

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760649

研究課題名(和文) 超低コストかつ高感度な診断用抗体アレイチップ製造技術の開発

研究課題名(英文) Development of sensitive and inexpensive antibody array chip

研究代表者

熊田 陽一 (Kumada, Yoichi)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：70452373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、scFvのはいスルーブット生産技術、固相リフォールディング技術とDNAアレイチップ製造に定評のある名のスポットティング技術を融合し、低コストかつ高感度な診断用抗体アレイチップの開発を行った。その結果、PMMA-tagのscFvに対する広い汎用性が明らかになり、PMMA基板上にscFvを高密度・高配向・高活性に固定化した抗体チップの製造技術を確認することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated to establish technologies for fabrication of antibody-based microarray chips immobilized with single-chain Fv antibodies (scFvs) by utilizing our original solid-phase refolding technology and conventional microarray spotting technology. Consequently, we found that our originally-isolated peptide tag specific to poly(methyl methacrylate) was significantly useful for efficient refolding and site-specific immobilization of scFv onto the surface of PMMA plate. Thus, we successfully established preparation method of scFv-immobilized PMMA plate and sensitive detection of antigen could be attained.

研究分野：プロセス・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：PMMA-tag 単鎖抗体 配向固定

1. 研究開始当初の背景

現在、医療や生化学の分野で、多種類の相互作用を同時に検出可能なバイオチップは分析時間の短縮や作業のハイスループット化を可能にするとして注目されている。具体的には、基板上に、オリゴDNAを高密度に固定化し、短鎖のcDNAやmRNAの検出を行うDNAチップ、タンパク質を固定化してタンパク質間の相互作用解析に利用可能なプロテインチップ、細胞自体を固定化することで細胞のモニタリングに役立つセルチップなどがある。なかでも、抗体をプラスチック基板上に固定化した抗体チップはガンなどの疾病を直接かつ早期に発見できることから盛んに研究されている。

しかし、従来のイムノアッセイに用いられてきたマイクロタイタープレートと比べると、基板上に固定化する抗体溶液のスポットティング容積は極めて少量である。それゆえ、体積に対して基板に接触している表面積の割合(面積/体積比)が著しく上昇する。これが抗体固定化密度の減少と安定性の悪化につながり、検出感度が低下する問題がある。

これまでの研究で、ポリスチレン(PS)製のマイクロタイタープレートに対して高い親和性を有するペプチド(PS-tag: RIIIRIRR)を導入した抗体や酵素を利用し、親水性PS基板への高密度な固定化技術を開発しており、上述のscFvにPS-tagを導入したPS-tag融合scFvの固定化後の高活性保持を実証している。一方、これまでの研究で、大腸菌内タンパク質のアミノ酸配列内から、バイオチップの素材になり得るポリメタクリル酸メチル(PMMA)やポリカーボネート(PC)に対して高い親和性を有するペプチドのスクリーニングに成功しており、これらを利用したタンパク質固定化技術の開発が期待されている。現在、このプラスチック親和性ペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)に融合し、PCおよびPMMA基板への吸着特性を評価したところ、このプラスチック親和性ペプチド融合GSTが野生型GSTよりも基板に対して高い親和性を示すことが確認されている。

2. 研究の目的

PMMA-tag: **DVEGIGDVDLVNYFEVGAT-YTFNK**、PC-tag: **NSNFFGLVDGLNF-AVQYLGK**の基板表面に対する付着特性は

未だに検討されておらず、これらを導入した単鎖抗体がバイオチップの製造に利用できるかは未知数である。グルタチオン-S-トランスフェラーゼをモデルとし、まず、PS-tag、PMMA-tag、PC-tagの3つのプラスチック親和性ペプチドの中からタンパク質の固定化に最適なペプチドタグとバイオチップに最適な材料の組み合わせを選別した。さらに、最適なペプチドタグを単鎖抗体(scFv)のC末端に導入し、それらの製造方法、固定化方法について検討するとともに、従来のマイクロタイタープレートからバイオチップ基板に固相の形状を変更した際の感度比較についても検討を行った。

3. 研究の方法

3-1 プラスチック親和性ペプチド融合GSTの親和力評価

無処理のPS、PMMA、PC基板と親水化処理した基板(phi-PS、phi-PMMA、phi-PC)に対して、3種類の各プラスチック親和性ペプチド融合GSTの吸着挙動についてQCMセンサを用いて解析した。さらに、無処理のプラスチックプレート上に野生型GST(wt-GST)およびタグ付きGSTをスポットし、平板プレート上に付着したGSTを抗GST抗体を用いる蛍光イムノアッセイにより検出した。

3-2 PMMA親和性ペプチド融合単鎖抗体の調製

単鎖抗体(scFv)のモデルとして、anti-CEA scFvおよびanti-RNase scFvを用いた。遺伝子組換え大腸菌により、タグなしscFv、PMMA-tag融合scFv(scFv-PM)をインクルージョンボディ内に生産し、これらを8MUrea存在下でHis Trap HPカラムを用いて精製した。同様にanti-RNase scFvについてもscFv、scFv-PMの生産ならびに精製を行った。8MUrea PBSに溶解したscFvを異なるpHならびにNaCl濃度の溶液中にscFvおよびscFv-PMを終濃度500 µg/mlとなるように希釈し、それぞれの条件におけるscFv-PMの凝集体形成を30分ごとに濁度として検出し、比較した。さらに、最適リフォーディング条件であった0.5MUrea 0.05M TAPSで500 µg/mlに希釈したscFv-PMに対し、0.05M TAPS(pH8.5)で透析を行うことで、残存する0.5M Ureaの除去を試みた。

3-3 PMMA製マイクロタイタープレート

に固定化された scFv-PM の評価

scFv-PM および scFv-D5 (または D10)を PMMA 製マイクロタイタープレートに固定化後、サンドイッチ ELISA によって、抗原結合活性を評価した。さらに、Micro BCA 法により、PMMA 製マイクロタイタープレート上に吸着した scFv の固定化量を算出し、PMMA-tag の効果を確認した。

3-4 スポットティングによる scFv-PM 固定化 PMMA 製平板プレートを用いた抗原検出

Anti-CEA scFv-PM および anti-CEA scFv-D5 それぞれ 100 μ g/ml および 370 μ g/ml を 1 μ l ずつ PMMA 製平板プレート上にスポットティングし、これを用いて異なる濃度の抗原を検出した。Anti-RNase scFv-PM および scFv-D10 についてもそれぞれ、300 μ g/ml、320 μ g/ml で 1 μ l ずつスポットティングし、抗原検出を行った。

3-5 ナノスポットティングによる scFv-PM 固定化 PMMA 基板を用いた抗原検出

1 μ l のスポットティングからさらに汎用性を持たすために 10nl のスポットティングができるナノスポットターを用いて、3-4 と同様の実験を行った。

4 . 研究成果

4-1 プラスチック親和性ペプチド融合 GST の親和力評価

Fig.1 に示すとおり QCM センサを用いた結果から、PBS 中では GST-PM および GST-PS がいずれの基板に対しても wt-GST よりも高い吸着量を示し、これらのペプチドタグの幅広い選択性が確認できた。一方、GST-PC は PC 基板に対してのみ比較的高い吸着量を示した。GST-PS はいずれの基板に対しても高い吸着量を示した。GST-PM は phi-PS への吸着量が減少し、phi-PC への吸着量が増加した。この原因は明らかではないが、プラスチック表面の親水度とペプチドタグの付着力に深い関係があることが示唆された。また、PBST 中では、GST-PS のみが親水化処理した基板(phi-PS、phi-PMMA、phi-PC)にのみ高い吸着挙動を示すことが確認された。

平板プレート上にこれらタグ付き GST を固定化し、抗 GST 抗体を用いて固定化された GST を検出した所、PS、PC 基板上で検出されたシグナルはタグの有無にかかわら

ず、ほぼ同じであり、タグ以外の部位における非選択的な付着が起こっていると考えられた。一方で、PMMA 基板については wt-GST のシグナルは極めて低く、PMMA-tag の相互作用によって、GST が選択的に固定化されることが示唆された。

これらの結果を勘案し、本研究では以後、PMMA 基板に対して PMMA-tag 融合単鎖抗体を固定化した高感度バイオチップの作成を検討することとした。

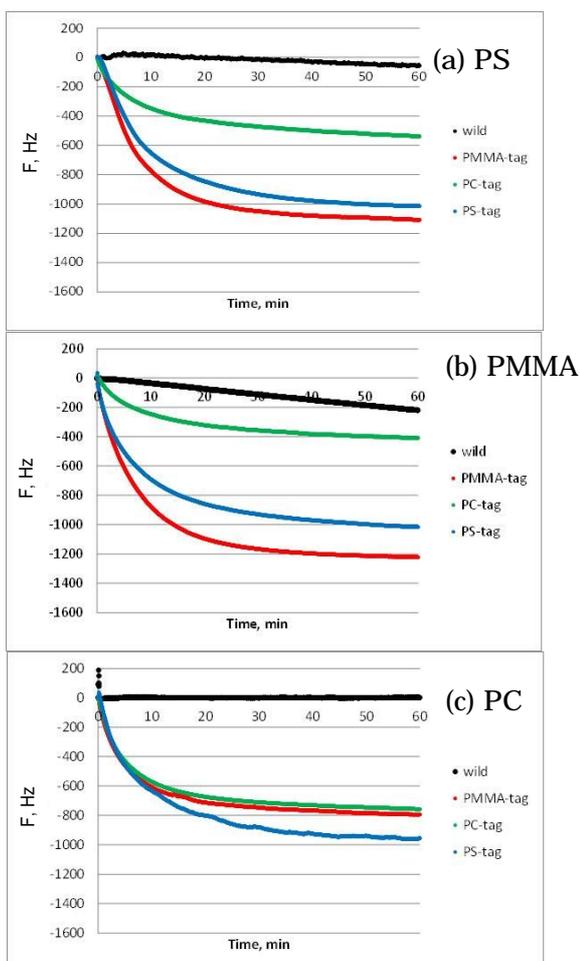


Fig. 1 QCM によるプラスチック基板へのタグ付き GST の吸着モニタリング (a) PS, (b) PMMA, (c) PC

4-2 PMMA 親和性ペプチド融合単鎖抗体の調製

Fig.2 に anti-CEA scFv の培養上清、可溶性画分、不溶性画分精製後の SDS-PAGE 結果を示す。この結果から、anti-CEA scFv と同様に、anti-CEA scFv-PM が高生産され、高純度に精製されていることが確認できた。

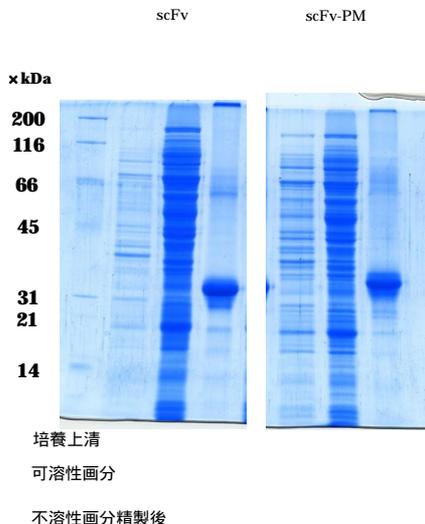


Fig.2 精製された scFv および scFv-PM の SDS-PAGE

発現された PMMA-tag 融合 scFv のリフォールディングを検討したところ、anti-CEA scFv-PM の回収率は極めて高く、ほぼ 100% であった。anti-RNase scFv-PM は回収率が anti-RNase scFv よりも低い値となった。これは、anti-CEA scFv と anti-RNase scFv の等電点を比較してみると、anti-CEA scFv は anti-RNase scFv よりも 2 ほど等電点が低くなっていた。他の scFv の等電点についても比較してみても、anti-CEA scFv の等電点は他の scFv の等電点よりも極端に低いことが明らかとなった。さらに PMMA-tag の導入により、scFv-PM の等電点は 4.85 となり、リフォールディング時の pH(7.2)と比較して pH-PI の差は約 2.4 となった。したがって、anti-CEA scFv-PM の極めて高い回収率は PMMA-tag の導入によるみかけの表面電荷の増加とそれによる等電点の低下が原因と考えられる。すなわち、リフォールディング時の pH やイオン強度の最適化を行えば、anti-CEA scFv-PM のみならず、anti-RNase scFv-PM や他の scFv-PM についても高い回収率が得られるものと考え、希釈法によって scFv-PM のリフォールディング条件を最適化することを試みた。anti-CEA scFv および anti-CEA scFv-PM を異なる pH および NaCl 濃度の溶液に希釈後 6 時間目における濁度を計測した所、Anti-CEA scFv 溶液は pH8.0~pH8.5 にかけてほとんど凝集しておらず、さらに PMMA-tag を C 末端に導入された scFv-PM は pH7.0~pH8.5 という広範囲の pH において凝集体の形成が著

しく抑制されていることが明らかとなった。同様の検討を anti-RNase scFv ならびに anti-RNase scFv-PM に対しても行ったところ、anti-CEA scFv より凝集体が生じているものの、やはり PMMA-tag の挿入により、scFv-PM の pH8.0~pH8.5 における凝集形成が著しく抑制されていることが明らかとなった。以上の結果より 0M NaCl 0.05M TAPS(pH8.5)を最適リフォールディング条件に設定し、透析後によって残存する 0.5M Urea の除去を試みた。

Table 1 より 0.05M TAPS (pH8.0、NaCl 0M) 透析を行い、残存する Urea の除去をしたところ、anti-CEA scFv-PM および anti-RNase scFv-PM の回収率は 100% 近くに到達した。以上の結果より、PMMA-tag を導入した scFv のリフォールディング条件を最適化することで極めて高い回収率で scFv-PM を製造できることが明らかとなった。

Table 1 scFv および scFv-PM のリフォールディング回収率

	回収率(%)
anti-CEA scFv	94
anti-CEA scFv-PM	99
anti-RNase scFv	21
anti-RNase scFv-PM	100

4-3 PMMA 製マイクロタイタープレートに固定化された scFv-PM の評価

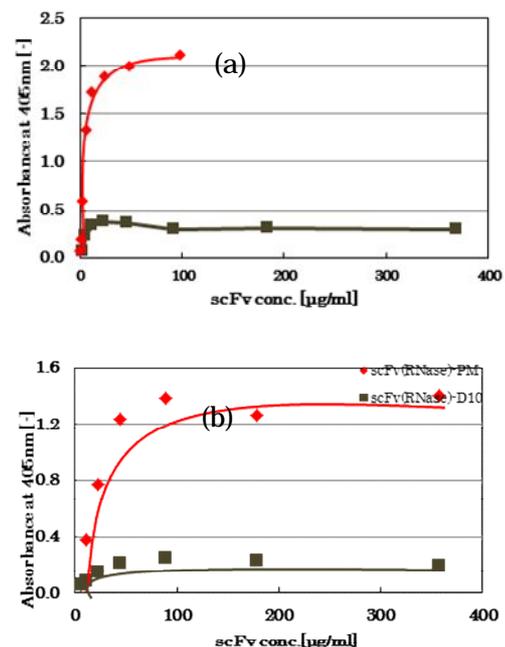


Fig. 3 PMMA プレートに固定化された scFv の抗原結合活性
(a) Anti-CEA Ab, (b) Anti-RNase Ab

Fig.3 (a)に示すとおり、Anti-CEA scFv-D5 および scFv-PM を PMMA 製マイクロプレートに固相化し、ELISA 法によって抗原結合シグナルを検出した。その結果、コントロールとして scFv-D5(または scFv-D10)を固定化した際と比較して、scFv-PM 固定化基板から著しく高い抗原結合活性が検出された。

同様に、Fig.3 (b)に示すとおり、anti-RNase scFv-PM についても scFv-D10 と比較して極めて高い抗原結合活性が検出された。したがって、PMMA-tag の介在によって scFv が PMMA 基板の上に極めて強く相互作用しているものと考えられる。MicroBCA 法によって PMMA plate 上に固定化された scFv の密度を算出したところ、anti-CEA scFv-PM は anti-CEA scFv-D5 よりも高い固定化密度を示した。また、同様に、anti-RNase scFv-PM も anti-RNase scFv-D10 よりも高い固定化密度を示した。したがって、scFv に導入された PMMA-tag が PMMA 基板表面に強く付着することで scFv を高密度かつ高活性に固定化出来ると考えられる。

4-4 スポットティングによる scFv-PM 固定化 PMMA 製平板プレートを用いた抗原検出

Fig.5 の結果から、anti-CEA scFv-PM は anti-CEA scFv-D5 よりもおよそ 100 倍高感度に抗原を検出していることが確認された。さらに、anti-CEA scFv-PM は CEA 濃度 2.5ng/ml 以下まで検出可能であった。

同様に Fig.21 の結果から、anti-RNase scFv-PM は anti-RNase scFv-D10 よりもおよそ 10 倍高感度に抗原を検出可能であった。さらに、anti-RNase scFv-PM も RNase 濃度 2.5ng/ml 以下まで認識した。

これらの結果から、PMMA 製平板プレート上に scFv を固定化する際にも PMMA-tag が有利に働いていることが示された。

Fig.6 に示すように anti-CEA scFv-PM に関して、ナノスポットティングで固定化した場合、1 μ l スポットティングとの結果と比較して、検出されたシグナルはほとんど変化なかった。一方で anti-CEA scFv-D5 の検出シグナルは 1 μ l スポットティングの際と比較して高くなった。このことから、anti-CEA scFv-PM の検出シグナルのうち、非特異的に PMMA 基板に吸着をしている抗体の割合が高くなっていることが考えられる。

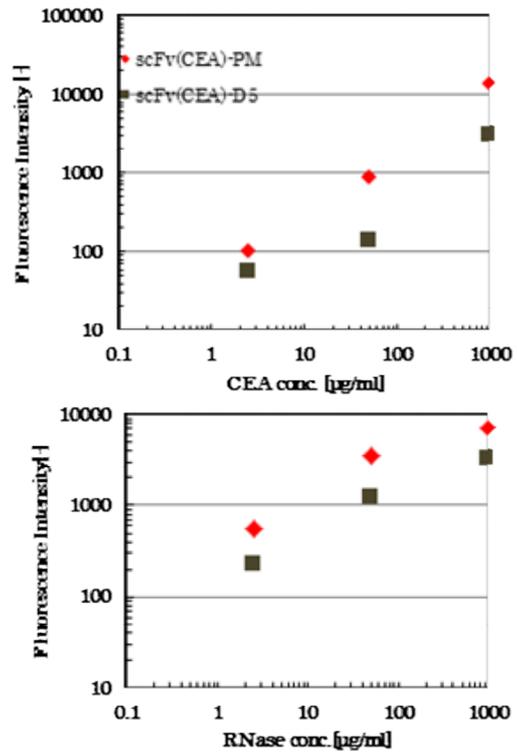


Fig.5 スポットティング容量 1 μ L における scFv 固定化 PMMA 基板の抗原検出比較
4-5 ナノスポットティングによる scFv-PM の PMMA 製平板プレートへの固定化と評価

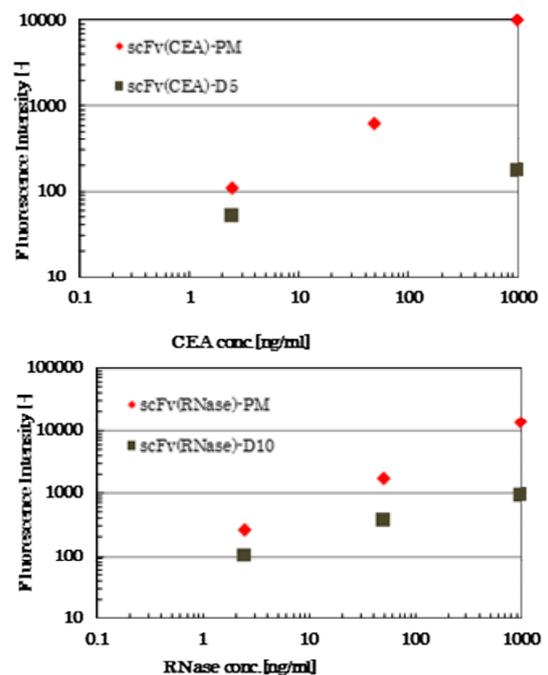


Fig.6 ナノスポットティングによる scFv の PMMA 基板上への固定化と抗原検出の比較

また、anti-RNase scFv においては、anti-RNase scFv-PM の検出シグナルが、1

μl スポットティングとの結果と比較して、低くなっていることが確認された。また、anti-RNase scFv-D10 の検出シグナルが高くなっていることから、anti-RNase scFv-PM についても PMMA-tag の選択性は小さくなり、非特異的な吸着が増加していることが考えられる。これらは、1μl スポットティングから、ナノスポットティングにしたことで、固定化直後の抗体溶液の蒸発速度が大幅に早くなったことに起因すると考えられる。そのため PMMA-tag が親和的に基板に対して吸着するよりも前に、液滴の蒸発により無理矢理に非特異的な吸着が基板に対して起こったことが原因として考えられる。

まとめ

本研究荷を行うことで以下の事柄が明らかとなった。

- 0.05M TAPS (pH8.5)の透析条件で PMMA-tag を融合した anti-CEA scFv-PM と anti-RNase scFv-PM の効率的なリフォールディングに成功した。
- PMMA 基板上への scFv-PM の固定化条件を検討したところ、anti-CEA scFv-PM は 0.05M ADA NaCl 0M anti-RNase scFv-PM は 0.05M MOPS NaCl 50mM が固定化に最適であることが確認された。
- 1μl スポットティングによって scFv-PM 固定化 PMMA 基板を作成した。scFv-PM 固定化基板は scFv-D5 固定化基板よりも 100 倍高感度であった。また、anti-RNase scFv-PM 固定化基板は anti-RNase scFv-D10 固定化基板よりも最大 10 倍高い感度で抗原を認識していることが確認された。

以上のことから、PMMA-tag を scFv の C 末端に融合することで PMMA 基板に対する scFv の高密度化で高活性維持した固定化に有効であることが確認された。

さらに、PMMA 製プレート上にナノスポットティングした scFv-PM を 1μl スポットティングした scFv-PM と比較した場合、わずかにナノスポットのシグナル強度が大きくなった。しかし、非常に早い蒸発による非特異吸着が増えていることが懸念され

るため、今後、この乾燥の問題を克服できれば、マイクロアレイ型の高感度バイオチップの作成が可能になると考えられる。

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. Y. Kumada, K. Hamasaki, A. Nakagawa, E. Sasaki, T. Shirai, M. Okumura, M. Inoue, M. Kishimoto, “Immobilization and functional reconstitution of antibody Fab fragment by solid-phase refolding”, Journal of Immunological Methods, 400–401・70–77 (2014)

2. Y. Kumada, T. Ootsuka, M. Asada, S. Yoshizuka, M. Chiyama, M. Sakane, F. MD Hasan, K. Sawada, K. Okumura, M. Kishimoto, Identification and characterization of peptide fragments for the direct and site-specific immobilization of functional proteins onto the surface of silicon nitride, Journal of Biotechnology, in press

6 . 研究組織

(1)研究代表者

熊田 陽一 (Kumada, Yoichi)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：70452373