

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460709

研究課題名(和文) 進化分子工学を基盤とする新規な「抗体様」臨床検査薬の創製と応用

研究課題名(英文) Generation of "antibody-like" proteins based on evolutionary molecular engineering for novel clinical diagnostics

研究代表者

森田 いずみ (MORITA, IZUMI)

神戸薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20299085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体は、各種臨床検査に重用されているが、その結合部位はVHとVLの2つのドメインの間に構築される上、大腸菌内での発現量も低いため、遺伝子操作により機能を改変するうえで障害が大きい。そこで、分子量が小さく、標的分子の結合部位を単一のドメイン内に持ち、大腸菌内で高い発現率が得られる、新しい「抗体様」タンパク質の創製を試みた。ビオチン結合タンパク質であるストレプトアビジン(stav)の単量体に着目し、進化分子工学の手法によりランダム変異をもつループ構造を導入してstav変異体の分子集団(ライブラリー)を作製し、エストラジオールに特異的な結合能を示す分子種を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Antibodies are widely used in various clinical tests. However, lower expression levels in *E. coli* and their nature requiring two variable domains (VH and VL) for building the antigen-binding sites reduce their utility in genetic manipulation for generating improved species. Therefore, we attempted creation of new "antibody-like" proteins, which are composed of a single domain scaffold with much smaller molecular weight and can be expressed with a satisfactory yield in *E. coli*. We chose the biotin-binding protein, streptavidin monomer (stav), as the basic scaffold. After several steps of mutagenesis and selection for their loop structures protruding from the scaffold, we succeeded in obtaining stav' mutants that had gained novel binding specificities targeting a steroid, estradiol.

研究分野：分析化学

キーワード：進化分子工学

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、生命を維持するために無数の精緻な分子認識機構が常に働いている。抗原抗体反応はその代表例で、抗体という一群の機能性タンパク質が各々特定の化学構造(抗原決定基)を認識して捕捉し、その物質を的確に処理している。こうした生体内の機能性タンパク質は、医学・工学など様々な領域で利用価値が高い。そのため、それら自体の活用にとどまらず、その構造に改変を加えてさらに優れた機能をもつ人工分子種の創製が、1990代から試みられてきた。主に *in vitro* の実験系で短期間に改良型分子種を得ることから、「進化分子工学」ともよばれる研究領域である。「出発物質」である天然の抗体に、遺伝子レベルでランダム変異を加えた後に大腸菌などの宿主内で発現させて変異体の分子集団(ライブラリー)を調製し、その中から偶然に生成した改良型分子種(improved binder)を選択・単離するものである。遺伝子操作を容易にするために、抗体分子はそのH鎖とL鎖の可変部ドメイン( $V_H$ と $V_L$ )を連結した低分子量の一本鎖Fvフラグメント(single-chain Fv fragment; scFv)に変換される。また、大量に副生する「改悪分子種」の中らごく希少な改良分子種を効率よく単離するために、scFvをファージや酵母の表面に提示する、「遺伝型-表現型対応化」の手法が活用される。この手法により、高分子量のタンパク質抗原については、天然の抗体を上回る親和力を持つ変異体が数多く作製されている。しかし、ステロイド類、ビタミン類、合成医薬品など、分子量の小さい抗原(ハプテン)については成功例に乏しい。ハプテンの場合、分子サイズが小さいため、抗体パラトープのアミノ酸との接触点が少ないことが一因と考えられる。

ところで、抗体は上述のように優れた性能を持つが、抗原との結合には $V_H$ と $V_L$ の2つのドメインが必要であるうえ、大腸菌での

発現量に難がある。そこで近年、抗体より優れた機能をもつ「抗体様」結合タンパク質の創製が試みられている。目標とする性質は、単量体であり、安定で、複数の $\beta$ シートからなる枠組み構造と可動性に富むループ構造を併せ持ち、ループのアミノ酸組成に応じて多様な標的分子と結合することが可能で、大腸菌での大量発現が容易で、水溶性が高いことである。こうした要件を満たす母体タンパク質として、これまでに、リポカリン、ノッティン、ピリン結合タンパク質、トランスフェリンなどが有望視されている。そのループ領域にランダム変異を導入したライブラリーから、本来のリガンドとは大きく異なる低分子化合物(例えば、ジゴキシゲンやフルオレセイン)との結合能を獲得した新分子種が得られている。こうした成績を考慮すると、とくに低分子バイオマーカーを対象とするとき、抗体以外の母体タンパク質から得られるライブラリーは、より大きな可能性を秘めているものと期待される。申請者らは、免疫化学実験で汎用されるストレプトアビジン(stav)単量体に着目した。stavは *Streptomyces avidinii* が産生する4量体タンパク質( $M_r$  53,000)で、低分子リガンドであるビオチンと強い親和力( $K_a \sim 10^{15} M^{-1}$ )で結合する。その単量体の分子量は約13,250と小さく、枠組み構造とループ構造を併せ持ち、様々な低分子バイオマーカーと結合する新しい機能性タンパク質になりうるものと期待される。以上の観点から、臨床検査薬の新しい創製基盤の開発を目指して、stav単量体を母体とする変異体ライブラリーの構築を企画するに至った。

## 2. 研究の目的

抗体は、様々なバイオマーカーの化学構造を精密に認識し、強い親和力で結合するため、各種臨床検査に重用されてきた。しかし、その結合部位は $V_H$ と $V_L$ の2つのドメイン

の間に構築される上、大腸菌内での発現量も低いと、遺伝子操作により機能を改変するうえで障害が大きい。そこで、分子量が小さく、標的分子の結合部位を単一のドメイン内に持ち、大腸菌内で高い発現率が得られる、新しい「抗体様」タンパク質の創製を試みる。ビオチン結合タンパク質であるストレプトアビジン (stav) の単量体がこうした要素を満たす基本構造になりうると考え、進化分子工学の手法によりランダム変異をもつループ構造を導入して stav 変異体の分子集団 (ライブラリー) を作製し、様々なバイオマーカーに特異的な分子種の探索と臨床検査への応用を試みた。

### 3. 研究の方法

まず、4量体タンパク質である stav の単量体化を行うため、stav 単量体の遺伝子をクローニングし、4量体に会合するのを防ぐために、会合に係わるアミノ酸残基を部位特異的に変換した。その産物の構造は SDS-PAGE により確認した。次に、*in silico* 分子モデリングにより stav 単量体と低分子バイオマーカーとドッキングモデルを作製し、各分子が stav のどのループあるいはシートと相互作用するかを推定した。低分子マーカーとしては、卵胞ホルモンであるエストラジオール-17 ( $E_2$ ) などを取り上げた。その後、上記の分子モデリングで推定した  $E_2$  と接触しうる領域に遺伝子レベルでランダム変異を導入し、ファージ提示を行った。得られた変異 stav 提示ファージのライブラリーから、目標の  $E_2$  に特異的なクローンを探索した。さらに、可溶性 stav を調製して、その結合能を ELISA で検討した。

### 4. 研究成果

まず野生型 stav に T76R と V125R の部位特異的な変異を加え、単量体化を試みた。これらの変異がコードされ、3'末端に FLAG タグの配列が付加された変異型 stav 遺伝子を、合成

オリゴ DNA の over lap extension PCR により構築した。これを大腸菌内に発現させて、得られた変異型 stav タンパク質を SDS-PAGE に付した。POD 標識抗 FLAG 抗体をプローブとする Western Blotting を行ったところ、単量体 stav とほぼ同じ分子サイズを示すバンドが認められた。さらに、サイズ排除型カラムを装着した HPLC においても単量体 stav と同程度の分子量 (約 13,700) をもつ ribonucleaseA と同等の保持時間を示し、単量体化に成功したことが示された。引き続き、 $E_2$  と stav との *in silico* 分子モデリングを行ったところ、 $E_2$  は stav の 8 つの  $\beta$  シートのうち  $\beta_5$  と  $\beta_6$  の一部、そして  $\beta_1 - \beta_2$  間、 $\beta_3 - \beta_4$  間と  $\beta_5 - \beta_6$  間の 3 か所のループと接触することが示唆された。そこで、これらの 3 つのループのうちいずれか 1 つについて、連続する 3 つの残基にランダム変異を導入し、多様性に富む変異 stav' 遺伝子ライブラリー 3 種の作製を行った。これらについてファージ提示を行い、 $E_2$  に特異的なクローンの探索を行ったところ、 $E_2$ -BSA/BSA 比が 3.1 のファージクローンを単離することができた。さらに得られたクローンの未修飾のループに同様のランダム変異を加えた変異体ライブラリーを作製し、 $E_2$  に対してより特異的な分子種の探索を行った。その結果、さらに、 $E_2$  特異性が向上したと判断されるクローン 2 種 ( $E_2$ -BSA/BSA 比が 12.8, 8.7) が得られた。

### 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 6 件)

H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, S. Miyake, A. Moriuchi, T. Akisada, T. Niwa, N. Kobayashi, *Gaussia* luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers, *Anal. Chem.*, **87**(24), 12387-12395, 2015. 査読有.  
DOI:10.1021/acs.analchem.5b04015  
K. Kuwabara, K. Nishitsuji, K. Uchimura, S.-C. Hung, M. Mizuguchi, H. Nakajima, S.

Mikawa, N. Kobayashi, H. Saito, N. Sakashita, Cellular interaction and cytotoxicity of the Iowa mutation of Apolipoprotein A-I (ApoA-I<sub>Iowa</sub>) amyloid mediated by sulfate moieties of heparan sulfate, *J. Biol. Chem.*, **290**(40), 24210-24221, 2015. 査読有.

DOI: 10.1074/jbc.M115.652545

M. Ohta, A. Fujinami, N. Kobayashi, A. Amano, A. Ishigami, H. Tokuda, N. Suzuki, F. Ito, T. Mori, M. Sawada, K. Iwasa, J. Kitawaki, K. Ohnishi, M. Tsujikawa, H. Obayashi, Two chalcones, 4-hydroxy-derricin and xanthoangelol, stimulate GLUT4-dependent glucose uptake through the LKB1/AMP-activated protein kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes, *Nutrition Res.*, **35**(7), 618-625, 2015. 査読有.

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2015.05.010

R. Omura, K. Nagao, N. Kobayashi, K. Ueda, H. Saito., Direct detection of ABCA1-dependent HDL formation based on lipidation-induced hydrophobicity change in apoA- , *J. lipid Res.*, **55**(11), 2423-2431, 2014. 査読有. DOI: 10.1194/jlr.D049445

H. Oyama, S. Yamaguchi, S. Nakata, T. Niwa, N. Kobayashi, "Breeding" diagnostic antibodies for higher assay performance: A 250-fold affinity-matured antibody mutant targeting a small biomarker, *Anal. Chem.*, **85**(10), 4930-4937, 2013. 査読有. DOI: 10.1021/ac3037602

H. Oyama, E. Tanaka, T. Kawanaka, I. Morita, T. Niwa, N. Kobayashi, Anti-Idiotypic scFv-Enzyme Fusion Proteins: A Clonable Analyte-Mimicking Probe for Standardized Immunoassays Targeting Small Biomarkers, *Anal. Chem.*, **85**(23), 11553-11559, 2013. 査読有.

DOI: 10.1021/ac402868f

[学会発表] (計 20 件)

黒田 裕美, 森田 いずみ, 伊藤 綾, 小山 千尋, 池田 夏美, 大山 浩之, 小林 典裕, 「オンサイト分析を目的とする Teoc 化覚せいアミンに対するモノクローナル抗体の作製」日本薬学会第 136 年, 2016.03.28, パシフィコ横浜(横浜)

山本 知佳, 大山 浩之, 木口 裕貴, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「抗エストロジオール scFv 試験管内親和性成熟機構の解析(2)」日本薬学会第 136 年, 2016.03.28, パシフィコ横浜(横浜)

木口 裕貴, 藤田 真聡, 片山 恵美子, 大山 浩之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「高性能変異抗体の効率的単離を目的

とする抗ファージ抗体 scFv - GLuc 融合体の調製」日本薬学会第 136 年, 2016.03.28, パシフィコ横浜(横浜)

大山 浩之, 江浪 友理, 田川 達矢, 山本 知佳, 森田 いずみ, 小林 典裕,

「改良型抗エストロジオール scFv の親和性成熟機構の解析」日本分析化学会第 64 年会, 2015.09.11, 九州大学(福岡)

大山 浩之, 宮下 貴之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「scFv - ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いるチロキシン生物発光 ELISA の試み」日本分析化学会第 64 年会, 2015.09.11, 九州大学(福岡)

大山 浩之, 「試験管内親和性成熟による実用抗体の創製: 低分子バイオマーカーを例に」生物化学的測定研究会第 20 回学術シンポジウム, 2015.11.13, 神戸薬科大学(神戸)

Morita I., Oyama H., Kobayashi N., "Antibody breeding" for more sensitive immunoassay 2: Human urinary cotinine ELISA using an affinity matured scFv to monitor tobacco smoke exposure", *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015.06.22, Paris (France)

Oyama H., Kobayashi N., "Antibody breeding" for more sensitive immunoassay 1: Three-step affinity maturation generated an improves scFv suitable for serum estradiol -17 beta ELISA". *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, , 2015.06.22, Paris (France)

Oyama H., Kobayashi N., "Sensitive luminescent ELISA for human serum cortisol using a fusion protein combining anti-cortisol scFv and Gaussia Luciferase", *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015.06.22, Paris (France)

伊藤 綾, 安尾まゆみ, 竜田都加, 森田 いずみ, 大山 浩之, 小林 典裕, 「大麻成分に対するモノクローナル抗体の調製とキャラクタリゼーション」日本薬学会第 135 年, 2015.03.27, 神戸学院大学(神戸).

堀江 有紀, 土屋 沙織, 大山 浩之, 小林 典裕, 斎藤 博幸, 「アミロイドーシスの病態解明を目指した抗 ApoA-モノクローナル抗体の作製」日本薬学会第 135 年会, 2015.03.27, 神戸学院大学(神戸).

森田 いずみ, 西村 沙貴, 蓑田 早耶香, 木口 裕貴, 大山 浩之, 小林

典裕,「抗コチニン scFv の親和性成熟における部位特異的変異の効果」日本薬学会第 135 年会, 2015.03.27, 神戸学院大学(神戸).

大山 浩之, 江波 友理, 木口 裕貴, 森田 いずみ, 小林 典裕,「抗エストロジオール scFv 試験管内親和性成熟機構の解析」日本薬学会第 135 年会, 2015.03.27, 神戸学院大学(神戸).

森田 いずみ, 平井 杏奈, 西村 沙貴, 大山 浩之, 太田 光熙, 小林 典裕,「改良型変異 scFv フラグメントを用いるヒト尿中コチニンのモノクローナル ELISA」日本分析化学会第 63 年会, 2014.09.19, 広島大学(東広島).

大山 浩之, 三宅 沙也香, 森田 いずみ, 丹羽 俊文, 小林 典裕,「高感度ヒト血清中コルチゾール ELISA の開発を目的とする scFv-ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製」日本分析化学会第 63 年, 2014.09.19, 広島大学(東広島).

Morita I., Oyama H., Banzono E., Ohta M., Kobayashi N., ""Breeding" Diagnostic Antibodies: An Affinity-Matured scFv for Urinary Cotinine ELISA to Monitor Tobacco Smoke Exposure", *Fifth Annual PEGS Europe : Protein & Antibody Engineering Summit*, 2013.11.05, Lisbon (Portugal).

Oyama H., Niwa T., Kobayashi N., ""Breeding" Diagnostic Antibodies: A 250-Fold Affinity-Matured scFv Mutant for Measuring Human Serum Estradiol-17 $\beta$ ", *Fifth Annual PEGS Europe : Protein & Antibody Engineering Summit*, 2013.11.05, Lisbon (Portugal).

Kobayashi N., Oyama H., Morita I., Niwa T., "Anti-Idiotypic scFv-Enzyme Fusion Proteins Work as a Clonable Analyte-Mimicking Probe That Enables Standardization of Hapten Immunoassays", *Fifth Annual PEGS Europe : Protein & Antibody Engineering Summit*, 2013.11.05, Lisbon (Portugal).

大山 浩之, 森田 いずみ, 太田 光熙, 小林 典裕,「高親和力 scFv 融合タンパク質を用いるコルチゾールの高感度 ELISA」第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, 2013.08.30, あわぎんホール(徳島).

大山 浩之, 森田 いずみ, 太田 光熙, 小林 典裕,「試験管内親和性成熟 scFv を用いるヒト尿中コチニンの ELISA」生物化学的測定研究会第 18 回学術集会・総会, 2013.06.07, キャンパスプラザ京都(京都).

〔図書〕(計 1 件)

生物化学的測定研究会編(小林 典裕, 他)講談社, 免疫測定法 基礎から先端まで, 2014, 336

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 いずみ (MORITA, Izumi)  
神戸薬科大学・薬学部・助手  
研究者番号: 20299085

### (2) 研究分担者

小林 典裕 (KOBAYASHI, Norihiro)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90205477

### (3) 研究分担者

大山 浩之 (OYAMA, Hiroyuki)  
神戸薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 80572966