

酵母表層ディスプレイ系による動物個体免疫系を用いない新規抗体酵素の創製

村井（加藤）倫子
（京都大学大学院農学研究科）

研究の目的

抗体酵素とは、生体の免疫システムにおける抗体分子の多様性と酵素の有する触媒機能を兼ね備えたものである。抗体酵素は、「遷移状態類似物質と結合する抗体はその化学反応の触媒として機能する」という概念に基いて、従来マウスの免疫システムを利用して作成されてきた。しかし、マウスの免疫システムを利用した抗体酵素の作成には、時間と手間がかかるのが現状である。これに対して、酵母細胞表層への分子ディスプレイ法を利用して抗体酵素を作成できれば、抗体酵素の精製操作を経ずに、その活性を酵母細胞のまま解析することが可能であり、また望ましい機能を有する抗体酵素の選択に、試験管内でのハイスループットスクリーニングシステムを適用することも可能である。そこで、本研究では、酵母表層ディスプレイ系を用いて、試験管内で思い通りの触媒能をもつテラーメイドの人工酵素を自由自在に創製することを目的とした。特に、プロテアーゼ活性を有する抗体酵素は、創薬などの医療分野において、新たな応用の可能性を持つと考えられたので、抗体酵素分子にセリンプロテアーゼ様の Ser-His-Asp で構成される触媒トライアドを導入することにより新規抗体酵素を作成することを試みた。

方法と結果

1. 抗体酵素 6D9 軽鎖への触媒トライアドの導入

現有している酵母表層への抗体酵素 6D9¹⁾の提示発現系を用い、その軽鎖に変異を導入してトライアドを設計した。本設計には、Vasoactive intestinal peptide (VIP)の免疫によって作製される抗-VIP抗体の配列情報を基にした。抗-VIP抗体はVIPの加水分解反応を穏やかに触媒し²⁾、その触媒メカニズムはセリンプロテアーゼと類似したものであることが示唆されている³⁾。さらにその軽鎖可変領域のSer^{27a}、His⁹³、Asp¹がセリンプロテアーゼ様の触媒トライアドを形成していると考えられている^{4,5)}。そこで、抗-VIP抗体と同一の位置に同様の触媒トライアドを導入するため、部位特異的変異によって抗体酵素 6D9 の軽鎖可変領域のGlu¹とThr^{27a}をそれぞれAspとSerに置換した。作製した触媒トライアド導入 6D9 (Lc (Triad)) 遺伝子を含む酵母表層提示用プラスミドを、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168 株 (内在性プロテアーゼに大きく寄与するプロテイナーゼA、プロテイナーゼB、カルボキシペプチダーゼYの遺伝子欠損株) に導入し、酵母細胞表層でのLc (Triad) の発現を免疫染色法により調べた。酵母細胞表層のみが蛍光標識されたことによりその発現が確認された。

2. Lc (Triad)の活性測定

分子ディスプレイ法は、酵母細胞表面にタンパク質（酵素）を最密充填的に提示する

ことができる。つまり細胞をタンパク質（酵素）クラスターとして扱うことが可能であるので、従来のタンパク質精製操作なしに細胞のまま活性測定できる利点を利用し、Lc (Triad)の活性測定を行った。

まず、Lc (Triad) 提示酵母を培養し、集菌・洗浄した後の菌体に、基質として蛍光基質であるBODIPY FL Casein (Molecular Probes)、あるいは7種類のpeptide-MCA (Peptide institute, inc.)を加え反応させた。その後、菌体を除いた上清の蛍光強度を測定した。活性評価の比較として野生型抗体酵素 6D9 軽鎖 (Lc (WT))提示酵母を用いた。その結果、Lc (Triad)の活性は、コラゲナーゼ様ペプチダーゼの基質であるSuc-GPLGP-MCAに対してLc (WT)よりも顕著に高い値を示した。さらに、この活性の差はセリンプロテアーゼ阻害剤であるDiisopropyl-phosphofluoridate (DFP)によってほぼ完全に消失した。これらの結果は、6D9 の軽鎖がセリンプロテアーゼ様の触媒トライアド導入によってコラゲナーゼのようなプロテアーゼ活性が発現できることを示唆している⁹⁾。

結論

抗体酵素 6D9 の野生型軽鎖 Lc (WT)と、部位特異的変異によって同様の触媒トライアドを導入した変異軽鎖 Lc (Triad)を、*S. cerevisiae* のプロテアーゼ欠損株の細胞表層にディスプレイした。これらの細胞を BODIPY FL casein、および7種類の peptide-MCA と反応させたところ、Suc-GPLGP-MCA を基質としたときに両者の間に顕著な加水分解活性の差が検出された。この活性の差はセリンプロテアーゼ阻害剤である DFP によってほぼ完全に消失した。これらの結果は、セリンプロテアーゼ様の触媒トライアドの導入によって 6D9 の軽鎖がコラゲナーゼのようなプロテアーゼ活性を発現したことを示している。軽鎖の分子認識メカニズムについては、今後詳細な調査が必要であるが、軽鎖可変領域のアミノ酸配列の相違によってこのような基質特異性の差が生じていることから判断すると、軽鎖可変領域への変異の導入によって、さらに Lc(Triad)の基質特異性を制御することが十分可能であると考えられる。

文献

1. Kristensen, O., Vassilyev, D.G., Tanaka, F., Morikawa, K., and Fujii, I. A structural basis for transition-state stabilization in antibody-catalyzed hydrolysis: crystal structures of an abzyme at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **281**, 501-511 (1998).
2. Paul, S., Sun, M., Mody, R., Tewary, H.K., Stemmer, P., Massey, R.J., Gianferrara, T., Mehrotra, S., Dreyer, T., Meldal, M., and Tramontano, A. Peptidolytic monoclonal antibody elicited by a neuropeptide. *J. Biol. Chem.* **267**, 13142-13145 (1992).
3. Gao, Q.S., Sun, M., Tyutyulkova, S., Webster, D., Rees, A., Tramontano, A., Massey, R. J., and Paul, S. Molecular cloning of a proteolytic antibody light chain. *J. Biol. Chem.* **269**, 32389-32393 (1994).
4. Gao, Q.S., Sun, M., Rees, A.R., and Paul, S. Site-directed mutagenesis of proteolytic antibody light chain. *J. Mol. Biol.* **253**, 658-664 (1995).
5. Gololobov, G., Sun, M., and Paul, S. Innate antibody catalysis. *Mol. Immunol.* **36**, 1215-1222

(1999).

6. Okochi, N., Kato-Murai, M., Kadonosono, T., and Ueda, M. Design of a serine protease-like catalytic triad on an antibody light chain displayed on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 597-603 (2007).