ファージ提示法による抗体工学

東北大学大学院工学研究科
熊谷 泉, 津本浩平, 前仲勝実

1. はじめに

近年報告されているファージ提示法は、新機能を持つペプチドや蛋白質分子を選択するための強力な手法のひとつである。本稿ではファージ提示法について概観した後、抗体分子を中心とする蛋白質の提示とその応用について述べる。

2. ファージ提示法

大腸菌に感染する繊維状ファージは、外被蛋白質として主にマイナーな外被蛋白質である遺伝子3産物のgp3、メジャーな外被蛋白質である遺伝子8産物のgp8を有している。gp3はファージ粒子一つあたり3～5個存在するとされており、その役割はファージが感染するために大腸菌の繊毛に接触することであるが、N末端ドメイン、C末端ドメインの二つに分けることができ、前者は繊毛接触、後者は形態形成に重要であることが示唆されている。またgp8はファージ粒子ひとつあたり数千個あり、形態形成に重要な役割を果たしている。ファージ提示法は当初、目的の結合能を持つペプチド断片をスクリーニングするために構築された¹⁾。そのシステムはfdファージのgp3のN末端側数残基に無作為なアミノ酸残基を挿入できるように遺伝子を挿入し、大腸菌に感染させることにより得られるファージを選択に用いるというものである。その後、蛋白質分子の機能を保持したまま提示できることがわかり、さまざまな蛋白質分子が提示され²⁾、その幾つかは機能解析もしくは機能変換に用いられてきた。しかしながら、ファージゲノムにそのまま蛋白質分子の遺伝子を挿入しても多くの場合、遺伝子の欠損が起こる。しかも高分子を提示させるためにfdファージの大腸菌への感染能が著しく低下する。そこで、gp8を用いる、ファージミ

ドとヘルパーファージを用いる、gp3のN末端を欠損させて融合発現させる、などの改良が試みられている²⁾。なかでもファージミドを用いた方法は提示効率は低下するものの、蛋白質分子を提示させるのに効果的だと考えられている。しかし、gp3の融合蛋白質の大量発現は大腸菌に対して毒性を示すことから、やはり遺伝子の欠損に遭遇する場合も少なくない。それに対してさまざまな対策が試みられている（例えば文献3）。

3. ファージ抗体を用いた新機能抗体分子の作製、機能変換

ファージ提示法を用いた抗体分子の作製は、生体の免疫系をまねることを基本としている（説明は文献4に詳しい）。大きな流れは図1にまとめてあるが、方法的に重要であるのは①抗体遺伝子の増幅とファージ表面への提示②目的の抗体分子の選択と可溶性分子の調製③親和性の増大を目指した無作為変異の導入や可変領域のshufflingの三つである。

3.1 遺伝子増幅とファージ表面への提示

ライブラリー作製の第一歩は抗体遺伝子の調製にある。まずmRNAを調製し、PCR法により遺伝子を増幅する必要がある。遺伝子増幅プライマーは、ファルマシア社とNovogen社から販売されている。ファルマシア社が販売している、マウス抗体のためのプライマーは配列が公表されていない。Novogen社のプライマーセットは数種類が用意されており、その増幅も効果的ようである。ヒト抗体についてはMRCのグループが配列を公表しており⁵⁾、増幅の効率もよい。マウス抗体については、最近報告された山中らのプライマーの信頼性も高いようである⁶⁾。この断片をファージ提示用のファージミドベクターに挿入する。ファージミドベクターそのものは数社から販売されている。

ファージ提示法はコート蛋白質のN末端側に融合発現させるのが基本的戦略であり、抗体のように重鎖、軽鎖が存在する場合には工夫が必要となる。抗体断片として、Fab断片、Fv断片双方の方法があるが、Fv断片はドメイン間の相互作用が弱く、抗原存在下でない限り、非共有結合的にヘテロダイマーとして提示することは困難である。そこで実際にファージ表面にはペプチドリンカーで可変領域を結合し、一本鎖化する作業が必要となる⁷⁾。またFab断片として提示する場合は、片方の鎖をファージ表面に提示し、もう片方の鎖を大腸菌

Antibody engineering by phage display
Izumi KUMAGAI, Kouhei TSUMOTO, Katsumi MAENAKA
Graduate School of Engineering, Tohoku University

図1 ファージ提示法を用いた抗体分子の調製

内で可溶性蛋白質として発現させるが、提示効率や大腸菌での発現量の点で問題がある。

3.2 ファージ抗体の選択（パンニング法）と可溶性分子の調製

ライブラリーが構築できたら次は目的の分子を選択することになる。通常パンニング法と呼ばれる方法で選択する。これはマイクロタイタープレート（96穴、あるいは24穴等も用いる）に抗原を非共有結合的に結合させ、適当なブロッキング剤でブロックした後、ファージライブラリーを加え、リン酸緩衝液で洗った後、溶出する。得られたファージを大腸菌に再感染させ、再び培養する。この操作を3～4回繰り返すことによって目的の機能を持つファージ分子を濃縮する訳である。しかしながら、プレートの材質、抗原の吸着効率、ブロッキング剤の相性、などの問題により、各々の抗原ごとに至適条件を選び出さなければならない。ストレプトアビジンとビオチン化した抗原を用いた固定化法、ある

いはプレートではなく、磁気ビーズを用いた方法が効果的な場合もある。

結合能の検出には酵素標識した抗M13抗体を用いたELISA法を用いることが多い。M13ファージを認識する抗体はファルマシア社やシグマから入手することができる。しかしながら、ファージ表面への提示効率等を考えると、この方法によってのみでは分子認識能を完全に議論しきれず、得られたクローンについて、可溶性分子として調製し、本当に目的の機能を持つ抗体分子であるかを確認する必要がある。

3.3 親和性の増大

生体内の抗体産生ではAffinity maturation（親和性の成熟）と呼ばれる現象が知られており、最終的に非常に高い親和性を持つクローンが選択されることになる。ファージ抗体では当然部位特異的な変異導入、error-prone PCRによる無作為な変異導入等が考えられるが（代表的なのは文献8）、VH、VL鎖のどちらかー

方を、ゲノムから切り出した断片に置き換え、構築したライブラリーを用いて親和性の高い分子を選択する方法 (Chain-shuffling 法) も試みられている⁹⁾。

4. ファージ抗体を用いた新しい抗原定量法と抗原認識能変換への応用

ファージに提示した抗体分子はさまざまな応用面を引き出せる。ここでは我々が行った2例を紹介する。

4.1 Open Sandwich 法

3.1に述べたように、可変領域のみからなる抗体Fv断片は単独ではVHとVLに分離しやすいが、抗原の存在下で安定化する場合が知られている。これを利用すると、あらかじめファージ表面にはVH鎖のみを提示し、VL鎖を可溶性蛋白質として調製しておき、それらの会合を調べることによってサンプル中の抗原濃度が測定できる (図2)。この方法により、従来から用いられているSandwich法の半分の手間と同程度の感度を得ることができる¹⁰⁾。

4.2 抗原認識能変換への応用

Open Sandwich法は先に述べたChain-shuffling法とあわせて、片方の鎖に無作為変異を導入してファージに提示し、もう片方の鎖を可溶性蛋白質として調製しておくことによって、無作為変異導入した抗体分子の機能変換に用いることができる (図2)。筆者らは最近、本来ヒトリゾチームを認識できない、抗ニワトリリゾチーム抗体HyHEL10にこの方法を用いて認識能を賦与することに成功した¹¹⁾。

5. 異種蛋白質の機能変換への応用

ファージ提示法は抗体分子に限られず、さまざまな蛋白質へ応用できる。ヒト成長ホルモンの機能改良¹²⁾、セリンプロテアーゼインヒビター、DNA結合蛋白質の機能改変^{13), 14)}に应用されているほか、トリプシン、アルカリ性フォスファターゼなど酵素分子の提示が報告されている¹⁵⁾。酵素の設計の評価法について詳細な吟味が必要であるが¹⁶⁾、構造既知、構造未知の蛋白質について、無作為変異導入を施した効果を迅速に評価できるファージ提示法は、進化分子工学の一つの有効な手段となることが期待される。

6. おわりに

ファージ提示法は、蛋白質の機能変換、機能改良を行う上で最も有効な手段の一つであるが、基礎的な研究のためにも非常に優れた方法である。例えば、我々は最近、ニワトリリゾチームに部位特異的変異導入し、ファ

図2 Open Sandwich法 の概念と効率良い抗体分子の選択への応用

(A) Fv断片が抗原の存在下で安定に存在することを利用したOpen Sandwich法。VH鎖をファージ表面に提示し、VL鎖と抗原を混合する。三者が複合体形成する際、ファージ量をELISA法で定量することにより抗原の濃度を測定することが可能となる。

(B) ファージ表面に提示するVH鎖に無作為変異を導入することによって、目的の機能を持つ抗体分子の選択に用いることができる。

ージ表面に提示した上で、それらの変異体と抗体との結合能を測定することによって、フォールディングに重要なアミノ酸残基を同定する系を提案した¹⁷⁾。この系を用いれば、蛋白質の立体構造形成に重要なアミノ酸残基の同定に应用することも可能であろう。また蛋白質間相互作用において重要な寄与を果たすアミノ酸残基の効率的な同定にも有効であると期待される。

謝 辞

本稿で述べた研究の一部は東京大学工学部の長棟教授、上田博士との共同研究であり、ここに感謝の意を表します。また研究の一部はNEDO提案公募型・最先端分野研究開発事業の助成を受けて行いました。

文 献

- 1) Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) *Science*, **249**, 386-390.
- 2) Bass, S., Greene, R. and Wells, J. A. (1990) *Proteins*, **8**, 309-314.
総説として, Clackson, T. and Wells, J. A. (1994) *TIBTECH*, **12**, 173-184.
- 3) Maenaka, K., Furuta, M., Tsumoto, K., Watanabe,

- K., Ueda, Y. and Kumagai, I. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 682-687.
- 4) Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. and Winter, G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16007-16010.
- 5) Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonner, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. and Winter, G. (1991) *J. Mol. Biol.*, **222**, 581-597.
- 6) Yamanaka, H.I., Kirii, Y. and Ohmoto, H. (1995) *J. Biochem.*, **117**, 1218-1227.
- 7) Waterhouse, P., Griffiths, A. D., Johnson, K. S. and Winter, G. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2265-2266.
- 8) Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. and Hoogenboom, H. R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 433-455.
- 9) Kang, A. S., Jones, T. M. and Burton, D. R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11120-11123.
- 10) Ueda, H., Tsumoto, K., Kubota, K., Suzuki, E., Nagamune, T., Nishimura, H., Schueler, P. A., Winter, G., Kumagai, I. and Mahoney, W. C. (1996) *Nature biotech.* **14**, 1714-1718.
- 11) Tsumoto, K., Nishimiya, Y., Ueda, H., Nagamune, T., Ogasahara, K., Yutani, K., Tokuhisa, K., Matsushima, M. and Kumagai, I. (1997) *Protein Engng.* 印刷中.
- 12) Lowman, H. B. and Wells, J. A. (1993) *J. Mol. Biol.*, **234**, 564-578.
- 13) Roberts, B.L. et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2429-2433.
- 14) Rebar, E. J. and Pabo, C.O. (1994) *Science*, **263**, 671-673.
- 15) McCafferty, J., Jackson, R. H. and Chiswell, D. J. (1992) *Protein Engng.* **4**, 955-961.
- 16) 前仲勝実, 熊谷 泉 (1996) 化学, **51**, 398-399.
- 17) 前仲, 津本, 上田, 熊谷 (1995) 第2回蛋白質の立体構造の構築原理ワークショップ要旨集, p151.

Japanese Journal of Physiology (JJP) への投稿のお誘い

葛西道生

Japanese Journal of Physiology (JJP) は1951年に刊行され、今年(1996年)で46巻をむかえる日本生理学会の欧文機関誌です。日本生理学会から、上記欧文誌に日本生物物理学会の会員の投稿を歓迎する旨の連絡があり、JJP誌にBiophysicsのセクションが新設され、生物物理学会から私がBiophysicsのSection Editorとして1996年5月から参加しています。日本生物物理学会は欧文誌を持っておりませんので、今まで欧文誌をどうするかが何度も学会の運営委員会等で検討されてきましたが、まだそれについての結論は出ていません。本誌がその解決というわけではありませんが、生物物理学のかなりの分野は生理学と深い関係があり、本誌に論文を掲載するのも1つの選択と思っています。会員皆様の投稿を歓迎します。

JJPについての情報や投稿規定などは以下のホームページを参考にして下さい。

<http://wwwbase.nacsis.ac.jp/psj/jjp/jjphome.html>