

令和元年6月18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08296

研究課題名(和文) Quenchbodyを活用した迅速・簡便・高感度アルテミシニン免疫測定法の開発

研究課題名(英文) Development of Quenchbody-based directive immunoassay against anti-malarial drug artemisinin

研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA, HIROYUKI)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：30253470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：まず、アルテミシニンのみを選択的に認識するモノクローナル抗体(MAb)の作製を行った。しかしながら、期待した高い特異性を得ることが出来なかった。そこで、Quenchbody(Q-body)を活用したイムノアッセイの開発については、既に作製している抗アルテミシニン MAbを基にQ-bodyの作製を行い、大腸菌を用いた翻訳系による抗体の大量調製を試みたところ、十分な収量で、目的とする各種抗体断片を得ることに成功した。続いて、発現したVH-CH1、VL-CL各断片を精製した後、それらを蛍光色素により修飾した。しかしながら、活性を有するQ-bodyの調製を研究期間内に達成することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Q-bodyは、抗体内に存在するトリプトファンにより、標識された蛍光色素の蛍光が消光されており、抗原が結合することによりその消光が解除されて蛍光強度が増強し、直接的イムノアッセイを可能とする。新規蛍光免疫測定素子として登場したQ-bodyを用いて、乱用薬物を対象とした高感度分析が報告されている。今回、重要な天然化合物である抗マラリア薬であるアルテミシニンの迅速・簡便・高感度分析法としてQ-bodyを活用したイムノアッセイの確立を企図し、抗体断片の大量発現に成功した。今後、機能性を持つQ-bodyの構築が可能となれば、天然化合物の新しい分析手技として幅広く応用される可能性を秘めていると考える。

研究成果の概要(英文)：Firstly, a monoclonal antibody against artemisinin showing a high specificity was not obtained using a new hapten. So, the monoclonal antibody developed before was used for preparation of Quenchbody (Q-body) against artemisinin. Each gene encoding VH-CH1 and VL-CL domain was cloned and inserted into a vector for expression using E. coli. Successfully, each domain was expressed sufficiently using E. coli expression system for preparation of Q-body. Subsequently, each expressed domain was labeled by fluorescent compounds. However, the refolding with each labeled domain was not successful to obtain Q-body recognizing artemisinin. A variety of attempt was conducted to solve this difficulty, though. By the end of this project, the development of active Q-body against artemisinin was not completed. In the future, I will try to invent the effective refolding method to get active Q-body and develop directive immunoassay to detect anti-malarial drug, artemisinin.

研究分野：生薬学

キーワード：アルテミシニン Artemisia annua Quenchbody イムノアッセイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Artemisia annua から発見されたアルテミシンは、マラリアの第一選択薬として広く使用されており、その安定供給が今後も重要な課題である。現在、アルテミシンの安価な化学合成法は実現されていないことから、生産性の向上を目指したアルテミシニン高含有品種の選抜育成が活発に進められている。上記育種研究において、アルテミシンの迅速、簡便、高感度な分析法は、優良品種の選抜に必須な技術である。アルテミシニンは、分子内に紫外線を吸収するクロモフォアを持たないことから、一般的な装置を用いて定量的に分析することは容易ではない。そこで、申請者らは優良品種選抜に有用な簡便、高感度な分析手法としてイムノアッセイに着目し、これまでに抗アルテミシニンモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、本抗体を活用した ELISA を開発している (Tanaka H et al., *PLANTA MED.*, 73, 1127-1132, 2007)。また、Guo S らのグループにより、申請者のグループと同様の手法により抗アルテミシニン抗体が作製され、アルテミシニンの分析法としてイムノアッセイの有用性が報告されている (Guo S et al., *PLOS ONE*, 8 (11): e79154, 2013)。最近、申請者のグループは抗アルテミシニン組換え Fab を大量安価に調製する方法を報告し (Madan K et al, *ANAL. CHEM.*, 84, 2002-2008, 2012)、さらに、本組換え抗体とアルテミシンとの相互作用を X 線結晶構造解析により進めている段階にある。

一方、Quenchbody(Q-body)は、抗体内に存在するトリプトファンにより、標識された蛍光色素の蛍光が消光されており、抗原が結合することによりその消光が解除されて蛍光強度が増強し、直接的なイムノアッセイを可能とする (Abe R et al., *J. AM. CHEM. SOC.*, 133, 17386-17394, 2011)。新規蛍光免疫測定素子として登場した Q-body を用いて、これまでにモルヒネ、コカイン、メタンフェタミンなど乱用薬物を対象とした高感度分析が報告されている (Abe R et al., *SCI. REP.*, 4, 4640, 2014)。しかしながら、Q-body の種類は限られており、今後益々その適用拡大が期待できるツールと考えている。

そこで、申請者はこれまでに約 40 種類の天然生理活性成分に対する mAb を作製した経験を生かし、重要な天然化合物であるアルテミシニンの迅速・簡便・高感度分析法として Q-body を活用したイムノアッセイの確立を企図した。

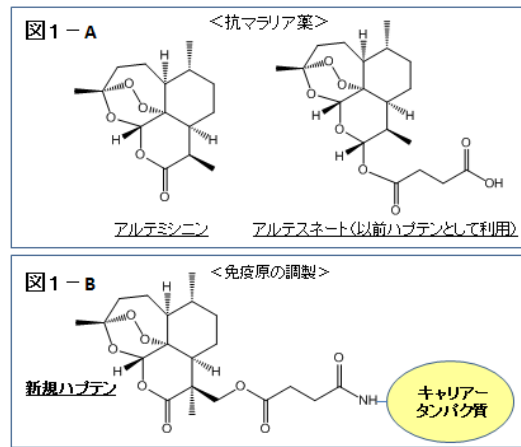
2. 研究の目的

発展途上国ではマラリアにより依然として年間約 50 - 70 万人の命が失われており、その撲滅は極めて重要な国際的な課題である。マラリアの特効薬として登場したアルテミシニンは、*Artemisia annua* 由来のセスキテルペンであり、多剤耐性を示すマラリア原虫に対しても高い効果を示すことから、現在最も有効な抗マラリア薬として利用されている。一方、Quenchbody(Q-body)はイムノアッセイに活用される最先端のインテリジェント組換え抗体として注目されている。申請者は、抗アルテミシニン抗体に関するこれまでの研究成果を基盤として、アルテミシニン高含有品種の選抜育種法への応用を念頭に、Q-body を活用した迅速・簡便・高感度なイムノアッセイによるアルテミシニン分析法の確立を本申請課題の目的としている。

3. 研究の方法

1) Anti-AM mAb 作製

図 1-A には、前回 anti-AM mAb の作製に用いたハブテンであるアルテスネート (AS) と今回設計を計画している新規ハブテンを示している。既存の anti-AM mAb の選択性は、アルテミシニン (AM) と比較して AS に対して 6 倍程度高く、この幅広い選択性が *Artemisia annua* 中の AM の定量結果に影響を及ぼしている可能性が否定できない。そこで、より AM に対する選択性が高い mAb の作製を目指し、図 1-B に示した新規ハブテンの合成を行った。



合成した新規ハブテンとタンパク質を結合させ、免疫原を調製した。続いて、マウスへ免疫原を投与した後、抗体価と抗体の各種関連化合物に対する選択性について評価を行った。十分な血中抗体価と AM に対する高い選択性が認められた段階で、常法による細胞融合を実施した。続いて、得られたハイブリドーマの選抜、クローニングを進め、期待する性能を有する新規 anti-AM mAb の作製を行った。

調製した anti-AM mAb について、反応性並びに AM 関連化合物との選択性を競合的 ELISA により評価することで、既存の anti-AM mAb と比較した場合の有用性を見極めた。

2) Anti-AM 小型化抗体の作製と機能評価

AM を認識する scFv を作製するために、anti-AM mAb 産生ハイブリドーマから mRNA を得、続いて cDNA の調製を行った。特異的なミックスプライマーを用い VH, VL をコードする遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子の配列が正しいことを確認した後、フレキシブルなペプチドリンカーをコードする遺伝子を VH, VL 間に導入する splicing by overlap extension (SOE) PCR を行うことで最終的に scFv 遺伝子を構築する。一方、anti-AM Fab 遺伝子は、VH-CH1 並びに VL-CL 遺伝子をそれぞれ増幅することで調製した。

構築した scFv、VH-CH1 並びに VL-CL 遺伝子を発現用ベクターに組み込み、続いて大腸菌を形質転換した。形質転換を行った大腸菌について、IPTG による発現誘導を行った後、封入体に発現した組換え抗体の精製を行った。scFv は単独で巻き戻しに供し、VH-CH1 並びに VL-CL は当量混合した後に、巻き戻しを行い組換え Fab を調製した。続いて、anti-AM mAb との比較を行うことで巻き戻した小型化抗体の反応性、特異性を見極めた。

3) 抗アルテミシニン Q-body(anti-AM Q-body)の作製と機能評価

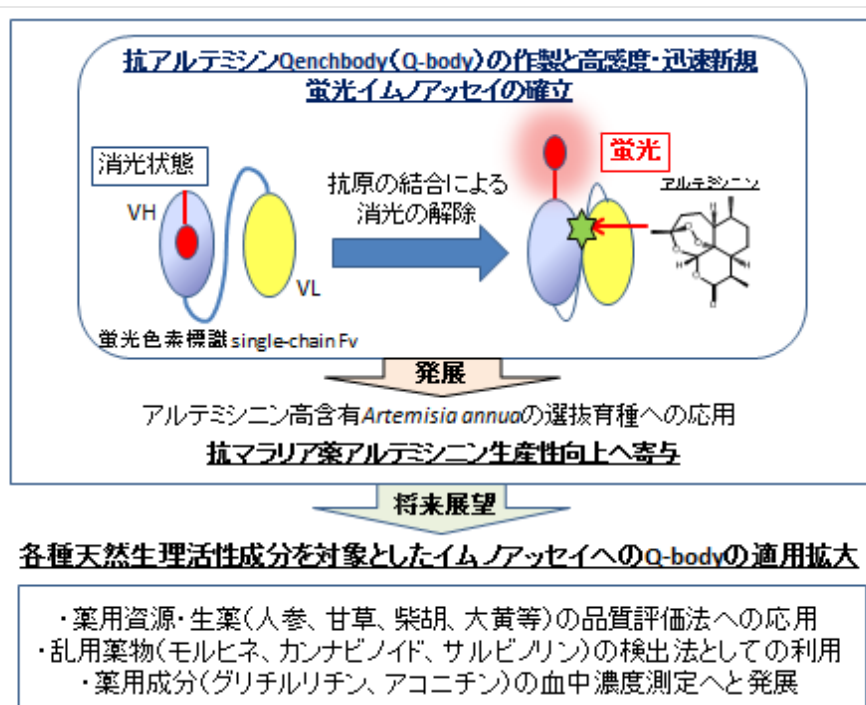
“ Quenchbody(Q-body) ” の調製に用いる小型化抗体遺伝子は、既に作製している anti-AM 抗体遺伝子と新たに作成する mAb 由来の抗体遺伝子の中から、有用な材料を選定し実験に供した。Q-body の調製には、無細胞翻訳系とインビトロ翻訳系を検討した。蛍光色素には市販の p -(TAMRA-aminocaproyl)-aminophenylalanine(TAMRA-C6-AF) 及び p -(ATTO655-aminocaproyl)-aminophenylalanine(ATTO655-AF)を用いた。続いて、調製した各種 Q-body を用いて、直接法における AM の測定感度や AM 関連化合物に対する交差反応性を調査し、その性能を評価した。

4. 研究成果

本申請課題では、アルテミシニンのみを選択的に認識する MAb の作製を目指し、新規免疫原の調製を行った。適切に分子設計した新規ハプテンとタンパク質を結合させ、免疫原を調製後、マウスへ免疫原を投与した。続いて、血中抗体価の測定と抗体の各種関連化合物に対する選択性について ELISA による評価を行ったところ、抗体価の上昇は確認できたものの、期待した極めて高い特異性を得ることが出来なかった。各種ハプテンを新たに合成し、免疫原である蛋白質コンジュゲートを調製した後、マウスに免疫感作を行った結果、目的とする極めて高い特異性を有するモノクローナル抗体を得ることができなかった。その原因としては、新たに合成したハプテンがマウス生体内で分解した結果、アルテミシニンの重要な構造が変化し、アルテミシニンの特異的に認識する抗体が産生されなかったと考察している。

そこで、Q-body を活用した免疫アッセイの開発については、既に作製しているアルテミシニンおよびアルテスネートを認識する MAb の情報を基に Q-body の作製を開始した。Q-body の調製には、無細胞翻訳系と細胞を用いた翻訳系を検討した。無細胞翻訳系を用いた結果、その収率は極めて低く、詳細な機能の解析を行うことができなかった。そこで、大腸菌を用いた翻訳系による抗体の大量調製を試みたところ、Q-body の機能解析を実施できる収量で、目的とする各種抗体断片を得ることに成功した。続いて、大腸菌を用いて発現した VH-CH1、VL-CL 各断片を精製した後、それらを蛍光色素により修飾した。

精製した各種 Q-body 断片の巻き戻し条件を詳細に検討し、活性を有する Qbody を安定して調製する手法を構築することが本研究の成否を決める重要な課題である。しかしながら、活性を有する Q-body の調製を研究期間内に達成することができなかった。今後、更なる検討を重ね、活性のある Q-body の調製を継続していく計画である。アルテミシニンの直接的分析法を構築し、原料植物である *Artemisia annua* 中アルテミシニンの測定系確立した後、薬物動態学的解析やアルテミシニン高含有品種の作出を進めていく計画である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Hiroyuki Tanaka, "Development of Immunoassays for Ginsenosides in Ginseng", Japan-Taiwan Joint Symposium, Hokkaido University, 2018 (国際学会)

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。