様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　１３３０１
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ１５１９０

研究課題名（和文）抗原固相化ナノファイバーの創製と新規自己抗体検出法開発への応用

研究課題名（英文）Generation of antigene-fixed nanifibers and its application to autoantibody detection

研究代表者

横山　茂（Yokoyama, Shigeru）

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：００２１０６３３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：神経伝達物質受容体、イオンチャネルに代表される疎水性膜タンパクは、自己免疫性精神神経疾患の標的抗原となることが知られている。その診断検出システムを開発するために血自己抗原膜タンパクを大腸菌に大量発現させた。今回、グルタミン酸受容体サブユニット2種（GluN1-1, GRIA2)と神経型アセチルコリン受容体サブユニット（nAChR-alpha7)の大腸菌大量発現を達成した。ナノファイバーに組み込むための溶媒の検討を行い、ファイバー化に適した条件を模索している。

研究成果の概要（英文）：In autoimmune neuropsychiatric diseases, neurotransmitter receptors and ionic channels are known to be targeted by autoantibodies that destruct neural tissues. In an attempt to establish a detection systems for autoantibodies, we produced these proteins in Escherichia coli. Of several proteins tried, two subunits for the glutamate receptor, GluN1-1 and GRIA2, and a neuronal nicotinic acetylcholine receptor, nAchR-alpha7 were successfully produced in large amount. We are now trying to find out media to dissolve these recombinant proteins and optimal conditions to integrate them into nanofibers.

研究分野：　神経科学

キーワード：　膜タンパク　自己抗体　ナノファイバー

１．研究開始当初の背景

最近、自己抗体が精神神経疾患の原因となることを示唆する報告が増えてきた（Mol. Psychiat. 18: 1171-7, 2013)。母体血中抗体による胎児脳傷害も示唆されている（Science 341: 1164-7, 2013)。本邦でも岡崎基礎生物研の野田らのグループから、Na(x)ナトリウムチャネルに対する自己抗体による電解質異常の先駆的報告がある（Neuron 54: 59-72,2007)。標的と想定される抗原は神経伝達物質受容体・イオンチャネル分子など疎水性の強い膜タンパクであることが多く、標品として揃えることが難しい。このため簡便な自己抗体検出法の確立が待たれる状況にある。

我々は最近、傍腫瘍症候群で自律神経症状を呈する患者の中に、神経型アセチルコリン受容体（α3 サブユニット）に対する自己抗体を検出し、その抗体が細胞外からの Ca2+ 流入を阻害する活性を持つことを報告した。[Kobayashi, S., Yokoyama, S., Maruta, T., (他 5 名), and Yoshikawa H. (2013). J. Neuroimmunol. 257, 102-106.]　この研究を通じて以下の問題に突き当たった。

1. 神経型アセチルコリン受容体各種サブユニットを過剰発現する培養細胞株を遺伝子導入によって樹立し、Cell-based ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を行ったが、力価の低い抗血清では感度・特異性ともに不充分であった。とくに自己抗体陰性という判定を、高い信頼度で下せなかった。

2. 一般に感度・特異性とも優れているとされる自己抗体検出法は、既成抗体を固相化したマイクロプレートに抗原標品を加えて固定し、さらに患者血清を反応させる Sandwich-ELISA 法である。この方法に取り組んだが、抗原標品を得るために神経伝達物質受容体、イオンチャネル等の疎水性膜タンパクを大腸菌、カイコ細胞に大量発現させても、封入体に蓄積され不溶性になってしまう。このようなタンパク界面活性剤等の諸条件を変えて可溶化する試みは、ことごとく徒労に終わった。

着想の経緯：　研究代表者の横山は、ＪＳＴ研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)の助成を受け、『非線維性 VI 型コラーゲンを含む生体吸収性ナノファイバーを用いた神経再生用ガイドチューブの開発』の全く異なる研究課題に取り組んでいた。このため、一見関係のないナノファイバー作製技術を疎水性膜タンパク抗原の固相化に応用できるのではないかと考えるに至った。

２．研究の目的

自己免疫疾患は、免疫系が自らの正常組織を過剰攻撃して発症する疾患の総称である。近年、脳内神経伝達物質受容体・イオンチャネル等と反応する自己抗体の存在が知られるようになってきた。しかしながら、これらの標的分子は疎水性の強い膜タンパクであるため、可溶性標品を回収・確保することができない。このため、従来の ELISA 等による自己抗体検出は困難を極める。この問題を克服するため、以下の３点を目的として研究を行う。

①　疎水性抗原タンパクを固相化したナノファイバーを創製する。

②　このナノファイバーをもとに、自己抗体の高感度・高特異性検出システムを開発する。

③　さらに、この検出システムを組み合わせ、自己抗体検出スクリーニング用アレイとして製品化する。

３．研究の方法

① 抗原タンパク含有ナノファイバーの創製。神経伝達物質受容体・イオンチャネルタンパクをバキュロウイルス発現系で大量に産生させ、疎水性有機溶媒に溶かし込み、ナノファイバー化する。

② 抗原タンパク含有ナノファイバーを抗体結合の場とする自己抗体検出システムの開発。上記１で得られたナノファイバーを円形カバーガラス表面に展開し、96 穴プレート底部に収める。もしくは裏打ちされたシート状にし、小片をプラスチックスィックに固定する。ELISA と同様の化学発色にて血中抗体を検出できるようにする。

③　血清のスクリーニング。特異性、感度を評価する。自己免疫疾患患者および正常者を

含む 50 例の血清を検討する。さらに、自己抗原アレイを作製し、自己抗体の簡便スクリーニングを目指す。

４．研究成果

神経伝達物質受容体、イオンチャネルに代表される疎水性膜タンパクは、自己免疫性精神神経疾患の標的抗原となることが知られている。その診断には、血液中の疎水性膜タンパクに対する自己抗体の検出システムの開発が必要とされている。前々年度および前年度に続き、自己抗体検出システムのコンポーネントとしての自己抗原膜タンパクを大腸菌に大量発現させ、電気泳動ゲルから回収するとともに、ナノファイバー化への条件検討を行った。成果は、以下の通りである。

(i) アセチルコリン等の神経伝達物質の受容体サブユニットの cDNA をクローニングし、プラスミド(pTac-2)に組み込んだ。さらに、cDNA を大腸菌発現用ベクター（pColdTFDNA）に移し、大腸菌 [Rosetta2(DE3)PlysS あるいは Origami2(DE3)PlysS など]を形質転換した。得られた大腸菌を液体培地の中で増殖させ、低温下（15℃）にて IPTG（isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)を添加して発現誘導をかけ、さらに 24 時間培養を続けた後、菌体を回収した。

(ii) 得られた菌体成分を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にて分析したところ、４種の cDNA のうち３種において、推定される分子量をもつ融合タンパクの誘導が繰り返し確認された。**図１**は、グルタミン酸受容体サブユニット（GluN1-1，GRIA2)、**図２**は、神経型アセチルコリン受容体（nAChR-α7)の電気泳動の結果である。大腸菌培養のスケールを増大させた。

(iii) (i)、(ii)の結果得られた神経伝達物質受容体サブユニットタンパクをゲルから種々の溶液中に回収し、ナノファイバーに組み込むための諸条件の検討を行った。ファイバー化に適した条件を模索している。

② 抗原タンパク含有ナノファイバーを抗体結合の場とする自己抗体検出システムの開発と③ 血清のスクリーニングについては、現在進行中である。

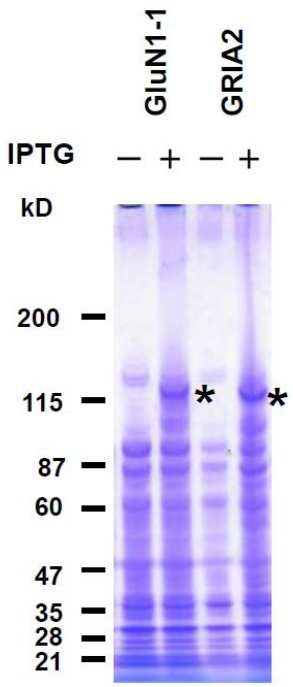

図１ 大腸菌におけるグルタミン酸受容体サブユニットの大量発現（＊で指示）

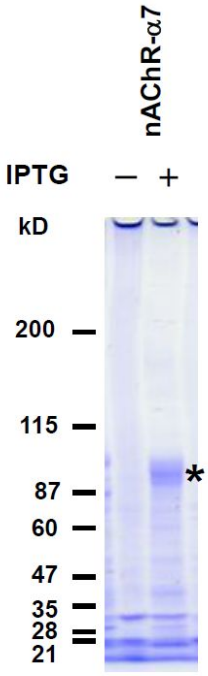

図２ 大腸菌における神経型アセチルコリン受容体サブユニットの大量発現 （＊で指示）

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　0 件）

〔学会発表〕（計　0 件）

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://kodomokokoro.w3.kanazawa-u.ac.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
横山 茂　　（YOKOYAMA, Shigeru）
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・教授
研究者番号：00210633

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
吉川 弘明　（YOSHIKAWA, Hiroaki）
金沢大学・保健管理センター・教授
研究者番号：10272981

(4)研究協力者
（　　）