

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670051

研究課題名(和文)蛋白質ライゲーションによる網羅的な二重特異性抗体の作製と革新的分子の単離

研究課題名(英文) Construction of bispecific antibodies from the camelid antibody VHHs via in-cell protein trans-splicing

研究代表者

真壁 幸樹 (Makabe, Koki)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20508072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：二重特異性抗体Ia1-cAbGFP4と蛍光蛋白質ラベル化体の作製に成功した。二種類の発現ベクターを同時にBL21(DE3)株に形質転換し、一晩の前培養後に本培養を開始した。IPTGの誘導で発現したIa1-IntNは直ちに既に発現しているIntC-cAbGFP4と反応し、目的産物であるIa1-cAbGFP4が作り出された。SDSPAGE上に現れたバンドが目的の物であるかどうかはcAbGFP4のC末端に融合してあるFLAGタグに対する抗体を用いたWestern Blottingにて確認した。二重特異性抗体と蛍光蛋白質ラベル化体の活性をフローサイトメトリーにて確認した。

研究成果の概要(英文)：Production of various combinations of bispecific antibodies (bsAbs) is important for evaluating the next generation antibody drugs. In spite of its importance, it requires several gene-engineering steps. Here, we report an alternative approach for bsAb construction to reduce the gene manipulation steps. We used a method to create bsAbs in vivo through protein trans-splicing. For proof-of-concept of this method, we show the construction of a bsAb with anti-epidermal growth factor receptor variable domain of heavy chain antibody (VHH) and anti-green fluorescent protein (GFP) VHH. We successfully constructed the bsAb using this method and the resulting bsAb has the bispecific activity.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：蛋白質工学 抗体工学 蛋白質トランススプライシング 二重特異性抗体 重鎖抗体

1. 研究開始当初の背景

二重特異性抗体は二種類の抗原認識部位を一つのタンパク質分子上に持ち、二種類の抗原を空間的に近接させることができる。例えば癌細胞上の抗原と免疫細胞上の抗原をそれぞれ認識する抗体から二重特異性抗体を作製すると、癌細胞特異的に免疫細胞が集積し、癌の治療薬になるため研究が進められている(図1)。二重特異性抗体の中でも、抗体の可変領域のみを用いたタンデム scFv や VHH ダイマーは分子サイズが最小で機能を持つ分子となる(図1)。これらは遺伝子工学によって二種類の抗体断片を融合させて作られている。

二重特異性抗体では、たとえ同じ抗原に対する抗体を用いても、結合する際の配向性や結合親和力の違いによって、二重特異性抗体としての効果が異なってくる。このため、同じ抗原を標的としているいくつかの抗体で組み合わせを変更して効果を検討する必要がある。この場合、それぞれの構成を遺伝子工学を用いて個別に作り出すため、時間と手間が大きかった。

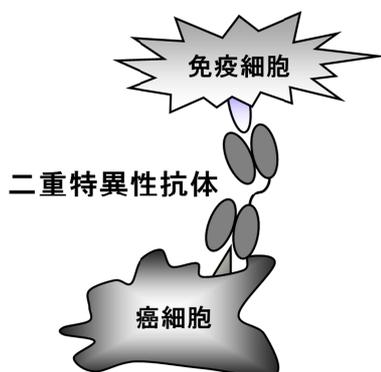


図1 二重特異性抗体：図では癌細胞上の蛋白質と免疫細胞上の蛋白質の両者を認識し、同時に結合できるために癌細胞近辺に免疫細胞を誘導することができる。図の二重特異性抗体はタンデム scFv の例。

2. 研究の目的

本研究では、二種類の抗体を組み合わせることで二重特異性抗体を作り出す際に、別々の蛋白質として個別に作製しておき、蛋白質ライゲーションで結合させる方法を確認する(図2)。抗体はインテインのN末端断片とC末端断片に結合させて作り出す(スプリットインテイン)。これによって、様々な組み合わせの二重特異性抗体を新たに遺伝子工学を行うことなく、混ぜ合わせる

だけで融合蛋白質を作り出すことができる。例えば10種類と10種類の抗体を用意しておけば組み合わせとして $10 \times 10 = 100$ 種類の二重特異性抗体を生み出すことができる。

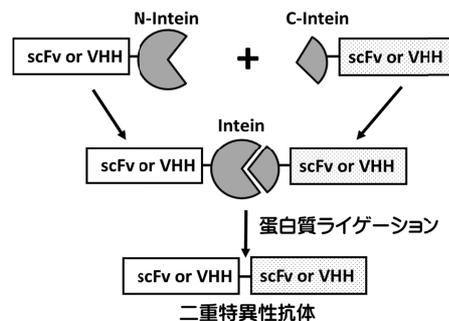


図2 インテインによる二重特異性抗体の作製

3. 研究の方法

二重特異性抗体を蛋白質ライゲーションによって生み出す方法を確立する。

融合させる抗体断片として一本鎖 Fv 抗体(scFv)およびラクダ抗体重鎖可変領域(VHH)を用いる。まず方法論の確立を目指して、VHH抗体を用いて行う。VHH抗体として癌細胞上に強く発現する上皮成長因子受容体(EGFR)を認識するIa1 VHH抗体断片、容易な蛍光検出のために緑色蛍光タンパク質 GFPへ結合するcAbGFP4 VHH抗体断片を用いる。

これらの遺伝子を発現ベクターへ組み込み蛋白質ライゲーション反応を行う。スプリットインテイン発現システムとしてIwaiらによって開発されたpSKDuetおよびpSKBADを用いる(Nat. Protoc. 2010)。これら発現ベクターはすでにAddgene(www.addgene.org)より入手済みである。このベクターシステムは複製起点が別種であるため大腸菌中において共存でき、共発現させることが可能である。まずIa1-N末端インテイン(pSKDuet)とC末端インテイン-cAbGFP4 VHH(pSKBAD)発現ベクターを構築する。Ia1 VHHのN末端にヒスチジンタグを融合し、cAbGFP4 VHHのC末端にFLAGタグを融合させる。これによって、Ni-NTAカラムと抗FLAG抗体検出を組み合わせることで精製し、ライゲーションされた二重特異性抗体のみを精製する。

構築された二重特異性抗体の活性をEGFRを発現している細胞株を用いて、フローサイトメトリーのGFP蛍光検出によって評価する。

さらに抗体の蛍光ラベル化を評価するために、pSKBAD2に緑色蛍光蛋白質 GFPを

導入したベクターを作製した。二重特異性抗体 Ia1-cAbGFP4 と同様に二段階の誘導で発現し、フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡で観察を行う。

4. 研究成果

(1) Ia1-cAbGFP4 の作製と評価

Ia1-IntN, IntC-cAbGFP4 それぞれの発現ベクターを同時に BL21(DE3) 株に形質転換し、一晩の前培養後に本培養を開始した。菌体密度が 0.D.600nm=0.6 の時にアラビノースによって IntC-cAbGFP4 の発現を誘導し、その 30 分後に IPTG で Ia1-IntN の発現を誘導した (図 3 (a))。IPTG の誘導で発現した Ia1-IntN は直ちに既に発現している IntC-cAbGFP4 と反応し、目的産物である Ia1-cAbGFP4 が作り出された (図 3 (a) 黒矢印)。

SDSPAGE 上に現れたバンドが目的の物であるかどうかは cAbGFP4 の C 末端に融合してある FLAG タグに対する抗体を用いた Western Blotting にて確認した (図 3 (b))。アラビノース誘導後に現れる、低分子両側のバンド (レーン 2) は IntC-cAbGFP4 であり、IPTG の誘導後に高分子量側に現れるバンドが Ia1-cAbGFP4 であることが分かる。

Ni-NTA カラムにて精製を行うと目的産物を 1 ステップで精製することが出来た (図 3 (c))。FLAG タグの検出バンドと Ni-NTA カラムで精製されることから、これは目的産物の Ia1-cAbGFP4 であることが確認できる。収量は培地 1L あたり 1.9 mg であった。

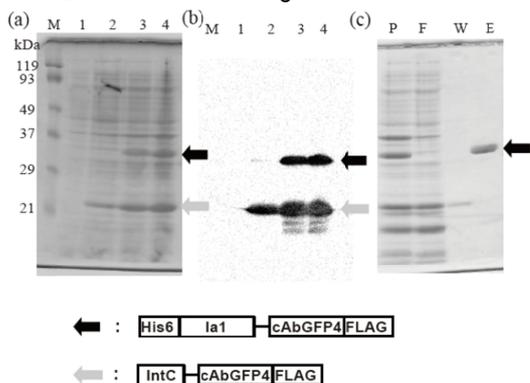


図 3 タンパク質ライゲーションによる Ia1-cAbGFP4 の構築。(a)SDSPAGE, (b)抗 FLAG 抗体による Western Blotting (c)Ni-NTA カラム精製。M: マーカー、1: 誘導前、2: アラビノース誘導後、3、4: IPTG 誘導後。

目的産物 (Ia1-cAbGFP4) の二重特異性はフローサイトメトリーによって評価した (図 4)。細胞は EGFR 陽性の A431 を用いた。細胞のみ、Ia1-cAbGFP4 のみ、GFP のみでは細胞の自家蛍光のみが観察されているが、Ia1-cAbGFP4 と GFP を一緒に加えた場合では蛍光強度の増強が観察された。この結果から

Ia1-cAbGFP4 は細胞株 A431 と GFP を二重特異性抗体として架橋する活性を持っていることが分かった。

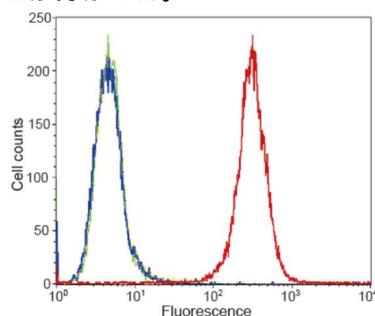


図 4 Ia1-cAbGFP4 のフローサイトメトリーによる架橋活性評価。青: 細胞のみ、緑: GFP のみ、黄色: Ia1-cAbGFP4 のみ、赤: Ia1-cAbGFP4+GFP。

(2) Ia1-GFP の作製と評価

Ia1 VHH 遺伝子を導入したベクターをそのまま用いて相手のベクターを変えるだけで新しい融合蛋白質を作り出せる。今回は GFP を用いて蛍光ラベルを行った。

Ia1-cAbGFP4 二重特異性抗体を作製したときと同様に、二種類のベクターを同時に形質転換し、アラビノースと IPTG で誘導を行った。Ni-NTA カラムで精製を行い、目的産物を得た。収量は 7.1 mg / 1L 培養であった。

目的産物は GFP の蛍光スペクトルを示した。EGFR 陽性細胞を染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察を行ったところ、細胞表面が GFP 蛍光で染色されることを見いだした (図 5)。

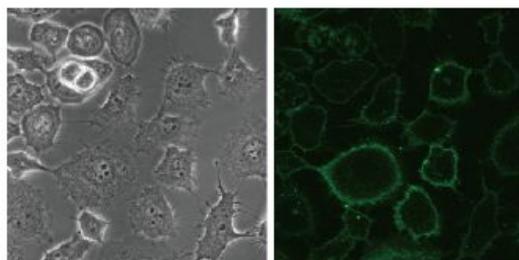


図 5 EGFR 陽性 A431 細胞の Ia1-GFP による蛍光画像。

今回の結果から、スプリットインテインを用いた蛋白質ライゲーションは二重特異性抗体を作り出すのに有効な方法であり、また、一度構築したベクターは相手の組み合わせを変えるだけで新たな融合蛋白質を作製できるため様々な応用に有効であることが示された。

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 2件)

1. Biancalana M, Makabe K, Yan S and Koide S

Aromatic cluster mutations produce focal modulations of β -sheet structure

Protein Science, **24**, 841-849, 2015
査読有り

2. Ryosuke Sasaki, Soichiro Kitazawa, Ryo Kitahara, Hikaru Nakazawa, Yoshikazu Tanaka, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, and Koki Makabe
Zinc ion-binding activity of an anti-ZnO VHH antibody, 4F2
Chem. Lett. **44**, 1309-1311, 2015
査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

Makabe, Koki; Shibuya, Yuki; Asano, Ryutaro; Nakazawa, Hikaru; Umetsu, Mitsuo;
Pacifichem 2015, Honolulu (USA)
Construction of a bispecific antibody via protein trans-splicing, 2016/12/20

Makabe Koki, Sasaki Ryosuke、
Kitazawa Soichiro、Kitahara Ryo、
Tanaka Yoshikazu、Kumagai Izumi、
Umetsu Mitsuo、
第53回日本生物物理学会 金沢大学(石川県金沢市)
Zinc ion binding activity of an anti-ZnO VHH antibody, 4F2, 2016/9/15

堀裕基、真壁幸樹
第15回日本蛋白質科学会 あわぎんホール(徳島県徳島市)
シートモデルタンパク質へのアミロイドコア配列の移植とその構造評価, 2016/6/24

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://makabe.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
真壁 幸樹 (MAKABE, Koki)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 20508072

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし