

特別賞

簡便迅速な「その場」免疫測定に挑む

～新規蛍光抗体センサー Quenchbody の開発と応用～

1. ウシオ電機株式会社
2. 東京工業大学

阿部 亮二¹ 大橋 広行¹ 開米 玲奈¹
鄭 熙陳² 董 金華²

1. 緒言

抗体は、動物の体内にウイルスや微生物毒素などの外来性物質(抗原)が侵入した場合、その刺激に対して産生される糖タンパク質であり、抗原を捕捉し、その毒性の不活性化や体外への排除を担うなど、生体防御機構において重要な役割を果たしている(図1)。抗原に対して高い親和性と特異性を持つ抗体を利用し、混合物に存在する抗原を感度よく選択的に検出・定量する免疫測定法は、生物学の基盤研究から汚染物質・有害物質の検査および病気の診断・治療まで幅広く利用されており、その重要性は益々増加している。

免疫測定法は、抗原抗体複合体の凝集反応を利用する凝集免疫測定法と、標識物質を抗原または抗体に結合させた複合体を用いる標識免疫測定法に分類することができる。標識免疫測定法は抗原抗体反応に影響を与えずに免疫複合体の生成量を微量で正確に測定可能であり、その方法の一例として、放射性同位体を標識に用いる放射線免疫測定法(RIA)、ユーロピウム等の蛍光発光物質を標識に用いる蛍光免疫測定法(FIA)、ペルオキシダーゼ等の酵素を標識に用いる酵素免疫測定法(EIA)が挙げられる。なかでも、EIA法の一つである固相化酵素免疫測定法(ELISA)は、その特徴として、放射性物質を使用しないため安全性が高いこと、洗浄後の酵素反応に基づく発色や発光をシグナルに用いるため感度および定量性が良いこと等が挙げられ、最も広く使用されている(図2)。しかし、ELISAを含めた従来の免疫測定法は高感度ではあるが、抗体または抗原を固相化する工程と、非特異的な吸着を除去するための洗浄工程を必要とする。これらの工程は、作業が煩雑で時間と手間を要する上、測定結果のばらつきの原因となることから、固相化や洗浄工程を必要としないホモジニアス測定法の開発が求められている。その場で(in situ)簡便かつ迅速に抗原を検出可能な免疫測定法が確立すれば、特殊な施設や技術を確保する必要がなく、短時間で実施結果が得られ、臨床審査の含めたさまざまな分野の現場のニーズに対応できる。

現在まで報告されているホモジニアス測定法の一つとして、異なる蛍光色素で標識した抗体または抗体断片が抗原と相互作用することで、蛍光色素間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こる原理を利用する手法がある。しかし、この方法は検出可能な抗原が限られ、シグナルとバックグラウンドとの比がやや低いという問題点がある。また、目的蛋白質の配列を持つ鋳型DNAに緑色蛍光蛋白質(GFP)の配列を導入して発現させたGFP融合蛋白質を免疫測定に用いる方法に関する知見が得られているが、GFPのサイズが大きいため、そ

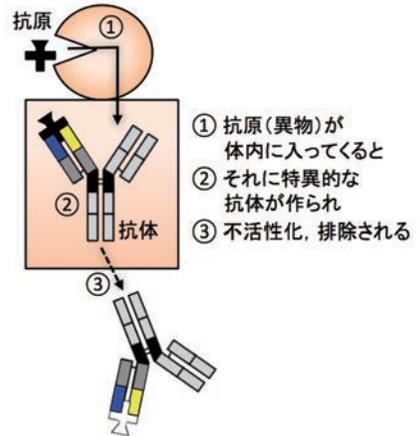


図1. 抗原抗体反応の例

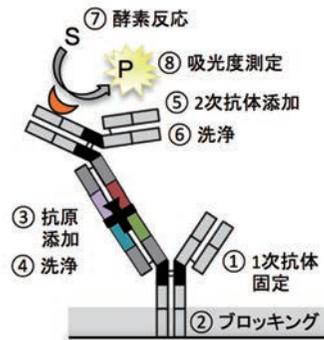


図2. ELISA法の模式図

れを導入することにより元々の蛋白質の構造や機能に影響を及ぼす場合がある。環境応答性色素と呼ばれるやや特殊な蛍光色素で抗体の抗原結合部位近傍を標識し、それを用いて抗原を検出した例も報告されているが、今までこの手法は分子量が大きい蛋白質の検出でしか用いられておらず、低分子の検出に応用した例はない。なお、この方法では、抗原結合部位を構成する超可変領域の前後のアミノ酸を部位得意な変異導入によりシステインに変異させて色素の修飾を行うため、多数の変異体を作製して抗体の抗原結合能に影響が少なく、かつ応答性も高くなるような標識部位を試行錯誤によって決定しなければならない。

そこで当研究グループでは最近、このような問題を潜在的に解決しうる、固相化と洗浄工程を必要とせずに目的物質の定量が可能な今までにない非常にユニークで新しい免疫測定原理が見出され、これに基づく新規免疫測定素子 Quenchbody (Q-body) が開発された。

2. 抗原と結合すると光る抗体“Q-body”

Q-body を用いた免疫測定法は、部位特異的に蛍光色素を導入した抗体断片において、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、消光が解除され蛍光を発するという原理に基づく (図3) [1]。当研究グループではこの現象を、FRET を用いたオープンサンドイッチ ELISA の感度向上を目的とした検討の過程で偶然見出した [2]。具体的には、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) を認識する抗体の可変領域 V_H と V_L それぞれを TAMRA と R110 で標識し、これらを等モルで混合した後、抗原存在下での溶液の蛍光強度を測定した。その結果、抗原依存的な蛍光の増加が見られ、実験系の本来の目的が達成された。しかし、予想外なことに、TAMRA 標識 V_H と R110 標識 V_L を等モルで混合したにもかかわらず、R110 蛍光の減少分より TAMRA 蛍光の増加分が多いという現象が見つかった。そこで対照実験として V_H のみを標識し、非標識の V_L と混合して測定を行ったところ、抗原濃度依存的に蛍光強度が上昇したのである (図4)。

その後、 V_H と V_L をペプチドリンカーにて繋ぐことで両方の相互作用が高まるとされている一本鎖抗体 (scFv) を用いて蛍光標識を行ったところ、より顕著に蛍光強度が増大し、抗原非存在時に比べその応答は約6倍まで増加した (図5)。蛍光強度変化は抗原濃度依存的であったことから、この原理を用いることで検体中の抗原の定量が可能になると考え、我々はこの蛍光色素標識抗体断片を

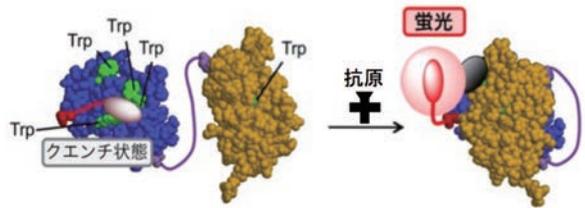


図3. Q-body の動作原理 文献1より転載

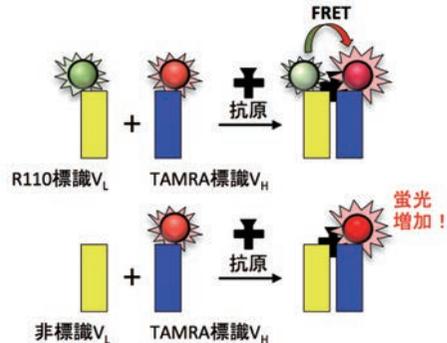


図4. オープンサンドイッチ法と FRET を利用する免疫測定法 (上) と Q-body 原理の発見 (下)

Q-body と命名し、より詳細な検討を行った。

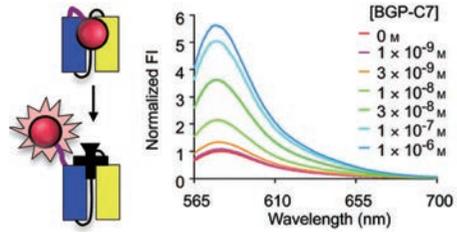


図5. scFv 型 Q-body 蛍光強度の抗原濃度依存性
文献1より一部転載

3. なぜ光るのか？

これまでに、Trp 残基によって蛍光色素が消光する現象が報告されており、これは Trp 残基から色素に光誘起電子移動 (PeT) が起きるためであるとされている。そこで当研究グループでは Q-body でも Trp 残基によって同様の現象が起きているかを確認するため、抗 BGP scFv 内の Trp 残基 (V_H の 33, 36, 47, 103 番目と V_L の 35 番目のアミノ酸) をそれぞれ構造類似のフェニルアラニンとする変異を導入し、BGP 存在下でのそれらの蛍光強度を測定した。その結果、いずれの変異体においても野生型に比べて抗原添加時の蛍光強度増加が小さくなり (図

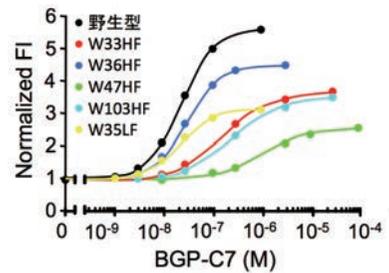


図6. 抗原添加時の各変異体の応答
文献1より一部転載

6), Trp 残基どれもが蛍光消光に寄与しており、それらが相乗的に働くことで色素が消光していることが考えられた。すなわち、抗体断片に取り込まれた蛍光色素と、その近傍にある Trp 残基との電子移動によって蛍光が消光され、その後抗原が加わると何らかの理由で色素と Trp 残基との相互作用が弱くなり消光が解除されると考えた。

そこで抗原添加によって消光が解除される理由の一つのヒントになった実験結果は、Q-body 溶液中に抗原の代わりに変性剤を添加した際に、抗原を加えた場合とほぼ同程度に蛍光強度が増加したことである。すなわち、変性剤を加えることによって蛋白質の高次構造が破壊され、色素と Trp 残基との空間的距離が大きくなり、それらの電子移動による消光が解除されたと考えられる。抗原を加えることによって scFv の V_H と V_L が空間的に移動し、変性剤を加えたときと同様の現象が起きた可能性がある。もう一つの実験結果は、TAMRA 標識 Q-body、抗 TAMRA 抗体、そして scFv の C 末端に付加した His タグを認識する抗体を用いたサンドイッチ ELISA にて、抗原の有無の測定系において非変性状態で Q-body の外に露出している TAMRA の量を測定したところ、共存する抗原の有無でシグナルが約 3 倍変化したことである。抗体内の Trp 残基の多くは、抗原が結合していない場合にのみ色素と接触しうる抗体の抗原結合部位近傍に位置している。 V_H/V_L 界面の Trp 近傍に入り込んでいた色素は、抗体に抗原が結合すると抗体構造が安定化し、 V_H/V_L 界面が閉じて、外部に露出せざるを得なくなる。その結果としてクエンチが解除され、蛍光強度が増大したと考えられる。

4. 無細胞転写翻訳系を用いた Q-body の作製

開発当時の Q-body は、無細胞蛋白質転写翻訳系と部位特異的非天然アミノ酸導入技術を用いて作製され、後述するが現在にはそれに加え大腸菌を用いても作製が可能となっている。無細胞転写翻訳系を用いた Q-body の作製では、scFv 配列の N 末端近傍に蛍光色素結合配列(アンバーコドン, UAG)を導入した鋳型 DNA と、蛋白質の転写翻訳に必要な酵素類、アミノ酸、ライセート等を混合することで、細胞内の蛋白質合成因子を試験管内で再構成して蛋白質の合成を行い、合成の際に反応系の中にアンチアンバーコドン(CUA)をもつ蛍光色素標識アミノアシル-tRNA を混合することで、部位特異的に蛍光色素を導入する(図7)。

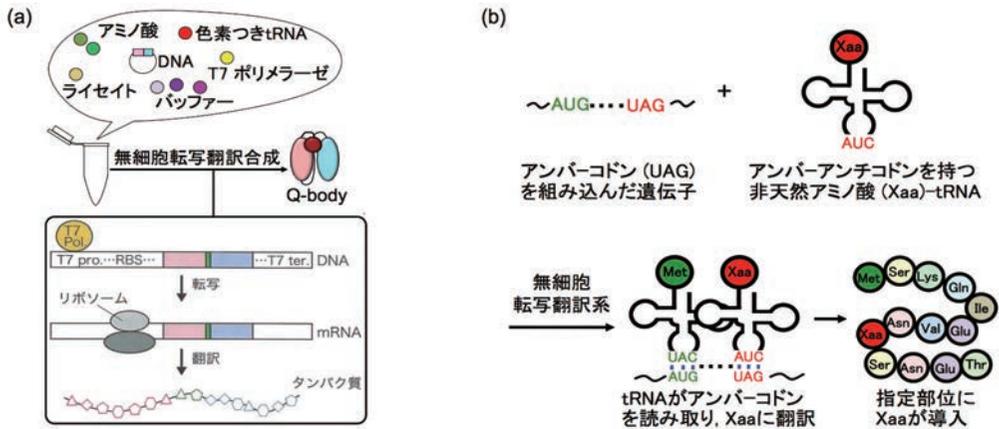


図7. (a)無細胞転写翻訳系を用いた Q-body の作製法と (b)ピンポイント蛍光色素導入の原理
文献[3, 4]より一部転載

そこで、UAG コドンを終結因子が読みとった場合には、その時点で蛋白質合成は停止されるが、C 末端領域に His タグを導入し、金属イオンアフィニティークロマトグラフィー精製を行うことで、完全長蛋白質として合成された蛋白質のみを得ることができる。また、その精製法を用いることで蛋白質に取り込まれなかった遊離の非天然アミノ酸も除去できることから、得られた Q-body は蛍光色素が指定した位置に 100% の効率で標識された蛋白質となる。さらに、この方法を用いた場合、短時間(約2時間)で Q-body の合成が終了し、多種類の Q-body を容易に同時作製できる利点を併せ持つ。

この原理に基づき我々は、BGP を認識する scFv 断片の N 末端近傍に導入したアンバーコドン部位に TAMRA 標識アミノアシル-tRNA を取り込ませて Q-body を作製・精製し、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約 6 倍の増加を示した。さらに、Q-body の汎用性を確かめるため、標識色素として TAMRA より短波長側に最大蛍光波長をもつ R6G ならびに ATTO520 を用いても Q-body を作製した結果、いずれにおいても抗原濃度依存的な蛍光の増大が見られた(図8)。特に Q-body の標識色素として TAMRA より疎水性が高い R6G を用いた場合、より高い応答性が得られ、疎水性が高い色素を使用することで、抗原非存在時には色素がより抗体内部でクエンチされ、抗原添加

時によりそれが解除された可能性があると考えられた[5]。

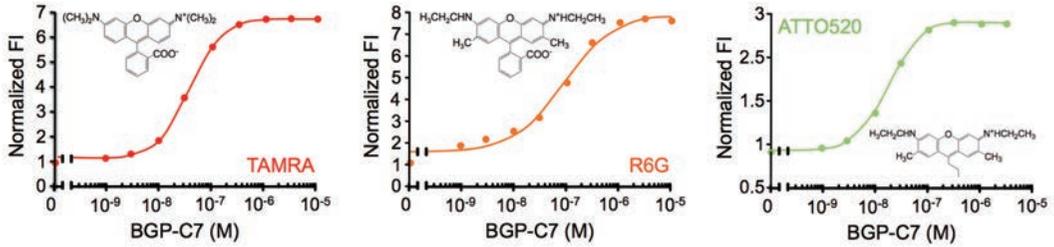


図8. 各種の色素で修飾した BGP 認識 scFv 型 Q-body 蛍光強度の抗原濃度依存性
文献[5]より転載

5. Fab 断片のダブル標識による蛍光応答の向上

そこで当研究グループでは、より天然抗体に近く、構造的に安定な Fab 断片を用いて Q-body を作製できれば更に新たな知見が得られると思い、無細胞転写翻訳系で BGP を認識する Fab 断片を発現させ、H 鎖の N 末端を TAMRA で標識した Q-body を作製した[6]。その結果、scFv 型 Q-body よりも高い約10倍の抗原依存的な蛍光応答が得られた(図9)。scFv を用いた場合、 V_H と V_L を人工的なペプチドリンカーにて一本鎖抗体として結合させたことで V_H - V_L 間の相互作用を高めることはできるが、人工的なペプチドリンカーの付加により抗体が本来有する抗原との結合活性などの機能を低下させている可能性が考えられた。一方、 V_H および C_H からなるポリペプチドと、 V_L および C_L からなるポリペプチドとが、ジスルフィド結合で結合されたヘテロダイマータンパク質からなる Fab であれば、抗体が有する本来の機能を保持し、抗原非存在時には蛍光色素はより消光し、バックグラウンドを低下させた可能性が考えられた。さらに、Fab 抗体の H 鎖または L 鎖の一方の N 末端を蛍光標識したシングル標識 Q-body に比べ、H 鎖と L 鎖の両者に同色の蛍光色素をダブルで標識したところ、抗原存在時の蛍光強度は抗原非存在時より約26倍増加し、蛍光色素と Trp 残基間の電子移動による消光に加え、色素同士の接近によるクエンチの効果が加わった可能性が考えられた。さらに、H 鎖と L 鎖の N 末端を異色の蛍光色素で標識することで約50倍まで蛍光強度を増加させることに成功し、異色色素間の FRET 効果がさらに加わったことが考えられた(図10)。

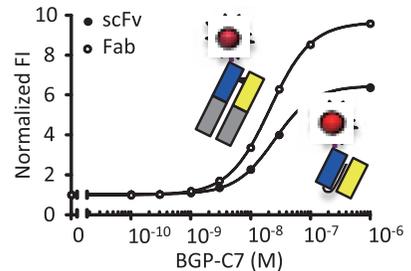


図9. scFv 及び Fab 型 Q-body の蛍光強度変化 文献[6]より転載

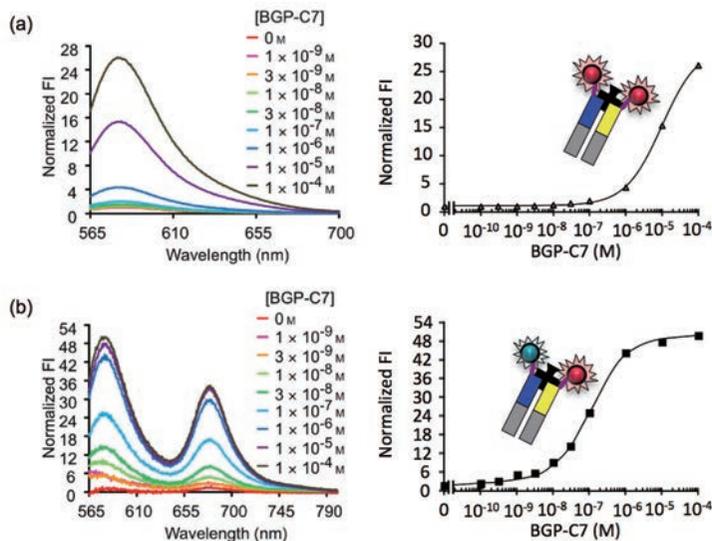


図10. (a)homo-(b)hetero-double Fab型 Q-body の蛍光強度変化 文献[6]より転載

6. 大腸菌を用いた Q-body の大量生産

以上のように、我々は Q-body に導入する蛍光色素の数や、Q-body の基本骨格となる抗体領域について様々な改良を行っており(図11)、その応答を向上させてきている [1, 6, 7]。

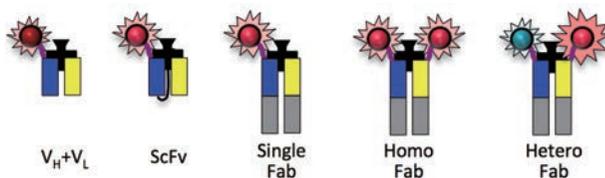


図11. Q-body の構造のバリエーション

一方で、これまでの Q-body は無細胞転写翻訳系を用いてのみ構築が可能であったため、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。それに比べて大腸菌系では多量の蛋白質の合成が可能なることから、より安価で Q-body を構築できると考えた。これらを踏まえ我々は、無細胞系によらない Q-body 構築法の確立を目指し、大腸菌での遺伝子発現と化学修飾との組み合わせによる Q-body の大量生産を試みた[6]。具体的には、BGP 認識抗体の Fab 断片を大腸菌で発現・精製し、H鎖およびL鎖のN末端付近に導入しておいたシステイン残基に後からマレイミド付き蛍光色素を修飾した。これに BGP ペプチドを添加し、蛍光強度を測定したところ、ペプチド濃度依存的な蛍光強度の増大が見られた。すなわち、本法での Q-body 作製に成功した(図12)。

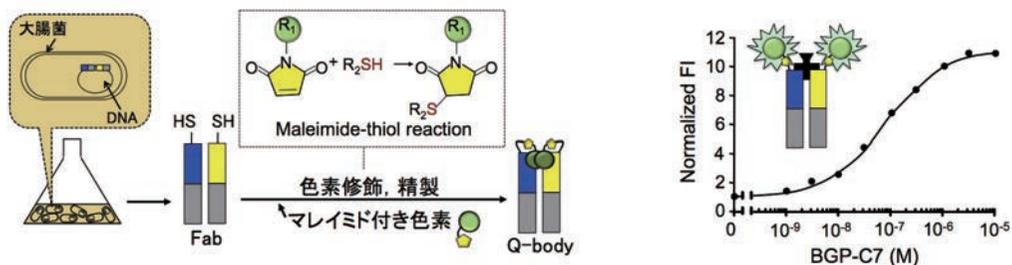


図 12. 大腸菌を用いた構築法(左)で作製された ATTO520 標識 Q-body の蛍光強度(右)
文献[6]より転載

7. Q-body のビーズ固定化とその蛍光イメージング

次に、大腸菌を用いて構築した Q-body を抗 Flag 抗体あるいはストレプトアビジン結合ビーズに固定し、顕微鏡にて抗原有無における蛍光観察を行った。その結果、抗原存在時のみビーズの顕著な蛍光が観察され、抗原によるクエンチ解除を蛍光イメージングできた(図 13)、その蛍光強度は顕微鏡で十分観察可能で比較対象とも比較できたため、Q-body を用いた顕微鏡観察の可能性を示唆する重要な結果となった。なお、本研究では精製の際に Q-body を抗 Flag 抗体結合ビーズに固定し、遊離の色素を洗浄によって分離した後、Flag ペプチドを用いた競合法で溶出させて得られる Q-body を用いて測定を行っているが、顕微鏡観察から得られた結果に基づき、溶出させず、ビーズに固定されている Q-body をそのまま検体と混合して蛍光顕微鏡で観察することで、検体に含まれている抗原の存在をより簡単にその場で知ることができると考えられた。

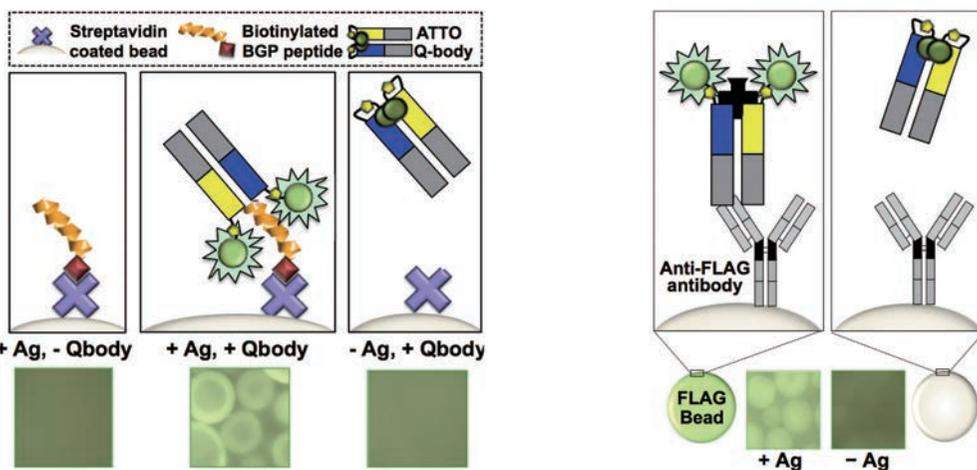
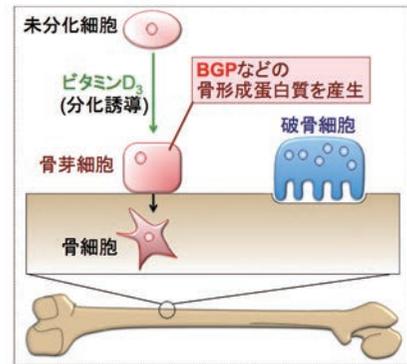


図 13. ストレプトアビジン(左)および Flag(右)ビーズ結合 Q-body の模式図およびその顕微鏡写真
文献[6]より一部転載

8. 細胞イメージングへの応用

次に我々は、Q-bodyを用いたライブ細胞イメージングに取り組んだ。具体的には、ヒト骨肉腫細胞U2OSを培養し、この細胞の分化を促し、BGP産生を誘導することが知られている10 μ MのビタミンD3を添加して36時間反応させた後、Q-bodyを添加し顕微鏡観察を行った(図14)。比較のため、ビタミンD3もしくはQ-bodyを添加しない条件下でも同様の実験を行った。その結果、ビタミンD3で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た(図15)。この結果から、Q-bodyを用いたBGP産生骨芽細胞のイメージングに成功し、これまで実施が困難であったQ-bodyによる細胞イメージングの可能性が示され、Q-bodyの簡便迅速な蛍光イメージング素子としての有用性が示唆された。Q-bodyを細胞系に用いることで得られる大きなメリットとして、Q-bodyを細胞系に入れた後に洗浄過程を介さず直ちにその蛍光を観察できることが挙げられる。これは特に洗浄が不可能な細胞内(小胞体を含め)での観察に絶大な利点となることから、経時的なライブイメージングが可能となり、様々な生細胞内イメージングへの応用が期待される。更に、Q-bodyを用いて細胞内外分子を可視化することで、細胞内外における内在性ターゲット分子の有無を、蛍光の有無によってその場でイメージング出来るようになり、蛋白質やその修飾の動態を知ることが出来、Q-body原理を多くの生命現象に関わる抗原検出に応用できると期待される。



- 健常人
: 骨芽細胞 (骨形成) = 破骨細胞 (骨融解)
- 甲状腺機能亢進症などの骨疾患
: 骨芽細胞 (骨形成) > 破骨細胞 (骨融解)

図14. 骨疾患マーカー BGP の産生原理

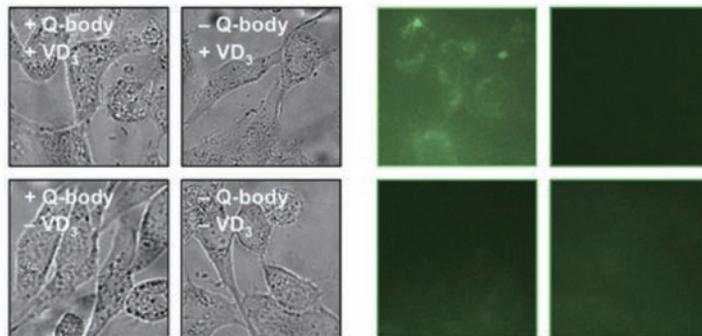


図15. Q-bodyによるBGP産生骨芽細胞のイメージング 文献[6]より転載

認識する抗体でも同様の現象が起きる可能性が高いと考えられた。そこで、既にクローン化された各種の抗体遺伝子を用いて Q-body を作製し、検討を行ったところ、内分泌攪乱作用が懸念されるビスフェノール A ならびに女性ホルモンであるエストラジオールのような低分子から、上記のニワトリ卵白リゾチーム (HEL) ならびに血清アルブミン (BSA, HSA) のような高分子蛋白質まで、各種の抗原を認識する Q-body は抗原依存的に蛍光強度増加を示し、Q-body を用いた免疫測定法はさまざまな抗原の検出に応用可能な汎用性の高い方法であることが分かった (図17)。

さらに我々は、Q-body を用いた細胞周期依存的タンパク質リン酸化の検出に成功している。具体的には、細胞分裂中期と後期それぞれにリン酸化され、細胞分裂の M 期におけるビメンチンの脱重合に関与する可能性が示唆されているビメンチンセリン 82 リン酸化 (PS⁸²) とセリン 71 リン酸化 (PS⁷¹) を検出ターゲットとし、抗 PS⁸² 一本鎖抗体および抗 PS⁸² 一本鎖抗体に蛍光色素を導入した Q-body を作製した。その後リン酸化または非リン酸化ペプチド添加時の蛍光強度を測定した結果、リン酸化ペプチド存在時にその蛍光強度が増加し (PS⁸² では約 7 倍、PS⁷¹ では約 4 倍)、いずれの場合も非リン酸化ペプチドを添加したときには蛍光強度の変化はみられなかった。このことから、Q-body を用いてビメンチンリン酸化の検出が可能であることが示された (図18)。

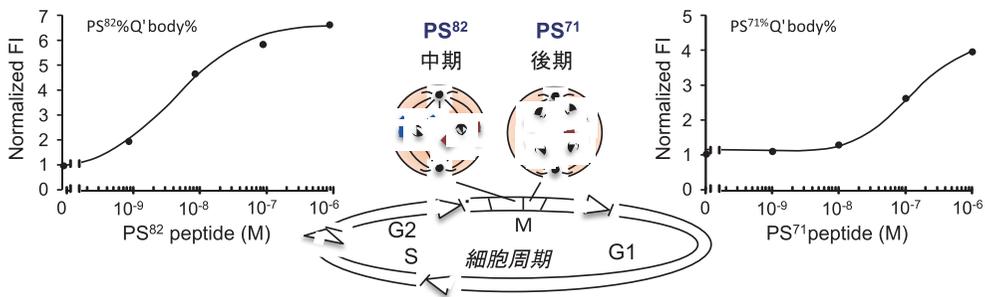


図18. 抗ビメンチンリン酸化 Q-body 蛍光強度のリン酸化ペプチド濃度依存性
文献[5]より一部転載

またより最近の研究では、強い免疫抑制作用と抗がん作用をもつことが知られる抗生物質ラパマイシンに結合する蛋白質 FKBP12 および FRB を材料として、ラパマイシンを高感度で定量できる Q'-body を作製することに成功し、実際の医療におけるラパマイシン測定素

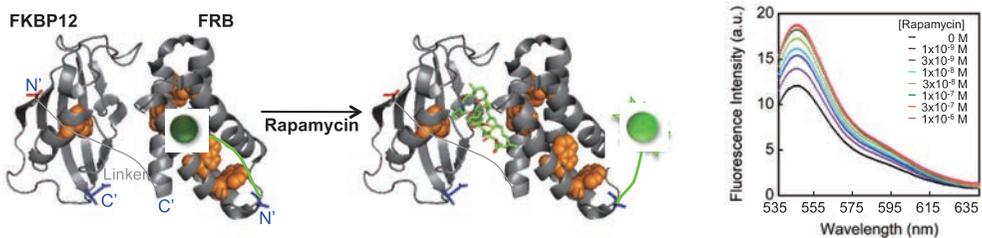


図19. Q'-body の動作原理 (左) およびラパマイシン濃度依存的な蛍光強度の変化 (右)
文献[8]より転載

子としての使用可能性を見出した。特に、Q-bodyの原理は抗体以外の結合蛋白質においても応用できることが示唆され、その汎用性を更に広げることができた(図19)。

我々は、臨床審査、食の安全、環境保全、薬物乱用防止等に更にQ-bodyの利用範囲を広げ、操作に専門知識を必要とせず、比較的安価な器具で、現場で数分以内に分析が可能となるオンサイト検出系への展開を目指して研究を続けている。将来的には、病院の診察室やベッドサイズで使用できるようなpoint of care testデバイスにも利用可能なバイオセンサーとして食品、環境分析から医療までさまざまな用途にもQ-bodyの応用範囲が広がると期待される。

11. 結 論

Q-bodyを用いた免疫測定は、洗浄操作を必要とせず、微量サンプル(抗原)を測定試薬(Q-body)と混合し数分後にその蛍光強度を測定するだけで抗原の定量が完了する簡便性と迅速性、抗体次第で低分子から高分子まで検出できる汎用生など多くの利点を持ち、「その場」免疫測定における汎用技術となる可能性を秘めている。この測定法は、他に類を見ない非常にユニークなものであり、抗体工学分野、ケミカルバイオロジー分野、バイオセンサー分野の見地からみて大変興味深いのみならず、臨床診断分野への産業応用の可能性という意義も併せ持つと言える。また、Q-body原理に基づく新しい検出・診断法や装置等、さらなる研究の発展につながることを期待される。本論文で述べたQ-bodyを用いた免疫測定に関する研究結果は、各種診断マーカー・環境汚染物質を含めた多くの分子の検出に適用されると考えられ、我が国発の画期的技術の更なる発展を目指した提案として、基礎研究のみならず、産業の発展にも大いに貢献することが期待される。

12. 参考文献

- [1] R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hohsaka and H. Ueda "“Quenchbodies”": quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence" *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17386-17394 (2011).
- [2] 上田 宏 “免疫反応を測れる 光る抗体” 現代化学 5月号 p. 32-36 (2014)
- [3] 上田 宏, 鄭 熙陳 “抗原結合により光る抗体 Quenchbody による, 細胞周期依存的タンパク質リン酸化の検出” 実験医学増刊号 **31**(2) “ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013” 中山敬一編 ISBN: 978-4-7581-0328-2, 羊土社 pp.194-200 (2013).
- [4] H. Ueda and J. Dong "From Fluorescence Polarization to Quenchbody: Recent Progress in Fluorescent Reagentless Biosensors Based on Antibody and Other Binding Proteins" *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics* **1844**, 1951-1959 (2014).
- [5] H.J. Jeong, Y. Ohmuro-Matsuyama, H. Ohashi, F. Ohsawa, Y. Tatsu, M. Inagaki and H. Ueda "Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies" *Biosens. Bioelectron.* **40**, 17-23 (2013).
- [6] R. Abe, H.J. Jeong, D. Arakawa, J.H. Dong, H. Ohashi, R. Kaigome, F. Saiki, K. Yamane, H. Takagi and H. Ueda "Ultra Q-bodies: quench-based antibody probes that utilize dye-dye interactions with enhanced antigen-dependent fluorescence" *Scientific Reports* **4**, 4640 (2014).

- [7] H.J. Jeong and H. Ueda "Strategy for making a superior Quenchbody to proteins: effect of the fluorophore position" *Sensors (Basel)* **14**(7), 13285-13297 (2014).
- [8] H.J. Jeong, S. Itayama and H. Ueda "A signal-on fluorosensor based on quench-release principle for sensitive detection of antibiotic rapamycin" *Biosensors* **5**(2), 131-140 (2015).