

2012年度 生物工学奨励賞（照井賞）受賞



単鎖抗体の高密度配向固定化技術の
開発と高感度免疫診断への応用

熊田 陽一



Development of scFv-immobilized polystyrene support
for Sensitive immunodiagnosis

はじめに

将来の予防医療社会を考えるうえで、疾病診断技術、特に抗体を用いる免疫診断（イムノアッセイ）の高感度化と低コスト化の両立は直近の課題であり、これらの課題解決のために技術革新が必要なことは言うまでもない。すなわち、今後は、投薬や手術など、疾病患者の負担が大きい「治療」中心の医療社会から、遺伝情報や個人の体質を正確に把握し、疾病の発症を未然に防ぐ「予防」中心の医療社会へ変化すると考えられ、これまで以上に診断技術の充実化が必要となる。現行の診断技術では、検査項目数の増大に伴う診断コストの高騰ならびに診断処理時間の超過は避けられず、これまで以上に高感度、低コストならびにハイスループットなイムノアッセイの開発が急務とされている。

現代のイムノアッセイは、担体の形状や検出原理はそれぞれ違えど、1977年に Engvalらが発表した enzyme-linked immunoSorbent assay (ELISA) を基本としている(図1)^{1,2)}。ELISAでは、高純度に精製された抗体を

ポリスチレンなどの固体表面上に固相化し、固液間における免疫反応（すなわち、抗原抗体反応）によって目的成分（抗原）のみを固相側に濃縮する。濃縮された目的成分は、酵素や蛍光分子を標識した二次抗体でサンドイッチされ、専用の検出機器（たとえばマイクロプレートリーダーなど）で測定されている。ELISAは、多くの研究室ならびに医療機関で日常的に実施されており、一見、技術研究の余地は残されていないように思われるかもしれないが、抗体の製造、固定化、B/F分離、シグナル検出など、各操作ステップにおける課題はかなり残されており、長年の経験則によってそれぞれの課題を場当たり的に克服しているのが現状である。

特に、イムノアッセイに用いられてきた完全長抗体（Whole抗体）は、遺伝子工学やタンパク質工学が発展した現代においてもいまだ実験動物（マウス、ウサギ、ヤギなど）によって製造されており、これらは、血液中から高純度に分離・精製されて利用されているため、製造コストがきわめて高く、結果として免疫診断の価格高騰を引き起こしている。さらに、これらを診断用部材であるポリスチレン基板上に固定化した際、立体障害、配向性、安定性などの問題から密度ならびに抗原結合活性を高く維持できない。これらの問題を解決するためには、遺伝子工学的ならびにタンパク質工学的な分子改変による抗体分子自身のサイズダウンはもちろんのこと、培養工学的な観点からの低分子化抗体の生産技術の開発、ならびに化学工学的観点からの固定化技術の抜本的な開発が必要である。

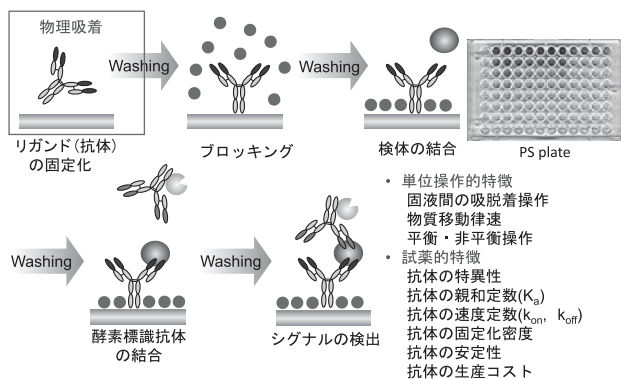


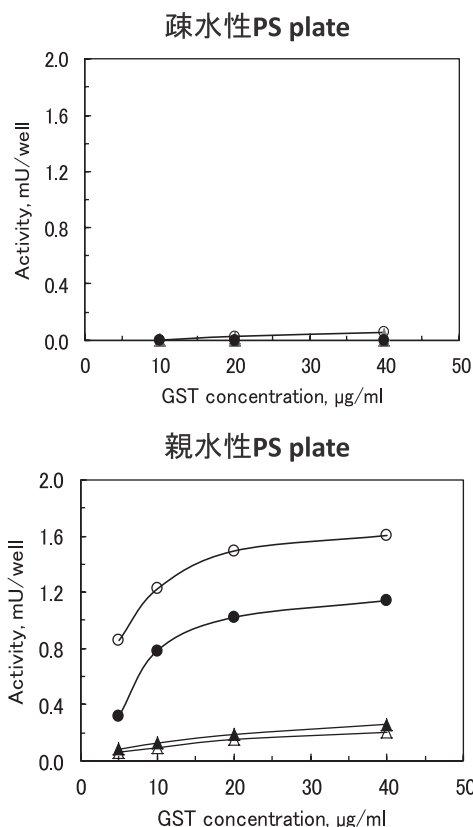
図1. ELISAの概略と特徴

材料親和性ペプチドを用いる
タンパク質の固定化技術の開発

本研究では、まず、所望のタンパク質を固体表面上に

高密度に、均一な配向で、溶液中の生理活性を可能な限り保持した状態で、簡便に固定化する技術の開発を目指した。抗原抗体反応を利用した免疫診断は、ポリスチレン (PS) 製のマイクロタイタープレートやマイクロビーズなどが担体として用いられており、これらの表面に抗体を物理吸着によって固定化し、利用されている。筆者らは、PS基板の表面構造を高度に認識し、高親和的に付着可能なペプチド、すなわち、ポリスチレン親和性ペプチド (PS-tag) の開発を行った。ランダムペプチド提示大腸菌ライブラリ中から10ラウンドのバイオパニング操作によって10種類の候補ペプチドを単離した。これらのアミノ酸配列をモデル酵素であるグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) のC末端部に導入し、PS基板上への付着性、ならびに付着後の残存活性を評価した。これら候補ペプチドの内、特にPS基板上に強い付着力を示したペプチド (PS19: RAFIASRRIKRP) を単離することに成功した³⁾。PS19ペプチド融合GSTは、ポリスチレンプレートの中でも、表面の親水度の高い親水化PSプレート (phi-PSプレート) に特に強い付着性を示し、高濃度の非イオン性界面活性剤 (Tween 20) やBSAなど、夾雑物の共存下においてもその親和性は高く保持されていた。また、GSTのN末端領域を認識する抗ペプチド抗体を作製し、GSTのN末端部の露出度を間接ELISAにて評価したところ、野生型GSTと比較して2~3倍の高いシグナルが得られ、PS基板上に固定化されたPS-tag融合GSTの分子配向が、野生型GSTと比較してより均一であることが示された。

さらに、本研究では、PS19ペプチドとポリスチレン基板表面の相互作用メカニズムを解明するべく、認識部位の特定ならびにアミノ酸配列の最適化を行った^{4,5)}。PS19ペプチドの構成アミノ酸とphi-PSプレートとの相互作用を詳細に調べたところ、PS19ペプチドのphi-PSプレートへの分子認識は、主に塩基性アミノ酸であるアルギニン (R) と脂肪族アミノ酸であるアラニン (A) およびイソロイシン (I) からなっており、ポリスチレンの化学式から予測されるようなアロマトイックなアミノ酸 (フェニルアラニン (F), トリプトファン (W), チロシン (Y)) との相互作用は存在しないことが明らかとなった。すなわち、本研究で単離されたPS19ペプチドは、ポリスチレンのベンゼン環に対して付着しているのではなく、親水化処理 (主に酸素プラズマによる酸化処理) によって生じた表面のカルボン酸や開裂したポリマー鎖の一部に対して高親和的に付着していることが明らかとなった。PS19ペプチドのアミノ酸配列を改変し、より親和力の強化されたPS19-6ペプチド (RIHIRRIR) を単離することに成功した。親水度の異なる市販のPS



▲: wt-GST (PBS), ●: GST-PS19-6 (PBS), △: wt-GST (PBST), ○: GST-PS19-6 (PBST)

図2. 疎水性PS plateおよび親水性PS plateに固定化されたGSTの残存活性

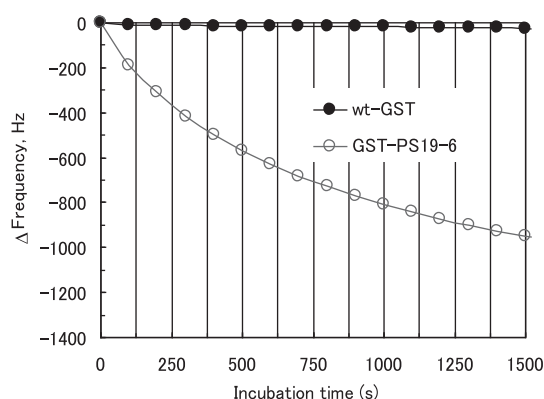


図3. phi-PSコートQCMセンサによるPS-tag融合GSTの付着挙動の解析

プレートに対し、PS-tag融合GSTの付着特性および付着後の残存活性を評価したところ、もっとも親水度の高い市販の組織培養用PSプレート (AGCテクノグラス社, BD Falcon社, TPP社など) やNunc社のMultisorpプレートを用いた場合においてきわめて高い付着性と残存活性を示した (図2)。さらに、phi-PS薄膜をコートしたQCMセンサを用いてphi-PS表面へのGSTの付着挙動をモニタリングしたところ、その付着速度は野生型

GSTと比較して格段に速いことが実証された(図3)。以上の成果によって、PS-tagのPSプレート表面への分子認識メカニズムが解明され、PS-tagを用いて所望のタンパク質をPS基板上に高密度、高活性、さらには均一な分子配向で固定化可能となった。

単鎖抗体固定化基板製造プロセスの開発

PS-tag融合単鎖抗体 免疫診断では、動物血清、マウス腹水、またはハイブリドーマ培養上清中から高度に分離精製された抗体(Whole抗体)を主に物理吸着法(またはアミンカップリング法)によって固定化したPSプレートまたはマイクロビーズが用いられている。すなわち、抗体の製造コストはきわめて高く、さらに、固定化効率もきわめて低いため、免疫診断にかかるコストの大部分は、抗体固定化基板の製造にあるといっても過言ではない。

筆者らは、PSプレート上に固定化するリガンド分子として、従来用いられてきたWhole抗体ではなく、上述のPS-tagを導入した単鎖抗体(single-chain Fv, 以下scFv)を利用した。scFvは、図4に示す通り、Whole抗体の抗原結合ドメイン(Fvドメイン)をフレキシブルリンカー((G₄S)₃)で連結した融合タンパク質である。scFvは、抗原結合ドメインであるVHおよびVLドメインが一連成りとなっており、定常部(Fc)を有さないため、分子量はWhole抗体のおよそ1/5(約30 kDa)である。したがって、Whole抗体と比較してかさの小さいscFvをPS基板上に高密度・高配向・高活性に固定化できれば免疫診断の大幅な高感度化が期待できる(図5)。さらに、組換え微生物を利用してscFvを安価に生産できれば、免疫診断にかかるコストを大幅に削減できると考えられる。このような背景から、本研究では、PS-tagをscFvのC末端部に導入したscFv(以下、scFv-PS)を分子設計し、これらの生産技術ならびに固定化技術について検討を行った。

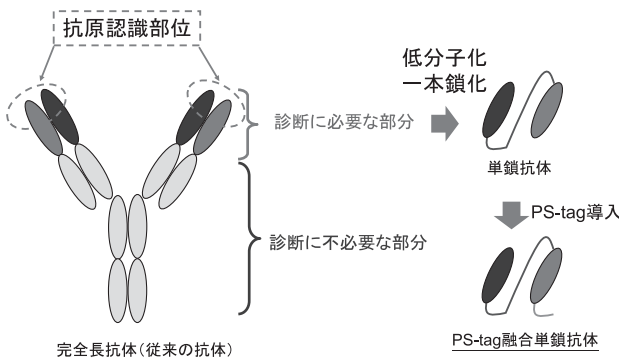


図4. 免疫診断に適した抗体の分子設計

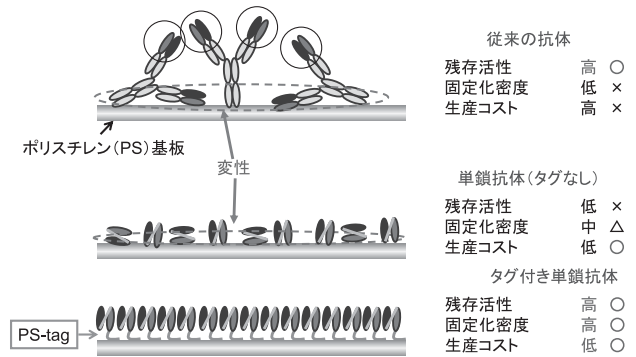


図5. PS-tag融合単鎖抗体の高密度配向固定

組換え大腸菌によるscFv-PSのハイスループット生産 組換え大腸菌によってscFv-PSを大量生産した場合、細胞内環境の違いなどからそれらの大部分は不溶で不活性な凝集体(インクルージョンボディ)として回収され、抗原結合活性を有する活性型のscFv-PSはほとんど回収できない。一方で、インクルージョンボディ内に存在するscFv-PSは、正しい立体構造は有していないものの、生産量(～1 g/l)、純度(～70%)ともに高く維持することが可能であり、scFv-PSの生産コストを大幅に削減できる。さらに、回収されたscFv-PSは下記に示すリフォールディング操作によって本来の抗原結合活性を回復することが可能である。

本研究では、近い将来開発されるであろう「抗体チップを用いる多項目同時疾病診断」に対応可能なscFv-PSのハイスループットな生産システムを構築した⁶⁾。図6に示す通り、ディープウェルマイクロプレートを培養器として利用し、培地として、IPTGなどの添加なく組換えタンパク質の誘導発現が可能なOvernight Express Auto Induction System(以下、OE培地)を用いることで、各ウェル内においてきわめて再現性よく多種類のscFv-PSが同時生産可能であることを実証した。scFv-PSの生産量は、ウェル内の液側境膜酸素移動容量係数 k_{La} の増加とともに上昇し、最大で1ウェルあたり1 mg(生産濃度として1 g/l)のscFv-PSを精製可能であった。ウェル間のクロスコンタミネーションもなく、24時間というきわめて短時間において高濃度かつ高純度のscFv-PSを製造可能であることを実証した。

固相リフォールディングによる単鎖抗体固定化基板の調製 上述のとおり、組換え大腸菌を用いて封入体中に高生産されたscFv-PSは、8 M尿素共存下において分離精製されるため、これを正しい3次元構造に巻き戻す操作、すなわち、リフォールディング操作が必要となる。scFvのリフォールディング操作は津本らが開発した添加剤にアルギニン(Arg)を加える多段階透析操作⁷⁾が

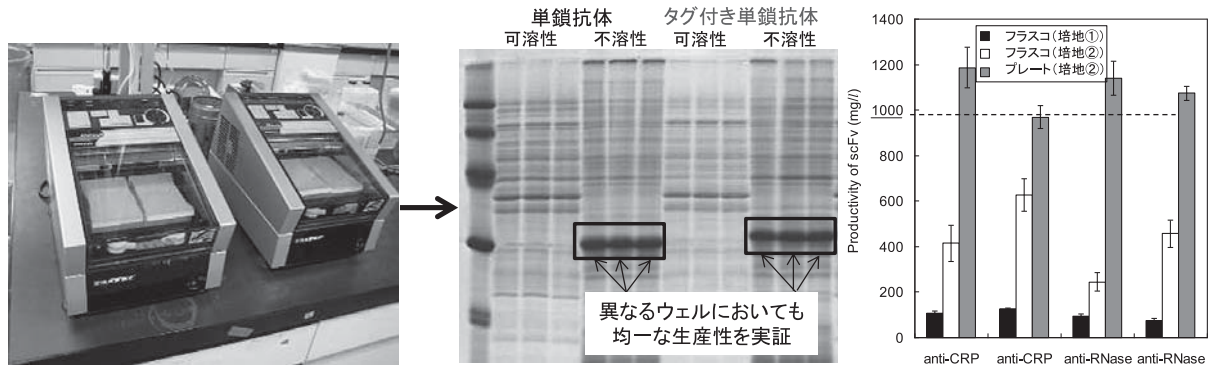
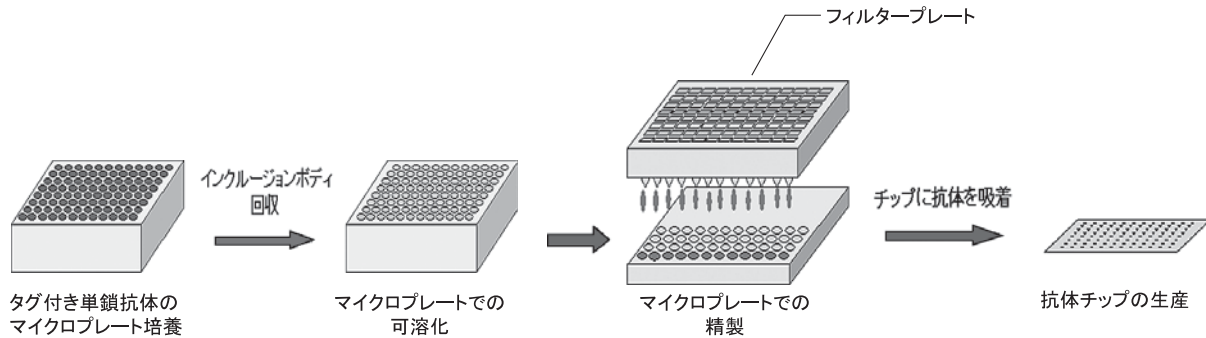


図6. ディープウェルプレートを用いるPS-tag融合単鎖抗体のハイスループット生産



従来のリフォールディング・固定化技術 (高コスト・煩雑・低効率)



固相リフォールディング (低コスト・簡便・高効率)

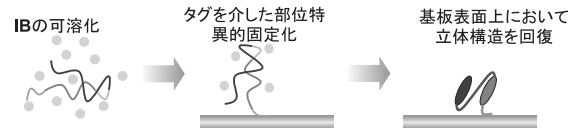


図7. 従来のリフォールディングと本研究で開発した固相リフォールディング

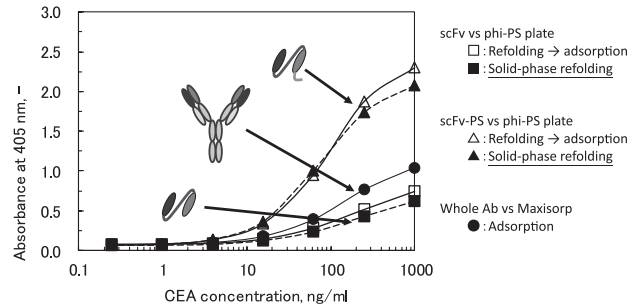


図8. 固相リフォールディングによって調製したPS-tag融合単鎖抗体固定化基板の評価

有名であるが、操作が煩雑なうえ、導入しているPS-tagの影響で回収率がきわめて低いことなどが問題であった。

筆者らは、PS-tagが0.5~2 M程度の比較的低い尿素共存下においてもphi-PS基板上への親和力を高く保持していることに着目し、本機能を利用した簡便で効率的な固相リフォールディング方法を開発した(図7)。すなわち、完全変性状態にあるscFv-PSを0.5~2 M尿素共存下において希釈して半変性状態とし、PS-tagの親和力を利用して基板に部位特異的に付着、さらに、基板表面を尿素不含のバッファーで洗浄することで単鎖抗体の抗原結合活性を回復できることを見いだした^{8,9)}。本手

法は、きわめて簡便、低コスト、かつ効率的であり、従来の液相法によって調製したscFv-PS固定化基板と同等の抗原結合活性を保持していた(図8)。さらに、固相リフォールディング条件を最適化することで、抗原タンパク質のさらなる高感度検出が可能となった。すなわち、pH、塩濃度、GSH/GSSG比、添加剤の有無などの組み合わせが異なる192通りの固相リフォールディング条件を独自に開発し、これらの中からそれぞれのscFv-PSにとって最適な固相リフォールディング条件を抽出可能なハイスループットスクリーニングシステムを構築した。本システムの開発によって、さまざまなscFv-PSの固相

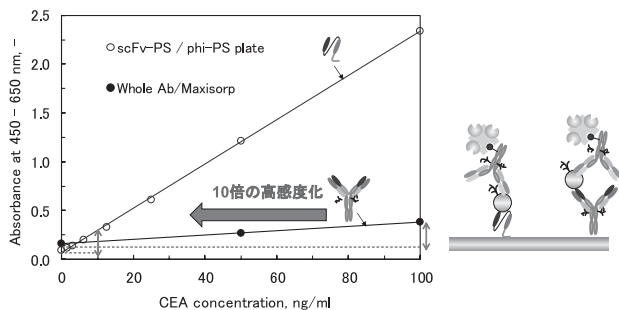


図9. 固相リフォールディング条件の最適化による単鎖抗体固定化基板の高感度化

リフォールディングが可能となり、scFv-PSのハイスループット生産技術と組み合わせることで、scFv固定化PS基板の製造コストを大幅に削減することに成功した。

図9に示す通り、固相リフォールディング条件を最適化することによってscFv-PSをphi-PS基板上に高密度、高活性、さらには均一な配向性で固定化することが可能となり、Whole抗体を固定化したELISA用PSプレートと比較しても10倍以上高感度な抗原検出が可能であった。現在、さまざまな種類の単鎖抗体について本技術の汎用性を検討しており、アミノ酸配列の異なる10種類以上の単鎖抗体について、固相リフォールディングによるscFv固定化基板の製造に成功している。

リアルタイムバイオセンサーへの応用

上述の通り、組換え大腸菌を用いてインクルージョンポディ内にscFv-PSを安価に大量生産し、固相リフォールディング技術によってscFv固定化PS基板を作成することに成功した(図10)。本研究では、これら一連のscFv固定化基板製造技術を用い、表面プラズモン共鳴(SPR)センサー、水晶振動子マイクロバラン(s)センサー、反射干渉分光(RIFS)センサーなどのリアルタ

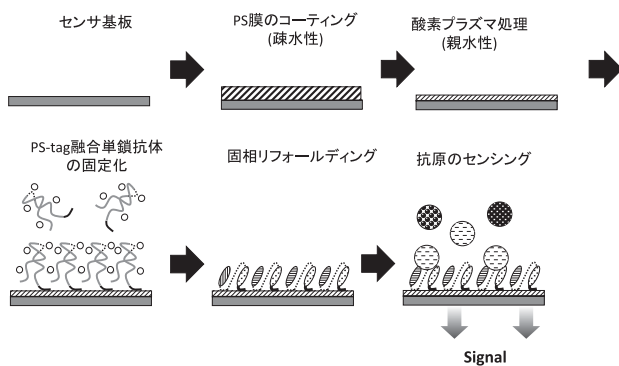


図10. センサ基板上への単鎖抗体の固定化と抗原のリアルタイムセンシング

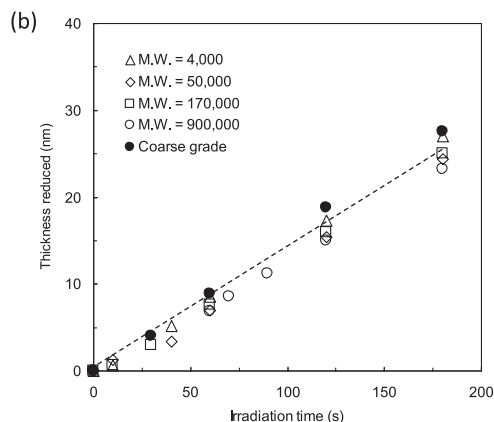
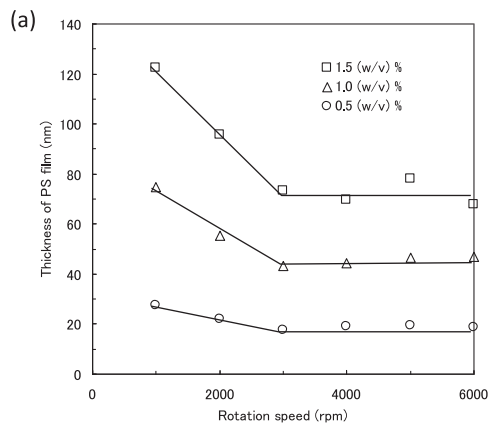


図11. センサ基板上へのphi-PS薄膜の調製と膜厚制御. (a) PS薄膜のスピンコーティング, (b) 酸素プラズマ照射による親水化と膜厚制御.

イムバイオセンサー上における単鎖抗体の高密度配向固定と、それに続く迅速かつ高感度な抗原検出について検討を行った。ここでは、QCMセンサーを用いた事例について紹介したい¹⁰⁾。

QCMセンサー表面にスピンコーティング法によって厚み100 nm以下のPS薄膜を調製した。スピンコーターの回転数を3000 rpm以上に設定することで、再現性よくセンサーチップ基板上にPS薄膜を調製でき、さらに、それに続く酸素プラズマ照射によって、PS薄膜表面をPS-tagが認識可能な親水性表面(phi-PS)に変換可能であった。また、酸素プラズマの照射時間を調節することで、センシングに最適な厚みまでphi-PS薄膜の膜厚を調節することも明らかとなった(図11)。

phi-PSコートQCMセンサーチップへの半変性状態のscFv-PSの付着挙動を、QCMセンサーを用いて直接モニタリングしたところ、PS-tagを導入していないscFvと比較してscFv-PSはきわめて迅速にphi-PS表面に付着し、その付着の様子をリアルタイムに検出することにも成功した。さらに、phi-PSコートQCMセンサーに固定化

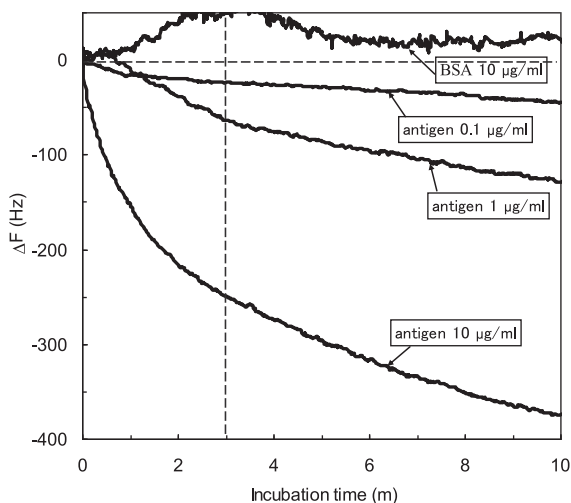


図12. 単鎖抗体固定化QCMセンサによる抗原タンパク質のリアルタイム検出

されたscFv-PSの比活性は、PS-tagを導入していないscFvよりも2倍以上高く、PS-tagの導入によって高い抗原結合活性を保持していることも再現できた。さらに、それぞれ異なる濃度の抗原を添加し、scFv-PS固定化QCMセンサによる抗原検出を試みたところ、それらはきわめて迅速にセンサ基板上でscFvと相互作用し、抗原添加からわずか3分以内で濃度依存的なシグナルが得られた(図12)。同様に、SPRセンサ(センサ基板の材質はAu)、RIFsセンサ(材質はSiN)基板上においても同様phi-PS薄膜をコートすることでscFv-PSの固相リフォールディングが可能となり、簡便かつ効率的に単鎖抗体をセンサ基板上に配向固定することに成功した。

以上のことから、phi-PS薄膜の作成によって、さまざまな材料基板上にきわめて安価かつ効率的にscFv-PSを配向固定することが可能であり、分子認識素子としてのscFvの可能性を大きく広げること成功したといえる。

おわりに

大学院生の最初の年、当時の指導教官であった加藤滋雄教授から、初めて抗体というタンパク質に触れさせていただき、それ以後、抗体や分子認識をキーワードに研究活動を始めてから13年が経過した。その間、神戸大学、岡山大学(中西一弘教授)、そして現在の京都工芸繊維大学(岸本通雅教授)と3研究室渡り歩き、生物化学工学という学問体系の中で、上流から下流までそれぞれ異なる分野の偉大な先生方に熱心にご指導いただいたおかげで、さまざまな側面から自分の研究を見直すことができ、また、基礎研究と実用化に向けた工学研究とのギャップの大きさをあらためて実感した。

学生時代、Whole抗体をPSプレート上に固定化し、酵素標識抗体を用いて抗原を検出するという免疫測定は、誰にでもできて当たり前の操作だと信じていたし、そこをあえて研究する必要があるのかとさえ考えていた。世間一般的には今もそう考えられていることだろう。しかしながら、長年免疫測定の研究に携わってみると、固相化後に大きく結合活性を損なってしまう抗体がたくさんあることに気付く。ポリスチレンのような疎水性プラスチックの基板上にタンパク質を物理吸着というもっともシンプルかつ乱暴な方法で固定化し、その機能を高く維持できているのは一部の特殊な抗体やストレプトアビジンなど、ほんのわずかしかない。すなわち、現在、当たり前に行われている免疫診断は、かなり特殊な世界であると理解すべきなのである。また、世間からはタンパク質の「非特異的な吸着」がどうのという言葉がよく聞こえてくるが、タンパク質の固定化に関する研究を続けている筆者から言わせれば、その「非特異的」という言葉の中にも、実は付着しやすい部位や付着し難い部位、親和力の強い、弱いがあるように思えてならないのである。このような観点から、ポリスチレンだけでなく、他の材料基板に対するペプチドタグのスクリーニングに関する研究を近年開始している。幸いなことに、ポリカーボネート(PC-tag)、ポリメタクリル酸メチル(PMMA-tag)、窒化ケイ素(SiN-tag)については、高親和性を有するペプチドタグの単離に成功した。これらの分子認識メカニズムの解析やアミノ酸配列の最適化などはまだまだ時間がかかることと思われるが、PS-tag同様、ペプチドタグと基板表面との相互作用メカニズムが理解できれば、それらの応用範囲はかなり広がるものと考えられる。

一方で、このような機能性ペプチドを抗体や酵素などの機能性タンパク質に導入し、「2つの機能を併せ持つ新しい人工タンパク質」を創生するというアイディアは、基礎研究を中心とした生化学や分子生物学の分野においてはすでに常識的なものかもしれない。しかしながら、それらが有用なものであればあるほど、「どうやって安く速く大量につくるか?」「それをどうやって使える最終形態にまでもっていくか」という技術開発が必ず必要となり、それらは生物化学工学に携わる大学の研究者が絶対に忘れてはならない部分であると考えている。本研究に携わり経験させていただいたことは数えきれないほどあるが、免疫診断という特殊な研究分野において、抗体の製造、固定化、利用までプロセス全体を視野に入れた研究を行ってこられたことは、現在の筆者にとって大きな財産になっている。育種、培養、分離精製、リフォールディング、固定化、検出というふうに単位操作的な考

え方で各プロセスの専門家として技術を極めるのも必要ではあるが、それぞれの専門家同士が相互連携しながら最速・最安・最高の最終生産物に到達できるようなチャレンジングな製造プロセス開発がまだまだ生物化学工学分野には必要なのではないかと考えている。

本研究は、神戸大学大学院自然科学研究科（2000年～2005年）、岡山大学大学院自然科学研究科（2005年～2007年）ならびに京都工芸繊維大学大学院工学科学研究科（2007年～現在）において行われたものであり、この間、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました加藤滋雄先生（神戸大学名誉教授）、中西一弘先生（岡山大学名誉教授、現中部大学教授）、岸本通雅先生（京都工芸繊維大学教授）に厚く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたりご助言いただきました山地秀樹先生（神戸大学教授）、勝田知尚先生（神戸大学准教授）、富岡寛治先生（久留米高専教授）、寺嶋正明先生（神戸女学院大学教授）、塩見尚史先生（神戸女学院大学教授）、今村維克先生（岡山大学教授）、今中洋行先生（岡山大学助教）、岩田博夫先生（京都大学教授）、有馬祐介先生（京都大学助教）片倉啓雄先生（関西大学研究所）に厚く御礼申し上げます。そして、本研究を行うにあたりご協力いただきました神戸大学、岡山大学、京都工芸繊維大学所属研究室の学生さんに深く感謝の意を表します。本研究は、日本学術振興会（JSPS）、科学技術振興機構（JST）、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）からの助成を受けて行われました。

文 献

- 1) Engvall, E.: *Med. Biol.*, **55**, 193–200 (1977).
- 2) Engval, E.: *Meth. Microbiol.*, **70A**, 419–439 (1980).
- 3) Kumada, Y., Tokunaga, Y., Imanaka, H., Imamura, K., Sakiyama, T., Katoh, S., and Nakanishi, K.: *Biotechnol. Prog.*, **22**, 401–405 (2006).
- 4) Kumada, Y., Kuroki, D., Yasui, H., Ohse, T., and Kishimoto, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 583–587 (2010).
- 5) Kumada, Y., Shiritani, Y., Hamasaki, K., Ohse, T., and Kishimoto, M.: *Biotechnol. J.*, **4**, 1190–1197 (2009).
- 6) Kumada, Y., Takase, Y., Sasaki, E., and Kishimoto, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 569–573 (2011).
- 7) Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T., and Kumagai, I.: *J. Immunol. Meth.*, **219**, 119–129 (1998).
- 8) Kumada, Y., Shiritani, Y., Hamasaki, K., Nakagawa, A., Sasaki, E., and Kishimoto, M.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 1295–1303 (2010).
- 9) Kumada, Y., Ohigashi, Y., Emori, Y., Imamura, K., Omura, Y., and Kishimoto, M.: *J. Immunol. Meth.*, **385**, 15–22 (2012).
- 10) Kumada, Y., Sasaki, E., and Kishimoto, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 459–464 (2011).