

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

高親和性抗体のスクリーニング方法と抗体結合磁性ビーズプロテオミクス法の開発

氏名 太期 健二

### 1. 緒言

ヒトの塩基配列が全て解読され、その遺伝情報を元にした包括的な生命現象の研究が活発に進められている。同時にそれらの研究成果を利用し新たな診断と治療の方法が開発されている。また昨今は遺伝情報だけではうまく説明できない生命現象をタンパクの包括的動態から解明する試みが進められているが、タンパクは核酸と比べてより精密な検出原理が必要であるため、その基礎技術開発が望まれている。

タンパクを同時に検出する方法として、プロテインチップ（もしくはプロテインアレイ）というチップ基板上にタンパク質を微小に多数並べたものがある。その用途は大別して 1. 発現プロファイル解析、2. 相互作用解析であり、具体的に 疾患に關与するタンパク質の探索、 疾患に關与するタンパク質の検証、 たんぱく質産生代謝経路の解析、 薬剤リード化合物のスクリーニング、 診断などへの応用が期待される。プロテインチップの1つに抗体チップが報告されている。それらのほとんどが二次元の基板上に抗体を固定するという方法を用いているが、反応面積の制限があることから高感度測定には不向きであることが予想される。そこで現在高感度に多数のタンパクを測定できる新たな原理を用いた抗体チップの開発を目指している。チップの概要は、基板上に微細な穴を作成しその中に抗体結合粒子をいれたものである。測定原理は、抗体サンドイッチアッセイを行い、蛍光で検出するものである。このような方式をもちいると、微小な空間でも広い反応面積を得られるので、高感度化が期待できる。加えて高親和性の抗体と非特異吸着の少ないビーズを用いてシグナル/ノイズ比を上げることにより更なる高感度化が期待できると考えている。

本研究では高感度抗体チップ作成を目指した基礎技術開発を目的とした。チップの開発には多種の要素技術が必要であるが、そのうち特に重要であると考えられる高親和性抗体と低非特異吸着ビーズについて注目し、高親和性抗体スクリーニング法の開発と抗体結合磁性ビーズプロテオミクス法の開発を行った。最後に抗体チップへ高親和性抗体や低非特異吸着ビーズを搭載するためのスクリーニング系としてフィルタープレートを用いたビーズELISA法を立ち上げ各種検討を行った事についても述べる。

### 2. 高親和性抗体スクリーニング法の開発

モノクローナル抗体は、病態の診断や治療、研究目的のタンパク検出に用いられる優れ

たツールである。例としてHER2 抗原に対するモノクローナル抗体が乳癌の診断と治療に有効であることが報告されるなど、その広い利用範囲が注目されている。癌治療には早期に診断することが有効であるが、そのためには高感度の測定方法と、多種のマーカータンパクの測定が望まれる。モノクローナル抗体の特性の 1 つに親和性がある。抗体の親和性は通常  $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$ M で親和性の高い抗体は高感度検出に有利であると考えられる。一般的なモノクローナル抗体のスクリーニング方法は、ハイブリドーマの培養上清をサンプルとして、抗原固相化ELISAにより測定するものであるが、この方法は抗体の親和性は判断されていない。親和性を判別するスクリーニング方法に関しては、タンパク相互作用リアルタイム検出機器BIAcoreを用いた報告がある。しかし培養上清中の抗体濃度が不明なため測定効率が落ちる可能性が指摘される。そこでハイブリドーマの培養上清からハイスループットに親和性を判別できるスクリーニング方法の開発を目指した。

まず培養上清中の抗体濃度に依存しないスクリーニング方法が必要であると考え、モデル計算から抗原濃度の異なるアッセイのシグナル比で親和性を判別できる方法を考案した。そこで親和性既知の抗体数種を用いて調べたところ、ELISA法と比べ高感度で広いダイナミックレンジを持つDELFI A法を用いると効率的に高親和性抗体をスクリーニングできる可能性が示唆された。次にその方法を実際に肝癌マーカータンパク フェトプロテイン(AFP)抗体のスクリーニングで検討したところ、ELISAよりも効率的に $K_D=10^{-9}$ M台の高親和性抗体をスクリーニングすることに成功した。最後に得られた高親和性抗体の特性を検討したところ得られた高親和性抗体は各検討により市販の高親和性抗体と同等もしくはそれ以上の親和性を示した。また得られた抗体でAFPの糖鎖、アイソフォーム、複合体解析が可能であることが示唆され、本方法により新たな診断を可能にする高親和性抗体が得られたことを示す結果となった。

### 3. 抗体結合磁性ビーズプロテオミクス法の開発

核内受容体は低分子量脂溶性生理活性物質をリガンドとするリガンド応答性の転写因子タンパクであり、ヒトでは 48 遺伝子がクローニングされている。また転写調節機能はコファクターと呼ばれるタンパクと複合体を形成し機能している。さらに転写の各段階で異なる複合体を形成して機能していると考えられている。核内受容体の 1 つである HNF 4 は、グルコースや脂質の代謝調節、内胚葉の発生などに関与する。また、MODY1 の原因遺伝子であることも知られている。HNF 4 と相互作用するタンパクはいくつか報告されているが、内因性の HNF 4 を bait として相互作用タンパクを同定した例は報告されていない。すなわち HNF 4 に相互作用するタンパクはタグ付強制発現 HNF 4 によるプルダウンや、Yeast two hybrid 法などで同定されている。これらの強制発現系を用いる方法は、細胞内で起こっている生理的なタンパク質相互作用を必ずしも反映しないと考えられる。この解決策として、内因性タンパクの免疫沈降により同定する方法があるが、内因性タンパクは微量であるため、抗体の高い親和性と低いバックグラウンドが望まれる。そこで高親和性抗体結

合磁性ビーズを用いた網羅的 LC-MS/MS 測定による内因性 HNF4 複合体の同定を試みた。

まず BIAcore 高親和性 HNF4 の選定を行ったところ、H1415 抗体が最も良好な親和性を示し、内因性 HNF4 を効率的に回収できることが示唆された。そこで H1415 抗体を結合した磁性ビーズを用いて免疫沈降により HepG2 細胞破碎液中から HNF4 複合体を単離し LC-MS/MS 測定による相互作用タンパク質の同定を行ったところ、内因性 HNF4 を効率的に回収できることが示され、また HNF4 がヒットしてきたことから HNF4 と HNF4 がヘテロダイマーを形成している可能性が示唆された。その相互作用は実際に *in vitro* 系および細胞破碎液からの免疫沈降により確認された。この検討の際、細胞破碎方法の違いにより複合体が変化していること、抗体の純度が不十分であることなどが明らかとなり、免疫沈降の条件検討が必要であることがわかった。そこで条件を改良して免疫沈降を行ったところ、よりバックグラウンドの低い結果になったため、その免疫沈降サンプルをショットガン法 LC-MS/MS 測定による網羅的相互作用タンパク質の同定を試みた。結果多数の転写に関わるタンパク質が同定され、特にクロマチン間顆粒群に含まれていると考えられるタンパク質が多く同定された。よってこの技術を用いて高感度、高精度の微量タンパク質複合体解析が可能であると考えられた。

#### 4. フィルタープレートを用いたビーズ ELISA によるビーズと抗体の特性検討

抗体チップの基板は開発段階にあるが、その前段階としてチップに搭載する抗体とビーズの特性をチェックする必要がある。ゆえにチップとほぼ同じような形態で簡便にアッセイができる系を立ち上げる必要がある。フィルタープレートはウェルの底にフィルターがついている 96 穴プレートである。この中に抗体結合ビーズを入れ、サンドイッチ ELISA アッセイを行うことができると考えられる。このアッセイは想定しているチップのアッセイスタイルと似ているので、抗体とビーズの特性チェックに適していると考えられた。本章ではフィルタープレートを使用したビーズ ELISA アッセイで抗体とビーズの特性チェックを試みた。

まず AFP 抗体を用いて粒径による反応性の違いを検討した結果、反応性は粒径ではなく使用する 1 次抗体の量に依存していると考えられた。また、粒径によらず一次抗体と抗原の反応は十分飽和していると考えられた。各項目 (AFP, CEA, 2M, HGF, PSA) でのアッセイも、ELISA と同じ反応性だったことから、評価系として十分使用できると考えられた。将来的には本方法により非特異吸着の少ないビーズや、高感度の抗体ペアを大まかに選別し、実際のチップに搭載して最終的に判断するという評価系の立ち上げが望まれる。