

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13739

研究課題名(和文)抗体のN末端特異的蛍光標識による新規抗原検出法の開発

研究課題名(英文)N-Terminally fluorescent-labeled antibodies that show fluorescence change upon antigen-binding

研究代表者

芳坂 貴弘 (Hohsaka, Takahiro)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：30263619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既存のIgG抗体のN末端を特異的に蛍光標識することで、蛍光応答性抗体を作製する新規手法を開発した。弱酸性条件下で蛍光標識アルデヒドをIgG抗体と反応させることで、N末端特異的に蛍光基が付加され、得られたN末端蛍光標識抗体は、抗原の結合に伴って蛍光強度変化を示すことを明らかにした。また、FRETと蛍光消光解消を組み合わせることで、抗原を蛍光強度比の変化として検出可能な二重標識蛍光応答性抗体を合成すること、および、タグ化タンパク質の無細胞翻訳系での発現をリアルタイム検出することも可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, a novel method was developed for producing N-terminally fluorescent-labeled IgG antibodies that show antigen-dependent fluorescence change. By reacting fluorescent-labeled aldehyde with IgG antibody under weakly acidic condition, the fluorescent group was specifically attached at the N terminus, and the resulting N-terminally fluorescent-labeled antibody showed fluorescence intensity changed upon the antigen binding. In addition, it is possible to synthesize dual-labeled fluorescence-responsive antibody that can detect the antigen-binding as a change in fluorescence intensity ratio, and to detect tagged proteins expressed in a cell-free translation system in a real-time manner.

研究分野：生体関連化学

キーワード：抗体 イムノアッセイ 蛍光

1. 研究開始当初の背景

抗体は、特定の抗原に対する優れた結合能を有することから、診断薬・検査薬や研究用試薬として、幅広く活用されている。しかし多くの場合、その検出には結合・非結合状態の抗体を分離する操作が必要であり、抗原と抗体の結合を直接的かつ迅速に検出することは一般的に困難であった。

一方で研究代表者らは、独自に開発してきた非天然アミノ酸導入技術 (Nature Methods, 2006, 3, 923-929 等) を利用して、抗体の重鎖と軽鎖をリンカーペプチドで連結した一本鎖抗体断片 (scFv: single-chain Fv fragment) の N 末端部位を蛍光標識することで、抗原の結合を蛍光強度の変化として検出できることを世界に先駆けて見出した (J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 17386-17394) (図 1)。これは、抗原非結合状態では重鎖・軽鎖界面の Trp により蛍光基が消光されるが、抗原の結合により重鎖・軽鎖が強く会合して Trp が内部に埋まり、その結果として消光が解消されて蛍光が増大すると推測されている。しかしこの手法では個々の抗体遺伝子を取得・改変し無細胞翻訳系を使用して非天然アミノ酸を導入するために手間と時間が掛かり合成量も低く、さらなる応用展開には重大な障壁となっていた。

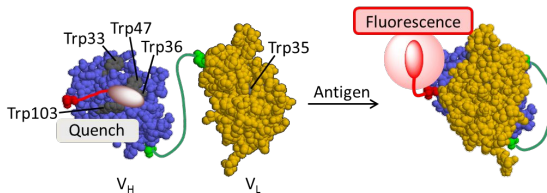


図 1 N 末端部位を蛍光標識した一本鎖抗体。抗原非結合状態では Trp により蛍光基が消光されるが、抗原の結合により消光が解消されて蛍光が増大する。

2. 研究の目的

本研究では、既存の IgG 抗体の N 末端を特異的に蛍光標識することで、蛍光応答性抗体を作製する新規手法を開発した。具体的には、弱酸性条件下で蛍光標識アルデヒドを IgG と反応させることで、N 末端特異的に蛍光基を付加し、これにより抗原の結合を蛍光消光の解消として検出することを試みた。また、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) と蛍光消光解消を組み合わせることで、抗原の結合を蛍光強度比の変化として検出可能な二重標識蛍光応答性 IgG を合成することも試みた。

3. 研究の方法

IgG の N 末端を特異的に蛍光標識するために、アミノ基の pKa 値が Lys 側鎖アミノ基 (9~10) と N 末端アミノ基 (7~8) で異なっていることを利用した。この pKa 値の違いのため、弱酸性条件下では Lys 側鎖のアミノ基はほぼ完全にプロトン化して求核性を失っ

ているのに対し、N 末端アミノ基は一部脱プロトン化して求核性を保持している。そこで、この状態で蛍光分子のアルデヒド誘導体と還元剤 (NaBH₃CN 等) で還元的アルキル化を行うことで、N 末端特異的に蛍光分子を結合させることが可能となる (図 2 上)。これまでに PEG アルデヒドを用いてタンパク質の N 末端を特異的に修飾できることは報告されており (Advanced Drug Delivery Reviews 54,477-485,2002) 蛍光分子のアルデヒド誘導体でも同様の修飾が可能であると予想された。

蛍光基としては scFv でも使用したテトラメチルローダミン (TAMRA) をまず使用し、リンカーとなるアルキル鎖を介してアルデヒドを有する誘導体 (図 2 下) を化学合成した。

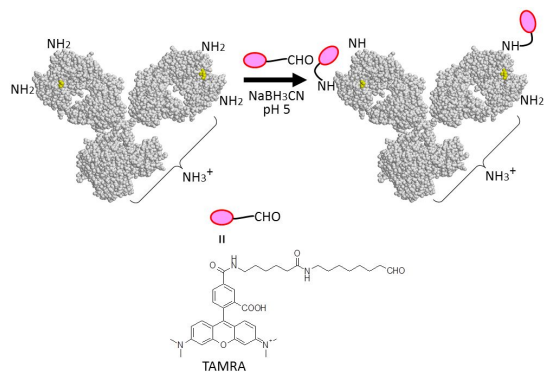


図 2 IgG 抗体の N 末端を特異的に蛍光標識する手法。弱酸性条件下では N 末端アミノ基のみが一部脱プロトン化して求核攻撃性を保持しており、蛍光分子のアルデヒド誘導体を用いて還元的アルキル化を行うことで N 末端特異的に蛍光標識が可能。

蛍光標識反応終了後、ゲルろ過により残存する蛍光分子のアルデヒド誘導体を除去して、吸収スペクトル測定により 280nm と 550nm の吸光度から標識率を算出した。続いて、抗原を段階的に添加しつつ蛍光スペクトルを測定して、蛍光強度変化を評価した。また、抗原濃度に対する蛍光強度をプロットして解離定数を算出し非標識のものと比較した。さらに、質量分析によって蛍光標識部位の特定を行った。

また、N 末端の蛍光基に加えて、不特定部位の Lys 残基に FRET ドナーとなる蛍光基 (RhodamineGreen など) を通常の化学修飾により付加することで、IgG の二重蛍光標識を行った。この二重標識抗体では、抗原非結合時には FRET が起こるものの N 末端のアクセプターは消光されるために主にドナーの蛍光が観測され、その一方で、抗原が結合すると FRET は同様に起こりつつアクセプターの消光が解消されるため、ドナーとアクセプターの両方の蛍光が生じると予想される。このように抗原の結合を蛍光強度比の変化として検出することで、抗体濃度に依存せずに抗原を定量できるため、抗体濃度を一定に保つことが困難な細胞イメージングなど

において特に有用となる。

4. 研究成果

まず、弱酸性溶液中で蛍光分子のアルデヒド誘導体と還元剤を用いて、IgG の N 末端アミノ基の還元的アルキル化による蛍光標識を行った。実際に、テトラメチルローダミン (TAMRA) のアルデヒド誘導体を化学合成して、pH 5 において IgG 抗体の還元的アルキル化反応を行った結果、SDS-PAGE の蛍光イメージ測定により、重鎖、軽鎖ともに TAMRA で標識されていることが確認された (図 3)。

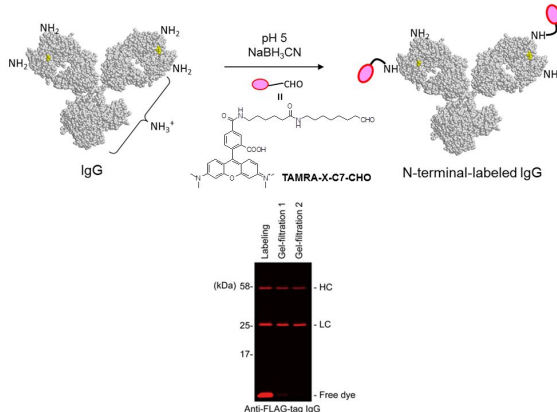


図 3 TAMRA アルデヒドにより蛍光標識した抗体の SDS-PAGE の蛍光イメージ

蛍光基の修飾位置を確認するために、アミノ酸配列既知の cMyc 抗体について反応後の蛍光標識抗体をペプチド断片化した後、質量分析を行った。その結果、N 末端アミノ基に TAMRA アルデヒドが付加した生成物が得られていることが確認された。ただし軽鎖のアミノ酸配列が MS/MS 分析から十分に読み取れなかったことから、同様に配列既知である抗 Her2 抗体を用いて同様の分析を行った。その結果、抗 Her2 抗体では重鎖、軽鎖ともに明確なアミノ酸配列が得られ、TAMRA が確かに N 末端アミノ基に付加されていることが確認できた。

続いて、蛍光標識 IgG へ抗原を添加し、それに伴う蛍光変化を測定した。抗 FLAG タグ抗体を用いた場合、抗原濃度に依存した蛍光強度の増大が観察された (図 4)。

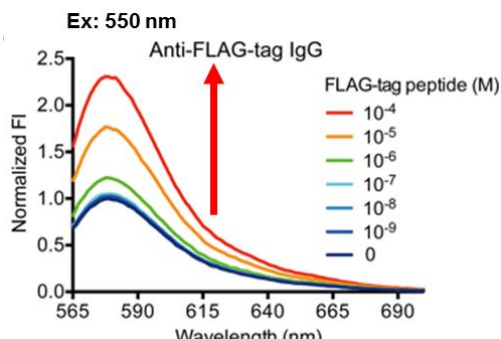


図 4 N 末端 TAMRA 標識抗 FLAG 抗体の抗原添加に伴う蛍光変化

これは、抗原非存在下では N 末端に付加された TAMRA の蛍光が減弱化されるのに対し、抗原存在下では蛍光強度が回復するためと考えられる。同様に、様々な種類の抗体への適用を試み、実際に蛍光応答を示す蛍光標識抗体を複数取得することができた。また、蛍光基の種類、蛍光基とアルデヒド間のリンカー長の長さ (図 5)、および蛍光測定時の pH などについても検討を行い、抗原依存的な蛍光強度変化を引き起こさせるための条件の最適化も行った。

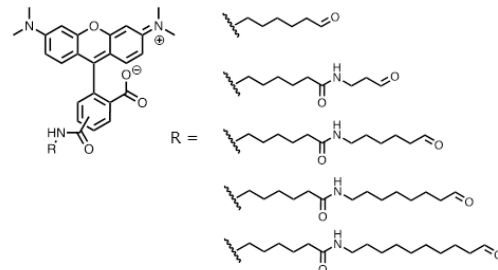


図 5 蛍光基標識アルデヒドのリンカー長の最適化

さらに、N 末端アミノ基の蛍光標識に加えて、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) のドナーとなる蛍光基を Lys 側鎖アミノ基へ修飾することで、二重標識抗体を合成した。この抗体は FRET に加えて、アクセプター蛍光の抗原に応答した蛍光強度変化により、抗原をドナー/アクセプターの蛍光強度比 (蛍光レシオ) の変化として検出できた (図 6)。このような二重標識抗体は、抗体濃度に依存せずに抗原の検出が可能になるというメリットがある。

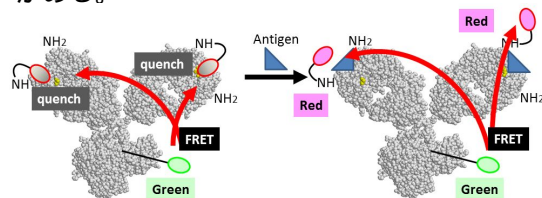


図 6 二重蛍光標識抗体の抗原結合に伴う蛍光変化

また、タグペプチドに対する蛍光標識抗体を、タンパク質発現のリアルタイム検出に応用した。すなわち、タグペプチドを含む遺伝子系を無細胞翻訳系で発現させる際に、タグペプチドに対する蛍光標識抗体を混在させておくことで、タグペプチド付加タンパク質の発現をリアルタイムに検出することができた (図 7)。この手法は、複数のタグペプチド抗体について適用可能であり、タンパク質発現の研究ツールとして有用になる。

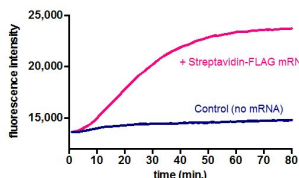
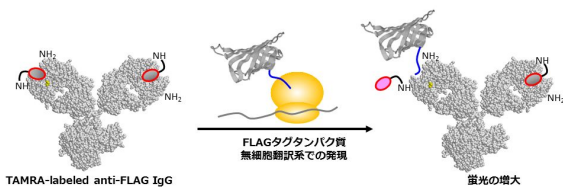


図7 . N末端蛍光標識抗体による無細胞翻訳系でのタンパク質発現のリアルタイム検出

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)

1. Y. Mori, H. Okumura, T. Watanabe, T. Hohsaka, Antigen-dependent fluorescence response of anti-c-Myc Quenchbody studied by molecular dynamics simulations, *Chem. Phys. Lett.*, 698, 223-226 (2018) 査読有
DOI: 10.1016/j.cplett.2018.03.011

〔学会発表〕(計18件)

1. 芳坂貴弘・福永圭祐・Dian Novitasari・渡邊貴嘉、N末端蛍光標識 IgG による抗原の蛍光検出、生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017/12/6-9
2. K. Fukunaga, D. Novitasari, T. Watanabe, and T. Hohsaka, A novel IgG-based fluorescent probe showing increased fluorescence upon binding of antigen, The 6th Official Conference of the International Chemical Biology Society, Shanghai, China, 2017/10/17-20
3. 芳坂貴弘、非天然アミノ酸の導入によるタンパク質機能の人工的カスタマイズ、招待講演、第16回日本蛋白質科学会、福岡、2016/6/7-9
4. Keisuke Fukunaga, Takayoshi Watanabe, Dian Novitasari, Takahiro Hohsaka, Novel IgG-based fluorescent biosensor that shows antigen-dependent fluorescence enhancement, PACIFICHEM2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015/12/15-20
5. 福永圭祐・渡邊貴嘉・Novitasari Dian・阿部亮二・大橋広行・芳坂貴弘、抗原依存的な蛍光増強を示す N末端蛍光標識 IgG の開発、第9回バイオ関連化学シンポジウム、熊本、2015/9/10-12

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hohsaka>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

芳坂 貴弘 (HOHSAKA TAKAHIRO)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技

術研究科・教授

研究者番号：30263619