

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成13年度博士課程入学
氏名 李 永揆
指導教員名 山口 五十磨

論文題目 抗活性型ジベレリン一本鎖抗体の構築と新規検出系への応用

抗体はその多様な認識特性から、様々な物質の分析・検出系として、ELISA, Western, 免疫染色等に用いられている他、アフィニティーカラムなどの精製手段にも多用されている。筆者の所属する研究室においては、従来より低分子性の脂溶性物質である植物ホルモンを認識する抗体の調製を行っており、ELISA や RIA による高感度なホルモンの分析系を開発してきた。また、遺伝子工学技術の発達に伴い、組換え型抗体の生産が可能になったことを受け、当研究室でも種々のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマよりクローニングした抗体遺伝子を用い、一本鎖抗体 (scFv) と呼ばれる組換え型抗体を作成し、様々な用途に用いている。scFv は抗原結合部位 (Fv) を構成する重鎖 (H 鎖) と軽鎖 (L 鎖) の可変領域 V_H , V_L を可動性の高いペプチドで結合したもので、一分子で Fv を構成するため、植物など他生物における発現に利点がある。本研究では、様々な検討にも拘わらず抗原結合能を有する scFv の調製が困難であった GA_1 や GA_4 といった活性型ジベレリンに対する scFv を、*in vitro* での分子進化的な手法を適用して調製した結果について述べる。また、 V_H と V_L のリガンド依存的な会合という性質に着目し、活性型ジベレリンの新規な検出系を確立することを目的に行った検討について述べる。

1. 抗活性型ジベレリン scFv の調製

scFv は前述の様に組換え型抗体として植物等で発現させる上での利点がある一方で、 V_H と V_L をリンカーを介して結合させるために分子にひずみが生ずる危険性も考えられる。定法に従って調製した抗活性型ジベレリン scFv は結合能を示さなかったが、その理由として、この様な分子のひずみが考えられ、ごく微細な構造の修正に

よって結合活性が得られる可能性も十分にあると考えた。そこで、まず抗活性型ジベレリン scFv の調製を目的として、scFv にランダムな変異を導入したライブラリーを作成し、偶然に活性を保持する様な変異を持ったクローンを選抜するという手法を試みた。「エラーの導入とより良いクローンの選抜」という手順は、*in vitro* での分子進化的な分子改変を目的として多く適用されている。Cadwell et al.の方法に従い、エラーの生じやすい条件で PCR を行い、2種の抗活性型ジベレリンモノクローナル抗体 (8/E9, 21/D13) 産生ハイブリドーマより調製した scFv 遺伝子にランダムな変異を導入した。これを繊維状ファージのコート蛋白質の一つである gIIIp との融合蛋白質として発現させることにより、変異 scFv ライブラリーをファージ提示型の発現系として調製した。scFv と gIIIp の間にはアンバー終止コドン (TAG) が存在しており、アンバーサプレッサーの大腸菌株 (TG1) を用いることにより、ファージ提示型として発現させた。モノクローナル抗体作成時の免疫原である BSA-GA₄ をポリスチレン管にコートし、scFv 発現ファージを反応させ、洗浄後、BSA-GA₄ に結合性のファージを回収し、再度大腸菌に感染させてファージを増幅させた。この様な一連のパニング操作を再度行った結果、8/E9, 21/D13 のいずれの場合も、2回目に回収されたファージのタイターは、1回目の約千倍に増加し、パニング操作により BSA-GA₄ に結合性の scFv を発現するファージが濃縮されているものと思われた。その後、より高アフィニティーのクローンが得られる可能性を考えてコートする BSA-GA₄ の濃度を下げたパニングや、GA₄ の認識の特異性を挙げるために BSA-GA₄ の代わりに KLH-GA₄ をコートしたパニング等を行った。2回以上のパニングにより、BSA-GA₄ 結合性ファージの濃縮が十分に行われた各区のファージ混合物からモノクローナル化したところ、パニングの条件による区画間の明瞭なアフィニティーの違いは認められなかったものの、多くのクローンが BSA-GA₄ への結合性を示した。また、この結合は過剰の GA₄ により阻害されたことより、GA₄ に特異的な結合を示す scFv が得られたと判断した。これらの陽性クローンのいくつかを、大腸菌アンバー非サプレッサー株 (HB2151) で発現させることにより、可溶性の scFv としての調製を試みたところ、ELISA 分析で陽性を示すクローンと陰性のクローンが混在していた。これらのクローンの scFv 部位の配列を解析したところ、ファージ提示型として陽性を示した全てのクローンで scFv 部位の 2 番目のアミノ酸が Glu から Gly へと置換されているか (E2G)、あるいは Glu のコドンの一塩基が欠失してフレームシフトを起こしており、さらにこれら以外に少なくとも一つのアミノ酸置換を有していた。ウェスタン解析の結果、アンバーサプレッサー株 TG1 では、E2G 置換のクローンより、フレームシフトを起こしているクローンでより多量の scFv-gIIIp 融合蛋白質が生産されており、TG1 株では高頻度の -1 シフトによるフレームの修正が起こっており、むしろフレームにずれのないクローンで、リボソームスリップにより蛋白質の発現量が低下しているものと考えられた。

一方、フレームシフト変異を持ったクローンは、HB2151 株ではフレーム修正が起こらないため、蛋白質そのものが検出されず、このことが ELISA において陰性を示した理由であることが判明した。通常、ファージ提示型抗体が結合活性を示しても、可溶性抗体にした際に陰性を示す場合がよく知られているが、今回の様な大腸菌ホスト株によるフレーム修正の有無がその原因の一部となっているものと考えられる。

2位のアミノ酸は、大腸菌内で切断されるシグナルペプチドのC末端に位置することから、E2G 置換は scFv の構造に影響を与えるのではなく、シグナルの切断効率に対する影響と考えられた。今回得られたクローンには E2G 置換のみの変異クローンは見られなかったため、元の配列に人為的に E2G 置換のみを導入したところ、ファージ提示型では 8/E9, 21/D13 とともに抗原結合能を示した。しかしながら、これらの可溶性 scFv は蛋白質としては発現しているにも拘わらず、抗原との結合能を示さなかった。ファージ上での提示が、scFv に結合活性を持たせる様な構造的な変化を生じたものと考えられる。21/D13 では、E2G 置換ではなく、フレームシフト変異を有するクローンしか得られず、結合能を示す可溶性 scFv が得られなかったため、フレームシフト変異を持ち、ファージ提示型として陽性を示したクローンに E2G 置換を人為的に導入し正しいフレームとした結果、結合能を有する可溶性 scFv が得られた。

以上、2種の scFv いずれについても、分子進化的な手法を用いて、結合活性を有さない scFv より、結合活性を有する scFv の調製に成功した。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから scFv 遺伝子を構築しても、機能を持った抗体が生産しない例はよく知られており、この様な手法が一般的な解決法として有用なものであると考えられる。

2. V_HおよびV_Lのリガンド依存的な会合を利用した新規なジベレリン検出系の確立

活性型ジベレリンに対する組換え型抗体の生産が可能になったため、次に V_Hと V_Lのリガンド依存的な会合という性質に着目し、活性型ジベレリンの新規な検出系の確立を試みた。IgG では H 鎖、L 鎖間の会合がジスルフィド結合によって保たれているが、V_Hと V_L部分同士のアフィニティーは弱く、リガンドとの結合によるコンフォメーション変化を通して、お互いのアフィニティーが増加することが知られている。

まず、8/E9, 21/D13 の V_H, V_Lをそれぞれ繊維状ファージのコート蛋白質である gIXp, gVIIp との融合蛋白質として、ファージの一端に提示させる様に発現させたところ、ELISA において BSA-GA₄ との結合能が確認された。gIXp と gVIIp はお互いに寄り添う様に位置していることが知られており、V_Hと V_Lを立体的に近い位置に発現させることにより、scFv の様にリンカーで結合していなくても V_H, V_Lが会合し、抗原結合能を有することが示された。V_Lと gVIIp 間にはアンバー終止コドンが存在するため、次に、アンバー非サプレッサー株で発現させることにより、V_Hを gIXp との融合蛋白質

質としてファージ上に提示させ、V_Lを可溶性蛋白質として培養液中に分泌させて生産し、リガンド依存的なV_H, V_Lの会合の検出を試みた。しかしながら、ウェスタン解析の結果、回収したファージからはV_H-gIXp融合蛋白質が検出されたものの、ペリプラズム画分、培養液ともにV_Lは検出されず、V_L単独での発現は不安定であると考えられた。そこでV_LをGSTとの融合蛋白質として発現し、精製後、ファージ上に提示したV_Hとリガンド依存的に会合するか否かを解析した。その結果、GA₄存在下で会合量の増加が認められた。しかしながらGA₄非依存的な会合に比べて依存的な会合量は十分には高くなく、このままではGAの高感度分析に用いることは困難であると考えられた。

そこで次に、より目的に適ったクローンのスクリーニングが将来的に可能な系の確立を視野に、大腸菌内におけるV_H, V_LのGA₄依存的会合をPCA (protein complementation assay) により検出する系の構築を試みた。PCAはレポーターとなる蛋白質を2つのドメインに分割し、それぞれをお互いに相互作用する2つの蛋白質(A, B)と融合させることにより、AとBの結合を通して、レポーター蛋白質が再構成され、活性を示す系である。本研究では大腸菌のコロニーを視覚的にスクリーニング出来る様、GFPをN末端側(NGFP)とC末端側(CGFP)の2つに分割し、それぞれにV_H, V_Lを融合蛋白質として発現させた。V_H, V_Lとも分子内にジスルフィド結合を有するため、還元酵素が欠損したOrigami株を用い、NGFP-V_HおよびV_L-CGFPの発現ベクターを同時に導入した。その結果、GA₄存在下で培養した大腸菌はGA₄非存在下で培養した大腸菌に比べて、蛍光顕微鏡下で明らかに強いGFP蛍光を与えた。この結果はGFPを用いたV_H, V_LによるPCAが可能であることを示すとともに、大腸菌を対象としたスクリーニング系で、よりS/N比が高く、感度の良いクローンを選抜できる可能性を示唆している。また、ルシフェラーなどのレポーター系をPCAへ適用することにより、より高感度な1段階ELISA分析系へ応用することも可能である。さらに、S/N比、感度などの問題をクリア出来れば、植物におけるジベレリンの局在を検出する系へと適用できる可能性もあると考え、現在、植物発現用に改変されたGFPを用いて、植物での一過性発現用ベクターの構築を進めている。