

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460689

研究課題名(和文) タグ付抗体産生マウスを利用した次世代型高感度抗体チップの開発と応用

研究課題名(英文) Development of high sensitivity antibody protein chip using tagged antibody produced by genetic recombination technology.

研究代表者

古元 礼子 (FURUMOTO, Hiroko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70311818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体チップは網羅的にタンパク質の発現を解析するツールである。本研究ではダイヤモンド様表面加工特殊基板にタグ付蛋白を結合させる技術を利用し、高感度次世代型抗体チップを開発する目的で、遺伝子組み換え技術を用いて免疫グロブリンG(IgG)にタグを付加したモノクローナル抗体の大量産生を行った。タグを導入したIgGを、基板に固定し、基板上でのタグ付抗体の固定状態と抗原検出能を評価し、抗体チップのプロトタイプを作製を試みた。様々な抗原に対する抗体にタグを導入するためには、ゲノム編集技術の応用が必要である。

研究成果の概要(英文)：An antibody chip is a tool used to exhaustively analyze protein expression in full detail. The purpose of this study is to create a new technology for antibody arrays by developing a highly sensitive next generation antibody chip, using the technology where a tagged protein is immobilized on a diamond-like surface treated substrate. Thus, we created a monoclonal antibody where the tag-sequence was added to immunoglobulin G (IgG) using genetic recombination technology. The tag introduced IgG and a control IgG were produced in a cell culture system. Then, they were fixed to the substrate to evaluate the state of the antibody and antigen-detection efficiency on the substrate with or without the tag. As a result, it was confirmed that a tagged-antibodies are high sensitivity, but hundreds of different kind of tagged-antibodies are required for the creation of the antibody array. Therefore, a high-throughput production system of the tagged-antibody, such as genome editing is under trial.

研究分野：生化学

キーワード：蛋白チップ

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景

抗体チップは小型の基板に多数の抗体を固定し、試料中の抗原を網羅的に検出するツールである。現在は研究用製品を中心に開発・販売されているが、今後需要の増加が見込まれる。その核となる技術は抗体の固定方法や抗体に結合した抗原の検出方法で、様々な技術改良がなされている。本研究の目的は表面加工特殊基板にタグ付蛋白を結合させる技術を利用し、産業的に大きな波及効果が期待できる高感度次世代型抗体チップの開発を行うことである。

2. 研究の目的

これまでに作製したタグ付抗体産生遺伝子改変マウスを利用し、タグ付抗体大量生産システムの開発を行う。作製したタグ付抗体数種類を小型のマレイミド基板に固定し、基板上での抗原抗体反応の条件設定を行い、抗体チップのプロトタイプを作製する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスを用いたタグ付抗体の作製

(2) 培養細胞発現系タグ付抗体大量作製方法の改良と評価

(3) タグ付モノクローナル抗体のマレイミド基板への固定条件の検討

(4) 抗体フラグメントのマレイミド基板固定

(5) IgG 軽鎖へのタグの付加
上記方法で行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスを用いたタグ付抗体の作製

タグ付抗体産生マウスを抗原タンパク質(緑色蛍光蛋白質:EGFP)で免疫し、ハイブリドーマを樹立した。得られたハイブリドーマの培養上清を用いて ELISA を行い、目的の抗原を認識するものをスクリーニングした。選択したハイブリドーマの培養上

清を一次抗体に用いてウェスタンブロッティングを行い、抗原認識能の高いクローンを選択した。選択したハイブリドーマを限界希釈により単クローン化した。単クローン化したハイブリドーマを培養し、タグ付抗体を得ようとしたところ、タグ付抗体産生マウスから得られたハイブリドーマ(膜型 IgG1 クラス)は細胞増殖能が低く、長期間培養することができず、実験に十分な細胞の量が得られなかった。タグ付抗体産生マウスから得られたタグのない抗体のサブクラス(IgG2a と IgG2b)のハイブリドーマは細胞増殖能が高く、長期間培養が可能だったので、遺伝子改変操作でマウスの抗体遺伝子にタグを付けること自体が細胞に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

(2) タグ付抗体大量作製方法新技術の検討

タグ付抗体産生マウスから得られたハイブリドーマ(膜型 IgG1 クラス)は細胞増殖能が低く、長期間培養できず、実験に十分な細胞の量が得られなかったため、最近開発された培養細胞発現系の大量発現システムによる組み換え型タグ付抗体の作製を行い、実験に十分な量の抗体が得られるか検討した。Exp293F 細胞を用い、IgG 重鎖と IgG 軽鎖の発現ベクターをトランスフェクションし、37℃ で震盪培養を行い、3日後に培地を回収した。培地を遠心分離して細胞成分を除去し、プロテイン G カラムで IgG 分画の回収を行った収量は図の通りである。

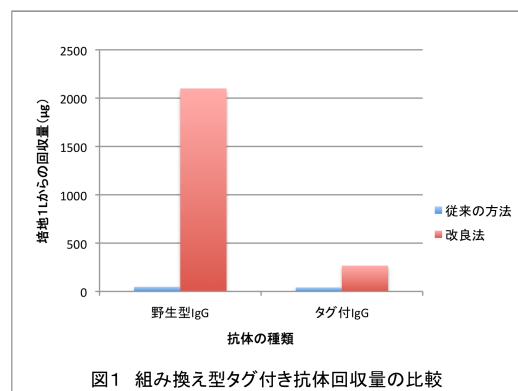


図1 組み換え型タグ付き抗体回収量の比較

従来の培養細胞発現系と比較すると、6 倍から 40 倍の回収量が得られた。

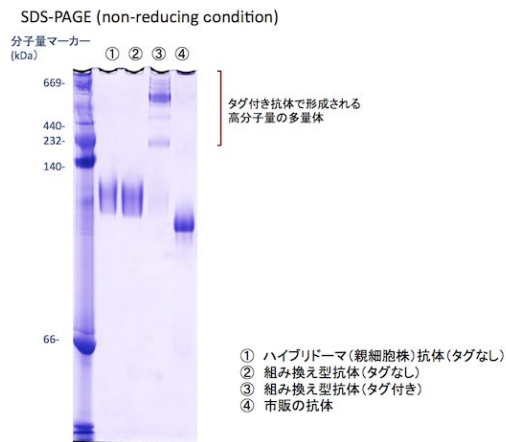


図2 組み換え型抗体のSDS-PAGEによる評価

得られた試料を SDS-PAGE で純度と分子量の評価を行ったところ、タグ付き抗体では高分子のバンドが出現し、抗体同士が高分子体を形成することが推定された(図2)。質量分析計で分子量を解析したところ、通常4量体の抗体が8量体以上の分子量を示したので、タグ同士の結合による多量体形成と明らかとなった。この多量体形成の原因が培養細胞で発現させる組み換え抗体のためなのか、抗体の精製の段階で自然に起きる酸化反応で生じるのかは不明である。タグ付き抗体のタグ同士が結合すると、タグを介して基板に固定することが困難になる可能性があるため、タグの位置を再検討することとした。

(3) タグ付モノクローナル抗体のマレイミド基板への固定条件の検討

培養細胞発現系で作製したタグ付モノクローナル抗体をマレイミド基板へ固定し、蛍光抗体法で固定状態を確認したところ、タグ付き抗体では、IgG 軽鎖に対する抗体で検出レベルが高く、抗原認部位が多数表面に露出していることが示唆された。また、抗原である EGFP の検出もタグ付き抗体が最も高い感度を示した。一方、タグの無い抗体もマレイミド基板に固定され、軽鎖抗

体分子に含まれるシステインを介して基板に固定されると考えられた(図3、4)。抗体分子を基板に固定するためにはタグ以外のシステイン残基が少ない方が適していると考えられ、検討課題となった。

(4) 抗体フラグメントのマレイミド基板固定

マレイミド基板へ固定するタンパク質は小分子のほうが適していることから、抗体フラグメントを作製し、フラグメント化した抗体もマレイミド基板に固定されるか検討した。抗体(免疫グロブリン)を消化酵素で処理し、Fab と F(ab')₂ を作製し、whole の抗体と小分子の抗体のどちらが基板の固定に適しているか検討した。抗体のサブクラスのうち、一般的に使用されるマウス IgG1、IgG2a、IgG2b についてフラグメント作製を試みたところ、IgG1 はシステイン存在下に Ficin 処理を行い、反応条件を変えることで Fab と F(ab')₂ を特異的に調製することが可能であった。しかし、IgG2a については、ペプシン処理で F(ab')₂ が得られる予定であったが、分子の大きい Fab' と Fc が産生され、2F(ab')₂ は得られなかった。また、IgG2b についても、ペプシン処理で Fab' と Fab/c という不規則な抗体フラグメントが産生された。文献的にも IgG2a と IgG2b は糖鎖付加の影響により、ペプシンやパパインなど消化酵素で不規則なフラグメントが得られることが報告されており、基板に固定するためには均一なフラグメントが望ましいので、IgG2a と IgG2b は適しないと判断した。作製した IgG1 由来の Fab と F(ab')₂ をそれぞれマレイミド基板に固定し、免疫蛍光抗体法で観察を行ったところ、Fab と F(ab')₂ は IgG1 完全分子と同様にマレイミド基板に固定された。また、Fab と F(ab')₂ は IgG1 軽鎖に対する抗体で IgG1 完全分子よりも強く検出されたので、抗原認識部位が表出している可能性が示唆された

(図 3、 4)

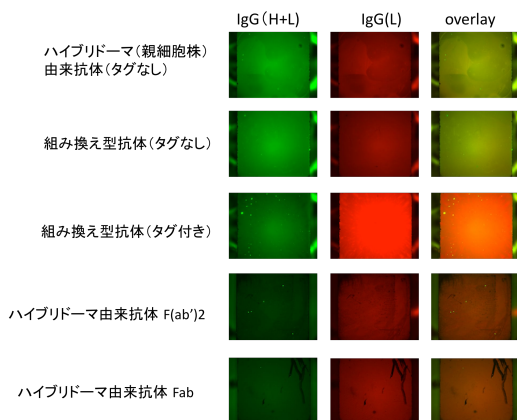


図3 基板上の抗体の検出(蛍光抗体法)

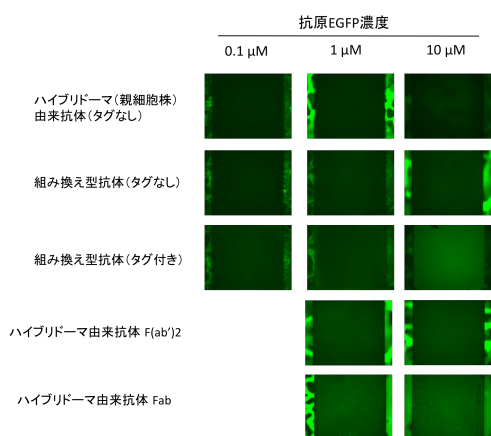


図4 作製した抗体チップによる抗原タンパク質の検出

(5) IgG 軽鎖へのタグの付加

マレイミド基板へ固定するタンパク質は小分子の方が適していることから、抗体フラグメントを作製し、フラグメント化した抗体もマレイミド基板に固定されるか検討したところ、IgG1 由来の Fab と F(ab')₂ をそれぞれマレイミド基板に固定し、免疫蛍光抗体法で観察を行ったところ、Fab と F(ab')₂ は IgG1 完全分子と同様にマレイミド基板に固定された。軽鎖にタグを付加した IgG1 を大量作製した。今後、フラグメントを調製し、軽鎖タグを介して基板に結合させることを検討する。

培養細胞発現系の大量発現システム Exp293F 細胞を用い、IgG 軽鎖 Cys-タグ付抗体の大量作製を行った。IgG 軽鎖遺伝子のストップ配列の直前に数個のシステイン

配列を挿入した発現ベクターと野生型 IgG 重鎖発現ベクターを同時に細胞にトランスフェクションし、培地からプロテイン G カラムを用いて組み換え型 IgG 軽鎖タグ付抗体を回収した。回収した IgG 軽鎖タグ付抗体を SDS-PAGE、ウェスタンブロット、タンパク定量を行い、作製した抗体の純度検定と定量を行った。次に、マレイミド基板へ固定するタンパク質は小分子の方が適していることから、タグ付き抗体フラグメントの作製の条件検討を行った。酵素反応により、Fab と F(ab')₂ の調製を試みたが、組み換え型抗体ではフラグメント形成がうまくできないことがわかった。糖鎖付加が十分起きていないことが影響している可能性が示唆された。

フラグメントの調製のためにはハイブリドーマが産生する糖鎖の付加された抗体が適していること、また、あらゆる抗原に対する多種類のタグ付き抗体を作製するためにはゲノム編集法によるハイブリドーマ抗体遺伝子へタグの付加が適していると考えられ、将来の検討課題となった。

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)

A new type of protein chip to detect hepatocellular carcinoma-related autoimmune antibodies in the sera of hepatitis C virus-positive patients. Akada J, Kamei S, Ito A, Ito M, Kitagawa T, Furumoto H, Kato Y, Tamesa M, Takashima M, Shirai M, Yamano H, Oka M, Kuramitsu Y, Nakamura K. *Proteome Sci* 11, 33, 2013 doi: 10.1186/1477-5956-11-33. 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[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 1件）

名称：抗ヒスチジントグ抗体
発明者：古元 礼子
権利者：国立大学法人山口大学
種類：特許
番号：5849275号
取得年月日：平成27年12月11日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古元 礼子 (FURUMOTO, Hiroko)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70311818

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし