

論文内容の要旨

論文題目

リボソームディスプレイ法を用いた

エピトープマッピング系の開発

(Development of epitope mapping of monoclonal antibody and scFv using ribosome display)

氏名 長田 江里子

序論

ランダムペプチドプールから新機能・高機能性ペプチドの探索は創薬をはじめ多くの分野でその重要性が指摘されているが、現時点では、基盤となる技術開発が不十分である。そこで、ペプチド-抗体間(エピトープ-抗体間)の特異的な結合を応用し、10 アミノ酸からなるランダムペプチドライブラリからモノクローナル抗体のエピトープを決定するエピトープマッピング系の技術開発を行った。

現在行われているエピトープマッピング(ペプチドアレイ、ファージディスプレイ、X線結晶構造解析、NMR など)では、コストが高い・汎用性が低い・実験操作が煩雑・合成困難なペプチドがある等の問題を抱えている。このような背景を踏まえ、これらの問題解決の一つの手法として、再構成型無細胞タンパク質合成系である PURE system (Protein synthesis Using Recombinant Elements system) を応用したリボソームディスプレイ法を提

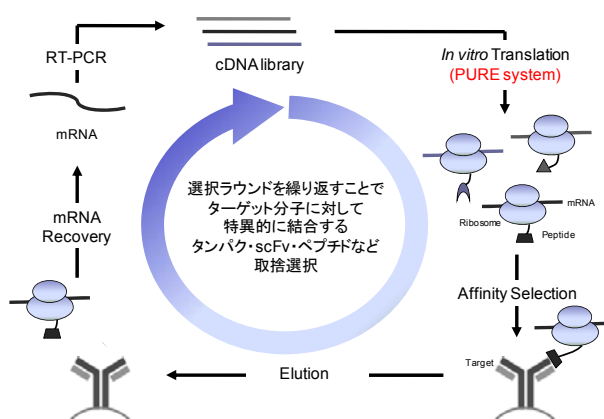


図 1. リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピングの基本戦略。

案し、従来法と比較し、迅速かつ簡便にエピトープマッピングが可能な技術開発を行った(図 1)。

リボソームディスプレイ法とは cDNA ライブラリから *in vitro* で翻訳し、特定の結合特性を持つタンパク質のスクリーニングに大変有用な手法である。リボソームディスプレイ法では、選択ラウンドを繰り返すことで、ターゲット抗体に対して特異的に結合するペプチドの選択ができる。そのうえ、選択されたペプチドのアミノ酸配列情報からエピトープを決定することも可能である。本論文では、リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピング系の技術開発を行った結果について報告した。

1. モノクローナル抗体(Immunoglobulin G)に対するエピトープマッピング

エピトープ既知および未知のモデル抗体をターゲットに選択を行い、リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピングの実用化と応用化の可能性について検討した。技術系確立の第一段階として、先行研究で、エピトープが既知の anti-FLAG M2 antibody に対する選択を行い、anti-FLAG M2 antibody のエピトープ DYKXXD を持つペプチドが濃縮された。この結果より、リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピングの実用性が示された。

第二段階として、エピトープが未知の anti-β-Catenin monoclonal antibody を用いた本格的な選択を試み、選択 1 ラウンド後から anti-β-Catenin monoclonal antibody (mAb 36a) と特異的に結合するペプチドが選択された(図 2A)。選択後の cDNA プールをクローニングし、配列解析したところ、抗原であるβ-Catenin と濃縮されたペプチド間のアミノ酸配列に相同性が見られた(図 2B)。そこで、濃縮されたペプチドの配列情報を元に推定エピトープを PURE system で合成すると、この推定エピトープは mAb 36a と特異的に結合した(図 2C)。さらに、推定エピトープを欠損させた変異体タンパクと mAb 36a との結合や推定エピトープペプチドの Alanine scanning の結果から、エピトープおよびコアエピトープの決定にも成功した。本手法を用いることで、エピトープが未知のモノクローナル抗体に対してエピトープマッピングができることも示された。

第三段階として、本手法の更なる迅速化と簡便化を目指し、mAb 36a のビーズへの固定化方法、および low pH バッファーによる溶出条件の検討を行った。前者では、培養上清中に含まれる

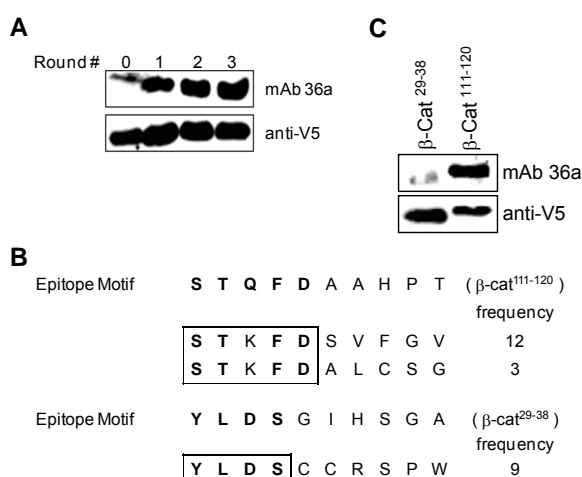


図 2. リボソームディスプレイ法で選択されたペプチドおよび推定エピトープペプチドは mAb 36a と特異的に結合する。A: 選択 3 ラウンド後のペプチドプール中に含まれる mAb 36a と特異的に結合するペプチドを検出。B: 選択 3 ラウンド後の cDNA プールを配列解析。C: 推定エピトープペプチドと mAb 36a との結合を検出。

モノクローナル抗体を直接ビーズへ固定化し、この抗体に対する選択を行った。この方法では、細胞培養サイズのスケールダウンとモノクローナル抗体の精製操作の省略化を図ることができる。後者の low pH バッファーによる溶出では、0.2 M Glycine (pH2.5)を溶出バッファーに使用した。この方法では、抗原タンパクの準備と溶出条件の検討の省略化を図ることができる。両者とも、選択 1 ラウンド後から、ターゲット抗体と特異的に結合するペプチドが選択された(図3)。これらの結果から、本手法を改良することで、実験操作の迅速化と簡便化も可能であることが併せて示された。

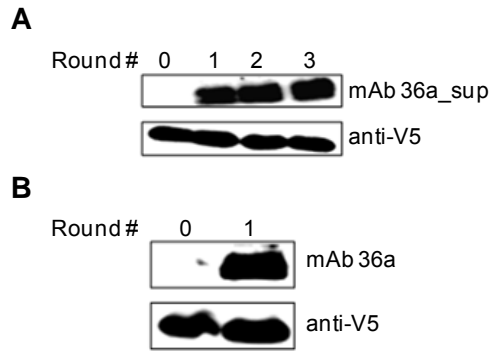


図3. 実験操作の改良. A: クルードな培養上清中に含まれるモノクローナル抗体を直接ビーズへ固定化. B: low pH バッファーによる溶出。

2. scFv に対するエピトープマッピング系の開発に向けて

近年、モノクローナル抗体に代わり、*in vitro* display system で取得された一本鎖抗体である scFv (Single chain variable fragment of antibody)の応用化に注目が注がれている。scFv はモノクローナル抗体と比較し、細胞毒性のある抗原から抗体を作製できる、作製は数日で可能など優れた利点があるからだ。このような優れた利点があるにもかかわらず、scFv に対するエピトープマッピング系の技術開発分野は発展途上である。なぜなら、抗原認識能を保持した scFv を基盤上へ簡単に固定化することが困難であるからだ。そこで、リボソームディスプレイ法を用いたモノクローナル抗体のエピトープマッピングシステムを応用し、同様に scFv のエピトープマッピングシステ

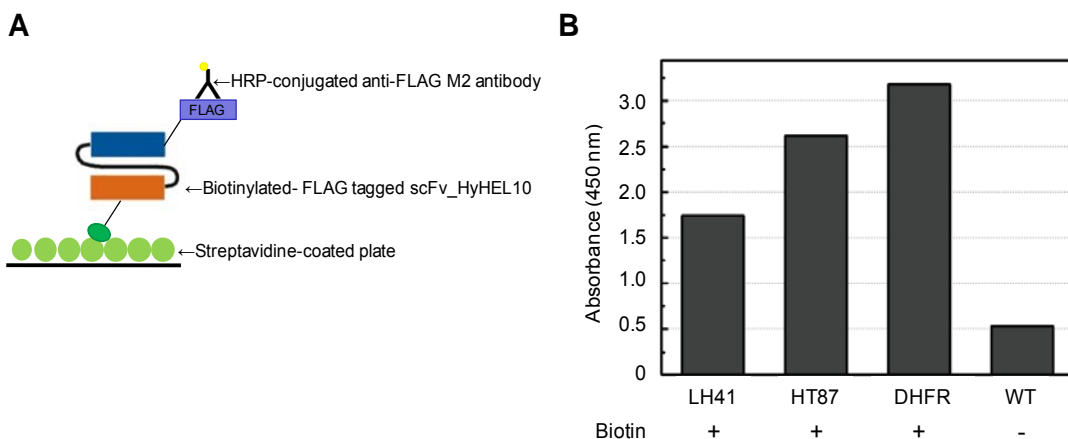


図4. scFv HyHEL10 は部位特異的に基盤上へ固定化される. A: 固定化方法の概略図. B: 部位特異的に固定化されたscFv_HyHEL10をFLAG tagで検出. LH41はL鎖41番目のHを、HT87はH鎖87番目のTを、DHFR87はDHFR87番目をbiotin標識した。WTはbiotin未標識のscFv_HyHEL10。

ムの技術開発も併せて行った。モデル scFv には抗ニワトリリゾチーム抗体である scFv_HyHEL10 を用いた。技術系確立のため、まずは scFv_HyHEL10 を部位特異的に biotin 標識し、biotin-streptavidin を介した基板上への固定化を検討した。なお、scFv の固定化方法の概略は図 4A に示した。

図 4B より、scFv を部位特異的に基盤上へ固定化することができた。そのうえ、部位特異的に biotin 標識した scFv_HyHEL10 は抗原認識能を失わないことも併せて確認できた。

今後は、scFv に対する本格的な選択を行い、scFv と特異的に結合するペプチドを選択することができれば、モノクローナル抗体のみならず、scFv に対するエピトープマッピングも迅速かつ簡便に行うことができる。そして、抗原認識能を保持したまま scFv を部位特異的に基板上へ固定化することで、本法はエピトープマッピング以外の分野(例えば、相互作用解析や抗体工学、創薬)への応用化も期待できる。

まとめ

本手法を用いた技術開発により、迅速かつ簡便にモノクローナル抗体のエピトープマッピングを行うことに成功した。今後は、scFv に対するエピトープマッピングシステムの開発が大きな課題である。

モノクローナル抗体と特異的に結合するペプチドの選択に成功したことにより、本手法はランダムペプチドライブラリからターゲットタンパク質へ特異的に結合するペプチドの選択にも応用できる可能性が示された。特に、リガンド分子としてのペプチドや scFv は再構成型無細胞タンパク質合成系で合成可能でかつ、コスト、安定性、スピード性および汎用性の面においても優れたターゲットタンパク質である。本手法を応用することで、エピトープマッピングを迅速かつ簡便に行うことができるだけでなく、受容体のリガンド結合部位に結合するアゴニスト・アンタゴニストペプチドや、酵素の活性中心に結合する阻害ペプチドのスクリーニング、抗体やタンパク質の相互作用解析にも効果を発揮することが期待される。