

## 一本鎖 DNA 結合タンパク質 gp32 に対する抗体のスクリーニング

日大生産工（院） ○安田弥奈      日大生産工 Pham Thi Kim Ngan  
京女大家政 平川由紀 門間敬子      京大院農 保川清      日大生産工 吉宗一晃

### 1. まえがき

感染症は非常に身近な疾患でありながら、ひとたび流行すると人々の健康のみならず、社会や経済活動にも深刻な影響を及ぼす。2019年に発生した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、急速に世界中へ拡大し、世界保健機構（WHO）によって国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態（PHEIC）が宣言されるほどの事態となった。各国では渡航制限や外出制限などの措置が講じられ、人の移動が制限された。それに伴い生産活動や物流が停止し、物資不足や経済活動の停滞が生じた。現在、PHEICは解除され、経済活動もCOVID-19流行前の水準に回復しつつあるものの、いまだ感染例は報告されており、将来的に新たな感染症が再び流行する可能性も否定できない。

感染症は一度流行するとその制御が極めて困難であるため、発生の初期段階で感染を的確に把握し、迅速に対応することが求められる。したがって、感染拡大の抑制には感染症の早期診断が極めて重要であり、診断法には高感度性・迅速性・簡便性・低コスト性が求められる。

実際にCOVID-19の診断には、主にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）と抗原検査が利用されている。PCRはウイルスや細菌由来の核酸を増幅して検出する手法であり、非常に高い感度を有する。しかし、専門的な機器や技術を必要とするため検査コストが高く、現場で迅速に結果を得ることが難しいという課題がある。一方、抗原検査は検体中のウイルスや細菌（抗原）を抗体によって直接検出する手法であり、検査キットの操作方法が簡便であるため、検査コストが低く、現場で即時結果を得ることができる。しかし、感度はPCRに劣り、特に感染初期での検出が困難であるという課題がある。

それぞれの感染症診断法には長所と短所があり、高感度性・迅速性・簡便性・低コスト性

のすべてを兼ね備えた手法が診断方法が必要である。

したがってこれらの要件を総合的に満たす新たな感染症診断技術の開発を目指し、T4ファージ由来の一本鎖DNA結合タンパク質gp32および抗gp32抗体を利用したDNA検出法の構築を試みた。DNAよりもサイズが大きいgp32を介してDNAを認識させることで、抗体が結合できる部位を増やし、DNAを直接抗体で検出する場合と比較して検出感度の向上が期待できる。これが実現できれば、増幅された核酸を抗原検査のような簡便な方法で検出が可能となる。

この検出系の鍵となるgp32は、コアドメイン、N末端ドメインおよびC末端ドメインから構成される。コアドメインにはDNA結合部位が存在し、通常このDNA結合部位はC末端ドメインによって覆われているが、DNA結合時にはC末端ドメインの立体構造が変化し、DNA結合部位が露出する（Fig. 1）<sup>1)</sup>。また、C末端ドメインには抗gp32抗体の結合部位が存在する<sup>2)</sup>。そのため、DNA結合によるC末端ドメインの立体構造変化は、gp32に対する抗体結合性に影響を及ぼす可能性がある。

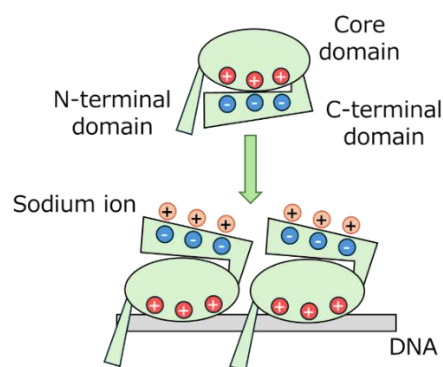


Fig. 1 DNA結合によるgp32の構造変化

このような構造的特徴に基づき、当研究室ではこれまでに、DNA結合に伴うgp32の立体構

Screening for Antibodies against the Single-stranded DNA-binding Protein Gp32

Mina YASUDA, PHAM Thi Kim Ngan, Yuki HIRKAWA, Keiko MOMMA,  
Kiyoshi YASUKAWA and Kazuaki YOSHIMUNE

造変化がgp32と抗gp32抗体との結合性を低下させることを明らかにしてきた<sup>3)</sup>。モデルDNAとして二本鎖DNAはλDNAを、一本鎖DNAはPrimerを用い、gp32と抗gp32モノクローナル抗体MGP45の結合性を、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって評価した。その結果、λDNA濃度の上昇に伴い、gp32とMGP45の結合性が低下することが確認された (Fig. 2)。

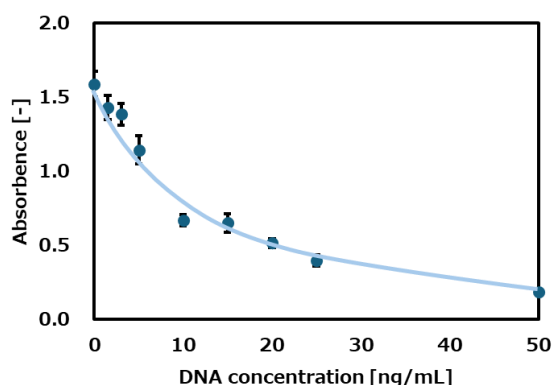


Fig. 2 DNA濃度に依存したgp32に対するMGP45の結合性低下

この結果から、DNA濃度に依存したgp32と抗gp32抗体の結合性低下を利用し、試料中のDNAを抗体で間接的に検出できる可能性が示唆された。

この方法は検出対象であるDNAの存在下で抗体結合が生じないことを指標としてDNAを検出するものである。一方で、従来の抗原検査は、抗原存在下で抗体結合が生じることを指標として抗原を検出する方法である。これらの検出原理は対照的であるため、医療現場において混乱を招く可能性がある。

以上の知見を踏まえ、DNA存在下で抗体結合性が向上する抗体の作製を試みた。本研究では、gp32の抗体結合部位が存在するC末端ドメインペプチドを用いてマウスを免疫化し、得られた複数のモノクローナル抗体のスクリーニングを実施した。

## 2. 実験方法

gp32のC末端ドメインペプチドgp32\_C30 (NH<sub>2</sub>-TKTEDDFMSSSSGSSSSADDTDLDDLNDL-COOH) を抗原としてマウスを免疫

化し、得られたモノクローナル抗体のスクリーニングをELISAにより行った。

ELISAは、試料溶液中の目的抗原を特異抗体で捕捉するとともに、酵素反応を利用して検出、定量する方法である。

まず、gp32を0.2 mM HEPES pH7.0および0.1% Triton X-100を含む混合溶液を用いて3.0 μg/mLに希釈・懸濁し、これをgp32混合液とした。次に、このgp32混合液に目的濃度となるように調製したλDNAおよびPrimerを添加し、gp32の終濃度が0.15 μg/mLとなるように調製した。こうして得られた試料溶液をELISAに供し、gp32と抗gp32モノクローナル抗体の結合性を吸光度測定により評価した。

## 3. 実験結果

gp32\_C30を抗原としてマウスを免疫化した結果、MGP3, 8, 10, 11, 16, 19, 21, 22の計8種のモノクローナル抗体が得られた。得られた抗体を用いてELISAを実施したところ、gp32に対して明確な抗体結合を確認したのはMGP19のみであった。

さらに、MGP19のDNA結合型gp32に対する結合性を評価したところ、DNA濃度上昇に合わせて抗体結合性が低下する、MGP45のような傾向が見られた。

以上の結果から、本研究の目的であるDNA存在下での抗体結合性が向上する抗体は得られなかった。

今後は、C末端ドメインペプチドに加えて、N末端ドメインペプチドによる免疫化から得られる抗体についても検討していく予定である。

## 参考文献

- 1) Pant, K. *et al.*, *PLoS One*, **2018**, *13* (4), e0194357
- 2) Krassa, K. B. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**, *88* (9), 4010-4014
- 3) Yasuda, M. *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **2025**, *89* (5), 728-732