

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

2019

生命分析化学

木口 裕貴

目次

略語表	vi
緒論	1
本論	8
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	8
第1節 序	8
第2節 抗コルチゾールモノクローナル抗体の調製と諸性質	9
第3節 抗コルチゾール抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製と諸性質	11
第4節 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	16
第5節 考察	18
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	19
第1節 序	19
第2節 抗ファージモノクローナル抗体の調製と諸性質	20
第3節 抗ファージ抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製と諸性質	22
第4節 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	25
第5節 考察	29
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	30
第1節 序	30
第2節 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	33
第3節 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	36
第4節 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	39
第5節 高親和力変異体の免疫測定法における有用性	44
第6節 考察	46

結論	48
謝辞	50
実験の部	51
研究全般に関する項目	51
i. 装置	
ii. 器材	
iii. ソフトウェア	
iv. 緩衝液	
v. ステロイド類	
vi. トリチウム標識化合物	
vii. 抗体類および抗体関連試薬	
viii. 抗体以外の免疫化学関連試薬	
ix. 酵素類	
x. 基質溶液	
xi. その他の試薬・器材	
xii. 培地類	
xiii. 細胞とファージ	
xiv. ベクターDNA	
xv. プライマー	
xvi. キット類	
xvii. 電気泳動用ゲルと泳動条件	
xviii. 実験動物	
xix. 依頼分析	
第1章付属実験	59
第2節付属実験	59
1.2.1 項 CS-アルブミン結合体 (CS-BSA または CS-OVA) の調製	
1.2.2 項 抗CS抗体産生ハイブリドーマ株の樹立および 抗CSモノクローナル抗体の産生	
1.2.3 項 ELISAによる培養上清中抗CS抗体の検出	
1.2.4 項 Scatchard法による結合定数の算出	
1.2.5 項 Ab-CS#3を用いるELISA	
第3節付属実験	61

1.3.1 項	Ab-CS#3 および Ab-CS#10 抗体可変部遺伝子を含む cDNA の調製	
1.3.2 項	Ab-CS#3 抗体 H 鎖可変部遺伝子 (#3 V_H) を含む DNA 断片の調製	
1.3.3 項	Ab-CS#3 抗体 L 鎖可変部遺伝子 (#3 V_L) を含む DNA 断片の調製	
1.3.4 項	Ab-CS#10 抗体可変部遺伝子 (#10 V_H および#10 V_L) を含む DNA 断片の調製	
1.3.5 項	Ab-CS#3 および Ab-CS#10 抗体の V_H または V_L 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング	
1.3.6 項	Ab-CS#3 および Ab-CS#10 抗体の V_H および V_L 遺伝子の塩基配列の決定	
1.3.7 項	<i>scFv</i> 遺伝子構築のための V_H -DNA および V_L -DNA 断片の調製	
1.3.8 項	Ab-CS#3 抗体 <i>scFv</i> 遺伝子のクローニング	
1.3.9 項	CS#10- <i>scFv</i> 遺伝子の作製と大腸菌への導入	
1.3.10 項	可溶型 CS#3- <i>scFv</i> 遺伝子の作製と大腸菌への導入	
1.3.11 項	可溶型 CS#10- <i>scFv</i> 遺伝子の作製と大腸菌への導入	
1.3.12 項	可溶型 <i>scFv</i> の作製と精製	
1.3.13 項	Scatchard 法による結合定数の算出	
1.3.14 項	可溶型 CS#3- <i>scFv</i> を用いる ELISA	
第 4 節付属実験-----		66
1.4.1 項	Error-prone PCR による変異 <i>scFv</i> 遺伝子の調製	
1.4.2 項	変異 <i>scFv</i> 遺伝子のクローニングと DNA 塩基配列の決定	
1.4.3 項	KM13 ヘルパーファージの調製	
1.4.4 項	KM13 ヘルパーファージの力価算定	
1.4.5 項	変異 <i>scFv</i> 提示ファージライブラリーの調製とファージの力価算定	
1.4.6 項	抗 CS 活性を持つ変異 <i>scFv</i> 提示ファージのパンニングによる選択	
1.4.7 項	スクリーニングに用いるモノクローナル変異 <i>scFv</i> 提示ファージの調製	
1.4.8 項	モノクローナル変異 <i>scFv</i> 提示ファージのスクリーニング	
1.4.9 項	モノクローナル変異 <i>scFv</i> 提示ファージの調製	
1.4.10 項	モノクローナル変異 <i>scFv</i> 提示ファージの抗 CS 活性の評価	
1.4.11 項	可溶型変異 <i>scFv</i> の調製	
1.4.12 項	Scatchard 法による結合定数の算出	
第 2 章付属実験-----		71
第 2 節付属実験-----		71
2.2.1 項	VCSM13 ヘルパーファージの調製	
2.2.2 項	VCSM13 ヘルパーファージの力価算定	
2.2.3 項	抗 VCSM13 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立および抗 VCSM13 モノクローナル抗体の調製	

- 2.2.4 項 ELISA による培養上清中抗 VCSM13 抗体の検出
- 2.2.5 項 Ab-M13#71 を用いる競合 ELISA
- 2.2.6 項 イムノブロット法による Ab-M13#71 のエピトープの推定

第 3 節 付属実験 -----72

- 2.3.1 項 Ab-M13#71 抗体可変部遺伝子を含む cDNA の調製
- 2.3.2 項 Ab-M13#71 抗体 H 鎖可変部遺伝子 (V_H) を含む DNA 断片の調製
- 2.3.3 項 Ab-M13#71 抗体 L 鎖可変部遺伝子 (V_L) を含む DNA 断片の調製
- 2.3.4 項 Ab-M13#71 抗体の V_H または V_L 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング
- 2.3.5 項 Ab-M13#71 抗体の V_H および V_L 遺伝子の塩基配列の決定
- 2.3.6 項 *M13-scFv* 遺伝子構築のための V_H -DNA および V_L -DNA 断片の調製
- 2.3.7 項 Overlap extension PCR による *M13-scFv* 遺伝子の構築とサブクローニング
- 2.3.8 項 可溶性 M13-scFv の発現と電気泳動
- 2.3.9 項 可溶性 M13-scFv を用いる競合 ELISA
- 2.3.10 項 ビオチン化 VCSM13 フェージの作製
- 2.3.11 項 バイオレイヤー干渉法による結合定数の算出

第 4 節 付属実験 -----75

- 2.4.1 項 CS#10-scFv-*Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための *GLuc* 遺伝子を含む DNA 断片の調製
- 2.4.2 項 CS#10-scFv-*Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための *CS#10-scFv* 遺伝子を含む DNA 断片の調製
- 2.4.3 項 Overlap extension PCR による *CS#10-scFv-GLuc* 遺伝子の構築とサブクローニング
- 2.4.4 項 CS/ビオチン 2 重標識ポリ-L-リシンの作製
- 2.4.5 項 CS#10-scFv-*Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質の発現と電気泳動
- 2.4.6 項 CS#10-scFv-*Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質の発光測定
- 2.4.7 項 CS#10-scFv-*Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質の検出感度の検討
- 2.4.8 項 *M13-scFv-Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための *M13-scFv* 遺伝子を含む DNA 断片の調製
- 2.4.9 項 *M13-scFv-Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための *GLuc* 遺伝子を含む DNA 断片の調製
- 2.4.10 項 Overlap extension PCR による *M13-scFv-GLuc* 遺伝子の構築とサブクローニング
- 2.4.11 項 可溶性 M13-scFv-*GLuc* の発現と電気泳動
- 2.4.12 項 可溶性 M13-scFv-*GLuc* の結合能評価に用いる CS#10-scFv 提示フェージの作製

2.4.13 項	可溶型 M13-scFv-GLuc を用いるファージ ELISA	
第 3 章	付属実験	80
第 2 節	付属実験	80
3.2.1 項	ファージ作製条件の評価に用いる scFv 提示ファージの作製	
3.2.2 項	ELISA によるファージ作製条件の評価	
3.2.3 項	アレイ型選択法に用いる培地組成および培養時間の評価	
第 3 節	付属実験	81
3.3.1 項	変異 scFv 遺伝子ライブラリーによる大腸菌の形質転換とコロニー分離	
3.3.2 項	M13-scFv-GLuc を用いた発光強度のプロファイリング	
3.3.3 項	ファージの回収とサブクローニング	
3.3.4 項	モノクローナルファージの調製と抗 CS 活性の評価	
3.3.5 項	可溶型変異 scFv の調製	
3.3.6 項	Scatchard 法による結合定数の算出	
3.3.7 項	可溶型変異 scFv の大量調製と精製	
3.3.8 項	終止コドンが存在する可溶型変異 scFv のアミノ酸の同定	
第 4 節	付属実験	83
3.4.1 項	CS#10-scFv-GLuc 融合タンパク質を用いた off-rate 選択条件の検討	
3.4.2 項	M13-scFv-GLuc を用いた発光強度のプロファイリング	
3.4.3 項	ファージの再増幅と M13-scFv-GLuc を用いた off-rate の観測	
3.4.4 項	モノクローナルファージの調製と ELISA	
3.4.5 項	可溶型変異 scFv の調製	
3.4.6 項	Scatchard 法による結合定数の算出	
3.4.7 項	可溶型変異 scFv の大量調製と精製	
3.4.8 項	ビオチン化 CS-BSA の作製	
3.4.9 項	バイオレイヤー干渉法による解離速度定数の測定	
第 5 節	付属実験	84
3.5.1 項	可溶型変異 scFv を用いる ELISA	
引用文献		86

略語表

AAP: abridged anchor primer
Amp: ampicillin
ATP: adenosine 5'-triphosphate
AUAP: abridged universal amplification primer
BSA: bovine serum albumin
cDNA: complementary DNA
CDR: complementarity-determining region
cfu: colony-forming unit
C_H: heavy chain constant region
C_L: light chain constant region
CTP: cytidine 5'-triphosphate
CS: cortisol
CT: cotinine
dATP: deoxy ATP
dCTP: deoxy CTP
dGTP: deoxy GTP
DMSO: dimethyl sulfoxide
DNA: deoxyribonucleic acid
dNTP: deoxynucleoside triphosphate
dTTP: deoxy TTP
E₂: estradiol-17β
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
Fab: antigen-binding fragment
FLuc: firefly luciferase
FR: framework region
GLuc: *Gaussia* luciferase
GSP: group specific primer
GTP: guanosine 5'-triphosphate
IgG: immunoglobulin G
IPTG: isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside
Kan: kanamycin
NHS: *N*-hydroxysuccinimide (*N*-hydroxysuccinimidyl)
MOI: multiplicity of infection

mRNA: messenger RNA
OVA: ovalbumin
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PCR: polymerase chain reaction
PEG: polyethylene glycol
pfu: plaque-forming unit
POD: peroxidase
PVDF: poly(vinylidene fluoride)
RACE: rapid amplification of cDNA ends
RLuc: *Renilla reniformis* luciferase
RNA: ribonucleic acid
RT-PCR: reverse transcriptase-PCR
scFv: single-chain Fv fragment
SDS: sodium dodecyl sulfate
TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase
TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TTP: thymidine 5'-triphosphate
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
V_H: heavy chain variable region
V_L: light chain variable region

以下に塩基の略語を示す.

A: adenine
C: cytosine
G: guanine
T: thymine

以下にアミノ酸の略語を示す.

A: alanine
C: cysteine
D: aspartic acid
E: glutamic acid
F: phenylalanine
G: glycine
H: histidine
I: isoleucine

K: lysine
L: leucine
M: methionine
N: asparagine
P: proline
Q: glutamine
R: arginine
S: serine
T: threonine
V: valine
W: tryptophan
Y: tyrosine

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、特定の分子構造を精密に認識して強い親和力で結合する性質を持つため、幅広い分野で活用されている。2018年のノーベル化学賞および生理学・医学賞はいずれも抗体に関する業績に対して授与された。^{1,2)} 抗体の作製や応用に関連する進歩が人類・社会の発展に大きく寄与することを改めて周知させる快挙と言えよう。

医療分野では、周知のように、抗体そのものが癌や自己免疫性疾患の治療薬として使用されている。優れた分子標的薬となりうる資質を備え、承認件数も急増していることから、³⁾ その需要の高さがうかがえる。一方、抗体は、診断・分析試薬としても不可欠である。⁴⁾ 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。体液中のホルモンの動態解析は、免疫測定法の開発により可能になったと言っても過言ではない。本法は操作が簡便で検体処理能力も大きく、オンサイト分析やマススクリーニングにも最適である。妊娠検査やインフルエンザの診断に用いられている「イムノクロマトグラフィー」は、その特長を活かした改良法である。

免疫測定法の構築には抗体が必須であるが、免疫方法の工夫により様々な分子に対する抗体が得られるため、薬物やステロイドのような低分子化合物からタンパク質などの高分子化合物まで、多様な分子の測定が可能である。抗体を得るには、一般に実験動物を標的物質 (抗原) で過免疫する。すなわち、標的物質を非経口的に繰り返し投与するが、被免疫動物に対して異種の動物に由来する高分子化合物であれば、通常、抗体の産生が惹起される。他方、低分子化合物は一般に免疫原性を示さず、そのまま動物に投与しても抗体は産生されない。しかし、適切なキャリアー分子と共有結合させたのちに投与すると、低分子化合物が抗原決定基 (エピトープ) として働き、これを認識する抗体が得られるようになる。このような化合物は免疫化学の領域で「ハプテン」と総称される。

免疫後の動物から採血し、血液凝固成分を分離することで得られる抗血清は、そのまま分析試薬として利用することができる。しかし、含まれる抗体は複数の抗体産生細胞に由来するポリクローナル抗体であるため、一定品質のものを供給し続けることは困難であった。この問題は、ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体作製技術の確立により、抜本的に克服された。⁵⁾ 被免疫動物の脾細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合させて作製したハイブリドーマをクローン化するもので、単一の抗体産生細胞に由来する均質な抗体分子が得られる。モノクローナル抗体は測定の標準化に有利なことからポリクローナル抗体より利用価値が高く、最近の免疫測定法キットの多くが採用するに至っている。

免疫測定法は、その測定原理から非競合法と競合法に大別される。非競合法は、酵素や放射性同位体で標識した抗体を抗原（測定対象物）に対して過剰に反応させ、生成した抗原抗体複合体の量を標識のシグナル強度からモニターするものであり、抗原の増加に応じてシグナル強度も増加する（図 1a）。イムノメトリックアッセイとも呼ばれているが、1 分子中に 2 つ以上の抗原決定基（エピトープ）を有している高分子抗原であれば、2 種類の抗体で抗原を捕捉する two-site イムノメトリックアッセイ（サンドイッチアッセイ）の適用が可能で、高感度なアッセイ系を構築しやすい。^{6,7)} 近年、サンドイッチアッセイを fL（フェムトリットル）レベルの微小容器のなかで行う“デジタル ELISA”が開発され、⁸⁻¹⁰⁾ femtomolar~attomolar レベルの感度が達成されていることは特筆に値する。

一方、競合法は、測定対象の抗原（非標識抗原）と、一定量の標識抗原を、一定量の抗体に対して競合的に反応させる。非標識抗原を加えないとき、標識抗原の一部は抗体と結合し（B 画分）、一部は遊離の状態に残る（F 画分）。この反応系に非標識抗原の標準品を加えていくと、標識抗原と競合し、添加する抗原の増加に応じて B 画分の割合が減少するため、用量作用曲線が得られる（図 1b）。一般に上述のサンドイッチアッセイほどの測定感度は得難いものの、その分子全体が単独のエピトープとしてふるまうハブ

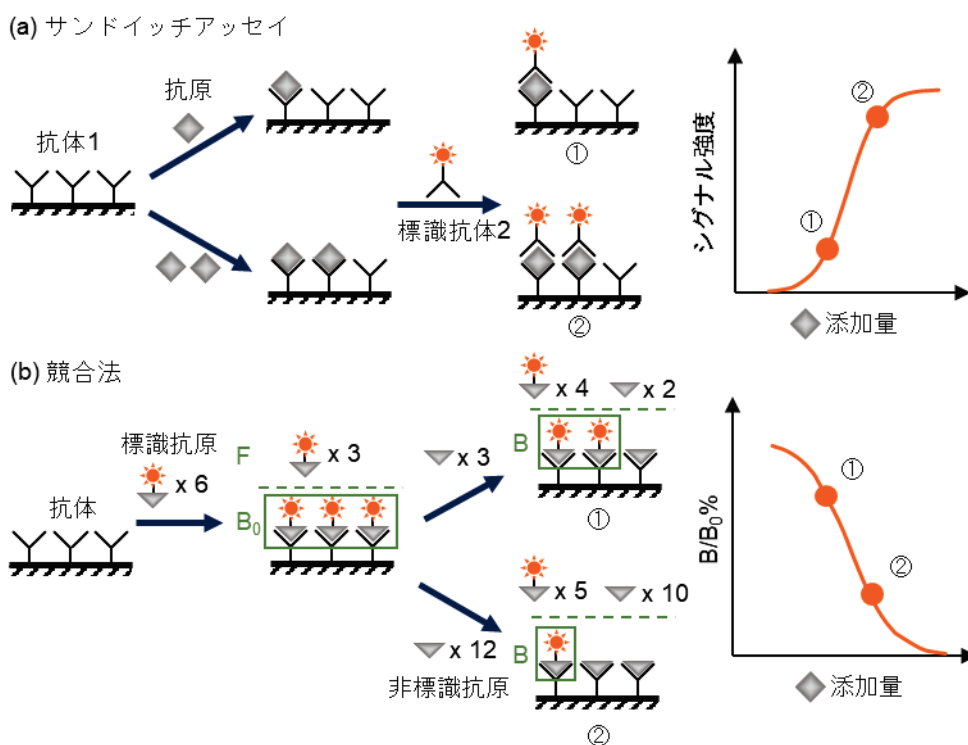


図 1. 非競合法（サンドイッチアッセイ）および競合法の原理

(a) 非競合法の代表例として、two-site イムノメトリックアッセイ（サンドイッチアッセイ）の原理を示す。固定化抗体に対して抗原を添加し、別のエピトープを認識する標識抗体で検出する。加える抗原の量を増加させると、得られるシグナル強度も増加する。(b) 競合法の原理を示す。一定量の抗体に一定量の標識抗原を非標識抗原とともに加える。適切な方法を用いて B 画分と F 画分を分離して（この例では抗体を固相に固定化することで達成される）、非標識抗原を添加しなかったときの B 画分のシグナルを B_0 、添加したときのそれを B とし、 B_0 に対する B の百分率 ($B/B_0\%$) を、添加した標準品の量に対してプロットすれば、右下がりの標準曲線が得られる。

テンに対しても適応が可能である。

免疫測定法の感度に影響する因子として、抗原や抗体の標識に用いられるマーカー物質の検出感度も挙げられるが、用いる抗体の標的抗原に対する結合親和力がとりわけ重要である。一般に、結合定数 K_a が大きいほど、換言すれば解離定数 $K_d (= 1/K_a)$ が小さいほど、高感度な測定が可能になる。競合法では、反応系に使用する標識抗原量に対して抗体量を抑える必要があるため、その影響が顕著に表れる。ハプテン抗原 (25-ヒドロキシビタミン D_3) のラジオイムノアッセイ (放射性同位体標識抗原を用いる競合型免疫測定法) をモデルとして標準曲線をシミュレーションした例から、競合法であっても抗体の K_a が 10^{12} M^{-1} 以上であれば、subfemtomole レベルの感度が期待できることが示されている。¹¹⁾ 放射性同位体よりも高感度に追跡可能な酵素などを標識し、標識抗原の添加量を減じることで、attomole レベルの検出も可能と推定される。しかし、動物を免疫する従来の抗体産生法により、 K_a が $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ を上回るような抗体が得られることは稀である。ハイブリドーマ法により $K_a = 1.7 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ のモノクローナル抗ジゴキシン抗体を得たとする例もあるが、¹²⁾ こうした高親和力抗体を確実に得るための明確な指針は見当たらない。

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、動物から得られる天然の抗体を上回る機能を備えた人工抗体 (変異抗体) を創製することが可能視されている。動物に頼らず、*in vitro* の実験系で抗体の機能を改良していくため、抗体の「試験管内分子進化」とも呼ばれる研究領域である。本法により上記のような高親和力抗体が得られるならば、免疫測定法の抜本的な高感度化が可能と期待される。抗体工学は 1980 年代末期から 1990 年代前半にかけて急速に進展し、技術基盤が確立された。^{13,14)} その契機は、抗原との結合に関わる抗体可変部の遺伝子クローニング^{15,16)} と、大腸菌を宿主として低分子フラグメント (後述) の発現が可能になったこと¹⁷⁻¹⁹⁾ である。

抗体の機能改変は、一般に次の手順により行われる。まず、ハイブリドーマ法などで既に得られている「天然の」抗体 [すなわち免疫グロブリン; 主に immunoglobulin G (IgG)] を低分子化する。多くの場合、その H 鎖と L 鎖の可変部ドメイン (それぞれ V_H , V_L) を人工の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) に変換する。IgG の抗原結合部位 (パラトープ) は V_H と V_L の間に位置するため、scFv も同様のパラトープを形成することが可能であり、対応する IgG の抗原結合能を保持していることが多い。しかも scFv 分子の大きさは IgG の約 1/6 であり (図 2)、大腸菌内で安定に発現できることに加え、^{20,21)} 単一のオープンリーディングフレームにより転写、翻訳されるため、遺伝子操作が容易である。次に、これをプロトタイプとして何らかの方法でランダム変異あるいは部位特異的な変異を導入し、適切な宿主に発現させることにより多様性に富む変異 scFv のライブラリーを得る。このなかから「偶然に」生成した稀少な改良型変異 scFv を、大量に副生する「改悪型」scFv から分

離しつつ獲得するのである。この工程を効率よく行うために、遺伝型-表現型対応型技術が開発された。すなわち、表現型である scFv タンパク質と、それをコードする遺伝子を、同一の粒子の構成成分として一体化させる技術である。これにより、改悪型 scFv に埋没した改良型 scFv の検出・単離と、その複製による必要量の生産を連続的に行うことが可能となった。scFv 遺伝子の塩基配列から、改良型 scFv の 1 次構造を推定することも容易である。

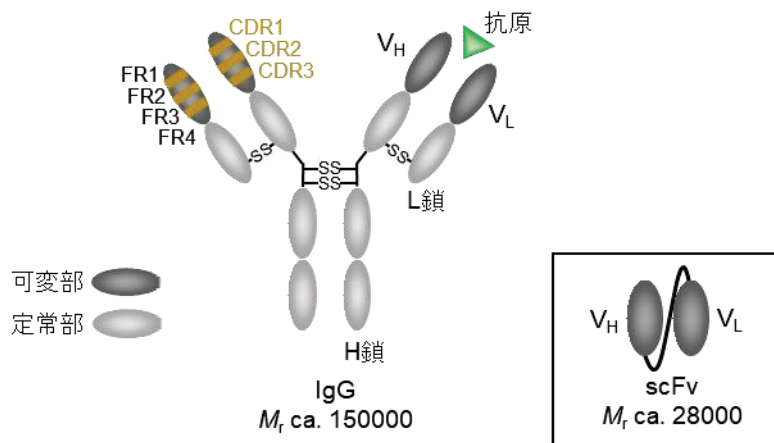


図 2. 抗体 (IgG) および一本鎖 Fv フラグメント (scFv) の構造

免疫測定法に一般的に用いられる抗体は IgG である。2 本の H 鎖と L 鎖からなるタンパク質で、それぞれ N 末端に可変部 (V_H , V_L) を持つ。抗原結合部位 (パラトープ) は V_H と V_L の間に位置する。可変部内には抗原の結合に大きく関与する相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) が 3 カ所、そして、その構造を支持する枠組み配列 (framework region; FR) が 4 カ所存在する。scFv は V_H と V_L を可動性に富む人工のリンカーペプチドで連結した抗体フラグメントである。

遺伝型-表現型対応型技術の代表例はファージ提示法である。この方法を 1985 年に報告した Smith は、本法を抗体機能の改変に応用した Winter と共に 2018 年のノーベル化学賞を受賞した。^{1,22-24)} ファージ提示法とは繊維状バクテリオファージ粒子の表面にペプチドやタンパク質などの標的分子を提示する技術であり、生成する標的分子提示ファージのゲノム内にその分子をコードする遺伝子が組み込まれるため、遺伝型と表現型の対応が達成される。ランダム変異を導入した scFv 遺伝子ライブラリーを一挙にファージ提示することにより、変異 scFv 提示ファージライブラリーが作製される。このなかから改良型 scFv を選択する方法として、「パンニング」という手法が用いられる (図 3)。すなわち、ファージライブラリー全体を固相に固定化した抗原に一挙に反応させ、結合したファージのみを何らかの方法で溶出する。こうして得られる抗原特異的な scFv 提示ファージはごく微量であるが、ファージが大腸菌に感染して増殖する性質を利用して迅速に必要な量を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 (図 3)。この方法により、本来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」と呼ばれている。その成果として、タンパク質などの高分子抗原に対しては、1000 倍以上もの親和力の向上を経て、その K_a が 10^{10} を上回る抗体を作製した例がいくつか報告されている。¹³⁾ なお、遺伝型と表現型を対応させる手段として、酵母の

細胞表面に存在する分子を利用する酵母表層提示法²⁵⁾や、無細胞タンパク質合成系を利用して messenger ribonucleic acid (mRNA)-リボソーム-標的タンパク質の複合体を形成させるリボソームディスプレイ²⁶⁾も開発されているが、取り扱いの簡便さやシステムの安定性に優れることからファージ提示法が最も普及している。

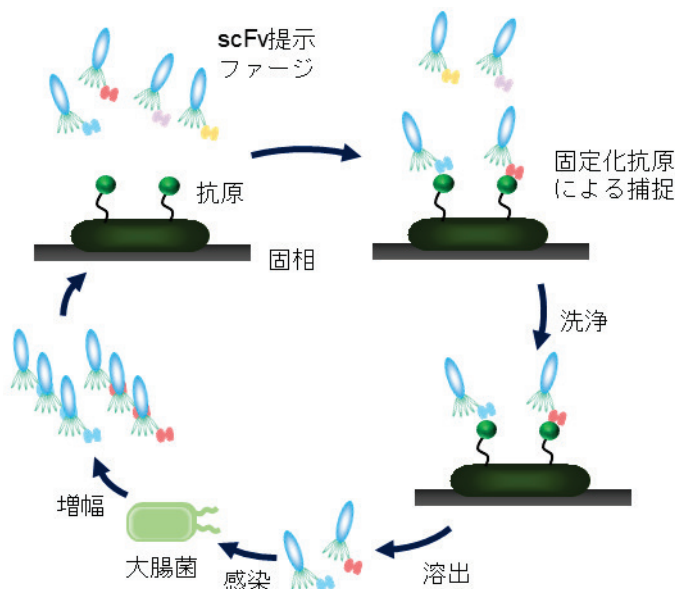


図 3. ファージ提示法を利用した試験管内分子進化の原理

ファージ提示法を用いて作製した変異 scFv 提示ファージライブラリーを固相に固定化した抗原に反応させ、抗原特異的なファージを捕捉する。未反応のファージを洗浄したのち、固相に残るファージを酸や塩基などで溶出し、大腸菌に感染させることで、抗原特異的なファージが濃縮された2次ライブラリーが作製される。このサイクル (パンニングと呼ばれる) を繰り返して、目的の性質をもつクローンを獲得する。

しかしながら、ファージ提示法における改良型分子種を選択効率については改善すべき問題が残されている。パンニングを行っても、より高い親和力を示す変異体がより優先的に濃縮されるとは限らず、一般的に溶出された多数の scFv 提示ファージクローンについて個別の解析 (スクリーニング) が必要である。その結果、高親和力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。これは、主に次の2つの可能性に起因するものと考えられる。まず、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) の増殖率の差が挙げられる。パンニングを実行するに際しては、変異 scFv 遺伝子を導入した直後に得られる「オリジナルライブラリー」の形質転換大腸菌を再培養したのち、ヘルパーファージを感染させて十分量のファージを生産する必要がある。その際、大腸菌の増殖速度やファージ粒子の形成率 (パッケージング率) にクローン間で大きな差が生じる。希少な改良型変異体のクローンが順調に増殖する保証はなく、野生型や改悪型クローンに淘汰される可能性もありうる (図 4)。実際、Derda らは、パンニングにおける各過程の前後で得られるペプチド提示ファージクローンを追跡した結果、ライブラリーの多様性は標的物質に対する選択よりもむしろ増幅の過程で大きく減少していく、つまり少数の変異クローン種からなる集団に収束していくことを示した。²⁷⁾ これは、パンニングで最終的に得られるファージ集団は、

抗原結合能の高さより、むしろ複製率の高さを反映したものであることを意味する。

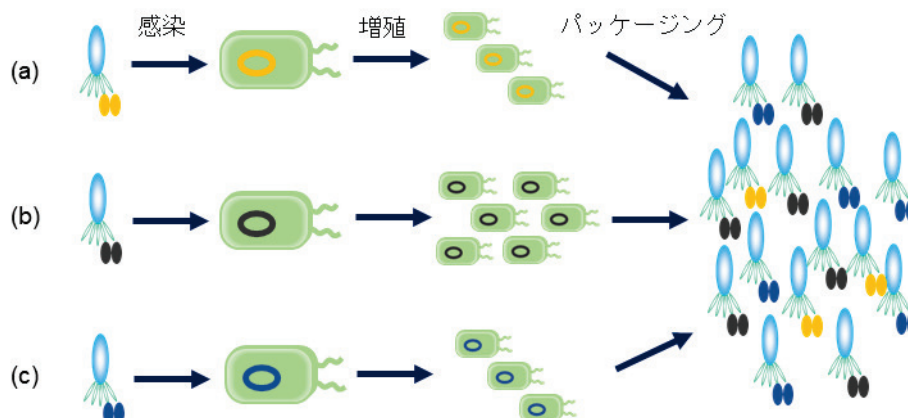


図 4. フェージライブラリー作製における大腸菌の増殖速度やパッケージング率の差の影響
 scFv 提示フェージ感染後の大腸菌の増殖速度やフェージ粒子のパッケージング率が異なる場合に作製されるフェージライブラリーの状態を示す。クローン (a) の増殖速度やパッケージング率を標準とすると、クローン (b) はパッケージング率は標準レベルであるが増殖速度が速く、クローン (c) は増殖速度は標準レベルであるがパッケージング率が高い。クローン (a) が目的の改良型であったとしても、パンニングを繰り返すことにより、(b) や (c) に淘汰されることがありうる。

さらに、パンニングでは、限られた量の固定化抗原あるいはビオチンなどのアフィニティ抽出用タグを付加された抗原に対して、莫大な種類の scFv 提示フェージクローンが同時に反応することになる。複製率が高く大量に増幅された改悪型あるいは野生型の scFv 提示フェージが競合的に反応することにより、ごく微量の希少な改良型 scFv 提示フェージの捕捉が妨げられることは想像に難くない (図 5)。

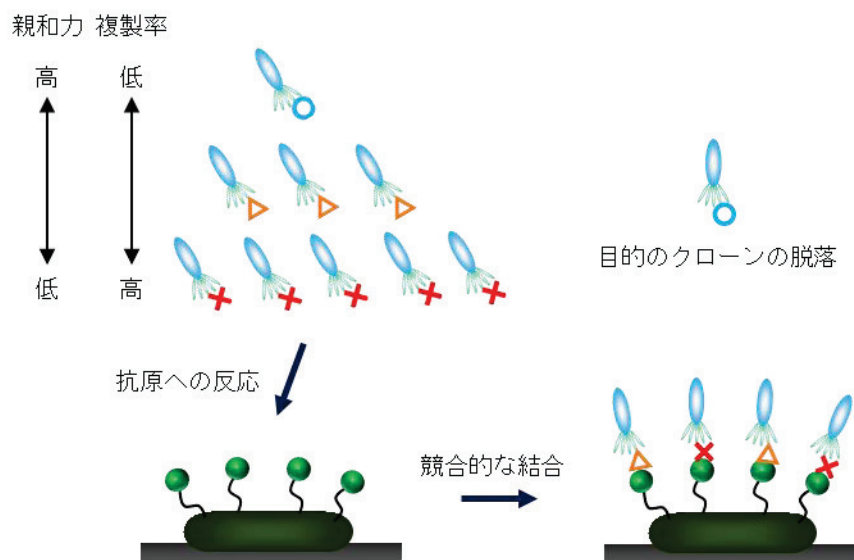


図 5. パンニングにおける競合反応
 親和力が高く、複製率の低いクローンと、親和力が低く、複製率の高いクローンが共存する場合、複製率の高いクローンがライブラリーの大部分を占める。このライブラリーをまとめて抗原に反応させた場合、低親和力クローンに抗原が占有されてしまい、獲得すべき高親和力クローンが結合せず、ライブラリーから脱落してしまうこともありうるだろう。

以上のパンニングに起因する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個別に抗原と反応させ、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、図 6 に示す「アレイ型プロファイリング」システムを考案した。すなわち、あらかじめヘルパーファージを含む培地を分注した抗原固定化プレートのマイクロウェルに、*scFv* 遺伝子を保持する形質転換菌クローンを個別に接種して「コロニーアレイ」を作成し、ウェル内で培養してファージを産生させ、抗原に結合した *scFv* 提示ファージを抗ファージ抗体を用いて検出するものである。そ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用いる変異 *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獲得を試みた (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)。

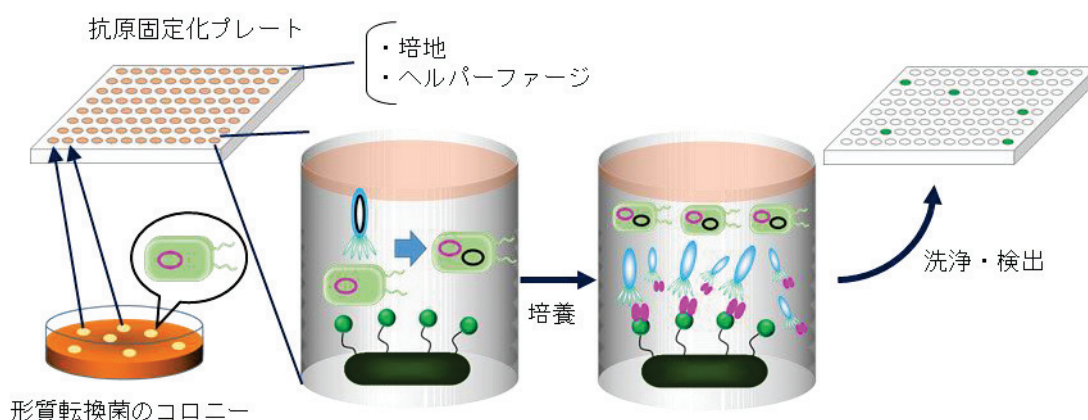


図 6. アレイ型プロファイリングシステムの概略図

変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーで形質転換した大腸菌を寒天培地に塗布して培養し、形成したコロニーを、あらかじめヘルパーファージを含む培地を分注した抗原固定化マイクロプレートの各ウェルに懸濁する。その後、十分な時間振とう培養することで、ウェル内で *scFv* 提示ファージが産生されつつ、抗原に捕捉される。洗浄後、固相上のファージを検出することで、抗原特異的なファージが存在するウェルを特定する。

本論

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

第1節 序

ファージ提示法による試験管内親和性成熟は、高分子抗原を標的とする抗体については成功例が複数報告されている。¹³⁾ところが、抗ハプテン抗体については成功例に乏しい。²⁸⁻³⁴⁾ 実際、著者の所属研究室では4種のハプテンについて高親和力変異 scFv の創製に成功しているものの、その単離には多大な労力と時間を費やしている。³²⁻³⁶⁾

これは緒論で言及したパンニング固有の諸問題が原因と考えられる。アレイ型プロファイリングシステムはこれらの問題を抜本的に解決し、改良分子種の獲得効率を飛躍的に向上させるものと期待される。本法は抗原の種類にかかわらず、あらゆる抗体の試験管内親和性成熟に有効と考えられるが、本研究では、その構築にあたり、あえてパンニングの成功例が少ない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性能を評価することとした。

モデルハプテンとして、コルチゾール (cortisol; CS, M_r 362.5) を選んだ。CS はヒトにおける主要な糖質コルチコイドであり、視床下部-下垂体-副腎系機能の評価に重用されるため、³⁷⁾ 診断試薬としての抗 CS 抗体の需要は恒常的に高い。しかしながら、動物に免疫する従来法により CS に対して満足のいくモノクローナル抗体を得ることは容易ではなく、成功例は少ない。³⁸⁻⁴⁰⁾ そこで、CS を抗原とする scFv の変異体ライブラリーを作製することにした。

そのためには、プロトタイプとなる天然型抗体可変部の遺伝子が必要になる。そこで、まず、ハイブリドーマ法により抗 CS 抗体産生細胞株の樹立を企てた (第2節)。その結果、親和力の異なる2種類の抗 CS モノクローナル抗体が得られた。次いで、これら天然型抗体の可変部遺伝子をクローニングし、遺伝子操作に適する低分子量フラグメント、scFv に変換した (第3節)。得られた2種の scFv のうち、あえて親和力の低い scFv を試験管内親和性成熟の出発物質 (野生型; wt-scFv) とし、error-prone polymerase chain reaction (PCR) によりランダム変異を導入したライブラリーを作製した (第4節)。そして、アレイ型プロファイリングシステムに対する対照実験として、本ライブラリーから標準的なパンニングにより高親和力変異体を単離することを試みた (第4節)。

第2節 抗コルチゾールモノクローナル抗体の調製と諸性質

ハプテンとはそれ自体で免疫原性を持たない低分子化合物の総称であり、そのまま動物に投与しても抗体は産生されない。しかし、適切な高分子キャリアーと共有結合したのちに投与すると、キャリアー上のハプテン基がエピトープとして働き、抗体が得られるようになる。その際、ハプテン分子のどの位置をキャリアーと結合させるかが、産生される抗体の特異性を決定する重要な要素である。⁴¹⁾ すなわち、一般に、キャリアー結合部位から遠く、キャリアーによる立体障害を受けにくい部分構造をよく認識する抗体が得られてくる。図 7a に CS の構造を示す。11 位のヒドロキシ基と 17 位の側鎖が CS の構造を特徴づける官能基であり、これらの認識に優れることが実用的な抗体の条件である。この点を考慮して、CS の 3 位にキャリアー結合用ブリッジを持つ誘導体、CS 3-(*O*-carboxymethyl)oxime (CS-3CMO) (図 7b) を用いて、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) と結合させたハプテン-キャリアー結合体 (CS-BSA) (図 7c) を調製し、免疫原に用いた。^{35,42)} なお、同時に産生されると想定される BSA に特異的な抗体の影響を避けるため、BSA を卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) に置き換えた結合体 (CS-OVA) も併せて作製し、血清中の抗体価の比較や、ハイブリドーマのスクリーニングに用いた。

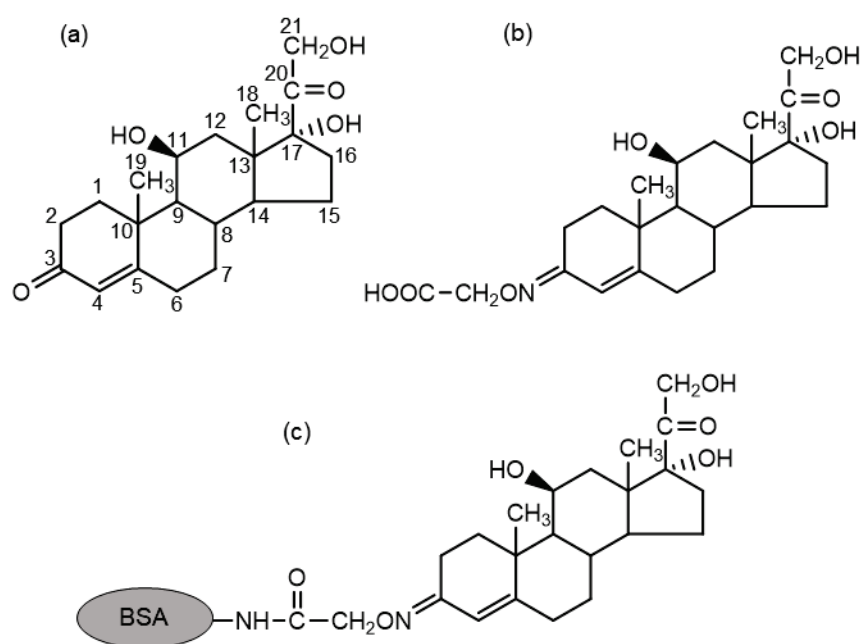


図 7. コルチゾールおよびその誘導体の構造

(a) コルチゾール, (b) CS-3CMO, および (c) CS-BSA 結合体の構造を示す。

CS-BSA を免疫原として、BALB/c マウスを繰り返し免疫したのち、血中の抗 CS 抗体価の上昇したマウスを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により特定し、それらマウスの脾細胞を P3/NS1/1-Ag4-1 (NS1) ミエローマ細胞と融合させた。得られる抗

CS 抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、抗 CS 抗体産生細胞株#3 および#10 を得た。これら細胞株が分泌する抗体 Ab-CS#3 および Ab-CS#10 の H 鎖および L 鎖のアイソタイプを調べたところ、H 鎖は Ab-CS#3 では $\gamma 1$ 、Ab-CS#10 では $\gamma 2b$ であり、L 鎖はともに κ であった。

次いで、Ab-CS#3 および Ab-CS#10 の K_a を、 $[^3H]$ -CS をトレーサーに用いる Scatchard 法⁴³⁾により算出したところ、それぞれ 4.7×10^7 、 $4.0 \times 10^{10} M^{-1}$ であった。Ab-CS#10 は CS に対してすでに十分に大きい親和力をもつことから、試験管内親和性成熟の出発物質としては Ab-CS#3 がむしろ好適と判断した。そこで、Ab-CS#3 の競合 ELISA における感度を調べた。すなわち、CS-BSA を固定化したマイクロプレートに Ab-CS#3 および各種濃度の CS 標準品を加えて競合反応を行い、固相に残る Ab-CS#3 をペルオキシダーゼ (peroxidase; POD) 標識抗マウス抗体により捕捉した。固相上の POD 活性は、*o*-フェニレンジアミン/過酸化水素を用い、比色法で測定した。用量作用曲線を作成したところ、midpoint (50%阻害に要する CS 量) は 28 ng (図 8) であった。CS の血中濃度基準値 (2.7~15.5 $\mu g/dL$)⁴⁴⁾ を考慮すると、臨床試験へ適用するためには、およそ 1~10 ng/assay の測定範囲が求められるが、この結果は明らかに不十分である。

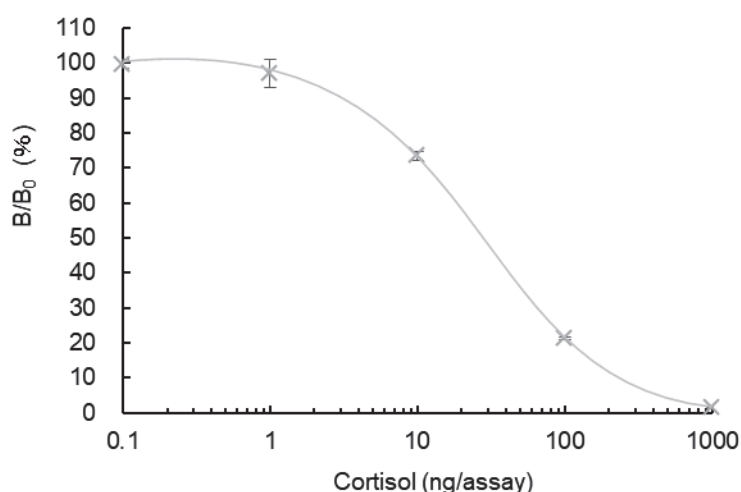


図 8. Ab-CS#3 を用いる CS の競合 ELISA

CS-BSA を固定化したマイクロプレートに Ab-CS#3 および CS 標準品を加えて競合反応を行い、得られた用量作用曲線を示す。各点のエラーバーは 4 重測定標準偏差を示す。

第3節 抗コルチゾール抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製と諸性質

緒論で述べたように、抗体の遺伝子操作では、改変を加える対象の抗体を scFv として取り扱うのが好都合である。そこで、前節で作製した Ab-CS#3 を scFv に変換し、その諸性質に検討を加えた。また、アレイ型プロファイリングシステムを構築するにあたり、各ステップの条件を設定するうえで高親和力抗体も必要となることが想定される。それに備えて Ab-CS#10 の scFv 化も併せて行った。

scFv 化には、抗体可変部ドメイン (V ドメイン) の遺伝子 (V 遺伝子) のクローニングが必須である。V 遺伝子のクローニング法としては、抗体産生ハイブリドーマから総 RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を合成したのち、含まれる V 遺伝子を PCR により増幅 [すなわち, reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)] するのが一般的である。V 遺伝子の 3'末端には、抗体のアイソタイプごとにほとんど一定の配列をもつ定常部遺伝子 (C 遺伝子) が隣接する。したがって、目的の抗体のアイソタイプが同定されているならば、3'プライマーの選定は容易である。これに対して、5'プライマーの選択は難しい。その結合部位として、可変部 N 末端に位置する枠組み配列 (framework region; FR) 1 (図 2) あるいはさらに上流のリーダー配列の塩基配列を利用することになるが、いずれも大きな多様性を示すためである。このような場合、5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法⁴⁵⁾ が有効である。本法では、cDNA の 3'末端に terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) と deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) を働かせてポリシチジル酸 (ポリ C) 配列を付加し、これを 5'プライマーの結合部位として PCR を行う (図 9)。したがって、3'末端側の配列さえ既知であれば、その上流の遺伝子の塩基配列を増幅することができる。

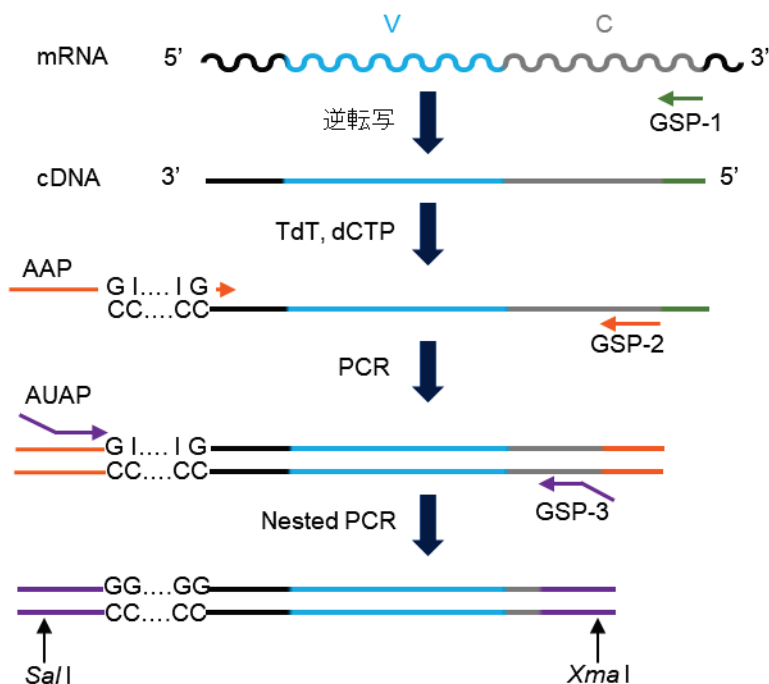


図 9. 5'RACE 法に基づく抗体可変部遺伝子クローニングの概要

抗体産生ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として、C 領域に相補的な GSP-1 プライマーおよび逆転写酵素を用いて V 遺伝子を含む cDNA を合成したのち、TdT および dCTP を作用させてその 3'末端にポリ C 配列を付加する。続いて、GSP-1 よりも上流の C 領域に相補的な GSP-2 プライマーと AAP を用いて PCR を行う。AAP 中の I はイノシンを示す。その増幅産物を鋳型に、制限酵素配列を含むプライマー (AUAP および GSP-3) を用いて nested PCR を行う。得られた産物を制限酵素で消化後、ベクターへ挿入する。

前節に記したように, Ab-CS#3 および Ab-CS #10 の H 鎖および L 鎖のアイソタイプは同定されている. そこで, まず, 5'RACE 法による V 遺伝子のクローニングを試みた (図 9). 前節で樹立したハイブリドーマ株より総 RNA を抽出し, それぞれの C 遺伝子に特異的なプライマー [group specific primer (GSP)-1] と逆転写酵素を作用させることにより, V 遺伝子を含む cDNA を合成した. 次に, これらの cDNA の 3'末端に上述のようにポリ C 配列を付加したのち, ポリ C 配列に相補的なプライマー (abridged anchor primer; AAP) と, GSP-2 (C 遺伝子上, GSP-1 よりも 5'側の配列に相補性を示す) を用いて PCR を行った. さらに増幅の特異性を高めるために, 得られた産物を鋳型として, AAP の 5'側と同じ配列を有するプライマー (abridged universal amplification primer; AUAP) と GSP-3 (C 遺伝子上, GSP-2 よりも 5'側の配列に相補性を示す) プライマーを用いる nested PCR を行ったところ, Ab-CS#3 の V_L 遺伝子, Ab-CS#10 の V_H および V_L 遺伝子を含む DNA 断片が得られた.

ところが, Ab-CS#3 の V_H 遺伝子を含む DNA 断片は得られなかったため, Jones ら⁴⁶⁾が開発したユニバーサルプライマーセットを用いるクローニングを試みた (図 10). このプライマーセットは, 12 種類の縮重プライマー (MHV-1~12) から構成され, 多くの場合, これらのいずれかが標的の V_H 遺伝子のリーダー配列に相補性を示す. 上記の cDNA を鋳型とし, これらプライマーのいずれかと H 鎖定常部に相補的なプライマー (MHC) を用いる 12 種の RT-PCR を試みたところ, MHV-2 プライマーを用いたときに目的の遺伝子断片を得ることができた.

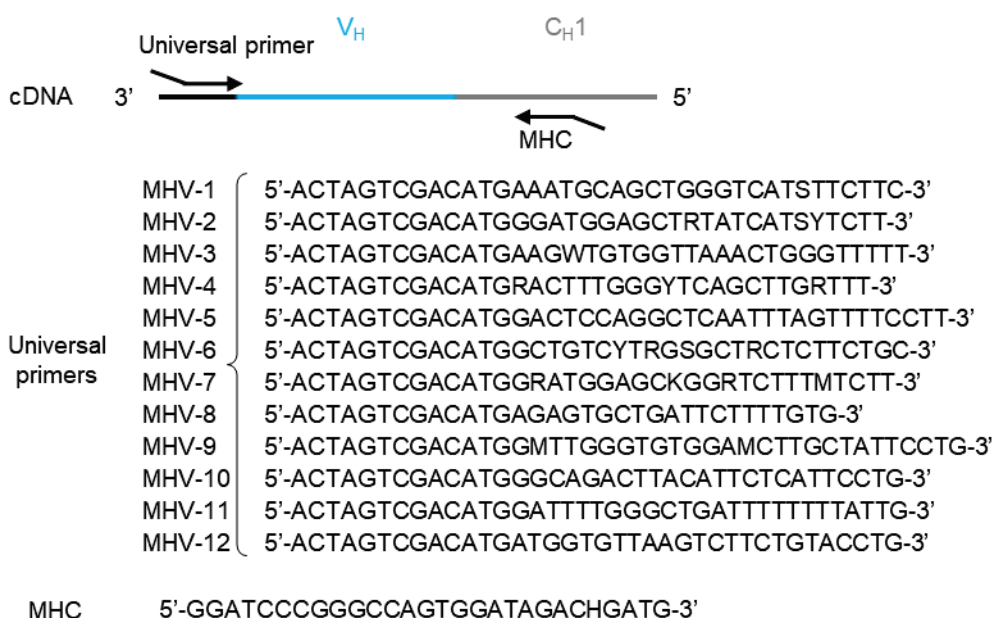


図 10. ユニバーサルプライマーセットを用いる V_H 遺伝子のクローニング

Jones らによって報告されたユニバーサルプライマーセットを示す.⁴⁶⁾ これらのプライマーを用いて PCR を行うことにより, 目的の V_H 遺伝子の特異的に増幅し, クローニングすることが可能である. プライマー中の Y, R, W, K, M, S はそれぞれ C または T, A または G, A または T, G または T, A または C, C または G を示す. C_H は H 鎖定常部を示す.

引き続き、得られた V_H , V_L 各遺伝子断片を pBluescript II ベクターへサブクローニングし、大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入した。形質転換菌のクローンをコロニーPCR に付して V 遺伝子を保持するクローンを特定し、組換えプラスミドを抽出して、DNA 塩基配列を解析した。導かれるアミノ酸配列を Kabat の抗体シーケンスデータベース⁴⁷⁾ と照合したところ、Ab-CS#3 および Ab-CS#10 の V_H ドメイン (それぞれ 115 アミノ酸, 118 アミノ酸からなる), V_L ドメイン (それぞれ 113 アミノ酸, 114 アミノ酸からなる) を同定した。 V_H , V_L に 3 カ所ずつ存在し、抗原と直接相互作用するとされる相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) の配列も決定することができた。ところで、抗体の V ドメイン全体のアミノ酸配列は大きな多様性を示すが、FR の多様性は比較的小さく、Kabat らはこれらを基に V_H を 11 種, V_L を 7 種のサブグループに分類している。⁴⁷⁾ Ab-CS#3 については V_H をサブグループ IIB, V_L をサブグループ III に、Ab-CS#10 については V_H を IB, V_L を II に帰属することができた。

次に、得られた塩基配列をもとに、 V_H , V_L 各遺伝子の 5'末端と 3'末端に相補的なプライマーをそれぞれ設計して PCR を行い、scFv 遺伝子を構築するための DNA フラグメントを調製した。Ab-CS#3 については、増幅した V_H , V_L 各遺伝子を scFv フェージ提示用ベクター (pEXmide 7) の V_H クローニングサイト, V_L クローニングサイトに順次組み込み、対応する scFv (CS#3-scFv) の遺伝子をプラスミド内に構築した (図 11)。pEXmide 7 には、 V_H および V_L の各クローニングサイトの間、リンカーペプチド [VSS(GGGGS)₃T] (アミノ酸配列を一文字表記で示す) をコードする遺伝子があらかじめ導入されている。なお、この配列のうち、(GGGGS)₃ は scFv 調製における標準的なリンカー配列で、^{21,48)} 両端の VSS と T は V_H , V_L を導入するための制限配列に由来するものである。一方、Ab-CS#10 を scFv 化するために、 V_H 増幅の 3'プライマー (CS#10V_H-For) と V_L 増幅の 5'プライマー

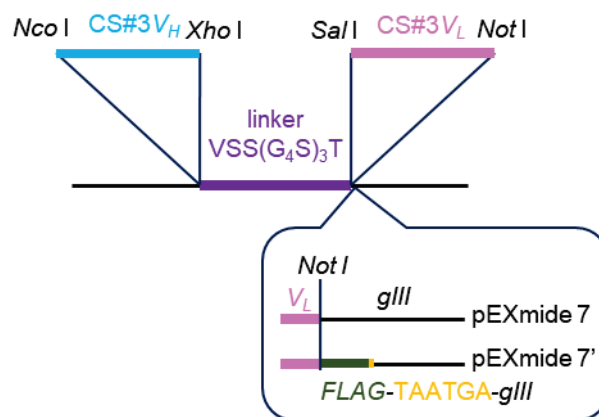


図 11. CS#3-scFv 遺伝子の構築および pEXmide 7 と pEXmide 7' のクローニングサイト

PCR により増幅した可変部遺伝子のうち、 V_H は *Nco*I および *Xho*I で、 V_L は *Sal*I および *Not*I でそれぞれ消化し、順次 pEXmide 7 ベクターに組み込むことで CS#3-scFv 遺伝子を構築した。ベクター内で完成した scFv 遺伝子はフェージ *gIII* と直結するため、scFv-pIII 融合タンパクとして発現されてフェージ粒子に組み込まれる。これに対して pEXmide 7' は、pEXmide 7 の V_L クローニングサイトの下流に FLAG および 2 重の終止コドン (TAATGA) を挿入したものであり、scFv 遺伝子は可溶性 scFv タンパク質として発現される。

(CS#10V_L-Rev) に、これらの連結部となるリンカーペプチド [(GGGGS)₃] をコードする配列の一部を導入した。この配列の相補性を利用する overlap extension PCR により、V_H と V_L を連結して CS#10-scFv 遺伝子を構築し (図 12), scFv フェージ提示用 pEXmide 5 ベクター⁴⁹⁾ にサブクローニングした。

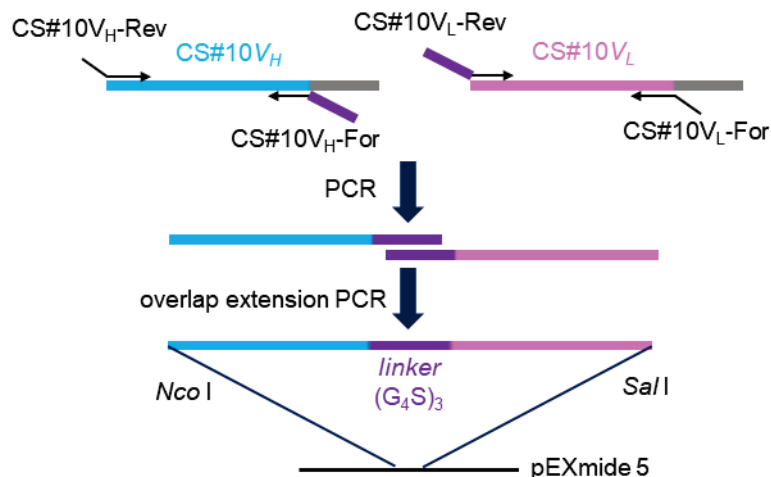


図 12. Overlap extension PCR による CS#10-scFv 遺伝子の構築

Ab-CS#10 の V_H, V_L 遺伝子を PCR により増幅する。このとき、V_H 増幅の 3'プライマーと V_L 増幅の 5'プライマーにリンカーペプチド [(GGGGS)₃] の一部をコードする遺伝子を導入しておく。増幅された各遺伝子断片のうちリンカーペプチド配列の一部が相補的であるため、両者を混合して PCR を行うことにより scFv 遺伝子が構築される。この遺伝子を制限酵素で処理して pEXmide 5 ベクターに組み込んだ。

これらの組換えプラスミドを大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入し、コロニーPCR により目的の scFv 遺伝子 (CS#3-scFv および CS#10-scFv) を保持するクローンを同定した。その塩基配列を解析したところ、最初に同定した V_H と V_L の塩基配列が変異を伴うことなく保持されていることが分かった。また、CS#3-scFv 遺伝子を pEXmide 7 ベクターに組み込み、大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。pEXmide 7 ベクターとは、pEXmide 7 ベクターを可溶性 scFv (フェージに連結されていない scFv をこのように呼ぶ) の発現用に改変したものである (図 11)。このベクターの V_L 遺伝子の 3'末端部分には FLAG タグ (DYKDDDDK のアミノ酸配列)⁵⁰⁾ をコードする塩基配列および 2 重の終止コドン (TAATGA) が配置されており、挿入された scFv 遺伝子は、lac プロモーターの支配下で可溶性タンパク質として発現され、pelB リーダーペプチドの働きによりペリプラズム間隙に放出される。⁵¹⁾ 他方、CS#10-scFv については、CS#10V_H-Rev および FLAG-TAA2 プライマーを用いた PCR により可溶性 scFv 発現用の遺伝子を増幅し、pEXmide 5 ベクターに組み込んだのち、大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。得られたこれらの形質転換菌を、イソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG) とスクロースの存在下で培養し、浸透圧ショック法により、可溶性 CS#3-scFv および CS#10-scFv が含まれるペリプラズム抽出物を得た。

これら scFv の K_a を Scatchard 法により算出したところ、CS#3-scFv は 3.4 × 10⁸ M⁻¹, CS#10-scFv は 1.7 × 10¹⁰ M⁻¹ であった。また、親和性成熟の出発物質となる CS#3-scFv を

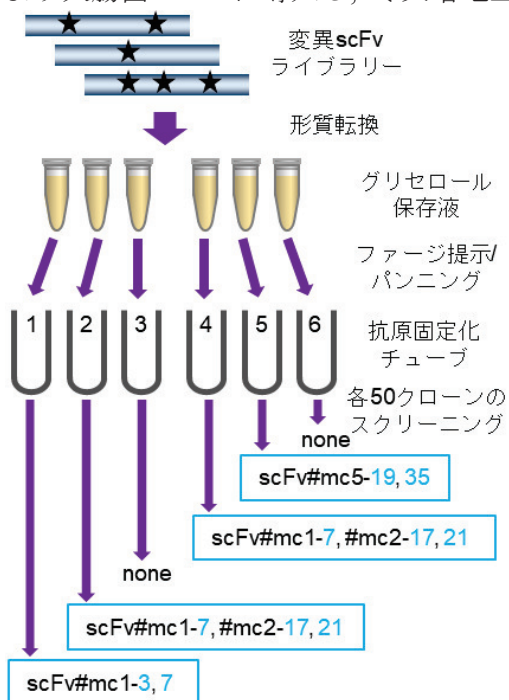
前節と同様の競合 ELISA に付したところ, CS の増量に応じたシグナルの減少が認められた. 用量作用曲線の midpoint は 720 pg であり, Ab-CS#3 (28 ng; 前節参照) に比べて大幅に高感度化していた. CS#3-scFv が, 「親抗体」となる Ab-CS#3 (K_a ; $4.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) よりも親和力が増大した理由は定かではないものの, 競合 ELISA における感度の改善は, 親和力の変化だけでなく, 抗体 1 分子内のパラトープ数 (IgG では 2, scFv では 1) による影響も反映したものであると考えられる.

第4節 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

試験管内親和性成熟では、プロトタイプとなる抗体フラグメントの遺伝子に変異を導入して得られる変異遺伝子群を、適切な宿主に発現させてライブラリーを構築し、偶然に生じることがわずかな改良型分子種を選択して単離する。変異の導入方法としては、PCR の忠実度 (フィデリティ) を故意に低下させて行うことで点変異を導入する方法 (error-prone PCR)⁵²⁾ や、CDR など機能改変に有効と考えられる部位に縮重配列をもつ化学合成オリゴDNAを導入する方法⁵³⁾ が用いられる。前者は操作も簡便であり、標的遺伝子の広い範囲にわたって適度な頻度の変異を加えるのに適している。

そこで本研究では、error-prone PCR により、CS#3-scFv (これを野生型 scFv とし、以後 wt-scFv と略す) の全長にランダム変異を導入したライブラリーを作製した。本法では PCR 反応液に Mn^{2+} を添加し、さらに 4 種の deoxynucleoside triphosphate (dNTP) を不均等な割合で添加することにより、フィデリティを低下させる。wt-scFv 遺伝子が組み込まれた pEXmide 7 ベクターを鋳型として、0.10 mM Mn^{2+} 存在下、deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP) のみを他 3 種の 1/5 に減じた条件で PCR を行った。増幅酵素には、入手が容易なものなかではフィデリティが元来低い *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼを用いた。プライマーは、5'プライマーに pEX7-V_H-CP5 (V_Hの上流に位置する *pelB* 配列に相補性を示す)、3'プライマーに pEX7-V_L-CP3 (V_Lの下流に位置する *gIII* に相補性を示す) を用い、リンカーを含めた scFv 全長に変異を導入した。

得られた増幅産物を pEXmide 7ベクターに組み込み、電気穿孔法 (electroporation) により大腸菌 TG1 に導入し、寒天培地上で一晩培養して形質転換菌のライブラリー (5.9



×10⁵ クローンを含む) を作製した。寒天培地上のすべてのコロニーを混合して均一なグリセロール保存液としたのち、その一部を 6 分割して、それぞれを対数増殖期まで培養し、ヘルパーファージ KM13⁵⁴⁾ を感染させて 6 つのファージライブラリーを作製した (図 13)。なお、宿主として TG1、ヘルパーファ

図 13. パンニングによる改良型変異 scFv の選択
ランダム変異を導入した変異 scFv ライブラリーで形質転換した大腸菌の保存液を 6 つに分け、それぞれヘルパーファージを感染させてファージライブラリーを構築した。これらをそれぞれ CS-BSA 固定化チューブ (#1~6) に加え、各チューブについてパンニングの操作を 3 回ずつ繰り返した。固相に吸着したファージの回収の際、#1~3 にはグリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2)、#4~6 にはトリエチルアミン水溶液 (pH 12) を用いた。300 クローンを解析した結果、32 クローンで陽性シグナルが認められたが、そのうち図に示した 6 種の変異 scFv が wt-scFv よりも大きな K_a 値を示した。

ジとして KM13 を用いたのは、第 3 章で述べるように、アレイ型プロファイリングシステムの構築においてこの組み合わせを採用したことによる。得られた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。未反応のファージおよび非特異的に弱く結合したファージを洗浄して除去したのち、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。各チューブから最終的に回収されたファージについて 50 クローンずつ (すなわち、計 300 クローン) を選択した。これらについて、「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 POD 標識抗ファージ抗体で検出する) により CS 結合能を精査したところ、wt-scFv よりも高感度な応答を示したファージクローンは 6 種のみであった。各チューブ (#1~6) から得られたクローンを図 14 に示す。同一の形質転換菌ライブラリーを処理したにもかかわらず、チューブ #3 と #6 からは改良型クローンは得られていない。しかも、これら 6 種について提示する scFv を可溶性タンパク質に変換して、その 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、wt-scFv からの上昇率は 1.2~5.6 倍に過ぎなかった (図 14)。

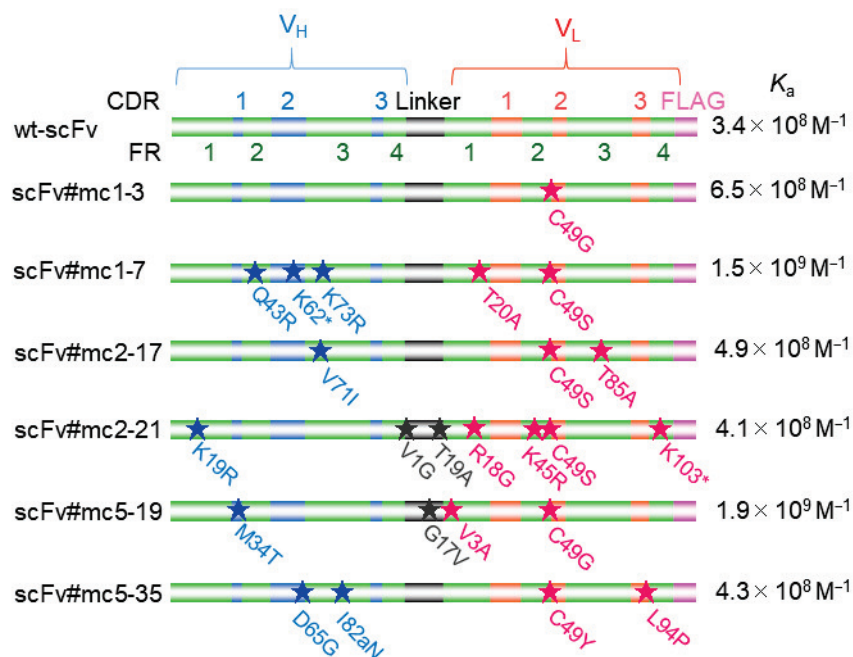


図 14. パニングで得られた scFv クローンの 1 次構造 (模式図) と Scatchard 法による結合定数の算出

本法により得られたクローンの 1 次構造および算出された K_a を示す。星印はその位置のアミノ酸が置換されたことを意味する。scFv#mc1-7 の V_H 62 番目および scFv#mc2-21 の V_L 103 番目に記されている「*」は、終止コドン (アンバーコドン; TAG) を示す。なお、これらの位置は質量分析により Q に翻訳されていることが判明している。

第5節 考察

CSを標的抗原とする scFv に error-prone PCR により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。得られた 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ところ、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 14)。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 (V_H では 22 および 92 番目, V_L では 23 および 88 番目) に存在するが、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。

一方で、計 300 ものクローンの抗原結合能を精査したにもかかわらず、K_a の増大した変異 scFv クローンはわずか 6 種しか得られず、しかも、K_a の上昇率は最大でも 5.6 倍に過ぎなかった。この試験では、パンニングを 6 重に行ってその再現性についても配慮し、固相からの溶出条件についても 2 種 (酸処理と塩基処理) を試みたが、チューブ #3 および #6 では有望な候補クローンを見出せなかった。この結果は、パンニングの成否が、制御の困難な因子により大きく変動することを示唆する。また、scFv#mc1-7, 2-17, および 2-21 は異なるチューブから共通して得られており、特定のクローンが高頻度で単離されることが示された。これらのクローンは、緒論で言及したように、提示する scFv の親和力よりも増殖率の高さ (すなわち、フェージ提示のための 2 次培養における形質転換菌の増殖あるいはフェージのパッケージングにおける優位性) により選択された可能性がある。

以上の実験結果は、「本ライブラリーについてパンニングを何重に行ったとしても、その K_a が 10¹⁰ M⁻¹ を超えるような高親和力クローンを得ることは困難」と思わせるものであった。これは、こ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基づくものなのか? 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

第1節 序

本研究でその構築を目指すアレイ型プロファイリングシステムでは、マイクロウェル内で生成し、抗原に捕捉される scFv 提示ファージを高感度に検出する必要がある。その手段として、ごく微量で検出が可能なマーカー分子を標識したファージ特異的抗体が最適である。マーカー分子としては、増幅効果が得られ、高感度な検出が可能なことから酵素が望ましい。酵素活性の検出法としては、比色法あるいは蛍光法が標準的であるが、発光検出の利用が可能ならばさらに高感度な検出が期待できる。*Gaussia* ルシフェラーゼ (GLuc) は、海洋性カイアシ類に由来する酵素であり、基質であるセレンテラジンを酸化する際に 480 nm を極大波長とする光を生じる。在来のホタルルシフェラーゼ (firefly luciferase; FLuc) やウミシイタケルシフェラーゼ (*Renilla reniformis* luciferase; RLuc) より高感度な発光検出が可能であり、⁵⁵⁻⁵⁷⁾ 免疫測定法における標識酵素としても有用であることが示されている。⁵⁸⁾

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 化したのちその N 末端あるいは C 末端に酵素を融合させることが可能である。scFv 化により抗体としての分子量が低下 (IgG の約 1/6) するため、ファージ 1 ビリオンに多数の GLuc を結合させることが可能と期待され、検出感度向上の観点からも有利である。

以上の観点から、アレイ型プロファイリングシステムに適する抗ファージ抗体 scFv-GLuc 融合タンパク質の創製を試みた。繊維状ファージに対する抗ファージ抗体は市販されているものの、その配列情報は得られないため、まずは抗ファージ抗体を新規に調製し (第 2 節)、得られた抗体の可変部遺伝子をクローニングして抗ファージ scFv を構築した (第 3 節)。次いで、目的の融合タンパク質に先だって、第 1 章で作製した高親和力の抗 CS 抗体フラグメントである CS#10-scFv を GLuc と連結した融合タンパク質を調製し、その発光特性や有用性を検討した。引き続き、上記の抗ファージ scFv に GLuc を連結させた融合タンパク質 (M13-scFv-GLuc) を作製し、プロファイリングシステムにおける有用性を評価した (第 4 節)。

第2節 抗ファージモノクローナル抗体の調製と諸性質

繊維状ファージは長い筒状のカプシドのなかに環状一本鎖 DNA をゲノムとして保持し、大腸菌雄株にその F 線毛を介して感染するバクテリオファージであり、Ff ファージとも総称される。M13, f1, および fd が代表的であるが、なかでも M13 ファージはファージ提示法に多用されている。^{59,60} 図 15 に Ff ファージの構造を示す。抗ファージ抗体を用いてファージを検出する場合、ファージ 1 ビリオンに対してより多くの抗体を結合させることができれば、より高感度な検出系が構築できる。Ff ファージのカプシドは主にコートタンパク質 pVIII から構成され、1 ビリオン中に約 2700 分子の pVIII が含まれる (図 15)。⁶¹ したがって、ファージをマルチプルに標識するためには、pVIII を認識する抗体を調製すべき、と考えた。

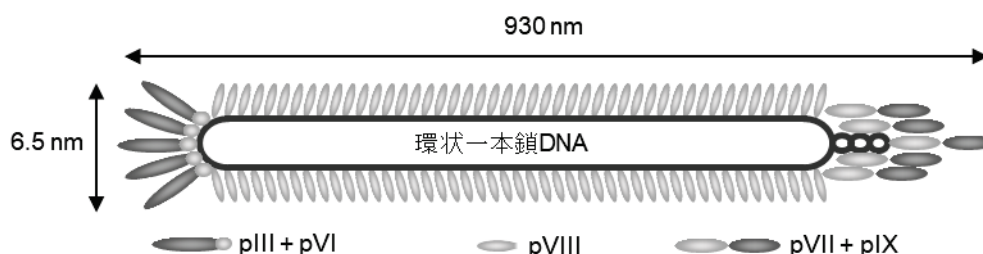


図 15. 繊維状ファージ (Ff ファージ) の構造

約 2700 分子の pVIII タンパク質 (50 アミノ酸, M_r : 5235) からなる筒状のカプシド内に、11 の遺伝子を含むゲノムを保持している。図の左端には pIII (406 アミノ酸, M_r : 42522) および pVI (112 アミノ酸, M_r : 12342), 右端には pVII (33 アミノ酸, M_r : 3599) および pIX (32 アミノ酸, M_r : 3650) が位置している。

はじめに、組換え pVIII タンパク質を免疫原とすることを企てた。データベースから得られた pVIII 遺伝子 (*gVIII*) の塩基配列⁶² を発現ベクターに組み込み、大腸菌に導入して組換え pVIII タンパク質を作製したが、市販の抗 M13 ファージ抗体には反応性を示さず、ファージ粒子を構築している pVIII とは立体構造が大きく異なるものと考えられた。そこで、VCSM13 ファージそのものでマウスを免疫した。VCSM13 は、M13 ファージのゲノム (複製起点) に人工的な改変を加えて感染菌内での複製を阻害した変異体である。ファージミドベクターを用いたファージ提示法 (第 3 章第 2 節で述べる)⁶³ においてヘルパーファージとして多用されるが、^{60,64} その pVIII の一次構造は野生型 M13 のそれと同一である。^{62,65} ポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) 沈殿法により精製した VCSM13 を水溶性の ABISCO-100 アジュバント⁶⁶ に懸濁し、BALB/c マウスの皮下に繰り返し投与したのち、血中抗体価の上昇を比較した。最も良好な免疫応答を示したマウスに VCSM13 を最終免疫し、その 3 日後に脾臓を摘出した。得られた脾細胞を NS1 ミエローマ細胞と融合させ、生成した抗 VCSM13 抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化し、細胞株 (#71) を樹立した。⁶⁷

本細胞株が分泌する抗 VCSM13 抗体 (Ab-M13#71) の H 鎖と L 鎖のアイソタイプを調べたところ、それぞれ $\gamma 2b, \kappa$ であった。本抗体のエピトープを、イムノブロットにより

調べた. すなわち, 加熱処理した VCSM13 をドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS) の存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) に付し, 分離されたタンパク質をポリフッ化ビニリデン [poly(vinylidene fluoride); PVDF] 膜に転写したのち, Ab-M13#71 を反応させた. 次いで, POD 標識第 2 抗体により膜上の抗体を捕捉し可視化したところ, pVIII の分子量に相当する 5.2 kDa 付近にバンドが認められ, Ab-M13#71 はファージの pVIII を認識することが示された (図 16). さらに, ファージへの反応性を競合 ELISA により調べた. すなわ

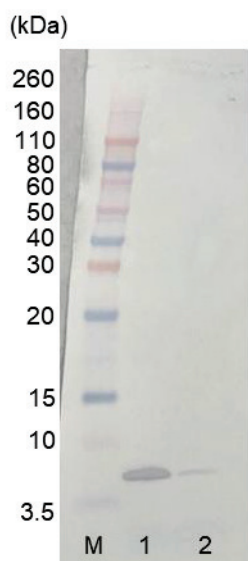


図 16. VCSM13 を用いる Ab-M13#71 のイムノブロット解析
Ab-M13#71 の特異性を推定するためのイムノブロットの結果を示す. lane1 および 2 はそれぞれ 1×10^{10} または 1×10^9 pfu のファージを用いた反応, M は M_r マーカーである.

ち, VCSM13 を固定化したマイクロプレートに, Ab-M13#71 および VCSM13 を加え, 競合反応を行った. 固相に残る Ab-M13#71 を POD 標識抗マウス抗体で捕捉し, *o*-フェニレンジアミンを用いて比色測定した. その結果, VCSM13 の添加量の増加に伴い, シグナルが減少し, ファージへの反応は特異的であることが示された (図 17).

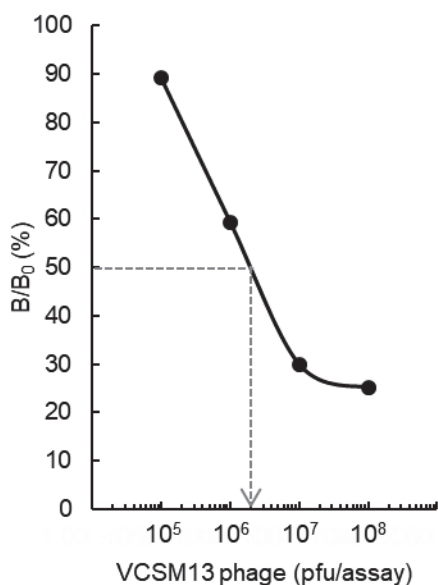


図 17. Ab-M13#71 を用いる VCSM13 ファージの競合 ELISA

VCSM13 ファージを固定化したマイクロプレートに, 遊離の VCSM13 ファージおよび Ab-M13#71 を加えて競合反応を行った結果を示す. 用量作用曲線の midpoint (50%阻害に要する VCSM13 量) は 2.0×10^6 pfu/assay であった.

第3節 抗ファージ抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製と諸性質

目的のファージ検出試薬を作製するために、前節で得られたマウス抗体 Ab-M13#71 の可変部遺伝子 (V 遺伝子) をクローニングして scFv を構築し、その結合能を精査した。まず、第 1 章第 3 節と同様の 5'RACE 法による V 遺伝子のクローニングを試みた。前節に記したように、Ab-M13#71 の H 鎖のアイソタイプは $\gamma 2b$ と同定されている。そこで、前節で樹立したハイブリドーマ株#71 より総 RNA を抽出し、 $\gamma 2b$ に特異的なプライマー (m $\gamma 2b$ -GSP-1) と逆転写酵素を作用させることにより、 V_H 遺伝子を含む cDNA を合成した。次いで、本 cDNA を鋳型として、図 9 に示す PCR を順次行い、 V_H 遺伝子を含む DNA 断片を得た。

同様の操作を L 鎖についても行ったが、 V_L 遺伝子は得られなかった。その原因として、5'RACE 法による κ 鎖可変部遺伝子 (V_κ 遺伝子) のクローニングは、ハイブリドーマから得られる RNA 中に NS1 ミエローマ細胞が元来保有する κ 鎖の mRNA が混入した場合に妨害をうけやすいことが挙げられる。⁶⁸⁾ そこで、本抗体の V_L 遺伝子については Nichols ら⁶⁹⁾ により開発されたユニバーサルプライマーセットを用いるクローニングを試みた (図 18)。多様性を示す V_L 遺伝子の 5'末端 (FR1 の一部をコードする) に対応する 6 種類の縮重プライマーを 5'プライマーとして PCR を行うものである。mk κ -GSP-1 をプライマーとして合成した cDNA を鋳型とし、6 種の 5'プライマーのいずれかと κ 鎖定常部に相補的な 3'プライマー (mk κ -GSP-3) を組み合わせる 6 種の PCR を試みたところ、5'プライマーとして VL-I/III プライマーを用いたときに、 V_L を含む目的の遺伝子断片を得ることができた。

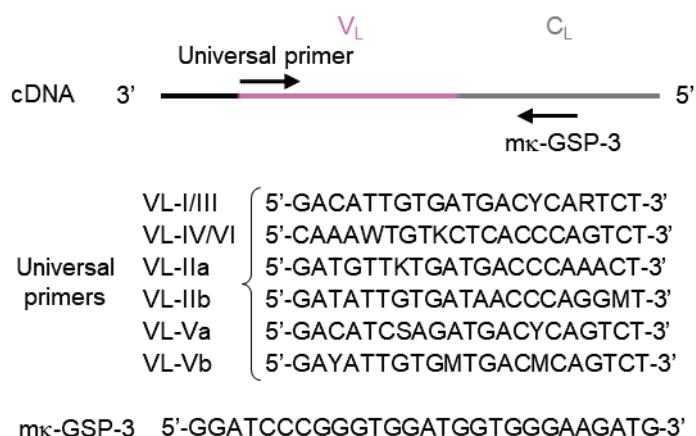


図 18. ユニバーサルプライマーセットを用いる κ タイプ V_L 遺伝子 (V_κ) のクローニング

本研究で細胞融合に用いたミエローマ細胞 (P3/NS1/1-Ag-4) はマウス抗体 κ 鎖の偽遺伝子を有するため、5'RACE 法によるクローニングには困難を伴うことがある。Nicholls らによって報告されたユニバーサルプライマーセット⁶⁹⁾ を 5'プライマーに用いた PCR を行うことにより、目的の V_L 遺伝子を特異的に増幅し、クローニングすることが可能である。プライマー中の Y, R, W, K, M, S はそれぞれ C または T, A または G, A または T, G または T, A または C, C または G を示す。C_L は L 鎖定常部を示す。

引き続き、得られた遺伝子断片を pBluescript II ベクターへサブクローニングして大腸菌 XL1-Blue 細胞へ導入し、 V 遺伝子を保持するクローンを特定した。組換えプラスミドを抽出して DNA 塩基配列を解析し、導かれるアミノ酸配列を Kabat の抗体シークエンスデータベース⁴⁷⁾ と照合した。その結果、 V_H ドメイン (125 アミノ酸からなる)、 V_L ドメイン (109 アミノ酸からなる) を同定し、CDR の配列 (V_H -CDR1, NTYVH; V_H -CDR2, RIDPANGKTKYDPNFQD; V_H -CDR3, DFPYYIGSTYVSFFDV; V_L -CDR1, KASQNVRTDVA; V_L -CDR2, LASKRHT; V_L -CDR3, LQHRSYPLT) も決定することができた。また、本抗体については、 V_H をサブグループ IIC、 V_L をサブグループ I に帰属することができた。⁶⁷⁾

次に、得られた塩基配列をもとに、 V_H 、 V_L 各遺伝子の 5'末端と 3'末端に相補的なプライマーをそれぞれ設計して PCR を行い、*scFv* 遺伝子を構築するための DNA フラグメントを調製した。このとき、 V_H 増幅の 3'プライマー (M13#71 V_H -For) と V_L 増幅の 5'プライマー (M13#71 V_L -Rev) については、 V_H と V_L の連結に用いる標準的なリンカーペプチド [(GGGGS)₃; linker1]²¹⁾ をコードする塩基配列の一部を導入した。この配列の相補性を利用する overlap extension PCR により、 V_H と V_L を連結して *scFv* 遺伝子を構築した。なお、 V_L の 3'プライマー (FLAG-TAA2) に FLAG タグ (DYKDDDDK)⁵⁰⁾ をコードする塩基配列および 2 重の終止コドン (TAATAA) を付加した。得られた *scFv* 遺伝子 (M13-*scFv*; 5'- V_H -linker1- V_L -FLAG-TAATAA-3') を、pEXmid5 ベクター⁴⁹⁾ にサブクローニングし、大腸菌 XL1-Blue 細胞に導入した。コロニーPCR により M13-*scFv* 遺伝子を保持するクローンを同定し、その塩基配列を調べて、抗体 Ab-M13#71 の V_H と V_L の配列が保持されていることを確認した。

得られた形質転換菌を培養し、可溶性 *scFv* (M13-*scFv*) が含まれるペリプラズム抽出物を得た。これを第 2 節と同様の競合 ELISA に付したところ、VCSM13 の添加量の増加に応じたシグナルの減少が認められ、ファージへの結合能は保持されていることが示された (図 19)。また、得られたペリプラズム抽出物を、抗 FLAG 抗体固定化アガロースを用いてアフィニティ精製したのち、SDS-PAGE に付したところ、予想される分子量 (M_r ; 27878.8) 付近に単一のバンドが認められた (図 20)。

さらに、M13-*scFv* の K_a をバイオレイヤー干渉法により算出した。本法はセンサー先端表面上のリガンドに対するアナライトの

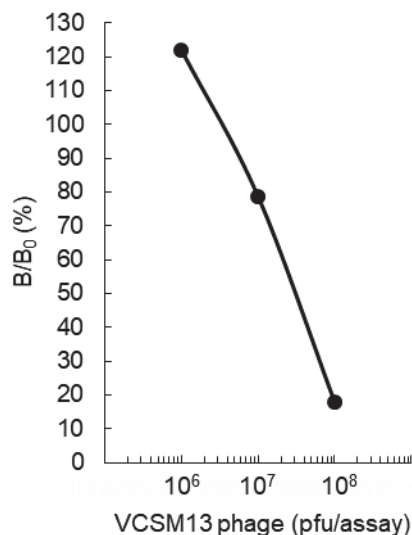


図 19. M13-*scFv* を用いる VCSM13 ファージの競合 ELISA

VCSM13 ファージを固定化したマイクロプレートに、遊離の VCSM13 ファージおよび M13-*scFv* を加えて 37°C で 1 時間競合反応したのちに、固相上の M13-*scFv* 量を POD 標識抗 FLAG 抗体で検出した。

分子間相互作用解析技術である。⁷⁰⁾ VCSM13 を固定化したセンサーチップを用いることで、本 scFv の VCSM13 への K_a を算出することが可能である。そこで、ビオチン標識 VCSM13 を調製し、ストレプトアビジン固定化センサーチップに結合させた。これを本 scFv の溶液に浸すことで、 K_a は $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と算出された。⁶⁷⁾ 予想より小さい K_a 値であったが、目的のプロファイリングシステムにおけるファージ検出反応では固

相に捕捉されたファージに対して大過剰の scFv を反応させるため、十分に使用に耐えるものと期待し、実際、優れた機能を発揮した。その詳細は次節で述べる。

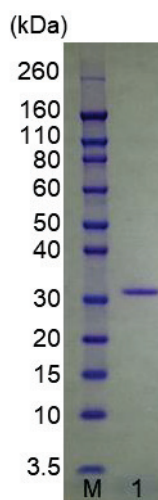


図 20. SDS-PAGE による M13-scFv 発現の確認

抗 FLAG 抗体固定化アガロースでアフィニティ精製した M13-scFv を SDS-PAGE に付し、クマシーブリリアントブルーにより染色した結果を示す。M; M_r マーカー, lane 1; M13-scFv である。

第4節 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

生物由来の発光基質や酵素を用いる発光法は生物発光法に分類され、第1節で言及した FLuc (550 アミノ酸, 62 kDa) による発光が代表的な例である。この反応は D-ルシフェリンを基質とし、ATP および Mg^{2+} 存在下で 562 nm に極大を持つ発光を生じるが、量子収率が高い (0.88) ことが特徴である。^{71,72)} GLuc (185 アミノ酸, 19.9 kDa) は海洋性カイアシ類 *Gaussia princeps* から同定されたルシフェラーゼであり、セレンテラジンを基質として 480 nm に極大を持つ発光を生ずる。この反応には ATP や Mg^{2+} は不要である。同様にセレンテラジンを基質とする RLuc (311 アミノ酸, 34 kDa) よりも小型であり、*in vitro* で FLuc や RLuc よりも 1000 倍高感度に検出できることが報告され、近年注目されている生物発光酵素である。⁵⁶⁾

そこで、scFv と GLuc の融合タンパク質を作製し、その有用性を、免疫測定法 (ELISA) において評価することにした。まず、第1章と同様に CS をモデル標的抗原として取り上げ、高親和力の抗 CS-scFv である CS#10-scFv (CS に対して $1.7 \times 10^{10} M^{-1}$ の K_a を持つ)⁴²⁾ を用いて GLuc との融合タンパク質を創製した。CS#10-scFv 遺伝子を組み込んだ pEXmide 5 を鋳型として、CS#10V_H-Rev および V_L-For-2 プライマーを用いて PCR を行い、CS#10-scFv 遺伝子を含む遺伝子断片を得た。このとき、V_L 遺伝子の 3' 末端に、ペプチダーゼに抵抗性を示すリンカーペプチド (GSTSGSGKSSEGKG⁷³⁾; linker2) をコードする linker2 遺伝子の一部 (5' 末端側) を導入した。一方で、pMCS-Gaussia Luc ベクター (ThermoFisher Scientific から購入) を鋳型として、GLuc-Rev および GLuc-For プライマーを用いて PCR を行い、GLuc 遺伝子を含む断片 [5' 末端に linker2 遺伝子の一部 (3' 末端側) を、3' 末端に FLAG および His6 タグをコードする遺伝子と 2 重の終止コドン (TAATGA) を付加したもの] を得た。引き続き、両遺伝子断片を overlap extension PCR により連結して pEXmide 5 ベクターに組み込み、大腸菌 XL1-Blue に導入した (図 21)。

コロニー PCR により目的の遺伝子 (CS#10-scFv-GLuc; CS#10-scFv-linker2-GLuc-FLAG-His6-TAATGA) を保持する形質転換菌を特定し、培養して CS#10-scFv-GLuc 融合タンパク質を得た。本融合タンパク質を抗 FLAG 抗体固定化アガロースにより精製し、SDS-PAGE およびイムノブロット法に付した。その結果、目的の融合タンパク質が得られていることが示された (図 22)。そこで、本融合タンパク質の発光反応による検出限界を調べたところ、融合タンパク質非添加時のバックグラウンドシグナルの 2 倍の発光強度を示す融合タンパク質の物質質量として、20 amol ($20 \times 10^{-18} \text{ mol}$) であった (図 23)。

ところで、GLuc の発光は、基質の添加後 10 秒で最大となるが、その後急速に減衰し、80 秒経過すると最大強度の 1 割にまで低下することが報告されている。⁵⁵⁾ 発光検出を用いる免疫測定法では、このような速やかな発光強度の変化を考慮し、マイクロプレートを用いる場合も 1 ウェルずつ基質の添加と発光測定を行う必要に迫られる (すなわち、

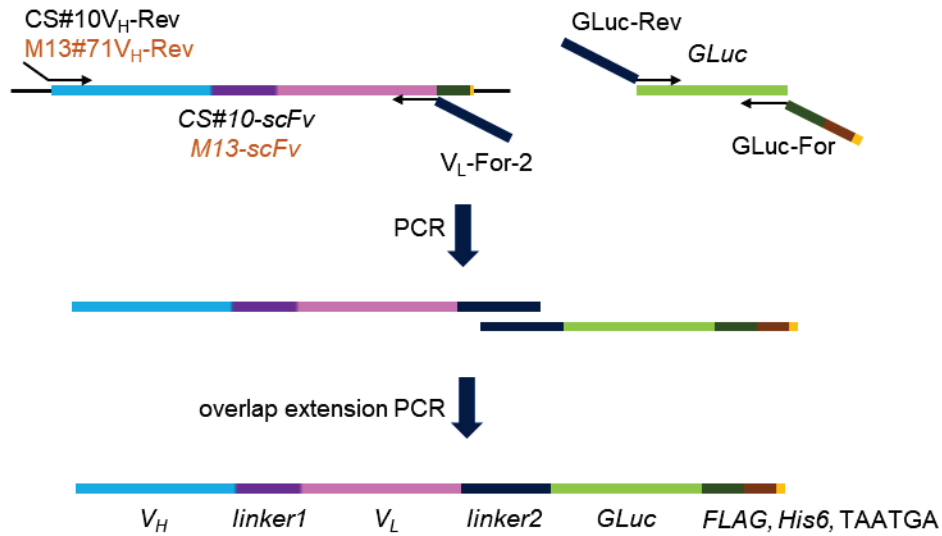


図 21. CS#10-scFv-GLuc および M13-scFv-GLuc 遺伝子の構築

CS#10-scFv または M13-scFv 遺伝子の V_H の 5'末端に相補的なプライマー (CS#10V_H-Rev または M13#71V_H-Rev) および V_L の 3'末端に相補的なプライマー (V_L -For-2; ペプチダーゼに抵抗性を示す linker2 の一部を含む) を用いて PCR を行い, 各 scFv を含む遺伝子断片を得た. 一方で, GLuc の 5'末端に相補的なプライマー (GLuc-Rev; linker2 の一部を含む) および GLuc の 3'末端に相補的なプライマー (GLuc-For; タグをコードする遺伝子を含む) を用いて GLuc 遺伝子を含む断片を増幅した. 両遺伝子断片を overlap extension PCR により連結し, 目的の遺伝子を得た.

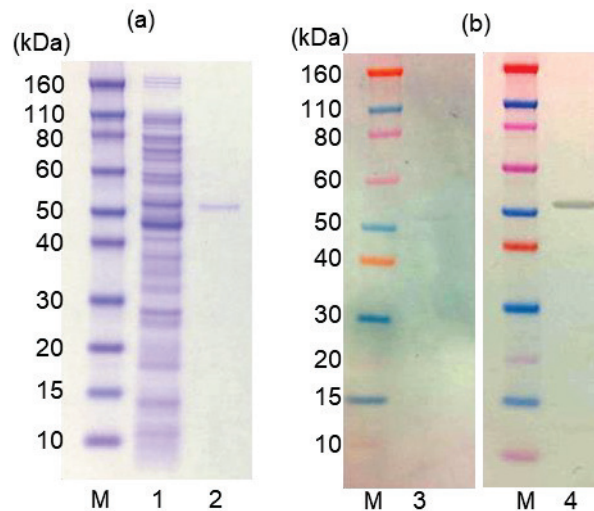


図 22. SDS-PAGE による CS#10-scFv-GLuc 発現の確認

(a) CS#10-scFv-GLuc を SDS-PAGE に付し, クマシーブリリアントブルーにより染色した結果を示す. lane 1; 未精製, lane 2; アフィニティ精製済み. (b) アフィニティ精製済みの CS#10-scFv-GLuc を SDS-PAGE により分離し, PVDF 膜に転写したのち次の 2 通りの方法でタンパク質を染色した: lane 3; CS/ビオチン 2 重標識ポリ-L-リシンと POD 標識ストレプトアビジンと POD 標識抗 FLAG 抗体を反応させた. 膜上の POD 活性は 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を用いて可視化した. M は M_r マーカーである.

プレート単位のバッチ処理が難しい) ことが少なくなかった. これに対して,

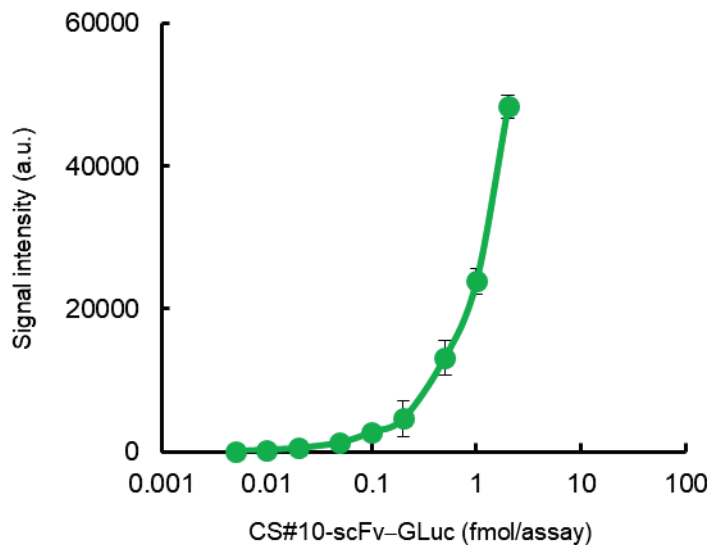


図 23. CS#10-scFv-GLuc の検出感度の検討

各種濃度の CS#10-scFv-GLuc にセレンテラジンを加えて発光強度を測定した. a.u.は, arbitrarily unit (任意発光単位) の略. エラーバーは標準偏差を示す (n=4).

scFv-GLuc 融合タンパク質の発光は, 基質の添加後 30 秒後の強度を 100%としたとき, その後の 30 秒で 55%まで減衰するものの, 以後はほとんど一定の割合 (≈200 カウント/s) で緩やかに減衰した (図 24). このため, バッチ処理を行っても基質添加などのウェル間の時間差の影響を受けることなく信頼性の高い定量分析が可能であった. 以上より, scFv-GLuc 融合タンパク質は, 実用的で高感度な生物発光 ELISA 系を構築するために有用な「酵素標識抗体」であることが示された.

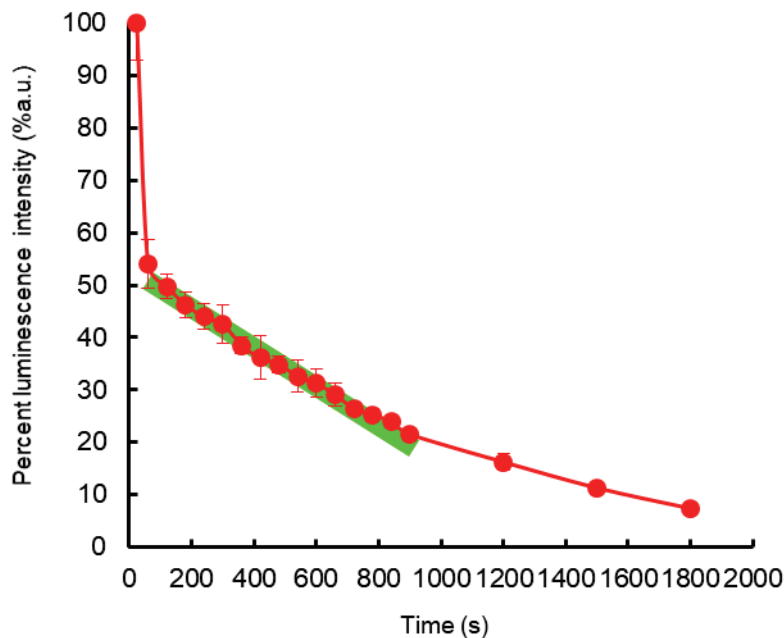


図 24. CS#10-scFv-GLuc の発光の時間依存性

CS#10-scFv-GLuc (10 fmol) を含む緩衝液 (G-PBS) にセレンテラジン (2.0 nmol) を加えて一定時間 (0~1800 秒) 後に発光強度 (a.u.) を測定した. 基質添加 30 秒後の発光強度を 100%として, 各時間における発光強度の百分率を示す. 時間と発光強度の間に直線関係が見られた部分を緑で示す. エラーバーは標準偏差を示す (n=4).

そこで, M13-scFv-GLuc 融合タンパク質の創製を試みた. 前節で作製した M13-scFv 遺伝子を鋳型として, M13#71V_H-Rev および V_L-For-2 プライマーを用いて PCR を行った.

この遺伝子断片を、上記と同様に overlap extension PCR により *GLuc* 遺伝子断片と連結し、*M13-scFv-GLuc* 遺伝子 (*M13-scFv-linker2-GLuc-FLAG-His6-TAATGA*) を構築した。これを大腸菌 XL1-BLue に導入し、形質転換菌を培養することで、*M13-scFv-GLuc* 融合タンパク質を得た。これを抗 FLAG 抗体固定化アガロースにより精製し、SDS-PAGE に付したところ、52 kDa 付近に *M13-scFv-GLuc* と想定されるバンドが認められた (図 25a)。さらに、イムノブロット法により当該のバンドとファージとの反応性を調べた。すなわち、SDS-PAGE により分離されたタンパク質を PVDF 膜に転写して、VCSM13 を反応させたのち POD 標識抗 M13 抗体で捕捉し、膜上の POD 活性を可視化した。その結果、SDS-PAGE で確認されたバンドと同一の位置にバンドが認められ、目的のタンパク質が得られていることが示された (図 25b)。

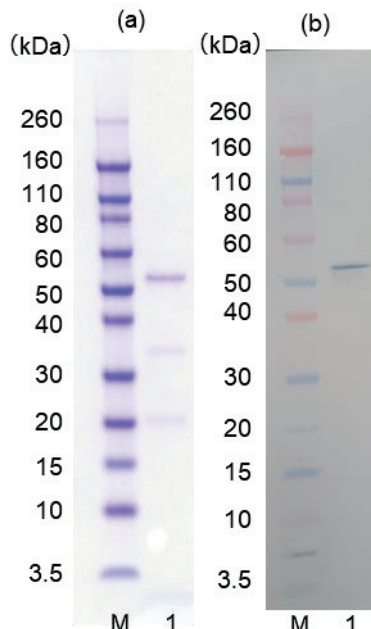


図 25. SDS-PAGE による *M13-scFv-GLuc* 発現の確認
(a) *M13-scFv-GLuc* を SDS-PAGE に付して、クマシーブリリアントブルーにより染色した結果を示す。(b) SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写して、VCSM13 および POD 標識抗 M13 抗体を順に反応させたのち、膜上の POD 活性を TMB を用いて可視化した。M; M_r マーカー, lane 1; アフィニティ精製済み *M13-scFv-GLuc* である。

そこで、この融合タンパク質を用いて scFv 提示ファージを検出し、その感度を調べた。CS-BSA 固定化マイクロプレートに、各種濃度の CS#10-scFv 提示ファージを加え、37°C で 1 時間反応させた。プレートを洗浄したのち、作製した *M13-scFv-GLuc* を加えてファージを捕捉し、セレンテラジンを加えて固相上の *GLuc* 活性を測定した。その結果、 1×10^6 colony-forming unit (cfu) のファージによる発光をバックグラウンドシグナルと有意に識別することが可能であった (図 26)。

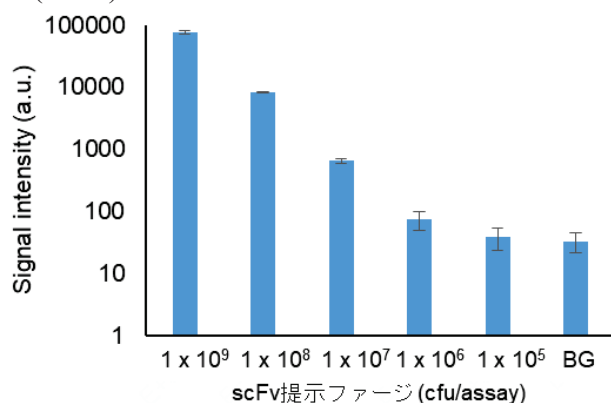


図 26. *M13-scFv-GLuc* を用いた scFv 提示ファージの検出
CS-BSA を固定化したマイクロプレートに、各種濃度の CS#10-scFv 提示ファージを反応させ、*M13-scFv-GLuc* およびセレンテラジンを用いて検出した結果を示す。エラーバーは標準偏差 ($n=4$) を示す。 1×10^6 cfu でバックグラウンドと有意な差 ($P<0.05$) が見られた。

第5節 考察

アレイ型プロファイリングシステムのキー試薬となる M13-scFv-GLuc 融合タンパク質を作製するために、マウス抗ファージ抗体 Ab-M13#71 を新規に調製し、その可変部遺伝子をクローニングして scFv 化を行った。さらに、この scFv に、マーカー分子として発光酵素 GLuc を結合させた融合タンパク質を調製した。

酵素免疫測定法におけるマーカー分子としてよく用いられている POD やアルカリホスファターゼでは、その比色あるいは蛍光検出に、基質の添加後 10~60 分のインキュベーションを要する。そして、酸やアルカリなどの酵素反応停止液を加えたのちにシグナルを検出するのが一般的である。一方、GLuc は、先述のように、基質 (セレンテラジン) の添加直後から強いシグナルを発するため、M13-scFv-GLuc 融合タンパク質を用いることでインキュベーションの不要なファージ検出系を構築することができる。したがって、多数のマイクロウェルについて迅速に発光強度をプロファイリングすることが可能である。しかも、期待どおり検出感度が高く、本融合タンパク質を用いることで、 1×10^6 cfu の scFv 提示ファージを検出することが可能であった。次章で構築するプロファイリングシステムでは、マイクロウェル内に平均 $\sim 10^{10}$ cfu のファージが生成することが判明しており (第3章第2節参照)、こ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、酵素反応停止液を加える必要がないため、検出を終えた後でそのマイクロウェル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

第1節 序

ファージ提示法は、動物からは得ることのできない優れた抗体を迅速に創出しうる革新的な方法と期待されてきたものの、現実には目的のクローンを単離す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。

図 27 に著者が所属する研究室における抗ハプテン抗体に対する試験管内親和性成熟の成果を示す。エストラジオール-17 β (estradiol-17 β ; E₂)^{32,33} コチニン (cotinine; CT)³⁴ のいずれについても、高感度イムノアッセイの開発には向かない低親和力の野生型 scFv を出発物質として、ランダム変異の導入により、実用的な親和力を示す scFv へ改善することに成功している。しかし、それらの発見に至るまで、複数回におよぶパンニングを終えたライブラリーから、E₂ では 1000 個以上、CT では約 500 個ものコロニーをランダムに選択し、個別に scFv 提示ファージを調製して、各々のクローンを精査する過程を経ている。このような時間と労力を要するスクリーニング工程を強いられるのは、パンニングでは想定されているような改良型クローンの濃縮が達成されていないためである。その原因として、緒論で述べた 2 つの問題、すなわち、クローン間の複製率の差と固定化抗原への反応における競合が考えられる。

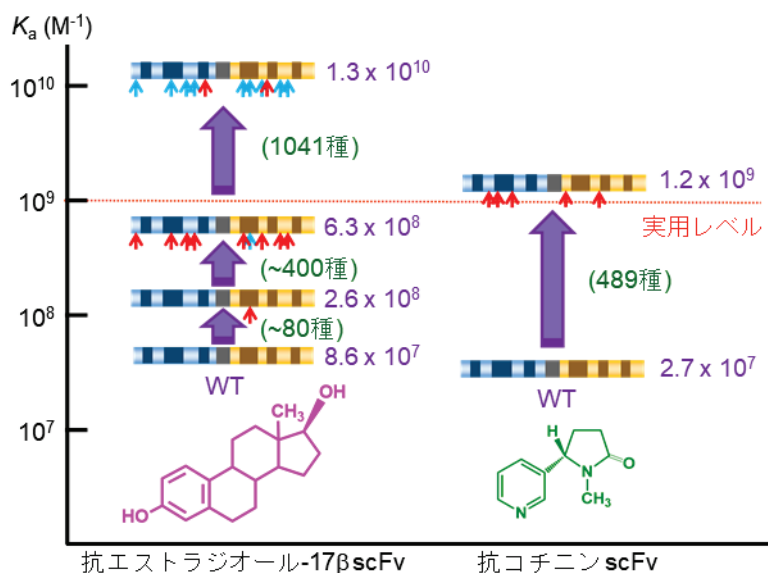


図 27. 抗ハプテン抗体に対する試験管内親和性成熟の例

グラフの縦軸は結合定数 K_a を示す。小さな矢印は導入された変異の箇所を示す。赤い矢印は各ステップで新たに導入されたアミノ酸置換を、青い矢印は既に導入されているアミノ酸置換を示す。

近年、改良型変異体のスクリーニング工程に次世代シーケンサーを活用する試みが報告され、多大の注目を集めている。パンニング前後のクローンについてその scFv 遺伝子を網羅的に解析し、濃縮されたクローンをその 1 次構造を特定しつつ追跡するもの

である.⁷⁴⁻⁷⁶ 本法により、従来法では獲得し得なかった稀少クローンの同定に成功した例も報告されてはいるが、パンニング後に高頻度で出現するクローンが必ずしも高い親和力を持つとは限らないことも同時に示していることになり、パンニングに固有の上述の問題は相変わらず付き纏う。

この問題を抜本的に解決するためには、scFv 提示ファージと目的の抗原を反応させたのち、ファージを 1 ビリオンずつ個別に精査し、目的の抗原と結合しているクローンをなんらかの方法（顕微鏡観察やフローサイトメトリーなど）で未反応のクローンと区別する系が有効と考えられる（図 28）。しかし、scFv に結合した 1 分子の抗原を検出するためには（次節で述べるように、1 ビリオンのファージは、通常、1 分子の scFv を提示すると考えられている）^{60,61}、極めて高い感度が求められ、現時点では困難である。しかし、他のファージクローンが共存しない状態で、特定の scFv 提示ファージのみを十分量まで増幅することができれば、その抗原結合能を評価することは可能であろう。これは、scFv 遺伝子を組み込んだファージミドベクターで形質転換された大腸菌をクローンごとに培養し、ファージを産生させることにより達成が可能である。

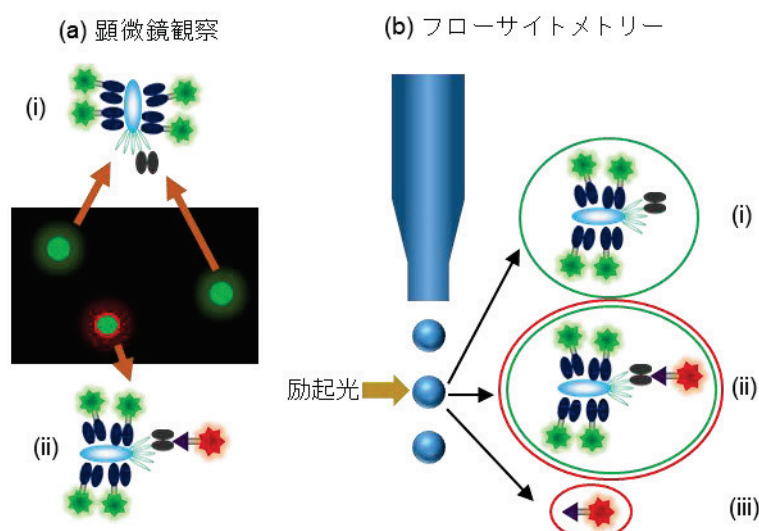


図 28. 抗原特異的な scFv 提示ファージの個別検出が可能なる原理

(a) 顕微鏡を用いて抗原を捕捉した scFv 提示ファージを観測する例。(b) フローサイトメトリーの原理を応用して、抗原特異的なファージを特定する例。いずれの手法も緑の蛍光色素で標識した抗ファージ抗体と赤の蛍光色素で標識した抗原を用いる。(i) はファージのみ（緑）が検出された場合、(ii) は抗原特異的ファージ（赤+緑）が検出された場合、(iii) は抗原のみ（赤）が検出された場合を示す。

著者は、この観点に立ち、アレイ型プロファイリングシステムを考案した。このシステムでは、変異 scFv 遺伝子を宿主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（すなわち、異なるマイクロウェル内で）評価する（図 29）。本章では、前章で創製した M13-scFv-GLuc 融合タンパク質をキー試薬として目標とするシステムを構築し、第 1 章で作製した抗 CS 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。

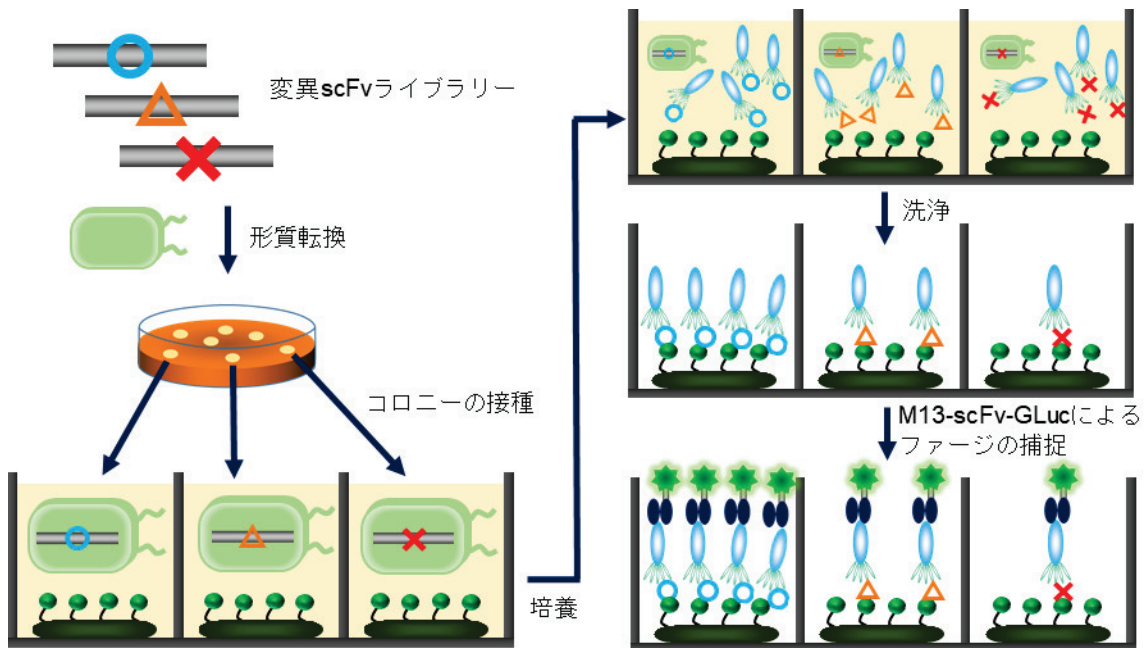


図 29. アレイ型プロファイリングシステムの原理

変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーで大腸菌を形質転換したのち寒天培地上に塗布して培養する。形成されたコロニーを、抗原固定化マイクロプレートに分注したヘルパーファージを含む培地に個別接種し、「コロニーアレイ」を作成する。これを十分な時間培養し、*scFv* 提示ファージを増殖させる。培養液を除いてプレート洗浄したのち、M13-*scFv*-GLuc 融合タンパク質で固相に結合した抗原特異的な *scFv* 提示ファージを捕捉し、発光検出を行う。

第2節 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

scFv 提示ファージを得るためには、scFv 遺伝子をファージミドベクターあるいはファージベクターのいずれかに組み込んだのち、宿主の大腸菌に導入することが必要である。ファージミドベクターは、プラスミドに繊維状ファージの複製起点やコートタンパク質 pIII の遺伝子 (*gIII*) を導入したものであり、ファージベクターは繊維状ファージの複製型二重鎖ゲノムを基本構造としている。いずれの場合も、組み込まれた scFv 遺伝子は *gIII* と直結されるため、大腸菌内で scFv-pIII 融合タンパク質が発現される。^{60,64,77)} 現在は、入手も取り扱いも容易で、大腸菌への導入効率がより高いファージミドベクターが多用されている。

scFv 遺伝子を組み込んだファージミドベクターで形質転換した大腸菌にヘルパーファージ (VCSM13 や KM13) を感染させることで、ヘルパーファージのゲノムが大腸菌に導入される (図 30)。このゲノムからファージの複製に必要なタンパク質 (野生型の pIII も含む) が全て供給されるほか、カナマイシン (kanamycin; Kan) に対する耐性も獲得する。この感染菌を、Kan およびアンピシリン (ampicillin; Amp) を含む培地で選択培養することで (ファージミドベクターを持ち、かつファージに感染した菌のみが生育する) ファージが構築され、大腸菌外へ放出される。この際、scFv-pIII が野生型の pIII とともにファージ粒子に取り込まれることで、scFv 提示ファージが生成される。しかし、野生型の pIII のほうがより取り込まれやすいため、生成するファージの大半は scFv を提示せず、実際には 10%以下のファージに「単価で」(1 ビリオンあたり 1つの scFv の割合で) 提示される程度と言われている。^{60,61)} 生成したファージの総数に対する提示ファージの割合を提示率と呼ぶ。

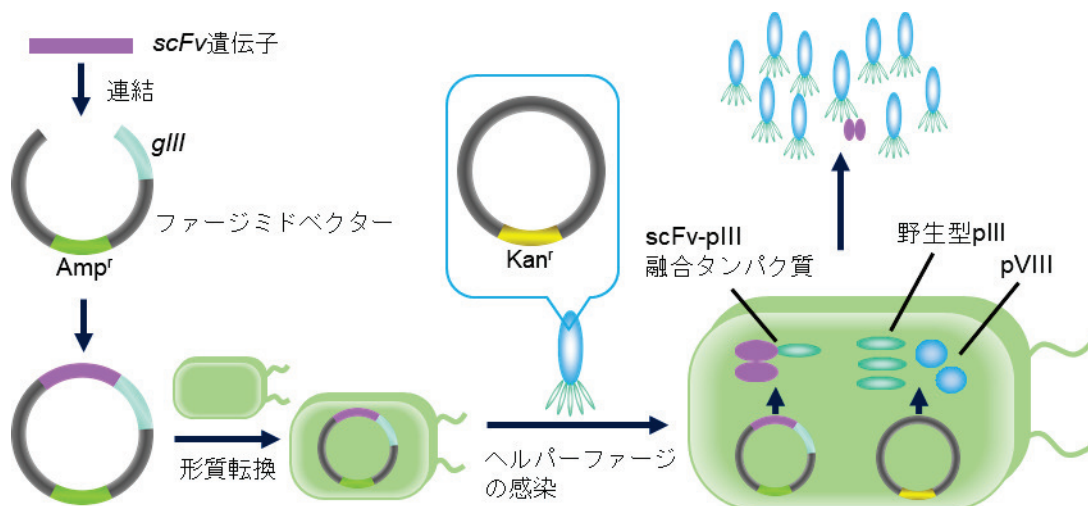


図 30. scFv 提示ファージが生成されるしくみ

Amp^r および *Kan^r* は、それぞれアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子を示す。ヘルパーファージ感染菌を培養することで、多くの「非提示」ファージと、少数の scFv 提示ファージが生成される。この図の場合、提示率は 1/10 (10%) となる。

目的抗原に対する結合力を指標として微量のファージを検出するためには、この提示率を可能な限り高めることが重要となる。宿主とする大腸菌株やヘルパーファージの種類が提示率に大きく影響することが予想されるため、まず、最適な大腸菌とヘルパーファージの組み合わせを検討した。

ここでは第1章で作製した高親和力抗CS抗体フラグメントであるCS#10-scFv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Kan含有培地で選択培養し、4通りの条件で産生されたファージをELISAに付した。すなわち、CS-BSAを固定化したマイクロプレートに、 1×10^9 cfuのファージを加え、抗原に結合したファージをPOD標識抗M13抗体を用いて捕捉し、比色測定した。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(図31)、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。

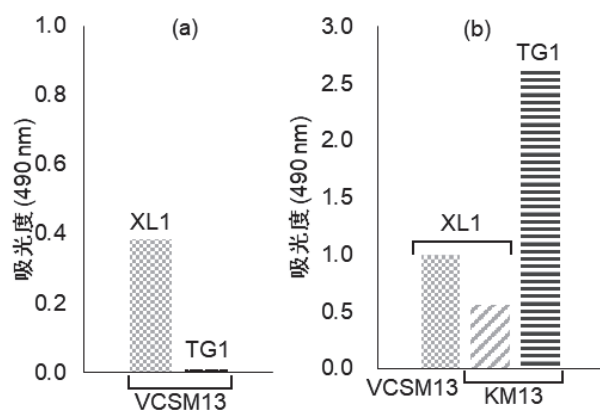


図 31. 宿主とヘルパーファージの異なる組み合わせで作製した scFv 提示ファージの ELISA における反応性

(a) はヘルパーファージを VCSM13 として産生されたファージ。左は XL1-Blue, 右は TG1 を宿主とした場合を示す。(b) はヘルパーファージを KM13 として産生されたファージ。中央は XL1-Blue, 右は TG1 を宿主とした場合を示す。左はコントロールとして VCSM13 と XL1-Blue の組み合わせで作製したファージの反応性を示す。

ところで、ファージ提示法では、通常、ファージミドベクターを保持する大腸菌を十分に増殖させたのち、ヘルパーファージを感染させ、感染菌を Kan を含む培地に移して選択培養する。これらの工程を、マイクロプレートを用いるアレイ型プロファイリングシステムにそのままあてはめた場合、操作が煩雑になり(多数のウェルへのヘルパーファージの分注やプレートの遠心など)、扱えるクローン数が限られてしまう。コロニーを各マイクロウェルへ接種したのちは、すべての作業がプレート単位のバッチ処理で遂行可能な系を構築するために、あらかじめ各マイクロウェルに、ヘルパーファージおよび Kan を含有する培地を分注しておくことが望ましい。しかし、Kan 含有培地へ大腸菌を接種すれば、ヘルパーファージの感染を受けて Kan 耐性を獲得する前に死滅する可能性がある。

そこで、次に KM13 および Kan の濃度の最適化を行った。CS-BSA を固定化した白色マイクロプレートに、Kan を 5.0 または 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、KM13 を 5×10^8 または 5×10^9 plaque-forming unit (pfu) /mL を含む 2 \times YT 培地を 200 μL ずつ分注し、このマイクロウェル 80 穴に、CS#10-scFv 遺伝子を導入した TG1 形質転換菌のコロニーを 1 つずつ接種した。このとき、KM13 に感染して Kan による死滅を免れ、ファージの産生を開始する菌の数は

非常に少ないものと想定される。そこで、培養時間は通常のパージ提示法と同様の一晚（16時間）に加え、24または45時間に延長した条件でも実験を行った。

培養後、各プレートを洗浄し、第1章第4節で作製した M13-scFv-GLuc を加えて固相上のファージを捕捉し、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、45時間培養したプレートでは、Kan 濃度を 5.0 $\mu\text{g/mL}$ とした場合に、ほぼ全てのウェルから十分な発光シグナルが得られ、scFv 提示ファージの産生が確認された（図 32a）。また、KM13 の濃度は、コロニーを加えなかったウェルのシグナル（バックグラウンド値）の低さから、 5×10^8 pfu/mL が適切であると判断した（図 32b）。なお、Kan を 25 $\mu\text{g/mL}$ とした場合は、シグナル陽性のマイクロウェル数は 10%まで減少し、培養時間を 16 時間とすると全ての条件で 0%、24 時間とすると Kan 濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、Kan 濃度 5.0 $\mu\text{g/mL}$ でも 15~25%となり、いずれも不適當と考えられた。

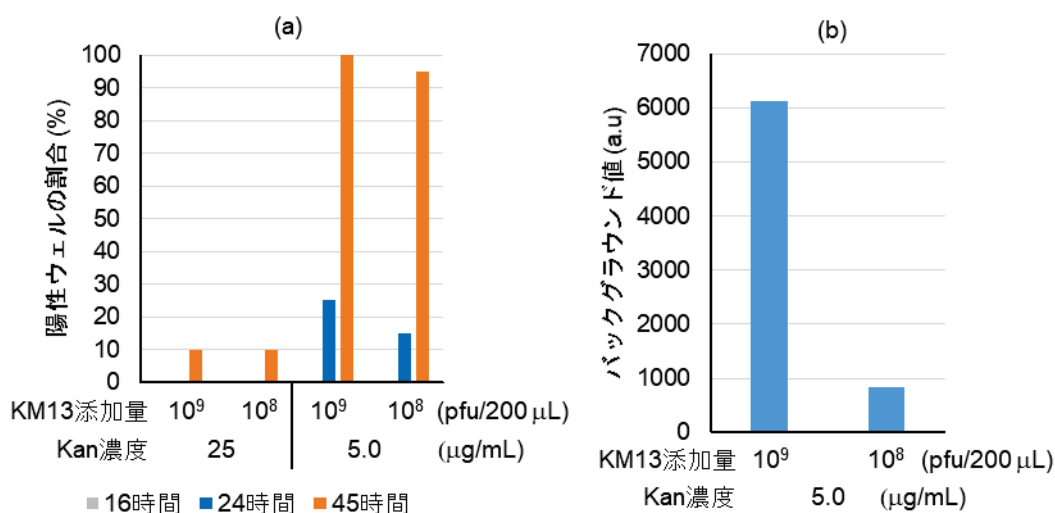


図 32. アレイ型プロファイリングシステムにおけるファージ産生条件の検討

(a) 発光強度がバックグラウンド値の2倍以上のウェルを陽性とし、各条件 (KM13 添加量, Kan 濃度, 培養時間) で実験した全 20 ウェルのうち、陽性ウェルの割合を縦軸に示した。16 時間ではいずれの条件でも陽性ウェルは存在しなかった。(b) Kan 濃度を 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、培養時間を 45 時間としたときのバックグラウンド値を示す。

以上の最適条件で、CS#10-scFv 遺伝子を導入した形質転換菌のコロニー58 個を寒天培地から移植して培養し、マイクロウェル内に増殖したファージのコピー数を求めたところ、平均 $\sim 10^{10}$ cfu のファージが生成することが判明した。第2章で確立した M13-scFv-GLuc を用いるファージ検出法の感度 ($\sim 10^6$ cfu 以上で検出可能) を考慮すれば、十分に満足のいく結果と言える。

第3節 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

前節で設定した諸条件に従って、実際に変異 scFv ライブラリーから高親和力変異体を探索することを試みた。第1章第4節で作製したCSを標的抗原とする変異 scFv 遺伝子群で大腸菌TG1を形質転換し、寒天培地上で一晩培養してコロニーを形成させた。得られたライブラリーの多様性は、コロニー数として 3.4×10^5 cfu であった。これを、Kan 5.0 $\mu\text{g/mL}$ および KM13 5×10^8 pfu/mL を含む $2 \times \text{YT}$ 培地を分注したマイクロプレートに接種した。ライブラリー全体を解析に付すのが理想的だが、手法でのパイロットスタディであるため、9400個のコロニー（ライブラリーの約3%に相当する）を対象とした。コロニーを接種したのち、25°Cの恒温槽で45時間振とう培養した。培養後プレートを洗浄し、M13-scFv-GLuc で固相上のファージを捕捉した。同様に洗浄後、セレンテラジンを基質として固相上のGLuc活性を測定した。その結果を図33に示す。全体の8%にあたる761ウェルで100000カウント以上の発光シグナルが得られたが、コロニーを加えなかったウェルの平均値が3000カウント程度であったことを考慮すると、このカウントは、明らかにファージの結合によるものと期待できる。このなかから発光強度の大きい順に40ウェルを選択してグリ

シン塩酸緩衝液 (pH 2.2) を用いてファージを回収し、改めてTG1に感染させてモノクローナルファージを調製した。これを競合ELISAに付し、wt-scFvよりも高親和力であると推定された7種を可溶性scFvに変換した。このうち競合ELISAにおいてwt-scFvよりも高感度な用量作用曲線を与えた4種のCSに対する K_a を、 $[^3\text{H}]$ -CSをトレーサーとするScatchard法により算出したところ、wt-scFv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34)。すなわち、発光強度のプロファイリングの結果から選択した40種のなかから、親和力の改善したクローンが4種得られたことになる。

これらのクローンについて、scFv遺伝子の塩基配列を解析し、アミノ酸配列を推定したところ、scFv#m1-2では V_H FR1の1カ所(6番目と7番目の間)のアミノ酸挿入、他のクローンでは1カ所(scFv#m1-10および1-18)または6カ所(scFv#m1-7)のアミノ酸置換が認められた(図34)。最も大きな K_a ($1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) を示したscFv#m1-18では、

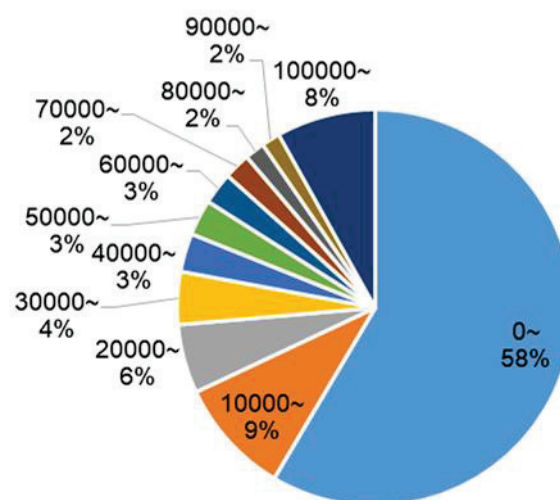


図 33. 発光強度のプロファイリングの結果 (1)
全9400ウェル (ELISA用マイクロプレート100枚分) から得られた発光強度を10000カウントごとの階級にわけ、その比率を示した。なお、10万カウント以上は1つの階級としてまとめている。

V_H と V_L を連結しているリンカー部分 [VSS(GGGGS)₃T] の 3 番目のセリンがグリシンに置換しているのみであった。この置換は、V_H 全体と V_L 全体の会合に影響するのであろうが、抗原 (CS) との相互作用に直接関わるとは考えにくい。このような置換で K_a が 41 倍も増大していることは特筆に値しよう。

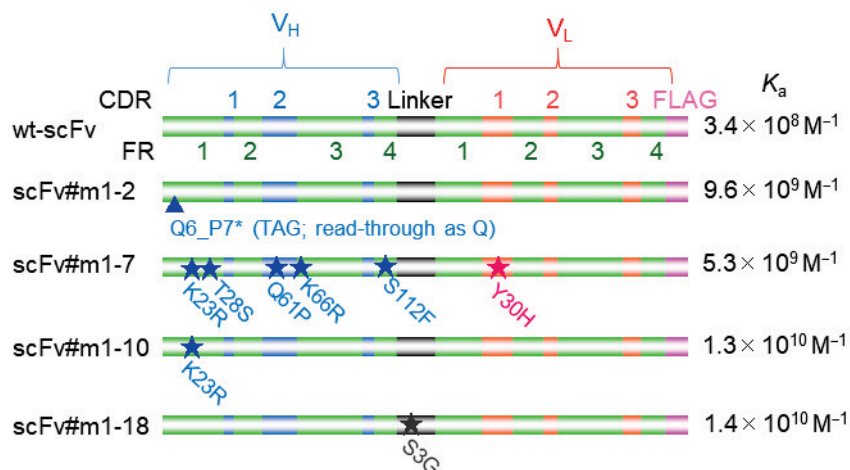


図 34. アレイ型プロファイリングシステムで得られたクローンの 1 次構造と結合定数
 本法により得られたクローンの 1 次構造および Scatchard 法により算出された K_a を示す。三角印はその位置にアミノ酸が挿入されたことを意味する。星印はその位置のアミノ酸が置換されたことを意味する。

scFv#m1-2 に見られた挿入は、アンバー終止コドン (TAG) によるものであった。野生型 scFv より 20 倍以上も改善された親和力を示していることから、当然、その終止コドンは何らかのアミノ酸に翻訳されて (read-through されて) scFv 全長が合成されているはずである。宿主として amber suppressor 株として知られる大腸菌 XL1-Blue を用いていることから、グルタミンへの翻訳が予想されたが、確認のため本 scFv を大量発現し、抗 FLAG 抗体固定化アガロースで精製したのち (図 35)、エドマン分解^{78,79)} に付して N 末端から 10 アミノ酸残基までを特定したところ、QVQLQQQPGA であり、挿入されたアンバーコドンは予想どおりグルタミンに翻訳されていることがわかった。

この終止コドンの read-through は scFv#m1-10 にも見られている。本クローンでは、図 34 に示されている置換以外に、V_H の 36 番目のコドンが野生型の TGG (トリプトファンをコード) からオパール終止コドン (TGA) に変化していた。本 scFv を大量発

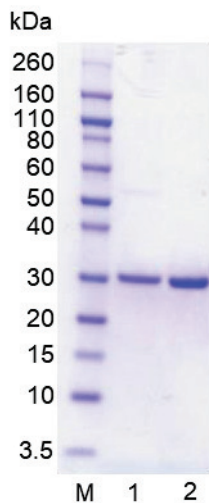


図 35. scFv#m1-2 および scFv#m1-10 の電気泳動像
 精製した scFv を還元処理したのちに SDS-PAGE に付した。ゲルをクマシーブリアントブルーにより染色し、タンパク質を可視化した。M; M_r マーカー, lane 1; scFv#m1-2, lane 2; scFv#m1-10.

現し、上記と同様に精製したのちペプチドマスフィンガープリント法⁸⁰⁾に付したところ、オパールコドンがトリプトファンに翻訳されていることがわかった。上記のように wt-scFv の V_H 36 番目は元来トリプトファンだったためこの位置には置換は起きず、scFv#m1-10 の置換は V_H 23 番目のアルギニンのみとなっているが、この 1 カ所で 38 倍も親和力が改善されていることは興味深い。

第4節 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

前節のプロファイリングシステムにおいて発光シグナルが得られた場合、2つの状況が考えられる。まず1つはファージが提示する scFv の目的抗原 (CS) に対する親和力が十分に高い場合である。このとき、ウェル内に存在する scFv 提示ファージのコピー数がある程度少なくとも、十分なシグナルが得られるだろう (図 36a)。2つ目は、scFv の親和力は低いものの、増殖能やパッケージング率が高く、ウェル内に多量の scFv 提示ファージが複製されている場合である。この状況下では、抗原抗体反応の平衡が複合体の形成側へ移行することにより、結果的に多くのファージが抗原に捕捉され、高いシグナルを発することとなる (図 36b)。望ましいのは、当然、前者のクローンであるが、同程度のシグナルを発している複数のクローンのなかから発光強度のみを頼りに選別するのは困難である。

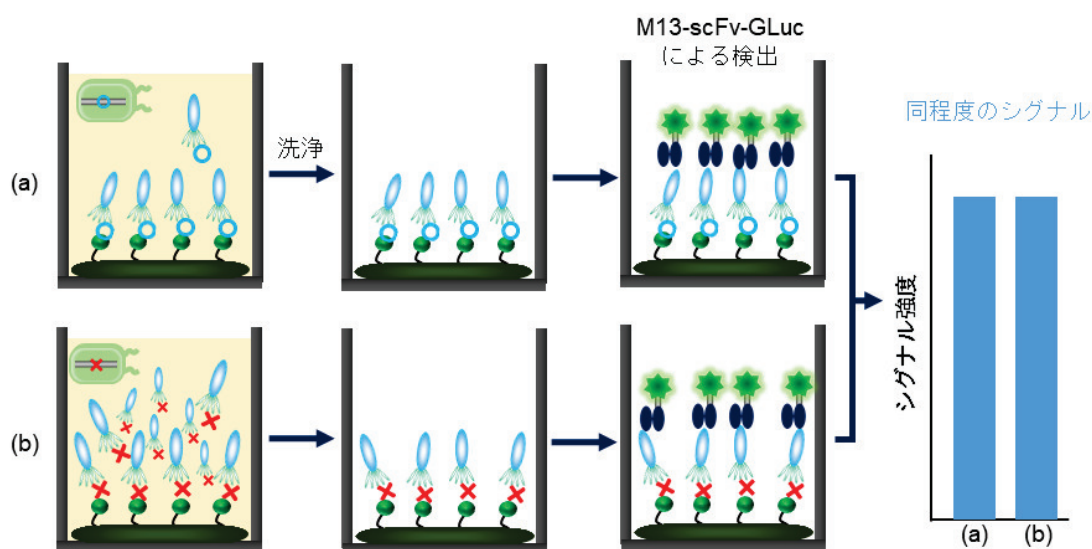


図 36. ファージの複製率と親和力の発光強度への影響

(a) ファージの複製率は低い、親和力が高い場合と、(b) ファージの親和力は低い、複製率は高い場合。いずれの場合も同程度のファージが固相に捕捉され、結果的に得られるシグナルも同程度となることがある。

そこで、抗体の解離率 (off-rate) に着目した。抗原抗体反応の結合定数 K_a (M^{-1}) は以下の式で表される。

$$K_a = \frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag][Ab]} = \frac{k_a}{k_d}$$

ここで、 $[Ag]$ および $[Ab]$ は、それぞれ平衡状態のもとでの遊離の抗原および遊離の抗体のモル濃度、 $[Ag \cdot Ab]$ は抗原抗体複合体のモル濃度を意味する。また、 k_a は結合速度定数 ($M s^{-1}$)、 k_d は解離速度定数 (s^{-1}) である。一般に、超微量定量分析に適する高親和力抗体は、 k_d が小さく、一度結合した抗原から解離しにくい。off-rate を利用した親和性成熟の例として、パンニング後のライブラリーに含まれる各クローンの k_d をバイオレ

イヤー干渉法により測定し、その値が小さいクローンを選択することで、トラスツズマブに対する Fab (antigen-binding fragment) の親和力を 38 倍向上させた例が挙げられる。⁸¹⁾ 低 off-rate クローンを優先的に選択することが、高親和力抗体の効率的な創製に有効であることを示唆した一例と言える。

そこで、前節のプロファイリングシステムに、低 off-rate クローンを選択する工程を加えた系の構築を試みた。すなわち、まず、前節と同様の実験を行って scFv 提示ファージをマイクロウェルに固定化した抗原 (CS) で捕捉する。次いで、遊離の抗原 (CS) を含む緩衝液をマイクロウェルに加えて、一定時間振とうする。scFv 提示ファージが、その k_d に応じて固定化 CS から解離していくが、緩衝液中の CS と優先的に結合するため、固定化 CS への再結合は阻害される。そして、緩衝液 (CS-scFv 提示ファージ複合体を含む) を除去したのちにマイクロウェルに残存するファージを再び検出する (図 37)。このサイクルを 3 回繰り返し、なおマイクロウェルに残存するファージを低 off-rate クローンと考え、単離するものである。

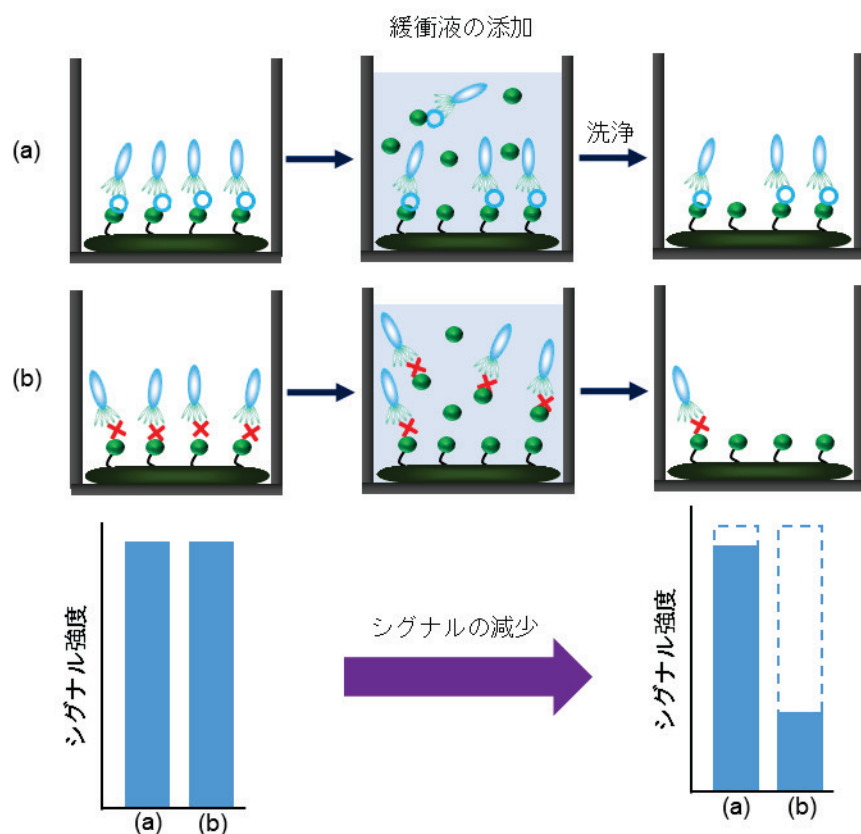


図 37. 低 off-rate 指向選択法の概略図

(a) は off-rate の低いクローンを示す、(b) は off-rate の高いクローンを示す。ファージ増殖後、最初に得たシグナルが同程度であったとしても、緩衝液を添加し、固相上のファージの一部が解離したのち再度検出することで、off-rate の低い (a) と off-rate の高い (b) を区別することが可能となる。

はじめに、解離反応の条件、すなわち、CS 添加量と反応時間について設定した。CS-BSA を固定化したマイクロプレートに、CS#10-scFv-GLuc を加え、37°C で 1 時間反応させた。洗浄したのちセレンテラジンを加えて発光強度を測定した。再び洗浄したの

ち 0, 5.0, または 50 $\mu\text{g/mL}$ の CS を含む緩衝液 (G-PBS) を加えて 1, 2, 4, または 6 時間振とうした。緩衝液を除いて洗浄したのち、再びセレンテラジンを加えて発光強度を測定した (図 38)。その結果, CS を加えなかった場合, 1 時間以上の振とうは発光強度に大きな変化が見られなかったのに対し, CS を加えた場合は 6 時間まで時間依存的にシグナルの減少が認められた。3 サイクル後に大半のクローンがほとんど解離する (発光強度が 5000 以下に減少する) 条件が実験上好都合であったことから, CS 含有緩衝液での振とう時間は 4 時間とした。また, CS 濃度については, 5.0 および 50 $\mu\text{g/mL}$ の差はあまり見られないことから, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ とした。

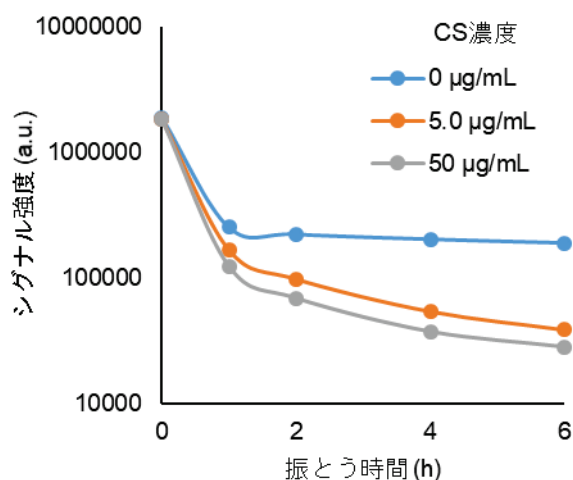


図 38. off-rate 条件の検討

CS-BSA を介して CS#10-scFv-GLuc 融合タンパク質を捕捉し, 直後に測定した発光強度を振とう時間 0 の値とした。そのマイクロプレートに遊離 CS を含む G-PBS 緩衝液を加えて 1, 2, 4, または 6 時間振とうしたのちに再び発光強度を測定した結果を示す。

前節で用いたものと同じの変異 scFv 遺伝子ライブラリーを, 前節と同様に大腸菌に導入し, 前節とほぼ等しいサイズ (2.6×10^5 cfu) の形質転換菌ライブラリーを得た。得られたコロニーのうち, 前節と同様の 9400 クローンについて, 発光強度のプロファイリングを行った。その結果を図 39 に示す。これに続く解離反応の追跡は, もちろん全クローンを対象とすることが理想的であるが, 用手法では困難である。そこで, 50000 カウント以上のシグナルを示した 897 ウェル (全体の約 10%) のうち 376 ウェルを選択して前節に記載したようにファージを回収し, 新たなマイクロウェル内で再度増幅することとした。すなわち, 回収したファージを, 別の CS-BSA 固定化マイクロプレート内であらかじめ培養した TG1 に加えて感染させ, KM13 お

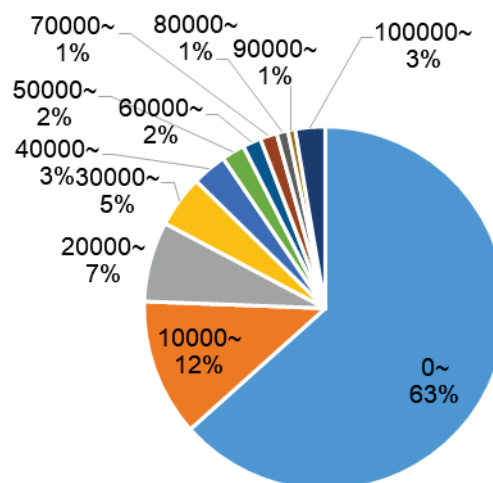


図 39. 発光強度のプロファイリングの結果 (2)

前節と同様に, 発光強度を区分して, その頻度を示した。50000 カウント以上は全体の約 10% (897 ウェル) を占める。

よび Kan を加えたのち、25°Cで 45 時間振とう培養した。プレート洗净して M13-scFv-GLuc を反応させたのち、セレンテラジンを加えて発光強度を測定した。このときの発光強度を「initial」とする。プレート洗净して基質溶液を除き、CS を 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む G-PBS を加えて 25°Cで 4 時間振とうしたのち、再びセレンテラジンを加えて発光強度を測定した。このサイクルを 3 回繰り返した結果を図 40 に示す。

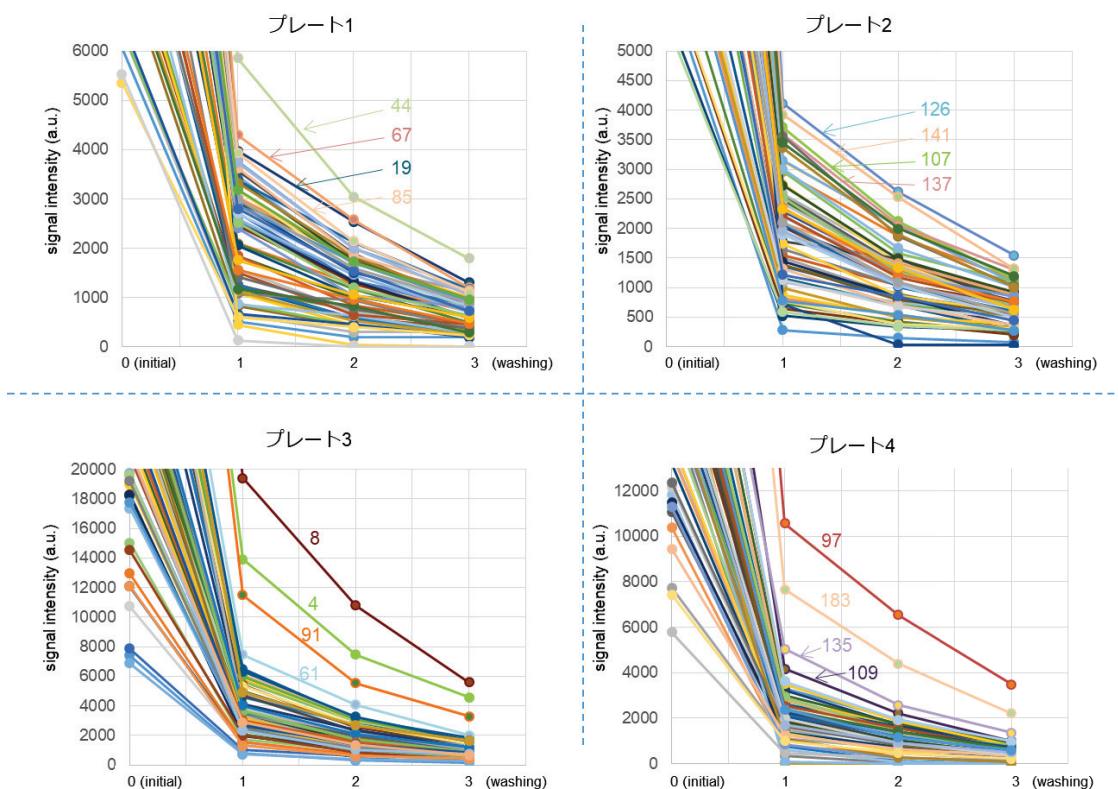


図 40. off-rate 追跡の結果

横軸に洗浄回数、縦軸にシグナル強度をとったグラフを、実際に実験を行ったマイクロプレートごとに示す。図中に記したナンバーの scFv 提示ファージクローンを選択し、サブクローニングを行って以降の解析に用いた。

この操作を経てもなお発光強度が残存するクローン 16 種を再増幅し、寒天培地上でサブクローニングした。これらのファージを競合 ELISA に付した結果、wt-scFv よりも高感度な用量作用曲線を与え、より高親和力であることが推定された 4 種を可溶性 scFv に変換し、その K_a を Scatchard 法により算出したところ、 $0.59\sim 2.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であり、wt-scFv よりも 17~71 倍高い値を示した (図 41)。また、これら 4 種の k_d をバイオレイヤー干渉法により測定したところ、scFv#m2-4, 2-91, 2-97, および 2-183 の順に 0.38, 0.21, 0.87, および $2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であり、いずれも wt-scFv ($2.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) よりも低値であり、期待どおり off-rate がより低くなっていた。

これらのクローンについて、前節と同様にアミノ酸配列を推定したところ、scFv#m2-91 および 2-183 では、いずれも V_H の N 末端側に位置する FR1 の 1 カ所のみアミノ酸置換が認められた (図 41)。最も大きな K_a ($2.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) を示した scFv#m2-97 では 4 カ所に、次いで K_a の大きかった scFv#m2-4 では 3 カ所に置換が認められたが、いずれも

V_H FR1 への置換を含んでいることは興味深い。

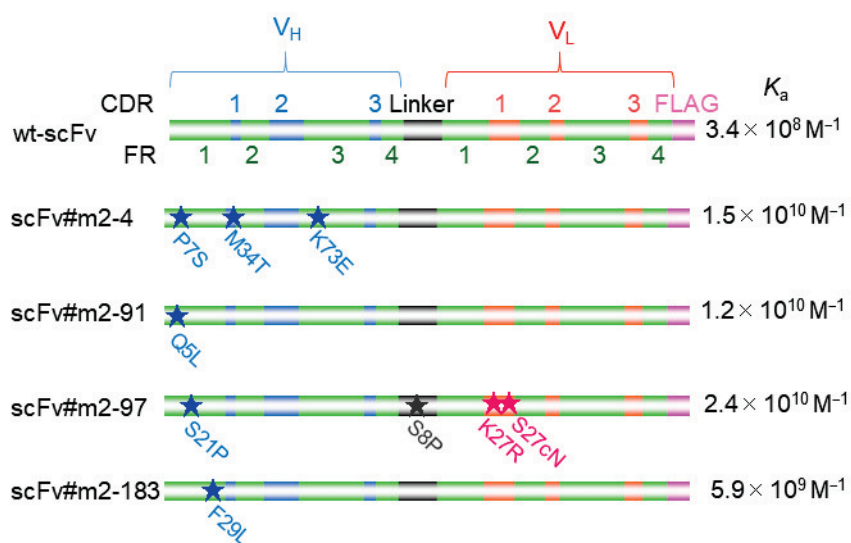


図 41. 低 off-rate 指向選択法で得られたクローンの 1 次構造と結合定数

本法により得られたクローンの 1 次構造および Scatchard 法により算出された K_a を示す。星印はその位置のアミノ酸が置換されたことを意味する。scFv#m2-97 の置換のうち、27「c」は、Kabat らの定義⁴⁷⁾ に基づく 27 番と 28 番の間に挿入されたアミノ酸 (本抗体では 27a~27d の 4 残基が挿入されている) であることを示す。

第5節 高親和力変異体の免疫測定法における有用性

第3節、第4節で得られた変異 scFv のうち、 K_a が $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ を上回った 5 種について、その免疫測定法における性能を評価するため、CS の競合 ELISA を行った。すなわち、CS-BSA 固定化マイクロプレートに各種濃度の CS 標準品および一定量の変異 scFv を加え、混合したのち、 4°C で 2 時間反応させた。プレートを洗浄後、固相上の scFv を POD 標識抗 FLAG 抗体を用いて捕捉し、POD 活性を比色測定した。なお、添加する scFv の量は、 B_0 (CS を添加しない反応) における吸光度が約 1 となるように調整し、scFv 間での標準化を図った。なお、この条件下では、バックグラウンド (CS, scFv のいずれも添加しない反応) の吸光度は、 B_0 の 1/20 以下であった。

変異 scFv を用いる ELISA の用量作用曲線の midpoint は 28~60 pg であり、wt-scFv のそれ (720 pg) と比べて 12~26 倍も減少していた。すなわち、pg レベルの測定が可能な感度であり、これら変異体は十分に臨床応用が可能であることを意味する結果である (図 42)^{37,82)} 比較のため、第 1 章で従来のパンニングにより得られた変異 scFv 6 種を用いて同様に ELISA を行い、用量作用曲線を作成した (図 43)。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 ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ オーダー) から予想されるように、プロファイリングによる変異体で認められた改善率には明らかに及ばない。

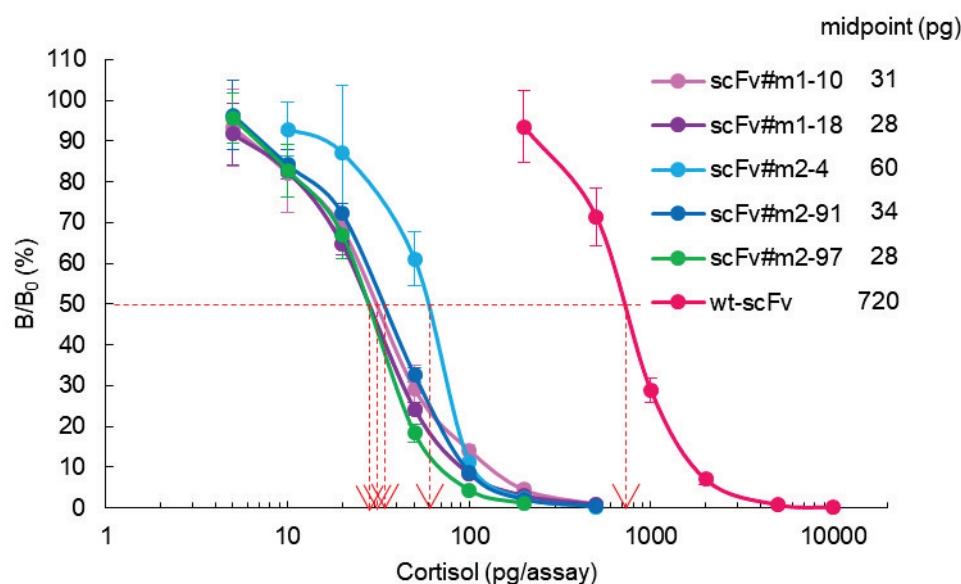


図 42. アレイ型プロファイリングシステムにより得られた高親和力変異 scFv を用いる競合 ELISA

K_a が $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ を超える変異 scFv および wt-scFv を用いて競合 ELISA を行い、得られた用量作用曲線を示す。各点のエラーバーは標準偏差 ($n=4$) を示す。

以上の結果から、本章で開発したアレイ型プロファイリングシステムが、免疫測定法

の高感度化を可能とする高親和力変異体の創製において、従来のパンニングより有利なことが実証された。

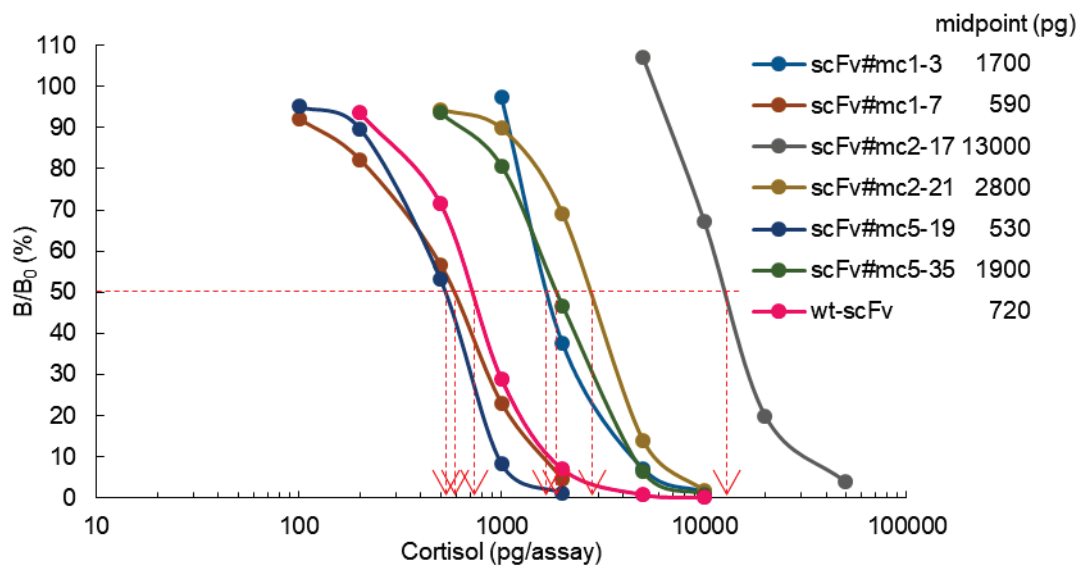


図 43. パンニングで得られた変異 scFv を用いる競合 ELISA
 第 1 章第 4 節で得られた変異 scFv を用いる競合 ELISA により得られた用量作用曲線を示す。

第6節 考察

マイクロウェル内でのファージ提示条件を種々調整し、前章で作製した M13-scFv-GLuc を用いる発光検出に十分な量の scFv 提示ファージの複製が可能になったことで、アレイ型プロファイリングシステムを構築することができた。その結果、パンニングでは 6 重実験を行っても全く得られなかった $K_a > 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の高親和力変異 scFv クローンを、一挙に 5 種獲得することに成功した。

本章で得られた 8 種のクローンの塩基配列を解析し、アミノ酸配列を推定した結果、アミノ酸置換および挿入は平均 2.3 カ所であり、パンニングで得られたクローン (平均 4 カ所) よりも明らかに少ない。また、8 種のうち 5 種では、1 カ所のみの変異 (scFv#m1-2 は挿入, scFv#m1-10, 1-18, 2-91, および 2-183 は置換) でありながら、 K_a として 10 倍を上回る (17~41 倍) 大幅な親和力の向上が認められた。しかも、これらのうち 4 種 (scFv#m1-2, 1-10, 2-91, および 2-183) では、その変異は V_H FR1 に見られ、複数の変異が導入された 3 種 (scFv#m1-7, 2-4, および 2-97) でも全てに V_H FR1 に変異が導入されていた。SWISS-MODEL タンパク質モデリングサーバー⁸³⁾ および SwissDock⁸⁴⁾ を利用して scFv と CS のドッキングモデルを作製した結果 (図 44) から、FR1 は直接抗原と作用する可能性は考えにくいものと思われた。しかし、FR1 の変異が scFv の二量体化や熱力学的安定性に影響を及ぼすことが示唆されており、⁸⁵⁾ これらの性質に及ぼす変異の影響が親和力に反映されたものとも考えられる。そして興味深いことに、第 1 章でパンニングにより得られた変異 scFv クローンに必ず見られた、 V_L 49 番目の「不自然な」システインを排除する置換は見られなかった。この置換を本章で得られたクローンに導入することでさらに親和力が向上した変異体を得られるか、興味を持たれるところである。

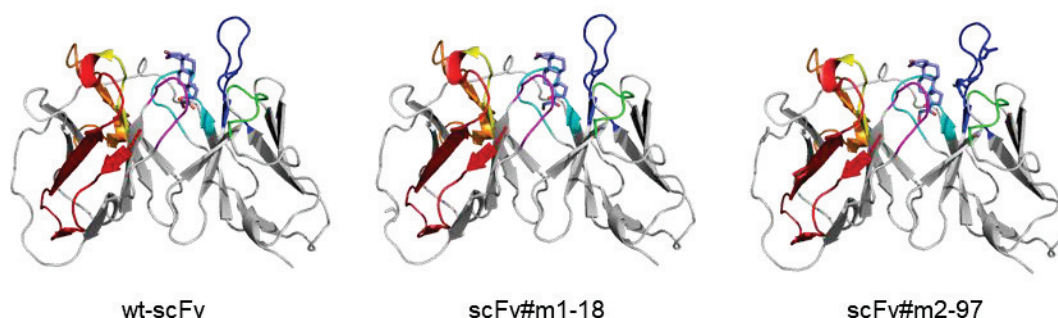


図 44. scFv と CS のドッキングモデル

wt-scFv, scFv#m1-18, および scFv#m2-97 についてモデリングを行った。scFv の β -シートは灰色、CDR はそれぞれ V_H -CDR1 (黄), V_H -CDR2 (オレンジ), V_H -CDR3 (マゼンタ), V_L -CDR1 (青), V_L -CDR2 (緑) および V_L -CDR3 (水色) で示した。FR1 は赤色で示している。CS の骨格は紫で示す。

本章の実験は全工程を的手法で行っているため、9400 コロニーの解析にとどまっているが、この数はライブラリー全体 (10^5 レベル) の約 3%にすぎない。このような部分的な解析ですら、従来のパンニングでは得られなかった高親和力の ($K_a > 10^{10} \text{ M}^{-1}$) scFv ク

クローンを計 5 種 (第 3 節および第 4 節の実験から) 得ることができた。もし、ライブラリー全体に対して本法を適用することができれば、同等の高親和力 scFv クローンを多数得ることができるだろう。そのなかに、さらに高い親和力 ($K_a > 10^{11} \text{ M}^{-1}$) を持ち、**subfemtomole** レベルの免疫測定法を可能とする優れた変異抗体が含まれることも期待できる。本法は、自動コロニーピッカーやマイクロプレートの洗浄装置などを用いて、多くの工程を自動化することが可能と考えられる。その実現が今後の課題である。

結論

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」により、動物が産生し得ない優れた変異抗体を迅速に創出することが可能視されている。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。多様性に富む変異 scFv ライブラリーから、抗原結合能の向上した変異体を効率よく選別するために、ファージ提示法が汎用される。本法では、偶然に生成した希少な改良型 scFv を提示するファージを、パンニング (抗原結合能に基づくアフィニティ抽出) という手法で、大量に副生する改悪型 scFv 提示ファージから分離して単離する。しかし、パンニングは緒論で述べた問題を内包するため、満足のいく変異体を得るまでに多大の労力を要するのが実情であった。

本研究では、この問題の抜本的な解決を目指して、アレイ型プロファイリングシステムを構築した。第 1 章では、CS をモデル標的抗原として変異 scFv ライブラリーを作製し、新規選別法の単離効率を評価するための対照実験として、従来どおりのパンニングによる特異抗体の選別を行った。念のため、CS を固定化した固相からの溶出条件は酸性と塩基性の 2 条件とし、それぞれについて 3 重の実験を併行して行った。しかし、野生型の wt-scFv よりも親和力の向上したクローンは、得られたものの K_a にして 10^9 M^{-1} のレベルにとどまった。しかも、単離されたクローンは多様性に乏しく、同一のクローンが複数得られた。第 2 章では本法の構築に必須である「ファージ検出試薬」(M13-scFv-GLuc) を作製した。ファージ提示に常用される M13 ファージに対するモノクローナル抗体を新規作製し、これを scFv 化して発光酵素 GLuc との融合タンパク質とした。レポーター分子として選択した GLuc は高感度検出が可能であることに加え、基質の添加後、直ちに発光する性質を備え、目的のプロファイリングシステムを構築するうえで多くの利点を有していた。特に、酸やアルカリなどの酵素反応停止液を加える必要がないため、基質を再度添加することにより繰り返し発光させることが可能であり、off-rate による選択を実施するために極めて有利であった。

第 3 章では種々の実験条件を整えた結果、アレイ型プロファイリングシステムの構築に成功した。本法は抗原特異的な抗体提示ファージの産生能を形質転換菌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)⁸⁶⁾ 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、普及には至らなかった。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。本章で得られた scFv クローンは、同一の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、第1章で得られた変異 scFv クローンとの共通性は全く見られず、明らかに親和力に優れていた。動物を免疫する従来の方法で、CS に対して 10^{10} オーダーの K_a を示す高親和力抗体を作製した例は少ない。⁴²⁾ 本プロファイリングシステムでは、第3章第3節と第4節のわずか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。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 が一挙に得られるものと期待される。

本研究では、アレイ型プロファイリングシステムが、従前のパンニングでは回収が困難な改良分子種の獲得を可能にすることを実証した。今後、本システムが、高分子抗原を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。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学生命分析化学研究室教授 小林典裕先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、有益な御助言と御協力を賜りました本学生命分析化学研究室講師 大山浩之先生、同助手 森田いずみ先生に深謝いたします。

本研究の論文作成に際し、貴重な御助言、御指導を賜りました本学医薬細胞生物学研究室教授 土反伸和先生、同薬化学研究室教授 奥田健介先生、同生化学研究室准教授 灘中里美先生に厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大な御協力をいただきました本学生命分析化学研究室で研究生生活を共にした卒業生ならびに学生諸氏に心から感謝いたします。

本研究での scFv タンパク質のアミノ酸分析につきまして、本学中央分析准教授 竹内敦子先生に多大のお力添えをいただきました。ここに感謝の意を表します。

第1章および第2章の研究において、暖かい御支援を賜りました東北大学大学院医学系研究科准教授 丹羽俊文先生に感謝いたします。また、pEXmide 5 ベクターを御恵与下さいましたスウェーデン Lund 大学教授 Carl A. K. Borrebaeck 先生、スウェーデン Avena Partners AB Eskil Söderlind 博士に深謝いたします。

最後に、博士課程在籍中、あらゆる面で私を支えてくれた両親に感謝いたします。

実験の部

研究全般に関する項目

本研究に用いた主要な装置, ソフトウェア, 器材・試薬など各種実験の型式, 性状, 購入先などについて以下に一括する. 動物実験は, 神戸薬科大学動物実験委員会の承認を得たのち, 神戸薬科大学動物実験実施規程を遵守し, 動物に不必要な苦痛を与えぬよう, 十分に配慮して行った. また, 組換え DNA 実験は神戸薬科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たのち, 同委員会の指針および「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守して行った.

i. 装置

- ・ 紫外可視吸光度の測定 (DNA およびタンパク質の定量, 大腸菌密度の測定など) には, Ultrospec 2100 分光光度計 (Amersham Bioscience) を用いた.
- ・ PCR による DNA の増幅には, T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いた.
- ・ 抗体フラグメントの SDS-PAGE には, X Cell SureLock (Invitrogen) を用いた. また, ブロッキング分析におけるタンパク質の転写には, iBlot Gel Transfer System (Invitrogen) を用いた.
- ・ 大腸菌への電気穿孔法によるプラスミドの導入には, ECM 630 (BTX) を用いた.
- ・ ELISA における POD 活性の可視部吸光度測定 (比色測定) には, iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いた.
- ・ GLuc 活性の測定 (発光測定) には, Synergy HTX プレートリーダー (BioTek) または FLUOstar OPTIMA プレートリーダー (BMG Labtech) を用いた.
- ・ トリチウム標識体を用いる Scatchard 解析における放射能の測定には, Tri-Carb 2900TR 液体シンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いた.
- ・ バイオレイヤー干渉法による抗体フラグメントの結合パラメーターの測定には, BLItz (Pall ForteBio) を用いた.

ii. 器材

- ・ 比色測定による ELISA に用いた Costar 96 ウェルマイクロプレート (No. 3590) およびアレイ型プロファイリングに用いた Costar 白色 96 ウェルマイクロプレート (No. 3922) は, Corning から購入した.
- ・ 抗体ライブラリーのパンニングに用いたチューブ (75 mm×12 mm “Maxisorp” ポリスチレン試験管) は, Nunc から購入した.
- ・ 細胞培養に用いた滅菌済みディスポーザブルフラスコ, シャーレ, クラスタードイッシュ, ピペット類は, Corning または東洋器材から購入した.
- ・ 放射能測定に用いたシンチレーションバイアルは, Iwaki glass から購入した.

iii. ソフトウェア

- ・ PCR 用プライマーおよび化学合成 *scFv* 遺伝子の構築に用いる一本鎖オリゴ DNA の設計には, Oligo™ program version 4.0 (National Bioscience) を用いた.
- ・ DNA の塩基配列データの解読は, Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems) を用いた.
- ・ アミノ酸配列の推定には, ExPASy Translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) を利用した.
- ・ 抗体フラグメントの立体構造モデリングには, SWISS-MODEL サーバー (<http://swissmodel.expasy.org>)⁸³⁾ を利用した.
- ・ 抗体フラグメントと抗原とのドッキングモデルの作製には, SwissDock サーバー (<http://www.swissdock.ch>)⁸⁴⁾ を利用した.

iv. 緩衝液

以下の略号で表記する各緩衝液の組成を示す.

- ・ PB: 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.3).
- ・ PBS: 9.0 g/L NaCl を含む PB.
- ・ PBS-2: NaCl (137 mM), Na₂HPO₄ (10.0 mM), KCl (2.68 mM), および KH₂PO₄ (1.76 mM) の水溶液を pH 7.4 に調整し, オートクレーブ滅菌したもの.
- ・ G-PBS: 1.0 g/L のゼラチンを含む PBS-2.
- ・ PVG-PBS: 1.0 g/L のポリビニルアルコール (平均重合度 500) を含む G-PBS.
- ・ T-PBS: 0.050 (v/v) %の Tween 20 を含む PBS.
- ・ T-PBS-2: 0.10 (v/v) %の Tween 20 を含む PBS-2.
- ・ M-PBS: 20 g/L のスキムミルクを含む PBS.
- ・ M-PBS-2: 20 g/L のスキムミルクを含む PBS-2.
- ・ TBS: NaCl (137 mM), KCl (2.68 mM), および tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (24.8 mM) の水溶液を 3 M HCl で pH 7.4 に調整したもの.
- ・ CB: 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃ (pH 8.6).
- ・ TAE 緩衝液: ナカライテスクから購入した.
- ・ 浸透圧ショック用緩衝液: スクロース (584 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1.0 mM), および Tris-HCl (50 mM; pH 8.0) の水溶液をろ過滅菌したもの.

v. ステロイド類

- ・ CS および CS ラベル用誘導体 [CS 3-(*O*-carboxymethyl)oxime (CS-3CMO)] は, Sigma-Aldrich から購入した.

vi. トリチウム標識化合物

- ・ [1,2,6,7-³H (N)]-CS (3.44 TBq/mmol) は, PerkinElmer から購入した.

vii. 抗体類および抗体関連試薬

- ・ 抗 FLAG 抗体固定化アガロースは, Sigma-Aldrich から購入した.
- ・ POD 標識抗マウス IgG 抗体は, Jackson ImmunoResearch から購入した.
- ・ POD 標識抗 M13 モノクローナル抗体は, GE Healthcare から購入した.
- ・ POD 標識抗 FLAG 抗体は, Sigma-Aldrich から購入した.

viii. 抗体以外の免疫化学関連試薬

- ・ AbISCO-100 アジュバントは, Isconova AB から購入した.
- ・ EZ-Link NHS-LC-Biotin (ビオチン標識試薬) は, Thermo Fisher Scientific から購入した.
- ・ Biotin *N*-succinimidyl ester (ビオチン標識試薬) は, Sigma-Aldrich から購入した.
- ・ セレンテラジンは, NanoLight または Promega から購入した.

ix. 酵素類

- ・ 制限酵素類: *Xma* I, *Sal* I, *Nco* I, *Xho* I, *Not* I, *Spe* I, *Sfi* I (各 10 U/μL) は, New England Biolabs から購入した.
- ・ DNA ポリメラーゼ類: *AmpliTaq* ポリメラーゼ (5 U/μL) は Thermo Fisher Scientific から, *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (5 U/μL) は TaKaRa から, *KOD* ポリメラーゼ (2.5 U/μL) および *KOD Fx* ポリメラーゼ (1 U/μL) は TOYOBO から, *Pfu* DNA ポリメラーゼは Promega から, それぞれ購入した.
- ・ 組換え DNA 実験に用いたその他の酵素: Superscript II reverse transcriptase (200 U/μL) は Invitrogen から, T4 DNA リガーゼ (400 U/μL) は New England Biolabs から, それぞれ購入した.

x. 基質溶液

- ・ 比色測定用 POD 基質溶液: クエン酸 (25 mM) および Na₂HPO₄ (50 mM) の各水溶液を混合して pH 5.0 に調整した溶液と, 30% (w/v) H₂O₂ を体積比 5000 : 3 で混合した溶液 (25 mL) に, *o*-フェニレンジアミン・2 塩酸塩 (10 mg) を溶解したもの.
- ・ 発光測定用 GLuc 基質溶液: セレンテラジン (5.0 mg) を 0.10 M HCl を含むメタノール (1.18 mL) に溶解したのち, セレンテラジンとして 5.0 または 20 μM となるように PBS で希釈したもの.

xi. その他の試薬・器材

- ・ ゼラチン, SDS, アンピシリンナトリウム, 硫酸カナマイシン, TMB, Tween 20, ポリ

ビニルアルコール (重合度約 500), クリアゾル II, および IPTG は, ナカライテスクから購入した.

- ・ *o*-フェニレンジアミン・2 塩酸塩, BSA, OVA, および PEG8000 は, Sigma-Aldrich から購入した.
- ・ PEG4000 は, Merck から購入した.
- ・ スキムミルクは, BD Biosciences から購入した.
- ・ ブロックエース粉末は, DS ファーマバイオメディカルから購入した.

その他の生化学用試薬, 分子生物化学用試薬ならびに有機合成用試薬は試薬特級を用いた.

xii. 培地類

A) マウス細胞用培地

- ・ 基本培地: 1.0 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) -NaOH 緩衝液 (pH 7.3) [1% (v/v)] および硫酸カナマイシン (100 mM) を含む RPMI-1640.
- ・ ハイブリドーマ用培地: ウシ胎児血清 [10% (v/v)], 2-メルカプトエタノール (50 mM), L-グルタミン (2.0 mM), およびピルビン酸ナトリウム (1.0 mM) を含む基本培地.
- ・ Hypoxanthine-thymidine (HT) 培地: ヒポキサンチン (0.10 mM) およびチミジン (16 μ M) を含むハイブリドーマ用培地.
- ・ HAT 培地: アミノプテリン (0.40 μ M) を含む HT 培地.

なお, RPMI-1640 液体培地およびウシ胎児血清は GIBCO から, HAT 培地サプリメントおよび HT 培地サプリメントは Sigma-Aldrich から, それぞれ購入した.

B) 大腸菌およびファージ用培地

- ・ 2 \times YT 培地: Bacto tryptone (16 g/L), Bacto yeast extract (10 g/L), および NaCl (5.0 g/L) の水溶液を pH 7.0 に調整し, オートクレーブ滅菌したもの.
- ・ 2 \times YT-AG (1%) 培地: アンピシリンナトリウム (100 mg/L) および D-グルコース (10 g/L) を含む 2 \times YT 培地.
- ・ 2 \times YT-AG (2%) 培地: アンピシリンナトリウム (100 mg/L) および D-グルコース (20 g/L) を含む 2 \times YT 培地.
- ・ 2 \times YT-AK (1%) 培地: アンピシリンナトリウム (100 mg/L) および硫酸カナマイシン (50 mg/L) を含む 2 \times YT 培地.
- ・ 2 \times YT-ATG (1%) 培地: アンピシリンナトリウム (100 mg/L), テトラサイクリン塩酸塩 (10 mg/L), および D-グルコース (10 g/L) を含む 2 \times YT 培地.
- ・ 2 \times YT-ATG (2%) 培地: アンピシリンナトリウム (100 mg/L), テトラサイクリン塩酸塩 (10 mg/L), および D-グルコース (20 g/L) を含む 2 \times YT 培地.
- ・ SOB (-) 培地: Bacto tryptone (20 g/L), Bacto yeast extract (5.0 g/L), NaCl (0.50 g/L), および KCl (0.186 g/L) の水溶液を pH 7.0 に調整し, オートクレーブ滅菌したもの.

- ・ SOC 培地: MgCl₂ (5.0 mM), MgSO₄ (5.0 mM), および D-グルコース (20 mM) を SOB (-) 培地に混合したもの.
- ・ タンパク質発現用誘導培地: スクロース (0.40 M), IPTG (0.10 mM), およびアンピシリンナトリウム (100 mg/L) を含む 2×YT 培地.
- ・ トップアガー: Bacto agar (7.0 g/L) を含む 2×YT 培地をオートクレーブ滅菌したもの.
- ・ TYE アガー: Bacto tryptone (10 g/L), Bacto yeast extract (5.0 g/L), Bacto agar (15 g/L), および NaCl (8.0 g/L) の水溶液をオートクレーブ滅菌したもの.

なお, Bacto tryptone, Bacto yeast extract, および Bacto agar は BD Biosciences から購入した.

xiii. 細胞とファージ

- ・ P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞は, ヒューマンサイエンス資源バンクより入手した.
- ・ 大腸菌 XL1-Blue 細胞および TG1 細胞は, Agilent Technologies から購入した.
- ・ 大腸菌 XL0LR 細胞および VCSM13 ヘルパーファージは, Stratagene から購入した.
- ・ 大腸菌 XL1-Blue および XL0LR エレクトロコンピテント細胞は, 常法⁸⁷⁾に従って調製した.
- ・ KM13 ヘルパーファージは, 英国 Medical Research Council の Gregory Paul Winter, Ian M. Tomlinson 両博士より供与されたものを用いた.

xiv. ベクターDNA

- ・ pBluescript II は, Invitrogen から購入した.
- ・ pEXmide 5 はスウェーデン Avena Partners AB・Eskil Söderlind 博士, スウェーデン Lund 大学・Carl A. K. Borrebaeck 博士から供与された.
- ・ pEXmide 7 は, Avena Partners AB・Eskil Söderlind 博士, スウェーデン Lund 大学・Carl A. K. Borrebaeck 博士の許諾のもと, V_H 遺伝子と V_L 遺伝子を独立にクローニングしたのちこれらから構成される *scFv* 遺伝子がファージ提示されるよう, 著者らが pEXmide 5 を改変して作製した.
- ・ pEXmide 7' は, Avena Partners AB・Eskil Söderlind 博士, スウェーデン Lund 大学・Carl A. K. Borrebaeck 博士の許諾のもと, V_H 遺伝子と V_L 遺伝子を独立にクローニングしたのちこれらから構成される *scFv* 遺伝子が可溶性タンパク質として発現されるよう, 著者らが pEXmide 5 を改変して作製した.
- ・ pMCS-Gussia Luc vector は, Thermo Fisher Scientific から購入した.

xv. プライマー

PCR および DNA の塩基配列の決定に用いたプライマーは, つくばオリゴサービスで化学合成され, 逆相カートリッジ精製品または高速液体クロマトグラフィー精製品と

して供与されたものを用いた。以下に、本文中に記載されたプライマーの略号とその塩基配列 (アンダーラインは増幅産物のクローニングに用いた制限配列) を示す。

- my1-GSP-1: 5'-GCTGGCCGGGTGGGCAAC-3'
- my1-GSP-2: 5'-ACACCGCTGGACAGGGAT-3'
- my1-GSP-3: 5'-GGATCCCGGGAAATAGCCCTTGACCAGGC-3' (*Xma* I)
- my2b-GSP-1: 5'-GCTGGCCGGGTGGGCAAC-3'
- my2b-GSP-2: 5'-ACACTGCTGGACAGGGAT-3'
- my2b-GSP-3: 5'-GGATCCCGGGAGTACCCCTTGACCAGGC-3' (*Xma* I)
- mκ-GSP-1: 5'-GTTGAAGCTCTTGACAAT-3'
- mκ-GSP-2: 5'-ATTTTGTCTTCACTGCC-3'
- mκ-GSP-3: 5'-GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAAGATG-3' (*Xma* I)
- AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG-3' (*Sal* I)
- AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (*Sal* I)
- MHC: 5'-GGATCCCGGGCCAGTGGATAGACHGATG-3' (*Xma* I)
- MHV-2: 5'-ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT-3' (*Sal* I)
- VL-I/III: 5'-GACATTGTGATGACYCARTCT-3'
- KS-reverse: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
- KS-forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
- V_{HH}-cPCR-back: 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCA-3'
- V_{HH}-cPCR-for: 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGT-3'
- pEX7-V_H-CP5: 5'-GGATTGTTATTACTCGCGGC-3'
- pEX7-V_L-CP3: 5'-CCTGATGTGTGCGTCTTAGT-3'
- pEX-cla-3: 5'-GCCATTTGGGAATTAGAGCCA-3'
- CS#3V_H-Rev: 5'-CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCC TG-3' (*Nco* I)
- CS#3V_H-For: 5'-TGAACCGCCTCCACCGCTCGAGACTGCAGAGACAGTGACCAGAG TC-3' (*Xho* I)
- CS#3V_L-Rev: 5'-GGATCCGGCGGTGGCGGGTCGACGGACATTGTGCTGACACAGTC TC-3' (*Sal* I)
- CS#3V_L-For: 5'-GGGCTCAACTTTCTTTGCGGCCGCAGCCCGTTTTATTTCAGCTTG -3' (*Not* I)
- CS#10V_H-Rev: 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCCAAGTTACTCT AAAAGAGTCTGGC-3' (*Nco* I)
- CS#10V_H-For: 5'-CCGCCGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCGGAGGAGA CGGTGACTGAGGTTCC-3'
- CS#10V_L-Rev: 5'-CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGATGTTTTGGT

GACCCAAACTC-3'

- CS#10V_L-For: 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTTATCATCATCATCTTTAT AATCAGCCCGTTTAATTTCCAGCTTGG-3' (*Sal* I)
- V_L-For-2: 5'-TTTACCTTCGCTACTTTTGCCGCTACCACTAGTAGAGCCAGCCCGTTT AATTTCCAGCTTG-3' (*Spe* I)
- GLuc-Rev: 5'-TCTACTAGTGGTAGCGGCAAAAGTAGCGAAGGTAAAGGTAAGCCCA CCGAGAACAACGAAGAC-3' (*Spe* I)
- GLuc-For: 5'-GGGCTCAACTTTCTTTGCGGCCGCTCATTAATGGTGGTGATGGTGAT GCCCTTTATCATCATCATCTTTATAATCGTCACCACCGGCCCCCTTGATC-3' (*Not* I)
- M13#71V_H-Rev: 5'-ATTGTTACTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAGGTTTCAG CTGCAGCAGTCTG-3' (*Nco* I)
- M13#71V_H-For: 5'-CCGCCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGA CGGTGACCGTGGTC-3'
- M13#71V_L-Rev: 5'-CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGACATTGTGA TGACTCAGTCTCA-3'
- M13#71V_L-For: 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTTATCATCATCATCTTTA TAATCAGCCCGTCTCAGCTCCAGCTTG-3' (*Sal* I)
- FLAG-TAA2: 5'-GATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCGACTTATTATTTATCATCATC ATCTTTATAATC-3' (*Sal* I)

xvi. キット類

- RNA 抽出キット (RNeasy mini kit) は, Qiagen から購入した.
- 5'RACE キット (5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends, version 2.0) は, Invitrogen から購入した.
- プラスミド DNA 抽出キット (QIAGEN plasmid mini kit) は, Qiagen から購入した.
- DNA 精製キット (A) (Wizard PCR preps DNA purification system) および DNA 精製キ ャット (B) (Wizard SV gel and PCR clean-up system) は, Promega から購入した.
- 質量分析用ゲル内消化キット (XL-Tryp Kit) はアプロサイエンスから購入した.
- タンパク質定量に用いたプロテインアッセイ Lowry キットは, ナカライテスクから 購入した.

xvii. 電気泳動用ゲルと泳動条件

- Invitrogen 製のアガロースゲルを用い, TAE 緩衝液中, 100 V で泳動を行った.

xviii. 実験動物

- 抗 CS 抗体, 抗 VCSM13 抗体の作製に際して免疫に用いた BALB/c マウス (8 週齢,

雌) は, 日本 SLC から入手した.

xix. 依頼分析

- ・ DNA の塩基配列の解析は, TaKaRa バイオまたはユーロフィンジェノミクスの受託 DNA シーケンスサービスに依頼した.
- ・ 第 1 章第 4 節および第 3 章第 4 節の質量分析による *scFv* 遺伝子内の終止コドン部位のアミノ酸の特定は, アプロサイエンスまたは神戸薬科大学中央分析室に依頼した.

第1章付属実験

第2節付属実験

1.2.1 項 CS-アルブミン結合体 (CS-BSA または CS-OVA) の調製

CS 3-(*O*-carboxymethyl)oxime (CS-3CMO) (30 mg; 70 μ mol) を 95% 1,4-ジオキサン (550 μ L) に溶解し, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-HCl (210 μ mol) と *N*-hydroxysuccinimide (210 μ mol) を加え, 室温で 15 分反応させて, CS 3-(*O*-carboxymethyl)oxime *N*-hydroxysuccinimide ester (CS-3CMO-NHS) を作製した. CS-3CMO-NHS (18 μ mol) をピリジン (1.5 mL) に溶解し, BSA または OVA (各 0.45 μ mol) の PB 溶液 (3 mL) と混和して, 室温で 1 時間反応させたのち, 4°Cで一晩攪拌した. これを精製水に対して 4°Cで一晩透析したのち, 反応液を精製水で全量約 10 mL に調整し, 氷冷したアセトン (10~20 mL) および少量の NaCl を加え, 氷上で 30 分間放置した. 遠心分離 (1500g, 15 分, 4°C) 後, 沈殿を精製水 (約 10 mL) で再び懸濁し, 氷冷したアセトン (10~20 mL) を添加して同様の操作を繰り返した. 得られた沈殿を 20% ピリジンに溶解したのち, 精製水に対して 4°Cで一晩透析した. さらに 0.90% NaCl に対して 4°Cで一晩透析したのち透析膜内容物を回収し, 目的の CS-アルブミン結合体を 0.90% NaCl 溶液として得た. CS-BSA における BSA 濃度を Hartree 法,⁸⁸⁾ 他方, CS-OVA における OVA 濃度をプロテインアッセイ Lowry キットを用いてそれぞれ算出した. また, 250 nm における吸光度 (CS 残基の結合による) を測定して, 各 CS-アルブミン結合体の結合モル比を求めたところ, CS/BSA では 12, CS/OVA では 5 であった.

1.2.2 項 抗 CS 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立および抗 CS モノクローナル抗体の産生

CS-BSA の生理食塩水溶液 (0.5 mg/mL) を等体積のフロイント完全アジュバントと混合してエマルジョンとしたのち, 8 週齢の BALB/c マウス (雌) の背部に皮下投与 (1 個体あたり 0.2 mL) した. 2 週間隔で 4 回追加免疫 (フロイントの不完全アジュバントを使用) を行い, 最終免疫から 7 日後, CS-BSA (0.25 mg/mL) を含む生理食塩水 (計 0.5 mL) をマウスの腹腔内と脾臓に投与し, 3 日後に脾臓を摘出した. 得られる脾細胞 (約 1×10^8 個) を, ポリ-L-アルギニン塩酸塩 (10 mg/L) および 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む PEG4000 (400 g/L) (1.0 mL) を融合剤に用いて, ミエローマ P3/NS1/1-Ag4-1 細胞 (約 2×10^7 個) と融合させた.⁸⁹⁾ 融合後の細胞を, 96 ウェルクラスターディッシュ中, HAT 培地で約 2 週間培養することによりハイブリドーマの選択を行った. ハイブリドーマの増殖が確認されたマイクロウェルの培養上清を, 下記の ELISA に付して, 抗 CS 抗体の分泌の有無を調べた. 陽性を示したハイブリドーマ細胞 (#3 および #10) を HT 培地で拡大培養したのち, 限界希釈法によりクローン化した.

1.2.3 項 ELISA による培養上清中抗 CS 抗体の検出

CS-OVA (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む 0.10 M 炭酸緩衝液 (pH 8.6) (CB) を ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに分注 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) し、室温で一晩放置した。溶液を吸引除去し、PBS で 3 回洗浄したのち、M-PBS (300 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) を添加し、37°C で 1 時間放置してブロッキングを行った。ウェルを T-PBS で 3 回洗浄したのち、検体であるハイブリドーマ培養上清 (G-PBS で 5 倍以上に希釈したもの; 100 μL) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。同様に溶液を除去、ウェルを洗浄したのち、POD 標識ヤギ抗マウス IgG の G-PBS 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を分注 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) し、37°C で 1 時間放置した。溶液を除去、ウェルを洗浄したのち、各ウェルに POD 基質溶液を分注 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) し、十分な発色が認められるまで (10~30 分)、室温で放置した。1.0 M H_2SO_4 を添加 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) して酵素反応を停止させたのち、マイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定した。

1.2.4 項 Scatchard 法による結合定数の算出

ガラス試験管 (12×75 mm) に、G-PBS で各種濃度に希釈した CS の標準液 (100 μL)、 ^3H -CS (1.5×10⁴ dpm; 500 μL)、および Ab-CS#3 または Ab-CS#10 (100 μL) を添加して攪拌後、4°C で一晩インキュベートした。反応液を氷上で 10 分間インキュベートし、ここへ dextran-coated charcoal 懸濁液 (0.4%の活性炭末を 0.01%のデキストランを含む G-PBS で懸濁した液) (500 μL) を添加して攪拌後、氷上でさらに 20 分間インキュベートした。この懸濁液を遠心分離 (800g, 10 分, 4°C) し、上清をクリアゾル II (10 mL) と混和し、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。得られた放射能 (dpm) と添加した CS 量 (pmol) から Scatchard プロットを行い、⁴³⁾ Ab-CS#3 および Ab-CS#10 の CS に対する結合定数 K_a を算出した。

1.2.5 項 Ab-CS#3 を用いる ELISA

CS-BSA (0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む CB を ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに分注 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) し、室温で一晩放置した。溶液を吸引除去し、PBS で 3 回洗浄したのち、M-PBS (300 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) を添加して、37°C で 2 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、T-PBS で 3 回洗浄した。このプレートに、G-PBS で希釈した Ab-CS#3 (100 μL) と、各種濃度の CS 標準品を含む PVG-PBS 溶液 (50 μL) を加えて混和し、4°C で 2 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、T-PBS で 3 回洗浄したのち、PVG-PBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗マウス抗体 (100 μL) を加え、37°C で 30 分インキュベートした。再び溶液を吸引除去し、T-PBS で 3 回洗浄したのち、各ウェルに POD 基質溶液を分注 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) して室温で 30 分放置した。1.0 M H_2SO_4 を添加 (100 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) して酵素反応を停止させたのち、490 nm の吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

第3節付属実験

1.3.1 項 Ab-CS#3 および Ab-CS#10 抗体可変部遺伝子を含む cDNA の調製

1.2.2 項で樹立したハイブリドーマ細胞#3 および#10 (それぞれ Ab-CS#3 および#10 を分泌する) ($\sim 1 \times 10^7$ 個) から, RNA 抽出キットを用いて, 総 RNA を抽出した. 得られた RNA (2 μg) に, dNTP 混合物 (各 10 nmol), Superscript II reverse transcriptase (200 U), および H 鎖では#3 の場合は my1-GSP-1, #10 の場合は my2b-GSP-1 プライマー, L 鎖ではともに mk-GSP-1 プライマー (各 2.5 pmol) を加え, 専用緩衝液中 (25 μL) で 42°C, 50 分インキュベートし, V_H 遺伝子を含む cDNA (#3 V_H -cDNA および#10 V_H -cDNA), V_L 遺伝子を含む cDNA (#3 V_L -cDNA および#10 V_L -cDNA) をそれぞれ合成した. これら反応液を, 5'RACE キットに含まれる DNA 精製カートリッジに付して, V_H -cDNA, V_L -cDNA を含む水溶液 ($\sim 50 \mu\text{L}$) を得た.

1.3.2 項 Ab-CS#3 抗体 H 鎖可変部遺伝子 (#3 V_H) を含む DNA 断片の調製

1.3.1 項で調製した#3 V_H -cDNA の溶液を 10 倍に希釈し, その一部 (1 μL) に, Jones らにより報告されたユニバーサルプライマー (MHV-1~12 の 12 種のうちいずれか 1 種)⁴⁶⁾ および MHC プライマー (各 1 μM), dNTP 混合物 (各 0.2 mM), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (25 U/mL) を添加し, 専用緩衝液中 (20 μL) で PCR を行った. PCR 条件は, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, これを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液をアガロースゲル (2%) を用いる電気泳動で分析したところ, MHV-2 プライマーを用いるときに増幅が認められた. そこで, MHV-2 プライマーを用いる PCR を, 上記と同じ条件で 100 μL にスケールアップして行い, 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, #3 V_H を含む DNA 断片を得た.

1.3.3 項 Ab-CS#3 抗体 L 鎖可変部遺伝子 (#3 V_L) を含む DNA 断片の調製

1.3.1 項で調製した#3 V_L -cDNA に, 専用緩衝液中 (25 μL), TdT (15 U) と dCTP (5 nmol) を加えて 37°C で 10 分インキュベートし, その 3'末端にポリ C 配列を付加した. その反応液 (8 μL) を AAP および mk-GSP-2 をプライマーとする PCR に付した. 本 PCR は上記プライマー (各 10 pmol), dNTP 混合物 (各 8 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.5 U) を含む専用緩衝液中 (20 μL) で行い, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, これを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. さらに, この PCR 反応液の一部 (8 μL) を AUAP および mk-GSP-3 をプライマーとする PCR に付した. 本 PCR は上記プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を含む専用緩衝液中 (100 μL), 同上の反応条件で行った. その反応液中の増幅産物を, DNA 精製キット (A) を用いて精製し, #3 V_L を含

む DNA 断片を得た.

1.3.4 項 Ab-CS#10 抗体可変部遺伝子 (#10 V_H および#10 V_L) を含む DNA 断片の調製

1.3.1 項で調製した#10 V_H -cDNA および#10 V_L -cDNA を, 前項と同様に 5'RACE 法に付し, #10 V_H および#10 V_L 遺伝子を含む DNA 断片を得た. なお, V_H 遺伝子増幅の際の 3'プライマーは my2b-GSP-2 および my2b-GSP-3 を用いた.

1.3.5 項 Ab-CS#3 および Ab-CS#10 抗体の V_H または V_L 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング

1.3.2 項, 1.3.3 項, および 1.3.4 項で得られた V_H または V_L 遺伝子を含む DNA 断片 (#3 V_H ; 7 μ g, #3 V_L ; 1 μ g, #10 V_H および#10 V_L ; 各 10 μ g) に, 制限酵素 *Xma* I (#3 V_H , V_L の場合は 25 U, #10 V_H , V_L の場合は 50 U) を加え, BSA (100 μ g/mL) を含む反作用緩衝液中 (#3 V_H , V_L の場合は 100 μ L, #10 V_H , V_L の場合は 200 μ L), 37°Cで一晩インキュベートした. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その全量に, 制限酵素 *Sal* I (#3 V_H , V_L の場合は 25 U, #10 V_H , V_L の場合は 50 U) を加え, 反作用緩衝液中 (100 μ L), 37°Cで一晩インキュベートした. 反応液を再び DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その一部 (#3 V_H , V_L の場合は 250 ng, #10 V_H , V_L の場合は 125 ng) と, 同様に *Xma* I および *Sal* I で消化した pBluescript II ベクター (#3 V_H , V_L の場合は 500 ng, #10 V_H , V_L の場合は 250 ng) を滅菌水に溶解し (#3 V_H との反応では 43 μ L, #3 V_L および#10 V_H , V_L との反応では 16 μ L), 42°Cで 5 分間インキュベートしたのち直ちに氷冷した. この溶液に 10 倍濃度の反作用緩衝液 (#3 V_H との反応では 5 μ L, #3 V_L および#10 V_H , V_L との反応では 2 μ L) と T4 DNA リガーゼ (各 800 U, 2 μ L) を加えて 16°Cで一晩インキュベートした. これらの反応液を, フェノール-CHCl₃-イソアミルアルコール抽出し, 沈殿キャリアーとしてグリコーゲン (20 μ g) を添加したのち EtOH 沈殿を行い, 得られる沈殿をそれぞれ滅菌水 (10 μ L) で溶解した.

これらの DNA 水溶液をエレクトロコンピテント細胞 (#3 V_H の反応生成物には XL1-Blue を, #3 V_L および#10 V_H , V_L の反応生成物には XL0LR を使用) の懸濁液 (100 μ L) に加えて混合し, その全量をキュベット電極に移して氷上で 20 分間インキュベートした. これを遺伝子導入装置に装着し, 50 μ F, 印加電圧 1800 V, 内部抵抗 125 Ω の条件で電気パルスを加えた. その直後にキュベット内容物に SOC 培地 (900 μ L) を添加し, 37°Cで 1 時間振とう培養 (~200 rpm) した. 培養液の一部を段階希釈したのち, 2 \times YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°Cで一晩培養した.

このプレート上からコロニーをランダムに選択し, 2 \times YT 培地 (5 μ L) に懸濁させた. この懸濁液 (1 μ L) に, 5'および 3'プライマー [#3 V_H の増幅には MHV-2 および MHC (各 5 pmol), #3 V_L の増幅には AUAP および mk-GSP-3 (各 4 pmol), #10 V_H または#10 V_L の増幅には KS-back および KS-for (各 5 pmol)], dNTP 混合物 (各 4 nmol), および *AmpliTag* DNA

ポリメラーゼ (0.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (#3 V_H ; 20 μ L, #3 V_L ; 40 μ L, #10 V_H および #10 V_L ; 20 μ L) で PCR (コロニーPCR) を行った. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, これを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液をアガロースゲル (2%) 電気泳動に付して目的の遺伝子の有無を調べ, V_H 遺伝子または V_L 遺伝子を保持する形質転換菌を特定した.

1.3.6 項 Ab-CS#3 および Ab-CS#10 抗体の V_H および V_L 遺伝子の塩基配列の決定

前項で V_H または V_L 遺伝子が認められた形質転換菌について, そのグリセロール凍結保存液を少量とり, 2×YT-ATG (1%) 培地 (10 mL) に接種して, 37°C で一晩振とう培養 (~200 rpm) した. 培養液を遠心分離 (1800g, 20 分, 室温) して集菌したのち, プラスミド DNA 抽出キットを用いて組換えプラスミドを調製した. これらのプラスミドの一部 (600 ng) を用い, 挿入された遺伝子の塩基配列を解析した.

1.3.7 項 *scFv* 遺伝子構築のための V_H -DNA および V_L -DNA 断片の調製

前項で調製した組換えプラスミド (50 ng) に, 5' および 3' プライマー (#3 V_H の増幅には CS#3 V_H -Rev および CS#3 V_H -For, #3 V_L の増幅には CS#3 V_L -Rev および CS#3 V_L -For, #10 V_H の増幅には CS#10 V_H -Rev および CS#10 V_H -For, #10 V_L の増幅には CS#10 V_L -Rev および CS#10 V_L -For) (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, これを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, V_H -DNA および V_L -DNA 断片を得た.

1.3.8 項 Ab-CS#3 抗体 *scFv* 遺伝子のクローニング

pEXmide 7 ベクターに, まず V_H 遺伝子を組み込んだ. 前項で調製した #3 V_H -DNA 断片 (5 μ g) に, 制限酵素 *Nco* I および *Xho* I (各 25 U) を加え, 反作用緩衝液中 (100 μ L), 37°C で一晩インキュベートした. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その一部 (125 ng) を, 同様に *Nco* I および *Xho* I で消化した pEXmide 7 ベクター (250 ng) の水溶液 (16 μ L) と混合して, 1.3.5 項に準じてライゲーション反応に付し, その産物を 1.3.5 項に準じた方法で XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した. 形質転換菌を 2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で一晩培養した. 出現したコロニーをランダムに選択し, コロニーPCR を行った. なお, プライマーは CS#3 V_H -Rev および CS#3 V_H -For (各 2 pmol) を用いた. 反応液をアガロースゲル (2%) 電気泳動に付して目的の遺伝子の有無を調べ, V_H 遺伝子を保持する形質転換菌を特定した. これらのコロニーを 2×YT-ATG (1%) 培地 (10 mL) に接種して 37°C で一晩振とう培養 (~200 rpm) し, 1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出した.

次いで、このプラスミドに V_L 遺伝子を組み込んだ。1.3.7 項で調製した #3 V_L -DNA 断片 (5 μ g) を反応用緩衝液 (100 μ L) に溶かし、制限酵素 *Sal* I および *Not* I (各 25 U) を加えて 37°C で一晩インキュベートした。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) により精製し、その一部 (125 ng) と、同様に *Sal* I および *Not* I で消化した上記プラスミド (250 ng) を混合して上記と同様にライゲーション反応に付し、その産物を 1.3.5 項に準じて XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した。形質転換菌を 2 \times YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で一晩培養した。出現したコロニーをコロニー-PCR に付して V_L 遺伝子を保持する形質転換菌を同定した。なお、プライマーは CS#3 V_L -Rev および CS#3 V_L -For (各 2 pmol) を用いた。特定されたクローンを 2 \times YT-ATG (1%) 培地 (10 mL) に接種して 37°C で一晩振とう培養 (~200 rpm) し、1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出して *scFv* 遺伝子の塩基配列を解析した。

1.3.9 項 CS#10-*scFv* 遺伝子の作製と大腸菌への導入

1.3.7 項で作製した #10 V_H -DNA および #10 V_L -DNA 断片 (各 200 ng) に、dNTP 混合物 (各 10 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.65 U) を加え、専用緩衝液中 (25 μ L) で PCR を行った。PCR 条件は、熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 55°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分とし、このサイクルを 10 回繰り返したのち、72°C で 10 分の伸長反応を追加した。この反応液の一部 (10 μ L) に、CS#10 V_H -Rev および CS#10 V_L -For プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え、専用緩衝液中 (100 μ L), 上記の条件で (ただし 15 サイクル) PCR を行った。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し、CS#10-*scFv* 遺伝子 (20 μ g) を得た。その一部 (10 μ g) に制限酵素 *Nco* I と *Sal* I (各 50 U) を加え、反応用緩衝液中 (100 μ L) で 37°C, 一晩インキュベートした。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し、制限酵素消化済みの DNA 断片を得た。

この DNA 断片 (250 ng) と、同様に制限酵素 *Nco* I と *Sal* I で消化し、アガロースゲル (1%) 電気泳動により精製した pEXmide 5 (500 ng) を混和し、1.3.5 項と同様のライゲーション反応に付して、その産物を 1.3.5 項と同様に XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した。形質転換菌を 2 \times YT-ATG (1%) アガープレート上に塗布し、37°C で一晩培養した。このプレートからランダムに選択したコロニーをコロニー-PCR に付し、*scFv* 遺伝子を保持するクローンを同定した。なお、プライマーは V_{HH} -cPCR-back および V_{HH} -cPCR-for (各 2 pmol) を用いた。特定されたクローンを 2 \times YT-ATG (1%) 培地 (10 mL) に接種して 37°C で一晩振とう培養 (~200 rpm) し、1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出して *scFv* 遺伝子の塩基配列を解析した。

1.3.10 項 可溶型 CS#3-*scFv* 遺伝子の作製と大腸菌への導入

1.3.8 項で作製したプラスミド (10 μ g) に、制限酵素 *Nco* I および *Not* I (各 20 U) を加

え、反応用緩衝液中 (100 μ L), 37°Cで一晩インキュベートした。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製したのち, アガロースゲル (2%) を用いる電気泳動を行って, 分離された *scFv* 遺伝子を含むゲルを切り出したのち, DNA 精製キット (B) を用いて DNA 断片を得た。これを, 同様に制限酵素処理した pEXmide 7'ベクターと混合し, 1.3.5 項と同様のライゲーション反応に付して, その産物を XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した。形質転換菌を 2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°Cで一晩培養し, 出現するコロニーをコロニーPCR に付して, CS#3-*scFv* 遺伝子を保持する形質転換菌を同定した。

1.3.11 項 可溶型 CS#10-*scFv* 遺伝子の作製と大腸菌への導入

1.3.9 項で作製したプラスミド (10 ng) に, CS#10V_H-Rev および FLAG-TAA2 プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った。PCR 条件は, 熱変性 95°C, 1 分, アニール 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, このサイクルを 35 回繰り返したのち, 72°Cで 10 分の伸長反応を追加した。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その全量 (約 3 μ g) に制限酵素 *Nco*I と *Sal*I (各 50 U) を加え, 反応用緩衝液中 (200 μ L) で 37°C, 一晩インキュベートした。反応液を DNA 精製キット (A) に付して, 制限酵素消化済みの DNA 断片を得た。

この DNA 断片 (250 ng) を前項と同様に pEXmide 5 ベクターに組み込み, 1.3.5 項と同様に XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した。形質転換菌を 2×YT-ATG (1%) アガープレート上に塗布し, 37°Cで一晩培養した。このプレートからランダムに選択したコロニーをコロニーPCR に付し, *scFv* 遺伝子を保持するクローンを同定した。

1.3.12 項 可溶型 *scFv* の作製と精製

1.3.10 項および 1.3.11 項で作製した形質転換菌を 2×YT-AG (1%) 培地 (20 mL) に加え, 600 nm における吸光度が 0.8 に達するまで 37°Cで振とう培養 (~200 rpm) した。培養液を遠心分離 (1800g, 30 分, 室温) し, 沈殿をタンパク質発現誘導培地 (20 mL) に懸濁して, 25°Cで一晩振とう培養 (120 rpm) した。これを再び遠心分離 (1800g, 30 分, 室温) し, 沈殿を浸透圧ショック用緩衝液 (1 mL) で懸濁したのち, 氷上で 1 時間インキュベートした。この混合液を遠心分離 (19300g, 30 分, 4°C) 後, 上清 (ペリプラズム抽出液) を回収し, -20°Cで保存した。この一部を TBS に対して 4°Cで一晩透析したのち, 抗 FLAG-M2 抗体固定化アガロースゲル (約 1 mL) を充填したアフィニティーカラムに付した。カラムを TBS で洗浄後, 0.10 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で可溶型 *scFv* を溶出した。この画分を PBS に対して 4°Cで一晩透析したのち, 遠心式限外ろ過膜 (Amicon Ultra) を用いて濃縮した。

1.3.13 項 Scatchard 法による結合定数の算出

1.2.4 項に準じて実験を行い, Scatchard 法により前項で得られた CS#10-scFv および CS#3-scFv の CS に対する K_a を算出した.

1.3.14 項 可溶型 CS#3-scFv を用いる ELISA

1.2.5 項に準じて CS-BSA を固定化したマイクロプレートに, 1.0% ブロックエース溶液 (300 μ L/ウェル) を添加して, 37°C で 2 時間インキュベートした. 溶液を吸引除去し, PBS で 3 回洗浄してプレートをブロッキングした. このプレートに, G-PBS で希釈した CS#3-scFv (1.3.12 項で作製したもの) (100 μ L) と, 各種濃度の CS 標準品を含む G-PBS 溶液 (50 μ L) を加えて混和し, 4°C で 2 時間インキュベートした. 溶液を吸引除去し, T-PBS で 3 回洗浄したのち, PVG-PBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗 FLAG 抗体 (100 μ L) を加え, 37°C で 30 分インキュベートした. 再び溶液を吸引除去し, T-PBS で 3 回洗浄したのち, 1.2.5 項に準じて固相上の POD 活性を比色測定した.

第4節付属実験

1.4.1 項 Error-prone PCR による変異 scFv 遺伝子の調製

1.3.8 項で得られた *wt-scFv* 遺伝子挿入プラスミド (1 ng) に, pEX7-V_H-CP5 および pEX7-V_L-CP3 プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 [deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP), dCTP, および deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP) 各 0.1 μ mol と dATP 0.02 μ mol を含む], および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え, error-prone PCR 用緩衝液 [16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 6.1 mM MgCl₂, 6.7 μ M EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 10% (v/v) DMSO, 0.17 g/L BSA, および 0.10 mM MnCl₂ を含む 67 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)] 中 (100 μ L) で PCR を行った. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分とした. このサイクルを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を行った. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, 変異 *scFv* 遺伝子のライブラリーを得た.

1.4.2 項 変異 scFv 遺伝子のクローニングと DNA 塩基配列の決定

前項で作製した変異 *scFv* 遺伝子 (4 μ g) に, 制限酵素 *Nco* I および *Not* I (20 U) を加え, 反作用緩衝液中 (100 μ L), 37°C で一晩インキュベートした. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) により精製し, その一部 (125 ng) を同様に制限酵素で消化した pEXmid 7 (250 ng) と混合して 1.3.5 項に準じてライゲーション反応に付し, その産物を 1.3.5 項に準じた方法で TG1 エレクトロコンピテント細胞へ導入した. 形質転換菌を 2 \times YT-AG (1%) アガープレート上に塗布し, 37°C で一晩培養した. このプレートからランダムに選択したコロニーをコロニーPCR に付し, *scFv* 遺伝子が導入された菌を同定し

た. なお, プライマーは pEX7-V_H-CP5 および pEX7-V_L-CP3 (各 2 pmol) を用いた. 特定された菌の懸濁液を 2×YT-AG (1%) 培地 (5 mL) に接種し 37°Cで一晩振とう培養 (~200 rpm) した. その一部 (1 mL) に対して, 終濃度が 15%になるようにグリセロールを添加して-80°Cで保存した. 残りの培養液から遠心分離 (1800g, 20 分, 室温) により集菌したのち, 1.3.6 項と同様にプラスミドを抽出し, *scFv* 遺伝子の塩基配列を解析した.

1.4.3 項 KM13 ヘルパーファージの調製

大腸菌 TG1-Tr 細胞のグリセロール凍結保存液 (200 μL) を, 2×YT 培地 (20 mL) へ接種して, 対数増殖期に達するまで 37°Cで振とう培養 (~200 rpm) した. この培養液の一部 (200 μL) に PBS で段階希釈 ($1 \times 10^2 \sim 10^{12}$ 倍希釈) した KM13 ヘルパーファージ液 (10 μL) をそれぞれ添加し, 37°Cで 30 分間インキュベートした. このファージ懸濁液に, 42°Cに保温したトッパアガー (3.0 mL) を加えて混和したのち, TYE アガープレートに塗布して 37°Cで一晩培養した. このプレートからシングルプラークを取り, これを対数増殖期の TG1-Tr 培養液 (5.0 mL) に添加して, 37°Cで約 2 時間振とう培養 (~200 rpm) した. この培養液の全量を 2×YT 培地 (500 mL) に移して, 37°Cで 1 時間振とう培養 (~200 rpm) したのち, 硫酸カナマイシン (50 mg/L; 500 μL) を添加して, 30°Cでさらに一晩振とう培養 (~200 rpm) した. 遠心分離 (10800g, 15 分, 4°C) 後, 上清 (480 mL) に PEG/NaCl 液 (120 mL) を加えて混合し, 氷上で 1 時間インキュベートした. この混合液を遠心分離 (10800g, 30 分, 4°C) して上清を除去し, 沈殿したファージを PBS (9.6 mL) に溶解して再度 PEG/NaCl 液 (2.4 mL) を加えて混合し, 氷上で 20 分間インキュベートした. 遠心分離 (3300g, 30 分, 4°C) 後, 沈殿を PBS (6.0 mL) に懸濁し, 残存する大腸菌由来の固形物を除くために再び遠心分離 (11600g, 10 分, 室温) して, KM13 ヘルパーファージを含む上清を 4°Cで保存した.

1.4.4 項 KM13 ヘルパーファージの力価算定

前項で調製したヘルパーファージ液 (45 μL) に, PBS で希釈したトリプシン溶液 (1.0 g/L; 5.0 μL) または PBS (5.0 μL) を添加し, 37°Cで 30 分間インキュベートした. トリプシン処理または未処理のファージを PBS で段階希釈 ($1 \times 10^3 \sim 10^{13}$ 倍希釈) して, 各希釈液 (50 μL) を, 対数増殖期の TG1-Tr 培養液 (1 mL) に添加した. 直後に, 42°Cに保温したトッパアガー (3 mL) を加えて細胞を懸濁し, これを TYE アガープレートへ塗布して 37°Cで一晩培養した. 出現したプラークを計数することにより, KM13 ヘルパーファージの力価を pfu/mL として算定した.

1.4.5 項 変異 *scFv* 提示ファージライブラリーの調製とファージの力価算定

1.4.2 項で作製した変異 *scFv* 遺伝子を保持する大腸菌群のグリセロール凍結保存液 (50 μL) を 2×YT-AG (2%) 培地 (50 mL) に加え, 対数増殖期に達するまで 37°Cで振と

う培養 (~200 rpm) した. この培養液の一部 (20 mL×2) に 1.4.3 項で作製した KM13 ヘルパーファージを添加し, 37°Cで 30 分間インキュベートした. このとき, ヘルパーファージの MOI (multiplicity of infection; ファージ pfu/大腸菌細胞数) は 20 とした. 培養液を遠心分離 (1800g, 20 分, 室温) し, 沈殿した細胞を 2×YT-AK 培地 (20 mL×2) に懸濁したのち, 25°Cで一晩振とう培養 (120 rpm) した. 培養液を遠心分離 (1800g, 20 分, 室温) し, 上清に PEG/NaCl 液 (5 mL×2) を加えて混合し, 氷上で 1 時間インキュベートした. この混合液を遠心分離 (10000g, 30 分, 4°C) して上清を除去し, 沈殿したファージを PBS-2 (200 µL×2) に懸濁した. 残存する大腸菌由来の固形物を除くために, 再び遠心分離 (15700g, 10 分, 4°C) して, 上清として得られる scFv 提示ファージ液を 1 つにまとめ (400 µL), 4°Cで保存した. その一部 (5.0 µL) を PBS-2 で段階希釈 ($1 \times 10^7 \sim 10^9$ 倍希釈) し, 各希釈液 (10 µL) を, 対数増殖期の XL1-Blue 培養液 (90 µL) に添加して, 37°Cで 30 分間インキュベートした. この培養液の一部 (10 µL) を 2×YT-ATG (1%) アガープレートに滴下して 37°Cで一晩培養した. 出現したコロニーを計数することにより, ファージ液 1 mL あたりのコロニー数 (cfu/mL) に換算し, scFv 提示ファージの力価を示す指標として用いた.

1.4.6 項 抗 CS 活性を持つ変異 scFv 提示ファージのパンニングによる選択

免疫チューブに CS-BSA (5.0 µg/mL) を含む CB (2.0 mL) を添加し, 室温で一晩放置した. 溶液を吸引除去し, PBS-2 で 3 回洗浄したのち, M-PBS-2 (4 mL) を添加し, 37°Cで 2 時間放置した. 溶液を吸引除去し, T-PBS で 3 回洗浄して CS-BSA 固定化チューブを作製した. このチューブに, PVG-PBS で希釈調製した変異 scFv 提示ファージライブラリー (1×10^{11} cfu/mL) (1 mL) を添加し, 37°Cで 1 時間, イムノローターで倒立混和した. 溶液を吸引除去後, T-PBS-2 で 3 回洗浄し, 0.10 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2, 1.0 mL) あるいは 0.10 M トリエチルアミン (pH 12, 1.0 mL) を添加し, 室温で 10 分間攪拌することで, チューブに結合したファージを溶出した. このファージ溶液にそれぞれ 2.0 M Tris (35 µL) あるいは 1.0 M Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液 (0.50 mL) を加えて中和したのち, 全量を対数増殖期の TG1 培養液 (9 mL) に添加して, 37°Cで 30 分間インキュベートした. この培養液の一部を段階希釈 ($1 \times 10^1 \sim 10^4$ 倍希釈) したのち, 各希釈液 (100 µL) を 2×YT-AG (1%) アガープレートに塗布して 37°Cで一晩培養し, 力価 (cfu) を算定して, ファージの回収率を求めた. 一方, 残りの感染菌を遠心分離 (10000g, 10 分, 室温) し, 沈殿を 2×YT 培地 (100 µL) に懸濁したのち, 2×YT-AG (1%) アガープレートに塗布して 37°Cで一晩培養した. 翌日, 15%グリセロールを含む 2×YT 培地 (1.5 mL) をプレート上へ添加し, スクレイパーを用いて生成したコロニーを懸濁させたのち, 凍結保存用チューブに移して-80°Cで凍結保存した. また, この感染菌懸濁液を用いて前項と同様に scFv 提示ファージの調製を行い, 同様の操作を行った. これら一連の操作を 3 サイクル繰り返した. なお, それぞれの溶出条件に対し, 同様の試行を 3 回行った.

1.4.7 項 スクリーニングに用いるモノクローナル変異 scFv 提示ファージの調製

前項の操作で回収したファージの感染菌を塗布したアガープレートから 1 試行につき 50 コロニーをランダムに選択 (50×3 試行×2 条件; 計 300 コロニー) し、各コロニーを 2×YT-AG (2%) 培地 (1 mL) に懸濁して培養し、1.4.5 項に準じて KM13 ヘルパーファージを感染させた。遠心分離 (1800g, 10 分, 室温) 後、沈殿を 2×YT-AK 培地 (1 mL) で懸濁し、25°C で一晩振とう培養 (~200 rpm) した。培養液を遠心分離 (1800g, 10 分, 室温) し、上清を 4°C で保存した。なお、ファージの再増幅や scFv 遺伝子の解析に備えて、対数増殖期まで増殖した各クローンの培養液の一部 (10 µL) を 4°C で保存した。

1.4.8 項 モノクローナル変異 scFv 提示ファージのスクリーニング

1.2.5 項に準じて作製した CS-BSA 固定化マイクロプレートに、前項で調製したファージを含む上清 (100 µL) を加え、37°C で 1 時間反応させた。溶液を吸引除去し、T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち、M-PBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗 M13 モノクローナル抗体 (100 µL) を加え、37°C で 30 分インキュベートした。同様に洗浄したのち、ウェル上の POD 活性を 1.2.5 項と同様に比色測定した。吸光度が 0.3 以上認められたクローンについて、1.4.7 項で保存した大腸菌液の一部 (2 µL) を 2×YT-AG (1%) 培地 (1 mL) に接種して 37°C で一晩培養し、終濃度が 15% となるようにグリセロールを加えて -80°C で凍結保存した。

1.4.9 項 モノクローナル変異 scFv 提示ファージの調製

前項で保存した大腸菌の凍結保存液 (200 µL) を 2×YT-AG (1%) 培地 (20 mL) に接種して、1.4.5 項に準じてモノクローナル scFv 提示ファージを含む PBS-2 溶液 (200 µL) を得た。

1.4.10 項 モノクローナル変異 scFv 提示ファージの抗 CS 活性の評価

1.4.8 項に準じて CS-BSA を固定化したマイクロプレートに、PVG-PBS で希釈した scFv 提示ファージ (前項で作製したもの) (100 µL) および各種濃度の CS 標準品を含む PVG-PBS 溶液 (50 µL) を加えて混和し、37°C で 1 時間インキュベートした。溶液を吸引除去し、TPBS-2 で 3 回洗浄したのち、M-PBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗 M13 モノクローナル抗体 (100 µL) を加え 37°C で 30 分インキュベートした。同様に洗浄したのち、ウェル上の POD 活性を 1.3.14 項と同様に比色測定した。

1.4.11 項 可溶性変異 scFv の調製

前項で wt-scFv よりも高親和力であると推定されたクローンについて、1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出した。この一部 (100 ng) に、pEX7-V_H-CP5 および pEX7-V_L-CP3 プライマー (各 20 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5

U) を加え、専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った。PCR 条件は熱変性 95°C, 30 秒, アニール 55°C, 30 秒, 伸長 72°C, 1 分とした。このサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C で 5 分の伸長反応を行った。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製したのち、1.4.2 項と同様に制限酵素 *Nco* I および *Not* I で消化し、アガロースゲル (2%) を用いる電気泳動を行って、制限酵素処理済み DNA 断片を得た。これを、1.3.5 項に準じて、同様に制限酵素で消化した pEXmide 7' と連結し、その産物を 1.3.5 項に準じた方法で XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した。形質転換菌を 2 \times YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で一晩培養した。出現したコロニーをコロニー PCR に付し、特定した遺伝子保持菌を 2 \times YT-AG (1%) 培地 (20 mL) に接種し、1.3.12 項に準じてペリプラズム抽出液を回収した。

1.4.12 項 Scatchard 法による結合定数の算出

1.2.4 項に準じて実験を行い、Scatchard 法により可溶型変異 scFv の CS に対する K_a を算出した。

第2章付属実験

第2節付属実験

2.2.1 項 VCSM13 ヘルパーファージの調製

大腸菌 XL1-Blue のグリセロール凍結保存液を少量とり、2×YT-T 培地 (10 mL) に接種して 37°Cで一晩振とう培養 (~200 rpm) した。その一部 (800 μL) を 2×YT-T 培地 (80 mL) に加えて 600 nm における吸光度が 0.3 になるまで 37°Cで振とう培養 (~200 rpm) した。ここへ、VCSM13 ヘルパーファージ (以下、VCSM13) を MOI が 20 となるように加え、37°Cで 30 分振とう培養 (120 rpm) したのち、硫酸カナマイシン (50 mg/mL; 32 μL) を加えてさらに 37°Cで 8 時間振とう培養 (120 rpm) した。培養液を 65°Cで 15 分インキュベートしたのち遠心 (1800g, 20 分, 室温) して上清を分離し、ろ過 (0.45 μm) することで大腸菌を除いた。ここに、PEG/NaCl 液 (20 mL) を加え、氷上で 1 時間インキュベートして遠心分離 (10000g, 30 分, 4°C) し、上清を除去したのち沈殿したファージを PBS-2 (800 μL) に溶解した。残存する大腸菌由来の固形物を除くために再び遠心 (15700g, 10 分, 4°C) して VCSM13 を含む上清を分離し、使用まで-20°Cで保存した。

2.2.2 項 VCSM13 ヘルパーファージの力価算定

前項で作製した VCSM13 液 (5 μL) を PBS-2 で段階希釈 ($1 \times 10^7 \sim 10^{10}$ 倍希釈) して、各希釈液の一部 (10 μL) を対数増殖期の XL1-Blue 培養液 (100 μL) に添加した。直ちに 42°Cに保温したトップアガー (3.5 mL) を加えて細胞を懸濁し、これを 2×YT-T アガープレートへ塗布して 37°Cで一晩培養した。出現したプラークを計数してファージ液 1 mL あたりのプラーク数 (pfu/mL) に換算し、VCSM13 の力価を示す指標として用いた。

2.2.3 項 抗 VCSM13 抗体産生ハイブリドーマ株の樹立および抗 VCSM13 モノクローナル抗体の調製

2.2.1 項で作製した VCSM13 (1×10^{10} pfu) の生理食塩水溶液 (160 μL) を AbISCO-100 アジュバント (40 μL) と混合したのち、8 週齢の BALB/c マウス (雌) の背中に皮下投与した。2 週間隔で 3 回追加免疫を行い、最終免疫から 7 日後、VCSM13 (1×10^{10} pfu) を含む生理食塩水をマウスの腹腔内 (500 μL) と脾臓 (200 μL) に投与し、3 日後に脾臓を摘出した。得られる脾細胞 (約 1×10^8 個) を、1.2.2 項に準じてミエローマ P3/NS1/1-Ag4-1 細胞と融合させた。融合後の細胞を、96 ウェルクラスターディッシュ中、HAT 培地で約 2 週間培養することによりハイブリドーマの選択を行った。ハイブリドーマの増殖が確認されたマイクロウェルの培養上清を、下記の ELISA に付して、抗 VCSM13 抗体の分泌の有無を調べた。陽性を示したハイブリドーマ細胞を HT 培地で拡大培養したのち、限界希釈法によりクローン化した。

2.2.4 項 ELISA による培養上清中抗 VCSM13 抗体の検出

VCSM13 の PBS 溶液 (1×10^{11} pfu/mL) を ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートに分注 (100 μ L/ウェル) し, 4°Cで一晩放置した. 溶液を吸引除去し, PBS (300 μ L/ウェル) で 3 回洗浄したのち, M-PBS (300 μ L/ウェル) を添加し, 37°Cで 1 時間放置してブロッキングを行った. ウェルを T-PBS で 3 回洗浄したのち, 検体であるハイブリドーマ培養上清 (G-PBS で 5 倍以上に希釈したもの; 100 μ L) を加えて 37°Cで 1 時間反応させた. 同様に溶液を除去, ウェルを洗浄したのち, POD 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体の G-PBS 溶液 (160 ng/mL) を分注 (100 μ L/ウェル) し, 37°Cで 1 時間放置した. 溶液を除去, ウェルを T-PBS で 3 回洗浄したのち, POD 活性を 1.2.3 項に準じて比色測定した.

2.2.5 項 Ab-M13#71 を用いる競合 ELISA

前項に準じて VCSM13 を固定化したマイクロプレートに, PVG-PBS で適切に希釈した Ab-M13#71 (2.2.3 項で作製) と, 各種濃度の VCSM13 を含む PVG-PBS 溶液 (50 μ L) を加えて混和し, 37°Cで 1 時間インキュベートした. 溶液を吸引除去し, T-PBS で 3 回洗浄したのち, POD 標識ヤギ抗マウス IgG の G-PBS 溶液 (160 ng/mL) を分注 (100 μ L/ウェル) し, 37°Cで 30 分インキュベートした. 再び溶液を吸引除去し, T-PBS で 3 回洗浄したのち, POD 活性を 1.2.5 項に準じて比色測定した.

2.2.6 項 イムノブロット法による Ab-M13#71 のエピトープの推定

2.2.1 項で作製した VCSM13 (1×10^{10} または 1×10^9 pfu) およびジチオスレイトール (0.8 μ mol) を, 専用緩衝液 (それぞれ 16 または 10 μ L) に混和し, 70°Cで 10 分インキュベートした. この混合液を, ポリアクリルアミドゲル (4~12%) 電気泳動 (200 V, 35 分) に付してタンパク質を分離したのち, PVDF 膜に転写した. この膜を 1.0%ブロックエース溶液 (~30 mL) に浸して室温で 2 時間振とう (~60 rpm) することでブロッキングした. 溶液を除去して T-PBS (~30 mL) に浸し, 同様に 10 分間振とうする操作を 3 回繰り返すことで膜を洗浄したのち, Ab-M13#71 を G-PBS で 1000 倍に希釈した溶液 (~30 mL) に浸して室温で 1 時間振とう (~60 rpm) した. 同様に洗浄したのち, POD 標識ヤギ抗マウス抗体を G-PBS で 2000 倍に希釈した溶液を加えて室温で 1 時間振とう (~60 rpm) した. 洗浄後, 精製水で 10 倍希釈した TMB 溶液中 (~30 mL), 室温で 30 分振とう (~60 rpm) し, POD 活性を可視化した.

第3節付属実験

2.3.1 項 Ab-M13#71 抗体可変部遺伝子を含む cDNA の調製

2.2.3 項で樹立した Ab-M13#71 分泌ハイブリドーマ細胞 (~ 1×10^7 個) から, 1.3.1 項に準じて総 RNA を抽出し, V_H -cDNA, V_L -cDNA を得た. なお, プライマーは, H 鎖に対し

ては my2b-GSP-1, L 鎖に対しては mk-GSP-1 を用いた.

2.3.2 項 Ab-M13#71 抗体 H 鎖可変部遺伝子 (V_H) を含む DNA 断片の調製

前項で調製した V_H -cDNA を 1.3.3 項に準じて 5'RACE 法に付し, V_H 遺伝子を含む DNA 断片を調製した. なお, 3'プライマーは my2b-GSP-2 および my2b-GSP-3 を用いた.

2.3.3 項 Ab-M13#71 抗体 L 鎖可変部遺伝子 (V_L) を含む DNA 断片の調製

2.3.1 項で調製した V_L -cDNA の溶液を 10 倍に希釈し, その一部 (2 μ L) に, Nicholls らにより報告されたユニバーサルプライマー (VL-I/III, -IIa, IIb, -IV/VI, -Va, -Vb の 6 種のうちいずれか 1 種)⁶⁹⁾ および mk-GSP-3 プライマー (各 0.50 μ M), dNTP 混合物 (0.40 mM), および *Pfu* DNA ポリメラーゼ (26 U/mL) を添加し, 専用緩衝液中 (20 μ L) で PCR を行った. PCR 条件は, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, これを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液中の DNA をアガロースゲル (2%) を用いる電気泳動で分析したところ, VL-I/III プライマーを用いるときに増幅が認められた. そこで, VL-I/III プライマーを用いる PCR を, 上記と同じ条件で 100 μ L にスケールアップして行い, 反応液を DNA 精製キット (A) を用いて精製した.

2.3.4 項 Ab-M13#71 抗体の V_H または V_L 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング

2.3.2 項および 2.3.3 項で得られた V_H または V_L 遺伝子を含む DNA 断片 (V_H ; 2.5 μ g, V_L ; 1 μ g) に, 制限酵素 *Xma* I (25 U) を加え, BSA (100 μ g/mL) を含む反应用緩衝液中 (100 μ L), 37°C で一晩インキュベートした. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その全量に制限酵素 *Sal* I (25 U) を加え, 反应用緩衝液中 (100 μ L), 37°C で一晩インキュベートした. 増幅産物を再び DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その一部 (200 ng) と, 同様に *Xma* I および *Sal* I で消化した pBluescript II ベクター (400 ng) を混合して 1.3.5 項に準じてライゲーション反応に付し, その産物を XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した. 形質転換菌を 2 \times YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で一晩培養した.

このプレート上からコロニーをランダムに選択し, 2 \times YT 培地 (10 μ L) に懸濁させた. この懸濁液 (2 μ L) に, 5'および 3'プライマー, dNTP 混合物 (各 8 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (20 μ L) で PCR を行った. なお, V_H の増幅には AUAP および my2b-GSP-3 プライマー (各 5 pmol), V_L の増幅には VL-I/III および mk-GSP-3 プライマー (各 2 pmol) をそれぞれ用いた. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, これを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液をアガロースゲル (2%) 電気泳動に付して目的の遺伝子の有無を調べ, V_H 遺伝子または V_L 遺伝子を保持する形質転換菌を特定した.

2.3.5 項 Ab-M13#71 抗体の V_H および V_L 遺伝子の塩基配列の決定

前項で Ab-M13#71 抗体の V_H または V_L 遺伝子が認められた形質転換菌について、1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出し、挿入された遺伝子の塩基配列を解析した。

2.3.6 項 M13-scFv 遺伝子構築のための V_H -DNA および V_L -DNA 断片の調製

前項で調製した組換えプラスミド (50 ng) に、前項で解析した塩基配列から設計したプライマー (V_H の増幅には M13#71 V_H -Rev および M13#71 V_H -For, V_L の増幅には M13#71 V_L -Rev および M13#71 V_L -For) (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え、専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った。PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし、これを 35 回繰り返したのち、72°C で 10 分の伸長反応を加えた。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し、 V_H -DNA および V_L -DNA 断片を得た。

2.3.7 項 Overlap extension PCR による M13-scFv 遺伝子の構築とサブクローニング

前項で調製した V_H -DNA および V_L -DNA 断片 (各 200 ng) に、dNTP 混合物 (各 10 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.65 U) を加え、専用緩衝液中 (25 μ L) で PCR を行った。PCR 条件は、熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 55°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分とし、このサイクルを 10 回繰り返したのち、72°C で 10 分の伸長反応を追加した。この反応液の一部 (10 μ L) に、M13#71 V_H -Rev および FLAG-TAA2 プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え、専用緩衝液中 (100 μ L), 上記の条件で (ただし 15 サイクル) PCR を行った。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し、その一部 (3 μ g) に制限酵素 *Nco* I と *Sal* I (各 25 U) を加え、反作用緩衝液中 (100 μ L) で 37°C, 一晩インキュベートした。反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し、制限酵素消化済みの DNA 断片を得た。

この DNA 断片 (200 ng) と、同様に制限酵素 *Nco* I と *Sal* I で消化し、アガロースゲル (1%) 電気泳動により精製した pEXmide 5 (400 ng) を混和して、1.3.5 項と同様のライゲーション反応に付し。その産物を XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した。形質転換菌を 2 \times YT-ATG (1%) アガープレート上に塗布し、37°C で一晩培養した。このプレートからランダムに選択したコロニーをコロニーPCR に付し、scFv 遺伝子を保持するクローンを同定して、1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出した。この一部 (600 ng) を用いて scFv 遺伝子の塩基配列を解析した。

2.3.8 項 可溶型 M13-scFv の発現と電気泳動

2.3.7 項で作製した M13-scFv 遺伝子保持菌から、1.3.12 項に準じてペリプラズム抽出液を回収し、抗 FLAG 抗体固定化アガロースを用いて精製した。この一部 (1 μ g) を 2.2.6 項に準じて SDS-PAGE に付し、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーに浸

して室温で1時間振とう (~60 rpm) することでタンパク質を染色した. 溶液を除去して精製水に浸し, 同様に室温で一晩振とうすることでゲルを脱色した.

2.3.9 項 可溶型 M13-scFv を用いる競合 ELISA

2.2.4 項に準じて VCSM13 を固定化したマイクロプレートに, PVG-PBS で適切に希釈した M13-scFv (前項で作製) と, 各種濃度の VCSM13 を含む PVG-PBS 溶液 (50 μ L) を加えて混和し, 37°C で1時間インキュベートした. 溶液を吸引除去し, T-PBS-2 で3回洗浄したのち, G-PBS 溶液で1000倍希釈した POD 標識抗 FLAG 抗体を分注 (100 μ L/ウェル) し, 37°C で30分インキュベートした. 再び溶液を吸引除去し, T-PBS-2 で3回洗浄したのち, POD 活性を 1.2.5 項に準じて比色測定した.

2.3.10 項 ビオチン化 VCSM13 フェージの作製

VCSM13 (6.5×10^{11} pfu) と NHS-LC-Biotin (約 5 ng) を PBS 中 (1 mL) に混和し, 攪拌しながら室温で2時間反応させた. これを PBS に対して 4°C で一晩透析したのち透析膜内容物を回収し, 目的のビオチン化 VCSM13 を PBS 溶液として得た.

2.3.11 項 バイオレイヤー干渉法による結合定数の算出

ストレプトアビジンが固定化された専用チップの先端を, PBS で10000倍希釈したビオチン化 VCSM13 (前項で作製) (4.0 μ L) に浸し, 25°C で2分振とう (1000 rpm) した. これを PBS (250 μ L) に浸して, 25°C で1分振とう (1000 rpm) し, このときのシグナルを基準とした. 引き続き, チップの先端を 2.3.9 項で作製した M13-scFv (0~5.0 μ M) を含む PBS (4 μ L) に浸して 25°C で2分振とう (1000 rpm) した. その後, PBS (250 μ L) に浸して 25°C で2分振とう (1000 rpm) した. 得られたセンサーグラムから, 専用ソフトウェアを用いて K_a を算出した.

第4節 付属実験

2.4.1 項 CS#10-scFv-Gaussia ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための GLuc 遺伝子を含む DNA 断片の調製

pMCS-Gaussia Luc ベクター (50 ng) に, GLuc-Rev および GLuc-For (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った. PCR 条件は熱変性 95°C, 1分, アニーリング 55°C, 1分, 伸長 72°C, 2分とし, このサイクルを 35 回繰り返したのち, 72°C で10分の伸長反応を追加した. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, CS#10-scFv と連結するための *linker2* の一部および GLuc 遺伝子を含む DNA 断片を得た.

2.4.2 項 CS#10-scFv-Gussia ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための CS#10-scFv 遺伝子を含む DNA 断片の調製

1.3.9 項で構築した CS#10-scFv 遺伝子の一部 (100 ng) に, CS#10V_H-Rev および V_L-For-2 プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μL) で PCR を行った. PCR 条件は, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 55°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分とし, このサイクルを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を追加した. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, *GLuc* を連結するための *linker2* の一部と CS#10-scFv 遺伝子を含む DNA 断片を得た.

2.4.3 項 Overlap extension PCR による CS#10-scFv-GLuc 遺伝子の構築とサブクローニング

2.4.1 項および 2.4.2 項で作製した DNA 断片 (各 200 ng) に, dNTP 混合物 (各 10 nmol) および *KOD* DNA ポリメラーゼ (1.5 U) を加え, 専用緩衝液中 (26 μL) で PCR を行った. PCR 条件は, 熱変性 98°C, 30 秒, アニーリング 64°C, 30 秒, 伸長 74°C, 1 分のサイクルとし, これを 10 回繰り返したのち 74°C で 10 分の伸長反応を追加した. この反応液の一部 (10 μL) に, CS#10V_H-Rev および *GLuc-For* プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *KOD* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μL), 上記の条件で (ただし 15 サイクル) PCR を行った. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その一部 (1 μg) に制限酵素 *Not* I (50 U) を加え, 反応用緩衝液中 (100 μL) で 37°C, 一晩インキュベートした. 増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その全量に制限酵素 *Sfi* I (50 U) を加え, 反応用緩衝液中 (100 μL) で 50°C, 一晩インキュベートした. 増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, CS#10-scFv-*GLuc* 遺伝子を含む制限酵素消化済みの DNA 断片 (*#10V_H-linker1-#10V_L-linker2-GLuc-FLAG-His6-TAATGA; CS#10-scFv-GLuc*) を得た.

この DNA 断片 (125 ng) と, 同様に制限酵素 *Not* I と *Sfi* I で消化し, アガロースゲル (1%) 電気泳動により精製した pEXmide 5 (250 ng) を混和して, 1.3.5 項と同様のライゲーション反応に付し, その産物を XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞に導入した. 形質転換菌を 2×YT-ATG (1%) アガープレート上に塗布し, 37°C で一晩培養した. このプレートからランダムに選択したコロニーをコロニーPCR に付し, *scFv* 遺伝子を保持するクローンを同定した. なお, プライマーは V_{HH}-cPCR-back および V_{HH}-cPCR-for (各 2 pmol) を用いた.

2.4.4 項 CS/ビオチン 2 重標識ポリ-L-リシンの作製

1.2.1 項で作製した CS-3CMO-NHS (53 mg/mL) を含む 1,4-ジオキササン (200 μL), biotin *N*-succinimidyl ester (25 mg/mL) を含む *N,N*-dimethylformamide (88 μL), および 3.0 M HCl

(40 μ L) を poly-L-lysine (1.3 mg/mL) を含む PB (3.4 mL) に混和し、攪拌しながら室温で 3 時間反応させたのち、さらに 4°C で一晩反応させた。この液を PB に対して 4°C で 2 日間透析し、透析膜内容物を回収して使用まで 4°C で保存した。

2.4.5 項 CS#10-scFv-Gaussia ルシフェラーゼ融合タンパク質の発現と電気泳動

2.4.3 項で作製した *M13-scFv-GLuc* 遺伝子保持菌から、1.3.12 項に準じてペリプラズム抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体固定化アガロースを用いて精製した。この一部 (1 μ g) を 2.2.6 項に準じて SDS-PAGE に付し、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーにより染色した。また、同条件の電気泳動により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写した。この膜を 1.0% ブロックエース溶液 (30 mL) に浸して室温で 2 時間振とう (~60 rpm) することでブロッキングし、2.2.6 項に準じて洗浄した。この膜に G-PBS で 10000 倍希釈した CS/ビオチン 2 重標識ポリ-L-リシン (前項で作製) (30 mL) を加えて室温で 1 時間振とう (~60 rpm) し、洗浄したのち G-PBS で 1000 倍希釈した POD 標識ストレプトアビジン (~30 mL) を加えて同様に室温で 1 時間振とうした。別途、ブロッキング後の膜に対して G-PBS で 10000 倍希釈した POD 標識抗 FLAG 抗体 (30 mL) を加えて室温で 1 時間振とう (~60 rpm) し、同様に洗浄した。これらの膜の POD 活性を、2.2.6 項に準じて可視化した。

2.4.6 項 CS#10-scFv-Gaussia ルシフェラーゼ融合タンパク質の発光測定

前項で作製した CS#10-scFv-GLuc (20 fmol) を含む G-PBS を ELISA 用白色 96 ウェルマイクロプレートに分注し (100 μ L/ウェル)、セレンテラジン (20 μ M) を含む PBS (100 μ L/ウェル) を加え、その 30 秒後から 900 秒後までは 60 秒ごと、900 秒から 1800 秒までは 300 秒ごとに 475 nm における発光強度を FLUOstar OPTIMA を用いて測定した。

2.4.7 項 CS#10-scFv-Gaussia ルシフェラーゼ融合タンパク質の検出感度の検討

2.4.5 項で作製した CS#10-scFv-GLuc (0~1.0 fmol) を含む G-PBS 溶液 (20 μ L) にセレンテラジン (20 μ M) を含む PBS (100 μ L) を加え、15 秒後の発光強度を前項に準じて測定した。得られた発光シグナル値を CS#10-scFv-GLuc 量に対してプロットし、用量作用曲線を作成した。

2.4.8 項 M13-scFv-Gaussia ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための M13-scFv 遺伝子を含む DNA 断片の調製

2.3.7 項で作製したプラスミド (50 ng) に、M13#71V_H-Rev および V_L-For-2 プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え、専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った。PCR 条件は、熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 1 分とし、このサイクルを 35 回繰り返したのち、72°C で 10 分

の伸長反応を追加した. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, *M13-scFv* および *GLuc* と連結するための *linker2* の一部を含む DNA 断片を得た.

2.4.9 項 *M13-scFv-Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質作製のための *GLuc* 遺伝子を含む DNA 断片の調製

2.4.3 項で作製したプラスミド (50 ng), に *GLuc-Rev* および *GLuc-For* プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *KOD Fx* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μ L) で PCR を行った. PCR 条件は, 熱変性 94°C, 2 分ののちに, 熱変性 98°C, 10 秒, アニーリング 55°C, 30 秒, 伸長 68°C, 1 分のサイクルを 35 回繰り返した. 反応液中の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, *linker2* の一部と *GLuc* 遺伝子を含む DNA 断片を得た.

2.4.10 項 *Overlap extension PCR* による *M13-scFv-GLuc* 遺伝子の構築とサブクローニング

2.4.8 項および 2.4.9 項で作製した DNA 断片 (各 200 ng) に, dNTP 混合物 (各 10 nmol) および *KOD Fx* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え, 専用緩衝液中 (60 μ L) で PCR を行った. PCR 条件は, 熱変性 98°C, 30 秒, アニーリング 64°C, 30 秒, 伸長 74°C, 1 分とし, このサイクルを 10 回繰り返したのち, 74°C で 10 分の伸長反応を追加した. この反応液の一部 (10 μ L) に, *M13#71V_H-Rev* および *GLuc-For* プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 40 nmol), および *KOD Fx* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え, 専用緩衝液中 (100 μ L), 上記の条件で (ただし 25 サイクル) PCR を行った. 反応液の増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その一部 (5 μ g) に制限酵素 *Not I* (40 U) を加え, 反应用緩衝液中 (100 μ L) で 37°C, 一晩インキュベートした. 増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, その全量に制限酵素 *Sfi I* (50 U) を加え, 反应用緩衝液中 (100 μ L) で 50°C, 一晩インキュベートした. 増幅産物を DNA 精製キット (A) を用いて精製し, 制限酵素消化済みの DNA 断片 (*V_H-linker1-V_L-linker2-GLuc-FLAG-His6-TAATGA; scFv-GLuc*) を得た.

この DNA 断片を 2.4.3 項と同様に pEXmid5 に組み込み, 大腸菌 XL1-Blue に導入し, 1.3.6 項に準じてプラスミドを抽出して, *scFv-GLuc* 遺伝子の塩基配列を解析した.

2.4.11 項 可溶型 *M13-scFv-GLuc* の発現と電気泳動

2.4.3 項で作製した *M13-scFv-GLuc* 遺伝子保持菌から, 1.3.12 項に準じてペリプラズム抽出液を回収し, 抗 FLAG 抗体固定化アガロースを用いて精製した. この一部 (1 μ g) を 2.2.6 項に準じて SDS-PAGE に付し, 泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーにより染色した. また, 同条件の電気泳動により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写した. この膜を M-PBS (~30 mL) に浸して室温で一晩振とう (~60 rpm) することでブロッ

キングし, 2.2.6 項に準じて洗浄したのち, VCSM13 (1×10^{12} pfu) を含む PVG-PBS (30 mL) を加えて室温で 1 時間振とう (~60 rpm) した. 溶液を除去して洗浄したのち, M-PBS で 2000 倍に希釈した POD 標識抗 M13 抗体 (30 mL) を加えて室温で 30 分振とう (~60 rpm) した. 同様に洗浄したのち, 膜上の POD 活性を 2.2.6 項に準じて可視化した.

2.4.12 項 可溶型 M13-scFv-GLuc の結合能評価に用いる CS#10-scFv 提示ファージの作製

1.3.9 項で作製したプラスミド (約 10 ng) と TG1 エレクトロコンピテント細胞 (100 μ L) を混和し, 1.3.5 項に準じて電気パルスを与えたのち SOC 培地中で培養した. この菌液を $2 \times$ YT-AG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で一晩培養して形成されるコロニーをコロニーPCRに付し, CS#10-scFv 遺伝子を保持する TG1 細胞を同定した. この形質転換菌を $2 \times$ YT-AG (2%) 培地 (20 mL) で培養し, 1.4.5 項に準じて scFv 提示ファージを含む PBS-2 溶液 (200 μ L) を得たのち, 一部 (5 μ L) を用いて, ファージの力価 (cfu) を算定した.

2.4.13 項 可溶型 M13-scFv-GLuc を用いるファージ ELISA

CS-BSA (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む CB を, ELISA 用白色 96 ウェルマイクロプレートに分注し (100 μ L/ウェル), 室温で一晩放置した. 溶液を除去して PBS で 3 回洗浄したのち, 1.0%ブロックエース溶液 (300 μ L/ウェル) を加えて 37°C で 2 時間放置した. 溶液を除去して T-PBS で 3 回洗浄したのち, 前項で調製した CS#10-scFv 提示ファージ ($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ cfu) を含む $2 \times$ YT 培地 (200 μ L/ウェル) を加え, 37°C で 1 時間インキュベートした. 再び溶液を除去し, T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち, M-PBS で 500 倍に希釈した M13-scFv-GLuc (2.4.11 項で作製したペリプラズム抽出液) を加え (100 μ L/ウェル), 37°C で 30 分インキュベートした. 同様に洗浄後, セレンテラジン (5 μM) を含む PBS を加え (100 μ L/ウェル), 直後に 300~700 nm における発光強度を Synergy HTX を用いて測定した.

第3章付属実験

第2節付属実験

3.2.1 項 ファージ作製条件の評価に用いる scFv 提示ファージの作製

CS#10-scFv 遺伝子を保持する大腸菌 XL1-Blue (1.3.9 項で作製) および TG1 (2.4.12 項で作製) の凍結保存液の一部 (各 200 μ L) を液体培地 [それぞれ 2 \times YT-ATG (2%), 2 \times YT-AG (2%)] (各 20 mL) に添加し, 対数増殖期に達するまで 37 $^{\circ}$ C で振とう培養 (~200 rpm) した. これらの培養液に, VCSM13 または KM13 (それぞれ 2.2.1 項, 1.4.3 項で作製) を, MOI が 20 となるように添加し, 37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした. これらの混合物を遠心分離 (1800g, 20 分, 室温) したのち, 沈殿を 2 \times YT-AK 培地 (20 mL) で懸濁して, 25 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養 (120 rpm) した. これらの培養液を遠心分離 (1800g, 20 分, 室温) し, 上清に含まれる CS#10-scFv 提示ファージを 1.4.5 項に準じて PEG/NaCl により精製, 濃縮した. 得られたファージ液 (200 μ L) は使用まで 4 $^{\circ}$ C で保存した. 一方で, この一部 (5 μ L) を用いて, ファージの力価 (cfu) を 1.4.5 項に準じて算定した.

3.2.2 項 ELISA によるファージ作製条件の評価

CS-BSA を 1.3.14 項に準じて固定化したマイクロプレートに, 前項で作製した CS#10-scFv 提示ファージ (各 1×10^9 cfu) を含む PVG-PBS を加え (100 μ L/ウェル), 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした. 溶液を除去して T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち, M-PBS で 2000 倍に希釈した POD 標識抗 M13 抗体 (100 μ L/ウェル) を加え, 37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした. 同様に洗浄後, 固相上の POD 活性を 1.2.3 項に準じて比色測定した.

3.2.3 項 アレイ型選択法に用いる培地組成および培養時間の評価

CS-BSA (1.0 μ g/mL) を含む CB を, ELISA 用白色 96 ウェルマイクロプレートに分注し (100 μ L/ウェル), 室温で一晩放置した. 溶液を除去して PBS で 3 回洗浄したのち, ろ過滅菌した 1.0% ブロックエース溶液 (300 μ L/ウェル) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 2 時間放置した. 溶液を除去したのち, T-PBS で 3 回洗浄し, アンピシリンナトリウム (100 μ g/mL), 硫酸カナマイシン (5.0 または 25 μ g/mL), および KM13 (5×10^8 または 5×10^9 pfu/mL) を含む 2 \times YT 培地を分注した (200 μ L/ウェル). 一方で, 2.4.12 項で作製した CS#10-scFv 遺伝子を保持する大腸菌 TG1 の凍結保存液を 2 \times YT 培地で希釈し ($1 \times 10^5 \sim 10^8$ 倍希釈), 2 \times YT-AG (1%) アガープレートに塗布して 37 $^{\circ}$ C で一晩培養することによりコロニーを形成させた. これを, 滅菌した爪楊枝を用いて上記のようにマイクロプレートに分注した培地中に懸濁し, 25 $^{\circ}$ C で 16, 24, または 45 時間振とう培養 (800 rpm) した. 培養液を除去して T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち, 2.4.13 項に準じて M13-scFv-GLuc を反応させ, セレンテラジンを加えて発光強度を測定した.

第3節付属実験

3.3.1 項 変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーによる大腸菌の形質転換とコロニー分離

1.4.1 項で作製した変異 *scFv* ライブラリーを 1.4.2 項に準じて pEXmide 7 に組み込み、大腸菌 TG1 エレクトロコンピテント細胞と混和した。この混合物に 1.3.5 項に準じて電気パルスを与えたのち SOC 培地中で培養した。培養液を SOC 培地で段階希釈し (10~1000 倍希釈)、2×YT-AG (1%) アガープレート (角 2 号シャーレで作製) に塗布 (200 μL/プレート) して、37°C で一晩培養した。

3.3.2 項 M13-*scFv*-GLuc を用いた発光強度のプロファイリング

3.2.3 項に準じて作製した CS-BSA 固定化マイクロプレートに、アンピシリンナトリウム (100 μg/mL)、硫酸カナマイシン (5.0 μg/mL)、および KM13 (5×10^8 pfu/mL) を含む 2×YT 培地を分注 (200 μL/ウェル) したのち、そのなかへ前項で作製したコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて懸濁した。プレートを 25°C、800 rpm で 45 時間培養したのち、培養液を除去して T-PBS-2 で 3 回洗浄し、M-PBS で 500 倍希釈した M13-*scFv*-GLuc (2.4.11 項で作製したペリプラズム抽出液) (100 μL) を加え、37°C で 30 分インキュベートした。同様に洗浄したのち、セレンテラジン (5 μM) を含む PBS を加え (100 μL/ウェル)、直ちに 300~700 nm における発光強度を Synergy HTX を用いて測定した。

3.3.3 項 ファージの回収とサブクローニング

前項で得られた発光強度から特定したウェルに残存する溶液を除いたのち、0.10 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2, 100 μL) を加え、室温で 10 分振とう (600 rpm) した。2.0 M Tris (約 4 μL) を加えて中和したのち、その一部 (50 μL) を、対数増殖期の 大腸菌 TG1 (450 μL) に加え、37°C で 30 分インキュベーションした。この一部 (15 μL) を 2×YT 培地で段階希釈 (10~1000 倍希釈) し、2×YT-AG (1%) アガープレートに塗布して 37°C で一晩培養した。得られるコロニーをコロニー-PCR に付して、*scFv* 遺伝子を保持する大腸菌を特定した。

3.3.4 項 モノクローナルファージの調製と抗 CS 活性の評価

前項で作製した形質転換菌の凍結保存液の一部 (200 μL) を、2×YT-AG (2%) 培地 (20 mL) で培養し、1.4.5 項に準じて *scFv* 提示ファージを含む PBS-2 溶液 (200 μL) を得た。この溶液を適切に希釈して 1.4.10 項に準じて ELISA に付した。

3.3.5 項 可溶型変異 *scFv* の調製

前項で wt-*scFv* よりも高親和力であると推定されたクローンについて、*scFv* 遺伝子を 1.4.11 項に準じて pEXmide 7 ベクターに組み込み、可溶型 *scFv* を含むペリプラズム抽

出液を得た。

3.3.6 項 Scatchard 法による結合定数の算出

1.2.4 項に準じて実験を行い, Scatchard 法⁴³⁾ により可溶型変異 scFv の CS に対する K_a を算出した。

3.3.7 項 可溶型変異 scFv の大量調製と精製

3.3.5 項で作製した可溶型変異 scFv 遺伝子を保持する大腸菌の凍結保存液を少量とり, 2×YT-AG (1%) 培地 (20 mL) に接種して, 37°Cで一晩振とう培養 (~200 rpm) した。この培養液を全量 2×YT-AG (1%) 培地 (2 L) に加え, 600 nm における吸光度が 0.8 に達するまで 37°Cで振とう培養 (~200 rpm) した。これを遠心分離 (1800g, 30 分, 室温) したのち, 沈殿をタンパク質発現誘導培地 (2 L) に懸濁して 25°Cで一晩振とう培養 (120 rpm) した。培養液を遠心分離 (6000g, 20 分, 室温) 後, 沈殿を浸透圧ショック用緩衝液 (100 mL) に懸濁し, 氷上で 1 時間インキュベートした。遠心分離 (19300g, 30 分, 4°C) 後, 上清をペリプラズム抽出液として回収した。これを TBS に対して 4°Cで一晩透析したのち, 抗 FLAG 抗体固定化アガロース (約 1 mL) を充填したアフィニティーカラムに付した。カラムを TBS で洗浄後, 0.10 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出した。この画分を PBS に対して 4°Cで一晩透析したのち, 遠心式限外ろ過膜 (Amicon Ultra) を用いて濃縮した。

3.3.8 項 終止コドンが存在する可溶型変異 scFv のアミノ酸の同定

前項で精製した scFv のうち, 終止コドンが存在するもの (scFv#m1-2 および 1-10) についてアミノ酸分析を行った。scFv#m1-2 は精製水に対して 4°Cで一晩透析し, 遠心式限外ろ過膜 (Amicon Ultra) を用いて濃縮したもの (5.6 μM, 約 100 μL) を N 末端アミノ酸配列分析に付した。一方, scFv#m1-10 は一部 (5 μg) を 2.2.6 項に準じて電気泳動に付し, ゲルをクマシーブリリアントブルーに浸して室温で 30 分振とう (~60 rpm) した。溶液を除去してゲルを滅菌水に浸し, 同様に一晩振とうした。染色された scFv タンパク質を含むゲルを切り出し, ジチオスレイトール (0.15 mg) を含む 0.10 M 炭酸水素アンモニウム溶液 (100 μL) に浸して室温で 30 分静置した。溶液を除いたのち, ヨードアセトアミド (1.0 mg) を含む 0.10 M 炭酸水素アンモニウム溶液 (100 μL) に浸して室温で 30 分静置した。再び溶液を除いたのち, 質量分析用ゲル内消化キットにより, トリプシン消化されたペプチド断片を得た。これをペプチドマスフィンガープリント法に付してアミノ酸を同定した。

第4節付属実験

3.4.1 項 CS#10-scFv-GLuc 融合タンパク質を用いた off-rate 選択条件の検討

3.2.3 項に準じて CS-BSA を固定化したマイクロプレートに, 2.4.5 項で作製した CS#10-scFv-GLuc 融合タンパク質 (約 1 pmol) を含む G-PBS を分注 (100 μ L/ウェル) し, 37°C で 1 時間インキュベートした. 溶液を除去して T-PBS で 3 回洗浄したのち, セレンテラジン (5 μ M) を含む PBS を加え (100 μ L), 300~700 nm における発光強度を測定した. 同様に洗浄したのち各種濃度の CS を含む G-PBS を分注し (200 μ L), 25°C で一定時間 (1~6 時間) 振とう (600 rpm) した. 同様に洗浄したのちセレンテラジンを加えて発光強度を測定した.

3.4.2 項 M13-scFv-GLuc を用いた発光強度のプロファイリング

3.3.1 項に準じてコロニー分離を行い, 3.3.2 項と同様に各コロニーの発光強度をプロファイリングした.

3.4.3 項 ファージの再増幅と M13-scFv-GLuc を用いた off-rate の観測

前項で特定したウェルに残存する溶液を除去したのち, 0.10 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2, 100 μ L) を加え, 室温で 10 分振とう (600 rpm) した. この全量に 2.0 M Tris (約 4 μ L) を加えて中和したのち, その一部 (10 μ L) を, 3.2.3 項に準じて作製した CS-BSA 固定化白色マイクロプレートに分注した対数増殖期の TG1 (90 μ L) に加え, 37°C で 30 分インキュベーションした. ここに, アンピシリンナトリウム (200 μ g/mL), 硫酸カナマイシン (10 μ g/mL), および KM13 (1×10^9 pfu/mL) を含む 2 \times YT 培地を加え (100 μ L), 25°C で 45 時間振とう培養 (800 rpm) した. 培養液を除去して T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち, M-PBS で 500 倍希釈した M13-scFv-GLuc (2.4.11 項で作製) を加え (100 μ L), 37°C で 30 分インキュベートした. 同様に洗浄したのち, セレンテラジン (5 μ M) を含む PBS を加えて (100 μ L) 発光強度を測定した. 溶液を吸引除去して T-PBS で 3 回洗浄したのち, CS 標準品 (5.0 μ g/mL) を含む G-PBS を加え (200 μ L), 25°C で 4 時間振とう (600 rpm) し, 同様に洗浄したのちセレンテラジンを加えて発光強度を測定する操作を 3 回繰り返した.

3.4.4 項 モノクローナルファージの調製と ELISA

前項で低 off-rate と推定されるクローンについて, 前項でグリシン塩酸緩衝液により溶出したファージ液 (50 μ L) を用いて 3.3.3 項に準じて大腸菌 TG1 を形質転換した. その凍結保存液の一部 (200 μ L) を用いて 1.4.5 項に準じてモノクローナル変異 scFv 提示ファージを作製した. このファージ液を適切に希釈し, 1.4.10 項と同様の ELISA に付して, 抗 CS 活性を評価した.

3.4.5 項 可溶型変異 scFv の調製

前項の実験により wt-scFv よりも高感度であると推定されたクローンについて、1.4.11 項に準じて可溶型変異 scFv を調製した。

3.4.6 項 Scatchard 法による結合定数の算出

1.2.4 項に準じて実験を行い、Scatchard 法⁴³⁾により可溶型変異 scFv の CS に対する K_a を算出した。

3.4.7 項 可溶型変異 scFv の大量調製と精製

3.4.5 項で作製した形質転換菌の凍結保存液を少量とり、3.3.8 項に準じてペリプラズム抽出液を回収し、抗 FLAG 抗体固定化アガロースを用いて精製したのち、PBS で一晚透析後、濃縮した。

3.4.8 項 ビオチン化 CS-BSA の作製

NHS-LC-Biotin (1.4 mg) を *N,N*-dimethylformamide (810 μ L) に溶解し、その一部 (2 μ L) を CB (498 μ L) と混和した。この全量を、1.2.1 項で作製した CS-BSA の一部 (1.0 mL) と混和し、攪拌しながら室温で 2 時間反応させた。この混合液に、エタノールアミン (5 μ L) を加え、室温で 30 分攪拌した。この液を PBS に対して 4°C で一晚透析し、透析膜内容物を回収して使用まで -20°C で保存した。

3.4.9 項 バイオレイヤー干渉法による解離速度定数の測定

ストレプトアビジンが固定化された専用チップの先端を、G-PBS で 8 倍希釈したビオチン化 CS-BSA (前項で作製) (4 μ L) に浸し、25°C で 2 分振とう (1000 rpm) した。これを G-PBS (250 μ L) に浸し、25°C で 30 秒振とう (1000 rpm) し、このときのシグナルを基準とした。引き続き、チップの先端を 3.4.8 項で作製した精製済みの変異 scFv (0~5544 nM) を含む G-PBS (4.0 μ L) に浸して 25°C で 2 分振とう (1000 rpm) した。その後、G-PBS (250 μ L) に浸して 25°C で 10 分振とう (1000 rpm) した。得られたセンサーグラムから、専用ソフトウェアを用いて解離速度定数 (k_d) を算出した。

第5節 付属実験

3.5.1 項 可溶型変異 scFv を用いる ELISA

CS-BSA を 1.3.14 項に準じて固定化したマイクロプレートに、G-PBS で適切に希釈したペリプラズム抽出液 (3.3.5 項および 3.4.5 項で作製) (100 μ L) および各種濃度の CS 標準品を含む G-PBS 溶液 (50 μ L) を加えて混合し、4°C で 2 時間インキュベートした。溶液を除去して T-PBS で 3 回洗浄したのち、G-PBS で 5000 倍に希釈した POD 標識抗 FLAG

抗体 (100 μ L) を加えて 37°C で 30 分インキュベートした。再び洗浄して、固相上の POD 活性を 1.2.5 項と同様に比色測定した。

引用文献

- 1) Gibney E., Van Noorden R., Ledford H., Castelvechi D., Warren M., *Nature*, **562**, 176 (2018).
- 2) Ledford H., Else H., Warren M., *Nature*, **562**, 20–21 (2018).
- 3) Kaplon H., Reichert J. M., *mAbs*, **10**, 183–203 (2018).
- 4) 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).
- 5) Köhler G., Milstein C., *Nature*, **256**, 495–497 (1975).
- 6) Ruan K.-H., Hashida S., Tanaka K., Ishikawa E., Niitsu Y., Urushizaki I., Ogawa H., *Anal. Lett.*, **20**, 587–601 (1987).
- 7) Hashida S., Ishikawa E., *J. Biochem.*, **108**, 960–964 (1990).
- 8) Rissin D. M., Kan C. W., Campbell T. G., Howes S. C., Fournier D. R., Song L., Piech T., Patel P. P., Chang L., Rivnak A. J., Ferrell E. P., Randall J. D., Provuncher G. K., Walt D. R., Duffy D. C., *Nat. Biotechnol.*, **28**, 595–599 (2010).
- 9) Kim S. H., Iwai S., Araki S., Sakakihara S., Iino R., Noji H., *Lab Chip*, **12**, 4986–4991 (2012).
- 10) Wilson D. H., Rissin D. M., Kan C. W., Fournier D. R., Piech T., Campbell T. G., Meyer R. E., Fishburn M. W., Cabrera C., Patel P. P., Frew E., Chen Y., Chang L., Ferrell E. P., von Einem V., McGuigan W., Reinhardt M., Sayer H., Vielsack C., Duffy D. C., *J. Lab. Autom.*, **21**, 533–547 (2016).
- 11) Kobayashi N., Oyama H., *Analyst*, **136**, 642–651 (2011).
- 12) Mudgett-Hunter M., Anderson W., Haber E., Margolies M. N., *Mol. Immunol.*, **22**, 477–488 (1985).
- 13) Hoogenboom H. R., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1105–1116 (2005).
- 14) Wild D., "The Immunoassay Handbook", Amsterdam: Elsevier (2013).
- 15) Orlandi R., Gussow D. H., Jones P. T., Winter G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 3833–3837 (1989).
- 16) Sastry L., Altling-Mees M., Huse W. D., Short J. M., Sorge J. A., Hay B. N., Janda K. D., Benkovic S. J., Lerner R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 5728–5732 (1989).
- 17) Skerra A., Plückthun A., *Science*, **240**, 1038–1041 (1988).
- 18) Better M., Chang C. P., Robinson R. R., Horwitz A. H., *Science*, **240**, 1041–1043 (1988).
- 19) Cabilly S., *Gene*, **85**, 553–557 (1989).
- 20) 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).
- 21) Huston J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M. S., Novotny J., Margolies M. N.,

- Ridge R. J., Bruccoleri R. E., Haber E., Crea R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 5879–5883 (1988).
- 22) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
- 23) Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G., *Nature*, **352**, 624–628 (1991).
- 24) Jespers L. S., Roberts A., Mahler S. M., Winter G., Hoogenboom H. R., *Bio/technology*, **12**, 899–903 (1994).
- 25) Boder E. T., Wittrup K. D., *Nat. Biotechnol.*, **15**, 553–557 (1997).
- 26) Hanes J., Pluckthun A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 4937–4942 (1997).
- 27) Derda R., Tang S. K. Y., Li S. C., Ng S., Matochko W., Jafari M. R., *Molecules*, **16**, 1776–1803 (2011).
- 28) Short M. K., Jeffrey P. D., Kwong R. F., Margolies M. N., *J. Biol. Chem.*, **270**, 28541–28550 (1995).
- 29) Chames P., Coulon S., Baty D., *J. Immunol.*, **161**, 5421–5429 (1998).
- 30) Lamminmäki U., Paupério S., Westerlund-Karlsson A., Karvinen J., Virtanen P. L., Lövgren T., Saviranta P., *J. Mol. Biol.*, **291**, 589–602 (1999).
- 31) Kramer K., *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 4892–4898 (2002).
- 32) Kobayashi N., Oyama H., Kato Y., Goto J., Söderlind E., Borrebaeck C. A. K., *Anal. Chem.*, **82**, 1027–1038 (2010).
- 33) Oyama H., Yamaguchi S., Nakata S., Niwa T., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **85**, 4930–4937 (2013).
- 34) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Banzono E., Ishii K., Kubo S., Watanabe Y., Hirai A., Kaede C., Ohta M., Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **89**, 988–995 (2017).
- 35) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Morishita T., Fukushima S., Nishimori Y., Niwa T., Kobayashi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 2191–2198 (2017).
- 36) Morita I., Oyama H., Yasuo M., Matsuda K., Katagi K., Ito A., Tatsuda H., Tanaka H., Morimoto S., Kobayashi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 174–181 (2017).
- 37) Chrousos G. P., Kino T., Charmandari E., *Neuroimmunomodulation*, **16**, 272–283 (2009).
- 38) 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).
- 39) Lewis J. G., Manley L., Whitlow J. C., Elder P. A., *Steroids*, **57**, 82–85 (1992).
- 40) Kobayashi N., Sun P., Fujimaki Y., Niwa T., Nishio T., Goto J., Hosoda H., *Anal. Sci.*, **18**, 1309–1314 (2002).
- 41) 神戸川明, *臨床化学*, **3**, 62–71 (1974).
- 42) Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Miyake S., Moriuchi A., Akisada T., Niwa T.,

- Kobayashi N., *Anal. Chem.*, **87**, 12387–12395 (2015).
- 43) Scatchard G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660–672 (1949).
- 44) 黒川清, 高久史麿, 春日雅人, 北村聖, "臨床検査データブック 2017-2018", 医学書院, 東京 (2017).
- 45) Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8998–9002 (1988).
- 46) Jones S. T., Bendig M. M., *Bio/technology*, **9**, 88–89 (1991).
- 47) Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S., Foeller C., "Sequences of proteins of immunological interest", Washington, DC: U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1991).
- 48) Chen X., Zaro J. L., Shen W. C., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 1357–1369 (2013).
- 49) Jirholt P., Ohlin M., Borrebaeck C. A. K., Söderlind E., *Gene*, **215**, 471–476 (1998).
- 50) Hopp T. P., Prickett K. S., Price V. L., Libby R. T., March C. J., Cerretti D. P., Urdal D. L., Conlon P. J., *Bio/Technology*, **6**, 1204–1210 (1988).
- 51) Kobayashi N., Shibahara K., Ikegashira K., Shibusawa K., Goto J., *Steroids*, **67**, 733–742 (2002).
- 52) Leung D. W., Chen E., Goeddel D. V., *Technique*, **1**, 11–15 (1989).
- 53) Siegel R. W., Baugher W., Rahn T., Drengler S., Tyner J., *Clin. Chem.*, **54**, 1008–1017 (2008).
- 54) Kristensen P., Winter G., *Fold. Des.*, **3**, 321–328 (1998).
- 55) Tannous B. A., Kim D. E., Fernandez J. L., Weissleder R., Breakefield X. O., *Mol. Ther.*, **11**, 435–443 (2005).
- 56) Tannous B. A., *Nat. Protoc.*, **4**, 582–591 (2009).
- 57) Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Yampolsky I. V., *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 6048–6077 (2016).
- 58) Venisnik K. M., Olafsen T., Gambhir S. S., Wu A. M., *Mol. Imaging Biol.*, **9**, 267–277 (2007).
- 59) Pande J., Szewczyk M. M., Grover A. K., *Biotechnol. Adv.*, **28**, 849–858 (2010).
- 60) Rakonjac J., Bennett N. J., Spagnuolo J., Gagic D., Russel M., *Curr. Issues Mol. Biol.*, **13**, 51–76 (2011).
- 61) Clackson T., Lowman H. B., "Phage Display", New York: Oxford University Press (2004).
- 62) "VCSM13 interference-resistant helper phage, complete genome."
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY598820.1?report=genbank>>.
- 63) Qi H., Lu H., Qiu H. J., Petrenko V., Liu A., *J. Mol. Biol.*, **417**, 129–143 (2012).
- 64) Smith G. P., Petrenko V. A., *Chem. Rev.*, **97**, 391–410 (1997).

- 65) "Capsid protein G8P-P69541 (CAPSD_BPM13).":
<<http://www.rcsb.org/pdb/protein/P69541>>.
- 66) Sjölander A., Cox J. C., Barr I. G., *J. Leukoc. Biol.*, **64**, 713–723 (1998).
- 67) Kiguchi Y., Oyama H., Morita I., Katayama E., Fujita M., Narasaki M., Yokoyama A., Kobayashi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1062–1070 (2018).
- 68) Carroll W. L., Mendel E., Levy S., *Mol. Immunol.*, **25**, 991–995 (1988).
- 69) Nicholls P. J., Johnson V. G., Blanford M. D., Andrew S. M., *J. Immunol. Methods*, **165**, 81–91 (1993).
- 70) Kumaraswamy S., Tobias R., *Methods Mol. Biol.*, **1278**, 165–182 (2015).
- 71) de Wet J. R., Wood K. V., Helinski D. R., DeLuca M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 7870–7873 (1985).
- 72) Chiu N. H. L., Christopoulos T. K., *Clin. Chem.*, **45**, 1954–1959 (1999).
- 73) Whitlow M., Bell B. A., Feng S. L., Filpula D., Hardman K. D., Hubert S. L., Rollence M. L., Wood J. F., Schott M. E., Milenic D. E., *Protein Eng.*, **6**, 989–995 (1993).
- 74) 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).
- 75) 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).
- 76) Rouet R., Jackson K. J. L., Langley D. B., Christ D., *Front. Immunol.*, **9**, 118 (2018).
- 77) 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).
- 78) Edman P., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283–293 (1950).
- 79) Edman P., *Acta Chem. Scand.*, **10**, 761–768 (1956).
- 80) Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J., *Curr. Biol.*, **3**, 327–332 (1993).
- 81) Ylera F., Harth S., Waldherr D., Frisch C., Knappik A., *Anal. Biochem.*, **441**, 208–213 (2013).
- 82) Aardal E., Holm A. C., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **33**, 927–932 (1995).
- 83) Guex N., Diemand A., Peitsch M. C., *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 364–367 (1999).
- 84) Grosdidier A., Zoete V., Michielin O., *Nucleic Acids Res.*, **39**, 270–277 (2011).
- 85) Jung S., Spinelli S., Schimmele B., Honegger A., Pugliese L., Cambillau C., Plückthun A., *J. Mol. Biol.*, **309**, 701–716 (2001).
- 86) Dreher M. L., Gherardi E., Skerra A., Milstein C., *J. Immunol. Methods*, **139**, 197–205 (1991).
- 87) Sambrook J., Russell D. W., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual Third Edition", New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- 88) Hartree E. F., *Anal. Biochem.*, **48**, 422–427 (1972).

- 89) Kobayashi N., Oiwa H., Goto J., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **64**, 171–177 (1998).