

2. 公募研究 6) 唾液中の生理活性物質の検出を可能とするセンサーの開発

研究代表者： 仙葉 慎吾（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

研究分担者： 谷村 明彦（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

根津 顕弘（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

【背景】

唾液は非侵襲的に簡単かつ大量に採取できる検体で、その中には様々な生理活性物質や病原体のみならず、乳がんや膵がんなどの腫瘍組織に由来するエクソソームや代謝産物も含んでいる。これらのことから、唾液を用いたリキッドバイオプシーは口腔内の健康状態だけではなく、感染症やがんの超早期発見など様々な全身疾患の診断に有用である可能性が示されている。しかし現在用いられている手法は次世代シーケンサーやPCR、ELISAをベースにしたものが多く、費用や時間がかかる上に専門的な機器や手技を必須とするためクリニックや在宅でのpoint of care testingに用いることは不可能である。簡便な検査法としてイムノクロマトグラフィー法があるが、唾液はムチンなどの夾雑物が多いため感度が低く、広く普及しているとは言い難い。したがって簡便で高感度な唾液検査法の開発が強く望まれている。

近年、抗体の遺伝子情報を元にした組換え抗体の技術が大きく進歩している。抗原認識部位である可変領域（Fv）の重鎖と軽鎖をペプチドリンカーで結合した単鎖可変領域フラグメント（single-chain Fv、scFv）は抗体の最小機能単位であり、高い安定性と可溶性を持ち、バクテリアでの安価大量生産が可能であるなど多くの利点がある。これらの組換え抗体と、タンパク質間相互作用を高感度に検出できる分離型発光タンパク質を用いることで微量タンパク質を検出する新たなセンサーの開発が可能となった。

【目的】

本申請では、唾液中に含まれる生理活性物質や病原体を検出し、唾液検体を用いたリキッドバイオプシーを可能とするセンサーを開発することを目的とする。同一抗原に結合するがその抗原認識部位が異なる2種類の抗体（抗体AおよびB）のscFvに発光タンパク質の構成要素であるペプチド α および β をそれぞれ遺伝子工学的に融合させた組換え抗体を作成する。この二つの抗体が同一抗原に結合すると近接した α と β が会合し分離型発光タンパク質が再構成される。これによって酵素活性が回復するので、それを検出することで検体中の抗原の有無を判定できる（図1）。

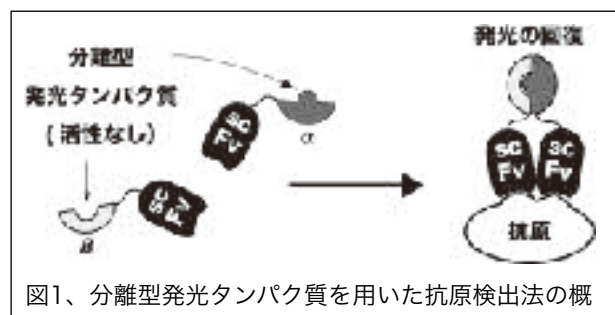


図1、分離型発光タンパク質を用いた抗原検出法の概

【方法】

抗体AおよびBのscFvにペプチド α および β を融合させた遺伝子（それぞれA- α 、B- β ）合成し、哺乳細胞発現ベクターにサブクローニングした。CHO細胞にタンパク質を過

剰発現させ、それぞれのタンパク質に付加したタグに対する抗体（A- α はFLAG、B- β はHA tag）を用いて精製した。

発光の測定は次のように行なった。2 μ Lの抗FLAG抗体ビーズに0.1 nmolのA- α を固定したのち、このビーズと種々の濃度の抗原を反応させた。ビーズを洗浄したのち1.0 nmolのB- β と反応させ、発光をルミノメーターで計測した。

【結果と考察】

A- α を固定化したビーズに0.01 nmolの抗原を反応させた時の発光量の変化を図3に示した。抗原非存在下では発光量はバックグラウンドと同等の150 RLU程度であった。一方、抗原存在下では2500 RLU以上に増加した。このことから、抗原を介することではじめて分離型発光タンパク質の再構成が起こるものと思われた。

次に、本検出法による抗原検出感度を調べるため、加える抗原の濃度を変えて同様の実験を行なった。図4に示すように、10 ng (0.36 pmol、反応液中の濃度は0.1 μ g/mL) の抗原の存在下で相対発光量の上昇が見られた。また、各反応ステップにおけるビーズの洗浄をすべて省略しても同様な発光量の上昇が見られた。一般的な標識抗体を用いた検出法では、抗原との結合に関与しなかった標識抗体を反応系から除去する必要がある。これは標識抗体からの反応が抗原に結合した抗体によるものなのか、結合しなかった抗体によるものなのか判別不可能なためである。しかし、本研究で作成したセンサーでは二つの抗体が同一抗原に結合して十分に近接しない限りは酵素活性が回復しないため、抗原との結合に関与しなかった抗体を除去する必要はない。このことは、検査手法の簡便化や検査時間の短縮に寄与するものである。

今後、本研究をもとにタンパク質のみならず、相補的な塩基配列のハイブリダイゼーションを利用したcell free DNAや、唾液エクソソーム中のmicro RNAの検出にも応用したいと考えている。

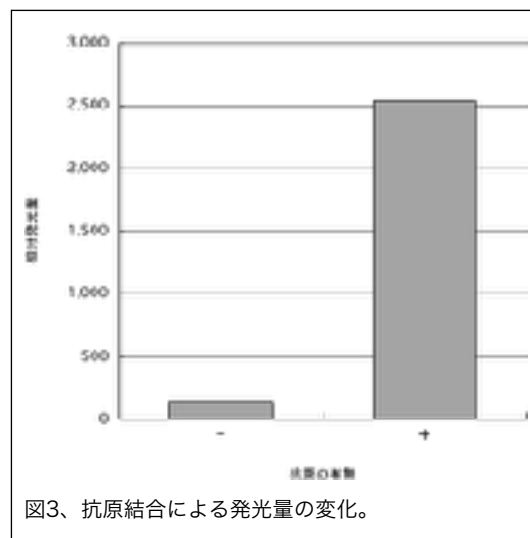


図3、抗原結合による発光量の変化。

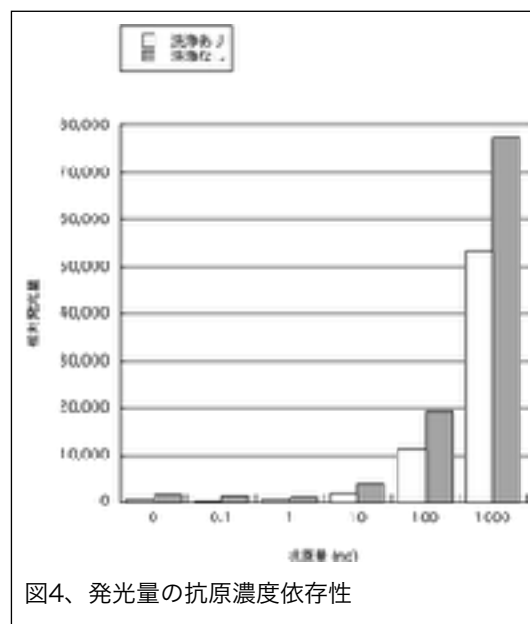


図4、発光量の抗原濃度依存性