

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420793

研究課題名(和文) 高病原性トリインフルエンザウイルス検出用Quenchbodyの開発

研究課題名(英文) Development of Quenchbody for detection of highly pathogenic influenza virus

研究代表者

董 金華 (Dong, Jinhua)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：80527838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスは我々人類全体に対する脅威であり、それに対する対応は医療システムの大きな負担となるため簡便迅速高感度の検出方法の開発が求められている。本研究ではインフルエンザウイルスを検出するためのQuenchbodyを開発した。この結果、特にATT0520ダブルラベル型において高い感度と応答が見られた。本QuenchbodyはインフルエンザウイルスHAタンパク質と結合すると、色素間で起きた蛍光クエンチが解除され蛍光が回復されると考えられる。Quenchbodyとサンプルを混合し、蛍光強度を測定するだけでウイルスの有無を判断することが出来るため、国民の健康を守るために役に立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus is a threat to our entire humanity and treatment against influenza virus has become a great burden of health care system. Therefore, there is a growing demand for the development of convenient, rapid detection methods with high sensitivity. In this project, we developed a novel immunosensor, Quenchbody for detection of influenza viruses. We first labeled antigen binding fragment of antibody with some fluorescent dyes and those doubly labeled with ATT0520 gave higher sensitivity and better dose response than others. Quenching between fluorescence dye molecules that labeled on Quenchbody is released and results to the recovery of fluorescence while the Quenchbody bound to influenza viral HA protein. With this method, influenza virus can be detected just by mixing up Quenchbody and sample and measurement. The developed influenza virus Quenchbody will be useful to protect public health.

研究分野：抗体工学

キーワード：インフルエンザウイルス 抗体 Quenchbody

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは我々人類全体に対する脅威であり、それに対する対応は医療システムの大きな負担となっている。インフルエンザウイルスは、エンベロープと一本鎖 RNA(-)を持つオルトミクソウイルス科に属しており、A 型、B 型、C 型のウイルスが存在する。ウイルス表面上には、糖タンパク質ヘマグルチニン(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)がスパイク状に配置しており、HA16 種類(H1~H16)、NA9 種類(N1~N9)の組み合わせによって分類されている。インフルエンザウイルスは増殖の過程での連続変異や、分類の異なるウイルスに共通の宿主(豚など)内で不連続変異を起こしやすく、新型インフルエンザウイルスとしてパンデミックを引き起こすことがある。新型インフルエンザは毎年流行するインフルエンザとは抗原性が大きく違うため、急速に感染が広がる。記録に残る最初のパンデミックは1918年のスペイン風邪で、H1N1の変異ウイルスが原因とされ多くの死者を出した。その後も多数のパンデミックが発生し、トータルで死者は一億人以上に昇った。近年大型なインフルエンザ感染がしばしば発生してきた。例えば、2009年に流行したインフルエンザは変異したウイルスが感染を広げて、数千人が命を落とした。また2013年中国でトリインフルエンザ(H7N9)が発生し、131名の感染者の中、35名が死亡した。今後トリインフルエンザウイルスによるパンデミックの発生が予想され、感染症との戦いが続くことが予想される。また、日本特有の高齢社会における安全・安心かつ豊かな活力のある持続可能な成長社会を成し遂げるため、感染症診断技術の開発は緊急の課題である。即ちインフルエンザウイルスを迅速かつ正確に検出することが感染をコントロールするために大変重要である。インフルエンザウイルス検出法の感度と特異性は方法に左右される。検出感度が比較的高いPCR(Polymerase Chain Reaction)法は測定に数時間以上かかり、免疫クロマトグラフィー法のような比較的迅速な方法もあるものの、感度が低く、診断上偽陰性が多い等の問題がある。そのため正確かつ迅速な診断が可能な検出法の開発が求められている。

2. 研究の目的

当グループは抗体を用いた免疫測定法を研究してきた。最初に「抗体の可変領域(抗原結合部位)は抗原がないと不安定だが、抗原が結合すると安定化される」という原理に基づくOpen Sandwich 免疫測定法が考案され、その原理に基づき骨代謝疾患マーカーBGPの測定法、甲状腺ホルモンの測定法など多数の測定法が開発されてきた。その後、当グループはQuenchbody(Q-body)免疫測定法を世界で初めて考案した。Q-body 免疫測定法では、まず蛍光物質を抗体に標識する。す

るとこれが分子の内部に侵入し、主に抗体内の芳香族アミノ酸によって、消光する。しかし、抗原が結合すると、抗体の中にある蛍光物質が開放され、再び蛍光を発するようになる。Q-body 技術の特徴は1)洗浄工程が不要で、少量のサンプルと混合して蛍光強度を測定するだけで測定が完了するため極めて簡便、2)抗体中に存在する保存性の高いトリプトファン(Trp) 残基あるいは他の色素を消光に利用するため、抗体の種類を変えても消光効果が得られ汎用性が高い、などがある。検出操作は、測定しようとする物質が入っているサンプルとQ-bodyを混合し、短時間(数分)インキュベートした後、蛍光強度を測定するだけで、目的物質の含量が分かる、迅速かつ感度の優れた方法である。本研究はインフルエンザウイルスを検出するためのQ-bodyを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

3.1 抗体 Fab 断片発現ベクターの構築

インフルエンザウイルス抗体F16v3 遺伝子をPCRで増幅し、その後、増幅した遺伝子及び発現ベクター-pUQを適当な制限酵素で消化処理を行い、市販DNA精製キットによる精製を行った。制限酵素で処理した抗体遺伝子断片とプラスミドを適切な量を取り、DNAリガーゼを加えて、抗体遺伝子とベクターを連結した。ライゲーションサンプルを用いて、コンピテント大腸菌細胞を形質転換し、LBプレートに播き、コロニーが確認できるまで培養し、出来たコロニーをPCRによるインサートを増幅して、そのサイズが抗体遺伝子と一致することを確認した。その後プラスミドを調製し、挿入配列の解析を行い、目的抗体遺伝子であることを確認した。

3.2 抗体 Fab 断片の発現及び精製

構築したプラスミドを発現用大腸菌株SHuffle T7 lysYのコンピテントセルと混合して、大腸菌を形質転換した。その後、LBプレートに播き、37℃で培養して、形成したコロニーを取り、アンピシリン入りのLB培地で培養し、その後IPTGでFab抗体断片の発現を誘導した。その後、SDS-PAGE電気泳動やWestern blotなどの手法を用いて、誘導前後を比較し、抗体Fab断片の発現を確認した。発現条件を決定した後、ラージスケールで抗体Fab断片の発現を行った。培養した大腸菌を破碎し、菌体内画分を調製した後に、H鎖に付加したHisタグを利用して、アフィニティカラムでタンパク質を精製した。またpUQシステムでは、L鎖にFLAGタグも導入されているので、Anti-FLAG Affinity gelによる精製も行った。精製したタンパク質をSDS-PAGE電気泳動で分離し、その分子量及び純度の確認を行った。その後、作製した抗体の結合能を評価した。具体的には、HAタンパク質をELISAプレートに固定化して、ブロッキングを行った後、精製したFab断片を加

えて、インキュベート及び洗浄の後、HRP 修飾した抗 His タグ抗体を加えて、反応させた。最後に発色基質を加えて HRP によって発色させ、吸光度を測定し、結合能を確認した。

3.3 Fab 型 Q-body(UQ-body) の調製

精製した抗体 Fab 断片を TCEP ゲル (Immobilized Tris (2-carboxyethyl) phosphinehydrochloride Disulfide Reducing Gel, Pierce 社) を使用して、抗体の重鎖可変領域 V_H 、及び軽鎖可変領域 V_L のそれぞれの N 末端に導入されたシステイン (Cys) 残基の還元を行った。Fab 断片を還元した後、遠心して、上清(還元された Fab 断片)を回収した。種々な蛍光色素(例えば、ATT0520-maleimide、TAMRA-maleimide 等)と TCEP 処理後の Fab とを混合し、25 で遮光静置し、蛍光色素の修飾を行った。ゲルろ過グロマトグラフィーや Cut Off 分子ろ過フィルター等を用いて遊離の蛍光色素を除去した。

3.4 UQ-body の評価

蛍光色素で修飾した Fab 型 Q-body を SDS-PAGE 電気泳動によって分離して、蛍光観察装置によって、蛍光でラベリングした UQ-body の分子量、遊離色素の除去を確認した。次に、Bradford 法を用いて精製後の UQ-body の濃度を測定した。作製した UQ-body の抗原結合能力を ELISA によって評価した。

3.5 UQ-body による HA タンパク質の測定

UQ-body を PBST 溶液で適当な濃度まで希釈した後、組換え HA タンパク質を種々の濃度で加えて、蛍光分光光度計 (JASCO FP-8500) を用いて、各濃度での蛍光強度を測定し、本測定方法の感度を評価した。また、数種類トリインフルエンザウイルスとの反応性を測定し、本法の特異性を評価した。

3.6 Avidity による UQ-body 測定法感度改善の試み

本研究では抗体の Fab 断片を用いた。しかし、天然抗体は 2 つの Fab 部分を有するため、avidity 効果により、より強くウイルス粒子上の抗原に結合できると考えられる。出来るだけ天然抗体に近い検出素子を作製するため、Fab の軽鎖定常領域 C_L の末端に 2 量体化タンパク質、WA20 を融合させ、大腸菌にて発現を行った。WA20 は 2 本の長いヘリックスが連結した構造をしており、2 つの WA20 分子がお互いにはさみこむように組み合わせ、安定な二量体を形成する。この設計によって、2 つの Fab 断片が WA20 を通して二量体を形成し、天然抗体に近い分子が作製される。その後、蛍光色素で抗体断片をラベルし、組換え HA と不活化ウイルスを用い、二量体化した UQ-body の検出感度を評価し

た。さらに同様の手法で Fab の 4 量体化も試みた。

4. 研究成果

インフルエンザウイルス認識抗体 (F16v3) の可変領域遺伝子 V_H/V_L を pUQ1H および pUQ2 ベクターにクローニングし、シングルラベル用の Fab 発現ベクター pUQ1H-F16v3 ならびにダブルラベル用の pUQ2-F16v3 の作製に成功した。その後両ベクターを用いて大腸菌 SHuffle T7 lysY を形質転換し、Fab 断片を発現し、TALON IMAC ゲルを用いて精製した。その後、TCEP ゲルを用いて V_H 及び V_L の N 末近傍に導入したシステイン (Cys) 残基の還元を行った。その後、還元された Fab と TAMRA あるいは ATT0520-maleimide とを混合し、25 で遮光静置し、蛍光修飾を行った。さらに抗 FLAG ゲルで精製を行い、遊離の蛍光色素を除去し、UQ-body を得た。SDS-PAGE による分離後、変性剤 DTT を含む塩酸グアニジンを用いて調製した UQ-body の変性度合いを測定した。図 1 に示すように、TAMRA を用いた場合、シングルラベル(図 1A)では 1.3 倍、ダブルラベル(図 1B)の UQ-body は約 1.7 倍の蛍光強度の増加が観察されたに対して、ATT0520 を用いた実験では、シングルとダブルそれぞれ 1.5 倍と 5.0 倍の増加が見られた(図 1C、1D)。

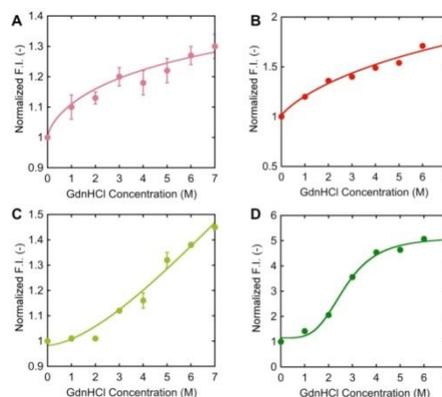


図 1 変性剤による UQ-body 蛍光強度の増加

次は ATT0520 にて調製した UQ-body を用いて、組換え H1N1 A/New Caledonia/20/1999 HA タンパク質の検出を検証した。ATT0520 標識後の UQ-body の SDS-PAGE と蛍光観察の結果、Fab の H 鎖 (Fd 鎖) と L 鎖の標識が確認された。その後、ダブルラベル UQ-body に各濃度の H1N1 HA を加えて蛍光を測定した。結果は図 2 に示す。図 2A は各 HA 濃度 UQ-body のスペクトルを示す。HA 濃度の増加に従い、UQ-body の蛍光強度が増加することが観察された。図 2B は検量線を示す。UQ-body の蛍光強度が HA 濃度依存的に増加し、最大 4.5 倍の蛍光強度増加が見られ、検出限界は $10^{-8}M$ 以下であった。また算出した EC_{50} は $6.3 \times 10^{-8}M$ であった。

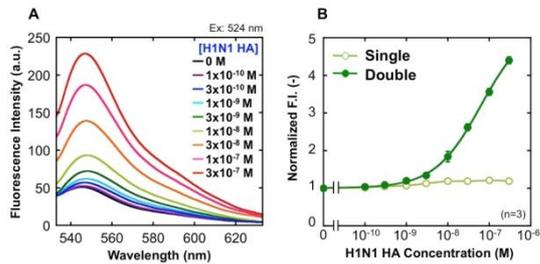


図2 ATT0520 ダブルラベル UQ-body による HA の検出

一方、シングルラベル UQ-body は反応性が低かった。ダブルラベル UQ-body の場合、抗原不在時において Trp 残基による蛍光色素のクエンチに加え、二つの鎖に標識した色素間でクエンチが起こり、抗原添加によりそれらが効果的に解除されたことが考えられる。

さらに調製した UQ-body のウイルスとの結合性を確認した。北海道大学大学院医学研究科細胞生理学分野の大場雄介教授らよりご恵与いただいた弱毒性ウイルス A/Aichi/2/68(H3N2) 及び A/Puerto Rico/8/34(H1N1;PR8)を用い、96 ウエルマイクロプレートに 10^7 PFU/ml のウイルスを固定化し、ブロッキング後に蛍光色素 ATT0520 で修飾した UQ-body (4 μ g/ml)を加えて室温で 2 時間インキュベートした。その後、Fab 断片中にある His タグを HRP 修飾抗体で検出したところ、対照としたストレプトアビジン (4 μ g/ml)より高いシグナルを検出することが出来た。UQ-body への A/Aichi/2/68(H3N2)ウイルス (2.5×10^7 PFU/ml)の添加により、その蛍光強度が 1.15 倍まで上昇し、UQ-body によるウイルス粒子の検出に原理的に成功した。一方、A/Puerto Rico/8/34(H1N1; PR8)ウイルスの UQ-body アッセイでは明らかな蛍光上昇が見られなかった。

より天然抗体に近い検出素子を作製するため、信州大学新井亮一博士らにより作製された 2 量体化タンパク質 WA20 及びその安定化変異体 SUWA20 を Fab に融合した。Fab の軽鎖定常領域 C_L の末端に、WA20 あるいは SUWA20 を融合させた。SHuffle T7 lysY 大腸菌株にて発現させ、SDS-PAGE 分析したところ、蛋白質の発現が確認できた。さらに ELISA において、いずれのウイルスとの結合も確認された。

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 12 件)

Jinhua Dong, Mototada Shichiri, Chan-I Chung, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Yoshihisa Hagihara, Yasukazu Yoshida, Hiroshi Ueda, An Open Sandwich immunoassay for detection of 13(R,S)-Hydroxy-9(E),11(E)-octadecadienoic acid, *Analyt*, **142(5)**, 787-793, 2017(査読有)

有)

Hiroto Iwai, Miki Kojima-Misaizu, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda, Creation of antigen-dependent β -Lactamase fusion protein tethered by circularly permuted antibody variable domains, *Methods in Molecular Biology*, **1596**, 149-165, 2017(査読有)

Jinhua Dong, Hiroshi Ueda, ELISA-type assays of trace biomarkers using microfluidic methods, *WIREs Nanomedicine & Nanobiotechnology*, doi: 10.1002/wnan.1457, 2017(査読有)

Hiroyuki Ohashi, Toshio Matsumoto, Hee-Jin Jeong, Jinhua Dong, Ryoji Abe, Hiroshi Ueda, Insight into the working mechanism of quenchbody: transition of the dye around antibody variable region that fluoresces upon antigen binding, *Bioconjugate Chemistry*, **27(10)**, 2248-2253, 2016(査読有)

Hee-Jin Jeong, Tomoki Kojima, Jinhua Dong, Hiroyuki Ohashi, Hiroshi Ueda, One-pot construction of Quenchbodies using antibody-binding proteins, *Analytical Methods*, **8**, 7774-7779, 2016(査読有)

Jinhua Dong, Hee-jin Jeong, Hiroshi Ueda, Preparation of Quenchbodies by protein transamination reaction, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **122(1)**, 125-130, 2016(査読有)

Hiroto Iwai, Miki Kojima-Misaizu, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda, Switching enzyme activity by antigens: impact of using bi-circularly permuted antibody fragments, *Bioconjugate Chemistry*, **27(4)**, 868-873, 2016 (査読有)

Hee-Jin Jeong, Takuya Kawamura, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda, Q-bodies from recombinant single-chain Fv fragment with better yield and expanded palette of fluorophores, *ACS Sensors*, **1(1)**, 88-94, 2016(査読有)

Jinhua Dong, Tomoki Kojima, Hiroyuki Ohashi and Hiroshi Ueda, Optimal fusion of antibody binding domains resulted in higher affinity and wider specificity, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120(5)**, 504-509, 2015 (査読有)

Misaki Komatsu, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda, and Ryoichi Arai, Crystal structure of Fab

fragment of an anti-osteocalcin C-terminal peptide antibody KTM219, *Photon Factory Activity Report 2014 #32 (2015) B*(査読無)

Chan-I Chung, Ryoji Makino, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda, Open flower fluoroimmunoassay: a general method to make fluorescent protein-based immunosensor probes, *Analytical Chemistry*, **87(6)**, 3513-9, 2015(査読有)

Hiroshi Ueda, Jinhua Dong, From fluorescence polarization to Quenchbody: recent progress in fluorescent reagentless biosensors based on antibody and other binding proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1844(11)**, 1951-1959, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

董金華、鄭熙陳、上田宏、インフルエンザウイルスを検出するための Ultra Quenchbody の構築、第 87 回日本生化学会年会、2014 年 10 月 15 日～18 日、国立京都国際会館

董金華、鄭熙陳、上田宏、インフルエンザウイルス検出用新規免疫測定素子 UQ-body の構築、第 66 回生物工学会年会、2014 年 9 月 9 日～11 日、札幌コンベンションセンター

Jinhua Dong, Shitao Zhao, Hee-Jin Jeong, Hiroshi Ueda, Fast and sensitive detection of a neonicotinoid insecticide imidacloprid with a reagentless immunoassay reagent Quenchbody, *Pacificchem2015*, December 15-19, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

董金華 (Jinhua Dong)
東京工業大学・科学技術創成研究院・助教
研究者番号：80527838

(2) 研究分担者

上田宏 (Hiroshi Ueda)
東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
研究者番号：60232758