

# ヒト型一本鎖抗体ライブラリを用いた抗ペプチド抗体8000種類の整列化

●奥井 理予

慶應義塾大学医学部

## ＜研究の目的と進め方＞

モノクローナル抗体は、研究のみならず診断にも非常に有用であるが、治療で用いる場合、従来のマウス抗体ではその免疫原性から問題点が多い。そのため、生体内に投与するイメージングや治療目的の抗体は、ヒト抗体が望ましく、現在はヒト抗体由来もしくはヒトの抗体遺伝子を利用したヒト型化抗体が主流となっている。本研究の目的は、所属研究室で独自に作製したヒト型一本鎖抗体ライブラリを用い、多数の抗原ペプチドに対するアフィニティーの高い抗体を単離・整列化する方法論を確立することである。

一般的なヒト型モノクローナル抗体の作製法としては、ヒトリンパ球を用いたハイブリドーマを選択する方法や、ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いる方法などがある。しかし、これらは動物に抗原を免疫する必要があり、スクリーニングに労力を伴うだけでなく、例えば自己抗原に対する抗体を得るのは非常に困難である。それに対して、ファージ提示型ヒト型一本鎖抗体ライブラリであれば、動物に免疫する必要がなく、ファージを用いて *in vitro* でスクリーニングを行うため、操作は容易かつ迅速（2～3週間）である。また、原理的に抗原に制約がないため、毒性のある抗原や自己抗原に対する抗体も得ることができる。しかも、抗体遺伝子も同時に単離できるため、大腸菌や酵母での大量発現や、種々の改変も容易に行うことができる。

本研究の具体的な実験方法としては、まずビーズ上にペプチドが結合した抗原ペプチドライブラリを作製し、我々が独自に作製した抗体ライブラリを用いてスクリーニングを行う。最終目標は、ファージ抗体と抗原ペプチドの配列を対応させたデータベースと抗体カタログのシステム構築であり、疾患の診断・治療に有用な抗体を網羅的かつ迅速に得る画期的なシステムを構築することが可能となると考えている。

## ＜研究開始時の研究計画＞

### 1) ペプチド抗原ライブラリの調製

ヒト型一本鎖抗体ライブラリから抗体をスクリーニングするための抗原として、固定型のペプチド（10アミノ酸）ライブラリを用いる。10アミノ酸すべてをランダムペプチドとして合成した場合、そのレパートリー数は、 $20^{10}$ ＝約1013となり、実際に全種類の合成ペプチドを準備することは困難である。そこで、抗原と抗体の結合性を考慮して、Gly 2・Ser・Pro・X・X・Gly 4（X：ランダムアミノ酸）をビーズ上で分割法により合成する。この方法により完成したペプチドライブラリは、各ビーズに一種類のペプチドだけが結合し、そのレパートリー数は、 $20^2$ ＝400種類となる。また、抗体のスクリーニングに関して、非特異的な結合を避けるためのブロックペプチドとして、Gly 2・Ser・Pro・Gly 6を用いる。さらに、ペプチドとビーズを容易に切断できるように官能基を入れておく。

### 2) ヒト型一本鎖抗体ライブラリを用いた抗体のスクリーニング

### ーニング

作製したペプチドビーズライブラリを抗原として、一本鎖抗体ライブラリと抗原抗体反応を行い、洗浄・再増幅のサイクルを繰り返して、ビーズと強く結合するファージをビーズごと単離する。個々のビーズおよび（ポリクローナル）ファージを96穴プレート単位で管理し、質量分析法によりビーズ上の抗原ペプチドのアミノ酸配列を決定する。自動サンプラーを用いて96穴プレート単位で自動分析できるシステムを構築する。

### 3) ペリプラズムシャペロンの共発現系の導入

抗体の可溶性を増強するペリプラズムシャペロンの発現プラスミドを宿主菌に導入し、クローン化抗体の可溶性増強効果を検証する。また、ライブラリ全体のタイター増強効果についても検証する。

### 4) ペプチド抗体ライブラリの整列化

一本鎖抗体ライブラリから単離・精製した抗体（ファージ）を、PVDF膜上にスポットする。Gly 2・Ser・Pro・X・X・Gly 6配列の数種のペプチドおよびその配列を内包する組換えタンパクを蛍光ないしビオチンで標識し、スポットした抗体への結合強度・特異性を検討し、スポット量や洗浄強度を検討する。また、BIACORE（既存設備）を用いてペプチドや組換えタンパクと抗体との親和性を評価する。

### 5) ペプチド抗体ライブラリのカタログ化

8,000種類のペプチドビーズライブラリ Gly 3・X・Pro・X・X・Gly 3（X：任意のアミノ酸）を用い、抗原ペプチドと結合する一本鎖抗体のパンニングを行い、抗原ペプチドと結合する一本鎖抗体を集団のまま（ポリクローナルファージ抗体）、384穴プレート25枚分（9,600クローン）を整列化する。整列化の方法は、抗体ファージをビーズに結合させたまま各ビーズを一つずつ単離し、その結合ファージを整列化する。各ビーズには、一種類のペプチド配列のみが結合している。もしくは、各ペプチドを膜に結合させたものを用い、パンニングを行い、各ペプチドスポットに結合したファージをポリクローナル抗体ファージとして扱う。また、整列化した各抗体クローン（ファージ）について、免疫グロブリン遺伝子のシーケンスを確認し、結合する抗原ペプチドの配列との対応付けを行う。さらに、単離した一本鎖抗体については、必要に応じ、BIACORE 3000（既存設備）によって抗体親和性の評価を行う。

### 6) 一本鎖抗体自動精製システムの開発

5) でカタログ化したファージクローンから、一本鎖抗体を自動精製するためのシステムを構築する。すなわち、抗体発現用の大腸菌に感染後、IPTGによって抗体を発現誘導し、大腸菌可溶性画分から一本鎖抗体を精製する。精製には既存ロボットシステム（BIOMEK 2000）を用い、96穴プレート単位で抗体C末端側に存在するHisタグを利用したアフィニティー精製を行う。

### 7) ディファレンシャル・ディスプレイ法によるガン細胞特異的発現タンパク質の解析

整列化したペプチド抗体の予備的評価として、ディフ

ァレンシャル・ディスプレイ法によるガン細胞特異的発現タンパク質の解析を行う。方法は、カタログ化した(ファージ)抗体をイムノプレートもしくは膜に固定し、培養細胞(正常細胞&ガン細胞)から抽出し蛍光色素(Cy3,Cy5)で標識した細胞膜画分と反応させ、正常細胞とガン細胞で比較を行う。

#### 〈研究期間の成果〉

##### 1) ペプチドビーズの作製とスクリーニングの条件検討

ペプチドライブラリの試作品として、数種のペプチドを結合したビーズを作製した。この試作品のペプチドビーズを用いて、ビーズ上のペプチドに結合するファージ抗体を単離した。

##### 2) 一本鎖抗体の発現・精製における条件検討とスクリーニングシステムの改良

多数の抗原に対する抗体ファージを網羅的に短期間でスクリーニングするシステムの改良を行った。培養温度や発現誘導条件、菌株、ブロッキング剤などのスクリーニング諸条件を詳細に検討し、ファージ抗体発現時の培養温度を25℃で培養を行うことにより欠失クローンの出現・増幅を抑制することに成功し、効率的なスクリーニング法を確立することができた。

抗体の整列化にはハイスループットな精製が必要である。しかし、現在の抗体ライブラリのHisタグで精製するだけでは夾雑物の混入が予想以上に多く、ハイスループットな精製に適していないと判断し、新たにストレプトアビジン結合性タグに変更したベクターを構築した。同時に抗体チップ化に向けて固相化に適した配列を導入した。また、各クローンによって可溶性発現量に大きな差があったため、それを解消すると考えられるペリプラズムシャペロン発現ベクターを作製した。

上記の手順で確立した諸条件を応用し、数種のコントロールペプチドビーズを用いてスクリーニングを行った。得られた抗体クローンについてHisタグで粗精製後、ピアコアを用いた相互作用実験を行い、目的ペプチドと結合することを確認した。この結果から、各ペプチドビーズに結合する抗体ファージをポリクローナルな(混合)状態で整列化しても有用である可能性が高いと考えられた。

##### 3) 8,000種類のアミノ酸配列を有するペプチドライブラリの作製

抗体のスクリーニングに用いるペプチドライブラリを作製するにあたり、ビーズ上に合成するペプチドの配列を、当初計画の400種類(Gly2・Ser・Pro・X・X・Gly4)から8,000種類(Gly2・X・Pro・X・X・Gly4)にバージョンアップし、実際にスクリーニングを行った。ビーズ上のペプチドに結合するファージ抗体を単離し、各クローンについて免疫グロブリン遺伝子配列を確認するとともに、ファージ抗体を整列化するための条件検討を行った。また、各ファージ抗体を384穴プレート25枚分(9,600クローン)として整列化するためのプロトコルの見直しおよび機器類の条件検討を行った。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

ファージ提示型抗体ライブラリは既に国内外に報告があり、一本鎖抗体ライブラリ作製キットも市販されているが、それらは様々な欠点が残されており、膨大なレパートリーを作製するのは容易ではない。本方法もファージ提示型組換え抗体の基本原理を利用しているが、様々なアイデアを導入することによって、作製の容易さ、およびレパートリーの大きさの点で他のシステムを遙かに凌ぐ性能を有しており、随時柔軟な対応が可能である。

一方、抗体が診断のみならず治療にも有効であることが示され、この分野の新規な展開が始まっている。またヒトを含む様々な生物のゲノム配列が解読され、各遺伝子がコードするタンパクの検出や同定などに必要な特異抗体を簡便に取得する方法が切望されている。混合物中のタンパクの網羅的検出法はごく小規模のシステムのみしか実現されていないが、そのニーズは非常に高い。本研究で開発しているシステムはこれらの要求に応えることが可能である。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

一本鎖抗体の精製をハイスループットで行うシステムの構築を積極的に試みたが、各クローンで一本鎖抗体の発現量に差があること、Hisタグのアフィニティーカラムによるワンステップの精製だけでは予想以上に夾雑タンパクが混入するなど、抗体タンパク質の精製に関して予想以上に困難な点が多かった。抗体タンパク質の可溶性に関して、ペリプラズムシャペロン発現ベクターを構築して併用したところ、可溶性抗体の発現量が上昇した。さらにマイナーコドンtRNA遺伝子を組み込み、発現量の均等化を図る予定である。

今後、一本鎖抗体の精製をハイスループットで行うために、精製用タグの改良を行う必要があると判断し、新しい抗体ライブラリの作製を計画中である。我々の抗体ライブラリは短期間(2~3週間)で作製できるため、ライブラリの改良が容易であるという点で非常に有利である。

#### 〈今後の課題〉

当研究室で独自に作製した一本鎖抗体ライブラリを用いて、ペプチドビーズに結合するファージ抗体を単離することができた。これらのクローンは、コロニーピッカーを用いて384穴プレートに保存し、今後の実験にハイスループットで対応することが可能である。今後、上記の諸条件を統合したシステムで、新しい抗体ライブラリを用いてスクリーニングし、抗体を整列化した後、メンブレンまたはチップ上に固相化することにより網羅的解析を行うためのシステムを構築できると考えている。