

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の構築とバイオアッセイ系への応用
Title(English)	Construction of protein-based nanoparticle displaying antibody binding domains applying for bioassay system
著者(和文)	杉原努
Author(English)	Tsutomu Sugihara
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10970号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小島 英理,桑 昭苑,山口 雄輝,上田 宏,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10970号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

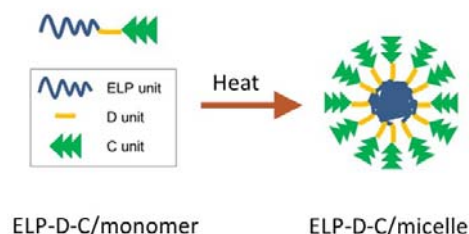
抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の構築とバイオアッセイ系への応用

発表者氏名 指導教員名
杉原 努 小島 英理 教授

【緒言】

ナノ粒子は直径 1~100 nm からなる球状の粒子で、生物、医療、食品、化粧品、農業、環境、電気など様々な分野で急速に利用されつつある。ナノ粒子の出発原料として、金属、シリカ、カーボン、有機ポリマー、脂質、タンパク質などが例示されるが、この中でもタンパク質は他の物質に比べ、より複雑かつ高度な機能を発現するナノ分子を創製できる可能性を秘めている。当研究室では、疎水性の高いエラスチン特有の配列 (Elastin-like polypeptides をモチーフにしたポリペプチド (Pro-Ala-Val-Gly-Val) を 42 回繰り返した配列、以下「ELP」と称す)、親水性の高いポリアスパラギン酸配列 (Asp₁₁-Lys を 4 回繰り返した配列、以下「D」と称す) から構成されるタンパク質ナノ粒子を構築する基本技術を有している。このタンパク質は、加熱により ELP 配列を核にして凝集し、直径数十 nm のナノ粒子体を形成する性質を有し、さらにこのタンパク質配列に機能性部位を付加することにより、ナノ粒子表面に機能部位を提示させることに成功している。

そこで本研究では、抗体結合機能を有する配列 (Protein G に由来する抗体結合ドメインを 3 回繰り返した配列、以下「C」と称す) を組み合わせた新規タンパク質 (ELP-D-C) を設計した。このタンパク質は、表面上に抗体結合機能を提示するナノ粒子 (抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子) となり、この抗体結合機能を介して抗体をナノ粒子上に提示できるものと考えられる。この新規タンパク質 (ELP-D-C) を遺伝子工学的に合成し、物理化学的性質を明らかにすること、抗体結合機能提示型ナノ粒子を構築し、免疫測定系に適用することを、本研究の目的とする。



【実験結果及び考察】

抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の遺伝子工学的合成

本研究で設計した ELP-D-C 配列をコードするプラスミド pET28b-PAVGV42-D44-C3-His を構築し、大腸菌 BLR (DE3) 株を形質転換した。IPTG による ELP-D-C の発現誘導をさせた後、大腸菌を超音波破碎し、得られた可溶性画分から ELP-D-C を固定化金属アフィニティー精製した。ELP-D-C の二次構造を CD スペクトル法で解析したところ、ELP ユニット特有の β -spiral 構造、C ユニットに由来する α -helix 及び β -sheet 構造を強く反映したスペクトルが得られた。さらに三次構造を蛍光スペクトル法で解析したところ、トリプトファンに由来する 344 nm 付近に極大を持つスペクトルが得られた。

抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の物理化学的性質の評価

ELP-D-C は加熱により ELP 配列を核にして凝集し、直径数十 nm のナノ粒子体を形成すると考えられる。このナノ粒子の形成過程を、動的光散乱法を用いて測定した。ELP-D-C は 20°C において平均粒子径 10 nm 程度の単分子 (ELP-D-C/monomer) として存在するが、転移温度 (40°C 付近) を境に疎水性の高い ELP 配列の疎水性相互作用が高まり、急速に集合することで、平均粒子径 40 nm 程度の micelle 状のナノ粒子 (ELP-D-C/micelle) を形成する現象が見られた。ELP-D-C は 70°C まで加熱しても、平均粒子径が 100 nm を超える凝集体 (ELP-D-C/aggregate) をほとんど形成しなかったことから、40°C から 70°C において安定した micelle を形成するものと考えられた。次に疎水性領域に結合して蛍光を発する 1,8-ANS (1-Anilino-naphthalene-8-Sulfonic Acid) を用いた解析を行った結果、50°C 以上において ELP-D-C/micelle の蛍光強度の最大値の上昇が認められた。このことから ELP-D-C は、まず 40°C 付近で疎水性の高い ELP 配列を核に疎水性相互作用による micelle を形成し、さらに 50°C 以上で ELP 配列がもつコアセルベーションと呼ばれる特有の分子間相互作用により、より安定な micelle を形成しているものと考えられた。micelle を形成する最小濃度 (臨界ミセル濃度) は 0.1 mg/mL と推定された。分子認識ユニットを持たない ELP-D も、ELP-D-C と同様、加熱により micelle 状の粒子 (ELP-D/micelle) を形成したが、平均粒子径は 50 nm とやや大きく、また転移温度もやや低く 30°C 付近であった。粒子形成ユニット (ELP-D) を持たない Protein G は、ELP-D-C 及び ELP-D で見られた加熱による micelle の形成は認められなかった。このことから、ELP-D 配列はナノ粒子形成に必須であること、また C 配列の付与がナノ粒子のサイズやその形成過程に影響を与えることが明らかとなった。

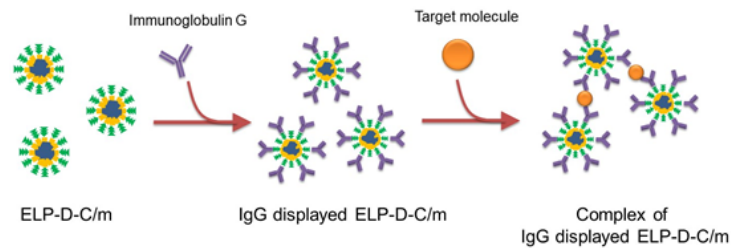
粒子形成過程で行う加熱による ELP-D-C の二次構造及び三次構造への影響を CD スペクトル及び蛍光スペクトルで評価したところ、ELP-D-C は 50°C 以上で構造変化により CD スペクトルが大きく変化するものの、冷却後は巻き戻り、加熱前と同等の CD スペクトルになることが明らかとなった。一方、ELP-D 及び Protein G は加熱による CD スペクトルの変化は見られず、二次構造は安定していると考えられた。即ち C 配列の付与が ELP-D 配列の安定性に大きく影響を与えているものと考えられた。また、ELP-D-C 及び ELP-D の蛍光スペクトルは、加熱により蛍光強度が大きく低下した。特に ELP-D の蛍光強度の低下が顕著であることから、ELP-D-C 及び ELP-D が共通してもつ N 末側のトリプトファンが加熱による micelle 化で大きく変化したためと考えられた。

最後に抗体結合ユニット (C) の抗体結合能力を、Protein G を比較対象とした Competitive ELISA 法で評価したところ、ELP-D-C は Protein G と同程度の抗体結合能を保持していること、加熱後も同程度の抗体結合能を維持することが明らかとなった。

抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子のバイオアッセイ系への応用

このように調製した ELP-D-C/micelle の応用例として、免疫比濁法への適用を検討した。ELP-D-C/micelle に抗体、抗原の順に作用させたところ、ELP-D-C/micelle はナノ粒子表面に提示された抗体結合ユニット (C) を介して抗体を結合し、さらに抗原を介してナノ粒子

間で相互作用することにより、より大きな凝集体を形成することを、溶液の濁度変化として確認した。このときの濁度変化は抗原濃度依存的であることから、ELP-D-C/micelle は濁度を指標に直接的 (Homogeneous) に溶液の抗原濃度を測定できる免疫比濁法 (Turbidity immunoassay) の材料として利用可能であることが明らかとなった。



【結言】

本研究で設計したタンパク質 ELP-D-C は、加熱により抗体結合ユニットを粒子表面に提示する抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子 (ELP-D-C/micelle) を形成することが示された。さらにこの抗体結合ユニットを介して抗体をナノ粒子表面に提示することにより、抗原濃度測定を目的とした免疫比濁法に適用できることが示された。今後、構築したタンパク質ナノ粒子の更なる高感度化、高機能化を図ると共に、薬剤、サイトカインなど機能性低分子のキャリアーとして医療・臨床分野への応用が期待される。

【報文目録】

T. Sugihara, M. Mie, E. Kobatake. “Application of elastin-based nanoparticles displaying antibody binding domains for a homogeneous immunoassay.” *Anal. Biochem.* 544 (2018) pp. 72-79.

【参考文献】

R. Matsumoto, R. Hara, M. Mie, E. Kobatake: “Targeting of EGF-displayed protein nanoparticles with anticancer drugs” *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 102 (2014) pp. 1792-1798.

Y. Fujita, M. Mie, E. Kobatake: “Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain” *Biomaterials*, 30 (2009) pp. 3450-3457.