

論文の内容の要旨

論文題目 GFP キメラ蛋白質の創製と免疫測定への応用

氏名 新井 亮一

1. 緒言

キメラ蛋白質は、複数の異なった機能を持つ蛋白質を結合して創製する人工蛋白質であり、大量発現・精製や抗体医薬、免疫測定法など様々に応用されている。

本論文でキメラ蛋白質の創製に主に用いた Green fluorescent protein (GFP) は、オワンクラゲ由来の蛋白質で強く安定な緑色蛍光を発する分子量 27kDa の蛍光蛋白質である。原核生物、真核生物いずれでも発現し、構造、蛍光活性とも安定である。また、近年、蛍光活性を高めた変異体や、蛍光波長が変換された変異体などが開発され、遺伝子発現や生細胞内局在のマーカーなどに盛んに応用されている。しかしながら、GFP を免疫測定に応用した例はほとんどなかった。そこで、本論文では、抗体や抗体結合蛋白質と蛍光蛋白質 GFP とのキメラ蛋白質を作製し、免疫測定法へ応用することを目的として研究を行った。GFP を免疫測定法に応用する場合、抗体や抗体結合蛋白質と遺伝子的に蛍光標識できるので化学修飾が不要となり、また一般的な蛍光試薬である fluorescein よりも蛍光が退色しにくい利点があり、有用性が高いと考えられる。

本論文ではまず、抗体結合部位の protein G と蛍光蛋白質変異体 EGFP のキメラ蛋白質を

作成し、抗体の蛍光標識試薬として免疫測定法に応用した。次に、抗体可変領域 V_H , V_L と蛍光蛋白質変異体 EBFP, EGFP とのキメラ蛋白質をそれぞれ作成し、抗原濃度依存的な V_H , V_L の会合を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって測定する免疫測定法 Open Sandwich FIA 法に応用した。またさらに、抗体可変領域 V_H , V_L と発光酵素 Rluc, 蛍光蛋白質変異体 EYFP とのキメラ蛋白質をそれぞれ作成し、発光酵素-GFP 変異体間の発光エネルギー移動(BRET)を利用した新規免疫測定法の開発を行った。

2. Protein G-EGFP キメラ蛋白質の創製とその免疫測定への応用

Protein G は、バクテリア *Streptococcus* から単離された細胞表面蛋白質であり、ヒト、ウサギ、ヒツジ、ヤギなど多くの種の抗体 IgG に特異的に強く結合する蛋白質である。本研究では、Protein G と蛍光蛋白質 GFP を遺伝子工学的に結合させてキメラ蛋白質を作成し、抗体の蛍光標識試薬として蛍光免疫測定法へ応用することを試みた。従来法では、fluorescein などの蛍光色素を抗体に化学的に修飾する必要があり、また、それぞれの種の抗体に対する蛍光標識抗体をそれぞれ用意する必要があった。そこで、また、野生体よりも蛍光活性を高めた変異体である EGFP と、多くの種の抗体と結合する protein G を用いることにより、より汎用性の高い抗体の蛍光標識試薬の創製を試みた。

protein G の C1 ドメイン (抗体結合ドメイン) と EGFP を遺伝子的に結合したキメラ蛋白質の発現ベクター pPG-EGFP を作成し、大腸菌を用いてキメラ蛋白質を発現させ、抗体固定化ゲルを用いてアフィニティ精製を行った。得られたキメラ蛋白質

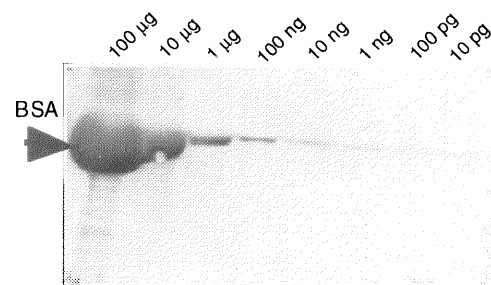


Fig 1. Detection of bovine serum albumin (BSA) by Western blotting using PG-EGFP

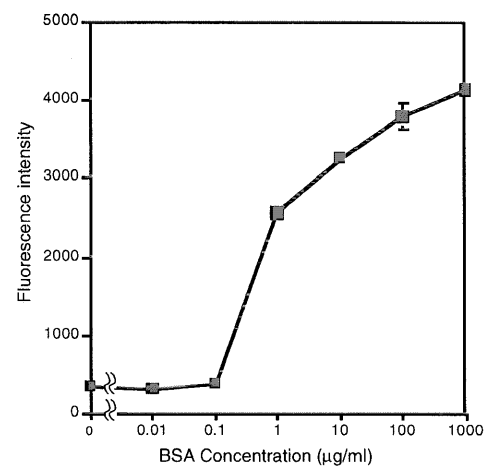


Fig 2. Determination of bovine serum albumin (BSA) by sandwich fluoroimmunoassay using PG-EGFP

PG-EGFP は、蛍光活性及びウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウスなどの抗体に対する結合活性を十分に有していた。これらを抗体の蛍光標識試薬としてウェスタンブロットティングに応用したところ、1ng 以下の BSA の検出が可能であった (Fig. 1)。また、サンドイッチ蛍光免疫測定法に応用したところ、BSA (Fig. 2) やウサギ抗体などが測定可能であった。これらの結果により、PG-EGFP は、汎用的な抗体の蛍光標識試薬として応用可能であることが示された。

3. 抗体可変領域-GFP 変異体キメラ蛋白質の創製と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)を利用した免疫測定法への応用

免疫測定法は、微量物質を感度良く測定する方法で臨床検査などに必須の方法であるが、従来のサンドイッチ免疫測定法では、数ステップの反応と洗浄の繰り返しを必要とし、非常に煩雑な手間と時間がかかるのが問題であった。そこで当研究室では、より簡便迅速な方法であるオープンサンドイッチ免疫測定法の開発を行ってきた (1)。抗ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)抗体 HyHEL10 などの抗体では、H 鎖抗体可変領域 V_H と L 鎖抗体可変領域 V_L との間の会合は不安定であるが、 V_H 、 V_L 及び抗原を同時に存在させると両者は抗原を介して安定に会合する。オープンサンドイッチ法とは、この抗原の有無による V_H 、 V_L の会合の安定性変化を免疫測定に応用した新しい免疫測定法である。オープンサンドイッチ法では、 V_H 、 V_L で抗原をサンドイッチするため 1 種の抗体しか必要としない。従って、従来のサンドイッチ法が適用できないハプテンなどの単価抗原の測定も可能である (2)。また、洗浄を必要としないホモジニアス測定法として、 V_H 、 V_L それぞれを蛍光色素で標識し、蛍光色素間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用するオープンサンドイッチ蛍光免疫測定法が開発された (3)。しかし、この方法では、 V_H 、 V_L を蛍光色素で化学的に標識する際の失活や、標識率の制御が問題であった。そこで、本研究では、 V_H 、 V_L を

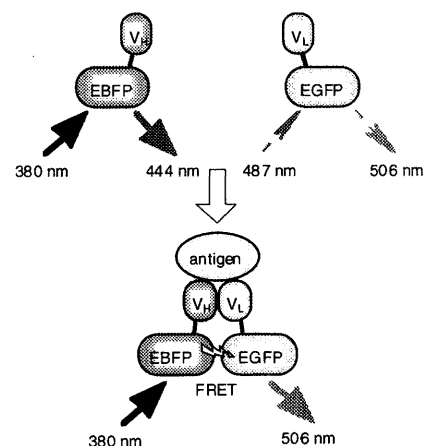


Fig. 3. Principle of open sandwich fluoroimmunoassay.

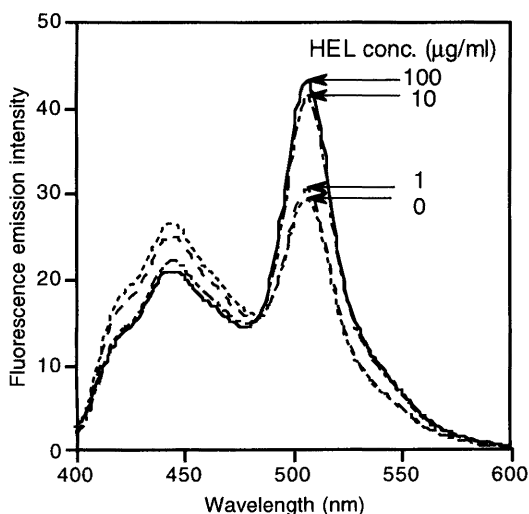


Fig. 4. Change in the fluorescence spectra by FRET due to the addition of HEL.

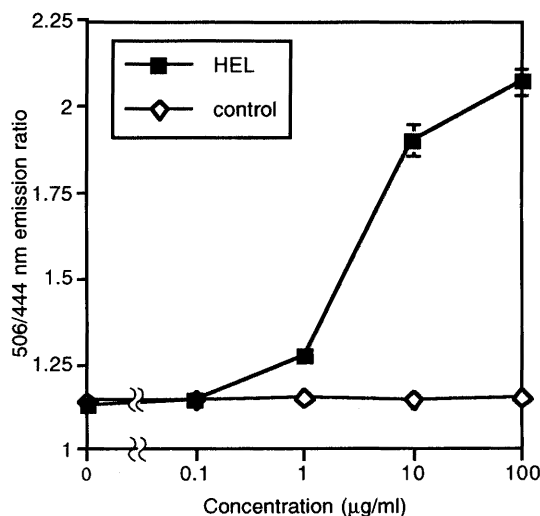


Fig. 5. Determination of antigen concentration by FRET. HEL, hen egg lysozyme; Control, buffer only.

失活させず高い収率で蛍光標識するために、抗体可変領域と GFP 変異体を遺伝子的に結合させた GFP キメラ蛋白質を創製し、GFP 変異体間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したオープンサンドイッチ蛍光免疫測定法への応用を行った (Fig.3)。この方法によれば、洗浄操作などが一切不要となり、サンプルと試薬を混合するだけで測定が可能であるので、測定に時間がかかる従来のサンドイッチ免疫測定法よりも、大幅な測定時間の短縮が可能であった。実験では、まず、HyHEL10 の V_H と青色蛍光変異体 EBFP、 V_L と緑色蛍光変異体 EGFP のキメラ蛋白質を大腸菌を用いて発現させた。次に、両者のライセートを混合し、HEL アフィニティーカラムを用いて精製した。得られたキメラ蛋白質は、十分な抗原結合活性及び蛍光活性を有し、 V_H 、 V_L ともほぼ完全に EBFP、EGFP により蛍光標識されていた。次に、これらのキメラ蛋白質混合液に抗原の HEL を添加しながら蛍光スペクトルを測定したところ、HEL の添加量に応じて、EBFP の蛍光が減少し、EGFP の蛍光が増大するという FRET に由来する変化が見られた (Fig. 4)。また、EGFP と EBFP のピーク強度比を FRET の指標として HEL の濃度に対してプロットしたところ、HEL 濃度 1~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で定量できることが示された (Fig. 5)。また、96 穴のマイクロプレートを用いて測定を行ったところ、サンプル添加 2 分後には検出可能なシグナルが得られ、本手法により臨床診断などに必須の多検体迅速測定が可能であることが示された。

4. 抗体可変領域-発光酵素キメラ蛋白質の創製と発光酵素- GFP 変異体間の発光エネルギー移動(BRET)を利用した新規免疫測定法の開発

前章の FRET を用いたオープンサンドイッチ蛍光免疫測定法の場合、励起光が必要なため、励起光によるアクセプター蛍光色素の直接励起による蛍光や、蛍光色素の退色等が問題となりうる。そこで本研究では、ドナー蛍光色素の代わりにウミシイタケ由来の発光酵素(*Renilla luciferase*, Rluc)を用い、発光酵素から GFP 変異体 EYFP への発光エネルギー移動(BRET)を測定することにより、抗原濃度を定量する新規免疫測定法の開発を行った (Fig. 6)。前章と同様に、抗 HEL 抗体 HyHEL10 の V_H とウミシイタケ由来の発光酵素 Rluc, V_L と GFP の黄色蛍光変異体 EYFP のキメラ蛋白質を大腸菌を用いて発現させ、それぞれ精製して実験に用いた。次に両者のキメラ蛋白質を混合し、HEL と基質セレンテラジンを添加して発光スペクトルを測定したところ、HEL の添加量に応じて、BRET に由来する EYFP の蛍光の増加が見られた (Fig. 7)。また、EYFP と Rluc のピーク強度比を BRET の指標とした時に、HEL の濃度に対して $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の範囲で定量で

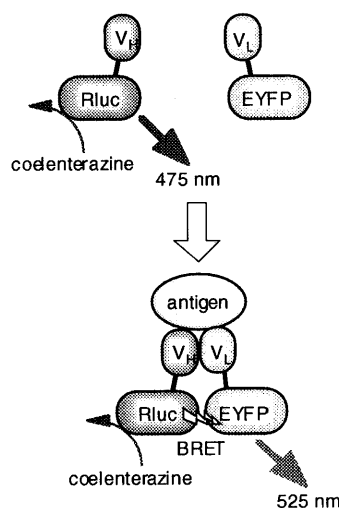


Fig. 6 Principle of open sandwich bioluminescent immunoassay.

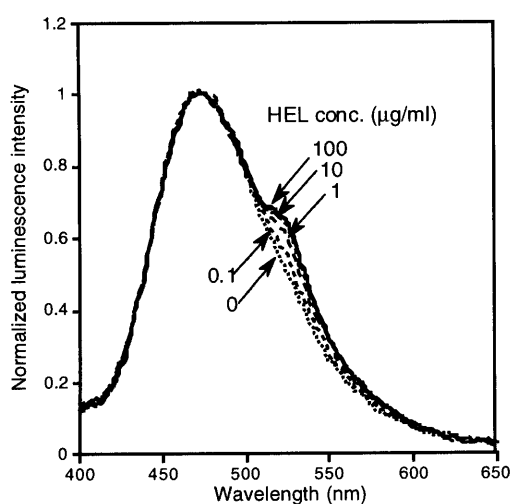


Fig. 7. Change in the normalized luminescence spectra by BRET due to the addition of HEL.

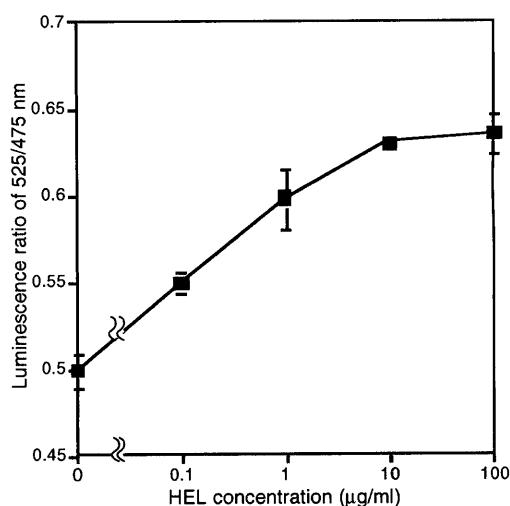


Fig. 8. Determination of antigen concentration by open sandwich bioluminescent immunoassay.

きることが示された (Fig. 8)。この結果は、前章の FRET の結果と比較して、検出感度で約 10 倍の向上を示している。これは、一般に蛍光法よりも感度がよいといわれる生物発光法を用いることにより、測定に用いるキメラ蛋白質の量を減らすことができたことによると考えている。以上により、BRET を用いて、簡便でより高感度な均一系非競争的免疫測定法が可能であることが示された。

5. 結言

本論文では、まず、抗体結合蛋白質の Protein G と蛍光蛋白質変異体 EGFP のキメラ蛋白質を作製し、抗体の蛍光標識試薬として各種免疫測定法へ応用できることを示した。次に、抗体可変領域 V_H , V_L と蛍光蛋白質変異体 EBFP, EGFP とのキメラ蛋白質をそれぞれ作製し、抗原濃度依存的に V_H , V_L が会合することを蛍光共鳴エネルギー移動を利用するオープンサンドイッチ蛍光免疫測定法に応用した。また、抗体可変領域 V_H , V_L と発光酵素 Rluc, 蛍光蛋白質変異体 EYFP とのキメラ蛋白質をそれぞれ作成し、発光酵素 GFP 変異体間の発光エネルギー移動を利用した新規免疫測定法を開発した。

<参考文献>

- (1) H. Ueda, K. Tsumoto, K. Kubota, E. Suzuki, T. Nagamune, H. Nishimura, P. A. Schueler, G. Winter, I. Kumagai, and W. C. Mahoney. *Nature Biotechnol.*, **14**, 1714-1718 (1996).
- (2) C. Suzuki, H. Ueda, W. Mahoney, and T. Nagamune. *Anal. Biochem.*, **286**, 238-246 (2000).
- (3) H. Ueda, K. Kubota, Y. Wang, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, and T. Nagamune. *Biotechniques*, **27**, 738-742 (1999).

<発表状況>

- (1) R. Arai, H. Ueda and T. Nagamune, *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 440-445 (1998).
- (2) R. Arai, H. Ueda, K. Tsumoto, W.C. Mahoney, I. Kumagai, and T. Nagamune, *Protein Eng.*, **13**, 369-376 (2000).
- (3) R. Arai, H. Nakagawa, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, H. Ueda and T. Nagamune, *Anal. Biochem.*, in press (2001).