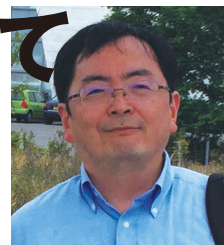




抗体をセンサー化して 生命現象を探る

上田 宏 うえだ ひろし

博士（工学）、東京工業大学資源化学研究所教授

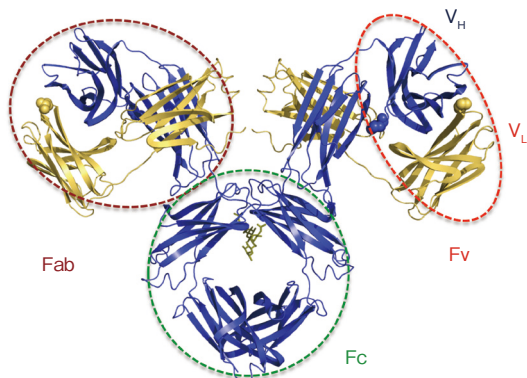


まず最初に自己紹介から。私は大学の修士課程で、当時の研究室の教授の発案による「抗体を使ったバイオセンサー」を実現するため、蛋白質工学の対象として抗体を扱い始め、その後のヒト型抗体の医療応用の発展もあり、以来30年間、その魅力に惹かれ続けてきた。そして現在も、蛍光色素・蛋白質、酵素などとの融合を通じ、汎用性の高い測定法として「抗原センサー」の実現にこだわって研究を続けている。バイオイメージング分野は現在、色素や機器の進化もあって花盛りの感があるが、用いられるプローブは（特に細胞内ターゲット用は）測定対象ごとに「テーラーメイド」で作られた「作品」であって、個々に膨大な作り込みが必要なのが現状だろう。多くのターゲットを同じ原理で検出できる、より汎用的な蛍光（あるいは発光）プローブを、例えば抗体のような結合分子を用いて作れば、皆がもっと気軽に多彩なイメージングを試せるのではないだろうか？ 今回はそんな気持ちで我々が構築してきた方法のいくつかを、紹介できればと思う。

生体分子を特異的かつ高感度に検出できる抗体

ご承知の通り、抗体は我々の体内で外敵から身を守ってくれる、兵隊役の蛋白質である（図1）。抗体は分子

図1 IgG抗体の構造



青で示したH鎖と黄色のL鎖のヘテロ4量体。大きく抗原結合断片(Fab)とそれ以外(Fc)に分けられる。抗原結合部位である可変領域(Fv)はV_HとV_Lからなる。それぞれのN末端残基を実体モデルで示す

- 1963年 東京都生まれ
- 1986年 東京大学工学部化学工学学科卒業
- 1988年 同大学院工学系研究科化学工学専攻修士課程修了
- 1991年 同大学院博士課程修了・同工学部化学工学科助手
- 1997年 同大学院工学系研究科化学生命工学専攻講師
- 2001年 同大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻准教授
- 2003年 同大学院工学系研究科化学生命工学専攻准教授
- 2013年 東京工業大学資源化学研究所教授

プロジェクト、共同研究、受賞歴

研究分野：蛋白質工学、バイオセンサー

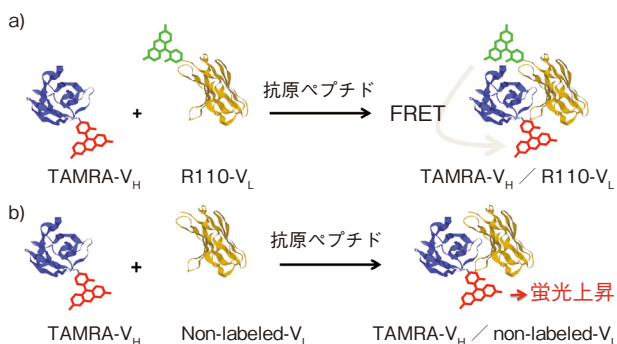
プロジェクト：科学技術振興機構・戦略的研究推進事業（さきがけ）、同・先端計測分析技術・機器開発プログラム、文部科学省都市エリア産学官連携促進事業、基盤研究（B）など
受賞歴：化学工学会奨励賞、同研究賞、長瀬研究振興賞

認識素子として色々な意味で理想的な性質を持っている。まず、予め予想できない外敵（抗原）に対応するため、極めて多数（10⁹以上といわれる）の多様な構造をとる部分（可変領域）を持っている。そのため、抗体は抗原のみに結合する性質（特異性）と、強く結合する性質（親和性）をあわせ持つ。また、蛋白質の中では安定性も高い。また、抗体は蛋白質のような高分子だけでなく、蛋白質についての糖鎖や化合物など、その分子量が1000以下の低分子（ハプテン）も認識することができ、さらに広い応用範囲を持つ。

オープンサンドイッチ原理による蛍光プローブ

では、抗体に信号発生部位を付加して、例えば蛍光センサーにしてイメージング用プローブとするにはどうすれば良いだろうか？ その1つの答えは、可変領域の性質（抗原結合による安定性変化）の利用である（図2a）。我々はこの測定原理をオープンサンドイッチ（OS）法と呼んでいる。特に低分子認識抗体は、抗原の可変領域を構成する2つの鎖（V_HとV_L）の間のポケットで認識するため、抗原結合によって安定化することが多い。この性質を利用すれば、V_HとV_Lを別々の色素でラベルしておき、両者を混合して蛍光観察することにより、抗原の有無を蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）効率の変化による蛍光色変化で検出できる（OS-FIA法）。通常

図 2



a) 無細胞系を用いて作った赤いTAMRA標識V_Hと緑色のローダミン110 (R110) 標識V_Lを混ぜて水色 (~490 nm) の光をあてその蛍光を測定すると、抗原依存的に色素間のFRETが誘起され、赤い (~580 nm) 蛍光が強まる。b) 対照として行った、非標識V_Lを用いた実験。緑色 (~530 nm) の光をあて抗原を加えると、なぜか赤い蛍光が抗原依存的に強くなった

の蛍光標識抗体は抗原結合の有無でその蛍光は全く変化しないのに対し、本法では細胞内外で混ぜるだけで、抗原検出が可能である。

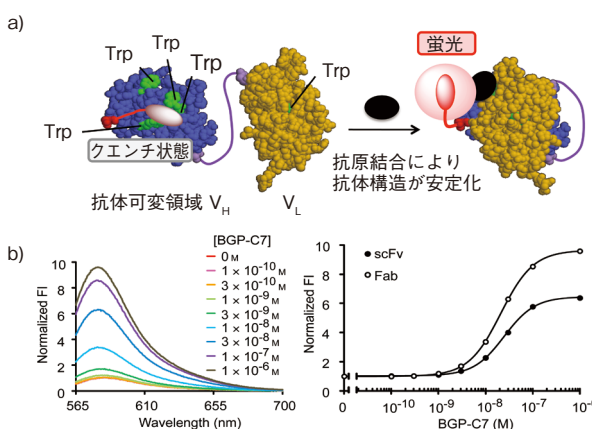
我々はこの方法で、低分子のみならずチロシンリン酸化ペプチドや細胞骨格蛋白質ビメンチンのセリンリン酸化検出にも成功している。また蛍光色素修飾の代わりにV_H/V_LのC末に蛍光蛋白質を融合して用いることも可能であった。ただ注意点として、蛋白質認識抗体は抗原結合による安定化が顕著でないため、ターゲットは低分子あるいは修飾が望ましい。また本法ではプローブが2つ必要なため、適用にあたっては他の理由で両者の比が変化しないよう、気を付ける必要がある。

Q-bodyの発見

我々は最近、「抗原が結合すると光って検出できる」、新しい蛍光標識抗体の構築法を見いだした。その発端は、実は上記のOS-FIA法の改良の試みであった。あるプロジェクトで、骨代謝マーカーであるオステオカルシン(別名BGP)認識抗体のV_H/V_L断片をOS-FIA法に用いることとなり、そのため、無細胞翻訳系を用いた標識法を用いてN末端近傍を部位特異的に蛍光色素でラベルした。これらを等モル混合し、期待通りFRETが起きるかどうか調べたところ、予想通り抗原BGPペプチド(BGP-C7)濃度依存的なFRETの増大が見られた(図2b)。

しかし、ここでやや予想外の現象が見つかった。すなわち、抗原を加えたときに、本来大きく下がるべきドナー(R110)の緑の蛍光がそれほど下がらないのに、ア

図 3



a) 無細胞系を用いて作った赤いTAMRA標識V_Hと緑色のローダミン110 (R110) 標識V_Lを混ぜて水色 (~490 nm) の光をあてその蛍光を測定すると、抗原依存的に色素間のFRETが誘起され、赤い (~580 nm) 蛍光が強まる。b) 対照として行った、非標識V_Lを用いた実験。緑色 (~530 nm) の光をあて抗原を加えると、なぜか赤い蛍光が抗原依存的に強くなった

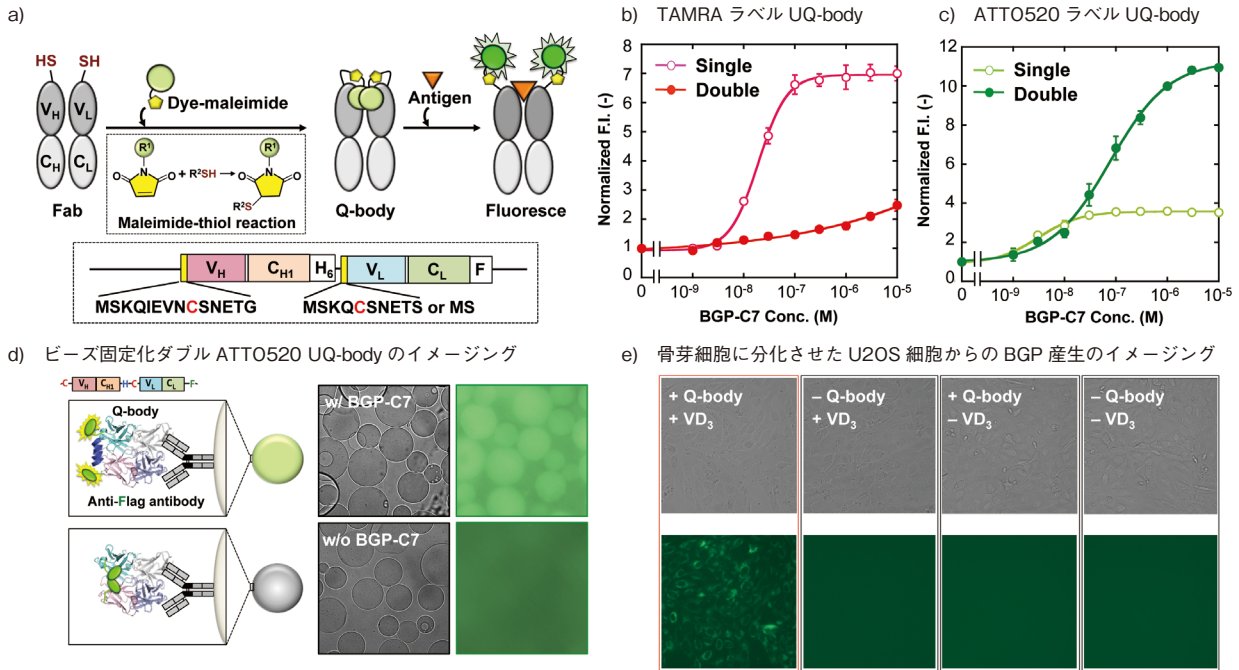
クセプタ側のTAMRA蛍光が顕著に、ドナー側の蛍光減少以上に増大したのである。FRETの効率は、当然ながら100%以上になるはずはない。ここに何か別の現象が潜んでいる可能性を考、共同研究者の阿部亮二博士にコントロール実験をお願いした。すなわち、TAMRA標識V_Hに等モルの未標識V_Lを加え、これに抗原を加えてみたのである(図2b)。すると、わずかであるが蛍光強度が加えた抗原の濃度に応じて上昇した。さらに、TAMRA標識とV_Hと未標識V_Lをリンカーペプチドでつないだ一本鎖抗体(TAMRA-scFv)を同様に構築したところ、蛍光強度は抗原依存的に5倍以上に増大した(図3)。また、scFvより天然抗体に構造的に近いFabを同様に無細胞系で発現させた場合、更に高い応答が観察された。その原因を調べたところ、抗体内のトリプトファン(Trp)に変異を導入すると応答が下がることから、これらのTrpが最初にTAMRAの蛍光を光誘起電子移動と呼ばれるメカニズムでクエンチ(消光)していることが示唆された。

これらのTrpの多くは既知の抗体で90%以上保存されているため、他の抗体でも同様の実験を試みたところ、応答の程度はまちまちながら同様な抗原依存的な蛍光応答が見られた。以来我々はこの標識抗体をQuenchbodyあるいは短くQ-bodyと呼んで、研究を続けている。

Q-bodyを用いた細胞イメージング

現在Q-bodyは違法薬物などの検出系として実用化が

図 4



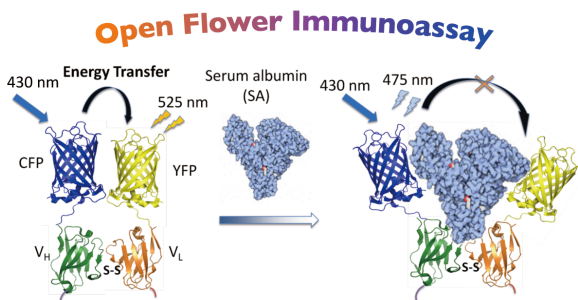
大腸菌合成 Fab 型 Q-body の a) 構築法、b) TAMRA および c) ATTO520 標識 Q-body の抗原 BGP ペプチド検出能、d) Q-body 固定化アガロースビーズの蛍光顕微鏡像、e) U2OS 骨肉腫細胞のイメージング。ビタミン D3 (VD₃) での分化誘導による BGP 産生が明瞭に観察された

検討されているが、私はむしろ本稿の主題であるバイオイメージングへの応用に興味を持っている。図4はそのような用途のため開発した、大腸菌を用いた Fab 型 Q-body の構築法とその細胞イメージングへの適用の結果である。やや敷居の高い無細胞系を用いずとも、H鎖あるいは／およびL鎖N末にラベル用のCys残基を導入したFab断片を大腸菌で発現させ、マレイミド色素を用いて標識することでFab型Q-body (Ultra Q-body、UQ-bodyとも呼んでいる) を作製することができる。

このうちHL両鎖を標識したダブルATTO520標識UQ-bodyを用いて、U2OS骨肉腫細胞を分化誘導して作

製した骨芽細胞からのBGP産生がイメージできた。通常の免疫染色と異なり反応後の洗浄は一切必要なく、分化誘導しUQ-bodyを加えた場合にのみ、細胞内に蛍光が観察された。この他、癌細胞での異常発現が報告されるClaudinの膜表面イメージングにも成功している。これらダブルラベル型UQ-bodyは、蛋白質性の高分子抗原に対しても顕著に応答する。おそらく両鎖にラベルした色素同士が相互作用し、それによるクエンチが抗原結合で解除されるのだろう。洗浄不要の利点を生かした、生細胞内外の各種ターゲット可視化への応用が期待される。

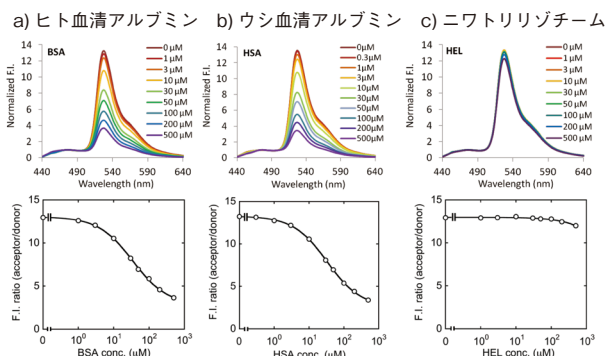
図 5 OF-FIA のスキーム (©American Chemical



花開け (Open Flower) FRET 法

OS-FIA では検出が難しい蛋白質でも、ダブルラベル型UQ-bodyでは検出が可能になる。この原理を応用したら、蛍光蛋白質で修飾したFabでも蛋白質の検出が出来るかも知れない。そのような考えのもと、可変領域中のC末端より抗原結合部位に近いN末端側にCFPとYFPを融合したプローブを作製した(図5)。但し、Fabとの融合蛋白質は大腸菌発現が困難だったため、V_H/V_L間をSS結合で安定化させたdsFvの形で、酸化的細胞質を持つ大腸菌で発現させた。

図 6



OF-FIAの結果を475 nmで規格化した蛍光スペクトルとピーク強度の (a) HSA (b) BSA (c) リゾチーム濃度依存性

これを用いた蛍光検出の結果、抗原であるヒトおよびウシ血清アルブミンに対して顕著なFRET効率変化が観察され、無関係なリゾチームに関しては観測されなかった(図6)。また、アクセプタ側に蛍光強度の弱いYFP (dYPet) を使うことで、抗原依存的にCFPの蛍光強度が増大する、いわば遺伝子でコードされたQ-bodyを作ることに成功した。これらのプローブの応答はGFP誘導体の二量体形成能に依存することを、二量体界面への変異導入にて確かめている。現状では抗体の機能的発現のために酸化的環境での発現が必要となるが、汎用的な蛋白質プローブとして、利用価値は高いと思われる。

おわりに

我々はこれらの蛍光プローブのほか、スペースの都合でここで詳細は述べられないが発光酵素(ホタルルシフェラーゼ)変異体同士の機能相補に基づく蛋白質間相互作用検出法(FlimPIAと呼んでいる)の開発も進めている。今後はこれら蛍光系と発光系それぞれのメリットを生かした、より革新的なイメージングプローブを開発してこの分野に貢献できれば、と考えている。 