

2P-073 抗原免疫した VHH 抗体ファージライブラリからのハイスループット配列解析により同定された特異的抗体候補の抗原結合活性の評価

○佐竹 貴莉子, 宮本 結花, 岸本 聡, 加藤 由貴子, 加藤 太一郎, 伊東 祐二
(鹿児島大学院・理工・生命化学)
yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

【背景と目的】ファージライブラリからの特異的なバインダーの特定に、バイオパニングと NGS 解析を組み合わせた手法の有用性を確認するため、特定された VHH 抗体の機能性について、抗体ファージ並びに VHH の抗原結合活性について評価した。

【方法】抗原 A、B、C を免疫したアルパカ血液由来の VHH 抗体ファージライブラリを用い、パニング前後の NGS 解析による VHH 配列の増幅率の変化から、抗原特異的 VHH の候補を特定した。CDR3 配列を基にしたプライマーにより VHH 遺伝子を再構成し、抗体ファージならびにバクテリアで産生した VHH を調製し、ELISA で評価した。

【結果と考察】増幅率の高い 2 クローン（増幅率 1871、979 倍）と、中程度の 4 クローン（増幅率 36.3-46.0 倍）を選択し、抗原結合の機能性を検討した結果、いずれのクローンも、ファージ並びに VHH のレベルで抗原に対し結合活性を有していた。以上の結果から、NGS 解析によって特定された VHH 配列は高確率で機能性を有することが分かった。

Functional evaluation of antigen-specific antibodies identified by high-throughput sequence analysis from immunized VHH antibody phage libraries

○Kiriko Satake, Yuka Miyamoto, Satoshi Kishimoto, Yukiko Katou, Dai-ichiro Katou, Yuji Ito
(Dept.Chem Biosci., Grad. Sch. Sci Eng., Kagoshima Univ.)

Key words antibody, phage display, NGS

2P-074 抗原免疫した VHH 抗体ファージライブラリからのハイスループット配列解析による特異的抗体の同定

○宮本 結花, 佐竹 貴莉子, 岸本 聡, 加藤 由貴子, 加藤 太一郎, 伊東 祐二
(鹿児島大院・理工・生命化学)
yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

【背景と目的】アルパカのもつ重鎖抗体の抗原結合ドメインである VHH の抗体ライブラリから、抗原特異的な抗体の単離手法の確立をめざし、バイオパニングと NGS による網羅的配列解析を組み合わせた手法を検討した。

【方法】抗原 A、B、C の免疫 VHH 抗体ファージライブラリを用い、抗原に対するバイオパニング後の VHH 配列解析を Miseq (illumina) により行った。得られた配列を解析ソフトによって、すべての VHH 配列とそれらの各ラウンドでの頻度（存在率、%）、パニング前後での各配列の存在率の変化（増幅率）を算出した。

【結果と考察】抗原 A、B、C に対するバイオパニング前後の VHH 遺伝子配列を NGS で解析し、パニング前後の配列の増幅率が上位 100 のアミノ酸配列をもとに系統樹解析を行った。その結果、8 個のクラスターが形成され、抗原 A に特異的と予想される VHH 配列が同定された。抗原 B 並びに C に対する抗体ライブラリの実験結果を合わせ、本手法が、迅速にかつ多様な抗原特異的な候補配列を得るために極めて有用であるということが示された。

Identification of specific antibodies by high-throughput sequence analysis from the antigen immunized VHH antibody phage library

○Yuka Miyamoto, Kiriko Satake, Satoshi Kishimoto, Yukiko Kato, Daiichiro Kato, Yuuji Ito
(Dept.Chem Biosci., Grad. Sch. Sci Eng., Kagoshima Univ.)

Key words antibody, phage display

2P-075 アルパカ由来ナイーブ VHH 抗体ライブラリからの抗原特異的抗体の獲得と特性解析ならびに *Brevibacillus brevis* 発現系を用いた発現効率向上の検討

○岸本 聡, Abdor Rafique, 佐竹 貴莉子, 宮本 結花, 加藤 太一郎, 伊東 祐二
(鹿児島大院・理工・生命化学)
yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

【目的】アルパカが有する重鎖抗体由来結合ドメイン VHH は、単一ドメインで構成され、安定性・生産性に優れるといった産業化に適した特性を有している。本発表では、非免疫（ナイーブ）ライブラリからの抗原特異的な VHH の獲得方法を確立するため、VHH ファージライブラリの構築および、特異的 VHH の単離と発現方法の検討を行った。

【方法】アルパカ末梢血リンパ球から非免疫 VHH ファージライブラリを構築し、4 種類の抗原に対するバイオパニングを行った。VHH の発現については、大腸菌 HB2151 によるペリプラズム分泌発現、*Brevibacillus brevis* 分泌発現系で発現の検討を行った。

【結果・考察】複数の抗原に対し特異的な VHH クローンを複数獲得することに成功した。大腸菌発現系においては、以前我々の研究室で単離された免疫ライブラリ由来 VHH の収量が 10-20mg/L であったのに対し、非免疫由来 VHH では発現が極めて低い傾向にあった。一方、*B.brevis* では非免疫由来 VHH でもそれぞれ 100-200mg/L の収量が得られた。これらの結果から、非免疫ライブラリ由来の VHH 発現系として *B.brevis* の系が有用であることが示された。しかし、非免疫ライブラリ由来の VHH は μM 程度の Kd 値と親和性が低い、ファージでは結合活性があるものの、VHH タンパク質では、抗原結合活性が見られないケースが存在した。現在、親和性改善、発現量向上の検討を進めている。

Isolation and characterization of antigen-specific antibodies from alpaca naive VHH antibody libraries and their expression using *Brevibacillus brevis* expression system

○Satoshi Kishimoto, Abdor Rafique, Kiriko Satake, Yuka Miyamoto, Daiichiro Kato, Yuji Ito
(Dept.Chem Biosci., Grad. Sch. Sci Eng., Kagoshima Univ.)

Key words antibody, phage display, VHH

2P-076 NGS 解析によるアレルギー患者由来ヒト抗体ファージライブラリからの特異的 IgE の同定と特性解析

○藤山 愛子¹, 梅村 修平¹, 榎元 友里恵¹, 手島 玲子², 福富 友馬³, 伊東 祐二¹
(¹鹿児島大院・理工・生化学, ²国立医薬品食品衛生研, ³相模原病院臨床研究セ)
yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

【目的】本発表では「茶のしずく」石鹼による小麦関連アレルギーの原因となる IgE 抗体の特性解析のため、アレルギー患者血液の IgE 由来単鎖 Fv 抗体ファージライブラリを構築し、小麦抗原に対するバイオパニングを行うことで、アレルギー特異的クローンの単離を行った。その際、本研究では NGS 解析を組み合わせた手法を導入した。

【方法】茶のしずく患者の血液をソースに構築した抗体ファージライブラリを、プレートに固定化した小麦抗原グルテンに反応させ、結合ファージを回収・増幅させることで特異的抗体の濃縮を行った。パニング前後のライブラリ中の VH 配列について、NGS による網羅的配列解析を行い、各配列の存在率及び増幅率を算出した。

【結果と考察】グルテンに対するパニング後、算出した抗体配列の存在率が 2.5 倍以上増幅している、CDR3 配列の異なる 10 種の配列を特定した。これら CDR3 配列を基に設計したプライマーを用いて単鎖 Fv 遺伝子を単離し、単鎖 Fv 抗体を発現後、結合活性を評価したところ、グルテンだけでなく、茶のしずく石鹼によるアレルギー発症の原因とされるグルパールに対して交叉活性を示すクローンが認められた。以上より、NGS 解析をバイオパニングと組み合わせる手法は、抗体ファージライブラリからの迅速かつ多様な抗体の同定に有用である。

Isolation and characterization of wheat allergen-specific antibody from allergic patient-derived IgE antibody phage library using next generation sequencing

○Aiko Fujiyama¹, Shuhei Umemura¹, Yurie Enomoto¹, Reiko Teshima², Yuma Fukutomi³, Yuji Ito¹
(¹Dept. Chem.Biosci., Grad. Sch. Sci.Eng., Kagoshima Univ., ²NIHS, ³Clinical Res. Center for Allergy and Rheumatology, Nat. Hosp. Organization, Sagami-hara Nat. Hosp.)

Key words antibody, phage display, scFv