



抗体ライブラリー作製のための トリマーホスホロアミダイトの探求

急速に進歩するバイオテクノロジーの分野において、多様な抗体ライブラリー作製は、新しい治療法、診断法、研究ツールの開発にとって重要な取り組みとなっています。様々な疾患を正確に治療するために抗体の力を利用することを追求した結果、革新的な方法論が生まれました。こうした方法論の中で極めて重要な進歩として登場したのが、トリマーホスホロアミダイト技術です。この技術は、ランダム化されたアミノ酸コドンを含むオリゴヌクレオチドライブラリーと組み合わせることで、広大なエピトープ多様性を持つ抗体ライブラリーの作成に新しい道を切り開きました。この記事では、トリマーホスホロアミダイト技術の複雑さ、オリゴヌクレオチドライブラリーとの統合、抗体ライブラリー作製への革新的影響について詳しく掘り下げます。

トリマーホスホロアミダイト技術の本質

トリマーホスホロアミダイト技術は、合成生物学においてDNA配列を構築する代表的かつ洗練されたアプローチです。ホスホロアミダイトは、DNAの構成要素である核酸の短い配列「オリゴヌクレオチド」の合成に使用される化合物です。従来のホスホロアミダイト化学では、ヌクレオチドを予め定義した配列で一度に1つずつ追加して、特定のDNA分子を合成します。しかしながら、トリマーホスホロアミダイト技術は、アミノ酸コドンに対応する3つのヌクレオチドを同時に付加することでこのプロセスに革命をもたらし、これによってオリゴヌクレオチドの合成を大幅に加速し、多様な配列の生成効率を高めます。

オリゴヌクレオチドライブラリーとランダム化コドンとの統合

ランダム化されたアミノ酸コドンを含むオリゴヌクレオチドライブラリーとトリマーホスホロアミダイト技術の統合は、重要な進歩です。20種類の天然アミノ酸の全てのコドンを表すトリマー（三量体）を使用することにより、翻訳時に広範囲のアミノ酸配列をカバーするオリゴヌクレオチドライブラリーを作製できます。これらのライブラリー内のコドンのランダム化は、非常に多様なペプチドの生成を可能にし、その後、対応する抗体フラグメントの作成にも使用できるため非常に重要です。

このプロセスには、ランダム化領域を含むオリゴヌクレオチド配列の設計が含まれており、各位置にトリマーホスホロアミダイトのいずれかを組み込むことができます。このアプローチにより、抗原への結合に重要な、幅広い潜在的な抗体可変領域をコードするDNA配列の合成が可能になります。その後、ランダム化された配列がベクターに挿入され、細菌や酵母などの適切な宿主で発現されて、抗体フラグメントのライブラリーが生成されます。

これらのオリゴヌクレオチドの配列設計は、生成物のクローニング、発現、機能を確実に成功させるため、慎重に検討する必要があります。重要な考慮事項の一つは、クローニング工程やベクターの安定性を妨げる可能性のある制限部位を避けることです。以下では、これらの考慮事項について、特に制限部位の回避に焦点を当てつつ、コドン設計で避けるべき一般的な酵素とその制限部位を挙げながら、詳しく説明します。

最適な発現のための配列設計の考慮事項

1. コドン最適化：これには宿主生物が好むコドンを使用するようにDNA配列を変更することが含まれます。これにより、翻訳効率とタンパク質発現レベルが向上します。
2. 内部プロモーターの回避：コード配列内で潜在的なプロモーターとして機能する可能性のある配列は、早期の転写終了または望ましくないタンパク質発現パターンを引き起こす可能性があります。

3. GC含量：適切なGC含量は、安定性と効率的な転写および翻訳にとって非常に重要です。GC含量が極端に高いまたは低い場合、DNA合成、クローニング、発現に問題が生じる可能性があります。
4. 二次構造の防止：強力な二次構造（ヘアピンなど）を形成しやすい配列は、転写や翻訳プロセスを妨げる可能性があります。RNAの二次構造を予測するツールを使用して、そのような配列を特定し、変更することができます。
5. 反復配列の回避：反復配列は、組換えイベント、ベクターの不安定性、インサートの配列決定における課題をもたらす可能性があります。

制限酵素認識部位の回避

最も重要な考慮事項の一つは、クローニングプロセスで使用される制限酵素認識部位または、ベクターのマルチクローニングサイト（MCS）に存在する制限酵素認識部位を回避するオリゴヌクレオチド配列を設計することです。これにより、クローニングやダウンストリームアプリケーションを複雑にする可能性のあるインサートまたはベクターの不要な切断を防ぐことができます。オリゴヌクレオチドを設計するとき、または配列を変更する時、バイオインフォマティクスツールは、これらの制限部位を特定して除去するのに役立ちます。

制限酵素認識部位を避けることの重要性

1. ライブラリーの多様性の維持：オリゴヌクレオチド配列内の制限酵素認識部位によりDNAが切断され、潜在的な抗体バリエーションを失う可能性があります。この多様性の減少により、望ましい特性を持つ抗体をスクリーニングする際、ライブラリーの有効性が著しく損なわれる可能性があります。
2. 意図しないクローニングの複雑さ：制限酵素認識部位の存在により、クローニングプロセスが複雑になる場合があります。これらの部位は、オリゴヌクレオチドのベクターライゲーションを妨げ、機能的な抗体の発現を妨げるような誤った挿入または欠失を引き起こす可能性があります。
3. 効率とコスト：制限酵素認識部位を回避すると、ライブラリーの構築とスクリーニングの効率が向上し、有望な抗体候補の同定に関連する時間とコストの両方が削減されます。
4. 配列の完全性：制限酵素認識部位が存在しないこと、または戦略的に配置されていることを確認することで、ライブラリー内の配列の完全性が維持され、目的の抗体バリエーションの正確な表現と発現が可能になります。

一般的な制限酵素と避けるべき部位

下記は、分子生物学で使用されるいくつかの一般的な制限酵素と、抗体ライブラリーのコードン設計で避けるべき認識配列の一覧です。

制限酵素： 認識部位

1. EcoRI : GAATTC
2. BamHI : GGATCC
3. HindIII : AAGCTT
4. NotI : GCGGCCGC
5. XhoI : CTCGAG
6. SacI : GAGCTC
7. KpnI : GGTACC
8. SmaI : CCCGGG
9. XbaI : TCTAGA
10. SpeI : ACTAGT

発現ベクターに挿入する合成オリゴヌクレオチドを設計する場合、これらの一般的な制限部位の存在だけでなく、特定のクローニング戦略または使用するベクターに関連する可能性のある、あまり使用されない酵素の制限部位の配列についてもスクリーニングすることが重要です。

制限酵素部位を避けるための戦略

- ・ サイレント突然変異：サイレント突然変異を導入して、コードされたアミノ酸を維持するようにDNA配列を変更すると、不要な制限部位を削除できます。
- ・ 代替クローニング戦略：制限酵素に依存しないGibson AssemblyやTOPO® Cloningなどの技術をクローニングに使用することで問題を回避できます。
- ・ カスタム酵素の選択：可能であれば、目的の遺伝子内に認識部位を持たない制限酵素を選択するか、重要な領域がこれらの部位と一致しないように構築物を設計します。

広いエピトープ多様性を持つ抗体ライブラリーの生成

ランダムオリゴヌクレオチドライブラリーと組み合わせるとリマーホスホロアミダイト技術を使用する主な利点は、前例のないエピトープ多様性を持つ抗体ライブラリーを生成できることです。エピトープは抗体が結合する抗原分子の特定の部分であり、エピトープの多様性は、広範囲の抗原を認識して結合できる抗体の作製に不可欠です。

この方法によって達成される大規模な多様性により、結果として得られる抗体ライブラリーには、広範囲の標的に対して高い親和性と特異性を備えた候補が含まれます。これは、疾患関連抗原を正確に標的にすることができる抗体の同定が重要な治療用途において特に有益です。さらに、ライブラリーの多様性により、新しい作用機序を持つ抗体や、ウイルス、がん細胞の保存領域など難しい標的に結合できる抗体を発見する可能性が高まります。

1. 発現ベクターの選択

- ・ ベクターの選択：宿主系（細菌、酵母、哺乳動物など）および目的の用途（タンパク質生産、機能研究など）に基づいて、適切な発現ベクターが選択されます。この際、ベクターの複製起点、抗生物質耐性マーカー、プロモーター、マルチクローニングサイト（MCS）などを考慮する必要があります。
- ・ 調製：MCSに隣接する部位で切断する制限酵素による消化、またはGibson AssemblyやTOPO® Cloningなどの制限部位に依存しない方法を使用して、クローニング用ベクターを調製します。

2. クローニング用オリゴヌクレオチドの調製

- ・ アニールリング：オリゴヌクレオチドが一本鎖の場合、相補鎖がアニールされて二本鎖DNAが形成されます。これは通常、等モル量の各鎖を混合して加熱し、その後ゆっくりと冷却することによって行われます。
- ・ 末端修飾：クローニングを容易にするために、必要に応じて二本鎖オリゴヌクレオチドが修飾されます。これには5'末端へのリン酸基の付加（リン酸化）や、調製されたベクターと適合するオーバーハングの追加が含まれます。

3. ベクターへのライゲーション

- ・ 混合：調製したオリゴヌクレオチドを、DNAリガーゼの存在下で調製したベクターと混合します。リガーゼは、オリゴヌクレオチド末端とベクター間のホスホジエステル結合の形成を触媒し、インサートをベクターに組み込みます。
- ・ 条件：ライゲーション条件（温度、時間、バッファー組成）は、最高の効率を得られるように最適化を行います。

4. 宿主細胞への形質転換

- ・ コンピテントセルの調製：宿主細胞（多くの場合、細菌発現系では大腸菌）は、化学処理またはエレクトロポレーションによって、DNAを取り込むことができるようにします。
- ・ 組換えベクターの導入：ライゲーション混合物をコンピテントセルに導入し、DNAの取り込みが可能な条件下でインキュベートします。

5. セレクションおよびスクリーニング

- ・ セレクション：形質転換細胞を、抗生物質を含む寒天培地に播種し、ベクターに抗生物質耐性遺伝子を含んだ細胞を選択します。ベクターをうまく取り込み、維持した細胞のみが増殖します。
- ・ スクリーニング：コロニーPCR、制限酵素による消化、シークエンスを使用してコロニーをスクリーニングすることで、インサートの挿入を確認します。これにより、オリゴヌクレオチドがベクターに正しく組み込まれたことが確認されます。

6. 発現試験

- タンパク質発現の誘導：ベクター内のプロモーターからタンパク質発現を誘導する条件は最適化され、選択されたクローンに適用されます。
- 検証：SDS-PAGEやウェスタンブロットリングなどの手法を用いて、組換えタンパク質の発現を検証します。

7. スケールアップおよびタンパク質精製

- 培養：目的のタンパク質の発現が確認されたクローンは、より大量のタンパク質を生産するために最適化された条件下で培養されます。
- 精製：設計したオリゴヌクレオチドに含まれているタグに基づいて、アフィニティークロマトグラフィーなどの方法により、組換えタンパク質を培養物から精製します。

標的抗原の調製（一次スクリーニング用）

- 抗体のスクリーニング対象となる標的抗原を調製し、必要に応じて検出用に標識します。調製方法は、使用するスクリーニング技術によって異なります。

一次スクリーニング

- パニング（ファージまたは酵母ディスプレイ）：ライブラリーを固定化抗原に暴露します。非結合フラグメントは洗い流され、さらなる選択のために増幅されます。
- 蛍光活性化細胞選別（FACS）：主に酵母または細菌のディスプレイで使用され、蛍光標識された抗体フラグメントが抗原に結合し、蛍光シグナルに基づいて細胞が選別されます。
- 細胞ベースのスクリーニング：細胞表面抗原を対象とする場合、抗原を発現している細胞に対して直接スクリーニングを行うことができます。

濃縮と増幅

- 一次スクリーニング後、選択されたクローンを増幅します。ファージディスプレイの場合、選択されたファージを細菌に感染させ、その後の選択ステップで選択された抗体フラグメントをより多く産生することが含まれます。
- 酵母または細菌のディスプレイでは、選択された細胞が増殖と抗体フラグメントの発現を促進する条件下で培養されます。

二次スクリーニング

- ハイスループット結合アッセイ：ELISAなどの技術を使用して、抗原に対する個々の抗体フラグメントの結合親和性を定量的に評価します。
- 機能アッセイ：用途に応じて、選択した抗体を中和活性や受容体ブロッキングなどの機能特性について、スクリーニングすることができます。

配列解析とクローニング

- 二次スクリーニングを通過した抗体フラグメントはシーケンスされ、可変領域の遺伝子構造が特定されます。
- 選択された配列は、さらなる特性評価と生産のために、発現ベクターにクローニングされます。

親和性成熟（オプション）

- より高い親和性が必要な場合は、選択された抗体フラグメントに指向性進化や部位特異的突然変異誘発などの親和性成熟のプロセスを経た後、追加のスクリーニングを行う場合があります。

選択された抗体の発現と精製

- 望ましい特性を備えたクローンを、大規模生産に適したシステム（大腸菌、酵母、哺乳類細胞など）で発現させます。
- 組換え抗体は、発現系や抗体フォーマットに適した手法（アフィニティークロマトグラフィーなど）を用いて精製されます。

最終的な特性評価

精製された抗体は、結合親和性、特異性の測定、治療可能性を確認するためのin vitroおよびin vivo機能アッセイなど徹底的な特性評価が行われます。

1. 配列解析

- 目的：選択した抗体フラグメントの可変領域の遺伝子配列を決定します。
- 方法：スクリーニングプロセスで望ましい結合を示した抗体フラグメントは、サンガーシーケンスや次世代シーケンス（NGS）などの方法を使用して配列決定され、その可変領域配列が特定されます。

2. 親和性と特異性の評価

- 目的：標的抗原に対する抗体フラグメントの結合強度と特異性を評価します。
- 方法：
表面プラズモン共鳴（SPR）：抗体と抗原間の結合動態をリアルタイムで測定します。
ELISA：プレートベースのアッセイ形式で、抗体が抗原に結合する能力を定量化します。
フローサイトメトリー：標的抗原を発現する細胞への結合を評価し、細胞表面標的に役立ちます。

3. 機能特性評価

- 目的：関連モデルにおける抗体の生物学的活性を試験します。
- 方法：
中和アッセイ：標的の生物活性を阻害する抗体の能力（例：受容体-リガンド相互作用のブロック）を決定します。
細胞ベースのアッセイ：細胞シグナル伝達、増殖、アポトーシス、その他関連する細胞応答に対する影響を評価します。

4. 交差反応性と免疫原性の予測

- 目的：潜在的なオフターゲット効果を特定し免疫原性を予測します。
- 方法：
In Silico分析：バイオインフォマティクスツールを使用して、ヒトタンパク質と潜在的な免疫原性領域との交差反応性を予測します。
ウェスタンブロットおよび免疫組織化学：ヒト組織のパネルへの結合をテストして、オフターゲット結合を特定します。

5. 親和性成熟（必要な場合）

- 目的：抗原に対する抗体の結合親和性を高める。
- 方法：
指向性進化：抗体可変領域の突然変異誘発とその後のより高い親和性変異体のスクリーニングを行います。
合理的設計：構造情報を使用して、結合親和性を高めることが期待される特定の変異を導入します。

6. ヒト化（非ヒト抗体の場合）

- 目的：治療用途のために非ヒト抗体の免疫原性を低下させます。
- 方法：
CDRグラフトング：非ヒト抗体からヒト抗体の足場に相補性決定領域（CDR）を移します。
ベルニエ領域エンジニアリング：構造をゆがめることなくCDRに適合するようにフレームワーク領域を変更します。

7. 安定性および溶解性試験

- 目的：生理学的条件下で抗体が安定かつ可溶性を維持することを確認させます。
- 方法：
熱安定性アッセイ：抗体の融解温度（Tm）を測定して、熱安定性を評価します。
凝集テスト：動的光散乱（DLS）などの技術を使用して、抗体の凝集蛍光を評価します。

8. スケールアップとGMP生産の準備

- 目的：適正製造規範（GMP）基準を遵守し、さらなる試験や臨床試験のために抗体を大量に生産します。
- 方法：
クローン選択：スケールアップのために高発現クローンを選択します。
プロセス開発：発現および精製プロセスを最適化して収量と純度を高めます。

9. 前臨床試験

- 目的：臨床試験前に生体内での抗体の安全性と有効性を評価します。
- 方法：
In Vivo有効性研究：疾患動物モデルで抗体を試験し、治療の可能性を評価します。
毒性研究：動物モデルにおける抗体の安全性プロファイルを評価します。

アプリケーションとインプリケーション

トリマーホスホロアミダイト技術による多様な抗体ライブラリー生成がもたらす影響は計り知れません。治療法の開発において、これらのライブラリーは、抗体薬物複合体、二重特異性抗体、CAR-T細胞療法に豊富な候補をもたらします。診断学において、これらのライブラリーに由来する抗体の高い特異性と親和性は、より高感度かつ正確な診断検査の開発につながります。

さらに、大規模なライブラリーを迅速に生成してスクリーニングすることが可能なため発見プロセスは加速され、従来の抗体作製にかかる時間とコストを削減できます。この効率性は、診断用抗体と治療用抗体の迅速な開発が公衆衛生の成果に大きく影響する新興感染症の対策において、特に重要です。

課題と今後の方向性

トリマーホスホロアミダイト技術は、抗体ライブラリーの作製に革新的潜在性を持ちますが、課題もあります。ライブラリーの構築とスクリーニングは複雑であり、高度な機器と専門知識が必要です。さらに、ライブラリーの多様性は、何百万もの候補の中から望ましい特性を持つ抗体を特定するための高度なスクリーニングと選択方法を必要とします。

将来的には、計算生物学と機械学習の進歩がこれらの課題を克服する上で極めて重要な役割を果たすことになるかと予想されます。アミノ酸配列に基づいて抗体の構造と機能を予測できるアルゴリズムが選択プロセスを合理化し、有望な候補をより効率的に同定する可能性があります。さらにトリマーホスホロアミダイト法とライブラリー構築方法のさらなる改良により、抗体ライブラリーの多様性と質が向上し続けるでしょう。

結論

トリマーホスホロアミダイト技術は、ランダム化されたアミノ酸コドンを含むオリゴヌクレオチドライブラリーと統合されると、抗体ライブラリー作製の分野で大きな進歩を遂げます。この技術は、多様な抗体ライブラリーの迅速な合成を可能にすることで、幅広い治療および診断用途を備えた新規抗体の発見に道を開きます。課題はあるものの、抗体発見と開発のプロセスを加速化、変革する可能性は否定できません。私たちが、合成化学、分子生物学、計算ツールの継続的な革新によって前進することは、間違いなく抗体の活用に新たな可能性を切り拓くでしょう。

関連サービス：[トリマーオリゴを用いたランダムオリゴヌクレオチドライブラリー合成](#)

※ この記事は、著者Luke McLaughlin([@LKMBiotechRev](#))に許可を得て翻訳したものです。
オリジナル：<https://x.com/LKMBiotechRev/status/1774798168665797039>

フィルジェン 株式会社 

【お問い合わせ】 試薬機器部

TEL : 052-624-4388 FAX : 052-624-4389

メール : biosupport@filgen.jp URL : <https://filgen.jp/>

代理店

(MAY.2024)