

生体分子高感度検出を目指した酵素融合タンパク質 試薬の開発

林, 浩之輔

<https://doi.org/10.15017/1500698>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名 : 林 浩之輔

論 文 名 : 生体分子高感度検出を目指した酵素融合タンパク質試薬の開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

臨床検査やタンパク質研究の分野では、任意のタンパク質を特異的に検出する需要が高く、検出対象タンパク質に直接的あるいは間接的に結合する抗体などのアフィニティ分子に、加水分解酵素や酸化還元酵素などの酵素を標識した、酵素標識抗体等のタンパク質検出試薬が使われている。それらの酵素標識抗体等は、一般的に、酵素とアフィニティ分子を化学結合法により複合化しているが、その結合反応は非特異的で結合部位や配向性を制御できないため、酵素やアフィニティ分子の機能が劣化するおそれがある。また、酵素とアフィニティ分子をそれぞれ個別に調製、精製し、結合反応後にさらに精製を行う必要があり、その製造工程は煩雑である。一方、複数のタンパク質遺伝子を遺伝子工学的に連結して得られる融合タンパク質は、配向性が保たれた均一な分子を、より少ない工程で調製することが可能である。

そこで本研究では、酵素とアフィニティ分子からなる融合タンパク質を調製することで、酵素標識抗体の欠点を改良し、酵素標識抗体を代替するタンパク質検出試薬の開発を行った。1種類のアフィニティ分子に対し、加水分解酵素あるいは酸化還元酵素が融合した2種類の融合タンパク質を設計し、3種類のタンパク質発現系でその調製を試み、それぞれイムノアッセイで機能する融合タンパク質を得ることに成功した。アフィニティ分子には抗体結合性タンパク質である黄色ブドウ球菌由来の protein A およびレンサ球菌由来の protein G の部分配列を融合したタンパク質 (PG) を用いた。加水分解酵素にはアルカリフォスファターゼを、酸化還元酵素にはペルオキシダーゼを用いた。それらの融合タンパク質を、ヒト培養細胞、原核微生物、カイコ幼虫の3つの異種タンパク質発現系を用いて生産し、従来の化学結合法より少ない工程でタンパク質検出試薬を調製することに成功すると共に、イムノアッセイで使用可能であることを示した。

本小論の構成は以下の通りである。

第一章は序論であり、臨床分野における検査試薬の位置付けやタンパク質試薬の市場動向、これらに付随する検体分析システムに関する既往の研究例について纏めた。

第二章では、ヒト培養細胞を用いたアルカリフォスファターゼとアフィニティ分子の融合タンパク質の生産検討について述べた。アルカリフォスファターゼには、ヒト胎盤由来とヒト小腸由来のアルカリフォスファターゼのキメラアルカリフォスファターゼ (IPP) を用いて高感度化を狙った。得られたヒト由来キメラアルカリフォスファターゼとアフィニティ分子の融合タンパク質 (IPP-PG) をウェスタンブロッティング法で評価したところ、市販の酵素標識抗体あるいは酵素標識 protein G と同等以上の検出限界である 32 pg の抗原を検出でき、イムノアッセイに使用可能であることを示すと共に、免疫組織化学法においても市販品を代替しうる結果を得た。また、ヒト培養細胞発現系の最適化により、単位培地あたりのタンパク質収量を 2,600 倍に高めることに成功した。

第三章では、グラム陽性細菌分泌発現系を用いたペルオキシダーゼとアフィニティ分子の融合タンパク質の生産検討について述べた。原核微生物であるブレヴィバチルスを用いて、真核生物である *Arthromyces ramosus* 由来のペルオキシダーゼ (ARP) とアフィニティ分子の融合タンパク質 (ARP-PG) を調製し、培養上清中に活性体として分泌させることに成功した。ヘムタンパク質である ARP を過剰発現させるにあたり、ヘムの生合成を補完することを目的とし、培地に hemin chloride あるいはヘムの前駆体である 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を添加して培養したところ、5-ALA を添加したときに培養上清のペルオキシダーゼ活性が向上することを見出した。また、培養上清を未精製のままドットブロットイムノアッセイで評価したところ、アフィニティ精製済みのタンパク質より高い S/N 比で抗原を検出することができた。

第四章では、カイコ幼虫-バキュロウイルス発現系による、ARP-PG の生産検討について述べた。カイコ幼虫でヘムタンパク質を生産するにあたり、5-ALA をカイコ幼虫へ注射することが生産量の向上に有効であることを明らかにした。5-ALA をカイコに注射して得られた ARP-PG の抗原検出限界は 32 pg であり、前章で得た組換えタンパク質よりも性能の高い ARP-PG の調製に成功した。カイコ幼虫-バキュロウイルス発現系で得られたタンパク質の紫外-可視吸収スペクトルから、ヘムが ARP-PG に会合していること、発現したタンパク質のうち約 30% の ARP-PG がヘムと結合することで酵素活性を発現していると推測された。

第五章では、本研究の総括を行い、今後の展望について述べた。