

遊離型抗体の構造活性相関解析を迅速に評価可能とする新手法を開発

—ペプチドバーコーディングと高性能プロテオミクスによる
遊離型抗体のハイスループットな評価方法を構築—

【概要】

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の青木航助教、松崎友星修士課程学生（研究当時）、植田充美教授（現：産官学連携本部特任教授）は、数百の遊離型抗体^{注1}の結合能を一斉に評価できるシステムを開発し、抗体の構造活性相関を迅速に解析可能としました。

ある抗原に強く結合する抗体の同定には、時間と労力がかかります。抗体を単クローンごとに発現・評価する必要があるため、特に抗体の構造活性相関解析に時間と労力がかかっていました。そこで本研究では、質量分析計で同定可能なペプチドバーコード^{注2}を遊離型抗体に付加しつつ、結合能力に基づいて遊離型抗体群をゲルろ過クロマトグラフィーにより分画することで、解離定数の小さな違いを区別しつつ数百の遊離型抗体の結合能を一斉に評価できる新手法「ペプチドバーコーディング2.0」を開発しました（図1）。本研究により、抗体の構造活性相関を迅速に解析可能となり、結合能が高い抗体をより効率的に取得できるようになると期待されます。

本研究成果は、2021年11月2日に国際学術誌「Scientific Reports」に掲載されました。

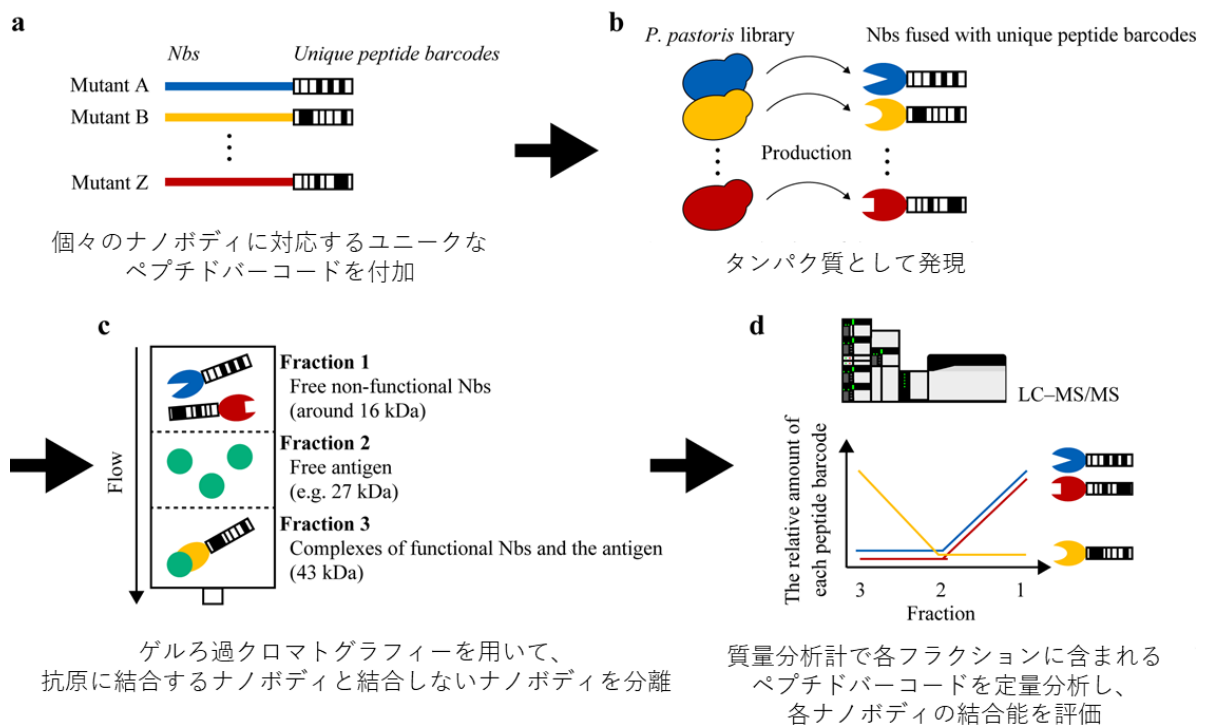


図1. 本研究で開発したペプチドバーコーディング2.0の概要

【背景】

抗原特異的で結合能が高い抗体の同定には多くの時間と労力がかかります。ファージディスプレイ等のディスプレイ法はハイスループットな抗体機能評価を可能にしますが、提示担体が抗体機能に影響を与えてしまうことが知られています。そのため、結合能を正確に評価するためには、抗体を個別に精製し、表面プラズモン共鳴^{注3}や ELISA^{注4}を用いて構造活性相関を解析する必要があり、時間と労力がかかっていました。複数の抗体の結合能を一斉評価するため、我々のグループでは、遊離型抗体にユニークに結合させたペプチドバーコードを質量分析計で検出する手法を開発してきました。本手法では、多数の遊離型抗体の混合物の中から、結合能が高い遊離型抗体のみを分離し、その抗体由来のペプチドバーコードを質量分析計で同定することで、結合能が高い抗体をハイスループット^{注5}に同定できます。ただ、既存の方法では、抗体間の結合能の違いを正確に評価できず、表面プラズモン共鳴や ELISA による抗体結合能の再評価が必要でした。そこで本研究では、当研究室で開発したペプチドバーコーディング法を改良し、数百種類の抗体の結合能を nM から sub-nM の範囲で正確に相対評価可能とする新規手法の開発を目指しました。

【研究手法・成果】

本研究では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に結合するナノボディ^{注6}をモデルとして採用しました。まず、ペプチドバーコードの付加が抗 GFP ナノボディの結合能に影響を与えないことを確認しました。様々な電荷と疎水度を持つペプチドをそれぞれ野生型の抗 GFP ナノボディに付加し、それらのナノボディの結合能を評価しました。その結果、ペプチドバーコードを付加した抗 GFP ナノボディの結合能は野生型と変わらず、ペプチドバーコードは抗 GFP ナノボディの結合能に影響を与えないことが示唆されました (表 1)。

次に、網羅的に作製した抗 GFP ナノボディ変異体に対して、それぞれの結合能を迅速に決定可能か調べました。それぞれにユニークなペプチドバーコードを付加した抗 GFP ナノボディの変異体ライブラリーを、GFP とともにゲルろ過クロマトグラフィー (SEC) に供しました。GFP と GFP に結合したナノボディ変異体の複合体のピークと、GFP と結合していないナノボディ変異体のピークに含まれる変異体由来のペプチドバーコードを質量分析計で定量分析しました。その結果、5つのナノボディ変異体 (R35A, Y37A, W47A, G50A, E103A) 由来のペプチドバーコードが GFP 非結合のナノボディ変異体のピークに多く含まれていました。それらのナノボディ変異体は GFP との結合能が低いことが示唆されました (図 2)。

さらに、結合能がより小さく、GFP と全く結合しない抗 GFP ナノボディ変異体の同定を試みました。それぞれにユニークなペプチドバーコードを付加したナノボディ変異体を、先程の 2 倍量の GFP とともに SEC に供しました。より多くのナノボディ変異体が GFP と結合するため、GFP と全く結合しなくなった変異体のみを分離できると考えました。GFP と GFP に結合したナノボディ変異体との複合体のピークと、GFP に結合していないナノボディ変異体のピークに含まれるペプチドバーコードを質量分析計で定量しました。その結果、2つのナノボディ変異体 (R35A, E103A) 由来のペプチドバーコードが非結合

のナノボディ変異体のピークに多く含まれていることが分かり、それらのナノボディ変異体は GFP と全く結合しないことが示唆されました (図 3)。

最後に、同定した変異体の結合能を検証しました。その結果、前半の実験で同定した 5 つの変異体 (R35A, Y37A, W47A, G50A, E103A) は、いずれも野生型の抗 GFP ナノボディより小さい結合能を持つことが分かりました (表 2)。また、後半の実験で同定した 2 つの変異体 (R35A, E103A) は、GFP と全く結合しないことが分かりました (表 2)。この結果より、ペプチドバーコーディング 2.0 は抗体の結合能の細かな違いを区別でき、構造活性相関解析に応用できることを示しました。

【結論】

本研究では、ゲルろ過クロマトグラフィーとペプチドバーコードを組み合わせ、抗体の構造活性相関を迅速に解析するための新規手法を開発しました。本手法を用いて、一般に使用される抗体の解離定数である nM から sub-nM の範囲で、数百種類のナノボディの結合能を一斉に相対評価できました。

【波及効果、今後の予定】

本手法は、抗体結合能の迅速かつ正確な評価を可能にし、昨今のコロナウイルスなどに対する中和抗体の創出などに貢献できると期待されます。また、今後は一度に評価できる抗体の数を増やし、抗体スクリーニングにも本手法を応用できるよう研究を推進していきます。

【研究プロジェクトについて】

本研究は、JST-CREST (grant number JPMJCR16G2)、JST-COI-NEXT (grant number JPMJPF2008) および JST FOREST (Grant Number JPMJFR204K) の支援により推進されました。

<用語解説>

遊離型抗体：担体に固定されておらず、溶媒に溶けている状態の抗体。

ペプチドバーコード：遺伝型の情報を含ませたユニークなペプチド配列のこと。ペプチドバーコードの配列を読み取ることで、そのペプチドバーコードと融合していたナノボディを同定できます。

表面プラズモン共鳴：分子間相互作用を評価する方法の一つ。抗体抗原反応の結合力を定量的に評価するために汎用的に使われています。

ELISA：Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay の略。抗体の結合能を評価する方法の一つ。目的の抗体を特異抗体や抗原で捕捉し、酵素反応を利用してその抗体の結合能を定量評価する手法です。

ハイスループット：多数の検体を迅速に評価できること。

ナノボディ：ラクダ科動物が持つ重鎖抗体に由来する単ドメイン抗体。従来の抗体とは異なるプロファイルを持ち、医薬・診断・研究の各用途で幅広く利用されています。

【研究者のコメント】

本研究では、遊離型の抗体の結合能をハイスループットに評価する方法を確立しました。従来のアプローチでは、遊離型の抗体をひとつずつ精製し、表面プラズモン共鳴や ELISA を用いて評価する必要性がありました。本研究で確立した技術により、有望な抗体をより迅速に取得可能になります。また、昨今のコロナウイルスなどに対する中和抗体の創出などにも貢献できると期待されます。

<論文タイトルと著者>

論文名: Peptide barcoding for one-pot evaluation of sequence–function relationships of nanobodies
(遊離ナノボディの構造活性相関をハイスループットに評価可能とするペプチドバーコーディング)

著者: Yusei Matsuzaki, Wataru Aoki, Takumi Miyazaki, Shunsuke Aburaya, Yuta Ohtani, Kaho Kajiwara, Naoki Koike, Hiroyoshi Minakuchi, Natsuko Miura, Tetsuya Kadonosono, Mitsuyoshi Ueda

掲載誌: Scientific Reports DOI : <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01019-6>

<お問い合わせ先>

青木 航 (あおき わたる)

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 応用生化学講座 生体高分子化学分野・助教

TEL: 075-753-6495 FAX: 075-753-6112

E-mail: aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp



(左：青木航助教、右：松崎友星・元修士課程学生)

参考図表

表1. 様々な物性を持つペプチドバーコードを付加した抗GFPナノボディの結合能

Sample	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
Without peptide barcode	3.64×10^6	1.49×10^{-4}	4.09×10^{-11}
With peptide barcode 1	3.75×10^6	1.30×10^{-4}	3.45×10^{-11}
With peptide barcode 2	3.16×10^6	1.28×10^{-4}	4.05×10^{-11}
With peptide barcode 3	3.23×10^6	1.25×10^{-4}	3.86×10^{-11}
With peptide barcode 4	4.10×10^6	1.30×10^{-4}	3.17×10^{-11}
With peptide barcode 5	3.06×10^6	1.27×10^{-4}	4.13×10^{-11}
With peptide barcode 6	3.52×10^6	1.33×10^{-4}	3.79×10^{-11}
With peptide barcode 7	4.41×10^6	1.30×10^{-4}	2.95×10^{-11}
With peptide barcode 8	4.38×10^6	1.25×10^{-4}	2.86×10^{-11}
With peptide barcode 9	3.63×10^6	1.52×10^{-4}	4.19×10^{-11}

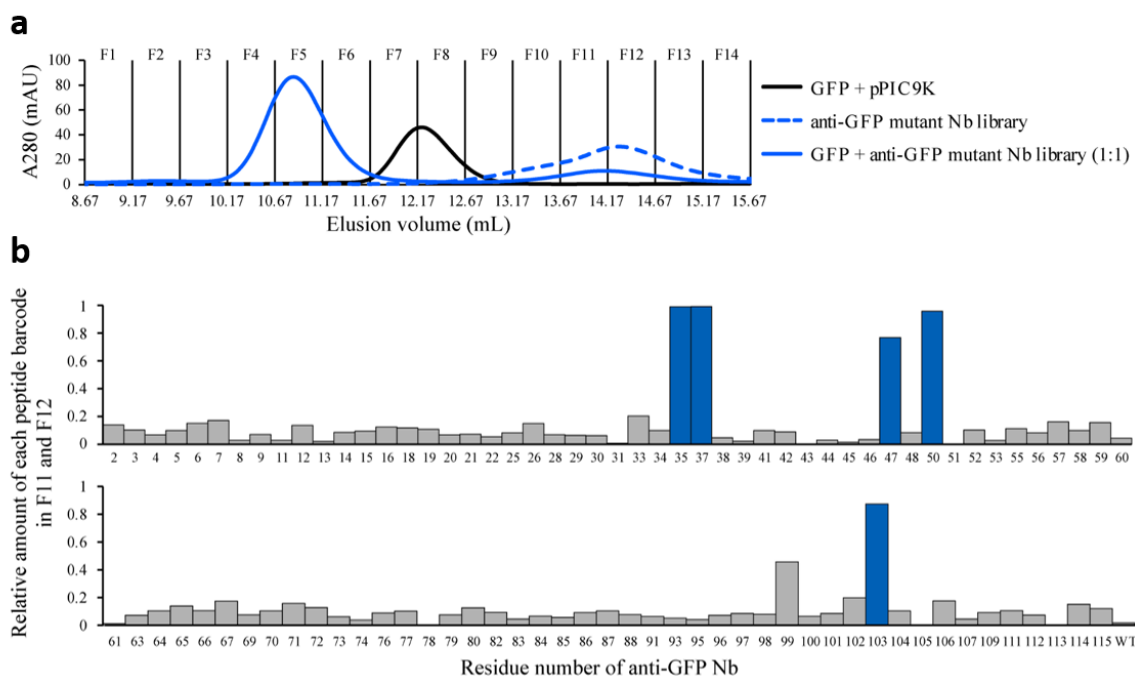


図2. GFPに対する結合能が低い抗GFPナノボディ変異体の同定

(a) GFPと抗GFPナノボディ変異体のゲルろ過クロマトグラフィー。GFPのみ（黒線）、ナノボディ変異体のみ（青点線）と比べて、GFPとナノボディ変異体を一緒に加えたサンプルでは、GFPとナノボディ変異体の複合体形成により、ピークが高分子量側にシフトしました。

(b) GFPと結合していない抗GFPナノボディ変異体のピーク由来のペプチドバーコードの分析（フラクションF11, F12）。5つのナノボディ変異体（R35A, Y37A, W47A, G50A, E103A）では、分析した全フラクション（F3-F7, F11, F12）のうち、大部分のペプチドバーコードが本フラクション（F11, F12）にて検出されました。これらのナノボディ変異体はGFPに対する低い結合能を持つことが予想されます。

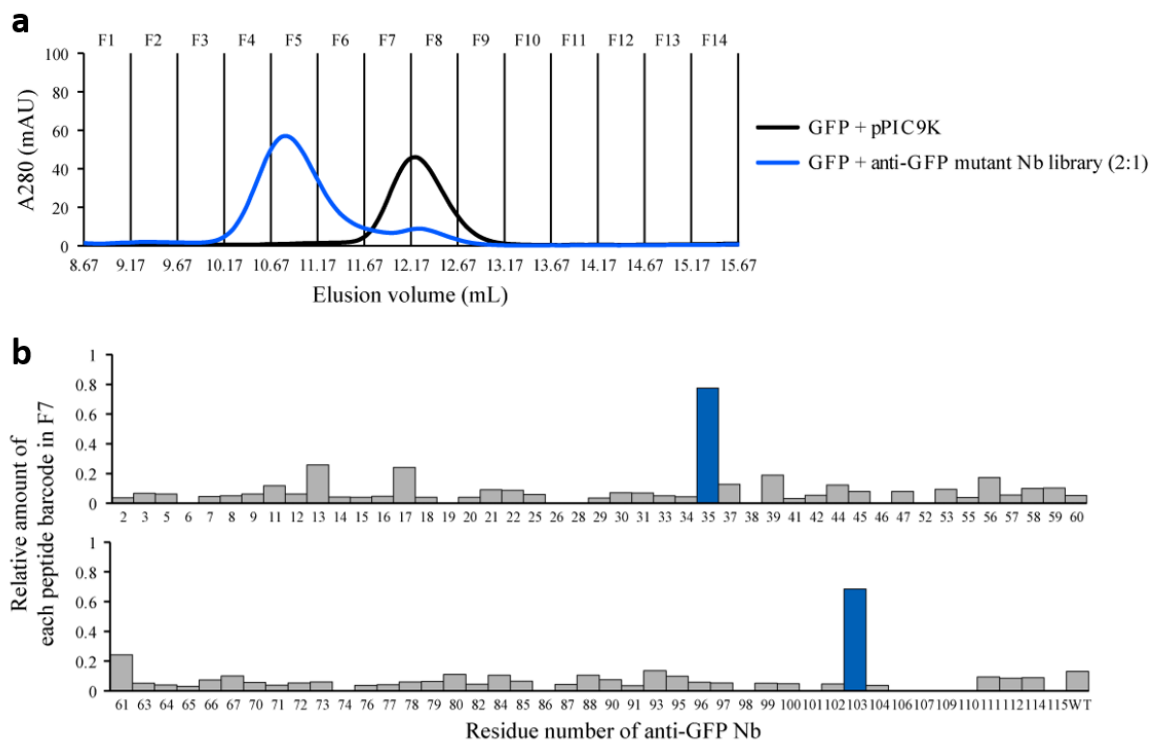


図3. より結合能が低い抗GFPナノボディ変異体の同定

(a) GFPと抗GFPナノボディ変異体のゲルろ過クロマトグラフィー（GFP:ナノボディ変異体=2:1）。図2の実験から供するGFPの量を2倍にしました。GFPのみ（黒線）と比べて、GFPとナノボディ変異体を同時にゲルろ過クロマトグラフィーに供したとき（青線）には、GFPとナノボディ変異体が結合して複合体を形成し、ピークが高分子量側にシフトしました。

(b) GFPと結合していない抗GFPナノボディ変異体のピーク由来のペプチドバーコードの分析（フラクションF7）。2つのナノボディ変異体（R35A, E103A）では、分析した全フラクション（F3-F7）のうち、大部分のペプチドバーコードが本フラクション（F7）にて検出されました。これらの変異体はGFPに対するより低い結合能を持つと考えられます。

表2. 同定した5つの抗GFPナノボディ変異体の結合能

Sample	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
Wild-type	1.04×10^7	1.29×10^{-4}	1.24×10^{-11}
R35A	No binding		
Y37A	4.62×10^6	7.59×10^{-2}	1.64×10^{-8}
W47A	8.39×10^6	6.06×10^{-3}	7.22×10^{-10}
G50A	No binding		
E103A	No binding		