

各位

2022年7月22日

NLuc と人工ミニ抗体の融合体が高感度免疫アッセイを可能にする
～新しい発光酵素の分析化学における有用性に期待～

神戸薬科大学生命分析化学研究室の小林典裕教授、大山浩之准教授、森田いずみ講師、木口裕貴特任助教らは、人工のミニ抗体である scFv タンパク質と新しい発光酵素 NLuc (NanoLuc ルシフェラーゼ) の融合体 (scFv-NLuc) を遺伝子操作により創製し、甲状腺ホルモン (チロキシン) の高感度免疫アッセイを開発しました。

従来、免疫アッセイには IgG 型の天然抗体が常用され、その酵素標識は化学試薬による架橋反応により行われてきましたが (図 1)、様々な分子種を生じるうえ酵素の活性を著しく損なう難点がありました。一方、scFv タンパク質は IgG 型抗体の抗原結合部位 (V_H および V_L) を連結した「ミニ抗体」で、その遺伝子に酵素の遺伝子を直結させたのちに大腸菌内で発現させると、安定な scFv-酵素融合タンパク質が均質な分子種として得られます。この scFv-NLuc はフリマジンを基質として強く発光し、zeptomole (10^{-21} モル) レベルで検出できました (図 2(i))。

本研究は、NLuc の既存の発光酵素に対する優越性と scFv の融合パートナーとしての有用性を初めて実証したもので、2021年5月29日に、*Analytica Chimica Acta* 誌に掲載されました。本論文に公表された成果は、今後、高感度免疫アッセイ開発に広く役立つものと期待されます。

図 1

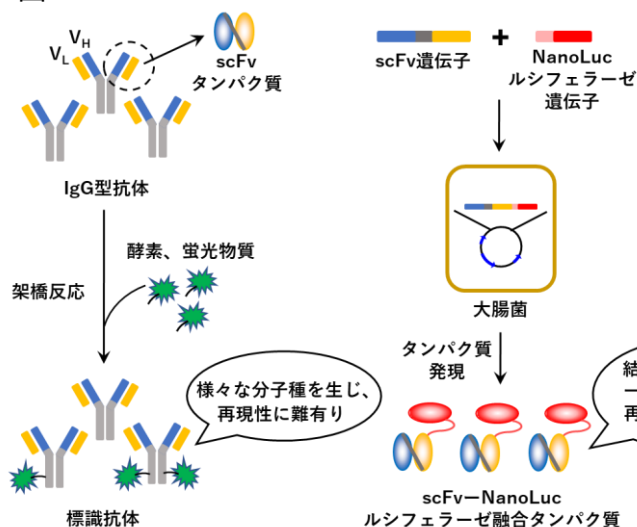
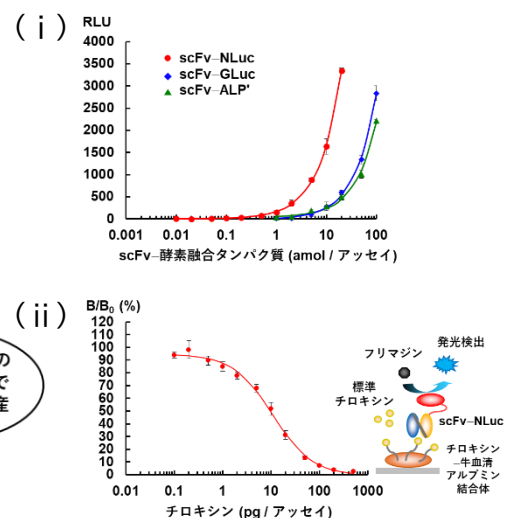


図 2





【1. 研究の背景】

イムノアッセイは、病気の診断指標となる化学物質を高感度・高選択的に測定する分析手法であり、その代表例である ELISA*（固相酵素イムノアッセイ）は医療機関での日常検査に不可欠です。ELISA の測定原理は競合法とサンドイッチ法に分類されますが、どちらも酵素を指標として抗原抗体複合体の進行を追跡することにより標的分子を定量します。私たちは以前、海洋プランクトン由来の発光酵素である *Gaussia* ルシフェラーゼ（GLuc）に着目して scFv との融合タンパク質を調製し、ステロイドホルモンの高感度な ELISA への応用が可能であることを報告しました。しかし、GLuc は発光半減期が短く、取り扱いに高度な手技が必要でした。最近、深海エビ由来の NanoLuc ルシフェラーゼ（NLuc）が注目され、細胞内での遺伝子発現やタンパク質間の相互作用評価などに用いられるようになりました。NLuc は既存の発光酵素よりも高輝度で半減期が長い特徴を持ちますが、抗体への標識が困難であったため ELISA に応用した例はありません。そこで、NLuc と scFv の融合タンパク質を創製し、その高感度 ELISA 開発における有用性を検討しようと考えました。

【2. 研究成果の概要】

NLuc の性能を評価するために、GLuc および 20 年来使われている変異型アルカリホスファターゼ（ALP'）を用いて抗チロキシン抗体 scFv との融合タンパク質を調製し、検出限界値を比較したところ、NLuc 融合体では 59 zeptomole であり、GLuc または ALP' との融合体よりも 20 倍以上低い（優れた）値でした（図 2(i)）。また、NLuc 融合体を用いるチロキシンの競合型 ELISA（図 2(ii)）の検出限界は 0.67 pg であり、GLuc または ALP' を融合させた scFv を用いた場合よりも 9.3 倍、6.3 倍高い感度でした。発光強度の安定性にも優れ、GLuc では基質添加後 10 分で 50%以下に減衰するのに対し NLuc では 60 分まで変化せず、プレート内の全ウェルの発光強度を一括測定することが容易になりました。scFv-NLuc を採用した ELISA で健常人の血清中チロキシンを測定したところ基準範囲内の値が得られ、実用的な分析方法であることが実証されました。さらに、大腸菌に感染する繊維状ファージを測定標的として、scFv-NLuc がサンドイッチ ELISA の高感度化にも有効であることを示しました。

以上、scFv-NLuc は様々なイムノアッセイ系に応用できる新たな「分析試薬」として有用と期待されます。

[掲載論文]

雑誌名: *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1161, 238180
(doi: org/10.1016/j.aca.2020.12.055).

題目: NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays

著者: Hiroyuki Oyama, Yuki Kiguchi, Izumi Morita, Takayuki Miyashita, Akiyoshi Ichimura, Hiroko Miyaoka, Sayaka Terasawa, Natsumi Osumi, Hiroki Tanaka, Toshifumi Niwa, Norihiro Kobayashi



【用語説明】

***scFv**: single-chain Fv fragment の略称。天然型抗体の H 鎖および L 鎖の可変部ドメイン (V_H および V_L) をリンカーペプチドで連結した人工の抗体フラグメント。分子サイズは IgG の約 1/6 と小さく、大腸菌での調製も容易である。

***ELISA**: enzyme-linked immunosorbent assay の略称。免疫アッセイの代表的な手法で、抗体または抗原（すなわち測定対象物質）を固定化したプラスチック製の 96 穴マイクロプレートのなかで抗原抗体反応を行う。競合法は、一定量の固定化抗体（あるいは酵素標識抗体）に対して一定量の酵素標識抗原（あるいは固定化抗原）と試料中の非標識抗原を競合的に反応させて、プレート上に捕捉された酵素活性を指標として抗原を測定する方法で、分子量を問わず様々な抗原に適用できる。サンドイッチ法は、タンパク質のような高分子抗原に適用され、異なる 2 種類の抗体（いずれかを酵素で標識し、もう一方を固定化する）を用いて抗原抗体反応を行い、抗原の増量に応じて増加するプレート上の酵素活性から抗原量を求める方法である。