

令和元年5月28日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08954

研究課題名(和文)抗体提示ファージの1ピリオン直接蛍光検出を機軸とする高性能変異抗体の効率的創製

研究課題名(英文)Efficient generation of high-affinity mutated antibodies based on a single virion direct fluorescence detection of antibody-displaying phage

研究代表者

大山 浩之(Oyama, Hiroyuki)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80572966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗体は標的の抗原分子に特異的に結合するため、体内診断薬・体外診断薬として広く活用され、病態検査に不可欠の機能性分子である。近年、遺伝子操作による変異抗体の創製が注目されているが従来の選択法には問題点が多い。本研究では、共焦点レーザー蛍光顕微鏡による1個の抗原特異的なscFv提示ファージ粒子の可視化と撮像に成功した。これにより、ライブラリー中の改良クローンを顕微鏡下で「直接」検出し単離することが可能視され、ファージ提示法の抜本的な改善がなされるものと期待される。さらに、アレイ型のスクリーニング法へ展開し、高親和力抗体提示ファージの迅速・効率的な単離法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子操作による変異抗体の創製には抗体提示ファージライブラリー法が活用される。希少な改良型分子種を、大量のジャンク抗体から選別しつつ単離するため「試験管内分子進化」ともいわれるが、実用的な変異抗体の取得は容易ではない。疎水的なファージ粒子の性質や、ファージに提示される抗体分子の割合(提示率)が低いことが問題であった。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡によってファージを可視化することで抗原特異的な抗体提示ファージを直接単離することが可能視された。また、これまで不明であった提示率を算出し、蛍光検出に用いた抗ファージ抗体によるアレイ型スクリーニング法を開発し、目的抗体の迅速な取得が期待される。

研究成果の概要(英文)：Antibodies specifically bind to target antigen molecules, and thus are widely used as in vivo and in vitro diagnostic agents, and are essential functional molecules for clinical examination. Recently, generation of antibody mutants by antibody-engineering has attracted attention, but there are many problems with conventional selection methods (panning). In this study, we have been succeeded in visualization of a single antigen-specific scFv-displaying phage using confocal laser fluorescence microscope. It will be possible to detect and isolate the improved clones in the scFv-displaying phage library "directly" under the confocal laser fluorescence microscope and it is expected that a drastic improvement of the phage display method will be made. Moreover, we developed into an array-type screening method and established a rapid and efficient isolation method for high affinity scFv-displaying phage.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗体工学 ファージ提示 scFv 共焦点レーザー顕微鏡 抗ファージ抗体

1. 研究開始当初の背景

抗体は標的の抗原分子に特異的に結合するため、体内診断薬・体外診断薬として広く活用され、病態検査に不可欠の機能性分子である。現在、診断用抗体は、多くの場合、マウスなどの動物を標的抗原で免疫したのち B 細胞ハイブリドーマ法で調製されている。しかし、得られる「天然の抗体」の性能（親和力や特異性）には限界がある。

近年、遺伝子操作による変異抗体の創製が、こうした制約の打破が可能と期待されている。抗体の抗原結合部位を構成する H 鎖および L 鎖の可変部ドメインの遺伝子にランダム変異を導入し、一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) を構築し、大腸菌などに発現させて多様な変異 scFv ライブラリーを調製する。この中から改良型分子種を効率よく選択・単離するために、「ファージ提示法」が活用される。「遺伝型-表現型一体化」を可能にする方法で、多様な変異 scFv を繊維状バクテリオファージ粒子の表面に発現させてファージ抗体の「ライブラリー」を作製し、ごく希少な改良型分子種を、大量に副生する「改悪分子種」から選別しつつ単離する。具体的には、目的の抗原を固定化した固相にファージライブラリーをまとめて反応させ、非特異的なファージを洗浄・除去したのちに抗原特異的なファージを固相から酸やアルカリで溶出・回収する。この手法はパンニングと呼ばれている。溶出ファージを大腸菌に感染・増幅させてパンニングを繰り返すことで原理的には *in vitro* で短期間に抗原特異的なファージクローンが濃縮されていく。それゆえ「試験管内分子進化」ともいわれるが、実用レベルの結合力・特異性を示す変異抗体の取得は、実際には困難を伴い、目的の達成に至らない場合も少なくない。申請者らは、ここ 10 年来、抗体の試験管内分子進化について研究を行ってきたが、目的抗体の取得を阻む最大の障害は、パンニングによる選別効率の悪さである。本法で用いられる繊維状ファージは疎水性が高く、パンニングの際には固相などに非特異的に吸着する性質を示す。そのため、非特異的ファージが洗浄操作により完全には除去されず、特異的ファージと同時に溶出されることで極微量の目的ファージの回収に支障をきたしてしまう。しかも、調製したファージ粒子のごく一部しか scFv を提示していないことが、特異的ファージを効率的に選択するうえでさらなる足枷となっている。これはファージ提示法の根本的な問題点ともいえる。その scFv 提示率は約 0.1 ~ 1% 程度と推定されているが、根拠は示されておらず、信憑性に乏しかった。

2. 研究の目的

本研究では、共焦点レーザー顕微鏡による 1 個 (1 ビリオン) の scFv 提示ファージ粒子の可視化と撮像を機軸として、ライブラリー中の改良クローン選択における抜本的解決を試みる。scFv 提示ファージを選択的に検出するため、(1) モノクローナル抗ファージ抗体および蛍光標識した抗ファージ scFv を用いてファージ粒子を可視化し、(2) 蛍光標識抗原 (モデル抗原としてコルチゾール: CS) を用いて抗原特異的なファージの特定を可能にしてこれまで算出することが事実上不可能だった scFv 提示率を求め、顕微鏡下で特定した scFv 提示ファージを選択的に回収する。以上により、ライブラリー中に存在する極微量の高性能変異抗体クローンを顕微鏡下で「直接」検出し単離することが可能視され、ファージ提示法の抜本的な改善がなされるものと期待される。さらに、(3) アレイ型のスクリーニング法へ展開し、高親和力抗体提示ファージの迅速・効率的な単離法を確立する。

3. 研究の方法

(1) マウスモノクローナル抗ファージ抗体および野生型抗ファージ一本鎖 Fv フラグメントを用いるファージ粒子の可視化

CS に対する scFv を提示したファージを調製し、ポリエチレングリコールにより沈殿精製したのち、抗ファージ抗体を予め固定化したスライドガラスのチャンバーに加えた。洗浄後、抗ファージ scFv を反応させたのち、その C 末端に付加した FLAG 配列に反応する Alexa Fluor 488 標識抗 FLAG 抗体を順次反応させた。洗浄後、Zeiss LSM700 共焦点レーザー顕微鏡でチャンバーを観察した。

(2) ビオチン化コルチゾール-BSA およびビオチンと蛍光色素で二重標識した β -ガラクトシダーゼを用いる scFv の可視化

(1)と同様に CS に対する scFv を提示したファージをチャンバー内に固定化したのち、

自作したビオチン化 CS-BSA 結合体を反応させた。ここへビオチンと Alexa Fluor 555 で二重標識した β -ガラクトシダーゼを予めストレプトアビジンで架橋した複合体を加え、ビオチン化 CS-BSA 結合体を染色した。洗浄後、Zeiss LSM700 共焦点レーザー顕微鏡でチャンバーを観察した。

(3)アレイ型選択による高親和力 scFv 提示ファージの単離

方法(1)(2)で確立した観察条件からスライドガラス上の CS 特異的なファージの回収を想定していたが、顕微鏡の視野を手作業で探索する方法は現実的ではなく、機械による自動化が望まれた。そこで、自作した抗ファージ抗体を応用する抗原特異的な scFv 提示ファージのマイクロアレイ型スクリーニングを試みた。

変異 scFv 遺伝子を導入した大腸菌ライブラリーを寒天培地上でコロニー分離し、予め CS-BSA 結合体を固定化したマイクロウェル内でヘルパーファージ存在下に培地中で個別に培養し、CS 特異的な scFv 提示ファージを捕捉する。未反応物を洗浄除去し、自作した *Gussia luciferase* 標識抗ファージ scFv を加えて固相のファージを発光検出した。高いシグナルを示したウェルからファージを回収し、再増幅したのち CS 結合能を ELISA により評価した。

4. 研究成果

(1) マウスモノクローナル抗ファージ抗体および野生型抗ファージ一本鎖 Fv フラグメントを用いるファージ粒子の可視化

CS に対する scFv を提示したファージを 1×10^7 cfu から 1×10^9 cfu に希釈してチャンバーに捕捉したのち、Alexa Fluor 488 にもとづく緑色蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、得られた蛍光点を Image J で画像化して算出した。添加したファージの用量依存的な蛍光点の増減が認められ、ファージを添加しないウェルでは緑色蛍光は全く観測されなかった(図1)。

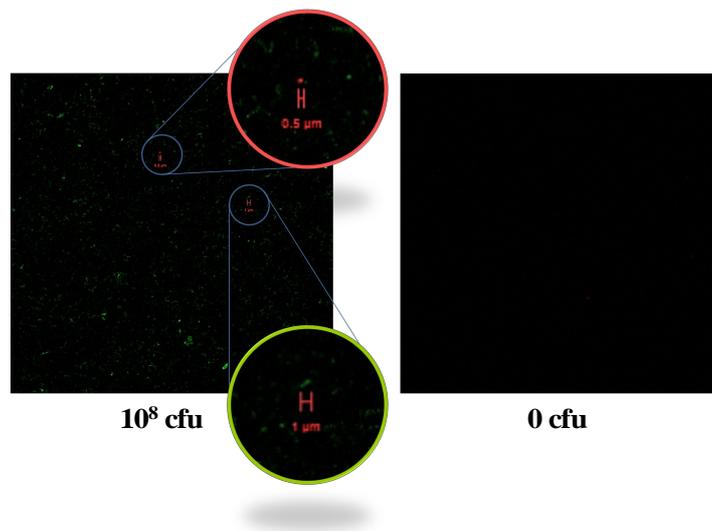


図1. scFv 提示ファージの観察

(2)ビオチン化コルチゾール-BSA およびビオチンと蛍光色素で二重標識した β -ガラクトシダーゼを用いる scFv の可視化

各チャンバーを無作為に4回観察したのち、(1)と同様に Alexa Fluor 555 にもとづく蛍光点を Image J により算出した。scFv を染色している赤色蛍光は 10^8 cfu のファージを添加したウェルで 6.9 個、ファージ 0 cfu では 2.2 個であった。一方、(1)での緑色蛍光はそれぞれ 2538.5 個、0.16 個であった。この結果から、ファージを添加したチャンバーの蛍光数からバックグラウンドで観測された蛍光数を減じて、赤色蛍光粒子数/緑色蛍光粒子数の比を求めたところ、 $0.18 \pm 0.064\%$ であり、従来の提示率の推定値とされている 0.1~1% に近い値が得られた。

(3)アレイ型選択による高親和力 scFv 提示ファージの単離

クローニングしたマウス抗 CS 抗体の可変部からなる野生型 scFv (WT) の遺伝子を鋳型とし、error-prone PCR により scFv 全長にランダム変異を導入した。これを大腸菌に導入し、寒天培地上に形成されたコロニー (計 9400) を用いた。強い発光シグナルを示した 40 ウェルからファージを回収し、再増幅したのち競合 ELISA に付したところ、7 種のクローンが WT 提示ファージより高い感度を示した。これらを可溶性タンパク質として調製し、³H 標識 CS を用いる Scatchard 法により結合定数 K_a を求めた。4 種のクローンは WT ($3.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) よりも 15 倍以上も大きな結合定数を示し、変異体#18 ($1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) では 41 倍もの改善が認められた

アレイ型選択法は従来のパンニングに比べ、1 回の選択操作で迅速に親和力の向上したクローンが複数得られたことから、ファージ提示ライブラリー法による有用な改変タンパク質の確実な創出法として期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Yui Kanda, Mayumi Yasuo, Aya Ito, Masahiro Toyota, Yoshinori Hayashi, Takeshi Yokoyama, Norihiro Kobayashi, Enantioselective Monoclonal Antibodies for Detecting Ketamine to Crack Down on Illicit Use, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 41(1), 2018, 123-131.

DOI : 10.1248/bpb.b17-00762

Yuki Kiguchi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Emiko Katayama, Masatoshi Fujita, Mai Narasaki, Aiko Yokoyama, Norihiro Kobayashi, Antibodies and Engineered Antibody Fragments against M13 Filamentous Phage to Facilitate Phage-Display-Based Molecular Breeding, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 41(7), 2018, 1062-1070.

DOI : 10.1248/bpb.b18-00162

Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Tomomi Morishita, Sakiko Fukushima, Yuki Nishimori, Toshifumi Niwa, Norihiro Kobayashi, A Single-Step "Breeding" Generated a Diagnostic Anti-cortisol Antibody Fragment with Over 30-Fold Enhanced Affinity, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40(12), 2017, 2191-2198.

DOI : 10.1248/bpb.b17-00633

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Mayumi Yasuo, Kazuhisa Matsuda, Kengo Katagi, Aya Ito, Hiroka Tatsuda, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, Norihiro Kobayashi, Antibody Fragments for On-Site Testing of Cannabinoids Generated via in Vitro Affinity Maturation. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40(2), 2017, 174-181.

DOI : 10.1248/bpb.b16-00669

Hitoshi Kimura, Shiho Mikawa, Chiharu Mizuguchi, Yuki Horie, Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Takashi Ohgita, Kazuchika Nishitsuji, Atsuko Takeuchi, Sissel Lund-Katz, Kenichi Akaji, Norihiro Kobayashi, H. Saito, Immunochemical Approach for Monitoring of Structural Transition of ApoA-I upon HDL Formation Using Novel Monoclonal Antibodies. *Sci. Rep.*, 査読有, 7, 2017, 2988.

DOI : 10.1038/s41598-017-03208-8

Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Erika Banzono, Kasumi Ishii, Satoshi Kubo, Yoshiro Watanabe, Anna Hirai, Chiaki Kaede, Mitsuhiro Ohta, Norihiro Kobayashi, One-Shot in Vitro Evolution Generated an Antibody Fragment for Testing Urinary Cotinine with More Than 40-Fold Enhanced Affinity, *Anal. Chem.*, 査読有, 89(1), 2017, 988-995.

DOI : 10.1021/acs.analchem.6b04332

[学会発表](計 10 件)

森川 真衣, 中野 明日香, 木口 裕貴, 大山 浩之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 高親和力変異 scFv の創製におけるアレイ型選択法の有用性、日本薬学会第 139 年会、2019
中野 明日香, 森川 真衣, 木口 裕貴, 大山 浩之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 低 off-rate 指向アレイ型選択法による高親和力変異抗体の効率的単離、日本薬学会第 139 年会、2019

池田 穂高, 片木 謙吾, 宮脇翔大, 大山 浩之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 共焦点レーザー顕微鏡による scFv 提示ファージの可視化、日本薬学会第 139 年会、2019

木口 裕貴, 大山 浩之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 抗体の試験管内親和性成熟を迅速化する酵素融合型抗ファージ scFv の作製、日本薬学会第 139 年会、2019

大山 浩之, 木口 裕貴, 森田 いずみ, 小林 典裕, 新規な酵素融合型 scFv を活用する繊維状ファージのサンドイッチ ELISA、日本分析化学会第 67 年会、2018

小林 典裕, 大山 浩之, 森田 いずみ, 木口 裕貴, 新世代の高性能イムノアッセイを目指す「抗体育種」、日本分析化学会第 67 年会、2018

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, and Norihiro Kobayashi, In vitro affinity maturation of a single-chain Fv fragment for on-site testing of cannabinoids, European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017

Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Toshifumi Niwa, and Norihiro Kobayashi, Utility of Gaussia luciferase as a fusion partner with scFvs for bioluminescent immunoassays testing clinical biomarkers, European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017

大山浩之, 森田いずみ, 松田 和久, 片木 謙吾, 小林典裕, 田中宏幸, 森元聡, 抗 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール一本鎖 Fv フラグメントの作製と試験管内親和性成熟、日本法中毒学会第 36 年会、2017

大山浩之, 森田いずみ, 松田 和久, 伊藤 綾, 小林典裕, 大麻成分の検出を目的とする抗 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール scFv の試験管内親和性成熟、日本分析化学会第 65 年会、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 典裕

ローマ字氏名：(KOBAYASHI NORIHIRO)

所属研究機関名：神戸薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90205477

研究分担者氏名：森田 いずみ

ローマ字氏名：(MORITA IZUMI)

所属研究機関名：神戸薬科大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：20299085

(2)研究協力者