

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20360368

研究課題名（和文）ペプチドの非競合検出系による生物計測の新展開

研究課題名（英文）Developments in biological assays by a noncompetitive detection of peptides

研究代表者

上田 宏 (UEDA HIROSHI)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：60232758

研究成果の概要（和文）：可変領域 Fv を材料として各種 Fv の安定性が抗原の有無で変わることを利用した免疫測定法であるオープンサンドイッチ(OS)法を利用して、通常のサンドイッチ法では検出が困難な、低分子ペプチドの高感度な非競合検出系を創出することを目的とした。新規開発した Fab 断片ファージ提示法を利用することで、甲状腺ホルモンであるチロキシン、高病原性インフルエンザウィルスペプチドについてハイブリドーマ細胞を用いず免疫マウスから直接 OS 法に適した抗体を取得することに成功した。さらに、OS 法の原理に基づき抗ペプチド抗体の親和性を未修飾の抗原を用いて向上させる OS-selection 法により、オステオカルシンペプチドの検出感度を数百倍に向上させた。

研究成果の概要（英文）：Using an immunoassay that utilizes the antigen-dependent stabilization of antibody variable (Fv) regions (Open-sandwich immunoassay, OS-IA), we attempted to create systems for non-competitive sensitive detection of small molecular peptides, which was not measurable by conventional sandwich assays. Bypassing hybridoma, by utilizing newly developed phage display system for antibody Fab fragments, we succeeded in directly obtaining good antibodies for OS-IA from conjugate-immunized mice with thyroxine and an antigenic peptide from highly pathogenic influenza virus as antigens. Moreover, by OS-selection which is a method for affinity maturation using unconjugated small molecule antigens based on the OS-IA principle, we could improve the sensitivity for osteocalcin peptide by several hundred fold.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究代表者の専門分野：蛋白質工学・抗体工学
 科研費の分科・細目：プロセス工学（生物・生体工学）
 キーワード：生物・生体工学、分析科学、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの科学研究費課題研究等において、可変領域 Fv を材料として各種 Fv の安定性が抗原の有無で変わることを利用した免疫測定法の可能性を世界に先駆け実証してきた (Ueda et al., *Nat. Biotechnol.* **14**, 1714 (1996))。この方法 (V_H と V_L の上に抗原が乗った複合体を用いるのでオープンサンドイッチ法あるいは OS 法と呼ぶ) の感度と測定濃度域の広さは既存のサンドイッチ法に匹敵し、さらに抗体を一種類しか用いないので原理的に 1) 単一エピトープしかない低分子の非競合測定が可能で、かつ 2) 結合・洗浄ステップが各一回ずつですみ迅速に測定が可能である。

今回の基盤領域研究においては、この OS 法を特に「ペプチド認識抗体」に応用することで、ペプチドおよびその親タンパク、更なるリン酸化やメチル化などの化学修飾およびプロセッシングを高感度かつ簡便に検出する強力な手段としたいと考え研究を進めた。

2. 研究の目的

抗体可変領域 (Fv) 断片の抗原による安定化を利用した新原理免疫測定法を利用して、ペプチドの網羅的な高感度検出系を作製することを目的とした。また、実用化をにらみ、抗体産生ハイブリドーマを用いた OS-ELISA 用融合タンパク発現系構築を目ざした検討も行った。

3. 研究の方法

今回新たに開発した、従来より安定な提示が可能な Fab 断片ファージ提示法 pDong システム (Ref. 13, Fig. 1) を用いて、ペプチド性抗原について OS 法に最適な抗体断片を得る。この際用いる抗体遺伝子の材料としては、抗原コンジュゲートで免役したマウスより脾臓細胞を回収し、これより mRNA を抽出したもの、および大規模非免疫 (Naïve) 抗体ライブラリを用意した。

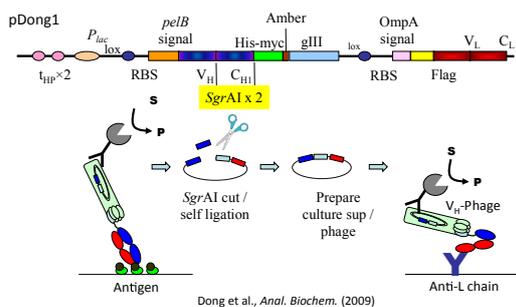


Fig. 1. pDong システムの模式図

4. 研究成果

(1) ファージライブラリからの甲状腺ホルモンの高感度検出系の構築

血液中の甲状腺ホルモン (Thyroxine, T4) 量は甲状腺疾患の診断マーカーとして重要であり、その簡便迅速な測定系の確立は最近の放射能不安解消の観点からも急務といえる。我々は、pDong システムを用いたライブラリ選択のモデルとして、免疫マウスより T4 の高感度な OS-ELISA に適した抗体を選択することに成功した。これは、ハイブリドーマを介さず OS 法に適した抗体を選択した初めての例である。さらに、ここで得られた抗体をマイクロ流路検出系に用いて、数マイクロリットルのサンプルより 20 分以内で血清中の T4 濃度を測定することに成功した (Refs. 2, 5)。

(2) ランダム化した V_H ドメインを提示するファージを、磁気ビーズに固定化した V_L ドメインに対して微量の抗原ペプチド存在下で選択するオープンサンドイッチ選択法 (Fig. 2) により、従来より数百倍高感度に骨疾患マーカーである BGP ペプチドを検出可能な親和性成熟した抗体の取得に成功した (Ref. 4)。これは抗原キャリア複合体を用いない新しい低分子認識抗体選択法であり、真にその分子を認識する抗体を選択可能である。現在他の低分子認識抗体においても良い結果を得つつある。

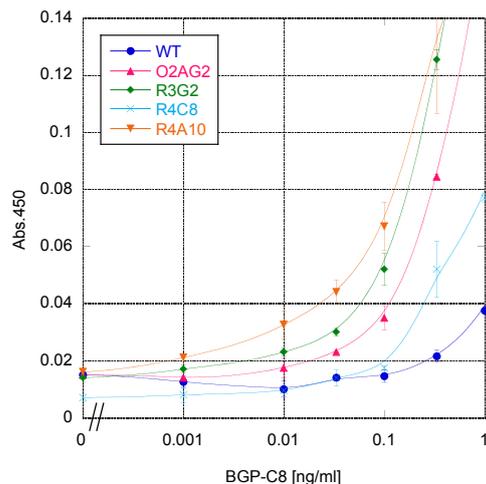


Fig. 2. OS 選択法による親和性成熟。OS-ELISA で顕著な感度向上が見られた。

(3) インフルエンザウイルス抗体の取得 高病原性 (H5N1) トリインフルエンザウイルス

スは、現在特に迅速高感度な診断を要するターゲットである。そこで東京都臨床医学研究所の芝崎博士、内藤博士らと共同で、ウィルスの表面蛋白質ヘマグルチニン (H5-HA) ペプチドで免疫したマウス由来抗体ライブラリをpDongシステムで作製し、ここから、このペプチドに特異的に結合する抗体を多数取得した。さらにこれらを用いて、HA蛋白質ペプチドの高感度なOS-ELISA実施に成功した。

さらに、GFP-HA融合蛋白質を発現するモデル感染細胞染色の実験で、これらの抗体が細胞内のHAとも結合することが確認された。現在実際の感染細胞でのウィルス粒子の検出をImmunoPCR法との組み合わせを含めて検討している (未発表)。

その他ヒト型を含む各種非免疫ライブラリからの特異的抗体取得の試みを、現在進行中である。

(4) 動物細胞でのOS法用抗体酵素の発現

動物細胞での抗体-分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 融合タンパク質発現系に成功した (Ref. 3)。また、相同組換えベクターを抗原NP特異的IgM産生細胞J (V μ 1) に導入し、抗生物質にて選択することで高効率に抗体IgM定常領域遺伝子をSEAP遺伝子に置き換えることに成功し、Fd-SEAPキメラmRNAの検出とFab-AP蛋白質のELISAおよびWestern blotによる検出に成功した (未発表)。またRNAレベルでの組換えとして、抗NP IgMとSEAPをコードするpre-mRNA同士のtrans-splicing (TS)を試み、COS-1細胞を用いたモデル系でTS由来キメラmRNAの検出と、V μ -SEAPならびにFab-SEAP蛋白質のELISAによる検出に成功した (Fig. 3, Ref. 10)。最後にL鎖融合蛋白質発現法により複数のIgM抗体産生細胞を用いて酵素抗体融合蛋白質の発現に成功した。具体的にはがん細胞認識IgM抗体にルシフェラーゼ融合L鎖を導入発現させ、細胞内でIgMを酵素標識し、がん細胞を特異的に発光検出することに成功した (未発表)。今後それぞれの系に更に改良を加え、汎用性を示していきたい。

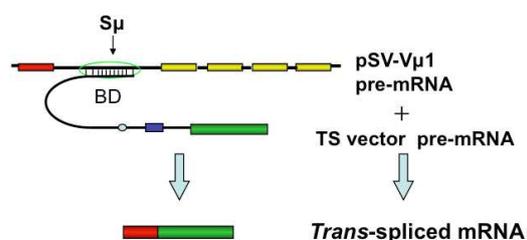


Fig. 3. トランスプライシングによる抗体融合タンパク質発現の模式図

(5) 2種類の低分子認識抗体可変領域と円順列変異 β ラクタマーゼとの融合タンパクFv-cpBLAを作製し、抗原添加により酵素活性が上昇する一種の人工アロステリック酵素であることを確認した (Ref. 1, 特許出願済み)。今後、簡便迅速な免疫診断素子としての利用が期待される。

(6) この他、各種低分子のOS法構築とその迅速高感度検出への応用 (Refs. 6, 8, 12, 15, 17-18)、カイコでのヒト抗体発現に関する研究 (Refs. 9, 11)、分子シャペロンによるアミロイド前駆体形成に関する研究 (Ref. 14)、新規蛍光ナノ粒子のがん細胞可視化への応用 (Ref. 7)などの研究を行った。

また予定外の成果として、抗原結合により蛍光が増大する新規蛍光標識抗体断片 Quenchbodyの開発と、ホタル発光酵素変異体同士の機能的相補を利用した新規蛋白質間相互作用検出系の構築に成功した (未発表)。

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 18 件)

1. M. Kojima, H. Iwai, J. Dong, S.-L. Lim, S. Ito, K. Okumura, M. Ihara, and H. Ueda "Activation of circularly permuted β -lactamase tethered to antibody domains by specific small molecules" *Bioconj. Chem.* (査読有) 22, 633-641 (2011).
2. K.N. Islam, M. Ihara, J. Dong, N. Kasagi, T. Mori, and H. Ueda "Direct construction of an open-sandwich enzyme immunoassay for one-step noncompetitive detection of thyroid hormone T4" *Anal. Chem.* (査読有) 83, 1008-1014 (2011).
3. Y. Sasajima, R. Iwasaki, K. Tsumoto, I. Kumagai, M. Ihara, and H. Ueda "Expression of antibody variable region-human alkaline phosphatase fusion proteins in mammalian cells" *J. Immunol. Methods* (査読有) 361, 57-63 (2010).
4. H. Iwai, B. Oztürk, M. Ihara, and H. Ueda "Antibody affinity maturation in vitro using unconjugated peptide antigen" *Protein Eng. Des. Sel.* (査読有) 23, 185-193 (2010).
5. K.N. Islam, M. Ihara, J. Dong, N. Kasagi, T. Mori, and H. Ueda "Micro open-sandwich ELISA to rapidly evaluate thyroid

- hormone concentration from serum samples" *Bioanalysis* (査読有) 2, 1683-1687 (2010).
6. M. Ihara, A. Yoshikawa, Y. Wu, H. Takahashi, K. Mawatari, K. Shimura, K. Sato, T. Kitamori, and H. Ueda "Micro OS-ELISA: Rapid noncompetitive detection of a small biomarker peptide by open-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (OS-ELISA) integrated into microfluidic device" *Lab. Chip* (査読有) 10, 92-100 (2010).
 7. T. Zako, H. Nagata, N. Terada, A. Utsumi, M. Sakono, M. Yohda, H. Ueda, K. Soga, and M. Maeda "Cyclic RGD Peptide-Labeled Upconversion Nanophosphors for Tumor Cell-Targeted Imaging" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 381, 54-58 (2009).
 8. T. Sakata, M. Ihara, I. Makino, Y. Miyahara, and H. Ueda "Open sandwich-based immuno-transistor for label-free and non-competitive detection of low molecular weight antigen" *Anal. Chem.* (査読有) 81, 7532-7537 (2009).
 9. E. Y. Park, M. Ishikiriya, T. Nishina, T. Kato, H. Yagi, K. Kato, and H. Ueda "Human IgG1 expression in silkworm larval hemolymph using BmNPV bacmids and its N-linked glycan structure" *J. Biotechnol.* (査読有) 139, 108-114 (2009).
 10. R. Iwasaki, H. Kiuchi, M. Ihara, T. Mori, M. Kawakami, and H. Ueda "Trans-splicing as a novel method to rapidly produce antibody fusion proteins" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 384, 316-321 (2009).
 11. M. Ishikiriya, T. Nishina, T. Kato, H. Ueda, and E. Y. Park "Human Single-chain Antibody Expression in the Hemolymph and Fat Body of Silkworm Larvae and Pupae Using BmNPV Bacmids" *J. Biosci. Bioeng.* (査読有) 107, 67-72 (2009).
 12. M. Ihara, T. Suzuki, N. Kobayashi, J. Goto, and H. Ueda "Open-sandwich enzyme immunoassay for one-step noncompetitive detection of corticosteroid 11-deoxycortisol" *Anal. Chem.* (査読有) 81, 8298-8304 (2009).
 13. J. Dong, M. Ihara, and H. Ueda "Antibody Fab display system that can perform open sandwich ELISA" *Anal. Biochem.* (査読有) 386, 36-44 (2009).
 14. M. Sakono, T. Zako, H. Ueda, M. Yohda, and M. Maeda "Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin" *FEBS J.* (査読有) 275, 5982-5993 (2008).
 15. Y. Lee, T. Asami, I. Yamaguchi, H. Ueda, and Y. Suzuki "A new gibberellin detection system in living cells based on VH/VL interaction of antibody" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 376, 134-138 (2008).
 16. M. Kawahara, H. Ueda, and T. Nagamune "Engineering cytokine receptors to control cellular functions" *Biochem. Eng. J.* (査読有) 48, 283-294 (2010).
 17. 伊原 正喜, 上田 宏 "第三の免疫測定法「オープンサンドイッチ法」の開発" *化学工学* (査読有) 72, 486-488 (2008).
 18. 上田 宏 "抗体の二本鎖構造を生かした低分子の非競合的検出法の開発" *化学と生物* (査読有) 46, 252-258 (2008).
- [学会発表] (計6件)
1. 上田 宏 "抗体融合タンパク質を用いた低分子センサーの創出" 第8回日本蛋白質科学会年会, 東京(6/13, 2008)
 2. Hiroshi Ueda, Hiroto Iwai, Bengu Ozturk and Masaki Ihara "Open Sandwich Selection to Improve the Affinity of Anti-Peptide Antibody Using Unconjugated Osteocalcin Peptide" 4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering, Kookmin University, Seoul, Korea (11/22, 2008)
 3. 上田 宏, "オープンサンドイッチ法による低分子免疫測定技術の開発と各種バイオ計測への応用" 酵素工学研究会第62回講演会, 東京大学山上会館 (11/13, 2009)
 4. H. Ueda "Novel methods to produce fusion proteins in mammalian cells: fusions in DNA, RNA and protein levels", APBioChEC 2009, Kobe International Conference Center (11/25, 2009)
 5. H. Ueda, "Quenchbody: An antibody probe that fluoresces upon binding with antigen" Gordon Research Conference on Antibody Biology and Engineering", 2010.3.10, Ventura, CA., USA.
 6. 上田 宏 "蛍光標識抗体断片の消光解消を原理とする新しい免疫化学測定法" 生

物化学的測定研究会第 15 回学術シンポジウム, 2010.11.2, 長岡京市

伊原正喜 (Masaki Ihara)

研究者番号 : 50391868

[図書] (計 2 件)

1. 上田 宏 他 “コンビナトリアルバイオエンジニアリング” 植田充美監修, シーエムシー出版, 2010.
2. 大室 (松山) 有紀, 北岡 優一, 上田 宏 in 細胞周期フロンティア. (eds. 佐方功幸, 稲垣昌樹 & 岸本健雄) 11-17 (共立出版, 2010).

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称 : 抗原濃度測定法
発明者 : 上田 宏・小嶋美樹
権利者 : 科学技術振興機構
種類 : 特許
番号 : PCT/JP2008/002049
出願年月日 : 20 年 7 月 30 日
国内外の別 : 国外

名称 : 抗体を選択するためのベクター
発明者 : 上田 宏・伊原正喜ほか
権利者 : 東京大学・富士フィルム
種類 : 特許
番号 : PCT/JP2009/052944
出願年月日 : 21 年 2 月 13 日
国内外の別 : 国外

○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

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hueda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 宏 (Hiroshi Ueda)

研究者番号 : 60232758

(2) 研究分担者