

機関番号：24403

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200033

研究課題名（和文）試験管内進化によるマイクロ抗体の創出

研究課題名（英文）Generation of MicroAntibody by directed evolution

研究代表者

円谷 健 (TSUMURAYA TAKESHI)

大阪府立大学・理学系研究科・准教授

研究者番号：00372855

研究成果の概要（和文）：

本研究では、タンパク質構造構築理論と試験管内進化とを組み合わせ、抗体の機能をダウンサイジングした。すなわち、抗体タンパク質とは全く異なるモチーフをもつペプチドのライブラリーを構築し、抗体に代わる分子プローブや分子標的医薬を開発した。本研究で提案する特定の標的抗原に対して特異的に結合するヘリックス・ループ・ヘリックス構造を有するペプチドを「マイクロ抗体」と名付けた。マイクロ抗体ライブラリーを用いてヒトマウス IgG-Fc やオーロラキナーゼに特異性を示すマイクロ抗体を獲得した。また、マイクロ抗体の抗原性や安定性について検討した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have developed a method to downsize the antibody by the combination of structure-design of proteins and directed evolution. We have constructed a library of alternative-binding peptide with non-immunoglobulin domain to develop molecular probe and molecular targeting drug. The helix-loop-helix peptide, which binds to specifically target molecules, is named as "MicroAntibody". We have constructed a library of MicroAntibody to generate human IgG-Fc-specific peptides and Aurora kinase-specific peptides. We also studied immunogenicity and stability of MicroAntibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
年度			
年度			
総計	25,400,000	7,620,000	33,020,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ペプチド, コンビナトリアル化学, ポストゲノム創薬, マイクロ抗体, 分子プローブ, 分子標的医薬, ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

新しいタンパク質を単離した研究者が、最初に考えることは、標的タンパク質に対する抗体を入手することである。抗体を使った免疫染色法により、標的タンパク質の発現量や

発現部位を同定することができる。しかしながら、抗体は、多数のジスルフィド結合を含む巨大タンパク質であるため、抗体を細胞内で機能させることができず、生細胞内におけるタンパク質の動的解析（センシングやコン

トロール)には利用できない。そこで、近年、免疫システムにおける抗体産生の過程(多様性と選別)を試験管内で再現して、比較的分子量の人工タンパク質を作り出す研究分野に注目が集まっている。これは「試験管内進化」と呼ばれ、現在、様々な関連技術の開発が活発に行われている。我々は、早くから本研究分野に取り組んでおり、免疫システムが持つ抗体タンパク質の多様性を利用して、テラーメイド人工酵素である「抗体酵素」を開発してきている。また、試験管内進化の主要技術であるファージ表面提示ディスプレイ法を利用して、抗体の基質特異性の改良や抗体の結合活性の最適化に成功している。このような経験を生かし、本研究では、試験管内進化により、次世代抗体として「マイクロ抗体」の開発を行う。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の構造構築理論と試験管内進化とを組み合わせ、抗体の機能をダウンサイジングすることを目的とする。すなわち、抗体タンパク質とは全く異なる構造モチーフをもつ人工マイクロ抗体の分子ライブラリーを構築し、免疫システムにおける抗体の多様性と選別の機能を試験管内で再構築して、抗体に代わる分子プローブや分子標的医薬の開発を行う。本研究で提案する特定の標的抗原に対して特異的に結合するペプチドを「マイクロ抗体」と名付ける。このマイクロ抗体は、強固な立体構造を持つペプチド(分子量:3000~5000)で、ヒトに投与しても安定であり、かつ低分子量のため抗原性を示さない。

また、近年古典的な遺伝学手法の欠点を補う方法として、特定のタンパク質に特異的に結合するリガンド分子を用いて、細胞機能を変えたり停止させたりする化学的分子生物学(Chemical Biology)が注目されている。本研究で開発するマイクロ抗体は、タンパク質-タンパク質相互作用を制御するリガンド分子(促進的あるいは抑制的リガンド)として機能するため、これらのリガンドを用いて、タンパク質-タンパク質相互作用をコントロールすることが可能となる。このことにより、生命秩序に関して従来の分子遺伝学的手法では得ることのできなかった、新しい知見を手に入れることができる。

3. 研究の方法

マイクロ抗体は3つの領域で構成される。[①N末端ヘリックス(14アミノ酸残基からなる構造支持領域)、②ループ(グリシン7残基からなるリンカー)、③C末端ヘリックス(14アミノ酸残基からなるライブラリー領域)]。これまでに、ファージ表面提示法によってC末端ヘリックス外側のアミノ酸をラ

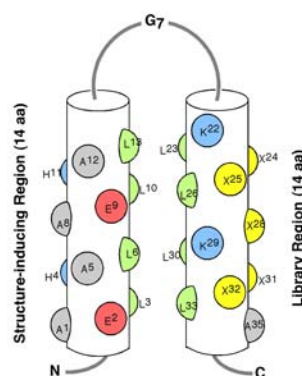


図1. マイクロ抗体ライブラリー:ヘリックス・ループ・ヘリックス構造を土台にして、X部分をランダム化したライブラリーを構築する。

ンダム化したマイクロ抗体ライブラリーを構築し(図1,ライブラリーサイズ: 1.5×10^7),マウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体に対してスクリーニングしたところ、受容体結合性のマイクロ抗体1AAが得られている。

(1) マイクロ抗体の生体内安定性の向上

① G-CSF受容体結合性マイクロ抗体の最適化

本研究ではまず、G-CSF受容体マイクロ抗体の試験管内進化を再検討し、さらにヘリックス構造の安定化を検討しマイクロ抗体の生体内における安定性を向上させた。

② マイクロ抗体の立体構造安定性

立体構造の安定性を検討するために、P8-2KAおよび分子内架橋した2種類のペプチドについてCDスペクトルを測定した。

③ マイクロ抗体の受容体結合活性

P8-2KAおよび分子内架橋した2種類のマイクロ抗体とG-CSF受容体との結合活性を表面プラズモン共鳴法で測定した。

④ マイクロ抗体の血清中安定性

マイクロ抗体の血清中安定性を、以下に示す4種類のペプチドを用いて検討した。

- P8-2KA half (P8-2KAのC-helixのみ)
- P8-2KA
- P8-2KA-S (ジスルフィド)
- P8-2KA-S (チオエーテル)

⑤ マイクロ抗体の抗原性

マイクロ抗体P8-2KA-S(ジスルフィド)をBSAおよびKLHに結合させた複合体を調製し、これをマウスに投与し、血清中の抗マイクロ抗体の産生をELISA法により調べた。

(2) イムノグロブリンG-Fc領域結合性マイクロ抗体の獲得と機能解析

ヘリックス・ループ・ヘリックスペプチド

のC末端ヘリックスにおける5残基のアミノ酸をランダム化(図1)させたマイクロ抗体をファージのpIIIタンパク質に提示させたマイクロ抗体ファージライブラリーを作製し、ヒトIgG-Fcに対してバイオパンニングを行い、IgG-Fc結合性ペプチドのスクリーニングを行った。得られたIgG-Fc結合性マイクロ抗体についてチオレドキシン融合マイクロ抗体として大量調製し、IgG-Fcに対する結合活性を測定した。さらに、IgG-Fc結合性マイクロ抗体を化学合成し、立体構造の安定性および結合活性を測定した。

(3) Aurora キナーゼ A 結合性マイクロ抗体の獲得と機能解析

① ループライブラリーの構築

これまで構築したヘリックス・ループ・ヘリックス構造のループ領域に着目し、新規ペプチドライブラリーを構築した(図2)。ファージディスプレイ法を用いてループライブラリーを構築した。遺伝子工学的にオリゴヌクレオチドバリエーションをPCR法を用いて構築し、制限酵素処理後、ファージミドベクターpComb8に導入した。ファージミドを大腸菌XL1-Blueにエレクトロポレーション法により導入し、VCSMヘルパーファージを感染させて、目的のペプチド(マイクロ抗体)をコートタンパク質pVIIIに提示したファージライブラリーを作製した。

② ループライブラリーの Aurora キナーゼ A

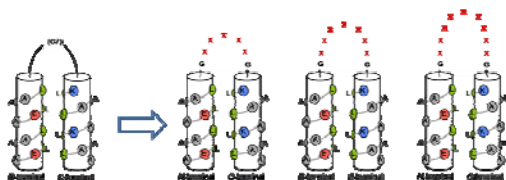


図2. 新規ループライブラリー

に対するバイオパンニング

上記で作製した、ループ・マイクロ抗体ライブラリーをAurora キナーゼ A に対してバイオパンニングを行い、Aurora キナーゼ A 特異的マイクロ抗体の獲得を検討した。

4. 研究成果

(1) マイクロ抗体の生体内安定性の向上

① G-CSF 受容体結合性マイクロ抗体の最適化

G-CSF 受容体結合性マイクロ抗体 1AA ($K_d = 53 \mu\text{M}$) の C-末端ヘリックスを構成する各アミノ酸残基を、アラニン残基に置換したペプチドを合成した。各ペプチドの特性を調べることで、G-CSF 受容体への結合やヘリックス構造形成における各アミノ酸残基の特性について検討した。その結果をもとに、1AA の C-末端ヘ

リックスの6アミノ酸残基をライブラリー化したペプチドライブラリーを構築した。ペプチドをファージの pIII コートタンパク質に提示させたファージライブラリーを用いて、G-CSF 受容体を用いてバイオパンニングを行い、新たに結合活性の向上したマイクロ抗体 P8-2 を得た ($K_d = 3.2 \mu\text{M}$)。次に、マイクロ抗体 P8-2 のヘリックス構造を安定化させるためアミノ酸置換すると、親和性が 14.7 倍向上したマイクロ抗体 P8-2KA ($K_d = 214 \text{ nM}$) を獲得することができた。さらに、ヘリックス構造を安定化させるため分子内ジスルフィド結合を持つマイクロ抗体 P8-2KA-S (ジスルフィド) を合成した。また、ジスルフィド結合は細胞内の酸化還元状態により、分子内架橋が切断される可能性が考えられる。そこで、P8-2KA に生体内でより安定なチオエーテル結合を分子内架橋に導入してマイクロ抗体 P8-2KA-S (チオエーテル) を合成した (図3)。

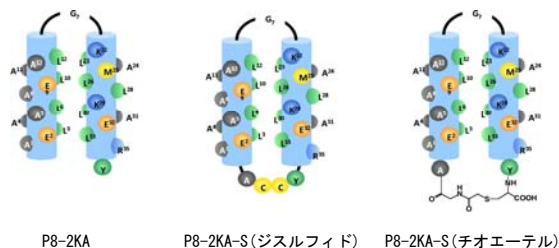


図3. 分子内架橋マイクロ抗体の合成

② マイクロ抗体の立体構造安定性

マイクロ抗体の CD スペクトルを測定した結果、分子内架橋の導入によりマイクロ抗体の立体構造は安定化することが明らかとなった。また、ジスルフィド結合を有するマイクロ抗体はチオエーテル結合を有するマイクロ抗体と比較して、ヘリックス構造をより安定化することが判明した。

③ マイクロ抗体の受容体結合活性

結合活性を表面プラズモン共鳴で測定したところ、分子内架橋の導入によって、G-CSF 受容体に対する結合活性が上昇した。また、ジスルフィド結合とチオエーテル結合では、 K_d はジスルフィド結合が 1.7 nM に対して、チオエーテル結合は 3.6 nM となり、ほぼ同等の結合活性を示した。

④ マイクロ抗体の血清中安定性

マウス血清中における4種類のペプチドの安定性を検討した。その結果、立体構造を有する P8-2KA では立体構造をもたない P8-2KAhalf と比べて、血清中での安定性は向上することが明らかとなった。特に、チオエーテル結合を有するマイクロ抗体はジスル

フィド結合を有するマイクロ抗体よりも半減期が約2倍となることが判明した(図4).

⑤マイクロ抗体の抗原性の検討

マイクロ抗体-KLH縮合体+アジュバントを免疫したマウスについては、非常に高い血

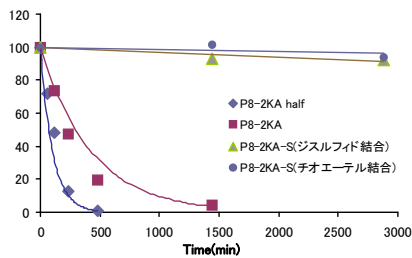


図4.マイクロ抗体の血清中での安定性

中抗体価が観測された。また、マイクロ抗体+アジュバントを免疫したマウスは、弱い血中抗体価の上昇が見られたが、マイクロ抗体飲みを免疫した場合には、全く抗体価の上昇は観測されなかった。これらの結果より、マイクロ抗体は、単独では抗原性を示さないものと考えられる。

(2)イムノグロブリンG-Fc領域結合性マイクロ抗体の獲得と機能解析

ファージライブラリー(ライブラリーサイズ 1.6×10^6)をプレート上に固定化させたヒトIgG-Fcに対してスクリーニングした。ヒトIgG-Fcをマイクロタイタープレート上に固定化し、これに対してバイオパンニングを行い、ヒトIgG-Fcに親和性を示す2種類のファージクローンHYKTQ ($K_d = 133 \mu\text{M}$)およびETRQR ($K_d = 37.2 \mu\text{M}$)を得た。さらに高活性なETRQRはヒトIgG-Fcに対して特異的に結合することが明らかとなった。

(3)Aurora キナーゼ結合性マイクロ抗体の獲得と機能解析

①ループライブラリーの構築

ヘリックス-ループ-ヘリックスペプチドのループ部分の長さの異なる3種のライブラリーを構築した。

1) L-lib

(AELAALAEELAALAE-GXXXXXG-KLAALKAKLAALKA)

2) L-lib9

(AELAALAEELAALAE-GXXXXXXXXXG-KLAALKAKLAALKA)

3) L-lib11

(AELAALAEELAALAE-GXXXXXXXXXXG-KLAALKAKLAALKA)

3種類のファージ表面提示ライブラリーのライブラリーサイズは、L-lib, L-lib9, L-lib11それぞれについて目標であったライブラリーサイズ $>10^7$ を確保した。

②ループライブラリーの Aurora キナーゼ A に対するバイオパンニング

プレートに固定化したオーロラ A に対してバイオ・パンニングを4ラウンド行った結果、オーロラキナーゼ A 結合性ファージクローンが獲得された。獲得した多数のクローンの中から任意に選択してDNA配列を確認して72クローンの同定を行った。そのうち任意に選択した52クローンを用いてファージELISAを行い、オーロラキナーゼ A に対する結合活性を調べた(図5)。その結果、オーロラキナーゼ A 結合性ファージクローンが獲得できたものと結論付けた。

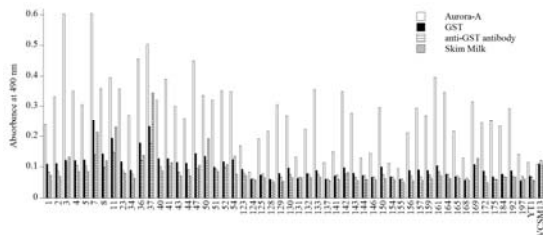


図5. オーロラキナーゼ A 結合性クローンの同定

ファージ ELISA により同定したオーロラ A 結合性ファージクローンが遺伝的にコードしているマイクロ抗体を化学合成した。これらマイクロ抗体を用いてIMAP法によるキナーゼ活性阻害試験を行った(図6)。マイクロ抗体1, 54, 128について濃度依存的にオーロラキナーゼ A 活性を阻害することが確認できた。最も阻害活性の大きかったマイクロ抗体54について更に詳細を検討した。マイクロ抗体54のループ部位由来の11-merペプチドはオーロラキナーゼ A のキナーゼ活性を阻害しなかった。このことから、マイクロ抗体のHLH構造はペプチド54の阻害活性に必須であることが明らかとなった。

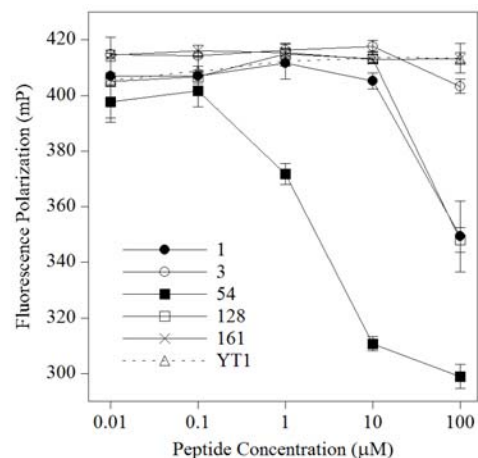


図6. オーロラキナーゼ A 阻害実験

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 15 件)

- ① M. Liu, M. Xu, X. J. Loh, H. Abe, T. Tsumuraya, I. Fujii, Y. Ito, PEGylated antibody in Organic Media, *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 564-568 (2011), 査読有.
- ② T. Kojima, S. Karasawa, A. Miyawaki, T. Tsumuraya, I. Fujii, Novel screening system for protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 397-401 (2011), 査読有.
- ③ M. Ui, Y. Tanaka, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, M. Hirama, K. Tsumoto, Structural and energetic hot-spots for the interaction between a ladder like polycyclic ether and the anti-ciguatoxin antibody 10C9Fab, *Mo. BioSyst.*, 7, 793-798 (2011), 査読有.
- ④ T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Hirama, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Pacific Ciguatoxins, *Toxicon*, 56, 797-803 (2010), 査読有.
- ⑤ D. Fujiwara, Z. Ye, M. Gouda, K. Yokota, T. Tsumuraya, I. Fujii, Selection of Inhibitory Peptide for Aurora-A Kinase from a Phage-displayed Library of Helix-Loop-Helix Peptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1776-1772 (2010), 査読有.
- ⑥ R. El-Haggar, K. Kamikawa, K. Machi, Z. Ye, Y. Ishino, T. Tsumuraya, I. Fujii, Molecular Design of Small Organic Molecules Based on Structural Information for a Conformationally Constrained Peptide that Binds to G-CSF Receptor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1169-1172 (2010), 査読有.
- ⑦ M. Oda, M. Saito, T. Tsumuraya, I. Fujii, Contribution of the trifluoroacetyl group in the thermodynamics of antigen-antibody binding, *J. Mol. Recogn.*, 23, 263-270 (2010), 査読有.
- ⑧ M. Inoue, N. Lee, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Hirama, Use of Monoclonal Antibodies as an Effective Strategy for Treatment of Ciguatera Poisoning, *Toxicon*, 53, 802-805 (2009), 査読有.
- ⑨ F. Ishikawa, T. Tsumuraya, I. Fujii,

A Single Antibody Catalyzes Multiple Chemical Transformations upon Replacement of the Functionalized Small Non-protein Components, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 456-457 (2008), 査読有.

- ⑩ T. Tsumuraya, I. Fujii, Molecular Basis for Transition-state Stabilization in Catalytic Antibodies, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 81, 1039-1052 (2008), 査読有.
- ⑪ M. Ui, Y. Tanaka, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, M. Hirama, K. Tsumoto, How protein recognizes ladder-like polycyclic ethers: interactions between ciguatoxin (CTX3C) fragments and its specific antibody 10C9, *J. Biol. Chem.* 19940-19947 (2008), 査読有.
- ⑫ T. Matsubara, M. Iida, T. Tsumuraya, I. Fujii, T. Sato, Selection of carbohydrate-binding domain with a helix-loop-helix structure, *Biochemistry*, 6745-6751 (2008), 査読有.
- ⑬ K. Tsumoto, A. Yokota, Y. Tanaka, M. Ui, T. Tsumuraya, I. Fujii, I. Kumagai, Y. Nagumo, H. Oguri, M. Inoue, M. Hirama, Critical Contribution of Aromatic Rings to Specific Recognition of Polyether Rings by Antibody: The Case of Ciguatoxin CTX3C and Its Specific Antibody 1C9, *J. Mol. Biol.*, 283, 12259-12266 (2008), 査読有.

[学会発表] (計 50 件)

- ① 藤井 将貴, 植田 淳子, 柴崎 誠司, 円谷 健, 藤井 郁雄, ヘリックス・ループ・ヘリックスペプチドの高効率スクリーニングをめざした酵母表面提示法の確立, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 年 6 月 17 日, 札幌コンベンションセンター (北海道).
- ② 川端 久美子, 西原 舞, 円谷 健, 藤井 郁雄, ヘリックス・ループ・ヘリックスペプチドライブラリーを用いたヒト免疫グロブリンG-Fc領域に結合する新規ペプチドの創出, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 年 6 月 17 日, 札幌コンベンションセンター (北海道).
- ③ Y. Fujii, Y. Ishino, T. Tsumuraya, I. Fujii, Biological Activities of G-CSF Receptor Binding Peptides, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009 年 11 月 10 日, Jeju, Korea.

- ④ Y. Ishino, Y. Fujii, T. Tsumuraya, I. Nakase, S. Futaki, I. Fujii, Cell Permeability of De Novo Designed Helix-loop-helix Peptides, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009年11月10日, Jeju, Korea.
- ⑤ 円谷 健, 抗体酵素の新展開, 第61回日本生物工学会大会, 2009年9月25日, 名古屋大学(愛知県).
- ⑥ R. El-Haggar, Z. Ye, Y. Ishino, K. Kamikawa, T. Tsumuraya, I. Fujii, 2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium, 2009年9月11日, 東京大学(東京都).
- ⑦ T. Tsumuraya, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Pacific Ciguatoxins, 2009 International Symposium and Annual Meeting, Recent Trends in Bioconvergence Technology, 2009年6月25日, Daejeon, Korea.
- ⑧ 斎藤 理恵, 円谷 健, 藤井 郁雄, ヘリックスルーラーヘリックスペプチドライブラリーを用いたRANKL結合ペプチドの探索, 第9回日本蛋白質科学会年会, 2009年5月21日, 熊本.
- ⑨ 円谷 健, 抗体を用いた高感度微量検出系の開発, 日本化学会第89春季年会, 2009年3月10日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県).
- ⑩ D. Fujiwara, Z. Ye, T. Tsumuraya, I. Fujii, Isolation of Protein Kinase Inhibitors from a Phage-displayed Library of Conformationally Constrained Loop Peptides, 4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering, 2008年11月22日, Seoul Korea.
- ⑪ Z. Ye, T. Tsumuraya, I. Fujii, A Disulfide-bridged Helix-Loop-Helix Peptide: Phage-displayed Library and Its Recombinant System, 4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering, 2008年11月22日, Seoul Korea.
- ⑫ M. Oguri, D. Fujiwara, Z. Ye, T. Tsumuraya, I. Fujii, A Conformation of the Loop Region in the De Novo Designed Helix-Loop-Helix Peptide, 12th Korean Peptide-Protein Society Symposium, 2008年11月21日, Seoul, Korea.
- ⑬ T. Tsumuraya, Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins, Ciguatera and Related Biotoxins Workshop, 2008年10月28日,

Noumea, New Caledonia.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: シガトキシン類 CTX1B および 54-デオキシ CTX1B を認識するモノクローナル抗体およびそれを用いるシガトキシン類検出キット

発明者: 藤井 郁雄, 円谷 健, 平間 正博, 山下 修治

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-226734

取得年月日: 2010年10月6日

国内外の別: 国内

名称: シガトキシン類を認識するヒト化抗体

発明者: 藤井 郁雄, 円谷 健, 山口 亜佐子, 平間 正博

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-70349

取得年月日: 2010年3月25日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://if.b.s.osakafu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

円谷 健 (TSUMURAYA TAKESHI)

大阪府立大学・理学系研究科・准教授

研究者番号: 00372855

(2) 連携研究者

藤井 郁雄 (FUJII IKUO)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号: 70189984