

## 抗原抗体反応を利用したタンパク質の光リソグラフィ

### Photolithography of proteins using antigen-antibody reactions

- 代表研究者 東京工業大学資源化学研究所助教授 穴戸 昌彦  
Assoc. Prof., Res. Lab. of Resources Utilization, Tokyo Inst. of Tech.  
Masahiko SISIDO
- 協同研究者 名古屋市立大学薬学部教授 中西 守  
Prof., Faculty of Pharmaceutical Sci., Nagoya City Univ.  
Mamoru NAKANISHI
- 東京工業大学生命理工学部教授 岡畑 恵雄  
Prof., Faculty of Biosci. and Biotech., Tokyo Inst. of Tech.  
Yoshio OKAHATA
- 東京工業大学資源化学研究所助教授 池田 富樹  
Assoc. Prof., Res. Lab. of Resources Utilization, Tokyo Inst. of Tech.  
Tomoki IKEDA

Photoreversible antigen-antibody reaction was achieved by using a peptide carrying a photochromic side group (azobenzene). Monoclonal antibodies against the peptide carrying trans azobenzene group bound the antigen very effectively in solution and released it when the antigen was irradiated with uv light to induce photoisomerization to cis state. The photoisomerization was shown to occur inside the antigen-binding site of the antibody, indicating that the binding site is flexible enough to allow the trans to cis photoisomerization.

The photochromic antigen was linked to DPPE molecule and the conjugate was coated on a quartz microbalance. The antigen-coated quartz microbalance was found to react with antibody in solution and, in this way, the antigen-antibody reaction could be detected. The antigen-antibody reaction on the quartz surface was specific to the antigen but was not reversible even after the antigen photoisomerized to cis form. The non-reversible binding was explained by a deformation of antibody molecules after the binding. The hypothesis was directly confirmed by an AFM observation of antibody molecules on mica surface coated with DPPE molecules.

The research on the photoreversible antigen-antibody reactions on the surface of DPPE LB layers provides a basis for the realization of photolithography of antibody proteins.

#### 研究目的

分子を識別して結合し、特定の分子に対してのみ外部応答を引き起こす系は、センサー、薬物のミサイル輸送、微量物質の捕獲など多くの応用展開の可能性がある。有機化学的にはシクロデキストリン、クラウンエーテル、カリックスアレン、環状ペプチドなどの環状化合物の分子識別能力が注目され、広範な研究が展開されてきた。しかしこれらの分子は、任意のゲスト分子に対して識別

能力を持つように設計できるわけではない。あるゲスト分子に対してオーダーメイドでそれを認識する分子が作製できる点で、抗体は大きな可能性を持っている。近年抗体、とくにモノクローナル抗体の作製が容易になり、有機化学や高分子化学を背景とする研究者でも比較的簡単にとり扱えるようになってきた。

抗体の高度な分子認識機能を工学的に応用しようとするときの一つの問題は、抗原抗体反応があ

まりにも高い結合能を持っているので、一旦結合した抗原はよほど希薄な溶液中に入れられない限り解離しないということである。このことは抗原抗体反応をセンサーや特定の薬物の輸送（ドラッグデリバリー）に応用しようとする上で大きな限界になっていた。われわれは光異性化する置換基（フォトクロミック基）を側鎖に持つペプチドを抗原（ハプテン）として抗体を作製すると、抗原抗体反応の結合・解離が光で制御できるようなことをすでに見いだしている。光は生体分子系そのものにはほとんど損傷を与えることなくその機能を制御できる点で、他の制御法、例えば電極による酸化還元や pH 制御より優れており、またフォトマスクなどの方法により  $\mu\text{m}$  のオーダーまで反応場を局在化することが可能である。本研究は抗原抗体反応の光制御に関する基礎研究、また、抗原抗体反応を基板表面で行うための基本的な検討を進めることによって、タンパク質光リソグラフィへの応用をはかることを目的とした。

## 研究経過

### 1. 抗原抗体反応の光制御

抗原抗体複合体の生成を光で制御できれば、後続するいろいろな免疫反応が制御できるようになる可能性がある。抗原抗体複合体によって活性化される補体系の反応は、数多くの酵素群のカスケード的反応であり、比較的少数の抗原抗体複合体の生成と解離の制御によって、大きな生体の応答を引き起こすことができるであろう。抗原抗体反応を光制御するには、抗原の形で光で変化させる方法と、抗体に光受容基を結合する方法とがある。後者の方法の方がより一般的な応用が可能であるが、そのためには、抗体タンパク質の任意の位置に光受容基（光で形を変化させる分子＝フォトクロミック分子）を化学結合させなければならない。これは現在のタンパク質工学の技術ではまだ不可能である。そこで我々は、図1のような構造のペプチドを抗原（ハプテン）としてモノクローナル抗体を作製し、抗原の構造を光で変化させる方法で抗原抗体反応の光制御を試みた。

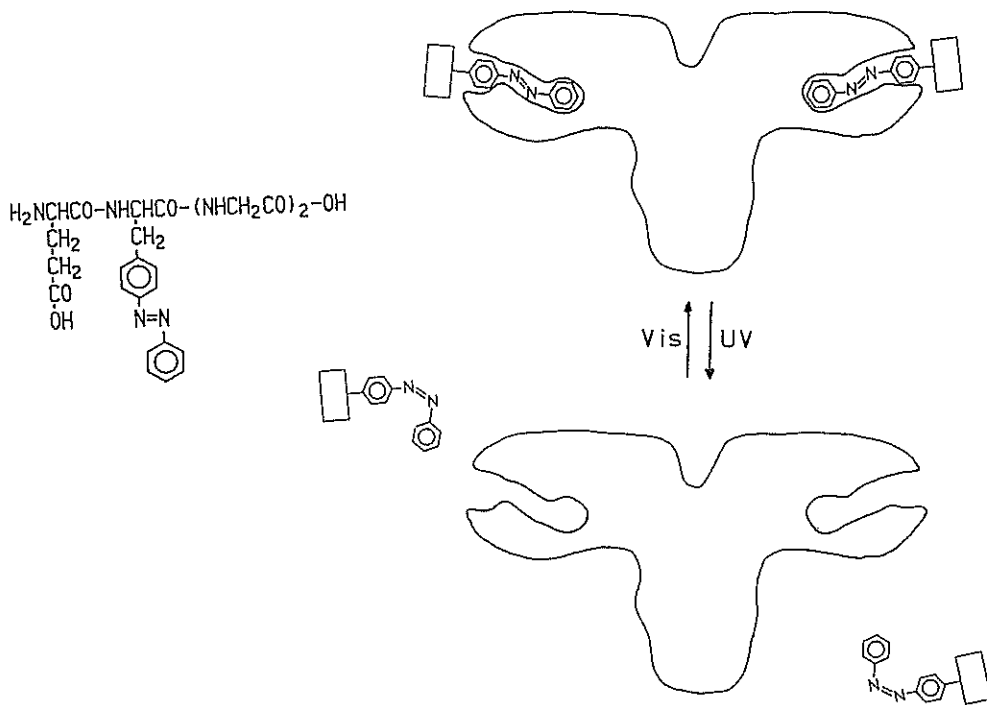


図1. フォトクロミック抗原の構造と抗原抗体反応の光制御の原理。

このペプチドハプテンはアゾベンゼン基を側鎖にもつ非天然アミノ酸を含んでいる。アゾベンゼン基は紫外光 (320 nm) 照射により熱的に安定なトランス状態からシス状態に異性化し、可視光 (430 nm) 照射によりシスからトランスに戻る。トランス状態のペプチドを BSA に結合し、マウスに注射して免疫することによってモノクローナル抗体 (Z1H01) を得た。この抗体とペプチドとの混合液を紫外光/可視光で交互に照射すると、抗体の蛍光強度の増減がみられた。すなわちトランス体のペプチドは抗体に結合し ( $K=5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ )、抗体の蛍光を強く消光するが、シス体のペプチドは抗体にはほとんど結合しないことが分かった。またトランスからシスへの光異性化により、抗体に取り込まれていたペプチドも抗体から脱離することが分かった。

フォトクロミックハプテン分子の光異性化が、抗体に結合したままで起こっているのか、あるいは抗体から遊離したハプテンだけに異性化が起こり、平衡がシフトするのかは、抗原結合部位の堅さに関係して興味深い。そこで、ほとんど (99% 以上) のハプテンが結合した条件で、抗原の解離速度よりはるかに短いパルスレーザー光 (半値幅 12 ナノ秒) によって光照射し、光異性化が起こるかどうかを調べた。その結果、短いパルス光によっても充分光異性化が起こることが分かり、このことから大部分の異性化は抗体結合部位の内部で起こることが明らかになった。すなわち抗体の抗原結合部位はアゾベンゼン基のトランスからシスへの変化を許す程度に柔らかなものである。

このようにフォトクロミックな抗原を用いると、抗原抗体反応は容易に制御できることが分かった。一般に抗原と抗体とが結合する多くの複雑な生化学反応が誘起される。その中で重要なものとして、B 細胞の活性化、補体系の活性化による溶血反応、補体系の C3a, C5a などアナフィラトキシンの生産によるヒスタミンの遊離、および抗体が結合した微粒子のマクロファージによる食があげられる。これらの生体反応を光で制御し免疫反応の速度を求めたり、生体系の特定の位置を光照射して特定の場所で免疫反応を起こさせたり

することも可能になるであろう。

アゾベンゼンのほかにピレニル基に対するモノクローナル抗体を作製された。この抗体は、ピレニル基を結合すると、抗体のトリプトファンからピレニル基へのエネルギー移動を起こすことが分かった。また蛍光プローブとしてのピレニル基を利用して、抗体に結合された抗原 (ハプテン) の状態について分子論的な詳しい情報を得ることができつつある。

## 2. 基板表面での抗原抗体反応

抗原抗体反応の高い分子認識能を利用し、基板表面に抗体や他のタンパク質を配列させる試みがなされている。これによりトポケミカルな生体連鎖反応系を制御したり、微小なマルチチャンネルバイオセンサーを構成したり、あるいはタンパク質 IC チップを作ったりする応用展開が期待できる。一般に基板表面での抗原抗体反応は、溶液中や細胞膜上の反応と比べて非特異的な吸着が起こりやすく、困難であるとされてきた。しかし最近の研究によれば脂質単分子膜や、2 分子膜をコートしたガラスやシリコンの表面は、疑似生体膜として機能することが分かってきた。例えば、リン脂質ハプテンを加えて抗原性を導入した膜をガラス面上に作成すると、膜表面で特異的な抗原抗体反応が起こることが知られている。

基板表面での抗原抗体反応を見るため、水晶発振子の表面にアゾベンゼン基をもつハプテンを含む脂質膜をコートし、その膜上での抗原抗体反応を水晶発振子の周波数変化から追跡した。まずハプテンペプチドを LB 膜にするため DPPE (ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン) とペプチドとの複合体の脂質ペプチドを合成した。この脂質ペプチドを単独、または DPPE と混合して水面上に展開し、その膜を水晶発振子表面上に累積した。この水晶発振子を抗体を含む溶液中に浸漬して膜表面での抗原抗体反応を調べた。トランス状態のペプチドを 30 mol% 含む膜と、それに紫外線を照射してシス状態にした膜に対する抗体の結合量を比べたところ、明らかにトランス状態の方が抗体を結合しやすいことが分かった。すなわち抗原を含む膜表面上においても特異

的な分子認識が起こっており、その情報は水晶発振子の発振周波数の違いとして外部に取り出すことができた。またこの分子認識機能は、光によって制御可能であることが分かった。

溶液中ではトランス状態で結合したハプテンペプチドはシス状態にすると解離したが、膜表面では一旦ハプテンと結合した抗体を光照射しても脱離は起こらなかった。これは材料表面に結合した抗体がコンホメーション変化を起こし非特異的な結合をしているためと推定される。材料表面上で抗原抗体反応を光制御するためには、抗体の非特異的な吸着を抑制するような表面にすることが必要である。そこでタンパク質の非特異的な吸着を最小限に抑える表面を探索する研究を行った。膜形成脂質分子として DSPC、アニオン性の DPPS、およびカチオン性の DPPE の 3 種を用い、それらをそれぞれ単独で水晶発振子表面に累積してその上への抗体の吸着を調べた。その結果、DPPE 膜への抗体タンパク質の吸着が最も少ないことが分かった。そこでアゾベンゼン基を含むペプチドと DPPE とを化学結合したハプテン脂質と DPPE との混合膜を作製し、その上での抗体の吸着を調べた。ハプテン脂質膜へは約 4-6 分の後に抗体の吸着が平衡に達することが分かり、この方法で抗原抗体反応のリアルタイムの追跡が可能であることが分かった。一方、DPPE 単独膜をコートした水晶発振子と抗体水溶液の場合には、小さいが迅速な周波数変化が観測された。抗体分子の脂質膜への非特異的な吸着は、抗原抗体反応を介した吸着より速く、数 10 秒以内に進行することが明らかになった。

トランス状態のアゾベンゼン基をもつハプテン脂質に抗体を吸着させ平衡に達した後に紫外光を照射し、シス状態にしても抗体の解離は見られなかった。一方、最初シス状態にしたハプテン脂質膜の場合は 20% 程度のトランス体が残っているため、かなりの抗体の吸着がみられている。そこへ可視光を照射してトランス状態とすると、再び抗体の吸着が起こった。膜表面にはまだかなりの抗体未吸着部分が残っていたため、トランス体にすることで吸着量が増えたものと解釈される。

この様に、光照射によって部分的ではあるが、脂質膜表面での抗原抗体反応が制御できることが示された。

### 3. 原子間力顕微鏡 (AFM) による基板表面への抗原吸着の直接観測

基板表面での抗体の吸着挙動を更に詳しく調べるためには、最近普及し出した原子間力顕微鏡 (AFM) によって抗体分子の数や形態を観測するのが最も直接的である。そこでまず原子レベルで平滑な表面として知られる雲母のへき開面を基板とし、その表面に脂質膜を LB 法で張り付けそこへ抗体水溶液を流した試料について、抗体分子の直接観察を試みた。

上の実験で最も非特異的な抗体吸着が少なかった DPPE 膜を雲母基板にコートした。この LB 膜累積基板の AFM 像を観察したところ、所々に膜の欠陥や不純物に由来すると思われる凹凸が見られた。しかし全体としては雲母基板の表面と同様、非常に平滑な面が得られ、これは 10 層程度膜を累積しても同様であった。この膜上に抗体 (IgG) の緩衝溶液を流し抗体を吸着させた。雲母表面に直接吸着させた場合、抗体は会合し、大きな変形を受けていることが示された。DPPE の膜を 3 層以上累積した表面では IgG の変形が少なくまた会合も抑えられていることがあった。これらの結果は上に述べた水晶発振子をつかった結果とつつまが合っている。

### 研究成果

本研究の成果は次のようにまとめられる。

(1) 光異性化する抗原分子を用いることにより、溶液中では抗原抗体反応の結合・解離反応を光で可逆制御できる。

(2) その際、抗原分子は抗体の結合部位内で光異性化し、その後解離する。

(3) 水晶発振子の表面に抗原を含む脂質膜をコートすると、水溶液中の抗体が表面の抗原と反応する様子が、実時間で追跡できる。

(4) 発振子表面での抗原抗体反応も抗原特異的に進行するが、一旦結合した抗体は抗原が光異性化しても解離しない。

(5) 表面での抗原抗体反応は非特異的な吸着を

伴っているが、表面にカチオン性の脂質膜をコートすることによって非特異的吸着を少なくすることができる。

(6) 脂質膜をコートした表面での非特異的な抗体の吸着を原子間力顕微鏡で直接観測した結果、抗体が会合し、変形していることが示された。この会合、変形が表面の抗原抗体反応において、一旦結合した抗体が解離できない理由であると考えられる。

#### 今後の課題と発展

今回の実験ではハブテンペプチドをもつ脂質膜への抗体の光可逆結合制御までは至らなかった。しかし界面、とくに脂質膜コート表面での抗体の吸着挙動について AFM などを用い、分子レベルの知見を得ることができた。また脂質膜の種類によって、抗体の結合状態を制御できることが明らかにされた。これらの結果は、本研究の最終目標である抗体を用いた光リソグラフィに対して着実な進歩を与えるものである。今後抗原基を持つ脂質膜の構造を変化させることによって、最小限の抗体の会合、変形の元に、表面での抗原抗体反応を制御することが必要であるが、そのための指針

はすでに本研究で得られたものと考えている。

#### 発表論文リスト

##### 原著論文

- 1) M. Harada, M. Sisido, J. Hirose and M. Nakanishi: Photoreversible Antigen-Antibody Reactions, *FEBS Lett.*, **286**, 6-8 (1991).
- 2) M. Harada, M. Sisido, J. Hirose and M. Nakanishi: Photocontrolled Uptake and Release of Photochromic Haptens by Monoclonal Antibodies. Evidence of Photoisomerization Inside the Hapten-Binding Site, in preparation.
- 3) M. Sisido: Conformational Analysis of Polypeptides on a Personal Computer, *Peptide Chemistry 1991*, **29**, 105-110 (1992).

##### 総説, その他

- 1) 穴戸昌彦: 光機能性ポリペプチドの合成, 高分子加工, **40**, 587-594 (1991).
- 2) 穴戸昌彦: 抗体の分子識別能力の化学的応用, 生物物理, **32**, 21-24 (1992).
- 3) M. Sisido: Photoresponsive Biodevices, *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.*, **10**, (Ed. by S. Somiya), 62-76 (1992).
- 4) 穴戸昌彦: ポリペプチドアーキテクチャ, 高分子, **41**, 595 (1992).
- 5) M. Sisido: Molecular to Supramolecular Design of Synthetic Polypeptides, *Prog. Polym. Sci.*, in press.