

1. 緒言

Open Sandwich 酵素免疫測定法(以下 OS-ELISA 法) は、抗原存在下では重鎖可変領域(V_H)-軽鎖可変領域(V_L)-抗原の三者が安定な複合体を形成し、抗原非存在下では V_H と V_L の間にはほとんど相互作用が働かないような性質をもつ抗体可変領域(Fv)を利用して抗原濃度を測定する、非競争的免疫測定法である。OS-ELISA 法は、他の免疫測定法に比べて操作が簡便であるという利点のほかに、同じ非競争的免疫測定法である Sandwich ELISA 法では原理的に測定できない単一エピトープしか持たない小分子(単価)抗原を測定できるという最大の利点がある。従来の酵素免疫測定法(ELISA 法)による単価抗原測定においては、原理的な制約により非競争法に比べて感度的に劣る競争法が用いられてきた。もし多くの単価抗原に対して OS-ELISA 法が適用出来れば、環境ホルモンのような化学物質の濃度を高感度、簡便に測定する系が可能となり、その潜在的有用性は非常に高い。

OS-ELISA 法には、抗原濃度依存的に V_H/V_L 間相互作用の強弱が変化する抗体 Fv が必要であるが、これまで V_H/V_L 間相互作用と抗体 Fv アミノ酸配列の関係について系統的に研究した例はほとんどなく、例えば V_H/V_L 間相互作用の強弱の変化を予測し、部位特異的に変異を加えることにより OS-ELISA に適した抗体を作成することは困難であった。

そこで本研究では、まず V_H/V_L 間相互作用の強弱の異なる 4 種類の抗 BSA 抗体をモデル系として、 V_H/V_L 間相互作用の強弱に関与する残基について解析を行った。

次に OS-ELISA 法に適した抗体を効率よく選択するために開発した新規 Phage Display 法を利用して、環境ホルモン Bisphenol A (BPA) を認識する 3 種の抗体の中から OS-ELISA に最も適した抗体を選択し、OS-ELISA 法による BPA 測定系の構築を行った。

2. V_H 、 V_L 間相互作用に関与する残基の解析

単一(V3-23/DP-47+ J_H 4b, 012/02/DPK9+ J_k 1)フレームワークヒト合成 scFv ライブラリーより得られた、同一エピトープを認識するが V_H/V_L 間相互作用の強弱が異なる 4 種の抗 BSA 抗体 Fv に着目し、 V_H/V_L 間相互作用の強弱を決定する残基について Phage Display と ELISA を利用して検討を行った。

はじめに、各 4 種の V_H 、 V_L から生じる全 16 種の組合せについて、 V_H/V_L 間相互作用を ELISA 法により調べた結果、 V_H/V_L 間相互作用の強弱は V_L ではなく、 V_H によって決定されることを見出した。そこでその後は V_H/V_L 間相互作用の強かった 13CG2 V_H と相互作用の弱かった 29IJ2 V_H の 2 クローンに着目した。この 2 種の V_H 間で異なる 6 残基について、29IJ2 または 13CG2 どちらかの残基になるように作成した V_H のファージライブラリーを用いて、相互作用の強弱に関与する残基を同定したところ、95 番の残基 (H95) に 13CG2 V_H と同じ Gly をもつクローンのみが強い V_H/V_L 間相互作用を示すことが分かった。

次に、 V_H/V_L 間相互作用の弱い 29IJ2 V_H を鋳型として、H95 の残基にサチュレーション変異をかけ、アミノ酸残基と V_H/V_L 間相互作用の強弱の関係を、29IJ2 V_L をプレートに固定した ELISA により検証した。

その結果、29IJ2 V_H の H95Ser を Gly に置換した変異体が特に V_L と強い相互作用を示し、13CG2 V_H の H95Gly を Ser に置換した変異体は、 V_L との相互作用が著しく弱くなったことから、H95Gly が V_H/V_L 間相互作用の強弱に大きく関与することが示された。

さらに、上の相互作用に対するファージ上への V_H の提示量ならびに安定性の影響をより定量的に調べるため、29IJ2 V_H (野生型(wt)ならびに 95G/D/L)および 13CG2 V_H (wt ならびに 95S)の 6 クローンについて、29IJ2 V_L または protein A を固定化して ELISA を行い、結合のファージ濃度依存性を検討した。protein A に対しては、

全クローンがほぼ同等の結合を示し、変異によるファージ上への V_H の提示量ならびに安定性への影響は少ないことが示された。一方 29IJ2 V_L に対しては、変異による結合の濃度依存性に顕著な差が見られた。この結果は表面プラズモン共鳴バイオセンサーと可溶性 V_H を用いた解離定数測定の結果と良く一致した。

本研究で用いた 95Gly を持つ V_H が他の V_L に対しても強い親和性をもつかどうか検証するため、ポリクローナルな L 鎖 (κ 鎖) を固定化して ELISA を行った。95Gly をもつ V_H は 95Ser をもつ V_H と比較して強い結合を示したことから、95Gly をもつ V_H は特定の V_L のみならず他の V_L とも強い相互作用をもつことが示唆された。

H95 は、CDR H3 のループの根元にあたり、 V_L と直接相互作用する位置にはない。H95 が Gly のとき、CDR H3 ループの柔軟性が顕著に増大するという報告 (Kim, S. T. *et al. Proteins* 37, 683-696(1999)) があることから、H95 が Gly のとき、ループ全体の柔軟性が高くなることによって、 V_H 、 V_L 間のパッキングがさらに密になり、より V_L との相互作用が強くなった可能性がある。

今回用いた V_H/V_L 間相互作用の弱いクローン 29IJ2 V_{Hwt} は、 V_H と V_L をリンカーで結合した scFv の状態では十分な抗原結合能をもっていることから、このクローンが OS-ELISA に適さなかった理由は、 V_H/V_L 間相互作用が弱すぎるためにパラトープを十分に形成できなかったためであると推測される。

3. Open Sandwich ELISA 法の Bisphenol A 濃度測定への応用

OS-ELISA 法に適した抗体を効率よく選択するためには、抗体 Fv の抗原への結合能および V_H/V_L 間相互作用の抗原濃度依存性を迅速に検証できる系が必要となる。そこで、繊維状ファージ M13 のマイナーコートタンパク質 pIX と pVII それぞれに V_H 、 V_L を融合することによりファージ表面に Fv を提示させ、同時に V_L 遺伝子と gVII の間にアンバーコドンを配し、宿主大腸菌の *supE* 変異の有無により V_L 断片の提示と分泌の切り替えが可能な新規ファージディスプレイ法を開発した (split Fv (spFv) system.)。spFv system を用いることにより、ベクターの組み換えなどを行うことなしに 1) *supE* 変異株 TG-1 を宿主として調製した V_H および V_L を提示したファージを用いて Fv の抗原結合能の評価が可能となり、2) 非 *sup* 変異株 HB2151 を宿主としてファージを調製し、 V_L を培養上清に分泌させたときには、 V_L をマイクロタイタープレート上に固定化し、OS-ELISA を行うことが可能となる。

また、Pellequer J. L. (*J. Mol. Recognit.* 12, 267-275 (1999)) らの、抗原結合に際して V_H/V_L 界面は、抗原がハプテンのような小分子の場合に、よりコンパクトな構造をとるように変化し、タンパク質性の大きな抗原のときにはあまり変化しないという報告を参考にして、小分子のほうが OS-ELISA のターゲットとしてより適していると考え、今回は抗原として、化学物質であり、また内分泌攪乱作用をもつとされ、近年生体及び環境中での濃度測定の必要性の高まっている Bisphenol A (BPA) を用いることとした。

ここでは、spFv system 及び既存のハイブリドーマ由来の抗体遺伝子を用いて、OS-ELISA 法による BPA 濃度測定系の可能性を検討した。3 種の抗 BPA 抗体 scFv 遺伝子 (BBA2187、BBA2617、BTE3456) から spFv ベクターを構築し、まず TG-1^{sup+} を宿主として V_H 、 V_L 共に提示したファージを調製し、3 種の抗 BPA 抗体 spFv の BPA 結合能を評価した。その結果、いずれの 3 種も十分な BPA 結合能を保持していることを確認した。

次に HB2151 を宿主として V_H のみを表面に提示したファージと分泌された V_L を含む培養上清を用いて、OS-ELISA を行った。BPA を多価で結合させたウサギ血清アルブミン(BPA-RSA)を抗原として測定を行ったところ、3 種共に抗原濃度依存的シグナル変化が見られたが、BBA2187 が最も感度良く検出できた。次に BPA を抗原として BBA2187 を用いて OS-ELISA を行ったところ、抗原濃度依存的シグナル変化が見られ、その感度は 1ng/ml 以下であった。

4. 結言

本研究では、これまでほとんど知見の得られていなかった抗体 V_H/V_L 間相互作用の強弱と Fv アミノ酸配列

の関係について、ヒト抗 BSA 抗体をモデルとして CDR H3 の根元にある H95Gly が V_H/V_L 間相互作用の強弱を決定することを見出した。しかし、H95 に変異を加えて V_H/V_L 間相互作用を弱めるだけでは OS-ELISA 法に適した抗体を得ることはできなかったことから、今後さらに V_H/V_L 間相互作用に関与する残基について知見を蓄積していくことが必要であると思われる。

また新規ファージディスプレイ法 spFv system を利用して OS-ELISA による BPA 濃度測定系の構築を行った。その感度は 1 ng/ml 以下と市販の BPA 測定キットと比較して同等またはそれ以上であった。また spFv system を用いることで、OS-ELISA 法に適した抗体を迅速に判定できることが示された。