

博士論文

IgA 結合ペプチドによる

特異的精製システムの開発に関する研究

Development of IgA Purification System by Using IgA-specific Peptide

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 システム情報科学専攻

畠中 孝彰

目次

要旨	1-2
各章の概要	3-4
第1章 研究背景	5-17
1-1 抗体	
1-2 ヒト IgG 抗体とその精製方法	
1-3 ヒト IgA 抗体とその精製方法	
1-4 マウス IgA 抗体とその精製方法	
第2章 ファージディスプレイシステム	18-26
2-1 ファージディスプレイシステムとは	
・ M13 ファージディスプレイシステム	
・ T7 ファージディスプレイシステム	
2-2 標的特異的分子のスクリーニング方法	
第3章 ヒト IgA 結合ペプチドの単離	27-40
3-1 目的	
3-2 材料と方法	
3-3 結果	
・ ランダムペプチドライブラリからのヒト IgA 結合ファージの単離	
・ A2 ペプチドの機能解析	
・ ヒト IgA への結合に重要な残基の同定	
3-4 まとめと考察	
第4章 ヒト IgA 結合ペプチドのアフィニティマチュレーション	41-68
4-1 目的	
4-2 材料と方法	
4-3 結果	
・ 結合モチーフ保存ライブラリからの高親和性ペプチドの単離	
・ A2-3a ペプチドの機能解析	
・ 合成ペプチドスクリーニング	
・ Opt-1 ペプチドのデザインと機能解析	
・ ペプチド分子内ジスルフィド結合の重要性	

- ・分子シミュレーション
- ・ヒト IgA 結合ペプチドの親和性増強メカニズム

4-4 まとめと考察

第5章 ヒト IgA 結合ペプチドの結合特異性改善 69-84

5-1 目的

5-2 材料と方法

5-3 結果

- ・ Opt-1 ペプチド中の疎水性クラスター
- ・ Opt-2 ペプチドのデザインと機能解析
- ・ 非特異性を引き起こす残基の同定
- ・ Opt-2_M2Q ペプチドのデザインと機能解析
- ・ Opt-3 ペプチドのデザインと機能解析

5-4 まとめと考察

第6章 IgA 結合ペプチドのヒト/マウス間における特異性変換 85-98

6-1 目的

6-2 材料と方法

6-3 結果

- ・ ヒト IgA 結合ペプチドのマウス IgA に対する交差反応性
- ・ マウス IgA への結合に関わる残基の同定
- ・ モチーフ保存ライブラリからのマウス IgA 結合ファージの単離
- ・ MA1 ペプチドの機能解析

6-4 まとめと考察

第7章 総括と今後の課題 99-101

引用文献 102-109

業績目録 110-114

謝辞 115

要旨

抗体は、我々の体内において免疫機能の中枢を担う重要な機能分子であり、中でも IgG 抗体は現在、癌や自己免疫疾患、ウイルス感染症などに対する抗体医薬品のスキュフォールドとして医療の現場において用いられている。IgG 抗体が抗体医薬品のスキュフォールドとして用いられている理由の一つに、FcγRIIIa を介したナチュラルキラー細胞（NK 細胞）による細胞障害活性誘導能力があげられるが、近年、IgA 抗体も FcαR を介して免疫細胞の中で最も多い好中球を効果的に動員し、腫瘍細胞に対し高い細胞障害活性（オートファジー）を誘導できることが明らかとなってきた。また、血液中で産生された IgA 抗体は、基底膜側の細胞膜上に発現している pIgR を介して細胞を通過し粘膜層へと輸送される際に（トランスサイトーシス）、細胞の中に侵入してきたウイルスタンパク質と結合して、ウイルス粒子の形成を阻害するという細胞内抗体としての機能も注目されている。このように、IgA 抗体も IgG 抗体と同様に、医薬品としての機能性を十分に有していると考えられるが、抗体医薬品としての使用はおろか、未だ、IgA 抗体自身の機能に関する研究報告も、IgG 抗体と比較すると非常に少ない。

このように、IgA 抗体に関する研究が十分に進展していないことの一理由の一つとして、確立された精製システムが未だ無いことが挙げられる。従来は、IgA₁ の糖鎖を認識するレクチンである Jacalin やバクテリア由来の Sir22 タンパクなどを用いたアフィニティクロマトグラフィーによる精製が行われてきたが、これらの分子は結合力・特異性の面で不十分であり、また、Sir22 タンパクの IgA 結合ドメインを取り出した IgA に非常に高い親和性・特異性を有する Sap ペプチドについても、ペプチド鎖が 50 残基と長いため、合成には多額のコストが必要となる。つまり、現在、より親和性・特異性・生産コストに優れたリガンドが求められている。これらのことから我々は、合成・精製・修飾が容易でコストにも優れる 20 残基以下の IgA 特異的高親和性ペプチドをデザインし、これによる新規ヒト IgA 精製システムの構築を目的として研究を行った。

ヒト IgA 特異的ペプチドをデザインするために我々は、T7 フェージディスプレイシステムを利用したランダムペプチドライブラリを構築した。これを用いてヒト IgA 抗体に対してバイオパンニングを行ったところ、4 種のヒト IgA 結合フェージクローン（A1-A4）が単離された。これらの内最も結合活性の高かった A2 配列について合成ペプチドを調製し、その性状を解析したところ、親和性 ($K_d=1300$ nM)・特異性ともに精製用アフィニティリガン

ドとしては十分ではないことが明らかとなった。そこで我々は、これの親和性・特異性を改善するため、A2 配列を基にした部分変異ライブラリを作製して、IgA への結合に重要な残基を同定するとともに、さらに、重要残基を保存してそれ以外を完全にランダム化したライブラリを作製して、A2 ペプチドよりも、親和性・特異性の面で優れる A2-3a ペプチド ($K_d=530$ nM) を単離した。次いで、A2-3a ペプチドをベースとして変異ペプチドを合成し、それらのヒト IgA に対する結合親和性を指標に、IgA への親和性上昇に効果のあるアミノ酸置換を同定し、また、それらを組み合わせることで 33 nM (K_d) と極めて高い親和性を有する Opt-1 ペプチドのデザインに成功した。さらに、MD シミュレーションを用いて作製した Opt-1 ペプチドの分子モデルを基に改良 (アミノ酸置換) を行うことで、非常に高い特異性で IgA を認識する Opt-3 ペプチドのデザインに成功し、ヒト血清中からの特異的な IgA 精製を達成した。

ヒト IgA 抗体特異的ペプチドをデザインする一方で我々は、デザインしたペプチドがマウスの IgA 抗体に対しても弱いながら結合力を有することを見出した。ヒト IgA 抗体研究の発展上、マウスを用いた動物実験を行う必要があると考えられるが、ヒト IgA 抗体の場合と同様に、マウス IgA 抗体の精製システムも未だ確立されていない。そこで我々は、ヒト IgA 結合ペプチドを基にした変異ライブラリを構築し、マウス IgA 抗体をより高い親和性で認識するペプチドのデザインを試みた。結果、マウス IgA 抗体を高い特異性で認識するペプチドの単離に成功したが、親和性の面で改良する必要があることが示された。

本研究においてデザインされたヒト IgA 抗体、マウス IgA 抗体特異的ペプチドは、ヒト IgA 抗体に関する研究を進展させ、ヒト IgA 抗体の医薬品化を促進させることが期待される。また、ライブラリ技術を利用した我々の手法は、医薬品化やその他のバイオマテリアルとしての応用を目的とした標的特異的ペプチドのデザインをサポートする新たな手法となると考えられる。

各章の概要

本論文は、T7 フェージディスプレイシステムを利用したライブラリ技術を用いて、全く新規の IgA 特異的結合ペプチドのデザインと、これを用いた新規ヒト/マウス IgA 抗体特異的な精製システムの構築を行ったものであり、全7章から成る。

第1章は、研究背景として、抗体（特に IgG、IgA）の医薬品としての有用性を記述するとともに、その製造過程での精製システムにおける問題点について提起した。抗体は、我々の免疫機能を担う重要な分子であり、特に IgG においては、すでに、癌や自己免疫疾患を中心に抗体医薬品として臨床の現場で用いられている。一方、近年 IgA が、免疫細胞中で最も多い好中球を効果的に動員し、腫瘍細胞を傷害できることが明らかとなってきた。このことから、IgA もまた IgG と同様に抗体医薬品としての有用性を有していると考えられるが、IgG におけるプロテイン A カラム精製のような確立された精製システムが未だ無いことが、IgA の医薬品化を妨げる一つの原因となっている。そこで、IgA 結合性のペプチドをデザインすることにより、新たな IgA 精製システムの開発を試みた。

第2章は、本研究で IgA 結合性ペプチドのデザインに用いたフェージディスプレイ法について述べた。1985 年、Smith 等により、M13 フェージを用いたフェージディスプレイ法が報告されて以来、この技術を用いて、抗体やペプチドの分子ライブラリを構築することで、多くの機能性分子が発見されてきた。また、近年、T7 フェージを用いたランダムペプチドライブラリによる機能性ペプチドの単離が多く報告されており、本研究で用いた T7 フェージの利点について、M13 フェージとの比較を交えながら概説した。

第3章は、T7 フェージディスプレイ法によって構築されたランダムペプチドライブラリからのヒト IgA 結合ペプチドの単離・デザインを記述した。T7 フェージペプチドライブラリを用いてヒト IgA に対してバイオパンニングを行った結果、4 種類の IgA 結合フェージクローン（A1-A4）が単離され、この内最も結合力の高かった A2 ペプチドを用い、ペプチドを固定化したアフィニティカラムでのヒト IgA の精製が原理的に可能であることを示した。しかし、一方で、親和性・特異性の改良が必要であることが明らかとなり、A2 配列を基にした部分変異ペプチドフェージライブラリを用いることで、ヒト IgA への結合に必須な残基の同定を行った。

第4章は、3章で得られたヒト IgA 結合ペプチドの親和性増強の検討を行った。結合に必須な残基を固定化し、それ以外をランダム化したライブラリを用いることで、A2 ($K_d=1.3$ μM) よりも親和性の高い A2-3a ($K_d=530$ nM) ペプチドの単離に成功し、さらに、ライブラリより得られたヒト IgA 結合配列データと合成ペプチドを用いた手法により、親和性上昇に効果のあるアミノ酸を同定することで、極めて高い親和性を持つ Opt-1 ペプチド ($K_d=33$ nM) のデザインに成功した。一方で、Opt-1 ペプチドは IgA 以外の血清タンパクに非特異的な結合を示した。

第5章では、Opt-1 ペプチドの IgA との結合における特異性の改善を試みた。分子シミュレーションにより得られた Opt-1 ペプチドの溶液中におけるモデル構造から、Opt-1 ペプチドにおいて非特異的結合を引き起こす残基を推定した。さらに、それらの残基に変異導入したペプチドのアフィニティカラムによる血清中 IgA の精製実験を基に改良を加え、最終的に高い特異性と親和性を持つ Opt-3 ペプチドをデザインし、そのペプチドによる IgA 精製システムを確立した。

第6章では、得られたヒト IgA 結合性ペプチドのマウス IgA 結合性ペプチドへの特異性変換の試みを行った。ヒト IgA 結合ペプチドは弱いながらもマウスの IgA を認識したため、ヒト IgA 結合ペプチドを基にした部分変異ペプチドライブラリを構築し、マウス IgA に対してスクリーニングを行った。この結果、ヒトよりもマウスの IgA を高い親和性で認識する MA1 ペプチドの単離に成功したが、親和性が 60 μM (K_d) と低いため、親和性の改善が今後必要であることが分かった。

第7章は、研究の総括であり、今回用いたヒト IgA、マウス IgA 特異的ペプチドのデザイン手法の一般性、得られたペプチドの IgA 精製用リガンドとしての有用性についてまとめ、今後の展望と課題について述べた。

第 1 章

研究背景

1-1 抗体

抗体は我々の免疫システムの中枢を担う重要な機能分子で、重鎖と軽鎖からなるヘテロ四量体の機能分子である。「抗体」という名前は抗原に結合する機能を重視した名称で、物質としては、免疫グロブリン (immunoglobulin、Ig) と呼ばれており、我々の体内においては、IgM、IgG、IgA、IgE、IgD と5種類のクラスが存在する (図1-1 [1]、表1-1)。これら抗体が、体内に侵入してきた細菌やウイルスなどの微生物、あるいはウイルス感染細胞を特異的に認識して結合し、その抗原抗体複合体をマクロファージや好中球などの貪食細胞が認識して体内から除去したり (オプソニン化)、毒素や感染エピトープを認識して毒性・感染力を低下させたり (中和作用) する。また、補体分子やリンパ球を介した免疫反応を誘導して、我々を病原から保護している。

このように、抗体は我々の体内において重要な働きを担う一方、その標的分子に対する高い親和性と特異性から、古くより生化学の分野において検出試薬として用いられてきた重要な分子ツールである。また、近年においては、特にIgG (1-2項) が、多くの癌や自己免疫疾患を中心に抗体医薬として医療の現場に用いられており、IgA (1-3項) についても、近年の研究から新たな抗体医薬スキャフォールドとしての利用が期待されている。

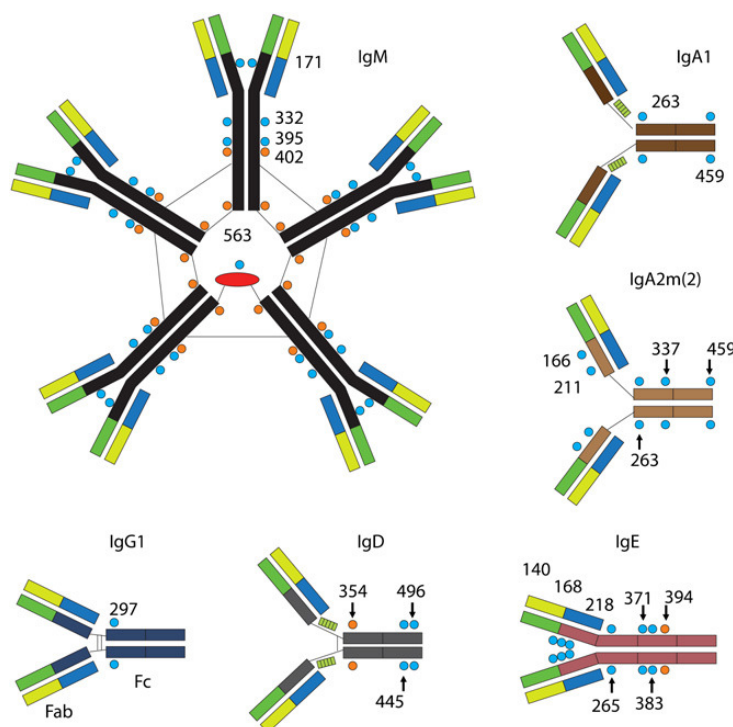


図1-1 抗体の種類と構造

丸は糖鎖修飾サイトを示し、数字はアミノ酸番号を示す。

J Allergy Clin Immunol 2010, **125**, 41-52.より引用。

表1-1 抗体の性質と機能

性状	免疫グロブリン								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
重鎖	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	μ	$\alpha 1$	$\alpha 2$	δ	ϵ
分子量 (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
血清中含有量 (mg/ml)	9	3	1	0.5	1.5	3	0.5	0.03	5.00E-05
血清中半減期	21	20	7	21	10	6	6	3	2
機能									
NK細胞活性化	+++	-	++	-	-	-	-	-	-
マクロファージ及び他の食細胞への結合	+	-	+	-/+	=	+	+	-	+
オプソニン化	+++	-	++	+	-	+	+	-	-
マスト細胞好塩基球への結合	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
補体活性化 (古典経路)	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-
補体活性化 (第二経路)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
分布									
胎盤通過能	+++	+	++	-/+	-	-	-	-	-
血管上皮細胞を介する輸送	-	-	-	-	+	+++ (2量体)	+++ (2量体)	-	-
血管外組織への拡散	+++	+++	+++	+++	-/+	++ (1量体)	++ (1量体)	-	+

株式会社南江堂発行 免疫生物学—免疫の正常と病理— p143, p361 より抜粋

1-2 ヒト IgG 抗体とその精製方法

ヒト IgG 抗体

IgG 抗体は血液中で最も多い抗体 (8~17 mg/ml) のクラスであり、定常領域の違いにより IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ と 4 つのサブクラスに分けられる。免疫応答においては、ウイルスなどの病原体に結合し細胞への感染を阻害する中和活性や、マクロファージなどの食細胞に標的を認識させるためのオプソニン化、ナチュラルキラー細胞 (NK) を動員し、癌などの腫瘍細胞を攻撃する抗体依存性細胞障害活性 (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity ; ADCC) (図 1-2 A)、補体分子を介した補体依存性細胞障害活性 (Complement Dependent Cytotoxicity) など様々な働きを担っている。また、IgG₁、IgG₂、IgG₄ はネオナタール Fc レセプター (neonatal Fc receptor ; FcRn) を介したリサイクリング機能により、血中半減期が 21 日と非常に長い (図 1-2 B) といった特徴も併せ持つ [2-4]。このように、IgG は非常に有用で多彩な機能を持つが、中でも、IgG₁ が NK 細胞による高い ADCC 誘導能力から、現在主に抗体医薬品として様々な疾患へ適用されている。

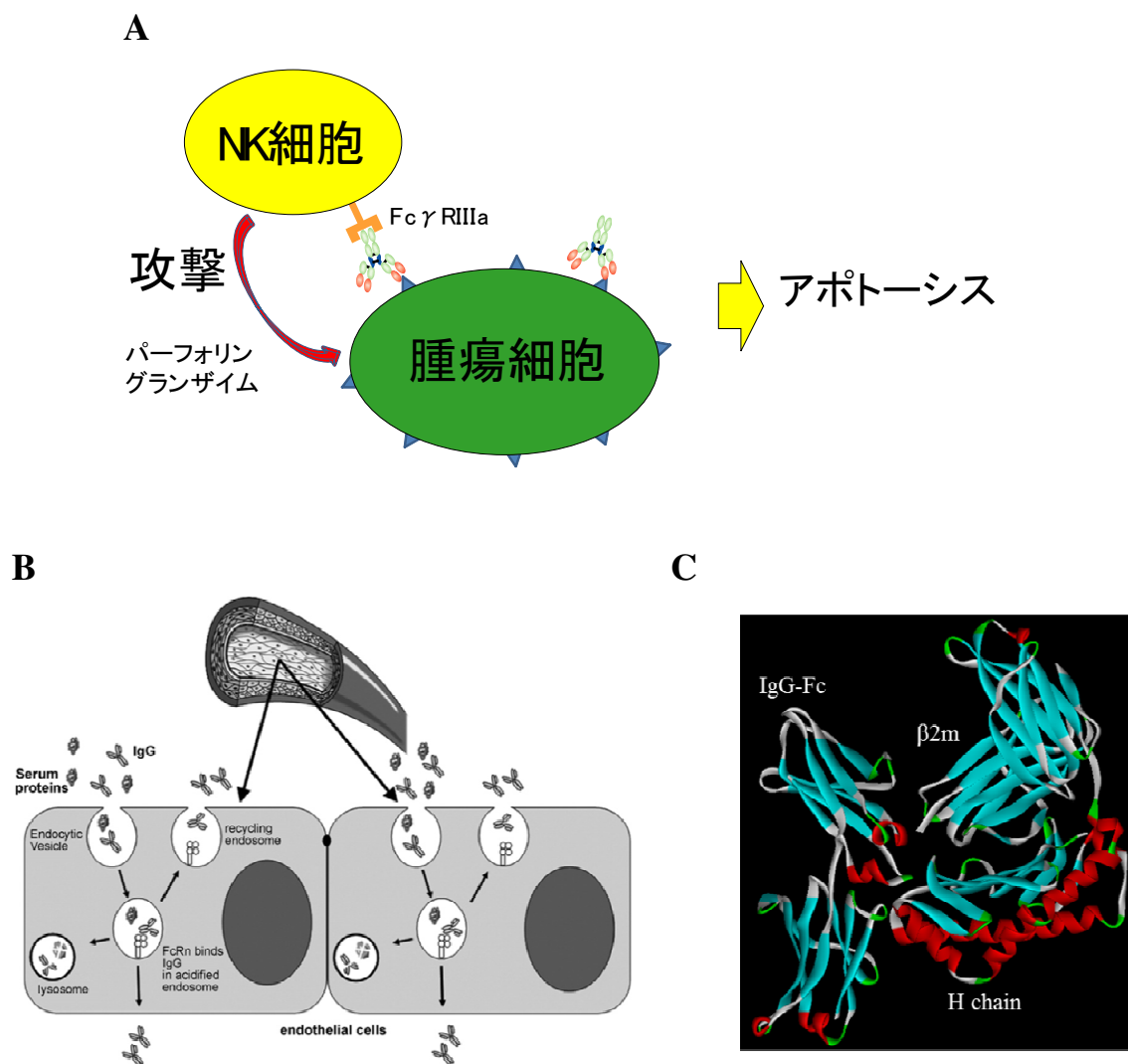


図1-2 NK細胞を介した抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）とネオナタールFcレセプター（FcRn）によるIgG抗体のリサイクリング

A. 腫瘍細胞に特異的に結合している抗体（IgG₁）に、Fc γ RIIIaを介してNK細胞が結合すると、NK細胞が活性化され、NK細胞よりパーフォリン（細胞膜に穴を開ける）、グランザイム（セリンプロテアーゼの一種；カスパーゼの活性化を誘導）が放出される。最終的に腫瘍細胞はアポトーシスにより死ぬ。B. エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたIgGは弱酸性条件下（pH 5前後）のエンドソーム内においてFcRnと結合する。FcRnと結合しなかったIgGはリソソームにて分解を受けるが、FcRnに結合したIgGは、細胞外へ運ばれpH変化（pH5からpH7）によりFcRnから解離し、細胞外へと放出される [4]。Vet Immunol Immunopathol 2009, 128, 171-177より引用。C. IgG-FcとFcRn複合体の結晶構造（PDBID: 1frt [5]）FcRnは β 2ミクログロブリンとH鎖から構成されている。

ヒト IgG 抗体医薬

抗体医薬のスキヤフォールドとしては現在、前項に挙げたように、非常に長い半減期（21日）や ADCC 活性、CDC 活性を誘導できるなどといった特徴を併せ持つ IgG（IgG₁）が主に用いられている。この IgG₁ 抗体医薬は従来の低分子薬とは異なり、我々の身体が持つ免疫システムを利用して癌細胞などの特定の細胞・抗原を特異的に攻撃・除去するため、高い効果と少ない副作用が期待される画期的な医薬品である。2012 年現在においては、癌や自己免疫疾患を中心として、40 種弱の抗体医薬品が上市されている。

さらに近年、IgG の CH2 領域に存在する糖鎖中のフコースを除去することで FcγRIIIa との結合力を上昇させ、NK 細胞による ADCC 効果を高める技術 [6-8]（ポテリジェント技術：図 1-3）やアミノ酸置換により補体への結合活性を高める技術 [9]（コンプリジェント技術）、またはその両方を併せ持つ IgG 抗体の開発なども行われており [10]、臨床試験段階に入っているもの 12 種、2012 年現在ですでに承認されているもの 1 種（ポテリジオ点滴静注：モガムリズマブ；抗 CCR4 ポテリジェント抗体、2012 年 3 月 30 日承認）と、多くの注目を集めている [11, 12]。このように IgG、特に IgG₁ を用いた研究開発・臨床への応用は非常に進展しているが、これらは、IgG の生産、精製システムが確立されているということに支えられている。

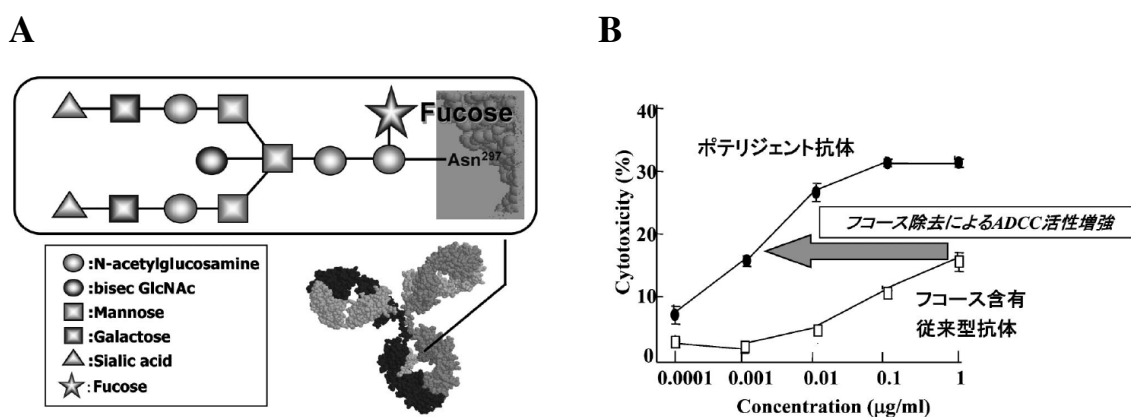


図 1-3 ポテリジェント抗体

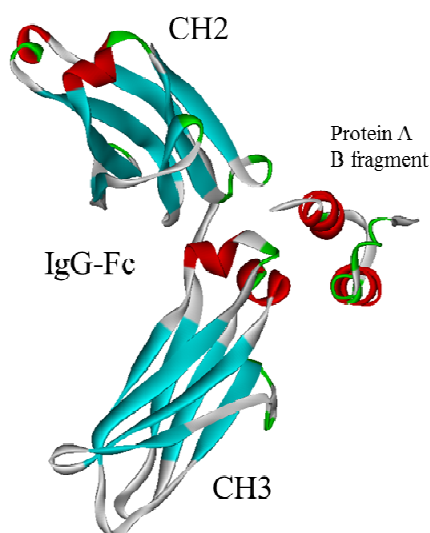
A. IgG の Fc 部位に存在する 297 番目の Asn には、図に示すような糖鎖が付加しており、この Fucose（☆印）を除去する技術をポテリジェント技術と呼ぶ。B. ポテリジェント抗体は、従来型の抗体に比べ ADCC 活性が 100 倍以上上昇している。縦軸には細胞障害率、横軸は抗体濃度を示す。Yakugaku Zasshi 2009, 129, 3-9.より引用。

ヒト IgG 抗体の精製方法

現在、IgG 抗体は、アフィニティ精製の後、イオン交換クロマトグラフィー、次いでゲル濾過クロマトグラフィーと多段階の工程により精製されている。アフィニティ精製の担体としては一般的に、黄色ブドウ球菌のコートタンパクの一つであるプロテイン A (42 kDa) が用いられているが、このプロテイン A は、ヒト IgG_{1,2,4} の CH2 と CH3 間の領域を非常に高い特異性と親和性で認識する (図 1-4A) (IgG₃ に対する親和性はほとんどない)。また、このプロテイン A はヒト IgG だけではなく、マウス IgG や豚 IgG など多様な種の IgG を精製することができる (図 1-4B)。カラムからの溶出時には一般的に酸性緩衝液 (pH 2.7 ~ 3.5) が用いられるため、精製した抗体の変性・凝集がしばしば問題視されるが [13-16]、近年、ヒスチジンスキャニングなどの手法により pH 感受性の増大したプロテイン A による、より穏和な条件下での IgG 精製についての研究が報告されている。また、カラムに非特異吸着した疎水性分子や DNA、エンドトキシン、ウイルスなどを除去する目的で、水酸化ナトリウム溶液によるカラムの洗浄・再生処理が一般的に行われる。従来プロテイン A ではこの操作により、吸着キャパシティの低下が生じていたが、近年、アミノ酸置換により高いアルカリ耐性を獲得したプロテイン A が報告された [17]。

このように、プロテイン A を用いたゴールドスタンダードな精製手法が、ヒト IgG 抗体に関する研究並びに医薬品化を大いに支えている。

A



B

動物種	サブクラス	結合性	動物種	サブクラス	結合性
ヒト	IgG1	◎	ヤギ	IgG1	×
	IgG2	◎		IgG2	◎
	IgG3	△	ヒツジ	IgG1	×
	IgG4	◎		IgG2	◎
	IgM	○	ブタ	IgG	◎
	IgA	○	モルモット	IgG	◎
IgE	○	イヌ	IgG	◎	
マウス	IgG1	△	ネコ	IgG	◎
	IgG2a	◎	ハムスター	IgG	△
	IgG2b	◎	ウサギ	IgG	◎
ラット	IgG3	◎			
	IgG1	○			
	IgG2a	×			
ニワトリ	IgG2b	×			
	IgG2c	◎			
ウシ	IgG	×			
	IgY	×			
	IgG1	×			
	IgG2	◎			

図 1-4 プロテイン A の結晶構造と結合特異性

A. IgG-Fc とプロテイン A (フラグメント B) 複合体の結晶構造 (PDB ID: 1FC2)。B. 種々の動物の抗体に対するプロテイン A の結合特異性。◎通常の条件 (pH 7) で強く結合する。
○ 通常の条件 (pH 7) で弱く結合する。条件を変えれば結合性が増す (pH 8 以上)。× 結合が非常に弱い。結合しない。

1-3 ヒト IgA 抗体とその精製方法

ヒト IgA 抗体

IgA 抗体は、イムノグロブリン (Ig) の中で一日の生産量が最も多い抗体 (~66 mg/kg/day) であり、ウイルスや細菌に対する最初の防衛ラインである粘膜において主要な役割を担っている [18, 19]。IgA も IgG と同様に、定常領域 (主にヒンジ領域) の異なる 2 つのサブタイプ、IgA₁、IgA₂ (IgA₂ はそのアミノ酸配列の違いからさらに二つのサブクラスに分類される。) に分けられる [20]。IgA₁ と IgA₂ 間での大きな違いは、ヒンジ部の長さであり、IgA₁ のヒンジ領域はプロリンリッチな 19 残基から成るが、IgA₂ においては 6 残基のアミノ酸で構成されている。また、IgA₁ のヒンジ領域には、肺炎連鎖球菌やインフルエンザ菌等の持つプロテアーゼによる切断サイトを有しているが、IgA₂ はこれが欠損しているため、IgA₁ よりも細菌由来のプロテアーゼ耐性が高い [21, 22]。血中においては IgA₁ の量が血中 IgA 全体の 90% 以上と、その大部分を占めているのに対し、粘液中においては IgA₂ の量が 30~50% と存在比が上昇することもこの高プロテアーゼ耐性と関連していると考えられている [19]。また、糖鎖の修飾位置、数も異なり、特に IgA₁ はヒンジ領域に 5 つの O 型糖鎖を持つという特徴を有している (図 1-5)。このヒンジ部の O 型糖鎖は IgA 腎症 (IgA が腎糸球体メサンギウム領域に沈着し、免疫複合体を形成することでメサンギウム細胞を活性化させ、炎症を誘発する) の発症と深く関わっていることが多くの研究から明らかになっている [23-25]。

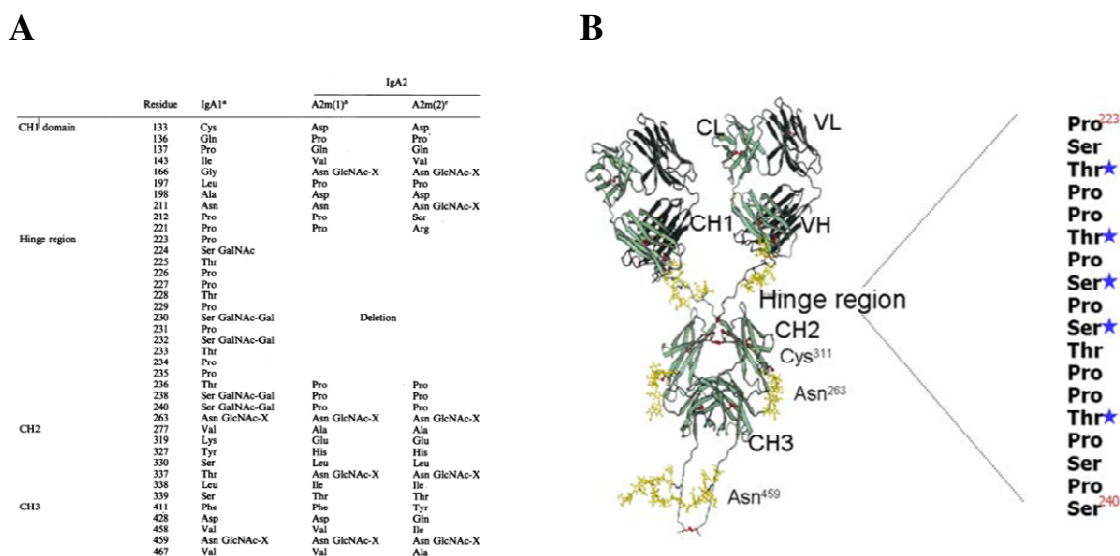


図 1-5 IgA₁ と IgA₂ 間のアミノ酸配列、糖鎖修飾部位の違い

A. IgA₁ と IgA₂ 間のアミノ酸配列、糖鎖修飾部位の違い [19]。 *Biochem J* 1990, **271**, 285-296. より引用。 B. IgA₁ 構造中の糖鎖修飾部位 [24]。 *Clin Exp Nephrol* 2009, **13**, 415-423. より引用。 ★糖鎖修飾サイト

また、IgA は、血中においても IgG に次いで 2 番目に多い Ig のクラスである (表 1-1)。含有量としては、1-4 mg/ml でありその内約 90% 程度を IgA₁ が占め [19]、多くは単量体であるが、粘膜部位へと輸送される際には、重鎖の C 末端に存在するフリーのシステインを介して 2 つの IgA が J 鎖 (Joining chain) に結合し、ヘテロ 3 量体を形成する。その後、基底膜側の細胞上に発現している poly Ig receptor (pIgR) と結合して、トランスサイトーシス機構により粘膜側へと輸送される。粘膜表面に到達後、poly Ig receptor がプロテアーゼにより分解され、粘液中へと放出されるが、この際に poly Ig receptor は Secretory component (SC) として 2 量体 IgA に結合した状態で存在している [26]。これまでは、粘膜免疫における重要性から、ワクチンターゲットとしての研究が行われてきたが [27, 28]、近年、免疫細胞中で最も多い好中球 (白血球の 50~70% を占める) を動員して、腫瘍細胞に対し ADCC (オートファジー) を誘導できることが示されたことから (図 1-6)、新たな抗体医薬スキュフォールドの候補として注目されている [29]。

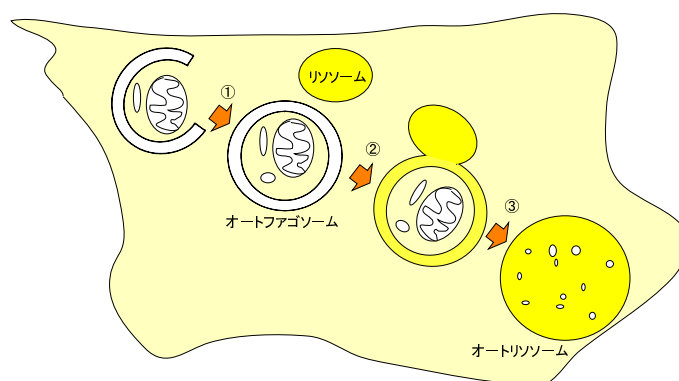


図1-6 オートファジー

①細胞質の一部が膜に囲まれ、オートファゴソームとなる。②オートファゴソームと、多種のプロテアーゼを含むリソソームが融合する。③オートファゴソーム内のタンパク質が分解される。生じたアミノ酸は再利用される。

ヒト IgA 抗体の機能性

IgA はこれまで、その粘膜免疫における重要性からワクチン開発に焦点があてられてきたが、近年、癌細胞を殺傷する能力を有していることがいくつかのグループにより報告された [30-33]。Dechant 等は肺癌や大腸癌、膠芽細胞腫などの非上皮細胞性の癌に共通の抗原である Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) を特異的に認識するリコンビナント IgA を作製し、これが polymorphonuclear cell (多核球：好中球が 90%以上を占める) 存在下で、非常に高い細胞障害活性を誘導できることを示した (図1-7 A, B) [32]。また、Huls らも同様に Ep-CAM 特異的 IgA を用いることで、多核球・血液存在下で大腸がん細胞 (LS174T) を特異的に殺傷することができることを示している [31]。

また、IgA は、pIgR を介したトランスサイトシス [38] (図1-8) の際に、エンドソーム内のウイルスタンパクと結合して、ウイルス粒子の複製を阻害するという細胞内抗体としての機能も有していることが近年明らかとなり注目を集めている [34-37]。

このように、IgA もまた IgG と同様に、抗体医薬としての機能性・有用性を十分に有していると考えられるが、未だ、IgA をスキャフォールドとした医薬品はおろか、臨床試験段階のものすら無い。これの原因の一つに、IgA においては、IgG におけるプロテイン A カラム精製のような精製方法が、未だ確立されていないということが挙げられる。

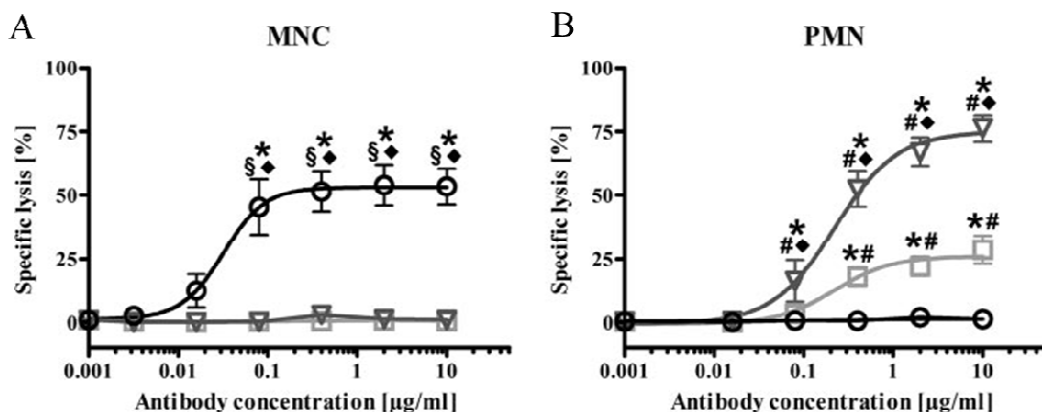


図1-7 IgAによる腫瘍細胞の傷害

MNC（単核球：A）、PMN（B）存在下における、抗EGFR-IgG、-IgA抗体（○;IgG, □;IgA₁, ▽;IgA₂）の、表皮癌細胞A431に対する細胞傷害活性。J Immunol 2007, 179, 2936-2943.より引用。

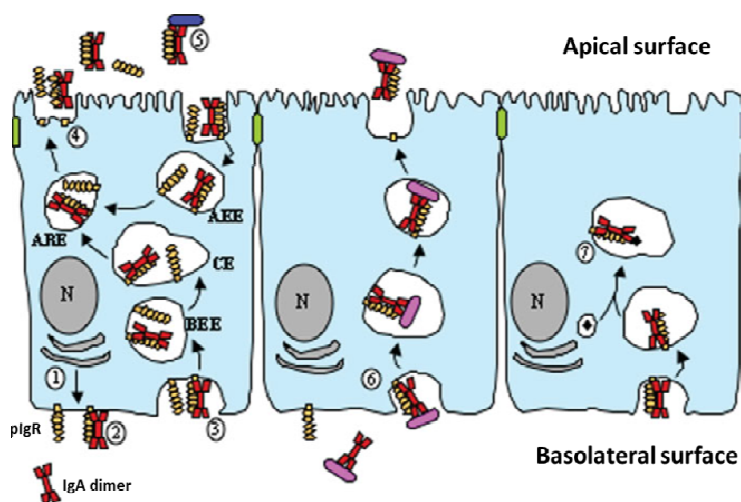


図1-8 IgAのトランスサイトーシス機構

①細胞内で発現したpIgRがbasolateral surfaceに移動し、②2量体のIgAと結合する。その後、③エンドサイトーシスにより細胞内に取込まれ、BEE→CE→AREと各エンドソームを経由してapical surfaceへと輸送される。④apical surface（mucosal surface）ではpIgRが酵素により分解され、dimeric IgAとpIgRの複合体がsecretory IgA（s-IgA）として放出される。⑤s-IgAはmucosal surfaceにて抗原や細菌に対する免疫を担う。⑥basolateral surfaceで2量体IgAと結合した抗原タンパク等は、上記の過程を経てapical surfaceへと輸送される場合がある。⑦IgAはトランスサイトーシスの際にウイルスタンパクに結合し、ウイルス粒子の複製を阻害する。抗原タンパク：青、ピンク、◆；ウイルスタンパク、ARE；apical recycling endosome、AEE；apical early endosome、BEE；basolateral early endosome、CE；common endosome。J Pathol 2006, 208, 270-282.より引用。

ヒト IgA 抗体の精製方法

従来の IgA 精製方法としては、L 鎖を認識する protein L で粗精製した後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製する方法や、IgA の糖鎖を認識するレクチンである Jackalin、protein A mimetic peptide TG19318、バクテリア由来 IgA 結合タンパク Sir22 などによるアフィニティ精製法が報告されている [39-44]。しかし、jackalin は IgA₂ に結合することができず、特異性、結合力も低いこと、その他のアフィニティリガンドに関しても、結合力、特異性が十分でないなどといった問題点がある [40]。この一方、2002 年、Sadin 等により、IgA を非常に高い特異性と親和性で認識する Sap peptide が報告された [45] (図 1-9)。このペプチドは、バクテリア由来 IgA 結合タンパク Sir22 の IgA 結合ドメインを取り出した約 50 残基のペプチドであり (図 1-9 A)、このペプチドを固定化したアフィニティカラムによる、血清中からの IgA 精製がすでに報告されている (図 1-9 C)。しかし、このペプチドは、50 残基と非常に長いいため合成は困難であり、また、末端の Cys を介して 2 量体化した状態でなければ IgA に対する親和性が非常に低い (図 1-9 B)、S-S 結合の形成、二量体ペプチドの精製と、ペプチド自体の取り扱いも複雑となり、結果としてペプチド自体の生産コストが非常に高額となる。これらのことから現在、特異性、結合親和性に加え、それ自体の生産コストにも優れた新たなリガンドが求められている。

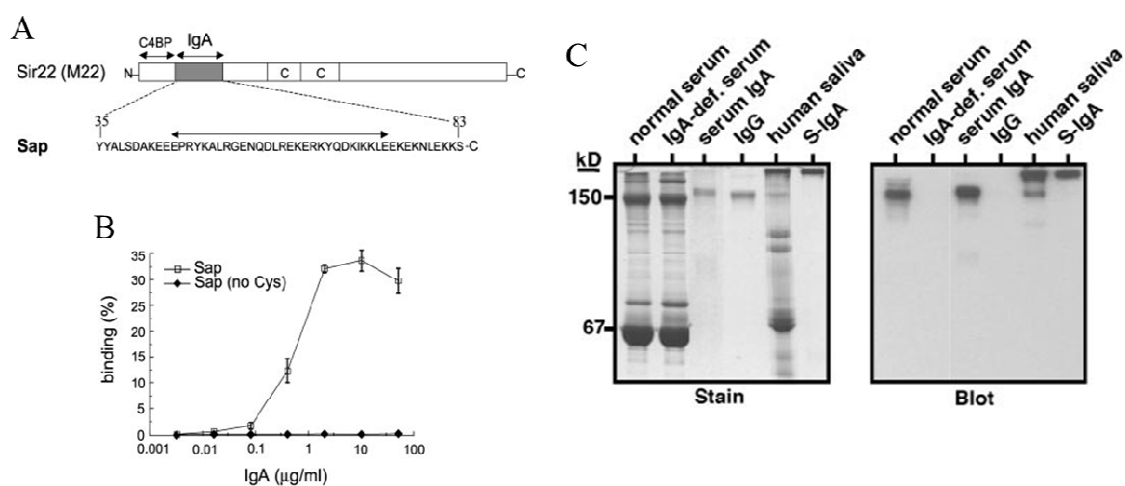


図 1-9 Sap ペプチド

A. バクテリア由来 IgA 結合タンパク Sir22 の IgA 結合ドメイン (35-83 残基) を取り出したペプチド: Sap ペプチド。B. 単量体 Sap ペプチドと二量体 Sap ペプチド (C 末端の Cys を介して二量体化) の IgA に対する結合活性。C. Sap ペプチドを固定化したアフィニティ

カラムによる血清中、唾液中 IgA の精製。左図；精製画分の SDS-PAGE 後の protein staining。
右図；抗 IgA 抗体による Western blotting。 *J Immunol* 2002, **169**, 1357-1364. より引用。

1-4 マウス IgA 抗体とその精製方法

医薬品候補の前臨床試験段階において、モデルマウスを用いた試験がよく行われる。IgA 抗体の研究、医薬品開発プロセスにおいても同様に、マウスを用いた試験を行う必要があると考えられるが、この際に用いるマウス IgA についてその精製方法は未だ確立されていない。TG19318 や抗マウス IgA 抗体、抗 L 鎖抗体を用いて精製する方法が報告されているが、どのリガンドもマウス IgA 特異的なリガンドではなく、IgG や IgM などその他のイムノグロブリンにも結合するため（表 1-2）、図 1-10 に示すような多段階の精製工程を必要とする [42, 46, 47]。また、吸着させた IgA をカラムから溶出する際には、プロテイン A カラムを用いた IgG 精製の場合と同様に酸性バッファー（pH 2.0~2.8）が用いられるが、これによる IgA 抗体の変性、さらにはリガンド自身の変性も懸念される。これらのことから、より簡易かつ穏和な条件下でマウス IgA を精製できるシステムの確立が、マウス IgA 研究において求められており、またこの確立は、マウスを用いた動物実験という観点から、ヒト IgA の医薬品化研究の進展においても重要な意味を持っている。

表 1-2 各 IgA 結合タンパクの結合特異性

Product	Human κ light chain	Human λ light chain	Human IgA1	Human IgA2	Human IgG	Human IgM	Human IgE	Human IgD	Mouse IgA	Mouse IgG	Rat IgA
Peptide M	-	-	○	○	-	-	n/a	n/a	-	-	n/a
SSL7	-	-	○	○	-	-	n/a	-	-	-	○
Jacalin	-	-	○	-	-	n/a	n/a	○	-	n/a	-
Protein L	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○
TG19318	-	-	○	○	○	○	○	-	○	○	n/a

○：結合活性有り。－：結合活性無し。n/a：データ無し。Peptide M: Sap ペプチド、SSL7：
 バクテリア由来 IgA 結合タンパク質。

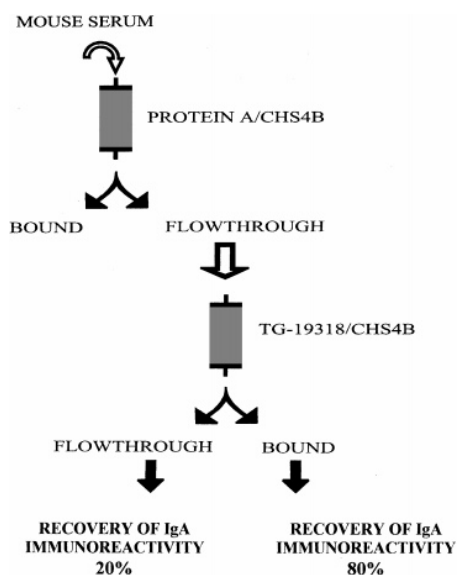


図1-10 TG19318によるマウス血清からのIgA精製方法

第一段階：マウス血清をプロテイン A カラムにかけ、血清中 IgG、IgM、IgE などの免疫グロブリンを除去する。第二段階：プロテイン A カラムへの非結合画分（FLOWTHROUGH）を TG19318 カラムにかける。結合画分を酸性 Buffer 等で溶出後回収する。*J Mol Recognit* 1998, **16**, 243-246より引用。

研究目的

完全合成、精製、化学修飾が容易に可能な 20 残基以下の短いペプチドによるヒト、マウス IgA 特異的アフィニティリガンドをデザインする。また、デザインしたペプチドを用いた IgA 精製システムの構築について検討を行う。

第 2 章

ファージディスプレイシステム

2-1 ファージディスプレイシステムとは

ファージディスプレイシステムとは、大腸菌に感染することで増殖・複製を行うウイルス（ファージ）の DNA に外来ポリペプチド鎖をコードする DNA を挿入することで、ファージ表面に外来ポリペプチド鎖をディスプレイする手法である。1985 年、Smith 等はこのファージディスプレイ法を報告し [48]、1993 年にはこれと DNA ライブラリ技術を融合させ、標的分子に対して特異的に結合するペプチドの効率的な同定方法を報告した [49, 50]。

標的特異的分子の単離におけるファージディスプレイシステムの利点としては、①一度に検索できるライブラリサイズが 10^{8-11} と非常に大きい、②ファージ DNA 内に提示分子の DNA 配列がコードされているため、DNA 配列を解析することで容易に提示分子の配列を同定できる、③特に抗体ライブラリなどの場合、ライブラリ DNA を人工的に合成することで、免疫寛容を経ていないライブラリの構築が可能であり、自己抗原などの抗原性を持たない分子に対しても結合分子を単離することができるなどといった点があげられる。また、我々の免疫系においては、 $\sim 10^8$ 種類程度の分子認識能の多様性を持った B 細胞のライブラリより、目的分子（抗原）を認識する抗体が選別され成熟していくことで、抗原に対する高い特異性とアフィニティを持った抗体を作り出すが、ファージディスプレイライブラリ技術は、この一連の分子進化システムを試験管内で模倣することができるという特徴も併せ持つ。

現在までに、このファージディスプレイ法を用いて単鎖 Fv 抗体 (scFv) や Fab、TCR、GFP、VHH などをスキュフォールドとしたさまざまな標的特異的タンパクやペプチドが多く報告されている [51-55]。とりわけ、この技術は、標的特異的 scFv の作製技術として多くの研究が行われてきたが [56-61]、中でも、抗 TNF- α 抗体が、2002 年にアメリカで完全ヒト抗体として世界で初めて FDA に承認され、(日本では 2008 年に承認)、現在では関節リュウマチの治療薬として世界各国にて販売されている [62]。

また、近年、次世代シーケンサーが飛躍的な技術革新を遂げ、以前よりより大量のサンプルを低コストで処理できるようになった。これらの新しい技術とファージライブラリ技術を融合させることで、より簡便かつ迅速な標的特異的分子の単離が可能になると期待される [63]。

M13 ファージディスプレイシステム

ファージディスプレイ法でよく用いられる繊維状ファージ M13 は、環状の一本鎖ゲノム DNA (約 6.4 kb) を持ち、そのまわりに 5 つのコートタンパク質 (g3p, g6p, g7p, g8p, g9p) がアセンブリした細長い筒状の構造 (図 2-1 A) をしている。ファージ上へのポリペプチドの提示は、ほぼ全てのコートタンパク質で可能であるが、従来の研究においては主に g3p, g8p への提示系が用いられている [64-66]。ファージ 1 匹あたりに 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、この提示分子数の少なさは強いアフィニティを有するポリペプチドの単離を可能にする。一方、ファージ 1 匹あたりに約 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ことから弱いアフィニティを有するポリペプチドでも単離することができ、また近年においては、この提示系を用いたファージワクチンに関する研究も行われている [67, 68]。

M13 ファージのライフサイクルを図 2-1 B に示す。ホストとなる大腸菌に感染後、大腸菌内に注入された環状一本鎖ゲノム DNA からファージタンパク質が合成され、これらのタンパクが大腸菌内膜から外側に向かって分泌される過程で会合し、ファージ粒子が形成される。提示に用いられる g3p タンパク質の N 末端側に融合された外来ポリペプチド鎖は、分泌シグナルによって内膜を通過してペリプラズム空間へ移行し、さらに、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) などによってフォールディングが促進される。このようにペリプラズム空間への移行を経由しているため、scFv や Fab、分子内ジスルフィド結合を多く持つ分子など、機能発現においてしっかりとしたフォールディングが要求される分子の提示には適しているが、提示分子の配列によっては (疎水性残基が多いなど)、細胞内膜に非特異的に結合しペリプラズム空間へ移行されにくくなってしまうため、提示分子のアミノ酸配列に偏りが生じてしまうという問題点もある [69]。

現在においては、M13 ファージ以外にも、T7 ファージ、大腸菌や酵母、リボソームなどを提示に用いる方法が報告されているが [70-74]、この M13 ファージディスプレイは近年においても多くの特異分子の単離や新規ディスプレイ手法・用途が研究・報告されているシステムである [75-78]。

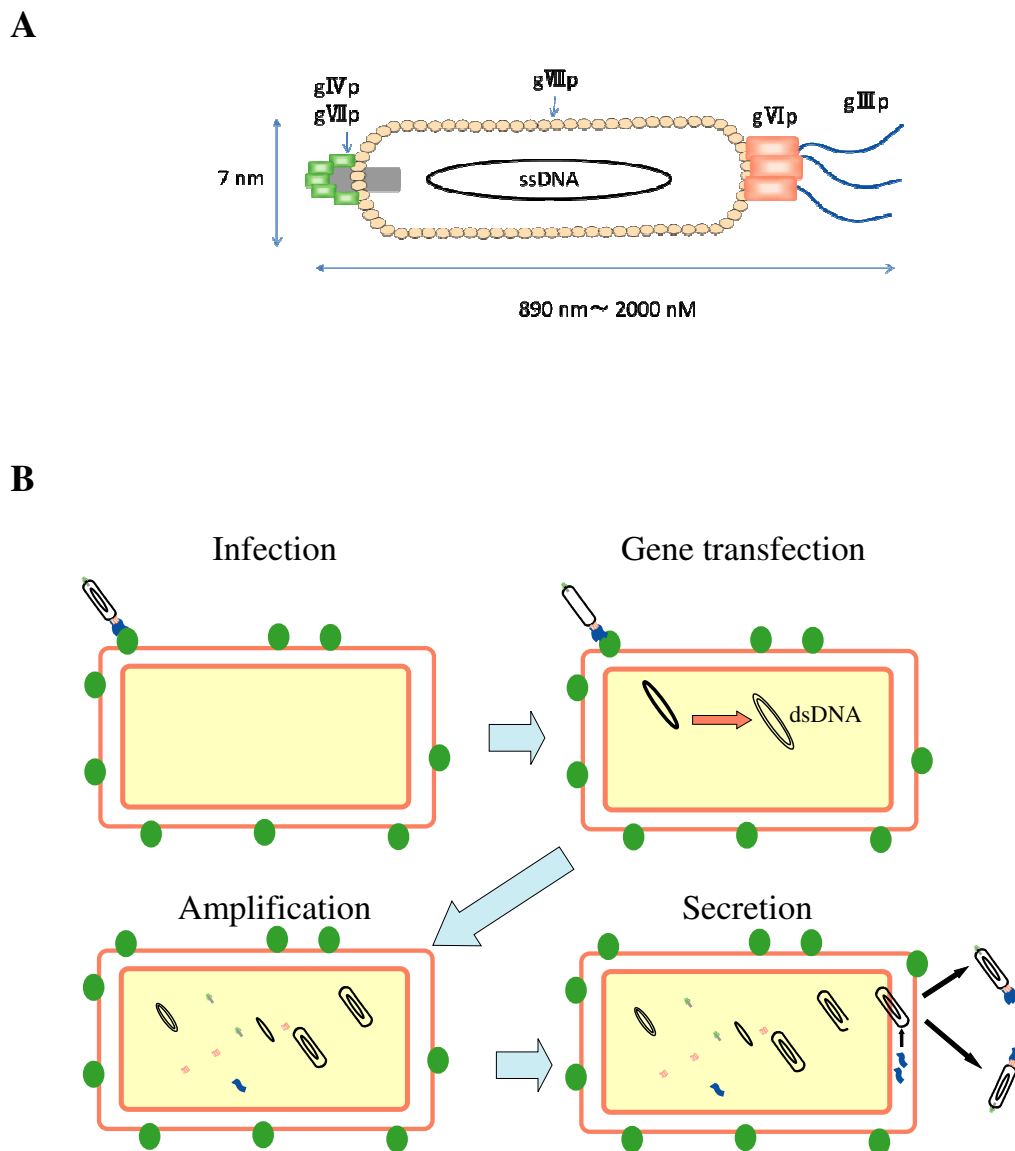


図2-1 M13 ファージの構造とライフサイクル

A. M13 ファージの構造。**B.** M13 ファージのライフサイクル。宿主細胞表面上の F pilus (F 絨毛) を gp3 が認識して感染し、自身の一本鎖 DNA を挿入する。一本鎖 DNA は宿主細胞内にて二本鎖に変換され、宿主内で自己を構成するタンパク質を合成し最終的に分泌される形で放出される。

T7 フェージディスプレイシステム

近年フェージディスプレイ法の一つとして用いられるようになってきた T7 フェージ (図 2-2A) は、60 程度の遺伝子を含む約 40 kbp の 2 本鎖直鎖状のゲノム DNA を持つ溶菌性のフェージで、大腸菌表面の LPS を介して結合し、大腸菌内へ DNA を注入して感染する。図 1 に示すように、T7 フェージのゲノム DNA は、415 個の G10 タンパク質の会合によって形成される頭部に保存されており、その下に宿主感染に関わる尾部が付加されている [70]。

ポリペプチドのディスプレイは、頭部を構成する G10 タンパク質の C 末端側に外来遺伝子を挿入することで達成される。ポリペプチドの提示数としては、G10 タンパク質すべてを利用した 415 分子の提示系 (T7Select[®] 415) から、10 分子 (T7SelectTM10)、1 分子 (T7Select[®]1) と三段階の提示が可能であるが、大まかには、T7Select[®] 415 はペプチドなどの低分子専用、T7Select[®]1 は蛋白質、T7SelectTM10 は兼用といった具合に用いられる。

従来の M13 フェージと T7 フェージの大きな相違点は、ライフサイクルやフェージ粒子の形成機構にある。M13 フェージは前項に述べた通りであるが、T7 フェージでは、大腸菌に感染後、合成されたフェージタンパク質の細胞質内での自己会合により、フェージ粒子が大腸菌内で形成され、最終的には、自身の持つフェージリゾチームなどの作用による溶菌を経て菌外へ放出される [70] (図 2-2B)。このため、提示タンパク質のフォールディングは細胞内 (サイトゾル) にて、溶菌までの短時間内 (30 分から 2 時間) で完了しなければならない。このようなフェージの形成機構の違いのため、M13 フェージでは活性型の提示が可能であったタンパク質が、T7 フェージでは不活性であるといった問題が、特にジスルフィド結合を持つタンパク質には起こりうることを考慮する必要がある。

このような課題がある一方で、T7 フェージディスプレイの利点も数多くある。①フェージの形成に膜透過機構を含まないため、提示される分子のアミノ酸配列に偏りが少ない [69]。②大腸菌への感染から溶菌まで 2 時間程度で終了するため、ハイスループットなスクリーニングが行える。③M13 フェージにおけるヘルパーフェージの重感染の必要がなく、取り扱いが簡便であるといった点である。二つの提示系を比較した場合の特徴を表 2-1 にまとめた。

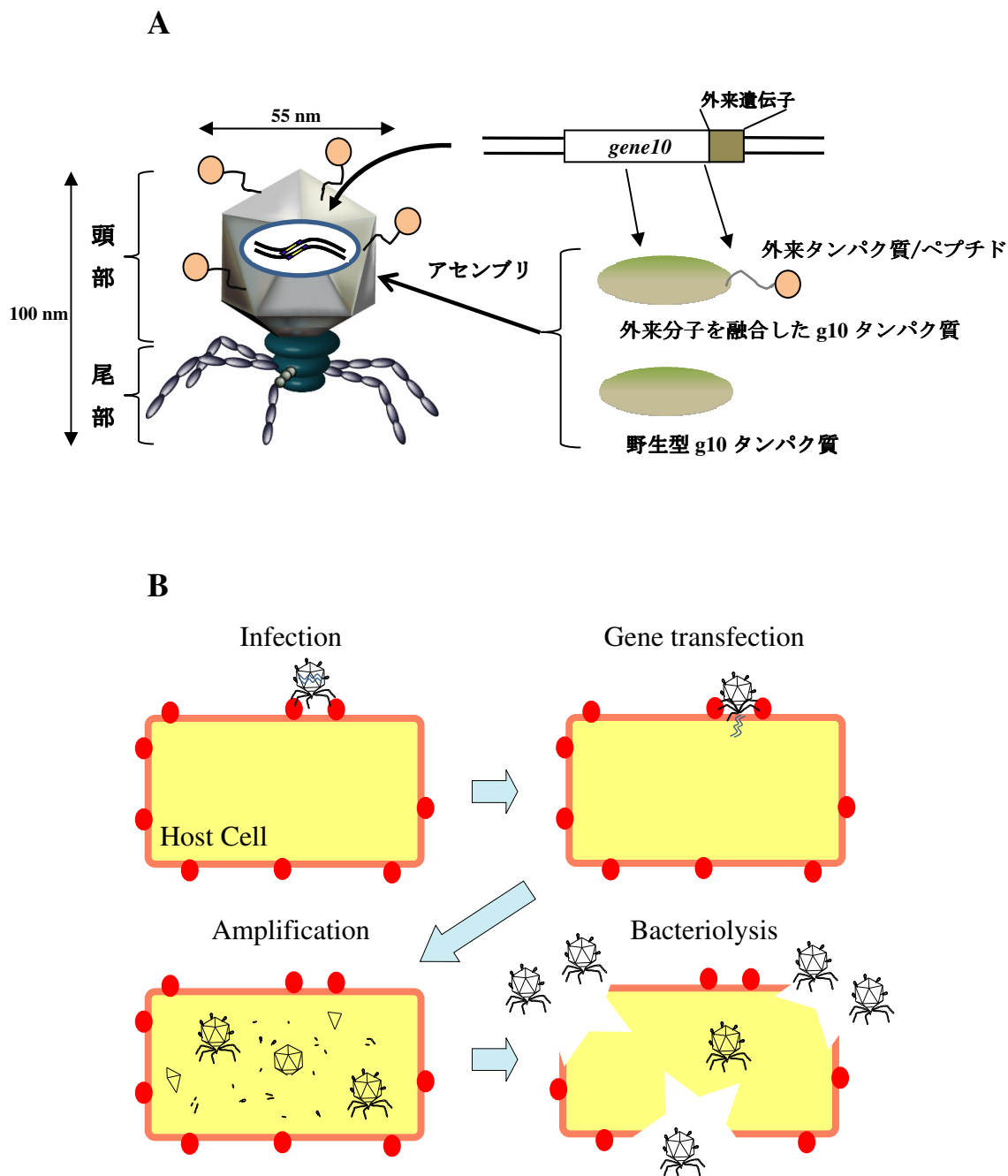


図2-2 T7ファージの構造とライフサイクル

A. T7ファージの構造。B. T7ファージのライフサイクル。ホスト細胞表面上のLPSを介して認識後、自身の直鎖状二本鎖DNAを挿入する。ホスト内で自己を構成するタンパク質、DNAを合成し、ファージ粒子を細胞質内で形成後、最終的に大腸菌を破壊することで放出される。

表2-1 M13 フェージと T7 フェージの特徴の比較

項目	M13 フェージ	T7フェージ
提示配列のバイアス	膜透過過程を含むため、膜透過されにくい分子は提示されにくい	フェージ粒子は大腸菌内で形成され、溶菌により放出されるので提示分子には偏りが生じにくい
提示可能分子	ジスルフィド結合を持つ分子(ペプチド、タンパク質)も提示可能。細胞内で安定なタンパクは、膜輸送シグナル配列の検討が必要	ジスルフィド結合を多く持つ分子の提示には不向き。ホスト大腸菌の最適化により改善できる可能性有
ライブラリ	サイズ: $10^7 \sim 10^{10}$ 。 大腸菌の形質転換効率に依存	サイズ: $10^6 \sim 10^8$ 。 In vitro パッケージングにより作製される。
スクリーニングに要する時間	1ラウンドのパンニングに2日～4日。 ヘルパーフェージの重感染、ベグ沈などに手間がかかる	1日で最大4ラウンドのパンニングが可能。 大腸菌への感染からフェージ回収まで2時間程度
パンニングにおける結合分子からの溶出	提示分子をg3pに提示させる場合、g3pは感染因子としても重要であるため、標的分子からの溶出操作が必要。	提示に用いられるg10は感染に関与しないため、標的分子に結合した状態での大腸菌への感染が可能。(溶出操作が不要)

このように、T7 フェージは細胞質内でのフェージ粒子の形成と、分泌過程を経ないこと、感染からフェージ回収までの時間が短いことから、ランダムペプチドライブラリの構築と標的に対するスクリーニングには適していると考えられ、実際これまでも多くの特異的ペプチドの単離報告がなされている [16, 79-84]。一方で、scFv などのタンパク質や分子内ジスルフィド結合を多く持つ分子については、不向きであるように思われるが、大腸菌ホストやその他の培養条件を最適化することで機能的分子の提示が可能であり、実際に、T7 フェージディスプレイシステムを利用して scFv などのタンパク性の機能分子単離が近年報告され始めている [54, 85]。

2-2 標的特異的分子のスクリーニング方法

フェージディスプレイ系を応用して作製されたポリペプチドライブラリ (10^7 ~ 10^{11} の多様性を持つ) から、標的特異的なポリペプチド鎖を取り出す操作をバイオパンニングと呼ぶ。特にランダムライブラリの様に理論的な多様性が非常に大きい場合、実際に用いることができる多様性は全体のごく一部であるため、標的特異的分子の単離は非常に難しく、標的やライブラリの性質に合わせてこのバイオパンニングの手法を最適化する必要がある。このことからこれまでに、多くのバイオパンニング法が開発されてきたが、これら全てに共通していることは、親和性ベースのスクリーニング技術であるという点である [86]。基本的な流れとしては、固定化した標的タンパク質にフェージライブラリを反応させ、結合しなかったフェージを洗浄により除去した後、結合したフェージを回収し、大腸菌ホストに感染させて増殖させるという操作を複数回行うことで、標的タンパク質に特異的なペプチドを提示するフェージを濃縮する。提示ペプチドの遺伝子配列は、フェージゲノム内に保存されているため、スクリーニングにより得られたフェージの遺伝情報を解読することで、標的結合性のペプチド配列を容易に同定することが可能となる (図2-3) [87]。この一連の操作において重要となるのが、非特異的フェージの除去であるが、これにはブロック剤の種類や、吸収操作、洗浄溶液の組成や洗浄回数など様々な条件を最適化する必要がある。本研究においては、標的蛋白質を96穴免疫プレートに固定化する最も一般的な方法を用いており、各条件についての詳細は対応する章の方法に記載する。

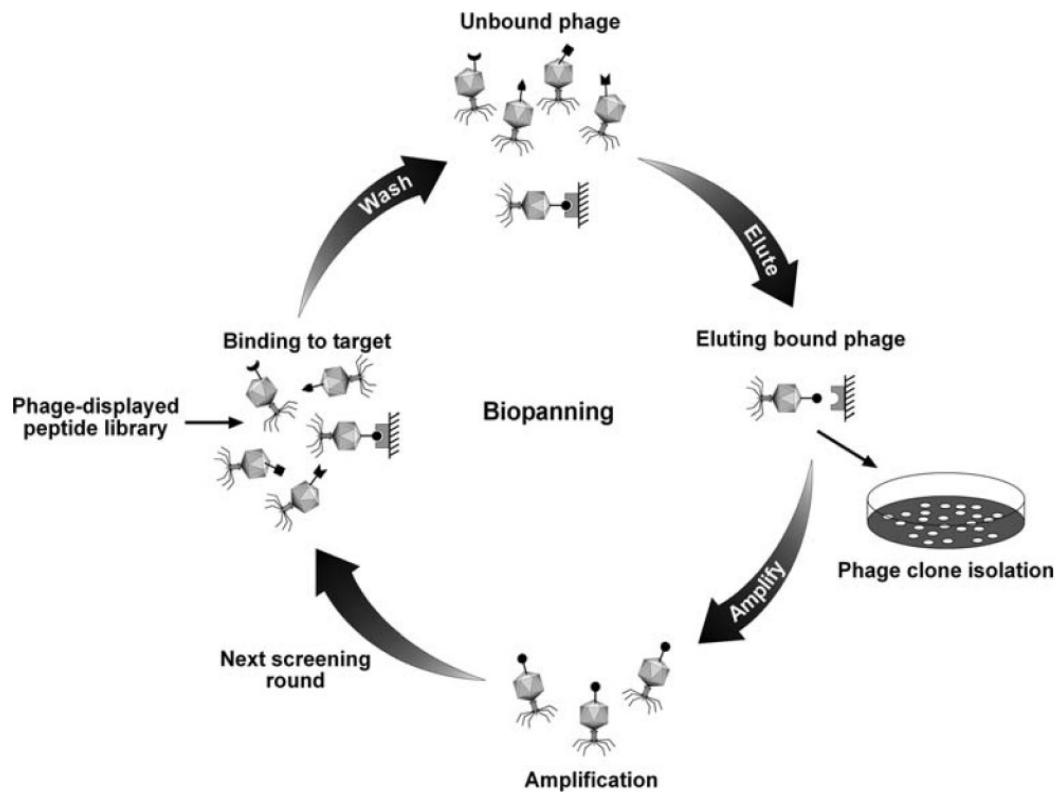


図2-3 T7 フェージライブラリを用いたバイオパンニングの概要

標的分子をマイクロプレートやマグネットビーズなどに固定化し、Blocking 後、フェージライブラリと反応させる。洗浄により標的に結合していないフェージを除去し、結合したままのフェージについては、各種溶出剤を加えフェージを回収するか、もしくは直接大腸菌と反応させることで、結合フェージを回収し培養する。溶菌後、上清中のフェージを回収・精製し、次のラウンドに用いる。 *Int J Pept Res Ther* 2006, **12**, 79-91.より引用。

本研究では、T7 フェージディスプレイシステムを用いて、種々のペプチドライブラリを構築し、3章から5章においてはヒト IgA に、6章についてはマウス IgA に対する結合フェージクローンの単離を試みた。

第 3 章

ヒト IgA 結合ペプチドの単離

3-1 目的

ランダムペプチド提示型 T7ファージライブラリを用いて、ヒト IgA に対するバイオパニングを行い、ヒト IgA 結合ペプチドファージの単離を行う。また、得られたヒト IgA 結合ファージの DNA 配列解析を行うことで、ヒト IgA を認識するペプチド配列を同定し、さらには合成ペプチドを調製して、そのヒト IgA に対する結合親和性・特異性を解析する。また、ペプチドを固定化したアフィニティカラムを作製して、ヒト血清中 IgA の精製を試みることで、20 残基以下の比較的短いペプチドによるヒト IgA の精製が原理的に可能かどうか検討する。

3-2 材料と方法

材料

ポリクローナルヒト抗体 IgG、IgA、IgE、ポリクローナルマウス抗体 IgG、IgA、IgE、BSA、HSA、ヒト LF、は Sigma Aldrich 社より、抗 T7-tag 抗体は Novagen 社より、SA-HRP、SA-AP は Vecter 社より購入した。

ランダムペプチドファージライブラリの構築

2 つの Cys を分子内に導入した 8 パターンのランダムペプチドライブラリ、CX₇₋₁₀C または X₃CX₇₋₁₀CX₃ は、T7Select 10-3b ベクター (Novagen) を用いて、T7Select System Manual (Novagen) に従って作製されたものを、米国 NCI より恵与していただいた [69]。各ライブラリの多様性について図 3-1 に示す。また、各混合ライブラリのシーケンスの多様性は、平均 2.5×10^9 と評価された。

A2 部分変異ライブラリの構築には、テンプレート DNA 5'-GGATCCGAATTCAGGTGGAGGTTTCGZWXWXYWYYTGTXXYZWXXWZWWYYYYYWYYWYYXXZTGTXXXXXXYXGGATAAAAGCTTGC GGCCG-3' (W;A70%,T10%,G10%,C10%, X; A10%, T70%, G10%, C10%, Y; A10%, T10%, G70%, C10%,Z; A10%, T10%, G10%, C70%) を制限酵素サイト (EcoRI, HindIII) を付加したプライマー5'-Biotin ATGAATACCAGGATCCGAATTCAGGTGGAGGTTTC

G-3' (KEB-547) と 5'-Biotin-ACTATCGCCGGCCGCAAGCTTTTATCC-3' (KEB-553) を用いて PCR により増幅し、フェノール処理後、2-ブタノールを用いて濃縮した。濃縮した PCR 産物は、(QIA-quick nucleotide removal kit : Qiagen) を用いて精製した後、制限酵素処理を行い、T7Select 10-3b ベクター (Novagen) にライゲーションにより挿入した。ライゲーション産物を T7select packaging solution と混合し 22 °C で 2 時間反応させた後 (パッケージング)、 $OD_{600} = 0.6 \sim 1$ まで培養した BLT5403 (100 ml) に感染させた。パッケージング後にライブラリの多様性を測定したところ、 1.4×10^7 と評価された。

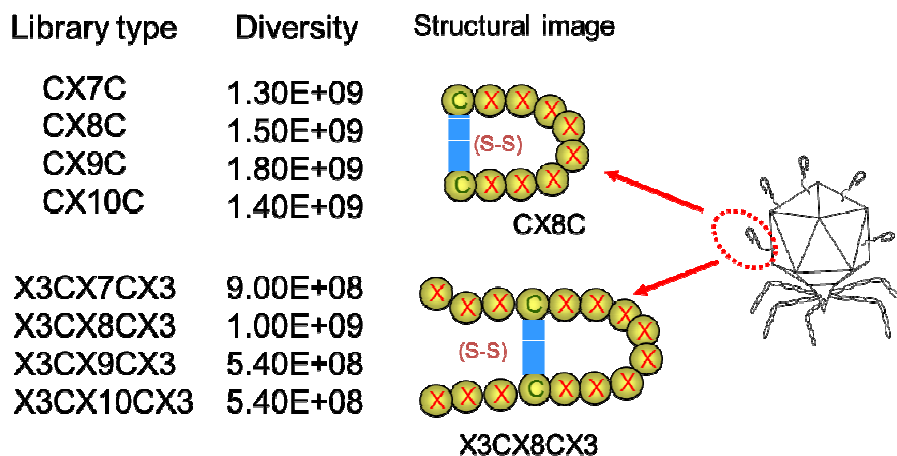


図 3-1 T7 ファージランダムペプチドライブラリ

ヒト IgA に対するバイオパンニング

96穴のマイクロプレート (Nunc, Maxisorp) のウェルにポリクローナルヒトIgA、IgG、IgE (1 μ g/100 μ l/well) をそれぞれコートし、0.5 % BSAでブロッキングを行った。1st、2nd、5th ラウンドにおいてはポリクローナルヒトIgGに、3rd、4thラウンドにおいてはポリクローナルヒトIgG、IgE固定化wellにファージライブラリ (CX₇₋₁₀CまたはX₃CX₇₋₁₀CX₃) を1時間反応させ、非特異的ファージの除去を行った。その後、上清をポリクローナルヒトIgA と1時間反応させた。ウェルを0.1 % Tween20/ PBS (0.1 % PBST) で洗浄後、大腸菌BLT5615を加えてwell上に残ったファージを回収・感染させ、ファージ増殖のために培養した。溶菌後は、PEG沈によって培養後の上清からファージを回収し、次のパンニングに用いた。

ELISA

96穴のマイクロプレートのウェルに、ヒトIgA、その多コントロールタンパクを0.1M NaHCO₃溶液中でコートし (100 ng/ 50 μ l/well)、PBSに溶解した0.5% BSAでブロッキングを行った。各ウェルに、パンニング後の培養上清、またはクローン化したファージ、SA-APとプリインキュベートしたビオチン化A2ペプチドを加え、室温で1時間反応後、0.1% PBSTで5回洗浄した。結合したファージはビオチン化抗T7ファージマウス抗体 (Novagen) を反応させ、SA-HRP (vector) で検出した。HRPによる呈色にはTMB溶液 (Wako Chemicals)、APによる呈色にはパラニトロフェニルリン酸を用い、それぞれ450 nm、405 nmの吸光度をELISA プレートリーダーにて測定した。

DNA配列決定

T7ファージ上に提示されたペプチドのアミノ酸配列の決定は、ファージG10遺伝子の3'末端部分のDNAシーケンスを解析することより行った。シーケンス反応用のプライマーは、上流プライマー (5'-GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3') を用いて、ABI DNA sequencer 373A-36S上で行った。

ペプチド合成

合成ペプチドはFmoc固相合成法により合成された。すべてのペプチドはC末端側をアミド化している。保護基を除去した後、緩やかな酸化条件下で分子内S-S結合を形成させ、逆相HPLCを用いて分子内S-S結合ペプチドを精製した。純度、S-S結合の形成についてはAcquity SQD ultraperformance liquid chromatography system (Waters Corp., Milford, MA) により確認した。また、N末端をビオチン化または、アミノPEG₄化したペプチドについては、N-Fmoc-amido-PEG₄-COOHもしくはN-Fmoc-amido-PEG₄-biotinを用いて合成した。

SPR 解析

全ての解析は、BIAcore T100、2000 (GE healthcare) を用いて、室温 25 °C にて行い、必要な試薬とセンサーチップは同社から購入した。センサーチップ CM5 上へのリガンド (ポリクローナルヒト IgA₂) の固定化は、一般的なアミンカップリングプロトコールに従って行った。ポリクローナルヒト IgA₂ の CM5 センサーチップへの固定化は pH 4 (10 mM 酢酸 Na) の条件下で行い、固定化量は RU 値で 4000 - 5000 (Rmax : 150 RU 前後) の範囲内になるように調整した。ペプチドとヒト IgA の結合反応は、Running 緩衝液 (HBS-EP : 0.01 M HEPES,

0.15 M NaCl, 0.005 % Tween 20, 3 mM EDTA, pH 7.0) 中において、流速 50 μ l/min にて 180 秒間ペプチドをインジェクトすることで測定した。解離反応は、アナライトのインジェクト終了後 Running 緩衝液により洗浄するで測定した。結合パラメーターの解析は、BIAevaluation Version 3.2 ソフトウェアもしくは、BIAevaluation T100 ソフトウェアを用いて行った。

A2 ペプチド固定化アフィニティカラムの作製

Hitrap Streptavidin HP column (GE healthcare) に PBS 中に溶解したビオチン化 A2 ペプチドをインジェクトすることでペプチドアフィニティカラムを作製した。固定化量は、固定化に用いた A2 ペプチド全量と未結合分の A2 ペプチドを逆相 HPLC にて定量し算出した結果、約 500 nmol/column と評価された。

ヒト血清中 IgA の精製

A2 ペプチド固定化アフィニティカラムを profinia システム (Bio-rad Laboratories) に設置し、PBS にて 5 倍希釈したヒト血清 5 ml を 1 ml/min の流速でインジェクトした。血清インジェクト後 PBS にて 15 分間洗浄し、Gly-HCl pH 2.5 (0.1 M Glycine, 0.15 M NaCl) を用いてカラムに吸着したタンパク質を回収した。回収したサンプルは 1 M Tris-HCl pH 9.0 にて中和後、SDS-PAGE 解析 (4–20 % Supersep グラジエントゲル; 和光純薬) を行った。また、泳動後のタンパク質はニトロセルロースメンブレンにブロッティングし、5 % Skim milk にて blocking 後、ヤギ抗ヒト IgA 抗体、マウス抗ヤギ抗体-HRP を用いて検出した。

3-3 結果

ランダムペプチドライブラリからのヒト IgA 結合ファージの単離

T7 ファージディスプレイシステムを利用して作製された、分子内に二つの Cys を持つ 2 系統 8 種類の環状ランダムペプチドライブラリ (CX₇₋₁₀XC 型, X₃CX₇₋₁₀CX₃ 型; 図 3-1) を用いてヒト IgA に対するバイオパンニングを行った。(一般的に環状ペプチドは、直鎖状

ペプチドと比較してチェーンエントロピーが大きく抑制されるため、結合に伴うエントロピー項のロスが小さくなり、標的に対してより高い結合活性を持つと考えられる [88]。このことから今回我々は、直鎖型のランダムライブラリによるパンニングは行っていない。) ヒト IgA に対して 5 回バイオパンニングを繰り返した後、5 ラウンド後のファージプールについて各種抗体・蛋白質に対する結合活性を ELISA にて確認した (図 3-2 A)。結果、パンニングを行う前のライブラリ (Initial library) と比較すると、5 ラウンド後のファージプールにおいてヒト IgA にのみ高い結合活性が確認され、バイオパンニングによりヒト IgA 特異的なファージが濃縮されたことが確認できた。そこで、5 ラウンド目のファージプールについて単クローン化を行い、得られた 20 クローンについてそれぞれヒト IgA への結合活性を指標にスクリーニングを行った。結果、20 クローン中 10 クローンについてヒト IgA への結合活性が確認されたため、それらのクローンについて提示ペプチド配列を解析した。表 3-1 に示すように、10 クローン中 5 クローンが A2 ペプチドと同様のペプチドを提示しており、A1、A3 ペプチドを提示しているファージがそれぞれ 2 クローンずつ、A4 ペプチドを提示しているがファージが 1 クローンと、計 4 種類の IgA 結合ペプチドを提示するファージクローンが確認された。また、それぞれの配列は 2 つの Cys 間の挿入アミノ酸数に違いがあったが (A1: X₃CX₉CX₃、A2,A3: X₃CX₈CX₃、A4: X₃CX₁₀CX₃) A2、A3 を基準に配列アライメントを行ったところ、ライブラリ構築の際に固定化した Cys (4 番目、13 番目) の他に 5 番目の Leu、14 番目の Phe が全てのクローン間で完全に保存されていた。さらに、4 種のファージクローンについてその結合特異性を確認したところ、全てのクローンについて IgG などの他の血清タンパクにはほとんど反応せず、ヒト IgA にのみ高い結合反応性を有していることが確認された (図 3-2 B)。また、例外的に、最も高いヒト IgA への結合が確認された A2 ファージについては、マウス IgA に対しても弱いながら結合活性が確認された。

このように、XCXCX 型ライブラリから 4 種類のヒト IgA 結合ファージが単離された一方、CXC 型ライブラリ由来のヒト IgA 結合ファージは確認されなかった。CXC 型ライブラリの方がランダム部位は少ないため理論的な多様性は低く、用いたライブラリの配列カバー率は XCXCX 型ライブラリに比べ高くなる。それにもかかわらず、一種類も特異的ファージが確認できなかったこと、さらに、14 番目の Phe が A1-A4 の全てにおいて保存されていることより、フレキシビリティの高い 2 つの Cys の外側の残基についても、ヒト IgA への結合に重要な効果を有している可能性が示唆された。

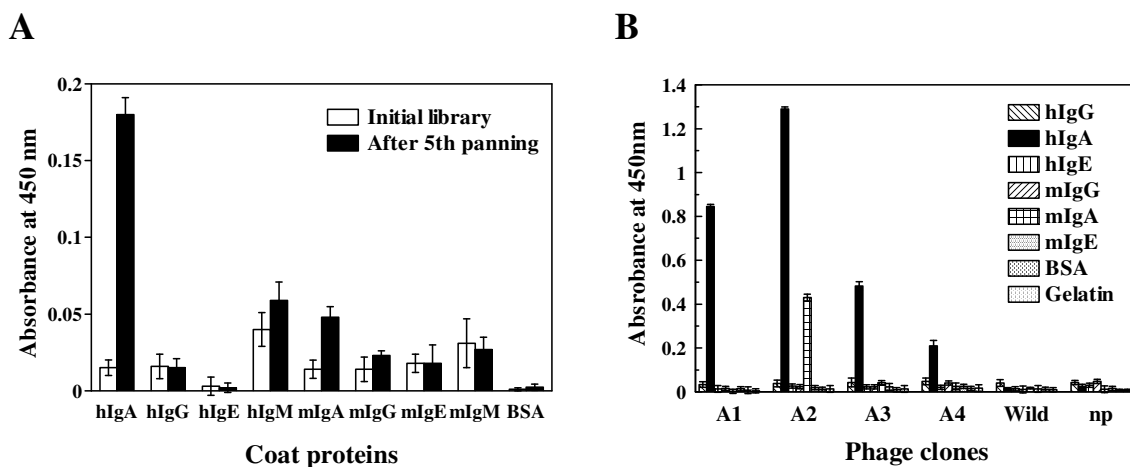


図3-2 ランダムペプチドライブラリからのヒト IgA 結合ファージクローンの単離

A. パンニング前のライブラリと5ラウンドのパンニング後のファージプールの各種蛋白質に対する結合活性。B. A1-A4 ファージの各種蛋白質に対する結合特異性。Wild: 野生型の T7 ファージ、np: ファージ無し

表3-1 ヒト IgA 結合ファージクローンの提示ペプチド配列

Library	Clone	Sequence					Frequency
		1	5	8	10	15	
XCX9CX	A1	STFCLLGQK				DQSYCF	2/10
XCX8CX	A2	HMRCLHYK	--			GRRVCFLL	5/10
XCX8XCX	A3	KTMCLRYN	--			HDKVCFRI	2/10
XCX10CX	A4	LVLCLVHRT				SKHRKCFVI	1/10
			*			*	

残基番号は、X3CX8CX 型のペプチドを基本としている。

*は A1-A4 全てのペプチドにおいて共通のアミノ酸の位置を示す (Cys は除く)。

A2 ペプチドの機能解析

ヒト IgA に対する親和性と結合特異性

単離された4クローンの中で最も高いヒト IgA 結合活性が確認された A2 フェージが提示しているペプチド配列 (HMRCLHYKGRRVCFL) について合成ペプチドを調製し (N 末端以外のアミノ基を除去する目的で8番目の K は R に置換した)、その機能 (結合親和性・特異性) について解析を行った。

BIAcore T100 を用いた親和性解析の結果、ヒト IgA に対する親和性は約 1.3 μM (K_d) であることが明らかとなり (図 3-3A)、先に Sadin 等により報告されている Sap ペプチドの場合 ($K_d = 20 \text{ nM}$) と比較すると 50 倍以上低い親和性であった。また、A2 ペプチドと IgA 間の結合は、結合速度定数 (k_{on}) が $1 \times 10^5 / \text{Ms}$ 以上、解離速度定数 (k_{off}) が 0.5 /s 以上と共に非常に速い相互作用であることが明らかとなった。(A2 ペプチドとヒト IgA の結合センサーグラムは、一般的に箱型と呼ばれる弱い相互作用を示すセンサーグラムであり、正確な k_{on} 、 k_{off} を算出することはできなかった。無理やりフィッティングした結果は、 $k_{on} = 0.6 /s$, $k_{off} = 4.7 \times 10^5 / \text{Ms}$)

また、ELISA を用いて各種蛋白質に対する結合特異性を解析した。結果、ヒト IgA に対する結合活性は明らかに高かったが、その他のイムノグロブリン、タンパク質に対しても弱いながら非特異的に結合してしまうことが示された (図 3-3B)。A2 ペプチドはその配列上に4つの Arg を含むため、等電点は 10.7 以上 (合成 A2 ペプチドは C 末端をアミド化しているため実際の等電点はより高くなる) と非常に高く、一般的な実験条件 (PBS, pH 7.4) においては正に帯電している。これによる非特異的な静電相互作用により、ヒト IgA 以外のタンパク質に対する非特異的な反応が引き起こされている可能性が示唆された。

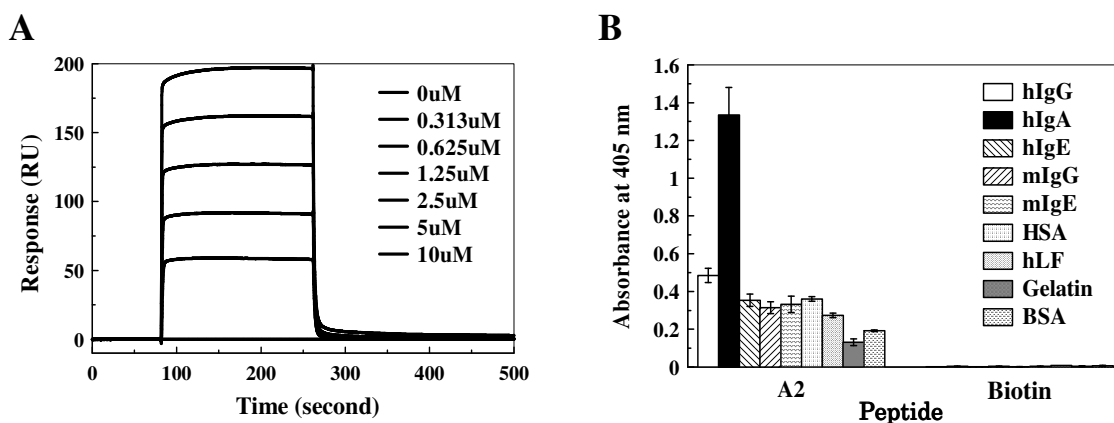


図3-3 A2合成ペプチドの結合親和性・特異性

A. BIAcore T100 を用いて A2 ペプチドとヒト IgA₂ の結合親和性を解析した。B. 各種蛋白質に対する合成 A2 ペプチドの特異性を ELSIA にて確認した。

ヒト血清中からの IgA 精製

N 末端に PEO₄ リンカーを介してビオチン化した A2 ペプチドを、Hitrap SA カラムに固定化してペプチドアフィニティカラムを作製し、ヒト血清中、唾液中 IgA の精製を試みた (図 3-4 A, B)。サンプルインジェクションの後、PBS にてカラムを洗浄し酸性 buffer (0.1M Gly-HCl pH2.5) を用いて吸着画分を溶出させ回収した。回収画分について SDS-PAGE、Western blotting、ゲル濾過クロマトグラフィー解析を行ったところ、血清中より単量体、二量体、唾液中より二量体のヒト IgA を回収できていることが確認された。ヒト IgA は血清中において、単量体と J 鎖を介した二量体 (ヘテロ 3 量体) の状態で存在しており、唾液などの粘液中においては、J 鎖と SC を介して二量体 (ヘテロ 4 量体) を形成していることが報告されており、今回の解析結果と一致する。一方で、特に血清を用いた場合において、回収画分に IgA 以外の他の血清タンパクの混入が確認された (図 3-4 C, D, E)。

これらの実験結果より、16 残基と非常に小さなペプチドであっても標的分子の精製用リガンドとして十分機能することが示された。

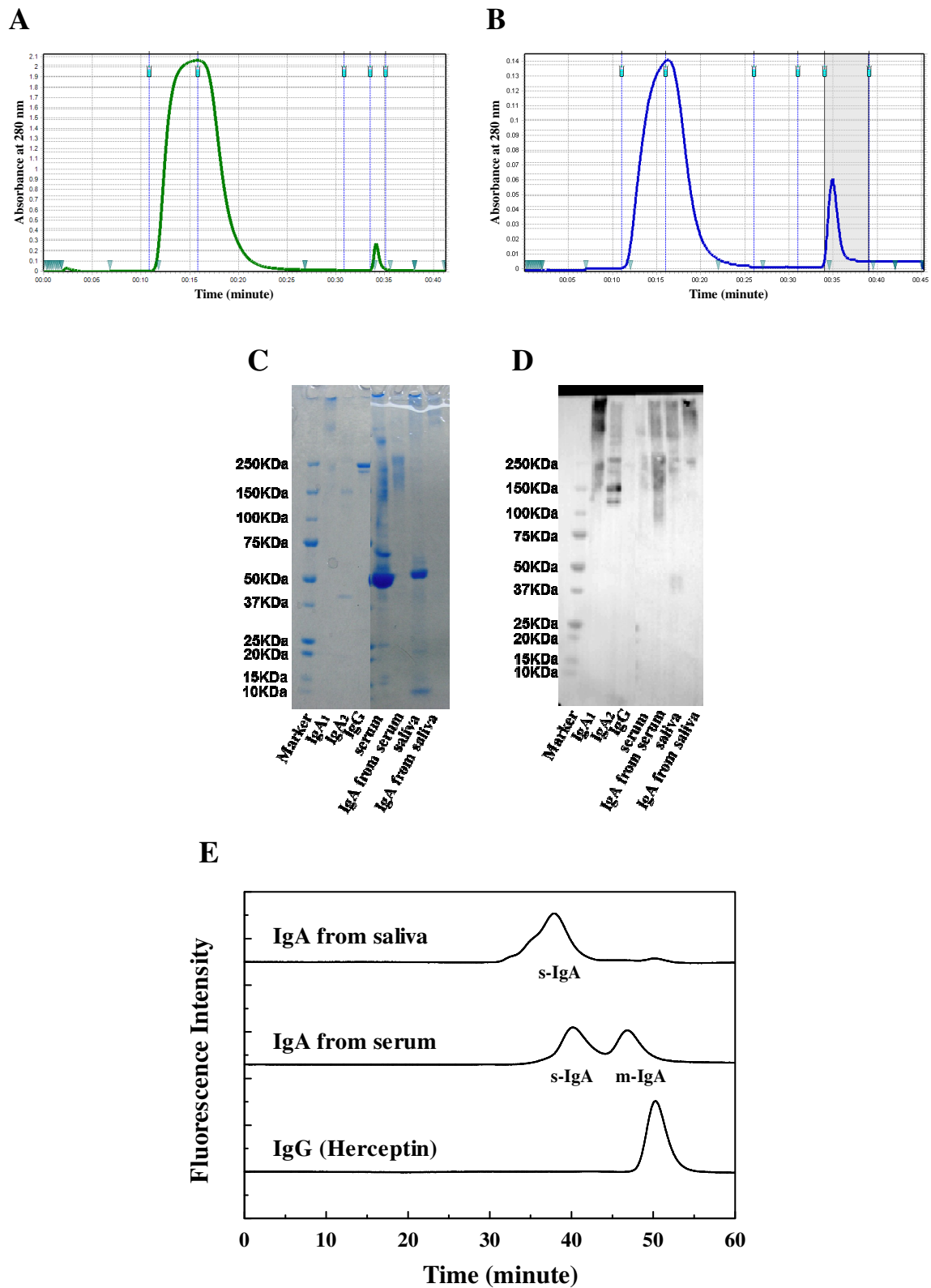


図3-4 A2 ペプチドカラムによる血清中唾液ヒト IgA の精製

A,B. A2 ペプチドカラムによる血清中 (A)、唾液中 (B) ヒト IgA の精製クロマトグラム。

C. 精製画分の SDS-PAGE。D. 抗ヒト IgA 抗体による Western Blotting。E. 精製ヒト IgA のゲル濾過クロマトグラム。

ヒト IgA への結合に重要な残基の同定

表 3-1 に示すように、ランダムライブラリから単離されたペプチドは 4 種と少なく、それぞれのライブラリのタイプも異なり (A1: X₃CX₉CX₃、A2, A3: X₃CX₈CX₃、A4: X₃CX₁₀CX₃)、さらに共通配列 (4 種間で完全に保存されていた配列) としてもライブラリ構築時に保存した Cys (4 番目と 13 番目) 以外には 5 番目の Leu と 14 番目の Phe のみであったため、ヒト IgA への結合に重要な残基 (ヒト IgA 結合モチーフ) の同定は困難であった。そこで、A2 ペプチド配列を基に部分的にランダム化したライブラリ (A2 部分変異ライブラリ) をデザインし、これを用いて A2 ペプチドにおけるヒト IgA への結合に必須な残基の同定を試みた。

A2 部分変異ライブラリの構築

ライブラリ DNA は、A2 ペプチド配列由来のコドンにコードするそれぞれのヌクレオチドが 70 %、それ以外が 10 %ずつ出現するように設計し、理論的に約 34%の確立で A2 ペプチド由来のコドンが出現するように設計した (表 3-2)。(各アミノ酸にはいくつかコドンがあるため、A2 ペプチド由来アミノ酸の理論的出現頻度としては 34~50 %である)

ライブラリ作製後、ランダムに選択した 10 クローンの提示ペプチド配列を解析した結果、塩基の出現頻度、A2 ペプチド由来アミノ酸の出現頻度ともにある程度設計通りに近い結果が得られた。

表 3-2 A2 部分変異ライブラリ

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Amino acid	H*	M*	R*	C	L*	H*	Y*	K*	G*	R*	R*	V*	C	F*	L*	L*
DNA	C*A*T*	A*T*G*	A*G*G*	tgt	T*T*G*	C*A*T*	T*A*C*	A*A*G*	G*G*G*	A*G*G*	A*G*G*	G*T*C*	tgt	T*T*T*	T*T*G*	T*T*G*
A2由来アミノ酸の出現頻度	39.2%	34.3%	46.2%	100%	46.2%	39.2%	39.2%	39.2%	49%	46.2%	46.2%	49%	100%	39.2%	46.2%	46.2%

*付アミノ酸はランダム化した部位を示す。ライブラリ DNA は*付塩基が 70 %、それ以外が 10 %ずつ含まれる混合塩基を用いて合成した。

A2 部分変異ライブラリからのヒト IgA 結合ファージクローンの単離

作製した A2 部分変異ライブラリを用いて、ヒト IgA に対して再度バイオパンニングを行った。3 ラウンド終了後、ELISA を用いて各ラウンド後のファージプールの IgA、HSA、BSA に対する結合活性を評価した結果、バイオパンニングのラウンドを重ねるにつれ、ヒト IgA にのみ結合するファージが濃縮されていることが確認された (図 3-5 A)。そこで、3 ラウンド後のファージプールについて単クローン化を行い、ヒト IgA に対して特異性を有していたファージに関して、その結合活性に関係なく 10 クローン選別し、提示ペプチド配列を確認した (図 3-5 B)。結果、固定した Cys 以外に、3 番目に Arg がそれぞれ 80 % と 60 %、14 番目に Phe が 50 %、16 番目に Leu が 60 % の確立で確認され、また、8 番目は塩基性アミノ酸で占められていた。さらに、5 番目の Leu、7 番目の Tyr、9 番目の Gly、12 番目の Val については、10 種の IgA 結合ペプチド間で完全に保存されていた。A2 と同様の X₃CX₈CX₃ ランダムペプチドライブラリより単離された A3 ペプチドにおいても、5 番目の Leu、7 番目の Tyr、12 番目の Val については保存されている。これらの結果より、5 番目の Leu、7 番目の Tyr、9 番目の Gly、12 番目の Val は、ヒト IgA への結合に重要な効果を有していると考えられた (図 3-5 C, D)。

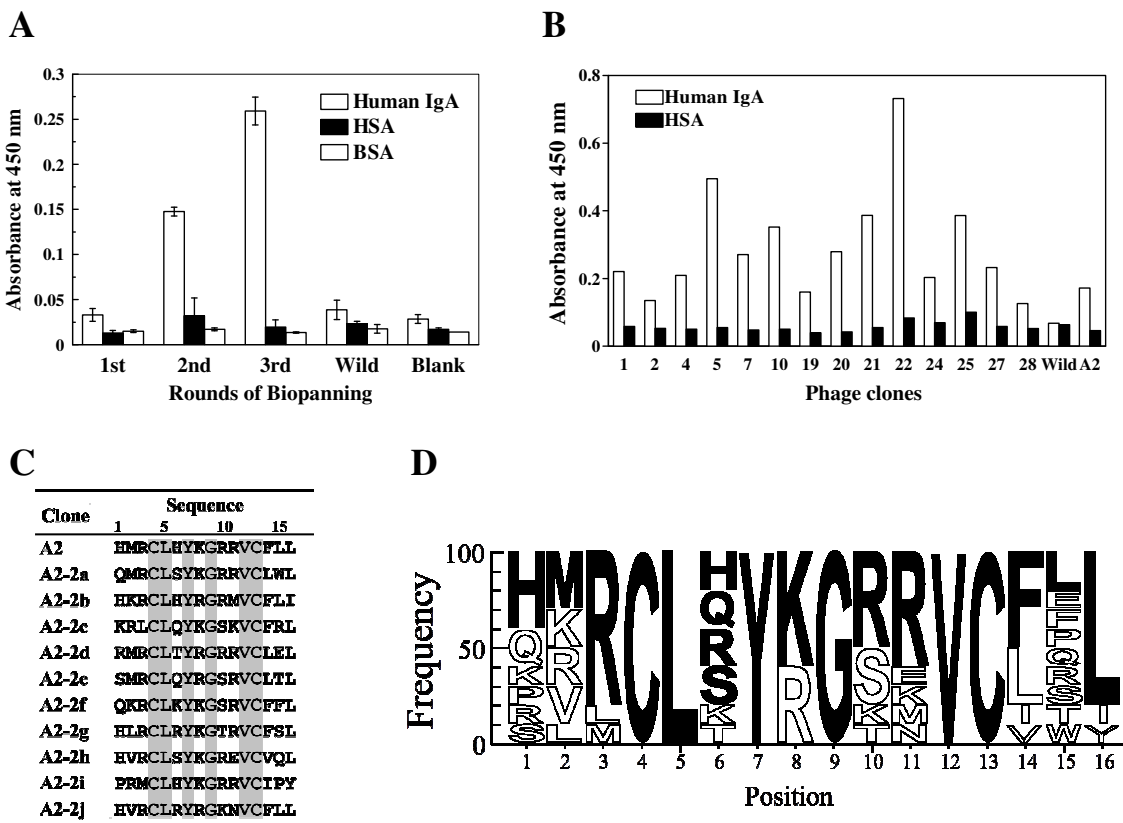


図3-5 A2 部分変異ライブラリによるヒト IgA への結合に重要な残基の同定

A. 3 ラウンドのバイオパンニング後、ELISA を用いてヒト IgA 結合ファージクローンの濃縮を確認した。**B.** ヒト IgA に特異的なファージの結合活性を ELISA を用いて確認した。**C.** ヒト IgA に対する結合活性に寄らず、特異性の高かった 10 クローンについて提示ペプチド配列を解析した。灰色の囲みは確認したクローン間で完全に保存されていた残基を示す。**D.** 得られたペプチド配列について Weblogo 形式で表示した。各アミノ酸の文字の大きさは出現頻度 (%) を表す。黒塗り文字は各位置において最も高い頻度で出現したアミノ酸を表す。

3-4 まとめと考察**ファージディスプレイシステムを用いたヒト IgA 結合ペプチドの単離**

ランダムペプチド提示型 T7 ファージライブラリ (CX₇₋₁₀C 型、X₃CX₇₋₁₀CX₃ 型) を用いてヒト IgA に対しバイオパンニングを行うことで、ヒト IgA を特異的に認識する 4 種のペプチドファージ (A1-A4) を単離した。また、A2 ペプチドを基にした部分変異ライブラリを用いることで、ヒト IgA への結合活性を有する 10 種類のファージクローンの単離に成功し、これらのファージが提示するペプチド配列の相同性解析より、5 番目の Leu、7 番目の Tyr、9 番目の Gly、12 番目の Val がヒト IgA への結合に重要な残基であることが示唆された。また、8 番目の位置においては、Arg、Lys よって占められていたことから、ヒト IgA 側の酸性アミノ酸と相互作用していることが示唆された。このように、ランダムライブラリはその大きな多様性から、標的に対する特異的分子の単離に適しているが、実際にスクリーニングに用いることができる多様性には限界があり、その配列のカバー率は非常に低い (例えば、 1×10^{10} の多様性を持つ 16 残基のランダムペプチドライブラリの場合、そのカバー率 (%) は $1/10^8$ 以下となる)。そのため今回のように、単離されたペプチド配列間の相同性が低く、標的への結合に重要な残基の特定が困難な場合がある。一方で今回、部分変異ライブラリを用いることで容易に標的との結合に重要であると考えられる残基の同定が行えた。これは、部分変異ライブラリは、多様性、カバー率としてはランダムライブラリと変

わらないものの、ランダムライブラリの場合と比較すると、実際にスクリーニングに用いるライブラリ中の標的結合ペプチド配列の数が非常に多くなるためであると考えられる。

A2 ペプチドの機能性

ランダムライブラリより得られた4種のペプチドの内最も結合活性の高かった A2 フェージクローンの提示するペプチド (HMRCLHYRGRRPVCFLL) は、ヒト IgA に対して約 1.3 μM (K_d) の親和性を有していたが、ヒト IgG や IgE などその他のタンパク質に対する非特異的な結合も確認された。また、A2 ペプチドを固定化したアフィニティカラムを用いることで、ヒト血清中、唾液中から IgA を回収することには成功したが、精製画分には IgA 以外の血清蛋白質の混入が確認された。以上の結果より、T7 ランダムペプチドライブラリより単離した A2 ペプチドは、16 残基と短く、親和性も 1.3 μM (K_d) と低いにもかかわらず、ヒト IgA のアフィニティリガンドとして機能することが示された。これはアフィニティカラム中における高いリバインディング効果に寄るところが大きいと考えられる。しかしながら、産業応用可能な精製システムには高い吸着量と特異性が求められるため、ペプチドのヒト IgA に対する親和性の改善、その他タンパクに対する非特異的結合の低減が必要である。

第4章

ヒト IgA 結合ペプチドの アフィニティマチュレーション

4-1 目的

3章において、ヒト IgA 結合ペプチドの単離、ヒト IgA への結合に重要な残基の同定に成功し、ペプチド固定化アフィニティカラムによるヒト血清中 IgA の精製が十分可能であることが示されたが、単離された A2 ペプチドは親和性 ($K_d=1.3 \mu\text{M}$)、特異性の面で、精製用リガンドとしては不十分であった。そこで、重要な残基のみを固定化しそれ以外をランダム化した結合モチーフ保存ライブラリ (XXXCLXYXGXXVCXXX) や、合成ペプチドによるスクリーニングを行い、よりヒト IgA に対して高い親和性で結合するペプチドの単離を試みた。

4-2 材料と方法

材料

ポリクローナルヒト抗体 IgA₂ (κ)、IgA₁ (λ) は Acris ANTIBODY 社より、ヒト Fc α レセプター/CD89 は R&D SYSTEMS 社より、ヒト化抗 HER2 医薬品抗体 Herceptin (Trastuzumab) は中外製薬株式会社より、ポリクローナルマウス抗体 IgM は Sigma 社より購入した。

モチーフ保存ライブラリの構築

モチーフ保存ライブラリの構築には、テンプレート DNA 5'-GGATCCGAATTCAGGTGGA GGTTCG NNK NNK NNK tgt TTG NNK TAC NNK GGG NNK NNK GTT tgt NNK NNK NNK GGATAAAAGCTTGC GGCCG -3' (N:A, T, G, C それぞれ 25%、K:G, T を 50% ずつ含む混合塩基) を基に、A2 部分変異ライブラリと同様の方法で作製した。多様性は、 1.2×10^7 と評価された。

ヒト IgA に対するバイオパンニング

96穴のマイクロプレート (Nunc, Maxisorp) のウェルにポリクローナルヒト IgA₂、Herceptin、

HSA (1 µg/ 200 µl/ well) をそれぞれコートし、0.5 % BSAもしくは5 % Skim milkでブロッキングを行った。1st~5thラウンドにおいて、ヒトIgA₂に対しライブラリを反応させる前に、Herceptin、HSA固定化wellにファージライブラリをそれぞれ1時間反応させ、非特異的ファージの除去を行った。その後、上清をヒトIgA₂と1時間反応させた。ウェルを0.1 % Tween20/PBS (0.1 % PBST) で洗浄後、大腸菌BLT5403を加えてwell上に残ったファージを回収・感染させ、ファージ増殖のために培養した。溶菌後は、5 M NaClを1/10 volume加え遠心し、上清を回収して、次のパンニングに用いた。

ELISA

96穴のマイクロプレートのウェルに、ヒトIgA₂、その他コントロールタンパク質 (50 ng/ 50 µl/ well) を0.1 M NaHCO₃溶液中でコートし、PBSに溶解した0.5 % BSAでブロッキングを行った。各ウェルに、パンニング後の培養上清、またはクローン化したファージ、SA-HRPとプリインキュベートしたビオチン化合成ペプチドを加え、室温で1時間反応後、0.1 % PBSTで5回洗浄した。結合したファージはビオチン化抗T7ファージマウス抗体 (Novagen) を反応させ、SA-HRP (vector) で検出した。

競合ELISA

96穴のマイクロプレートウェルに、ヒトIgA₂ (50 ng/ 50 µl/ well) を0.1 M NaHCO₃溶液中でコートし、PBSに溶解した0.5 % BSAでブロッキングを行った。ビオチン化A2-3aペプチドとSA-HRPを1時間室温で反応させた後、FcαR (0–100 nM) と混合した。その後、ヒトIgA₂固定化Wellに加え、1時間反応後5回PBSTにて洗浄し、wellに残ったペプチド量を定量した。

DNA配列決定

T7ファージ上に提示されたペプチドのアミノ酸配列の決定は、ファージG10遺伝子の3'末端部分のDNAシーケンスを解析することより行った。シーケンス反応用のプライマーは、上流プライマー (5'-GGAGCTGTCGTATTCAGTC-3') を用いて、ABI DNA sequencer 373A-36S上で行った。

ペプチド合成

合成ペプチドはFmoc固相合成法により合成された。すべてのペプチドはC末端側をアミド化している。保護基を除去した後、緩やかな酸化条件下で分子内S-S結合を形成させ、逆

相HPLCを用いて分子内でジスルフィド結合を形成しているペプチドを精製した。精製したペプチドの純度、分子内ジスルフィド結合の有無についてはLC/MS (Acquity SQD ultra-performance liquid chromatography system ; Waters Corp., Milford, MA) .を用いて確認している。また、N末端をビオチン化または、アミノPEG化したペプチドについては、N-Fmoc-amido-PEG₄-COOHもしくはN-Fmoc-amido-PEG₄-biotinを用いて合成した。精製されたペプチドは凍結乾燥後、使用まで-20 °Cにて保存した。ペプチドをSPR等の測定に用いる際は、各種実験バッファーに溶解して遠心 (15000 rpmで10 min) し、沈殿を取り除いた後、ペプチド濃度は分光光度計 (e-spect) を用いて定量した。

SPR 解析

全ての解析は、BIAcore T100 (GE healthcare) を用いて、室温 25 °Cにて行い、必要な試薬とセンサーチップは、同社から購入した。センサーチップ CM5 上へのリガンド (ポリクローナルヒト IgA₂) の固定化は、一般的なアミンカップリングプロトコールに従って行った。ポリクローナルヒト IgA₂ の CM5 センサーチップへの固定化は pH 4 (10 mM 酢酸 Na) の条件下で行い、固定化量は RU 値で 4000 - 5000 (R_{max} : 150 RU 前後) の範囲内になるように調整した。ペプチドとヒト IgA の結合反応は、Running 緩衝液 (HBS-T : 0.01 M HEPES, 0.4 M NaCl, 0.005 % Tween 20, pH 7.0) 中において、流速 50 µl/min にて 180 秒間ペプチドをインジェクトすることで測定した。解離反応は、アナライトのインジェクト終了後 Running 緩衝液により洗浄するで測定した。結合パラメーターの解析は、BIAevaluation Version 3.2 ソフトウェアもしくは、BIAevaluation T100 ソフトウェアを用いて行った。

競合 SPR

アミンカップリング法を用いて FcαR を CM5 センサーチップ上に固定化 (3000 RU) し、ヒト IgA₂ (100 nM) と A2-3a ペプチド (0-2500 nM) の混合溶液を流速は 10 ul/min で 180 秒間インジェクトした。測定は BIAcore 2000 を用いて行われ、ランニング buffer には HBS-EP バッファーを用いた。

結合熱力学的パラメータ解析

4 °C - 35 °C において、ヒト IgA₂ とペプチドの親和性を解析し、van't Hoff の式 $\{d \ln K_d = -\Delta H/R \cdot d(1/T)\}$ より、 ΔH を算出した。さらに、ギブスエネルギー変化の式 ($\Delta G = RT \ln K_d = \Delta H - T \Delta S$) より、 ΔS を算出した (BIAevaluation T100 ソフトウェア)。親和性

解析は BIAcore T100 を用いて行われ、Running 緩衝液 (HBS-T: 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Tween 20, pH 7.0) 中において、流速 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ にて 180 秒間ペプチドをインジェクトすることで測定した。

ペプチド固定化アフィニティカラムの作製

Hitrap Streptavidin HP column (GE healthcare) に PBS 中に溶解したビオチン化 A2-3a ペプチドをインジェクトすることでペプチドアフィニティカラムを作製した。固定化量は、回収した未結合分のペプチドを逆相 HPLC にて定量し、約 550 nmol/column と評価された。

ヒト血清中 IgA の精製

A2-3a、Opt-1 ペプチド固定化アフィニティカラムを profinia システム (Bio-rad Laboratories) に設置し、PBS にて 5 倍希釈したヒト血清 1 ml を 1 ml/min の流速でインジェクトした。血清インジェクト後 PBS にて 15 分間洗浄し、Gly-HCl pH 2.5 (0.1 M Glycine, 0.15 M NaCl) を用いてカラムに吸着したタンパク質を回収した。回収したサンプルは 1 M Tris-HCl pH 9.0 にて中和後、SDS-PAGE 解析 (4–20 % Supersep グラジエントゲル; 和光純薬) を行った。また、泳動後のタンパク質はニトロセルロースメンブレンにブロットイングし、5 % Skim milk にて blocking 後、ヤギ抗ヒト IgA 抗体、マウス抗ヤギ抗体-HRP を用いて検出した。

Molecular Dynamics (MD) シミュレーション

All MD simulations on the Opt-1 peptide and its complex with hIgA-Fc were performed using the SANDER module of the AMBER 10 simulation package [89] with the force field ff99SB [90]. Each system was explicitly solvated with TIP3P water molecules and neutralized by counter ions. The SHAKE algorithm was applied to constrain all bonds linking hydrogen atoms, and the particle mesh Ewald method was used for treating long-range electrostatic interactions. For Opt-1 simulation, the system was subjected to 1000 steps of steepest decent minimization followed by 1000 steps of conjugate gradient minimization with 500 kcal \cdot (mol \cdot \AA^2)⁻¹ harmonic constrains on the peptide to remove unfavorable van der Waals (VDW) contacts. Then, the whole system was minimized using 5000 steps of steepest decent minimization without harmonic restraints. The system was gradually heated from 0 to 310 K over 20 ps for equilibration. Production runs were carried out for 100 ns with 2-fs steps. A total of six independent MD trajectories were generated from various starting structures,

i.e., three unfolded conformations and three β -hairpin conformations.

For simulation of the Opt-1 complex with hIgA-Fc, the initial structure for the complex was modeled with the simulated Opt-1 structure and X-ray-determined hIgA-Fc structure (PDB code: 2QEJ). To remove unfavorable VDW contacts, the system was subjected to 6000 steps of steepest decent minimization followed by 6000 steps of conjugate gradient minimization while the complex was constrained by $500 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{\AA}^2)^{-1}$ harmonic potential. The whole system was then minimized using 20000 steps of steepest decent minimization without harmonic restraints. The system was gradually heated from 0 to 310 K over 50 ps for equilibration. Then, the production run was carried out for 5 ns with 2-fs steps. A total of three independent simulations were performed for the complex with various relative orientations between Opt-1 and hIgA-Fc. All MD simulations were carried out with the NPT ensemble, i.e., a constant number of particles (N), pressure (P), and temperature (T), and the trajectories were recorded every 2 ps.

Circular Dichroism Spectrometry (CD スペクトル解析)

ペプチドの CD スペクトルは、Jasco J-820Q4 spectropolarimeter (Jasco) で、0.1 nm キュベットを用いて測定した。測定条件は、走査速度 : 100 nm/min, バンド幅 : 1 nm, データ取り込み間隔 : 0.5 nm で行った。それぞれのスペクトルは 5 回積算して、buffer によるバックグラウンドスペクトルを差し引き、スムージングした。ペプチドは、リン酸 buffer (Na_2HPO_4 ; 8.1 mM, KH_2PO_4 ; 1.5 mM, KCl; 2.7 mM, NaCl; 68 mM, pH 7.4) に希釈した。

4-3 結果

結合モチーフ保存ライブラリからの高親和性ペプチドの単離

結合モチーフ保存ライブラリの構築

A2 部分変異ライブラリ (3章-ヒト IgA への結合に重要な残基の同定) を用いた解析により明らかになったヒト IgA への結合に重要な残基のみを保存し (Cys-4, -13, Leu-5, Tyr-7, Gly-9, Val-12)、それ以外を NNK 混合ヌクレオチド (N:A or T or G or C, K:G or T) によっ

て完全にランダム化したライブラリ（結合モチーフ保存ライブラリ：3次ライブラリ）を作製した（表4-1）。

ライブラリ作製後、ランダムに選択した10クローンの提示ペプチド配列を解析した結果、設計通りにヒト IgA へ結合に重要な残基が保存されていること、それ以外の残基は完全にランダム化されていることが確認された。このように、重要残基を保存してそれ以外を完全にランダム化し多様性を制限したライブラリを用いてヒト IgA に対してパンニングを行うことで、ヒト IgA への結合に重要な残基以外の配列についても最適化されたようなペプチド配列を得ることができると考えられる。

表4-1 結合モチーフ保存ライブラリ

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Amino acid	X	X	X	C	L	X	Y	X	G	X	X	V	C	X	X	X
DNA	NNK	NNK	NNK	tgt	TTG	NNK	TAC	NNK	GGG	NNK	NNK	GTT	tgt	NNK	NNK	NNK

Xはランダムな20種のアミノ酸を示し、対応するDNAは各塩基を均等に含む混合塩基（NNKコドン）を用いて合成した。

結合モチーフ保存ライブラリからのヒト IgA 結合ファージの単離

作製したライブラリを用いて再度ヒト IgA に対して5ラウンドのバイオパンニングを行った。本パンニングにおいては、ファージライブラリとヒト IgA 反応後の洗浄操作について最大30回行うなど厳しい条件下で実施し、ヒト IgA をより高い親和性で認識するペプチドファージの単離を試みた。結果、A2部分変異ライブラリを用いた時と同様に、ラウンドを重ねるごとにヒト IgA 特異的ファージの濃縮が確認されたため（図4-1A）、4、5ラウンド後のファージプールについて単クローン化を行い、ヒト IgA に対して高い結合活性を有していたクローンについて提示ペプチド配列を解析した。計29クローンの提示ペプチド配列を解析した結果、結合活性、特異性ともに高いA2-3a配列（SDVCLRYRGRPVCFQV）が4クローンで確認された（図4-1B）。また興味深いことに、A2-3a配列の各位置における出現アミノ酸は、ほとんどの場合において、各位置において確認されたアミノ酸の中でも出現頻度の高いアミノ酸で構成されていた（表4-2）。

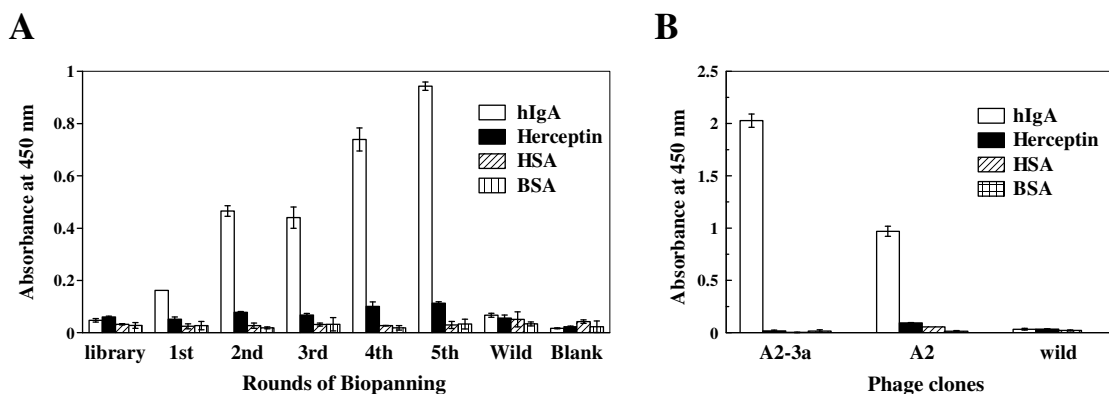


図4-1 モチーフ保存ライブラリからのヒト IgA 高親和ファージの単離

A. 5 ラウンドのバイオパンニング後、ヒト IgA 結合ファージの濃縮を ELSIA により確認した。B. 単離された 29 クローンの内、出現頻度 (4/29)、結合活性・特異性に最も優れていた A2-3a ファージの結合特異性を ELISA にて確認した。

A2-3a ペプチドの機能解析

ヒト IgA に対する親和性と結合特異性・結合部位

PEO₄ リンカーを介して biotin 化した A2-3a 合成ペプチドを調製し、BIAcore T100 を用いてヒト IgA に対する親和性を解析したところ、約 530 nM (K_d) と A2 ペプチドに比べ 2.5 倍程度高い親和性を有していることが明らかとなった (図 4-2 A)。また、ELISA を用いて各種蛋白質に対する結合特異性を確認したところ、非常に高い特異性でヒト IgA を認識することが示された (図 4-2 B)。さらに、A2-3a ペプチドのヒト IgA 上の結合領域を特定するため、ヒト IgA の CH2~CH3 の境界領域を認識する Fc α R/CD89 を用いて、SPR、ELISA (図 4-2 C, D) による競合試験を行った。Fc α R を固定化した CM5 センサーチップに、ヒト IgA (100 nM) と A2-3a ペプチド (0 - 2500 nM) の混合溶液をインジェクトしたところ、ペプチドの濃度依存的にヒト IgA の Fc α R に対する結合レスポンスの減少が確認された (図 4-2 C)。また、ヒト IgA を固定化したマイクロプレートに、Streptavidin-HRP を用いて 4 量体化した A2-3a ペプチド (16 nM) と Fc α R (0 - 100 nM) の混合溶液を加えたところ、Fc α R の濃度依存的にヒト IgA に対するペプチドの結合レスポンスが減少した (図 4-2 D)。以上のことから、我々の単離したペプチドは、Fc α R や Sir22、Arp4 などといった細菌由来のヒト IgA 結合タンパクと同様に、ヒト IgA の CH2~CH3 の境界領域を認識して結合す

ることが示された (図4-2E) [91, 92]。この領域には、いわゆるホットスポットと呼ばれるような溝状の構造があり、ペプチドはこの部分を特異的に認識しているのではないかと考えられた。

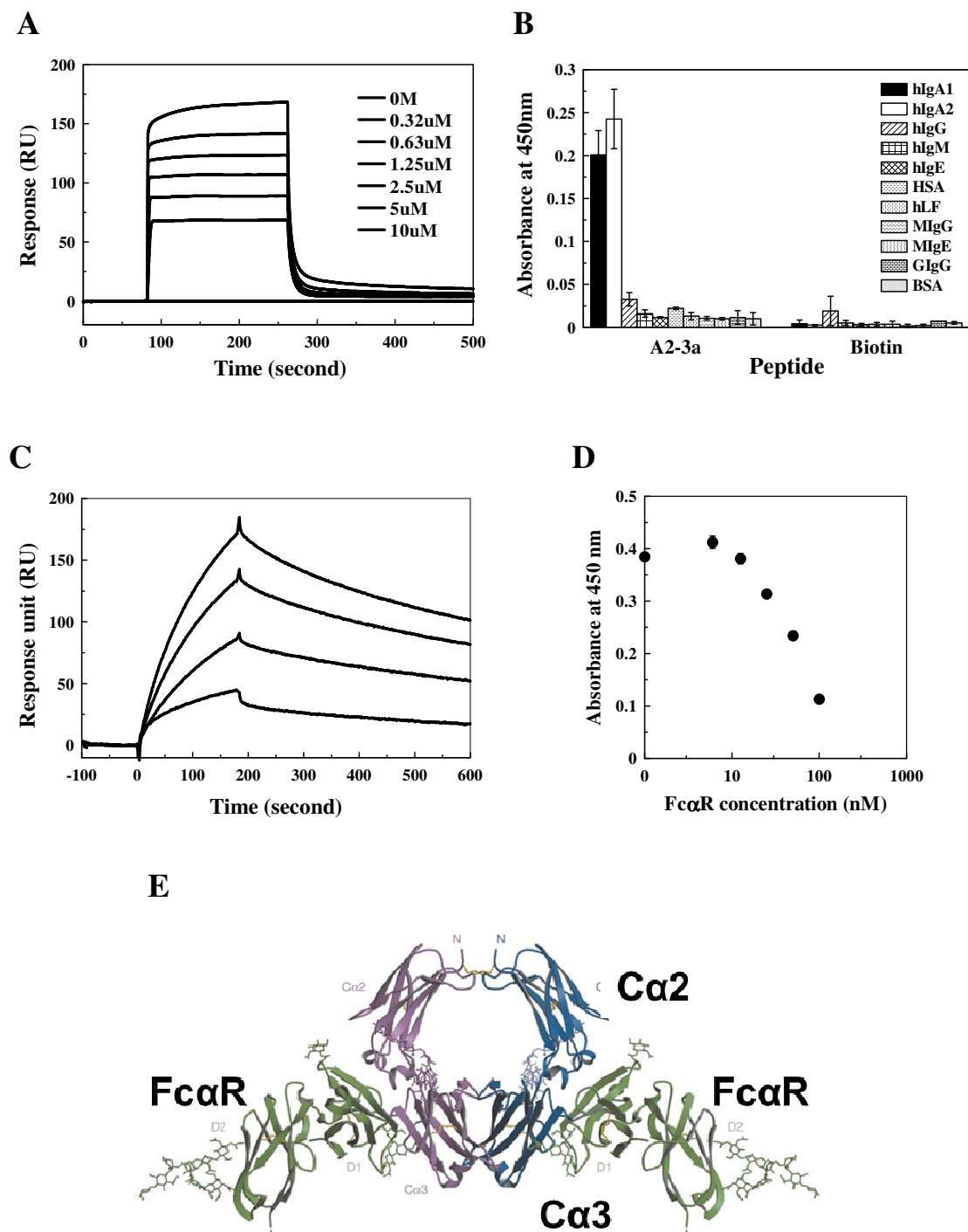


図4-2 A2-3a 合成ペプチドの特徴

A. SPR を用いて A2-3a ペプチドとヒト IgA₂ の親和性を解析した。B. A2-3a ペプチドの各種タンパク質に対する結合特異性について ELISA を用いて解析した。C, D. ヒト IgA に対する A2-3a ペプチドと FcαR の競合的な結合について SPR と ELISA を用いて解析した。E. FcαR とヒト IgA-Fc 複合体の結晶構造 [91]。Nature 2003, 423, 614-620.より引用。

ヒト血清中からの IgA 精製

ビオチン化 A2-3a ペプチドを Hitrap SA カラムに固定化し、ヒト血清中、唾液中より IgA の精製を試みた (図4-3 A, B)。図4-3 C に示すように、溶出画分には、ヒト IgA 以外の血清タンパク、唾液中タンパクの混入はほとんど見られず、非常に特異的にヒト IgA を精製することに成功していた。一方で、血清を用いた場合、洗浄画分にもヒト IgA の存在が確認された (図4-3 D)。ヒト IgA に対する親和性が低いため、カラム中から漏れ出てきていると考えられる。

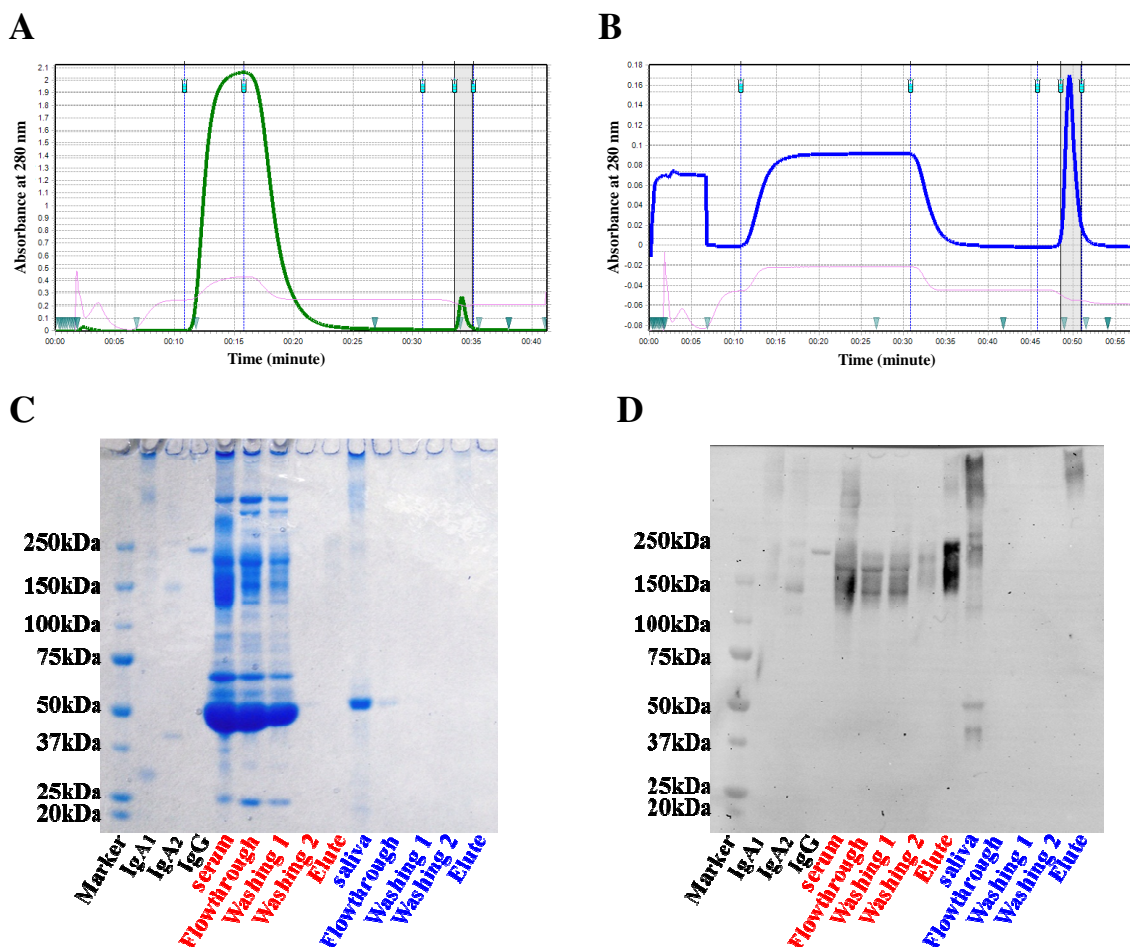


図4-3 A2-3a ペプチドカラムによる血清中、唾液中ヒト IgA の精製

A,B. A2-3a ペプチドカラムによる血清中 (A)、唾液中 (B) ヒト IgA の精製クロマトグラム。C,D. 酸性 buffer でカラムへの吸着画分を溶出した後、得られた画分について SDS-PAGE、Western blotting 解析を行った。

合成ペプチドスクリーニング

A2-3a 変異ペプチドのデザイン

T7 ファージディスプレイ法を用いたライブラリ技術により、A2 ペプチドから A2-3a ペプチドへと結合力・特異性の面で改良することに成功したが、工業利用可能な精製カラム用のアフィニティリガンドとしては未だ十分でない。そこで我々は、A2-3a ペプチドの各位置に一つずつアミノ酸置換を導入した合成ペプチドを調製し、BIAcore を用いたヒト IgA への結合親和性解析結果を指標にスクリーニングを行くことで、A2-3a ペプチドのヒト IgA に対する親和性上昇に効果のあるアミノ酸置換の同定を試みた。A2-3a ペプチド置換体のデザインとしては以下の三種になる。

- 1) モチーフ保存ライブラリより単離されたペプチド配列の各位置において最も出現頻度の高かったアミノ酸 (表 4-2) をそれぞれ A2-3a に導入した置換体; ヒト IgA への結合に重要な残基を同定した場合と同様に、モチーフ保存ライブラリから単離されたペプチドの各位置において出現頻度の高いアミノ酸は、その部位における最適なアミノ酸である可能性がある。出現頻度が最も高かったアミノ酸が、A2-3a のそれと同一であった場合は、2 番目に出現頻度の高いアミノ酸に置換した。
- 2) A2-3a ペプチドのアラニン置換体; A2-3a ペプチドの各残基の側鎖の重要性を明らかにする。
- 3) A2-3a ペプチドに A2 由来のアミノ酸を導入した置換体; ランダムライブラリは理論的な配列の多様性は非常に大きいものの、実際に用いることができる数には限りがあるためカバー率は非常に小さい。そのため、一般的に、ランダムライブラリからの標的分子に対する結合ペプチドの単離が最も難しい工程となる。この工程から単離されてきた A2 ペプチドの各残基は、IgA との相互作用に重要な配列を含んでいる可能性がある。

これらの置換体について BIAcore を用いてヒト IgA に対する親和性を解析し、A2-3a ペプチド中各残基のヒト IgA への結合における効果の検証と、親和性の増強に効果のあるアミノ酸置換の特定を試みた。

表4-2 3次ライブラリから単離されたヒト IgA 結合ペプチド配列

Peptide	Sequence															
A2	H	M	R	C	L	H	Y	K	G	R	R	V	C	F	L	L
A2-3a	S	D	V	C	L	R	Y	R	G	R	P	V	C	F	Q	V
	R 24	A 24	V 45	C	L	N 24	Y	R 93	G	R 55	P 41	V	C	F 52	R 24	W 24
	S 17	D 14	R 17			S 17		N 3		S 21	R 14			R 34	Q 14	F 17
	P 14	L 14	I 10			K 14		Q 3		K 14	Q 14			L 3	T 10	V 14
Amino acid appearing at each position	L 10	R 10	L 7			R 14				A 7	T 10			M 3	I 10	P 10
	G 10	S 7	W 7			M 10				N 3	K 7			G 3	K 7	G 7
	T 10	E 7	A 3			A 3					F 3				V 7	I 7
	V 7	V 7	T 3			T 3					V 3				N 3	L 7
	F 3	F 3	F 3			D 3					S 3				L 3	R 3
	H 3	W 3	S 3			Q 3					L 3				F 3	T 3
		M 3				H 3									P 3	Y 3
						G 3									D 3	
															H 3	
															M 3	

各アミノ酸の右横の数値は、出現頻度 (%) を表す。

A2-3a 変異ペプチドの IgA に対する結合親和性評価

各 A2-3a 変異ペプチドのヒト IgA に対する親和性とその自由エネルギー変化の差 ($\Delta G_{\text{mutant}} - \Delta G_{\text{A2-3a}}$) について表4-3、図4-4にまとめた。

Ser-1 について、A2 由来の His、3次ライブラリ由来の Arg への置換体は親和性の上昇が確認されたが、Ala 置換体は親和性が低下した。Asp-2 については、A2 由来の Met、Ala 置換体の両方で親和性が大きく上昇した。Val-3 について A2 由来の Arg、Ala 置換体の両方で親和性が6倍程度低下した。Leu-5 については、Ala 置換体において親和性が40倍程度低下した。Arg-6 については A2 由来の His、Ala 置換体は若干の親和性上昇が確認されたが、3次ライブラリ由来の Asn への置換体は親和性が若干低下した。Tyr-7 については、Ala 置換体において親和性が50倍程度低下した。Arg-8 については Ala 置換体において親和性が9倍程度低下した。Gly-9 については Ala 置換体において親和性が4倍程度低下した。Arg-10 については A2 由来の Ser への置換で3倍、Ala 置換体で約4倍親和性が低下した。Pro-11

については A2 由来の Arg、Ala 置換体の両方で親和性が 9~10 倍程度低下した。Val-12 については Ala 置換体で親和性が 8 倍程度低下した。Phe-14 においては、3 次ライブラリ由来の Arg への置換体は約 4 倍、Ala 置換体は約 20 倍親和性が低下した。Gln-15 について、A2 由来の Leu、3 次ライブラリ由来の Arg、また、Ala への置換のすべてで親和性が上昇した。Val-16 については、A2 由来の Leu 置換体で親和性が若干上昇したが、3 次ライブラリ由来の Trp、Ala への置換は親和性が低下した。

2 次ライブラリより同定されたヒト IgA への結合に重要な残基について、Leu-5, Tyr-7, Val-12 それぞれの Ala 置換体は、親和性がそれぞれ約 40 倍、50 倍、8 倍と大きく低下しており、ヒト IgA への結合への寄与の高さが証明された。一方 Gly-9 の Ala 置換体については、親和性は 4 倍程度しか低下しなかったが、Gly と Ala はメチル基一つの違いしかなく、この残基はペプチドのターン構造に寄与していると考えられることが、これの原因であると考えられる。また、3 次ライブラリにおいて高い出現率 (> 40 %) を有していた Val-3 (45 %)、Arg-8 (93 %)、Arg-10 (55 %)、Pro-11 (41 %)、Phe-14 (52 %) については、置換を加えることで 4~20 倍の親和性低下を招いた。一方、3 次ライブラリにおいて出現率のそれほど高くはない (< 30 %) アミノ酸への置換は、一部は親和性の上昇が確認されたが、一部は親和性が低下していた。以上のことから、T7 フェージライブラリよりパンニングによって得られたペプチド配列において、出現率の高い (> 40 %) アミノ酸は標的に対する結合に寄与している可能性が高いことがわかり、一方で出現率の低い (< 30 %) アミノ酸については、寄与率がそれほど高くはないということが考えられる。また、「**3 章—ランダムペプチドライブラリからの IgA 結合フェージの単離**」において、CXC 型のランダムライブラリからはヒト IgA 結合フェージクローンが単離されなかったが、これは、1-3、14-16 番目の 2 つの Cys の外側の残基においても、ヒト IgA への結合に寄与していることが原因であると考えられる。特に、本ペプチドの場合、Cys の一つ外側の残基 (Val-3、Phe-14) は、置換を導入することで 3~20 倍の親和性の低下が確認されている。

表4-3

A2-3a ペプチド置換体のヒト IgA に対する親和性と結合自由エネルギー変化

Peptides	Sequence				K_d (μM)	$\Delta\Delta G(\Delta G_{\text{mutant}} - \Delta G_{\text{A2-3a}})^{\dagger}$ (kcal/mol) [†]											
	1	5	1 0	1 5 [†]													
A2	HMRCLHYKGRRVCFLL				1.3	0.54 [†]											
A2-3a	SDVCLRYRGRPVCFQV				0.53	0 [†]											
A2-3a(S1R)	R				0.41	-0.15 [†]											
A2-3a(S1H)	H				0.36	-0.23 [†]											
A2-3a(S1A)	A				2.0	0.80 [†]											
A2-3a(D2A)	A				0.25	-0.45 [†]											
A2-3a(D2M)	M				0.15	-0.73 [†]											
A2-3a(V3R)	R				3.0	1.0 [†]											
A2-3a(V3A)	A				3.0	1.0 [†]											
A2-3a(L5A)		A			20.0	2.1 [†]											
A2-3a(R6N)		N			0.76	0.21 [†]											
A2-3a(R6H)		H			0.43	-0.13 [†]											
A2-3a(R6A)		A			0.34	-0.27 [†]											
A2-3a(Y7A)		A			25.0	2.3 [†]											
A2-3a(R8A)		A			4.4	1.3 [†]											
A2-3a(G9A)		A			1.9	0.75 [†]											
A2-3a(R10S)			S		1.7	0.69 [†]											
A2-3a(R10A)			A		2.2	0.85 [†]											
A2-3a(P11R)			R		5.2	1.4 [†]											
A2-3a(P11A)			A		4.4	1.3 [†]											
A2-3a(V12A)			A		4.0	1.2 [†]											
A2-3a(F14R)				R	2.3	0.86 [†]											
A2-3a(F14A)				A	11.0	1.8 [†]											
A2-3a(Q15R)				R	0.31	-0.32 [†]											
A2-3a(Q15L)				L	0.36	-0.23											
A2-3a(Q15A)				A	0.28	-0.38 [†]											
A2-3a(V16W)				W	1.6	0.65 [†]											
A2-3a(V16L)				L	0.45	-0.10 [†]											
A2-3a(V16A)				A	0.82	0.26 [†]											
Opt-1	H	M	V	C	L	A	Y	R	G	R	P	V	C	F	A	0.033	-1.6 (-1.7)* [†]
Opt-2	H	M	V	C	L	S	Y	R	G	R	P	V	C	F	S	0.016	-2.1 [†]
Opt-3	H	Q	V	C	L	S	Y	R	G	R	P	V	C	F	S	0.072	-1.2 [†]

全てのペプチドはC末端側をアミド化している。 $\Delta\Delta G$ はA2-3aペプチド変異体のヒトIgAに対する結合自由エネルギーとA2-3aペプチドの結合自由エネルギーの差を示す。下線で示す変異体をA2-3aペプチドに導入することでOpt-1ペプチドをデザインした。Opt-1、Opt-2ペプチド中の太字で示すアミノ酸は、A2-3aペプチドに対して変異を導入したアミノ酸を示す。

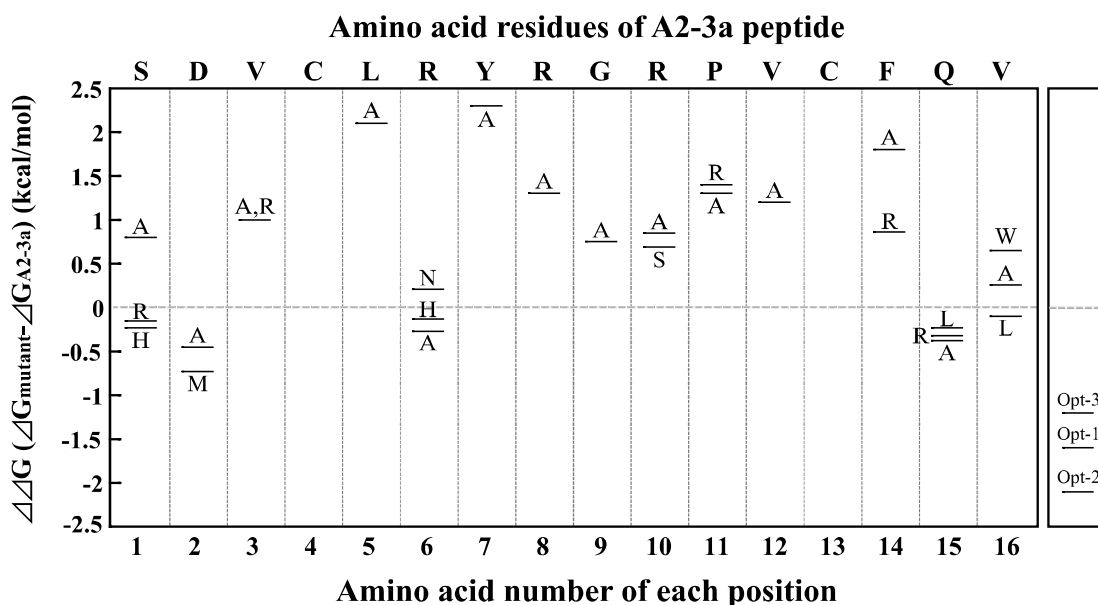


図4-4 A2-3a ペプチドへの変異導入によるヒト IgA への結合自由エネルギー変化

表中のアミノ酸は、各位置における A2-3a ペプチドへの変異を示す。—は各変異における $\Delta\Delta G$ の値を示す。

Opt-1 ペプチドのデザインと機能解析

Opt-1 ペプチドのデザインとヒト IgA に対する結合親和性

A2-3a ペプチド変異体の親和性解析の結果、A2-3a (S1H)、A2-3a (D2M)、A2-3a (R6A)、A2-3a (Q15A)、A2-3a (V16L) の変異が、それぞれの位置ごとの置換体の中で最も高いヒト IgA への結合親和性を示した。そこで、これらの変異をすべて A2-3a に導入した Opt-1 ペプチドを調製し、その親和性を解析した。結果、驚くべきことに、Opt-1 ペプチドは 33 nM (K_d) と非常に高い結合親和性を有しており、A2 ペプチドに比べ約 40 倍、A2-3a ペプチドに比べ約 16 倍と飛躍的に親和性が上昇していた (表 4-4、図 4-5)。また、興味深いことに、A2-3a に対する各変異体の結合自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{mutant}} - \Delta G_{\text{A2-3a}}$) の総和 (-1.7 kcal/mol) は、A2-3a ペプチドに対する Opt-1 ペプチドの結合自由エネルギー変化の差 ($\Delta G_{\text{Opt-1}} - \Delta G_{\text{A2-3a}} = -1.6$ kcal/mol) と非常に近く、つまり、これらの変異導入では加成性が

成り立っていることがわかる。さらに、Opt-1 ペプチドの疎水性を抑える目的で6番目と15番目の Ala を Ser に置換した Opt-2 ペプチドについては、ヒト IgA に対する親和性が 16 nM (K_d) と本研究によりデザインされたペプチドの内最も高い高い結合親和性を有していた。Opt-2 ペプチドについては、「4章-Opt-2 ペプチドのデザインと機能解析」に詳細を記載する。

表4-4 ヒト IgA への親和性が上昇した置換体

Peptide	Sequence				K_d (μ M)	$\Delta\Delta G$ ($\Delta G_{A2-3a} - \Delta G_{mutants}$) (kcal/mole)
	1	5	10	15		
A2	HMRCLHYKRRVCFLL				1.3	-0.54
A2-3a	SDVCLRYRGRPVCFQV				0.53	0
A2-3a(S1H)	H				0.36	0.23
A2-3a(D2M)	M				0.15	0.73
A2-3a(R6A)		A			0.34	0.27
A2-3a(Q15A)				A	0.28	0.38
A2-3a(V16L)				L	0.45	0.10
Opt-1	HMVCLAYRGRPVCFAL				0.033	1.6 (1.7)

() は変異体の $\Delta\Delta G$ の総和を示す。

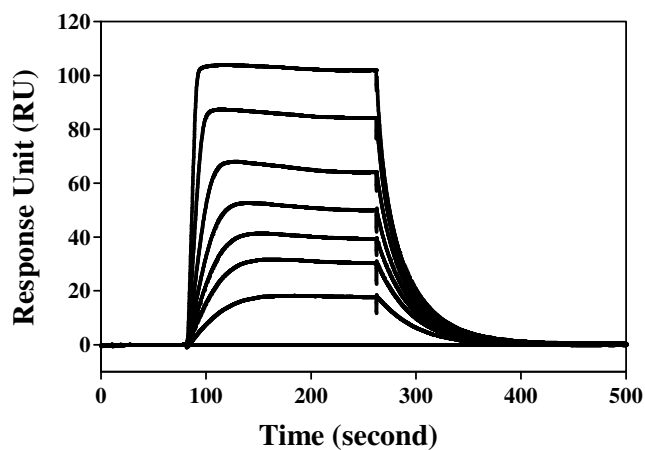


図4-5 Opt-1 ペプチドのヒト IgA に対する結合センサーグラム

ヒト IgA2 固定化センサーチップに Opt-1 ペプチド (3.9~625 nM) をインジェクトした。

ヒト血清中からの IgA 精製

N 末端をアミノ PEG 化した Opt-1 ペプチドを Hitrap NHS activated HP カラム (GE healthcare) にアミンカップリング法を用いて固定化したアフィニティカラムを作製し、ヒト血清中より IgA の精製を試みた (図 4-6 A)。酸性 buffer による溶出分画について、SDS-PAGE (4-20 %) を行った結果を図 4-6 B に示す。非還元条件下において 150 kDa 付近に IgA 由来のバンドが確認でき、還元処理を行うことで、H 鎖、L 鎖由来のバンドを確認することができたことから、Opt-1 ペプチドカラムを用いることでヒト血清中より IgA を回収できることが示された。しかしながら、非還元条件下において、20-25 kDa 付近と 50-75 kDa 付近に IgA 以外のバンドが確認された。これらのバンドは、ヒト IgA 以外のその他の血清タンパク質由来であると考えられる。Opt-1 ペプチドは A2 ペプチドと同様に、ヒト IgA 以外のタンパク質にも非特異的に結合してしまうことが示された。

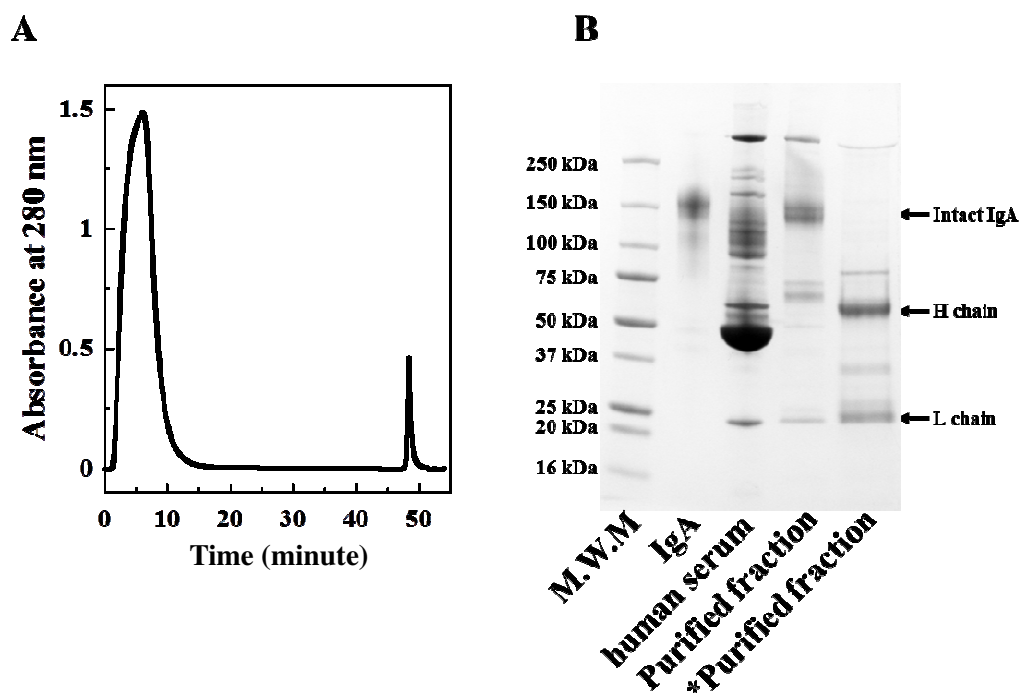


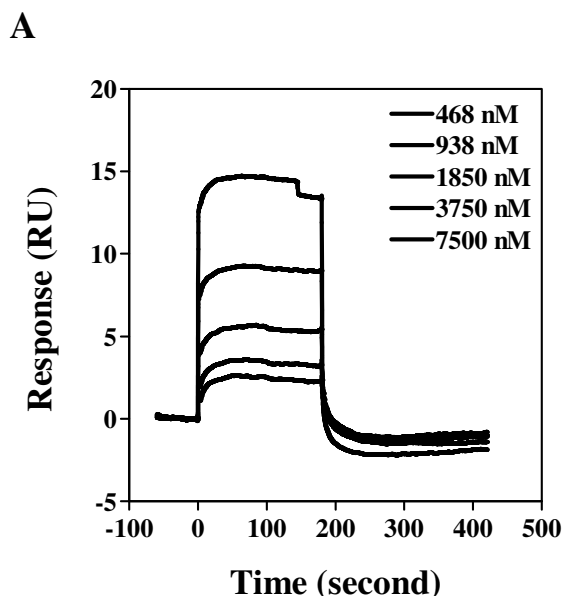
図 4-6 Opt-1 ペプチドカラムによる血清中ヒト IgA の精製

A. ヒト血清中 IgA の精製クロマトグラム。B. 精製画分の SDS-PAGE。*は 2 メルカプトエタノールを加え煮沸した (還元処理) サンプルを示す。MWM : 分子量マーカー。

ペプチド分子内ジスルフィド結合の重要性

比較的短いペプチド（20 残基以下）は、一般的に、立体構造を持たず（二次構造を持つ小分子ペプチドは報告されている；IgG の Fc 領域を認識する 13 残基の FcIII ペプチドは分子内に β シート構造を持つ [93]。）、フレキシビリティが高い（チェーンエントロピーが大きい）ため、溶液中においては多様な構造をしている。そのため、標的に対する結合の際には大きな構造変化が必要となり、結果として親和性は低くなる（結合におけるチェーンエントロピー変化が負に大きくなるため、自由エネルギー変化が抑制される）。そのため我々は、ランダムペプチドライブラリの設計時にペプチド分子内に 2 つの Cys を保存導入（Cys-4, -13）し、ペプチド分子のフレキシビリティ（チェーンエントロピー）を低下させた。本項では、この 2 つの Cys のヒト IgA に対する結合への重要性について、Opt-1 ペプチド中の 2 つの Cys を Ser に置換し直鎖状にした Opt-1L ペプチドを用いて検討した。

BIAcore T200 による IgA との結合親和性解析の結果、ヒト IgA に対する親和性は約 25 μM (K_d) と Opt-1 ペプチドに比べ約 1000 倍低いことが示され（図 4-7A）、また CD スペクトル解析の結果より、ペプチド分子内の二次構造含有量の低下も確認された（図 4-7B）。これらの結果より、IgA 結合ペプチド中のジスルフィド結合は、ペプチド自身の構造安定化と IgA への結合において重要であることが示された。



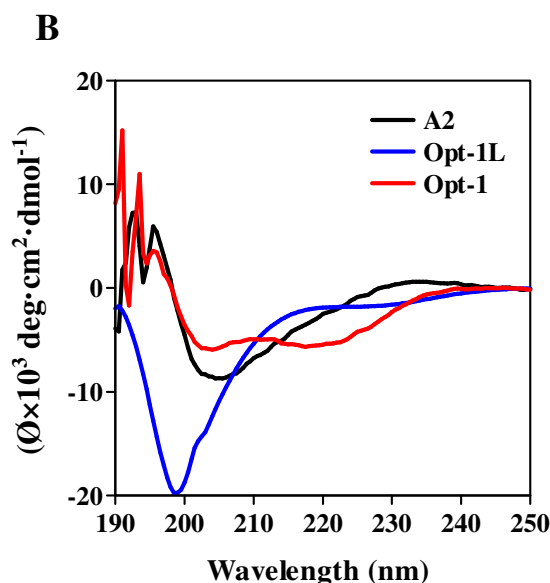


図4-7 Opt-1L ペプチドの親和性と二次構造

A. BIAcore T200 を用いて Opt-1L ペプチドとヒト IgA の結合親和性を解析した。B. リン酸緩衝液中における A2、Opt-1、Opt-1L ペプチドの CD スペクトル。

分子シミュレーション

Opt-1 ペプチドの分子モデル

Opt-1 ペプチド単体の溶液中における構造を分子シミュレーションによりモデリングした。本シミュレーションは、共同研究先のスンミョン女子大学・Sihyun Ham 教授（韓国）等のグループにより実施していただいた。

驚くべきことに、Opt-1 ペプチドは 16 残基と非常に短く、分子内の 2 つの Cys により環状構造を形成しているにもかかわらず、2 番目の Met から 7 番目の Tyr にかけて α ヘリックス構造を形成していることが示された（図 4-8 A）。この結果は、Opt-1 ペプチドの水溶液中における CD スペクトル解析結果と一致している（図 4-8 B）。

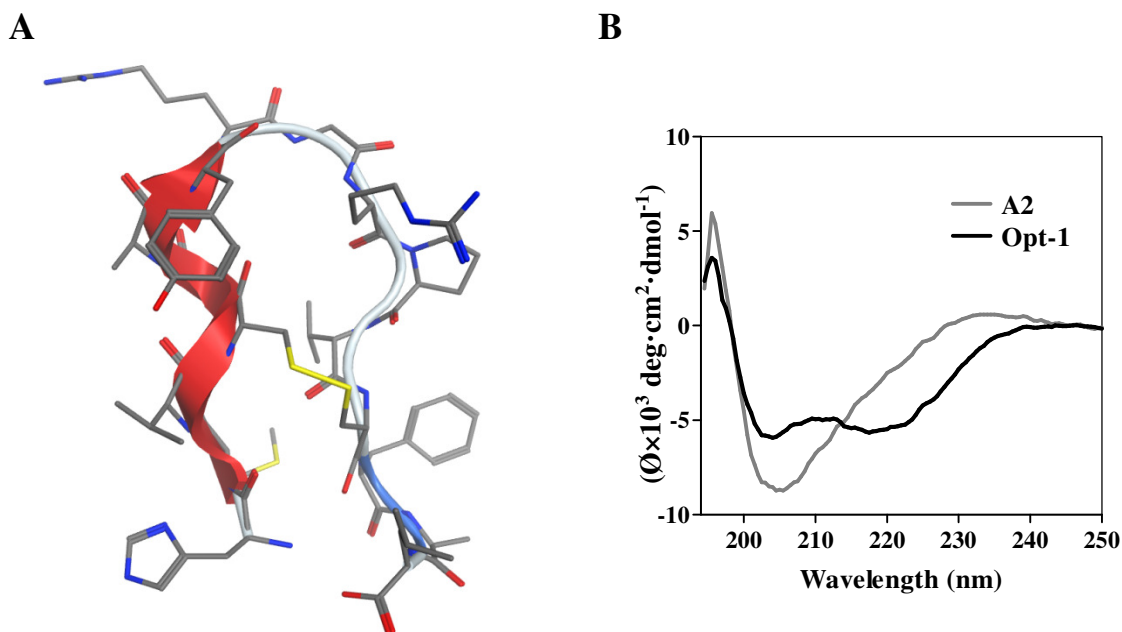


図4-8 Opt-1 ペプチドのモデル構造

A. 分子シミュレーションを用いて作製した Opt-1 ペプチドのモデル構造。赤リボンが α ヘリックス構造を示す。青は N、灰色は C、黄色は S、赤は O を示す。B. リン酸緩衝液中における A2、Opt-1 ペプチドの CD スペクトル。

Opt-1 ペプチドとヒト IgA-Fc 複合体モデル

前項で構築した Opt-1 ペプチドのモデルを用いて、ヒト IgA-Fc (X 線結晶解析像) とのドッキングシミュレーションを行った。これについても、共同研究先の韓国スンミョン女子大学・Si Hyun Ham 教授らのグループにより実施していただいた。

シミュレーションにより得られた複合体構造を図4-9に示す。このシミュレーション結果より、Opt-1 ペプチドの7番目の Tyr はヒト IgA-Fc の313番目の Glu と、8番目の Arg は IgA-Fc の255番目の Asp、261番目の Glu と水素結合を形成していることが示唆され、2番目の Met、3番目の Val、5番目の Leu、11番目の Pro、12番目の Val、14番目の Phe はヒト IgA-Fc 側の疎水性領域と疎水結合を形成していることが示唆された。

5番目の Leu、7番目の Tyr、12番目の Val は、A2 部分変異ライブラリによるスクリーニングから IgA への結合に必須な残基でると同定された残基であり、A2-3a ペプチドにおけるアラニン置換体の親和性評価からもその重要性が示されている。また、3番目の Val、11

番目の Pro、14 番目の Phe はモチーフ保存ライブラリから単離されたペプチドにおいて高く保存されていた残基であり、2 番目の Met に関しては、A2-3a 置換体の中で最もヒト IgA に対する結合親和性の上昇を招いた変異であり、ドッキングモデル中では、CH2 と CH3 間の溝に挿入されるような形で位置している。このように、分子シミュレーションにより得られた Opt-1 ペプチドと IgA-Fc の複合体構造は、これまでの実験結果と良い相関を示した。

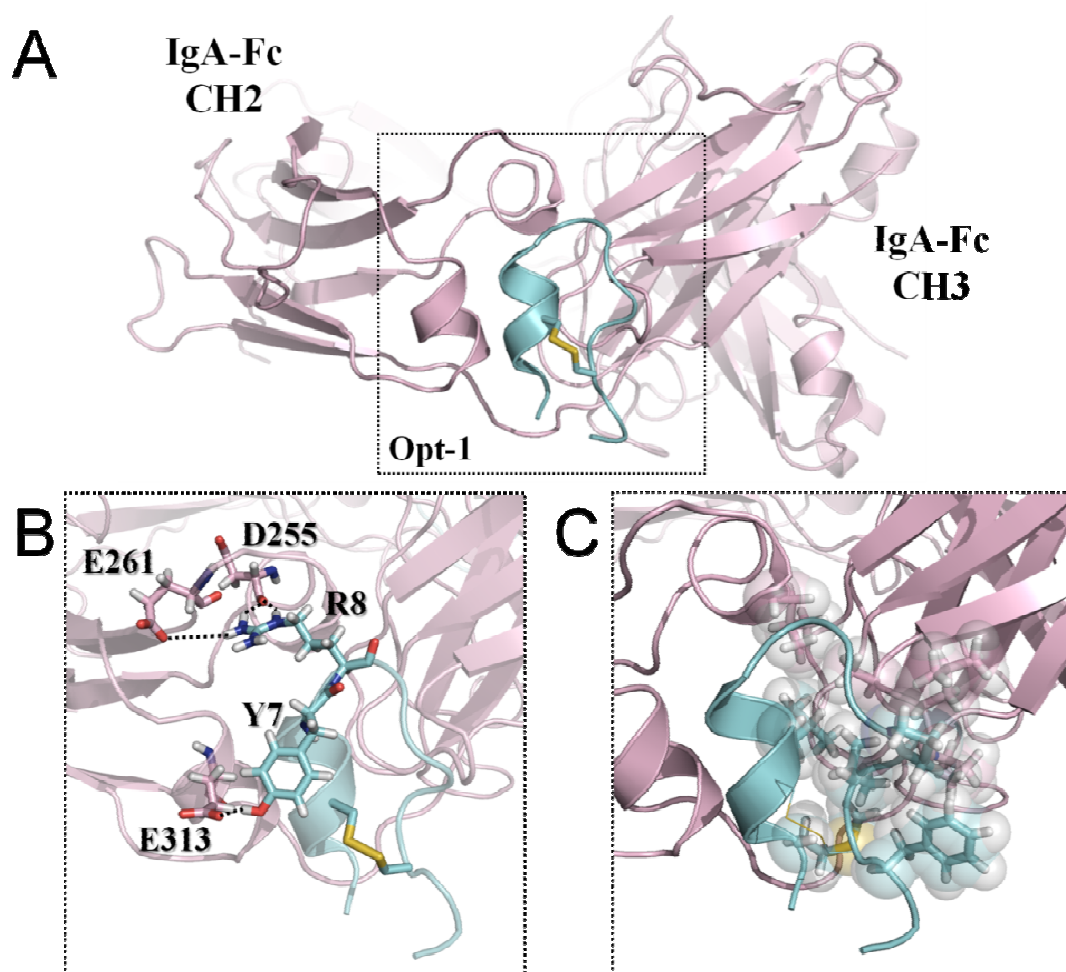


図4-9 Opt-1 ペプチドとヒト IgA-Fc の複合体モデル

A. Opt-1 ペプチドとヒト IgA-Fc 複合体モデルの全体図。B. Opt-1 ペプチドとヒト IgA-Fc (CH2) 間の水素結合。ドットラインは水素結合を示す。C. Opt-1 ペプチドとヒト IgA-Fc (CH3) 間の疎水性結合。灰色がヒト IgA-Fc、ピンクが Opt-1 ペプチドを示す。黄色は Opt-1 ペプチド中のジスルフィド結合を示し、N は青、O は赤で示す。

ヒト IgA 結合ペプチドの親和性増強メカニズム

ペプチドファージライブラリや合成ペプチドを用いたスクリーニングにより、A2 ペプチド ($K_d=1.3 \mu\text{M}$) から Opt-2 ペプチド ($K_d=16 \text{ nM}$) へと、ヒト IgA に対する結合親和性を約 80 倍増強することに成功した。この親和性の増強メカニズムを明らかにするために、A2、A2-3a、Opt-2 ペプチドについて、CD スペクトル測定による二次構造解析、BIAcore T100 によるヒト IgA との相互作用における熱力学的パラメーター解析を行った結果を以下に示す。

CD スペクトル測定の結果、 $A2 < A2-3a < \text{Opt-2}$ ペプチドとヒト IgA に対する親和性の上昇に伴い、222 nm の負の極大が大きくなっていった。これは、ペプチドの IgA に対する親和性の上昇とともにペプチド中の二次構造 (α ヘリックス) 含有量が増大していることを示している (図 4-10A)。

また、BIAcore T100 を用いてヒト IgA との結合におけるエンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) を解析した結果、A2、A2-3a、Opt-2 ペプチドのヒト IgA との結合におけるエンタルピー変化については、Opt-2 ペプチドにおいて若干大きい、約 11 kcal/mol 前後と各ペプチド間でほとんど差がない一方 (A2 : -10.9 kcal/mol、A2-3a : -10.7 kcal/mol、Opt-2 : -11.2 kcal/mol)、エントロピー変化の項 ($-T\Delta S$) においては、ペプチドの親和性が上昇するにつれて A2 ペプチドで 3.1 kcal/mol、A2-3a ペプチドで 1.7 kcal/mol、Opt-2 ペプチドで 1.3 kcal/mol と減少していることが明らかとなった (図 4-10B)。さらに、各ペプチドの結合解離反応の成分 (結合速度定数、解離速度定数) に注目すると、結合速度定数が A2 から Opt-2 ペプチドにかけて約 5.5 倍上昇し、解離速度は 10 倍程度遅くなっていた (図 4-10C)。

以上の結果より、A2 から Opt-2 ペプチドへと IgA への結合に適した形に一次配列が最適化される過程において、ペプチドとヒト IgA 間の水素結合やイオン結合などの相互作用数には大きな変化がなかったが (エンタルピー変化にはあまり差がない)、ペプチド自身の二次構造 (α ヘリックス) 含有量が上昇し、おそらくはこの構造がヒト IgA との結合に適していたため、結合に伴うチェーンエントロピー変化のロスを低減し (エントロピー変化の増大)、親和性が上昇したと考えられる。

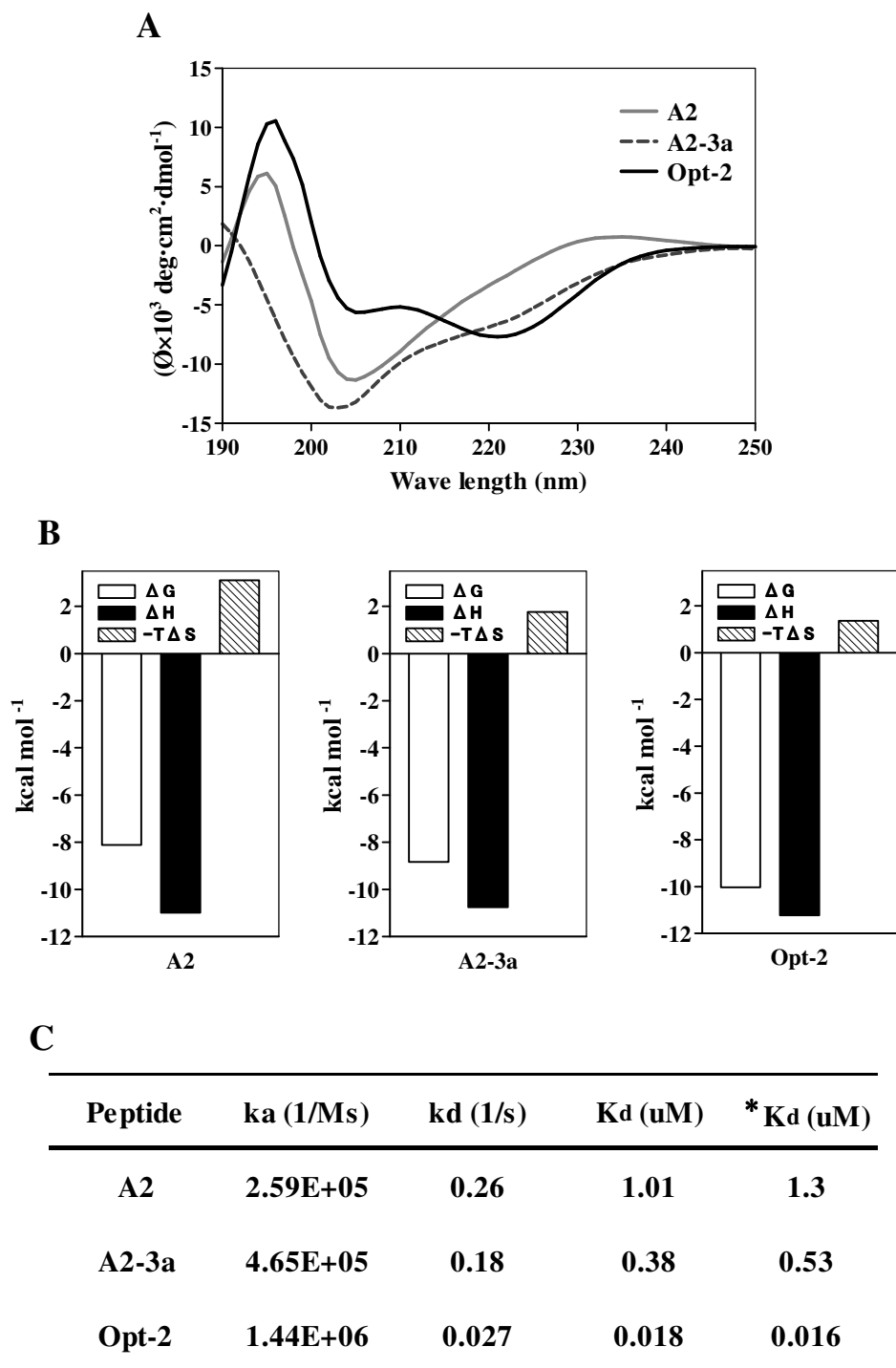


図4-10 ヒト IgA 結合ペプチドの親和性上昇メカニズム

A. A2、A2-3a、Opt-2 ペプチドの CD スペクトル。B. A2、A2-3a、Opt-2 ペプチドのヒト IgA への結合に伴う熱力学的パラメーター。C. A2、A2-3a、Opt-2 ペプチドの結合解離速度定数。A2 と A2-3a については、解離速度が非常に早いため Fitting は良好ではなかった。

* K_d は平衡値解析結果を示す。

4-4 まとめと考察

高親和性ペプチドのデザイン

ヒト IgA への結合に重要な残基を固定化しそれ以外をランダム化した結合モチーフ保存ライブラリを用いることで、A2 ペプチド ($K_d=1.3 \mu\text{M}$) よりも親和性の高い A2-3a ペプチド ($K_d=530 \text{ nM}$) の単離に成功したが、IgA に対する親和性の上昇は 2.5 倍程度に止まった。今回用いた T7 ファージディスプレイシステムにおいては、ファージ表面に 10-15 個のペプチドが提示される。これによる標的分子との多価結合効果 (アビディティ効果)、リバインディング効果により、実際は弱い結合力のペプチドを提示するファージであっても、その結合は見かけ上、非常に強くなる (図 4-1 1 A)。また、ファージの数の測定は手間と時間がかかる作業の割に正確性が低いため、ファージ数を一定にした状態で実験を行うことは非常に難しい。これらのことから、特に標的分子をイムノプレートに固定化する一般的なバイオパンニングでは、結合力が強いペプチドを提示するファージだけを選別することが難しく (標的分子の固定化量や洗浄条件を高度に最適化する必要がある)、また、ELISA 法においても、近しい親和性を持つようなペプチドを提示するファージについて、その結合親和性を正確に反映するようなランキング結果を得ることが非常に困難である。ファージ自身をイムノプレートや BIAcore のセンサーチップ上に固定化し、アビディティ効果、リバインディング効果を小さくした条件下にて標的分子との結合活性を測定することで、ファージ上ペプチドの標的分子に対する結合活性をより正確に反映するような結果が得られるかもしれない (図 4-1 1 B)。

この一方で我々は、これまでに得られたヒト IgA 結合クローンの提示するアミノ酸配列データを基に、A2-3a ペプチドに 1 塩基ずつ置換を導入した A2-3a 変異ペプチドを調製し、これのヒト IgA に対する親和性解析結果を指標にスクリーニングを行うことで、ヒト IgA への親和性上昇に効果のあるアミノ酸の同定に成功し、さらに 33 nM (K_d) と極めて高い親和性を有する Opt-1 ペプチドのデザインに成功した。本検討から、ライブラリより単離されたペプチド配列について、保存性の高いアミノ酸 (> 40%) は標的に対する結合に重要な役割を持ち、保存性の低いアミノ酸 (< 30%) は必ずしも結合に関与するわけではないことが示された。ファージ上提示ペプチドの標的に対するより詳細な親和性ランキングが行えれば、配列データ間の相同性と比較検討することで、合成ペプチドによる検討を行わずに高い親和性を有するペプチドをデザインすることができると考えられる。

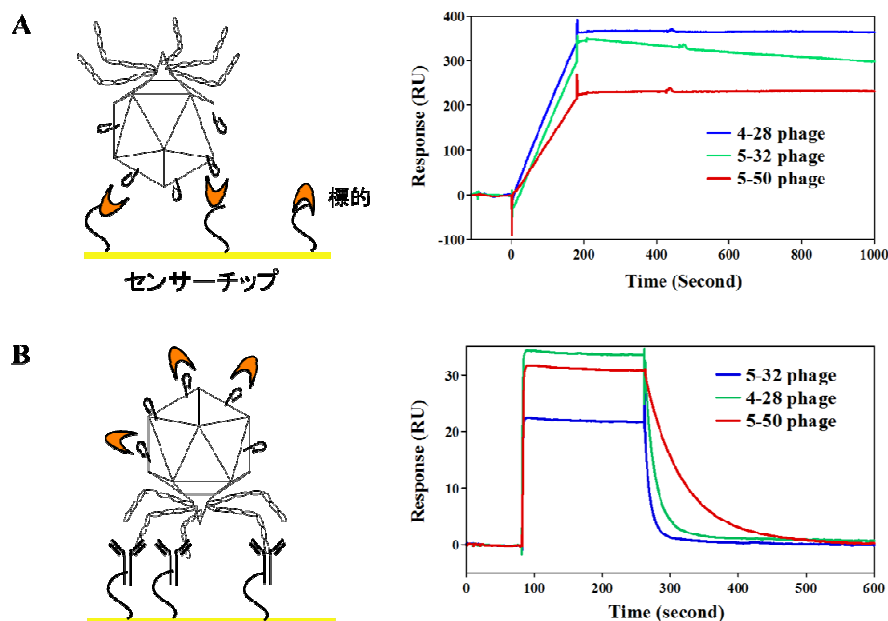


図4-11 アビディティ効果

A. センサーチップに標的分子 (IgG) を固定化し、標的的特異的なペプチドを提示する T7 ファージ (4-28, 5-32, 5-50) をインジェクトした際の結合センサーグラムを示す。一度結合すると、アビディティ効果やリバインディング効果によりほとんど解離が見られず、また、結合速度定数はファージの濃度に依存するが、ファージ量を一定にすることは非常に困難である。**B.** センサーチップに抗 T7-tail fiber 抗体を介して T7 ファージを固定化 (キャプチャー) し、標的分子をインジェクトした際の結合センサーグラムを示す。ファージをインジェクトする際のセンサーグラムを確認しながら作業が行えるため、ファージのキャプチャー量は一定値に揃えることができる。結合速度定数は、合成ペプチドの場合と比較すると非常に速い結果となるが、解離速度定数については、実際のペプチドの場合とよく一致した。

親和性上昇メカニズム

また、我々は、この IgA 結合ペプチドの親和性上昇メカニズムについて、A2、A2-3a、Opt-2 ペプチドの二次構造、ヒト IgA への結合に伴う熱力学パラメーター (ΔH 、 $-T\Delta S$) を解析することで明らかにした。A2 < A2-3a < Opt-2 ペプチドと、ヒト IgA への結合親和性が上昇するにつれ、ペプチド中の二次構造含有量も増加し、また、各ペプチドにおいてヒト

IgA との結合に伴うエンタルピー変化 (ΔH) にほとんど差が無かったが、一方でエントロピー変化の項 ($-T\Delta S$) について親和性上昇に反比例するかたちで減少していた。これらの結果より、置換導入によるペプチド中二次構造含有量の増加がチェーンエントロピーを減少させ、ヒト IgA との結合における負のチェーンエントロピー変化を抑制し、結果として親和性が上昇したことが示された (図4-12)。これは、ペプチド中の2つの Cys を Ser に置換した Opt-1L ペプチドにおける、親和性・二次構造の大幅な減少と一致する。

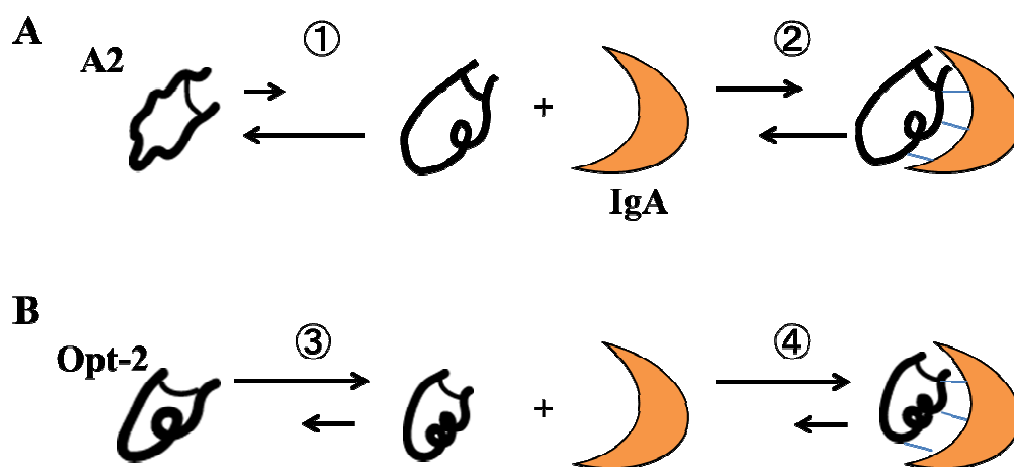


図4-12 親和性増強メカニズムの考察

A. A2 ペプチドと IgA の結合様式モデル。B. Opt-2 ペプチドと IgA の結合様式モデル。A2 ペプチドはランダムな構造をしているため IgA との結合に適した構造への構造変化にエネルギーを要する①。一方で、Opt-2 ペプチドはある程度 IgA への結合に適した構造をしているため、構造変化が少ない③。IgA との結合速度は、結合に適したペプチド構造の実際の結合速度とその濃度に依存するため比較は難しいが、少なくとも、結合状態の構造は Opt-2 の場合が安定であるため、解離速度定数は小さくなると考えられる②,④。

分子シミュレーション

Opt-1 ペプチドの構造的な特徴を明らかにするために、分子シミュレーションを用いて、Opt-1 ペプチドの溶液中のモデル構造を構築した。驚くべきことに、Opt-1 ペプチドは、16 残基と非常に短く、さらに、分子内の2つの Cys (4, 13 番目) が形成するジスルフィド結合により環状構造を形成しているにもかかわらず、ペプチド N 末端側の Met-2 から Tyr-7 にかけて α ヘリカルな構造を有していることが示され、この結果はペプチドの CD スペクトル

測定結果と一致した。また、Opt-1 ペプチドと IgA のドッキングシミュレーションから、Opt-1 ペプチド中各残基のヒト IgA との結合における役割が示唆されたが、これについても、A2 部分変異ライブラリや結合モチーフ保存ライブラリ、A2-3a ペプチド変異体合成ペプチドを用いたスクリーニングの結果と良い相関性を示していた。これらの結果より、本シミュレーション結果は、実際の溶液中における Opt-1 ペプチドの構造や、IgA との結合状態を良く反映していると考えられる。

ヒト IgA 上の結合部位

FcαR との競合試験より、我々の単離したペプチドは、IgA-Fc の CH2-CH3 間の領域を認識することが示された。分子シミュレーションにより示された Opt-1 - IgA-Fc の複合体において、Opt-1 ペプチドはこの領域に存在する cave (洞穴) 状の構造にペプチドの片面が埋まるように結合している (図 4-13)。このような鍵と鍵穴と呼ばれるような結合様式は、酵素と低分子阻害剤によく見られる結合様式であり、結合における相互作用表面を多く確保でき、結果として結合力が高くなる。本研究には完全長のヒト IgA を用いてバイオパンニング、スクリーニングを行っているため、この CH2-CH3 間以外の部位に結合するペプチドを提示したファージも多数存在したと考えられるが、上記の特徴を持ついわゆる Hot spot と呼ばれるような構造が、特にペプチドなどの低分子の標的としてより適していたと考えられる。

ヒト血清中からの IgA 精製

Opt-1 ペプチドはヒト IgA への結合親和性が高いことから、IgA への結合に特化したような構造をとっていると考えられた。しかしながら、Opt-1 ペプチドを固定化したアフィニティカラムを用いてヒト血清中 IgA のアフィニティ精製を試みた際、精製画分にヒト IgA 以外の血清タンパクの混入が確認された。IgA との結合に直接関わらない残基がこの非特異的な結合を引き起こしている可能性がある。

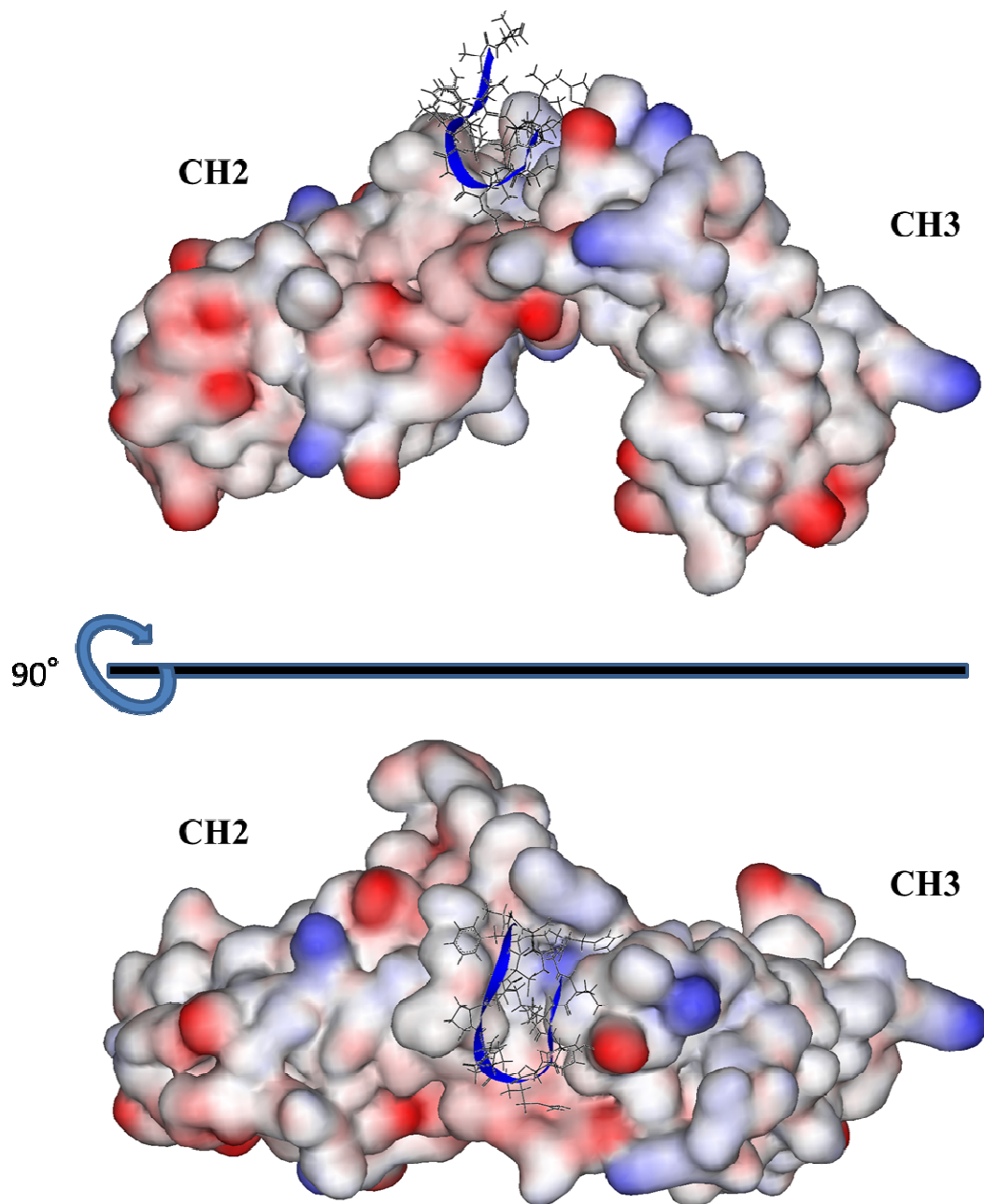


図4-13 IgA-Fc 中の Hot Spot

MD シミュレーションにより得られた Opt-1 - IgA-Fc 複合体。ペプチドの主鎖を青リボンで、側鎖を黒スティック形式で示した。IgA-Fc は surface map を示している。赤が酸性、青が塩基性、白が非極性部位を示す。

第 5 章

ヒト IgA 結合ペプチドの 結合特異性改善

5-1 目的

ファージディスプレイライブラリ技術と合成ペプチドを用いた親和性評価ベースのスクリーニング手法により、A2 ペプチド ($K_d=1.3 \mu\text{M}$) から、Opt-1 ペプチド ($K_d=33 \text{ nM}$) へとヒト IgA に対する親和性を 40 倍以上上昇させることに成功した。しかしながら、Opt-1 はヒト IgA だけでなく、その他の血清タンパク質にも若干非特異的に結合することが、ペプチド固定化カラムを用いた実験より明らかとなった。本章では、Opt-1 ペプチドのどの残基がこの非特異的な結合を引き起こしているのかについて検討し、置換導入を行うことで、より特異的な IgA 精製が可能なペプチドのデザインを試みた。

5-2 材料と方法

材料

ポリクローナルヒト抗体 IgA₂ (κ)、IgA₁ (λ) は Acris ANTIBODY 社より、ヒト Fc α レセプター/CD89 は R&D SYSTEMS 社より、ヒト化抗 HER2 医薬品抗体 Herceptin (Trastuzumab) は中外製薬株式会社より、ポリクローナルマウス抗体 IgM は Sigma 社より、ヒト血清はロンザジャパン株式会社より購入した。

ペプチド合成

合成ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成された。すべてのペプチドは C 末端側をアミド化している。保護基を除去した後、緩やかな酸化条件下で分子内 S-S 結合を形成させ、逆相 HPLC を用いて分子内でジスルフィド結合を形成しているペプチドを精製した。精製したペプチドの純度、分子内ジスルフィド結合の有無については LC/MS (Acquity SQD ultra-performance liquid chromatography system ; Waters Corp., Milford, MA) を用いて確認している。また、N 末端のアミノ PEG 化体は、N-Fmoc-amido-PEG₄-COOH を用いて合成した。精製されたペプチドは凍結乾燥後、使用まで -20°C にて保存した。ペプチドを SPR 等の測定に用いる際は、各種実験バッファーに溶解して遠心 (15000 rpm で 10 min) し、沈殿を取り除

いた後、ペプチド濃度は分光光度計 (e-spect) を用いて定量した。

ELISA

96穴のマイクロプレートのウェルに、ヒトIgA₂、その他コントロールタンパク質 (50 ng/ 50 μl/well) を0.1 M NaHCO₃溶液中でコートし、PBSに溶解した0.5 % BSAでブロッキングを行った。各ウェルにSA-HRPとプリインキュベートしたビオチン化合物ペプチドを加え、室温で1時間反応後、0.1 % PBSTで20回洗浄し、TMB溶液を加えて結合ペプチド量を測定した。

SPR 解析

全ての解析は、BIAcore T100 (GE health care) を用いて、室温 25°C にて行い、必要な試薬とセンサーチップは、同社から購入した。センサーチップ CM5 上へのリガンド (ポリクローナルヒト IgA₂) の固定化は、一般的なアミンカップリングプロトコールに従って行った。ポリクローナルヒト IgA₂ の CM5 センサーチップへの固定化は pH 4 (10 mM 酢酸 Na) の条件下で行い、固定化量は RU 値で 4000 - 5000 (Rmax : 150RU 前後) の範囲内になるように調整した。ペプチドとヒト IgA の結合反応は、Running 緩衝液 (HBS-T : 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Tween 20, pH 7.0) 中において、流速 50 μl/min にて 180 秒間ペプチドをインジェクトすることで測定した。解離反応は、アナライトのインジェクト終了後 Running 緩衝液により洗浄するで測定した。結合パラメーターの解析は、BIAevaluation Version 3.2 ソフトウェアもしくは、BIAevaluation T100 ソフトウェアを用いて行った。

ペプチド固定化アフィニティカラムの作製

Hitrap NHS activated HP column (GE healthcare) を 1 mM HCl で洗浄し、次いで固定化 buffer (0.2 M NaHCO₃, 0.15 M NaCl) 3ml で洗浄した後、固定化 Buffer に溶かした Opt-3 ペプチド (N 末端はアミノ PEG₄) をインジェクトした。室温で 1 時間反応後、1 M Tris-HCl pH 7 を加えてカラム中の未反応活性化基をブロッキングした。固定化量は、回収した未結合分のペプチドを逆相 HPLC にて定量し、約 500 nmol/column と評価された。

ヒト血清中 IgA の精製

Opt-3 ペプチド固定化アフィニティカラムを profinia システム (Bio-rad Laboratories) に設置し、PBS にて 5 倍希釈したヒト血清 1 ml を 1 ml/min の流速でインジェクトした。血清インジェクト後 PBS にて 15 分間洗浄し、Gly-HCl pH 2.5 (0.1 M Glycine, 0.15 M NaCl) を用

いてカラムに吸着したタンパク質を回収した。回収したサンプルは 1 M Tris-HCl pH 9.0 にて中和後、SDS-PAGE 解析 (4–20 %グラジエントゲル; Bio-rad Laboratories) を行った。また、泳動後のタンパク質はニトロセルロースメンブレンにブロッティングし、5 % Skim milk にて blocking 後、ヤギ抗ヒト IgA 抗体、マウス抗ヤギ抗体-HRP を用いて検出した。

Circular Dichroism Spectrometry (CD スペクトル解析)

ペプチドの CD スペクトルは、Jasco J-820Q4 spectropolarimeter (Jasco) で、0.1 nm キュベットを用いて測定した。測定条件は、走査速度 : 100 nm/min, バンド幅 : 1 nm, データ取り込み間隔 : 0.5 nm で行った。それぞれのスペクトルは 5 回積算して、buffer によるバックグラウンドスペクトルを差し引き、スムージングした。ペプチドは、リン酸 buffer (Na_2HPO_4 ; 8.1 mM, KH_2PO_4 ; 1.5 mM, KCl; 2.7 mM, NaCl; 68 mM, pH 7.4) に希釈した。

ゲル濾過クロマトグラフィー

Superdex peptide 10/300 カラム (GE healthcare) に流速 0.4 ml/min で各ペプチドをインジェクトし、215 nm の吸光度をモニターした。ランニング buffer には PBS を用いた。

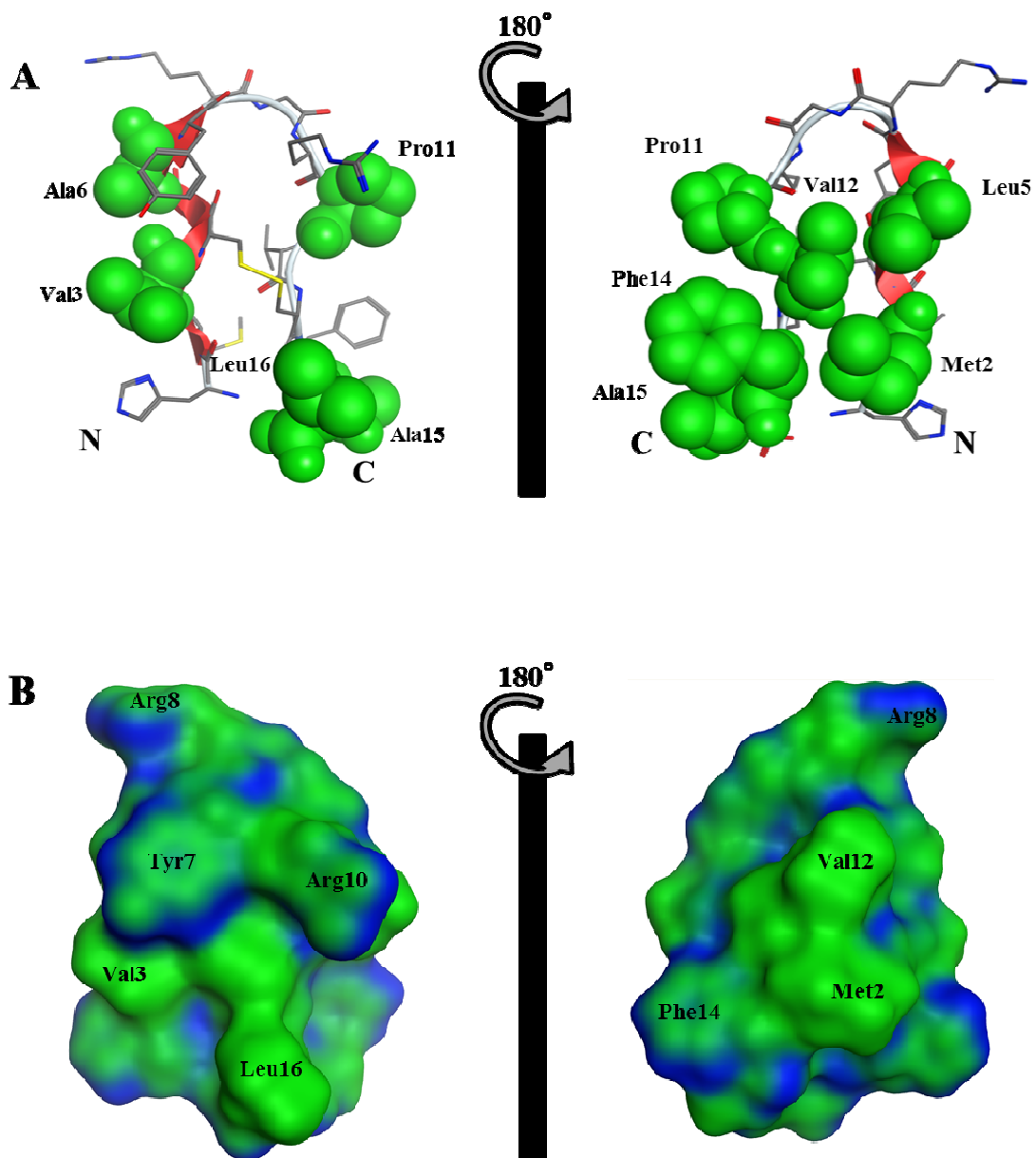
5 – 3 結果

Opt-1 ペプチド中の疎水性クラスター

Opt-1 ペプチド中疎水性残基の分布を図 5 – 1 A に示す。Opt-1 ペプチド表面には、Met-2、Leu-5、Pro-11、Val-12、Phe-14、Leu-16 の疎水性アミノ酸側鎖から成る疎水性のクラスターが形成されていることがわかる。また、図 5 – 1 B に示すように、特に、2 番目の Met、12 番目の Val、16 番目の Leu の側鎖が溶媒側に露出していることがわかる。

また、Opt-1 ペプチドについてゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分析したところ、単量体としての溶出ピークは確認されず、非常にブロードな溶出ピークが確認された。さらに、ペプチドのインジェクション量の増加に伴い、その溶出ピークトップは早くなった (図 5 – 1 C)。これは、Opt-1 ペプチド自身が分子間で相互作用し、多量体を形成していること

を示唆している。Opt-1 ペプチドのアミノ酸配列中には Arg が 2 つ存在するが（8、10 番目）、酸性アミノ酸は無く C 末端側もアミド化しているため、分子間の静電的な相互作用による多量体化は考えにくい。これらのことから、上記した Opt-1 ペプチド表面の疎水性クラスターが、ペプチド自身の多量体化に関与していると考えられ、さらには、ヒト IgA 以外の血清中タンパクとの非特異的な反応にも関与していると考えられた。



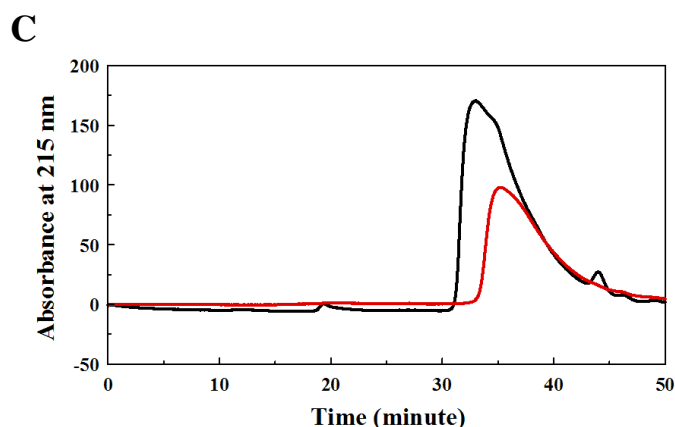


図5-1 Opt-1 ペプチド中の疎水性クラスター

A. Opt-1 ペプチドの疎水性残基を CPK 表記 (緑) で、それ以外をスティック形式で示す。
B. Opt-1 ペプチドのサーフェスマップ。青は親水性部分を、緑は疎水性部分を示す。
C. Opt-1 ペプチドのゲル濾過クロマトグラム。黒ラインは赤ラインの二倍量のサンプルをインジェクトした際の結果を表す。単量体ピークは、40 分前後。

Opt-2 ペプチドのデザインと機能解析

Opt-1 ペプチドの非特異的な反応は疎水性クラスターによって引き起こされる考えられた。そこで我々はまず、IgA に対する結合親和性は保ちつつ Opt-1 ペプチド自身の疎水性を減少させるため、結合には A 直接かかわらないと考えられた Ala-6, -15 について Ser に置換した Opt-2 ペプチドを合成し、その機能解析を行った。

注目すべきことに、Opt-2 ペプチドのヒト IgA に対する親和性は、16 nM (K_d) と Opt-1 ペプチドの場合より約 2 倍程度の上昇が確認された (図 5-2 A)。一方、二次構造は、Opt-1 ペプチドの場合と同程度の含有率であり、ゲル濾過クロマトグラフィーによる解析の結果も Opt-1 ペプチドと同様に、高分子量側にブロードなピークが確認された (図 5-2 B, C)。また、N 末端に PEO₄ リンカーを介して Biotin 化した Opt-2 ペプチドを用い、各種タンパク質に対する特異性を解析した結果、A2 ペプチドに比べ、ヒト IgA とその他のタンパクに対する結合の S/N 比は増大したが (図 5-2 D)、その他のタンパクに対しても若干結合が確認され、さらに、Opt-2 ペプチドを固定化したアフィニティカラムを用いてヒト血清中から IgA の精製を試みたが、Opt-1 ペプチドの場合と同様に精製画分中へのヒト IgA 以外の血清タンパク質の混入が確認された (図 5-2 E, F)。

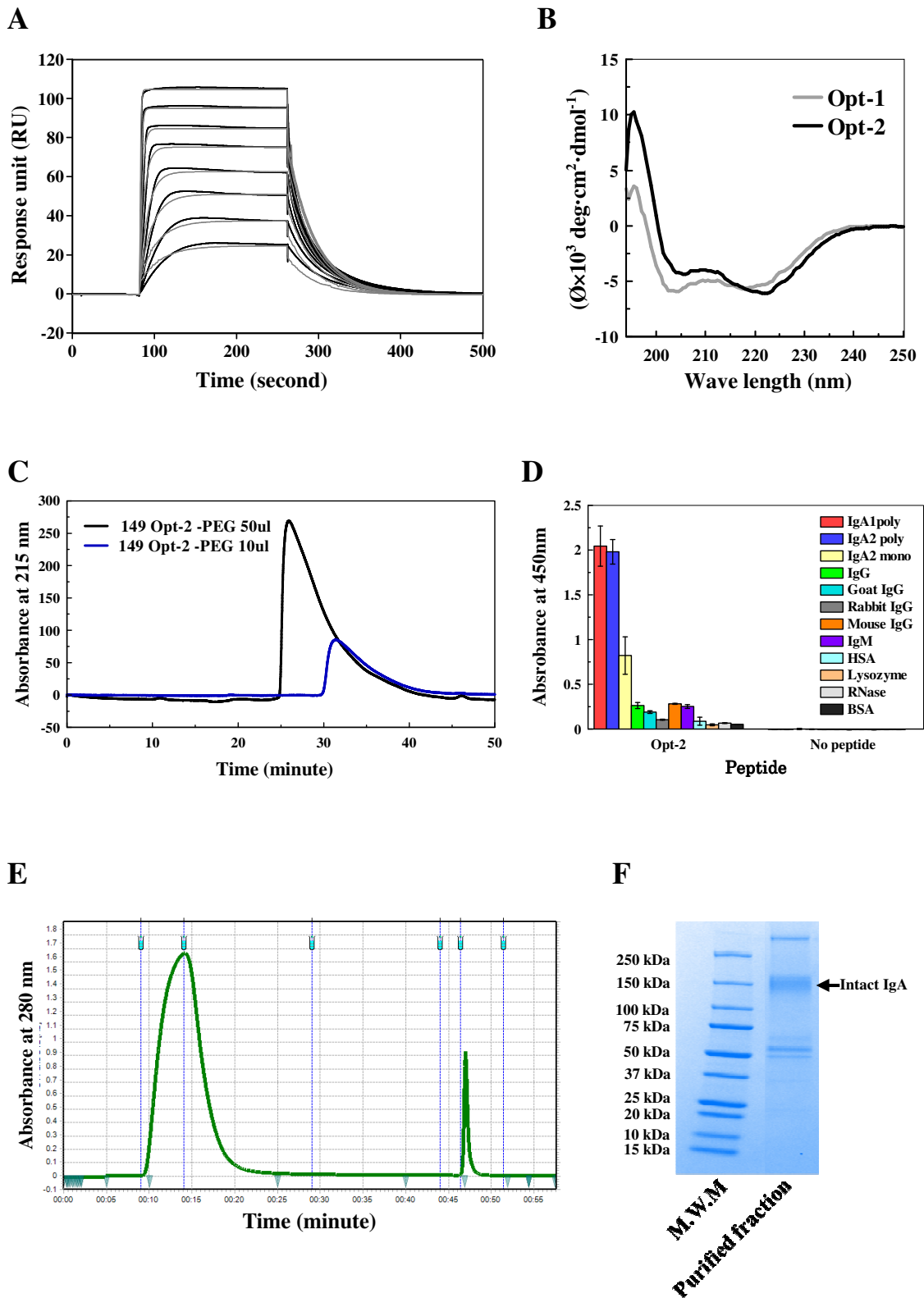


図5-2 Opt-2 ペプチドの機能解析

A. BIAcore T100 によるヒト IgA₂ と Opt-2 ペプチドの親和性解析。B. Opt-1、Opt-2 ペプチドのリン酸緩衝液中における CD スペクトル。C. Opt-2 ペプチドのゲル濾過クロマトグラ

ム。黒ラインは青ラインの5倍のサンプル量をインジェクトした。D. Opt-2 ペプチドの各種タンパク質に対する結合特異性を ELISA により解析した。E. Opt-2 ペプチドカラムによる血清中ヒト IgA の精製クロマトグラム。F. SDS-PAGE による Opt-2 ペプチドカラム精製画分 IgA の純度解析。

IgA₁ と IgA₂ に対する結合親和性

ヒト IgA は IgA₁ と IgA₂ の二つのサブクラスに分類されることが知られており、その最も大きな違いとしては、IgA₁ のヒンジ領域に存在する Pro リッチな配列が IgA₂ には存在しないという点である (図5-3)。また、Fc 部位においてもいくつかのアミノ酸の差異が存在し、特に、分子シミュレーションの結果より示唆されたペプチドとの結合表面には、194 番目の残基 (IgA₁ : Glu, IgA₂ : Gln) と 220 番目の残基 (IgA₁ : Ser, IgA₂ : Thr) について、IgA₁ と IgA₂ でアミノ酸の差異がある。さらに、3 次ライブラリを用いたパンニングにおいては、単量体画分を多く含んでいることがゲル濾過クロマトグラフィーにより確認された IgA₂ 抗体 (Acris Antibodies) を標的分子として用いており、その後のスクリーニングにおいても、IgA₁ 抗体は用いていない。この IgA₁ と IgA₂ における構造の違いやスクリーニング手法が、ペプチドの IgA₁、IgA₂ に対する認識に影響を与えたかどうかについて検討を行った。

本研究で得られたヒト IgA 結合ペプチドの内最も親和性の高かった Opt-2 ペプチドについて、IgA₁ と IgA₂ それぞれに対する親和性を解析した (表5-1)。結果、Opt-2 ペプチドは IgA₁、IgA₂ どちらも認識することが示されたが、IgA₁ よりも IgA₂ をより高い親和性で認識することが示された。特に、koff について、IgA₁ (koff = 0.06 S⁻¹) と IgA₂ (koff = 0.023 S⁻¹) で3倍近い差が観察された。このように、本研究で単離したペプチドは、IgA₁ と IgA₂ 両方に対して十分高い親和性で結合することが示されたが、その親和性は若干異なることが明らかとなった。IgA₂ に特化したスクリーニングの結果、IgA₁ よりも IgA₂ への結合により適したかたちにペプチドが最適化されたと考えられる。

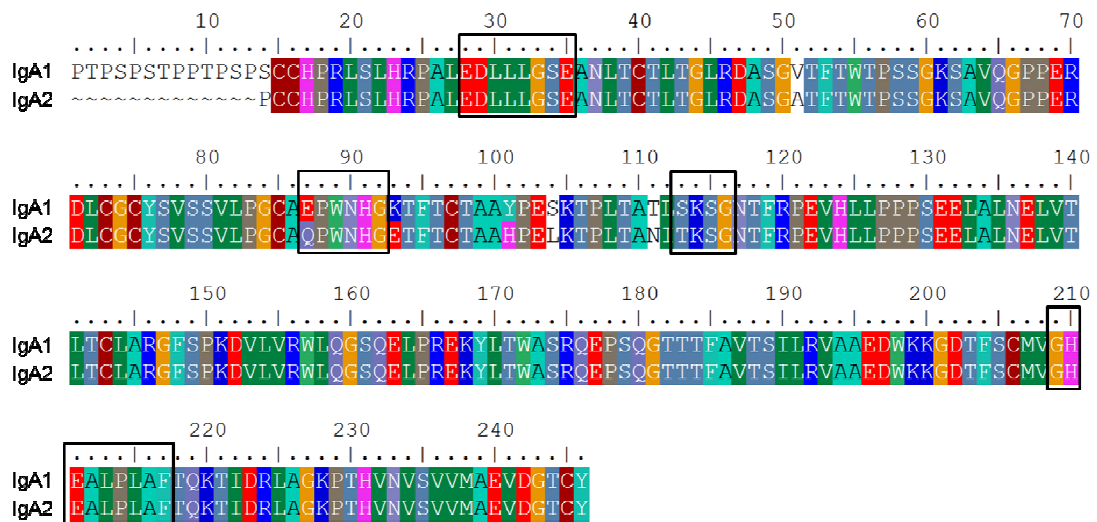


図5-3 IgA₁とIgA₂のconstant領域の相同性

IgA₁とIgA₂の定常領域について一次配列を比較した。Hinge:1-14、CH2:15-115、CH3:116-246。
□はOpt-1ペプチドとの結合に関与すると考えられる部位を示す。

表5-1 Opt-2ペプチドのIgA₁とIgA₂に対する結合親和性

	ka	kd	Kd	
			kinetics	平衡値
IgA1	1.27E+06	0.06	47 nM	34 nM
IgA2	8.78E+05	0.023	26 nM	18 nM

非特異性を引き起こす残基の同定

A2-3aペプチドを固定化したアフィニティカラムの場合、比較的特異的にヒト血清中よりIgAを精製することに成功している(3章—A2-3aペプチドの機能解析)。そのため、Opt-1、Opt-2ペプチドカラムにおける非特異的な結合は、A2-3aからの変異導入過程で生じたものであると考えられた。つまり、Opt-1ペプチドのデザイン時にA2-3aペプチドに導入した5つの変異(Ser1His、asp2Met、Arg6Ala、Gln15Ala、Val16Leu)が、ヒトIgA以外のその他

のタンパク質に対する非特異的な結合に関与している可能性が高い。そこで我々は、これらの A2-3a ペプチド変異体を固定化したアフィニティカラムを作製して血清中からのヒト IgA 精製を行い、非特異的な結合を生じさせるアミノ酸変異の同定を試みた。

各ペプチドカラムからの精製画分を SDS-PAGE 解析した結果を図 5-4 に示す。A2-3a と比較して D2M と D2A 変異体において、50-70 kDa にヒト IgA 以外のバンドが複数確認されることから、これらの置換導入が主に、Opt-1、Opt-2 ペプチドにおいて非特異的な結合を引き起こしていることが示唆された。

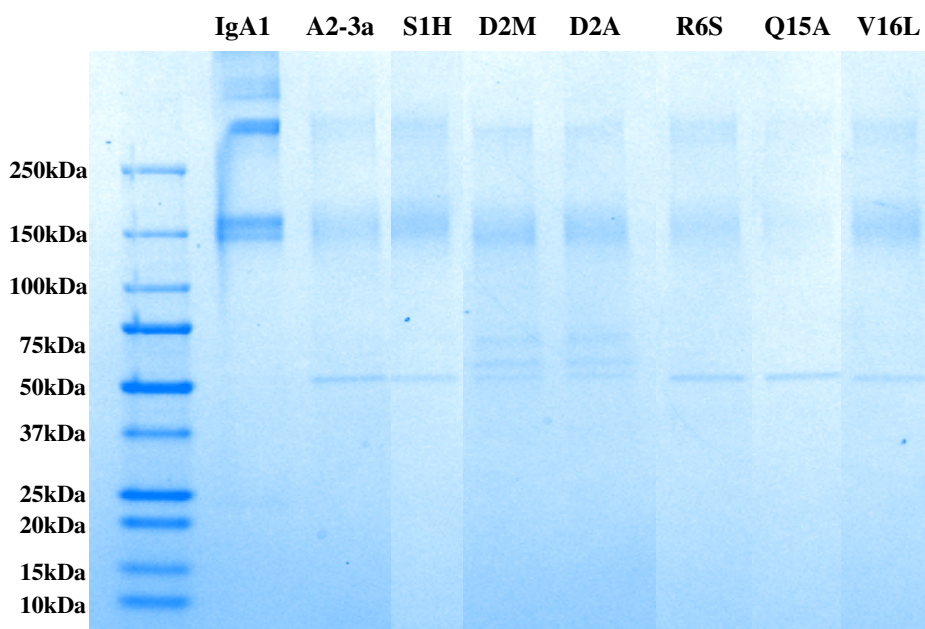


図 5-4 A2-3a ペプチド変異体固定化カラムの吸着特異性

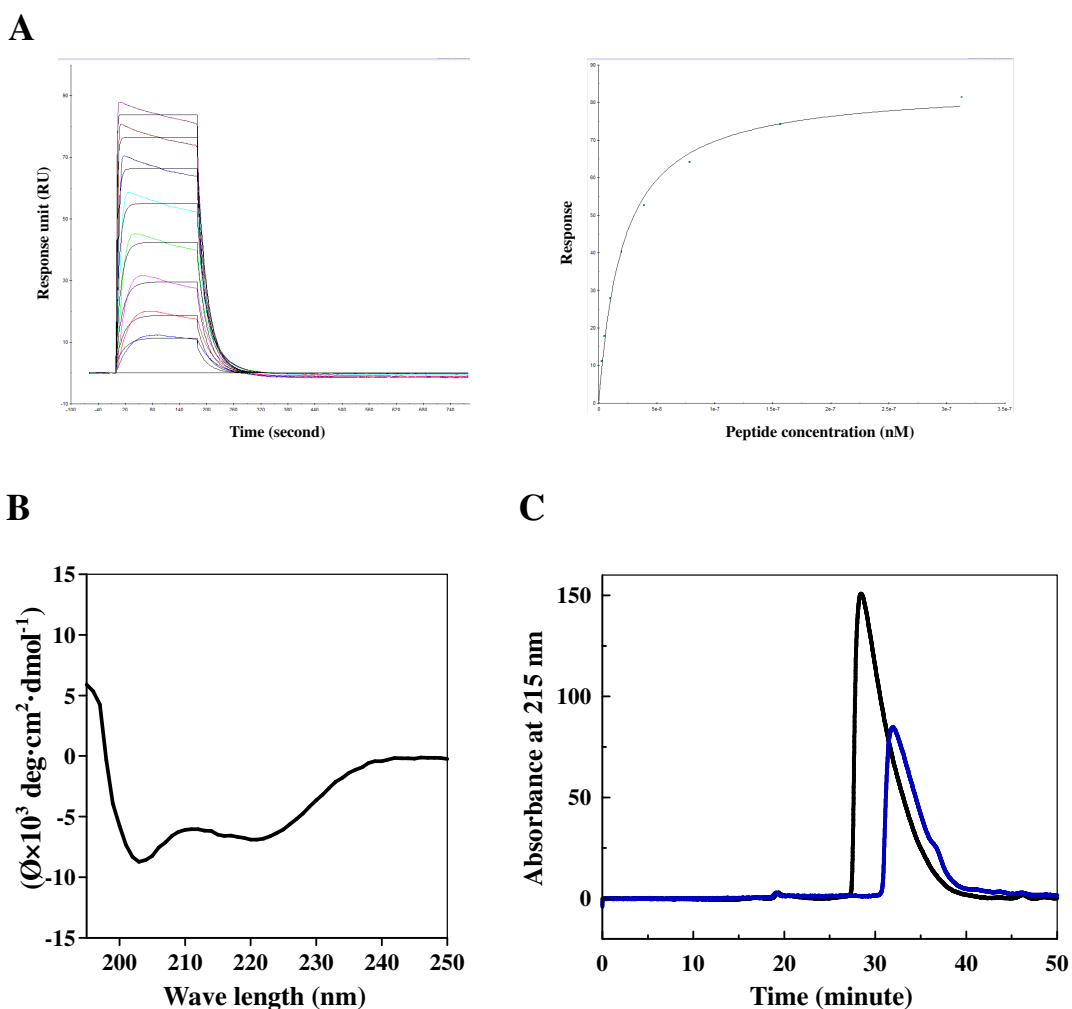
カラムに固定化した A2-3a ペプチド変異体の種類を図上部に示す。各ペプチドカラムを用いて血清中 IgA の精製を試みた。精製画分について 12.5 % SDS-PAGE を行った。

Opt-2_M2Q ペプチドのデザインと機能解析

分子シミュレーションと A2-3a 変異ペプチドカラムを用いた検討より、A2-3a ペプチドへの Asp2Met の置換が疎水結合による非特異的な結合を引き起こしていることが示された。

そこで、Opt-2 ペプチドについて、2番目の Met を同様な側鎖構造を持つ Gln に置換した Opt-2_M2Q ペプチドを合成し、その機能を解析した。

BIAcore T100 による親和性解析の結果、ヒト IgA に対して約 21 nM (K_d) と、Opt-2 ペプチドに次いで高い親和性を有していることが明らかとなった(図5-5A)。このようにM2Qの置換導入による親和性低下が確認できないことから、Opt-2_M2Q ペプチドの Gln-2 の側鎖も Opt-1 ペプチドの Met-2 の側鎖と同様に、IgA-Fc の CH2~CH3 の間に存在する溝状の構造に嵌る様な形で相互作用していると考えられる。また、CD スペクトル解析の結果、Opt-2_M2Q ペプチドも α ヘリックス構造も有していることが明らかとなり(図5-5B)、ゲル濾過クロマトグラフィー解析の結果についても Opt-1、Opt-2 ペプチドと同様に、多量体の形成を示唆するようなピークが確認された(図5-5C)。しかしながら、一方で、Opt-2_M2Q ペプチドを固定化したアフィニティカラムにおいては、25 kDa に IgA 以外のバンドが確認されたものの、Opt-1、Opt-2 ペプチドカラムの場合に確認されていた、50-75 kDa 付近のバンドが消失していた(図5-5D)。



D

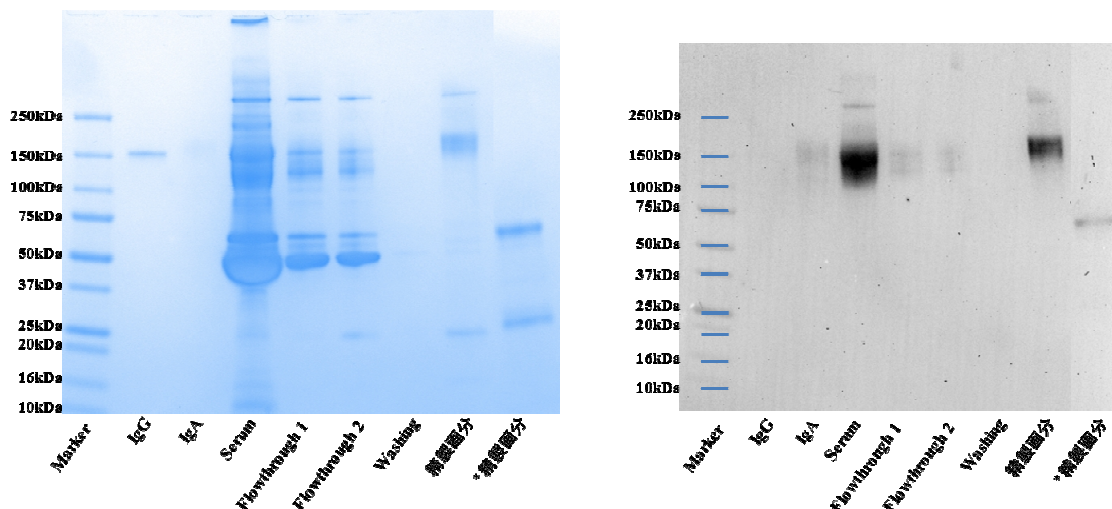


図5-5 Opt-2_M2Q ペプチドの機能解析

A. BIAcore T100 を用いて、IgA と Opt-2_M2Q ペプチドの親和性を解析した。左図は結合センサーグラムを示し、色つきラインが実測値、黒ラインが fitting ラインを示す。右図は平衡値解析結果を示す。B. リン酸緩衝液中における Opt-2_M2Q ペプチドの CD スペクトル。C. Opt-2_M2Q ペプチドのゲル濾過クロマトグラム。D. Opt-2_M2Q ペプチドを固定化したカラムを用いて、血清中よりヒト IgA の精製を試みた。左図は回収画分の SDS-PAGE (4-20%)、右図は抗ヒト IgA 抗体を用いて Western Blotting を行った結果を示す。

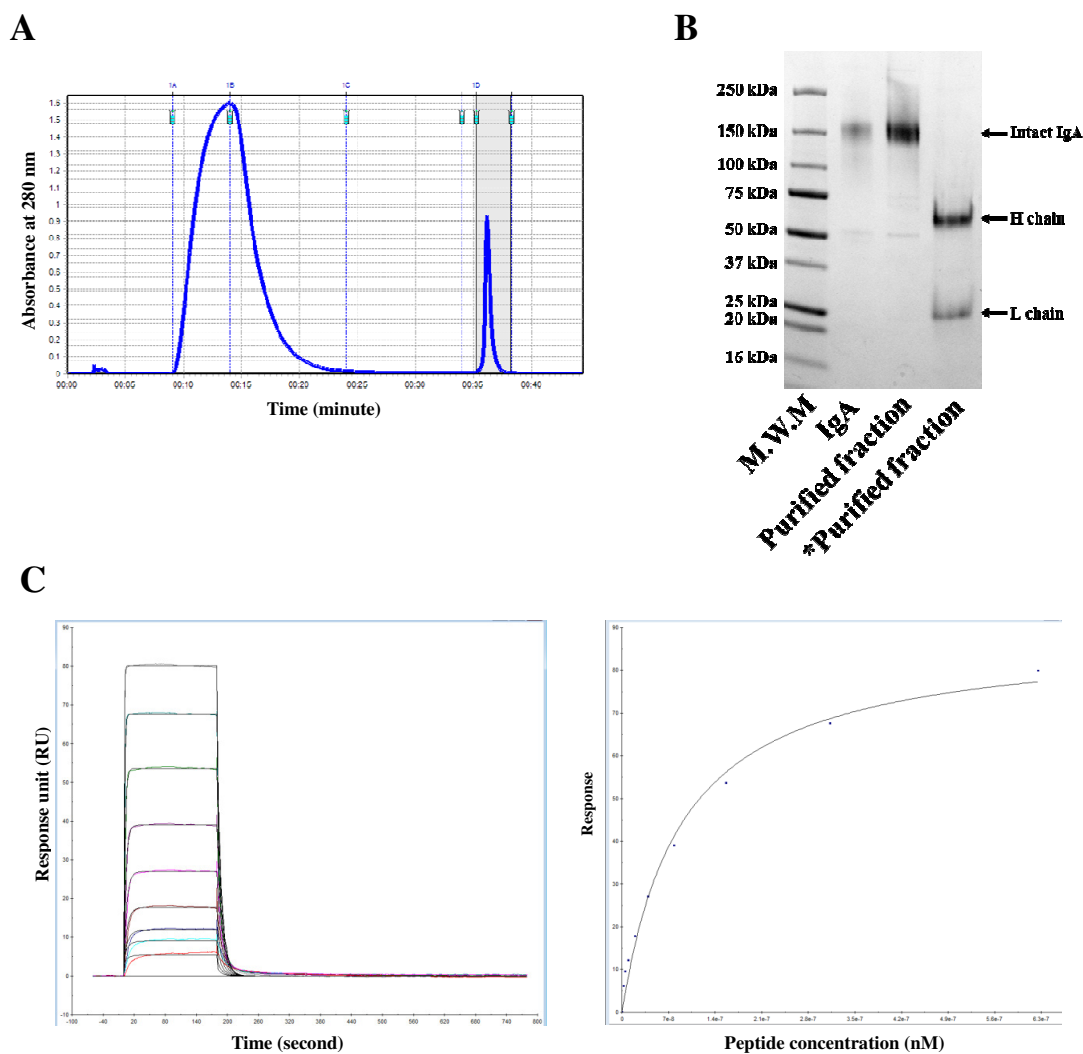
Opt-3 ペプチドのデザインと機能解析

Opt-2 ペプチドに M2Q の置換を導入した Opt-2_M2Q ペプチドは、Opt-1、Opt-2 ペプチドと比較すると、比較的高い純度で血清中 IgA 精製の精製に成功していた。しかし、25kDa 付近に IgA 以外のバンドが確認されている。そこで我々はさらに、溶媒側に疎水性側鎖が露出しており IgA への結合には関与しないと考えられる 16 番目の Leu について (図 5-1 B)、Thr への置換を行った Opt-3 ペプチド (HQVCLSYRGRPVCFSST) をデザインした。

Opt-3 ペプチドを固定化したアフィニティカラムを作製し、再度ヒト血清中からの IgA 精製を試みた。結果、Opt-1 や Opt-2 ペプチドカラムにおいて確認された非特異的なバンドは確認されず、非常に高い精製度でヒト IgA を血清中より回収できることが示された (図 5-6 A, B)。また、BIAcore T100 による親和性解析の結果、Opt-3 ペプチドは、ヒト IgA に対する親和性が約 72 nM (K_d) と Opt-1、Opt-2 ペプチドと比較すると 2-4 倍程度低いが、

十分な親和性を有しており、さらに、CD スペクトル解析の結果、Opt-1、Opt-2 ペプチドと同様に α ヘリックス構造を有していることが示された (図5-6 C, D)。一方で興味深いことに、ゲル濾過クロマトグラフィーによる解析の結果、Opt-1、Opt-2 ペプチドで観察されたブロードなピークや、インジェクト量の違いによるピークトップのずれは観察されず、モノマーと考えられる位置にシャープなピークが確認された (図5-6 E)。

以上の結果より、Opt-1、Opt-2 ペプチドの Leu-16 は IgA への結合にも関与していることが示されたが、ペプチド自身の多量体化や血清中タンパクに対する非特異的な結合にも大きく関係していることが示された。また、分子シミュレーションを基にしたアミノ酸置換や、ゲル濾過クロマトグラフィーによるペプチドの物性評価がペプチドの改良に効果的であることが示唆された。



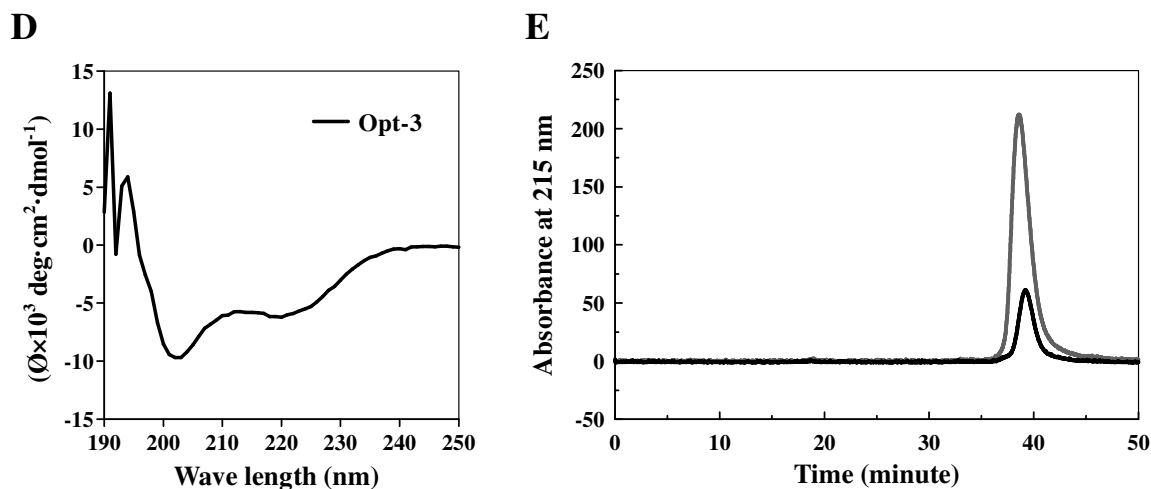


図5-6 Opt-3 ペプチドの機能解析

A. Opt-3 ペプチドカラムによる血清中ヒト IgA の精製クロマトグラム。B. Opt-3 ペプチド精製画分の SDS-PAGE。MWM は分子量マーカーを、*は還元処理したサンプルを示す。C. BIAcore T100 による Opt-3 ペプチドのヒト IgA₂ に対する結合親和性解析。D. リン酸緩衝液中における Opt-3 ペプチドの CD スペクトル。E. Opt-3 ペプチドのゲル濾過クロマトグラム。灰色は黒の5倍量のサンプルをインジェクトした。

5-4 まとめと考察

非特異的な相互作用の抑制

MD シミュレーションを用いて作製した Opt-1 ペプチドの分子モデルから、Met-2, Val-3, Leu-5, Pro-11, Phe-14, leu-16 の疎水性側鎖が溶媒側に露出していることが示され、さらに、各種 A2-3a ペプチド変異体を固定化したアフィニティカラムを用いた検討より、特に A2-3a への Asp2Met の変異において、ヒト IgA 以外の血清タンパク質へ非特異的な結合が大幅に増加することが示された。これらの結果を受け、Met2Gln, Ala6Ser, Ala15ser, Leu16Thr と Opt-1 ペプチドの疎水性を減少させるようにデザインされた Opt-3 ペプチドは、親和性としては 72 nM (K_d) と Opt-1 ペプチド ($K_d=33$ nM) と比較すると2倍程度低くなったが十分に高い親和性を有しており、また、血清中ヒト IgA を高い純度で精製するに成功した。本

結果より、Opt-1 ペプチド中の疎水性残基が、ヒト IgA に対する結合に大きく寄与していることが示されると同時に、ヒト IgA 以外の血清タンパクに対する非特異的な結合に関与していたことが示された。特に、Met-2、Leu-16 が、IgA 以外の血清タンパクに対する非特異的な結合に関与していることが、Opt-2 ペプチドから Opt-3 ペプチドへの返還により明らかになったが、この二つの残基は、Opt-1 ペプチドのモデル構造において、溶媒側に大きく疎水性側鎖が露出している残基であった（図5-1）。この結果は、ペプチドの溶液中における構造を明らかにすることができれば、これを基に、非特異性を引き起こす残基の同定や親和性を上昇させるための置換導入部位の決定などといったペプチドの改良が可能であることを示唆している。

Opt-2 ペプチド

Opt-1 ペプチドと IgA-Fc 複合体の分子シミュレーションの結果、6 番目、15 番目の Ala は、ヒト IgA との結合に深く関与しないと考えられた。そこで、IgA への結合活性は損なわず、かつ、Opt-1 ペプチドの疎水性を減少させる目的で、この二つの残基について Ser への置換を行った。結果興味深いことに、ヒト IgA に対する結合親和性は 16 nM (K_d) と Opt-1 ペプチド ($K_d = 33$ nM) よりも 2 倍程度上昇し、今回デザインされたペプチドの内最も高い親和性を有していた。この結果は、少なくとも導入した 2 つの置換が IgA との相互作用に負の影響を与えるような置換ではなかったことを意味しており、特に 6 番目の Ser については、IgA-Fc と静電的な相互作用の形成に寄与するため親和性が上昇したのではないかと予想された。また、Met-2 について、同様な側鎖構造を持つ Gln への置換を行った結果 (Opt-2_M2Q ペプチド)、IgA 以外の分子に対する非特異的な結合が大幅に抑制され、IgA への親和性としても 21 nM (K_d) と Opt-2 ペプチドに次いで高い値を有していた。

IgA 結合ペプチド配列中の 2、6、15、16 番目の残基は、ファージライブラリを用いたスクリーニングにより得られたペプチド配列ごとに偏りが少なく、バリエーションに富んでいた。(最も多く出現したアミノ酸はそれぞれ Ala、Asn、Arg、Leu であり、出現頻度は 24%) 一方で、これらの残基に置換を導入したペプチドは、IgA に対する親和性、特異性が大きく変化した。このように、安定な 3 次構造を持たないペプチドは、標的との結合に関わらないような部位のアミノ酸の違いによっても、全体の構造大きく変化する可能性が有るため、その機能性 (結合力、特異性) も大きく変化する。今回デザインされた IgA 結合ペプチドにおいても、これらの部位について今後さらに検討を行うことで、より結合力・特異性の高いペプチドをデザインできる可能性がある。

ペプチドのゲル濾過クロマトグラフィー

Opt-1 や Opt-2 ペプチドはゲル濾過クロマトグラフィー解析において、ペプチドのインジェクト量に依存してリテンションタイムが変化し、また、非常にブロードな溶出ピークが確認された。一方、Opt-3 ペプチドや A2-3a ペプチドは、インジェクト量よらず同一のリテンションタイムでシャープな溶出ピークが確認された。Opt-1 や Opt-2 ペプチドにおいて観察されたリテンションタイムの変化、ブロードな溶出ピークは、ペプチド分子同士の会合や非特異的なカラムへの吸着に由来すると考えられることから、ペプチドの特異性評価にゲル濾過クロマトグラムを用いた解析が簡便で有効かもしれない。

第6章

IgA 結合ペプチドの ヒト/マウス間における特異性変換

6-1 目的

ファージディスプレイシステム、合成ペプチドスクリーニング、分子シミュレーションを用いることで、ヒト IgA を非常に高い特異性と親和性で認識するペプチドのデザインを達成し、これを用いたアフィニティカラムを用いることで、ヒト血清中より特異的に IgA を精製することに成功した。本章においては、ヒト IgA 結合ペプチドの特異性をマウス IgA に変換することで、標的特異的ペプチドのデザインにおける新たな手法の開発を試みるとともに、デザインしたペプチドを用いて、マウスを用いた動物実験に使用するマウス IgA 精製システムを構築することを目的とした。

6-2 材料と方法

材料

モノクローナルマウス抗体 IgA (λ)、(κ) は Immunology Consultants Laboratory 社、Sigma Aldrich 社よりそれぞれ購入した。

MA1 部分変異ライブラリの構築

MA1 部分変異ライブラリの構築には、テンプレート DNA 5'- GGATCCGAATTCAGGTGG AGGTTTCG G*A*G* G*A*G* G*T*N tgt T*T*N G*T*N T*A*C* A*G*N G*G*N C*C*NG*A* T* G*T*N tgt T*G*G* G*T*N T*G*G*GGATAAAAGCTTGC GGCCG -3' (A*: A55 %+TGC それぞれ 15 %ずつ、T*: T55 %+AGC それぞれ 15 %ずつ、G*: G55 %+TAC それぞれ 15 %ずつ、C*: C55 %+TGA それぞれ 15 %ずつ、N: A, T, G, C それぞれ 25 %ずつ含む混合塩基) を基に、A2 部分変異ライブラリと同様の方法で作製した。多様性は、 1.15×10^7 と評価された。

マウス IgA に対するバイオパンニング

96穴のマイクロプレート (Nunc, Maxisorp) のウェルにモノクローナルマウス IgA、Herceptin、HSA (1 μ g/ 200 μ l/ well) をそれぞれコートし、0.5 % BSAもしくは5 % Skim milk

でブロッキングを行った。1st~5thラウンドにおいて、マウスIgAに対しライブラリを反応させる前に、Herceptin、HSA固定化wellにファージライブラリをそれぞれ1時間反応させ、非特異的ファージの除去を行った。その後、上清をマウスIgAと1時間反応させた。ウェルを0.1% Tween20/PBS (0.1% PBST) で洗浄後、大腸菌BLT5403を加えてwell上に残ったファージを回収・感染させ、ファージ増殖のために培養した。溶菌後は、5 M NaClを1/10 volume 加え遠心し、上清を回収してペグ沈精製後、次のパンニングに用いた。

ELISA

96穴のマイクロプレートのウェルに、マウスIgA、その他コントロールタンパク質 (50 ng/50 μ l/well) をPBS溶液中でコートし、PBSに溶解した0.5% BSAでブロッキングを行った。各ウェルに、パンニング後の培養上清、またはクローン化したファージ、SA-HRPとプリインキュベートしたビオチン化合成ペプチドを加え、室温で1時間反応後、0.1% PBSTで5回洗浄した。結合したファージはビオチン化抗T7ファージマウス抗体 (Novagen) を反応させ、SA-HRP (vector) で検出した。

DNA配列決定

T7ファージ上に提示されたペプチドのアミノ酸配列の決定は、ファージG10遺伝子の3'末端部分のDNAシーケンスを解析することより行った。シーケンス反応用のプライマーは、上流プライマー (5'-GGAGCTGTCGTATCCAGTC-3') を用いて、ABI DNA sequencer 373A-36S上で行った。

ペプチド合成

合成ペプチドはFmoc固相合成法により合成された。すべてのペプチドはC末端側をアミド化している。保護基を除去した後、緩やかな酸化条件下で分子内S-S結合を形成させ、逆相HPLCを用いて分子内でジスルフィド結合を形成しているペプチドを精製した。精製したペプチドの純度、分子内ジスルフィド結合の有無についてはLC/MS (Acquity SQD ultra-performance liquid chromatography system ; Waters Corp., Milford, MA) .を用いて確認している。また、N末端をビオチン化または、アミノPEG化したペプチドについては、N-Fmoc-amido-PEG₄-COOHもしくはN-Fmoc-amido-PEG₄-biotinを用いて合成した。精製されたペプチドは凍結乾燥後、使用まで-20℃にて保存した。ペプチドをSPR等の測定に用いる際は、各種実験バッファーに溶解して遠心 (15000 rpmで10 min) し、沈殿を取り除いた

後、ペプチド濃度は分光光度計 (e-spect) を用いて定量した。

SPR 解析

全ての解析は、BIAcore T100 (GE health care) を用いて、室温 25 °C にて行い、必要な試薬とセンサーチップは、同社から購入した。センサーチップ CM5 上へのリガンド(マウス IgA) の固定化は、一般的なアミンカップリングプロトコールに従って行った。マウス IgA の CM5 センサーチップへの固定化は pH 4 (10 mM 酢酸 Na) の条件下で行い、固定化量は RU 値で 4000 - 5000 (Rmax : 150RU 前後) の範囲内になるように調整した。ペプチドと IgA の結合反応は、Running 緩衝液 (HBS-T : 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Tween 20, pH 7.0) 中において、流速 50 μ l/min にて 180 秒間ペプチドをインジェクトすることで測定した。解離反応は、アナライトのインジェクト終了後 Running 緩衝液により洗浄するで測定した。結合パラメーターの解析は、BIAevaluation Version 3.2 ソフトウェアもしくは、BIAevaluation T100 ソフトウェアを用いて行った。

ペプチド固定化アフィニティカラムの作製

Hitrap Streptavidin HP column (GE healthcare) に PBS 中に溶解したビオチン化 MA1 ペプチドをインジェクトすることでペプチドアフィニティカラムを作製した。固定化量は、固定化に用いた MA1 ペプチド全量と未結合分の MA1 ペプチドを逆相 HPLC にて定量し算出した結果、約 360 nmol/column と評価された。

マウス腹水中 IgA の精製

MA1 ペプチド固定化アフィニティカラムを profinia システム (Bio-rad Laboratories) に設置し、PBS にて 5 倍希釈したマウス腹水 1ml を 1 ml/min の流速でインジェクトした。血清インジェクト後 PBS にて 15 分間洗浄し、Gly-HCl pH 2.5 (0.1 M Glycine, 0.15M NaCl) を用いてカラムに吸着したタンパク質を回収した。

Circular Dichroism Spectrometry (CD スペクトル解析)

ペプチドの CD スペクトルは、Jasco J-820Q4 spectropolarimeter (Jasco) で、0.1 nm キュベットを用いて測定した。測定条件は、走査速度 : 100 nm/min, バンド幅 : 1 nm, データ取り込み間隔 : 0.5 nm で行った。それぞれのスペクトルは 5 回積算して、buffer によるバックグラウンドスペクトルを差し引き、スムージングした。ペプチドは、リン酸 buffer (Na_2HPO_4 ;8.1

mM, KH₂PO₄; 1.5 mM, KCl; 2.7 mM, NaCl; 68 mM, pH 7.4) に希釈した。

ゲル濾過クロマトグラフィー

Superdex peptide 10/300 カラム (GE healthcare) に流速 0.4 ml/min で MA1 ペプチドをインジェクトし、215 nm の吸光度をモニターした。ランニング buffer には PBS を用いた。

6-3 結果

ヒト IgA 結合ペプチドのマウス IgA に対する交差反応性

我々はヒト IgA 結合ペプチドについて研究を進める中で、T7 ファージライブラリより単離したペプチドファージ A2、A2-3a が、マウスの IgA にも弱いながら結合活性を有していることを見出した (図 6-1 A)。実際、SPR を用いて、A2、A2-3a、Opt2、Opt3 ペプチドについてマウス IgA に対する結合親和性を解析したところ、表 6-1 に示すように、ヒトの IgA に対する親和性と比較すると 3 倍から 10 倍程度の差はあるものの、マウス IgA に対する明らかな結合活性を有していた。また、マウス IgA とヒト IgA の Fc 領域について一次配列を比較したところ、その相同性は約 70 % と高い相同性を有しており、ペプチドとの結合に関わると考えられる部位周辺の残基についても、同様に高い配列の相同性が示された (図 6-1 B)。一方で、ヒト IgA とマウス IgA の場合でペプチドの結合親和性に大きな差があるが、これは、一次配列上約 30 % の差異があるため Fc 全体の立体構造としても若干の違いがあること、特に、73 番目の残基についてヒト IgA では Pro でありマウス IgA においては Arg であるなど、相互作用に関わる残基周辺の構造において互いに若干異なることが原因であると考えられる。(ヒト IgA の 73 番目の残基はペプチドと直接相互作用しないが、72 番目の残基の側鎖はペプチドの Tyr-7 と水素結合を形成することが示唆されている。)

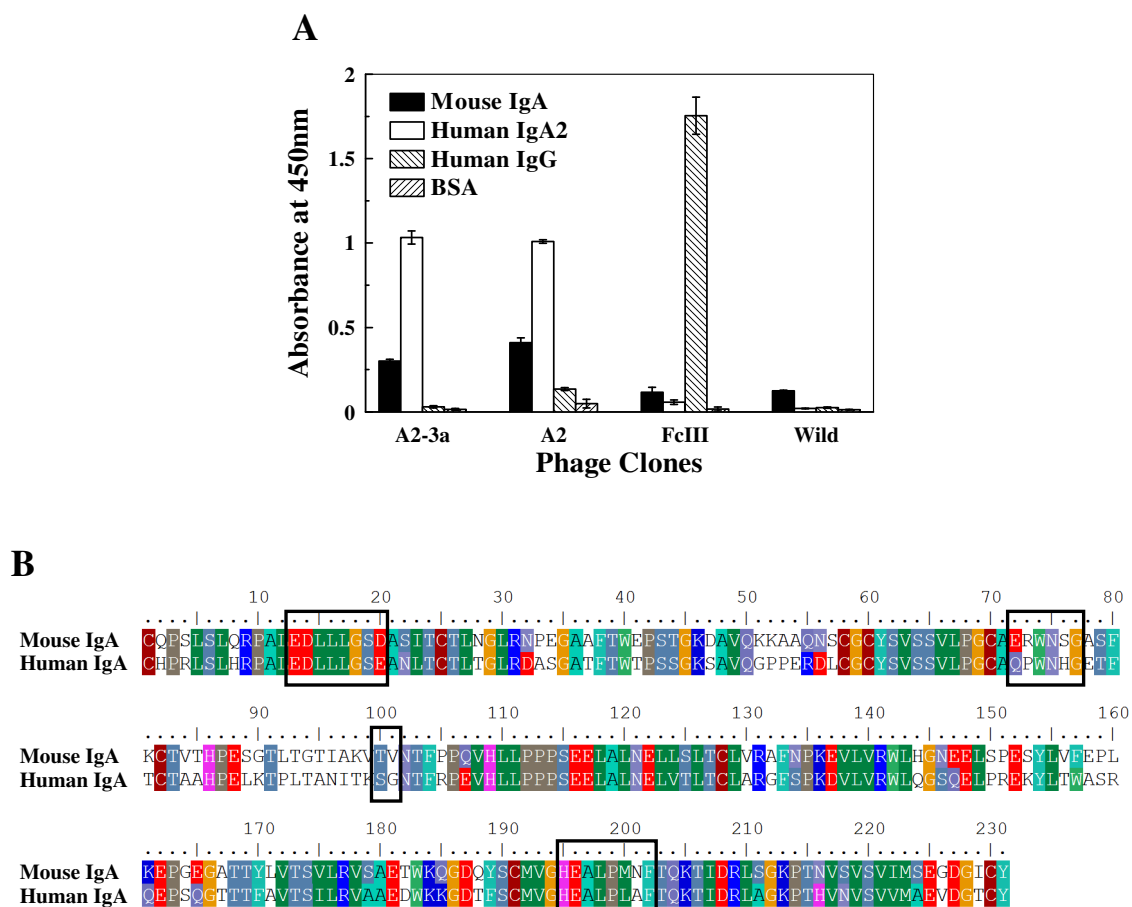


図 6-1 ヒト IgA 結合ファージのマウス IgA に対する交差反応

A. A2、A2-3a ファージについて、マウス IgA に対する結合活性を ELISA をにより評価した。FcIII は IgG 結合ファージを示す。B. ヒト IgA₂ とマウス IgA の Fc 領域配列のアライメント。□は Opt-1 ペプチドとの相互作用に関わる残基周辺に位置する部位を示す。

表 6-1 ヒト IgA 結合ペプチドのマウス IgA に対する結合親和性

Peptide	K _d (nM)	
	Human IgA ₂	Mouse IgA
A2	1300 nM	3000 nM
A2-3a	500 nM	765 nM
Opt-2	16 nM	548 nM
Opt-3	72 nM	690 nM

マウス IgA への結合に関わる残基の同定

前項で示したように、マウス IgA とヒト IgA は、一次配列上高い相同性を有するものの、約 30 % の差異があること、A2、A2-3a、Opt-2、Opt-3 ペプチドの結合親和性がマウス IgA に対して低いことから、上記ペプチド中のヒト IgA とマウス IgA への結合に関与する残基、もしくは、その重要度は異なると考えられる。

そこで、我々はまず、ヒト IgA 結合ペプチド配列中のマウス IgA への結合に重要な残基を同定するため、A2 部分変異ライブラリ (**3 章-ヒト IgA への結合に重要な残基の同定**) を用いて、マウス IgA に対するバイオパニングを行った。4 ラウンドのパニングの後、ELISA によりマウス IgA に対する結合ファージの濃縮を確認した (図 6-2A)。結果、3、4 ラウンド後のファージプールについて、マウス IgA 結合ファージの濃縮が確認されたため、4 ラウンド後のファージプールについて単クローン化を行い、得られた 96 クローンについてマウス IgA への結合活性を指標にスクリーニングを行った後、マウス IgA に対して結合活性を有していたクロンの提示するペプチド配列を解析した。図 6-2B に示すように、ライブラリ構築の際に固定化した 4,13 番目の Cys 以外に、Leu-5、Val-12 がすべてのクローンにおいて保存されていた。また、Met-2、が 7/12、Arg-3、Tyr-7、Arg-10、Leu16 が 8/12、Lys-8 が 10/12、Gly-9、Phe-14 が 11/12 と高い頻度 (60 % 以上) の頻度で保存されていた。また、各位置において最も出現頻度の高かったアミノ酸は、ヒト IgA の場合と同様であった (図 6-2C)。

以上の結果より、A2 ペプチドにおいて、ヒト IgA とマウス IgA への結合に重要な残基はほぼ同様であることが示されたが、特に Tyr-7 (出現頻度: 72 %) や Phe-14 (出現頻度: 90 %) についてヒトとマウス IgA の場合で出現頻度に大きな差が確認されることから、その結合における重要度はヒト IgA とマウス IgA で異なることが示唆される。{Tyr-7 は A2 部分変異ライブラリを用いたスクリーニングにおいては得られたクロンの全てで保存されており、Phe-14 は 60 % の確立で保存されていた (図 3-5C, D)。}

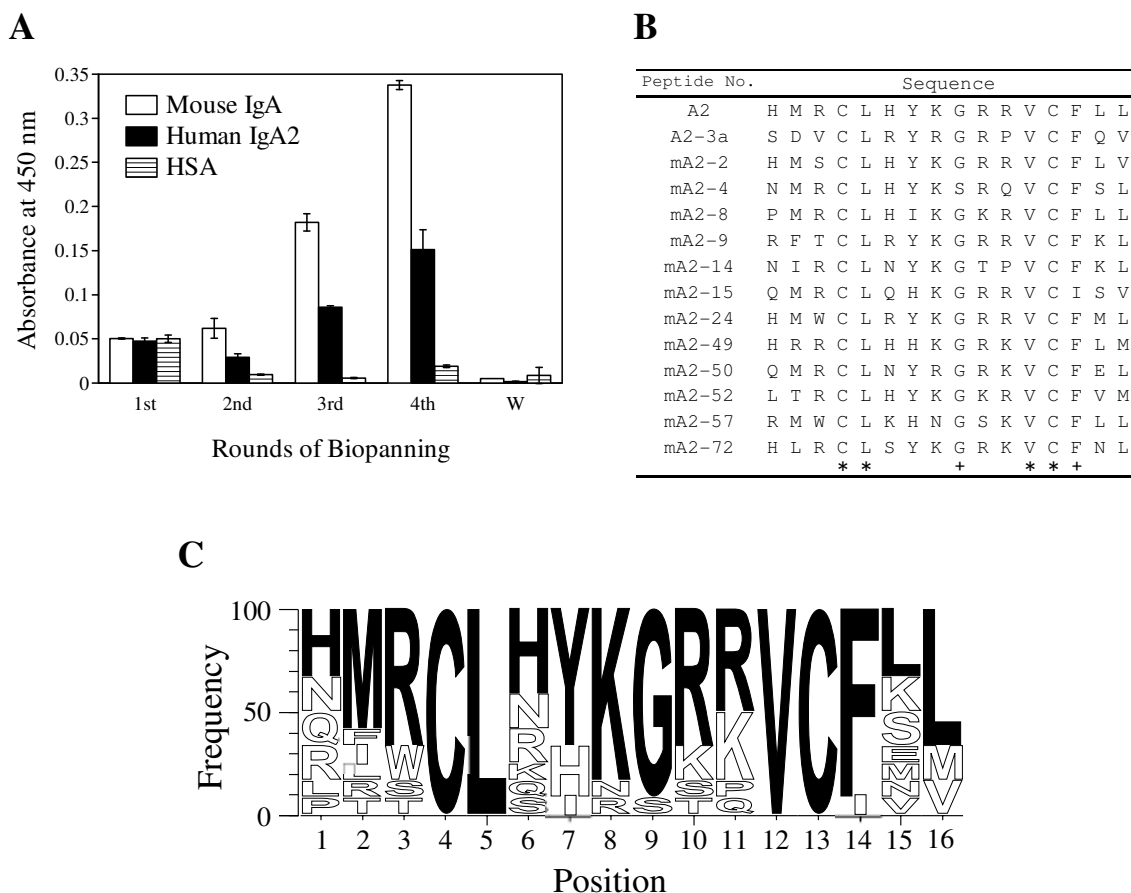


図 6-2 マウス IgA への結合に必要な残基の同定

A. バイオパンニングによる A2 部分変異ライブラリからのマウス IgA 結合ファージの濃縮。**B.** マウス IgA に結合活性を有する 11 ファージクローンの提示アミノ酸配列。+ は 11 クローン全てにおいて、+ は 10 クローンにおいて保存されていた配列を示す。**C.** 得られたペプチド配列について Weblog 形式で表示した。各アミノ酸の文字の大きさは出現頻度を表す。

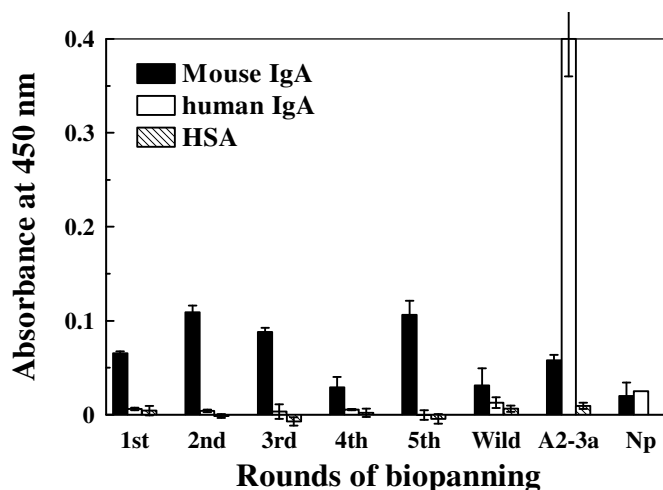
モチーフ保存ライブラリからのマウス IgA 結合ファージの単離

前項の結果より、ヒト IgA の場合と同様に、Leu-5、Tyr-7、Gly-9、Val-12 はマウス IgA への結合に関与していると考えられたため、これらの残基を保存しそれ以外をランダム化させたモチーフ保存ライブラリ（4章—結合モチーフ保存ライブラリからの高親和性ペプチドの単離）を用いて、再度マウス IgA に対してバイオパンニングを行った。5 ラウンドのバイオパンニングによりマウス IgA 結合ファージの濃縮が確認できたが（図 6-3 A）、より

強い結合力を持つファージを単離するため、さらに 2 ラウンドバイオパンニングを行った後単クローン化を行い、マウス IgA への結合活性を指標にスクリーニングを行った。結果、5 クローンのマウス IgA 特異的ファージクローンが単離され、それらはすべて同一のペプチド (MA1 ペプチド: EEVCLVYRGPDVCWVW) を提示していた (図 6-3B)。

MA1 ペプチドとヒト IgA 結合ペプチドの配列を比較した結果、ヒト IgA 結合ペプチドにおいてヒト IgA への結合に重要な効果を有していた Arg-10、Pro-11、Phe-14 が MA1 ペプチドにおいては、Pro-10、Asp-11、Trp-14 へと変化していた (表 6-2)。これらの変異は、ファージライブラリを用いたヒト結合ペプチドのデザイン次 (3 章、4 章) においては出現していないアミノ酸であることから、これらの残基がマウス IgA への特異的な結合に関与している可能性が高いと考えられる。

A



B

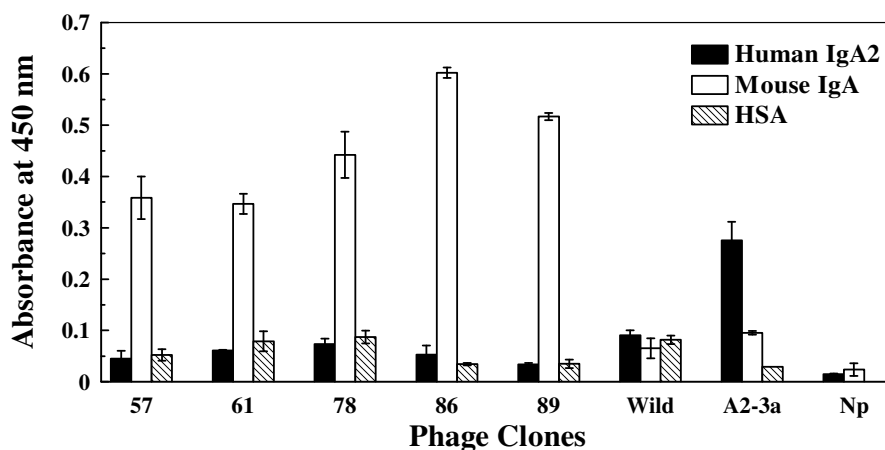


図6-3 モチーフ保存ライブラリからのマウス IgA 結合ファージの単離

A. バイオパンニングによるモチーフ保存ライブラリからのマウス IgA 結合ファージの濃縮。B. マウス IgA 結合ファージクローンの結合活性。

表6-2 ヒト IgA 結合ペプチド配列とマウス IgA 結合ペプチド配列の比較

Peptide	Sequence															
MA1	E	E	V	C	L	V	Y	R	G	P	D	V	C	W	V	W
A2	H	M	R	C	L	H	Y	K	G	R	R	V	C	F	L	L
A2-3a	S	D	V	C	L	R	Y	R	G	R	P	V	C	F	Q	V
Opt-1	H	M	V	C	L	A	Y	R	G	R	P	V	C	F	A	L
Opt-2	H	M	V	C	L	S	Y	R	G	R	P	V	C	F	S	L
Opt-3	H	Q	V	C	L	S	Y	R	G	R	P	V	C	F	S	T

ヒト IgA 結合ペプチド配列において重要な残基を赤で、マウス IgA 結合ペプチド中の特徴的な残基を水色で示す。

MA1 ペプチドの機能解析

マウス IgA に対する親和性と結合特異性

前項において単離された MA1 ペプチドについて合成ペプチドを調製し、二次構造、マウス IgA に対する親和性・特異性について解析を行った。

BIAcore T200 による解析の結果、MA1 ペプチドのマウス IgA に対する親和性は 60 uM (K_d) 程度と非常に低い値であることが示され、ヒト IgA に対してはほとんど結合レスポンスを確認することができなかった (図6-4A, B)。また、各種タンパク質に対する結合特異性について ELISA を用いて検証したところ、MA1 ペプチドは非常に高い特異性で mIgA に結合することが示された (図6-4C)。さらに、リン酸緩衝液中における CD スペクトル測定より、MA1 ペプチドはほぼランダムな構造 (若干 β シート構造を含む) をとってお

り、ゲル濾過クロマトグラフィー解析の結果、MA1 ペプチドは PBS (pH 7.4) 中にてモノマー状態で存在していることが示された (図 6-4D, E)。

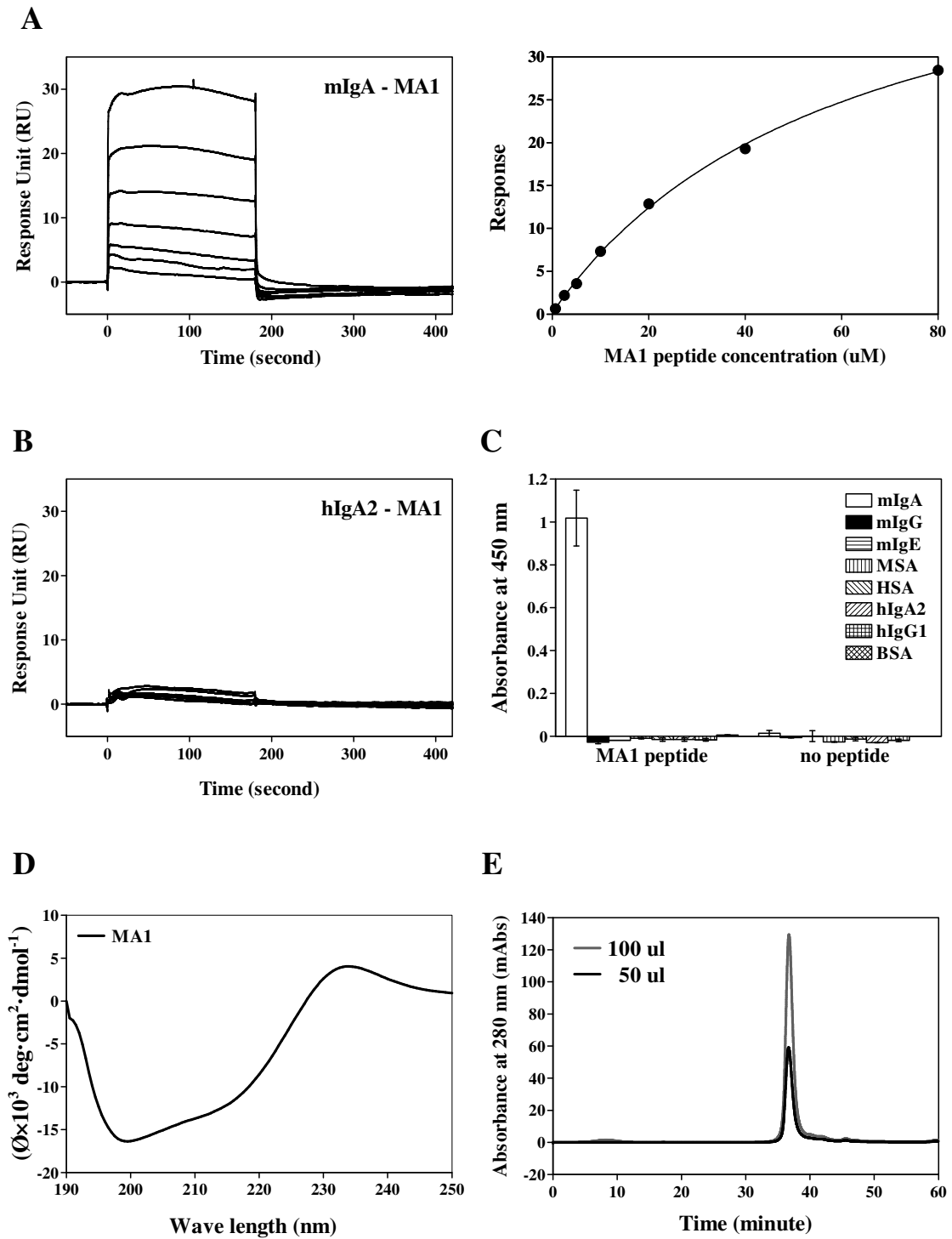


図 6-4 MA1 ペプチドの機能解析

A. BIAcore T200 による MA1 ペプチドのマウス IgA に対する結合親和性解析。左図 SPR センサーグラム、右図平衡値解析図。2.5 μM ~80 μM の MA1 ペプチドをインジェクトした。B. MA1 ペプチドのヒト IgA に対する結合センサーグラム。C. ELISA による MA1 ペプチドの結合特異性解析。D. リン酸緩衝液中における MA1 ペプチドの CD スペクトル。E. MA1 ペプチドのゲル濾過クロマトグラム。

マウス腹水中からの IgA の精製

ヒト IgA 結合ペプチドの場合と同様に、PEO₄ リンカーを介してビオチン化した MA1 ペプチドを Hitrap SA HP カラムに固定化してアフィニティカラムを調製し、腹水培養したマウス IgA の精製を試みた (図 6-5)。結果、酸性の Buffer (Gly-HCl pH 2.8) による溶出ピークは確認できなかったが、インジェクション終了直後のフロースルー画分においてショルダーピークが観察された。親和性が 60 μM と非常に低いため、カラム内にマウス IgA を保持することができず、漏れ出てしまったと考えられる。

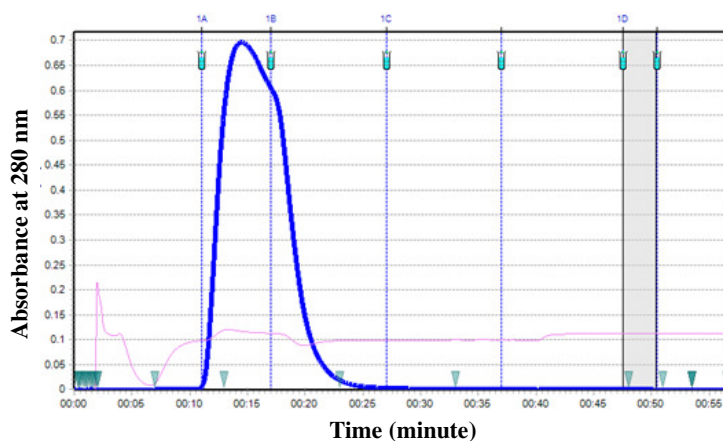


図 6-5 MA1 ペプチド固定化カラムによるマウス IgA の精製

流速 1 ml/min でマウス腹水を MA1 ペプチドカラムへとインジェクトし、PBS にてカラムを洗浄後、Gly-HCl pH 2.8 をインジェクトして結合画分の溶出をおこなった。

6-4 まとめと考察

ヒト/マウス間の交差反応性

3章から5章においてデザインしたヒト IgA 結合ペプチドは、その親和性は低いながらも、マウス IgA への結合親和性が確認された。ヒト IgA とマウス IgA の Fc 領域は一次配列上非常に高い相同性を有していることから (図 6-1 B)、立体構造もある程度高く類似していると考えられる。特に、ペプチドとの水素結合を形成すると考えられる 14 番目の Asp (側鎖同士での水素結合) はヒトとマウスで保存されており、また 20 番目 (ヒトでは Glu、マウスでは Asp)、72 番目 (ヒト IgA₁ では Glu、ヒト IgA₂ では Gln、マウスでは Gln)、199 番目 (ヒト、マウス共に Pro) については、主鎖のカルボニル基がペプチドと水素結合を形成するが、これらの残基はその周辺のアミノ酸配列についても高く保存されている (アミノ酸自体は異なるものもあるが、それらについても多くの場合で側鎖構造がよく似ている)。ペプチドの認識する部位は、FcαR が認識する部位でもあり、免疫機能を発揮する上で重要な役割を担っていることから種間においても高く保存されており、そのため我々のデザインしたペプチドはマウス IgA に対しても親和性は低いながら交差反応性を有していたと考えられる。

部分変異ライブラリによるスクリーニング

A2 部分変異ライブラリを用いたスクリーニングにより単離されたファージの提示ペプチド配列を明らかにすることで、A2 ペプチド配列中の Leu-5、Tyr-7、Lys-8、Gly-9、Val-12、Phe-14、Leu16 がマウス IgA への結合に大きく関わっている残基であることが示唆された。これらの残基の内、Leu-5、Tyr-7、Lys-8、Gly-9、Val-12、Phe-14 はヒト IgA への結合にも重要な残基であり、特に、マウス IgA に対する親和性を解析した A2、A2-3a、Opt-2、Opt-3 ペプチドの全てで保存されている (Lys-8 に関しては、Arg に変換している)。また、A2-3a と Opt-2 ペプチドでは、ヒト IgA に対しては 30 倍以上親和性に差があるのに対し (Opt-2 : 16 nM、A2-3a : 530 nM)、マウス IgA に対しては 1.4 倍弱とほとんど差がない (Opt-2 : 548 nM、A2-3a : 765 nM)。特に、A2-3a ペプチドはヒト IgA とマウス IgA に対する親和性が、それぞれ 530 nM (K_d) と 765 nM (K_d) とほとんど差がない。この結果より、5章までにデザインされたヒト IgA 結合ペプチドの特異性 (マウス IgA よりもヒト IgA を高い親和性で認識

する)は、A2-3a ペプチドへの置換導入の結果生じたものであると考えられた。

そこで、IgA への結合に重要な残基 (Leu-5、Tyr-7、Gly-9、Val-12) を保存し、それ以外をランダム化したモチーフ保存ライブラリを用いて再度マウス IgA に対するスクリーニングを行った。7 ラウンド後のファージプールより単離された MA1 ペプチドは、興味深いことに、ヒト IgA には全く反応せず、マウス IgA に対して高い特異性を有していた。ヒト IgA 結合ペプチドが 10 番目に Arg、11 番目に Pro を持つのに対し、MA1 ペプチドは、10 番目に Pro、11 番目に Asp が位置している。Opt-1 ペプチドのシミュレーション構造からも示唆されるように、ヒト IgA 結合ペプチドにおいては、Arg-8、Gly-9 にてターンした後、Pro-11 にて若干内側に折れ曲がったような構造をしている。MA1 ペプチドにおいては、10 番目に Pro が位置しているため、この折れ曲がったような構造がターン部分に位置することになる。また、CD スペクトル解析の結果、MA1 ペプチドは溶液中において α ヘリックスではなく、大部分はランダムであるが若干 β シートに近い構造が確認された。これらの結果より、特にペプチドの場合、アミノ酸の置換によりペプチド全体の構造が大きく変化し、これを利用することで、そのペプチドの結合特異性を変換することが可能であるということが明らかとなった。一方で、MA1 ペプチドはマウス IgA に対する親和性が 60 μM (K_d) と非常に低く、アフィニティ精製用のリガンドとしては機能しなかったため、今後親和性の改善が必要であることが示された。

第7章

総括と今後の課題

総括

T7 ファージディスプレイシステムを利用したランダムペプチドライブラリを用いることで、4種類のヒト IgA 結合ペプチド (A1-A4) の単離に成功した。この中でもっとも結合力の高かった A2 ペプチドを基にして部分変異ライブラリを構築することで、ヒト IgA への結合に必須な残基 (結合モチーフ) の同定に成功し、さらに結合モチーフを保存したライブラリを用いることで、A2 よりも親和性の上昇した A2-3a ペプチドを単離した。また、モチーフ保存ライブラリより得られた IgA 結合ペプチド配列情報を元に合成ペプチドを用いたアフィニティ解析ベースのスクリーニングを行うことで、親和性上昇に効果のあるアミノ酸の同定に成功し、これらを組み合わせることで最大 16 nM (K_d) と極めて高い親和性を有する Opt-2 ペプチドのデザインに成功した。さらに、分子シミュレーションを用いて作製した Opt-1 ペプチドのモデルを基に、変異導入・デザインした Opt-3 ペプチドを用いることで、ヒト血清中からの特異的な IgA 精製を達成した。また、ヒト IgA 結合ペプチドの場合と同様に、結合に重要な残基の同定、これを基にしたライブラリによるスクリーニングを行うことで、ヒト/マウス間におけるペプチドの結合特異性を変換することに成功した。

本研究でデザインされたヒト IgA 結合ペプチドは 16 残基と他の分子に比べ非常に小さいため生産コストにも優れており、ヒト IgA 精製用アフィニティリガンドとして非常に有用であると考えられる。また、マウス IgA 結合ペプチド MA1 については、親和性が低く精製用アフィニティリガンドとしては不十分であるが、ヒト IgA 結合ペプチドの場合と同様の手法を用いることで、親和性、特異性の改善が十分可能であると考えられる。

本研究で得られた成果は、ヒト IgA 抗体研究の発展、医薬品化に大きく貢献することが期待されると同時に、標的特異的ペプチドの効率的なデザイン手法を提案する。

今後の課題

① ヒト IgA 結合ペプチド—ヒト IgA-Fc 複合体の結晶構造解析

Opt-1 ペプチドとヒト IgA-Fc の結合状態の構造を明らかにすることで、「4章—分子シミュレーション」で示したペプチド-IgA-Fc 複合体の分子シミュレーション結果との比較を行い、分子シミュレーションの結果がどの程度正確に実際の結合状態を反映しているか評価する。現在、ヒト IgA₂-Fc の発現まで完了しており（カイコ体液）、今後精製・結晶化を行う必要がある。

② マウス IgA 結合ペプチドの親和性増強

MA1 ペプチドにおいてマウス IgA への結合に重要な残基の同定、さらには親和性の増強に効果のあるアミノ酸の同定を同時に行うため、以下のようなライブラリをデザインした（表7-1）。

表7-1 MA1 部分変異ライブラリ

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Amino acid	E*	E*	V*	C	I*	V*	Y*	R*	G*	E*	D*	V*	C	W*	V*	W*
DNA	G*A*G*	G*A*G*	G*T*N	tgt	T*T*N	G*T*N	T*A*C*	A*G*N	G*G*N	C*C*N	G*A*T*	G*T*N	tgt	T*G*G*	G*T*N	T*G*G

A* : A55 %+T, G, C それぞれ 15 %ずつ、T* : T55 %+A, G, C それぞれ 15 %ずつ、G* : G55 %+T, A, C それぞれ 15 %ずつ、C* : C55 %+T, G, A それぞれ 15 %ずつ、N : A, T, G, C それぞれ 25 %ずつ含む混合塩基を用いてオリゴ DNA を合成した。

MA1 由来配列のアミノ酸出現率は 17~34 %であり、「3章—ヒト IgA への結合に重要な残基の同定」でデザインした A2 部分変異ライブラリよりも出現するアミノ酸の偏り（34~50 %）が少なく、よりランダムライブラリに近くなっている。このように、MA1 由来のアミノ酸出現率を抑えたライブラリを用いること、さらに、従来の 10-3 型のディスプレイシステム（10~15 個のペプチドをファージ表面に提示）だけではなく、1-1b 型のディスプレイシステム（平均 1 個のペプチドをファージ表面に提示）を用いてスクリーニングを行うことで、マウス IgA への結合に重要な残基の同定だけでなく、親和性の上昇に効果のあるアミノ酸の特定、高親和性ペプチドの単離も行うことができると考えられる。

参考文献

1. Schroeder HW, Jr., Cavacini L: Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125 (2 Suppl 2) :S41-52.
2. Junghans RP: Finally! The Brambell receptor (FcRB) . Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol Res* 1997, 16 (1) :29-57.
3. Roopenian DC, Akilesh S: FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007, 7 (9) :715-25.
4. Cervenak J, Kacs Kovics I: The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2009, 128 (1-3) :171-7.
5. Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ: Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 1994, 372 (6504) :379-83.
6. Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, Wakitani M, Uchida K, Kakita S, Tsumoto K, Kumagai I, Shitara K: Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J Mol Biol* 2004, 336 (5) :1239-49.
7. Niwa R, Natsume A, Uehara A, Wakitani M, Iida S, Uchida K, Satoh M, Shitara K: IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods* 2005, 306 (1-2) :151-60.
8. Shitara K: [Potelligent antibodies as next generation therapeutic antibodies]. *Yakugaku Zasshi* 2009, 129 (1) :3-9.
9. Shen X, Hu GB, Jiang SJ, He FR, Xing W, Li L, Yang J, Zhu HF, Lei P, Shen GX: Engineering and characterization of a baculovirus-expressed mouse/human chimeric antibody against transferrin receptor. *Protein Eng Des Sel* 2009, 22 (12) :723-31.
10. Natsume A, Niwa R, Satoh M: Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* 2009, 3:7-16.
11. Beck A, Reichert JM: Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering. *MAbs*, 4 (4) :419-25.
12. Subramaniam JM, Whiteside G, McKeage K, Croxtall JC: Mogamulizumab: first global approval. *Drugs*, 72 (9) :1293-8.
13. Buchner J, Renner M, Lilie H, Hinz HJ, Jaenicke R, Kiefhabel T, Rudolph R: Alternatively

- folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* 1991, 30 (28) :6922-9.
14. Martsev SP, Kravchuk ZI, Vlasov AP, Lyakhnovich GV: Thermodynamic and functional characterization of a stable IgG conformer obtained by renaturation from a partially structured low pH-induced state. *FEBS Lett* 1995, 361 (2-3) :173-5.
 15. Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, Yumioka R, Nagase K, Arakawa T, Philo JS: Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins* 2007, 66 (4) :954-62.
 16. Sakamoto K, Ito Y, Hatanaka T, Soni PB, Mori T, Sugimura K: Discovery and characterization of a peptide motif that specifically recognizes a non-native conformation of human IgG induced by acidic pH conditions. *J Biol Chem* 2009, 284 (15) :9986-93.
 17. Linhult M, Gulich S, Graslund T, Simon A, Karlsson M, Sjoberg A, Nord K, Hober S: Improving the tolerance of a protein analogue to repeated alkaline exposures using a bypass mutagenesis approach. *Proteins* 2004, 55 (2) :407-16.
 18. Mestecky J, McGhee JR: Immunoglobulin A (IgA) : molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 1987, 40:153-245.
 19. Kerr MA: The structure and function of human IgA. *Biochem J* 1990, 271 (2) :285-96.
 20. Durrer P, Gluck U, Spyr C, Lang AB, Zurbriggen R, Herzog C, Gluck R: Mucosal antibody response induced with a nasal virosome-based influenza vaccine. *Vaccine* 2003, 21 (27-30) :4328-4334.
 21. Plaut AG, Wistar R, Jr., Capra JD: Differential susceptibility of human IgA immunoglobulins to streptococcal IgA protease. *J Clin Invest* 1974, 54 (6) :1295-300.
 22. Senior BW, Woof JM: The influences of hinge length and composition on the susceptibility of human IgA to cleavage by diverse bacterial IgA1 proteases. *J Immunol* 2005, 174 (12) :7792-9.
 23. Narita I, Gejyo F: Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2008, 12 (5) :332-8.
 24. Hiki Y: O-linked oligosaccharides of the IgA1 hinge region: roles of its aberrant structure in the occurrence and/or progression of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2009, 13 (5) :415-23.
 25. Gomes MM, Suzuki H, Brooks MT, Tomana M, Moldoveanu Z, Mestecky J, Julian BA, Novak J, Herr AB: Recognition of galactose-deficient O-glycans in the hinge region of IgA1

- by N-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. *Biochemistry*, 49 (27) :5671-82.
26. Mostov KE, Friedlander M, Blobel G: The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* 1984, 308 (5954) :37-43.
 27. Holmgren J: MUCOSAL IMMUNITY AND VACCINATION. *Fems Microbiology Immunology* 1991, 89 (1) :1-9.
 28. Holmgren J, Czerkinsky C: Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 2005, 11 (4) :S45-S53.
 29. Bakema JE, van Egmond M: Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies? *MAbs*, 3 (4) :352-61.
 30. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD: Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med* 1990, 171 (3) :597-613.
 31. Huls G, Heijnen IA, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel JG, Logtenberg T: Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1999, 59 (22) :5778-84.
 32. Dechant M, Beyer T, Schneider-Merck T, Weisner W, Peipp M, van de Winkel JG, Valerius T: Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 2007, 179 (5) :2936-43.
 33. Zhao J, Kuroki M, Shibaguchi H, Wang L, Huo Q, Takami N, Tanaka T, Kinugasa T, Kuroki M: Recombinant Human Monoclonal IgA Antibody Against CEA to Recruit Neutrophils to CEA-Expressing Cells. *Oncology Research* 2008, 17 (5) :217-222.
 34. Huang YT, Wright A, Gao X, Kulick L, Yan H, Lamm ME: Intraepithelial cell neutralization of HIV-1 replication by IgA. *J Immunol* 2005, 174 (8) :4828-35.
 35. Yan H, Lamm ME, Bjorling E, Huang YT: Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an in vitro measles virus model. *J Virol* 2002, 76 (21) :10972-9.
 36. Corthesy B, Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Parez N, Greenberg H, Schwartz-Cornil I: Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 2006, 80 (21) :10692-9.
 37. Wright A, Lamm ME, Huang YT: Excretion of human immunodeficiency virus type 1 through polarized epithelium by immunoglobulin A. *J Virol* 2008, 82 (23) :11526-35.

38. Woof JM, Kerr MA: The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 2006, 208 (2) :270-82.
39. Russell-Jones GJ, Gotschlich EC, Blake MS: A surface receptor specific for human IgA on group B streptococci possessing the Ibc protein antigen. *J Exp Med* 1984, 160 (5) :1467-75.
40. Kondoh H, Kobayashi K, Hagiwara K: A simple procedure for the isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. *Mol Immunol* 1987, 24 (11) :1219-22.
41. Lindahl G, Akerstrom B, Vaerman JP, Stenberg L: Characterization of an IgA receptor from group B streptococci: specificity for serum IgA. *Eur J Immunol* 1990, 20 (10) :2241-7.
42. Palombo G, De Falco S, Tortora M, Cassani G, Fassina G: A synthetic ligand for IgA affinity purification. *J Mol Recognit* 1998, 11 (1-6) :243-6.
43. Li R, Dowd V, Stewart DJ, Burton SJ, Lowe CR: Design, synthesis, and application of a protein A mimetic. *Nat Biotechnol* 1998, 16 (2) :190-5.
44. Pack TD: Purification of human IgA. *Curr Protoc Immunol* 2001, Chapter 2:Unit 2 10B.
45. Sandin C, Linse S, Areschoug T, Woof JM, Reinholdt J, Lindahl G: Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide. *J Immunol* 2002, 169 (3) :1357-1364.
46. Nilson BH, Logdberg L, Kastern W, Bjorck L, Akerstrom B: Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *J Immunol Methods* 1993, 164 (1) :33-40.
47. Parr EL, Bozzola JJ, Parr MB: Purification and measurement of secretory IgA in mouse milk. *J Immunol Methods* 1995, 180 (2) :147-57.
48. Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985, 228 (4705) :1315-7.
49. Smith GP, Scott JK: Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993, 217:228-57.
50. Smith GP, Schultz DA, Ladbury JE: A ribonuclease S-peptide antagonist discovered with a bacteriophage display library. *Gene* 1993, 128 (1) :37-42.
51. Omidfar K, Rasae MJ, Modjtahedi H, Forouzandeh M, Taghikhani M, Golmakani N: Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR. *Tumour Biol* 2004, 25 (5-6) :296-305.

52. Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC, et al.: Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J* 1993, 12 (2) :725-34.
53. Onda T, LaFace D, Baier G, Brunner T, Honma N, Mikayama T, Altman A, Green DR: A phage display system for detection of T cell receptor-antigen interactions. *Mol Immunol* 1995, 32 (17-18) :1387-97.
54. Dai M, Temirov J, Pesavento E, Kiss C, Velappan N, Pavlik P, Werner JH, Bradbury AR: Using T7 phage display to select GFP-based binders. *Protein Eng Des Sel* 2008, 21 (7) :413-24.
55. Roque AC, Lowe CR, Taipa MA: Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog* 2004, 20 (3) :639-54.
56. Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA: Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 1989, 246 (4935) :1275-81.
57. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990, 348 (6301) :552-4.
58. Winter G, Milstein C: Man-made antibodies. *Nature* 1991, 349 (6307) :293-9.
59. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G: Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991, 352 (6336) :624-8.
60. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G: Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 1991, 19 (15) :4133-7.
61. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G: By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991, 222 (3) :581-97.
62. van de Putte LB, Atkins C, Malaise M, Sany J, Russell AS, van Riel PL, Settas L, Bijlsma JW, Todesco S, Dougados M, Nash P, Emery P, Walter N, Kaul M, Fischkoff S, Kupper H: Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 2004, 63 (5) :508-16.
63. Larman HB, Zhao Z, Laserson U, Li MZ, Ciccia A, Gakidis MA, Church GM, Kesari S,

- Leproust EM, Solimini NL, Elledge SJ: Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome. *Nat Biotechnol*, 29 (6) :535-41.
64. Roberts BL, Markland W, Ley AC, Kent RB, White DW, Guterman SK, Ladner RC: Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89 (6) :2429-33.
65. Holliger P, Riechmann L, Williams RL: Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability. *J Mol Biol* 1999, 288 (4) :649-57.
66. Kneissel S, Queitsch I, Petersen G, Behrsing O, Micheel B, Dubel S: Epitope structures recognised by antibodies against the major coat protein (g8p) of filamentous bacteriophage fd (Inoviridae) . *J Mol Biol* 1999, 288 (1) :21-8.
67. Hashiguchi S, Yamaguchi Y, Takeuchi O, Akira S, Sugimura K: Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 402 (1) :19-22.
68. Charles-Nino C, Pedroza-Roldan C, Viveros M, Gevorkian G, Manoutcharian K: Variable epitope libraries: new vaccine immunogens capable of inducing broad human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibody response. *Vaccine*, 29 (32) :5313-21.
69. Krumpe LR, Atkinson AJ, Smythers GW, Kandel A, Schumacher KM, McMahon JB, Makowski L, Mori T: T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *Proteomics* 2006, 6 (15) :4210-22.
70. Alan Rosenberg KG, F. William Studier, Mark McCormick, James Berg, Robert Novy, and Robert Mierendorf: T7 select phage display system: a powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Innovations* 1996, 6:1-6.
71. Chen G, Hayhurst A, Thomas JG, Harvey BR, Iverson BL, Georgiou G: Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS) . *Nat Biotechnol* 2001, 19 (6) :537-42.
72. Boder ET, Wittrup KD: Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 1997, 15 (6) :553-7.
73. Hanes J, Jermutus L, Pluckthun A: Selecting and evolving functional proteins in vitro by ribosome display. *Methods Enzymol* 2000, 328:404-30.
74. Sun Y, Ning B, Liu M, Gao X, Fan X, Liu J, Gao Z: Selection of diethylstilbestrol-specific

- single-chain antibodies from a non-immunized mouse ribosome display library. *PLoS One*, 7 (3) :e33186.
75. Zhu G, Zhao P, Deng N, Tao D, Sun L, Liang Z, Zhang L, Zhang Y: Single chain variable fragment displaying m13 phage library functionalized magnetic microsphere-based protein equalizer for human serum protein analysis. *Anal Chem*, 84 (18) :7633-7.
76. Gazarian KG, Solis CF, Gazarian TG, Rowley M, Laclette JP: Synthetic peptide-targeted selection of phage display mimotopes highlights immunogenic features of alpha-helical vs non-helical epitopes of *Taenia solium* paramyosin: implications for parasite- and host-protective roles of the protein. *Peptides*, 34 (1) :232-41.
77. Kumaran J, Mackenzie CR, Arbabi-Ghahroudi M: Semiautomated panning of naive camelidae libraries and selection of single-domain antibodies against Peptide antigens. *Methods Mol Biol*, 911:105-24.
78. Ng S, Jafari MR, Matochko WL, Derda R: Quantitative synthesis of genetically encoded glycopeptide libraries displayed on m13 phage. *ACS Chem Biol*, 7 (9) :1482-7.
79. Houshmand H, Froman G, Magnusson G: Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Anal Biochem* 1999, 268 (2) :363-70.
80. Sokoloff AV, Bock I, Zhang G, Sebestyen MG, Wolff JA: The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display. *Mol Ther* 2000, 2 (2) :131-9.
81. Danner S, Belasco JG: T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98 (23) :12954-9.
82. Yamazaki T, Aoki S, Ohta K, Hyuma S, Sakaguchi K, Sugawara F: Synthesis of an immunosuppressant SQAG9 and determination of the binding peptide by T7 phage display. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14 (16) :4343-6.
83. Herman RE, Badders D, Fuller M, Makienko EG, Houston ME, Jr., Quay SC, Johnson PH: The Trp cage motif as a scaffold for the display of a randomized peptide library on bacteriophage T7. *J Biol Chem* 2007, 282 (13) :9813-24.
84. Matsumoto Y, Shindo Y, Takakusagi Y, Takakusagi K, Tsukuda S, Kusayanagi T, Sato H, Kawabe T, Sugawara F, Sakaguchi K: Screening of a library of T7 phage-displayed

- peptides identifies alphaC helix in 14-3-3 protein as a CBP501-binding site. *Bioorg Med Chem*, 19 (23) :7049-56.
85. Sun D, Shi H, Chen J, Shi D, Zhu Q, Zhang H, Liu S, Wang Y, Qiu H, Feng L: Generation of a mouse scFv library specific for porcine aminopeptidase N using the T7 phage display system. *J Virol Methods*, 182 (1-2) :99-103.
86. Hoogenboom HR: Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2005, 23 (9) :1105-16.
87. Krumpal LR, Mori T: The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *Int J Pept Res Ther* 2006, 12 (1) :79-91.
88. Scott JK: Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* 1992, 17 (7) :241-5.
89. Case DA, Cheatham TE, 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Jr., Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ: The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 2005, 26 (16) :1668-88.
90. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C: Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 2006, 65 (3) :712-25.
91. Herr AB, Ballister ER, Bjorkman PJ: Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc alpha RI and its complex with IgA1-Fc. *Nature* 2003, 423 (6940) :614-620.
92. Ramsland PA, Willoughby N, Trist HM, Farrugia W, Hogarth PM, Fraser JD, Wines BD: Structural basis for evasion of IgA immunity by *Staphylococcus aureus* revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104 (38) :15051-6.
93. DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA: Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* 2000, 287 (5456) :1279-83.

業績目録

1. 誌上発表

① [国際誌 査読有り 筆頭]

“Human IgA-binding Peptides Selected from Random Peptide Libraries: Affinity Maturation and Application in IgA Purification”, Takaaki Hatanaka, Shinji Ohzono, Mirae Park, Shogo Tsukamoto, Ryohei Sugita, Kotaro Sakamoto, Hiroyuki Ishitobi, Toshiyuki Mori, Osamu Ito, Koichi Sorajo, Kazuhisa Sugimura, Sihyun Ham, and Yuji Ito, *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, pp.43126-43136, 2012.12

② [国際誌 査読有り 非筆頭]

- 1) “Discovery and Characterization of a Peptide Motif That Specifically Recognizes a Non-native Conformation of Human IgG Induced by Acidic pH Conditions”, Kotaro Sakamoto, Yuji Ito, Takaaki Hatanaka, Preeti Brijiral Soni, Toshiyuki Mori, and Kazuhisa Sugimura, *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, pp.9986-9993, 2009.4
- 2) “Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor α chain and interleukin-13 receptor α 1 chain by a silkworm-baculovirus system”, Eijiro Honjo, Yoshinari Shoyama, Taro Tamada, Hideki Shigematsu, Takaaki Hatanaka, Sachiko Kanaji, Kazuhiko Arima, Yuji Ito, Kenji Izuhara, Ryota Kuroki, *Protein Expression and Purification*, **60**, pp.25-30, 2008.5
- 3) “Regulation of T cell response by blocking the ICOS signal with the B7RP- I -specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library” Masatoshi Maeda, Yuji Ito, Takaaki Hatanaka, Shuhei Hashiguchi, Masaharu torikai, Toshihiro Nakashima and Kazuhisa Sugimura, *mAbs*, **1**, pp.453-461, 2009.10

③ [Proceedings 査読有り 筆頭]

- 1) “Elimination of an Alternative Conformation of Human Immunoglobulin G Induced by Low-pH Condition on Specific Peptide-Conjugated Affinity Column”, 畠中孝彰、伊東祐二、林田潤、Preeti Brijiral Soni、坂元孝太郎、橋口周平、杉村和久(鹿児島大), *Peptide Science*

2007, pp. 487-488, 2008

- 2) “Effective Elimination of Particular Conformation of Human IgG from Antibody Solution by Peptide Affinity Column”, 畠中孝彰、伊東祐二、Preeti Soni、坂元孝太郎、林田潤、橋口周平、杉村和久（鹿児島大）, *Peptide Science* 2008, pp.477-478, 2009
- 3) “Affinity Purification of IgG by Specific Peptide-Conjugated Column”, 畠中孝彰、伊東祐二、Preeti Brijiral Soni、坂元孝太郎、林田潤、橋口周平、杉村和久（鹿児島大）, *Peptide Science* 2009, pp.259-260, 2010
- 4) “Isolation and characterization of human IgA-specific binding peptides from random peptide library on T7 phage display system ”, 畠中孝彰、梶幸也香、杉田良平、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、朝井洋明、山田賢恵、伊東祐二, *Peptide Science* 2010, pp.267, 2011
- 5) “Isolation and Affinity Maturation of Human IgA-Specific Peptide from Random Peptide T7 Phage Library for Designing a New IgA Affinity Ligand”, 畠中孝彰、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, *Peptide Science* 2011, pp.25-26, 2012
- 6) 畠中孝彰、中島田雄一、有馬一成、伊東祐二, *Peptide Science* 2012, inpress

④ [Proceedings 査読有り 非筆頭]

- 1) “Identification of mouse IgG antibody-binding peptide by screening from T7 phage random peptide library ”, 梶幸也香、畠中孝彰、杉田良平、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, *Peptide Science* 2010, pp. 72, 2011

2. 解説・総説

- 1) 「ProteOn XPR36 システムによるヒトイムノグロブリン G 結合ペプチドのスクリーニングとキャラクタライズ」, 畠中孝彰、梶幸也香、伊東祐二, BIO-RAD 出版, 2009
- 2) 「ファージライブラリによる機能性ペプチドのデザイン」, 畠中孝彰、伊東祐二, PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN, No80, pp.2-5, 2011
- 3) 「気になった論文」, 畠中孝彰, 生命化学研究レター FBC News Letter, No37, pp.27-28, 2011

- 4) 「15th Korean Peptide and Protein Symposiumの参加報告」 畠中孝彰, PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN, No84, pp.16-17, 2012

3. 著書・刊行物・調査報告

[日本語]

- 1) 「T7 フェージディスプレイライブラリのすすめ」, 畠中孝彰、伊東祐二, MERCK 出版, 2009
- 2) 「新機能抗体開発ハンドブック」株式会社エヌティーエヌ, 第3章, p 59-64, 2012
- 3) 「ペプチド医薬の最前線」株式会社シーエムシー出版, 第2章, p78-84, 2012

3. 口頭発表・ポスター発表

① [国際 筆頭]

- 1) “Isolation and characterization of human IgA-specific binding peptides from random peptide library on T7 phage display system”, 畠中孝彰、梅さやか、杉田良平、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 5th International Peptide Symposium ・ 第47回ペプチド討論会 合同大会, 京都, (2010.12)
- 2) “ISOLATION AND AFFINITY MATURATION OF HUMAN IGA SPECIFIC PEPTIDE FROM RANDOM PEPTIDE T7 PHAGE LIBRARY FOR IgA AFFINITY LIGAND”, 畠中孝彰、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 9th Australian Peptide Conference, オーストラリア, (2011.10)
- 3) “Design of a New IgA Affinity peptide for Constructing IgA Purification and Detection System”, 畠中孝彰、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 15th Korean Peptide-Protein Symposium, 韓国, (2011.12)

② [国内 登壇者]

- 1) 「Elimination of an Alternative Conformation of Human Immunoglobulin G Induced by Low-pH Condition on Specific Peptide-Conjugated Affinity Column」, 畠中孝彰、林田潤、

- Preeti Brijiral Soni、坂元孝太郎、伊東祐二、橋口周平、杉村和久、第 44 回ペプチド討論会、富山、(2007.11)
- 2) 「酸性条件下で誘導される特殊な構造を持つヒト IgG 抗体の特異ペプチドによる除去・分離システム」、畠中孝彰、伊東祐二、林田潤、Preeti Brijiral Soni、坂元孝太郎、橋口周平、杉村和久、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、福岡、(2008.5)
- 3) 「Effective Elimination of Particular Conformation of Human IgG from Antibody Solution by Peptide Affinity Column」、畠中孝彰、伊東祐二、Preeti Brijiral Soni、坂元孝太郎、林田潤、橋口周平、杉村和久、第 45 回ペプチド討論会、東京、(2008.10)
- 4) 「酸性条件下で誘導される特殊な構造を持つヒト IgG 抗体の特性」、畠中孝彰、伊東祐二、林田潤、坂元孝太郎、Preeti Brijiral Soni、橋口周平、杉村和久、第 81 回日本生化学大会・第 31 回日本分子生物学会年会 合同大会、神戸、(2008.12)
- 5) 「酸性条件下で誘導される特殊な抗体分子の性質」、畠中孝彰、伊東祐二、坂元孝太郎、梶幸也香、杉村和久、第 9 回日本蛋白質科学会年会、熊本、(2009.5)
- 6) 「Affinity Purification of IgG by Specific Peptide-Conjugated Column」、畠中孝彰、伊東祐二、梶幸也香、坂元孝太郎、橋口周平、杉村和久、第 46 回ペプチド討論会、福岡、(2009.11)
- 7) 「IgG 結合ペプチドによる抗体精製システムの構築の試み」、畠中孝彰、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二、平成 22 年度日本生化学会九州支部例、鹿児島、(2010.5)
- 8) 「BIAcore T100 による T7 フェージ上に提示された特異ペプチドとヒト抗体との相互作用解析」、畠中孝彰、梶さやか、畠中秀一、有馬一成、伊東祐二、BIA symposium 2010、東京、(2010.7)
- 9) 「IgG 特異的結合ペプチドを用いたヒト血清からの抗体精製法の検討」、畠中孝彰、梶幸也香、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二、第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、(2010.6)
- 10) 「ヒト IgA の精製を目指したアフィニティリガンドのデザイン」、畠中孝彰、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二、平成 23 年度日本生化学会九州支部例、福岡、(2011.5)

- 1 1) 「ヒト IgA 精製リガンドのデザインに向けた T7 ファージライブラリからの IgA 結合ペプチドの単離と親和性増強」, 畠中孝彰、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪, (2011.6)
- 1 2) 「Isolation and Affinity Maturation of Human IgA-Specific Peptide from Random Peptide T7 Phage Library for Designing a New IgA Affinity Ligand」, 畠中孝彰、塚本翔悟、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 第 48 回ペプチド討論会, 札幌, (2011.9)
- 1 3) 「ヒト IgA 結合ペプチドの親和性・特異性向上アプローチ」, 平成 24 年度生化学会九州支部例会, 畠中孝彰、中島田雄一、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 福岡, (2012.5)
- 1 4) 「Conversion of specificity in human IgA-binding peptide by using T7 phage display system」, 畠中孝彰、中島田雄一、坂元孝太郎、有馬一成、伊東祐二, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, (2012.6)
- 1 5) 「BIAcore による IgA,IgG 特異的高親和性ペプチドのデザインと評価」, 畠中孝彰、中島田雄一、坂元孝太郎、伊東祐二, BIA symposium 2012 ,東京, (2010.7)
- 1 6) 「CONVERSION OF BINDING SPECIFICITY IN IGA-AFFINITY LIGAND BY USING T7 PHAGE DISPLAY SYSTEM.」 畠中孝彰、中島田雄一、有馬一成、伊東祐二, 第 49 回ペプチド討論会, 鹿児島 (2012.11)
- 1 7) 「ライブラリ技術を用いた IgA 結合ペプチドのヒト/マウス間の特異性変換」, 畠中孝彰、中島田雄一、有馬一成、伊東祐二, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡 (2012.12)

6. 受賞・表彰等

- 1) 第 10 回日本蛋白質科学会ポスター賞, 畠中孝彰, 2010.6.17
- 2) JPS Travel Award (第 15 回韓国ペプチドシンポジウムへの若手研究者参加支援), 畠中孝彰, 2012.11.10
- 3) BIA symposium 2012 ポスター賞 2012.7.19

謝辞

本研究は鹿児島大学大学院 理工学研究科 システム情報科学専攻 有機生化学講座
(伊東研究室) にて行われました。

大学院より 6 年間根気強く丁寧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心より感謝いたします。学位論文審査に当たり副査として、多忙な中お時間を割いていただいた杉村和久教授、橋本雅仁准教授、高梨啓和准教授に心より感謝申し上げます。

多くのご助言・ご協力を頂いた大塚化学株式会社の大園慎二様、北尾みどり様をはじめとする山田賢恵様グループの皆様、韓国スンミョン女子大学の Sihyun Ham 先生、Mirae Park 様、独立行政法人日本原子力研究開発機構の黒木良太先生、当研究室の有馬一成准教授にもこの場をお借りして感謝申し上げます。また、私は、大学 4 年、修士、博士とそれぞれ所属していた研究室が異なりますが、それぞれの研究室にてお世話になった先輩方、支えてくれた後輩達、学生生活・研究活動に当たりお世話になった事務の方々にも心より感謝します。最後になりましたが、これまでの 28 年間好き勝手を支えてくれた両親にも心より感謝いたします。

今後とも末永いお付き合いのほどよろしくお願いいたします。

2013 年 3 月 畠中孝彰