

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820360

研究課題名(和文) DNAを足場としたナノ構造化高機能ハイブリッド抗体分子の開発

研究課題名(英文) Development of a nanostructured hybrid antibody molecule with DNA scaffold

研究代表者

加藤 晃代 (Kato, Teruyo)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：40727640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗体はライフサイエンス分野で必須のツールであり、特にモノクローナル抗体の高感度センサーとしての利用が広まりつつある。

本研究では、DNA、DNA結合タンパク質および抗体から成る新たなセンサー分子であるHybridbodyを開発した。まず、DNA結合タンパク質と抗体との融合体を大腸菌にて大量生産するために、N末端タグ配列付加とシャペロン共発現が有効であることを見出し、大腸菌による生産系と精製法を確立した。当該抗体融合物とDNAを混合することにより、Hybridbodyを形成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Antibodies have become essential tool in the life technology fields and their applications as a high-sensitivity sensor are increasing.

In this research, we have developed a novel sensor molecule named 'Hybridbody' which consists of DNA (PCR product or plasmid), DNA-binding protein, and antibody (scFv). First, we established an efficient production scheme for fusion proteins of DNA-binding protein and scFv using E. coli expression systems with an N-terminal tag and chaperon co-expression. Bivalent antibody-DNA hybrid molecule, Hybridbody, was formed by mixing with the purified proteins and DNA fragments.

研究分野：分子生物学

キーワード：学会発表

## 1. 研究開始当初の背景

抗体はライフサイエンス研究全般において必須の道具の一つであり、免疫学的測定・解析、細胞やタンパク質の機能解析、遺伝子の発現スクリーニングなどの基礎研究において幅広く利用されている。

モノクローナル抗体は、1種類だけのエピトープと結合するのに対し、ポリクローナル抗体は、複数のエピトープと結合する複数種類の抗体の混合物である。一般にモノクローナル抗体は特異性が高いとされるものの、異なる抗原分子上に同一あるいは似た抗原決定基が存在する場合、それらの分子を区別することはできない。一方、ポリクローナル抗体は複数のエピトープを認識でき、抗体および抗原が複合体化することによって得られる高いアビディティが知られる。しかしながら、多数の異なる抗体分子の複合物であるため、実用面においては品質の安定化が困難といった問題がある。複数の抗原認識ができる抗体としては2種類の結合サイトが同一抗体分子上にある Diabody が知られているが、その抗原結合サイトの距離は固定されており、2種類以上の結合サイトを一分子中に持たせることはできない。

## 2. 研究の目的

そこで申請者はポリクローナル抗体の複数エピトープ認識性および高いアビディティと、モノクローナル抗体の分子同一性とを兼ね備えた、DNA と抗体(scFv)のハイブリッド分子(Hybribody)の構築を目指した(図1)。抗体の抗原結合部位である scFv を DNA 結合タンパク質の融合タンパク質として作製し、DNA 結合タンパク質を足場として任意の配列を有する DNA (PCR 産物またはプラスミド) に結合させたものである。複数の抗体種および DNA 結合タンパク質変異体を組み合わせ、DNA の鎖長および配列を変えることで抗体の空間的距離をナノスケールで任意に

調整できる。また、DNA 結合タンパク質を多種組み合わせることにより、抗体分子数とその種類も任意に調整できることから、抗原分子に適した結合特性を有するポリクローナル抗体様のモノクローナル抗体をデザインすることが可能となる。

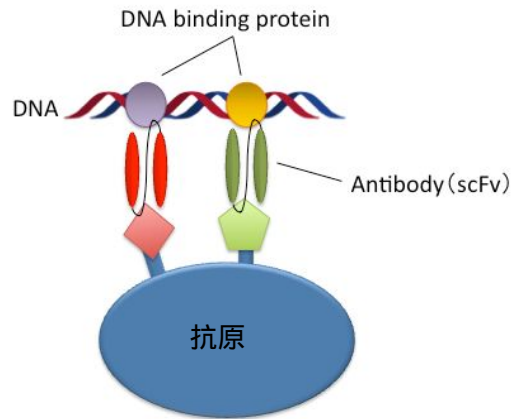


図1. Hybribody のイメージ

## 3. 研究の方法

1) モノクローナル抗体と DNA 結合タンパク質 (p15) 融合体の組み換え大腸菌により調製する。大腸菌における発現条件 (シャペロン、培地、培養温度) を最適化する。

2) 精製モノクローナル抗体と DNA 結合タンパク質の融合体、DNA 断片 (PCR 産物) を用い、Hybribody を構築する。

3) Hybribody の抗原結合能解析

## 4. 研究成果

まず、モデル抗体としてマウス抗リゾチーム scFv 抗体を機能性タンパク質 p15 との融合タンパク質 (scFv-p15) として細胞内発現を試みた。宿主として DsbC を細胞内に発現する大腸菌 SHuffle T7 express を用いたところ、scFv-p15 の大部分は封入体を形成していた。そこで、可溶性タンパク質の発現量向上のために、N 末端に 9~12 残基のアミノ酸から成る様々なタグ配列を付加し、さらにシャペロンと共発現させることにより、可溶性発現量

の向上を試みた。

その結果、タグ配列の一つである T7 タグとシャペロン的一种であるトリガーファクターの組み合わせにより、scFv-p15 の細胞内可溶性発現量が増大することに成功した。

精製条件検討の結果、30% 硫酸沈殿画分をアフィニティカラム製精することにより、目的タンパク質融合体を SDS-PAGE で単一バンドに精製することができた。ELISA により、本精製タンパク質はリゾチームおよび DNA の両方に対して結合活性を有していることを確認した(図2)。

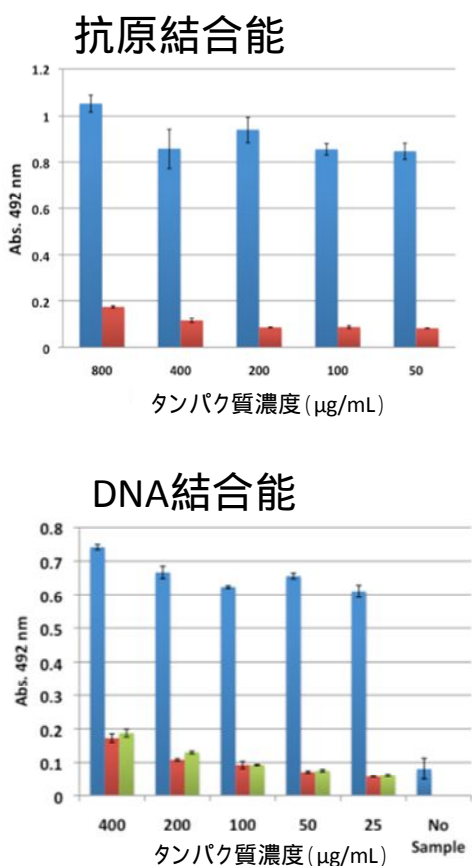


図2. 抗体と DNA 結合タンパク質融合物の ELISA による評価結果抗原。

次に、3 種類の DNA 断片を用い、精製融合タンパク質が DNA 配列依存的に結合するかゲルシフトアッセイにより検討したところ、認識配列を有するときのみ抗体と DNA のハイブリッドが形成されることが確認できた。ELISA の結果、本分子は抗原結合能を有して

いた。以上より、ポリクローナル抗体の複数エピトープ認識性および高いアビディティと、モノクローナル抗体の分子同一性を兼ね備えた、Hybribody の形成が可能であることが示された。

## 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0件)

[学会発表](計2件)

1. 本間啓介, 加藤晃代, 兒島孝明, 上田宏, 中野秀雄. シャペロンとタグ配列の付加による抗体融合タンパク質の大腸菌内可溶性発現効率の向上. 生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2015, 平成27年7月, 北名古屋(ポスター)

2. 本間啓介, 加藤晃代, 兒島孝明, 上田宏, 中野秀雄. 大腸菌細胞内発現系を用いた抗体融合タンパク質の効率化に関する研究. 日本農芸化学会2015年度大会, 2015年3月, 岡山

[図書](計0件)

[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〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

加藤 晃代 (KATO, Teruyo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・研究  
員

研究者番号：40727640

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：