

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19360377

研究課題名（和文） 試験管内選択法による新機能抗体創出システムの開発

研究課題名（英文） *In vitro* selection of novel recombinant antibodies

研究代表者

土居 信英 (DOI NOBUHIDE)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：50327673

研究成果の概要：mRNA ディスプレイ (IVV) 法を用いて、合成一本鎖抗体 (scFv) ライブラリーから濃縮効率 100 万倍以上の高効率で、様々な抗原に結合する scFv や、on-rate 選択および off-rate 選択により親和性の向上した scFv を迅速かつ簡便に取得する手法を確立した。また、同様の手法を単一のドメイン抗体 (ナノ抗体) の試験管内進化にも適用できた。次に、DNA ディスプレイ (STABLE) 法を用いて、二本鎖の Fab 抗体の試験管内選択に世界で初めて成功した。さらに、STABLE 法のスクリーニング効率を上げるために、ビーズエマルジョン PCR と STABLE 法とを組み合わせた新しい手法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学 組み換え抗体 ライブラリー 試験管内進化 抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

抗原に対する高い特異性と親和性を示すモノクローナル抗体は、診断薬・治療薬への応用のみならず、分子細胞生物学の基礎研究における利用など、その応用範囲は極めて広い。しかし、現在主流の抗体作製法である細胞融合法は手間と時間がかかる上に、抗原を実験動物に注射して免疫感作するので、自己抗体や抗毒素抗体、膜タンパク質に対する抗体など、抗体作製が困難な場合もある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、申請者が独自に開発した試験管内選択法である IVV 法および STABLE 法を用いて、従来法では作製が困難であった抗原に対する新機能モノクローナル抗体を、迅速かつ簡便に作製できる実験系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組み換え抗体ライブラリーの構築

無細胞タンパク質合成系で高発現するヒト抗体フレームワークを選び、合成オリゴ DNA を用いて、抗原と相互作用する相補性決定領域 (CDR) にランダムなアミノ酸配列を導入した多様性の大きい一本鎖抗体ライブラリーを構築した。このときランダム配列のアミノ酸頻度や長さについては、天然の抗体の CDR のデータを参考にした。

(2) STABLE 法および IVV 法による組み換え抗体の試験管内選択

これまでに申請者らは、タンパク質とそれをコードする DNA または mRNA を連結した『表現型と遺伝子型の対応づけ分子』(図 1) のライブラリーを試験管内で構築する技術を開発し、それぞれ STABLE 法および *in vitro virus* (IVV) 法と名づけた。これらの方法を用いて、多様な抗体の対応づけ分子ライブラリーから、ビーズに固定した抗原に結合する特定の抗体をアフィニティー精製した後、核酸部分を PCR で増幅して塩基配列を解読することで目的の抗体を容易に取得・同定した。

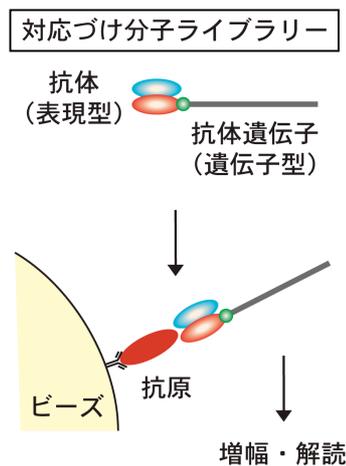


図 1 抗体の試験管内選択

(3) 試験管内進化による組み換え抗体の特異性・親和性・安定性の向上

既存の有用な抗体遺伝子または(2)で得られた抗体遺伝子に対して、エラー・プローン PCR によるランダム変異導入および DNA シャフリングによる変異の組み合わせの最適化により、多様な変異体抗体ライブラリーを作製し、IVV 法による親和性一本鎖抗体の試験管内進化を行った。また、STABLE 法による Fab 抗体のスクリーニング効率を上げるために、エマルジョン PCR の利用について検討した。

(4) 組み換え抗体の大量調製および特性評価

上記スクリーニングにより得られた組み換

え抗体について、大腸菌における大量発現または無細胞タンパク質合成系による大量合成を行い、His タグや FLAG などのアフィニティー・タグを利用して精製した後、ELISA、ウェスタンブロッティング、表面プラズモン共鳴法などの手法を用いて、抗体の親和性・特異性・安定性などの特性評価を行った。

4. 研究成果

まず、mRNA ディスプレイ法の 1 種である IVV 法 (図 2) を用いて、合成一本鎖抗体 scFv ライブラリーから濃縮効率 100 万倍以上の高効率で、様々な抗原に結合する scFv や、on-rate 選択および off-rate 選択により親和性の向上した scFv を迅速かつ簡便に取得する手法を確立した (図 3)。また、同様の手法を単一のドメイン抗体 (ナノ抗体) の試験管内進化にも適用することができた。

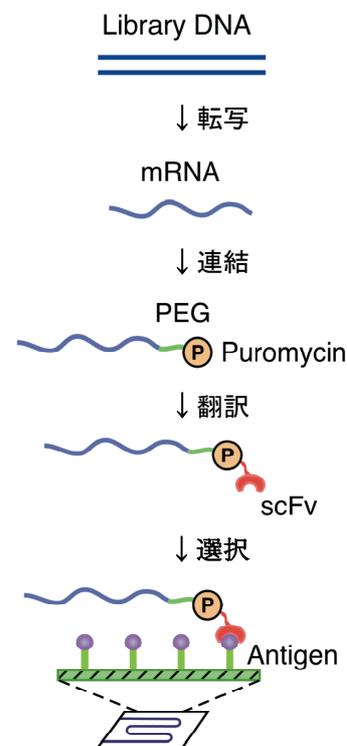
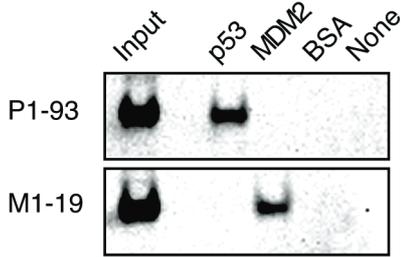


図 2 IVV 法とマイクロ流体チップの組み合わせによる scFv 抗体の試験管内選択の原理 mRNA の 3'末端に PEG スペーサーを介してピューロマイシンを連結し、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行うことにより、scFv 抗体 (表現型) と mRNA (遺伝子型) をリボソーム上で対応づける。この対応づけ分子ライブラリーの中から、ビーズに固定した抗原に結合する抗体を試験管内選択した後、逆転写 PCR により遺伝子を増幅し解読する。

A



B

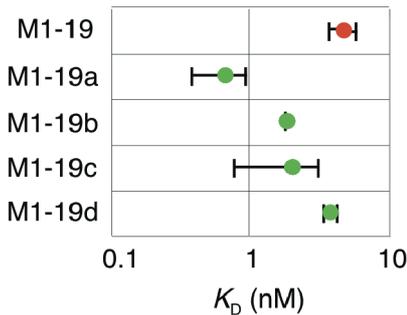
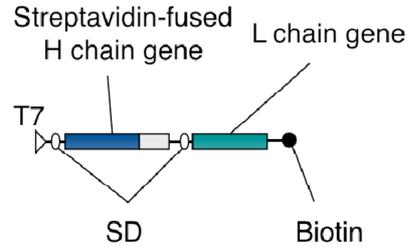


図3 抗 p53 および抗 MDM2-scFv 抗体の取得 (A) 得られた抗体の抗原特異的結合確認。(B)高親和性 scFv 抗体の試験管内進化の例。野生型 (赤) および変異型 (緑) 抗 MDM2 抗体の解離定数。

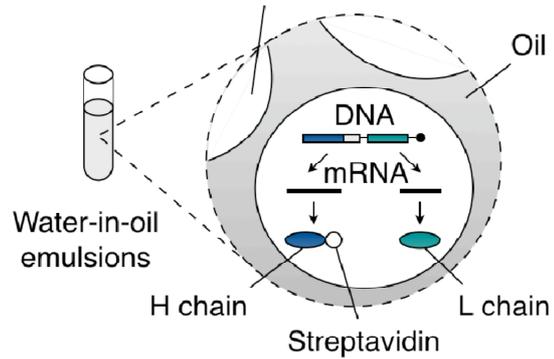
次に、DNA ディスプレイ法の1種である STABLE 法 (図4) を用いて、一本鎖だけではなく、二本鎖の Fab 抗体の試験管内選択に世界で初めて成功した (図5)。また、Fab 抗体の定常領域 (図6) に変異を導入し、熱安定性の高い Fab 変異体の試験管内選択に成功した。さらに、STABLE 法のスクリーニング効率を上げるために、ビーズエマルジョン PCR と STABLE 法とを組み合わせた新しい手法を開発した。

本研究により、従来よりも簡便・迅速な抗体作製法を確立することができた。将来的には、ゲノム情報から得られた大量の遺伝子産物の発現解析や機能解析 (プロテオーム解析) などの基礎科学への応用はもちろんのこと、遺伝子が関与する多種多数の疾患の迅速かつ網羅的な診断法の確立など、バイオ産業上の幅広い応用が期待できる。例えば、細胞表面に発現した疾患関連受容体などの膜タンパク質を直接抗原として認識する新しい抗体医薬の開発や、既に治療や診断に用いられている抗体医薬の親和性や特異性の向上を図ることによって、投薬量および副作用の低減、診断用チップの感度向上に寄与することが期待できる。

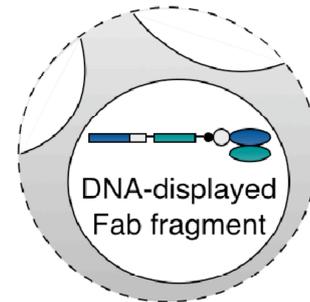


↓ エマルジョン化

In vitro transcription/translation system



↓ 転写・翻訳



↓ 選択

Immobilized antigens

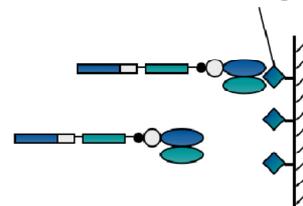
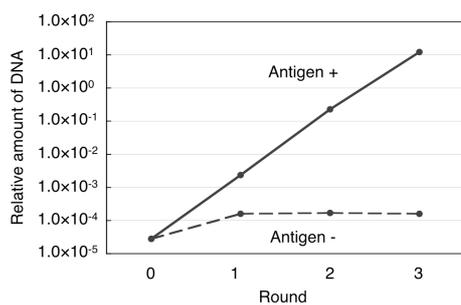


図4 STABLE 法による Fab 抗体の試験管内選択の原理 無細胞転写・翻訳系を含むエマルジョン中のマイクロカプセル (逆相ミセル) の中で、Fab 抗体 (表現型) をストレプトアビジンとの融合タンパク質として合成させ、それをコードする予めビオチン化した DNA (遺伝子型) と連結させる。この対応づけ分子ライブラリーの中から、ビーズに固定した抗原に結合する抗体を試験管内選択した後、その DNA 部分を PCR により増幅し塩基配列を解読する。

A



B



図5 抗フルオレセイン-Fab抗体遺伝子の濃縮実験 (A) リアルタイムPCRによる定量。(B) 抗フルオレセイン抗体遺伝子のみを切断する制限酵素で処理したDNAのゲル電気泳動写真。

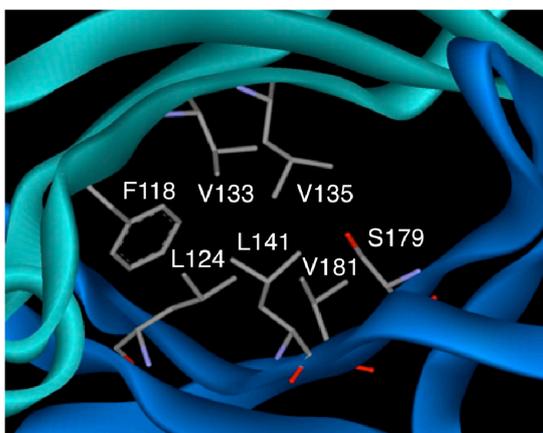


図6 定常領域の疎水性コアを構成する7つのアミノ酸 重鎖(青)、軽鎖(緑)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tabata, N., Sakuma, Y., Honda, Y., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H.: Rapid antibody selection by mRNA display on a microfluidic chip. *Nucleic Acids Res.*, **37**, e64 (2009) 査読有

- ② Horisawa, K., Doi, N., Yanagawa, H.: Use of cDNA tiling arrays for identifying protein-interactions selected by *in vitro* display technologies. *PLoS ONE*, **3**, e1646 (2008) 査読有

- ③ Doi, N., Takashima, H., Wada, A., Oishi, Y., Nagano, T., Yanagawa, H.: Photocleavable linkage between genotype and phenotype for rapid and efficient recovery of nucleic acids encoding affinity-selected proteins. *J. Biotechnol.*, **131**, 231-239 (2007) 査読有

- ④ Kawahashi, Y., Doi, N., Oishi, Y., Tsuda, C., Takashima, H., Baba, T., Mori, H., Ito, T., Yanagawa, H.: High-throughput fluorescence labeling of full-length cDNA products based on a reconstituted translation system. *J. Biochem.* **141**, 19-24 (2007) 査読有

[学会発表] (計5件)

- ①丸岡優子, 住田壮, 山川奈津子, 土居信英, 柳川弘志: ビーズエマルジョン PCR と STABLE 法の組み合わせによる受容体ペプチドリガンド探索手法の開発. 第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会合同年会(神戸, 2008.12.12)

- ②田島典子, 佐久間裕子, 山川奈津子, 土居信英, 柳川弘志: IVV 法による選択実験の多用途性. 第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会合同年会(神戸, 2008.12.9)

- ③木村香緒梨, 小磯崇, 田島典子, 土居信英, 柳川弘志: 抗体医薬開発に向けたヒト一本鎖抗体の IVV スクリーニング. 第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会合同年会(神戸, 2008.12.9)

- ④住田壮, 土居信英, 柳川弘志: DNA ディスプレイ法による Fab 抗体の完全試験管内選択. 第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会合同年会(神戸, 2008.12.9)

- ⑤小磯崇, 福田伊佐央, 鬼丸美智子, 田島典子, 土居信英, 高嶋秀昭, 柳川弘志: *In vitro* virus 法を用いたヒト一本鎖抗体の試験管内選択. 第80回日本生化学会・第30回日本分子生物学会合同年会(横浜, 2007.12.11)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土居 信英 (DOI NOBUHIDE)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号: 50327673

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

柳川 弘志 (YANAGAWA HIROSHI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 40327672