

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月12日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659116

研究課題名（和文） 高感度次世代抗体チップ開発のためのタグ付抗体産生マウスの作製と抗体機能の検討

研究課題名（英文） Development and analysis of a tagged antibody producing mouse for the creation of a new antibody array technology

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

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を作製した。タグを導入したIgGを培養細胞発現系で作製し、基板に固定し、基板上でのタグ付抗体の固定状態を評価した。本研究の遂行には純度の高いタグ付抗体を大量に作製する必要があることが確認され、タグ付抗体の大量生産システムの開発を行った。

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, where the antibodies were secreted and purified from their conditioned medium. Then, they were fixed to the substrate to evaluate the state of the antibody on the substrate with or without the tag. As a result, it was confirmed that a high purity of tagged-antibodies are necessary in large quantities for the creation of the antibody array. Therefore, a high-throughput production system of the tagged-antibody was developed, which would be a powerful tool in creating a new technology for antibody arrays.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：腫瘍検査学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：蛋白チップ

1. 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。研究代表者らはこれまでに、ダイヤモンド様表面加工特殊基板にタグ付蛋白を高密度かつ安定的に固定化する技術を開発している。

2. 研究の目的

本研究の目的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、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。

3. 研究の方法

抗体蛋白である免疫グロブリン (IgG) は重鎖と軽鎖が2分子ずつ重合した4量体で、抗原認識部位は遺伝子組み換えによる多様性がある。IgG重鎖遺伝子にタグを付加した組み換え蛋白発現ベクターを構築し、培養細胞系で組み換え型タグ付IgG重鎖がIgG軽鎖と重合するか検討を行った。次に、抗体を基板に固定する条件設定を行った。また、本研究の遂行のためには純度の高い抗体を大量に作製する必要があり、タグ付抗体の大量生産システムの開発を行った。

4. 研究成果

(1) 組換え型抗体の作製

組換え型抗体を培養細胞発現系で作製した。抗ヒスチジンタグ (ヒスタグ) 抗体産生ハイブリドーマから遺伝子をクローニングしてIgG重鎖発現ベクターとIgG軽鎖発現ベクターを作製した。これらベクターをCOS7細胞にトランスフェクションし、培養上清からプロテインGで抗体を回収・精製した。通常の血清含有培地ではウシ血清由来IgGの混入により基板への固定に支障が生じたので、無血清培地を使用する方法に変更した。

(2) 無血清培地による組換え型抗体の作製

無血清培地を用い、培養細胞発現系で組換え型抗体を作製し、(1)と同様に回収した。

培養細胞発現系で調製できる抗体の量は培地1Lあたり100 μ g程度であった。ハイブリドーマでは1Lあたり24mgが回収されたので、極めて微量であった (図1)。

	ハイブリドーマ (親細胞株) 由来抗体	タグなし 組換え型 抗体	タグ付組換え 型抗体 (1回目)	タグ付組換え 型抗体 (2回目)
試料番号	FF0024	FF0028	FF0033	FF0053
日付	2011.9.16	2011.10.14	2011.11.22	2012.2.20
濃度	1.25 mg/ml	35.6 μ g/ml	24.1 μ g/ml	470 μ g/ml
量	19.5 ml	2.4 ml	0.5 ml	0.245 ml
タンパク総量	24.375 mg	85.44 μ g	12.05 μ g	115.15 μ g

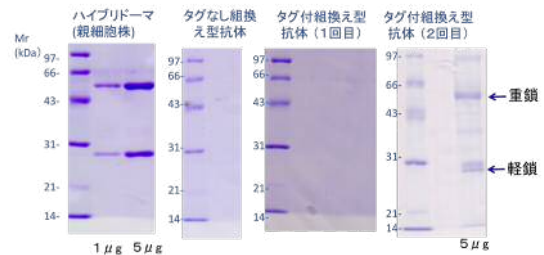


図1 無血清培地から回収された組換え型抗体の量(上)とSDS-PAGE像(下)

(3) 組換え型抗体の抗体機能の検討

ELISA法による抗体活性検定では、組換え型抗体は親細胞株のハイブリドーマ由来のヒスタグ抗体より低い傾向がみられたが、タグの有無による抗体活性の差はみられなかった (図2)。また、タグ付組換え型抗体を一次抗体として用いたウェスタンブロッティングで、タグを付加しても抗体が抗原認識能を保持することを確認できた。

	ハイブリドーマ (親細胞株) 由来抗体	タグなし 組換え型 抗体	タグ付組換え 型抗体 (2回目)
5 μ g/ml感作のみ			
試料番号	FF0024	FF0028	FF0053
10 μ g/ml	1.184	1.234	1.149
1 μ g/ml	1.213	0.404	0.398
0.1 μ g/ml	0.554	0.069	0.075
Blank(PBS)	0.007	0.014	0.010
培養上清	1.184	0.296	0.329

図2 ELISA法による抗体活性検定

(4) 抗体の基板固定条件の検討

抗体チップのプロトタイプとして、通常の抗体を3x3mm大の基板へ固定した。まず、タグの無い抗体を用いて抗体固定の条件検討を行った。抗体を各種濃度で基板にスポット固定・洗浄後、標識抗体を用いた蛍光抗体

法で基板上的の抗体を検出した (図3)。結果は抗体スポット濃度 0.05 mg/mL まで蛍光検出可能であった。本抗体の抗原であるヒスタグ付加緑色蛍光蛋白 (His-EGFP) 溶液を用いて、基板上での抗原検出反応を行った (図4)。抗原検出には抗体スポット濃度 0.3 mg/mL 以上が必要であった。抗原溶液の濃度は 0.1~10 μ M まで検討し、0.1 μ M まで抗原の検出に成功した。

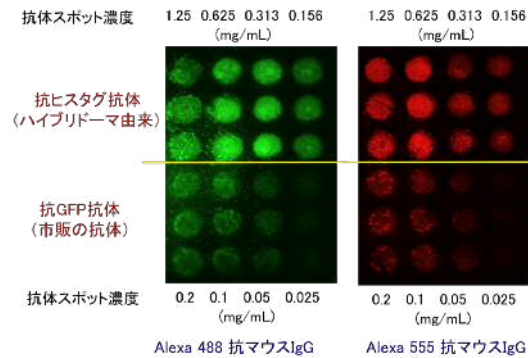


図3 基板に固定した抗体の検出(蛍光抗体法)

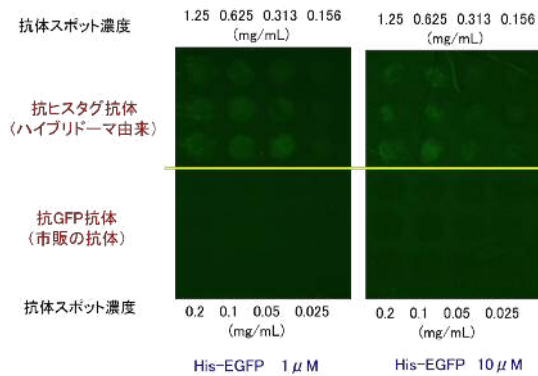
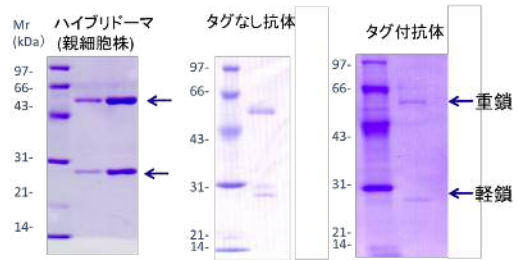


図4 基板上の抗体による抗原の検出

(5) タグ付抗体大量生産システムの開発

IgG 重鎖発現ベクターと IgG 軽鎖発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、タグ付抗体産生安定発現細胞株を樹立した。無血清培地を用い組換え型抗体を作製し、純度および抗体活性について検討した。純度の検定は SDS-PAGE と Native-PAGE で行った。その結果、少量であるが純度の高いタグ付抗体が得られた (図5)。抗体活性は ELISA 法で検定し、抗原認識能が保持されていることを確認した (図6)。

1. SDS-PAGE (変性, 12.5 % gel)



2. Native-PAGE (未変性, 5-20 % gradient gel)

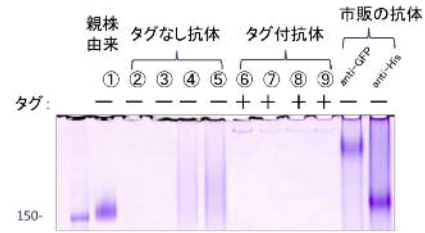


図5 細胞株による抗体の純度の検定

精製抗体量(培地1L)

細胞の種類	ハイブリドーマ	一過性	細胞株	一過性	細胞株
タグ	なし	なし	なし	あり	あり
濃度(mg/mL)	1.25	0.12	0.87	0.15	0.169
量(mL)	19.5	0.4	0.9	0.28	0.35
総量(μg)	24000	48	783	42	59.15

精製抗体活性(ELISA)

10μg/ml	1.184	1.190	1.479	1.285	1.203
1μg/ml	1.213	0.728	0.470	0.837	0.751
0.1μg/ml	0.554	0.141	0.062	0.176	0.236
Blank(PBS)	0.007	0.007	0.022	0.005	0.019
培養上清	1.184	0.315	0.839	0.355	0.617

図6 細胞株による抗体の回収量と活性の検定(ELISA法)

(6) タグ付抗体産生マウスの作製

タグ付抗体産生マウスの作製を行った。今後、本マウスを利用して研究を遂行し、実用化を目指す。

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 古元 礼子、C型肝炎ウイルスの感染拡大と肝炎の進行におけるアポリポ蛋白Eの役割、三井生命厚生年金事業団第41回医学研究助成研究報告集、2010年発行、37-39頁(査読なし)

[学会発表] (計2件)

① 古元 礼子他、高密度蛋白チップを利用し

たマウス脳におけるスタスミン結合蛋白の解析、第 61 回日本電気泳動学会 (JES) シンポジウム 第 7 回日本臨床プロテオーム研究会 (JSCP) 2011 連合大会、2011 年 5 月 10 日、山口大学医学部霜仁会館、宇部市

②古元 礼子、タグ付蛋白による次世代型蛋白チップ技術の開発、Bio Japan 2010、2010 年 9 月 29 日～10 月 1 日、パシフィコ横浜、横浜市

〔図書〕 (計 1 件)

①古元 礼子他、金原出版、臨床プロテオミクス - バイオマーカー探索から個別化医療へ - 第 4 章 解析方法および技術 2. 探索的解析手法 5) プロテインチップ、2012 年発行、146-156 頁 (査読なし)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：抗ヒスチジンタグ抗体
発明者：古元 礼子
権利者：国立大学法人山口大学
種類：特願
番号：2011-153275
出願年月日：2011 年 7 月 11 日
国内外の別：国内

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