

4Ep17 レクチン免疫アッセイを用いたヒト抗体糖鎖解析技術の開発

○山川 景成, 熊田 陽一, 岸本 通雅
(京工繊大院・工芸科学・生体分子)
yamakawakagenari@yahoo.co.jp

【背景】近年、バイオマーカーに修飾された特徴的な糖鎖構造と重篤な疾病の発症や進行、再発との関連性が明らかになりつつある。例えば、リウマチや骨髄腫等では、血液中のヒト抗体に修飾された糖鎖の末端ガラクトースが健常者と比較して、欠損していることが明らかとなっている。したがって、これら糖鎖の質的变化を簡便かつ高感度に検出できれば、より信頼性の高い医療診断が実施可能となる。本研究では、ヒト抗体(Human IgG, Human IgA)を特異的に認識する Whole 抗体から PS-tag 融合 scFv(scFv-PS)を調製し、これと HRP 標識レクチンを用いたヒト抗体糖鎖解析技術の開発を目的とした。

【実験及び考察】大腸菌の封入体より精製した scFv-PS を親水性 PS 基板へ固定化し、固相リフォーディング法により抗原結合活性を回復させた。ブロッキング後、0~10 µg/ml に調製したヒト抗体、さらには 12 種類の HRP 標識レクチン 5 µg/ml の添加により、サンドイッチ型レクチン ELISA を行った。その結果、ヒト抗体の濃度依存的なシグナルが得られた。さらに、scFv-PS はそれ自身に糖鎖を有しないため、Whole 抗体と比較して、バックグラウンドシグナルが低く抑えられた。糖鎖認識部位のそれぞれ異なる 12 種類のレクチンを用いてレクチン免疫アッセイを行った結果、ヒト IgG では 4 種類、ヒト IgA では 5 種類のレクチンにおいてシグナルを検出出来た。これらのレクチンが認識する糖鎖構造と、ヒト IgG、ヒト IgA の糖鎖構造が一致していることが確認出来た。これらの結果より、scFv-PS を用いることで、レクチン免疫アッセイによるヒト抗体糖鎖解析が可能である。

Development of lectin immunoassay method for detection of glycol-chains conjugated with Human antibodies

○Kagenari Yamakawa, Yoichi Kumada, Michimasa Kisimoto
(Dept. Biomol Eng., Kyoto Inst. Tech)

Key words Lectin immunoassay, PS-tag, scFv

4Ep19 マルチラベル Quenchbody を用いたビメンチンセリンリン酸化の高感度検出

○ジョン ヒジシ¹, 上田 宏¹, 稲垣 昌樹²
(¹東大院・工・化生, ²愛知県がん研)
hueda@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

【目的】ビメンチンはセリン (Ser) 残基集約的にリン酸化され、正常な細胞分裂において構造変化を起こす。本研究では、部位特異的蛍光標識抗体 (Quenchbody) を用いた細胞分裂後期と中期に行われる Ser71 リン酸化 (PS71) と Ser82 リン酸化 (PS82) の検出を試みた。

【方法と結果】まず、抗 PS71 一本鎖抗体の N 末端近傍に TAMRA を取り込ませた Quenchbody を合成。PBST0.05 (PBS+0.05% Tween 20) 中で PS71 を含むペプチドを添加した所、約 1.2 倍の蛍光強度の増加が見られた。そこで、rhodamine 6G (R6G) で標識した Quenchbody を用いて反応液と抗原添加前のブレインキューベーション処理の最適化を行った結果、PBST0.25 中で 16 時間処理した際に、蛍光強度が最大 1.4 倍まで増大した。さらに N 末端近傍に加えてドメイン間リンカー領域にも 1 カ所 R6G を取り込ませた結果、PBST0.25 中で 16 時間処理した際その蛍光強度が最大 4.0 倍まで増加した。次に、抗 PS82 一本鎖抗体の R6G 標識 Quenchbody を合成し蛍光強度を測定した結果、VH-VL の N 末端近傍を R6G 標識した Quenchbody では約 1.2 倍の蛍光増加が見られたが、さらにリンカー領域に R6G を標識し、ドメイン順を逆にすることで、その蛍光強度が最大 6.7 倍に増加し、検出感度も 1 nM 程度に高まった。

【結論と今後の展望】以上より、Quenchbody 法によって蛋白質リン酸化の検出が可能で、さらに色素、反応条件および Quenchbody 構造の最適化を行うことで蛍光応答性を顕著に向上できることが示唆された。現在、Fab 型 Quenchbody による更なる応答性の向上について検討を行っている。

Reference : Jeong et al., Biosens. Bioelectron. in press, 2012

Sensitive detection of vimentin serine phosphorylation by multilabeled Quenchbodies

○Hee-Jin Jeong¹, Hiroshi Ueda¹, Masaki Inagaki²
(¹Dept. Chem. Biotech., Univ. Tokyo, ²ACCR)

Key words Quenchbody, vimentin, fluorescence quenching

4Ep18 (講演中止)**4Ep20 多量体化がん治療抗 EGFR 一本鎖抗体の高機能化に向けた検討**

○浅野 竜太郎¹, 小山 典明¹, 萩原 康世¹, 鉦 陽介¹, 古本 祥三²,
梅津 光央¹, 熊谷 泉¹
(¹東北大院・工・バイオ工, ²東北大院・医)
kmiz@kuma.che.tohoku.ac.jp

抗体医薬の低コスト化に向けた 1 つのアプローチとして、微生物を用いた製造が可能な低分子抗体の開発が挙げられるが、親和性の低下や体内半減期の減少がしばしば問題となる。また効果的な治療効果を誘導するためには多価性の結合が要求されることもあり、当研究室でも抗上皮増殖因子受容体 (EGFR) 抗体 528 の一本鎖抗体 (scFv) を作製したところ、がん細胞増殖阻害活性の消失が確認された。本研究では、大腸菌で調製可能なサイズを維持したまま、多価化による、がん細胞増殖阻害効果の回復と親和性、および体内半減期の延長が見込まれる多量体化 528 scFv の作製と変異導入によるさらなる高機能化を目指した。構造的束縛を高める様なリンカー長にすることで、二量体と三量体を調製することに成功し、それぞれ多価化に起因すると思われる、がん細胞の増殖阻害活性の回復がみられた。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた測定の結果、多量体化に応じた親和性の向上が確認され、担がんマウスを用いた治療実験においても有意な抗腫瘍効果が、特に三量体においては市販の抗 EGFR 抗体医薬に匹敵する効果が確認された。続いて、さらなる高機能化を目指して、親和性を向上させる変異を導入したところ、それぞれ期待通りの親和性とがん細胞増殖抑制効果の向上がみられた。いずれの分子も長期保存での安定性も確認されたことから、微生物で生産可能な多量体化 528 scFv はコストおよび機能の面でも低コスト抗体医薬として有望であるといえる。

Study on functionalization of anti-EGFR scFv multimers for cancer therapy

○Ryutaro Asano¹, Noriaki Koyama¹, Yasuyo Hagiwara¹, Yosuke Masakari¹, Shozo Furumoto¹, Mitsuo Umetsu¹, Izumi Kumagai¹
(¹Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Med., Tohoku Univ.)

Key words scFv, antibody, recombinant protein