

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on Genetically Engineered Antibodies Fused to Alkaline Phosphatase and Their Application in Immunoassay

(和訳 アルカリフォスファターゼをレポーターとする人工抗体の創製とその免疫測定への応用)

氏名 鈴木 智香子

抗体(免疫グロブリン)を利用した免疫測定法は基礎研究や臨床診断に欠かすことのできない測定手段である。現在最も一般的に用いられている Sandwich ELISA は、高い選択性と感度の良さを併せ持つが、測定では数回の反応と洗浄を繰り返さなければならず、1 回の測定に数時間かかる。また測定の原理上、最低 2 種類の抗体が必要であるため、抗体結合部位を 1 つしか持たない、小分子の測定には適用できないという制約がある。免疫測定の簡便性、敏速性、及び適用性を上げることは急務であり、測定の改良が望まれていた。

本研究ではその方法論の一つとして人工抗体の利用を取り上げた。抗体分子のうち、実際に抗原との結合に関わるのは約 24kDa の可変領域 Fv と呼ばれる部分である。Fv は分子量が小さいにも関わらず元の抗体分子の抗原選択性、抗原結合能を保持しているため、Fv をコードする遺伝子をクローニングし、これにレポーターの酵素遺伝子を繋げることにより、小分子であり、且つ抗原認識能と酵素活性を併せ持つ人工抗体が創製される。本研究では、レポーターとして大腸菌由来アルカリホスファターゼを用い、種々の抗体の可変領域-アルカリホスファターゼ融合タンパク質を作成し、免疫測定に応用した。これらの融合タンパク質は、いずれも免疫測定において測定の簡便化、短縮化を可能にするものであり、特に抗体可変領域モノドメイン-アルカリホスファターゼ融合タンパク質は、抗体の VL-VH 相互作用、及び抗原認識のメカニズムを解明する上で、非常に有力なツールになると思われる。以下に各章ごとの研究の概要を述べる。

第1章、第2章は、緒言、研究の背景、及び既往の研究についての記述である。

第3章では、抗NP(4-hydroxy 3-nitrophenyl acetic acid)一本鎖抗体-アルカリホスファターゼ融合タンパク質の作製とその機能評価を行った。NPはタンパク質や核酸を化学標識できるため、ELISAのみならずサザンハイブリダイゼーションやノーザンハイブリダイゼーションにおけるプローブとしての応用も期待される。また本研究では、抗体可変領域に一本鎖抗体(ScFv)を用い、より小分子化させるとともに、抗体分子そのものの安定化も図った。

抗NP抗体のVL、VHをVLがN末側にくるようにヘリックスリンカーで繋げたScFvを作製し、このC末側にPhoA遺伝子を組み込み、融合タンパク質発現プラスミドを作製した。これを大腸菌に導入し、融合タンパク質を発現させ、細胞質画分からScFv(NP)-PhoAを精製した。ScFv(NP)-PhoAのPhoA酵素活性、及び抗原結合能を評価したところ、それぞれ野生型とほぼ同等の機能を保持していることが分かった。またScFv(NP)-PhoAをELISAに用いてNP-BSA濃度を測定したところ、酵素標識二次抗体を使わずに10ng/ml以上の濃度範囲でNP-BSAが再現性良く検出できた。これは通常のELISAに匹敵する感度であり、ScFv(NP)PhoAが免疫測定試薬として十分に利用できることを意味する。さらにScFv(NP)-PhoAは抗体と酵素の機能を併せ持つため、従来の洗浄、反応のステップ数を減らす、理想的な代替試薬となりうることが分かった。

第4章では抗DIG(Digoxin)一本鎖抗体-アルカリホスファターゼ融合タンパク質の作製、及びこれを用いてDIG-BSAの定量を行った。DIGはNPと同じくハプテンの一種であり、タンパク質や核酸を化学標識できるため、予め測定試料をDIG標識することにより、殆ど全ての生体物質を抗原とすることができる。またDIGは心臓病の治療薬として実際に用いられており、血中のDIG濃度の定量など、抗体DIG抗体のニーズは大きい。

抗DIG抗体のVH、VLをVHがN末側にくるようにフレキシブルリンカー(GGGGS)₃で繋げScFvとし、このC末側にPhoAが来るような融合タンパク質ScFv(DIG)-PhoAを作製した。本融合タンパク質はScFv(NP)-PhoAと異なり、インクルージョンボディとして発現したため、これを単離しリフォールディングを行った。リフォールディング後のScFv(DIG)-PhoAの抗原に対する平衡結合定数をSPRセンサー(BIAcore)を用いて測定したところ、ScFv(DIG)-PhoAはリフォールディング後も十分な抗原結合能を保持していることが分かった。また、リフォールディング後の酵素活性を野生型PhoAの比活性と比較したところ、約10%の活性を保持していることが分かった。ScFv(DIG)-PhoAをELISAに用いてDIG-BSA濃度を定量したところ、酵素標識二次抗体を使わずに50ng/ml以上の濃度範囲でDIG-BSAが再現性良く検出できた。このことからScFv(DIG)-PhoAはリフォールディングが必要であるものの、ScFv(NP)-PhoAと同じく免疫測定試薬として十分に利用できることが分かった。

第5章では抗HEL抗体VH-VL-アルカリホスファターゼ融合タンパク質の作製とこれらを用いたOpen Sandwich ELISAを行った。Open Sandwich ELISAは抗体VL、VHの分子間相互作用が抗原の存在によって誘起され、抗原が存在する場合にのみVH-VL-抗原の安定な複合体が形成されるという現象を応用した新規免疫測定法である。(OS-ELISA、Fig. 1A)従来の免疫測定法は二種類の抗体分子を利用したSandwich ELISA法に代表されるが、抗原濃度

の測定に反応と洗浄操作を含む多段階の操作が必要となるために数時間を要している (Fig 1B)。これに対して OS-ELISA は、抗体を一種類しか必要とせず、測定に必要な時間も原理的に大幅に短縮できる。これまで、抗ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) 抗体 HyHEL-10 の VL とファージに提示 VH を用いて OS-ELISA のプロトタイプ測定が HEL の定量系で行われたが、ファージを検出するのに酵素標識ファージ抗体を必要とするため、測定の簡便化、効率化には至らなかった。

本研究では PhoA をレポーター分子として HyHEL-10 の VH、VL との融合タンパク質 VH(HEL)-PhoA、VL(HEL)-PhoA を作製し、これをファージ抗体の代わりに OS-ELISA 測定に用いることにより、測定が高速、かつ高感度で行えることを実証した。VL 断片をビオチン化し、これを予めstreptavidinコートしたマイクロプレートに加え、VL を固定化した。プレートをブロッキングした後、各種濃度の HEL と過剰量の VH(HEL)-PhoA を同時に加え、反応させた後、PBS で十分に洗浄し、プレートに固定化された PhoA の量を基質 *p*-NPP との呈色反応で測定した。同様に VH 断片を固定化し、VL(HEL)-PhoA についても抗原濃度依存性を測定した。その結果、抗原存在下においてのみ VL、VH の有意な会合が見られ、25ng/ml 以上の濃度範囲で HEL が再現性良く測定された。これらは通常の Sandwich 法の感度に匹敵し、且つ従来より反応ステップが少ないため、より迅速な測定が可能となった。

第 6 章では Open Sandwich ELISA のハプテン測定への応用についての研究を行った。OS-ELISA の大きな特色の一つに、ハプテンのような単価抗原の定量が可能であることが挙げられる。本研究ではこの事を立証する目的で、単価抗原モデルとして第 3 章で用いた NP の系を取り上げ、抗 NP 抗体 Fv のうち、VH は PhoA との融合タンパク質として、また VL はプレートへの固相化をより効率的に行うために ProteinG (PG) との融合タンパク質として、それぞれ作製した。

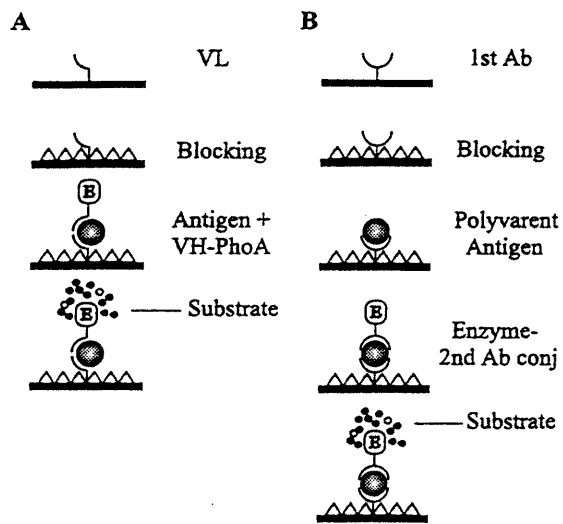


Fig. 1 OS-ELISA と Sandwich ELISA の反応モデル
A: OS-ELISA、B: Sandwich ELISA

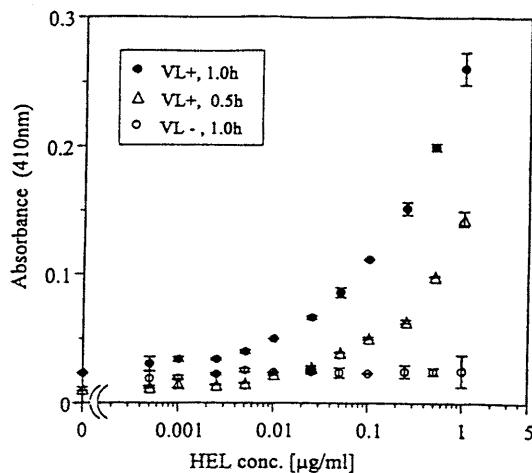


Fig. 2 Open Sandwich ELISA
OS-ELISA 法による HEL 濃度依存曲線

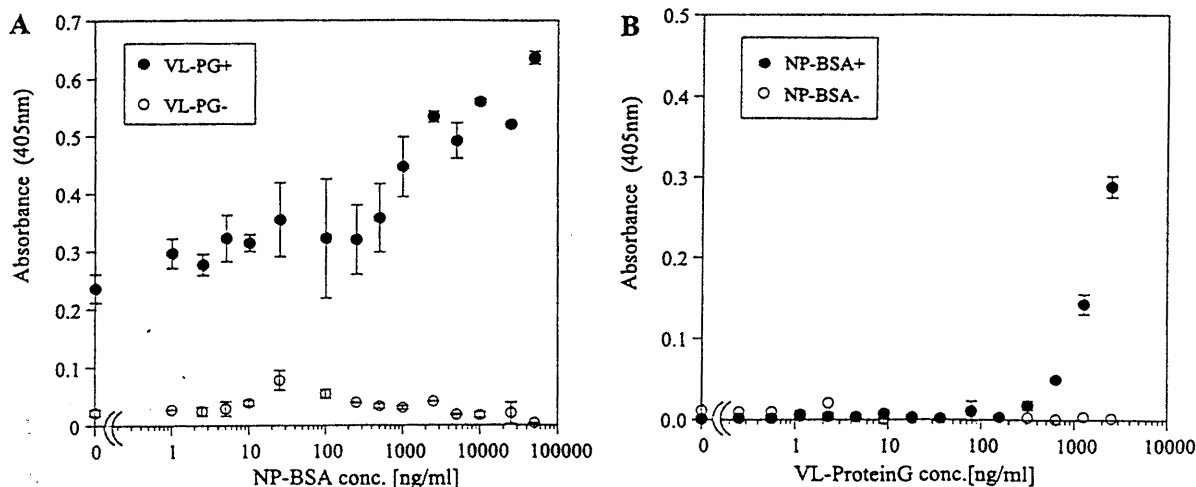


Fig. 3 OS- ELISA の NP 定量への応用

A: OS-ELISA 法による NP 濃度依存曲線。VL(NP)-PG を固相化、VH(NP)-PhoA で検出
 B: NP-BSA を固相化、VH(NP)-PhoA で検出

OS-ELISA に先立ち、SPR センサー (BIAcore) を用いて、抗 NP 抗体 VH、VL 及び NP それぞれの相互作用を測定した。その結果、Fv (VL+VH)-NP 間の結合定数は $K_a=2.1 \times 10^5(1/M)$ と、文献値と近い値を示した。これに対し、VH-VL 間の相互作用は $K_a \sim 10^4(1/M)$ であった。これらを用いて OS- ELISA を行ったところ、NP 濃度に依存してシグナルの増加は見られたものの、バックグラウンドが高く、また誤差もかなり大きかった (Fig. 3A)。しかし逆に NP 標識 BSA を吸着させたマイクロタイタープレートに各種濃度の VL(NP)-PG と過剰量の VH(NP)-PhoA 溶液を同時に加え、VL(NP)-PG の定量を行ったところ、この場合はバックグラウンドも低く、VL(NP)-PG 濃度に応じて明らかなシグナル増加が見られた (Fig. 3B)。

第 7 章では、第 5 章、第 6 章の結果をふまえ、OS-ELISA に適応可能な抗体の一般的な特徴についての考察を行った。OS-ELISA を行うには 1) 強い VH-VL-抗原の三者の相互作用があること 2) これに対し VL-VH 相互作用が無視できるほど小さいこと、が必要条件であると思われる。

HEL の系は、HyHEL10 の VH-VL 間相互作用が非常に低く ($K_a < 10^4(1/M)$)、これに対し三者の複合体は $K_a \sim 10^9(1/M)$ と非常に強い相互作用があることが既に報告されており、故に高感度且つ再現性良く HEL の定量が行われたと思われる。これに対して、NP の系では VH-VL 相互作用は小さいものの、三者の相互作用も比較的弱いため、感度の良い測定が出来ないものと思われる。本研究では OS-ELISA 法を用いることにより、簡便に、且つ従来の Sandwich ELISA 法に匹敵する測定感度で抗原 (HEL) 濃度が測定できることを明らかにした。しかし今後、OS-ELISA 法を Sandwich ELISA 法に匹敵する新測定法として確立していくためには、従来の抗体を OS-ELISA に適用出来るように改変する方法の開発が不可欠である。