

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590576
 研究課題名（和文）ナノ抗体を分子認識単位とする生理活性ハプテンの高感度モニタリングシステムの開発
 研究課題名（英文）Development of monitoring systems for bioactive haptens with high sensitivity using "nano-antibodies" as a molecular recognition unit
 研究代表者
 小林 典裕 (KOBAYASHI NORIHIRO)
 神戸薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：90205477

研究成果の概要：

生体内生理活性物質の正確な測定は臨床化学の基盤であるが、低分子化合物（ハプテン）の高感度測定は高分子化合物に比べて難しい。新しい分子認識単位として、“ナノ抗体”、すなわち、単ドメイン抗体（single-domain antibody; sdAb）を導入することで、ハプテンの高感度モニタリングが可能と期待される。sdAbとは、ラクダの“H鎖抗体”の変部ドメイン（V_HH）あるいはそれを模倣したタンパク質で、抗原結合能を保持する最小の抗体フラグメントである。以上の観点から、ステロイドをモデルハプテンとしてマウス抗体の変部ドメイン（V_HまたはV_L）を基本構造とするsdAbを遺伝子工学的に作成し、そのハプテン結合能を検討した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ナノ抗体、単ドメイン抗体、分子認識、ハプテン、エストラジオール、イムノメトリックアッセイ

1. 研究開始当初の背景

生体内のごく微量の生理活性物質を正確に測定することは臨床化学の基盤である。この目的には抗原抗体反応を利用する免疫測定法が広く用いられているが、低分子化合物(ハプテン)の高感度測定は、高分子化合物のそれに比べて難しく、subfemtomole レベルの測定を可能とする新たな方法論の開発が待たれていた。

2. 研究の目的

ハプテンの免疫測定法は競合法により行われているが、その測定感度は用いる抗ハプテン抗体の親和力に厳しく制約される。高分子化合物の超高感度測定法として定着している非競合型サンドイッチアッセイは、ハプテンの分子サイズが小さく、同時に2つの抗体が結合できないため応用することは困難である。

測定対象のハプテンを、ハプテンと結合する何らかの受容体との複合体としたのち、複合体を特異的に認識するが受容体自体とは反応しない抗体で複合体の生成量をモニターすればハプテンの高感度な測定が可能と期待される(図1)。

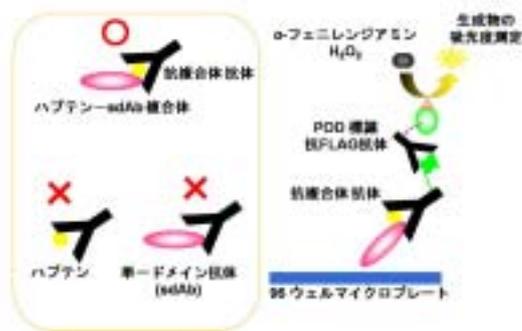


図1. SdAbを活用するハプテンのイムノメトリックアッセイ

このような抗複合体抗体を得るためには、受容体の分子量はできるだけ小さいほうが有利である(ハプテンの結合前後での立体構造の変化が大きいため)。SdAbは抗原結合能を示す最小の抗体フラグメント(分子量15,000-18,000)であり、上記の受容体として利用可能と期待される。

以上の観点から、エストラジオール-17β(E₂)とジゴキシン(Dig)を標的ハプテンとするsdAbを調製し、その有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) "野生型" 抗ステロイド単ドメイン抗体の調製と諸性質

先に我々がクローニングしたマウス抗E₂抗体由来の一本鎖Fvフラグメント(single-chain Fv fragment; scFv) (scFv#E4-4)に含まれるH鎖可変部ドメイン(V_H)の遺伝子をPCRにより増幅し、同時にその5'末端にFLAG配列、3'末端にHis6、c-Myc配列と終止コドンが付加した。他方、マウス抗ジゴキシン(Dig)抗体産生ハイブリドーマから総RNAを抽出し、RT-PCRによりV_H遺伝子をクローニングし、その両末端に同様の修飾を加えた(図2)。

これら遺伝子断片を発現ベクターpEXmide 5へ組み込んだのち大腸菌XL1-Blueに導入し、“野生型”の(マウスV_Hそのものから成る)sdAb(E₂-sdAb-V_H, Dig-sdAb-V_H)(図2)を得た。また、scFv#E4-4のL鎖可変部ドメイン(V_L)の遺伝子を同様にクローニングし、5'末端にFLAG配列、3'末端にV5タグ配列と終止コドンが付加して、V_L型のsdAb(E₂-sdAb-V_L)を調製した(図2)。

これらアフィニティー精製したのち、そのハプテン結合能をELISAにより評価した。すなわち、E₂-ウシ血清アルブミン(BSA)またはBSAを固定化したマイクロプレートにsdAbを添加し、固相に結合したsdAbをペルオキシダーゼ(POD)標識抗FLAG抗体を用いて検出した。

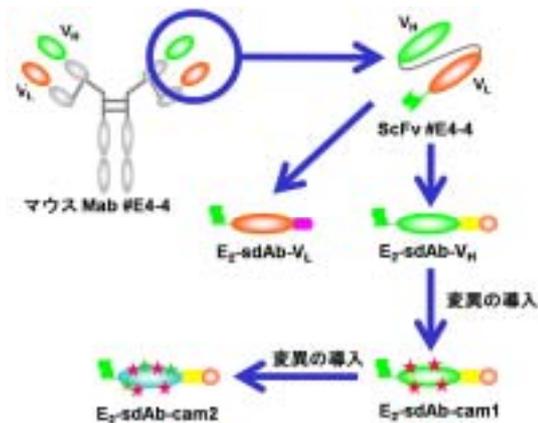


図2. SdAb調製の過程

(2) "ラクダ化" 単ドメイン抗体の調製と諸性質

E₂-sdAb-V_Hの枠組み配列(framework region; FR)2の4カ所のアミノ酸(37V, 44R, 45L, 47W; マウスIgGで保存性が高く、L鎖と

の会合に働く)を、それぞれ、ラクダ V_{H1} に特有のアミノ酸 (それぞれ F, E, R, G) に置き換えるために、 E_2 -sdAb- V_{H1} に部位特異的な変異を加えた。これを大腸菌内で発現させてラクダ化 sdAb (E_2 -sdAb-cam1) を調製した (図 2)。

ところで、これまで、カフェインやメトトレキサートなどのハプテンに対する sdAb の調製が数例報告されているが、いずれもラマをハプテン-キャリアー結合体で免疫し、その末梢リンパ球から V_{H1} 遺伝子をクローニングして調製されたものである。これらは、ハプテンに対して十分な親和力 ($K_a = 10^6 \sim 10^7$ L/mol) を示すが、上記の 4 カ所以外にも、特有のアミノ酸置換が認められる。この点を考慮して、さらに 22 カ所のアミノ酸を置換した遺伝子を設計し、その全長を化学合成オリゴ DNA から構築した。これを大腸菌に発現させることにより、 E_2 -sdAb-cam2 を調製した (図 2)。

4. 研究成果

(1) "野生型" 抗ステロイド単ドメイン抗体の調製と諸性質

ELISA において、Dig-sdAb- V_{H1} (V_{H1} サブグループは IIA) は明瞭な Dig 結合能を示さなかったが、 E_2 -sdAb- V_{H1} (V_{H1} サブグループは IIIID; ラクダ V_{H1} はサブグループ IIIID に類似のアミノ酸配列を持つ) では E_2 基に対する結合能が認められた (図 3A)。

V_L を分子認識単位とする sdAb については、Dig-sdAb- V_L では Dig 基への特異性が不十分であったが、 E_2 -sdAb- V_L では、 E_2 基に特異的な結合が認められた (図 3B)。

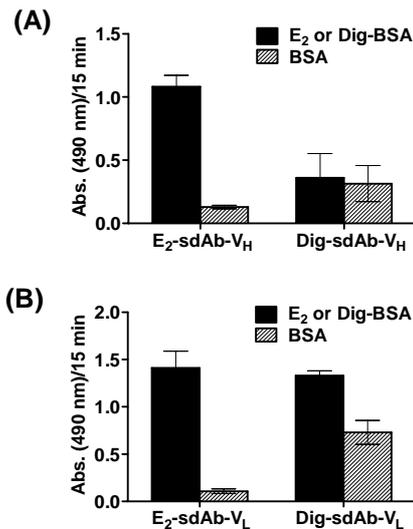


図 3. ELISA による "野生型" 抗ステロイド sdAb のハプテン基への結合能

E_2 または Dig のウシ血清アルブミン (BSA) 結合体、または BSA を固定化したマイクロウェルに、(A) E_2 -sdAb- V_{H1} (125 ng) または Dig-sdAb- V_{H1} (5 μ g) を、37

で 1 時間反応させた。ウェルに結合した sdAb を、ペルオキシダーゼ (POD) 標識抗 FLAG 抗体を用いて検出した。(B) E_2 -sdAb- V_L (5 μ g) を同条件で反応させ、結合した sdAb を、POD 標識抗 FLAG 抗体を用いて検出した。

一般に、同一の抗体分子から調製された V_{H1} と V_L のフラグメントは溶液中で会合して、より大きな抗原結合能をもつ Fv フラグメントを形成する。そこで次に E_2 -sdAb- V_{H1} と E_2 -sdAb- V_L を共存させて E_2 基に対する結合能を調べたところ、いずれかを単独で加えた場合に比べて著しく増強した (図 A, B)。

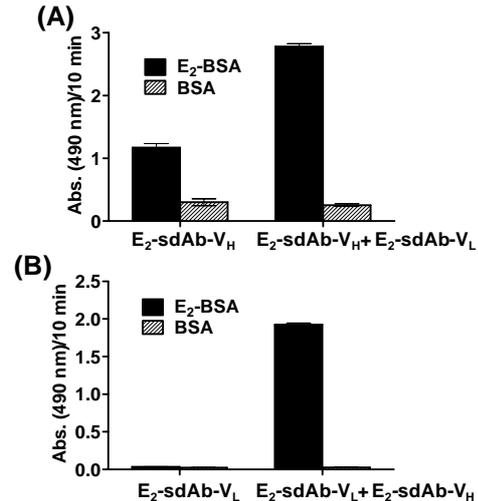


図 4. ELISA による E_2 -sdAb- V_{H1} と E_2 -sdAb- V_L の共存効果の検討

図 3 と同様に ELISA を行った。(A) E_2 -sdAb- V_{H1} (25 pmol) 単独、または等しい物質量の E_2 -sdAb- V_L と共に反応させ、結合した sdAb を POD 標識抗 c-Myc 抗体を用いて検出した。(B) E_2 -sdAb- V_L (25 pmol) 単独、または等しい物質量の E_2 -sdAb- V_{H1} と共に反応させ、結合した sdAb を POD 標識抗 V5 抗体を用いて検出した。

また、 E_2 -sdAb- V_{H1} の結合特異性に検討を加えた (図 5)。 E_2 , Digに加え、コルチゾール (Cs), デオキシコル酸 (DCA), コル酸 (CA), テストステロン (Ts) に対する反応性を比較したところ、Cs, DCA, CA の各ステロイド基と大きく交差反応し、 E_2 基に対する特異性が損なわれていることが判明した。しかし、 E_2 -sdAb- V_L を共存させた場合、抗 E_2 -scFv と同様の E_2 特異性を示した。このことから、これら sdAb が由来する抗 E_2 -scFv では、特異性の発現に関しても V_L が重要な役割を果たしていることが示された。

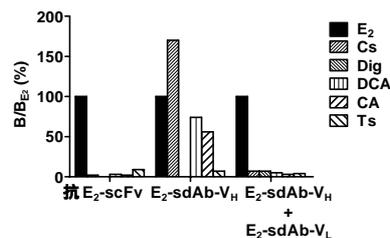


図5. 抗E₂抗体フラグメントの特異性

E₂, Dig, Cs, DCA, CA, Ts の各 BSA 結合体を固定化したマイクロウェルに, E₂-sdAb-V_H (30 pmol) を単独で, または E₂-sdAb-V_L (30 pmol) と共に反応させた. ウェルに結合した sdAb を図4と同様に検出した. 比較のため, 抗 E₂-scFv (30 pmol) についても同様の反応を行った.

(2) "ラクダ化" 単ドメイン抗体の調製と諸性質

上記の sdAb は, マウス V_H そのものを構成単位とするため, 水溶液中での安定性や大腸菌内での発現量 (図6) などに解決すべき問題が残されている. そこで, 部位特異的変異導入により "ラクダ化" を行い, より実用的な sdAb 分子種の創製を試みた.

得られたラクダ化 sdAb (E₂-sdAb-cam1) は, 野生型の E₂-sdAb-V_H と同等の E₂ 結合能を示したものの (図6), 大腸菌内での発現量には大きな改善がみられなかった (図7).

そこで, 既存のラマ由来抗ハプテン抗体のアミノ酸配列にみられる特有の変異をさらに導入した E₂-sdAb-cam2 遺伝子を化学合成オリゴ DNA から構築した. その産物の発現量は, E₂-sdAb-V_H, E₂-sdAb-cam1 に比べて著しく増大し (図6), アミノ酸置換の効果が認められた. しかし, E₂ 基に対する結合能は低下し (図7), この点の改善が必要と思われた.

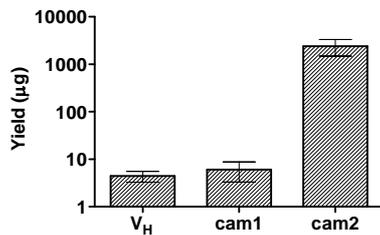


図6. E₂-sdAb の発現量

野生型 E₂-sdAb-V_H (V_H), ラクダ化 E₂-sdAb-cam1 (cam1) および cam2 (cam2) の, 遺伝子保持菌培養液 100 mL 当たりの発現量 [ペリプラズム画分から得られた質量 (µg)] を比較した.

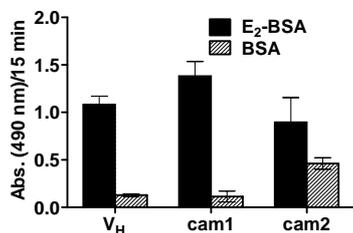


図7. 野生型およびラクダ化 E₂-sdAb の E₂ 基への結合能

図3と同様に ELISA を行った E₂-sdAb-V_H (V_H; 125 ng), E₂-sdAb-cam1 (cam1; 62.5 ng), E₂-sdAb-cam2 (cam2; 25 µg) を反応させたのち, POD 標識抗 FLAG 抗体で検出した.

(4) 総括

マウス V_H, V_L に基づく抗ハプテン sdAb

の調製例は皆無に等しい. 本研究で得られた "野生型" の E₂-sdAb-V_H, E₂-sdAb-V_L は E₂ 基に対する結合能を示し, 低分子量分子認識単位への発展性が示唆された. E₂-sdAb-V_H を "ラクダ化" した E₂-sdAb-cam2 は, 大腸菌内での発現量については満足しうるものであったが, E₂ 基に対する結合能は低下していた. 今後, E₂ 基への結合能を損なうことなく発現量を向上させるために, ここで導入した各アミノ酸置換の効果を吟味する必要があるだろう. さらに, その相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) にランダム変異を加えてライブラリーを作成することで, ハプテン結合能, 発現量, 安定性のいずれにも優れ, ハプテンのイムノメトリックアッセイを可能にする sdAb が得られることを期待する.

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 13 件)

- 1) T. Niwa, T. Kobayashi, P. Sun, J. Goto, H. Oyama, N. Kobayashi : An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol based on idiotypic-anti-idiotypic reactions. Anal. Chim. Acta, 638, 94-100 (2009) (査読有).
- 2) N. Kobayashi, H. Oyama, M. Nakano, T. Kanda, E. Banzono, Y. Kato, T. Karibe, T. Nishio, J. Goto : "Cleavable" hapten-biotin conjugates: Preparation and use for the generation of anti-steroid single-domain antibody fragments. Anal. Biochem., 387, 257-266 (2009) (査読有).
- 3) J. Koyama, A. Takeuchi, C. Tode, M. Shimizu, I. Morita, M. Nobukawa, M. Nobukawa, N. Kobayashi : Development of an LC-ESI-MS/MS method for the determination of histamine: Application to the quantitative measurement of histamine degranulation by KU812 cells. J. Chromatogr. B, 877, 207-212 (2009) (査読有).
- 4) N. Kobayashi, Y. Kato, H. Oyama, S. Taga, T. Niwa, P. Sun, M. Ohtoyo, J. Goto : Anti-estradiol-17β single-chain Fv fragments: Generation, characterization, gene randomization, and optimized phage display. Steroids, 73, 1485-1499 (2008) (査読有).
- 5) J. Koyama, I. Morita, N. Kobayashi, T. Konoshima, M. Takasaki, T. Osakai, H. Tokuda : Correlation between oxidation potentials and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of flavonoids. Cancer Lett., 263, 61-66 (2008) (査読有).
- 6) J. Koyama, Y. Nishino, I. Morita, N.

Kobayashi, T. Osakai, H. Tokuda : Correlation between reduction potentials and inhibitions of Epstein-Barr virus activation by anthraquinone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 4106-4109 (2008) (査読有).

- 7) 小高謙一, 上原知也, 小林典裕, 今中恭子, 荒野 泰, 棚田修二, 入江俊章 : 臨床応用に向けたラジオアイソトープ標識抗テネインC低分子化抗体の開発 : 抗体2種類の同時静注による検討. *INNERVISION*, 22, 21-21(2007) (査読無).
- 8) 小林典裕 : アップコンバージョン FRET を利用するハプテンの高感度ホモジニアス イムノアッセイ. *臨床化学*, 36, 251-251 (2007) (査読無).
- 9) 小林典裕, 加藤芳徳, 大山浩之, 後藤順一 : 低分子化抗体フラグメント ---バイオメディカル分析化学における新しい分子認識単位---. *臨床化学*, 36, 125-139 (2007) (査読無).
- 10) 小林典裕 : 新たな分子認識システムを活用する生体成分分析の試み. *臨床化学*, 36, 99-100 (2007) (査読無).
- 11) 小林典裕, 加藤芳徳, 大山浩之, 後藤順一 : 抗体工学を基盤とする超高感度ハプテンイムノメトリックアッセイへのアプローチ. *YAKUGAKU ZASSHI*, 127, 55-69 (2007) (査読有).
- 12) 小林典裕, 後藤順一 : 抗体工学が推進する精密分子認識の新たな展開. *YAKUGAKU ZASSHI*, 127, 41-42 (2007) (査読無).
- 13) J. Koyama, I. Morita, N. Kobayashi : Simultaneous determination of anthraquinones in rhubarb by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1145, 183-189 (2007) (査読有).

[学会発表](計 22 件)

- 1) 森田いずみ, 小山淳子, 清水真希, 小林典裕, 信川真智子, 信川真貴子 : LC-APCI-MS/MS による *Taxus yunnanensis* の成分研究. 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009 年 3 月 27 日.
- 2) 小山淳子, 森田いずみ, 小林典裕, 岩佐衣子, 守安正恭 : プロトベルベリン型アルカロイドの生物活性と還元電位との相関性について. 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009 年 3 月 27 日.
- 3) 中野正典, 番園恵理佳, 大山浩之, 小林典裕 : 可溶性抗ステロイド単ドメイン抗体の調製と諸性質. 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009 年 3 月 26 日.
- 4) 小林典裕, 多賀詩織, 大山浩之, 加藤芳徳 : 変異抗体フラグメントを用いるエストロジオール免疫測定法の感度と特異性.

日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009 年 3 月 26 日.

- 5) 清水真希, 小山淳子, 竹内敦子, 森田いずみ, 小林典裕, LC-APCI-MS/MS を用いたエモジンの Raji 細胞内代謝物の同定. 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009 年 3 月 26 日.
- 6) 大山浩之, 小林典裕 : 抗ステロイド抗体 scFv の抗原結合活性に及ぼす枠組み領域置換の効果. 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009 年 3 月 26 日.
- 7) 大山浩之, 小林典裕 : 抗体工学による抗ハプテン抗体の親和力成熟と高感度免疫測定法への応用. 次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 2009 (大阪), 2009 年 3 月 24 日.
- 8) 小山淳子, 森田いずみ, 小林典裕, 徳田春邦 : プロトベルベリン類による Epstein-Barr virus 活性抑制と還元電流との相関性について. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋), 2008 年 10 月 29 日.
- 9) 清水真希, 小山淳子, 竹内敦子, 森田いずみ, 小林典裕, LC/ESI-MS による KU812 細胞由来ヒスタミンならびに生体アミン類の分析. 第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (神戸), 2008 年 10 月 25 日.
- 10) 小林典裕 : 教育講演 1. 免疫測定法の実際 : 特異抗体の創製を中心に (招待講演). 第 48 回日本臨床化学会年次学術集会 (浜松), 2008 年 8 月 29 日.
- 11) 中野正典, 大山浩之, 番園恵理佳, 加藤芳徳, 小林典裕 : Cleavable ビオチン標識ハプテンを用いる抗エストロジオール変異単ドメイン抗体の調製. 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008 年 3 月 28 日.
- 12) 大山浩之, 中野正典, 多賀詩織, 加藤芳徳, 小林典裕 : 抗エストロジオール "camelized" 単ドメイン抗体の調製. 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008 年 3 月 28 日.
- 13) 加藤芳徳, 大山浩之, 小林典裕, 後藤順一 : 抗体工学的アプローチによる高親和力抗ステロイド抗体創製の試み (シンポジウム). 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008 年 3 月 27 日.
- 14) 森田いずみ, 小山淳子, 小林典裕 : トゲバンレイシ *Annona muricata* の成分研究. 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008 年 3 月 26 日.
- 15) 小山淳子, 竹内敦子, 森田いずみ, 小林典裕, 信川真智子, 守川耕平, 岡野哲郎 : 新規アレルギー活性成分の検索を目的とする LC/ESI-MS による KU812 細胞由来ヒスタミンの定量. 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008 年 3 月 26 日.
- 16) 小林典裕 : 免疫測定法の基礎と先端. 第 47 回日本臨床化学会年次学術集会・第 54 回日本臨床検査医学会学術集会連合大会 (大阪), 2007 年 11 月 23 日.

- 17) 加藤芳徳, 大山浩之, 小林典裕, 後藤順一 : CDR shuffling を活用する高親和力変異抗エストロジオール抗体フラグメントの探索. 第 59 回日本生物工学会大会 (広島), 2007 年 9 月 27 日.
- 18) 小山淳子, 森田いずみ, 小林典裕, 矢守隆夫 : ヘテロキノン化合物のがん細胞増殖抑制効果と還元電位の相関性について. 日本薬学会第 127 年会 (富山), 2007 年 3 月 30 日.
- 19) 西野 悠, 小山淳子, 竹内敦子, 森田いずみ, 小林典裕 : LC/APCI-MS を用いたエモジンの Raji 細胞内代謝物について. 薬学会第 127 年会 (富山), 2007 年 3 月 29 日.
- 20) 加藤芳徳, 矢吹玲子, 小林典裕, 後藤順一 : 高感度イムノメトリックアッセイに適する一本鎖 Fv フラグメント-酵素融合タンパク質調製の試み. 薬学会第 127 年会 (富山), 2007 年 3 月 29 日.
- 21) 大山浩之, 山本真由美, 加藤芳徳, 小林典裕, 後藤順一 : 高感度イムノメトリックアッセイの開発を目的とする変異型抗エストロジオール単ドメイン抗体の探索. 薬学会第 127 年会 (富山), 2007 年 3 月 29 日.
- 22) 神田龍明, 大山浩之, 加藤芳徳, 小林典裕, 後藤順一 : Cleavable ビオチン標識ハプテンを活用する高親和力抗コルチゾール変異抗体創製の試み. 薬学会第 127 年会 (富山), 2007 年 3 月 29 日.

〔図書〕(計 7 件)

- 1) 小林典裕 : 薬学分析科学の最前線, 日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編, じほう, 2009, 総ページ数 2 (pp. 150-151).
- 2) 小林典裕 : スタンダード薬学シリーズ 2. 物理系薬学 IV. 演習編, 日本薬学会編, 東京化学同人, 2008, 総ページ数 5 (pp. 157-159, pp. 165-166).
- 3) 小林典裕 : ベーシック薬学教科書シリーズ 2. 分析科学, 萩中 淳編, 化学同人, 2007, 総ページ数 57 (pp. 79-99, pp. 255-290).
- 4) 小林典裕 : NEW 薬品分析化学, 小林典裕, 藤井洋一編, 廣川書店, 2007, 総ページ数 309.
- 5) 小林典裕 : NEW 薬学機器分析, 伊藤允好, 萩中 淳, 和田昭盛編, 廣川書店, 2007, 総ページ数 24 (pp. 85-90, pp. 269-286).
- 6) 小林典裕 : コアカリ対応分析化学, 前田昌子, 今井一洋編, 丸善, 2007, 総ページ数 50 (pp. 121-123, pp. 242-250, pp. 381-418).
- 7) 小林典裕, 島田和武 : パートナー分析化学 II, 山口政俊, 升島 努, 斎藤 寛, 能田均編, 南江堂, 2007, 総ページ数 15 (pp. 253-267).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 典裕
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 90205477

(2) 研究分担者

小山 淳子
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号 60027092

森田 いずみ
神戸薬科大学・薬学部・助手
研究者番号 20299085

加藤 芳徳
神戸薬科大学・薬学部・助手
研究者番号 10368491
(退職に伴い, 2008 年度は離脱)

(3) 連携研究者

なし

