

博士論文（要約）

新規免疫測定素子 Quenchbody に関する基礎的検討

ジョン ヒジン

近年、ファージ提示法などにより得られたヒト型抗体が、治療用抗体としてがんや関節リウマチなど多くの難治性疾患に絶大な効果を示しているのは周知の通りである。その一方で、高価な治療用抗体の投与においては、その標的分子や、治療にあたってその効果を予測するための、分子の濃度や分布を簡便かつ正確に調べることのできる診断薬（コンパニオン薬）の必要性がますます高まってきている現状がある。特に、抗体と抗原との結合が特異的であることに基づく免疫測定法は、測定対象物質として生体物質、非生体物質を問わず、広範囲な物質を対象として、混合物中に微量に存在する物質を選択的に、かつ感度よく検出・定量可能である。しかし、従来の免疫測定法は高感度であるが、測定に時間と手間を要す上、測定対象を低分子と高分子に分けて異なる方法を用いる必要があった。

以上の背景のもと、最近当研究グループでこのような問題を潜在的に解決しうる新規免疫センサー蛋白質 **Quenchbody**（以下、**Q-body**）の作製原理が見出された。その作製法は、目的分子に対する抗体配列を一本鎖抗体（scFv）化し、その N 末端近傍に蛍光色素結合配列（アンバーコドン）を導入し、無細胞転写翻訳系にて蛍光色素標識および蛋白質合成を行うものである。**Q-body** を用いた測定は、抗原非存在時には抗体分子内のトリプトファン（Trp）残基によって色素の蛍光が消光（クエンチ）されているが、抗原結合により抗体断片が空間的に移動し、消光が解除されるという新しい原理に基づく。**Q-body** 法は、微量サンプルを測定試薬と混合し、数分後にその蛍光強度を測定するだけで測定が完了する簡便性、迅速性、抗体次第で低分子から高分子まで検出できる汎用性など多くの利点を持つ。しかし、これまで **Q-body** を細胞内外の抗原の蛍光観察に応用した例はない。

本研究においては、**Q-body** を用いた細胞内外分子の可視化を目標に、蛋白質やその修飾の動態を知ることが出来る、**Q-body** を用いた細胞イメージングを目指した。そのため、**Q-body** 原理を生命現象に関わる抗原検出に応用するとともに、その応答性や検出感度、および収量をより向上させるべく、従来の構築法の改良を試みた。

第 1 章では、本研究の意義を明確にするために、免疫測定法と **Q-body** に関する既存の研究は知見を中心に、研究の背景について述べた。

第 2 章では、**Q-body** 合成の際に用いる無細胞転写翻訳試薬の作製と **BGP Q-body** 作製による性能確認について述べた。当研究グループでは従来、鋳型 DNA と蛍光標識 tRNA を市販の大腸菌無細胞転写翻訳系（**RYTS** 試薬）と混合し、反応させることで **Q-body** の作製を行ってきた。そこでまず、各種 **Q-body** 実験を行う上で十分な量の合成試薬を確保するため、大腸菌ライセート以外の転写・翻訳に必要な T7 ポリメラーゼ等の酵素類やアミノ酸を含む緩衝液類を自作した。そして、先行研究で高い蛍光応答性を示してい

る、骨粗鬆症などの骨疾患の診断マーカーであるオステオカルシン (BGP) の C 末ペプチド (BGP-C7) 認識抗体 KTM219 を用いて scFv 型 Q-body を作製し、RYTS 試薬を用いて作製した場合と比較することで自作した試薬の性能を評価した。具体的には、KTM219 scFv の N 末端近傍に導入したアンバーコドン部位にテトラメチルローダミン (TAMRA) 標識アミノアシル tRNA を取り込ませ、無細胞転写翻訳系を用いて蛋白質合成を行った。その後、蛋白質の C 末端側に付加した His₆ タグを利用して精製を行い、得られた Q-body に BGP-C7 ペプチドを添加した際の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定した。その結果、ペプチド濃度依存的に蛍光強度が増加し、ペプチド非添加時に比べ最大 5.5 倍の増加を示した。この結果は RYTS 試薬を使用した場合とほぼ一致したことから、以後の無細胞転写翻訳系を用いた Q-body 合成においては今回作製した試薬を用いることにした。

第 3 章では、抗ニワトリ卵白リゾチーム抗体を用いた Q-body の作製について述べた。リゾチームは細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素であり、抗菌・抗ウイルス作用および白血球貪食能増強作用などの生体防御機構へ関与していることが知られている。特に、ニワトリ卵白から抽出したリゾチーム (Hen egg lysozyme, HEL) を認識する抗体のひとつである HyHEL-10 はその立体構造が解明されていることから、蛋白質工学や構造生物学分野においてモデル蛋白質として幅広く使用されている。そこで本研究では、内部に存在する Trp 残基の位置が分かっている HyHEL-10 を用いて Q-body を作製することで、クエンチの要因とされる Trp 残基と蛍光色素間の相互作用について新たな知見が加えられる可能性があると考え、HyHEL-10 Q-body の作製を試みた。また、Q-body の更なる機能拡張のため、HyHEL-10 Q-body の蛍光標識に、TAMRA と構造類似のローダミン系蛍光色素で TAMRA よりやや短い励起蛍光波長をもつローダミン 6G (R6G) が使えないか、検討した。

まず、SDS-PAGE の結果より、TAMRA 標識および R6G 標識 Q-body それぞれにおける蛋白質合成、色素標識、遊離色素の除去を確認した。次に、HEL 添加時の蛍光強度を測定したところ、HEL 添加後 1 分以内に HEL 濃度依存的に蛍光強度が増加、特に R6G 標識 Q-body において TAMRA 標識 Q-body より優れた蛍光応答性や検出感度が得られた。以上の結果より、高感度な HEL 検出用 Q-body の作製が示され、蛋白質検出における Q-body の可能性が確かめられた。また、標識色素を変えることでその応答性を向上できる可能性が示唆された。

第 4 章では、Q-body を用いた細胞周期依存的ピメンチンセリンリン酸化の検出について述べた。蛋白質のリン酸化は細胞の機能制御にきわめて有効な情報伝達手段であり、細胞骨格の中間径フィラメント構成蛋白質のひとつであるピメンチンは細胞の形態変

化・運動の進行に伴って細胞周期依存的にリン酸化され、そのリン酸化部位は特にセリンに集約していることが知られている。リン酸化されたビメンチンは解離・再組織化され、定常な細胞分裂において構造変化を起こすことから、ビメンチンのリン酸化は細胞生物学の基礎研究、さらには分裂制御の異常を伴うがんの診断・創薬にとって重要なターゲットと考えられる。

そこで本研究では、Q-body を用いた細胞分裂後期と中期それぞれに行われるセリン 71 リン酸化 (PS71) とセリン 82 リン酸化 (PS82) の検出を試みた。まず、抗 PS71 scFv の N 末端近傍に TAMRA を標識した Q-body を合成し、PBST (PBS+0.05% Tween20) 中で PS71 ペプチドを添加したところ、非リン酸化ペプチド (S71) 添加時に比べその蛍光強度が約 1.2 倍増加した。そこで、更なる応答性向上の可能性を検討するため、R6G で標識した Q-body を用い、反応液とペプチド添加前のプレインキュベーション処理の最適化を行った結果、PBST0.25 (PBS+0.25% Tween 20) 中で 16 時間処理した際に、蛍光強度が最大 1.4 倍にまで増加した。そこで、さらに Trp 残基と蛍光色素間に加えて蛍光色素同士のカエンチ効果を期待し、N 末端近傍に加えてドメイン間リンカー中にももう 1 ヶ所アンバーコドンを導入し、計 2 ヶ所に R6G を取り込ませた scFv を作製し、実験に用いた。その結果、PBST0.25 中で 16 時間前処理した場合に、Q-body の蛍光強度が最大 4.0 ± 0.4 倍まで増加した。二つの色素を導入することで色素同士が近接して会合体 (H-dimer) を形成し、よりカエンチしやすくなったことが考えられる。以上より、Q-body で PS71 の検出が可能なが示され、非リン酸化ペプチドや PS82 ペプチドを添加した際には蛍光強度の変化はみられなかったことから、PS71 Q-body はリン酸化およびその部位特異性をもつことも明らかになった。次に、同様にして抗 PS82 scFv の R6G 標識 Q-body を合成し、PBST 中で PS82 ペプチド添加時の蛍光強度を測定した。その結果、 V_H - V_L 型 scFv の N 末端近傍を R6G で標識した Q-body では約 1.2 倍の蛍光強度増加がみられたが、 V_H と V_L のドメイン順を逆 (V_L - V_H) にすることで、その蛍光強度は 2.5 倍に増加した。抗 PS82 scFv の V_H ドメインには Trp が 3 個存在するのに対し、 V_L ドメインには 4 個存在し、蛍光標識した N 末端側により多くの Trp 残基をもつ V_L を配置することで、色素がよりカエンチされやすくなったと考えられた。さらに、抗 PS82 scFv (V_L - V_H 型) のドメイン間リンカー領域にもアンバーコドンを導入し、R6G をダブル標識したところ、PS82 ペプチド存在時にその蛍光強度が最大 6.7 ± 0.2 倍に増加し、検出感度も 1 nM にまで向上した。また、非リン酸化ペプチド (S82) や PS71 ペプチドを添加した際には蛍光強度の変化は全くみられなかった。

以上より、Q-body 法によって蛋白質リン酸化の検出が可能なが示された。これは本法による蛋白質リン酸化検出の初めての例である。さらに、色素、反応条件および

Q-body 構造の最適化を行うことで蛍光応答性を顕著に向上できることが示唆された。特に PS82 Q-body においては生理的条件に近い反応液で高い応答性が得られたことから、今後このプローブを細胞に導入しても機能する可能性が示唆された。

第 5 章では、大腸菌を用いた Fab 型 Q-body の構築と細胞イメージングへの応用について述べた。前述のように、Q-body を用いた測定は洗浄操作を必要とせず、原理的に極めて簡便、迅速、高感度である。しかしこれまで Q-body は無細胞転写翻訳系を用いてのみ構築可能であったため、細胞イメージング等、プローブ量を必要とする応用が困難であった。また、これまでは scFv 型の Q-body を作製してきたが、細胞内でも機能させるためには scFv より構造的に安定な Fab を用いた方が有利とも考えられる。そこで本研究では、大腸菌で未修飾の抗体 Fab 断片を大量に発現・精製し、後から蛍光色素修飾して構築する方法について検討を行い、併せて細胞イメージングへの応用を試みた。

まず、KTM219 の Fab 断片を大腸菌で発現させ、H 鎖・L 鎖の N 末端付近に導入しておいたシステイン残基に TAMRA-マレイミド、もしくは ATTO520-マレイミドを修飾して Q-body を作製した。これらに BGP ペプチドを添加したところ TAMRA 修飾 Q-body では 1.3 倍、ATTO520 修飾 Q-body においては 5.5 倍の蛍光強度の増大が見られた。すなわち、本法での Q-body 構築に成功した。

次に、高い応答を示した ATTO520 修飾 Q-body を用いてアガロースビーズを用いた蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、ビーズに Q-body を結合させ、抗原を加えた場合に顕著な蛍光が観察され、抗原によるクエンチ解除が観察された。そこで次に、この Q-body を用いて生きたヒト骨肉腫細胞 U2OS からの BGP 分泌の観察を試みた。その結果、BGP 分泌を誘導する $0.1 \mu\text{M}$ ビタミン D_3 で 36 時間細胞の前処理を行い、かつ外部より Q-body を加えた場合にのみ細胞膜表面近傍に蛍光が観察され、分泌後に沈着した BGP がイメージできたと思われる。

最後に第 6 章において、本研究全体の総括と、今後の展望について述べた。