

令和元年6月12日現在

機関番号：57403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06588

研究課題名(和文)ロイシンリッチリピートを分子骨格とした新規抗体の創出とその応用に関する基礎研究

研究課題名(英文) Design and basic reserch of novel antibody using Leucine Rich Repeat scaffold.

研究代表者

吉永 圭介 (Yoshinaga, Keisuke)

熊本高等専門学校・生物化学システム工学科・准教授

研究者番号：30513238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：通常の免疫グロブリンとは構造や抗原認識部位が異なる新規の抗体をロイシンリッチリピート骨格をもとに設計し、そのライブラリ構築をおこなった。抗体医薬やバイオ医薬品の探索候補となるライブラリの作製において、新たな作製手法を考案しその有用性をライブラリの作製とその性状評価により検証した。本法は複数の変異導入モジュールを1段階で導入する方法であり、操作の容易さ、ライブラリの質の維持しやすさの面から、とくにモジュール構造が繰り返されたタンパク質のライブラリ化に適している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、モジュール構造が繰り返されたタンパク質のライブラリ作製に適した方法を考案、検証した。変異導入モジュールを逐次多段階で導入する方法でみられた、操作の煩雑さ、ライブラリの質の劣化という問題を解決する新たな手法を考案し、実証した点で学術的意義は大きい。また本法は新たな抗体医薬、バイオ医薬の探索、発見に貢献できることから社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：A novel LRR antibody was designed based on LRR scaffold of human TLR3 protein. The designed antigen binding sites were constructed of several repetitive LRR modules. In this study, a novel library construction method for repetitive protein was designed. LRR antibody library was constructed and evaluated its properties. In this method, several randomized LRR modules were recombined to the phagemid vector in one step. This is easy method for construct repetitive protein library with retaining its diversity.

研究分野：抗体工学

キーワード：タンパク質のライブラリ化 ライブラリ構築法 モジュール構造を有するライブラリ 非免疫グロブリンのライブラリ化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

哺乳類をはじめとする有顎セキツイ動物は、免疫グロブリンを抗体および抗原レセプターとして使用し生体防御をおこなっている。免疫グロブリン以外のタンパク質をライブラリ化し、抗原に特異的結合可能な抗体様タンパク質の開発が創薬・タンパク質工学的側面から国際的におこなわれているが、国内ではそのような研究がおこなわれてこなかった。近年、ヤツメウナギなどの無顎セキツイ動物では免疫グロブリンでなくロイシンリッチリピート（LRR）を分子骨格とした VLR 抗体／抗原レセプター系が免疫系で使われており、免疫グロブリンとは異なる抗原認識機構の理解、あらたな創薬ツールとして注目され、いくつかのグループによりライブラリ化、抗原特異的クローンの単離と解析がおこなわれている。

申請者らはこれまでに免疫グロブリン抗体をはじめとして様々な分子をライブラリ化、改変することにより、様々な活性のある分子を開発して来た。今回、VLR 抗体の構造と抗原認識機構に着目し、ヒト生体での使用も視野に入れ、ヒトのタンパク質のなかから LRR 骨格を有し VLR と類似したタンパク質を選定・ライブラリ化し、有用な分子をスクリーニングする着想に至った。とりわけ、LRR は繰り返し構造を有し、抗原認識部位をモジュール化できるためクローンの改変や抗体工学的側面からも興味深い分子骨格である。

2. 研究の目的

本研究は、通常の免疫グロブリン(Ig)抗体とは認識機構を全く異にする分子を骨格にすることで、今までにない新しいタイプの抗体を創出し、免疫グロブリン抗体と同様に様々な分野で応用するための基礎的な研究をおこなうことが目的である。

本研究では、1)免疫系でパターン認識に用いられるロイシンリッチリピートからなるタンパク質を分子骨格に抗体ファージライブラリを設計・構築し、2)SPR センサーを応用した抗体クローン選別法を確立し、3)次世代型抗体としての特徴・応用について基礎的な研究をおこなう。

3. 研究の方法

(1) LRR 抗体ライブラリの設計

LRR モチーフを VLR 抗体として実際に生体防御に使っているヌタウナギ VLR と構造の類似している、ヒト TLR3 の膜外ドメインをもとに鋳型となる LRR 抗体遺伝子を設計した。VLR と TLR はともに LRR モチーフのタンデムな繰り返し構造を有しており、繰り返し構造は N 末端ドメイン(NT)と C 末端ドメイン(CT)によって挟まれている。抗原やリガンドとの結合には両者とも LRR モチーフが関与していることがわかっているため、NT と CT との間に多様な LRR モチーフを逐次組み込むことによりライブラリを構築する。TLR3 の NT と CT からなる TLR 鋳型遺伝子に、ランダム化した LRR モチーフを段階的に組み込み、LRR モチーフの数を次第に増やせるように、ランダム化する LRR モチーフの側鎖およびその組み込みに必要な鋳型遺伝子内の制限酵素サイトの設計をおこなった。

(2) LRR 抗体の発現解析

ライブラリ化する前に、鋳型となる LRR 抗体遺伝子を用いてファージ上での発現（提示）を ELISA 法およびウェスタンブロットティング法で解析した。大腸菌株による可溶性発現と発現分画についてもウェスタンブロットティング法で解析した。

(3) ファージ上における LRR 抗体の立体構造確認

ファージ上に提示された LRR 抗体が適切な立体構造を保持していることを確認するため、既知のモノクローナル VLR より抗原結合部位を移植した LRR 抗体を作製し、抗原への結合活性を ELISA 法で解析した。

(4) 設計変更とそれに伴うベクター改変

当初の設計を変更する事案が発生したため、新たな方式でライブラリ構築できるよう使用する制限酵素の変更やベクターの改変をおこなった。

(5) 新方式によるライブラリ構築と評価

新しい方式で各段階の条件検討を重ねながら実際にライブラリを作製した。構築したライブラリよりランダムにクローンの配列を解析し、設計通りの構築ができているかを評価した。

4. 研究成果

(1) LRR 抗体ライブラリの設計

ホモロジーモデリングモデルをもとに、LRR モチーフのうち溶媒に露出している側鎖を選定し、抗原結合部位を設計した。ランダム化した LRR モチーフを1つずつ逐次導入し、かつ任意の回数繰り返すことができるよう、使用する制限酵素の組み合わせを工夫した。設計した鋳型遺伝子は大腸菌発現用にコドンの最適化をおこない、遺伝子を人工合成しファージミドベクターへ組込んだ。

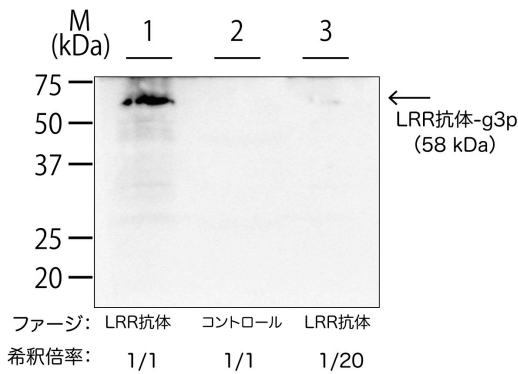


図 1 : ファージ上での LRR 抗体発現

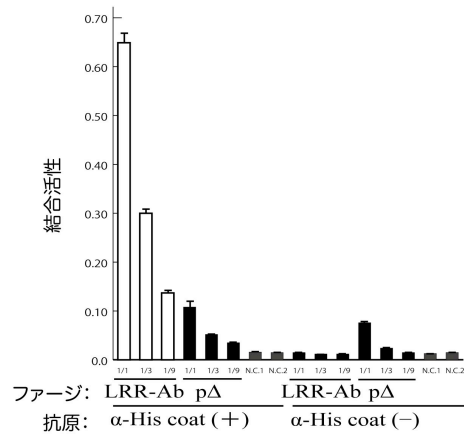


図 2 : ファージ表面での LRR 抗体発現(ELISA)

(2) LRR 抗体の発現解析

ランダム化する前の鑄型となる LRR 抗体を提示した M13 ファージを調製し、LRR 抗体の提示をウェスタンブロッティング法により解析し、目的の産物が目的の分子量で発現していることがわかった (図 1)。また、LRR 抗体の提示は抗 His タグ抗体を用いた ELISA 法によっても解析し、目的の産物がファージ表面に抗原とアクセスできる形で提示されていることがわかった (図 2)。さらに、非サプレッサー株における LRR 抗体の可溶性発現と発現する画分についても解析をおこなった。

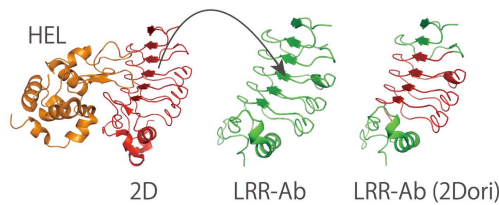
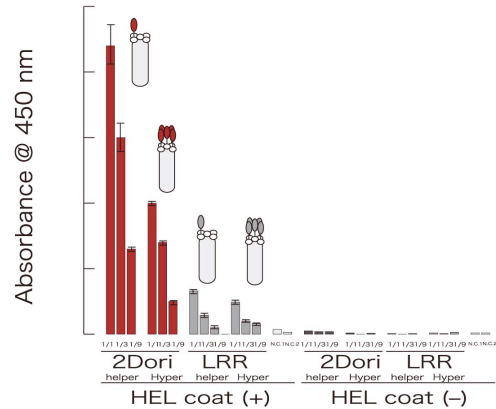


図 3 : 抗原結合部位の移植 (左) と HEL 結合能評価 (右)



(3) ファージ上の LRR 抗体の立体構造確認

本研究で設計した LRR 抗体は基本的に VLR 抗体と同じ構造を有している。卵白リゾチーム (HEL) に対する既知のモノクローナル VLR (clone 2D) より抗原結合に寄与する部位のみを LRR 抗体へ遺伝子レベルで移植したものを作製した (図 3 左)。ファージに提示後、ELISA 法により HEL 結合能を解析した (図 3 右)。HEL 抗原に濃度依存的に結合できたことから、ファージ上に提示された LRR 抗体が適切な立体構造を有していることを確認できた。また、VLR 抗体から有用な抗原結合部位を移植する抗体エンジニアリングが可能であることも示唆された。

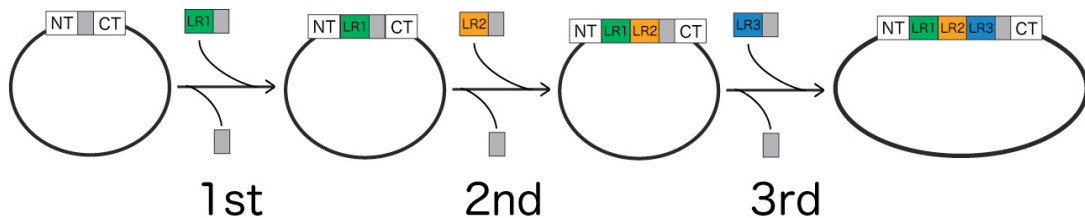


図 4 : LRR モチーフの逐次・多段階導入によるライブラリ構築

(4) ライブラリ構築法の変更

ランダム化した LRR モチーフを逐次・多段階で導入する方法では (図 4)、各段階で大腸菌への形質転換およびファージミド調製と制限酵素処理が必要であり、1:各工程での構成クローンのロスにより多様性の維持が困難であること、2:構築に多大な労力を要すること、が判明し、構築法の変更を余儀なくされた。

使用する制限酵素と切り口の構造を工夫し、あらかじめ 3 つの LRR モチーフを DNA リガーゼで連結し、目的通り連結できた産物のみを PCR で増幅・濃縮後、1 段階でベクターに導入する構築法を開発した。それに伴いベクターの改変をおこなった。

(5) 新方式によるライブラリ構築と評価

ランダム化した LRR モチーフを、末端の切り口配列が異なる 3 種 (LR1-LR3) 準備し、3つのモチーフをあらかじめ DNA リガーゼで連結した。目的の数、方向で連結した産物のみが増幅できるような PCR で、目的産物を濃縮した。目的産物を精製後、両端を制限酵素で切り口をつくり、1段階でファージミドベクターに組込むことで中程度 ($\sim 10^6$) のライブラリを構築した (図5)。

ライブラリより数十クローンをランダムに選び、DNA シークエンシングをおこなったところ、目的通り LRR モチーフのランダム化ができており、解析したなかには同一配列のクローンは存在しなかった。

本法で LRR 抗体のライブラリ化が十分にで

きることが判明し、今後本法をスケールアップし、より大きなサイズのライブラリ ($\sim 10^9$) を構築し、モデル抗原によるスクリーニングをおこなう予定である。

本研究では、当初計画のライブラリ構築法を大幅に変更したが、変更に伴い新しい方式を開発することができたのは大きな成果である。とくに繰り返し構造をランダム化するライブラリ構築に有用な方法と考えられ、抗体工学やタンパク質工学への応用が十分に期待される。また、開発した LRR 抗体ライブラリも新たな結合様式を有する抗体のソースとして活用が期待される。

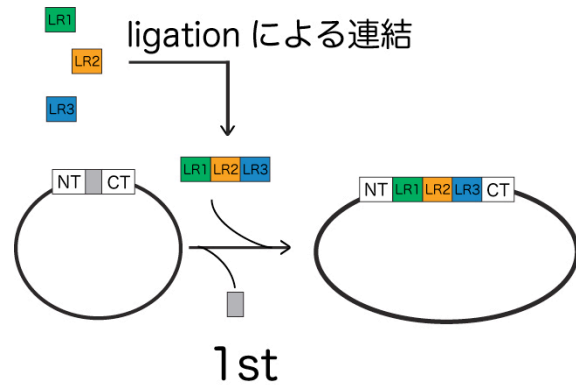


図5：1段階でライブラリ構築する方法

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計7件)

- ① Satoshi Morita, Keisuke Yoshinaga. The randomization method for construction of LRR antibody library. 第24回高専シンポジウム in Oyama, 2019
- ② 森田哲史 吉永圭介, 新規 LRR 抗体ライブラリ構築法の検討, 日本生化学会九州支部例会, 2018
- ③ 安部航平 森田哲史 吉永圭介, M13 フェージ上に提示された LRR 抗体の構造評価, 第27回高専シンポジウム, 2017
- ④ 森田哲史 安部航平 吉永圭介, M13 フェージ上における LRR 抗体の提示率制御の試み, 第27回高専シンポジウム, 2017
- ⑤ 安部航平 吉永圭介, LRR 抗体提示フェージの作製とその評価, 日本生化学会九州支部例会, 2017
- ⑥ 安部航平 吉永圭介, LRR 抗体フェージの HEL 結合活性の評価, 第26回高専シンポジウム, 2016
- ⑦ 安部航平 吉永圭介, LRR 抗体の M13 フェージ上での発現確認, 第25回高専シンポジウム, 2015

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：橋口 周平

ローマ字氏名：Shuhei Hashiguchi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：理工学域工学系

職名：助教

研究者番号 (8桁)：40295275

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。