

ファージディスプレイと Beyond antibody : ～抗体様分子による分子標的～

橋口 周平, 伊東 祐二, 田中 孝一, 松木園美穂, 村岡 賢, 杉村 和久

1975年, G. Kohler と C. Milstein により細胞融合法が報告され, モノクローナル抗体による生命科学の革命が始まる. 1985年 G.P. Smith がファージディスプレイ法を発表し, この手法をもとに, 1989年から1991年にかけて R.A. Lerner と G. Winter がヒト抗体をファージにディスプレイすることができることを報告. ここに, 細胞融合法が夢見たヒトの抗体医薬が実現するに至る. すでにこの成果はヒトの疾病の治療に驚異的な実績を積み上げつつ, さらに速度を増しながら「抗体」構造を超えた「標的化分子」を産み出しつつある. 本稿では, ファージディスプレイ法で用いられているバクテリオファージの生物学から現在進展している抗体エンジニアリングの現状までの全貌を紹介する.

はじめに

Smithらは1985年に, 遺伝子クローニングの発見ベクターとして繊維状ファージゲノムが利用できることを *Science* に報告した¹⁾. この論文で, バクテリオファージの表層タンパク質分子のN末に人工的なペプチド配列を提示できることを述べた. 1989年になってスクリップス研究所のLernerらがラムダ(λ)ファージを用いてFabライブラリーを構築したと報告²⁾, 1990年にMRC分子生物学研究所のWinterらは, 二本鎖の抗体の抗原結合に関与するH鎖のV領域とL鎖のV領域を短いリンカーでつなぎ一本鎖とし, これをSmithらの発見に基づき, 繊維状ファージに提示させると, 1匹の抗体ファージクローンが出現することを示した³⁾. この二つの発見は, マウスモノクローナル抗体のデッドロックを突き崩し, 診断薬を越えて, ヒトの疾病治療を可能にする抗体医薬の時代を切り開くに

至った. 本稿ではこの領域のこれまでの経緯から現状までの概要を述べる.

1. ライブラリー構築に用いられるバクテリオファージ

バクテリオファージは細菌に感染するウイルスである. ネガティブ染色法による電子顕微鏡解析が報告された1959年以降, 5,000種類以上のファージの形状が解析されており, その96%以上は多面性の頭部と尾部をもつ Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae の三つのファミリーに属し, 残りのマイナーな集団は, 多角性, 多形性, 繊維状の形態で10のファミリーに分類される⁴⁾.

ファージディスプレイ法は, 外来の分子をファージの外殻タンパク質と融合した形でファージ粒子表面に提示させる技術である¹⁾. 個々のファージに異なるペプチド配列もしくはタンパク質をディスプレイしたファージ集団(ライブラリー)は, 目的の機能をもったポリペプチドを迅速に単離する方法として発展し, 現在では有用な生理活性ペプチドや新たな機能をもったタンパク質の創製, ヒト抗体の作製など様々な分野で応用されている. ファージディスプレイ法では, グラム陰性細菌に感染する Inoviridae に属する繊維状ファージで, F 繊毛をもつ大腸菌に感染する F₁ ファージが広く用いられているが, λ (Siphoviridae), T4 (Myoviridae), T7 (Podoviridae) ファージを用いたディスプレイ法も報告されている^{2,5-7)}.

鹿児島大学大学院理工学研究科分子生物工学 (〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40)

Beyond antibody using phage display: Molecular targeting by novel designed molecule

Shuhei Hashiguchi, Yuji Ito, Koichi Tanaka, Miho Matsukizono, Satoshi Muraoka, and Kazuhisa Sugimura (Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan)

1) Ff ファージ

Ff ファージの遺伝子は環状の一本鎖 DNA であり、11 のタンパク質分子がコードされている。ファージの増殖には、ファージ粒子の構造タンパク質である五つのタンパク質 (g3p, g6p, g7p, g8p および g9p)、ファージ DNA の複製に関与する三つのタンパク質 (g2p, g5p および g10p)、ファージ粒子の構築と分泌に関与する三つのタンパク質 (g1p, g4p および g11p) の全てが必須であり、溶菌は伴わない^{8,9)}。ファージの形状は、ファージ DNA を約 2,700 分子の g8p が覆った直径約 6.5 nm、長さ約 930 nm の筒状で、g7p と g9p が一方の末端に、g3p と g6p がもう一方の末端に結合している (図 1)。Ff ファージの感染には g3p が必須であり、大腸菌の F 繊毛と TolA 分子を介して感染する (図 2A)¹⁰⁾。g3p は、N 末端側の N1 および N2 と呼ばれる二つのドメインと C 末端側の CT ドメインの三つのドメインが、それぞれグリシンリッチな G1 および G2 領域でつながれた構造で、N2 ドメインが大腸菌の F 繊毛の先端に結合すると、g3p の構造がほどけて、N1-N2 ドメイン間に埋もれていた N1 ドメイン内に存在する TolA 結合領域が露出し、大腸菌の外膜にある TolA 分子の C 末側ドメインと結合する¹⁰⁾。その後、DNA を保護していた g8p が細胞質膜に拡散することで、ファージ DNA は細胞質内に移行し、ファージが感染する。感染後、新規に複製された一本鎖 DNA は、ファージ由来の g5p の結合により安定化される。Ff ファージのアセンブリは、ファージ DNA 内のパッケージングシグナルに g7p と g9p が作用することで開始され、外膜の g4p、細胞内膜の g1p および g11p の多量体はファージ粒子の形成と細胞外に分泌される際の場合となり、ファージ DNA と内膜に存在するファージの構成タンパク質が結合し細胞外へ放出される (図 2B)¹¹⁾。外来分子をファージ粒子上の分子と融合して発現させる場合、ファージとしての機能を維持させる必要があるが、Smith らによる初めての報告では、増殖能を維持したままで、fl

バクテリオファージの g3p の N 末端に外来タンパク質を提示できることが報告されている¹⁾。一方、g8p を提示系として用いた場合、約 3,000 分子提示させることが可能であるが、提示できる分子は、5~8 アミノ酸残基のポリペプチドに限られる¹²⁾。後述するファージミドとヘルパーファージを用いて一部の g8p だけに外来分子を提示する場合は、長めのポリペプチド鎖やタンパク質分子を提示できることが報告されている¹²⁾。

2) ファージベクターとファージミド

Ff ファージディスプレイの構築には、ファージベクターとファージミドを用いた二つの系がある。ファージベクターの場合、提示するタンパク質の遺伝子はファージゲノムに組込まれ、その結果、プロテアーゼなどによる分解の可能性を除くと、全ての g3p もしくは g8p に、外来の分子が提示される (図 3A, C)。一方、ファージミドを用いた系では通常、組換え g3p 融合タンパク質もしくは g8p 融合タンパク質と薬剤耐性因子遺伝子、それにパッケージングシグナルをもつファージミドを用いるが、ファージミド単独ではファージが産生されないため、ファージの複製に必要な情報を供給するためにヘルパーファージと呼ばれる Ff ファージを同時に感染させることでファージ粒子を形成させる。これにはパッケージングシグナルを含まない Ff ファージがヘルパーファージとして用いられている。このシステムではヘルパーファージ由来の分子もアセンブリされるため、g3p の場合、3~5 分子の内の約 1 分子が外来の分子を含む融合タンパク質となる (図 3B, D)。ファージミドを用いた場合、挿入した外来遺伝子の欠損が起きにくく、外来のタンパク質とファージタンパク質の間に、例えばアンバーストップコドン (TAG) を導入しておくことで、アンバーサプレッサー株、もしくはそれ以外の菌体を使いわけることで、ファージの調製と可溶性タンパク質の調製を簡単に切り替えることができる^{13,14)}。アンバー

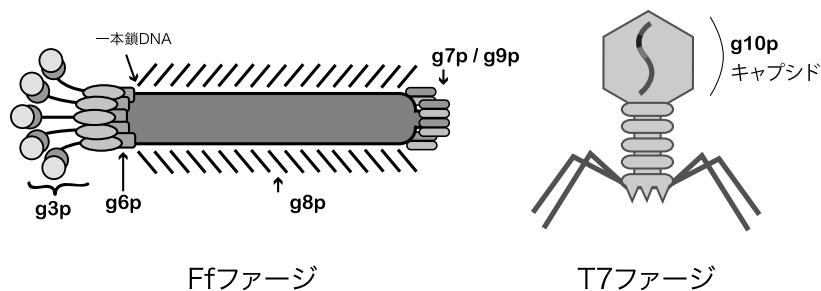


図 1 Ff ファージと T7 ファージの模式図

(A) Ff ファージ：主要なコートタンパク質 (g8p) が、一本鎖 DNA ゲノムを覆ったフィラメント状の形態をしている。g3p と g8p が外来分子を提示する外殻タンパク質である。(B) T7 ファージ：二本鎖 DNA ゲノムを収納する頭部と、感染に関わる尾部 (尾繊維をもつ形態) で、頭部に発現する g10p に外来分子が提示される。

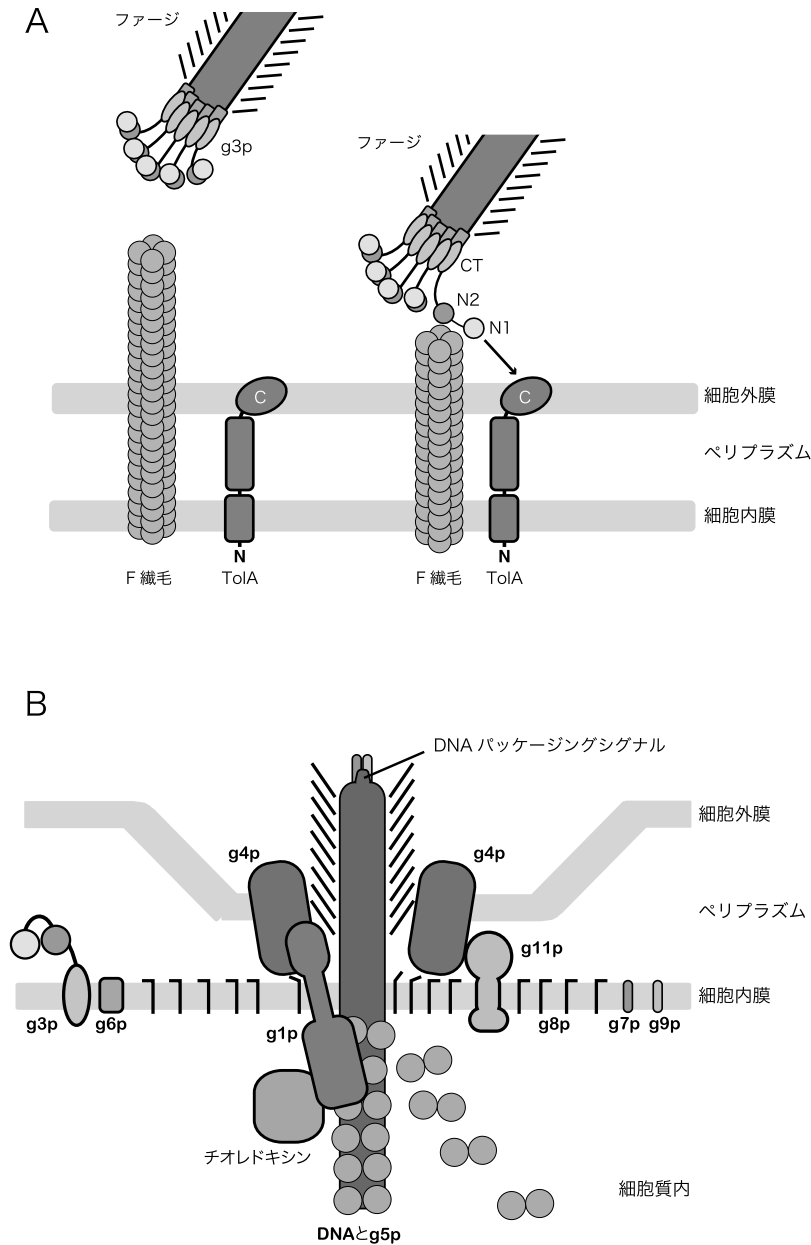


図2 Ffファージの感染と増幅

(A) Ffファージの感染とg3p: Ffファージの感染に必須のg3pのN2ドメインが大腸菌のF繊毛の先端に結合後、露出したg3pのN1ドメインは大腸菌上のTolA分子のC末側ドメインと結合することで感染がはじまる。(B)バクテリオファージのアセンブリは、大腸菌の外膜および内膜で行われる。ファージDNA上の32塩基対からなる不完全なヘアピン構造がパッケージングシグナルとなり、g7pとg9pが結合することでファージ粒子のアセンブリが開始される。ファージの一本鎖DNAは、細胞質内ではg5pダイマーの結合により安定化されているが、内膜を通過する際にg8pと置きかわる。最後にg3p、g6pが末端に結合して細胞外に放出される。外膜のチャンネルは約14コピーのg4pで構成され、g1pおよびg11pの多量体は内膜のチャンネルを形成していると考えられている。(文献10, 11より引用改変)

ストップコドンのサプレッサー変異株としては、supD, supE, supFをフェノタイプにもつ大腸菌などがあり、それぞれTAGコドンに対して、セリン、グルタミン、チロシン残基がサプレッサーtRNAにより運ばれることで、終

止コドンが読み飛ばされるが、その能力は菌株によって異なる¹³⁾。ディスプレイ効率を上げるための工夫として、g3pの機能を欠損したヘルパーファージも作製されている¹⁵⁾。

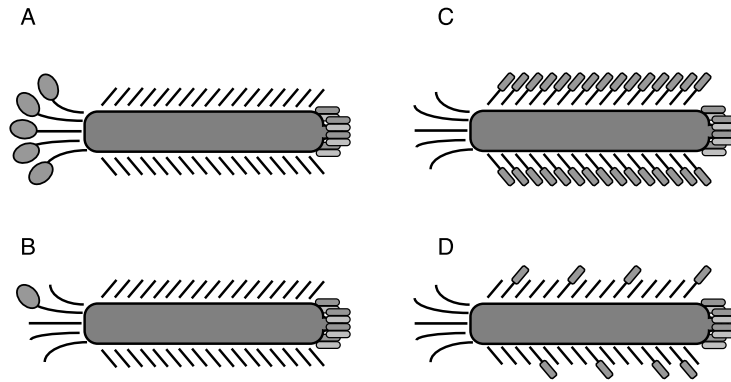


図3 Ff ファージを用いたファージディスプレイ (A)全ての g3p, (B)一部の g3p, (C)全ての g8p, (D)一部の g8p 分子に外来分子を提示させる四つの提示方法がある。また, g6p, g7p, g9p に外来分子を提示させた報告もある。

3) シグナル配列

先述したように Ff ファージは大腸菌の内膜でアセンブリされるため、ディスプレイしようとするタンパク質がファージ表面に効率よく提示されるためには、細胞質内で合成されたあとの膜輸送と目的タンパク質のフォールディングの状況が重要になる。細胞質内から内膜への輸送に関わる経路については、Sec, SRP (signal recognition particle), Tat (twin-arginine translocation) 経路の三つが知られており、どの経路を利用するかは、N 末端のシグナル配列に依存する¹⁶⁻²⁴⁾。Sec 経路のシグナル配列には、OmpA, pIII, PelB, PhoA などがあり、Sec シグナル配列を有するタンパク質分子は、SecA を介して SecYEG のチャンネルからペリプラズムに通り抜ける (図4)。SRP 経路には、DsbA, SfmC, TolB, TorT などのシグナル配列があり、SRP は SRP シグナル配列とリボソームに結合し複合体を形成する。この SRP 複合体は細胞内膜にある FtsY に結合した後、SecYEG トランスロカゼに橋渡しされ、合成されてくるタンパク質は SecYEG のチャンネルを介してペリプラズムに分泌される。Tat 経路は、Sec 経路に依存しない第2の輸送経路として報告され^{16,22,24)}、シグナル配列には TorA, CueO, SufI などがある。Tat シグナルには、(S/T) RRXFLK というコンセンサスモチーフがあり、RR 残基が必須である。Tat 経路では、細胞質内で完全にフォールディングされたタンパク質分子がペリプラズムに輸送される。ファージディスプレイにおけるシグナルペプチド配列の影響については、抗体分子、CD147 などいくつかの分子で検討されている²⁵⁻²⁷⁾。また、後述するアンキリンリピートタンパク質を用いた研究では、Sec シグナル配列を SRP 依存性のシグナル配列にすることで、ファージ表面へのディスプレイ効率を 700 倍以上改善できたという報告がある^{25,26)}。アンキリンリピートタンパク質は、大腸菌に発現させると細胞質内ですみやかにフォールディン

グされるタンパク質であり²⁶⁾、これはフォールディングしていないタンパク質輸送に関与する Sec 経路と比較して、合成を伴いながら分泌される SRP 経路がアンキリン-g3p 融合タンパク質のファージ上へのアセンブリに有利に働いたと考えられる。このようにシグナル配列は、提示効率、提示された目的タンパク質の機能に影響するため、Ff ファージを用いたファージディスプレイを行う際はシグナル配列の選択が重要である。

4) 溶菌性ファージ

溶菌性ファージの中では、大腸菌に感染する T4, T7, λ ファージが用いられている。ファージにより構成タンパク質は異なるが、感染、増殖に重要な分子群と必須でない分子群によって構成されており、提示系を構築する場合ファージ頭部の外殻タンパク質分子に融合タンパク質として発現させるのが一般的である。図1に示すように、T7 ファージの頭部は、g10 キャプシドタンパク質が 415 個アセンブリすることで形成されている。この g10 遺伝子の 3'末端 (C 末側) に、外来の遺伝子を組込むことで、頭部の表面に外来のタンパク質もしくはペプチドを提示することができる³⁾。Ff ファージと異なり、溶菌ファージの場合ファージ粒子は菌体内でパッケージングされたあと菌体を破壊して放出されるので、細胞質内で発現し機能するようなタンパク質分子の提示系構築に向いていると考えられている。また、ランダムペプチドを提示した M13 ファージライブラリーと T7 ファージライブラリーに提示されているペプチドのアミノ酸出現率を解析した報告では、M13 ファージに比べて T7 ファージでは、提示されるペプチド配列の偏りが少なく、多様性の高いランダムペプチドライブラリーを構築できることが報告されている²⁸⁾。T4 ファージでは、ファージ頭部の感染に関与しないキャプシド側の構成タンパク質である Soc, Hoc 分子を用いたディ

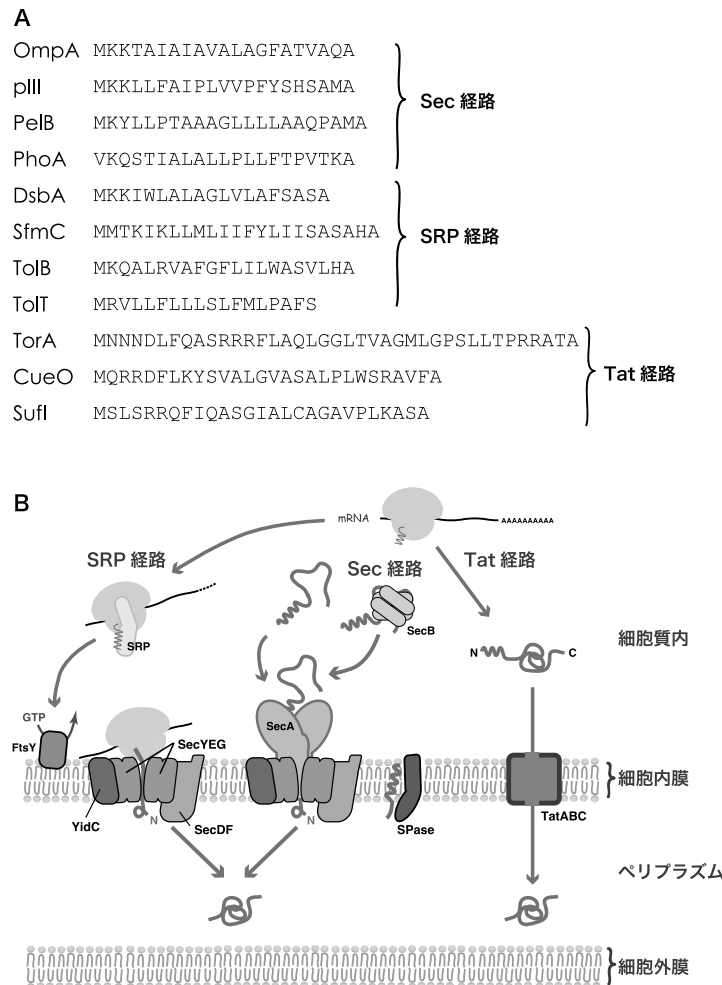


図4 シグナル配列と大腸菌でのタンパク質分子の膜輸送

(A)大腸菌でよく用いられるシグナル配列を示した。分泌シグナルの改変なども行われている。(B)分泌経路の模式図：Sec分泌経路は、SecA, SecYEG, SecDF, YidCタンパク複合体によって構成される。Secシグナルをもつタンパク質は、SecBシャペロン分子を介して、もしくは、シグナル配列の直接的なターゲティングによりSec分泌経路にはいる。N末側のシグナル配列は、膜結合型ペプチターゼ(SPase)によりペリプラズム側で切断される。Sec経路では、SRP-リボソーム複合体は細胞内膜のFtsYと結合したあと、GTPが介在してリボソームがSecYEGに結合し、合成されたタンパク質はペリプラズム側に分泌される。Tat経路のトランスロコンは、TatA, B, Cの三つの膜タンパク質で構成される。TatBC複合体、特にTatCがTatシグナル配列と特異的に結合する。TatAは、リング型の多量体で、フォールドされたタンパク質を通過させるチャンネルとして機能する。

スプレイ系があり、これらの分子に2つの異なる外来分子を提示できるという報告もある⁶⁾。一方、1989年、Lernerらが作製したマウスFab抗体ライブラリーではλファージが用いられていた²⁾が、その後、λファージの尾部を構成するpVに提示させるファージベクター、頭部の構成タンパク質であるgD分子に提示させるディスプレイ系が確立されている^{7,29,30)}。

5) その他のディスプレイ系

ファージディスプレイライブラリーの他に、酵母、バクテリアの細胞表面に様々な分子を提示したライブラリーが作製されている^{31,32)}。フローサイトメトリー解析で集団が特定できる酵母、大腸菌を用いているので、標的抗原を蛍光標識しておけば、結合活性を有するファージをリアルタイムにモニタリングしながら、ソートして回収できることがこれらのディスプレイ系の特徴である。酵母の場合、Aga2p分子と融合させることで提示系を構築するが、これ

までに EGF, IL-2, scFv, GFP, ペプチド/MHC クラス II 複合体などが提示できることが報告されている³¹⁾。他には、遺伝子からの転写、タンパク質合成のシステムを *in vitro* にもち出したリボソームディスプレイ法、mRNA ディスプレイ法が確立されている^{33,34)}。

2. 抗体エンジニアリング

ファージディスプレイ法は一本鎖抗体を提示した抗体ライブラリーを産み、その後数々の優れた抗体ライブラリーが作製された。2009年5月において、米国FDAで認可された抗体医薬は7種のペンディングになっているものを含めると30種を超える³⁵⁾。この手法は抗体様機能や抗体を超える機能を有する低分子化抗体や抗体以外のスキュフォールドを使った特徴のある抗体様分子を比較的容易にエンジニアリングすることを可能にした。この項では、このような抗体医薬開発の現状を踏まえ、抗体の高機能化および低分子化の観点から俯瞰する。

1) 抗体の高機能化

(1) エフェクター機能の増強

ヒト IgG 抗体には、IgG1 から IgG4 の4種のサブタイプが存在し、特にがんを標的にした治療抗体の場合には、ADCC 活性 (抗体依存性細胞障害活性) や CDC 活性 (補体依存性細胞障害活性) などのエフェクター機能をもつ IgG1 が多用される。このエフェクター機能をさらに強化することで、投与量の低減を図る研究が行われている。Lazer ら (Xencor 社) は、IgG1 の Fc 領域に変異を導入した1,000以上上る変異体の中から、IgG の Fc レセプター (FcγRI, IIa, IIb, IIIa) 並びに、補体 (C1q) や胎性 Fc レセプター (neonatal Fc receptor, FcRn) への結合活性のスクリーニングを行った。特に ADCC 活性の発現に重要な FcγRIIIa に対して結合活性が強く、抑制性のレセプターである FcγRIIb に対し結合活性が相対的に弱い Fc 変異体を同定し³⁶⁾、ADCC 活性が100倍以上増強されることを示した³⁷⁾。

Niwa ら (協和発酵キリン) の技術は、抗体の CH2 ドメインの N 型糖鎖のフコースを除去することで、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 上に発現する Fc レセプター (FcγRIIIa) に対する親和性を増強させ、これにより ADCC 活性を増大させ、より低い投与量での抗がん活性を達成することに成功している³⁸⁾。この技術はポテリジェント技術 (POTELLIGENT[®]技術) として実用化されつつあり、乳がん患者の PBMC においてもフコース除去した抗 Her2 抗体 (trastuzumab) は、通常の抗体に比べて有意に高い ADCC 活性を発現することができたことが報告されている³⁹⁾。一方で、抗がん活性に有効なエフェクター機能としては、抗腫瘍効果に対し CDC 活性も重要であるが⁴⁰⁾、先の協和発

酵キリンのグループは、ヒト IgG1 と IgG3 間の Fc キメラを作製することによって、10 倍程度高い CDC 活性を有する抗体を報告した (COMPLEGENT[®]技術)。

(2) 血中半減期の延長

ヒト IgG の抗体医薬の半減期は平均で約12日程度であるが、抗体により、短いものは4日から長いもので25日程度とかなりばらつきがある。抗体の血中半減期の延長は、投与回数を減らすことによる患者の負担軽減だけでなく、抗体医薬の治療効果を改善できると期待される。血中での IgG のレベルと半減期は、主として血管内皮細胞の FcRn との結合によってコントロールされている。pinocytosis によって細胞内に取り込まれた抗体は、エンドソームの成熟化に伴う弱酸性化 (pH 6) により FcRn との結合力が増大することで、エンドソーム膜上の FcRn と結合する。この FcRn と結合したものだけが、リサイクリング機構によって血中 (pH 7.4) へ再放出されるが⁴¹⁾、FcRn と結合しなかった抗体はリソソーム系へと移行し分解される。Dall'Acqua らは、抗 RSV (respiratory syncytial virus) IgG1 抗体 (MEDI-524) に、三つの変異 M252Y/S254T/T256E (YTE) を導入した抗体 (MEDI-524-YTE) が、pH 7.4 では共に早い解離反応を示すにもかかわらず、pH 6 では、サルあるいはヒトの FcRn との親和性が10倍程度増大することを見出した⁴²⁾。この変異体を用いて、サルを使った血中半減期の測定を行ったところ、4倍の半減期の延長が見られた。このことは、FcRn との親和性増強によって、血中半減期の延長が起こることが示唆されたが、Yeung らは、作製した種々の IgG1 変異体 (trastuzumab) の FcRn への結合活性を pH 6.0 から pH 7.4 で比較し、特に pH 6.0 で結合が強くなるような変異体を見出そうとした⁴³⁾。しかし、pH に対するこれらの変異体の結合定数の依存性はいずれの変異体でも同程度であった。そこで、pH 6.0 において野生型に比べて結合力が4倍もしくは80倍増大した二つの変異体 (N434A と N434W) を用いて、サルでの血中半減期の実験を行ったところ、N434A では約2倍の半減期延長が認められたものの、FcRn との強い結合活性が見られた N434W は、野生型と同程度の半減期しか示さなかった。このことは、FcRn への中程度の結合活性の増強が、血中動態の改善を生むことを示唆しており、おそらく、強すぎる FcRn との結合力の改善は、pH 7.4 付近での解離を遅くすることによって、再放出を抑制するためと考えられる。

(3) 抗体のアゴニスト活性の強化

抗体は、その2価性の結合により細胞表面のレセプターを二量体化し、細胞内へシグナルを送るいわゆるアゴニスト活性を有することは古くから知られていたが、IgG の Fc 領域やヒンジ領域を変換、改良することで、本来の IgG のもつアゴニスト活性をさらに強化できることが示さ

れた。Kaiらは⁴⁴⁾、血小板増殖ホルモンであるTPO (thrombopoietin) のレセプター、c-MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene) に対するIgG1抗体が、比較的弱い血小板増殖活性を示すのに対し、Fcドメインの細胞障害活性が低いIgG4-Fcへの交換と、より長くフレキシブルなIgG3ヒンジリンカーの導入によって、細胞障害活性を抑えながらアゴニスト活性を上昇させることに成功した。このヒンジとFc領域を変換した抗体は、UT-7/TPO細胞(ヒト巨核芽球細胞由来株)を使った増殖試験で、親株のIgG1に比べ、約10-50倍の高い活性を示した。さらに、ヒトc-MPLトランスジェニックマウスを用いた*in vivo*実験において、TPOやそのレセプター結合ドメインをもつPEG化rhMGDF (recombinant human megakaryocyte growth and development factor) 等と比べ、アゴニスト抗体は、顕著に高い血小板増殖能と効果の延長持続を認めた。抗体は他のバイオ医薬品よりも半減期の長いことも特徴であり、そこにアゴニスト抗体を用いる大きな有用性も存在する。

(4) ドメインの付加による機能性の増強

多くの疾患においては、複数の疾患因子が、冗長的に働くことによって、病因に関与している場合が多い。例えば、炎症性のサイトカインであるIL-1 α と β は、同じ細胞シグナルのカスケードをもち、相補的に作用する。このような炎症を抑制する場合、両方のサイトカインをブロックすることが必要になるが、治療において、二つの抗体の混合系を用いることは、コストにおいても、薬剤としての安全性、効果を確保するうえでも問題がある。Abottのグループは、一つの抗原に対する抗体のVドメインの先端に、別の抗原に対する抗体のVドメインを連結したDVD-Ig (dual variable domain Ig) を作製し、その効果を評価した⁴⁵⁾。DVD-Igは、動物細胞における生産性も良好であり、心配された連結による二つのVドメインの抗原結合力の低下も、リンカーの長さを最適化することによって、ほぼ解決されたと報告している。実際に、IL-1 α と β に対する二重特異的なDVD-Igは、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにおいて、IL-1 α と β それぞれの親株のIgGの併用投与と同程度のリウマチ症状の抑制効果を示した。

このような二重特異性抗体は、2種の標的抗原の異なる結合ドメイン、例えば、単鎖Fv抗体(scFv, single chain Fv)を用いても比較的容易に作製される。Asanoらは、IgG抗体のVH、VLを、2種の標的抗原の異なる単鎖Fv抗体(scFv, single chain Fv)に入れ替えることで、EGFR (epidermal growth factor receptor) とCD3に対する二重特異性抗体を作製し、T細胞のがん細胞への効率的な標的化を可能にした⁴⁶⁾。また、IgG-FcのN末、C末に異なる特異性の結合ドメインを導入した4価の二重特異性抗体もデザインされている⁴⁷⁾。最もシンプルな二重特異性抗体のデザイン

は、中国のグループによって報告された。Xieらは、CH3ドメインのH鎖間のコンタクト領域に、一方のH鎖FcにT336Yの変異を、もう片方にはY407Tの変異を導入した2種のH鎖を共発現させた。この2種のH鎖には特異性の異なるscFvが融合されており、2種のH鎖間でのヘテロ鎖間でのみの結合が起こるようにしたことで、二重特異性抗体の作出が容易になった⁴⁸⁾。このような二重特異性抗体は、単独のエピトープを認識する抗体のみでは効果の薄い病原体に対しても、効果的にその毒性を抑えることができる。

2) 抗体分子の低分子化

(1) 低分子化抗体とsingle domain antibody

従来からあったFab抗体、scFv抗体、diabodyに加え、sc(Fv)₂やその二重特異性sc(Fv)₂などの低分子抗体も報告されているが、近年では、ヒト抗体のVHあるいはVLを用いたドメイン抗体、ラマやラクダのもつ抗体の可変ドメインVHHのmonobody、さらにはIgNAR (new antigen receptor) と呼ばれるサメの可変ドメインが、single domain antibodyと呼ばれる抗体医薬の候補として注目されるようになった。これらは、単一のイムノグロブリンのスキューフォールドからなり、ドメイン上の3箇所の相補性決定領域(complementary determining region, CDR 1, 2, 3)の変異によって、種々の抗原との結合の多様性を生み出す。

このような低分子抗体の医薬応用における利点として、1) 抗体と同様に標的分子、アンタゴニスト、さらにはアゴニストとして機能する、2) 大腸菌において低コストでの生産が可能、3) 血中半減期が短い分、血中の濃度コントロールが可能、4) 低分子であるため組織浸潤性が高い、5) 他の分子との融合タンパク質による機能強化デザインが容易、等があげられる。この5)については、(scFv)₂-Fc等の例を出すまでもなく、多くの融合タンパク質による高機能化が図られており、詳細については、総説を参照願いたい⁴⁹⁾。一方、弱点としては、6) 血中半減期が短い(T_{1/2}=5-30分)、7) Fcがないのでエフェクター機能をもたない、等があげられる。6)については、PEG(ポリエチレングリコール)化等のほか、血液の主要タンパク質(IgGやヒト血清アルブミン)に対する抗体ドメインを付加するなどして血中半減期を伸ばす工夫がされている。7)については、次項で述べるBiTE技術が、低分子抗体による細胞障害活性を発現する技術として注目されよう。

(2) BiTE技術

低分子抗体の中でも臨床試験が進んでおり、良好な結果が報告されているBiTE技術について紹介したい。BiTEとは、bispecific T cell engagersの略で、基本的な分子の構成は、抗腫瘍抗体のscFvとT細胞を標的とする抗CD3抗体のscFvをタンデムに連結した二重特異性(scFv)₂のこ

とである。通常のIgG抗体による抗腫瘍活性は、FcとNK細胞上のFcγRⅢaとの結合を介したいわゆるADCC活性に依存している。Bargouらは、non Hodgkin's lymphomaの治療を目的に、CD19とCD3に特異性をもつBiTE抗体(blinatumomab)を作製し、患者への投与を行った⁵⁰⁾。その結果、極めて低用量(0.005mg/m²)で血中からのリンパ腫の消失、0.015-0.06 mg/m²の投与でリンパ節腫瘍の退行が見られ、さらに骨髄や肝臓からの腫瘍の消失も認められた。このBiTE抗体による抗腫瘍活性は、T細胞活性化によるグランザイムBの発現による細胞障害活性、さらにはカスパーゼ依存的な細胞死を腫瘍細胞にもたらすことで起こることが、EpCAM(epithelial-specific cell adhesion molecule)/CD3-二重特異性抗体による腺がん細胞に対する抗腫瘍活性で報告されている⁵¹⁾。このような高い抗腫瘍活性は、血中に多量に存在し細胞障害活性を有するCD4およびCD8陽性T細胞をエフェクター細胞として利用したことが大きい。通常のIgGによるADCC活性は、血中リンパ球の10%程度のNK細胞に依存しているが、人工的な低分子抗体が、T細胞をエフェクター細胞として利用するといった天然抗体を超える機能を発揮したよい例である。

(3) 低分子抗体によるアゴニスト活性

前述の完全抗体のアゴニスト活性は、2価性の低分子抗体によっても、再現、強化することが可能である。Oritaらは、TPOのレセプター(MPL)に対するIgG(VB22B)を基に作製したdiabodyやsc(Fv)₂が、VB22B抗体よりはるかに高いMPL依存性BaF/MPL細胞増殖活性を示すことを明らかにした⁵²⁾。また、Kimuraらは、HLAクラスI分子に対するマウス抗体(2D7)を基にdiabodyを作製し、この低分子抗体が、元の抗体では極めて弱かったARH-77細胞(plasma cell leukemia)に対する細胞障害活性を飛躍的に増大させることを報告した⁵³⁾。同様なdiabodyによる細胞死誘導が極めて効率的に起こることを、我々もヒトのHLAクラスII分子に対する低分子抗体によるS1T細胞(ヒト成人白血病由来)の細胞障害活性を報告しており⁵⁴⁾、このような2価性の低分子抗体は、細胞表面のレセプターを二量体化して効率よくシグナルを伝える上では、完全抗体よりも適しているかもしれない。

2006年に起こった制御性T細胞上の抗CD28アゴニスト抗体(TGN1412)によるフェーズI試験での、サイトカインストームによる重篤な副作用報告⁵⁵⁾の例にもあるように、アゴニスト活性をもつ治療用抗体は、過剰な生体応答を引き起こす懸念が付きまとう。特に完全抗体では血中半減期が長いので、投与中断による副作用の回避が容易にできない欠点がある。しかし、低分子アゴニスト抗体では、その短い血中半減期から、血中濃度のコントロールが容易で、投与中断による副作用の回避が容易であることも

優位な点である。

(4) Bリンパ球クローンの抗体エンジニアリング

最近、ヒトB細胞1クローンから直接抗体遺伝子をクローニングし、その発現により抗体分子を作製することが達成され始めている。例えば、1915年のスペイン風邪の生還者から得られたB細胞由来の抗ヘマグルチニン(HA)抗体は、EBV(エプスタイン・バーウイルス)によるB細胞のトランスフォーマントとミエロマ細胞との細胞融合により作出されたハイブリドーマによって生産された⁵⁶⁾。これらの抗体は、1918年のH1N1インフルエンザウイルス株に対する非常に強い中和活性を有したが、近年のインフルエンザ株に結合しなかった。この抗体のエピトープは、高い抗原性をもちまた変異性も高いHAのウイルス表面側の領域であり、この抗体は、抗体のgerm line配列との比較から、多くの変異(somatic mutations)を重ねながら、この毒性の高いウイルス株に対抗したことが示唆された。一方、村口らのグループは、'immunospot array assay on a chip (ISAAC)'と呼ぶ方法を開発し、チップ上で末梢血から効率よく抗体産生細胞をクローニングし、さらに抗原特異的な抗体のスクリーニングを行う方法を提案している⁵⁷⁾。このようにヒトの血液中に有用な抗体があることが分かっている場合、上記のような方法を用いて、直接ヒト抗体を単離することは極めて理にかなっている。Throsbyらは、季節性インフルエンザ(H5N1株)のワクチンを接種した人からIgM陽性メモリーB細胞(CD24+/CD27+/IgM+)を単離し、この細胞からscFvファージライブラリーを構築した。このライブラリーから得られた抗体の一群は、幅広いヘテロサブタイプ(H1, H2, H5, H6, H8並びにH9)特異的な結合を示し、ウイルス株間のHAタイプの違いを超えた中和活性を有する抗体の創製に成功している⁵⁸⁾。さらに、この抗体のエピトープが、X線結晶解析によって明らかにされ、この抗体は、HAのヘリックスの膜近位の保存性の高い領域を認識することで、幅広い中和活性をもつことが明らかになった⁵⁹⁾。

Smiderらは、2007年に設立されたFabrus社(<http://www.fabrus.net/>)において、ヒトのgerm lineの抗体遺伝子(V, (D), J)の組合わせに基づいた10,000以上のFabタンパク質ライブラリーを構築し、この中から1次スクリーニングによって、標的分子に対する特異的なFab抗体を同定した。最初のFab抗体の抗原との親和性は予想通り弱く、Kd値で4,800 nMであったが、変異導入によるサブライブラリーからのスクリーニングによって、親和性を約1,000倍増強した抗体を得ることができた。この方法は、免疫システムの非生体レベルでの模倣であり、このようなコンビナトリケミストリー様の抗体ライブラリーの作製もこれからの抗体作製の一つの手法になるかもしれない。

3. Beyond antibody：抗体分子を超えて

抗体ファージライブラリー構築からの経験を基にすれば、標的分子への特異的結合を達成するには、抗体V領域が有するランダムペプチド配列(CDR)が複数個存在し、それらを一極にフォーカスさせるように支持する分子骨格があればいいことが明らかとなった。椅子の足は3本あれば床に安定に置くことができると同じく、抗体V領域のCDRは三つある。構築を目指す分子の目的により、どのような分子骨格を抗体の替わりにするかが選択される。最近の状況を紹介する。

1) モノボディ/アドネクチン (Monobody/AdNectins)

モノボディ (monobody) はイムノグロブリンのV領域の構造に似たヒトフィブロネクチンタイプIIIドメイン(FN3)の10番目のユニット(FNfn10)を分子骨格として作製された低分子化抗体である(図5A)。フィブロネクチンは細胞外マトリックスの構成成分であり、細胞間相互作用にも関与する巨大タンパク質である。その中のFN3は、15のユニットで構成され、FNfn10は94残基(10 kDa)のアミノ酸で構成されている。FNfn10はシステイン残基を含まないことから、バクテリアでの発現が容易で、可溶性、熱安定性も優れている。Koideらは、FNfn10のBCとFGループにランダム配列を挿入したファージライブラリーを作製し、このライブラリーからモデル抗原であるユビキチンに対し特異的なモノボディを単離した⁶⁰⁾。また、彼らはFNfn10のBC、DE、FGループをセリン、スレオニンの2アミノ酸だけでコードしたライブラリーからも抗原特異的(Kd=0.1 nM)モノボディの単離に成功し、少数アミノ酸で構成される多様性だけでタンパク質結合表面を作製できることを証明した⁶¹⁾。XuらもFNfn10ドメインを分子骨格として、BC、DE、FGループにランダム配列を挿入したmRNAディスプレイライブラリーを作製し、TNF-alpha特異的アドネクチン(Kd=20 pM)を単離している⁶²⁾。また、GetmanovaらはヒトVEGF受容体2(VEGFR-2)に特異的なアドネクチンを単離後、アフィニティマチュレーションによりKd=0.06-2 nMのアドネクチンを作製している⁶³⁾。VEGFR-2特異的アドネクチンは現在、再発性多形神経膠芽腫患者を対象とした第2相臨床試験が行われている⁶⁴⁾。

2) アビマー (avimer)

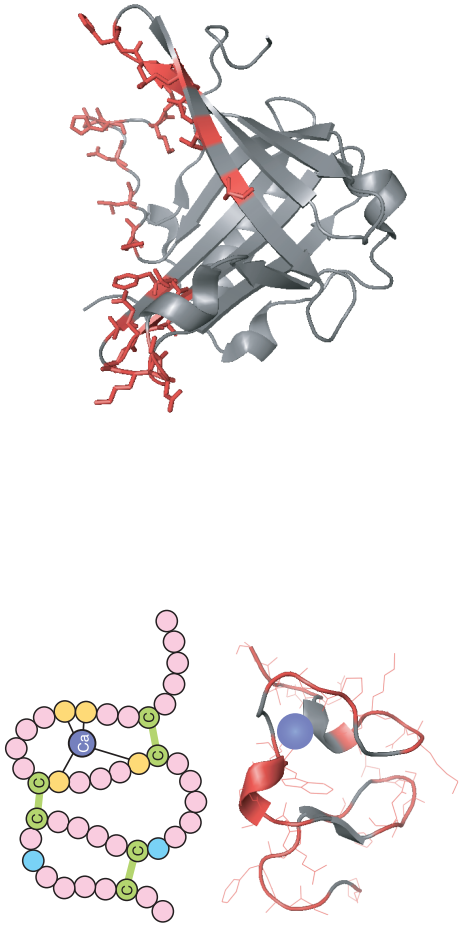
アビマーはマイクロプロテインのAドメイン(約35アミノ酸; 4 kDa)を基に作製された(図5B)。Aドメインは様々なヒト細胞表面受容体の細胞外部に存在する紐状の多価ドメインであり、100種類以上の異なる分子と結合することが報告されている。その結合様式は、複数のAド

メインが独立した異なるエピトープに結合することから、標的分子に対し高い特異性と親和性を示すことも報告されている。Stemmerらは、この性質を利用し標的分子に対しマルチドメインで結合する新規結合タンパク質の作製を試みた。彼らはAドメインの分子骨格形成に関与する2残基と、六つのシステイン残基、およびCaの配位に関与する四つのアミノ酸残基を残し、その他の配列をランダム化したファージライブラリーを作製した⁶⁵⁾。アビマーはセレクションの度に新規の結合ドメインを付加することで独立したエピトープで結合するマルチマーを作製できる。実際にIL-6、cMET、CD28、CD40L、BAFFに結合するアビマーを単離しており、抗IL-6アビマーについては、三つのAドメインからなるトリマーでIL-6に対する親和性がKd=0.1 nMであり、市販抗体と同等のIL-6依存性増殖細胞の増殖阻害活性を示した。さらにマウスでの動物実験においてもIL-6誘導性の血清アミロイドAの産生を市販抗体と同程度阻害した⁶⁵⁾。現在クローン病治療薬として第1相試験が行われている⁶⁶⁾。

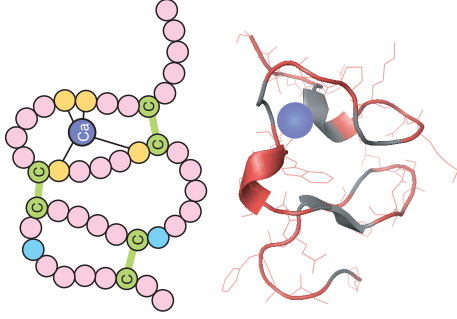
3) アンチカリン (Anticalin)

リポカリンファミリーに属する分子を分子骨格にもつ人工抗体をアンチカリン (anticalin) と呼び、Skerraらにより報告されている⁶⁷⁾。リポカリン(160~180アミノ酸残基)は、脊椎動物から昆虫、植物、バクテリアにまで存在する分子で、主にビタミン、ステロイド、脂質などの化合物や、代謝産物のトランスポーターとして機能している。ヒトにおいてはアポリポタンパク質D、 α 1-酸性糖タンパク質など異なる生理機能を有した12のリポカリンが同定されている⁶⁸⁾。リポカリンは八つの逆並行 β ストランドが中央方向にねじれた β バレル構造を高度に保存しており、片側を4本のループが支えるカップのような開いた構造を有する(図5C)。Skerraらはこの4本のループ領域にランダム配列を挿入することで、新規結合タンパク質の構築を試みた。初め、彼らはオオモンシロチョウ由来のリポカリンであるビリリン結合タンパク質 (bilin-binding protein: BBR) の4本のループ領域にそれぞれ16残基のランダム配列を挿入したファージライブラリーを作製し、低分子であるフルオレセイン、ジゴキシゲニンに特異的なアンチカリンを単離した⁶⁹⁾。その後、結晶解析情報から点変異により、親和性の改善を報告している⁷⁰⁾。また、彼らは、ヒト由来のリポカリンである好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン (neutrophil gelatinase-associated lipocalin: NGAL) を分子骨格としたファージライブラリーを作製し、CTLA-4特異的アンチカリン(親和性がKd=10 nM)を報告した⁷¹⁾。さらに、すでに確立されているVEGF特異的アンチカリンは2010年前半にも臨床試験に進むとされている⁷²⁾。

A ヒトフィブロネクチン C ヒトリポカリン



B ヒトADメイン



D アンキリン反復 E 可変性リンパ球受容体(VLR)

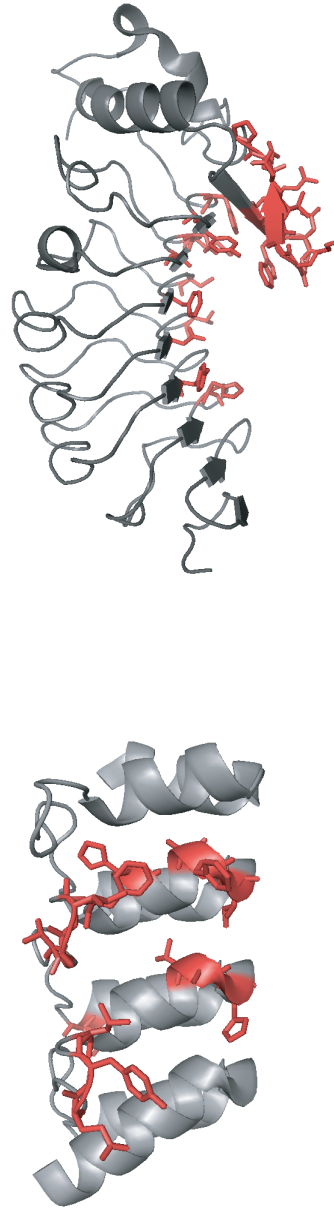


図5 代表的な低分子化抗体の分子骨格

- A: モノボデー分子骨格, マルトース結合タンパク質特異的モノボデー, (PDB ID: 2OBG)
- B: アビマ-分子骨格, J. Silverman, et al., Nat. Biotechnol., (2005) 23, 1556-1561 から改変 (PDB ID: 1AJJ)
- C: アンチカリン分子骨格, CTLA-4 特異的アンチカリン, (PDB ID: 3BX7)
- D: DARPin分子骨格, Her2 特異的 DARPin, (PDB ID: 2JAB)
- E: 可変性リンパ球受容体, H-トリサッカライド特異的 VLR, (PDB ID: 3E6J)

4) アンキリン反復タンパク質 (Designed Ankyrin Repeat Proteins: DARPin)

アンキリン反復 (ankyrin repeat: AR) は, 33 アミノ酸残基で構成する β ターン, 二つの逆並行 α ヘリックス, ループのサブユニットが繰り返して積み重なった構造を有する (図 5D). AR は初め酵母の細胞周期制御に関わる分子内に同定された. その後, 核および細胞内外で働く多くのタンパク質に保存されていることが示され, 様々な環境においてタンパク質間相互作用を媒介することが明らかとなった⁷³⁾. Plückthun らはこの AR に着目し, 発現, 溶解性, 熱安定性において優れた新規結合タンパク質の構築を試みた. 彼らは 200 以上の AR において保存率が低く, 分子表面に露出する領域にランダム配列を挿入することでライブラリーを作製し, モデル抗原であるマルトース結合タンパク質とキナーゼに対し高い親和性を有した特異的 AR を単離し抗体に代る分子骨格を報告した⁷⁴⁾. その後, Zahnd らは, ヒト EGF 受容体 2 (human epidermal growth factor receptor 2: Her2) に特異的な DARPin を単離し⁷⁵⁾, error-prone PCR と骨格領域のアミノ酸置換によるアフィニティーマチュレーションにより親和性が $K_d=90$ pM の DARPin を報告した⁷⁶⁾. また, Kawe らは NIa^{pro} プロテアーゼ特異的 DARPin が, 細胞内で NIa^{pro} プロテアーゼの活性を阻害することを報告し, DARPin が細胞内でも機能することを示した⁷⁷⁾. 近年, bispecific 抗体の報告が多くあるが, DARPins においても同様な研究が報告されている. Eggel らは Fc ϵ R1 α を標的として得られた, エピトープの異なる 2 種の DARPins (親和性が共に $K_d=10$ nM) をリンカーで連結することで bispecific な DARPins を作製し, 親和性の改善 ($K_d=10$ pM) と共に IgE によって誘導される好塩基球の脱顆粒を市販抗体である Xolair[®] (一般名; オマリツマブ) と同レベルで阻害することを報告している⁷⁸⁾.

5) 可変性リンパ球受容体 (variable lymphocyte receptor: VLR)

フィブロネクチン, リポカリン, アンキリンなど前述のタンパク質分子が抗体に代わる分子骨格として研究が先行しているが, そのいずれも元来, 免疫システムにおいて抗原受容体の機能を有していない. 一方近年, ヤツメウナギ, スタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体 (variable lymphocyte receptor: VLR) が発見された⁷⁹⁾. VLR はロイシン残基に富んだリピート (leucine-rich-repeat; LRR) モジュールが繰り返して積み重なった馬蹄形構造を有しており, 内部に並行型 β シート構造を保持している (図 5E). Herrin らは炭疽菌胞子の糖タンパク質である BclA 特異的 VLR のクローニングを行い, 得られた複数の BclA 特異的 VLR の相同性解析を行うことで, β シート構

造のくぼんだ領域が抗原認識部位として機能することを示した⁸⁰⁾. その後, Han らによる H-トリサッカライド特異的 VLR の結晶構造解析で, 同領域と C 末端モジュールの可変ループ領域により抗原を認識することが明らかとなった⁸¹⁾. Tasumi らは酵母ディスプレイ技術を用いて作製した免疫ライブラリーから, 鶏卵リゾチーム (hen egg lysozyme; HEL) 特異的 VLR を単離し, error-prone PCR でのアフィニティーマチュレーションにより親和性が $K_d=4.3$ nM の VLR を報告している⁸²⁾. VLR は無顎類の獲得免疫システムであることから進化論的に最も古い抗体であることが伺える. 興味深いことに高等動物の自然免疫システムを司る Toll 様受容体 (toll-like receptor; TLR) も VLR に特徴的な LRR 構造を有している.

4. 低分子化合物を標的とした抗体エンジニアリング

分子量が小さい低分子量の化合物は, 免疫学ではハプテンと呼び, 単独で動物に投与しても免疫応答を誘導せず免疫原性がない. 一方, このハプテンをタンパク質 (担体もしくはキャリア分子) と共有結合すると免疫原性を示すようになる. ハプテンはホルモン, ビタミン, 代謝物, 薬物, 環境汚染物質, 抗生物質, 除草剤, 添加物等多岐にわたり我々の生活に広範に存在しており, これらの低分子化合物を検出するための手段として, ハプテンに対する抗体等の分子は有用である. これらのアッセイの効率を決定する重要なポイントはこの抗体等の分子の特異性である. 構造の類似した化合物を含むサンプルから目的ハプテンのみを特異的に検出する場合や, 特異性の幅広い抗体を使用して一度に類似した化合物を検出する場合等, 目的に合わせた特異性が必要となる. このような抗体分子は, 研究用試薬・診断キット・バイオセンサー・医薬品等に有用であるが, タンパク質を標的とする場合とは異なる, この領域に特徴的な問題点が多く存在する. 以下, この状況を概説する.

1) ハプテンとハプテン抗体の相互作用の特徴

一般に, タンパク質抗原では抗体 V 領域の相補鎖決定領域ループの末端が結合し, その抗原認識表面は平面的であるのに対して, ハプテン抗原の場合は抗原結合部位の底部や VH と VL の接触面を形成する β ストランドに含まれるアミノ酸と結合し, 抗原認識表面はキャビティ型である⁸³⁾. また, 実際に抗原と結合するアミノ酸残基 (specificity-determining residues: SDR) の平均的な数はハプテン抗体の場合は 12 で, タンパク質抗体やペプチド抗体の 17 よりも 5 個少ない. その中でも H 鎖の CDR3 (H3) に含まれる SDR の割合は, 抗ハプテンの場合は 33% であるのに対し抗タンパク質・抗ペプチドは 25% で, H3 ループは特に抗ハプテン抗体においては重要な役割を果たして

表1 抗体エンジニアリング法により確立されたハプテン特異抗体

ハプテン	抗体	ライブラリーの種類	引用文献
2,4-D	Fab	from hybridoma	Gerdes et al. (1997) <i>Anal Biochem</i> 252; 198-204
Atrazine, paraquat	scFv	from hybridoma	Longstaff et al. (1998) <i>Biochim Biophys Acta</i> 1381 2; 147-160
Atrazine	scFv	from hybridoma	Strachan et al. (1998) <i>Biosens Bioelectron</i> 13; 665-673
Atrazine	scFv dimers	from hybridoma	Grant et al. (1981) <i>Prog Clin Biol Res</i> 64; 413-428
Atrazine	Fabs	from hybridoma	Rau et al. (2002) <i>Anal Bioanal Chem</i> 372 2; 261-267
Cyclohexanedione	scFv	from hybridoma	Webb et al. (1997) <i>J Agric Food Chem</i> 45; 535-541
Mecoprop	scFv	from hybridoma	Strachan et al. (1998) <i>Biosens Bioelectron</i> 13; 665-673
Chlorpyrifos-ethyl	scFv	from hybridoma	Alcocer et al. (2000) <i>J Agric Food Chem</i> 48; 335-337
Paraquat	scFv	from hybridoma	Graham et al. (1995) <i>J Chem Technol Biotechnol</i> 63 3; 279-289
PCBs	Fabs	from hybridoma	Chiu et al. (2000) <i>J Agric Food Chem</i> 48 6; 2614-2624
Picloram	Fab	from hybridoma	Yau et al. (1998) <i>J Agric Food Chem</i> 46 10; 4457-4463
Aflatoxin B1	scFv	naïve	Moghaddam et al. (2001) <i>J Immunol Methods</i> 254; 169-181
Digoxigenin	scFv	naïve	Dorsam et al. (1997) <i>FEBS Lett</i> 414; 7-13
Doxorubicin	scFv	naïve	Vaughan et al. (1996) <i>Nat Biotechnol</i> 14; 309-314
Estradiol	scFv	naïve	Dorsam et al. (1997) <i>FEBS Lett</i> 414; 7-13
Indole-3-acetic acid	VHH	naïve	Sheedy et al. (2006) <i>J Agric Food Chem</i> 54; 3668-3678
Fluorescein	scFv	naïve	Vaughan et al. (1996) <i>Nat Biotechnol</i> 14; 309-314
Phenyl-oxazolone	scFv	naïve	de Haard et al. (1999) <i>J Biol Chem</i> 274; 18218-18230
Picloram	VHH	naïve	Yau et al. (2003) <i>J Immunol Methods</i> 281; 161-175
Progesterone	scFv	naïve	Dorsam et al. (1997) <i>FEBS Lett</i> 414; 7-13
Progesterone	scFv	naïve	He et al. (1999) <i>J Immunol Methods</i> 231; 105-117
Fumosinin B1	scFv	naïve	Lauer et al. (2005) <i>J Agric Food Chem</i> 53; 899-904
Atrazine	scFv	immune	Li et al. (2000) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 268; 398-404
Atrazine	scFv	immune	Charlton et al. (2001) <i>Biosens Bioelectron</i> 16; 639-646
Atrazine	scFv	immune	Charlton et al. (2000) <i>J Immunol</i> 164; 6221-6229
Azo-dye RR1	VHH	immune	Spinelli et al. (2000) <i>Biochemistry</i> 39; 1217-1222
Azo-dye RR120	VHH	immune	Frenken et al. (2000) <i>J Biotechnol</i> 78; 11-21
Azo-dye RR6	VHH	immune	Frenken et al. (2000) <i>J Biotechnol</i> 78; 11-21
Cortisol	scFv	immune	Chames et al. (1998) <i>J Immunol</i> 161; 5421-5429
Digoxin & analogues	scFv	immune	Short et al. (1995) <i>J Biol Chem</i> 270; 28541-28550
Isoproturon	scFv	immune	Li et al. (2000) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 268; 398-404
Mecoprop	scFv	immune	Li et al. (2000) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 268; 398-404
Simazine	scFv	immune	Li et al. (2000) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 268; 398-404
Triazine	scFv	immune	Kramer (2002) <i>Environ Sci Technol</i> 36; 4892-4898
Picloram	scFv	immune	Tout et al. (2001) <i>J Agric Food Chem</i> 49 8; 3628-3637
caffeine	VHH	immune	Ladenson et al. (2006) <i>Anal Chem</i> 78; 4501-4508
15-acetyldeoxynivalenol	VHH	immune	Doyle PJ (2008) <i>Mol Immunol</i> 45 (14): 3703-3713
4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenol	scFv	synthetic	Van Wyngaardt et al. (2004) <i>BMC Biotechnol</i> 4; 6
Fluorescein	scFv	synthetic	Van Wyngaardt et al. (2004) <i>BMC Biotechnol</i> 4; 6
Glutathione	scFv	synthetic	Hirose et al. (1998) <i>Protein Eng</i> 11; 243-248
Microcystin LR	scFv	synthetic	Strachan et al. (2002) <i>FEMS Microbiol Lett</i> 210; 257-261
Phtalic acid	scFv	synthetic	Strachan et al. (2002) <i>FEMS Microbiol Lett</i> 210; 257-261
digoxigenin	scFv	error prone PCR	Daugherty (2000) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 97; 2029-2034
cortisol	Fab		Miyazaki (1999) <i>Protein Eng</i> 12; 407-415
progesteron	Fab		Gram (1992) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 89; 3576-3580
p-azophenylarsonate	Fab		Casson (1995) <i>J Immunol</i> 155; 5647-5654
p-azophenylarsonate	Fab		Parhami (2002) <i>J Immunol Methods</i> 259; 43-53
digoxin	Fab		Short (1995) <i>J Biol Chem</i> 270; 28541-28550
2-phenyl-5 oxazolone		Bacterial mutator strains	Low (1996) <i>J Mol Biol</i> 260; 359-368
2-phenyl-5 oxazolone	sVH	site directed	Davies (1996) <i>Immunotechnology</i> 2; 169-179
testosterone	Fab		Valjakka (2002) <i>Biol Chem</i> 277; 44021-44027
digoxin	Fab		Short (1995) <i>J Biol Chem</i> 270; 28541-28550
digoxin	scFv		Daugherty (1998) <i>Protein Eng</i> 11; 825-832
parathion			Wyatts (1999) <i>Food Agric Immunol</i> 11; 207-218
atrazine	Fab		Kusharyoto (2002) <i>Protein Eng</i> 15; 233-244
mesothelin	scFv	Mutational hot spots	Chowdhury (1999) <i>Nat Biotechnol</i> 17; 568-572
cortisol	scFv	Parsimonious	Chames (1998) <i>J Immunol</i> 161; 5421-5429
interleukin 1β		DNA shuffling	Stemmer (1994) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 91; 10747-10751
azo-dye reactive red-6	VHH		van der Liden (2000) <i>J Biotechnol</i> 80; 261-270
fluorescein			Boder (2000) <i>Methods Enzymol</i> 328; 430
triazine	scFv	Chain shuffling	Kramer (2002) <i>Environ Sci Technol</i> 36; 4892-4898
nitrophenyl phosphate	Fab		Kang (1991) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 88; 11120-11123
auxin	VHH	StEP	Sheedy (2006) <i>J Agric Food Chem</i> 54; 3668-3678

文献 88 より引用改変

おり⁸⁴⁾, π -スタッキングやファンデルワールス作用は抗体の特異性に影響すると考えられる。

2) 抗ハプテン抗体作製で考慮される要因

(1) ハプテン-キャリアタンパク質複合体

ハプテンは低分子であるため、抗原-抗体結合を形成するのに十分な反応基を保持していない場合が多い。誘導される抗体の選択性を改善するためには、ハプテンの最も特徴的な構造を可能な限りキャリアタンパク質と距離をおくように複合体を作製する。また、ハプテン-キャリア結合の化学構造や架橋位置等が、目的とするハプテン分子の構造や抗体の結合能力に大きな影響を及ぼすことが想定される場合、分子モデリング解析 (computer-assisted molecular modeling: CAMM) の利用は有用となる⁸⁵⁾。例えば、ターゲット物質と構造的にも電子的にも類似したハプテン抗原はCAMMを用いてデザインできる。CAMMはハプテン抗原のデザインの他にも、交差反応性、抗原抗体相互作用に関する様々な情報を与える。

(2) 免疫

ハプテンの含有モル比の多いハプテン抗原を免疫すると一般的に強い抗体応答を誘導できる。Fodeyらは、サルメテロールを用いて、キャリアタンパク質へのコンジュゲート量と誘導されてくる抗体活性を検討し、コンジュゲート量の低いハプテン抗原を免疫することで、抗体価は低くなるが、サルメテロールへの選択性が改善される傾向にあることを報告している⁸⁶⁾。親和力、選択性の高い抗体を得るためには、ハプテン抗原を作製する際のハプテンとキャリアタンパク質のモル比、免疫の際の投与量、投与回数を検討することも重要なポイントとなる。

(3) パンニング、スクリーニング

ハプテン-キャリア複合体の免疫で誘導された抗体では、ハプテン分子そのものよりも、複合体への認識力が高くなる傾向が多々生じる。このバイアスを避けるため、抗体ライブラリーを用いたパンニングでは、a) 免疫抗原と異なるキャリアタンパク質もしくは異なる架橋反応基で作製した複合体の使用、b) 固相化する複合体濃度の減少、c) キャリアタンパク質やハプテン類似化合物とのブレインキューベーションによる吸収除去、d) ハプテン単独や特異的抗体による特異的溶出、e) 溶出条件を厳しくする、などの工夫により選択性の高いハプテン特異的抗体の単離が試みられている⁸⁷⁾。

3) 抗体エンジニアリング法による抗ハプテン抗体の作製例

ファージディスプレイ法が主な手法であるが、1次抗体ライブラリーやPCRによる変異導入等を施した2次ライブラリーから単離された抗体の例を表1にまとめた⁸⁸⁾。ど

のように作製された抗体ライブラリーがハプテン特異抗体を選別するのに最も有効かは興味をもたれるが、一覽で見られるように多様なライブラリーが抗ハプテン抗体の単離に用いられている。ライブラリーの特長別に紹介する。

(1) ナイブライブラリー

免疫初期応答に相当する多様性 (diversity) があり、得られる抗体の親和性 (Kd) は 10^{-5} - 10^{-7} M と想定され、親和性の増強が必要である場合が多いと考えられているが、現実には十分な親和性を保持した一本鎖抗体 (single chain Fv: scFv) を獲得できている。ヒトナイブライブラリーよりフルオレセイン、ジエチレントリアミン5酢酸、ドキシソルピシン、エストラジオールに対する Kd が 10^{-8} M 以下の scFv⁸⁹⁾、プロゲステロン、テストステロンに対する scFv⁹⁰⁾、IgM ライブラリーよりステロイドに対する親和性が 10^{-8} M の scFv⁹¹⁾、半合成ライブラリーよりアフラトキシン B1 に対する親和性が 10^{-9} M の scFv⁹²⁾ 等が報告されている。

(2) 合成ライブラリー

Griffin ライブラリーよりマイクロシスチンに対する $IC_{50} = 4-1 \times 10^{-6}$ M (50% 阻害濃度: IC_{50}) の scFv が、Tomlinson ライブラリーより同じくマイクロシスチンに対する $IC_{50} = 13-2,000 \times 10^{-9}$ M の scFv、等が報告されている⁹³⁾。

(3) 免疫ライブラリー

ナイブライブラリーに比べて親和性の高い分子を選択する可能性が高いと考えられている。実際にヒツジ免疫ライブラリーよりアトラジンに対して $IC_{50} = 10^{-10}$ M オーダーの scFv が報告されている⁹⁴⁾。またウサギ免疫ライブラリーより、イソプロトロン、アトラジン、シマジン、メコプロップに対する $Kd = 6.75 \times 10^{-10}$ M の scFv が報告されている⁹⁵⁾。

(4) 突然変異導入ライブラリー

生体内での免疫メカニズムでは到底存在しえない高親和性・高特異性の抗体分子を創出できる可能性が期待できる。抗ジゴキシゲニン scFv の PCR 変異導入 (error-prone PCR mutagenesis) による親和性の増強⁹⁶⁾、抗コルチゾール scFv の 50% 変異導入 (parsimonious mutagenesis) による親和性の向上・交差反応性の抑制⁹⁷⁾、抗テストステロン Fab のドメインシャッフリング・部位特異的変異導入による親和性の向上・交差反応性の抑制⁹⁸⁾、抗エストラジオール scFv の CDRH2 挿入・PCR 変異導入による親和性の向上・交差反応性の抑制⁹⁹⁾、抗アゾ染料 red-6 llama VHHs (ラマ重鎖抗体フラグメント: VHH) の DNA シャッフリングによる親和性の向上・生産性の向上¹⁰⁰⁾、抗オーキシン llama VHHs のジグザグ DNA 配列シャッフリング (staggered extension process: StEP) による交差反応性の抑制¹⁰¹⁾ 等が報告されている。

(5) その他の有用なライブラリー

a) キャビティライブラリー法

抗体がフリーなハプテンと結合しないのは、フリーなハプテンは抗体の抗原結合表面を占有することができないためだと予想される。Ohlinらは、一つのFITC特異的scFvクローンのV遺伝子を分子骨格として、その結合キャビティを形作るアミノ酸のうち11個のポジションに変異を入れたキャビティライブラリーを作製して、五つの異なるハプテンに対する特異抗体の単離を試み、四つのハプテンに対して特異抗体の単離を達成したことを報告している¹⁰²⁾。

b) アフィニティークランプ (affinity clamps) 法

二つの異なるタンパク質ドメインをリンカーでつなぎ、そのタンパク質間の表面を最適化することによりターゲットとしている物質との結合部位を作製する新しいストラテジーである¹⁰³⁾が、ハプテンが結合する抗体のキャビティ構造もこのストラテジーを用いて作製できる可能性がある。

c) オープンサンドイッチ法

11-デオキシコルチゾールのfMでの検出が可能であることを述べている¹⁰⁴⁾。この方法は固相化したL鎖に抗原とH鎖(酵素標識したH鎖やファージに提示させたH鎖)を反応させ‘L鎖-抗原-H鎖’複合体を形成させている。このようにしてハプテンをきっちりと包み込むL鎖とH鎖の組合せをスクリーニングし、ハプテンが結合する抗体のキャビティ構造を構築する方法と言える。

5. 補足：ライブラリー作製時での注意事項

一般の遺伝子クローニングでは、1種類の遺伝子について、数多くのトランスフォーマントを調べて、正しい配列のDNA断片を一つ選別・決定すればいいが、ライブラリーでは全てのクローンのDNA配列の正確さを必要とし、ライブラリーの多様性を確保するために優れた形質転換効率を達成しなければならない。このため、DNAの調整、ライゲーション効率および形質転換では、一般の遺伝子クローニングでの操作とは比較にならないほど神経を使う。そのポイントは「阻害因子を除く」に尽きるが、具体的に列挙する。最も平凡な操作が一番重要であることを経験している^{105~109)}。ヒト末梢血リンパ球を利用する場合、倫理委員会への申請も必要とする。

1) プライマー

合成プライマーは、最高の精製純度が必要。

2) ファージミドベクターの挿入断片

ファージミドベクターを構築する時、インサート(抗体遺伝子)を組込む挿入領域に制限酵素サイトを付加しておくと、ベクターの切れ残りによる抗体遺伝子の未導入のものがライブラリーに残存する可能性を減らせる。

3) 遺伝子増幅の簡略化の問題

V領域の増幅を、プライマーを混合して簡略に行うと、増幅されるV遺伝子配列と増幅されない配列が生ずる。すべてのプライマーの組合わせで個別に増幅するほうが確実。

4) アガロース

DNAの形質転換効率はライブラリーの優劣の決定因子であるので、高純度なDNAを作製するため、最高純度のアガロースを利用。

5) UVの影響

DNA断片の精製に用いるUVランプの影響も要注意。UVランプを使用せずDNAのバンドを検出する手法もある。

6) ゲルからの抽出

経済的な意味で、DE81ペーパーを用いて精製できれば安価で済む¹¹⁰⁾。

7) キャリアRNA

精製するDNAの濃度が20 µg/ml以下の時、tRNAを加え20 µg/mlにして共沈させることにより回収できる¹¹¹⁾。tRNAを添加しても形質転換効率は実験誤差範囲に収まる。

8) コンピート細胞

形質転換効率が優れているSS320を含めて¹¹²⁾、効率のよいコンピート細胞が市販されている。

9) 培養方法

増殖速度が速い、遅いクローンが存在するため、固層培養を行うことですべてのクローンを均一に回収することができる。

おわりに

beyond antibodyと呼ばれる領域はペプチドや更なる小分子デザインの領域と融合しつつある。分子標的医薬としての抗体は医療へ及ぼす経済的影響が大きいので、この領域で汎用される基本技術や材料が、テレビや自動車と同様に、100余りに及ぶ先端技術の国際特許網で固められている。しかし、この領域に身をおかずして、この領域の未来を感知することはできない。若い情熱から優れた研究が数多く生み出されることを期待したい。また、平凡だが、飛躍のないアイデアの蓄積による分子デザインが、想定を越えた高機能な分子標的を達成できることを示す研究領域でもある。

文 献

- 1) Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315-1317.
- 2) Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J., & Lerner, R.A. (1989) *Sci-*

- ence, 246, 1275–1281.
- 3) McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., & Chiswell, D.J. (1990) *Nature*, 348, 552–554.
 - 4) Ackermann, H.-W. (2007) *Arch. Virol.*, 152, 227–243.
 - 5) Houshmand, H., Fröman, G., & Magnusson, G. (1999) *Anal. Biochem.*, 268, 363–370.
 - 6) Kurzepa, A., Dabrowska, K., Switała-Jeleń, K., & Górski, A. (2009) *Folia Microbiol. (Praha)*, 54, 5–15.
 - 7) Maruyama, I.N., Maruyama, H.I., & Brenner, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8273–8277.
 - 8) Marvin, D.A. & Hohn, B. (1969) *Bacteriol. Rev.*, 33, 172–209.
 - 9) Rasched, I. & Oberer, E. (1986) *Microbiol. Rev.*, 50, 401–427.
 - 10) Eckert, B. & Schmid, F.X. (2007) *J. Mol. Biol.*, 373, 452–461.
 - 11) Houbiers, M.C. & Hemminga, M.A. (2004) *Mol. Membr. Biol.*, 21, 351–359.
 - 12) Smith, G.P. & Petrenko, V.A. (1997) *Chem. Rev.*, 97, 391–410.
 - 13) Bradbury, A.R.M. & Marks, J.D. (2004) *J. Immunol. Methods*, 290, 29–49.
 - 14) Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., & Winter, G. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19, 4133–4137.
 - 15) Kramer, R.A., Cox, F., van der Horst, M., van der Oudenrijn, S., Res, P.C.M., Bia, J., Logtenberg, T., & de Kruif, J. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31, e59.
 - 16) Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C., & Palmer, T. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 18003–18006.
 - 17) Driessen, A.J.M. & Nouwen, N. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 643–667.
 - 18) Egea, P.F., Stroud, R.M., & Walter, P. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 213–220.
 - 19) Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C.A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H.R., & Berks, B.C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 10482–10486.
 - 20) Gouridis, G., Karamanou, S., Gelis, I., Kalodimos, C.G., & Economou, A. (2009) *Nature*, 462, 363–367.
 - 21) Leake, M.C., Greene, N.P., Godun, R.M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R.M., Palmer, T., & Berks, B.C. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 15376–15381.
 - 22) Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., & Palmer, T. (1998) *EMBO J.*, 17, 3640–3650.
 - 23) Tarry, M.J., Schäfer, E., Chen, S., Buchanan, G., Greene, N.P., Lea, S.M., Palmer, T., Saibil, H.R., & Berks, B.C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 13284–13289.
 - 24) Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A., & Turner, R.J. (1998) *Cell*, 93, 93–101.
 - 25) Steiner, D., Forrer, P., & Plückthun, A. (2008) *J. Mol. Biol.*, 382, 1211–1227.
 - 26) Steiner, D., Forrer, P., Stumpp, M.T., & Plückthun, A. (2006) *Nat. Biotechnol.*, 24, 823–831.
 - 27) Thammawong, P., Kasinrerk, W., Turner, R.J., & Tayapiwatana, C. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 697–703.
 - 28) Krumpke, L.R.H., Atkinson, A.J., Smythers, G.W., Kandel, A., Schumacher, K.M., McMahon, J.B., Makowski, L., & Mori, T. (2006) *Proteomics*, 6, 4210–4222.
 - 29) Mikawa, Y.G., Maruyama, I.N., & Brenner, S. (1996) *J. Mol. Biol.*, 262, 21–30.
 - 30) Zanghi, C.N., Lankes, H.A., Bradel-Tretheway, B., Wegman, J., & Dewhurst, S. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33, e160.
 - 31) Gai, S.A. & Wittrup, K.D. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17, 467–473.
 - 32) Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., & Curtiss, R. (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 29–34.
 - 33) He, M. & Khan, F. (2005) *Expert review of proteomics*, 2, 421–430.
 - 34) Takahashi, T.T., & Roberts, R.W. (2009) *Methods Mol. Biol.*, 535, 293–314.
 - 35) Reichert, J.M. (2008) *mAbs.*, 1, 1–3.
 - 36) Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., Vielmetter, J., Carmichael, D.F., Hayes, R.J., & Dahiyat, B.I. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 4005–4010.
 - 37) Horton, H.M., Bennett, M.J., Pong, E., Peipp, M., Karki, S., Chu, S.Y., Richards, J.O., Vostiar, I., Joyce, P.F., Repp, R., Desjarlais, J.R., & Zhukovsky, E.A. (2008) *Cancer Res.*, 68, 8049–8057.
 - 38) Niwa, R., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Shinkawa, T., Uchida, K., Nakamura, K., Matsushima, K., Ueda, R., Hanai, N., & Shitara, K. (2004) *Cancer Res.*, 64, 2127–2133.
 - 39) Suzuki, E., Niwa, R., Saji, S., Muta, M., Hirose, M., Iida, S., Shiotsu, Y., Satoh, M., Shitara, K., Kondo, M., & Toi, M. (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13, 1875–1882.
 - 40) Teeling, J.L., Mackus, W.J., Wiegman, L.J., van den Brakel, J. H., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., Parren, P.W., Glennie, M.J., & van de Winkel, J.G. (2006) *J. Immunol.*, 177, 362–371.
 - 41) Ober, R.J., Martinez, C., Lai, X., Zhou, J., & Ward, E.S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11076–11081.
 - 42) Dall'Acqua, W.F., Kiener, P.A., & Wu, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 23514–23524.
 - 43) Yeung, Y.A., Leabman, M.K., Marvin, J.S., Qiu, J., Adams, C. W., Lien, S., Starovasnik, M.A., & Lowman, H.B. (2009) *J. Immunol.*, 182, 7663–7671.
 - 44) Kai, M., Motoki, K., Yoshida, H., Emuta, C., Chisaka, Y., Tsuruhata, K., Endo, C., Muto, M., Shimabe, M., Nishiyama, U., Hagiwara, T., Matsumoto, A., Miyazaki, H., & Kataoka, S. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26, 209–211.
 - 45) Wu, C., Ying, H., Grinnell, C., Bryant, S., Miller, R., Clabbers, A., Bose, S., McCarthy, D., Zhu, R.R., Santora, L., Davis-Taber, R., Kunes, Y., Fung, E., Schwartz, A., Sakorafas, P., Gu, J., Tarcsa, E., Murtaza, A., & Ghayur, T. (2007) *Nat. Biotechnol.*, 25, 1290–1297.
 - 46) Asano, R., Watanabe, Y., Kawaguchi, H., Fukazawa, H., Nakanishi, T., Umetsu, M., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., & Kumagai, I. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 27659–27665.
 - 47) Biburger, M., Weth, R., & Wels, W.S. (2005) *J. Mol. Biol.*, 346, 1299–1311.
 - 48) Xie, Z., Guo, N., Yu, M., Hu, M., & Shen, B. (2005) *J. Immunol. Methods*, 296, 95–101.
 - 49) Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) *Nat. Biotechnol.*, 23, 1126–1136.
 - 50) Bargou, R. Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P.A., & Kufer, P. (2008) *Science*, 321, 974–977.
 - 51) Haas, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbüse, R., Schlereth, B., Kufer, P., & Baeuerle, P.A. (2009) *Immunobiology*, 214, 441–453.

- 52) Orita, T., Tsunoda, H., Yabuta, N., Nakano, K., Yoshino, T., Hirata, Y., Ohtomo, T., Nezu, J., Sakumoto, H., Ono, K., Saito, M., Kumagai, E., Nanami, M., Kaneko, A., Yoshikubo, T., & Tsuchiya, M. (2005) *Blood*, **105**, 562–566.
- 53) Kimura, N., Kawai, S., Kinoshita, Y., Ishiguro, T., Azuma, Y., Ozaki, S., Abe, M., Sugimoto, M., Hirata, Y., Orita, T., Okabe, H., Matsumoto, T., & Tsuchiya, M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 1201–1209.
- 54) Muraoka, S., Ito, Y., Kamimura, M., Baba, M., Arima, N., Suda, Y., Hashiguchi, S., Torikai, M., Nakashima, T., & Sugimura, K. (2009) *J. Biochem.*, **145**, 799–810.
- 55) Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., & Panoskaltis, N. (2006) *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1018–1028.
- 56) Yu, X.C., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C. J., Hicar, M.D., Tumphey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., Stevens, J., Wilson, I.A., Aguilar, P.V., Altschuler, E. L., Basler, C.F., & Crowe, J.E. (2008) *Nature*, **455**, 532–536.
- 57) Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Obata, T., Kondo, S., Kinoshita, K., Kadowaki, S., Takahashi, K., Sugiyama, T., Kishi, H., & Muraguchi, A. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 1088–1092.
- 58) Throsby, M., van den Brink, E., Jongeneelen, M., Poon, L.L., Alard, P., Cornelissen, L., Bakker, A., Cox, F., van Deventer, E., Guan, Y., Cinatl, J., ter Meulen, J., Lasters, I., Carsetti, R., Peiris, M., de Kruif, J., & Goudsmit, J. (2008) *PLoS One*, **3**, e3942.
- 59) Ekiert, D.C., Bhabha, G., Elsliger, M.A., Friesen, R.H.E., Jongeneelen, M., Throsby, M., Goudsmit, J., & Wilson, I.A. (2009) *Science*, **324**, 246–251.
- 60) Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X., & Koide, S. (1998) *J. Mol. Biol.*, **284**, 1141–1151.
- 61) Koide, A., Gilbreth, R.N., Esaki, K., Tereshko, V., & Koide, S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6632–6637.
- 62) Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R.G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A.C., Liu, H., Lohse, P.A., Sun, L., Weng, S., Wagner, R.W., & Lipovsek, D. (2002) *Chem. Biol.*, **9**, 933–942.
- 63) Getmanova, E.V., Chen, Y., Bloom, L., Gokemeijer, J., Shamah, S., Warikoo, V., Wang, J., Ling, V., & Sun, L. (2006) *Chem. Biol.*, **13**, 549–556.
- 64) <http://www.adnexustx.com/>.
- 65) Silverman, J., Liu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., Alba, B.M., Smith, R., Rivas, A., Li, P., Le, H., Whitehorn, E., Moore, K.W., Swimmer, C., Perlroth, V., Vogt, M., Kolkman, J., & Stemmer, W.P. (2005) *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1556–1561.
- 66) <http://wwwext.amgen.com/>.
- 67) Skerra, A. (2008) *Febs J.*, **275**, 2677–2683.
- 68) Breustedt, D.A., Schonfeld, D.L., & Skerra, A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 161–173.
- 69) Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T., & Skerra, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1898–1903.
- 70) Vopel, S., Mühlbach, H., & Skerra, A. (2005) *Biol. Chem.*, **386**, 1097–1104.
- 71) Schlehüser, S. & Skerra, A. (2005) *Drug Discov. Today*, **10**, 23–33.
- 72) <http://www.pieris-ag.com/>.
- 73) Sedgwick, S.G. & Smerdon, S.J. (1999) *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 311–316.
- 74) Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grütter, M.G., & Plückthun, A. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 575–582.
- 75) Zahnd, C., Pecorari, F., Straumann, N., Wyler, E., & Plückthun, A. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 35167–35175.
- 76) Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J.M., Steiner, D., Lawrence, M.C., McKern, N.M., Pecorari, F., Ward, C.W., Joos, T.O., & Plückthun, A. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**, 1015–1028.
- 77) Kawe, M., Forrer, P., Amstutz, P., & Plückthun, A. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 40252–40263.
- 78) Eggel, A., Baumann, M.J., Amstutz, P., Stadler, B.M., & Vogel, M. (2009) *J. Mol. Biol.*, **393**, 598–607.
- 79) Pancer, Z., Amemiya, C.T., Ehrhardt, G.R., Ceitlin, J., Gartland, G.L., & Cooper, M.D. (2004) *Nature*, **430**, 174–180.
- 80) Herrin, B.R., Alder, M.N., Roux, K.H., Sina, C., Ehrhardt, G. R., Boydston, J.A., Turnbough, C.L., Jr., & Cooper, M.D. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2040–2045.
- 81) Han, B.W., Herrin, B.R., Cooper, M.D., & Wilson, I.A. (2008) *Science*, **321**, 1834–1837.
- 82) Tasumi, S., Velikovskiy, C.A., Xu, G., Gai, S.A., Wittrup, K. D., Flajnik, M.F., Mariuzza, R.A., & Pancer, Z. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12891–12896.
- 83) Almagro, J.C. (2004) *J. Mol. Recognit.*, **17**, 132–143.
- 84) Livesay, D.R. & Subramaniam, S. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 463–472.
- 85) Xu, Z.L., Shen, Y.D., Beier, R.C., Yang, J.Y., Lei, H.T., Wang, H., & Sun, Y.M. (2009) *Anal. Chim. Acta*, **647**, 125–136.
- 86) Fodey, T.L., Greer, N.M., & Crooks, S.R. (2009) *Anal. Chim. Acta*, **637**, 328–332.
- 87) Aitken, R. (2009) The Isolation of scFv Against Small Target Molecules (Aitken, R. ed.), *Antibody Phage Display Methods and Protocols*, Humana Press.
- 88) Sheedy, C., MacKenzie, C.R., & Hall, J.C. (2007) *Biotechnol. Adv.*, **25**, 333–352.
- 89) Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J., & Johnson, K.S. (1996) *Nat. Biotechnol.*, **14**, 309–314.
- 90) Little, M., Welschof, M., Braunagel, M., Hermes, I., Christ, C., Keller, A., Rohrbach, P., Kürschner, T., Schmidt, S., Kleist, C., & Terness, P. (1999) *J. Immunol. Methods*, **231**, 3–9.
- 91) Dörsam, H., Rohrbach, P., Kürschner, T., Kipriyanov, S., Renner, S., Braunagel, M., Welschof, M., & Little, M. (1997) *FEBS Lett.*, **414**, 7–13.
- 92) Moghaddam, A., Løbersli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M., & Marvik, O.J. (2001) *J. Immunol. Methods*, **254**, 169–181.
- 93) Strachan, G., McElhiney, J., Drever, M.R., McIntosh, F., Lawton, L.A., & Porter, A.J. (2002) *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 257–261.
- 94) Charlton, K., Harris, W.J., & Porter, A.J. (2001) *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 639–646.
- 95) Li, Y., Cockburn, W., Kilpatrick, J.B., & Whitlam, G.C. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **268**, 398–404.
- 96) Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., & Georgiou, G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2029–2034.
- 97) Chames, P., Coulon, S., & Baty, D. (1998) *J. Immunol.*, **161**, 5421–5429.
- 98) Valjakka, J., Hemminki, A., Niemi, S., Söderlund, H., Takkinen, K., & Rouvinen, J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 44021–44027.
- 99) Lamminmäki, U., Paupério, S., Westerlund-Karlsson, A., Karvinen, J., Virtanen, P.L., Lövgren, T., & Saviranta, P. (1999) *J. Mol. Biol.*, **291**, 589–602.
- 100) van der Linden, R.H., de Geus, B., Frenken, G.J., Peters, H., & Verrips, C.T. (2000) *J. Biotechnol.*, **80**, 261–270.
- 101) Sheedy, C., Yau, K.Y., Hirama, T., MacKenzie, C.R., & Hall, J.C. (2006) *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3668–3678.

- 102) Persson, H., Lantto, J., & Ohlin, M. (2006) *J. Mol. Biol.*, **357**, 607–620.
- 103) Huang, J., Makabe, K., Biancalana, M., Koide, A., & Koide, S. (2009) *J. Mol. Biol.*, **392**, 1221–1231.
- 104) Ihara, M., Suzuki, T., Kobayashi, N., Goto, J., & Ueda, H. (2009) *Anal. Chem.*, **81**, 8298–8304.
- 105) Hamasaki, T., Hashiguchi, S., Ito, Y., Kato, Z., Nakanishi, K., Nakashima, T., & Sugimura, K. (2005) *J. Biochem.*, **138**, 433–442.
- 106) Hashiguchi, S., Nakashima, T., Nitani, A., Yoshihara, T., Yoshinaga, K., Ito, Y., Maeda, Y., & Sugimura, K. (2003) *J. Biochem.*, **133**, 43–49.
- 107) Yoshihara, T., Takiguchi, S., Kyuno, A., Tanaka, K., Kuba, S., Hashiguchi, S., Ito, Y., Hashimoto, T., Iwatsubo, T., Tsuyama, S., Nakashima, T., & Sugimura, K. (2008) *J. Biochem.*, **143**, 475–486.
- 108) 杉村和久, 橋口周平, 伊東祐二 (2003) *Molecular Medicine*, **40**, 1150–1158.
- 109) 杉村和久, 濱崎隆之, 吉永圭介 (2004) *Dojin News*, **109**, 1–7 (<http://www.dojindo.co.jp/letterj/109/news109.pdf> よりダウンロード可).
- 110) Russell, J.S.D.W. (2001) *Molecular Cloning*, **3**, A8. 13.
- 111) Russell, J.S.D.W. (2001) *Molecular Cloning*, **3**, A8. 26.
- 112) Sidhu, S.S., Lowman, H.B., Cunningham, B.C., & Wells, J.A. (2000) *Methods Enzymol.*, **328**, 333–363.
-