

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420795

研究課題名(和文) 単鎖抗体の精密配向固定による反射干渉分光センサの超高感度化

研究課題名(英文) Immobilization of scFv through SiN-binding peptide for sensitive RfS sensor

研究代表者

熊田 陽一 (Kumada, Yoichi)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：70452373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、反射干渉分光センサの高感度化のために、SiN基板上に高密度かつ高活性に固定化可能なタグ付き単鎖抗体の開発を行った。大腸菌由来Elongation Factor Tuから生成するペプチド断片の中に、SiNに対して強く吸着する複数のペプチド断片を獲得し、これらをSiN親和性ペプチドタグ(SiN-tag)とした。SiN-tagを導入したグルタチオンSトランスフェラーゼはSiN基板上において高密度に固定化可能であった。さらに、SiN-tag融合単鎖抗体の安価な生産技術を確立するとともに、RfSセンサ上で抗原分子を高感度に検出ことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new immobilization method of protein onto the surface of silicon nitride. First, we successfully identified SiN-binding peptides from Elongation Factor Tu which was isolated from E. coli cell lysate. Especially, one of them showed the strongest binding affinity towards the surface of SiN plate. By genetic fusion of SiN-tag to the C-terminus of single-chain Fv antibodies resulted in higher antigen-binding activity of scFv in adsorption state. Thus, the SiN-binding peptides developed in this study will be significantly useful for site-specific immobilization of recombinant antibody fragments such as scFvs in RfS sensor.

研究分野：Biochemical Engineering

キーワード：SiN SiN-tag antibody GST immobilization orientation control

## 1. 研究開始当初の背景

疾病の早期発見・早期治療に役立つベッドサイド検査 (Point of Care Testing, POCT) は、医療の質の向上、患者の時間的・精神的負担の軽減等の効果が高く、患者志向の医療の実現に必要不可欠である。特に、緊急性の高い感染症や心疾患の POCT 検査は、検出感度のみならず、検査時間の大幅な短縮が要求されている。図 1 に示すように、反射干渉分光 (RIfS) センサは、窒化ケイ素 (SiN) 表面に生じる微小な相互作用の変化を光学膜厚としてリアルタイムかつ高感度に検出可能な次世代のバイオセンサである。RIfS センサは、SPR センサや QCM センサと同等以上の検出感度を有しながら、ノイズレベルが極めて低く、光ファイバーや半導体技術の導入によって小型化が可能であることから POCT 検査機器への利用が期待されている。一方で、RIfS センサのセンシング材である窒化ケイ素 (SiN) 基板上に分子認識素子であるモノクローナル抗体を固定化する場合、その表面親水性や安定性の高さゆえ、高密度・高配向・高活性な固定化は極めて困難な状況にあり、本センサの利用は研究用途に限定されてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウィルスや病原性微生物のリアルタイム検出に利用可能な **低コストかつ高感度な反射干渉分光 (RIfS) センサ** の開発を目的とする。すなわち、申請者が独自に開発する窒化ケイ素親和性ペプチド (SiN-tag) の付着メカニズムを解明するとともに、SiN-tag を末端部に導入した単鎖抗体 (scFv-SiN-tag) を分子シミュレーションによって精密設計し、分子配向性や熱力学的安定性を評価する。さらに、組換え大腸菌を用いた scFv-SiN-tag の培養生産技術、高効率リフォールディング技術、さらには、従来極め

て困難であった RIfS センサチップ (SiN) 基板上への scFv の高密度配向固定化技術を確立することで、抗体固定化 RIfS センサの大幅な低コスト化、高感度化を達成する。本研究を実施することで、極めて低コスト・高感度・迅速なベッドサイド検査が可能となる。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1 SiN 親和性ペプチドの単離

大腸菌可溶性タンパク質を調製し、これを用いて SiN 基板への吸着実験を行った。さらに、吸着タンパク質を 6M 塩酸グアニジンで溶出し、二次元電気泳動により分離した。分離・検出されたタンパク質スポットを PMF 法で解析し、SiN 親和性タンパク質を同定した。さらに、SiN 親和性タンパク質をプロテアーゼ消化し、ペプチド断片を調製後、再び SiN 基板との吸着実験に供した。吸着前後のペプチド成分を HPLC で解析することで、SiN 親和性タンパク質ないに存在する SiN 親和性ペプチドを単離・同定した。

### 3 - 2 SiN 親和性ペプチド融合タンパク質の評価

同定された 9 種類の SiN 親和性ペプチドがタンパク質固定化用タグとして機能するかを検証するために、SiN 親和性ペプチドを C 末端部に導入したグルタチオン S トランスフェラーゼ (タグ付き GST) を調製した。これらタグ付き GST を用い、RIfS センサ内の SiN 基板上におけるタグ付き GST の吸着挙動を RIfS センサによって解析した。

### 3 - 3 SiN 親和性ペプチド融合単鎖抗体の生産技術の開発

3 - 2・3 - 3 で単離された SiN 親和ペプチド (V821) を C 末端部に導入した単鎖抗体の組換え大腸菌における調製を検討し

た。さらに、培養後の封入体中から SiN-tag 融合単鎖抗体 (scFv-SiN) を変性状態で分離・精製し、立体構造を巻き戻すためのリフォールディング操作についても検討した。特に、アニオン性ペプチド (Poly D-tag) の導入によって scFv-SiN の回収率の向上が可能かを検証した。

#### 3 - 4 SiN 親和性ペプチド融合単鎖抗体を利用した RfS による抗原検出

リフォールディングによって回収された活性型の scFv-SiN について、SiN 基板上への固定化が可能かを RfS センサを用いて検証した。さらに、

### 4 . 研究成果

#### 4 - 1 SiN 親和性ペプチドの単離

大腸菌可溶性タンパク質を用いて、SiN 基板上に付着可能なタンパク質の探索を行った。付着タンパク質を溶出し、二次元電気泳動で解析した結果、2 種類のタンパク質スポットが検出された。これらのスポットを PMF 法で同定したところ、Elongation Factor Tu (ELN) ならびに Outermembrane protein C (OMC) であった。これらのうち、ELN の遺伝子を合成し、組換え大腸菌にて発現・精製した。精製タンパク質を SiN 基板に対して吸着させたところ、コントロールの BSA と比較して、吸着量の大幅な増加が確認された。以上の結果より、ELN を SiN 親和性タンパク質として以後の実験に用いた。

次いで、ELN をトリプシン、気もトリプシン、V8 プロテアーゼによって消化したペプチドサンプルについて、再度、SiN 基板への吸着実験を行った。吸着前後のペプチド成分について、HPLC で解析したところ、9 種類のペプチド成分の明らかなピークの減少が確認できた。これらのペプチドの分子量ならびに N 末端配列からアミノ酸配列

を決定し、これらを SiN 親和性ペプチド候補とした。

#### 4 - 2 SiN 親和性ペプチド融合タンパク質の評価

4 - 1 で単離された SiN 親和性ペプチド候補のタンパク質への導入と、導入した状態での SiN 基板への吸着性を確認するために、グルタチオン S トランスフェラーゼの C 末端部への導入を検討した。組換え大腸菌を用いて発現後、アフィニティクロマトグラフィーを用いて精製したところ、比較的高純度の SiN タグ融合 GST の調製に成功した。これら、SiN タグ付き GST を用いて SiN 基板上への吸着現象を RfS センサにて解析した。その結果、4 種類の SiN タグ候補について、明らかな SiN 基板への吸着が見られ、これらを SiN 親和性ペプチド (SiN タグ) として以後の実験に利用した。特に、ELN-TP14 は、アミノ酸配列が 9 残基と単離された SiN タグの中で最も短く、SiN 基板上への吸着量も最も高かった。したがって、タンパク質固定化用タグとしての利用が期待できた。SiN-TP14 ペプチド融合 GST の SiN 基板表面における付着挙動ならびに配向状態を分子シミュレーションによって解析したところ、SiN-tag が SiN 基板に対して積極的にアプローチし、GST の吸着性を維持しつつ、配向を正しく制御していることが明らかとなった。

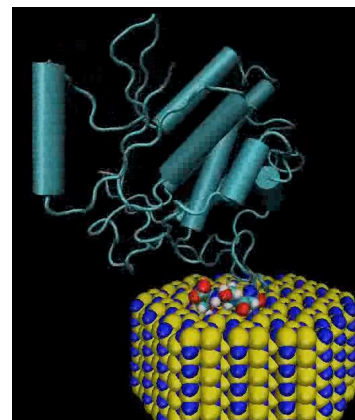


図 1 SiN-tag 融合 GST のシミュレーション

#### 4 - 3 SiN 親和性ペプチド融合単鎖抗体の生産技術の開発

SiN-tag 融合 scFv を組換え大腸菌を用いて培養生産したところ、そのほとんどは封入体として回収された。そこで、変性剤共存下に置いて scFv-SiN をアフィニティ精製し、さらに、ジスルフィド結合を空気酸化、さらには、透析による変性剤の除去を行ったところ、scFv-SiN は、可溶化し、活性型として回収された。特に、SiN-tag の C 末端側にアニオン性のアミノ酸配列 D-tag を導入することで、pH8.5 における scFv-SiN の回収率が大幅に改善されることが明らかとなった。

以上の結果より、SiN-tag 融合 scFv の大量生産に必要な要素技術を開発することに成功した。

#### 4 - 4 SiN 親和性ペプチド融合単鎖抗体を利用した RfS による抗原検出

RfS センサを用いて scFv-SiN の吸着挙動ならびに固定化状態にある scFv-SiN の抗原結合活性を測定した。

まず、タグなし scFv および scFv-SiN を SiN 基板の上に固定化したところ、これらの吸着量はほぼ同等となった。したがって、scFv 自身が SiN 基板の上に吸着しやすく、SiN-tag の導入によって、scFv の密度の向上はあまり期待できないことが明らかとなった。

一方で、固定化状態におけるタグなし scFv と scFv-SiN の抗原結合活性を比較したところ、scFv-SiN 固定化 SiN 基板の方が明らかに低濃度の抗原に対して高いシグナルが得られたことから、scFv-SiN は、SiN 基板において、タグなし scFv よりも安定であり、かつ、正しい配向性で固定化されていることが明らかとなった。

以上の結果より、SiN 基板表面に高親和的に作用する SiN-tag の単離に成功し、

SiN-tat 融合 scFv を利用した高感度 RfS センサの開発が可能であることを示した。

#### 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 1 件 )

Y. Kumada et al., Identification and characterization of polydimethylsiloxane-binding peptides (PDMS-tag) for oriented immobilization of functional protein on a PDMS surface. J Biotechnol. 236:193-8 (2016)

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.cis.kit.ac.jp/~kumada/index.html>

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

熊田陽一 (Yoichi KUMADA)

京都工芸繊維大学分子化学系 准教授

研究者番号 : 70452373