

Antibody-phage library clones panned on ELISA plate coated with PAGE gels

T. Hamasaki¹, S. Uchida¹, S. Hashiguchi¹, Y. Ito¹, T. Nakashima², K. Sugimura¹

¹Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Kagoshima University, ²The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

[Objective] Animal-based hybridoma technology requires a quantity of purified antigen for optimal antibody generation. In contrast, phage library provide a revolutionary means to produce monoclonal antibodies since this tech. is independent of immunization and requires an antigen at ng order. We have proposed a method (ultra high speed method: UHSM) which permits direct selection of scFv phage to a protein fractionated by Native-PAGE of habu-snake toxin¹⁾. We here determined the sensitivity of UHSM, i.e., the quantity of target antigen, and the frequency of specific clone in phage library using a model system.

[Method] A minute amount of rhIL-18 mixed with N2a cell extracts were run on a Native-PAGE. The gel was fractionated into 8 fragments. Each gel fragment was incubated with PBS in well. After blocking with skim milk, each well was incubated with IL-18-specific scFv phage solution, followed by washing. Bound phage were eluted with 0.1M glycine-HCl(pH2.1). The titer of bound phage was determined by infection of *E. coli*. TG-1.

[Results] Anti-IL-18-scFv phage was recovered from fractions containing IL-18, but not from other fraction. The required amount of IL-18 was as little as 2 ng/lane of PAGE.

[Reference] 1) H. Kokuryo et al., 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2003

プリオン研究会

2006年9月

岩手

全長リコンビナントプリオン分子から作製された繊維型及びオリゴマープリオンに対するヒト抗体ファージクローンの反応性について

久保田俊也¹、橋口周平¹、今泉智之¹、黒川恵¹、中島敏博²、西田教行³、片峰茂³、佐々木健⁴、Jyoti U. Gaikwad⁴、赤坂一之、伊東祐二¹、杉村和久¹

¹ 鹿児島大・工・生体工学、² 化血研、³ 長崎大・医歯薬総合研究科・感染分子病態学、⁴ 近畿大・生物工・分子生物学

プリオン病の病態解析には、そのコンフォメーションを認識する抗体が有用となる。この作製のためには、1. リコンビナントプリオン蛋白から作製する方法あるいは、2. プリオン感染脳組織を用いて直接作製する方法がある。1.のアプローチは、*in vitro* で自在にコンフォメーションを制御でき、かつ大量に調整できる。私たちは、これまでにヒト一本鎖抗体(scFv)を提示したファージライブラリーを反応させ、そのコンフォメーションに特異的な抗体単離を試みてきた。

昨年度の本研究会において、Collinge らのプロトコールにもとづいて作製したβ型プリオン(β-PrP)に特異的に結合する抗体ファージクローン(β-PrP7, β-PrP30)を単離したことを報告した。

Collinge らは、プリオン 90-231 を用いて、プリオン fiber の作製に成功しているが、Hashiguchi らは、プリオン 23-231 を用いて fiber 形成を観察することは出来なかった。一方、最近 Baskakov らは、プリオン 23-231 を用いてβ型の fiber 及び oligomer を作製したことを報告した。そこで今回は、Hashiguchi らが単離したβ-PrP7, β-PrP30 ファージ抗体が、Baskakov らのプロトコールにより作製したプリオンに結合するかどうかを検討した。

表 1. リコンビナントプリオン蛋白のフォールディング結果のまとめ

Researcher	Seq.	CD	PK ⁴	Conformation	Cytotoxicity
Collinge ら ¹	90 - 231	β-form	+	β-oligomer → fiber	?
Hashiguchi ら ²	23 - 231	β-form	+	β-oligomer → -	?
Baskakov ら ³	23 - 231	β-form	+	β-oligomer → fiber	+
Kubota ら	23 - 231	β-form	+	β-oligomer → fiber	?

1. Collinge J. et al., *Science* 283: 1935-37, 1999

2. プリオン研究会, 仙台 (2005)

3. Baskakov, I.V. et al., *J Mol Biol* 346, 645-59, 2005

4. PK = Proteinase K-resistance

Cambridge Healthtech Institute's
6th annual international
conference: Recombinant antibody

May 2005

Boston

Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein .

Sho Kitamoto¹, Shuhei Hashiguchi¹, Yuji Ito¹, Toshihiro Nakashima², Ken Sasaki³,
Jyoti U Gaikwad³, Kazuyuki Akasaka³, Suehiro Sakaguchi⁴, Shigeru Katamine⁴,
Kazuhisa Sugimura¹

(e-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp <Kazuhisa Sugimura>)

1, Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima Univ.

2, The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst.

3, Deot. Biotechol. Sci, Kinki Univ.

4, Dept. Mol. Microbiol. Immunol., Nagasaki Univ.

The pathogenesis of prion disease involves a structural change of prion protein (PrP). A series of antibodies recognizing a distinct conformational change of prion is useful for not only understanding the mechanism of molecular conversion but also for diagnostic and therapeutic reagents. We have previously prepared two kinds of refolded recombinant human prions according to the Collinge's protocol (Science 283: 1935-1937, 1999). Alpha-helical conformation (α -PrP) of PrP23-231 was prepared under neutral pH condition whereas the beta-sheet-rich conformation (β -PrP) was prepared by refolding the PrP23-231 under reductive and pH4.0 condition that likely endosome-like condition. In this study, we successfully isolated five single-chain Fv (scFv) antibodies specific to α -PrP and two β -PrP specific scFv antibodies from human antibody displaying phage library (Antibody Engineering, San Diego, 2004). Two β -PrP specific antibodies were showed the fine specificity to β -PrP but not α -PrP under both neutral and acidic condition. In addition to immunochemical examinations including epitope and affinity analysis, we are going to test the immunohistological ability of these antibodies using brain with prion disease.

プリオン研究会

2005年8月

山形

コンフォメーション特異的抗体によるプリオンの構造変異の追跡

橋口周平¹、北本祥¹、久保田俊也¹、今泉智之¹、中島敏博²、坂口末廣³、片峰茂³、佐々木健⁴、Jyoti U. Gaikwad⁴、赤坂一之、伊東祐二¹、杉村和久¹

¹鹿児島大・工・生体工学、²化血研、³長崎大・医歯薬総合研究科・感染分子病態学、⁴近畿大・生物工・分子生物工学

[目的]プリオン病は、プリオン蛋白のコンフォメーションの変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされるが、タンパク質の構造解析と生物学的解析の両者を同時に解析する手法が確立されていないため、「タンパク質のコンフォメーションとその感染機構の分子基盤」の詳細は明らかになっていない。分子がもつコンフォメーションを識別する抗体を作製することは、構造と生物学的活性を調べる上で重要である。従来抗体作製法では、分子の形をコントロールして抗体を得ることができないが、ファージディスプレイ法では、*in vitro*で作製したさまざまなconformerを用いて直接抗体を単離できるので、このバリアを乗り越えることができる。私どもは昨年プリオン病国際シンポジウムにおいて、遺伝子組み換えヒトプリオン分子(aa23-231)からβシート型プリオンを作製(β-PrP: Science 283: 1935-37, 1999)、原子間力顕微鏡、CDスペクトル解析によりそのコンフォメーションを確認した後、ヒト抗体ファージライブラリーと直接反応させ、β-PrP特異的ヒト一本鎖抗体(β-PrP7, β-PrP30)を単離したことを報告した。今回は、scFv抗体からFab抗体への抗体エンジニアリングを行い、抗体を用いて、作製したβ-PrPのコンフォメーション変化を経時的に調べたところ、β-PrPへの結合活性が変化していることから、コンフォメーション特異的抗体をプローブとすることで、蛋白分子の構造変化を追跡できることが示唆された。Fab抗体とプリオンの複合体の結晶化は比較的容易であり、X線結晶解析により抗体のエピトープの高次構造を決定できるので、その抗体をプローブとして感染性試料を用いた生物学的解析を行うことで、プリオンのコンフォメーションとその感染機構の分子基盤を解明できると考えられる。

第78回 日本生化学会

2005年10月

神戸

Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein .

Sho Kitamoto¹, Shuhei Hashiguchi¹, Yuji Ito¹, Toshihiro Nakashima², Ken Sasaki³,
Jyoti U Gaikwad³, Kazuyuki Akasaka³, Suehiro Sakaguchi⁴, Shigeru Katamine⁴,
Kazuhisa Sugimura¹

(e-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp <Kazuhisa Sugimura>)

1, Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima Univ.

2, The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst.

3, Deot. Biotechol. Sci, Kinki Univ.

4, Dept. Mol. Microbiol. Immunol., Nagasaki Univ.

The pathogenesis of prion disease involves a structural change of prion protein (PrP). A series of antibodies recognizing a distinct conformational change of prion is useful for not only understanding the mechanism of molecular conversion but also for diagnostic and therapeutic reagents. We have previously prepared two kinds of refolded recombinant human prions according to the Collinge's protocol (Science 283: 1935-1937, 1999). Alpha-helical conformation (α -PrP) of PrP23-231 was prepared under neutral pH condition whereas the beta-sheet-rich conformation (β -PrP) was prepared by refolding the PrP23-231 under reductive and pH4.0 condition that likely endosome-like condition. In this study, we successfully isolated five single-chain Fv (scFv) antibodies specific to α -PrP and two β -PrP specific scFv antibodies from human antibody displaying phage library (Antibody Engineering, San Diego, 2004). Two β -PrP specific antibodies were showed the fine specificity to β -PrP but not α -PrP under both neutral and acidic condition. In addition to immunochemical examinations including epitope and affinity analysis, we are going to test the immunohistological ability of these antibodies using brain with prion disease.

第35回 日本免疫学会

2005年12月

横浜

プリオンのコンフォメーション変化を識別する抗体プローブの作製
Direct cloning of phage library antibodies detecting various prion species under conformational conversion.

橋口周平、北本祥、久保田俊也、中島敏博、伊東祐二、杉村和久

鹿児島大・工・生体工 (Dept. Bioengin', Facult. Engin', Kagoshima-u., Japan)

化血研 (The Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst., Japan)

[目的]プリオン病は、プリオン蛋白のコンフォメーションの変化による変性タンパク質が引き起こす疾病とされる。しかしながら、「タンパク質のコンフォメーションとその感染機構の分子基盤」は、ほとんど不明である。分子がもつコンフォメーションを識別する抗体を作製することは、構造と生物学的活性を調べる上で重要である。従来の抗体作製法では、分子の形をコントロールして抗体を得ることができないが、ファージディスプレイ法では、in vitro で作製したさまざまな conformer を用いて直接抗体を単離できるので、このバリアを乗り越えることができる。本研究では、上記の方法を用いて、プリオンのコンフォメーションを識別する抗体プローブの作製を試みた。

[方法及び結果]遺伝子組み換えヒトプリオン分子 (aa23-231) から β シート型プリオンを作製し (Science 283: 1935-37, 1999)、原子間力顕微鏡、CD スペクトル解析によりそのコンフォメーションを確認した。この β シート型プリオン (β -PrP) にヒト抗体ファージライブラリーを直接反応させ、 β -PrP 特異的ヒト一本鎖抗体 (b-PrP7, b-PrP30) を単離した。これらの抗体をプローブとして、作製した β -PrP のコンフォメーション変化を経時的に調べたところ、 β -PrP への結合活性が変化していることから、コンフォメーション特異的抗体をプローブとすることで、蛋白分子の構造変化をモニタできることが示唆された。

会員外研究者：坂口末廣、片峰茂 (長崎大・医歯薬総合研究科・感染分子病態学)、佐々木健、Jyoti U. Gaikwad、赤坂一之 (近畿大・生物工・分子生物工学)