

博士論文

ファージディスプレイ法によるアヘン成分認識
単鎖抗体の開発

(Development of a phage-display library-derived anti-opium antibody)

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 生命環境科学専攻

松木園美穂

目次

	Page
要旨	1
序論	2
第 1 章 薬物認識抗体及びその抗体作製方法	3
1-1 小序論	3
1-2 抗ハブテン抗体	3
1-3 抗 morphine 抗体	6
1-4 抗体作製方法	8
1-5 ハイブリドーマ法	9
1-6 ファージディスプレイ法	10
1-7 抗薬物抗体作製におけるファージディスプレイ法の有用	12
1-8 小括	13
1-9 引用文献	14
第 2 章 ハイブリドーマ法による抗体作製	17
2-1 小序論	17
2-2 材料と方法	18
2-2-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体作製	
2-2-2. ハイブリドーマ法による抗体作製	
2-3 結果	20
2-3-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体作製	
2-3-2 ハイブリドーマによる抗体作製	
2-4 小括	25
2-5 引用文献	26
第 3 章 ファージディスプレイ法を用いたモルヒネ特異的一本鎖抗体 (single chain Fv, scFv)の単離とその特異性の評価	27
3-1 小序論	27
3-2 材料と方法	27
3-2-1 免疫及び抗体価の評価	
3-2-2 抗morphine 免疫 scFv ファージライブラリの構築	
3-2-3 ScFv提示ファージのレスキュー	

3-2-4	パンニング	
3-2-5	抗 morphine scFv の発現の検討	
3-2-6	M86 の発現及び精製	
3-2-7	SDS-PAGE、Western blotting	
3-2-8	ELISA	
3-2-9	配列解析（遺伝子配列解析、CDR領域解析、gene usage解析）	
3-2-10	M86 の SPR による速度論的パラメーターの算出	
3-2-11	コンピューターシュミレーションによる構造解析	
3-3	結果	33
3-3-1	抗 morphine immune scFv library の構築	
3-3-2	パンニング	
3-3-3	スクリーニング	
3-3-4	クローンの配列解析（遺伝子配列解析、CDR 領域解析、gene usage 解析）	
3-3-5	抗 morphine scFv の発現と精製	
3-3-6	M86 の発現及び精製	
3-3-7	M86 は morphine-タンパク質コンジュゲート体の morphine 部位を特異的に認識する	
3-3-8	SPR 解析	
3-3-9	M86 は morphine のみならず codeine、heroin をも認識する	
3-3-10	M86 のコンピューターシュミレーションによる構造解析	
3-3-11	抗ハプテン抗体作製における本手法の考察	
3-4	小括	53
3-5	引用文献	54
第 4 章	バイオセンサー素子に向けた開発	55
4-1	小序論	55
4-2	材料と方法	55
4-2-1	M86 のアミノ酸置換体の解析	
4-2-2	M86の薬物タンパク質コンジュゲート体に対する反応性の解析	
4-3	結果	57
4-3-1	M86 のアミノ酸置換体の解析	
4-3-2	M86の薬物タンパク質コンジュゲート体に対する反応性の解析	
4-4	小括	67
4-5	引用文献	67
第 5 章	総括	68

文献リスト・学会報告	70
謝辞	72

要旨

本研究は低分子量化合物である morphine を特異的に認識する抗体分子の作製を目標とした。Morphine-conjugated BSA に対する免疫抗体ライブラリを作製し、morphine-conjugated thyroglobulin によりバイオパンニングを行い、morphine を特異的に認識する scFv (single chain Fv; scFv) の単離を試みた。その結果、morphine を認識する scFv、M86 の単離に成功した。M86 について以下に要約する。

タンパク質コンジュゲート体に対する結合評価では、モルヒネコンジュゲート体のみを認識し、非常に構造の似たコデインコンジュゲート体は認識しなかったことより、非常に優れた特異性を有していることが示された。Morphine-固定化 CM5 センサーチップを用いた SPR 解析(Surface Plasmon resonance analysis)では K_d 値は 1.26×10^{-8} M であった。競合 ELISA による薬物単体に対する評価では、morphine、opium のみならず、codeine、heroin を認識した。 IC_{50} 値は opium, morphine, codeine, heroin に対してそれぞれ 257 ng/ml、36.4、7.3、7.4 nM だった。従って、M86 は morphine や codeine 単体のみならずアヘン剤や heroin の検出にも利用できることが示された。また、本研究では、動物にハプテン - コンジュゲート体を免疫し、ハプテン - コンジュゲート体でセレクションを行い、フリーのハプテンを特異的に認識する抗体を作製する作製手法に限界があることが示唆された。一方で、コンピューターシミュレーションを利用した M86 の抗体エンジニアリングにより morphine を特異的に認識するよう改変できる可能性も示唆されたことより、M86 は morphine 特異的認識抗体のプロトタイプとなりうることが示唆された。まとめると、M86 は抗 morphine 抗体プロトタイプと成り得る可能性を有するとともに、M86 はアヘン剤・heroin の検出プローブやアヘン剤中毒・heroin 中毒の治療薬として幅広くその活用が期待される。

序論

研究の背景

文部科学省の報告によると、平成 13 年の米国で発生したテロ以来、世界各地で各種テロが発生しており、テロ対策が世界共通の主要課題となってきた。危険物質探知機器に関しては、ほとんどが外国製品を利用している。これらは軍用に開発されたものも多く、事件現場における正確な判定には不向きである。現在諸外国で市販されている各種携帯型や据え置き型の探知機材等の評価を行った結果、さらなる感度面、選択性の向上が必要と認められたにも関わらず技術面において公開されていない部分が多いため、日本国内独自の技術開発が必要とされている。

危険物質とは、化学物質・核物質・毒物・生物剤・爆薬等を対象とし、それぞれの物質に対応して、MS 測定・テープ式光電法・放射検出・中性子技術・ミリ波技術・近赤外分光・テラヘルツ波技術・DNA 分析・抗原抗体反応、の探知機器開発が進められている。抗原抗体反応を原理とした探知機器の開発においては、その特異性における性能はほぼ抗体の性能に左右されると考えられる。従って、化学物質等の低分子化合物に対する抗体作製は極めて重要な開発課題である。

本研究では不正薬物等社会悪物品の一つである morphine をターゲットとした。Morphine は優れた鎮痛作用を持ち重要な医薬品の一つでもあるが、依存性の強い麻薬としても知られている。近年は morphine を含む不正薬物等社会悪物品の密輸が急増している状況であり、このような不正薬物等社会悪物品を正確に探知する探知機器開発は必要不可欠である。

現在利用されている morphine の測定方法としては、呈色反応・抗原抗体反応・LC・GC・GC/MS・LC/MS・IR が挙げられる。抗原抗体反応の検出下限は 300 ng/ml であり、精密機器測定の検出下限は数 ng/ml オーダーである。

従って、特異性の高い抗体を搭載したポータブルな探知機器は、不正薬物探知としても医薬品探知としても幅広くその活用が期待できるため特異性の高い優れた抗体の開発は有意義な研究であるといえる。

第 1 章

薬物認識抗体及びその抗体作製方法

1-1 小序論

免疫イムノグロブリン（抗体）は、生体における免疫作用をはじめとし、治療薬、ターゲット物質に対する特異的反応プローブとして、様々な分野で機能する超機能的な物質である。あらゆるターゲットに対してこのような超機能的物質を作製する技術を取得することは応用性が広いとともに限らない可能性を秘めている。そこで我々は、ハイブリドーマ法を用いて抗体作製を行ってきた。ハイブリドーマ法は完全に確立された技術であるが、ピンポイントで標的を狙う場合や技術的な面で限界があるように思われる。例えば技術的な面では、細胞融合効率は良いにも関わらず血清中に存在していたはずの抗体産生細胞をハイブリドーマとして得ることができない等である。そこで本研究では、ピンポイントで標的を捉える抗体の作製を行うために、遺伝子組換え技術を利用したファージディスプレイ法の可能性を検討した。本研究のターゲット物質は免疫学的にハプテンに属される低分子化合物の薬物（morphine, MW 285.4）とした。以下では、抗ハプテン抗体、抗 morphine 抗体、抗体作製方法、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法、について述べ、最後に抗ハプテン（薬物）抗体作製におけるファージディスプレイ法の優位性について述べる。

1-2 抗ハプテン抗体

分子量が小さい低分子量の化合物(MW 1000 以下)は、免疫学的にハプテンと呼ばれ、単独で動物に投与しても免疫応答を誘導せず免疫原性がないといわれている。一方、このハプテンをタンパク質（担体もしくはキャリア分子）と共有結合すると免疫原性を示すようになる。ハプテンはホルモン、ビタミン、代謝物、薬物、環境汚染物質、抗生物質、除草剤、添加物等多岐にわたり我々の生活に広範に存在しており、これらの低分子化合物を検出するための手段として、ハプテンに対する抗体等の分子は有用である。これらのアッセイのパフォーマンスを決定する重要なポイントはこの抗体等の分子の特異性である。構造の類似した化合物を含むサンプルから目的ハプテンのみを特異的に検出する場合や、特異性の幅広い抗体を使用して一度に類似した化合物を検出する場合等目的に合わせた特異性が必須である。このような抗体分子は、研究用試薬・診断キット・バイオセンサー・医薬品等に有用であるが、抗体分子作製においてタンパク質を標的とする場合とは異なる、ハプテンに特徴的な問題点が多く存在する。以下、抗ハプテン抗体の特徴を述べる。

ハプテン抗体の特徴的な構造として、Almagro 等[1]は、タンパク質抗原が相補鎖決定領

域ループの末端のみと結合し抗体の抗原認識表面は平面的であるのに対して、ハプテン抗原の場合は抗原結合部位の底部や重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) の接触面を形成する ストランドに含まれるアミノ酸と結合し抗原認識表面はキャビティ型であると報告している。また、実際に抗原と結合するアミノ酸残基 (specificity-determining residues : SDR) の平均的な数はハプテン抗体の場合は 11.9 で、タンパク質抗体の 16.6 とペプチド抗体の 17.2 よりも 5 個少ない。その中でも重鎖相補鎖決定領域ループ 3 (complementarity determining region H3 : CDRH3) に含まれる SDR の割合は、抗ハプテンの場合は 33% であるのに対し抗タンパク質・抗ペプチドは 25% となり、H3 ループは特に抗ハプテンにおいては重要であると述べている。

ハプテンとハプテン抗体の特徴的な相互作用としては、Livesa 等[2]は、ハプテン分子のなかで最も多く自然界で存在しているリン酸化合物(ハプテンの 1/3)ですら、抗体とリン酸基の相互作用において、ある決まった結合モチーフや酸 - 塩基相互作用は見出されていないと報告している。しかし決まった結合様式はないものの、抗原の結合には結合部位の相補的な電荷を要し、スタッキングやファンデルワールス作用により特異性が決定されると述べている。

ハプテン抗原の調整方法については、ハプテンは一般的に低分子・疎水性であり、抗原 - 抗体結合を形成可能な反応基を保持していない場合が多い。キャリアタンパク質をコンジュゲートしても免疫応答を誘発しない低分子化合物もある。基本的にハプテンの最も特徴的な構造を可能な限りキャリアタンパク質から離してコンジュゲートする。また、ハプテン - キャリア結合の化学構造や架橋位置等が結果的に免疫応答や抗体の結合能力に大きな影響を及ぼす事が容易に想定されるため、分子モデリング解析 (computer-assisted molecular modeling : CAMM) の利用も極めて有用である。すなわち、ハプテンはターゲット物質と構造的にも電子的にも最も類似した化合物となるようにデザインするほうが良い[3]。ハプテン : キャリアタンパク質のモル比や免疫量も重要なポイントになってくる。Fodey 等によると、免疫量の増加・ハプテンの含有モル比の増加により早い免疫応答と高いタイターを得ることができるが、逆にそれらの減少により、抗体の特異性・選択性を上げることができると述べている[4]。

抗ハプテン抗体に適した分子骨格に関して考察した。近年では従来からある Fab 抗体や scFv 抗体等に加え、ラマやラクダのもつ抗体の可変ドメイン VHH の monobody が single domain antibody として注目されている[5]。また、目的の機能に合致した分子骨格を選択し抗体様分子を構築する手法も一つの選択肢と考えられ、近年では特にタンパク質抗原を中心として表 1-1 に示す様々な抗体分子及び様々な分子骨格を用いた抗体様分子構築の試みがなされている。抗ハプテン抗体に対するそれぞれの分子骨格の適合性を検討したところ、リガンドポケットが深く、リガンドに対して相補的である anticalins[6]、長い CDR3 ループが特徴的でありキャビティ型のリガンドポケットを形成する VHH[5]、及び元来の抗体、が適していると推測された。

以上の - より、抗ハプテン抗体作製において、ある決まった手法があるわけではなく、抗ハプテン抗体作製はタンパク質抗原及びペプチド抗原をターゲットとする場合よりも繊細な配慮が必要であると推測される。さらに構造の非常に類似した小さな化合物中の僅かな差を識別する抗体を作製することは、非常に困難であることが推測された。

表 1-1 抗ハプテン抗体に最適な分子

	Ab	Fab, scFv	Domain Ab (Domanist, UK)	VHH (Ablynx, Belg)	anticalins (Pieris, Germany)	DARPin (MolecularPartners AG, Switzerland)	FN3	avimers (Avidia, US)	affibody (Affibody, Sweden)
サイズ	150kDa	57kDa 27kDa	13kDa	15kDa	<20kDa	14kDa	10kDa	<4kDa	6kDa
特異性	pM-nM	pM-nM	nM	pM-nM	pM-nM	pM-nM	pM-nM	pM-nM	pM-nM
ハプテン抗体に対する 優位性	元来の免疫システム	元来の免疫システム		CDR3 の long fingerlike extension により抗原結合 capacity を保有している。	深く、非常に相補的なリガンドポケットを形成する				

青文字は抗体分子、黒文字は抗体以外の分子骨格を保有する抗体様分子。

1-3 抗 morphine 抗体

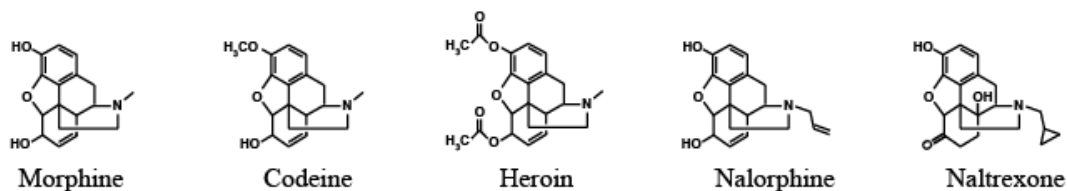
1971 年に抗 morphine ポリクローナル抗体が報告されて以来、より高い特異性を有した抗 morphine 抗体の確立を目指して数多くの研究がなされている(表 1-2)[7-26]。しかし、これらの抗体の全ては、図 1-1 に示すような類似構造化合物に交差反応している。例えば、Glasel 等や Sawada 等の抗体は codeine に対して交差反応することを報告し[8-9]、Usagawa 等の抗体は codeine には交差反応しないが、nalorphine、morphine-6-glucuronide、naltrexone に交差反応することを報告している[13]。Rahbarizadeh 等は heroin に対して 10%の交差反応性を有し、codeine に対して低い交差反応性である抗体を確立している[16]。また、表 1-2 に示すようにほとんどの抗体がハイブリドーマ法で作製されたものである。唯一、Brennan 等が免疫ファージライブラリを使用した抗 morphine scFv 抗体を単離しているが、その特異性についての評価は報告されていない[18]。従って、ファージディスプレイ法により得られた抗体の詳細な評価を行うことは抗 morphine 抗体作製のみならず、抗ハブテン抗体作製において重要な知見となる。また、表 1-2 では使用した免疫源を記載した。全ての研究において、morphine の 3 位ヒドロキシル基の誘導体、6 位ヒドロキシル基の誘導体、ピペリジン環の窒素原子の誘導体を免疫源として使用していた。本研究では morphine の分子骨格を可能な限り反映させるために、morphine の 2 位炭素原子の誘導体を免疫源とした (morphine-C conjugate) (図 1-1)。

表 1-2 抗 morphine 抗体

著者	引用文献	免疫動物	交差反応性	抗原
Van Vunakis, H	<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> 1972, 180, 514-521.	mouse	codein	3-O-carboxymethylmorphine
Glasel, J. A.	<i>Mol. Immunol.</i> 1983, 20, 1419-1422.	mouse	cross	morphine-6-hemisuccinate
Sawada, J.	<i>Mol. Immunol.</i> 1988, 25, 937-943.	mouse	codeine	morphine-6-hemisuccinate
Miller, A., 3rd	<i>J. Mol. Biol.</i> 1989, 209, 763-778.	mouse	opiate	morphine-6-hemisuccinate
Biagini, R. E.	<i>Life Sci.</i> 1990, 47, 897-908.	human	heroin	heroin
Lee, J. W.	<i>J. Pharm. Sci.</i> 1991, 80, 284-288.	mouse	hydromorphine	—
Usagawa, T.	<i>J. Immunol. Methods</i> 1993, 157, 143-148.	mouse	less codeine	N-(4-aminobutyl)normorphine
Sawada, J.	<i>Mol. Immunol.</i> 1993, 30, 77-86.	mouse	codeine	N-(4-aminobutyl)normorphine
Yang, T. B.	<i>Hybrid Hybridomics</i> 2002, 21, 197-201.	mouse	—	C6-hemisuccinate
Rahbarizadeh, F.	<i>Hybridoma</i> 2000, 19, 413-417.	mouse	least codeine	C6-hemisuccinate
Xi, X.	<i>Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi</i> 2003, 19, 395-396.	mouse	—	—
Brennan, J.	<i>J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.</i> 2003, 786, 327-342.	mouse, scFv	—	morphine-3-glucuronid
Dillon, P. P.	<i>Biosens. Bioelectron</i> 2003, 18, 217-227.	rabbit	codeine	morphine-3-glucuronid
Li, L.	<i>Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao</i> 2005, 25, 833-836.	mouse	heroin, codeine	Morphine-6-succinyl
Ma, L. X.	<i>Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi</i> 2006, 22, 368-370.	mouse	heroin, codeine	6-succinylmorphine (M-6-S)
Gandhi, S.	<i>Biosens. Bioelectron</i> 2009, 25, 502-505.	chicken	heroin, codeine	6-monoacetylmorphine(MAM)
Pozharski, E.	<i>J. Mol. Biol.</i> 2004, 337, 691-697.	mouse	—	3-carboxymethylmorphine N-carboxymethylnormorphine
Findlay, J. W.	<i>Clin. Chem.</i> 1981, 27, 1524-1535.	mouse	opiate	N-carboxypropyl-normorphine

不明な箇所は (-) で表記した。

a)



b)

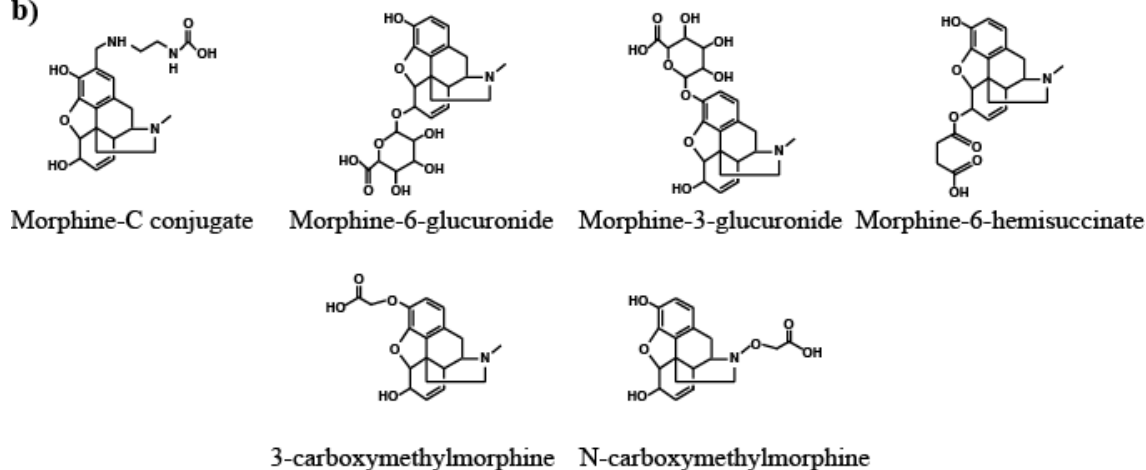


図 1-1 Morphine の構造 . a) Morphine 及び類似構造化合物の構造 . b) Morphine-C conjugate 及びその他の免疫源の構造 . 本研究では morphine-C conjugate (morphine の 2 位炭素原子を利用したコンジュゲート体) を免疫源とした . その他の研究では morphine-6-glucuronide、morphine-3-glucuronide、morphine-6-hemisuccinated 、 3-carboxymethylmorphine 、 N-carboxymethylmorphine のカルボキシル基を利用してコンジュゲート体を作製している .

1-4 抗体作製方法

表 1-3 に示すように、抗体を作製するために様々な方法を用いることができる。1975 年に Köhler と Milstein により報告されたハイブリドーマ法[27]、1985 年に Smith 等により報告されたファージディスプレイ法[28]に代表される生体外抗体作製系、に大別される。ハイブリドーマ法では DNA 免疫[29]や人工リンパ節技術[30]等新たな試みがなされている。生体外抗体作製系は表中に記載したように様々なディスプレイ方法と抗体ライブラリ（ナイーブ・免疫・合成）との組合せである。また、生体外抗体作製系の他の系としてニワトリ N リンパ球培養細胞 DT40 を用いる ADLib 法[31]や Fab タンパク質ライブラリ[32]が挙げられる。その他ヒト B 細胞から直接目的抗体産生細胞を得る EBV 法や EBV-ハイブリドーマ法、同じくヒト B 細胞 1 クローンから直接抗体遺伝子をクローニングし抗体分子を作製する技術があり[33]、ヒト血清中に有用な抗体があることが分かっている場合は非常に理にかなった手法である。また様々な特異性を持つ抗体産生細胞群のなかからピンポイントの特異性を有する抗体産生細胞を選択する場合も有用な方法であるかもしれない。

本研究では、1-3・1-4 の分析より、morphine-タンパク質コンジュゲート体 (morphine-C conjugate) を免疫源として、ハイブリドーマ法と免疫ライブラリ/ファージディスプレイ法により、抗 morphine IgG 抗体・抗 morphine scFv 抗体の作製検討に着手した。

表 1-3 抗体作製方法

ハイブリドーマ法	生体外抗体作製系
・ 常法	・ ファージディスプレイ法
・ DNA 免疫	・ 細菌及び酵母細胞表面ディスプレイ法
・ 人工リンパ節技術	・ リボソームディスプレイ法
・ EBV-ハイブリドーマ法	・ mammalian cell ディスプレイ法
	・ Rantls 法（体外免疫法＋ファージディスプレイ法）
EBV 法	Single B cell RT-PCR
	ADLib 法
	Fab タンパク質ライブラリ

1-5 ハイブリドーマ法

特定の抗原に対する単一の抗体分子を無限に得られることがメリットであるが、免疫寛容の問題、毒素や病原体を抗原とした場合の問題、作製の経済的・時間的コストが大きい点が欠点としてあげられる。以下は一般論を述べる（図 1-2）。抗原を動物の腹腔内、静脈内、皮下等に投与し免疫を行う。血清中に十分な抗体価を示した動物の脾臓またはリンパ節を摘出し、これらに含まれる抗体産生細胞（脾臓細胞またはリンパ球）と骨髄腫細胞とを融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製する。マウスを用いた場合は、骨髄腫細胞としては、P3-X63Ag8-U1 (P3U1)、NS-1、SP2/O、X63. 653、P3-X63Ag8 (P3)、FO 等が挙げられる。細胞融合の方法としては、センダイウイルスを使用する方法、ポリエチレングリコール等の高分子ポリマーを使用する化学的方法や高電圧パルスによる電気穿孔法等が挙げられる。ハイブリドーマの選択は、HAT 培地（正常培地にヒポキサンチン、アミノプリテン、チミジンを加えた培地）で未融合細胞とハイブリドーマを培養して、アミノプリテン耐性を備えたハイブリドーマのみを選択的に増殖させることにより行うことができる。限界希釈法等によるクローニングにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として樹立する。

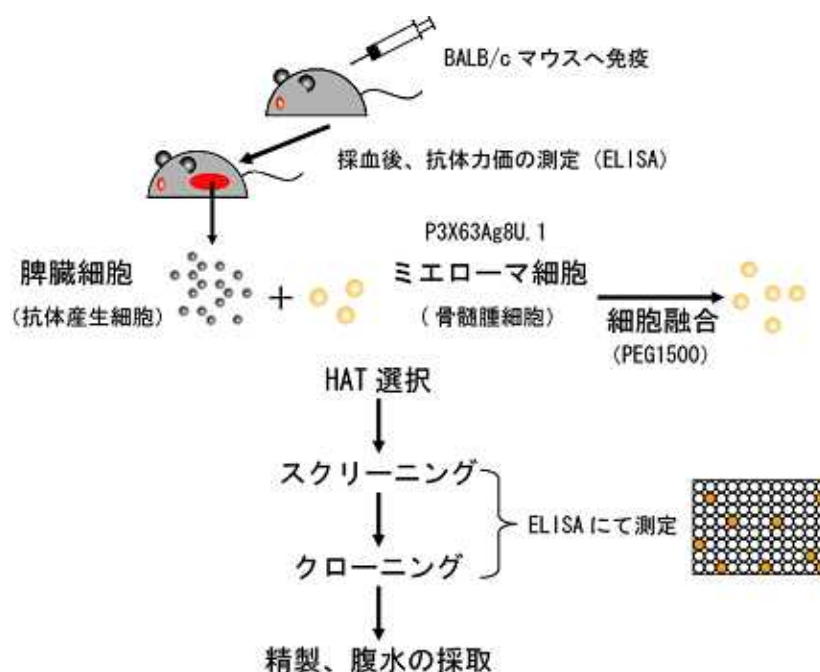


図 1-2 ハイブリドーマ法 .マウスに抗原を免疫し抗体力価の上昇した脾臓細胞とミエローマ細胞とを細胞融合する。HAT 選択後、スクリーニング・クローニングを行いモノクローン化したハイブリドーマを樹立する。

1-6 ファージディスプレイ法

ハイブリドーマ法の問題点を克服する手法として生体外抗体作製系が開発されている。抗体の多様性の増加、免疫源に依存しない点、ヒト抗体作製等がメリットであるが、完全抗体製造には組換え DNA 操作を必要とする点や良質なライブラリの確保、高親和性ファージ抗体選択技術などで生じる技術的な困難さが欠点といえる。

ファージディスプレイ法は生物学的に機能性のタンパク質分子をその表面に発現し提示するバクテリオファージの能力を利用して、抗体断片や目的の機能を持ったポリペプチドのライブラリを作成しかつ迅速に単離する方法として広く利用されている。

予め抗原で免疫された動物の脾臓細胞由来の抗体遺伝子を基に構築される免疫ライブラリの他、そのままのナイーブラライブラリ、合成ライブラリ等が挙げられる。ライブラリの構築にあたっては、特異的なプライマーを設計し、抗体遺伝子断片を作製し、これらを M13 または fd ファージベクターまたはファージミドベクターに挿入することにより作成する。

繊維状ファージ M13 は環状の一本鎖ゲノム DNA をもち、そのまわりに 5 つのコートタンパク (g3p、g6p、g7p、g8p、g9p) がアセンブリーした細長い筒状の構造をしており、大腸菌に感染して増殖するウィルスである。ファージディスプレイは、これらのファージコートタンパクと外来ポリペプチドを融合した形で発現させることでファージ表面にディスプレイさせる。ファージに提示されている外来ポリペプチドのアミノ酸配列はファージゲノムの塩基配列を読むことで推定できることから、アミノ酸配列と機能の関係を容易に同定でき、目的にそった分子を迅速に単離同定することが可能である。ファージへのディスプレイ法としては、ほぼ全てのコートタンパク質上に提示可能であるが、主に g3p、g8p への提示系が用いられている。ファージ 1 匹に 5 分子存在する g3p を提示系として用いた場合、分子量約 50,000 程度までのポリペプチドをファージ 1 匹あたり 1 - 5 分子提示することができる (図 1-3)。一方、ファージ 1 匹に約 3,000 分子存在する g8p を提示系として用いた場合 5 - 8 アミノ酸残基のポリペプチドを約 3,000 分子提示させることが可能である。ファージディスプレイ法は図 1-4 に示したストラテジーによりターゲットに結合する分子を単離することができる (図 1-4)。

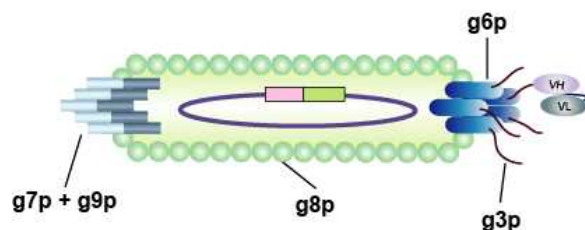


図 1-3 M13 ファージ . 遺伝子、- でコードされる g3p、g6p - g9p のタンパク質がファージ粒子を構成する . g8p はファージの殻を覆う最も主要なコートタンパク質で、その他のタンパク質は少数のコートタンパク質としてファージの両先端に局在している . g3p はファージ上に 1~5 分子存在しており、大腸菌の F 繊維毛への感染に関与する 図は g3p が scFv を提示している模式図である .

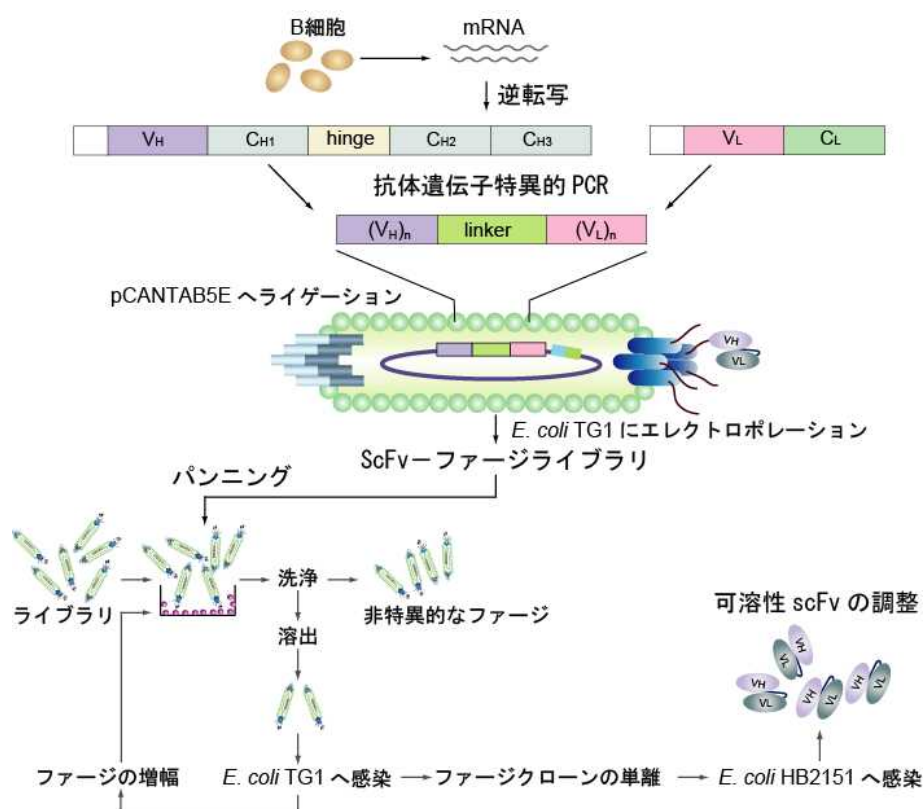


図 1-4 ファージディスプレイ法 . B細胞より抗体断片を作製しファージミドベクター等に挿入しライブラリを作製する . 図の場合はscFvライブラリである . ライブラリは目的抗原を固定化したプラスチックプレート中で反応させ、洗浄後抗原に結合したファージを溶出させ回収する . 増幅後、同様のパンニング操作を繰り返すことにより目的抗原に結合するファージクローンが濃縮される . クローニング後、クローンを *E. coli* HB2151 へ感染させることにより可溶性scFvを調整する .

1-7 抗薬物抗体作製におけるファージディスプレイ法の有用性

本研究におけるファージディスプレイ法のハイブリドーマ法に対する最大の利点は、抗体の多様性化を達成できる点である。実際に生体内に存在しない抗体遺伝子断片をもライブラリ化することができるためオリジナルの抗体のみならずオリジナルの抗体以上の性能を有する抗体を単離できる可能性も秘めている[25]。ハイブリドーマ形成効率に依存しない点や、ディスプレイ化によるハイスループットな選択手法も非常に魅力的である。一方で、ファージディスプレイ法の問題点も挙げられ技術的な面でいえば、良質なライブラリの確保や高親和性ファージ抗体の選択技術において慎重な検討が必要となってくる点である。

本研究開発におけるハイブリドーマ法に対するファージディスプレイ法の有用性を以下に述べる。

構造の非常に類似した小さな化合物中の僅かな差を識別する抗体を作製するためには、多様性の大きい抗体集団を作り上げ、その中から目的の性能を持つ抗体を選択することが重要であるため、ファージディスプレイ法を利用したほうが抗体獲得の可能性が高いと推測される。

抗ハプテン抗体の特徴で述べたように、抗morphine抗体の場合もある決まった結合モチーフがあるわけではなく、結合部位の相補的な電荷及びスタッキングやファンデルワールス作用により特異性が決定されると推定されるため、と同様、様々なアミノ酸の組合せによる抗体の多様性が重要となってくる。

ファージディスプレイ法ではハイブリドーマ法による細胞融合でのバイアスを抑制できる可能性がある。

ファージディスプレイ法では遺伝子を直接捕ってくるので、性能向上のための遺伝子改変（抗体エンジニアリングへの対応）も行い易い。さらにscFvはIgGの反応に重要な部位だけから成る分子であり、抗体の2量体化などにも適している。

ハイブリドーマ法で作製する抗体は、無血清培地もしくは血清が必要となり、コストを増加させる。また細胞培養であるため、十分な注意が必要である。これに対して抗体ライブラリから抗体遺伝子を捕ってくる場合は、安価な大腸菌用培地で大腸菌を培養すればよく、その差は明白である。

1-8 小括

抗morphine抗体作製を行うにあたって、1-7で述べたように、抗morphine抗体の獲得のためには、抗体産生細胞のロスを最大限に抑えること、抗体の多様性を増加させ、しいては様々な特異性を有した大きな抗体ライブラリを作製することが重要であり、これにより構造が非常に似ている薬物の僅かな差を識別することができる抗体分子を単離できる可能性が高くなると推測する。本研究では、1-3・1-4・1-7の分析をふまえて、morphine-タンパク質コンジュゲート体（morphine-C conjugate）を免疫源として、ハイブリドーマ法と免疫ライブラリ/ファージディスプレイ法により、抗morphine IgG抗体・抗morphine scFv抗体の作製検討に着手した。

1-9 参考文献

1. Almagro, J. C. Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires. *J Mol Recognit* **2004**, *17*, 132-143.
2. Livesay, D. R.; Subramaniam, S. Conserved sequence and structure association motifs in antibody-protein and antibody-hapten complexes. *Protein Eng Des Sel* **2004**, *17*, 463-472.
3. Xu, Z. L.; Shen, Y. D.; Beier, R. C.; Yang, J. Y.; Lei, H. T.; Wang, H.; Sun, Y. M. Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review. *Anal Chim Acta* **2009**, *647*, 125-136.
4. Fodey, T. L.; Greer, N. M.; Crooks, S. R. Antibody production: Low dose immunogen vs. low incorporation hapten using salmeterol as a model. *Anal Chim Acta* **2009**, *637*, 328-332.
5. Wesolowski, J.; Alzogaray, V.; Reyelt, J.; Unger, M.; Juarez, K.; Urrutia, M.; Cauerhff, A.; Danquah, W.; Rissiek, B.; Scheuplein, F.; Schwarz, N.; Adriouch, S.; Boyer, O.; Seman, M.; Licea, A.; Serreze, D. V.; Goldbaum, F. A.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **2009**, *198*, 157-174.
6. Skerra, A. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *Febs J* **2008**, *275*, 2677-2683.
7. Van Vunakis, H.; Wasserman, E.; Levine, L. Specificities of antibodies to morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1972**, *180*, 514-521.
8. Glasel, J. A.; Bradbury, W. M.; Venn, R. F. Properties of murine anti-morphine antibodies. *Mol. Immunol.* **1983**, *20*, 1419-1422.
9. Sawada, J.; Janejai, N.; Nagamatsu, K.; Terao, T. Production and characterization of high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *Mol. Immunol.* **1988**, *25*, 937-943.
10. Miller, A., 3rd; Glasel, J. A. Comparative sequence and immunochemical analyses of murine monoclonal anti-morphine antibodies. *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 763-778.
11. Biagini, R. E.; Klinecicz, S. L.; Henningsen, G. M.; MacKenzie, B. A.; Gallagher, J. S.; Bernstein, D. I.; Bernstein, I. L. Antibodies to morphine in workers exposed to opiates at a narcotics manufacturing facility and evidence for similar antibodies in heroin abusers. *Life Sci.* **1990**, *47*, 897-908.

12. Lee, J. W.; Pedersen, J. E.; Moravetz, T. L.; Dzerk, A. M.; Mundt, A. D.; Shepard, K. V. Sensitive and specific radioimmunoassays for opiates using commercially available materials. I: Methods for the determinations of morphine and hydromorphone. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 284-288.
13. Usagawa, T.; Itoh, Y.; Hifumi, E.; Takeyasu, A.; Nakahara, Y.; Uda, T. Characterization of morphine-specific monoclonal antibodies showing minimal cross-reactivity with codeine. *J. Immunol. Methods* **1993**, *157*, 143-148.
14. Sawada, J.; Yamazaki, T.; Terao, T. Molecular and biochemical analyses of combining sites of monoclonal anti-morphine antibodies. *Mol. Immunol.* **1993**, *30*, 77-86.
15. Yang, T. B.; Zhong, P.; Nie, J. L.; Li, J. S.; Qu, L. N.; Li, Y. H.; Kan, G. H. Preparation and identification of specific and high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *Hybrid Hybridomics* **2002**, *21*, 197-201.
16. Rahbarizadeh, F.; Rasaee, M. J.; Madani, R.; Rahbarizadeh, M. H.; Omidfar, K. Preparation and characterization of specific and high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *Hybridoma* **2000**, *19*, 413-417.
17. Xi, X.; Jin, B. Q.; Zhu, Y.; Liu, X. S.; Wang, W. X.; Li, X. S.; Wu, H. Y. Preparation of monoclonal antibodies against morphine and preliminary application of its colloidal gold conjugates. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **2003**, *19*, 395-396.
18. Brennan, J.; Dillon, P.; O'Kennedy, R. Production, purification and characterisation of genetically derived scFv and bifunctional antibody fragments capable of detecting illicit drug residues. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *786*, 327-342.
19. Dillon, P. P.; Daly, S. J.; Manning, B. M.; O'Kennedy, R. Immunoassay for the determination of morphine-3-glucuronide using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Biosens. Bioelectron* **2003**, *18*, 217-227.
20. Li, L.; Liu, J.; Zhu, P.; Xu, J. P.; Fu, N. Preparation of anti-morphine monoclonal antibodies with complete cross reactivity with heroin. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **2005**, *25*, 833-836.
21. Ma, L. X.; Zhou, Q.; Zheng, H. B.; Li, S. B. Preparation and characterization of anti-morphine vaccine antibody. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **2006**, *22*, 368-370.
22. Gandhi, S.; Caplash, N.; Sharma, P.; Raman Suri, C. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. *Biosens. Bioelectron* **2009**, *25*, 502-505.
23. Pozharski, E.; Wilson, M. A.; Hewagama, A.; Shanafelt, A. B.; Petsko, G.; Ringe, D.

- Anchoring a cationic ligand: the structure of the Fab fragment of the anti-morphine antibody 9B1 and its complex with morphine. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 691-697.
24. Findlay, J. W.; Butz, R. F.; Jones, E. C. Relationships between immunogen structure and antisera specificity in the narcotic alkaloid series. *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1524-1535.
 25. Moghaddam, A.; Borgen, T.; Stacy, J.; Kausmally, L.; Simonsen, B.; Marvik, O. J.; Brekke, O. H.; Braunagel, M. Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *J Immunol Methods* **2003**, *280*, 139-155.
 26. Dillon, P. P.; Manning, B. M.; Daly, S. J.; Killard, A. J.; O'Kennedy, R. Production of a recombinant anti-morphine-3-glucuronide single-chain variable fragment (scFv) antibody for the development of a "real-time" biosensor-based immunoassay. *J Immunol Methods* **2003**, *276*, 151-161.
 27. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
 28. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **1985**, *228*, 1315-1317.
 29. Tang, D. C.; DeVit, M.; Johnston, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **1992**, *356*, 152-154.
 30. Suematsu, S.; Watanabe, T. Generation of a synthetic lymphoid tissue-like organoid in mice. *Nat Biotechnol* **2004**, *22*, 1539-1545.
 31. Ohta, K.; Seo, H. [ADLib system for rapid and flexible design of monoclonal antibodies]. *Yakugaku Zasshi* **2007**, *127*, 81-89.
 32. Mao, H.; Graziano, J. J.; Chase, T. M.; Bentley, C. A.; Bazirgan, O. A.; Reddy, N. P.; Song, B. D.; Smider, V. V. Spatially addressed combinatorial protein libraries for recombinant antibody discovery and optimization. *Nat Biotechnol* **2010**, *28*, 1195-1202.
 33. Yu, X.; Tsibane, T.; McGraw, P. A.; House, F. S.; Keefer, C. J.; Hicar, M. D.; Tumpey, T. M.; Pappas, C.; Perrone, L. A.; Martinez, O.; Stevens, J.; Wilson, I. A.; Aguilar, P. V.; Altschuler, E. L.; Basler, C. F.; Crowe, J. E., Jr. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* **2008**, *455*, 532-536.

第2章

ハイブリドーマ法による抗体作製

2-1 小序論

(5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol (morphine) 、
(5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6-ol (codeine) 、
(5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol diacetate (heroin) 、
(*RS*)-2-(2-chlorophenyl)-2-methylamino-cyclohexan-1-one (ketamine), and methyl
(1*R*,2*R*,3*S*,5*S*)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate
(cocaine)を中央税関研究所より提供していただきタンパク質コンジュゲート体 [BSA、
thyroglobulin (Tg)]を合成作製した。第1章で述べたように、過去の抗 morphine 抗体作製
の研究では、morphine の6位にタンパク質を架橋した morphine 誘導体 (protein
conjugated morphine-6-hemisuccinate)、morphine の3位にタンパク質を架橋した
morphine 誘導体 (protein conjugated morphine-3-glucuronid)、morphine のピペリジン
環の窒素原子にタンパク質を架橋した誘導体 (protein conjugated
N-carboxypropylnormorphine) が使用されていた。本研究では、薬物全体の構造を限りな
く保持させるため、薬物の2位炭素原子に hydroxycarbonylmethylaminomethyl 基を導入
した誘導体を合成し、これとタンパク質とをコンジュゲートした C conjugate、及び Inject
PharmaLink Immunogen Kit により carbonylaminoethylaminomethyl 基がリンカー部位
として挿入されたタンパク質コンジュゲート体 C conjugate を作製した。また過去の研
究と同様に薬物の窒素原子に hydroxycarbonylmethyl 基を導入した誘導体を合成し、これ
とタンパク質とをコンジュゲートした N conjugate を作製した。これらをマウスに免疫
しモノクローナル抗体作製を試みた。薬物の使用においては、全て中央税関研究所の許可
を得て中央税関研究所内、もしくは九州大学大学院薬学研究院で行った。また元長崎大学
の高良先生が合成をされた。

2-2 材料と方法

2-2-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体作製

C conjugate 誘導体 (図 2-1 a ; compound 1-3)

Inject PharmaLink Immunogen Kit(Thermo Fisher Scientific)を用い、morphine(10 μmol)と活性化 BSA (SuperCarrier®) の混合物にホルムアルデヒドを加え室温で 24 時間反応させることでマンニッヒ反応により合成した。スピнкаラムによって不純物を除去し、morphine-C'-BSA を得た (図 2-1 a ; compound 1)。

Morphine (30 μmol) にマンニッヒ反応により aminomethyl 基 ($\text{CH}_2\text{-NRH}$) を導入し、これに bromoacetic acid benzyl ester (30 μmol) を反応させ、benzyloxycarbonylmethylaminomethyl-conjugated 中間体を合成した。中間体 (ca. 10 μmol) より接触還元により hydroxycarbonylmethylaminomethyl-conjugated morphine (morphine-C 誘導体) を合成した (図 2-1 a ; compound 2)。

Benzyloxycarbonylmethylaminomethyl-conjugated 中間体 (ca. 10 μmol) に methyl iodide (10 μmol) を反応させ 3-methoxy-2-benzyloxycarbonylmethylaminomethyl 中間体を合成した。接触還元により hydroxycarbonylmethylaminomethyl-conjugated codeine (codeine-C 誘導体) を合成した (図 2-1 a ; compound 3)。

N conjugate 誘導体 (図 2-1 b ; compound 4-6)

Morphine (20 μmol) cocaine (20 μmol) より 1-chloroethyl chloroformate (80 μmol) による脱メチル化反応により normorphine、norcocaine を合成した[1]。Normorphine (10 μmol)、norcocaine (10 μmol) と bromoacetic acid benzyl ester を反応させ、*N*-benzyloxycarbonylmethyl -conjugated 中間体を合成し、接触還元により *N*-hydroxycarbonylmethyl-conjugated morphine (morphine-N 誘導体)、*N*-hydroxycarbonylmethyl-conjugated cocaine (cocaine-N 誘導体) を合成した (図 2-1 b ; compound 4-5)。Ketamine (20 μmol) に bromoacetic acid benzyl ester (22 μmol) を反応させ *N*-benzyloxycarbonylmethyl-conjugated 中間体を合成した。接触還元により *N*-hydroxycarbonylmethyl-conjugated ketamine (ketamine-N 誘導体) を合成した (図 2-1 b ; compound 6)。

Protein-conjugate の作製

1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC)により C conjugate 誘導体、N conjugate 誘導体とタンパク質 (BSA もしくは Tg)とを架橋した。Compounds 2-6 (ca. 10 μmol) を 10 mg の Tg [2 ml、50 mM phosphate buffer (pH 7.5)] に加え、4°C、15 時間反応させ、ゲルろ過により精製した。同様にして Compounds 2、4 と BSA のコンジュゲート体を作製した。

2-2-2 ハイブリドーマ法による抗体作製

マウスへの免疫

上記で作製した薬物 - タンパク質コンジュゲート体を BALB/cCrIcrlj、メス、7 週令 (n = 3; Charles River Laboratories Japan, Inc.) に 25 µg/100 µl の濃度で免疫した。抗体価が十分に上昇するまで追加免疫を行った。初回免疫のみ Adjuvant, Complete(Freund) (DIFCO)で免疫し、追加免疫 (2-5 回目) には Adjuvant, Incomplete(Freund) (DIFCO)で免疫した。抗体価の評価はマウス血清を ELISA で評価した。

ハイブリドーマ作製

マウスの脾臓よりリンパ球細胞を調整し、リンパ球細胞 : P3U1 細胞 = 5 : 1 となるように、P3U1 細胞を加えた。Polyethylene Glycol 1500 (PEG) により細胞融合を行った。細胞融合後は 1.0×10^5 細胞/ウェルの濃度で HAT 培地中で培養を行った。細胞融合 10 日目以降は HT 培地で培養し、さらに 10 日経過後は通常培地にて培養を行った。十分な細胞の生育を確認後 ELISA によるスクリーニングを行った。

クローニング

活性が検出された細胞集団については、限界希釈法によるクローニングを行った。単一細胞からの産生を確認するまでクローニングを繰り返した。評価は ELISA で行った。

ELISA

薬物 - タンパク質コンジュゲート体を 50 ng/50 µl/ウェルで Nunc-Immuno plate (Maxisorp, Nunc) に固定化し、1.0% blockace (DS Pharma Biomedical) で室温で 2 時間ブロッキング後、50 µl の希釈した血清もしくは培養上清を 2 時間反応させた。検出抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:2500) (Santa Cruz Biotechnology) を使用し 30 分反応させた。検出試薬は 100 µl の o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50set (Sigma - Aldrich Corporation) を使用し 30 分反応させ、50 µl の 2 M (10%) H_2SO_4 により反応を停止し、EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer) により 490 nm で測定した。

競合 ELISA

Morphine-C-BSA (図 2-3 b) Morphine-N-BSA (図 2-3 c) を 50 ng/50 µl/ウェルでコートしたプレート中で、薬物 (morphine、codeine、heroin、cocaine、ketamine ; 0.1、10、1000 ng/ml) と培養上清とを 2 時間反応させた。それ以外は上記の方法に従った。

2-3 結果

2-3-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体作製

morphine-C'-BSA、morphine-C-BSA、morphine-C-Tg、morphine-N-BSA、morphine-N-Tg、codeine-C-Tg、ketamine-N-Tg、cocaine-N-Tg を作製した (図 2-1)。

a) C conjugates

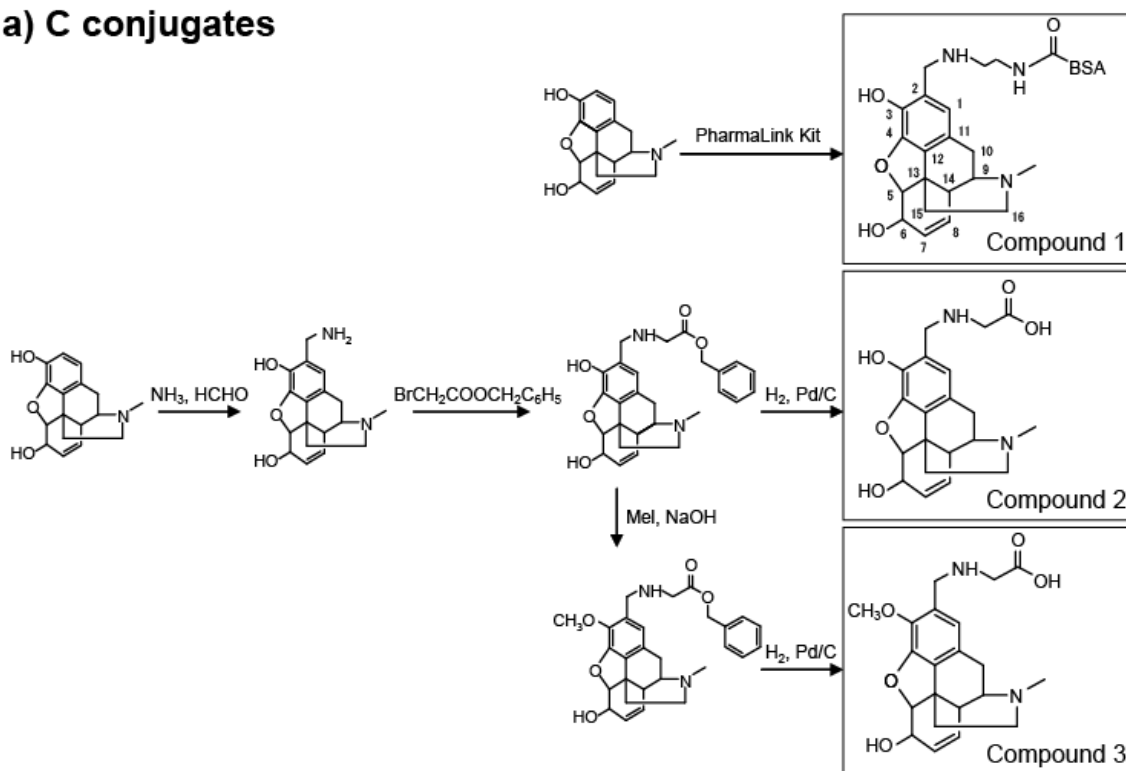


図 2-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体の合成 . a) C conjugate 誘導体 . PharmaLink Immunogen kit を用いて Compound 1 を合成した (morphine-C'-BSA) . C compounds 2、3 を合成し、さらにそれぞれのタンパク質コンジュゲート体を morphine-C-protein (BSA or Tg) codeine-C-Tg とした . C' conjugate と C conjugate の違いはリンカ - 部分である: C' conjugate は carbonylaminoethylaminomethyl であり、C conjugate は carbonylmethylaminomethyl である .

b) N conjugates

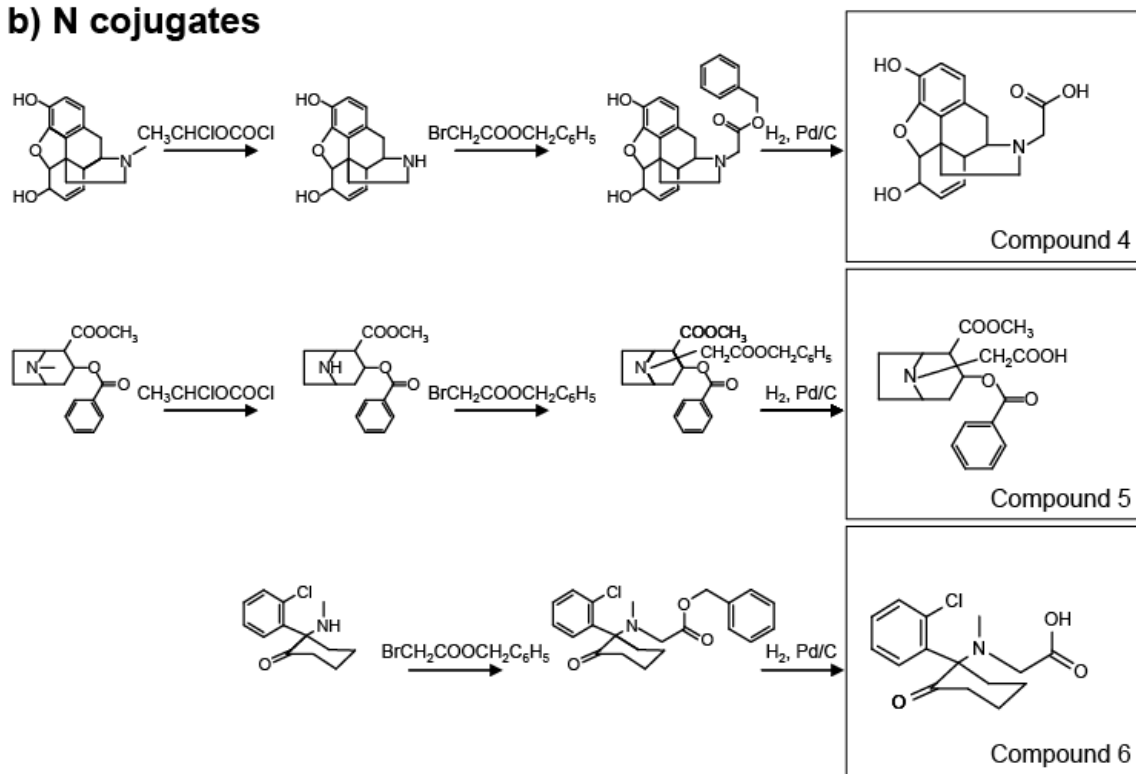


図 2-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体の合成 . b) N conjugate 誘導体 .
N compounds 4、 5、 6 を合成し、さらにそれぞれのタンパク質コンジュゲート
体を morphine-N-protein (BSA or Tg)、cocaine-N-Tg、ketamine-N-Tg とした .

c)

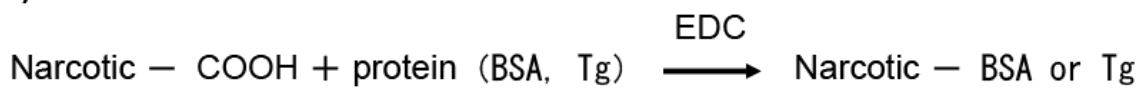


図 2-1 薬物 - タンパク質コンジュゲート体の合成 . c) 薬物とタンパク質のカ
ップリング . Compounds 2-6 とタンパク質キャリアとを
1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) によりカップリング
した .

2-3-2 ハイブリドーマ法による抗体作製

morphine-C'-BSA、morphine-N-Tg を免疫し、抗体価が上昇したマウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマの作製を行った。血清中の抗体価測定の結果、morphine-C'-BSA、morphine-N-Tg に対する抗体価が上昇していることを確認した (図 2-2)。細胞融合後の細胞を 1.0×10^5 細胞/ウェルの濃度で 96 ウェルプレートに播き HAT 培地中及び HT 培地中で培養後、細胞が生存したウェルの数より細胞融合効率 (%) を算出した (表 2-1)。Morphine-C'-BSA 抗原免疫の細胞融合効率は 14.6% と 2.6% であり低い結果となった。同時期に細胞融合を行ったその他の抗原については 54.9% - 96.8% であり、試薬 (血清、PEG) の影響、P3U1 の影響、マウス (脾臓、リンパ細胞を含む) の個体差の影響、人為的操作の影響、ではなく、抗原の性質に影響を受けていることが推測された。

スクリーニングを行った結果、morphine-C'-BSA 抗原免疫の場合は morphine-C-Tg に結合する陽性クローンは得られなかった。Morphine-N-Tg 抗原免疫の場合は、morphine-C-BSA に結合する 2 つのクローンが得られた (M17-2E12、M17-1E10)。ELISA 及びアイソタイピングの結果より M17-2E12 のクローニングを行い単クローン化した (MH1)。MH1 の交差反応性の評価を ELISA 及び競合 ELISA で行った結果、MH1 は morphine-N-BSA、morphine-C-BSA のみならず、codeine-C-BSA、cocaine-N-BSA、ketamine-N-BSA にも反応し、薬物の骨格に広く交差反応することが示された (図 2-3 a)。BSA 及び Tg には反応しないことより MH1 の認識部位はタンパク質部分でないことが示された。Morphine-N-BSA 及び morphine-C-BSA に対する反応性が同程度であることより MH1 の認識部位はタンパク質と薬物とのコンジュゲート部分ではないことが示された。また、morphine-C-BSA (図 2-3 b)、morphine-N-BSA (図 2-3 c) と薬物の競合 ELISA の結果より MH1 は本実験条件下においては薬物単体とは反応しないことが示された。

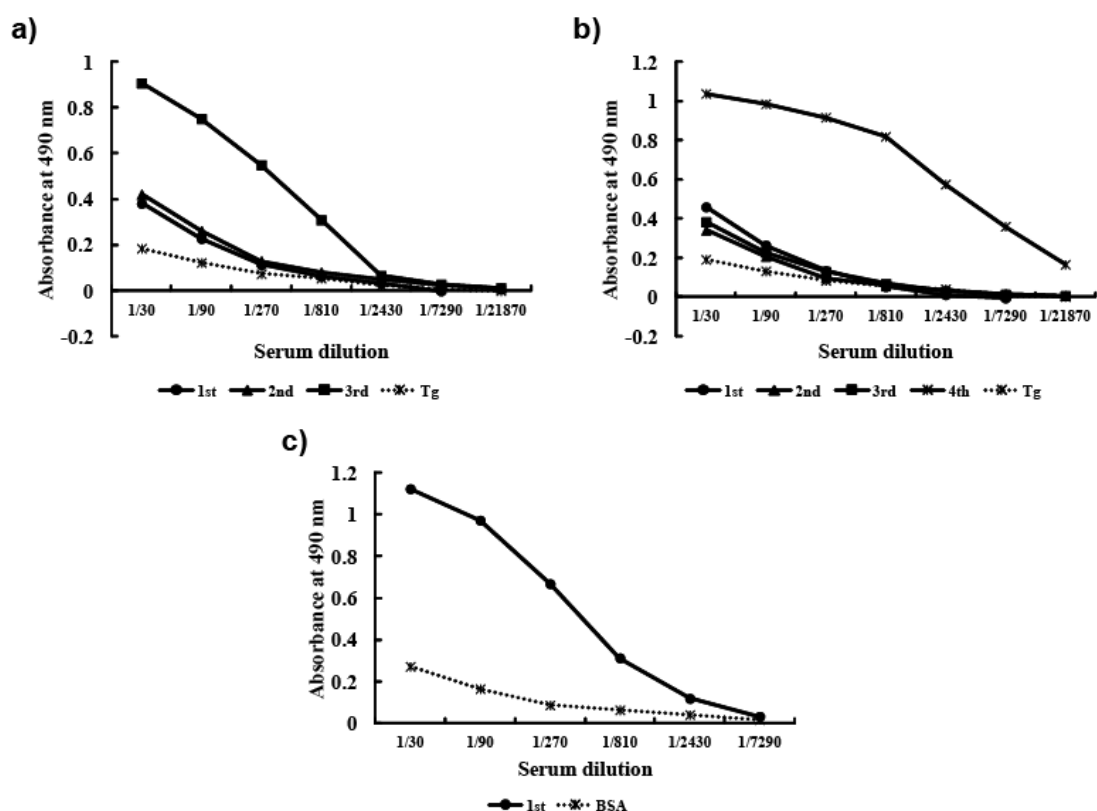


図 2-2 抗血清の評価 a) Morphine-C'-BSA 抗原免疫/1 回目の細胞融合に使用したマウスの抗血清 . b) Morphine-C'-BSA 抗原免疫/2 回目の細胞融合に使用したマウスの抗血清 . c) Morphine-N-Tg 抗原免疫の細胞融合に使用したマウスの抗血清 . morphine-C-Tg (a, b) morphine-N-BSA (c) Tg (a, b) BSA (c) を固定化した ELISA により評価した . 検出は HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:2500) 及び *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50set を用い、490 nm で測定した .

表 2-1 細胞融合効率 (%) .

免疫原	細胞融合効率 (%)
morphine-C' -BSA 1 回目	14.6
morphine-C' -BSA 2 回目	2.6
morphine-N-Tg	54.9
ketamine-N-Tg	98.6
cocaine-N-Tg	74.8

2-4 小括

Morphine-N-Tg抗原免疫の場合、morphine-C-BSAに結合するクローン、MH1が単離されたが、morphine構造類似体であるcodeine-C-BSA、およびmorphine非構造類似体であるocaine-N-BSA、ketamine-N-BSAにも交差反応性を示した。MH1の認識部位はタンパク質部分やタンパク質と薬物とのコンジュゲート部分ではないことが示され、morphineのみならずcodeine、cocaine、ketamineを含む薬物の骨格を広く認識することが示された。しかし競合ELISAの結果ではMH1はmorphine、codeine、heroin、cocaine、ketamineの全てと反応しなかった。以上の結果より、MH1は薬物 - タンパク質コンジュゲート体の薬物骨格には広く反応するが、薬物単体には反応しないことが示された。

Morphine-C'-BSA抗原免疫の場合は、細胞融合効率が非常に低く、その原因は抗原に起因していることが推測された。最終免疫から細胞融合までの日数が細胞融合効率及び抗体の性能（異なる部位を認識する抗体産生細胞の活性化による）に影響を及ぼすことが知られている[2-4]。Morphine-C'-BSA抗原免疫の場合は、最終免疫後3日後と5日後の脾臓を使用しそれぞれ細胞融合効率は14.6%と2.6%だった。一般的に抗原刺激を受けたB細胞は免疫後48 - 72時間後に細胞分裂を開始し、最終免疫後3 - 4日後にハイブリドーマ形成率が最高となると知られている。Morphine-C'-BSAのBSA（cationized BSA）は、プラスに荷電しており、その結果抗原提示細胞に対して高親和性であり通常のBSAに比較して高い抗体応答を誘導する。従って、morphine-C'-BSAを用いた場合、通常の抗体応答よりもはやく細胞融合に適した時期もはやい時期であった可能性も考えられる。ハイブリドーマ法で抗体作製を行う場合は、最終免疫から細胞融合までの日数の詳細な検討が必要である。

引用文献

1. Pelander, A.; Ojanper, I.; Hase, T. A. Preparation of N-demethylated drug metabolites for analytical purposes using 1-chloroethyl chloroformate. *Forensic Science International* **1997**, *85*, 193-198
2. Ando, T.; Generation of monoclonal antibody. In *Manual of monoclonal antibody experiments*; Toyama, S., Ando, T., Eds.; Kodansya Co.: Tokyo, Japan, 1987; pp 8-85.
3. Lovborg, U. Production and maintenance. In *Monoclonal Antibodies*; William Heinemann Medical Books: London, Great Britain, 1982; p.6.
4. Gerhard, W. Monoclonal antibodies to influenza virus. In *Monoclonal Antibodies*; Kennett, R. H., Bechto, K., Eds.; Plenum Press: New York, United States of America, 1980; p.317-333.

第 3 章

ファージディスプレイ法を用いたモルヒネ特異的一本鎖抗体(single chain Fv, scFv)の単離とその特異性の評価

3-1 小序論

ファージディスプレイ法により morphine を認識する抗体の作製を試みた。第 2 章ではハイブリドーマ法では抗 morphine 抗体の単離を行うことができなかった。第 1 章で述べたように、抗体の多様性が確保された抗体ライブラリを利用することにより、morphine を認識する抗体、さらには morphine と非常に構造が類似した codeine とを識別する抗体の作製を試みた。

3-2 材料と方法

3-2-1 免疫及び抗体価の評価

BALB/cCrIcrlj、メス、7 週令 (n = 3) に morphine-C'-BSA の免疫を行った。初回免疫には Adjuvant, Complete(Freund)との 1 : 1 (体積) 混合物の 100 μ l を腹腔に投与、2 - 5 回目の追加免疫には Adjuvant, Incomplete(Freund)との 1 : 1 (体積) 混合物の 100 μ l を腹腔に投与した。2 週間の間隔で抗体価が十分に上昇するまで免疫を行った。最終免疫の 3 日後の脾臓細胞を使用した。抗体価の評価は眼窩 静脈叢採血法により採取し調整した血清を用いて ELISA により評価した。

3-2-2 抗 morphine 免疫 scFv ファージライブラリの構築

抗 morphine 免疫 scFv ファージライブラリの構築は Burmester 等[1]の方法に従った。BALB/cCrIcrlj の脾臓よりリンパ球細胞を回収し、20 μ g の morphine-C-Tg を固定化したディッシュに 30 分反応させ、morphine-C-Tg に結合する morphine moiety-reactive リンパ球細胞を選択した。

Morphine moiety-reactive リンパ球細胞より ISOGEN (NIPPON GENE CO., LTD.) により RNA を抽出し、First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) により cDNA を作製した。これよりマウス抗体遺伝子特異的プライマーにより VH 断片・VL 断片の作製を行った。プライマーは Burmester 等[1]より報告されているプライマー配列を基本として以下の点について改良したプライマーを使用した。DNA 断片順序の変更 (5'-SfiI

site-VL-linker-VH- *Sfi*I site-3' から 5'-*Sfi*I site-VH-linker-VL-*Spe*I site-3'へ変更し、FLAG Tag の除去である。VH 遺伝子増幅のフォワードプライマーは 19 本、リバープライマーは 4 本、Vk 遺伝子増幅のフォワードプライマーは 17 本、リバープライマーは 3 本であり、Vλ 遺伝子のフォワードプライマーは 1 本、リバープライマーも 1 本である。これらのプライマーを用いてそれぞれの組合せにおいて PCR を行った。VH 断片・VL 断片はアガロースゲルにより目的断片を分離し、DEAE ペーパーにて抽出・精製を行い調整した。精製した VH、VL 断片を overlapping-PCR により連結させ VH-(Gly₄Ser)₃ リンカ - VL から構成される scFv とした。ScFv と pCANTAB5E ファージミドベクターとを 50 ~ 100 unit の *Sfi*I (New England Biolabs Inc.) の 50 、8 時間、50 unit の *Spe*I (New England Biolabs Inc.) の 37 、オーバーナイトで制限酵素消化後、アガロースゲルにより目的断片を分離し、DEAE ペーパーにて抽出・精製を行い制限酵素消化済みの断片を調整した。ScFv と pCANTAB5E ファージミドベクターとをモル比で 3.8 : 1 の割合で 200 unit の T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc.) により 16 、オーバーナイトでライゲーションした。ライゲーション産物を精製後、*E. coli*. TG1 Electrocompetent Cells (Lucigen Corporation) に 2.0mm cuvette、25 μF、200 、25 KV の条件で BIO-RAD GENE PULSER[®] (Bio-Rad Laboratories) によりエレクトロポレーションした。400 mL の 2TYAG (Bacto Tryptone 1.6%、Bacto Yeast Extract 1.0%、NaCl 0.5%、Glucose 2.0%、Ampicillin 0.01%) 培地にてオーバーナイトで培養しライブラリとした。

ライブラリの多様性は以下の方法により決定した。増幅操作を施していない 10 ショット分の形質転換済みの TG1 cells の少量を 2TYAG プレートに播き Ampicillin-耐性クローン数をライブラリの多様性 (cfu/ml) とした。また、これらの Ampicillin-耐性クローンよりランダムにクローンを選択し、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA 配列の解析を行った。

3-2-3 ScFv提示ファージのレスキュー

ScFvを提示ファージのレスキューはHashiguchi等[2]の方法に従った。ファージミドが感染した *E. coli*. TG1 cells を 2TYAG で 37 で OD600 = 0.4-0.5 になるまで培養し、10¹¹ cfu (final conc. 10⁹ cfu/ml) の M13 KO7 helper phage を重感染させた。感染後、2TYAG (Kanamycin 0.005%) 培地に交換しオーバーナイトで培養した。遠心後上清中に含まれるファージ粒子を 20% polyethylene glycol (PEG)/2.5 M NaCl で沈殿させ精製した。精製したファージは PBS に懸濁させた。

3-2-4 パンニング

1 μg の morphine-C-Tg/0.1 M NaHCO₃ をイムノチューブに室温で一晩反応させて固定化した。次いで、1.0 % blockace で 2 時間ブロッキングした後、0.1 % Tween20-PBS (PBST) で 3 回洗浄した。これに、ファージライブラリーを 0.55 mL

(1.2×10^{12} cfu/1.0%Tg, 1.0%BSA溶液) 加え、反応させた。

次に、イムノチューブを、PBSTで10回、PBSで5回洗浄した後、0.5 mLのグリシン緩衝液 (pH 2.2) を加え、morphine-C-Tgと結合するscFv提示ファージを溶出した。溶出したファージに、1 M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, (pH 9.0) を加えてpHを調製した後、対数増殖期の *E. coli*. TG1 cellsに感染させた。感染後の少量のTG1を2TYAGプレートに播き、30 で一晩培養した (1st パンニング)。残りのTG1を2TYAGで30 、一晩培養し、1stパンニング済みのライブラリとし、2ndパンニング、3rdパンニングと、上記操作を繰り返した。

前述のmorphine-C-Tg固定化プレートを用いてパンニングを計3回行った。2回目、3回目のパンニング後に、2TYAGプレートから任意にクローンを抽出し、scFvの発現の確認及びmorphine-C-Tgに対するELISAによる特異性の確認 (スクリーニング) と塩基配列の解析とを行った。

3-2-5 抗morphine scFv の発現の検討

可溶性scFvの調整はHashiguchi等[2]の方法に従った。morphine-C-Tgに反応するファージクローン (No.9, 33, 38, 86, 95, 101) を *E. coli* HB2151に感染させた。SOBAG-Nプレート (Bacto Tryptone 2%、Bacto Yeast Extract 0.5%、NaCl 0.05%、KCl 終濃度2.5 mM、MgCl₂ 終濃度10 mM、Glucose 2.0%、Ampicillin 0.01%、NaI 終濃度125 µg/ml、Agar 1.5%) に播き30 で一晩培養後、シングルコロニーを2TYAG培地で30 で一晩前培養した。この前培養の一部を2TYAGに移植し、37 でOD600 = 0.4-0.5になるまで培養した。これを遠心後2TYAI培地 (終濃度1 mM IPTG、0.01%のAmpicillin) に交換して更に25 で12時間培養してscFvの発現誘導を行った。培養終了後、遠心にて培養上清画分と菌体画分とをそれぞれ回収した。菌体画分は1 mM EDTAを含むPBSに懸濁して氷中に30分菌体を放置した。次いで15000 × rpmで10分間遠心し、上清を回収して、ペリプラズム画分とした。さらに沈殿物に対してはPBSで懸濁後5分間ボイルし15000 × rpmで5分間遠心した後の上清を細胞質画分とした。30 培養で上記方法で調整したそれぞれの画分の発現量をドットプロットにて解析した。

ドットプロットは培養上清画分、ペリプラズム画分、細胞質画分をImmobilon-P (Millipore) にプロットイングし、1.0%blockaceでブロッキング後、5 µg/mlの抗E-tag モノクローナル抗体 (Abnova)、二次抗体として1 : 2000希釈のHRP標識ヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体を反応させた。検出試薬はChemi-Lumi One (Nacalai Tesque Inc.) を使用し、LAS1000 (FUJIFILM) で検出した。

3-2-6 M86の発現及び精製

クローンNo.86 (M86) を、HisTrap HP column (GE Healthcare) を用いて、

常法に従って精製した。溶出は20 mM sodium phosphate、500 mM NaCl、500 mM imidazole、pH 7.4で行った。PBSで透析後、SDS-PAGEで確認を行った。さらにSuperdex 75 10/300 GL(GE Healthcare)を用いて精製を行い100 μ lずつに分画した。溶離液はPBS、流速0.4 ml/minの溶離条件で行った。分子量マーカーとしてBSA及びOvalbuminの解析を行った。

3-2-7 SDS-PAGE、Western blotting

SDS-PAGEは15%ゲル、20 mA、1時間、還元及び非還元条件のもとで行った。染色はSimplyBlue SafeStain (Invitrogen) もしくは銀染色SilverStain kit (Wako) を使用した。

Western blottingはHashiguchi等[2]の方法に従った。15%ゲルで還元及び非還元条件のもとSDS-PAGEを行いゲルをImmobilon-Pに転写した。検出は抗E-tagポリクローナル抗体 (Kamiya Biomedical Company) とHRP標識ヤギポリクローナル抗ラビットIgG (H + L) 抗体 (Thermo Scientific) により行った。検出試薬はChemi-Lumi Oneを使用しLAS-1000で検出した。

3-2-8 ELISA

ELISAはHashiguchi等[2]の方法に従った。50 ng/50 μ lのハプテンタンパク質コンジュゲート体及びタンパク質をELISAプレートに入れ室温で一晩静置し固定化した。1.0% blockace溶液200 μ l/ウェルをELISAプレートに入れ室温で2時間静置しブロッキングを行った。

血清における抗体価の評価は、morphie-C-Tgを50 ng/50 μ l/ウェルで固定化し、50 μ lの段階希釈した血清サンプルを2時間反応させた。洗浄後、50 μ lのHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体(1:2500)を30分反応させた。洗浄後、100 μ lのo-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50setを30分反応させ、50 μ lの2 M (10%) H₂SO₄により反応を停止し、EnSpire 2300 Multilabel Readerにより490 nmで測定した。

ScFv提示ファージ検出においては、scFv提示ファージを含む試料液50 μ l/ウェルを入れて2時間室温で反応させた後、50 μ lの1:1000希釈した抗M13モノクローナル抗体 (GE Healthcare) を一次抗体として1時間反応させ、50 μ lの1:1000希釈したAlkaline Phosphatase (AP) 標識抗マウスIgG (H + L) 抗体 (Jackson Immuno Research) を二次抗体として30分反応させた。発色基質液 (1 g/ml p-nitrophenyl phosphate、10%ジエタノールアミンを含む溶液) を50 μ l/ウェル入れ、遮光し、室温で発色させ405 nmの吸光度を測定した。

可溶性scFvの検出においては、希釈したscFvを含む試料液50 μ l/ウェルを入れて2時間室温で反応させた後、50 μ lの1:1000希釈した抗E-tagポリクローナル抗体を一次抗体として1時間反応させ、50 μ lの1:1000希釈したHRP標識ヤギポリクローナル

抗ラビットIgG (H + L) 抗体を二次抗体として30分反応させた。100 μ lの α -phenylene diamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50setを30分反応させ、50 μ lの2 M (10%) H₂SO₄により反応を停止し、490 nmで測定した。

MOP-7 (マウス 抗-morphine IgG: sc-69864; Santa Cruz Biotechnology) の検出においては、1:5000希釈したMOP-7を含む試料液50 μ l/ウェルを入れて2時間室温で反応させた後、二次抗体として50 μ lの1:2500希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgGを使用した以外は可溶性scFvの検出と同様の操作を行った。

競合ELISAにおいては、希釈した薬物溶液と希釈したscFv溶液とをあらかじめ混合しELISAプレートに入れた以外は可溶性scFvの検出と同様の操作を行った。

3-2-9 配列解析 (遺伝子配列解析、CDR領域解析、gene usage解析)

単離したクローンのscFv遺伝子のDNA塩基配列をApplied Biosystems 3130xl Genetic AnalyzerとBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて決定した。遺伝子配列解析はGenetyx ver. 8. software(Genetyx Corporation)を用いた。得られた遺伝子配列よりアミノ酸配列を推測した。得られたアミノ酸配列はKabat format [3] に従い、相補性決定領域1-3 (CDR1-CDR3)、フレームワーク領域 (FR1-FR4) の解析を行った。ScFv遺伝子配列は IMGT/V-QUEST database を用いてgene usageの解析を行った。

3-2-10 M86のSPRによる速度論的パラメーターの算出

BIAcore X100 system (GE Healthcare, Princeton) により測定した。CM5センサーチップ (Amersham Biosciences) にmorphine-C-Tg (20 μ g/ml、10 mM sodium acetate buffer, pH 4.0) を固定化した。1 M ethanolamine-HCl (pH 8.5) でブロッキングを行った。Association reactionは62.5 ng/ml、125 ng/ml、250 ng/ml、500 ng/ml、1000 ng/mlのM86を反応させ測定した。流速は30 μ l/minで行った。Dissociation reaction はHBS-EP buffer (0.01 M Hepes、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% v/v surfactant P20、pH 7.4) により測定した。0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.5) で再生を行った。解析はBIAcore system software (BIAcore X100 evaluation software) の1:1 binding model を用いて association constant (k_a , M⁻¹s⁻¹)、dissociation constant (k_d , s⁻¹)、 K_d (M)を算出した。

3-2-11 コンピューターシミュレーションによる構造解析

Molecular Operating Environment (MOE) software (Chemical Computing Group Inc.) [4]により全てのコンピューターシミュレーション解析を行った。抗morphine抗体のうち唯一のX線構造解析データであるanti-morphine antibody 9B1 (PDB ID: 1Q0Y) [5]をテンプレートとしてホモロジーモデリングを行った。モデリングにはMMFF94s

force field、generalized Born salvation model を使用した。モデリングしたM86 に対する、morphine, codeine, heroin, ketamine, cocaineとのドッキングシュミレーションをASEDock program (Ryoka Systems Inc.) [6]により以下の方法で行った。() 水素原子の付与 ; () MMFF94s force field によるエネルギー極小化計算及び最安定構造の検索 ; () MOE Alpha Site Finder によるM86の抗原結合部位の検索及び最適な部位におけるダミー原子の配置 ; ()Morphine, codeine, heroin, ketamine, cocaineの配座解析済みのデータとのドッキングシュミレーション。UdockスコアによりM86 - 薬物複合体の相互作用の評価を行った。

3-3 結果

3-3-1 抗 morphine immune scFv library の構築

抗 morphine immune scFv library の構築は、当研究室により改変済みの pCANTAB5E phagemid vector を用いて図 3-1 に示すスキームで作製した（図 3-1）。

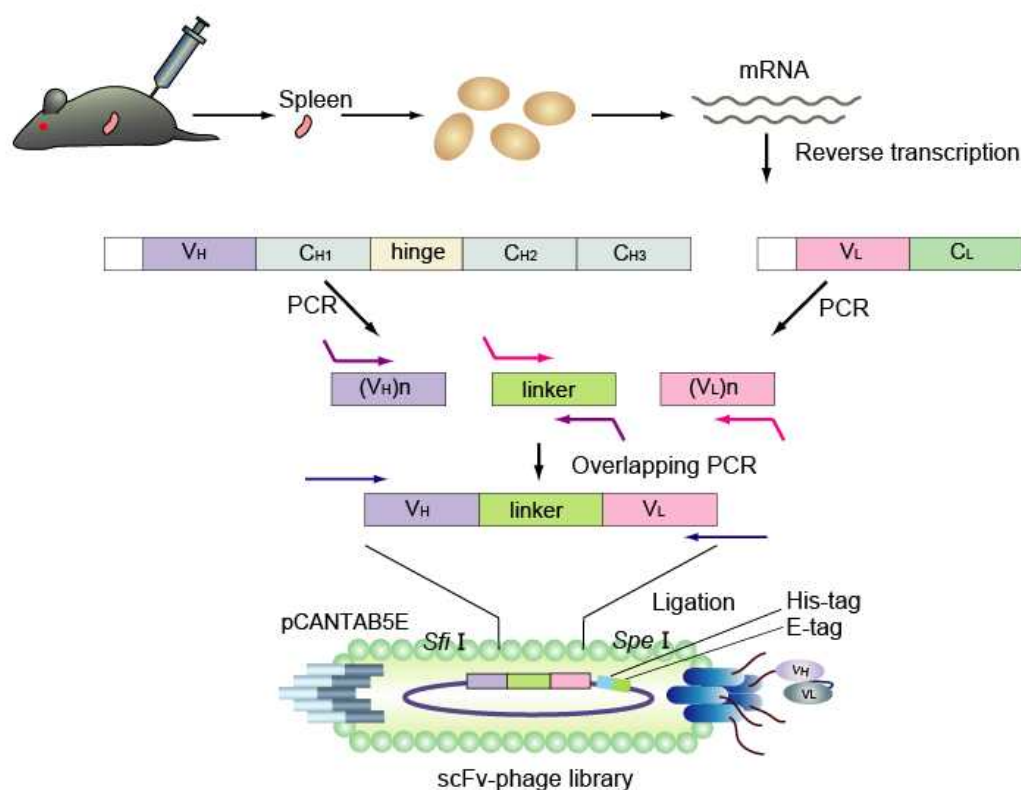


図 3-1 抗 morphine immune scFv library 構築スキーム図． Morphine-C'-BSA を BALB/cCrIcrlj に免疫し脾臓中の morphine-C-Tg-reactive リンパ球細胞より mRNA を抽出した．これより PCR により V_H 断片・V_L 断片及び scFv 断片を作製し改変済み pCANTAB5E phagemid vector にライゲーション、*E. coli* TG1 にエレクトロポレーションしライブラリとした．

抗原 Morphine-C'-BSA の BALB/cCrIcrIj への 5 回の免疫後、血清の抗体価の評価を行った。Morphine-C-Tg、morphine-N-Tg に対して結合活性を有する抗体が含まれていることが示された。またそれらは codeine-C-Tg、Tg に対する交差反応性は小さいことが示された (図 3-2)。

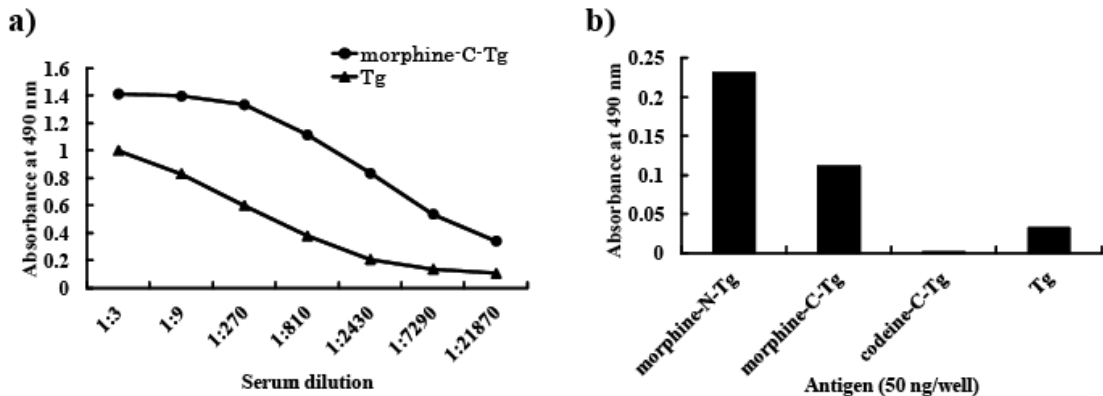


図 3-2 抗血清の評価 a) 抗血清は morphine-C-Tg に優位に反応する . b) 抗血清は morphine-moiety を特異的に認識している . morphine-C-Tg、morphine-N-Tg、codeine-C-Tg、Tg を固定化した ELISA により評価した。検出は HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:2500) 及び *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma FAST) 50set を用い、490 nm で測定した。

本研究では、morphine 特異的な scFv を作製するために、異なるタンパク質とコンジュゲートしたコンジュゲート体、異なる部位でタンパク質とコンジュゲートしたコンジュゲート体、異なる薬物とコンジュゲートしたコンジュゲート体とを表 3-1 に示すように適切に使用した (表 3-1)。

表 3-1 抗モルヒネ scFv 単離のための薬物コンジュゲート体使用における戦略。括弧内で記した実験操作において、コンジュゲート体を適切に使用した。

C-conjugates		N-conjugates	
-BSA	-Tg	-BSA	-Tg
morphine-C'-BSA (Immunization)			
morphine-C-BSA (ELISA evaluation)	morphine-C-Tg (cell selection) (panning) (screening) (ELISA evaluation)	morphine-N-BSA (ELISA evaluation)	morphine-N-Tg (ELISA evaluation)
	codeine-C-Tg		cocaine-N-Tg ketamine-N-Tg

BALB/cCrIcrlj の脾臓より morphine-C-Tg-reactive リンパ球細胞をセクションし、マウス抗体遺伝子特異的プライマー（表 3-2）を用いて VH 断片・VL 断片の作製を行った。本プライマーで増幅可能である全ての IMGT subgroup の遺伝子群が作製された（図 3-3）。VH 断片・VL 断片及び VH-(Gly₄Ser)₃ リンカ - -VL (scFv) 断片において、それぞれ目的の大きさの遺伝子断片（VH 断片 = 386-440 bp； VL 断片 = 375-402 bp； scFv 断片 = 761-842 bp）が増幅されていた（図 3-3 b）。

表 3-2 マウス抗体遺伝子特異的プライマー .VH 遺伝子増幅は 19 種類の VH フォワードプライマー（HB）と 4 種類の VH リバースプライマー（HF）を用いた。V_κ 遺伝子増幅は 17 種類の V_κ フォワードプライマー（LB）と 3 種類の V_κ リバースプライマー（LF）。V_λ 遺伝子増幅は 1 種類の V_λ フォワードプライマー（LB_λ）と 1 種類の V_λ リバースプライマー（LF_λ）を用いた。それぞれのプライマーに対応した IMGT subgroup で示される遺伝子群が増幅される。

Heavy Chain		Light Chain	
Primers	IMGT subgroup	Primers	IMGT subgroup
HB1	IGHV3	LB1	
HB2	IGHV1, IGHV14	LB2	
HB3	IGHV2	LB3	IGKV5
HB4	IGHV1	LB4	IGKV3
HB5	IGHV1	LB5	IGKV6, IGKV8
HB6	IGHV1	LB6	IGKV12
HB7		LB7	IGKV12
HB8	IGHV5, IGHV7	LB8	IGKV10
HB9	IGHV5, IGHV7	LB9	
HB10	IGHV5, IGHV16	LB10	IGKV3
HB11		LB11	IGKV6, IGKV8
HB12	IGHV7	LB12	IGKV1
HB13	IGHV10	LB13	IGKV2, IGKV5, IGKV6, IGKV7, IGKV8
HB14	IGHV4	LB14	IGKV2
HB15	IGHV6	LB15	
HB16	IGHV8	LB16	
HB17	IGHV1	LB17	
HB18		LB _λ	IGLV1
HB19			
HF1	IGHJ1	LF1	IGKJ1, IGKJ2
HF2	IGHJ2	LF4	IGKJ4
HF3	IGHJ3	LF5	IGKJ5
HF4	IGHJ4	LF _λ	IGLJ1

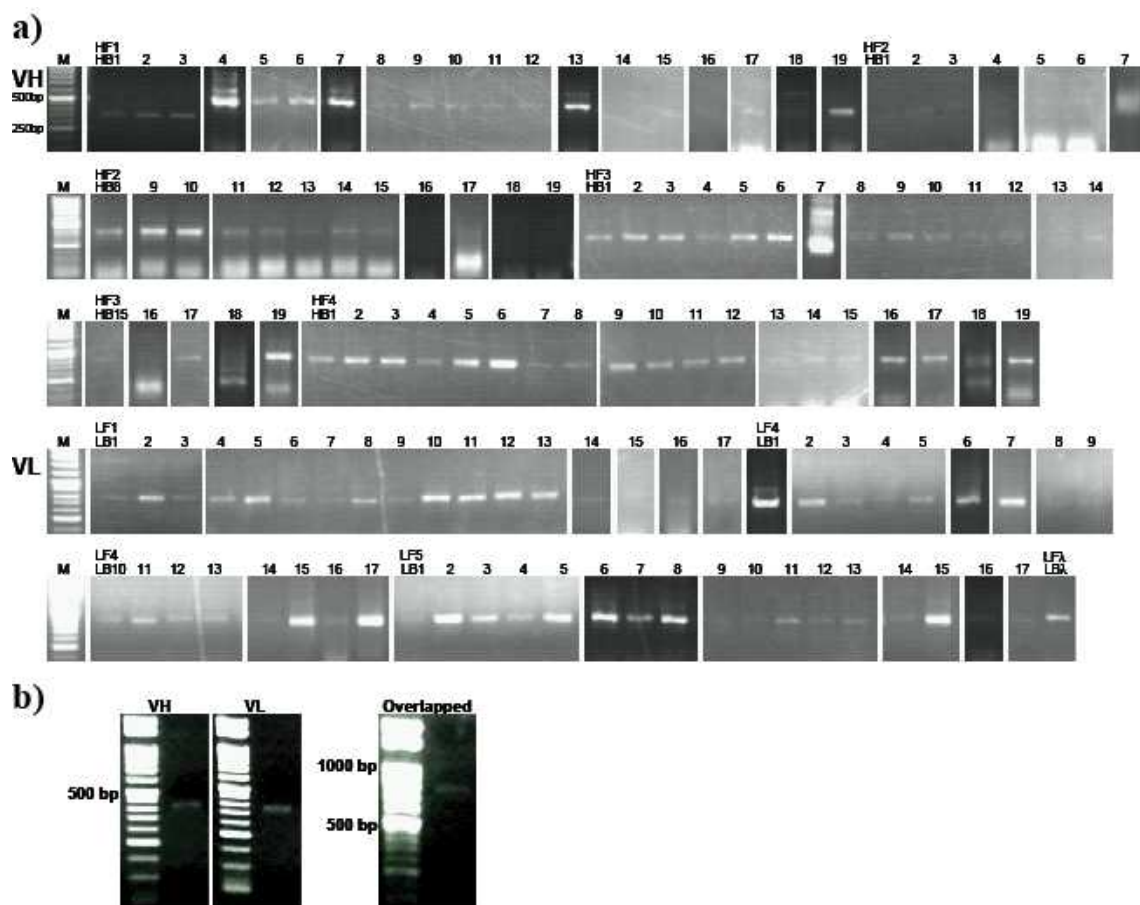


図 3-3 マウス脾臓由来リンパ球細胞からのPCRによる抗体V遺伝子ファミリーの増幅．a) VH 遺伝子及び VL 遺伝子の増幅．b) VH 断片、VL 断片、scFv 断片．PCR 増幅産物は 2%アガロースゲル電気泳動で解析した．HF1-4 は VH 遺伝子増幅のリバースプライマー、HB1-19 は VH 遺伝子のフォワードプライマー、LF1-5 は V_{κ} 遺伝子増幅のリバースプライマー、LB1-17 は V_{κ} 遺伝子増幅のフォワードプライマー、LF λ と LB λ は V_{λ} 遺伝子増幅のリバースプライマーとフォワードプライマー．PCR 増幅産物の大きさは計算値と一致した．

pCANTAB5E phagemid vector(図 3-4 a)の His-tag を挿入した改変済みの pCANTAB5E phagemid vector (図 3-4 b) と scFv 断片は、制限酵素 *Sfi*I、*Spe*I により制限酵素消化を行った後、モル比で 3.8 : 1 の条件でライゲーションを行い精製後、10 ショットのエレクトロポレーションを行い、 1.1×10^8 diversity のライブラリを構築した。

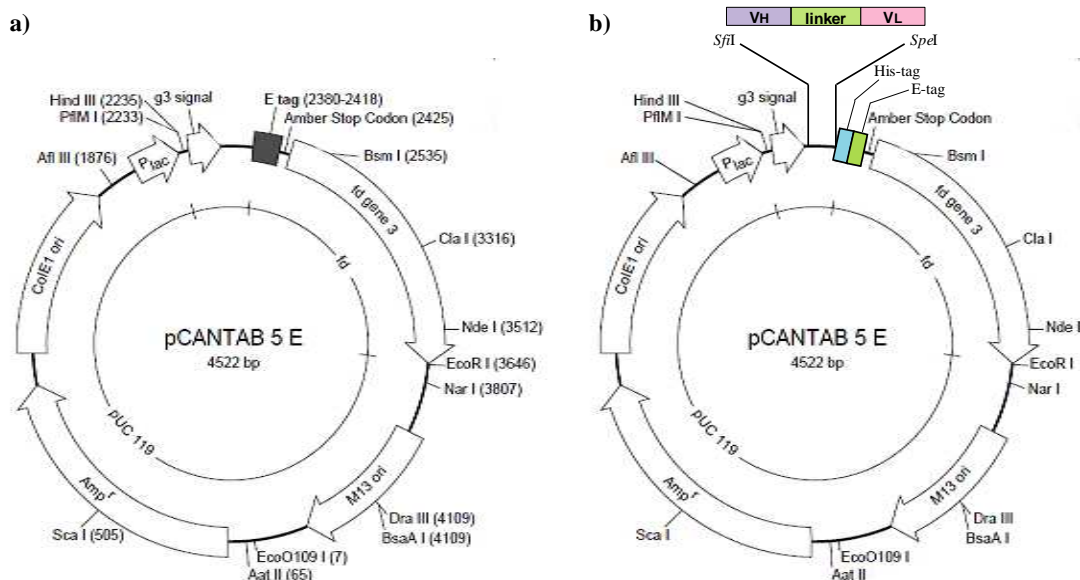


図 3-4 pCANTAB5E phagemid vector a)改変前 b)改変後 .新たに His-Tag が挿入されている .

E-tag 検出による ELISA 評価により、ランダムに選択したクローンのうち 70%が scFv-g3p を提示していることが示された。また DNA 配列解析においては、63 クローン解析した結果、45 クローンが全長 scFv を有しており、それらの配列は全て異なる配列だった (表 3-3)。

表 3-3 DNA 配列によるライブラリの評価 .

Diversity (cfu)	1.1X10 ⁸
Total number of seq.	63
Full-length ORF	45
stop -codon including deletions	0
self -ligation	6

3-3-2 パンニング

3回のパンニングを行った。パンニングの回数とともにmorphine-C-Tgに結合するscFv提示ファージが濃縮されていることが示された。3rdパンニングでは1stパンニングに比較しmorphine-C-Tg-reactiveファージが1000倍に濃縮されていた（表3-4）。

表 3-4 Morphine-C-Tg-reactiveファージの濃縮 .

Selection round	Input ^a	Recovery ^a	Yield ^b (10 ⁻⁴ %)	Amplified ^a
1	1.2×10^{12}	6.9×10^3	0.0058	1.2×10^{13}
2	7.4×10^{11}	1.6×10^5	0.22	7.4×10^{12}
3	3.7×10^{11}	1.7×10^6	4.5	3.7×10^{12}

^a Phage inputs、recoveries、amplified はファージを *E.coli* TG1に感染させ2TYAGプレートに播いた後のAmpicillin- 耐性クローン数より算出した（cfu/ml）。

^b Yield はoutput phage number / input phage number × 100 により算出した。

3-3-3 スクリーニング

評価した256クローンうち6個のクローン (No.9、33、38、86、95、101) が、morphine-C-Tgに特異的に結合することが確認された (図3-5)。

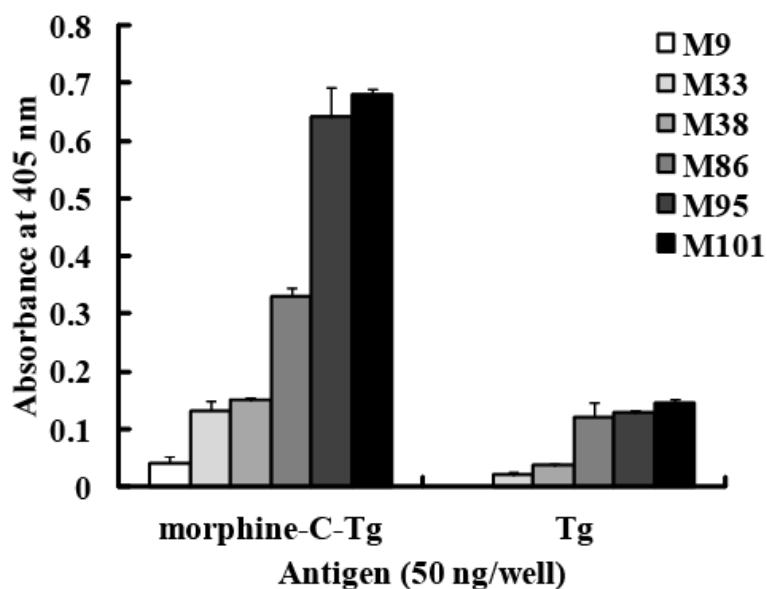


図 3-5 Morphine-C-Tgに結合するファージクローン . Morphineに特異的に反応する6つのファージクローンが単離された (M9、M33、M38、M86、M95、M101) . Morphine-C-Tg、Tgを固定化したELISAにより評価を行った . 検出は抗M13モノクローナル抗体とAP標識ヤギポリクローナル抗マウスIgG (H + L) 抗体を用いた . M9、M33、M38は2ndパンニング由来のクローンでありM86、M95、M101は3rdパンニング由来のクローンである .

3-3-4 クローンの配列解析（遺伝子配列解析、CDR 領域解析、gene usage 解析）

単離したクローンは全て同一のクローンだった。次項の発現の検討の結果を考慮し最も発現量の多かった M86 を今後の解析に用いた。アミノ酸配列より分子量は 29308.33 と算出された。また CDR 領域の推定及び gene usage の推定を行った（図 3-6）。M86 は VH5 gene family に属する germline gene IGHV5-6-4*01、IGHV5-9*02、IGHV5-9-1*01、IGHV5-9-3*01、IGHV5S9*01 に相同性が高く V κ 3 gene family に属する IGKV3-4*01 に相同性が高いことが示された（図 3-6 b）。

a)

```

FR1          CDRH1          FR2          CDRH2          FR3
M86  DVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTSS SYAMS WVRQSPKRLWEWA SISGGSTYYPDSVKG RFTISRDNARNNLYLQMSSLRSEDAMYYCVR

CDRH3          FR4
M86  EDYHGSSYWYFDV WGAGTTVTVSS

FR1          CDRL1          FR2          CDRL2          FR3
M86  DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC KASQSVDYDGDSYMN WYQKPQGPPKLLIY AASNLES GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC

CDRL3          FR4
M86  QQSNEDPWT FGGGTKLEIKR

```

b)

Heavy chain			Light chain	
V	D	J	V	J
IGHV5-6-4*01 (96.1)	IGHD1-1*01 (82.4)	IGHJ1*02 (94.2)	IGKV3-4*01 (99.7)	IGKJ1*01 (100)
IGHV5-9*02 (96.1)				
IGHV5-9-1*01 (96.1)				
IGHV5-9-3*01 (96.1)				
IGHV5S9*01 (96.1)				

図 3-6 M86 のアミノ酸配列及び gene usage . a) VH、VL ドメインのアミノ酸配列 . DNA 配列より Genetyx ver. 8 を用いてアミノ酸配列に翻訳した . Kabat 等[3]のナンバリングに従い CDR1–CDR3、FR1–FR4 を推定した。CDR 領域はボールドで示している . b) Gene usage . Germline gene usage は germline V genes の IMGT database に対するホモロジー検索により推定した . 括弧内の数字は相同性を示している .

3-3-5 抗 morphine scFv の発現と精製

全てのクローン (No.9、33、38、86、95、101) において scFv はペリプラズム画分に多く発現していたことを確認した (図 3-7)。

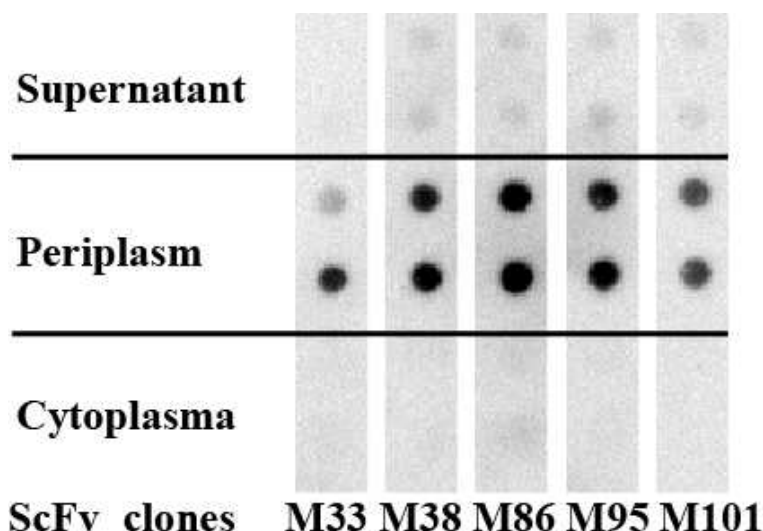


図 3-7 可溶性 Morphine-reactive scFv の発現検討 . Morphine-reactive ファージクローンを *E.coli* HB2151 に感染させ、1 mM IPTG 発現誘導後 12 時間 30 ° で培養した . 培養上清画分 (Supernatant) 、ペリプラズム画分 (Periplasm) 、細胞質画分 (Cytoplasm) を調整後、ドットプロットによる検出を行った . 検出は 1 次抗体として抗 E tag モノクローナル抗体、2 次抗体として HRP 標識ヤギポリクローナル抗マウス IgG 抗体を使用し Chemi-Lumi One 及び LAS1000 により可視化した .

3-3-6 M86 の発現及び精製

M86 scFv は HisTrap アフィニティクロマトグラフィーに引き続き Superdex 75 size exclusion クロマトグラフィーにより精製を行った (図 3-8) . SDS-PAGE より 3 つの異なる大きさの分子が含まれていることが示された (図 3-8 c) . M86 の morphine-C-Tg に対する結合活性は全長 scFv であると推測される 30 kDa のバンドと相関性が示された (図 3-8 b, c) . Western blotting においても 30 kDa のバンドのみが E-tag-ポジティブであった (図 3-8 d) . 従って、M86 の 30 kDa の分子種についての特性の評価を、抗 E-tag 抗体及び ELISA により解析した .

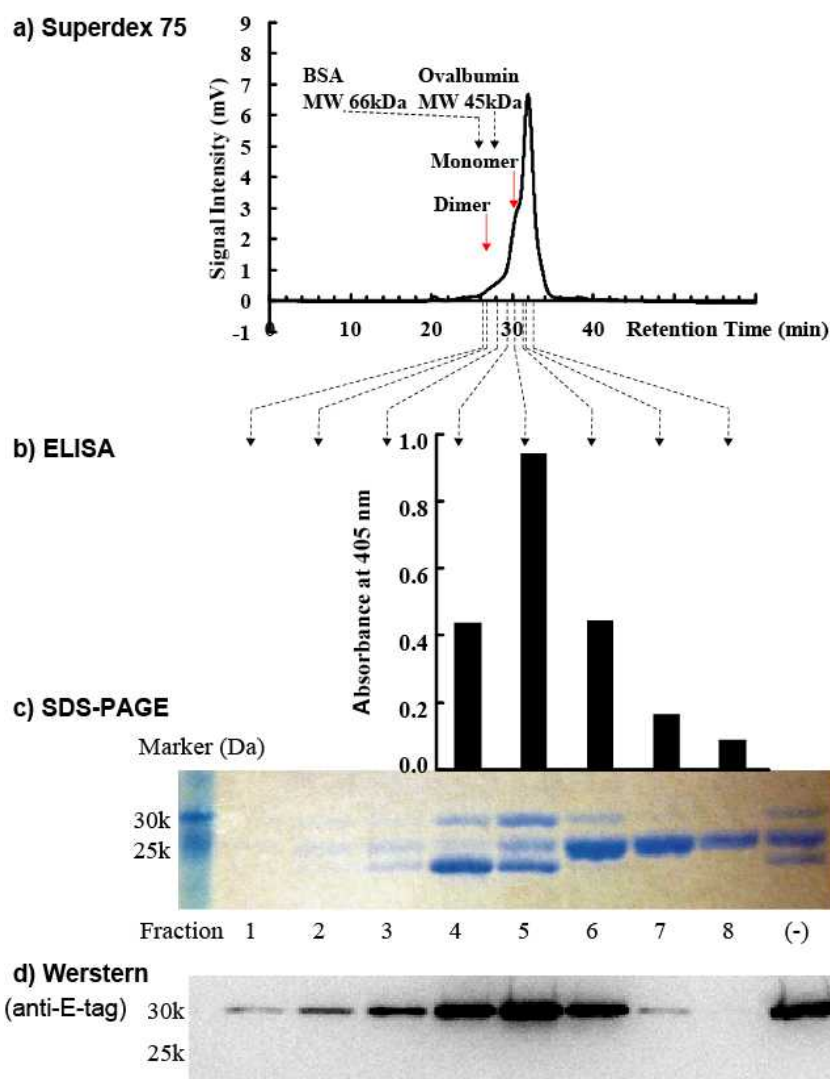


図 3-8 M86 scFvの発現・精製 . a) Size-exclusion HPLCクロマトグラフィ . HisTrap HPで精製したM86をSuperdex 75 10/300 GLにより100 μ lずつ分画した . 赤矢印はM86のダイマー画分、モノマー画分を示す . 点線は分子量マーカーであるBSAとOvalbuminの溶出位置を示す . **b) ELISA .** フラクシオン4-8をmorphine-C-Tgを固定化したELISAプレートにアブライした . 検出は抗E-tagポリクローナル抗体及びHRP標識ヤギポリクローナル抗ラビットIgG (H + L) 抗体で行った . **c) SDS-PAGE .** フラクシオン1-8とHisTrap HPのみで精製したサンプル(-)を還元条件下のもとでSDS-PAGE (15%)を行った . **d) Western blotting .** フラクシオン1-8とHisTrap HPのみで精製したサンプル(-)を還元条件下のもとでSDS-PAGE (15% gel)を行いPVDF膜にブロッティングした . 検出は抗E-tagポリクローナル抗体及びHRP標識ヤギポリクローナル抗ラビットIgG (H + L) 抗体で行った . Chemi-Lumi One及びLAS1000により可視化した .

3-3-7 M86はmorphine-タンパク質コンジュゲート体のmorphine部位を特異的に認識する。

Morphine 及び morphine 類似化合物に対する M86 の結合活性について、タンパク質コンジュゲート体を用いて検討した (図 3-9)。M86 は morphine-C-BSA、morphine-C-Tg には結合するが BSA、Tg には結合しない (図 3-9 a)。M86 は codeine-C-Tg、ketamine-N-Tg、cocaine-N-Tg には結合しない (図 3-9 b)。また、M86 は M86 濃度依存的に morphine-C-Tg に結合するが、codeine-C-Tg には結合しない (図 3-9 b)。これらのことより M86 は morphine moiety を特異的に認識しタンパク質部位やタンパク質コンジュゲーション部位を認識しないことが示された。また、タンパク質コンジュゲート体を用いる限りでは、M86 は morphine の 3 位のヒドロキシル基の付近を認識することが推測された (図 3-9 b)。

M86 の morphine moiety に対する結合様式を解明するために、C conjugates (morphine-C-BSA、morphine-C-Tg) と N conjugates (morphine-N-BSA、morphine-N-Tg) を用いて解析を行った (図 3-9 c)。M86 は C conjugates に対しては高い結合活性を有し、それに比較し N conjugates に対しては低い結合活性であった (図 3-9 c)。市販品の抗モルヒネ抗体 (MOP-7) の場合は C conjugates、N conjugates に対して同程度の結合活性であった (図 3-9 c)。これらの結果より M86 は morphine の 3 位のヒドロキシル基の付近のみならず、ピペリジン環の窒素原子付近も認識していることが推測された。

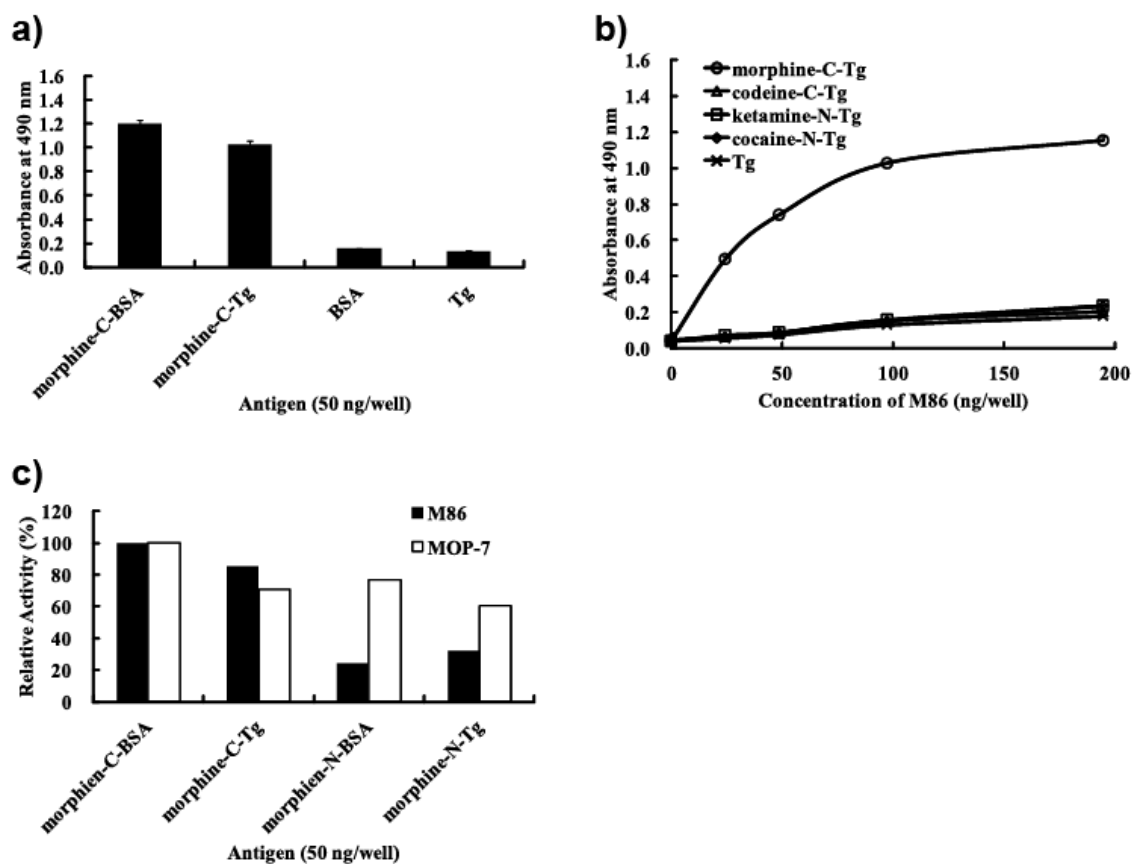


図 3-9 M86 結合特異性 .タンパク質コンジュゲート体を固定化した ELISA により結合活性の評価を行った。検出は抗 E-tag ポリクローナル抗体及び HRP 標識ヤギポリクローナル抗ラビット IgG (H + L) 抗体で行った。a) M86 は特異的に morphine moiety を認識しキャリア - タンパク質を認識しない。b) M86 は濃度依存的に morphine-C-Tg に結合するが codeine-C-Tg、ketamine-N-Tg 及び cocaine-N-Tg (非構造類似物コンジュゲート体) には結合しない。c) M86 は N conjugates に比較し C conjugates に対して高い結合活性を有する。M86 と MOP 7(anti-morphine IgG)の morphine-C-BSA、-Tg、morphine-N-BSA、-Tg に対する結合活性の評価を行った。結合活性は A_{490} での morphine-C-BSA に対する値を 100%とした場合の相対活性 (%) で示している (M86、 $A_{490} = 1.199$; MOP 7、 $A_{490} = 0.602$)。

3-3-8 SPR 解析

M86 の結合アフィニティ - を決定するために、morphine-C-Tg を固定化した CM5 センサーチップを用いて SPR 解析を行った。本解析においては、Superdex 75 10/300 GL により M86 モノマー画分（フラクション 5）を調整し解析を行った（図 3-10）。フラクション 5 に含まれる 3 つの分子種（図 3-8 c）のうち 1st バンド、2nd バンドは、以下の操作で得られたサンプル中に含まれる成分と同一であった。HisTrap HP column で精製した M86 精製物を morphine-C-Tg でコートしたイムノチューブ中でインキュベーションし、glycine-HCl (pH 2.2) により溶出された成分（図 3-11）。これより 1st バンド、2nd バンドの分子種が morphine 結合活性を有していることが示された。ImageJ による解析よりフラクション 5 全体量に占める 1st バンド、2nd バンドの存在量は 59%であった。従って K_d 値はフラクション 5 トータルタンパク質濃度の 59%に対して 1:1 結合モデルを用いて算出した。M86 の K_d は 1.26×10^{-8} M と算出された（図 3-12）。

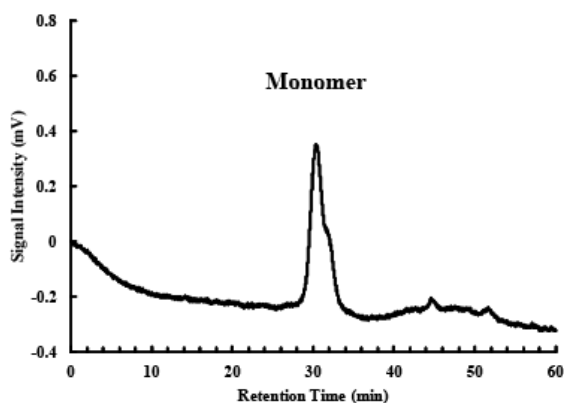


図 3-10 フラクション 5 の HPLC 分析．Superdex 75 10/300 GL によりフラクション 5 の解析を行った．メインピークは M86 のモノマーフォームである．

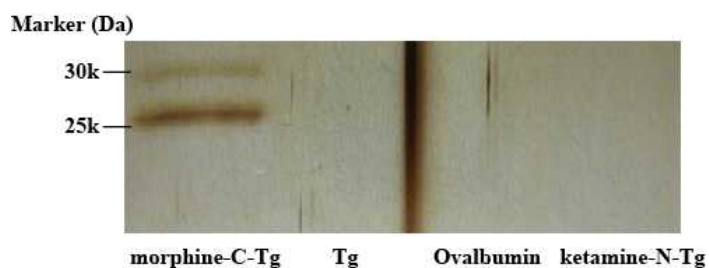


図 3-11 フラクション 5（図 3-8 c）の 1st バンド、2nd バンドの分子種はそれぞれ morphine 結合活性を有する．HisTrap HP column で精製した M86 精製物（1 μ g/0.5 ml）を morphine-C-Tg, Tg, Ovalbumin, ketamine-N-Tg（2 μ g/0.5 ml）をコートしたイムノチューブ中でインキュベーション後、結合した成分を 0.1 M glycine-HCl (pH 2.2) で溶出した．溶出した画分を還元条件下のもと SDS-PAGE（15%）を行い銀染色で可視化した．

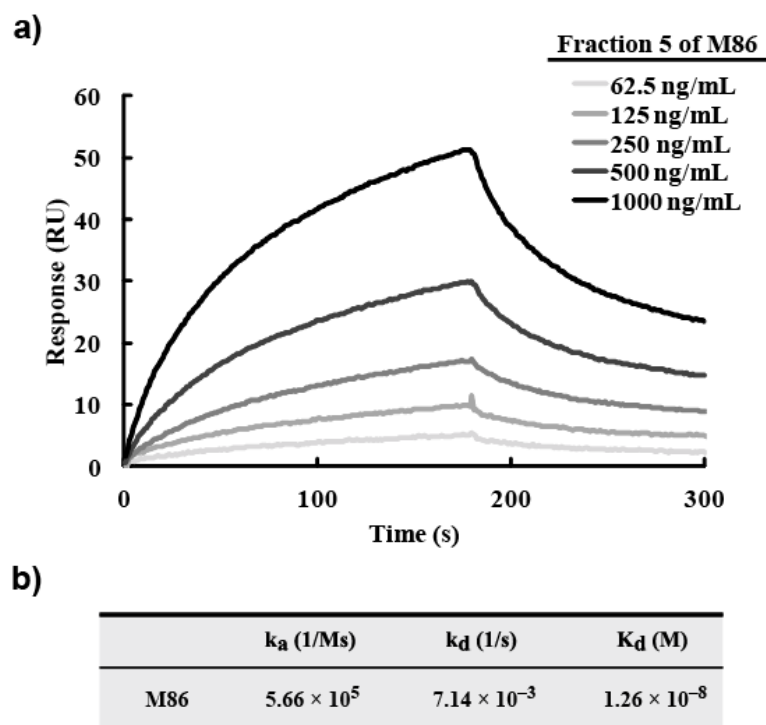


図 3-12 SPR 解析 . a) M86 の結合及び解離の SPR センサグラム . Morphine-C-Tg (20 μ g/ml) を固定化した CM5 センサーチップを用いて SPR 解析を行った . b) 速度論的パラメーター . K_d 値はトータルタンパク質濃度の 59% に対して 1:1 結合モデルを用いて算出した .

3-3-9 M86 は morphine のみならず codeine、heroin をも認識する

M86 の morphine 及び類似化合物 (codeine、heroin、opium)、非類似化合物 (cocaine、ketamine) に対する結合活性を解析するために、M86 の様々な濃度の薬物と morphine-C-Tg を用いた競合 ELISA を行い評価した (図 3-13)。M86 は morphine だけでなく opium、codeine、heroin にも結合した (図 3-13 a)。IC₅₀ 値は 36.4 nM (morphine)、257 ng/ml (opium)、7.3 nM (codeine)、7.4 nM (heroin) であった (図 3-13 c)。一方で、M86 は cocaine、ketamine、Tg には結合しなかった (図 3-13 a, b)。Codeine と heroin に対する結合活性は morphine に対する結合活性よりも高かった。

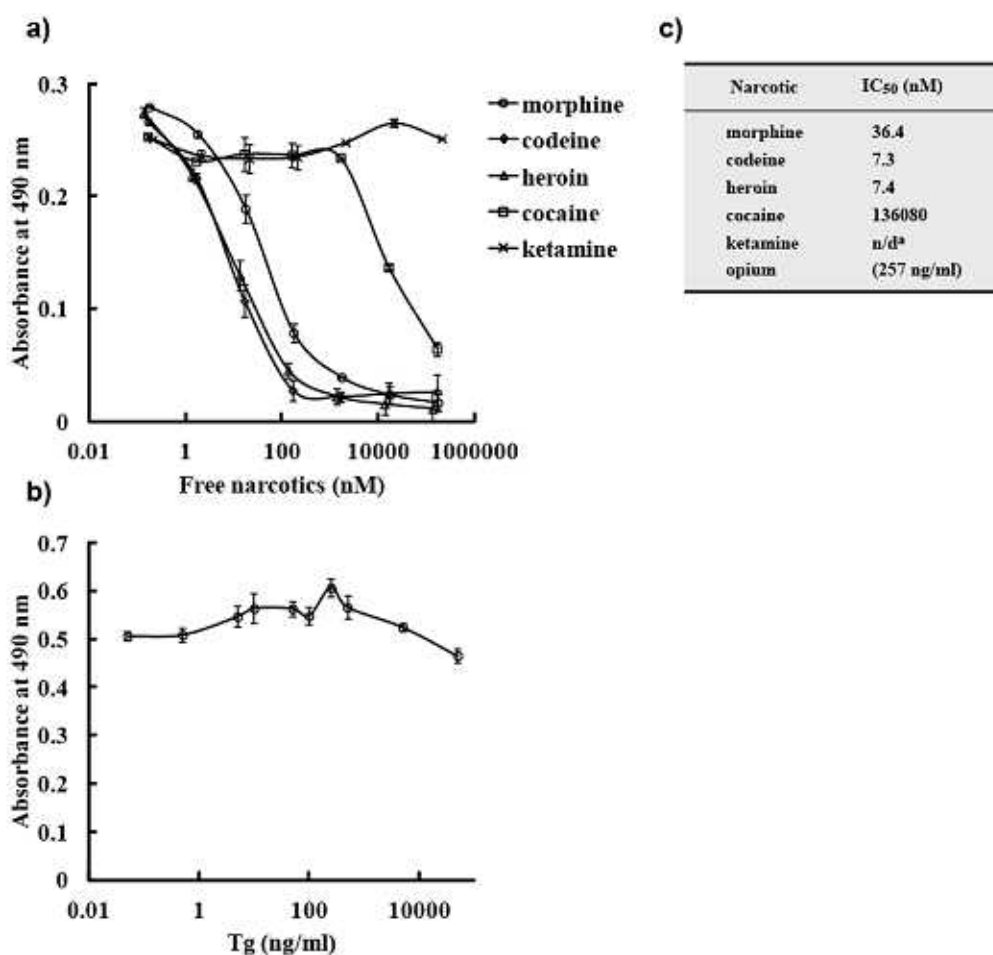


図 3-13 競合 ELISA . a) Morphine-C-Tg に対する M86 結合活性は morphine、morphine-類似化合物濃度依存的に阻害された . b) Morphine-C-Tg に対する M86 結合活性は Tg により阻害されない . M86 (75 ng) と様々な濃度の morphine、codeine、heroin、opium、cocaine、ketamine、Tg の混合物を morphine-C-Tg が固定化された ELISA プレートに加えた . 検出は抗 E-tag ポリクローナル抗体及び HRP 標識ヤギポリクローナル抗ラビット IgG (H + L) 抗体で行った . c) IC₅₀ 値 . n/d^a: 検出不能 .

3-3-10 M86 のコンピューターシュミレーションによる構造解析

ハプテン-タンパク質コンジュゲート体に対する ELISA 測定では M86 は morphine moiety を認識していた。一方で、ハプテンのみを用いた競合 ELISA 測定では、M86 は morphine のみならず codeine、heroin をも認識した。そこで、M86 の結合様式の理解を深めるためにコンピューターシュミレーションによる構造解析を行った。抗 morphine 抗体のうち唯一結晶構造解析がなされている抗 morphine 抗体 9B1 (PDB ID: 1Q0Y, [5]) の X 線結晶構造解析データをテンプレートとして M86 のモデリングを行った。M86 と 9B1 のアミノ酸配列の相同性は 43% の identical で 81.8% の similar である(図 3-14)。また、9B1 の交差反応性を含めた特性評価についての報告はなされていない。9B1 は morphine のプラスに荷電した窒素原子に結合し、morphine の 3 位及び 6 位の極性の 2 つの酸素原子は溶媒中へさらされている[5,7]。一方で、M86 は morphine の 3 位及び 6 位の極性の 2 つの酸素原子を認識していることが推測された(図 3-15 a、b)。これより M86 と 9B1 の抗原認識様式は異なることが推測された(図 3-15 a、b)。また、M86 は少なくとも morphine の 3 位ヒドロキシル基の近傍を認識していることが推測された ELISA の結果(図 3-9 b)と一致した。表 3-5 に示したドッキングスコア (morphine、- 13.7524 kcal/mol ; codeine、- 13.8064 kcal/mol ; heroin、- 16.4704 kcal/mol) についても、競合 ELISA の結果(図 3-13 c)から得られた IC₅₀ 値 (morphine、36.4 nM ; codeine、7.3 nM ; heroin、7.4 nM) と同様な傾向であり morphine、codeine、heroin に結合することが示された(表 3-5)。

本解析より、M86 の SerL91 と AspL94 は morphine の 3 位ヒドロキシル基 (codeine の場合はメトキシ基、heroin の場合はメトキシカルボニル基) の近傍に配置しており、これらのアミノ酸残基のポイントミューテーションが M86 の活性の調節に關与する可能性が推測された。例えば、これらのアミノ酸残基を嵩高い側鎖を持つアミノ酸残基へと置換することにより、morphine への結合活性は保持しつつ codeine と heroin に対する結合活性を選択的に抑制することも可能性として推測できる(図 3-16)。これより M86 は morphine、codeine、heroin を識別するべく抗体のプロトタイプとしても期待できることが示唆された。以上のことより、特にハプテン特異的抗体の場合は、特異性の高い抗体を開発するために、コンピューターシュミレーションを併用したアプローチは有用であることが推測された。

a)

M86	DVKLVESGGG	LVKPGGSLKL	SCAASGFTSS	SYAMSWVRQS	PEKRLEWVAS	I-SSGGSTYY
	.*.*	.*.*.*	.*.*.*.*	.*.*.*.*	.*.*.*.*	.*.*.*.*
9B1	EVQLQQSGAE	LMKPGASVKI	SCKATGYTFS	SYWIEWVKQR	PGHGLEWIGE	ILPGSGDTIF
M86	PDSVKGRFTI	SRDNARNNLY	LQMSSLRSED	TAMYYCVR--	EDYHGSSYWY	FDVWGAGTTV
	..**.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*
9B1	NEKFKGKATF	TADTSSNTAY	QMLSSLTSED	SAVYYCARWV	LDYYGMDY	WGQGTSLTVSS

b)

M86	DIVLTQSPAS	LAVSLGQRAT	ISCKASQSV	YDGD SYMNWY	QKPGQPPKL	LIYAASNLES
	..*.*.*	*.*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*
9B1	DAVVTQESA-	LTTSPGETVT	LTCRSS-TGA	VTTSNYANWV	QEKPDHLEFG	LIGGTNNRAP
M86	GIPARFSGSG	SGTDFTLNH	PVEEEDAATY	YCQSNEDPW	TFGGGTKLEI	KR
	..*.*.*	*.*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*	..*.*.*.*
9B1	GVPARFSGSL	IGDKAALTIT	GAQTEDEAIY	FCALWSNNKL	VFGGGTKLTV	LGQP

c)

	VH		VL		VH + VL	
	Identical (%)	Similar (%)	Identical (%)	Similar (%)	Identical (%)	Similar (%)
All region	47.0	84.3	39.1	79.1	43.0	81.8
CDR regions	32.4	67.6	12.9	71.0	23.1	69.2
FR region	53.1	91.4	49.1	82.3	51.3	86.9

図 3-14 M86 と 9B1 のアミノ酸配列比較 .a) VH ドメイン、b) VL ドメイン、c) 相同性のまとめ . GENETYX ver. 8 によりホモロジー解析を行った . アスタリスク (*) はアミノ酸が完全一致であることを示し、ドット (.) は同類のアミノ酸であることを示す . VH ドメイン及び VL ドメインの CDR 領域は太字で表記している .

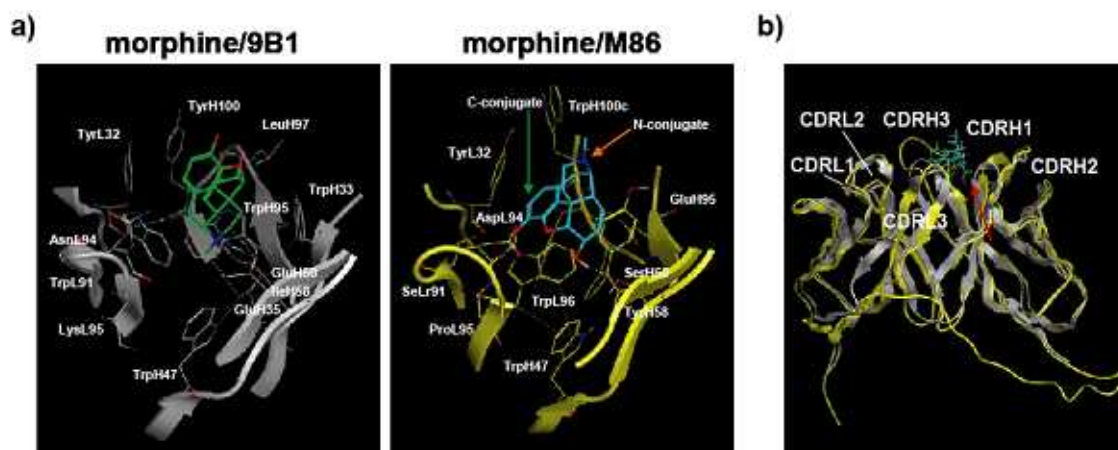


図 3-15 M86 のコンピューターシュミレーション . a) 9B1、M86 のリガンド相互作用表面の側面図 . 抗 morphine 抗体 9B1 (PDB ID: 1Q0Y) の X 線結晶構造解析データをテンプレートとして MOE の解析を行った . 左のパネルは 9B1 のリガンド相互作用表面である . 9B1 は灰色のリボン構造で表記し morphine は緑色のスティックモデルで表記している . 右のパネルは M86 のリガンド相互作用表面である . M86 は黄色のリボン構造で表記し morphine は青色のスティックモデルで表記している . リガンド相互作用部位のアミノ酸残基をスティックモデル、及び Kabat 等[3]のナンバリングに従い表記した . 緑色の矢印は () C conjugate の morphine のタンパク質との結合部位を示し、橙色の矢印 () は N conjugate の morphine のタンパク質との結合部位を示す . b) M86 と 9B1 の重ね合わせ図 . 赤色の矢印 () より観察した側面図が a) である .

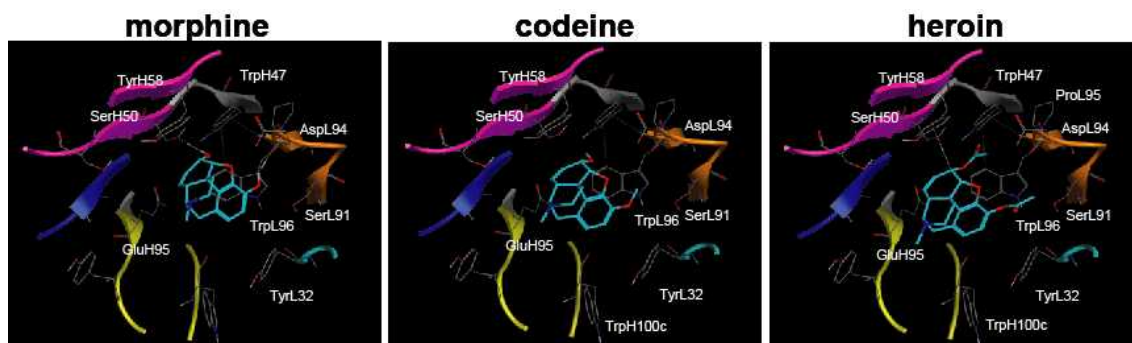


図 3-16 M86 結合ポケットの上面図により推測される M86 の morphine-類似化合物に対する結合特性．左パネル：morphine との結合；中央パネル：codeine との結合；右パネル：heroin との結合．M86 は図 3-15 に記載した方法でモデリングを行った．M86 はリボン構造で表記した（CDRH1、シアン；CDRH2、マゼンダ；CDRH3、イエロー；CDRL1、ブルー；CDRL2、レッド；CDRL3、オレンジ）．薬物は青色のスティックモデルで表記し、morphine（左パネル）、codeine（中央パネル）、heroin（右パネル）である．リガンド相互作用部位のアミノ酸残基をスティックモデル、及び Kabat 等[3]のナンバリングに従い表記した．水素結合は点線（...）で表記した．

表 3-5 M86 の morphine-類似化合物に対するドッキングスコア．

Narcotics	U_dock ^a
morphine	-13.7524
codeine	-13.8064
heroin	-16.4704

^a U_dock (kcal/mol) : docking score by ASEDock

3-3-11 抗ハブテン抗体作製における本手法の考察

タンパク質コンジュゲート体に対する評価では morphine と codeine を識別できたにもかかわらず、薬物単独では morphine のみならず構造の類似した codeine、heroin に反応した。以下の点が推測される。

M86 の結合ポケット内へ挿入するにあたって、タンパク質コンジュゲート体は morphine や codeine の近傍にタンパク質が存在するため制限がかかっているのではないかと推測する。そのためタンパク質コンジュゲート体の codeine-C-Tg には結合しない結果となったのだと推測する。一方で薬物単独ではそのような制限がなくなるため結合性を示したと推測する。M86 の morphine 認識は 3 位ヒドロキシル近傍とピペリジン環の窒素原子近傍でることが推測されたことから M86 の結合ポケットは薬物全体をポケット内に挿入させていることが推測される。この点からもタンパク質コンジュゲート体の制限が原因での codeine-C-Tg に対する M86 の不活性が指示される。

本研究により得られたクローンは全て同一の塩基配列だったことより、本手法においては抗 morphine 抗体はかなり限られたレパトアであった可能性が示された。

競合 ELISA の結果より、構造の類似した morphine、codeine、heroin の構造を M86 は識別することができなかった。この僅かな構造の違いを識別する抗体を作製するために、morphine-C'-BSA の免疫においてもハイパーミューテーションが起こるように十分な追加免疫を行い様々な多様性を構築させ、ライブラリ作製においても多様性の高いライブラリを作製し、実際生体内では生じえない scFv 遺伝子断片もライブラリ中に存在していたにもかかわらず、結果としては十分ではなかった。薬物のタンパク質コンジュゲート体を免疫し薬物のタンパク質コンジュゲート体でセレクションを行い、薬物単独に対する高い特性を有した抗体を作製する方法に限界があるのではないかと推測される。また、そもそも生体内の抗体自体の性能として、morphine、codeine、heroin を識別する必要がないのではないかと考えられる。このような物質に対してはある一種の抗体が作用すればすむようなメカニズムになっているとも考えられる。

上記 より morphine、codeine、heroin を識別する抗体を作製するためには、M86 のような全てを認識する抗体より、コンピューターシミュレーションによる構造解析やドッキングシミュレーションによる抗体と薬物との結合の解析後、morphine、codeine、heroin を識別するべく新たな抗体の配列及び構造を人工的に探し出さなくてはならないと考えられる。

3-4 小括

1.1×10^8 の多様性の抗morphine抗体ライブラリを作製した。このライブラリよりパイオパニングにより、morphineに反応する6つのクローン (No.9、33、38、86、95、101) を単離した。遺伝子配列解析の結果、6つのクローンは全て同一だった。これより 1.1×10^8 の多様性の抗morphine抗体ライブラリ中にmorphineに結合するscFv遺伝子断片はかなり限られた数でしか存在していないことが推測され、本研究で作製した抗morphine抗体ライブラリに限っては抗morphine抗体として機能するには唯一の遺伝子配列が必要であることが推測された。M86クローンを用いて特異性の評価を行った。M86はタンパク質コンジュゲート体を使用したELISAにおいてはmorphine特異的な結合特性を持ち、構造に似たcodeineには結合しなかった。構造が類似しないketamine、cocaineにも結合しなかった。SPRによりKd値は 1.26×10^{-8} (M) と算出された。競合ELISAによる薬物との反応性については、free-morphine、opiumのみではなく、free-codeine、free-heroinをも認識した。M86のopium、morphine、codeine、heroinに対するIC₅₀値は257 ng/ml、36.4、7.3、7.4 nMだった。一方で構造の類似しないketamine、cocaineには結合しなかった。従って、M86はopium (morphine、codeineを含む) やheroinの検出プローブとして、またそれら薬物に対する治療薬として幅広い有用性が期待される抗体であると結論づけられた。また、本研究では、動物にハプテン - タンパク質コンジュゲート体を免疫し、ハプテン - タンパク質コンジュゲート体でセレクションを行い、freeのハプテンを認識する抗体を作製する作製手法の限界が示唆された。構造の非常に類似したmorphine、codeine、heroinを識別できる抗体を作製するためには更なる抗体エンジニアリングが必要であり、M86はそのプロトタイプとなりえることがコンピューターシュミレーション解析の結果より示唆された。

引用文献

1. Burmester, J.; Plückthun, A. Construction of scFv Fragments from Hybridoma of Spleen Cells by PCR Assembly. In *Antibody Engineering*; Roland Kontermann, Stefan Dübel, Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2001; pp 19-40.
2. Hashiguchi, S.; Nakashima, T.; Nitani, A.; Yoshihara, T.; Yoshinaga, K.; Ito, Y.; Maeda, Y.; Sugimura, K. Human Fc epsilon RIalpha-specific human single-chain Fv (scFv) antibody with antagonistic activity toward IgE/Fc epsilon RIalpha-binding. *J. Biochem.* **2003**, *133*, 43-49.
3. Kabat, E. A.; Wu, T. T. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1709-1719.
4. Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE), 2011.10, Montreal, Canada, 2011
5. Pozharski, E.; Wilson, M. A.; Hewagama, A.; Shanafelt, A. B.; Petsko, G.; Ringe, D. Anchoring a cationic ligand: the structure of the Fab fragment of the anti-morphine antibody 9B1 and its complex with morphine. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 691-697.
6. Goto, J.; Kataoka, R.; Muta H.; Hirayama, N. ASEDock-Docking Based on Alpha Spheres and Excluded Volumes. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 583-590.
7. Oka, K.; Kantrowitz, J. D.; Spector, S. Isolation of morphine from toad skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1985**, *82*, 1852-1854.

第4章

バイオセンサー素子に向けた開発

4-1 小序論

M86 の特異性の改変及び向上を目的として、M86 アミノ酸置換体のコンピューターシュミレーションによる解析を行った。第3章で、M86 の SerL91 と AspL94 が morphine の3位ヒドロキシ基 (codeine の場合はメトキシ基、heroin の場合はメトキシカルボニル基) の近傍に配置しており、これらのアミノ酸残基置換が M86 の活性の調節に関与する可能性が推測された。本章では実際に SerL91 と AspL94 のアミノ酸置換変異体のモデリングと薬物とのドッキングシュミレーションを行い、アミノ酸置換が及ぼす M86 特異性への影響を解析した。

また、ELISA の結果より、M86 はフリーの codeine に対しては結合するが、codeine-C-Tg に対しては結合しなかったため、M86 の薬物タンパク質コンジュゲート体へのドッキングシュミレーションを行い morphine-C-Tg と codeine-C-Tg に対する反応性の違いについて考察した。

4-2 材料と方法

4-2-1 M86 のアミノ酸置換体の解析

様々なアミノ酸を M86 に導入し、MOE によるモデリング後、薬物とのドッキングシュミレーションを行い解析した。疎水性芳香族アミノ酸 (Trp、Phe)、極性芳香族アミノ酸 (Tyr)、極性酸性アミノ酸 (Asp、Glu)、極性塩基性アミノ酸 (Arg、His)、疎水性アミノ酸 (Met)、疎水性脂肪族アミノ酸 (Ala、Pro)、極性アミノ酸 (Ser、Gln) のアミノ酸置換体のモデリングを行った。抗モルヒネ抗体 9B1(1Q0Y)をテンプレートとし、[3-2-11 コンピューターシュミレーションによる構造解析]の方法に従った。

4-2-2 M86の薬物タンパク質コンジュゲート体に対する反応性の解析

MOE タンパク質構造ファミリーデータベースを使用して Thyroglobulin [Sus scrofa] (GenBank: ACY66900.1)のホモロジー検索を行い、Thyroglobulin のホモロジーモデリングのテンプレートとして Acetylcholinesterase (PDB_3DL4.B)を選択した。モデリングには AMBER99 force field、generalized Born salvation model を使用した。続いて Tg の 386 位 Arg に hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine、もしくは hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine を結合させ、morphine-C-Tg、codeine-C-Tg

のモデルとした (morphine-C-Tg-model、codeine-C-Tg-model)。morphine-C-Tg-model、codeine-C-Tg-model は MMFF94x force field でエネルギー極小化計算を行い最安定構造を検索した。

ドッキングシュミレーションは全て Dock、MMFF94s force field で行った。M86 のリガンドポケットに対する以下のドッキングシュミレーションを行った。

- (1) hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine、hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine 部分と M86 とのドッキングシュミレーション。
- (2) Arg 386 の hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine を含む Tg の近傍部分 (morphine-C-Tg-model_1) と M86 とのドッキングシュミレーション。同様に hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine を含む Tg の近傍部分 (codeine-C-Tg-model_1) と M86 とのドッキングシュミレーション。
- (3) Arg 386 の hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine を含む Tg の一部分 (morphine-C-Tg-model_2) と M86 とのドッキングシュミレーション。同様に hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine を含む Tg の一部分 (codeine-C-Tg-model_2) と M86 とのドッキングシュミレーション。

4-3 結果

4-3-1 M86のアミノ酸置換体の解析

Morphineの3位ヒドロキシル基、codeineの3位のメトキシ基、heroinの3位のメトキシカルボニル基の近傍に配置しているM86のSerL91とAspL94とを嵩高い側鎖を持つアミノ酸残基に置換すればヒドロキシル基との反応性はそのままメトキシ基とメトキシカルボニル基との反応性を低下させmorphineに対する特異性を高められるのではないかと考え、以下のアミノ酸残基を選択し変異体のモデリングを行った。疎水性芳香族アミノ酸(Trp、Phe)、極性芳香族アミノ酸(Tyr)、極性酸性アミノ酸(Asp、Glu)、極性塩基性アミノ酸(Arg、His)、疎水性アミノ酸(Met)、疎水性脂肪族アミノ酸(Ala、Pro)、極性アミノ酸(Ser、Gln)。ドッキングシュミレーションのドッキングスコアを表4-1に示す。その結果、SerL91His/AspL94His置換体は僅かなmorphineに対する特異性向上が推測されたが、その他の芳香族アミノ酸置換(SerL91Trp/AspL94Trp、SerL91Phe/AspL94Phe、SerL91Tyr/AspL94Tyr)ではmorphineに対する特異性向上に寄与しないことが推測された。むしろ小さな疎水性アミノ酸置換(SerL91Ala/AspL94Ala、SerL91Pro/AspL94Pro)がmorphineに対する特異性向上に寄与していることが推測された。また、特に、SerL91Glu/AspL94Glu置換体の場合、heroinとの結合を効率良く低下させることが可能であることが推測された。この場合、SerL91Trp/AspL94Glu置換体、SerL91Glu/AspL94Trp置換体と比較すると、どちらか一方の置換体での結合阻害は不十分であることが推測された。図4-1より、M86のTyrH58とheroinの水素原子とのCH- 相互作用がM86アミノ酸置換体では消滅していることが推測された。これよりheroinに対する特異的結合阻害はheroin-M86アミノ酸置換体の結合不安定化が一つの原因として考えられる。また、図4-1より、SerL91Glu/AspL94Gluの配置のみならずM86全体の側鎖の配向に影響を及ぼすことが推測された。片方のアミノ酸残基のみTrpに置換した、SerL91/AspL94Trp置換体、SerL91Trp/AspL94置換体についてはmorphineに対して僅かな特異性の増強が推測されるにとどまった。その他のアミノ酸置換体(SerL91Gln/AspL94Gln、SerL91Arg/AspL94Arg、SerL91Met/AspL94Met、SerL91/AspL94His)はmorphine特異的結合能に寄与しないことが推測された。以上の結果より、heroinとの結合を特異的に阻害するM86アミノ酸置換体の推測はできたが、エネルギー値の差よりmorphineとcodeineとを識別するには不十分であると推測された。図4-1に示したように僅か2つのアミノ酸置換によっても全体的な側鎖の配向が変化しているように、本研究でターゲットとした2つのアミノ酸残基だけではなくその他のアミノ酸残基置換の検討が必要であると考えられる。

表 4-1 M86アミノ酸置換体のmorphine-類似化合物に対するドッキングスコア .

Amino Acid		U_dock ^a		
L91	L94	Morphine	Codeine	Heroin
Ser	Asp (WT)	-13.7524	-13.8064	<u>-16.4704</u>
Glu	Glu	<u>-15.9627</u>	-15.1644	3.7357
His	His	<u>-14.2703</u>	-13.4493	-13.6901
Trp	Trp	-15.8822	<u>-17.1385</u>	-15.5683
Phe	Phe	-11.5761	-12.2051	<u>-17.3572</u>
Gln	Gln	-14.6598	-15.1535	<u>-17.7289</u>
Arg	Arg	-16.4909	-14.4782	<u>-16.8094</u>
Met	Met	-13.5894	-14.0403	<u>-16.5713</u>
Tyr	Tyr	-14.2797	<u>-15.4573</u>	-15.4096
Ala	Ala	<u>-16.5609</u>	-15.2448	-14.2003
Pro	Pro	<u>-16.4355</u>	-13.7393	-14.6616
Trp	Glu	-13.5704	<u>-15.8127</u>	-14.7391
Glu	Trp	<u>-16.8457</u>	-16.5112	-16.7369
Ser	Trp	<u>-17.2050</u>	-14.8680	-16.6698
Ser	His	-10.6651	<u>-10.9070</u>	-10.4060
Trp	Asp	<u>-14.9763</u>	-10.5167	-13.1177

^a U_dock (kcal/mol) : docking score by ASEDock

M86アミノ酸置換体は図3-15に記載した方法でモデリングを行った．アミノ酸はKabat等[1]のナンバリングに従い表記した．それぞれのM86アミノ酸置換体において最も低いエネルギー値を下線で記した．

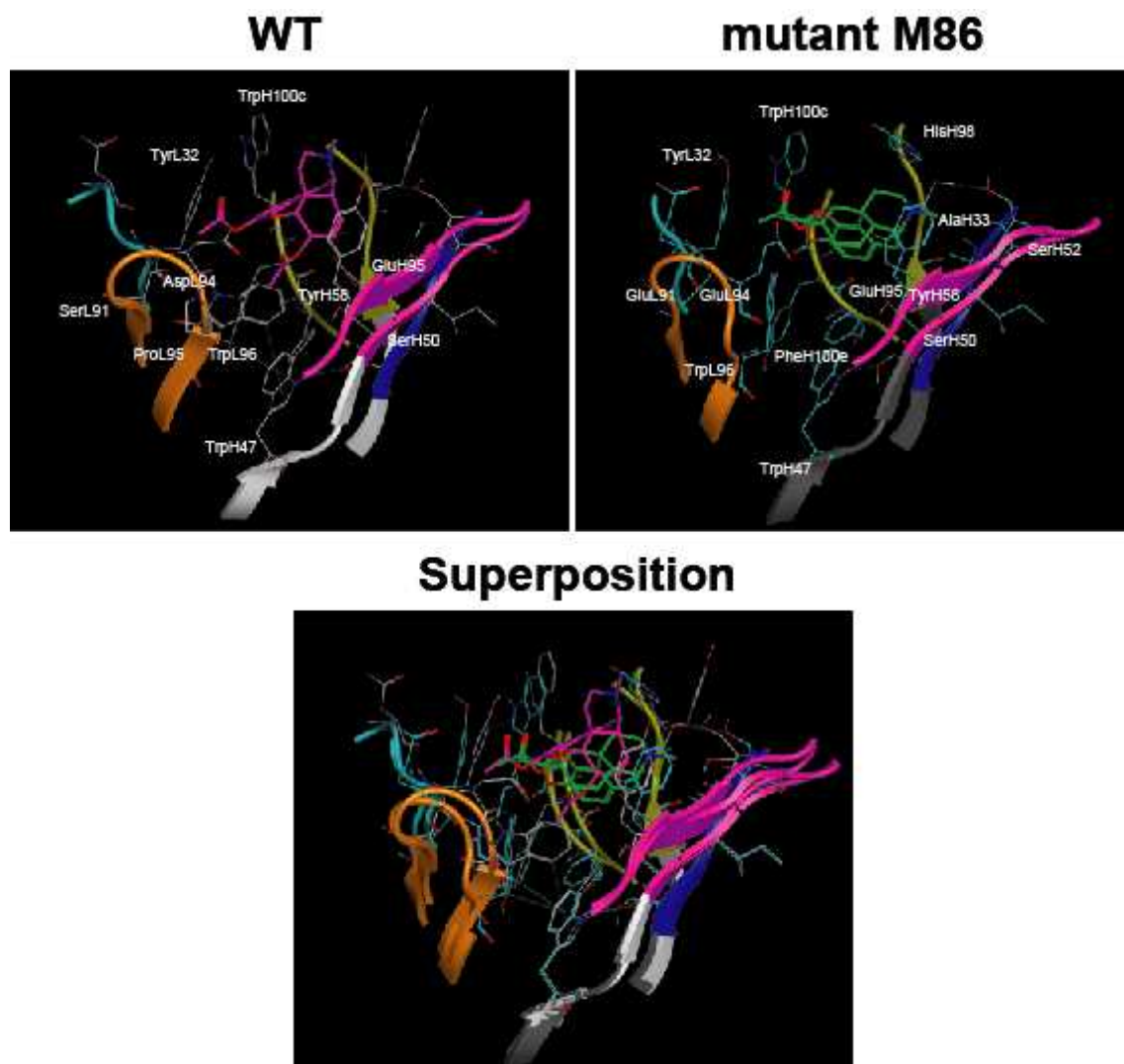


図 4-1 M86アミノ酸置換体、SerL91Glu/AspL94Glu置換体のheroinとのドッキングシュミレーション．左パネルはWT M86とheroinとのドッキングシュミレーション、右パネルはM86アミノ酸置換体(SerL91Glu/AspL94Glu)とheroinとのドッキングシュミレーション、下パネルは重ね合わせた図．図3-15に記載した方法でモデリングとドッキングシュミレーションを行った．抗モルヒネ抗体 9B1 (1Q0Y) をテンプレートした．WT M86とM86アミノ酸置換体はリボン構造で表記した (WT M86のFR領域、ホワイト；M86アミノ酸置換体のFR領域、グレイ；CDRH1、シアン；CDRH2、マゼンダ；CDRH3、イエロー；CDRL1、ブルー；CDRL2、レッド；CDRL3、オレンジ) ． Heroinはマゼンダ (WT) 、グリーン (置換体) のスティックモデルで表記した．リガンド相互作用部位のアミノ酸残基をスティックモデル、及びKabat等[1]のナンバリングに従い表記した．図3-15に記載の方向より観察した側面図である．M86のTyrH58とheroinの水素原子とのCH- 相互作用がM86アミノ酸置換体では消滅した．

4-3-2 M86の薬物タンパク質コンジュゲート体に対する反応性の解析

Morphine-C-Tg-modelを用いてM86とドッキングシュミレーションを行った。Morphine-C-Tg-modelは図4-2に示す。Codeine-C-Tg-modelも同様にモデリングした。

(1) hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine (図 4-2 b)、hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine 部分と M86 とのドッキングシュミレーション。

M86 と hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine No.3 の相互作用エネルギー値は - 2.5388 kcal/mol、hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine No. 8 との相互作用エネルギー値は 0.4707 kcal/mol であり M86 と hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine との反応性が高いことが推測された (図 4-3)。

(2) Morphine-C-Tg-model_1 (図 4-2 c) codeine-C-Tg-model_1 と M86 とのドッキングシュミレーション。

M86 と morphine-C-Tg-model_1 No.2 の相互作用エネルギー値は - 1.9228 kcal/mol、codeine-C-Tg-model_1 No. 5 との相互作用エネルギー値は - 2.0168 kcal/mol であり M86 と morphine-C-Tg-model_1、codeine-C-Tg-model_1 との反応性は同等であることが推測された (図 4-4)。

(3) Morphine-C-Tg-model_2 (図 4-2 d) codeine-C-Tg-model_2 と M86 とのドッキングシュミレーション。

Morphine-C-Tg-model_2、codeine-C-Tg-model_2 を使用した場合、計算上では morphine 部位、codeine 部位は M86 の結合ポケットに効率良く挿入されない傾向が推測された。また、morphine は M86 の結合ポケット周辺に位置している確率が高いが、codeine の場合はほとんどにおいて結合ポケットから離れて位置していることが推測された (図 4-5 a-d)。

M86と薬物コンジュゲート体との最も現実的な配向関係である、薬物部位が結合ポケット方向にリンカ 部位が溶媒方向に配向しているmorphine-C-Tg-model_2 No. 11 (図4-5 e) codeine-C-Tg-model_2 No. 12 (図4-5 f) とで比較した場合は、morphine-C-Tg-model_2 No. 11の相互作用エネルギー値は16.6553 kcal/mol、codeine-C-Tg-model_2 No. 12との相互作用エネルギー値は18.5601 kcal/molだった。

Morphine-C-Tg-model_2 No. 20 (図4-5 g) は相互作用エネルギー値が46.3062 kcal/mol であるが、M86 結合ポケットに morphine 部位が挿入されていた。一方で codeine-C-Tg-model_2の場合はM86の結合ポケットにcodeine部位が挿入しているデータは得られなかった。

MOEの解析においては以上の(1)-(3)より、薬物タンパク質コンジュゲート体のうち、薬

物リンカ 部位のみとM86とでドッキングシュミレーションを行うと、M86の morphine-C-Tg、codeine-C-Tgコンジュゲート体に対する反応性は僅かにmorphine-C-Tg に対して高いだけであるが、キャリアタンパク質Tgを含む薬物コンジュゲート体とM86と でドッキングシュミレーションを行うとmorphine-C-Tgに対する反応性が高い傾向が示唆 された。Morphine-C-Tg-model_2、codeine-C-Tg-model_2を使用した場合、図4-5 a-dに示 されるように、ほとんどにおいてM86の結合ポケットに対してmorphineやcodeineは挿入さ れていない。M86と薬物タンパク質コンジュゲート体の薬物部位との相互作用においてキ ャリアタンパク質Tgの構造が大きく影響を及ぼしていることが示唆された。M86と薬物タ ンパク質コンジュゲート体との相互作用の推測は、M86と薬物単体との相互作用の推測に 比較して信頼性が低下するが、M86はフリーのcodeineに対しては結合するが、 codeine-C-Tgに対しては結合しなかったELISAのデータと同様の傾向を示した。

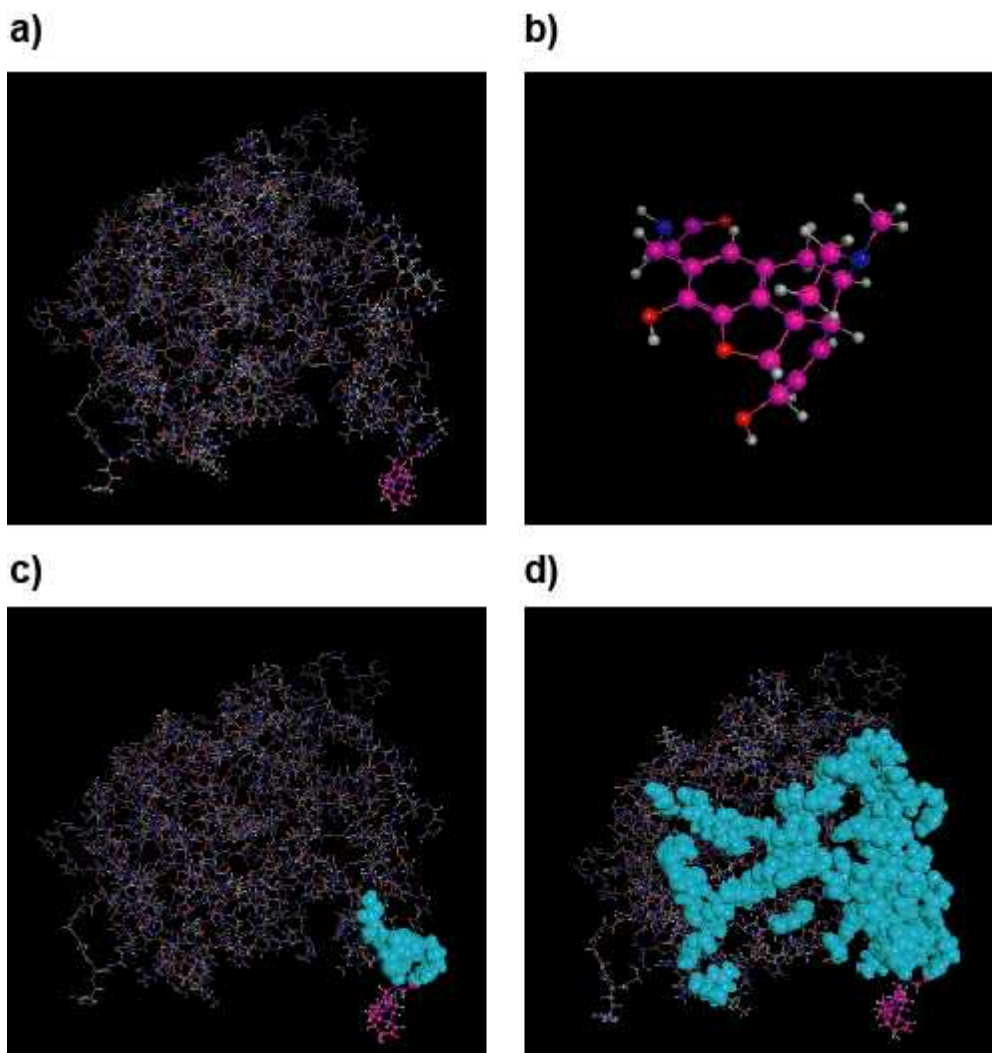


図 4-2 Morphine-C-Tg のモデリング . Acetylcholinesterase (PDB_3DL4.B) の X 線結晶構造解析データをテンプレートとして Tg のモデリングを行った . Tg の Arg 386 に hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine を結合させ構造最適化を行い morphine-C-Tg-model とした . Tg はスティックモデルで表示し、hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine 部位は Ball and Line モデル (マゼンダ) で表示した . a) **Morphine-C-Tg-model** . b) **hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine** 部 分 . c) **hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine** を含む Tg の近傍部分 (**morphine-C-Tg-model_1**) . ドッキングシュミレーションに使用した Tg 部位は Space Filling モデル (ブルー) で表示した . d) **hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine** を含む Tg の一部分 (**morphine-C-Tg-model_2**) . ドッキングシュミレーションに使用した Tg 部位は Space Filling モデル (ブルー) で表示した .

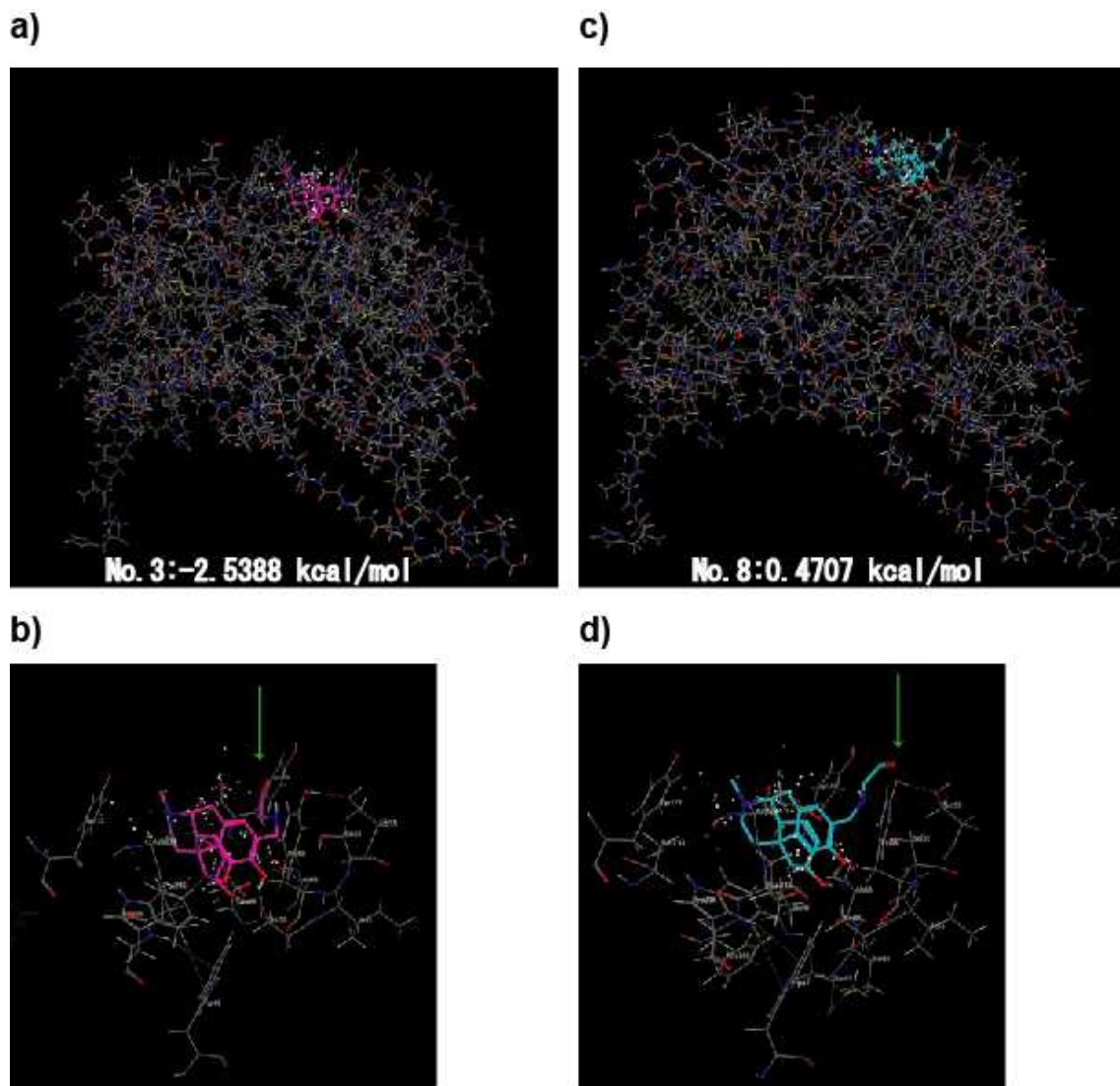


図 4-3 M86 と薬物リンカ 部位とのドッキングシュミレーション .

M86 は ス テ ィ ッ ク モ デ ル で 表 示 し た 。 Hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine 部位はスティックモデル (マゼンダ) hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine 部位はスティックモデル (ブルー) で表示した . MOE Alpha Site Finder による M86 の抗原結合部位にはダミー原子が配置されている . 選択した複合体における相互作用エネルギーを記載した (kcal/mol) . 緑色の矢印は () C conjugate のタンパク質との結合部位を示す . アミノ酸残基は MOE に従い表記している .

a) Hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine 部分とのシュミレーション .
 b) a)の結合ポケット . c) Hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine 部分とのシュミレーション . d) c)の結合ポケット .

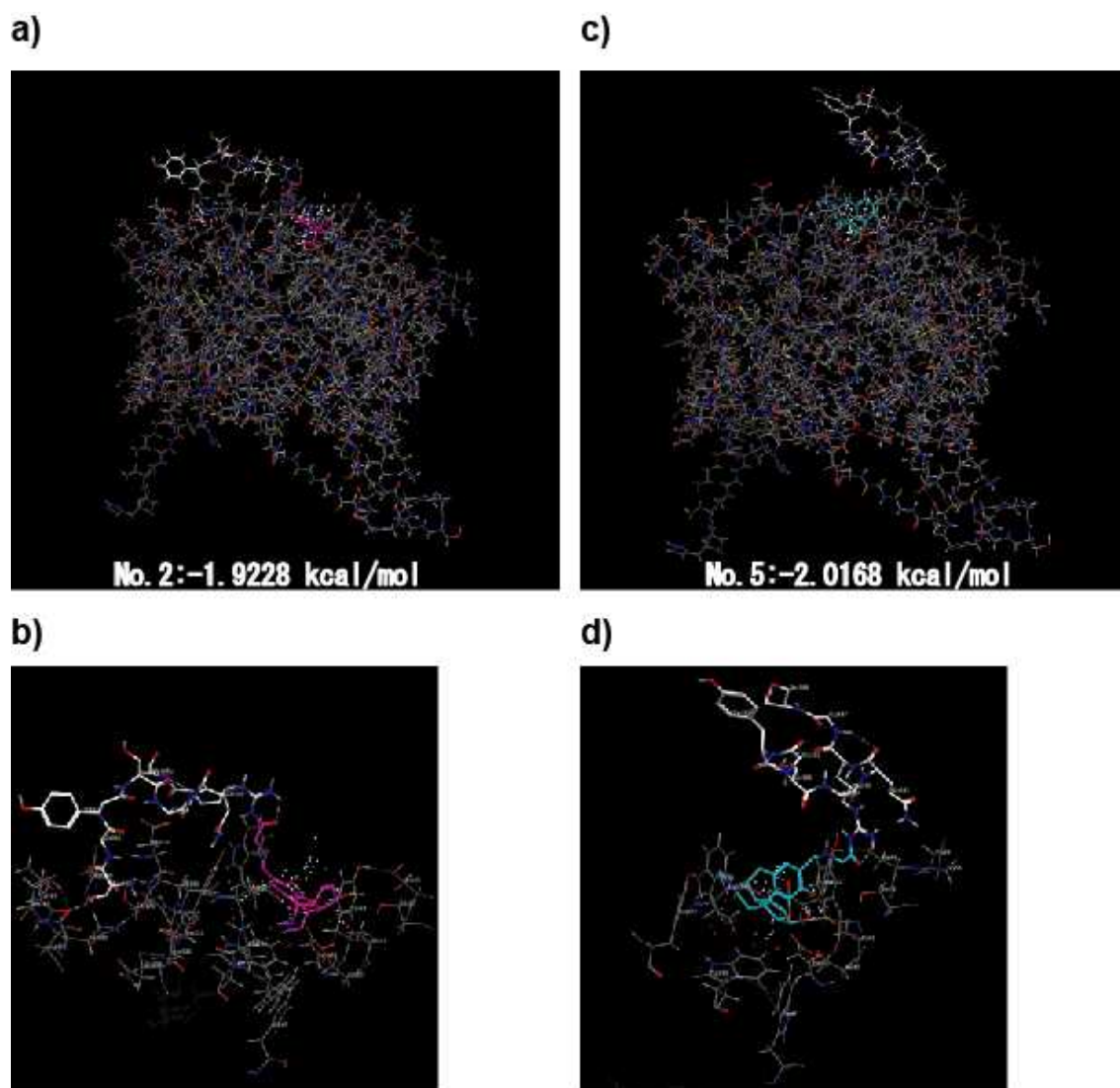


図 4-4 M86 と薬物コンジュゲート体 model_1 とのドッキングシュミレーション . M86 はスティックモデル (グレイ) で表示した . Hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine 部位はスティックモデル (マゼンダ) hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine 部位はスティックモデル (ブルー) で表示した . Tg 部分はスティックモデル (ホワイト) で表示した . MOE Alpha Site Finder による M86 の抗原結合部位にはダミー原子が配置されている . 選択した複合体における相互作用エネルギーを記載した (kcal/mol) . アミノ酸残基は MOE に従い表記している . a) Morphine-C-Tg-model_1 とのシュミレーション . b) a) の結合ポケット . c) Codeine-C-Tg-model_1 とのシュミレーション . d) c) の結合ポケット .

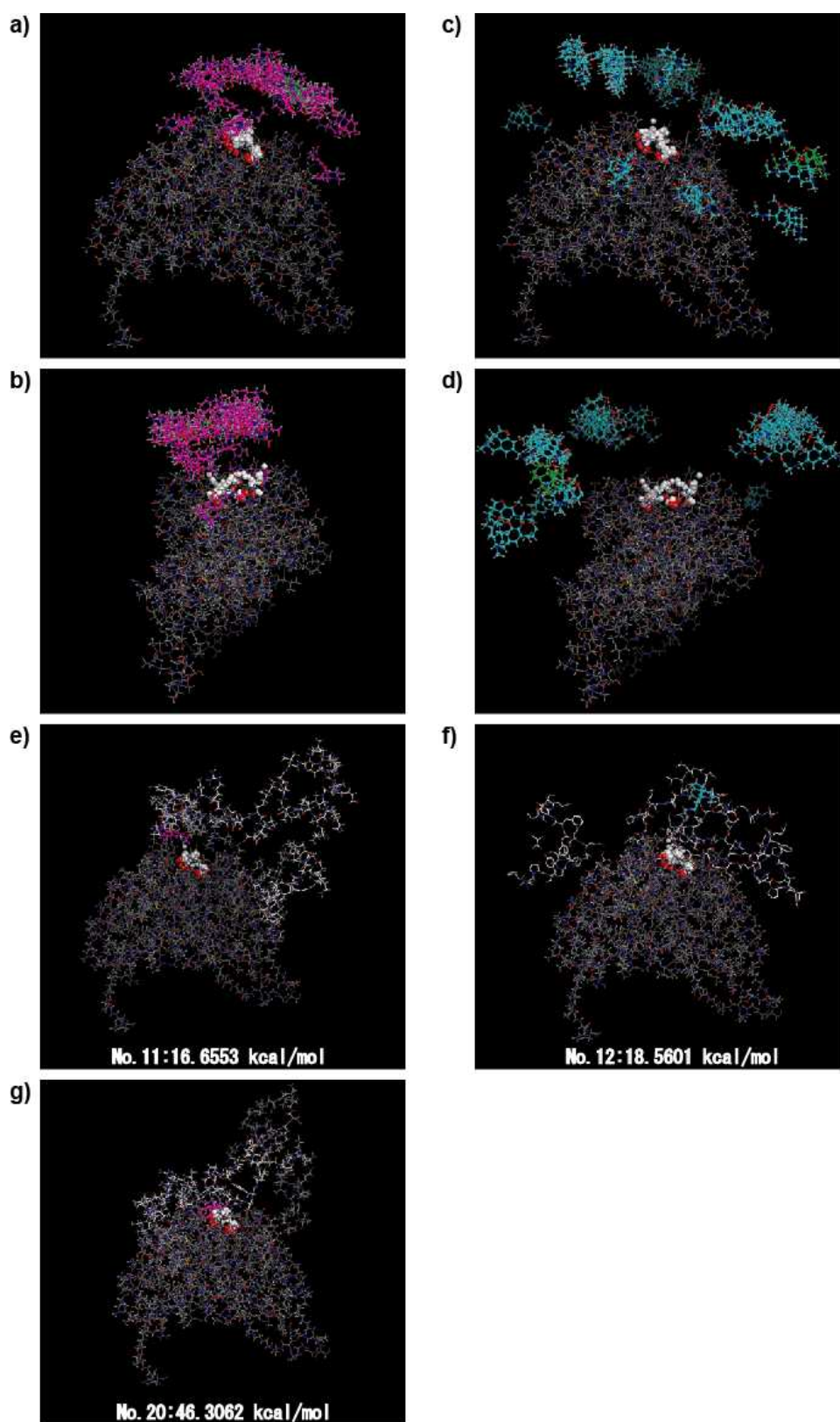


図 4-5 M86 と薬物コンジュゲート体 model_2 とのドッキングシュミレーション . M86 はスティックモデル (グレイ) で表示した。算出された 27 種類の hydroxycarbonylmethylaminomethyl-morphine 部位を Ball and Line モデル (マゼンダ) で表示した . 同様に算出された 26 種類の hydroxycarbonylmethylaminomethyl-codeine 部位をスティックモデル (ブルー) で表示した . それぞれにおける最安定構造は Ball and Line モデル (グリーン) で表示した . Tg はスティックモデル (ホワイト) で表示した . MOE Alpha Site Finder による M86 の抗原結合部位にはダミー原子が配置されている . 選択した複合体における相互作用エネルギーを記載した (kcal/mol) .

a), b) Morphine-C-Tg-model_2 とのシュミレーション . c) ,d) Codeine-C-Tg-model_2 とのシュミレーション . e) Morphine-C-Tg-model_2 No. 11 とのシュミレーション . f) Codeine-C-Tg-model_2 No. 12 とのシュミレーション . g) Morphine-C-Tg-model_2 No. 20 とのシュミレーション .

4-4 小括

Morphineの3位ヒドロキシル基、codeineの3位のメトキシ基、heroinの3位のメトキシカルボニル基の近傍に配置しているM86のSerL91とAspL94をターゲットとしたアミノ酸変異体のモデリング及びドッキングシュミレーションを行った。その結果、嵩高い側鎖のアミノ酸置換(His、Trp、Phe、Tyr)よりも、小さな疎水性アミノ酸置換(Ala、Pro)がmorphineに対する特異性向上に寄与することが推測された。また、特に、SerL91Glu/AspL94Glu置換体の場合、heroinとの結合を効率良く低下させることが可能であることが推測された。従って、heroinとの結合を特異的に阻害するM86アミノ酸置換体の推測はできたが、エネルギー値の差よりmorphineとcodeineとを識別するには不十分であると推測された。一方で僅か2つのアミノ酸置換により分子全体のアミノ酸側鎖の配向に影響を及ぼしていることもコンピューターシュミレーション上で確認され、本研究でターゲットとしたSerL91とAspL94のアミノ酸残基だけではなくその他のアミノ酸残基置換の検討が必要であると考えられる。

M86の薬物タンパク質コンジュゲート体への反応性に関する考察より、本手法を用いたコンピューターシュミレーションの解析結果においては、キャリアタンパク質であるTgの影響が大きくM86のmorphine-C-Tgとcodeine-C-Tgに対する反応性が異なることが推測された。またこれはELISAの結果と同様な傾向であり、薬物タンパク質コンジュゲート体を使用して抗ハプテン抗体を作製する限界を示唆する結果となった。

引用文献

1. Kabat, E. A.; Wu, T. T. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1709-1719.

第5章

総括

第1章より、抗ハプテン抗体・抗morphine抗体・抗体作製方法について分析を行った結果、抗morphine抗体を単離するためには、確立された技術はないものの、考えるうる技術のなかで抗体の多様性を増加させることが一つの解決手段となりえることが推測された。またmorphineを認識する分子としても、近年では様々な分子骨格のバインダーが創られているが、元来生体に備わっているIgG及びscFvが適していると判断した。これまでに報告されている抗morphine抗体に使用された抗原を分析し、それらの抗原構造とは異なる、つまりmorphine構造を最大限に提示できる抗原をデザインした。ハイブリドーマ法と、抗体の多様性化が図られる免疫ライブラリ/ファージディスプレイ法を用いて抗morphine抗体単離の検討を行うよう結論付けた。

第2章より、本研究での抗原、morphine-C'-BSA免疫の場合は、抗morphine抗体を単離することができなかった。細胞融合効率が非常に低く、その原因は抗原に起因していることが推測された。ハイブリドーマ法では細胞融合効率が一つの重要なポイントとなるため、この影響を受けたものであると推測する。本方法で抗morphine抗体を単離するためには、多大なコストと労力が必要であるが最終免疫から細胞融合までの日数に対応した細胞融合効率の詳細な検討が必要であると推測している。

第3章より、本研究での抗原、morphine-C'-BSAを用いて、抗morphine抗体、M86の単離に成功した。抗原morphine-C'-BSAの場合においては、戦略通りハイブリドーマ法に比較し免疫ライブラリ/ファージディスプレイ法が適していたといえる。

第一の成果として、M86はmorphineのみならず、codeine、heroinも認識することより、アヘン剤やheroinの検出プローブとして、またアヘン剤やheroin中毒の治療薬として広くその活用が期待できる。

第二の成果として、過去の研究においてmorphineに反応するscFvが一つ単離されているが、その詳細については報告されていない。一方で本研究では抗morphine抗体、M86の遺伝子配列解析及び特異性の詳細な検討結果を提示することができたことより、M86は抗morphine類似化合物抗体としてあらゆる可能性を秘めた抗体であると我々は考えている。

第三の成果として、抗体の多様性化が図られると期待された免疫ライブラリ/ファージディスプレイ法を用いた場合において単離される抗体の性能の評価を提示できた点にある。本手法を用いてもハイブリドーマ法から単離された抗体と同様にmorphine類似化合物に交

差反応性を示したことより、免疫ライブラリにおいて単純に多様性化を図ってもmorphineやcodeine、heroinのような僅かな構造の差を識別できる抗体を単離するには十分ではないということを示すことができた。この点については、抗morphien抗体のみならず、抗ハプテン抗体作製において重要な知見となると考えている。

第四の成果として、抗ハプテン抗体作製における一つの見解を示すことができた。本研究においては、動物にハプテン - タンパク質コンジュゲート体を免疫し、ハプテン - タンパク質コンジュゲート体でセレクションを行い、freeのハプテンを認識する抗体を作製する作製手法の限界が示唆された。しかしこのような場合においても、コンピューターシミュレーション解析をまじえた抗体エンジニアリングにより構造の非常に類似したmorphine、codeine、heroinを識別できる抗体に改変できる可能性を示すことができた。

第4章より、変異体M86のコンピューターシミュレーション解析により構造の非常に類似したmorphine、codeine、heroinを識別できる抗体に改変できる可能性を示すことができた。抗体特異性の目標はmorphine、codeine、heroinのうちmorphineにのみ特異的に結合するとしたが、現段階ではheroinに対する結合を抑制するには十分であるが、codeineに対しては不十分であると推測される変異体抗体モデリングにとどまった。M86のうち2つのアミノ酸残基をターゲットとして変異体モデリングを行ったにもかかわらず側鎖の配向性の変化は全アミノ酸残基に及んでいたため、2つのアミノ酸残基だけでなく広範囲な検討が必要であろうと推測された。

文献リスト

第 1 章

(著書)

橋口周平、伊東祐二、田中孝一、松木園美穂、村岡賢、杉村和久、「ファージディスプレイと Beyond antibody : ~ 抗体様分子による分子標的 ~ 」生化学 第 82 巻 第 8 号、pp. 710-726、2010

第 3 章

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Kazuhisa Sugimura. 「 Generation of an Immune Antibody Phage-Display-Library Directed to Narcotics. 」 Proc. 5th International Peptide Symposium (Kyoto, Japan) Vol. 2010 pp. 273

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Yuta Hamazoe, Kazuhisa Sugimura. 「 Single-Chain Antibodies (ScFv) Specific to the Narcotics Isolated from Immune Phage Libraries. 」 48th Japanese Peptide Symposium (Sapporo, Japan) Vol. 2011 pp. 263 - 264

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Yuta Hamazoe, Kazuhisa Sugimura. 「 Characterization of a single chain Fv antibody that reacts with free morphine 」 Antibodies, *Accepted: 5 February 2013/ Published: February 2013*

(特許出願)

杉村和久、有蘭幸司、高良真也、明日山康生、松木園美穂、亀川麻梨子、「抗モルヒネ抗体、抗モルヒネ抗体を用いたモルヒネの測定方法、および抗モルヒネ抗体を含むモルヒネ測定キット」特願 2011-103593、平成 23 年 5 月 6 日

学会報告

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Kazuhisa Sugimura.

“ Generation of an immune antibody phage-display-library directed to narcotics. ”

5th International Peptide Symposium, Dec 4-9, 2010, Kyoto, Japan

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Kazuhisa Sugimura.

“ A High-affinity morphine-specific mouse single-chain Fv (scFv) antibody showing minimal cross-reactivity with narcotics. ”

PEGS : the essential protein engineering summit, May 9-13, 2011 Boston, MA USA

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Yuta Hamazoe, Kazuhisa Sugimura.

「ファージディスプレイ法を用いた薬物に対する抗体作製」

The 11th ASIA MEDICAL SHOW , Jul 21-23, 2011, Fukuoka, Japan

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Yuta Hamazoe, Kazuhisa Sugimura.

“ Single-chain antibodies specific to the narcotics isolated from immune phage libraries. ”

48th Japanese Peptide Symposium, Sep 27-29, 2011, Sapporo Japan

Miho Matsukizono, Mariko Kamegawa, Koichi Tanaka, Shinya Kohra, Koji Arizono, Yuta Hamazoe, Syuhei Hashiguchi, Kazuhisa Sugimura

“ Development of single-chain Fv (scFv) antibody probe derived from phage-display-library detecting narcotic components of opium. ”

85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Dec 14-16, 2012, Fukuoka, Japan

謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院理工学研究科物質生産工学専攻分子生物工学講座（杉村研究室）にて行われた研究であり、本論文は私が本研究室に在籍した平成 20 年度から平成 24 年度の研究成果をまとめたものです。

主指導教官の杉村和久教授、副指導教官の隅田泰生教授、伊東祐二教授には、4 年もの長い間、終始適切なご指導とご鞭撻を賜り心より感謝を申し上げます。杉村教授には博士後期課程進学のかきかけをつくっていただきました。今こうしていただけるのもひとえに杉村教授のおかげです。このような機会をつくっていただいた点につきまして心より感謝致します。また、この 4 年間で私の至らないところにより大変ご面倒をおかけしましたが、御多忙にもかかわらず丁寧にご指導をしていただき有難うございました。伊東教授にも、先生が当研究室の准教授でいらっしゃった 2 年間を中心として、その後も特別演習・専攻ゼミナールや学位論文予備審査等以外でも様々な場面で御相談にのっていただき誠に有難うございました。隅田教授には私の方からもっと積極的に先生のところへ伺うべきだったのですが、そのようにできなかったため特別演習・専攻ゼミナールや学位論文予備審査等限られた時間となりましたが、それでも鋭いご指摘と適切なご指導賜りました。有難うございました。4 年間で技術・学問を学んだことは当然ですが、それ以上に先生方より研究者として、指導者としてどうあるべきかを学べました。私にとりまして先生方はやはり非常に怖い存在でした。先生方のように威厳のある研究者を目指していきたいと思えます。

また 4 年間もの長い間、鹿児島大学への出向を快く承認していただいた㈱ジーンネットの皆様にも心より感謝申し上げます。特に明日山社長、亀川様、渡辺様には様々な面でサポートしていただきました。今後の業務で貢献できるよう頑張っていきます。

本研究におきましては、熊本県立大学の有園教授、長崎大学の高良教授、九州大学の田中准教授、中央税関研究所の中村様、水田様のご協力をいただきました。また、鹿児島大学杉村研の橋口助教にはありとあらゆる御相談とご指導をしていただきました。本研究が無事遂行できたのは皆様のご協力のおかげです。心より感謝申し上げます。

杉村研究室の皆様にも楽しい研究生活を共有していただき、また様々なサポートをしていただき有難うございました。沢山の研究仲間が増えたことに嬉しく思います。

主指導教官の杉村和久教授、副指導教官の隅田泰生教授、伊東祐二教授をはじめとし、様々な方々のご協力のもと本研究を遂行することができました。心より御礼申し上げます。皆様の善意に恥じぬよう今後の業務を遂行していく所存です。

平成 25 年 3 月

松木園美穂