

## 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

二量体検出原理による新規免疫測定法の開発

## 2. 氏名

上田 宏

## 3. 研究のねらい

抗体を用いた特異的高感度分析法である免疫測定法は、その汎用性の高さから臨床診断をはじめ様々な分野で活用されている。従来免疫測定法は、その測定ターゲット(抗原)の分子量によって(i)分子量 1000 以上の高分子抗原を二種類の抗体で抗原をサンドイッチして測定するサンドイッチ法、および(ii)分子量 1000 以下の低分子を標識(あるいは固相)抗原との競合反応を利用して測定する競合法が使い分けられてきた。しかし、(i)では測定ステップが多く低分子が測定できない、(ii)では測定可能な濃度範囲が狭く高感度を得るための条件設定が困難、といった欠点があった。これらの欠点を潜在的に解決しうる新規免疫測定法として、さきがけ研究以前に私は遺伝子工学的に抗体のH鎖L鎖それぞれの可変領域Fv(抗原結合部位 $V_H/V_L$ )を分離し、それらの抗原依存的な再会合から抗原濃度を測定する「オープンサンドイッチ法(OS法)」を考案した(図1, Ref. 1)。OS法は原理的に低分子でも非競合的に、一回の反応洗浄サイクルのみで測定できる大きなメリットを有している。しかし同時にその一般性がまだ十分明らかではなく、特にタンパク質抗原に対しては使える抗体に限られるとの見方があった。そこでさきがけ研究において、(a) OS法の一般性を明らかにするため、様々な抗体を用いて特に低分子の検出を試み、OS法が実用的な測定法たりうるかを評価した。また(b)免疫マウス由来の抗体ライブラリを作製し、ここからOS法による抗原(低分子および高分子)検出に適した可変領域断片( $V_H/V_L$ )あるいは非天然可変領域ペア( $V_H/V_H$ など)を選択することで、よりバックグラウンド値の少ない高精度な測定系を構築できないか検討した。またこの過程で、将来これをもとに抗体ライブラリを作製できるよう、OS法に適した可変領域のフレームワークを得ることも目的とした。

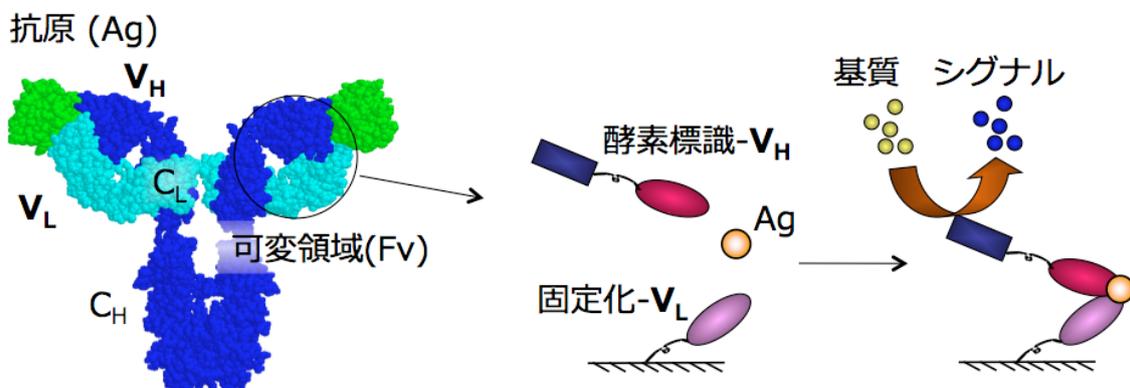


図1 抗体構造とオープンサンドイッチ法の原理。可変領域の抗原結合による安定化を利用する。

#### 4. 研究成果

##### (i) OS法による低分子化合物の検出

まず低分子の非競合検出が可能, というOS法の第一の特長を生かすべく, 数種の新規低分子測定系の構築と評価を行った。例えば内分泌攪乱作用のあるカビ毒ゼアラレノン(FW:318)について, 我々が開発した抗原による選択とOS-ELISAの両者が可能なファージ提示系Split Fvシステム(図2, Ref. 2)を用いて抗体産生細胞から抗体可変領域遺伝子のクローニングを行った。これを用いて通常の競合ELISAとOS-ELISAをファージ提示した抗体断片を用いて行ったところ, それぞれ3-30 ng/ml, 0.3-1000 ng/mlの測定レンジが得られ, OS-ELISAは各国の規制値(30-1000 ng/ml)を一回でカバーできる広い測定レンジと高い感度を持つことがわかった(Ref. 3)。また同様の結果を大腸菌で発現精製したマルトース結合タンパク(MBP)融合 $V_L$ および大腸菌アルカリフォスファターゼ(PhoA)融合 $V_H$ を用いて再現することもでき, 測定をMBP- $V_L$ の固相への直接固定とブロッキング, サンプルおよび $V_H$ -PhoAとの同時反応, 最後に酵素反応という非常に簡便なプロトコルで実施可能なことも明らかとなった。

同様に, 副腎機能マーカーである 11-deoxycortisol (11DC, FW:346)の測定においても競合ELISAよりも優れた感度と測定レンジが得られた。当初, 野生型配列の $V_H$ 断片を用いたファージOS-ELISAで抗原濃度0の測定値がやや高いという問題が見受けられたが, 我々が $V_H$ 断片中で $V_H/V_L$ 相互作用に重要な残基として同定した(Ref. 4) Gln39 に変異を導入することで, 応答性を向上させることにも成功した。さらに, 血清中に高濃度に存在するCortisolに対する選択性が, 競合法における交差反応(0.2%)と同程度に保たれることも明らかとなった。

この他, ネオニコチノイド系農薬等, 多くの分子量 300 程度の低分子化合物の測定に成功した。この理由として, 一般に低分子認識抗体は $V_H/V_L$ 界面のくぼみで抗原を認識するため, 抗原結合により安定化されるFvの割合が多い可能性がある。また競合法より感度が向上する理由としては, OS法が非競合系であって  $K_D$ 値による検出限界の制限がない利点があるが, 可変領域を分割して用いることによるエントロピー的な不利を補って余りあるためと考えられる。

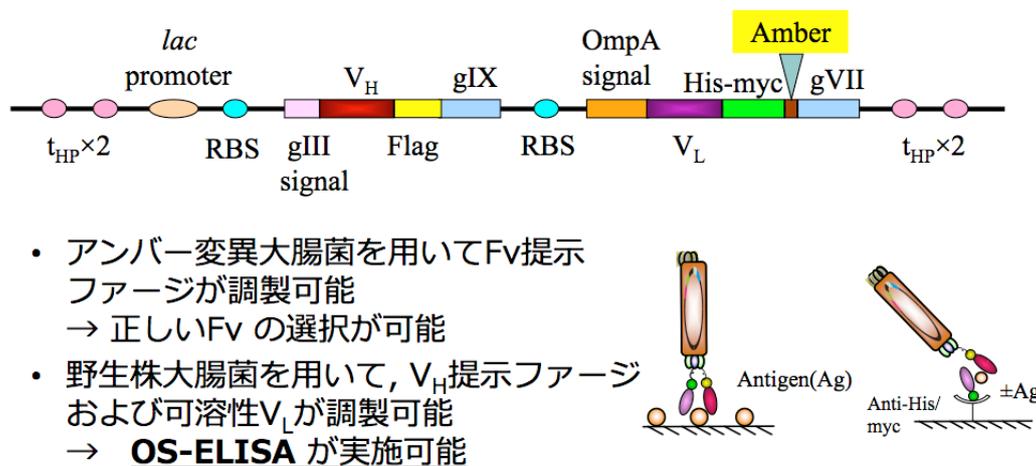


図2 Split Fv システムに用いるファージ提示用ベクターの構造(一部)と可能な ELISA。

### (ii) OS法によるペプチドの非競合検出とマイクロ化

さらに非競合測定の特長が生かせる低分子として、ペプチドの測定を試みた。骨代謝マーカーであるオステオカルシン(別名BGP)の部分ペプチドをモデルに、抗体産生細胞からそのC末端7残基のペプチド(BGP-C7, MW:894)を認識し高い結合能をもつ $V_H/V_L$ を取得した。これを用いたOS-ELISAの結果、予想通り競合法より優れた感度、測定濃度域、更に応答レンジが得られた(図3, Ref. 5)。また得られた測定濃度域は臨床検査に必要な濃度域を十分カバーした。C末残基が認識に必須なこと、およびブタBGPの立体構造から考え、BGP-C7はハプテン様の構造をとり $V_H/V_L$ 界面で特異的に認識されている可能性がある。将来同様の末端ペプチド認識抗体を作製することで多くのペプチドあるいはタンパク質についてOS-ELISAが実施できるかもしれない。

また、診断におけるOS-ELISAの有用性の更なる向上を目指し、この系を用いてマイクロ流路を用いた微量高速測定系の構築を試みた(北森アドバイザーとの共同研究)。MBP- $V_L$ 固定化ポリスチレンビーズを流路に充填、ブロッキングの後サンプルとペルオキシダーゼ標識MBP- $V_H$ 計5 $\mu$ lを導入し、洗浄後に基質と反応させ熱レンズ顕微鏡で検出した。結果、計13分程度でマイクロプレート系とほぼ同等の検量線が得られた。さらにアルブミン除去のための簡単な前処理を行うことで、血清中のペプチド濃度も同条件で測定できた。興味深いことに血清中では全長BGPの濃度に比べBGP-C7濃度測定値が顕著に高いことも判明した。BGPは血中で分解されやすいことから、今後BGP-C7が新たな診断マーカーとなりうる可能性もある。

### (iii) 免疫ライブラリを用いた新規測定系の構築

既存の抗体由来でない、新規な抗体断片を用いたOS-ELISA測定系構築を目指し、抗原免疫マウスより $10^6$ サイズの一本鎖抗体提示ファージライブラリを作製した。抗原としてはタンパク質としてニワトリリゾチーム(HEL)、および低分子としてフルオレセイン(FL)を修飾したKLHを用いた。常法に基づき固定化抗原(HELあるいはFL-BSA)を用いた選択により特異的結合ファージを濃縮したところ、3ラウンド以内の選択で抗原に特異的に結合するクローン多数を得ることができた。これらの遺伝子を用いて各2種類のOS-ファージELISA系を構築したところ、HEL認識抗体では両方で抗原濃度依存的な信号増加を観測し、うち1つのクローンで極めて低いバックグラウンドと1 ng/mlからの良好な応答性を得ることができた。すなわちタンパク質認識抗体でもOS-ELISAに適した $V_H/V_L$ ペアが予想以上に存在することが示唆された(図4)。

またライブラリ構築の際、通常の $V_H-V_L$ 型一本鎖抗体提示ファージと同時に $V_H-V_H$ 型提示のものも作製したが、後者をFL-BSAにより選択した結果、予想に反し $V_H$ 単独で強くFL(分子量353)と結

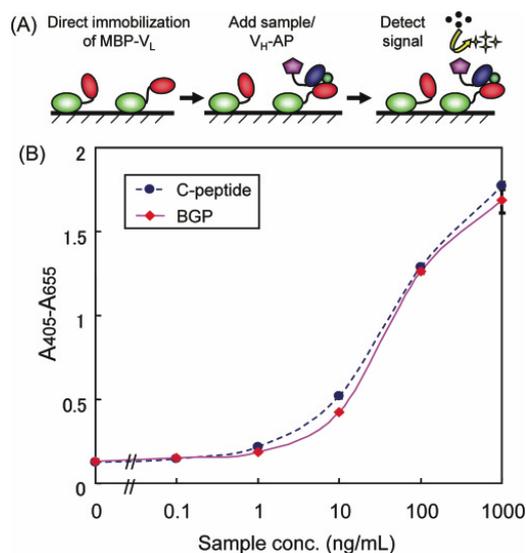


図3 OS-ELISAの(A)模式図および(B)BGPとそのC末ペプチドの検量線。

合するクローンが得られた。この $V_H$ 部分をMBP融合タンパクとして発現させ、BiacoreでFL-BSAに対する平衡解離定数を評価したところ $K_d = 25$  nMと算出された。単量体でハプテンに結合する珍しい $V_H$ ドメインが得られたものと考えられる。同様の選択で $V_H/V_L$ ペアについては所期のクローンが多数得られているので、これは天然に存在しない $V_H/V_L$ ダイマーの選択が困難な結果の可能性もある。

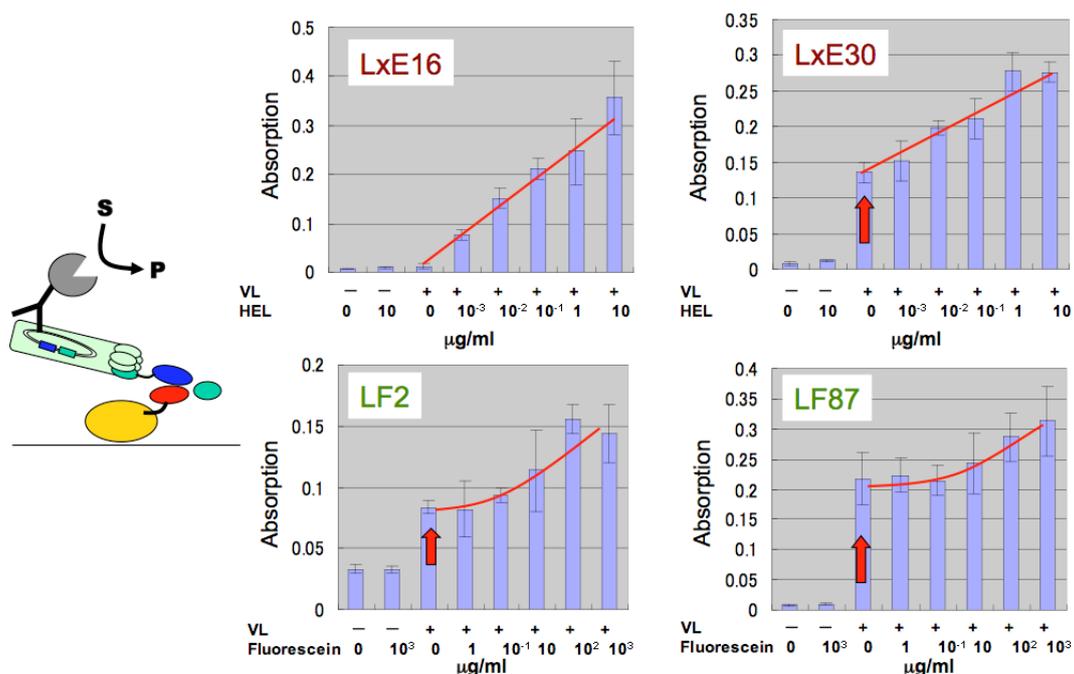


図4 免疫マウス由来ライブラリから得られたクローンを用いた OS-ELISA の結果

LxE は HEL 認識, LF は FL 認識クローンを示す。

### まとめ

今回、自身の開発したオープンサンドイッチ法の低分子検出における汎用性と優位性を、既存の各種低分子認識抗体との比較をもとに確認できた。またペプチド認識抗体を用いた初の OS-ELISA の実施と、そのマイクロ迅速診断への応用も行うことができた。さらに、免疫マウス由来ライブラリから OS-ELISA に至適な性質を持つ抗体可変領域を選択することにも成功した。また詳細は省略するが、オープンサンドイッチ原理を DNA 結合タンパク質に応用し、生理的条件下の特異的二本鎖 DNA 配列の二量体形成原理による高感度検出にも成功した(Ref. 6)。

### 参考文献

1. H. Ueda et al., *Nat. Biotechnol.*, **12**, 1714 (1996).
2. T. Aburatani, H. Ueda, et al., *Anal. Chem.*, **75**, 4057 (2003)
3. T. Suzuki, Y. Munakata, K. Morita, T. Shinoda & H. Ueda, *Anal. Sci.*, **23**, 65 (2007).
4. K. Masuda, H. Ueda et al., *FEBS J.*, **273**, 2184 (2006).
5. S.-L. Lim, H. Ichinose, T. Shinoda & H. Ueda, *Anal. Chem.*, **79**, 6193 (2007).
6. K. Yoshitake, S. Waki, & H. Ueda, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1266-1271 (2008)

## 5. 自己評価

目標のうち、(a) OS法の一般性を明らかにするため、様々な抗体を用いて特に低分子の検出を試み、OS法が実用的な測定法たりうるかを評価する、に関してはペプチドを含む多数の低分子について予想以上の結果を出すことができ、目標を達成することができたと考えている。また予定外の成果として、共同研究によりマイクロ流路を用いた微量迅速測定への応用も行うことができた。また(b)免疫マウス由来の抗体ライブラリを作製し、ここからOS法による抗原(低分子および高分子)検出に適した可変領域断片( $V_H/V_L$ )あるいは非天然可変領域ペア( $V_H/V_H$ など)を選択することで、よりバックグラウンド値の少ない高精度な測定系を構築できないか検討する、に関しては主たる目標であった $V_H$ 二量体によるOS-ELISAには成功しなかったものの、特にHEL免疫マウス由来ライブラリからOS-ELISAに最適な性質を持つ可変領域ペアを単離することができた。OS法に適した可変領域のフレームワークを得ることも目的の1つであったので、目標の半分は達成できたのではと考えている。

また当初の目的としてはあげていなかったが DNA 結合タンパク質の二量体形成を用いた特異的二本鎖 DNA 配列の検出、トランスプライミングを用いた抗体酵素融合タンパクの発現、新規抗体酵素融合タンパクによる高感度な低分子抗原濃度測定法の開発にも成功した。特に最後の研究成果については JST による特許出願も行うことができたのでここに付記し感謝したい。

## 6. 研究総括の見解

自ら考案した非競合的免疫測定法である「オープンサンドイッチ法」を発展させ、小分子からタンパク質までを、1回の反応洗浄サイクルのみで検出可能とする測定法の開発である。測定操作の簡易化や測定時間の短縮などを行い、広い測定濃度域に対して高感度な特性を持つ生体関連物質定量法の完成を狙う。主たる成果は次の3点である。

- ①分子量 300 程度であるカビ毒などの数種の化合物を対象に OS 法による高感度定量に成功した。
- ②ペプチドを認識し高い結合能を示す $V_H/V_L$ を取得し、OS-ELISAも実証した。これをマイクロチップに応用して血清のペプチド濃度の測定にも成功した。
- ③タンパク質およびハプテン免疫マウスから、ファージ提示法により多数の特異的可変領域の単離に成功した。

着実な要素技術の積み上げにより低分子を中心に種々の生体関連物質を幅広い濃度範囲で高感度に検出できる可能性を実証した。また、オープンサンドイッチ法により ELISA のハイスループット化を前進させた。これらの成果を通じてオープンサンドイッチ法の一般性を実証し、応用範囲を拡大に貢献したことは高く評価できる。

研究成果は 8 篇の原著論文、4 件の学会招待講演にまとめられている。また、この研究成果に基づく特許 5 件を出願している。

OS 法の完成に向けて幅広い視点と手法を駆使して取り組む努力は賞賛に値する。抗体から可変領域を単離した場合に抗原分子認識に及ぼす効果など解明すべき課題もある。さらなる幅広い取り組みにより、この方法が生体物質や環境汚染物質の検出などの基盤技術として発展する

ことを強く期待する。

## 7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

- ・ Kenji Masuda, Kenzo Sakamoto, Miki Kojima, Takahide Aburatani, Takuya Ueda and Hiroshi Ueda, “The role of interface framework residues in determining antibody VH/VL interaction strength and antigen binding affinity”, FEBS J. 273 (2006) 2184–2194
- ・ Yoshiyuki Sasajima, Takahide Aburatani, Kenzo Sakamoto and Hiroshi Ueda, “Detection of protein tyrosine phosphorylation by Open Sandwich fluoroimmunoassay.”, Biotechnol. Prog. 22, 968–973 (2006)
- ・ Shean-Lee Lim, Hiroko Ichinose, Tatsuya Shinoda, and Hiroshi Ueda, “ Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay”, Anal. Chem. 79 (16), 6193–6200 (2007)
- ・ Kazutoshi Yoshitake, Shoko Waki and Hiroshi Ueda, “Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA”, Biosens. Bioelectron. 23, 1266–1271 (2008)

##### 論文(国内)

- ・ Tatsuya Suzuki, Yuriko Munakata, Kazuki Morita, Tatsuya Shinoda, and Hiroshi Ueda, “Sensitive detection of estrogenic mycotoxin zearalenone by open sandwich immunoassay”, Anal. Sci., 23(1), 65–70, 2007

#### (2)特許出願

発 明 者:上田 宏、小嶋美樹

発明の名称:抗原濃度測定法

出 願 人:科学技術振興機構

出 願 日:2007.8.1(未公開)

出 願 番 号:特願 2007-187324

その他 国内特許 1件(未公開)

外国特許 1件(未公開)

#### (3)著書

- ・ 上田 宏、“オープンサンドイッチ免疫アッセイによる非競合的な低分子分析”、臨床化学 36(2), 116–124, 2007

## (4) 学会発表

**口頭発表(国内)**

- ・ (学) 呉 雨書・(KAST) 高橋 寛子・佐藤 香枝・志村 清仁・北森 武彦・(正) 上田 宏、“マイクログルチンを用いた骨代謝マーカーオステオカルシンペプチドの非競合高速度検出”、化学工学会第 72 年会、2007
- ・ 小嶋 美樹・岩井 宏徒・伊原正喜・上田 宏、“抗体酵素融合タンパクを用いた、環境汚染物質指示菌の創製”、日本生物工学会 2007 年大会、2007

**ポスター発表(国際)**

- ・ Hiroshi Ueda, Kazutoshi Yoshitake, Ryohei Iwasaki, Shoko Waki、“Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA”、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006

**ポスター発表(国内)**

- ・ 岩崎 亮平, 田辺 明人, 上田 宏、“mRNA トランススプライシングを利用した抗体融合タンパク質作製”、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006
- ・ 伊原 正喜, 黒田 翔, 吉田 将志, 上田 宏、“免疫ライブラリ由来抗体断片を用いたオープンサンドイッチ免疫測定”、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007

## (5) 招待講演

**招待講演(国際)**

- ・ Hiroshi Ueda、“Open Sandwich immunoassay as a general detection principle for low-molecular weight antigens”、Antibody Engineering International Meeting (A satellite meeting of 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology)、2006
- ・ Hiroshi Ueda、“Open sandwich ELISA for sensitive detection of various biomolecules”、Antibody Engineering Asia (Singapore)、2008

**招待講演(国内)**

- ・ 上田 宏、“オープンサンドイッチ免疫測定法による低分子の高感度非競合的測定”、日本薬学会第 126 年会、2006
- ・ 上田 宏、“オープンサンドイッチ原理による各種生体関連分子の非競合検出とその応用”、高分子学会 バイオ・高分子研究会、2006

## (B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表 なし

(2) 特許出願

国内特許 2 件(未公開)