

各位

2022年7月28日

## 「えっ、そこですか？」抗体の性能を高める新たな急所の開拓 ～H鎖可変部 FR1 のピンポイント改変により抗体の親和力が飛躍的に up!～

神戸薬科大学生命分析化学研究室 小林典裕教授、木口裕貴特任助教、大山浩之准教授、森田いずみ講師らは、広範な抗体分子のうち、H鎖可変部 ( $V_H$ ) の N 末端 30 アミノ酸からなる枠組み領域 1 (framework region 1; FR1) に標的を絞って少数の置換または挿入を加えることにより、抗原 (副腎皮質ホルモン) への結合が飛躍的に強まることを発見しました。結合定数  $K_a$  として 17-31 倍もの増強です。その結果、これら抗体を用いる分析法、「免疫測定法」の感度も大幅に向上し、pg ( $10^{-12}$  g) レベルの超微量定量が可能になりました (図 1)。抗体は特定の抗原と「鍵と鍵穴」のように特異的に結合します。近年、抗原との結合に関与する「可変部」のアミノ酸配列を遺伝子操作により変化させることで、より強く抗原と結合する「人工抗体」を作製する試みがなされています。可変部は、抗原と直接相互作用する相補性決定部 (CDR) とその「土台」を形成する枠組み領域 (FR) とに分けられますが (図 1)、変異の導入は CDR を標的とすることが一般的でした。

今回の成果は、これまで標的部位として全く顧みられなかった  $V_H$  の FR1 が親和力向上の急所となり得ることを初めて示したものであり、2021年4月15日に *Scientific Reports* 誌に掲載されました。現在、特許を申請中です。

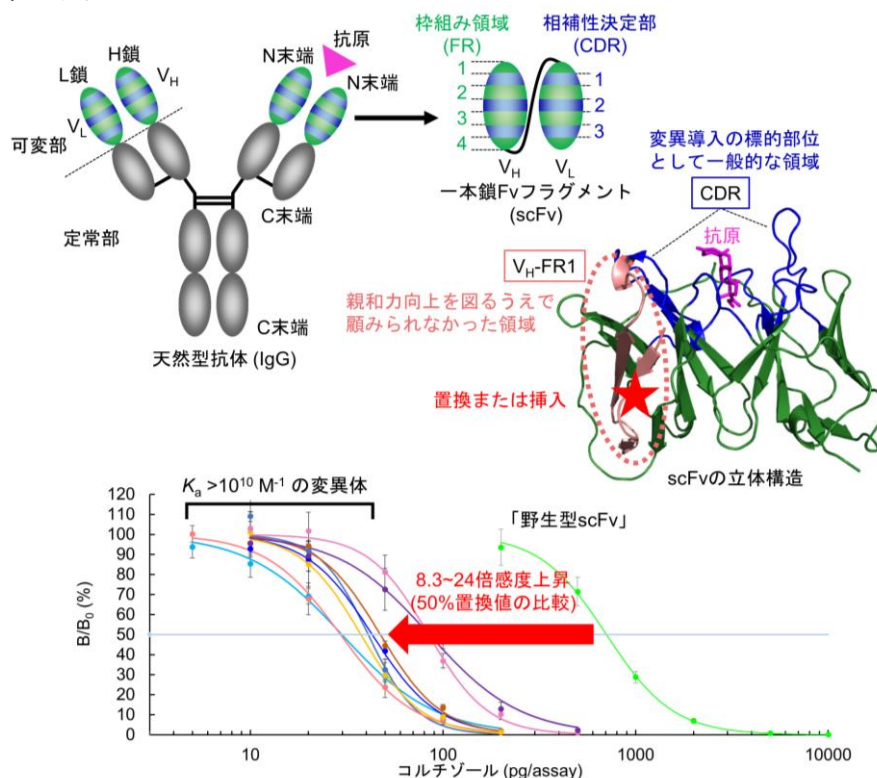


図 1  $V_H$ -FR1 を変異導入の標的とした高親和力抗コルチゾール scFv の創製



## 【1. 研究の背景】

抗体は体内に侵入した抗原（生体異物など）を排除するために動物が産生するタンパク質であり、H鎖、L鎖の可変部ドメイン（ $V_H$ 、 $V_L$ ）（図1）により抗原分子の構造を認識して結合します。最近では治療薬としての応用が注目されていますが、分析試薬としても重要です。抗体を用いる分析法は免疫測定法とよばれ、ヒト体内の生理活性物質の超微量

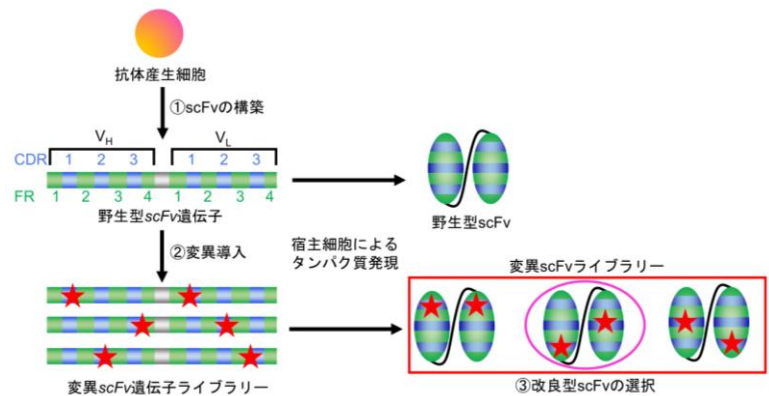


図2 一般的な抗体工学の手順

定量に不可欠です。高感度な免疫測定法を構築するには目的の抗原に高い親和力を示す（結合定数  $K_a$  が大きい）抗体が必要です。その作製法として、遺伝子操作により抗体のアミノ酸配列を人為的に改変し、動物から得られる天然抗体を上回る  $K_a$  を示す人工抗体を創製することが有望と考えられています。図2のように、①プロトタイプとなる適切な抗体の  $V_H$ 、 $V_L$  を連結して「野生型」の一本鎖 Fv フラグメント（single-chain Fv fragment; scFv）\*の遺伝子を構築し、②多様な変異を導入して変異 scFv 遺伝子のライブラリー\*を作製して一括してタンパク質に翻訳し、③偶然に生成した高親和力 scFv を選択します。「抗体工学」ともよばれる手法です。

本法の潜在力を最大限に発揮するには、②の工程で親和力が向上した変異体の出現率が高いライブラリーを構築することと、③の工程でライブラリーに含まれる稀少な改良型変異体を確実に単離し得る選択法を用いることが重要です。我々は、先に選択法の改革に取り組み、ライブラリーを構成する変異体を個別に評価する clonal array profiling (CAP) 法\*を独自に開発しました。そして、CAP 法が従来の gold standard 選択法である「パンニング\*」より優れることを実証しました。ライブラリーの構築については様々な戦略がとられますが、可変部を構成する枠組み領域（FR）と相補性決定部（complementarity-determining region; CDR）のうち、CDR を重視した変異導入を行うことが主流です。可変部は、 $V_H$ 、 $V_L$  のいずれも 4 つの FR と 3 つの CDR からなり、N 末端から、FR1→CDR1→FR2→CDR2→FR3→CDR3→FR4 の順に連なっています（図1,2）。CDR はループを形成して抗原の捕捉に直接関与しますが、FR は CDR を支えるβシートの土台を構築するため、親和力向上を図るうえであえて FR を変異の標的部位とする報告は見当たりません。ところが我々は、副腎皮質ホルモンであるコルチゾールに対する変異 scFv を CAP 法により探索した際に、 $V_H$  の FR1（ $V_H$ -FR1）へのわずか 1 残基のアミノ酸置換あるいはわずか 1 残基のアミノ酸挿入が  $K_a$  を 16–34 倍も向上させることを発見しました（図3）。 $V_H$ -FR1 は H 鎖 N 末端の 30 アミノ酸から成る領域ですが、変異導入の標的部位として顧みられなかった、いわば「未開の地」です。この狭い領域を標的とすることにより高親和力抗体が多数得られるならば、ライブラリー構築に新たな指針をもたらし、抗体工学の可能性をさらに開拓することができると考え、本研究に着手しました。

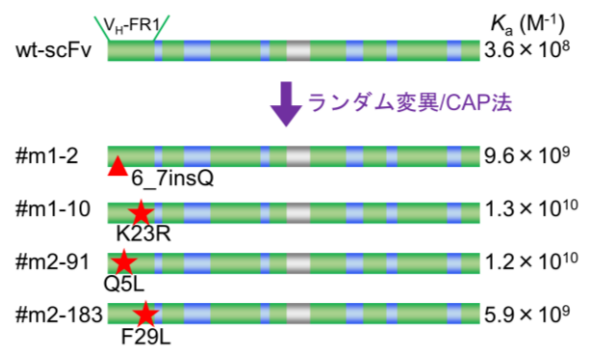


図3 CAP法により得られた変異体の一次構造と  $K_a$



## 【2. 研究成果の概要】

上述の結果を踏まえ、本研究では図 4 に示す 2 種の遺伝子ライブラリーを作製し、コルチゾールに対する高親和力 scFv を探索しました。すなわち、コルチゾールに対する野生型 scFv (wt-scFv;  $K_a = 3.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) の  $V_H$ -FR1 の 1-10 番アミノ酸にパターン化した置換を導入するライブラリー (Library A) と、 $V_H$  の 6 番と 7 番の間に 1-6 個のランダムなアミノ酸を挿入するライブラリー (Library B) を構築し、各々を導入した形質転換菌のうち各 4700 種 (ライブラリー全体の約 1%未満) を CAP 法に付しました。その結果、 $K_a$  が wt-scFv と比較して 17-31 倍向上した変異体が計 21 種得られました (図 4)。得られた変異体のうち、 $K_a > 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  のクローンを用いて競合型の免疫測定法 (ELISA) を行ったところ、wt-scFv による測定よりも 8.3-24 倍高感度な検量線が得られました (図 1)。

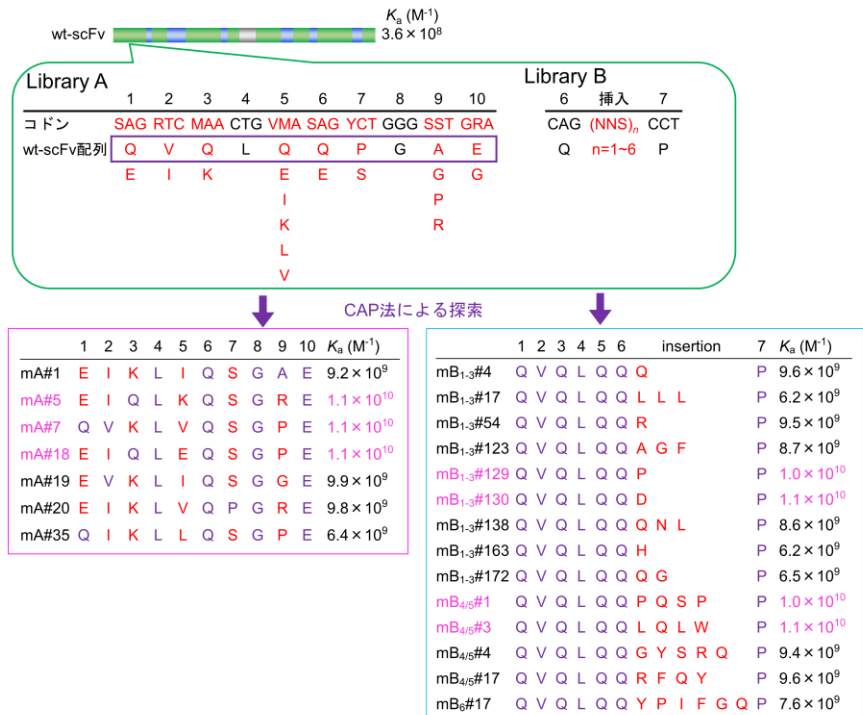


図 4 ライブラリーの構築と得られた変異体の一次構造および  $K_a$

以上、 $V_H$ -FR1 を標的とした変異導入が、高親和力抗体を作製するための戦略として有効であることが示されました。今後、その汎用性を検証していく予定です。今回得られた成果は、ライブラリーのわずか 1% 未満を解析した結果に過ぎません。CAP 法の自動化に成功し、ライブラリーを全て検索できるようになれば、より多くの高親和力変異体を獲得できるものと期待されます。

なお、本研究は JSPS 科研費 JP19K07021 の助成により行われました。

### [掲載論文]

雑誌名: *Scientific Reports*, 2021, 11, 8201

(doi: org/10.1038/s41598-021-87501-7).

題目: The  $V_H$  framework region 1 as a target of efficient mutagenesis for generating a variety of affinity-matured scFv mutants

著者: Yuki Kiguchi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Yasuhiro Nagata, Naoko Umezawa, Norihiro Kobayashi



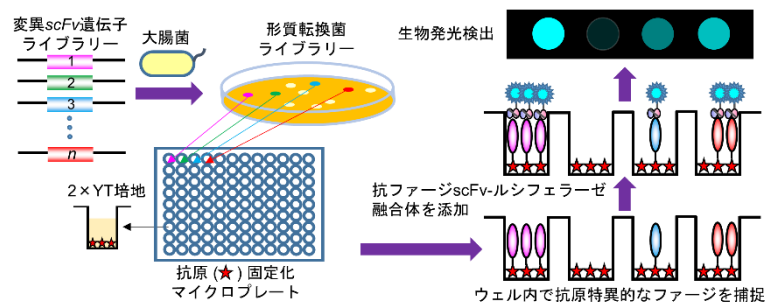
### 【用語説明】

\***scFv**: 抗体の部分構造のうち、可変部のみを連結した人工の小型抗体。 $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子をリンカーペプチドをコードする遺伝子を介して連結して *scFv* 遺伝子を構築したのち、大腸菌などの宿主細胞に導入することで、翻訳産物である *scFv* タンパク質が得られる。分子量は IgG 型の抗体と比べて約 6 分の 1 程度である。遺伝子操作の容易さや大腸菌内での発現量に優れる点で、抗体工学を実施するうえで天然型抗体よりも扱いやすい。

\***ライブラリー**: 様々な位置に様々なパターンで変異を導入した結果得られる多様な抗体の遺伝子、遺伝子を導入した宿主（大腸菌など）、あるいは遺伝子の産物である抗体の集団。元の（野生型の）抗体よりも親和力や特異性が向上あるいは低下した様々な抗体分子が含まれる。

\***CAP 法**: ファージ提示された *scFv* のライブラリーから高親和力 *scFv* を選択する手法。当研究室で開発した。変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーを導入した大腸菌を寒天培地上で培養し、生成するコロニーを抗原固定化マイクロウェル内に個別に接種したのち培養して、各大腸菌が産生する *scFv* の抗原結合能をスクリーニングするものである。各 *scFv* の抗原結合能を、他の *scFv* の干渉がない状態で個別に評価できる。

\***パンニング**: 抗体ライブラリーから高親和力抗体を選択する際の標準的な手法。変異 *scFv* 遺伝子ライブラリーを導入した大腸菌を液体培地でまとめて培養し、固定化抗原を利用して得られる多様な *scFv* の混合物のなかから高親和力 *scFv* を抽出するものである。共存する他の *scFv* の干渉を受けるため、目的の高親和力 *scFv* が得られないことも少なくない。



CAP 法の原理