

1S-Ep02 抗原結合により光る抗体 Q-body の開発とそのバイオ計測への応用

○上田 宏
(東工大・資源研)
ueda@res.titech.ac.jp

高等動物の免疫系が創り出す高性能な抗体を用いた検出法（免疫測定法）は、化合物、ペプチドなどの低分子から各種タンパク質まで、各種の微量生体物質（抗原）を高感度かつ選択的に検出できる測定法として、他を抜きん出た存在である。しかしこれまで、一般的な酵素免疫測定法(ELISA 法)等においては、数回の反応と洗浄操作後に抗原抗体複合体の量を酵素で測定するため、測定にかなりの手間と時間がかかる問題があった。最近筆者らは、これら従来法に比べ簡便迅速に測定が可能な新しい免疫測定原理として、部位特異的蛍光標識抗体（Quenchbody あるいは Q-body と呼ぶ）を用いた方法を見いだした¹⁾。

Q-body とは、基本的にはその N 末端にペプチドリンカーを介して蛍光色素を標識した一本鎖抗体(scFv)や Fab などの抗体断片である。通常、市販の蛍光色素で標識した抗体の蛍光強度は、抗原結合の有無に関わらず変化しない。しかし、Q-body においては、標識部位と用いる色素の性質により、抗体可変領域にあるトリプトファン残基によって色素の蛍光が消光（クエンチ）されており、ここに抗原が結合することでクエンチが解除され、蛍光状態になる。その結果、反応開始後数秒から数分で、溶液中の抗原濃度に応じた蛍光が観察される。抗原結合によりクエンチが解除される理由は、色素と抗原の結合部位が近いため同時に結合できないか、抗原結合によって抗体構造が安定化されるためと考えられるが、いずれの場合も色素が抗体外部に放出され、蛍光が回復する。抗体中のトリプトファン残基の保存性の高さのため、この原理に基づき、骨疾患マーカーであるオステオカルシンの部分ペプチド BGP-C7、環境ホルモン活性が懸念されるビスフェノール A、違法薬物、リゾチーム、アルブミンなどのタンパク質など、タイプの異なる抗原を競合法と同等以上の感度で検出できる事が明らかとなった^{2,3)}。

当初 Q-body は無細胞タンパク質合成系でのみ合成可能であったが、現在は大腸菌で発現させた組み換え抗体から合成することも可能である⁴⁾。すなわち、N 末端ペプチドリンカーに Cys 残基を挿入して抗体断片を発現させ、そのチオール基に色素標識を行うことで、より低コストで大量の Q-body を得ることができる。どちらの方法でも scFv 型 Q-body と H 鎖と L 鎖からなる Fab 型 Q-body の両方を合成可能であるが、より安定性の高い Fab 型の方が高い応答を与える事が多い。また特にタンパク質認識 Q-body では二つの N 末端に色素を導入することで、より高い応答が得られる。これは色素間のクエンチが抗原結合により解除されるためと考えられ、この原理に基づき蛍光蛋白質を用いた Q-body の構築にも成功した (Open Flower Immunoassay)⁵⁾。

さらに蛍光標識抗体の一種である Q-body は、試験管内での免疫測定のみならず、バイオイメージング分野においてもその利点を発揮する。例えばこれまで、通常観察前に必要な洗浄操作なしに、オステオカルシン認識 Fab 型 Q-body を用いた骨芽細胞からのオステオカルシン産生検出、さらにがん関連膜タンパク質であるクロードインの検出に成功している。従来の免疫染色では必須であった洗浄操作が不要な蛍光観察法として、今後細胞を用いたハイコンテンツスクリーニング、組織や個体を対象とした各種診断など、幅広い応用が期待される。

参考文献

- 1) R. Abe, H. Ueda, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17386 (2011).
- 2) H. Ueda and J. Dong. *Biochim. Biophys. Acta* **1844**, 1951 (2014).
- 3) H.J. Jeong, H. Ueda: *Sensors*, **14**, 13285 (2014).
- 4) R. Abe, H.J. Jeong, J. Dong, H. Ueda, et al. *Sci. Rep.*, **4**, 4640 (2014).
- 5) C.I. Chung, R. Makino, J. Dong and H. Ueda. *Anal. Chem.* **87**, 3513 (2015).

Development of Q-body, an antibody fragment that fluoresces upon antigen binding, and its application to bioanalysis

○Hiroshi Ueda
(Chem. Res. Lab., Tokyo Tech)

Key words antibody, biosensor, fluorescence spectra, fluorescent microscopy

1S-Ep03 無細胞蛋白質合成系および大腸菌細胞質内系により合成容易なロイシンジッパー付加抗体

○中野 秀雄¹, 児島 孝明¹, 加藤 晃代^{1,2}
(¹名大院・生命農学, ²科技財団)
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

抗体の微生物生産は、古くから研究され、多くの報告がある。しかしながらそのほとんどが、リフォールディングを伴う一本鎖抗体(scFv)に関するものである。B 細胞でつくられている抗体配列から scFv 化すると結合活性を失うことも度々あることから、基本的には不安定なフォールドであると考えられる。一方 Fab は CH1 と CL の相互作用が有り、scFv よりはるかに安定で抗体の Fab 化により活性を失うことははるかに少ない安定なフォールドである。しかしながらその微生物生産は、分子量が大きいことや 2 本のポリペプチド鎖の会合に伴い、scFv に比べるとより困難であった。

Fab の中には、大腸菌の無細胞タンパク質合成系により効率よく合成できるものもある。しかしながらそれは抗体の配列に依存する。我々は各種の Fab 抗体を無細胞タンパク質合成系により発現させる研究を行う中で、多くの場合その L 鎖と H 鎖との間のジスルフィド結合形成効率に大きな違いがあることを見出した。そこで Fab の L 鎖と H 鎖の C 末端に互いに強く結合するヘテロロイシンジッパーを付加したところ、Fab の形成効率が飛躍的に向上し、また ELISA シグナルも顕著に増大した。この Fab-LZ は大腸菌の細胞質内発現系においても、多くの場合可溶性割合が増大し、タグを利用した簡易な精製方法により精製することが可能であった。ロイシンジッパーの会合効果により L 鎖と H 鎖の会合とフォールドが促進したのではないかと考えている。

この新規なロイシンジッパー付 Fab(Zipbody)は、Fab 抗体を安価に製造できる技術として、B 細胞 1 個からのモノクローナル抗体取得など、様々な場面で利用可能である。

【謝辞】本研究は、知の拠点あいち重点研究プロジェクト 2「食の安心・安全技術開発プロジェクト」の他、科学研究費などの研究支援により行われた。

Leucin Zippered-Fab antibody efficiently expressed in *E.coli* cell-free protein synthesis and cytoplasmic expression systems

○Hideo Nakano¹, Takaaki Kojima¹, Teruyo Kato^{1,2}
(¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²Aichi, Sci.&Technol.)

Key words antibody, *Escherichia coli*, expression system