

VHH 抗体の抗体工学によるレジオネラ検出系の開発研究

Development of immunoassay for *Legionella* through antibody  
engineering of VHH antibody

2023 年 9 月

清瀬 紀彦

# 目次

要旨.....	1
第1章 研究背景.....	3
1-1 VHH抗体.....	4
1-1-1 抗体の一般的な特徴と構造.....	4
1-1-2 抗体の利用.....	5
1-1-3 ラクダ科動物、サメ類の持つ重鎖抗体.....	6
1-1-4 VHH抗体の優れた特徴.....	8
1-2 ファージディスプレイ法.....	12
1-2-1 ファージディスプレイ法の原理.....	12
1-2-2 ファージディスプレイ法による抗体選別.....	14
1-3 レジオネラ.....	16
第2章 レジオネラ特異的VHH抗体.....	18
2-1 目的.....	19
2-2 材料と方法.....	20
2-2-1 抗原調整～アルパカへの免疫.....	20
2-2-2 重鎖抗体の精製.....	21
2-2-3 ELISA（アルパカ精製抗体）.....	22
2-2-4 アルパカVHH抗体ファージライブラリの構築.....	23
2-2-5 バイオパニング.....	26
2-2-6 レジオネラ特異的クローンの単離.....	26
2-2-7 ELISA（ファージ、VHH抗体）.....	27
2-2-8 可溶性VHH抗体の発現・精製.....	28
2-2-9 Western blotting.....	28
2-3 結果.....	29
2-3-1 アルパカ重鎖抗体の精製.....	29
2-3-2 アルパカ重鎖抗体の抗体力価測定.....	30
2-3-3 VHH抗体ファージライブラリの構築.....	31
2-3-4 レジオネラに対するバイオパニング.....	33
2-3-5 レジオネラ特異的ファージクローンの単離.....	34
2-3-6 レジオネラ特異的VHH抗体の配列解析.....	35
2-3-7 レジオネラ特異的VHH抗体の性状解析.....	36
2-4 考察.....	39
第3章 VHH抗体の抗体工学による多価化.....	41

3-1	目的	42
3-2-1	VHH 抗体二量体の作製	43
3-2-2	C 末システイン残基付加 VHH 抗体の作製	44
3-2-3	BSA-VHH コンジュゲート体の作製 (マレイミド法)	45
3-2-4	BSA-VHH コンジュゲート体の作製 (クリック反応)	45
3-2-5	KLH-VHH コンジュゲート体の作製 (マレイミド法)	45
3-2-6	サンドイッチ ELISA(コンジュゲーション確認)	46
3-2-7	多価化 VHH 抗体の ELISA	46
3-2-8	MALDI-TOF MS 解析	47
3-3	結果	48
3-3-1	<i>LpSGI</i> 特異的 VHH 抗体二量体の性状解析	48
3-3-2	VHH-Cys の調製	50
3-3-3	BSA-VHH コンジュゲート体 (マレイミド法) の性状解析	53
3-3-4	BSA-VHH コンジュゲート体 (クリック反応) の性状解析	57
3-3-5	KLH-VHH コンジュゲート体 (マレイミド法) の性状解析	61
3-3-6	各 VHH 抗体の ELISA による活性試験	64
3-4	考察	66
第 4 章	VHH 抗体を用いたレジオネラ検出イムノアッセイの構築と高感度化	68
4-1	目的	69
4-2	材料と方法	70
4-2-1	サンドイッチ ELISA	70
4-2-2	イムノクロマトグラフィ法	71
4-2-3	ラテックス凝集法	72
4-3	結果	73
4-3-1	サンドイッチ ELISA による抗原検出	73
4-3-2	イムノクロマトグラフィ法による抗原検出	79
4-3-3	ラテックス凝集法による抗原検出	81
4-4	考察	87
第 5 章	総括	89
	引用文献	92
	業績目録	98
	謝辞	101

## 要旨

本論文は、レジオネラ菌体免疫後のアルパカ由来の VHH 抗体ファージライブラリからレジオネラ特異的な抗体の単離と VHH 抗体を用いたレジオネラ検出のための免疫測定システム確立と高感度化についてまとめたものである。

ラクダ科動物は、天然に軽鎖が欠損した重鎖のみで構成された重鎖抗体を有しており、その抗原結合ドメインは、VHH 抗体 (Nanobody) と呼ばれている。VHH 抗体は、分子として機能的な改善のためのいくつもの利点を有しており、次世代の抗体として注目されている。(主にヒトやマウスやウサギ由来の) 抗体は、医薬品や診断薬、様々な分子ツールとして応用利用されているが、VHH 抗体の世の中での利用はまだ少ない。そこで、我々はモデル抗原としてレジオネラ感染症の原因菌であるレジオネラを選択し、レジオネラ特異的な VHH 抗体の単離と VHH 抗体を用いたレジオネラ検出のための免疫測定システム構築の方法論について検討した。

まず、レジオネラ菌体の免疫を行ったアルパカより採取した末梢血リンパ球を用いて VHH 抗体ファージライブラリを構築し、レジオネラ特異的 VHH 抗体の単離を試みた。作製したライブラリを用いて 2 回のバイオパニングを実施した後、ELISA によるスクリーニングによってレジオネラ特異的 VHH 抗体ファージクローンを 9 クローン単離した。これら 9 クローンの配列解析の結果、抗原との結合に最も寄与しているとされる CDR3 配列の比較にて、2 種類のクローンの取得に成功している事を認めた。さらに我々は、抗体工学技術を用いた VHH 抗体の多価化を検討した。1 つ目が VHH 抗体をリンカーで連結させて 2 量体化する方法で、2 つ目が、VHH 抗体を配向制御して BSA や KLH といったキャリアタンパク質にコンジュゲーションさせて多価化する方法である。両手

法とも VHH 抗体の抗原結合活性が保持されたまま、多価化に成功した。

3つのフォーマットの VHH 抗体（単量体、二量体、BSA または KLH コンジュゲート体）について、我々はレジオネラ検出のための3つの免疫アッセイ（サンドイッチ ELISA 法、免疫クロマトグラフィ法、ラテックス凝集法）の構築について検討し、抗原検出に成功した。また、各アッセイ系において多価化 VHH 抗体を使用する事で、単量体を使用した検出系からの高感度化に成功した。興味深い事にラテックス凝集反応においては、単量体では抗原検出を確認する事が出来なかったが、二量体・BSA・KLH コンジュゲート体においては、抗原検出が可能である事が示された。また、抗原検出感度が二量体<BSA コンジュゲート体（マレイミド法）<BSA コンジュゲート体（クリック反応）<KLH コンジュゲート体の順である事が示され、一番の高感度であった KLH コンジュゲート体はウサギポリクローナル抗体を用いた市販ラテックスと同等以上の検出感度である事が示された。

本研究により、我々は抗体工学技術を用いて VHH 抗体を利用した免疫アッセイを構築する際の1つの方法論を示した。アッセイ系にもよると考えられるが、我々の研究から VHH 抗体は単量体よりも多価化したほうが利用しやすいことが示唆され、この方法を利用することで感染症等に対する診断薬等の開発を加速することが期待される。

## 第 1 章 研究背景

## 1-1 VHH 抗体

### 1-1-1 抗体の一般的な特徴と構造

抗体（イムノグロブリン）は、生体の免疫作用（液性免疫）に関わる糖たんぱく質で、主な機能としては、異物（抗原）に結合する高い特異性と親和性である<sup>1</sup>。抗体は抗原を VH と VL の 2 つのドメイン（可変部）で認識し、相補性決定領域（Complementarity Determining Regions, CDR）の多様性と VH と VL の組合せによる多様性にて、多種多様な抗原を認識することができる（図 1-1）。

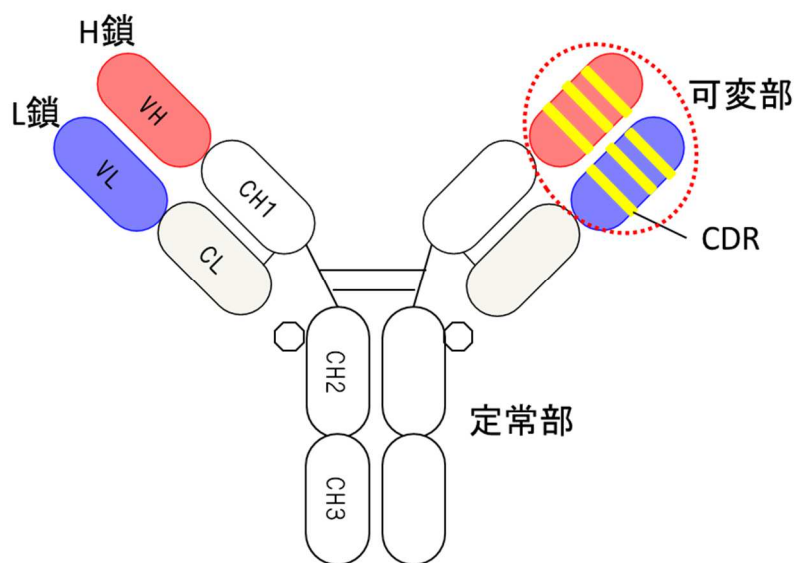


図 1-1 抗体の構造

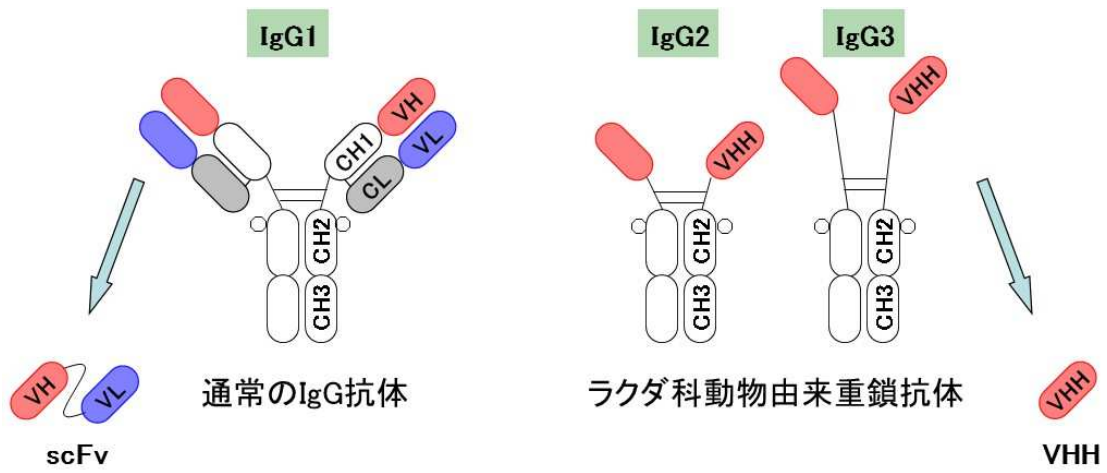
### 1-1-2 抗体の利用

抗体は、抗原に対する高い特異性と親和性を活かして、様々な治療薬（治療効果の高さや副作用の低減が期待される）や臨床診断薬として生物製剤の最も大きいグループの一つとして確立されている。また精製担体やイメージング試薬等の分子ツールとしても広く応用利用されている。一方で、抗体の断片化も探求されてきた。しかし、サイズ優位性は、低い親和性<sup>2</sup>、大量生産の難しさ<sup>3</sup>、非常に短い血中半減期<sup>4</sup>、凝集傾向<sup>5</sup>によってバランスがとられてきた。抗体の産業利用については、ハイブリドーマ技術<sup>6</sup>や組換え抗体の取得技術（ディスプレイ法等）の確立<sup>7-9</sup>により急速に発展してきており、抗体の市場は、現在まで右肩上がり伸びてきており、今後もさらに伸びていくことが予想される。



### 1-1-3 ラクダ科動物、サメ類の持つ重鎖抗体

ラクダ科動物やサメ類には、重鎖と軽鎖で構成されている通常の IgG 抗体に加え、通常の IgG 抗体とは異なる特殊な構造の抗体が存在する (図 1-2)。この特殊な抗体は、1993 年にラクダ科動物血清中で<sup>10</sup>、1995 年にはコモリザメ血清中でも存在している事が報告され<sup>11</sup>、ラクダ科動物の持つ天然に軽鎖と CH1 ドメインが存在せず重鎖のみで構成される抗体として重鎖抗体 (Heavy-chain antibody : HCAb) と呼ばれている (サメ類の重鎖のみの抗体は IgNAR と呼ばれている)。ラクダ科動物の重鎖抗体は CH1 領域を欠損しており、CH1 はゲノムには存在するが、mRNA のプロセッシングの過程でスプライスアウトしている<sup>12, 13</sup>。それにもかかわらず、いろいろな抗原に対する高い親和性が報告されている<sup>14-16</sup>。アルパカにおいては、重鎖抗体は血清中の IgG のほぼ 50%含まれており<sup>17</sup>、重鎖抗体は血清中に稀に存在する抗体というわけでは無いため、ラクダ科動物の免疫系においても重要な役割を担っていると考えられる。現在、ラクダ科動物は 6 種類確認されており、南米に生息するラマ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコ、アジア・アフリカに生息するヒトコブラクダ、フタコブラクダである。このうちビクーニャとグアナコは野生種であり、その他の 4 種類は家畜種であるため、実験動物としては家畜種の 4 種類が使用されている。しかしながら、ヒトコブラクダ、フタコブラクダは、体長約 2m、体重約 500kg と、非常に大型の動物であるため、ラマやアルパカが VHH の研究に多く使用されている。また、サメ類についても一般的に飼育が難しいと言われている。このような理由から、我々は、ラマよりも体格の小さいアルパカを実験動物として選択した。



サメ類由来

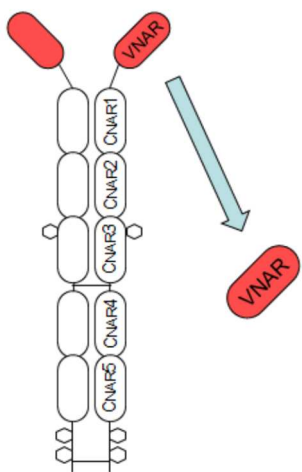


図 1-2 ラクダ科動物・サメ類由来重鎖抗体

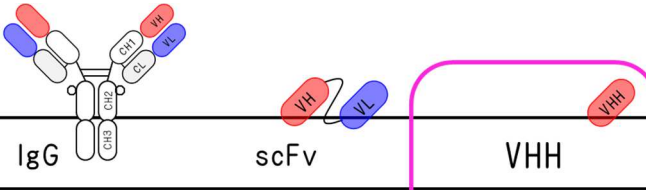
#### 1-1-4 VHH 抗体の優れた特徴

重鎖抗体の可変領域は、VHH (Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody) や nanobody®と呼ばれており (サメ類の IgNAR の可変領域は VNAR と呼ばれている)、天然起源のシングルドメイン抗体として利用可能である。VHH は、B 細胞成熟過程において染色体 4 番上の IgH 遺伝子座の V、D、J 遺伝子 (従来抗体の VH と共有) の再組換えで構成される<sup>18</sup>。大部分のラクダ科の動物 VHH と VH 遺伝子はヒトの IGHV3 遺伝子に相同であり<sup>19</sup> (75-90%の相同性)、VHH 型と VH 型で特徴的なアミノ酸残基を FR2 (Phe/Tyr37Val、Glu44Gly、Arg45Leu、Gly47Trp) にコードしている<sup>24</sup>。VHH の特徴の 1 つである CDR3 の長さについては、ヒトやマウスの VH が平均 9~12 アミノ酸であるのに対して、VHH は平均 13~18 アミノ酸とより長い CDR3 を持っている<sup>20, 21</sup>。一般的な IgG 抗体は、VH と VL の 6 箇所の CDR 領域により抗原結合領域を形成する。しかし、重鎖抗体由来の VHH 抗体の場合、3 箇所の CDR 領域で抗原と結合する必要がある。3 箇所の CDR 領域で抗体の多様性を確保するためには CDR3 領域の長さが重要となる。また多様性を確保するため、再編成された VHH 遺伝子は、CDR と FR 領域に高い確率でソマティックハイパーミューテーションが入ると考えられている<sup>22-24</sup>。VHH 抗体のシングルドメインの性質は、構造研究に関して多くの利点を提供して、組織侵入を必要としている治療的なアプリケーションや診断において有利である。また、通常の抗体と比較し、小さいサイズという事で多くの利点 (表 1-1) があり、様々な発現系での発現の容易さ<sup>25-27</sup>、高い熱安定性<sup>28</sup> (図 1-3)、優れた可溶性<sup>29</sup>、タンパク質分解に対する抵抗<sup>30</sup>、遺伝子操作の容易さ<sup>31</sup>がある。VHH 抗体のエンジニアリングは、VHH 抗体や他のタンパク質、リポーター分子または薬の付加を容易にしている<sup>32, 33</sup>。エンジニアリングの一例として、抗ウイルス VHH 抗体を 2 個、3

個とタンデム化することにより、ウイルス中和活性が上昇することも示されている（図 1-4）<sup>34</sup>。また、タンデム化により結合親和性が上昇することも報告されている<sup>35</sup>（表 1-2）。近年、Antibody-drug conjugate（ADC）が注目されており、VHH 抗体での応用も期待されている。

VHH 抗体の利用については、医薬利用を含めた広範囲にわたる Hamers 特許（2013 年に期限切れ）の独占実施権をもっていたベルギー Ablynx 社（現フランス Sanofi 社）により、VHH 抗体医薬の開発が進められており、2019 年に米国にて血小板凝集抑制薬「CABLIVI」（caplacizumab）が VHH の医薬品として初めて承認された。日本国内においては、大正製薬株式会社が Ablynx 社（現フランス Sanofi 社）より関節リウマチに対する抗 TNF $\alpha$  抗体「ナノゾラ」（ozoralizumab）を 2015 年に導入し開発を進めており、2022 年に国内で初めて VHH の医薬品として承認された。他にも複数の VHH の医薬品の開発が進められており、世界の注目を集めている<sup>36</sup>。

表 1-1 各組換え抗体の特徴



組換え抗体	IgG	scFv	VHH
分子質量	170KDa	24KDa	15KDa
組換え産生	培養細胞	大腸菌,酵母	大腸菌,酵母
安定性 (熱、酸等)	低	低	高
中和抗体	低頻度	低頻度	高頻度
蛋白工学	困難	可能	容易

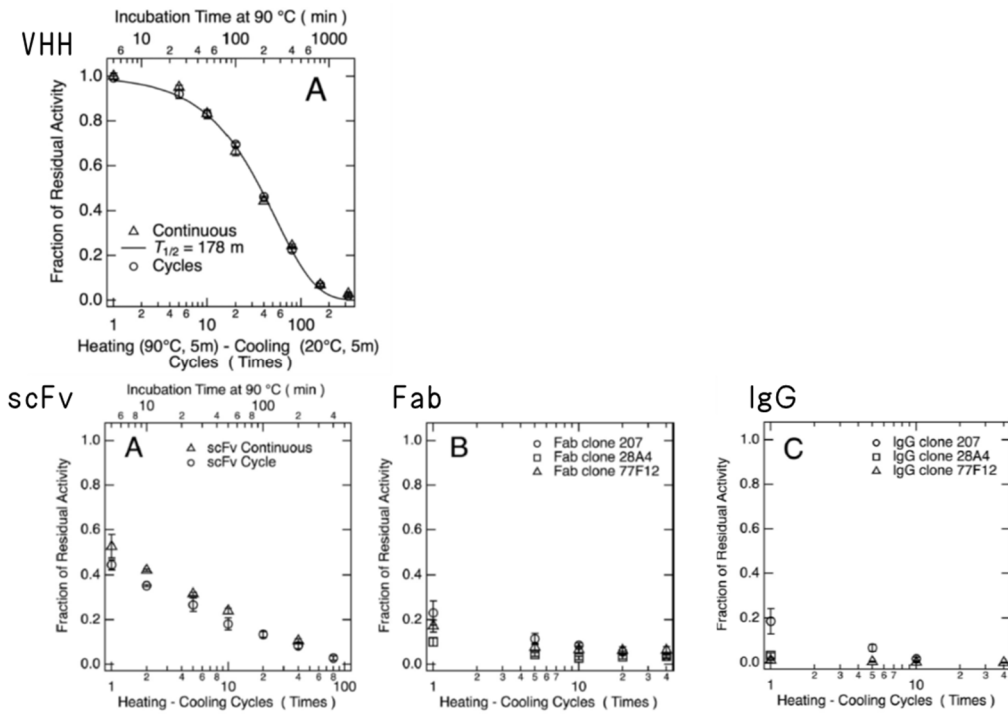


図 1-3 hCG に対する各抗体の熱安定性の評価

他のフォーマットの抗体に対して、VHH 抗体が熱に対して安定である事が示された。縦軸は活性比率（熱処理後/処理前）、横軸はサイクル数（90°C→20°C）を示している（引用文献 28 より引用）

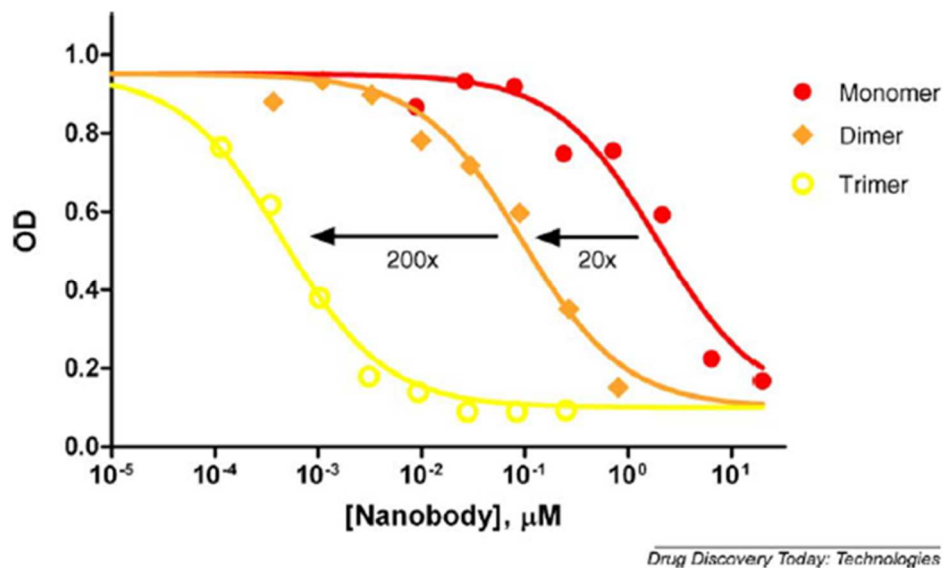


図 1-4 タンデム化 VHH 抗体の中和活性

Monomer から Trimer へタンデム化する事で中和活性 (IC50 値) が約 4000 倍向上したことが示された。縦軸は吸光度、横軸は抗体濃度を示している (引用文献 34 より引用)

表 1-2 VHH 抗体のタンデム化による親和性評価

Protein	Cuvette coupled with	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$
cAblys3	Lysozyme	52	0.0030	57
cAblys3-cAbβLA01	Lysozyme	50	0.0027	54
cAbβLA01-cAblys3	Lysozyme	12	0.0026	215
cAblys3-cAblys3	Lysozyme	60	0.0007	11
cAblys3-cAbβLA01	β-Lactamase	19	0.0005	26
cAbβLA01-cAblys3	β-Lactamase	27	0.0006	22
cAbβLA01	β-Lactamase	62	0.0016	26

同じ VHH を 2 量体化する事で、親和性 ( $K_D$ ) が約 5 倍向上した事を示された。(引用文献 35 より引用)

## 1-2 フェージディスプレイ法

### 1-2-1 フェージディスプレイ法の原理

フェージディスプレイ法とは、大腸菌に感染するウイルスであるバクテリオフェージ粒子表面に、タンパク質やペプチドを別の分子と相互作用できる形で提示させる方法である<sup>37</sup>。しかも、提示された分子の遺伝子情報は、フェージ内の DNA に組み込まれているため、容易に提示分子の構造情報を入手出来るという利点を有している (図 1-5)。1991 年に G. Winter らによって抗体の抗原結合領域の VH と VL をリンカーで結合させた単鎖 Fv や Fab がフェージ上への提示が可能である事が報告された<sup>38</sup>。フェージディスプレイ法は、何十億もの抗体断片を含んだライブラリより抗原特異的抗体断片を選択するために強力な簡易的かつ安価な方法の一つであり、抗体医薬等の開発に広く利用されてきた。

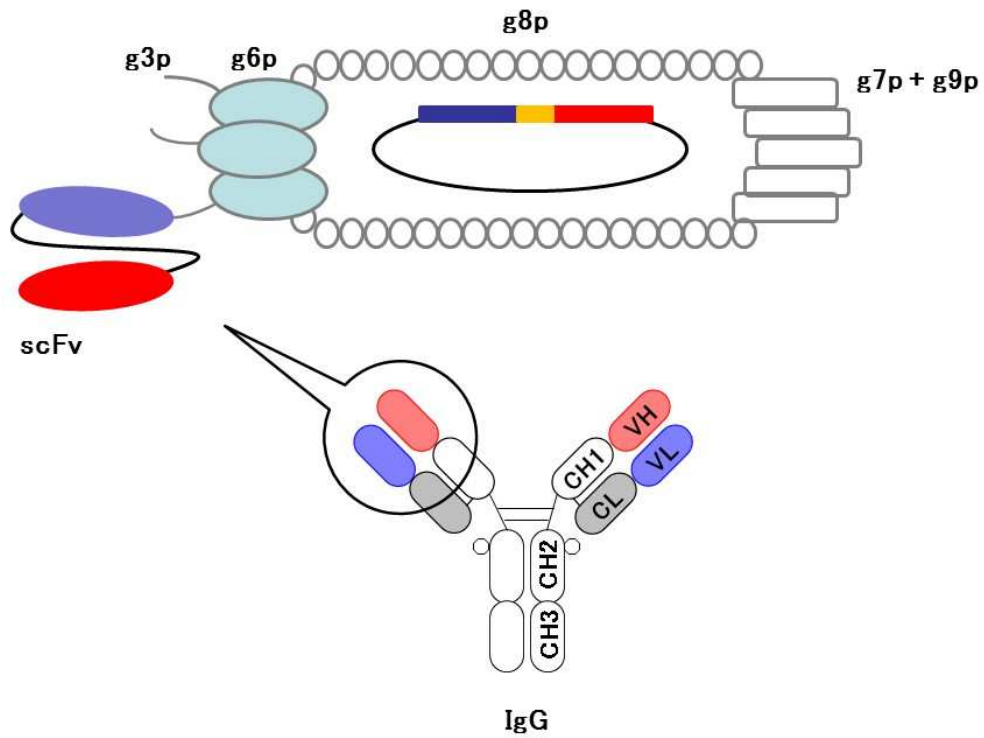


図 1-5 抗体分子を提示する繊維状 M13 ファージ

g3p の末端に融合タンパク質として外来タンパク質を提示すると同時に外来タンパク質の遺伝子を M13 ファージ内に保有する。



### 1-2-2 ファージディスプレイ法による抗体選別

繊維状 M13 ファージは、ファージディスプレイ法を用いた抗体探索に用いられる代表的なファージである。ファージ表面に外来タンパク質を提示するには、コートタンパク質 (g3p、g6p、g8p、g7p、g9p) に融合タンパク質として発現提示する方法が一般的に用いられている。我々は、抗体遺伝子を g3p に提示する方法を利用している。

抗原特異的な抗体は、ライブラリを用いたバイオパニングにより単離することができる (図 1-6)。ファージディスプレイ抗体ライブラリの選択プロセスは、バイオパニングの方法のような様々な分子要因に依存する<sup>39-43</sup>。一般的なバイオパニングの手法では、固相化した抗原に対しファージライブラリを反応させ、抗原に結合するファージ抗体群を溶出する。溶出したファージを大腸菌に感染させることで、抗原に結合を示すファージ群を増幅することができる。これを 1 ラウンドとし、条件を変えながらラウンドを繰り返すことにより、より抗原に特異的な抗体を提示したファージ群を濃縮することができる。

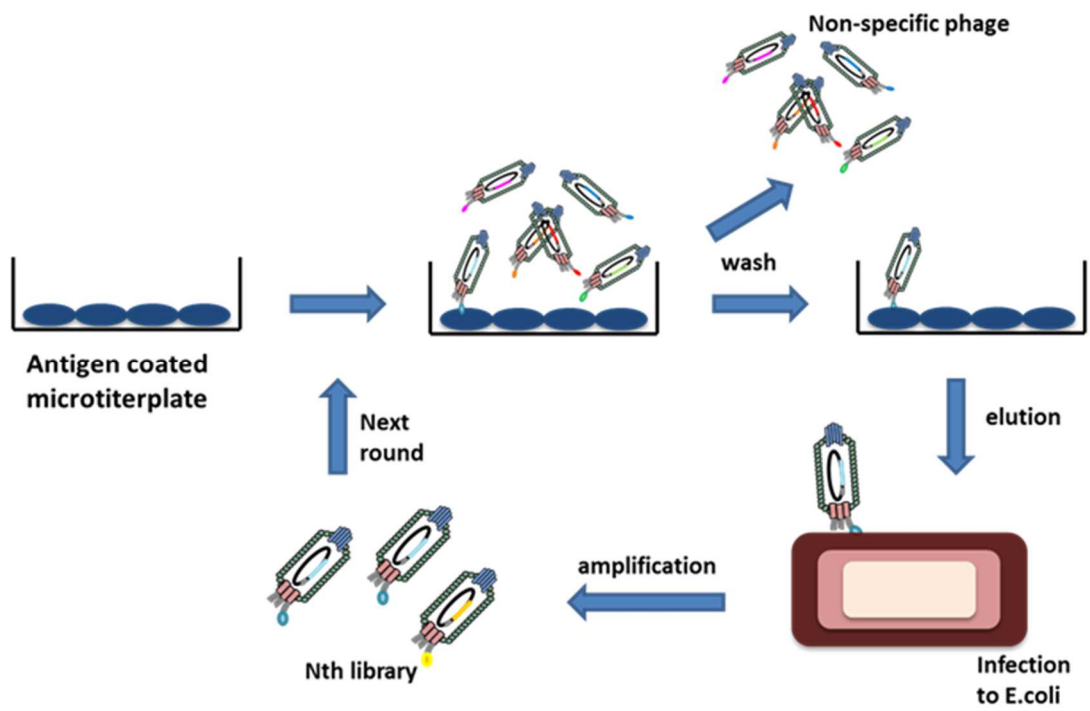


図 1-6 バイオパニング

### 1-3 レジオネラ

レジオネラは、1976年に発見されたブドウ糖非発酵の好気性グラム陰性桿菌（図1-7）で、現在までに少なくとも約50種の菌と約70種の血清型が発見されている。レジオネラはバイオフィルムのような群生物中<sup>44, 45</sup>やアメーバのような原生生物のように寄生して生存しており<sup>46, 47</sup>、自然界や人工の水生環境にいる常在菌の一種で、通常はヒトに感染することはないが、人工施設（プール水、冷却塔水、噴水等）で爆発的に増殖する事があり、増殖したレジオネラ細菌を含むエアロゾルをヒトが吸引する事で、人間の肺に浸入することができ<sup>48</sup>、その後、肺胞のマクロファージに感染し<sup>49</sup>、レジオネラ感染症（LD）と呼ばれる致命的な肺炎をしばしば引き起こす<sup>50</sup>。*Legionella pneumophila serogroup 1* は、主にLDの症例の原因菌として報告され、特に市中感染で報告された<sup>51</sup>。国内においても入浴施設や施設利用者の増加、レジオネラ検査の保険適用による認知度の高まり等により右肩上がりレジオネラ症の報告数が増加しており、近年においてもレジオネラ症による死亡者が出ている。感染症患者の早期治療や他の感染者を増やさないためにも、レジオネラ症の臨床検査と感染源の迅速な断定が必要とされている。



図 1-7 レジオネラ菌の電子顕微鏡像  
(C.L information Vol.27 2013.8 より引用)

## 第 2 章 レジオネラ特異的 VHH 抗体

## 2-1 目的

本研究では、レジオネラ菌体をモデル抗原として、レジオネラ特異的 VHH 抗体を取得するために、レジオネラ菌体を免疫したアルパカの末梢血リンパ球を利用し、免疫 VHH 抗体ファージライブラリを作製した。また、免疫 VHH 抗体ファージライブラリからバイオパニングを用いて、レジオネラ特異的な VHH 抗体の取得と性状解析を行った。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 抗原調整～アルパカへの免疫

*Legionella pneumophila serogroup1* (*LpSG1*) (麻布大学古畑教授より分与いただいた環境分離株) をポアメディア B-CYE $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) に植菌した。37 度で 5 日間培養した。プレート上の菌体を白金針にて集菌し、熱処理 (100 度 3 分) 又は終濃度 1%ホルマリンで不活化処理した。成人の雄アルパカ (*Vicugna pacos*) は、*LpSG1* 抗原 1.2 OD unit (1OD unit : OD600=1 の培養液 1 mL 中の菌量) と等量のフロイント完全アジュバントで乳化した抗原液を皮下免疫した (0 日)。その後、*LpSG1* 抗原 1.2 OD unit と等量のフロイント不完全アジュバントで乳化した抗原液を 14 日毎に皮下免疫を 4 回実施した。63 日目に採取した血液(50mL)を抗凝固剤(0.1%EDTA)で処理し、Leucosep<sup>TM</sup> リンパ球分離チューブ(Greiner Bio-One)を用いて比重法により末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。単離した PBMC は RNAiso Plus(Takara Bio)でホモジナイズした。

## 2-2-2 重鎖抗体の精製

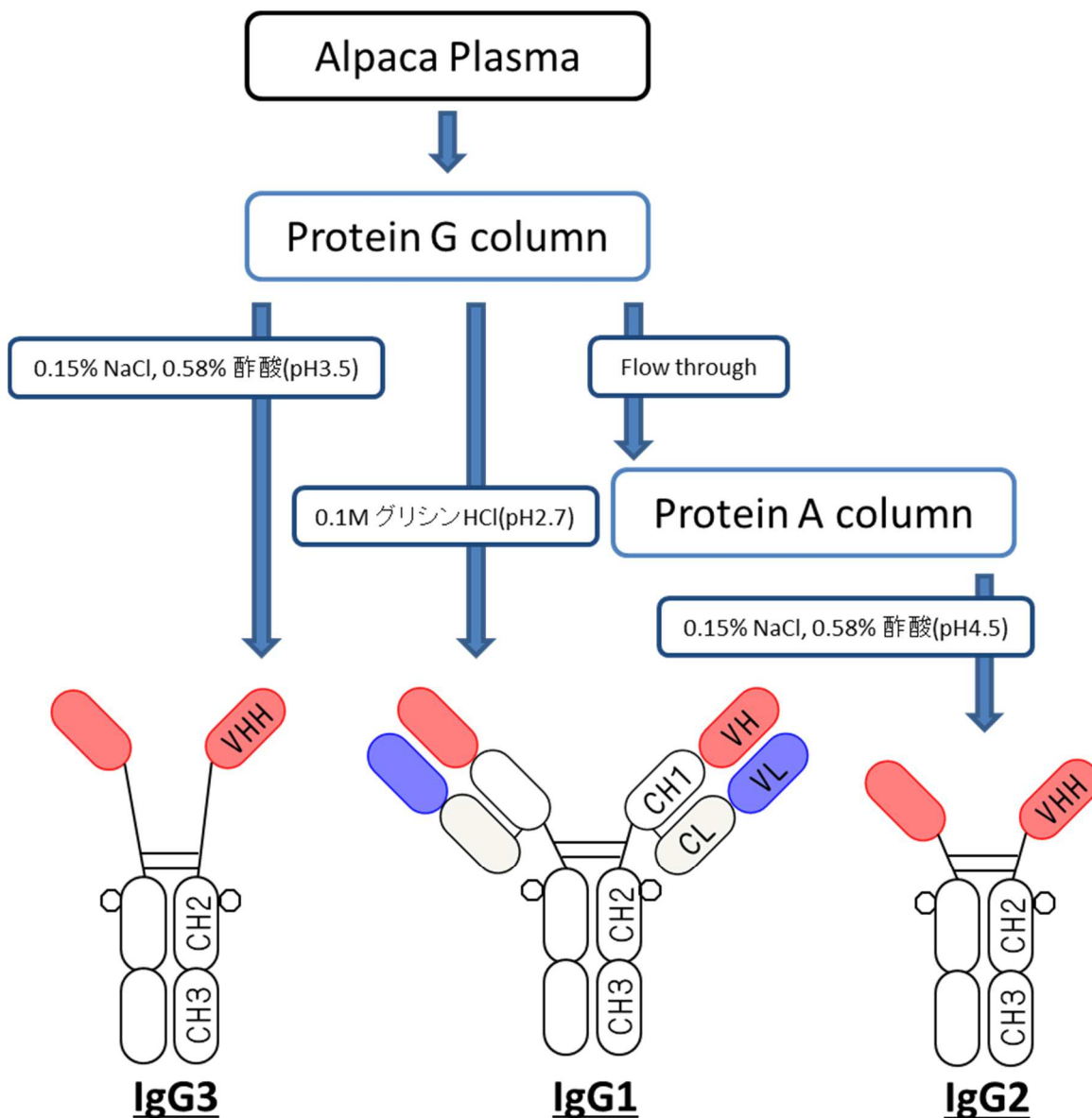


図 2-1 重鎖抗体精製の概要図

IgG2（ヒンジ領域が短い）と IgG3（ヒンジ領域が長い）の 2 種類の重鎖抗体は、Protein G Sepharose column（GE Healthcare）と Protein A Sepharose column（GE Healthcare）の組み合わせで精製した。まず Protein G Sepharose column を用いて IgG3 と IgG1 の精製を行った。63 日目に採取した血漿を PBS で 2 倍希釈し、Protein G Sepharose column にアプライ後に洗浄し、0.15 M NaCl / 0.58%



acetic acid (pH 3.5)の溶出バッファーを用いて IgG3 を溶出し、続いて 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7) の溶出バッファーを用いて IgG1 を溶出した。さらに、Protein G Sepharose column の素通り画分を Protein A Sepharose column にアプライ後に洗浄し、0.15 M NaCl / 0.58% 酢酸 (pH4.5) の溶出バッファーを用いて IgG2 を溶出した。溶出画分は中和し、タンパク質濃度を BCA アッセイ (Thermo Fisher Scientific) によって決定した。

### 2-2-3 ELISA (アルパカ精製抗体)

96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に *LpSG1* 抗原 ( $5 \times 10^{-4}$  OD unit) を PBS 溶液中にて 4°C で 1 晩静置にて固相化し、0.5% gelatin/PBST にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。0.05% PBST で 3 回洗浄した後、希釈したアルパカ血漿サンプル (100 $\mu$ L) を加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、ウサギ抗アルパカ IgG 抗体 (アーク・リソース) を室温で 1 時間反応させ、0.05% PBST で 3 回洗浄後、ウサギ抗アルパカ IgG 抗体を検出するために HRP 標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Bio-Rad) を室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、*o*-フェニレンジアミンを含む基質溶液を用いた呈色反応により (反応停止は 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合しているアルパカ抗体を定量化した。検出には ELISA プレートリーダーを用いて、492nm の吸光度を測定して評価した。

## 2-2-4 アルパカ VHH 抗体ファージライブラリの構築

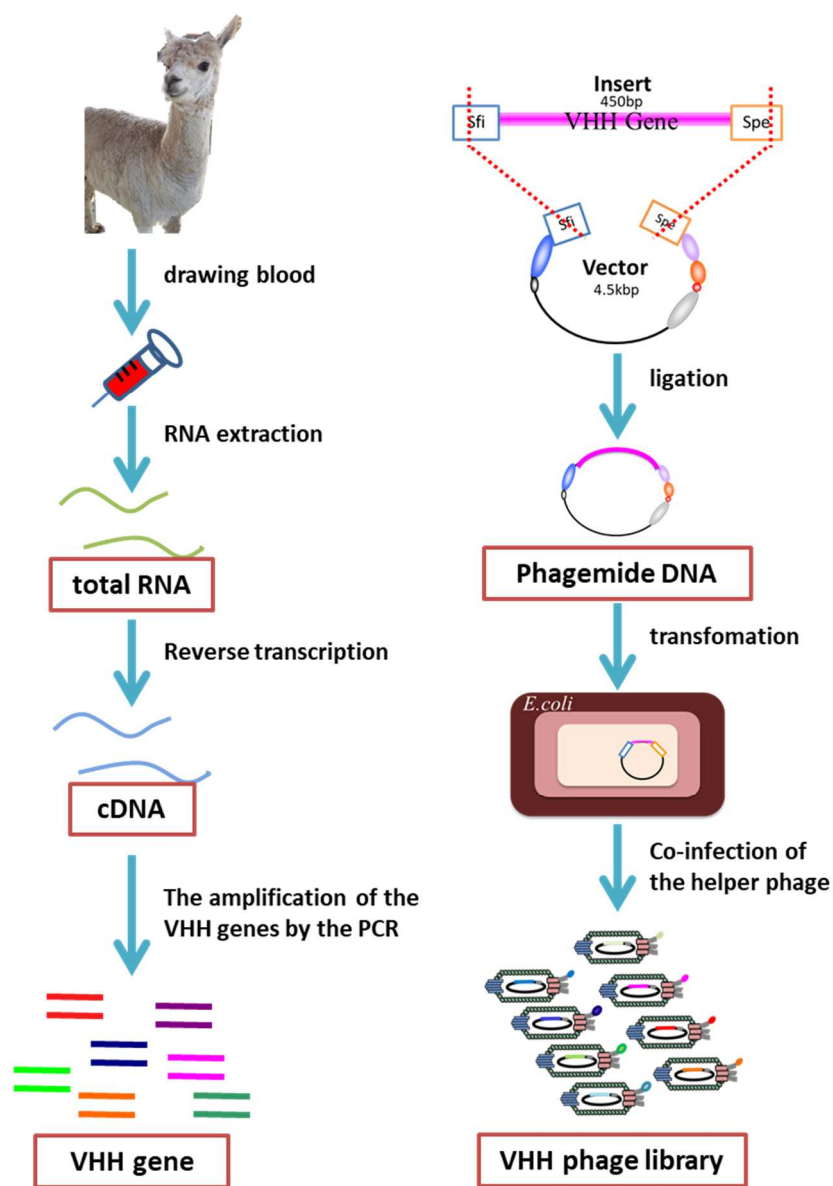


図 2-2 VHH 抗体ファージライブラリ構築の概要図

採血した血液より分離・ホモジナイズした末梢血リンパ球より total RNA を回収した。回収した RNA を SuperScript™ III (Invitrogen) を用いて逆転写反応にて cDNA を調製した。

VHH 遺伝子を増幅するプライマーは、以前の報告 8 をもとに設計し、北海道システムサイエンス株式会社にて合成した。

表 2-1 使用した VHH 抗体遺伝子増幅用プライマーセット

PCR name	Primer name	sequence
1 <sup>st</sup> -PCR	KSB-297	5'-AGKTGCAGCTCGTGGAGTCNCGGNGG-3'
	KSB-331	5'-AGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG-3'
	KSB-300	5'-TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
2 <sup>nd</sup> -PCR	KSB-338	5'-TGCTCCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG-3'
	KSB-344	5'-ATGATGATGTGCACTAGTTTTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'

調製した cDNA を鋳型に、1<sup>st</sup> PCR を行った。KOD-Plus DNA ポリメラーゼを用いて VHH 特異的なプライマーセット（表 2-1）である KSB-297、331（フォワードプライマー）と KSB-300（リバープライマー）にて、98°C 10 秒-58°C 30 秒-68°C 30 秒の 25 サイクルの条件で VHH 遺伝子を増幅した。増幅した VHH 遺伝子を鋳型に 2nd PCR を行った。Gene Taq DNA ポリメラーゼを用いて、2nd PCR プライマーセット（表 2-1）の KSB-338（*Sfi*I 制限酵素サイト付加）、KSB-344（*Spe*I 制限酵素サイト付加）にて PCR（94°C 30 秒-58°C 30 秒-72°C 2 分の 15 サイクル）することによって、VHH 抗体遺伝子に制限酵素サイトを付加した。

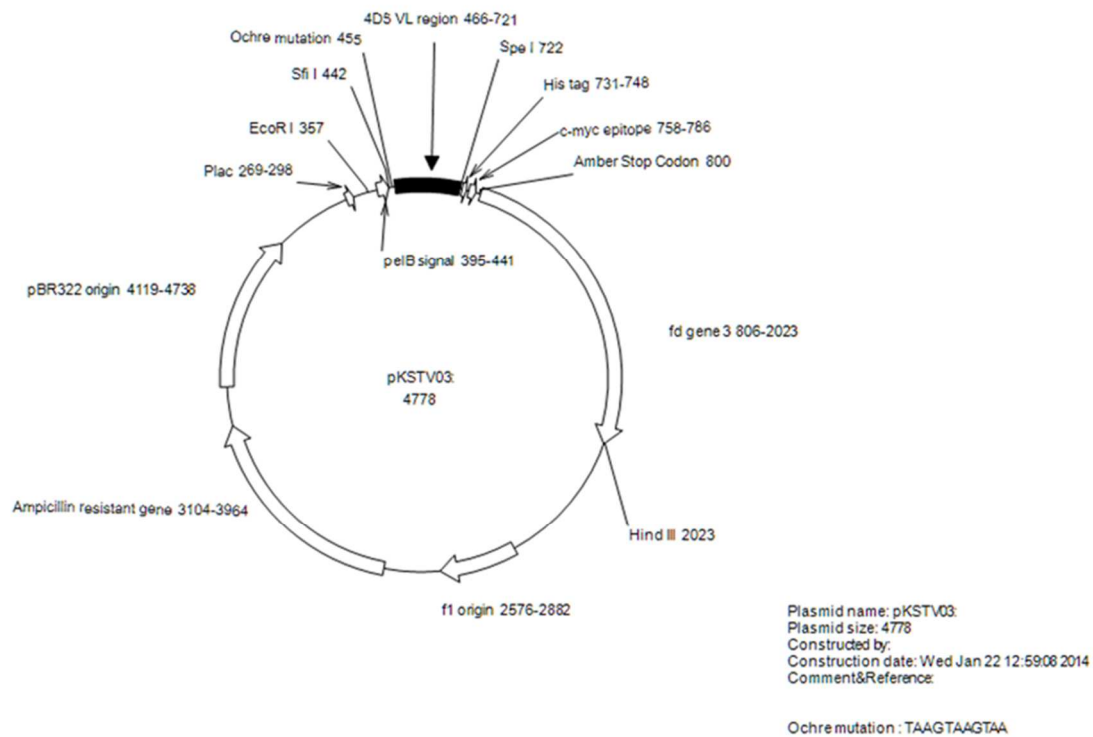


図 2-3 pKSTV03 のベクターマップ

制限酵素サイトを付加した遺伝子断片と pTV118N (TAKARA BIO) 一部改変したファージミドベクターpKSTV03 を制限酵素 *Sfi*I・*Spe*I でそれぞれの至適条件で処理した後、ゲル抽出し、T4DNA ligase でライゲーション反応を 16°C overnight で行った。ライゲーション産物を精製後、形質転換に用いた。形質転換の宿主には、ファージの感染が可能な宿主 *Escherichia coli* TG-1 cell (*E.coli* TG-1、Lucigen Co) にエレクトロポレーション法によって導入した。形質転換産物の一部はタイターチェックに使用し、残りはプレート培養 (2TY-AG、37°C、10 時間) し、ファージ感染に用いた。プレート培養後の形質転換産物の適量を 2TY-AG (2TY medium、100µg/mL ampicillin、2% gulcose) 500mL に植菌し培養 (37°C、1.5 時間) 後、M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen、m.o.i=10) を重感染後、培養した (37°C 30 分 静置、37°C 30 分 振盪培養)。へ

ヘルパーファージ感染後、大腸菌を遠心分離し、ヘルパーファージが感染した大腸菌沈渣を、2TY-AK (2TY medium、100 $\mu$ g/mL ampicillin、25 $\mu$ g/mL kanamycin) 500mL で懸濁し、37 $^{\circ}$ Cで16時間培養した。培養液を遠心分離し、上清に浮遊したファージ溶液を回収後、0.2volのPEG/NaClを加えて、4 $^{\circ}$ Cで4時間沈降反応を行った。その後、遠心分離し、ファージ沈渣をPBSで懸濁し、終濃度が40%になるように80%グリセロールを加えて、ファージライブラリとして-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

#### 2-2-5 バイオパニング

96穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に、*LpSG1* 抗原  $1 \times 10^{-3}$  OD unit をPBS中にて4 $^{\circ}$ Cで1晩静置にて固相化し、0.05%PBSTで溶解したブロッキング溶液 (0.5% BSA or 5% skim milk) を加え、室温で1時間ブロッキングを行った。0.05% PBSTで3回洗浄した後、作製したファージライブラリを加え、室温で2時間反応させた。0.05% PBSTで洗浄を行い (5~数十回)、非特異的結合のファージを除去後、0.1M glycine-HCl (pH2.2) を加え、抗原特異的なファージを溶出した。溶出したファージを1M Tris-HCl (pH9.1) で中和後、*E.coli* TG-1に感染させ、M13KO7ヘルパーファージを重感染させることでファージ集団を増幅した。増幅したファージを次のラウンドに用いた。この行程を数ラウンド繰り返し行った。

#### 2-2-6 レジオネラ特異的クローンの単離

VHHのDNAが組み込まれた*E.coli* TG-1が培養されたプレートから、シングルコロニーを選択し、シングルコロニーを37 $^{\circ}$ Cで1晩培養し、2TY-AG (2TY medium、100 $\mu$ g/mL ampicillin、2% glucose) 3mLに植菌し培養 (37 $^{\circ}$ C、1.5時間) 後、M13KO7ヘルパーファージ (Invitrogen、m.o.i=5) を37 $^{\circ}$ C 30分静

置、37°C 30 分 振盪培養の条件で重感染させた。ヘルパーファージ感染後、大腸菌を遠心分離し、感染していない過剰量のヘルパーファージが残る上清を捨て、ヘルパーファージが感染した大腸菌沈渣を、2TY-AK (2TY medium、100µg/mL ampicillin、25µg/mL kanamycin) 1mL で懸濁し、37°Cで 16 時間培養した。培養液を遠心分離し、上清に浮遊したファージ溶液を回収後、0.2vol の PEG/NaCl を加えて、4°Cで 4 時間、沈降反応を行った。その後、遠心分離し、ファージ沈渣を PBS で懸濁した。

### 2-2-7 ELISA (ファージ、VHH 抗体)

96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に *LpSG1* 抗原  $2.0 \times 10^{-4}$  OD unit を PBS 溶液中にて 4°Cで 1 晩静置にて固相化 (その他のタンパク質は、200ng / well で固相化) し、0.5% BSA/PBS にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。0.05% PBST で 3 回洗浄した後、ファージ溶液 (50µL) もしくは VHH 溶液 (100ng / 50µL) を加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、ファージを検出するためにビオチン化 Mouse anti-M13 抗体 (Abcam) を室温で 1 時間反応後、ビオチン化 Mouse anti-M13 抗体を検出するために SA-HRP (VECTOR LABORATORIES) を室温で 1 時間反応させ、VHH を検出するために Mouse anti-Myc tag 抗体 (MBL) を室温で 1 時間反応後、Mouse anti-Myc tag 抗体を検出するために HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (KPL) を室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine を含む基質溶液を用いた呈色反応により (反応停止は 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合している VHH 抗体ファージもしくは VHH タンパク質を定量化した。検出には ELISA プレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定して評価した。

### 2-2-8 可溶性 VHH 抗体の発現・精製

VHH 遺伝子が組み込まれたプラスミドを *E.coli* HB2151 に形質転換し、プレート培養 (2TY-AG、37°C、12 時間) した。培養した大腸菌を 100mL の 2TY-A で 37°C で一晩培養し、新しい培地 (2TY-A) 2000mL に 1/100vol 加え、37°C で OD600=0.6~0.8 になるまで培養した。この大腸菌に終濃度 1mM の IPTG を加え、37°C で 12 時間培養した。培養液を遠心分離にて上清 (培養上清) と大腸菌に分離し、大腸菌に TES buffer (0.2M Tris-base、0.5mM EDTA、0.5M sucrose) 30mL にて懸濁後、氷上で 2 時間静置した。1/4 TES buffer を 60mL 加え再懸濁し氷上で 1 時間静置。遠心後の上清を回収した (periplasm)。上清を Ni カラム (Ni excel、GE Healthcare) を用いて可溶性 VHH を精製し、SDS-PAGE にて精製度を確認した。

### 2-2-9 Western blotting

レジオネラ菌体サンプルを FastBreak™ Cell Lysis Reagent (promega) にて可溶化した。その上清を SDS-PAGE にて泳動後、メタノールで親水化した PVDF メンブレン上に転写し、1% skim milk にて室温で 1 時間でブロッキングした。その後、Biotin Labeling Kit - NH2 (同仁化学) にて biotin 化した VHH 抗体を室温で 1 時間反応後、SA-HRP を室温で 1 時間反応後、0.05% PBST で洗浄後、発色基質の Ez West Blue (ATTO) を加え、撮影した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 アルパカ重鎖抗体の精製

アルパカ血漿中には IgG1~3 が混在しており、*LpSGI* の免疫によって重鎖抗体 (IgG2、IgG3) の力価が上昇しているかわからないため、重鎖抗体の精製を行い、SDS-PAGE により重鎖抗体が精製できていることを確認した (図 2-4)。

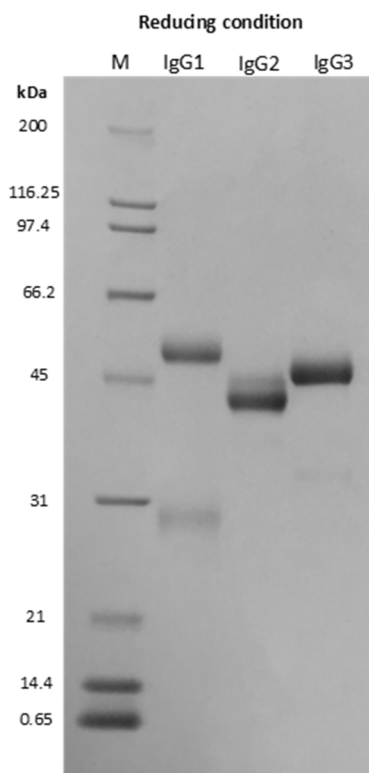


図 2-4 精製抗体の SDS-PAGE



### 2-3-2 アルパカ重鎖抗体の抗体力価測定

重鎖抗体が精製できたため、続いて ELISA により重鎖抗体の *LpSG1* に対する力価を確認した (図 2-5)。

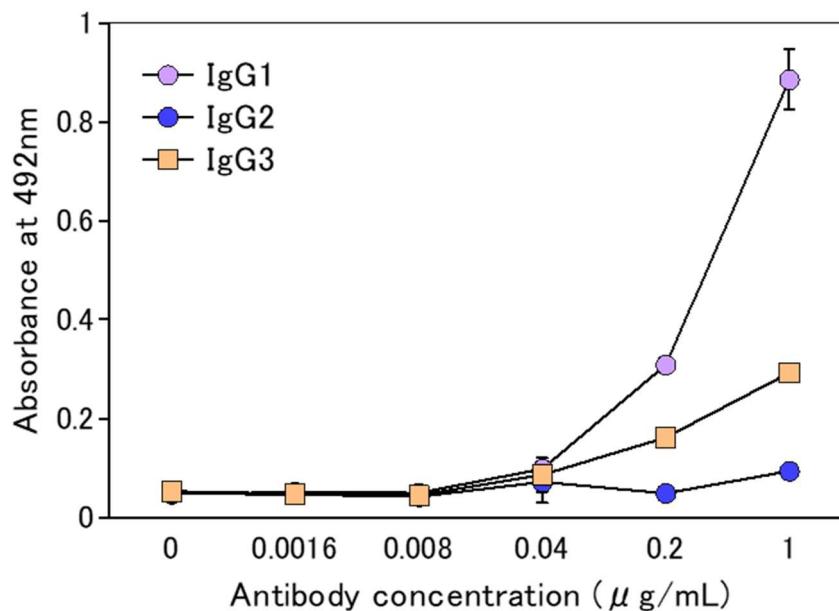


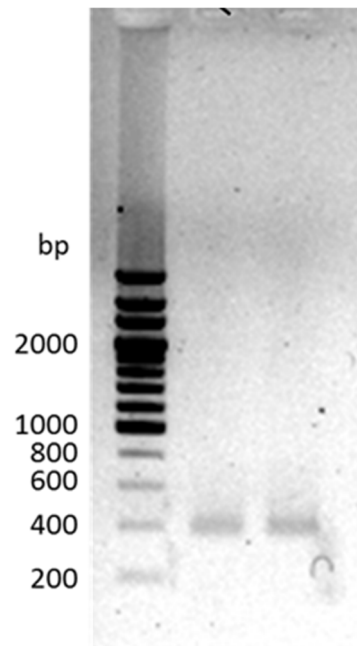
図 2-5 重鎖抗体力価

従来抗体である IgG1 抗体及び、重鎖抗体の IgG2 (ヒンジ領域が短い)、IgG3 (ヒンジ領域が長い) の抗原に対する力価上昇を確認した。重鎖抗体では IgG3 が、優位に *LpSG1* に対する力価が上昇していることが認められたため、IgG3 由来 VHH ライブラリを作製することとした

### 2-3-3 VHH 抗体ファージライブラリの構築

免疫した1頭のアルパカ由来の末梢血リンパ球（約  $10^7$  cell）から total RNA を回収し、回収した total RNA を鋳型に逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に IgG3 由来の VHH 遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動にて確認した結果、400bp 付近に IgG3 の VHH 遺伝子の増幅を確認した（図 2-6、A）。制限酵素サイトを付加した DNA 断片とファージミドベクターを制限酵素 *SfiI*、*SpeI* の至適条件にて消化させ、T4 DNA リガーゼにて DNA 断片とファージミドベクターをライゲーションさせた。ライゲーションさせたプラスミドを *E.coli* TG-1 にエレクトロポレーション法によって形質転換したところ、形質転換効率が  $7.97 \times 10^7$  CFU（Colony Forming Unit）であった。形質転換後の大腸菌コロニーを用いて、VHH 抗体遺伝子が挿入されているか PCR にて VHH 遺伝子の増幅を行い、アガロースゲル電気泳動にて確認した結果、14/15 の確率で 800bp 付近のバンドが確認できることより VHH 遺伝子が挿入されていることを認めた（図 2-6、B）。その後、形質転換後の大腸菌に M13KO7 ヘルパーファージを重感染させ、VHH ファージライブラリを構築した。

(A)



(B)

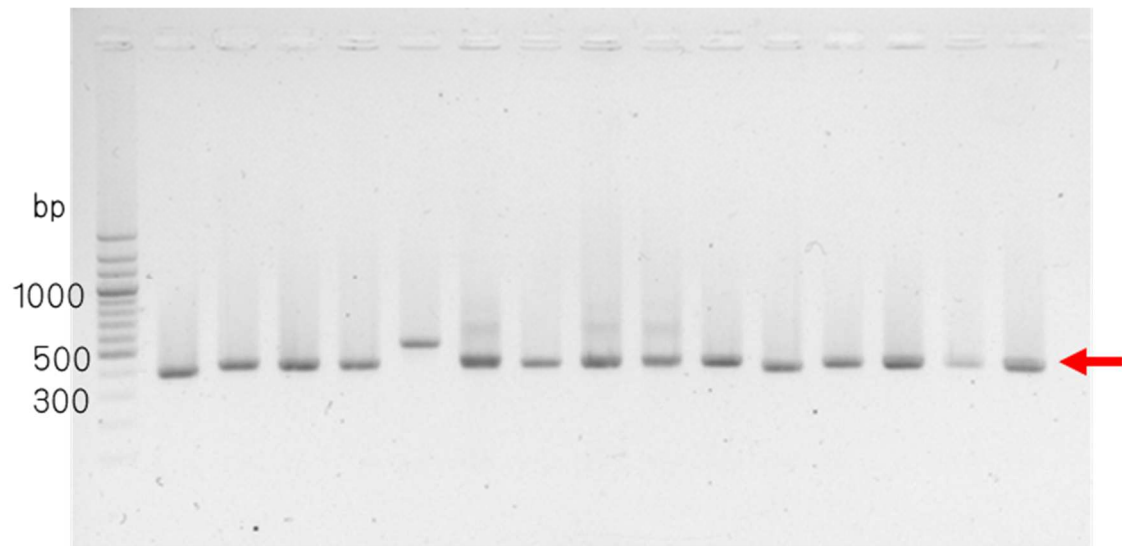


図 2-6 VHH 遺伝子調製・VHH 遺伝子挿入確認

(A) : IgG3 由来の VHH 遺伝子の増幅確認

(B) : 作製ライブラリの VHH 遺伝子挿入確認

#### 2-3-4 レジオネラに対するバイオパニング

作製した免疫ライブラリを用いて *LpSG1* に対してバイオパニングを行った。バイオパニング後のライブラリを用いて、ELISA にて結合性を評価したところ、2 ラウンド後のライブラリで *LpSG1* 抗原特異的な結合が認められ、*LpSG1* 特異的なファージ群が濃縮したと判断した (図 2-7)。

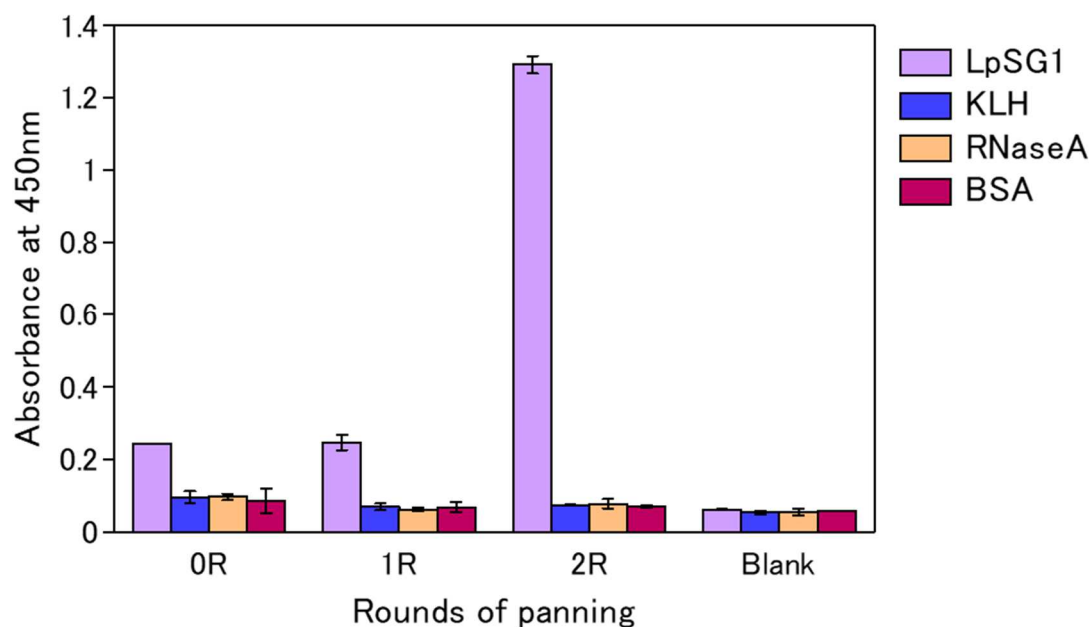


図 2-7 バイオパニング (*LpSG1* 特異的ファージ集団の濃縮)

### 2-3-5 レジオネラ特異的ファージクロンの単離

バイオパニングによって抗原特異的なファージ群の濃縮が確認できたため、濃縮できたライブラリをプレート上で展開し、シングルコロニーを用いてファージクロンを作製し、ELISAにて結合性を評価したところ、25クローン中9クローンが *LpSG1* 特異的なファージクロンであった (図 2-8)。

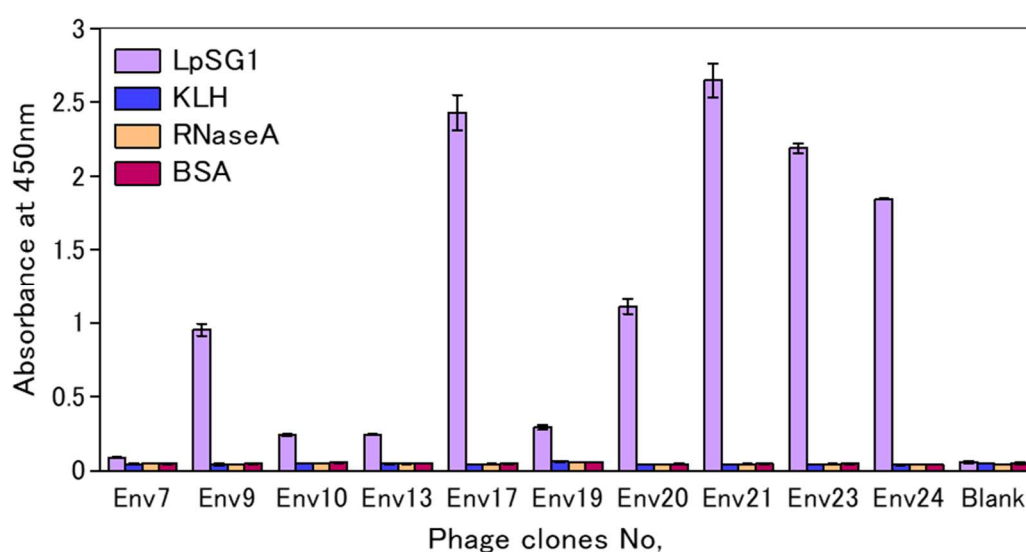


図 2-8 スクリーニング (*LpSG1* 特異的ファージクロンの単離)

### 2-3-6 レジオネラ特異的 VHH 抗体の配列解析

単離した抗原特異的な 9 クローンのアミノ酸配列解析を行った結果、抗原結合に最も寄与しているとされる CDR3 の配列の比較にて 2 種類の *LpSG1* 特異的 VHH 抗体を取得していることが確認された (図 2-9)。アミノ酸配列は、IMGT のナンバリングによって、CDR 領域の分類を行った。

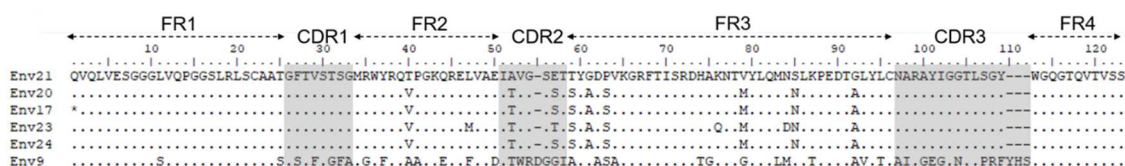


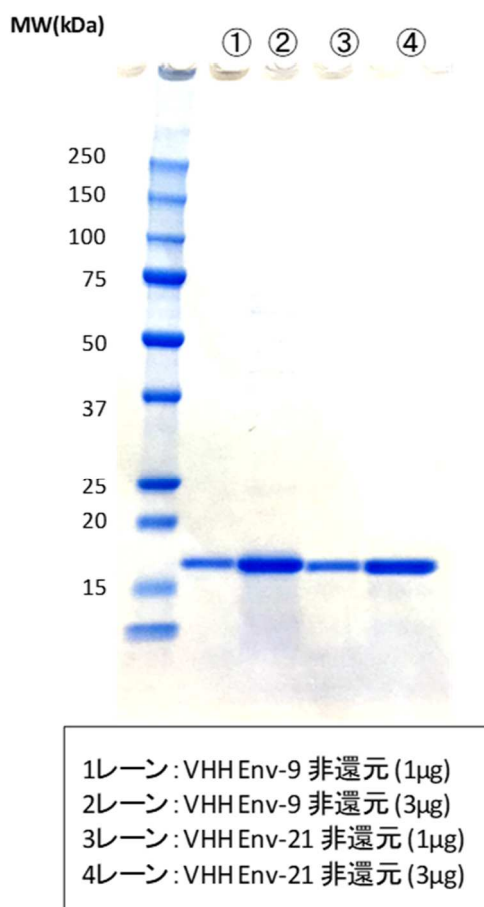
図 2-9 *LpSG1* 特異的クローンのアミノ酸配列解析

得られたクローンの内、抗原結合に最も寄与しているとされる CDR3 領域の配列より Env9 と Env21 の 2 種類を選択した。VHH 抗体の FR2 領域のアミノ酸の特徴 (VHH 型 : VH 型 Phe /Tyr37Val、Glu44Gly、Arg45Leu、Gly47Trp) から、Env9 【Phe37、Glu44、Arg45、Phe47】、Env21 【Tyr37、Gln44、Arg45、Leu47】である事より、両クローンとも VHH 型である事が示された。

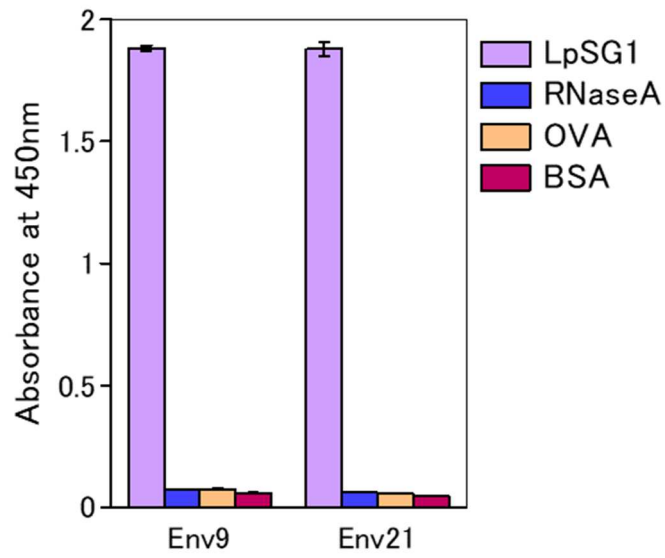
### 2-3-7 レジオネラ特異的 VHH 抗体の性状解析

*LpSG1* 特異的クローン (Env9、Env21) の更なる性状解析のために、VHH タンパク質を大腸菌で発現させ、タンパク質レベルでの性状解析を行った。大腸菌の培養上清、ペリプラズム画分で発現させた VHH を Ni カラムで精製を行い、SDS-PAGE で確認した結果、VHH のシングルバンドを確認した (図 2-10、A)。続いて、精製した VHH の抗原特異性を ELISA (タンパク質 3 種類、グラム陰性菌 5 種類) で確認した結果、*LpSG1* 特異的 VHH であることが確認できた (図 2-10、B・C)。さらに、可溶化抗原を用いた Western blotting にて VHH 抗体の反応性を確認したところ、Env9、21 ともに 37~150kDa の抗原を認識していることが示された (図 2-10、D)。

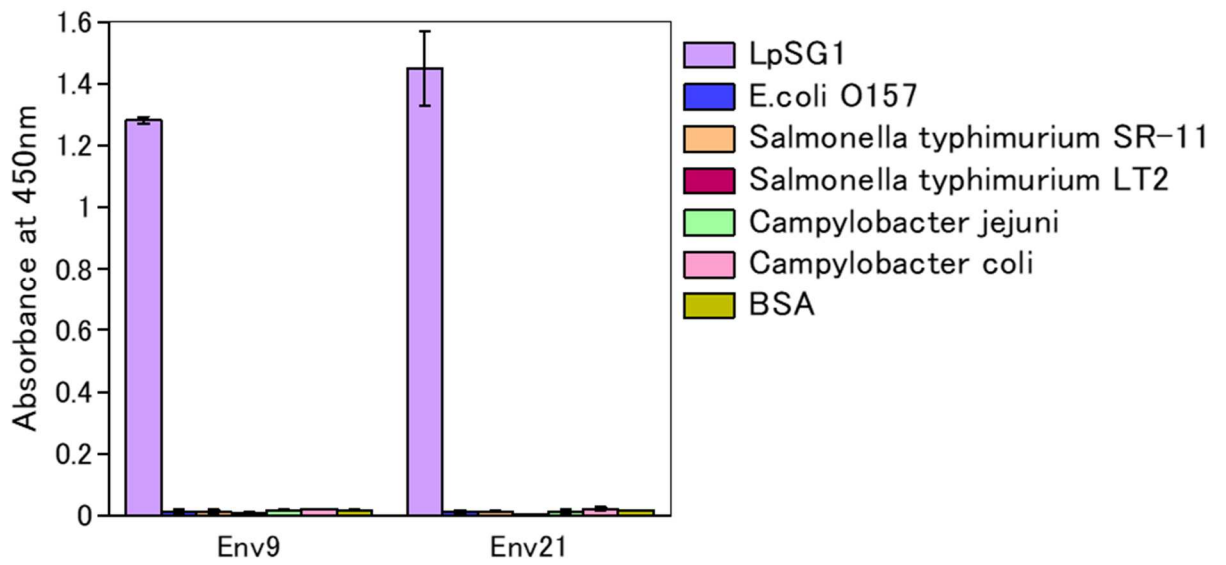
(A)



(B)



(C)





(D)

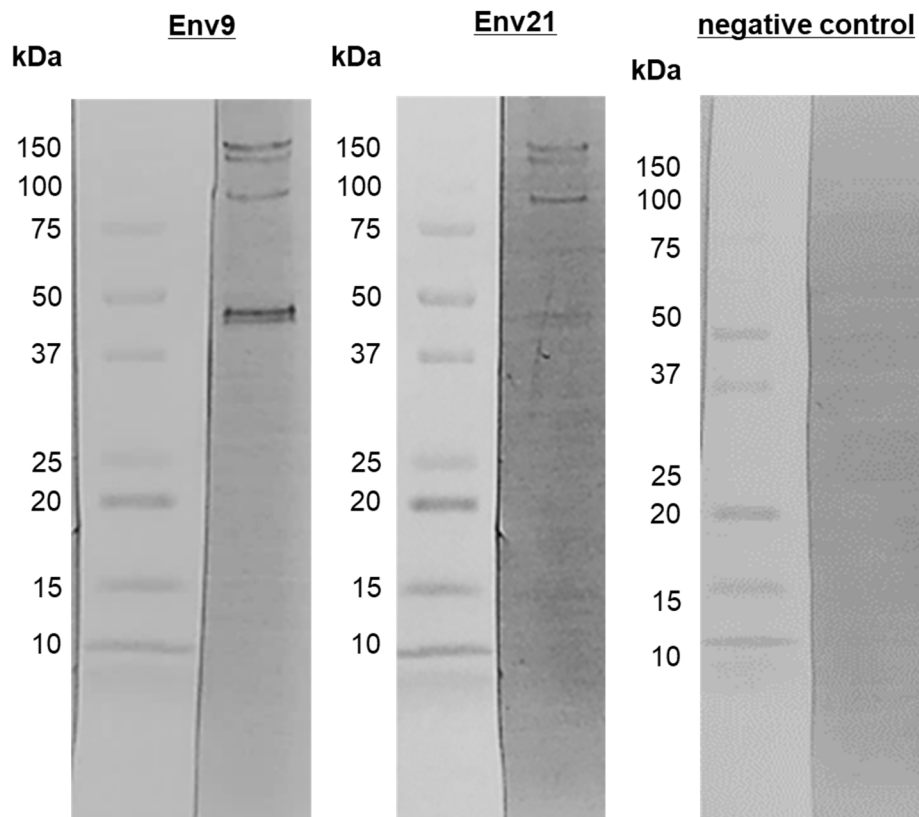


図 2-10 *LpSGI* 特異的 VHH 抗体の性状解析

(A) : 精製 VHH 抗体の SDS-PAGE

(B) : 精製 VHH 抗体の ELISA (結合活性試験 : タンパク質)

(C) : 精製 VHH 抗体の ELISA (結合活性試験 : グラム陰性菌)

(D) : 精製 VHH 抗体の Western blotting (可溶化抗原)

## 2-4 考察

本研究では、VHH 抗体ライブラリからレジオネラ特異的 VHH 抗体を取得する事を目的とし、レジオネラを免疫したアルパカの血液由来のライブラリを構築した。実際にアルパカへレジオネラ菌体を免疫し、免疫後の抗体力価の測定結果より、各種抗体価が上昇している事が確認された。力価の高さは  $IgG1 > IgG3 > IgG2$  の順であった。アルパカの抗体成熟メカニズムはまだ完全に解明されていないが、経験上、免疫抗原に対する抗体価は  $IgG1 \rightarrow IgG3 \rightarrow IgG2$  の順に上昇していく傾向にある事が確認されている。今後、さらなる免疫に関するデータを蓄積する事により重鎖抗体産生のメカニズムを明らかにする可能性が考えられる。

レジオネラ抗原に対して  $IgG3$  の力価上昇が確認された時点の PBMC ホモジナイズ溶液より、免疫ライブラリを構築し、抗原特異的な VHH 抗体の単離を試みた結果、2 ラウンドのバイオパニングで抗原特異的なフェージ群の濃縮に成功した。濃縮したライブラリより 24 クローンを無作為に選択し、抗原特異性を評価したところ、9 クローンが抗原特異的クローンであり、抗原特異的 VHH 抗体が単離可能であった。また、取得した抗原特異的クローンのアミノ酸配列解析の結果、抗原結合に最も寄与しているとされる CDR3 領域より 2 種類の VHH 抗体 (Env9 と Env21) を取得しており、先行研究で報告されている VHH 型の FR2 の特徴的アミノ酸配列と比較し、両クローンとも VHH 型である事が示された。上述したように、抗原特異的 VHH 抗体の取得が非常に効率的であったのは、免疫ライブラリの優位な特徴であるといえる。

さらなる性状解析のため、VHH 抗体を発現・精製した。Env9 と Env21 を大腸菌にて発現させ、Ni カラムにて His タグタンパク質の精製を行った結果、タ

ンパク質発現用のベクターでないにも関わらず、Env9 が約 60mg/L、Env21 が約 65mg/L という十分な発現量で、ベクターや培養条件の検討でさらに高発現となる可能性がある。産業利用においては、発現量は非常に重要な問題となるので、発現量の点からみても VHH 抗体が有用な候補である事が示唆される。

精製した VHH 抗体を用いて、レジオネラの属するグラム陰性菌に対して交差性を行った結果、両クローンとも他のグラム陰性菌には結合を示さず、レジオネラ菌特異的である事が示された。また、第 4 章で詳しく述べるが、液中のレジオネラ菌に対して結合活性を持っていることより、レジオネラ菌の外膜上の抗原を認識していることが示唆される。また、可溶化抗原の Western blotting の結果、Env9 は、ネガティブコントロールと比較して、45 kDa のタンパク質のバンドを強く認識し、このバンドが抗原である可能性が示唆された。一方、Env21 は、明確なタンパク質のバンドを認識しなかった。Env21 の抗原が検出されない理由は、現在のところ不明であるが、Env21 のエピトープがコンフォメーション型エピトープで、3 次構造が失われているため、SDS-PAGE 条件下では VHH に認識されない可能性が示唆される。80-130kDa の 3 つのバンドは、いずれの VHH でも弱く検出されたが、これらのタンパク質バンドについて、これ以上の詳細な議論は情報不足で困難であった。

### 第3章 VHH抗体の抗体工学による多価化



## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 VHH 抗体二量体の作製

VHH 遺伝子を増幅するプライマーは、当研究室にて設計し、北海道システムサイエンス株式会社にて合成した。

表 3-1 使用した VHH 抗体二量体作製用プライマーセット

PCR name	Primer name	sequence
Dimer 1 <sup>st</sup> -PCR	Dimer 1 <sup>st</sup> -F1	5'-TGCTCCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG-3'
	Dimer 1 <sup>st</sup> -R1	5'-GCCTCCACCACTCGAGGTTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
	Dimer 1 <sup>st</sup> -F2	5'-GGTGGCTCTGGGTCGACGGGATCGCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG-3'
	Dimer 1 <sup>st</sup> -R2	5'-ATGATGATGTGCACTAGTTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
Dimer 2 <sup>nd</sup> -PCR	Dimer 2 <sup>nd</sup> -F	5'-TGCTCCTCGCGGCCAG-3'
	Dimer 2 <sup>nd</sup> -R	5'-TGATGATGTGCACTAG-3'
	GS linker	5'-CTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGGTCGACGGGATCG-3'

VHH 抗体遺伝子に GS リンカーの一部の付加する Dimer 1st-PCR を行った。

VHH 遺伝子を鋳型に KOD-Plus DNA ポリメラーゼを用いて表 3-1 のプライマーセット (Dimer 1st-F1 と Dimer 1st-R1、Dimer 1st-F2 と Dimer 1st-R2 の組み合わせ) で、98°C 10 秒-58°C 30 秒-68°C 30 秒の 25 サイクルの条件で行った。続いて、VHH 抗体遺伝子の GS リンカーによる架橋を行う Dimer 2nd-PCR を行った。Dimer 1st-PCR 産物と GS リンカーを鋳型に GeneTaq DNA ポリメラーゼ反応剤を用いての表 3-1 のプライマーセット (Dimer 2nd -F と Dimer 2nd -R) で、94°C 30 秒-62°C 30 秒-72°C 60 秒の 15 サイクルの条件で行った。アガロースゲルでの電気泳動によって精製した Dimer 2nd-PCR 産物とファージミドベクター (pKSTV03) は、*Sfi*I および *Spe*I で制限酵素消化し、PCR 産物を線状化

pKSTV03 に連結した。連結したプラスミドを用いて、第 2 章の『2-2-7 可溶性 VHH 抗体の発現・精製』と同様の手順にて VHH 二量体を大腸菌にて発現、Ni カラムにて精製し、性状解析をおこなった。

### 3-2-2 C 末システイン残基付加 VHH 抗体の作製

VHH 遺伝子を増幅するプライマーは、当研究室にて設計し、北海道システムサイエンス株式会社にて合成した。

表 3-2 使用した VHH 抗体 C 末システイン残基作製用プライマーセット

PCR name	Primer name	sequence
C-Cys-PCR	C-Cys-F	5'-TGCTCCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTGAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGG-3'
	C-Cys-R	5'-ATGATGATGTGCACTAGTGCATGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'

VHH 抗体の C 末端へのシステイン残基の付加する C-Cys-PCR を行った。VHH 遺伝子を鋳型に KOD-Plus DNA ポリメラーゼを用いて表 3-2 のプライマーセットで、98°C 10 秒-58°C 30 秒-68°C 30 秒の 25 サイクルの条件で行った。アガロースゲルでの電気泳動によって精製した C-Cys-PCR 産物とファージミドベクター (pKSTV03) は、*Sfi I* および *Spe I* で制限酵素消化し、PCR 産物を線状化 pKSTV03 に連結した。連結したプラスミドを用いて、第 2 章の『2-2-7 可溶性 VHH 抗体の発現・精製』と同様の手順にて C 末にシステイン残基を導入した VHH (VHH-Cys) を大腸菌にて発現、Ni カラムにて精製し、性状解析をおこなった。

### 3-2-3 BSA-VHH コンジュゲート体の作製（マレイミド法）

作製した VHH-Cys は、3mM TCEP（BioVision）にて還元した（還元した VHH-Cys は、陽イオンカラム（Shodex IEC SP-825）にて 10%酢酸ナトリウム（pH5.5）と 10%酢酸ナトリウム（pH5.5）+1M NaCl を 0-70%の混合率で 0.8mL/分の 15 分の測定にて評価した）。BSA（FUJIFILM Wako）は、FOCUS™ Protein Alkylation（Takara Bio）にて遊離のシステインをアルキル化した後、NHS-PEG2-Maleimide（東京化成）を 20 倍量 mol 数加え、室温で 1 時間静置した。未反応の試薬を除去した後、BSA 1 分子に対して還元した VHH-Cys を 5 倍量 mol 数加え、室温で 12 時間静置した後、未反応の VHH-Cys を除去し、性状解析をおこなった。

### 3-2-4 BSA-VHH コンジュゲート体の作製（クリック反応）

作製した VHH-Cys は、3mM TCEP（BioVision）にて還元し、DBCO-Maleimide（Click Chemistry Tools）を 5 倍量 mol 数加え、室温で 1 時間静置した（VHH-DBCO）。BSA は、NHS-PEG4-Azide（Click Chemistry Tools）を 20 倍量 mol 数加え、室温で 1 時間静置した（BSA-Azide）。未反応の試薬を除去した後、BSA-Azide に対して VHH-DBCO を 5 倍量 mol 数加え、50°Cで 3 時間静置した後、未反応の VHH-DBCO を除去し、性状解析をおこなった。

### 3-2-5 KLH-VHH コンジュゲート体の作製（マレイミド法）

作製した VHH-Cys は、3mM TCEP（BioVision）にて還元した。市販の KLH-Maleimide（Sigma）1 分子に対して還元した VHH-Cys を 100 倍量 mol 数加え、室温で 2 時間静置した後、未反応の VHH-Cys を除去し、性状解析をおこなった。



### 3-2-6 サンドイッチ ELISA(コンジュゲーション確認)

96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に抗 BSA 抗体または抗 KLH 抗体を 250ng/well を PBS 溶液中にて 4°C で 1 晩静置にて固相化し、0.5% BSA/PBS にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。0.05% PBST で 3 回洗浄した後、各濃度に希釈したコンジュゲート体溶液を加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、VHH 抗体を検出するために Mouse anti-Myc tag 抗体 (MBL) を室温で 1 時間反応後、Mouse anti-Myc tag 抗体を検出するために HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (KPL) を室温で 1 時間反応させた。0.05%PBST で 3 回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine を含む基質溶液を用いた呈色反応により (反応停止は 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合している BSA コンジュゲート体を定量化した。検出には ELISA プレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定して評価した。

### 3-2-7 多価化 VHH 抗体の ELISA

96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に *LpSG1* 抗原  $2.0 \times 10^{-4}$  OD unit を PBS 溶液中にて 4°C で 1 晩静置にて固相化 (その他のタンパク質は、200ng/well で固相化) し、0.5% BSA/PBS にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。0.05% PBST で 3 回洗浄した後、各フォーマットの VHH 抗体溶液 (50ng /50 $\mu$ L) を加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、VHH を検出するために Mouse anti-Myc tag 抗体 (MBL) を室温で 1 時間反応後、Mouse anti-Myc tag 抗体を検出するために HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (KPL) を室温で 1 時間反応させた。0.05%PBST で 3 回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine を含む基質溶液を用いた呈色反応により (反応停止は 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合している VHH 抗体ファージもしくは VHH タンパク質を定量化した。検出には ELISA プレートリーダー

を用いて、450nm の吸光度を測定して評価した。

### 3-2-8 MALDI-TOF MS 解析

BSA コンジュゲート体を MALDI-TOF 質量分析装置 (autoflex speed TOF, Bruker Daltonics) で分析した。サンプルは、ターゲットプレート (MTP 384 ターゲットプレート ポリッシュドスチール) にスポットし、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を飽和させた 67%アセトニトリル/0.033%TFA/H<sub>2</sub>O と混合し、MALDI-TOF MS キャリブレーションスタンダードで校正して分析した。

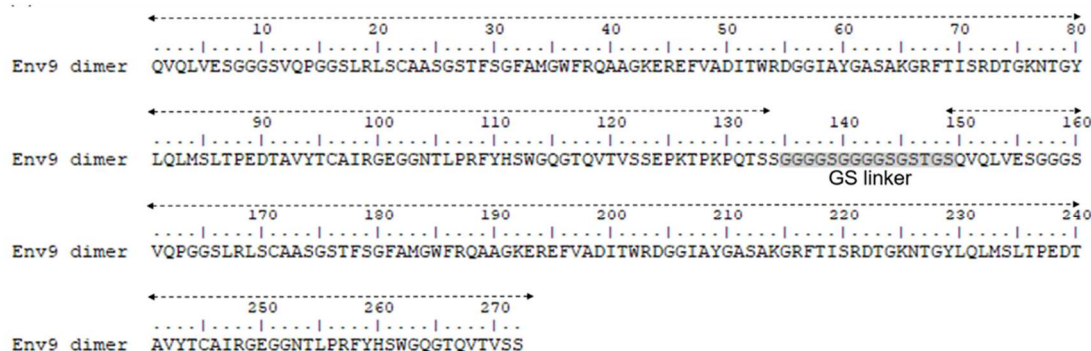
### 3-3 結果

#### 3-3-1 *LpSG1* 特異的 VHH 抗体二量体の性状解析

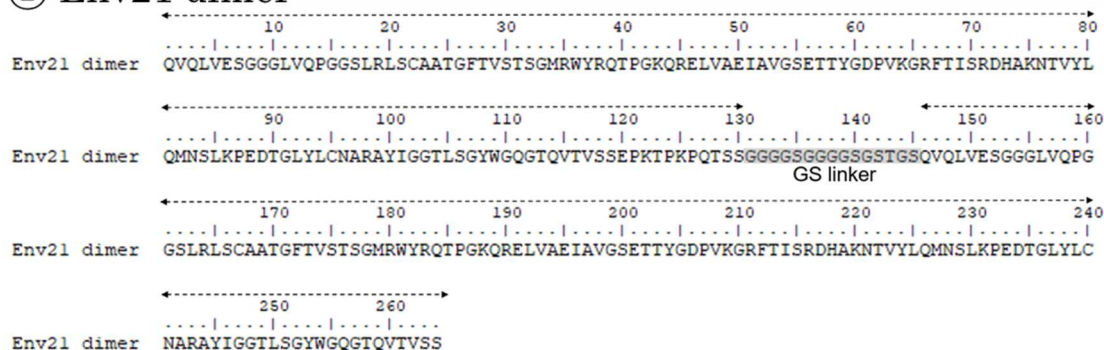
VHH 抗体二量体は、VHH 遺伝子と GS リンカーを遺伝子的に連結して作製した。配列解析にて VHH 遺伝子と GS リンカーが連結している事を確認した後 (図 3-2、A)、大腸菌にてタンパク質発現、Ni カラムを用いた IMAC 精製を行った。精製物の SDS-PAGE の結果、目的の分子質量のところにバンドを確認し (図 3-2、B)、ELISA にて VHH 抗体二量体が *LpSG1* 特異的結合能を保持していることを確認した (図 3-2、C)。

(A)

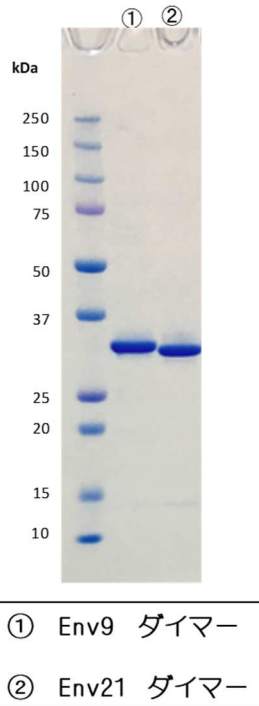
#### ① Env9 dimer



#### ② Env21 dimer



(B)



(C)

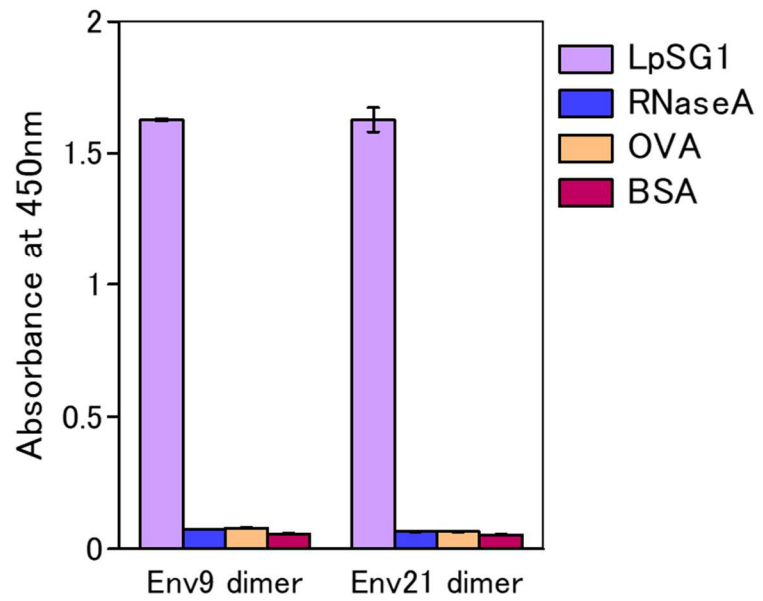


図 3-2 *LpSG1* 特異的 VHH 抗体二量体の性状解析

(A) : VHH 抗体二量体の配列解析

(B) : VHH 抗体二量体の SDS-PAGE

(C) : VHH 抗体二量体の ELISA (結合活性試験 : タンパク質)

### 3-3-2 VHH-Cys の調製

VHH-Cys は、PCR にて VHH の C 末端にシステイン残基後に配列を確認し (図 3-3、A)、大腸菌で発現した後、Ni カラムを用いた IMAC 精製を行った。精製物の SDS-PAGE 解析の結果、非還元状態で導入したシステイン残基を介した分子間ジスルフィド結合による二量体と単量体の 2 本のバンド、還元状態で単量体の 1 本のバンドを確認した (図 3-3、B)。また、ELISA にて、結合活性に問題がない事を確認した (図 3-3、C)。作製した VHH-Cys は、TCEP にて還元処理し、陽イオンカラムにて大部分が単量体となっている事を確認した (図 3-3、D)。

(A)

```

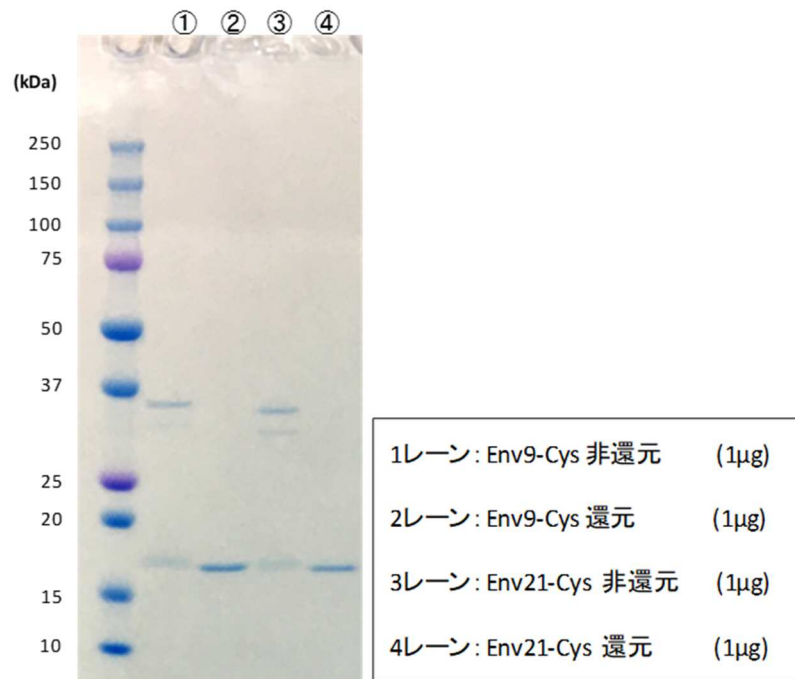
      10      20      30      40      50      60      70      80
Env9      QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGSTFSGFAMGWFRQAAGKEREVADIITWRDGGIAYGASAKGRFTISRDTGKNIGY
Env9-Cys  E.....

      90     100     110     120     130     140     150
Env9      LQLMSLTPEDTAVYTCAIRGEGGNTLPRFYHSWGQGTQVTVSSEPKTPKPTSAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA
Env9-Cys  .....C.....

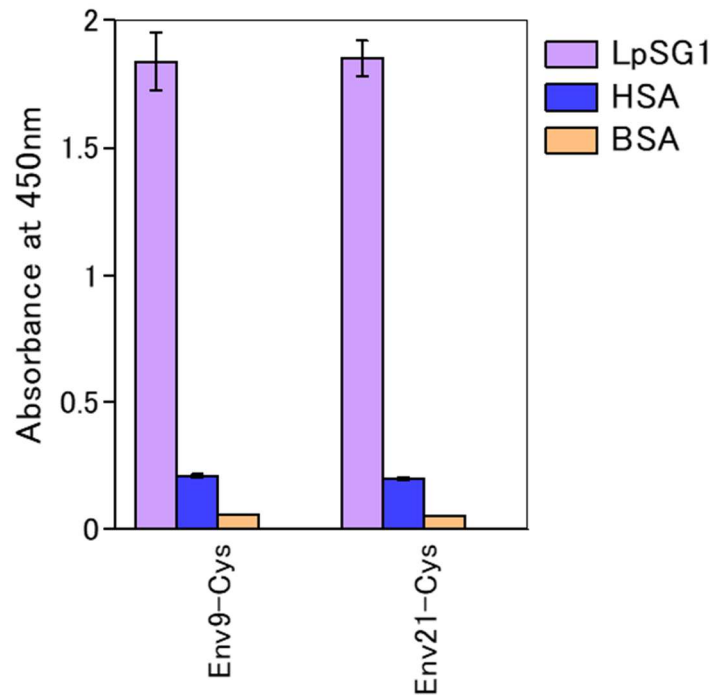
      10      20      30      40      50      60      70      80
Env21     QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTVSTSGMRWYRQTPGKQRELVAEIAVGSETTYGDPVKGRFTISRDHAKNIVYL
Env21-Cys E.....

      90     100     110     120     130     140     150
Env21     QMNSLKPEDTGLYLCNARAYIGGTLSGYWGQGTQVTVSSEPKTPKPTSAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA
Env21-Cys .....C.....
```

(B)



(C)



(D)

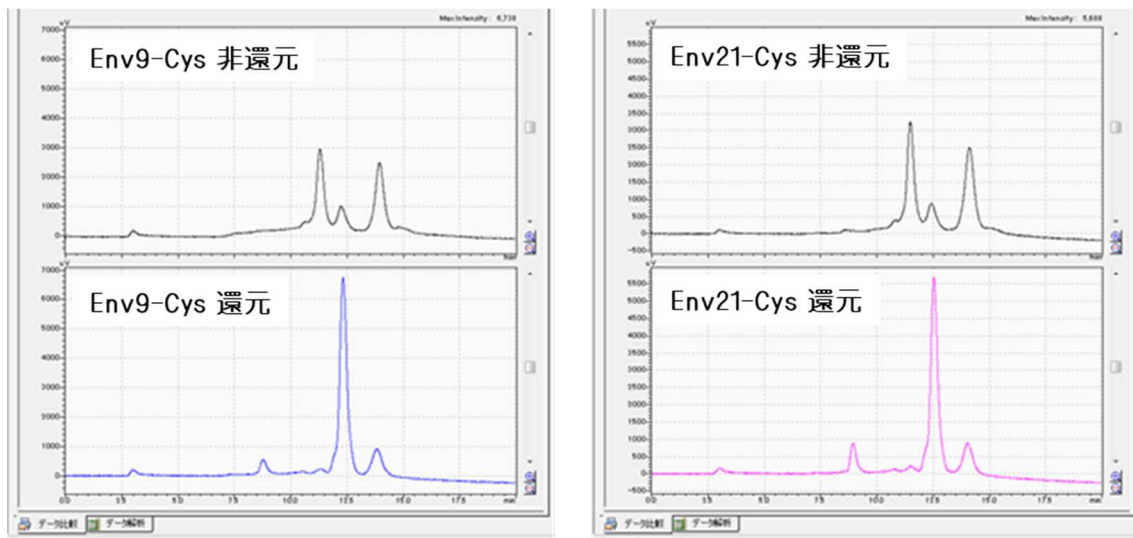


図 3-3 *LpSG1* 特異的 VHH-Cys の性状解析

(A) : VHH-Cys の配列解析

(B) : VHH-Cys の SDS-PAGE

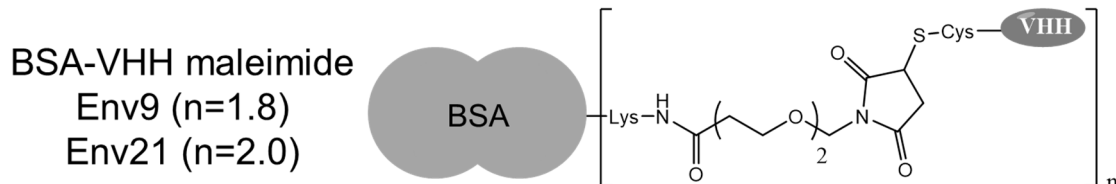
(C) : VHH-Cys の ELISA (結合活性試験 : タンパク質)

(D) : 陽イオンカラムによる VHH-Cys の還元処理後の確認

### 3-3-3 BSA-VHH コンジュゲート体（マレイミド法）の性状解析

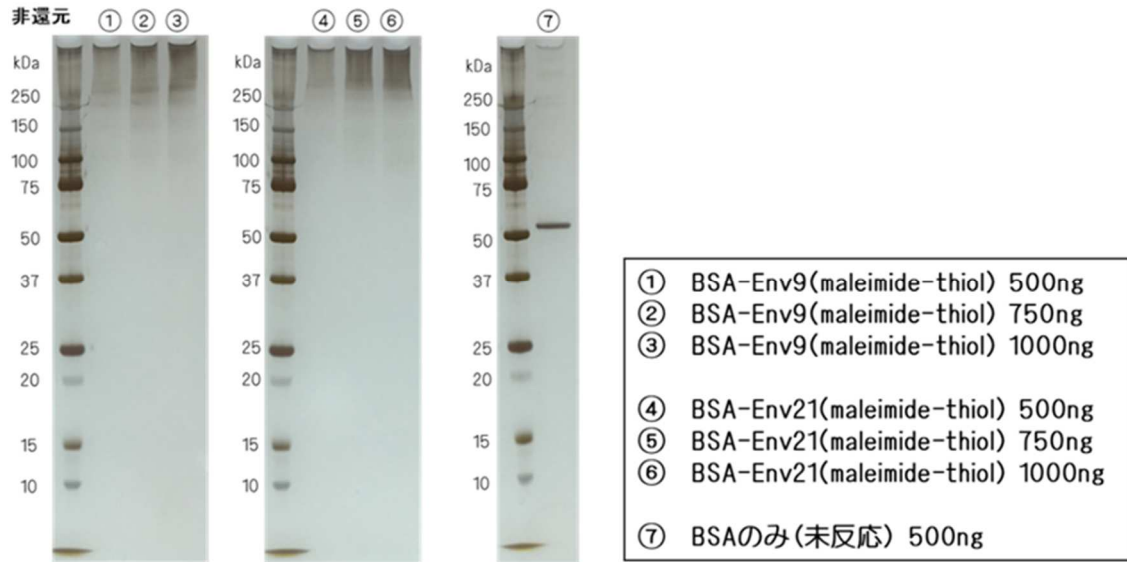
TCEPにて還元処理した VHH-Cys とマレイミド基を付加した BSA を混合する事でマレイミド基とチオール基を介したコンジュゲーションをおこなった。コンジュゲーションの確認を SDS-PAGE と抗 BSA 抗体と抗 Myc タグ抗体（VHH 抗体に付加されたタグ）のサンドイッチ ELISA にて実施した結果、BSA に VHH 抗体が付加されている事が示された（図 3-4、A、B）。また、コンジュゲート体の MALDI-TOF MS 分析の結果、BSA 1 分子に対して、VHH 抗体が 0~4 個（Env9：平均 1.8 個、Env21：平均 2.0 個）付加されていることが示された（図 3-4、B）。また、ELISA にてコンジュゲート体に付加した VHH 抗体が *LpSG1* 特異的結合能を保持していることを確認した（図 3-4、C）。

(A)

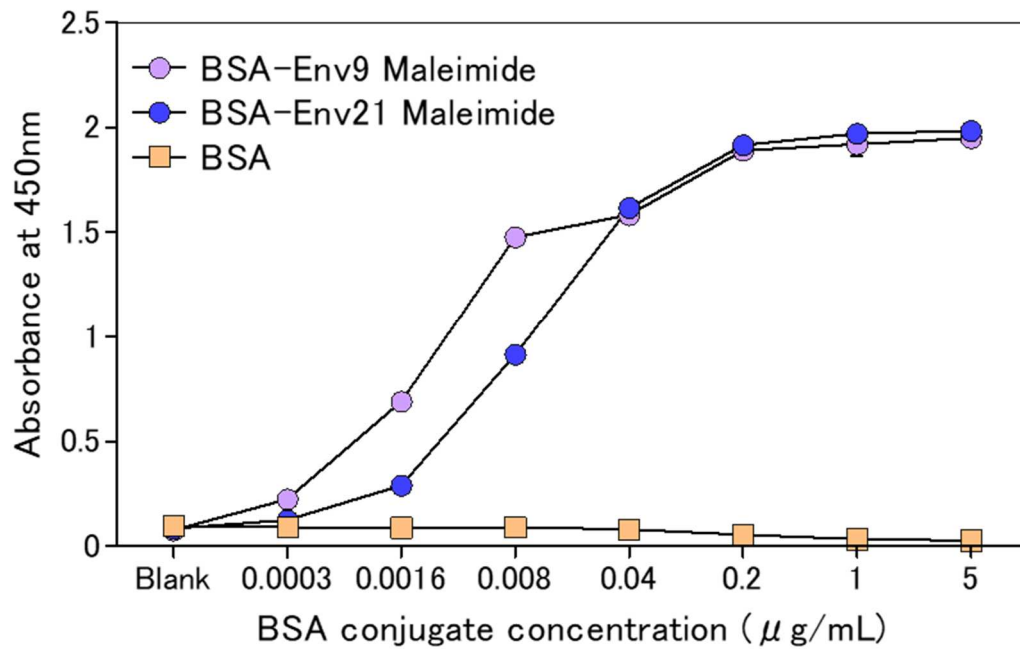




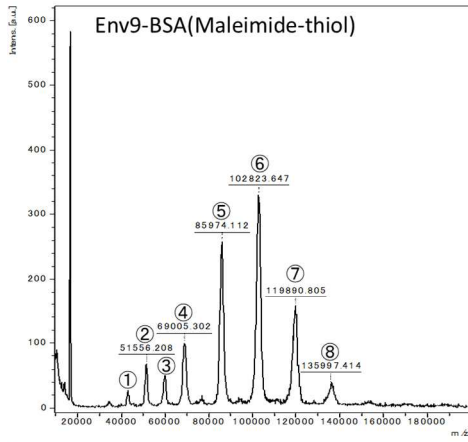
(B)



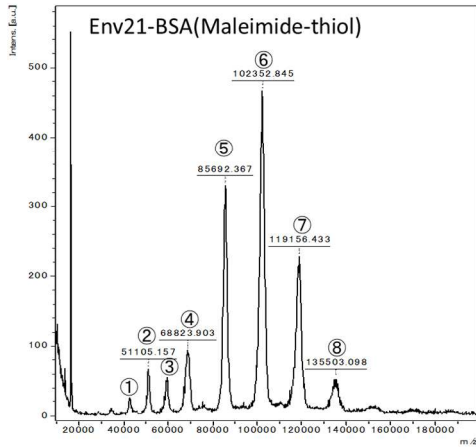
(C)



(D)



peak	sample	m/z	area
①	⑤-Bivalent peak	42947.015	488
②	⑥-Bivalent peak	51556.208	2206
③	⑦-Bivalent peak	59818.756	1424
④	BSA	69005.302	2252
⑤	BSA-Env9	85974.112	11532
⑥	BSA-[Env9] <sub>2</sub>	102823.647	7269
⑦	BSA-[Env9] <sub>3</sub>	119890.805	2395
⑧	BSA-[Env9] <sub>4</sub>	135997.414	2079



peak	sample	m/z	area
①	⑤-Bivalent peak	42810.266	218
②	⑥-Bivalent peak	51105.157	941
③	⑦-Bivalent peak	59654.096	1522
④	BSA	68823.903	2017
⑤	BSA-Env21	85692.367	6569
⑥	BSA-[Env21] <sub>2</sub>	102352.845	13178
⑦	BSA-[Env21] <sub>3</sub>	119156.433	8087
⑧	BSA-[Env21] <sub>4</sub>	135503.098	1978

(E)

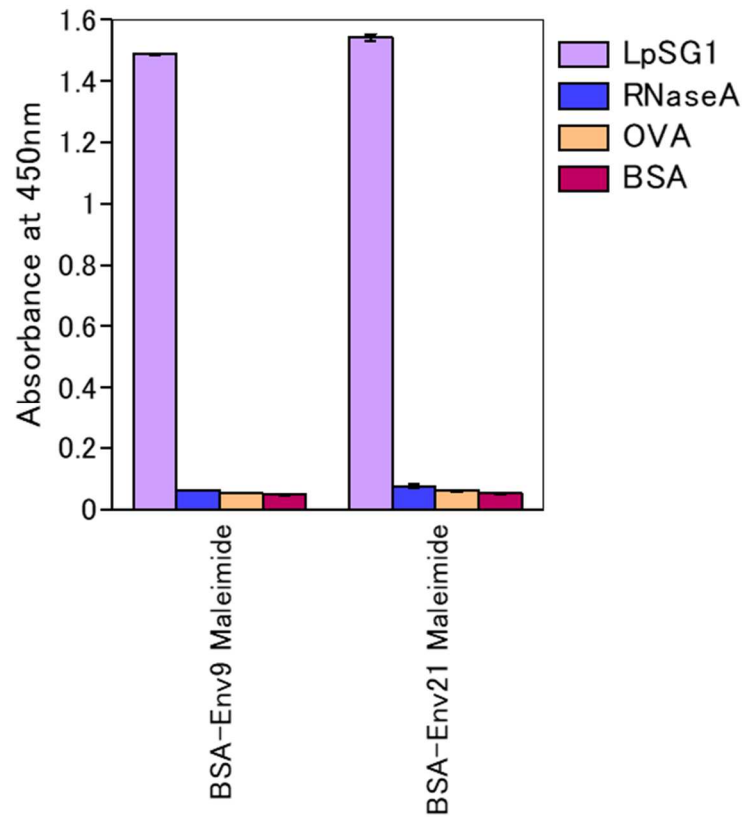


図 3-4 BSA-VHH (マレイミド基-チオール基) の性状解析

(A) : コンジュゲート体の模式図

(B) : BSA-VHH (マレイミド基-チオール基) の SDS-PAGE

(C) : BSA-VHH (マレイミド基-チオール基) のサンドイッチ ELISA

(コンジュゲーション確認)

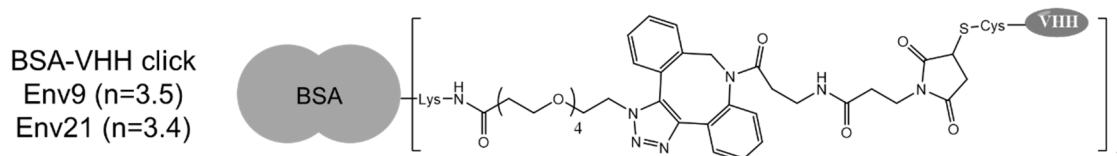
(D) : BSA-VHH (マレイミド基-チオール基) の MALDI-TOF MS 解析

(E) : BSA-VHH (マレイミド基-チオール基) の ELISA (結合活性試験)

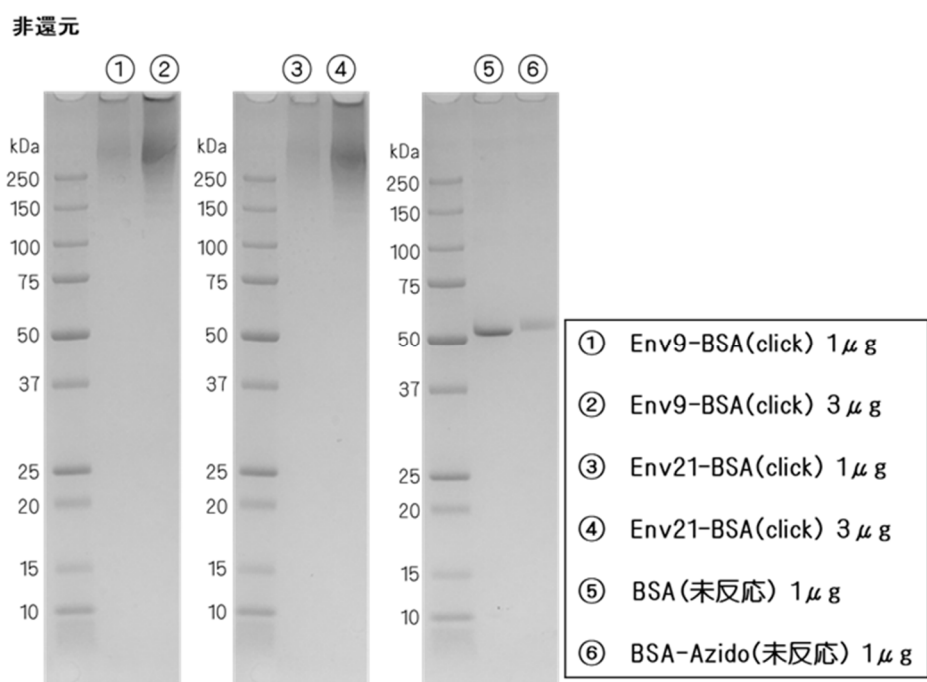
### 3-3-4 BSA-VHH コンジュゲート体 (クリック反応) の性状解析

TCEPにて還元処理した VHH-Cys にマレイミド基-DBCO を混合する事で VHH-DBCO を調製した。さらに、アジド基を付加した BSA と VHH-DBCO を混合する事で、アジド基と DBCO のクリック反応によるコンジュゲーションをおこなった。コンジュゲーションの確認を 3-3-3 と同様に SDS-PAGE とサンドイッチ ELISA にて実施した結果、BSA に VHH 抗体が付加されている事が示された (図 3-5、A、B)。コンジュゲート体の MALDI-TOF MS 分析の結果、BSA 1 分子に対して、VHH 抗体が 1~6 個 (Env9 : 平均 3.5 個、Env21 : 平均 3.4 個) 付加されており、マレイミド法よりも高効率で付加されていることが示された (図 3-5、B)。また、ELISA にてコンジュゲート体に付加した VHH 抗体が *LpSG1* 特異的結合能を保持していることを確認した (図 3-5、C)。

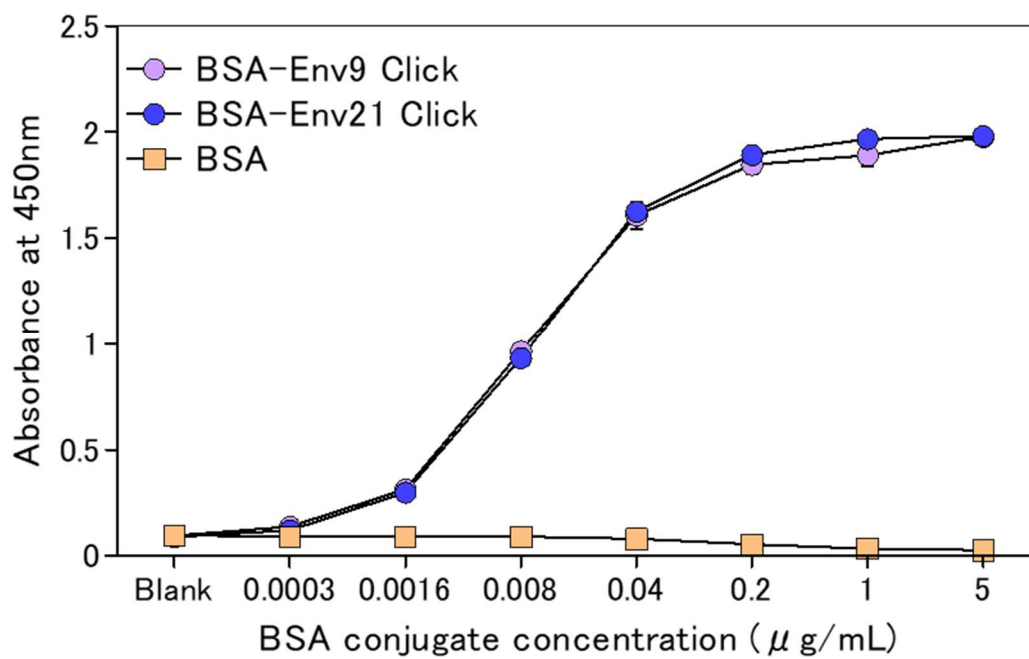
(A)



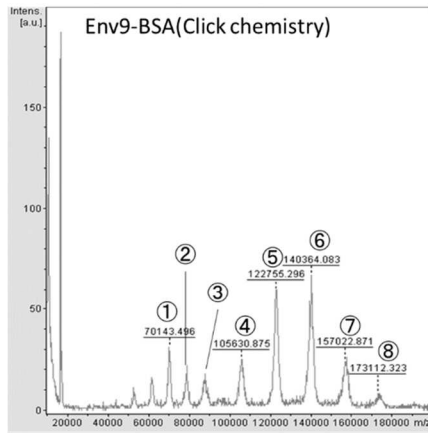
(B)



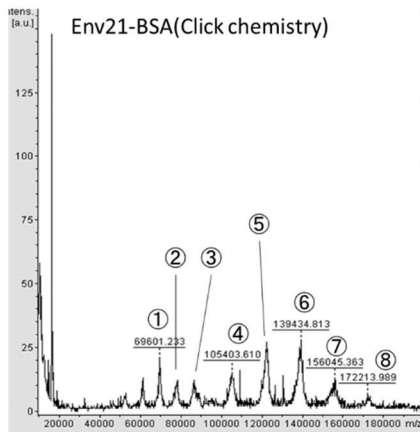
(C)



(D)



peak	sample	m/z	area
①	⑥-Bivalent peak	70143.496	634
②	⑦-Bivalent peak	79009.395	282
③	BSA-Env9	88015.731	281
④	BSA-[Env9] <sub>2</sub>	105630.875	625
⑤	BSA-[Env9] <sub>3</sub>	122755.296	2572
⑥	BSA-[Env9] <sub>4</sub>	140364.083	3257
⑦	BSA-[Env9] <sub>5</sub>	157022.871	691
⑧	BSA-[Env9] <sub>6</sub>	173112.323	235



peak	sample	m/z	area
①	⑥-Bivalent peak	69601.233	609
②	⑦-Bivalent peak	78386.607	233
③	BSA-Env21	86334.320	242
④	BSA-[Env21] <sub>2</sub>	105403.610	384
⑤	BSA-[Env21] <sub>3</sub>	122484.824	1004
⑥	BSA-[Env21] <sub>4</sub>	139434.813	713
⑦	BSA-[Env21] <sub>5</sub>	156045.363	435
⑧	BSA-[Env21] <sub>6</sub>	172213.989	145

(E)

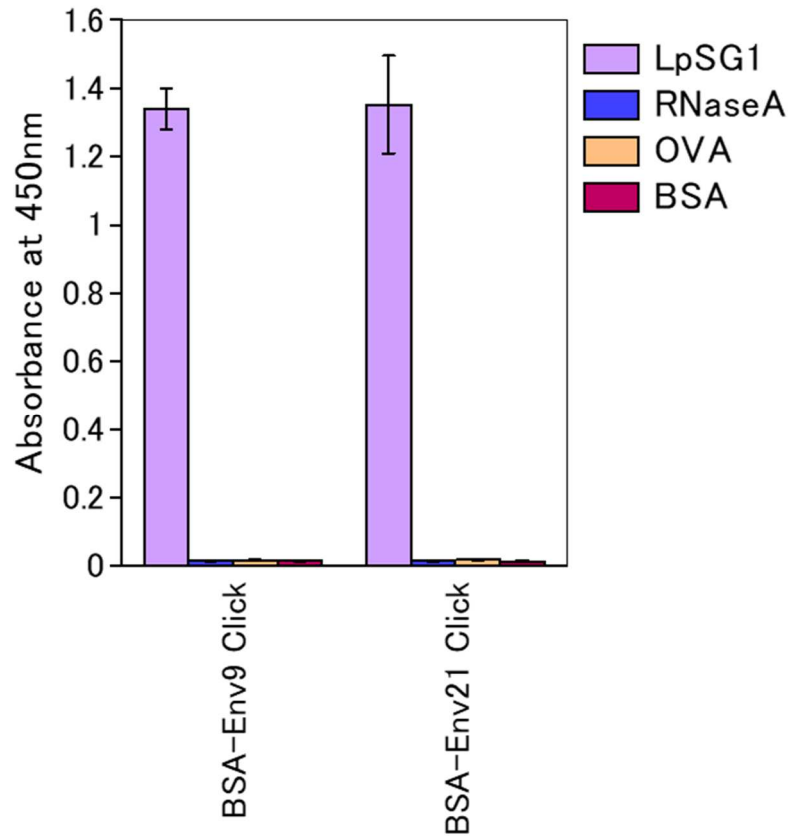


図 3-5 BSA-VHH (クリック反応) の性状解析

(A) : コンジュゲート体の模式図

(B) : BSA-VHH (クリック反応) の SDS-PAGE

(C) : BSA-VHH (クリック反応) のサンドイッチ ELISA

(コンジュゲーション確認)

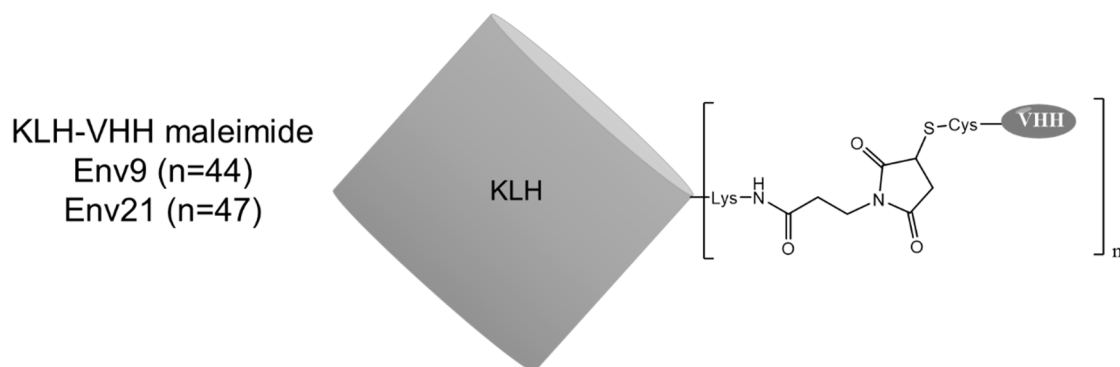
(D) : BSA-VHH (クリック反応) の MALDI-TOF MS 解析

(E) : BSA-VHH (クリック反応) の ELISA (結合活性試験)

### 3-3-5 KLH-VHH コンジュゲート体 (マレイミド法) の性状解析

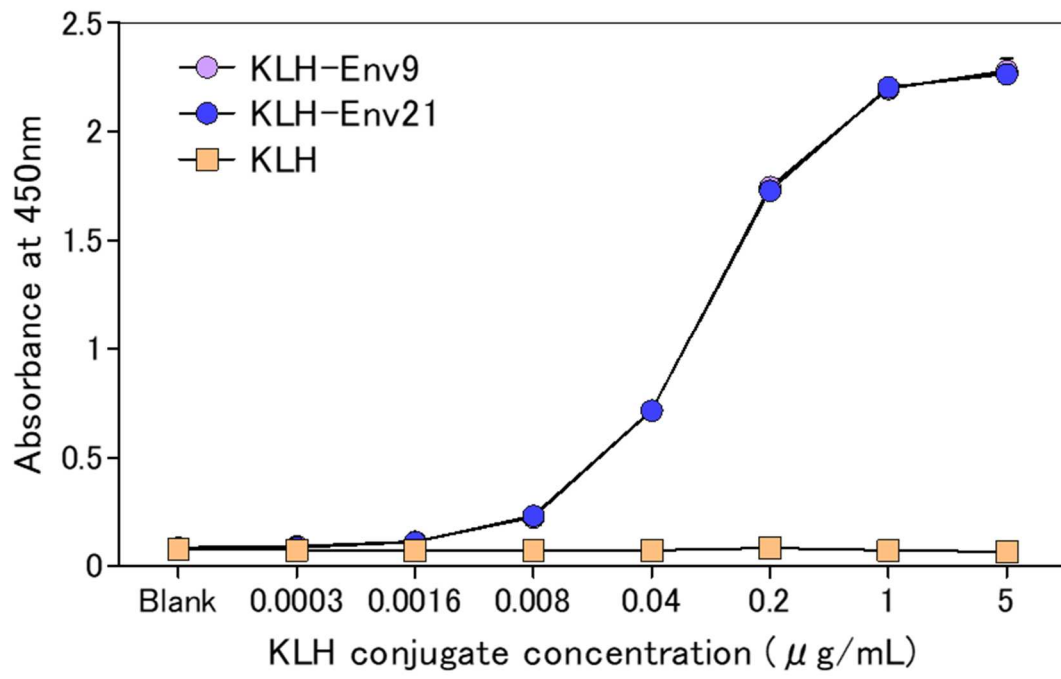
TCEPにて還元処理した VHH-Cys とマレイミド基を付加した KLH を混合する事でマレイミド基とチオール基を介したコンジュゲーションをおこなった。コンジュゲート体作製時の未反応の VHH 抗体量より、KLH1 分子に対して、VHH 抗体が 40~50 個程度 (Env9 : 44 個、Env21 : 47 個) 付加されていると推定した。コンジュゲーションの確認を抗 KLH 抗体と抗 Myc タグ抗体のサンドイッチ ELISA にて実施した結果、KLH に VHH 抗体が付加されている事が示された (図 3-6、A)。また、ELISA にてコンジュゲート体に付加した VHH 抗体が *LpSG1* 特異的結合能を保持していることを確認した (図 3-6、B)。

(A)





(B)



(C)

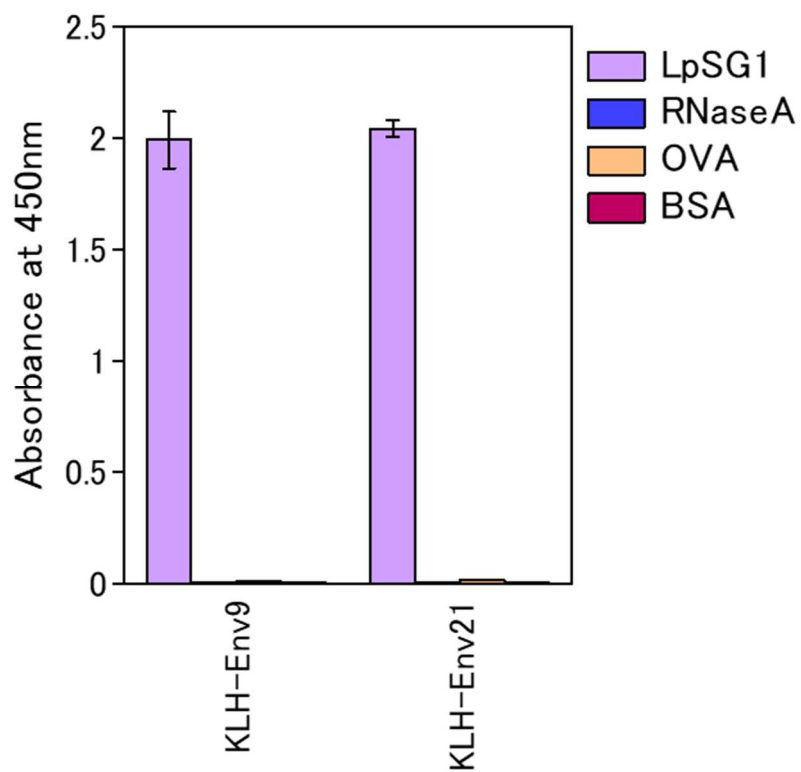


図 3-6 KLH-VHH (マレイミド基-チオール基) の性状解析

(A) : コンジュゲート体の模式図

(B) : KLH-VHH (マレイミド基-チオール基) サンドイッチ ELISA

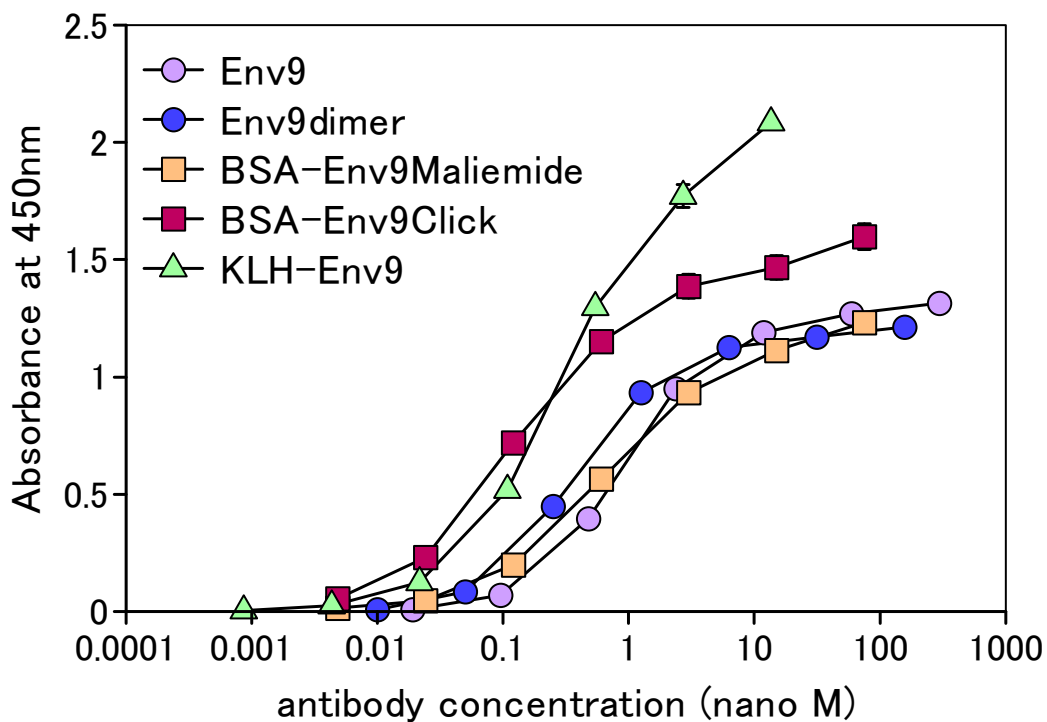
(コンジュゲーション確認)

(C) KLH-VHH (マレイミド基-チオール基) ELISA (結合活性試験)

### 3-3-6 各 VHH 抗体の ELISA による活性試験

作製した各 VHH 抗体を用いて、ELISA による活性試験を実施した。横軸をモル濃度で表示した結果、両クローンとも VHH 単独や二量体、BSA コンジュゲート体 (マレイミド法) より、BSA コンジュゲート体 (クリック反応) や KLH コンジュゲート体が、親和性が高い事が示唆された。

(A)



(B)

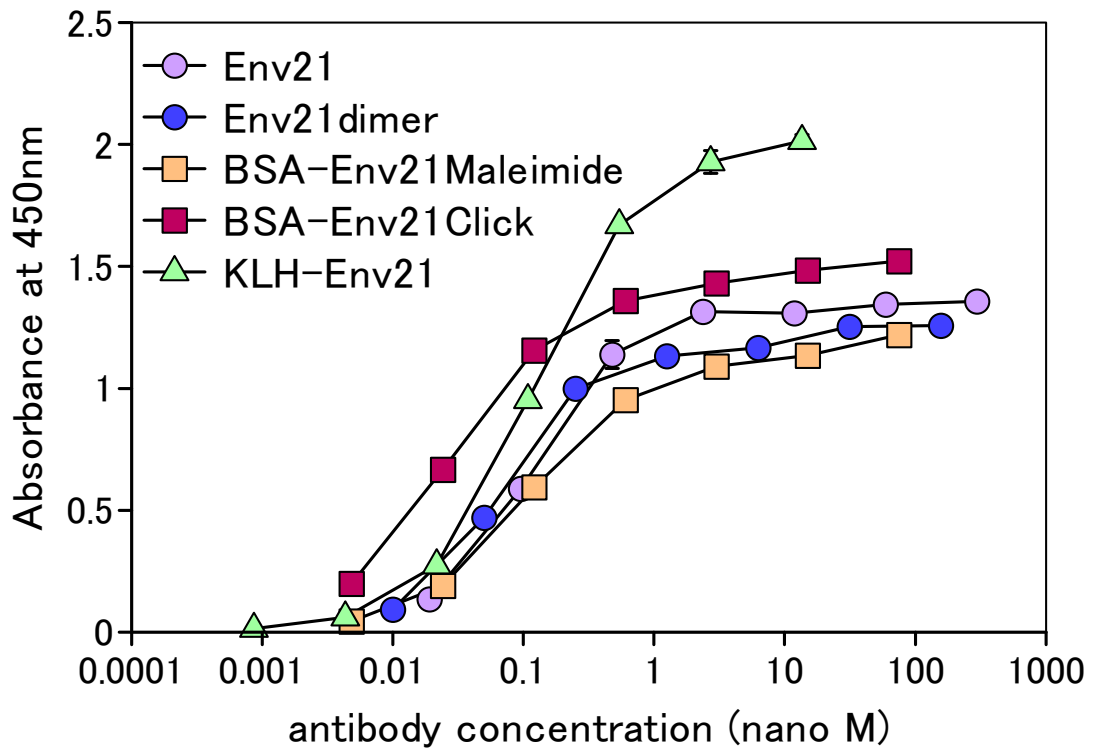


図 3-7 各 VHH 抗体の ELISA 活性試験

(A) : Env9 グループ

(B) : Env21 グループ

### 3-4 考察

本章では、VHH 抗体の高機能化を目的として、第 2 章で取得した 2 種類の VHH 抗体を用いて、抗体工学による VHH 抗体の多価化を実施した。

VHH 抗体二量体は、VHH 抗体遺伝子をリンカーDNA とオーバーラップさせる形で PCR する事で、容易に連結する事ができた。VHH 抗体二量体の大腸菌での発現と Ni カラムでの精製を実施した結果、タンパク質発現用のベクターでないにも関わらず、Env9 二量体が約 12mg/L、Env21 二量体が約 9mg/L という発現量であった。使用した発現系では、VHH 抗体二量体の発現量は、VHH 抗体単量体 (Env9 : 約 60mg/L、Env21 : 約 65mg/L) と比較すると落ちてしまっていたが、10mg/L 程度の取得量はあり、発現用ベクターや培養条件の検討次第で十分に改善される可能性がある。VHH 抗体を配向制御した状態でのキャリアタンパク質へのコンジュゲーションについては、VHH 抗体の C 末端にシステイン残基を導入する事で配向制御可能であった。今回使用した VHH 抗体は、分子内にジスルフィド結合が 1 本であったが、クローンによってはジスルフィド結合が 2 本存在する場合もあるので、その際は、分子間ジスルフィド結合を還元する条件をさらに詳細に検討する必要がある。コンジュゲーション方法については、キャリアタンパク質 BSA に対して、マレイミド基とチオール基のコンジュゲーション (マレイミド法) とアジド基と DBCO によるクリック反応によるコンジュゲーションを実施し、それぞれのコンジュゲート体の MALDI-TOF MS 解析の結果、マレイミド法は、1~4 個 (Env9 : 平均 1.8 個、Env21 : 平均 2.0 個) の VHH 抗体が付加されているのに対し、クリック反応では、1~6 個 (Env9 : 平均 3.5 個、Env21 : 平均 3.4 個) の VHH 抗体が付加されており、クリック反応の方が効率よく VHH 抗体が付加されている事が示された。マレイ

ミド法にて作製した KLH コンジュゲート体については、分子量が巨大である事より MS 解析や SDS-PAGE で VHH 付加数の分析はできなかったが、KLH コンジュゲート体作製後の限外濾過素通り画分のタンパク質量（未反応の VHH 抗体と推定される）より VHH-Cys Env9 の 44 個、VHH-Cys Env21 の 47 個が、1 つの KLH 分子に共有結合していると示唆された。VHH 抗体の付加効率や付加数は、ロット差や感度向上において非常に重要な要因となるので、安定したコンジュゲーション条件を得るためにも今後もさらなる条件検討の必要がある。

ELISA 試験にて、全ての VHH 抗体のフォーマットにおいて、*LpSGI* への結合活性が保持されている事が示された。VHH 抗体について様々な処理をおこなったにも関わらず、全てのフォーマットで抗原への結合活性を保持できた点については、VHH 抗体がシングルドメインで抗原への結合活性を持つ点や、VHH 抗体自身の高いフォールディング能力に起因する安定性によるものではないかと考察した。

また、各フォーマットの VHH 抗体の ELISA 試験の結果について、モル濃度で測定値を比較した場合に、両クローン（Env9、Env21）の BSA コンジュゲート体（クリック反応）と KLH コンジュゲート体（マレイミド法）は、各 VHH 単独や二量体、BSA コンジュゲート体（マレイミド法）よりも親和性が高い事が示唆された。この結果より、1 分子中の VHH 抗体数を増加させる事が親和性上昇に有効である事が示され、今後さらに効率よく VHH 抗体を多価化する事でさらなる親和性の上昇が期待される。

## 第4章 VHH抗体を用いたレジオネラ検出免疫アッセイの構築と高感度化

## 4-1 目的

作製した *LpSGI* 特異的な 3 つのフォーマット VHH 抗体（単量体、二量体、BSA または KLH コンジュゲート体）について、レジオネラ検出イムノアッセイの構築（サンドイッチ ELISA 法、イムノクロマトグラフィ法、ラテックス凝集法）し、多価化 VHH 抗体を用いる事でアッセイの高感度化を検討した（図 4-1）。

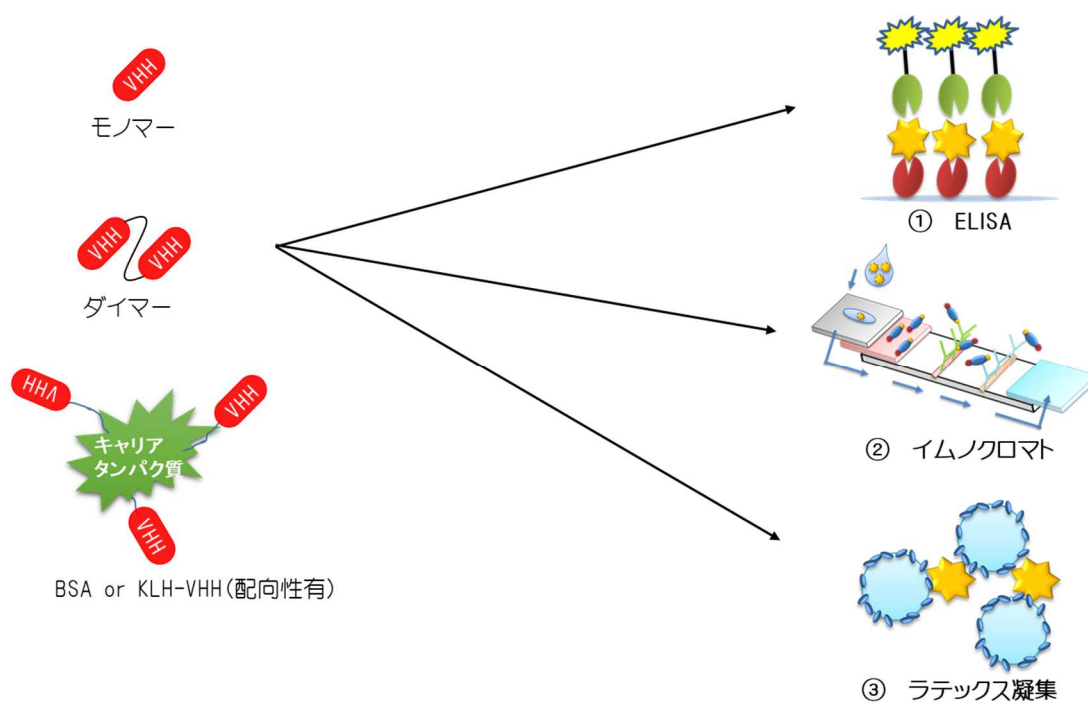


図 4-1 検討したレジオネラ検出イムノアッセイの概要図



## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 サンドイッチ ELISA

96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に各 VHH 抗体溶液の至適量を PBS 溶液中にて 4°C で 1 晩静置にて固相化し、0.5% BSA/PBS にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。0.05% PBST で 3 回洗浄した後、段階希釈した *LpSGI* 抗原を加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、*LpSGI* 抗原を検出するために Biotin Labeling Kit - NH2 (同仁化学) にて biotin 化した各 VHH 抗体を室温で 1 時間反応後、biotin 化 VHH 抗体を検出するために SA-HRP を室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine を含む基質溶液を用いた呈色反応により (反応停止は 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合している *LpSGI* 抗原を検出した。検出には ELISA プレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定して評価した。

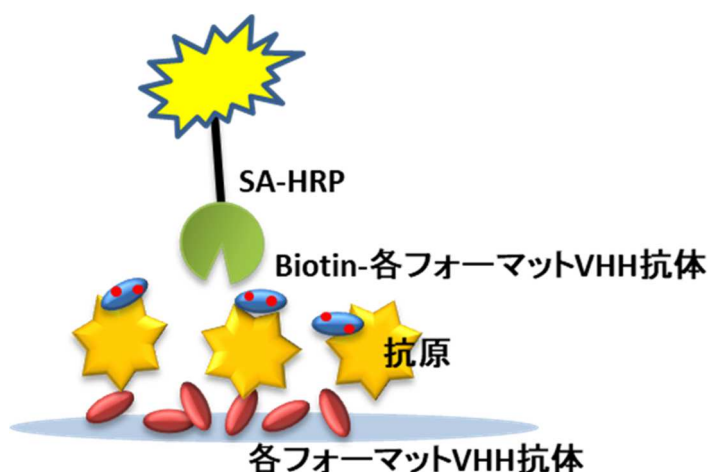


図 4-2 サンドイッチ ELISA アッセイの概要図

#### 4-2-2 イムノクロマトグラフィ法

各フォーマットの VHH 抗体を至適濃度にて 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH8.0 にて金コロイド液 (BBI solutions) に感作する。感作した金コロイド液をコンジュゲートパットに浸漬し、真空インキュベーターにて 80°C 30 分で乾燥する。HFC メンブレン (GE ヘルスケア) に塗布機を用いて、テストライン (各 VHH 抗体) とコントロールライン (抗 VHH 抗体) を塗布する。塗布後のメンブレンは、インキュベーターにて 60°C 30 分で乾燥後、0.5%カゼイン溶液でブロッキングする。パッキングシートに下からサンプルパッド、コンジュゲートパット、メンブレン、吸収パッドの順にアセンブリし、5mm 幅にカットする。各濃度に希釈した *LpSGI* をサンプルパッドにアプライし、15 分後にラインの有無を判定する (図 4-3)。

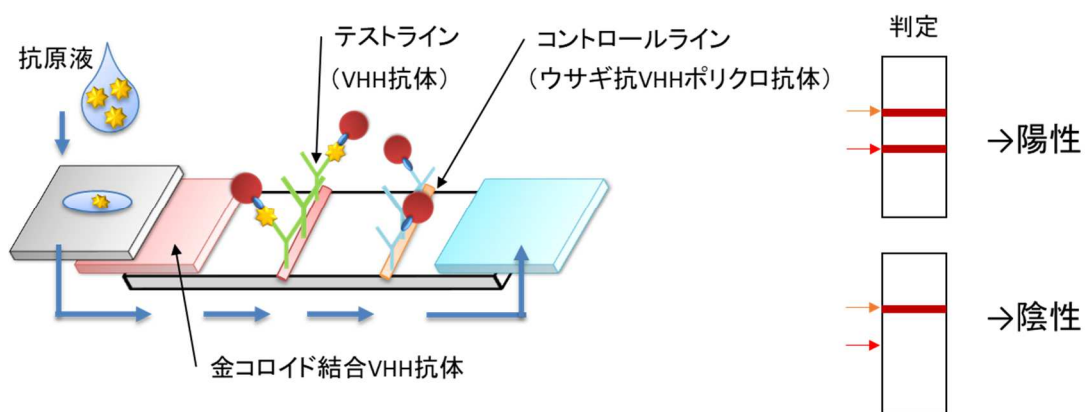


図 4-3 イムノクロマトグラフィアッセイの概要図

### 4-2-3 ラテックス凝集法

ラテックスビーズ(Polysciences : Polybead Polystyrene Microsphere 1.00  $\mu\text{m}$ )に、至適量の各 VHH 抗体を加えた。その後、ブロッキング操作を行い、VHH 抗体ラテックスを調製した。

吸光度測定アッセイについては、Costar® 96well Plates (corning) に 0.1% BSA/PBS で各濃度に希釈した *LpSG1* の 45 $\mu\text{L}$  と 1.25% VHH 抗体ラテックス 5 $\mu\text{L}$  を加え、プレートリーダー (BioTek:EPOCH2) にて 10 秒振盪後に OD600 を測定するサイクルを 10 分間実施した。OD600 の測定値をプロットし凝集反応を評価した (図 4-4)。凝集の有無は、Blank 測定値の 0 分と各抗原濃度測定値 10 分後の吸光度値の差にて評価した。

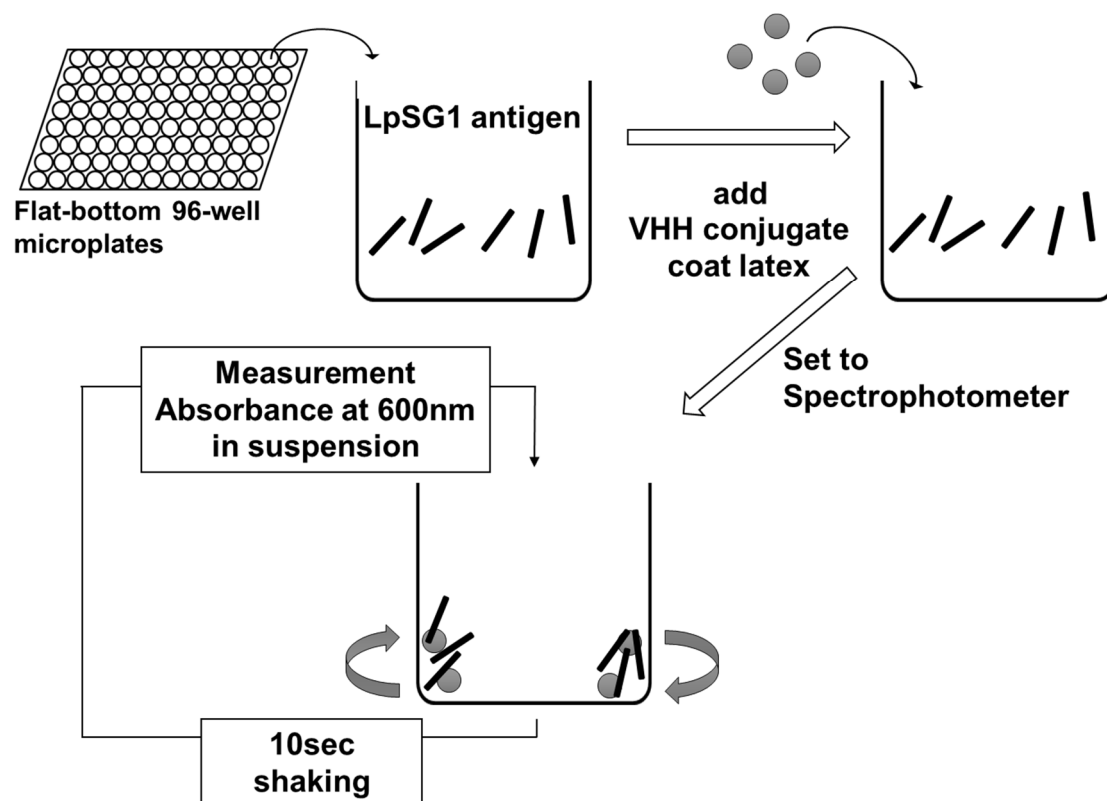


図 4-4 吸光度測定アッセイの概要図

## 4-3 結果

### 4-3-1 サンドイッチ ELISA による抗原検出

VHH 抗体単量体、VHH 抗体二量体、VHH 抗体-BSA コンジュゲート体（マレイミド法）の3つのフォーマットにおいて、*LpSGI* 抗原検出のためのサンドイッチ ELISA の組合せを検討した。

まず VHH 抗体単量体の組合せを決定するために2種類の VHH 抗体を ELISA プレート上に固定化（500ng または 250ng/well）し、各濃度に希釈した biotin 化した各 VHH 抗体にて、一定濃度の *LpSGI* を検出した。その結果、固相化が Env21 250nm/well、検出が biotin 化 Env9 ×100 の組合せが、検出感度が一番高い事が示された（図 4-5）。

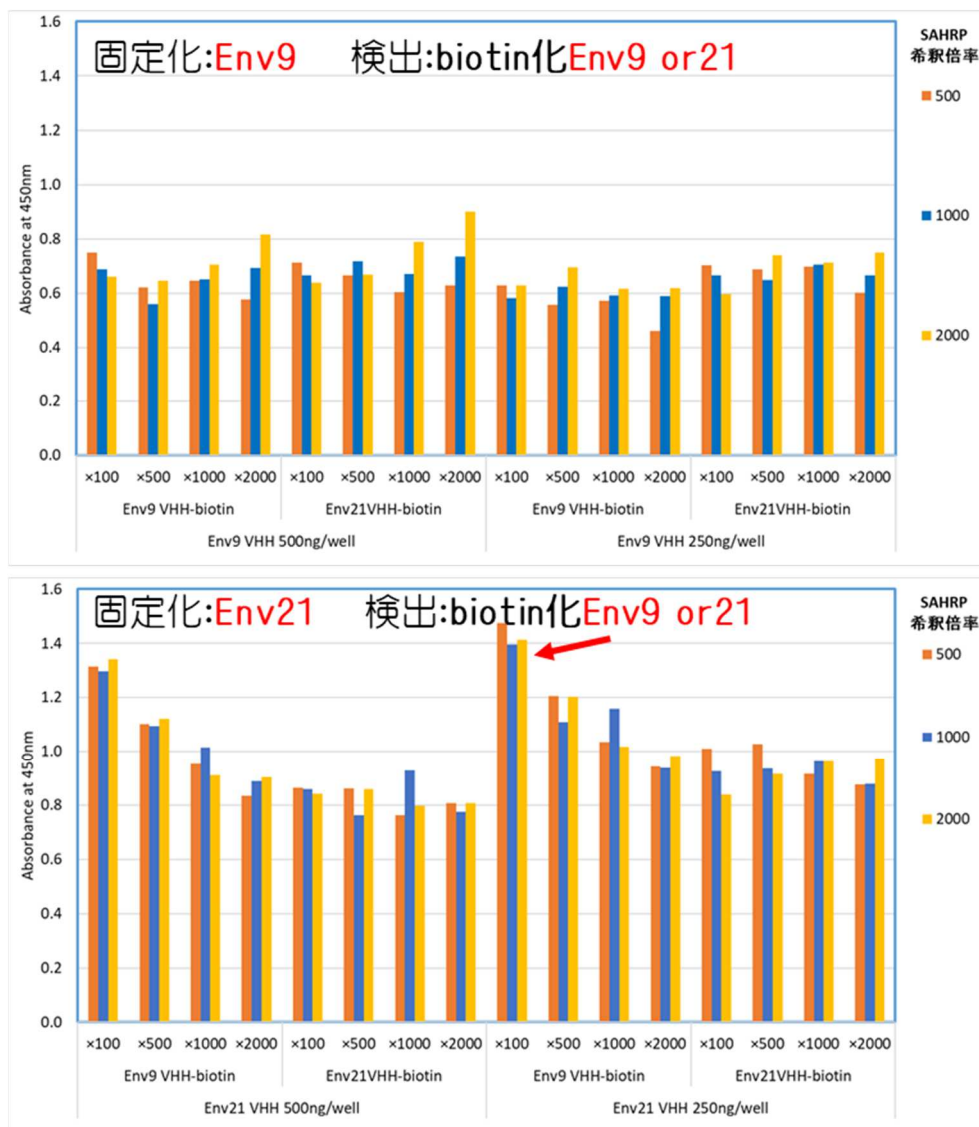
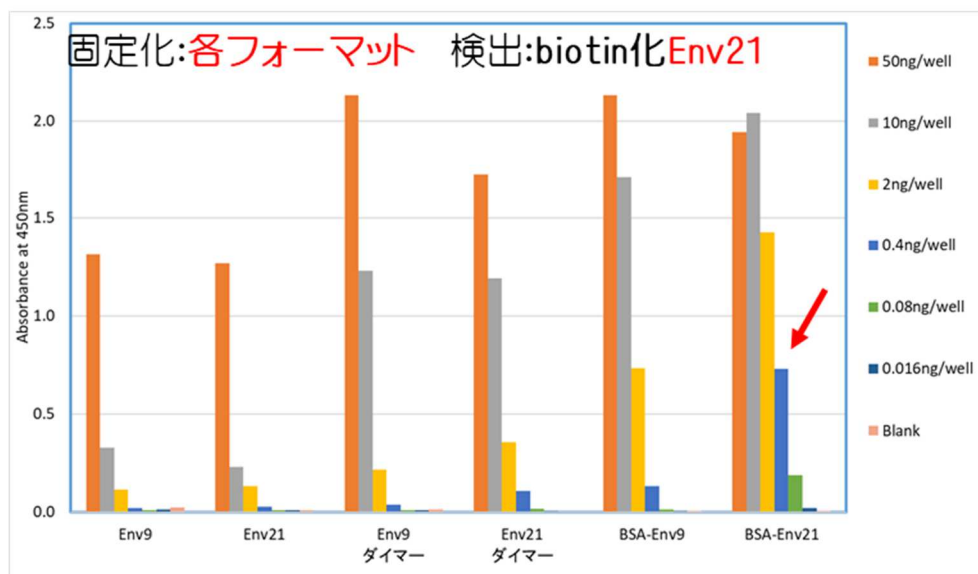
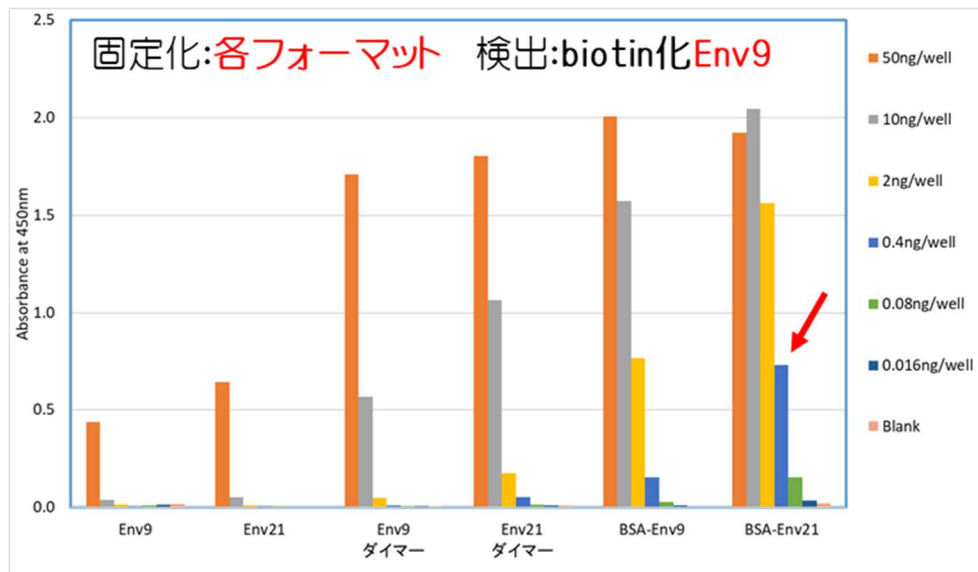


図 4-5 VHH 抗体単量体のサンドイッチ ELISA の組合せ検討

次に多価化 VHH 抗体を含めたサンドイッチ ELISA の組合せの検討をおこなった。まず ELISA プレートへの固定化条件を決めるために、検出を biotin 化 Env9 または Env21 で実施し、ELISA プレートへ各濃度に希釈した各フォーマット VHH 抗体を固定化した。一定濃度の *LpSGI* 抗原検出の結果、低濃度でも抗原検出が示された Env21-BSA が最適であると判断した (図 4-6、A)。続いて、Env21-BSA 50ng/well を ELISA プレート上に固定化し、各濃度に希釈した biotin 化各フォーマット VHH 抗体にて一定濃度の *LpSGI* 抗原を検出したところ、BSA-Env21 ×100 が最適検出条件である事が示された (図 4-6、B)。

(A)



(B)

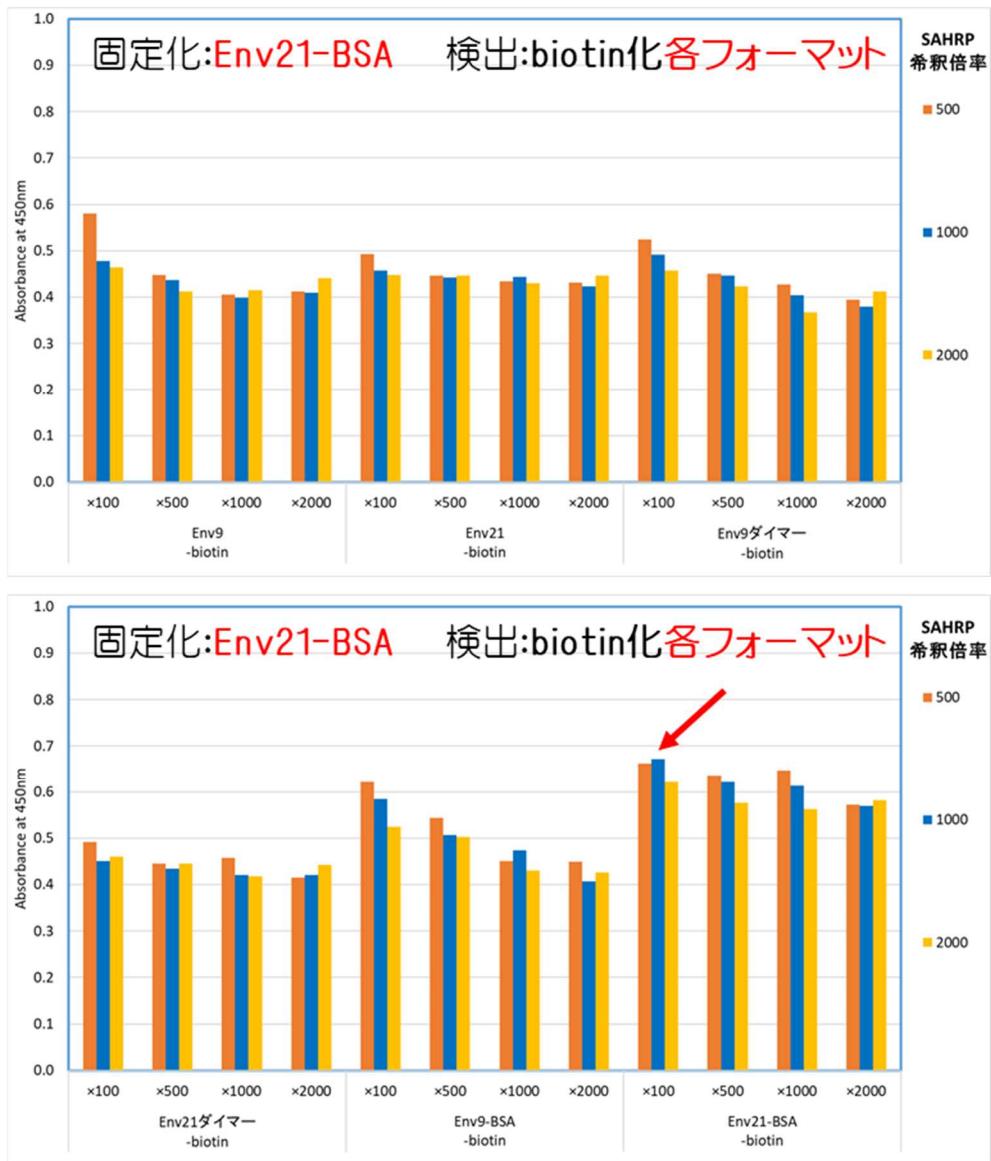


図 4-6 全フォーマット VHH 抗体のサンドイッチ ELISA の組合せ検討

(A) : 固定化フォーマット VHH 抗体の検討

(B) : 検出フォーマット VHH 抗体の検討



構築した VHH 抗体単量体検出系と多価化 VHH 抗体検出系について、*LpSG1* 抗原の抗原検出感度について評価した。反応値が 0.1 以上の場合に検出と判定した際に、*LpSG1* 抗原検出感度については、VHH 抗体単量体検出系では 0.0003125 OD unit であり、多価化 VHH 抗体検出系では 0.000078125 OD unit であった。(図 4-7)。

Antigen amount LpSG1 (OD Unit/well)	coat : Env21 detection : Env9-biotin	coat : BSA-Env21 detection : BSA-Env21-biotin
0.00125	0.801	1.6635
0.000625	0.319	0.9325
0.0003125	0.1205	0.475
0.00015625	0.0495	0.2385
0.000078125	0.009	0.114
3.90625E-05	-0.0165	0.0415

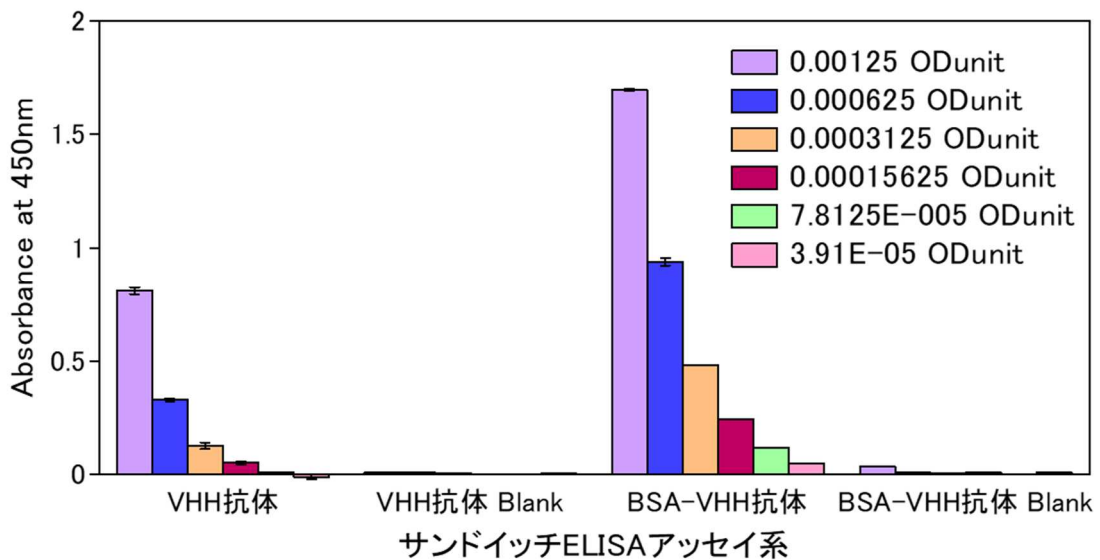


図 4-7 各サンドイッチ ELISA の *LpSG1* 抗原検出感度

以上の結果より、サンドイッチ ELISA でのレジオネラ検出において、多価化 VHH 抗体を使用する事によって検出感度の高感度化に成功し、多価化 VHH 抗体が有用である事が示された。

#### 4-3-2 イムノクロマトグラフィ法による抗原検出

4-3-2 サンドイッチ ELISA の組合せ（VHH 抗体単量体：Env9・Env21 の組合せ、多価化 VHH 抗体：BSA-Env21 の組合せ）を用いて、イムノクロマトグラフィストリップを作製した。各濃度の *LpSG1* 抗原をアプライしたところ、VHH 抗体単量体検出系では、テストラインを確認する事が出来なかった（図 4-8）。一方で、多価化 VHH 抗体検出系では、0.00125 OD unit までテストラインが確認された。しかしながら、BSA-Env21 結合金コロイドでは、コントロールラインが非常に薄いという問題点があった（図 4-8）。これは、BSA コンジュゲート体であるがゆえに、金コロイド上の VHH 抗体量が少ないためではないかと考察した。

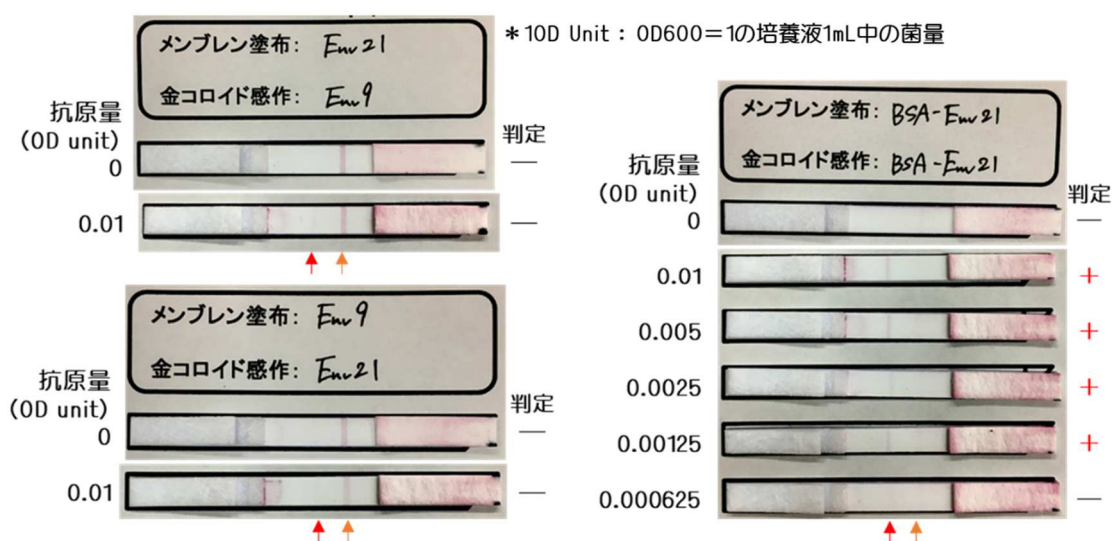


図 4-8 VHH 抗体単量体（Env9 と Env21）と多価化 VHH 抗体（BSA-Env21）によるイムノクロマトグラフィ法での *LpSG1* 抗原検出感度

そのため、メンブレンのテストライン塗布を BSA-Env21、金コロイドへの感作を VHH 抗体単量体と VHH 抗体二量体で検討した（Env21 二量体は金コロイ

ド感作中に凝集してしまい使用できなかった)。それぞれのイムノクロマトグラフィストリップを作製し、各濃度の *LpSG1* 抗原をアプライしたところ、VHH 抗体単量体、VHH 抗体二量体ともにテストラインとコントロールラインの2本のラインを確認した (図 4-9)。なかでも Env9 二量体結合金コロイドの検出感度が、0.00125 OD unit と BSA-Env21 結合金コロイドの検出感度と同程度である事が確認された。

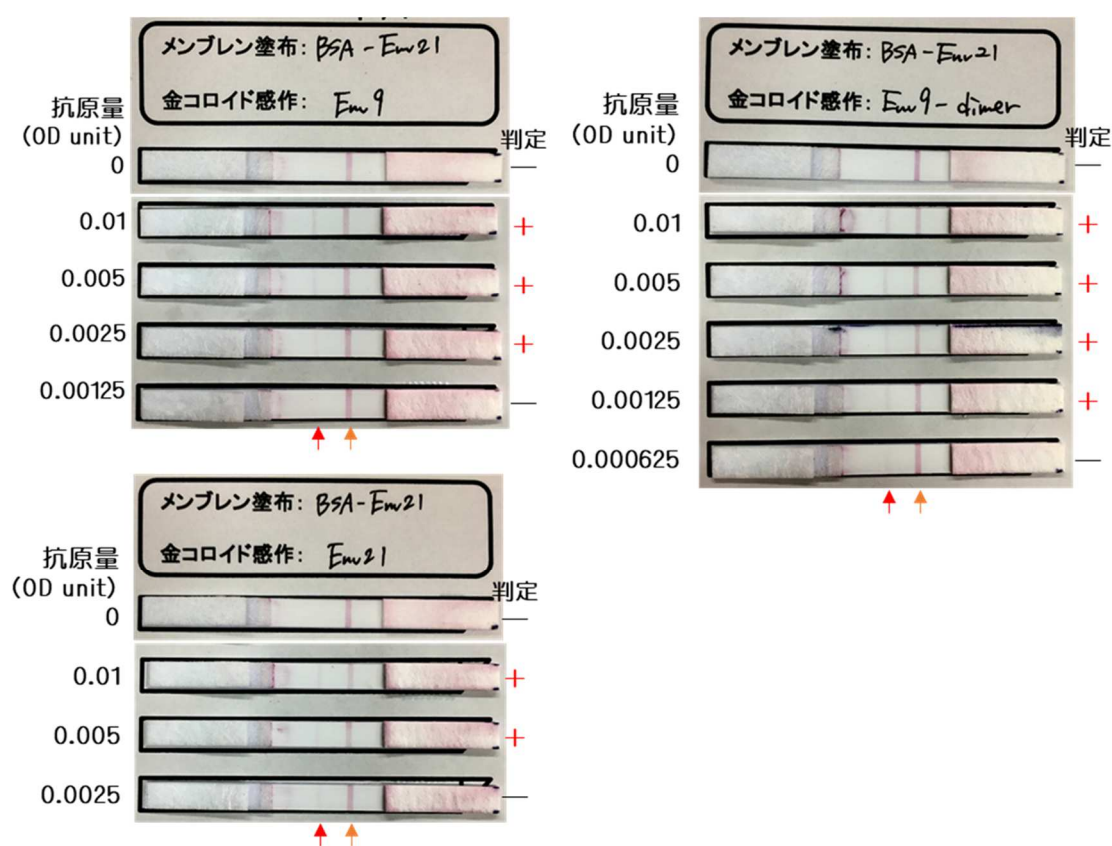


図 4-9 多価化 VHH 抗体イムノクロマトグラフィストリップの改良と *LpSG1* 抗原検出感度

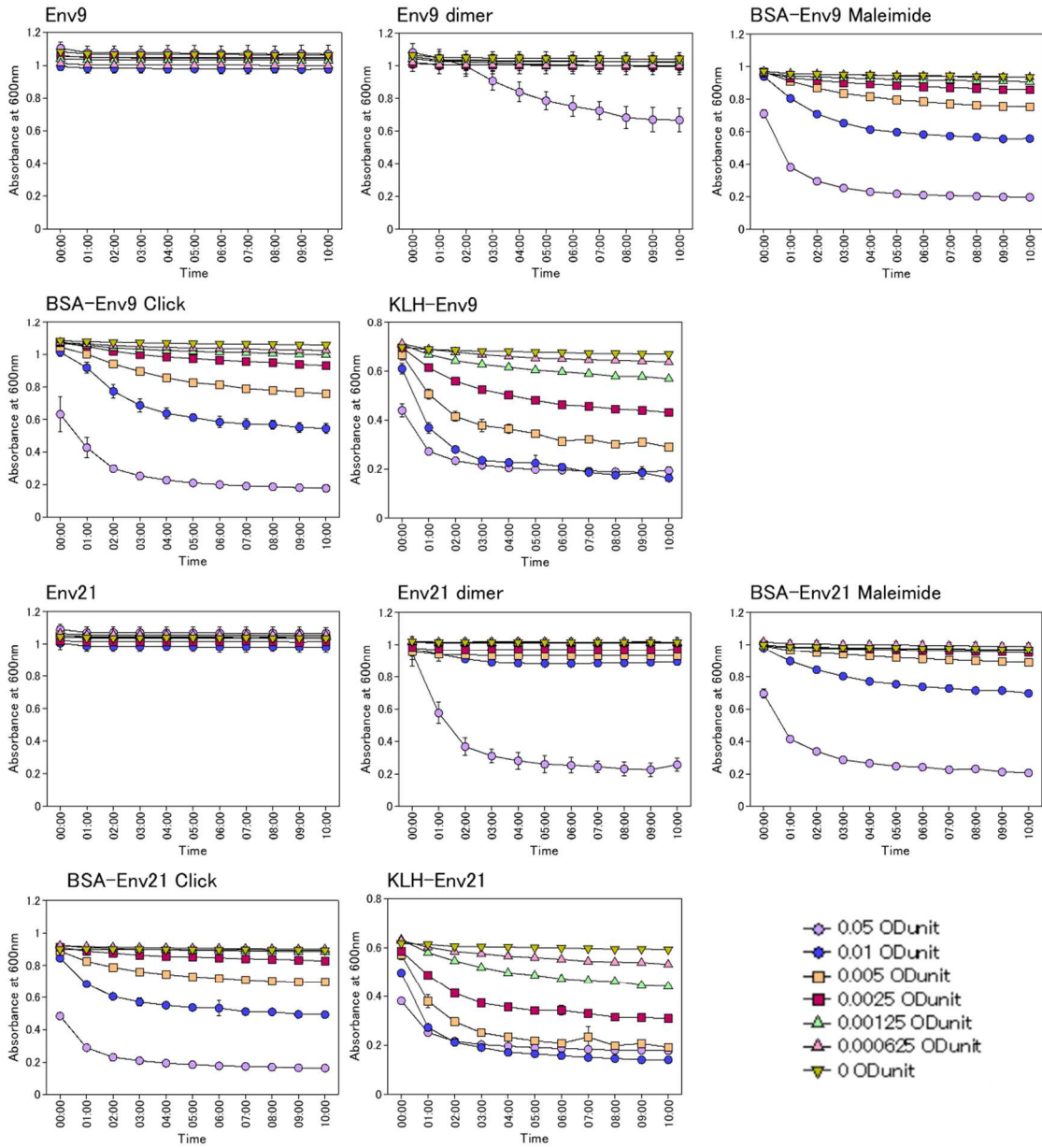
以上の結果より、多価化 VHH 抗体を用いることで、*LpSG1* 抗原の検出におけるイムノクロマトグラフィ法によるイムノアッセイを構築する事が可能であり、多価化 VHH 抗体が有用である事が示された。

### 4-3-3 ラテックス凝集法による抗原検出

作製した全てのフォーマット VHH 抗体（VHH 抗体単量体、VHH 抗体二量体、BSA コンジュゲート体（マレイミド法）、BSA コンジュゲート体（クリック反応）、KLH コンジュゲート体）を結合したラテックスを用いて、*LpSGI* 抗原検出のための吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイを構築し、各フォーマット VHH 抗体の性能を評価した。

吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイ（n=2）にて *LpSGI* 抗原検出を評価した結果、VHH 抗体単量体検出系では凝集反応がなく、多価化 VHH 抗体検出系で凝集反応が確認された（図 4-10、A）。Blank の 0 分と各抗原濃度測定値 10 分後の吸光度値の差をグラフ化したところ、各フォーマット VHH 抗体の *LpSGI* 抗原の検出感度としては、VHH 抗体二量体 < BSA コンジュゲート体（マレイミド法） < BSA コンジュゲート体（クリック反応） < KLH コンジュゲート体であった（図 4-10、B）。

(A)



(B)

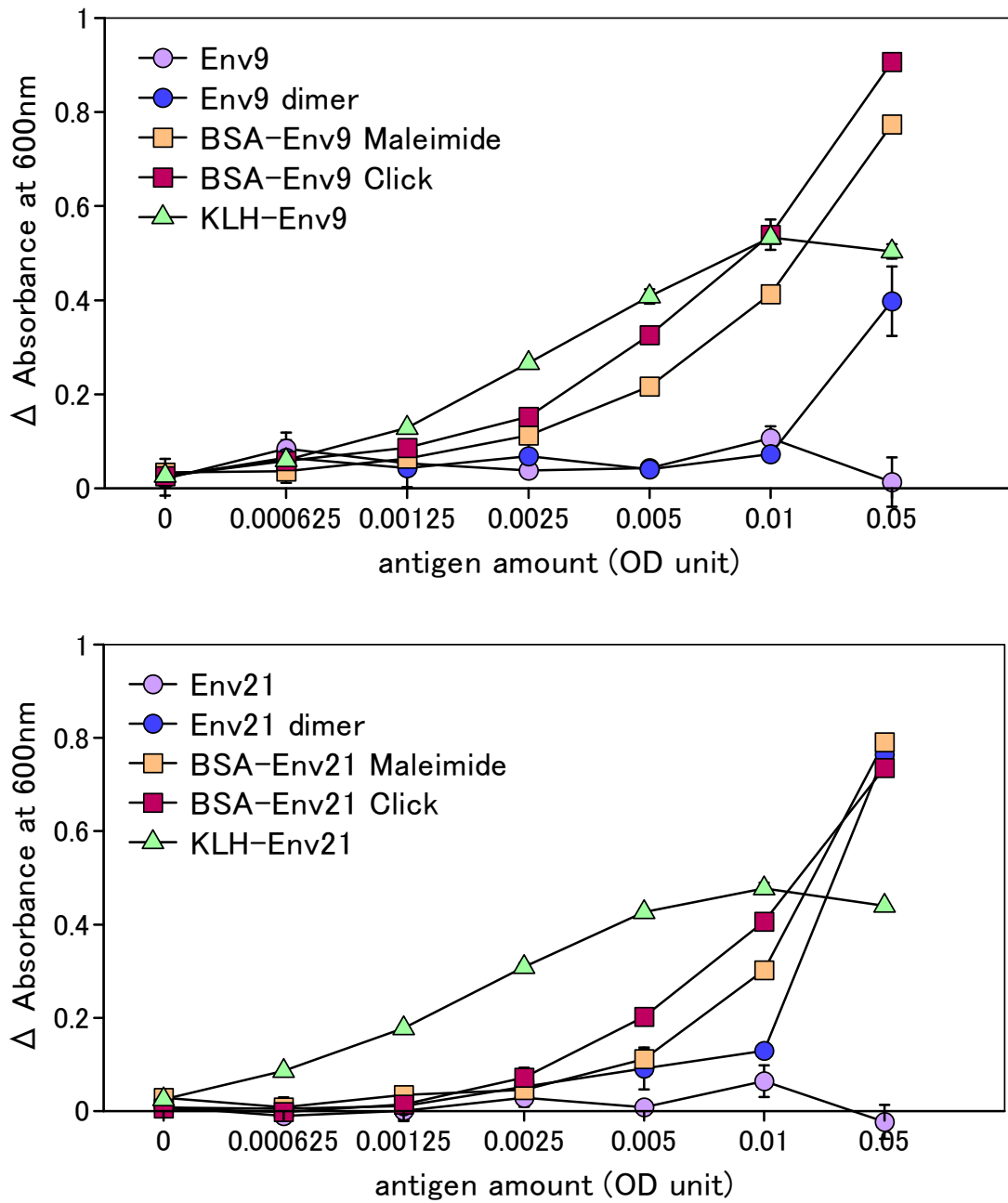


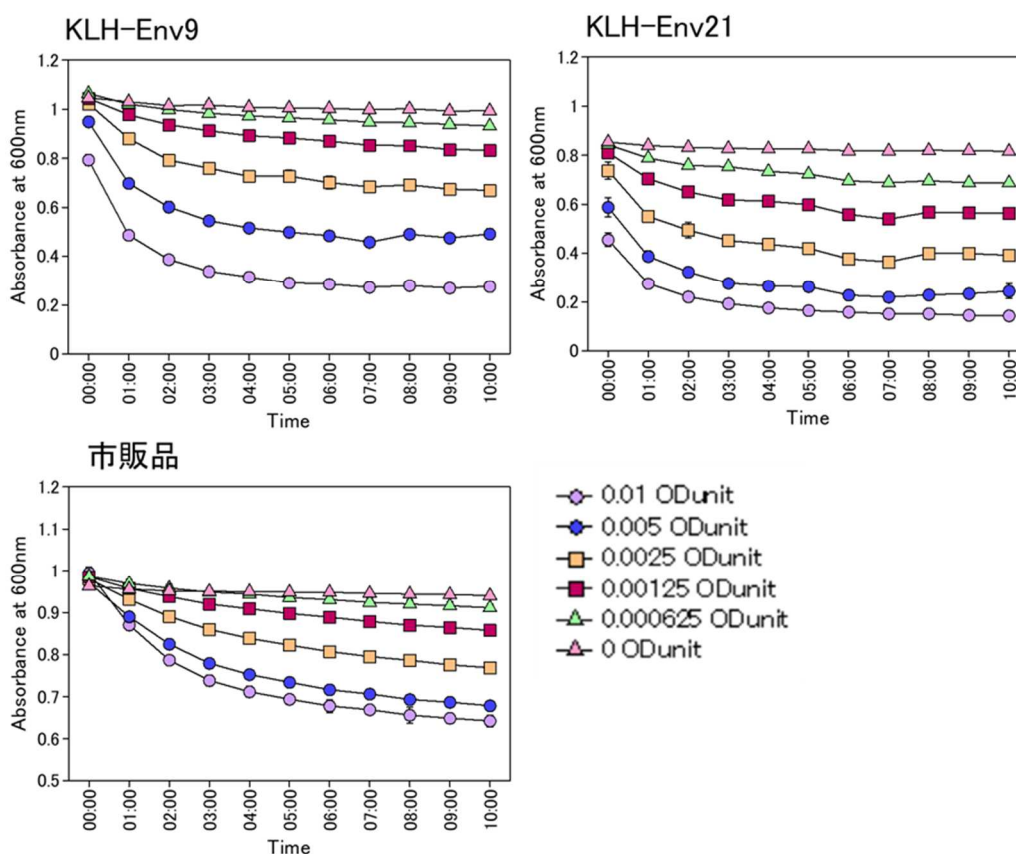
図 4-10 吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイ

(A) : 各ラテックスと *LpSG1* の凝集反応の 10 分間の吸光度測定値

(B) : (A) の Blank 測定値 (0 分) と各吸光度測定値 (10 分) の差分の測定値

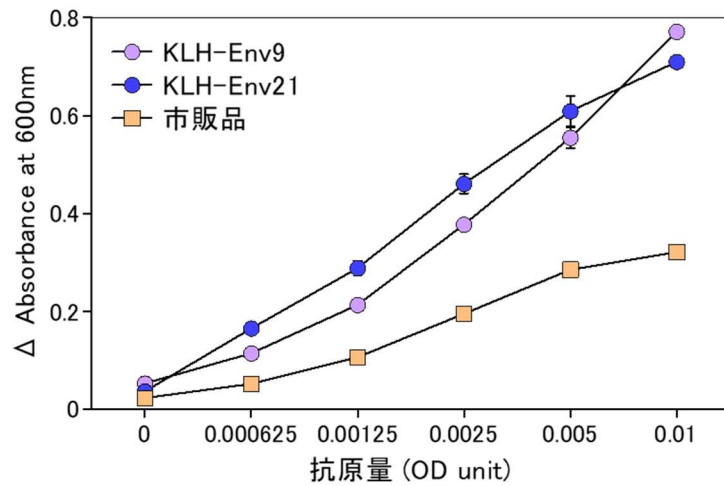
一番高感度であった KLH コンジュゲート体について、市販品（ウサギポリクローナル抗体結合ラテックス試薬）との吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイ（n=2、3回）にて感度比較を実施した（図 4-11、A）。Blank 測定値（0分）からの各吸光度測定値（10分）の差にて評価したところ、KLH コンジュゲート体が市販品よりも高感度で抗原を検出できていることが示された（図 4-11、B）。また、KLH コンジュゲート体結合ラテックスについて、5種のグラム陰性菌について吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイでの交差性試験を実施した結果、市販品と同様に *LpSG1* 特異的である事が示された（図 4-11、C）。

(A)





(B)



(C)

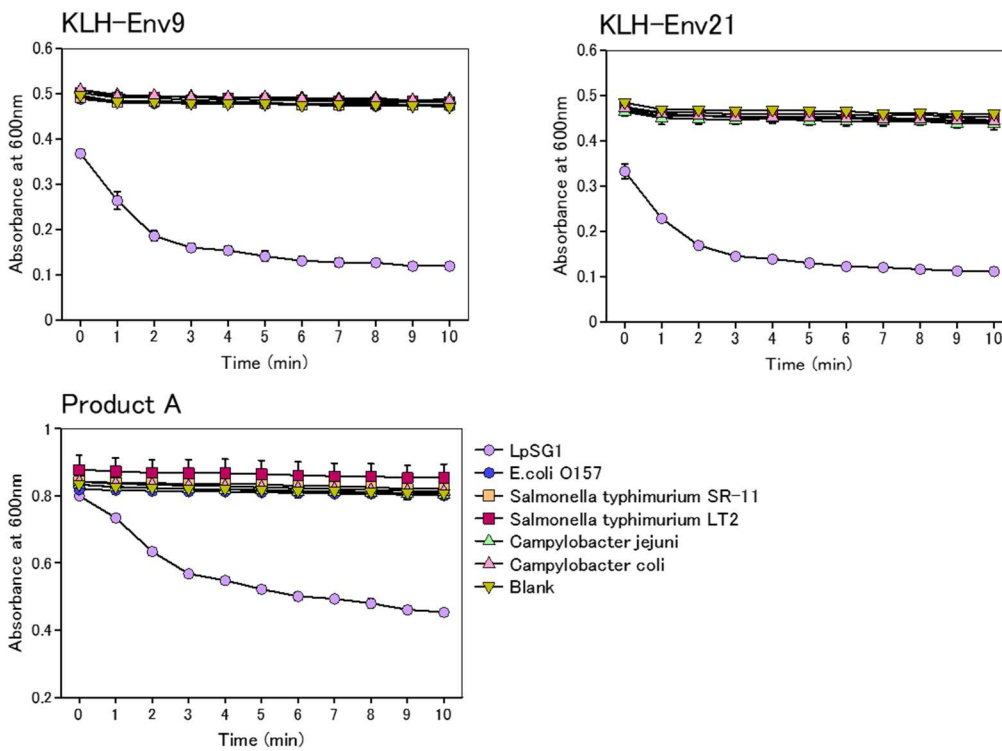


図 4-11 KLH コンジュゲート体と市販品の感度比較

(A) : 各ラテックスと *LpSG1* の凝集反応の 10 分間の吸光度測定値

(B) : (A) の Blank 測定値 (0 分) と各吸光度測定値 (10 分) の差分の測定値

(C) : 各ラテックスと *LpSG1* と 5 種グラム陰性菌についての吸光度測定値



以上の結果より、ラテックス凝集反応によるレジオネラ検出系においては、VHH 抗体単量体は凝集反応が認められず、多価化 VHH 抗体を用いる事で凝集反応が確認された。また、ラテックスに結合させる VHH 抗体は、二量体や BSA コンジュゲート体よりも KLH コンジュゲート体がより高感度である事が示され、KLH コンジュゲート体結合ラテックスは、当研究室の吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイにおいては、市販品と同等以上の検出感度である事が示された。

#### 4-4 考察

本章では、VHH抗体を用いたレジオネラ検出のイムノアッセイの構築と、エンジニアリングしたVHH抗体（多価化VHH抗体）の利用についての有用性を評価する事を目的とした。

我々は、作製した各フォーマットのVHH抗体を用いたレジオネラ検出のための各イムノアッセイ（サンドイッチELISA法、イムノクロマトグラフィ法、ラテックス凝集法）を構築し、成功した。サンドイッチELISAにおいては、VHH抗体単量体検出系と比較し、多価化VHH抗体検出系で抗原検出感度の向上を認めた。検討した中では一番親和性が高いと推測されるBSAコンジュゲート体が、高感度であった。イムノクロマトグラフィ法とラテックス凝集法においては、（興味深い事に）VHH抗体単量体のみの検出系では、抗原が検出できなかったが、多価化VHH抗体検出系を用いる事で抗原の検出が可能であった。ラテックス凝集法については、作製した全てのフォーマットのVHH抗体について評価し、抗原検出感度については、VHH抗体二量体<VHH抗体-BSAコンジュゲート体（マレイミド基-チオール基）<VHH抗体-BSAコンジュゲート体（クリック反応）<VHH抗体-KLHコンジュゲート体である事が示された（KLHコンジュゲート体の抗原濃度0.05 OD unitの試験区においては、凝集反応が強すぎる事による反応の飽和によって、見かけ上、反応値の差分が小さくなっているのではないかと考察した）。アッセイ系を構築した全てのイムノアッセイにおいて、VHH抗体単量体よりも多価化したVHH抗体を用いた検出系の方がより良い結果が得られた理由の考察としては、1つ目にELISAプレートや金コロイド、ラテックスビーズ等の担体にVHH抗体を吸着した際のVHH抗体の抗原結合能の保持が考えられる。VHH抗体単量体は、重鎖抗体の抗原結合

部位である単ドメインなので、そのまま担体に吸着した場合に抗原結合面（パラトープ）が担体側に向いてしまい抗原との結合が出来なくなる恐れがある。また、分子量の小さい VHH 抗体単量体は、担体へ吸着させる事によるタンパク質の変性の影響が大きい。一方で多価化 VHH 抗体は、VHH 抗体の多価化やキャリアタンパク質へのコンジュゲーションにより機能的な VHH 抗体が多くなり、またタンパク質としての分子量が大きくなる事で担体へ吸着した際の活性型 VHH 抗体（抗原結合面（パラトープ）が抗原側へ向く、変性による失活を免れる）の割合が高くなる事が考えられる。作製した全てのフォーマットの VHH 抗体を使って試験したラテックス凝集反応における抗原検出感度の結果も、おそらくラテックスビーズ上の活性型 VHH 抗体の割合が多かった順番ではないかと考察した。2つ目の考察が VHH 抗体の多価化によるアビディティ効果である。各イムノアッセイ系における抗原検出感度の結果より、エンジニアリングにて VHH 抗体がより付加されているフォーマットの VHH 抗体を使用した検出系がより高感度である事から、アビディティ効果で抗原に対する親和性が上昇し、検出感度が上昇した可能性が示唆された。

## 第 5 章 総括

組換え抗体としての優れた利点（小さな分子サイズ、高い生産性、構造の可逆性の高さによる安定性、タンパク質工学的な改変の容易さ）より次世代抗体として注目を集めている VHH 抗体は、2018 年に VHH 抗体の初の抗体医薬品として 1 剤目が上市したが、体外診断薬等への産業利用については、まだ報告がない。本研究では、VHH 抗体の体外診断薬等への応用における有用性を明らかにするため、レジオネラ菌体をモデル抗原とした VHH 抗体を用いたイムノアッセイの構築を試みた。

我々は、ラクダ科動物であるアルパカへのレジオネラ抗原免疫をおこない、免疫後の末梢血由来リンパ球より VHH 抗体ライブラリを構築した。構築したライブラリからバイオパニングによって 2 種類の抗原特異的なクローン（Env9 と Env21）を取得した。2 種類の VHH 抗体は、FR2 領域の特徴的アミノ酸配列より VHH 型である事が示された。取得した VHH 抗体の大腸菌分泌発現系での発現量は、Env9 が約 60mg/L、Env21 が約 65mg/L という発現量であった。これは、発現ベクターや培養条件の検討でさらに高発現となる可能性があり、産業利用においても発現量の点からみても VHH 抗体が有用な候補である事が示唆された。

我々は VHH 抗体の工学的改変の容易さに注目し、取得した 2 種類の VHH 抗体を用いた高機能化を目的とした抗体工学による VHH 抗体の多価化（リンカー付加の連結による 2 量体化、キャリアタンパク質へのコンジュゲーションによる多価化）を実施した。その結果、実施した全ての方法で工学的改変や処理を加えた VHH 抗体がレジオネラ抗原への結合活性を保ったまま、多価化させることに成功した。VHH 抗体に様々な処理をおこなったにも関わらず、結合活性を保持できた点は、VHH 抗体の利点であるシングルドメインで抗原への結合活性を持つ点や、高いフォールディング能力に起因する安定性によるものでは

ないかと考察した。

最後に我々は、作製した各フォーマットの VHH 抗体を用いたレジオネラ抗原を検出するイムノアッセイ（サンドイッチ ELISA 法、イムノクロマトグラフィ法、ラテックス凝集法）を構築し、VHH 抗体の有用性について評価した。構築した全てのアッセイ系において、VHH 抗体単量体よりも多価化 VHH 抗体を用いた方が検出感度が高い事が示された。また、ラテックス凝集法については、当研究室で構築したアッセイ系（吸光度測定ラテックス凝集反応アッセイ）において、KLH コンジュゲート体が市販品（ウサギポリクローナル抗体）と同等以上の検出感度である事が示された。VHH 抗体の工学的改変によって、市販品のポリクローナル抗体と同程度の性能まで検出感度を向上できた点は、VHH 抗体がイムノアッセイへの利用において、有用である事を示唆している。

本研究により、我々は VHH 抗体を利用したイムノアッセイを構築する際の 1 つの方法論を示した。アッセイ系によると考えられるが、我々の研究から VHH 抗体は単量体よりも多価化したほうが利用しやすいことが示唆され、この方法を利用することで、例えば感染症に対する診断薬等の開発を加速することが期待される。

## 引用文献

1. Gitlin D. (1966) Current aspects of the structure, function, and genetics of the immunoglobulins. *Annu Rev Med* 17, 1–22.
2. Borrebaeck CA, Malmborg AC, Furebring C, et al. (1992) Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interactions: relation between structural domains and antigen binding. *Biotechnology (NY)* 10(6), 697–698.
3. Lin S, Houston-Cummings NR, Prinz B, et al. (2012) A novel fragment of antigen binding (Fab) surface display platform using glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* 375(1–2), 159–165.
4. Adams GP, Schier R, McCall AM, et al. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res* 61(12), 4750–4755.
5. Nguyen A, Reyes AE, Zhang M, et al. (2006) The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. *Protein Eng Des Sel* 19(7), 291–297.
6. Milstein, C. (1999) The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays* 21(11), 966-973.
7. Smith GP. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
8. P. Dufner, L. Jermutus, R.R. Minter. (2006) Harnessing Phage and Ribosome Display for Antibody Optimisation. *Trends Biotechnol* 24, 523–529.
9. Nobuo Miyazaki, Norihiko Kiyose, Yoko Akazawa, Mizuki Takashima, Yosihisa Hagihara, Naokazu Inoue, Tomonari Matsuda, Ryu Ogawa, Seiya Inoue, Yuji Ito. (2015) Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning

- followed by high-throughput sequencing. *J. Bio chem* 158(3), 205-15.
10. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, Bendahman N, Hammers R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-448.
  11. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. (1994) A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 374 (6518) 168-73.
  12. Muyldermans S, Baral TN, Cortez Retamozzo V, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen VK, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tillib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Saerens D. (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 178-183.
  13. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. (1999) Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* 36(8), 515–24.
  14. Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, Raes G, De Baetselier P, Muyldermans S. (2010) A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol* 184, 5696–5704.
  15. Gene RW, Kumaran J, Aroche C, van Faassen H, Hall JC, MacKenzie CR, Arbabi-Ghahroudi M. (2015) High Affinity anti-Internalin B VHH Antibody Fragments Isolated From Naturally and Artificially Immunized Repertoires. *J Immunol Methods* 416, 29-39.
  16. Tabares-da Rosa S, Rossotti M, Carleiza C, Carrion F, Pritsch O, Ahn KC, et al. (2011) Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Anal Chem* 83, 7213–20.



17. David R. Maass, Jorge Sepulveda, Anton Pernthaner, Charles B. Shoemaker. (2007) Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *Immunol Methods* 324(1-2), 13–25.
18. Achour I, Cavelier P, Tichit M, Bouchier C, Lafaye P, Rougeon F. (2008) Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *J Immunol* 181, 2001–2009.
19. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. (2009) General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized Nanobody scaffold. *J Biol Chem* 284(5), 3273–3284.
20. David R. Maassa, Jorge Sepulvedac, Anton Pernthanerb, and Charles B. Shoemaker. (2007) Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods* 324, 13–25.
21. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A., Hamers, R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 7, 1129–1135.
22. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. (2000) Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* 19, 921–930.
23. Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., Muyldermans, S. (1997) Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* 34, 1121–1131.
24. Nguyen VK, Su C, Muyldermans S. van der Loo W. (2002) Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* 54, 39–47.
25. Zarschler K, Witcey S, Kapplusch F, Foerster C, Stephan H. (2013) High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microb Cell Fact* 12, 97–110.

26. Okazaki F, Aoki J, Tabuchi S, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. (2012) Efficient heterologous expression and secretion in *Aspergillus oryzae* of a llama variable heavy-chain antibody fragment V(HH) against EGFR. *Appl Microbiol Biotechnol* 96(1), 81-8.
27. Ismaili A, Jalali-Javaran M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh-Moghadam M, Memari HR. (2007) Production and characterization of anti-(mucin MUC1) single-domain antibody in tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi). *Biotechnol Appl Biochem* 47, 11–19.
28. Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A et al. (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sc*, 11(3), 500–515.
29. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 7(9), 1129–1135.
30. Hussack G, Hiramata T, Ding W, Mackenzie R, Tanha J. (2011) Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS One* 6(11), e28218.
31. Zabetakis D, Olson MA, Anderson GP, Legler PM, Goldman ER. (2014) Evaluation of disulfide bond position to enhance the thermal stability of a highly stable single domain antibody. *PLoS One* 9(12), e115405.
32. Katja Els Conrath, Mark Lauwereys, Lode Wyns, Serge Muyldermans. (2001) Camel Single-domain Antibodies as Modular Building Units in Bispecific and Bivalent Antibody Constructs. *J Biol Chem* 276, 7346-7350.
33. Behrens CR, Liu B. (2014) Methods for site-specific drug conjugation to antibodies. *MAbs* 6(1), 46–53.
34. Joost A. Kolkman, Debbie A. Law. (2010) Nanobodies - from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discov Today Technol* 7 (2) e95-e146 17.

35. Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S. (2001) Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* 276 (10) 7346-50.
36. G.Sinha. (2012) Ablynx drops lead nanobody. *Nature Biotechnology* 30, 124.
37. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., et al. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
38. Reddy ST, Ge X, Miklos AE, Hughes RA, Kang SH, Hoi KH, Chrysostomou C, Hunicke-Smith SP, Iverson BL, Tucker PW, Ellington AD, Georgiou G. (2010) Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol* 28(9), 965-9.
39. Lomonosova AV, Laman AG, Fursova KK, Shepelyakovskaya AO, Vertiev YV, Brovko FA, et al. (2011) Generation of scFv phages specific to Staphylococcus enterotoxin C1 by panning on related antigens. *MAbs* 3, 513-6.
40. Liu B, Huang L, Sihlbom C, Burlingame A, Marks JD. (2002) Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. *J Mol Biol* 315, 1063-73.
41. Garet E, Cabado AG, Vieites JM, González-Fernández A. (2010) Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicon* 55, 1519-26.
42. Chang C, Takayanagi A, Yoshida T, Shimizu N. (2011) Screening of scFv-displaying phages recognizing distinct extracellular domains of EGF receptor by target-guided proximity labeling method. *J Immunol Methods* 372, 127-36.
43. Noronha EJ, Wang X, Ferrone S. (2002) Isolation of human tumor-associated cell surface antigen-binding scFvs. *Methods Mol Biol* 178, 227-33.
44. Declerck P. (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*.

Environ Microbiol 12, 557–566.

45. Catherine R. Stewart, Viraj Muthye, Nicholas P. Cianciotto. (2012) Legionella pneumophila Persists within Biofilms Formed by Klebsiella pneumoniae, Flavobacterium sp., and Pseudomonas fluorescens under Dynamic Flow Conditions. PLoS One 7(11), e50560.
46. Rowbotham TJ. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 33, 1179–1183.
47. Fields BS, Benson RF, Besser RE. (2002) Legionella and Legionnaires disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 15, 506–526.
48. Fraser DW. (1980) Legionellosis: evidence of airborne transmission. Ann NY Acad Sci 353, 61–66.
49. Isberg RR, Tj OC, Heidtman M. (2009) The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. Nat Rev Microbiol 7, 13–24.
50. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 297, 1197–1203.
51. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. (2009) Distribution of Legionella pneumophila serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000–2008). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28, 781–791.

## 業績目録

発表論文

[筆頭]

“Sensitive immunoassay of Legionella using multivalent conjugates of engineered VHHs”, Norihiko Kiyose, Nobuo Miyazaki, Katsunori Furuhata, and Yuji Ito, *Journal of Biochemistry*, 2023, 173(3), 185 – 195.

[非筆頭]

“Selection and Characterization of Human Serum Albumin specific Porcine scFv Antibodies Using a Phage Display Library”, Muraoka Junko, Ozawa Takuya, Enomoto Yurie , Kiyose Norihiko, Imamura Ayana, Arima Kazunari, Nakayama Hiroshi, and Ito Yuji, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* , 2014, 33(1), 42- 8.

“Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning followed by next generation sequencing”, Nobuo Miyazaki, Norihiko Kiyose, Yoko Akazawa, Mizuki Takashima, Yosihisa Hagihara, Naokazu Inoue, Matsuda Tomonari, Ryu Ogawa, Seiya Inoue and Yuji Ito, *Journal of Biochemistry*, 2015, 158(3), 205-15.

国内学会報告 8 演題

[筆頭]

「Improvements in sensitivity of immunoassay for Legionella through an antibody engineering of VHH antibodies」、清瀬紀彦、伊東祐二、第 20 回日本蛋白質科学

会年会、Web、(2020、7)

「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の単離と機能解析」、清瀬紀彦、宮崎誠生、岸本聡、井上聖也、萩原義久、有馬一成、伊東祐二、第 86 回日本生化学会大会、横浜、(2013、9)

「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の特性解析」、清瀬紀彦、宮崎誠生、井上聖也、萩原義久、有馬一成、伊東祐二、平成 25 年度九州生化学会、佐賀、(2013、5)

「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから得られた抗 Her2 抗体の特性解析」、清瀬紀彦、宮崎誠生、井上聖也、有馬一成、川口博明、川浪理沙、萩原義久、伊東祐二、第 85 回日本生化学会大会、福岡、(2012、12)

「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリの構築と抗原特異的抗体単離への試み」、清瀬紀彦、宮崎誠生、井上聖也、有馬一成、萩原義久、伊東祐二、平成 24 年度九州生化学会、福岡、(2012、5)

「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリの構築と抗原特異的抗体単離への試み」、清瀬紀彦、宮崎誠生、井上聖也、有馬一成、川口博明、小島敏之、萩原義久、伊東祐二、第 12 回日本蛋白質化科学会年会、名古屋、(2012、6)

[非筆頭]

「抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリの特性と抗原特異的抗体単離の研究」、宮崎誠生、清瀬紀彦、萩原義久、松田知成、井上聖也、有馬一成、伊東祐二、第 37 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、雲仙、(2013、9)

「抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリからの抗原特異的抗体の単離と機能解析」、宮崎誠生、清瀬紀彦、萩原義久、井上聖也、有馬一成、伊東祐二、第 86 回日本生化学会大会、横浜、(2013、9)

## 謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院、理工学研究科総合理工学専攻、伊東研究室および、アーク・リソース（株）において行われ、私が本研究室に在籍中の3年間でまとめた研究成果になります。3年間、御懇意なご指導とご鞭撻を賜りました主指導教官の伊東祐二教授に深く感謝致します。また、大変お忙しい中、副査としてご指導頂きました、新留康郎教授、隅田泰生特任教授、有馬一成准教授へこの場を借りて心より感謝申し上げます。また、レジオネラサンプルをご提供いただきました麻布大学の古畑勝則教授、MALDI-TOF MS 解析のデータ取得・解析にご協力いただきました鹿児島大学の坂井智咲さまに深く感謝申し上げます。さらに、社会人学生として送り出していただいたアーク・リソース（株）の井上聖也社長へ深く感謝申し上げます。

私は大学生の頃からアルパカ抗体の研究に携わらせていただき、社会に出た後も縁がありアーク・リソース（株）にてアルパカ抗体を扱う仕事に就くことができました。アルパカ抗体は非常に魅力的な抗体で、大変良い研究テーマにめぐり合うことが出来たと実感しております。普段は、熊本で働いていたこともあり、思うように研究室に顔を出すことは出来ませんでした。暖かく接してくれた伊東研究室の皆様にも、この場を借りて御礼申し上げます。

最後になりますが、社会人学生として忙しい3年間をそばで支えてくれた家族に心より感謝致します。

これからも本研究の産業応用へ向けて頑張っ参りますので、何卒宜しくお願ひ申し上げます。