

博士論文

産業応用を目指したアルパカ由来VHH抗体に関する研究

Studies on Alpaca VHH Antibodies for Industrial  
Applications

2015年3月

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

宮崎 誠生

# 目次

要旨 .....	1
第 1 章 研究背景.....	3-17
1-1 VHH 抗体 .....	4
1-1-1 はじめに .....	4
1-1-2 様々なシングルドメイン抗体 .....	4
1-1-3 アルパカ .....	8
1-1-4 VHH 抗体の優れた特徴.....	8
1-2 ファージディスプレイ法.....	15
1-3 次世代シーケンサー .....	17
第 2 章 アルパカナイーブライブラリ .....	18-39
2-1 目的.....	19
2-2 材料と方法 .....	19
2-2-1 VHH 特異的プライマー .....	19
2-2-2 アルパカ VHH ナイーブファージライブラリの構築.....	20
2-2-3 アルパカ VHH ファージクローンの単離.....	21
2-2-4 ELISA (ファージ上の VHH 抗体提示確認) .....	22
2-2-5 ELISA (ファージ特異性確認) .....	23
2-2-6 可溶性 VHH の発現 .....	23
2-2-7 ドットブロット .....	24
2-2-8 バイオパンニング .....	24
2-3 結果 .....	25
2-3-1 アルパカ VHH ナイーブライブラリの構築 .....	25
2-3-2 ベクターへの VHH 遺伝子導入確認 .....	28
2-3-3 ファージ上への VHH 抗体の提示効率 .....	29
2-3-4 大腸菌での可溶性タンパク質としての発現効率 .....	30

2-3-5	NDOM 特異的 VHH 抗体の単離.....	32
2-3-5-1	バイオパンニング.....	32
2-3-5-2	抗 NDOM VHH 抗体のアミノ酸配列解析.....	36
2-4	考察.....	38
第 3 章	アルパカ免疫ライブラリ.....	40-68
3-1	目的.....	41
3-2	材料と方法.....	41
3-2-1	VHH 特異的プライマー.....	41
3-2-2	アルパカへの免疫.....	42
3-2-3	重鎖抗体の精製.....	43
3-2-4	ELISA(重鎖抗体).....	43
3-2-5	VHH ファージライブラリの構築.....	44
3-2-6	アルパカ VHH ファージクローンの単離.....	45
3-2-7	ELISA(VHH ファージ、VHH).....	46
3-2-8	バイオパンニング.....	47
3-2-9	可溶性 VHH の発現(ペリプラスム画分).....	47
3-2-10	可溶性 VHH の発現(封入体).....	48
3-2-11	表面プラズモン共鳴解析.....	48
3-3	結果.....	49
3-3-1	免疫抗原(NDOM)のコンジュゲート確認.....	49
3-3-1	アルパカ血漿力価.....	51
3-3-2	アルパカ重鎖抗体の精製.....	53
3-3-3	アルパカ重鎖抗体の抗体力価.....	55
3-3-4	VHH 免疫ライブラリの構築.....	57
3-3-5	NDOM に対するバイオパンニング.....	61
3-3-6	NDOM 特異的クローンのアミノ酸配列解析.....	63
3-3-7	NDOM 特異的 VHH の性状解析.....	65

3-4 考察 .....	67
第 4 章 次世代シーケンサーを利用した抗原特異的な VHH 抗体の単離手法の開発..	69-85
4-1 目的 .....	70
4-2 材料と方法 .....	70
4-2-1 次世代シーケンサーによる網羅的配列解析 .....	70
4-3 結果 .....	71
4-3-1 NGS 解析結果 .....	71
4-3-2 パンニング前出現率上位 100 位のパンニング前後での出現率推移 .....	73
4-3-3 3 章で取得した抗原特異的クローンのパンニング前後の出現率及び増幅率..	75
4-3-4 パンニング前後の増幅率上位 100 位の系統樹解析及びアミノ酸配列解析 ...	77
4-3-5 Cluster1-3 の性状解析 .....	82
4-4 考察 .....	84
第 5 章 総括 .....	86
参考文献 .....	89
業績目録 .....	94
謝辞 .....	98

## 要旨

本論文は、アルパカ由来VHH抗体の産業応用を目指し、今まであまり研究されてこなかった効率的なアルパカ由来VHH抗体の単離法の研究についてまとめたものである。

アルパカのようなラクダ科動物には、重鎖と軽鎖で構成された一般的なIgG抗体とは別に、軽鎖が欠損した重鎖のみの重鎖抗体を天然に有しており、重鎖抗体の抗原結合ドメインは、VHH (Variable domain of the heavy chain of heavy chain antibody) 抗体や Nanobody®と呼ばれている。本論文で、我々はモデル抗原としてIZUM01タンパク質のN末端断片 (NDOM) を用いてアルパカ由来VHH抗体ファージライブラリから効率的なアルパカ由来VHH抗体の単離法の研究及び単離したVHH抗体の性状解析を行った。

初めに免疫前のアルパカから採取した抹消血リンパ球を用いてナイーブライブラリを作製し、繊維状M13ファージ上へのVHH抗体の提示効率、大腸菌を用いたVHH抗体の発現効率等のライブラリの性能を評価した結果、ファージ上でのVHH抗体の高い提示効率、VHH抗体の高い発現効率が明らかとなった。さらに、モデル抗原に対して特異抗体の単離に成功し、単離クローンの性状解析を行った。

次に、さらに効率的な抗原特異的VHH抗体の単離を目指し、実際にアルパカへ免疫を行い、免疫後のアルパカより採取した抹消血リンパ球を用いて免疫ライブラリを作製し、抗原特異的VHH抗体の単離を試み、単離クローンの性状解析を行った。その結果、免疫することにより、わずか1ラウンドのバイオパニングによってモデル抗原特異的なファージ集団の濃縮に成功し、そのファージ集団の中から抗原特異的クローンを単離した。非常に興味深いことに、免疫ライブラリから単離したモデル抗原特異的VHH抗体のアミノ酸配列は、クロー

ン間でのアミノ酸配列の相同性が非常に高く、共通の親B細胞由来であることが示唆された。また、フレームワーク2 (FR2) のアミノ酸配列より全てのクローンがVH型であることを確認した。免疫ライブラリの結果より、通常のスクリーニングではほぼ1種類の抗原特異的クローンしか単離出来なかったが、例えばVHH抗体をサンドイッチELISAやイムノクロマトへ産業応用する場合、異なったエピトープのクローンが必要となる。そのためには、多様な配列を有したVHH抗体を単離する技術が必要である。

そこで、我々はより多様性を有したモデル抗原特異的VHH抗体の単離を目的として、次世代シーケンサー (Next generation sequencing: NGS) を利用したハイスループット塩基配列解析を行い、モデル抗原特異的なVHH抗体の単離法の研究を行った。我々は、バイオパニングの前後の免疫ライブラリについてNGSによる塩基配列解析を行い、通常のELISAスクリーニングで取得したモデル抗原特異的VHH抗体のバイオパニング前後の存在率、増幅率を解析した。その結果、バイオパニング前後のアミノ酸配列出現数の増幅率が抗原特異的VHH抗体を選択する指標の1つとして利用できる可能性があることを明らかにした。増幅率を指標とすることで、免疫ライブラリより通常のELISAスクリーニングで単離したVHH抗体のアミノ酸配列とは異なる配列集団に属するクローンの中からモデル抗原特異的なVHH抗体の単離に成功した。NGS解析の結果より単離に成功したVHH抗体の性状解析の結果、通常のELISAスクリーニングで単離したVHH抗体と同様の抗原特異性、親和性を有していることを明らかにした。つまり、ファージディスプレイとNGSによるハイスループット塩基配列を組み合わせることにより、通常のELISAスクリーニングに比べより多様な配列を有したVHH抗体の取得が可能となり、本方法が抗原特異的VHH抗体の効率的な取得方法の1つとして非常に有用であり、本研究によりアルパカVHH抗体の産業応用が促進すると考えられる。

# 第1章 研究背景

## 1-1 VHH抗体

### 1-1-1 はじめに

ヒトコブラクダやラマ、アルパカなどのラクダ科動物には、天然に重鎖と軽鎖で構成されている通常のIgG抗体とは異なる特殊な構造の抗体が存在している。この特殊な抗体は、重鎖抗体(Heavy-chain antibody:HCAb)と呼ばれ、軽鎖とCHドメインが存在せず重鎖のみで構成される抗体である。この重鎖抗体の可変領域は、VHH抗体(Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody)やNanobody®と呼ばれており、天然起源のシングルドメイン抗体として利用可能である(図1-1)。実際に、ベルギーのAblynx社では抗体医薬の開発が進められており、2012年2月のNature BiotechnologyのNEWSによれば、現在、血栓症に対する抗vWF抗体(ALX-0081)、関節リウマチに対する抗TNF $\alpha$ 抗体(ATN-103)及び抗IL-6R抗体(ALX-0061)が第II相試験に進んでおり、世界の注目を集めている(1)。

### 1-1-2 様々なシングルドメイン抗体

シングルドメイン抗体は、1989年にE. Sally WardらがNatureで提唱した抗体であり、リゾチーム特異的なマウスIgGモノクローナル抗体をVHDメイン化した場合でも、20nMの高アフィニティーの結合活性を維持している事が証明されている(2)。しかしながら、通常のIgG抗体は、重鎖と軽鎖の可変部位を利用して抗原と結合するため、シングルドメイン化してしま



うと特異性や結合活性が低下してしまう可能性が考えられ、注意する必要がある。一方で1993年にラクダ科動物血清中で(3)、1995年にはコモリザメ血清中でも重鎖抗体が存在している事が報告された(4)(図1-2)。重鎖抗体は、重鎖の可変部位のみで抗原と結合しているため、シングルドメイン化した場合でも、抗体の性質には、ほとんど影響を受けないと予想される。ラクダ科動物血清中では、約50%~75%存在しているとの報告もあり(3)、重鎖抗体は血清中に稀に存在する抗体というわけではないため、ラクダ科動物の免疫系において重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、体液性免疫での重鎖抗体の役割は解明されていない(5,6)。このように、効率的にシングルドメイン抗体を作製するためには、重鎖抗体を天然に有する動物を利用する事が効率的であると考えられる。

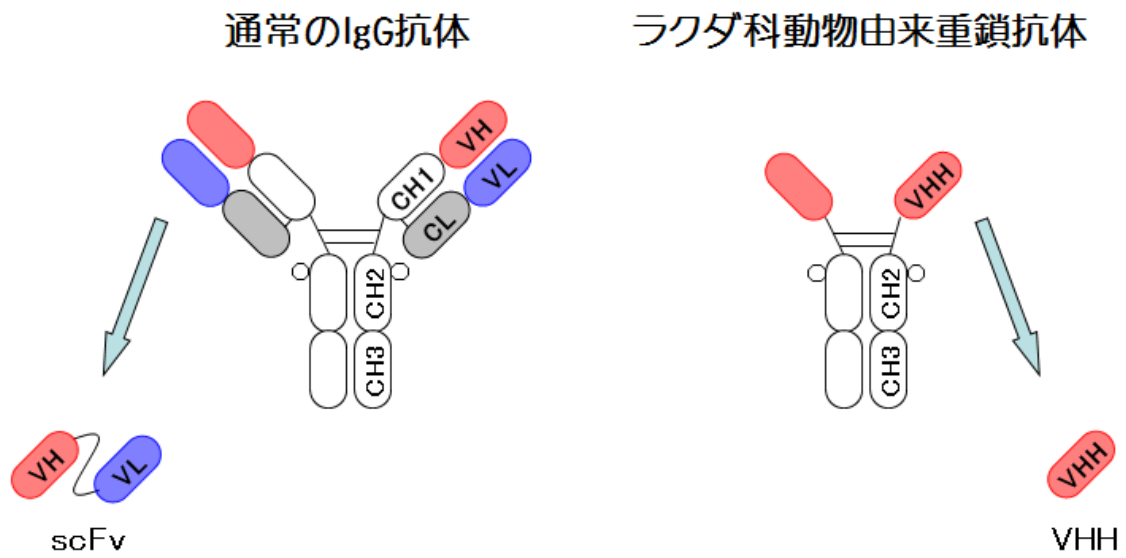


図1-1 一般的なIgG抗体とラクダ科動物由来重鎖抗体

ラクダ科動物は、重鎖と軽鎖から構成される一般的なIgGと、天然に軽鎖及びCH1ドメインが欠損している重鎖のみの重鎖抗体を有している。黒線はジスルフィド結合を、定常領域のCH2ドメインに示す六角形は糖鎖修飾部位を示している。

## サメ類由来

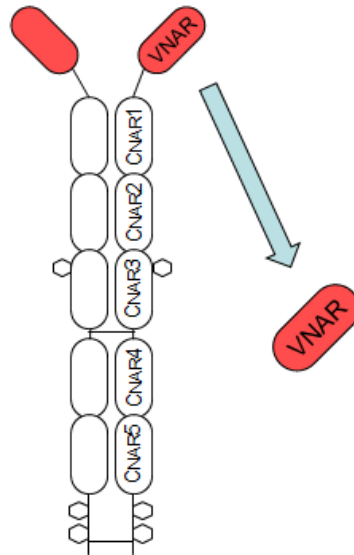


図1-2 サメ類由来重鎖抗体

サメ類由来の重鎖抗体は、5つのドメインで定常領域が構成されており、可変部は、Variable New Antigen Receptor (VNAR) と呼ばれている。黒線はジスルフィド結合を、定常領域のCH2ドメインに示す六角形は糖鎖修飾部位を示している。

### 1-1-3 アルパカ

現在、ラクダ科動物は全世界で6種類確認されている。南米に生息するラマ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコ、アジア・アフリカに生息するヒトコブラクダ、フタコブラクダである。このうちビクーニャとグアナコは野生種であり、その他の4種類は家畜種であるため、実験動物としてはこの4種類が使用されている。しかしながら、ヒトコブラクダ、フタコブラクダは、体長約2m、体重約500kgと非常に大型の動物であるため、比較的小型のラマやアルパカがVHH抗体の研究に多く利用されている。また、サメ類についても一般的に飼育が難しいと言われている。このような理由から、我々はアルパカを実験動物として選択した。

### 1-1-4 VHH抗体の優れた特徴

VHH抗体はシングルドメイン抗体であることで、さまざまな優れた特徴を有している。

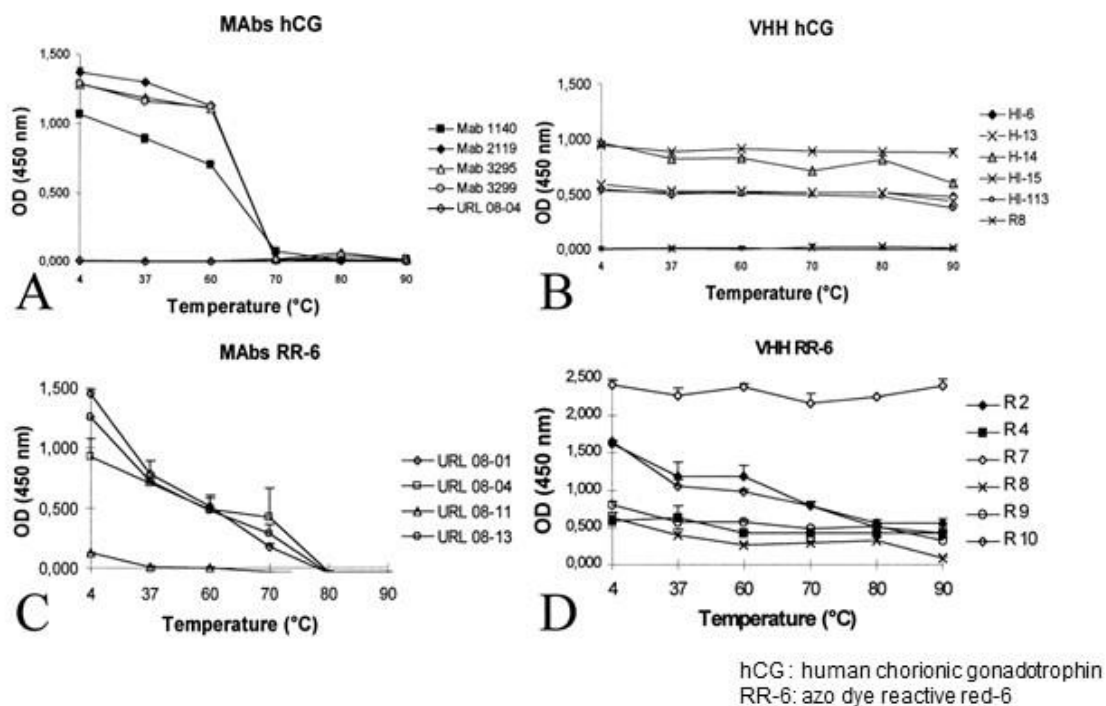
1つ目の特徴は、CDR3領域が通常のIgG抗体と比べ長いという点である。一般的なIgG抗体は、VHとVLの6箇所のCDR領域により抗原結合領域を形成する。しかし、重鎖抗体由来のVHH抗体の場合、3箇所のCDR領域で抗原と結合する必要がある。3箇所のCDR領域で抗体の多様性を確保するためにはCDR3領域の長さが重要となる。<sup>1)</sup>リゾチームに対するVHH抗体とマウスモノクローナル抗体のCDR3アミノ酸配列解析からもCDR3領域のアミノ酸残基数の違いが明らかである(7)。<sup>1)</sup>リゾチームに対するマウスモノクローナル抗体のCDR3領域のアミノ酸が7残基であったのに対し、VHH抗体は24残基と3倍以上も長い。CDR3領域の配列

の長短の違いは、リゾチームと抗体複合体の立体構造解析にも表れている(8)。VHH抗体が、長いCDR3によって凸面のパラトープを形成しており、リゾチームの凹面のエプトープへ結合しているのに対し、マウスモノクローナル抗体由来のFabフラグメントは平らなエプトープで結合している(9)。一般的に、基質結合部位は酵素表面の凹面に存在しているため、VHH抗体は凹面に結合しやすく中和抗体として機能する抗体の割合が、通常のIgG抗体に比べ高いと推測される。

2つ目の特徴は、生産の容易さである。分子量が約15kDaと低分子の抗体であるため、大腸菌や酵母のような微生物発現系で容易に発現させることが可能である(10)。通常のIgG抗体の可変領域をリンカーで繋いだ一本鎖抗体(Single chain variable fragment; scFv)やFabフラグメントも大腸菌や酵母で発現が可能であるが、VHH抗体はVHドメインとVLドメイン間の相互作用を形成する必要がないため、一般的に他のフラグメント抗体に比べ発現効率が良く、生産性が高いと考えられる。

3つ目の特徴は、立体構造の可逆性の高さである。VHH抗体は、様々な変性状態下(グアニジン塩酸塩、尿素などの変性剤溶液中、高温、高圧)から天然の構造へ巻き戻りやすい性質を備えている(11)。特に注目したいのが、熱安定性の高さである。VHH抗体は90℃という高温で熱処理した場合でも、室温に戻す事により熱処理前と同程度の抗原結合活性を示す(12)。一方、通常のIgG抗体は70℃以上で熱処理を行うと失活し、抗原結合活性が回復することはない(図1-3)。熱処理に対するVHH抗体の構造安定性の測定から、熱力学安定性については、VHH抗体も通常のIgG抗体と同程度であることが示されている(13,14)。つまり、VHH抗体の熱安定性は、熱により立体構造が壊れにくい性質というよりは、熱変性状態から天然状態へ戻りやすい性質によるものであろうと解釈できる。

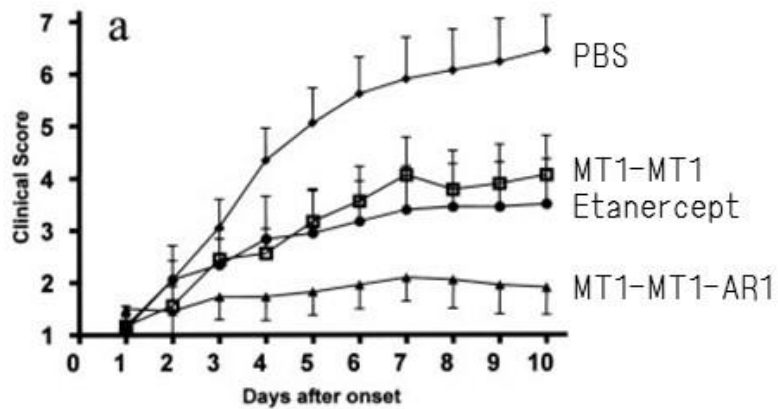
4つ目の特徴は、タンパク質工学的な抗体改変の容易さである。VHH抗体はシングルドメイン抗体であるため、他のタンパク質やペプチドと融合する事により容易に様々な用途に適した抗体へ改良する事が可能である。一例として、既存の創薬ターゲットであるTNF- $\alpha$  に対してVHH抗体の作製が試みられ、抗体エンジニアリングによってVHH抗体をタンデム化する事により現在使用されているバイオ医薬品に比べ良好な結果が示されている(図1-4) (15)。また、抗ウイルスVHH抗体を2個、3個とタンデム化することにより、ウイルス中和活性が上昇することも示され(図1-5) (16)、結合親和性についてもタンデム化により上昇することが報告されている(表1-1) (17)。近年、Antibody-drug conjugate (ADC) が注目されており、VHH抗体での応用も期待されている。



R.H.J van der Linden et al. Biochimica et Biophysica Acta. 1431 37 (1999)

図1-3 熱処理後のVHH抗体とマウスモノクローナル抗体の反応性比較

熱処理を行った後、室温へ戻し、ELISAにて抗原結合性を確認した。横軸は昇温温度を示し、縦軸は吸光度を示している。

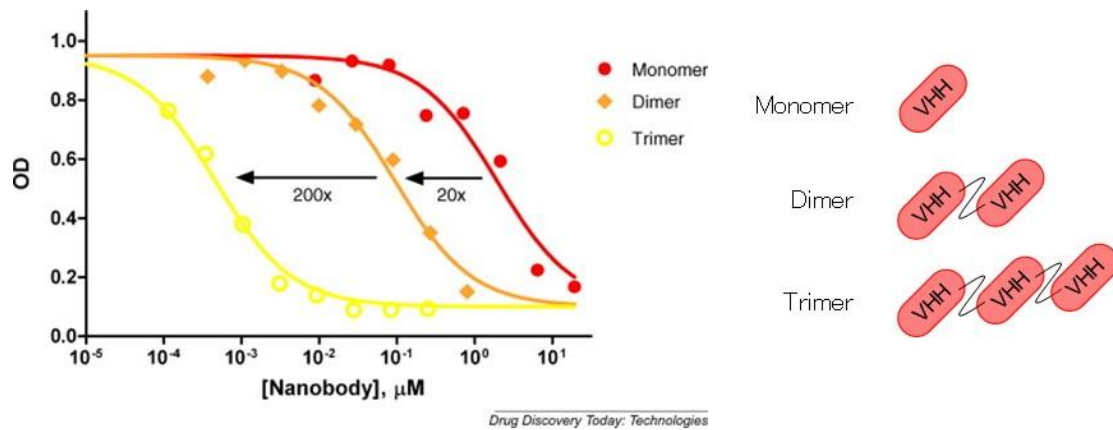


Coppieters K et al. Arthritis Rheum. 54 1856 (2006)

図1-4 コラーゲン誘導性関節炎マウスの臨床症状スコア

コラーゲンによって関節炎が誘導されるDAB/1マウスへ、抗TNF- $\alpha$  VHH抗体であるMT-1もしくはEtanercept (TNFR-IgG1 Fc) を100  $\mu$ g/day投与した際の臨床症状スコアについて検討した。横軸は発症後日数を示し、縦軸は臨床スコアを示している。





Joost A. Kolkman et al. Drug Discovery Today: Technologies. 7 139 (2010)

図1-5 抗ウイルスVHH抗体の中和活性

MonomerからTrimerへタンデム化することにより、IC<sub>50</sub>が、約4,000倍向上した。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は吸光度を示している。

表1-1 VHH抗体の結合親和性

Protein	Cuvette coupled with	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$
cAblys3	Lysozyme	52	0.0030	57
cAblys3-cAb $\beta$ LA01	Lysozyme	50	0.0027	54
cAb $\beta$ LA01-cAblys3	Lysozyme	12	0.0026	215
cAblys3-cAblys3	Lysozyme	60	0.0007	11
cAblys3-cAb $\beta$ LA01	$\beta$ -Lactamase	19	0.0005	26
cAb $\beta$ LA01-cAblys3	$\beta$ -Lactamase	27	0.0006	22
cAb $\beta$ LA01	$\beta$ -Lactamase	62	0.0016	26

Els Conrath Ket al. J Biol Chem. 276 7346 (2001)

同じVHH抗体をタンデム化することにより、結合親和性が約5倍向上した。

## 1-2 ファージディスプレイ法

ファージディスプレイ法とは、大腸菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ粒子表面に、タンパク質やペプチドを別の分子と相互作用できる形で提示させる方法である。また、提示された分子の遺伝子情報はファージ内のDNAに組み込まれているため、容易に提示分子の構造情報を入手できるという利点を有している。1991年にG. Winterらによって抗体の抗原結合領域のVHとVLをリンカーで結合させた一本鎖抗体やFabがファージ上への提示が可能であることが報告されて以来(図1-6)(18)、ファージディスプレイ法により作製された抗体ライブラリが、抗原特異的な抗体を試験管内で単離できる方法(19-22)として抗体医薬等の開発に広く利用されてきた。

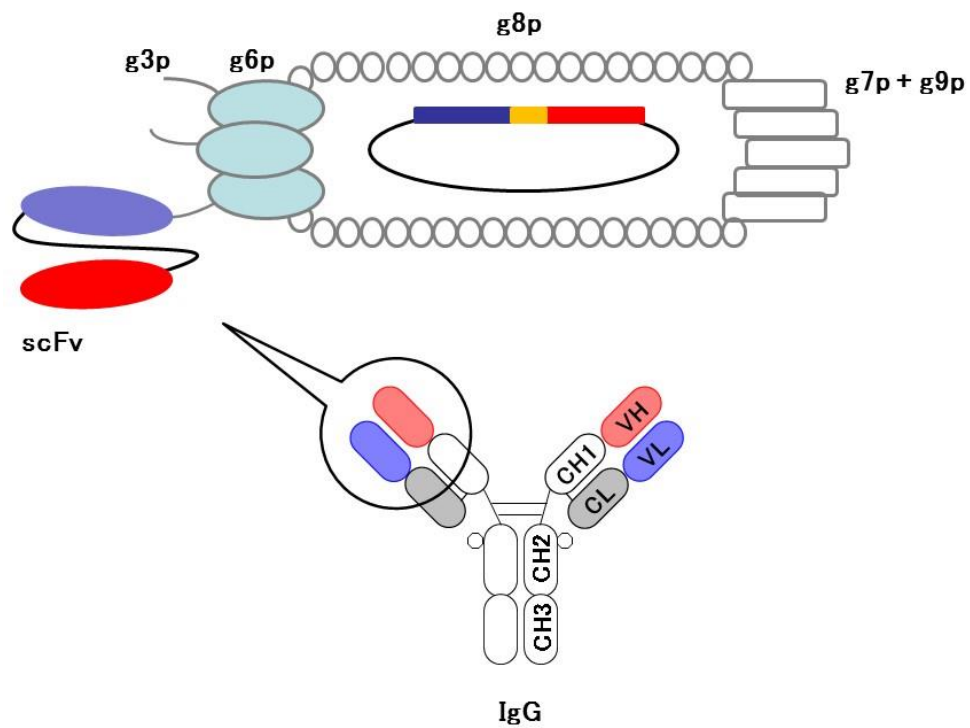


図1-6 抗体を提示する繊維状M13ファージ

繊維状M13ファージは5種類のコートタンパク質 (g3p、g6p、g8p、g7p、g9p) で構成されており、我々は、抗体遺伝子をg3pに提示する方法を利用している。

### 1-3 次世代シーケンサー

近年、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing、NGS) を利用し、サンプルの遺伝子配列を網羅的に解析することにより微生物の同定や抗原特異的な抗体やペプチドの単離が試みられている。

例えば、抗原を免疫後のマウスのVHとVLのCDR3配列をNGSにより網羅的に解析することにより、出現頻度が高い配列を持ったVHとVLの組み合わせの約7割が抗原特異的であることが報告されている(23)。また、ペプチドファージディスプレイにおいて、抗原に対してバイオパニング前後のペプチド配列をNGSにより網羅的に解析することにより、抗原特異的なペプチドが単離可能であることが示されており(24)、さらにファージディスプレイ法とNGSを用いて抗原特異的なヒト一本鎖抗体(scFv)が単離可能であることも示されている(25)。

## 第2章 アルパカナイーブライブラリ

## 2-1 目的

第1章で先述したようにアルパカVHH抗体は、非常に優れた特徴を有している。しかしながら、アルパカVHH抗体の単離法については深く研究されていない。そのため本研究では、効率的なVHH抗体の単離法の開発を目的として、まず免疫をしていないアルパカから取得した抹消血リンパ球を用いてナイーブライブラリを作製し、アルパカVHHナイーブファージライブラリの性状（VHH遺伝子導入率、提示率、発現率）の解析、さらにナイーブライブラリからモデル抗原特異的なVHH抗体の単離を試みた。ナイーブライブラリから、目的のVHH抗体の効率的な単離が可能であれば、最初に抗体ライブラリを大量に調製しておくことによって、さまざまな抗原特異的VHH抗体単離までの時間が大幅に短縮され、動物福祉の面からも非常に有用な方法となる。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 VHH特異的プライマー

VHH遺伝子を増幅するプライマーは、以前の報告(26)をもとに以下のように設計し、株式会社グライナージャパンにて合成した。

- KSB-297: AGKTGCAGCTCGTGGAGTCNNGGNGG
- KSB-331: AGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG
- KSB-300: CCCAAGACACCAAAAACCACAA
- KSB-338: TGCTCCTCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG
- KSB-344: ATGATGATGTGCACTAGTTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG

## 2-2-2 アルパカVHHナイーブファージライブラリの構築

免疫をしていない健康なアルパカ2頭から血液(100mL/頭)を採取し、Ficollを用いて密度勾配遠心法により抹消血リンパ球(PBMC)を分離し、RNAiso Plus (TAKARA BIO)を添加し、分離したPBMCをホモジナイズし、total RNA(tRNA)を回収した。回収したtRNAをSuperScript™ III (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。

合成したcDNAをテンプレートにして、VHH抗体特異的なプライマーであるKSB-297、331 (フォワードプライマー)とKSB-300 (リバースプライマー)を用いて、98℃ 10sec-58℃ 5sec-72℃ 15secを22サイクル行うという条件でアルパカVHH抗体遺伝子を増幅した。増幅したVHH抗体遺伝子をKSB-338 (*Sfi*I 制限酵素サイト付加)、KSB-344 (*Spe*I 制限酵素サイト付加)でPCR(98℃ 30sec-58℃ 30sec-72℃ 2minを15サイクル)を行うことによって制限酵素サイトを付加した。制限酵素サイトを付加したVHH抗体遺伝子断片とpTV118N (TAKARA BIO)を一部改変したファージミドベクターpKSTV03を制限酵素*Sfi*I・*Spe*Iでそれぞれの至適条件で処理した後、ゲル抽出し、T4DNA ligaseでライゲーション反応を16℃ overnightの条件で行った。ライゲーション産物を精製後、形質転換に用いた。形質転換の



宿主には、ファージの感染が可能な宿主 *E. coli* TG-1 cell (Lucigen) にエレクトロポレーション法によって導入した。形質転換産物の一部はタイターチェックに使用し、残りはプレート培養 (2TY-AG、37℃、10時間) し、ファージ感染に用いた。また、ファージ上へのVHHの提示効率と大腸菌での可溶性発現を確認するためにVHHの発現効率タイターチェック用のプレートを使用した。

プレート培養後の大腸菌TG-1の適量を2TY-AG (2TY medium、100  $\mu$ g/mL ampicillin、2% glucose) 500mLに植菌し培養 (37℃、1.5時間) 後、M13K07ヘルパーファージ (Invitrogen、m.o.i=10) を重感染後、培養した (37℃ 30min stand、37℃ 30min shake)。ヘルパーファージ感染後、大腸菌を遠心分離し、ヘルパーファージが感染した大腸菌沈渣を、2TY-AK (2TY medium、100  $\mu$ g/mL ampicillin、25  $\mu$ g/mL kanamycin) 500mLで懸濁し、37℃で16時間培養した。培養液を遠心分離し、上清に浮遊したファージ溶液を回収後、0.2volのPEG/NaClを加えて、4℃で4時間沈降反応を行った。その後、遠心分離し、ファージ沈渣をPBSで懸濁し、終濃度が40%になるように80%グリセロールを等量加えて、-80℃で保存した。

### 2-2-3 アルパカVHHファージクローンの単離

アルパカVHH抗体遺伝子が組み込まれた大腸菌TG-1を培養したプレートから、シングルコロニーを選択し、シングルコロニーを30℃で一晩培養し、2TY-AG (2TY medium、100  $\mu$ g/mL ampicillin、2% glucose) 1mLに植菌し培養 (37℃、1.5時間) 後、M13K07ヘルパーファージ (Invitrogen、m.o.i=5) を37℃ 30min stand、37℃ 30min shakeの条件で重感染させた。

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

#### 2-2-4 ELISA (ファージ上のVHH抗体提示確認)

96穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に anti-M13 抗体 (GE Healthcare) (50ng/50  $\mu$ L) を 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液中で室温で一晩固相化し、0.5% BSA/PBS を用いて室温で1時間ブロッキング処理を行った。0.05% PBST で3回洗浄後、ファージ溶液 (50  $\mu$ L) を加え、室温で1時間反応させた。0.05% PBST で5回洗浄後、HRP 標識された anti-His 抗体 (MBL) を室温で1時間反応させた。0.05% PBST で5回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine を含む基質溶液を用いた呈色反応により (反応停止は 1N HCl で行った)、VHH 抗体を提示しているファージクローンを検出した。検出には ELISA プレートリーダー (Bio Rad) を用いて、450nm の吸光度を測定して評価した。

#### 2-2-5 ELISA(ファージ特異性確認)

96穴マイクロタイタープレート(Nunc Thermo Fisher Scientific)に各種抗原(50ng/50  $\mu$ L)を0.1M NaHCO<sub>3</sub>溶液中で室温で一晩固相化し、0.5% BSA/PBSを用いて室温で1時間ブロッキング処理を行った。0.05% PBSTで3回洗浄した後、ファージ溶液(50  $\mu$ L)を加え、室温で1時間反応させた。0.05% PBSTで3回洗浄後、プレインキュベートした二次抗体(ビオチン化されたMouse anti-M13抗体(Abcam)及びSA-HRP(VECTOR LABORATORIES)を室温で1時間反応させた。0.05%PBSTで3回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidineを含む基質溶液を用いた呈色反応により(反応停止は1N HClで行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合しているVHH抗体ファージを検出した。検出にはELISAプレートリーダー(BIO Rad)を用いて、450nmの吸光度を測定して評価した。

#### 2-2-6 可溶性VHHの発現

ファージクローンを大腸菌HB2151に感染させ(37°C 30min stand)、SOBAG-Nプレート(SOB medium、100  $\mu$ g/ml ampicillin、2% glucose、100  $\mu$ g/ml nalidixic acid)に播種後、37°Cで12時間程度培養した。成育してきたシングルコロニーを2TY-AG 3mlの量で37°Cで一晩培養後、新しい培地(2TY-AG)3mlに1/10vol加え、37°CでOD<sub>600</sub>=0.6~0.8になるまで培養した。この大腸菌を遠心分離にて回収し、2TY-AI(2TY medium、100  $\mu$ g/ml ampicillin、1mM IPTG)で懸濁後、30°Cで10時間培養した。培養液を遠心分離にて上清と大腸菌に分離し、上

清を回収した (supernatant)。大腸菌を1mM EDTA/PBS 150  $\mu$ lで懸濁し、10分氷上で静置後、遠心分離を行い上清を回収した (periplasm)。沈渣をPBS 150  $\mu$ lで懸濁後、10分間煮沸後、遠心分離し上清を回収した (cytoplasm)。

#### 2-2-7 ドットブロット

メタノールで親水化したPVDFメンブレン上にサンプルを滴下後、5%skim milk/PBSで室温で2時間でブロッキング処理した。その後、ブレインキュベートした二次抗体 (ビオチン化されたMouse anti-His tag抗体+SA-HRP) を室温で1時間反応後、0.1% PBSTで3回洗浄し、Chemi-Lumi one (ナカライテスク) を加えた後、ChemiDoc XRS (Bio-Rad) を用いて測定した。

#### 2-2-8 バイオパンニング

96穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に、それぞれの抗原 (500ng/200  $\mu$ l) をPBS中で4℃で一晩固相化し、0.5% BSA/PBSもしくは5% skim milk /PBSで室温で2時間ブロッキング処理を行った。0.1% PBSTで3回洗浄した後、作製したナイーブライブラリを加え、室温で2時間反応させた。0.1% PBSTで5回洗浄を行い、非特異的結合のファージを除去後、0.1M glycine-HCl (pH2.2) を加え、固相化抗原に結合しているファージ集団を溶出した。溶出したファージを1M Tris-HCl (pH9.1) で中和後、大腸菌TG-1に

感染させ、M13K07ヘルパーファージを重感染させることでファージ集団を増幅した。増幅したファージ集団を次のラウンドに用いた。この行程を合計4ラウンド繰り返し行った。

## 2-3 結果

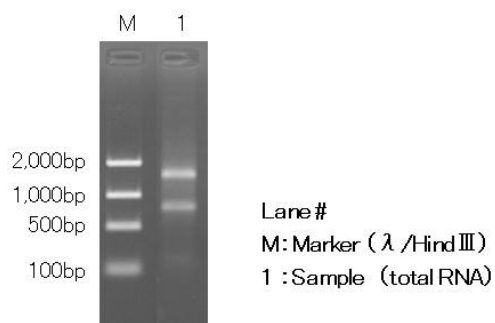
### 2-3-1 アルパカVHHナibrariesの構築

免疫を行っていない2頭のアルパカから100mlずつ採血を行い、抹消血リンパ球(約 $10^7$  cells)からtRNAを回収し、アガロース電気泳動により28Sサブユニットと18SサブユニットのリボソームRNAを確認した(図2-1、A)。回収したtRNAを用いてcDNAを合成し、合成したcDNAをテンプレートにVHH抗体特異的プライマー(KSB297、KSB331、KSB300)を用いてVHH抗体遺伝子を増幅するために1st PCRを行った(98℃ 10sec-58℃ 5sec-68℃ 15secを22サイクル)。電気泳動の結果から、400bp付近に単一バンドを確認し(図2-1、B)、VHH抗体遺伝子が間違いなく増幅していることが示唆された。続いて、制限酵素サイトを付加する2nd PCRを行った(98℃ 30sec-58℃ 30sec-72℃ 2minで15サイクル)。電気泳動の結果から、450bp付近に単一バンドが確認し(図2-1、C)、制限酵素サイトが付加されたことを確認した。

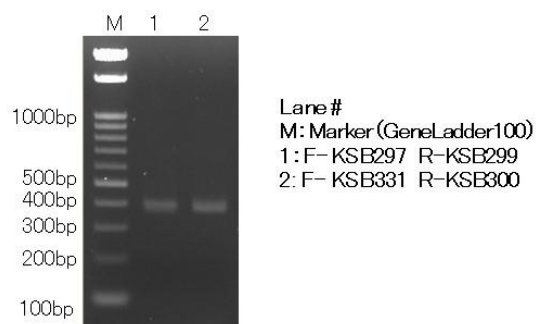
制限酵素サイトを付加したDNA断片とファージミドベクターを制限酵素 *Sfi*I、*Spe*I の至適条件にて制限酵素処理し、T4 DNAリガーゼにてDNA断片とファージミドベクターをライゲーションした。ライゲーションしたプラスミドを大腸菌TG-1にエレクトロポレーション法によっ

て形質転換させたところ、形質転換効率が $2.1 \times 10^9$ であった。形質転換後、M13K07ヘルパーファージを重感染させ、アルパカVHHナイーブライブラリを構築した。

A



B



C

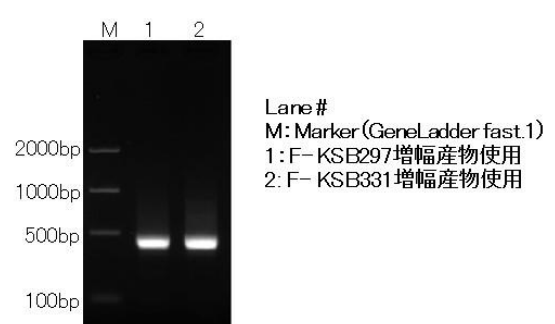


図2-1 VHH抗体遺伝子のPCRによる増幅

A. PBMCから抽出したtRNAの電気泳動像。B. Aで確認したtRNAから逆転写したcDNAを用いて1st PCRにより増幅したアルパカVHH抗体遺伝子の電気泳動像。C. Bで増幅したVHH抗体遺伝子に制限酵素付加を目的とした2nd PCR後の電気泳動像。

### 2-3-2 ベクターへのVHH遺伝子導入確認

構築したナイーブラライブラリの評価を目的として、VHH遺伝子を組み込んだTG-1から無作為に選択した64クローンのVHH特異的PCRを行った結果、61クローンでVHH特異的バンドを検出した。ベクターへの導入効率は95%であった(図2-2)。

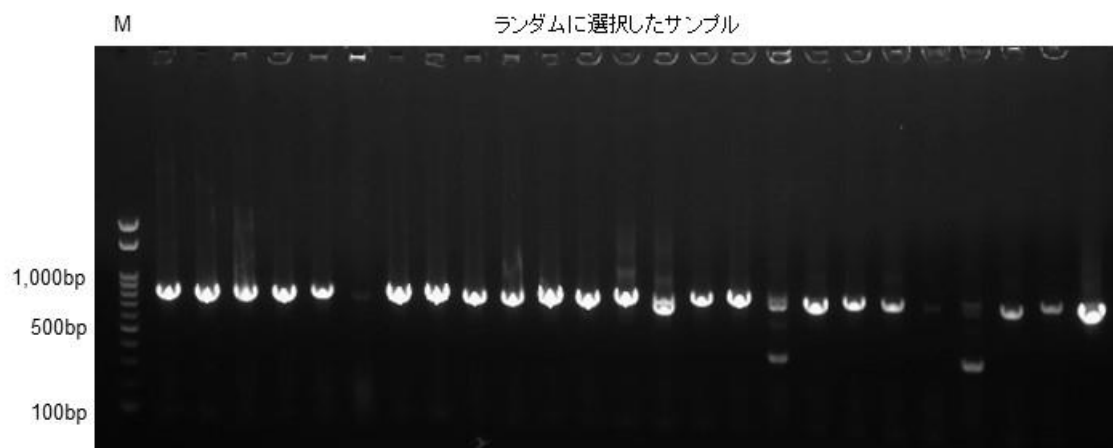


図2-2 コロニーPCRによりVHH抗体遺伝子の導入効率確認

800bp付近に単一バンドが認められたサンプルが、目的のVHH抗体遺伝子が組み込まれているクローンを示している。



### 2-3-3 ファージ上へのVHH抗体の提示効率

構築したナイーブラライブラリの性状を評価するために、まずVHH抗体がファージ上へ提示されているかどうかを確認した。マイクロプレート上に抗M13抗体を固相化し、ランダムに選択したファージクローンを反応させ、ファージクローン上へ提示されているVHH抗体のC末端に付加されているヒスチジンタグ (His tag) を利用して、抗His tag抗体により検出した結果、24クローン中23クローン (96%) でファージ上へのVHHの提示を確認した (図2-3)。

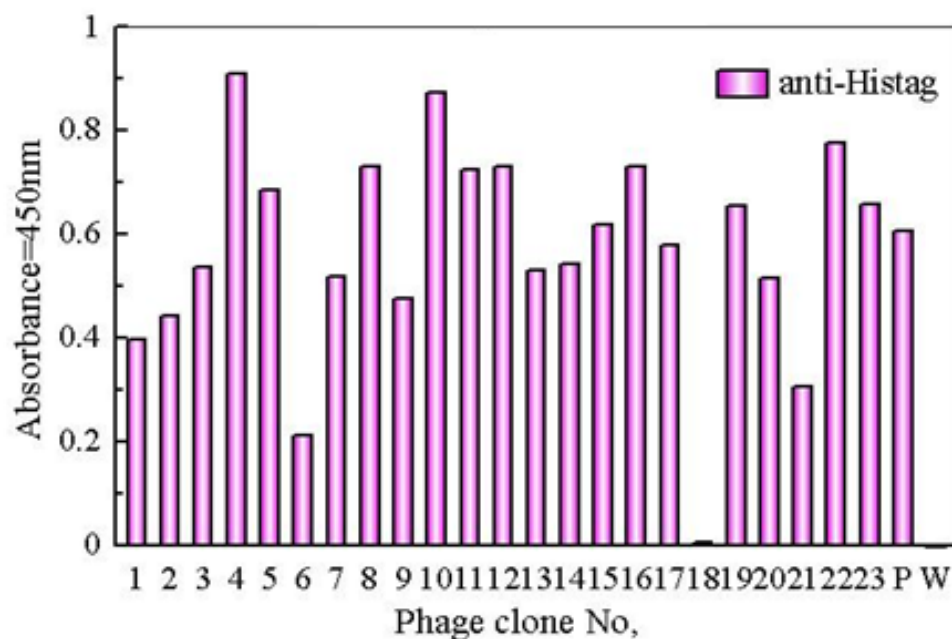


図2-3 ファージ上へのVHH抗体提示の確認

ファージ上に提示されているVHH抗体を、VHH抗体に付加されているHis tagを検出することにより確認した。

#### 2-3-4 大腸菌での可溶性タンパク質としての発現効率

ナイーブラライブラリのファージ上へのVHH抗体の提示率は、非常に高い効率であること  
を確認した。さらなる性状の検討として、ナイーブラライブラリからランダムに選択したVHH  
抗体クローンについて、VHH抗体単独を可溶性タンパク質として発現可能かどうかを評価する  
事を目的として、2-3-3と同様のクローンを用いて発現効率の評価を行った。選択したクロ  
ーンを大腸菌HB2151に感染させ、IPTGによる発現誘導を10時間行い、各画分 (supernatant:  
sup、periplasm: peri、cytoplasm: cyto) を回収してドットプロットを行い、可溶性VHH抗体の発  
現を検討した。その結果、23クローン中21クローン(91%)において3画分のうち、いずれか  
に発現していることを確認した(図2-4)。

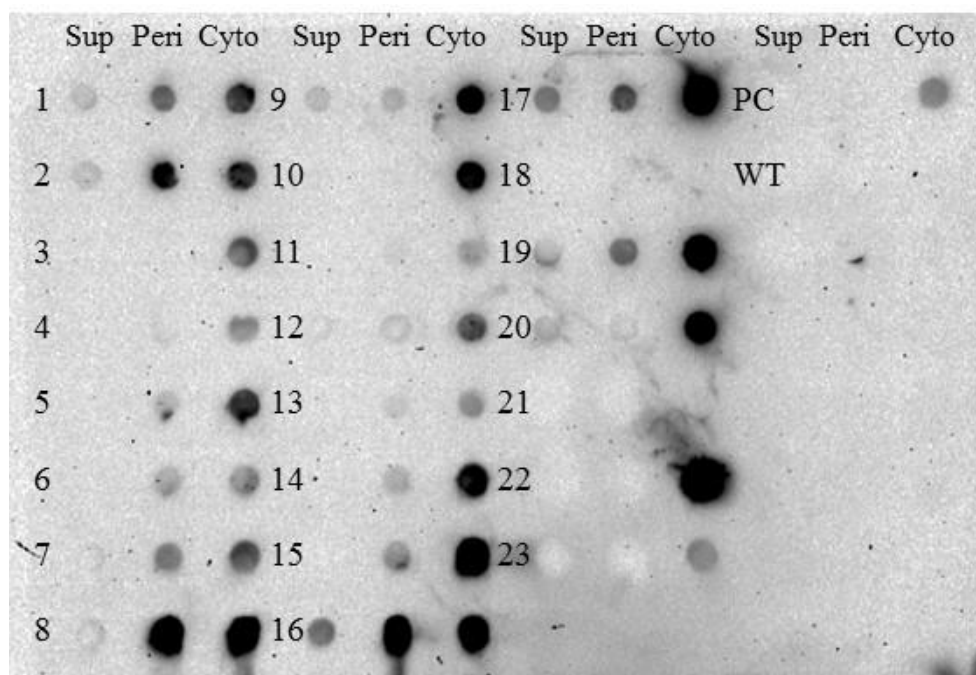


図2-4 VHH抗体発現の確認

sup: supernatant、peri: periplasm、cyto: cytoplasmの3画分を示しており、PC: positive control、WT: wild type M13 phageを示している。

## 2-3-5 NDOM特異的VHH抗体の単離

### 2-3-5-1 バイオパンニング

本研究では、モデル抗原としてマウス精子由来タンパク質 Izumo sperm-egg fusion protein1 N末端フラグメント(NDOM) (27)を用いてNDOM特異的ファージクローンを濃縮するためにバイオパンニングを行った(図2-5)。NDOMを固相化したマイクロタイタープレートに構築したアルパカVHHナイーブファージライブラリを反応させ、結合していないファージを洗浄することにより除去し、NDOM特異的に結合しているファージを酸で溶出し、大腸菌に感染させ、増殖させた。この行程を4ラウンド繰り返した結果、3ラウンド後からNDOMに対して特異的なファージ集団の濃縮を確認することができた(図2-6)。

3〜4ラウンドで抗原特異的ファージ集団の濃縮を確認できたため、3、4ラウンドのクローンから無作為に47クローンを選択し、NDOM、KLH、Izumo sperm-egg fusion protein2 N末端フラグメント(NyaFP2)、BSAの4種類の抗原に対してELISAにより反応性を検討し、NDOMに対して特異的に反応を示すクローンをスクリーニングした。結果としては47クローン中12クローンが、NDOMに対して特異的なクローンであった(図2-7)。

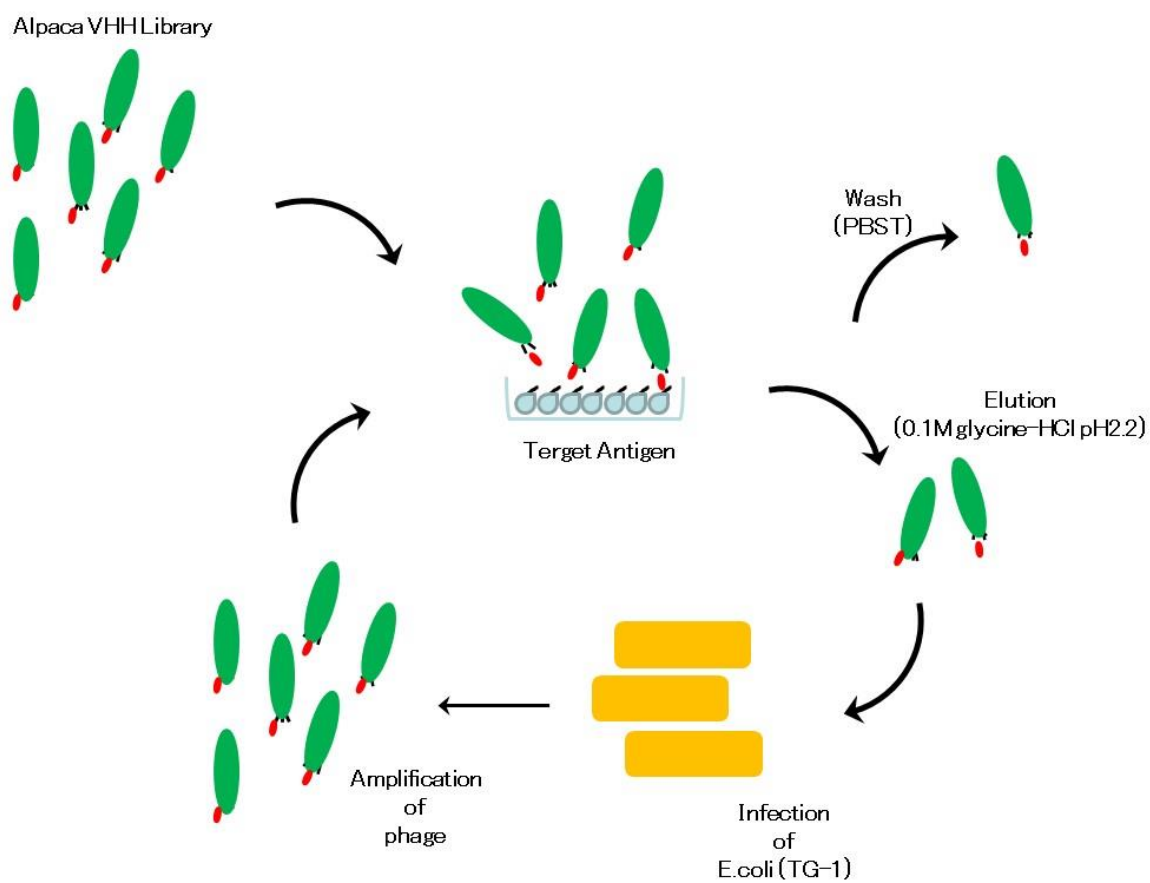


図2-5 バイオパンニング概略図

作製したファージライブラリを目的抗原を固相化したマイクロタイタープレートに反応させ、初めに未反応のファージを洗浄除去した。その後、目的抗原に結合しているファージを酸性の溶出バッファーを用いて溶出し、溶出したファージを大腸菌に感染させることにより増幅させた。この工程を1ラウンドとしてバイオパンニングを行った。

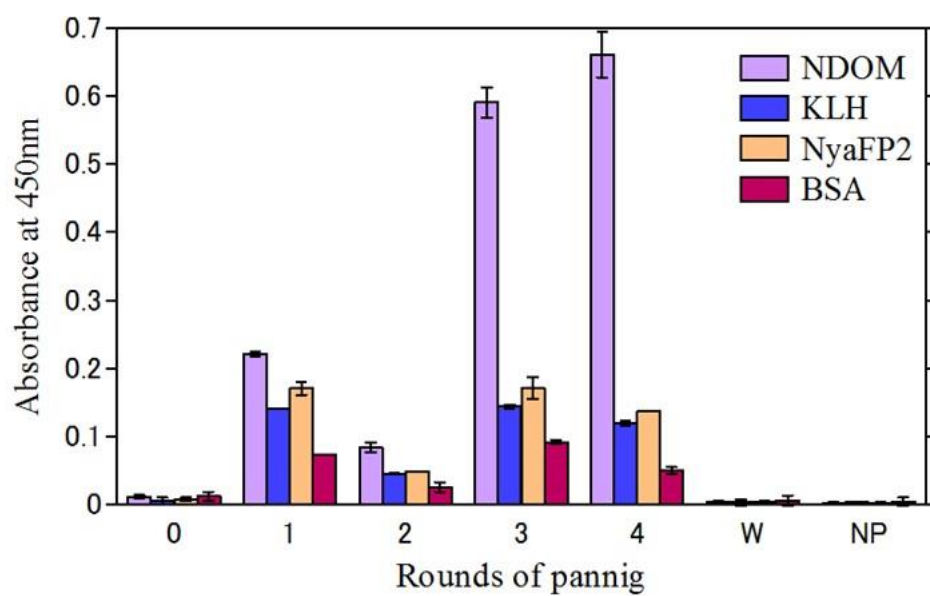


図2-6 ラウンド毎のライブラリの抗原特異性確認

3ラウンド後から、NDOM特異的ファージ集団の濃縮が確認された。W: wild type M13 phage、NP: no phageを示している。

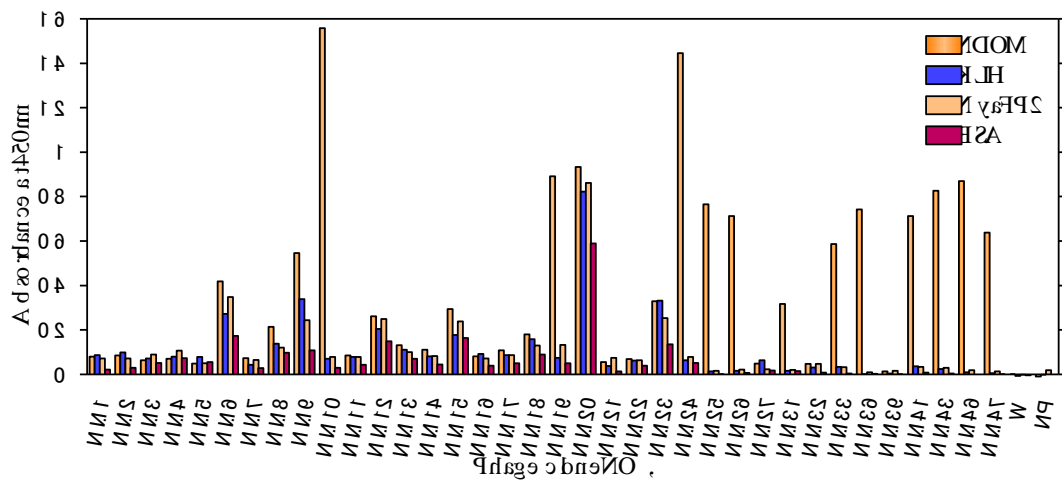


図2-7 3、4ラウンドから選択したクローンのスクリーニング

バイオパンニングによりNDOM特異的なファージ集団の濃縮が確認された3～4ラウンドから無作為に選択した47クローンの抗原特異性を示している。

W: wild type M13 phage、NP: no phageを示している。

#### 2-3-5-2 抗NDOM VHH抗体のアミノ酸配列解析

ELISAによりNDOMに対して抗原特異性が確認できた12種類のファージクローンについてアミノ酸配列解析を行った。その結果、抗原との結合に重要とされているCDR3領域や、フレームワーク領域の異なる5種類のVHH抗体に分類することができた(図2-8)。

VHH抗体は、FR2領域アミノ酸配列によってVHH型[37Phe (F, フェニルアラニン)/Tyr (Y, チロシン)、44Glu (E, グルタミン酸)、45Arg (R, アルギニン)、47Gly (G, グリシン)]とVH型[37Val (V, バリン)、44 Gly (G, グリシン)、45 Leu (L, ロイシン)、47 Trp (W, トリプトファン)]に分類される(28)。単離したNDOM特異的VHH抗体のFR2領域のアミノ酸配列は、NN46はVH型であり、NN10、NN24、NN33はVHH型であり、NN31については、完全にVHH型ではないがVHH型に近い配列であった。



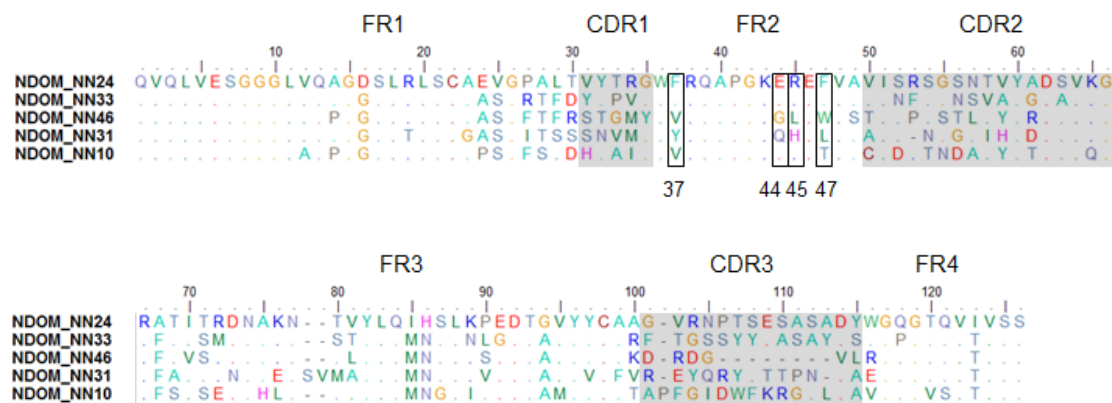


図2-8 NDOM特異的クローンのアミノ酸配列解析

NDOM特異的クローンのアミノ酸配列を解析した結果、5種類のクローンに集約された。フレームワーク領域 (FR) と相補鎖決定領域 (CDR) は、Kabatの分類により決定した (29)。

## 2-4 考察

本研究で作製を試みたアルパカVHH抗体ナイーブライブラリの性状を解析した結果、96%という高いVHH抗体のファージ提示率、91%という高いVHH抗体の可溶性タンパク発現効率を示し、ヒトやマウスのscFvライブラリと比較しても非常に良い性状を有していると考えられる。

良い性状を有していても目的抗原に対するVHH抗体が取得できなければアルパカVHH抗体ナイーブライブラリを産業応用することは難しいため、本研究ではモデル抗原(NDOM)に対して、抗原特異的VHH抗体の単離を試みた。その結果、バイオパンニングを3~4ラウンド繰り返す事により、抗原特異的なファージ集団の濃縮が確認され、抗原特異的な種類のVHH抗体を単離することができた。このことから、アルパカVHH抗体ナイーブライブラリを用いた抗原特異的なVHH抗体単離も問題ないことが示唆された。

今回取得できた抗原特異的VHH抗体のアミノ酸配列解析結果より、VHH抗体に特徴的な長いCDR3配列であるかを確認したところ、15アミノ酸と長い配列を有するクローンを確認することができたが、6アミノ酸と短い配列を有するクローンも存在していた。この理由としては、使用した抗原にも依存していると考えられるが、VHH抗体であるからといって全てがVHH抗体に特徴的な長いCDR3を有しているわけではないということが明らかとなった。このようにアルパカVHH抗体ナイーブライブラリは、非常に性状が良い結果が示された。しかしながら、NDOM特異的VHH抗体の大腸菌による可溶性発現を試みたところ、発現効率が悪く、単離したVHH抗体の更なる性状解析ができなかった。ナイーブライブラリにおいては、発現量を向上させることが重要な課題であると考えられる。発現量が低い原因の1つ

の可能性として、免疫をしていないナイーブライブラリから取得されたクローンであるため、完全に成熟したクローンではないことが考えられる。つまり、発現に関連する配列が最適化されていないクローンのため発現効率が低くなっていると推察される。

## 第3章 アルパカ免疫ライブラリ

### 3-1 目的

第2章の結果より、免疫を行っていないアルパカから作製したナイーブライブラリからモデル抗原特異的VHH抗体の単離が可能であった。しかしながら、免疫を行っていないため目的抗原特異的VHH抗体の濃縮のために、複数回のバイオパンニングを必要とし、また単離したVHH抗体の発現効率が悪くVHH抗体のさらなる性状解析ができなかった。そこで、さらなるVHH抗体の性状解析のため、実際にアルパカへ免疫を行い作製する免疫ライブラリの検討を試みた。モデル抗原のアルパカへの免疫、アルパカVHH免疫ライブラリの作製、モデル抗原に対する重鎖抗体の力価推移、バイオパンニング、モデル抗原特異的VHH抗体の単離、単離した抗原特異的VHH抗体の性状解析の研究を行った。

### 3-2 材料と方法

#### 3-2-1 VHH特異的プライマー

VHH遺伝子を増幅するプライマーは、ナイーブライブラリ作製時と同様に、以前の報告(26)をもとに下記のように設計し、株式会社グライナー・ジャパンにて合成した。

- KSB-297: AGKTGCAGCTCGTGGAGTCNNGGNGG
- KSB-331: AGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG
- KSB-300: CCCAAGACACCAAAAACCACAA
- KSB-338: TGCTCCTCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG
- KSB-344: ATGATGATGTGCACTAGTTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG

### 3-2-2 アルパカへの免疫

免疫抗原のNDOMは、2.6 mMの1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propyl carbodiimide中でおよそ1 : 26 (w / w)の割合でKLH (Sigma-Aldrich)と混合することにより、KLHコンジュゲート抗原を作製した。作製したコンジュゲート抗原は、約5週齢のアルパカへ、初回免疫は、3.3mgのNDOMをフロイント完全アジュバント(FCA)で乳化し、頸背部の皮下へ免疫した。その後、14日目および28日目に3.3mgのNDOMをフロイント不完全アジュバント(FIA)で乳化し、追加免疫を行った。抗原への抗体価を確認するために、適宜採血を行い、血漿サンプルを取得した。

48日目に採取した血液(50ml)を抗凝固剤として(終濃度0.1%のEDTA)で処理し、Leucosep(Greiner Bio-One)を用いてFicoll密度勾配遠心により末梢血単核細胞(PBMC)を分離した。PBMCの回収量は、 $5 \times 10^7$ 個であり、回収後RNAiso Plus(タカラバイオ)でホモジナイズし、使用するまで-80℃で保存した。

### 3-2-3 重鎖抗体の精製

IgG2 (ヒンジ領域が短い重鎖抗体)とIgG3 (ヒンジ領域が長い重鎖抗体)の2種類の重鎖抗体は、Protein G精製とProtein A精製を組み合わせることで精製を行った。48日目に採取した血漿をPBSで2倍希釈し、まずProtein G Sepharose column (GE Healthcare)を用いてIgG3とIgG1の精製を行った。血漿サンプルを添加したカラムを洗浄後、0.15 M NaCl / 0.58% acetic acid (pH 3.5)の溶出バッファーを用いてIgG3を溶出し、続いて0.1 M glycine-HCl (pH 2.7)の溶出バッファーを用いてIgG1を溶出した。続いて、Protein G精製で生じた素通り画分をProtein A Sepharose column (GE Healthcare)を用いてIgG2を精製した。素通り画分を添加したカラムを洗浄後、0.15 M NaCl / 0.58% 酢酸 (pH 4.5)の溶出バッファーを用いてIgG2を溶出した。全ての溶出画分は1M Tris-HCl (pH 9.1)により中和した。抗体濃度については、BCAアッセイ (Thermo Fisher Scientific)により決定した。

### 3-2-4 ELISA (重鎖抗体)

96穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific)に各種抗原 (500ng/100  $\mu$ L)をPBS溶液中で室温で一晩固相化し、0.5% gelatin/PBSTで室温で1時間ブロッキングを行った。0.05% PBSTで3回洗浄した後、段階希釈したアルパカ血漿サンプル (100  $\mu$ L)を加え、室温で1時間反応させた。0.05% PBSTで3回洗浄後、ウサギ抗アルパカIgG抗体を室温で1時間反応させた。0.05% PBSTで3回洗浄後、ウサギ抗アルパカIgG抗体を検出するた

めにHRP標識したヤギ抗ウサギIgG抗体 (Bio-Rad) を室温で1時間反応させた。0.05%PBSTで3回洗浄後、o-フェニレンジアミンを含む基質溶液を用いた呈色反応により(反応停止は2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で行った)、ウェル上の抗原タンパク質に結合しているアルパカ抗体を検出した。検出にはELISAプレートリーダーを用いて、490nmの吸光度を測定し、評価した。

### 3-2-5 VHHファージライブラリの構築

NDOMを免疫したアルパカ1頭から抗凝固剤(終濃度0.1% EDTA)を用いて血液(50mL/頭)を採取し、Ficollを用いて密度勾配遠心により末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、RNAiso Plus (TAKARA BIO)を添加し、細胞をホモジナイズし、total RNAを回収した。回収したRNAをSuperScript<sup>TM</sup> III (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行いcDNAを合成した。

合成したcDNAをテンプレートにして、VHH特異的なプライマーであるKSB-297、331(フォワードプライマー)とKSB-300(リバースプライマー)を用いて、98℃ 10sec-58℃ 5sec-72℃ 15secを22サイクル行うという条件でVHH遺伝子を増幅した。増幅したVHH遺伝子をKSB-338(*Sfi*I 制限酵素サイト付加)、KSB-344(*Spe*I 制限酵素サイト付加)でPCR(98℃ 30sec-58℃ 30sec-72℃ 2minを15サイクル)することによって制限酵素サイトを付加した。制限酵素サイトを付加したVHH遺伝子断片とpTV118N(TAKARA BIO)一部改変したファージミドベクターpKSTV03を制限酵素*Sfi*I・*Spe*Iでそれぞれの至適条件で処理した後、ゲル抽出し、T4DNA ligaseでライゲーション反応を16℃ overnightで行った。ライゲーション産物を精製後、形質転換に用いた。形質転換の宿主には、ファージの感染が可能な*E. coli*



TG-1 cell (Lucigen Co) にエレクトロポレーション法によって導入した。形質転換産物の一部はタイターチェックに使用し、残りはプレート培養 (2TY-AG、37℃、10時間) し、ファージ感染に用いた。また、ファージ上へのVHHの提示効率を確認するためにVHHの発現効率タイターチェック用のプレートを用い、ランダムにクローンを選択した。

プレート培養後の大腸菌TG-1の適量を2TY-AG (2TY medium、100  $\mu$ g/mL ampicillin、2% glucose) 500mLに植菌し培養 (37℃、1.5時間) 後、M13K07ヘルパーファージ (Invitrogen、m.o.i=10) を重感染後、培養した (37℃ 30min stand、37℃ 30min shake)。ヘルパーファージ感染後、大腸菌を遠心分離し、ヘルパーファージが感染した大腸菌沈渣を、2TY-AK (2TY medium、100  $\mu$ g/mL ampicillin、25  $\mu$ g/mL kanamycin) 500mLで懸濁し、37℃で16時間培養した。培養液を遠心分離し、上清に浮遊したファージ溶液を回収後、0.2volのPEG/NaClを加えて、4℃で4時間沈降反応を行った。その後、遠心分離し、ファージ沈渣をPBSで懸濁し、終濃度が20%になるように80%グリセロールを加えて、ファージライブラリとして-80℃で保存した。

### 3-2-6 アルパカVHHファージクローンの単離

VHHのDNAが組み込まれた大腸菌TG-1が培養されたプレートから、シングルコロニーを選択し、シングルコロニーを30℃で一晩培養し、2TY-AG (2TY medium、100  $\mu$ g/mL ampicillin、2% glucose) 3mLに植菌し培養 (37℃、1.5時間) 後、M13K07ヘルパーファージ (Invitrogen、m.o.i=5) を37℃ 30min stand、37℃ 30min shakeの条件で重感染させた。ヘルパーファージ

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

### 3-2-7 ELISA (VHHファージ、VHH)

96穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に各種抗原 (50ng/50  $\mu$ L) を0.1M NaHCO<sub>3</sub>溶液中で室温で一晩固相化し、0.5% BSA/PBSで室温で1時間ブロッキングを行った。0.05% PBSTで3回洗浄した後、ファージ溶液 (50  $\mu$ L) もしくはVHH溶液 (100ng /50  $\mu$ L) を加え、室温で1時間反応させた。0.05% PBSTで3回洗浄後、ファージを検出するELISA系では、ブレインキュベートした二次抗体 (ビオチン化 Mouse anti-M13抗体 (Abcam) + SA-HRP (VECTOR LABORATORIES) を室温で1時間反応させた。VHHを検出するELISA系では Mouse anti-His tag抗体 (GE Healthcare) を室温で1時間反応後、Mouse anti-His tag抗体を検出するためにHRP標識したウサギ抗マウスIgG抗体を室温で1時間反応させた。0.05%PBSTで3回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (反応停止は1N HClで行った) もしくはo-フェニレンジアミン (反応停止は2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で行った) を含む基質溶液を用いた呈色反応により、ウェル上の抗原タンパク質に結合しているVHH抗体ファージもしくはVHH抗体を検出した。検出にはELISAプレートリーダーを用いて、450nmもしくは490nmの吸

光度を測定して評価した。

### 3-2-8 バイオパンニング

96穴マイクロタイタープレート(Nunc Thermo Fisher Scientific)に、それぞれの抗原(500ng/200  $\mu$ l)を0.1M NaHCO<sub>3</sub>溶液中で4℃で一晩固相化した。0.05% PBSTで3回洗浄した後、作製したファージライブラリを加え、室温で1.5時間反応させた。0.05% PBSTで5回洗浄を行い、非特異的結合のファージを除去した後、0.1M glycine-HCl(pH2.2)を加え、抗原特異的なファージを溶出した。溶出したファージを1M Tris-HCl(pH9.1)で中和後、大腸菌TG-1に感染させ、M13K07ヘルパーファージを重感染させることでファージ集団を増幅した。

### 3-2-9 可溶性VHHの発現(ペリプラスム画分)

VHH抗体を提示しているファージを感染させることによりVHH抗体のDNAが組み込んだ大腸菌HB2151を10mlの2TY-AGで37℃で一晩培養し、新しい培地(2TY-AG)500mlに1/10vol加え、37℃でOD600=0.6~0.8になるまで培養した。この大腸菌を遠心分離にて回収し、2TY-AI(2TY medium、100  $\mu$ g/ml ampicillin、1mM IPTG)で懸濁後、30℃で10時間培養した。培養液を遠心分離にて上清と大腸菌に分離し、大腸菌にTES buffer(0.2M Tris-base、0.5mM

EDTA、0.5M sucrose) 10mlにて懸濁後、氷上で2時間静置した。1/4 TES bufferを20ml加え再懸濁し氷上で1時間静置。遠心分離を行い上清を回収した(periplasm)。上清をニッケルカラム(His trap、GE Healthcare)を用いて可溶性VHHを精製した。

### 3-2-10 可溶性VHHの発現(封入体)

大腸菌での発現のために最適化されたコドンを有するVHH抗体遺伝子を発現ベクターpAED4に組み込んだ。大腸菌BL21(DE3)pLysSを37℃で培養し、発現ベクターを形質転換し、0.15mM IPTGで一晩もしくは2時間で発現誘導した。VHHタンパク質は、1.6 Lの培養液から遠心分離によって封入体として回収し、沈渣を3mlの10mM Tris-HCl(pH8.5)中に懸濁し、3gのグアニジン塩酸塩を添加することにより可溶化した。6M尿素へ透析後、サンプルをHiTrap Chelating HP columns (GE Healthcare)で精製した。48時間室温で空気酸化した後、試料をリフォールディングのためにHBS/バッファー(150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween-20を含有した10mM Hepes/バッファー、pH7.2)中で20倍に希釈し、使用するまで4℃で保存した。

### 3-2-11 表面プラズモン共鳴解析

VHH抗体は、アミンカップリングによりCM-5センサーチップ(GE Healthcare)上に固定化

した。SPR測定は、Biacore2000 (GE Healthcare) を用いてHBS緩衝液中で25℃で行った。センサーチップは、0.5M NaCl /10mM グリシン-HCl (pH2.0) で溶出することにより再生した。センサーグラムは、平衡解離定数(KD)を決定するためにBIA evaluation software (GE Healthcare) を用いて分析した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 免疫抗原 (NDOM) のコンジュゲート確認

免疫抗原 (NDOM) とキャリアタンパク質 (KLH) をカルボジイミドカップリング法でコンジュゲートした後、コンジュゲートの確認のため、サンドイッチELISAで確認した。コンジュゲートした免疫抗原について、固相化抗原にKLHと反応するanti- KLH抗体、検出抗体にNDOMのFlag tagを検出するためのanti- Flag tag抗体を用いてサンドイッチELISAを行った。その結果、KLHとコンジュゲートしたNDOMのみ反応性を示し、コンジュゲートされていることが確認できた (図3-1)。

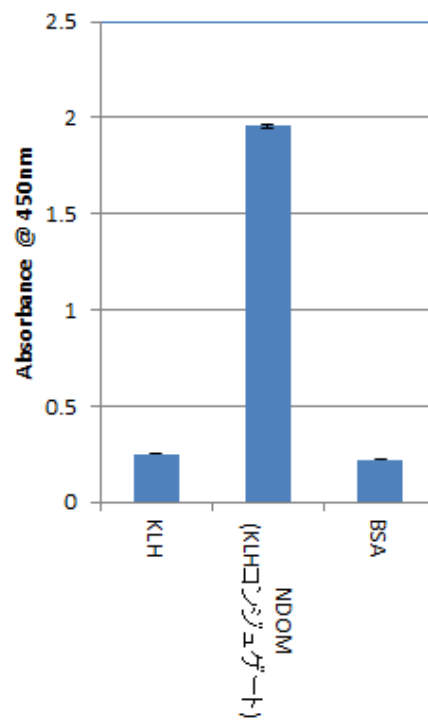


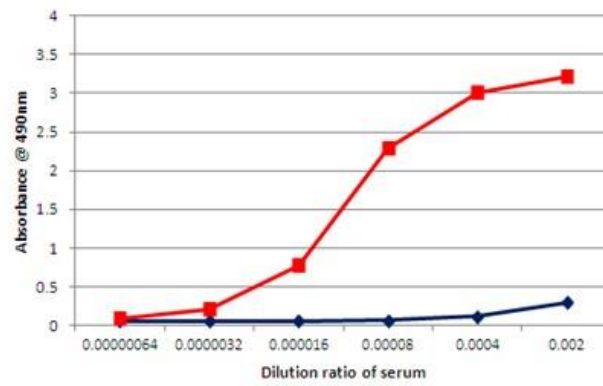
図3-1 NDOMのコンジュゲート確認

NDOMとKLHのコンジュゲート確認のため、抗KLH抗体とNDOMに付加されているFlag tagを検出するための抗Flag tag抗体を用いてサンドイッチELISAによりコンジュゲートを確認した。

### 3-3-1 アルパカ血漿力価

コントロールとして免疫前の血漿と3回目免疫後の血漿サンプルについて、ELISAにより免疫抗原であるNDOMおよび、キャリアタンパク質であるKLHに対する抗体力価を検討した。その結果、目的抗原であるNDOMに対する抗体力価の上昇を確認し、キャリアタンパク質であるKLHに対しても抗体力価の上昇を確認した。(図3-2)。しかしながら、血漿の抗体力価には通常のIgG抗体と重鎖抗体が含まれているため、血漿サンプルの結果から重鎖抗体の抗体力価が上昇しているかどうかは判断できない。VHH抗体は重鎖抗体の結合ドメインであるため、重鎖抗体の力価を確認することが重要である。そのため、血漿サンプルから重鎖抗体を分離精製し、重鎖抗体力価の検討を行った。

A



B

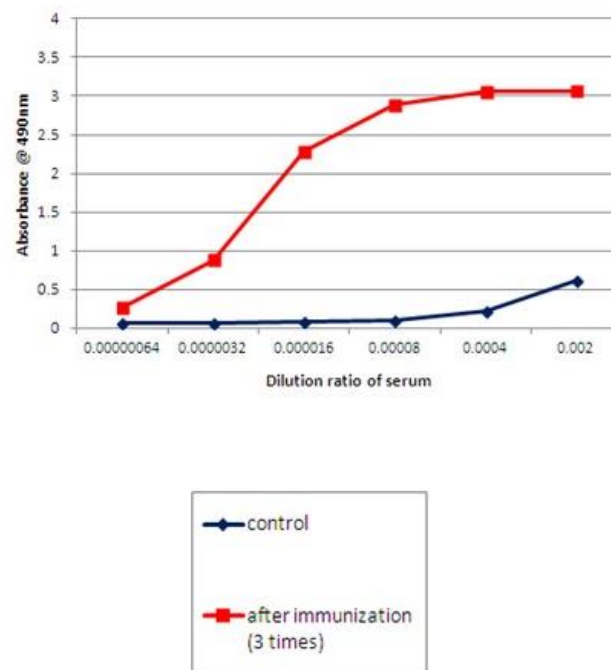


図3-2 アルパカ血漿ELISA

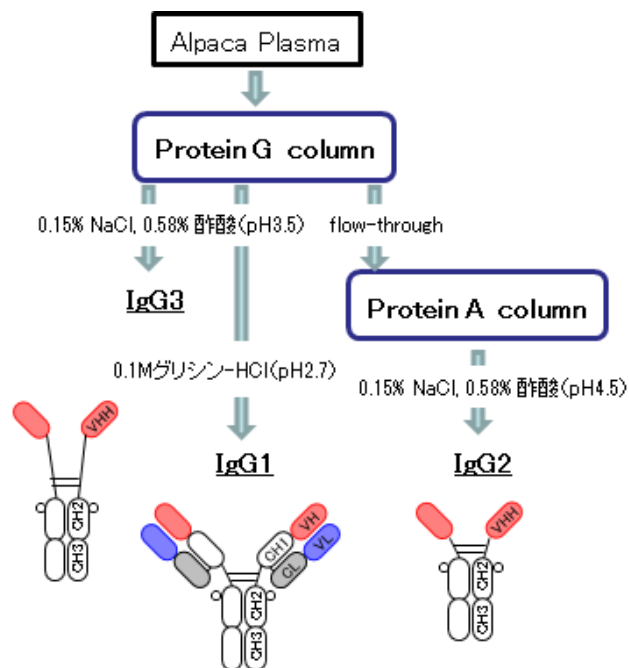
A. 免疫抗原であるNDOMに対する血漿力価。B. キャリアタンパク質であるKLHに対する血漿力価。コントロールは、免疫前の血漿サンプルを示している。



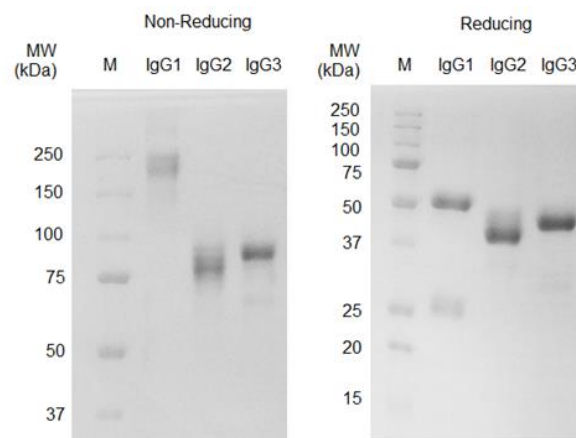
### 3-3-2 アルパカ重鎖抗体の精製

3-3-1で血漿サンプルのNDOMに対する抗体力価の上昇を確認した。しかしながら、VHH抗体は、重鎖抗体の結合ドメインであるため、通常のIgG抗体と重鎖抗体がどちらも含まれている血漿サンプルを用いた力価測定だけでは不十分である。そのため、血漿サンプルより重鎖抗体を分離精製し、重鎖抗体のみの抗体力価を測定する必要がある。そこで、Protein GおよびProtein A アフィニティーカラムを使用し、pHの異なる溶出バッファーを使用することにより血漿サンプルから重鎖抗体の分離精製を行い(図3-3、A)、SDS-PAGEにより精製後のサンプルの泳動像を検討することにより、重鎖抗体の精製を確認した(図3-3、B)。

A



B



M: Marker ( Precision Plus Protein Standard )

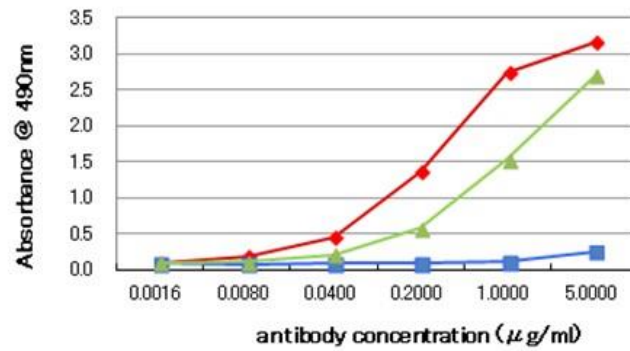
図3-3 重鎖抗体精製

A. 重鎖抗体精製概要。B. SDS-PAGE。非還元サンプル (Non-Reducing、左図) は、8%のポリアクリルアミドゲル、還元サンプル (Reducing、右図) は、10%のポリアクリルアミドゲルを使用した。

### 3-3-3 アルパカ重鎖抗体の抗体力価

3-3-2において重鎖抗体の精製が確認できた。そのため、精製した重鎖抗体のNDOMに対する抗体力価をELISAにより検討した。その結果、IgG1(通常のIgG抗体)及びIgG3(ヒンジ領域が長い重鎖抗体)において目的抗原であるNDOMに対する抗体力価が上昇していることが確認された(図3-4)。また、キャリアタンパク質であるKLHについてもIgG1及びIgG3の抗体力価が優位に上昇していることを確認した。本結果より、免疫ライブラリに使用する遺伝子サンプルは、IgG3由来VHH抗体遺伝子サンプルを使用し作製することとした。

A



B

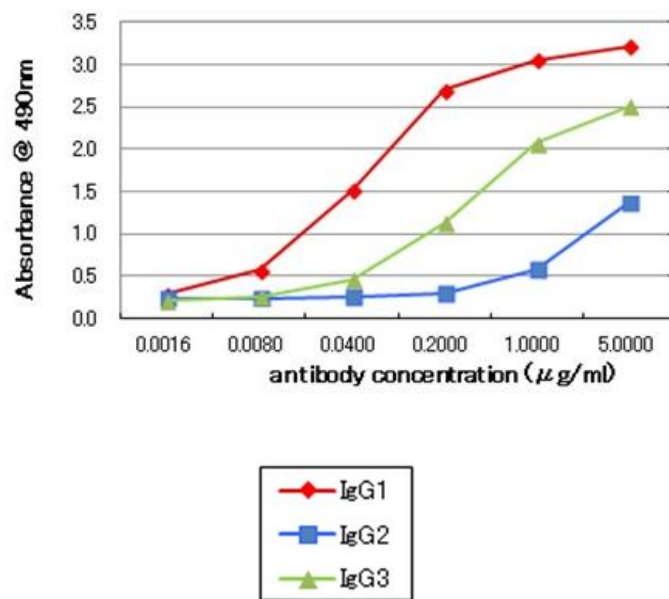


図3-4 精製抗体(IgG1~IgG3)の抗体力価

A. 目的抗原であるNDOMに対する重鎖抗体力価。B. キャリアタンパク質であるKLHに対する重鎖抗体力価。IgG1は、通常のIgG抗体、IgG2は、ヒンジ領域が短い重鎖抗体、IgG3は、ヒンジ領域が長い重鎖抗体を示している。

#### 3-3-4 VHH免疫ライブラリの構築

免疫した1頭のアルパカから抗凝固剤として(終濃度0.1%のEDTA)を用いて50ml採血を行い、リンパ球(約 $10^7$  cell)からtotal RNAを回収し、アガロース電気泳動により28Sサブユニットと18SサブユニットのリボソームRNAを確認した(図3-5、A)。回収したtotal RNAを使用し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。このcDNAをテンプレートにIgG2もしくはIgG3由来のVHH遺伝子の増幅を確認した結果、IgG3のVHH遺伝子のみ増幅を確認した(図3-5、B)。IgG3由来VHH抗体遺伝子を増幅するために、VHH特異的プライマー(KSB297、KSB331、KSB300)を用いて1st PCRを行った(98℃ 10sec-58℃ 5sec-68℃ 15secを22サイクル)。アガロースゲル電気泳動の結果から、400bp付近に単一バンドを確認した(図3-5、C)ことから、VHH遺伝子の増幅を確認した。続いて、制限酵素サイトを付加する2nd PCRを行った(98℃ 30sec-58℃ 30sec-72℃ 2minを15サイクル)。アガロースゲル電気泳動の結果、450bp付近に単一バンドが得られ(図3-5、D)、この結果より制限酵素サイトが付加されたことを確認した。

制限酵素サイトを付加したVHH抗体DNA断片とファージミドベクターを制限酵素 *Sfi* I、*Spe* I の至適条件にて消化し、T4 DNAリガーゼにてVHH抗体DNA断片とファージミドベクターをライゲーションした。ライゲーションしたプラスミドを大腸菌TG-1にエレクトロポレーション法によって形質転換したところ、形質転換効率が $8.3 \times 10^7$ であった。形質転換後、M13K07ヘルパーファージを重感染させ、VHH免疫ライブラリを構築した。

構築した免疫ライブラリのVHH抗体のファージ提示率を確認するために、ランダムに20クローンを単離し、VHH抗体が持っているHis tagとmyc tagを検出することで、ファージ上へ

VHH抗体が提示されているかを確認した(図3-6)。その結果、20クローン中19クローン(95.0%)という高い確率でVHH抗体の提示を確認した。

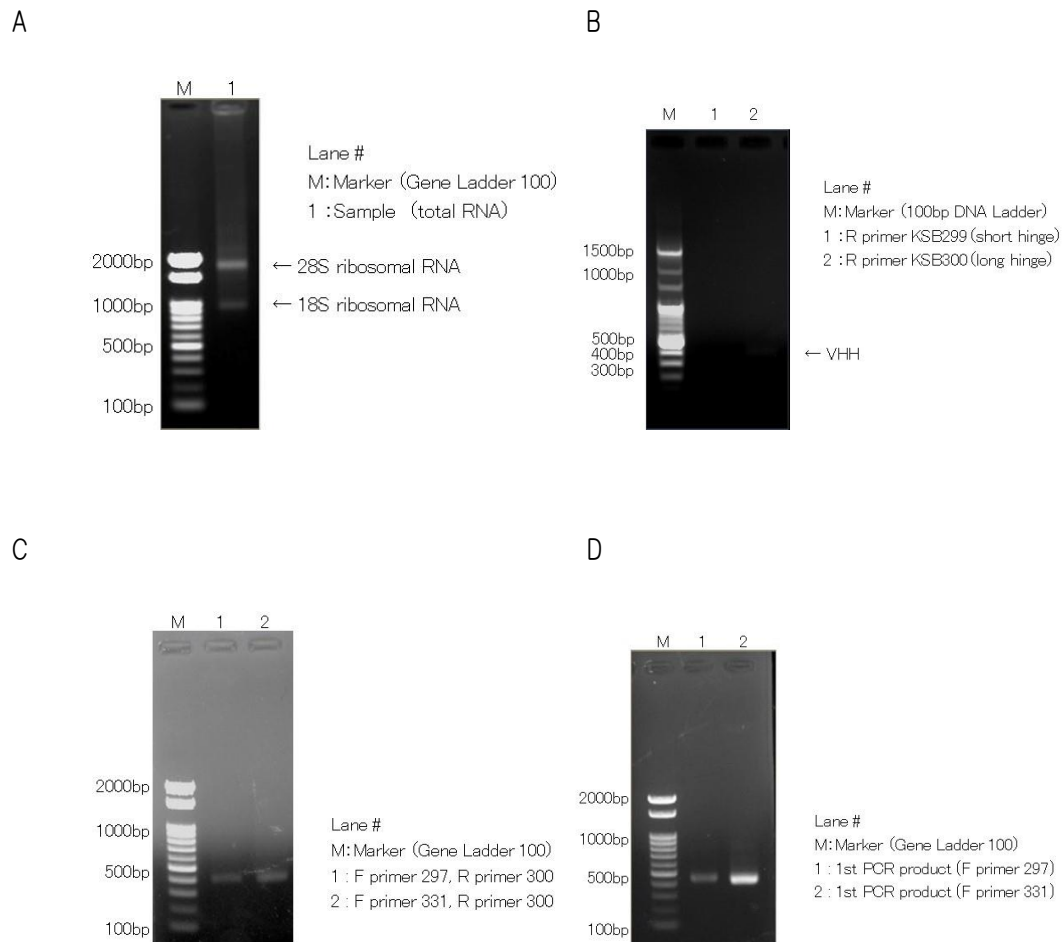


図3-5 VHH遺伝子調製

A. PBMCから抽出したtRNAの電気泳動像。B. Aで確認したtRNAから逆転写したcDNAを用いてIgG2もしくはIgG3由来のVHH遺伝子増幅確認PCR後の電気泳動像。C. Aで確認したtRNAから逆転写したcDNAを用いて1st PCRにより増幅したIgG3由来のVHH遺伝子の電気泳動像。D. Cで増幅したIgG3由来のVHH抗体遺伝子に制限酵素付加を目的とした2nd PCR後の電気泳動像。

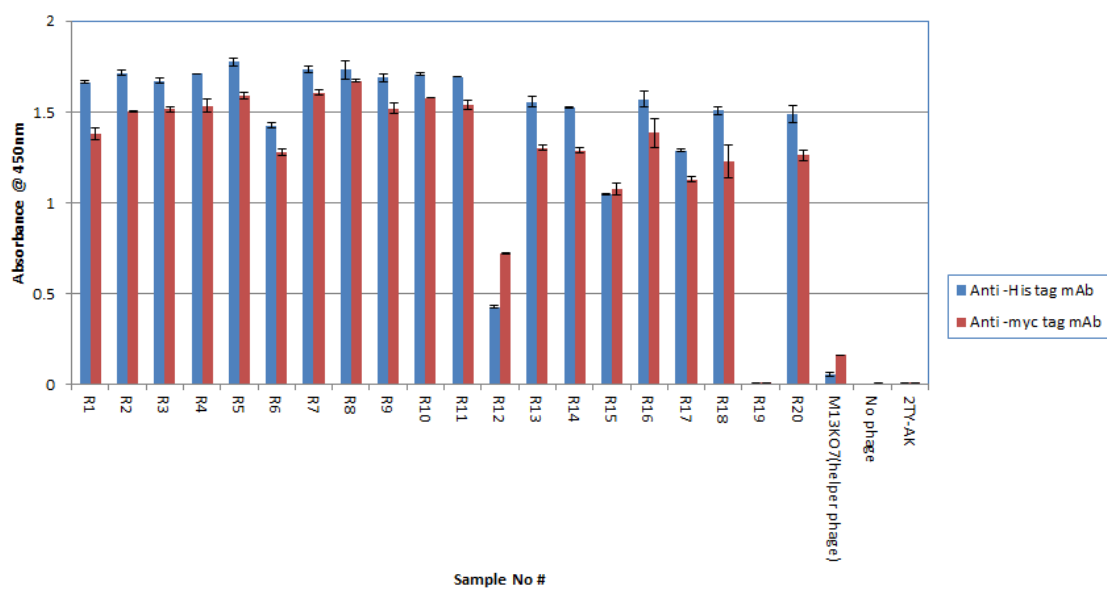


図3-6 ファージ上のVHH抗体提示の確認

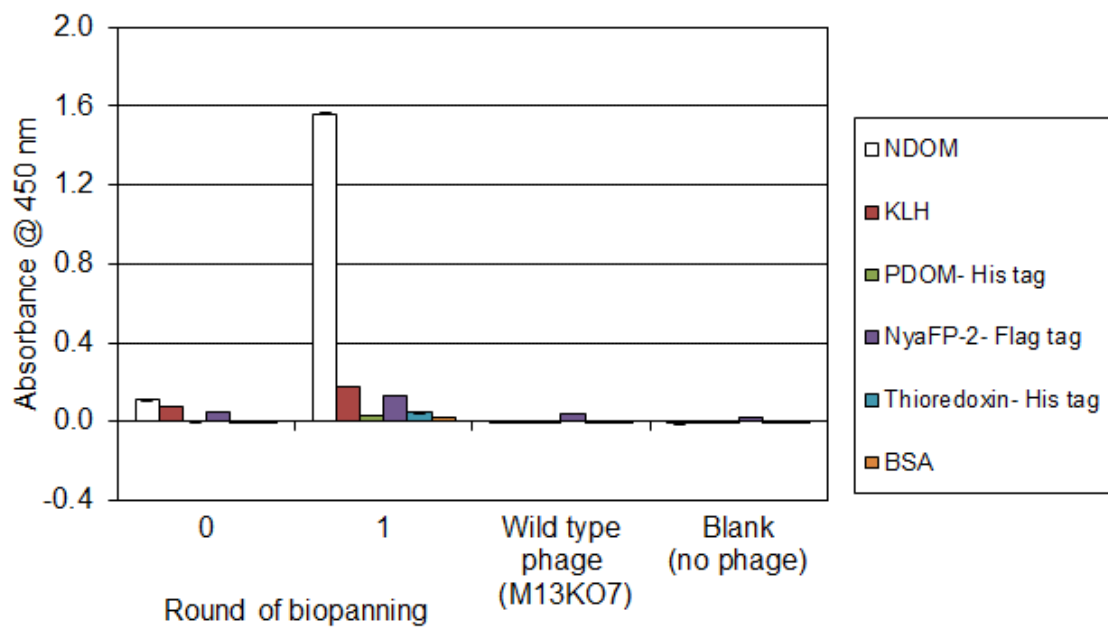
ファージ上に提示されているVHH抗体を、VHH抗体に付加されているHis tag及びmyc tagを検出することにより確認した。



### 3-3-5 NDOMに対するバイオパンニング

3-3-4で作製した免疫ライブラリを用いてNDOMに対してバイオパンニングを行った。その結果、わずか1ラウンドで抗原特異的なファージ集団の濃縮を確認した(図3-7、A)。抗原特異的なファージの濃縮が確認できたため、1ラウンドバイオパンニング後のファージライブラリからランダムに21クローンを選択し、抗原特異性についてELISAにより検討した。その結果、21クローン中13クローン(61.9%)という高い確率でNDOMに対して特異的なクローンであることが確認された(図3-7、B)。

A



B

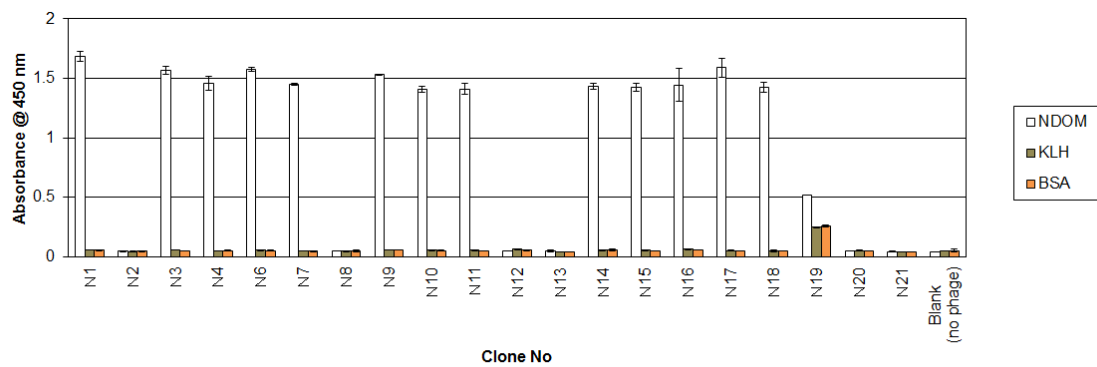


図3-7 バイオパンニング

A. NDOM特異的ファージ集団の濃縮。B. NDOM特異的クローンの単離。

### 3-3-6 NDOM特異的クローンのアミノ酸配列解析

3-3-5で単離した抗原特異的クローンのアミノ酸配列解析を行った。その結果、非常に相同性が高く(図3-8)、同じ親B細胞由来のクローンであることが示唆された。また、VHH抗体は、FR2領域アミノ酸配列によってVHH型[37Phe (F, フェニルアラニン) / Tyr (Y, チロシン)、44Glu (E, グルタミン酸)、45Arg (R, アルギニン)、47Gly (G, グリシン)]とVH型[37 Val (V, バリン)、44 Gly (G, グリシン)、45 Leu (L, ロイシン)、47 Trp (W, トリプトファン)]に分類される(28)。単離したNDOM特異的VHH抗体のFR2領域のアミノ酸配列は、全てのクローンで37V(バリン)、44A(アラニン)、45L(ロイシン)、47W(トリプトファン)であり、VH型に分類された。また、抗原結合に重要なCDR3の配列を解析した結果、2種類の配列があることがわかった。

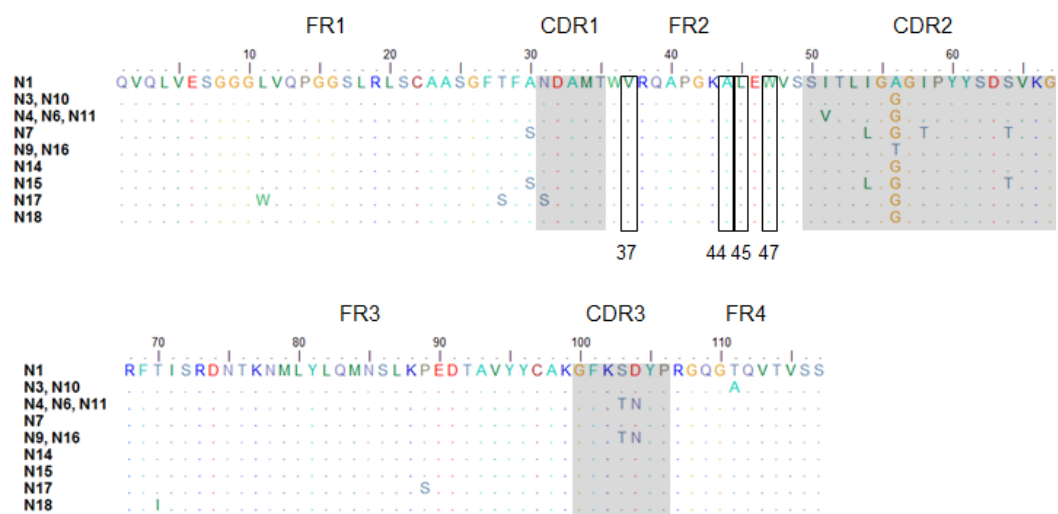


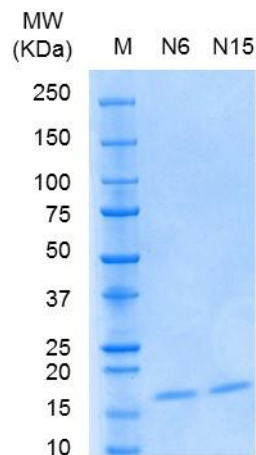
図3-8 NDOM特異的クローンのアミノ酸配列解析

NDOM特異的クローンのアミノ酸配列を解析した結果、8種類のクローンに集約された。フレームワーク領域 (FR) と相補鎖決定領域 (CDR) は、Kabatの分類により決定した (29)。

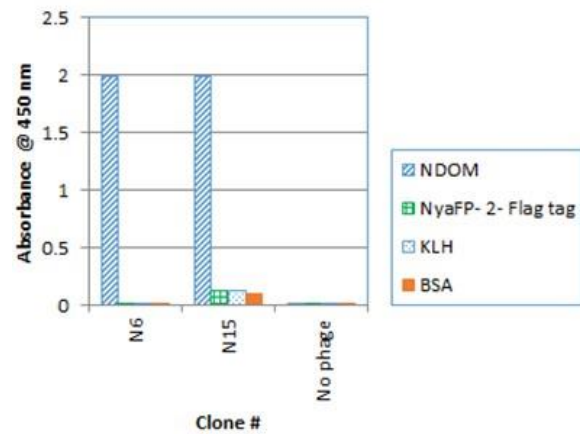
### 3-3-7 NDOM特異的VHHの性状解析

3-3-6ではファージ上に提示された状態のVHH抗体の解析を行ってきたが、NDOM特異的VHHクローンのさらなる性状解析のために、CDR3領域の配列が異なるN6とN15という2種類のクローンについて大腸菌を用いてVHH抗体単独で発現させ、タンパク質レベルでの性状解析を行った。大腸菌のペリプラスム画分で発現させたVHH抗体をVHH抗体に付加されているHis-tagを利用してニッケルキレーティングカラムで精製を行い、SDS-PAGEで精製度を確認した。その結果、VHH抗体の単一バンドを確認した(図3-9、A)。続いて、精製したVHH抗体の抗原特異性をELISAにより確認した。その結果、ファージ上に提示されていた状態の抗原特異性と変わることなくNDOMに対しての抗原特異性を確認した(図3-7、B)。さらに、表面プラズモン共鳴解析により、NDOMとの抗原親和性を解析した。その結果、KD値はN6で8.5nM、N15で12.7nMであり(図3-9、C)、VHH抗体が単ドメインであることを考慮すると十分に強い結合親和性を有していると考えられた。

A



B



C

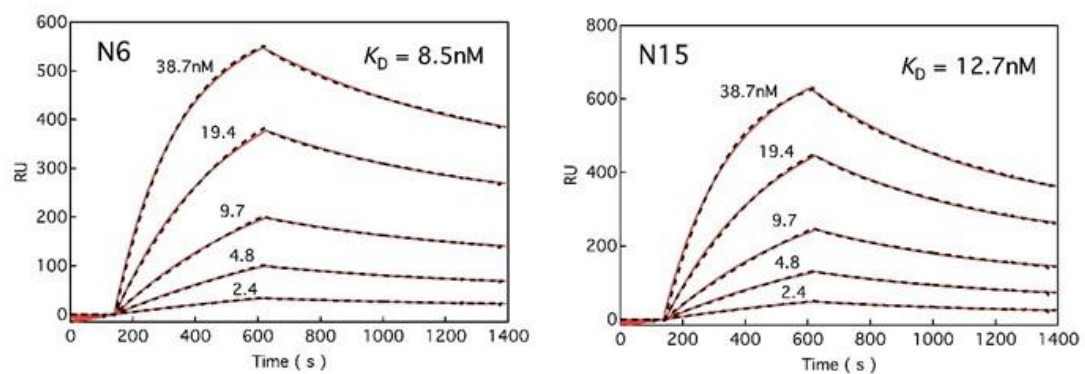


図3-9 NDOM特異的VHH抗体の性状解析

A. SDS-PAGE。12.5%のポリアクリルアミドを使用した。B. N6、N15の抗原特異性。ELISAにより精製したVHH抗体 (N6、N15) のNDOMに対する抗原特異性を確認した。C. 親和性解析。表面プラズモン共鳴解析により、精製したVHH抗体 (N6、N15) とNDOMとの親和性を解析した。

### 3-4 考察

一般的に、実際に動物へ目的抗原を免疫して作製する免疫ライブラリは、免疫により抗体力価が上昇していれば動物体内で目的抗原に対する抗体を産生するB細胞が増殖しているため、目的抗原に対して特異抗体が取得しやすくなると考えられる。

本研究では、実際にアルパカへモデル抗原としてNDOMを免疫し、免疫ライブラリを作製した。免疫後の抗体力価の測定結果より、NDOMに対して通常のIgG抗体であるIgG1と長いヒンジ領域を有する重鎖抗体であるIgG3の抗体力価が上昇していることが確認され、ヒンジ領域が短い重鎖抗体であるIgG2の抗体力価は上昇していなかった。IgG2の力価が上昇しなかった理由として、アルパカの個体差もしくは、抗原の特性、重鎖抗体へのクラススイッチの特性等考えられるが、アルパカの抗体成熟メカニズムはまだ完全に解明されていない。今後、さらに様々な抗原の免疫に関するデータを蓄積することにより重鎖抗体産生メカニズムが明らかになる可能性が考えられる。

モデル抗原に対して十分にIgG3の抗体力価が上昇した時点で、免疫ライブラリを作製し、抗原特異的VHH抗体の単離を試みた結果、わずか1ラウンドのバイオパンニングで抗原特異的ファージ集団を十分に濃縮可能であった。さらにバイオパンニング後のライブラリから無作為に21クローンを選択し抗原特異性を解析した結果、13クローンが抗原特異的クローンであり、ナイーブライブラリと比較して、非常に効率よく抗原特異的VHH抗体を単離可能であった。しかしながら、免疫ライブラリより取得した抗原特異的クローンのアミノ酸配列を解析した結果、全てのクローン間で非常に相同性が高く、同じ親B細胞由来のVHH抗体の可能性が示唆された。また、取得した全てのクローンはVH型であり、重鎖抗体由来のVHH抗体

の多くがVHH型ではないということが明らかになった。また、抗原結合に重要なCDR3の配列は2種類であった。そこで、異なるCDR3配列を有するN6とN15の2種類のクローンのVHH抗体を大腸菌で発現させ、性状を解析した結果、それぞれ5mg/L、7mg/Lの発現量でタンパク発現量に特に問題はなく、ファージ上に提示されていた状態と比較しても同様の抗原特異性を有しており、さらに親和性解析結果 (N6:8.5nM、N15:12.7nM) からシングルドメイン抗体であるという点を考慮すると十分な抗体親和性を有していると考えられた。

このように、第2章で論じたナイーブライブラリでのVHH抗体単独での発現の問題が、免疫ライブラリでは認められなかったということは、免疫することによりアルパカ体内で体細胞突然変異が起こり、発現に関連するアミノ酸配列が最適化され、発現効率が向上していることが推測される。一方で、取得したクローンが、相同性が高く、多様性を持った抗体が取得できなかったという問題点もあり、その原因の1つとして、免疫過剰であることが考えられ、免疫回数、免疫量を検討することで、より多様性を有したVHH抗体の取得が可能になると推測される。今後の検討課題の1つになると考えられる。



## 第4章 次世代シーケンサーを利用した抗原 特異的なVHH抗体の単離手法の開発

## 4-1 目的

第3章の結果から、アルパカVHH免疫ライブラリから通常のELISAスクリーニングにより単離された抗原特異的VHH抗体は、全てVH型で非常に相同性が高かった。例えば、抗原を特異的に認識できる抗体が1種類だけ必要な時は、特に問題にならないと考えられるが、抗体医薬、サンドイッチELISA、イムノクロマト等の様々な用途へ産業応用するために、目的抗原のさまざまなエピトープを認識できるVHH抗体(多様な配列を有したVHH抗体)が必要となる。そこで我々は、多様な配列を有した抗原特異的VHH抗体を単離する手法として、次世代シーケンサーを利用した網羅的な配列解析を行う方法を用いて、抗原特異的VHH抗体の単離法について検討を行った。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 次世代シーケンサーによる網羅的配列解析

免疫ファージライブラリの塩基配列は、MiSeq next generation DNA sequencer (Illumina)を用いて分析した。TruSeq™ DNA Sample Preparation v2 (Illumina)は、プライマーのAI-F1-4 (GGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG)およびAllgG3-R1-3 (GTGGTTTTGGTGTCTTGGGTTC)を使用して、アルパカVHHファージライブラリ10ngのDNAサンプルからDNAシーケンシングライブラリーを構築するために使用した。MiSeq Reagent

Kit v2 (500 cycles)を次世代シーケンサーのPCR反応に用いた。配列決定データは、CLC Genomics Workbench ver5 (CLC Bio) softwareにより処理した。低品質の配列決定データは、品質スコアに応じて削除し、取得したフォワードおよびリバースから解析した塩基配列データをアルパカVHH抗体の完全な配列を得るために組み合わせた。

## 4-3 結果

### 4-3-1 NGS解析結果

NGS解析は、免疫ライブラリのバイオパンニング前と後の2サンプルを行った(表4-1)。  
今回の検討で解析した配列数は、バイオパンニング前が621,532種類、バイオパンニング後が751,048種類を解析し、最終的にVHH抗体の配列まで合わせることができたのは、バイオパンニング前が64,172クローン、バイオパンニング後が78,493クローンであった。この配列の中で、独立した配列を有していたクローンは、バイオパンニング前が40,622種類、バイオパンニング後が36,401種類であった。さらに、ライブラリ中に最高出現頻度配列の出現頻度は、バイオパンニング前が9,874回、バイオパンニング後が6,860回であった。

表4-1 NGS解析結果

	Before biopanning (%)	After biopanning (%)
Total number of read sequences	621532	751048
Number of read sequences after trim	328592	419232
Number of reads used for successful merge	130196	161324
Number of merged sequences	65098	80662
In frame sequences <sup>a</sup>	64172 (100%)	78493 (100%)
Unique sequences	40622 (72%)	36401 (46%)
Highest frequency	9874 (15%)	6860 (9%)
Single occurrence sequences <sup>b</sup>	37338 (58%)	32673 (42%)

<sup>a</sup>In frame sequences: number of sequences that code VHH amino acid sequence in frame.

<sup>b</sup>Single occurrence sequences: number of amino acid sequences occurring a single time in the set of unique sequences.

#### 4-3-2 パンニング前出現率上位100位のパンニング前後での出現率推移

4-3-1でバイオパンニング前のライブラリより、約4万種類のVHH抗体のアミノ酸配列情報を取得した。その中から、出現率上位100位までのアミノ酸配列について、バイオパンニング前後での出現率推移を解析した(図4-1)。その結果、バイオパンニング前の免疫ライブラリで最も出現率が高いクローン(No.1)は15.39%の割合で存在し、出現率2位以下は1%以下であった。この上位100位のバイオパンニング後の出現率を解析した結果、ほとんどのクローンで出現率が低下している中で、4種類のクローン(No.10、No.21、No.37、No.49)については、約40～50倍出現率が上昇していることが明らかになった。さらにこの4種類のクローンのアミノ酸配列を解析したところ、3章で取得したNDOM特異的クローンと同様のアミノ酸配列(No.10=N4,N6,N11、No.21=N14、No.37=N3,N10、No.49=N9,N16)であることを確認した。

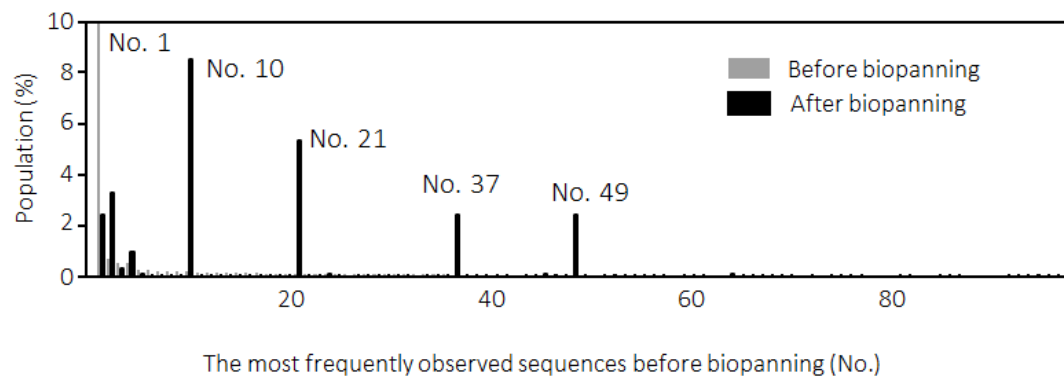


図4-1 免疫ライブラリのバイオパンニング前の出現率上位100クローンのバイオパンニング後の出現率推移

灰色の棒はバイオパンニング前を示し、黒の棒はバイオパンニング後を示している。バイオパンニング前に最も出現率が高かったNo1は15.39%であった。バイオパンニング後に出現率が増加したNo.10、No.21、No.37、No.49の出現率は、それぞれ8.95、5.47、2.53及び2.58%であった。

#### 4-3-3 3章で取得した抗原特異的クローンのパンニング前後の出現率及び増幅率

4-3-2で、バイオパンニング前後の出現率が上昇しているクローンが3章で取得したNDOM特異的クローンであることを確認した。NGS解析データから抗原特異的クローンを選択するための指標を検討するため、その他のNDOM特異的クローンについてもバイオパンニング前後の出現率及び増幅率について解析した(表4-2)。その結果、バイオパンニング後の出現率は、8.952%(N4、N6、N11)と高いクローンもあれば、0.085%(N17)と低いクローンもあったが、増幅率については25.1倍～107.1倍と大きく増幅していた。

表4-2 NDOM特異的クローンのバイオパンニング前後の増幅率及び出現率解析

Clone No.	Fraction before biopanning (%)	Fraction after biopanning (%)	Amplification factor
N1	0.011	0.274	25.1
N3, N10 (No.37) <sup>a</sup>	0.064	2.533	39.6
N4, N6, N11 (No.10) <sup>a</sup>	0.198	8.952	45.2
N7	ND	ND	ND
N9, N16 (No.49) <sup>a</sup>	0.048	2.581	53.4
N14 (No.21) <sup>a</sup>	0.114	5.478	48.2
N15	0.002	0.167	107.1
N17	0.003	0.085	27.4
N18	0.011	0.487	44.6

<sup>a</sup>図4-1のクローンNoを示している。



#### 4-3-4 パンニング前後の増幅率上位100位の系統樹解析及びアミノ酸配列解析

4-3-3の結果より、バイオパンニング前後の増幅率が抗原特異的VHH抗体を単離する指標の1つの成り得ることが示唆されたため、バイオパンニング前後の増幅率上位100位のクローンについて系統樹解析(図4-2)及びアミノ酸配列解析(図4-3)を行った。その結果、NDOM特異的クローンと相同性が高く、同じ集団を形成しているN-group VHHの集団が増幅率上位100位の75%を占めていた。また、N-group VHH集団内の最低増幅率は7.4倍であり、88%のクローンの増幅率は10倍以上であった。

より多様な抗体配列の単離を目的としているため、N-group VHH集団以外の25%の集団から、増幅率、出現率共に高いCluster1、増幅率が高いが出現率は低いCluster2、増幅率が低いが出現率が高いCluster3という3種類のクローンを選択した(表4-3)。3種類のクローンのアミノ酸配列を確認した結果、全てVHH型の配列であり、第3章で取得したNDOM特異的クローンのアミノ酸配列を比較した結果、抗原結合に重要なCDR3の長さや配列も大きく異なっていた(図4-4)。

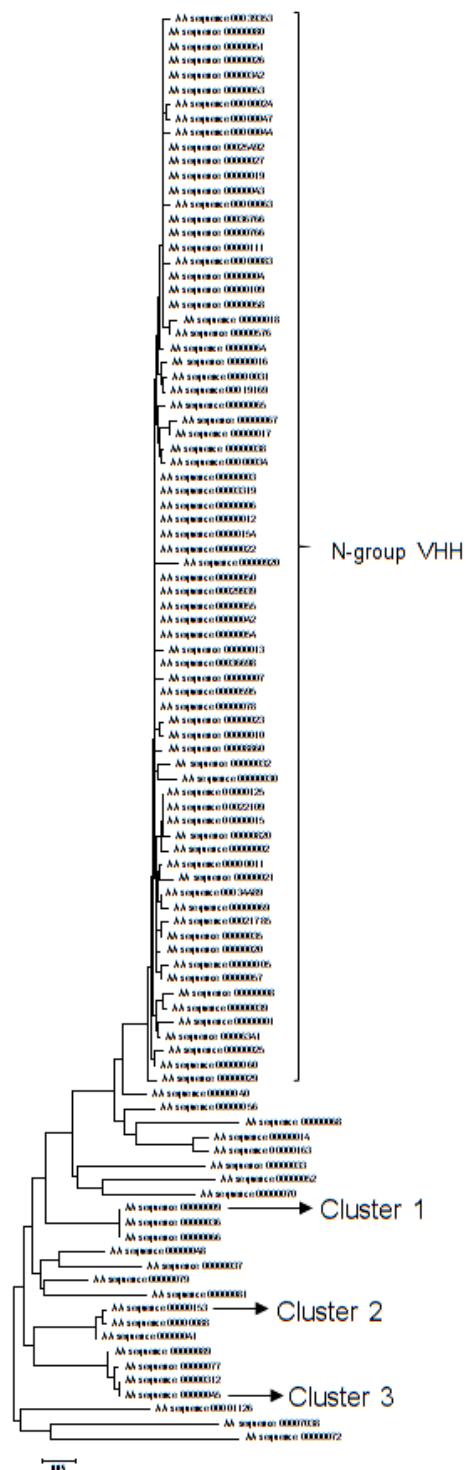
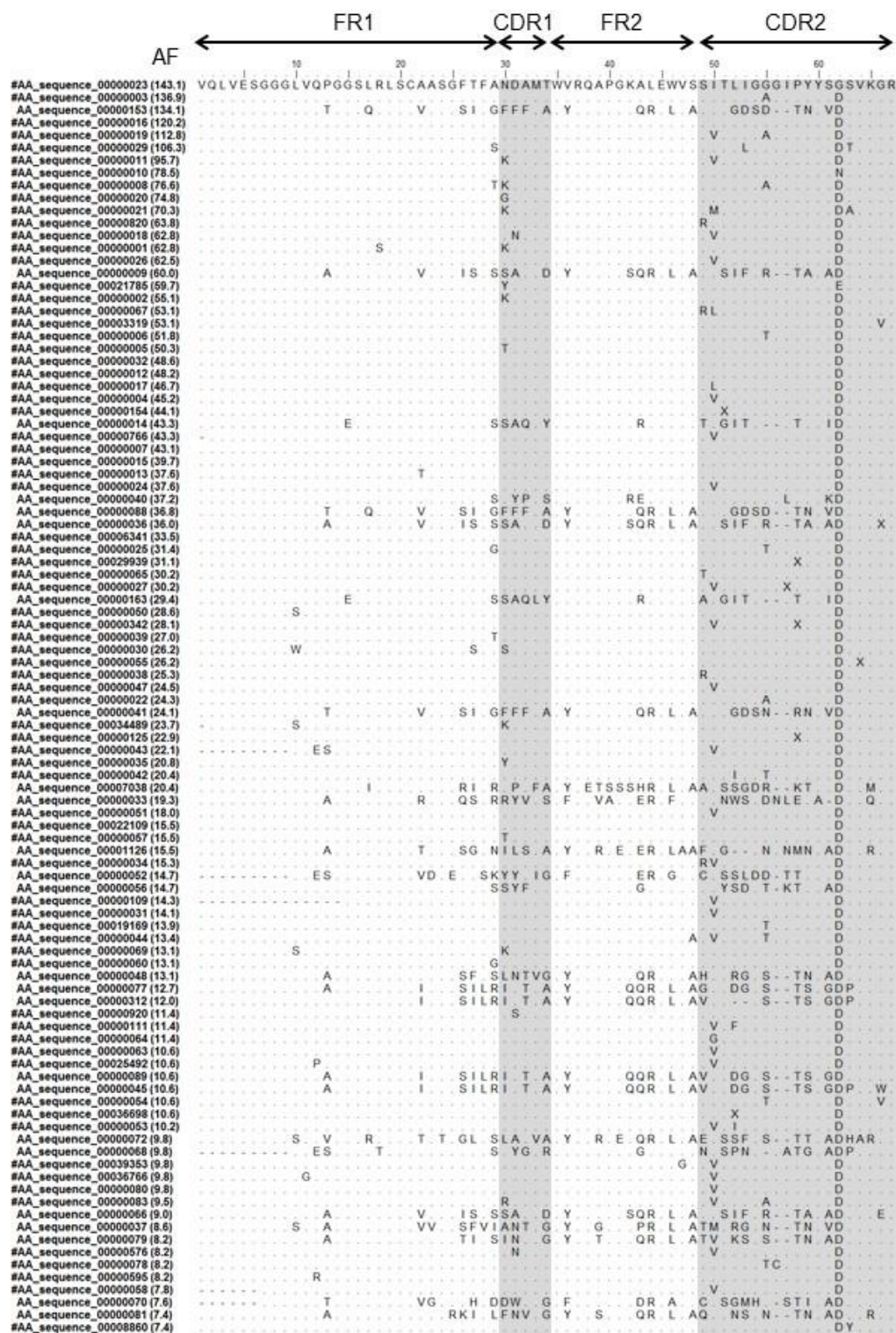


図4-2 バイオパンニング前後の増幅率上位100位の系統樹解析

N-group VHHは、第3章で取得したNDOM特異的VHH抗体の相同性の高い(90%以上)集団を示している。



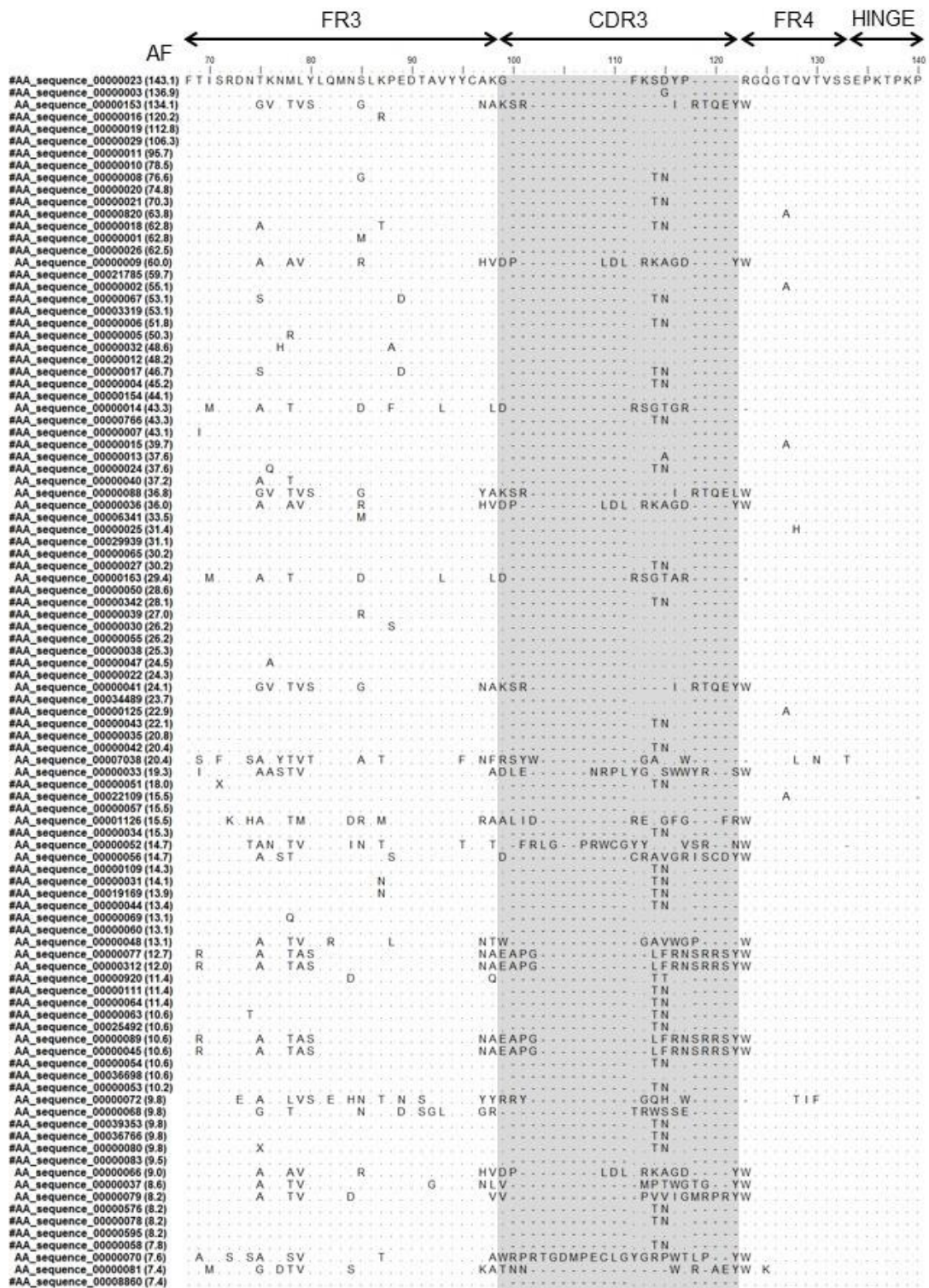


図4-3 バイオパンニング前後の増幅率上位100位のアミノ酸配列解析



フレームワーク領域 (FR) と相補鎖決定領域 (CDR) は、Kabat の分類により決定した (29)。

AF (amplification factor) は、バイオパニング前後での増幅率を示している。

表4-3 Cluster1-3のバイオパニング前後の出現率及び増幅率

Sequence	Frequency before biopanning (%)	Frequency after biopanning (%)	Amplification factor
Cluster 1	0.019	1.122	60.0
Cluster 2	0.002	0.209	134.1
Cluster 3	0.678	3.352	4.9

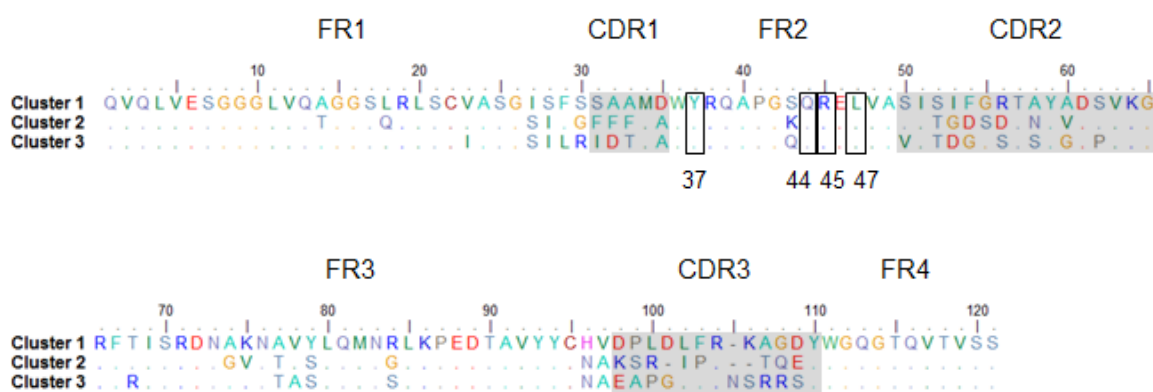


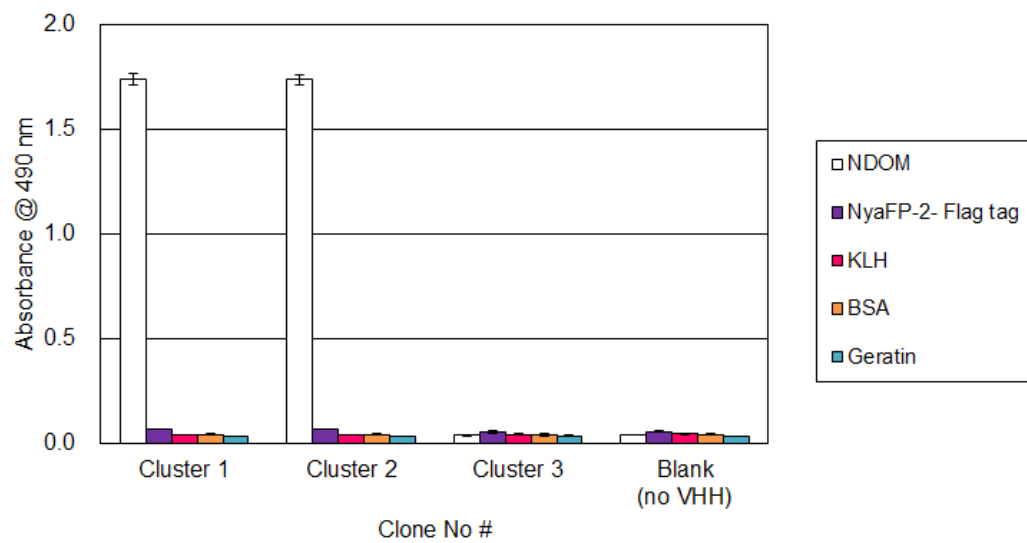
図4-4 Cluster1-3のアミノ酸配列解析

フレームワーク領域 (FR) と相補鎖決定領域 (CDR) は、Kabat の分類により決定した (29)。

#### 4-3-5 Cluster1-3の性状解析

4-3-4で選択した、Cluster1-3の性状を解析するため、それぞれのクローンの遺伝子配列を人工的に合成し、大腸菌でVHH抗体を発現させ、性状の解析を行った。その結果、高い増幅率を示していたCluster1とCluster2においてELISAで抗原特異性が確認され、増幅率は低かったがバイオパンニング後の出現率が高かったCluster3については、抗原結合活性を示さなかった(図4-5、A)。さらに、ELISAで結合活性を確認できたCluster1とCluster2について親和性解析を行った。その結果、KD値は、Cluster1は、6.8nM、Cluster 2は、13.6nMであり(図4-5、B)、第3章で解析したN6、N15クローンの親和性と同等の値で、シングルドメインであることを考慮すると十分な親和性を有していると考えられる。

A



B

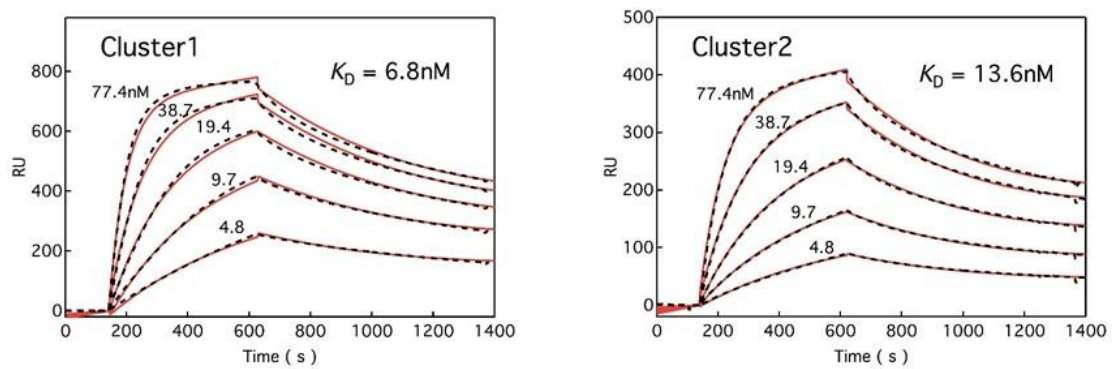


図4-5 Cluster1-3の性状解析

A. Cluster1-3の抗原特異性。ELISAにより精製したVHH抗体 (Cluster1-3) のNDOMに対する抗原特異性を確認した。B. 親和性解析。表面プラズモン共鳴解析により、精製したVHH抗体 (Cluster1-3) とNDOMとの親和性を解析した。

#### 4-4 考察

第3章において、バイオパンニングと一般的なELISAでスクリーニングを行う方法により単離した抗原特異的VHH抗体は、単離した全てのクローン間でアミノ酸配列の相同性が非常に高かった。VHH抗体の産業応用にあたっては、目的抗原のさまざまなエпитープを認識する抗体の取得が必要になると考えられるため、さらに多様な配列のVHH抗体単離を目的として、バイオパンニングとNGS解析を組み合わせた新規の抗原特異的VHH抗体単離方法の開発を試みた。

免疫ライブラリのバイオパンニング前後での大規模塩基配列解析を行うことにより、バイオパンニングにより目的抗原に対してセクションされているため、出現率が増幅するクローン、出現率が減少するクローンを確認した。出現率が増幅したクローンが、抗原特異的VHH抗体である可能性が高いと考えられるが、第3章で取得したNDOM特異的クローンの出現率解析により、バイオパンニング後の出現率が低くても抗原特異性を示すクローンの存在が明らかとなった。しかしながら、全てのクローンに共通して、バイオパンニング後に高い増幅率を示した。そのため、抗原特異的VHH抗体を選択するための指標としてバイオパンニング前後の増幅率が適していると考えられた。具体的には、本章のバイオパンニング前後の増幅率上位100位の解析の結果から、増幅率が10倍以上であれば、抗原特異的VHH抗体の可能性が高いことが示唆された。また、Cluster3の解析からバイオパンニング後の高い出現率が抗原特異性を示していないことが明らかとなり、NGS解析結果から抗原特異的なクローンを選択する際に非常に重要である。

実際にバイオパンニング前後の増幅率を指標として、NGS解析結果から選択したCluster



1、Cluster2という2種類のクローンの性状解析により、通常のELISAスクリーニングで取得される抗原特異的クローンと同様の抗原特異性を有し、親和性についても同等のKD値を有していた。つまり、バイオパンニング後の出現率が低い、ライブラリ中で稀なVHH抗体クローンにおいても、十分に使用できる性能を有している抗体であることが示唆された。

本章の結果より、バイオパンニングとNGS解析を組み合わせる事により、十分な抗原特異性、親和性を有し、さらに多様な配列を持つ抗原特異的VHH抗体の単離が可能になると考えられる。

## 第5章 総括

次世代抗体として注目されているアルパカVHH抗体は、優れた特徴(CDR3領域の長さ、微生物発現系による高い生産性、構造の可逆性の高さによる安定性、タンパク質工学的な抗体改変の容易さ)を有しているが、アルパカVHH抗体の単離法については、これまで詳細な研究はなされていなかった。

第2章、第3章の結果から、アルパカVHH抗体ライブラリは、ファージ上への高いVHH抗体提示効率や大腸菌でのVHH抗体の高い発現効率を有しており、ヒトやマウスのscFv抗体ライブラリと比較して非常に性状が良く、かつモデル抗原(NDOM)に対して特異的なVHH抗体の単離も問題ない事を明らかにした。しかしながら、ナイーブライブラリから単離したNDOM特異的VHH抗体は、VHH抗体の発現量が少なく、VHH抗体のさらなる性状解析ができなかった。この原因として、ナイーブライブラリから単離されたクローンであるため抗体の配列が成熟していないことが考えられる。この問題を解決するために、ナイーブライブラリ由来のさらに多種類のNDOM特異的VHH抗体の単離、発現検討、他のさまざまな抗原に対する抗体単離等の追加検討が必要であると考えられる。今回の研究では、大腸菌を用いた発現系で検討を行っているが、その他の微生物(酵母等)を用いた発現検討も1つの手段であると考えられる。

第3章の結果から、アルパカに免疫を行うことよりナイーブライブラリと比較して非常に効率的に抗原特異的なクローンが取得できることを明らかにした。また、NDOM特異的VHH抗体の発現量についても良好で(N6:5mg/L、N15:7mg/L)、結合親和性もnMオーダーであり、シングルドメイン抗体である事を考慮すると、高い結合力を有していると考えられる。つまり、抗原特異的VHH抗体を取得する場合は、免疫ライブラリを用いることが、非常に有用である。しかしながら、取得したVHH抗体のアミノ酸配列の相同性が非常に高く、1種類のクロ

ーンしか単離できなかった。この原因の1つとして、免疫により抗原特異的クローンが集約された可能性が示唆され、抗体の多様性を確保する必要がある場合には、免疫回数や免疫抗原量を減らす等の方法を検討する必要があると考えられる。

第4章の結果から、バイオパンニング前後のライブラリの網羅的塩基配列を行うことにより、抗原特異的VHH抗体を単離可能であることを明らかにした。本研究により、抗原特異的なVHH抗体を選択する際の重要な因子の1つは、バイオパンニング前後での増幅率であることが示唆された。また、ライブラリ内での出現率が低い稀なクローンであるが増幅率は高いクローンにおいて、通常のELISAによるスクリーニングで取得される出現率が高いクローンと性状（抗原特異性、結合親和性）に大きな差はなかった。このことから、NGS解析を利用することにより、より多様な配列を有した抗原特異的VHH抗体の単離が可能であることが考えられる。

本研究により、アルパカ由来VHH抗体の単離法では今までに報告されていない免疫ライブラリとNGSを組み合わせた方法により、さまざまな異なる配列を有したVHH抗体の取得が可能であることを明らかにした。今後は、例えば、免疫前後のアルパカVHH抗体ライブラリのNGS解析を行うことで、バイオパンニングを行うことなく抗原特異的なクローン取得が可能となる事も考えられる。また、ナイーブラライブラリにおいても、バイオパンニングとNGSを組み合わせることにより抗原特異的VHH抗体の単離が可能になると考えられ、さまざまなアルパカ由来VHH抗体の単離効率が向上し、VHH抗体の産業応用に寄与できると予測される。

## 参考文献

- 1) G.Sinha: Ablynx drops lead nanobody. *Nature Biotechnology* 2012, 30 (2):124
- 2) Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G: Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 1989, 341 (6242):544-6
- 3) Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R: Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993, 363 (6428):446-8
- 4) Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF: A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 1994, 374 (6518):168-73
- 5) Daley, L.P., Kutzler, M.A., Bennett, B.W., Smith, M.C., Glaser, A.L., and Appleton, J.A. Effector functions of camelid heavy-chain antibodies in immunity to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2010, 17 (2):239-46
- 6) Daley-Bauer, L.P., Purdy, S.R., Smith, M.C., Gagliardo, L.F., Davis, W.C., and Appleton, J.A. Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clin Vaccine Immunol.* 2010, 17 (12):2007-15
- 7) Wu TT, Johnson G, Kabat EA: Length distribution of CDRH3 in antibodies: *Proteins* 1993, 16 (1):1-7
- 8) Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MH, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans

- S, Wyns L: Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme: *Nat Struct Biol.* 1996, 3 (9):803-11
- 9) Braden BC, Souchon H, Eiselé JL, Bentley GA, Bhat TN, Navaza J, Poljak RJ: Three-dimensional structures of the free and the antigen-complexed Fab from monoclonal anti-lysozyme antibody D44.1: *J Mol Biol.* 1994, 243 (4):767-81.
- 10) Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007, 77 (1):13-22
- 11) Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LG, Muyldermans S, Wyns L, Matagne A: Single-domain antibody fragments with high conformational stability: *Protein Sci.* 2002, 11 (3):500-15
- 12) van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, de Ron L, Wilson S, Davis P, Verrips CT: Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies: *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1431 (1):37-46
- 13) Hagihara Y, Mine S, Uegaki K: Stabilization of an immunoglobulin fold domain by an engineered disulfide bond at the buried hydrophobic region: *J Biol Chem.* 2007, 282 (50):36489-95
- 14) Hagihara Y<sup>1</sup>, Matsuda T, Yumoto N: Cellular quality control screening to identify amino acid pairs for substituting the disulfide bonds in immunoglobulin fold domains: *J Biol Chem.* 2005, 280 (26):24752-8

- 15) Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, Beirnaert E, Jonckheere H, Van de Wiele C, Staelens L, Hostens J, Revets H, Remaut E, Elewaut D, Rottiers P: Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis: *Arthritis Rheum.* 2006, 54 (6):1856-66
- 16) Joost A. Kolkman, Debbie A. Law: Nanobodies - from llamas to therapeutic proteins: *Drug Discov Today Technol.* 2010, 7 (2):e95-e146
- 17) Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S: Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs: *J Biol Chem.* 2001, 276 (10):7346-50
- 18) Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G: Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage: *J Mol Biol.* 1991, 222 (3):581-97
- 19) Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., and et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 1994, 13 (14):3245-60
- 20) Muraoka, S., Ito, Y., Kamimura, M., Baba, M., Arima, N., Suda, Y., Hashiguchi, S., Torikai, M., Nakashima, T., and Sugimura, K. Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DRbeta-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library. *J Biochem.* 2009, 145 (6):799-810

- 21) Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol.* 2001, 74 (4):277-302
- 22) Yang, J., Yoshida, R., Kariya, Y., Zhang, X., Hashiguchi, S., Nakashima, T., Suda, Y., Takada, A., Ito, Y., and Sugimura, K. Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity. *J Biochem.* 2010, 148 (4):507-15
- 23) Reddy ST, Ge X, Miklos AE, Hughes RA, Kang SH, Hoi KH, Chrysostomou C, Hunicke-Smith SP, Iverson BL, Tucker PW, Ellington AD, Georgiou G: Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol.* 2010, 28 (9):965-9
- 24) t Hoen PA, Jirka SM, Ten Broeke BR, Schultes EA, Aguilera B, Pang KH, Heemskerk H, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, den Dunnen JT: Phage display screening without repetitious selection rounds. *Anal Biochem* 2012, 421 (2):622-31
- 25) Ravn U, Didelot G, Venet S, Ng KT, Gueneau F, Rousseau F, Calloud S, Kosco-Vilbois M, Fischer N: Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery. *Methods.* *Methods* 2013, 60 (1):99-110
- 26) Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB: Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs): J Immunol Methods. 2007, 324 (1-2):13-25



- 27) Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y: Molecular dissection of IZUM01, a sperm protein essential for sperm-egg fusion: *Development*. 2013, 140 (15):3221-9
- 28) Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Holzer, W., De Genst, E., Wyns, L., and Muyldermans, S. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*. 1998, 17 (13):3512-20
- 29) Kabat, E.A., and Wu, T.T. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*. 1991, 147 (5):1709-19

## 業績目録

### 発表論文

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

### 国際学会報告

#### ポスター発表

- 1) “Isolation and characterization of antigen-specific VHH antibodies from immunized alpaca VHH antibody phage library using Next Generation Sequencing (NGS)”, Nobuo Miyazaki, Norihiko Kiyose, Yoshihisa Hagihara, Matsuda Tomonari, Seiya Inoue, Kazunari Arima and Yuji Ito, 2013 Antibody Engineering & Therapeutics, Huntington Beach, CA

### 国内学会報告

#### [筆頭]

- 1) 「抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリ」の特性と抗原特異的抗体単離の研究」, 宮崎誠生、清瀬紀彦、萩原義久、松田知成、井上聖也、有馬一成、

伊東祐二, 第 37 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 雲仙,  
(2013, 9)

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

[非筆頭]

- 1) 単ドメイン抗体の効率的リフォールディングと高密度配向固定化技術の開発, 熊田陽一、カンボンムン、山川景成、萩原義久、伊東祐二、宮崎誠生、岸本通雅, 化学工学会 第 79 年会, 岐阜, (2014, 3)
- 2) 「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の単離と機能解析」, 清瀬紀彦、宮崎誠生、岸本聡、井上聖也、萩原義久、有馬一成、伊東祐二, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, (2013, 9)
- 3) 「網羅的配列解析を利用した抗体ファージライブラリからの特異抗体の単離・同定」, 伊東祐二、萩原義久、宮崎誠生、松田知成, 第 13 回日本蛋白質化科学会年会, 鳥取, (2013, 6)
- 4) 「アルパカ由来 VHH ナイーブ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH

抗体の特性解析」, 清瀬紀彦、宮崎誠生、井上聖也、萩原義久、有馬一成、伊東祐二, 平成 25 年度九州生化学会, 佐賀, (2013, 5)

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

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

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

## 出版物

### [筆頭]

1) 「ファージディスプレイ法」, 宮崎誠生、榎元友里恵、伊東 祐二, 講談社サイエンティフィック, 免疫測定法の基礎と応用 (2014 年 9 月発刊予定)

- 2) 「ラクダ化動物由来天然起源シングルドメイン抗体 (VHH 抗体) の開発」, 宮崎誠生、萩原義久、伊東祐二, シーエムシー出版, 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線, 124-129.(2012)

[非筆頭]

- 1) 「次世代型フラグメント抗体としてのラクダ科動物由来 VHH 抗体」, 赤澤陽子、宮崎誠生、伊東祐二、萩原義久, PHARM TECH JAPAN, Vol.29 No.9, (2013)
- 2) 「2-2-6.天然起源の単ドメイン抗体-ラクダ科動物由来 VHH 抗体」, 萩原義久、宮崎誠生、川口博明、小島敏之, 新機能抗体開発 HB, NTS, (2012)

**受賞**

- 1) 鈴木紘一メモリアル賞, 宮崎誠生, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, (2013, 9)

## 謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院、理工学研究科システム情報専攻、有機化学講座(伊東研究室)および、アーク・リソース(株)において行われ、私が本研究室に在籍中の3年間でまとめた研究成果になります。

3年間、御懇意なご指導とご鞭撻を賜りました主指導教官の伊東祐二教授に深く感謝致します。また、大変お忙しい中、副査としてご指導頂きました、杉村和久教授、橋本雅仁教授、九町健一准教授、有馬一成准教授へこの場を借りて心より感謝申し上げます。さらに、共同研究において、VHH抗体の発現でご協力頂いた(独)産業技術総合研究所の萩原義久先生、次世代シーケンサーのデータ取得、解析にご協力頂いた京都大学の松田知成准教授、(株)MOLCUREの小川隆社長に心より感謝申し上げます。最後に、社会人学生として送り出していただいたアーク・リソース(株)の井上聖也社長へ深く感謝申し上げます。

私が社会に出ておよそ4年目で、縁がありアルパカの仕事に携わることになりました。アルパカ抗体の研究は、非常に興味深く、大変良い研究テーマにめぐり合うことが出来たと実感しております。普段は、熊本で働いていたこともあり、思うように研究室に顔を出すことは出来ませんでした。暖かく接してくれた伊東研究室の皆様にも、この場を借りて御礼申し上げます。

最後になりますが、社会人と学生という2足のわらじで、非常に忙しい3年間でそばで支えてくれた家族に心より感謝致します。

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