

## ファージを用いたファージディスプレイ法による新規自己抗原の探索

つくば研究所 丹羽幹夫

米国スクリプス研究所の丸山により開発された、ファージを用いた新規ファージディスプレイ技術を応用し、自己免疫疾患に対する自己抗原を探索した。最初にシェーグレン症候群をターゲットにして自己抗原を探索し、既知自己抗原だけでなく新規自己抗原を得ることができた。1985年に繊維状ファージを用いたファージディスプレイ技術が提唱されて以来、この技術を用いてcDNAライブラリーから自己抗原を得た最初の例である。一般に、自己抗原を探索する他の既存技術では、単調かつ多段階のプロセスを必要とし、しかも2～3年で1または2個の自己抗原が得られる程度の効率であるが、本方法では1年で7個以上（その内、3個は新規）の自己抗原を見出すことに成功し、既存技術に比して効率的な探索方法であることが示された。更に、患者数は多いが自己抗原が得られにくいとされる慢性関節リウマチをターゲットに自己抗原を探索し、幾つかの新規自己抗原を得ることに成功している。以上の結果より、ファージを用いたファージディスプレイ法は、新規自己抗原の探索に非常に適した方法であることが示された。

### 1 緒言

現在までに知られている自己抗原は、自己抗体（血清等）を用いて、細胞や組織の溶解液から免疫沈降により特異的に結合するタンパク質（自己抗原）を分離する免疫沈降法が、又は細胞や組織のcDNAライブラリーから自己抗原を発現しているクローンを免疫染色により探し出す発現スクリーニング法のどちらかの方法でのみ見いだされている。

免疫沈降法は、放射性メチオニンでラベルした細胞の溶解液に自己抗体とプロテインAビーズを加え、抗原-抗体-ビーズの複合体を形成させて沈澱させる方法である。原理的に最も簡単ではあるが、バックグラウンドが高くなり、自己抗原を特定できなかつたりすることが多い。自己抗原を特異的に沈降できたとしても、そのタンパク質の精製・アミノ酸配列の決定・cDNAの選別といったハードルをクリアしていかなければならない。

一方、cDNAライブラリーの発現スクリーニング法は、タンパク質発現用ファージに組み込まれたライブラリーをプレートにまいてプラークを形成させ、挿入DNAがコードするタンパク質を誘導発現させてプラークごとメンブレンに転写し、自己抗体を用いた免疫染色を行なうことで自己抗原発現ファージをスクリーニングする方法である。免疫沈降法と異なり、容易に自己抗原のDNA塩基配列決定ができ、ホモロジー検索により既知・未知の判定が可能である。しかし実際のスクリーニングでは、通常1プレート（10～15cm）当たり5万個のファージプラークを形成させ、このプレートを20枚以上作製してそこからスクリーニングを行なうこととなり非常に労力がかかり、多数の血清サンプルを用いて行うことは不可能である。しかも、特異的な抗原を得られる確率は低く、その成否はcDNAライブラリーの“でき具合”によるところが大きい。

このような発現スクリーニングをより効率よく行なうために、G.

P. Smith<sup>1)</sup>によって1985年にファージディスプレイ法が提案された。この方法は、繊維状ファージの外套タンパク質に外来タンパク質を融合させて、表面にそのタンパク質を“提示”したファージをパニングと呼ばれる操作により特異的に増幅していく方法である。タンパク質・核酸・脂質に結合するタンパク質（もしくはペプチド）を知る有力な方法であるが故、自己抗原の探索にも威力を発揮すると期待された。しかし、現在までに数多くの研究がなされているにも拘わらず、報告の大半はランダム又はオリゴペプチドライブラリーを用いたエピトープ解析や抗体作製がほとんどで、自己免疫疾患に関与する自己抗原をcDNAライブラリーより見いだした例はない。一つの理由として、繊維状ファージは、大腸菌の内膜と外膜との間のペリプラズム空間で会合してファージとなるため、外套タンパク質に融合した外来タンパク質は内膜を通過しなければならず、ゆえに分泌タンパク質以外の外来タンパク質の提示はされにくいと考えられる。

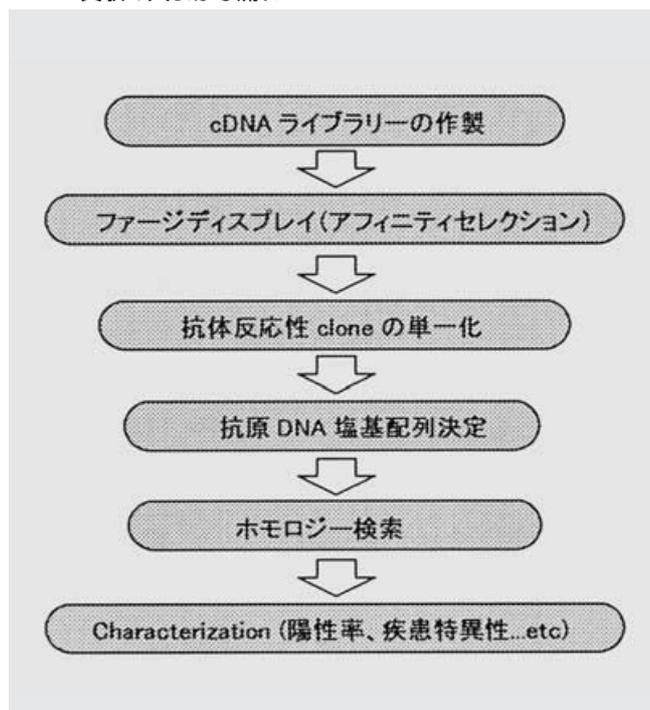
近年、The Scripps Research Instituteの丸山研究室で開発された新しいファージディスプレイ法<sup>2),3)</sup>は、ファージの尾部タンパク質であるVタンパク質あるいは頭部修飾タンパク質であるDタンパク質との融合タンパク質を作ることで外来タンパク質をファージ表面上に発現することができる。ファージの表面タンパク質に融合させると言う意味からfoo (fusion on the outside) と名付けられ、Dタンパク質のC末に外来タンパク質を融合させるファージベクターをfooDcと呼ぶ。本系の特長は、ファージの会合が大腸菌内で起こるため、融合タンパク質が内膜を通過する必要がなく、分泌/細胞内タンパク質に拘わらずファージ表面に発現できることで、まさに繊維状ファージ系の欠点を克服している。

シェーグレン症候群（以下SS）は慢性・全身性の自己免疫疾患で、特に唾液腺・耳下腺の破壊による分泌機能の低下・消失を特徴とする疾患である。現在までに幾つかの自己抗原/抗体が同定されており、その中でもSS-B/Laに対する抗体はSSの疾患

マーカーとして使用されている。SS-B/La抗体は、SSに特異的であるが、患者で検出される割合（陽性率）は20～30%と低いため、診断に苦慮するケースもある。

## 2 実験

### 2.1 実験の大まかな流れ



### 2.2 大腸菌株、細胞株、ファージおよび血清

ファージ宿主大腸菌として、JM105、TG 1、Q447を用いた。Mikawa等<sup>3)</sup>が作製したファージ表面発現ベクターの fooDcのマルチクローニングサイトに、以下のようなオリゴDNAを組み込んでSfiI制限酵素サイトを2つ持つベクターを構築し、fooDc2Sfilと名づけた。

```

5'-GATCCCCGGGTACCGAGGCCGCCTCGGCCGAG
3'-GGGCCCATGGCTCCGGCGGAGCCGGCTC
  
```

```

5'-CTCGAATTCGGCCGGCCATAGCGGCCGC
3'-GAGCTTAAGCCGGCCGGTATCGCCGGCGTTAA
  
```

SS患者血清は、Scripps Reference Laboratoryより供与された。その他の自己免疫疾患患者血清（SLE, PBC, SSc）および健康人血清は奈良医大より供与された。ヒトcell lineのHeLaおよびHepG2はATCCより購入し、10%FBS含有DMEM培地で、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

### 2.3 cDNAライブラリーの作製

およそ3×10<sup>6</sup>個のHeLa細胞またはHepG2細胞よりグアニジンチオシアネート法と塩化セシウム密度勾配遠心法にて全RNAを抽出した。得られた全RNA 1 mgより、定法に従い、オリゴ(dT)カラムを用いてpoly(A)<sup>+</sup> RNA約25 μgを精製した。このRNA約5 μgと2.5 μgのランダムヘキサマー (Sigma) を用いて、逆転写酵

素 (SuperScript II, Life Technologies) により1st strand cDNAを合成した。これを鋳型として、2nd strand cDNAを合成キット (Promega) を用いて作製した。T<sub>4</sub> DNA ligase (New England Biolabs) を用いて、下記の2本鎖DNA (Sfi-I adapter) を合成cDNAの末端に結合させた。

```

adapter 1,5'- CGGCCAGGATCTGGTGGT
3'-GGAGCCGGTCCTAGACCACCA
  
```

```

adapter 2,5'-CTGACTGACTGAGGCCATAG
3'-GACTGACTGACTCCGGT
  
```

未反応のadapterはゲルろ過スピンカラム (Sephacryl S-400, Amersham Pharmacia) を通すことで除去した。このようにして得られた合成cDNAを1 μgの fooDc2SfilファージDNAと結合させ、packaging mixture (MaxPlax, Epicentre Technologies) を用いてファージ粒子とし、宿主大腸菌Q447株に感染させて増幅した。

### 2.4 ファージタイターの測定法

E.coli JM105のシングルコロニーを0.2% maltose-CY (1%カザミノ酸/0.5% yeast extract/51 mM NaCl/27 mM KCl) 培地に植菌し、37 °Cで1晩培養した。このJM105培養液100 μlに1/100 vol.の1 M MgCl<sub>2</sub>を加えた後、SM溶液 (0.1 M NaCl/0.01% gelatin/5 mM MgCl<sub>2</sub>/50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) で希釈したcDNAライブラリーやファージ溶出液を1～10 μl程度添加して、37 °Cで15分間振盪させながら、ファージをE.coliに感染させた。このファージ感染E.coli液に8 μlの25 mg/ml IPTGを添加した後、8 μlの25 mg/ml X-galを添加したTop agar 1.5 mlを加え、良く攪拌した後、直径6 cmの agar plate上に重層し、37 °Cで8時間以上インキュベートしてファージプラークを形成させた。プラークは、親ファージ (fooDc2Sfil) による青色プラークとcDNAなどの外来遺伝子が挿入されたファージによる白色プラークとなるので、各々を計数した後、ファージタイター (pfu : plaque forming unit) と白色プラーク比を求めた。

### 2.5 cDNAライブラリーのアフィニティセレクション

E.coli TG1 (suppressor positive) のシングルコロニーを1 mlのCY培地に植菌し、37 °Cで1晩培養した。このE.coli TG1培養液1/100 vol.を3 mM MgCl<sub>2</sub>-CY培地に添加し、37 °Cで1時間培養した後、cDNAライブラリーを加えて完全に溶菌するまで37 °Cで培養した (およそ1 mlのE.coli培養液に対して、4×10<sup>7</sup>pfuのファージを添加すると4～5時間で完全に溶菌する)。溶菌した後、溶菌液1 ml当たり1 μlのCHCl<sub>3</sub>を添加し更に15分間培養を続けた。この溶菌液を遠心して溶菌細胞片を除いた上清 (phage lysate) に、1 ml当たり2 μlの10 mg/ml RNaseA水溶液と1 μlの10 mg/ml DNaseI水溶液を加えて37 °Cで10分間インキュベートした後、polyethylene glycol (MW6000 - 8000)、NaCl、MgCl<sub>2</sub>を各々、終濃度7%、3.5%、2 mMになるように加え、氷上で1時間静置してファージを沈澱させた (PEG沈澱)。遠心してファージを集め、

phage lysateの1/50-1/100 vol.のblocking buffer (5% dry milk/0.1% Tween20/0.25% BSA /0.05%  $\text{NaN}_3$ /PBS) で懸濁した物をファージ懸濁液 (又は"Input") として以下の操作に使用した。

0.05%  $\text{NaN}_3$ -PBSで血清を適宜希釈し、Immulon 4 microtiter plate (Dynatec Lab.) に50  $\mu\text{l}$ /wellずつ添加した。4 で1晩置いて、血清をプレートに結合させた後、100  $\mu\text{l}$ のblocking bufferでwellを2回洗浄し、更に100  $\mu\text{l}$ の同bufferを加えて、室温下1時間静置した。バッファーを除いた後、前述のファージ懸濁液50  $\mu\text{l}$ を添加して、4 で1晩緩やかに振盪しながら抗原発現ファージを結合させた。未結合のファージ懸濁液を除いて、0.3 mlのwashing solution (5% dry milk/0.1% Tween20/PBS/0.05%  $\text{NaN}_3$ )を添加し、軽く振り混ぜるなどした後、washing solutionを捨てた。このwash操作を3回行った後、SM溶液を用いて同様に3回洗浄した。10 mM  $\text{CaCl}_2$ -SM溶液 50  $\mu\text{l}$ を添加し、10 units/ $\mu\text{l}$ のcollagenase溶液2  $\mu\text{l}$ を加えた後、37 で2時間、microplate mixer (M-36, TAITEC) で激しく振盪しながらcollagenaseを作用させ、plateに結合していたファージを上清中に溶出させた。これをファージ溶出液 (又は"Output") とした。

## 2.6 ファージブランク免疫染色 (Immunostaining) 及びクローン化

Outputなどのファージ溶液を用いて、径10 cmの agar plateに、タイター測定操作 (2.4参照) と同様にしてファージブランクを形成させた。その上に、径82 mmのnitrocellulose membrane (PROTRAN, pore size 0.2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schnell) をかぶせ、37 で1晩静置してファージ粒子をメンブレン上に転写させた。メンブレンをImmunostaining buffer (5% dry milk/0.1% Triton-X-100/PBS) を用いて30分間振盪しながら洗浄し、これを2回行うことで同時にブロッキングした。血清を fooDc2Sfilファージ溶菌液で適度に希釈 (500~5000倍) した後、4 で1晩振盪しながら血清中の fooDc2Sfil及びE.coli溶菌液に対する抗体を吸収させ (この操作によりback groundが下がる) Immunostaining bufferで2倍に希釈したものをブロッキングされたメンブレン上に注いだ。室温で1時間ほどゆっくりと振盪した後、Immunostaining bufferを加え、10分間激しく振盪してメンブレンを洗浄した。この洗浄を3回行った後、Immunostaining bufferで10000倍に希釈した2次抗体 (抗human IgG-Alkaline phosphatase標識mouse monoclonal抗体: SIGMA) を加え、室温で1時間ほどゆっくりと振盪した。上記と同様にしてImmunostaining bufferで3回洗浄を行い、PBS及びAP buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.5)/100 mM NaCl/5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) で各1回ずつ洗浄した後、Alkaline phosphatase基質溶液 (0.33 mg/ml NBT/ 0.165 mg/ml BCIP in AP buffer) を添加して、室温で発色させた。

免疫染色されたファージブランクを爪楊枝で突いて、E.coli JM105 菌叢上に線を書くよう塗り、37 で1晩インキュベートして線状ブランクを形成させた。E.coli Q447の1晩培養液20  $\mu\text{l}$ を2 mlの3 mM  $\text{MgCl}_2$ -CY 培地に加え、37 で1時間培養した後、

上記の線状ブランクから2 mm程掻き取ったものを加え、37 で完全に溶菌するまで培養した (およそ、3~4時間)。この溶菌液を遠心して溶菌細胞片を除いた上清 (phage lysate) から0.8 mlを分注して、 $\text{CHCl}_3$ を終濃度0.3%になるように加え、これをクロール化したphage lysateとして4 で保存した。残りの1.2 mlは2.7のDNA抽出に用いた。

## 2.7 ファージからのDNA抽出およびDNA塩基配列決定

2.6で得られたphage lysate 1.2 mlを用いて2.5と同様の手技によりファージをPEG沈澱させた。遠心により集めたファージを130  $\mu\text{l}$ の10 mM Tris-HCl /10 mM EDTA (pH 8.0)で懸濁し、5分間氷上に静置した後、緩やかに攪拌した。1.2  $\mu\text{l}$ の10% SDSを加え、室温で5分間静置した後、TE飽和phenolによる抽出を2回、phenol :  $\text{CHCl}_3$  = 1 : 1溶液による抽出を1回行った。EtOH沈澱を行った後、これをTEで溶解させたものをファージDNA 溶液としてDNA塩基配列決定等に用いた。DNA塩基配列決定は、ダイデオキシ法にて行った。

## 2.8 ファージELISA

E.coli TG1の1晩培養液1/100 vol.を3 mM  $\text{MgCl}_2$ -CY 培地に添加し、37 で1時間培養した後、各抗原発現ファージ (2.6で得られるphage lysate) を加えて完全に溶菌するまで37 で培養した。溶菌した後、溶菌液1 ml当たり1  $\mu\text{l}$ の $\text{CHCl}_3$ を添加し更に15分間培養を続け、遠心して溶菌細胞片を除いた上清 (phage lysate) を以下の操作に使用した。

抗 fooDc2Sfil抗体 (ウサギ、ポリクローナル抗体) を0.05%  $\text{NaN}_3$ /PBSで2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈し、Immulon 4 microtiter plateに100  $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加した。4 で1晩静置した後、溶液を除去し、100  $\mu\text{l}$ の1% BSA/PBS/0.05%  $\text{NaN}_3$ を加えて室温下1時間静置した。溶液を除いた後、前述のphage lysateの10倍希釈液 (blocking bufferで希釈) 100  $\mu\text{l}$ を添加して、4 で1晩静置してファージを結合させた。溶液を除去し、0.3 mlのImmunoscreening bufferを添加し、軽く振り混ぜた後、bufferを除去した。このwash操作を3回行った後、0.05%  $\text{NaN}_3$ /PBSで1000倍希釈した各血清を100  $\mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間静置した。0.3 mlのImmunoscreening bufferで6回の洗浄を行った後、0.05%  $\text{NaN}_3$ /PBSで10000倍に希釈した2次抗体 (抗 human IgG-Alkaline phosphatase標識mouse monoclonal抗体: SIGMA) を加え、室温で1時間静置した後、0.3 mlのImmunoscreening bufferで4回とAP bufferで2回の洗浄を行った。AP bufferで2 mg/mlに調整したSIGMA 104 (Alkaline phosphatase基質: SIGMA) 100  $\mu\text{l}$ を添加し、室温で1時間静置して発色させ、405 nmにおける吸光度を測定した。コントロールとして、fooDc2Sfilのphage lysateを用い、以下のように判定を行った。

「抗原ファージでのA405 nmの平均値 > fooDc2SfilでのA405 nmの平均値 + 3 SDの場合、陽性とする」

### 3 結果および考察

#### 3.1 cDNAライブラリーの作製

fooベクターは ガラクトシダーゼの サブユニットをコードしている為、サブユニットを持つ宿主大腸菌(たとえばJM105やTG1など)の菌叢上で、ガラクトシダーゼ基質のXgalを含んだ寒天培地を用いてプラークを形成させると、青色のプラークとなる。このベクターのクローニングサイトはサブユニット内にある為、cDNAが挿入されると、ガラクトシダーゼ生成が阻害され、白色のプラーク(厳密には透明)が形成される。このシステムにより、作製したライブラリー中にcDNAが挿入されたファージがどれくらい存在しているのか計算することができる。

HeLa細胞またはHepG2細胞から作製したcDNAライブラリーはそれぞれ、 $2.7 \times 10^7$  pfuおよび $2.5 \times 10^7$  pfuのファージから成り、白色プラークの比率はそれぞれ15.3%と3.0%であった。故に、cDNAが挿入されたファージ数はそれぞれ、 $4.1 \times 10^6$  pfuと $7.5 \times 10^5$  pfuと算出された。しかしながら、cDNA挿入ファージ中、理論上、半分は本来のタンパク質翻訳方向とは逆向きに挿入され、また、3分の2はリーディングフレームではない為、スクリーニングに有効なライブラリーのプールは、 $6.9 \times 10^5$  pfuおよび $1.3 \times 10^5$  pfuと算出された。

今回用いたベクターは挿入されたcDNA由来のタンパク質を外套タンパク質のDタンパク質に融合させた形で発現するが、そのつなぎ目にはamber停止コドンを持つようにデザインされている。それゆえ、amber suppressor変異大腸菌株(TG1など)でファージを増殖させると外来タンパク質はファージ表面にDタンパク質との融合タンパク質として"ディスプレイ"され、amber suppressorを持たない大腸菌(Q447など)では外来タンパク質は発現されない。一般に外来タンパク質は大腸菌やファージの生育に阻害的に働くため、上記性質を利用して、作製したcDNAライブラリーはその多様性をできるだけ失わないようにQ447で増殖させ、アフィニティセレクションの直前にTG1で再増殖させた。

#### 3.2 cDNAライブラリーのスクリーニング

HepG2 cDNAライブラリーのスクリーニングの為に、5~6人分のSS患者血清をプールして1つのmixtureとし、51人の患者血清から9つの血清mixtureを作製した。この血清mixtureをコートしたmicro titer plateに、TG1で増殖させたライブラリーから約 $2 \times 10^{10}$  pfuのファージを添加して、アフィニティセレクションを開始した。未結合のファージを除去した後、結合したファージをcollagenaseによる切断で溶出させた。ファージタイターを測定した後、約500個のファージプラークを寒天培地で形成させ、ニトロセルロース膜にこれらのプラークを転写して、スクリーニングに用いた血清mixtureで免疫染色を行い、血清と反応するプラークを探索した。残りの溶出液は再度TG1に感染・増殖させ、血清コートプレートに添加してアフィニティセレクションを繰り返した。4回のアフィニティセレクションを行った結果、9つの

mixtureの内、5つから免疫染色で血清と反応するファージプラークを多数見出した。このセレクションの1例をFig. 1に示す。セレクションのサイクルが進むにつれ、全溶出ファージ中に占める白色ファージの割合が増加し、免疫染色されるプラーク数も増加することがわかる。

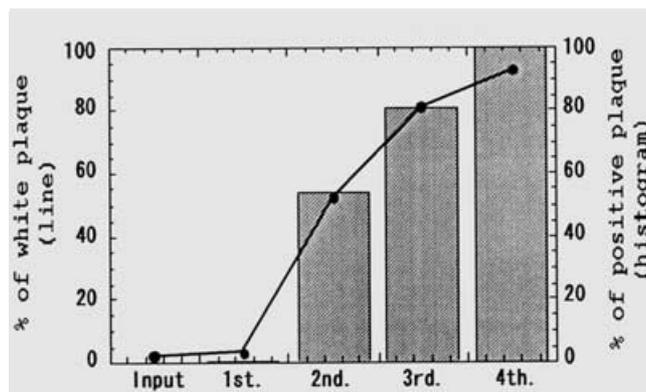


Fig. 1. Affinity selection of cDNA libraries with sera from patients with SS.

Phages from the HepG2 cDNA library were applied to a microtiter well coated with serum from a patient with SS, and selected four cycles by affinity selection as described in 2.5. In this figure, an example of such affinity selection is shown, and the increased fraction of white plaques in total phage plaques is illustrated by a line graph and the increased fraction of reactive clones with a patient serum in the library population by a histogram.

5つの血清mixtureで選別された血清反応クローンを血清mixture 1つにつき、10クローンずつランダムに拾い上げ、PCRによる挿入断片サイズの比較およびDNAシーケンスを行った。その結果、4つの異なったcDNA断片を持ったクローンであることが判明した。これらを、Sg1p3、Sg3p11、Sg4p1およびSg9p22と名づけた(Table 1)。これら単離したファージクローンをを用いて、それぞれスクリーニングに用いた血清mixtureのどの患者血清と反応したかを同定した。

更に、HeLa cDNAライブラリーを用いて、51人中17人の患者血清を個々に、および残りの34人分については上記と同様に4~5人の患者血清からなる8つのmixtureによるアフィニティセレクションを行った。17患者血清を個々に用いた場合では、最終的に2個の血清反応クローンが得られ、S7-1およびS12-11と名づけた。8つのmixtureによるセレクションにおいては、3個の血清反応クローンが得られ、Sg2-1、Sg4-1およびSg7-2と名づけた(Table 1)。

Table 1

Summary of cDNA library screening		
SS sera	cDNA library	Clones isolated
Mixed (9 groups/51 sera)	HepG2	Sg1p3
		Sg3p11
		Sg4p1
		Sg9p22
Individual (17 sera)	HeLa	S7-1
		S12-11
Mixed (8 groups/34 sera)	HeLa	Sg2-1
		Sg4-1
		Sg7-2

### 3.3 DNA塩基配列解析

選別したクローンの挿入cDNA断片の5'および3'末端の塩基配列(およそ400塩基)を読み、インターネット上のDNAデータベース(GenBank、EMBL、DDBJ、PDB)と比較した(BLAST検索)。その結果、9つのクローンで7つの既知タンパク質の一部をコードしていることが判明した(Fig. 2)。この7つのタンパク質の内、3つのクローン(Sg7-2、Sg3p11、Sg4-1)がコードするタンパク質はこれまでにどの自己免疫疾患でも、自己抗原として報告されたことは無く、一方残りの4つのタンパク質(Sg1p3、Sg2-1、Sg9p22、S7-1)はSS患者血清により認識される自己抗原として報告のあるものであった。新規な自己抗原タンパク質の内、Sg7-2はSMN(survival motor neuron gene product)と呼ばれるタンパク質の中心部位をコードしていた。SMNは脊髄筋萎縮症原因遺伝子としても知られている<sup>9)</sup>。Sg3p11はpM5と呼ばれるタンパク質のカルボキシ末端部と3'-UTR部分をコードしており、pM5はヒトコラゲナーゼの金属結合領域とホモロジーを持つcDNAとしてA2058メラノーマcDNAライブラリーから単離されたものである<sup>5)</sup>。Sg4-1とSg4p1はTRK-fused gene(TFG)と呼ばれるタンパク質のアミノ末端をコードしていた<sup>9)</sup>。

Sg1p3とS12-11はSS-B/Laのアミノ末端側のペプチドをコードしていた。SS-B/LaはRNA polymerase-III転写産物の結合するリボヌクレオプロテインでSS-B/Laに対する自己抗体はSSやSLEで見つけられている<sup>7)</sup>。

Sg2-1はhuman replication protein-A 70 kDa subunit(hRPA-70)のアミノ末端側約1/3部位をコードしていた。hRPAは1本鎖DNA結合能をもち、種を超えてよく保存されているタンパク質混合体であり、DNAの複製開始と伸長反応に関与するタンパク質である<sup>8)</sup>。

Sg9p22はnucleolus organizer region-90/human upstream binding factor(NOR-90/hUBF)の一部をコードしており、NOR-90/hUBFはRNA polymerase-Iが関与するリボソームRNAの転写を活性化する機能をもつ<sup>9)</sup>。

S7-1はcell cycleに関与したりリボヌクレオプロテインの一つであるcell proliferation-associated protein Ki-67 antigenのカルボキシ末

端領域をコードしていた。このKi-67 antigenに対する抗体は"proliferation marker"として使用されている<sup>10)</sup>。

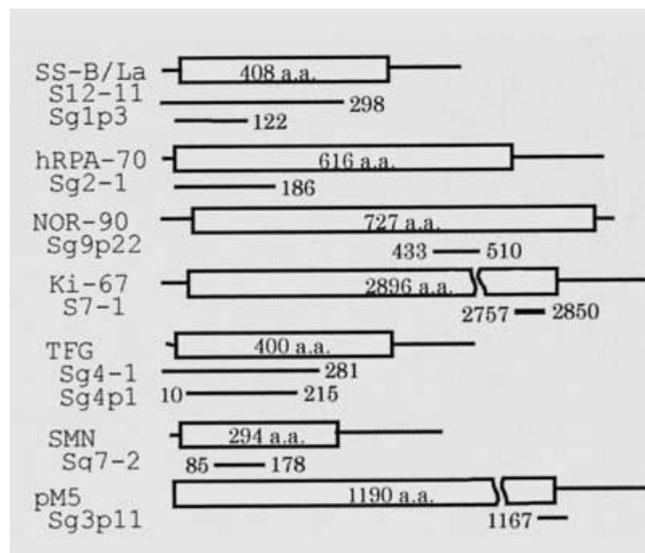


Fig. 2. cDNA sequences encoded by phage clones isolated.

Rectangles indicate coding sequences of autoantigen cDNA based on published sequences. Lines protruded from the rectangles indicate the 5' and 3' untranslated regions on the left and right, respectively. DNA sequences encoded by all the cDNA clones isolated in this study are indicated by lines under the rectangles. The numbers of amino acid residues encoded by the autoantigen cDNA are shown inside the rectangles. The names of autoantigens and isolated clones are shown on the left.

### 3.4 単離したクローンと反応する患者血清の頻度

各種自己免疫疾患および健康人の血清中に存在する、単離した抗原クローンに対する自己抗体の頻度を測定する為に、ファージクローンを固相に結合させたELISA法を用いて、72人のSS患者、22人のSS以外の自己免疫疾患患者(SLE 8人、PBC 8人、SSc 6人)および72人の健康人より得られた血清を測定した。Table 2に示すように、Sg1p3(SS-B/La)は21/72(29%)のSS患者血清と反応した。22個のSS以外の自己免疫疾患患者血清では、1人のPBC患者血清と反応した(1/22: 4.5%)。市販のELISAキットを用いた試験では、Sg1p3と反応した上記21人のSS患者血清では20人の患者血清がSS-B/La抗体陽性と判定され、ファージELISAの有効性が示唆された。SS-B/LaはSS患者血清で認識される主要な抗原の1つであり、陽性率は20~30%と低いものの疾患特異性が高い為にSS診断の柱とされる診断マーカーとなっている。今回の陽性率および特異性に関する結果は既存の知見と非常に一致していた。抗体が結合する抗原の領域をエピトープと呼ぶが、SS-B自己抗原のエピトープに関してはよく研究されており<sup>11)</sup>、アミノ末端側に存在するエピトープ領域と今回得られたクローンの挿入cDNA断片は一致しており、このことから本研究所の採用した方法が正しかったことを裏付けている。

Sg2-1/hRPA-70クローンは72人中2人の患者血清と反応したが(2.8%)、SLE患者の2/8(25%)とも反応した。近年、immunoblot

Table 2

Frequency of antibodies against autoantigens in normal sera and sera from patients with SS and other autoimmune diseases.

Clones <sup>a</sup> (antigens)	Sera from patients with		
	SS (%)	Other autoimmune disease (%)	Normal (%)
Sg7-2 (SMN)	4/72 (5.5)	1/22 (4.5)	0/72 (0)
Sg3p11 (pM5)	3/72 (4.2)	0/22 (0)	0/72 (0)
Sg4-1 (TFG) <sup>b</sup>	1/72 (1.4)	0/22 (0)	1/72 (1.4)
-----			
Sg1p3 (SS-B/La) <sup>c</sup>	21/72 (29)	1/22 (4.5)	0/72 (0)
Sg2-1 (hRPA-70)	2/72 (2.8)	2/22 (9.1)	0/72 (0)
Sg9p22 (NOR-90)	1/72 (1.4)	0/22 (0)	0/72 (0)
S7-1 (Ki-67 antigen)	1/72 (1.4)	0/22 (0)	0/72 (0)

<sup>a</sup> Three clones above the dashed line encode previously unknown proteins as autoantigens and four clones below the line encode SS autoantigens previously known.

<sup>b</sup>The same results were obtained for Sg4p1. <sup>c</sup>The same results were obtained for S12-11.

解析によりhRPAの3つのサブユニットの内2つ(70 kDaと32 kDa)がSSとSLE患者の血清と反応することが示されている<sup>(12),(13)</sup>。Garcia-Lozanoらによれば、SS患者血清中に存在するhRPAサブユニットに対する自己抗体の頻度は2~3%とされ、今回の結果とよく一致している。hRPA-70自己抗体が結合する部位(エピトープ)に関する知見については報告が無く、本研究で見出された1-186番目のアミノ酸からなる領域がエピトープとしての初の報告となった。

Fujii<sup>(14)</sup>によれば、NOR-90/hUBF自己抗体の出現頻度はSS患者で7.7%、SSc患者で2.2%とされているが、今回得られたクローン(Sg9p22)では、SS患者で1.4%(1/72)と非常に低いものであった。この抗原の主要エピトープは89-310番目と310-633番目の2つの領域であることが既に報告されており、Sg9p22クローンの持つ433-510番目のアミノ酸からなる領域は2番目のエピトープと重なるだけである為、陽性率が低かったものと思われた。

Ki-67 antigenはBlochらによって、HepG2 cDNAライブラリーからSS患者血清を用いた免疫染色で反応したクローンがKi-67 antigenの一部をコードしていたことから自己抗原であることが確認された<sup>(5)</sup>。BlochらのクローンはKi-67 antigenの1159-1526番目(中心付近)のアミノ酸配列領域をコードしていたが、筆者が取得したクローンはカルボキシ末端の2757-2850番目の領域をコードしていた。SS患者血清中の自己抗体出現頻度は1/72(1.4%)と非常に低いが、新しいエピトープ領域と考えられた。

これまでに自己抗原としての報告の無い3つのタンパク質では、SMN(Sg7-2)に対する自己抗体の頻度が4/72(5.5%)と最も高く、次いでpM5(Sg3p11)で3/72(4.2%)であり、TFG(Sg4-1)では1/72と非常に低かった。今回得られた抗原クローンでは健康人血清72サンプルと反応するものはTFG以外に無く、TFGはSS特異的な自己抗原ではない可能性が考えられた。この3つの中では、pM5(Sg3p11)が他の自己免疫疾患患者血清とは全く反応していないことから、特異性が非常に高い。SS患者

における頻度もSS-B/Laと比較して低いが、コードしている領域がC末端の短い領域であることおよび、自己抗体の多くは複数のエピトープを持っている事からこれ以外の主要エピトープが存在している可能性がある。

#### 4 結語

自己免疫疾患の自己抗原探索における、fooファージベクターで作製したcDNA発現ライブラリーを用いたファージディスプレイスクリーニングの有用性を検討した結果、有効なツールであることが確認できた。この技術は必要とする患者血清が非常に少量(10 µl程度)で良いこと、また多数の検体をマイクロプレートなどを使って同時にスクリーニングできることなどから、非常に効率的であることがわかった。このようなファージを用いた発現では糖付加やリン酸化といった翻訳後修飾が抗原性に関与している場合には適していない為、万能とは言えない。しかし今回のような抗体や、リガンド、レセプターなどのタンパク質、DNA、RNAなどの核酸、多糖類など固相化できるものと相互作用するタンパク質を見出すことには有用である。この方法は、タンパク質の機能解析に研究の主流が移行しつつあるポストゲノム時代の有用なツールの一つとして期待が持たれるものである。

#### 引用文献

- 1) G. P. Smith, *Science*, 228, 1315-1317 (1985).
- 2) I. N. Maruyama, H. I. Maruyama, S. Brenner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8273-8277 (1994).
- 3) Y. G. Mikawa, I. N. Maruyama, S. Brenner, *J. Mol. Biol.*, 262, 21-30 (1996).
- 4) S. Lefebvre, L. Bürglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Bulet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, D. L. Paslier, J. Frézal, D. Cohen, J. Weissenbach, A. Munnich, J. Melki, *Cell*, 80, 155-165 (1995).

- 
- 5) N. S. Templeton, L. A. Rodgers, A. T. Levy, K.-L. Ting, H. C. Krutzsch, L. A. Liotta, W. G. Stetler-Stevenson, *Genomics*, 12, 175-176, (1992).
  - 6) A. Greco, C. Mariani, C. Miranda, A. Lupas, S. Pagliardini, M. Pomati, M. A. Pierotti, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6118-6127 (1995).
  - 7) E. Gottlieb, J. A. Steitz, *EMBO J.*, 8, 841-850 (1989).
  - 8) L. F. Erdile, W.-D. Heyer, R. Kolodner, T.J. Kelly, *J. Biol. Chem.*, 266, 12090-12098 (1991).
  - 9) E. K. L. Chan, H. Imai, J. C. Hamel, E. M. Tan, *J. Exp. Med.*, 174, 1239-1244 (1991).
  - 10) J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke, H. Stein, *Int. J. Cancer*, 31, 13-20 (1983).
  - 11) L. J. McNeilage, K. Umaphysivam, E. Macmillan, A. Guidolin, S. Whittingham, T. Gordon, *J. Clin. Invest.*, 89, 1652-1656 (1992).
  - 12) R. Garcia-Lozano, F. Gonzalez-Escribano, J. Sanchez-Roman, I. Wichmann, A. Nuñez-Roldan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5116-5120 (1995).
  - 13) R. Garcia-Lozano, I. Wichmann, A. Garcia, J. Sanchez-Roman, F. Gonzalez-Escribano, A. Nuñez-Roldan, *Clin. Exp. Immunol.*, 103, 74-76 (1996).
  - 14) T. Fujii, T. Mimori, M. Akizuki, *Arthritis Rheum.*, 39, 1313-1318 (1996).
  - 15) D. B. Bloch, D. Rabkina, K. D. Bloch, *Lab. Invest.*, 73, 366-371 (1995).
  - 16) M. Niwa, H. Maruyama, T. Fujimoto, K. Dohi, I. N. Maruyama, *Gene*, 256, 229-236 (2000).

#### 略語一覧

PBC, primary biliary cirrhosis (原発性胆汁性肝硬変)  
SLE, systemic lupus erythematosus (全身性エリテマトーデス)  
SS, Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群)  
SSc, systemic sclerosis (強皮症)  
RA, rheumatoid arthritis (慢性関節リウマチ)

#### 謝辞

本研究はスクリプス研究所丸山一郎主任研究員、奈良県立医大藤本隆講師のご指導とご協力を頂いておこなわれたものであり、深く謝意を示します。

本論文は、Geneに発表した論文<sup>16)</sup>をもとに加筆・修正したものであり、図表はElsevier Science社より転載許可を頂きましたことをここに明記します。