

抗体工学的アプローチによるハプテン用抗体の親和性向上に関する研究

加藤 芳徳

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Kobayashi N, Ohtoyo M, Wada E, Kato Y, Mano N, Goto J, Generation of a single-chain Fv fragment for the monitoring of deoxycholic acid residues anchored on endogenous proteins, *Steroids*, **70**: 285-294, 2005.
2. Kobayashi N, Iwakami K, Kotoshiba S, Niwa T, Kato Y, Mano N, Goto J, Immunoenzymometric assay for a small molecule, 11-deoxycortisol, with attomole-range sensitivity employing an scFv-enzyme fusion protein and anti-idiotypic antibodies, *Anal Chem*, **78**: 2244-2253, 2006.
3. Kobayashi N, Kato Y, Oyama H, Taga S, Niwa T, Sun P, Ohtoyo M, Goto J, Anti-estradiol-17 β single-chain Fv fragments: Generation, characterization, gene randomization, and optimized phage display, *Steroids*, **73**: 1485-1499, 2008.

目 次

略語表	
緒言	----- 1
本論	
第 1 章 マウス抗デオキシコール酸 モノクローナル抗体一本鎖 Fv フラグメントの 調製と免疫測定法への応用	
第 1 節 序論	----- 10
第 2 節 抗デオキシコール酸抗体可変部の遺伝子配列の解析	----- 13
第 3 節 抗デオキシコール酸抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製	----- 17
第 4 節 抗デオキシコール酸抗体一本鎖 Fv フラグメントを用いる 免疫測定法の構築と諸性質	----- 20
第 5 節 考察	----- 25
第 2 章 マウス抗 11-デオキシコルチゾール モノクローナル抗体一本鎖 Fv フラグメントー アルカリホスファターゼ融合タンパク質の調製と高感度非競合型単一抗体免疫測 定法の構築	
第 1 節 序論	----- 27
第 2 節 抗 11-デオキシコルチゾール抗体一本鎖 Fv フラグメントー アルカリホスファターゼ融合タンパク質の調製	----- 30
第 3 節 一本鎖 Fv フラグメントーアルカリホスファターゼ融合体を用いる 非競合型単一抗体免疫測定法の構築	----- 32
第 4 節 非競合型単一抗体免疫測定法を用いる 血中 11-デオキシコルチゾールの測定	----- 40
第 5 節 考察	----- 42
第 3 章 競合型免疫測定法の高感度化を目的とする抗エストラジオール-17 β モノクローナル抗体一本鎖 Fv フラグメントのアフィニティマチューレーション	
第 1 節 序論	----- 45
第 2 節 抗エストラジオール-17 β 抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製	----- 51
第 3 節 エラープローン PCR を用いる抗エストラジオール-17 β 抗体 可変部遺伝子へのランダム変異の導入	----- 54
第 4 節 一本鎖 Fv フラグメントのフェージ提示条件の検討	----- 64
第 5 節 CDR シャッフリングによる変異一本鎖 Fv フラグメント ライブラリーの調製とフェージ提示法／パンニングによる 高親和力変異体の探索	----- 71

第6節 考察	-----	81
結語	-----	83
実験の部	-----	85
第1章 付属実験	-----	95
第2章 付属実験	-----	102
第3章 付属実験	-----	108
謝辞	-----	119
引用文献	-----	120

略語表

AAP : abridged anchor primer
ALP : alkaline phosphatase
A-TBS : tris-buffered saline containing sodium azide
ATG : ampicillin/tetracycline/glucose
AUAP : abridged universal amplification primer
BSA : bovine serum albumin
CA : cholic acid
CDCA : chenodeoxycholic acid
CDR : complementarity-determining region
11-DC : 11-deoxycortisol
DCA : deoxycholic acid
E₂ : estradiol-17 β
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH : ethanol
FR : framework region
FXR : farnesoid X receptor
GCA : glycocholic acid
GCDCA : glycochenodeoxycholic acid
GLCA : glycolitocholic acid
G-PBS : phosphate-buffered saline containing gelatin
GSP : gene-specific primer
GUDCA : glycooursodeoxycholic acid
HIV : human immunodeficiency virus
IgG : immunoglobulin G
IMA : immunometric assay
IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LCA : lithocholic acid
LXR : liver X receptor
MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption - time of flight
MOI : multiplicity of infection
M-PBS : phosphate-buffered saline containing skimmed milk
MS : mass spectrometry
OVA : ovalbumin
PB : phosphate buffer

PBS : phosphate-buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
o-PD : *o*-phenylenediamine
PEG : polyethylene glycol
POD : peroxydase
RIA : radioimmunoassay
ScFv : single-chain Fv fragment
TAE : tris-acetate-EDTA buffer
TBE : tris-borate-EDTA buffer
TBS : tris-buffered saline
TCA : taurocholic Acid
TCDCA : taurochenodeoxycholic Acid
TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase
TLCA : taurolithocholic acid
T-PBS : phosphate-buffered saline containing Tween-20
TUDCA : tauroursodeoxycholic acid
UDCA : ursodeoxycholic acid

緒言

抗体は、特定の抗原に対して精緻な特異性と高い親和性を示す機能性分子であり、この特性は体外診断¹⁾や画像診断²⁾などの臨床化学分析をはじめ、様々なバイオメディカル分野で応用されている³⁾。なかでも抗原抗体反応を基盤とする免疫測定法は、生体内に存在するごく微量の生理活性物質を、特異的に、しかも簡便な操作で測定しうる分析手法として、広く用いられている^{3,4)}。また、高速液体クロマトグラフィーや質量分析計と比較して、体液、組織などを簡便な前処理で測定できることや、抗原抗体反応の速さから、ハイスループットな測定系の構築が可能であり、自己免疫疾患⁵⁾や HIV⁶⁾など、種々の疾患のスクリーニングにも応用されつつある。従来、免疫測定法では、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体が用いられているが、多くの場合、分子量約 15 万の糖タンパク質であるイムノグロブリン G (IgG) である⁷⁾。IgG は 2 本の H 鎖および L 鎖からなるヘテロ 4 量体であり、パパインにより処理すると Fab が、ペプシンにより処理すると F(ab')₂ が調製できる。抗体の抗原との反応には、H 鎖および L 鎖各々の N 末端に位置する約 110 アミノ酸残基の可変部 (V) ドメインが関与する。(図 1) この V ドメインには、抗原との反応に直接関わる相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) と、βシートを形成してその土台を構築する枠組み領域 (framework region; FR) が存在し、これらがモザイク状に配列している。H 鎖および L 鎖の可変部 (V_H, V_L) ドメインはそれぞれ 3 カ所に CDR をもつが、抗原との結合部位 (パラトープ) は主にこれら CDR が形成する。

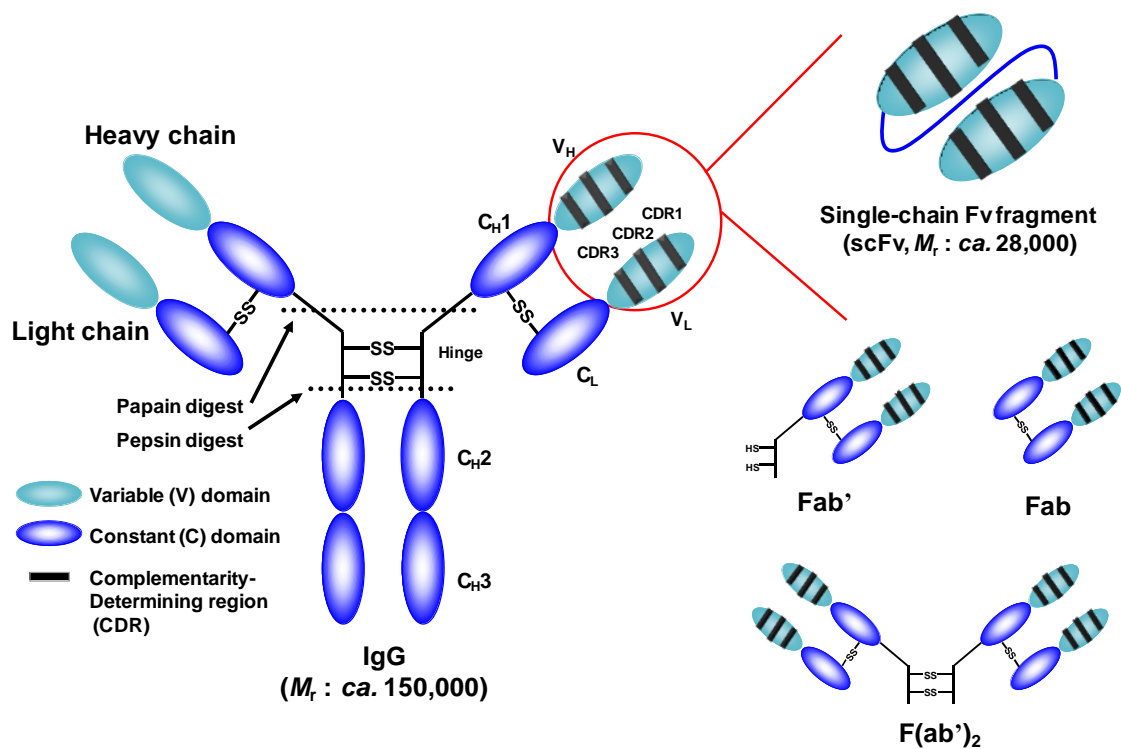


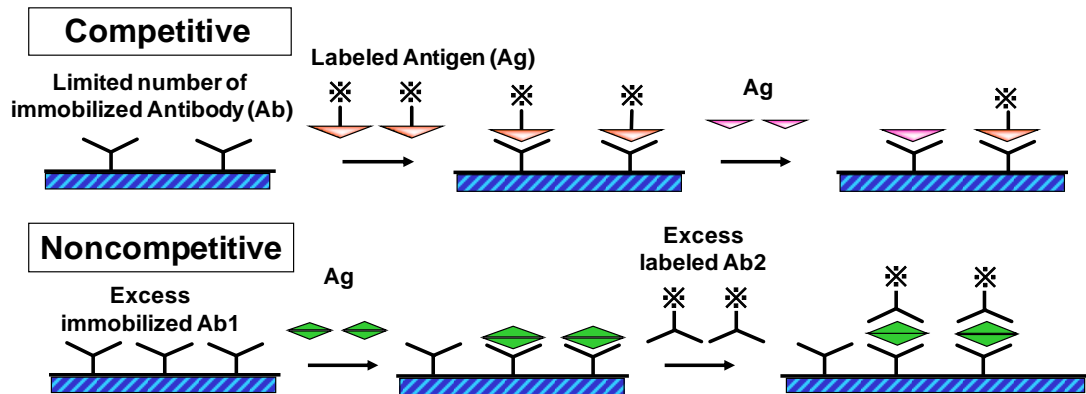
図 1. IgG 型抗体および各種抗体フラグメントの構造

IgG 型抗体は、分子量約 15 万の糖タンパク質であり、2 本の H 鎖および L 鎖からなるヘテロ 4 量体である。本抗体をパパインおよびペプシンで処理すると Fab および F(ab')₂ が調製できる。抗体の抗原との反応には、H 鎖および L 鎖各々の N 末端に位置する約 110 アミノ酸残基が可変部 (V) ドメインが関与する。(図 1) この V ドメインには、抗原との反応に直接関わる相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) と、βシートを形成してその土台を構築する枠組み領域 (framework region; FR) が存在し、これらがモザイク状に配列している。H 鎖および L 鎖の可変部 (V_H , V_L) ドメインはそれぞれ 3 カ所に CDR をもつが、抗原との結合部位 (パレート) は主にこれら CDR が形成する。抗体工学では、この V_H , V_L を一本のペプチドリンカーで連結した一本鎖 Fv フラグメント [single-chain Fv (scFv)] を用いることが多い。

免疫測定法は競合型と非競合型の 2 通りに大別され⁸⁾、測定する抗原の分子量により、主として用いる方法が異なる。抗原が高分子の場合、複数の抗原決定基 (エピトープ) を有するため、非競合型免疫測定法の一方法であるサンドイッチ法が汎用されている。すなわち、抗原捕捉用抗体を固相化したプレートに抗原を反応させたのち、抗原捕捉用抗体とは異なるエピトープを認識する検出用標識抗体を用いて測定する方法である。(図 2 A; Noncompetitive) 本法は添加する抗原の量に依存してシグナル強度が増大するアッセイ系

であり，添加する抗原量を横軸，得られるシグナルを縦軸としてその用量－反応曲線（検量線）を描いた場合，右上がりの曲線が得られる．(図 2 B; **Noncompetitive**) 一般的に，本法をはじめとする非競合型免疫測定法では，微量の抗原を過剰量の抗体で捕捉するため，アトモル－zeptomol ($10^{-18} - 10^{-21}$ mol) にも達する高感度な測定が可能である⁹⁻¹¹⁾．

A



B

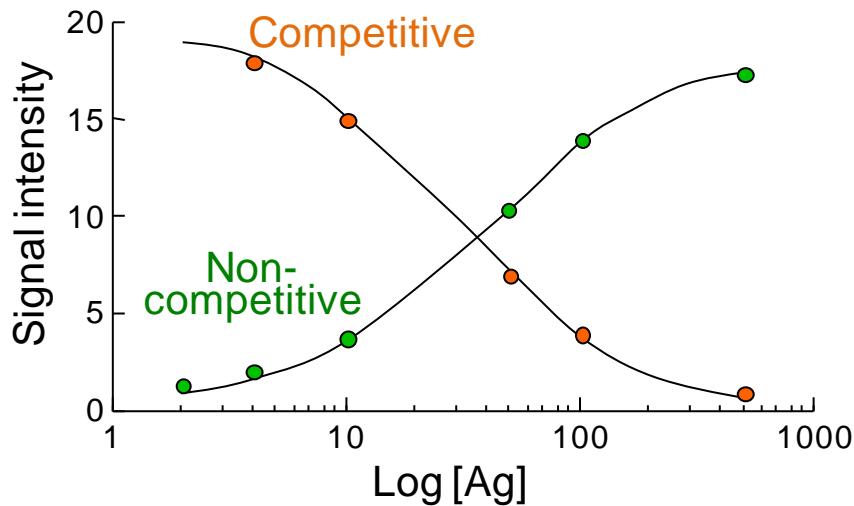


図 2. 競合型および非競合型免疫測定法の原理 (A) と得られる用量-反応曲線 (B)

免疫測定法は競合型と非競合型の 2 通りに大別される。競合型の場合、抗原認識抗体を固相化したプレートなどに、標識抗原と本来の抗原とを競合的に反応させ、固相に残る標識抗原を測定する方法である。(A; Competitive) 抗原の添加量に依存して検出されるシグナルは減少するため、添加する抗原量を横軸、得られるシグナルを縦軸としてその用量-反応曲線 (検量線) を描いた場合、右下がりの検量線が得られる。(B; Competitive) 一方、非競合型のうち、最も用いられる方法としてサンドイッチ法がある。本法は抗原捕捉用抗体を固相化したプレートなどに、抗原を反応させたのち、抗原捕捉用抗体とは異なるエピトープを認識する検出用標識抗体を用いて測定する方法である。(A; Noncompetitive) 本法は添加する抗原の量に依存してシグナル強度が増大するため、右上がりの検量線が得られる。(B; Noncompetitive) ただし、ハプテンに総称される低分子抗原は単一のエピトープしか持たないことが多く、サンドイッチ法は適用できない。そのため、専ら競合型が用いられている。

しかし、臨床化学において測定の対象となる物質は、ステロイドホルモンや内分泌攪乱物質など、分子量が2,000に満たない、いわゆるハプテンと総称される低分子化合物の場合が多い。低分子抗原は、多くの場合単一のエピトープしか存在せず、また、アッセイに用いる2つの抗体可変部に立体障害が働くため、サンドイッチ法の適用は極めて困難である。そのため、ハプテンの測定には専ら競合型の免疫測定法が用いられる。本法は抗原認識抗体を固相化したプレートなどに、標識抗原と本来の抗原とを競合的に反応させたのち、固相に残る標識抗原に基づくシグナルを検出する方法である。(図2 A; Competitive) 非競合型とは対照的に、添加する抗原量に依存してシグナルが減少するため、右下がりの用量-反応曲線となる。(図2 B; Competitive) 本法の場合、その感度は使用する抗体の親和力に依存する。たとえば、生理活性物質として、ステロイド類や胆汁酸類などを考慮してハプテンの分子量を400程度とし、様々な K_a 値を示す抗ハプテン抗体を用いた際の用量-反応曲線を、若林の報告した式¹²⁾を用いて理論的に描いた場合、抗体の K_a 値に依存して検量線は左側(低抗原量側)にシフトし、高感度測定が可能となる。(図3) また、本図に従った場合、フェムトモル-アトモル(10^{-15} - 10^{-18} mol; 図3の例では、 $1 \text{ pg} = 2.5 \times 10^{-15} \text{ mol}$)レベルの測定には、 K_a 値が 10^{12} M^{-1} を上回る抗体が必要である。(図3; $K_a = 1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$) しかし、通常のハイブリドーマ法で調製された抗ハプテン抗体のうち、 K_a 値が 10^{12} M^{-1} を上回る抗体はジゴキシンに対する抗体($K_a = 1.7 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$)が報告されているのみである¹³⁾。

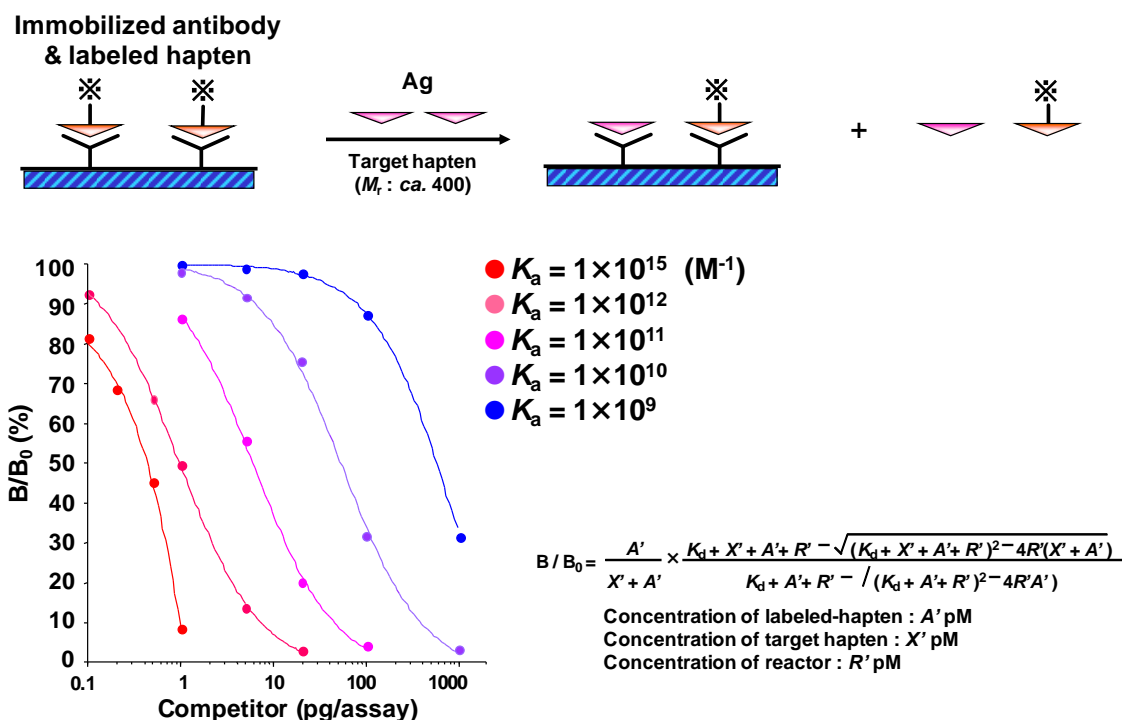


図 3. 競合型免疫測定法の原理と理論的な用量－反応曲線

競合型免疫測定法では、その感度は抗体の親和定数 (K_a 値) に大きく依存する。本図には、生理活性物質として、ステロイド類や胆汁酸類などを考慮してハプテンの分子量を 400 程度とし、様々な K_a 値の抗ハプテン抗体を用いた際の用量－反応曲線を、若林の報告した式¹²⁾を用いて理論的に描いている。横軸には加えたハプテンの量を、縦軸にはハプテン未添加の際の反応性を 100% とした際の、各ハプテン添加時の反応性を百分率 [B/B_0 (%)] で示している。抗体の K_a 値に応じて検量線が左にシフトし、高感度な測定が可能となる。また、フェムトモル－アトモル (10^{-15} – 10^{-18} mol; 上記例では、 $1 \text{ pg} = 2.5 \times 10^{-15}$ mol) レベルの測定には、 K_a 値が 10^{12} M^{-1} を上回る抗体が必要である。

シガトキシン類^{14,15)}や[Arg⁸]-バソプレシン¹⁶⁾のように、低分子抗原でもサンドイッチ法を適用できる例も存在するが、これらの分子量は 1,000 前後であり、かつ一方に長い構造をしていることから、一般的なハプテンへの応用例とは一線を画す。また、Voss らはフルオレセインと抗フルオレセイン抗体の抗原抗体複合体を認識するポリクローナル抗体を調製し、3 成分の複合体を検出する免疫測定法を構築している^{17,18)}。このような抗原抗体複合体を認識する抗体は抗メタタイプ抗体と呼ばれ、その調製には、標的ハプテンとそれに対する抗体の複合体を動物に免疫投与することになる。しかし、抗原抗体複合体の体液

中での安定性の問題などから、その調製は非常に困難であり、現在までに調製された抗メタタイプ抗体は先の例のほか、ジゴキシシ¹⁹⁾、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール^{20,21)}、アンジオテンシンII²²⁾、ミクロシスチン-LR²³⁾、およびモルヒネ²⁴⁾に対する抗体など、わずか数例にとどまっている。(ただし、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール2例のうち1例²¹⁾およびモルヒネの例²⁴⁾は、抗体工学的手法により調製されている) 一方、ハプテンを測定可能な非競合型免疫測定法としては単一の抗体を用いる非競合型単一抗体免疫測定法がある²⁵⁾。本法は、測定ハプテンに対して過剰な抗体を反応させたのち、何らかの方法(抗原固相化プレートなど)で抗原抗体複合体と遊離の抗体を分離し、生成される抗原抗体複合体の量を標識のシグナル活性として検出する方法である²⁵⁾。(図4)

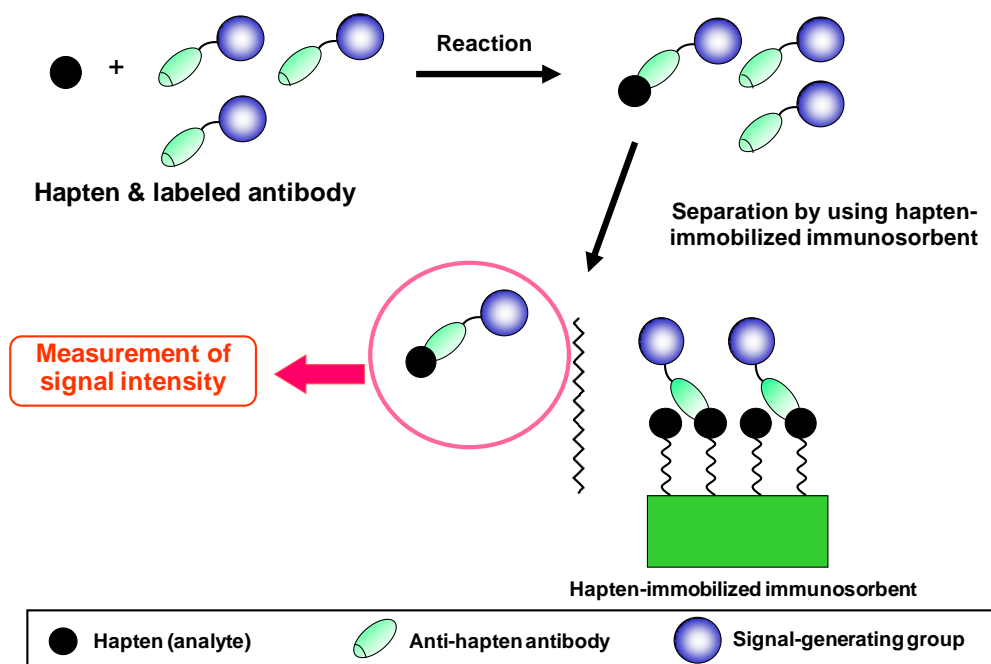


図4. 非競合型単一抗体免疫測定法の原理

非競合型単一抗体免疫測定法は、測定ハプテンに対して過剰な標識抗体を反応させたのち、抗原固相化プレートなどで抗原抗体複合体と遊離の抗体を分離し、生成される抗原抗体複合体の量を標識のシグナル活性として検出する方法である。単一のエピトープしかないハプテンに適応できる方法であるうえ、サンドイッチ法と同様に過剰量の標識抗体で抗原を捕捉するため高感度な測定が可能である。反面、本法の適用には、一定品質の標識抗体および分離に用いる固相化抗原の継続的な供給が必要である。

サンドイッチ法と同様、過剰量の抗体を用いて微量の抗原を捕捉して標識の活性へと変換できることから、高感度な測定が可能であるが、本法には一定品質の標識抗体および分離に用いる固相化抗原の継続的な供給が必要である。今までに固相化抗原のリサイクルを目的に、抗原固相化カラム^{26,27)}や、抗原固相化ポリ-L-リジン²⁸⁾などの多価抗原分子を作製し、これを分離試薬として用いる変法が報告されているものの、標識抗体の供給に関する問題点については未だ解決されていない。

近年、抗体の遺伝子工学、すなわち抗体工学を駆使し、動物が産生することのできない人工の抗体分子を創製する試みがなされている²⁹⁾。通常、免疫測定法における抗体は、標的分子に特異的に結合する“結合試薬”として機能しているが、その機能は主に V_H と V_L の両ドメインが担っている。抗体工学においてはこの V_H と V_L を適当なリンカーペプチドで連結した、分子量約 28,000 の一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) が用いられている^{30,31)}。(図 1; scFv) この scFv は分子量が小さいのみでなく、IgG 型抗体の抗原結合特性を保持していることが多い。さらに、scFv は生体組織細部への浸透性に優れ³²⁾、速やかに排泄されやすいため、イムノシンチグラフィ³³⁾や放射免疫療法³⁴⁾にも活用され、さらには臨床化学分野への応用も試みられつつある³⁵⁾。近年では scFv 遺伝子に対して、遺伝子工学的にランダムな点変異を導入した変異 scFv 遺伝子の集団 (ライブラリー) を調製し、その中から親和力に優れる変異種を調製する試みも盛んである³⁶⁻³⁸⁾。本手法を用いて、既存の抗ハプテン抗体の親和力を向上することができれば、競合型免疫測定法の高感度化が期待され、臨床分析化学分野への寄与も大きいと考えられる。また、抗体工学を用いて、scFv の酵素標識体を調製することで、一様に標識された抗体を比較的容易に調製することができ、ハプテンの非競合型単一抗体免疫測定法の構築も可能である。

そこで本研究では、scFv を用いたハプテンの免疫測定法の構築とその高感度化について検討した。なお、モデルハプテンとしては、臨床化学領域でその測定が重要視される胆汁酸類およびステロイド類を取り上げた。まず第 1 章では、デオキシコール酸 (DCA) をモデルハプテンとし、マウスより得られる抗 DCA 抗体の遺伝子より scFv を調製し、これを

用いる免疫測定法の構築を行った。

さらに、scFv を用いてハプテン免疫測定法の高感度化を行った。第 2 章では、11-デオキシコルチゾール (11-DC) に対する抗体の scFv 遺伝子を用いて scFv-酵素融合体を調製し、非競合型単一抗体免疫測定法の構築を行った。また、第 3 章では、競合型ハプテン免疫測定法の高感度化を目的として、抗体工学的アプローチによる抗体の親和力の向上 (アフィニティマチュレーション) を行った。モデル抗原として、女性ホルモンのうち、最も活性が高いエストラジオール (E_2) を用いた。 E_2 に対する抗体の scFv 遺伝子を鋳型としてランダムな点変異を導入した遺伝子の集団 (ライブラリー) を作成し、親和性の向上した scFv クローンの獲得を行った。

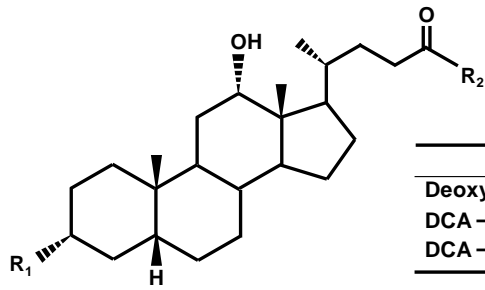
第1章 マウス抗デオキシコール酸モノクローナル抗体一本鎖Fvフラグメントの調製と免疫測定法への応用

第1節 序論

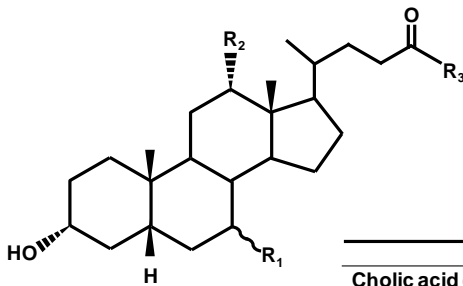
胆汁酸は、肝においてアセチル CoA からコレステロールを経て生合成されるカルボン酸であり、コレステロールの 7 α 位または 27 位が水酸化され、1 次胆汁酸であるケノデオキシコール酸およびコール酸が生成される³⁹⁾。これらのほとんどは、タウリンまたはグリシン抱合を受け、十二指腸へ分泌される。さらにその一部は、腸内細菌により脱抱合反応、脱水酸化反応および酸化還元反応を受け、2 次胆汁酸であるケノデオキシコール酸、リトコール酸およびデオキシコール酸へと変換される^{40,41)}。これらの多くは腸管膜より再吸収され、門脈を経て肝に戻り、再び胆汁中に分泌される。このような腸肝循環の過程で、胆汁酸はミセルの形成や、脂質吸収促進など、重要な生理機能を担っている。

近年、胆汁酸のシグナル分子としての機能が注目されている。上述の腸肝循環において、胆汁酸は肝 X 受容体 (LXR) とファルネソイド X 受容体 (FXR) の 2 つの核内受容体により、胆汁酸の生合成をフィードバックしている⁴²⁾。また、胆汁酸のカルボキシ基にグルクロン酸⁴³⁻⁴⁵⁾ や 5'-アデニル酸⁴⁶⁾によるエステル型の抱合を受けた代謝物が存在することが報告された。これら代謝物はアミノ基との反応性を有するため⁴⁷⁾、生体内で非酵素的に組織中のタンパク質と共有結合付加体を形成し、毒性発現の一因となる可能性がある。さらに近年、デオキシコール酸 (図 3; DCA) の 5'-アデニル酸付加体 (図 3; DCA-adenylate) が、ヒストン H3 の N 末端部位に非酵素的に結合する可能性が報告された⁴⁸⁾。DCA-adenylate は *in vivo* では今のところ同定されていないものの、DCA やリトコール酸のような疎水性の大きい胆汁酸が、大腸がんのプロモーターとなるとの報告⁴⁹⁾も加味すると、胆汁酸のタンパク質修飾が、生体内での機能や病態に密接に関与する可能性がある。これら胆汁酸-タンパク質付加体の生体内での機能や病態との関連性を把握する上で、scFv は生体組織細部への浸透性、排泄速度、および発光物質との融合体の調製の観点から、極めて有用と考えられる。そこで、本章では、DCA に対する抗体の遺伝子情報を解析し (第 2 節)、scFv

の構築を行った (第 3 節). さらに, 調製された scFv を用いて免疫測定法を構築し, 臨床化学分析における scFv の有用性について検討した.



	R ₁	R ₂
Deoxycholic acid (DCA)	OH	OH
DCA – Lysine (DCA-Lys)	OH	NH-(CH ₂) ₄ -CH(NH ₂)-COOH
DCA – 3-sulfate	SO ₃ H	OH



	R ₁	R ₂	R ₃
Cholic acid (CA)	α-OH	OH	OH
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	α-OH	H	OH
Ursodeoxycholic acid (UDCA)	β-OH	H	OH
Lithocholic acid (LCA)	H	H	OH
Glycocholic acid (GCA)	α-OH	OH	NH-CH ₂ -COOH
Glychenodeoxycholic acid (GCDCA)	α-OH	H	NH-CH ₂ -COOH
Glycoursodeoxycholic acid (GUDCA)	β-OH	H	NH-CH ₂ -COOH
Glycolithocholic acid (GLCA)	H	H	NH-CH ₂ -COOH
Taurocholic acid (TCA)	α-OH	OH	NH-CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ H
Taurochenodeoxycholic acid (TCDCA)	α-OH	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ H
Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)	β-OH	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ H
Taurolithocholic acid (TLCA)	H	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ H

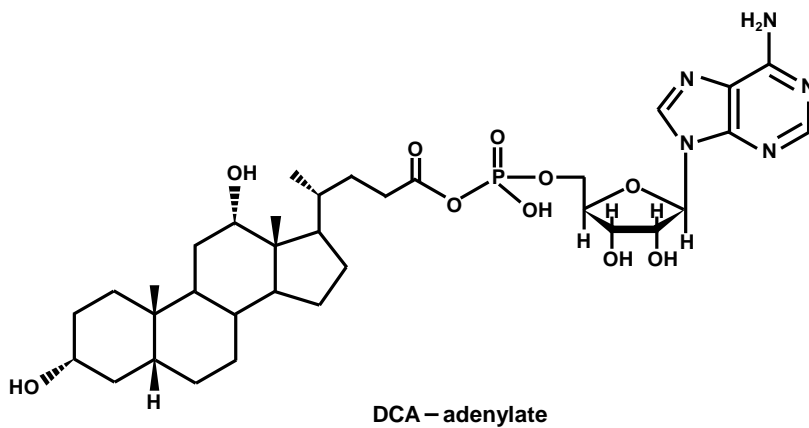


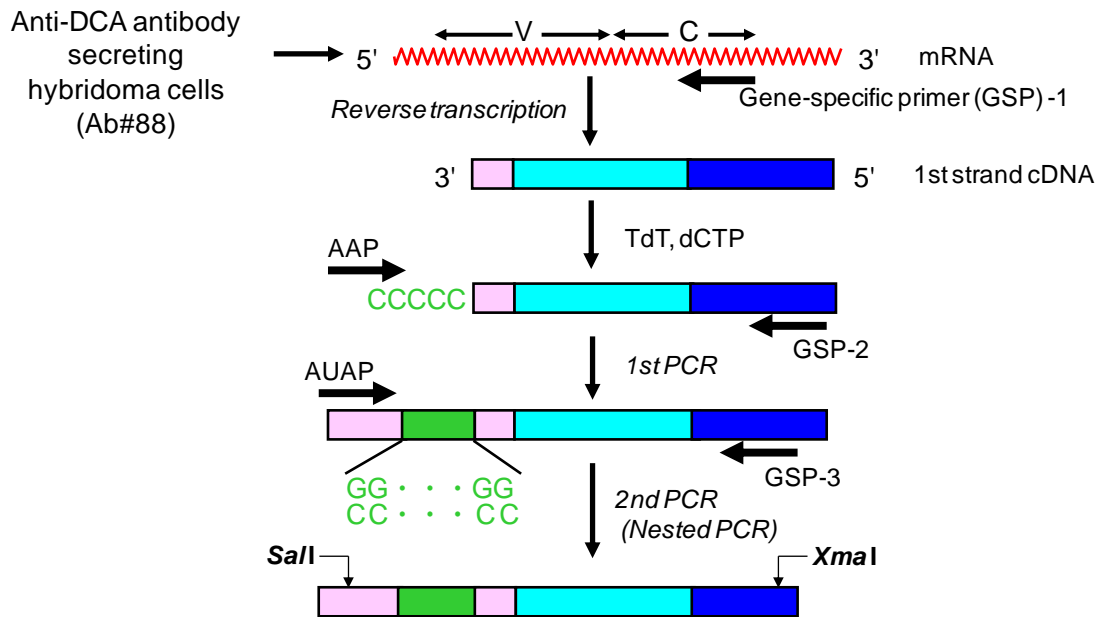
図 5. 各種胆汁酸，胆汁酸抱合体および DCA – adenylate の化学構造

第2節 抗デオキシコール酸抗体可変部の遺伝子配列の解析

抗 DCA 抗体 scFv の調製にあたり、用いる抗体産生ハイブリドーマ株として、Ab#88 (isotype γ_1 , λ) を用いた⁵⁰⁾。本抗体は 24 位のカルボキシ基に対して BSA を付加した DCA-BSA 結合体を免疫源として作成されており、生体中の DCA の測定に十分な親和性を有している ($K_a = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)。また、DCA のリジン残基付加体 (図 4; DCA-Lys) に対する反応性も有するため、生体内の DCA-タンパク質付加体の測定も可能である⁵⁰⁾。

この Ab#88 分泌ハイブリドーマ細胞より総 RNA を抽出し、 γ_1 鎖および λ 鎖に特異的なプライマー (gene-specific primer; GSP-1) および逆転写酵素を用いて、 V_H 遺伝子を含む cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、5'-RACE 法により目的とする遺伝子の増幅を行った⁵¹⁾。すなわち、cDNA に対して、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) と dCTP を用いて、3' 末端にポリ C 配列を付加した。その後、ポリ C リンカーに相補的なプライマー (abridged anchor primer; AAP) および GSP-1 より 5'側の配列に相補するプライマー (GSP-2) を用いて PCR を行った。さらに AAP の 5'側と同じ配列を有するプライマー (abridged universal amplification primer; AUAP) と GSP-2 より 5'側の配列に相補性を有するプライマー (GSP-3) を用いて nested PCR を行い、 V_H 遺伝子および V_L 遺伝子の断片を増幅した。(図 4 A) 得られた各遺伝子について、アガロースゲルを用いて電気泳動したところ、600 bp および 500 bp 付近にそれぞれ V_H 遺伝子および V_L 遺伝子に基づくバンドが確認できた。[図 6 B (i) H3 レーン (V_H 遺伝子), (ii) L3 レーン (V_L 遺伝子)]

A.



B.

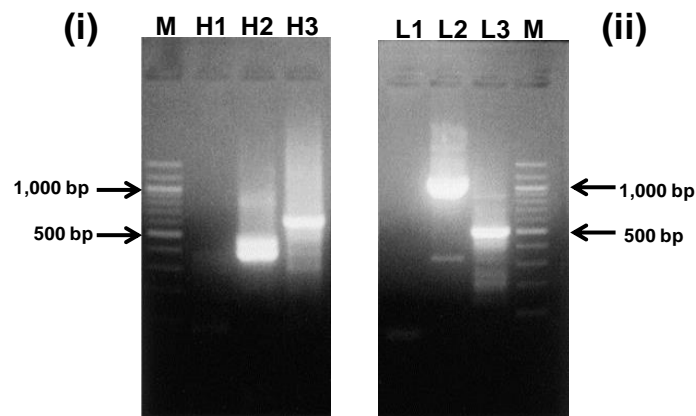


図 6. 5'-RACE 法による V_H および V_L 遺伝子の増幅方法 (A) と増幅される V_H (i; H3 レーン) および V_L (ii; L3 レーン) 遺伝子の電気泳動写真 (B)

(A) 抗 DCA 抗体分泌ハイブリドーマ細胞 (Ab#88) より得られる総 RNA に含まれる mRNA に対し、 γ_1 鎖および λ 鎖に特異的なプライマー (GSP-1) および逆転写酵素を用いて、 V_H および V_L 遺伝子を含む cDNA を合成した。この cDNA に対して、TdT と dCTP を用いて、3'末端にポリ C 配列を付加した。その後、ポリ C リンカーに相補的なプライマー (AAP) および GSP-1 より 5'側の配列に相補するプライマー (GSP-2) を用いて PCR を行った。(1st PCR) さらに AAP の 5'側と同じ配列を有するプライマー (AUAP) と GSP-2 より 5'側の配列に相補性を有するプライマー (GSP-3) を用いて nested PCR を行い、 V_H および V_L 遺伝子断片を増幅した。(B) 増幅した遺伝子について、アガロースゲルを用いる電気泳動を行ったところ、600 bp および 500 bp 付近にそれぞれ V_H 遺伝子および V_L 遺伝子に基づくバンドが確認できた。[B. (i) H3 レーン (V_H 遺伝子), (ii) L3 レーン (V_L 遺伝子)] なお、1st PCR を行わずに nested PCR を行った際には、両遺伝子に基づく遺伝子のバンドは検出されず、[B. (i) H1 レーン (V_H 遺伝子), (ii) L1 レーン (V_L 遺伝子)] 5'-RACE 時に poly-C 付加反応を行わずに調製した PCR 産物に対して PCR を行った際には、非特異的な増幅産物に由来するバンドが検出された。[B. (i) H2 レーン (V_H 遺伝子), (ii) L2 レーン (V_L 遺伝子)]

得られた V_H , V_L 遺伝子断片を pBluescript II ベクターにサブクローニングし, 大腸菌 XL1-Blue 細胞株へ電気穿孔法により遺伝子導入した. 形質転換した大腸菌クローンをコロニーPCR に付して V 遺伝子の導入が確認できたクローンより, 組換えプラスミドを抽出して遺伝子塩基配列を解析した. 対応するアミノ酸配列を Kabat らの抗体シーケンスデータベース⁵²⁾と照合し, V_H および V_L の遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列を同定した. (図7) 同定した V_H ドメイン, V_L ドメインはそれぞれ 116 アミノ酸, 110 アミノ酸から構成されており, CDR に相当するアミノ酸配列も特定することができた.

Heavy chain

5' GAG GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA GAC TTA ATA CAA CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACT CTC AAT
 E V Q L V E S G G D L I Q P G G S L K L S C A V S G F T L N

TAC TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAC AGG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT ATT GGT GGT CTC ACC TAC TAT CCA GCC
Y Y G M S W V R Q T P D R R L E W V A T I I G G L T Y Y P A
 CDR1

AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAT ATC CTG TAC CTG CAA ATG GGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACA GCC
S V K G R F T I S R D N A K N I L Y L Q M G S L R S E D T A
 CDR2

ATG TAT TTC TGT GCA AGA CGG GGA TAT GGT CAC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC GCT CTC ACA GTC TCC TCA 3'
 M Y F C A R R G Y G H H F D Y W G Q G T A L T V S S
 CDR3

Light chain

5' CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG ACT GTT ACA
 Q A V V T Q E S A L T T S P G E T V T L T C R S S T G T V T

ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAG GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT GGT ACC AAC AAC CGA GTT CCA GGT GTT
T S N Y A N W V Q E K P D H L F T G L I G G T N N R V P G V
 CDR1 CDR2

CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AGG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA CAG ACT GAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC TGT
 P A R F S G S L I G D R A A L T I T G A Q T E D E A I Y F C

GGT CTA TGG TTC AGC AAC CAT TTG GTG TTC GGT GGA GGA ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC 3'
G L W F S N H L V F G G G T K L T V L G
 CDR3

図7. 抗DCA抗体Ab#88のV_H, V_Lの遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列

図に示したV_H, V_Lのアミノ酸配列について、Kabatらの抗体シーケンスデータベース⁵²⁾と照合し、V_HおよびV_Lに3カ所ずつ存在するCDRを青字に示す通り同定した。

第3節 抗デオキシコール酸抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製

緒言で述べたとおり，scFv は，分子量が小さいだけでなく，生体組織細部への浸透性が高い³²⁾，排泄速度が速い³³⁾などの利点がある．また，融合タンパク質としての発現も可能⁵³⁾であることから，DCA-タンパク質結合体を測定する試薬としての有用性も高い．そこで，前節で得られた遺伝子塩基配列から，scFv を調製した．

前節で同定した V_H ， V_L 各遺伝子の塩基配列から，5'末端と3'末端に相補的なプライマー (V_H ; DCA V_H -back および DCA V_H -forward, V_L ; DCA V_L -back および DCA V_L -forward) を設計した．この際， V_H 遺伝子の3' プライマー (DCA V_H -forward) および V_L 遺伝子の5' プライマー (DCA V_L -back) には， V_H ， V_L 遺伝子を連結するためのリンカーペプチド [(GGGGGS)₃] をコードする配列の一部を加えた．このプライマーを用いて PCR に付すことで，scFv の構築に必要な V_H ， V_L 各遺伝子断片を調製した．この V_H ， V_L 各遺伝子を混合して PCR を行うと， V_H ， V_L 両遺伝子がリンカー配列の相補する部位がアニールすることで連結し，5'- V_H -linker- V_L -3' に連結された，一本の scFv 遺伝子が調製される．(図 8)

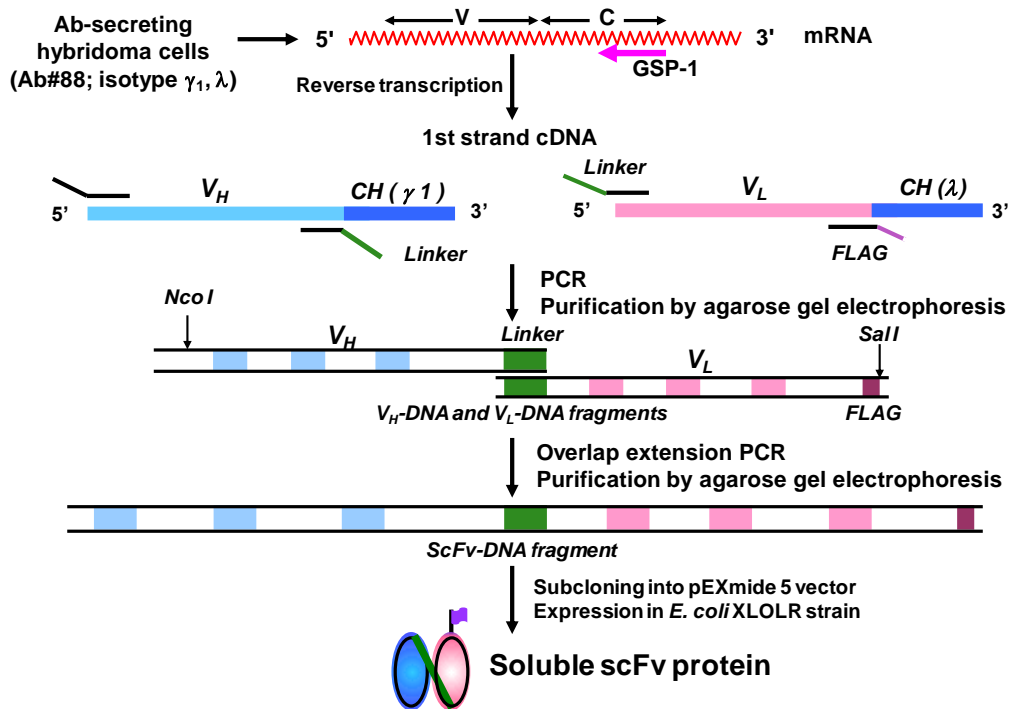


図 8. ScFv 遺伝子の構築と、可溶型 scFv タンパク質の調製方法

第 1 節で調製した cDNA に対し、 V_H 遺伝子および V_L 遺伝子の特異的に増幅するよう設計したプライマーを用いて PCR を行い、 V_H および V_L 遺伝子を調製した。この際、 V_H 遺伝子の 3' 末端側および V_L 遺伝子の 5' 末端側に、それぞれ相補するようにペプチドリンカーをコードする遺伝子配列の一部を加えておく。また、発現した scFv タンパク質の検出および精製のため、 V_L 遺伝子の 3' 末端側に FLAG ペプチド [DYKDDDDK] をコードする配列を付加している。これら調製された V_H 遺伝子および V_L 遺伝子を混合してオーバーラップエクステンション PCR に付すことで、 V_H 、 V_L 両遺伝子が、リンカー配列を介して連結し、scFv 遺伝子 ($5'V_H\text{-linker-}V_L\text{-}3'$) が調製される。この scFv 遺伝子を pEXmide5 ベクターへと連結後、大腸菌 XL0LR 細胞へと導入し、タンパク質発現を行うことで可溶型 scFv タンパク質を調製した。

この“オーバーラップエクステンション PCR”により、 $5'V_H\text{-linker-}V_L\text{-}3'$ および $5'V_L\text{-linker-}V_H\text{-}3'$ の 2 通りの scFv 遺伝子の構築が考えられるが、本研究では前者を採用した。また、発現した scFv タンパク質の検出および精製のため、 V_L 遺伝子の 3' プライマー (DCA V_L -forward) に FLAG ペプチド [DYKDDDDK] をコードする配列を付加している。得られた scFv 遺伝子を発現ベクターである pEXmide 5 ベクターにサブクローニングし、大腸菌 XL0LR 細胞株に遺伝子導入した。形質転換体をコロニー PCR に付して scFv 遺伝子の

導入を確認した。遺伝子の確認されたクローンより、組換えプラスミドを抽出し、その遺伝子塩基配列を確認した。その結果、Ab#88 と同様の塩基配列を有する scFv クローン (scFv#14) が調製できた。

第 4 節 抗デオキシコール酸抗体一本鎖 Fv フラグメントを用いる免疫測定法の構築と諸性質

本節では、第 3 節で調製した scFv を用いて競合型免疫測定法を構築し、その反応性について親抗体である Ab#88 と比較した。

本研究で用いたファージ提示用ベクター pEXmide5 では、scFv タンパク質の発現は *lac* プロモーターにより制御されている。またベクターに連結された scFv 遺伝子の 5' 末端には、大腸菌の内膜と外膜の間に存在するペリプラズム領域へとタンパク質を移行させるよう、*peIB* リーダーペプチド遺伝子が連結するよう設計されている。さらに scFv の 3' 末端には、ファージのマイナーコートタンパク質 III (pIII) をコードする遺伝子がアンバー終止コドン (UAG) を介して連結されており、第 3 章で示すようなファージ提示法への応用が可能である (第 3 章を参照)。本プラスミドを、抑制遺伝子を持たない non-suppressor 型の大腸菌 (XL0LR 細胞など) に遺伝子導入してタンパク質発現すると、アンバー終止コドンに基づいて翻訳が終止し、可溶性の scFv タンパク質が調製される。そこで前節で調製した scFv クローン (scFv#14) を isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) とスクロース存在下で培養し、scFv タンパク質をペリプラズム領域に発現した。本培養液を浸透圧ショック法に付して大腸菌の外膜を破壊し、ペリプラズム抽出液として可溶性 scFv タンパク質を回収した。得られた scFv#14 タンパク質を、抗 FLAG-M2 抗体アガロースゲルを用いてアフィニティ精製後、DCA-BSA 結合体固相化プレートおよび遊離 DCA を用いてその反応性を確認した。(図 9 A) その結果、アッセイあたりの遊離 DCA 量 2-5000 pg の範囲で良好な用量-反応曲線が得られ、抗体の親和力の目安となる 50% 阻害値 (DCA-BSA 固相化プレートとの結合を 50% 阻害するのに必要な遊離 DCA の質量) は 250 pg/assay であった。(図 9 B) Kobayashi らは親抗体 Ab#88 の 50% 阻害値が 254 pg/assay であると報告しており⁵⁰⁾、この結果を考慮すると、調製された scFv は親抗体と同様の親和性を示した。

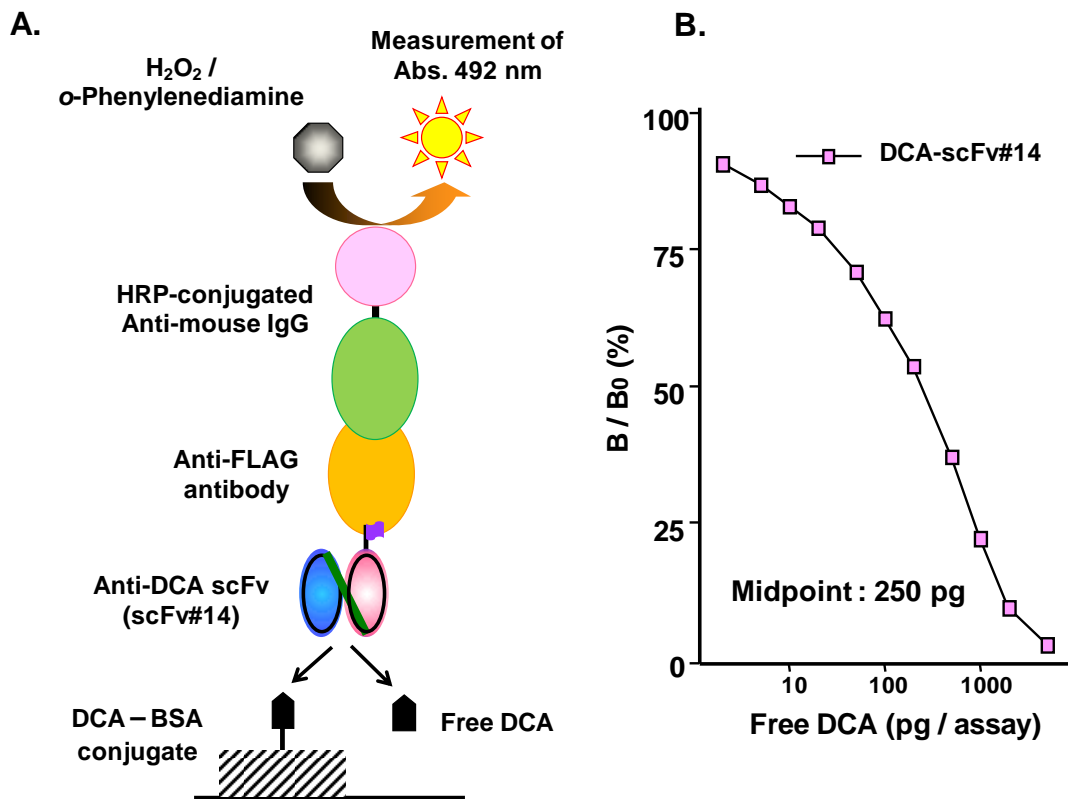


図9. 抗 DCA scFv#14 タンパク質を用いる競合型免疫測定 (A) と用量-反応曲線 (B)

(A) DCA-BSA を固相化した 96 ウェルプレートに, 抗 DCA scFv と各種濃度の DCA を反応させたのち, 2 種の抗出用抗体 (マウス抗 FLAG-M2 抗体およびペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG 抗体) を順次反応させ, 固相に残る scFv に基づく酵素活性を測定した. (B) 本測定により得られる用量-反応曲線を示す. 横軸には添加した DCA 量を, 縦軸には DCA 未添加の際の反応性を 100% とした際の各濃度の反応性を百分率 [B/B₀ (%)] で示している. 本測定ではアッセイあたりの添加 DCA 量 2-5000 pg の範囲で良好な用量-反応曲線が得られた. 抗体の親和力の目安となる 50% 阻害値は 250 pg/assay と, 親抗体と同様の値⁵⁰⁾であった.

Orosz らの方法⁵⁴⁾により, K_a 値を算出した結果, scFv#14 の K_a 値は $9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり, 親抗体 Ab#88 のそれ ($7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) と比較して 10 倍低い値であることが判明した. しかし, Ab#88 は IgG 抗体であり, 2 価の結合価に起因するアビディティ効果により親和力の違いが生じていると考えられた. 次に, DCA-BSA 結合体固相化プレートおよび種々の胆汁酸類およびその抱合体を用い, 作成された scFv の交差反応性について親抗体と比較した. 交差反応性については, 50% 置換法により算出しているが, その結果, 遊離 DCA との反応性を

100%とした際の胆汁酸類およびその抱合体との交差反応性は、親抗体の特性を保持していた。また、DCA-Lys 付加体に対する交差反応性は 72%であり、DCA-タンパク質付加体についても解析可能であった。(表 1)

表 1. ScFv#14 および親抗体 (Ab#88) を用いる各種胆汁酸類
および胆汁酸抱合体との交差反応性

調製された scFv について、DCA 抱合体、胆汁酸類およびその抱合体との交差反応性を 50%置換法により算出した。その結果、親抗体と同様、高い特異性を保持していた。なお、各種胆汁酸類および胆汁酸抱合体の化学構造については図 5 に示す。

Bile acid derivatives	Cross-reactivity (%)	
	ScFv#14	Ab#88
DCA	100	100
DCA-Lys	72	72
DCA-3-sulfate	0.04	<0.07
CA	0.79	0.14
CDCA	<0.02	<0.03
UDCA	<0.02	<0.03
LCA	0.2	0.04
GCA	0.47	0.38
GCDCA	<0.02	<0.14
GUDCA	<0.03	<0.07
GLCA	0.21	0.08
TCA	0.63	0.07
TCDCA	<0.02	<0.03
TUDCA	<0.02	<0.03
TLCA	0.08	<0.03

DCA-adenylate は、BSA と共有結合することが報告されており⁵⁰⁾、その反応性はグルクロン酸抱合体よりも高い。生体内においても、これら抱合体がタンパク質のリジン残基と共有結合することで、何らかの毒性を発現しているものと推測されるが、生体内で DCA-adenylate は同定されていない。そこで、BSA と DCA-adenylate が化学的に結合したタンパク質付加体モデルを作成し、scFv による付加体測定の可否を検討した。BSA を固相化したプレートに対して、DCA-adenylate を 37°C で 2 日間反応させたのち、scFv を反応させ、固相に残る抗原抗体複合体のシグナルを測定した。(図 10 A) その結果、1 ウェルあたりの DCA-adenylate 添加量 1-100 ng の範囲で DCA-BSA 付加体に基づくシグナルが検出できた。(図 10 B)

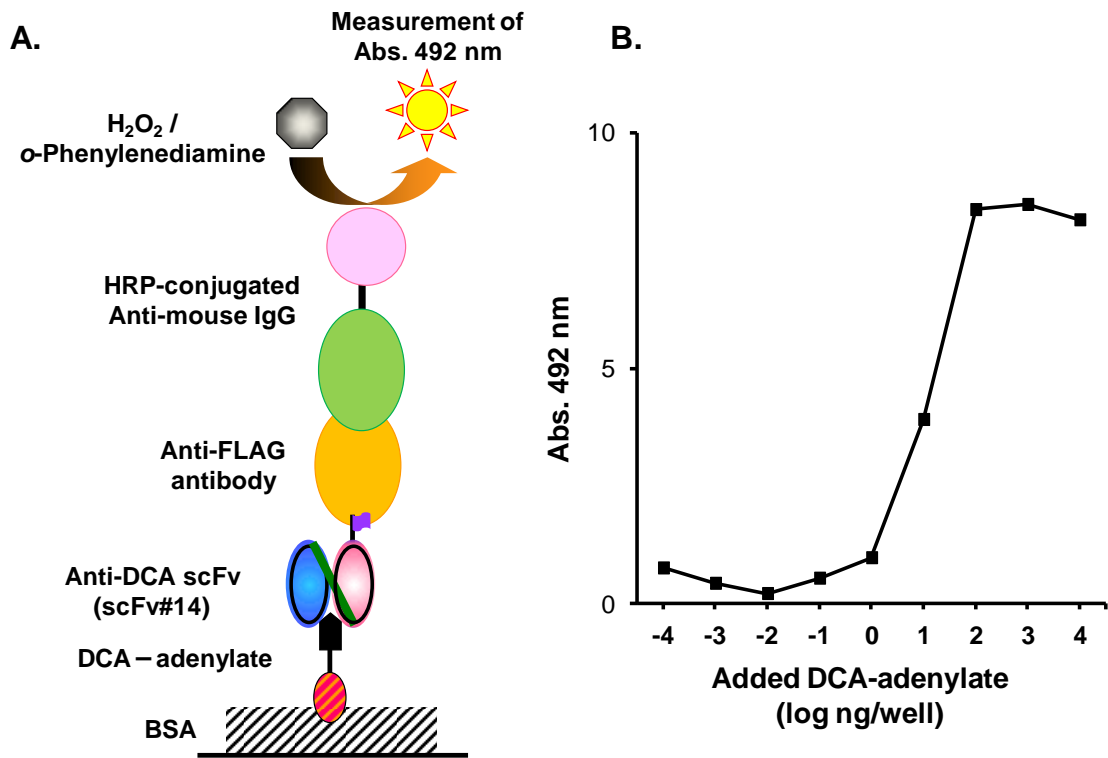


図 10. 抗 DCA scFv#14 を用いる DCA-adenylate の BSA 付加体の測定法およびその反応性 (B)

(A) モデルタンパク質として BSA を固相化した 96 ウェルプレートに、DCA-adenylate を反応させたのち、抗 DCA scFv および検出用抗体を順次反応させ、固相に残る酵素活性を測定した。(B) 測定の結果、1 ウェルあたりの DCA-adenylate 添加量 1–100 ng の範囲で測定が可能であった。

第 5 節 考察

本章では、scFv の低分子認識システムにおける有用性について、DCA に対する抗体から scFv を調製し、免疫測定法を構築してその諸性質を解析した。まず、用いる抗体 Ab#88 の遺伝子情報を、5'-RACE 法を用いて解析した。本法は 3'側に既知の塩基配列が隣接するような標的遺伝子に対するクローニング法である。抗体の可変部遺伝子はある程度配列が既知である定常部位が隣接しているため、本法の格好の対象となり、その有用性も確認されている^{55,56)}。ただし、 V_L 遺伝子においては、本法の適応が困難な場合がある。マウス由来の抗体の場合、L 鎖の 95%以上が κ 鎖であり、 κ 鎖の定常部位を標的として 5'-RACE 法を適用する場合、 κ 鎖の偽遺伝子が増幅されることがある。この κ 鎖は MOPC-12 細胞由来のミエローマ細胞が元来有しているものである^{57,58)}。今回用いたハイブリドーマ細胞においても、その調製段階において P3/NS1/1-Ag4-1 細胞株が用いられており、この細胞も上記に該当する。そのため、 κ 鎖の V_L 遺伝子の塩基配列を決定する際には、各サブグループの FR1 を認識する“ユニバーサルプライマー”のセットを用いるが、今回の場合、L 鎖のアイソタイプは λ 鎖であり、5'-RACE 法を適用することができた。次いで、解析した遺伝子配列から scFv の構築を行い、その諸性質について解析した。序論でも述べたが、scFv は生体組織への浸透性や排泄速度の観点から、体内動態解析に有用なプローブ試薬となる。第 1 節で決定した塩基配列を基に、 V_H 、 V_L 遺伝子を増幅したのち、オーバーラップエクステンション PCR により、リンカーを介して V_H 、 V_L 遺伝子を連結し、scFv 遺伝子を調製した。本遺伝子より調製される scFv タンパク質の活性を確認した結果、十分な親和性と特異性を示し、親抗体の結合特性を保持していた。さらに、DCA-タンパク質付加体についても、DCA-adenylate 添加量 1-100 ng の範囲で測定が可能であった。

今回作成した scFv の親抗体である Ab#88 については、DCA-adenylate との結合部位の解析が行われている⁵⁹⁾。この研究ではアシルアデニレートのアフィニティラベル化試薬としての有用性について検討しているが、抗体の V_H の CDR2 と CDR3 の間に存在する 74 番目のリジン残基に対して、DCA-adenylate が結合していた⁵⁹⁾。今回得られた scFv は、その親

和性および特異性より，親抗体と同様のパラトープの構造を示すと想定される．そこで，SWISS MODEL Protein Modeling Server⁶⁰⁾を用いて scFv の分子モデリングを作成し，各アミノ酸の立体構造を予測した．その結果，6 つの CDR で形成されるパラトープは，くぼみ構造を形成しており，Lys74 はパラトープから離れた位置に存在していた．DCA, DCA-Lys, 種々の胆汁酸類およびその抱合体に対する交差反応性の解析から，本 scFv は DCA の A 環の部位を強く認識する．以上を考慮すると，scFv は DCA を A 環方向から認識し，D 環の C17 位付近より抗原抗体反応の外側に側鎖が突出しているものと推察される．ただし，scFv の結合メカニズムについては，X 線結晶構造解析や NMR などを用いて詳細に解析する必要がある．

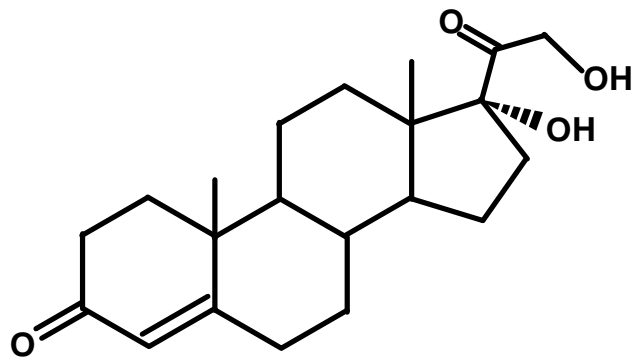
第2章 マウス抗 11-デオキシコルチゾール モノクローナル抗体一本鎖 Fv フラグメント —アルカリホスファターゼ融合タンパク質の調製と高感度非競合型単一抗体免疫測定法の構築

第1節 序論

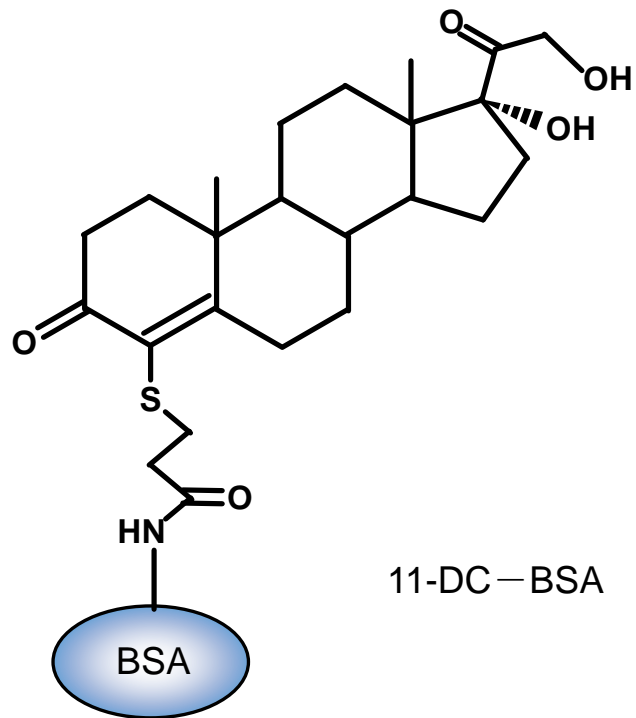
第1章では DCA を題材に、抗 DCA 抗体の scFv を構築し、その臨床化学分野における低分子認識システムへの応用を確認することができた。本システムを土台とし、さらに高感度な分析を可能とする免疫測定法の構築を行った。臨床化学や環境化学において、ステロイドホルモンや内分泌攪乱物質などハプテンに属する低分子化合物の測定は重要である。競合型の免疫測定法はこれらハプテンの定量に重用されているが、その感度はフェモトモル (10^{-15} mol) レベルに留まっている⁶¹⁾。一方、非競合型免疫測定法のうち、サンドイッチ法は低分子化合物に適応することは困難であるものの、単一抗体免疫測定法がある^{25,62)}。本法は、標的抗原に対して過剰量の標識抗体を反応させたのち、未反応の標識抗体を何らかの方法で分離し、抗原と複合体を形成する標識抗体のシグナル強度を検出・測定するものであり、高感度な測定が可能である。しかし、標識抗体は抗体とシグナル分子とを架橋試薬を用いて連結する際、その際様々な複合体が生成されるため、安定的な供給が難しい。また、作製される標識抗体から、生成物中に混在する未反応のシグナル分子や抗体を分離・除去することが困難であり、本測定法は広く用いられていない^{3,25)}。この問題について scFv と酵素を遺伝子工学的に連結することで、未反応の酵素や抗体の分離・除去が必要なく、モル比が 1:1 の抗体-酵素融合体を調製することができる。そこで本章では、モデル抗原として下垂体副腎系機能の診断指標である 11-デオキシコルチゾール (11-DC) をとりあげた (図 11)。11-DC は 17α -ヒドロキシprogesterone から 21-水酸化酵素により生合成される糖質コルチコイドである。11-DC から 11β -水酸化酵素の作用によりコルチゾールが生合成されるため、副腎皮質機能異常の診断指標として、その測定は重要である。例えば、コルチゾールの産生上昇が原因で発症するクッシング症候群の診断方法にメチラポン試験がある。メチラポンは 11β -水酸化酵素を阻害する薬剤であり、本剤を投与するとコルチゾー

ルの産生が抑制されるため、負のフィードバックにより下垂体より副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が分泌され、結果として血清 11-DC 量が増加する。このメチラポン試験に感受性を示さない場合、異所性 ACTH 産生腫瘍や副腎腺種および副腎がんなどの可能性が考えられ、その診断結果により治療も変わる⁶³⁾。

今回、遺伝子工学的に抗 11-DC scFv と酵素の融合タンパク質を調製し、本融合体を活用する高感度な非競合型単一抗体免疫測定法の構築を行った。



11-Deoxycortisol (11-DC)



11-DC-BSA

図 11. 11-デオキシコルチゾール (11-DC) および 11-DC-BSA 結合体の化学構造

第2節 抗11-デオキシコルチゾール抗体一本鎖Fvフラグメントーアルカリホスファターゼ融合タンパク質の調製

ScFvの調製には、マウス抗11-DCモノクローナル抗体(CET-M8)を用いた⁶⁴⁾。本抗体は11-DCの6位にBSAを結合したもの(図11; 11-DC-BSA)を免疫源として調製されている⁶⁴⁾。本抗体の K_d 値は $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であり、競合型免疫測定法における検出限界は5-10 pg/assayである^{65,66)}。今回、Kobayashiらにより既に構築された抗11-DC抗体scFv遺伝子(scFv^{#12}; 5'-V_H-linker-V_L-3')を用いた⁶⁶⁾。また、連結する酵素としてはアルカリホスファターゼ(ALP)を選択した。本酵素は酵素反応の持続性に起因して感度が高く、大腸菌ゲノムよりALP遺伝子を増幅し、scFv遺伝子と直接連結できるためである。培養した大腸菌よりゲノムDNAを採取し、特異的なプライマー(ALP-back, ALP-forward)を用いてALP遺伝子(EC 3.1.3.1)を増幅した。次いで、scFv^{#12}遺伝子と連結するため、V_L遺伝子の3'末端をコードするプライマー(DC/ALP-back)を用いてPCRを行った。この際、ALPの3'末端にタンパク質の検出および精製を行うため、His 6配列およびFLAG配列をコードし、かつタンパク質の翻訳が終止するよう、FLAG配列の直後にオーカー終止コドン(UAA)を配したプライマー(ALP-forward-2)を用いている。得られるALP遺伝子とscFv^{#12}遺伝子を混合してオーバーラップエクステンションPCRにより連結し、scFv-ALP遺伝子を調製した。本遺伝子をpEXmide 5ベクターへとサブクローニングした。このプラスミドを大腸菌XL1-Blue細胞株に遺伝子導入して、目的遺伝子の導入をコロニーPCRにより確認した。遺伝子の確認できたクローンについて、IPTGを用いてタンパク質発現を行うと、オーカー終止コドンに基づいて翻訳が終了し、scFv-ALP融合タンパク質が調製できた。(図12)

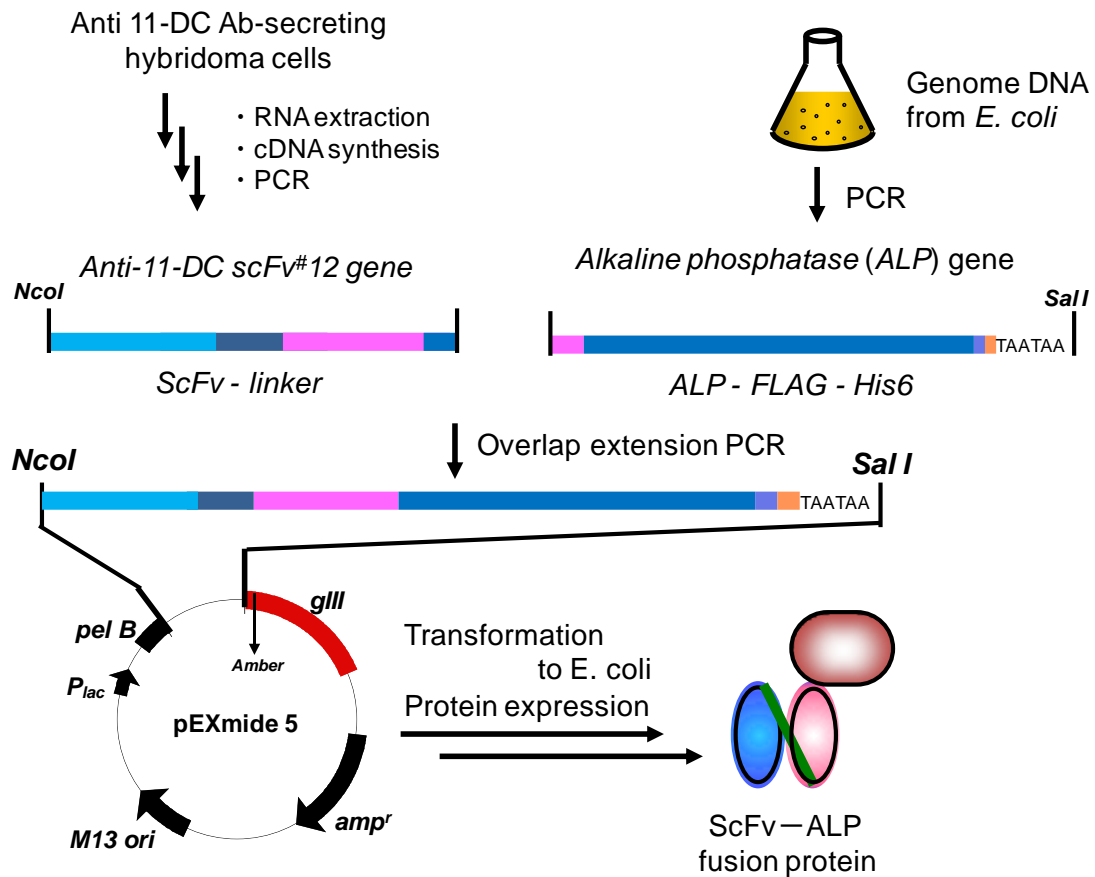


図 12. ScFv-ALP の遺伝子および融合タンパク質の調製方法

抗 11-DC 抗体産生ハイブリドーマ細胞より, Kobayashi らにより既に構築された抗 11-DC 抗体 *scFv* 遺伝子 (*scFv*^{#12}; 5'-*V_H*-linker-*V_L*-3') を用いた⁶⁶⁾. 連結する酵素として, アルカリホスファターゼ (ALP) を採用し, 大腸菌ゲノム DNA より *ALP* 遺伝子を調製した. この両遺伝子をオーバーラップエクステンション PCR により連結し, ベクターへと連結後, 大腸菌へと導入して *scFv*-ALP 融合タンパク質を調製した.

第3節 一本鎖 Fv フラグメント-アルカリホスファターゼ融合体を用いる非競合型単一抗体免疫測定法の構築

本節では、調製した scFv-ALP 融合タンパク質を用いて、非競合型単一抗体免疫測定法の構築を行った。本法では、まず測定抗原である 11-DC を scFv-ALP と反応させる。その後、11-DC-BSA を固相化したプレートを利用して未反応の scFv-ALP を固相に分離した。分離した液相には抗原抗体複合体が含まれており、この ALP 活性を測定すれば、11-DC 量に基づくシグナルが測定できると考えられる。(図 13 A)

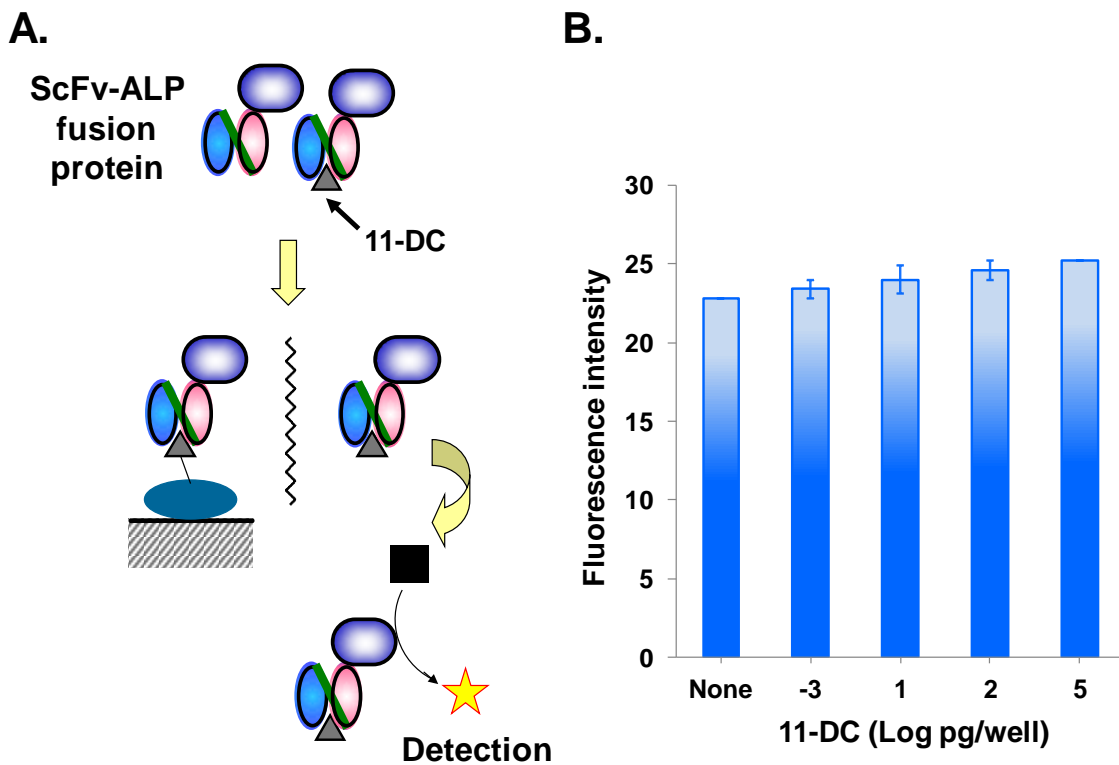


図 13. ScFv-ALP 融合タンパク質を用いる非競合型単一抗体免疫測定法 (A) と 11-DC 添加時の反応性の変化 (B)

(A) ScFv-ALP 融合タンパク質と 11-DC を反応後、11-DC-BSA 固相化プレートを用いて抗原抗体複合体と未結合の抗体を分離した。液相中に存在する抗原抗体複合体の酵素活性をシグナルとして検出することで、添加した 11-DC に基づくシグナルが検出できると想定される。(B) 横軸には添加した 11-DC 量を、縦軸は得られたシグナルを示すが、添加した 11-DC 量に依存したシグナルの増大は検出されず、11-DC 未添加時 (None) に高値のバックグラウンドが検出された。

そこで、上記方法に従って検討を行ったところ、バックグラウンド値が非常に高く、かつ添加した 11-DC 量に依存したシグナルの増大は認められなかった。(図 13 B) この高値のバックグラウンドは 11-DC への結合活性をもたず、かつ ALP 活性を有する妨害物質が混在することを示唆する。そこで、精製した scFv-ALP を滅菌した TBS 中で 2 時間インキュベーションしたのち、MALDI-TOF 質量分析計を用いてその質量を解析した。その結果、 m/z 約 49,000 および約 98,000 の分子イオンピークが検出された。(図 14) このピークは scFv-ALP の分解により生じた ALP 断片 (M_r 48931.6) およびその 2 量体の分子量 (M_r 97863.2) と符合していることから、妨害物質は分解により生じた ALP 断片であり、これを除去するような測定系の構築が必要と考えられた。

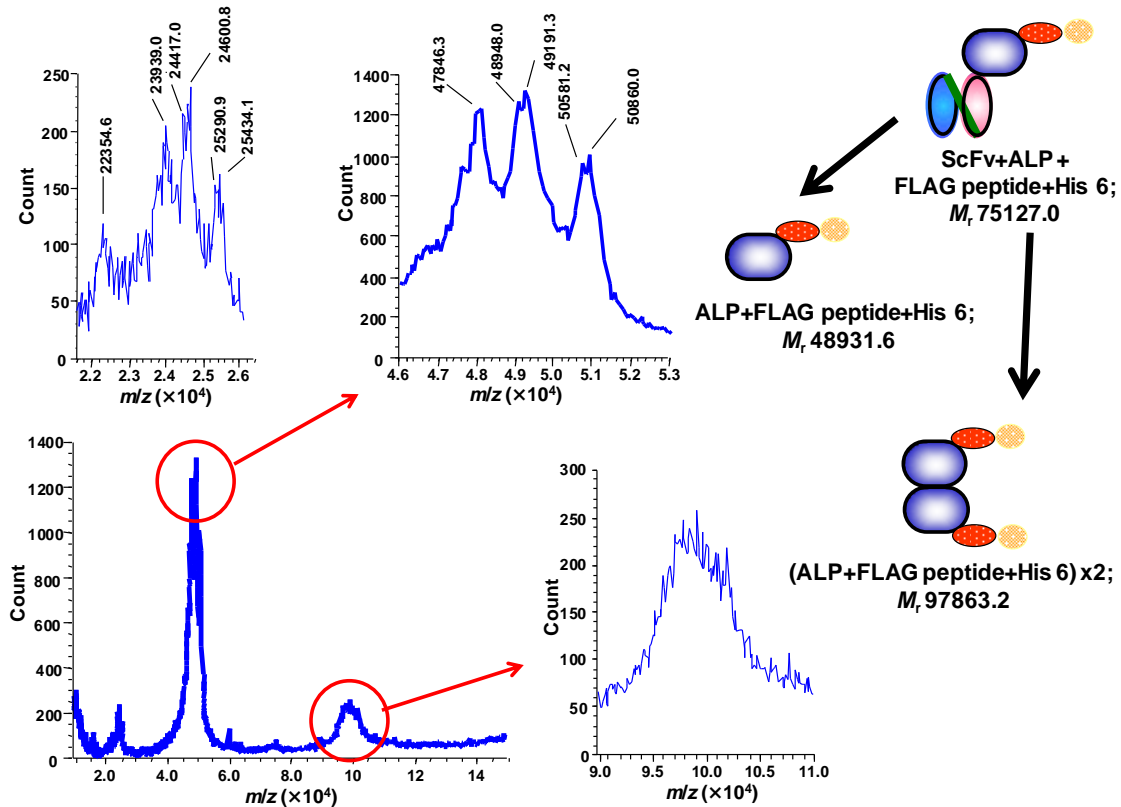


図 14. 緩衝液中 2 時間インキュベーション後の ScFv-ALP 融合タンパク質の MALDI-TOF 質量分析計を用いる質量分析

11-DC-BSA を用いる非競合型免疫測定において、scFv-ALP 融合タンパク質の分解が想定されたことから、精製した scFv-ALP を滅菌した TBS 中で 2 時間インキュベーションしたのち、MALDI-TOF 質量分析計を用いてその質量を解析した。その結果、 m/z 約 49,000 および約 98,000 の分子イオンピークが検出された。このピークは scFv-ALP の分解により生じた ALP 断片 (M_r 48931.6) およびその 2 量体の分子量 (M_r 97863.2) と符合していることから、妨害物質は分解により生じた ALP 断片であり、これを除去するような測定系の構築が必要となった。

分解産物である ALP 断片を分離する場合、ALP 断片を何らかの固相に捕捉して除去する方法と、ALP を遊離の状態 で除去する方法の 2 通りが考えられる。前者の場合、抗 ALP 抗体固相化プレートなどで ALP 断片を捕捉するが、scFv-ALP も同様に捕捉されるため、その分離能は著しく低い。次に後者を考慮すると、scFv-ALP と 11-DC との抗原抗体複合体を特異的に固相分離するシステムの構築が必要となる。抗原抗体複合体を認識する試薬として、抗メタタイプ抗体が考えられるが¹⁷⁻²⁴⁾、緒言でも述べたように、その調製は容易

ではない。そこで、抗原と反応している抗体にも親和性を示す、抗イデオタイプ抗体 (Id-Ab) を分離試薬として用いた⁶⁷⁻⁶⁹⁾。Id-Ab は、特定の抗体 (第 1 抗体; 本研究の場合、抗 11-DC 抗体) の可変部を認識する抗体であり、2 つのタイプに分類される。第 1 抗体の FR に、その抗原結合能を損なうことなく結合するものを α 型、第 1 抗体のパラトープに結合し、本来の抗原と競合するものを β 型と呼ぶ⁶⁷⁻⁶⁹⁾。(図 15) そこで Kobayashi らの調製した⁶⁴⁾、CET-M8 抗体に対する α 型と β 型のマウス Id-Ab ($\alpha^{\#29}$ および $\beta^{\#38}$) を用いて、測定系の改良を行った。

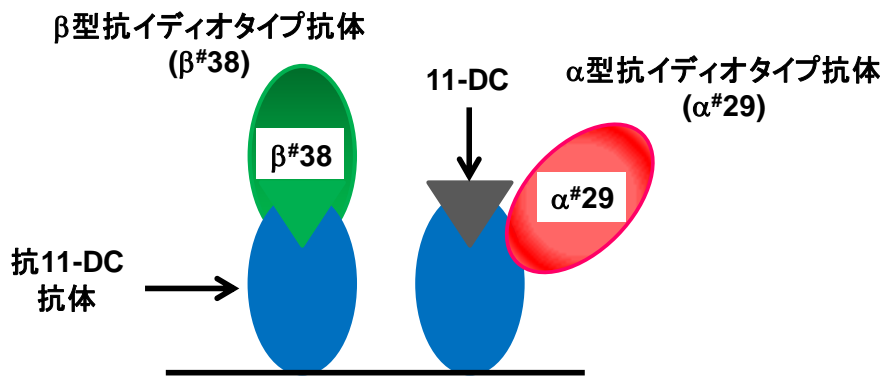


図 15. 抗イデオタイプ抗体の模式図

抗イデオタイプ抗体は、特定の抗体 (今回の場合、抗 11-DC 抗体) の可変部を認識する抗体であり、2 つのタイプに分類される。第 11-DC 抗体の FR に、その抗原結合能を損なうことなく結合するものを α 型、第 11-DC 抗体のパラトープに結合し、本来の抗原と競合するものを β 型と呼ぶ

先述と同様，11-DC を scFv-ALP と反応させた後，11-DC-BSA を固相化したプレートを利用して未反応の scFv-ALP を固相に分離した．液相には抗原抗体複合体のほか，分解産物である ALP が共存するが，これを α 型 Id-Ab である $\alpha\#29$ を固相化したプレートに反応させ，scFv-ALP と 11-DC の抗原抗体複合体を固相に分離した．固相に残る ALP 活性を測定した結果，バックグラウンドが大幅に減少し，加えた 11-DC の増量に応じたシグナルの上昇が検出できた．[図 16 (B)]

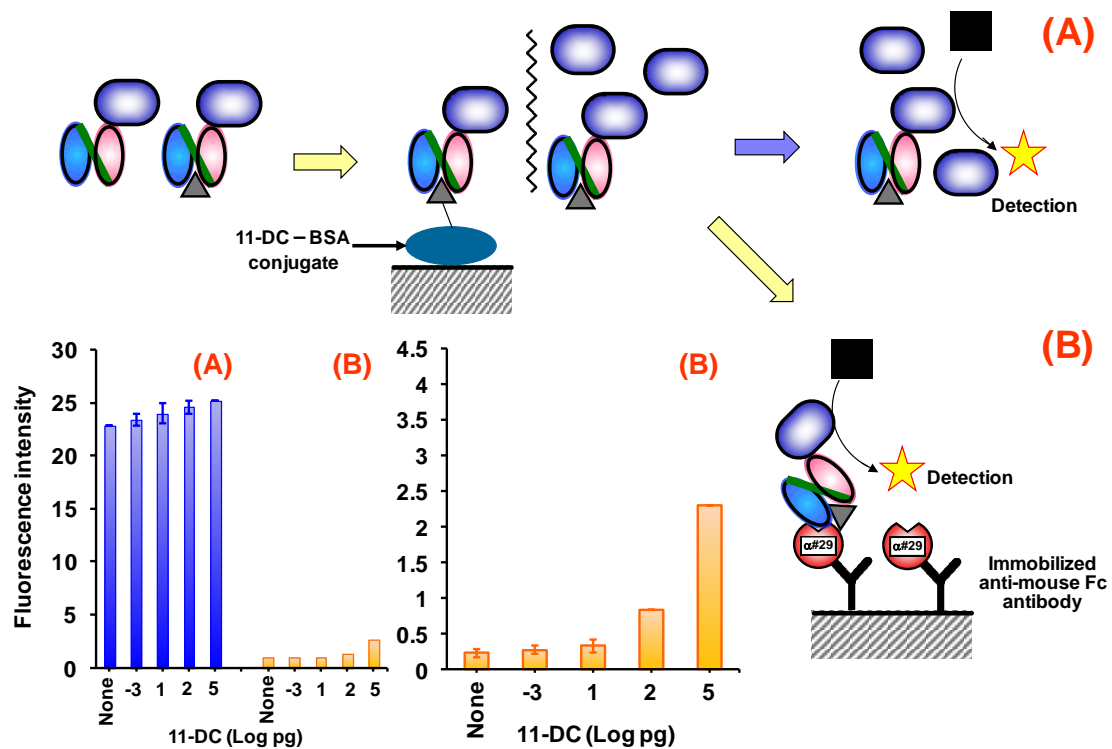


図 16. 非競合型単一抗体免疫測定法への α 型抗イディオタイプ抗体の応用

(A) ScFv-ALP 融合タンパク質を 11-DC と反応させたのち，11-DC-BSA 固相化プレートを用いて分離し，その上清の酵素活性を測定した場合，scFv-ALP の分解により生じた ALP 断片に起因したシグナルがバックグラウンドとして検出されていた．(B) 一方，液相の抗原抗体複合体を α 型 Id-Ab ($\alpha\#29$) 固相化プレートを用いて抗原抗体複合体を固相に分離し，固相に残る酵素活性をシグナルとして測定した場合，(A) と比較して 11-DC 未添加時 (None) のバックグラウンドの大幅な低下が認められ，添加した 11-DC に依存したシグナルの増大が認められた．

さらに、 β 型 Id-Ab である $\beta^{\#38}$ を用いることで、11-DC と、scFv 断片および scFv-ALP との競合反応を避け、より高感度な測定系を構築した。すなわち、11-DC と scFv-ALP を 37°C で 2 時間反応させたのち、 $\beta^{\#38}$ の溶液を加えた。その後、 $\beta^{\#38}$ と scFv-ALP の複合体を、抗マウス IgG 抗体固定化磁性ビーズを用いて除去した。さらに液相に残る抗原抗体複合体を $\alpha^{\#29}$ 固相化プレートに捕捉した。(図 17 A) $\alpha^{\#29}$ 固相化プレート上の ALP 活性を測定したところ、10 fg - 100 ng の広い範囲をカバーする用量-反応曲線が得られ、その検出限界は 20 アトモル (2×10^{-17} mol; 11-DC の質量として 6.9 fg) であった。(図 17 B) また、その特異性について近縁ステロイド類を用いて交差反応試験を行った結果、競合型ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay; RIA) で得られている結果と遜色のない結果が得られた。(表 2)

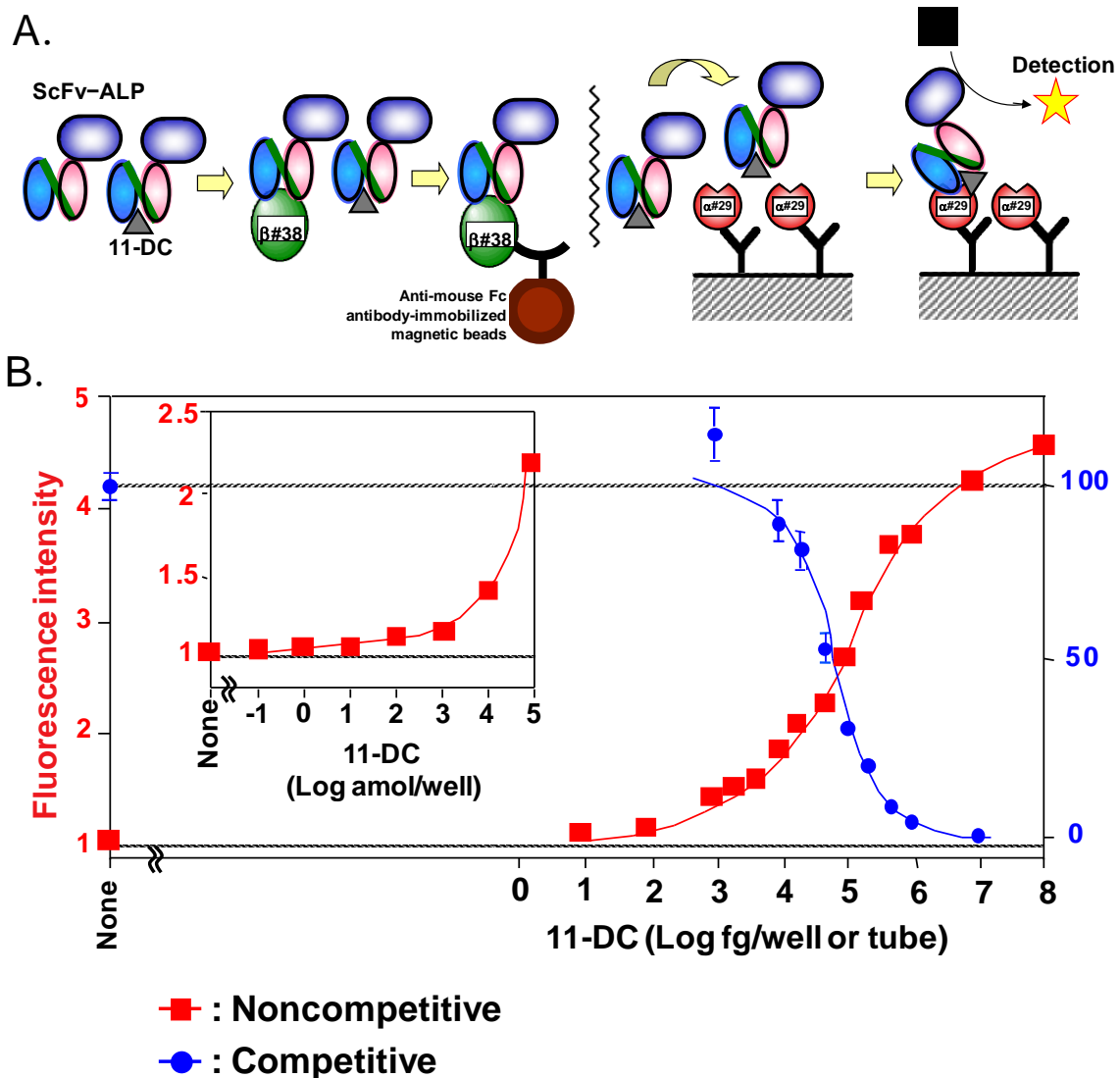
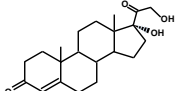
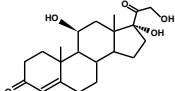
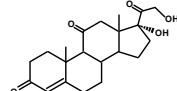
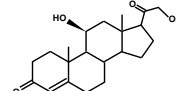
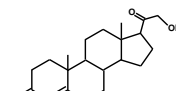
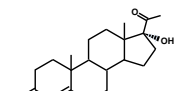
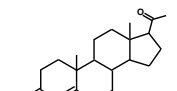
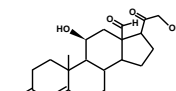


図 17. 最適化した単一抗体免疫測定法 (A) と得られる用量-反応曲線 (B)

(A) ScFv-ALP 融合タンパク質を 11-DC と反応後、 β 型 Id-Ab ($\beta\#38$) および抗マウス抗体固定化磁性ビーズを用いて、抗原抗体複合体を液相に分離した。この溶液を α 型 Id-Ab ($\alpha\#29$) 固相化プレートを用いて抗原抗体複合体を固相に分離し、固相の酵素活性に基づくシグナルを測定した。(B) (A)で示す測定系で得られる用量-反応曲線を示した。横軸は添加した 11-DC 量を、縦軸には 11-DC 未添加時のシグナル強度を 1 とした際の 11-DC 添加時のシグナル強度の比を示す。その結果、10 fg - 100 ng の幅広い範囲の検量線が得られ、 t 検定により検出限界を算出したところ、20 アトモル (2×10^{-17} mol; 6.9 fg) であった。

表 2. 近縁ステロイド類を用いる非競合型および競合型免疫測定法の交差反応性

11-DC に対する反応性を 100%とした際の、近縁ステロイド類との反応性を 50%置換法により算出した。今回構築した非競合型免疫測定法 (赤字) は、親抗体 (青字) および scFv (緑字) を用いる競合型 RIA により算出された交差反応性^{65,66)}と同様、高い特異性を保持していた。

	11-Deoxycortisol	Cortisol	Cortisone	Corticosterone
Steroid				
Constructed noncompetitive immunoassay	100	0.34	0.74	<0.14
Competitive RIA using CET-M8 ⁶⁵⁾	100	0.2	0.4	0.02
Competitive RIA using scFv#12 ⁶⁶⁾	100	0.15	0.26	0.019
	11-Deoxycorticosterone	17 α -Hydroxyprogesterone	Progesterone	Aldosterone
Steroid				
Constructed noncompetitive immunoassay	4.7	3.7	0.16	<0.21
Competitive RIA using CET-M8 ⁶⁵⁾	7	7	0.2	-----
Competitive RIA using scFv#12 ⁶⁶⁾	3.4	5.3	0.23	<0.10

第4節 非競合型単一抗体免疫測定法を用いる血中 11-デオキシコルチゾールの測定

健康人の血清中 11-DC 濃度は 10 µg/L 以下と低く、また血清中に多く存在するコルチゾールやコルチゾンが妨害物質となり、その測定が極めて難しい^{65,70)}。しかし、第3節で構築した非競合型免疫測定法の感度であれば、その測定は十分に可能と考えられる。そこで、本法が臨床化学において適用可能か否かを検討するため、健康ボランティアの血清を用いて 11-DC の添加回収試験および測定内・測定間変動試験を行った。

健康人より得られる血清を同量の生理食塩水および ³H 標識 11-DC を混合して 37°C で 1 時間インキュベートしたのち、2 倍量のジクロロメタンで抽出した。本抽出操作により、血清中に存在し、測定の妨害物質となりうるコルチコステロイドを除去することが可能である。抽出した有機相を乾固したのち、IMA 緩衝液 [3 g/L ゼラチン, 500 mM NaCl および 10% ブロックエースを含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4)] に溶解してサンプルを調製した。本サンプルに対して前節で構築した免疫測定法を行い、血清中の 11-DC 濃度を測定した。また、サンプル中の放射活性を測定し、抽出効率を算出した。その結果、11-DC の測定値は男性、女性それぞれ 1.1 ng/mL, 0.87 ng/mL であり、従来の免疫測定法で報告されている結果⁷¹⁾ (0.064–1.3 ng/mL) と符合するものであった。添加回収試験では、11-DC の添加量 10–1000 pg の間で、回収率 93.6% と良好な結果が得られた。(表 3) ただし、測定内・測定間変動を確認したところ、その変動係数がそれぞれ 10.9%, 15.5% であり、従来の競合型免疫測定法で得られている結果と比較するとやや大きいものとなった。これは、非競合型免疫測定法が競合型と比較して、幅広い範囲の用量–反応曲線を描くことに起因していると考えられた。(表 4)

表 3. 健常人血清を用いる 11-DC の添加回収試験

健常人の血清サンプル (n=4) に 10 - 1000 pg の範囲で 11-DC を添加し, その添加回収率を算出した. その結果, 測定された値 (Found) は予想される値 (Expected) とよく符合していた. 各 11-DC 濃度の添加回収率 (Recovery) は良好であり, その平均は 93.6% であった. また, 変動係数 (CV) についても 8.2% と良好な値を示した.

Added ($\times 10^2$ pg/assay)	Found ($\times 10^2$ pg/assay)	Expected ($\times 10^2$ pg/assay)	Recovery (%)	CV (%)
0	0.69			7.8
0.1	0.79	0.79	100.0	6.9
1.0	1.6	1.7	92.8	9.5
10	9.4	11	87.9	8.6
			93.6 \pm 6.1	8.2 \pm 1.1

表 4. 健常人血清を用いる 11-DC の測定内・測定間変動試験

6名の健常人の血清サンプルを用い, 血清中の 11-DC 濃度を測定し, 測定内 (Intra-assay) および測定間 (Inter-assay) の変動係数 (CV) を算出した. (各 n=4) その結果, 各変動係数は 10.9%, 15.5% とやや高い値となった. これは, 今回構築した非競合型免疫測定法が, 幅広い濃度範囲 (10 fg - 100 ng) の用量-反応曲線を描くことに起因していると考えられる. なお, 11-DC の測定値は男性 (M), 女性 (F) それぞれ 1.1 ng/mL, 0.87 ng/mL であり, 従来の免疫測定法で報告されている結果⁷¹⁾ (0.064 - 1.3 ng/mL) と符合するものであった. また, 血清サンプルに ³H 標識 11-DC を添加し, その抽出効率 (Extraction recovery) を算出しているが, その平均は 91.0% と良好な値であった.

Subjects	Sex	Intra-assay (n=4)		Inter-assay (n=4)		Extraction recovery (%)
		Concentration (ng / mL)	CV (%)	Concentration (ng / mL)	CV (%)	
1	M	1.0	14.8	0.99	15.5	87.3
2	M	1.1	2.6	0.90	16.9	94.2
3	M	1.1	17.2	0.96	13.4	86.4
4	F	1.2	11.4	1.1	16.7	95.7
5	F	0.53	9.0	0.62	16.9	90.7
6	F	0.93	10.6	0.89	13.5	91.5
		0.96 \pm 0.23	10.9 \pm 5.1	0.92 \pm 0.17	15.5 \pm 1.7	91.0 \pm 3.7

第5節 考察

本章では、scFv を用いるハプテンの高感度非競合型免疫測定法の開発を目的に、scFv-ALP 融合タンパク質の調製を行った。序論にも述べたが、ハプテンの非競合型免疫測定法として単一抗体免疫測定法があるが、本法に用いる酵素標識抗体を調製する際に生じる未反応の酵素や抗体の存在が、その適用を制限していた。今回の抗体工学的手法を用いる抗体-酵素融合体調製の試みは、上記の問題点を克服し、ハプテンの高感度測定におけるブレイクスルーとなると考えた。そこで、モデル抗体として抗 11-DC 抗体 (CET-M8) を用いて、抗体酵素融合体を調製し、非競合型免疫測定法への有用性を検討した。Kobayashi により構築された scFv 遺伝子⁶⁶⁾と、大腸菌ゲノムより得られる ALP とを連結して scFv-ALP 遺伝子を構築し、そのタンパク質を調製した。調製した scFv-ALP および 11-DC-BSA 固相化プレートを用いて、単一抗体免疫測定法を行ったところ、バックグラウンド値が非常に高く、しかも 11-DC 量に依存したシグナルの増大は認められなかった。MALDI-TOF 質量分析において、分解により生じた ALP 断片とその 2 量体の分子イオンと考えられるピーク (m/z 約 49,000, および約 98,000) が検出されたことから、scFv-ALP が保存中もしくは抗原抗体反応中に分解し、11-DC に対する結合性を失った ALP 断片が生成していた。この副産物に対して、Kobayashi らの調製した CET-M8 抗体に対する α 型と β 型のマウス Id-Ab を用い⁶⁴⁾、測定条件の最適化を行った。その結果、検出限界が 20 アトモル (2×10^{-17} mol; 11-DC の質量として 6.9 fg) という、高感度測定を実現した。CET-M8 抗体および scFv を用いる競合型 RIA および酵素免疫アッセイの検出限界は 5-10 pg である^{65,66)}ことを考慮すると、本アッセイ系の感度は約 1,000 倍高く、現在までに報告されているステロイド免疫測定法のなかで、最も高感度な免疫測定系の構築に成功した。

高感度なハプテン免疫測定法としては、[Arg⁸]-バソプレシン (M_r 1084.2) に対する非競合型の免疫測定法が挙げられる¹⁶⁾。この測定法の検出限界は 1 アトモル (1×10^{-18} mol) であり、今回開発された方法よりも感度が高い。ただし、[Arg⁸]-バソプレシンは構造上、抗体が N 末端側および C 末端側それぞれから抗体が結合できる。そのため、ハプテンでも稀なサン

ドイツ型の免疫測定法が適用されている点が今回の結果と異なる。また、抗体工学的手法により異なる非競合型免疫測定法の開発も試みられている。Ueda らは V_H および V_L の両タンパク質を別々に調製し、これらと抗原の 3 成分複合体測定する “オープンサンドイッチ” 型の免疫測定法を構築している⁷²⁾。今回用いた抗 11-DC 抗体についても上記の免疫測定法に応用されているが⁷³⁾、その検出限界は 3 pg/assay であり、今回得られた結果と比較すると、その感度は劣る。しかし、3 成分複合体をダイレクトに測定できるという、簡便性の高さは評価に値する。

さらに、今回開発した免疫測定系について、各種ステロイド類との交差反応性を確認したところ、その特異性は競合法と同様に良好であった。また臨床化学分野への応用を目的とし、健常人血清を用いて添加回収試験、測定内・測定間の変動試験を行った。その結果、競合法と比較して変動係数は大きいものの、十分応用可能な範囲であった。ただし、今回示された scFv-ALP 融合タンパク質の分解を防止する方法が必要である。Whitlow らは、scFv の V_H および V_L を連結するリンカー配列を変化させることで、scFv タンパク質の分解および凝集 (aggregation) を抑制しうることを報告している⁷⁴⁾。今回、scFv-ALP 融合タンパク質はリンカーを介さず連結しているが、今後、分解を抑制するリンカー配列を導入するなどの改変が必要である。

本章において、scFv-酵素融合体を用いることで、ハプテンの高感度非競合型単一抗体免疫測定法の構築に成功した。本法は、他の抗低分子抗体についても同様に適用しうる方法であり、今後、ハプテンに総称される低分子化合物の高感度免疫測定法におけるブレイクスルーとなると考えられる。近年、本研究と同様に、抗体-酵素融合タンパク質を調製し、ELISA に応用している例が報告された。Swain らは、コレラ毒素に対して非常に親和力の弱いラマ単ドメイン抗体 [single-domain antibody; sdAb ($K_a=1.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$)] と、触媒活性の向上した変異 ALP [大腸菌由来であり、153 番目および 330 番目のアミノ酸に変異 (D153G, D330N) を有する] とを連結した sdAb-ALP 融合タンパク質を調製した⁷⁵⁾。得られる sdAb-ALP 融合タンパク質は ALP の特性により 2 量体化し、2 価の抗体価である

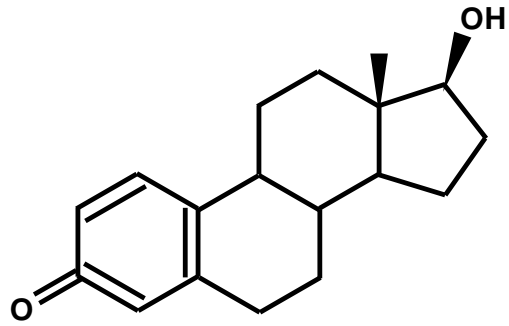
(sdAb-ALP)₂ として機能するが、その K_a 値は $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であり、可溶型 sdAb の約 3700 倍も高い親和性を示している [なお、論文中には解離定数 K_d 値 ($=1/K_a$) として示されている]. 本成果はアビディティ効果およびタンパク質の特性を活用した点で興味深い. また Dai らは、有機リン系殺虫剤であるクマホス (coumaphos) に対する抗体と電気化学発光を用いて、検出限界が 49.6 アトモル ($4.96 \times 10^{-17} \text{ mol}$) という高感度な測定系を構築した⁷⁶⁾. 本測定ではまず、抗原固相化プレートにグアニン結合一本鎖 DNA でラベルした抗クマホス抗体を反応させる. その後、各種濃度のクマホスを添加し、固相に遊離した抗体を DNA センサーチップ上に捕捉する. 本チップにルテニウム (II) 錯体を加えたのち、グアニン-ルテニウム (II) 錯体間の電子伝達反応に基づく発光を検出している. 本研究も単一抗体法の変法と捉えることができるが、なかでも検出系の改善を行い、高感度な測定を可能としている. 今後、今回構築した非競合型免疫測定についても、検出系の改善が望まれる.

第3章 競合型免疫測定法の高感度化を目的とする抗エストラジオール-17βモノクローナル抗体一本鎖 Fv フラグメントのアフィニティマチュレーション

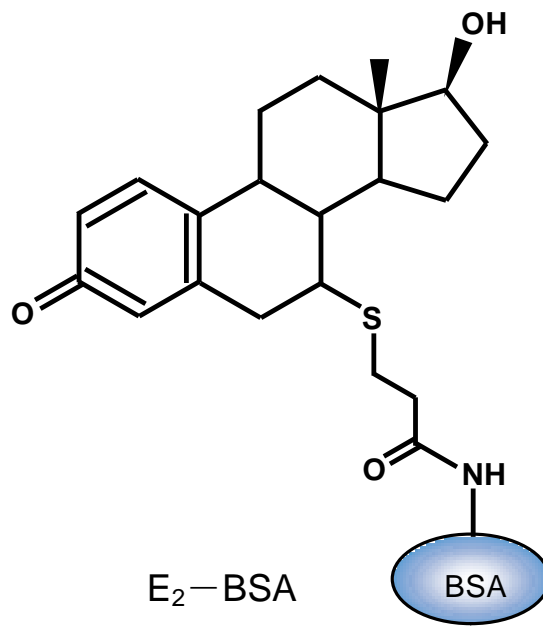
第1節 序論

生体試料および環境試料中のエストロゲン類の高感度かつ迅速な測定方法として免疫測定法は有用である。しかし、その免疫測定法は専ら競合法が用いられており、その高感度化には、抗体の親和力の向上が必須である。従来、動物を免疫することで調製する場合、得られるモノクローナル抗体の K_a 値は $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 程度にとどまり、そのため、測定感度はフェムトモル (10^{-15} mol) に留まっている。

近年の抗体工学の進展から、抗体遺伝子に変異を導入した変異抗体の分子集団 (ライブラリー) から、天然より得られる抗体の親和力を凌ぐ、“超高親和力”抗体を探索する試みが行われている。高分子量の抗原に対する抗体については、臨床化学分野に実用が可能なレベルの変異抗体の調製が報告されている⁷⁷⁾。一方、ハプテンにおいても、 $K_a \sim 1.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の抗フルオレセイン抗体を出発物質とし、 $K_a = 2.1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ へと親和性を向上させることに成功した例も存在する⁷⁸⁾。しかし、上記のような例は稀であり、親和力向上に向けた取り組みが今も行われている。本章では、エストロゲン類のうち、最も活性が高いエストラジオール-17β (図18; E₂) を題材とし、マウス抗E₂抗体に対して、抗体工学的手法を用いて親和力の向上 (アフィニティマチュレーション) を行った。



Estradiol-17β (E₂)



E₂-BSA

BSA

図 18. エストラジオール-17β (E₂) および E₂-BSA 結合体の化学構造

抗体工学を用いて高親和力抗体を創製する場合、 V_H 、 V_L 遺伝子に変異を導入した、変異抗体ライブラリーの調製が重要である。X 線結晶構造解析などにより、抗原との結合に関与するアミノ酸が特定されている場合、部位特異的な変異導入法⁷⁹⁻⁸²⁾を用いて、ライブラリーを構築することになる。しかし、そのような情報は少なく、野生型抗体の遺伝子にランダム変異を導入して、“偶然に”親和力の向上した変異体を探索する方法が一般的である。変異導入法としては様々な報告があるが、マンガンイオン (Mn^{2+}) や不均等な dNTPs を用いることで DNA ポリメラーゼの正確さ (フィデリティ) を低下させて、抗体遺伝子の増幅を行う、エラープローン PCR 法が簡便性の点から最も汎用されている⁸³⁻⁸⁶⁾。次に、変異を導入する部位について考慮する必要がある。抗体は V_H 、 V_L にそれぞれ 3 カ所ずつ存在する CDR が抗原の捕捉に直接関わる。そのため、CDR に選択的に変異を導入することが、親和力の向上の最短ルートと考えられる⁸⁷⁾。Valjakka らは、抗テストステロン抗体に存在する 5 カ所 (V_H -CDR-1, -3, V_L -CDR-1~3) の CDR に変異を導入したライブラリーを調製し、アフィニティマチュレーションを試みている⁸⁷⁾。その結果、親和力が約 40 倍向上した変異クローンの調製に成功しており、合計で 20 残基のアミノ酸置換が認められている⁸⁷⁾。その一方で、V ドメインの土台を形成する FR のアミノ酸変化が、CDR のコンフォメーションに影響を与えるとの報告もある^{84,88,89)}。Gram らは、抗プロゲステロン抗体の V ドメイン全体に変異を導入し、アフィニティマチュレーションを試みている⁸⁹⁾。結果として、30 倍親和力の向上した変異体が調製しているが、その際のアミノ酸置換数はわずか 8 残基 [V_H : 3 カ所 (うち、CDR は 2 カ所), V_L : 5 カ所 (うち、CDR は 2 カ所)] であった⁸⁹⁾。上記 2 例の標的ハプテンが、 E_2 と同様にステロイド類であることを考慮すると、変異の導入部位については、野生型抗体のアミノ酸配列およびパラトープの構造に依存すると想定される。また、抗体の変異導入頻度についても、上記例を考察した場合でも、その頻度は抗体により異なる。さらに抗タクロリムス抗体のアフィニティマチュレーションでは、わずか CDR のアミノ酸 5 残基が変異しただけで、親和力が約 15 倍向上したとの報告⁹⁰⁾がある。その一方、ジゴキシゲニンに対する抗体の V ドメインに 3 段階の遺伝子変異率 (0.22–3.0%) で変異を導入し

た scFv ライブラリーから、得られる変異抗体の親和力を比較した結果、変異導入率に依存して、得られる変異 scFv の親和性も向上したとの報告⁸³⁾もある。以上より、変異導入頻度についても、野生型抗体分子種の特徴に依存すると考えられる。そのため、ライブラリーの調製には、変異導入率の異なる複数のパターンを作製し、それぞれ、あるいはそれらの混合物について高親和力変異抗体クローンを探索することが必要と考え、ライブラリーの構築にあたり、種々の条件でエラープロン PCR を行い、その変異の導入頻度とパターンについて解析した (第 3 節)。

また、変異を導入した抗体ライブラリーから、目的とする分子を選択・単離する場合、存在する分子集団の“遺伝子型 (genotype)”を、一括して“表現型 (phenotype)”であるタンパク質として発現させる必要がある。ファージ提示法は、繊維状バクテリオファージを、遺伝子を導入した宿主に感染させることで、遺伝子型に基づくタンパク質をファージ表面に提示 (ファージ提示) する方法である^{91,92)}。本法では、まず scFv 遺伝子をファージ提示用ベクターへと連結し、遺伝子導入した形質転換大腸菌を調製する。この形質転換菌にヘルパーファージを感染させることで、scFv とファージの外殻タンパク質 (pIII や pVIII など) との融合タンパク質がファージ内に取り込まれ (パッケージング)、表面に様々な scFv が提示された“ファージミド粒子”の分子集団 (図 19; scFv-displaying phage library) が調製される。この調製した scFv 提示ファージライブラリーを、目的抗原を固相化したチューブなどに反応させることで、抗原特異的なクローンを選別する (パンニング)。固相に残るファージを、抗原抗体複合体を解離させて回収し、大腸菌に再度感染させる。これら scFv 提示ファージは、scFv 遺伝子を含むプラスミドベクターの+鎖を保持するため、感染した大腸菌にはプラスミドベクターが保持され、さらに上記操作を繰り返すことが可能である。(図 19)

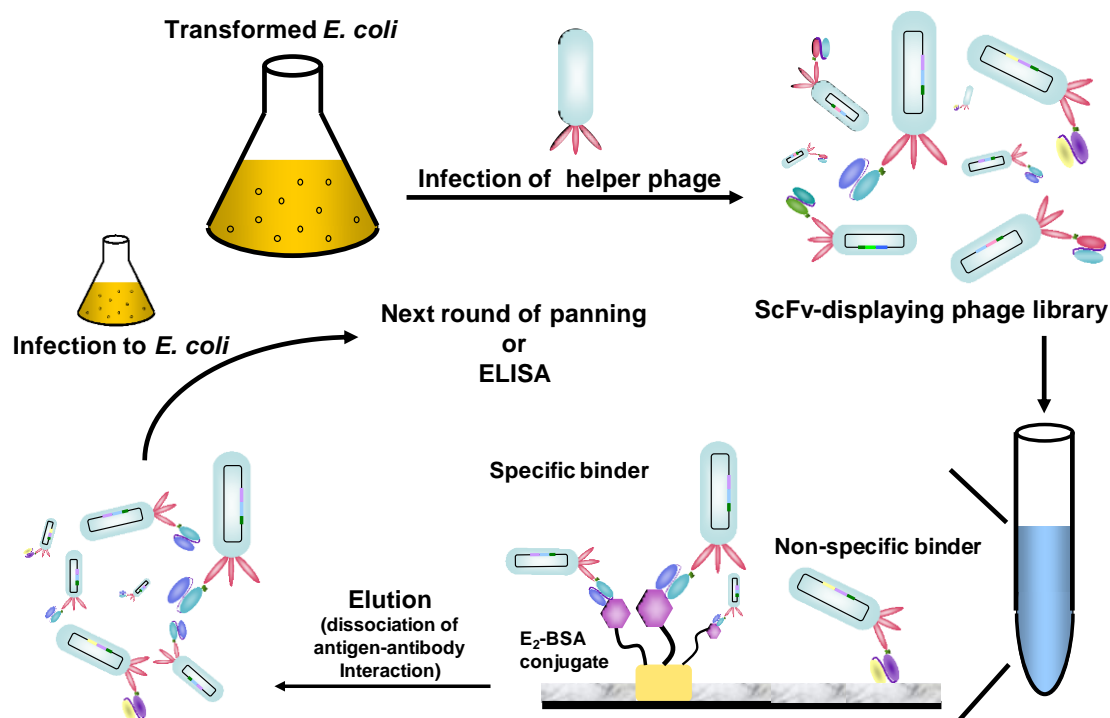


図 19. ファージ提示法／パンニングの原理

ScFv 遺伝子をファージ提示用ベクターを遺伝子導入した形質転換大腸菌 (Transformed *E. coli*) に、ヘルパーファージを感染させることで、scFv とファージの外殻タンパク質 (pIII や pVIII など) との融合タンパク質が調製されてファージ内に取り込まれ (パッケージング)、表面に様々な scFv が提示された“ファージミド粒子”の分子集団 (scFv-displaying phage library) が調製される。この調製した scFv 提示ファージライブラリーを、目的抗原 [E₂-BSA 結合体 (図 18) を例として示す] を固相化したチューブなどに反応させることで、抗原特異的なクローンを選別する (パンニング)。固相に残るファージ (Specific binder および Non-specific binder) を、抗原抗体複合体を解離 (アルカリ条件など) させて回収し、(Elution) 大腸菌に再感染させる。これら scFv 提示ファージは、scFv 遺伝子を含むプラスミドベクターの+鎖を保持するため、感染した大腸菌にはプラスミドベクターが保持され、さらに上記操作を繰り返すことが可能である。また、得られるファージの活性について ELISA などで評価することも可能である。

このファージ提示法およびパンニングを活用することで、親和性に優れる scFv 分子種の選別が可能であるが、本法を用いてアフィニティマチュレーションを行う場合、scFv 分子をファージ表面に効率良く提示させる必要がある。そこで、効率の良いファージ提示条件について検討を加えた (第 4 節)。変異の導入箇所については、抗原との反応性への寄与の大きさから CDR を選択し、“CDR シャッフリング”により 4 カ所の CDR (V_H-CDR2,

V_H-CDR3, V_L-CDR1, V_L-CDR3) に特異的に変異を導入した (第 5 節). この方法により獲得した抗体 scFv クローンについて, 競合型 RIA によりその親和力を解析した.

第2節 抗エストロジオール-17 β 抗体一本鎖 Fv フラグメントの調製

本節では、アフィニティマチュレーションの出発材料となる、抗 E₂ scFv を調製した。用いている抗体としては、マウス抗E₂抗体 (Ab#E4-4; isotype γ_1 , κ) を用いた。本抗体はE₂の7位に BSA を結合させたもの (図 18; E₂-BSA) を抗原として調製されており、 Fab (Fab#E4-4) を用いてE₂の ELISA および RIA を行った結果、得られた 50% 阻害値は 1.6 ng/assay および 9.0 ng/assay であった。健常人血清E₂値が男性では 10 - 60 pg/mL, 女性では 10 - 150 pg/mL (卵胞期), 50 - 380 pg/mL (排卵期), 30 - 300 pg/mL (黄体期), 10 - 50 pg/mL (更年期) であることを考慮すると⁹³⁾, 50% 阻害値が 100 pg/assay 以下の用量-反応曲線が必要である。そのため、本抗体は実試料測定に適する感度はないものの、アフィニティマチュレーションの出発物質としては好例である。本抗体についても、抗体分泌ハイブリドーマ株の総 RNA から、H 鎖については 5'-RACE 法を用いて遺伝子塩基配列を決定した。なお、本抗体の L 鎖は κ 鎖であり、5'-RACE 法を用いた場合、P3/NS1/1-Ag4-1 細胞株に由来する偽遺伝子が増幅される可能性が高い^{57,58)}。そのため、V_L 遺伝子の塩基配列を決定には、Nicholls らにより報告されているユニバーサルプライマーのセット⁹⁴⁾を用いて塩基配列を決定した。(図 20; Ab#E4-4)

V_H-sequence

Ab#E4-4 NA	GAA	GTG	CCA	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTG	AAG	CCT	GGA	GGG	TCC	CTA
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	E	V	P	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	AAA	CTC	TCC	TGT	ACA	GCC	TCT	GGA	TTC	CCT	TTC	AGT	AGG TCT GCC ATG TCT	TGG
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	K	L	S	C	T	A	S	G	F	P	F	S	R S A M S W	
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	GTT	CGC	CAG	TCT	CCA	GAC	AAG	AGA	CTG	GAA	TGG	GTC	GCC	GAG ATT AGT AGT GGT
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	V	R	Q	S	P	D	K	R	L	E	W	V	A	E I S S G
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	GGT TTT TAC ACC TCC TAT GTA GAC ACT GTG ACG GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	G F Y T S Y V D T V T G	R	F	T	I	S	R
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	GAC	AAT	GCC	AAG	AAT	ATC	CTG	TAT	CTG	GAA	ATG	AGC	AGT	CTG	AGG	TCT	GAG	GAC
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	D	N	A	K	N	I	L	Y	L	E	M	S	S	L	R	S	E	D
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	ACG	GCC	ATT	TAT	TAT	TGT	GCA	AGG	GAG AGG GGA ATT CAT TAC TAC GGA AGT AGC
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	T	A	I	Y	Y	C	A	R	E R G I H Y Y G S S
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	GAA ATT TTG GAC TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	TCA	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	E I L D Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

V_L-sequence

Ab#E4-4 NA	GAT	ATT	TTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	TCC	TCC	ATG	TCT	GTA	TCT	CTG	GGA	GAC	ACA
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	D	I	L	M	T	Q	T	P	S	S	M	S	V	S	L	G	D	T
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CAT GCA AGT CAG GGC ATT AGA AGT TAT ATC GGG	TGG	TTG
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	
Ab#E4-4 AA	V	T	I	T	C	H A S Q G I R S Y I G	W	L
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	

Ab#E4-4 NA	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAG	TCA	TTT	AAG	GGC	CTG	ATC	TAT	CAT GGA ACC AAC TTG
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	Q	Q	K	P	G	K	S	F	K	G	L	I	Y	H G T N L
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	GAA GAT	GGA	ATT	TCA	TCA	AGG	TTC	AGT	GGC	AGA	GGA	TCT	GGA	ACA	GAT	TAT	TCT
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	E D	G	I	S	S	R	F	S	G	R	G	S	G	T	D	Y	S
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	CTT	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	GAA	TCT	GAA	GAT	TTT	GGA	GAC	TAT	TAC	TGT	GTG CAA
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	L	T	I	S	S	L	E	S	E	D	F	G	D	Y	Y	C	V Q
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ab#E4-4 NA	TAT GCT CAG TTT CCG TAC ACG	TTC	GGT	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	GTA	AAA
ScFv#E4-4 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ScFv#m1-e7 NA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ab#E4-4 AA	Y A Q F P Y T	F	G	G	G	T	K	L	E	V	K
ScFv#E4-4 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ScFv#m1-e7 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図 20. 抗 E₂ 抗体 H 鎖 L 鎖可変部および scFv の遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列

図中, Ab#E4-4 は野生型抗体, scFv#E4-4 は野生型抗 E₂ scFv および scFv#m1-e7 は今回獲得した変異 scFv クローンの遺伝子塩基配列を示している. また, “NA” は遺伝子塩基配列, “AA” はアミノ酸配列を示しており, 各ドメインの CDR については青字斜体で示している.

得られた塩基配列を基に、 V_H , V_L 遺伝子を調製し、さらにオーバーラップエクステンション PCR により *scFv* 遺伝子を調製した (5'- V_H -*linker*- V_L -3'). なお、*scFv* の検出用に V_L の 3'末端には FLAG 配列 [DYKDDDDK] をコードする塩基配列を付加している。得られた *scFv* 遺伝子をファージ提示用ベクターである pEXmid5 にサブクローニングし、non-suppressor 型の大腸菌 XL0LR 細胞に遺伝子導入した。コロニーPCR により目的とする遺伝子 (*scFv#E4-4*) を保持するクローンを確認したのち、プラスミドを精製した。得られるプラスミドを用いて遺伝子塩基配列を決定し、対応するアミノ酸配列を同定した。その結果、*scFv* 遺伝子を構築する PCR の際に挿入されたと推測されるサイレント変異 (ACC→ACA) が V_L の FR3 に認められたものの、それ以外は親抗体 Ab#E4-4 の遺伝子塩基配列が保持されていた。(図 20; *scFv#E4-4*)

第3節 エラープローンPCRを用いる抗エストラジオール-17 β 抗体可変部遺伝子へのランダム変異の導入

序論でも述べたが、抗体のアフィニティマチュレーションを行う場合、変異の導入部位が重要となる。パルトープを形成する抗体のアミノ酸が特定されている場合、そのアミノ酸に対して特異的に変異を導入することが可能だが、その情報を得ることは難しい。そのため、ランダムな点変異を導入する方法が主として用いられており、エラープローンPCRは抗体のV遺伝子に対して比較的簡便にランダム変異を導入することが可能である。エラープローンPCRはLeungら⁹⁵⁾により報告された方法である。反応液中にMn²⁺を添加し、さらに加えるdNTPsを不均等な濃度で混合した条件下でPCR反応を行うことで、DNAポリメラーゼのフィデリティを低下させ、DNAにランダムな点変異を導入する方法である。この方法を用いて作製した変異V遺伝子から、さらにターゲットとなる箇所のみ(例えばCDR領域)をPCRで増幅できるため、その応用範囲が広い。また、アフィニティマチュレーションにおいては遺伝子への変異導入率も重要であるが、その頻度に関して一定の見解は得られていない^{83,84,88-90)}。そのため、異なる条件でエラープローンPCRを行い、導入率に幅のある変異V_H, V_L遺伝子群を調製し、それを組み合わせた。

エラープローンPCRによる変異導入の頻度は、添加するMn²⁺濃度によって、ある程度コントロールが可能である⁹⁶⁾。Leungらの報告では、0.5 mmol/Lの濃度でMn²⁺が添加されているが、本研究では0, 0.5 および 1.0 mmol/Lの濃度条件で行った。また、加えるdNTPのバランスについても変異の頻度を変化させる要因と考えられるが、今回はLeungらの報告と同様、dATPのみをdGTP, dCTP, dTTPの1/5量に減じた。さらにDNAの増幅に用いる酵素としては、容易に入手でき、かつフィデリティの低いAmpliTaq DNAポリメラーゼを用いた。以上の条件で抗E₂抗体scFv#E4-4を鋳型として行うエラープローンPCRを“single PCR”とし、得られる変異V_H, V_L遺伝子断片群を1st-mV_H-DNA, 1st-mV_L-DNAとした。この操作でMn²⁺濃度の異なる3種類(0, 0.5, 1.0 mmol/L)の変異V_H, V_L遺伝子群が調製されるが、これら産物に対して同じMn²⁺濃度条件で再度PCRを行った(double PCR)。このPCR

反応により調製される変異 V_H , V_L 遺伝子断片群を $2nd-mV_H$ -DNA, $2nd-mV_L$ -DNA とし, 計 6 種類の変異 V_H , V_L 遺伝子の集団を得ることができた. これら変異 V_H , V_L 遺伝子群について, 同じ PCR 条件で調製されたもの同士でオーバーラップエクステンション PCR に付したのち, 得られる変異 $scFv$ 遺伝子群を pEXmide5 ベクターにサブクローニングした. 得られる形質転換体に対してコロニー PCR を行い, $scFv$ 遺伝子の導入が確認できたクローンを任意に選択し, その塩基配列を決定して各反応条件における変異導入頻度およびパターンを解析した.

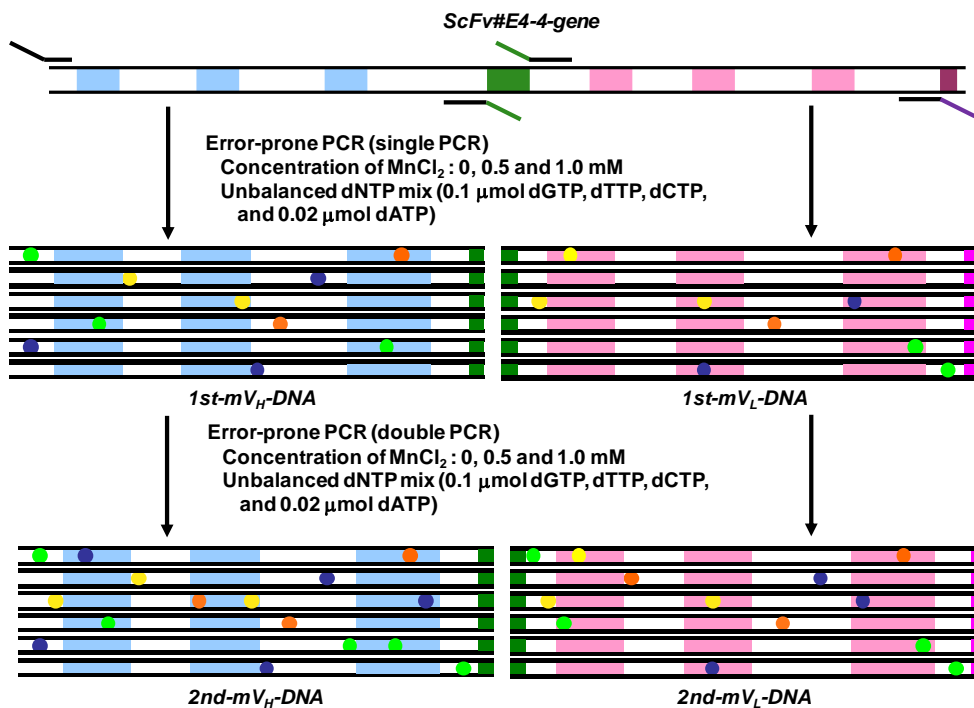


図 21. エラープロン PCR による変異 V_H , V_L 遺伝子断片群の調製

Leung ら⁹⁵⁾の報告を参考に, Mn^{2+} 濃度を 0, 0.5 および 1.0 mmol/L の 3 段階とし, 加える dNTP のバランスについては dATP のみを他の 1/5 量に減じた. 本条件で野生型 $scFv\#E4-4$ 遺伝子にエラープロン PCR を行うことで (single PCR), Mn^{2+} 濃度ごとに 3 種の変異 V_H , V_L 遺伝子 (図中には, まとめて $1st-mV_H$ -DNA, $1st-mV_L$ -DNA と記載) が調製される. この産物を同条件でさらにエラープロン PCR を繰り返し (double PCR), 3 種の変異 V_H , V_L 遺伝子 (図中には, まとめて $2nd-mV_H$ -DNA, $2nd-mV_L$ -DNA と記載) を調製した. 本操作で, 計 6 種の変異 V_H , V_L 遺伝子断片群が調製される.

遺伝子の変異導入率については、 V_H 、 V_L 遺伝子それぞれで算出し、各 PCR 条件での遺伝子の変異塩基数を、解析した全塩基数に対する百分率として求めた。ただし、プライマーが結合する 5'および 3'末端部位は変異が導入されないものとして除外しているため、 V_H 、 V_L 遺伝子それぞれ計 324 塩基 (V_H 全体 375 塩基)、275 塩基 (V_L 全体 321 塩基) の範囲について計算している。Single PCR における変異率に注目すると、 Mn^{2+} 未添加 (dNTP が不均等のみ) の条件では、 V_H 、 V_L の変異率はそれぞれ 0.93%、1.0% であった。この変異率は、加える Mn^{2+} 濃度に依存して増大し、1.0 mmol/L 条件では 8.5% (V_H)、11% (V_L) と高頻度の変異が認められた。さらに、double PCR では、 Mn^{2+} 濃度 1.0 mmol/L 条件下において、13% (V_H)、14% (V_L) と、さらに高い変異率であった。今回検討した条件における塩基の欠失は V_H 、 V_L でそれぞれ 10 カ所ずつと非常に少なく、挿入は全条件で認められなかった。また、変異パターンを解析すると、プリン塩基同士 ($A \leftrightarrow G$) およびピリミジン塩基同士 ($T \leftrightarrow C$) の変換 (トランジション変異) が、プリン塩基・ピリミジン塩基間の変換 (トランスバージョン変異) と比較して多く、トランジション/トランスバージョン比率は single PCR において 3.0 - 4.2 (V_H)、2.2 - 2.7 (V_L) であった。この傾向は double PCR においても同様であった。(表 5)

表 5. 各条件のエラープロードン PCR による変異数とその内訳

各 Mn^{2+} 条件 ($MnCl_2$ concentration) および各エラープロードン PCR 条件 (PCR multiplicity) により得られる各 6 種の変異 V_H , V_L 遺伝子について, 任意のクローンを選択し, 遺伝子配列を解析した. 解析したヌクレオチド数 (Sequenced nucleotides) に対し, 変異したヌクレオチド数 (Mutated nucleotides) およびその変異パターン [Transitions (Ts), Transversions (Tv) および Ts/Tv ratio] を示す. 遺伝子の欠失および挿入についてはそれぞれ Deletions および Insertions として示した. また, 全ての変異した (欠失および挿入を含む) ヌクレオチド数の合計を, 解析したヌクレオチド数で除し, 百分率とした値を変異頻度 [Mutation frequency (%)] として表に示している.

PCR multiplicity	$MnCl_2$ Concentration (mM)	Sequenced nucleotides (base)	Mutated nucleotides			Deletions	Insertions	Mutation frequency (%)
			Transitions (Ts)	Transversions (Tv)	Ts/Tv ratio			
A. V_H gene								
Single PCR	0	1290	9	3	3.0	0	0	0.93
	0.50	1620	55	13	4.2	1	0	4.3
	1.0	1296	87	21	4.1	2	0	8.5
Double PCR	0	1296	20	7	2.9	0	0	2.1
	0.50	1296	60	16	3.8	1	0	5.9
	1.0	1620	152	48	3.2	6	0	13
B. V_L gene								
Single PCR	0	1100	8	3	2.7	0	0	1.0
	0.50	1360	32	14	2.3	0	0	3.4
	1.0	1100	80	36	2.2	1	0	11
Double PCR	0	1100	9	4	2.3	0	0	1.2
	0.50	1100	44	13	3.4	1	0	5.3
	1.0	1375	137	50	2.7	8	0	14

抗体の可変部は, V_H , V_L いずれも抗原と結合する 3 カ所の CDR と土台を形成する 4 カ所の FR で構成されている. なかでも, CDR3 は抗原との結合特性への寄与の大きいとされている. そこで, V_H , V_L の CDR3 への変異の導入をみると, Mn^{2+} 濃度の上昇および PCR の繰り返しによって変異導入率の増大が認められた. (図 22)

V_H-CDR3

Ab[#]E4-4 GAGAGGGGAATTTCATTACTACGGAAGTAGCGAAATTTTGGACTAC
 Mut - 1 -----C-----
 Mut - 2 -----
 Mut - 3 -----
 Mut - 4 -----
 Mut - 5 --G-----T---C---G-
 Mut - 6 -----G-----
 Mut - 7 --A-----TG-
 Mut - 8 --G---C-----G---G-----
 Mut - 9 -----G-----G-----^---C-----
 Mut - 10 -----T---C-----T-----A-
 Mut - 11 --A-----G---G---A---G-
 Mut - 12 --G---G---G---G---G---G---C---T---T
 Mut - 13 -----A-----G-----
 Mut - 14 -----C-----
 Mut - 15 -----G-----
 Mut - 16 -----G-----
 Mut - 17 -----
 Mut - 18 -----C---C-----
 Mut - 19 -----C-----^G-----
 Mut - 20 -----G-----C-----
 Mut - 21 --AG---GC---G---A---C---C-
 Mut - 22 -----G-----
 Mut - 23 --G---G---C---T---CA-C-
 Mut - 24 --C---GGCA---C---GGT---G---T---G---C---G-
 Mut - 25 -----T---A-----

V_L-CDR3

Ab[#]E4-4 GTGCAATATGCTCAGTTTCCGTACAG
 Mut - 1 -----
 Mut - 2 -----
 Mut - 3 -----
 Mut - 4 -----
 Mut - 5 -C-----
 Mut - 6 -----C-----
 Mut - 7 -----
 Mut - 8 -----C---C-----
 Mut - 9 C-----A---G---T-----
 Mut - 10 -C---G-----G-
 Mut - 11 -----A-----C---G-
 Mut - 12 -----C---C-----
 Mut - 13 -----
 Mut - 14 -----A-----
 Mut - 15 -----
 Mut - 16 -----
 Mut - 17 -C-----
 Mut - 18 -----G-----
 Mut - 19 --G---C-----
 Mut - 20 -C-----T---C-----
 Mut - 21 --T---A---G-----
 Mut - 22 --G---C---C---G-
 Mut - 23 --C---T---C---A-
 Mut - 24 -C---C---T---C-----
 Mut - 25 -----

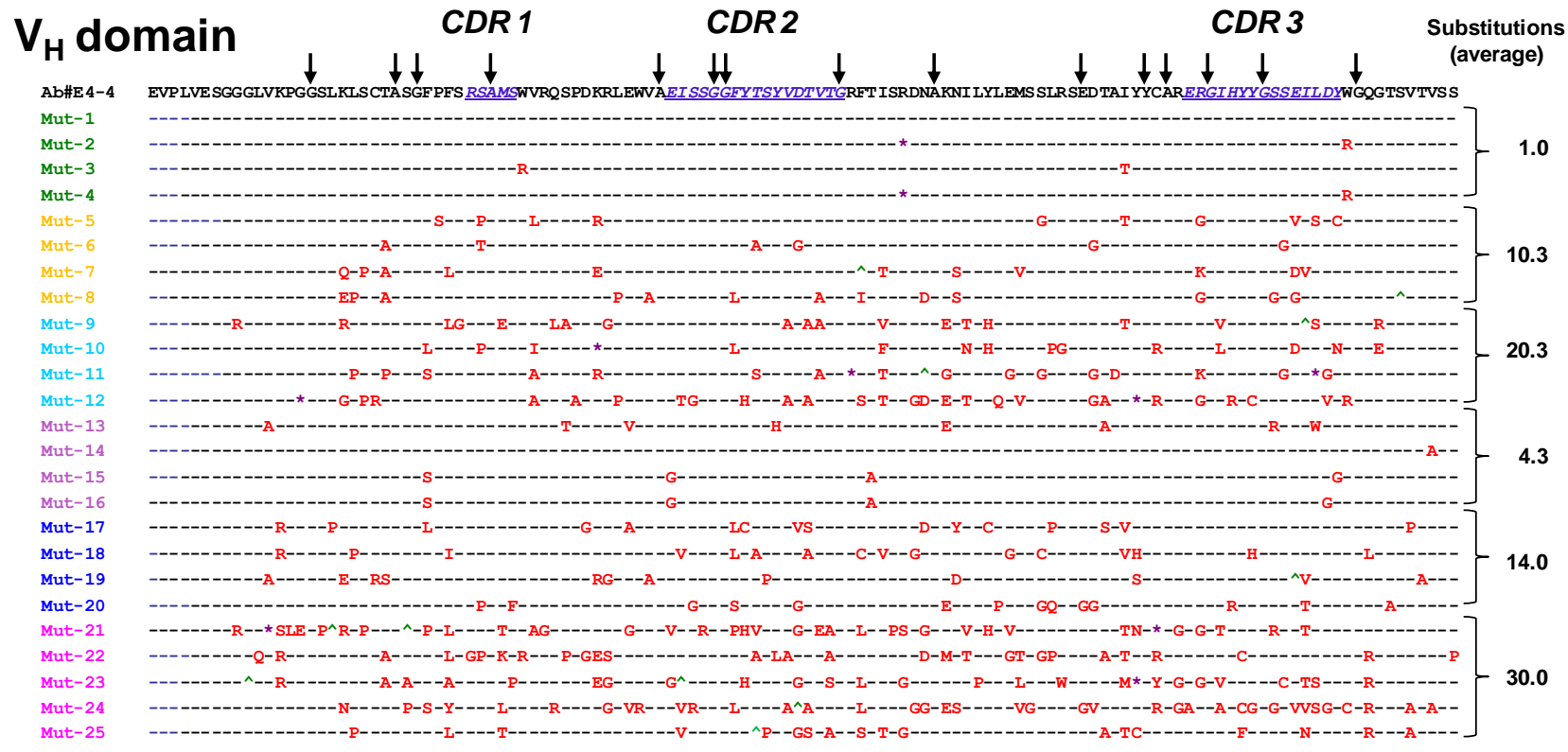
	Concentration of MnCl ₂ (mM)		
	0	0.5	1.0
Single PCR	Mut-1~4	Mut-5~8	Mut-9~12
Double PCR	Mut-13~16	Mut-17~20	Mut-21~25

図 22. 各条件のエラープローン PCR における V_H-CDR3 および V_L-CDR3 の塩基配列の変異

図中には本節で調製した scFv 遺伝子群より、任意にクローンを選択して解析した V_H および V_L に存在する CDR3 の遺伝子塩基配列の結果を示す。変異のあった遺伝子について、ミスセンス変異、サイレント変異、ノンセンス変異をそれぞれ赤字、青字および緑字で示しており、欠失についてはカレット (^) で示している。

さらに、アミノ酸レベルで scFv の多様性を確認した。V_H, V_L 各ドメインのアミノ酸はそれぞれ 124 残基, 107 残基であるが、プライマー結合領域を除く部位で、Mn²⁺ 濃度の上昇および PCR の繰り返しによってアミノ酸置換率の増大が確認できた。なお、V_H ドメインの 16 残基 (N 末端, C 末端の各 8 残基) および V_L ドメインの 15 残基 (N 末端の 7 残基, C 末端の 8 残基) はプライマー結合領域のため、アミノ酸置換率には考慮していないもの

の、最も Mn^{2+} 濃度の高い 1.0 mmol/L 条件下では、single PCR で 20 残基以上のアミノ酸置換が認められ、double PCR では 30 残基以上も置換されていた。(図 23) これらの解析から、 Mn^{2+} 濃度を変化させることで多様性に富む scFv 遺伝子が調製できることができた。ただし、アミノ酸配列を詳細に確認すると、特定のアミノ酸への変異 (例えば、 V_H の 20 番; L→P, V_L の 24 番; H→Q) や全く変異が導入されていない箇所が認められた。(図 23, 24 中, “↓” で記載)



	Concentration of MnCl ₂ (mM)		
	0	0.5	1.0
Single PCR	Mut-1~4	Mut-5~8	Mut-9~12
Double PCR	Mut-13~16	Mut-17~20	Mut-21~25

図 23. 各エラープロードン PCR 条件で調製される V_H ドメインのアミノ酸配列

本節で調製した *scFv* 遺伝子群より、任意にクローンを選択して解析した V_H のアミノ酸配列の結果を示す。図中、置換されたアミノ酸を赤字で示し、アスタリスク (*) およびカレット (^) はそれぞれノンセンスコドンによる終止、塩基の欠失によるフレームシフトを示している。また、各 PCR 条件におけるアミノ酸置換率の平均 (ノンセンス変異および欠失を含む) を図中右に示しており、解析した全クローンで 1 度も置換が起らなかった部位を下矢印 (↓) で示している。なお、V_H ドメイン N 末端および C 末端の各 8 残基はプライマー結合領域のため、この位置の置換は置換率の算出より除外した。

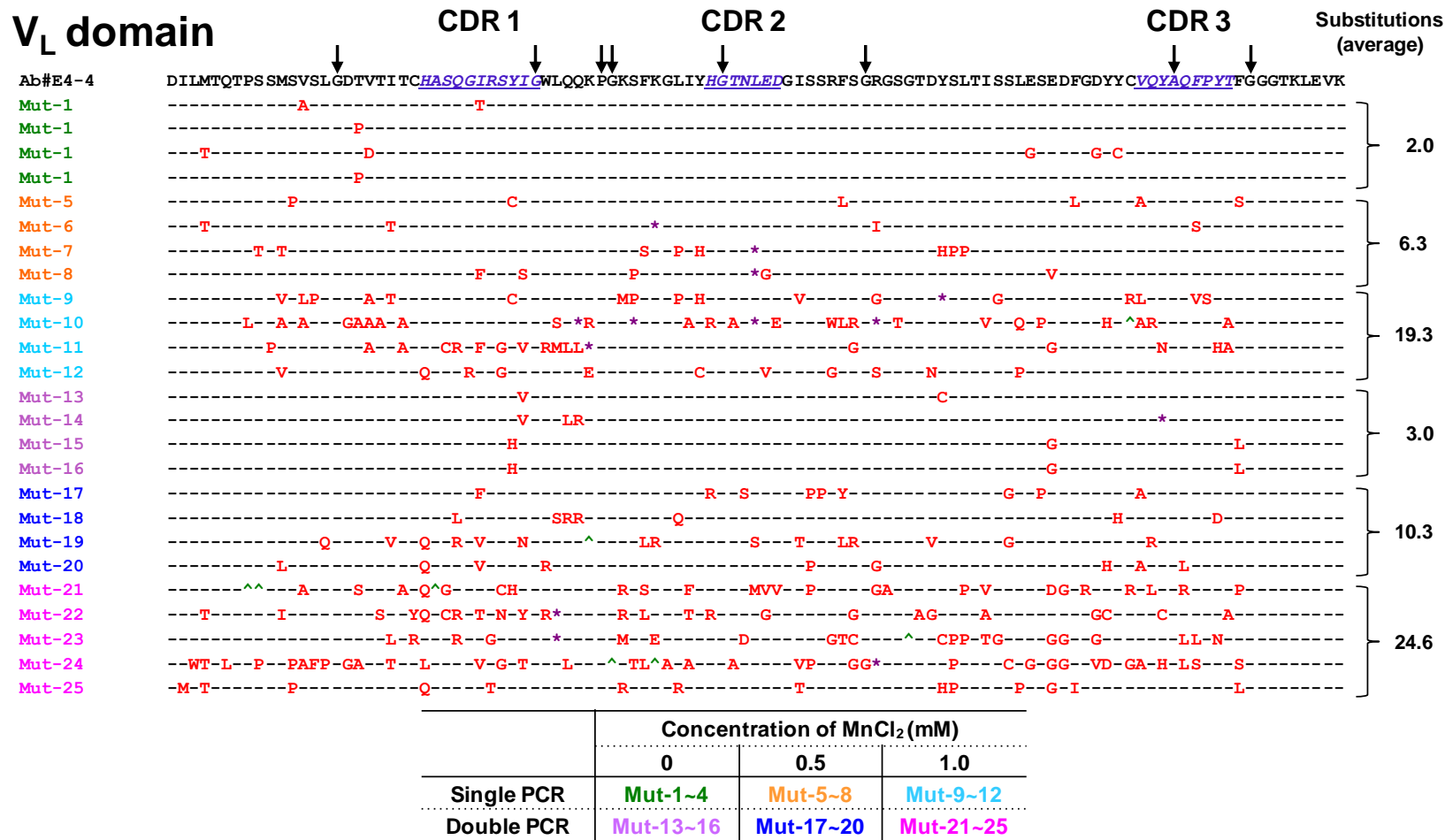


図 24. 各エラーブローン PCR 条件で調製される V_L ドメインのアミノ酸配列

本節で調製した *scFv* 遺伝子群より、任意にクローンを選択して解析した V_L のアミノ酸配列の結果を示す。図中、置換されたアミノ酸を赤字で示し、アスタリスク (*) およびカレット (^) はそれぞれノンセンスコドンによる終止、塩基の欠失によるフレームシフトを示している。また、各 PCR 条件におけるアミノ酸置換率の平均 (ノンセンス変異および欠失を含む) を図中右に示しており、解析した全クローンで 1 度も置換が起らなかった部位を下矢印 (↓) で示している。なお、V_H ドメイン N 末端 7 残基および C 末端 8 残基はプライマー結合領域のため、この位置の置換は置換率の算出より除外した。

このような変異の偏りはトランジション/トランスバージョン比率に起因しており、Leung らの方法およびその変法に共通するものである。たとえば、今回の条件では、他の dNTP と比較して dATP を減じているため、アデニン (A) およびそれを相補するチミン (T) から変異が開始するパターンが多い。さらにトランジション変異の割合が高いため、変異ヌクレオチドのパターンとしては A→G および T→C が多いと予測できる。その反面、グアニン (G) およびシトシン (C) については、添加量に変化はなく、変異するパターンは少ないと予想される。実際に、*V_H-CDR3* および *V_L-CDR3* の遺伝子変異パターンについて解析した結果を図 25 に示す。本解析は、第 5 節で示す CDR シャッフリングにより得られた scFv クローンから、任意に 17 クローンを選択し、CDR の遺伝子塩基配列を解析した結果であるが、CDR シャッフリングは本節で得られる PCR 産物の混合物を利用していることから、その変異パターンは本節で得られるパターンと同様と判断できる。変異パターン解析の結果、予想通り A→G および T→C のトランジション変異が多く、G および C からの変異については、トランジション変異およびトランスバージョン変異共に、極端に少ないことが判明した。(図 25) 以上を考慮すると、変異の起こりにくい G と C で主に構成されているコドンから翻訳されるアミノ酸 [グリシン (GGN), アラニン (GCN), プロリン (CCN), アルギニン (CGN)] は、その置換率は低いと想定できる。図 23 および図 24 で矢印 (↓) で示した、変異の導入されなかったアミノ酸には、グリシンが多く、上記の傾向を反映した結果となっている。

近年、*Pyrococcus furiosus* 由来の DNA ポリメラーゼが、トランジション/トランスバージョンの偏りの少ない変異パターンを示すことが報告されており⁹⁷⁾、今後、このような酵素の使用も検討する必要がある。

V _H -CDR3				V _L -CDR3			
Total number of sequenced nucleotides : 765				Total number of sequenced nucleotides : 459			
Number of mutated nucleotides (mutation rate) : 32 (4.2%)				Number of mutated nucleotides (mutation rate) : 23 (5.0%)			
Number of deletion (deletion rate) : 0				Number of deletion (deletion rate) : 1 (0.22%)			
Number of insertion (insertion rate) : 1 (0.13%)				Number of insertion (insertion rate) : 0			
Transition	Frequency	Transversion	Frequency	Transition	Frequency	Transversion	Frequency
A → G	12	A → T	4	A → G	8	A → T	1
G → A		A → C	3	G → A		A → C	1
T → C	9	C → A		T → C	11	C → A	
C → T	2	C → G	1	C → T		C → G	
		G → C				G → C	
		G → T				G → T	
		T → A				T → A	2
		T → G	1			T → G	

図 25. CDR シャッフリングにより得られた scFv クローンにおける V_H-CDR3 および V_L-CDR3 遺伝子の変異パターン解析

第 5 節で示す CDR シャッフリングにより得られた scFv クローンから、任意に 17 クローンを選択し、V_H-CDR3 および V_L-CDR3 の遺伝子塩基配列の解析結果を示す。図には変異のパターン (Transition, Transversion) と、その変異したヌクレオチド数 (Frequency) を示しているが、A→G および T→C のトランジション変異が多い一方、G および C からの変異については、トランジション変異、トランスバージョン変異共に、極端に少ないことが判明した。

第4節 一本鎖 Fv フラグメントのファージ提示条件の検討

変異を導入した scFv ライブラリーから、ファージ提示法を用いて微量の高親和力変異 scFv クローンを選択・単離するためには、ライブラリーに含まれる個々の scFv クローンを効率良くファージ提示することが重要である。

第1章 第4節でも述べたが、本研究で用いた pEXmide5 はファージ提示用ベクターであり⁹⁸⁾、導入された scFv 遺伝子の 5'末端には *pelB* リーダーペプチド遺伝子が、scFv の 3'末端には、ファージの pIII タンパク質をコードする遺伝子がアンバー終止コドン (UAG) を介して連結される。本プラスミドを、アンバー抑制遺伝子 *supE* を有する大腸菌 (XL1-Blue 細胞など) に遺伝子導入して形質転換すると、scFv と pIII の間のアンバー終止コドンがグルタミン酸へと翻訳されるため、*lac* プロモーター支配下で scFv-pIII 融合タンパク質が合成される。また、抑制遺伝子を持たない non-suppressor 型の大腸菌 (XL0LR 細胞など) に本プラスミドを遺伝子導入すれば、アンバー終止コドンに基づいて翻訳が終止し、可溶型の scFv タンパク質が調製できる。

一方、ヘルパーファージは大腸菌を宿主とする繊維状ファージであり、大腸菌の F 線毛にファージ表面の pIII が結合して感染が成立する。感染が成立すると、ファージのゲノム DNA が一本鎖 DNA として宿主に取り込まれ、宿主の各種酵素により二本鎖 DNA へと変換されてゲノムが複製される。ファージは 11 種のタンパク質に基づく遺伝子をコードしているが、そのうち 3 種は、二本鎖 DNA から、子ファージに導入される一本鎖ゲノム DNA の調製に関与する。またファージは 5 種の外殻タンパク質より構成されるが、ゲノム複製後に宿主内で合成される。さらに残りの 3 種のタンパク質により、ファージの外殻タンパク質は一本鎖ゲノム DNA とともに“パッケージング”され、宿主外へと放出される⁹⁹⁾。

ファージ提示法では、このファージのライフサイクルを利用する。scFv を連結した pEXmide5 ベクターで形質転換した大腸菌 (*supE* suppressor 株) にヘルパーファージを感染させると、上記のようにファージが複製・合成されるが、*lac* プロモーター支配下で scFv-pIII 融合タンパク質も調製される。その後のパッケージング過程において、本融合タンパク質

がファージの外殻タンパク質としてパッケージングされ、ファージ表面に scFv-pIII が提示されたファージミド粒子が調製される。さらに、調製されたファージは、提示された scFv 遺伝子を含むプラスミドベクターの+鎖を保持するため、ファージ提示されるタンパク質 (表現型) と、それをコードする scFv 遺伝子 (遺伝子型) の対応が可能となる。

こうして得られたファージミド粒子を用いてパンニングを行い、高親和力 scFv 分子種を探索するが、目的の達成には、表面に提示された scFv 分子種が、いかに効率良く抗原結合能を保持するかが重要となる。このファージ提示に影響を及ぼす因子として、感染時に用いるヘルパーファージ粒子単位 (プラーク形成単位, plaque-forming unit; pfu) の形質転換大腸菌に対する比率 (感染多重度, multiplicity of infection; MOI) と、感染後の大腸菌の培養温度が考えられる。ファージ提示に用いるファージミドベクター (pEXmide 5 ベクターを含む) の多くは lac プロモーターが利用されており、グルコース添加により発現制御が可能である。通常、これらのベクターを用いてファージ提示する際の MOI は 20 程度が多い。ただし、グルコース存在下においても scFv-pIII 融合タンパク質の一部が合成され、その一部が大腸菌細胞外へ分泌されることもある¹⁰⁰⁾。ScFv-pIII が細胞外へ分泌された場合、ヘルパーファージの感染を妨害する可能性があるため、感染ファージ数を多く (MOI を 20 より大きく) する必要がある。また、ファージ感染後の培養により scFv 提示ファージが増殖するが、その際の培養温度によって融合タンパク質の合成や安定性、および菌の生存率などに影響がある¹⁰⁰⁾。そこで、第 2 節および第 3 節で調製した野生型 scFv#E4-4 遺伝子および変異 scFv 遺伝子群を導入した 2 種の形質転換大腸菌を用い、各条件下でファージ提示を行い、調製されるファージミド粒子数およびその抗 E₂ 活性を評価した。

まず、scFv#E4-4 遺伝子が挿入された pEXmide5 ベクターを supE suppressor 株である大腸菌 XL1-Blue 細胞株に遺伝子導入した。得られる形質転換体に対して 4 段階の MOI (4, 20, 100 および 500) で VCSM13 ヘルパーファージを感染させ、scFv 提示ファージを調製した。ファージ感染後の培養温度については、25°C, 30°C および 37°C の 3 段階に設定し、120 回転で 12-16 時間培養した。また、第 3 節で得られた変異 V_H, V_L 遺伝子を用いて構築した

変異 *scFv* 遺伝子群で形質転換した大腸菌に対するファージ提示についても同様に行った。以上より、各条件を組み合わせると、いずれのパッケージにおいても 12 通り (計 24 通り) の条件でファージミド粒子が得られるが、これらについてパッケージング効率および抗 E₂ 活性を比較した。

パッケージング効率の指標として、コロニー形成単位 (colony-forming unit; cfu) を算出した。すなわち、各条件で得られたファージミド粒子を大腸菌 XL1-blue 細胞株に感染させ、生成するアンピシリン耐性菌の菌数を算出した。その結果、感染菌の培養温度については、いずれのパッケージでも培養温度 30°C で最も効率良くファージが調製された。(図 26)

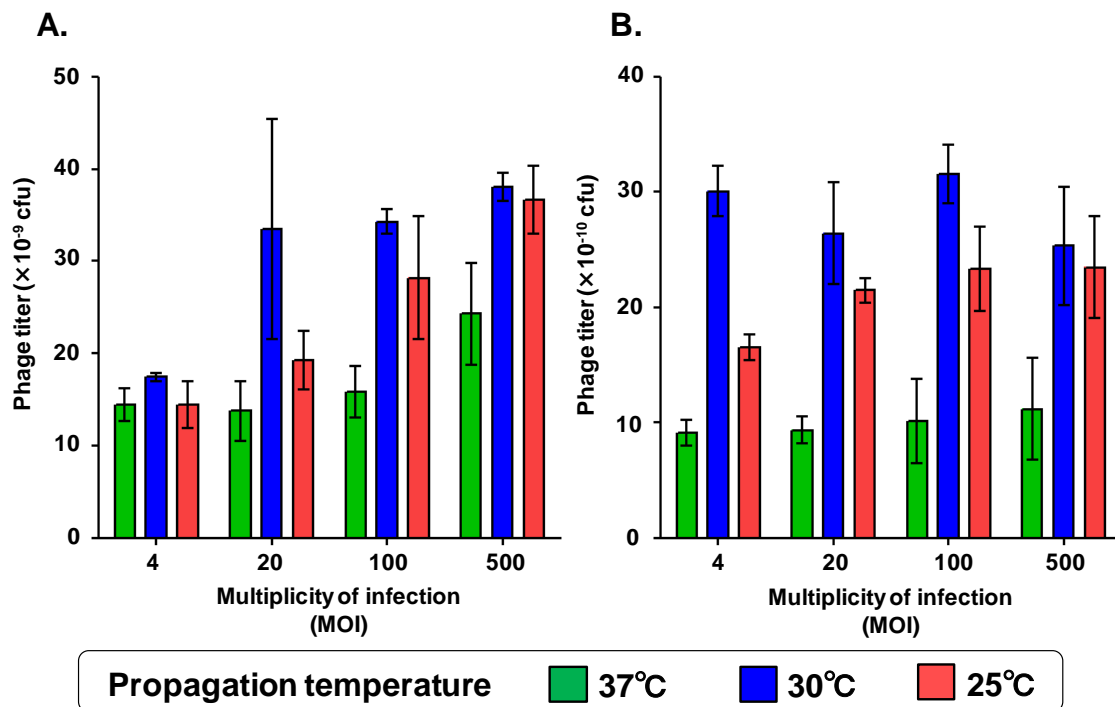


図 26. 種々の MOI (4, 20, 100, 500) および感染後の培養温度 (25, 30, 37°C) における scFv 提示ファージのパッケージング効率の比較

A には野生型 *scFv* (*scFv#E4-4*) 遺伝子を導入した大腸菌を, B には *scFv* 遺伝子ライブラリーを導入した形質転換菌を用いて各種条件でファージ提示した結果 (n=3) を示す. 横軸には感染多重度 (MOI) を示し, 縦軸は各条件で得られたファージ数を示す. 感染後の培養温度 (37°C; 緑, 30°C; 青, 25°C; 赤) ごとに結果を示しているが, 培養温度 30°C において最も効率良くファージを調製できた. また, MOI に依存して, 調製されるファージ数も増大することが分かった.

次にファージ提示された scFv の抗 E₂ 活性を E₂-BSA 固相化プレートを用いる ELISA により比較した. その際, ELISA に用いるファージ粒子数は 1×10¹¹ cfu/100 μL/assay とし, 固相に結合するファージをシグナルとして検出した. その結果, ファージ感染後, 25°C で培養することで最も高い抗 E₂ 活性が得られ, scFv の提示条件として 25°C が至適であると判断した. また, この温度条件で MOI を比較すると, MOI 500 において, 抗 E₂ 活性が他の MOI 条件に比べて低値であることが示された. (図 27)

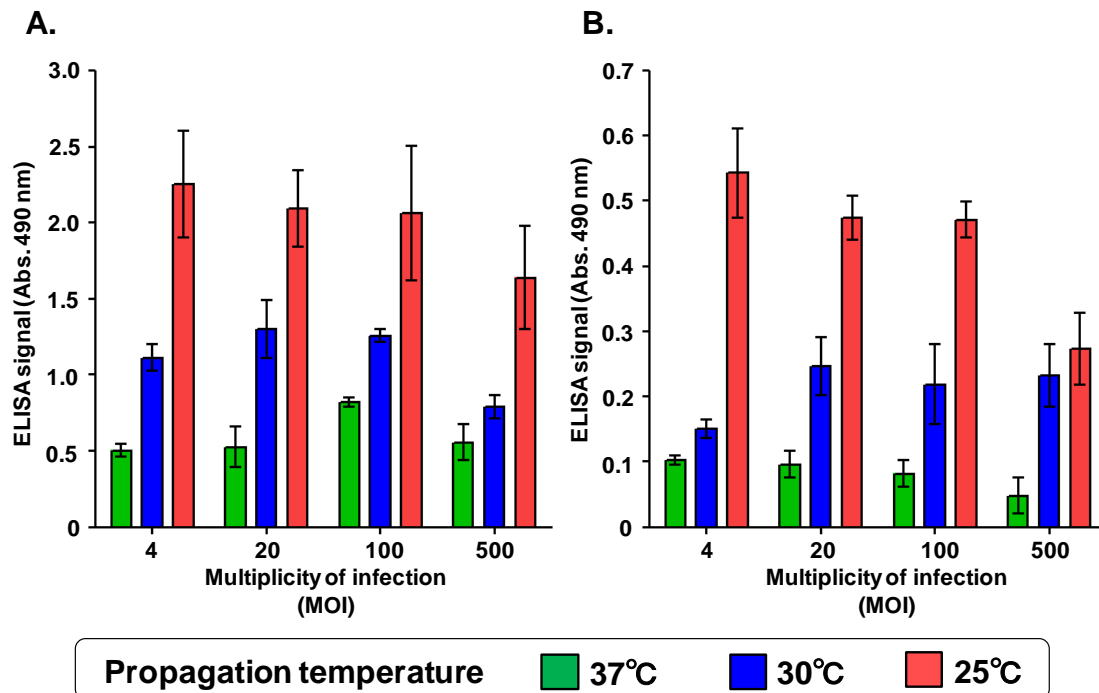


図 27. 種々の MOI (4, 20, 100, 500) および感染後の培養温度 (25, 30, 37°C) における scFv 提示ファージの抗 E₂ 活性の比較

A には野生型 *scFv* (*scFv#E4-4*) 遺伝子を導入した大腸菌を, B には *scFv* 遺伝子ライブラリーを導入した形質転換菌を用いて各種条件でファージ提示した結果 (n=3) を示す. 横軸には感染多重度 (MOI) を示し, 縦軸は scFv 提示ファージの抗 E₂ 活性に基づくシグナルを示す. 感染後の培養温度 (37°C; 緑, 30°C; 青, 25°C; 赤) ごとに結果を示しているが, 培養温度 25°C において最も高い抗 E₂ 活性が確認できた. また, MOI 500 では他の MOI 条件と比較して抗 E₂ 活性の低下が認められた.

さらに, パッケージングへの IPTG の影響についても検討した. これは, IPTG 添加により scFv-pIII の合成が高まり, 抗 E₂ 活性を保持したファージのパッケージングが向上することが考えられるためである. 第 3 節で調製した変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーを導入した形質転換菌に, VCSM13 ヘルパーファージを MOI 4, 20 または 100 で添加して感染させたのち, IPTG 濃度 0, 0.1 および 1.0 mM の条件で 25°C, 12 時間培養した. 得られるファージミド粒子について, 上述と同様の解析を行ったが, IPTG を添加することで, ファージ数はやや増大するものの, 抗 E₂ 活性は減弱傾向を示した. (図 28)

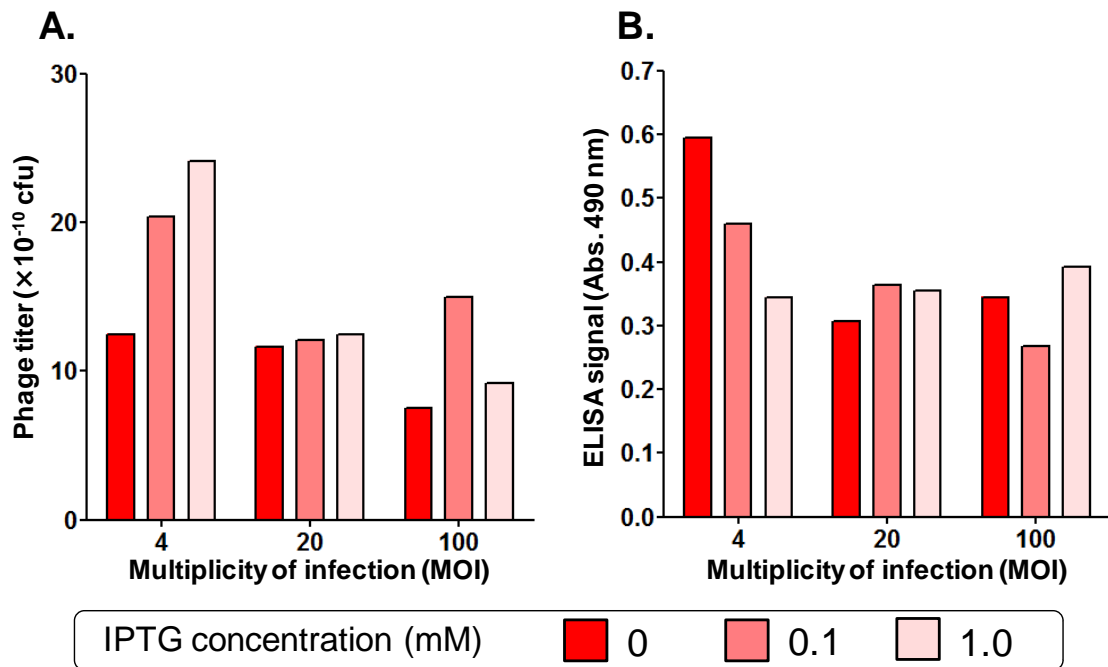


図 28. 種々の MOI (4, 20, 100) および IPTG 添加 (添加濃度 0, 0.1, 1.0 mM) における scFv 提示ファージの抗 E₂ 活性の比較

ScFv 遺伝子ライブラリーを導入した形質転換菌を用いてファージ提示し、得られる scFv 提示ファージの数および抗 E₂ 活性を検討した結果を示す。横軸には感染多重度 (MOI) を示し、縦軸は調製されるファージ数 (A) および抗 E₂ 活性に基づくシグナル (B) を示す。なお先の検討より、感染後の培養温度は 25°C を選択しており、MOI については 4 - 100 としている。図には添加する IPTG 濃度 (0 mM; 赤, 0.5 mM; 朱, 1.0 mM; 薄赤) ごとに結果を示している。本結果より、IPTG を添加することで、ファージ数はやや増大するものの、抗 E₂ 活性は減弱傾向を示すことが判明した。

以上の検討より、個々のライブラリーにより条件は多少異なる可能性はあるものの、本研究で用いる条件として、ヘルパーファージ感染の MOI を 20 前後とし、感染後の培養には IPTG を加えず、25℃の温度で行うこととした。

今回 IPTG 添加により認められた現象は、scFv-pIII 融合タンパク質の過剰発現が、タンパク質のフォールディングや分泌機構に影響を及ぼすためと考えられる。この問題に対し、ペリプラズム領域でのタンパク質フォールディングに関与する遺伝子 (Skp/OmpH/HlpA) を共発現し、改善する試みも行われている¹⁰¹⁾。一方、Scott らは、15 種の破傷風菌毒素に対する scFv を用いて、scFv 提示ファージに基づくタンパク量・活性と、可溶型 scFv の発現量との関連性について、ELISA および SDS-PAGE により解析している。結果として、scFv 提示ファージに基づくタンパク量および活性は、可溶型 scFv の発現量と強い相関性があり、その一因として scFv に使用されるコドンの影響を報告している¹⁰²⁾。本結果はタンパク質のフォールディングを因子として考慮していないが、過剰発現でなくとも、scFv の遺伝子塩基配列により、調製される scFv 提示ファージに偏りが生じることを示唆している。今後、大腸菌で使用頻度の低いコドンを改善し、かつファージ提示に使用できる菌体の調製が望まれる。

第5節 CDR シャッフリングによる変異一本鎖 Fv フラグメントライブラリーの調製と ファージ提示法／パンニングによる高親和力変異体の探索

序論でも述べたが、抗体の抗原との結合には、 V_H 、 V_L のそれぞれ3カ所ずつ存在する CDR が重要であり、CDR 選択的な変異導入が親和力向上のための第一選択と考えられる。抗体のパラトープを形成しているアミノ酸が特定されているような場合、ターゲット部位にアニールし、かつ変異を導入するよう設計した合成オリゴ DNA を用いる、カセット変異導入法^{81,82)}を用いることで、意図した部位に多様性に富む変異を確実に導入できる。しかし、ターゲットとするアミノ酸が絞り込めていない場合、変異の導入範囲を広く設定する必要がある。こうした場合、ランダムな点変異を遺伝子全体に導入できるエラープロローン PCR が有用である⁸³⁻⁸⁶⁾。

前節での検討より、種々の条件でエラープロローン PCR を行うことで、様々な頻度で V 遺伝子上に点変異を導入した変異 V_H 、変異 V_L 遺伝子群を調製した。そこで、得られた変異 V_H 、変異 V_L の DNA 断片から、CDR をコードする短い DNA 断片を作製し、これを野生型 *scFv* (*scFv#E4-4*) の FR の配列に挿入する、“CDR シャッフリング”を行った¹⁰³⁾。

CDR シャッフリング¹⁰³⁾は、 V_H 、 V_L 遺伝子の全長をそれぞれ6本の一本鎖合成オリゴ DNA に“分解”し、これを PCR に付して *scFv* を“再構築”する手法であり、図29ではその方法を示している。 V_L を例とすれば、図29 step i では、 V_L 遺伝子を6本の合成オリゴ DNA へと分割している。センス鎖の5'側から順に Oligo-L1 から-L6 まで番号を付けた場合、Oligo-L1、-L3、-L5 はセンス鎖の一部を、Oligo-L2、-L4、-L6 はアンチセンス鎖の一部をコードするよう設計する。(図29 step i) この際、各オリゴ DNA が相補するように設計するが、 V_L ドメインに存在する3つの CDR については、各合成オリゴ DNA のオーバーラップ部位を避けるように配置する。例えば、*CDR1* は *Oligo-L2*、*CDR2* は *Oligo-L3*、*CDR3* は *Oligo-L5* のオリゴ DNA 鎖の上に配置させる。この6本のオリゴ DNA を混合して PCR を行うことで、それぞれ相補する遺伝子が連結して一本の V_L 遺伝子が“再構築”できる。(図29 step ii)

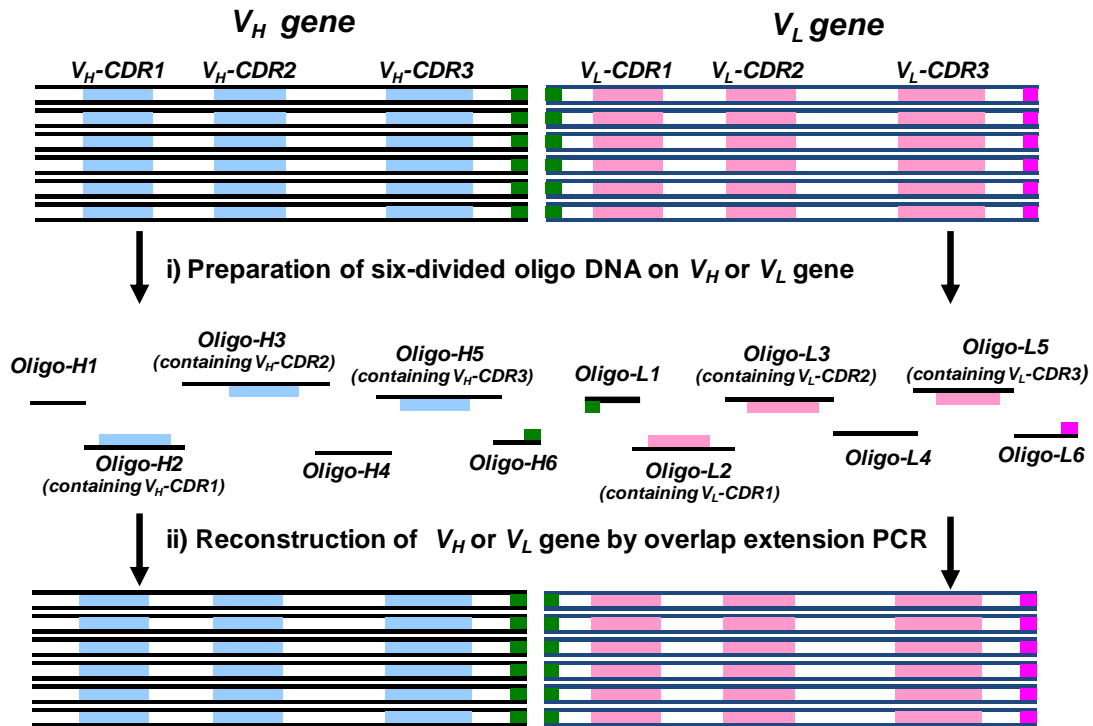


図 29. CDR シャッフリングの原理①

CDR シャッフリング¹⁰³⁾ は、 V_H , V_L 遺伝子の全長をそれぞれ 6 本の一本鎖合成オリゴ DNA に“分解”し、これを PCR に付して scFv を“再構築”する手法である。まず V_H , V_L 遺伝子をそれぞれ 6 本の合成オリゴへと分割する。(step i; V_H , V_L 遺伝子ともに、センス鎖の 5'側より、Oligo-1 から-6 と番号を付けている) 調製されるオリゴ DNA のうち、Oligo-1, -3, -5 はセンス鎖の一部を、Oligo-2, -4, -6 はアンチセンス鎖の一部をコードするが、各オリゴ DNA が相補するように設計する。(step i) この各ドメイン 6 本のオリゴ DNA を混合して PCR を行うことで、それぞれ相補する遺伝子が連結して一本の V_H および V_L 遺伝子が“再構築”できる。(step ii)

CDR シャッフリングでは、この再構築に用いるオリゴ DNA のうち、変異導入を目論む CDR を含むオリゴ DNA について、ランダムな点変異を導入したオリゴ DNA 群を使用する。(図 30) 例えば、 V_H -CDR2, 3, V_L -CDR 1 および 3 に変異を導入する場合、何らかの方法でこの部位に変異を導入したオリゴ DNA のセットを準備する。[図 30 (V_H ; Mutated oligo-H3 および-H5, V_L ; Mutated oligo-L2 および-L5)] これを他のオリゴ DNA (V_H ; Oligo-H1, -H2, -H4 および-H6, V_L ; Oligo-L1, -L3, -L4 および-L6) と混合して PCR を行うと、様々な配列の CDR が組み込まれた多様性に富む V_H , V_L 遺伝子群が調製される。こ

これらを用いて scFv を調製すれば、 V_H と V_L がシャッフルされて連結し、さらに多様性に富むライブラリーが構築できる。(図 30)

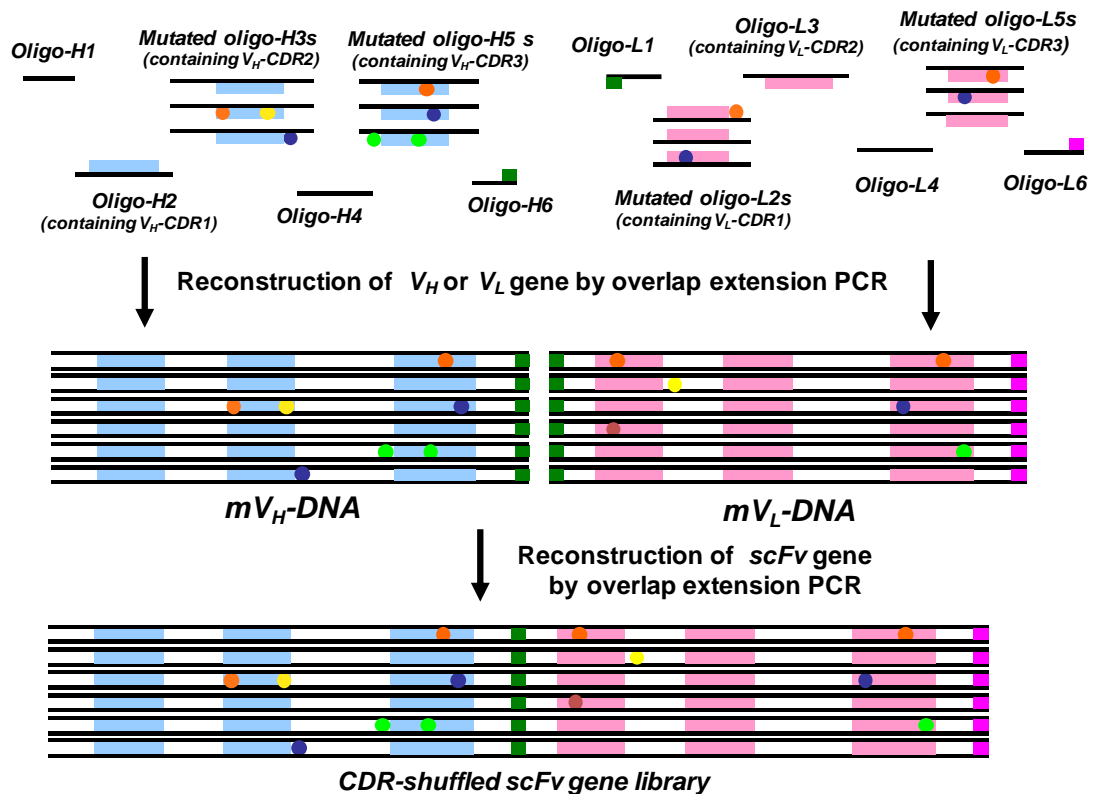


図 30. CDR シャッフリングの原理②

CDR シャッフリングを用いて変異を導入する場合、変異導入を目論む CDR を含むオリゴ DNA について、ランダムな点変異を導入したオリゴ DNA 群を使用する。上記では、 V_H -CDR2, 3, V_L -CDR1 および 3 に変異の導入を行う例を示すが、まず、何らかの方法でこの部位に変異を導入したオリゴ DNA のセットを準備する。(V_H ; Mutated oligo-H3, -H5, V_L ; Mutated oligo-L2, -L5) を他のオリゴ DNA (V_H ; Oligo-H1, -H2, -H4 および -H6, V_L ; Oligo-L1, -L3, -L4 および -L6) と混合して PCR を行うと、様々な配列の変異 CDR が組み込まれた多様性に富む V_H , V_L 遺伝子群が調製される。これらを用いて scFv を作製すれば、 V_H と V_L がシャッフルされて連結し、さらに多様性に富む scFv 遺伝子ライブラリーが構築できる。

この CDR シャッフリングによる scFv の再構築には、各ドメインを分割する、6 種のオリゴ DNA の設計が重要となる。本法では、scFv#E4-4 の V_H , V_L 遺伝子の塩基配列を 6 分

分割するが、まず3カ所の CDR がそれぞれ *Oligo-2*, *Oligo-3*, *Oligo-5* のオリゴ DNA に含まれるように設計する。次に、各オリゴ DNA の品質を確保するため、その鎖長は最小限に留める必要がある。ただし、オリゴ DNA 同士のオーバーラップする部位 (5'および3'側のそれぞれ20塩基程度) が必要であるため、各オリゴ DNA の鎖長は100塩基前後となる。さらに非特異的なアニーリングが起こる確率を最小限に抑える必要がある。以上の条件を満たす6分割オリゴ DNA の配列を市販のプライマー設計ソフト (*Oligo*TM program) を用いて設計した。次に、設計したオリゴ DNA を用いてライブラリーを構築していく際に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼを考慮する必要がある。*Taq* DNA ポリメラーゼに代表される pol I 型の酵素では、増幅産物の3'末端に A (アデニン) が付加される場合が多く¹⁰⁴⁾、この余分な A 付加が適切なアニーリングを阻害する可能性がある。そこで今回、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有し、増幅効率も十分に高い *KOD* DNA ポリメラーゼを用いた。さらに、変異の導入部位についても検討した。ライブラリーの多様性を考慮すると、 V_H , V_L 遺伝子の計6カ所の CDR を全てランダム化することが理想である。しかし変異の導入が多く、多様性が増大することで、不必要な変異まで導入され、調製された分子集団自体の親和力が劣る可能性もある。そこで本研究では、とりわけ多様性が大きく、抗原との結合に特に寄与が大きい V_H -CDR3, V_L -CDR3 と、そのアミノ酸の長さ起因して多様性に富む V_H -CDR2, V_L -CDR1 の計4カ所についてランダム化を行った。

第3節で調製した全6種の変異 V_H -DNA (*1st-mV_H*-DNA 3種および *2nd-mV_H*-DNA 3種)の等量混合物、および全6種の変異 V_L -DNA (*1st-mV_L*-DNA 3種および *2nd-mV_L*-DNA 3種)の等量混合物を鋳型として、各 CDR の前後に結合する1組の5'-および3'-プライマーを用いて PCR を行い、 V_H -CDR2, V_H -CDR3, V_L -CDR1, V_L -CDR3 を含む2本鎖 DNA (*Mutated ds-H3s*, *-H5s*, *-L2s*, *-L5s*) を調製した。(図 31 step i) なお、用いるプライマーの一方 (オリゴ DNA として用いる鎖を相補する DNA 鎖) は5'末端がビオチン化しており、増幅産物として存在する2本鎖 DNA はビオチン標識されている。この産物を、ストレプトアビジン結合磁気ビーズに結合させたのち、アルカリ処理をし、オリゴ DNA として用いる鎖を解離・回収

した。(図 31 step ii) 得られた一本鎖変異 CDR オリゴ DNA (V_H ; *Mutated oligo-H3* および *H5*, V_L ; *Mutated oligo-L2* および *-L5*) を他のオリゴ DNA (V_H ; *Oligo-H1*, *-H2*, *-H4* および *-H6*, V_L ; *Oligo-L1*, *-L3*, *-L4* および *-L6*) と混合して PCR に付し, それぞれ 2 カ所の CDR にランダム変異を持つ mV_H -DNA, mV_L -DNA を調製した。(図 31 step iii) これらを混合してオーバーラップエクステンション PCR を行い, 合計 4 カ所の CDR に特異的に変異を導入した変異 *scFv* 遺伝子を構築した。(図 31 step iv) 本遺伝子群を, pEXmide 5 ベクターへとサブクローニングし, 電気穿孔法により XL1-blue 細胞に導入した。遺伝子導入を 4 回行って得られた形質転換菌について, 多様性の指標となるライブラリーサイズを, *scFv* 遺伝子を持つ形質転換菌のクローン数として算出した。その結果, ライブラリーサイズは約 1×10^6 cfu であった。

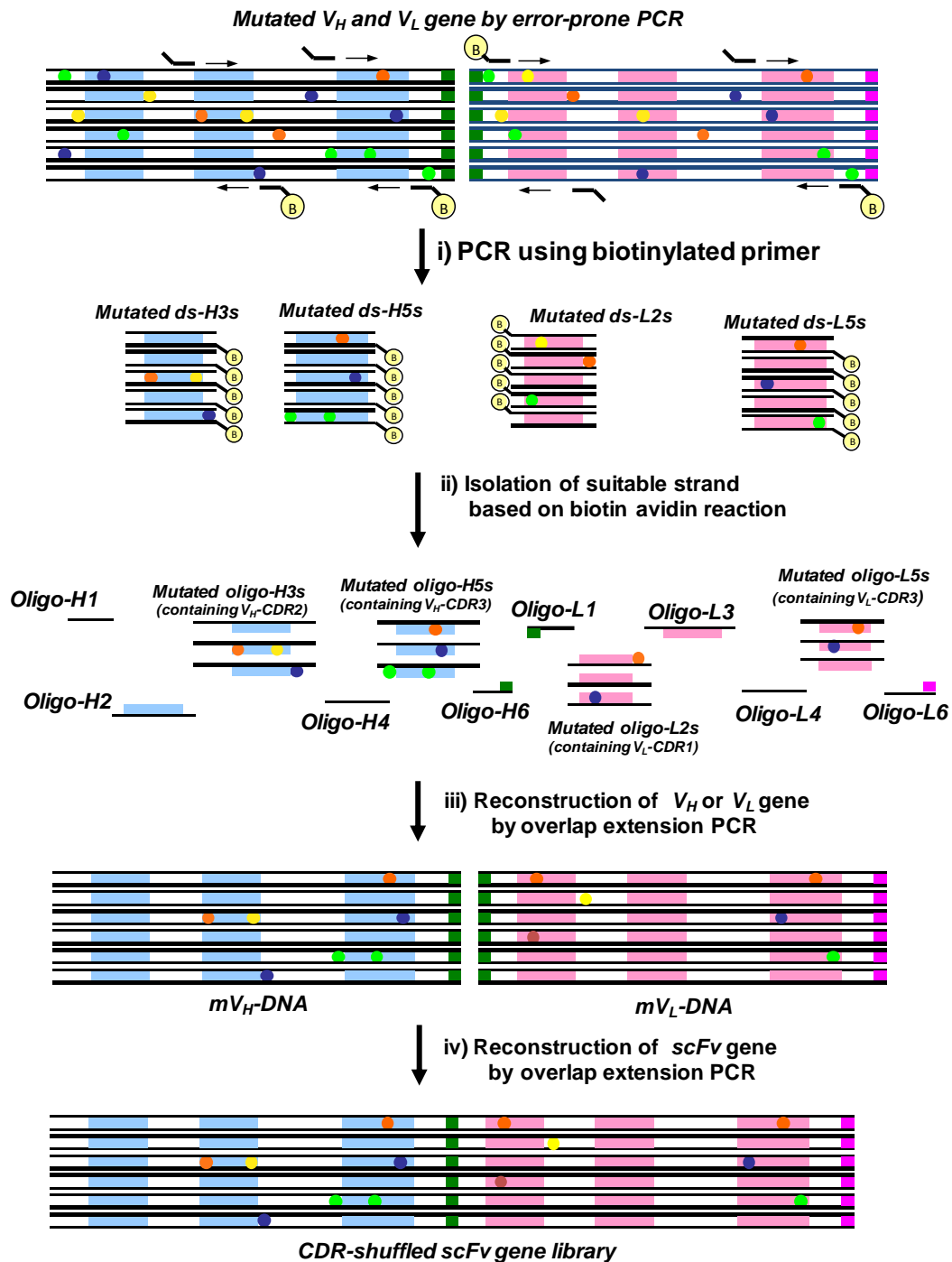


図 31. CDR シャッフリングによる変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーの構築

第 3 節で調製した 6 種の変異 V_H -DNA [(1st- mV_H -DNA 3 種および 2nd- mV_H -DNA 3 種)] の等量混合物, および 6 種の変異 V_L -DNA [(1st- mV_L -DNA 3 種および 2nd- mV_L -DNA 3 種)] の等量混合物に対して PCR を行い, V_H -CDR2, V_H -CDR3, V_L -CDR1, V_L -CDR3 を含む 2 本鎖 DNA を調製した. (step i) 得られる CDR 遺伝子群のうち, オリゴ DNA として用いない鎖はビオチン標識されているが, この鎖を, ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて除去した. (step ii) 得られた一本鎖変異 CDR オリゴ DNA (V_H ; Mutated oligo-H3 および -H5, V_L ; Mutated oligo-L2 および -L5) を他のオリゴ DNA (V_H ; Oligo-H1, -H2, -H4 および -H6, V_L ; Oligo-L1, -L3, -L4 および -L6) と混合して PCR に付してランダム変異を持つ mV_H -DNA, mV_L -DNA を調製した. (step iii) これらを混合してさらに PCR を行い, 4 カ所の CDR に特異的に変異を導入した変異 *scFv* 遺伝子群 (CDR-shuffled *scFv* gene library) を構築した. (step iv)

作製したライブラリーを、第4節で最適化した条件でファージ提示を行った。得られたファージミド粒子をパンニングに付し、E₂に対して反応性を示すファージを選択した。まず、E₂-BSAを固相化したイムノチューブにファージミド粒子を加えて反応させたのち、非特異的に結合したファージおよび結合力の弱いファージを洗浄・除去し、固相に残るファージを100 mMのトリエチルアミン溶液で溶出した。得られたファージを対数増殖期まで培養したXL1-blue細胞に感染させて回収した。さらに回収した細胞を培養したのち、VCSM13ヘルパーファージを感染させることでファージミド粒子を複製し、次のパンニングに用いた。この一連の操作を1ラウンドとして、計5ラウンドのパンニングを、洗浄強度を徐々に強くして繰り返した。すなわち、1回目のパンニングでは、チューブをPBSで3回の洗浄後、トリエチルアミン溶液でファージを回収したが、4回および5回目のパンニングではチューブを0.1% Tween 20を含むPBSで20回洗浄し、ファージを回収している。パンニングにより回収されたファージについては、そのファージ数を計数しているが、パンニングを繰り返すにつれて、回収されるファージ数は増大した。(表6 Output phage; E₂-BSA) またパンニングの際、陰性対照として、同ファージを、BSA固相化チューブに対してパンニングを行っている。回収されるファージ数についても計数しているが、その数はパンニングを行うごとに低下していた。(表6 Output phage; BSA) これはE₂に対して親和性を示すscFv提示ファージが濃縮されていることを示唆する。ただし、ブロッキング剤(2%スキムミルク)のみを固相としたチューブに対するパンニングを3ラウンド目より行っているが、4ラウンドおよび5ラウンド目のパンニングにおいて回収ファージの増加が確認された。(表6 Output phage; Blocking)

表 6. 各ラウンドのパンニングにおける洗浄強度，使用ファージ数および
回収ファージ数の推移

表中，各ラウンドのパンニング (Round of panning) における洗浄強度 (Wash stringency for panning)，チューブに反応させたファージ数 [Input phage (cfu)] および回収されたファージ数 [Output phage (cfu)] を示す。なお，パンニングは E₂-BSA 結合体，BSA およびブロッキング剤 (2% スキムミルク; Blocking) のみを固相化した 3 種のチューブを用いており，それぞれの回収ファージ数の結果を示している。

Round of panning	Wash stringency for panning	Input phage (cfu)	Output phage (cfu)		
			E ₂ -BSA	BSA	Blocking
1	PBS×3	1.0 × 10 ¹¹	1.0 × 10 ⁸	6.6 × 10 ⁶	-
2	0.1% T-PBS×3	1.0 × 10 ¹¹	3.3 × 10 ⁶	7.2 × 10 ⁶	-
3	PBS×10, 0.1% T-PBS×10	1.0 × 10 ¹¹	7.1 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁵	2.4 × 10 ³
4	0.1% T-PBS×20	1.0 × 10 ¹¹	5.2 × 10 ⁷	6.6 × 10 ⁵	7.7 × 10 ⁵
5	0.1% T-PBS×20	1.0 × 10 ¹¹	1.3 × 10 ⁸	1.1 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁵

そこで，パンニングを 5 ラウンドで終了し，4 ラウンド目および 5 ラウンド目のパンニングで得られるファージを non-suppressor 型大腸菌 XL0LR 細胞に感染させてクローン化した。得られる個々のクローンについて IPTG とスクロース存在下で培養し，浸透圧ショック法に付すことで可溶性 scFv タンパク質をペリプラズム抽出液として回収した。本タンパク質について，³H 標識 E₂ を用いる RIA により，その抗 E₂ 活性を評価した。その結果，野生型 scFv#E4-4 の反応性を上回るクローン scFv#m1-e7 が確認できた。(図 32; E7)

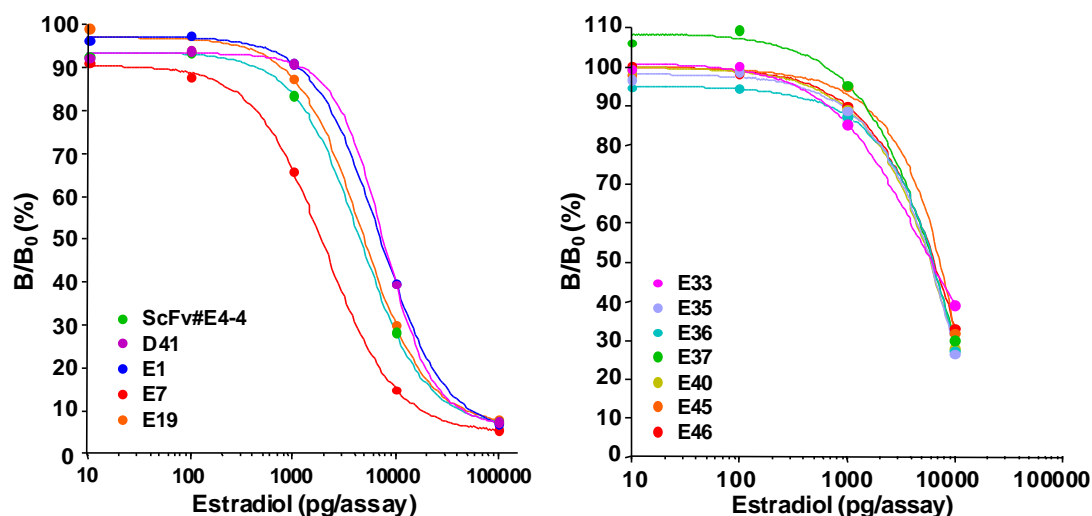


図 32. RIA による変異 scFv タンパク質の抗 E₂ 活性の評価

横軸には添加した E₂ 量を、縦軸には B/B₀ (%)を示している。左の黄緑で示す野生型 scFv (scFv#E4-4) と比較し、検量線が左にシフトし、親和力の向上が想定される変異 scFv (E7) が確認できた。

この変異 scFv クローンについて、プラスミドを精製し、scFv 遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列を同定した結果、V_L-CDR1 に I (イソロイシン) → V (バリン) の置換を持つのみであり、もう 1 カ所の変異 (V_H-CDR3) についてはサイレント変異 (ATT→ATC) であった。(図 20 ; scFv#m1-e7)

本クローンの親和力を解析するため、抗 FLAG-M2 抗体アガロースゲルを用いて精製したのち、³H 標識 E₂ を用いる RIA を行い、親抗体 Fab および野生型 scFv とその検量線および親和定数を比較した。その結果、親抗体 Fab および野生型 scFv と比較して明瞭に低濃度側にシフトした用量-反応曲線が得られた。Scatchard 法¹⁰⁵⁾ により各タンパク質の K_a 値を算出したところ、それぞれ K_a = 5.2 × 10⁷ M⁻¹ (親抗体 Fab#E4-4), 8.6 × 10⁷ M⁻¹ (野生型 scFv#E4-4) および 2.6 × 10⁸ M⁻¹ (scFv#m1-e7) であった。すなわち、パラトープを形成すると考えられるアミノ酸の一つからメチル基が除かれただけで、結合定数が約 3 倍上昇した。(図 33)

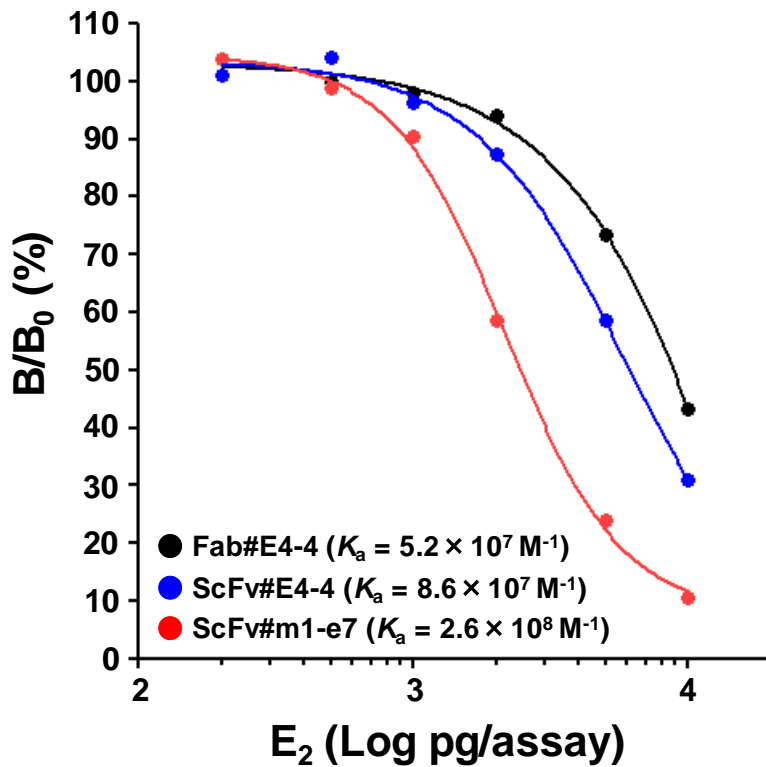


図 33. 親抗体 Fab (Fab#E4-4; ●), 野生型 scFv (scFv#E4-4; ●) および
変異 scFv (scFv#m1-e7; ●) を用いる競合型 RIA

横軸には添加した E₂ 量を、縦軸には B/B₀ (%) を示している。上記検量線より、Scatchard 法¹⁰⁵⁾により K_a 値を算出したところ、変異 scFv の K_a 値は $2.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であり、野生型 scFv (K_a 値 = $8.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) と比較して約 3 倍の親和力の向上が認められた。

さらに本変異 scFv について、SPR センサー分析を行ったところ、得られた k_a 値および k_d 値はそれぞれ $2.5 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, $1.9 \times 10^4 \text{ 1/s}$ であった。scFv#E4-4 における k_a 値 [$1.2 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$] および k_d 値 ($1.9 \times 10^4 \text{ 1/s}$) を考慮すると、scFv#m1-e7 の親和力の増大は結合速度の向上によるものと考えられ、これらの値から算出される K_a 値 ($=k_a/k_d$) は $1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と算出された。

第6節 考察

本章では、高感度な競合型ハプテン免疫測定を可能とする高親和力変異抗ハプテン抗体の創製を目指し、抗 E₂ 抗体のアフィニティマチュレーションを行った。今回の研究では、 10^{11} M^{-1} を上回る K_a 値の変異抗体を得ることはできなかったが、抗体工学を活用することで、抗ハプテン抗体の性能を改善することができた。すなわち、 K_a 値が $5.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ である抗 E₂ 抗体 (Fab#E4-4) を出発材料として scFv ($K_a = 8.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) を調製し、さらに 4 カ所の CDR に特異的に変異を導入することで、約 3 倍大きな親和性を示す変異 scFv クローン (scFv#m1-e7 ; $K_a = 2.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)、の創製に成功した。

今回得られた変異 scFv クローンは野生型と比較してアミノ酸の置換はわずか V_L-CDR1 に 1 変異 (I→V) のみであった。今回、変異 scFv ライブラリーを構築するにあたり、エラーブローン PCR の条件を種々検討しており、幅広い変異率のライブラリーを構築したが、そのなかから、変異の少ない scFv クローンが選択された。抗体の特異性を保持した状態で親和力を向上させる場合、パラトープの 3 次元構造を保持したまま、わずかに変化を施すことが重要である。アミノ酸の一つからメチル基が除かれただけで、結合定数が約 3 倍上昇したという今回の結果は、まさにその好例と考えられる。しかし、実際の臨床での使用を考えれば、本クローンの親和力をさらに向上させる必要がある。今回、多様性に富むライブラリーからわずか 1 アミノ酸が置換された変異クローンが選択されたことから、さらに親和力を向上させるには、今回変異を導入しなかった 2 カ所の CDR または V ドメインの土台を形成する FR に対して変異を導入したライブラリーを構築する必要がある。現在までも、FR のアミノ酸変化が、抗原との反応性に影響を及ぼすとの報告もある^{88,89)}。

上記の考察から、CDR のみでなく、FR を含むドメイン全体に変異を導入する必要があると考えられた。そのため、今回調製された変異 scFv (scFv#m1-e7) に対して V ドメイン全体に変異を導入する“チェーンシャッフリング”を行い、さらに高親和力な変異抗体の調製が行われている。Kobayashi らは、scFv#m1-e7 の遺伝子に対し、 Mn^{2+} 濃度を 0, 0.5 mmol/L、添加する dATP 濃度を他の 1/10 に減じた条件でエラーブローン PCR を行い、得られる変異 V_H,

V_L 遺伝子を混合して連結した変異 scFv 遺伝子群を調製した¹⁰⁶⁾。本遺伝子群により得られる scFv ライブラリー (5.0×10^6 cfu) を用いてファージ提示およびパンニングを行っている。パンニングの際の抗原抗体反応は 4°C にて行い、ファージ回収条件として、遊離 E_2 による溶出を組み合わせた結果、 K_a 値= $6.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ を示す変異抗体 (scFv#m2-c4) の調製に成功している¹⁰⁶⁾。さらに近年、scFv#m2-c4 に対して、チェーンシャッフリングにより変異を導入し、 K_a 値= $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ を示す変異抗体 (scFv#m3-a18) の調製に成功した¹⁰⁷⁾。親抗体 Fab#E4-4 の K_a 値 ($5.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) を考慮すれば、実に 250 倍の親和力の向上となる。Oyama は、本タイトルに“Breeding”と表現しているが、まさに変異導入条件、ファージ提示条件およびパンニング条件などの詳細な検討を結集し、抗体の親和力を“育て”た成果といえる。

結語

本研究では、臨床化学分析において重要な胆汁酸類およびステロイド類を用い、抗体工学的アプローチにより調製される scFv をハプテン免疫測定法に応用した。またハプテン免疫測定法の高感度化を目的として、非競合型ハプテン免疫測定法を構築し、さらに scFv のアフィニティマチュレーションを行うことで、競合型ハプテン免疫測定法の高感度化を行った。

まず第 1 章では、抗体工学的的手法により創製される低分子抗体フラグメントが、ハプテン免疫測定法の構築に有用であるかを検討した。天然型抗体であるマウス抗 DCA 抗体の遺伝子をクローニングしたのち、 V_H および V_L をリンカー配列で連結した scFv 遺伝子をオーバーラップエクステンション PCR を用いて作成した。この scFv 遺伝子をベクターへと連結して大腸菌に発現させることで scFv タンパク質を調製した。この scFv タンパク質に対して DCA-BSA 固相化プレートを用いた競合型免疫測定を行ったところ、2-5,000 pg/assay の範囲で良好な用量-反応曲線を示すことができた。さらに、ウシ血清アルブミン (BSA) と DCA-adenylate を用いた測定においても、1 ウェルあたりの DCA-adenylate 添加量 1-100 ng の範囲で DCA-タンパク質付加体に基づくシグナルが検出できた。

さらに第 2 章および第 3 章では、低分子化合物の免疫測定法の高感度化を行った。緒言にも述べている通り、免疫測定法は競合型と非競合型に大別され、ハプテンに総称される低分子化合物は競合型が用いられることが多いが、その感度は抗体の親和力に依存する。また低分子化合物の非競合型免疫測定法として単一抗体免疫測定法があり、本法を構築した場合、フェムトモル-アトモルレベル (10^{-15} - 10^{-18} mol) におよぶ高感度測定が可能と考えられるが、本法に用いる標識抗体の安定供給の点から、この測定法は広く用いられていない。そこで、第 2 章では、scFv-酵素融合体を遺伝子工学的に調製し、それを用いる非競合型単一抗体免疫測定法の構築を行った。抗 11-DC 抗体 scFv を大腸菌ゲノムより調製した ALP と PCR により連結し、これを測定に用いた。方法として、11-DC を scFv-ALP と反応させたのち、11-DC-BSA を固相化したプレートを利用して未反応の scFv-ALP を分離し、

抗原抗体複合体を含む画分の ALP 活性を測定することで、11-DC 量に基づくシグナルが測定できると考えた。しかし、高値のバックグラウンドが検出され、MALDI-TOF 質量分析から scFv-酵素融合タンパク質の分解が認められた。この問題を抗 11-DC 抗体の可変部を認識する 2 種の抗体 (α 型および β 型 抗イディオタイプ抗体) を用いて解決した。すなわち、11-DC と scFv-ALP を反応させたのち、未反応の scFv-ALP を β 型抗イディオタイプ抗体 (抗体のパラトープを認識する抗体) で除去した。その後、抗原抗体複合体を α 型抗イディオタイプ抗体 (抗体の FR 部位に抗原結合能を保持したまま認識する抗体) で捕捉することで、ALP の分解産物の影響を除去した。その結果、10 fg-100 ng の広い範囲をカバーする用量-反応曲線が得られ、その検出限界は 20 アトモル (2×10^{-17} mol; 6.9 fg) という高感度な非競合型単一抗体免疫測定法の構築に成功した。

さらに第 3 章では、競合型免疫測定法の高感度化を目的に、抗 E₂ 抗体を題材に、抗体工学を用いてアフィニティマチュレーションを行った。まず抗 E₂ 抗体の遺伝子から scFv を構築した。この scFv に対し、種々の条件でエラープローン PCR を行い、多様な変異を導入した変異 V_H, V_L 遺伝子群を調製した。抗体の抗原との反応には V_H, V_L にそれぞれ 3 カ所ずつ存在する CDR が関与することから、CDR シャッフリングを行い、6 か所の CDR のうち、4 か所 (V_H-CDR2, V_H-CDR3, V_L-CDR1, V_L-CDR3) に選択的に変異を導入した変異 scFv ライブラリーを調製した。このライブラリーを大腸菌に遺伝子導入したのち、ヘルパーファージに感染させてファージ表面に scFv を提示し、E₂-BSA 固相化チューブを用いて抗原と親和力を有するクローンを選択する(パンニング) が、この際、いかに効率よくファージ表面に scFv を提示するかが重要となる。そこで、scFv の提示条件に重要な 2 つの因子 [感染多重度 (multiplicity of infection ; MOI) および感染後の大腸菌の培養温度] について検討を加え、最適化を行った。最適化した条件で scFv を提示したファージを 5 ラウンドのパンニングに付した結果、親和力が約 3 倍向上した変異 scFv クローンの調製に成功した。

今後、これらの技術が臨床化学分野のみでなく、新規バイオ医薬品など幅広い分野で活用されることを期待する。

実験の部

i. 装置

紫外可視吸光度の測定は Ultrospec 2100 (Amersiam Bioscience) を用いた. PCR による DNA の増幅には, PCR thermal cycler (TaKaRa) を用いた. DNA のアガロースゲル電気泳動には, i-Mupid-J 電気泳動ユニット (Advance) を用いた. 抗体フラグメントの SDS-PAGE には, TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER (Bio-Rad) または X cell Superlock (Invitrogen) を用いた. またブロッティング分析におけるタンパク質の転写には, I Blot Gel Transfer System (Invitrogen) を用いた. DNA の塩基配列の決定には, Long-read Tower DNA シークエンサー (Amersiam Bioscience) を用いた. 大腸菌への電気穿孔法によるプラスミドの遺伝子導入には, ECM 630 (BTX) を用いた. ELISA における POD 活性の可視部吸光度測定 (比色測定) には, MPR-A4i マイクロプレートリーダー (Tosoh; 492 nm で測定) または Model 680 マイクロプレートリーダー (Bio-Rad; 490 nm で測定) を用いた. RIA における放射能の測定には, Tri-Carb 2900TR 液体シンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いた. 非競合型免疫測定における ALP の蛍光分光光度測定 (蛍光測定) には, 650-10 LC fluorescent spectrophotometer (Hitachi) を用いた. 抗体フラグメントの MALDI-TOF 質量分析には, Voyager-DE STR (Applied Biosystems) を用いた.

ii. 器材

比色測定における ELISA に用いた 96 ウェルマイクロプレート (No. 3590) および 96 ウェルハーフエリアマイクロプレート (No. 3690) は, Costar から購入した. 抗体ライブラリーのパンニングに用いたイムノチューブ (70 mm×11 mm, Maxisorp ポリスチレン試験管) は, Nunc から購入した. 細胞培養に用いた滅菌済みディスポーザブルプラスチック, シャーレ, クラスターディッシュ, ピペット類は, Costar, Corning または Falcon から購入した. 放射能測定に用いたシンチレーションバイアルは, 旭硝子から購入した.

iii. ソフトウェア

PCR 用プライマーおよび化学合成 scFv 遺伝子の構築に用いる一本鎖オリゴ DNA の設計には、OligoTM program version 4.0 (National Biosciences) を用いた。DNA の塩基配列の決定およびアミノ酸配列の同定には、DNASIS version 3.0.1 (日立ソフト) を用いた。抗体フラグメントの立体構造モデリングには、SWISS MODEL サーバー (<http://swissmodel.expasy.org/>) を用いた。

iv. 緩衝液

以下の略号で表記する各緩衝液の組成を示す。

PB は 50 mmol/L リン酸 2 水素ナトリウムおよび 50 mmol/L リン酸水素 2 ナトリウムを pH が 7.3 となるよう調製した。PBS は PB に 9.0 g/L 塩化ナトリウムを加えて調製した。PBS-2 は塩化ナトリウム (137 mmol/L), リン酸 2 水素ナトリウム (10.0 mmol/L), 塩化カリウム (2.68 mmol/L) およびリン酸カリウム (1.76 mmol/L) の水溶液を pH 7.4 に調製し、オートクレーブ滅菌したものを用いた。G-PBS は PBS-2 に 1.0 g/L ゼラチンを加えて調製した。T-PBS は PBS に 0.05 (v/v)% の Tween 20 を加えて調製した。なお、0.10 (v/v)% の Tween 20 を含む場合は T-PBS (0.10%) と記載した。T-PBS-2 は PBS-2 に 0.10 (v/v)% の Tween 20 を加えて調製した。M-PBS は PBS に 20 g/L のスキムミルク (DIFCO) を加えて調製した。TBS は塩化ナトリウム (137 mmol/L), 塩化カリウム (2.68 mmol/L) およびトリスヒドロキシメチルアミノメタン (24.8 mmol/L) の水溶液を pH 7.4 に調整し、オートクレーブ滅菌したものを用いた。A-TBS は TBS に 1 g/L となるようアジ化ナトリウムを加えて調製した。T-TBS は TBS に 0.05 (v/v)% の Tween 20 を加えて調製した。G-TBS は TBS に 1 g/L のゼラチンを加えて調製した。TAE および TBE 緩衝液はナカライテスクから購入した。浸透圧ショック用緩衝液はトリス塩酸緩衝液 (50 mmol/L; pH 8.0) にスクロース (584 mmol/L), EDTA (1 mmol/L) を加え、ろ過したものを用いた。ブロッキング用緩衝液は TBS に 50 (v/v)% のブロッキングエースおよび 1 g/L のアジ化ナトリウムを加えて調製した。非競合免疫測定用反応緩衝

液 (IMA 緩衝液) は 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に 3 g/L のゼラチン, 500 mmol/L の塩化ナトリウム, 50 (v/v)% のブロッコエースおよび 5 g/L のアジ化ナトリウムを加えて調製した. ALP 蛍光測定用反応停止液は 0.5 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 10.4) に 10 mmol/L EDTA を加えて調製した. 比色測定用 POD 基質緩衝液はクエン酸 (25 mmol/L) およびリン酸水素 2 ナトリウム (50 mmol/L) の各水溶液を混合して pH 5.0 に調整した溶液と, 30% (w/v) H₂O₂ を体積比 5,000:3 で混合したものをを用いた.

v. ステロイド類

非標識ステロイド類および胆汁酸類は, いずれも Sigma から購入した.

vi. トリチウム (³H) 標識化合物

トリチウム (³H) 標識化合物は Amersham Bioscience および DuPont NEN から購入した.

vii. 抗体類および抗体関連試薬

ヤギ抗マウス IgG+IgM 抗体 (アフィニティ精製品) および POD 標識マウス抗 M13 モノクローナル抗体は, Amersham Bioscience から購入した. ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (アフィニティ精製品), ウサギ抗マウス IgG 抗体 (アフィニティ精製品), POD 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体は, Jackson ImmunoResearch から購入した. 抗 FLAG M2 抗体は, Sigma から購入した. 抗 FLAG M2 抗体結合アガロースゲル, POD 標識抗 FLAG M2 抗体, ALP 標識抗 FLAG M2 抗体, ウサギ抗 FLAG ポリクローナル抗体は, Sigma から購入した. POD 標識ウサギ抗マウスκ鎖抗体は, Rockland から購入した.

viii. 抗体以外の免疫化学関連試薬

ストレプトアビジン固相化磁気ビーズ (Dynabeads M-280 Streptavidin) は, Dynal から購入した.

ix. 酵素類

制限酵素類はロシュダイアグノスティクスまたは New England Biolabs から購入した。DNA ポリメラーゼ類については, *Taq* ポリメラーゼ (5 U/ μ L) はロシュから, *Ex Taq* ポリメラーゼ (5 U/ μ L) は TaKaRa から, *KOD* ポリメラーゼ (2.5 U/ μ L) は東洋紡から, Proofstart DNA ポリメラーゼはキアゲンからそれぞれ購入した。Superscript II reverse transcriptase (200 U/ μ L) は Invitrogen から, T4 DNA ligase (400 U/ μ L) は New England Biolabs からそれぞれ購入した。

x. その他の試薬・器材

ゼラチン, ラウリル硫酸ナトリウム, アンピシリンナトリウム, テトラサイクリン塩酸塩, カナマイシン硫酸塩, *o*-フェニレンジアミン (*o*-PD), クリアゾル II, isopropyl 1-thio- β -D-thiogaractopyranoside (IPTG) は, ナカライテスクから購入した。ウシ血清アルブミン (BSA), 卵白アルブミン (OVA) およびポリエチレングリコール 8,000 は, Sigma から購入した。その他の生化学用試薬, 分子生物学用試薬は試薬特級を用いた。

xi. 大腸菌およびファージ用培地

M9 最小培地はリン酸水素 2 ナトリウム (0.209 mol/L), リン酸カリウム (0.110 mol/L), 塩化アンモニウム 1 (0.935 mol/L), 塩化ナトリウム (0.0428 mol/L) および塩化カリウム (0.135 mol/L) の水溶液をオートクレーブ滅菌したものを用いた。M9 最小培地アガープレートは Bacto agar (15 g/L) を含む M9 最小培地を滅菌シャーレ (90 mm) に分注して固化させたものを用いた。2 \times YT 培地は Bacto tryptone (16 g/L), Bacto yeast extract (10 g/L) および塩化ナトリウム (5.0 g/L) の水溶液を pH 7.0 に調整し, オートクレーブ滅菌したものを用いた。2 \times YT-AG (1%) 培地は 2 \times YT 培地にアンピシリンナトリウム (100 mg/L) および D-グルコース (10 g/L) を加えて調製した。2 \times YT-AK 培地は 2 \times YT 培地にアンピシリンナトリウム

(100 mg/L) およびカナマイシン硫酸塩 (50 mg/L) を加えて調製した。2×YT-ATG (1%) 培地は2×YT 培地にアンピシリンナトリウム (100 mg/L), テトラサイクリン塩酸塩 (10 mg/L) および D-グルコース (10 g/L) を加えて調製した。SOB (-) 培地は Bacto tryptone (20 g/L), Bacto yeast extract (5.0 g/L) および塩化ナトリウム (0.5 g/L) および塩化カリウム (0.186 g/L) の水溶液を pH 7.0 に調整し, オートクレーブ滅菌したものを用いた。SOC 培地: 塩化マグネシウム (5 mmol/L), 硫酸マグネシウム (5 mmol/L) および D-グルコース (20 mmol/L) を SOB (-) 培地に混合させたものを用いた。タンパク質発現誘導用培地は2×YT 培地にスクロース (0.4 mol/L), IPTG (0.1 mmol/L) およびアンピシリンナトリウム (100 mg/L) を加えて調製した。2×YT アガープレートは Bacto agar (15 g/L) を含む2×YT 培地をオートクレーブ滅菌したものを用いた。2×YT トップアガーは Bacto agar (7 g/L) を含む2×YT 培地をオートクレーブ滅菌したものを用いた。

xii. 細胞とファージ

大腸菌 XL1-Blue 細胞, XLOLR 細胞, VCSM13 ヘルパーファージは, Stratagene から購入した。また, 大腸菌 XL1-Blue 細胞, XLOLR 細胞エレクトロコンピテント細胞は, Stratagene から購入または常法に従い¹⁰⁸⁾調製した。

xiii. ベクターDNA

pBluescript II は, Invitrogen から購入した。pEXmide 5 は, スウェーデン Salinator AB・Eskil Söderlind 博士, スウェーデン Lund 大学・Carl A. K. Borrebaeck 博士から供与された。

xiv. プライマー

PCR および DNA の塩基配列の決定に用いたプライマーは, つくばオリゴサービスで化学合成され, 逆相カートリッジ精製品または HPLC 精製品として供与されたものを用いた。

以下に本研究で用いたプライマーの配列を示す。

モノクローナル抗体および scFv 遺伝子の遺伝子配列の解析

my1-GSP1 : 5'-GCTGGCCGGGTGGGCAAC-3'

my1-GSP2 : 5'-ACACTGCTGGACAGGGAT-3'

my1-GSP3 : 5'-GGATCCCGGGAGTACCCCTTGACCAGGC-3'

mλ1-GSP1 : 5'-RGACARACTCTTCTCCAC-3'

mλ1-GSP2 : 5'-GTACCATYTRCCTTCCAG-3'

mλ1-GSP3 : 5'-GGATCCCGGGTCAGRGAAGGTGGRAACA-3'

KS-reverse : 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

KS-forward : 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

VL-I / III : 5'-GACATTGTGATGACYCARTCT-3'

VL-IV / VI : 5'-CAAATGKTCTCACCCAGTCT-3'

VL-II a : 5'-GATGTTKTGATGACCCAAACT-3'

VL-II b : 5'-GATATTGTGATAACCCAGGMT-3'

VL-V a : 5'-GACATCSAGATGACYCAGTCT-3'

VL-V b : 5'-GAYATTGTGMTGACMCAGTCT-3'

VL-II a/b sal I : 5'-ACTAGTCGACGATRRTTKTGATRACCCA-3'

MKC : 5'-GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAAGATG-3'

Seq-343 : 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

Seq-532 : 5'-GGAGAGCCACCGCCACCCTAAC-3'

抗 DCA scFv の調製

DCA V_H-back : 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGT
GGAATCTGGG-3'

DCA V_H-forward : 5'-CCGCCGGATCCGCC'TCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACTG
TGAGAGCGGTGCC-3'

CDR シャッフリングにより変異 scFv の調製

E₂ V_H#1 : 5'-ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAAGTGCCACTGGTGGAG
TCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTAA-3'

E₂ V_H#2 : 5'-CCAGTCTCTTGTCTGGAGACTGGCGAACCCAAGACATGGCAGACCTACTGA
AAGGGAATCCAGAGGCTGTACAGGAGAGTTTTAGGGACCCTGGAGGCTT-3'

E₂ V_H#3 : 5'-CGCCAGTCTCCAGACAAGAGACTGGAATGGGTGCGCCGAGATTAGTAGTGGT
CGCCAGTCTCCAGACAAGAGACTGGAATGGGTGCGCCGAGATTAGTAGTGGTGACAATGC
CAAGAA-3'

E₂ V_H#4 : 5'-TGGCCGTGTCCTCAGACCTCAGACTGCTCATTTCAGATACAGGATATTCTTG
GCATTGTCTCTGGAGAT-3'

E₂ V_H#5 : 5'-TGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTATTGTGCAAGGGAGAGGGGAATTCA
TTACTACGGAAGTAGCGAAATTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC-3'

E₂ V_H#6 : 5'-CCGCCGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACT
GAGGTTTCCTT-3'

E₂ V_L#1 : 5'-CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGATATTTTGATGACCCAAA
CTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGA-3'

E₂ V_L#2 : 5'-TGACTTCCCTGGTTTCTGCTGCAACCACCCGATATAACTTCTAATGCCCTGAC
TTGCATGGCAAGTGATGGTGACTGTGTCTCCCAGAGATACAGACATG-3'

E₂ V_L#3 : 5'-CAGCAGAAACCAGGGAAGTCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACT
TGGAAGATGGAATTTTCATCAAGGTTTCAGTGGCAG-3'

E₂ V_L#4 : 5'-AAAATCTTCAGATTCCAGGCTGCTGATGGTAAGAGAATAATCTGTTCCAGATC
CTCTGCCACTGAACCTTGATG-3'

E₂ V_L#5 : 5'-GCCTGGAATCTGAAGATTTTGGAGACTATTACTGTGTGCAATATGCTCAGT
TTCCGTACACGTTTCGGTGGGGGGACCAAGCTGGAAGTA-3'

E₂ V_L#6 : 5'-GCTCAACTTTCTTGTCGACTTTATCATCATCATCTTTATAATCTTTTACTTCCA

GCTTGGTCCCCC-3'

E₂-Hcdr2-B : 5'-CGCCAGTCTCCAGACAAGAGACTGGAATGGGTCGCC-3'

E₂-Hcdr2-F-bio : 5'-TTCTTGGCATTGTCTCTGGAGATGGTGAATCG-3'

E₂-Hcdr3-B : 5'-TGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTATTGTGCAAGG-3'

E₂-Hcdr3-F-bio : 5'-GACGGTGACTGAGGTTCCCTTGACCCCA-3'

E₂-Lcdr1-B-bio : 5'-CATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAGTCACCATCACTTGC-3'

E₂-Lcdr1-F : 5'-TGACTTCCCTGGTTTCTGCTGCAACCA-3'

E₂-Lcdr3-B : 5'-GCCTGGAATCTGAAGATTTGGAGACTATTACTGT-3'

E₂-Lcdr3-F-bio : 5'-TACTTCCAGCTTGGTCCCCCACCAGAA-3'

xv. キット類

Fab フラグメント調製キット (ImmunoPure Fab preparation kit) は, Pierce から購入した. プロテイン A カラムキット (Ampure PA kit) は, Amersiam Bioscience から購入した. RNA 抽出キット (RNeasy mini kit) は, Qiagen から購入した. 5'-RACE キット (5'-RACE system for rapid amplification of cDNA ends, version 2.0) は, Invitrogen から購入した. プラスミド DNA 抽出キット (Qiagen plasmid mini kit) は, Qiagen から購入した. シークエンス用 PCR キット (Dual Cydye terminator sequencing kit) は, Amersiam Bioscience から購入した. DNA 精製キット 2 種 (A: Wizard PCR preps DNA purification system, B: Wizard SV gel and PCR clean-up system) は, Promega から購入した. タンパク質定量に用いたプロテインアッセイ Lowry キットは, ナカライテスクから購入した.

xvi. 電気泳動用ゲルと泳動条件

目的 DNA の確認や鎖長の分析を目的とする通常の電気泳動には, Invitrogen 社製のアガロースゲル (UltraPure™ Agarose) を用い, TAE 緩衝液中, 100 V で泳動を行った. DNA 断片およびプラスミドの精製を目的とする電気泳動には, Rockland 社製の低融点アガロース

ゲル (Sea Plaque) を用い, TAE 緩衝液中, 50 V で泳動を行った. 短い DNA フラグメント (< 200 bp) の精製を目的とする電気泳動には, CAMBREX 社製の短鎖フラグメント用アガロース (NuSieve) を用い, TAE 緩衝液中, 50 V で泳動を行った. DNA の塩基配列の決定には,

5. 5%アクリルアミド含有ゲル (Surefill LR Sequencing Gel, ベリタス社製) を用い, TBE 緩衝液中, 1,500 V で泳動を行った.

第 1 章 付属実験

第 2 節 付属実験

1. 2. 1 項 Ab#88 抗体可変部遺伝子を含む cDNA の調製

抗 DCA 抗体分泌ハイブリドーマ細胞 ($\sim 1 \times 10^7$ 個) から, RNA 抽出キットを用いて総 RNA を抽出した. 得られた総 RNA (2 μ g) に, my1-GSP-1 (V_H) プライマーまたは m λ -GSP-1 (V_L) プライマー (2.5 pmol), dNTP 混合物 (各 10 nmol), Superscript II reverse transcriptase (200 U) を加え, 専用緩衝液中 (25 μ L), 42°C, 50 分インキュベートし, V_H 遺伝子および V_L 遺伝子を含む cDNA (V_H -cDNA, V_L -cDNA) をそれぞれ合成した. これら反応溶液を, 5'-RACE キットに含まれる DNA カートリッジに付して, V_H -cDNA, V_L -cDNA を含む水溶液 (~ 50 μ L) を得た.

1. 2. 2 項 Ab#88 抗体可変部遺伝子を含む DNA 断片の増幅

5'-RACE キットを用い, 以下の手順で V_H および V_L 遺伝子を含む遺伝子断片を得た.

前述の V_H -cDNA および V_L -cDNA に, terminal deoxynucleotidyl transferase と dCTP を加えてその 3'末端にポリ C 配列を付加したのち, その反応液を AAP と, my1-GSP-2 (V_H) または m λ -GSP-2 (V_L) をプライマーとする PCR に付した. 本 PCR は, Ex Taq DNA ポリメラーゼ (1 U), dNTP 混合物 (各 10 nmol), 上記プライマー (各 20 pmol) を含む専用緩衝液 (50 μ L) 中で行い, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 2 分のサイクルを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. さらに, この PCR 反応液の 1,000 倍希釈液 (10 μ L) を, AUAP および my1-GSP-3 (V_H) または m λ -GSP-3 (V_L) をプライマーとする PCR に付した. 本 PCR は, Ex Taq DNA ポリメラーゼ (2.5 U), dNTP 混合物 (各 40 nmol), 上記プライマー (各 50 pmol) を含む専用緩衝液 (100 μ L) 中, 上記条件と同様に行った. この反応液を, フェノールクロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1; PCI) 抽出およびエタノール (EtOH) 沈殿に付した. 得られる沈殿物を 1.5% の低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動に付し, 目的 DNA と思われるバンドを含むゲルを切り出し, DNA

精製キット A を用いて DNA 抽出した。

1. 2. 3 項 Ab#88 抗体 V_H , V_L 遺伝子を含む DNA 断片のサブクローニング

1. 2. 2 項で得られた V_H , V_L 各遺伝子断片 (各 10 μL) に, 制限酵素 *Xma* I (50 U) を加え, BSA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む反作用緩衝液中 (100 μL) にて 37°C で一晩インキュベートした. 反応液を PCI 抽出, EtOH 沈殿に付したのち, 沈殿として得られた DNA を反作用緩衝液 (100 μL) に溶解し, 制限酵素 *Sal* I (50 U) を添加して 37°C で, 一晩インキュベートした. 反応液を再度 PCI 抽出, EtOH 沈殿に付したのち, 1.5% の低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行って, 目的 DNA と思われるバンドを含むゲルを切り出し, DNA 精製キット A を用いて, 制限酵素処理済み DNA を精製した. その 1 部 (0.1 μg) と, 同様に *Xma* I, *Sal* I で酵素処理した pBluescript II ベクター (0.2 μg) を滅菌水に溶解し, 45°C, 5 分間インキュベートしたのち, 直ちに氷冷した. この溶液に 10 倍濃度の反作用緩衝液 (5 μL), T4 DNA ligase (1,600 U/4 μL) を加えて 16°C で一晩インキュベートした. この反応液を PCI 抽出し, 沈殿キャリアーとしてグリコーゲン (40 μg) を添加したのち EtOH 沈殿を行い, 得られる沈殿を滅菌水 (10 μL) に溶解した.

本水溶液に XL1-Blue エレクトロコンピテント細胞の懸濁液 (100 μL) を加えて混合し, その全量をキュベット電極に移して, 氷中で 20 分間放置した. これを遺伝子導入装置に装着し, 50 μF , 印加電圧 1,800 V, 内部抵抗 125 Ω の条件で電気パルスを加えた. その直後に, 予め 37°C に加温した SOC 培地 (900 μL) を添加し, 37°C で 1 時間振とう培養 (~200 rpm) した. 菌液の 1 部を段階希釈したのち, 2 \times YT-ATG 培地 (1%) アガープレートに塗布し, 37°C で一晩培養した.

このプレート上から, コロニーをランダムに選択し, 2 \times YT 培地 (5 μL) に懸濁させた. この懸濁液 1 μL に, KS-reverse および KS-forward プライマー (各 2.5 pmol), dNTP 混合物 (4 nmol), および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (1U) を加え, 専用緩衝液 (20 μL) 中, PCR に付した. PCR の条件として, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 3

分のサイクルを 40 回繰り返したのち、72°Cで 10 分の伸長反応を加えた。反応液をアガロースゲル (2%) 電気泳動に付して、目的とするサイズの遺伝子を有するクローンを同定した。これらのクローンについて、上記懸濁液を 2×YT-A 培地 (10 mL) に播種して 37°Cにて一晩振とう培養 (~200 rpm) した。得られる培養液に、終濃度が 15%となるようにグリセロールを添加し、-80°Cで凍結保存した。

1. 2. 4 項 Ab#88 抗体 V_H および V_L 遺伝子の塩基配列の決定

前項の V_H および V_L 遺伝子が認められた形質転換体のグリセロール保存液を少量とり、2×YT-AG (1%) 培地 (10 mL) に播種して 37°Cで一晩振とう培養 (~200 rpm) した。これを 3,000 rpm にて 20 分間遠心分離して集菌したのち、プラスミド抽出キットを用いて組換えプラスミドを調製した。このプラスミド DNA を、市販のキットを用いるシーケンス用 PCR に付し、その反応液を DNA シークエンサーで分析した。なお、本 PCR には KS-reverse および KS-forward プライマーを用いた。得られた結果を DNASIS version 3.0.1 プログラムにより解析して、 V_H および V_L の塩基配列を決定し、対応するアミノ酸配列を同定した。

第 3 節 付属実験

1. 3. 1 項 *ScFv#14* 遺伝子構築のための V_H -DNA および V_L -DNA 断片の調製

1. 2. 1 項で調製した V_H -cDNA 溶液 (2 μ L) に V_H -back および V_H -forward プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を含む専用緩衝液 (100 μ L) 中で PCR を行った。また、1. 2. 1 項で調製した V_L -cDNA 溶液 (2 μ L) に V_L -back および V_L -forward プライマー (各 50 pmol) を加え、同様の条件で PCR を行った。これら PCR 条件として、熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分のサイクルを 35 回繰り返したのち、72°Cで 10 分の伸長反応を加えた。反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い、2%の低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行ったのち、目的遺伝子を含むゲルを切り出し、DNA 精製キット A を用いて目的の DNA 断

片をゲルから抽出した。

1. 3. 2 項 オーバーラップエクステンション PCR による *ScFv#14* 遺伝子の構築とサブクローニング

1. 3. 1 項で得られた V_H -DNA および V_L -DNA 断片 (各 200 ng) に, dNTP 混合物 (各 5 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.65 U) を含む専用緩衝液 (25 μ L) 中で PCR を行った。PCR 条件として, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 55°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分のサイクルを 10 回繰り返したのち, さらに 72°C で 10 分の伸長反応を加えた。この反応液の 1 部 (10 μ L) に V_H -back および V_L -forward プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を含む専用緩衝液 (100 μ L) 中, 上記と同様の条件で PCR を行った。反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い, 2% の低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行ったのち, 1. 3. 1 項に準じて処理し, *scFv*-DNA 断片を得た。この *scFv*-DNA 断片 (10 μ g) を, 制限酵素 *Nco* I および *Sal* I (各 50 U) を含む専用緩衝液 (300 μ L) 中で, 37°C で一晩インキュベートした。反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行ったのち, さらに 2% の低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行い, 1. 3. 1 項に準じて処理して制限酵素処理済み *scFv*-DNA 断片を得た。

この制限酵素処理済み *scFv*-DNA 断片を, 同様に制限酵素処理した pEXmid 5 ベクターと質量比 1:2 または 1:4 で混和し, 45°C, 5 分間インキュベートしたのち, 直ちに氷冷した。この溶液に 10 倍濃度の反应用緩衝液 (5 μ L), T4 DNA ligase (1,600 U/4 μ L) を加え (全量 50 μ L), 16°C で一晩インキュベートした。この反応液を PCI 抽出し, 沈殿キャリアーとしてグリコーゲン (40 μ g) を添加したのち EtOH 沈殿を行い, 得られる沈殿を滅菌水 (10 μ L) に溶解した。本溶液を XL0LR エレクトロコンピテント細胞 (100 μ L) と混和し, 1. 2. 3 項と同条件で電気パルスを加え, 直ちに SOC 培地中で培養した。菌液の 1 部を段階希釈したのち, 2 \times YT-ATG (1%) 培地アガープレートに塗布し, 37°C で一晩培養した。

このプレート上から, コロニーをランダムに選択し, 2 \times YT 培地 (5 μ L) に懸濁させた。

この懸濁液 1 μL に、 V_{H} -back および V_{L} -forward プライマー (各 2.5 pmol), dNTP 混合物 (4 nmol), および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (1U) を加え, 専用緩衝液 (20 μL) 中, PCR に付した. PCR の条件として, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 64°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分のサイクルを 40 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液をアガロースゲル (2%) 電気泳動に付して, 目的とするサイズの遺伝子を有するクローンを同定した. これらのクローンについて, 上記懸濁液を 2 \times YT-A 培地 (20 mL) に播種して 37°C にて一晩振とう培養 (~200 rpm) した. 得られる培養液に, 終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し, -80°C で凍結保存した.

第 4 節 付属実験

1. 4. 1 項 可溶型 scFv#14 タンパク質の発現と精製

前節で得られた *scFv#14* 遺伝子で組換えた大腸菌の一部を, 2 \times YT-AG (1%) 培地 (10 mL) に播種し, 37°C にて一晩振とう培養 (~200 rpm) した. 培養した菌体の一部 (0.2 mL) を 2 \times YT-AG (1%) 培地 (20 mL) に加え, 600 nm における吸光度が 0.8 に達するまで 37°C にて振とう培養 (~200 rpm) した. 培養液を 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し, 得られる沈殿物にタンパク質発現誘導用培地 (20 mL) に懸濁し, 25°C にて一晩振とう培養 (~120 rpm) した. 培養液を 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し, 得られる沈殿物に浸透圧ショック用緩衝液 (1 mL) を加えて懸濁したのち, 氷中に 1 時間以上インキュベートした. この懸濁液を 12,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心分離し, 得られる上清をペリプラズム抽出液として回収した.

得られたペリプラズム抽出液の精製を行うため, TBS に対して 4°C で一晩透析を行った. 本液を抗 FLAG-M2 抗体アガロースゲル (約 1 mL) を充填したアフィニティカラムに付した. TBS で洗浄後, 0.10 mol/L のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) または FLAG ペプチド (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いて溶出した. 溶出画分を PBS に対して 4°C で一晩透析を行い, 精製 scFv#14 タンパク質を得た.

1. 4. 2 項 可溶性 scFv と DCA の用量—反応曲線の作製と交差反応性の確認

BSA および DCA—BSA 結合体 (100 ng/mL) を含む 0.10 mol/L の炭酸緩衝液 (pH 8.5) 100 μ L を 96 ウェルマイクロプレートに加え、室温にて一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、5% スキムミルク (300 μ L/ウェル) を加えて 37°C で 2 時間ブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、G-PBS で希釈したペリプラズム抽出液 (100 μ L/ウェル) および 10% エタノールを G-PBS で各種濃度に希釈した胆汁酸および胆汁酸代謝物 (100 μ L/ウェル) を加えて、37°C で 3 時間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄後、マウス抗 FLAG-M2 抗体 (0.6 μ g/100 μ L/ウェル) を 37°C で 1 時間反応させて T-PBS で洗浄後、POD 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (100 μ L/ウェル) を 37°C で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄したのち、0.04% *o*-PD, 0.018% 過酸化水素を含む、比色測定用 POD 基質緩衝液 (100 μ L/ウェル) を室温で 30 分インキュベートし、固相に残る POD 活性を測定した。酵素反応を 1 mol/L の硫酸溶液 (100 μ L/ウェル) で停止したのち、492 nm における吸光度を測定した。

1. 4. 4 項 ScFv を用いる BSA に結合した DCA—adenylate の測定

10 mg/mL の BSA を含む 0.10 mol/L の炭酸緩衝液 (pH 8.5) 100 μ L を 96 ウェルマイクロプレートに加え、室温にて一晩インキュベートした。BSA 固相化プレートを PBS で 3 回洗浄後、PB で各濃度に希釈した DCA—adenylate を加え、さらに 37°C で 2 日間、振とうしながらインキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、1. 4. 3 項と同様に scFv, マウス抗 FLAG-M2 抗体 (0.6 μ g/100 μ L/ウェル) および POD 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (100 μ L/ウェル) を反応させた。T-PBS で洗浄したのち、0.04% *o*-PD, 0.018% 過酸化水素を含む、比色測定用 POD 基質緩衝液 (100 μ L/ウェル) を室温で 30 分インキュベートし、固相に残る POD 活性を測定した。

第 5 節 付属実験

1. 5. 1 項 SWISS Model サーバーを用いる scFv の分子モデリング

1. 2. 4 項で同定した scFv#14 のアミノ酸配列を SWISS-MODEL サーバー (<http://swissmodel.expasy.org>) に送信し、タンパク質立体構造のモデリングデータを得た。得られたモデリングデータは Swiss-pdb viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>) を用いて画像化し、その構造を解析した。

第2章 付属実験

第2節 付属実験

2. 2. 1 項 抗 11-DC *scFv* 遺伝子の調製

今回 Kobayashi らにより既に構築された抗 11-DC 抗体 *scFv* 遺伝子 (*scFv*^{#12} ; 5'-*V_H-linker-V_L*-3') を用いた⁵⁶⁾. 構築されたプラスミド (10 ng) に, *V_H-back* および *V_L-forward* プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (20 nmol), および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加え, 専用緩衝液 (100 μL) 中, PCR に付した. PCR の条件として, 熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分のサイクルを 40 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた.

2. 2. 2 項 大腸菌ゲノムからのアルカリホスファターゼ (ALP) 遺伝子の構築と

scFv-ALP 遺伝子の構築

2×YT 培地 (2 mL) で一晩培養した大腸菌 XL1-blue から, Wizard® Genomic DNA Purification Kit を用いてゲノム DNA を抽出した. このゲノム DNA (0.16 μg) を, ALP-back と ALP-forward プライマー (各 10 pmol), dNTP 混合物 (各 4 nmol) および *pfu* DNA ポリメラーゼ (0.5 U) を含む専用緩衝液と混合して (全量 20 μL), PCR に付した. この反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い, 1% 低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行ったのち, 目的遺伝子を含むゲルを切り出し, DNA 精製キットを用いて目的の DNA 断片をゲルから抽出した. この ALP 断片の一部 (500 ng) を, DC/ALP-back と ALP-forward-2 プライマー (各 10 pmol), dNTP 混合物 (各 4 nmol) および *pfu* DNA ポリメラーゼ (0.5 U) を含む専用緩衝液と混合して, (全量 20 μL) PCR に付した. その後, 上記と同様にゲル精製を行ったのち, その一部 (200 ng) を, *scFv*-DNA (100 ng), dNTP 混合物 (各 5 nmol) および *pfu* DNA ポリメラーゼ (0.6 U) を含む専用緩衝液と混合 (全量 25 μL) して, オーバーラップエクステンション PCR に付した. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分とし, このサイクルを 20 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応

を加えた. この反応液の一部 (2 μ L) を, V_H-back と ALP-forward-2 プライマー (各 20 pmol), dNTP 混合物 (各 4 nmol) および Proofstart DNA ポリメラーゼ (2.0 U) を含む専用緩衝液と混合 (全量 25 μ L) して, 再度 PCR に付した. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 68°C, 1 分, 伸長 72°C, 4 分とし, このサイクルを 40 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 得られる反応液を上記と同様にゲル精製を行い *scFv-ALP* DNA を調製した.

1. 3. 2 項と同様に, *Nhe* I および *Sfi* I で制限酵素処理を行って得られた *scFv-ALP* 断片を, 同様に酵素処理した pEXmide 5 ベクターと連結して, 大腸菌 XL1-blue に 1. 2. 3 項と同条件で電気パルスを加え, 直ちに SOC 培地中で培養した. 菌液の 1 部を段階希釈したのち, 2 \times YT-ATG (1%) 培地アガープレートに塗布し, 37°C で一晩培養した. さらに組換え大腸菌のコロニーに対して, 1. 3. 2 項と同様に, コロニー PCR を行い (プライマーは Seq-343, Seq-532, V_H-back および ALP-forward を使用した), 目的とするサイズの遺伝子を有するクローンを同定した. これらのクローンについて, 上記懸濁液を 2 \times YT-A 培地 (20 mL) に播種して 37°C にて一晩振とう培養 (~200 rpm) した. 得られる培養液に, 終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し, -80°C で凍結保存した.

2. 2. 3 項 可溶型 *scFv-ALP* タンパク質の発現と精製

2. 2. 2 項で得られた組換え大腸菌について, 1. 4. 1 項に準じ, 抗 FLAG-M2 抗体アガロースゲル (約 1 mL) を充填したアフィニティカラムを用いて精製した. TBS で洗浄後, 0.10 mol/L のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) または FLAG ペプチド (100 μ g/mL) を用いて溶出した. 溶出画分を PBS に対して 4°C で一晩透析を行い, 精製 *scFv*#14 タンパク質を得た.

第 3 節 付属実験

2. 3. 1 項 非競合型免疫測定法に用いるプレートの調製

抗原抗体反応用プレートは, 次のように調製した. ブロッキング用緩衝液を 96 ウェルマイクロプレート [360 μ L/ウェル (No.3590)] または 96 ウェルハーフエリアマイクロプレー

ト [190 μL /ウェル (No.3690)] に加え、 37°C で4時間インキュベートした。その後、T-TBS および TBS でそれぞれ2回洗浄し、使用まで 4°C で保管した。

11-DC-BSA 固相化プレートは、次のように調製した。11-DC-BSA 結合体 (400 ng/100 μL /ウェル) を含む0.10 mol/Lの炭酸緩衝液 (pH 8.5) を96ウェルマイクロプレートに加え、室温にて一晩インキュベートした。TBS で3回洗浄後、ブロッキング用緩衝液でウェルを満たし、 37°C で2時間ブロッキングした。また使用する際はTTBS で3回洗浄した。

Id-Ab 捕捉用2次抗体固相化プレートは、次のように調製した。A-TBS に希釈したアフィニティ精製済みウサギ抗マウスIgG抗体を96ウェルマイクロプレート [300 ng/100 μL /ウェル (No.3590)] または96ウェルハーフエリアマイクロプレート [150 ng/50 μL /ウェル (No.3690)] に加え、 4°C で一晩インキュベートした。TBS で3回洗浄後、ウェルをブロッキング用緩衝液で満たし、 37°C で2時間ブロッキングした。また使用する際はTTBS で3回洗浄した。

α -Id-Ab ($\alpha\#29$) 固相化プレートは、次のように調製した。上記のように作製したId-Ab 捕捉用2次抗体固相化プレートに1 g/Lのアジ化ナトリウムを含むG-TBS で希釈した $\alpha\#29$ を96ウェルマイクロプレート [400 ng/100 μL /ウェル (No.3590)] または96ウェルハーフエリアマイクロプレート [200 ng/50 μL /ウェル (No.3690)] を加え、 37°C で1時間インキュベートした。また使用する際はT-TBS で3回洗浄した。

β -Id-Ab ($\beta\#38$) 直接固相化プレートは、次のように調製した。A-TBS で希釈した $\beta\#38$ を96ウェルマイクロプレート [500 ng/100 μL /ウェル (No.3590)] に加え、 4°C で一晩インキュベートした。TBS で3回洗浄後、ウェルをブロッキング用緩衝液で満たし、 37°C で2時間ブロッキングした。また使用する際はT-TBS で3回洗浄した。

β -Id-Ab ($\beta\#38$) 間接固相化プレートは、次のように調製した。上記のように作製したId-Ab 捕捉用2次抗体固相化プレートに1 g/Lの Na_3N を含むG-TBS で希釈した $\beta\#38$ を96ウェルマイクロプレート [30 ng/100 μL /ウェル (No.3590)] に加え、 37°C で1時間インキュベートした。また使用する際はT-TBS で3回洗浄した。

2. 3. 2 項 11-DC-BSA 固相化プレートを用いる非競合型免疫測定法

抗原抗体反応用マイクロプレート (No.3590) に, scFv-ALP (200 fmol), および各濃度の 11-DC 標準液を IMA 緩衝液中で混合して (55 μ L), 37°C で 2 時間反応させた. このうち, 50 μ L を 11-DC-BSA 固相化プレートに加え, 37°C で 2 時間反応させた. その後, 上清 (45 μ L) をとり, 1 mmol/L の Attophos substrate (10 μ L) および精製水 (50 μ L) と混合して 37°C で 1 時間反応させたのち, ALP 蛍光測定用反応停止液 (100 μ L) を加えて酵素反応を停止した. この反応液 (140 μ L) をさらに ALP 蛍光測定用反応停止液を加えて希釈したのち (全量 200 μ L), 励起波長 435 nm によって放出される蛍光を波長 555 nm で測定した.

2. 3. 3 項 scFv-ALP タンパク質の MALDI-TOF MS 分析

精製した scFv-ALP タンパク質を 0.1 (v/v)% のトリフルオロ酢酸に対して透析した. この溶液 (16 pmol/0.5 μ L) と, マトリックス溶液 [0.1 (v/v)% のトリフルオロ酢酸を含むシナピン酸/アセトニトリルの 1:1 (v/v) 混合物] 0.5 μ L を測定用プレート上で混合して, 測定試料とした. 照射するレーザーの波長は 337 nm, 加速電圧を 25 V, グリッド電圧を 18 kV に設定し, リニアモードにより測定した. 外部標準物質として BSA の水素イオン付加体 (M_r 66438.6) を用いて, 得られる分子イオンピークを補正した.

2. 3. 4 項 α 型抗イデオタイプ抗 CET-M8 抗体 (Ab[#]29) 固相化したプレートを用いる非競合型免疫測定法

抗原抗体反応用マイクロプレート (No.3590) に, scFv-ALP (200 fmol), および各濃度の 11-DC 標準液を IMA 緩衝液中で混合して (55 μ L), 37°C で 2 時間反応させた. このうち, 50 μ L を 11-DC-BSA 固相化プレートに加え, 37°C で数時間反応させた. その後, 上清 (45 μ L) をとり, α -Id-Ab (α #29) 固相化プレートに加えて, 37°C で 30 分間反応させた. T-TBS を用いて 5 回洗浄後, 1 mmol/L の Attophos substrate (10 μ L) および精製水 (90 μ L) との混合液を

加えて 37°C で 1 時間反応させたのち、ALP 蛍光測定用反応停止液 (100 μ L) を加えて酵素反応を停止した。この反応液 (140 μ L) をさらに ALP 蛍光測定用反応停止液を加えて希釈したのち (全量 200 μ L)、励起波長 435 nm によって放出される蛍光を波長 555 nm で測定した。

2. 3. 5 項 α 型、 β 型抗イディオタイプ抗 CET-M8 抗体 (α #29, β #38) を用いる非競合型免疫測定法

抗原抗体反応用マイクロプレート (No.3590) に、scFv-ALP (200 fmol)、および各濃度の 11-DC 標準液を IMA 緩衝液中で混合して (55 μ L)、37°C で 2 時間反応させた。このうち、50 μ L を β -Id-Ab (β #38) 直接固相化プレートまたは β -Id-Ab (β #38) 間接固相化プレートに加え、37°C で 1 時間反応させた。その後、上清 (45 μ L) をとり、 α -Id (α #29) 固相化プレート (No.3590) に加えて、37°C で 30 分間反応させた。T-TBS を用いて 5 回洗浄後、1 mmol/L の Attophos substrate (10 μ L) および精製水 (90 μ L) との混合液を加えて 37°C で 1 時間反応させたのち、ALP 蛍光測定用反応停止液 (100 μ L) を加えて酵素反応を停止した。この反応液 (140 μ L) をさらに ALP 蛍光測定用反応停止液を加えて希釈したのち (全量 200 μ L)、励起波長 435 nm によって放出される蛍光を波長 555 nm で測定した。

2. 3. 6 項 最適化した非競合型免疫測定法

抗原抗体反応用ハーフエリアプレート (No.3690) に、scFv-ALP (200 fmol/10 μ L/ウェル)、および各濃度の 11-DC 標準液 (0 – 10 ng/10 μ L/ウェル) を IMA 緩衝液中で混合して、37°C で 2 時間反応させた。その後、IMA 緩衝液で希釈した β -Id-Ab (6 μ g/10 μ L/ウェル) を反応溶液に加え、振とうしながら 37°C で 20 分間インキュベートした。この上清 (25 μ L) を、抗マウス抗体固相化磁性ビーズ (6.7×10^6 beads/10 μ L/ウェル) と混合し、振とうしながら 37°C で 15 分間インキュベートした。磁石を用いて磁性ビーズを固定化することで除去し、得られる上清 (30 μ L) を、 α -Id-Ab (α #29) 固相化プレート (No.3590) に加えて、37°C で 30 分間

反応させた。T-TBS を用いて 5 回洗浄後、1 mmol/L の Attophos substrate (10 μ L) および精製水 (40 μ L) との混合液を加えて 37°C で 1 時間反応させたのち、ALP 蛍光測定用反応停止液 (50 μ L) を加えて酵素反応を停止した。この反応液について励起波長 435 nm によって放出される蛍光を波長 555 nm で測定した。また、11-DC 濃度が 0 の際に得られる蛍光強度を 1 として、各濃度の 11-DC で得られる蛍光強度を相対的にプロットすることで、用量-反応曲線を作製した。

2. 3. 7 項 最適化した非競合型免疫測定法を用いる scFv-ALP の交差反応性試験

抗原抗体反応用ハーフエリアプレート (No.3690) に、scFv-ALP (200 fmol/10 μ L/ウェル)、および各濃度の各種ステロイド標準液 (10 μ L/ウェル) を IMA 緩衝液中で混合して、37°C で 2 時間反応させた。その後の操作は 2. 3. 6 項に準じて行った。

第 4 節 付属実験

2. 4. 1 項 免疫測定に用いる健常人血清からのサンプル調製と免疫測定

健常ヒト血清は 6 名の健常ボランティア (性別; 男子 3 名, 女子 3 名, 範囲; 19-21 歳) より採取した。血清 250 μ L を生理食塩水 250 μ L と混合したのち、 3 H 標識 11-DC (~2,800 dpm) を加えて 1 時間室温でインキュベートした。この溶液にジクロロメタン 1 mL を加えて 20 秒間激しく 2 回振とうしたのち、1,000 g で 15 分間遠心分離した。有機相を測定バイアルに移して乾固させたのち、残渣を 100 μ L の IMA 緩衝液に溶解した。このうち、10 μ L を 2. 3. 5 項に準じて非競合免疫測定法を行った。また、残りの溶液をクリアゾル II (10 mL) と混合して、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、抽出効率を算出した。

第3章 付属実験

第2節 付属実験

3. 2. 1 項 抗 E₂ scFv 遺伝子の構築とサブクローニング

抗 E₂ 抗体分泌ハイブリドーマ細胞 (Ab#E4-4; $\sim 1 \times 10^7$ 個) を用いて, 1. 2. 1 項および 1. 2. 2 項に準じて V_H-DNA を調製した. また, V_L-DNA の調製については, Nicholls らにより報告されているユニバーサルプライマーを用いた. 1. 2. 1 項に準じて調製した V_L-cDNA の溶液を 1000 倍に希釈し, その一部 (2 μ L) を, ユニバーサルプライマー (#VL-I/III, -IIa, -IIb, -IV/VI, -Va, Vb の 6 種のうちいずれか 1 種) と MKC プライマー (各 10 pmol), dNTP 混合物 (各 4 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.5 U) を含む専用緩衝液と混合して (全量 20 μ L) PCR に付した. PCR 条件は熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 72°C, 1 分とし, このサイクルを 35 回繰り返したのち, 72°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液を 2% アガロースゲル (2%) を用いる電気泳動で分析したところ, VL-IIa プライマーを用いるときに増幅が認められた. そこで, 本プライマーによる PCR 反応液 (10 μ L) に, VL-IIa/b-Sal I と MKC プライマー (各 50 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol) および *pfu* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を含む専用緩衝液と混合して (全量 100 μ L) 上記と同様の条件で PCR に付した. 得られた DNA 断片は 1. 2. 2 項と同様に精製した. これら V_H および V_L 遺伝子から, 1. 2. 3 項および 1. 2. 4 項と同様に塩基配列を決定し, 対応するアミノ酸配列を同定した.

決定した V_H および V_L の遺伝子情報から, プライマー 4 種 [V_H 2 種 (E2 V_H-back および E2 V_H-forward), V_L 2 種 (E2 V_L-back および E2 V_L-forward)] を作製し, 1. 3. 1 項と同様に V_H-DNA および V_L-DNA を調製および精製した. この遺伝子を混合し, E2 V_H-back および E2 V_L-forward を用いて 1. 3. 1 項と同様にオーバーラップエクステンション PCR を行い, scFv 遺伝子を調製, 精製した. その後, この scFv 遺伝子断片 (10 μ g) を, 制限酵素 *Nco* I および *Sal* I (各 50 U) を含む専用緩衝液 (300 μ L) 中で, 37°C で一晩インキュベートした. 反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行ったのち, さらに 2% の低融点アガロースゲル (Sea

Plaque) を用いる電気泳動を行い, 1. 3. 1 項に準じて処理して制限酵素処理済み *scFv*-DNA 断片を得た.

この制限酵素処理済み *scFv* 遺伝子断片を, 同様に制限酵素処理した pEXmidE5 ベクターと質量比 1:2 または 1:4 で混和し, 45°C, 5 分間インキュベートしたのち, 直ちに氷冷した. この溶液に 10 倍濃度の反作用緩衝液 (5 μ L), T4 DNA ligase (1,600 U/4 μ L) を加え (全量 50 μ L), 16°C で一晩インキュベートした. この反応液を PCI 抽出し, 沈殿キャリアーとしてグリコーゲン (40 μ g) を添加したのち EtOH 沈殿を行い, 得られる沈殿を滅菌水 (10 μ L) に溶解した. 本溶液を XL0LR エレクトロコンピテント細胞 (100 μ L) と混和し, 1. 2. 3 項と同条件で電気パルスを加え, 直ちに SOC 培地中で培養した. 菌液の 1 部を段階希釈したのち, 2 \times YT-ATG (1%) 培地アガープレートに塗布し, 37°C で一晩培養した.

3. 2. 2 項 可溶性抗 E₂ *scFv* タンパク質の発現と精製

3. 2. 1 項で得られた *scFv*#E4-4 の遺伝子が導入された変異菌について, 1. 4. 1 項と同様にタンパク質発現を行い, ペリプラズム抽出液として回収した. また本液を抗 FLAG-M2 抗体アガロースゲル (約 1 mL) を充填したアフィニティカラムを用いて精製した.

3. 2. 3 項 可溶性 *scFv* と E₂ の用量—反応曲線の作製と交差反応性の確認

BSA および E₂-BSA 結合体 (100 μ g/mL) を含む 0.10 mol/L の炭酸緩衝液 (pH 8.5) 100 μ L を 96 ウェルマイクロプレートに加え, 室温にて一晩インキュベートした. PBS で 3 回洗浄後, ブロックエース (300 μ L/ウェル) を加えて 37°C で 1 時間ブロッキングした. PBS で 3 回洗浄後, G-PBS で希釈したペリプラズム抽出液 (100 μ L/ウェル) および 10%エタノールで各種濃度に希釈した E₂ および近縁ステロイド類 (25 μ L/ウェル) を加えて, 37°C で 3 時間インキュベートした. T-PBS で 3 回洗浄後, 抗 FLAG-M2 抗体 (0.6 μ g/100 μ L/ウェル) を 37°C で 1 時間反応させて T-PBS で洗浄後, POD 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (100 μ L/ウェル) を

37°Cで1時間反応させた。T-PBSで洗浄したのち、0.04% *o*-PD, 0.018% 過酸化水素を含む、比色測定用 POD 基質緩衝液 (100 μ L/ウェル) を室温で30分インキュベートし、固相に残る POD 活性を測定した。酵素反応を1 mol/L の硫酸溶液 (100 μ L/ウェル) で停止したのち、490 nm における吸光度を測定した。

第3節 付属実験

3. 3. 1 項 エラープローン PCR による変異 V_H および V_L 遺伝子断片群の調製

3. 2. 1 項で得られた scFv#E4-4 の遺伝子保持菌から抽出した組換えプラスミド (1 ng) に、E2 V_H -back および E2 V_H -forward プライマー、または E2 V_L -back および E2 V_L -forward プライマー (各 10 pmol), dNTP 混合物 (dGTP, dCTP, dTTP 各 0.10 μ mol および dATP 各 0.020 μ mol) および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加え、エラープローン PCR 用緩衝液 [16.6 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.1 mmol/L MgCl_2 , 6.7 μ mol/L EDTA, 10 mmol/L 2-メルカプトエタノール, 10% (v/v) DMSO, 0.17 g/L BSA および 0, 0.50 または 1.0 mmol/L MnCl_2 を含む 67 mmol/L トリス塩酸緩衝液] (全量 100 μ L) 中で PCR を行った。PCR 条件は熱変性 94°C, 1 分, アニーリング 50°C, 1 分, 伸長 70°C, 4 分とし、このサイクルを 25 回繰り返したのち、72°C で 10 分の伸長反応を加えた。反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い、2% 低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行ったのち、目的遺伝子を含むゲルを切り出し、DNA 精製キット A を用いて目的の DNA 断片をゲルから抽出することで、変異導入率の異なる 3 種の変異 V_H 遺伝子断片群 (*1st-mV_H-DNA*) および 3 種の変異 V_L 遺伝子断片群 (*1st-mV_L-DNA*) を調製した。さらに、これら変異遺伝子断片群の一部 (1 ng) を鋳型として、同じ MnCl_2 濃度条件でエラープローン PCR を繰り返し、変異導入率を高めた 3 種の変異 V_H 遺伝子断片群 (*2nd-mV_H-DNA*) および 3 種の変異 V_L 遺伝子断片群 (*2nd-mV_L-DNA*) を調製した。

3. 3. 2 項 変異 scFv の調製

3. 3. 1 項で調製した 6 種の変異 V_H 遺伝子断片群および 6 種の変異 V_L 遺伝子断片群について、同条件の $MnCl_2$ 濃度および PCR 多重度で増幅した変異 V_H -DNA 断片および V_L -DNA 断片 (各 200 ng) を混合して、dNTP 混合物 (各 5 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (0.65 U) を含む専用緩衝液 (25 μ L) 中で PCR を行った。PCR 条件として、熱変性 95°C, 1 分, アニーリング 55°C, 1 分, 伸長 72°C, 3 分のサイクルを 10 回繰り返したのち、さらに 72°C で 10 分の伸長反応を加えた。この反応液の 1 部 (10 μ L) に E2 V_H -back および E2 V_L -forward プライマー (各 100 pmol), dNTP 混合物 (各 20 nmol) および *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を含む専用緩衝液 (100 μ L) 中、上記と同様の条件で PCR を行った。反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い, 2% の低融点アガロースゲル (Sea Plaque) を用いる電気泳動を行ったのち, 1. 3. 1 項に準じて処理し, *scFv* 遺伝子断片群を得た。

3. 3. 3 項 変異 *scFv* 遺伝子のクローニングと DNA 配列の決定

3. 3. 2 項で調製した 6 種の変異 *scFv* 遺伝子断片群について, 1. 3. 2 項に準じて制限酵素 *Sal* I および *Nco* I で処理し, ゲル精製した後, 同様に制限酵素で処理した pEXmid 5 ベクターと連結し, 大腸菌 XL1-blue に電気穿孔法により遺伝子導入した。SOC 培地で 37°C, 1 時間培養 (~200 rpm) したのち, 2×YT-AG (1%) アガープレート上に塗布し, 37°C で一晩培養した。このプレートからコロニーをランダムに選択して E2 V_H -back および E2 V_L -forward プライマー (各 2.5 pmol), dNTP 混合物 (4 nmol), および *AmpliTaq* DNA ポリメラーゼ (1U) を加え, 専用緩衝液 (20 μ L) 中, PCR に付した。PCR の条件は 1. 3. 2 項に準じた。*scFv* 遺伝子を有するクローンについて, 上記懸濁液を 2×YT-AG (1%) 培地 (20 mL) に播種して 37°C にて一晩振とう培養 (~200 rpm) した。得られる培養液に, 終濃度が 15% となるようにグリセロールを添加し, -80°C で凍結保存した。さらにこれらクローンのプラスミドを抽出し, 1. 2. 4 項に準じて *scFv* 遺伝子の塩基配列を決定し, そのアミノ酸配列を同定した。なお, 本 PCR には Seq-343 および Seq-532 プライマーを用いた。得られた結果を DNASIS version 3.0.1 プログラムにより解析して, V_H および V_L の塩基配列を決定し, 対

応するアミノ酸配列を同定した。

第4節 付属实験

3. 4. 1 項 VCSM13 ヘルパーファージの調製

大腸菌 XL1-blue のグリセロール凍結保存液 (200 μ L) を、2 \times YT-T 培地 (20 mL) に播種して 37 $^{\circ}$ C にて 600 nm における吸光度が 0.4 に達するまで (本論文では、左記を“対数増殖期に達するまで”とする)、振とう培養 (~200 rpm) した。この培養液の一部 (200 μ L) に、PBS で希釈した VCSM13 ヘルパーファージ (1×10^2 - 1×10^8 pfu/mL; 10 μ L) をそれぞれ添加し、37 $^{\circ}$ C の水浴で 30 分間インキュベートした。このファージ懸濁液に、45 $^{\circ}$ C に保温した 2 \times YT トップアガー (3 mL) を加えて混和したのち、2 \times YT アガープレートに塗布して 37 $^{\circ}$ C にて一晚培養し、ファージのシングルプラークを作製した。また、チアミンを含む M9 アガープレートに大腸菌 XL1-blue を塗布し、37 $^{\circ}$ C にて 48~60 時間培養し、シングルコロニーを作製した。得られる大腸菌のシングルコロニーを 2 \times YT-T 培地 (5 mL) に播種して 37 $^{\circ}$ C にて対数増殖期に達するまで振とう培養 (~200 rpm) したのち、ファージのシングルプラークを添加し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間、振とう培養 (~200 rpm) した。この培養液を 2 \times YT-T 培地 (500 mL) に添加して 37 $^{\circ}$ C で 1 時間、振とう培養 (~200 rpm) したのち、カナマイシン硫酸塩 (50 mg/L; 500 μ L) を添加してさらに 37 $^{\circ}$ C にて一晚振とう培養 (~200 rpm) した。培養液を 10,800 g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離したのち、上清 480 mL に PEG/NaCl 溶液 [14.6% NaCl を含む 200 g/L ポリエチレングリコール 8,000 水溶液] を加え (120 mL), 氷上で 1 時間インキュベートした。この混合液を 10,800 g, 4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離したのち、上清を除去し、ファージの沈殿物を PBS-2 に溶解した。この溶液に対して 4 分の 1 量の PEG/NaCl 溶液を加え、氷上で 30 分間インキュベートした。この混合液を 3,300 g, 4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離したのち、上記と同様にファージの沈殿物を PBS-2 に溶解し、大腸菌由来の固形物を除去するために遠心分離 (11,600 g, 室温, 10 分間) した。この上清を VCSM13 ヘルパーファージ溶液として分離し、使用まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

3. 4. 2 項 VCSM13 ヘルパーファージの力価の算定

3. 4. 1 項で調製した VCSM13 ヘルパーファージ溶液 (5 μL) を PBS-2 で段階希釈 (1×10^3 - 1×10^{12} 倍希釈) して, 各希釈液 (50 μL) を対数増殖期の XL1-blue 培養液 (1 mL) に添加した. 混合後, 45°C に保温した $2 \times \text{YT}$ トップアガー (3 mL) を加えて混和したのち, $2 \times \text{YT}$ アガープレートに塗布して 37°C にて一晩培養した. 出現したファージのプラークを計数し, 1 mL あたりのプラーク数 [プラーク形成単位 (pfu)] に換算した. この値を VCSM13 ヘルパーファージの力価の指標として用いた.

3. 4. 3 項 ScFv#E4-4 および変異 scFv のファージ提示と力価の算定

野生型 *scFv#E4-4* 遺伝子および変異 *scFv* 遺伝子で組換えた大腸菌 XL1-blue のグリセロール凍結保存液 (200 μL) を, $2 \times \text{YT-T}$ 培地 (20 mL) に播種して対数増殖期に達するまで 37°C で振とう培養 (~ 200 rpm) した. この培養液に前項で調製した VCSM13 ヘルパーファージ溶液を加え, 37°C の水浴で 30 分間インキュベートした. この際, VCSM13 ヘルパーファージの MOI [Multiplicity of infection; ファージのプラーク形成単位を大腸菌細胞数で除した値] は 4, 20, 100 および 500 とした. 培養液を 1,000 g で 20 分間遠心分離したのち, 上清を除去し, 得られる沈殿物を $2 \times \text{YT-AK}$ 培地 (20 mL) に懸濁して, 25°C , 30°C または 37°C で一晩振とう培養 (~ 120 rpm) した. 培養液を 1,000 g で 20 分間遠心分離したのち, 得られる上清に対して 4 分の 1 量の PEG/NaCl 溶液を加え, 氷上で 1 時間インキュベートした. この混合液を 10,800 g, 4°C で 30 分間遠心分離したのち, 上清を除去し, *scFv* 提示ファージの沈殿物を PBS-2 (200 μL) に溶解して使用まで 4°C で保管した. この *scFv* 提示ファージ溶液の一部を PBS-2 で段階希釈 ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 倍希釈) したのち, その一部 (30 μL) を対数増殖期の XL1-blue 培養液 (270 μL) と混合して 37°C の水浴で 30 分間インキュベートした. この培養液の一部 (100 μL) を $2 \times \text{YT-ATG}$ (1%) アガープレートに塗布して 37°C にて一晩培養した. 出現した大腸菌のコロニーを計数し, *scFv* 提示ファージ溶液 1 mL あたりのコロニー

数 [コロニー形成単位 (colony-forming unit; cfu)] に換算した。この値を scFv 提示ファージの力価の指標として用いた。

3. 4. 4 項 ELISA による scFv 提示ファージの抗 E₂ 活性の評価

3. 2. 3 項に準じて BSA および E₂-BSA 結合体 (100 µg/mL) を 96 ウェルマイクロプレートに固相化したのち、M-PBS でブロッキングを行った。このプレートに前項で調製した scFv 提示ファージの M-PBS 希釈液 (1×10¹¹ cfu/100 µL) を加え、37°C で 1 時間反応させた。溶液を吸引除去して T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち、M-PBS で 2,000 倍希釈した POD 標識抗 M13 モノクローナル抗体 (100 µL/ウェル) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。T-PBS-2 で 3 回洗浄したのち、3. 2. 3 項と同様に固相に残る POD 活性を比色法により測定した。

第 5 節 付属実験

3. 5. 1 項 E₂ scFv の 6 分割オリゴ DNA の設計

Ab#E4-4 抗体の V_H および V_L 遺伝子を recursive PCR で構築するため、各遺伝子を 6 分割するオリゴ DNA (V_H#1~#6, V_L#1~#6, 計 12 種) を、本論第 3 章第 5 節に記載した諸注意を考慮して設計した。隣接するオリゴ DNA のハイブリダイゼーションの安定性や他のオリゴ DNA とのミスアニーリングの可能性については Oligo™ program version 4.0 を用いて解析し、ミスアニーリングの程度が最小になるように 3' 末端の終点を決定した。

3. 5. 2 項 変異 CDR を含む二本鎖 DNA 断片群の調製

3. 3. 1 項で調製した 6 種の変異 V_H-DNA 断片 [1st-mV_H-DNA 3 種および 2nd-mV_H-DNA 3 種] の等量混合物、または 6 種の変異 V_L-DNA 断片 [1st-mV_L-DNA 3 種および 2nd-mV_L-DNA 3 種] の等量混合物 (それぞれ合計 100 ng) に、Oligo-H3 (V_H-CDR2 を含む)、Oligo-H5 (V_H-CDR3 を含む)、Oligo-L2 (V_L-CDR1 を含む) および Oligo-L5 (V_L-CDR3 を含む) に該当する箇所

の二重鎖 DNA を増幅するように設計したプライマー[Oligo-H3(E₂-Hcdr2-B, E₂-Hcdr2-F-bio), Oligo-H5 (E₂-Hcdr3-B, E₂-Hcdr3-F-bio), Oligo-L2 (E₂-Lcdr1-B-bio, E₂-Lcdr1-F), Oligo-L5 (E₂-Lcdr3-B, E₂-Lcdr3-F-bio), 各 200 pmol], dNTP 混合物 (各 16 nmol), MgCl₂ (1.0 mmol/L) を含む専用緩衝液と混合した。この溶液をサーマルサイクラーで 98°C, 5 分間加温したのち, 直ちに *KOD* DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を加えて (全量 100 μL), PCR に付した。PCR 条件は熱変性 98°C, 30 秒, アニーリング 60°C, 30 秒, 伸長 74°C, 1 分とし, このサイクルを 15 回繰り返したのち, 74°C で 10 分の伸長反応を加えた。この反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い, 3%短鎖フラグメント用アガロース (NuSieve) を用いる電気泳動を行ったのち, 目的遺伝子を含むゲルを切り出した。得られたゲルを加温して溶解したのち, TE 飽和フェノール, PCI および EtOH を用いて精製を行い, 変異 CDR を含む 4 種の二本鎖 DNA 断片群 (*Mutated ds-H3s*, *Mutated ds-H5s*, *Mutated ds-L2s* および *Mutated ds-L5s*) を調製した。

3. 5. 3 項 変異 CDR を含む一本鎖 DNA 断片群の調製

ストレプトアビジン固定化磁気ビーズ (100 μg) と, 3. 5. 2 項で調製した 4 種の二本鎖 DNA 断片群 (*Mutated ds-H3s*, *Mutated ds-H5s*, *Mutated ds-L2s* および *Mutated ds-L5s*) を, 専用緩衝液 (binding solution, 40 μL) に添加し, 室温で激しく攪拌した。専用磁石で磁気ビーズを固定化して上清を除去したのち, ビーズを専用洗浄液 (washing solution) を用いて (80 μL) 2 回, 続いて滅菌精製水 (500 μL) で 1 回洗浄した。磁石で固定化した状態で上清を除去後, EDTA (2.0 mmol/L) を含む 0.20 mol/L NaOH (40 μL) を加えて室温で 10 分間放置し, 二本鎖 DNA を解離した。磁石で固定化した状態で上清を回収したのち, 直ちに 3.0 mol/L の酢酸ナトリウム (pH 4.0) を加えて上清を中和した。この溶液を EtOH 沈殿に付し, 一本鎖 DNA 断片群 4 種 (*mutated Oligo-H3s*, *mutated Oligo-H5s*, *mutated Oligo-L2s* および *mutated Oligo-L5s*) を調製した。

3. 5. 4 項 CDR シャッフリングによる変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーの構築

Oligo-H1, *Oligo-H6* (各 50 pmol)と, *Oligo-H2*, *mutated Oligo-H3s*, *Oligo-H4*, *mutated Oligo-H5s* (各 0.5 pmol) を混合し, dNTP 混合液 (各 20 nmol) および MgCl_2 (1.0 mmol/L) を含む専用緩衝液と混合した. この溶液をサーマルサイクラーで 98°C, 5 分間加温したのち, 直ちに *KOD* DNA ポリメラーゼ (5 U) を加えて (全量 100 μL), PCR に付した. PCR 条件は熱変性 98°C, 30 秒, アニーリング 68°C, 30 秒, 伸長 74°C, 1 分とし, このサイクルを 30 回繰り返したのち, 74°C で 10 分の伸長反応を加えた. 反応液に対して PCI 抽出, EtOH 沈殿を行い, 低融点アガロースゲル (2%) を用いる電気泳動を行ったのち, 目的遺伝子を含むゲルを切り出し, DNA 精製キット A を用いて目的の DNA 断片をゲルから抽出することで, CDR H2 および CDR H3 にランダムな点変異が導入された mV_H -DNA 断片群を調製した. 同様の手順で, *Oligo-L1*, *Oligo-L6* (各 50 pmol)と, *Mutated oligo-L2s*, *Oligo-L3*, *Oligo-L4*, *Mutated oligo-L5s* (各 0.5 pmol) を用いて PCR を行い, mV_L -DNA 断片群を調製した. さらに, これら mV_H -DNA 断片群, mV_L -DNA 断片群 (各 200 ng) を混合して, 3. 3. 2 項に準じてオーバーラップエクステンション PCR を行い, 変異 *scFv* 遺伝子断片群 (*CDR-shuffled scFv gene library*) を調製した. ただし, 用いるポリメラーゼは *KOD* DNA ポリメラーゼ (5 U) を用いた. これを 3. 2. 1 項に準じて pEXmide 5 ベクターに組み込んだのち, 大腸菌 XL1-blue に遺伝子導入した.

3. 5. 5 項 変異 *scFv* ファージライブラリーの調製

前節で調製した変異 *scFv* 遺伝子 (*CDR-shuffled scFv gene library*) 保持菌を, 3. 4. 3 項に準じて VCSM13 ヘルパーファージを感染させて, ファージ提示した. ただし, VCSM13 ヘルパーファージの MOI は 20 とし, 培養温度は 25°C とした. 得られる *scFv* 提示ファージは 3. 4. 3 項に準じて PEG/NaCl 溶液で精製後, PBS-2 (200 μL /20 mL 培養液) に溶解した. 提示されている *scFv* タンパク質の安定性を考慮し, 本溶液は調製後, 早期にパンニングに使

用した。また、その一部を用いて力価を算出し、パンニングに用いなかった提示ファージについては4℃または-20℃で保管した。

3. 5. 6 項 抗 E₂ 活性をもつ変異 scFv 提示ファージのパンニングによる選択

イムノチューブに E₂-BSA (10 µg/mL) を含む 0.10 mol/L の炭酸緩衝液 (pH 8.5) 1 mL を添加し、室温で一晩インキュベートした。吸引除去して PBS で 3 回洗浄後、M-PBS を、イムノチューブを満たすように添加し、37℃で 2 時間インキュベートした。なお、この際、BSA (10 µg/mL) を含む 0.10 mol/L の炭酸緩衝液 (pH 8.5) 1 mL を用いて、同様に BSA 固相化チューブを作製し、バックグラウンド値の算出に用いた。M-PBS を吸引除去し、PBS で 3 回洗浄後、前項で調製した第 1 次 変異 scFv ファージの希釈液 (約 1×10^{11} cfu/mL, M-PBS で希釈) 1 mL を添加し、さらに 37℃で 2 時間攪拌した。溶液を吸引除去して PBS-2 で 3 回洗浄後、100 mmol/L のトリエチルアミン溶液 (1 mL) を加えて、室温で 10 分間インキュベートし、抗原抗体反応を解離させることで、ファージを回収した。回収したファージ溶液に、1 mol/L のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 500 µL を直ちに加えて中和したのち、その一部 (1 mL) を対数増殖期の大腸菌 XL1-blue の培養液 (9 mL) に添加し、37℃で 30 分間インキュベートした。この培養液の一部を段階希釈し ($1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ 倍, 2×YT 培地に希釈), 各希釈液 (100 µL) を 2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して、37℃で一晩培養し、得られるコロニーを計数することで、ファージの回収率を評価した。残りの感染菌は、3,000 回転で 20 分遠心分離し、得られる沈殿物を 2×YT 培地に懸濁したのち、2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して、37℃で一晩培養した。培養したアガープレート上に 15%グリセロールを含む 2×YT 培地 (1 mL) を添加し、スクレーパーを用いてコロニーを懸濁して回収した。この懸濁液は-80℃で保管した。

さらに、得られた大腸菌を用いて、前項と同様に scFv 提示ファージの調製を行い、パンニングに付した。これらファージ提示およびパンニングの操作を 5 回繰り返した。ただし、scFv 提示ファージをチューブ内の抗原と反応させた後の洗浄条件は、1 サイクル目は PBS-2

で3回, 2サイクル目は TPBS-2 で3回, 3サイクル目は TPBS-2 と PBS-2 で各10回ずつ, 4サイクル目および5サイクル目は TPBS-2 で20回と, 順次, 洗浄強度を強くした.

3. 5. 7項 モノクローナル可変型変異 scFv タンパク質の調製と抗 E₂活性の評価

3. 5. 6項の各サイクルのパンニングで得られた scFv 提示ファージの一部 (30 μL) を, 対数増殖期の XLCLR 培養液 (270 μL) と混合して 37°Cの水浴で30分間インキュベートした. この培養液の一部 (100 μL) を, 2×YT-ATG (1%) アガープレートに塗布して 37°Cにて一晩培養した. 出現した大腸菌のコロニーを, 2×YT-ATG (1%) 培地に懸濁して, 1. 4. 1項に準じてタンパク質発現を行い, 可溶性 scFv タンパク質を含むペリプラズム抽出液を調製した. これを G-PBS で10倍希釈して, 3. 4. 4項に準じて, 抗 E₂活性を評価した.

3. 5. 8項 SPRによる抗原抗体反応の速度定数と結合定数の測定

3. 5. 7項で得られたペリプラズム抽出液の一部を, 1. 4. 1項に準じてアフィニティ精製した. 得られる精製 scFv タンパク質を用いて, SPR 分析を行った. なお, SPR の測定については Biacore ライフサイエンス社に委託した.

E₂-BSA を固相化したセンサーチップを搭載した SPR センサーを用いて, 精製した scFv#E4-4 および前節で得られた精製変異 scFv のチップ上の E₂残基に対する結合速度定数 (k_a), 解離速度定数 (k_d) および結合定数 [$K_a (=k_a/k_d)$] を算出した.

謝辞

本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたり多大なる御厚情、御指導、御助言を賜りました神戸薬科大学生命分析化学研究室教授 小林典裕先生に謹んで深謝申し上げます。また本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました同研究室助教 大山浩之先生に感謝申し上げます。

本研究に際し、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野教授 富岡佳久先生に謹んで感謝申し上げます。また、本論文を御精読いただき、適切な御指導、御助言賜りました東北大学大学院薬学研究科物性解析化学分野教授 安斉順一先生、同研究科臨床分析化学分野教授 大江知行先生に深く感謝申し上げます。

本研究に際し、多大なる御厚情、御支援賜りました東北大学名誉教授 後藤順一先生、東北大学病院 薬剤部長 眞野成康先生、東北大学医学系研究科分子機能解析学分野准教授 丹羽俊文先生に深く感謝申し上げます。

本研究において pEXmide 5 ベクターを御恵与下さいましたスウェーデン Salinator AB Eskil Söderlind 博士に感謝申し上げます。

本論文の作製に際し、多大な御協力をいただきました三菱化学メディアエンス株式会社 事柴周平先生、第一三共株式会社 大豊衛先生、エスティローダー株式会社 和田絵理子先生、MSD 株式会社 岩上景一先生、神戸薬科大学生命分析化学研究室修了生 多賀詩織 修士に深く感謝申し上げます。

本論文を纏めるにあたり、ご協力いただきました国際医療福祉大学薬学部医療薬学分野教授 旭満里子先生、同教授 百瀬泰行先生、同講師 眞野泰成先生、同助教 大内かおり先生、同大学薬学部臨床薬物動態学分野教授 小瀧一先生、同教授 山田治美先生、同助教 廣澤伊織先生、同助教 田島正教先生、同助手 松本准先生に感謝申し上げます。

最後に、本研究をはじめ、常に暖かく支援してくれる家族一同に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Odagiri E, Kuwa K, Katakami H, Takeda K, Takeoka K, Hidaka Y, Ieiri T, Ikeda H, Kameko M, *Rinsho Byori*, **60**: 932-954, 2012.
2. Gaykema SB, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN, Pleijhuis RG, Timmer-Bosscha H, Pot L, van Dam GM, van der Meulen SB, de Jong JR, Bart J, de Vries J, Jansen L, de Vries EG, Schröder CP, *J Nucl Med*, **54**: 1014-1018, 2013
3. 加藤芳徳, 大山浩之, 小林典裕, 後藤順一, 臨床化学, **36**: 125-139, 2007.
4. 小林典裕, 後藤順一, 島田和武, 松木容彦, 加藤芳徳, 臨床化学, **34**: 125-145, 2005.
5. 松下 雅和, 蛭間 香織, 土江 健太郎, 野澤 和久, 宮脇 治男, 掛川 真弓, 新井 次郎, 高崎 芳成, 医学と薬学, **70**: 109-117, 2013.
6. 曾根 伸治, 名倉 豊, 高橋 孝喜, 日本臨床検査自動化学会会誌, **38**: 326-331, 2013.
7. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ, *Proc Natl Acad Sci*, **63**: 78-85, 1969.
8. 小林典裕, 後藤順一, 臨床化学, **33**: 90-100, 2004.
9. 石川榮治, 酵素免疫測定法 (第3版), pp. 154-179, 医学書院, 東京, 1987.
10. Aoygai S, Arasawa K, Matsuyuki A, Kamatchi S, Fukushima M, Ohsawa N, *J Biolumin Chemilumin*, **10**: 345-51, 1995.
11. Matsuya T, Tashiro S, Hoshino N, Shibata N, Nagasaki Y, Kataoka K, *Anal Chem*, **75**: 6124-6132, 2003.
12. 若林克巳, 生化学実験講座 16 ホルモン (上), pp. 158-171, 東京化学同人, 東京, 1977.
13. Mudgett-Hunter M, Anderson W, Haber E, Margolies MN, *Mol Immunol*, **22**: 477-88, 1985.
14. Tsumuraya T, Fujii I, Hiram M, *Toxicon*, **56**: 797-803, 2010.
15. Tsumuraya T, Takeuchi K, Yamashita S, Fujii I, Hiram M, *Toxicon*, **60**: 348-57, 2012.
16. Hashida S, Tanaka K, Yamamoto N, Uno T, Yamaguchi K, Ishikawa E, *J Biochem*, **110**: 486-492, 1991.

17. Voss Jr EW, Miklasz SD, Petrossian A, Dombrink-Kurtzman MA, *Mol Immunol*, **25**: 751-759, 1988.
18. Voss Jr EW, Mummert ME, *Mikrochim Acta*, **126**: 193-202, 1997.
19. Self CH, Dessi JL, Winger LA, *Clin Chem*, **40**: 2035-2041, 1994.
20. Ullman EF, Milburn G, Jelesko J, Radika K, Pirio M, Kempe T, Skold C, *Proc Natl Acad Sci*, **90**: 1184-1189, 1993.
21. Niemi MH, Turunen L, Pulli T, Nevanen TK, Höyhty M, Söderlund H, Rouvinen J, Takkinen K, *J Mol Biol*, **23**;400: 803-14, 2010.
22. Towbin H, Motz J, Oroszlan P, Zingel O, *J Immunol Methods*, **181**: 167-176, 1995.
23. Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Ueno Y, *Nat Toxins*, **7**: 49-55, 1999.
24. Pulli T, Höyhty M, Söderlund H, Takkinen K, *Anal Chem*, **77**: 2637-42, 2005.
25. Kobayashi N, Goto J, *Adv Clin Chem*, **36**: 139-70, 2001.
26. Gunaratna PC, Wilson GS, *Anal Chem*, **65**:1152-1157, 1993.
27. Bauer CG, Eremenko AV, Kühn A, Kürzinger K, Makower A, Scheller FW, *Anal Chem*, **70**: 4624-4630, 1998.
28. Giraudi G, Anfossi L, Rosso I, Baggiani C, Giovannoli C, Tozzi C, *Anal Chem*, **71**: 4697-4700, 1999.
29. 小林典裕, 後藤順一, *Yakugaku Zasshi*, **127**: 41-42, 2007.
30. Bird RE, Hardman SM, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee S, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M, *Science*, **242**: 423-426, 1988.
31. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai M-S, Novot'y J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R, Oppermann H, *Proc Natl Acad Sci*, **85**: 5879-5883, 1988.
32. Dornieden S, Müller-Schiffmann A, Sticht H, Jiang N, Cinar Y, Würdehoff M, Korth C, Funke SA, Willbold D, *PLoS One*, **8**: e59820, 2013.

33. Kobayashi N, Odaka K, Uehara T, Imanaka-Yoshida K, Kato Y, Oyama H, Tadokoro H, Akizawa H, Tanada S, Hiroe M, Fukumura T, Komuro I, Arano Y, Yoshida T, Irie T, *Anal Chem*, **83**: 9123-30, 2011.
34. Huhálov A, Chester KA, *Q J Nucl Med Mol Imaging*, **48**: 279-288, 2004.
35. Warren DJ, Bjerner J, Paus E, Børmer OP, Nustad K, *Clin Chem*, **51**: 830-838, 2005.
36. González-Muñoz A, Bokma E, O'Shea D, Minton K, Strain M, Vousden K, Rossant C, Jermutus L, Minter R, *MAbs*, **4**:664-72, 2012.
37. Nakanishi T, Maru T, Tahara K, Sanada H, Umetsu M, Asano R, Kumagai I, *Protein Eng Des Sel*, **26**: 113-22, 2013.
38. Lamdan H, Gavilondo JV, Muñoz Y, Pupo A, Huerta V, Musacchio A, Pérez L, Ayala M, Rojas G, Balint RF, Larrick JW, *Mol Biosyst*, **9**: 2097-2106, 2013.
39. 内田清久, 胆汁と胆汁酸, pp. 6-128, 創英社, 東京, 2009.
40. Björkhem I, Einarsson K, Melone P, Hylemon P, *J Lipid Res*, **30**: 1033-1039, 1989.
41. Hirano S, Masuda N, Oda H, *J Lipid Res*, **22**: 735-743, 1981.
42. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ, *Science*, **289**: 1524-1529, 2000.
43. Panfil I, Lehman PA, Zimniak P, Ernst B, Franz T, Lester R, Radomska A, *Biochim Biophys Acta*, **1126**: 221-228, 1992.
44. Goto J, Murao N, Nakada C, Motoyama T, Oohashi J, Yanagihara T, Niwa T, Ikegawa S, *Steroids*, **63**:186-192, 1998.
45. Ikegawa S, Okuyama H, Oohashi J, Mano N, Goto J, *Anal Sci*, **15**: 625-631, 1999.
46. Ikegawa S, Ishikawa H, Oiwa H, Nagata M, Goto J, Kozaki T, *Anal Biochem*, **266**: 125-132, 1999.
47. Goto J, Nagata M, Mano N, Kobayashi N, Ikegawa S, Kiyonami R, *Mass Spectrom*, **15**:

- 104-109, 2001.
48. Mano N, Kasuga K, Kobayashi N, Goto J, *J Biol Chem*, **279**: 55034-55041, 2004.
 49. Owen RW, Thompson MH, Hill MJ, Wilpart M, Mainguet P, Roberfroid M, The importance of the ratio of lithocholic to deoxycholic acid in large bowel carcinogenesis, *Nutr Cancer*, **9**: 67-71, 1987.
 50. Kobayashi N, Katayama H, Nagata M, Goto J, *Anal Sci*, **16**: 1133-1138, 2000.
 51. Frohman MA, Dush MK, Martin GR, *Proc Natl Acad Sci*, **85**: 8998-9002, 1988.
 52. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gpttesman KS, Foeller C, Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991.
 53. Berger V, Richter F, Zettlitz K, Unverdorben F, Scheurich P, Herrmann A, Pfizenmaier K, Kontermann RE, *Protein Eng Des Sel*, **26**: 581-587, 2013.
 54. Orosz F, Ovádi J, *J Immunol Methods*, **270**:155-162, 2002.
 55. Ruberti F, Cattaneo A, Bradbury A, *J Immunol Methods*, **173**: 33-39, 1994.
 56. Heinrichs A, Milstein C, Gherardi E, *J Immunol Methods*, **178**: 241-251, 1995.
 57. Nisonoff A, Introduction to Molecular Immunology, Sinauer Associates Inc., MA, 1982
 58. Cochet O, Martin E, Fridman WH, Teillaud J-L, *Biotechniques*, **26**: 818-822, 1999.
 59. Mano N, Nagaya Y, Saito S, Kobayashi N, Goto J, *Biochemistry*, **43**: 2041-2048, 2004.
 60. Geux N, Diemand A, Peitsch MC, *Trends Biochem Sci*, **24**: 364-367, 1999.
 61. 小林典裕, *ぶんせき*, **9**: 551-552, 2004.
 62. 小林典裕, 加藤芳徳, 大山浩之, 後藤順一, *Yakugaku Zasshi*, **127**: 55-69 (2007).
 63. 中井利昭, 標準臨床検査医学, 第2版, pp. 103-113, 医学書院, 東京, 1998.
 64. Kobayashi N, Shibusawa K, Kubota K, Hasegawa N, Sun P, Niwa T, Goto J, *J Immunol Methods*, **274**: 63-75, 2003.
 65. Hosoda H, Kobayashi N, Tamura S, Mitsuma M, Sawada J, Terao, T, Nambara T, *Chem Pharm*

- Bull*, **34**: 2914-2918, 1986.
66. Kobayashi N, Shibahara K, Ikegashira K, Shibusawa K, Goto J, *Steroids*, **67**:733-742, 2002.
 67. Barnard G, Kohen F, *Clin Chem*, **36**: 1945-1950, 1990.
 68. Barnard G, Amir-Zaltsman Y, Lichter S, Gayer B, Kohen FJ, *Steroid Biochem Mol Biol*, **55**: 107-114, 1995.
 69. Barnard G, Osher J, Lichter S, Gayer B, De Boever J, Limor R, Ayalon D, Kohen F, *Steroids*, **60**: 824-829, 1995.
 70. Hosoda H, Tamura S, Tsukamoto R, Kobayashi N, Sawada J, Terao T, Nambara T, *Chem Pharm Bull*, **35**: 1497-1502, 1987.
 71. Hill M, Lapciák O, Hampl R, Stařka L, Putz Z, *Steroids*, **60**: 615-620, 1995.
 72. Liu X, Eichenberger M, Fujioka Y, Dong J, Ueda H, *Anal Sci*, **28**: 861-867, 2012.
 73. Ihara M, Suzuki T, Kobayashi N, Goto J, Ueda H, *Anal Chem*, **81**: 8298-8304, 2009.
 74. Whitlow M, Bell BA, Feng SL, Filpula D, Hardman KD, Hubert SL, Rollence ML, Wood JF, Schott ME, Milenic DE, Yokota T, Schlom J, *Protein Eng*, **6**: 989-995, 1993.
 75. Swain MD, Anderson GP, Serrano-González J, Liu JL, Zabetakis D, Goldman ER, *Anal Biochem*, **417**: 188-194, 2011.
 76. Dai Z, Liu H, Shen Y, Su X, Xu Z, Sun Y, Zou X, *Anal Chem*, **84**: 8157-8163, 2012.
 77. Muller BH, Savatier A, L'Hostis G, Costa N, Bossus M, Michel S, Ott C, Becquart L, Ruffion A, Stura EA, Ducancel F, *J Mol Biol*, **414**: 545-562, 2011.
 78. Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD, *Proc Natl Acad Sci*, **97**: 10701-10705, 2000.
 79. Holland EG, Buhr DL, Acca FE, Alderman D, Bovat K, Busygina V, Kay BK, Weiner MP, Kiss MM, *J Immunol Methods*, **1759**: 150-156, 2013.
 80. Nozaki S, Tomioka Y, Hishinuma T, Inoue M, Nagumo Y, Tsuruta LR, Hayashi K, Matsumoto T, Kato Y, Ishiwata S, Itoh K, Suzuki T, Hirama M, Mizugaki M, *J Biochem*, **131**: 729-738, 2002.
 81. Lang S, Xu J, Stuart F, Thomas RM, Vrijbloed JW, Robinson JA, *Biochemistry*, **39**:

- 15674-15685, 2000.
82. McCarthy BJ, Hill AS, *J Immunol Methods*, **251**: 137-49, 2001.
 83. Daugherty PS, Chen G, Iverson BL, Georgiou G, *Proc Natl Acad Sci*, **97**: 2029-34, 2000.
 84. Zahnd C, Spinelli S, Luginbühl B, Amstutz P, Cambillau C, Plückthun A, *J Biol Chem*, **279**: 18870-18877, 2004.
 85. Zhou Y, Drummond DC, Zou H, Hayes ME, Adams GP, Kirpotin DB, Marks JD, *J Mol Biol*, **371**: 934-947, 2007.
 86. Brockmann EC, *Methods Mol Biol*, **907**: 123-144, 2012.
 87. Valjakka J, Hemminki A, Niemi S, Söderlind H, Takkinen K, Rouvinen J, *J Biol Chem*, **277**: 44021-44027, 2002.
 88. Holmes MA, Buss TN, Foote J, *J Immunol*, **167**: 296-301, 2001.
 89. Gram H, Marconi LA, Barbas CF 3rd, Collet TA, Lerner RA, Kang AS, *Proc Natl Acad Sci*, **89**: 3576-80, 1992.
 90. Siegel RW, Baugher W, Rahn T, Drenkler S, Tyner J, *Clin Chem*, **54**: 1008-1017, 2008.
 91. Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ, *Proc Natl Acad Sci*, **88**: 7978-7982, 1991.
 92. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G, *Nature*, **352**: 624-628, 1991.
 93. 中井利昭, 標準臨床検査医学, 第2版, pp. 118-121, 医学書院, 東京, 1998.
 94. Nicholls PJ, Johnson VG, Blandford MD, Andrew SM, *J Immunol Methods*, **165**: 81-91, 1993.
 95. Leung DW, Chen E, Goeddel DV, *Technique*, **1**: 11-15, 1989.
 96. Koyanagi T, Yoshida E, Minami H, Katayama T, Kumagai H, *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**: 1134-1137, 2008.
 97. Biles BD, Connolly BA, *Nucl Acid Res*, **32**: e176, 2004.
 98. Jirholt P, Ohlin M, Borrebaeck CAK, Söderlind E, *Gene*, **215**: 471-476, 1998.
 99. Clackson T, Lowman HB, Phage display, pp. 1-26, Oxford University Press Inc., NY, 2004.
 100. Krebber A, Burmester J, Plückthun A, *Gene*, **178**: 71-74, 1996.

101. Bothmann H, Plückthun A, *Nat Biotechnol*, **16**: 376-380, 1998.
102. Scott N, Reynolds CB, Wright MJ, Qazi O, Fairweather N, Deonarain MP, *BMC Biotechnol*, **8**:97-106, 2008.
103. Söderlind E, Strandberg L, Jirholt P, Kobayashi N, Alexeiva V, Åberg AM, Nilsson A, Jansson B, Ohlin M, Wingren C, Danielsson L, Carlsson R, Borrebaeck CA, *Nat Biotechnol*, **18**: 852-6, 2000.
104. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE, Universal TA cloning, *Curr Issues Mol Biol*, **2**: 1-7, 2000.
105. Scatchard G, *Ann N. Y. Acad Sci*, **51**: 660-672, 1949.
106. Kobayashi N, Oyama H, Kato Y, Goto J, Söderlind E, Borrebaeck CA, *Anal Chem*, **82**: 1027-1038, 2010.
107. Oyama H, Yamaguchi S, Nakata S, Niwa T, Kobayashi N, *Anal Chem*, **85**: 4930-4937, 2013.
108. Sambrook J, Russell DW, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.