

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20760537  
 研究課題名(和文) 自立配向性モノクローナル抗体を用いた次世代免疫診断システムの開発  
 研究課題名(英文) Development of self-oriented monoclonal antibody for innovative clinical diagnosis

研究代表者  
 熊田 陽一 (KUMADA YOUICHI)  
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教  
 研究者番号：70452373

## 研究成果の概要 (和文)：

PS-tagのアミノ酸配列ならびにPS基板の表面状態を最適化することで、PS表面におけるscFvの直接的かつ安定な固定化を実現できた。さらに、PS-tagの特異的親和性を利用したOn-Chip Refolding法を開発した。PS-tag融合低分子抗体は、マイクロプレートを用いるハイスループット培養が可能であり、多種多様な抗体を短時間で低コストに生産する技術が確立できた。本研究で開発した要素技術を組合せることで高感度・低コスト・ハイスループットな次世代型免疫診断システムの開発が可能となる。

## 研究成果の概要 (英文)：

In this study, we first optimized amino acid sequence of the polystyrene binding peptide (PS-tag) that has specific binding affinity toward the hydrophilic PS plate. We further investigated to prepare the surface of hydrophilic PS plate that was suitable for binding of PS-tag. We further developed the novel solid-phase refolding method for preparation of scFv-immobilized PS plate mediated by PS-tag. According to the results of enzyme-linked immunosorbent assay, approximately 10times sensitivity and signal intensity were increased, in comparison with those using whole antibody which has been exclusively utilized in ELISA. Thus, solid-phase refolding using PS-tag-fused scFv would be significantly useful for preparation of antibody-immobilized PS surface and these technologies will be applicable to construction of next-generation of immunodiagnosis system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 ・ 生物機能・バイオプロセス

キーワード：(1) バイオテクノロジー (2) バイオ関連機器 (3) 生物・生体工学

### 1. 研究開始当初の背景

抗体の抗原に対する特異的親和性を利用した免疫測定(イムノアッセイ)は、高感度で汎用性が高く、医療診断やBSE試験、環境汚染物質の定量分析を中心に幅広い分析分野で利用されている。とりわけ、近年の診断薬市場は3,000億円を突破し、その50%弱をイムノアッセイが占めている。また、医療診断の検査件数は年間約6億件に達し、その需要は今後さらに増加すると予測される。今後の検査件数の増加および検査濃度範囲の低下にしたがって、これまで以上にイムノアッセイにおける検出シグナルの高感度化、検出操作の迅速化、および検出システムのハイスループット化が強く要求されている。従来のイムノアッセイに用いられてきた診断用抗体は、ポリスチレン製マイクロプレートの内壁にランダムな配向で固定化される。その結果、ポリスチレン表面の疎水的環境によって立体構造が変化し、特異性・親和性を喪失する。このような固定化抗体の変性・失活の傾向は、アッセイフォーマットを小型化する際に特に顕著に見られ、次世代医療診断の支援技術として期待されるプロテインチップ開発の大きな障害要因となっている。したがって、抗体を始め様々なタンパク質を基板上に安定かつ配向的に固定化する技術が強く要求されている。同時に、診断キットのコストダウン、検出操作の簡便化ならびに迅速化を大幅に達成できる革新的なアッセイシステムの構築が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、ポリスチレン(PS)基板表面に対して自己集積および自立配向性を有する診断用モノクローナル抗体を創生、大量生産し、高感度、迅速、ハイスループットな次世代免疫診断システムを構築することを目的とする。すなわち、申請者が独自に開発したポリスチレン親和性ペプチド(PS-tag)を末端部に有するモノクローナル抗体を大量生産し、これを親水化PS基板上に安定に自己集積および自立配向できる革新的な抗体の固定化技術を開発する。さらに、申請者が独自に開発した迅速イムノアッセイ法(One-step ELISA法)の測定原理を導入したマイクロアレイ検出システムを構築し、従来の1/10以下の検査時間でハイスループットかつ高感度な検出が行える次世代免疫診断システムの基盤技術を構築する。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、PS-tagならびにPS基板表面の最適化、診断用抗体の大量生産法の開発および選択的固定化法の開発、PS製マイクロアレイ基板の作成ならびにOne-step ELISA原理を導入したマイクロアレイシステムの構築を検討し、高感度、迅速さらにハイスループット処理が可能な次世代免疫診断システムの基盤技術を確立する。PS-tagのアミノ酸配列の最適化およびPS基板表面の親水化によってPS-tagの吸着特異性ならびに親和性を強化し、夾雑物質の非特異吸着レベルを極限まで減少させることが大きな課題である。さらに、PS-tagを融合した1本鎖抗体(scFv-PS-tag)の大量発現系を独自の手法を用いて構築する。次年度は、大量生産したscFv-PS-tagをPS基板表面に安定に自己集積・自立配向させるための固定化条件を探索する。特に、配向制御によって抗体の抗原結合活性がどの程度向上するかを定量的に解析する。これまでの研究で得られた知見を統合し、親水化PS基板とscFv-PS-tagを用いるマイクロアレイ測定系を構築し、One-step ELISAの操作原理を取り入れた検出システムの構築を行う。特に、アッセイフォーマットをマイクロ化した際の反応液量および接触面積の変化がscFv-PS-tagの吸着速度ならびに検出シグナルに及ぼす影響を詳しく解析し、検出システムの迅速化ならびにハイスループット化を目指す。

### 4. 研究成果

#### (1) PS-tagのアミノ酸配列最適化

これまで報告してきたポリスチレン親和性ペプチド(PS-tag)のアミノ酸配列(RAFIASRRIRRP)をもとに、6種類の新たなPS-tag(PS19-1:RAFIASRRIRRP, PS19-2:RIFIAS, PS19-3:RRIRRP, PS19-4:RAIARRIRR, PS19-5:(RIFIASRRIRRP)<sub>2</sub>, PS19-6:RIIIRRIIRRP)を調製し、PS plateに対する認識部位を同定した。その結果、2種類のペプチド(PS19-4:RAIARRIRR および PS19-6:RIIIRRIIRRP)がこれまでの5倍以上の親和力を有することが明らかとなった。さらに、PS19-6ペプチドの6つの変異体(PS19-6L:RLLLRLRR, PS19-6V:RVVRRVRR, PS19-6A:RAARRARR, PS19-6G:RGGRRGRR, PS19-6S:RSSRRSRR, PS19-6T:RTTRRTRR,

PS19-6M, RMMRRMR, PS19-6K:KIIKKIKK, PS19-6H, HIIHHIHH) の変異体を作製し、親和力の違いを比較したところ、PS19-6L, PS19-6V, PS19-6A, PS19-6G, PS19-6S, PS19-6T, PS19-6M から高い親和力が確認された。これらの中でも PS19-6, PS19-6L の親和力ならびに安定性は最も高く、タンパク質固定化用ペプチドタグとして有用であることが示された。さらに、PS19-1 および、PS19-6 ペプチドを固相合成し、様々な条件における親水性 PS plate に対する親和力を比較したところ、イオン強度ならびに変性剤存在下においてその親和力が著しく低下することが明らかとなった。

以上の結果より、PS19-6 を始めとする PS-tag は、親水性 PS plate に対して立体構造を伴う静電的相互作用で主に吸着していることが明らかとなった。

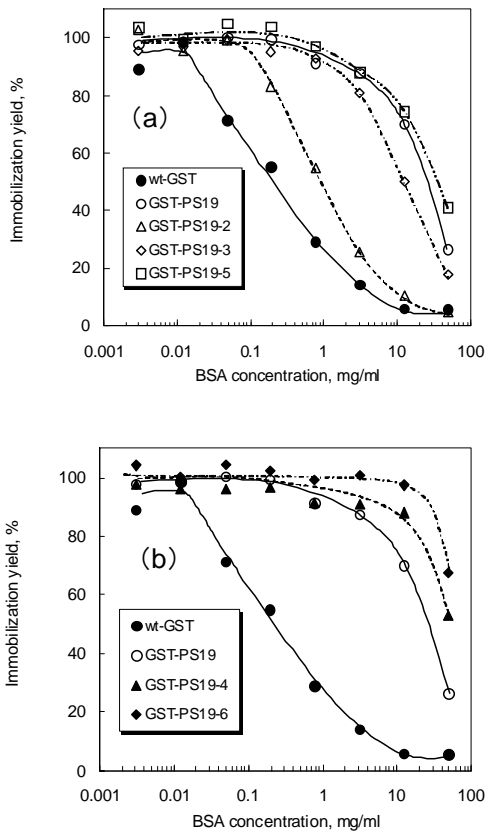


図 1 アミノ酸配列の違いによる PS-tag 融合 GST の固定化率変化

- (a) PS19, PS19-2, PS19-3, PS19-5  
(b) PS19, PS19-4, PS19-6

(2) PS-tag の特異的認識が可能な PS 表面の作製

PS-tag の特異的認識が可能な親水性 PS 基板表面の作製を検討した。種々の親水化技術を検討したところ、 $O_2$  プラズマ照射による表面親水化が有効であることが確認された。 $O_2$  プラズマ照射時間が PS-tag の認識に及ぼす影響を検討した結果、出力 30W の条件下において 30 秒以上の照射時間で PS-tag の認識が可能となることが明らかとなった。各メーカーより市販されている疎水性 PS プレートについて上記の条件でプラズマ照射を行ったところ、いずれについても PS-tag 融合一本鎖抗体の高密度な固定化が可能であった。以上のことから  $O_2$  プラズマ照射によって PS-tag の特異的認識が可能な PS 表面の作製に成功したといえる。

(3) PS-tag 融合 scFv の大量生産の検討

酵母 *P. pastoris* を用いる PS-tag 融合 scFv の大量生産を検討した。GS115 株の染色体上に scFv ならびに PS-tag 融合 scFv の遺伝子を導入したところ、scFv の発現は確認できたが、PS-tag 融合 scFv の発現は確認できなかった。そこで、PS-tag 融合 scFv を組換え大腸菌内でインクルージョンボディとして大量生産した。さらに、PS-tag の PS plate への親和力を利用した固相リフォールディング法 (On-Chip Refolding 法) を開発し、図 3 に示すとおり、半変性状態の PS-tag 融合 scFv を PS 基板上に選択的に固定化、さらに PS 基板上を PBST で洗浄することによって抗原結合活性を高度に回復できることを示した。

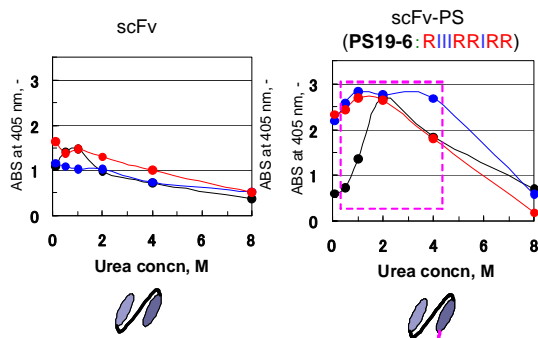


図 2 On-Chip Refolding 法による抗原結合活性の回復

(4) PS-tag 融合 scFv のデザイン

scFv の立体構造に基づき、抗原認識部位が溶液側に向けては以降固定できるように PS-tag の導入位置を検討した。図 4 に示すように、従来の scFv-PS に加えて、PS-tag を分子内部に導入した scFv-(PS)、さらには分子

内部ならびに C 末端部の双方に導入した scFv-PSII を新たに作製した。これらを On-Chip Refolding 技術によって基板上に固定化、さらには抗原結合活性の回復を検討したところ、PS-tag を 2 本有する scFv-PSII が最も高い抗原結合活性が得られた。scFv-PSII は、4 M Urea 共存下においても高い親和力で親水性 PS 基板に固定化可能である為、低コストかつ高感度な抗体固定化基盤の作成が可能となった。

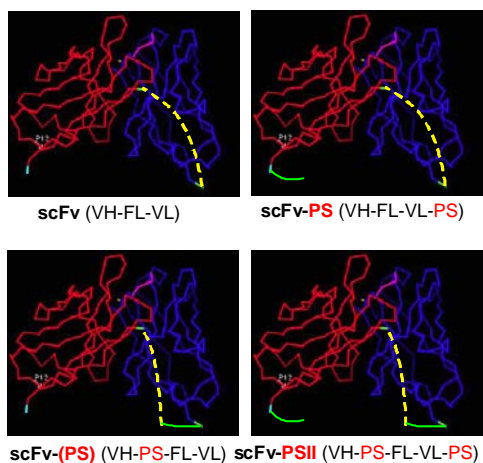


図 3 本研究で作製した PS-tag 融合 scFv

#### (5) PS-tag 融合 scFv と whole 抗体の比較

PS-tag 融合 scFv のイムノアッセイにおける有用性を評価する為に、酵素免疫測定 (ELISA) を行った。尚、比較対象として従来の完全長抗体を用いる測定も実施した。図 5 に示すとおり、従来法である Whole 抗体を用いる ELISA 法と比較して、On-Chip Refolding 法によって固定化した PS-tag 融合 scFv 固定化基板の方が 10 倍以上の高感度な結果となった。特に、PS-tag を分子内部ならびに C 末端部に有する scFv-PSII は感度、シグナル強度共に大幅な向上が見られた。本技術とこれまでに開発した One-step ELISA 技術を組み合わせることによって PS-tag 融合 scFv を用いる低コスト、高感度、ハイスループットな免疫診断法の確立が示唆された。

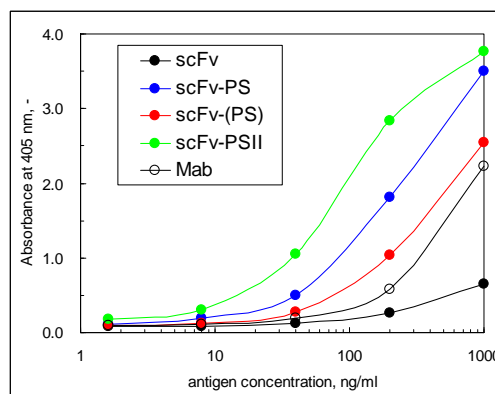


図 4 ELISA による PS-tag 融合 scFv と Whole 抗体の比較

#### 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 3 件)

① Y. Kumada, K. Hamasaki, Y. Shiritani, T. Ohse, M. Kisimoto, Efficient immobilization of a ligand antibody with high antigen-binding activity by use of a polystyrene binding peptide and an intelligent microtiter plate, *Journal of Biotechnology*, 査読有, 2009, vol. 142, pp. 135-141

② Y. Kumada, Y. Shiritani, K. Hamasaki, T. Ohse, M. Kisimoto, High biological activity of a recombinant protein immobilized onto polystyrene, *Biotechnology Journal*, 査読有, 2009, vol. 4, pp. 1190-1197

③ Y. Kumada, K. Hamasaki, Y. Shiritani, A. Nakagawa, D. Kuroki, T. Ohse, D. H. Choi, Y. Katakura, M. Kishimoto, Direct Immobilization of Functional Single-Chain Variable Fragment Antibodies (scFvs) onto a Polystyrene Plate by Genetic Fusion of a Polystyrene-Binding Peptide (PS-tag), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読有, 2009, vol. 395, pp. 759-765

[学会発表] (計 5 件)

① Y. Kumada, T. Ohse, M. Kishimoto, Novel polystyrene binding peptide (PS-tag) for site-specific immobilization and orientation control of recombinant antibody fragments, APBioChEC 2009, 神戸, 2009. 12. 1

② 熊田陽一, ポリスチレン親和性ペプチド

を利用したタンパク質の部位特異的固定化と配向制御, バイオマテリアル学会年次大会(招待講演), 京都, 2009.11.17

③ 熊田陽一, 大瀬 琢人, 岸本 通雅, ポリスチレン基盤への低分子抗体の部位特異的固定化と活性発現, 化学工学会秋季大会, 広島, 2009.09.16,

④ Y. Kumada, T. Ohse, M. Kishimoto, Novel Single-Chain Fv Antibody-Immobilized Polystyrene Supports: Its Potential and Possibility for Antibody Microarray, International Congress of Antibody, 北京(中国), 2009.05.23

⑤ Y. Kumada, T. Ohse, M. Kishimoto, Development of Rapid and Sensitive ELISA Systems by Use of Polystyrene Binding Peptides (PS-tags) and Intelligent Microtiter well plate, Biomarker Assay Development, San Diego (USA), 2009年1月26日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊田 陽一 (KUMADA YOUICHI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教  
研究者番号 : 70452373

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :