

# ハプテン免疫アッセイの 超高感度化

——「抗体工学」に寄せる期待——



小林 典裕

## 1 はじめに

1959年にラジオイムノアッセイが報告されて以来、イムノアッセイ法は目覚ましい発展を遂げ、低分子から高分子まで多岐にわたる化合物の超微量分析に必須の方法論となった。本法では標的物質（抗原）に対する抗体が分析試薬として機能し、「鍵と鍵穴」に例えられる分子認識力を発揮するため極めて特異的である。測定原理により競合法と非競合法に大別されるが<sup>1)</sup>、多数の抗原決定基をもつ高分子抗原（タンパク質など）には非競合型のサンドイッチアッセイが適用できる。抗原を過剰量の固定化抗体で捕捉した後、更に標識抗体を反応させて検出するもので、amol~zmol レンジの超高感度が得られる。しかし、ハプテン（低分子抗原；合成医薬品やステロイドなど）では、同時に2種の抗体が結合できないため、競合法に頼らざるを得ない<sup>1)</sup>。一定量の抗体と標識抗原が反応する系に測定対象の抗原を添加して競合反応を行うもので、標準曲線上、任意の抗原添加濃度（X pM）における  $B/B_0$  値（標識抗原の結合阻害率の尺度）は次式から算出される<sup>2)</sup>。

$$B/B_0 = \frac{A}{X+A} \times \frac{K_d + X + A + R - \sqrt{(K_d + X + A + R)^2 - 4R(X+A)}}{K_d + A + R - \sqrt{(K_d + A + R)^2 - 4RA}}$$

A (pM) = 標識抗原の濃度, R (pM) = 抗体の抗原結合部位の濃度,

$K_d$  (pM) = 抗体の解離定数

いま、便宜的に  $B/B_0 = 0.90$ （標識抗原の結合を10% 阻害する点）を与える抗原量をアッセイ感度の目安として試算してみる。アッセイ反応液の体積を 200  $\mu$ L、標識抗原濃度 A を 5 pM (<sup>125</sup>I による 1:1 標識抗原ならば約 4400 dpm/assay に相当し、現実的な値である)、そして添加した標識抗原の 50% を結合するように R の値を設定すると（この条件では  $R = K_d + 1/2 A$  となる<sup>2)</sup>）、解離定数  $K_d = 1.0 \times 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$  (M) の各抗体を用いた場合、それぞれ 810, 81, 8.2 fmol/assay の値が得られる。すなわち  $K_d$  値が小さいほど {親和定数  $K_a (=1/K_d)$  の値が大きいほど} 感度は上昇するが、動物を目的抗原で免疫する従来の方法では、 $10^{-10}$  (M) を下回る抗ハプテン抗体を調製することは極めて難しい。このためハプテン免疫アッセイの感度は fmol/assay のレベルにとどまっている。この制約を打破するためには、ハプテンに適用が可能な非競合型

Potentiality of Antibody Engineering for the Ultrasensitive Hapten Immunoassays.

の新しいアッセイ原理を工夫するか<sup>1)</sup>、 $K_d \ll 10^{-10}$  (M) の抗体分子種を人為的に創製することになろう。

## 2 抗体の遺伝子工学（抗体工学）

抗体の抗原結合部位は、H鎖とL鎖の可変部ドメイン ( $V_H$  と  $V_L$ ) の間に位置する（図1, ①）。 $V_H$  と  $V_L$  は 110 残基あまりのアミノ酸から構築されるが、各々の3箇所に抗原との接触に特に重要なアミノ酸配列（相補性決定部；CDR）が存在する。遺伝子工学的に  $V_H, V_L$  全体あるいは CDR のアミノ酸配列を改変することにより、抗原に対する親和力や特異性を改善することが可能視され、1980年代末から多くの研究がなされてきた。ランダムな変異が導入された抗体フラグメント {一本鎖 Fv (scFv; ②) 又は Fab} の分子集団（ライブラリー）の中から目的の結合特性を“偶然に”獲得した分子種を単離するのがストラテジーの基幹である<sup>3)</sup>。一般に scFv 又は Fab をファージ粒子上に発現させて“ファージ抗体”のライブラリーとした後（ファージディスプレイ）、固定化抗原を用いるアフィニティー抽出（バイオパニング）により目的のファージ抗体を選択、回収する。得られるファージ抗体は極微量であるが、大腸菌に感染させることで容易に増やすことができる。ハプテン免疫アッセイのブレイクスルーを期待させる成果は今のところ極めて乏しいが、“抗体工学”のポテンシャルを示唆する貴重な成果を以下に紹介したい。

## 3 超高親和力抗ハプテン抗体フラグメントの創製

イリノイ大学の Boder らは、抗体工学の先端技術を駆使して、フルオレセイン基（FL）に対して fM オーダーの  $K_d$  値を示す超高親和力 scFv を創製した<sup>4)</sup>。マウス抗 FL 抗体（4-4-20）（図1; ①）に改変を加えた結果であるが、本抗体の  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインから構築された野生型 scFv は、ビオチン標識 FL (FL-bio) に対して 0.7 nM の  $K_d$  値を示す（②）。その

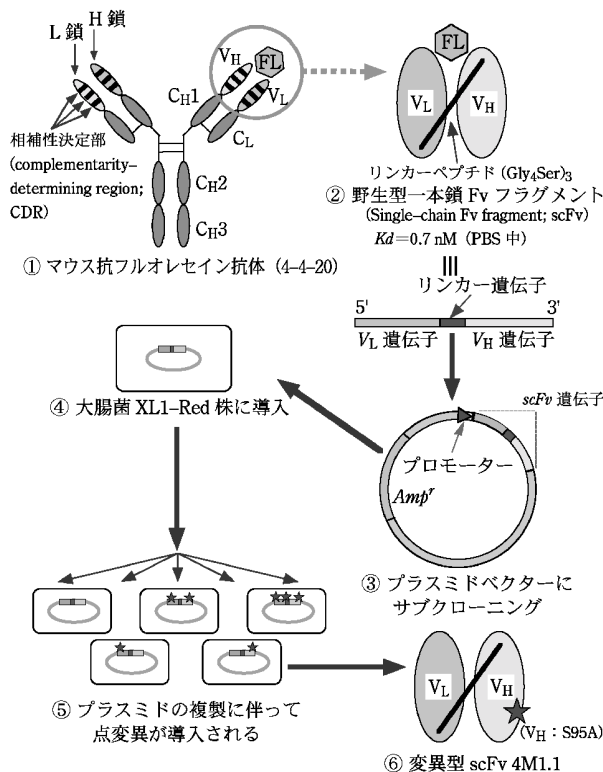


図1 超高親和力抗フルオレセイン抗体 scFv の創製 (1)

scFv 遺伝子を DNA 修復系を欠損した大腸菌 XL1-Red 株に導入することにより、ランダムな点変異が導入された scFv 遺伝子のライブラリーを得ているが (③~⑤), その産物の一つである scFv 4M1.1 {V<sub>H</sub> に Ser 95→Ala (S95A) の変異をもつ} は野生型より 3 倍大きな親和力を示した (⑥)。この 4M1.1 と他の変異クローンの scFv 遺伝子 (共に全長約 800 bp) を混合して “DNA シャッフリング”<sup>5)</sup> を行った (図 2; ⑦, ⑧)。すなわち、これらの遺伝子を DNase I でランダムに断片化した後、200 bp 以下のフラグメントをゲル濾過により回収して PCR に付すと、異なる scFv 遺伝子鎖に由来するフラグメントの間でランダムな再結合が起こる。その結果、個々の遺伝子に導入された点変異が様々なパターンで “連結” され、変異の多様性が拡大される。しかも、反応系に Mn<sup>2+</sup> を添加する “error-prone PCR” を行っているため (DNA の複製における相補性の忠実度を低下させる方法)、新たな点変異が更に導入される (⑧)。こうして得られた変異 scFv 遺伝子のライブラリーを、ディスプレイ用ベクター pCT302 に組み込んだ後、酵母 EBY100 株に導入した (⑨)。発現された scFv は Aga2p (細胞表層に局在する a-アグルチニンのサブユニットタンパク質) との融合体として酵母の細胞表層に提示される (⑩)<sup>6)</sup>。この酵母の集団に FL-bio を反応させた後、更にフィコエリトリン (蛍光性タンパク質) で標識したストレプトアビジンを反応させて蛍光ラベルする (FL 基の蛍光は scFv の結合により消光する可能性がある) (⑪)。引き続き、非蛍光性の抗原アナログである 5-アミノ-FL と一定時間反応させると、FL に対する親和力の小さい (解離速度定数  $k_{diss}$  の大きい) scFv が優先的に 5-アミノ体へ置換される。その後、なお FL-bio を保持

し、蛍光ラベルされている酵母をセルソーターにより選別した (⑫)。得られた高親和力 scFv 提示酵母群から scFv 遺伝子を回収し、変異の増幅と scFv 提示・選択 (⑦~⑫) を繰り返したところ、4 サイクル後に低塩濃度リン酸緩衝液 (LBS) 中で  $K_d = 48$  fM の超高親和力を示す変異 scFv (4M5.3) を提示する酵母クローンの単離に成功した (⑬)。この親和力は、遺伝子工学的に創製された変異タンパク質として最高で、その  $k_{diss}$  値 ( $1.4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ) はビオチン-ストレプトアビジン反応のそれをも下回る。アミノ酸配列をみると、V<sub>H</sub> で 12 残基 (5 残基が CDR 内)、V<sub>L</sub> では 2 残基 (1 残基が CDR 内) が変換されているが、CDR 以外の変異も親和力の改善に重要な役割を果たしている。この  $K_d$  値を前述の条件で式 (1) に代入すると 120 amol/assay の値が得られる。さらに、標識抗原濃度を 1/10 に減じると ( $A = 0.5 \text{ pM}$ ) 15 amol/assay の FL-bio が測定可能と期待できる。こうなるとサンドイッチアッセイの場合と同様に、標識物質の測定感度や標的ハプテンの非特異的な吸着の程度などがむしろアッセイ感度の限定因子となろうが、前者については在来の高感度検出系でも対応が可能であろう。

#### 4 おわりに

上記の報告がなされてから 4 年が経過しようとしているが、残念ながら 4M5.3 を上回る親和力の抗ハプテン抗体を創製した例は見当たらない。このような超高親和力抗体は、仮にライブラリーの中に実在しても、バイオパニングにより選別することは困難と思われる。固定化抗原からの溶出が難しいからである。Boder らの成功は、抗原抗体反応の解離が不要なプロセス、すなわち酵母表層ディスプレイとセルソーターによる選択を採用したことによるところが大であろう。この解離が不要な方法としてリボソームディスプレイ<sup>7)</sup>も挙げられる。ごく最近、チューリッヒ大学のグループが本法を基盤として  $K_d = 5 \text{ pM}$  の抗ペプチド抗体 scFv を創製した<sup>8)</sup>。その一方で、ファージディスプレイにおいても抗体の親和力に依存しない選択法の開発が進んでいる。こうしたバイオテクノロジーの進歩がハプテンの attomole~subattomole 分析への扉を開く日を期待する。

#### 文 献

- 1) 小林典裕, 後藤順一: 臨床化学, **33**, 90 (2004).
- 2) 若林克巳: “生化学実験講座 16, ホルモン (上)” ; pp. 158-171 (1977), (東京化学同人).
- 3) 小林典裕: 化学, **58**, 53 (2003).
- 4) E. T. Boder, K. S. Midelfort, K. D. Wittrup: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10701 (2000).
- 5) W. P. C. Stemmer: *Nature*, **370**, 389 (1994).
- 6) E. T. Boder, K. D. Wittrup: *Nat. Biotechnol.*, **15**, 553 (1997).
- 7) J. Hanes, A. Plückthun: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937 (1997).
- 8) C. Zahnd, S. Spinelli, B. Luginbühl, P. Amstutz, C. Cambillau, A. Plückthun: *J. Biol. Chem.*, **279**, 18870 (2004).

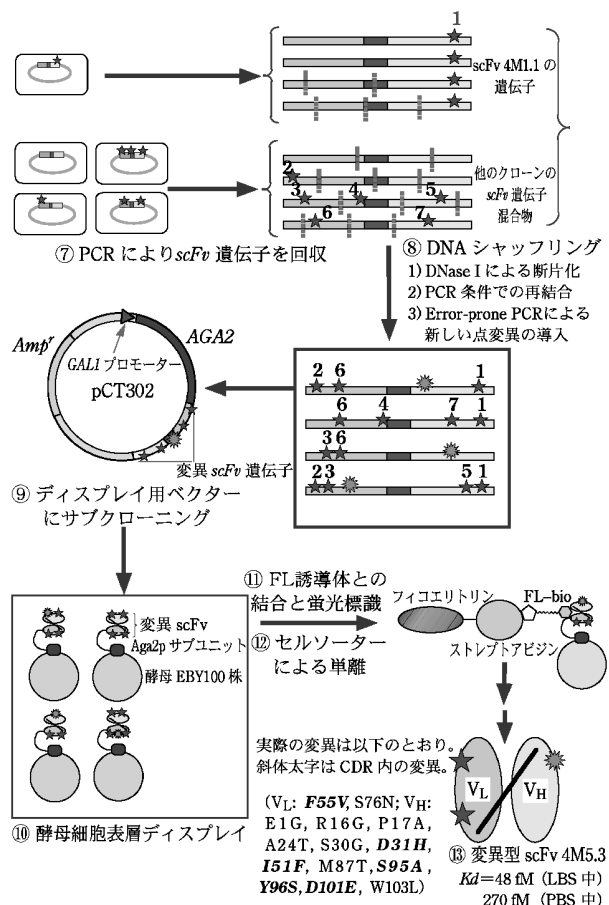


図 2 超高親和力抗フルオレセイン抗体 scFv の創製 (2)

小林典裕 (Norihiko KOBAYASHI)

神戸薬科大学生命分析化学研究室 (〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1)。東北大学大学院薬学研究科博士課程修了。薬学博士。<現在の研究テーマ>生体由来機能性分子の創製と生理活性物質の超微量分析への応用。<主な著書>“分析化学 II” (南江堂)。  
E-mail : no-kobay@kobepharmaceuticals-u.ac.jp

