

令和元年6月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07818

研究課題名(和文)セルロース繊維に蛋白質機能を付与する基盤技術開発

研究課題名(英文)Basic technology development to add protein functions to cellulose fiber

研究代表者

星野 英人(Hoshino, Hideto)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20371073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、超耐熱性キチン/セルロース結合ドメイン・hCBDを介して任意の蛋白質“X”を紙に複合化させるための人工融合蛋白質を“X”-C Linkと定義する。我々は、かつてクラゲGFPの緑色発光機構を再現する自己励起蛍光蛋白質・BAFを用いたBAF-C Linkを作製し、BAFを紙に複合化させる技術を独自開発した。この研究で、我々は、新たに抗体機能という付加価値を紙に付与する目的で、GFPに対する特異的VHH抗体を用いて抗GFP VHH-C Linkを開発した。抗GFP VHH/紙ハイブリッドは、1年以上の室温下での乾燥保管後もEGFPを捕捉可能で、ラテラルフローデバイスへの適用も可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、紙という安価な構造素材に従来技術のような化学修飾手法を用いることなく、簡単に生物機能としての蛋白質機能を安定付与することで付加価値を上げる基盤技術開発である。紙にVHH抗体機能を載せることで、単なる紙素材の高付加価値化だけではなく、VHH抗体の柔軟な活用方法を新たに提示することが出来た。今回は抗GFP VHH抗体に焦点を絞ったが、他のVHH抗体でも応用可能であり、将来的には、安価な臨床検査試薬開発の基盤になり得る研究成果である。

研究成果の概要(英文)：We define an artificial fusion protein for complexing any protein "X" to paper via the hyperthermostable chitin/cellulose binding domain (hCBD) as "X"-C Link. We have originally developed BAF-C Link using BRET-based Auto-illuminated Fluorescent protein (BAF) that reproduces the green light emission mechanism of jellyfish GFP, and developed a unique technology to combine BAF on paper.

In this study, we developed anti-GFP VHH-C Link using a specific VHH antibody against GFP in order to newly add the value of antibody function to paper. The anti-GFP VHH/paper hybrid was able to capture EGFP even after dry storage for 1 year or more at room temperature, and its application to lateral flow devices was also possible.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：セルロース 蛋白質 VHH抗体 複合材料

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来技術の概要

従来技術においては、セルロース繊維表面の水酸基は反応性が極めて低く、セルロースの階層構造を壊すことなく新たに機能付与する場合、プラズマ照射や酸化剤を用いた化学的な表面改質の必要があった。近年、より簡便なセルロース素材への蛋白質機能付与の手法として、(独)物質・材料研究機構(当時)の研究グループから金属アルコキシドを用いた、セルロース表面の活性化による蛋白質機能付与手法の報告がなされている(2006年、図1)。但し、何れの手法においても、セルロースの表面改質の過程を経ることが不可欠で、且つ、自然界には存在し得ない“人工的な修飾”も不可避である。更に、上記技術でさえも未だ実用化には至っておらず、セルロース繊維への蛋白質機能付与の可能性を示すだけの技術的レベルでの成果に過ぎなかった。

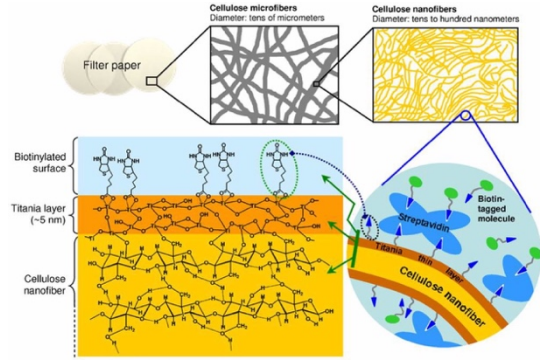


図1. 従来技術の一例(2006年のNIMSプレスリリース記事より)

(2) 当該研究に至る背景

そもそも、セルロース繊維やキチン繊維は、天然の動植物の体躯を構成する“植物細胞壁”や“甲殻”といった物理的な構造組織の骨格として利用されている。酢酸菌などの極一部の微生物では純化されたセルロース繊維のみが単独で合成される例外的局面も見受けられるが、天然構成の中では、多くの場合、他の生体高分子との複合化がなされているケースの方が一般的である。自然界ではバイオマス繊維は本来蛋白質と相性が良いはずなのに、従来技術においては酵素などの機能性蛋白質とバイオマス繊維素材との複合化により、紙などの構造素材に蛋白質機能を付与した“実用レベルでの活用事例”は、不思議なことに極めて少なかった。当該研究代表者は、一切のセルロース表面改質を伴わない、且つ、自然環境に優しい、蛋白質ならではのセルロース繊維表面への蛋白質機能付与手法を模索・検討している。

2. 研究の目的

当該研究代表者は、クラゲ GFP の化学発光機能を再現する自己励起蛍光蛋白質・BAF(図2)を過去に開発した実績を有する(Hoshino et al. *Nature Methods* 2007)。更に、超耐熱性キチン/セルロース結合ドメイン・hCBDを介して、このBAFを紙などのセルロース素材にハイブリッドさせるBAF-C Link技術を既に開発していた(図3)。BAF-C Link技術では、セルロース素材の表面に特殊な化学修飾等は一切施すことなく、精製したBAF-C Link蛋白質を紙上に付着・自然乾燥させるという単純操作だけでセルロース素材表面上にピンポイントに“クラゲ GFP の緑色発光機能”を付与することができた。研究代表者は、紙などのセルロース基材への蛋白質機能付与が可能な蛋白質“X”がBAF以外にも存在すると考えた。そこで、改めて任意の蛋白質“X”を紙にハイブリッドさせるためのhCBDとの人工融合蛋白質を“X”-C Linkと定義した。即ち、“X”の存在を明示することで、紙などのセルロース基材への、hCBDを介した蛋白質機能付与手法の汎用性を提示することを当該研究の第1の目的とした。また、単にセルロース表面に蛋白質を固着させるだけに留まらず、この手法を用いての実用的な応用事例の提示を第2の目的とした。

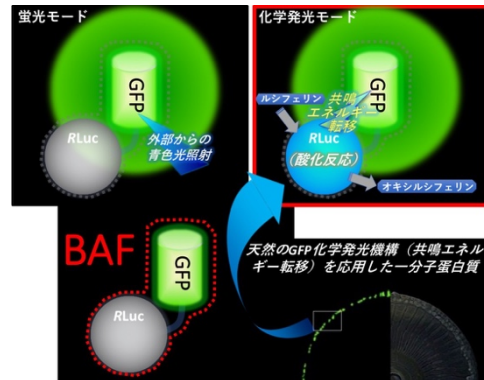


図2. 自己励起蛍光蛋白質・BAFの概略説明図

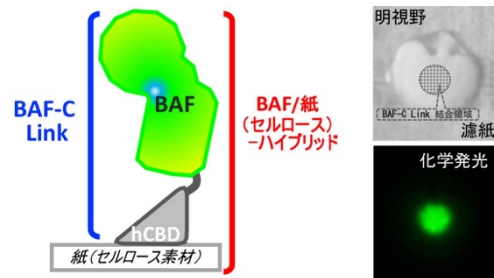


図3. BAF-C Linkを用いたBAF/紙ハイブリッドと化学発光

3. 研究の方法

紙素材表面に特定の機能性蛋白質を固着させ、紙という構造素材に簡便に新たな蛋白質機能を付与するためのアプローチを考えた。その際、所謂、酵素よりも、寧ろ、紙素材表面へ任意の蛋白質の吸着を一般化させることに主眼を置いた。hCBDをセルロース繊維へのアダプター分子として捉えるならば、最初の“X”の候補としては、任意のビオチン化した蛋白質を捕捉できるストレプトアビジン(SA)と抗体を候補蛋白質として選定した。図4に示すように、抗体の中でも、ラクダ由来のhcIgG抗体は重鎖のみから構成される抗体である。

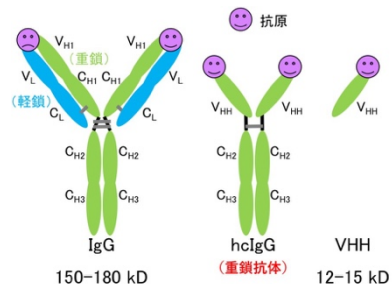


図4. 一般的なIgG抗体と低分子VHH抗体の比較

特に、遺伝子工学的手法を用いて hcIgG 抗体の抗原結合領域である VHH ドメインだけを抜き出して作製される『VHH 抗体』は 15kD 程度という小さな分子サイズにも関わらず、且つ、大腸菌で産生した蛋白質であっても抗体としての活性を十分発揮することが知られている。当該研究では、この小さな VHH 抗体を用いることにした。

(1) X-C Link 蛋白質の開発の試み

遺伝子工学的手法により SA、若しくは、VHH 抗体と hCBD との融合蛋白質 (SA-X Link、並びに VHH-C Link) の遺伝子を設計・作製し、これらが大腸菌で産生させ、適当なカラム精製による人工融合蛋白質の作製を試みた。SA 派生体-C Link に関しては大腸菌での調製が悉く不調であったため、初年度の終わり頃には VHH 抗体の検討へ移行し、その後 VHH-C Link 技術の開発に一本化した。特に VHH 抗体としては、既報告の VHH 抗体の中から、GFP に対する VHH 抗体を最初のモデルに選んだ。尚、VHH 抗体遺伝子は、論文報告されているアミノ酸配列に基づき、人工遺伝子合成により取得した。

(2) VHH/紙ハイブリッドの作製

常法により、大腸菌 BL21 株で産生し、精製した抗 GFP VHH-C Link 蛋白質水溶液を実験濾紙上の特定部位に滴下し、15分程度、自然乾燥させることで抗 GFP VHH/紙ハイブリッドを作製した。

(3) VHH/紙ハイブリッド上への抗原蛋白質 (EGFP) の捕捉性能の評価

大腸菌で作製し、精製した EGFP 水溶液を抗 GFP VHH/紙ハイブリッド上へ滴下し、数分間室温でインキュベートした後、大過剰の水で洗浄した。尚、抗 GFP VHH-C Link 蛋白質が固着していない領域は、EGFP の紙への非特異吸着がないことを示すネガティブコントロールになる。当該抗 GFP VHH/紙ハイブリッド上に残存した EGFP の蛍光を指標として、上記 VHH/紙ハイブリッドの抗原捕捉性能を評価した。

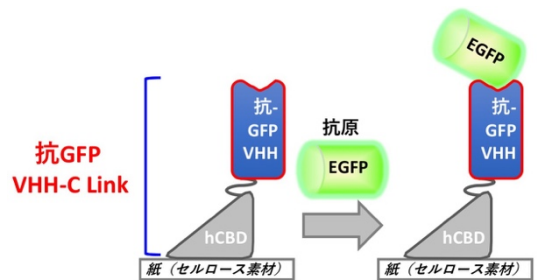


図5. 抗 GFP VHH/紙ハイブリッドによる EGFP の捕捉イメージ

4. 研究成果

VHH-C Link に用いる最初の VHH 抗体として、抗 GFP VHH 抗体を選択した。当該抗 GFP VHH 抗体は、野生型 GFP 以外にも、EGFP や EYFP を抗原として認識する。そのため、抗 GFP VHH-C Link/紙ハイブリッドの抗原捕捉性能を、洗浄後に当該ハイブリッド上に残存する EGFP の蛍光として簡便に検出可能である (図5)。

研究代表者の有する精製ノウハウを用いて、抗 GFP VHH-C Link は、大腸菌破砕液から1回のカラム精製で高純度の蛋白質として精製可能であり (図6)、精製蛋白質は水溶液の状態 4°C にて長期安定に保管できた。

抗 GFP VHH-C Link は、BAF-C Link と同様に精製蛋白質を円形濾紙中央の○表示部分上に滴下し、室温下で自然乾燥させるだけで、セルロース基材に強固に結合する。当該抗 GFP VHH/紙ハイブリッド上に、抗 GFP VHH 抗体の抗原である、EGFP を滴下すると EGFP は紙上の抗 GFP VHH-C Link 結合部分のみに捕捉され、当該ハイブリッド紙を大過剰の水で洗浄した後でも EGFP の蛍光活性は安定保持された。また、ハイブリッド作製後の室温下での乾燥保管を1年以上 (56週間) 経た後でも、当該抗 GFP VHH/紙ハイブリッドの EGFP 捕捉性能は、十分に維持されており (図7)、VHH 抗体の長期間の安定保管だけでなく、新たな活用手法の可能性をも強く示唆する。

また、当該抗 GFP VHH 抗体は、前述のように野生型 GFP や EGFP 以外にも EYFP を特異的に認識して結合することが報告されている。抗 GFP VHH/紙ハイブリッド上に、EGFP 水溶液、又は EYFP 水溶液を滴下させ、洗浄後のハイブリッド紙上に残存する蛍光活性を測定・評価した結果、確かに EGFP、EYFP は共に当該ハイブリッド上に捕捉されるものの、抗 GFP VHH 抗体に対する結合の強さに関して EGFP の方が EYFP よりも 5~7 倍強いことを示唆する結果を得た。改めて、BIACORE 解析を試みた結果、当該抗 GFP VHH 抗体に対するアフィニティーの強さは、EGFP>EYFP であった。これは、従来 EGFP と EYFP へのアフィニティー

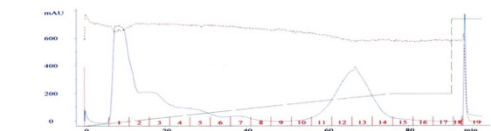


図6. 抗 GFP VHH-C Link (26kD) の大腸菌からの1ステップ精製

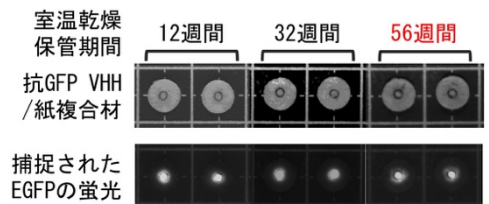


図7. 抗 GFP VHH/紙ハイブリッドの長期保管後の安定性能

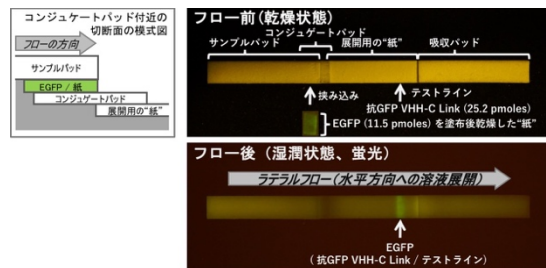


図8. 抗 GFP VHH-C Link を用いたラテラルフローデバイスの例

一が同等であると考えられてきた、当該抗 GFP VHH 抗体が、実は EGFP と EYFP へのアフィニティーに大きな差があることを示す最初の例であると共に、抗 GFP VHH/紙ハイブリッドによる簡便評価と矛盾しないことを示す結果でもある。世間的には、抗体は特定の物質を認識して結合するものと信じられているが、実際には、本来の抗原と類似した表面構造を有する分子にも結合し得る。但し、免疫に用いた本来の抗原分子と、抗原類似分子とのアフィニティーの強さは各々異なることが一般的に知られている。研究代表者は、抗 VHH/紙ハイブリッドという、このシンプルな VHH 抗体の担持・保管形態が、個々の VHH 抗体の抗原結合特性を簡便に評価するツールにもなり得ることを、今回の検討を通して新たに見出した。

更に、VHH-C Link を用いたアプリケーションの 1 つとして、ラテラルフローデバイスでの応用を検討した。ラテラルフローデバイスの 1 つである、通常の IgG 抗体を用いたインフルエンザ診断キットや妊娠検査キットなどのイムノクロマトデバイスにおいては、IgG 抗体を吸着させる展開膜には、ニトロセルロース膜を使用することが標準的である。ニトロセルロース膜には、部材自体が高価であることと共に、発火し易い危険物であるという短所がある。当該 VHH-C Link 技術では、高価で危険なニトロセルロース展開膜ではなく、比較的安価で安全な『ペーパークロマトグラフィー専用紙』上に、イムノクロマトディスペンサーを用いて、抗 GFP VHH-C Link を塗布したテストラインを形成することでハイブリッド展開膜を作製した。当該ハイブリッド展開膜を組み込んだラテラルフローデバイスを組み立て、上流から EGFP をラテラルフロー展開させると、デバイス上流から流れてきた EGFP は、予め抗 GFP VHH-C Link を塗布したテストライン上に悉く捕捉され、時間経過と共に蓄積し、その様子は、EGFP の蛍光活性により肉眼でもリアルタイムに観測可能であった(図8)。また、ペーパークロマトグラフィー専用紙に塗布した抗 GFP VHH-C Link 量に対してモル数で半分程度程度の EGFP をラテラルフロー展開させた際に、その全てをテストライン上に捕捉することも確認できた。このことは、ニトロセルロース膜へのランダムな受動的吸着による IgG 抗体の担持を前提とした従来技術と比べて、抗 GFP VHH-C Link 技術では、セルロース繊維に対して当該蛋白質を一定の配向性を維持した状態で担持させることが可能であり、その結果として担持された抗 GFP VHH 抗体が、抗原である EGFP を極めて効率良く捕捉可能であることを強く示唆するものであった(図9)。

当該研究代表者は、任意の VHH 抗体の利活用手法において、製造コスト面でも、また応用展開の多様性の面でも幅広く活用出来る技術として本技術を位置付けており、今後、更なる実用化レベルの技術へと発展させられるものと考えている。

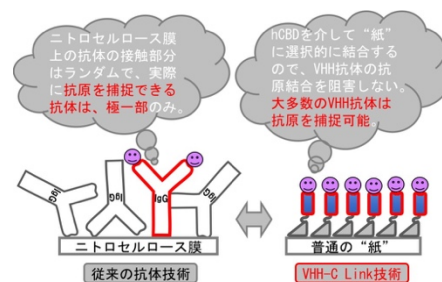


図9. VHH-C Link技術の基材への抗体担持上の利点

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計7件)

- ① 星野英人、セルロース・蛋白質ハイブリッドによる新しいVHH抗体の利用法、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017(ポスター発表)
- ② 星野英人、セルロース・蛋白質ハイブリッドによる新しいVHH抗体の利用法、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017(口頭発表)
- ③ 星野英人、セルロース・蛋白質ハイブリッドによる新しいVHH抗体の利用法、第17回産総研・産技連LS-BT合同発表会、2018(ポスター発表)
- ④ 星野英人、セルロース素材とVHH抗体の融合技術開発、第67回高分子討論会、2018(ポスター発表)
- ⑤ 星野英人、発光蛋白質とセルロースの機能性ハイブリッド、セルロース学会第25回年次大会、2018(ポスター発表)
- ⑥ 星野英人、ハイブリッド材料によるクラゲGFPお発光機構を自在に離確する技術、第27回ポリマー材料フォーラム、2018(ポスター発表)
- ⑦ 星野英人、VHH抗体の汎用的な活用技術、第27回ポリマー材料フォーラム、2018(ポスター発表)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：融合タンパク質およびそれを用いた試験キット

発明者：星野英人、上垣浩一

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願2017-235362

出願年：2017年

国内外の別：国内