

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659057

研究課題名（和文）分子進化工学の手法を応用した低分子抗原特異的一本鎖抗体の開発研究

研究課題名（英文）Development Research on Single-chain Antibodies against the Small Antigen through Application of Molecular Evolutionary Engineering

研究代表者

森岡 弘志 (MORIOKA HIROSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20230097

研究成果の概要（和文）：タンパク質の糖化反応生成物である AGE（Advanced Glycation Endproduct）は、多種多様な構造を持つ低分子量の翻訳後修飾体である。糖尿病関連疾患の研究を進める上で有用な AGE 認識抗体を調製するため、化学的に AGE 修飾した dendrimer 型合成ペプチドとファージディスプレイ法を用いて、GA-pyridine と呼ばれる AGE に対して、特異性ならびに結合性が高い一本鎖抗体の開発研究を行った。

研究成果の概要（英文）：It has been proposed that formation and accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in various tissues are involved in atherosclerosis, diabetic complications and aging-associated diseases. In order to determine AGEs accumulation in various pathological tissues, immunological studies using monoclonal anti-AGE antibodies are highly effective. However, only a few of antibodies against AGEs have been established at present. Actually, it is not easy to prepare monoclonal antibodies that have high-affinity and high-specificity against AGEs, because of the diversity and heterogeneity of AGE structures and their small molecular sizes. Therefore, we have conducted protein-engineering approaches to develop recombinant antibodies with high affinity for various kinds of AGEs. In the present study, we have carried out phage display experiments to prepare single-chain antibodies (scFvs) specific for one of AGE structure, GA-pyridine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：薬学、AGE 認識抗体、分子進化工学、ファージディスプレイ、scFv 抗体、低分子抗原、dendrimer 型ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) グルコースのような還元糖のアルデヒド基とタンパク質のアミノ基との間の非酵素的反応は、糖化反応 (glycation)、あるいは、その発見者の名にちなんでメイラード反応と呼ばれている。メイラード反応は、シッフ塩

基が形成された後にアマドリ転位を起こして比較的安定なアマドリ化合物が生成される前期反応と、その後、脱水・縮合・分解・酸化・環状化反応等、一連の複雑な反応を経て AGE (Advanced Glycation Endproduct) と呼ばれる多種多様な一群の化合物へ変化する後期反応とからなる。この反応は食品化学の分野で



#### 4. 研究成果

##### (1) AGE で修飾された dendriマー型ペプチド、および、タンパク質の作製

タンパク質分子中で AGE 修飾される部位は、その生成機構から、リジン (Lys)、または、アルギニン (Arg) の側鎖のアミノ基、あるいは、N 末端のアミノ基である。合成ペプチドとグリコールアルデヒド (GA) を反応させ、AGE 修飾された抗原混合物を作製した [合成ペプチドの中央部に糖化反応が起こる Lys、または、Arg 配置し、その N、C 両末端側に側鎖が小型のグリシン (Gly; G) とアラニン (Ala; A) を並べた 7 残基をコア配列 (-Gly-Ala-Gly-(Lys/Arg)-Gly-Ala-Gly-) として、さらに C 末端はアセチル基で保護したもの、および、同じ配列を有する dendriマー型ペプチド (図 2) を AGE 修飾体とした]。AGE 構造体が生成される位置近傍に側鎖が小さいアミノ酸を導入する (言い換えれば、エピトープ部位近傍に側鎖に電荷を持つアミノ酸や疎水性が高いアミノ酸の導入を避ける) ことで、標的 AGE の隣接構造により結合性が左右されない抗体分子が作製できると考えた。これらペプチド抗原で得られた抗体は、任意の場所に生成される AGE に対して正確かつ再現性の高い分析・測定が可能となると予想した。また、従来の方法に従い、BSA、および、KLH についても AGE 修飾し、同様の実験を行った。

##### (2) AGE で修飾されたペプチド、および、タンパク質のマウスへの免疫

GA を用いて AGE 修飾されたタンパク質 (KLH)、および、上記 dendriマー型ペプチドをマウスに免疫し、血清中の抗体価が上がったマウスより脾臓を摘出した。

##### (3) 抗体可変領域 (Fv) 遺伝子ライブラリーの作製、および、ファージディスプレイ法による組換え抗体分子のスクリーニング

マウス脾臓より RT-PCR 法によって IgG 抗体の重鎖および軽鎖 Fv 遺伝子ライブラリーを作製した。本実験で用いるクローニングに必要な一群のプライマーは、これまでの研究で抗体遺伝子のクローニングに成功した実績のあるものを利用した。ファージディスプレイ法によるスクリーニングにより、GA 修飾 KLH を免疫したマウス脾臓より、GA 修飾 AGE タンパク質 (BSA) に特異的に結合する 4 種類の組換え型モノクローナル抗体 (一本鎖抗体; scFv) を獲得できた。また、GA 修飾 dendriマー型ペプチドを免疫したマウス脾臓より、Fv 遺伝

子ライブラリーの作成を終了し、現在、スクリーニングを進めている。

##### (4) 組換え型 AGE 特異的 scFv 抗体の調製

(3) で得られた 4 種類の GA 修飾タンパク質を認識する組換え型 scFv 分子を大腸菌のシステムにより大量発現させ、ヒスチジンタグを利用したアフィニティカラム、ならびに、ゲル濾過クロマトグラフィー等を用いて高純度に精製した。

##### (5) エピトープとなる AGE 化学構造の解析

ペプチド合成用試薬であるベンジルオキシカルボニルリジン (Z-Lys)、および、ベンジルオキシカルボニルアルギニン (Z-Arg) を用い、(1) と同様にして AGE 修飾を行った。(4) で得られた scFv と結合する AGE 修飾された Z-Lys、および、Z-Arg を逆相 HPLC システムで探索し、scFv との結合が観察された化合物、AGE 修飾された Z-Lys を同様の方法で大量調製した。逆相 HPLC で高純度に精製した後、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、ならびに、マスマスペクトル測定によってその化学構造を決定した。その結果、本研究によって得られた scFv は、永井らによって報告された GA-pyridine (図 3) を認識する抗体であることがわかった。

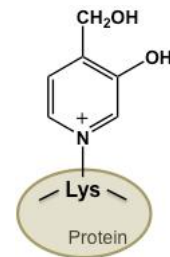


図 3 GA-pyridine の構造

##### (6) AGE 特異的 scFv の抗原認識能の評価

(4) で得られた scFv の抗原結合能を ELISA 法により抗原結合活性を調べた。4 種類の scFv のうち AGE73scFv と名付けられたクローンは GA-pyridine に対する抗原結合活性が最も高く、また、CD スペクトル測定でもイミノグロブリンで見られる  $\beta$ -ストランドに富んだ構造をとっていることが観察された。さらに、(1) と同様の方法で合成・精製したビオチン化合成ペプチド Biotin-(-Gly-Ala-Gly-(Lys/GA-pyridine)-Gly-Ala-Gly-) をストレプトアビジンチップ (SA チップ) に結合させたものを抗原として、SPR バイオセンサー (Biacore T100) により、速度論的・熱力学的に抗原結合活性を解析し、抗原認識機構を評価した。その結果、AGE73scFv は、Two-state Reaction

による抗原認識機構を示し、VL 領域が抗原親和性に関与していることが分かった。

#### (7) AGE 特異的 scFv を用いた生体試料中の AGE 測定・解析

AGE73scFv を用いて、糖尿病性腎不全患者、ならびに、糖尿病性透析患者の血清タンパク質の分析を行ったところ、ある割合の糖尿病性透析患者様のヘモグロビン画分に、強い抗原結合活性が見られた。また、動脈硬化組織の組織染色分析を行ったところ、良好な染色が観察された。

#### (8) 変異導入法による AGE 特異的 scFv の抗原結合活性の促進

先に述べたように AGE73scFv の VL 領域は抗原親和性に関与していたことから、この領域にランダムな変異を導入した遺伝子ライブラリーを構築し、ファージディスプレイ法を用いて、抗原結合能が向上したクローンのスクリーニングを行った。得られた数種類の AGE73scFv 変異体について SPR を用いて反応速度論的解析により評価した結果、変異体 V94A は 25℃において GA-pyridine に対する親和性が AGE73scFv と比べて約 2~3 倍高いことが明らかとなった。また熱力学的解析を行ったところ、V94A が AGE73scFv と比べて GA-pyridine と結合後に、安定な複合体への構造変化を引き起こしやすい性質を持つことが明らかとなった。また 37℃において AGE73scFv と V94A の GA-pyridine に対する親和性を評価したところ、AGE73scFv では親和性が大きく低下するのに対し、V94A では 25℃と同程度の親和性が観測された。

#### (9) 今後の展望

本研究から、ファージを用いた選択系である利点を生かして、抗体遺伝子へ変異導入とバイオパニングによるスクリーニング条件に検討を加えることで、より抗原結合性の高い scFv の開発が可能であることが示された。今後、より優れた機能性抗体の創製を試みる。

#### 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)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 中原悠介、蓑毛 藍、諏訪喜昭、内田真希代、高木美智代、森岡弘志、ファージディスプレイ法を用いた GA-pyridine に対して高い結合活性を示す一本鎖抗体のスクリーニング、第 35 回日本分子生物学会年会、2012. 12. 11、マリンメッセ福岡 (福岡)

- ② 中原悠介、蓑毛 藍、諏訪喜昭、内田真希代、高木美智代、森岡弘志、ファージディスプレイ法を用いた GA-pyridine に特異的な一本鎖抗体の高機能化、2012. 12. 8、第 29 回日本薬学会九州支部大会、熊本大学薬学部 (熊本)
- ③ 高木美智代、諏訪喜昭、内田真希代、森岡弘志、タンパク質糖化反応により生成する翻訳後修飾体 GA-pyridine に特異的な抗体の分子認識機構、2012. 12. 8、第 29 回日本薬学会九州支部大会、熊本大学薬学部 (熊本)
- ④ 森岡弘志、低分子化合物を識別する抗体の分子認識メカニズム、第 19 回ファーマサイエンスフォーラム“バイオ医薬品の現状と未来”、2012. 7. 25、北海道大学薬学部(札幌)
- ⑤ 森岡弘志、低分子化合物を識別する抗体の抗原認識機構の解析から機能性分子の構築まで、第 35 回ナノ・バイオテクノロジー研究会、2012. 3. 16、名古屋工業大学(名古屋)
- ⑥ 高木美智代、諏訪喜昭、内田真希代、森岡弘志、タンパク質糖化反応により生成する GA-pyridine に特異的な抗体の分子認識機構の解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011. 12. 13、パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑦ 森岡弘志、低分子化合物を識別する抗体の抗原認識機構の解析、第 5 回薬学研究フォーラム in 東京 ~九州からの情報発信~、2011. 11. 14、日本薬学会長井記念会館 (東京)
- ⑧ 高木美智代、諏訪喜昭、内田真希代、森岡弘志、タンパク質糖化反応により生成する GA-pyridine に特異的な抗体の抗原認識機構の解析、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011. 6. 8、千里ホテル (大阪)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森岡 弘志 (MORIOKA HIROSHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20230097

##### (2) 研究分担者

諏訪 喜昭 (SUWA YOSHIAKI)  
熊本大学・薬学部・特任助教  
研究者番号：50516127

##### (3) 連携研究者 なし

##### (4) 研究協力者

伊藤 禎司 (ITOHI TELJI)  
株式会社 岸本医学研究所・苫小牧ラボ・  
主席研究員  
研究者番号：なし