kDa相当に見られるシグナルは、抗原ペプチドによる吸収実験でも見られる二次抗体による非特異的シグナルである。

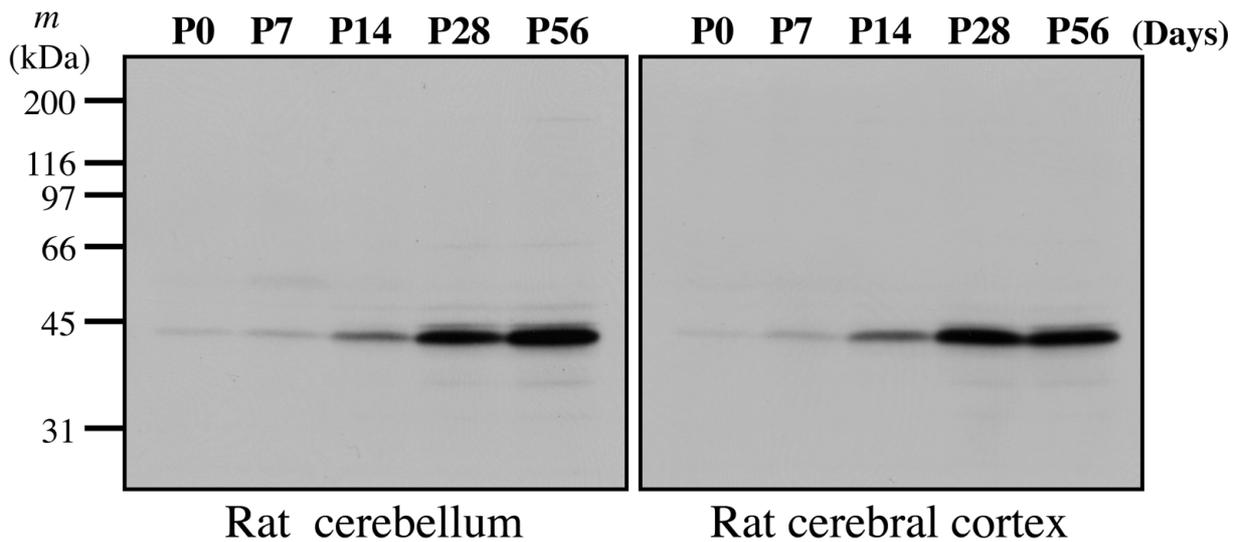


図8 ラット脳の生後発達過程における抗BCNT-C抗体による発現解析

生後0、7、14、28、56日齢のラット大脳と小脳の抗BCNT-C抗体を用いた化学発光法によるWestern blottingにより、生後発達過程におけるBcntの発現変動を調べた。ラット大脳と小脳では生後発達に伴って抗BCNT-C抗体の免疫活性が増大していた。図の上部の数字は生後日数を示す。

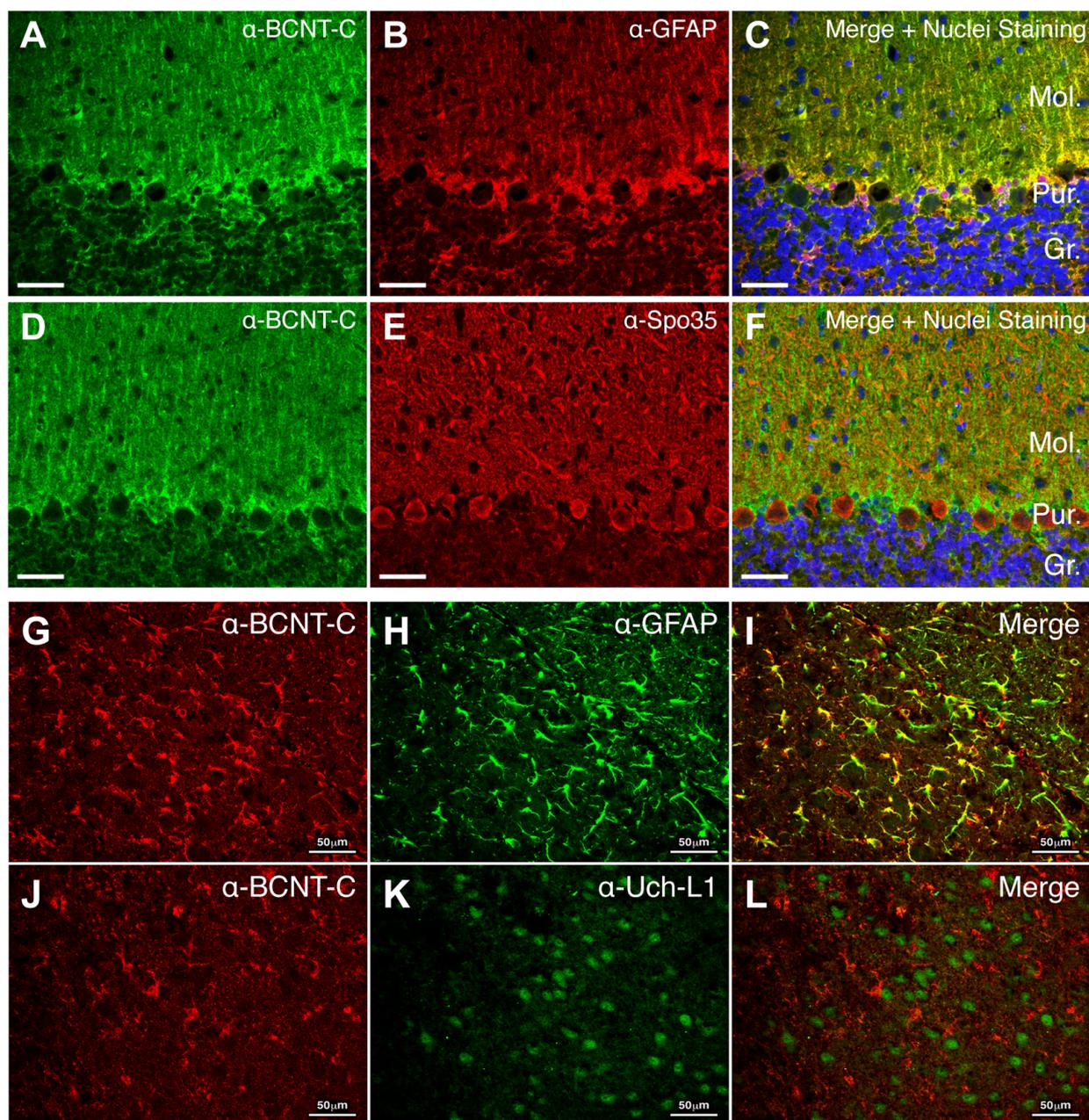


図9 ラット小脳とヤギ線条体の抗BCNT-C抗体による免疫組織学的解析

ラット小脳において、抗BCNT-C抗体（A、D；緑）とアストロサイトとプルキンエ神経細胞のマーカであるGFAP（B；赤）またはSpot35（Calbindin）（E；赤）に対する抗体との二重染色の結果（C、F）、抗BCNT-C抗体の免疫活性は、神経細胞ではなくアストロサイトの細胞質と突起に主に局在していた。青色はTO-PRO-3により染色した核を示す。ヤギ線条体では、抗BCNT-C抗体（G、J；赤）とアストロサイトと神経細胞のマーカであるGFAP（H；緑）とUch-L1（K；緑）に対する抗体との二重染色の結果（I、L）、ラット小脳と同様に、抗BCNT-C抗体の免疫活性は、アストロサイトの細胞質と突起に主に局在していた。スケールバーはそれぞれ50 μmを示す。

Mol.; Molecular layer、Pur.; Purkinje layer、Gr.; Granular cell layer

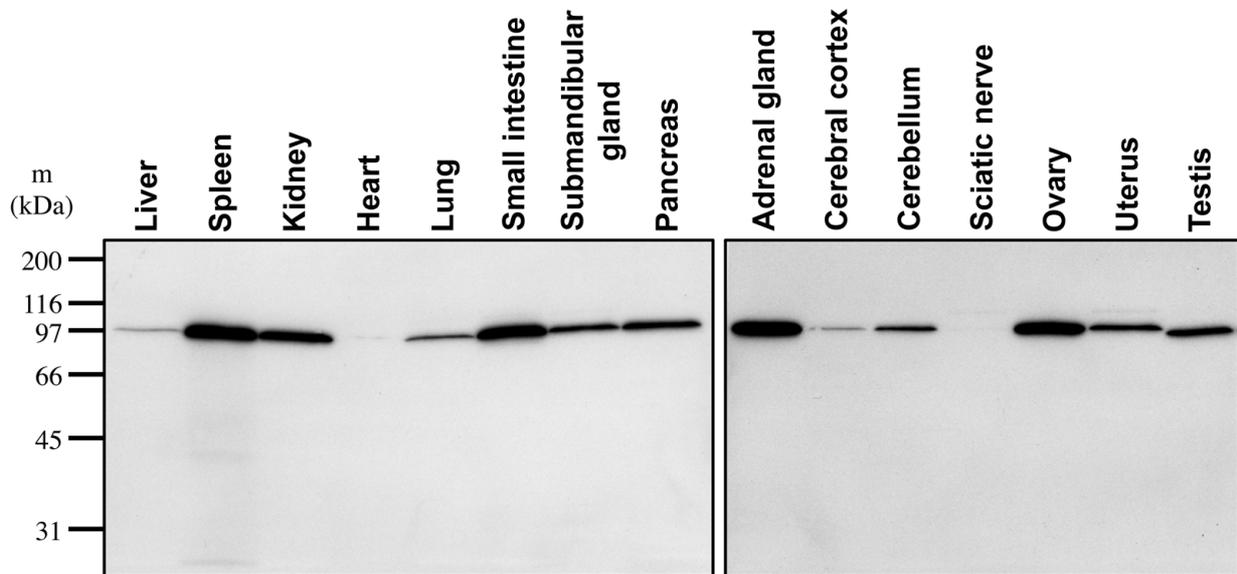


図10 ヤギ全身臓器抽出物の抗p97Bcnt抗体によるWestern blotting

抗p97Bcnt抗体を用いた成獣ヤギの全身臓器抽出物のWestern blottingを化学発光法により行った結果、多くの臓器で97 kDa相当に非常に特異的なシグナルが検出された。特に脾臓、小腸、副腎、卵巣で強い免疫活性が観察された。

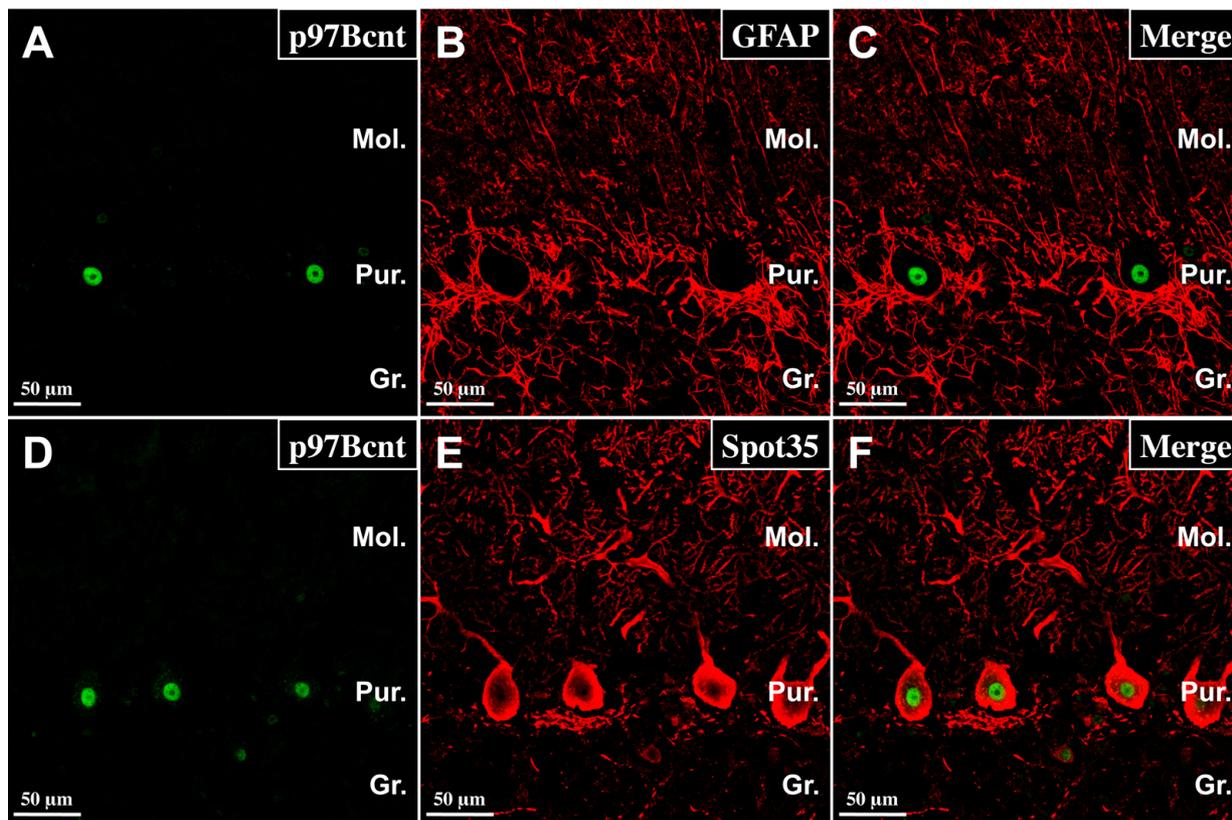


図11 ヤギ小脳の抗p97Bcnt抗体による免疫組織学的解析

抗p97Bcnt抗体 (A、D ; 緑) とアストロサイトとプルキンエ神経細胞のマーカであるGFAP (B ; 赤) とSpot35 (Calbindin) (E ; 赤) に対する抗体との二重染色の結果 (C、F)、抗p97Bcnt抗体の免疫活性は、神経細胞の核に特異的に局在していた。スケールバーはそれぞれ50 μmを示す。

Mol.; Molecular layer、Pur.; Purkinje layer、Gr.; Granular cell layer

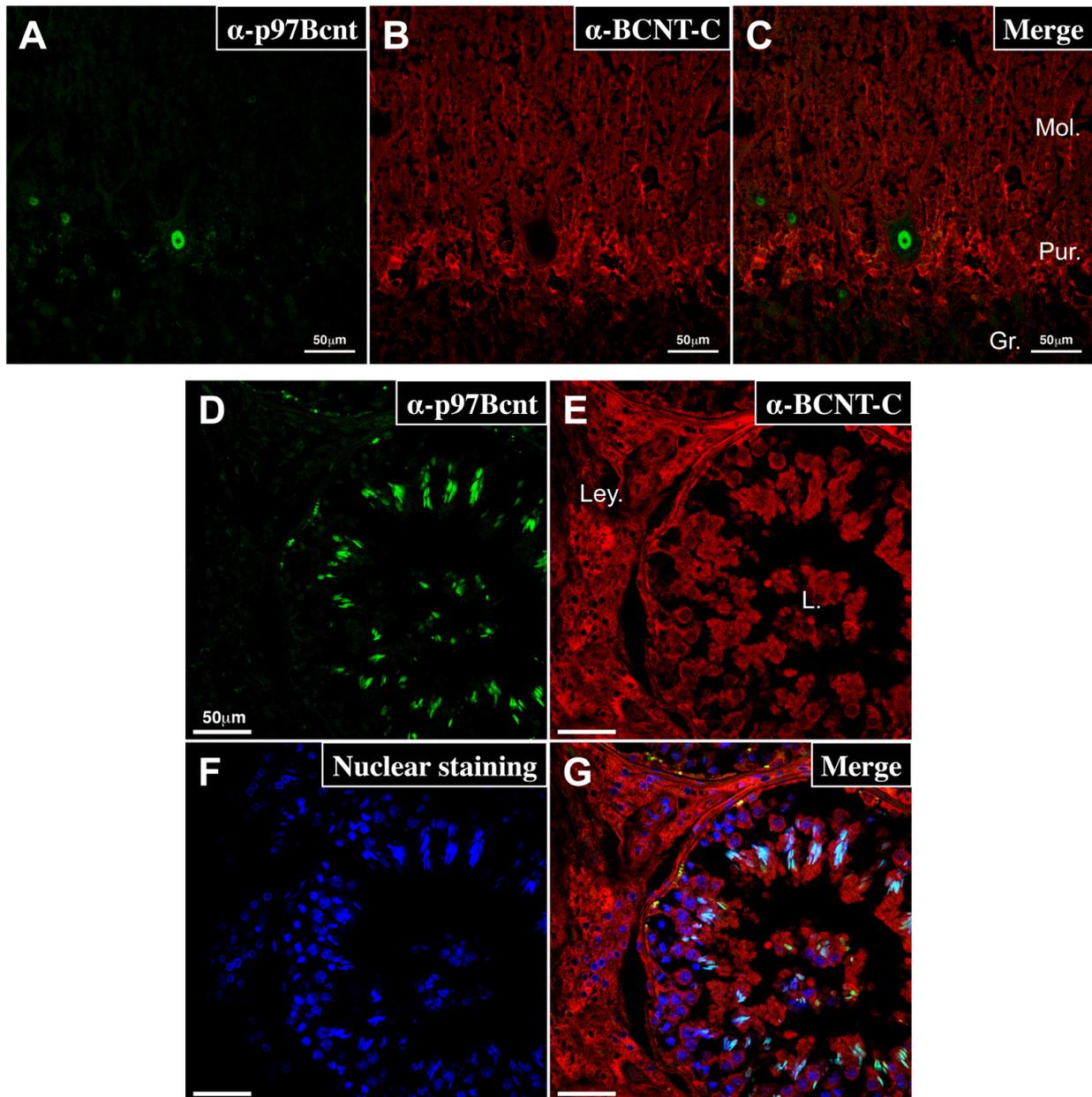


図12 ヤギ小脳とウシ精巣の抗BCNT-C抗体と抗p97Bcnt抗体による免疫組織学的解析

ヤギ小脳では、抗p97Bcnt抗体 (A ; 緑) と抗BCNT-C抗体 (B ; 赤) の免疫活性は全く重ならず (C)、図9と図11と同様に、それぞれアストロサイトの細胞質と神経細胞の核に局在していた。ウシ精巣では、抗p97Bcnt抗体の免疫活性 (D ; 緑) は、精細管の中心部に見られる成熟した精子の核に主に局在しており、抗BCNT-C抗体の免疫活性 (E ; 赤) は、精細管の間質に存在するライディッヒ細胞に主に局在していた。TO-PRO-3により染色された核を青色で示す (F ; 青)。これらの結果は、抗BCNT-C抗体と抗p97Bcnt抗体の免疫活性の局在が明らかに異なっていることを示している (G)。スケールバーはそれぞれ50 μm を示す。

Mol.; Molecular layer、Pur.; Purkinje layer、Gr.; Granular cell layer、L.; Lumen of seminiferous tubule、Ley.; Leydig cells

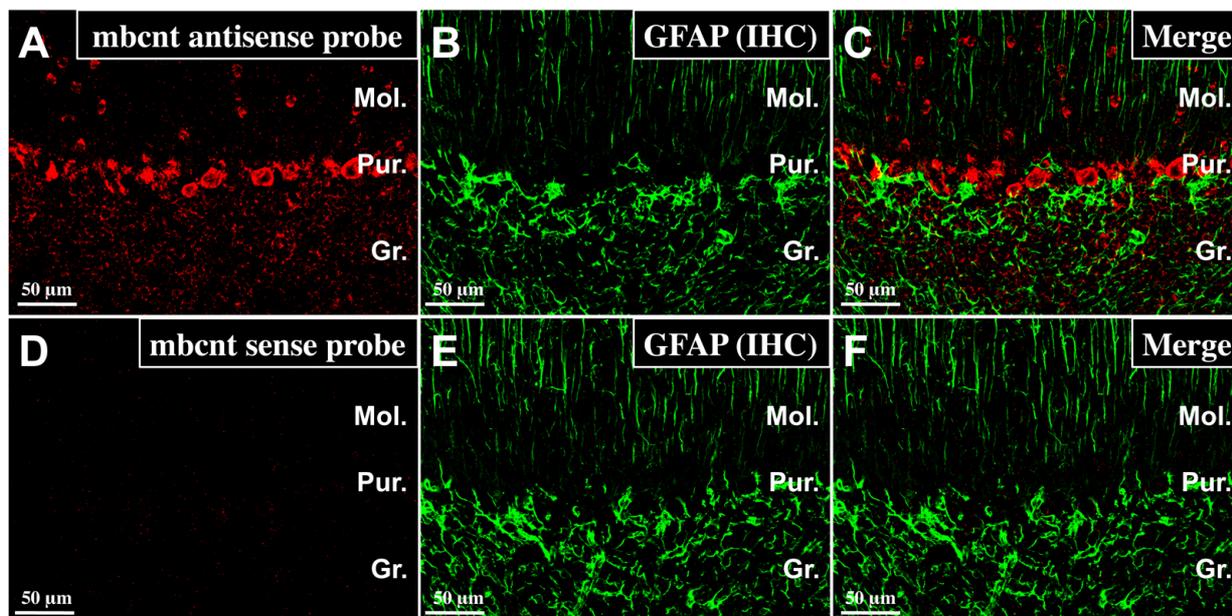


図13 マウス小脳における*in situ hybridization*によるBcnt mRNAの検出

DIG標識RNAプローブを用いた*in situ hybridization*において、マウスBcnt mRNAの相補的配列であるアンチセンスプローブでは、明瞭なシグナルが認められた (A; 赤)。一方、マウスBcnt mRNAと相同配列であるセンスプローブでは全くシグナルが検出されなかった (D; 赤)。それぞれをアストロサイトのマーカーであるGFAPに対する抗体を用いて二重染色した結果 (C, F)、アンチセンスプローブで見られたシグナルは神経細胞の細胞質に局在していることが明らかとなった。スケールバーはそれぞれ50 μmを示す。

Mol.; Molecular layer、Pur.; Purkinje layer、Gr.; Granular cell layer

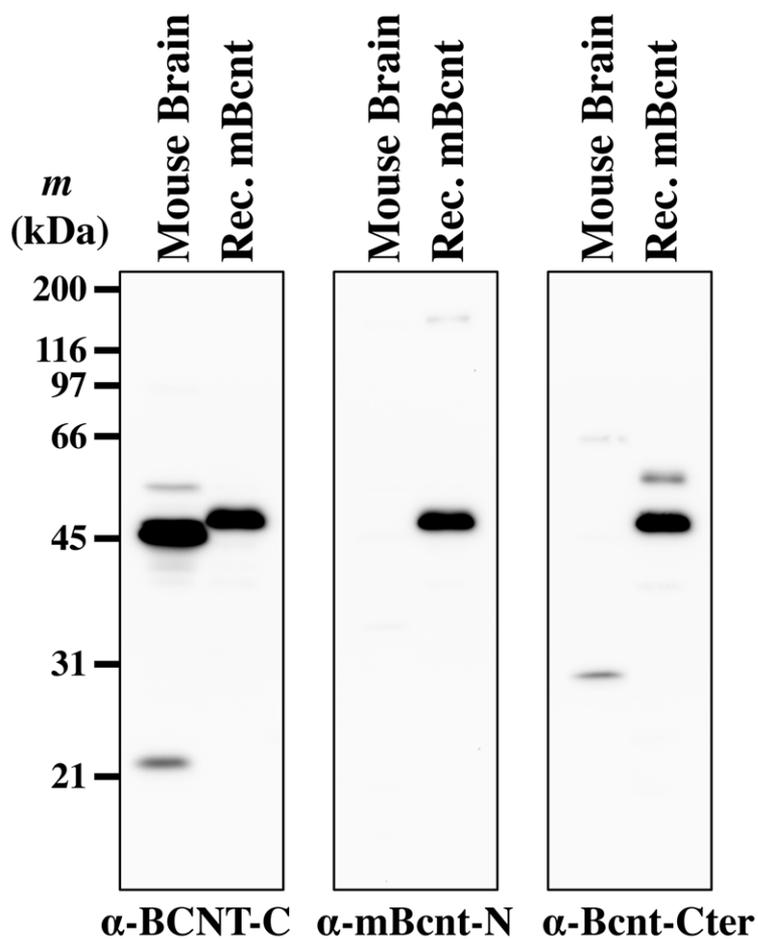


図14 抗原の異なる3種類の抗Bcnt抗体のWestern blottingでの反応性の比較

各レーンの上を示すようにマウス脳 (Mouse Brain) およびマウスBcnt発現ベクターをトランスフェクションしたHEK293T細胞の抽出物 (Rec. mBcnt) をSDS-PAGEで分離し、各図の下部に示すようにポリクローナル抗BCNT-C抗体、抗マウスBcnt-N抗体、抗BCNT-Cter抗体によってWestern blottingを行い、化学発光法により検出した。組換えマウスBcntは全ての抗体で検出されるのに対し、マウス脳抽出物での強い45 kDa 相当のシグナルは抗BCNT-C 抗体でのみ検出された。

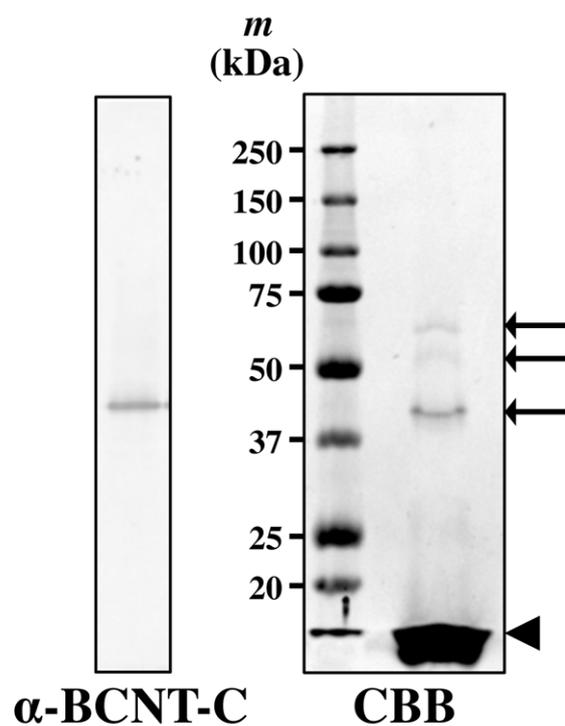


図15 ウシ脳抽出物から単離・精製された抗BCNT-C抗体の交差反応物

抗BCNT-C抗体と交差反応する43 kDaのタンパク質はウシ脳から単離した（補足の実験材料・方法および補足図3を参照）。抗BCNT-C抗体を結合したアガロースから、比色法で最も強い陽性反応を示した溶出分画（左図は代表的な分画を示す）を集めてアセトン沈降し、SDS-PAGEで分離した後、CBBで染色した（右図）。CBB染色で検出されたバンドを矢印で示す。図の下部の鏃は、溶出に用いた抗原ペプチドを示す。

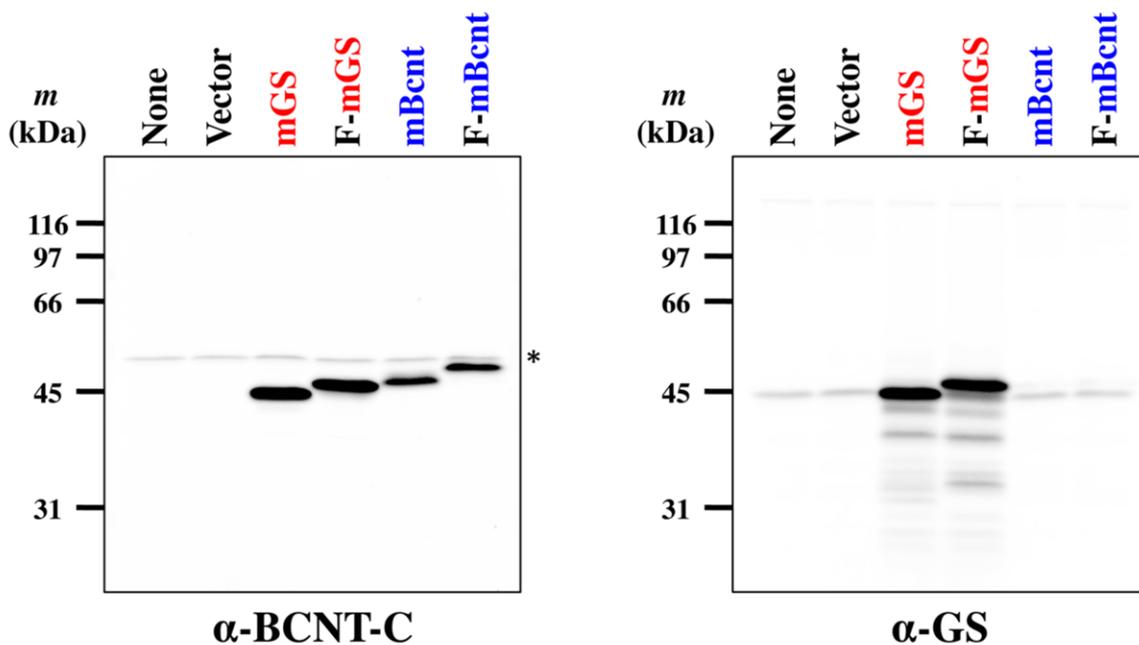


図16 抗BCNT-C抗体と組換えGSの交差反応性のWestern blottingによる確認

Flag-tag標識または標識なしのマウスGS (F-mGS、mGS)、マウスBcnt (F-mBcnt、mBcnt) を強制発現させたHEK239T細胞の抽出物を用いて、抗BCNT-C抗体 (左図) および抗GS 抗体 (右図) の二重プロービングによるWestern blottingを行った。どちらのシグナルも蛍光法で検出した。NoneおよびVectorはそれぞれプラスミドなしの溶媒のみ、導入遺伝子なしの空ベクターでトランスフェクションした試料を示す。アステリスクは非特異バンドを示す。

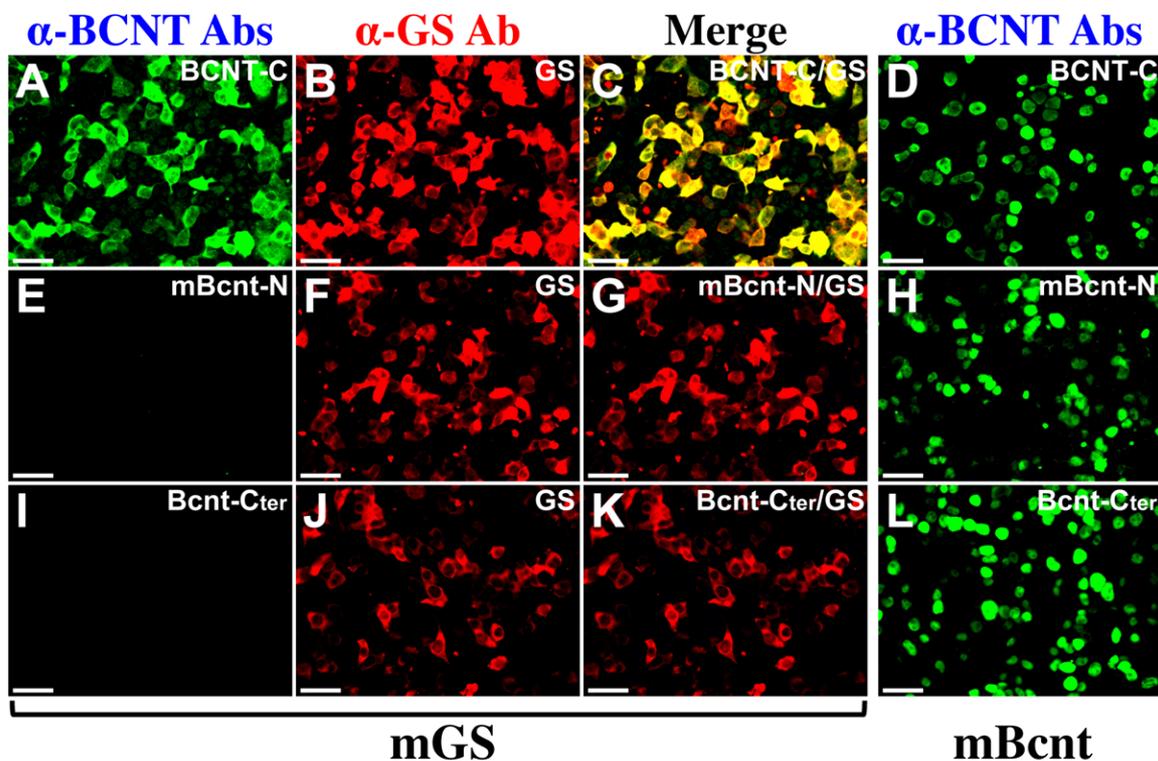


図17 細胞免疫染色による抗BCNT-C抗体と組換えGSの交差反応性の検討

マウスGSをコードする発現ベクター (A-C、E-G、I-K)、またはマウスBcntをコードする発現ベクター (D、H、L) をトランスフェクションしたHEK239T細胞を、抗BCNT-C抗体 (A、D)、抗マウスBcnt-N抗体 (E、H)、抗BCNT-Cter抗体 (I、L)、または抗GS抗体 (B、F、J) で免疫染色した。C、G、およびKはそれぞれAとB、EとF、およびIとJを重ね合わせた図である。スケールバーは50 μm を示す。

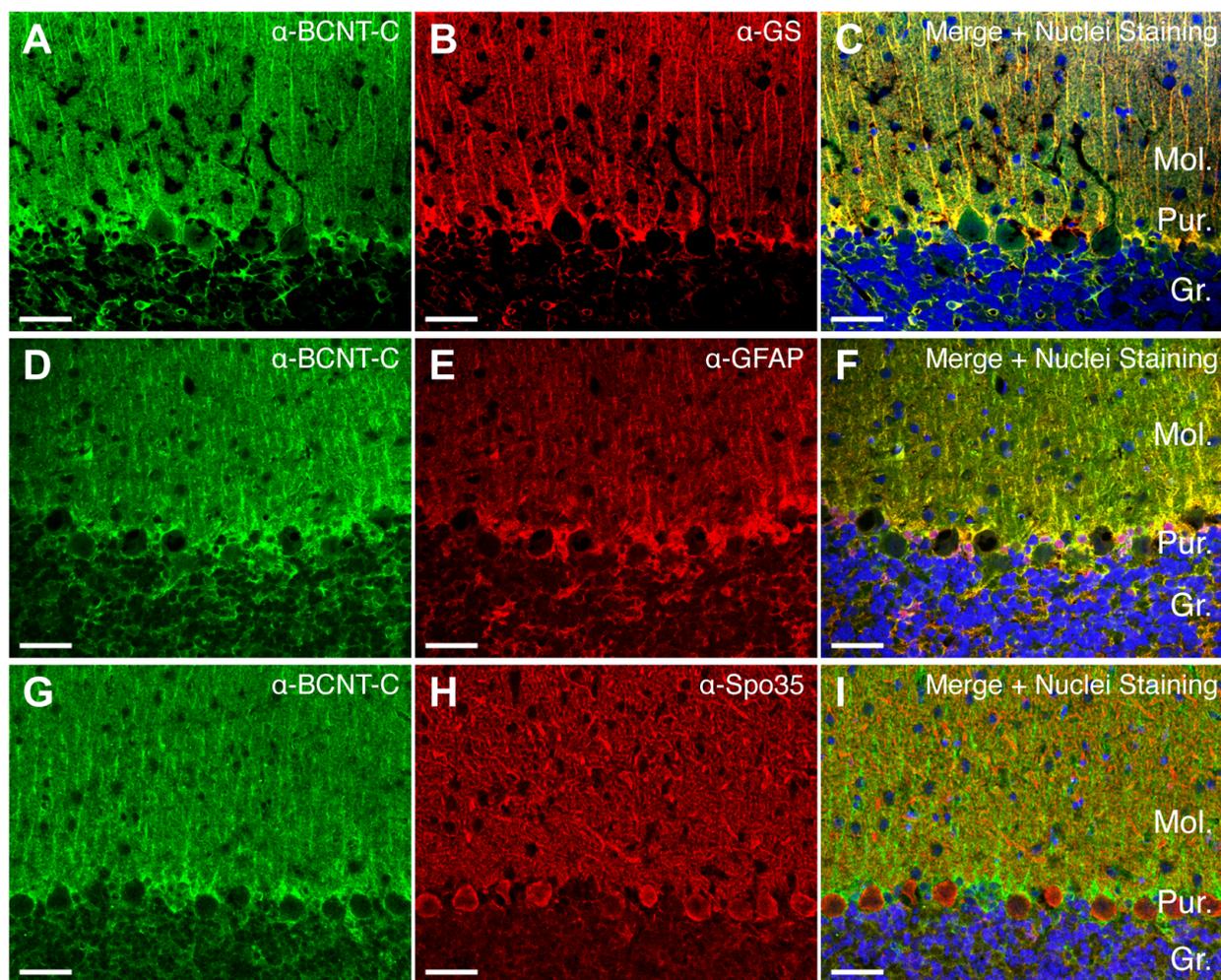


図18 ラット小脳における抗BCNT-C抗体と抗GS抗体の免疫活性の比較

緑色、赤色蛍光はそれぞれ、抗BCNT-C抗体 (A、D、G)、抗GS抗体 (B)、抗GFAP抗体 (E)、または抗Spot35 (Calbindin-D28K) 抗体 (H) による免疫活性を示す。C、F、およびIは、両方の蛍光の重ね合わせ画像である。青色の蛍光は、TO-PRO-3による核染色を示す。GFAPとSpot35はそれぞれ、アストロサイトとプルキンエ細胞のマーカーとして用いた。抗BCNT-C抗体による免疫活性は、GSとGFAP免疫活性と共存するが、Spot35免疫活性とは共存しなかった。スケールバーは50 μm を示す。

Mol.; Molecular layer、Pur.; Purkinje layer、Gr.; Granular cell layer

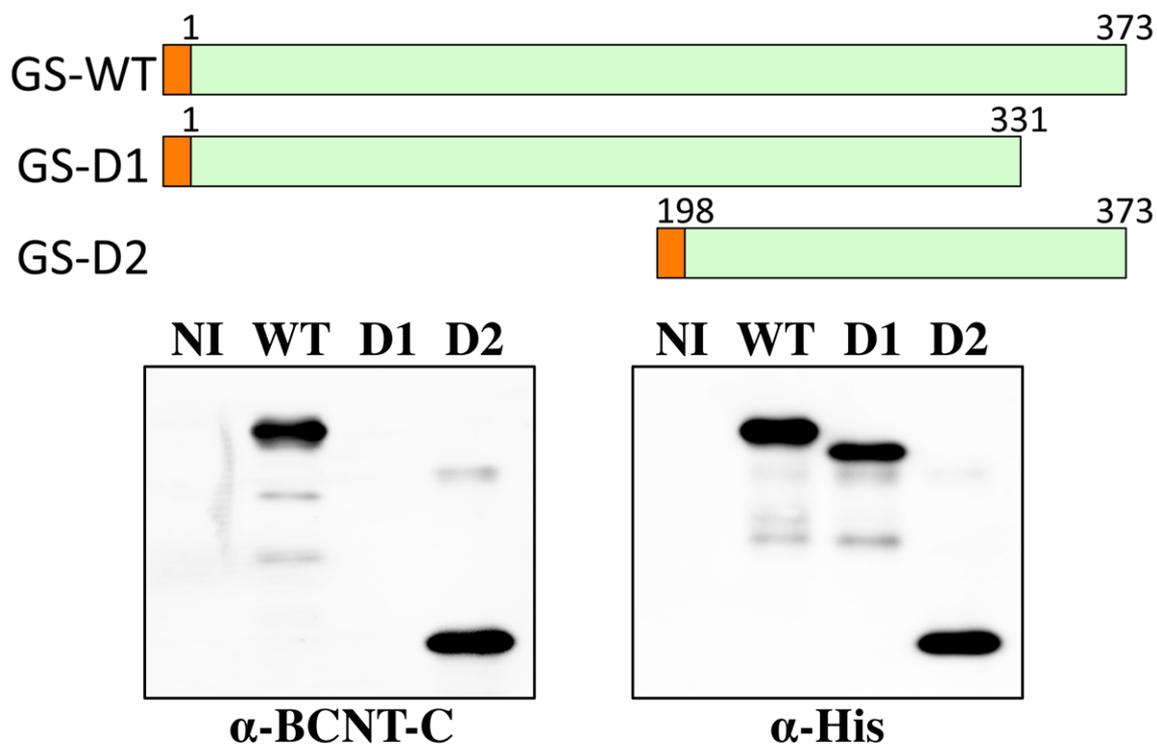


図19 GS欠損変異体を用いた抗BCNT-C抗体のエピトープ検索

上図：全長マウスGS (GS-WT)、その欠損変異体2つ (GS-D1、GS-D2) の模式的構造を示す。オレンジ、緑のボックスはそれぞれ、His-tag、GSのアミノ酸配列を示す。各ボックスの上の数字はコード領域を構成するアミノ酸の番号を示す。下図：GS-WT (WT)、GS-D1 (D1) またはGS-D2 (D2) を強制発現させた大腸菌、発現ベクターを含まない大腸菌 (NI) の抽出物を用いた抗BCNT-C抗体によるWestern blottingを行い、蛍光法により検出した (下左図)。用いたGS変異体の量を確認するために、メンブレンは抗His-tag抗体でリプロービングし、化学発光法により検出した (下右図)。

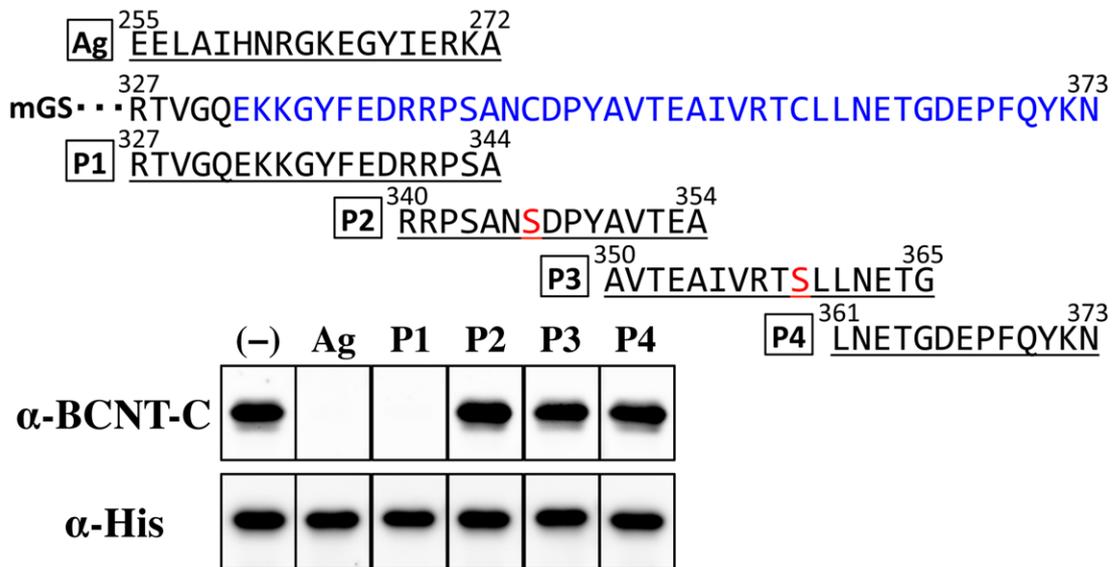


図20 GSのC末端領域由来ペプチドを用いた競合実験によるエピトープ検索

上図：上から、抗BCNT-C抗体を作成するために用いた抗原ペプチド (Ag)、マウスGSのC末端領域、競合実験に用いた4つのペプチド断片 (P1-P4) のアミノ酸配列を示す。ダイマー形成を回避するために、GSペプチドの2つのシステイン残基はセリン (赤) に置換した。下図：野生型マウスGSを強制発現させた大腸菌の抽出物をSDS-PAGEで分離し、メンブレンへ転写後、メンブレンを短冊状に切断した。各レーンの上を示すように、あらかじめ5 μ Mの抗原 (Ag)、各GSペプチド (P1-P4) あるいは陰性対照 (-) としてDMSOと反応させた抗BCNT-C抗体を用いてWestern blottingを行い、蛍光法により検出した (下図)。各レーンのGS量の同等性を確認するために、抗His-tag 抗体を図19と同様に用い、化学発光法により検出した。

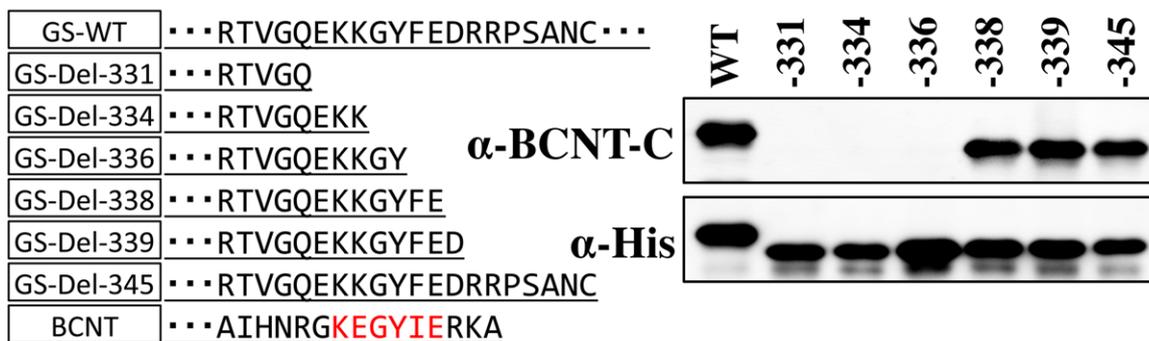


図21 GSのC末端領域の段階的な欠損変異体を用いたエピトープ検索

野生型マウスGS (GS-WT)、6つのGS欠損変異体を強制発現させた大腸菌の抽出物を用い、抗BCNT-C抗体によりWestern blottingを行い、蛍光法により検出した。抗His-tag抗体は図19と同様に用い、化学発光法により検出した。抗BCNT-C抗体の免疫活性は、339番目以降のGS欠損変異体 (-338) では見られるが、337番目以降のGS欠損変異体 (-336) では検出されなかった。赤字は、抗BCNT-C抗体を作製するために用いた抗原ペプチド中の、GSのP1ペプチド配列中の『KKG YFE』と類似したアミノ酸配列。右図の上部の数字は、欠損変異体のC末端のアミノ酸の、野生型GSの翻訳開始メチオニンからの数を示す。

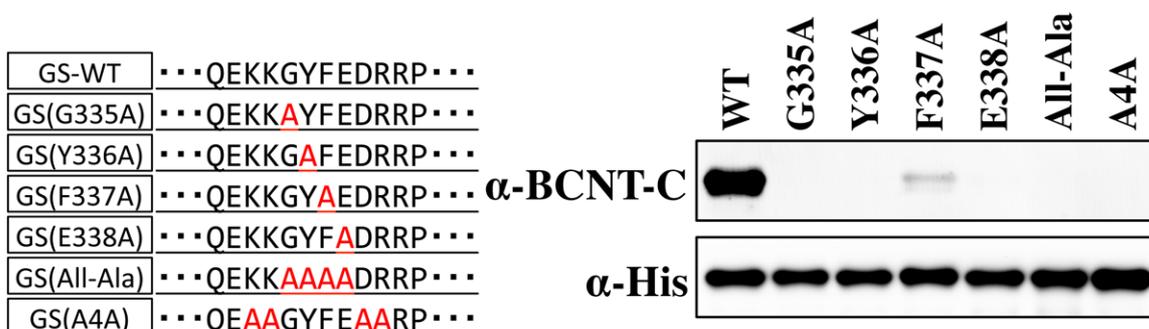
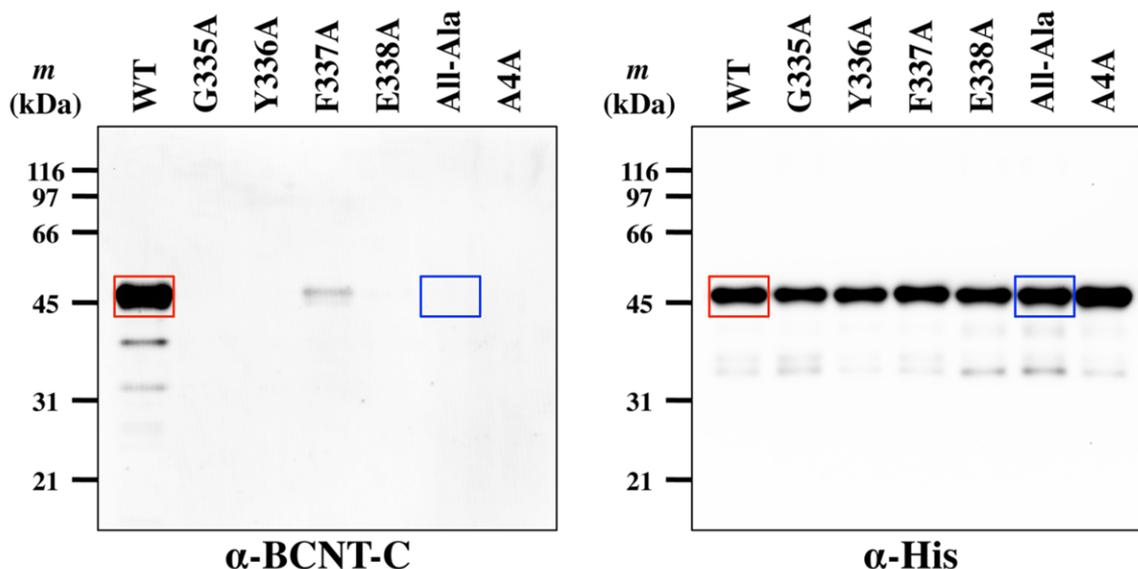


図22 GSのアラニン置換変異体を用いたエピトープの検証

野生型マウスGS (GS-WT)、1つまたは4つのアミノ酸をアラニン (赤字) に置換した変異体を強制発現させた大腸菌の抽出物を用い、抗BCNT-C抗体によりWestern blottingを行い、蛍光法で検出した。各レーンのGS量の同等性を確認するために、抗His-tag抗体を図19と同様に用い、化学発光法により検出した。F337A変異体で僅かなシグナルが観察されたが、それ以外のアラニン置換変異体では認められなかった。



 WT fraction was purified using a piece of the WT membrane (red box)

 All-Ala fraction was purified using a piece of the All-Ala membrane (blue box)

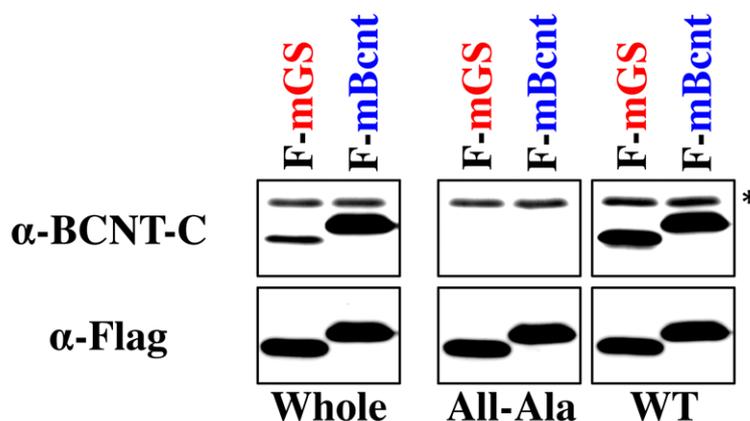
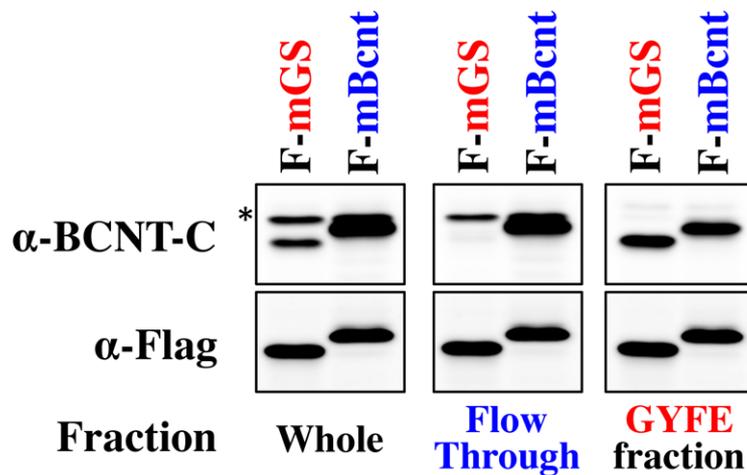


図23 GSと交差反応する抗BCNT-Cポリクローナル抗体亜集団の単離

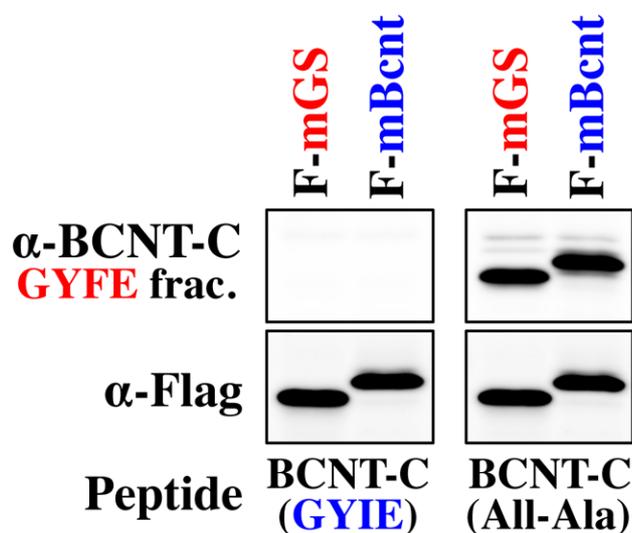
大腸菌由来のHis-tag標識マウスGS組換えタンパク質をSDS-PAGEで分離し、転写したメンブレンを用いて、GSと交差反応する抗BCNT-Cポリクローナル抗体の亜集団を単離した後、その亜集団のマウスGSとマウスBcntに対する反応性を比較した。陰性対照としてGSのAll-Ala変異体を強制発現させた大腸菌の抽出物を用いた（詳細は実験材料と方法を参照）。上のパネルの赤と青で示す囲いは、切出したメンブレンの大凡の位置を示す。Flag-mGS (F-mGS) またはFlag-mBcnt (F-mBcnt) を発現する大腸菌の抽出物は、抗Flag-tag抗体を用いて、同等の免疫活性を示すように調整し、Western blottingに用いた。その同等性を確認するために、メンブレンはまず、抗Flag-tag抗体と反応させ、蛍光法により検出した。抗体を剥離したメンブレンは、未処置の抗BCNT-Cポリクローナル抗体 (Whole) と、上述したGSのAll-Ala変異体 (All-Ala、図22を参照) または野生型 (WT) のメンブレンからアフィニティ精製した抗体亜集団を用いてリプロービングし、化学発光法により検出した。アスタリスクは非特異的なバンドを示す。



GS(332-346): CH₃CO-EKK**GYFE**DRRPSANC-COOH

図24 抗BCNT-Cポリクローナル抗体からGS由来ペプチドにより単離したGYFE fractionのBcntとGSに対する反応性

抗BCNT-Cポリクローナル抗体中の、GSのGYFEと交差反応する亜集団を、GS (332-346) ペプチド (実験材料・方法を参照) を用いたアフィニティ・カラムにより単離した。Flag-tag標識マウスGS (F-mGS) またはFlag-tag標識マウスBcnt (F-mBcnt) を強制発現させたHEK293T細胞の抽出物を、抗Flag-tag抗体に対して同等の免疫反応性を示すようにそれぞれの組換えタンパク質濃度を調整し、Western blottingに使用した。メンブレンは最初に、F-mBcntとF-mGSの量が同等であることを確認するために抗Flag-tag抗体と反応させ、蛍光法により検出した (下図)。抗体を剥がしたメンブレンを、GS (332-346) ペプチドのアフィニティ・カラムを通さなかった未処理の抗BCNT抗体 (Whole) と、カラムを通した素通り画分 (Flow Through)、アフィニティ精製抗体 (GYFE fraction) を用いてリプロービングし、化学発光法により検出した。F-mGSに対する抗BCNT-Cポリクローナル抗体の免疫活性 (Whole) は、F-mBcntの1/5程度であったが、GYFE fractionでは、F-mGSとF-mBcntに対して同等の免疫活性を示した。アステリスクは非特異反応のバンドを示す。



GYIE: NH₂-EELAIHNRGKE**GYIER**KA-NH₂
All-Ala: NH₂-EELAIHNRGKE**AAAAR**KA-NH₂

図25 BCNT由来ペプチドを用いたGYFE fractionのBcntとGSに対する交差反応性
 Flag-tag標識マウスGS (F-mGS) またはFlag-tag標識マウスBcnt (F-mBcnt) を強制発現させたHEK293T細胞の抽出物を、抗Flag-tag抗体に対して同等の免疫反応性を示すようにそれぞれの組換えタンパク質濃度を調整し、Western blottingを行った。メンブレンは最初に、F-mBcntとF-mGSの量が同等であることを確認するために抗Flag-tag抗体と反応させた(下図)。抗体を剥がした後、BCNT-Cペプチド(BCNT-C (GYIE)) または BCNT-CペプチドのGYIEを全てアラニンに置換したペプチド(BCNT-C (All-Ala)) とあらかじめ反応させたGYFE fractionを用いてリプロービングした。GYFE fractionの免疫活性は、BCNT-C (GYIE) により完全に阻害されたが、BCNT-C (All-Ala) では全く阻害されず、F-mGSとF-mBcntは同等の強さで検出された。

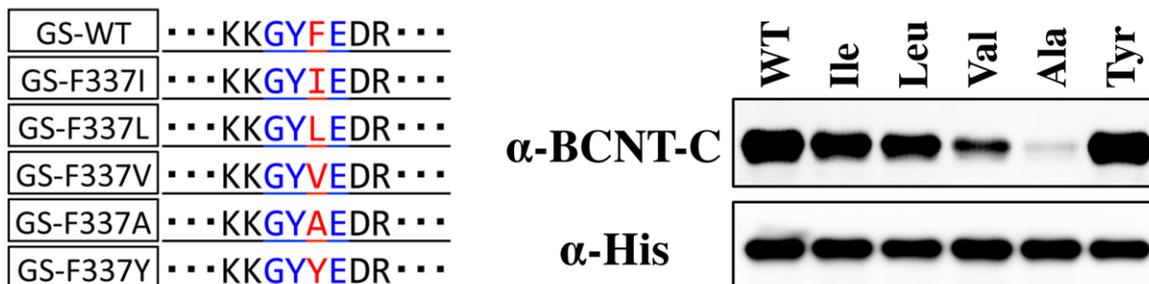


図26 GSのF337の各種変異体と抗BCNT-C抗体との交差反応性の検討

野生型GS (GS-WT)、または337番目のフェニルアラニン (F337) を、右図の各レーンの上にも示すように様々なアミノ酸に置換した変異体を強制発現させた大腸菌の抽出物を用いて、Western blottingを行った。青字はコアアミノ酸を、赤字は置換アミノ酸それぞれを示す。抗BCNT-C抗体は、各GS変異体とアミノ酸の立体化学的嵩高さに依存した交差反応性を示した。

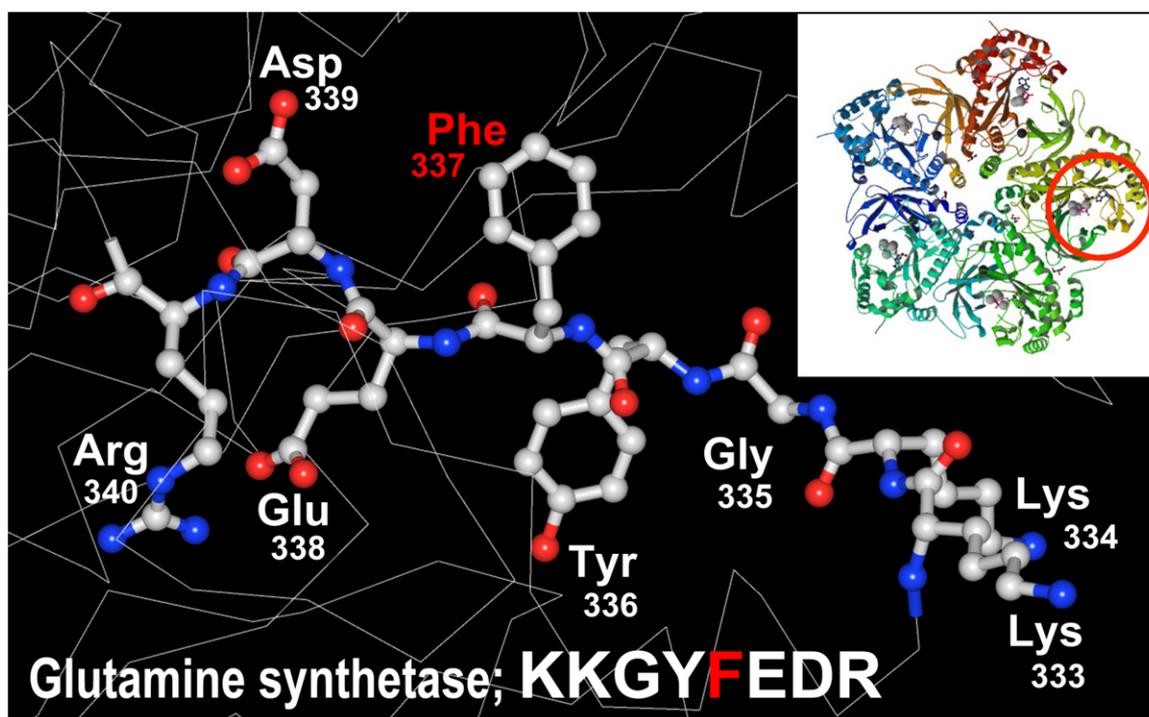


図27 抗BCNT-C抗体と交差反応を示すGSのコアアミノ酸の立体構造

ヒトGSは、環状に配したホモ5量体の2組から成る高次構造をとる。右上の挿入図 (PDB code 2OJW) は、そのうち1つの環状ホモ5量体を上から見たところを示す。赤丸は、環状ホモ5量体のうち1つのGSの中のコアアミノ酸の位置を示す。GSのコアアミノ酸を含む『KKGYFEDR』ペプチドの3次元配置図は、ヒトGSのX線結晶構造解析データ (PDB code 2OJW、文献32) に基づき、Wals (Altif Laboratories) を用いて作成した。この空間配置図は、共通エピソード領域のアミノ酸残基の空間配置を示している。

補足情報

補足表1

マウスGSおよびBcnt cDNAの増幅に用いたPCRプライマー

No.	Name	Sequence		
mGS-Fw	Full-mGS-pCold_Fw	5'-	GCCGCATATGGCCACCTCAGCAAG	-3'
mGS-Rev	Full-mGS-pCold_Rev	5'-	GCCGCTCGAGTTAGTTCTTGTATTGGAAGG	-3'
mGS2-Fw	NheI-BglII-koz-mGS_Fw	5'-	GCTAGCAGATCTGCCCATGGCCACCTCAGCAAGTTC	-3'
mGS2-Rev	mGS-XhoI-XbaI_Rev	5'-	TCTAGACTCGAGTTAGTTCTTGTATTGGAAGGGTTCGTC	-3'
F-mGS-Fw	NheI-BglII-mGS_Fw	5'-	GCTAGCAGATCTATGGCCACCTCAGCAAGTTC	-3'
F-mGS-Rev	mGS-XhoI-XbaI_Rev	5'-	TCTAGACTCGAGTTAGTTCTTGTATTGGAAGGGTTCGTC	-3'
mBcnt-Fw	SacI-BamHI-kozak-mbent Fw	5'-	GAGCTCGGATCCGCCCATGGAGGAATTCGACTCCGAAG	-3'
mBcnt-Rev	mbcnt-XhoI-XbaI_Rev	5'-	TCTAGACTCGAGTCAAGGTTTCATTTTGCTCAGCCTG	-3'
F-mBcnt-Fw	NheI-BamHI-mbent_Fw	5'-	GCTAGCGGATCCATGGAGGAATTCGACTCCGAAGAC	-3'
F-mBcnt-Rev	mbcnt-XhoI-XbaI_Rev	5'-	TCTAGACTCGAGTCAAGGTTTCATTTTGCTCAGCCTG	-3'

補足情報

補足表2

マウスGSの欠損また置換変異体の構築に用いたPCRプライマー

No.	Name	Sequence	
1-Fw	Del(1-197)_mGS-pCold_Fw	5'-	GCCGCATATGCCTGCCAGTGGGA -3'
1-Rev	Del(1-197)_mGS-pCold_Rev	5'-	GCCGCTCGAGTTAGTTCCTGTATTGGAAGG -3'
2-Fw	Del(332-373)_mGS-pCold_Fw	5'-	GTCGGCCAGTAACTCGAGGGATCCGAATTC -3'
2-Rev	Del(332-373)_mGS-pCold_Rev	5'-	CTCGAGTTACTGGCCACAGTCCGGGAATG -3'
3-Fw	Del(335-373)_mGS-pCold_Fw	5'-	CAGGAGAAGAAGTAACTCGAGGGATCCGAATTC -3'
3-Rev	Del(335-373)_mGS-pCold_Rev	5'-	CCTCGAGTTACTTCTTCTCCTGGCCGAC -3'
4-Fw	Del(337-373)_mGS-pCold_Fw	5'-	GAAGGGCTACTAACTCGAGGGATCCGAATTC -3'
4-Rev	Del(337-373)_mGS-pCold_Rev	5'-	CCTCGAGTTAGTAGCCCTTCTTCTCCTGG -3'
5-Fw	Del(339-373)_mGS-pCold_Fw	5'-	GGCTACTTTGAATAACTCGAGGGATCCGAATTC -3'
5-Rev	Del(339-373)_mGS-pCold_Rev	5'-	CCTCGAGTTATTCAAAGTAGCCCTTCTTCTCC -3'
6-Fw	Del(340-373)_mGS-pCold_Fw	5'-	CTTTGAAGACTAACTCGAGGGATCCGAATTC -3'
6-Rev	Del(340-373)_mGS-pCold_Rev	5'-	CCTCGAGTTAGTCTTCAAAGTAGCCCTTCTTC -3'
7-Fw	Del(346-373)_mGS-pCold_Fw	5'-	CTGCCAATTAACTCGAGGGATCCGAATTC -3'
7-Rev	Del(346-373)_mGS-pCold_Rev	5'-	CTCGAGTTAATTGGCAGAAGGCCGACG -3'
8-Fw	Ala(G335A)_mGS-pCold_Fw	5'-	GAGAAGAAGGCCTACTTTGAAGACCGTCGGCCTTC -3'
8-Rev	Ala(G335A)_mGS-pCold_Rev	5'-	TTCAAAGTAGCCCTTCTTCTCCTGGCCGACAG -3'
9-Fw	Ala(Y336A)_mGS-pCold_Fw	5'-	AAGGGCGCCTTTGAAGACCGTCGGCCTTC -3'
9-Rev	Ala(Y336A)_mGS-pCold_Rev	5'-	TCAAAGGCCTTCTTCTCCTGGCC -3'
10-Fw	Ala(F337A)_mGS-pCold_Fw	5'-	AGGGCTACGCAGAAGACCGTCGGCCTTCTG -3'
10-Rev	Ala(F337A)_mGS-pCold_Rev	5'-	GTCTTCTGCGTAGCCCTTCTTCTCCTGGC -3'
11-Fw	Ala(E338A)_mGS-pCold_Fw	5'-	GCTACTTTGCAGACCGTCGGCCTTCTGC -3'
11-Rev	Ala(E338A)_mGS-pCold_Rev	5'-	GACGGTCTGCAAAGTAGCCCTTCTTCTCCTGG -3'
12-Fw	All-Ala(335ALL338)_mGS-pCold_Fw	5'-	GGCCGCCGACGAGACCGTCGGCCTTCTGCAATTG -3'
12-Rev	All-Ala(335ALL338)_mGS-pCold_Rev	5'-	CTGCTGCGGGCCTTCTTCTCCTGGCCGACAGTCCG -3'
13-Fw	A4(AAGYFEAA)_mGS-pCold_Fw	5'-	GCAGCAGGCTACTTTGAAGCCGACGGCCTTCTGCAATTGTGACCCCTATGC -3'
13-Rev	A4(AAGYFEAA)_mGS-pCold_Rev	5'-	TGCGGCTTCAAAGTAGCCTGCTGCTCCTGGCCGACAGTCCGGGAATG -3'
14-Fw	Ile(F337I)_mGS-pCold_Fw	5'-	AGGGCTACATTGAAGACCGTCGGCCTTC -3'
14-Rev	Ile(F337I)_mGS-pCold_Rev	5'-	GGTCTTCAATGTAGCCCTTCTTCTCCTGGC -3'
15-Fw	Leu(F337L)_mGS-pCold_Fw	5'-	GGCTACCTGGAAGACCGTCGGCCTTCTG -3'
15-Rev	Leu(F337L)_mGS-pCold_Rev	5'-	GGTCTTCCAGGTAGCCCTTCTTCTCCTGGC -3'
16-Fw	Val(F337V)_mGS-pCold_Fw	5'-	GGCTACGTTGAAGACCGTCGGCCTTCTG -3'
16-Rev	Val(F337V)_mGS-pCold_Rev	5'-	GGTCTTCAACGTAGCCCTTCTTCTCCTGGC -3'
17-Fw	Tyr(F337Y)_mGS-pCold_Fw	5'-	GGCTACTATGAAGACCGTCGGCCTTCTG -3'
17-Rev	Tyr(F337Y)_mGS-pCold_Rev	5'-	GGTCTTCATAGTAGCCCTTCTTCTCCTGGC -3'

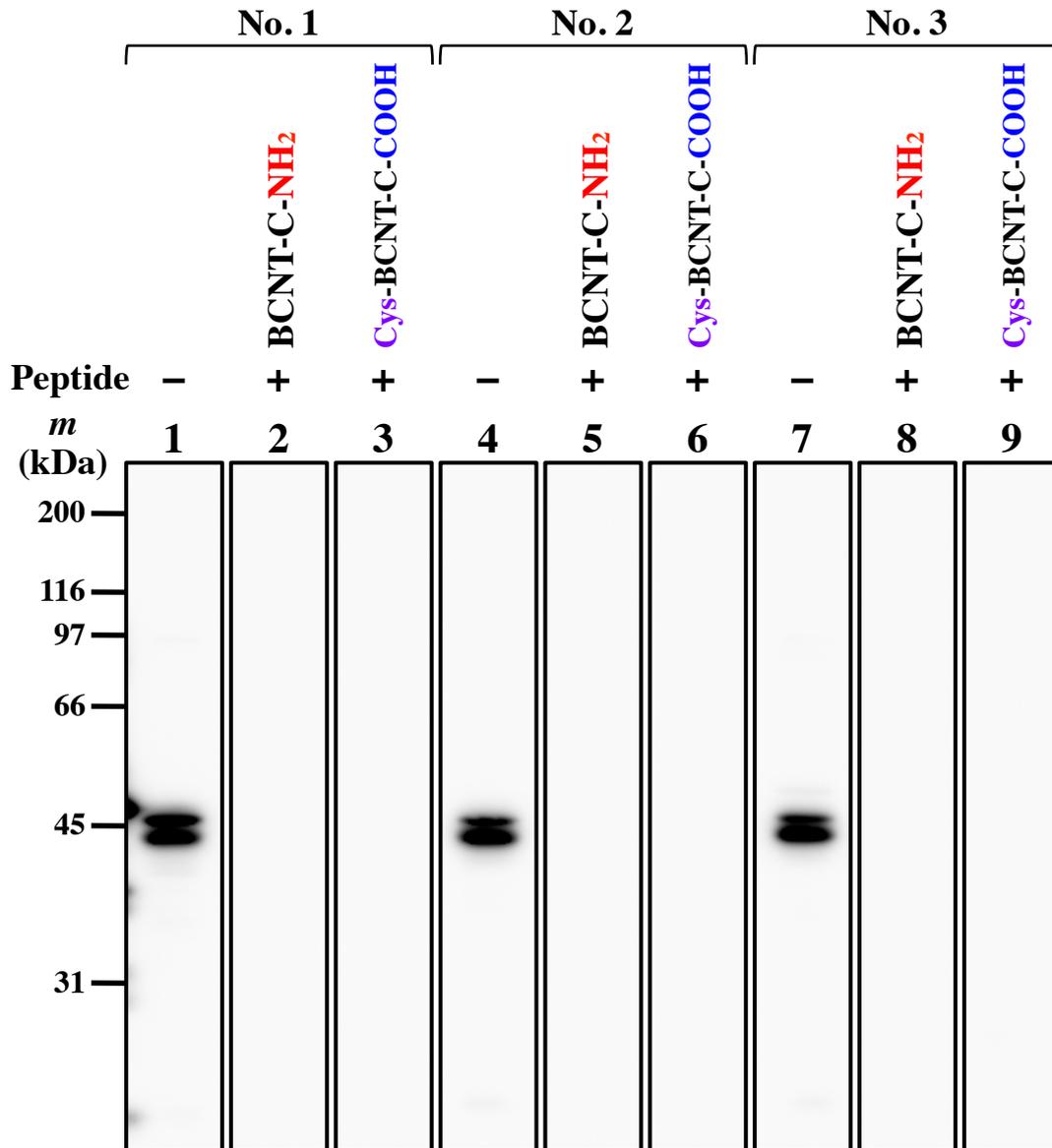
補足情報

補足表3

DNA配列確認に用いたシーケンシングプライマー

Name	Sequence		
pCold_Fw-2	5'-	GCTCTCCCTTATGCGACTCC	-3'
pCold_Rev-2	5'-	TCCGCTTACAGACAAGCTGTG	-3'
mGS(100-120)_Fw	5'-	GATGGTACCGGAGAAGGACTG	-3'

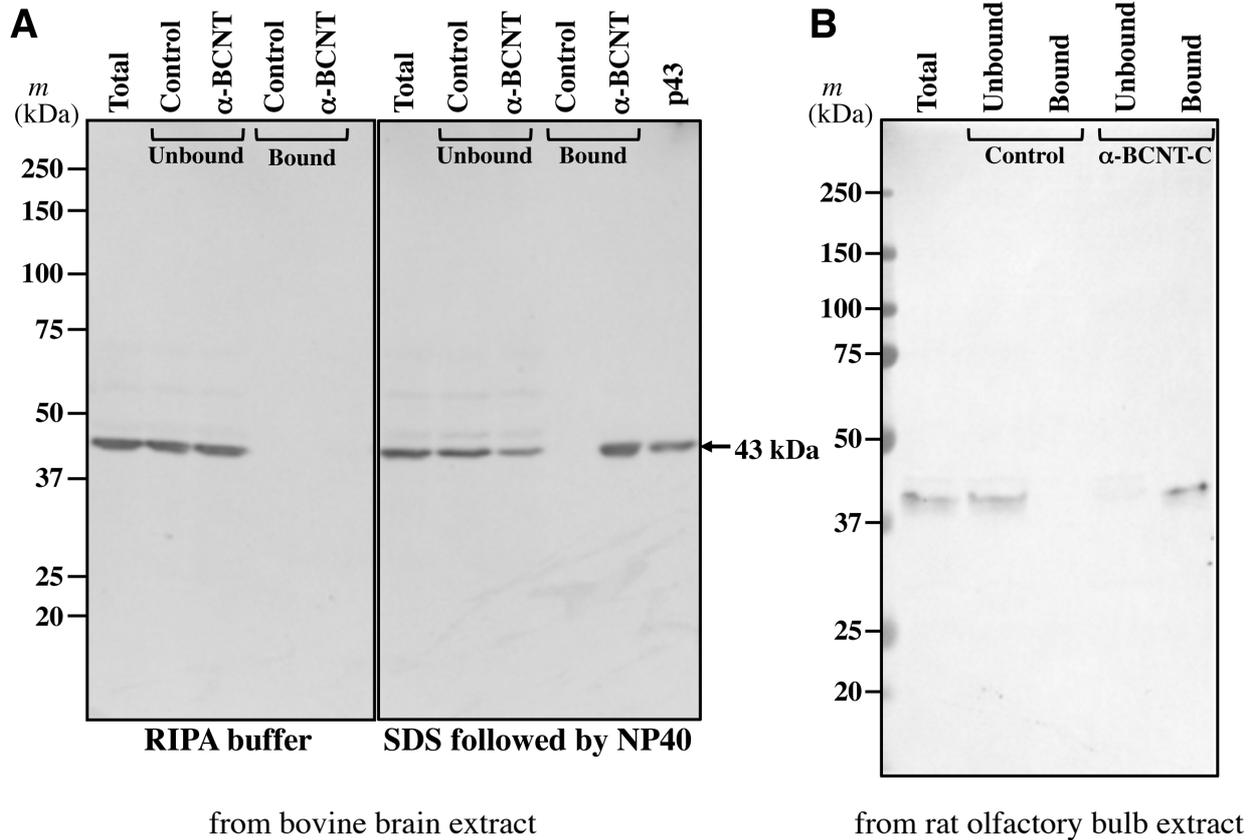
補足情報



補足図1 単離・精製した抗BCNT-C抗体の抗原特異性の評価と比較

抗原ペプチドによりアフィニティ精製された抗BCNT-C抗体の抗原特異性は、生後56日齢のラット小脳抽出物 (20 µg/レーン) を用い、免疫に用いた抗原ペプチド非存在下 (レーン1、4、7)、BCNT-C-NH₂ペプチド存在下 (レーン2、5、8)、またはCys-BCNT-C-COOH ペプチド存在下 (レーン3、6、9) で10,000倍希釈 (No. 1、2)、5,000倍希釈 (No. 3) した抗体によりWestern blottingで評価した。ここでは、8匹の免疫した動物から精製された抗体のうち、3つの代表的な抗体 (No. 1、2、3) について示す。強い43/45 kDバンドは3つ全ての抗体により検出された (レーン1、4、7)。これらの陽性バンドは、N末端およびC末端の修飾形に関わらず、BCNT-Cペプチドの存在下で完全に消失した。このWestern blottingは、化学発光法により検出した。

補足情報

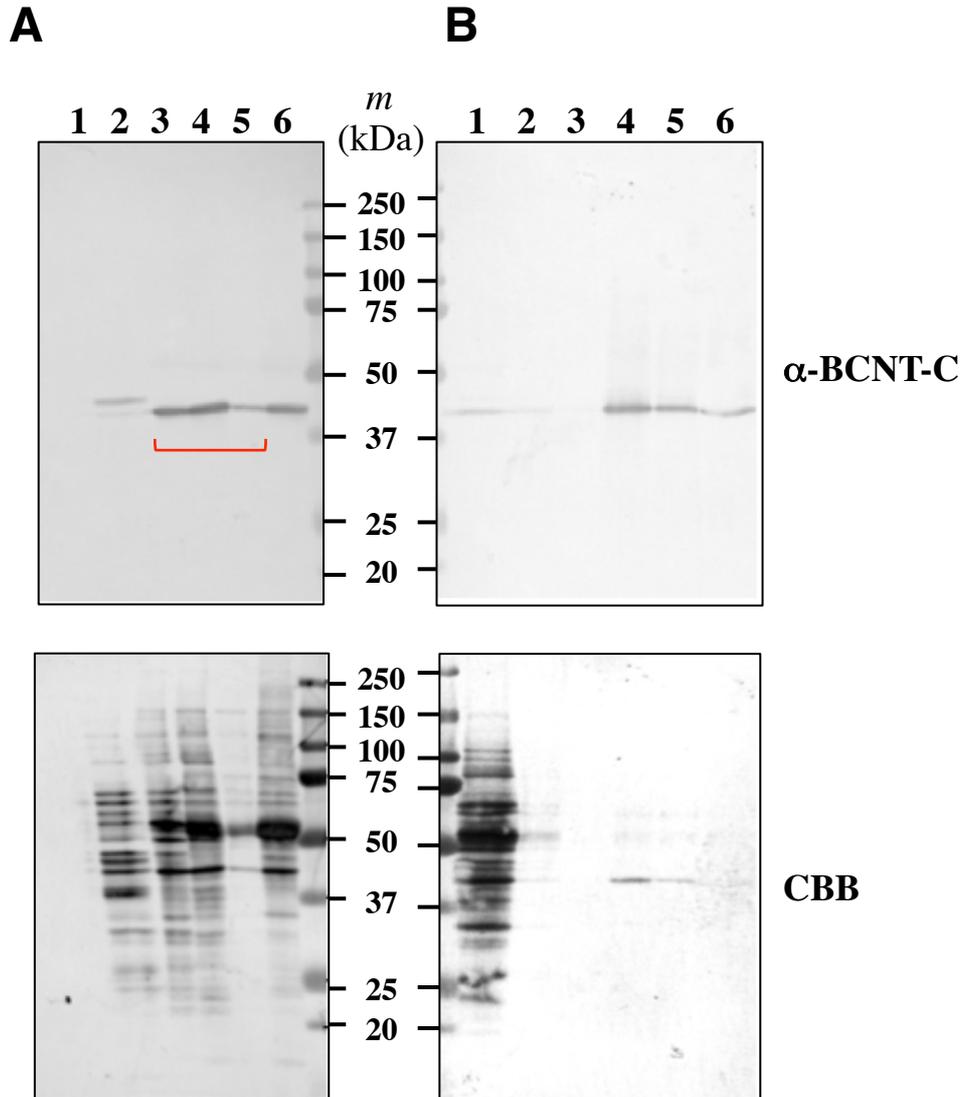


補足図2 ウシ脳、ラット嗅球抽出物からの43 kDaタンパク質の免疫沈降

(A) 免疫沈降における2つの可溶化法の比較。RIPAバッファの構成に調整したウシ脳抽出物を、抗BCNT-C抗体 (α -BCNT) を結合したアガロース、またはそれを変性させたアガロース (Control) と混和した。それぞれの混和物の結合または非結合画分を用いて、抗BCNT-C抗体 (1 μ g/mL、左パネル) によるWestern blottingを行った。SDS中、100°Cで加熱後、0.1%NP40を含むHBSで希釈した抽出物も同じ方法で処理し、Western blottingを行った (右のパネル)。カラムの上の“Total”と“p43”はそれぞれ、図15で示した検体の免疫沈降前の抽出物と免疫沈降後の単離された43 kDaタンパク質を示す。

(B) ラット嗅球の抽出物からの43 kDaタンパク質の免疫沈降。ラット嗅球の抽出物 (文献26) は、(A) に示すのと同様の操作によって抗BCNT-C抗体による免疫沈降を行った。これらのWestern blottingでの抗BCNT-C抗体の免疫活性は、比色法により検出した。

補足情報



補足図3 ウシ脳抽出物からの43 kDaタンパク質の単離

ウシ脳抽出物から硫酸アンモニウム分画により得られた沈殿をフェニル-セファロースカラムにより分離した（実験材料と方法を参照）。

(A) フェニル-セファロースカラムへの結合タンパク質はn-オクチル・グルコシドを含む溶液で溶出した。各レーンの上の数字1-5は、溶出順のチューブ番号を示し、6は担体をSDS-PAGEサンプル・バッファー中で煮こむことで回収した不可逆的に吸着されたタンパク質を示す。

(B) 抗BCNT-C抗体で最も強い免疫活性を示す3つの画分（(A) の上部のパネルで赤字の半括弧で示される）を集めてアセトン沈殿を行った。再懸濁したペレットをSDS中で煮込み、抗BCNT-C抗体を結合したアガロースによって免疫沈降し、結合タンパク質は抗原ペプチドで溶出した。レーン1：樹脂に結合しなかった分画、レーン2、3：洗浄画分、レーン4、5：溶出画分、レーン6：(A) の6レーンと同様の方法で回収された不溶出画分。

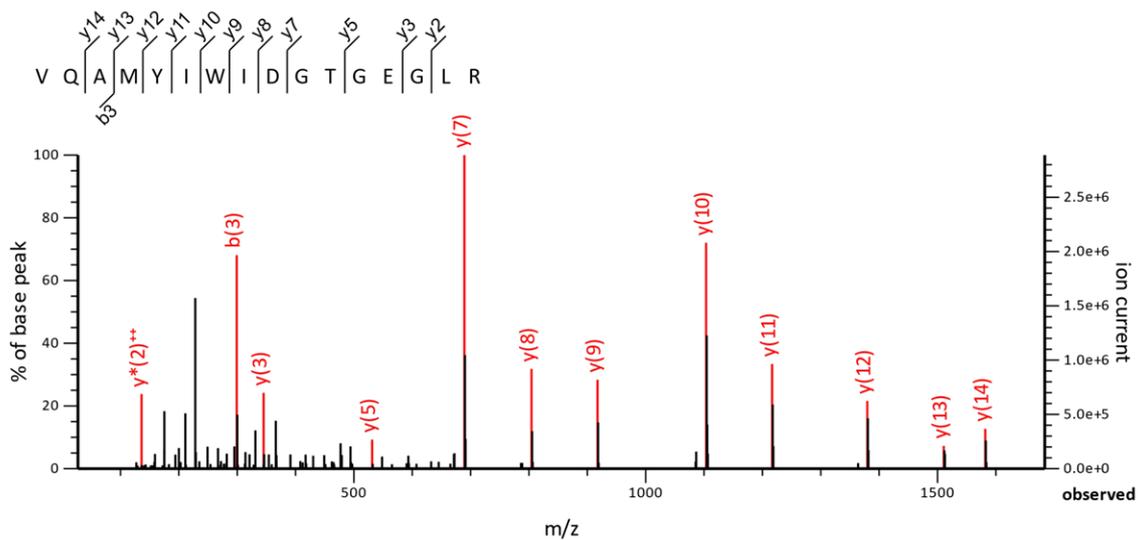
(A) と (B) の下のパネルは、上部のパネルで示した比色法によるWestern blottingの後に、メンブランをCBBで染色したものである。

補足情報

A

1 **MATSASSHLN** **KGIKQVYMAL** **PQGDK**VQAMY**** **IWIDGTG**EGL**** **RCKTRTL**DSE**** **PKCIEELPEW**
 61 **NFDGSST**FQS**** **EGSNSDMY**LV**** **PAAMFRD**PFR**** **KDPNKL**VFCE**** **VFKYNR**KPAE**** **TNLRHT**CKRI****
 121 **MDMVS**NQRPW**** **FGMEQ**EYTLM**** **GTDGHP**FGWP**** **SNGFP**GPQGP**** **YYCGV**GADKA**** **YGRD**IVEAHY****
 181 **RACLY**AGIKI**** **GGTNA**EVMPA**** **QW**EFQIGPCE**** **GIDMG**DHLWV**** **ARFIL**HRVCE**** **DFGVI**ATFDP****
 241 **KPIPG**NWNGA**** **GCHTN**FSTKA**** **MREEN**GLKYI**** **EEAIE**KLSKR**** **HQYH**IRAYDP**** **KGGLD**NARRL****
 301 **TGFH**ETSNIN**** **DFSAG**VANRG**** **ASIRI**PRTVG**** **QEKKG**YFEDR**** **RPSAN**CDPFA**** **VTEAL**IRTCL****
 361 **LNETG**DEPFQ**** **YKN**

B



補足図4 LC-MS/MSによる43 kDaタンパク質の同定

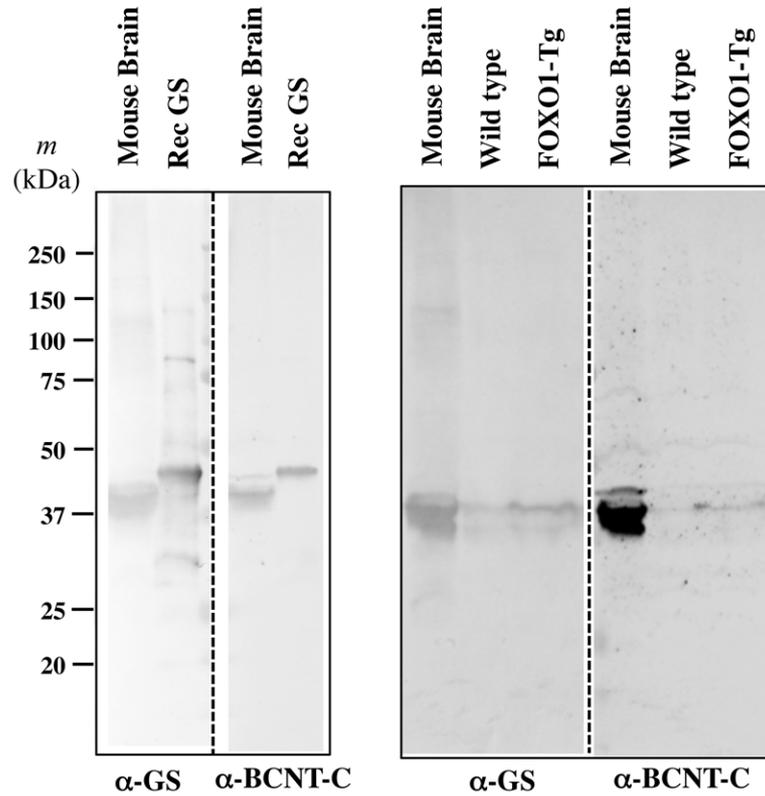
図15に示されたSDS-PAGEによって検出された3つのCBB陽性バンドを、トリプシンによる消化後にLC-MS/MSにより解析した。

(A) 43 kDa相当のバンドから回収されたペプチド断片は、GSのアミノ酸配列の76.9%をカバーした（赤い太文字で示される）。緑色の下線を引いた49アミノ酸の配列は、トリプシンによる分断箇所のない断片を示す。

(B) GSの同定のための代表的なMSMSスペクトルを示す。

(A) で示された赤い下線部と一致する43 kDa相当のバンドに由来するペプチド『VQAMYIWIDGTGEGRLR』は、Mascotを用いてスコア99および予測値3e-008でGSと同定された（表2を参照）。

補足情報



補足図5 GSを発現する検体を用いた抗BCNT-C抗体によるGSの認識

N末端にHis-tag配列を含む 20アミノ酸残基を持つ、精製された組換えヒトGS (Rec GS) (左のパネル)、および野性型 (Wild type) またはFOXO-1遺伝子導入マウス (FOXO1-Tg) の骨格筋抽出物 (右のパネル) の抗BCNT-C抗体 (1 μ g/mL) または抗GS抗体 (1 μ g/mL) を用いて比色法によるWestern blottingを行った。マウス脳の抽出物 (Mouse Brain) は両方のパネルの陽性対照として用いた。

謝辞

本学位論文の執筆に際し、長年にわたりご指導、ご支援、ご厚意をいただきました多くの皆様に、この場をかりて心より感謝申し上げます。

本学位論文は、私が横浜国立大学在学時に、当時の三菱化学生命科学研究所にて博士前期課程のテーマとして取り組んだ、Bcnt 遺伝子の機能的役割についての研究が端緒となり、曲折浮沈を経て、多くの研究者が見過ごしがちな標的外分子に対する抗原抗体反応の分子認識様式について纏めたものです。元徳島文理大学香川薬学部病態生理学講座教授（元徳島文理大学神経科学研究所教授、元三菱化学生命科学研究所主任研究員）宋時栄先生には、三菱化学生命科学研究所在籍時から、非常に長きに亘り懇切丁寧にご指導いただきました。特に、研究者にとって重要な論理的思考力と日本語および英語での文章力については、物書きの苦手だった私を諦めずに温かくご指導いただき、本学位論文の執筆に際しても詳細で的確な助言をいただけたことは、私の人生において幸甚の至りです。さらに、宋時栄先生が徳島文理大学神経科学研究所教授に着任された折には、主宰される研究室にお誘いいただき、懇倒切至な教育・研究指導のみならず、良き理解者として公私ともに一方ならぬご厚誼に与り感謝の念に堪えません。また、本研究のかけがえのない相談役であり、Bcnt ファミリー遺伝子研究の先駆者でもある徳島文理大学香川薬学部客員教授（元いわき明星大学薬学部教授、元三菱化学生命科学研究所主任研究員、元横浜国立大学客員教授）岩下新太郎先生には、生命科学研究の素人であった私を快く研究室に迎え入れていただき、Bcnt 遺伝子の機能解析を通して生化学・分子生物学研究の基礎をご指導いただけたことに心より拝謝申し上げます。

本学位論文の申請にあたり、快く主査をお引き受け下さり、本論文の細部にまで目を通し、ご指導いただきました徳島文理大学香川薬学部生体防御学講座教授 大岡嘉治先生、ならびに副査をお引き受け下さり、非常に有益な助言を頂きました徳島文理大学神経科学研究所教授 富永貴志先生、徳島文理大学香川薬学部衛生薬学講座教授 野地裕美先生、早稲田大学教育学部教授 伊藤悦朗先生に心よりお礼申し上げます。また、学位申請にあたり、紹介教員をお引き受け下さり、学位論文のみならず審査書

類の校閲や学内審査会での紹介など、多岐にわたりご支援いただきました徳島文理大学香川薬学部生命物理化学講座教授 岸本泰司先生に深謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、反芻動物の希少な検体を供与いただいた帯広畜産大学獣医学研究部門教授 佐々木基樹先生、ヒト GS の X 線構造解析データからエピトープ領域の3次元配置図を作製いただきご助言いただいた北里大学医学部附属医学教育研究開発センター教授 河野俊之先生、GS を同定するための LC-MS/MS 解析にご協力いただいた理化学研究所環境資源科学研究センター 堂前直先生、鈴木健裕先生、FOXO1 トランスジェニックマウスの骨格筋由来タンパク抽出物を供与いただいた京都府立大学生命環境科学研究科教授 亀井康富先生、ラット嗅球由来タンパク抽出物を供与いただいた元つくば国際大学医療保健学部教授 浦山修先生、ペプチド抗体についてご助言をいただきました元東京大学医科学研究所准教授 大海忍先生、本研究にご協力いただき、図の使用等を快く許可していただきました北海道大学大学院情報科学研究院准教授 長田直樹先生、千葉工業大学先進工学部教授 坂本泰一先生、東北大学遺伝子実験センター准教授 小林孝安先生、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構量子放射線医学総合研究所主幹研究員 安田武嗣先生、元国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センター 高橋一朗先生、元いわき明星大学薬学部客員研究員 岩下-大野淑子先生に、心より感謝申し上げます。

本研究の大部分は徳島文理大学香川薬学部勤めながら進めたものです。徳島文理大学香川薬学部の充実した研究施設に加え、素晴らしい研究環境をご支援いただいた村崎学園理事長 村崎正人先生、徳島文理大学学長 田村禎通先生、元徳島文理大学学長 桐野豊先生に、謹んで御礼申し上げます。そして、ここには書ききれませんが、多くの有益なご助言をいただいた徳島文理大学香川薬学部の先生方、ならびに現在は新天地でご活躍されている元徳島文理大学香川薬学部の先生方に、心から感謝申し上げます。さらに、宋時榮先生とともに三菱化学生命科学研究所在籍時から本研究の組織病理学的解析でご助力いただき、公私に渡り親身に相談に乗っていただき励ましてくださった実験助手の加藤千恵子さん、ならびに、徳島文理大学での研究活動を支えてくださった実験助手の藤井理恵さんと割田友子博士に深く感謝申し上げます。また、徳島文理大学での研究活動を支えてくださった事務職員の皆様に、お礼申し上げます。

横浜国立大学博士前期課程を修了後、短い期間ではありましたが、株式会社ニッピに在籍していました。所属したニッピコラーゲン工業株式会社では、化粧品製造開発部 次長 松田剛一さんに化粧品製造開発業務に関わる一切をご指導いただき、化粧品やコラーゲン製品の開発、製造・流通・品質管理について非常に多くを学ばせていただきました。さらに、本業とは関係のない、三菱化学生命科学研究所での研究活動や学会への参加などを快く了承していただいたお陰で本研究を継続することができ、本学位論文を書き上げることができました。そして、株式会社ニッピを辞職して研究者の道に進むか迷っているときは、真剣に相談に乗ってくださり、優しく背中を押してくださいました。また、ニッピバイオマトリックス研究所顧問（前所長）服部俊治博士、元所長 入江伸吉博士、プロジェクトリーダー 田中啓友さんからは、コラーゲンについての高論卓説を伺い、実際にコラーゲン研究も体験させていたお陰で知見を広げることができました。株式会社マトリクスーム代表取締役社長（株式会社ニッピ）山本卓司博士からは、BioMasher®の開発研究にお誘いいただき、共著者として論文執筆に関わらせていただけたことは大変勉強になりました。会社を辞め大学で研究する道を選んだにもかかわらず、変わらずに応援し、温かく励ましてくださった株式会社ニッピの皆様に深謝申し上げます。

本研究を支えてくださったにもかかわらず、ここに書ききれなかった方々に、この場を借りて心よりお礼申し上げます。

最後に、これまでの長い間、温かく見守り応援してくれた両親、研究中心の生活を支え続けてくれた妻、辛いときも満面の笑みで元気づけてくれた息子に心より感謝します。本当にありがとう。

2020年2月吉日

徳島文理大学 香川薬学部 生命物理化学講座 8階研究室（旧病態生理学講座）にて

中島 健太郎

二つの非相同タンパク質を認識する抗体の分子認識機構に関する研究
-Bent タンパク質と glutamine synthetase とを共通認識する抗体の解析から-

二〇二〇年

中島健太郎