

ファージライブラリーによる抗体産生

熊谷 泉・津本 浩平

(東北大学大学院工学研究科生物工学専攻)

I. はじめに

Kohler と Milstein によって1975年に発表された、細胞融合法を用いたモノクローナル抗体の作製法は、抗原特異性あるいは親和性が均一な抗体分子を手にするを可能にした。しかしながら、目的の機能を持つ(希望通りの特異性を持つ)抗体を常に得られるとは限らないことなど、問題が少なくなかった。近年報告されているファージ提示法による抗体の産生は、従来のハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体作製とならぶ手法として、注目を集めている。とくに、細胞融合では得られないような、抗体分子の調製、あるいは免疫化による調製が困難なヒト抗体分子の作製などに、非常に有効であることが示されてきた。本稿ではファージ提示法について概観した後、抗体をファージ表面にライブラリーとして提示し選択することによって、目的とする抗体分子がどのように調製できるか、その長所あるいは問題点も含めて論じてい

II. 繊維状ファージ提示法

大腸菌に感染する繊維状ファージは、遺伝子工学において、部位特異的変異導入、DNA塩基配列決定における一本鎖DNA調製など、さまざまな用途に用いられている。繊維状ファージは、外被蛋白質として主にマイナーな外被蛋白質である遺伝子3産物のgp3、メジャーな外被蛋白質である遺伝子8産物のgp8を有している。gp3はファージ粒子一つあたり3~5個存在するとされており、ファージが感染するために大腸菌の繊毛に接触することが主な機能である。N末端ドメイン、C末端ドメインの

二つに分けることができ、前者は繊毛接触、後者はファージ粒子の形態形成に重要であることが示唆されている。またgp8はファージ粒子ひとつあたり数千個あり、ファージ粒子の形態形成に重要な役割を果たしている。遺伝子型と表現型が一体になっていて、かつ非常に単純なウイルスであることから、これら二つの外被蛋白質をコードする遺伝子に、目的の蛋白質をコードする遺伝子を融合させ、大腸菌内で遺伝子を発現させ、ファージ表面に提示させることになる。ここでは蛋白質の提示あるいは選択に多用される、gp3を用いた提示法についてまとめる。

ファージ提示法は当初、fdファージのgp3のN末端側数残基に、ある抗体が認識する抗原分子の遺伝子をランダムに挿入したライブラリーを作製し、大腸菌に感染させることにより得られるファージを用いて、抗体との結合を観察することにより、その抗体のエピトープマッピングを行うために構築された[1](図1)。その後、ランダムペプチドをファージ表面に提示したペプチドライブラリーから、目的の結合能を持つペプチド断片をスクリーニングする[2]方法への応用が試みられ、現在までにさまざまな工夫が施されたライブラリーが報告されている[3]。また、蛋白質分子の機能を保持したまま提示できることがわかり、さまざまな蛋白質分子が提示され[3]、その幾つかは機能解析もしくは機能変換に用いられてきた[4]。

しかしながら、ファージゲノムにそのまま蛋白質分子の遺伝子を挿入し提示を試みても、多くの場合遺伝子の欠損が起こることが観察されている。しかも高分子を提示させるためにfdファージの大腸菌への感染能が著しく低下する

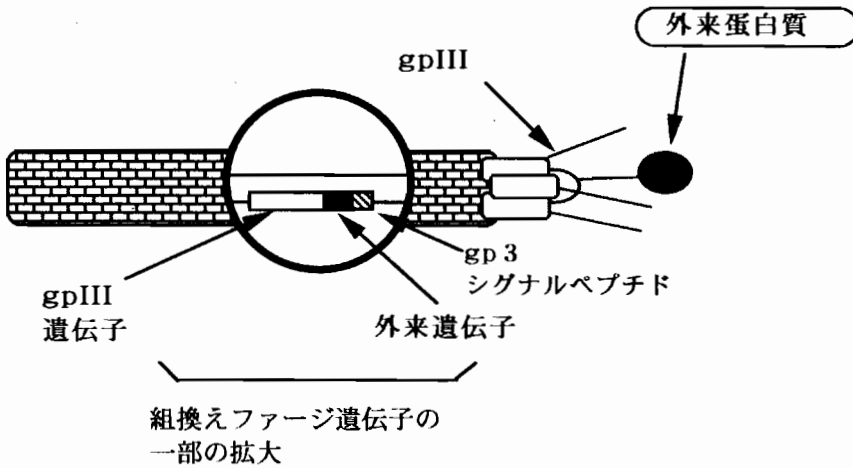


図1. ファージ提示系

ことも当初から分かっていた。そこで、ファージミドとヘルパーファージを用いる、gp3のN末端を欠損させて融合発現させるなどの改良が試みられている[4]。ファージミドを用いた方法は提示効率は低下するものの、蛋白質分子を提示させるのに効果的だと考えられている。しかし、gp3の融合蛋白質の大量発現は大腸菌に対して毒性を示すことから、やはり遺伝子の欠損に遭遇する場合も少なくない。その理由

の一つとして、プロモーターの制御が不十分であることや、構成的に働くプロモーターからの予期せぬ転写が起こることなどが挙げられる。実際、Kreberらはターミネーターをlacプロモーターの上流に挿入し、上流からの転写を抑制し、さらにグルコースを添加することにより発現を制御することが有効であることを報告している[5](図2A)。一方、筆者らのグループはファージミド上の遺伝子の読み枠をlacプロ

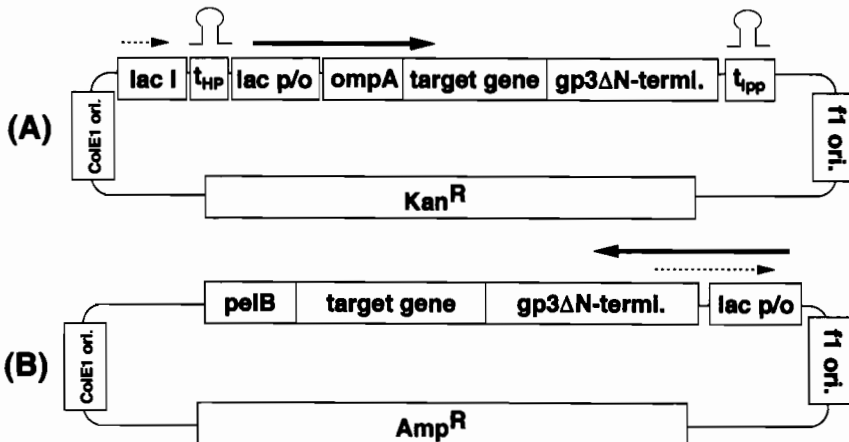


図2. ファージ提示系の改良

- より安定なファージ表面への提示のために、改良されたファージミドを示した。
- (A) lacプロモーターの上流にターミネーター導入し(tHP), lacIからの転写を抑制したファージミド[5]。
- (B) lacプロモーターの逆方向に融合遺伝子を組み替えたファージミド。転写はgp3のC末領域に存在するファージ由来のプロモーターから始まる[6]。

モーターと正反対に置くことによって、gp 3のC末端ドメインに存在する、ファージゲノム上で gp 3の下流にある gp 6のためのプロモーターを利用する系を開発している [6] (図 2 B).

Ⅲ. ファージ提示法を用いた抗体断片の作製

生体内の免疫系における、抗体の産生機構について、その多くが既に解明されていることは

周知のとおりである。ファージ提示法を用いた抗体分子の産生も、その概念は、免疫系をまねることを基本としている (説明は文献 7 あるいは 8 に詳しい)。試験管内で、目的の抗体分子を選択するための方法論として要求される基本は抗体の遺伝子を取り出して、ファージ表面に、クローンによる差がなく安定に提示することにより生体内と同じ規模のライブラリーを構築することと、生体内での正の選択にあたる、パニ

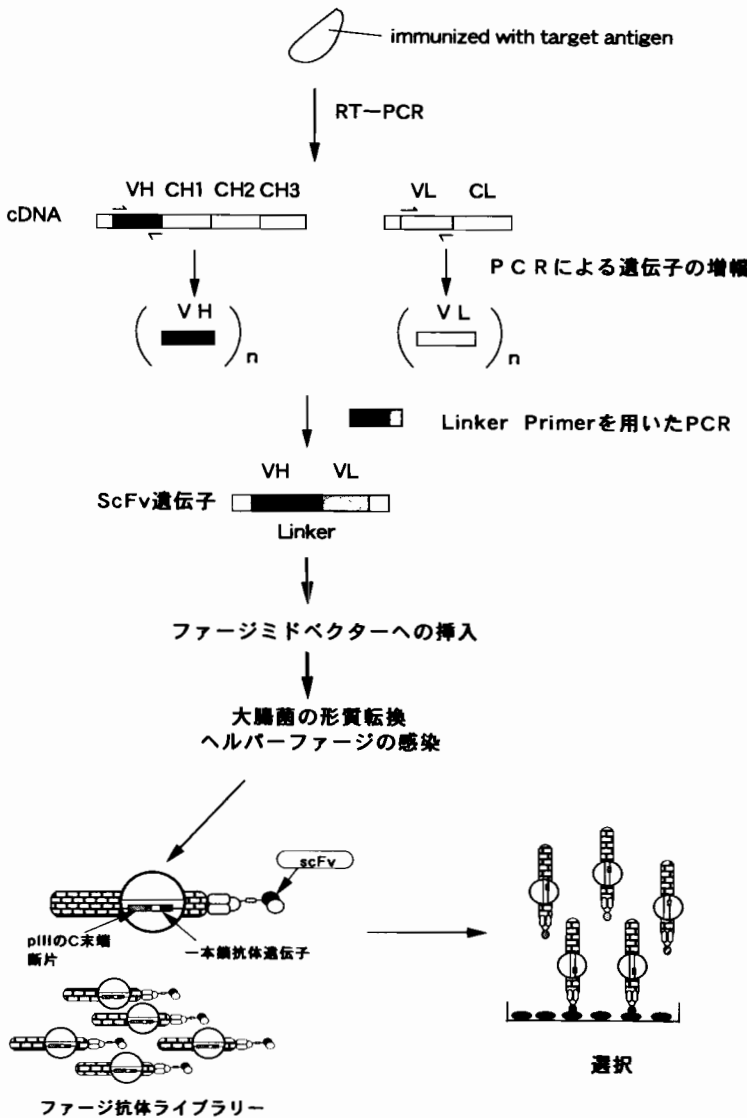


図 3. 生体内免疫系を模倣した試験管内選択系による抗体分子の調製

ングによる選択を繰り返すことによる目的のクローン選択の二つである。実験技術として重要であるのは、(1) 抗体断片遺伝子の増幅、(2) ファージ表面への提示、(3) 目的の抗体断片の選択、(4) 可溶性抗体断片の調製、(5) 親和性の増大を目指した無作為変異の導入や可変領域の shuffling の五項目に分けることができる。図3にその大きな流れを図示した。本節ではこれらについて、筆者らの経験も踏まえて解説したい。

A. 抗体断片遺伝子の増幅

ライブラリー作製の第一歩は遺伝子の調製にある。遺伝子の由来は、免疫したマウスの脾臓が一般的である。無論ハイブリドーマ化した細胞でもよい。ヒト抗体の場合は、白血球から調製することになる。mRNA の調製、ならびに

PCR 法による遺伝子の増幅を行うわけであるが、遺伝子増幅プライマーはファルマシア社と Novagen 社から販売されている。ファルマシア社が販売しているマウス抗体のためのプライマーは配列が公表されていない。Novagen 社のプライマーセットは数種類が用意されており、その増幅も効果的なようである。ヒト抗体については MRC のグループがプライマー配列を公表しており [9]、増幅の効率もよい。マウス抗体については、いくつかの研究グループによる報告がある [10,11]。PCR 法を用いた遺伝子の増幅にはつねに付きまとうことであるが、アニール温度が、特定の抗体断片遺伝子の増幅に非常に大きなファクターとなるので、細心の注意を払う必要がある。一本鎖抗体遺伝子の調製については次項で述べる。

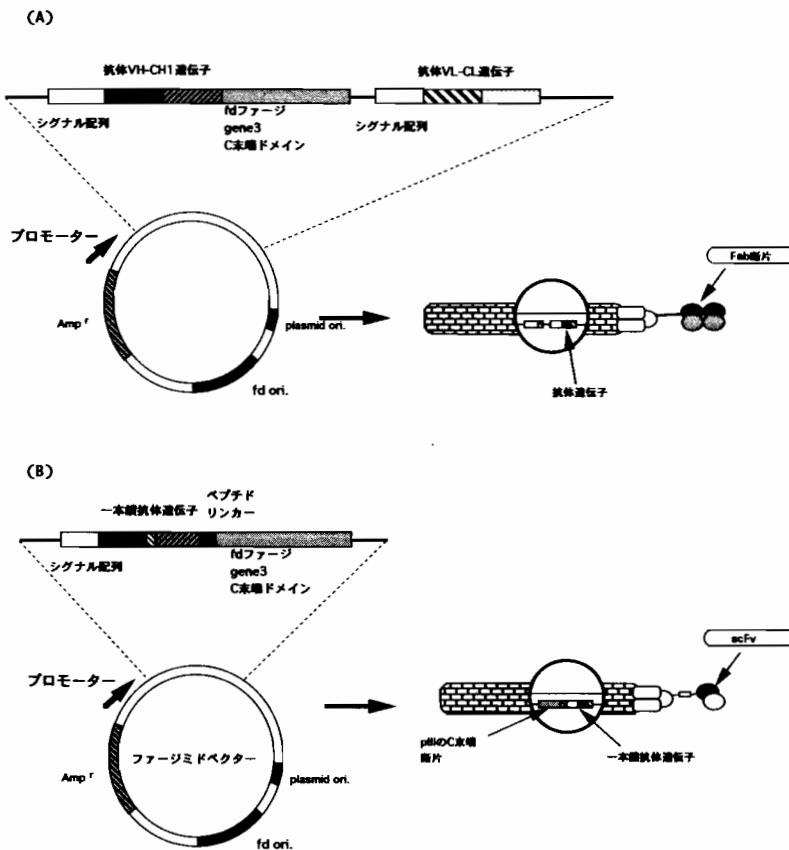


図4. ファージ提示系による抗体断片(Fab 及び scFv)の提示

B. 繊維状ファージ表面への提示

繊維状ファージ提示法は目的蛋白質をファージコート蛋白質のN末端側に融合発現させるのが基本的戦略であり、抗体のように重鎖、軽鎖が存在する場合には工夫が必要となる。通常提示する抗体断片として、Fab断片の場合とFv断片の場合がある(図4)。Fv断片はドメイン間の相互作用が弱く、抗原存在下でない限り、非共有結合的にヘテロダイマーとして提示することは困難である。そこで実際にファージ表面にはペプチドリンカーで可変領域を結合し、一本鎖化する作業が必要となる[9,11]。一本鎖化は一般にPCRで行われるが、なかなかうまく行かないのが現実のようである。先に述べたように、できるだけ精製度の高い遺伝子を用いることは無論のこと、VH鎖とVL鎖を完全に等しい量でリンカープライマーと共に混合し、PCRを行わないと、一本鎖化した遺伝子が意図したように増幅しない。アニール温度も重要なファクターである。

その点から鑑みると、Fab断片として提示する場合は、一本鎖化するという作業がなく、かつ本来存在しないリンカーを結合させる必要がないという点で、より合理的であるといえる。この場合、片方の鎖をファージ表面に提示し、もう片方の鎖を大腸菌内で可溶性蛋白質として発現させることになるが[12]、提示効率や大腸菌での発現量の点で問題が生じることが多い。

増幅された遺伝子断片をファージ提示用のファージミドベクターに挿入する。この際の遺伝子断片はできるだけ精製されたものを用いることが肝心である。ライゲーションしたファージミドベクターの大腸菌への導入効率が、ライブラリーの大きさを決定することにもなるからである。ファージ提示のためのファージミドベクターそのものは数社から販売されている。しかしながら、大腸菌の形質転換効率にはどうしても限界があり、なかなか思うような規模のライブラリーは得られないのが現実である。より効率の高いコンピテントセルを用いたエレクトロポレーションを複数回行うなどの工夫が必要

となる。細胞内で組み換え反応を行わせ、ライブラリーの規模を飛躍的に高める方法も報告されている[13]。

C. 目的の抗体断片を提示したファージの選択(パンニング)

ライブラリーが構築できたら次は目的の抗体断片を選択することになる。通常パンニングと呼ばれる方法で選択する。これはマイクロタイタープレート(96穴、あるいは24穴なども用いる)に抗原を非共有結合的に結合させ、適当なブロッキング剤でブロックした後、ファージライブラリーを加え、リン酸緩衝液で洗った後、溶出する。得られたファージを大腸菌に再感染させ、再び培養する。この操作を3~4回繰り返すことによって目的の機能を持つファージ分子を濃縮することになるが、プレートの材質、抗原の吸着効率、ブロッキング剤の相性などの問題により、各々の抗原ごとに至適条件を選び出さなければならない。ストレプトアビジンとビオチン化した抗原を用いた固定化法、あるいはプレートではなく、磁気ビーズを用いた方法が効果的な場合もある。

注意しなければならないのは、パンニング途中の遺伝子の欠損である。どのような理由であるかは明らかでないが、遺伝子の欠損は選択途中に頻繁に見られることであり、欠損のないことについて絶えずチェックを行うことが、意味のある選択を続行する上で重要である。

結合能の検出には酵素標識した抗M13抗体を用いたELISA法を用いることが多い。M13ファージを認識する抗体はファルマシア社やシグマから入手することができる。しかしながら、ファージ表面への提示効率等を考えると、この方法によってのみでは分子認識能を完全に議論しきれず、得られたクローンについて、可溶性分子として調製し、本当に目的の機能を持つ抗体分子であるかを確認する必要がある。

D. 可溶性抗体断片の調製

目的のクローンが得られたら、いよいよ可溶

性抗体断片を調製できるということになるが、意図するように大量に目的の蛋白質が大腸菌を用いた分泌発現[14]により得られるとは限らない。一本鎖抗体の場合は、ペリプラズム画分や膜画分に不溶性の粒子としてしか発現しない場合が多く、変性剤で抽出後、巻き戻すという操作が必要となる。シグナルペプチドがプロセッシングされていることは、筆者らも含め、多くのグループによって報告されており、細胞膜からの分泌がうまく行かず、膜に残った状態になるようである。一方 Fab 断片については、理由ははっきり分かっていないが、大腸菌での分泌発現量は極端に少ない[15]。

精製については、標的抗原を用いた親和性クロマトグラフィーが効果的であるが、不可能である場合、カルボキシ末端側にヒスチジンタグを融合発現させ、金属キレートクロマトグラフィーを行う、あるいは FLAG ペプチドを融合発現させ、抗 FLAG ペプチド抗体によるクロマトグラフィーを行うなどが有効である。ヒスチジンタグによる精製は、その大腸菌での発現量が多くない場合に多く見受けられることであるが、しばしば非特異的吸着を伴い、さらなる精製が必要になることがある。また、ペプチドタグが大腸菌における発現量を減少させることもあり、注意が必要である。

E. 変異導入による親和性の増大

生体内の抗体産生では親和性の成熟と呼ばれる現象が知られており、最終的に非常に高い親和性を持つクローンが選択されることになる。生体内では CDR のみならず、定常領域にも変異がかかることにより親和性が向上することが知られている。とくに、免疫化していないライブラリーからは、解離定数の低いクローンを得ることはなかなか難しく、人工的な変異導入を施す必要が生じることが多い[8,9]。ファージ抗体では部位特異的な変異導入、error-prone PCR による無作為な変異導入などが考えられる[16,17]。無論 CDR に直接無作為変異導入を施すことは非常に効果的なようである。

Scripps 研究所の Barbas らによる、ファージ提示系により選択されたヒト抗体分子について、各々の CDR に段階的に無作為変異を導入し、パンニングにおいて洗浄の条件などを調節することにより、より結合能の高いクローンを選択し、選択された CDR を組み合わせることにより、HIV 表面抗原(gp120)に対する親和性をピコモルオーダーまで高めた[18]。同様に Marks らのグループは c-erb B-2 に対して、重鎖、軽鎖ともに CDR 3 に無作為変異を導入し、得られたクローンを組み合わせることによって、抗原に対する親和性をピコモルオーダーまで高めている[19]。これらは、抗体に対する突然変異導入が、抗体の親和性向上に非常に有効であることを示しており、様々な応用が期待される。また、もはや生体内で調製される抗体分子の親和性(ナノモルオーダー)をはるかに越えていることから、細胞表面にごくわずかしかな存在しない抗原に対する高いターゲティング性を持つ抗体分子の作製など、臨床面からも今後に大きな期待を持たせる。他に、VH または VL 鎖のどちらか一方を、ゲノムから切り出した断片に置き換え、構築したライブラリーを用いて親和性の高い分子を選択する方法(Chain-shuffling 法)も試みられている[20, 21]。

IV. 抗原存在下での可変領域相互作用を利用した新しい抗原定量法と抗原認識能変換への応用

III. 一 A. に述べたように、可変領域のみからなる抗体 Fv 断片は単独では VH と VL に解離しやすいが、抗原の存在下で安定化する場合が知られている。これを利用すると、あらかじめファージ表面には VH 鎖のみを提示し、VL 鎖を可溶性蛋白質として調製しておき、それらの会合を調べることによってサンプル中の抗原濃度が測定できる(図 5 A)。この方法により、従来から用いられている Sandwich 法の半分の手間で同程度の感度を得ることに成功した(Open Sandwich 法)[22]。この手法は、先に述べた Chain-shuffling 法とあわせて、片方の鎖

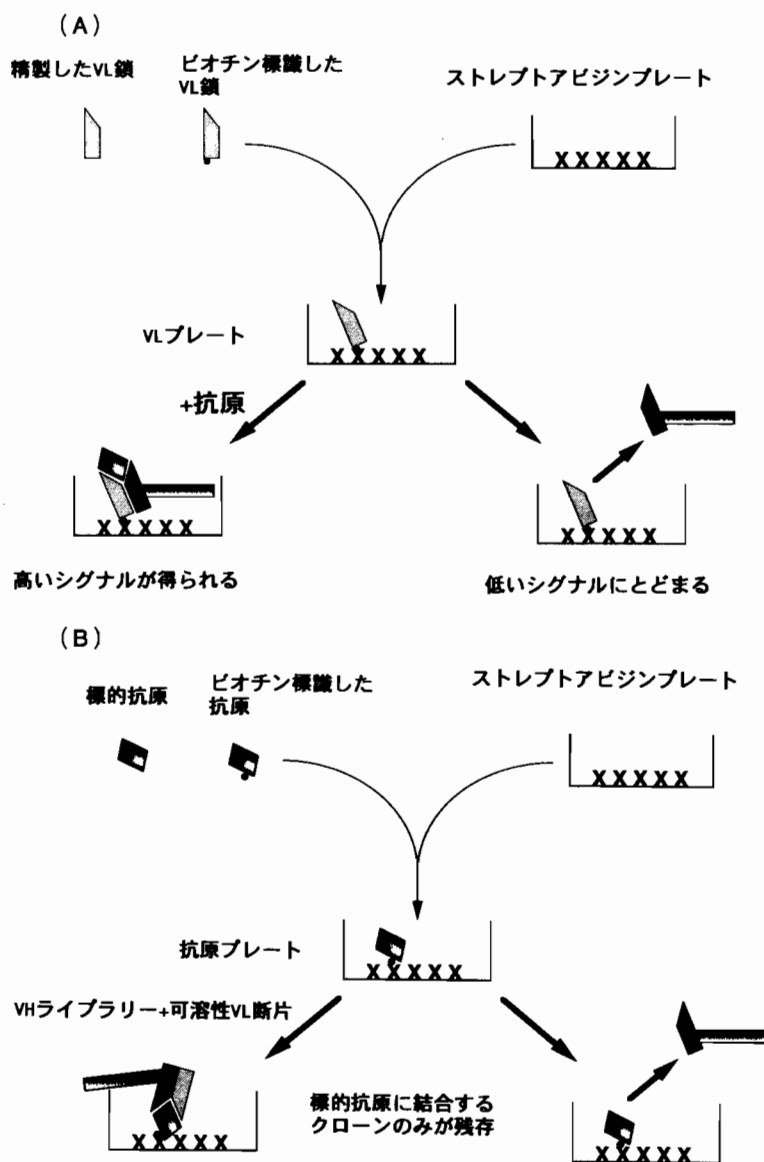


図5. Open Sandwich 法の概念と効率良い抗体分子の選択への応用

(A) Fv断片が抗原の存在下で安定に存在することを利用した Open Sandwich 法. VH鎖をファージ表面に提示し, VL鎖と抗原を混合する. 三者が複合体形成する際, ファージ量を ELISA 法で定量することにより抗原の濃度を測定することが可能となる.

(B) ファージ表面に提示する VH鎖に無作為変異を導入することによって, 目的の機能を持つ抗体分子の選択に用いることができる.

に無作為変異を導入してファージに提示し, もう片方の鎖を可溶性蛋白質として調製しておくことによって, 無作為変異導入した抗体分子の機能変換に用いることができる(図5 B). 筆者

らは最近, 本来ヒトリゾチームを認識できない抗ニワトリゾチーム抗体 HyHEL-10 に, この方法を用いて認識能を賦与することに成功した[23]. 同時にシチメンチョウリゾチームに対

する特異性を持つがニワトリリゾチームに対する特異性を失った抗体，双方に特異性を持つ抗体を自在に得ることも出来ており，抗原認識能の変換が自在に行える系として応用が可能であろう。

V. おわりに

抗体分子の持つ，抗原に対する高い特異性と親和性を最大限に発揮できるのは，臨床面であろう。従来用いられている，細胞融合法による抗体分子の調製は，手間，時間はかかるものの依然として重要な位置を占めている。一方，細胞融合では得にくい抗体分子の作製は，本稿で述べたファージ抗体による調製が非常に有効であることがいくつかの例で示されつつある。二つの手法が合わさることで，抗体分子のさまざまな分野での有用性を飛躍的に高めることが期待される。

また，抗体断片を用いた多価抗体[24]，酵素など別の機能を付与した抗体断片の構築[25]は，微生物を用いた抗体分子の作製によって最も強力に推し進めることができる。ファージ抗体による機能改良，機能改変と併せることによって，より迅速な抗体分子の工学が可能となるであろう。

さらに，ファージ提示法は，蛋白質の機能変換，機能改良を行う上で最も有効な手段の一つであり，抗体分子に限らず，さまざまな蛋白質へ応用できる。実際，ヒト成長ホルモンの機能改良[26]，プロテアーゼ基質特異性の選択[27]，セリンプロテアーゼインヒビター[28]，DNA結合蛋白質の機能改変[29]に應用されているほか，トリプシン，アルカリ性フォスファターゼなど酵素分子の提示が報告されている[30]。構造既知，構造未知の蛋白質について，無作為変異導入を施した効果を迅速に評価できるファージ提示法は，機能改変，改良という観点から今後とも発展していくであろう。

謝辞

本稿における筆者らの研究の一部は NEDO 提案公募型・最先端分野研究開発事業の助成を受けて行った。

文 献

1. Smith GP: Filamentous Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Viron Surface. *Science* **228**: 1315-1316, 1985.
2. Scott JK & Smith GP: Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science* **249**: 386-390, 1990
3. Bass S, Greene R & Wells JA: Hormone Phage: an Enrichment Method for Variant Proteins with Altered Binding Properties. *Proteins* **8**: 309-314, 1990
4. Clackson T & Wells JA: In vitro selection from protein and peptide libraries. *TIBTECH* **12**: 173-184, 1994
5. Krebber A, Burmester J & Plückthun A: Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene* **178**: 71-74, 1996
6. Maenaka K, Furuta M, Tsumoto K, Watanabe K, Ueda Y & Kumagai I: A Stable Phage-Display System Using a Phagemid Vector: Phage Display of HenEgg-White Lysozyme (HEL), Escherichia coli Alkaline Phosphatase, and Anti-HEL Monoclonal Antibody, HyHEL 10. *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 682-687, 1996
7. Marks JD, Hoogenboom HR, Griffiths AD & Winter G: Molecular evolution of proteins on filamentous phage: mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem* **267**: 16007-16010, 1992
8. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE & Hoogenboom HR: MAKING ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. *Annu Rev Immunol* **12**: 433-455, 1994
9. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD & Winter G: By-passing Immunization: Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage. *J Mol Biol* **222**: 581-597, 1991
10. Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Plückthun A: Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repositories employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* **201**: 35-55, 1997
11. Yamanaka H-I, Kirii Y & Ohmoto H: An improved phage display antibody cloning system using newly designed PCR primers optimized for

- Pfu DNA polymerase. *J Biochem* **117**: 1218-1227, 1995
12. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P. & Winter G: Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* **19**: 4133-4137, 1991.
 13. Waterhouse P, Griffiths AD, Johnson KS & Winter G: Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res* **21**: 2265-2266, 1993
 14. Pluckthun A & Skerra A: Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Meth Enzymol* **178**: 497, 1989
 15. Plückthun A: Mono- and Bivalent Antibody Fragments Produced in *Escherichia coli*: Engineering, Folding and Antigen Binding. *Immunol Rev* **130**: 151-188, 1992
 16. Riechmann L & Weill M: Phage Display and Selection of a Site-Directed Randomized Single-chain antibody Fv Fragment for Its Affinity Improvement. *Biochemistry* **32**: 8848-8855, 1993
 17. Deng S, MacKenzie CR, Sadwska J, Michniewicz J, Young NM, Bundle DR & Narang SA: Selection of Antibody Single-chain Variable Fragments with Improved Carbohydrate Binding by Phage Display. *J Biol Chem* **269**: 9533-9538, 1994
 18. Yang W, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR & Barbas III CF: CDR Walking Mutagenesis for the Affinity Maturation of a Potent Human Anti-HIV-1 Antibody into the Picomolar Range. *J Mol Biol* **254**: 392-403, 1995
 19. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KM, Merritt H, Yim M, Crawford RS, Weiner LM, Marks C & Marks JD: Isolation of Picomolar Affinity Anti-c-erbB 2 Single-chain Fv by Molecular Evolution of the Complementarity Determining Regions in the Center of the Antibody Binding Site. *J Mol Biol* **263**: 551-567, 1996
 20. Kang AS, Jones TM & Burton DR: Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11120-11123, 1991
 21. Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM & Winter G: By-Passing Immunization: Building High Affinity human Antibodies by Chain Shuffling. *Biotechnology* **10**: 779-783, 1992
 22. Ueda H, Tsumoto K, Kubota K, Suzuki E, Nagamune T, Nishimura H, Schueler PA, Winter G, Kumagai I & Mahoney WC: Open sandwich ELISA-a novel immunoassay based on the inter-chain interaction of antibody variable region. *Nature biotech* **14**: 1714-1718, 1996
 23. Tsumoto K, Nishimiya Y, Ueda H, Nagamune T, Ogasahara K, Yutani K, Tokuhisa K, Matsushima M & Kumagai I: Novel selection method for engineering of an antibody using the mechanism of Fv fragment stabilization in the presence of antigen. *Protein Engng* **10**: 1311-1318, 1997
 24. Kostelny SA, Cole MS & Tso JY: Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol* **148**: 1547-1553, 1992
 25. Wels W, Harwerth IM, Zwickl M, Hardman N, Groner B & Hynes NE: Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2 receptor. *Biotechnology* **10**: 1128-1132, 1992
 26. Lowman HB & Wells JA: Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J Mol Biol* **234**: 564-578, 1993
 27. Matthews DJ & Wells JA: Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display. *Science* **260**: 1113-1117, 1993
 28. Roberts BL, Marjkbab W, Ley AC, Kend RB, White DW, Guterman SK, Landner RC: Directed evolution of a protein: Selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2429-2433, 1992
 29. Rebar EJ & Pabo CO: Zinc Finger Phage: Affinity Selection of Fingers with New DNA-Binding Specificities. *Science* **263**: 671-673, 1994
 30. McCafferty J, Jackson RH & Chiswell DJ: Phage-enzymes: Expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage. *Protein Engng* **4**: 955-961, 1991