



Preparation of Quenchbodies by protein transamination reaction

アミノ基転移反応によるクエンチ抗体の調製

(JBB, Vol. 122, No. 1, 125–130, 2016)

董 金華^{1,2}・鄭 熙陳¹・上田 宏^{1*}

本論文は、抗原が結合することで蛍光強度が増大する蛍光標識抗体断片、クエンチ抗体 (Quenchbody または Q-body) の新たな構築法に関するものである。Q-body は、これを抗原サンプルと混ぜてしばらく置き、その蛍光強度を測定するだけで各種の抗原濃度を決定できることから、簡便迅速な免疫測定ツールとしての利用が期待されている¹⁾。率直に言って、本賞の半分はQ-body原理の発見に与えられたように感じており、以前の記事とやや被るが以下に少しだけその説明をさせていただく。

Q-bodyにおいては、抗原不在時にはその蛍光がクエンチ (消光) され、抗原を添加するとそれが解除されその蛍光増加量から抗原定量が可能になる (図1a)。このためQ-bodyでは抗体の抗原結合部位 (可変領域) の相補性決定部位 (超可変部位) 近傍に、部位特異的に蛍光色素を導入する。これにより、可変領域内のトリプトファン残基 (Trp) と色素が (複数色素を修飾した場合は蛍光色素間でも) 相互作用し、クエンチする。しかし、抗原結合により色素が抗体外に移動することで²⁾、蛍光強度が数倍以上増加し、抗原定量のみならず、たとえば、洗浄なしでのがん細胞表面抗原イメージングも可能となる³⁾。

しかしこれまで、Q-body構築のためには抗体遺伝子をクローン化し、その5'末端に色素修飾用のシステインやUAG (アンバー) コドンを含むタグを付加し、大腸菌や無細胞タンパク質合成系で発現させ修飾精製するなどの多数のステップを踏む必要があった。そのため、たとえば蛍光応答を最適化するための試行錯誤にはかなりの時間と手間がかかっていた。

そこで今回、このようなタグを持たないFab断片を材料として、最近報告されたタンパク質のN末端特異的修飾法⁴⁾を用いた蛍光標識を試みた。具体的にはアミノ基転移反応により抗体タンパク質のN末端アミノ基を特異的にケトン化し、受託合成などで比較的容易に入手可能なヒドロキシアミンあるいはヒドラジドを持つ蛍光色素 TAMRA で修飾した (図1b)。また (半分偶然見いだされたことではあるが) この際、N末端近傍のアミノ酸配列によりケトン化効率が異なることから、あらかじめ短い配列を付加することでH鎖が選択的にラベルされ、蛍光応答を最適化することができた。以上の結果、この方法で作製したFab型Q-bodyを用いて、従来法に近い感度での抗原オステオカルシンペプチドの検出に成功した。

本法では抗体のフォールディングに悪影響を及ぼすシステイン残基を修飾に用いないため、多くの抗体においてその収量増加が期待できる。本法の条件検討、さらには類似の可変領域特異的蛍光修飾法⁵⁾を用いることで、近い将来、たとえば、市販の天然抗体を迅速にQ-body化する方法が確立できれば、より多くの方にこの手法を気軽に利用いただけるようになるのでは、と期待しているところである。

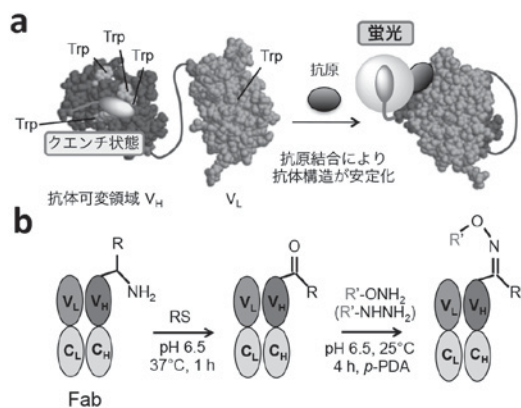


図1. Q-bodyの動作原理 (a) と、本論文での作製法 (b). RS: Rapoport's Salt⁴⁾. p-PDA: p-Phenylenediamine⁶⁾

- 1) 上田 宏ら: 生物工学, **94**, 489 (2016).
- 2) Ohashi, H. et al.: *Bioconjugate Chem.*, **27**, 2248 (2016).
- 3) Jeong, H. J. and Kawamura, T. et al.: *Anal. Chem.*, **89**, 10783 (2017).
- 4) Witus, L. S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 17223 (2013).
- 5) Jeong, H. J. et al.: *Chem. Commun.*, **53**, 10200 (2017).
- 6) Wendeler, M. et al.: *Bioconjugate Chem.*, **25**, 93 (2014).

*著者紹介¹ 東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所 (教授) E-mail: ueda@res.titech.ac.jp

²Weifang Medical University, Shandong, China