

ファージ提示法を用いた抗体作製

— ファージディスプレイ法に用いる遺伝子ライブラリーの作製方法 —

バイオスタッフ 中野道彦* 室伏敬太** 渡邊むつみ***
太田俊也**

Development of monoclonal antibody using phage display techniques

- Protocols to create large gene library for phage display -

Michihiko Nakano, Keita Murofushi, Mutsumi Watanabe and Toshiya Ohta

1. はじめに

我々は、ファージディスプレイ法^{1),2)}を用いた scFv型抗体 (scFv: single chain Fv、単鎖可変部抗体) の開発に取り組んでいる。この方法は、次に示す工程を経て目的の抗体タンパクを得る。: (1)抗体遺伝子ライブラリーの作製、(2)ファージディスプレイによるスクリーニング、(3)抗体タンパクの発現確認、(4)抗体の大量生産。ここでは、(1)について、実験の進め方やノウハウについて述べる。本法を用いることで、 10^8 規模のライブラリーを作製できる。

2. 遺伝子ライブラリーの作製

2.1 cDNAライブラリーの作製

まず、対象抗原で免疫したマウス脾臓からRNAを抽出し、cDNAを合成する。Isogen (Nippon Gene) を用いてマウス脾臓からRNAを抽出し、cDNA合成には Superscript III First Strand Synthesis kit (Invitrogen) を用いる。また、cDNA合成には、poly-(dt)を用いる。作製したcDNAライブラリーは、脱塩処理 (MicroSpin S-300HR Columns、GE Healthcare) を行い、次の工程に移行する。

2.2 遺伝子ライブラリーの作製

次に、cDNAライブラリーから抗体遺伝子を抽出する。抗体遺伝子のH鎖とL鎖をPCR (polymerase chain reaction) によってそれぞれ増幅し、それらを接合して遺伝子ライブラリーを作製する。H鎖とL鎖の接合には、リンカーDNAを介した3断片法¹⁾と、あらかじめリンカー配列をプライマーに組み込

んでH鎖、L鎖を増幅する2断片法²⁾とがある。ここでは、手順の簡便さから2断片法について説明する。

(1) DNA断片の精製方法

PCRを行った後には、目的とするDNAを分離精製しなければならない。アガロースゲル電気泳動でサイズ分離した後、目的サイズのゲルを切り出し、そこから、DNA分子を抽出する。アガロースゲルをGel Indicator kit (BioDynamics) で染色した後、Freeze'N Squeeze スピンカラム (Bio-rad) で精製している。この時、アガロースゲルをカラムに充てん後、 -20°C で一晩置くと、回収率が良くなる。精製をさらに進める場合は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用する。

(2) H鎖、L鎖遺伝子の増幅

作製したcDNAから、マウス抗体遺伝子に特異的なプライマーセット²⁾を用い、multiplex PCRによって抗体遺伝子のH鎖およびL鎖をそれぞれ増幅する。ここでは、特異性及び反応効率の観点からKOD plus ver.2 (TOYOBO) を用いてPCRを行う。既出の方法に従って、プライマーの長さを変えて、2回PCRを行う。それぞれのサーマルサイクルは次の通りである。1回目: 94°C 、2分 $\rightarrow 98^{\circ}\text{C}$ 、10秒; 55°C 、30秒; 68°C 、30秒 (40サイクル)、2回目: 94°C 、2分 $\rightarrow 98^{\circ}\text{C}$ 、10秒; 68°C 、30秒 (30サイクル)。

(3) 抗体遺伝子の接合

次に、作製したH鎖遺伝子とL鎖遺伝子をscFvとして発現させるために、単一の遺伝子へと接合

*) 現 退職 **) 現 微生物抗体開発プロジェクトスタッフ ***) 現 バイオ科

する。前述のように、ここではoverlapping extension PCRによる2断片法で行う。H鎖DNAとL鎖DNAとを、プライマーを含まないPCR溶液に混合し、overlap extension反応を行う。その後、プライマーを含むPCR溶液を加えて、PCRを行い、H鎖-L鎖接合DNAを増幅する。それぞれの反応溶液の構成の一例を表1-1～表2-2に示す。

表1-1 Overlap extension反応の反応液組成

	溶分量[μl]
H鎖DNA溶液	2
L鎖DNA溶液	2
10x KOD Buffer	2.5
2mM dNTPs	2.5
25mM MgSO ₄	1.25
KOD plus	0.4
DW	14.35
Total	25

表1-2 Overlap extension反応のサーマルサイクル

Temp.	Time	Cycles
94° C	2min	
98° C	10sec	10cycles
55° C	30sec	
68° C	30sec	

表2-1 Overlap extension反応に続くPCRの反応液組成

	溶分量[μl]
Overlap extension 反応溶液	25
Primer 1	2.5
Primer 2	2.5
10x KOD Buffer	2.5
2mM dNTPs	2.5
25mM MgSO ₄	1.25
KOD plus	0.4
DW	13.35
Total	50

表2-2 Overlap extension反応に続くPCRのサーマルサイクル

Temp.	Time	Cycles
94° C	2 min	
98° C	10 sec	25cycles
68° C	1 min	

2.3 抗体遺伝子のベクターへの組み込み

次に、作製したscFv遺伝子をベクターに組み込む。ベクターにはpCANTAB 5E (Amersham Pharmacia、現在は市販されていない)を用いる。制限酵素反応 (Sfi I/Not I)を行い、抗体遺伝子DNAおよびpCANTAB 5Eを切断し、pCANTAB 5Eのみアルカリフォスファターゼ処理を行う。その後、ライゲーション反応を行う。

2.4 エレクトロポレーション

最後に、遺伝子組み換えを行ったプラスミドDNAを大腸菌XL1-Blue (Agilent)に形質転換を行う。この時、形質転換後の大腸菌をプレート培地に植えるだけでなく、液体培地にも同時に植えておくと、後に続く工程を容易に行うことができる。つまり、プレート培養は、形成されたコロニーを数えて、ライブラリーサイズを同定するために用い、液体培養したものを後の固定に使用する。また、培養温度は30°Cとする。

謝辞

本研究は、文部科学省都市エリア産学官連携促進事業発展型(富士山麓エリア)の助成を受けて行った。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) A.R. Pope他: Construction and use of antibody gene repertoires, 1-40, Antibody engineering-A Practical Approach, IRL Press(1996).
- 2) I. Benhar他: Phage Display of Single-Chain Antibody Constructs, Current Protocols in Immunology, 10.19B.1-10.19B.31, John Wiley & Sons, Inc(2002).