

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05553

研究課題名(和文) 万能・超高感度な、『紙』を媒体とした『抗体』活用

研究課題名(英文) Utilization of "antibodies" using "paper" as a medium, which is versatile and ultra-sensitive

研究代表者

星野 英人 (Hideto, Hoshino)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20371073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々の独自技術である-C-LinkをVHH抗体に適用し、より自由にVHH抗体を活用できるVHH抗体の汎用プラットフォーム技術(VHH-C-Link)の開発とその高度化を試みた。具体的には、抗GFP VHH抗体をテストラインに配し、特異的アミノ酸配列を切断するプロテアーゼの活性を指標にしたプロテアーゼセンサー型ラテラルフローデバイスの開発と検討、並びに抗bRNaseA VHH抗体を用いてhRNase1を特異的捕捉し、そのRNA分解活性を指標にする、新しいVHH抗体の活用法の開発である。当該研究を通して、我々は、従来のIgG活用法に追従しない、新たなVHH抗体の活用可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VHH抗体は蛋白質工学的な改良が容易な点に利点があるにも関わらず、その優位性を従来技術では発揮できていない。当該研究では、極めてシンプルな原理に基づく、低コストで環境負荷が低い検査手法を検討した。それぞれの手法には更なる高度化の余地が残されるが、従来の抗体活用技術とは明確に一線を画すVHH抗体の新しい活用プラットフォーム基盤の提案には、学術的意義のみならず、大腸菌生産蛋白質とセルロース素材という安価で天然の素材の複合化による低コスト検査の可能性を示した点に、医療費を抑える必要性に迫られている、或いは環境負荷を意識せざるを得ない現代社会に対する社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We applied our original technology, "-C-Link" to VHH antibody, and tried to develop and advance the general-purpose platform technology "VHH-C-Link" of VHH antibody that can utilize VHH antibody more freely.

Specifically, we had two approaches, one was the development of a protease-sensor integrated lateral flow device, in which an anti-GFP VHH antibody was placed on the test line using the activity of a protease that cleaves a peptide bond with a specific amino acid sequence as an index, and the other the development of a new method of utilizing anti-bovine RNaseA VHH antibody so that captures the human ortholog hRNase1 and uses its RNA degradation activity as an index. Through these studies, we have presented the new possibility of utilizing VHH antibodies that do not follow the conventional IgG utilization method.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：VHH抗体 セルロース プロテアーゼ RNase 蛍光蛋白質 紙 セルロースアダプター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する研究機関所有の独創的ドメインである超耐熱性キチン・セルロース結合ドメイン (hyperthermostable Chitin/cellulose Binding Domain、以下 hCBD と略す) をセルロースアダプターとして任意蛋白質をセルロース素材に複合化させる融合蛋白質に基づく独自技術を『C-Link』と呼称する。研究代表者の独創技術である自己励起蛍光蛋白質・BAF (Hoshino H. *et al.* Nature Methods 2007) を用いた BAF-C-Link の検討により、かつて BAF をセルロース素材と複合化して、蛋白質を乾燥素材として室温下で長期間保管・活用する技術を開発していた (図 1)。当該研究開始当初において、H28-H30 年度実施の基盤研究 (C) の成果として、抗 GFP VHH 抗体を用いた、抗 GFP VHH-C-Link もまた、セルロース製濾紙との複合体として、一年以上の室温下乾燥保管を経た後でも、十分 EGFP を当該複合紙上に捕捉可能であることを示しており (図 2) 近年注目される VHH 抗体の新たな活用プラットフォームと成り得る可能性を示していた。

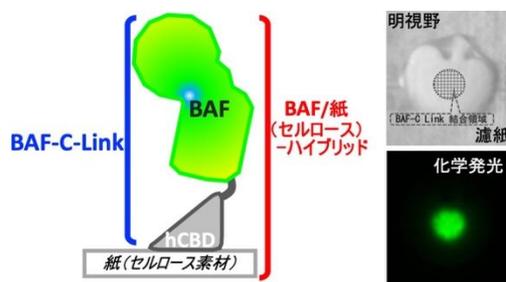


図 1. BAF-C-Link を用いた BAF/紙ハイブリッドと化学発光

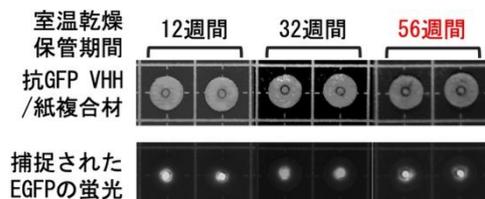


図 2. 抗 GFP VHH/紙ハイブリッドの長期保管後の安定性能

2. 研究の目的

『抗体』は、増え続ける医療費の削減やウイルスの脅威からの防御においてもニーズがある。しかし、現状の抗体技術は、抗体の活用適用範囲においても検出感度においても、ほぼ頭打ちの状況にある。また、近年、大腸菌で生産可能な小型抗体である VHH 抗体の潜在性に注目が集まっているが、抗体医薬としての利活用に研究開発が集中する傾向にあり、VHH 抗体の抗体としての利用法は従来の IgG 抗体の利用法に倣うだけで、VHH 抗体本来の性能を活かし切れている状況とは言い難い (図 3)。研究代表者が開発した『VHH-C-Link』技術は、特異的なセルロース結合ドメイン・hCBD を活用することで VHH 抗体を抗原に対してフリーな状態で紙上に配向担持することが可能と考えられる (図 3)。我々は、このように蛋白質工学的加工が容易な VHH 抗体の利点を活かした新たな VHH 抗体活用のプラットフォーム基盤として確立し、安価で使い勝手が良い『紙』を媒体とした、超高感度で環境負荷が極めて小さい、『VHH 抗体の幅広い活用手法の開発』を目指した。

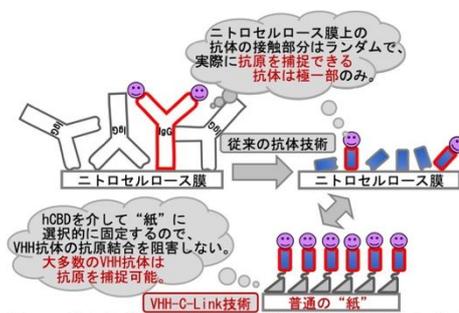


図 3. 従来技術と“VHH-C-Link”技術の大きな相違点

3. 研究の方法

大腸菌で生産可能な VHH 抗体の利点を活かして、各々の VHH 抗体を融合した His タグを付与した VHH-C-Link 蛋白質を常法に従い Ni-NTA カラムで精製し、それぞれの実験に用いた。また、他の蛋白質も同様の手法で精製した。

(1) プロテアーゼセンサー型ラテラルフローデバイスの作製

従来、配列特異的プロテアーゼの認識切断配列を BAF と hCBD のリンカー部に組み込んだプロテアーゼセンサー型 BAF-C-Link を紙に固定したプロテアーゼセンサー紙を試験管内で検体と反応させ、得られた反応液をテストライン上に抗 GFP VHH-C-Link を配したラテラルフローデバイスに供する 2 段階の検査手法を提案していた。しかし、当該手法では、作業者に煩雑な操作を強いる欠点があり、この欠点を解消すべく、新たに紙製のサンプルパッド内に直接当該プロテアーゼセンサーを搭載した、一体型プロテアーゼ活性検出デバイスの開発を試みた (図 4)。当該研究において配列特異的なプロテアーゼとして、HRV-3C と SARS コロナウイルスのポリプロテインから自身のウイルス再生産に必須のタンパク質群を自己消化により切り出す SARS 3CL プロテアーゼの切断配列を有するプロテアーゼセンサー型 BAF-C-Link を作製した。尚、このプロテアーゼセンサー型 BAF-C-Link には EGFP 型の BAF (以下 eBAF-G) を用いた。大腸菌で産生・精製した、各種プロテアーゼセンサー型 BAF-C-Link、並びに抗 GFP VHH-C-Link の精製蛋白

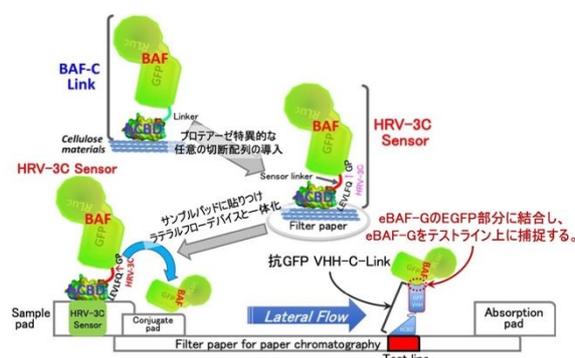


図 4. HRV-3Cセンサーとセンサー一体型ラテラルフローデバイス

質水溶液をイムノクロマトディスペンサーを用いて、サンプルパッド用厚手濾紙、並びにペーパークロマトグラフィー専用紙に吐出し、それぞれの『-C-Link/紙複合材』を作製した。これらを通常のイムノクロマトデバイスを作製する手順で各部材を適切に配置したデバイスに組立て、専用カッターを用いて 4mm 幅の短冊に切り出すことで最終的なラテラルフローデバイスを作製した。この際、一部、プロテアーゼセンサーをサンプルパッド上に配さないデバイスも作製した。

(2) 抗 GFP VHH-C-Link をテストライン上に配するラテラルフローデバイスの EGFP 型 BAF (eBAF-G) の検出感度の検討

上記(1)で作製した、プロテアーゼセンサーをサンプルパッド上に配さない抗 GFP VHH-C-Link をテストライン上に配するラテラルフローデバイスに対して、eBAF-G の精製標品をデバイス中のコンジュゲートパッド上に滴下して、フローバッファーで十分に展開後、青色 LED トランスイルミネーター照射下での蛍光観察後、同一デバイスのテストライン上にセレンテラジン水溶液を滴下して化学発光を観察した。尚、汎用性の手法確立を目指しており、検出器としては民生品のデジタルカメラ・SONY 社製 7S を用いた。

(3) プロテアーゼセンサー型ラテラルフローデバイスを用いたプロテアーゼ活性検出法の検討

(1)で作製した HRV-3C センサー型ラテラルフローデバイスを用いて、サンプルパッド内でのプロテアーゼ活性検出プロトコルの検討を試みた。一体型デバイスのため、サンプルパッド中での反応フェーズと反応終了後のフロー展開・検出フェーズに分けることとした。サンプルパッドに十分濃度の HRV-3C 反応液を滴下してフロー展開しない最大液量を確認し、当該液容量内で湿潤状態でのプロテアーゼ反応条件の検討を行った。検討の都度、展開バッファーで展開し、テストライン上での蛍光検出を試みた。

(4)VHH 抗体を用いた酵素濃縮 & 活性検出法の検討

VHH 抗体を紙に対して一定の配向性を維持して担持可能な当該技術は、これまでに無かった新しい VHH 抗体の活用を提供する。即ち、紙上に固定した VHH 抗体により、試料中の特定の蛋白質・酵素を捕捉してその活性を評価することにより、試料中に微量に存在する酵素の評価が可能になる。当研究では、蛋白質として非常に安定であることが知られているウシ RNaseA (以下、bRNaseA) に対する VHH 抗体をモデルとして、そのオルソログであるヒト RNase1 (以下、hRNase1) を

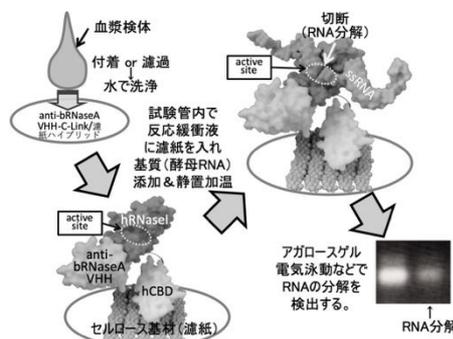


図 5. hRNase1 を標的とした酵素濃縮 & 活性検出法の概要

捕捉して、その RNA 分解活性を指標に評価する系を考案し検討した (図 5)。

具体的には、公知の抗 bRNaseA VHH を有する大腸菌生産の抗 bRNaseA VHH-C-Link 標品を濾紙に滴下、乾燥させることにより、抗 bRNaseA VHH-C-Link / 紙複合材を作製した。当該複合材に対して、モデル蛋白質として生産 & 精製した bRNaseA-EGFP、若しくは、hRNase1-EGFP 水溶液を滴下静置後、大過剰の精製水で 4 回洗浄し、当該複合材上に捕捉される EGFP の蛍光活性、或いは、当該試料を酵母 RNA と 37 °C で一定時間反応させた後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動(1% Agarose Gel、1xTAE)に供することにより、モデル蛋白質の RNA 分解活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 抗 GFP VHH-C-Link をテストライン上に配するラテラルフローデバイスの GFP 型 BAF の検出感度に関する検討

当該ラテラルフローデバイスは、GFP の蛍光、並びに化学発光の性質を最大限活用した、同一デバイスで、蛍光 化学発光の 2 段階検出が可能な従来に無い検査手法である。また、従来のイムノクロマト法と異なり、ニトロセルロース膜ではなくペーパークロマトグラフィー専用紙を展開膜とする点も大きく異なる (図 4)。

5 倍毎に段階希釈した eBAF-G 精製標品をプロテアーゼセンサーを搭載しないラテラルフローデバイスで展開させた結果を図 6 に示す。蛍光検出モードでの検出限界は 107 fmoles、化学発光検出モードでの検出限界は 856 amoles であった (図 6、中段と下段)。但し、民生品デジタルカメラを使用した場合、実質的な検出限界は、1 段階濃い 4.28 fmoles と考えるのが妥当である。尚、4.28 fmoles の eBAF-G はその分子量を加味すれば、1 ng の蛋白質質量に相当する。即ち、当該プロテアーゼセンサー型一体型デバイスでは、サンプルパッド内でのプロテアーゼ反応により、1 ng の eBAF-G がサンプルパッドより切り出されて下流に展開されれば、検出可能であることを示唆する。

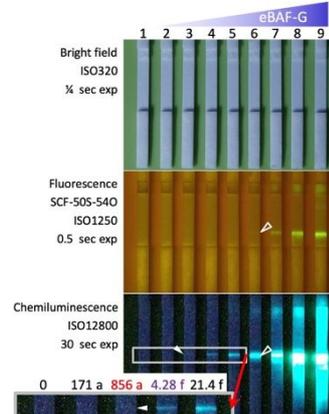


図 6. 当該デバイスによる検出感度

(2) 実際のプロテアーゼ反応条件の検討

折しも 2019 年暮れより世界的な新型 SARS コロナウイルス感染パンデミックが始まり、SARS-

3CL protease (3CL^{Pro})の検出系の確立が望まれる状況であったが、3CL^{Pro}特有の特殊事情もあり、同酵素の精製に問題を抱え、種々の検討を重ねながらも、プロテアーゼが安定入手可能な HRV-3C でのモデル系の検討を優先させた。通常の酵素反応で想定される均一水溶液中でのプロテアーゼ反応と異なり、サンプルパッドの厚手濾紙内での湿潤環境でのプロテアーゼ反応ということで、諸々の条件検討が当初予想よりも遙かに難航した。

最初に HRV-3C に対して、SARS-3CL センサーが交差反応しないことをデバイス状で確認した(図7A)。また、5~25 分の反応で切断する条件を見出した(図7B、蛍光検出)が、実用には、未だ不十分な状況である。尚、当該研究の過程で作製後2年以上室温下で保管したデバイスも問題なく尚使用可能であり、必要時に即利用できる基本性能を改めて確認した。

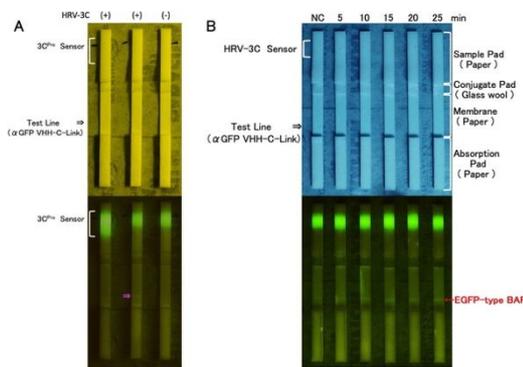


図7. 当該デバイスを用いたHRV-3Cの活性検出の検討

(3) hRNase1 をモデル系とした VHH 抗体を用いた紙上への酵素捕捉 & 活性検出法の検討

当該手法では用いる VHH 抗体の特性にも大きく依存するが、当研究では VHH 抗体が結合状態でも尚 bRNaseA が 20% の RNase 活性を示すことが既に論文報告されている抗 bRNaseA VHH 抗体を用いた。

当該抗 bRNaseA VHH 抗体を用いた抗 bRNaseA VHH-C-Link の精製標品を事務パンチで穿孔して得た円形濾紙中央部に配した抗 bRNaseA VHH 固定濾紙(以下、抗 bRNaseA VHH/濾紙)を作製し、モデル蛋白質として別途作製した bRNaseA-EGFP 精製標品を滴下し、室温下でインキュベートした後、大過剰の水で4回洗浄し、当該濾紙上に残存する蛍光を検出し、抗 bRNaseA VHH/濾紙が bRNaseA-EGFP を選択的に捕捉することを確認した(図8)。尚、陰性対照としては、同一モル濃度の EGFP 精製標品を用い、この濾紙への結合が EGFP に対するものでないことを示した。

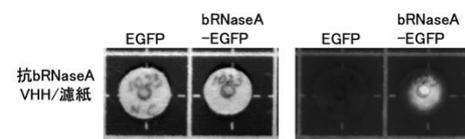


図8. 抗bRNaseA VHH/濾紙によるbRNaseAの選択的捕捉

当該抗 bRNaseA VHH 抗体が結合する bRNaseA の表面アミノ酸残基は特定されている。ヒトオルソログである hRNase1 の該当表面領域のアミノ酸配列の同一性は 60% であり、然程高い保存性ではないと考え、当該研究の計画当初は抗 bRNaseA VHH に hRNase1 への結合に最適化させるアミノ変異導入を想定していた。当該抗 bRNaseA VHH/濾紙に対して、bRNaseA-EGFP、並びに hRNase1-EGFP の高濃度精製標品を滴下し、上記と同様の処理を行い、当該濾紙上への残存蛍光と、RNA 分解活性を検討した(図9、上段)。その結果、当初の予想に反して、当該抗 bRNaseA VHH/濾紙でも十分 hRNase1 を捕捉でき、上記図5で想定した RNA 分解活性による評価が可能であることが強く示唆された(図9、下段)。

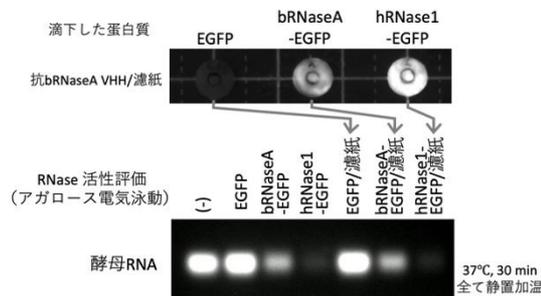
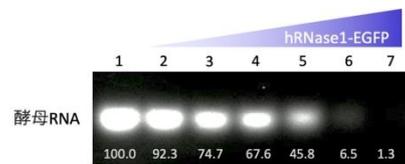


図9. 抗bRNaseA VHH/濾紙のhRNase1捕捉性能とRNA分解活性

この系を用いて、hRNase1-EGFP の精製標品を5倍毎に段階希釈した蛋白質水溶液を抗 bRNaseA VHH/濾紙上に滴下し、室温下で10分静置後、大過剰の水で4回洗浄した。当該濾紙を試験管内で大過剰量の酵母 RNA に対して 37 で静置加温し、RNA 分解反応を試みた。各サンプルの反応液の一定等量を 1.0%アガロースゲルを用いた電気泳動に供した。図10は、そのアガロースゲルの核酸染色後の蛍光画像である(lane 1:陰性対照(希釈緩衝液のみ)、lane 2: 2.28 f moles/μl、lane 3: 11.4 f moles/μl、lane 4: 57.0 f moles/μl、lane 5: 285 f moles/μl、lane 6: 1.42 pmoles/μl、lane 7: 7.12 pmoles/μl)。核酸染色写真中の各レーン下の数字は、デンシオメーターで定量化した核酸染色蛍光値に関して、レーン1の陰性対象の酵母 RNA を 100%として、各レーンの残存酵母 RNA の蛍光強度を評価したものである。



※視認し易いように、敢えてコントラストを強調した。

図10. 抗bRNaseA VHH/濾紙のhRNase1捕捉性能

ところで、hRNase1 の血中濃度は 300~400 μg/L とされ、成熟型 hRNase1 (糖鎖修飾無し) の分子量を加味すれば、20.4~27.2 f moles/μl と計算できる。今回、2.28 f moles/μl (lane 2) 及び 11.4 f moles/μl (lane 3) という血清中の hRNase1 濃度よりも低い濃度の hRNase1-EGFP でも、抗 bRNaseA VHH/濾紙上に捕捉された極微量の hRNase1-EGFP による RNA 分解活性を極めてシンプルなアガロース電気泳動法で検出することに成功した。この結果は飽くまでも試験管内でのモデル実験であり、また夾雑物等の影響が無い反応条件でもあるので、手放しで評価するには時期尚早であろうが、少なくとも抗 bRNaseA VHH/濾紙を用いて血中 hRNase1 を捕捉し評価可能な基本性能を有することは強く示唆された。

(4)まとめ

プロテアーゼセンサー一体型ラテラルフローデバイス

当該研究代表者は、その独自技術である“VHH-C-Link”を用いて、2つの新規性の高いVHH抗体利用法を提案した。プロテアーゼの特異性の高いペプチド切断活性を指標にしたプロテアーゼセンサー一体型ラテラルフローデバイスの検討では、厚手濾紙中での効率的なプロテアーゼ反応を実現する諸条件の最適化に、当初想定以上に難航し、当該研究終了時点でも最適解を未だ見出せずにいる。

今回の新型コロナパンデミックにおいて世界が右往左往為ざるを得なかった原因は、一重に世界的に事前の準備が至らなかった点にある。今回のパンデミック騒動で顕在化したように、ウイルス感染上、本質的に避けられない塩基レベルでの変異に対する脆弱性のため、ウイルス感染の初動段階での全数検査には本来PCR検査は適当ではない。SARSに限局して言えば、SARS-3CL^{Pro}とその切断配列の組み合わせに関しては、どちらかに負の変異が入れば、感染細胞内でのウイルス粒子再生産に必須の蛋白質群の供給が停止し、SARSウイルスにとっては感染戦略上死活的な状況に陥ることが容易に想像できる。即ち、SARS-3CL^{Pro}とその切断配列には少なくとも“所定の部位でポリプロテインが切断されなくなる変異”が入る可能性は極めて低く、この特殊性に着目する本手法は最初の感染者の篩い分け検査には最適である。当該手法は、PCR検査の前診断としての導入を想定した検査技術として、また今後の備えとしても、今回の研究で達成が不十分であった点に関しては、尚、地道に継続して検討していく。

hRNase1をモデル系としたVHH抗体を用いた紙上への酵素捕捉&活性検出法

当該研究代表者は、当該手法をVHH抗体を用いて『抗原酵素を試料中から濃縮してその活性の評価が可能な、従来に無かった全く新しいVHH抗体利用アプローチ』と位置付けている。当該手法の汎用性に関しては、実際の適用可能性は用いるVHH抗体とその標的酵素の特性に大いに依存する点を考慮しても、新しいVHH抗体の活用法としてIgG抗体の利用技術に盲目的に追従した従来のVHH抗体利用技術に一石を投じる重要な結果だと自負している。

RNase活性を指標にしたこの評価系に関しては、今後、ウシ胎児血清を用いた検討などヒト血清を想定した諸検討を進め、血中のhRNase1の存在を簡便かつ定量的に評価可能な高度化技術への改良を視野に、より実用的な分析・検査技術に作り上げたいと考えている。また、RNaseは、RNase Inhibitorによる活性阻害が広く知られている。我々は、この特性を考慮した、より発展的な検出システムも既に考案済みであり、今後更なる検討を続けて血中のhRNase1の動態をも解析可能なツールに高めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野英人、上垣浩一
2. 発表標題 蛋白質/紙ハイブリッドを利用したラテラルフローデバイスの開発
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野英人、上垣浩一
2. 発表標題 プロテアーゼ活性を指標にした感染症診断デバイス
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野英人
2. 発表標題 ウイルス特異的3CLプロテアーゼ活性を指標にしたコロナウイルス感染検査デバイスの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------