

総説

Clonal array profiling (CAP) 法による 高親和力変異抗体の効率的創製

木口裕貴*

京都薬科大学 薬品分析学分野

高感度な免疫測定法の構築に必須である高親和力抗体の作製には、抗体の構造を遺伝子操作で改変する「抗体工学」が有望である。しかし、その標準法である「パンニング」に多くの制約があるため、期待通りの結果を得ることは容易ではない。本研究ではこの問題の抜本的な解決を目指して「clonal array profiling (CAP) 法」を構築し、パンニングよりも CAP 法が明らかに高親和力抗体の獲得効率に優れていることを実証した。また、得られた変異体の一次構造から着想を得て、H 鎖可変部 N 末端枠組み領域を多様化したライブラリーを作製し、CAP 法による探索を行ったところ、結合定数 (K_d) が大幅に上昇した変異体が多数見出された。最後に、CAP 法に改良を加えた「解離非依存型 CAP 法」を構築して、上記ライブラリーに適用したところ、さらに高い K_d を示す変異体の獲得に成功した。

キーワード：免疫測定法、ファージ提示、抗体工学、一本鎖 Fv フラグメント

受付日：2023 年 8 月 28 日、受理日：2023 年 10 月 5 日

1. はじめに

抗体は動物の体内に抗原が侵入した刺激により産生される糖タンパク質であり、医薬品として様々な製品が開発されている¹⁾。一方、特定の化学構造を精密に認識して結合する性質から、分析試薬としても利用されている。抗体を用いる分析法は「免疫測定法」と総称され、バイオメディカル研究や臨床検査に不可欠の超微量定量法である。近年ではウイルス感染の有無を判定する手段としても重用されているが、その感度を担保するうえで測定対象物（抗原）に

対して高い親和力、すなわち高い結合定数 (K_d) を示す抗体が必要である。しかし、抗体の作製法として一般的なハイブリドーマ法²⁾により十分な K_d を示す抗体を得ることは容易ではない。

その解決策として抗体の構造を遺伝子操作により改変する「抗体工学」³⁾が挙げられる。本法の技術基盤は 1990 年代初頭に確立され⁴⁻⁷⁾、動物が産生し得ない優れた人工抗体を迅速に創出し得る革命的な方法として注目を浴び、2018 年ノーベル化学賞の対象となった⁸⁾。その原理は「ファージ提示」を活用する機会が多く、一般的な手順は次の通りである。①プロトタイプとなる天然型抗体の H 鎖、L 鎖の可変部ドメイン (V_H , V_L) を連結して「野生型」の一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv)^{9,10)} を構築する [図 1 (i - ii)]。②これに遺伝子

* 連絡先：
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町 5
京都薬科大学 薬品分析学分野

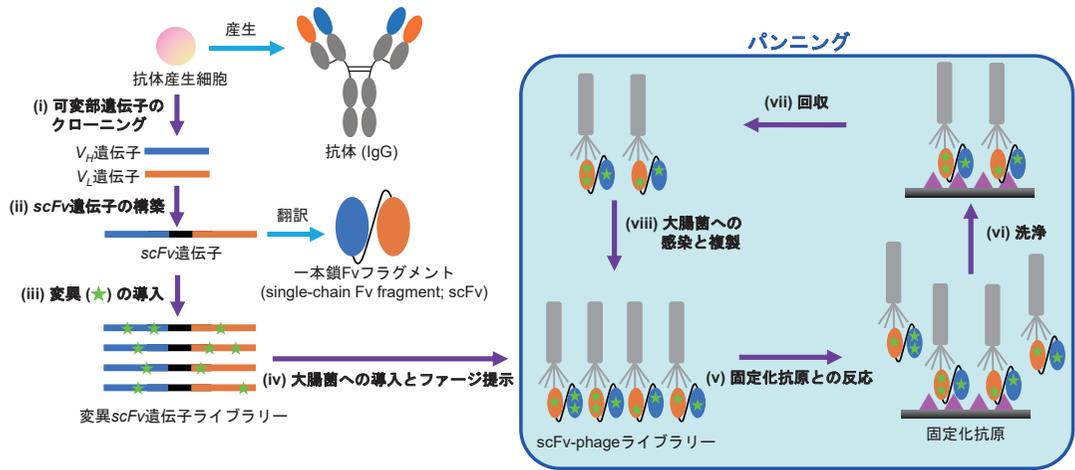


図1 フェージ提示法を用いた抗体工学の流れ

レベルで多様な変異を導入し (iii), 得られる変異 scFv の分子集団 (ライブラリー) を繊維状ファージの表面に提示する (iv). ③この scFv 提示ファージ (scFv-phage) ライブラリーを固相に固定化した目的抗原にまとめて反応させ (v), ④抗原と結合したごく微量の scFv-phage のみを回収し (vi - vii), 大腸菌に感染させて複製する (viii). 生体内の親和性成熟の過程を模倣して抗体の親和力を高めていくため, 「試験管内親和性成熟」とも呼ばれている. なお③ - ④の過程は「パンニング」と呼ばれ, 目的のクローンを単離するための標準法である. しかし, ③では共存する多量の低親和力クローンが競合的に反応し, ④では親和力は低くとも, 複製能力に優るクローンが回収後の scFv-phage の主要な構成成分となり得る¹¹⁾. このため, 目的の抗原結合能を持つ scFv を獲得することは容易ではないのが実情であった.

本総説では, この問題の抜本的な解決を目指した新規な変異抗体探索システム, clonal array profiling (CAP) 法の開発と, その応用について概説する. 本法は, 変異 scFv 遺伝子ライブラリーで形質転換した大腸菌を抗原固定化マイクロウェル内で個別に培養することで, 抗原特異的 scFv-phage の産生能をスクリーニングする

ものである (図2). 本法の有用性を副腎皮質ステロイドであるコルチゾール (cortisol; CS) に対する scFv の親和性成熟をモデルとして, パンニングとの比較により検証した (第2節). その際, CAP 法により獲得した高親和力 scFv の多くに, V_H の N 末端に位置する枠組み領域 1 (framework region 1; FR1) に変異が見られた. そこで, V_H -FR1 部位特異的変異導入ライブラリーを新たに作製し, 高親和力変異体を CAP 法で探索した (第3節). 最後に, CAP 法における scFv 提示ファージの回収方法を改良した「解離非依存型 CAP 法」を構築し, 第3節のライブラリーからさらに高い K_a を示す変異体の探索を試みた (第4節).

2. CAP 法の有用性の評価

あえて試験管内親和性成熟の成功例が少ないハプテン抗原をモデルとして, CAP 法の有用性を評価した. 具体的には, 視床下部 - 下垂体 - 副腎系機能の評価にも重用され, 臨床的な測定意義も高い CS をとりあげた. 天然型のマウス抗 CS 抗体 (Ab#3)¹²⁾ の V_H 及び V_L 遺伝子を連結した wt-scFv 遺伝子¹³⁾ を鋳型として error-

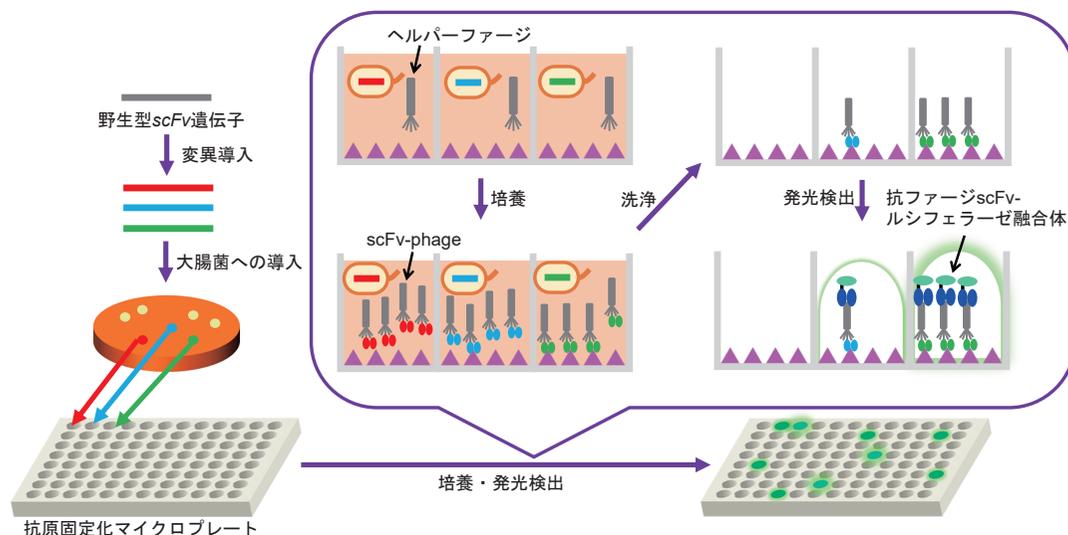


図2 CAP法の原理

prone PCR¹⁴⁾ (反応液に Mn^{2+} を添加し、4種のdNTPの濃度を不均等なことにし複製の忠実度を低下させたPCR)を行い、その全長にランダム点変異を導入した変異scFv遺伝子ライブラリーを構築した。これをCAP法ならびにパンニングに付し、高親和力変異体を検索したところ、以下の結果を得た¹⁵⁾。

① CAP法

電気穿孔法により上記の遺伝子ライブラリーを導入した大腸菌TG1を寒天培地上で一晩培養し、得られた形質転換菌コロニーをCAP法に付した。すなわち、あらかじめヘルパーファージKM13¹⁶⁾を含有する培地を分注したCS-ウシ血清アルブミン結合体(CS-BSA)固定化マイクロプレートに、上記のコロニーを個別に接種した。十分な時間振とう培養したのちプレートを洗浄し、自作した抗ファージscFv-ルシフェラーゼ融合体^{15,17)}により固相上のscFv-phageを発光検出した。その後、発光強度の高かったウェルからファージを回収し、個々のクローンを精査した。ライブラリーの約3%に相当する9,400

コロニーを検索したところ、わずか2回の施行にもかかわらず、変異導入の発生物質であるwt-scFvから14～63倍 K_a 値が上昇した変異体が8種得られた(図3A, B)。このうち、 K_a が $1 \times 10^{10} M^{-1}$ を上回った5種についてenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)における性能を評価した。すなわち、CS-BSAを固定化したマイクロプレートに、scFvおよびCS標準品を加えて4℃で2時間反応させた。プレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ(POD)標識抗FLAG抗体で固相上のscFvを捕捉し、酵素活性を α -フェニレンジアミンを色原体とする比色法で測定した。その結果、wt-scFvを用いるELISAより、50%阻害値の比較で11～25倍も高感度な用量作用曲線を与えた(図3B')。

② パンニング

CAP法と同様に上記の変異scFv遺伝子ライブラリーをTG1に導入し、形質転換菌をまとめて液体培地で培養したのちKM13を感染させ、常法に従ってファージ提示を行った。得られたscFv-phageライブラリーの全量(すなわち

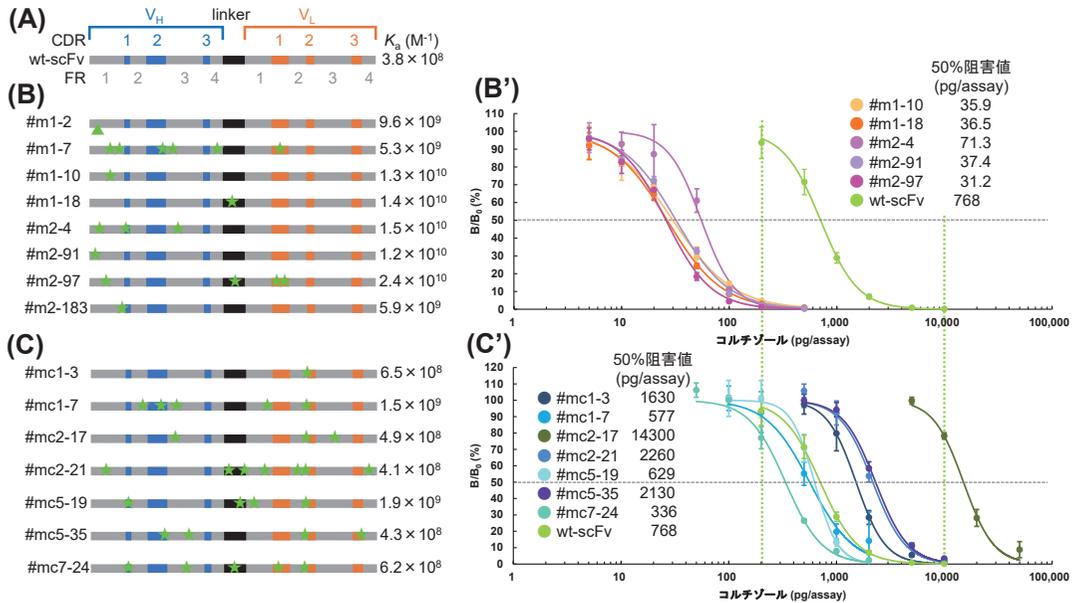


図3 CAP法とパンニングにより得られた変異 scFv の一次構造と K_a および競合 ELISA における用量作用曲線

ライブラリーの 100%) を、CS-BSA 固定化ポリスチレンチューブを用いたパンニングに付した。パンニングを3回繰り返したのち、得られるファージをクローニングして抗原結合能を精査した。

CS-BSA の固定化量およびファージ溶出条件の異なる3種のパンニング (P1 ~ 3; 詳細は文献 15 参照) を計 10 回 (P1 6 回, P2 と P3 を各 2 回) 行った。各試行につき 50 クローン (合計 500 クローン) を解析した結果、7 種の改良型 scFv が得られたが、 K_a の改善は 1.1 ~ 5.0 倍にとどまった (図 3C)。これらの変異 scFv を上記と同様に ELISA に付したところ、3 種は wt-scFv より 1.2 ~ 2.3 倍高い感度を与えたが、その他はむしろ感度が低下していた (図 3C')。

3. V_H-FR1 特異的変異導入ライブラリーの探索

可変部は V_H・V_L のいずれも 4 つの FR と 3 つの相補性決定部 (complementarity-determining

region; CDR) から構成され、その一次構造は N 末端から FR1 → CDR1 → FR2 → CDR2 → FR3 → CDR3 → FR4 の順に並んでいる (図 3A)。抗原との結合に大きく関与するのは CDR であり、なかでも V_H の CDR3 が最も多様性に富み、親和力や特異性の発現に特に重要と考えられている¹⁸⁾。実際に、著者らは V_H-CDR3 に 4 つのアミノ酸置換を導入することでエストラジオールに対する scFv の K_a を 90 倍向上することに成功している¹⁹⁾。親和力の発現における V_H-CDR3 のポテンシャルが示された好例といえよう。一方、FR は β-シート構造を形成して CDR のループ構造を支える土台として機能し、抗原と直接相互作用するとは考えにくい。ところが第 2 節で CAP 法により得られた変異 scFv の多くについて、V_H の FR1 に変異が認められた。しかも、本部位へのわずか 1 カ所のアミノ酸置換または 1 アミノ酸の挿入のみで K_a が 15 倍以上上昇したクローンが複数得られている (図 3B)。これらの結果は、これまで変異の導入部位としては全く顧みられなかった V_H-FR1 への変異導入が、

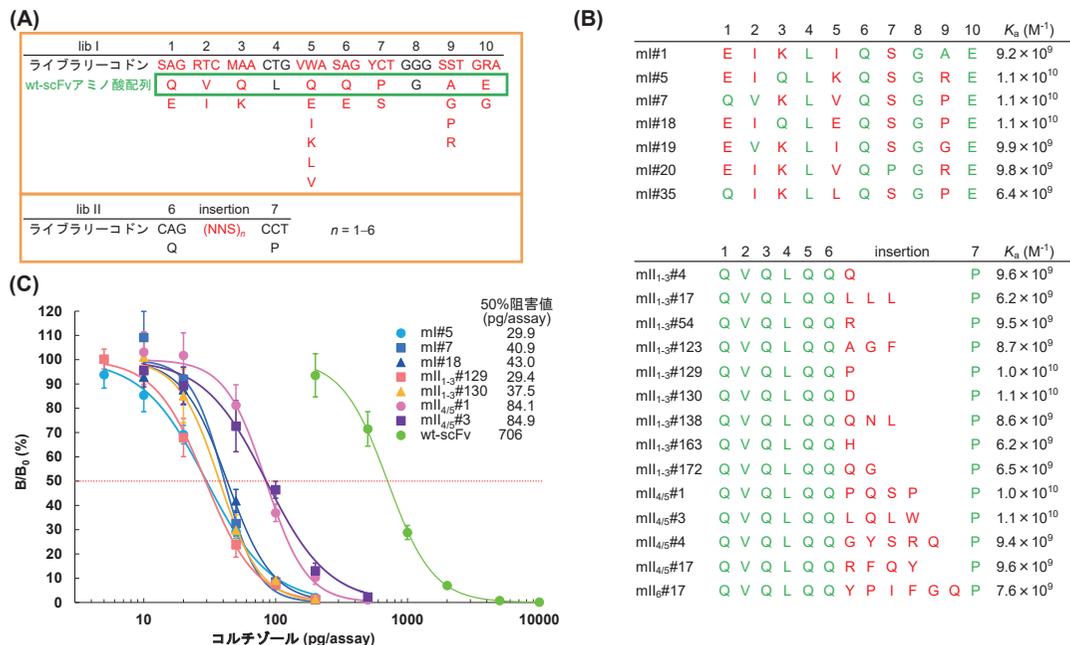


図4 V_H -FR1 特異的変異導入ライブラリーの設計と得られた変異体のキャラクタリゼーション

意外にも親和力の向上に有効である可能性を強く示唆する。そこで、 V_H -FR1 特異的にアミノ酸を置換または挿入したライブラリーを作製し、高親和力抗体の獲得を試みた²⁰⁾。

wt-scFv 遺伝子を鋳型として、縮重コドンにより多様化されたプライマーを用いて PCR を行い、 V_H -FR1 の 1 ~ 10 番にパターン化したアミノ酸置換を導入するライブラリー (lib I) と 6 番と 7 番のアミノ酸の間に 1 ~ 6 個の連続したランダムなアミノ酸を挿入するライブラリー (lib II) を作製した (図 4A)。各々を導入した形質転換菌のうち、各 4,700 種を CAP 法で検索したところ、 K_a が 17 ~ 31 倍向上した変異体が lib I からは 7 種、lib II からは 14 種も得られた (図 4B)。そのうち $K_a > 1 \times 10^{10} M^{-1}$ の 7 種を用いて第 2 節と同様に競合 ELISA を行ったところ、wt-scFv より 8.3 ~ 24 倍高感度な用量作用曲線が得られた (図 4C)。

4. 解離非依存型 CAP 法の構築

第 3 節で得られた変異体の K_a に着目すると、 $1.1 \times 10^{10} M^{-1}$ を境にそれ以上の K_a を示すクローンは得られていない (図 4B)。この原因として CAP 法において採用しているファージの回収方法が挙げられる。CAP 法では発光検出したファージクローンを、酸や塩基を加えて抗原抗体反応を解離させることで回収する。このとき、極端な pH 条件下でも解離しないファージは回収されず、見過ごされてしまうことになる。この問題を解決するために、ジスルフィド (SS) 結合を介して抗原を固定化した固相を用いる「解離非依存型 CAP 法」を構築した (図 5)。まず、ビオチンと CS を SS 結合を介して連結した化合物を作製し、ストレプトアビジン固定化プレートに加えて間接的に CS を固定化する。このプレートを用いて CAP 法と同様にウェル内で scFv-phage を増幅させたのち、酸性・塩基

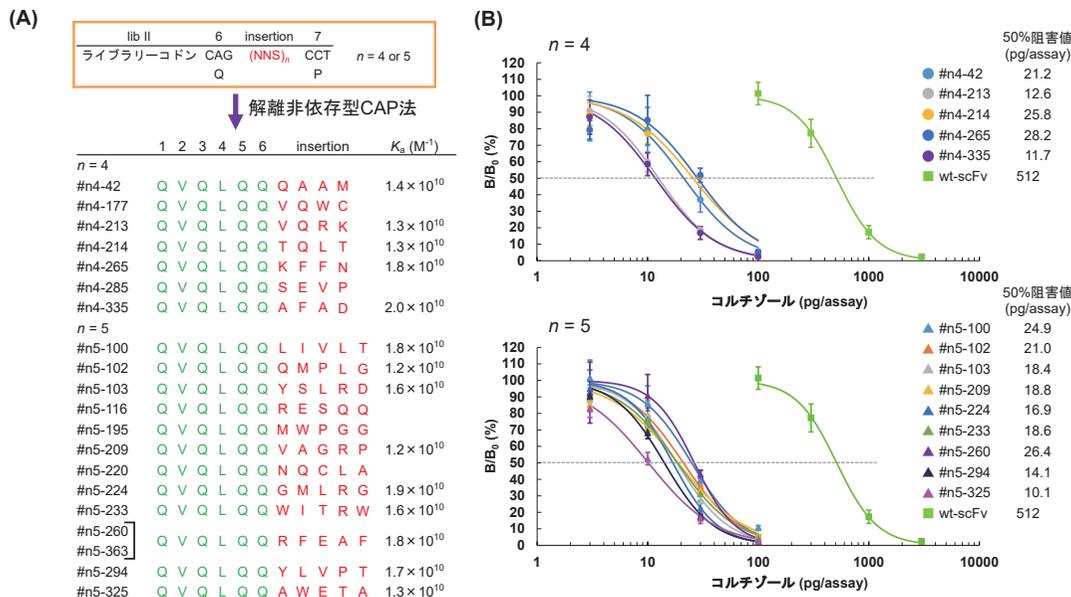


図6 解離非依存型CAP法により得られた各scFvの一次構造と K_a および競合ELISAにおける用量作用曲線

【謝辞】

本研究は著者の前所属である神戸薬科大学 生命分析化学研究室において行われたものです。本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました神戸薬科大学の小林典裕特別教授に謹んで感謝申し上げます。また、有益な御助言と御協力を賜りました同大学生命分析化学研究室の大山浩之准教授、同総合教育センターの森田いずみ講師に深謝いたします。

【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

【引用文献】

- Hélène Kaplon, Silvia Crescioli, Alicia Chenoweth, Jyothsna Visweswaraiyah, Janice M. Reichert. Antibodies to watch in 2023. *mAbs* **2023**, 15(1), 2153410.
- Georges Köhler, César Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, 256(5517), 495–497.
- Tim Clackson, Henry B. Lowman. *Phage Display*. **2004**, Oxford University Press, New York.
- George P. Smith. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **1985**, 228(4705), 1315–1317.
- Tim Clackson, Hennie R. Hoogenboom, Andrew D. Griffiths, Greg Winter. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **1991**, 352(6336), 624–628.
- Laurent S. Jespers, Andy Roberts, Stephen M. Mahler, Greg Winter, Hennie R. Hoogenboom. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Bio/Technology* **1994**, 12(9), 899–903.
- Hennie R. Hoogenboom. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23(9), 1105–1116.
- Elizabeth Gibney, Richard Van Noorden, Heidi Ledford, Davide Castelvecchi, Matthew Warren. ‘Test-tube’ evolution wins Chemistry Nobel Prize. *Nature* **2018**, 562(7726), 176.
- Robert E. Bird, Karl D. Hardman, James W. Jacobson, Syd Johnson, Bennett M. Kaufman, Shwu-Maan Lee, Timothy Lee, Sharon H. Pope, Gary S. Riordan, Marc Whitlow. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **1988**, 242(4877), 423–426.
- James S. Huston, Douglas Levinson, Meredith Mudgett-Hunter, Mei-Sheng Tai, Jiří Novotný, Michael N. Margolies, Richard J. Ridge, Robert E. Brucoleri, Edgar Haber, Roberto Crea, Hermann Oppermann.

- Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85(16), 5879–5883.
- 11) Ratmir Derda, Sindy K. Y. Tang, S. Cory Li, Simon Ng, Wadim Matochko, Mohammad R. Jafari. Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules* **2011**, 16(2), 1776–1803.
 - 12) Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Sayaka Miyake, Ayaka Moriuchi, Tatsuki Akisada, Toshifumi Niwa, Norihiro Kobayashi. *Gaussia* luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers. *Anal. Chem.* **2015**, 87(24), 12387–12395.
 - 13) Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Tomomi Morishita, Sakiko Fukushima, Yuki Nishimori, Toshifumi Niwa, Norihiro Kobayashi. A single-step “breeding” generated a diagnostic anti-cortisol antibody fragment with over 30-fold enhanced affinity. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40(12), 2191–2198.
 - 14) David W. Leung, Ellson Chen, David V. Goeddel. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1989**, 1(1), 11–15.
 - 15) Yuki Kiguchi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Mai Morikawa, Asuka Nakano, Wakana Fujihara, Yukari Inoue, Megumi Sasaki, Yuki Saijo, Yuki Kanemoto, Kaho Murayama, Yuki Baba, Atsuko Takeuchi, Norihiro Kobayashi. Clonal array profiling of scFv-displaying phages for high-throughput discovery of affinity-matured antibody mutants. *Sci. Rep.* **2020**, 10(1), 14103.
 - 16) Peter Kristensen, Greg Winter. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.* **1998**, 3(5), 321–328.
 - 17) Yuki Kiguchi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Emiko Katayama, Masatoshi Fujita, Mai Narasaki, Aiko Yokoyama, Norihiro Kobayashi. Antibodies and engineered antibody fragments against M13 filamentous phage to facilitate phage-display-based molecular breeding. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, 41(7), 1062–1070.
 - 18) Hiroyuki Oyama, Yuki Kiguchi, Izumi Morita, Chika Yamamoto, Yuka Higashi, Miku Taguchi, Tatsuya Tagawa, Yuri Enami, Yuriko Takamine, Hanako Hasegawa, Atsuko Takeuchi, Norihiro Kobayashi. Seeking high-priority mutations enabling successful antibody-breeding: systematic analysis of a mutant that gained over 100-fold enhanced affinity. *Sci. Rep.* **2020**, 10(1), 4807.
 - 19) Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Saya Nakamura, Ayano Yoshida, Haruna Kubo, Momo Ishida, Hiroyuki Oyama, Norihiro Kobayashi. More than 370-fold increase in antibody affinity to estradiol-17 β by exploring substitutions in the V_H-CDR3. *Biol. Pharm. Bull.* **2022**, 45(7), 851–855.
 - 20) Yuki Kiguchi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yasuhiro Nagata, Naoko Umezawa, Norihiro Kobayashi. The V_H framework region 1 as a target of efficient mutagenesis for generating a variety of affinity-matured scFv mutants. *Sci. Rep.* **2021**, 11(1), 8201.
 - 21) Yuki Kiguchi, Izumi Morita, Akari Tsuruno, Norihiro Kobayashi. Retrieving dissociation-resistant antibody mutants: an efficient strategy for developing immunoassays with improved sensitivities. *Biol. Pharm. Bull.* **2022**, 45(10), 1432–1437.