

2025年4月30日

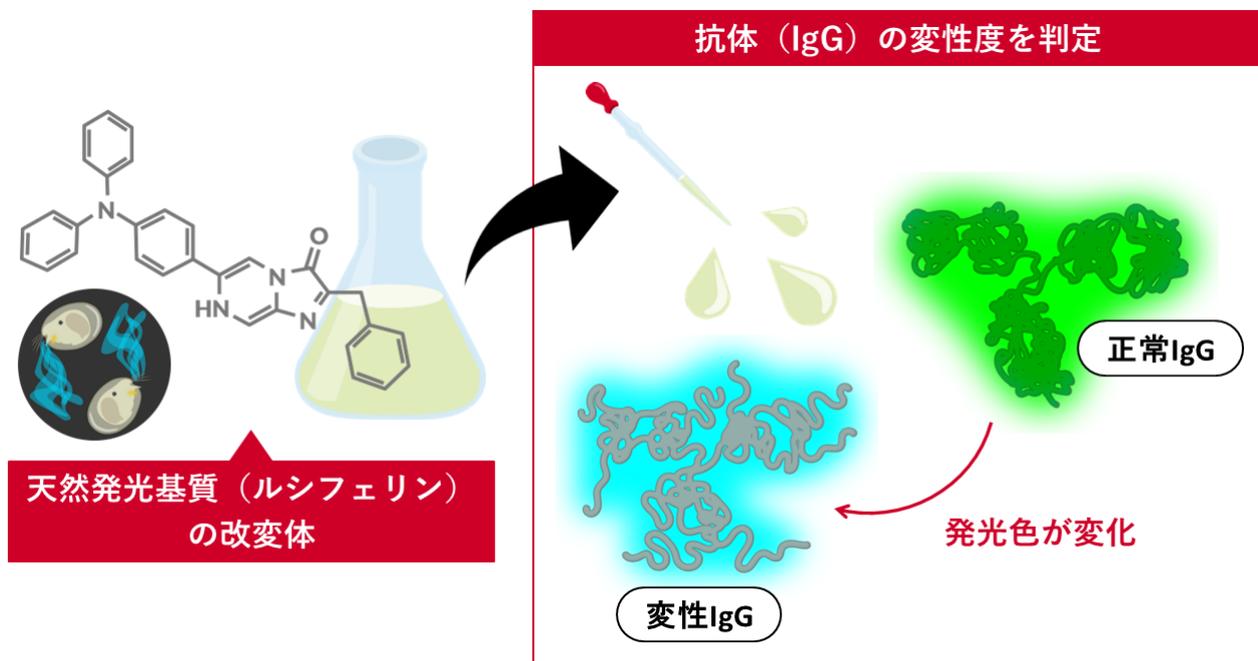
国立研究開発法人 産業技術総合研究所 / 慶應義塾大学 / 国立研究開発法人 科学技術振興機構

抗体の変性度を色で判定

IgG の構造に応じて発光色を変えるルシフェリンを開発

ポイント

- 免疫グロブリン G (IgG) を発光反応の触媒とする天然ルシフェリンの改変体を開発
- IgG の構造に応じて発光色を変化させることに成功
- 変性度を迅速・簡便に判定できるため、抗体の品質管理への応用に期待



天然ルシフェリンの改変体は抗体の構造状態を反映して発光色を変化させる

概要

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 (以下「産総研」という) 健康医工学研究部門 西原諒 主任研究員、木原良樹 テクニカルスタッフ (研究当時)、栗田僚二 研究部門付は、慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科 山本詠士 准教授、同大学院理工学研究科 平野秀典 特任准教授と共同で、治療や診断などに広く使用される抗体である免疫グロブリン G (IgG) と反応し、IgG の構造に応じて発光色を変える発光基質 (ルシフェリン) を開発しました。

抗体は、生体内においてウイルスや細菌を認識し、排除する役割を担っており、診断薬や治療薬としても広く利用されています。しかし、抗体は製造・保存・使用の各過程で環境の影響を受けやすく、変性すると本来の機能が失われてしまいます。

本研究では、抗体の一種である IgG がルシフェリンの発光反応を触媒する「擬似ルシフェラーゼ活性」を持つことを初めて発見しました。また、それを利用した IgG の変性検出技術を開発しました。この新規に設計、合成したルシフェリンの発光波長は IgG の構造に応じて変化するため、これを測定することで IgG の変性度を簡便かつ定量的に評価できます。本手法は従来の蛍光分析法よりも高い感度を持ち、開発したルシフェリンを混合するだけで 3 分以内に測定が完了するため、IgG に関連した抗体医薬品の品質管理や診断薬開発への貢献が期待できます。

なお、この技術の詳細は、2025 年 4 月 30 日に「*Analytical Chemistry*」に掲載されます。

下線部は【用語解説】参照

開発の社会的背景

IgG などの抗体は、生体内においてウイルスや細菌を認識・排除する重要な役割を担い、診断薬や治療薬としても広く利用されています。しかし、抗体の構造は保存条件や環境の影響を受けやすく、変性が進行すると本来の機能が損なわれます。抗体の変性は、製品の安全性と有効性に影響を与えるため、変性の進行状況をモニタリングする必要があります。現在、抗体の変性評価には、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、動的光散乱 (DLS) などの分析法が用いられています。しかし、これらの分析手法は専門的な知識と技術が必要です。そのため、抗体の変性度をより簡便かつ迅速に評価できる手法の開発が求められていました。

研究の経緯

産総研は、ホタル発光酵素のような発光酵素機能を持たないと考えられてきた天然タンパク質でも、特異な化学構造を持つ発光基質に対して、擬似的な発光酵素活性を持つことを世界に先駆けて報告してきました*1。例えば、ウミホタルのルシフェリンが、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質と特異的に反応して発光することを見いだしました (2024 年 1 月 17 日 産総研プレス発表)。この発光反応はスパイクタンパク質でのみ観察されるため、ルシフェリンを混ぜるだけで、ヒト唾液中の新型コロナウイルスのスパイクタンパク質濃度を 1 分で測定することが可能です。またその精度は、酵素免疫測定法 (ELISA) と同等であったことから、全く新しいタンパク質分析手法としての展開が期待されています。

今回、ウミホタルのルシフェリンに含まれるイミダゾピラジノン環に化学修飾を施した基質類縁体が、IgG と発光することを見いだしました。

本研究開発は、国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業さきがけ「細胞の動的高次構造体」課題名：発光反応場を構成するペプチドプローブ開発 (JPMJPR20EB) (2020~2024 年度)、非膜性構造体内部における分子挙動の階層統合的理解 (JPMJPR22EE) (2022~2025 年度)、独立行政法人 日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業「若手研究」(22K14802) (2020~2024 年度)、「基盤研究 B」(22H02114) (2022~2024 年度) による支援を受けています。

研究の内容

(1) IgG と発光反応を起こすルシフェリンの設計と合成

本研究では、IgG の変性に伴う構造変化に応じて発光波長が変化するルシフェリンの分子設計を行いました。ウミホタルをはじめとする多くの海洋性発光生物は、イミダゾピラジノン環を基本骨格とするルシフェリンを持ちます。

このイミダゾピラジノン環は、対応する酵素の存在下で、酸化されることで発光反応を引き起こします。本研究では、IgG との相互作用を促進し、IgG の構造変化に伴い発光波長の変化を引き起こすルシフェリンの開発を目指しました。そのために、ルシフェリンのイミダゾピラジノン環の炭素 6 位にトリフェニルアミン (TPA) 基を導入しました (図 1A)。TPA 基は外部刺激 (物理的な力や溶媒環境) に応じて分子内回転し (図 1A)、HOMO-LUMO バンドギャップを変化させる特性を持ちます。従って、IgG の構造変化がルシフェリンの TPA 基に作用することで、発光波長の変化が誘発されることを期待しました。実際に、合成したルシフェリンは免疫グロブリンの混合体であるポリクローナル抗体の IgG と発光反応を起こし (図 1B)、正常な IgG では緑色発光 (最大発光波長 539 nm) を示したのに対し、熱処理によって変性した IgG では青色発光 (最大発光波長 509 nm) を示しました (図 1C)。これは、IgG が発光反応を触媒する「擬似ルシフェラーゼ活性」を呈することを示した初めての例です。以前、ヒト由来タンパク質のヒト血清アルブミン (HSA) で発光する基質を“Human Luminophore 1 (HuLumino1)”と命名したことから*²、ヒト由来 IgG で発光する新規ルシフェリンを“HuLumino2”と命名しました。

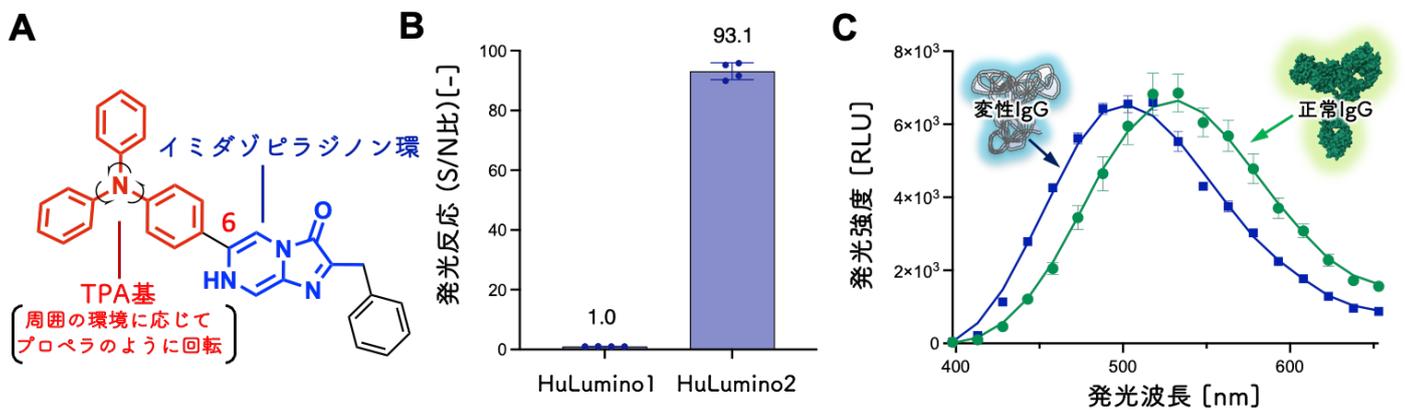


図 1 (A) HuLumino2 の化学構造 (B) ルシフェリンとポリクローナル IgG の発光反応の検証：HSA 用ルシフェリン HuLumino1 は反応しないが、IgG 用に設計したルシフェリン HuLumino2 は高い発光反応を示す。(C) HuLumino2 と正常ポリクローナル IgG または変性ポリクローナル IgG の発光スペクトル：正常状態だと緑色に発光するが、変性状態になると青色に発光する。

※原論文の図を引用・改変したものを使用しています。

(2) HuLumino2 結合サイトの予測

HuLumino2 と全長体 IgG と 3 種類の IgG フラグメント (Fc, Fab, F(ab')₂) の発光強度を測定した結果、全長体 IgG は他のフラグメント IgG と比べて約 10 倍高い発光強度を示しました (図 2A)。この測定結果は、HuLumino2 の発光反応に関与する主な触媒活性部位が、全長体のみが持つ ヒンジ領域であることを示唆します。さらに、分子動力学 (MD) シミュレーションにより、IgG と HuLumino2 の相互作用解析を実施した結果、HuLumino2 は TPA 基を介して、主に IgG のヒンジ領域に結合することが予測されました (図 2B)。MD シミュレーションでは、HuLumino2 がヒンジ領域の疎水性部分に結合し、特定の amino acid (Tyr306, Pro695, Pro697, Lys787) によって安定化される分子認識様式を予測することができました (図 2B)。発光測定および MD シミュレーションによって予

測された発光活性部位のヒンジ領域は、すべての全長体 IgG に保存される領域であるため、HuLumino2 はさまざまな種類の IgG とも発光反応を起こす可能性が示唆されました。

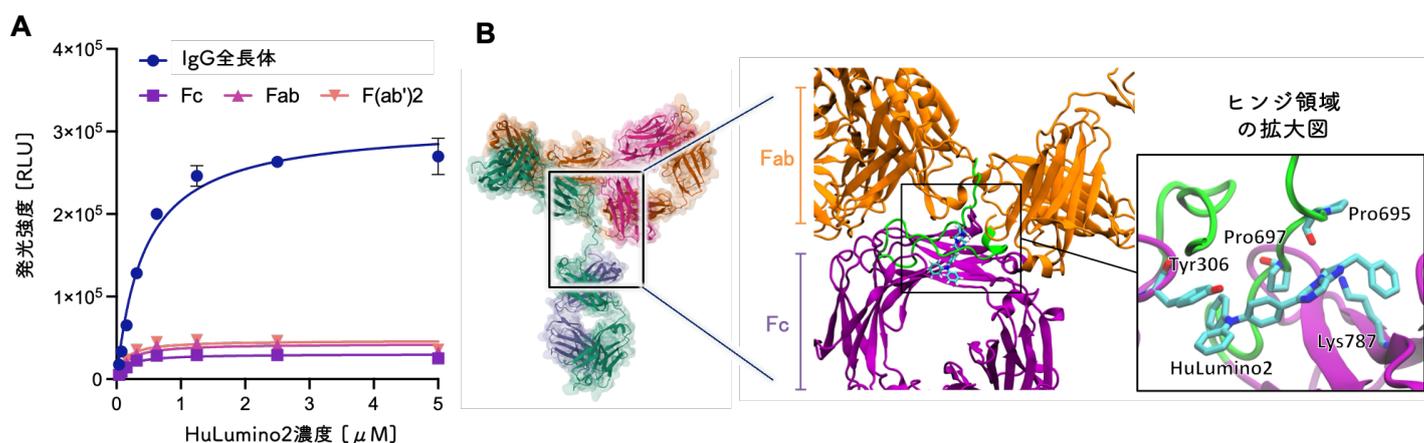


図2 (A) IgGの全長体とフラグメントの発光強度の比較 (B) MDシミュレーションで得られたルシフェリンとIgGの結合様式

※原論文の図を引用・変更したものを使用しています。

(3) モノクローナル抗体 (mAb) 医薬品の品質評価

均質な免疫グロブリンであるモノクローナル抗体 (mAb) を利用した医薬品は、主に IgG を基に開発され、がん、骨粗しょう症などの幅広い疾病の医薬品として利用されています。IgG には四つのサブクラス (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) があり、それぞれ重鎖のアミノ酸配列、ヒンジ領域の特徴 (長さ、ジスルフィド結合の数など) が異なります。mAb 医薬品は、IgG1, IgG2 および IgG4 を基に開発されているため、これらのサブクラスを基にした医薬品を対象に本技術の適用性を評価しました。結果として、すべての医薬品において発光活性を確認できましたが、正常状態と変性状態でルシフェリンの発光波長の変化が認められたのは、IgG2 のみでした。これは、ルシフェリンが IgG2 特有のヒンジ領域の構造変化によってのみ発光波長を変化させたためと考えられます。その発光波長は、熱変性させた IgG2 の増加に応じて、発光色を緑色から青色に変化させることを確認しました (図 3A)。この波長変化幅の値は、変性 IgG2 の割合が 20vol% に達するまで直線的に増加し、その検出限界 (LOD) は 1.8% であることを確認しました (図 3B)。変性抗体の定量には、蛍光色素などを用いた蛍光検出法が利用される例もありますが、蛍光強度変化を測定する方法であるため、バックグラウンドシグナルの影響を受けやすいという課題がありました。本研究で開発した発光アッセイ法は、誤差の出やすい発光強度の変動ではなく、発光波長の変化を指標とするため、より信頼性の高い定量分析が可能になります。

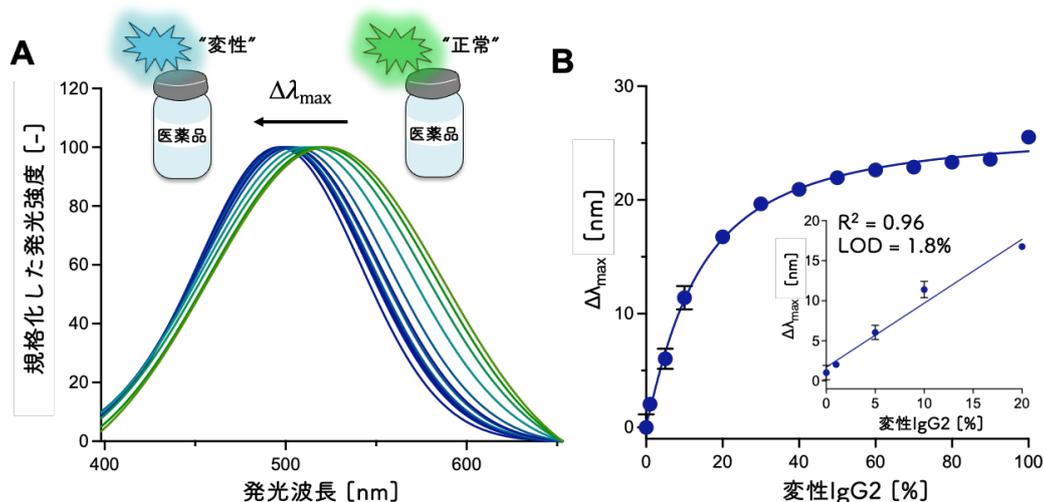


図3 (A) IgG2 医薬品の変性に伴う発光波長の変化：各発光スペクトルの最大発光強度を 100 に規格化した。(B) 変性 IgG2 含有率と最大発光波長変化幅の相関：正常 IgG2 の最大発光波長からの変化値を $\Delta\lambda_{\max}$ と表現した。

※原論文の図を引用・改変したものを使用しています。

以上の結果により、HuLumino2 と IgG を混合するだけで、IgG の変性度を定量的に検知できる可能性を明らかにしました。今回開発した手法は、ルシフェリンと混ぜて発光色を読み取る簡単なプロセスで IgG の変性度を 3 分以内に検出できるため、SEC や DLS などの従来法よりも簡便かつ迅速な技術であり、IgG の品質を評価できる新たな手段として期待されます。

今後の予定

今後はルシフェリンの化学構造をより最適化することにより、IgG1 や IgG4 など他の mAb 医薬品や診断薬の変性検出にも適用可能な発光分析技術を開発します。ルシフェリンを添加するだけで迅速に評価できるその簡便さから、本手法は ハイスループット解析 にも適用可能で、今後さまざまな抗体製品の品質管理や安定性試験への応用が期待できます。

論文情報

掲載誌： *Analytical Chemistry*

論文タイトル： Discovery of Pseudo-Luciferase Activity in Immunoglobulin G (IgG) and its Application to the Detection of IgG Denaturation

著者：西原諒、木原良樹、山本詠士、平野秀典、栗田僚二

DOI：10.1021/acs.analchem.5c00646

参考文献

*1 : Nishihara et al, "Pseudo-Luciferase Activity of the SARS-CoV-2 Spike Protein for *Cypridina* Luciferin", *ACS Cent. Sci.*, 2024, 10, 283-290.

*2 : Nishihara et al, "Coelenterazine Analogue with Human Serum Albumin-Specific Bioluminescence", *Bioconjugate Chem.*, 2020, 31, 2679-2684.

用語解説

免疫グロブリン G (IgG)

特異的な抗原を認識することで免疫反応を担う分子量約 15 万のタンパク質。バイオ医薬に多く用いられています。Y 字型の両腕先端部分に可変領域を持ち、その配列多様性により多様な抗原を認識します。

ルシフェリン

発光酵素ルシフェラーゼの基質となる物質の総称。

変性

タンパク質がとる特有の構造の一部またはすべてが変化することで、その機能が失われることをいいます。

抗体医薬品

疾患関連分子に特異的に結合する抗体を医薬品としたもの。標的分子への高い特異性から高い治療効果と副作用の軽減が期待できます。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

タンパク質を分子量の違いによって分離する方法。

動的光散乱 (DLS)

光子相関分光法の一つであり、粒子の粒径や粒度分布が得られる測定方法。抗体医薬品の品質分析では、単量体や凝集体の測定に使用されます。

スパイクタンパク質

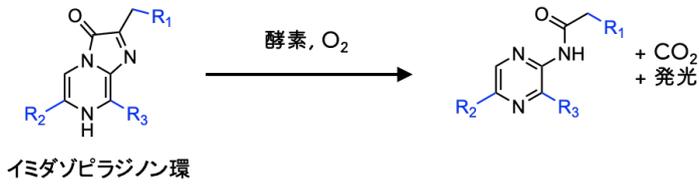
ウイルス粒子の外殻に存在し、被感染細胞と結合して、ウイルスの侵入を引き起こすタンパク質。

酵素免疫測定法 (ELISA)

抗体を用いて標的分子を定量分析する手法。抗体は、タンパク質、ペプチドなどの標的分子を特異的に認識・捕捉するために使用します。

イミダゾピラジノン環

多くの海洋性発光生物が持つルシフェリンの発光基本構造。対応する酵素と酸素の存在下で発光します。イミダゾピラジノン環側鎖 (R₁-R₃) の化学構造は、発光生物の種類によって異なります。



HOMO-LUMO バンドギャップ

分子軌道理論において、基底状態において電子を収容しているなかで最も高いエネルギー準位 (HOMO) と電子を収容していないなかで最も低いエネルギー準位 (LUMO) のエネルギー差を示します。

IgG フラグメント

IgG を酵素処理などで分解した際に生じる断片。抗原結合部位を持つ Fab と、Fcなどを指します。

ヒンジ領域

Fab ドメインと Fc ドメインの間にある柔軟な構造。

分子動力学 (MD) シミュレーション

古典力学のニュートン方程式を数値的に解き、原子や分子の運動をシミュレーションすることで、物質の動的性質や構造変化を解析する手法。

重鎖

タンパク質が大小二つの基本単位で構成されている場合に、分子量の大きい方を指します。IgG の場合は、構成する 4 本のポリペプチド鎖のうち長い 2 本 (H 鎖) を指します。

ジスルフィド結合

S-S 結合とも呼ばれる、システイン残基間の共有結合。タンパク質の構造や機能に影響する重要な結合です。

検出限界 (LOD)

ある分析手法によって検出できる最小の量または濃度。

ハイスループット解析

創薬研究などで、大量のサンプルを短時間で効率的に解析する手法。

機関情報

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

<https://www.aist.go.jp/>

ブランディング・広報部 報道室 hodo-ml@aist.go.jp

慶應義塾

<https://www.keio.ac.jp/>

広報室 m-pr@adst.keio.ac.jp

国立研究開発法人 科学技術振興機構

広報課 Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432 jstkoho@jst.go.jp