

ファージディスプレイシステムを用いた アフィニティリガンドの創製



研究ノート

菅 健一*, 片倉 啓雄**

Creation of affinity ligands using phage display system

Key Words : phage display, affinity ligand, peptide, antibody

1. はじめに

蛋白質などのターゲットを特異的に認識して強く結合するアフィニティリガンドは産業的にも様々な分野で利用されている。例えば、酵素やホルモンなどの有用蛋白質を精製する場合、目的蛋白質に特異的に結合するアフィニティリガンドを持っていれば、アフィニティクロマトグラフィーなどを用いて効率よく精製することができる。また、特定の蛋白質に結合するリガンドは、創薬、臨床検査などに利用できるだけでなく、医学、生化学分野の基礎研究にも有用である。

2. ファージディスプレイシステム

1990年代になって、大腸菌のファージを用いて、目的物質に対して特異的に結合する抗体やペプチドなどのリガンドを効率よく選択できるシステムが開発された¹⁾。ウイルスがヒトに感染して増殖するように、ファージは大腸菌に感染して自己複製する。ここで用いるファージは図1Aのように、その遺伝情報を担うDNAがコート蛋白質に覆われた構造を持っているが、このファージDNAに抗体やペプチドの遺伝子を挿入すれば、コート蛋白質の先端にそれぞれ融合蛋白質として提示させることができる(図1B)^{1)~3)}。

*Ken-ichi SUGA

1937年11月7日生
1967年大阪大学大学院工学研究科
応用化学専攻博士課程修了
現在、大阪大学大学院工学研究科、
応用生物工学専攻、教授、工学博士、
生物化学工学
TEL 06-879-7435
FAX 06-879-7435
E-Mail suga@bce.bio.eng.osaka-u.ac.jp



**Yoshio KATAKURA

1958年8月12日生
1984年大阪大学大学院工学研究科
博士前期課程醗酵工学専攻修了
現在、大阪大学大学院工学研究科、
応用生物工学専攻、助手、農学博士、
生物化学工学
TEL 06-879-7436
FAX 06-879-7439
E-Mail katakura@bce.bio.eng.osaka-u.ac.jp

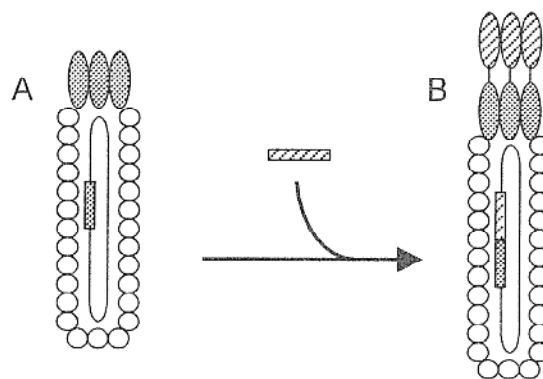
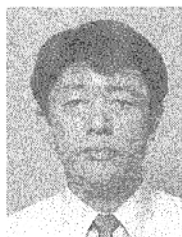


図1 ファージディスプレイ

3. ライブラリーの作成(図2)

脊椎動物は 10^7 種類以上の抗体のレパートリーを持っており、1つの抗体産生細胞が1種類の

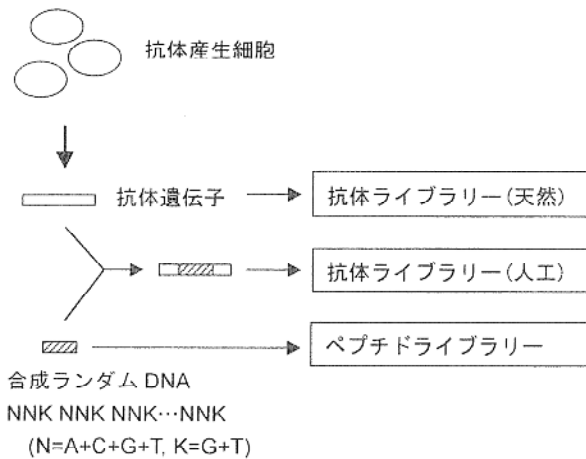


図2 フェージライブラリーに用いる遺伝子の調製

抗体遺伝子を生産する。そこで、脾臓細胞や血中のリンパ球などを集めて抗体遺伝子を取り出し、フェージの遺伝子に挿入して大腸菌に導入すれば、様々な抗体を提示したフェージのライブラリーを作ることができる²⁾。また、遺伝子はA, C, G, Tの4種の塩基から成り、3塩基単位でアミノ酸に翻訳され、一部重複して20種のアミノ酸に対応している。そこで例えばA, C, G, Tの等モル混合物を用いて18残基のDNAを合成すれば、 $4^{18} \approx 7 \times 10^{10}$ 通りのDNA配列ができ(実際には3残基目をGとTの等モル混合物にしても20種全てのアミノ酸に対応できるので 1×10^9 通り)、これらは $20^6 \approx 6 \times 10^7$ 通りのアミノ酸配列に対応する。このランダムDNAをフェージの遺伝子に挿入すれば、個々のフェージがそれぞれ1種類のペプチドを提示した 6×10^7 通りのペプチドライブラリーを作ることができる³⁾⁴⁾。更に、単離したある抗体の遺伝子について、その抗原認識に深く係わる部分をこのランダムDNAに置き換え、フェージDNAに挿入すれば、天然には存在しない様々な特性を持つ抗体ライブラリーを作成することもできる。

4. ライブラリーからの選択

作成したライブラリーから、目的蛋白質に対して親和性を持つペプチドや抗体を提示したフェージを選択する操作をバイオパニングと言ひ、目的蛋白質に対する親和性を利用して行う(図3)^{3), 4), 6)}。即ち、(A)固層に目的蛋白質を

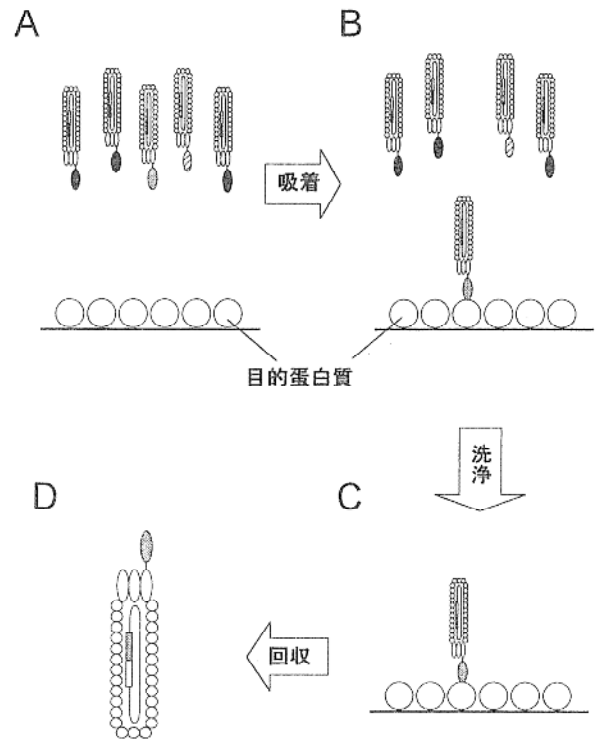


図3 バイオパニング

固定し、 $10^{11} \sim 10^{12}$ のフェージを含むライブラリーの溶液を加える。(B)目的蛋白質に親和性を持つフェージを吸着させる。(C)吸着されなかったフェージを洗浄して除去した後、(D)目的蛋白質に結合したフェージを回収する。回収したフェージは宿主大腸菌に感染させれば、数時間で $10^{11} \sim 10^{12}$ 倍に増幅することができ、ペプチドや抗体のアミノ酸配列を読みとることができる。

このシステムのポイントは、(1)回収したフェージ自身がその提示しているリガンドの遺伝子を持っており、(2)理論的には1分子のフェージを回収できれば宿主大腸菌に感染させて増やすことができ、(3) $10^8 \sim 10^9$ 規模のフェージライブラリーからわずか1~2週間程度で目的のリガンドを選択できることにある¹⁾。

5. ペプチドリガンドの単離

抗体はその抗原に対して特異的に結合し、 $10^9 \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 程度の高い親和定数を持っている。しかし、抗体は少なくとも約1,500アミノ酸残基からなる大きな蛋白質であるため、コスト、ハンドリングなどの面でやや難点がある。これ

に対してペプチドは安価に化学合成することが可能で、ハンドリングも容易である。実際に抗原と直接接触している抗体のアミノ酸残基は8～20残基程度であることが知られているので、我々は6～10残基程度のペプチドでも実用に耐える特異性と親和性を持つリガンドが得られると考えた。そこで、牛豚臓由来のリボヌクレアーゼA (RNase A)を一般の蛋白質のモデルとして、これに結合するペプチドを7残基のランダムペプチドを提示するファージライブラリーから選択した。その結果、Ser-Pro-Trp-Asp-Ala-Arg-Leuなどの配列を提示するファージが得られた。このペプチドを化学合成し、RNase Aに対する親和定数を測定したところ、 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ であった。また、このペプチドはRNase Aとよく似た物理化学的性質を持つ cytochrom Cには結合しなかった。

6. 選択条件をリガンドの特性の関係

脊椎動物に免疫して抗体を得る場合、得られる抗体はその動物が抗原から身を守るのに適した特性を持った抗体であり、抗体を使う側にとってその特性が都合の良いものであるとは限らない。例えば、抗体をアフィニティクロマトグラフィのリガンドとする場合、目的蛋白質(抗原)をリガンドから解離させ回収しなければならない。一般に抗原抗体の結合は、水素結合と疎水性相互作用などで成り立っており、静電的な結合の寄与は小さい⁵⁾。従って、その解離には高濃度の極性溶媒や強いカオトロピックイオンの添加が必要で、目的蛋白質や抗体が不可逆失活してしまうことも珍しくない。仮に静電的な結合の寄与が大きい抗体があれば、NaClを添加するなど目的蛋白質にとって温和な条件で解離させることができるが、このような抗体は生体内のイオン強度(約0.2M)では抗原に対する親和性が低下するので、淘汰されおそらく存在しないだろう。そこで、我々はまずジスルフィド結合によって構造を限定した6残基のランダムペプチドライブラリーから、低イオン強度でRNase Aに結合し高イオン強度で解離するペプチドリガンドの選択を行った。その結果、ラ

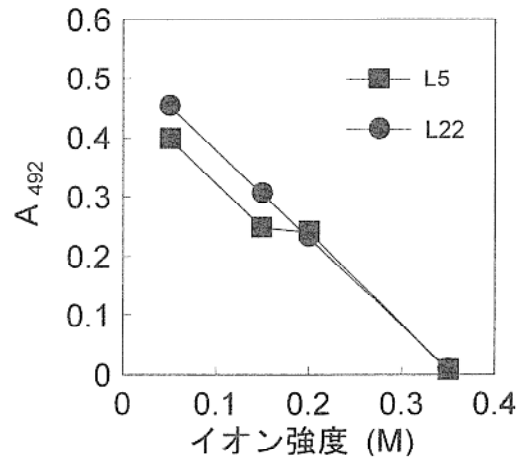


図4 得られたペプチドのRNase Aに対する親和性に及ぼすイオン強度の影響

ンダム部分の配列として Asn-Tyr-Asp-Leu-Gln-Glu(L5)及び Leu-Gln-Asp-His-Trp-Leu(L22)を持つファージを得た(下線は荷電を持つアミノ酸)⁶⁾。RNase Aは正荷電を多く持つ蛋白質であり、負に荷電した Asp, Gluとの静電的な結合が期待できる。実際、このペプチドを提示するファージとRNase Aの間の結合をELISA法で調べたところ、NaCl濃度の上昇と共に結合は顕著に弱まった(図4)。この結果は、得られたペプチドをリガンドとしてアフィニティクロマトグラフィを行えば、塩濃度を上げることによって目的蛋白質を解離させ回収できることを意味している。

7. 終わりに

ランダム配列を導入した人工抗体ライブラリーにおいても同様の手法を用いれば温和な塩による解離が可能な抗体が得られると考えられる。また例えば、目的蛋白質が仮に、pH 5～8の範囲で安定であれば、pH 8で結合し、pH 5で解離する抗体をライブラリーから選択すれば、目的蛋白質が安定なpHでアフィニティクロマトグラフィを行うことができるだろう。即ち、ファージディスプレイは、目的蛋白質に対するリガンドを迅速に選択できるだけでなく、選択条件を工夫すれば、望む特性を持つリガンドを同時に選択することができるシステムである。

参 考 文 献

- 1) 堀内賢介, 東谷篤志; 蛋白質核酸酵素, 37, 2589-2598(1992).
- 2) Winter, G. and Milstein, C., Nature, 349, 293-299 (1991).
- 3) Lowman, H. B., Annu. Rev. Biomol. Struct., 26, 401-424 (1997).
- 4) Smith, G. P. and Scott, J. K., Methods in Enzymol., 217, 228-257 (1993).
- 5) Katakura, Y., Kumamoto, T., Iwai, Y., Kurokawa, Y., Omasa, T., and Suga, K., Mol. Immunol., 34, 731-734 (1997).
- 6) Katakura, Y., Lim, E., Tujii, S., Omasa, T., and Suga, K., J. Ferm. Bioeng., 85, 447-450 (1998).

