

抗マウスプリオンペプチドファーゼ一本鎖抗体の反応性

蜂須賀暁子[#], 児矢野聡, 菊池 裕, 中島 治, 青笹正義*, 松田治男*, 澤田純一, 手島玲子

Characterization of anti-mouse prion peptide single chain Fv antibody by phage display

Akiko Hachisuka[#], Satoru Koyano, Yutaka Kikuchi, Osamu Nakajima,
Masayoshi Aosasa, Haruo Matsuda, Jun-ichi Sawada and Reiko Teshima

Antibodies can distinguish not only differences in amino acid sequences (primary structure), but also differences in three-dimensional structure and thus may be useful for detecting the conversion of prion proteins, especially in vivo. For diagnosis, we prepared chicken single chain variable fragment (scFv) antibodies that specifically recognized a prion protein using a phage display approach. As antigen, mouse prion protein (MoPrP) 138-153 containing YYR residues was conjugated with KLH. Total RNA was extracted from the splenocytes of an immunized chicken, and the cDNA of scFv was ligated in a phagemid vector. The phage display scFv library was panned against the peptide antigen four times. Twenty-three scFv phage clones that tested positive using ELISA with the peptide antigen were then reacted with recombinant mouse prion protein (23-231), mouse brain homogenate, mouse neuroblastoma Neuro-2a, recombinant human V129 and M129 prion proteins, and human glyoma T98G using ELISA, immunoblotting analysis, and immunocytochemistry. The results suggested that the scFv phage clones were useful for detecting mouse and human prion proteins.

KeyWords: single chain Fv, antibody, prion, phage display, chicken

緒 言

病態関連分子の高次構造を認識する特異性の高い抗体をガンマ線核種で放射標識し、脳内に送達させ、単光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) にて検出するイメージング法は、非侵襲的な診断及び病態解明に有用である。特に、神経系など生検ができない臓器においては、非侵襲的な検査がより重要になる。そこで、まず、伝達性海綿状脳症の診断に用いるための抗プリオンタンパク質一本鎖抗体 (single chain variable fragment, scFv) の作製を試みた。

プリオンタンパク質 (PrP) は哺乳類間で高度に保存された生体分子であり、ヒトとマウス間では204アミノ酸残基で92.2%の相同性があり、抗体の作製に一般的に用いられるマウスでは、免疫寛容が起こるため反応性の高い抗体が得られ難い。そのため、PrPノックアウト

マウスや、系統的に遠い動物種を利用することになる。PrPのヒトとニワトリ間での相同性は42.5%であることから、ニワトリは哺乳類のPrPに対する抗体作製に有用である。

また、抗原の相同性だけでなく、哺乳類と鳥類では抗体遺伝子の成熟過程においても相違がある。哺乳類では、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の各々につき多種類のV、D及びJ遺伝子が存在し、その再編成により主に多様性を獲得している。一方、鳥類ではV(D)J再編成に参与する両端のV及びJ遺伝子は、重鎖及び軽鎖につき一つずつであり、V遺伝子の上流に多数存在する偽V遺伝子の遺伝子変換により多様性を獲得する。このことは、重鎖及び軽鎖共に、機能的V及びJ遺伝子が一つしかないということであり、一組のプライマーで抗体遺伝子の可変部位を増幅できることを意味する。

今回は、汎用的な手法の確立を念頭に置き、哺乳類と系統的に遠く、かつ、高度な免疫系を有するニワトリを用いて、スクリーニング能力に優れたファーゼディスプレイ法により、抗マウスプリオンタンパク質 (MoPrP) scFv抗体の作製を試みた。

[#] To whom correspondence should be addressed: Akiko Hachisuka; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.243; Fax: 03-3707-6950; E-mail: hachisuk@nihs.go.jp

* 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室 Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Molecular and Applied Biosciences, Laboratory of Immunobiology

実験方法

1 抗原

免疫抗原には、MoPrPの138-153残基に相当するペプチドのN末に3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester (MBS) を用いてkeyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させたもの (KLH-Cys-IHF-GNDWEDRYRENM) を用いた。パニング及びELISAの固相抗原には、同一のペプチドを同様にovalbumin (OVA) に結合させたものを用いた。組換えマウスプリオンタンパク質 (rMoPrP) 23-230は、岸田らの方法¹⁾ を一部改変して作製した。マウスニューロプラストーマ細胞株 Neuro-2a (N-2a) 由来MoPrPのcDNAを、*Eco*RIと*Nde*I部位によりpET-23bに挿入し、*E. coli* BL21(DE3)pLysS に形質転換後、0.4 mM isopropyl β -d-thiogalactopyranoside により発現誘導を行い、発現したrMoPrPの精製は原法に従った。129番目のコドンがMetとValの組換えヒトプリオンタンパク質 (rHuPrP) の調製は、菊池らの方法²⁾ に従った。

2. 免疫

日本白色レグホン (5週齢, 雌) に深胸筋内にALUM (1 mg) と混和した免疫抗原 (100 μ g) を初回免疫後、2週間間隔で計4回腹腔内に免疫した。

3. ファージディスプレイによるscFv抗体の調製

中村らの方法^{3,4)} に従った。最終免疫3日後のニワトリ脾臓細胞から全RNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。抗体可変領域重鎖(VH)及び軽鎖(VL)遺伝子をそれぞれPCRで増幅後リンカー (GGGGS)₃とアセンブルPCRを行い、scFv遺伝子ライブラリーを作製した。scFv遺伝子をファージミドベクター pPDS⁵⁾ に組み込み (Fig. 1), エレクトロポレーションにより*E. coli* XL1-Blueに形質転換した。ヘルパーファージVCS-M13 (Stratagene) 感染により培養上清中に発現させたファージディスプレイscFvライブラリーを用いて、抗原ペプチド(OVA-peptide) に対してパニングを行い、特異抗体を濃縮した。パニング済ライブラリーから、ELISAで標的抗原に対して陽性反応を示すファージディスプレイscFv抗体を選別した。

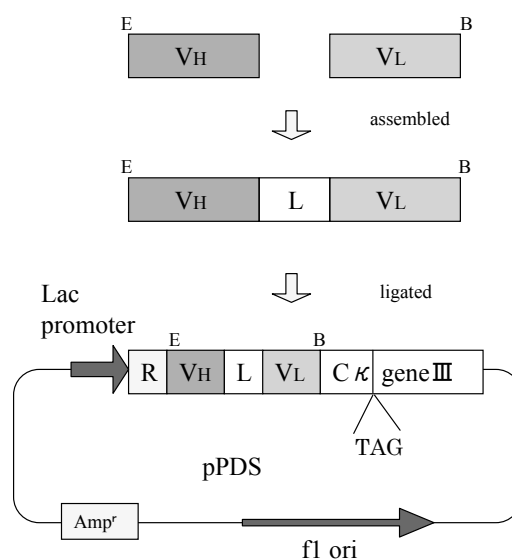


Fig. 1 Schematic diagram of phage-display vector pPDS

cDNA of immunoglobulin variable regions obtained chicken spleen cells by RT-PCR (top) are assembled into scFv expression form. Assembled scFv cDNA (middle) is ligated to pPDS at *Eag*I and *Bss*HII sites (bottom), then electroporated into *E. coli*. Recombinant phage displaying antibody fragment is prepared by helper phage infection. VH, variable region of Ig heavy chain; VL, variable region of Ig light chain; L, linker, (GGGGS)₃; E, *Eag*I site; B, *Bss*HII site; R, ribosome binding site and leader sequence of gene III; C κ , constant region of Ig kappa chain; gene III, g3p of M13 phage.

4. ELISA

固相抗原として、抗原ペプチド (OVA-peptide 2.5 μ g/ml in PBS) を96穴プレートに50 μ lずつ添加し、4°Cで一夜コートし、0.5% BSA-PBSでブロッキング後、ファージscFv抗体溶液を反応させた。二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスC κ 抗体 (x1/1000, SouthernBiotech), 基質にはp-nitrophenyl phosphateを用い、405 nmの吸光度により測定した。

5. イムノブロット

rMoPrP, マウス脳膜画分及び細胞膜画分を還元下で可溶化後、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、ニトロセルロース膜に転写後、ファージscFv抗体溶液を反応させ、2次抗体にアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスC κ 抗体 (x1/1000, SouthernBiotech) を用い、アルカリフォスファターゼ基質キット (BioRad) で可視化した。

6. 免疫組織染色

N-2a 細胞及びヒトグリオーマ細胞 (T98G細胞) をホルマリン固定し、ファージscFv抗体溶液を室温反応させ、イムノブロットと同様に可視化した。

7. ファージscFv抗体のシークエンシング

ELISAで陽性となったファージscFv抗体クローンのシークエンシングを、BigDye terminator cycle sequencing kit 及び3730 Gene Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

【結果及び考察】

1. ファージscFv抗体の調製

5羽のニワトリに抗原を5回免疫し、血清の抗体価を抗

原ペプチドに対するELISAにより測定したところ、全てのニワトリで上昇が認められた。最も抗体価が上昇したニワトリの脾臓細胞から調製したファージディスプレイscFvライブラリーを用いて、抗原ペプチドに対してパニングを4回繰り返した。抗原ペプチドに反応するファージscFv抗体の濃縮は、ELISAで確認した。パニング1回目 0.0375, 2回目 0.0445, 3回目 0.105, 4回目 0.121と、ELISAの値は回数を重ねる毎に上昇し、目的抗体が濃縮されていることが認められた。3回目及び4回目パニング済ライブラリーから各24クローンをピックアップしてファージscFv抗体溶液を調製し、抗原ペプチド及びrMoPrPに対する反応をELISAで調べ、陽性を示した23クローンを選別した (Table 1)。

Table 1 Characterization of phage anti-PrP scFv antibody

| H Chain - L Chain | Clone No. | ELISA | | Immunoblot Analysis | | | Cytochemistry | | Total Reac- tivity |
|-------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|---------------|---------------|--------------------------|
| | | Peptide (138-153) | rMoPrP (23-231) | rMoPrP (23-231) | Mouse Brain Homogenate | r HuPrP (129V, 129M) | Mouse N2a | Human T98G | |
| H1- L4 | 8, 11, 14, 15, 21, 35, 38 | 1.60-2.04 | 0.33-0.59 | 708-1096 | 112-199 | ++ | +, ++ | ++ | +++ |
| H2- L4 | 43 | 1.46 | 0.50 | 890 | 303 | ++ | +++ | ++ | +++ |
| H1- L2 | 9 | 2.00 | 0.39 | 938 | 31 | | + | | + |
| H2- L2 | 18, 44 | 1.80-1.96 | 0.19-0.43 | 361-1006 | 22-71 | + | +/, + | ++ | + |
| H5- L2 | 2, 23 | 1.62-1.86 | 0.32-0.56 | 767-840 | 38-69 | | +, ++ | | ++ |
| H4- L2 | 5, 7, 24 | 1.58-1.96 | 0.38-0.51 | 745-1041 | 32-144 | | +, ++ | | +++ |
| H4- L1 | 3, 4 | 1.00-1.59 | 0.11-0.40 | 26-1002 | 0-147 | | +/, + | | +/, ++ |
| H3- L7 | 19 | 1.60 | 0.36 | 836 | 138 | | ++ | | ++ |
| H3- L3 | 22 | 1.74 | 0.42 | 908 | 143 | | + | | ++ |
| H3- L5 | 26 | 1.53 | 0.30 | 641 | 121 | | + | | + |
| H1- L6 | 47 | 1.27 | 0.41 | 772 | 154 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| H6- L8 | 25 | 0.84 | 0.71 | 0 | 0 | | +/- | | - |
| - | 1, 6 | 0.06 | 0.06 | 0 | 1-2 | - | - | - | - |

Number of H and L chains are shown in Fig. 6. Values of ELISA and immunoblot analysis are expressed as absorbance at 405 nm and arbitrary unit, respectively. Strength of total reactivity classified from the comprehensive analysis result.

2. ファージscFv抗体の反応性

得られた23クローンのファージscFv抗体溶液の反応性をELISAにより測定した。全長のrMoPrPより、ペプチド抗原に対して反応が強く出る傾向が認められた (Table 1)。

イムノブロット法により、rMoPrP、マウス脳膜画分及びrHuPrPに対する反応性を調べた。rMoPrPに対しては、2クローンは弱いものの全てのELISA陽性クローンで

rMoPrPの分子量23kD付近にバンドが検出された (Fig. 2)。マウス脳膜画分との反応も確認できた (Fig. 3)。二本の糖鎖の有無により、検出バンドは幅広くなり、ファージscFv抗体に含まれているCk領域が、陰性コントロールでも認められた。また、rHuPrPの129M型及びV型とも高い反応性を示した (Fig. 4)。

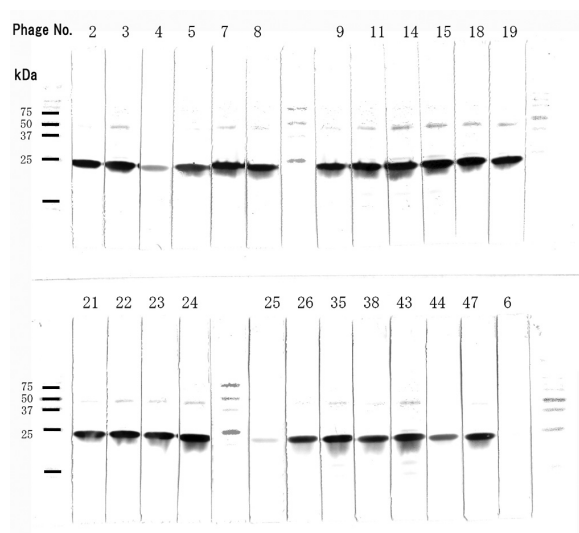


Fig. 2 Immunoblot analysis of recombinant mouse prion protein using phage scFv antibodies

SDS-PAGE was performed using 16% acrylamide gels. rMoPrP was loaded 0.2 μ g per lane. For immunoblot analysis, the proteins in gel were electrotransferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 0.5% casein-PBS, incubated with phage scFv antibody (1/10 culture solution) for 2 hours at room temperature, washed, and reacted with alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse Ck (1/1000, SouthernBiotech) for 1 hour. Visualization was performed by alkaline phosphatase kit (BioRad). A phage scFv antibody of clone No. 6 was used as negative control.

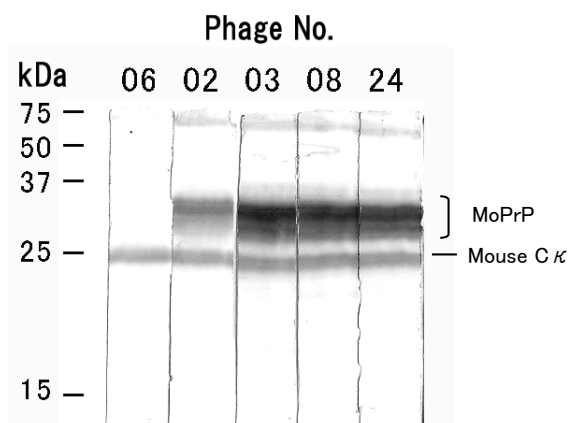


Fig. 3 Immunoblot analysis of mouse brain using phage scFv antibodies

Normal brain tissue from Balb/c mice was homogenized in 9 vol of 0.32 M sucrose containing 1 mM EDTA and 50 mM Tris-HCl. Homogenate was centrifuged at 1,000 \times g for 5 min. The supernatant was centrifuged at 10,000 \times g for 20 min. The pellet was resuspended in the same buffer, and an aliquot of equivalent to 2 mg wet brain was loaded per lane. The SDS-PAGE and immunoblotting were performed as described in Fig. 2. Phage scFv antibody of clone No. 6 was used as negative control.

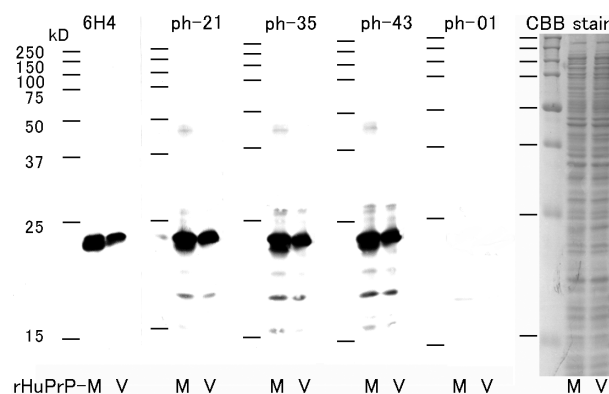


Fig. 4 Immunoblot analysis of recombinant human prion protein using phage scFv antibodies

E. coli strain BL21(DE3)pLysS transformed with HuPrP-129M or -129V was analyzed. The SDS-PAGE and immunoblotting was performed as described in Fig. 2. Monoclonal anti-PrP antibody 6H4 (Roche) was used as positive control and phage scFv antibody of clone No. 1 (ph-01) as negative control.

次に、培養神経系細胞に対する反応性を調べた。マウスN-2a細胞では、陰性対照のクローンでは全く染色されなかったが、ELISA陽性クローンでは3クローンを除き20クローンで染色された (Fig. 5)。反応性は、マウス脳膜画分に対するイムノプロット法と類似していた。ヒトT98G細胞でも、同様の結果であった。

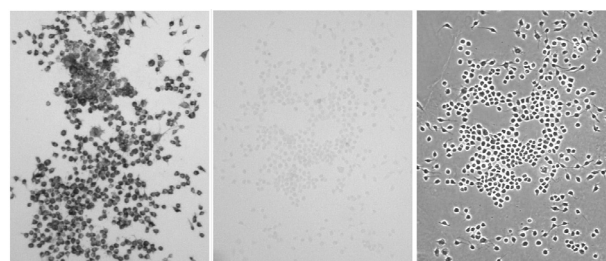


Fig. 5 Reactivity of phage scFv antibodies to mouse N2a cells

Mouse neuroblastoma N2a cells were cultured in MEM supplemented with non-essential amino acid (Gibco), 10% fetal calf serum and 100 μ g/ml kanamycin at 37 $^{\circ}$ C in 5% CO₂. Cells on cover glass were washed twice with PBS and fixed with 3.7% formalin for 15 minutes at room temperature. Fixed cells were blocked with 0.5% casein-PBS, and reacted with phage scFv antibody (x1 culture solution) at 4 $^{\circ}$ C overnight. Cells were washed with PBS and incubated with alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse Ck (1/1000, SouthernBiotech) at 4 $^{\circ}$ C for 2 hours. Visualization was performed as described in Fig. 2. Cells were stained by phage clone No. 08 (left) and not stained by phage clone No. 01 (middle). Right panel is a photograph of phase-contrast microscopy of the same field as shown in the middle panel.

ELISA陽性23クローンの反応性をTable 1にまとめた。反応性を3プラスで表したファージscFv抗体は、イムノブロットでのrMoPrPの検出限界において、陽性対照として用いた6H4抗体 (Roche) と、同等以上の反応性を示した。

3. ファージscFv抗体の遺伝子配列

陽性クローンのscFv抗体のシーケンスの結果、VHのアミノ酸配列は6種類であり、germlineとの相同性は77～80%であった (Fig. 6)。5種類のVH間では、アミノ酸配列が異なる場所は5箇所のみであり、3箇所の相補性決定領域(complementarity-determining region, CDR)においても高い相同性が見られた。VLは8種類で、germlineとの相同性は76～81%であった。7種類のVH間では、3箇所のCDR32残基中27残基のアミノ酸が同一であった。両鎖とも、各々高い相同性が見られ、一種類ずつを除き、同一のクローンから点突然変異により多様性を獲得したことが示唆された。

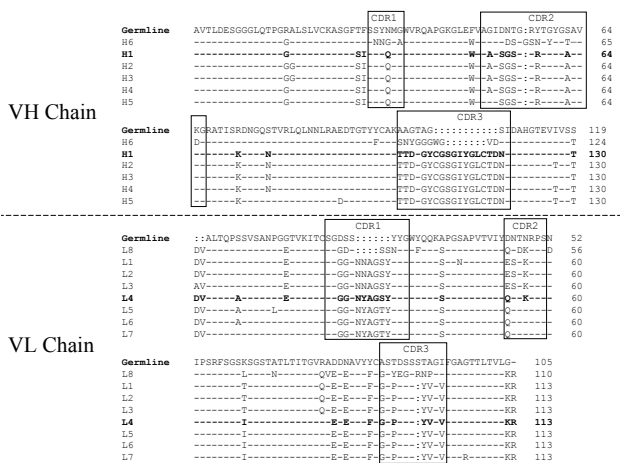


Fig. 6 Amino acid sequences of anti-PrP phage display scFv. Germline sequences were shown at the top line. CDRs were surrounded by boxes. Amino acid identity to the germline was shown by dash. The absence of corresponding residues was shown by colons.

4. 抗原ペプチドについて

抗原には、mPrPにおいて、正常型では α ヘリックス構造を取り、異常型では β シート構造を取り、病体と関連が深いと推定されている部分Y9R6)を含む138-153残基に相当するペプチドを用いた。この部位は、マウスとヒトで2残基異なるが (Fig. 7)、今回、ファージscFv抗体が、HuPrPとも交差反応することが認められたことから、他の動物種とも反応する可能性が示唆された。

| Species | 138 | 153 |
|---------------------|--------------|--------------|
| mouse, rat, hamster | IHF | GNDWEDRYRENM |
| sheep, goat, rabbit | -----Y----- | ----- |
| human, bovine | ----S-Y----- | ----- |

Fig. 7 Sequence homology of prion peptide antigen in various species

伝達性海綿状脳症は、PrPの一次構造に違いはなく、高次構造変化がその病因と考えられているため、構造の変化を認識する抗体の研究も進められている。抗PrP抗体をイメージング法に用いるためには、目的分子との高い反応性、特異性だけでなく、結合解離定数、体内動態も重要である。今後、膜透過性を向上させるペプチド等を用いて、今回作製したscFv抗体の分布を中心にした体内動態の測定を行っていく予定である。

謝辞

本研究は、文部科学省原子力試験研究費により実施されたものである。

引用文献

- 1) Kishida H., Sakasegawa Y., Watanabe K., Yamakawa Y., Nishijima M., Kuroiwa Y., Hachiya N.S. and Kaneko K.: Amyloid, 11, 14-20 (2004)
- 2) Kikuchi Y., Kakeya T., Nakajima O., Sakai A., Ikeda K., Yamaguchi N., Yamazaki T., Tanamoto K., Matsuda H., Sawada J. and Takatori K.: FEBS J., 275, 2965-2976 (2008)
- 3) Nakamura N., Shuyama A., Shimokawa M., Miyamoto K., Hojo S., Horiuchi H., Furusawa S. and Matsuda H.: J. Vet. Med. Sci., 66, 807-814 (2004)
- 4) Nakamura N., Aoki Y., Horiuchi H., Furusawa S., Yamanaka H.I., Kitamoto T. and Matsuda H.: Cytotechnology, 32, 191-198 (2000)
- 5) Yamanaka H.I., Kirii Y. and Ohmoto H.: J Biochem, 117, 1218-1227 (1995)
- 6) Paramithiotis E., Pinar M., Lawton T., LaBoissiere S., Leathers V.L., Zou W.Q., Estey L.A., Lamontagne J., Lehto M.T., Kondejewski L.H., Francoeur G.P., Papadopoulos M., Haghight A., Spatz S.J., Head M., Will R., Ironside J, O' Rourke K, Tonelli Q, Ledebur HC, Chakrabarty A. and Cashman N.R.: Nature Medicine, 9, 893 - 899 (2003)