

アルパカが持つ不思議な抗体の魅力

宮崎 誠生

はじめに

およそ7年前、熊本の地でアルパカの飼育を開始したと同時にアルパカが天然に有しているユニークな抗体の研究がスタートした。これまで筆者は、マウス抗体、ウサギ抗体など重鎖と軽鎖で構成されている一般的なIgG抗体を中心に扱ってきたため、今まで研究対象としたことがなかった新しい動物、抗体を取り扱えることにとっても興奮したことは記憶に新しい。飼育舎へアルパカが到着する当日は、今か今かと子供のように心待ちにしていたことを覚えている。アルパカを毎日目にするようになり動物に対する珍しさはなくなったが、筆者はその抗体の魅力に日に日に取つかれ、産業応用を目指して日々研究に邁進している。研究開始当初、アルパカ由来抗体の世間の認知度はそこまで高くなかったが、最近では次世代抗体として徐々に注目されており、本稿ではアルパカ由来抗体の魅力を読者の皆様へ少しでも感じてもらうために、背景からさまざまな優れた特徴までご紹介したい。

背景

アルパカは、ラクダ科に属する動物で天然に特殊な抗体を有している。この特殊な抗体は重鎖抗体と呼ばれ、通常のIgG抗体から軽鎖と重鎖の定常領域一部のCH1ドメインが欠損した重鎖のみで構成された抗体であり(図1)、ラクダの感染症に関する研究過程で発見され、1993年のnatureで初めて報告された¹⁾。通常のIgG抗体は、VLとVHの二つのドメインで抗原と結合するが、重鎖抗体は、抗原とシングルドメインで結合することが

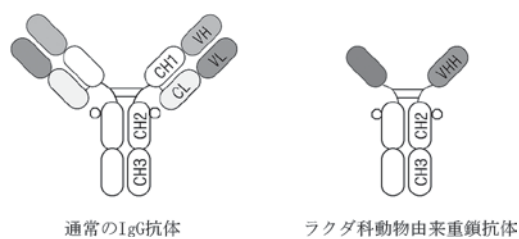


図1. 通常のIgG抗体とラクダ科動物由来重鎖抗体

大きな特徴の一つである。この重鎖抗体は、アルパカ血清中において約50%存在しているとの報告もあり²⁾、血清中に稀に存在する抗体というわけではない。そのため、重鎖抗体はアルパカのようなラクダ科動物の免疫系において重要な役割を担っていると推測され研究されているが、体液性免疫での重鎖抗体の役割は完全に解明されておらず、興味が尽きない^{3,4)}。実際に産業応用を目指し、検討が進んでいるのは重鎖抗体の可変領域であり、variable domain of heavy chain of heavy-chain antibodyの頭文字をとってVHH抗体もしくはNanobody[®]と呼ばれ、タンパク質工学的手法で天然由来のシングルドメイン抗体として利用されている。VHH抗体は、精製カラムや抗体試薬などで研究用試薬として製品が少しずつ増えてきているが、まだまだ実用化例は少ない状況である。一方で、ベルギーのAblynx社では抗体医薬としての研究開発が進められており、同社のHPによると血栓症に対する抗vWF抗体が2018年に世界初のVHH抗体を利用した最初の1剤として上市予定となっており、世界的な注目が集まっている。

実験動物としてのアルパカ

現在ラクダ科動物は、南米に生息するラマ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコと、アジア・アフリカに生息するヒトコブラクダ、フタコブラクダの6種類が確認されている。このうちビクーニャとグアナコは野生種のみであり、実際に実験動物として使用されているのは、家畜化されたアルパカ、ラマ、ヒトコブラクダ、フタコブラの4種類である。この中でも、ヒトコブラクダ、フタコブラクダは、体長約2 m、体重約500 kgと、非常に大型の動物であり、実験動物として使用することは大変困難であるため、筆者は、体長約1 m、体重約70 kgと入手可能なラクダ科動物の中でもっとも小型なアルパカを選択し、VHH抗体の研究に使用している(図2)。アルパカは大変愛らしい容姿をしているが、意外と力が強く、免疫や採血の作業時の保定は十分に注意を払う必要がある。また、機嫌を損ねると唾をかけてくるため、その点も要注意である。



図2. 現在飼育中のアルパカ (♂)

VHH抗体の特徴

シングルドメイン抗体であるVHH抗体は、VHとVLで抗原と結合するIgG抗体やIgG抗体の可変領域をリンカーでつないだ一本鎖抗体 (Single chain variable fragment; scFv) やFabフラグメントと比較して、さまざまな異なる特徴を有している。

CDR3領域のアミノ酸配列の長さ VHH抗体は、通常のIgG抗体と比べ、抗原との結合に重要な complementarity determining region 3 (CDR3) 領域のアミノ酸配列が長いという特徴がある。通常のIgG抗体は、VHとVLのCDR1~3の6箇所 of CDR領域により抗原結合領域を形成し抗原と結合するが、シングルドメインで抗原と結合するVHH抗体の場合、3か所のCDR領域で抗原と結合する必要がある。そのような状況で抗体の多様性を確保するためにCDR3領域の長さが重要となってくる。たとえば、リゾチームに対するVHH抗体とマウスモノクローナル抗体のアミノ酸配列を比較すると、マウスモノクローナル抗体のCDR3領域のアミノ酸数が7残基であったのに対し、VHH抗体は24残基と3倍以上も長かった⁵⁾。また、CDR3領域の配列の長短の違いは、リゾチームと抗体複合体の立体構造解析にも表れている⁶⁾。VHH抗体が長いCDR3領域によって凸面のパラトープを形成しており、リゾチームの凹面のエピトープへ結合しているのに対し、マウスモノクローナル抗体由来のFabフラグメントは平らなエピトープで結合している⁷⁾。このように、IgG抗体と比較して抗原の凹面へ結合する抗体が取得しやすいVHH抗体の特長を生かして、酵素表面の凹面に存在している基質結合部位に対する抗体取得など、通常のIgG抗体と比較して中和活性を有する抗体が効率的に産出できると考えられる。

高い生産性 VHH抗体は、質量が約15 kDaと分子

量が小さいタンパク質であり、抗体活性に糖鎖修飾は関係しないため、大腸菌や酵母のような微生物発現系で容易に発現させることができる⁸⁾。scFvやFabフラグメントも大腸菌や酵母で発現が可能であるが、VHH抗体はVHとVL間の相互作用を形成する必要がないため、一般的に他のフラグメント抗体に比べ発現効率が良く、生産性が高いと考えられる。筆者の経験上、数mg程度の量であれば、さほど苦勞することなく取得できる。

高い安定性 VHH抗体は、さまざまな変性状態下 (ゲアニジン塩酸塩、尿素などの変性剤溶液中、高温、高圧) から天然の構造へ巻き戻りやすい性質を備えている⁹⁾。筆者が特に注目しているのが熱安定性の高さであり、VHH抗体は90°Cという多くのタンパク質が失活してしまうような高温で熱処理した場合でも、室温に戻すことにより熱処理前と同様の抗原結合活性を示す。一方、通常のIgG抗体は一度でも熱処理を行うと大きく失活してしまい、抗原結合活性が回復することはない¹⁰⁾。筆者は受精に関わる精子の融合タンパク質であるIZUMO1タンパク質に対してVHH抗体を取得したことを報告しているが¹¹⁾、この抗体を使用したサーマルサイクラーによる80°Cへの昇温実験の結果からも、80°Cの熱処理を32回繰り返したとしても、ELISAによる抗原結合活性に大きな差は認められなかったことを確認している (図3)。

熱処理時のVHH抗体の構造安定性の検討から、熱力学的な安定性については、VHH抗体も通常のIgG抗体と同程度であることが示されている^{12,13)}。つまり、VHH抗体の熱安定性は、立体構造が熱によって壊れにくい性質を持っているというわけではなく、熱による変性状態から天然状態へ戻りやすい性質 (立体構造の可逆性の高さ) によるものと考えられる。

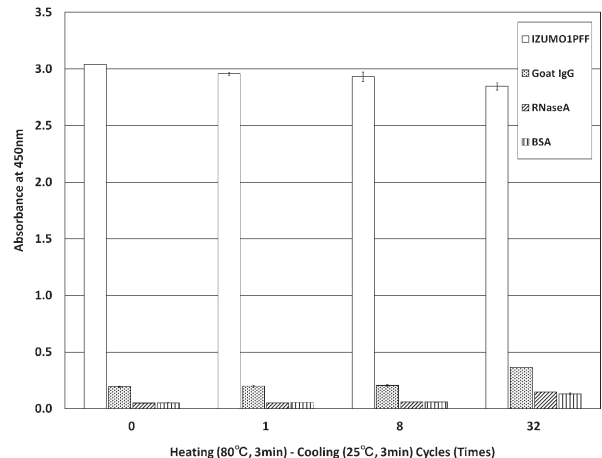


図3. VHH抗体の熱安定性検討試験

容易なタンパク質工学的改変 VHH抗体はシングルドメイン抗体であるため、他のタンパク質やペプチドと融合することにより容易に新たな機能性を付加した抗体へ改変することが可能である。一例をあげると、既存の創薬ターゲットであるTNF- α に対してVHH抗体の作製が試みられ、抗体エンジニアリングによってVHH抗体をタンデム化することにより、既存のバイオ医薬品と比較して良好な結果が示されている¹⁴⁾。また、抗ウイルスVHH抗体を2個、3個とタンデム化し、ドメインを増加させていくに従い、ウイルス中和活性が上昇することも示され¹⁵⁾、結合親和性についてもタンデム化により上昇することが報告されている¹⁶⁾。近年、抗体医薬の研究においてVHH抗体を使用したantibody-drug conjugate (ADC)への応用にも注目されており、今後もさまざまな分野に応用されることが期待される。

おわりに

アルパカが属するラクダ科動物から重鎖抗体が発見されておよそ24年、VHH抗体を利用した基礎研究から応用研究が世界各地で進められているが、まだまだ発展途上の抗体である。VHH抗体は、上述したように現在さまざまな分野で広く使用されているIgG抗体と比較しても、大変優れた特徴を有しており、魅力的なタンパク質(抗体)であると感じている。たとえば、電気設備が行き届いていない発展途上国内で試薬の安定性を気にせずに使用可能な抗体試薬への応用など、VHH抗体は大き

な可能性を秘めている。

最後に、本稿を通じてアルパカ由来VHH抗体の魅力を読者の皆様へ少しでも知っていただき、新たな研究の対象や今進められている研究に応用される研究者が一人でも増えることを願ってやみません。是非一度、VHH抗体を扱ってみませんか。

文 献

- 1) Hamers-Casterman, C. *et al.*: *Nature*, **363**, 446 (1993).
- 2) Maass, D. R. *et al.*: *J. Immunol. Methods*, **324**, 13 (2007).
- 3) Daley, L. P. *et al.*: *Clin. Vaccine Immunol.*, **17**, 239 (2010).
- 4) Daley-Bauer, L. P. *et al.*: *Clin. Vaccine Immunol.*, **17**, 2007 (2010).
- 5) Wu, T. T. *et al.*: *Proteins*, **16**, 1 (1993).
- 6) Desmyter, A. *et al.*: *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 803 (1996).
- 7) Braden, B. C. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **243**, 767 (1994).
- 8) Harmsen, M. M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 13 (2007).
- 9) Dumoulin, M. *et al.*: *Protein Sci.*, **11**, 500 (2002).
- 10) Akazawa-Ogawa, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **289**, 15666 (2014).
- 11) Miyazaki, N. *et al.*: *J. Biochem.*, **158**, 205 (2015).
- 12) Hagihara, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 36489 (2007).
- 13) Hagihara, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **280**, 24752 (2005).
- 14) Coppieters, K. *et al.*: *Arthritis Rheum.*, **54**, 1856 (2006).
- 15) Joost, A. *et al.*: *Drug Discov. Today Technol.*, **7**, e95 (2010).
- 16) Els Conrath, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 7346 (2001).