

可変部位は不安定だが… —抗体工学の最近の話題から

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 上田 宏

周知のように抗体（免疫グロブリン）はその特異的認識作用のため基礎研究から臨床診断、治療にまできわめて幅広く用いられている。しかし通常用いられるポリ／モノクローナル抗体は必ずしもその用途に最適であるとは限らない。たとえばガン治療にモノクローナル抗体を用いる場合、その大きな定常部位は直接抗原結合に関わっていないのに大きな抗原性を持っており、投与には慎重さを要する。このような観点からマウス-ヒトキメラ抗体などが研究されてきたが、最近ではより小さく抗原性も少ない大腸菌などの微生物でも生産可能な可変部位(Fv)に注目が集まっている。最近Fvが注目されるもう一つの理由は、フェージ提示法と呼ばれる抗原結合能を持つ一本鎖Fv(ScFv, 可変部のH鎖とL鎖を15アミノ酸程度のペプチドリンカーで結合させたもの)をM13フェージのコートタンパクとの融合タンパクとして発現させて選択する系が開発され、すでに商品化もされている点である。この系を用いれば、少なくとも原理的にはハイブリドーマを経ずに直接脾細胞より目的抗体クローンをその遺伝子と共に選別することができる。現在までにPCR法を利用したマウスおよびヒト抗体のフェージ提示技術が確立されているが、Yamanakaらは今まで報告のなかったニワトリ抗体由来のScFvをフェージに提示する系を作製した。免疫脾細胞より 1.4×10^7 クローンのライブラリーを作製し、そこからパンニングと呼ばれる選択の後マウス血清アルブミンを認識するクローンを5種得て、その特異性を確認した。今まで得にくかったマウス由来やマウス由来タンパクと類似性の高いタンパクに対するScFvあるいはその誘導体作製に有用と期待される。

Gunneriussonら²⁾はフェージではなく2種の*Staphylococcus*属のグラム陽性菌の膜表面にScFvを発現させることに成功した。プロテインAの膜貫通部分との融合タンパクとして発現させたものであるが、ヒトIgEを固相に吸着させ菌そのものを用いてのELISA検出に成功している。ライブラリーサイズが大きくなれるか、ベクターが扱いやすいかといった問題もあるが、フェージやグラム陰性で溶菌しやすい大腸菌よりも扱いやすければ今後目的の特異性を持った抗体クローンの選択に使われるようになる可能性もある。

さてFvは前述のように多くのメリットを持つが、IgGやFabと比較するとH鎖(VH)とL鎖(VL)が分離しやすくどうしても不安定で、抗原親和性も劣る場合が多い。これを安定化するには両鎖をペプチドで結合させただけでは不十分であるのも事実で、抗体の代替品として用いるためにはFvをより安定化させるための基礎研究も必要である。Youngら³⁾は抗*Salmonella* serotype B多糖ScFvのVH, VL間にジスルフィド結合を導入し、より安定化することに成功した。結晶構造よりC α 間の距離が6Å程度の2残基を選び、部位特異的変異導入によりシステインに変換した。大腸菌で不溶体として発現させ、巻き戻し酸化することにより単量体の目的タンパクを得た。変異体では変性温度が60°Cから69°Cと大幅に上昇しており、一本鎖でないFvにジスルフィドを導入した際によく見られるVH-VH, VL-VLなどの会合体は観察されなかった。

最近、このFvの不安定さを逆に利用することによってサンドイッチ法に代表される免疫測定を簡略化できる可能性が報告された。Uedaら⁴⁾は抗リゾチーム抗体HyHEL-10のVL断片をマイクロプレートに固定し、VH断片のみをM13フェージに提示して抗原と共にウェル内で混合し、マイクロプレート上に結合するフェージ量から抗原量を推定する新しい測定法を提案した。この抗体のVLとVHは抗原非存在下ではほとんど結合が見られないほど結合が弱いですが、抗原が共存すると3者は安定な複合体を形成する。この複合体の量は抗原濃度とよい相関を示し、これを抗原測定法と見た場合通常のスンドイッチ法と同等以上の感度で濃度が測定できた。フェージの代わりにアルカリフォスファターゼなどの酵素を用いれば、反応洗浄ステップが減らせるので在来法より短い測定時間での測定が可能である。今後はこの原理がホモジニアス測定系へ応用されてより短時間で測定できるようになり、また他の抗原抗体系でも広く利用できることが期待される。

- 1) Yamanaka, H. I. et al.: *J. Immunol.*, **157**, 1156 (1996).
- 2) Gunneriusson, E. et al.: *J. Bacteriol.*, **178**, 1341 (1996).
- 3) Young, N. M. et al.: *FEBS Lett.*, **377**, 135 (1995).
- 4) Ueda, H. et al.: *Nature Biotechnol.*, **14**, 1714 (1996).