

変異導入による抗体の交叉反応性改善

武 藤 悠*¹
松 葉 隆 雄*¹

Improving the Cross-Reactivity of an Antibody Using Site-Directed Mutagenesis

Yu MUTO
Takao MATSUBA

Isolation of monoclonal antibodies with high affinity and specificity is difficult. Therefore, we have established a technology to obtain high performance rabbit monoclonal antibodies. With this technology, we can acquire highly functional antibodies, but the selection from numerous candidate antibodies is laborious and time-consuming. In the present study, we have devised a novel method to isolate high performance monoclonal antibodies by introducing amino acid mutation to an antibody that has high affinity but does not have sufficient specificity for diagnostic use. We performed alanine-scanning on CDR3 of an immunoglobulin heavy chain to determine the amino acids that were not involved in antigen recognition. After introducing the mutation to the amino acids that did not relate to binding, cross-reactivity of the antibody was improved without decreasing its affinity. By using this technique, specificity of the monoclonal anti-triiodothyronine antibody (UT2AY-5), which has cross-reactivity to metabolites of diclofenac (a non-steroidal anti-inflammatory drug), was improved. Thus, this technique is expected to be useful for making high performance monoclonal antibodies in a short period of time.

1. 緒 言

モノクローナル抗体は標的抗原に特異的かつ高親和性に結合することから、ELISA、ウエスタンブロットなどの実験用試薬としてだけでなく、癌・自己免疫疾患などの治療薬、免疫診断薬の中核材料として広く利用されている。これらの用途で使用する抗体は特に高い親和性と特異性が要求されるが、それらを兼ね備えた抗体を単離するのは難しく、特に低分子抗原を高い特異性で認識する抗体の単離は非常に困難である。これは低分子抗原では、抗体と相互作用することのできる部分が限られること、さらに類似の構造をもつ化合物が多く存在することに起因する。

我々はこれまでに、高性能抗体の取得技術としてウサギモノクローナル抗体創製技術¹⁾を確立し、低分子抗原に対して高い特異性と親和性で結合できる抗体を単離した。しかし、特異性と親和性の両方が高い抗体

は、膨大な数の候補抗体の中から選別する必要があり、この工程に多くの時間と労力が必要であった。そこで、親和性は高いが特異性の改善が必要な抗体へアミノ酸変異を導入することで、高親和性と高特異性を兼ね備えた抗体に改変する検討を行った。

抗体の抗原認識能は、相補性決定領域 (complementarity determining region : CDR) と呼ばれる、抗原と直接接触する5～10残基程度のアミノ酸領域により決定される。このCDRのアミノ酸に変異を導入することで抗体の機能を改変する研究は、ファージディスプレイ^{2, 3)}という手法を用いて広く行われている。ファージディスプレイでは、CDRヘランダム変異を導入した組換Fab断片をファージ上に表示させ、パニング法により目的抗体のスクリーニングを行う。しかし、パニング法を用いたスクリーニングでは抗体の濃度の影響を無視できず、ライブラリー中に微量にしか存在しない高機能抗体の単離は原理的に不可能であった。このため、より系統的な方法を用い

* 1 バイオサイエンス事業部 開発部 技術開発 G

た抗体機能改変技術が必要とされていた。

今回我々は、抗体の抗原結合に最も寄与が大きいといわれる CDR3 領域に着目し、系統的なアミノ酸変異を導入することで、抗体の親和性を低減させずに、特異性を改善する技術の構築に成功した。この論文では、ジクロフェナク代謝物に対して交叉反応性を示す抗 T3 抗体 (抗トリヨードサイロニン抗体: UT2AY-5) の交叉反応性の低減に関して報告する。

2. 実 験

[1] 抗 T3 ウサギモノクローナル抗体の単離

高親和性を示す抗 T3 ウサギモノクローナル抗体は、BSA-T3 を免疫したウサギ (日本白色種) から脾臓を摘出し、定法に従って脾臓細胞を調整した後、ウサギモノクローナル抗体創製技術¹⁾ を用いて単離した。

[2] 変異導入抗体の発現とスクリーニング

(1) 抗体遺伝子への変異導入

抗体遺伝子への変異導入は、変異配列を導入した PCR プライマーを作製し、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡績株式会社製) を用いて行った。

(2) 変異導入抗体の発現 (COS 細胞による一過性発現)

COS 細胞で、変異を導入した遺伝子組み換え抗体の生産を行った^{4,5)}。96 ウェルプレート上で対数増殖期にある COS 細胞に、変異を導入した H 鎖発現ベクター (8 ng) と L 鎖発現ベクター (16 ng) を、リポフェクタミン 2000 (ライフテクノロジー社製) を用いて導入した。遺伝子導入時の培地は、Opti-MEM (ライフテクノロジー社製) を使用した。遺伝子導入から 3 日後に培養上清を回収し、発現抗体を評価した。

(3) ELISA

培養上清中の抗 T3 抗体は下記の方法で検出した。

α Rabbit-IgG (0.5 μ g/mL) を ELISA プレートに固定化した後、1% スキムミルクでブロッキングした。その後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識 T3 存在下で、遺伝子導入後の細胞培養上清を ELISA プレート上で 1 時間反応させた。未反応の ALP 標識 T3 を B/F 分離後、酵素基質である 4-メチルウンベリフェリルリン酸 (4-MUP) を分注し、蛍光強度を測定することで検出した。

[3] 変異導入配列の確認

抗体遺伝子の塩基配列は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて解析した。

[4] AIA 装置上での親和性の評価

競合法の測定原理上、抗体の親和性が高いほど、下記に示す B/B0 の値が小さくなり、競合がかかりやすい⁶⁾。つまり B/B0 の値を測定することで抗体の親和性を相対的に比較することができる。そこで、アミノ酸変異を導入した抗 T3 ウサギモノクローナル抗体の親和性の相対評価は、全自動エンザイムイムノアッセイ装置 AIA 600II (東ソー株式会社製) を用いて下記の方法で行った。まず変異抗体を使用した AIA600II 用の試薬 (以下 AIA 試薬と省略) を作製し、T3 を含まない血清 (cal1) と既知濃度 (35 μ g/mL) の T3 を含む血清 (cal6) を測定した。その後 B/B0 の値を、(cal6/cal1) \times 100 の計算式で算出した。得られた値と変異導入前の抗体の B/B0 とを下記に示す計算式で比較した。

$$\text{親和性 (\%)} = \frac{(100 - B/B0)_{\text{変異型}}}{(100 - B/B0)_{\text{野生型}}} \times 100$$

[5] AIA 装置上での交叉反応性の評価

ジクロフェナク代謝物に対する交叉反応性評価は、下記の方法で行なった。まず評価したい抗体で AIA 試薬を作製し、ジクロフェナク服用前および服用 2 時間後のヒト血清を測定した。AIA600II で得られる蛍光強度の値 (服用前: rate 0, 服用後: rate 1) の比をとり、変化割合を下記の式で比較することで行った。

$$\text{交叉反応率 (\%)} = \frac{(1 - \text{rate}1 / \text{rate}0)_{\text{変異型}}}{(1 - \text{rate}1 / \text{rate}0)_{\text{野生型}}} \times 100$$

[6] 変異導入抗体の親和性測定

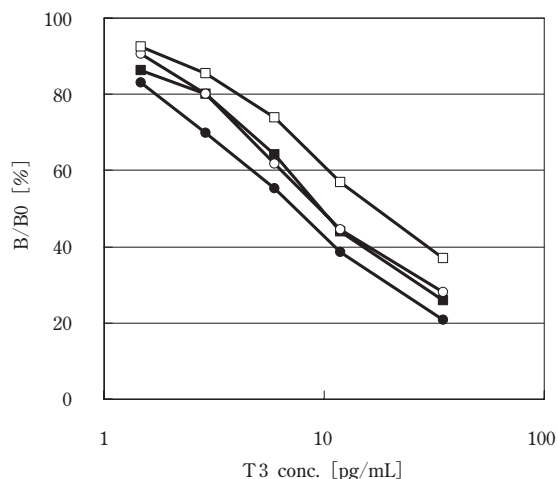
BIAcore T-100 (GE ヘルスケア社製) を用いて、変異導入前後のウサギモノクローナル抗体 (UT2AY-5, UT2AY-5mu2) の親和性を下記に示す方法で測定した。T3 をアミンカップリング法で、センサーチップ (CM5) 上に固定化し、ランニング緩衝液: HBS-EP、反応温度: 25 $^{\circ}$ C、流速 30 μ L/min、結合時間: 1 min、解離時間 10 min の条件で抗体の結合と解離を測定した。また得られたデータは、解析ソフト (BIAcore T100 Evaluation Software, version. 1.1.1) を用い、bivalent モデルで解析し、ka ($M^{-1}s^{-1}$)、kd (s^{-1})、KD (M) の値を算出した。

3. 結果および考察

[1] 変異導入前の抗 T3 抗体の性能

ウサギモノクローナル抗体創製技術を用いて数種の抗 T3 モノクローナル抗体を単離した。単離抗体を用

いてAIA 試薬を作製し、検量線を作成した結果を図1に示す。単離した抗体の中で、UT2AY-5は最も親和性の高い抗体であるが、ジクロフェナク代謝物に対して交叉反応性を示していた。今回、この抗体を特異性改変の材料として選択した。



Calibration curves of T3 measured with the AIA reagent using ●; UT2AY-5, ○; UT2AY-4, ■; UT1D-5, □; UT6AY-10 are shown. B0 means the value of the calibrator without T3 and B means the value of the calibrator containing T3.

Fig. 1 Comparison of calibration curve of the AIA reagents using isolated antibodies

[2] アミノ酸変異導入位置の決定

H鎖のCDR3配列は抗原との結合に最も寄与が大きいことが知られている⁷⁾。まず、配列中の特徴的なアミノ酸が交叉反応に参与するアミノ酸であると考え、同一のウサギ個体から得られた2種の抗T3抗体のH鎖CDR3領域の配列を比較した(表1; UT2AY-4, UT2AY-5)。その結果、UT2AY-5において、5、8、

10番目を特徴的なアミノ酸であると判断した。番号5は単純な骨格のアラニンに対して極性アミノ酸のアスパラギン、番号8はグリシンに対して酸性アミノ酸のアスパラギン酸、番号10は欠損に対して塩基性アミノ酸のアルギニンという組み合わせになっている。そこで、これら3箇所のアミノ酸に対してランダムにアミノ酸置換を行った。

[3] 変異導入抗体の親和性と交叉反応性の評価

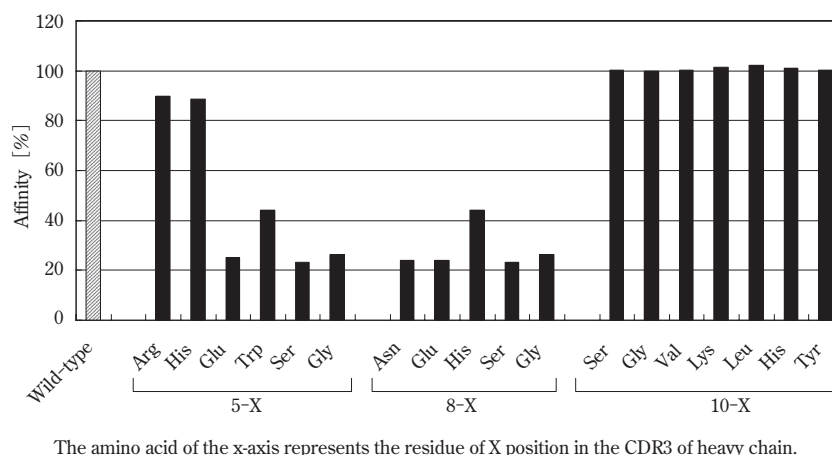
UT2AY-5のアミノ酸番号5, 8, 10の位置にランダムにアミノ酸置換を行った各抗体(表1; 5-X, 8-X, 10-X)の親和性を、AIA 600IIで評価した。その結果、アミノ酸番号8の位置の置換抗体では親和性が大きく低下してしまうことがわかった。また、アミノ酸番号5の位置の置換抗体では、ArgおよびHisへの変異は親和性の低下は少なかったが、それ以外では大きく低下してしまった。この現象がどこに起因するかは推測できず、より詳細な考察を行うにはX線結晶構造解析などを用いて、タンパクの立体情報を得る必要がある。アミノ酸番号10の位置を置換した抗体では親和性の変化はなかった(図2)。これは10の位置のアミノ酸がT3の認識に関与していないためだと考えられる。

親和性の変化がなかったアミノ酸番号10の位置の変異型抗体に対して交叉反応性を評価した。結果を図3に示す。アミノ酸番号10のArgをLysに置換した変異型抗体では交叉反応性の改善は見られないが、Glyに置換した変異型抗体(10G)はwild-typeと比較して、交叉反応性を40%まで低減できた。これらの結果から、アミノ酸番号10の位置の塩基性アミノ酸側鎖がジクロフェナク代謝物との交叉反応に参与し

Table 1 CDR-H3 sequences of anti-T3 antibodies

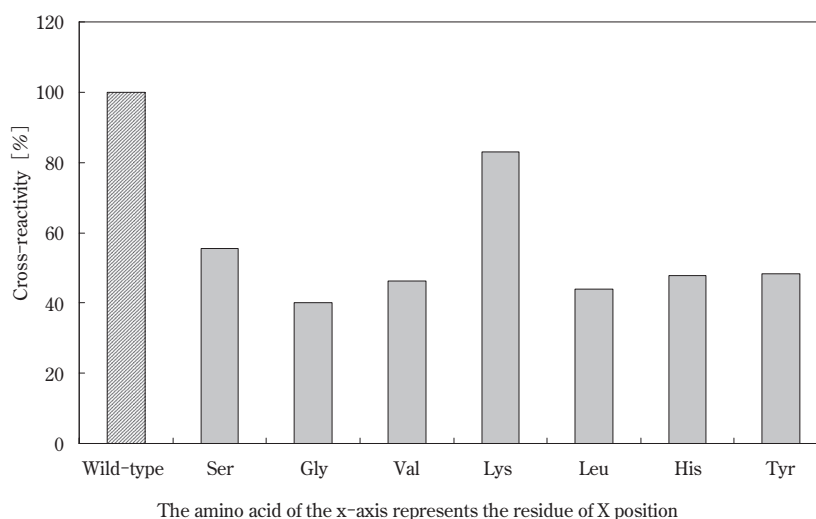
Antibody	amino acid sequense number											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
UT2AY-4	Arg	Ala	Ser	Arg	Ala	Tyr	Ile	Gly	Phe	-	Asn	Leu
UT2AY-5	-	-	-	Arg	Asn	Phe	Leu	Asp	Val	Arg	Asn	Leu
5-X					X							
8-X								X				
10-X										X		
10G												Gly
4A10G				Ala								Gly
6A10G					Ala							Gly
7A10G						Ala						Gly
9A10G									Ala			Gly
10G11A											Gly	Ala
10G12A											Gly	Ala
9X10G									X			Gly
UT2AY-5mu2									Trp			Gly

-(dash) : delated position. (blank) : blank position represents a same amino acid to UT2AY-5. X : X represents random mutated position.



The amino acid of the x-axis represents the residue of X position in the CDR3 of heavy chain.

Fig. 2 Comparison of affinity of wild-type and single mutation antibodies



The amino acid of the x-axis represents the residue of X position

Fig. 3 Comparison of cross-reactivity of wild-type and single mutation antibodies (10-X)

ていたことが考えられ、この位置の側鎖を削ったことで交叉反応性が改善できたと推測される。

以上、UT2AY-5 へのアミノ酸変異を導入し、得られた変異抗体の親和性と特異性を解析することで以下のことが示唆された。

- ①抗原結合に関与しているアミノ酸への変異導入により抗体の親和性は低下する
- ②抗原結合に直接関与しないアミノ酸への変異導入で親和性を低下させずに交叉反応性の改善が可能

[4] アラニンスキャニングによる変異導入位置の決定

[3] で得られた、アミノ酸番号 10 を Gly に置換した変異型抗体 (10G) の交叉反応性を更に改善するため、抗原結合に直接関与しない CDR3 のアミノ酸をアラニンスキャニング法により決定した。アラニンスキャニング法は、対象のアミノ酸を物理的・化学的に中性なアラニンに置換し、タンパク質の活性変化を調

べることで、置換位置の活性への寄与を評価する方法である⁸⁾。アラニン置換抗体 (表 1 ; 4A10G, 6A10G, 7A10G, 9A10G, 10G11A, 10G12A) を作製し、親和性の変化を評価した (図 4)。結果から、配列番号 9 の位置をアラニンに置換した抗体 (9A10G) で親和性が低下しないことがわかった。そこで配列番号 9 の位置へランダムにアミノ酸変異を導入して、特異性の改善を試みた。アミノ酸置換を行って得られた変異型抗体の親和性の変化、交叉反応性の変化を図 5、図 6 にそれぞれ示す。図 5 の結果から、配列番号 9 の位置にアミノ酸変異を導入しても親和性が低下しないことがわかった。このことから配列番号 9 のアミノ酸は抗原認識に直接関与しないアミノ酸であったと考えられる。さらに図 6 の結果から、アミノ酸番号 9 の位置を Trp に置換した抗体 (UT2AY-5mu2) で交叉反応性が最も改善できることがわかった。これは、嵩高い芳香族側鎖を持つ Trp への変異により交叉物質の反応ポケッ

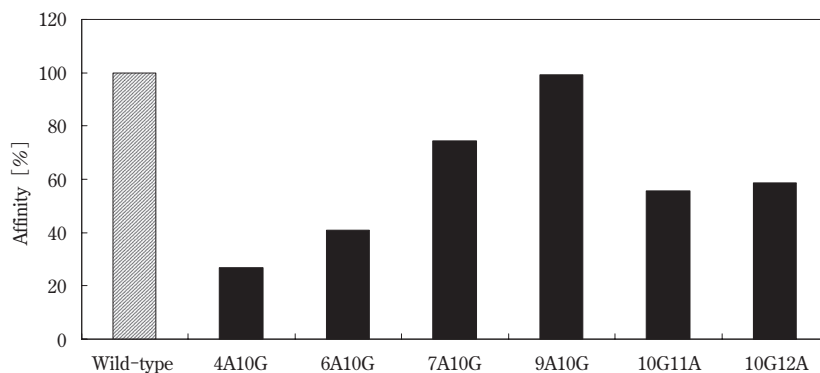


Fig. 4 Comparison of affinity of wild-type and alanine mutation antibodies

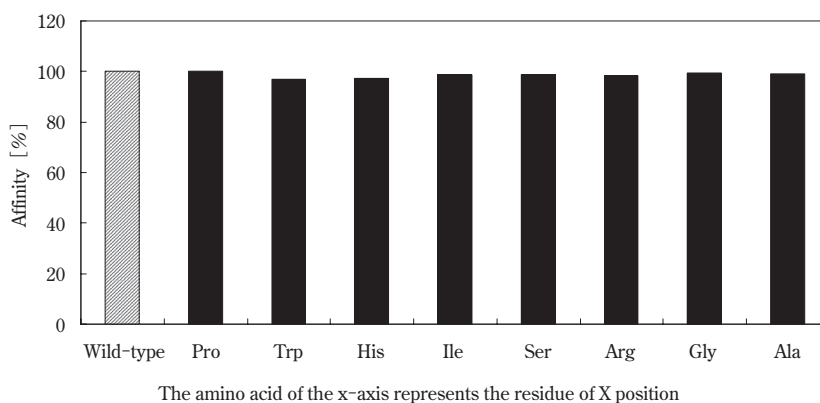


Fig. 5 Comparison of affinity of wild-type and double mutation antibodies (9X10G)

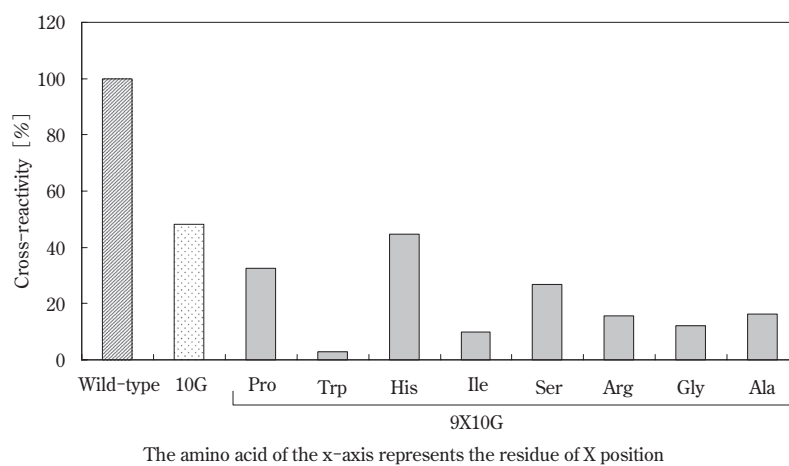


Fig. 6 Comparison of cross-reactivity of wild-type and mutation antibodies (10G, 9X10G)

トが塞がれたためだと推測できる。

[5] AIA 試薬形態での変異型抗体の評価結果

変異導入前の抗体 (UT2AY-5) と変異導入後の抗体 (UT2AY-5mu2) を AIA 試薬形態で検量線を比較した結果を図 7 (A) に示す。また 2 つの抗体を用いて、ジクロフェナク服用前後の検体中の T3 濃度を測定し

た結果を図 7 (B) に示す。結果から、UT2AY-5mu2 は UT2AY-5 と同等の検量線を描くことが分かり、T3 に対する親和性は変化していないと考えられる。また、ジクロフェナク服用検体を測定した際、UT2AY-5 を用いた測定試薬では交叉反応により偽高値を示すが、UT2AY-5mu2 では交叉反応が回避され、正確な T3 濃度を測定することが可能となった。

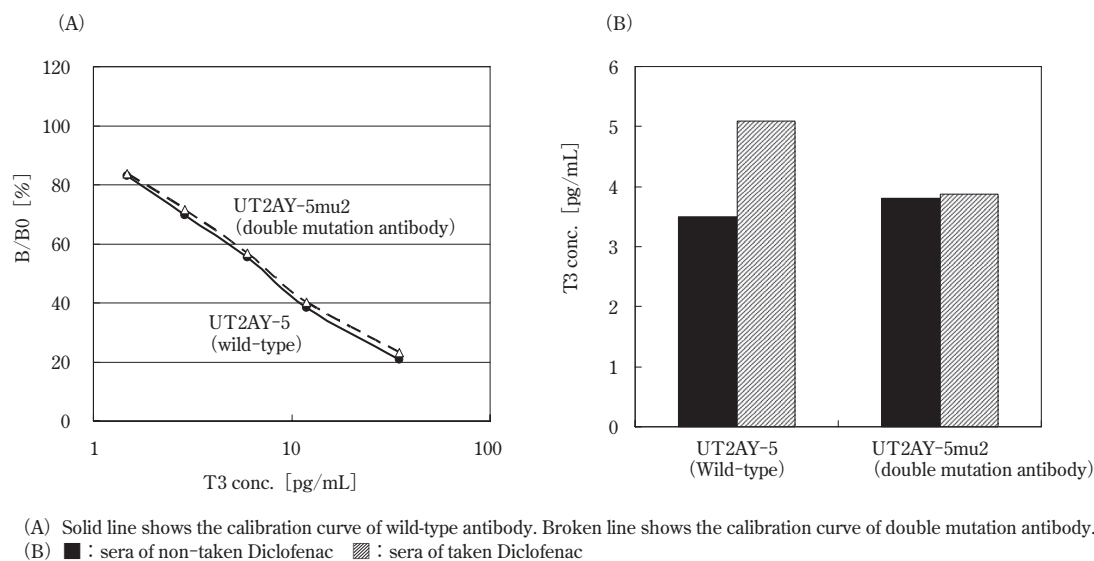


Fig. 7 (A) Standard curve for the T3 immunoassay on AIA-system
 (B) T3 concentrations in the sera of patients

[6] 変異型抗体の親和性

変異導入前後の抗体の親和性を BIAcore T-100 で解析した。図 8 は、代表例として UT2AY-5 を解析した際のセンサーグラムを示し、このグラフから k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_d (s^{-1})、 KD (M) 値を計算した。

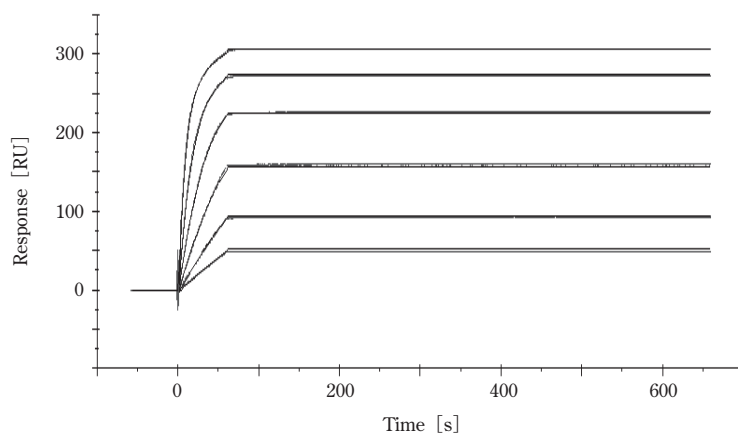
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)
UT2AY-5	1.1×10^6	3.2×10^{-6}	2.8×10^{-12}
UT2AY-5mu2	1.5×10^6	1.7×10^{-6}	1.1×10^{-12}

免疫アッセイによる物質定量の実践においては、反応時間が限定されるため、多くの場合、反応は平衡に達していない。したがって、実践における抗原抗体反応の評価は、静的なパラメーターの解離定数 (KD) でなく、動的なパラメーターの会合速度定数 (k_a) および解離速度定数 (k_d) によって評価することが好ま

しい⁹⁾。今回の抗体では、変異導入前後で、静的パラメーターである KD も、動的パラメーターである k_a 、 k_d もほぼ同等の値を示すことから、抗体の親和性に影響を与えずに、変異導入が行えていると言える。

4. 結 論

本研究により、抗体の親和性を低下させずに交叉反応性を改善する技術を確立した。この技術は、まずアラニンスキャンニングにより CDR 領域で抗原認識に関与しないアミノ酸を選定し、次にそのアミノ酸に対してランダムに置換を行うことで達成される。本技術は他のモノクローナル抗体に対しても適用可能であり、EE2 (エチニルエストラジオール) に対して交叉反応



UT2AY-5 was injected 6 different concentrations (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 and 0.78 nM; top to bottom) between = 0 and 60 s.

Fig. 8 Concentration series for capture of UT2AY-5 to immobilized T3

を示す抗 E2 (エストラジオール) モノクローナル抗体に適用し、交叉反応性を改善している。

これまでのファージディスプレイを用いた CDR へのランダム変異による抗体機能の改変は、パニング法によるスクリーニングを行うため抗体濃度の影響を無視できなかった。今回の交叉反応性改善技術は、アラニンスキャニングを行い、変異導入箇所を限定することで評価対象の変異型抗体を絞り込み、パニング法によらないスクリーニングが可能となった。

今回の報告では、抗原との結合に最も寄与が大きいことが知られている H 鎖の CDR3 にのみ変異導入を行っているが、他の CDR に対しても同様の方法を適用可能である。他の CDR へ変異導入を行うことで、さらに高機能な抗体の単離が期待される。

この技術を適応することで、高親和性と高特異性を有した抗体を短期間に効率よく取得することができる。今後、本技術を適用することで高特異性のモノクローナル抗体を単離し、AIA 試薬性能の向上を行っていく予定である。

5. 謝 辞

本研究を行うに当たり種々の実験でお世話になった相馬麗さん、池野佳恵さんに感謝いたします。

文 献

- 1) 松葉隆雄、三苦惠民、田中千代、井上益男、東ソー研究・技術報告、52、3 (2008)
- 2) アリ・ヘンミンキ、公表特許公報、特表 2001-515921
- 3) J. D. Marks, H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, *J.Mol.Biol.*, 222, 581 (1991)
- 4) Y. Iba, T. Kaneko, T. Ekida, K. Miyata, K. Inouye, Y. Kurosawa, K. Yasukawa, *Biotechnol. Lett.*, 17, 135 (1995)
- 5) K. Takagi, K. Yasukawa, Y. Iba, Y. Isobe, Y. Suketa, R. Kannagi, K. Kohda, M. Takagi, T. Imanaka, *J. Ferm. Bioeng.*, 79, 405 (1995)
- 6) 小林典裕、加藤芳徳、大山浩之、後藤順一、Y A K U G A K U Z A S S H I、127、55 (2007)
- 7) M. Jain, N. Kamal, S. K. Batra, *Trends. Biotechnol.*, 25, 307 (2007)
- 8) I. E. Collier, P. A. Krasnov, A. Y. Strongin, H. B. Hnasen, G. I. Goldberg, *J. Biol. Chem.*, 267, 6776 (1992)
- 9) D. H. Choi, Y. Katakura, K. Ninomiya, S. Shioya, *J. Biosci. Bioeng.*, 105, 261 (2008)