

D309

蛍光ラベル化抗体断片の消光解消を原理とする新規免疫測定法の開発

(東大院工・化生) ○ (正) 上田 宏*・(プロテイン・エクスプレス) 阿部 亮二・
高木 広明・(信州大農) 伊原 正喜・(北陸先端大・マテリアル) 芳坂 貴弘

1. 緒言

臨床診断や食品中の汚染物質検出など、低分子の簡便かつ迅速な検出法のニーズは高く、特に機器分析と比べて手軽にオンサイト分析が可能な免疫測定法開発への期待は大きい。しかし通常用いられる競合 ELISA 法は測定に手間と時間がかかる難点がある。我々は以前、蛍光標識した抗体断片同士の会合による蛍光エネルギー移動(FRET)現象を利用し、均相系で非競合的に抗原検出が可能な Open Sandwich (OS) FIA 法を報告した¹⁾。しかしこれを低分子検出に応用した例はまだない。そこで今回、無細胞蛋白質合成系を用いて部位特異的に蛍光ラベルした骨疾患マーカーペプチド BGP-C 認識抗体を用いて、FRET による抗原検出を試みた。また、解析の過程で1カ所のみを蛍光ラベルした抗体断片で抗原依存的に顕著な蛍光強度変化が起きることを見出したので報告する。

2. 実験方法と結果

実験スキームを Fig. 1 に示す。蛋白質発現には無細胞系発現ベクター pROX-FL-amber に抗 BGP-C 抗体 KTM219²⁾ V_H ないし V_L 遺伝子を挿入したプラスミドと大腸菌無細胞発現システム RTS *E. coli* disulfide kit (Roche)を用いた。この際、V_H 発現系には CloverDirect™ TAMRA を、V_L には CloverDirect™ CR110 を至適量加え、各蛋白質の N 末近傍のアンバーコドン部位に色素を取り込ませた。これらを C 末端側に付加された His₆ タグを利用して精製し、電気泳動による確認後に定量した。蛍光測定は一分子蛍光分析システム MF20 (Olympus)あるいは蛍光分光光度計(FluoroMax4, Horiba)を用いて行い、二つの標識抗体断片あるいは比較のために非標識断片を各種濃度の抗原ペプチド BGP-C7 と混合して測定した。

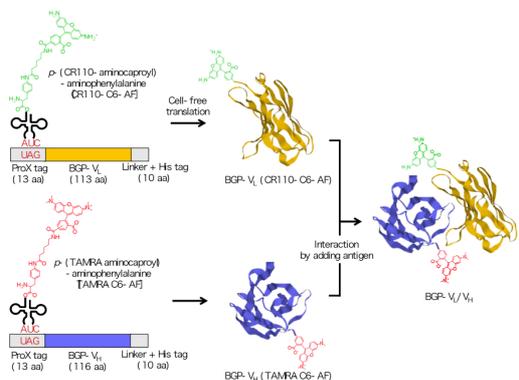


Fig. 1 Preparation of Pinpoint-fluorolabeled V_H/V_L fragments

TAMRA-V_H と CR110-V_L を混合して 490 nm で励起し蛍光スペクトルを測定した結果、BGP-C7 依存的に顕著に変化した。すなわち、本抗体を用いて OS-FIA による抗原検出が可能なが示された (Fig. 2)。

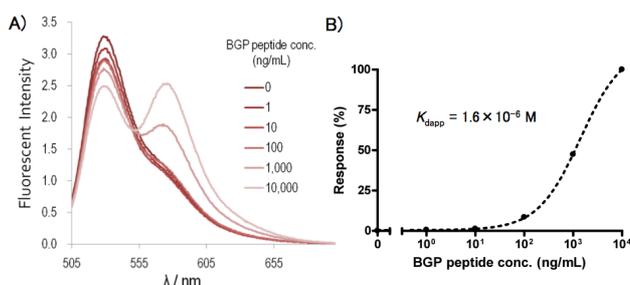


Fig. 2 (A) FL spectra of TAMRA-V_H/CR110-V_L in the presence of BGP-C7 as indicated. (B) Normalized ratio of F575/F525

次に、TAMRA-V_H と非標識の V_L を混合して MF-20 で TAMRA の蛍光強度を測定したところ、意外なことに抗原依存的な顕著な蛍光強度増大が見られた (Fig. 3)。この原因を探るため、V_H にある4カ所の Trp 残基をそれぞれ Phe に変異させた。この結果、二つの保存性の高い Trp 残基(W36/W103)の変異により抗原非存在時の蛍光強度が顕著に増加したことから、これらの残基による TAMRA の消光解除が蛍光強度変化の要因と示唆された。さらに同様の結果が TAMRA-ScFv でも観察された (データ省略)。

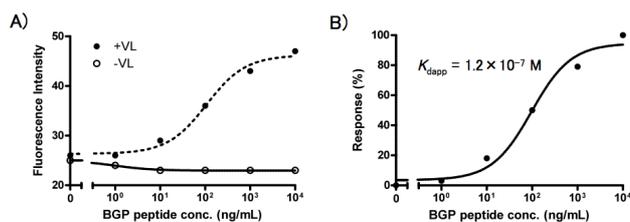


Fig. 3 (A) FL intensities of TAMRA-V_H ± non-labeled V_L in the presence of BGP-C7 as indicated. (B) Normalized response

3. 結言

ピンポイント蛍光ラベル化抗体断片を用いて OS FIA による BGP ペプチド検出に成功した。また蛍光の消光解消を原理とする新規な免疫測定法の可能性を見出した。低分子の簡便な検出法として、本法の実用化が期待される。

参考文献

- 1) H. Ueda et al., *Biotechniques* **27**, 738-742, 1999.
- 2) S.-L. Lim et al., *Anal. Chem.* **79**, 6193-6200, 2007.

*Email : hueda@chembio.t.u-tokyo.ac.jp