

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09211

研究課題名(和文)薬物スクリーニングに最適な抗体分子の三次元構造解析に基づく創出と薬物検出法の構築

研究課題名(英文)Development of a drug screening method using a recombinant antibody

研究代表者

笹尾 亜子 (Sasao, Ako)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：80284751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、薬物と薬物に対する抗体がどのように結合しているかを結晶構造解析によって調べ、法医学実務(検屍、解剖)に適した薬物検査法を素早く提供できる体制づくりを目指した。

抗うつ薬フルボキサミン(FLV)をモデル薬物として用い、FLVに対する抗原結合フラグメント(Fab)を調製した。Fabに過剰のFLVを混和し、Fab-FLV結晶を作製した。いくつかの条件で結晶が得られ、今後はそのX線構造解析を行う。また、免疫蛍光センサーであるQuenchbodyを利用したFLV検出法を構築した。この方法は、FLVを含むヒト血清の検査に利用できる事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学が担う実務において、その死因に薬毒物が関与していたかどうかを検査する事は重要である。現在、抗体を使った薬物検査法はよく利用されているが、検査できる薬物が限定的であり、類似化合物に対して擬陽性が起こる事など問題点も多い。本課題では、国内で中毒事例の多い向精神薬の一つであるFLVについて、薬物と抗体の相互作用部位を構造解析によって明らかにする事を試みた。本研究成果である結晶を用いた構造解析の知見は、異なる薬物に対する抗体作製への足掛かりとなるものである。また、本成果である作製したQuenchbodyは、異なる薬物に対する抗体遺伝子を挿入する事で、同様の検出法を直ちに提供できるツールとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to provide a drug screening method using a recombinant antibody which was suitable for forensic practices. We used an antibody against anti-depressant fluvoxamine (FLV) and prepared a highly purified antibody-binding fragment(Fab). The Fab was mixed with excess FLV, and crystals of FLV-Fab complex were grown using hanging drop vapor diffusion technique. The crystallographic analysis will be invaluable in designing more potent antibodies in near future. We also created a FLV detection system using a Quenchbody (Q-body), a novel fluoroimmunosensor that can detect an antigen immediately without additional reagents or washing steps. We showed that the system could be applied to detect serum FLV with high sensitivity. This study demonstrates the potential of Q-body probes as a tool towards developing novel immunoassay applications for forensic practices.

研究分野：法医学

キーワード：抗薬物抗体 組換え抗体 薬物スクリーニング 法医中毒学 免疫学的検出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学解剖や検屍・検案時の死因診断において、その死因に薬毒物の関与があったかどうかを確認する事は重要であり、簡便に検査ができる免疫学的検出法は極めて有用である。しかし、現存する市販のキットで検出可能な薬物はごく一部に限られている。そこで我々は、薬物として特に国内での中毒事例が増加している向精神薬に対する免疫学的検出法の開発に関する研究を行ってきた。なお、迅速な抗体作製や新しい検出法への展開を目指し、遺伝子工学的技術の利点(大腸菌発現系などによって安価に調製できる事、抗体遺伝子の改変による改良が容易にできる事)を活用した抗体作製を行っている。

この研究を実施する中、免疫学的手法による薬物スクリーニングでは対象薬物によっては「極めて高い特異性を持つ抗体」が望ましい場合や、「(化学構造上の基本骨格を持つ)同系薬物は包括的に検出できる抗体」が望ましい場合がある事に着目した。例えば、覚せい剤アンフェタミン類に対する抗体は腐敗性アミン類との交差反応が生じやすい事が知られており¹⁾、極めて高い特異性を持つ抗体ならば擬陽性を示す事がなく有用である。一方、危険ドラッグに代表される薬物群は基本骨格を維持する事が多いことから、包括的に検出できる抗体であれば多くの危険ドラッグをもれなく検出できる。この着想に基づいて、我々は薬物スクリーニングの目的に応じた最適な抗体を分子レベルでデザインし、その抗体を用いた薬物検出法を構築する事を本研究の目的とした。

2. 研究の目的

本研究では上記背景からの着想に基づいて、薬物スクリーニングの目的に応じた最適な抗体を分子レベルでデザインし、その抗体を用いた薬物検出法を構築する事を目的とした。具体的には、現在まで研究を行ってきた SSRI 系抗うつ薬フルボキサミン (FLV) に対する抗体をモデル薬物として用い、下記の二項目について研究を実施した。

(1) 抗体 - 薬物複合体の共結晶作製と X 線結晶構造解析

(2) Quenchbody (Q-body) を用いた薬物検出法の構築

上記(1)では、抗体 - 薬物複合体のタンパク質結晶構造解析により、スクリーニングに適した抗体へ改変するための知見を得る事を目的とした。上記(2)では、Q-body による薬物検出法を構築し、(1)の知見から改変した抗体遺伝子を用いて直ちに検出法を作製することができる体制づくりを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗体 - 薬物複合体の共結晶作製と X 線結晶構造解析

抗原結合フラグメント (Fab) の調製

抗 FLV モノクローナル抗体 (IgG) 産生ハイブリドーマを CELLLine™ Bioreactor を用いて無血清培地で培養し、その培養上清から ProteinG を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行って IgG を精製した。パバインによる IgG の酵素処理を行って Fab を調製し、その後 ProteinA によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。さらに、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを行って高純度に精製した。タンパク質量は Qubit® アッセイで行い、精製度の確認はポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で行った。

FLV 結合 Fab タンパク質の結晶化条件の検討

Fab タンパク質に対して過剰の FLV を混合し、共結晶化を試みた。結晶化は蒸気拡散法 (Hanging Drop 法) で行った。また、結晶化条件の検索には Index キット等を用いた。

(2) Q-body を用いた薬物検出法の構築

本検討は既に論文発表済み²⁾ 雑誌論文³⁾ であり、以下に各方法の概要を示す。

Q-body タンパク質発現ベクターの構築

FLV に対して応答性のより高い Q-body を検索するため、蛍光色素を結合させるリンカーの位置や長さの異なる 5 種の本鎖抗体 (V_H-V_L) 型 Q-body (Fig. 1: pSQ(FLV)-N0、-N2、-N5、-C2、-C5) 発現ベクターを既報²⁾の方法で作製した。なお、FLV 抗体遺伝子は pETCF-HL³⁾を用い、Q-body 発現遺伝子は pSQ(KTM219)⁴⁾を用いた。

Q-body の調製

で作製した Q-body 発現遺伝子にて形質転換した大腸菌を大量培養し、目的とするタンパク質の発現誘導を行った。大腸菌を超音波破碎し、不溶画分を 6M 塩酸グアニジンを含む可溶化液でよく溶かした。Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーで粗精製を行い、2-メルカプトエタノール (375 μ M) で 2 時間インキュベーションした後に段階透析法でタンパク質のリフォールディングを行った。得たタンパク質は、HPLC によるゲルろ過クロマトグラフィーにてさらに精製を行い、Q-body 前駆タンパク質を得た。これを用いて、既報の方法²⁾ で 4 種の蛍光色素 (ATTO520、TAMRA-C2、TAMRA-C5、R6G) にて標識した Q-body を作製した。Q-body の FLV 結合活性は、ELISA 法で確認した。

Q-body の抗原応答性

で調製した Q-body を用いて、蛍光分光光度計にて FLV 添加による蛍光変化を調べた。また、FLV を各終濃度 (1 nM ~ 10 μ M) になるよう添加して、その濃度依存性を調べた。さらに、各蛍光色素で作製した Q-body に FLV を添加し、蛍光上昇率を比較した。

さらに、応答性の高い Q-body を用いて、FLV を添加した血清試料に対する反応性を調べた。なお、本実験は熊本大学の倫理委員会の承認を得て行った (熊本大学倫理審査承認番号 第 1269 号)。

4. 研究成果

(1) 抗体 - 薬物複合体の共結晶作製と X 線結晶構造解析

ハイブリドーマ培養上清から約 120mg の精製 IgG を得た。精製 IgG は、37 18 時間のパパイニン処理で効率よく Fab が調製できた。その一部を用いて精製を行い、約 4 mg の高純度 Fab を得た (Fig.2、収率 15%)。

結晶化スクリーニングの結果、結晶化用緩衝液は 20% ポリエチレングリコール 4000 を含む 0.1M ビストリス緩衝液 (pH6.0) と 2.0M 硫酸アンモニウムを含む 0.1M トリス緩衝液 (pH8.5) で再現性良く結晶を得る事ができた (Fig.3a-d)。得られた結晶について、つくば市・高エネルギー加速器研究機構にて X 線結晶構造解析を現在進めている。

(2) Q-body を用いた薬物検出法の構築

調製した 5 種の Q-body 前駆タンパク質は、ELISA において何れも十分な FLV 結合活性を持つ事が示された。これらの Q-body を用いた蛍光分析では、何れの Q-body も 1 μ M FLV の添加によって 1 分以内に蛍光上昇を示した (Fig.4)。また、Fig.5 に示すように C 末標識よりも N 末標識した Q-body の蛍光上昇率が高く、N0 では 1.5 倍の上昇率を示した (ED_{50} : 31.4 nM)。この結果は、C 末標識した Q-body では蛍光色素が十分にクエンチングしていない事を反映していた。抗体から蛍光色素までの最適な距離 (リンカー長) は用いる抗体によって異なる事が報告されている。FLV に対する Q-body は、蛍光色素までの距離が近いほど色素が良くクエンチングする事が明らかとなった。標識する蛍光色素としては、Rhodamine 6G を用いた Q-body が最も蛍光上昇率が高かった (Fig.6)。用いた蛍光色素の中では Rhodamine 6G が最も脂溶性が高く、 V_H - V_L 間において色素がよくクエンチングした事が良い応答に繋がったと考えられる。作製した Q-body は、FLV の治療血清濃度 (190 ~ 720 nM) 以上を十分に検出できる事が示された。

本研究成果により、FLV-抗体タンパク質の結晶が得られ、抗原抗体反応における相互作用部位の構造解析への足がかりとなった。今後は構造解析で得られた知見を元に、よりスクリーニングに適した改変体を作製する。また、本研究成果によって Q-body による FLV 検出法が作製できた。この Q-body 発現遺伝子は、鋳型として用いてさまざまな薬物に対する

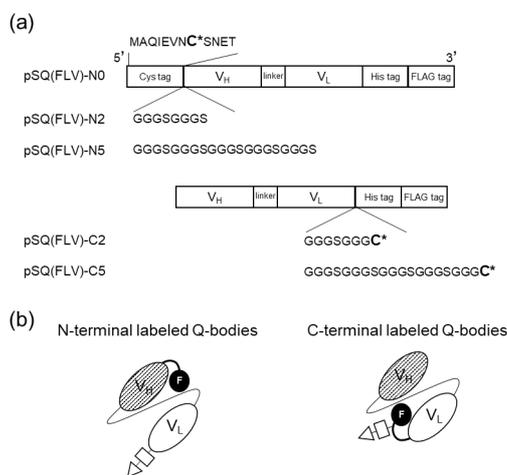


Fig. 1 Q-body expression vectors and diagrams with fluorophore labeling

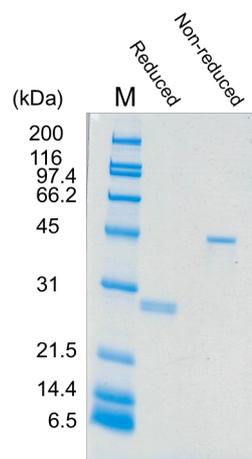


Fig. 2 SDS-PAGE of purified Fab (CBB stained)

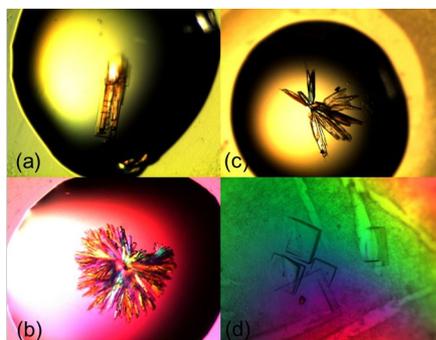


Fig. 3 Pictures of Fab-FLV crystals

抗体遺伝子を挿入する事で各薬物に対する検出法を迅速に提供できるものである。これら成果は、現在簡便に検出できない様々な薬物に対するスクリーニング法を迅速に提供できる手段となると考える。

【参考論文】

- 1) 渡邊友彦, 他. 法医学の実際と研究 1997; 40: 99-102.
- 2) Sasao A, *et al.* Drug Testing and Analysis 2019; 11, 601-609.
- 3) Sasao A, *et al.* Forensic Toxicology 2013; 31, 62-66.
- 4) Jeong HJ, *et al.* Acs Sensors 2016; 1, 88-94.

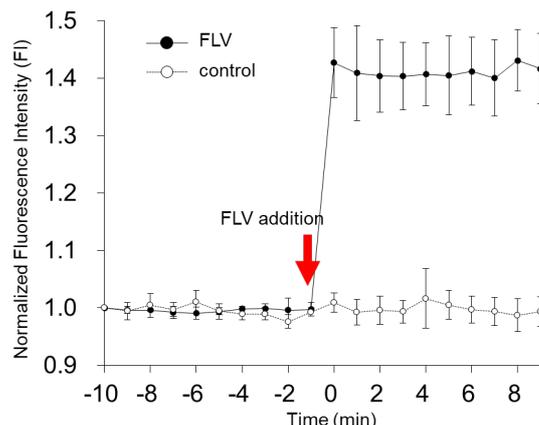


Fig. 4 Changes in normalized FI by interaction of the Q-body and FLV

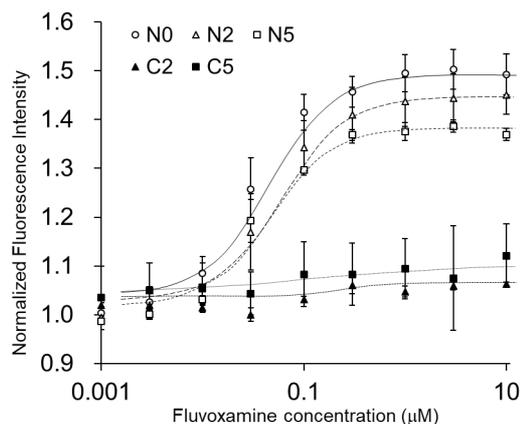


Fig. 5 FLV dependent fluorescence enhancement of the Q-body

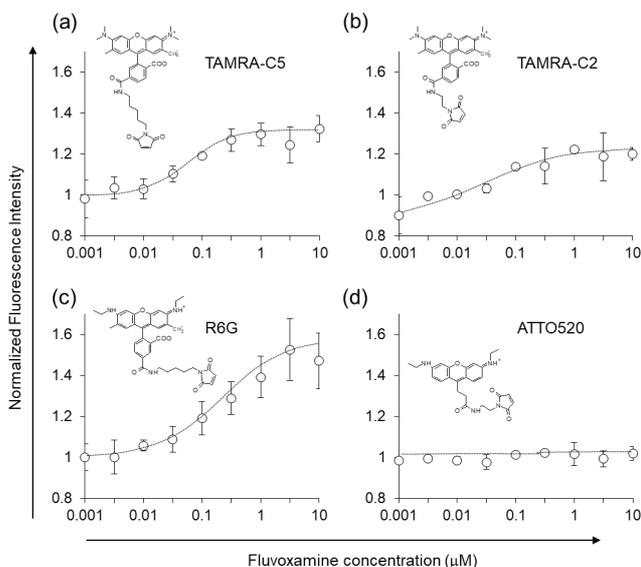


Fig. 6 Titration curves of the fluorescence intensity using each dye labeled Q-body.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sasao A, Takaki M, Jeong HJ, Yonemitsu K, Ohtsu Y, Tsutsumi H, Furukawa S, Morioka H, Ueda H, Nishitani Y
Development of a fluvoxamine detection system using a Quenchbody, a novel fluorescent biosensor. Drug Testing and Analysis 2019, 11(4), 601-609. DOI:10.1002/dta.2520 査読有り

Sasao A, Takaki M, Ohtsu Y, Mishima S, Yonemitsu K, Morioka H, Nishitani Y
Development of an immunoassay for fluvoxamine detection using a recombinant single-chain variable fragment antibody. Forensic Toxicology 2017, 35(2), 301-308. DOI: 10.1007/s11419-017-0358-9 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

笹尾亜子, 黒澤凜, 山口佳宏, 大津由紀, 堤博志, 古川翔太, 米満孝聖, 西谷陽子. 抗薬物抗体の抗原認識機構の解明を目指した薬物-抗体タンパク質の共結晶作製, 第 103 次日本法医学会学術全国集会, 2019, 宮城県.

Sasao A, Takaki M, Hirata K, Ohtsu Y, Tsutsumi H, Furukawa S, Yonemitsu K, Morioka H, Ueda H, Nishitani Y. Development of a fluvoxamine detection system using Quenchbody, a novel antibody-based biosensor, 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018, Fukuoka.

笹尾亜子, 高木美智代, 大津由紀, 三島聡子, 堤博志, 古川翔太, 米満孝聖, 森岡弘志, 西谷陽子. 抗うつ薬フルボキサミンの一本鎖抗体を用いた ELISA 定量法とその特性, 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 2017, 岐阜県.

笹尾亜子, 高木美智代, Hee-Jin Jeong, 大津由紀, 三島聡子, 米満孝聖, 上田宏, 西谷陽子. 抗うつ薬フルボキサミンに対する蛍光免疫測定素子 Quenchbody の作製, 第 100 次日本法医学会学術全国集会, 2016, 東京都.

〔その他〕(計 1 件)

物質・デバイス領域共同研究拠点 顕著業績

http://five-star.tagen.tohoku.ac.jp/results/distinguished_achievements.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森岡弘志

ローマ字氏名：Morioka Hiroshi

研究協力者氏名：上田宏

ローマ字氏名：Ueda Hiroshi

研究協力者氏名：山口佳宏

ローマ字氏名：Yamaguchi Yoshihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。