

論文の内容の要旨

論文題目 新規免疫測定法のための抗体選択系・酵素融合タンパクの開発

氏名 小嶋美樹

特定のリガンド認識を物理化学的なシグナルに変換するセンサー蛋白質は、洗浄操作が不要で迅速なホモジニアス系での測定が可能であるため、ヘテロジニアスなELISA法に代わる検出法として開発が望まれている。現在までに、活性部位近傍にエピトープを挿入したセンサー酵素や、マルトース結合蛋白質(MBP)と円順列変異体 β ラクタマーゼの融合蛋白質によるマルトースセンサーなど、様々なセンサー酵素作製例が報告されているが、リガンドによる活性変化があまり大きくないものが多く、また小分子化合物を対象としたセンサーの報告は少ない。さらに、これらのセンサーにおける活性制御は各融合タンパク質に固有であるため汎用性が低く、検出対象ごとにセンサーの開発が必要である。よって本論文では、任意抗原を高感度な非競合法で、かつ簡便なホモジニアス測定系で検出可能な新規センサー蛋白質を効率的に取得することを目的とし、2つのテーマについて研究を行った。すなわちセンサーの認識ドメインとなる抗体断片の取得、発現ベクターの変換を煩雑なクローニング操作なしに行える、オープンサンドイッチ(OS)法に適したscFv/OS変換系の作製と、低分子抗原を非競合的にホモジニアス測定系で検出可能な抗体酵素融合蛋白質の作製である。

第2章ではCre/loxPシステムを用いた、抗体選択・発現ベクター選択系の作製を試みた。抗原による V_H/V_L 間相互作用変化を抗原濃度測定に応用したOS法により、小分子抗原の非競合的な高感度検出や少ないステップでの迅速な測定が可能となった。これに応用する抗体としては、抗原非存在時の V_H/V_L 間相互作用が弱いことが必須条件であるが、天然の抗体ではその強さは様々である。また、通常一本鎖抗体(scFv)として選択されてきた抗体をOS法に応用するためには V_H/V_L 各断片を異なる発現ベクターにクローニングし直すという手間がかかる。本研究ではCre/loxP systemを用いて、より簡便にscFv発現ベクターをOS法としての活用が可能な V_L -MBPおよび V_H -phageを発現するOSベクターに変換する系の確立を試みた。

Cre/loxP systemとはP1 phage由来組み換え酵素Cre recombinaseにより、異なるloxPサイト間の配列を相同的に組み換えるシステムである。本研究では、loxP WTとloxP 551の2種類の基質配列をscFv中のリンカー両末端に配置したscFv/pMKを作製し、同様に2

つの基質配列間に MBPとRibosome binding site(RBS)をコードするドナーベクター OS/pMIと相同組み換えを行うことにより、OS用のベクターOS/pMKへと変換させる系を構築した (Fig. 1)。

モデル用抗体として、抗原非存在下での V_H/V_L 間相互作用が弱くOS法に適している抗ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) 抗体HyHEL-10を用い、 V_H/V_L 間に loxP 511 と loxP WTならびに *Swa I* サイトを含む loxP-linker を挿入した scFv (H10)/pMK を作製した。これと並行して loxP 511 と loxP WT間に MBP をコードする配列および Ribosome binding site (RBS) を持つ OS/pMI を作製した。

まず scFv (H10)/pMK を用いて loxP-linker をもつ scFv 提示ファージを作製し、ELISAにて有意なHEL結合能

を確認した。次に OS/pMI および *Swa I* 処理により直鎖状にした scFv (H10)/pMK それぞれ 0.25 μ g と 1 unit Cre recombinase (Novagen) を用いて組み換えを行い、コロニーPCR と DNA配列決定により 12 クローン中 3 つが設計どおりの組み換え体 OS (H10)/pMK であることを確認した。この実験から、Cre recombinase を利用した組み換え系を用いることで、わずか一日で scFv 提示用ファージミドベクターから OS 測定用ベクターを単離できることが明らかとなった。さらに、得られた OS (H10)/pMK にて形質転換した TG-1 培養上清にて ELISA を行い、抗原濃度依存的なシグナル上昇を観察した。これにより OS-ELISA に応用可能な V_L -MBP/ V_H -phage 混合溶液が調製できたことが示された。また、scFv (H10)/pMK と HEL 結合能のない抗体 scFv (9-3)/pMK を 1:5000 の割合で混合したモデルライブラリを用いて HEL に対するパニングを行い、scFv (H10)/pMK を 3000 倍以上に濃縮できた。

以上の結果より Cre/loxP system を用いた簡便な scFv/OS ベクター変換系の作製および loxP-linker をもつ scFv/pMK ベクターによるスクリーニングに成功したと考えられる。今後この scFv/pMK に、 V_H/V_L 間相互作用の弱い Framework (FR) 配列を持つ抗体断片を挿入したライブラリを作製することにより、OS法に適した目的抗体を簡便にスクリーニング

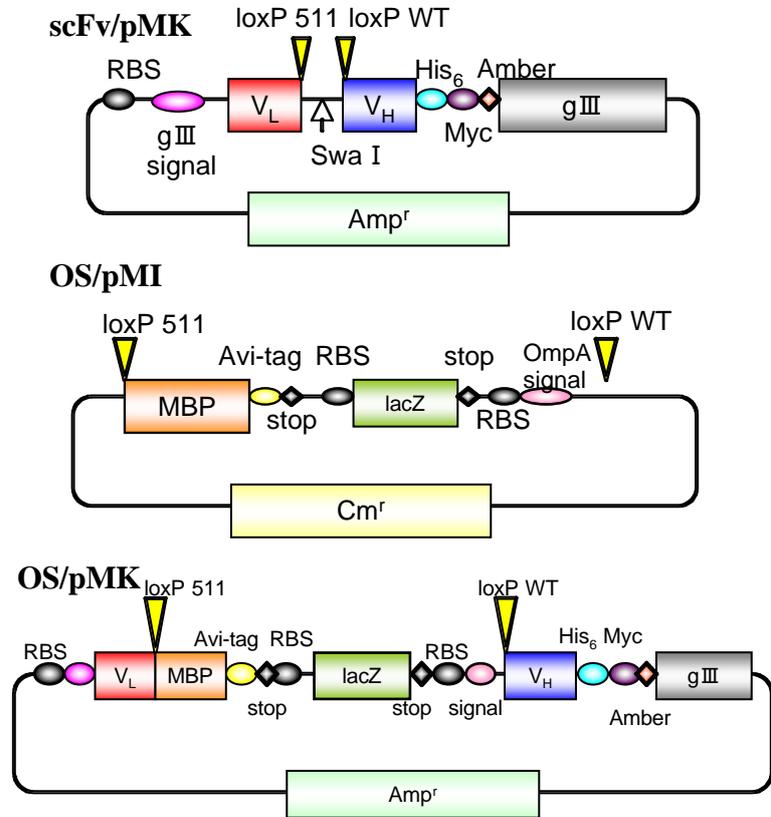


Fig. 1 Structure of vectors

できると期待される。またこの系は、ドナーベクター中のloxPサイト間配列を変換することにより、任意タンパク質と抗体との融合タンパク質を容易に作製できるようになると考えられるため、非常に有用である。

第3章では、抗体-酵素融合タンパク質を用いた農薬指示菌を作製した。これまで作製されてきた抗体と酵素を用いたセンサー蛋白質は、活性部位近傍にエピトープを挿入した酵素の活性を抗体により制御するものが多く、感度の劣る競合法での測定であること、また小分子化合物の検出は難しいといった欠点があった。そこで本研究では円順列変異または分割酵素を用い、小分子化合物の非競合的な測定が可能な融合タンパク質の作製を試みた。

円順列変異体とは本来のN/C末端を適切な長さのペプチドリンカーで接続し、別の領域に新たな末端を持たせた変異体である。これに異なるタンパク質ドメインを融合して融合タンパクを作製する場合、そのドメインの位置や大きさ、形、配向性などにおいてより自由度の高い混成蛋白質が作製でき、また更なる高次機能の発現も期待される。

今回は農薬認識抗体可変領域を融合した円順列変異体β-ラクタマーゼ(cpBLA)発現株をアンピシリン(Amp)含有培地にて培養し、農薬添加によってBLA活性が上昇し菌体増殖が観察される系の構築を行った(Fig. 2)。

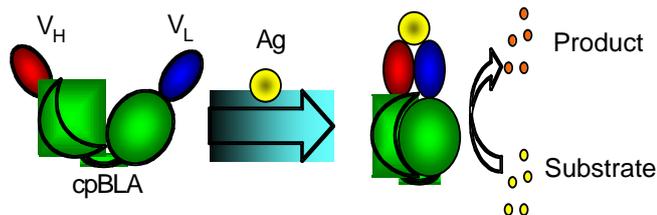


Fig. 2 Aim of the study

ネオニコチノイド系農薬 imidacloprid (ICP) を認識する scFv のリンカー領域に、活性部位近傍ループ168-170 位に新規末端を持つ cpBLA を挿入した pET26b 由来カナマイシン (Km) 耐性発現ベクター pET26/Fv-cpBLA を作製した。今回用いた抗体は scFv の状態で $K_d = 67$ nM 程度の ICP 結合能を持ち、類似体チアクロプリド (TCP) に対しては 1.3 % 程度の交差反応性しか持たない。作製したベクターにて大腸菌 BL21 (DE3, pLysS) を形質転換し、50 $\mu\text{g/ml}$ Km, 1mM IPTG, 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp ならびに 0-10 ng/ml の ICP または TCP を含む LB 培地にて 33 時間振盪培養し、経時的に濁度を測定した。この結果、Amp を含まないサンプルにおいては抗原の濃度、種類に関わらず同様の増殖が示された。よって ICP および TCP 自体には大腸菌に対する毒性ないし増殖促進能はないと考えられる。一方 Amp を含むサンプル中では、極めて微量 (1 ppb 以上) の ICP を含む培地において顕著な濃度依存的増殖が認められた。これに対し、TCP を加えた場合はより高い濃度でのみ有意な増殖が見られた。また、培養上清中の目的タンパク質を金属アフィニティーカラムにより濃縮し、ELISA により Fv-cpBLA の ICP 特異的な結合能を確認した。さらに発色基質 nitrocefin または蛍光基質 fluorocillin を用いた酵素活性測定より、ICP 特異的な BLA 活性の上昇が確認された。よって微量の ICP 依存的に活性化されるセンサー酵素ならびに ICP 依存的に増殖を示す高感度な環境汚染物質指示菌が創製できたと考えられる。これは抗体-円順列変異酵素にて小分子を検出

できた初めての例であり、また分泌系にてセンサータンパク質を作製した稀少な例でもある。さらにcpBLAはアンピシリン含有培地での培養による選択が容易であることから、より高感度なセンサーや任意抗原を認識する変異体の取得が可能になると期待され、意義深い。

以上より、**Cre/lox system** を用いた簡便なscFv/OS変換系および、環境汚染物質指示菌の作製を行うことができた。将来的には、scFv/OS変換系を用いたライブラリから得られたOS法に適したクローンをリガンド認識ドメインとし、cpBLAをコードするドナーベクターによって簡便に作製したFv-cpBLA発現ベクターにより、任意抗原に対するセンサー酵素を効率よく取得できるようになると期待される。