

抗体工学を駆使して改変した抗体に基づく免疫沈降による精度の高い抗原分離技術の開発

Development of highly accurate antigen separation technology by immunoprecipitation based on antibodies modified by antibody engineering

国立がん研究センター先端医療開発センター 安西 高廣

【研究の目的】

細胞あるいは組織溶解液中に含まれるタンパク質（抗原）を、そのタンパク質（抗原）を認識する抗体を用いて分離する手法が免疫沈降である。免疫沈降は抗原の相互作用分子や複合体形成などの情報を得るための手法として汎用されているが、実際には結合を数多く拾ってしまうという擬陽性の高さが常に問題となっている。本研究は、免疫沈降に用いる抗体側に改変を加え、このような擬陽性を低減した精度の高い抗原分離技術を開発することを目的とする。

【研究の内容、成果】

1. パラトープ改変抗体の作製

免疫沈降実験でよく使われている汎用性のあるタグ抗体として、抗 FLAG タグ抗体 2H8（Ikeda et al. BBRC, 2017）、抗 His タグ抗体 3D5（Kaufmann et al. JMB, 2002）を選定した。各抗体のアミノ酸配列を論文より取得し、抗体可変領域の遺伝子配列を人工遺伝子合成により作製した。得られた遺伝子配列は PCR 増幅し、抗体定常領域を含むプラスミドベクターに組み込んだ。アミノ酸配列情報を基に 2H8（図 1）、3D5（図 2）のホモロジーモデルを構築した。構造上外側を向く可能性の高いアミノ酸残基を各 CDR 領域に対して 3 アミノ酸ずつ選択し、変異導入するためのプライマーを設計した。

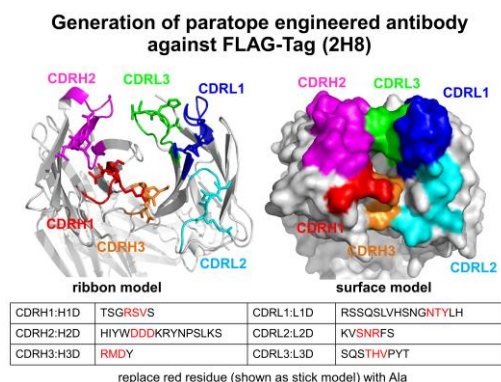


図 1

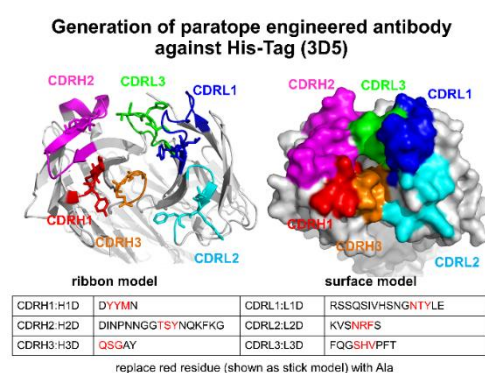


図 2

2, タグ抗体検出のための抗原作製

2H8 抗体（N 末端側 FLAG タグを認識）、3D5 抗体（His タグを認識）を ELISA で検出するための抗原として、FLAG-VenusA206K-His コンストラクトを設計、発現ベクターを作製した。Venus206K は緑色蛍光タンパク質の類縁体で、より明るい蛍光を発することから、精製時でも可視化することが可能である（図 3）。大腸菌 Rosetta2 株に形質転換した後、LB 培地にて培養、IPTG で発現誘導を行い、FLAG-VenusA206K-His を発現する大腸菌を回収した。超音波破碎を行い、Ni-NTA カラムにてアフィニティ精製を行った（図 3）。次に、ゲルろ過カラムによる精製を行い、濃縮して ELISA 実験に用いた。



図 3

3, パラトープ決定のための ELISA スクリーニング

2 で作製した 2H8 抗体変異体発現ベクターおよび 3D5 抗体変異体発現ベクターをそれぞれ CHO 細胞にトランスフェクションし、一過性発現を行った。培養上清を回収し、濃度定量のための ELISA を行って溶液中の抗体濃度を算出した。3 で作製した FLAG-VenusA206K-His タンパク質を ELISA 用プレートに固相化し、各抗体濃度を一定にして ELISA を行った。2H8 抗体では CDRH1、CDRH3、CDRL1、CDRL2（図 4）、3D5 抗体では CDRH1、CDRH3、CDRL1、CDRL3（図 5）が抗原となるタグへの結合に重要であることが示唆された。

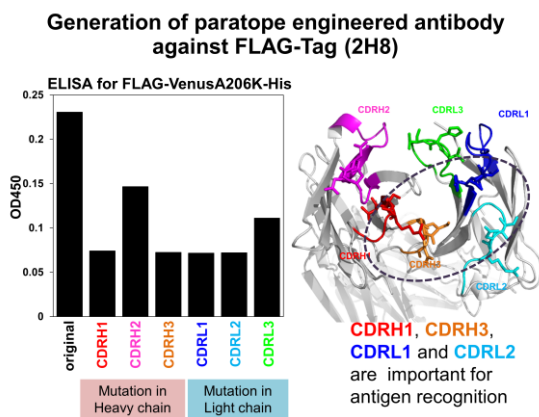


図 4

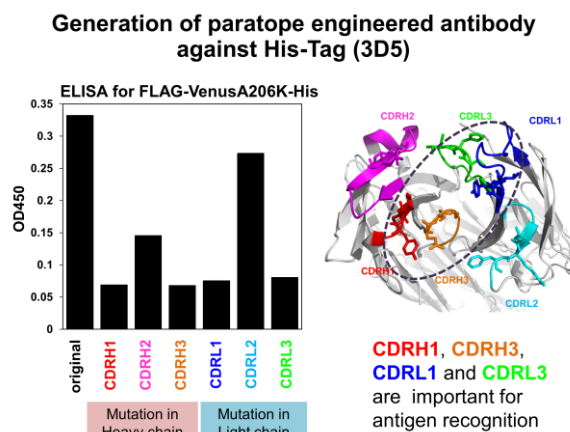


図 5

4, パラトープ決定

4 で絞り込んだパラトープ部位の候補を、H 鎖と L 鎖を組み合わせる CHO 細胞にて一過性発現させた。2H8 抗体では CDRH1、CDRH3、CDRL1、CDRL2（図 4）、3D5 抗体では CDRH1、CDRH3、CDRL1、CDRL3（図 5）作製した 2H8 抗体変異体発現ベクターおよび 3D5 抗体変異体発現ベクターをそれぞれ CHO 細胞にトランスフェクションし、一過性発現を行った。4 と同様に ELISA（感度を上げるため、3D5 用の固相化には His タグ融合 Tissue Factor を

用いた) を行ったところ、4 と同様に ELISA (感度を上げるため、3D5 用の固相化には His タグ融合 Tissue Factor を用いた) を行ったところ、2H8 抗体では CDRH1 と CDRL1 (図 6)、3D5 抗体では CDRH3 と CDRL1 (図 7) がパラトープであることが示唆された。

Generation of paratope engineered antibody against FLAG-Tag (2H8)

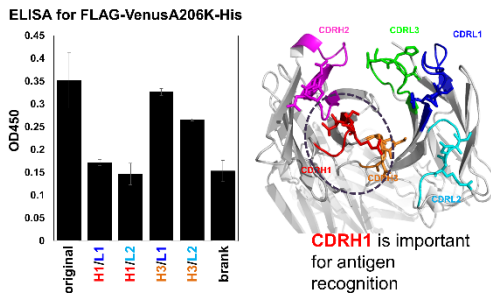


図 6

Generation of paratope engineered antibody against His-Tag (3D5)

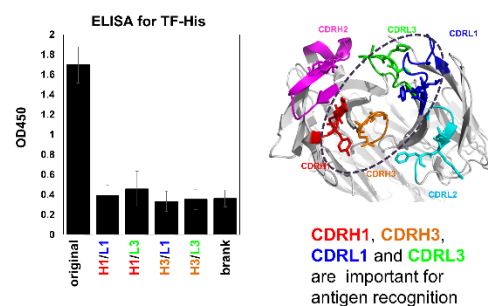


図 7

5. パラトープ改変抗体と改変前抗体を用いた免疫沈降

4 で構築に成功したパラトープ改変抗体を用いて免疫沈降を行った。2H8 は ELISA における結合能が 3D5 と比較して 1/5 程度と弱い
ため、開発には 3D5 を用いることにした。まず、免疫沈降用の抗体付加磁気ビーズを作製した。3D5、3D5 パラトープ改変抗体、コントロールとして抗 CD20 抗体である Rituximab を ProteinG 付加 FG ビーズ (多摩川精機) に結合した。ターゲットとなる His タグ配列付加融合タンパク質を HEK293T 細胞に一過性発現させ、細胞抽出液を調製した。作製した抗体付加磁気ビーズおよび磁気ビーズのみを室温で 30 分反応させ、磁気による精製をおこなった。精製した溶液の SDS-PAGE および銀染色を行った (図 8)。3D5 および 3D5 パラトープ改変抗体付加ビーズで免疫沈降を行ったサンプルを比較すると、ビーズ由来の抗体重鎖および軽鎖、白

Silver stain of immunoprecipitated samples

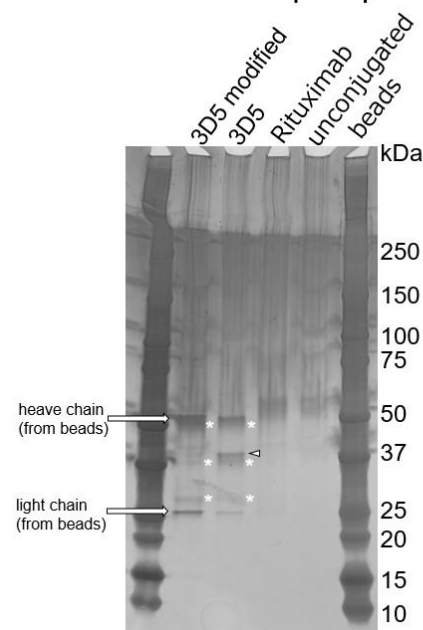


図 8

アスタリスクで示した非特異成分が等しく、かつ白い三角で示した His タグ配列付加融合タンパク質が免疫沈降できていることが示された。さらに、一般的な陰性コントロールとなりうる Rituximab 付加ビーズやビーズのみを添加したサンプルと比較して、パラトープ改変抗体付加ビーズを用いた場合、擬陽性が大きく低減されたことが示された。

【今後の研究の方向、課題】

本研究期間において、抗 His タグ抗体 3D5、抗 FLAG タグ抗体 2H8 の 2 つのクローンについてパラトープ改変抗体の作製に成功し、抗 His タグ抗体 3D5 について擬陽性を低減した免疫沈降を実施することができた。抗 FLAG タグ抗体 2H8 については、予想していたよりも抗原への結合能が低く、免疫沈降に用いることを断念した。最も汎用されていると考えられる抗 FLAG タグ抗体 M2 クローンに関する質量分析を用いたアミノ酸配列同定の論文（Peng et al. JProteomeRes, 2021）が公開されたことから、今後はこの抗体に関するパラトープ改変抗体の作製および免疫沈降法の確立を行い、本研究助成で得られた成果と合わせ、論文発表を行いたいと考えている。

【成果の発表、論文等】

本研究に関連する論文発表

Identification of CD73 as the antigen of an antigen unknown monoclonal antibody established by exosome immunization, and its antibody-drug conjugate exerts an antitumor effect on glioblastoma cell lines

Takahiro Anzai, Shinji Saijou, Hiroki Takashima, Misato Hara, Shingo Hanaoka, Yasuhiro Matsumura, Masahiro Yasunaga
bioRxiv 2021 doi:10.1101/2021.09.30.462527

本研究に関連する学会発表

抗体上の抗原認識部位であるパラトープ改変抗体の開発研究

安西 高廣、松村 保広、安永 正浩

第 37 回日本 DDS 学会学術集会

(2021.6.29-30 千葉・幕張/オンライン)

エクソソーム免疫により樹立したがん特異的抗原未知抗体の抗原決定と抗体開発研究

安西 高廣、安永 正浩

第 38 回日本 DDS 学会学術集会

(2022.6.29-30 オンライン)