

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560810

研究課題名（和文） 抗体医薬開発のためのアフィニティー濃縮技術と新規プロテオーム解析技術の融合

研究課題名（英文） Fusion of affinity techniques for protein concentration and novel proteome analysis

研究代表者

岸本 通雅 (KISHIMOTO MICHIMASA)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：00144436

研究成果の概要（和文）：最近ペプチドアフィニティーを利用して、メジャーなタンパク質を洗い流し、微量なタンパクを濃縮するキットが市販され始めた。このような濃縮手法を定量的に評価する技術を確認するため、高濃度の標準物質を二次元電気泳動で完全に分離する方法の確立と、新規画像解析気中によりよりタンパク質スポットの比較をより高精度に行う方法を検討した。さらにそれらの技術を抗体タンパク質生産培養に適応して、最適操作に対し重要な情報を与えられることを示し、プラスチックに特異的にくっつくタンパク質の探索にも有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）：For the detection of minor protein or small amount of protein, which are very useful for cancer and the other adult diseases, several approach is proposed using the peptide affinity technology for concentration of the minor protein by washing out the major protein. For the evaluation and promotion of these technology, we tried to develop the treatment of high concentration of standard protein and the graphic analysis method of the 2-DE gel image. These technology were applied for the scFv production to identify the culture phase and screening of proteins, which attached specifically to the surface of plastics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：アフィニティー濃縮、プロテオーム解析、ペプチド合成、医療診断、抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

抗ガン剤を初めとする分子標的医薬開発の為には、疾患に特異なタンパク質を検出し同定することが必要である。さらにその物質が同定できればその存在を確かめることにより、

診断にも応用できる。しかしプロテオーム解析でもっとも重要なタンパクの分離精製の段階で検出感度や分離能の限界などで微量な成分の同定は当初予定されたほどめざましい結果は得られなかった。例えばN. L. Andersono

等によると下図の如く、血清の中にはIgG やアルブミンなど高濃度で存在するタンパク質と、少量であるが診断には重要な因子であるインターロイキンなどが存在する。その量的比率は10 の10 乗にもなり、技術的な問題となつている。しかし最近アフィニティーを利用した抗体やペプチドを用いてメジャータンパクを排除し、微量タンパク質を濃縮して、二次元電気泳動にかける技術が開発されてきた。またこれまでに当研究室では二次元電気泳動の染色プロセスにおいて画像の経時変化を解析することによりタンパク質スポットの認識能力を1.5倍ほど高め、定量性も向上させた。

2. 研究の目的 当研究室で開発されてきた二次元電気泳動の画像解析を中心とするプロテオーム解析技術と、アフィニティーを利用した微量タンパク質の濃縮技術を融合させて、微量タンパク質の検出及び比較定量化を進め、培養や診断等に应用できる技術開発を行う。

3. 研究の方法

3-1. 標準物質を用いた二次元電気泳動の検討

市販されているアルブミン、カルボニックアンハイドラーゼ、トリプシンインヒビター、グルコースオキシダーゼ等を標準物質として用いて、濃縮倍率を正確にさせるスポット画像が得られる様な二次元電気泳動条件の検討

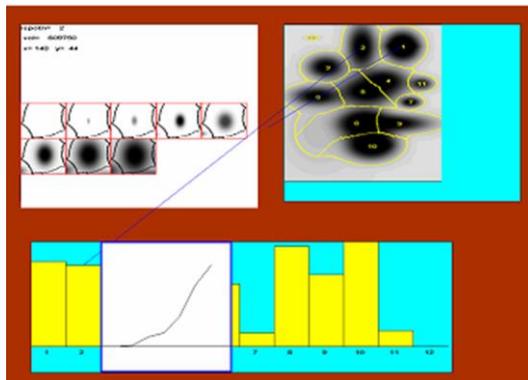
3-2. 3-1の条件で電気泳動実験を行い、画像解析から正確に濃縮倍率を計算できる画像解析を開発する。そのためこれまで主に培養細胞のプロテオーム解析用に当研究室で開発してきた画像解析プログラム Cancer13 (Third Place Poster Award. Dynamic Analysis of Developing Gel Image in 2DE Process. 2007.11 アメリカ電気泳動学会) を変更し、タンパク質スポットの対応や相関を正確に割り出せるようにする。

3-3 3-1, 3-2で開発された解析技術を培養プロセスや微量タンパク質のスクリーニングに応用する。

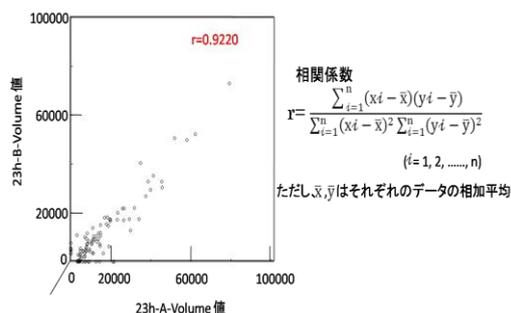
4. 研究成果

画像処理プログラムを改善し、重なったタンパク質スポットの識別を行うことに成功した。この方法は銀染色プロセス画像の経時変化を用いて、微小なスポットでも染色時期後半で重なってしまうスポットでも定量的に解析できるよう改善したソフトウェアであり、バックグラウンド処理も rolling ball 法を用いて、ほぼ自動的にかつ再現性よく処理できるよう改善しになっている。これをさ

らに下記のように2枚のゲル画像の相関を定量的にまとめるソフトに改善し、相関するスポットのない特異スポットを瞬時に割出し、解析できるソフトに改変した。



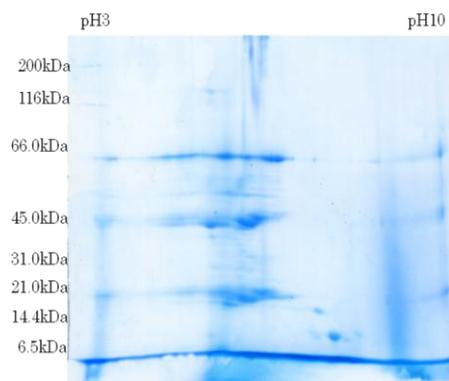
相関図の例を数に示す。この相関図では相関データをクリックすると図のように対応するスポットの元イメージが提供され相関データの検証も行える。



以上の画像処理のプログラム改変と同時に市販のタンパク質をモデルとして用いた二次元電気泳動の標準スポットを得るための実験を行った。標準スポットを用いた二次元電気泳動は一見簡単なように思えるが、これまでの予備実験からかなり難しいことが分かっていた。さらに市販の粉末状のタンパク質を用いてきれいな二次元電気泳動のゲル画像を得たという報告が不思議となさわれていなかった。生体内部のタンパク質たとえば酵母、大腸菌、がん細胞などはきれいな二次元電気泳動画像が得られるにかかわらず市販されているタンパク質をもちいるとうまくいかないのである。

通常のプロトコールでは市販のタンパク

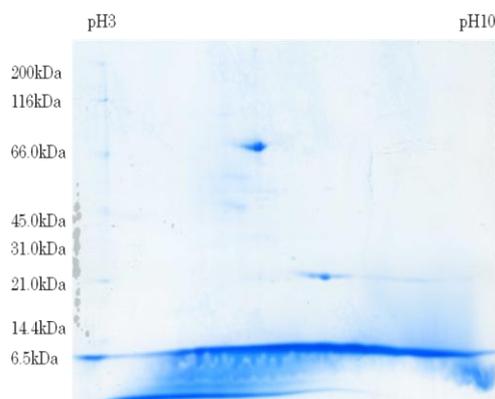
質をもちいた場合、下図 A のように著しくスメア状になるためそれを克服するため下記のような対策を施した。



A, 通常のプロとコールで二次元電気泳動を行った場合の例

スメアにならないための対策

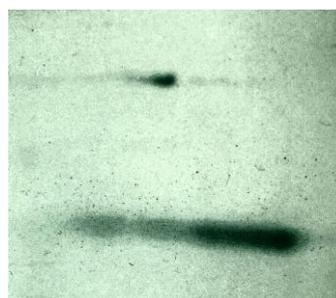
1. サンプルを尿素を主成分とする可溶化液に溶かす際、ビーズビーター等もちいて30分以上強力にかき混ぜ、タンパク質を徹底的に可溶化する（分散させる）。
2. 1 でまだ分散していないタンパク質は16000rpm, 4℃, 15 分間遠心分離して、十分可溶化できていないタンパク質を取り去る。



B, スメア対策を施した二次元電気泳動の例

以上の対策によりスメアの問題はかなり克服されてきたがタンパク質濃度が高くなるとスメア現象は残っており、高い濃縮を計測することは困難であった。

さらに攪拌の影響を見るためボルテックスミキサーでビーズ破碎を行う時間を30分間と一時間にわけて比較した結果を下図に示す。



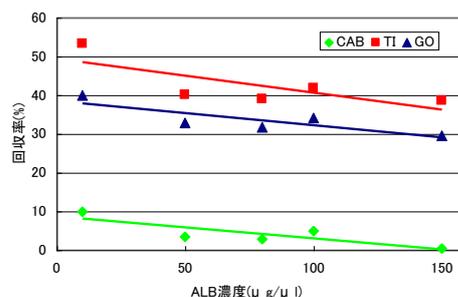
30分間破碎した泳動ゲルイメージ



一時間破碎した泳動ゲルイメージ

以上のように可溶化を入念に行うことにより、スメアの問題は幾分解決されてきたが、二次元電気泳動にアプライするタンパク質量が多くなるとこの問題は依然深刻で、特に高濃度のサンプルをもちいた濃縮の効率を定量化できるところまでには至らなかった。

以上の問題点を克服するため二次元電気泳動に頼るのではなく SDS 電気泳動による画像を用いた濃縮効率の検討を行った。その結果の例を下図に示す。



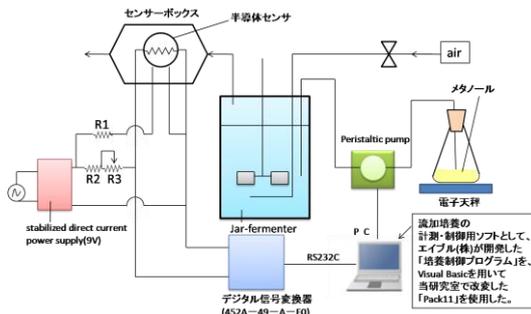
上図の結果より、ALB 濃度が大きくなるにつれて、回収率が減少していることが確認できた。更に ALB 濃度が 150g/l の場合の回収率は TI では約 40%、GO では約 30%、CAB では約 0.5%であることが確認できた。

3 種のモデル微量成分の回収率を比較すると、CAB の回収率が最も低いことが確認できた。これは CAB と親和性を持つペプチドが ALB とも親和性を持つためだと考えられる。

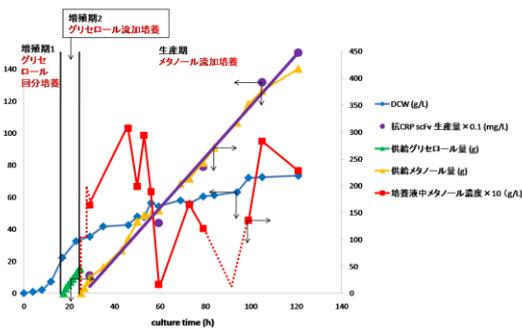
以上のごとく、プロテオーム解析の技術的検討を行うことにより、微量なタンパク質を同

定、定量解析することがかなり改善されてきたので培養やタンパク質スクリーニングへの応用を試みた。

酵母 *Pichia pastoris* をもちいた CRP 一本鎖交替 scFv の生産培養に応用した。scFv 遺伝子は AOX1 プロモータの下流に配置されており、メタノールによって発現し、一本鎖抗体が生産される。そのときもちいた培養実験システムを下記に示す。



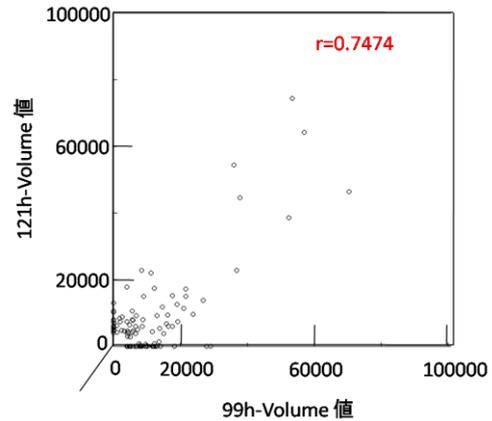
培養の経時変化の例を下記に示す。



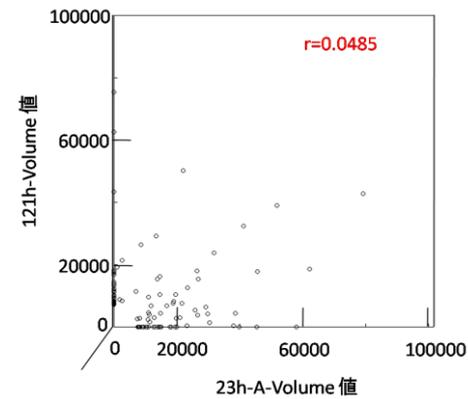
組換え *Pichia pastoris* の流加培養結果

この例では scFv 生産は長時間持続し、これまで公表されてきた *Pichia* による菌体外タンパク質生産量としては世界で最も高いレベルに達した。このような高い生産性を得た原因を追及すると共に、より高い生産量を得る培養方法を見つけるため、これまでに構築したプロテオーム解析技術を利用した。

下記に同じ生産フェーズの菌体内タンパク質の相関性を確認したもの、増殖フェーズと生産フェーズの相関を見たものを示す。この結果よりプロテオーム解析が培養の状態変化を観察するのに有効なツールであることが確認できた。この結果を 2011 年度 AICHe 年会で発表したところポスター賞を獲得した。



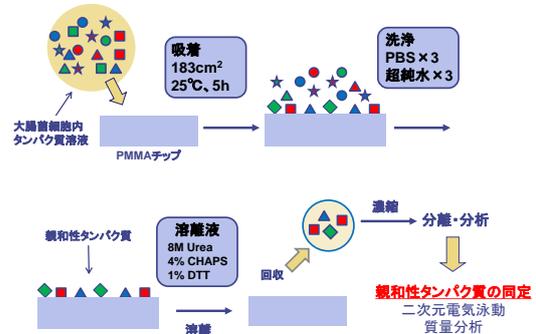
同じ生産フェーズのサンプルにおける泳動スポット画像の相関図



増殖期と生産期との泳動スポット画像の相関図

さらにこの方法をプラスチックである PMMA に特異的に接着するタンパク質のスクリーニングに応用した。スクリーニングの概略を書きに示す。

1次スクリーニング(タンパク質の吸着・溶離)



この結果下記のタンパク質が PMMA に接着することがわかった。

No.	Protein name	M.W.	pI
1	Elongation factor (ELN)	43326	5.30
2	Elongation factor (ELN)	43326	5.30
3	Malto porin (MLT)	49995	4.85
4	Ompf porin (OMP)	39309	4.69
5	Bifunctional aconitate hydratase (BIF)	95067	5.32

今後はこの結果を利用してタンパク質のどのペプチド部位が PMMA に特異的にくっつくのか検討し、抗体をプラスチック表面に固定化し、診断等に役立つシステムの開発をおこなっていききたい。

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 2 件)

1) M. Kishimoto, Y. Tatsumi, N. Tamesui, Y. Kumada, J. Horiuchi, K. Okumura, Dynamic analysis of the silver staining gel image of 2-DE for protein quantification. Journal of Electrophoresis Vol.51,1-7 (2010) (査読有)

2) Y. Kumada, S. Murata, Y. Ishikawa, K. Nakatsuka, M. Kishimoto, Screening of PC and PMMA-binding peptides for site-specific immobilization of protein. Journal of Biotechnology in press (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1) Y. Fujiki, Y. Kumada, M. Kishimoto, Analysis of Fermentation Process for Scfv Production by Proteomics Paper 626r 2011 AIChE Annual Meeting Minneapolis in USA, 2011 年 10 月 19 日

2) 大塚武、寺田貴裕、岸本通雅、熊田陽一、プロテオーム解析をもちいた半導体センサ親和性ペプチドのスクリーニング p148 第 63 回日本生物工学会大会 東京農工大学, 2011 年 9 月 27 日

3) 石川泰行、村田祥、熊田陽一、岸本通雅、タンパク質固定化用プラスチック親和性ペプチドの評価 p174 第 63 回日本生物工学会大会 東京農工大学, 2011 年 9 月 27 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ポリカーボネート及び/またはポリメタックリル酸メチル親和性ペプチド、およびその利用

発明者: 熊田陽一、岸本通雅、中塚一喜、村田祥

権利者: 京都工芸繊維大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-03166

出願年月日: 2010.02.16

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 通雅 (KISHIMOTO MICHIMASA)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号: 00144436

(2) 研究分担者

熊田 陽一 (KUMADA YOUICHI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号: 70452373

(3) 連携研究者

野村 明成 (NOMURA AKINARI)

京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20402901

岩田 博夫 (IWATA HIROO)

京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 30160120