

氏名(本籍)	木口 裕貴 (大阪府)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第 43 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 7 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	ファージ提示/アレイ型プロファイリングシステムを基軸とする 高性能変異抗体の効率的創製
論文審査委員	主査 教授 土反 伸和
	副査 教授 小林 典裕
	副査 教授 奥田 健介
	副査 准教授 灘中 里美

論文内容の要旨

緒論

抗体は、動物の体内に抗原が侵入した刺激により産生される糖タンパク質であり、特定の抗原を精密に認識して結合するため、診断・分析試薬として利用される。¹⁾ 抗体を用いる微量定量法は「免疫測定法(イムノアッセイ)」と総称され、生体試料のような複雑な組成のマトリックスに含まれるごく微量の標的分子を定量するうえで不可欠の方法論である。免疫測定法の感度は、用いる抗体の標的抗原に対する結合親和力に大きく影響され、結合定数 (K_a) が大きいほど高感度な測定が可能になる。しかし、動物が保有する B 細胞レパートリーの多様性に限りがあるため、動物を免疫する従来の抗体産生法で得られる天然の抗体の親和力には、おのずと限界がある。

今日、抗体の分子構造を遺伝子レベルで改変する「抗体工学」が進歩し、動物が産生し得ない優れた変異抗体(人工抗体)を迅速に創出し得る革新的な方法と期待されている。^{2,3)} 本法により従来法では得難い高親和力抗体を創出できるならば、免疫測定法の高感度化に資するところ大と期待される。抗体の機能改変は、一般に、①プロトタイプとなる天然型抗体の低分子化、②多様性に富む変異体の分子集団(ライブラリー)の構築、③遺伝型-表現型対応化技術を活用した改良

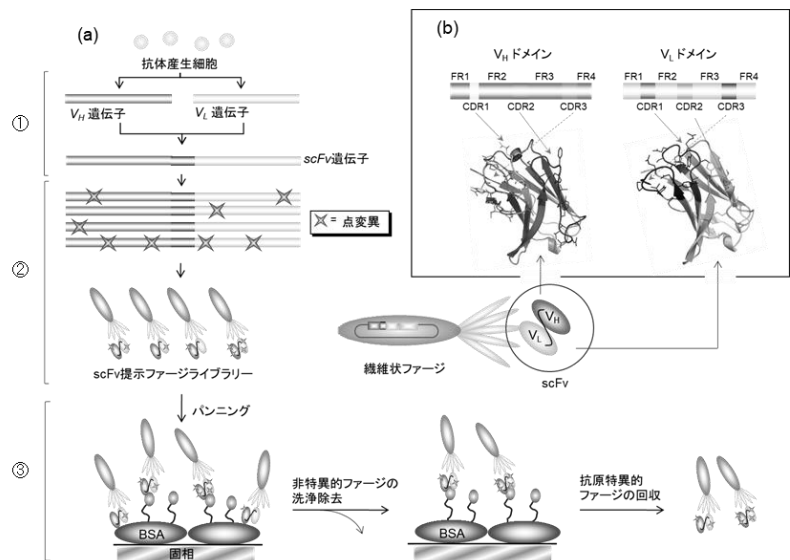


図 1. scFv ライブラリーの構築とファージ提示/パンニングによる高親和力変異体の単離

(a) ①抗体産生細胞からクローニングした V_H , V_L 遺伝子を連結して scFv 遺伝子へ変換したのち、②ランダム変異を導入して遺伝子ライブラリーを構築する。得られる変異遺伝子群をファージ提示したのち、③固相に固定化した抗原に反応させ、未反応のファージを洗浄除去する。そののち、固相に残存する抗原特異的なファージを酸や塩基で溶出し、回収する。

(b) V_H , V_L ドメインは、相補性決定部 (CDR; 各ドメインに 3 カ所ずつ存在する) と枠組み配列 (FR; 各ドメインに 4 カ所ずつ存在する) から構成される。CDR はループを形成して抗原との結合に寄与するとされ、抗体ごとに長さやアミノ酸配列が異なる。

型変異体の選択・単離, の3つのプロセスで行われる (図 1a). 抗体の低分子化は, 抗体遺伝子の大腸菌内での発現を容易にするためであり, その H 鎖および L 鎖の可変部ドメイン (V_H と V_L) をリンカーペプチドで連結した一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv)^{4,5)} に変換することが多い. 遺伝型-表現型対応化技術としては, 繊維状バクテリオファージ粒子表面のコートタンパク質 (主に pIII タンパク質が利用される) に機能変換を望むペプチドやタンパク質などを融合させるファージ提示が多用されている (図 1a).^{6,7)} プロトタイプ抗体に対応する野生型 scFv の遺伝子にランダム変異あるいは部位特異的変異を導入し, ファージ提示することにより, 変異 scFv を提示するファージのライブラリーが得られる. このなかから偶然に生成した貴重な改良型 scFv 提示ファージをパンニングという手法で選択する. すなわち, ファージライブラリー全体を, 標的となる抗原を固定化した固相に一気に反応させ, 結合しない非特異的なファージを洗浄・除去したのち, 結合した抗原特異的なファージのみを何らかの方法で溶出する. 回収されるファージはごく微量であるが, 大腸菌に感染させることで迅速かつ大量に複製することができる. このサイクルを繰り返すことで, 目的のファージを濃縮し, 最終的に単離する. 生体内で起きている抗体の親和性成熟過程を模倣して抗体の親和力を高めることが可能であり, 「試験管内親和性成熟」とも呼ばれている.

しかしながら, パンニングによる改良型分子種の選択効率は必ずしも十分と云えず, 目的の変異体の単離に多大な労力と時間を費やすことが少なくない. この原因として, ①ライブラリー構成メンバー (scFv 遺伝子保持菌あるいは scFv 提示ファージのクローン) の増殖率に差があることと, ②限られた量の抗原に対して莫大な種類の scFv 提示ファージが競合的に反応することが挙げられる.

以上の問題を抜本的に解決し, 高親和力の変異抗体フラグメントを得るためには, 個々のファージクローンを単独で標的抗原と反応させ, その結合能を網羅的かつ効率的にスクリーニングすることが確実なアプローチ法である. そこで著者は, 「アレイ型プロファイリング」システムを考案した (図 2). 変異 scFv 遺伝子で形質転換した大腸菌コロニーから産生されるモノクローナルファージを, マイクロプレートを用いてプロファイリングするものである. 各ウェル内で産生される微量の scFv 提示ファージは, その抗原親和力に応じて予めプレートに固定化された抗原に捕捉され, ルシフェラーゼ融合抗ファージ scFv により高感度に生物発光検出される. 本システムの実現を目標として, まず, 改良型変異体の単離効率の評価に適した変異 scFv ライブラリーを作製し, 新規選択法との比較のために従来のパンニングによる改良分子種の単離を試みた (第 1 章).

ついで, 新規選択法の構築に必須である繊維状ファージに対するモノクローナル抗体を樹立した (第 2 章). さらに本抗体を scFv 化し, 高感度な発光検出が可能な *Gaussia* ルシフェラーゼ (GLuc) との融合タンパク質を作製した (第 2 章). そして, この融合タンパク質をキー試薬として活用し, 上記のアレイ型プロファイリングシステムを構築した (第 3 章). 各ステップの諸条件を最適化したのち, 第 1 章で作製したライブラリーを用いて, その選択効率をパンニングとの比較の観点から評価した (第 3 章). さらに, 同システムで得られた変異 scFv の分析試薬としての実用性を評価した (第 3 章).

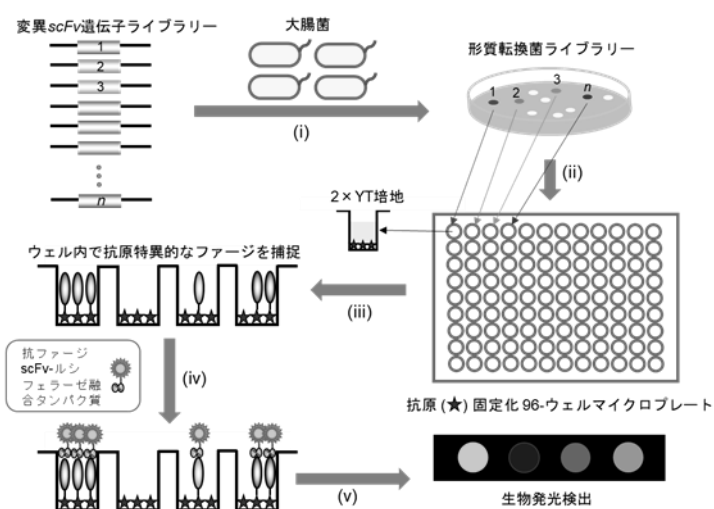


図 2. アレイ型プロファイリングシステムの概略

(i) 変異 scFv 遺伝子ライブラリーを大腸菌に導入してコロニーアレイを作成し, (ii) 得られた形質転換菌のシングルコロニーをマイクロウェル内で個別に培養する. (iii) 産生される抗原特異的な scFv 提示ファージは, ウェルに固定化された抗原に捕捉される. (iv) 培地を除去後, 抗ファージ scFv-ルシフェラーゼ融合タンパク質を反応させて, (v) 抗原特異的なファージを発光検出する.

第 1 章 高性能変異体単離効率の評価系としての抗体フラグメントライブラリーの構築

(1) 序

アレイ型プロファイリングシステムは、抗原を選ばずあらゆる抗体の試験管内親和性成熟に有効と期待されるが、成功例の少ない低分子 (ハプテン) 抗原に対する抗体の改変に応用することにより、その性能を評価することとした。モデルハプテンとして、ヒトにおける主要な糖質コルチコイドであるコルチゾール (CS; M_r 362.5) を選択した。CS は視床下部-下垂体-副腎系疾患の診断指標となり,⁸⁾ 診断試薬としての需要は恒常的に高いが、従来法により実用的なモノクローナル抗体を作製した例は乏しい。⁹⁻¹¹⁾ 本章では、まず、プロトタイプとなる抗 CS 抗体を従来のハイブリドーマ法により調製した。次いで、これを scFv 化したのちランダム変異を導入し、変異 scFv 提示ファージのライブラリーを作製した。さらに、プロファイリングシステムに対する対照実験として、標準的なパンニングにより高親和力変異体の単離を試みた。

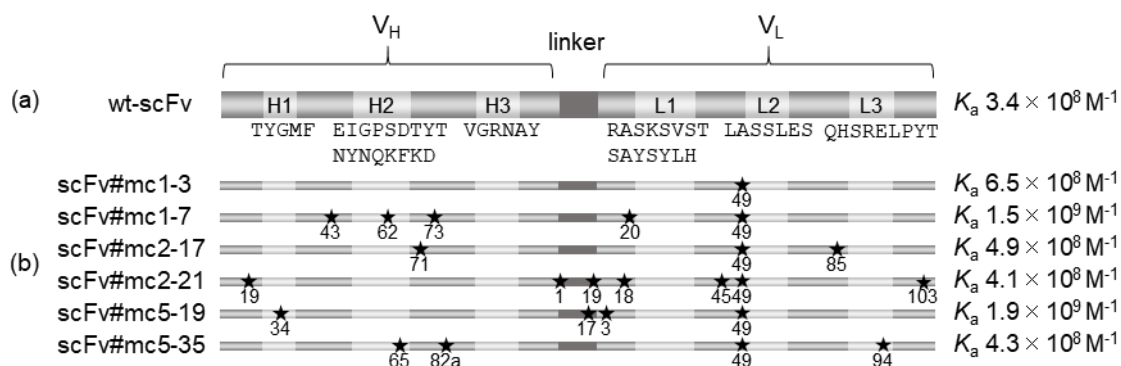
(2) 抗コルチゾールモノクローナル抗体の調製と scFv 化

CS-ウシ血清アルブミン結合体 (CS-BSA) で過免疫した BALB/c マウスから脾細胞を調製し、P3/NS1/1-Ag4-1 (NS1) ミエローマ細胞と融合させ、数種の抗 CS 抗体産生ハイブリドーマ株を樹立した。¹²⁾ 得られたモノクローナル抗体のうち、親和性成熟のプロトタイプとしては実用上やや不十分な親和力の抗体がむしろ好適と考え、 K_a が $4.7 \times 10^7 M^{-1}$ の抗体 (Ab-CS#3) を以降の実験に用いることにした。本抗体の相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) (図 1b) のアミノ酸配列を図 3a に示す。

樹立したハイブリドーマ細胞から総 RNA を抽出し、cDNA を合成した。これを鋳型として、 V_H 遺伝子はユニバーサルプライマーセット,¹³⁾ V_L 遺伝子は 5'RACE 法¹⁴⁾ を用いてそれぞれクローニングした。両遺伝子を (GGGGS)₃ 配列をコードするリンカー (*linker1*) を介して連結して野生型 scFv の遺伝子 (*wt-scFv*; 5'- V_H -*linker1*- V_L -FLAG-3') を作製し、可溶性タンパク質発現ベクター pEXmide 7¹⁵⁾ に組み込んだのち大腸菌 XL1-Blue に導入した。その産物 (*wt-scFv* タンパク質) (図 3a) の CS に対する K_a を Scatchard 法により算出したところ、 $3.4 \times 10^8 M^{-1}$ であり、由来する Ab-CS#3 をむしろ上回る親和力を示した。本 scFv の CS 結合能を更に確認するため、CS-BSA を固定化したマイクロプレートを用いて競合 ELISA を行い、用量作用曲線を作成した。その midpoint (50% 阻害に要した CS 量) は 720 pg であり、Ab-CS#3 (28 ng) より高感度な応答が認められた。

(3) 変異抗体フラグメントライブラリーの構築とパンニングによる高親和力変異体の探索

上記 *wt-scFv* 遺伝子の全域へ error-prone PCR¹⁶⁾ (Mn^{2+} 濃度を 0.10 mM, dATP 濃度のほかの dNTPs の 1/5 とした) によりランダム変異を導入した。得られた変異 scFv 遺伝子群を pEXmide 7 フェージミドベクタ



ー¹⁵⁾ に組み込み、電気穿孔法で大腸菌 TG1 に導入したところ、 5.9×10^5 クローンを含む形質転換菌ライブラリーが得られた。これを用いて標準的なパンニングを 6 重の併行実験として行い、親和力の向上した scFv 提示ファージの探索を試みた。すなわち、上記の形質転換菌ライブラリーを 6 分割し、それぞれを対数増殖期まで培養したのちヘルパーファージ KM13 を感染させた。得られた 6 つの変異 scFv 提示フ

図 3. wt-scFv およびパンニングで得られた変異 scFv のアミノ酸配列と結合定数 (K_a)

(a) wt-scFv の CDR のアミノ酸配列と K_a を示す。(b) パンニングで得られたクローンの変異導入箇所 (★) と K_a を示す。各変異体におけるアミノ酸置換の詳細を以下に示す。scFv#mc1-3 (V_L) C49G; scFv#mc1-7 (V_H) Q43R, K62*(amber codon; read through as Q), K73R, (V_L) T20A, C49S; scFv#mc2-17 (V_H) V71I, (V_L) C49S, T85A; scFv#mc2-21 (V_H) K19R, (linker) V1G, T19A, (V_L) R18G, K45R, C49S, K103*(amber codon; read through as Q); scFv#mc5-19 (V_H) M34T, (linker) G17V, (V_L) V3A, C49G; scFv#mc5-35 (V_H) D65G, I82aN, (V_L) C49Y, L94P.

ファージライブラリーを、それぞれ CS-BSA 固定化チューブ (#1~6) に加え、37°Cで1時間反応させた。洗浄後、チューブ#1~3 にはグリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2) を、#4~6 にはトリエチルアミン水溶液 (pH 12) を加えて固相に残ったファージを溶出・回収し、TG1 に感染させて複製させた。このサイクルを3回繰り返す。最終的に回収されたファージから50クローンずつ (計300クローン) を選択し、ファージ ELISA [CS-BSA 固定化プレート内で CS との競合反応を行い、固相上のファージをペルオキシダーゼ (POD) 標識抗ファージ抗体で検出する] により CS 結合能を精査した。wt-scFv よりも高感度な応答を示した6種のファージクローンについて、提示する scFv を可溶性タンパク質に変換した。これらの K_a を Scatchard 法により算出したところ、 $4.1\sim 19\times 10^8\text{ M}^{-1}$ の範囲であり、上昇倍率は1.2~5.6倍にとどまった (図3b)。これら変異体を用いた競合 ELISA における CS の用量作用曲線については、第3章 (5) で示す。一方、scFv 遺伝子の塩基配列を解析してアミノ酸配列を推定し、各変異 scFv のアミノ酸置換を特定した。置換数はクローン間で大きく異なっていたが (1~7カ所)、いずれの変異体でも wt-scFv の V_L 49番目に存在したシステインが置換されていた (図3b)。抗体の V_H および V_L には、鎖内ジスルフィド結合に与るシステインが2カ所ずつ存在するが、それ以外の位置にシステインが存在することは稀である。 V_L 49番目の「不自然な」システインを除くことが親和力の向上に寄与していることは、興味深い。

(4) 考察

CS を標的抗原とする scFv にランダム変異を導入して変異 scFv ライブラリーを作製し、標準的なパンニングにより親和力の向上したクローンを探索した。しかし、 K_a の増大した変異 scFv クローンは6種しか得られず、しかもその上昇率は最大でも5.6倍に過ぎなかった。この結果は、今回のライブラリーに本当に高親和力クローンが存在しないためなのか、あるいはやはりパンニングの選択効率に起因するものなのか? 後者ならば、アレイ型プロファイリングシステムの導入により解決される可能性がある、と期待された。

第2章 繊維状ファージの高感度検出を目的とする抗ファージ抗体フラグメント-ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製

(1) 序

アレイ型プロファイリングシステムの構築には、固相上に捕捉された scFv 提示繊維状ファージの高感度検出が求められる。その達成には、検出感度の高いマーカー分子で標識した抗ファージ抗体が必須である。マーカー分子としては、GLuc が有用と期待される。^{12,17)} GLuc は海洋性カイアシ類から発見された発光酵素である。セレンテラジンを基質として480 nmを極大波長とする光を生じ、ホタルやウミシイタケに由来するルシフェラーゼよりも高感度な検出が可能とされている。酵素を抗体に標識する場合、従来は架橋試薬を用いて両者を化学的に連結していたが、今日では遺伝子操作により、抗体を scFv 化したのち酵素を融合させることが可能である。scFv 化により分子量が低下し (IgG の約 1/6)、ファージ1ビリオンに多数のルシフェラーゼを結合させることが可能になるものと期待され、検出感度向上の観点からも有利である。そこで、著者は、まず抗ファージモノクローナル抗体をハイブリドーマ法により新規に作製した。次いで、本抗体を scFv 化し、そのC末端にGLucを連結させた融合タンパク質を創製して、ファージ検出能を評価した。

(2) 抗ファージモノクローナル抗体の調製と scFv 化

繊維状ファージ M13 の変異体である VCSM13 ファージで BALB/c マウスを繰り返し免疫し、その脾細胞を NS1 ミエローマ細胞と融合させて、M13 の外殻コートタンパク質 pVIII に特異的な抗ファージ抗体 Ab-M13#71 を分泌するハイブリドーマ株#71 を樹立した。¹⁸⁾ 本細胞から総 RNA を抽出して可変部遺伝子を含む cDNA を合成し、 V_H は 5'RACE 法、¹⁴⁾ V_L はユニバーサルプライマーセット¹⁹⁾ を用いてそれぞれクローニングした。両遺伝子に、上記の *linker1* 配列の一部を付加したのちに overlap extension PCR に付して *M13-scFv* 遺伝子 (5'- V_H -*linker1*- V_L -FLAG-TAATAA-3') を構築し、大腸菌内で発現させた。得られる

M13-scFv タンパク質を VCSM13 固定化マイクロプレートに反応させ、POD 標識抗 FLAG 抗体により追跡したところ、十分な結合が認められた。本 scFv の固定化 VCSM13 に対する K_a をバイオレイヤー干渉法により算出したところ、 $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。¹⁸⁾

(3) 抗ファージ scFv-ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製と有用性

上記 M13-scFv と GLuc をペプチダーゼに抵抗性を示すリンカー (linker2) で連結した融合タンパク質を作製した。M13-scFv 遺伝子と GLuc 遺伝子に linker2 の一部を付加したのち、両産物を overlap extension PCR により連結して、融合遺伝子 ($5' \text{-}V_H\text{-linker1-V}_L\text{-linker2-GLuc-FLAG-His6-TAATGA-3'$) を作製した。これを大腸菌 XL1-Blue 内で発現させ、得られる M13-scFv-GLuc 融合タンパク質を用いて scFv 提示ファージの検出を試みた。すなわち、CS-BSA を固定化したマイクロプレートに抗 CS-scFv 提示ファージを反応させたのち本融合タンパク質を加えてファージを捕捉し、セレンテラジンを基質として発光強度を測定した。その結果、 $1 \times 10^6 \text{ colony-forming unit (cfu)}$ でバックグラウンドと明瞭に識別が可能であった。

(4) 考察

GLuc は基質添加の直後に強いシグナルを発するため、¹⁷⁾ 迅速かつ高感度なファージ検出が可能である。次章で構築するプロファイリングシステムでは、マイクロウェルあたり平均 $\sim 10^{10}$ cfu のファージが生成することが判明しており、上記の感度は十分に実用的と言える。また、GLuc の酵素反応は中性条件で進行し、反応停止液を加える必要もないため、検出を終えた後で固相に結合しているファージを回収するうえでも支障がない。目的のプロファイリングシステムを構築するうえで、好都合なファージ検出試薬が創製できたものと考えられる。

第 3 章 高性能変異体の効率的創製を可能とする新規アレイ型プロファイリングシステムの開発

(1) 序

ファージ提示法は、革新的な抗体創製法と期待されたものの、現実には目的のクローンを得ることは容易ではない。その一因として、パンニングの選択効率の問題が挙げられる。最近、次世代シーケンサーを活用する選択法が報告され、画期的な解決策として注目を浴びた。²⁰⁻²²⁾ しかし、本法はパンニングによる抗体提示クローンの存在率の変化を、抗体遺伝子の塩基配列の網羅的解析により追跡するものであり、パンニング固有の問題は相変わらず付き纏う。

著者が考案したアレイ型プロファイリングシステムは、変異 scFv 遺伝子を宿主 (大腸菌) に導入した直後に得られる形質転換菌「オリジナルライブラリー」の多様性を極力保ちつつ、個々の形質転換菌クローンから産生される scFv 提示ファージの抗原結合能を、異なるクローンとの競合を遮断した条件下で評価する (図 2)。したがって、上記の問題の解決策として、より抜本的と期待される。本章では、前章で作製した M13-scFv-GLuc 融合体をキー試薬として目標とするシステムを構築し、第 1 章で作製した変異 scFv ライブラリーに適用することにより、その有用性を評価した。

(2) アレイ型プロファイリングシステムを可能とするファージ提示条件の検討

目的のシステムでは、わずかな大腸菌 (形質転換直後の初代培養である寒天培地上のコロニー) から発光検出が可能なコピー数の scFv 提示ファージを生成させる必要がある。そこで、宿主とする大腸菌株やヘルパーファージの種類と添加量、ファージ感染菌培養時の抗生物質濃度など、諸条件の検討を行った。ここでは、第 1 章で Ab-CS#3 と共に得られた高親和力抗 CS 抗体 Ab-CS#10 を scFv 化した CS#10-scFv¹²⁾ をモデル scFv として用いた。CS#10-scFv 遺伝子を大腸菌 XL1-Blue または TG1 に導入し、各形質転換菌にヘルパーファージとして VCSM13 または KM13 を感染させた。感染後の菌をカナマイシン (Kan) 含有培地で選択培養し、scFv 提示ファージを得た。これら 4 通りの条件で産生されたファージ ($1 \times 10^9 \text{ cfu}$) を、CS-BSA 固定化マイクロプレートに反応させ、結合したファージ量を POD 標識抗 M13 抗体を用いて評価した。その結果、TG1 と KM13 の組み合わせで得られたファージが最も高いシグナルを

示し、この条件が scFv 提示率の高いファージの生成に有利なことが判明した。引き続き、この組み合わせで培養条件の最適化を行った。すなわち、CS-BSA を固定化した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、アンピシリン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Kan (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), および KM13 [5×10^8 plaque-forming unit (pfu)/mL] を含む 2 \times YT 培地を分注 (200 μL /ウェル) し、CS#10-scFv 遺伝子を導入した大腸菌 TG1 のコロニーを接種して、25 $^{\circ}\text{C}$ で 45 時間振とう培養した。この条件下で、コロニーを接種したほぼすべてのウェル (> 95%) について、scFv 提示ファージの産生を上記の方法 (M13-scFv-GLuc を用いる発光検出) で確認することができた。

(3) アレイ型プロファイリングシステムを用いた高親和力変異体の探索

第 1 章で作製した変異 scFv 遺伝子群で大腸菌 TG1 を形質転換し、 3.4×10^5 クローンからなるライブラリーを得た。これを寒天培地に塗布し、形成されたコロニーのうち 9400 種 (ライブラリーの約 3% に相当する) を (2) の条件でプレート中の培地に接種し、振とう培養した。プレートを洗浄し、各ウェル内に結合しているファージを scFv-GLuc で捕捉し、セレンテラジンを添加して発光強度をプロファイリングしたところ、全体の約 8% にあたる 761 ウェルで 100000 カウントを超える高いシグナルが得られた。この中から発光強度の大きい順に 40 ウェルを選択し、ウェル内のファージをグリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2) を用いて回収した。これを大腸菌に感染させて再増幅したのち、ファージ ELISA にて wt-scFv よりも高親和力であると推定されるクローン 7 種について、提示されている scFv を可溶性タンパク質に変換した。このうち 4 種は競合 ELISA において wt-scFv よりも高感度な用量作用曲線を与え、 K_a を Scatchard 法により算出したところ、wt-scFv (図 4a) よりも 16~41 倍高い値 ($0.53 \sim 1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) を示した (図 4b)。

(4) 低 off-rate 指向アレイ型プロファイリングシステムによる高親和力変異体の探索

(3) の方法では、scFv が低親和力であっても、ファージの複製率が高い場合は強い陽性シグナルを示す。そのため、発光強度の大小のみで高親和力クローンを確定的に選別することは困難である。そこで、抗体の抗原からの解離率 (off-rate) に着目した。微量定量分析に用いる高親和力抗体は、一般に解離速度定数 (k_d) が小さく、一度結合した抗原から解離しにくい。そこで、遊離抗原を添加しても固相に残存するクローンを選別する「低 off-rate 指向」アレイ型プロファイリングシステムを構築した。

(3) と同様に 9400 種のコロニーを培養し、ウェル内のファージを発光検出したところ、約 10% にあ

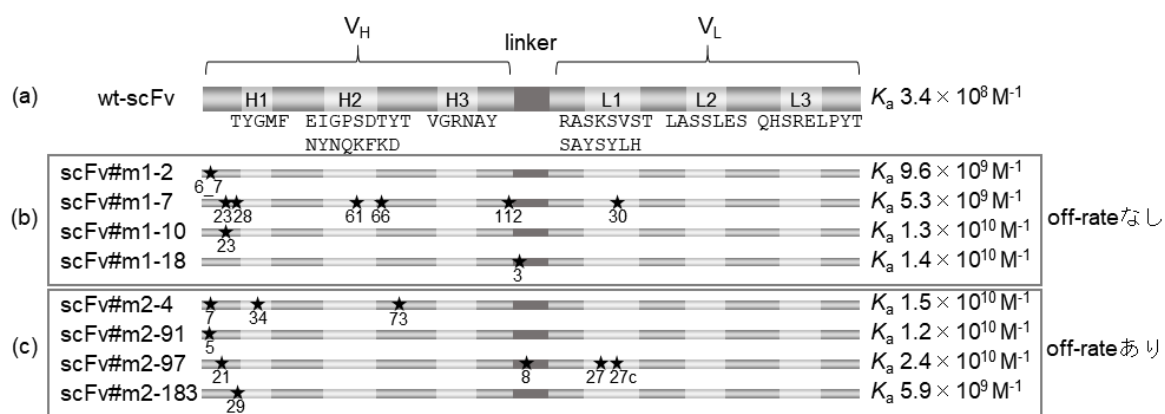


図 4. wt-scFv およびアレイ型プロファイリングシステムで得られた変異 scFv のアミノ酸配列と結合定数 (K_a)

(a) wt-scFv の CDR のアミノ酸配列と K_a を示す。(b) (3) で得られたクローン、(c) (4) で得られたクローンの変異導入箇所 (★) と K_a を示す。各変異体におけるアミノ酸置換の詳細を以下に示す。scFv#m1-2 (V_H) Q6-P7* (insertion of amber codon; read through as Q); scFv#1-7 (V_H) K23R, T28S, Q61P, K66R, S112F (V_L) Y30H; scFv#m1-10 (V_H) K23R, W36* (opal codon; read through as W); scFv#m1-18 (linker) S3G; scFv#m2-4 (V_H) P7S, M34T, K73E; scFv#m2-91 (V_H) Q5L; scFv#m2-97 (V_H) S21P

る 897 ウェルが 50000 以上のカウントを示した。これらのウェルから 376 ウェルを選択してファージを回収し、CS-BSA 固定化マイクロウェル内で予め培養した TG1 に感染させた。ヘルパーファージと Kan を加えたのち、25°C で 45 時間振とう培養し、ウェル内で増殖したファージを M13-scFv-GLuc を用いて発光検出した。ウェルを洗浄したのち、CS を含む緩衝液を分注して 25°C で 4 時間振とうし、洗浄したのち再びセレンテラジンを加えて発光検出するサイクルを 3 回繰り返した。この操作を経てもなお十分なシグナルが認められたファージクローン 16 種を再増幅し、ファージ ELISA にて wt-scFv よりも高親和力であると推定された 4 種についてその scFv を可溶型に変換した。これらの K_a を Scatchard 法により算出したところ、wt-scFv よりも 17~71 倍高い値 ($0.59\sim 2.4\times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) を示した (図 4c)。すなわち、有望と判断した 16 クローンのうち 4 クローンが 10 倍以上親和力の向上した改良型変異体であり、(3) (40 クローンのうち 4 クローンが 10 倍以上の改良型) よりも選択の効率は向上したと考えられる。

(5) 高親和力変異体の免疫測定法における有用性

(3), (4) で得られた変異 scFv のうち、 10^{10} M^{-1} オーダーの K_a を示した 5 種を用いて CS の競合 ELISA を行った。用量作用曲線の midpoint は wt-scFv のそれ (720 pg) と比べて 12~36 倍も減少し、pg レベルの測定が可能な程度に大幅な高感度化が達成された (図 5a)。他方、従来のパンニングにより得られた変異体 [第 1 章 (3)] のうち scFv#mc1-3, 2-17, 2-21 および 5-35 による用量作用曲線の midpoint は 1700~13000 pg で、wt-scFv よりむしろ増大していた。残る 2 種の変異体、scFv#mc1-7 および 5-19 では midpoint の減少が認められたが (530~590 pg)、その K_a 値 (10^9 M^{-1} オーダー) から予想されるように、プロファイリングから得られた変異体による改善には明らかに及ばなかった (図 5b)。

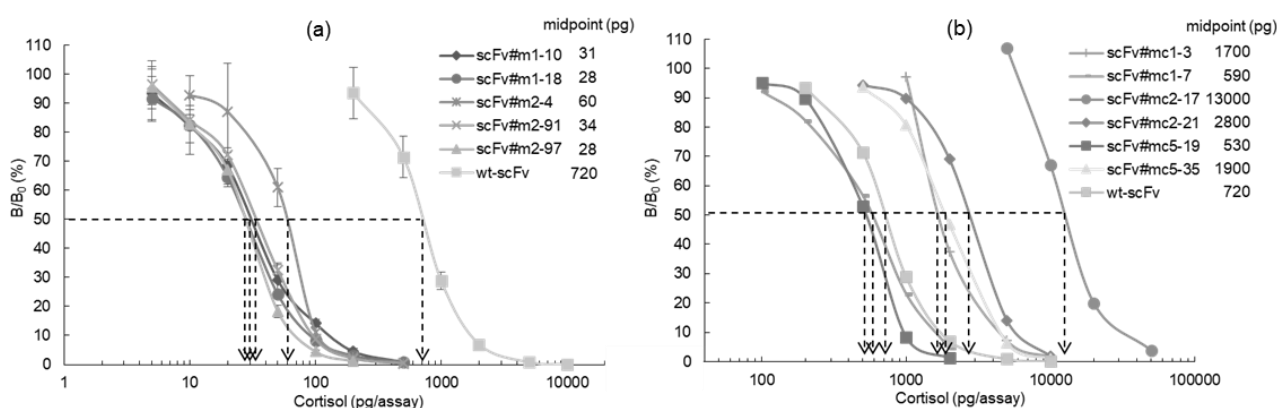


図 5. 変異 scFv を用いる CS の競合 ELISA

(a) アレイ型プロファイリングシステムで得られた可溶型変異 scFv のうち、 K_a が $1\times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ を超えたものを用いたときの用量作用曲線。エラーバーは 4 重測定の標準偏差を示す。(b) パンニングで得られた可溶型変異 scFv を用いたときの用量作用曲線。

(6) 考察

アレイ型プロファイリングシステムにより、期待どおり従来法よりも効率よく高親和力なクローンを得ることができた。その効率は、低 off-rate 指向選別ステップを加えることでさらに向上することが判明し、今後の更なる改良に期待がかかる。本章で得られた 8 種の変異 scFv の構造 (図 4b, c) に着目すると、アミノ酸置換および挿入が平均 2.3 カ所と、パンニングで得られたクローン (平均 4 カ所) よりも少ない。しかも V_H の framework region (FR) 1 に多く見られる点が注目される。また、パンニングで得られたクローンに必ず見られた V_L 49 番目の置換は見られなかった。この位置の置換を本章で得られたクローンに導入することで更に親和力が向上した変異体を得られるか、興味を持たれる。

結論

本研究で構築したアレイ型プロファイリングシステムは、形質転換菌の抗原特異的な抗体産生能をクローンごとにスクリーニングするものであり、1990 年代に報告された colony-lift assay (CLA; 寒天培地上

に展開された形質転換菌コロニーのレプリカをメンブラン上に作製し、もう1枚のメンブランを重ねて各コロニーが産生する抗体をスポットとして転写し、各スポットの抗原結合能を可視化するもの)²³⁾と類似のコンセプトに基づいていると言える。しかし、CLA では感度や再現性に難があるうえ遺伝型(コロニー) – 表現型(抗体)の対応の維持にもストレスを伴い、普及に至らなかった。アレイ型プロファイリングシステムでは、ファージの複製能力と高感度なファージ検出試薬(M13-scFv-GLuc)を活用し、形質転換菌のクローニングと増殖、ファージの産生、そしてその抗原結合能の評価までを、同一のマイクロウェルで行うことにより、上記の欠点を克服することに成功した。

第1章(従来のパンニング)と第3章(アレイ型プロファイリングシステム)とでは、同一の変異scFv遺伝子ライブラリーから選択操作を行っているにもかかわらず、得られた変異scFvクローンに共通性は全く見られず、後者の変異体が明らかに親和力に優っていた。動物を免疫する従来法で、CSに対して 10^{10} オーダーの K_d を示す高親和力抗体を作製した例は少ない。¹²⁾本プロファイリングシステムでは、第3章(3)と(4)のわずか2回の試行で、しかも $\sim 10^5$ クローンレベルの小さいライブラリーの3%を処理しただけで、 10^{10} オーダーの変異抗CS抗体フラグメントが計5種も得られている。自動コロニーピッカーなどの利用によりシステムを自動化することで、ライブラリーの全クローンの処理が可能になったときには、数十を超える高親和力変異scFv分子種が一挙に得られるもの、と期待される。

アレイ型プロファイリングシステムは、パンニングでは回収が困難な高親和力変異体の獲得を可能にすることが実証された。今後、高分子抗原も含めた様々な標的化合物に対する実用抗体の産生に貢献することを期待する。

引用文献

- 1) 生物化学的測定研究会編, "免疫測定法 基礎から先端まで", 講談社, 東京 (2014).
- 2) Chiu M. L., Gilliland G. L., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **38**, 163–173 (2016).
- 3) Chan C. E. Z., Lim A. P. C., MacAry P. A., Hanson B. J., *Int. Immunol.*, **26**, 649–657 (2014).
- 4) Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S., Whitlow M., *Science*, **242**, 423–426 (1988).
- 5) Huston J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M. S., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Brucoleri R. E., Haber E., Crea R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 5879–5883 (1988).
- 6) Clackson T., Lowman H. B., "Phage Display", New York: Oxford University Press (2004).
- 7) Barbas C. F., Burton D. R., Scott J. K., Silverman G. J., "Phage Display. A Laboratory Manual", New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- 8) Chrousos G. P., Kino T., Charmandari E., *Neuroimmunomodulation*, **16**, 272–283 (2009).
- 9) Crichton D., Grattage L., McDonald A., Corrie J. E. T., Steel C. M., Hubbard A. L., Al-Dujaili E. A. S., Edwards C. R. W., *Steroids*, **45**, 503–517 (1985).
- 10) Lewis J. G., Manley L., Whitlow J. C., Elder P. A., *Steroids*, **57**, 82–85 (1992).
- 11) Kobayashi N., Sun P., Fujimaki Y., Niwa T., Nishio T., Goto J., Hosoda H., *Anal. Sci.*, **18**, 1309–1314 (2002).
- 12) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Miyake S., Moriuchi A., Akisada T., Niwa T., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **87**, 12387–12395 (2015).
- 13) Jones S. T., Bendig M. M., *Bio/technology*, **9**, 88–89 (1991).
- 14) Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8998–9002 (1988).
- 15) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Morishita T., Fukushima S., Nishimori Y., Niwa T., Kobayashi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 2191–2198 (2017).
- 16) Leung D. W., Chen E., Goeddel D. V., *Technique*, **1**, 11–15 (1989).
- 17) Tannous B. A., Kim D. E., Fernandez J. L., Weissleder R., Breakefield X. O., *Mol. Ther.*, **11**, 435–443 (2005).
- 18) Kiguchi Y., Oyama H., Morita I., Katayama E., Fujita M., Narasaki M., Yokoyama A., Kobayashi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1062–1070 (2018).
- 19) Nicholls P. J., Johnson V. G., Blanford M. D., Andrew S. M., *J. Immunol. Methods*, **165**, 81–91 (1993).
- 20) Ravn U., Gueneau F., Baerlocher L., Osteras M., Desmurs M., Malinge P., Magistrelli G., Farinelli L., Kosco-Vilbois M. H., Fischer N., *Nucleic Acids Res.*, **38**, e193 (2010).
- 21) Hu D., Hu S., Wan W., Xu M., Du R., Zhao W., Gao X., Liu J., Liu H., Hong J., *PLoS One*, **10**, e0129125 (2015).
- 22) Rouet R., Jackson K. J. L., Langley D. B., Christ D., *Front. Immunol.*, **9**, 118 (2018).
- 23) Dreher M. L., Gherardi E., Skerra A., Milstein C., *J. Immunol. Methods*, **139**, 197–205 (1991).

論文審査の結果の要旨

抗体は特定の抗原を精密に認識して結合するため、診断・分析試薬として不可欠である。抗体を用いる微量定量法は免疫測定法と総称されるが、用いる抗体の標的抗原に対する親和力が大きいほど高感度な測定が可能になる。しかし、動物が保有する B 細胞レパートリーの多様性には限りがあるため、動物から得られる天然の抗体の親和力には限界がある。近年、抗体の分子構造を遺伝子レベルで改変する「抗体工学」により、従来法では得難い高親和力抗体を創出できるものと期待されている。抗体の機能改変では、一般に、プロトタイプとなる天然型抗体を分子量の小さい一本鎖 Fv フラグメント (scFv) に変換し、ランダムあるいは部位特異的変異を導入してバクテリオファージ粒子表面に提示する。得られる scFv 提示ファージの分子集団 (ライブラリー) のなかから、偶然に生成した改良型 scFv 提示ファージをパンニング (固定化抗原に対するアフィニティ抽出) で選択・単離する。しかし、パンニングの選択効率は必ずしも十分と言えず、目的の変異体の単離に多大な労力と時間を費やすのが実情であった。この難点は、ライブラリーを構成する scFv 遺伝子保持菌あるいは scFv 提示ファージのクローンの増殖率に差があることと、限られた量の固定化抗原に対して莫大な種類の scFv 提示ファージが競合的に反応することに起因する。木口氏は、以上の問題を抜本的に解決するために、「アレイ型プロファイリングシステム」を新規に考案した。本法では、変異 scFv 遺伝子で形質転換した大腸菌コロニーをマイクロウェル内で個別に、かつ網羅的に培養する。産生される微量の scFv 提示ファージは、その抗原親和力に応じて予めプレートに固定化された抗原に捕捉され、自作のルシフェラーゼ融合抗ファージ scFv により高感度に生物発光検出される。本研究では、重要な診断マーカーであるコルチゾールを標的抗原とする scFv のファージ提示ライブラリーを作製し、本システムによる高親和力変異体の探索を試みた。その結果、 $\sim 10^5$ クローンレベルの小さいライブラリーの 3% のみの処理から、 10^{10} オーダーの変異抗 CS 抗体フラグメントを計 5 種も得られるなど、従来のパンニングでは得難い優れた分子種を容易に得ることができた。しかもその効率は、「低 off-rate 指向選別ステップ」を加えることでさらに向上した。本研究では用手法で操作を行っているが、システムの自動化によりその有用性は一層高まるものと期待される。

木口氏の研究は、抗体工学的手法の可能性を飛躍的に高め、今後、様々な標的化合物に対する実用抗体の産生に貢献するものと期待される。以上、本論文は学位論文に相応しいものと評価される。