

3P-013 長鎖・分岐型ポリアミン添加による高温下での無細胞翻訳系の高効率化○井上 貴央¹, 秀瀬 涼太¹, 岡田 和真¹, 福田 青郎², 今中 忠行², 藤原 伸介¹(¹関西学院大・理工・生科, ²立命館大・生命科学・生工)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

ポリアミンは様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。好熱菌では一般的なポリアミンの他に、長鎖または分岐型構造の分子も存在し、これらは核酸安定化能が高いという報告がある。また、現在行われている無細胞翻訳系は、安定性が低く、高効率な物質生産に適さない。本研究では長鎖・分岐型ポリアミンの無細胞翻訳系への影響を調べ、効率化へ利用可能かを検証した。

Thermococcus kodakarensis から S30 画分を抽出後種々のポリアミンを添加し、無細胞翻訳系を用いて高温下の翻訳活性を測定した。その結果、直鎖型のポリアミンでは鎖長が長くなるほど活性は上昇し、カルドペンタミンで最も高い活性を示したがカルドヘキサミンでは低下した。また、アミノプロピル基の分岐数が増えるに従い高い活性を示した。この傾向は高温になる程顕著になった。よって、塩基度だけでなく、その構造も安定化に関与していると考えられる。分岐型ポリアミンの構造的特徴から tRNA などに作用し、高温環境下での高次構造維持に関与すると思われる。また、*Escherichia coli* の無細胞翻訳系において、長鎖・分岐型ポリアミンの添加で、従来の至適温度よりも高い温度 (45℃) でも翻訳活性が認められた。この知見は生物種問わず、長鎖・分岐型ポリアミンの添加が、tRNA を安定化し、結果として高温下での無細胞翻訳系の効率化を行っていることを予想させる。

Enhancing effect of long and branched chain polyamines on cell-free translation at the elevated reaction temperature○Takahiro Inoue¹, Ryota Hidese¹, Kazuma Okada¹, Wakao Fukuda²,Tadayuki Imanaka², Shinsuke Fujiwara¹(¹Dept. Biosci., Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., ²Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)**Key words** *Thermococcus kodakarensis*, polyamine, cell-free system, hyperthermophile**3P-015 蛍光色素導入部位の最適化による Q-body の応答性向上**

○ジョン ヒジン, 上田 宏

(東工大・資源研)

ueda@res.titech.ac.jp

最近当研究グループで、一本鎖抗体 (scFv) の N 末付近に標識した色素の、抗原非存在時における scFv 内部のトリプトファン (Trp) 残基からの消光が、抗原結合により解除され蛍光する Quenchbody (Q-body) の作製原理が見出された。その後 Q-body を用いた蛋白質のリン酸化の検出において、scFv の VH と VL のドメイン順を逆にし、N 末に加えドメイン間リンカー領域にも標識した所、より高い蛍光応答が得られた。そこで本研究では、結晶構造既知の抗ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) 抗体 HyHEL-10 を用いて蛍光色素の数と導入部位が異なる 12 種類の Q-body を作製し、新規色素導入部位の検討および Q-body 構造の最適化による応答性向上を目指した。まず、無細胞転写翻訳系を用いて、抗 HEL 抗体 scFv の N 末付近に蛍光色素 TAMRA を取り込ませた VH-VL 型 Q-body (tHL) を作製し、蛍光強度を測定した結果、HEL 濃度依存的に蛍光強度が増加し最大 1.8 倍の応答を示した。そこで次に、VL の 62 ~ 67 番目の配列 SGSGSG が、リンカー配列に類似であることに着目し、G65 と S66 をそれぞれアンバーコドンに置換しダブルで標識した tH65L, tH66L を作製した。又、VL-VH 型において、その N 末 (tLH), C 末 (LHt), N 末とリンカー (tLHt), N 末と 65G (t65LH), リンカーと 65G (65LHt), リンカーと C 末 (LHt), 65G と C 末 (65LHt), 65G のみ (65LH), リンカーのみ (LHt) を作製し、それらの蛍光強度を測定した。その結果、いずれにおいても HEL 濃度依存的に蛍光強度が増加し、特に 65LH で最大約 3 倍の応答が得られ、新規色素導入部位の効果が確認できた。更に、65LH における VL の Trp 残基を構造類似の Phe とした結果、野生型に比べて蛍光強度変化が減少し、本 Q-body でも Trp 残基が色素の蛍光消滅に寄与していることが示された。

Strategies for making a superior Q-body: effect of the position of fluorophores

○Hee-Jin Jeong, Hiroshi Ueda

(Chem. Res. Lab., Tokyo Tech)

Key words Quenchbody**3P-014 タンパク質カチオン化技術を用いた高感度抗体検出技術の開発**○木戸 桃子, 藤田 佳那, 勝瀬 奈津美, 新土居 奈緒美,
愛宕 祐基, 木下 理恵, 野々村 英典, 本莊 知子, 二見 淳一郎
(岡山大院・自科)

futamij@okayama-u.ac.jp

がん細胞内では様々なタンパク質が異常発現しており、正常組織でほとんど発現されていないタンパク質群が免疫原性を示すことから、がん抗原と呼ばれる。このがん抗原は細胞内でペプチドサイズに分解された後 MHC クラス I 分子上に提示され、細胞傷害性 T 細胞の標的となる。この細胞性免疫と同時に、体液性免疫も誘導され様々ながん抗原に対する抗体が出現・変動することから、腫瘍免疫活性を測定するバイオマーカーとしても注目されている。我々はがんと精巣に局限した発現を示す cancer/testis (CT) 抗原に特に注目し、多種類の全長 CT 抗原を用いた高感度な抗体検査試薬の開発に取り組んでいる。全長の組換え CT 抗原タンパク質の大半は不溶性として発現され、可溶性として取得される一部の CT 抗原も不安定で保存性が悪い。これらの問題に対し、Cys 残基に対して正電荷を付与したカチオン化 CT 抗原は、高い水溶性を示すほか、抗体との結合性も極めて良好であった。本発表では、各種のカチオン化 CT 抗原を用いた抗体検査試薬の有用性について報告したい。

Highly sensitive antibody detection technology using protein cationization technique

○Momoko Kido, Kana Fujita, Natsumi Katsuse, Naomi Niidoi, Yuuki Atago,

Rie Kinoshita, Hidenori Nonomura, Tomoko Honjo, Junichiro Futami

(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words cancer antigen, protein engineering**3P-016 ドメイン置換による EGFR 特異的リボヌクレアーゼ融合抗体の高機能化**

○西浦 大祐, 工藤 光代, 大崎 智弘, 北村 昌也, 中西 猛

(阪市大院・工・化生系)

nakanishi@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

抗体にバクテリアや植物由来の毒素を融合したイムノトキシンは、標的細胞に対して、高い傷害性を示す一方で、毒素に由来する副作用や抗原性が懸念されている。我々は、副作用がなく、高い細胞傷害性を発揮する融合抗体の作製に向けて、ヒト由来リボヌクレアーゼ (hRNase)、上皮増殖因子受容体 (EGFR) に結合するラマ抗体可変領域 (VHH)、ヒト重鎖定常領域 (Fc) を用いて融合抗体を作製し、その機能を評価してきた。その結果、hRNase、VHH、Fc の順に直列に連結した融合抗体では、がん細胞に対する傷害性を確認できなかった。そこで、VHH、hRNase、Fc の順に配置した融合抗体を新たに作製したところ、抗原結合活性は上昇したが、がん細胞傷害性は示さなかった。今回、新たにカエル由来リボヌクレアーゼ (Onc) を hRNase の代替分子として使い、Onc、VHH、Fc の順に配置した融合抗体を作製した。Onc は hRNase よりも強力な細胞傷害性を示すことが報告されている。Onc を用いることで、hRNase 融合抗体では見られなかったがん細胞傷害性を確認することができた。また、これまで用いてきた VHH (Ia1) とは抗原決定基の異なる VHH (IIIa42) を融合した Onc 融合抗体を作製し、各融合抗体について、抗原結合活性、酵素活性、細胞傷害性を比較した。Onc 融合抗体では hRNase 融合抗体に比べて、抗原結合活性および酵素活性は低下するものの、がん細胞傷害性は見られた。さらに、Ia1 を含む Onc 融合抗体に比べて、IIIa42 を含む Onc 融合抗体は高い細胞傷害性を示した。現在、Onc 融合抗体の作用機構について検討を進めている。

Functional enhancement of an anti-EGFR antibody-ribonuclease fusion protein by domain substitution

○Daisuke Nishiura, Kudo Mitsuyo, Tomohiro Osaki, Masaya Kitamura,

Takeshi Nakanishi

(Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words ribonuclease, EGFR, antibody, Onconase