

二量体検出原理による新規免疫測定法の開発

上田 宏

東京大学大学院工学系研究科

1. 研究のねらい

抗体（免疫グロブリン）を用いた測定法である免疫測定法はその測定操作の簡便さと汎用性の高さから基礎研究から臨床診断，さらには環境分析まで多くの場面で活用されている。なかでも現在最も多用される酵素免疫測定法（ELISA法）においては，二つの抗体分子を用いて測定対象（抗原分子）を挟んで測定するサンドイッチ法がその感度の高さと測定濃度域の広さから主流である。しかしサンドイッチ法にはその実施に二種類の抗体を要し，二回の反応洗浄操作が必須，さらに分子量 1000 以下の低分子の測定が不可能という根本的な限界があり，今回これらの限界を超える新規免疫測定法の確立を目指して研究を行った。具体的には各種抗体分子の抗原結合部位を構成する二つのドメイン（重鎖可変領域 V_H および軽鎖可変領域 V_L ）を単離し，これらの会合を検出することにより従来不可能であった低分子を含む各種抗原の高感度な非競合的ワンステップ測定の可能性の実証を試みた。

2. 研究成果

OS法による低分子の非競合検出

まず上記原理（二つのドメインの上に抗原を乗せて測定することからオープンサンドイッチ法，ないしOS法と呼ぶ）による測定の一般性を示すため，既存の抗体を用いたOS法の実施の可否につき検討した。OS-ELISA法においては通常 V_L 断片をマイクロプレートに固定化， V_H 断片を酵素で標識してサンプルと混合し反応させ，洗浄後に固相に残った酵素活性を測定する。このため，抗体産生細胞より常法に従いmRNAを抽出，逆転写PCR法により V_H/V_L cDNAを増幅しベクターに組み込み，ファージ提示法を用いて目的抗原に特異的に結合する抗体遺伝子をクローン化した。さらに V_L 断片をマルトース結合タンパクMBPと融合させ発現精製し， V_H 断片をアルカリフォスファターゼAPとの融合タンパクとして同様に発現精製してOS-ELISAを行った。

この結果，副腎機能マーカーである 11-deoxycortisol (11DC)，カビ毒ゼアラレノン，農薬イミダクロプリドといった分子量 300 程度の低分子についてOS-ELISAの実施に成功した。またいずれの場合も通常の低分子測定に用いられる競合ELISA法に比べて同等以上の感度と広い測定濃度域が得られた。これはOS法が非競合系であって K_D 値による検出限界の制限がないためと考えられる。さらに 11DC の測定においては野生型配列の V_H 断片を用いた場合に抗原濃度 0 の測定値がやや高いという問題が見受けられたが，我々が V_H 断片中で V_H/V_L 相互作用に重要な残基として同定したGln39 に変異を導入することで，応答性を大幅に向上させることができた。

ペプチドの非競合検出と検出系のマイクロ化

さらに非競合測定のメリットが生かせる低分子として，ペプチドの測定を試みた。骨代謝マーカーであるオステオカルシン（別名BGP）の部分ペプチドをモデルに，抗体産生細胞からそのC末端 7 残基のペプチド（BGP-C7）を認識し高い結合能をもつ V_H/V_L を取得した。これを用いたOS-ELISAの結果，予想通り競合法より優れた感度と測定濃度域，更には 400 倍以上の応答レンジが得られた（図）。また得られた測定濃度域は臨床検査に必要な濃度域を十分カバーした。ブタBGPの立体

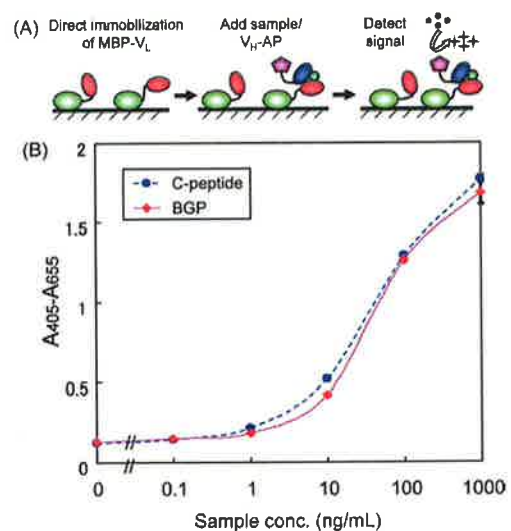


図 OS-ELISA の (A) 模式図および (B) BGP とその C 末ペプチドの検量線

構造から、BGP-C7 はハプテン様の構造をとり V_H/V_L 界面で特異的に認識されていると考えられ、同様の末端ペプチド認識抗体によるOS-ELISA実施の可能性が示唆される。

また、診断における有用性の更なる向上を目指し、この系を用いてマイクロ流路を用いた微量高速測定系の構築を試みた（北森アドバイザーとの共同研究）。数 μ lのMBP- V_L 固定化ポリスチレンビーズを流路に充填、サンプルとペルオキシダーゼ標識MBP- V_H 計5 μ lを導入し、洗浄後に基質と反応させ熱レンズ顕微鏡で検出した。結果、計10分程度でマイクロプレート系とほぼ同等のBGP-C7 検量線が得られた。

免疫ライブラリを用いた新規測定系の構築

次に、新規な抗体断片を用いたOS-ELISA測定系の構築のため、マウスを抗原で免疫、その脾臓細胞より 10^6 サイズの一本鎖抗体提示ファージライブラリを作製した。固定化抗原を用いた選択により特異的結合ファージを濃縮したところ、抗原ニワトリリゾチーム(HEL)あるいはフルオレセイン(FL)に結合するクローンが多数得られた。これらのいくつかを用いてOS-ELISA系を構築したところ、複数のHEL認識抗体でOS-ELISAに成功し、うち1つのクローンで極めて低いバックグラウンドと良好な応答性が得られた。すなわちタンパク質認識抗体でもOS-ELISAに適した V_H/V_L ペアは天然に多く存在することが示唆された。またライブラリ構築の際、通常 V_H-V_L 型一本鎖抗体提示ファージと同時に V_H-V_H 型提示のものも作製したが、後者をFL-BSAにより選択した結果、予想に反して V_H 単独で強くFL(分子量353)と結合するクローンが得られた。単量体でハプテンに結合する珍しい V_H ドメインとして、現在解析を行っている。

OS-ELISA用検出素子の簡便な作製法の開発

最後に、OS-ELISA系は現状その構築に少々手間がかかる問題があり、いくつかの方法でこの解決を試みている。その1つはバイオパニングと、OS-ELISAによるスクリーニングの両方が可能なファージ提示系の開発である。すでに開発した、 V_H と V_L を繊維状ファージの別々のコートタンパク上に提示して V_L の提示と分泌を宿主大腸菌の変更でスイッチできるシステムに加え、最近より安定な天然抗体の一部(F_{ab})の形で提示と選択を行った後、酵素処理でOS-ELISAを可能にするシステムも構築できた。これらのシステムを用いたnaiveライブラリの作製により、今後多数の抗原検出系を効率よく構築できるようになると期待される。またこれとは別に、大腸菌での遺伝子組換え操作を介さず、真核細胞中のH鎖RNA前駆体と、酵素をコードするRNA前駆体とのスプライシング(トランススプライシング)を利用した V_H -酵素融合タンパクの発現を試みている。現在COS-1細胞でのモデル実験に成功しており、今後抗体産生細胞での直接発現を目指したい。

3. 主な発表

論文

- S.-L. Lim, H. Ichinose, T. Shinoda & H. Ueda: Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay, *Anal. Chem.*, **79**, 6193 (2007).
- T. Suzuki, Y. Munakata, K. Morita, T. Shinoda & H. Ueda: Sensitive detection of estrogenic mycotoxin zearalenone by open sandwich immunoassay, *Anal. Sci.*, **23**, 65 (2007).
- Y. Sasajima, T. Aburatani, K. Sakamoto & H. Ueda: Detection of protein tyrosine phosphorylation by Open Sandwich fluoroimmunoassay, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 968 (2006).
- K. Masuda, K. Sakamoto, M. Kojima, T. Aburatani, T. Ueda & H. Ueda: The role of interface framework residues in determining antibody VH/VL interaction strength and antigen binding affinity, *FEBS J.*, **273**, 2184 (2006).

招待講演

- H. Ueda, "Open Sandwich Immunoassay as a general detection principle for low molecular-weight antigens" Antibody Engineering Conference, a satellite meeting of 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kagoshima, 2006/ 7/16.

4. 特許

- 上田 宏、川上 雅之、トランススプライシング法による融合タンパク質作製方法、特願2007-023974、富士フイルム株式会社、東京大学
- 上田 宏、小嶋美樹、抗原濃度測定法、特願2007-187324、科学技術振興機構