

論文の内容の要旨

論文題目 「Studies of Protein Engineering on Human Alkaline Phosphatase」

(ヒトアルカリフォスファターゼに関する蛋白質工学的研究)

氏名 笹島 義志

標的結合分子, なかでも抗体を用いた免疫測定は、被検体中の微量な物質を特異的に検出することができるため、分子生物学、細胞生物学などの基礎研究から臨床診断まで非常に重要な手法である。ELISA 法やウェスタンブロッティング法などの免疫測定法において、特に酵素標識抗体の性能は、測定系の精度に大きく影響を与える。これまでに様々な種類の酵素を抗体分子に標識した例が報告されているが、現在、標識酵素として主に用いられているのは、その酵素活性と安定性の高さから、ペルオキシターゼ (Peroxidase: POD EC:1.11.1.x) とアルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase: AP EC:3.1.3.1) である。このうち AP はリン酸エステルの加水分解を触媒するホスホモノエステラーゼであるが、熱やプロテアーゼに比較的強い性質を持ち、基質特異性が低いため、検出に適した多様な基質が利用でき、標識酵素やレポーター酵素として幅広く用いられている。

酵素を標識酵素としての利用する上で必要な性質としては、第一に高い触媒活性を持つことが挙げられる。一般に標識酵素が高活性であればあるほど、目的の被標識物質が低濃度であっても検出が可能になる。第二に挙げられるのが、高い安定性を持つことである。種々の酵素免疫測定では、抗体抗原反応や、B/F 分離の工程で活性を維持する必要があるため、試薬として長期の保存に耐えるためにも高い安定性が求められる。本研究の目的として酵素免疫測定に適した、高性能な酵素標識抗体分子を作製することを目標とした。第一章では本研究の意義を明確にするために、酵素標識抗体とアルカリフォスファターゼに関する既存の研究を中心に、研究の背景について述べた。

第二章では哺乳類細胞を用いた、抗体-ヒトアルカリフォスファターゼ融合蛋白質発現システムの構築を行った。抗体に酵素を標識する一般的な手法として化学標識法があるが、反応のために多数の煩雑な行程を伴い、またその過程で抗体の結合能や酵素活性が失われてしまうケースがしばしば見られる。他の手法として、抗体と酵素との融合タンパク質を発現させる遺伝子工学的手法があり、抗体と大腸菌 AP との融合タンパク質を大腸菌で発現した例がいくつか報告されている。これに対し、今回、我々は動物細胞を用いた発現系の構築を試みた。真核細胞を用いてリコンビナント抗体を発現させる場合、大腸菌などの原核細胞で発現する場合と比較して、翻訳後修飾やフォールディングを促進する機構が豊富なため、結合能を保持した抗体分子が得やすいと考えられる。また動物細胞発現に適した、大腸菌由来の AP より比活性が高いとされる哺乳類由来のアルカリフォスファターゼを用いることができる。そこで今回、私は第一に標的結合分子として抗体の抗原結合能を有する最小単位である VH、VL ドメインをペプチドリンカーでつなげた single chain Fv (scFv) をモデル分子として scFv-AP 融合蛋白質の発現を試みた。また第二に抗原濃度に依存した VH-VL 間相互作用の変化を利用した免疫測定

法 Open Sandwich ELISA 法 (OS-ELISA) のプローブとして用いることができる VH-AP 融合蛋白質の発現も併せて試みた。scFv-AP には抗 4-hydroxy-3-nitrophenacetyl (NP)抗体を、VH-AP には抗 Hen egg lysozyme 抗体(HyHEL-10)を用い、哺乳類由来 AP としてヒト胎盤由来の AP 遺伝子からアンカー配列を取り除いた Secreted form human PLAP (SEAP)を用いた。

アフリカミドリザルの COS-1 細胞で発現させた scFv-SEAP と VH-SEAP は、ともに AP 活性ならびに所期の標的結合能を有していることが確認された。また精製後のタンパクの酵素活性評価により、これらは K_m についてはともに SEAP 単体とほぼ同等の値を示したが、 k_{cat} については VH-SEAP はほぼ同等の値、scFv-SEAP は 25%程度の値を示し、scFv による SEAP 活性への立体障害が示唆された。大腸菌 AP は活性部位と N/C 末端との距離が長いのに比べ、SEAP では立体構造上 N 末端と活性部位との距離が短い。今後より立体障害を減少させるためにリンカーを設計して用いることで、より高い k_{cat} を得られると期待できる。すなわち 今回、我々が確立した手法を応用することで、ELISA 法や OS-ELISA 法で用いる様々な種類の標識抗体を迅速に生産できると期待された。

第三章では第二章で構築した発現系における酵素部位をさらに酵素免疫測定法に適した性能とするため、第二章で用いたヒトアルカリファスファターゼについて、相同酵素間の配列キメラ化により、高活性かつ熱安定性の高い AP を創出する試みを行った。ヒト由来の AP には胎盤型(PLAP)、小腸型(IAP)、生殖細胞型(GCAP)、組織非特異型(TNAP)の4つの相同酵素(アイソザイム)が存在し、それぞれ比活性と熱安定性が異なることが知られている。なかでも PLAP は最も高い熱安定性を持ち、IAP は最も高い比活性を示し、両者のアミノ酸配列の相同性は 88%と高い。そこで、両者の配列情報と立体構造情報を元に配列をキメラ化することで、両者の長を併せ持つ、高活性かつ熱安定性が高い、標識酵素に適した AP を創出できないか試みた。

具体的には分泌型 PLAP(SEAP)遺伝子を立体構造上特徴のある4つの領域(残基番号 1~25, 26~146, 147~304, 305~492)に分け、このうち 2~4 番目の領域を IAP の遺伝子に組み替え、7種類(IPP, PIP, PPI, PII, IPI, III)のキメラ AP 発現ベクターを構築し、COS-1 cell に導入、各キメラ AP を発現し検討した。

まず各キメラ AP について 56°C で 15 分から 8 時間熱処理し、その後の AP 活性で耐熱性を評価したところ、IPI, III については 15 分で非加熱のものと比較して活性が 3%以下になり、PPI, PII については当初から有意な AP 活性を示さなかったのに対し、PLAP, IPP, PIP, IIP については 8 時間後も 80%以上の活性を維持した。同様に各キメラ AP を 65~90°C で 30 分間熱処理し、AP 活性を測定したところ、IPI, III については 65°C 以上で比活性が 1%以下になったのに対し、PLAP, PIP は 75°C で 20%以上、IPP, IIP については 75°C で 45%以上の活性を維持していた。すなわち C 末領域(305~492)が PLAP 型のものが高い熱安定性を持つことがわかった。

さらにそれぞれの AP 活性を評価するために、精製した各蛋白質の酵素学的速度定数を測定したところ、26~146, ならびに 147~304 位が IAP 型の多くのキメラ AP が高い k_{cat} を示すことがわかった。

なかでも 26~146 位が IAP 型で 305~492 位が PLAP 型のキメラ AP は熱安定性が高く、かつ比活性が高いことが示され、N 末、C 末領域がそれぞれ活性と熱安定性に重要な役割を果たすことが明らか

かとなった。これらについてその理由を考察した。また両者のキメラ化により、PLAP より高い比活性と IAP より高い熱安定性を持つ、標識酵素として適した性質を持つ変異体を複数得ることができた。第4章では本研究全体の総括と、今後の展望について述べた。