

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630370

研究課題名(和文)超高性能抗体結合・精製素子の創製

研究課題名(英文)Creation of Ultra Super Fusion Protein for Antibody Binding and Purification

研究代表者

上田 宏 (UEDA, Hiroshi)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：60232758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二つの抗体結合タンパク質Protein A D domain (PA)とProtein G C1 (PG)を異なる長さのリンカー(DDAKK) $n$ で結合した新規抗体結合タンパク質PAXnPG ( $n=0,2,4,6$ )を作製し、FabとFcそれぞれに対する結合能をBiolayer Interferometry法に基づくバイオセンサーを用いて評価した。この結果求められた平衡結合定数は、Fabでは $n=4$ 、Fcでは $n=6$ で最大となり、これらはそれぞれの二つの結合部位間距離に対応すると考えられた。また得られた結合能は、PA、PG単独よりも数十倍高いものであり、抗体検出試薬としての有用性も示された。

研究成果の概要(英文)：Two antibody binding domains from Protein A D (PA) and Protein G C1 (PG) were fused with a linker peptide with various lengths (DDAKK) $n$ ,  $n=0,2,4,6$ , to create a novel antibody binding protein PAXnPG. When their affinity to Fab and Fc of antibody was evaluated with a biosensor based on biolayer interferometry, the highest binding constant was obtained with  $n=4$  for Fab, and  $n=6$  for Fc, probably reflecting their length between two binding sites. Moreover, the obtained binding constants are several tens-fold higher than those with PA/PG alone. The utility of PAXPG as an antibody detection reagent was also suggested by immunoblot analysis using a fusion protein with chimeric human alkaline phosphatase (AP) with higher catalytic activity and stability than the parent APs from intestinal and placental origins.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：antibody purification affinity avidity immunoassay

### 1. 研究開始当初の背景

最近、研究代表者らにより、無細胞タンパク質合成系を用いて部位特異的に蛍光ラベルを施した一本鎖抗体(scFv=V<sub>H</sub>-linker-V<sub>L</sub>)の蛍光強度が、抗原不在時と比較して添加時に顕著に強まる現象が見出された。この現象は、抗原不在時に可変領域内における V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> 相互作用部位近傍のトリプトファン残基(Trp)に蛍光色素が配位し、その蛍光強度を低下させる(Quench状態になる)が、抗原結合時は Trp に近接できず Quench が解除するため起こると考えられ、このような抗体断片を現在我々は「Quenchbody」と呼んでいる。これらの Trp は、95%以上保存されていることから、多くの抗体を Quenchbody 化することが可能であり、さらに複数の色素で標識することで色素間のクエンチを利用し、応答性をさらに向上できることなどから、本手法は免疫測定における汎用技術となる可能性が高い。

しかし、このような無細胞系による合成でなく、蛍光標識した抗体結合タンパク質をプローブとして市販の抗体タンパクと複合体形成させ、これを Quenchbody 化できれば、その汎用性は更に高まるはずである。幸いこの発想は H23-24 年度の挑戦的萌芽研究として採択され、実現された(投稿準備中)。しかしその過程で、抗体 Fab 領域への結合を狙って我々が作製した、2種類がよく知られた抗体結合タンパク由来ドメイン Protein A-D (PA)、Protein G-C1 (PG)をある程度の長さのリンカーを介してタンデムに結合させた融合タンパク質 PA-PG の性質をよく調べたところ、このタンパク質が予想外に各種の IgG と強く結合することが判明した。例えば、広く用いられるマウス IgG1 に、PA-PG は天然の Protein A、Protein G よりもはるかに強く結合した。解析の結果、その結合部位は主に抗体 Fc 領域であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本課題は、各種抗体の高感度検出や、高純度精製に応用可能な新規抗体結合素子の開発に関するものである。我々が最近見出した、従来の、天然由来の Protein A、Protein G 等の結合タンパク質をそのまま用いた、あるいは単にそれらのドメインを複数連結させた結合素子では実現できない、高い親和性を持つ抗体結合タンパク質の構築原理をもとに、その汎用性を高めることで、高感度な抗体検出試薬や高性能かつ低コストな抗体精製担体への応用が可能な、夢の結合蛋白質の実現をめざした。

### 3. 研究の方法

これまで構築した PA-PG をベースに、2種類の抗体結合ドメインと各種リンカーを組み合わせた融合タンパク質を大腸菌を用いて発現・精製し、これらの各種抗体 IgG への

結合能を評価する。ここから得られた最適化された結合タンパク質を用いて、アフィニティクロマトグラフィーを構築し、実際にヒト抗体が精製できることを確認する。さらに、この結合タンパク質とアルカリフォスファターゼなどの酵素を融合発現させ、高感度な抗体検出プローブとして使用可能なことを実証した。

具体的には PA-PG 間の結合リンカーの最適化と評価、抗体検出素子の構築をおこなった。

### 4. 研究成果

PA と PG を異なる長さのリンカーペプチド(DDAKK)<sub>n</sub> で結合した新規抗体結合タンパク質 PAxPG (n=0, 2, 4, 6) に関し、Fab と各種 Fc それぞれに対する結合能を Biolayer Interferometry 法に基づくバイオセンサー BLItz (金額の関係で別予算で購入)を用いて評価した。この結果求められた平衡結合定数は、Fab では n=4、Fc では n=6 で最大値を示し、Fab においては n=4 がそれぞれ V<sub>H</sub> と CH1 に結合した時の PA と PG 末端間距離に対応し、Fc においては n=6 あるいはそれ以上の距離が、二つの H 鎖上の結合部位間距離に対応する最適リンカー長と結論づけ、論文発表した(ref. 2, 図)。またこの際得られた結合能は、PA、PG 単独よりも 50 倍以上高いものであった。

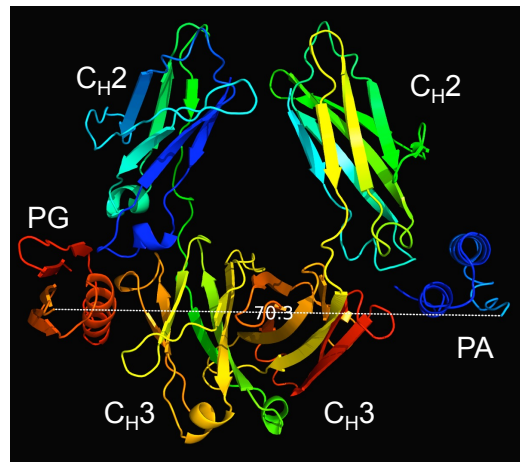


図 PAxPG の Fc 結合モデル(ref. 2)。  
PA-PG 間の距離は 7 nm 程必要。

また、九州大学神谷典穂教授らと共に PAxPG と天然酵素より高い活性と安定性を示すヒト型アルカリフォスファターゼ IPP(ref. 9)との融合タンパク質 IPP-PAxPG を構築し、動物細胞で大量発現させてこれを調製した。イムノブロット法による性能評価の結果、融合タンパク質は市販の各種酵素標識プロテイン G に比べ、少ない非特異的結合と遜色のない抗体結合能を示す事が確認された(ref. 5)。

### 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 19 件)

- 1) 大室 (松山) 有紀, 上田 宏 "生物発光・蛍光消光を利用した新規計測技術の開発" 化学工業 (査読無) 66, 2015, 61-66.
- 2) J. Dong, T. Kojima, H. Ohashi, and H. Ueda "Optimal fusion of antibody binding domains resulted in higher affinity and wider specificity" J. Biosci. Bioeng. (査読有) in press, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.014>
- 3) H. Veisi, J. Gholami, H. Ueda, P. Mohammadi, and M. Noroozi "Magnetically palladium catalyst stabilized by diaminyglyoxime-functionalized magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as active and reusable catalyst for Suzuki coupling reactions" J. Mol. Catal. A: Chemical (査読有) 396, 2015, 216-223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2014.10.012>
- 4) H. J. Jeong, S. Itayama, and H. Ueda "A signal-on fluorosensor based on quench-release principle for sensitive detection of antibiotic rapamycin" Biosensors (査読有) 5, 2015, 131-140, <http://dx.doi.org/10.3390/bios5020131>
- 5) K. Hayashi, Y. Tomozoe, K. Nagai, K. Matsuba, M. Mitsumori, Y. Hiraishi, T. Matsumura, H. Ueda, and N. Kamiya "固相免疫測定を目的とした融合タンパク質試薬の設計とヒト培養細胞による生産プロセスの最適化" 化学工学論文集 (査読有) 41, 2015, 38-42, [https://www.jstage.jst.go.jp/A\\_PRedirectJournalInit/-char/ja/?sryCd=kakorobunshu&noVol=41&noIssue=1&kiJiCd=41\\_14wh066&screenID=AF06S010](https://www.jstage.jst.go.jp/A_PRedirectJournalInit/-char/ja/?sryCd=kakorobunshu&noVol=41&noIssue=1&kiJiCd=41_14wh066&screenID=AF06S010)
- 6) C. I. Chung, R. Makino, J. Dong, and H. Ueda "Open flower fluoroimmunoassay: a general method to make fluorescent protein-based immunosensor probes" Anal. Chem. (査読有) 87, 2015, 3513-3519, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.5b00088>
- 7) 董 金華, 上田 宏 "生物発光タンパク質センサーを用いた薬剤のモニタリング" 実験医学 (査読無) 33, 2015, 583-584,
- 8) 上田 宏 "タンパク質の部位特異的修飾法の最近の進展" 化学 (査読無) 69, 2014, 64-65.
- 9) Y. Sasajima, Y. Kohama, M. Kojima-Misaizu, N. Kurokawa, Y. Hara, J. Dong, M. Ihara, and H. Ueda "Simultaneous retention of thermostability and specific activity in chimeric human alkaline phosphatases" Mol. Biotechnol. (査読有) 56, 2014, 953-961, <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-014-9774-9>
- 10) Y. Ohmuro-Matsuyama, Y. Hara, and H. Ueda "Improved protein-protein interaction assay FlimPIA by the entrapment of luciferase conformation" Anal. Chem. (査読有) 86, 2014, 2013-2018, <http://dx.doi.org/10.1021/ac403065v>
- 11) 大室 (松山) 有紀, 上田 宏, "ホタル発光酵素の反応機構を利用したタンパク質間相互作用検出系の開発" バイオサイエンスとインダストリー (査読無) 72, 2014, 113-116.
- 12) H. J. Jeong, and H. Ueda "Strategy for making a superior Quenchbody to proteins: effect of the fluorophore position" Sensors (査読有) 14, 2014, 13285-13297, <http://dx.doi.org/10.3390/s140713285>
- 13) H. Ueda, and J. Dong "From Fluorescence Polarization to Quenchbody : Recent Progress in Fluorescent Reagentless Biosensors Based on Antibody and Other Binding Proteins" Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics (査読有) 1844, 2014, 1951-1959, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.06.005>
- 14) 上田 宏 "免疫反応を測れる光る抗体" 現代化学 (査読無) 518, 2014, 32-36.
- 15) R. Abe, H. J. Jeong, D. Arakawa, J. H. Dong, H. Ohashi, R. Kaigome, F. Saiki, K. Yamane, H. Takagi, and H. Ueda "Ultra Q-bodies : quench-based antibody probes that utilize dye-dye interactions with enhanced antigen-dependent fluorescence" Sci. Rep. (査読有) 4, 2014, 4640, <http://dx.doi.org/10.1038/srep04640>
- 16) Y. Tone, M. Kawahara, D. Kawaguchi, H. Ueda, and T. Nagamune "Death signalobody: Inducing conditional cell death in response to a specific antigen" Hum. Gen. Ther. Methods (査読有) 24, 2013, 141-150, <http://dx.doi.org/10.1089/hgtb.2012.147>
- 17) Y. Ohmuro-Matsuyama, K. Nakano, A. Kimura, K. Ayabe, M. Ihara, T. Wada, and H. Ueda "A protein-protein interaction assay based on the functional complementation of mutant firefly luciferases" Anal. Chem. (査読有) 85, 2013, 7935-7940, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902573>
- 18) S. Hasan, J. Dong, Y. Hara, Y. Morizane, F. Shibasaki, and H. Ueda "Protein-based open sandwich

immuno-PCR for sensitive detection of small biomarkers” Anal. Sci. (査読有) 29, 2013, 871-876 (Hot Paper Award), <http://www.jsac.or.jp/analsci/abst.php/p/29/9/871/>

- 19) Y. Hara, J. Dong, and H. Ueda “Open-sandwich immunoassay for sensitive and broad-range detection of a shellfish toxin gonyautoxin” Anal. Chim. Acta (査読有) 793, 2013, 107-113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.024>

[学会発表] (計 9件)

- 1) H. Ueda “How can we transform uni-functional proteins to sensors?”, 20th YABEC symposium, National Chung Cheng University, Chiayi, Taiwan (11/7, 2014) (招待講演)
- 2) 上田 宏.” 生物発光・蛍光消光を利用した新規計測技術の開発”, 生物発光化学発光研究会第 31 回学術講演会, 信州大学繊維学部(長野県上田市) (11/1, 2014) (招待講演)
- 3) 董 金華, 児島智樹, 大橋広行, 阿部亮二, 上田 宏 「抗体プローブを用いた蛍光免疫センサーの構築」第 14 回日本蛋白質科学会年会 (2014/6/25, 横浜)
- 4) 児島智樹, 大橋広行, 阿部亮二, 董 金華, 上田 宏 「複数結合ドメインの最適配置による高性能抗体結合素子の構築」第 14 回日本蛋白質科学会年会 (2014/6/25, 横浜)
- 5) 上田 宏.” 理想のイムノアッセイを目指して～新規蛍光免疫素子 Q-body の開発と応用”, 第 11 回バイオ計測・試薬研究会 京都におけるバイオイノベーション～身近になったバイオ計測: 抗体を使った分析技術の実際と新展開～, 京都市産業技術研究所 (2/27, 2014) (招待講演)
- 6) 上田 宏.” “発光酵素の反応分割による迅速高感度な相互作用検出系の開発”, 日本生物工学会第65回大会, 広島国際会議場 (9/20, 2013) [招待講演]
- 7) 児島智樹, 大橋広行, 阿部亮二, 上田 宏 「複数結合ドメインの最適配置による高性能抗体結合素子の構築」日本生物工学会第65回大会, 広島国際会議場 (9/20, 2013)
- 8) 児島智樹, 大橋広行, 阿部亮二, 上田 宏 「複数結合ドメインの最適配置による高性能抗体結合素子の構築」第 86 回日本生化学会大会 (横浜, 9/11-13, 2014) [口頭発表]
- 9) 上田 宏, 阿部 亮二, ジョンヒジン, 荒川 大, 山根亨介, 高木広明, 芳坂貴弘.” 抗原結合により光る蛍光標識抗体断片 Quenchbody (Q-body)の開発”, 第 13 回

日本蛋白質科学会年会 3WC-4, 鳥取 (6/14, 2013) (招待講演)

[図書] (計 2件)

- 1) 阿部 亮二, 上田 宏 “抗体断片の蛍光技術を用いた迅速・簡便な検査キットの開発” 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」第 12 章 第 2 節 p. 335-338 ( (株) 技術情報協会, 東京; 2015).
- 2) 生物化学的測定研究会, 小林典裕, 上田 宏, 三宅司郎, 荒川秀俊編 「免疫測定法～基礎から先端まで」2. 3, 4. 3, 6. 4, 6. 5, 7. 5 章執筆, 講談社, 2014, <http://bookclub.kodansha.co.jp/product?isbn=9784061543850>

[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

<http://www.ueda.res.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 宏 (UEDA, Hiroshi)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号: 6 0 2 3 2 7 5 8

(2) 連携研究者

松山 有紀 (OHMURO-MATSUYAMA, Yuki)

学術振興会 RPD/神戸大学・

大学院工学研究科・特命助教

研究者番号: 3 0 5 7 1 0 8 8