

2024年10月21日

東京科学大学

株式会社バイオダイナミクス研究所

抗体と混ぜるだけで洗浄不要の免疫測定法を実現する 新たな測定素子を開発

ー臨床診断や環境モニタリングへの応用を期待ー

【ポイント】

- 抗体と混ぜるだけで迅速かつ高感度に抗原を検出できる OpenGUS プローブを開発
- 検出したい抗原に応じて抗体を自由に選択可能
- 臨床検査や環境調査におけるハイスループット検出やオンサイト検出に貢献

【概要】

東京科学大学 (Science Tokyo) *総合研究院 化学生命科学研究所の北口哲也准教授と朱博助教、安田貴信助教らの研究チームは、同リベラルアーツ研究教育院の永岑光恵教授、株式会社バイオダイナミクス研究所の山崎侑彦研究員と共同で、市販の抗体と混ぜるだけでさまざまな抗原を迅速かつ高感度に検出できる OpenGUS プローブの開発に成功しました。

免疫測定法 (用語 1) は、学術研究にとどまらず多岐にわたる分野で検体に含まれる微量の物質を検出するために利用されています。その中でも、**ホモジニアス免疫測定法** (用語 2) は未反応物を除去するための洗浄操作を行うことなく、検体内の抗原を検出することができるため、大規模な検体数を扱うハイスループット検出や、短時間での測定が要求されるオンサイト検出に適しています。しかし、ホモジニアス免疫測定法のための測定素子を新たに開発するには緻密な分子設計と試行錯誤が必要であり、多大な労力と時間がかかるという問題がありました。

本研究では、**プロテイン A** (用語 3) 由来の抗体結合ドメインと **β -グルクロニダーゼ (GUS)** (用語 4) 由来の酵素スイッチを組み合わせることで、抗体の改変や修飾といった最適化に時間の要する手法や工程なしにホモジニアスに抗原を検出できる測定素子として、OpenGUS プローブを開発しました。この OpenGUS プローブは抗体を取り換えることで、日本スギ花粉のアレルゲンである **Cry j 1** (用語 5) や炎症マーカーである **ヒト C 反応性タンパク (hCRP)** (用語 6)、**ヒトラクトフェリン (hLF)** (用語 7) を高感度に検出できました。このように、この免疫測定法は標的分子に応じて柔軟にカスタマイズできるという特長をもっているため、臨床検査や環境調査、食品分析など、幅広い分野での応用が期待されます。本研究成果は、9月23日付の「*Biosensors and Bioelectronics*」にオンライン掲載されました。

*2024年10月1日に東京医科歯科大学と東京工業大学が統合し、東京科学大学 (Science Tokyo) となりました。

●背景

免疫測定法は学術研究から臨床診断、環境モニタリング、食品の安全衛生管理などで長い間活用されており、未反応物を除去するための洗浄操作の有無によってヘテロジニアス免疫測定法（洗浄操作有り）とホモジニアス免疫測定法（洗浄操作なし）の2つに分類できます。ELISA に代表されるヘテロジニアス免疫測定法と比較してホモジニアス免疫測定法は簡単な操作で迅速に測定結果を得られるため、ポイントオブケア診断やハイスループット検査に適していることが知られています。しかしながら、標的分子をホモジニアスに検出できる新たな測定素子の開発には、毎回緻密な分子設計が求められ、目標とする検出感度に達するまでに多くの試行錯誤を要するため、膨大な労力と時間がかかるという課題がありました。そこで本研究では、検出したい抗原を認識する抗体と混ぜるだけでホモジニアス免疫測定が可能になる測定素子として OpenGUS プローブを開発し、さまざまな抗原を検出することに成功しました。

●研究成果

本研究で開発した OpenGUS プローブは、四量体で活性型となる酵素 GUS (β -グルクロニダーゼ)の単量体と抗体結合タンパク質 Protein A の一部である Z ドメイン(ZD)、フィブロネクチン III 型の 7 - 8 ドメイン (Fn7 - 8) で構成されます (図 1A-B)。今回用いる GUS 単量体は M516K と Y517W への変異導入により通常は二量体で存在しており、分子間相互作用などを利用して四量体へと会合させることで酵素活性を示す、本研究グループで独自に開発した酵素スイッチです。Fn7 - 8 の長さは 2 つの ZD が抗体の定常領域をちょうど挟み込める約 7 nm に調節しました。作動原理としては、OpenGUS プローブと結合した抗体が抗原結合によって会合するのに伴って四量体 GUS が形成され、酵素活性が回復することで、標的分子の検出が可能となることを期待しています。そして、使用する基質を変更することで、感度の高い蛍光検出と裸眼でも観察可能な比色検出を選択できるという特長もあります。

本研究では、まずシグナル/バックグラウンド比 (S/B 比) の上昇、すなわち酵素スイッチとしての機能のさらなる向上を試みました。具体的には、GUS の四量体化に重要と考えられる対角界面残基 (514 番目の His) に新たに点変異を導入した変異体をいくつか作製し、これらの中から変異導入前よりも高い S/B 比を示す H514A 変異体を見出しました。加えて、反応溶液に添加する有機溶媒の種類、塩や界面活性剤の濃度を最適化したところ、日本スギ花粉の主要アレルゲンの 1 つである Cry j 1 を高い S/B 比で検出できました (図 1C)。

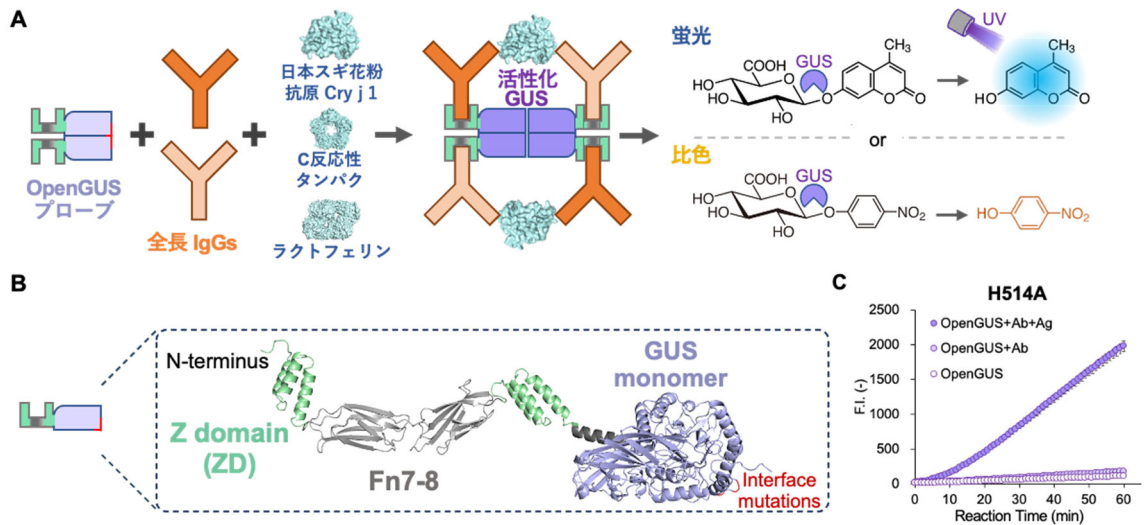


図 1. (A) OpenGUS プローブを用いた免疫測定法の作動原理 (B) OpenGUS プローブの分子デザイン (C) GUS の H514A 変異体における Cry j 1 の検出 Ab : 抗体 ; Ag : 抗原

DOI : 10.1016/j.bios.2024.116796 より一部改変

続いて、OpenGUS プローブを用いた免疫測定法の汎用性を検討するために、Cry j 1 だけでなく、炎症マーカーであるヒト C 反応性タンパク (hCRP)、ヒトラクトフェリン (hLF) の検出も行いました。OpenGUS プローブとそれぞれの抗原を認識する市販抗体を混合し、さまざまな濃度の抗原を添加して濃度依存曲線を描いたところ、Cry j 1 の検出限界および最大応答は、蛍光検出では 1.4 nM および 12 倍、比色検出では 4.2 nM および 9 倍 (図 2A-B) でした。また、hCRP の検出限界および最大応答は 0.17 nM および 21 倍 (蛍光検出)、1.0 nM および 12 倍 (比色検出) であり、hLF の検出限界および最大応答については 0.075 nM および 12 倍 (蛍光検出)、1.0 nM および 25 倍 (比色検出) でした (図 2C-F)。検出できた hCRP と hLF の濃度は報告されている健常人の血中濃度と同程度かそれよりも数桁低く、OpenGUS プローブを用いた免疫測定は実用に足る十分な感度で抗原を検出できることが分かりました。

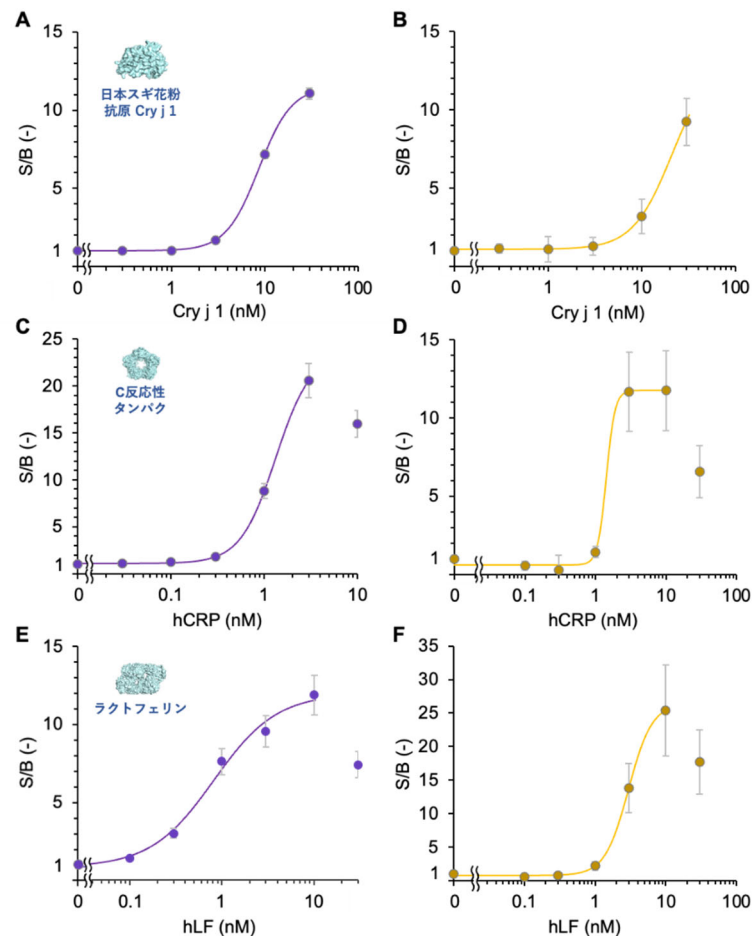


図 2. OpenGUS プローブを用いてさまざまなタンパク質を蛍光検出（左）あるいは比色検出（右）したときの濃度依存曲線。日本スギ花粉のアレルゲン Cry j 1 (A, B)、ヒト C 反応性タンパク hCRP (C, D)、ヒトラクトフェリン hLF (E, F)

DOI : 10.1016/j.bios.2024.116796 より一部改変

さらに、実用化への可能性を探るべく、実サンプルまたはそれを模倣した夾雑物を多く含む検体において OpenGUS プローブを用いた標的分子の検出を検証しました。まず、日本スギ花粉を破碎し、その検体に含まれる Cry j 1 を OpenGUS プローブと ELISA の 2 つの方法で定量し比較したところ、良好な正の相関 ($R^2 > 0.95$) が確認され、この免疫測定法の有効性が立証されました (図 3A)。また ELISA では 3 時間かかった測定時間は 15 分で完了できており、迅速性において優位性がありました。次に、ウシ血清に異なる濃度の hCRP を添加し、OpenGUS プローブで定量した濃度と、添加した hCRP 濃度を比較したところ、強い正の相関 ($R^2 > 0.95$) がありました。すなわち、生体試料のような多くの異なる夾雑物を含む検体においても本手法が有効であることが示されました (図 3B)。さらに、ヒト唾液サンプル中の hLF 濃度を ELISA により測定し、

正常サンプル ($\leq 14.9 \mu\text{g}$) と高濃度サンプル ($>14.9 \mu\text{g}$) に分類したところ、この分類は OpenGUS プローブにおいても有意に区別できました (図 3C)。これらの結果により、夾雑物を多く含む実サンプルにおいても、OpenGUS プローブを用いたホジニアス免疫測定法が高い有効性を持つことが示唆されました。この免疫測定法は、洗浄のような煩雑な操作を必要とせず、迅速かつ正確に標的分子を検出でき、さらに抗体を取り換えることで多岐にわたる抗原に対応できることから、今後の迅速診断や環境モニタリングといった多様な分野での応用が大いに期待されます。

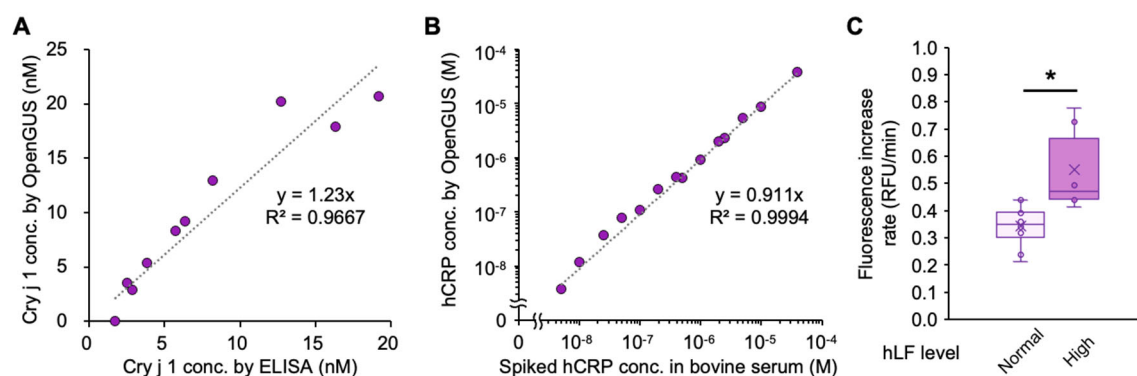


図 3. (A) 日本スギ花粉破砕液に含まれる Cry j 1 の検出 (B) ウシ血清に添加した hCRP の検出 (C) ヒト唾液サンプルに含まれる hLF の検出 DOI : 10.1016/j.bios.2024.116796 より

●社会的インパクト

本研究で開発した Open GUS プローブを用いることで、迅速・高感度・低コストなホジニアスな免疫測定を行うことができます。本手法を発展させた免疫測定キットが ONEPot Immunoassay Kit <OpenGUS Method> としてフナコシ株式会社より販売されており、臨床検査や環境調査におけるハイスループット検出やオンサイト検出など簡便な操作で迅速に検査結果が要求される場面での活躍が期待されます。

●今後の展開

生体試料に含まれる夾雑物の影響を受けにくくするために、検出抗体への特異性を向上させた次世代の OpenGUS プローブの開発を進めています。状況に応じて必要であった検体の前処理が不要になることで、OpenGUS プローブの適用範囲がさらに広がることが期待されます。

●付記

本研究は、科学研究費助成事業 (課題番号 : JP22H05176, JP24K01264, JP21K14468, JP24H01123)、中谷医工計測技術振興財団開発研究助成、三島海雲記念財団学術研究奨励金、東京工業大学科学技術創成研究院のプレ研究ユニット制度の支援を受けて行われ

ました。

【用語説明】

- (1) **免疫測定法**：抗原と抗体の反応を利用して、抗原あるいは抗体を検出・定量する手法の総称。
- (2) **ホモジニアス免疫測定法**：抗原や抗体は蛍光色素や酵素などで標識されており、未反応物は通常バックグラウンドの原因となるが、特別な工夫により、未反応物を分離するための洗浄操作を不要にした免疫測定法。
- (3) **プロテイン A**：幅広い動物種の抗体の Fc 領域に結合する *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) の細胞壁に存在するタンパク質。
- (4) **β -グルクロニダーゼ (GUS)**：D-グルクロン酸の β 型配糖体のグルクロニド結合を加水分解する酵素。
- (5) **Cry j 1**：日本スギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉の主要アレルゲンの 1 つ。
- (6) **ヒト C 反応性タンパク (hCRP)**：体内で起こる炎症反応に伴って血中で増加するタンパク質で、炎症や感染症の指標として使われる。
- (7) **ヒトラクトフェリン (hLF)**：母乳、唾液、涙などの外分泌液中に含まれるタンパク質で、免疫機能を助ける働きがある。

【論文情報】

掲載誌：*Biosensors and Bioelectronics*, 267, 116796 (2025)

論文タイトル：Customizable OpenGUS immunoassay: A homogeneous detection system using β -glucuronidase switch and label-free antibody

著者：Bo Zhu[#], Yukihiro Yamasaki[#], Takanobu Yasuda, Cheng Qian, Zhirou Qiu, Mitsue Nagamine, Hiroshi Ueda, Tetsuya Kitaguchi*

DOI：10.1016/j.bios.2024.116796

[#] Equal contributions

【研究者プロフィール】

北口 哲也 (キタグチ テツヤ) Tetsuya Kitaguchi

東京科学大学 総合研究院 化学生命科学研究所 准教授

研究分野：免疫測定、バイオイメージング、タンパク質工学

【お問い合わせ先】

(研究に関すること)

東京科学大学 総合研究院 化学生命科学研究所 准教授

北口 哲也

Email: kitaguc.t.aa@m.titech.ac.jp

TEL: 045-924-5270

FAX: 045-924-5248

(報道取材申し込み先)

東京科学大学 総務企画部 広報課

申し込みフォーム : <https://forms.office.com/r/F3shqsN7zY>



Email: media@ml.tmd.ac.jp

TEL: 03-5734-2975 FAX: 03-5734-3661

株式会社バイオダイナミクス研究所

Email: techservice@biodynamics.co.jp

TEL: 03-5803-9983 FAX: 03-5684-6270