

報告番号	※ 甲 第 10589 号
------	---------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 Antibody Binding Peptides and its Applications to Antibody Purification and Homogeneous Detection (抗体結合ペプチドの探索と抗体精製及びホモジニアス検出への応用)

氏 名 杉田 智哉

## 論 文 内 容 の 要 旨

ペプチドは、アミノ酸を数種類含む、分子量 1,000-10,000 Da 程度の分子であり、ヒトの体内における複雑な生物学的反応（細胞機能、シグナル伝達、免疫機構など）を調整している。これらのペプチドの多くは、プロテアーゼやペプチダーゼといった酵素によって分解されるタンパク質由来の成分であり、その生物学的な機能は様々なレセプターに結合することによって発揮される。何十年にもわたる研究の中で、数多くの生理活性ペプチド（ホルモンペプチドなど）が、活性を指標とする分離、検出法によって発見・同定されている。このようなペプチドは、その機能性や生体適合性から、製薬や化粧品、そして機能性食品の分野において幅広く活用されている。

近年では、ペプチドが、様々なターゲットに対して厳密な分子認識能力を持つことや様々な環境下において安定であるという性質が注目されるようになり、生体内におけるシグナル分子としてだけでなく、タンパク質の精製用タグや検出用プローブとしての利用が期待されるようになってきている。例えば、His タグ ((His)6-10) や FLAG タグ (DYKDDDDK) などは、ペプチドを精製タグとして利用した最も代表的な例であり、発現させたタンパク質の構造や機能への影響が少ないタグ分子として広く利用されている。また、最近では、抗体のエピトープやミモトープペプチドを用いることで、抗体精製を実施する例も報告されている。一方、検出プローブの応用としては、異なる二つの蛍光分子の距離に依存して蛍光強度が変化する Forster resonance energy transfer (FRET) や、photoinduced electron transfer (PeT) といった蛍光分子の特性を利用したペプチドプローブの研究が盛んであり、蛍光ラベル化したターゲット認識ペプチドプローブを用いたがんのイメージングや心疾患のバイオマーカー（トロポニン I や T）の検出、さらには HIV 抗体の検出などが報告されている。

このようにペプチドは、様々なタンパク質の精製・検出分子として注目される分子であるが、その中でも抗体精製用ペプチドリガンドの開発や簡便に抗体検出が可能なペプチドプローブの開発は最も期待される応用の一つである。その理由は、それぞれ以下の通りである。

現状の抗体医薬生産などに用いられる抗体精製用リガンドはプロテイン A であるが、プロテイン A は数多くの問題があり、結果としてコストがかかるという問題がある（製造コスト全体の 30-50 % を占める）。例えば、プロテイン A は、Staphylococcus aureus の膜タンパク質で、IgG や IgA, IgM の Fc 領域に結合するため、抗体精製に幅広く使用されているが、その作製と単離・精製に費用がかかる。また、宿主成分のコンタミネーションがないことを保証するために数多くの品質検査が必要であること、プロテイン A 自体が厳しい溶出条件にて劣化や変性してしまうこと、洗浄条件における安定性が悪いこと、さらには最終製品にコンタミネーションしてしまう恐れがあるといった問題点も存在する。タンパク質の改変技術によって多くの問題が解決されるようになってきたが、依然としてタンパク成分ではない新しい代替リガンドの開発が求められている。そこで注目されているのが安価に合成可能で、化学的な安定性があり、そして生体適合性のあるペプチドによるリガンドである。これまでに、プロテイン A 模倣配列である (RTY)4K2KG や環状の (CFHH)2KG といった様々なペプチドリガンドが報告されているが、これらのペプチドリガンドは結合容量や特異性に課題があるため、実用化には至っていない。したがって、さらなるスクリーニングが必要であるとされている。

また、抗体検出用プローブが注目される理由としては、一般的に抗体検出に用いられる ELISA などの方法は手間がかかるといった問題が存在するためである。病気の診断において、血中などのサンプル中の抗体量を測定する場合には、ELISA が用いられるが、ELISA は固相反応場を用いたヘテロジニアスな検出であるため、多段階の操作が必要となる。また、長い反応時間や洗浄操作が必要なことが欠点として挙げられており、より簡易で迅速な測定方法が求められている。そこで、注目されているのが蛍光分子を用いたホモジニアス検出である。ホモジニアスな検出方法は、固相場や洗浄操作、そして長い反応時間を必要としないため、簡易で迅速なターゲット検出が可能である。したがって、蛍光ラベル化した抗体認識ペプチドプローブは簡易で迅速な抗体検出方法として期待されている。これまでに、抗体のエピトープペプチドの N, C 末端に異なる二つの蛍光分子を付加した抗体検出ペプチドプローブがいくつか報告されているが、これらの抗体検出法は、コンフォメーション変化が誘導されるペプチドの場合のみに有効であり、すべての抗体分子の検出に適用できないという問題が存在する。したがって、ユニバーサルに利用可能なホモジニアス抗体検出プローブの開発も望まれている。

以上のような理由から、本論文では、抗体をターゲットとし、抗体精製用ペプチドリガンドの開発と簡易で迅速な抗体検出用ペプチドプローブの開発を目指した。本論文では、背景を記述した第 1 章に引き続き、抗体に結合するペプチドの探索と精製用リガンドの開発（第 2 章）、またそのペプチドを用いたホモジニアス抗体検出用ペプチドプローブの開発（第 3, 4 章）を行った。以下に各章の具体的な内容を述べる。

第 2 章では、Protein A に替わる新規リガンドの開発を目的とし、IgG に対して高結合性を有するペプチドの探索とそのペプチドの IgG 精製用リガンドとしての有用性を評価した。1st スクリーニングでは、IgG-Fc gamma Receptor の細胞外ドメイン配列を切り出したペプチドライブラリを作製し、そのライブラリから IgG に高結合するペプチド領域を同定し

た。さらに、2nd, 3rd スクリーニングでその配列のスクランブル化や残基置換をすることで、さらなる高結合化を目指した。その結果、IgG-Fc に対して高結合性を有する2種類のペプチド配列 (NKFRGKYK, NARKFYKG) の取得に成功した。次に、この2種類のペプチドを樹脂に直接合成し、IgG-Fc の精製を行った。その結果、IgG-Fc を選択的に吸着させることに成功し、pH4.0 の酢酸緩衝液で80%以上の結合抗体を回収することができた。以上の結果より、本研究でデザインされた2種類のペプチドはIgG-Fc の精製が高回収率で可能であり、抗体精製用リガンドとして有用であることが示された。

第3章では、IgG 抗体をホモジニアスに検出する系の開発を目的とし、第2章で得られたIgG 結合ペプチド (NKFRGKYK) に、相補的に結合することで消光を誘導する相補クエンチペプチドのデザインを行った。そして、その相補クエンチペプチドと蛍光ラベル化したIgG 結合ペプチドの2分子を用いたホモジニアス抗体検出系を構築した。原理としては、IgG 非存在下ではペプチド同士が結合によって蛍光分子とクエンチャーが近接するため消光する一方で、IgG 存在下ではそのペプチド間の相互作用が阻害されるため蛍光を発するという仕組みである。本研究では、蛍光分子として Atto655、クエンチャー分子としてトリプトファンを選択した。

相補ペプチドは、IgG-Fc の配列を基に作製したIgG-Fc 完全網羅ペプチドライブラリから探索した。その結果、Atto655-NKFRGKYK と強く相互作用する2種類のペプチド (NWYVDGVE, DIAVEWES) を取得した。次に、消光能の高い相補クエンチペプチドをデザインするために、それぞれのペプチドのN末端、C末端に1~3残基のトリプトファンを付加した相補クエンチペプチドをデザインした。各配列の Atto655-NKFRGKYK に対する消光能を評価した結果、DIAVEWES のN末端にトリプトファンを3残基付加した WWWG-DIAVEWES において最も消光が強く確認された。また、その消光は濃度依存的であり、消光反応は30秒で完了することもわかった。この相補クエンチペプチド (WWWG-DIAVEWES) と Atto655 ラベル化抗体結合ペプチド (Atto655-NKFRGKYK) を用いて抗体検出を行った結果、抗体濃度依存的に蛍光強度が増加し、10nM からの抗体検出に成功した。以上の結果より、本研究でデザインした相補クエンチペプチド (WWWG-DIAVEWES) と Atto655 ラベル化抗体認識ペプチド (Atto655-NKFRGKYK) の2分子を用いることで、迅速なホモジニアス抗体検出が可能であることを実証した。

第4章では、第3章同様にIgG のホモジニアス検出を目的とし、第2章で得られたNKFRGKYK と第3章で得られた相補ペプチド (DIAVEWES) を一分子として合成したペプチドビーコンを開発した。N末端とC末端に、それぞれ Atto655 とトリプトファンを付加させることで、抗体非存在下ではモレキュラービーコンの様に閉じた構造をとり消光する一方で、抗体存在下では開いた構造をとるため蛍光を発するペプチドビーコンの開発をした。まず、DIAVEWES のC末端に付加するトリプトファン数を最適化するために、1~5残基のトリプトファンを付加した相補クエンチペプチドをペプチドアレイ上に合成し、Atto655-NKFRGKYK の消光度を評価した。その結果、トリプトファンを4残基付加した DIAVEWEGWWW が最も効率的に消光させることができることがわかった。次に、Atto655 ラベル化抗体結合ペプチドと相補クエンチペプチドを、GGG リンカーを介して1分子として合

成した Atto655-NKFRGKYK-(GGG)<sub>2</sub>-DIAVEWEW-GWWWW を作製し、このペプチドビーコンを用いた抗体検出を行った。その結果、pH3.0 の溶液中にて抗体を検出することができ、その検出限界は 50nM であった。以上の結果より、本研究でデザインしたペプチドビーコンは、抗体非存在下では閉じた構造をとり消光するが、抗体存在下では開いた構造をとり蛍光を発することが示され、抗体のホモジニアス検出に有用であることが示された。

以上のように、本論文では IgG に結合するペプチドを探索し、それらのペプチドを抗体精製用リガンドとして (2 章)、またホモジニアス抗体検出用プローブとして応用した (3, 4 章)。本論文で開発されたペプチドリガンド、そしてペプチドプローブは、これまでになく利便性があり、従来の問題点を克服する十分な可能性を秘めている。今後、これらのペプチドや抗体検出用ペプチドプローブが、新規リガンドとして応用され抗体生産コストの低減につながることで、また新たな簡易・迅速診断ツールとして応用されることを期待している。