

博士論文

論文題目 プレターゲティング法による薬物輸送を指向した
新規融合抗体の創出

氏 名 湯村 恭平

目次

第 1 章	序論	1
1-1	緒言	2
1-2	avidin 蛋白質、core streptavidin	6
1-3	抗体を用いたドラッグデリバリーシステム	8
1-4	DDS におけるプレターゲットティング法	10
1-5	cSA 融合抗体、二重特異性抗体	12
1-6	本研究の目的と概要	14
第 2 章	低免疫原性化コアストレプトアビジン(cSA)の機能解析	15
2-1	緒言	16
2-2	実験手法	
2-2-1	各種 cSA の巻き戻しによる大量調製	20
2-2-2	cSA の分子量、及び分子サイズ解析	25
2-2-3	cSA の安定性解析	27
2-2-4	cSA の結合活性解析	29
2-3	結果と考察	
2-3-1	各種 cSA の巻き戻しによる大量調製	32
2-3-2	cSA の分子量、及び分子サイズ解析	35
2-3-3	cSA の安定性解析	38
2-3-4	cSA の結合活性解析	43
2-4	結言	46

第 3 章 cSA 融合抗体(scFv-cSA)の機能解析	51
3-1 緒言	52
3-2 実験手法	
3-2-1 scFv-cSA の巻き戻しによる大量調製	54
3-2-2 scFv-cSA の熱安定性解析	58
3-2-3 scFv-cSA の結合活性解析	58
3-2-4 scFv-cSA における avidity 効果の検証	59
3-3 結果と考察	
3-3-1 scFv-cSA の巻き戻しによる大量調製	61
3-3-2 scFv-cSA の熱安定性解析	64
3-3-3 scFv-cSA の結合活性解析	67
3-3-4 scFv-cSA における avidity 効果の検証	70
3-4 結言	72

第4章 新規二重特異性抗体形成システムを用いた共有結合による

抗 ROBO1 二重特異性抗体の構築	74
4-1 緒言	75
4-2 実験手法	
4-2-1 新規融合抗体の構築、巻き戻しによる大量調製	79
4-2-2 各種融合抗体の熱安定性解析	91
4-2-3 各種融合抗体の結合活性解析	91
4-2-4 各種融合抗体における avidity 効果の検討	92
4-3 結果と考察	
4-3-1 新規融合抗体の構築、巻き戻しによる大量調製	93
4-3-2 各種融合抗体の熱安定性解析	99
4-3-3 各種融合抗体の結合活性解析	102
4-3-4 各種融合抗体における avidity 効果の検討	106
4-4 結言	109

第 5 章 細胞を用いた <i>in vitro</i> 系での融合抗体アッセイ	111
5-1 緒言	112
5-2 実験手法	
5-2-1 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の調製	113
5-2-2 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の機能解析	115
5-2-3 cell-ELISA による結合強度の検証	116
5-3 結果と考察	
5-3-1 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の調製	118
5-3-2 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の機能解析	120
5-3-3 cell-ELISA による結合強度の検証	122
5-4 結言	125
第 6 章 結論	126
参考文献	130
謝辞	137
補足資料	139

第 1 章

序論

1-1 緒言

近年、ゲノム情報解析やエピゲノム解析、蛋白質間相互作用解析などの高度な測定技術開発によって、生命現象や種々の疾患の機構、原因を解明できるようになってきた。本質的な機構解明から得られる情報は我々に数々の有益な技術や治療法を与えてきた。患者各々に対して治療を行うテーラーメイド医療といった概念も生み出され、今後の医療技術において多大な貢献をすると期待される手法も開発されている。

開発されてきた手法の中で、とりわけ大きなものの一つに抗体医薬が挙げられる。1990年代末から一般的に用いられるようになってきた分子標的治療薬の一つであり、数々の抗体医薬が今までに盛んに研究され、そして上市されてきた(表 1-1)。元々、抗体は古くから生化学分野で研究されている蛋白質であり、生物が体内に保有している蛋白質である。抗体は外敵を認識して結合し、免疫応答などによって生物を守るという機能をもっている。抗体医薬では任意のターゲットを認識する抗体を患者に投与し、抗体がもつ機能を活かすことで疾患の治療を達成するのである。抗体医薬はその高特異性、高結合活性により選択したターゲットのみを狙った治療が可能である点、更に元々生体内にある蛋白質であるために、特にヒト由来抗体などを用いることで、薬物動態の問題を解消すると共に医薬品自身に対する副作用を抑えられる点などが期待されている。

抗体医薬はその高特異性により未だに十分に医療ニーズが満たされていない疾患に対して貢献する可能性を秘めているといえる。そのため、抗体医薬の治療効果をより効率化する、高機能化するという目標をもった研究が盛んに行われている。実際に、抗体の原子レベルでの抗原認識機能を詳細に理解し、変異や緻密な分子設計を行うことで抗原への親和性や特異性を向上させる研究がなされてきた。また、免疫応答などの生理活性や物性を向上させるための方策として、抗体がもつ抗原認識部位以外のドメインに対する抗体工学も研究されている。具体的には抗体に施される糖鎖修飾をコントロールし、フコース含有量を減らすことで抗体依存性細胞傷害活性を増強させるという研究や^{1,2}、

抗体の動態を向上させるために抗原認識部位や細胞膜上のレセプターへの結合部位に pH 依存性をもたせることで、細胞内に取り込まれた抗体をまた循環させるリサイクリング抗体³といった研究がなされている。

更に、抗体試薬は分離精製カラムや分析用カラム、イムノアッセイ法など分析化学においても幅広く応用されており、医薬品だけでなく多くの分野において求められているものである。このような分析化学などへの応用や、医薬品においても特に免疫応答を必要としないイメージング試薬などへと応用する場合には、抗体のサイズを小さくすることで取り扱いやすくし、生体内での浸潤性を向上させることが期待されている。この目的から抗体を酵素処理、あるいは遺伝子工学的手法によって断片化した抗体が作製され、用いられてきた。低分子化することで大腸菌や酵母などで大量培養できるという利点もある。F(ab')₂ は IgG のペプシン消化によって Fragment of crystallizable region (Fc) 領域が除去された分子である。Fab は、IgG のパパイン消化によって Fc 領域が除去された分子であり、大腸菌での調製やファージの提示なども可能なサイズである。variable fragment of antibody (Fv) は抗原結合能をもつ抗体の最小単位であり、大腸菌による大量調製が可能である。Fv は組織への浸透性が高い点で有利であるが、Fv のもつ VH ドメインと VL ドメインという二つのドメインが解離してしまう可能性があるために、実際には 2 つのドメインをペプチドリンカーで連結させた一本鎖抗体 single chain Fv (scFv) が用いられることも多い (図 1-1)。また二種類の抗体をつなげた二重特異性抗体⁴や、種々の蛋白質との融合抗体なども蛋白質工学的に設計、作成され、治療薬や分析試薬といった幅広い領域においての応用が期待されている^{5,6}。

今後の生命科学の発展、新たな分析手法の創出、そして新しい医療基盤形成のために抗体は必要不可欠なものである。新規抗体開発を担う抗体工学の重要性は疑う余地の無いものである。

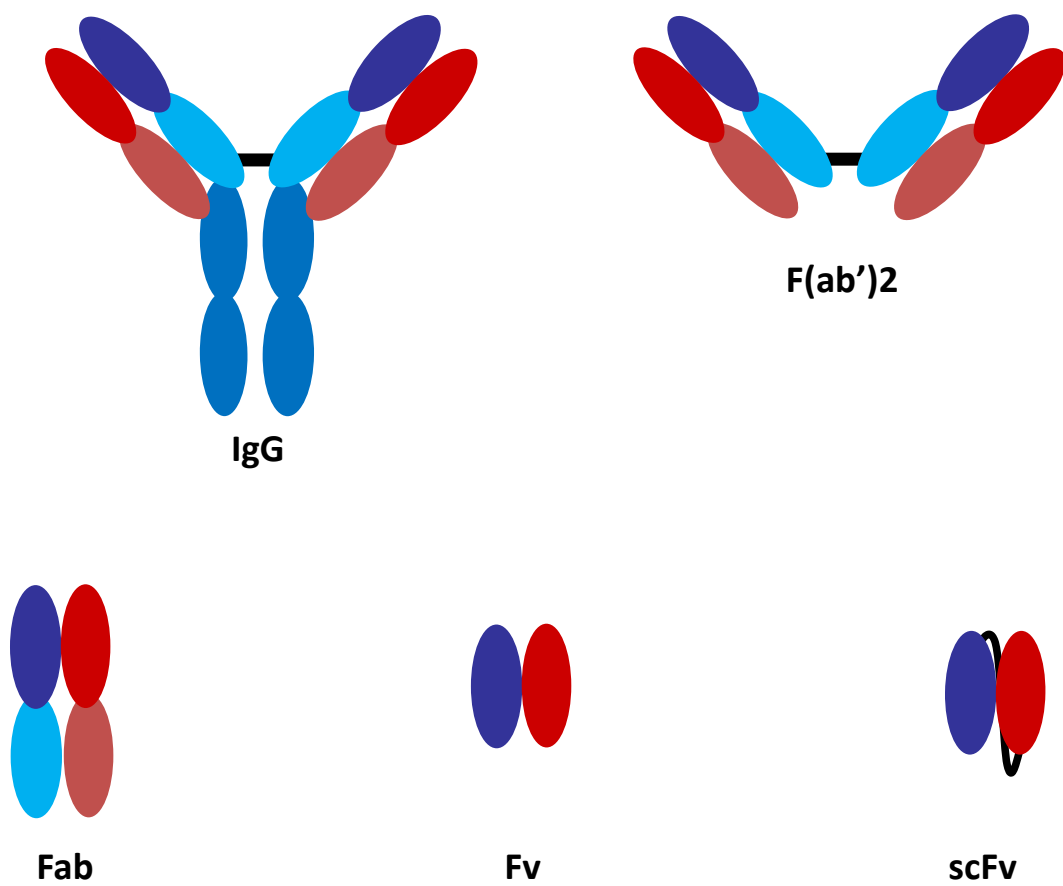


図 1-1. IgG、及び小分子化された改変抗体

1-2 avidin 蛋白質、core streptavidin

生化学的に応用され、盛んに研究されている蛋白質の代表的なものとして抗体の他に avidin 蛋白質群が挙げられる^{7,8}。avidin 蛋白質群とは鶏卵から最初に発見された avidin を代表とし、他に core streptavidin (cSA)、bradavidin 2⁹、rhizavidin (RA)¹⁰ などからなる、biotin という小分子と特異的かつ非常に強固な結合を形成する蛋白質群のことである。その中で、最初期に発見された avidin と近い時期に発見され、現在までに数多く応用されている蛋白質が cSA である¹¹。cSA は biotin との強固な結合(解離定数 $K_D \sim 10^{-14}$ M) を有しており、蛋白質 - 小分子間の相互作用としては他に類を見ないものである⁷。また、その安定性も非常に重要な特性として知られている。基本的に四量体を形成する蛋白質であり、その熱安定性は極めて高い^{12,13}。化学的安定性も高く、加熱しない限りはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)中でも四量体構造を保ち^{14,15}、同様に変性剤や¹⁶、蛋白質分解にも強いことが現在までにわかっている^{17,18}。

avidin と cSA の二つを比較すると avidin は鶏卵由来であるために糖鎖修飾などが必要であり、また等電点も 10 と塩基性である⁷。一方で cSA は放線菌であるストレプトマイセス属の *Streptomyces avidinii* 由来の蛋白質である。*Streptomyces avidinii* 中で発現された後にスプライシングを受けた core 領域(13-139 残基)のことを指して cSA と呼んでいるが、この cSA は糖鎖修飾もなく、等電点も 6 前後であり中性に近い⁷。糖鎖修飾の必要がないために大腸菌などでの大量発現が容易であり、工学的に取り扱いやすい蛋白質であるといえる。

cSA の応用法には、生化学における検出試薬、アフィニティークロマトグラフィーにおける吸着用の蛋白質、後述する医療目的での応用などが挙げられる。魅力的な cSA の特性は科学者の興味を引き、今までに多数の変異体が作成され、その特異な結合活性、及び安定性についての議論がなされてきた。これについては Laitinen らのレビューによくまとめられている¹⁹。avidin 蛋白質群は基本的に四量体を形成するが、その四量体中

の分子が相補的にお互いの機能を補助しあう。強固な結合の要因として特筆すべき点に、**biotin** 結合の際に四量体中の他の分子がもつループが **biotin** 結合部位に覆いかぶさるという点が挙げられる¹⁹。**cSA** はこの補助と、**biotin** 結合時の水素結合ネットワークによって強固な結合活性を達成している。

一方で、四量体という分子量の大きな状態よりも更に小さな、二量体、単量体を形成する **cSA** を構築するという研究も精力的に行われている。しかし、先述した関係性のため、野生型と同様の活性、安定性を保持した **cSA** 変異体を構築するのは極めて困難であるといえる。その中で近年、天然において二量体を形成する **RA** などの **avidin** 蛋白質が報告されてきた¹⁰。**RA** は先程述べたループによる他分子からの結合の補助は存在していないが、分子内にジスルフィド結合を導入することによって構造を変化させ、結合活性の保持に成功していると考えられる²⁰。二量体 **avidin** の特徴を **cSA** に取り込ませることで単量体化を目指した研究も行われている²¹。

このような特異な結合をもつ蛋白質群の発見、解析、及び応用は今後の更なる蛋白質工学の発展に寄与するものである。医療用目的においては **cSA** 融合抗体なども構築されているため、その有用性は今後益々期待されるものである。

1-3 抗体を用いたドラッグデリバリーシステム

疾患を乗り越えるために多数の新薬の研究開発が行われてきたことは言うまでもない。しかし、薬剤単独で使用する場合、体内の関係ない部位との反応による副作用や体内での分解、及び排出によって有効に作用する量は少なくなってしまう。その点を解決するために期待されている手法の一つとしてドラッグデリバリーシステム(DDS)という治療法があげられる。

DDS は体内の薬剤分布をコントロールし、必要な時に、必要な量を、必要な場所へと行き渡らせることを目標としたシステムである。DDS は、

1. 体内での薬剤濃度を維持する。
2. 特定部位へと薬剤を集中させることで副作用を抑える。
3. 薬剤の投与量を少なくする。
4. 投与回数を少なくすることで患者の負担を軽減する。
5. 半減期を長くし、薬剤の効率を上げる。

といった点で有利になることが期待されている²²。DDS の達成を目指して今までに、体内動態を向上させるための化学修飾や²³、薬剤を内包して輸送を行うためのミセル²⁴、体内吸収後に分解されることで薬理活性を示すプロドラッグ²⁵、といった研究がなされてきた。そして、特定部位への薬剤の集中という点において抗体が有用な輸送担体として期待されている。

一般の抗体医薬は完全長の抗体がもつ抗原認識部位、そして免疫応答を引き起こす定常領域、この二つの機能を活かしたものであり、第一世代抗体医薬と呼ばれるものであった。その中で、抗体がもつ抗原認識機能に注目し、ターゲットが存在する部位へと抗体を用いて薬剤を輸送するミサイル療法という DDS 手法が提案されるようになった。放射性同位体を標識させた Ibritumomab tiuxetan、Toitsumomab や化学療法剤を融合させた Gemtuzumab ozogamicin が実際に上市されている。これらの抗体医薬は主に抗体 IgG

全長を用いたものであり、第二世代抗体医薬と呼ばれる。抗体は全長で分子量が約 150 kDa という巨大な分子であり、安定性も高い。その点が有用ではあるものの、ターゲットへの浸潤性が低い、体内残留によって薬剤部分が副作用を起こす、抗体がもつ免疫応答性が通常臓器においても作用してしまう、などといった問題点がある²⁶。抗体の断片化などの技術開発によって体内での浸潤性を高めることでこの問題点を解決しようという第三世代抗体医薬品の研究もなされている。しかし、固形癌などへの作用には長期間の提示を達成する結合活性が必要な一方、強すぎても腫瘍内部への浸透が妨げられてしまうという点も問題点として判明しており²⁶、解決すべき問題点は多いといえる。

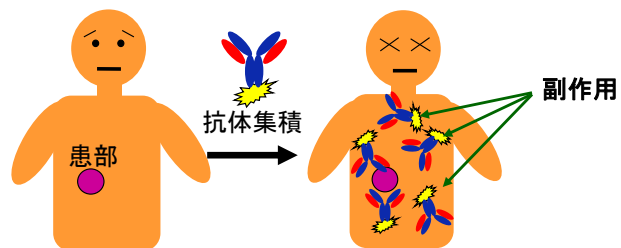
1-4 DDS におけるプレターゲットティング法

抗体に直接薬剤を修飾する DDS 手法がもつ問題点を打開するための有力な手法としてプレターゲットティング法が提案されている²⁷。この手法は、抗体に別の小分子認識部位を融合させた融合抗体を用いることで抗体集積と薬物輸送を分離して、高い腫瘍選択性を発揮させる手法である。まず始めに融合抗体のみを投与してターゲットとなる部位に抗体を十分に集積させた後で、小分子認識部位と結合するような形をとった薬剤を投与することで、抗体を足場とした輸送を行う。薬剤は輸送、及び余剰分の排出が速やかに行われ、副作用が抑えられると期待されている。今までに

1. ターゲットである抗原を認識する抗体と不完全抗原であるハプテンを認識する抗体を融合させた二重特異性抗体を用いてハプテン化薬剤による輸送を行う²⁸。
 2. 小分子である biotin とほぼ不可逆な結合を形成する avidin 蛋白質を用いた融合抗体によって biotin 化薬剤を輸送する^{5,29-31}。
 3. biotin 化した抗体を用いて、薬剤を付与した avidin 蛋白質による薬物輸送を行う^{32,33}。
 4. 核酸融合抗体を構築し、相補的な配列による薬物輸送を行う³⁴。
 5. 抗体と酵素を融合させ、酵素分解によって活性体となるプロドラッグを用いる³⁵。
- といった手法が研究されている³⁶。avidin 蛋白質としては先述した cSA が多く用いられている。この手法は薬剤を患部にのみ集積させるというドラッグデリバリーシステムの長所を発揮できると期待されている(図 1-2)。

輸送される薬剤の中で放射性同位体は既に臨床試験もされており期待が大きいといえる³¹。一般の薬剤では輸送後にターゲットとなる腫瘍細胞に薬剤が取り込まれる必要があるが、放射性同位体は患部の周辺に存在するだけで効果を発揮することができる。通常の体細胞への薬剤蓄積を抑え、腫瘍集積性を上げることができるプレターゲットティング法は放射性同位体を用いた放射線免疫療法において有力な選択肢であるといえる。

抗体による既存の
ドラッグデリバリーシステム



プレターゲティング法

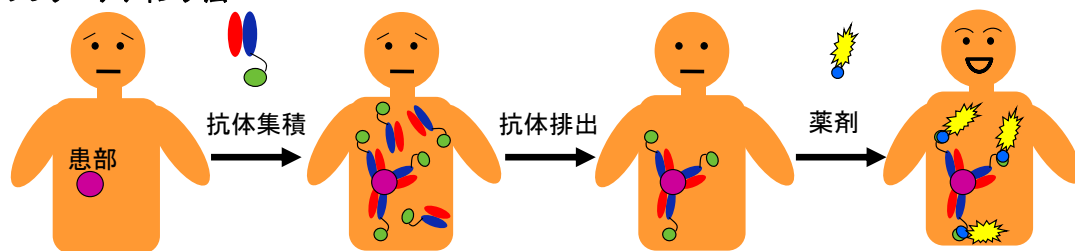


図 1-2. 既存の手法とプレターゲティング法の比較
上部: 抗体 IgG 全長を用いた薬物輸送、下部: プレターゲティング法

1-5 cSA 融合抗体、二重特異性抗体

我々はプレターゲットイング法を達成するための抗体として、患部に長い間結合できる結合力と、輸送を担当する強固な小分子結合部位が重要になると考えている。その点から本研究では cSA 融合抗体を用いた系及び二重特異性抗体を用いた系に注目している (図 1-3)。

cSA は先述のとおり biotin と強固な結合を形成するために、プレターゲットイング法の担体として非常に有用である。更に、cSA は四量体を形成するために融合抗体も四量体となる。一分子あたりの結合部位数が増えるために、細胞上や固相上などの固定化された抗原からの解離が一価の抗体と比べて遅くなる avidity 効果が生じると報告されている³⁷。大腸菌でも容易に発現可能である系を構築するために本研究では一本鎖抗体 scFv と cSA の融合抗体である scFv-cSA を採用した。

実際の scFv-cSA の使用法は以下のとおりである。scFv-cSA を投与し、患部に十分集積させる。次に特殊な試薬によって体内に残った抗体の余剰分を除去する。最後に biotin 化した薬剤を投与することで、biotin と cSA による強固な結合を介して速やかに患部へと薬剤の輸送を行う³¹。薬剤も biotin も共に小分子であり余剰分が体内に残留せずに排出されるため、通常の手法に比べて副作用が抑えられる。しかし、細菌由来である cSA がもつ免疫原性が現在大きな問題点となっている^{36,38,39}。

一方で二重特異性抗体を用いる系は、患部への集積と薬剤の輸送という二つの役割を抗体によって達成する系となっている²⁸。一方の抗体によって患部へと結合し、もう一方の抗体がハプテンなどを介して薬剤を認識して輸送を行う。また、二重特異性抗体はハプテンなどを介して薬物輸送を行うだけでなく、T 細胞表面のレセプターに結合する抗体などを用いることで免疫系によって腫瘍を攻撃することも可能であると報告されている^{40,41}。更に、ターゲットとなる抗原を二点で認識する二重特異性抗体は結合がより強固なものになるという報告もある⁴²。二重特異性抗体という分子自体が分子種とし

て非常に興味深いといえる。しかし、抗体という複雑なドメインを一分子中に多種含む融合抗体を構築することは難しいと当研究グループではすでに指摘されている。既報の論文において二重特異性抗体構築を目指した様々な新規分子種が盛んに報告されており⁴³、汎用性の高い二重特異性抗体のフォーマット構築に対する要求は極めて高いといえる。

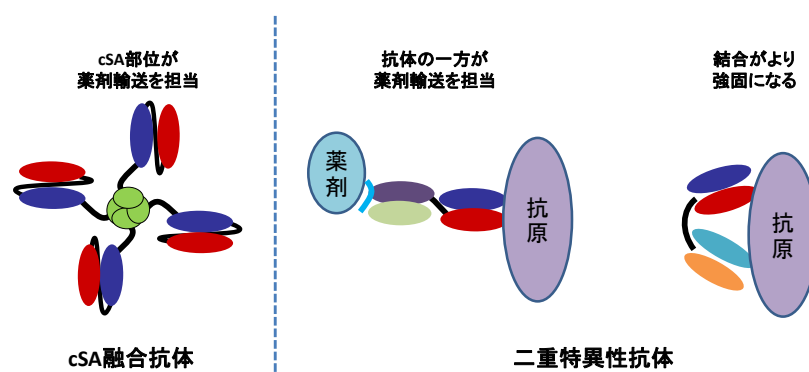


図 1-3. プレターゲティング法の担体としての cSA 融合抗体、及び二重特異性抗体

1-6 本研究の目的と概要

本研究はプレターゲットティング法の実用化を指向した新規融合抗体の構築を目標としている。

cSA 融合抗体に関しては、cSA 部位が細菌由来であるために免疫原性をもつという点が問題となっている。この問題点を解決するために当研究室ではシミュレーションを用いて cSA に変異を導入することで低免疫原性変異体を構築することに成功している⁴⁴。しかし、結合活性や熱安定性といった物理化学的な物性は未だに不明瞭なままであったため、まず始めに第 2 章では cSA 変異体について詳細な熱力学的解析を行った。

第 3 章では cSA 変異体を用いた融合抗体 scFv-cSA について熱力学的解析を行った。cSA が四量体を形成する蛋白質であるために、融合抗体も四量体を形成する。そのため、多価の結合価数による avidity 効果が期待されている。これらの効果についても踏まえた上で、cSA と同様の物理化学的な解析を行った。

第 4 章では二重特異性抗体の構築法において考えうる活性の制御などの問題点を踏まえた上で、混合によって簡単に共有結合を形成することが可能なタグシステムを用いた新規の融合抗体を提案した。そして二種の抗体部位を独立して発現精製した後で混合によって二重特異性抗体が形成可能であることを示した。更に、biotin 結合部位として二量体 avidin である RA を導入し、新たな機能を付与することが可能な汎用性の高い新規分子フォーマットであることを証明した。

第 5 章では新規二重特異性抗体形成システムによって抗原以外のターゲットとも結合できる融合抗体、つまり biotin 結合部位を含めて三重特異性をもった融合抗体を構築し、システムの更なる有用性を示すことを目指した。そして、前章までに構築した抗体と共に *in vivo* に近い系として細胞系を用いたアッセイを行った。

第 6 章では結論として、第 5 章までに行った本研究の結果を総括し、構築された融合抗体に関する有用性を提唱した。

第 2 章
低免疫原性化
コアストレプトアビジン(cSA)の
機能解析

2-1 緒言

この章では低免疫原性化を目指して構築された cSA 変異体の物理化学的性質の解析を行った。

特異な結合活性と高い安定性をもつ cSA は蛋白質工学の分野で多岐にわたる応用がなされている。しかし、医療用目的の応用にあたっては先述したとおり、免疫原性が問題となっている。その問題点を解決するために、cSA 表面に変異を導入することで低免疫原性化を目指す試みは以前にも行われていた⁴⁵。実際に低免疫原性化も確認されているが biotin 結合活性の低下が指摘されている。

当研究グループにおいても低免疫原性化を達成するための cSA 変異体が構築されている⁴⁴。この変異体は、蛋白質表面に存在する変異の候補となるアミノ酸残基についてペンタペプチド発現頻度解析というシミュレーションなどを行うことで構築された変異体である(図 2-1⁴⁶、表 2-1)^{44,47}。ヒトの免疫系に提示されるペプチドとなった際に、そのペプチドがヒトの配列により近くなるように設計されている。実際に、カニクイザルを用いた系で抗血清に対する反応性が低下することが示されている(表 2-1)。In silico における T 細胞エпитープ由来の免疫原性解析においても変異体は免疫原性が低下することが予測されている(表 2-2)^{44,48-50}。

実際に医療用蛋白質として応用するための前段階として、構築された cSA 変異体が野生型と比べて遜色ない物理化学的性質を保持しているのかを検討する必要がある。本章では、大腸菌での大量発現、及び巻き戻しという手法^{51,52}によって精製した各種 cSA 変異体について、等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry: ITC)、示差走査型熱量測定(Differential Scanning Calorimetry: DSC)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による熱力学的解析、Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation–Multi-angle Light Scattering (FFF-MALS)を用いた分子状態の解析などの結果を基にして物性の検討を行った。

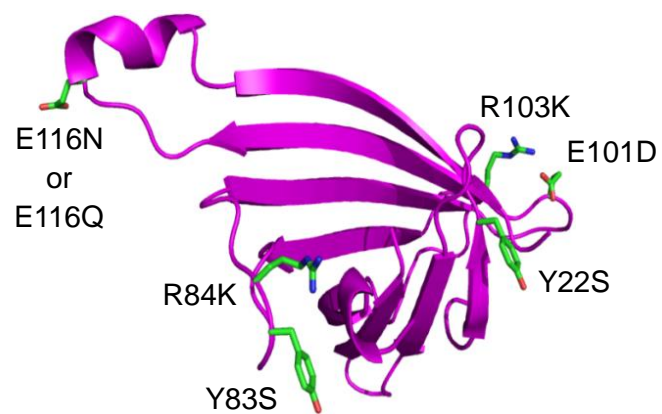
A**B**

図 2-1. A: cSA 四量体の結晶構造⁴⁶, B: 変異導入部位

表 2-1. 変異導入部位及び野生型に対する免疫反応⁴⁴

変異体	変異導入部位	野生型に対する比活性 (%)
072	Y83S	17
001	R84K	61
083	E116N	126
091	E116Q	113
030	Y83S, R84K, E116N	11
040	Y83S, R84K, E116Q	7
314	Y22S, Y83S, R84K, E101D, R103K, E116N	1
414	Y22S, Y83S, R84K, E101D, R103K, E116Q	1

表 2-2. T-cell エピトープの *in silico* 解析の結果⁴⁴

Allele	Serotype	Frequency	Streptavidin	cSA040	cSA072	cSA314	cSA414
			critical	critical	critical	critical	critical
			binders	binders	binders	binders	binders
DPA1*0103/DPB1*0401	DPw4	65%	1	1	1	0	0
DRB4*0101	DR53	46%	2	2	2	1	1
DRB3*0202	DR52	30%	3	3	3	2	2
DRB1*0701	DR7	25%	6	6	6	6	6
DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	25%	0	0	0	1	1
DPA1*0103/DPB1*0402	DPw4	24%	1	1	1	0	0
DRB1*1501	DR15(2)	23%	7	6	6	5	5
DRB3*0101	DR52	23%	1	1	1	1	1
DRB1*0301	DR17(3)	22%	0	1	0	0	1
DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	21%	1	1	1	1	1
DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	20%	1	1	1	0	0
DRB5*0101	DR51	19%	5	4	4	3	3
DRB1*0101	DR1	15%	11	10	10	9	9
DRB1*0401	DR4	14%	5	7	6	7	7
DRB1*1101	DR11(5)	12%	4	4	4	4	4
DRB1*1301	DR13(6)	11%	4	6	5	6	6
DRB3*0201	DR52	10%	1	1	1	1	1

2-2 実験手法

2-2-1 各種 cSA の巻き戻しによる大量調製

【ベクター構築】

発現ベクターは pET28b ベクターを用いた。各種 cSA 発現ベクターは本学先端科学技術研究センター 杉山 暁 助教によって構築された各種変異体ベクターを鋳型とし、以下のプライマーを用いて増幅した配列を導入した。

Forward primer : 5'-NNNNCCATGGCCGCGGAAGCTGGTATCACTG-3'

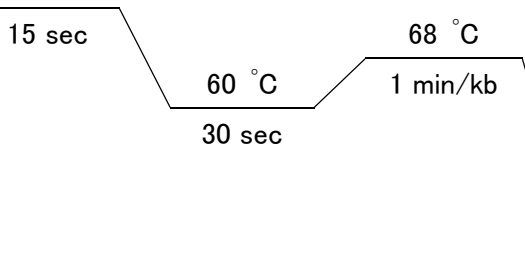
Reverse primer : 5'-NNNNCTCGAGGCTAGCAGCAGAAGGCTTAAC-3'.

PCR 条件は以下のとおりである。

反応液

滅菌水	32 μ l
10 \times PCR Buffer	5 μ l
25 mM MgSO ₄	3 μ l
2 mM dNTPs	5 μ l
Primer (10 pmol/ μ l)	各 1.5 μ l
鋳型 DNA	1 μ l
KOD -plus- neo	1 μ l
<hr/>	
Total	50 μ l

反応条件

サイクル数	1	30	1
	94 °C 2min		4 °C hold

増幅反応後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit により精製を行い、制限酵素(NcoI, XhoI)によって pET28b ベクターと共に 37 °C にて終夜、切断反応に供した。切断後の各溶液を 0.8 wt % アガロースゲルによって電気泳動し、切り出したゲル断片を FastGene Gel/PCR Extraction Kit によって精製した。精製後、ベクター : 挿入断片 = 1:10 というモル比になるように混合して、以下の条件で 16 °C、3 h ライゲーション反応を行った。

反応液

DNA 混合液 (ベクターを 50-100ng 含む)	x µl
10×ligation buffer	2 µl
T4 DNA ligase	1 µl
超純水	17-x µl
Total	20 µl

反応液を大腸菌 JM109 株にヒートショック法による形質転換を行った後、kanamycin (終濃度 50 µg/ml) 含有 LB (培地組成: 10 g/L Bacto trypton, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl) プレート培地にて 37 °C 条件下で培養した。生じたコロニーを kanamycin (終濃度 50 µg/ml) 含有 1.6 ml LB 試験管培地へ植菌し、37 °C、12~18 h 振盪培養後、Fast Gene Plasmid mini kit を用いてプラスミド抽出を行った。以下に、cSA 野生型の配列、変異導入部位及びベクターマップを示す(図 2-2, 2-3)。

10 20 30 40 50 60
 ATGGCCGCGGAAGCTGGTATCACTGGCACCTGGT**TATA**ACCAACTGGGGTCGACTTTCATT
 M A A E A G I T G T W **Y** N Q L G S T F I
 70 80 90 100 110 120
 GTGACCGCTGGTGCGGACGGAGCTCTGACTGGCACCTACGAATCTGCGGTTGGTAACGCA
 V T A G A D G A L T G T Y E S A V G N A
 130 140 150 160 170 180
 GAATCCCGCTACGTACTGACTGGCCGTTATGACTCTGCACCTGCCACCGATGGCTCTGGT
 E S R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G
 190 200 210 220 230 240
 ACCGCTCTGGGCTGGACTGTGGCTTGAAAAACAAC**TATCGT**AATGCGCACAGCGCCACT
 T A L G W T V A W K N N **Y R** N A H S A T
 250 260 270 280 290 300
 ACGTGGTCTGGCCAATACGTTGGCGGTGCT**GAG**GCT**CGT**ATCAACACTCAGTGGCTGTTA
 T W S G Q Y V G G A **E** A **R** I N T Q W L L
 310 320 330 340 350 360
 ACATCCGGCACTACCG**GAA**GCGAATGCATGGAAATCGACACTAGTAGGTCATGACACCTTT
 T S G T T **E** A N A W K S T L V G H D T F
 370 380 390 400 410 420
 ACCAAAGTTAAGCCTTCTGCTGCTAGCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC
 T K V K P S A A S L E H H H H H H

図 2-2. cSA 野生型の遺伝子配列
 (変異導入部位を太字網掛けで表示)

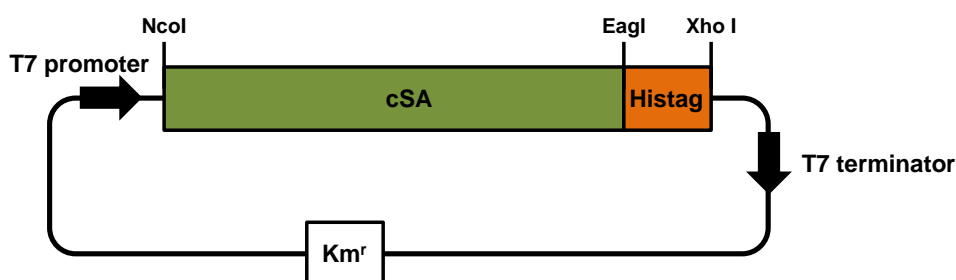


図 2-3. cSA のベクターマップ

【大腸菌による大量発現、巻き戻し】

cSA の野生型及び各種変異体は大腸菌で大量発現させ、巻き戻しによる精製を行った。この手法は大腸菌内の不溶性画分に存在している蛋白質を変性剤によって可溶化し、変性剤を除くことによって徐々に適切な蛋白質の形へと戻していく手法である。発現には大腸菌 Rosetta2 (DE3)株を用いた。ヒートショック法によりベクターを形質転換した後、kanamycin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml)含有 LB プレート培地にて 28 °C 条件下で培養した。生じたコロニーを kanamycin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml)含有 3 ml LB 試験管培地へと植菌し 28 °C、12~18 h 振盪培養後、培養液を回収し、kanamycin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml)含有 2×YT 培地 (培地組成: 16 g/L Bacto trypton, 10 g/L Yeast extract, 5 g/L NaCl) に 1 L 当たり 5 ml ずつ植え継いだ。培地は 28 °C にて振盪培養し、O.D.₆₀₀ = 0.8 にて終濃度 1 mM の isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を加えることで発現誘導を行い、37 °C にて終夜培養した。

培養液から遠心(7000 × g, 10 min, 4 °C)によって菌体を回収し、破碎用 buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 at 4 °C)で懸濁した。懸濁液を氷浴にて超音波破碎(model UD-201, TOMY, Tokyo, Japan)した後、遠心(6000 × g, 30 min, 4 °C)によって沈殿を回収した。封入体を含んだ沈殿を wash buffer (2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 at 4 °C)、acetone、超純水(それぞれ培養時の培地 1 L 当たり 35 ml)の順で洗浄(懸濁後、6000 × g, 8 min, 4 °Cにて遠心)した後、5 mM imidazole を含んだ binding buffer 1 (6 M guanidinium HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9 at 4 °C、培養時の培地 1 L 当たり 35 ml)に懸濁し、4 °C にて終夜振盪した。遠心(40000 × g, 30 min, 4 °C)により上清を回収し、5 mM imidazole を含んだ binding buffer 1 で平衡化した Ni-NTA Agarose (Qiagen, Valencia, CA) に 4 °C にてロードした。そのまま 4 °C にて imidazole を 5 mM、30 mM 含んだ binding buffer 1 でそれぞれ洗浄した後、imidazole を 50 mM、300 mM、500 mM 含んだ binding

buffer 1 で溶出した。

imidazole を 50 mM、300 mM 含んだ binding buffer 1 で溶出された画分を guanidinium HCl の濃度が 6 M、3 M、2 M、1 M、0.5 M である refolding buffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0 at 4 °C) に 6 M、3 M、2 M の段階では 6 h 以上、1 M、0.5 M の段階では 12 h 以上、4 °C にて透析し、徐々に変性剤を除いていった。guanidinium HCl の濃度が 1 M、0.5 M の段階では凝集抑制剤として 0.4 M L-arginine 塩酸塩を加えた。そして refolding buffer で 4 h 以上、4 °C にて 3 回透析し、完全に変性剤を除去した。遠心(6000 × g, 30 min, 4 °C)によって上清を回収し、Millex-GP (0.22 μm, PES, 33 mm, sterile; Millipore, Bedford, MA)を用いてろ過した。溶液を Amicon Ultra-15 (Millipore, Bedford, MA)を用いて濃縮し、refolding buffer で平衡化した 26/60 Superdex200 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ)に 4 °C にてロードし、サイズ排除クロマトグラフィーによって分離、精製を行った。サンプルは SDS-PAGE によって確認し、4 °C にて保管したものを実験に用いた。

2-2-2 cSA の分子量、及び分子サイズ解析

【サイズ排除クロマトグラフィーによる分析】

分析用の 10/300 Superdex75 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った。9-20 μM の各種 cSA 変異体に必要に応じて 1 当量以上の biotin を加えたものを、カラムに 500 μl ロードした。測定温度は室温、buffer は refolding buffer を用いて実験を行った。

【FFF-MALS】

各種 cSA の分子サイズや正確な分子量を求めるために FFF-MALS を使った分析を行った。

Field-Flow Fractionation (FFF)は拡散を使った分離手法である⁵³。この手法では薄いリボン状のチャンネル内を軸方向に放物線速度特性を保持した状態でサンプルが輸送される過程で、その輸送方向に対して垂直な方向の力を加えて壁面にサンプルを押し付けることで分離を行う。壁面に押し付けられたサンプルは小さいものほど早く拡散するため、結果として軸方向の流速によって早く輸送される。この原理によりサンプルを分離するため、サイズ排除クロマトグラフィーとは逆に、分子サイズが小さいものほど早く、大きい物ほど遅く溶出される。今回使用している Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation は片面が完全な壁面、そして反対側が半透膜で構成されたチャンネルを用いている。壁面に押し付ける力を膜方向への cross flow という形にすることで、サンプルの分離を行う(図 2-4)。この際のサンプルの保持時間は垂直方向の流速によって決まる。FFF によって分離されたサンプルを検出する際に MALS、つまり多角度光散乱を用いることで、分子サイズによる分離を行うと共にその溶出されたピークの分子量の同定も行うのが FFF-MALS という手法である。

今回の実験では Wyatt Eclipse separation system (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA)を用いて FFF-MALS による分析を行った。各種 cSA サンプルは 1.8 mg/ml まで濃縮し、必

要に応じて過剰量の biotin を加えた。サンプルを濃縮するための Focus Flow を 3 ml/min とし、分離は 5 kDa カットオフのセルロース膜を用いた。溶出段階では軸方向の流速である channel flow を 1 ml/min に維持したまま cross flow を 15 min に渡って 3 ml/min から 0 ml/min まで減少させることで溶出を行った。溶出されたピークは示差屈折計で検出され、分子量を多角度光散乱によって計算した。測定は室温にて refolding buffer を用いて行い、得られたデータは ASTRA ver. 5.3 (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA)によって解析した。

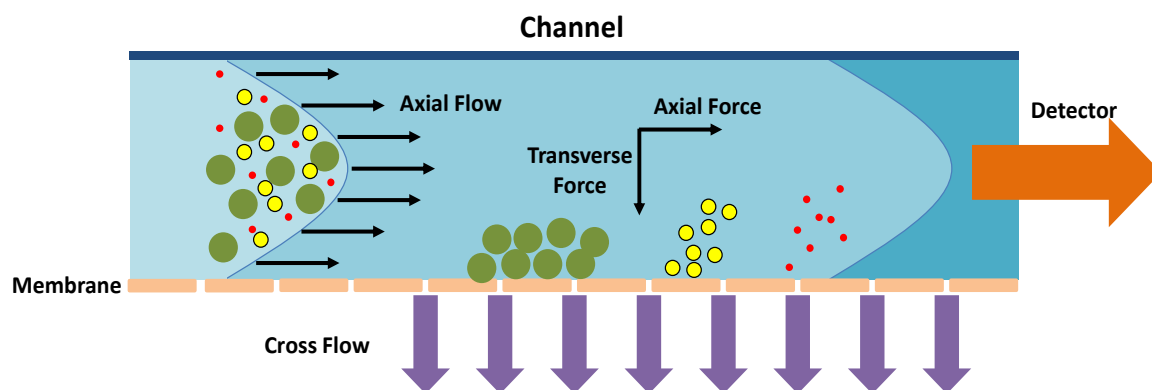


図 2-4. Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation の概略

2-2-3 cSA の安定性解析

【示差走査型熱量測定】

cSA 変異体の熱安定性を測定するために示差走査型熱量測定(DSC)を行った。

この手法は測定サンプルをプログラムに従って加熱させながら、標準サンプルとの熱容量の差を測定する手法である。蛋白質は基本的に温度上昇に伴う変性によって吸熱反応が生じるため、変性が始まると熱容量が大きくなる。結果として温度上昇に必要な熱量が増え、それによって変性温度をピークとして検出することができる(図 2-5)。そのピークの変性中点を変性温度(T_m)として蛋白質の熱安定性の指標の一つとすることができる。

本実験では示差走査型カロリーメーターVP-DSC (MicroCal, Northampton, MA)を用いて熱安定性測定を行った。温度上昇は $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて行った。サンプルセルには $20\text{-}50\text{ }\mu\text{M}$ の cSA 野生型及び変異体の Phosphate buffered saline (PBS)溶液を約 $400\text{ }\mu\text{l}$ 導入し、必要に応じて1当量以上の biotin を加えた。データは ORIGIN (Light Stone, Tokyo, Japan)にて解析した。熱力学的な解析を行うために、測定データから buffer データを差し引きし、蛋白質濃度によって正規化した。得られたグラフを二状態近似することで目的の結果を得た。

【SDS-PAGE による安定性解析】

熱安定性、及び化学的な安定性を詳細に解析するために SDS-PAGE による解析を行った。先述したとおり cSA は高い安定性をもち、加熱しない限りは SDS 中でも四量体構造を保つことがわかっている^{14,15}。SDS で変性させる前のサンプルを段階的に加熱することでその四量体構造が壊れ、単量体へと変性していく過程を測定することができる。

各変異体、及び野生型について、濃度 $9\text{-}12\text{ }\mu\text{M}$ で $6\text{ }\mu\text{l}$ の PBS 溶液を GeneAmp 9700 PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)によって $45\text{-}95\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲で 4 min 加熱した。加熱後、即座に $12\text{ }\mu\text{l}$ の sample buffer (80 mM SDS, 62.5 mM Tris-HCl, 8% glycerol, pH 6.8 at

room temperature)と 2 μl の bromophenol blue 溶液(10% glycerol)を加えて氷中に保持した。その後、各サンプルを 0.1% SDS 含有の 15% polyacrylamide ゲルにロードし、150 V、80 min 電気泳動を行った。泳動後のゲルは 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid 溶液にて染色し、水によって脱染を行った。

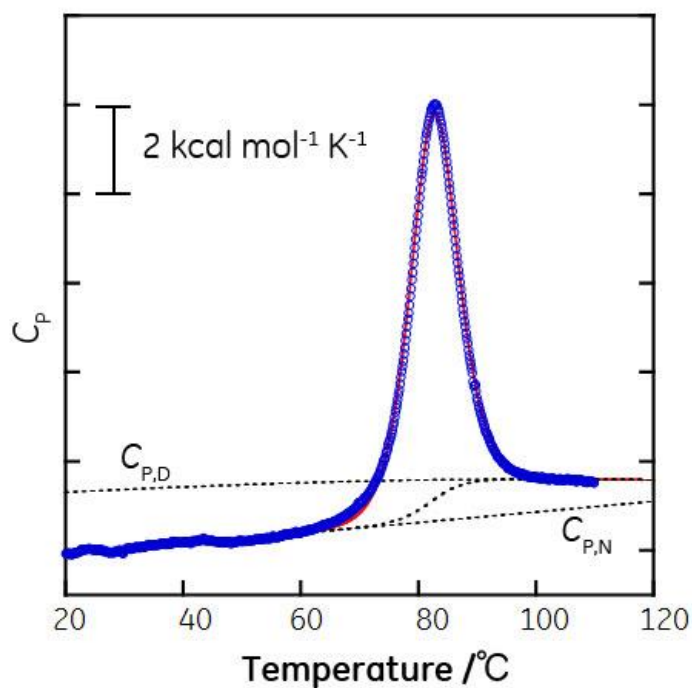


図 2-5. 蛋白質の DSC 曲線
(GE ヘルスケア・ジャパン、相互作用解析の王道より抜粋
http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/biacore/road/road_app04.html)

2-2-4 cSA の結合活性解析

【等温滴定型熱量測定】

cSA の変異体及び野生型の biotin 結合活性を解析するために等温滴定型熱量測定 (ITC)を行った。

この手法はセルに導入したリガンドにシリンジから標的分子を滴下した際に生じる熱量を観測する手法である。物質が結合、反応する際には熱の発生や吸収が起こるため、この熱量を滴定反応として測定することで、蛋白質におけるターゲットとの結合を観測することができる。得られたデータから相互作用のエンタルピー変化 ΔH や化学量論比 N 以下簡単のため、量論比と記す ν を精度良く求めることができる。また、測定データへのフィッティングから結合定数 K_a 、エントロピー変化 ΔS を求めることができる。リガンドは液状のまま用いることができるため、化学修飾や物理的固定化の影響を排除して測定でき、先述した分子間相互作用の熱力学的パラメータを一度に測定できるという点が特徴である。

原理は以下のとおりである。ITC の装置内部にはサンプルセルとリファレンスセルが備わっている。設定した一定温度に保たれているリガンド溶液に対して、滴定シリンジより溶液が滴下される。滴下によってサンプルセル内で反応が起こった場合、吸収もしくは発生した熱がリファレンスセルとの温度差を 0 にするためのフィードバック電力として検出される。滴定が進むに従って反応は飽和して、最終的にはシリンジ内の溶液の希釈熱のみが観測されるようになる(図 2-6)。

リガンド溶液にサンプル溶液を 18 回滴下した図を示す(図 2-7)。それぞれの滴定ピークの曲線下面積はその滴定によって発生した熱量と等しく、各滴定の発生熱量をセル中のリガンドとサンプルのモル比に対してプロットすることで図右側のような相互作用の結合等温線が得られる。発生熱量から結合に伴うエンタルピー変化 ΔH を、カーブフィッティングを行うことで、結合定数 K_a 、量論比 N 、エントロピー変化 ΔS を求めるこ

とができる。図では one-site binding isotherm を使用している(図 2-7)。

フィッティングよりパラメータを求める方法は以下の式によって定義される⁵⁴。リガンド **M** と標的分子 **X** において化学量論的に 1:1 の結合反応 $\text{M} + \text{X} = \text{MX}$ の結合平衡は次式で記述される。

$$K_a = \frac{[\text{MX}]}{[\text{X}][\text{M}]} \quad [\text{f2-1}]$$

K_a は結合定数である。この際、**X** の総量を X_{tot} 、**M** の総量を M_{tot} とすると、

$$X_{\text{tot}} = [\text{X}] + [\text{MX}] \quad [\text{f2-2}]$$

$$M_{\text{tot}} = [\text{MX}] + [\text{M}] = [\text{MX}] + \frac{[\text{MX}]}{K_a[\text{X}]} \quad [\text{f2-3}]$$

と表すことができる。[f2-3]式における **MX** の濃度変化は、ITC 測定において熱変化として次式と関連付けることができる。

$$dQ = d(\text{MX})\Delta H^\circ V_o \quad [\text{f2-4}]$$

ここでの ΔH° は結合エンタルピー、 V_o はセル容積、**Q** は反応によって吸収または発生した熱量である。以上の[f2-1]、[f2-2]、[f2-3]、[f2-4]式より次式が導かれる。

$$\frac{1}{V_o(dQ/X_{\text{tot}})} = \Delta H^\circ \left(\frac{1}{2} + \frac{1-(1+r)/2-X_r/2}{\{(X_r^2-2X_r(1-r)+(1+r)\}^{1/2}} \right) \quad [\text{f2-5}]$$

本式において $r = 1/(K_a M_{\text{tot}})$ 、 $X_r = X_{\text{tot}}/M_{\text{tot}}$ としている。ITC によって測定される実験的パラメータは示差熱 dQ/dX_{tot} (実際には $\Delta Q/X_{\text{tot}}$) であり、 ΔH° は滴定曲線下の総面積と形からデコンボリューションによって得られる。つまり実験データより ΔH° と K_a を求めることができる。そして、

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = RT \ln K_a \quad [\text{f2-6}]$$

より、ギブスエネルギー変化 ΔG° とエントロピー変化 ΔS° を求めることができる。

実際の測定は Microcal iTC₂₀₀ (MicroCal, Northampton, MA)を用いて行った。精製した

cSA を PBS にて 4 °C、終夜透析し、透析外液を用いて biotin の 500 μM ストック溶液を調製した。測定の際、biotin ストック溶液は測定する各 cSA 溶液の 10 倍濃度になるように濃度調整して用いた。カロリメーターのセル内に 9-20 μM の cSA を導入し、攪拌速度 1000 rpm、25 °C にて biotin 溶液を滴下した。得られたデータは ORIGIN を用いて解析を行い、滴定曲線は one-site binding isotherm にてフィッティングを行った。

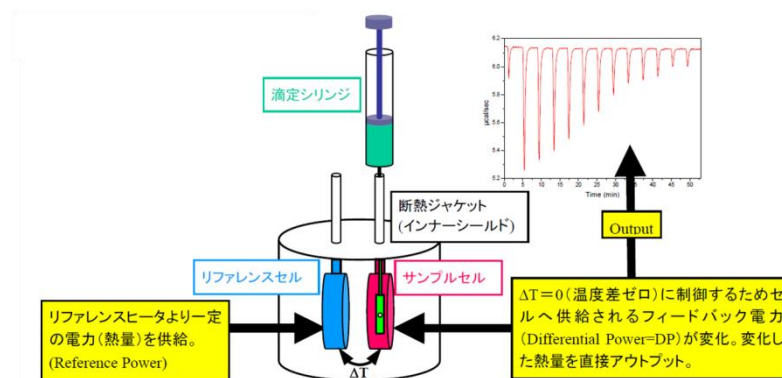


図 2-6. ITC の測定原理
(GE ヘルスケア・ジャパン、相互作用解析の王道より抜粋
http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/biacore/road/road01_07.html)

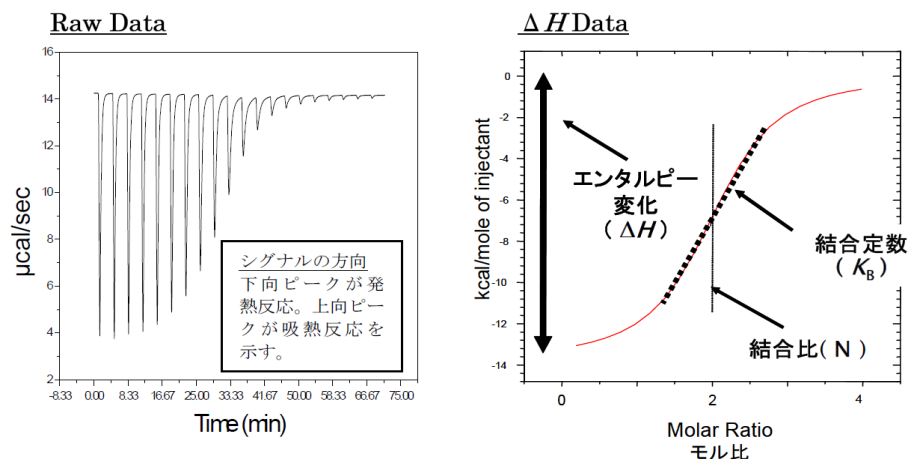


図 2-7. ITC の測定結果及びフィッティングカーブ
(GE ヘルスケア・ジャパン、相互作用解析の王道より抜粋
http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/biacore/road/road01_07.html)

2-3 結果と考察

2-3-1 各種 cSA の巻き戻しによる大量調製

大腸菌 Rosetta2 (DE3)を用いて発現した各種 cSA は不溶性画分に発現していた。そのため、得られた不溶性画分を binding buffer 1 に懸濁して可溶化し、Ni-NTA Agarose を用いて金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。粗精製を確認した SDS-PAGE の結果を図に示した(図 2-8)。どの変異体も 17 kDa を示すマーカーの下に目的物であると思われるバンドが観測された。発現量も十分に多いことがわかる。imidazole 濃度が 50mM、300 mM で溶出された画分について巻き戻しを行った。

巻き戻し後の最終精製として 26/60 Superdex200 column によるサイズ排除クロマトグラフィーを行った(図 2-9)。得られたクロマトグラムより、溶出体積 220-270 ml にて各変異体のメインピークが観測された。083 のみ、ピークに顕著な肩が見られたため別途 083'として回収した。予想溶出体積は 200 ml であると計算されているため、各種 cSA はカラムに吸着して溶出ピークが遅くなったと考えられる。四量体を形成しているかどうか不明瞭であったため、分子量、分子サイズについての検討を行うこととした。

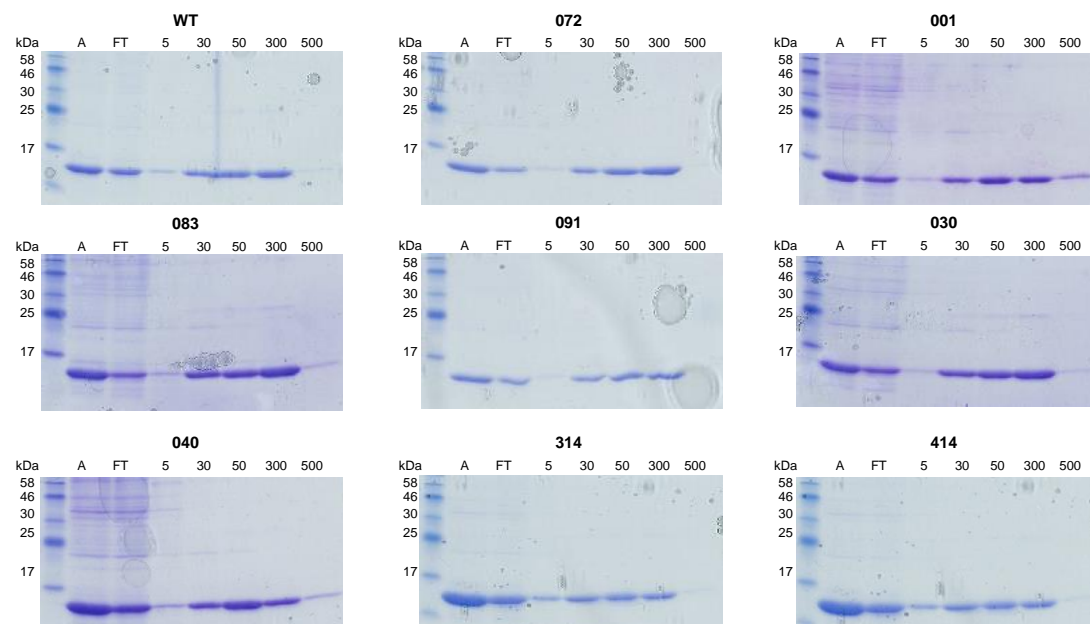


図 2-8. cSA 変異体における
金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの結果
A: apply, FT: flow-through, 5-500 は溶出に用いた imidazole 濃度(mM)を示している。

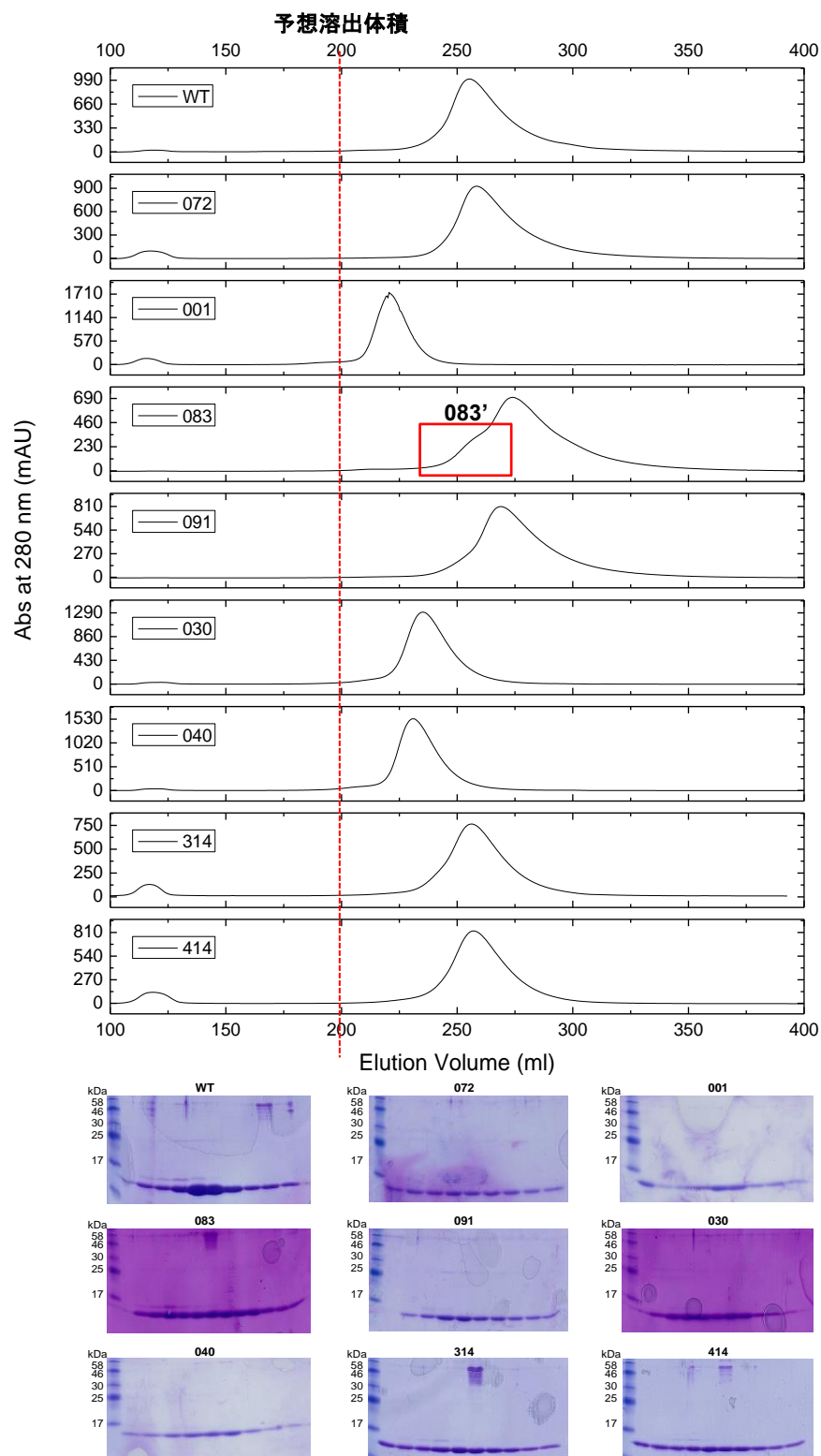


図 2-9. cSA 変異体におけるサイズ排除クロマトグラフィーの結果
column: 26/60 Superdex200 column, buffer: refolding buffer
及びピークの SDS-PAGE による解析結果

2-3-2 cSA の分子量、及び分子サイズ解析

回収した各ピークを 10/300 Superdex75 column を用いて分析を行った。先述した大量調製時のサイズ排除クロマトグラフィーから予測されるように、biotin 非存在下ではカラムの樹脂と相互作用し、四量体の予想溶出体積である 10 ml 付近よりも後方にブロードなピークが観測された(図 2-10 中黒線)。この溶出体積の後方へのシフトは大量調製時のシフトとほぼ一致していた。一方で biotin を加えることで予想溶出体積である 10 ml 付近でのシャープなピークが観測された(図 2-10 中赤線)。biotin 結合部位がカラム吸着に関与していることが推察された。また、083'では複数のピークが観測された。

biotin 存在下のサイズ排除クロマトグラフィーの結果より四量体であることは予測されているが、溶液中での実際の分子量について同定するために FFF-MALS による分析を行った(図 2-11)。図中の点線は多角度光散乱により測定された溶出ピーク中の分子量を示している。biotin 存在下、非存在下共に FFF によって検出されたピークは分子量が約 50 kDa という四量体に近い分子量を示していた。大量調製された各種 cSA は四量体を形成していたと結論付けられる。また、サイズ排除クロマトグラフィーと比較して非特異吸着の影響は無く、各種 cSA の分子サイズを反映した結果を得ることができたといえる。

FFF のピーク溶出位置に注目すると、六変異体である 314、414 は biotin 非存在下において野生型や他の変異体と比べて溶出位置が遅くなっていた (図 2-11A)。また、サイズ排除クロマトグラフィーの結果においては三変異体である 030、040 が野生型に比べて biotin 非存在下での溶出が早くなっていたにも関わらず、六変異体になることで再び溶出が遅くなっていた(図 2-10)。これらの結果や六変異体の biotin 存在下における FFF の分子サイズが野生型に近くなっていた点を考慮すると(図 2-11B)、三変異体から六変異体となる上で導入された三つの変異は biotin 非存在下における溶液中での分子サイズをわずかに緩ませているのではないかと推察することができる。

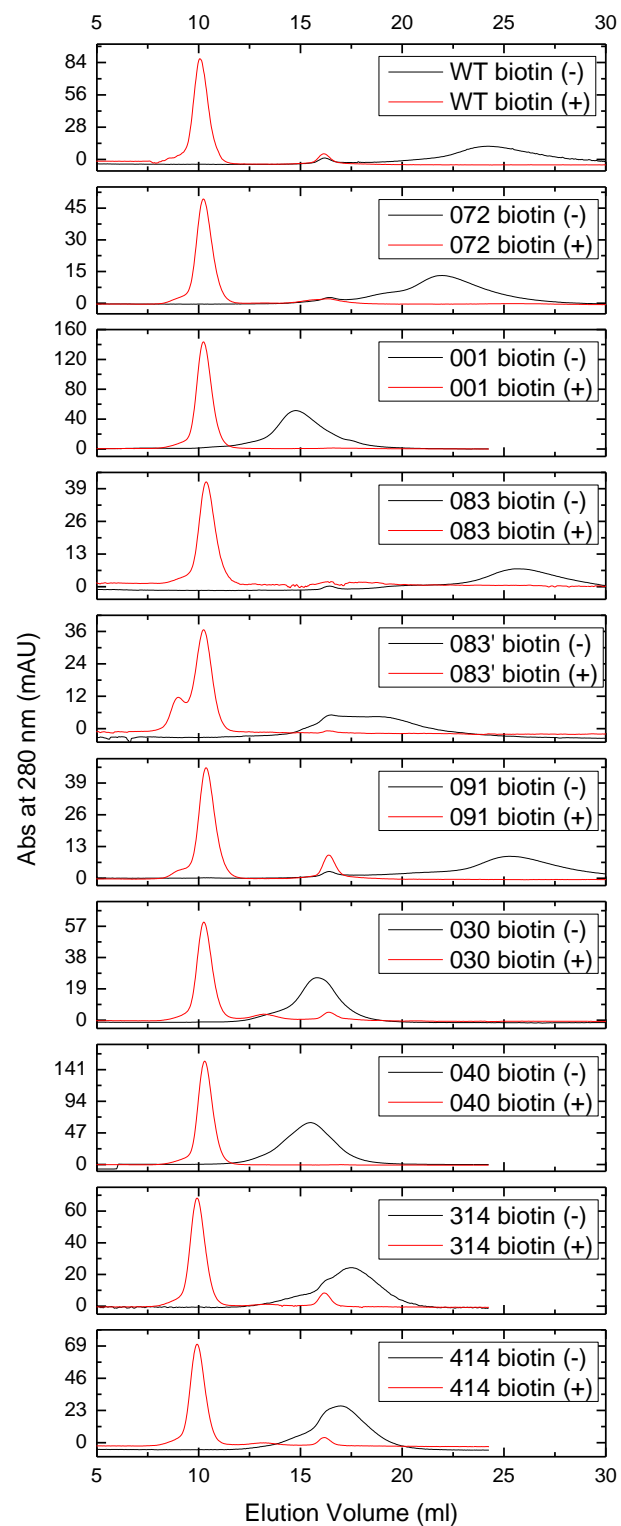


図 2-10. cSA 変異体における分析用サイズ排除クロマトグラフィーの結果
column: 10/300 Superdex75 column, buffer: refolding buffer

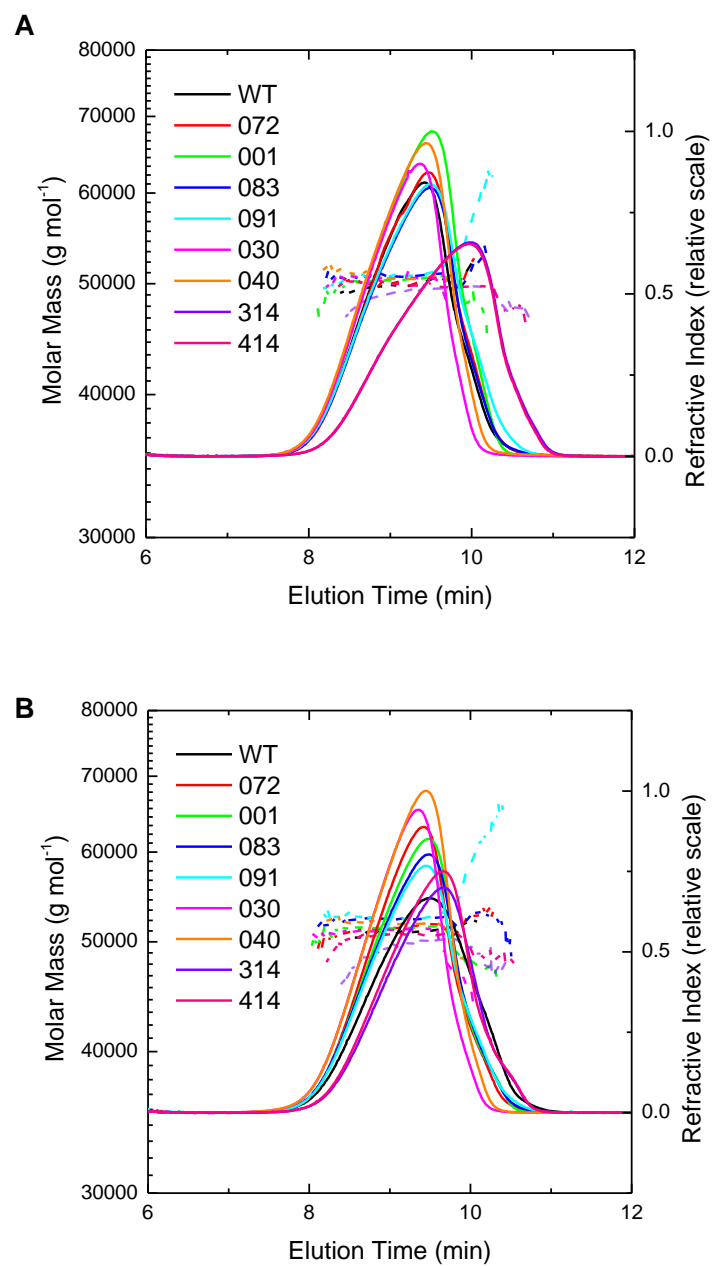


図 2-11. cSA 変異体における FFF-MALS の結果
実線が溶出ピークを、点線がそのピークの分子量を示す。

A: biotin 非存在下, B: biotin 存在下

buffer: refolding buffer

2-3-3 cSA の安定性解析

各種 cSA の熱安定性について考察するために DSC を用いた測定を行った(図 2-12)。どの変異体についても変性に由来する大きな比熱変化がピークとして観測された。そのピークの中点、変性温度 T_M に注目すると、六変異体である 314 及び 414 は野生型と比較して T_M が低下していることが示された(表 2-3)。各種変異体について比較すると特に 083、030、314 という E116N 変異を有する変異体において共通して T_M が野生型と比べて低くなっており、顕著な不安定化が観測された。一方で、001、091 では野生型と比べて高い T_M が観測されており、安定化していることが示唆された。特に 091 において、E116Q 変異は E116N 変異とは反対に cSA を安定化しているという結果が示された。また、083' のみ複数のピークが観測されており、これはいくつかの四量体構造が混ざっていると推察することができる。変異によって cSA は不安定化していたものの、最も不安定な変異体でもその変性温度は 65 °C 以上と生化学的条件においては十分に安定であり、問題なく応用できる変異体であるといえる。また、biotin 存在下で大きく安定化するという現象も観測されており(図 2-12)、cSA 変異体は biotin と結合していることが判明した。

熱安定性と化学的安定性について詳細に解析するために 45-95 °C の範囲で段階的に加熱した cSA をサンプルとして SDS-PAGE による解析を行った。低温度では cSA が四量体と思われる分子量をもったバンドとして観測されており、高い温度で加熱することで単量体と思われる分子量をもったバンドへとシフトしていく様子が観測された(図 2-13)。このシフトが観測された温度から熱安定性を見積もることができる。シフトが起こった温度は DSC によって算出された変性温度とよく一致していた。083' は低温度にて多重のバンドが観測され、多量体構造が複数存在していることが示唆された(図 2-13B)。SDS-PAGE によってバンドのシフトが容易に観測されたことから、cSA 変異体は十分な熱安定性と SDS に対する化学的安定性を保持していると示された。これは cSA

変異体が cSA 特有の特異な安定性を保持していることを意味している。しかしながら、野生型、及び安定化したとされる 001、091 以外の変異体では低温でも単量体のピークが微かに見られたことから、変異によってわずかに変性剤に対する安定性が低下したと考えられる。

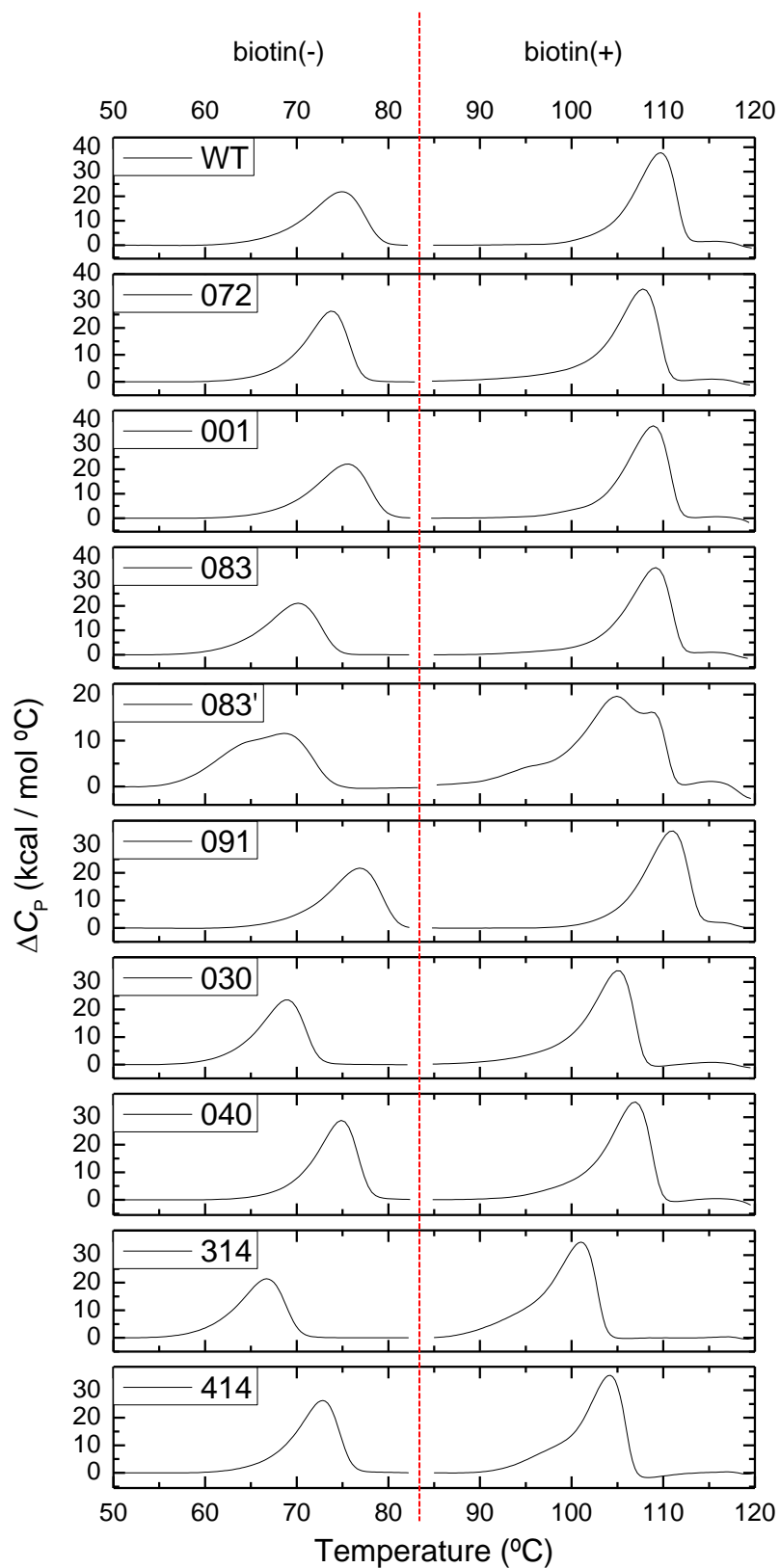


図 2-12. cSA 変異体における DSC の結果
 左: biotin 非存在下, 右: biotin 存在下
 buffer: PBS, 昇温速度 1 °C/min

表 2-3. cSA 変異体における DSC 解析より得られた変性温度 T_M

変異体	T_M (°C)	
	biotin (-)	biotin (+)
WT	74.9	109.5
072	73.7	107.8
001	75.7	108.9
083	70.2	109.2
091	76.9	111.1
030	68.2	104.9
040	74.9	107.0
314	66.7	101.0
414	72.9	104.2

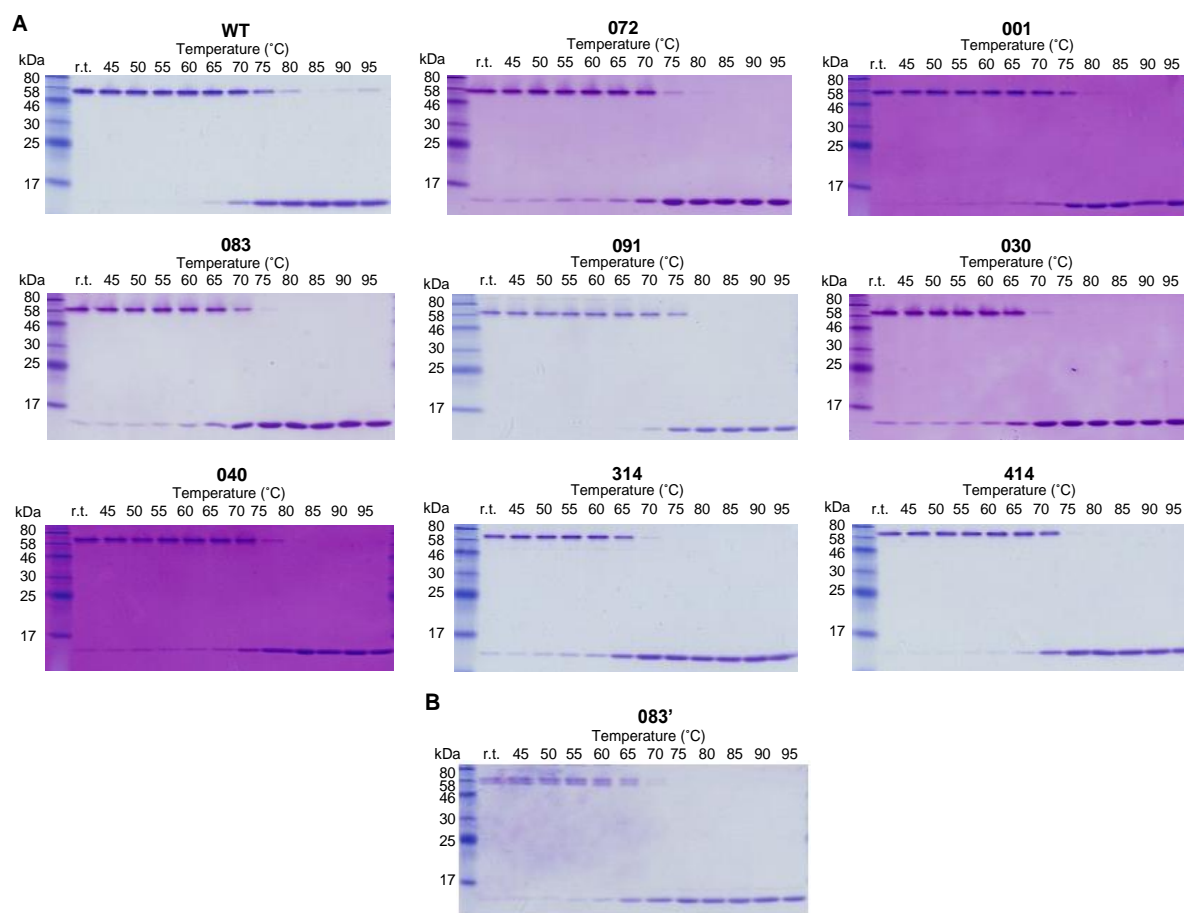


図 2-13. cSA 変異体における SDS-PAGE の結果
A: cSA 野生型及び変異体, B: 083'
r.t.(室温)、及び各温度で加熱後、泳動を行った。

2-3-4 cSA の結合活性解析

biotin 結合活性は cSA の最も重要で基本となる機能である。この結合活性について ITC を用いて測定した(図 2-14)。滴定に従って結合熱による顕著なピークが生じる様子が観測された。熱力学的パラメータに注目すると野生型、及び全ての変異体はこの測定手法の測定限界を超える非常に強固な結合($K_a > 10^{10} \text{ M}^{-1}$)を保持していることが明らかとなった。また、結合の際に生じる結合エンタルピー(ΔH_{bind})についてはほぼ-27 kcal/mol であり、エンタルピー駆動の結合であることが示唆された(表 2-4)。結合エンタルピーは野生型と変異体の間で顕著な差が見られなかった。これらの結果から今回導入された変異は biotin 結合という cSA の最も重要な機能に影響を与えていないということが明らかとなった。

結合の量論比 N もほぼ 1:1 となっていた。しかし、083'のみ N が約 0.8 と、四量体中の数部位が失活していることが予測される(図 2-14B)。これは先の安定性解析から見られた複数の多量体構造の存在とも一致する。

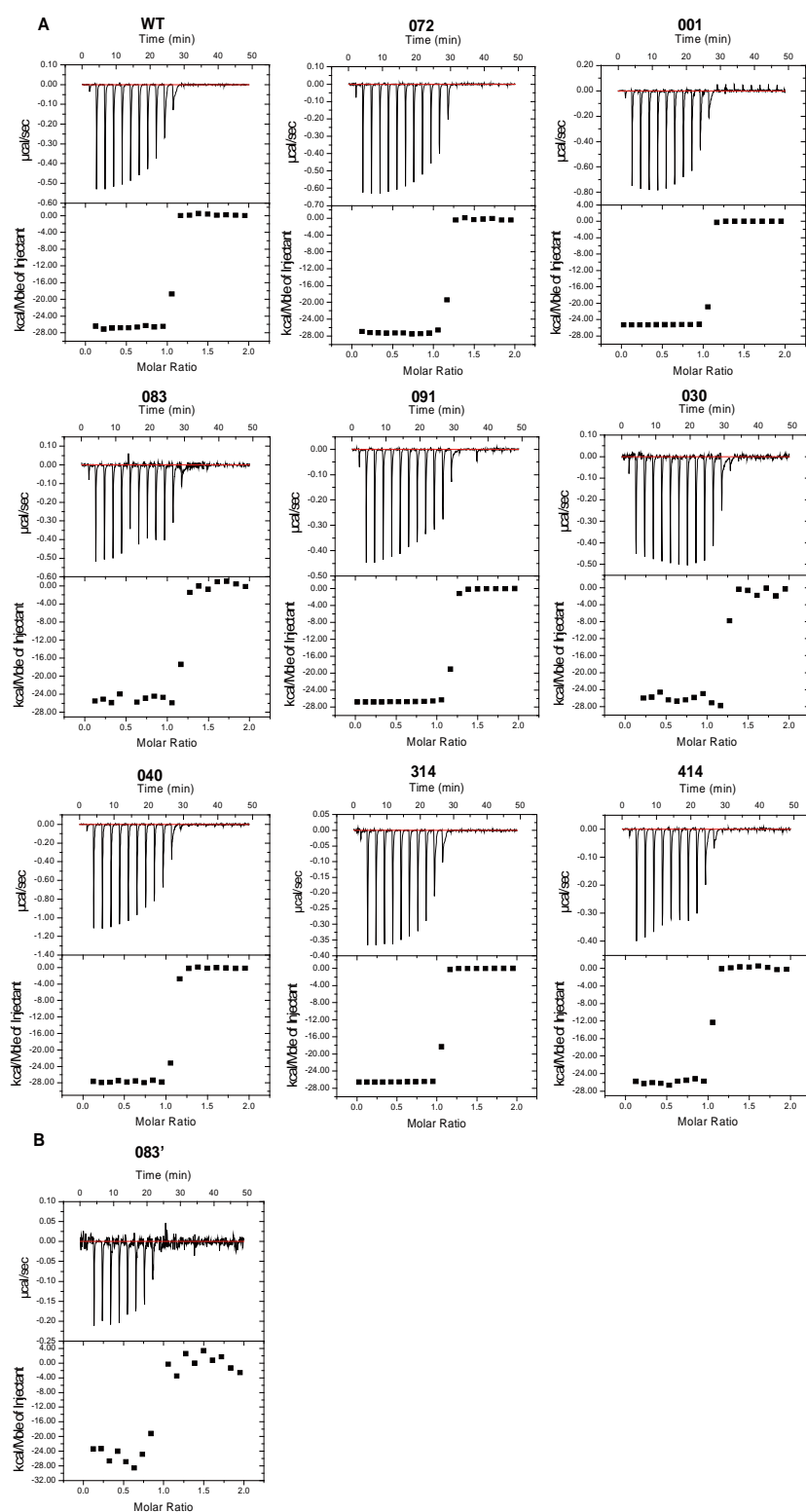


図 2-14. cSA 変異体における ITC の結果

A: cSA 変異体, B: 083'

セル: 各種 cSA, シリンジ: biotin

buffer: PBS

表 2-4. cSA 変異体における ITC 解析の結果

変異体	量論比(<i>N</i>)	ΔH_{bind} (kcal/mol)
WT	1.0	-27
072	1.1	-27
001	1.0	-25
083	1.1	-25
083'	0.82	-25
091	1.1	-27
030	1.2	-26
040	1.1	-28
314	1.0	-27
414	1.0	-26

2-4 結言

本章において、シミュレーションを用いて構築された低免疫原性 cSA 変異体の熱力学的な解析を行った。以前にも cSA 変異体を構築し、解析した例は多数報告されているが、一つの変異体について詳細に解析した例は多くない。その点、低免疫原性変異体の詳細な解析を行った本研究の意義は大きいといえる。

ITC の結果より、今回測定された全ての変異体は野生型と類似した biotin 結合活性を保持していることが示唆された(表 2-4, 図 2-14)。また、biotin の存在によって変性温度が大きく変化し、安定化するという現象は過去の cSA に関する報告とも一致する(表 2-3, 図 2-12)^{12,13}。そして、SDS-PAGE による解析からも非常に高い安定性が示された(図 2-13)。cSA がもつ四量体構造は biotin 結合において非常に重要な役割を果たしているという報告もあることから¹⁹、今回導入された変異は biotin 結合に関与する立体的構造に影響を与えておらず、変異体は問題なく応用可能なものであると結論付けられる。

以前に、R84I 変異体が biotin 結合活性を低下させると報告されている一方で⁴⁵、今回導入された R84K 変異(変異体 001)は結合活性や結合エンタルピーに影響を与えていないことが明らかとなった(表 2-4, 図 2-14)。この違いは isoleucine と lysine の間の電荷や水素結合に関与する残基の違いによるものであると推察することができる。lysine は元の残基である arginine と似た電荷をもち、同様に N-H 結合を側鎖に有している。これによって類似した水素結合ネットワークを形成できると考えられる。一方で isoleucine は側鎖に C-H 結合しかもたないため水素結合を形成できない。この違いが活性への影響の差として現れたと考えられる。

また、E116N 変異(変異体 083)は cSA を不安定化させ、083'においては四量体形成能の低下が示唆された(表 2-3, 図 2-10, 図 2-12, 図 2-13)。これと比較して、E116Q 変異(変異体 091)は cSA を安定化させた(表 2-3, 図 2-12, 図 2-13)。今回導入された他の部位へ

の変異と異なり、E116 への変異は安定性や四量体形成能に大きく影響を与えていたといえる。この顕著な違いも、先述した電荷や水素結合に関与する官能基の違いによるものであると推察される。野生型ではカルボキシル基(-COOH₂)であるアミノ酸側鎖が変異体ではカルボニル基(-CONH₂)になっている。結晶構造のデータを精査すると⁴⁶、E116 付近のループやヘリックスは cSA 四量体のそれぞれの界面に接しており(図 2-15)、このヘリックス上の W120 を lysine に変異させると cSA は二量体化するという報告もされている⁵⁵。今回の E116N、E116Q という変異によって明確な立体構造の変化はないものの、このループ領域の電荷や水素結合などの変化が四量体形成能や熱安定性に影響を与えたと推察される。従って R84、E116 部位への変異に関するデータは、電荷や水素結合に関与する残基が類似した変異は機能や構造の保持に貢献するということを強く示唆している。

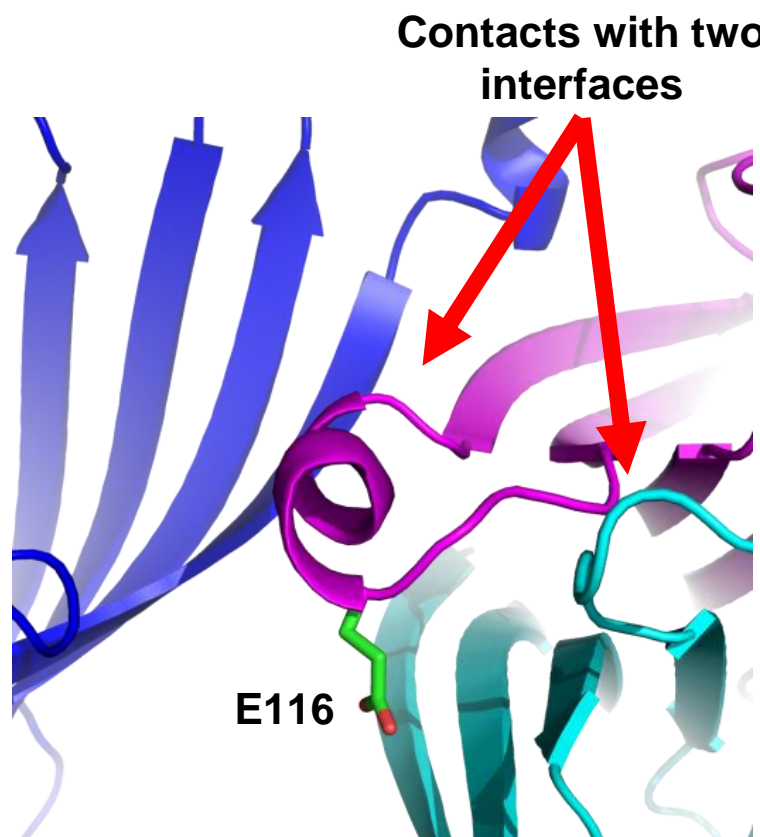


図 2-15. 四量体界面(青及びシアン)に接する E116 周辺のループとヘリックス

しかし、変異体 083 (E116N 単変異)において低下した巻き戻し時の四量体形成能は更なる変異を導入することで解消した(変異体 030: Y83S, R84K, E116N 変異)(図 2-9)。巻き戻しの可否は、蛋白質を変性剤によって処理している間に蛋白質の **unfold** な構造が柔軟に存在しているのか、構造的な衝突を起こすのか、というバランスによって決まる⁵¹。今回の結果は我々が導入した変異が **cSA** の四量体構造を崩してはいないものの、代わりに構造を「緩ませた」という可能性を示唆している。各種 **cSA** 変異体は確かに四量体構造を保ってはいたが、DSC 測定における変性温度 T_M が低下しており(表 2-3)、SDS-PAGE の解析においては変異体 001 (R84K 変異)、091 (E116Q 変異)を除いて低温域にわずかな単量体のバンドが観測された(図 2-13)。これらの事実は、導入されたそれぞれの変異によって **cSA** の熱安定性、化学的安定性がわずかに低下し、構造が「緩んでいる」ということを示唆している。「緩み」は変異体の安定性をわずかに低下させているものの、変性剤処理中の **unfold** な構造における柔軟性を向上させ、巻き戻し時の四量体形成能を改善したのではないかと考えられる。FFF-MALS において変異体 314、414 がビオチン非存在下で大きな分子サイズを示したという結果(図 2-11)は **cSA** 変異体の構造的な「緩み」が増したということを更に示唆している。

過去の知見から、人やマウスの免疫系は **cSA** を構造的なエピトープによって認識していると言われている⁴⁵。今回導入された変異は **cSA** の高次構造は保存していたものの、一方で表面に露出している残基の形を変えている。これらの変化が **cSA** に対するエピトープの構造を変え、低免疫原性化に貢献したと考えられる。低免疫原性 **staphylokinase** (K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R)においても今回我々が導入した変異と似た部位(下線部)が確認されている⁵⁶。

変異体 083、091 における単変異による免疫原性の向上(表 2-1)は表面残基以外の予期せぬ構造変化と熱安定性変化によるものであると推察される。しかし、この免疫原性は更なる変異の導入によって改善されている(表 2-1)。これらの結果は先述した「緩み」

も低免疫原性化に貢献しているという可能性を示唆している。この「緩み」がエピトープに動きを与え、免疫系によるエピトープ認識におけるエネルギーロスを増やしていると考えられる。更に、この緩みは B-cell に関連する免疫原性だけでなく、T-cell に関連する免疫原性にも貢献していると推察される。リソソーム中の加水分解に対して高い耐性をもつ蛋白質は T-cell エピトープの量がコントロールされ、結果として抗原提示細胞に長い間提示され、高い免疫原性を示すということが報告されている⁵⁷⁻⁵⁹。今回の「緩み」によって生じているわずかな不安定化が T-cell に関連する免疫原性も低下させているのではないかと期待される。しかし、biotin 存在下で大きく安定化する cSA の動物モデルにおける免疫原性には注意を払う必要があるだろう。

当研究グループの低免疫原性 cSA 変異体はシミュレーションを用いてヒト化させるという方法によって構築されている。しかし、以上の考察から、今回の熱力学的解析結果、及び過去の知見を合わせることで、低免疫原性化を目指す変異の導入法について熱力学的視点より以下のような提案を行うことができる。

「低免疫原性化を目指す変異は、蛋白質の表面に存在する荷電性や芳香族系の残基をターゲットとして、電荷や水素結合に関与する官能基を保存するように導入すると良い。それらの変異は高次構造を保ったまま表面に露出した残基の形を変え、更に構造に『緩み』を与える。この残基の変化と構造の『緩み』の両方が低免疫原性化に貢献する。」

Picornavirus のようなウィルスは表面に露出した残基を変化させることで免疫系を回避することが示唆されている⁶⁰。今回提案した仮説はこれらウィルスがとりうる戦略と何らかの共通点があるかもしれない。

今回提案したこの仮説は、以前から存在している手法であるキメラ化⁶¹と異なり対応するヒト蛋白質を必要としない。また、部位特異的な変異によって低免疫原性化を達成する場合は B-cell エピトープを alanine に置換する手法が主であり^{56,62}、構造や機能を保持することが可能な変異を導入するという点における指標は存在していなかった。少な

くとも **cSA** においては上記のような提案をすることができるだろう。そして、構築された変異体の中では六変異体 314、414 を治療用蛋白質の候補として提案することができる。治療用蛋白質の更なる構築に向けて、今回提案したモデルが他の **biotin** 結合タンパク質や種々の蛋白質においても検討されることが期待される。

第 3 章

cSA 融合抗体(scFv-cSA)の機能解析

3-1 緒言

前章にて低免疫原性 cSA 変異体の詳細な解析を行った。そして、導入された変異は cSA の物性を大きく損なうことなく低免疫原性化に貢献していたことを明らかにし、その有用性を実証した。本章では、cSA 融合抗体として、大腸菌で発現精製できるというメリットを活かすために一本鎖抗体 scFv を採用し、融合抗体 scFv-cSA を構築した。cSA 部位として前章にて有用性を示すことができた六変異体 314、414 を採用した。

抗原として ROBO1 という蛋白質をターゲットとした。ROBO1 は膜タンパク質であり細胞外領域に 5 つのイムノグロブリンドメインと 3 つのファイブロネクチンドメインを有する。Slit 蛋白質の受容体としても知られ、軸索の正中交差⁶³⁻⁶⁶や癌抑制遺伝子⁶⁷、癌細胞における血管新生⁶⁸など、数多くの機能を有していると考えられている。同様に発現部位についても多数報告があるが、肝臓癌の癌細胞、癌組織において発現亢進が起こっていることが先行研究により明らかとなっている⁶⁹。本学先端科学技術研究センター 浜窪研究室においてバキュロウィルス発現系を応用したウイルスディスプレイ法が開発され、抗体の作製が行われている⁷⁰⁻⁷²。それによって今回 ROBO1 に対する抗体を複数得ることに成功している。本章ではその中で、B5209B (5209B) というイムノグロブリンの第 5 ドメインを認識する抗体を scFv として用いた(図 3-1)。

本章では融合抗体 5209BscFv-cSA の物性について解析を行った。以前にも cSA を用いた scFv-cSA は構築されており、四量体化に起因して抗原からの解離が遅くなる avidity 効果が生じると報告されている³⁷。本章では低免疫原性 cSA 変異体である 314、414 を用いた 5209BscFv-cSA について詳細に熱力学的な解析を行うこととした。DSC による熱安定性解析、ITC、バイオレイヤー干渉法(BLI)による結合様式の解析を行い、低免疫原性 cSA 融合抗体の有用性を検討した。

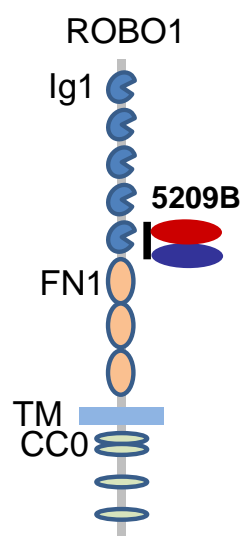


図 3-1. ROBO1 の模式図及び 5209B の結合部位

3-2 実験手法

3-2-1 scFv-cSA の巻き戻しによる大量調製

【ベクター設計】

発現ベクターは pRA2 ベクターを用いた。各種 5209BscFv-cSA 発現ベクターは当研究室卒業生 宇井 美穂子 現東北大学 多元物質科学研究所 助教によって構築されたものを用いた。以下に遺伝子配列及びベクターマップを示す(図 3-2, 3-3)。

VH

10 20 30 40 50 60
 ATGGCCGAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTAGTGCAAGCCTGGAGGGTCCCTG
 M A E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L

70 80 90 100 110 120
 AAACCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
 K L S C A A S G F T F S T Y D M S W V R

130 140 150 160 170 180
 CAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGTAGTACC
 Q T P D K R L E L V A T I N S N G G S T

190 200 210 220 230 240
 TATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCAAGTTCCAGAGACAATGCCAAGAACATC
 Y Y P D S V K G R F T S S R D N A K N I

250 260 270 280 290 300
 CTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA
 L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R

310 320 330 340 350 360
 GAGGCATTACTACGGCCCCCTTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTC
 E A L L R P P Y Y A L D Y W G Q G T S V

Linker

370 380 390 400 410 420
 ACCGTCCTCGGCCGGCGGGGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGGTCGGGCGGTGGCGGATCG
 T V S S A G G G G S G G G G S G G G S

VL

430 440 450 460 470 480
 GATATCCTCGATATTCAGATGACCCAGTCTCCAGCTTCACTGTCTGCATCTGTGGGAGAA
 D I L D I Q M T Q S P A S L S A S V G E

490 500 510 520 530 540
 ACTGTACCATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTTACGGTGCTTTAACTTGGTATCAG
 T V T I T C G A S E N I Y G A L T W Y Q

550 560 570 580 590 600
 CGGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAATCAATTGGCAGATGAC
 R K Q G K S P Q L L I Y G A I N L A D D

610 620 630 640 650 660
 AAGTCATCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCTCTCAAGATCAGTAGC
 K S S R F S G S G S G R Q Y S L K I S S

670 680 690 700 710 720
 CTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTAAGTACTCCATTACG
 L H P D D V A T Y Y C Q N V L S T P F T

linker

730 740 750 760 770 780
 TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAGCCGCGGGTTCTTCTGGTTCTGGTTCTGCG
 F G S G T K L E I K A A G S S G S G S A

cSA

790 800 810 820 830 840
 GCGGAAGCTGGTATCACTGGCACCTGGTATAACCACTGGGGTCGACTTTCATTGTGACC
 A E A G I T G T W Y N Q L G S T F I V T

850 860 870 880 890 900
 GCTGGTGGGACGGAGCTCTGACTGGCACCTACGAATCTGCGGTTGGTAACGCAGAAATCC
 A G A D G A L T G T Y E S A V G N A E S

910 920 930 940 950 960
 CGCTACGTACTGACTGGCCGTTATGACTCTGCACCTGCCACCGATGGCTCTGGTACCGCT
 R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G T A

970 980 990 1000 1010 1020
 CTGGGCTGGACTGTGGCTTGGAACCAACTATCGTAATGCGCACAGCGCCACTACGTGG
 L G W T V A W K N N Y R N A H S A T T W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TCTGGCCAATACGTTGGCGGTGCTGAGGCTCGTATCAACACTCAGTGGCTGTAAACATCC
 S G Q Y V G G A E A R I N T Q W L L T S

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGCACCTACCGAAGCGAATGCATGGAAATCGACACTAGTAGTCATGACACCTTTACCAAA
 G T T E A N A W K S T L V G H D T F T K

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTTAAGCCTTCTGCTGCTAGGGGGCCGTCACCATCATCACCACCAT
 V K P S A A S G A R H H H H H H

図 3-2. 5209BscFv-cSA (野生型)の遺伝子配列

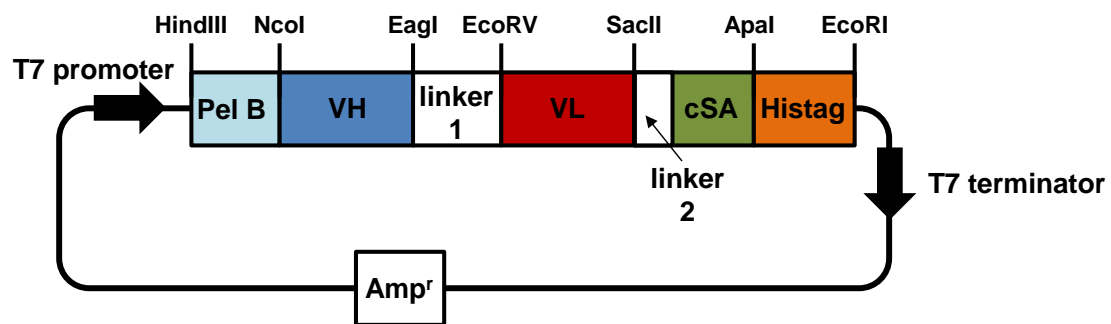


図 3-3. 融合抗体 5209BscFv-cSA のベクターマップ
(linker1: GGGGS×3, linker2: GSSGSGS)

【大腸菌による大量発現、巻き戻し】

5209BscFv-cSA の野生型及び各種変異体は大腸菌による大量発現、巻き戻しによる精製を行った。発現には大腸菌 Rosetta2 (DE3)株を用いた。ヒートショック法によりベクターを形質転換した後、ampicillin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml) 含有 LB プレート培地にて 28 °C 条件下で培養した。生じたコロニーを ampicillin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml) 含有 3 ml LB 試験管培地へと植菌し 28 °C、12~18 h 振盪培養後、培養液を回収し、ampicillin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml) 含有 2×YT 培地に 1 L 当たり 5 ml ずつ植え継いだ。培地は 28 °C にて振盪培養し、O.D.₆₀₀ = 0.8 にて終濃度 1 mM の isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を加えることで発現誘導を行い、そのまま 28 °C にて終夜培養した。

巻き戻しは第 2 章【大腸菌による大量発現、巻き戻し】による手法に準拠して行った。Ni-NTA Agarose による精製ではサンプルを load し、5 mM imidazole を含んだ binding buffer 1 で洗浄後、300 mM imidazole を含んだ binding buffer 1 で溶出を行った。巻き戻し効率改善の為、溶出後のサンプルの蛋白質濃度を適宜 7.5 µM 以下になるように希釈するという最適化を行い、巻き戻し及びサイズ排除クロマトグラフィーによって目的物を得た。SDS-PAGE で確認し、4 °C にて保存して後の解析に用いた。

5209BscFv-cSA414 については得られた目的物の検討をイオン交換クロマトグラフィーによって 4 °C にて行った。5209BscFv-cSA414 を 50 mM MES, pH 6.0 at 4 °C において 4 °C、終夜透析し、HiTrap SP HP 1ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ)にロードした。ロードの際の A buffer として 50 mM MES, pH 6.0 at 4 °C を用いた。溶出は B buffer として 50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6.0 at 4 °C を用いて、A buffer に対して徐々に濃度を上げていくことによって行った。

3-2-2 scFv-cSA の熱安定性解析

5209BscFv-cSA の熱安定性解析を DSC によって行った。測定は示差走査型カロリメーターVP-DSC を用いて行った。温度上昇は $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて行った。サンプルセルには $11\text{--}16\text{ }\mu\text{M}$ の 5209BscFv-cSA 野生型及び変異体の PBS 溶液を約 $400\text{ }\mu\text{l}$ 導入し、必要に応じて 1 当量以上の biotin を加えた。データは ORIGIN にて解析した。熱力学的な解析を行うために、測定データから buffer データを差し引きし、蛋白質濃度によって正規化した。得られたグラフを二状態近似することで目的の結果を得た。

3-2-3 scFv-cSA の結合活性解析

5209BscFv-cSA の biotin 結合活性、抗原結合活性を ITC によって測定した。測定は Microcal iTC₂₀₀ を用いて行った。精製した各種 5209BscFv-cSA、抗原である ROBO1 を同一の PBS にて $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、終夜透析し、透析外液を用いて biotin の $500\text{ }\mu\text{M}$ ストック溶液を調製した。抗原である ROBO1 は本学先端科学技術研究センター 浜窪 隆雄 教授より送っていただいたサンプルを精製して使用した(補足資料参照)。測定の際、biotin ストック溶液は各 5209BscFv-cSA 溶液の 10 倍濃度となるように、ROBO1 溶液は各 5209BscFv-cSA 溶液の 5 倍濃度となるように濃度調整して用いた。カロリメーターのセル内に $5\text{--}6\text{ }\mu\text{M}$ の 5209BscFv-cSA を導入し、攪拌速度 1000 rpm 、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて biotin 溶液、または ROBO1 溶液を滴下した。得られたデータは ORIGIN を用いて解析を行い、滴定曲線は one-site binding isotherm にてフィッティングを行った。

3-2-4 scFv-cSA における avidity 効果の検証

scFv-cSA が四量体を形成する際の avidity 効果についてバイオレイヤー干渉法(BLI)によって解析を行った。

この手法はセンサー上に固定化したリガンドに対するアナライトの結合と解離を反射光に対する干渉光の強度変化によって測定する手法である(図 3-4)。測定原理は reflectometric interference spectroscopy (RIfS)の原理⁷³⁻⁷⁵と共通している。センサー下部のオプティカルレイヤーの厚みが増加すると、センサーに投射された白色光に対する反射光の波長が変化し、干渉光の強度も変化する。この干渉光のスペクトル変化を計測することで、オプティカルレイヤーの厚みの変化をリアルタイムで計測することができる。このオプティカルレイヤー上の厚みの変化はアナライトの結合と解離を反映するため、干渉光のスペクトル変化を通じてセンサー上に固定化したリガンドに対するアナライトの結合と解離をリアルタイムで計測することができる。

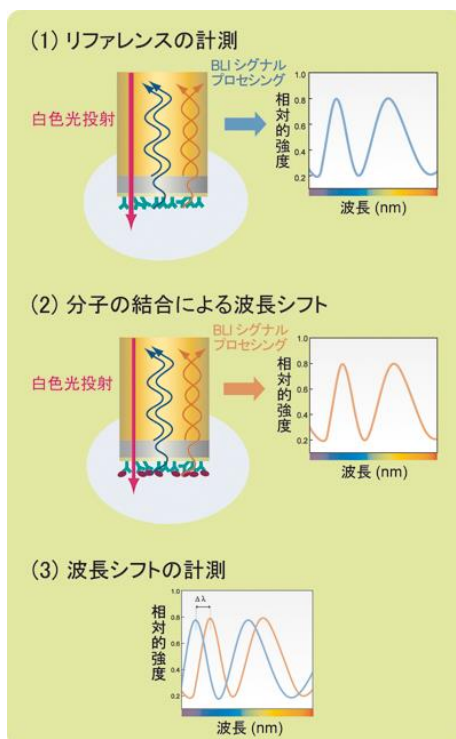


図 3-4. BLI の測定原理

(プライムテック株式会社ホームページより抜粋)

<http://www.primetech.co.jp/searc/tabid/90/Default.aspx?pdid=18>

実際の測定は Octet RED 384 システム(ForteBio, Inc., Menlo Park, CA)を用いて行った。5209BscFv 単体、5209BscFv-cSA414 及び ROBO1 は調製後、PBS にて 4 °C、終夜透析を行ったものを使用した。5209BscFv 単体は当研究室、長門石 暁 助教の精製したものをを用いた。Amine Reactive 2nd Generation (AR2G)チップ(ForteBio, Inc., Menlo Park, CA)を用いて、リガンドとして 10 mM acetate buffer, pH 6.0 の条件下で 5 µg/ml の ROBO1 を固定化した。buffer は 0.005% Tween 20 含有 PBS (PBS-T)を用いて、攪拌速度 1000 rpm、測定温度は 29 °C にて測定した。7 段階の濃度のアナライト(5209BscFv: 150 nM より 2 倍希釈列 7 点、5209BscFv-cSA414: 50 nM 1 点、10 nM より 2 倍希釈列 6 点)を用いて結合と解離を測定した。ROBO1 固定化後、buffer に対する挙動を測定したものをネガティブコントロールとして用いた。得られたセンサグラムからネガティブコントロールを差引して Octet システム付属のソフトウェアにて解析した。5209BscFv 単体は平衡値解析より解離定数 K_D を求めた。5209BscFv-cSA414 は速度論的パラメータを算出するために 1:1 結合であると仮定してフィッティングを行った。

3-3 結果と考察

3-3-1 scFv-cSA の巻き戻しによる大量調製

大腸菌 Rosetta2 (DE3)を用いて発現した各種 5209BscFv-cSA は不溶性画分に発現していた。そのため、得られた不溶性画分を binding buffer 1 に懸濁して可溶化し、Ni-NTA Agarose を用いて金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。粗精製を確認した SDS-PAGE の結果を図に示した(図 3-5)。どの変異体も 46 kDa を示すマーカーの下にバンドが観測された。imidazole 濃度が 300 mM で溶出された画分について巻き戻しを行った。

巻き戻し後の最終精製として 26/60 Superdex200 column によるサイズ排除クロマトグラフィーを行った(図 3-6)。得られたクロマトグラムより、溶出体積 165 ml 付近にて各メインピークが観測された。メインピークを回収して以降の測定に用いた。

得られたメインピークのうち 5209BscFv-cSA414 についてイオン交換クロマトグラフィーによって成分検討を行った(図 3-7)。得られたクロマトグラムより、カラムに吸着した成分が NaCl 濃度の増加によって単一のピークとして溶出されていることがわかる。この結果より、巻き戻しによって精製された 5209BscFv-cSA414 は単一の構造をもっているものであると推察される。



図 3-5. 5209BscFv-cSA における
金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの結果
FT: flow-through, 5-300 は溶出に用いた imidazole 濃度(mM)を示している。

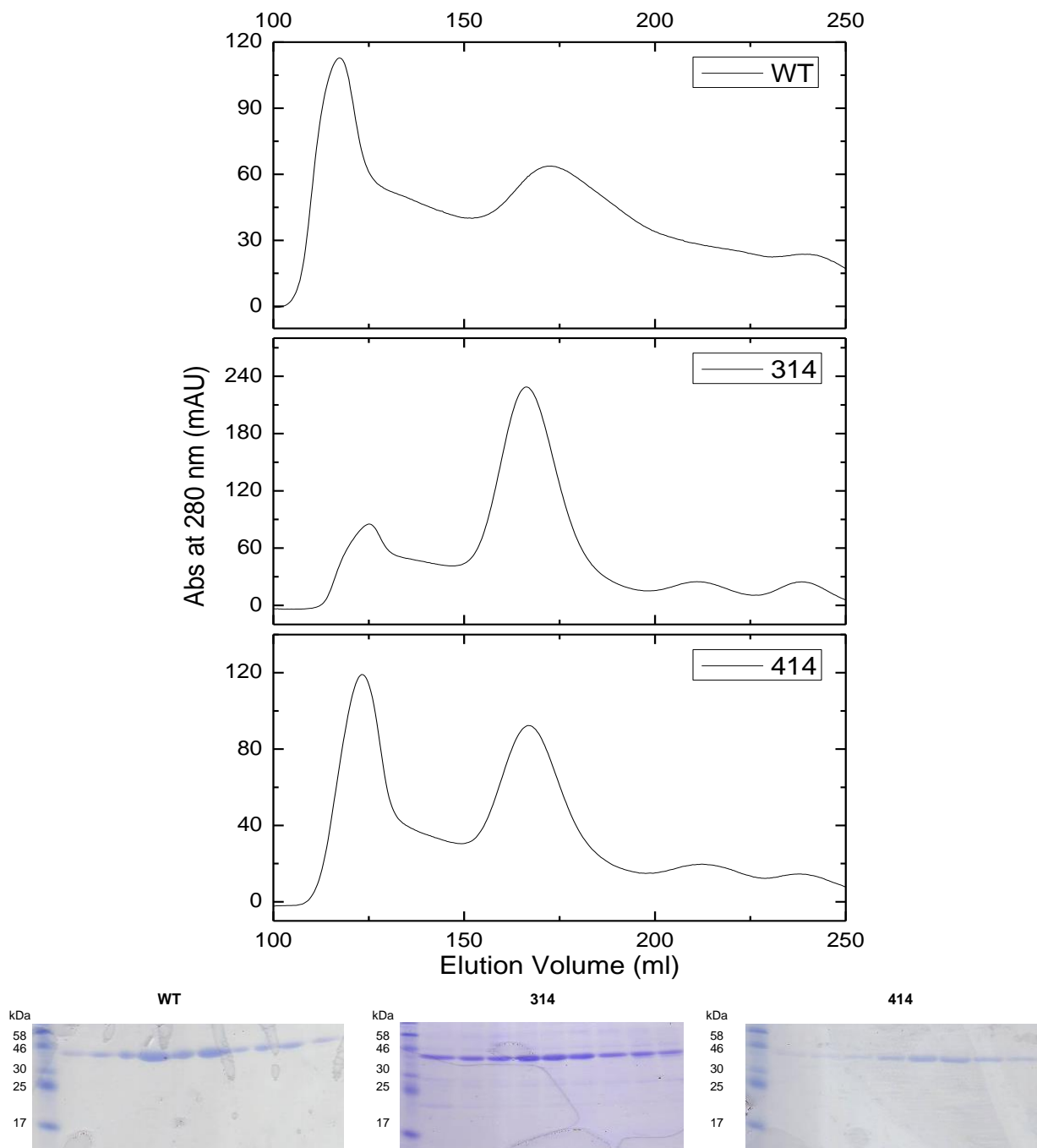


図 3-6. 5209BscFv-cSA のサイズ排除クロマトグラフィーによる精製結果
column: 26/60 Superdex200 column, buffer: refolding buffer
及びピークの SDS-PAGE による解析結果

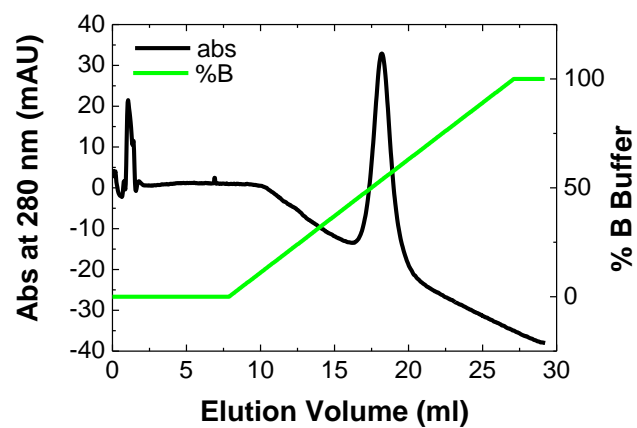


図 3-7. 5209BscFv-cSA414 のイオン交換クロマトグラフィーによる成分検討結果
column: HiTrap SP HP 1ml,
A buffer: 50 mM MES, pH 6.0 at 4 °C, B buffer: 50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6.0 at 4 °C

3-3-2 scFv-cSA の熱安定性解析

各種 5209BscFv-cSA の熱安定性について DSC を用いて解析した(図 3-8)。測定の結果、biotin 非存在下、存在下のどちらの条件からも二つの独立した変性温度 T_{M1} 、 T_{M2} が確認された(表 3-1)。 T_{M1} はおよそ 50 °C であり scFv 部位に由来したものであると推察される。一方、 T_{M2} は 75 °C 付近から biotin の存在によって独立して 108 °C 付近へとシフトしており、cSA 部位に由来したものであると推察される。biotin 存在下で cSA 部位のみが独立して安定化するという様子が観測された。これらの結果から、リンカーによって融合された各部位はそれぞれ独立して存在しており、scFv 部位と cSA 部位が複合体を形成してはいないということが示された。また、cSA 部位の熱安定性は単体時の解析と同様に変異体が不安定化していた。

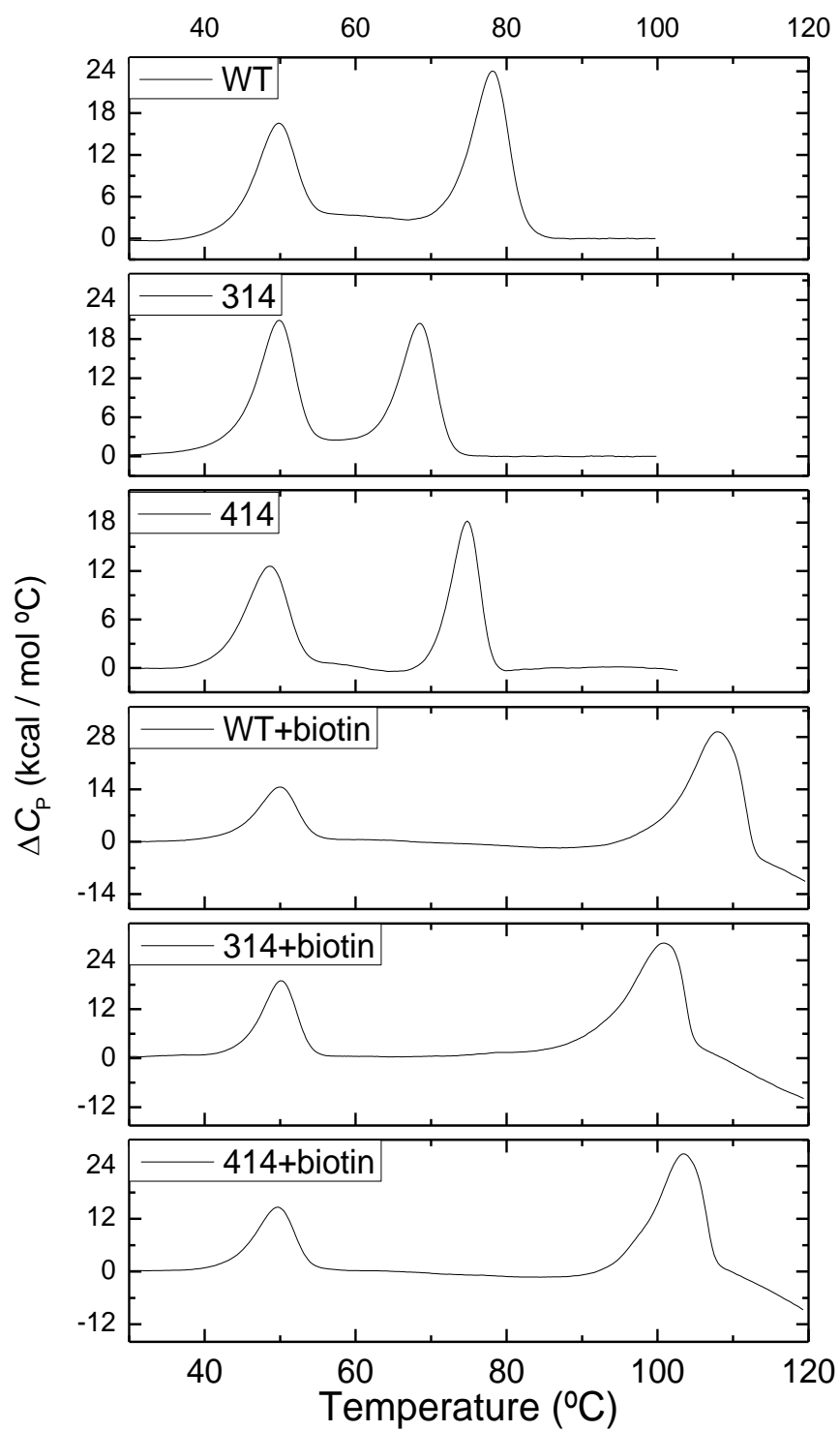


図 3-8. 5209BscFv-cSA における DSC の結果
buffer: PBS, 昇温速度 1 °C/min

表 3-1. 5209BscFv-cSA における DSC 解析により得られた変性温度 T_M

mutein	T_{M1} (°C)		T_{M2} (°C)	
	biotin(-)	biotin(+)	biotin(-)	biotin(+)
WT	49.8	49.9	78.1	108.0
314	49.9	50.0	68.3	100.8
414	48.6	49.6	74.8	103.4

3-3-3 scFv-cSA の結合活性解析

得られた 5209BscFv-cSA における cSA 部位の biotin 結合、及び scFv 部位の抗原結合について ITC を用いて解析した (図 3-9)。biotin、ROBO1 どちらの測定においても、滴定に従って結合熱による顕著なピークが生じる様子が観測された。cSA 部位は biotin と、scFv 部位は抗原である ROBO1 と反応していた。よって 5209BscFv-cSA の 2 つのドメインはそれぞれ結合能を有すると結論付けることができる。

ITC の測定結果から、熱力学的なパラメータを求めた(表 3-2)。cSA 部位は cSA 単体時の測定と同様に ITC の測定限界を超える非常に強固な結合($K_a > 10^{10} \text{ M}^{-1}$)を保持していた。量論比である N に注目すると、414 はほぼ 1 と言ってよい結果であり、cSA 部位と biotin が 1:1 の反応をしていることが予想される。WT、314 について、 N は 0.8 前後であった。こちらについてもおよそ 1 に近いと考えられるが純度などが懸念される。反応の際に生じる熱量 ΔH_{bind} は各変異体間でほぼ一定であるといってよい。その値はおよそ -28 kcal/mol であった。単体時と同様にこの結合はエンタルピー駆動の結合であると示唆された。

scFv 部位について、測定結果より算出された結合定数はおよそ $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。当研究グループの先行研究で明らかとなっている scFv 部位の結合定数とほぼ同等の値であるといえる($K_a = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)。5209BscFv-cSA が期待通りの抗体 - 抗原結合を形成することが予測される。しかし、ITC では抗原、抗体共に溶液中に存在しているため、avidity 効果は観測されなかった。scFv 部位の反応の際に生じる熱量はおよそ -10 kcal/mol であった。反応に際して熱が発生しており、この結合形成反応はエンタルピーに依存していると示唆された。量論比である N に注目するとおよそ $N = 0.5$ という値であった。scFv 部位は ROBO1 と 1:0.5 で反応していることが予想される。つまり、2 つの scFv 部位あたりに 1 つの ROBO1 と結合していることとなる。四量体を形成している 4 つの scFv 部位のうち、2 つのみが直接結合に関与しているということが示唆された。

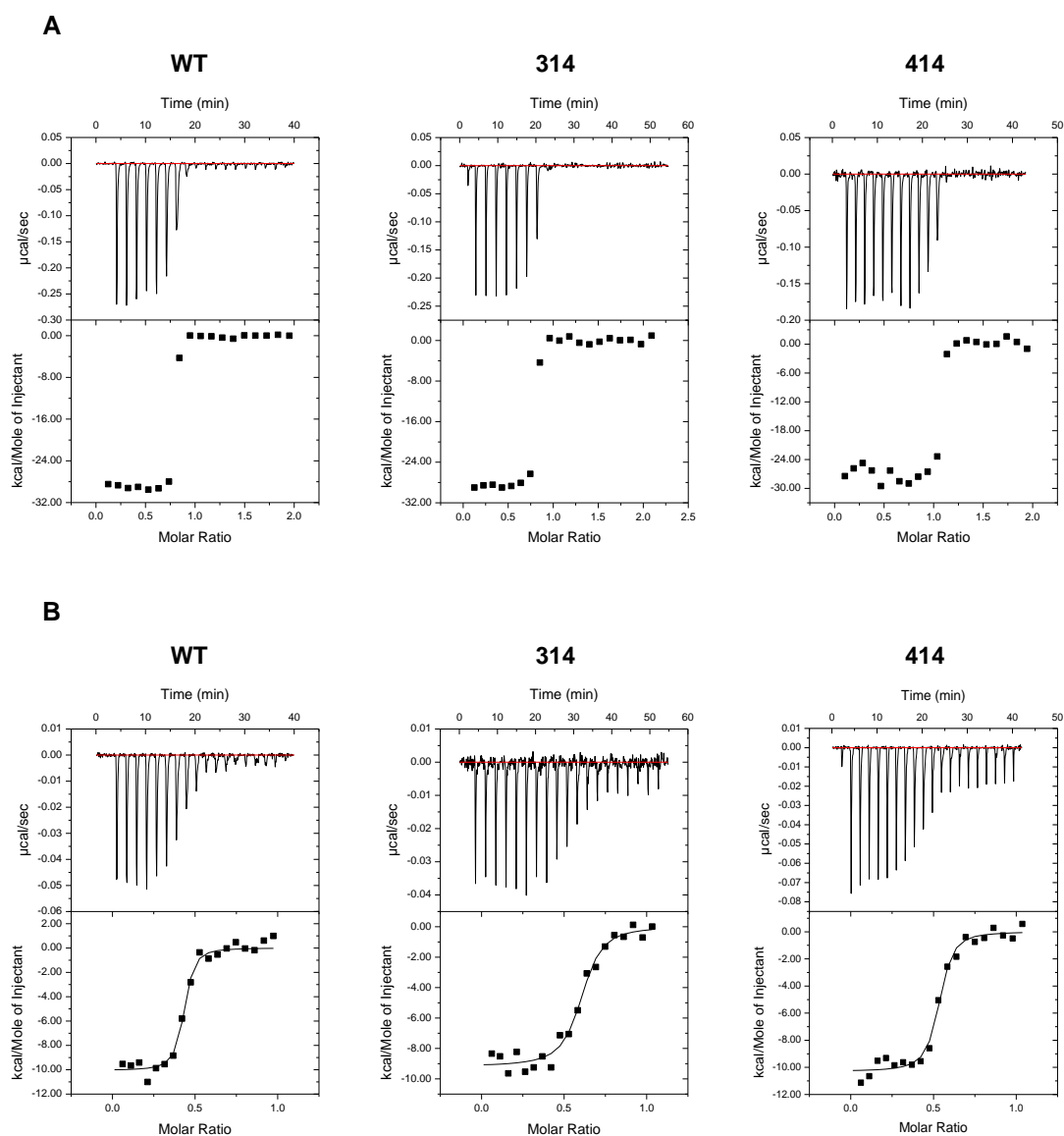


図 3-9. 5209BscFv-cSA における ITC の結果
 A: biotin 結合, B: ROBO1 結合
 セル: scFv-cSA, シリンジ: biotin または ROBO1
 buffer: PBS

表 3-2. 5209BscFv-cSA における ITC の結果

変異体	biotin		ROBO1			
	量論比(<i>N</i>)	ΔH_{bind} (kcal/mol)	量論比(<i>N</i>)	K_a (M^{-1})	ΔH_{bind} (kcal/mol)	ΔS_{bind} (cal/mol/°C)
WT	0.75	-29	0.41	7.7×10^7	-10	2.4
314	0.75	-29	0.59	3.2×10^7	-9.2	3.6
414	1.0	-27	0.51	5.1×10^7	-10	0.77

3-3-4 scFv-cSA における avidity 効果の検証

ITC の結合は抗体、抗原共に溶液中での結合である。固定化された抗原に対する 5209BscFv-cSA の結合について詳細に解析し、avidity 効果を検証するために BLI によって測定を行った。先述した ITC 測定において、ほぼ 100%の活性を有していると思われる biotin 結合を示した 5209BscFv-cSA414 について、抗原である ROBO1 との結合と解離の様子を一価である 5209BscFv 単体と比較した。測定の結果、どちらにおいても ROBO1 を固定化したセンサーチップ上における結合と解離に起因すると思われる干渉光の変化が観測された(図 3-10)。

scFv 単体の結果は非常に早い結合と解離を示してはいたが、解離の際に非特異吸着のようなベースラインの増大が見られ、1:1 フィッティングを正確に行うことができなかった。そのため結合速度定数 k_{on} と解離速度定数 k_{off} を正確に求めるには至らなかったが、平衡値解析より解離定数 K_D を求めた(表 3-3)。その値は $4.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ であり ITC より求められている $K_a = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ とほぼ同等の値であるといえる。

一方で四量体の 5209BscFv-cSA414 では顕著な解離速度の低下が見られている。1:1 フィッティングによって見かけの結合速度定数 $k_{on(obs)}$ と解離速度定数 $k_{off(obs)}$ を求めることに成功した。 $k_{on(obs)} = 2.6 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ 、 $k_{off(obs)} = 7.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ となっており、 $k_{off(obs)}$ に至っては装置の測定限界に近い値を示していた(表 3-3)。これは一度結合した scFv-cSA はほぼ解離しないということを意味している。四量体化に起因する顕著な avidity 効果が観測された結果であるといえる。

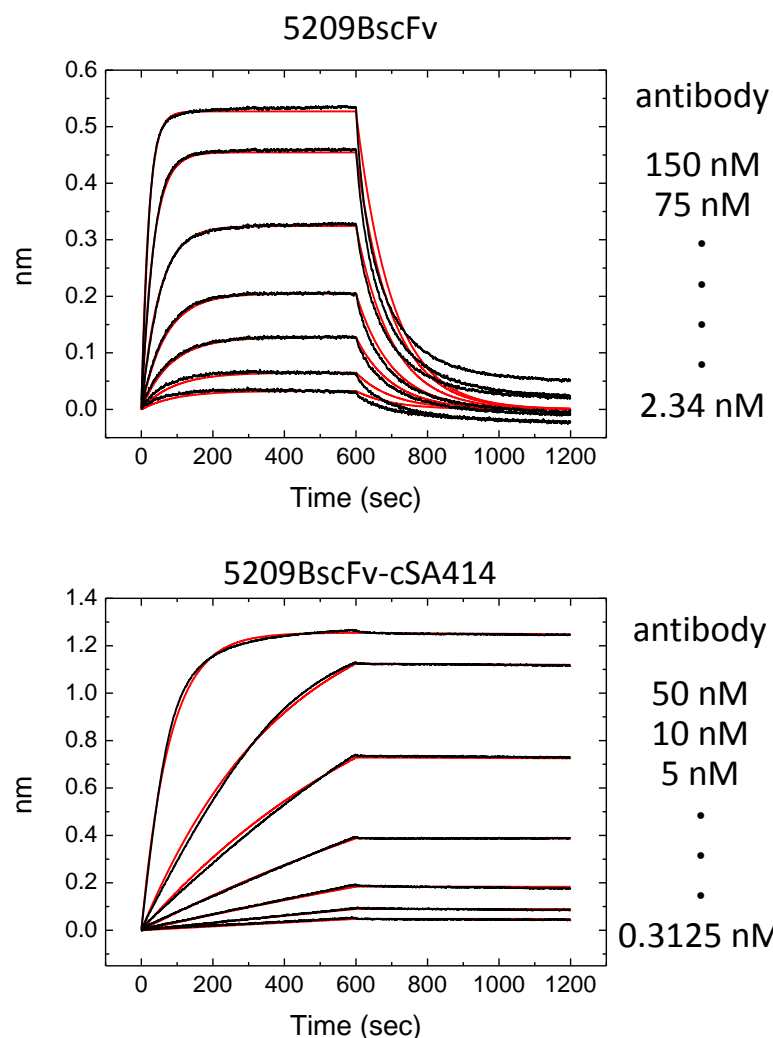


図 3-10. 5209BscFv 単体、及び 5209BscFv-cSA414 における BLI の結果
 リガンド: ROBO1, アナライト: 5209BscFv または 5209BscFv-cSA414
 buffer: PBS-T

表 3-3. 5209BscFv 単体、及び 5209BscFv-cSA414 における BLI の結果

	$k_{\text{on(obs)}} \text{ (Ms}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{off(obs)}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_{\text{D(obs)}} \text{ (M)}$
5209BscFv	n.d.	n.d.	4.2×10^{-8}
5209BscFv-cSA414	2.6×10^5	7.6×10^{-6}	3.0×10^{-11}

n.d. = not determined

3-4 結言

本章において低免疫原性 cSA 変異体を用いた融合抗体である scFv-cSA の構築に成功した。以前に scFv と cSA を用いた融合抗体については報告されてはいるが^{29,30,37}、本章は低免疫原性 cSA 融合抗体の性質について詳細に解析したものであり、その意義は非常に大きいものであるといえる。

融合抗体 5209BscFv-cSA は巻き戻しによって四量体として精製することができた。その際のサイズ排除クロマトグラフィーの結果では、cSA 単体と比較して、5209BscFv-cSA はカラムへの吸着が抑えられていた(図 3-6)。前章の結果より、カラムへの吸着は biotin 結合部位に依存していると示唆されていた(図 2-10)。今回の融合抗体は scFv 部位が存在しているために立体的にカラムへの吸着が阻害されたと考えられる。一方で DSC の結果よりこの融合抗体の各部位は独立して存在していることが明らかとなった(表 3-1, 図 3-8)。以上の結果からリンカーによって繋がれた scFv 部位は独立して存在はしているものの、cSA 部位の周辺を取り囲むように密集した状態で存在していると考えられる。

ITC による量論比 N から 5209BscFv-cSA の 4 つの抗原結合部位の中で 2 つのみが直接結合に関与していると示唆された (表 3-2, 図 3-9)。これは立体障害によるものか、もしくは結合部位が精製過程で失活していると推察される。一方で、BLI の解析結果より 5209BscFv-cSA において顕著な解離速度の低下が示された(図 3-10)。もし仮に ITC における量論比 N が失活によるものである場合、 N が 0.5 であるということは 50%失活していることになる。この場合、全ての四量体における 4 つの結合部位のうち 2 つが失活しているという状態ではなく、全部位失活しているもの、3 部位、2 部位、1 部位、がそれぞれ失活しているものが混在した状況となっていると考えられる。このような状況では BLI にて 1 部位のみ活性をもった一価の抗体結合による速い解離がノイズとして見られるはずである。BLI の解離においてはその様子は観測されず、cSA 融合抗体は一度結合したらほぼ解離しないということが示された (図 3-10)。精製後のイオン交換クロマ

トグラフィーによる成分分析においても、巻き戻しによって調製された 5209BscFv-cSA414 は単一な状態で精製されていると示唆された(図 3-7)。ITC における抗原結合の量論比 N は立体障害によるものであり、scFv 部位の立体的な密集状態を反映していると考えられる。

scFv 部位 - cSA 部位間のリンカー長を変更することで立体障害を解消することが可能になると考えられる。しかし、scFv-cSA 四量体の各部位は同時に結合には関与していないものの、avidity 効果として結合に貢献していることが BLI の結果より予測されるため、現状の scFv-cSA は十分に応用可能であると期待される。

本章では、低免疫原性 cSA 融合抗体の巻き戻しによる精製、詳細な物性解析を行い、そして顕著な avidity 効果が生じていることを示した。以前の cSA によるプレターゲットティング法においては免疫原性が問題点となっていた。本章においてその免疫原性が解消された cSA 変異体を用いた融合抗体の物性面における有用性を示すことに成功したといえる。今後、この融合抗体が実際に動物モデルによる薬物輸送実験などに用いられることが期待される。

第 4 章

新規二重特異性抗体形成システムを 用いた共有結合による 抗 ROBO1 二重特異性抗体の構築

4-1 緒言

本章と次章において高機能化を目指した新規二重特異性抗体の構築と解析を行った。二重特異性抗体は異なる二種の抗原を認識する特性から、抗原以外のもう一種の分子を引き寄せて架橋することによって薬物輸送や細胞傷害活性を達成するという応用が提案されてきた^{28,40,41}。二種の分子を架橋するだけでなく、一種の抗原を二点で認識することにより結合を強固にすることが可能であるという報告もされており⁴²、分子種として非常に興味深い。

しかし、二重特異性抗体構築には困難な点が多い。一本鎖抗体を遺伝子工学的につないだものでは、用いる抗体によっては安定して発現させることが困難であるという点が当研究グループで指摘されている。また、発現が可能であるとしても、遺伝子上での各ドメインの順序によって活性などが変わってしまうことが既に報告されている⁷⁶。別種の抗体を産生するハイブリドーマを融合させて二重特異性抗体を構築するというシステムにおいては、それぞれのH鎖、L鎖が混在して多数の副生成物が生じてしまい、目的の二重特異性抗体を得ることが難しくなってしまう⁷⁷。

二重特異性抗体を構築するために今までに多数の新規分子の構築、解析がなされてきた。強力な蛋白質 - 蛋白質相互作用によって融合抗体同士を繋ぐものや⁶、非天然アミノ酸を用いて化学反応によって融合を行うもの⁷⁸、Dock and Lock システムというヘリックスの相互作用を用いた二重特異性抗体構築システム⁴³など、多数の分子種が報告され、現在も盛んに研究されている。近年ではKnobs into Holes システムを用いた融合抗体が構築され、共発現による二重特異性抗体形成手法なども提案されている⁷⁹。

共発現させるもの、別個の抗体を架橋するもの、提案されてきた数々の手法の中で、本研究ではそれぞれの抗体を別個に発現させた後で、複合体を形成させるというシステムを採用することとした。理由としては、それぞれの抗体の結合を個別に評価した後で、形成された複合体における結合と比較することで、二重特異性抗体という研究が盛んな

分野において、詳細な熱力学的解析を通じて新たな知見を得ることができると考えたからである。また、その形成手法について以下のような条件を設定し、理想的な二重特異性抗体形成システムの構築を目指した。

1. biotin 結合のような強固な結合も交換反応は起こるため、共有結合による複合体形成法を用いる。
2. scFv 部位の変性温度は 45-50 °C であることが多いため、酵素反応を介した複合体形成法などを避け、低温条件下で反応が進む複合体形成法を用いる。
3. 抗体部位がジスルフィド結合をもつため、制御の簡便化を目的としてジスルフィド結合を介さない複合体形成法を用いる。

このような条件を基に複合体形成システムを精査した結果、我々は SpyCatcher (Spy) と SpyTag (Stag) によるタグシステムに注目した⁸⁰。Spy はグラム陽性菌である *Streptococcus pyogenes* の細胞外蛋白質 FbaB のドメインである collagen adhesion domain 由来のタグシステムである。元々分子内にイソペプチド結合を保持しているドメインであり、このイソペプチド結合に関与する部位をタグとして分離し、最適化を行うことで構築されている。Spy と Stag を混ぜることにより特異的な共有結合が温度や buffer 条件に大きく影響されずに形成される。このシステムによる二重特異性抗体は報告例がない。我々は Spy 融合抗体を構築し、新規の二重特異性抗体構築系をデザインした(図 4-1A)。

このシステムは複合体化させるドメインの変更が容易になることが期待される。新たに導入するドメインとして、前章までに用いていた強固な biotin 結合部位はプレターゲティングを指向する上で非常に有益である。また、一価同士の抗体による二重特異性抗体では結合の面での問題点も懸念されるが、avidin 蛋白質は多量体を形成するため、avidity 効果によって問題点の解消が期待される。前章において cSA は四量体化に起因する立体障害が指摘されている。立体的に抗原結合部位を過度に密集させることを避けるために、近年新たに発見された二量体を形成する avidin 蛋白質である rhizavidin (RA)¹⁰

を用いて、新規の二重特異性 avidin 融合抗体を提案した(図 4-1B)。この融合抗体は二種の抗原認識による薬物輸送、または二点認識による avidity 効果、そして RA 部位に起因する多量体化による avidity 効果と強固な biotin 結合部位も活用可能であり、非常に強力な抗体となることが期待される。

これらの新規二重特異性抗体について、本章では詳細な熱力学的解析による知見が少なかった一種の抗原に対して二点認識を行う二重特異性抗体について解析を行うこととした。前章と同じく肝臓癌特異的に発現する抗原である ROBO1 をターゲットとし、ROBO1 中のイムノグロブリン第 5 ドメインを認識する抗体 HP103A と、ファイブロネクチン第 3 ドメインを認識する抗体 B2212A (2212)を用いることとした。HP103A は前章までに用いた 5209B を改良した変異体である。抗 ROBO1 二重特異性抗体構築を目指し、2212-Spy、HP103A-Stag、HP103A-RA-Stag を構築した(図 4-2)。Spy タグシステムによって二重特異性抗体を形成するこれらの抗体について結合活性や熱安定性を DSC、ITC、BLI を用いて詳細に解析し、本システムが予想通りの二重特異性抗体構築に成功しているか検討を行った。

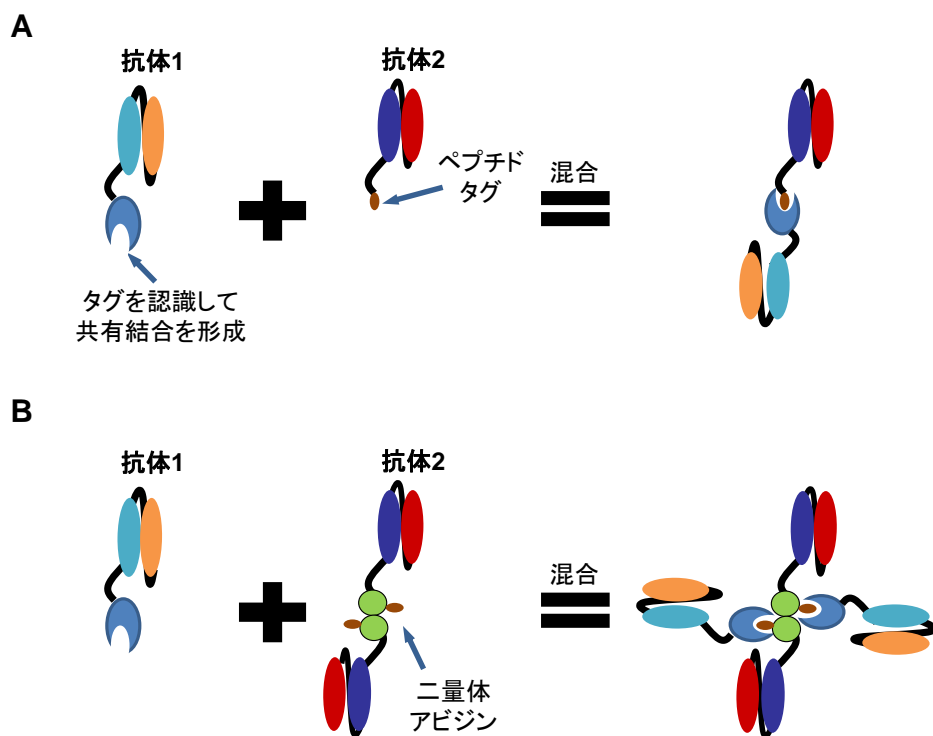


図 4-1. タグシステムを用いた新規二重特異性抗体の概略
A: 通常の二重特異性抗体, B: RA 部位を導入した二重特異性抗体

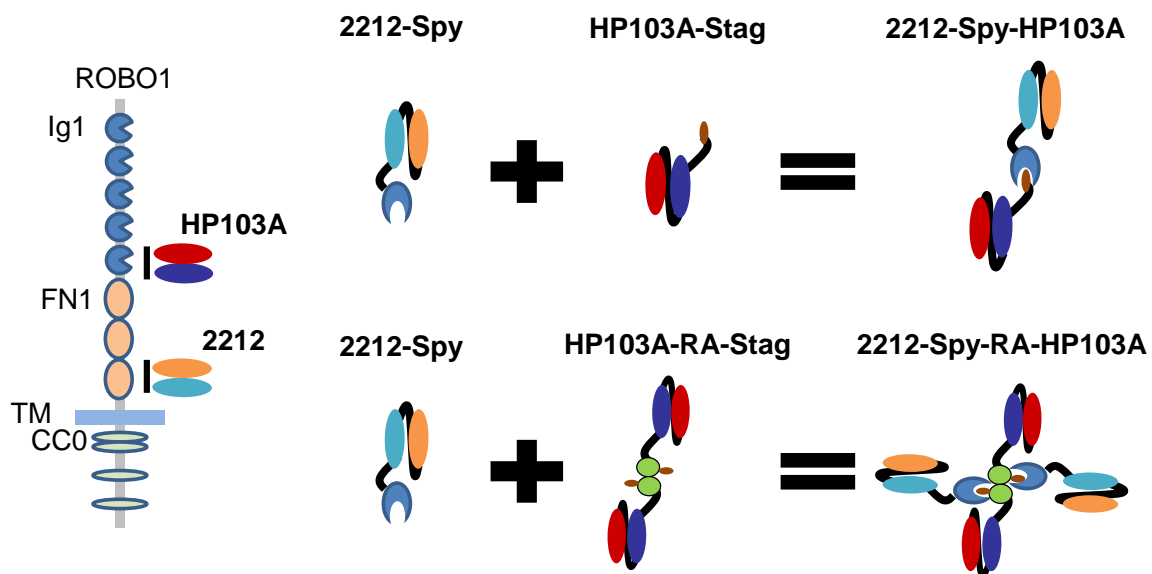


図 4-2. 抗 ROBO1 二重特異性抗体

4-2 実験手法

4-2-1 新規融合抗体の構築、巻き戻しによる大量調製

【ベクター構築】

発現ベクターは pRA2 ベクターを用いた。抗体配列は 2212 については当研究室卒業生 中木戸 誠 博士、HP103A については当研究室 渡部 貴大 氏によって構築されたベクターを鋳型として用いた。Spy 及び RA-Stag については遺伝子合成を行ったものを鋳型として用いた(Life Technologies, Tokyo, Japan)。

合成した配列を基に以下のプライマーを用いて増幅した後、前章に用いた scFv-cSA 発現ベクターに導入した。

Spy

Forward primer : 5'- NNNNCCGCGGGTAGCAGCGGTAGCGG -3 '

Reverse primer : 5'- NNNNGGGCCCCAATATGTGCATCACCTTTGGTTGC -3 '

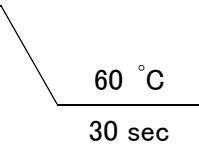
RA

Forward primer : 5'- NNNNCCGCGGGTAGCAGCGGTAGCGG -3 '

Reverse primer : 5'- NNNNGGGCCCCCTTTGGTCGGTTTATATGCATCAACC -3 '

反応液は先述したものと同一であり、反応条件は以下のとおりである。

反応条件

サイクル数	1	30	1
	94 °C 2min	98 °C 10 sec  60 °C 30 sec	4 °C hold

増幅反応後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit により精製を行い、制限酵素(SacII, ApaI) によって pRA2 ベクターと共に切断反応に供した。ApaI で 25 °C、30 min 切断反応後、 SacII を加えて 37 °C にて終夜切断反応を行った。以降の手順は第 2 章に準ずる。但し培地として ampicillin (終濃度 50 µg/ml)含有のものを用了。

以上のようにして 5209B-Spy を構築後、中木戸 誠 氏が構築した 2212 配列を鋳型として以下のプライマーを用いて増幅した配列を導入した。

Forward primer : 5'- NNNNCCATGGCCGAAGTCCAGCTACAGCAATCTG -3 '

Reverse primer : 5'- NNNNCCGCGGTTTCAGCTCCAGCTTGGTC -3 '

増幅以降の手順は先述した手法に準ずる。制限酵素は NcoI と SacII を用了。

5209B-RA-Stag を構築後、以下のプライマーを用いて KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO, Osaka, Japan)によって 5209B-Stag の構築を行った。

Forward primer : 5'- GGTGGTGGCAGCGG -3 '

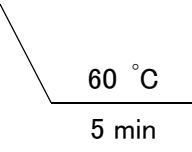
Reverse primer : 5'- ACCCGCGGCTTTTATTTCC -3 '

反応条件は以下のとおりである。

反応液

滅菌水	35 µl
10× Buffer for iPCR	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
Primer (10 pmol/µl)	各 1.5 µl
鋳型 DNA	1 µl
KOD -plus-	1µl
<hr/>	
Total	50 µl

反応条件

サイクル数	1	5	1
	94 °C 2min	98 °C 10 sec 	4 °C hold

反応後 DpnI によって鋳型 Plasmid の消化反応を 37 °C、1 h 行い、以下の溶液条件で 16 °C、1 h self-ligation 反応を行った。

反応溶液

DpnI 処理済み溶液	2 µl
滅菌蒸留水	7 µl
Ligation high	1 µl
T4 Polynucleotide Kinase	1 µl
<hr/>	
Total	15 µl

反応後、ヒートショック法による形質転換を行った後、先述の手法に準じた。

HP103A の鋳型ベクターは NcoI、及び SacII の認識配列を両末端に保持していたため、ベクターから制限酵素切断を行い、構築された 5209B-Stag、5209B-RA-Stag 発現ベクターに同様の手順で導入した。

また、熱安定性解析のために Spy 部位のみの発現ベクターを、以下のプライマーを用いて pRA2 ベクターを発現ベクターとして構築した。

Forward primer : 5'- NNNNCCATGGCCGTTGATACCCTGAGCGGTC -3 '

Reverse primer : 5'- NNNNCCGCGGCAATATGTGCATCACCTTTGGTTG -3 '

更に、構築された Spy 発現ベクターと以下のプライマーを用いて KOD -Plus-

Mutagenesis Kit によって Spyfull 発現ベクターを構築した。

Forward primer :

5'- GTTATGGTTGATGCATATAAACCGACCAAAGCCGCGGGTCACCATC -3 '

Reverse primer : 5'- AATATGTGCATCACCTTTGGTTG -3 '

Spyfull についてはイソペプチド結合を発現時に自発的に形成してしまうため pelB 配列を有する plasmid では発現が困難であることが懸念される。そのために以下のプライマーを用いて Spyfull 配列を pET28b ベクターに導入した。制限酵素は NcoI と XhoI を用いた。

Forward primer : 5'- NNNNCCATGGCCGTTGATACCCTGAGCGGTC -3 '

Reverse primer : 5'- NNNNCTCGAGTTTGGTCGGTTTATATGCATCAAC -3 '

以下に、今回の発現ベクターのベクターマップ、及び遺伝子配列を示す(図 4-3, 4-4)。

5209B-RA-Stag

```

10      20      30      40      50      60
ATGGCCGAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTG
M A E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L

70      80      90      100     110     120
AAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
K L S C A A S G F T F S T Y D M S W V R

130     140     150     160     170     180
CAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGTAGTACC
Q T P D K R L E L V A T I N S N G G S T

190     200     210     220     230     240
TATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCCACAGTTCAGAGACAATGCCAAGAACATC
Y Y P D S V K G R F T S S R D N A K N I

250     260     270     280     290     300
CTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA
L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R

310     320     330     340     350     360
GAGGCATTACTACGGCCCCCTTACTATGCTTTGGACTACTGGGTCAGGGAACCTCAGTC
E A L L R P P Y Y A L D Y W G Q G T S V

370     380     390     400     410     420
ACCGTCTCCTCGGCCGCGGGGCGGTAGCGCGGTGGCGGTCGGGCGGTGGCGGATCG
T V S S A G G G G S G G G G S G G G G S

430     440     450     460     470     480
GATATCCTCGATATTAGATGACCCAGTCTCCAGCTTCACTGTCTGCATCTGTGGGAGAA
D I L D I Q M T Q S P A S L S A S V G E

490     500     510     520     530     540
ACTGTCACCATCACATGTGGAGCAAGTGAAGAATTTACGGTGCTTTAACTTGGTATCAG
T V T I T C G A S E N I Y G A L T W Y Q

550     560     570     580     590     600
CGGAAACAGGGAAAACTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAATCAATTTGGCAGATGAC
R K Q G K S P Q L L I Y G A I N L A D D

610     620     630     640     650     660
AAGTCATCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCTCTCAAGATCAGTAGC
K S S R F S G S G S G R Q Y S L K I S S

670     680     690     700     710     720
CTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTAAGTACTCCATTCAGC
L H P D D V A T Y Y C Q N V L S T P F T

730     740     750     760     770     780
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAATAAAAGCCGCGGTAGCAGCGGTAGCGGTAGCTTT
F G S G T K L E I K A A G S S G S G S F

790     800     810     820     830     840
GATGCAAGCACTTTAAAGATTTTAGCAGCATTGCAAGCGCAAGCAGCAGCTGGCAGAAAT
D A S N F K D F S S I A S A S S S W Q N

850     860     870     880     890     900
CAGAGCGGTAGCACCATGATTATTCAGGTTGATAGCTTTGGTAATGTGAGCGGTGAGTAT
Q S G S T M I I Q V D S F G N V S G Q Y

910     920     930     940     950     960
GTTAATCGTGCACAGGACCGGTTGTGAGAATAGCCCGTATCCGCTGACCGGTGCGTGT
V N R A Q G T G C Q N S P Y P L T G R V

970     980     990     1000    1010    1020
AATGGCACCTTTATTGCAATTTAGCGTGGGTTGGAATAATAGCACCAGAAATTGTAATAGC
N G T F I A F S V G W N N S T E N C N S

1030    1040    1050    1060    1070    1080
GCCACCGGTTGGACCGGTTATGCACAGGTTAATGGTAATAATACCGAAATTGTGACCAGC
A T G W T G Y A Q V N G N N T E I V T S

1090    1100    1110    1120    1130    1140
TGGAACTCTGGCCTATGAAGGTGGTAGCGGTCCGGCAATTGAACAGGGTCAGGATACCTTT
W N L A Y E G G S G P A I E Q G Q D T F

1150    1160    1170    1180    1190    1200
CAGTATGTGCCGACCACCGAAAAAAGCCTGCTGAAAGATGGTGGTGGTGGCAGCGGT
Q Y V P T T E N K S L L K D G G G G S G

1210    1220    1230    1240    1250    1260
GGTGGCGGTAGCCGACATATTGTTATGGTTGATGCATATAAACCGACCAAGGGGGCCGT
G G G S A H I V M V D A Y K P T K G A R

1270    1280
CACCATCATCACCACCAT
H H H H H H

```


2212-Spy

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGCCGAAGTCCAGCTACAGCAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTG
M A E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V

      70      80      90     100     110     120
AAGATATCCTGTAAGGCTTCTGGATACAGTTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAG
K I S C K A S G Y T F T D Y Y M N W V K

      130     140     150     160     170     180
CTGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTGTTCTAACAATGGTGATACT
L S H G K S L E W I G D I V P N N G D T

      190     200     210     220     230     240
ACCTACAACCAGAATTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACA
T Y N Q N F R G K A T L T V D K S S S T

      250     260     270     280     290     300
GCCTACATGGAACCTCCGACGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTGCAAGA
A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R

      310     320     330     340     350     360
TTTTCTAACTACGTGTACCCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC
F S N Y V Y P F D Y W G Q G T T L T V S

      370     380     390     400     410     420
TCGGCCGCGGGGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGGTGGGGCGGTGGCGGATCGGATATCCAG
S A G G G G S G G G G S G G G G S D I Q

      430     440     450     460     470     480
ATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGATCACCATTAGTTGC
M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C

      490     500     510     520     530     540
AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTTTAACTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAACC
R A S Q D I S N F L N W Y Q Q K P D G T

      550     560     570     580     590     600
GTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCGAGGTTCAGT
V K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S

      610     620     630     640     650     660
GGCAGTGGGTCTGGAACAGATTTTCTCTCACCATTAGCAAACCTGGAACAAGAAGATATT
G S G S G T D F S L T I S K L E Q E D I

      670     680     690     700     710     720
GCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGCTCACGTTCCGTTGCTGGGACCAAG
A T Y F C Q Q G N T L P L T F G A G T K

      730     740     750     760     770     780
CTGGAGCTGAAAGCCGCGGTAGCAGCGGTAGCGGTAGTGTGATACCTGAGCGGTCTG
L E L K A A G S S G S G S V D T L S G L

      790     800     810     820     830     840
AGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATC
S S E Q G Q S G D M T I E E D S A T H I

      850     860     870     880     890     900
AAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAACCTGCGT
K F S K R D E D G K E L A G A T M E L R

      910     920     930     940     950     960
GATAGCAGTGGTAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTAT
D S S G K T I S T W I S D G Q V K D F Y

      970     980     990    1000    1010    1020
CTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCA
L Y P G K Y T F V E T A A P D G Y E V A

      1030    1040    1050    1060    1070    1080
ACCGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACC
T A I T F T V N E Q G Q V T V N G K A T

      1090    1100    1110    1120    1130
AAAGGTGATGCACATATTGGGGCCCGTCACCATCATCACCACCAT
K G D A H I G A R H H H H H H
```

HP103A-RA-Stag

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGCCGAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTG
M A E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L

      70      80      90     100     110     120
AAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGACATGTCTTGGGTTCCG
K L S C A A S G F T F S T Y D M S W V R

      130     140     150     160     170     180
CAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAAATAGTAATGGTGGTAGTACC
Q T P D K R L E L V A T I N S N G G S T

      190     200     210     220     230     240
TATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCCAGGTTCCAGAGACAATGCCAAGAATC
Y Y P D S V K G R F T S S R D N A K N I

      250     260     270     280     290     300
CTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA
L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R

      310     320     330     340     350     360
GAGGCATTACTACGGCCCGCTTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTC
E A L L R P A Y Y A L D Y W G Q G T S V

      370     380     390     400     410     420
ACCGTCTCCTCGGCCGCGGGGCGGTAGCGCGGTGCGGGTCGGGCGGGGCGGTAGC
T V S S A G G G G S G G G S G G G S G G G G S

      430     440     450     460     470     480
GGCGGTGGCGGGTCGGATATCCTCGATATTCAGATGACCCAGTCTCCAGCTTCACTGTCT
G G G G S D I L D I Q M T Q S P A S L S

      490     500     510     520     530     540
GCATCTGTGGAGAAACTGTACCATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTACGGTGCT
A S V G E T V T I T C G A S E N I Y G A

      550     560     570     580     590     600
TTAACTTGTATCAGCGGAAACAGGAAATCTCCTCAGTCTCCTGATCTATGGTGAATC
L T W Y Q R K Q G K S P Q L L I Y G A I

      610     620     630     640     650     660
AATTTGGCAGATGACAAGTCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCT
N L A D D K S S R F S G S G S G R Q Y S

      670     680     690     700     710     720
CTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTA
L K I S S L H P D D V A T Y Y C Q N V L

      730     740     750     760     770     780
AGTACTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAGCCGGGGTAGCAGC
S T P F T F G S G T K L E I K A A G S S

      790     800     810     820     830     840
GGTAGCGGTAGCTTTGATGCAAGCACTTTAAAGATTTAGCAGCATTGCAAGCGCAAGC
G S G S F D A S N F K D F S S I A S A S

      850     860     870     880     890     900
AGCAGCTGGCAGAATCAGAGCGGTAGCACCATGATTATTACAGGTTGATAGCTTTGGTAAT
S S W Q N Q S G S T M I I Q V D S F G N

      910     920     930     940     950     960
GTGAGCGGTCAGTATGTTAATCGTGCACAGGGCACCGGTTGTCAGAATAGCCCGTATCCG
V S G Q Y V N R A Q G T G C Q N S P Y P

      970     980     990    1000    1010    1020
CTGACCGGTCTGTGTTAATGGCACCTTTATTGCATTTAGCGTGGGTGGAATAATAGCACC
L T G R V N G T F I A F S V G W N N S T

      1030    1040    1050    1060    1070    1080
GAAAATTGTAATAGCGCCACCGGTTGACCGGTTATGCACAGGTTAATGGTAATAATACC
E N C N S A T G W T G Y A Q V N G N N T

      1090    1100    1110    1120    1130    1140
GAAATTGTGACCAGCTGGAATCTGGCCTATGAAGTGGTAGCGGTCCGGCAATTGAACAG
E I V T S W N L A Y E G G S G P A I E Q

      1150    1160    1170    1180    1190    1200
GGTCAGGATACCTTTCAGTATGTGCCGACCACCGAAAACAAAAGCCTGCTGAAAGATGGT
G Q D T F Q Y V P T T E N K S L L K D G

      1210    1220    1230    1240    1250    1260
GGTGGTGGCAGCGGTGGTGGCGGTAGCGCACATATTGTTATGGTTGATGCATATAAACCG
G G G S G G G G S A H I V M V D A Y K P

      1270    1280    1290    1300
ACCAAAGGGGCCGTCACCATCATCAACCAT
T K G A R H H H H H H

```

HP103A-Stag

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGCCGAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTG
M A E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L

      70      80      90     100     110     120
AAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGACATGTCTTGGGTTCGC
K L S C A A S G F T F S T Y D M S W V R

      130     140     150     160     170     180
CAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAAAGTAATGGTGGTAGTACC
Q T P D K R L E L V A T I N S N G G S T

      190     200     210     220     230     240
TATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCAACAGTTCCAGAGACAATGCCAAGAATC
Y Y P D S V K G R F T S S R D N A K N I

      250     260     270     280     290     300
CTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA
L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R

      310     320     330     340     350     360
GAGGCATTACTACGGCCCGCTTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTC
E A L L R P A Y Y A L D Y W G Q G T S V

      370     380     390     400     410     420
ACCGTCTCCTCGGCCGGCGGGCGGTAGCGGGTGGCGGGTCGGCGGGGCGCGGTAGC
T V S S A G G G G S G G G S G G G G S

      430     440     450     460     470     480
GGCGGTGGCGGGTCGGATATCCTCGATATTCAGATGACCCAGTCTCCAGCTTCACTGTCT
G G G G S D I L D I Q M T Q S P A S L S

      490     500     510     520     530     540
GCATCTGTGGGAGAACTGTACCATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTTACGGTGCT
A S V G E T V T I T C G A S E N I Y G A

      550     560     570     580     590     600
TTAACTTGGTATCAGCGGAAACAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAATC
L T W Y Q R K Q G K S P Q L L I Y G A I

      610     620     630     640     650     660
AATTGGCAGATGACAAGTCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCT
N L A D D K S S R F S G S G S G R Q Y S

      670     680     690     700     710     720
CTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTACTGTCAAAATGTGTTA
L K I S S L H P D D V A T Y Y C Q N V L

      730     740     750     760     770     780
AGTACTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAGCCGCGGGTGGTGGT
S T P F T F G S G T K L E I K A A G G G

      790     800     810     820     830     840
GGCAGCGGTGGTGGCGGTAGCGCACATATTGTTATGGTTGATGCATATAAACCGACCAAA
G S G G G S A H I V M V D A Y K P T K

      850     860     870
GGGGCCCGTCACCATCATCACCACCAT
G A R H H H H H H
```

Spy

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGCCGTTGATACCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACC
M A V D T L S G L S S E Q G Q S G D M T

      70      80      90     100     110     120
ATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAA
I E E D S A T H I K F S K R D E D G K E

      130     140     150     160     170     180
CTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGTGGTAAACCATTAGCACCTGGATT
L A G A T M E L R D S S G K T I S T W I

      190     200     210     220     230     240
AGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTATCTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACC
S D G Q V K D F Y L Y P G K Y T F V E T

      250     260     270     280     290     300
GCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGC
A A P D G Y E V A T A I T F T V N E Q G

      310     320     330     340     350     360
CAGGTTACCGTGAATGTTAAAGCAACCAAGGTGATGCACATATTGCCGCGGGTCACCAT
Q V T V N G K A T K G D A H I A A G H H

      370     380
CATCACCAACCAT
H H H H

```

Spyfull

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGCCGTTGATACCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACC
M A V D T L S G L S S E Q G Q S G D M T

      70      80      90     100     110     120
ATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAA
I E E D S A T H I K F S K R D E D G K E

      130     140     150     160     170     180
CTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGTGGTAAACCATTAGCACCTGGATT
L A G A T M E L R D S S G K T I S T W I

      190     200     210     220     230     240
AGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTATCTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACC
S D G Q V K D F Y L Y P G K Y T F V E T

      250     260     270     280     290     300
GCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGC
A A P D G Y E V A T A I T F T V N E Q G

      310     320     330     340     350     360
CAGGTTACCGTGAATGTTAAAGCAACCAAGGTGATGCACATATTGTTATGGTTGATGCA
Q V T V N G K A T K G D A H I V M V D A

      370     380     390     400
TATAAACCGACCAAACTCGAGCACCAACCAACCAACCAAC
Y K P T K L E H H H H H H H

```

図 4-3. 各種目的物の遺伝子配列

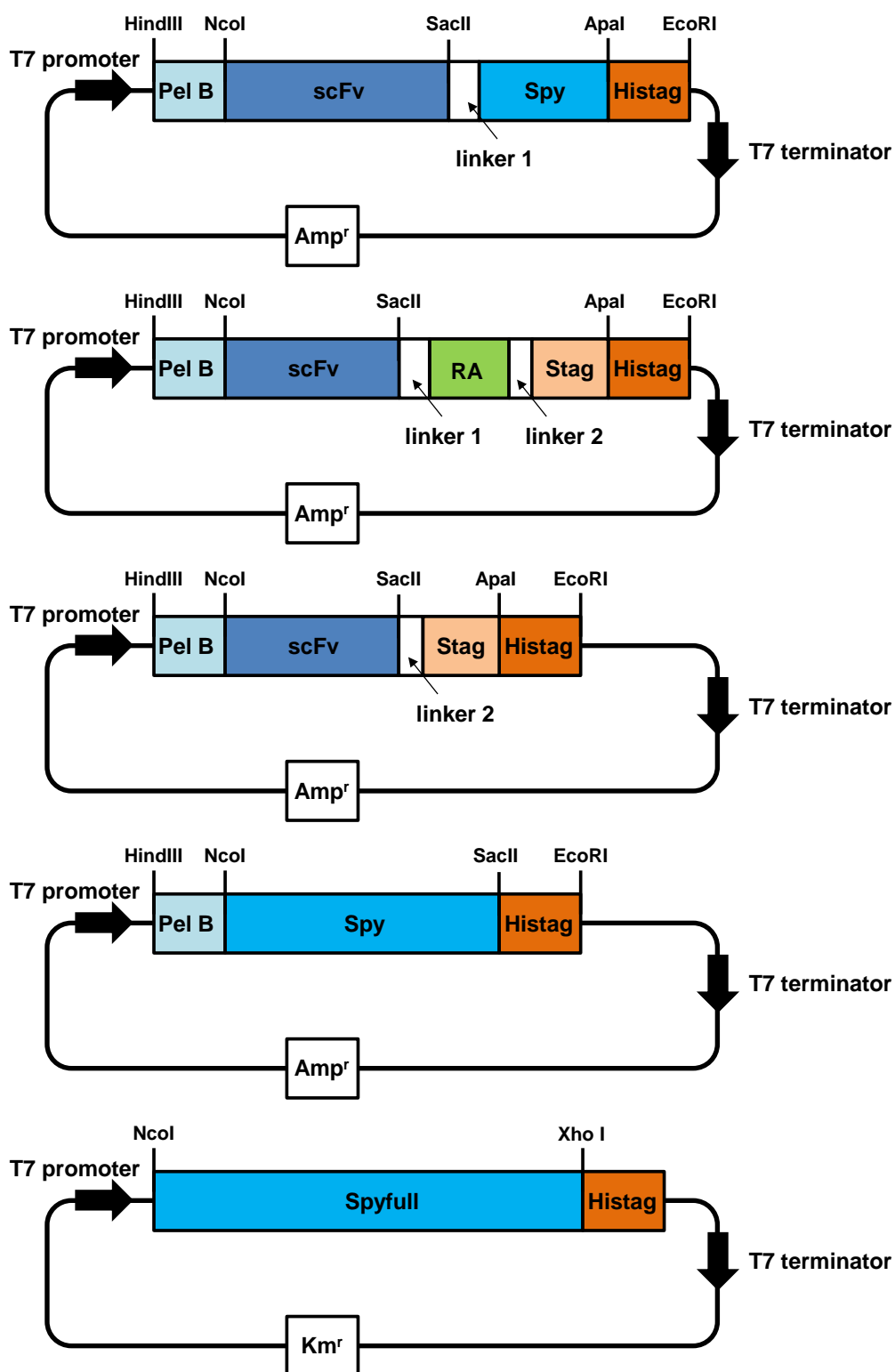


図 4-4. 各種ベクターマップ
(Linker1: GSSGSGS, Linker2: GGGGSGGGGS)

【大腸菌による大量発現、巻き戻し】

Spyfull 以外の各種蛋白質は融合抗体 scFv-cSA と同様に大腸菌による培養を行った。

巻き戻しは第 2 章【大腸菌による大量発現、巻き戻し】による手法に準拠して行った。

Ni-NTA Agarose による精製ではサンプルを load し、imidazole を 5 mM、30 mM 含んだ binding buffer 1 で洗浄後、500 mM imidazole を含んだ binding buffer 1 で溶出を行った。5209B-RA-Stag のみ 5 mM imidazole を含んだ binding buffer 1 で洗浄後、imidazole を 300 mM、500 mM 含んだ binding buffer 1 で溶出を行い、300 mM で溶出した画分を巻き戻しに用いた。溶出後の各サンプルの蛋白質濃度を適宜 7.5 μ M 以下になるように希釈し、そして巻き戻し時の guanidium HCl の濃度を 6 M、3 M、2 M、1 M、0.5 M から 3 M、2 M、1 M、0.5 M に変更するという最適化を行い、巻き戻し及びサイズ排除クロマトグラフィーによって目的物を得た。

得られた目的物の内、2212-Spy、HP103A-RA-Stag、HP103A-Stag については 4 °C におけるイオン交換クロマトグラフィーによって更に精製を行った。2212-Spy は 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 at 4 °C において 4 °C、終夜透析し、HiTrap Q HP 1ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ) にロードした。ロードの際に A Buffer として 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 at 4 °C を用いた。溶出は B buffer として 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 at 4 °C を用いて、A buffer に対して段階的に濃度を上げていくことによって行った。

HP103A-RA-Stag、HP103A-Stag については 50 mM MES, pH 6.0 at 4 °C において 4 °C、終夜透析し、HiTrap SP HP 1ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ) にロードした。ロードの際に A Buffer として 50 mM MES, pH 6.0 at 4 °C を用いた。溶出は B buffer として 50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6.0 at 4 °C を用いて、A buffer に対して徐々に濃度を上げていくことによって行った。

得られた 2212-Spy、HP103A-RA-Stag、HP103A-Stag はそれぞれ PBS に 4 °C、終夜透

析して buffer 置換を行った。必要に応じて 2212-Spy と HP103A-RA-Stag、または HP103A-Stag を濃度比 1:1 になるように混合し、4 °C にて終夜、二重特異性抗体形成反応を行った。

Spyfull については大腸菌にて発現し、可溶性画分より回収を行った。発現には大腸菌 Rosetta2 (DE3)株を用いた。ヒートショック法によりベクターを形質転換した後、kanamycin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml)含有 LB プレート培地にて 28 °C 条件下で培養した。生じたコロニーを kanamycin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml)含有 3 ml LB 試験管培地へと植菌し 28 °C、12~18 h 振盪培養後、培養液を回収し、kanamycin (終濃度 50 µg/ml)、chloramphenicol (終濃度 34 µg/ml)含有 2×YT 培地に 1 L 当たり 5 ml ずつ植え継いだ。培地は 28 °C にて振盪培養し、O.D.₆₀₀ = 0.8 にて終濃度 1 mM の isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を加えることで発現誘導を行い、28 °C にて終夜培養した。培養液から遠心(7000 × g, 10 min, 4 °C)によって菌体を回収し、破碎用 buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 at 4 °C)で懸濁した。懸濁液を氷浴にて超音波破碎した後、遠心(40000 × g, 30 min, 4 °C)によって上清を回収した。上清を 5 mM imidazole を含んだ binding buffer 2 (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9 at 4 °C)で平衡化した Ni-NTA Agarose に 4 °C にてロードした。そのまま 4 °C にて imidazole を 5 mM、30 mM 含んだ binding buffer 2 でそれぞれ洗浄した後、imidazole を 300 mM 含んだ binding buffer 2 で溶出した。溶出液を refolding buffer によって 4 °C にて透析し、Millex-GP (0.22 µm, PES, 33 mm, sterile)を用いてろ過した。その後、refolding buffer で平衡化した 26/60 Superdex75 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ)にロードし、4 °C にてサイズ排除クロマトグラフィーによって分離、精製を行った。サンプルは SDS-PAGE によって確認し、4 °C にて保管したものを実験に用いた。

4-2-2 各種融合抗体の熱安定性解析

各種蛋白質の熱安定性解析を DSC によって行った。測定は示差走査型カロリメーターVP-DSC を用いて行った。温度上昇は 1 °C/min にて行った。サンプルセルには 10-58 µM の蛋白質の PBS 溶液を約 400 µl 導入し、必要に応じて 1 当量以上の biotin を加えた。データは ORIGIN にて解析した。熱力学的な解析を行うために、測定データから buffer データを差し引きし、蛋白質濃度によって正規化した。得られたグラフを二状態近似することで目的の結果を得た。

4-2-3 各種融合抗体の結合活性解析

融合抗体の biotin 結合活性、抗原結合活性を ITC によって測定した。測定は Microcal iTC₂₀₀ を用いて行った。精製した各種融合抗体、抗原である ROBO1 を同一の PBS にて 4 °C、終夜透析し、透析外液を用いて biotin の 500 µM ストック溶液を調製した。測定の際、biotin ストック溶液、及び ROBO1 溶液は測定する各融合抗体溶液の 10 倍濃度になるように濃度調整して用いた。カロリメーターのセル内に 3-5 µM の融合抗体を導入し、攪拌速度 1000 rpm、25 °C にて biotin 溶液、または ROBO1 溶液を滴下した。得られたデータは ORIGIN を用いて解析を行い、滴定曲線は one-site binding isotherm にてフィッティングを行った。

4-2-4 各種融合抗体における avidity 効果の検討

各種抗体の avidity 効果について BLI によって検討を行った。測定は Octet RED 384 システムを用いて行った。融合抗体、及び ROBO1 は PBS にて 4 °C、終夜透析を行ったものを使用した。Amine Reactive 2nd Generation (AR2G)チップを用いて、アナライトとして 10 mM acetate buffer, pH 6.0 の条件下で 5 µg/ml の ROBO1 を固定化した。buffer は PBS-T を用いて、攪拌速度 1000 rpm、測定温度は 29 °C にて測定した。7 段階の濃度に希釈したアナライト(HP103A-Stag: 124 nM より 2 倍希釈列 7 点、他の融合抗体: 50 nM 1 点、10 nM より 2 倍希釈列 6 点)を用いて結合と解離を測定した。コントロールとして ROBO1 固定化後、buffer に対する挙動を測定したものを用いた。得られたセンサグラムからコントロールを差引して Octet システム付属のソフトウェアにて解析した。HP103A-Stag は平衡値解析より解離定数 K_D を求めた。他の融合抗体は速度論的パラメータを算出するために 1:1 結合であると仮定してフィッティングを行った。その際、フィッティングの精度を上げるため、一部データを除外する処理を行った。

4-3 結果と考察

4-3-1 新規融合抗体の構築、巻き戻しによる大量調製

大腸菌 Rosetta2 (DE3)を用いて発現した Spyfull 以外の各種蛋白質は不溶性画分に発現していた。得られた不溶性画分を binding buffer 1 に懸濁して可溶化し、Ni-NTA Agarose を用いて金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。粗精製を確認した SDS-PAGE の結果を図に示した(図 4-5)。どの蛋白質も imidazole で溶出した画分に目的物と思われる分子量付近のバンドが観測された。しかし、5209B-RA-Stag、HP103A-RA-Stag は目的物付近にダブルバンドが検出された。これ以上の精製は不可能であるので、他のものと同様に溶出された画分について巻き戻しを行った。

Spyfull については目的物の分子量である 15 kDa よりも大きな位置にダブルバンドが見られたが(図 4-5)、imidazole 濃度 300 mM で溶出された画分をサイズ排除クロマトグラフィーに用いた。

最終精製として 26/60 Superdex column によるサイズ排除クロマトグラフィーを行った(図 4-6)。得られたクロマトグラムより各メインピークが観測された。5209B-RA-Stag、HP103A-RA-Stag についてはメインピークの前部に不純物と思われるピークの肩が見えた。SDS-PAGE においてメインピークは肩も含め、目的物由来であることが示された。しかし 5209B-RA-Stag では顕著に、HP103A-RA-Stag ではわずかにダブルバンドが残っていた。Western Blot においてダブルバンドはどちらも目的物であることが示されており、これはシグナル配列である pel B 配列が切断されていないものが混在していると考えられる。Spyfull についてはクロマトグラムでは予想分子量 15 kDa 前後という分子サイズである単一のピークが得られた。しかし、SDS-PAGE 中では粗精製時と同じく、より大きな分子量であると示された。粗精製時と比べて単一のバンドになっていることから分子内共有結合形成が進んでいることが示唆された。この SDS-PAGE とクロマトグラムの分子量の差は共有結合が形成されたことによる影響であると考えられる。

5209B-RA-Stag、HP103A-RA-Stag については肩を含むメインピーク全体を、他の蛋白質はメインピークを回収して以降の実験に用いた。

2212-Spy、HP103A-RA-Stag、HP103A-Stag についてイオン交換クロマトグラフィーによって更に精製を行った。得られたクロマトグラムより、サイズ排除クロマトグラフィーで回収されたピークが更に精製され、メインピークと夾雑物に分けられている様子が観測された (図 4-7)。メインピークを回収し、以降の実験に用いた。

2212-Spy、HP103A-RA-Stag、HP103A-Stag を混合して反応させることで二重特異性抗体 2212-Spy-HP103A、及び 2212-Spy-RA-HP103A を形成させた。共有結合形成反応が進み、SDS-PAGE において複合体となったことが確認された(図 4-8)。

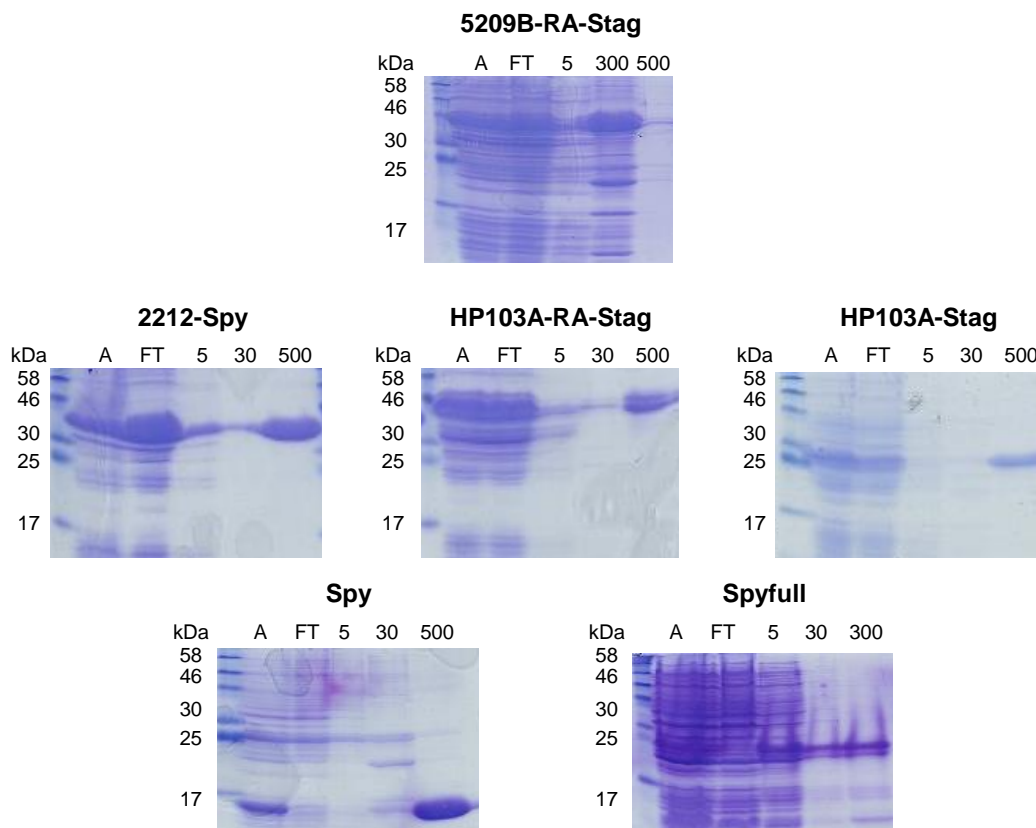


図 4-5. 各種蛋白質における
金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの結果
A: apply, FT: flow-through, 5-500 は溶出に用いた imidazole 濃度(mM)を示している。

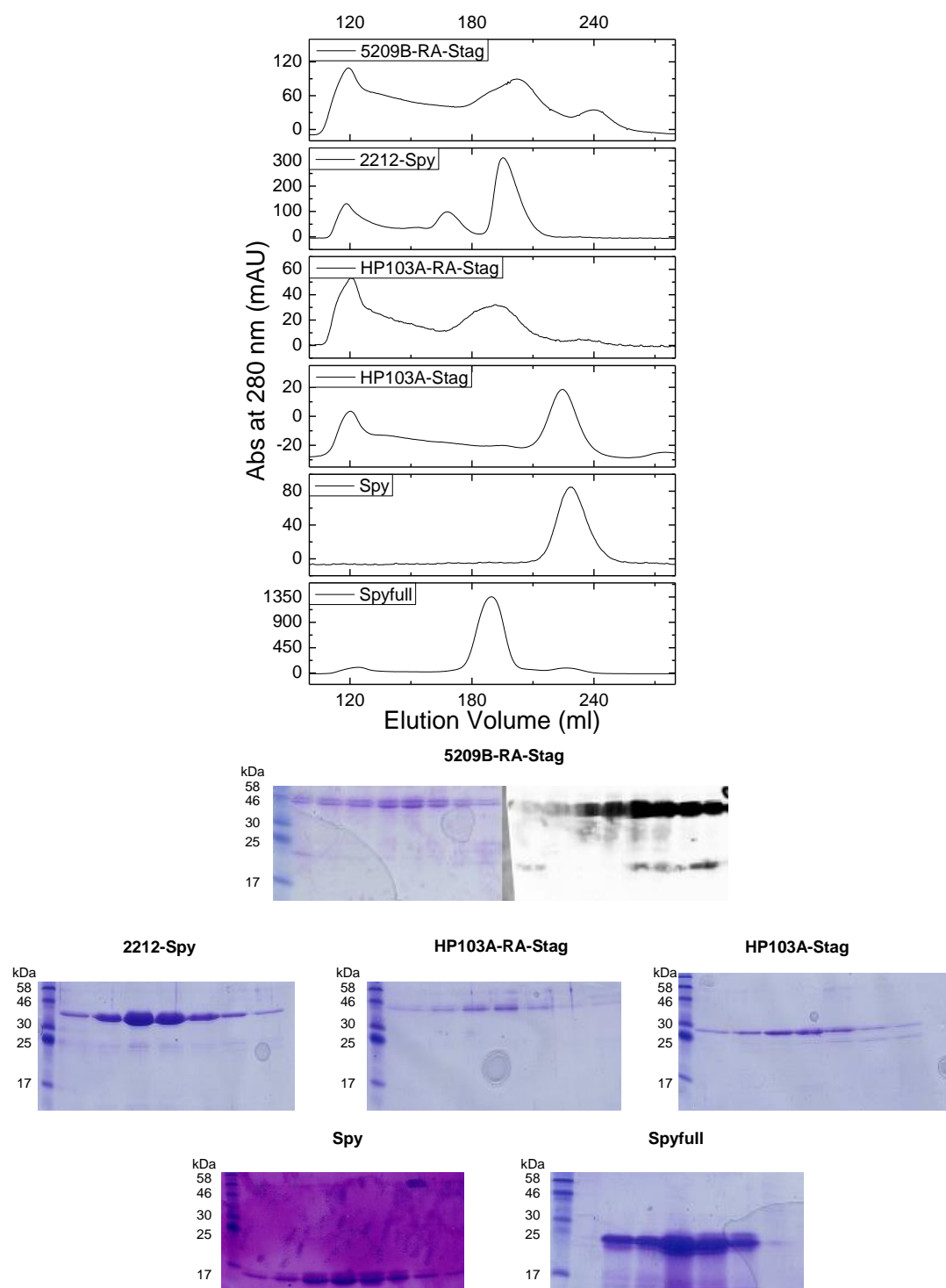


図 4-6. 各種蛋白質のサイズ排除クロマトグラフィーによる精製結果
column: Spyfull 以外 26/60 Superdex200 column, Spyfull 26/60 Superdex75 column
buffer: refolding buffer
及びピークの SDS-PAGE (Western Blot)による解析結果

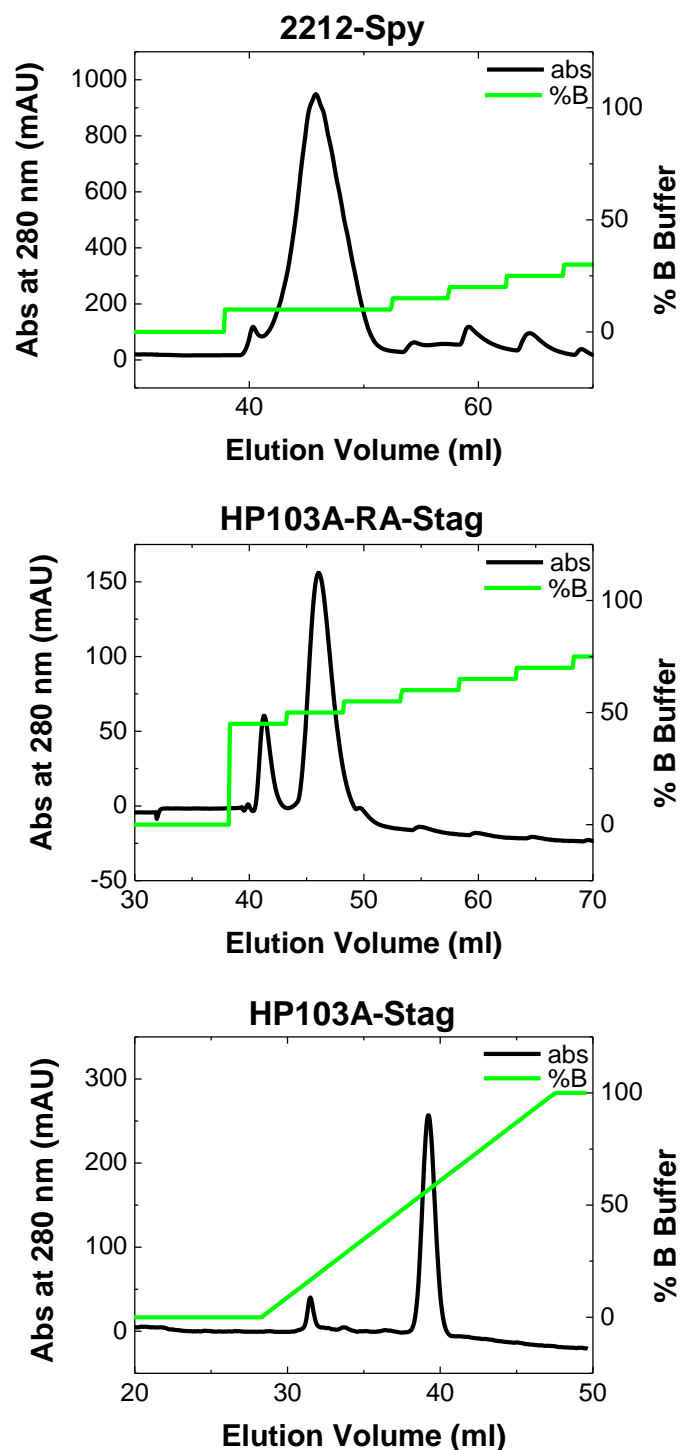


図 4-7. 各種融合抗体のイオン交換クロマトグラフィーによる精製結果

2212-Spy

column: HiTrap Q HP 1ml,

A buffer: 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 at 4 °C,

B buffer: 1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 at 4 °C

HP103A-RA-Stag, HP103A-Stag

column: HiTrap SP HP 1ml,

A buffer: 50 mM MES, pH 6.0 at 4 °C, B buffer: 50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6.0 at 4 °C

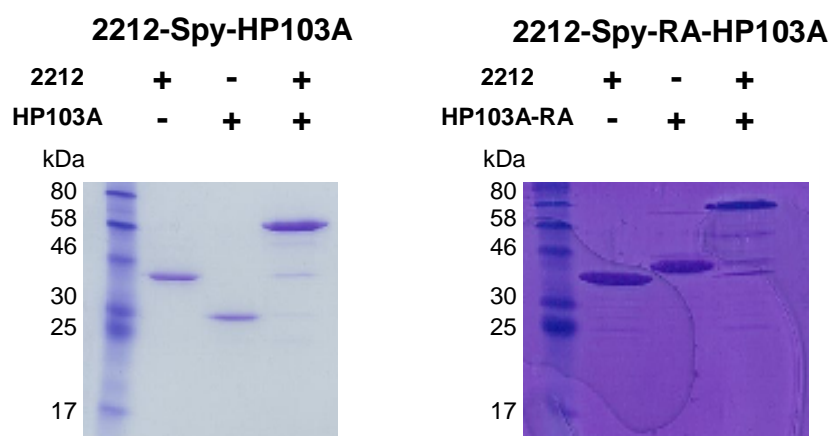


図 4-8. タグシステムによる二重特異性抗体形成反応についての SDS-PAGE 確認
buffer: PBS, 反応温度: 4 °C にて終夜反応させた。

4-3-2 各種融合抗体の熱安定性解析

融合抗体の熱安定性について DSC を用いて解析した(図 4-9)。

RA 融合抗体として 5209B-RA-Stag の熱安定性を測定した(図 4-9A)。測定の結果、cSA 融合抗体の時と同じく、biotin 非存在下、存在下のどちらの条件からも二つの独立した変性温度 T_{M1} 、 T_{M2} をもつことが確認された(表 4-1)。 T_{M1} はおよそ 49 °C、 T_{M2} は 81 °C 付近から biotin の存在によって独立して 93 °C 付近へとシフトしていた。biotin 存在下で RA ドメインのみが独立して安定化するという様子が観測された。これらの結果から、融合された各部位は cSA 融合抗体と同様にそれぞれ独立して存在していることが示された。

Spy を介した二重特異性抗体について 2212-Spy、HP103A-Stag、Spy、Spyfull、2212-Spy-HP103A の熱安定性を測定した(表 4-1, 図 4-9B)。それぞれ変性温度は確認されたが 2212-Spy において Spy 由来の変性温度が確認されなかった。Spy 単体時の変性ピークは非常に小さく、緩やかなものであるため、融合抗体とした際はシャープな scFv 部位の変性ピークに引きずられる形になっていると考えられる。複合体形成時には 60 °C 及び 85 °C 付近に新たなピークが観測された。Spy の元となっている蛋白質は分子内結合のために非常に熱安定性が高いことが知られている⁸⁰。実際に Spyfull では 95 °C 付近のピークが観測された。そのため 85 °C 付近のピークが共有結合形成に由来する Spy 部位のピークであると考えられる。一方で 60 °C 付近のピークは、2212-Spy 時に Spy 由来のピークが観測されなかったことを考慮すると、Spy 部位の安定化に影響された 2212 部位なのではないかと推測される。

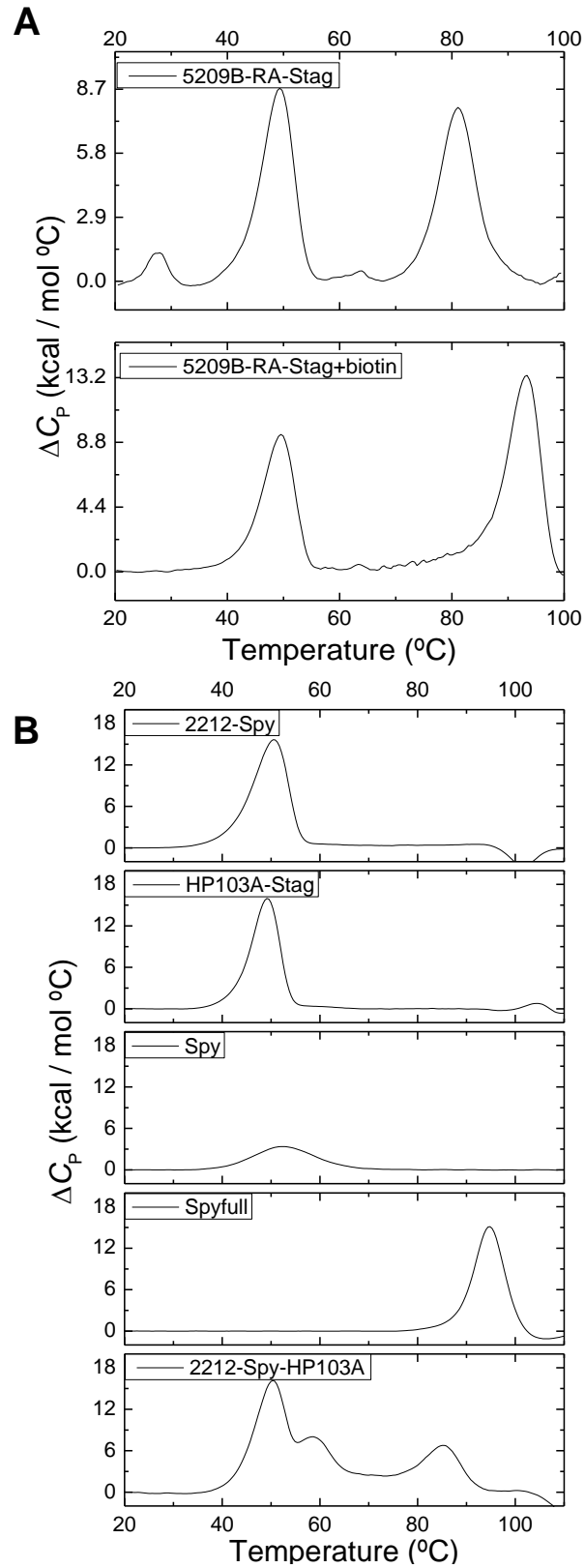


図 4-9. 各種蛋白質における DSC の結果

A: RA 融合抗体(5209B-RA-Stag), B: Spy 融合抗体及び Stag 融合抗体

buffer: PBS, 昇温速度 1 °C/min

表 4-1. 各種蛋白質における DSC 解析により得られた変性温度 T_M

A. RA 融合抗体(5209B-RA-Stag)

T_{M1} (°C)		T_{M2} (°C)	
biotin(-)	biotin(+)	biotin(-)	biotin(+)
48.8	48.9	80.9	92.5

B. Spy 融合抗体及び Stag 融合抗体

	T_{M1} (°C)	T_{M2} (°C)	T_{M3} (°C)
2212-Spy	50.9	-	-
HP103A-Stag	49.1	-	-
Spy	52.8	-	-
Spyfull	94.8	-	-
2212-Spy-HP103A	50.3	58.3	85.4

4-3-3 各種融合抗体の結合活性解析

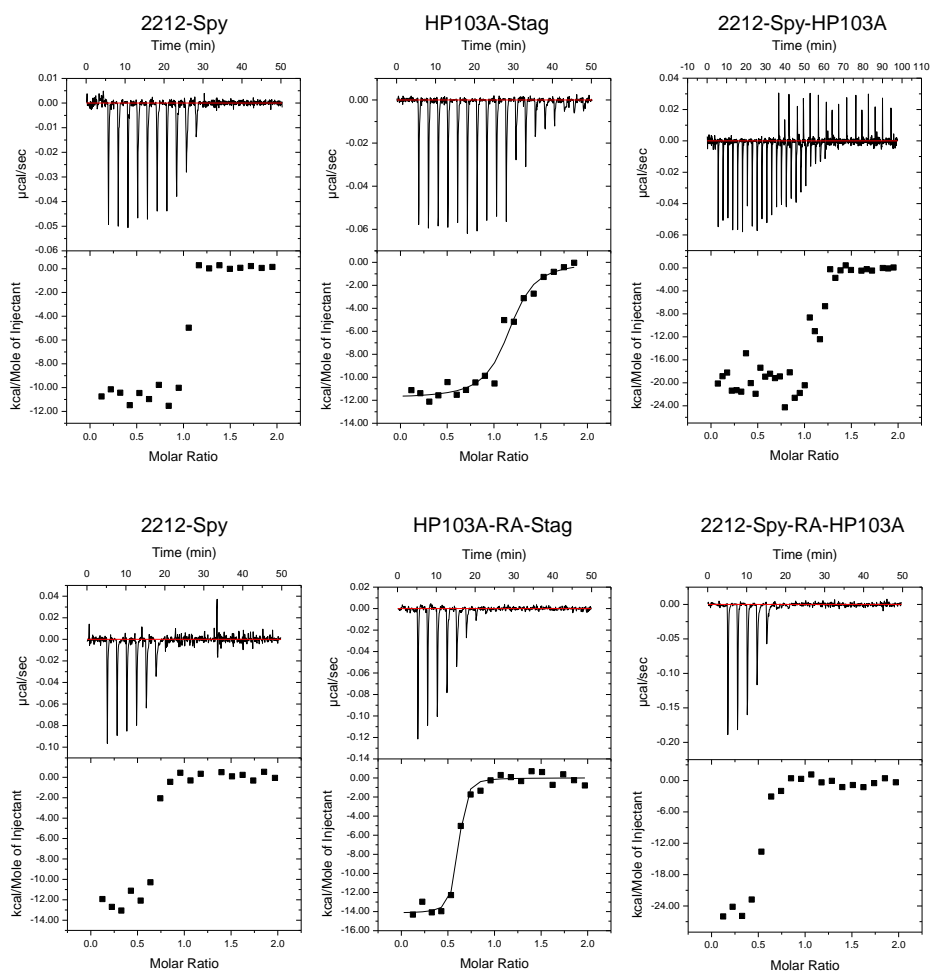
得られた各種融合抗体における抗原結合、biotin 結合について ITC を用いて解析した(図 4-10)。RA 融合抗体による二重特異性抗体の測定時は十分な蛋白質量を得るために、イオン交換クロマトグラフィーによる精製前のサンプルを用いて ITC 測定を行った。そのために、2212-Spy、HP103A-RA-Stag 共に活性が 100% ではない様子が観測された。ROBO1、biotin どちらの測定においても、滴定に従って結合熱による顕著なピークが生じる様子が観測された。scFv 部位は抗原である ROBO1 と、RA 部位は biotin と、それぞれ反応しているといえる。また、混合によって形成させた二重特異性抗体においても同様に結合が観測されたことから、scFv 部位は複合体形成後も結合能をもつと結論付けることができる。

ITC の測定結果から、熱力学的なパラメータを求めた(表 4-2)。2212scFv 単体は当研究グループの先行研究で解離定数が $K_D = 3.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ であることが示されている。これは ITC の測定限界に近いので、今回の結果においては正確な値を求めるには至っていないが、ほぼ測定限界に近い結合を 2212 部位が保持していると示された(図 4-10A)。一方、HP103A 部位についても当研究グループの先行研究($K_a = 3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)とほぼ同等の結合を保持していたと示された。そして混合することで形成された二重特異性抗体である 2212-Spy-HP103A についても結合が観測された。量論比 N に注目すると複合体形成後も N はほぼ 1 であり、二重特異性によって二点で ROBO1 を認識する際に、立体障害が生じていないということが示唆された(表 4-2)。結合定数は 2212 部位の影響もあり、正確な値を求めるには至っていない。反応熱である ΔH_{bind} に注目すると 2212 単体時では -11 kcal/mol、HP103A 単体時では -12 kcal/mol であったものが複合体を形成した際には -20 kcal/mol になり、結合エンタルピーに加算性が見られた。この結果も量論比と同じく、二重特異性抗体 2212-Spy-HP103A がもつそれぞれの抗原結合部位が独立して結合に関

与するというを示している。以上のことから、Spy によるタグシステムを介した二重特異性抗体の構築に成功したと結論付けることができる。

RA 融合抗体についても同様に熱力学的パラメータをもとめた(表 4-2)、RA 部位は cSA と同様に ITC の測定限界を超える非常に強固な biotin 結合($K_d > 10^{10} \text{ M}^{-1}$)を保持しており(図 4-10B)、結合エンタルピーは-17 kcal/mol であった。量論比である N は 0.57 であり、約半分が失活してしまっていると考えられる。同様に抗原結合に関しても N は 0.57 であった。2212-Spy と複合体を形成した際に抗原結合の量論比は大きく変化はしなかった($N = 0.49$)。更に結合エンタルピー ΔH_{bind} に注目すると 2212 単体時では-12 kcal/mol、HP103A-RA 時では-14 kcal/mol であるものが 2212-Spy-RA-HP103A となることで-26 kcal/mol となっており、結合エンタルピーについて加算性が見られた。以上の結果から、RA 融合抗体を用いた場合にも問題なく二重特異性抗体を構築することに成功したと結論付けられる。量論比に大きく変化がなかったことから、四量体化により四価となった cSA 融合抗体と比べ、二重特異性によって二点認識、二価抗体となっている RA 融合二重特異性抗体は立体障害の影響も抑えられていると期待される。

A



B

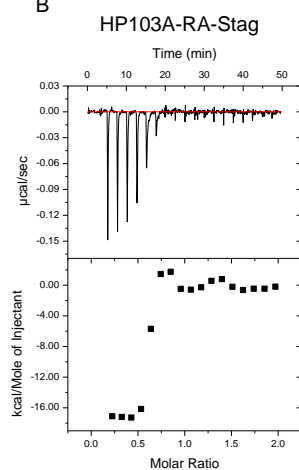


図 4-10. 各種融合抗体における ITC の結果
A: ROBO1 結合, B: biotin 結合
セル: 各種融合抗体, シリンジ: ROBO1 または biotin
buffer: PBS

表 4-2. 各種融合抗体における ITC の結果

A. ROBO1 結合

	ROBO1		
	量論比(<i>N</i>)	K_a (M^{-1})	ΔH_{bind} (kcal/mol)
2212-Spy	1.0	n.d.	-11
HP103A-Stag	1.1	2.0×10^7	-12
2212-Spy-HP103A	1.1	n.d.	-20
2212-Spy	0.64	n.d.	-12
HP103A-RA-Stag	0.57	7.7×10^7	-14
2212-Spy-RA-HP103A	0.49	n.d.	-26

n.d. = not determined

B. biotin 結合

	biotin	
	量論比(<i>N</i>)	ΔH_{bind} (kcal/mol)
HP103A-RA-Stag	0.57	-17

4-3-4 各種融合抗体における avidity 効果の検討

各種融合抗体の固定化した抗原に対する結合について詳細に解析するために BLI によって測定を行った。2212-Spy と HP103A-Stag は混合させない状態では一価の scFv とみなすことができる。HP103A-RA-Stag、2212-Spy-HP103A、及び 2212-Spy-RA-HP103A の結合と解離の様子を一価である 2212-Spy、HP103A-Stag と比較した。測定の結果、どの融合抗体においても ROBO1 を固定化したセンサーチップ上における結合と解離に起因すると思われる干渉光の変化が観測された(図 4-11)。

その結合と解離について詳細に解析を行った(表 4-3)。HP103A-Stag では単体の scFv による速い結合と解離の様子が観測された。解離が早く、前章の結果と同じく非特異吸着のようなベースラインの増大が見られ、1:1 フィットtingを正確に行うことができなかった。平衡値解析よりその解離定数は $K_D = 5.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ となっていた。2212-Spy 単体の解離は遅く、1:1 フィットtingによって結合速度定数 k_{on} と解離速度定数 k_{off} を求めることができた。 $k_{\text{on(obs)}} = 2.6 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ 、 $k_{\text{off(obs)}} = 8.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_D = 3.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ であり、先行研究や ITC の結果とほぼ一致していた。

HP103A-RA-Stag、2212-Spy-HP103A、及び 2212-Spy-RA-HP103A においては解離が遅くなっていることが明らかとなった(表 4-3, 図 4-11)。特に二重特異性抗体となっている 2212-Spy-HP103A、2212-Spy-RA-HP103A においては解離がほぼ見られず、その見かけの解離定数はそれぞれ $1.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $2.6 \times 10^{-11} \text{ M}$ にまで達していた。一つの抗原を二点以上で認識する抗体の avidity 効果による顕著な結合活性の増大が確認された。

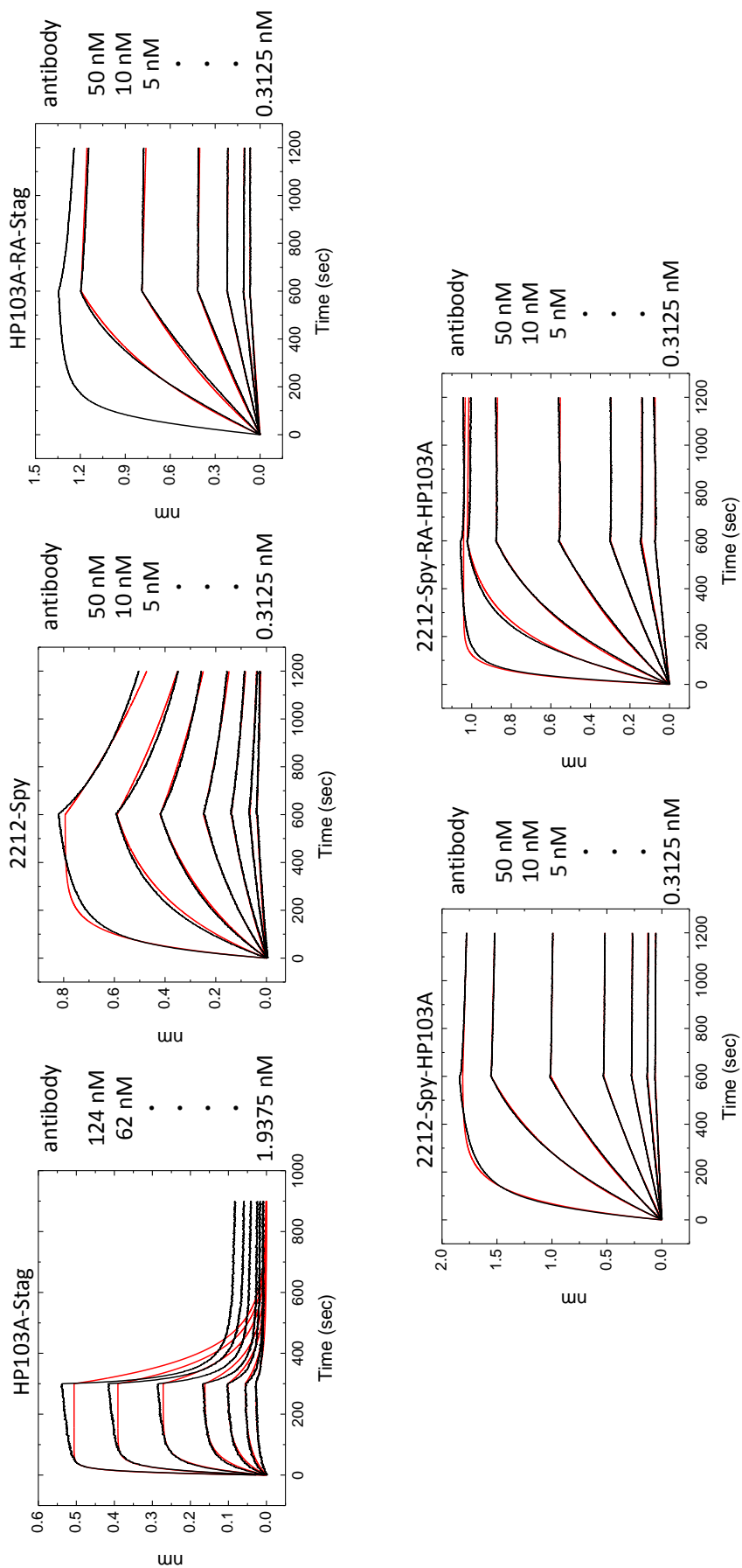


図 4-11. 各種融合抗体における BLI の結果
 リガンド: ROBO1, アナライト: 各種融合抗体
 buffer: PBS-T

表 4-3. 各種融合抗体における BLI の結果

	$k_{\text{on(obs)}} \text{ (Ms}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{off(obs)}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_{\text{D(obs)}} \text{ (M)}$
2212-Spy	2.6×10^5	8.7×10^{-4}	3.3×10^{-9}
HP103A-Stag	n.d.	n.d.	5.0×10^{-8}
HP103A-RA-Stag	2.1×10^5	5.6×10^{-5}	2.6×10^{-10}
2212-Spy-HP103A	2.4×10^5	3.3×10^{-5}	1.4×10^{-10}
2212-Spy-RA-HP103A	5.2×10^5	1.3×10^{-5}	2.6×10^{-11}

n.d. = not determined

4-4 結言

本章では Spy と Stag を用いたタグシステムによって高機能化を目指した新規二重特異性抗体構築システムを考案し、実際の構築と解析を行った。二重特異性抗体に関する報告は今までに数多く存在するが、一つの抗原に対する二重特異性という点での解析例は多くはなかった。本章は一つの抗原に対する二重特異性抗体について構築し、詳細な熱力学的解析を行ったものであり、その意義は非常に大きいものである。

大腸菌を用いた発現、及び巻き戻しによって各種融合抗体を精製することができた。巻き戻しの最終精製であるサイズ排除クロマトグラフィーの後にイオン交換クロマトグラフィーを行うことで更に純度を上げることに成功した。

しかし、RA 融合抗体に関しては発現量、純度はまだ改善の余地があるといえるだろう。それは RA 融合抗体の解析結果から特に示唆されている。熱安定性解析より、RA 部位の変性温度は biotin 非存在下で 81 °C 付近であった(表 4-1)。また ITC における結合エンタルピーは-17 kcal/mol であった(表 4-2)。一方で、過去の文献値では RA は biotin 非存在下にて変性温度は 74.8 °C であり、ITC における結合エンタルピーは-27 kcal/mol であった¹⁰。熱安定性の変化は融合抗体化に起因することが予想されるが、結合エンタルピーに関しては精製に起因する RA 部位の状態の変化を強く示唆している。RA は二量体 avidin としてジスルフィド結合をもつ点が特徴としてあげられる²⁰。このジスルフィド結合が、巻き戻し時に何らかの影響を受けたために、結合に影響が出ているのではないかと考えられる。しかし、biotin 結合は ITC の測定限界を超える状態で保持されており、DSC における安定性も十分に高いといえる。強固な二量体を保持しつつ、scFv 部位から独立して存在する biotin 結合部位として問題なく機能していると結論付けることができる。

ITC における RA 融合抗体 HP103A-RA-Stag の解析結果より、RA 部位と scFv 部位の結合の際の量論比 N はほぼ同じ 0.5 程度であった(表 4-2)。失活によるものであると考

えられるが BLI における測定の結果より、解離速度は二量体化によって大きく低下していることが示された(表 4-3)。その解離のセンサグラムの形から、単量体の顕著な影響なども見られなかった(図 4-11)。cSA 融合抗体の時に見られた立体障害による ITC 上の見かけの失活は二量体である RA 融合抗体においては生じていないと推察された。

熱安定性解析の結果より Spy 融合抗体は、cSA 融合抗体、RA 融合抗体と異なり、それぞれの部位が完全には独立していない可能性が示唆された(図 4-9B)。しかし、一番不安定な部位である scFv 部位が不安定化するという現象は見られなかった。そのため、Spy 融合抗体は問題なく応用できると考えられる。更に、Stag による複合体形成によって Spy 部位は大きく安定化することが示唆されているので、複合体形成時には問題なく使用できるものと考えられる。

混合させることによって形成された各種二重特異性抗体は抗原結合能を保持していた。二重特異性抗体形成前後の量論比及び結合エンタルピーの比較から 2212、HP103A の両結合部位が同時に ROBO1 に対して結合していることが示された (表 4-2, 図 4-10A)。更に今回構築された二重特異性抗体 2212-Spy-HP103A、2212-Spy-RA-HP103A は顕著な avidity 効果を示していた(表 4-3, 図 4-11)。これらの結果から本章において、タグシステムを用いた二重特異性抗体の形成に成功したと結論付けることができる。

このシステムは細菌由来の蛋白質である Spy を用いているために免疫原性が懸念される。しかし、第 2 章において有用性を検証したシミュレーションによる変異導入や、仮説として提案した電荷や水素結合を保持した変異を表面に導入する、といった手法を適用することで低免疫原性化 Spy を構築することが可能であると期待される。

本章で構築された二重特異性抗体形成システムは、biotin 結合部位も導入可能であり、多量体化や二重特異性による avidity 効果を活かすことができると示された。Spy を用いたこのシステムが今後様々な応用を経て、二重特異性抗体やプレターゲティング法という分野に貢献することが期待される。

第 5 章

細胞を用いた in vitro 系での融合抗体 アッセイ

5-1 緒言

前章において、Spy と Stag を用いたタグシステムによる抗 ROBO1 二重特異性抗体構築を完了した。本章では、このタグシステムの汎用性を示すために、ROBO1 の他にもう一つ別種の抗原を認識する抗体を融合させた二重特異性抗体を構築し、結合について評価した。そして前章までに構築してきた融合抗体と共に細胞を用いたアッセイを行った。

もう一種の抗体として C-C chemokine receptor type5 (CCR5) というケモカイン受容体の N 末端のループに存在するペプチド配列において、Tyr が硫酸化されていないもの (CCR5Tag) のみを認識する抗体である α CCR5 を用いた。この CCR5Tag は生体内に存在する配列であるために抗原性が低く、また、生体内では通常は Tyr が硫酸化されている。そのため、硫酸化されていないペプチド配列である CCR5Tag のみに結合する α CCR5 はプレターゲット法法の担体としての期待が高い。

この α CCR5 について RA 融合抗体 α CCR5-RA-Stag を構築し、前章でも用いた 2212-Spy との二重特異性抗体を構築して解析を行った。そして結合について BLI を用いて評価した後、前章までに構築した抗体とともに細胞を用いたアッセイを行った。

5-2 実験手法

5-2-1 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の調製

【ベクター構築】

発現ベクターは pRA2 ベクターを用いた。 α CCR5 の配列については当研究室卒業生 中木戸 誠 博士、当研究室 秋葉 宏樹 特任研究員によって構築されたベクターを鋳型として用いた。

α CCR5 の配列を基に以下のプライマーを用いて増幅した後、前章に用いた 5209B-RA-Stag 発現ベクターに導入した。

α CCR5

Forward primer : 5'- NNNNCCATGGCAGAGGTACAGCTTC -3 '

Reverse primer : 5'- NNNNCCGCGGCTTTTATTTCCAG -3 '

反応液、反応条件は先述したものと同一であり、後の反応も先述した手法に準じてベクター構築を行った。以下にそのベクター配列を示す(図 5-1)

【大腸菌による大量発現、巻き戻し】

α CCR5-RA-Stag は前章と同様に大腸菌による培養を行った。巻き戻しは第 4 章【大腸菌による大量発現、巻き戻し】による手法に準拠してサイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製を行った。

得られた α CCR5-RA-Stag は PBS にて 4 °C、終夜透析して buffer 置換を行った。必要に応じて 2212-Spy と α CCR5-RA-Stag を濃度比 1:1 になるように混合し、目的となる二重特異性抗体形成反応を 4 °C にて終夜行った。

αCCR5-RA-Stag

```

10      20      30      40      50      60
ATGGCAGAGGTACAGCTTCAGCAATCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTG
M A E V Q L Q Q S G A E L V R P G T S V

70      80      90      100     110     120
AAGATGTCCTGCAAGGCTGCTGGATACACCTTCACTAAATACTGGATAGGTTGGGTAAAG
K M S C K A A G Y T F T K Y W I G W V K

130     140     150     160     170     180
CAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTCACCCCTGGAAGTTTTTATAGT
Q R P G H G L E W I G D I H P G S F Y S

190     200     210     220     230     240
AACTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACA
N Y N E K F K G K A T L T A D T S S S T

250     260     270     280     290     300
GCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGA
A Y M Q L S S L T S E D S A I Y Y C A R

310     320     330     340     350     360
GACTACTATACTAATTACGGGGACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCGGCC
D Y Y T N Y G D W G Q G T S V T V S S A

370     380     390     400     410     420
GGCGGGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGGTCGGGCGGGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGGTCG
G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G

430     440     450     460     470     480
GATATCGTGATGACGCAGGCTGACCCCTCTGTATCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCC
D I V M T Q A A P S V S V T P G E S V S

490     500     510     520     530     540
ATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGGAATGGCAACACTTACTTGTTTTGG
I S C R S S K S L L H R N G N T Y L F W

550     560     570     580     590     600
TTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGCCAACCTTGCC
F L Q R P G Q S P Q L L I Y R M S N L A

610     620     630     640     650     660
TCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGAAGTCTTTCACACTGAGAATC
S G V P D R F S G S G S G T A F T L R I

670     680     690     700     710     720
AGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCT
S R V E A E D V G V Y Y C M Q H L E Y P

730     740     750     760     770     780
TATACGTTTCGGATCGGGACCAAACTGGAATAAAAGCCGCGGTAGCAGCGGTAGCGGT
Y T F G S G T K L E I K A A G S S G S G

790     800     810     820     830     840
AGCTTTGATGCAAGCAACTTTAAAGATTTTAGCAGCATTGCAAGCGCAAGCAGCAGCTGG
S F D A S N F K D F S S I A S A S S S W

850     860     870     880     890     900
CAGAATCAGACGCGTAGCACCATGATTATTCAGGTTGATAGCTTTGGTAATGTGAGCGGT
Q N Q S G S T M I I Q V D S F G N V S G

910     920     930     940     950     960
CAGTATGTTAATCGTGACAGGGCACCAGTTGTGAGAATAGCCCGTATCCGCTGACCAGT
Q Y V N R A Q G T G C Q N S P Y P L T G

970     980     990     1000    1010    1020
CGTGTTAATGGCACCTTTATTGCATTTAGCGTGGGTGGAATAATAGCACCGAAAATTGT
R V N G T F I A F S V G W N N S T E N C

1030    1040    1050    1060    1070    1080
AATAGCGCCACCGGTTGGACCGGTTATGCACAGGTTAATGGTAATAATACCGAAATTGTG
N S A T G W T G Y A Q V N G N N T E I V

1090    1100    1110    1120    1130    1140
ACCGCTGGAATCTGGCCTATGAAGGTGGTAGCGGTCCGGCAATTGAACAGGGTCAGGAT
T S W N L A Y E G G S G P A I E Q G Q D

1150    1160    1170    1180    1190    1200
ACCTTTTCAGTATGTGCCGACCCAGCAAAAACAAAGCCTGCTGAAAGATGGTGGTGGTGGC
T F Q Y V P T T E N K S L L K D G G G G

1210    1220    1230    1240    1250    1260
AGCGGTGGTGGCGGTAGCGCACATATTGTTATGGTTGATGCATATAACCGACCAAAGGG
S G G G G S A H I V M V D A Y K P T K G

1270    1280    1290
GCCCGTCACCATCATCACCACCAT
A R H H H H H H

```

図 5-1. αCCR5-RA-Stag の遺伝子配列

5-2-2 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の機能解析

各抗体の結合について BLI によって解析を行った。測定は Octet RED 384 システムを用いて行った。融合抗体、ROBO1、及び GFP-CCR5Tag は PBS にて 4 °C、終夜透析を行ったものを使用した。GFP-CCR5Tag は当研究室 宮鍋 一紘 氏が調製したものを用いた。Amine Reactive 2nd Generation (AR2G)チップを用いて、アナライトとして ROBO1、または GFP-CCR5Tag を固定化して測定を行った。ROBO1 は 5 µg/ml、10 mM acetate buffer, pH 6.0 の条件下で固定化し、GFP-CCR5Tag は 5 µg/ml、10 mM acetate buffer, pH 4.0 の条件下で固定化した。buffer は PBS-T を用いて、攪拌速度 1000 rpm、測定温度は 29 °C にて測定した。7 段階の濃度のアナライト (α CCR5-RA-Stag, 2212-Spy-RA- α CCR5 共に 37 nM 1 点、7.4 nM より 2 倍希釈列 6 点)を用いて結合と解離を測定した。ROBO1 または GFP-CCR5Tag を固定化後、buffer に対する挙動を測定したものをコントロールとして用いた。得られたセンサグラムからコントロールを差引して Octet システム付属のソフトウェアにて解析した。速度論的パラメータを算出するために 1:1 結合であると仮定してフィッティングを行った。その際、フィッティングの精度を上げるため、一部データを除外する処理を行った。

5-2-3 cell-ELISA による結合強度の検証

2212-Spy-RA- α CCR5、及び前章までに構築した融合抗体の細胞上における結合について cell-ELISA によって解析を行った。融合抗体は PBS にて透析したものを使用した。

細胞は本学先端科学技術研究センター 岩成 宏子 特任助教、新井 修 特任研究員らによって樹立された ROBO1 発現 Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞、及び ROBO4 発現 CHO 細胞を用いた。培養は Ham-F12 培地(Life Technologies, Tokyo, Japan)に 10% fetal bovine serum 及び 1% (終濃度はそれぞれ 100 U/ml, 100 μ g/ml) Penicillin-Streptomycin (Life Technologies, Tokyo, Japan)を添加したものをを用いて行った。細胞の選別は終濃度 333 μ g/ml となるように hygromycin B (Life Technologies, Tokyo, Japan)を添加して行った。

Cell dissociation buffer (Life Technologies, Tokyo, Japan)によって回収、懸濁した細胞をそれぞれ BD BioCoat™ Poly-D-Lysine Cellware Plates, 96 Well, Clear (Becton Dickinson, Bedford, MA)に各 well 2×10^5 cells となるように 100 μ l ずつ分注し、室温にて 2000 rpm、1 min 遠心することで固定化した。上清を除去後 0.005% proclin 300 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 40% Block Ace (Dainippon Pharma, Osaka, Japan)含有 Tris buffered saline (TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6 at room temperature) (40% BA buffer)を 50 μ l 加えて室温にて 30 min ブロッキングを行った。ブロッキング後、上清を除去し 40% BA buffer によって濃度調整を行った各抗体を加えて室温にて 1 h 静置して一次反応を行った。その後 0.05% Tween 20 含有 Saline (0.9 w/v % NaCl)にて 2 回洗浄操作を行い、0.005% procline 300, 10% Block Ace 含有 TBS (10% BA buffer)を用いて 3 μ g/ml になるよう濃度調整した Anti-His-Tag mouse IgG (code No. D291-3, MBL, Nagoya, Japan)を 50 μ l 加えて室温にて 30 min 静置して二次反応を行った。再び 0.05% Tween 20 含有 Saline にて 2 回洗浄操作を行い、HP103A-Stag、2212-Spy、5209BscFv-cSA414 の測定においては 0.8 μ g/ml、その他の抗体の測定においては 0.267 μ g/ml となるように 10% BA buffer にて濃度調整した Peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse F(ab')₂ (code No. 115-036-071, Jackson

ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)を 50 μ l 加えて室温にて 30 min 静置して三次反応を行った。0.05% Tween 20 含有 Saline にて 3 回、Saline にて 1 回洗浄操作を行い、TMB soluble reagent (Cosmobio, Tokyo, Japan)を 50 μ l 加えて暗所にて室温、30 min 静置して発色反応を行った。その後 TMB stop buffer (Cosmobio, Tokyo, Japan)を 50 μ l 加えて反応停止後、Biotrak II (GE Healthcare, Piscataway, NJ)にて 450 nm の吸光を測定した。各抗体それぞれ n = 3、一次反応は 3.16 倍希釈列 8 点の濃度において行った。

得られた各抗体のデータについて excel を用いて解析を行った。各濃度における吸光度を濃度に対してプロットし、回帰曲線である以下の式に最小二乗法を用いてフィッティングを行った。得られた値より、50%の反応強度を示す 50%効果濃度 EC₅₀ を求めた。

$$Y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{X}{EC_{50}}\right)^C}$$

Y は効果の度合い(吸光度)、X は薬剤濃度、A、B はそれぞれ測定値の最小値と最大値、そして C は勾配の最大値の絶対値を示す。

5-3 結果と考察

5-3-1 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の調製

大腸菌 Rosetta2 (DE3)を用いて発現した蛋白質は不溶性画分に発現していた。そのため、得られた不溶性画分を binding buffer 1 に懸濁して可溶化し、Ni-NTA Agarose を用いて金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。粗精製を確認した SDS-PAGE の結果を図に示した(図 5-2)。αCCR5-RA-Stag は 500 mM の imidazole 濃度で溶出された画分に目的物と思われる分子量付近のバンドが観測された。この画分を巻き戻しに用いた。

巻き戻し後の精製として 26/60 Superdex200 column によるサイズ排除クロマトグラフィーを行った(図 5-3)。得られたクロマトグラムでは巻き戻しによる夾雑物由来と思われるベースラインの増大が観測されてはいるが、αCCR5-RA-Stag の目的物と思われるメインピークがわずかに観測された。SDS-PAGE にて目的物であることを確認後、回収して以降の実験に用いた。

2212-Spy、αCCR5-RA-Stag を混合することで二重特異性抗体 2212-Spy-RA-αCCR5 を形成させた。共有結合形成反応が進み、SDS-PAGE において複合体となったことが確認された (図 5-4) 。しかし、反応せずに残ってしまった夾雑物のバンドが見られた。これはαCCR5-RA-Stag の純度が低いことによって Stag 部位が反応しないものが含まれてしまったと考えられる。

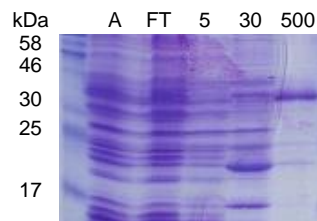


図 5-2. α CCR5-RA-Stag における
金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの結果
A: apply, FT: flow-through, 5-500 は溶出に用いた imidazole 濃度(mM)を示している。

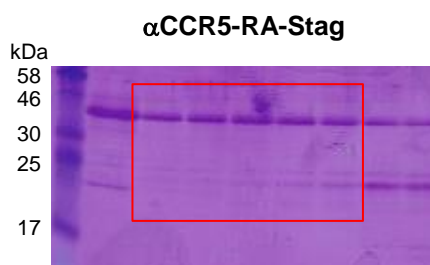
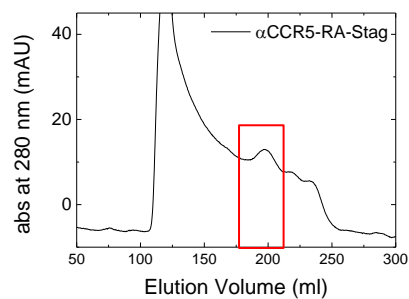


図 5-3. α CCR5-RA-Stag のサイズ排除クロマトグラフィーによる精製結果
column: 26/60 Superdex200 column, buffer: refolding buffer

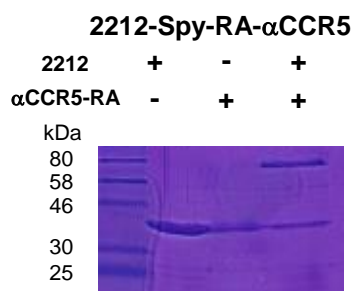


図 5-4. タグシステムによる二重特異性抗体形成反応についての SDS-PAGE 確認
buffer: PBS, 反応温度: 4 °C にて終夜反応させた。

5-3-2 二種の抗原を認識する二重特異性抗体の機能解析

α CCR5-RA-Stag、2212-Spy-RA- α CCR5 の結合について詳細に解析するために BLI によって測定を行った。測定の結果、 α CCR5-RA-Stag、2212-Spy-RA- α CCR5 共に ROBO1、または GFP-CCR5Tag を固定化したセンサーチップ上における結合と解離に起因すると思われる干渉光の変化が観測された(図 5-5)。

測定結果より 1:1 フィッティングによって見かけの結合速度定数と解離速度定数を求めることができた(表 5-1)。先行研究より α CCR5scFv の解離定数は $K_D = 4.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ と報告されている。 α CCR5-RA-Stag、2212-Spy-RA- α CCR5 は抗原である CCR5Tag に対して二価で結合しているために解離は遅くなっており、一価の scFv と比較して結合はより強固なものになっていることが明らかとなった。同様に、2212-Spy-RA- α CCR5 における 2212 部位についても二量体である RA 部位と Spy タグシステムを介して多量体を形成しているため、2212scFv 単体と比較して結合は強固なものになっていることが示された(表 5-1)。

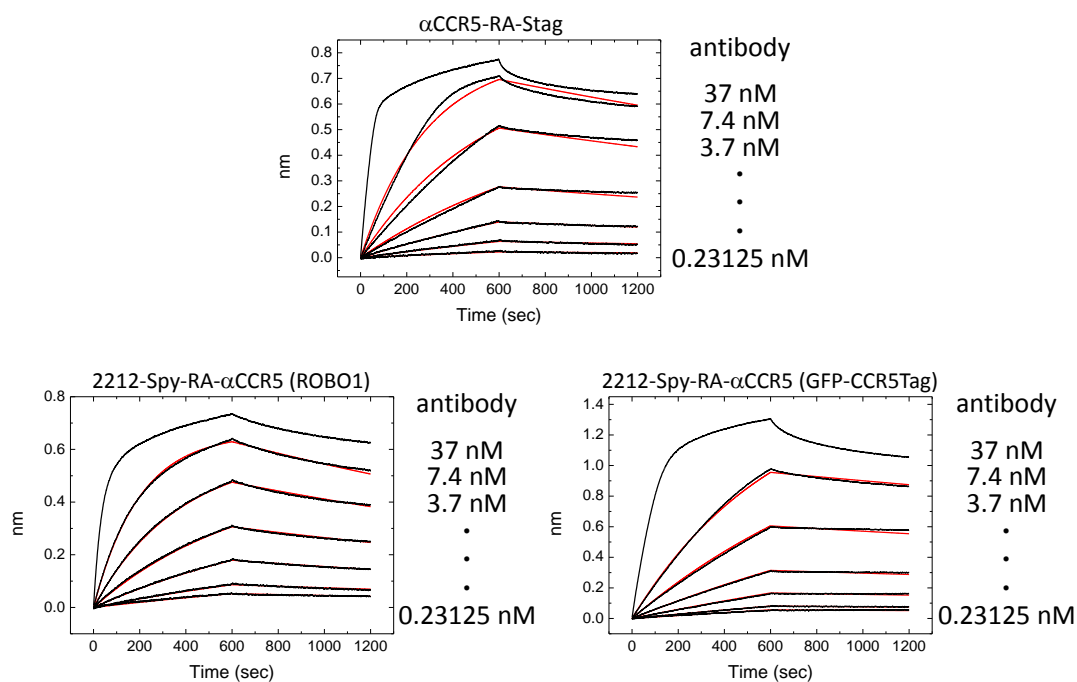


図 5-5. 各種融合抗体における BLI の結果
 リガンド: ROBO1 または GFP-CCR5Tag, アナライト: 各種融合抗体
 buffer: PBS-T

表 5-1. 各種融合抗体における BLI の結果

	$k_{\text{on(obs)}} \text{ (Ms}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{off(obs)}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_{\text{D(obs)}} \text{ (M)}$
αCCR-RA-Stag	4.4×10^5	2.6×10^{-4}	5.9×10^{-10}
2212-Spy-RA- αCCR5 (GFP-CCR5tag)	2.0×10^5	1.5×10^{-4}	7.5×10^{-10}
2212-Spy-RA- αCCR5 (ROBO1)	6.4×10^5	3.7×10^{-4}	5.7×10^{-10}

5-3-3 cell-ELISA による結合強度の検証

各種融合抗体について cell-ELISA による解析を行った。抗体の濃度を上げていくにしたがって、結合を示す吸光度の上昇が観測された(図 5-6)。しかし、HP103A-Stag においては結合が見られず、HP103A-RA-Stag においては結合している様子は見られたものの、測定濃度範囲内において結合反応が飽和している様子は見られなかった。

測定結果のフィッティングから EC_{50} を算出した(表 5-2)。多量体、二重特異性抗体を形成していくにつれて EC_{50} は小さな値となっていた。以上の結果より、avidity 効果は細胞上でも有効であると結論付けることができる。

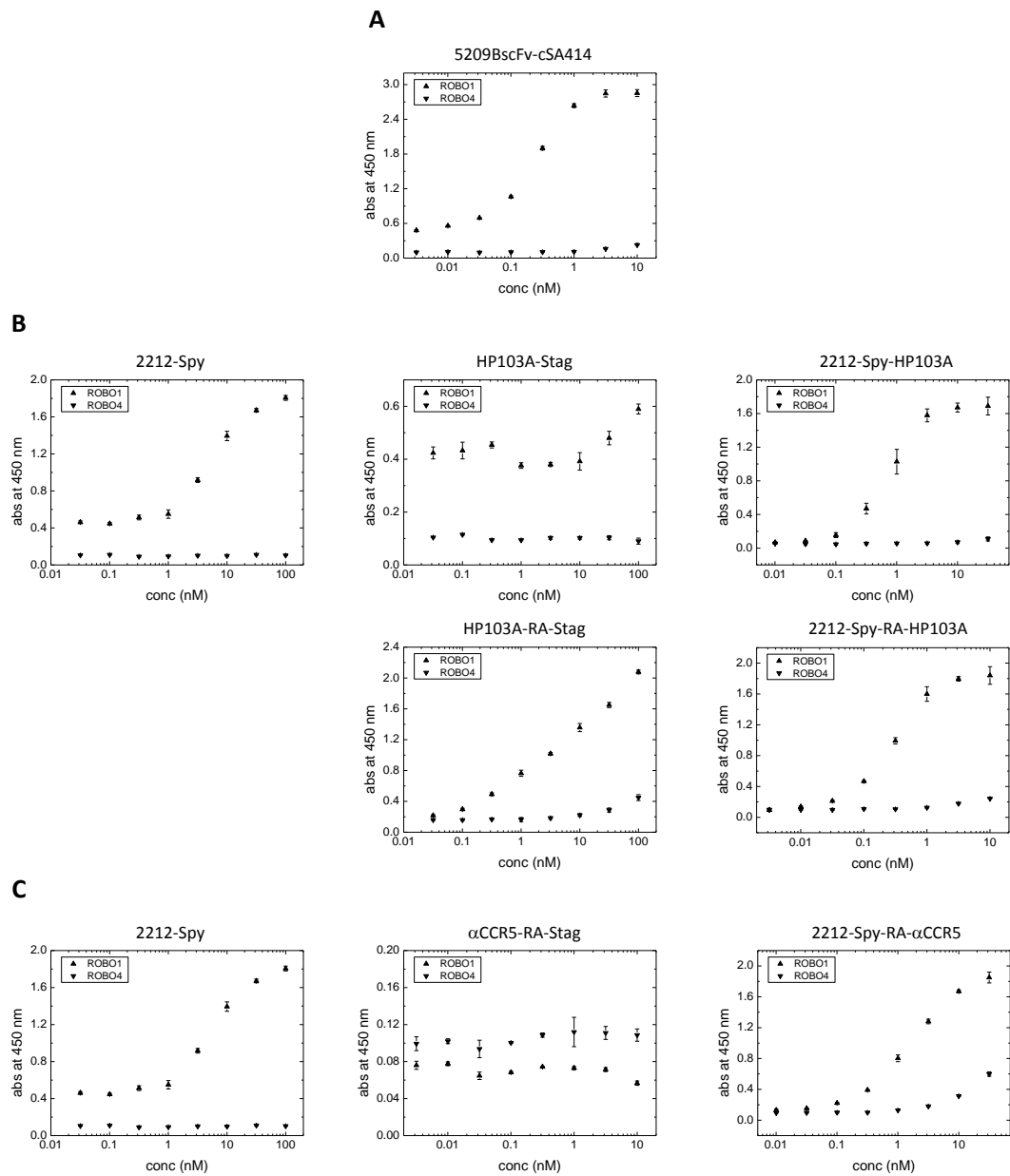


図 5-6. 各種融合抗体における cell-ELISA の結果
A: cSA 融合抗体, B: 抗 ROBO1 二重特異性抗体,
C: 抗 ROBO1-CCR5tag 二重特異性抗体(2212-Spy は B と同じ実験結果)
ROBO1 または ROBO4 を発現させた CHO 細胞を固定化して ELISA を行った。

表 5-2. 各種融合抗体における cell-ELISA の結果

	EC ₅₀ (nM)
5209BscFv-cSA414	0.24
2212-Spy	5.5
HP103A-Stag	n.d.
HP103A-RA-Stag	n.d.
2212-Spy-HP103A	0.72
2212-Spy-RA-HP103A	0.30
αCCR-RA-Stag	n.d.
2212-Spy-RA-αCCR5	1.8

n.d. = not determined

5-4 結言

本章において、肝臓癌特異的な抗原である ROBO1 と、プレターゲットイング法の輸送担体としても期待の高い CCR5Tag の両者に結合する二重特異性抗体を構築することに成功した。BLI の結果より両者に結合することが実際に示されており(図 5-5)、非常に期待の高い抗体を構築することに成功したといえる。

cell-ELISA により、本論文にて構築された各種融合抗体は細胞上でも avidity 効果によって強固な結合を形成することが示された(図 5-6)。しかし、HP103A 単体では細胞上での結合が見られず、HP103A-RA-Stag においては結合が飽和する様子が見られなかった。前章にて HP103A-Stag は解離が早い抗体であることが示されている(図 4-11)。cell-ELISA の結果は、一次反応による抗体結合後の操作によって解離の早い抗体が解離してしまうのではないかと示唆している。BLI における見かけの解離定数などで十分な強度があると想定される結合においても、操作によっては予想されるほどの強固な結合が観測されない可能性があるということを cell-ELISA の結果は示唆している。

しかし、HP103A-Stag、HP103A-RA-Stag は 2212-Spy と複合体を形成させることで強固な結合を細胞上で形成した(図 5-6)。他の抗体においても、cSA による四量体化、タグシステムによる二重特異性抗体化、多量体化によって EC_{50} が小さくなるという結果が得られた(表 5-2)。本論文にて構築された抗体が、プレターゲットイング法を目指す上で有力な抗体となることが期待される。

第 6 章

結論

抗体医薬は画期的な医薬品として注目され、盛んに研究されてきた。既に抗体医薬は数多く上市し、その力を発揮している。一方で、抗体分子そのものの医薬品としての研究が始まった比較的早い段階から、ミサイル療法などに代表される抗体による薬物輸送も期待され、研究されていた。しかし、現状上市している数は少なく、まだまだ実用化に向けて多くの課題を残しているといえる。本研究では、抗体を用いた薬物輸送法として期待されているプレターゲットイング法の実用化に向けた融合抗体を構築し、解析を行った。既存の cSA がもつ免疫原性という問題点を改善した変異体による融合抗体を構築し、熱力学的解析、及び細胞アッセイを通して、実用化に向けた抗体の有用性を検証した。更に、輸送のための新規の分子種として、タグシステムを介した二重特異性抗体形成システムを構築し、その有用性を熱力学的解析、及び細胞アッセイを通して検討することを試みた。

第 2 章では、シミュレーションを用いて構築された低免疫原性 cSA 変異体について ITC、DSC に代表される熱力学的解析を行い、有用性を実証した。熱安定性、化学的安定性や分子サイズについての違いを比較することで、蛋白質表面に露出した残基に導入された変異は、その電荷や水素結合に関与する官能基が元の残基と似ているために構造や機能の保持に貢献しているということを提案した。そして、それらの変異は蛋白質表面の残基を変化させるとともに、わずかに分子に緩みを与え、不安定化させることで低免疫原性化に貢献しているのではないかという提案を行うに至った。

第 3 章では、有用性が示された低免疫原性 cSA 変異体を用いて、肝臓癌特異的に発現する ROBO1 を抗原とする抗体 5209B を用いた融合抗体 scFv-cSA の構築を行った。この融合抗体についても ITC などの熱力学的解析を行い、有用性を検証した。その結果、リンカーによって遺伝子工学的に融合された scFv 部位と cSA 部位はそれぞれ独立して存在しており、各部位の結合が保持されていることが示された。cSA の四量体化に起因して scFv 部位には立体障害が生じていることが示唆されたが、scFv-cSA 一分子中に四

つの結合部位が存在することによって顕著な avidity 効果が生じていることが BLI の結果より示された。細胞上に存在する抗原に多点で結合し、解離しにくくなったことが示された scFv-cSA は、低免疫原性も獲得しており、プレターゲットイング法の有望な担体となることが期待される。

第 4 章では、現在盛んに研究され、有用な分子として期待されている二重特異性抗体について、Spy によるタグシステムを用いた新規の二重特異性抗体構築システムを提案した。前章までと同じく ROBO1 をターゲットとした抗体 HP103A、2212 を用いて、二重特異性抗体を構築することに成功した。biotin 結合部位として RA 部位を導入した二重特異性抗体の構築にも成功した。熱力学的解析によりそれぞれの scFv 部位が独立して結合に関与し、ROBO1 を多点で認識して結合していることを示した。多点認識によって、多量体化と同様に avidity 効果が生じることも示された。Spy タグシステムを用いた二重特異性抗体構築システムは、抗体の保存が可能な低温度域においても複合体を形成して二重特異性抗体となるため、有用性が高いといえる。更にこのシステムでは scFv 部位が確立されれば、融合させる抗体は自由に組み替えることが可能となるため、同一抗原の多点認識、抗体による二分子架橋など、様々な応用が可能となることが期待される。

第 5 章において、実際に抗体部位を変更し、ROBO1 に加えてもう一つ別の抗原としてペプチドタグである CCR5tag を認識する二重特異性抗体を構築した。実際にそれぞれの部位の結合が確認され、プレターゲットイング法の担体として有用性が示された。更に、本章までに構築された各種融合抗体について細胞上での結合を観測することに成功した。In vitro の系で示されていた avidity 効果が細胞上でも有効であり、顕著な結合活性を得たと結論付けることができた。

以上のことから本研究では 2 章、3 章を通じて、既存の cSA がもつ問題点を改善した融合抗体を提案し、4 章、5 章を通じて、新規の二重特異性抗体構築システムを提案し

たといえる。プレターゲティング法を実用化するための担体は今までにいくつか報告があるが、免疫原性や、薬物動態などの問題から上市に至ったものは現状存在していない。本研究によって提案された融合抗体が、これからの更なる検証を通じて、プレターゲティング法の実用化に貢献することを期待してやまない。

参考文献

1. Satoh M, Iida S, Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(11):1161-73.
2. Mori K, Iida S, Yamane-Ohnuki N, Kanda Y, Kuni-Kamochi R, Nakano R, Imai-Nishiya H, Okazaki A, Shinkawa T, Natsume A and others. Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology* 2007;55(2-3):109-14.
3. Igawa T, Ishii S, Tachibana T, Maeda A, Higuchi Y, Shimaoka S, Moriyama C, Watanabe T, Takubo R, Doi Y and others. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol* 2010;28(11):1203-7.
4. Asano R, Nakayama M, Kawaguchi H, Kubota T, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T and others. Construction and humanization of a functional bispecific EGFR \times CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J* 2012;279(2):223-33.
5. Lin Y, Pagel JM, Axworthy D, Pantelias A, Hedin N, Press OW. A genetically engineered anti-CD45 single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted radioimmunotherapy of hematologic malignancies. *Cancer Res* 2006;66(7):3884-92.
6. Deyev SM, Waibel R, Lebedenko EN, Schubiger AP, Plückthun A. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat Biotechnol* 2003;21(12):1486-92.
7. Green NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* 1990;184:51-67.
8. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 1991;37(5):625-36.
9. Leppiniemi J, Meir A, Kähkönen N, Kukkurainen S, Määttä JA, Ojanen M, Jänis J, Kulomaa MS, Livnah O, Hytönen VP. The highly dynamic oligomeric structure of bradavidin II is unique among avidin proteins. *Protein Sci* 2013;22(7):980-94.
10. Helppolainen SH, Nurminen KP, Määttä JA, Halling KK, Slotte JP, Huhtala T, Liimatainen T, Ylä-Herttua S, Airene KJ, Närvänen A and others. Rhizavidin from *Rhizobium etli*: the first natural dimer in the avidin protein family. *Biochem J* 2007;405(3):397-405.
11. Chalet L, Wolf FJ. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch Biochem Biophys* 1964;106:1-5.

12. González M, Bagatolli LA, Echabe I, Arrondo JL, Argaraña CE, Cantor CR, Fidelio GD. Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding. *J Biol Chem* 1997;272(17):11288-94.
13. González M, Argaraña CE, Fidelio GD. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng* 1999;16(1-4):67-72.
14. Chivers CE, Crozat E, Chu C, Moy VT, Sherratt DJ, Howarth M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nat Methods* 2010;7(5):391-3.
15. Chivers CE, Koner AL, Lowe ED, Howarth M. How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J* 2011;435(1):55-63.
16. Kurzban GP, Bayer EA, Wilchek M, Horowitz PM. The quaternary structure of streptavidin in urea. *J Biol Chem* 1991;266(22):14470-7.
17. Bayer EA, Ben-Hur H, Hiller Y, Wilchek M. Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochem J* 1989;259(2):369-76.
18. Schechter B, Arnon R, Colas C, Burakova T, Wilchek M. Renal accumulation of streptavidin: potential use for targeted therapy to the kidney. *Kidney Int* 1995;47(5):1327-35.
19. Laitinen OH, Hytönen VP, Nordlund HR, Kulomaa MS. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(24):2992-3017.
20. Meir A, Helppolainen SH, Podoly E, Nordlund HR, Hytönen VP, Määttä JA, Wilchek M, Bayer EA, Kulomaa MS, Livnah O. Crystal structure of rhizavidin: insights into the enigmatic high-affinity interaction of an innate biotin-binding protein dimer. *J Mol Biol* 2009;386(2):379-90.
21. Lim KH, Huang H, Pralle A, Park S. Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnol Bioeng* 2013;110(1):57-67.
22. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998;392(6679 Suppl):5-10.
23. Zalipsky S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995;16(2-3):157-182.
24. Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(2):169-90.
25. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 1998;34(8):1274-81.

26. Adams GP, Schier R. Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods* 1999;231(1-2):249-60.
27. Goodwin DA, Meares CF, McCall MJ, McTigue M, Chaovapong W. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J Nucl Med* 1988;29(2):226-34.
28. Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J, Boerman O, Sharkey RM. Cancer Imaging and Therapy with Bispecific Antibody Pretargeting. *Update Cancer Ther* 2007;2(1):19-31.
29. Schultz J, Lin Y, Sanderson J, Zuo Y, Stone D, Mallett R, Wilbert S, Axworthy D. A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy. *Cancer Res* 2000;60(23):6663-9.
30. Cheung NK, Modak S, Lin Y, Guo H, Zanzonico P, Chung J, Zuo Y, Sanderson J, Wilbert S, Theodore LJ and others. Single-chain Fv-streptavidin substantially improved therapeutic index in multistep targeting directed at disialoganglioside GD2. *J Nucl Med* 2004;45(5):867-77.
31. Knox SJ, Goris ML, Tempero M, Weiden PL, Gentner L, Breitz H, Adams GP, Axworthy D, Gaffigan S, Bryan K and others. Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):406-14.
32. Yao Z, Zhang M, Kobayashi H, Sakahara H, Nakada H, Yamashina I, Konishi J. Improved targeting of radiolabeled streptavidin in tumors pretargeted with biotinylated monoclonal antibodies through an avidin chase. *J Nucl Med* 1995;36(5):837-41.
33. Paganelli G, Magnani P, Zito F, Villa E, Sudati F, Lopalco L, Rossetti C, Malcovati M, Chiolerio F, Seccamani E. Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res* 1991;51(21):5960-6.
34. He J, Liu G, Gupta S, Zhang Y, Ruscowski M, Hnatowich DJ. Amplification targeting: a modified pretargeting approach with potential for signal amplification-proof of a concept. *J Nucl Med* 2004;45(6):1087-95.
35. Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6(10):1421-31.
36. Goldenberg DM, Sharkey RM, Paganelli G, Barbet J, Chatal JF. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol* 2006;24(5):823-34.

37. Kipriyanov SM, Little M, Kropshofer H, Breitling F, Gotter S, Dübel S. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng* 1996;9(2):203-11.
38. Paganelli G, Chinol M, Maggiolo M, Sidoli A, Corti A, Baroni S, Siccardi A. The three-step pretargeting approach reduces the human anti-mouse antibody response in patients submitted to radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. *European Journal of Nuclear Medicine* 1997;24(3):350-351.
39. Förster GJ, Santos EB, Smith-Jones PM, Zanzonico P, Larson SM. Pretargeted radioimmunotherapy with a single-chain antibody/streptavidin construct and radiolabeled DOTA-biotin: strategies for reduction of the renal dose. *J Nucl Med* 2006;47(1):140-9.
40. Cao Y, Lam L. Bispecific antibody conjugates in therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(2):171-97.
41. Kufer P, Lutterbüse R, Baeuerle PA. A revival of bispecific antibodies. *Trends Biotechnol* 2004;22(5):238-44.
42. Neri D, Momo M, Prospero T, Winter G. High-affinity antigen binding by chelating recombinant antibodies (CRAbs). *J Mol Biol* 1995;246(3):367-73.
43. Rossi EA, Goldenberg DM, Chang CH. The dock-and-lock method combines recombinant engineering with site-specific covalent conjugation to generate multifunctional structures. *Bioconjug Chem* 2012;23(3):309-23.
44. Kodama T, Hamakubo T, Doi H, Sugiyama A, Tsumoto K (2010) Hypo-immunogenic streptavidin and use thereof. International Patent Application WO/2010/095455 (August 26, 2010).
45. Meyer DL, Schultz J, Lin Y, Henry A, Sanderson J, Jackson JM, Goshorn S, Rees AR, Graves SS. Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci* 2001;10(3):491-503.
46. Freitag S, Le Trong I, Klumb L, Stayton PS, Stenkamp RE. Structural studies of the streptavidin binding loop. *Protein Sci* 1997;6(6):1157-66.
47. Subramanian N, Adiga PR. Mapping the common antigenic determinants in avidin and streptavidin. *Biochem Mol Biol Int* 1997;43(2):375-82.
48. Desmet J, Spriet J, Lasters I. Fast and Accurate Side-Chain Topology and Energy Refinement (FASTER) as a new method for protein structure optimization. *Proteins-Structure Function and Genetics* 2002;48(1):31-43.

49. Desmet J, Meersseman G, Boutonnet N, Pletinckx J, De Clercq K, Debulpaep M, Braeckman T, Lasters I. Anchor profiles of HLA-specific peptides: Analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 2005;58(1):53-69.
50. Kapoerchan V, Wiesner M, Hillaert U, Drijfhout J, Overhand M, Alard P, van der Marel G, Overkleeft H, Koning F. Design, synthesis and evaluation of high-affinity binders for the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Molecular Immunology* 2010;47(5):1091-1097.
51. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 2003;28(1):1-8.
52. Arakawa T, Tsumoto K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(1):148-52.
53. Wittgren B, Wahlund K-G. Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering. *Journal of Chromatography* 1997;760:205-218.
54. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 1989;179(1):131-7.
55. Laitinen OH, Airene KJ, Marttila AT, Kulik T, Porkka E, Bayer EA, Wilchek M, Kulomaa MS. Mutation of a critical tryptophan to lysine in avidin or streptavidin may explain why sea urchin fibropellin adopts an avidin-like domain. *FEBS Lett* 1999;461(1-2):52-8.
56. Laroche Y, Heymans S, Capaert S, De Cock F, Demarsin E, Collen D. Recombinant staphylokinase variants with reduced antigenicity due to elimination of B-lymphocyte epitopes. *Blood* 2000;96(4):1425-32.
57. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta E. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting Cells determines antigen fate. *Science* 2005;307(5715):1630-1634.
58. Delamarre L, Couture R, Mellman I, Trombetta ES. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med* 2006;203(9):2049-55.
59. Arancibia S, Del Campo M, Nova E, Salazar F, Becker M. Enhanced structural stability of Concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *European Journal of Immunology* 2012;42(3):688-699.

60. Mateu MG. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* 1995;38(1):1-24.
61. Vaswani SK, Hamilton RG. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81(2):105-15; quiz 115-6, 119.
62. Nagata S, Pastan I. Removal of B cell epitopes as a practical approach for reducing the immunogenicity of foreign protein-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(11):977-85.
63. Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A. Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 1999;22(3):463-73.
64. Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C and others. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 1999;96(6):807-18.
65. Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 1998;92(2):205-15.
66. Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 1999;96(6):785-94.
67. Dallol A, Forgacs E, Martinez A, Sekido Y, Walker R, Kishida T, Rabbitts P, Maher ER, Minna JD, Latif F. Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the *Drosophila* Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. *Oncogene* 2002;21(19):3020-8.
68. Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, Gui L, Qian KX, Duan S, Chen Z, Rao Y and others. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 2003;4(1):19-29.
69. Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, Shibahara J, Midorikawa Y, Kawai S, Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T and others. Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. *Clin Cancer Res* 2006;12(11 Pt 1):3257-64.
70. Tanaka T, Takeno T, Watanabe Y, Uchiyama Y, Murakami T, Yamashita H, Suzuki A, Aoi R, Iwanari H, Jiang SY and others. The generation of monoclonal antibodies against human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). *J Atheroscler Thromb* 2002;9(5):233-42.

71. Watanabe Y, Tanaka T, Uchiyama Y, Takeno T, Izumi A, Yamashita H, Kumakura J, Iwanari H, Shu-Ying J, Naito M and others. Establishment of a monoclonal antibody for human LXRalpha: Detection of LXRalpha protein expression in human macrophages. *Nucl Recept* 2003;1(1):1.
72. Watanabe Y, Jiang S, Takabe W, Ohashi R, Tanaka T, Uchiyama Y, Katsumi K, Iwanari H, Noguchi N, Naito M and others. Expression of the LXRalpha protein in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(3):622-7.
73. Schmitt H-M, Brecht A, Piehle J, Gauglitz G. An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. *Biosensors and Bioelectronics* 1997;12(8):809-816.
74. Piehler J, Schreiber G. Fast transient cytokine-receptor interactions monitored in real time by reflectometric interference spectroscopy. *Anal Biochem* 2001;289(2):173-86.
75. Hänel C, Gauglitz G. Comparison of reflectometric interference spectroscopy with other instruments for label-free optical detection. *Anal Bioanal Chem* 2002;372(1):91-100.
76. Asano R, Kumagai T, Nagai K, Taki S, Shimomura I, Arai K, Ogata H, Okada M, Hayasaka F, Sanada H and others. Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody. *Protein Eng Des Sel* 2013;26(5):359-67.
77. Suresh MR, Cuello AC, Milstein C. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol* 1986;121:210-28.
78. Kim CH, Axup JY, Dubrovskaya A, Kazane SA, Hutchins BA, Wold ED, Smider VV, Schultz PG. Synthesis of bispecific antibodies using genetically encoded unnatural amino acids. *J Am Chem Soc* 2012;134(24):9918-21.
79. Spiess C, Merchant M, Huang A, Zheng Z, Yang NY, Peng J, Ellerman D, Shatz W, Reilly D, Yansura DG and others. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. *Nat Biotechnol* 2013;31(8):753-8.
80. Zakeri B, Fierer JO, Celik E, Chittock EC, Schwarz-Linek U, Moy VT, Howarth M. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(12):E690-7.

謝辞

本研究遂行にあたり、大変魅力にあふれる研究題材、そして自由に自分の研究を組み立て、それを実現できるという素晴らしい研究環境を与えてくださるとともに、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました本学新領域創成科学研究科 津本 浩平 教授に心より深く感謝申し上げます。抗体工学、生命科学の基礎から応用に渡る数多くの知識、経験、そして実社会でどのように還元していくかという点に至るまで、研究者として大切なことをご教授いただいたことを深く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、大変有益なご意見、ご助言を賜りました、本学新領域創成科学研究科 伊藤 耕一 教授、富田 野乃 准教授、産業技術総合研究所 本田 真也 教授、本学先端科学技術研究センター 浜窪 隆雄 教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

共同研究をご承諾いただき、貴重な実験試料をご提供頂いたほか、研究遂行、投稿論文執筆にあたって激励を賜りました本学先端科学技術研究センター 児玉 龍彦 教授、土居 洋文 特任教授、杉山 暁 助教に深く感謝申し上げます。

貴重な実験試料をご提供頂いたほか、種々の細胞実験において実験の場、及び実験機器を使用させて頂き、その実験においても数多くのご助言、ご指導を賜りました本学先端科学技術研究センター 増田 一之 助教、岩成 宏子 特任助教、新井 修 特任研究員に心より御礼申し上げます。

貴重な蛋白質試料をご提供頂いた本学先端科学技術研究センター 浜窪研究室の皆様に御礼申し上げます。

研究遂行の際、数多くのご助言、深いご討論を賜り、更に研究室生活で数多くの激励を賜りました、本学工学系研究科 Jose Manuel Martinez Caaveiro 主幹研究員に深く御礼申し上げます。

研究遂行の際に貴重な実験試料をご提供頂いたほか、有意義なご討論、ご助言を賜り、

また研究以外でも博士課程の学生として、一社会人としての数々のご助言を賜り、研究室運営にもご尽力いただきました本学工学系研究科 長門石 暁 助教に深く御礼申し上げます。

研究遂行の際に貴重な実験試料をご提供頂いたほか、実験内容について数多くのご相談に乗っていただき、また数々のご助言を賜りました、本学工学系研究科 秋葉 宏樹 特任研究員に深く御礼申し上げます。

研究遂行にあたって実験試料を提供して下さった当研究室所属 渡部 貴大 氏、鍋 一紘 氏、当研究室卒業生 中木戸 誠 博士、 宇井 美穂子 現東北大学 多元物質科学研究所 助教に深く御礼申し上げます

そして、これまで5年間大変お世話になりました同期、後輩の皆様に心より感謝申し上げます。研究に対する高い志や意欲を持ち、日々研究に励むその姿に強く刺激を受けました。そして、日々の生活において私を常に励まし、支え、助けて頂きました。皆様に教えて頂いたことは一生の財産です。秘書の越谷 香奈 様、鎌田 美奈 様到大変お世話になりました。また、日々の生活でご助言賜りました佐野 恵海子 博士に感謝申し上げます。研究室の皆様、本当にありがとうございました。

最後に、これまで私をいつも見守って下さり、長い学生生活を常に、計り知れない愛情で支えてくださった、家族、親戚、そして友人の皆様に心よりの感謝を述べさせていただきます。本当にありがとうございました。

補足資料

本論文で使用した ROBO1 は、ROBO1 中の細胞外領域(1-864 残基)を用いて構築された可溶型の ROBO1 である。本学先端科学技術研究センター 浜窪 隆雄 教授より送っていただいたサンプルを先述した binding buffer 2 を用いた Ni-NTA Agarose による粗精製(溶出は 500 mM imidazole にて行った)、及び refolding buffer を用いた 26/60 Superdex200 column による最終精製を行って、実験に使用した。

以下に、頂いた実験試料である ROBO1、5209BscFv、GFP-CCR5tag の蛋白質配列を記す。

ROBO1

MIAEPAHFYLFGLICLCSGSRLRQEDFPPRIVEHPSDLIVSKGEPATLNCKAEGRPTPTIE
WYKGGERVETDKDDPRSHRMLLPSSGLFRLIVHGRKSRPDEGVYVCVARNYLGEAV
SHNASLEVAILRDDFRQNPSDVMVAVGEPVMECQPPRGHPEPTISWKKDGSPDDDKD
ERITIRGGKLMITYTRKSDAGKYVCVGTNMVGERESEVAELTVLERPSFVKRPSNLAVT
VDDSAEFKCEARGDPVPTVRWRKDDGELPKSRYEIRDDHTLKIRKVTAGDMGSYTCV
AENMVGKAEASATLTVQVGSEPPHFVVKPRDQVVALGRTVTFQCEATGNPQPAIFWRR
EGSQNLLFSYQPPQSSSRFSVSQTGDLTITNVQRSDVGYIYCQTLNVAGSIITKAYLEV
DVIADRPPPVIHQGPVNQTVAVDGTFLVSCVATGSPVPTILWRKDGVLVSTQDSRIKQLE
NGVLQIRYAKLGDGTGRYTCIASTPSGEATWSAYIEVQEFQVVPVQPPRPTDPNLIPSAPSK
PEVTDVSRNTVTLVSWQPNLNSGATPTSYIIIEAFSHASGSSWQTVAEENVKTETSAIKGLK
PNAIYLFLVRAANAYGISDPSQISDPVKTQDVLPTSQGVVDHKQVQRELGNVLAHLHNP
TVLSSSSIEVHWTVDQQSQYIQGYKILYRPSGANHGESDWLVFEVTRPAKNSVVIPDLR
KGVNVEIKARPPFFNEFQGADSEIKFAKTLEEAPSAPPQGVTVSKNDGNGTAILVSWQPP
PEDTQNGMVQEYKVVWCLGNETRYHINKTVDGSTFSVIPFLVPGIRYSVEVAASTGAG
SGVKSEPPQFIQLDAHGNPVPSPEDQVSLAQQISDVVKQPAKGLSKLRPGKPIPNPLLGLD
STRTGHHHHH

5209BscFv

MAEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIMNWVKLSHGKSLEWIGDIVPNN
GDTTYNQNFGRGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARFSNYVYPFDYWGQG
STLTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALTW
YQRKQGKSPQLLIYGAINLADDKSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLST
PFTFGSGTKLEIKAAGHHHHHH

GFP-CCR5tag

MKGSHHHHHHGSSENLVYFQGGSGEFSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGE
GDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGY
VQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNV
YITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDGGGGSDINYYTSEP