

# 分子標的素子デザインにおけるファージライブラリー法

橋口 周平<sup>1\*</sup>・宮原 隆二<sup>2</sup>・岸本 聡<sup>3</sup>・伊東 祐二<sup>4</sup>

抗体は生命が育て上げてきた専属の分子標的素子の中で無限の特異性を誇る分子である。この抗体を作製する技術として、1975年にKollerとMilsteinらによって確立された細胞融合法は、研究用ツールや標的分子の検出用試薬としての抗体、さらに近年では、がんや免疫疾患に対する抗体医薬品を創製するための手段として利用されてきた。しかし最近では、ファージディスプレイ技術によって作製された抗体ライブラリーが、細胞融合法に替る新たな抗体作製法として注目されている。ファージディスプレイ法とは、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージの表面にペプチドやタンパク分子を提示する技術であり、この技術を使って、抗体だけでなく機能性ペプチドや結合タンパク質などの「分子標的素子」が産み出されている。本稿では、抗体ライブラリーを中心にファージディスプレイ法の概要とその実際について紹介したい。

## ファージディスプレイ法

ファージディスプレイでは、外来の遺伝子産物をバクテリオファージのコートタンパク質に融合することで、他の分子と相互作用できる形で、ファージ表面に提示することができる。しかも、単離したファージに提示されている外来遺伝子産物のアミノ酸配列は、ファージ内のファージDNAに格納されているその遺伝子の塩基配列を読むことで、容易に特定できる。この技術を用いた機能分子の探索では、まず、ランダム配列のペプチドや多様な配列を持つ抗体分子などのいわゆる分子ライブラリーを提示させたファージの集団（ファージライブラリー）を作製し、次にバイオパニングと呼ばれる目的とする標的分子への結合力を指標にしたファージの濃縮を行う。その後更なる絞り込みによって目的の機能を持つ分子を提示したファージを単離する。

1985年、George SmithがScience誌に、fdファージの感染能は保持しつつキャプシドタンパク分子g3pのN末端にランダムペプチドをディスプレイさせることができることを報告<sup>1)</sup>して以来、繊維状fdファージ(M13

ファージ)の使用が、その主流となった。現在では、溶菌性のλファージ<sup>2,3)</sup>、T4ファージ<sup>4)</sup>やT7ファージ<sup>5)</sup>も使用されているが、ここでは、我々が主に使用している繊維状ファージとT7ファージを用いたディスプレイ系について解説する。

**繊維状ファージとT7ファージによる提示系** 繊維状ファージ(fd, M13ファージ)は、環状の一本鎖ゲノムDNAを内包し、回りに5種類のコートタンパク(g3p, g6p, g7p, g8pおよびg9p)がアセンブリすることで細長い筒状の構造を有している(図1)。この提示系に使用されるファージベクターDNAは、ファージ粒子形成に必要な遺伝子をすべて含んでおり、大腸菌感染により単独でファージを形成できる。このシステムでは、外来遺伝子を融合したコートタンパク質すべてが、外来分子を提示することになる。たとえばファージ粒子に5分子存在するg3pを使った提示系では、比較的大きな分子量のタンパク質(~25,000)を提示させることができる<sup>1)</sup>。ただし、g3pは大腸菌への感染子としても機能するため、提示される外来分子の大きさや性質によっては、ファージの感染能が低下する恐れがある。これを回避するため、後述のファージミドベクターが利用される。また、ファージ粒子の鞘を形成するg8pを提示系として用いた場合、1粒子当たり約3000もの分子を提示させることが可能であるが、提示できるのは5~8アミノ酸残

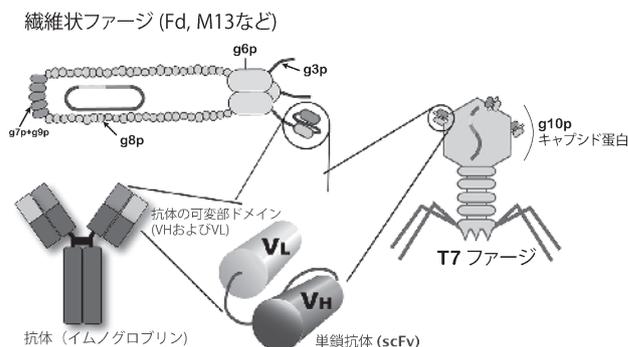


図1. 抗体ディスプレイファージの構造

\*著者紹介 <sup>1)</sup> 鹿児島大学理工学研究科化学生命化学工学専攻(助教) E-mail: shuh@be.kagoshima-u.ac.jp

<sup>2)</sup> 鹿児島大学理工学研究科化学生命化学工学専攻(博士後期課程学生)

<sup>3)</sup> 鹿児島大学理工学研究科生命化学専攻(博士前期課程学生)

<sup>4)</sup> 鹿児島大学理工学研究科生命化学専攻(教授) E-mail: yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

基のペプチドに限られる<sup>9)</sup>。g8pの提示系の利点としては、多価での結合ができるため、低親和性のリガンドを探索する場合には有利である。最近ではg7pやg9pを利用した提示方法も確立されている<sup>7,8)</sup>。また先に述べたg3pを提示分子とするペプチドファージライブラリがNew England Biolabs社から市販されており、手軽に利用することができる。

一方、T7ファージは頭部、尾部、脚部をもつ形態の溶菌性ファージで、直鎖状二本鎖DNAゲノムが頭部に格納されている。T7ファージの頭部はg10キャプシドタンパクが415個アセンブリすることで形成され(図1)、このg10遺伝子の3'末端(g10タンパクのC末側)に、外来の遺伝子を組み込むことで、頭部の表面に外来のタンパク質もしくはペプチドを提示することができる<sup>5)</sup>。繊維状ファージと異なり、C末端への提示は、外来遺伝子によるファージコートタンパク質発現への影響が少ないので、cDNA発現ライブラリーなどの作製に有利であると考えられる。T7ファージへのディスプレイシステムはT7Selectベクターとして、Novagen社から購入できる。

**ファージベクターとファージミドベクター** fdファージを用いた提示系には、前述のファージベクターに加えてファージミドベクターを使った系がある。ファージミドベクターは、プラスミドとしての機能を持つ環状のDNAであり、単独ではファージ粒子を形成できない。外来分子を提示分子(たとえばg3p)と融合させた遺伝子を持つファージミドベクターを形質転換させた大腸菌に、ファージ粒子形成に必要な遺伝子を供給するヘルパーファージ(M13KO7など)を感染させることで、外来分子を提示させたファージ粒子を作製することができる。この際、外来分子を融合したg3pは、ヘルパーファージから供給される野生型g3pと競合しながらファージ粒子に組み込まれるため、外来分子の提示は、g3pの一部、つまり5分子のg3pの内1-3程度に限られる。残存する野生型g3pの存在によって、大腸菌への感染能は担保され、さらに大きな分子の提示が可能となる。また、ヘルパーファージのパッケージングシグナルには変異が導入されており、この方法で作製したファージの中には、ファージミドベクターが優先的にパッケージングされるため、提示分子の遺伝情報はファージ内に格納される。

多くのファージミドベクターでは、外来遺伝子とファージコートタンパク質遺伝子の間にアンバーストップコドン(TAG)を導入することで、大腸菌のアンバーサプレッサー株にそのまま形質転換することにより、外

来遺伝子由来のタンパク質を、可溶性タンパク質として分泌発現させる工夫がなされている<sup>9,10)</sup>。

## 抗体ファージライブラリー

1989年から1991年にかけてスクリップス研究所のLerner RAとMRC分子生物学研究所のWinter Gがヒト抗体をファージに提示できることを示した<sup>11,12)</sup>。抗体の抗原結合部位であるH鎖の可変部(VH)とL鎖の可変部(VL)領域で構成されるFvを短いリンカーで直列につないだ単鎖Fv抗体(single-chain Fv; scFv)<sup>12)</sup>や、抗体のFab領域を提示したFab抗体ライブラリーが良く用いられる。これらの抗体ライブラリーは、遺伝子ソースの違いによって、以下の3つに分類される。

**免疫(immune)ライブラリー** マウスなどの実験動物を特定の抗原で繰り返し免疫し、抗体応答を十分に高めたあと、その動物のリンパ球から作製したものを免疫(immune)ライブラリーと呼んでいる。免疫によって親和性が増強された抗体遺伝子由来であることから、強いアフィニティーの抗体クローンを単離することができる。

がんや自己免疫疾患、感染症患者、あるいは対象抗原をワクチンとして接種されたヒト由来のリンパ球や骨髄細胞を用いて作成したライブラリーなども免疫ライブラリーと呼ばれるが、これらのライブラリーでは、特定の抗原に対する抗体遺伝子がライブラリー中にあらかじめ多く含まれているため、比較的小さなサイズのライブラリーからでも、目的の抗体を単離することが可能である。

**ナイーブライブラリー** ナイーブリンパ球“naïve lymphocyte”とは、抗原刺激を一度も受けていないリンパ球のことであり、ナイーブライブラリーとは無菌室で飼育されている実験動物などのリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された抗体ライブラリーのことを指す。ただし、ヒトでは、繰り返し抗原免疫されていないという意味から、健康人由来のライブラリーをナイーブライブラリーあるいは非免疫ライブラリー(non-immune library)と呼んでいる。ナイーブライブラリーは、免疫ライブラリーとは異なり抗原特異的なクローンが少ないため、抗体ライブラリーの多様性が確保されていることが重要である。免疫ライブラリーに比べて、抗原特異的クローンの単離に苦勞する傾向にあるが、得られる抗体としては十分なアフィニティーをもつ抗体が単離されている<sup>13,14)</sup>。

**合成ライブラリー** 大腸菌での発現とファージへの提示に適した特定の抗体遺伝子のフレーム構造の組合せを選択し、相補性決定領域(CDRs)などの抗原結合領

域の部分に、適度な長さのランダムなアミノ酸配列をコードする人工的なオリゴヌクレオチドを挿入することで、ライブラリー化したものである。最初から機能的な scFv を産生する VH と VL 遺伝子の組合せでライブラリーを構築することができるため、得られる抗体の発現効率や安定性が高いとされる。Morphosys 社が開発した HuCAL<sup>®</sup> が代表的なライブラリーである。

### ファージライブラリーからの結合分子単離

**抗体ライブラリーの構築** 免疫ライブラリーおよび ナイーブ抗体ライブラリーにおける抗体の多様性は、多種類の VH 遺伝子と VL 遺伝子とをランダムに組み合わせることにより達成される。イムノグロブリンそのもの、もしくは Fab フラグメントをファージに提示しようとする試みも報告されているが、先述した VH と VL 領域を短いリンカー配列で直列につないだ単鎖抗体 (scFv) として提示させている (図1)。B細胞由来のさまざまな配列をもつ抗体遺伝子プールから、数十個存在する V 領域の遺伝子を、配列が類似した遺伝子ごとに特異的なプライマーを設定した後、cDNA 鋳型として VH 遺伝子と VL 遺伝子を個別に PCR 増幅する。PCR によって VH と VL 遺伝子を増幅し、(GGGGS)<sub>3</sub> などのリンカーペプチド配列をコードしたリンカー DNA を用いてアセンブリ PCR を行うことでランダムに連結させ、それをファージのコートタンパク質 g3p の N 末端側に融合タンパク質として発現するようにファージミドベクター上に組み換えて scFv 遺伝子ライブラリーを構築する (図2)。大腸菌に形質転換後ヘルパーファージを用いて、ファージを

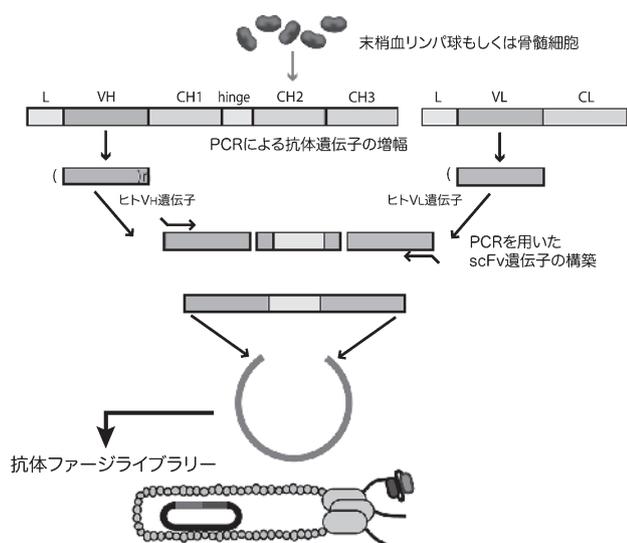


図2. ナイーブ抗体ライブラリー構築法の概略

回収することで、最終的に多様性をもつ抗体ファージライブラリーを作製する。高い親和性、特異的を有するクローンを得るためには、できるだけ大きなサイズのライブラリー構築が重要であるが、経験上  $10^8$  程度のサイズがあれば、特異的抗体を選別するには十分であると考えている<sup>14)</sup>。

**バイオパンニング** 抗体などを提示したファージライブラリーから、標的としている分子に結合するファージを選別する操作をバイオパンニングと呼んでいる。基本的には、固定化した標的分子にファージライブラリーを反応させ、結合しなかったファージを洗浄により除去した後に、結合したファージを溶出し大腸菌に感染させ増幅させるという操作を数回行うことで、標的分子に結合活性を有するファージクローンを濃縮することである (図3)。

パンニングの手法としては、さまざまなものが考案されているが、プラスチックプレートに固定化した抗原とファージライブラリーを反応させるパンニング法や、ビオチン化した標的抗原をファージライブラリーと反応後ストレプトアビジンを介して回収する方法などがよく使用される<sup>15,16)</sup>。また、標的分子を発現している細胞を用いて選別するという手法 (細胞パンニング) もある<sup>17,18)</sup>。さらに、ファージライブラリーを生体内に投与して、新規ターゲティングペプチドを同定する試み (*in vivo* パンニング) も行われている<sup>19-21)</sup>。

**次世代シーケンサーを用いた抗原特異的抗体クローン同定の新しい試み** 最後に、我々が最近行った食物 (小麦) アレルギー患者血液由来の IgE 抗体ライブラリーから、アレルギーの原因となる食物アレルゲン (抗原) に対する IgE 抗体の同定を行った例について紹介する。小麦アレルギーの症状を持つ 2 人の患者 A, B から血液 (5 ml) を採取し、全 RNA から cDNA を調製後、VH 上

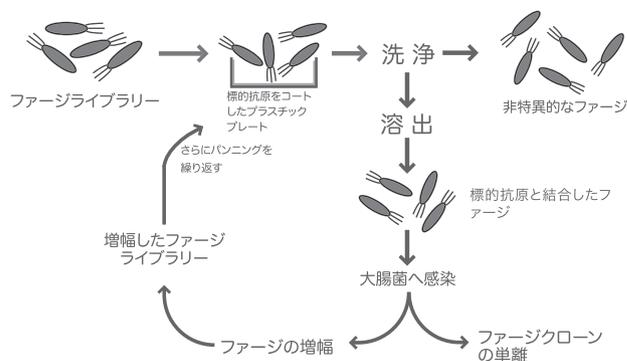


図3. ファージディスプレイライブラリーを用いたパンニング方法

流配列に特異的なプライマーとIgE重鎖( $\epsilon$ 鎖)のCH1領域特異的なプライマーを用いて、IgEのVH領域の遺伝子を増幅した。別に増幅したL鎖の遺伝子を連結させ、単鎖Fvライブラリーを構築し、このライブラリーを用いて、小麦アレルゲンに対するバイオパンニングとその後のスクリーニングを行った。その結果、A、Bの患者から、それぞれ4種類と3種類の小麦アレルゲンに対する特異的な抗体クローンの単離に成功した。

一方で、バイオパンニング後のファージクローンの結合スクリーニングでは、100–200、多くても1000クローン程度のスクリーニングが限界である。また、特異的な抗体ファージの濃縮には、複数回のパンニングが必要であり、これらの操作に多くの時間と手間がかかる。これらの労力を省き、ライブラリー中にきわめて少量しか存在しない特異的クローンの単離が可能になれば、迅速かつ多様な抗体の取得法が確立できる。そこで、我々は、バイオパンニングにおける新しい技術の導入として、次世代シーケンサーを用いた抗原特異的な抗体の同定法の確立を行っている。この方法は、構築したライブラリーのパンニング前と後のVHの配列を、次世代シーケンサーで解析し、その中に含まれる各VH配列の全リード数中の存在率(頻度)を計算する。もし、あるVH配列が抗原特異的であれば、パンニング後でそのVH配列の頻度が上昇するはずであり、この頻度の上昇(増幅率)によって、抗原特異的なVHの配列を特定できる。この手法を、前述の小麦アレルゲンに対するIgE抗体に単離に適応したところ、スクリーニングによって単離されたクローン以外に、新たに5種類の抗原特異的なVH配列を同定することができた。

この次世代シーケンサーを使った抗体の同定手法は、細胞パンニングや*in vivo*パンニングにおいても、得られたクローン配列を網羅的に解析することができるという点で画期的であり、しかも、通常複数回必要なパンニングの操作を1回行うだけで目的のクローンの同定が可能である。

### おわりに

本稿では、ファージライブラリーについてヒト抗体ファージライブラリーの例を中心に解説したが、この技術はその他の分子へも適用可能である。たとえば、ラク

ダ科の動物が持つ重鎖抗体のVHH抗原結合ドメインは、ヒト抗体のVHにあたるドメインのみによる抗原結合が可能であり、次世代の抗体医薬品や産業利用が可能な抗体として期待されている。我々も、アルパカのVHHドメイン抗体ファージライブラリーを使って、機能抗体の単離を進めている<sup>22,23</sup>。さらに、イムノグロブリン以外のスキヤフォールドのタンパク質や低分子ペプチドのリガンドの設計にも<sup>24</sup>、ファージライブラリーは大きな威力を発揮する。この分野への新たな技術の導入や研究者の方々の参入によって、医薬品やセンサーの素子となる新規の分子標的素子設計研究がさらに盛んになることを期待したい。

### 文 献

- 1) Smith, G. P.: *Science*, **228**, 1315 (1985).
- 2) Sternberg, N. and Hoess, R. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1609 (1995).
- 3) Mikawa, Y. G. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **262**, 21 (1996).
- 4) Ren, Z. J. *et al.*: *Protein Sci.*, **268**, 363 (1999).
- 5) Novagen. T7Select System Manual TB178. Madison, WI: Novagen (2000).
- 6) Smith, G. P. and Petrenko, V. A.: *Chem. Rev.*, **97**, 391 (1997).
- 7) Løset, G. Å. *et al.*: *PLoS ONE*, **6**, e14702 (2011).
- 8) Løset, G. Å. *et al.*: *PLoS ONE*, **6**, e17433 (2011).
- 9) Bradbury, A. R. M. and Marks, J. D.: *J. Immunol. Methods*, **290**, 29 (2004).
- 10) Hoogenboom, H. R. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4133 (1991).
- 11) Huse, W. D. *et al.*: *Science*, **246**, 1275 (1989).
- 12) Marks, J. D. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **222**, 581 (1991).
- 13) Cardoso, D. F. *et al.*: *Scand. J. Immunol.*, **51**, 337 (2000).
- 14) Gejima, R. *et al.*: *Hum. Antibodies*, **11**, 121 (2002).
- 15) Hawkins, R. E. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **226**, 889 (1992).
- 16) Chen, Y. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **293**, 865 (1995).
- 17) de Kruif, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3938 (1995).
- 18) Muraoka, S. *et al.*: *J. Biochem.*, **145**, 799 (2005).
- 19) Pasqualini, R. and Ruoslahti, E.: *Nature*, **380**, 364 (1996).
- 20) Arap, W. *et al.*: *Science*, **279**, 377 (1998).
- 21) Krag, D. N. *et al.*: *Cancer Res.*, **66**, 7724 (2006).
- 22) Miyazaki, N. *et al.*: *J. Biochem.*, (in press).
- 23) Mizukami, M. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **105**, 23 (2015).
- 24) Hatanaka, T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **43126**, 823 (2012).