

オープンサンドイッチ免疫測定法による低分子の高感度非競合的測定

上田 宏

Sensitive Noncompetitive Measurement of Small Molecules by Open Sandwich Immunoassay

Hiroshi UEDA

School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

(Received September 8, 2006)

Proteins having multiple epitopes can be usually measured with sandwich ELISA employing two kinds of antibodies, which permits high sensitivity as well as a wide working range of more than three orders of magnitude. On the other hand, so-called monovalent antigens with MW less than 1000 are not susceptible to sandwich assays due to their small size and have almost always been measured in competitive assays. However, while a competitive assay needs only one antibody due to the principle of ratiometric measurement, optimization of the reaction conditions is necessary to attain suitable sensitivity and working range, which are often inferior to those of sandwich assays. As an alternative immunoassay for small antigens, here we propose a noncompetitive “open sandwich” immunoassay, which is based on the principle of stabilization of the antibody variable region F_v upon binding with antigen. Using ELISA to detect labeled V_H fragments bound to immobilized V_L in the presence of sample in microplate wells, various small molecules with MW around 200—300 can be measured with a superior detection limit and working range compared with those achieved with the corresponding competitive assays. The results indicate a common antigen recognition mode of anti-hapten antibody and wide applicability of the assay to the sensitive and handy analysis of low molecular-weight substances in areas such as environmental analysis and clinical diagnostics.

Key words—immunoassay; antibody engineering; phage display

1. はじめに

高等動物の獲得免疫系、特に液性免疫においてその中心的役割を果たす抗体（免疫グロブリン）は、外敵（抗原）の攻撃から自己を守るため多種多様な分子を高い親和性と特異性で認識、排除する能力を持つ。約30年前のモノクローナル抗体技術の確立、さらに最近のファージ提示法を始めとする組換え技術の進歩も相まって、抗体はタンパク同定や精製のための基礎研究試薬として、また病院や検査所での診断薬として、さらに最近では組換えヒト型抗体が種々の難治性疾患の特効薬として歴史上始まって以来のペースで使われている。

抗体がこのように幅広い用途を持つに至った1つの理由としては、抗体がタンパク質のような高分子

だけでなく低分子も認識可能な点があるであろう。かつてABO式血液型の発見者Landsteinerによって見出されたごとく、糖鎖や低分子化合物のように単独では抗原性がない物質でも、キャリアタンパクに結合したもの（ハプテン）なら抗体はこれを抗原として認識し得る。この性質を利用し、これまで多くの低分子について特異的抗体が樹立され、基礎研究から触媒抗体の作製、さらにはホルモン・薬物・環境汚染物質分析などに幅広く応用されてきた。本稿では、これら低分子抗原特異的抗体を用いた免疫測定法の最近の進歩、中でもこれまで難しいとされてきた低分子の非競合的測定法の進展について主に筆者らの仕事を中心に紹介したい。

2. 既往の低分子の免疫測定法

生体内における低分子はあるときには酵素の活性中心で活性発現に中心的な役割を担い、またあるときには逆に活性を阻害するドラッグとして大きな役割を果たす。しかしそれを物質として捉え、抗体を用いて検出しようとした場合、それにはその大きさ

東京大学大学院工学系研究科(〒113-8656 文京区本郷7-3-1)

e-mail: hueda@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS23で発表したものを中心に記述したものである。

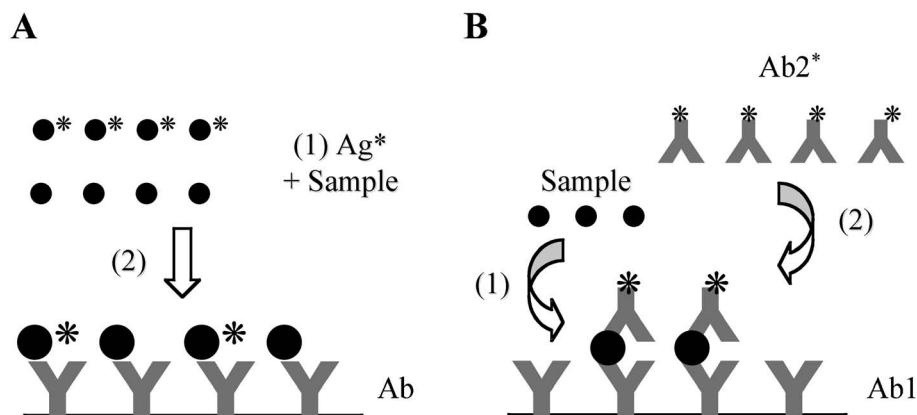


Fig. 1. Scheme of Competitive (A) and Noncompetitive (B) Immunoassays

(小ささ)ゆえの困難がある. すなわち低分子抗原の場合, 分子量が小さくなるほどそれに従い抗体パラトープとの界面積が小さくなり, 一般に低分子ハプテンほど高親和性抗体を得ることは難しい. さらに本質的に, ハプテンは通常1個のエピトープしか持たない単価抗原であって2個の抗体が同時に結合できず, 高感度で特異性の高いサンドイッチ測定系を組むことができない. そのため低分子の免疫測定では通常, 精製した抗原と抗体を用意し, 両者の一方を酵素等でラベルすると同時に一方を固相に固定化し, 固相へのラベルの結合量が共存するサンプル中の抗原によって減少することを利用して測定する. このような測定法を競争法あるいは競合法という (Fig. 1).

しかしこの一見単純そうな競合法には, 抗体あるいは競合抗原量をうまく調節し, 競合をうまく起こさせるための条件検討が必須という欠点がある. また割合を測定するその原理から, 操作者にはサンドイッチ法より注意深い実験操作が求められる. 検出限界の抗原濃度は理論上, 抗体の解離定数 K_d の1/100程度と言われている. しかしどんなに親和性の高い抗体を用いても, 通常の酵素標識固相免疫測定法 (ELISA) では抗体及びラベル化抗原量がある程度ないと信号強度が下がり, 検出自体が不可能になる. したがって実際の検出限界は理論値よりかなり高い値とならざるを得ない.

測定限界を下げる1つの方法として, 最近大村らにより抗原アフィニティーカラムと蛍光検出器を用いる方法が報告された.¹⁾ この手法では, あらかじめ低濃度の抗体とサンプルを反応させた混合液を高

速で抗原固定化カラムに通すことで, 平衡状態を変えずに抗原フリーの抗体を捕捉し, 結合抗体量を蛍光標識二次抗体で測定する. 平衡反応と測定のステップを分離することで, 競合法の理論値に近い検出限界を得ることができる.

3. 低分子の非競合的免疫測定

これに対し, 原理的にこれらの競合法の欠点がなくより高感度な低分子の非競合的測定法がいくつか発表されている. 例えば, 抗アロタイプ抗体 (抗原結合状態の抗体のみを認識する抗体) あるいは複数の抗イディオタイプ抗体をうまく用いて, 低分子を非競合的かつ高感度に検出できることが示されている.²⁾ しかしこれらの方法では通常の抗ハプテン抗体を得る倍以上の手間を掛けて特殊な抗体を得る必要がある. また他の例で, 固相に固定化した抗体にサンプル中の抗原を結合させたのち, 抗原フリーの抗体を poly-L-lysine に結合させたハプテンでブロックし, ブロックされない (サンプル中の抗原を結合した) 抗体量を HRP 標識した抗 IgG 二次抗体で検出できることが示されている.³⁾ Avidity 効果のためハプテンキャリア複合体の解離はハプテン単体よりかなり遅く安定なブロッキングが可能なることを巧



上田 宏

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻助教授. 1963年東京都生まれ. 1991年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了. 工学博士. 1998年~2000年 MRC タンパク質工学研究センター (英国) にて, 文部省在外研究員 (ラムゼー記念奨学生) として抗体工学の研究に従事. 2003年5月より現職. 現在の研究テーマ: 抗体工学的手法による新規免疫測定法の開発.

の研究テーマ: 抗体工学的手法による新規免疫測定法の開発.

妙に利用した方法であるが、反応ステップが増加する点と、方法としての一般性の証明が課題と思われる。

4. オープンサンドイッチ法

筆者らは、抗体の分子認識機構をうまく利用すれば、例え単価抗原であっても非競合的に測定することが可能なのではないか、と考え数年前に新規原理の免疫測定法「オープンサンドイッチ法」を提案した (Fig. 2)。単離された可変領域を構成する2つのドメイン V_H/V_L 間の相互作用は、天然抗体においてこれらを支える2つの定常領域 C_H1/C_L がないため一般に弱く、 K_d 値は 10^{-8} — 10^{-5} M と言われている。この不安定さは低濃度域での安定性さらには抗原結合能に悪影響を与えると考えられ、これを改善するため V_H と V_L の間をリンカーペプチドで結んだ融合タンパク (一本鎖抗体) が天然抗体より小さな結合分子として盛んに作製されている。これに対しわれわれは、この不安定さを逆に利用し、弱い V_H/V_L 間相互作用が抗原添加により強められればその相互作用を測定することで抗原濃度が測定できる可能性があると考え、その立証を試みた。具体的にはリゾチーム認識抗体 HyHEL-10 をモデルとして用い、 V_L 断片をビオチン化してストレプトアビジン固定化プレートに結合させ、これに V_H 断片が結合するかどうかを V_H 断片を提示させたファージ⁴⁾あるいは V_H 断片とアルカリフォスファターゼ⁵⁾の融合タンパクを用いて測定した。そして V_H 断片との反応の際、同時に抗原リゾチームを加えない場合と加えた場合について比較したところ、前者

では V_H 断片のプレートへの結合がほとんどみられなかったのに対し、後者では顕著な信号の増加がみられた。プレートに V_L 断片を固定化した場合のみ信号が上昇したので、非特異的にプレートに吸着した抗原に V_H 断片が結合している訳ではない。以上のことからこの方法で共存する抗原の存在の有無、さらに濃度が測定できることが明らかとなった。さらにサンドイッチ法では広い測定濃度域を得るため通常2回必要な抗原抗体反応が、このオープンサンドイッチ法では V_H - V_L -抗原3者複合体が他のどの2者複合体よりも安定なため1回で済むこと、また感度も1 ng/ml程度と通常のスンドイッチ法に劣らないことも確かめられた。

5. ホモジニアス測定への応用

臨床診断においては、洗浄操作を含まない測定法 (ホモジニアス法) が、装置の自動化が容易で迅速な測定が可能という理由で強いニーズがある。そこでオープンサンドイッチ法でさらに簡便に抗原濃度を測定できる可能性を考え、ホモジニアス法への応用の可能性を検討した。具体的には精製した V_H 断片をフルオレセインで、 V_L 断片をローダミンで化学的に修飾し、 V_H/V_L 相互作用を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して検出を試みたところ、溶液中の抗原 (リゾチーム) 濃度が確かに測定できた。⁶⁾ 抗原と試薬を混合するだけで2分以内に抗原濃度を決定でき、また各抗体断片の蛍光ラベルに GFP 誘導体を用い大腸菌内で融合タンパク質 (V_H -eGFP, V_L -eYFP) として蛍光抗体を生産することで、容易に再現性よく検出試薬を調製することもで

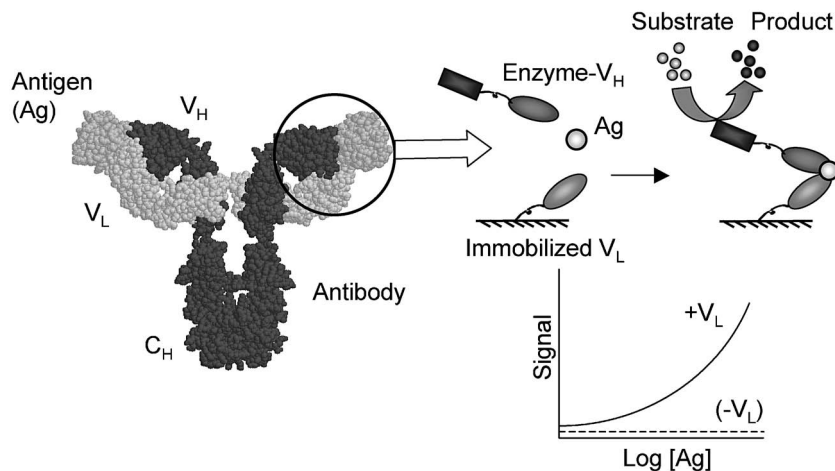


Fig. 2. Scheme of Open Sandwich Immunoassay

きた.⁷⁾以上の結果より、少なくとも抗体自身が適した性質を持つ場合、この方法の応用範囲はかなり広いことが明らかとなった。

6. オープンサンドイッチ法による低分子検出

もし仮にこのような抗原による可変領域の安定化が常に起こるとすれば、どんな抗体の V_H/V_L 相互作用でも、それを何らかの方法で測定すれば非競合的に抗原濃度が測定できることになる。特に低分子抗原でこれが可能であれば、非競合的検出系のメリットは高分子抗原認識抗体の場合よりはるかに大きいと期待された。そこで次に、HyHEL-10の代わりに低分子NP (4-hydroxy-3-nitrophenacyl) に対する抗体 B1-8 を用いてオープンサンドイッチ-ELISA系を構築し、NP及びそのアナログ5-iodo-NP (NIP)の検出を試みた。その結果、HyHEL-10に比べて抗原非存在時のバックグラウンド信号がやや高めであったものの、確かにオープンサンドイッチELISAが実施できることが確認された (Fig. 3)。またこの際、比較のために同時に行った間接競合ELISAより10倍以上高い感度と広い検出濃度範囲を得ることができた。⁸⁾ただしB1-8は抗原NPに対する親和性が $3.0 \times 10^5/M^9$ と低いためか、親和性が約10倍高い高親和性 V_H 変異体 (W33L)¹⁰⁾を用いても、ELISA系での検出限界は $1 \mu M$ に留まった。

そこでより高い感度の実現をめざし、この V_H , V_L 断片の溶液中での結合を大腸菌 β ガラクトシ

ダーゼ変異体 $\Delta\alpha$, $\Delta\omega$ 間の活性相補¹¹⁾により高感度に検出することを試みた。すなわち酸化的な細胞質を持つ大腸菌 Origami (DE3, plysS) の細胞質で $V_H-\Delta\alpha$, $V_L-\Delta\omega$ の二種類の融合タンパク質を発現、精製し、これらを混合した溶液に各種濃度の抗原を入れて5分反応させたのち、発光基質 Galacton Plus を加えて発光強度で酵素活性を測定した (Fig. 4(A))。化学発光を用いる大きなメリットとして、少量 (すなわち低濃度) の酵素 (すなわち

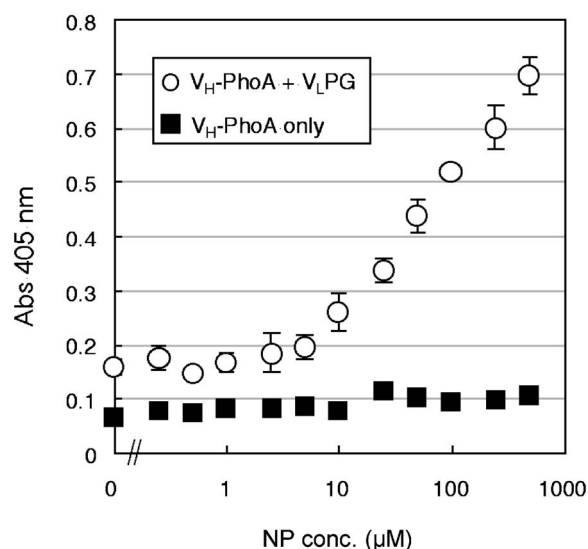


Fig. 3. Open Sandwich ELISA for NP (Fw: 198)

Microplate wells immobilized with (○) or without (■) anti-NP V_L -protein G fusion protein were added together with V_H -PhoA fusion protein and samples. After the reaction and a wash, well-bound PhoA activity was measured.

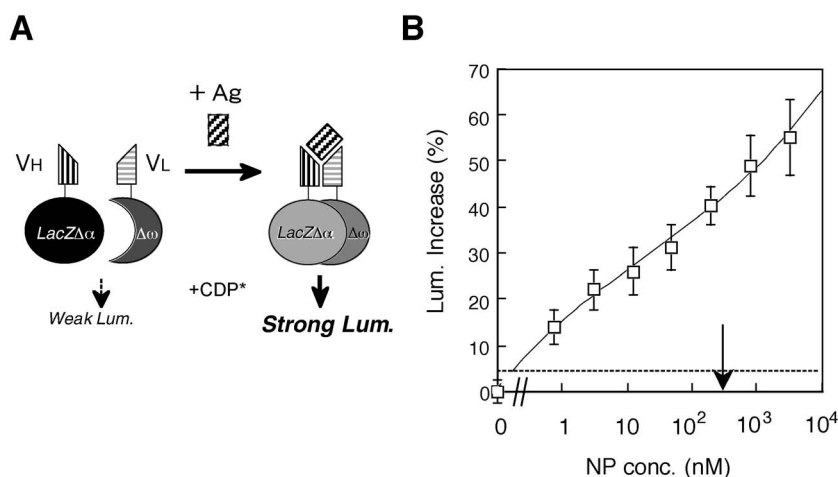


Fig. 4. Open Sandwich Enzymatic Complementation Immunoassay

(A) Scheme of the assay. $V_H-\Delta\alpha$ and $V_L-\Delta\omega$ fusion proteins expressed in *E. coli* Origami cytoplasm were mixed with cognate antigen, which drives approximation of the two proteins and increased β -galactosidase activity, which was measured by a luminescent substrate CDP star. (B) Dose-response curve for NP. The K_d value of this Ab is shown as the arrow. Dotted line shows the background luminescence + 2SD at 0 nM NP.

V_H/V_L) を用いて酵素活性が測定でき、このため抗原非存在時のバックグラウンド信号が低減し、より高い感度が得られることが期待された。実際、最適化後の測定試薬濃度は 15 ng/ml と ELISA に用いた試薬濃度 (4 μ g/ml) の 1/100 以下であり、結果 K_d の 1/1000 の濃度の抗原 (NP で <1 nM, NIP で <0.1 nM) から 4 桁程度の濃度範囲で抗原濃度を測定できることが示された (Fig. 4(B)).¹²⁾ 一般にこの濃度の検出限界と検出濃度範囲は一般に競合法では到達不可能とされている。さらに検出される信号強度のダイナミックレンジ (抗原の有無による信号強度比) も、少なくとも HyHEL-10 抗体を用いたりゾチーム検出系では抗体断片 (V_H/V_L) と酵素部位を接続するリンカー長の最適化でかなり (1.6 から 2.5 に) 改善されることも分かった。¹³⁾ この系は洗浄を要しないホモジニアス系であり、今後さらに信号強度比が改善されれば現在ハプテン定量に広く使われる β ガラクトシダーゼの α 相補性を利用した競合的ホモジニアス検出系 (CEDIA)¹⁴⁾ に代わる測定系になり得ると期待される。

7. オープンサンドイッチ法の一般化

しかしこのようなよい結果が得られる抗体があるにも係わらず、いくつかの他のタンパク認識抗体の V_H/V_L を大腸菌で発現させ、それらの相互作用を ELISA や表面プラズモン共鳴 (SPR) で測定したところ、抗原の有無に係わらずかなりの V_H/V_L 相互作用があり、抗原添加による変化がほとんどない場合も見受けられた。そこで次にわれわれは、この方法の普及のためには適した抗体の選択法が必要と考え、方法の開発に取り組んだ。

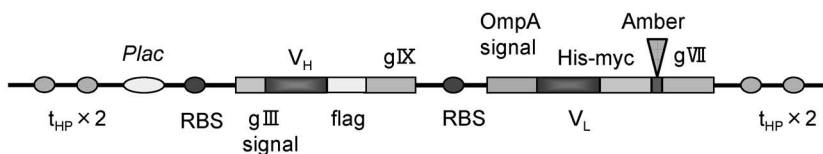
近年抗体の遺伝子クローニングの際には、しばしば抗原結合能を持つ抗体断片を特異的に濃縮できるファージ提示法が用いられる。現在最も広く用いられる方法では、一本鎖抗体を線維状ファージの p3 コートタンパクに提示し、抗原結合親和性の高いものをバイオパニングにより選択・スクリーニングする。¹⁵⁾ しかしわれわれの目的では V_H/V_L 両者による抗原結合能が高いことに加え、 V_H-V_L 間の相互作用が抗原結合によって変化するかどうか重要なポイントとなる。この両者を評価できる方法はこれまで存在しなかったため、これが可能なファージ提示法として、新規に Split-Fv (spFv) システムを開発した。

Split-Fv 法では繊維状ファージの p3 と反対側の末端に 3-5 コピーずつ存在する二種類のコートタンパク p9 及び p7 を利用し、これらのそれぞれにタグ配列を介して V_H 及び V_L 断片を提示する (Fig. 5)。この提示法自体は Scripps 研の Kim Janda らが開発したものである¹⁶⁾ が、われわれは V_L 側の myc タグ C 末にアンバーコドンを配し、ファージ生産に用いる大腸菌のサブレッサー変異の有無により、タグ付き V_L のファージ表面への提示と分泌生産のスイッチが可能になるよう設計した。すなわちこのファージミドで TG1 のようなアンバーサブレッサー株を形質転換し、ヘルパーファージを感染させれば V_H-V_L の両者すなわち Fv を提示したファージが生産されるので抗原結合能の評価選択ができる。また HB2151 のような非サブレッサー株を用いてファージを調製すれば V_H 提示ファージとタグ付き V_L 断片の両者が同時に分泌生産され、この培養上清を抗タグ抗体あるいは V_L 結合タンパクである protein L を吸着させたプレートに注げば、プレート上の V_L 断片と V_H -ファージとの相互作用を抗ファージ標識抗体を用いて簡便に測定できる。すなわちこの培養上清に抗原を添加した際、信号強度上昇が大きければオープンサンドイッチ法に向けた抗体だ、と判断できる。このシステムを作製し、HyHEL-10 を用いて性能チェックを行ったところ、確かに抗原結合能と V_H/V_L 相互作用の抗原依存性が検出できた。

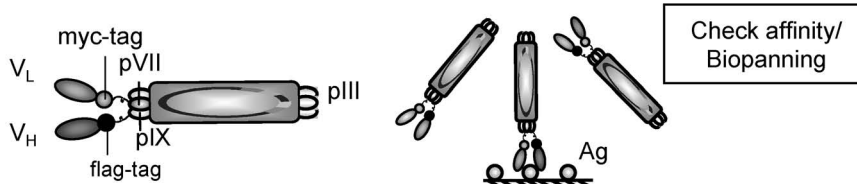
8. 低分子の高感度非競合的検出

そこで次に、このシステムを用いて他の抗原、特に低分子単価抗原を認識する抗体のスクリーニングを試みた。モデルとして近年その環境ホルモン様作用が注目されているビスフェノール A (Bisphenol A, BPA, 分子量 228.3) 認識抗体に着目し、3 種の抗 BPA 抗体クローンのオープンサンドイッチ法への適性を調べてみた。¹⁷⁾ spFv ベクターへの抗体遺伝子クローニングは市販の scFv 作製キットと全く同じ操作で可能であり、違うのは使用するプライマーとリンカー DNA だけである。ファージミドベクターへの cDNA クローニングののち、まずサブレッサー株である TG1 を用いて Fv の提示を行ったところ、天然抗体で認められた 3 クローンの親和性の違いが再確認された。次に非サブレッサー株 HB2151 を用いてオープンサンドイッチ ELISA を

A. Structure of split Fv coding region of the phagemid pKST2



B. Display Fv with *sup*⁺ strain (TG1) as a host



C. Display V_H and secrete V_L with *sup*⁻ strain (HB2151) as a host

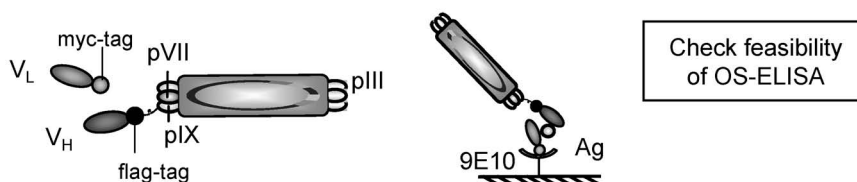


Fig. 5. Scheme of Split Fv System

(A) Structure of the phagemid vector for phage display V_H and V_L fragments were connected to genes IX and VII, through flag and his-myc tags, respectively. RBS: ribosome binding site; t_{HP} : glutamine permease terminator. Phages and proteins in the culture supernatant derived of (B) suppressor and (C) non-suppressing strains are shown. In (C), 9E10 antibody is used for immobilizing V_L -his-myc fragment.

行った。その結果、抗原親和性の強弱に応じて信号の強弱はあったが、どのクローンでも測定は可能という結論になった。また一番応答性のよい、すなわち一番親和性の高いクローンの BPA 検出限界は 0.2 ng/ml (=1 nM) 程度と、競合法に勝るとも劣らない結果であった。この結果は、ストレプトアビジンを経して固定化したビオチン化 V_L 断片と V_H -アルカリフォスファターゼ融合タンパクを用いても再現された。

この結果にカづけられたわれわれは、いくつかの低分子認識抗体産生ハイブリドーマからの遺伝子クローニングとオープンサンドイッチ法の実施を試みた。その結果、多くの分子量 1000 以下の低分子特異的抗体について可変領域の cDNA クローニングと、オープンサンドイッチ法による抗原濃度測定に成功しつつある。以下に一例としてカビ毒ゼアラレノンの検出例を示す。

ゼアラレノン (Zearalenone, ZEA, 分子量 318.3) はフザリウム属のカビ類が産生する毒素 (マイコトキシン) の一種で、近年家畜用飼料であるトウモロコシ、オオムギ、ハトムギなどの汚染が問題となっ

ている。特徴として、急性毒性は低いが生体内分泌攪乱作用を持ち、ブタなどの家畜に不妊、流産、外陰部肥大を引き起こすことが知られている。日本では家畜飼料濃度 (原料ではない) の暫定基準値が 1 ppm とされているが、国により規制値が異なりより高い感度が求められる場合もある。そこでオープンサンドイッチ法による ZEA の高感度検出を試みた。

具体的にはゼアラレノン認識抗体産生ハイブリドーマより RNA を抽出、RT-PCR 法を用いて可変領域 cDNA を増幅し、得られた V_H/V_L cDNA 断片を gene 9 を介して Splice-Overlap-Extension PCR により結合させて split Fv ベクターに組み込んだ。これを TG-1 に形質転換し、split Fv 提示ファージを作製しファージ ELISA を行ったところ、ZEA 標識 BSA と強く結合する多数のクローンを得た。そこでこれらより 1 クローンを選んで競合 ELISA を行ったところ、標識 IgG 抗体を用いる測定キットとほぼ同じ感度で ZEA を検出できた (Fig. 6(A))。これより正しい可変領域 cDNA のクローニングに成功したと判断し、HB2151 を用いてファージを含む培養上清を調製し、タグに対する抗体を用いて

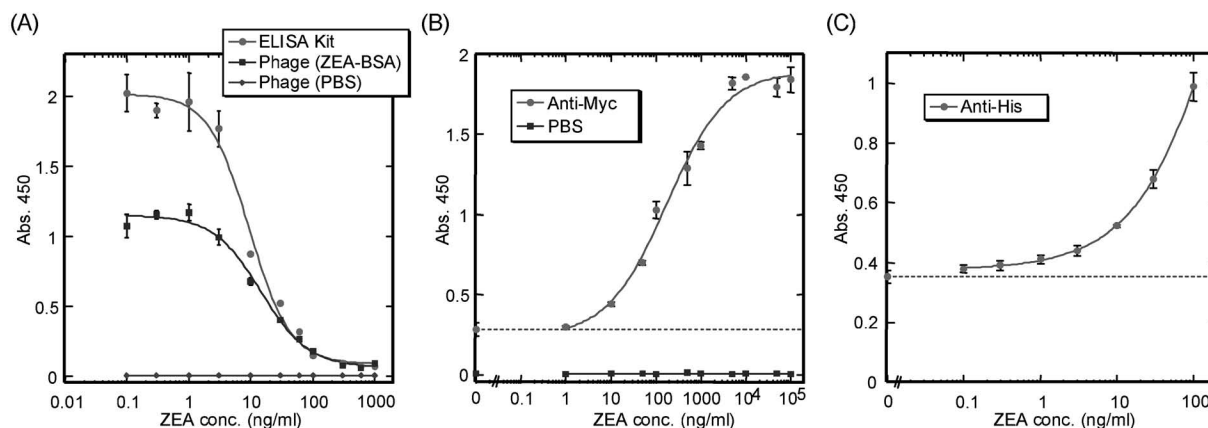


Fig. 6. Zearalenone Dose-response Curves of (A) Competitive Phage ELISA, and Open Sandwich Phage ELISA with (B) Anti-myc or (C) Anti-His Aag Ab

V_L 断片を固定化してオープンサンドイッチ ELISA を行った。

幸いこの結果は予想外によく、 V_L 固定化のために抗 myc 抗体と多め (全体の 1/5 vol.) のファージ培養液を用いた場合 (Fig. 6(B)), 競合 ELISA とほぼ同等の感度とより広い検出可能濃度範囲を、また V_L 固定化のために抗 His-tag 抗体と少なめ (全体の 1/20 vol.) のファージを用いた場合、競合 ELISA より明らかに優れた検出限界 (ppb 以下) を得ることができた (Fig. 6(C)). さらに V_L を MBP 融合タンパクとして作製し、これをマイクロプレートに直接吸着させて別に作製した V_H -PhoA 融合タンパクを用いて測定を行った場合にもこれらとほぼ同等の結果が得られた (投稿準備中). 以上から、オープンサンドイッチ法でゼアラレノン競合法と同等以上の感度と濃度域で測定できると言っ

てよいであろう。また最近神戸薬科大学小林典裕教授らとの共同研究で、副腎由来ステロイドを認識する抗体を用いたオープンサンドイッチ ELISA において、競合法で得られるより優れた感度と測定濃度域が得られること、さらには類縁体に対する選択性が同程度に保持されていることが明らかとなってきている (未発表データ).

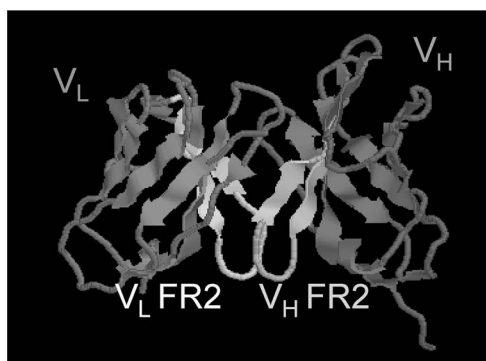
9. オープンサンドイッチ法への適性を決める残基

さてここまで読まれてきた読者は、「タンパク認識抗体では測定が難しいが低分子認識抗体ではうまくいくというが、いったい抗体のオープンサンドイ

ッチ法への適・不適は何が決めているのか?」という疑問を持たれると思う。ニフトリリゾチームを認識する抗体には V_H/V_L 相互作用の弱い HyHEL-10 以外に相互作用の極めて強い ($K_a \sim 10^{10}/M$) D1.3 が知られている。そこでこれらをモデルとして、抗原非存在時の V_H/V_L 相互作用が低くオープンサンドイッチ法に適した HyHEL-10 と、相互作用が強くて適していない D1.3 のフレームワーク残基を比較し、 V_H/V_L 相互作用の強弱さらにはオープンサンドイッチ法への適不適に影響を与える残基の同定を試みた。

具体的な実験としては、D1.3 より若干抗原結合能が強い HyHEL-10 の V_H, V_L 界面にある 2 つの FR2 領域のうち HyHEL-10 と D1.3 で異なっている残基 (V_H 7 個, V_L 6 個) につき、これらを遺伝子上で両方コードし得るコドンに置き換え、理論上の多様性 (2.6×10^5) を十分カバーするサイズ (10^7) のファージミドライブラリを作製した (Fig. 7). これを TG-1 に形質転換し、常法に従いファージ提示 spFv ライブラリとしたのち、抗原固定化プレートを用いたパニングを 1 回行い結合クローンを濃縮した。そしてスクリーニングの結果得られた特異性の高いクローン 36 個についてその抗原結合能と、HB2151 で作ったファージのオープンサンドイッチ ELISA への適性を評価した。オープンサンドイッチ ELISA への適性は、ファージの抗原存在時の吸光度を抗原非存在時の吸光度で割った値を適性として評価した。

この結果を、横軸を野生型を 1 とした Fv 提示フ



• V_H FR2

37 39 40 43 44 47 48

I	K	F	N	R	Y	M	H10 type
V	Q	P	K	G	W	L	D1.3 type
		L			C		Others
		S			amber		

• V_L FR2

40 41 42 45 48 49

S	H	E	R	I	K	H10 type
Q	G	K	Q	V	Y	D1.3 type
P	R				N	Others
amber D					amber	

Fig. 7. Position and Sequences of V_H/V_L Framework 2 Regions

アージュの抗原への相対結合能に、縦軸をオープンサンドイッチ法への適性としてプロットしたものが Fig. 8 である。変異導入の結果、幅広い抗原結合能と適性を持つクローンが得られたと言えるが、注目すべきこととして V_H FR2 のある残基 (H39) の種類によってオープンサンドイッチ法への適性が大きく影響を受けることが分かった。すなわち H39 が HyHEL-10 型のリジン (K) の場合にはほぼすべてのクローンで高い適性値が得られるのに対し、D1.3 型のグルタミン (Q) の場合には測定が不可能になる (すなわち抗原非存在時の V_H/V_L 相互作用が強まる) ことが分かった。

この理由は、HyHEL-10 と D1.3 の結晶構造から推測することができる (Fig. 9)。HyHEL-10 では H39K は V_L 側の残基と積極的な相互作用をしているとはみえない。これに対し、D1.3 では他の多くの抗体同様 H39Q は V_L 側の相同残基である L38Q と 2 個の水素結合を形成しており、これらが V_H/V_L 相互作用の安定化に大きく寄与していると思わ

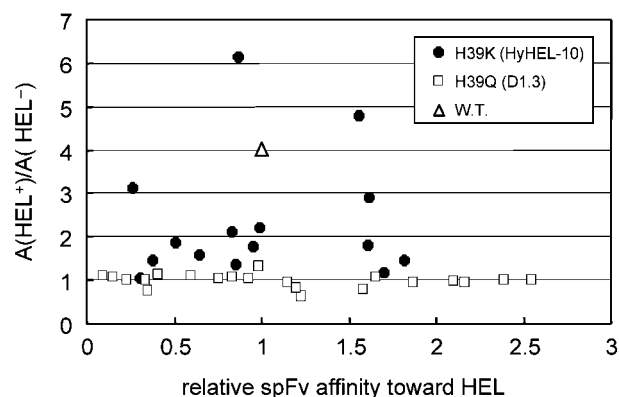


Fig. 8. Open-sandwich Fitness of HyHEL-10 Framework Mutants Classified by the Type of H39 Residue
The enhancement of V_H/V_L interaction upon addition of antigen (HEL) is plotted against specific binding of spFv phage to HEL measured by ELISA.

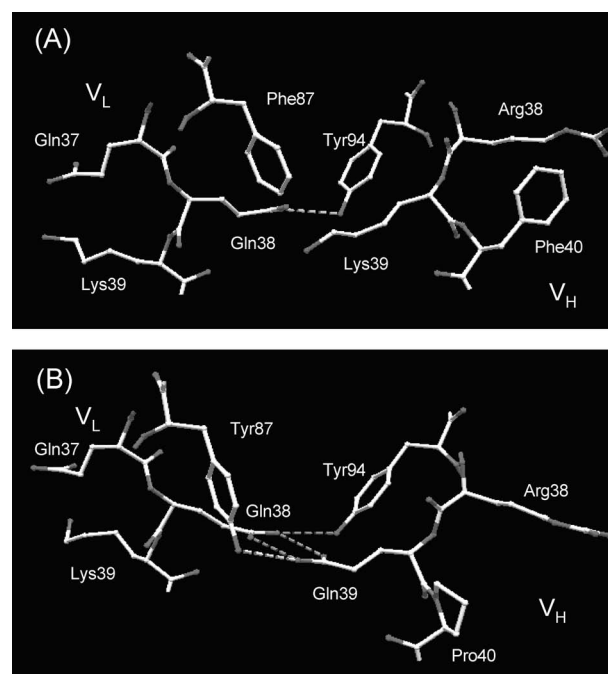


Fig. 9. Three Dimensional Structures of HyHEL-10 (A) and D1.3 (B) around H39

Possible hydrogen bonds calculated by SwissPDB Viewer are shown as dotted lines.

れる。マウスの場合 H39 及び L38 は 95% がグルタミン残基であり、多くのタンパク認識抗体でオープンサンドイッチ法がうまくいかない原因の一端はここにあるのかもしれない。

10. おわりに

しかし前項の結果と一見矛盾するようだが、H39 がグルタミンである BPA あるいは ZEA のような低分子認識抗体では、十分な感度と応答性でオーブ

ンサンドイッチ法が実施できる。これはなぜだろうか？ 筆者には、これはこれまで構造が解かれた低分子認識抗体のほとんどが抗原を V_H と V_L 断片の間のくぼみで認識している事実、及びタンパク認識抗体が抗原を V_H/V_L が作る上部平面で認識している事実と対応しているように思われる。すなわち低分子は結合によって、 V_H-V_L 間に新たに抗原を介した結合（水素結合、van der Waals 接触等）を作って複合体を安定化させるのに対し、タンパク認識抗体は（例外はあるにせよ）結合前から V_H/V_L 界面が既に安定化されているところにタンパク質が結合するケースが多いのではないだろうか？

また前項の結果を利用すれば、逆にある抗体のオープンサンドイッチ法への適性が低い場合に、H39 をグルタミン以外に変えることで適性を高められる可能性がある。実際、われわれは抗ホスホチロシン抗体 PY20 について、野生型 Fv における比較的強い V_H/V_L 相互作用を、H39QR 変異により顕著に低減させてオープンサンドイッチ法に適した抗体とすることに成功している。さらにこの変異体を用いて eCFP/eYFP 間の FRET を利用しペプチドのチロシンリン酸化を検出することにも成功した。¹⁸⁾ 原理的にほとんどのタンパクのチロシンリン酸化が検出される点、また抗体を還元的な細胞質で機能させる技術が未完成である点などまだまだ課題は多いが、今後この手法を発展させることにより抗体をプローブとして多種多様な細胞内の情報伝達を可視化できる可能性があると期待している。

さらに今後、オープンサンドイッチ法が実用的な免疫測定法として使われるための課題としては、測定素子の構築のために遺伝子クローニングが必須な点があると思われる。近年実用的に使われるようになってきた治療用ヒト型抗体のように、今後はファージ提示法などの分子選択法を利用して Naïve あるいは合成された大規模ライブラリからオープンサンドイッチ法に適した抗体を効率よく選択していく技術開発を進めるとともに、既存のハイブリドーマ資源を有効に利用し、ここから今より簡便に素子を作製してゆく手法の開発も行っていく価値がある。

以上、筆者らの方法を含めて非競合法には、抗原量に従って信号が増加する点で競合法より直観的に判り易いメリットがある。今後も基礎研究から臨床診断、さらには環境分析などをターゲットに、誰も

が使える方法になるよう更なる発展を期待したい。

謝辞 小生のために快適な研究環境を作っていたいただいた、東京大学大学院工学系研究科長棟輝行教授、同新領域創成科学研究科上田卓也教授、及び抗体遺伝子をご恵与いただいた東北大学大学院工学研究科熊谷 泉教授、神戸大学遺伝子実験施設の大川秀郎教授、協和メデックス榎田達也氏並びに多くの大学院生諸氏に深く感謝します。

REFERENCES

- 1) Ohmura N., Lackie S. J., Saiki H., *Anal. Chem.*, **73**, 3392–3399 (2001).
- 2) Kobayashi N., Goto J., *Adv. Clin. Chem.*, **36**, 139–170 (2001).
- 3) Giraudi G., Anfossi L., Rosso I., Baggiani C., Giovannoli C., Tozzi C., *Anal. Chem.*, **71**, 4697–4700 (1999).
- 4) Ueda H., Tsumoto K., Kubota K., Suzuki E., Nagamune T., Nishimura H., Schueler P. A., Winter G., Kumagai I., Mahoney W. C., *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1714–1718 (1996).
- 5) Suzuki C., Ueda H., Tsumoto K., Mahoney W., Kumagai I., Nagamune T., *J. Immunol. Methods*, **224**, 171–184 (1999).
- 6) Ueda H., Kubota K., Wang Y., Tsumoto K., Mahoney W., Kumagai I., Nagamune T., *Biotechniques*, **27**, 738–742 (1999).
- 7) Arai R., Ueda H., Tsumoto K., Mahoney W. C., Kumagai I., Nagamune T., *Protein Eng.*, **13**, 369–376 (2000).
- 8) Suzuki C., Ueda H., Mahoney W., Nagamune T., *Anal. Biochem.*, **286**, 238–246 (2000).
- 9) Suzuki C., Ueda H., Suzuki E., Nagamune T., *J. Biochem.*, **122**, 322–329 (1997).
- 10) Allen D., Cumano A., Dildrop R., Kocks C., Rajewsky K., Rajewsky N., Roes J., Sablitzky F., Siekevitz M., *Immunol. Rev.*, **96**, 5–22 (1987).
- 11) Rossi F., Charlton C. A., Blau H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 8405–8410 (1997).
- 12) Yokozeki T., Ueda H., Arai R., Mahoney W., Nagamune T., *Anal. Chem.*, **74**, 2500–2504 (2002).
- 13) Ueda H., Yokozeki T., Arai R., Tsumoto K., Kumagai I., Nagamune T., *J. Immunol.*

- Methods*, **279**, 209–218 (2003).
- 14) Henderson D. R., Friedman S. B., Harris J. D., Manning W. B., Zoccoli M. A., *Clin. Chem.*, **32**, 1637–1641 (1986).
 - 15) Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E., Hoogenboom H. R., *Ann. Rev. Immunol.*, **12**, 433–455 (1994).
 - 16) Gao C., Mao S., Lo C. H., Wirsching P., Lerner R. A., Janda K. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6025–6030 (1999).
 - 17) Aburatani T., Sakamoto K., Masuda K., Nishi K., Ohkawa H., Nagamune T., Ueda H., *Anal. Chem.*, **75**, 4057–4064 (2003).
 - 18) Sasajima Y., Aburatani T., Sakamoto K., Ueda H., *Biotechnol. Prog.*, **22**, 968–973 (2006).