

# 利用成果報告書

- 1 課題番号 H27-007
- 2 報告者 鈴木 洋史 国立大学法人東京大学医学部附属病院薬剤部研究室
- 3 利用区分 成果公開有償利用
- 4 利用課題名 複数の主要適合遺伝子複合体対立遺伝子に対して使用可能なT細胞受容体ファージライブラリの作製
- 5 使用装置名 BIACORE 分子間相互作用解析装置
- 6 利用期間 平成 27 年 5 月 25 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日

## 【序論】

ファージディスプレイ法を用いたT細胞受容体(TCR)ライブラリ作製に向け、その鑄型の選定を目的に、特定の遺伝型の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)に対してTCRを表面に発現したM13ファージ(TCR-ファージ)を数種作製し、いずれのTCR-ファージが胸腺教育過程を経た適切な結合能(Kd 100  $\mu$  M)を持つかを評価しようとした。そこで、BIACORE T-100を使用させていただき、MHCを固相化した流路に対しTCR-ファージを流した際の流路上の質量変化を測定することで、その結合能の評価を試みた。

## 【方法・結果】

まず、結合能を有することが既知であるhuman MHC A\*02:01とhuman TCR 868の組合せを用いてMHC固相化条件の検討とMHC-TCR相互作用を検出するコントロール実験を行った。human TCR 868とファージの外殻タンパク質g3pの融合タンパク質の発現系を構築し、調整法上の上限となる濃度(40nM)でTCR-ファージを調整した。このファージ溶液を用いた際、MHCの分子量(~57kDa)とTCR-ファージの分子量(16.3MDa)、想定する解離定数(Kd 100  $\mu$  M)を考慮して、MHCの固相化量と検出されるシグナルの関係を計算したところ、この条件下において固相化量を1,000RUとすることで、~109RUという測定に十分なシグナルが検出されると考えられた(式)。そこで、double Hisタグの付加されたMHC組換えタンパク質をNi-NTA chip上へ流すことで、キレート形成によりMHCの固相化を行い、1,300RUという固相化量にて安定して達成できる条件を決定した。また、対照群としてMHCの構成分子である $\beta$  2-microglobulin( $\beta$  2m)を設定し、double Hisタグ付加組換えタンパク質を作製し、その分子量(~14kDa)を考慮したうえで適切な量(~370RU)を固相化できる条件を決定した。この固相化流路に対してTCR-ファージを流したところ、MHC固相化条件と $\beta$  2m固相化条件において同等のシグナルが観測された(表)。また、Niを除いたNTA流路に対して同TCR-ファージを流したところ、タンパク質非固相化かつNi非存在条件においてはシグナルが大きく減弱した(表)。さらに、別日の検討にて、タンパク質を固相化せずNiを添加した条件において、MHC固相化条件、 $\beta$  2m固相化条件と同程度のシグナルが検出されることを確認した。

## 【まとめ・考察】

結果から、TCR-ファージがNi依存的にchip表面に結合していることが想定された。また、今回使用したM13ファージ粒子はその全長が800nmである一方、BIACOREの検出原理ではchipから300nmまでの範囲の質量変化しか検出できない。このため、M13ファージの使用が不適切であったことも、MHC-TCR特異的な相互作用の検出がなされなかった原因として考えられた。以上、BIACORE T-100を用いた実験は行われたが、その結果、実験系の再考が必要と考えられたため、現在検討中である。

## 7 利用成果・実績の概要

### 【序論】

ファージディスプレイ法を用いたT細胞受容体(TCR)ライブラリ作製に向け、その鑄型の選定を目的に、特定の遺伝型の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)に対してTCRを表面に発現したM13ファージ(TCR-ファージ)を数種作製し、いずれのTCR-ファージが胸腺教育過程を経た適切な結合能(Kd 100  $\mu$  M)を持つかを評価しようとした。そこで、BIACORE T-100を使用させていただき、MHCを固相化した流路に対しTCR-ファージを流した際の流路上の質量変化を測定することで、その結合能の評価を試みた。

### 【方法・結果】

まず、結合能を有することが既知であるhuman MHC A\*02:01とhuman TCR 868の組合せを用いてMHC固相化条件の検討とMHC-TCR相互作用を検出するコントロール実験を行った。human TCR 868とファージの外殻タンパク質g3pの融合タンパク質の発現系を構築し、調整法上の上限となる濃度(40nM)でTCR-ファージを調整した。このファージ溶液を用いた際、MHCの分子量(~57kDa)とTCR-ファージの分子量(16.3MDa)、想定する解離定数(Kd 100  $\mu$  M)を考慮して、MHCの固相化量と検出されるシグナルの関係を計算したところ、この条件下において固相化量を1,000RUとすることで、~109RUという測定に十分なシグナルが検出されると考えられた(式)。そこで、double Hisタグの付加されたMHC組換えタンパク質をNi-NTA chip上へ流すことで、キレート形成によりMHCの固相化を行い、1,300RUという固相化量にて安定して達成できる条件を決定した。また、対照群としてMHCの構成分子である $\beta$  2-microglobulin( $\beta$  2m)を設定し、double Hisタグ付加組換えタンパク質を作製し、その分子量(~14kDa)を考慮したうえで適切な量(~370RU)を固相化できる条件を決定した。この固相化流路に対してTCR-ファージを流したところ、MHC固相化条件と $\beta$  2m固相化条件において同等のシグナルが観測された(表)。また、Niを除いたNTA流路に対して同TCR-ファージを流したところ、タンパク質非固相化かつNi非存在条件においてはシグナルが大きく減弱した(表)。さらに、別日の検討にて、タンパク質を固相化せずNiを添加した条件において、MHC固相化条件、 $\beta$  2m固相化条件と同程度のシグナルが検出されることを確認した。

### 【まとめ・考察】

結果から、TCR-ファージがNi依存的にchip表面に結合していることが想定された。また、今回使用したM13ファージ粒子はその全長が800nmである一方、BIACOREの検出原理ではchipから300nmまでの範囲の質量変化しか検出できない。このため、M13ファージの使用が不適切であったことも、MHC-TCR特異的な相互作用の検出がなされなかった原因として考えられた。以上、BIACORE T-100を用いた実験は行われたが、その結果、実験系の再考が必要と考えられたため、現在検討中である。

(次ページに原文を掲載)

## 8 社会・経済への波及効果

9 学会等における口頭・ポスター発表 該当無し

10 学会誌・雑誌等における論文掲載 該当無し

## 【序論】

ファージディスプレイ法を用いた T 細胞受容体 (TCR) ライブラリ作製に向け、その鋳型の選定を目的に、特定の遺伝型の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) に対して TCR を表面に発現した M13 ファージ (TCR-ファージ) を数種作製し、いずれの TCR-ファージが胸腺教育過程を経た適切な結合能 (Kd 100 $\mu$ M) を持つかを評価しようとした。そこで、BIACORE T-100 を使用させていただき、MHC を固相化した流路に対し TCR-ファージを流した際の流路上の質量変化を測定することで、その結合能の評価を試みた。

## 【方法・結果】

まず、結合能を有することが既知である human MHC A\*02:01 と human TCR 868 の組合せを用いて MHC 固相化条件の検討と MHC-TCR 相互作用を検出するコントロール実験を行った。human TCR 868 とファージの外殻タンパク質 g3p の融合タンパク質の発現系を構築し、調整法上の上限となる濃度 (40nM) で TCR-ファージを調整した。このファージ溶液を用いた際、MHC の分子量 (~57kDa) と TCR-ファージの分子量 (16.3MDa)、想定する解離定数 (Kd 100 $\mu$ M) を考慮して、MHC の固相化量と検出されるシグナルの関係を計算したところ、この条件下において固相化量を 1,000RU とすることで、

$$R = 1000RU \times \frac{16.3MDa}{60kDa} \times \frac{40nM}{100\mu M} = 109RU$$

~109RU という測定に十分なシグナルが検出されると考えられた (式)。そこで、double His タグの付加された MHC 組換えタンパク質を Ni-NTA chip 上へ流すことで、キレート形成により MHC の固相化を行い、1,300RU という固相化量にて安定して達成できる条件を決定した。また、対照群として MHC の構成分子である  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m) を設定し、double His タグ付加組換えタンパク質を作製し、その分子量 (~14kDa) を考慮したうえで適切な量 (~370RU) を固相化できる条件を決定した。この固相化流路に対して TCR-ファージを流したところ、MHC 固相化条件と  $\beta$ 2m 固相化条件において同等のシグナルが観測された (表)。また、Ni を除いた NTA 流路に対して同 TCR-ファージを流したところ、タンパク質非固相化かつ Ni 非存在条件においてはシグナルが大きく減弱した (表)。さらに、別日の検討にて、タンパク質を固相化せず Ni を添加した条件において、MHC 固相化条件、 $\beta$ 2m 固相化条件と同程度のシグナルが検出されることを確認した。

表 :コントロール実験の結果

流路	固相化量(RU)	TCR-ファージ結合量(RU)
A*02:01	1310	253
$\beta$ 2m	377	309
NTA	-	45

## 【まとめ・考察】

結果から、TCR-ファージが Ni 依存的に chip 表面に結合していることが想定された。また、今回使用した M13 ファージ粒子はその全長が 800nm である一方、BIACORE の検出原理では chip から 300nm までの範囲の質量変化しか検出できない。このため、M13 ファージの使用が不適切であったことも、MHC-TCR 特異的な相互作用の検出がなされなかった原因として考えられた。以上、BIACORE T-100 を用いた実験は行われたが、その結果、実験系の再考が必要と考えられたため、現在検討中である。