

# ロイシンジッパー相互作用および蛍光共鳴エネルギー移動現象に基づく均一系免疫学的測定技術の開発

大 廣 義 幸

広島大学大学院総合科学研究科

## Development of homogeneous immunoassay technologies based on the leucine zipper interaction and fluorescence resonance energy transfer

Yoshiyuki OHIRO

Graduate School of Integrates Arts and Sciences, Hiroshima University

免疫学的測定法は、抗原と抗体が結合する反応を利用して目的物質を定性的または定量的に測定する方法であり、特異性が高く、試薬も安価なため、さまざまな分野で応用されている。古くからさまざまな方法が開発されているが、現在では酵素や蛍光物質などで抗体（または抗原）を標識し、免疫複合体の形成を標識物質からのシグナルを用いて検出する方法が広く利用されている。このような標識物質を利用した方法は、高感度な測定が可能であるという長所を有するが、その反面、未反応の標識抗体（または標識抗原）を反応系から除去する工程（B/F分離）が必要であり、操作が煩雑で結果が得られるまでに長時間を要するという欠点も有している。本論文では、このような煩雑なB/F分離を必要としない簡便かつ迅速な均一系免疫学的測定原理の構築と測定法の開発を目的として研究をおこなった。

未反応の標識抗体を除去することなく免疫複合体の形成を検出するには、標識抗体が抗原と反応した際に何らかのシグナルを発するような仕組みが必要である。そして、そのシグナルは、酵

素活性の測定のように多段階の操作を必要とするものではなく、より直接的に測定できるものが望ましい。本研究では、蛍光共鳴エネルギー移動現象（Fluorescence Resonance Energy Transfer ; FRET）の利用を考案した。FRETは、蛍光エネルギー供与体（蛍光ドナー）と蛍光エネルギー受容体（蛍光アクセプター）が凡そ100 Å以内に近接した際に起こる非放射的エネルギー移動現象であり、タンパク質間相互作用やタンパク質-核酸相互作用などの様々な物質間相互作用の解析に利用されている。FRETを用いて免疫複合体を効率よく検出するには、免疫複合体の中で蛍光ドナーと蛍光アクセプターが近接するように蛍光標識抗体（または蛍光標識抗原）を分子設計することが重要である。本論文では、まずFRETを利用した免疫学的測定法に適した蛍光標識抗体を設計し、それらが非競合系および競合系の免疫学的測定法に適用可能であることを明らかにすると同時にその問題点も指摘した。そして最終的には利用可能な感度をもつFRET原理に基づく免疫学的測定法を確立した。本研究の技術開発の各段階を第1章か

ら第3章で述べた。

第1章では、ヒト血清アルブミン(HSA)をモデル抗原として、FRET原理に基づく非競合型均一系免疫測定系を構築し、検証した。HSAに対する2種類の抗体断片Single chain Fv (ScFv)とFRETの関係にある2種類のGFP変異体 (ECFPおよびEYFP) との融合タンパク質遺伝子を設計した。融合タンパク質の分子設計においては、HSAの大きさを考慮し、ScFvのC末端とGFP変異体のN末端をGlyGlyGlyGlySerの4回繰り返し配列からなるフレキシブルリンカーで繋いだ。さらに、免疫複合体におけるGFP変異体同士の会合を促すため、GFP変異体のC末端にはロイシンジッパー配列 (c-Jun由来ロイシンジッパーまたはFosB由来ロイシンジッパー) を挿入した。なお、ロイシンジッパーとはタンパク質の構造モチーフの1つであり、種々の転写調節因子において2量体形成を担う機能性ドメインである。その一次構造はロイシンが7アミノ酸ごとに4~5回繰り返し配列であり、そのサイズが小さいことを利用して*in vitro*においても種々の応用例が報告されている2量体形成ドメインである。このような分子設計を施した融合タンパク質 (6種類) を大腸菌の発現系を用いて調製し、ロイシンジッパーの組み合わせと抗原濃度依存的なFRETの関係を調べた。その結果、JunとFosまたはJunとJunの組み合わせを用いることにより抗原濃度に依存したFRETを誘導できることが確認され、フレキシブルリンカーの使用に加えて、上記のロイシンジッパーの組み合わせがFRET原理に基づく非競合型均一系免疫測定法に有効であることを明らかにした。なお、本免疫測定法は、ロイシンジッパーの相互作用により有効性が増すことを特長とするため、Enhanced FRET免疫測定法と名づけた。

第2章では、Enhanced FRET免疫測定法を実用化に向けて改良した。改良すべき課題は、以下の2点である。(1) 第1章で作製した抗体断片ScFvの蛍光抗体融合タンパク質は、抗体活性が元のIgG抗体よりも大きく低下していたので、これを回避する必要がある。(2) 大腸菌発現系からの融合タンパク質の収量が非常に少なく、実用化するにはFRET用蛍光標識抗体を大量に調製できる技術が

必要とされる。抗体断片ScFvの抗体活性の低下は、FabやFab'などの抗体断片を使用することで改善できる可能性がある。また、融合タンパク質の収量が少ないのは、ScFv断片が大腸菌での発現に適していないことが一つの原因と考えられるため、ScFv領域を除去したタンパク質にすることで収量を増やすことができる可能性がある。そこで、これら2つの可能性を検証するため、フレキシブルリンカー、GFP変異体、ロイシンジッパーからなる融合タンパク質を別途調製し、これを抗体断片Fab'に部位特異的に化学結合することを試みた。ScFvを欠き、代わりにN末端にチオレドキシントグを導入した融合タンパク質 (チオレドキシニン-フレキシブルリンカー-GFP変異体-ロイシンジッパー) の発現ベクターを構築し、大腸菌で発現させたところ、その収量は大幅に増加した。さらに得られたScFv欠如蛍光タンパク質のチオレドキシニンに含まれるチオール基と抗体断片Fab'のヒンジ部に存在するチオール基を2価性のマレイミド試薬で架橋することにより、最終的に蛍光標識Fab'抗体を作製することに成功した。この蛍光標識Fab'抗体をHSAの測定系に使用したところ、第1章で用いた抗体断片ScFvの蛍光抗体融合タンパク質よりも約10倍程度抗体活性を上昇させることができた。また、本標識抗体作製法は市販の抗GST抗体や抗リン酸化MAPキナーゼ抗体にも応用することができ、GST融合リン酸化MAPキナーゼのEnhanced FRET免疫測定法においても抗原濃度に依存したFRETを誘導することに成功した。以上の結果から、蛍光標識Fab'抗体を用いることによってEnhanced FRET免疫測定法の高感度化が実現され、様々な抗原の検出にEnhanced FRET免疫測定法が適用可能であることが明らかになった。

第3章では、競合型Enhanced FRET免疫測定法について検討した。リン酸化MAPキナーゼを測定対象として、第2章で確立した蛍光標識Fab'抗体の作製法を応用した。MAPキナーゼの活性部位に対応するリン酸化ペプチド抗原と融合タンパク質 (チオレドキシニン-フレキシブルリンカー-GFP変異体-ロイシンジッパー) を化学結合させた。標識抗原として使用するリン酸化ペプチド

の長さを調節することによってリン酸化MAPキナーゼとの競合反応に適した蛍光標識リン酸化ペプチド抗原を作製することができた。その結果、競合型Enhanced FRET免疫測定法によるリン酸化MAPキナーゼの濃度測定に成功した。

以上のように、抗体断片（または抗原ペプチド）-フレキシブルリンカー-GFP変異体-ロイシンジッパーからなる蛍光標識体を用いることに

より、FRET原理に基づく新しい均一系免疫測定法を構築することができ、本原理の有効性が実証されたと考えられる。本測定法は、サンプルと試薬を混合し、蛍光測定するだけで抗原濃度を測定することができる。その操作方法は非常に簡便であり、迅速な分析に適しているため、簡易で迅速な免疫測定が必要とされる臨床検査や基礎研究の現場における実用化が期待される技術である。