

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23656517
研究課題名（和文） クエンチ原理に基づく汎用蛍光免疫測定素子の構築
研究課題名（英文） Construction of versatile fluoroimmunoassay probe based on quench-release principle
研究代表者 上田 宏 (Ueda Hiroshi) 東京工業大学・資源化学研究所・教授 研究者番号：60232758

研究成果の概要（和文）：各種の抗原検出を迅速高感度に行うことができる新規免疫測定原理 Quenchbody 法の発展を目指し、末端を蛍光ラベルした抗体結合蛋白質プローブを作製した。これをビメンチン認識ヒト Fab 抗体断片と混合すると、プローブの色素が抗体内部の Trp 残基によりクエンチされた。さらにこれに抗原ビメンチンを加えると濃度依存的にクエンチが解除され、抗原を蛍光強度の増加として観察することに成功した。

研究成果の概要（英文）：With the aim of extending Quenchbody principle that can detect various antigens in a rapid and sensitive manner, an antibody binding protein probe that is fluorescence labeled at its terminus was constructed. When this probe was mixed with an anti-vimentin human Fab fragment, the dye of the probe was quenched by the Trp residues in the antibody. Moreover, when the antigen vimentin was added, dose-dependent release of the quenching was observed, thus resulted in successful detection of antigen by fluorescence increase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：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：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

最近、応募者らにより、無細胞タンパク質合成系を用いて部位特異的に蛍光ラベルを施した一本鎖抗体可変領域 scFv あるいは Fab 断片の蛍光を測定した場合、その蛍光強度が抗原不在時と比較して添加時に顕著に強まる現象が見出された。この現象は、抗原不在時に可変領域内における VH/VL 相互作用部位近傍のトリプトファンに蛍光色素が配位し、その蛍光強度を低下させる (Quench 状態になる) が、抗原結合時は色素がトリプトファン周辺部位に近接できなくなることから Quench 状態が解消するために起こると

考えられ、このような抗原依存的な Quench 解消現象を起こす抗体可変領域を「Quenchbody」と呼んでいる (Abe, R., H. Ueda et al., *JACS* **133**, 17386-17394 (2011) (図 1))。この方法では、各種抗原と Quenchbody を混合し、その蛍光強度を測定するだけで洗浄操作なしに極めて短時間で濃度測定が可能である。すでに複数の抗体を Quenchbody 化可能なことが確認されていること、Quench 現象に必要なトリプトファンは、95%以上保存されていることから、汎用的な技術となる可能性が高い。

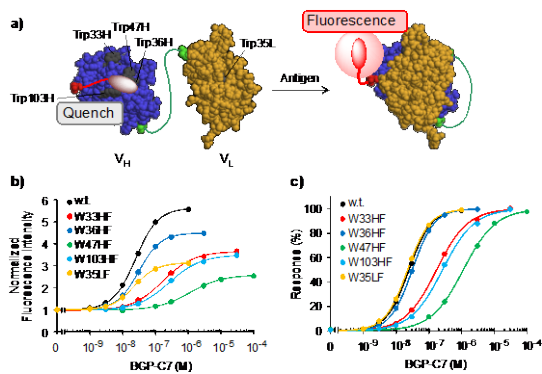


図1 a) Quenchbodyの原理図 b) 可変領域にある各 Trp 残基を Phe に変異させた変異体の蛍光強度変化率の抗原濃度依存性 c) 規格化した蛍光強度変化の抗原濃度依存性。

2. 研究の目的

この理想的な免疫測定素子 Quenchbody の作製のためには、現在の所クローン化した抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、蛍光ラベル化試薬存在下で無細胞蛋白合成を行う必要がある。こうして得られた Quenchbody は一般に高い性能を示すものの、必要な特異的抗体遺伝子のクローン化にはかなりの手間を要する。もし仮に、このような手間の不要な Quenchbody 作製法が実現できれば、既存の膨大な抗体資源を利用でき、本法の適用範囲を飛躍的に拡大しうると期待される。そこで今回、多くの抗体 VL ドメインに特異的に結合することが知られる *Peptostreptococcus magnus* 由来プロテイン L (PpL)、あるいは Fab の H 鎖に結合能のある *Staphylococcus Protein A* および *Streptococcus Protein G* を汎用的な抗体結合蛋白質として用い、各種の蛍光標識 PpL を作製して Fv, scFv, Fab さらには IgG と混合するだけで抗原を蛍光で検出できる Quenchbody 複合体の構築を目指した。

3. 研究の方法

材料となる抗体結合蛋白質としては、最初に幅広い種の L 鎖可変領域 (V_L) 断片に結合することが知られる Protein L (PL) を用い、次にある種のヒト Fab 断片に高い結合能を示す Protein A (PA) ならびに Protein G (PG) を用いることとした。

蛋白質の調製法としては、当初はこれらの N 末端近傍を、通常の Quenchbody と同様に無細胞蛋白質合成系を用いて蛍光ラベルし、蛍光測定その他に用いた。その後、結合定数の決定、酵素修飾など、より大量の蛋白質を必要とする場合には大腸菌発現系を用いてほぼ同じ構造の蛋白質を発現・精製し、その後マレイミド修飾色素、あるいは

酵素を用いてシステイン残基特異的にラベルを行った。

4. 研究成果

まず、平成 23 年度には結合蛋白質として Protein L (PL) を用い、その N 末端近傍を TAMRA ラベルして当研究室でクローン化したリゾチーム認識抗体 Lx1E16 の MBP 融合 V_H, V_L 断片各 160 nM と混合し TAMRA の蛍光強度を観察した。その結果、抗原添加前に約 8 % のクエンチが見られ、そこに 320 nM の抗原を加えることで 2 ~ 3 % の蛍光量増加が観測され、本原理により抗原検出が可能な事が示唆された。しかしこの応答は本抗体と類似の抗リゾチーム抗体の scFv 型 Quenchbody の最大応答 (~ 40 %) には至らないこと、PL 結合能は抗体クローンによってまちまちである事等の問題も見受けられたため、次に平成 24 年度にはより汎用性の高い他の結合蛋白質として Protein G (PG) および Protein A (PA) およびそれらの組み合わせを用いて各種 Fab 断片に結合するプローブの構築を行った。

この結果、PA と PG の各 1 つの結合ドメイン PA-D と PG-B1 をヘリックス形成リンカー (DDAKK)₄ を用いてタンデムに結合したプローブ PAxPG が、市販の中間径フィラメント蛋白質ビメンチンに対するヒト型 Fab に高い結合能を示した。大変興味深いことに、SPR バイオセンサー Biacore 2000 を用いた評価により、PAxPG は天然 PA ないし PG の結合能をはるかにしのぐ結合能を示した (図 2)。

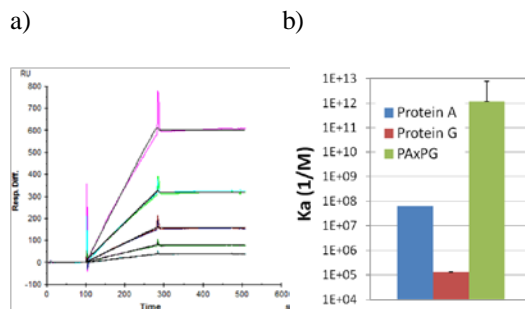


図2 a) SPR sensorgrams for interaction between constructed probe and human anti-vimentin Fab fragment. b) Comparison of calculated association constants K_a for the Fab fragment.

おそらく、この Fab は PA 結合能の高い VH3 に属する V_HD ドメインと、PG 結合能の高い CH1 ドメインの両方で協同的に PAxPG と強く結合したものと考えられる。

次に PAxPG をその N 末近傍で蛍光色素 TAMRA ラベルし、その蛍光活性の評価を行った。TAMRA-PAxPG を 250 μl の 1 mg/mL BSA を含む PBS+0.1% Tween20 (PBST0.1) で希釈し、日立 F-2500 蛍光分光光度計で 530 nm で励起し 580 nm の蛍光強度を測定した結果、測定

開始30分後に、終濃度 100 nM の抗ビメンチン Fab 断片(12.5 μ l)を加えたところ、その後約1時間にわたり蛍光強度の減少が観察された。これに対し、Fab の代わりに PBST0.1 を加えた場合には明らかな減少は見られなかった。なお全ての蛍光強度は、その溶液量変化に伴う減少については補正して示している。これをもとに、Fab 断片投入後の蛍光強度変化を Fab 断片投入時の蛍光強度を1として規格化して表したところ、Fab 断片を投入したサンプルにおいて、投入しなかったサンプルと比べて有意な蛍光強度減少(最大約9%)が観察された(図3)。

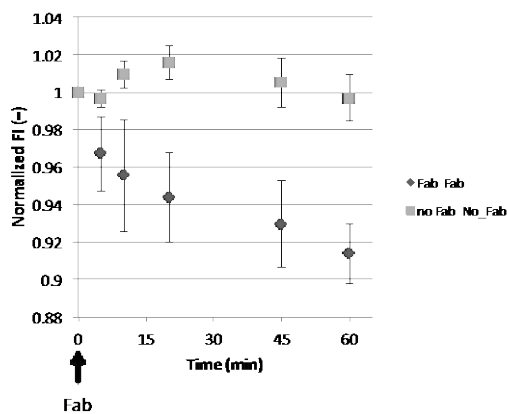


図3 エラーバーは3回の測定の標準偏差SDを示す。

次に、Fabを加えたサンプル2種類に対し、更に抗原ビメンチン(終濃度を示す)あるいはPBST0.1各13.6 μ lを段階的に加え、蛍光強度変化を測定した結果が図4である。標識プローブIとFabの混合物(複合体)への抗原添加により、蛍光強度が増加したことがわかる。すなわち、TAMRA-PAxPGが、特に結合能の高いヒト型Fabと結合してQuenchbodyとしての性質を示す可能性が示された。

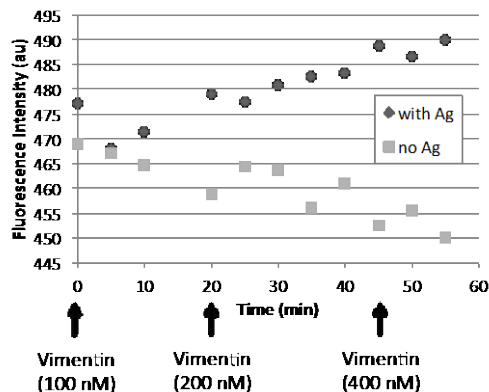


図4 TAMRA-PAxPG/Fab 複合体に抗原を加えた(with Ag)際の蛍光強度。

この結果に関しては、その重要性を鑑み、今

後、更に再現性等の精査をした後、論文発表を行う所存である。

この他、本研究を進めた結果得られた予想外の成果としてPAxPGは各種のIgG Fc部位に強い結合能を持つことがわかり、新規抗体検出・精製試薬としての応用の可能性が示唆された。これについては別の挑戦的萌芽研究において、引き続き検討を行う予定である。

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8件)

1. Y. Ohmuro-Matsuyama, C. I. Chung, and H. Ueda "Demonstration of protein-fragment complementation assay using purified firefly luciferase fragments" *BMC Biotechnol.* (査読有) **13**, 31 (2013).
2. H.-J. Jeong, Y. Ohmuro-Matsuyama, H. Ohashi, F. Ohsawa, Y. Tatsu, M. Inagaki, and H. Ueda "Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies" *Biosens. Bioelectron.* (査読有) **40**, 17-23 (2013).
3. J. Dong, A. Sakurai, N. Nomura, E. Y. Park, F. Shibasaki, and H. Ueda "Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus" *PLOS ONE* (査読有) **8**, e61158 (2013).
4. K. Minami, M. Ihara, S. Kuroda, H. Tsuzuki, and H. Ueda "Open-sandwich molecular imprinting: making a recognition matrix with antigen-imprinted antibody fragments" *Bioconj. Chem.* (査読有) **23**, 1463-1469 (2012).
5. X. Liu, M. Eichenberger, Y. Fujioka, J. Dong, and H. Ueda "Improved detection sensitivity and selectivity attained by Open-Sandwich selection of an anti-estradiol antibody" *Anal. Sci.* (査読有) **28**, 861-867 (2012).
6. J. Dong, S. Hasan, Y. Fujioka, and H. Ueda "Detection of small molecule diagnostic markers with phage-based Open-Sandwich Immuno-PCR" *J. Immunol. Methods* (査読有) **377**, 1-7 (2012).
7. M. Kojima, H. Iwai, J. Dong, S. L. Lim, S. Ito, K. Okumura, M. Ihara, and H. Ueda "Activation of circularly permuted β -lactamase tethered to antibody domains by specific small molecules" *Bioconj. Chem.* (査読有) **22**, 633-641 (2011).
8. R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M.

Ihara, H. Takagi, T. Hohsaka, and H. Ueda "Quenchbodies" : quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence" *J. Am. Chem. Soc.* (査読有) **133**, 17386-17394 (2011).

〔学会発表〕(計10件)

1. 児島 智樹, 大橋広行, 上田宏, 高親和性抗体結合タンパク質を利用した蛍光免疫センサー構築法の開発, 化学工学会 第78年会, 2013年03月19日, 大阪
2. 上田 宏, 抗原結合により光る蛍光標識抗体Quenchbody (Q-body)の開発, 第35回日本分子生物学会年会(招待講演), 2012年12月14日, 福岡
3. 児島 智樹, 大橋広行, 上田宏, 抗体結合タンパク質を利用した蛍光免疫センサー構築法の検討, 化学工学会 第44回秋季大会, 2012年9月19日, 仙台
4. 上田 宏, 新規蛍光免疫素子Quenchbodyによる各種バイオマーカーの迅速高感度検出, 日本プロテオーム学会2012年大会(招待講演), 2012年07月27日, 東京
5. Ueda, Hiroshi, "Quenchbodies" : quench-based antibody probes that fluoresce upon antigen binding, Biosensors 2012(招待講演), 2012年05月16日, Cancun, Mexico.
6. Hee-Jin Jeong, Hiroyuki Ohashi, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Masaki Inagaki and Hiroshi Ueda, Detection of vimentin serine phosphorylation by Quenchbodies, AsiaSense 2011 (<http://www.asiasense2011.org/>), 2011/10/26, 済州, 韓国
7. 大橋 広行・阿部 亮二・高木 広明・上田 宏, 蛍光標識抗体Quenchbodyを利用した麻薬・覚醒剤類の迅速高感度検出, 蛍光標識抗体Quenchbodyを利用した麻薬・覚醒剤類の迅速高感度検出, 2011/09/15, 名古屋
8. 大室(松山)有紀, 北岡 優一, ジョンヒジン, 達吉郎, 稲垣 昌樹, 上田 宏, オープンサンドイッチ原理と新規相互作用検出系による蛋白質リン酸化修飾の検出, 第11回蛋白質科学学会年会 2WB-3(招待講演), 2011. 6. 8., 大阪
9. 上田 宏, 非天然アミノ酸導入法による蛍光免疫センサー蛋白質Quenchbodyの創製, 第11回蛋白質科学学会年会 1WC-2(招待講演), 2011. 6. 7., 大阪
10. Hiroshi Ueda, Ryoji Abe, Hiroaki Takagi, and Takahiro Hohsaka,

Quenchbodies : Antibody Probes That Fluoresce Upon Antigen Binding (Selected as oral presentation), Quenchbodies : Antibody Probes That Fluoresce Upon Antigen Binding (Selected as oral presentation), 2011/5/12, 上海, 中国

〔図書〕(計1件)

1. 上田 宏, ジョンヒジン, 実験医学増刊一人と医学のステージへ拡大する細胞周期 2013 中山敬一編, p. 194-200, 羊土社, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称 : 抗体結合タンパク質
発明者 : 上田 宏, 大橋 広行, 阿部 亮二
権利者 : 東京大学, ウシオ電機
種類 : 特許
番号 : **2013028284**
出願年月日 : **2013/2/15**
国内外の別 : 国内

○取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ueda.res.titech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 宏 (Ueda Hiroshi)
東京工業大学・資源化学研究所・教授
研究者番号 : 60232758

(2) 研究分担者

大橋 広行 (Ohashi Hiroyuki)
東京大学・特任研究員
研究者番号 : 40589454

(3) 連携研究者

大室(松山)有紀 (Ohmuro-Matsuyama Yuki)
東京大学・特任研究員
研究者番号 : 30571088