

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590859

研究課題名(和文)次世代薬毒物スクリーニング法の開発を目指した抗体ファージライブラリーの構築と応用

研究課題名(英文)Application of antibody engineering in forensic toxicological analysis

研究代表者

笹尾 亜子(Sasao, Ako)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：80284751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は抗体ファージライブラリー法などの遺伝子工学的技術によって抗薬物抗体を迅速に調製し、それによる薬毒物の免疫学的スクリーニング法を構築する事を目的とする。研究期間内には、ライブラリーの出発材料となる抗体遺伝子(抗うつ薬フルボキサミン及び抗精神病薬フェノチアジン類に対する各抗体2種)を抽出し、そのアミノ酸配列を決定した。また、ファージライブラリーで得られた一本鎖抗体を想定し、各抗体遺伝子を元に組換え抗体を調製してその性質を調べた。その結果、モノクローナル抗体と同等の結合能が示された。さらに、簡便な検出を可能とするQ-body法を利用したフルボキサミン検出法を構築してその性質を調べた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to facilitate preparation of anti-drug antibodies using antibody engineering such as phage display technology. In this study, we acquired cDNAs that encode immunoglobulin variable regions (VL and VH) from hybridoma cells producing anti-drug monoclonal antibodies (antidepressant, fluvoxamine; FLV, antipsychotic, phenothiazines; PTZ), and determined their DNA sequences. Then, we constructed expression vectors and prepared single chain variable fragment (scFv) recognizing FLV or PTZ. Their physicochemical properties were examined by ELISA or SPR analysis. Anti-FLV or anti-PTZ scFvs were found to have specific and sufficient binding to their each antigen. Also, we prepared an FLV Quenchbody protein that was a novel antibody-based fluorescent biosensor and examined its physicochemical properties.

研究分野：法医中毒学

キーワード：薬毒物スクリーニング 法医中毒学 組換え抗体 一本鎖抗体 フルボキサミン 向精神薬

1. 研究開始当初の背景

法医解剖や検屍・検案時の死因診断において、その死因に薬毒物の関与があったかどうかを確認する事は重要であり、その検査手段は簡便・迅速・正確であることが望まれる。この点において抗体を用いた免疫学的検出法は非常に有用である。しかし、市販のキットで検出可能な薬物はごく一部に限られており、その他多くの薬毒物は簡易なスクリーニング法を持たない。そこで、我々は国内において中毒事例が多い薬物や、将来的に中毒事例の増加が危惧される薬物に対する免疫学的簡易検出法に関する研究を行ってきた。しかし、それらの研究において必須材料となるモノクローナル抗体の作製に約半年もの長期間を要する事や、対象薬物によっては化学構造上の不安定さから免疫動物内で抗原として機能せず、結果として抗体作製に至らない場合を多く経験してきた。この経緯から、我々はこれらの問題点を克服できる抗体ファージディスプレイライブラリー法による抗薬物抗体の検索・調製に関する研究に着手した。

抗体ファージディスプレイライブラリー法は、遺伝子工学的技術により試験管内での抗体検索を可能とするものであり、動物への免疫が不要である事、毒素や糖鎖など免疫困難であったものに対する抗体調製を可能にするなどの特徴を持つ。つまり、従来のハイブリドーマ法の問題点を克服し、抗薬物抗体の調製を迅速化する事が可能となる技術である。

2. 研究の目的

上記に述べた背景から、我々は抗体作製にかかる時間の短縮が可能で、多種多様な薬物に対する抗体の同時作製が容易になりえる抗体ファージライブラリー法を用いた次世代薬物スクリーニング法の開発を目指す本研究課題を計画した。

本研究課題では、1)薬毒物などの低分子化合物に対する抗体の検索・調製が可能となる抗体ファージライブラリーの構築、及び2)一本鎖抗体等の組換え抗体タンパク質を用いた新たな薬毒物検出法の開発、という二つの課題を目的として研究を進めた。特に本研究期間内においては、抗体ファージライブラリー構築の出発材料となる抗体遺伝子の抽出及び配列情報の確定と、得られた組換え抗体を想定した薬物検出法の構築を行った。なお、本研究における対象薬物には、現在簡易な検出法のない向精神薬の中からSSRI系抗うつ薬フルボキサミンと抗精神病薬フェノチアジン類を選出し、これらに対する検出法構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究の方法としては、抗うつ薬フルボキサミン (FLV) に対する一本鎖抗体 (scFv) 発現ベクターの構築と scFv 調製を行い、そ

の特性を調べた (第1項)。また、抗精神病薬フェノチアジン (PTZ) 類に対する抗体産生ハイブリドーマを出発材料として抗体遺伝子のアミノ酸配列の確認を行い、その一本鎖抗体発現ベクターを構築、scFv 調製を行った (第2項)。さらに検出法として Q-body 技術を利用するため、FLV に対する Q-body 発現ベクターの構築と Q-body 調製を行い、その特性を調べた (第3項)。以下に、各々の実験方法について述べる。

(1) 抗 FLV 一本鎖抗体の調製と特性

抗 FLV 一本鎖抗体発現ベクターの構築
発現ベクターは、既報 (雑誌論文) の抗 FLV 抗体遺伝子を出発材料として抗体可変領域 (V_L , V_H) の各遺伝子をリンカー配列で連結して作製した。この際、N 末端から V_L V_H の順で繋いだものを LH 型、 V_H V_L の順で繋いだものを HL 型として各々調製した (図1)。なお、C 末端には精製・検出のためのタグ配列を挿入した。

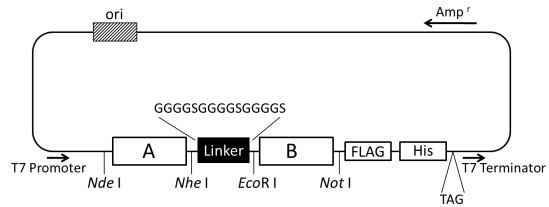


図1 抗 FLV 一本鎖抗体発現ベクター

LH 型) A; V_L , B; V_H を挿入、
HL 型) A; V_H , B; V_L を挿入

一本鎖抗体の調製

各ベクターで形質転換した大腸菌を培養・タンパク発現させた後に菌体を回収した。菌体は緩衝液で再懸濁し、氷冷下で超音波破碎した。破碎液は遠心分離して上清を除き、6M 塩酸グアニジンを含む緩衝液で沈殿物を再溶解した。室温で一晩混和した後、アフィニティークロマトグラフィーにて目的分画を回収した。次に、透析法にて変性剤を徐々に除いてタンパク質の巻き戻し操作を行い、最終的にゲルろ過クロマトグラフィーを行って目的タンパク (抗 FLV 一本鎖抗体) を精製した。

ELISA

得られたタンパクは、ELISA にて FLV 結合活性の確認を行った。ELISA は、既報 (雑誌論文) のように抗原 (FLV 結合オボアルブミン; OVA-FLV) を固相化したプレートに対し、一次抗体として調製したタンパク、二次抗体として酵素標識抗タグ抗体を用いて行った。

また、得られたタンパクの抗原特異性を調べるために、各種薬物との非競合試験にてその抗原特異性を調べた。つまり、各種濃度の薬物と得られたタンパクを 30 分間室温下でプレインキュベーションし、その反応液を試

料として上記と同様に ELISA を行った。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析

SPR 解析は、既報 (雑誌論文) のように OVA-FLV を固相化したセンサーチップを用いて、調製したタンパクとの分子間相互作用解析を行って結合定数等を算出した。

(2) 抗 PTZ 一本鎖抗体の調製

抗体可変領域 DNA 配列の確認

既に調製済みの抗 PTZ 抗体産生ハイブリドーマから RNA を抽出し、RT-PCR によって抗体可変領域 DNA (V_H , V_L) の増幅・精製を行った。pBluescript II KS(+) をベクターとして、各 DNA (V_H , V_L) を挿入したプラスミドを調製し、これを用いて大腸菌を形質転換した。コロニー PCR でスクリーニングした後、プラスミドを抽出、その遺伝子配列をキャピラリー DNA シーケンサーにて確認した。

抗 PTZ 一本鎖抗体発現ベクターの構築

で確定した V_H , V_L ドメイン DNA を PCR にて増幅し、第 (1) 項のプラスミドベクターと共に目的箇所を制限酵素で各々切断した。各 DNA 試料の精製後、プラスミドへのライゲーション、大腸菌への形質転換を行い、遺伝子配列の確認を行った。

一本鎖抗体の調製と ELISA による検定

抗 PTZ 一本鎖抗体の調製は第 (1) 項と同様に行った。また、調製した scFv の ELISA は固相化抗原に OVA-PTZ を用い、第 (1) 項と同様に行った。

(3) FLV に対する Q-body 調製

Q-body 発現ベクターの構築

東京工業大学の上田宏教授よりご恵いただいた 2 種の Q-body 発現ベクター (pUQ1H, pUQ2) を用いて、抗 FLV 抗体遺伝子の V_H , V_L 遺伝子を挿入してベクターを構築した。なお、いずれのベクターにおいても H 鎖 C 末端と L 鎖 C 末端に精製・検出用のタグ配列が導入されており、さらに蛍光色素の標識を目的として pUQ1H の H 鎖 N 末端に 1 つ、pUQ2 の H 鎖、L 鎖の各 N 末端に 1 つずつのシステインタグ配列が導入されている。

Q-body の調製

で構築したベクターを用いて大腸菌を形質転換し、培養・タンパク発現させた後に菌体を回収した。菌体は超音波破碎し、その遠沈上清をアフィニティー精製して Q-body 精製タンパクを得た。

調製した Q-body 精製タンパクに対し、還元剤を用いてシステインタグを還元して色素標識を行った。蛍光色素として pUQ1H には TAMRA を、pUQ2 には ATTO 520 を用いた。未反応の色素を除去するため再度アフィニティー精製を行い、目的とする 2 種の Q-body タンパク (TAMRA-UQ1H, ATTO520-UQ2) を得

た。

Q-body の FLV 反応性

調製した Q-body について、ELISA にて抗原結合能の有無を確認した。ELISA は第 (1) 項と同様のプレートに、一次抗体として Q-body を、二次抗体として酵素標識抗タグ抗体を用いて行った。

また、蛍光分光光度計を用いて Q-body の FLV 反応性を調べた。励起光/蛍光波長は TAMRA-UQ1H では 546/575 nm を、ATTO520-UQ2 では 524/545 nm を用いた。1% 牛血清アルブミンを含む緩衝液に で調製した Q-body を加え、2 分ごとに 20 分間測定し、その後 FLV を終濃度 10 μ M になるように添加して 2 分ごとに 20 分後まで測定を行った。得られたデータは、FLV を添加していない対照群の蛍光強度を用いて補正を行った。

4. 研究成果

(1) 抗 FLV 一本鎖抗体の調製と特性

調製した抗 FLV 一本鎖抗体 (LH 型及び HL 型) は、大腸菌 300ml 培養あたり 4.5 mg、2.9 mg のタンパク量を回収できた。ELISA の結果、何れも FLV との結合が確認された。さらに、Biacore による相互作用解析の結果、各一本鎖抗体と FLV の解離定数は LH 型で 7.6×10^{-9} M、HL 型で 3.8×10^{-9} M と一般的なモノクローナル抗体と同等の結合能を示した (表 1)。また、LH 型より HL 型の結合能が僅かに高い事が示唆され、本検討において設計された一本鎖抗体では HL 型のタンパク構造が抗原結合に有利である事が確認された。また、FLV 以外で非特異的の反応を示す薬物は、元来のモノクローナル抗体と同様の結果であり、scFv への構造転換が抗原結合能や特異性に影響しない事が示された (図 2)。

表 1 各 scFv の速度パラメーター

	$k_a \times 10^4$ (1/MS)	$k_d \times 10^{-4}$ (1/s)	$K_D \times 10^{-9}$ (M)
LH	4.6 ± 0.07	3.5 ± 0.03	7.6 ± 0.18
HL	6.9 ± 0.18	2.6 ± 0.12	3.8 ± 0.26

(2) 抗 PTZ 一本鎖抗体の調製

抗 PTZ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから抽出した抗体可変領域のアミノ酸配列は Kabat database と照らし合わせた結果、 V_H は Ig H 鎖サブグループ に、 V_L は Ig 鎖サブグループ に近似する事が明らかとなった。

調製した抗 PTZ 一本鎖抗体は、PTZ 類であるクロロプロマジン、プロメタジン及びレボメプロマジンとの結合は確認できたが、保存中の抗体活性低下が著名であった。そのため、構造安定性を向上させるための改変が今後の課題である。

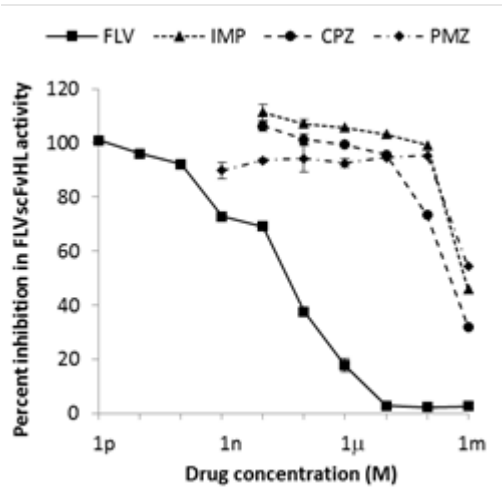


図2 各種薬物との反応性
FLV: fluvoxamine, IMP: imipramine,
CPZ: chlorpromazine, PMZ: promethazine

(3) FLV に対する Q-body 調製

調製した Q-body は、ELISA の結果、何れも FLV 特異的な結合能を有することが明らかとなった。さらに、Q-body の FLV 反応性を調べた蛍光分析の結果、TAMRA-UQ1H では 10 μM FLV により 1.3 倍、ATT0520-UQ2 では 1.6 倍の蛍光強度上昇が確認された (図 3)。また、いずれの反応も 5 分以内に平衡状態に達し、その反応速度は ATT0520-UQ2 が TAMRA-UQ1H よりやや早かった。

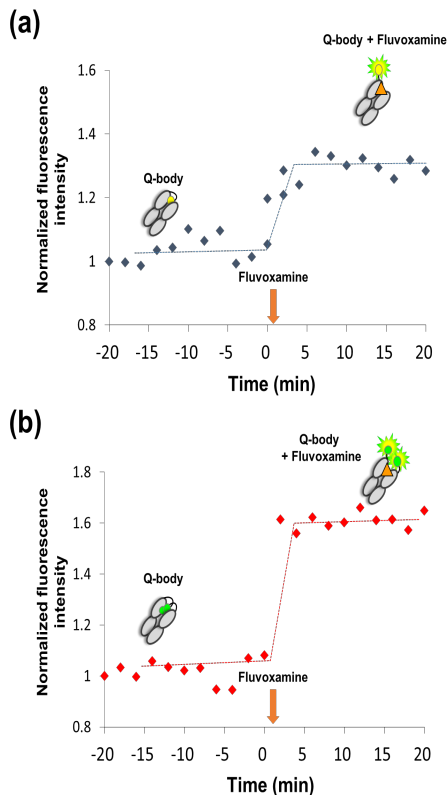


図3 FLV による Q-body 蛍光強度変化
(a)TAMRA-UQ1H, (b)ATT0520-UQ2

本検討によって調製した Q-body は、10 μM FLV を検出できる事が明らかとなった。しかし、実務応用のためには治療血清濃度である 0.5 μM 程度を検出できることが望ましい。この検出感度の向上については、抗 FLV 抗体を遺伝子工学的に改変して抗原結合親和性を高める事が必要であろう。また、蛍光強度の上昇率をより向上させるためには、色素-タンパク質間にリンカーを導入するなどの検討で改善可能と考えている。今後は上記の検討を進めながら、実用可能な薬物検出法として改良していく事を予定している。

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1件)

Sasao, A., Suwa, Y, Aso, T, Kohmatsu, H, Ohtsu, Y, Mishima, S, Yonemitsu, K., Morioka, H., Nishitani, Y. Single-chain variable fragment technology in forensic toxicological analysis: production of an antibody to fluvoxamine. Forensic Toxicology, 31 (1), (2013), 62-66.

[学会発表](計5件)

Sasao, A., et al. Application of recombinant antibody engineering to drug screening. Report 1: preparation of anti-fluvoxamine single chain variable fragment (scFv) antibody, 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (2012年06月03~08日, Hamamatsu, Act City Hamamatsu, Japan)

笹尾亜子, 他. 抗うつ薬フルボキサミンに対する一本鎖抗体の調製, 第96次日本法医学会学術全国集会(2012年06月07~09日 浜松市・アクトシティ浜松)

米満孝聖, 笹尾亜子, 他. プタンガス吸引中の体内プタン濃度測定とその代謝物の検出, 第97次日本法医学会学術全国集会(2013年06月26~28日 札幌市・ロイトン札幌)

笹尾亜子, 他. 最近経験したプタンガス吸引中急死の3事例, 平成25年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(2013年10月03~05日 岡山市・岡山コンベンションセンター)

Sasao, A., et al. Application of antibody engineering to drug screening: Preparation of the anti-fluvoxamine Quenchbody -A novel fluorescent biosensor, 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (2014年06月16~20日, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center, Japan)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹尾 亜子 (SASAO AKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80284751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

森岡 弘志 (Morioka Hiroshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20230097

西谷 陽子 (Nishitani Yoko)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：30359997

米満 孝聖 (Yonemitsu Kosei)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10128332