

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670280

研究課題名(和文)新しい低分子量機能性ドメイン群の創製と臨床化学への応用

研究課題名(英文)Generation and clinical application of low-molecular-weight functional domain proteins.

研究代表者

小林 典裕 (KOBAYASHI, NORIHIRO)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90205477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体は診断マーカーの高感度分析に必須であるが、分子量が大きく大腸菌内での発現量も低い。そこで、分子量が小さく大腸菌内で発現率が高い「リガンド結合ドメインタンパク質群」の創製を試みた。まず、抗体のH鎖可変部ドメイン(VH)を基本構造とし、相補性決定部H3のアミノ酸をランダム化したライブラリーを作製したが、実用的な変異体の取得には至らなかった。一方、単量体化したストレプトアビジンの3カ所のループ部位にin silico分子モデリングに基づいてランダム変異を導入したライブラリーを作製したところ、コルチゾールまたはエストラジオールに対して結合能を獲得した変異体をそれぞれ単離することができた。

研究成果の概要(英文)：Although antibodies are essential for trace characterization of diagnostic biomarkers, their high molecular weight and low expression levels in E.coli make it difficult to improve their functions by genetic engineering. To overcome these limitations, we planned generation of low-molecular-weight functional domain proteins. First, we made a molecular library, each member of which has the VH domain of an antibody as a fundamental structure and a randomized complementarity-determining region 3 loop, but any practical species could not be isolated. Then, another library based on the streptavidin monomer was produced. Three loop structures, which were supposed to contact with steroids by in silico modeling, were selected as the target of randomization. This library provided the species that were evaluated to have gained the ability to recognize and bind estradiol or cortisol.

研究分野：医歯薬学

キーワード：進化分子工学

### 1. 研究開始当初の背景

抗体は多様な抗原結合部位を持つタンパク質群で、特定の化学構造(抗原決定基)を認識して捕捉するため、臨床診断薬としての利用価値が高い。そこで、その構造に改変を加えてさらに優れた機能をもつ人工の分子種を創製する「抗体工学」が、1990年代から種々試みられてきた。「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適当な宿主内で発現させて変異抗体の分子集団(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(より優れた親和力や特異性を示す変異体クローン; improved binder)を選択・単離するものである。

この手法により、高分子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見られているが、ステロイド類、合成医薬品など、臨床化学的に重要な低分子抗原(ハプテン)については成功例に乏しい。抗体と抗原結合部位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が、抗体より優れた性能を持つ新しい「リガンド結合性ドメイン」を開拓するアプローチも試みられるべきであり、実際、少数ながら注目すべき成果が報じられていた。抗体は、抗原との結合に  $V_H$  と  $V_L$  の2つのドメインを必要とし、大腸菌での発現量が少ないことも難点である。したがって、単量体であり、安定で、複数の $\beta$ シートからなる安定な枠組み構造(スキヤッフールド)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、水溶性が高いことが望まれる。こうした要件を満たす母体タンパク質として、リボカリン、ノッティン、ピリン結合タンパク質などが有望視されてきた。

これに対して、申請者らは、抗体  $V_H$  ドメイン ( $V_{HD}$ ) とストレプトアビジン (stav) 単量体を母体タンパク質として着目した。 $V_{HD}$  は、ラクダ科動物がL鎖を持たない抗体を産生することの発見を契機として注目されたドメインである。Stav は *Streptomyces avidinii* が産生する4量体タンパク質で、低分子リガンドであるビオチンと極めて強い親和力で結合する。 $V_{HD}$ 、stav 単量体ともに分子量は $\sim 15,000$  と小さく、 $\beta$ シートからなる枠組み構造と標的分子との接触点となりうるループ構造を併せ持つ。したがって、様々な低分子バイオマーカーと結合する新しい機能性ドメインに改変しうるものと期待された。しかし、 $V_{HD}$ 、stav 単量体を基本骨格として用いる試みは報告されておらず、取り組む価値は高いと考えた。

### 2. 研究の目的

抗体は標的抗原に対して大きな親和性と特異性を示すため、様々な診断マーカーの高感度分析に利用され、近年では遺伝子操作による機能の改善も試みられている。しかし、抗原結合部位(パラトープ)を形成するためには2つのドメインが必要で、遺伝子操作の宿主である大腸菌内での発現量も低い。本研究の目的は、こうした抗体の根本的な難点の克服を目標として、抗体よりシンプルな構造を持つ全く新しいリガンド結合タンパク質群を創製することである。分子量が小さく、単一のドメイン内に土台となる枠組み領域と標的分子の結合部位として働くループ領域を併せ持ち、活性部位の遺伝子操作が容易で、大腸菌内で発現率が高いことが満たすべき要素である。申請者は、抗体の  $V_H$  ドメイン単独あるいはビオチン結合タンパク質であるストレプトアビジン (stav) の単量体が基本構造として有望と考えた。そこで、進化分子工学の手法により  $V_H$  ドメインならびに stav 単量体の変異体の分子集団(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を探索することとした。

本研究の特色は、臨床化学の進歩に最新の進化分子工学によりアプローチする点である。複数のバイオマーカーに対して、超微量分析に應用できる変異体クローンが得られるならば、その成果は分子認識化学、タンパク質工学の分野からも多大の注目を集めるものと期待される。

### 3. 研究の方法

以下の手順により、本来のリガンド以外の低分子バイオマーカーに対する結合能を獲得した  $V_{HD}$  および stav 単量体 (stav' とする) の変異体の創製を試みた。低分子バイオマーカーとしては、エストラジオール- $17\beta$  ( $E_2$ ) ( $M_r$  272: 卵胞ホルモン)、コルチゾール (CS) ( $M_r$  363: 糖質コルチコイド) およびコチニン (CT) ( $M_r$  176: ニコチンの主代謝物) をとりあげた。

*in silico* 分子モデリングにより  $V_{HD}$  または stav' と上記の低分子マーカーとのドッキングモデルを作製し、各分子がどのループ [ $V_{HD}$  の場合は相補性決定部 (CDR) に相当する] あるいは $\beta$ シートと相互作用する可能性が高いかを推測した。 $V_{HD}$  および stav 遺伝子を調製した。前者は既に当研究室でクローニング済みであったので、それを利用した。後者については、成熟型 stav タンパク質の遺伝子塩基配列情報を基に、数本の化学合成オリゴ DNA を用いる overlap extension PCR により調製した。

上記 stav 遺伝子を大腸菌に発現させて、その産物が天然の stav と同等のビオチン

結合能を保持していることを確認した。

stav が 4 量体化する際にキーになるアミノ酸を部位特異的に変換して、単量体 (stav') として安定な形に変換した。この単量体化に適したアミノ酸の変換については既知情報を利用した。

stav' の分子量を SDS-PAGE で確認し、ビオチン結合能を ELISA で調べた。結合能が大きく低下したが、本研究の目的にはむしろ好都合であった。

上記の分子モデリングで推定した低分子マーカーと接触しうるループ領域に遺伝子レベルでランダム変異を導入し、変異  $V_HD$  および変異 stav' 遺伝子のライブラリーを構築した。変異の導入には様々な戦略が考えられるが、本研究では、縮重コドンを導入したオリゴ DNA を PCR により部位特異的に挿入する方法を採用した。

$V_HD$  遺伝子の場合、抗原と接触する可能性の最も高い相補性決定部 CDR-H3 の連続する 7 つのアミノ酸を DVS コドン (12 種のアミノ酸がランダムに出現する) または連続する 5 つのアミノ酸を、NNS コドン (20 種すべてのアミノ酸がランダムに出現する) に置換した。stav' 遺伝子の場合、ループを構成するアミノ酸のうち、連続する 3 つの残基に変異を導入した遺伝子 [1 番目と 2 番目の  $\beta$  シートの間のループ (L1-2; アミノ酸 5 残基から成る) の場合、変異点が 1-2-3、2-3-4、3-4-5 の 3 種類できる] を混合した。これを、L3-4、L5-6 のループについても同様に行い、多様性に富むライブラリーを作製した。

上記の遺伝子ライブラリーをファージ提示用ベクター pEXmide にサブクローニングし、大腸菌を形質転換した。得られた組換え大腸菌ライブラリーにヘルプファージを感染させて、変異  $V_H$ 、変異 stav' をファージ提示した。

得られたファージライブラリーについて、 $E_2$ 、CS あるいは CT 固定化試験管に対してパンニングを行い、 $E_2$ 、CS、CT に対する結合能を獲得したクローンを選択した。

選択したクローンについて、 $E_2$ 、CS あるいは CT 固定化マイクロプレートを用いる ELISA (検出抗体はペルオキシダーゼ標識抗 M13 ファージ抗体) に付して、 $E_2$ 、CS あるいは CT への結合能を評価した。

#### 4. 研究成果

抗体は、特定の抗原の化学構造を認識する分析試薬として重用されるが、 $V_H$  と  $V_L$  の 2 つのドメインの会合が必要なうえ分子量が大きく大腸菌内での発現量も低い。この点を

克服するため、マウス抗  $E_2$  抗体の H 鎖可変部ドメイン ( $V_H$ ) を基本構造とし、様々なハプテン結合能を示す、単ドメイン抗体の単離を試みた。相補性決定部 H3 の連続する 7 アミノ酸残基を DVS コドンによりランダム化、または連続する 5 アミノ酸残基を NNS コドンによりランダム化した 2 種ライブラリーから、受動喫煙マーカーである CT と結合するクローンを 9 種得たが、いずれも親和力が不十分で、分析試薬としての応用は困難であった。

一方、単量体化したストレプトアビジン stav (stav') のループ部位にランダム変異を導入したライブラリーを作製し、CS と  $E_2$  に対する結合能を獲得した分子種の探索を試みた。CS および  $E_2$  と stav との複合体について *in silico* 分子モデリングを行い、ステロイド分子と接触が示唆された 3 つのループ部位 (A、B、C) のいずれかについて、連続する 3 つのアミノ酸残基をランダム化した 3 種の遺伝子ライブラリーを作製した。その産物である変異 stav' をファージ提示したのち、CS、 $E_2$  に結合能を示すクローンをパンニング (ステロイド-BSA 結合体あるいは BSA を固定化した試験管との結合を利用する) により選別した。その結果、CS については、ループ A、ついでループ C に順次変異を導入したサブライブラリーから、CS-BSA/BSA 比が 10.5、7.9 のクローンが得られた。 $E_2$  については、ループ A、ついでループ B に順次変異を導入して、 $E_2$ -BSA/BSA 比が 3.1、4.1 のものが得られた。さらにループ C に変異を導入して、より大きな  $E_2$ -BSA/BSA 比 (6.1) のクローンを単離した。この結果は、変異点の追加により、 $E_2$  の認識能・結合能が段階的に向上したものと解釈することができる。野生型 stav' の ELISA によるシグナルとの比較の観点から、これらのクローンは CS または  $E_2$  に対する結合能を獲得したものと判断された。

抗体を凌駕する分子認識力を有しながら、抗体よりシンプルな構造を持つタンパク質ファミリーを新規に創製する試みは、それ自体、極めて意義が大きくかつチャレンジングである。iPS 細胞の発明により細胞の分化を逆行させる「奇跡」が可能になったが、標的リガンドの構造に基づく理論的な結合タンパク質の *de novo* デザイン (リガンドにタンパク質をフィットさせる) が可能になるまでには、まだ道のりは険しい。本研究は、結合タンパク質のランダムライブラリーからのスクリーニング (タンパク質にリガンドをフィットさせる) ではあるが、*in silico* ドッキングモデリングを活かして自然界には存在しない機能性タンパク質の創製に挑むものであり、臨床化学への寄与もさることながら、上記の未解決の難題への足がかりにもなり

うるものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Oyama H., Tanaka E., Kawanaka T., Morita I., Niwa T., Kobayashi N., "Anti-Idiotypic scFv-Enzyme Fusion Proteins: A Clonable Analyte-Mimicking Probe for Standardized Immunoassays Targeting Small Biomarkers", *Anal. Chem.* 2013, **85**(23), 11553-11559. 査読有. DOI:10.1021/ac402868f

Oyama H., Yamaguchi S., Nakata S., Niwa T., Kobayashi N., ""Breeding" Diagnostic Antibodies for Higher Assay Performance: A 250-fold Affinity-matured Antibody Mutant Targeting a Small Biomarker", *Anal. Chem.* 2013, **85**(10), 4930-4937. 査読有. DOI:10.1021/ac3037602

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

〔学会発表〕(計13件)

大山 浩之, 中田 茂利, 丹羽 俊文, 小林 典裕, 「実用診断試薬を創出する試験管内分子進化(5). 改良型 scFv を用いるヒト血清中エストロジールの測定」日本薬学会第 133 年会 (2013.03.28 横浜).

森田 いずみ, 大山 浩之, 渡部 芳郎, 平井 杏奈, 太田 光熙, 小林 典裕, 「実用診断試薬を創出する試験管内分子進化(6). 改良型 scFv を用いるヒト尿中コチニン ELISA の確立」日本薬学会第 133 年会 (2013.03.28 横浜).

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 京都).

大山 浩之, 森田 いずみ, 太田 光熙, 小林 典裕, 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会 (2013.08.30 徳島). 「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」

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).

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).

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).

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 年会 (2014.09.19 東広島).

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 東広島).

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).

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).

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).

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 年会 (2015.03.27 神戸).

〔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.

〔その他〕

ホームページ等 神戸薬科大学 生命分析  
化学研究室 HP

(<http://www.kobepharma-u.ac.jp/analchem/>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 典裕 (KOBAYASHI, Norihiro)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 90205477

### (2) 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

森田 いずみ (MORITA, Izumi)

神戸薬科大学・薬学部・助手

研究者番号: 20299085