

各種ビオチン化モノクローナル抗体を $0.2 \mu\text{g/mL}$ で $100 \mu\text{L/well}$ ずつ分注し、 25°C 、2 時間反応を行った。その後、PBS-T で 3 回洗浄を行い、Avidin-HRP (1000 倍希釈) 溶液を $100 \mu\text{L/well}$ ずつ分注し 25°C 、1 時間反応を行った。反応後、再度 PBS-T にて 3 回洗浄を行い、TMB One Component HRP Microwell Substrate (SurMedics, TMBW-1000-01) を $100 \mu\text{L/well}$ ずつ分注し 25°C 、10 分間反応を行った。反応後、反応停止液 (1N 硫酸) を $100 \mu\text{L/well}$ ずつ添加し反応を停止した後、プレートの端を軽く叩き攪拌して、SPECTRAMax 340PC³⁸⁴ を用いて主波長 450nm /副波長 630nm の吸光度を測定した。得られた測定値は抗原濃度 0 ng/mL の OD (Blank) を差し引いた値で解析を行った。その結果、TA-A, TA-K, TA-R, TA-W 全てのビオチン化モノクローナル抗体において抗原濃度依存的なシグナルの上昇が確認された (図 8)。また図 8 の反応曲線から、抗体の抗原に対する親和性は $\text{TA-A} > \text{TA-K} > \text{TA-R} = \text{TA-W}$ であると考えられた。

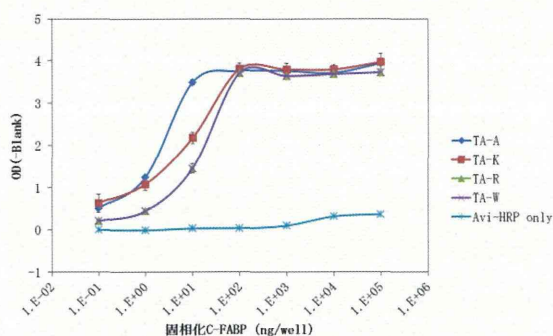


図8. ビオチン化検出抗体の評価

b. サンドイッチ ELISA 抗体マッチング
 50 mM リン酸緩衝液, $\text{pH}7.5$ を希釈液として、各種抗体を $1 \mu\text{g/well}$ となるように C8 MAXISORP NUNC-IMMUNOMODULE (Thermo SCIENTIFIC, 445101) に分注し、 4°C で一晩固相化反応を行った。抗

体固相化プレートを洗浄液 (50 mM リン酸緩衝液, $\text{pH}7.5$, 3% スクロース, 0.05% BSA, 0.05% Tween 20) $300 \mu\text{L/well} \times 3$ 回洗浄を行い室温にて 3 時間静置した。次に Well 内液を除いた後、ブロッキングバッファー (50 mM リン酸緩衝液, $\text{pH}7.5$, 3% スクロース, 0.05% BSA) を $200 \mu\text{L/well}$ 添加し、 25°C にて 1 晩ブロッキングを行った。ブロッキング後、内液を除き減圧デシケーター (0.085 MPa)で一晩プレートを乾燥させ抗体固相化プレートとした。

スタンダード希釈液 (ダルベッコリン酸緩衝液, 1% BSA, 0.05% アジ化ナトリウム) を用いて C-FABP 組換え蛋白質を $10000, 2000, 400, 80, 16, 3.2, 0.64 \text{ ng/mL}$ の濃度に希釈し、予め反応緩衝液 (0.1 M HEPES-NaOH, $\text{pH}7.5$, 0.15 M NaCl, 0.1% アジ化ナトリウム, 1% BSA) で満たした抗体固相化プレートに分注し、 25°C で 1 時間反応させた。反応後、PBS-T を用いて 3 回洗浄を行い、上記の各種ビオチン化モノクローナル抗体を $0.2 \mu\text{g/mL}$ で $100 \mu\text{L/well}$ ずつ分注し、 25°C 、1 時間反応を行った。その後、PBS-T で 3 回洗浄を行い、Avidin-HRP (1000 倍希釈) 溶液を $100 \mu\text{L/well}$ ずつ分注し 25°C 、1 時間反応を行った。反応後、再度 PBS-T にて 3 回洗浄を行い、TMB One Component HRP Microwell Substrate (SurMedics, TMBW-1000-01) を $100 \mu\text{L/well}$ ずつ分注し 25°C で 10 分間反応を行った。反応後、反応停止液 (1N 硫酸) を $100 \mu\text{L/well}$ ずつ添加し反応を停止した後、プレートの端を軽く叩き攪拌した後、SPECTRAMax 340PC³⁸⁴ を用いて主波長 450nm /副波長 630nm の吸光度を測定した。得られた測定値は抗原濃度 0 ng/mL の OD (Blank) を差し引いた値で解析を行った (図 9)。

その結果、どの組み合わせも C-FABP 最大濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ においてもシグナルの上昇が確認されなかった。

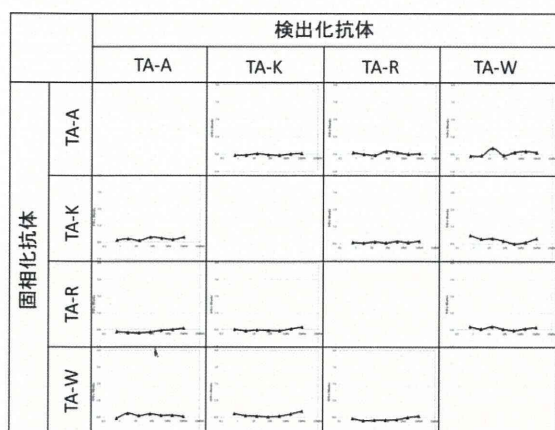


図9. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理無）

上記の結果、どの抗体の組み合わせにおいても ELISA シグナルが検出されなかったことから、抗原の前処理を検討した。

c. 前処理検討

抗体固相化プレートに C-FABP を分注する前に、前処理液として 40 mM AAPH (ラジカル発生剤), 2% SDS, 2% SDS+10 mM DTT, 3% H_2O_2 , 1.6 M 塩酸グアニジン (Gu-HCl) 溶液を用いて C-FABP と 1:1 で混合し、 25°C にて 10 分間前処理反応を行い、上記と同様の操作で ELISA 反応を行った。得られた測定値は抗原濃度 0 ng/mL の OD (Blank) を差し引いた値で解析を行った (図 10)。その結果、どの前処理でも ELISA の値が上昇しない抗体の組み合わせがある一方で、SDS, H_2O_2 , Gu-HCl の前処理によって ELISA 値が上昇する抗体の組み合わせが数組存在した。その中でもっとも低い抗原濃度域から ELISA 値が上昇する前処理と抗体の組み合わせが「前処理 SDS, 固相化 TA-K/検出 TA-R」と「前処理 SDS, 固相化 TA-W/検出 TA-A」であった。そのため以下はこの 2 つの組み合わせについて

更なる検討を行った。

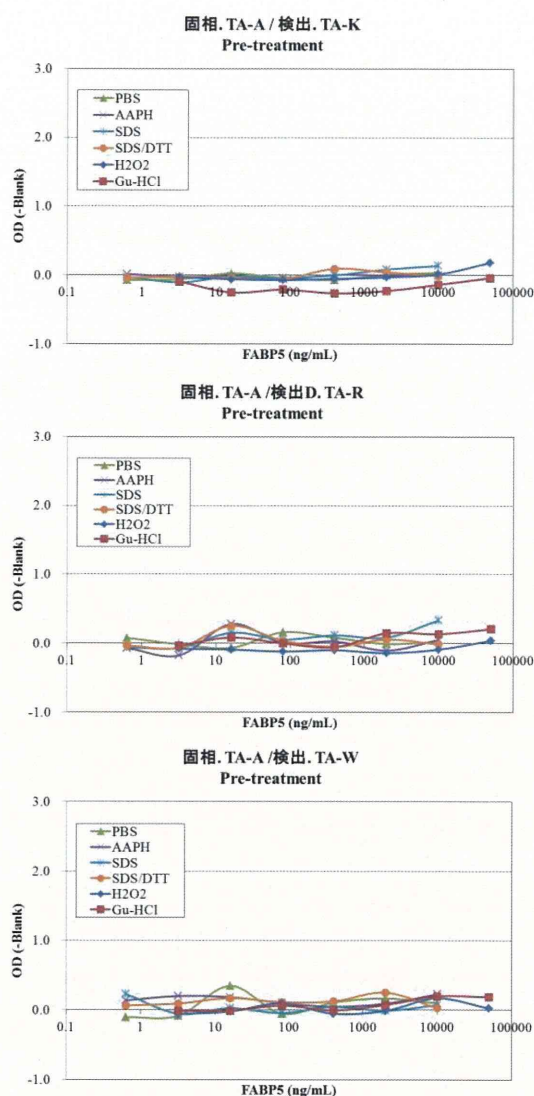


図10-1. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

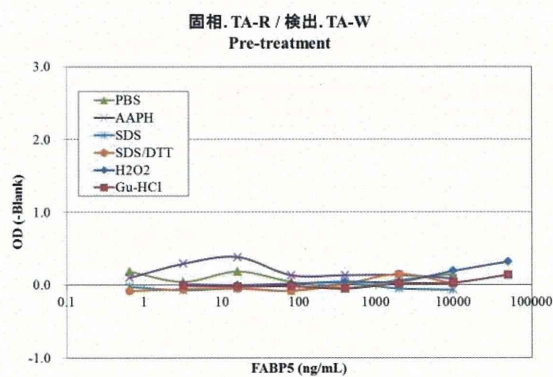
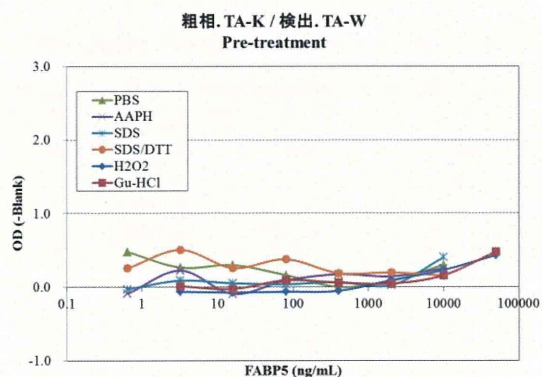
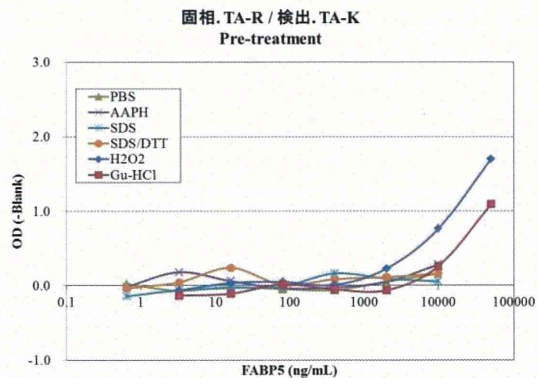
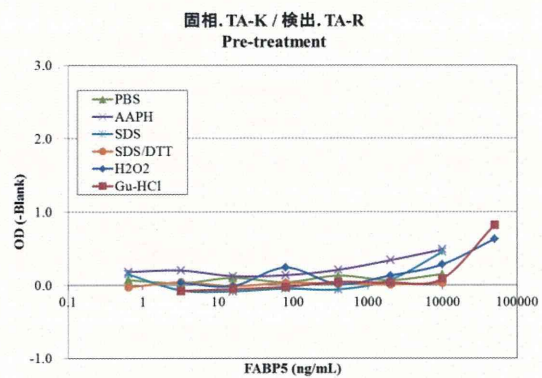
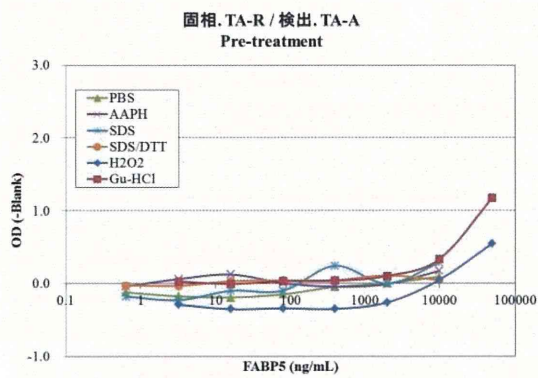
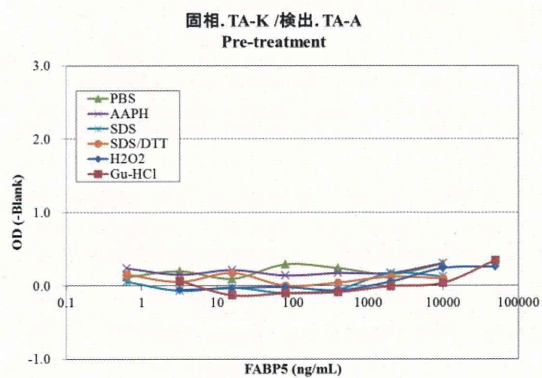


図10-2. サンドイッチELISA抗体マッチング試験 (前処理検討)

図10-3. サンドイッチELISA抗体マッチング試験 (前処理検討)

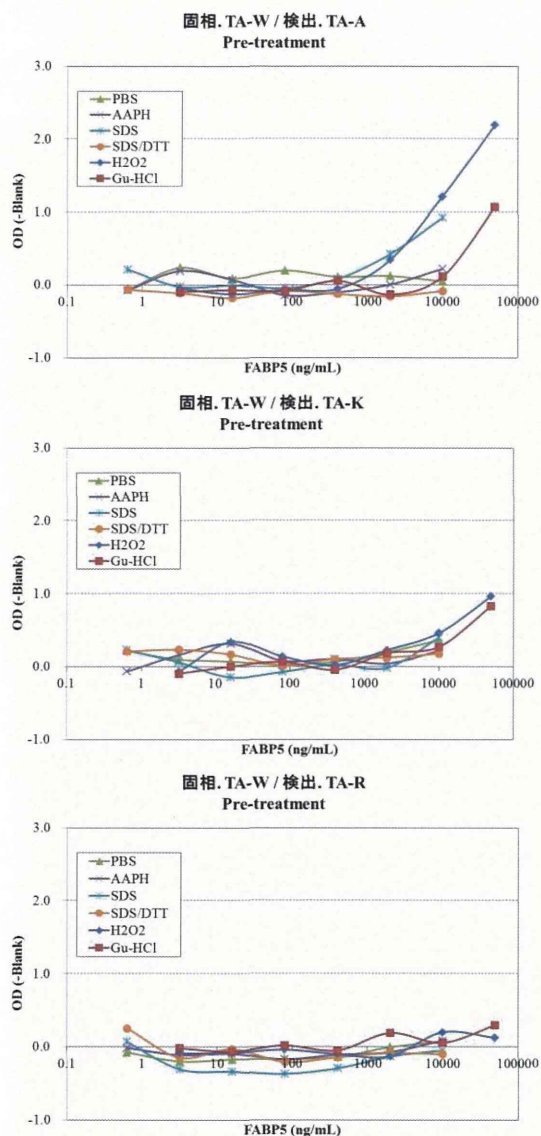


図10-4. サンドイッチELISA抗体マッチング試験（前処理検討）

d. 各種条件検討

上記で選択した前処理・固相/検出抗体の組み合わせにおける固相抗体濃度の最適化検討を行った。

抗体固相化プレート作製時に固相化する抗体量を 5.0, 2.5, 1.0 μg に設定し、上記と同様の操作によって ELISA 反応を行った。その結果、固相 TA-K/検出 TA-R 系においては固相化抗体濃度依存的な ELISA 値の上昇は確認されなかった(図 11 A)。一方、固相 TA-W/検出 TA-A 系においては C-FABP 10~1000 $\mu\text{g/mL}$

の濃度域で固相化抗体濃度依存的な ELISA 値の上昇が確認された(図 11 B)。しかし、固相化抗体量の増量によるシグナルの増幅効果と最小検出感度の上昇は顕著ではなかったため、原料のコストパフォーマンスの観点から、固相化抗体量は 1 μg と決定した。

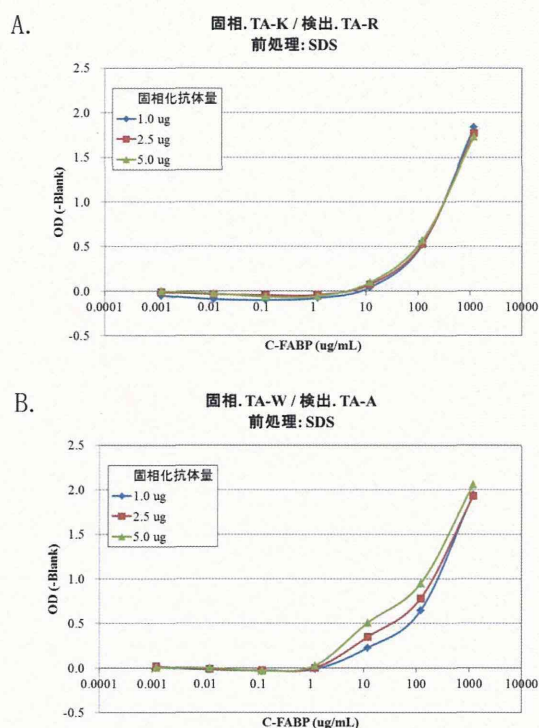


図11. 固相化抗体濃度の検討

次いで、固相化抗体量を 1.0 μg として作製した抗体固相化プレートを用いて、検出抗体濃度の最適化検討を行った。ELISA 反応は上記方法に則り、検出抗体の濃度を 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{g/mL}$ に設定した。検出抗体濃度上昇に伴いバックグラウンド吸光度の上昇が予想されたため、Avidin-HRP 溶液は 50,000 倍希釈したものを用いて検討した。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図 12 A, B に、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図 12 C, D に示す。また、得られた測定値は、検出 OD(図 12 A, C) と、検出 OD 値から抗原濃度 0 ng/mL の

OD (Blank) を差し引いた値 (図 12 B, D) で解析を行った

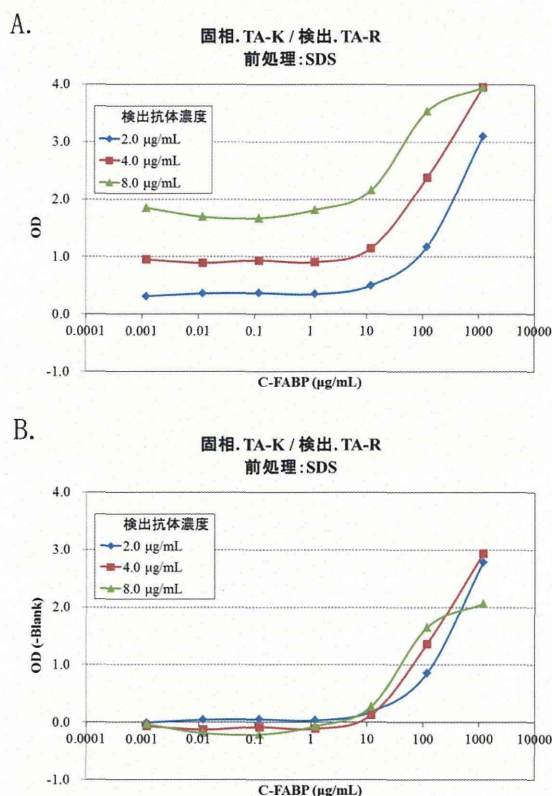


図12-1. 検出抗体濃度の検討

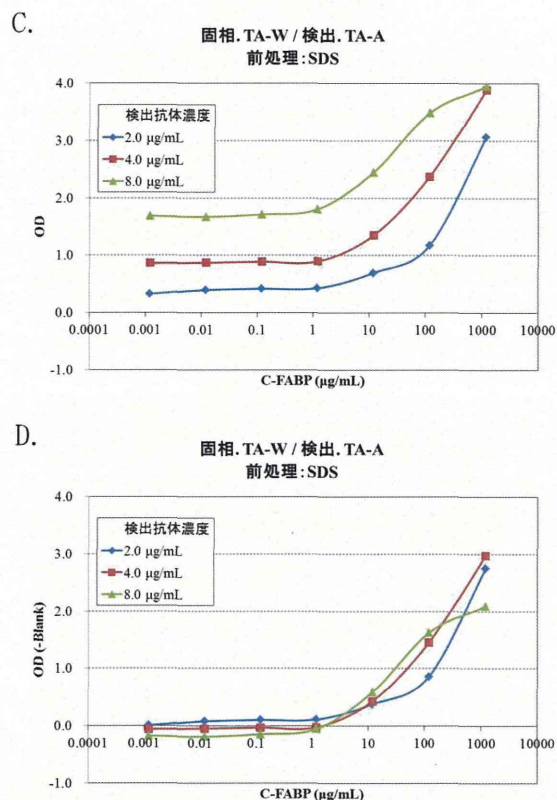


図12-2. 検出抗体濃度の検討

その結果、検出抗体濃度を増加させると、どちらの抗体の組み合わせも検出 OD 値の上昇が確認され、8.0 µg/mL では OD 値が 4.0 付近になり反応が飽和に達していることが確認された。しかし、OD (Blank) を差し引いた値での解析では、検出抗体量の増量によるシグナルの増幅効果と最小検出感度の上昇は顕著ではなかった (図 12 B, D)。よって、検出抗体濃度は 2.0 µg/mL とした。

さらに、上記条件 (固相化抗体量 1.0 µg/well, 検出抗体濃度 2.0 µg/mL) の下で Avidin-HRP 溶液濃度の検討を行った。ELISA 反応は上記方法に則り、Avidin-HRP 濃度は原液濃度 5.0 mg/mL の希釈倍率を 5,000 倍 (1.0 µg/mL), 15,000 倍 (0.3 µg/mL), 50,000 倍 (0.1 µg/mL) に設定した。検討した固相化/

検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図13 Aに、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図13 Bに示す。また、得られた測定値は、検出 OD として解析を行った(図13)。その結果、Avidin-HRP 溶液の希釈倍率の増加に伴いバックグラウンド吸光度の減少が確認された(図13 A, B)。また、どちらの抗体の組み合わせでも 5,000 倍、15,000 倍希釈共に C-FABP 100 $\mu\text{g/mL}$ において OD 値が 4.0 付近まで上昇し、反応が飽和していることが確認された。よって、Avidin-HRP 溶液濃度は 50,000 倍希釈(0.1 $\mu\text{g/mL}$)とした。

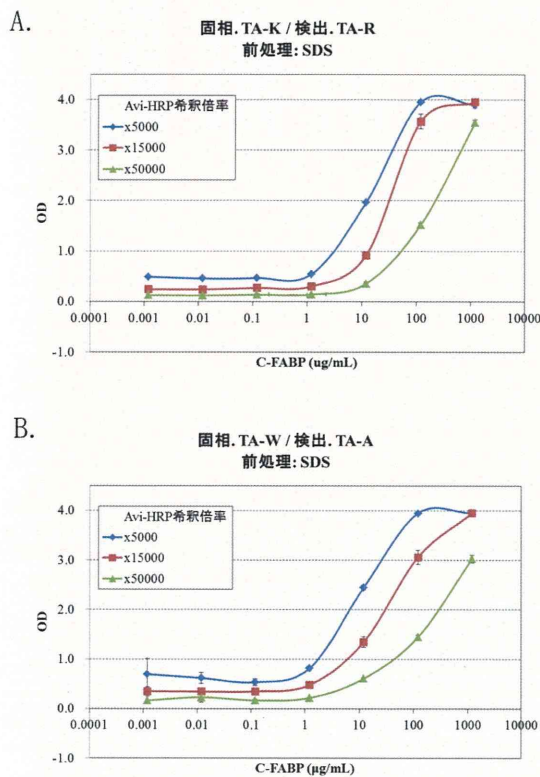


図13. Avidin-HRP濃度の検討

上記条件検討によって得られた C-FABP 検出 ELISA においては最低検出感度が 1 $\mu\text{g/mL}$ 程度であるため感度の上昇が必要である。そこで、図7で示した ELISA

の設計の範疇で感度上昇の検討を行うこととした。

先に述べた方法では抗原を前処理液と 1:1 で混合し、予め 100 μL の反応緩衝液を満たした抗体固相化プレートに試料を 20 μL 添加することとしているが、この段階で反応系中では試料は 12 倍に希釈されている。この希釈比率を変えることで抗原の添加量の底上げを図ることとした。まず、前処理として用いている SDS が固相化抗体-抗原間の一次反応に影響するのかを検討するために SDS 濃度を検討した。

ELISA 反応は上記方法に則り、SDS 濃度は 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.17, 0.10% を設定した(先に示した条件は 0.17% SDS)。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相.TA-K/検出.TA-R」を図14 A に、「固相.TA-W/検出.TA-A」を図14 B に示す。また、得られた測定値は、検出 OD として解析を行った(図14)。その結果、SDS 濃度 0.17~0.25% で ELISA 値は最大値を示し、0.1% SDS では ELISA 値は減少することが確認され、0.5% SDS 以上ではシグナルが顕著に減弱した。これは 0.1% SDS では抗原の前処理が不十分であり、0.5% SDS 以上では一次反応に影響を与え固相化抗体を変性させてしまっているのではないかと考えられる。以上より、SDS 濃度は 0.25% まで増加させることが可能であると考えられた。

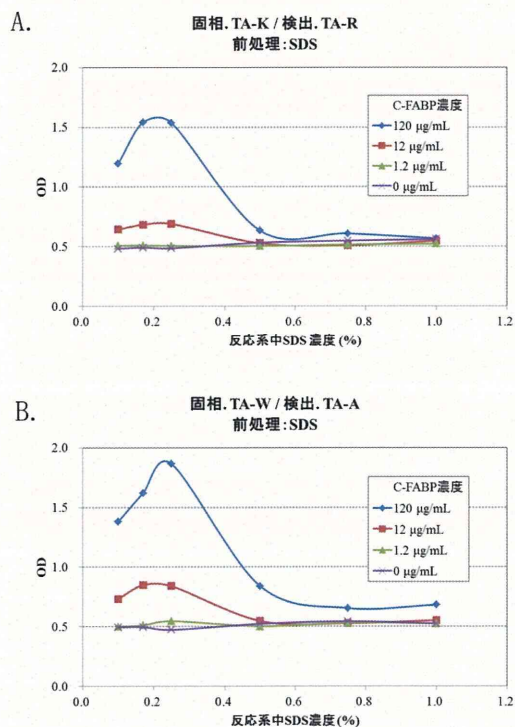


図14. 反応系中への混入SDS濃度の検討

次に上記検討の結果から SDS 濃度 0.25% に設定した場合の一次反応容量の最適化を検討した。ELISA 反応は上記方法に則り、SDS 濃度 0.25% に固定して一次反応容量を 100, 150, 200, 250, 300 μL とした。また、上記条件検討での SDS 濃度 0.17%, 容量 120 μL も同時に評価した。検討した固相化/検出抗体の組み合わせは「固相. TA-K/検出. TA-R」を図 15 A に、「固相. TA-W/検出. TA-A」を図 15 B に示す。また、得られた測定値は、バックグラウンド吸光度を 1 とした S/N 比を算出し解析を行った (図 15)。その結果、どちらの抗体の組み合わせにおいても 200 μL で S/N 比の上昇が確認された。以上の結果より、一次反応容量は 200 μL とすることとした。

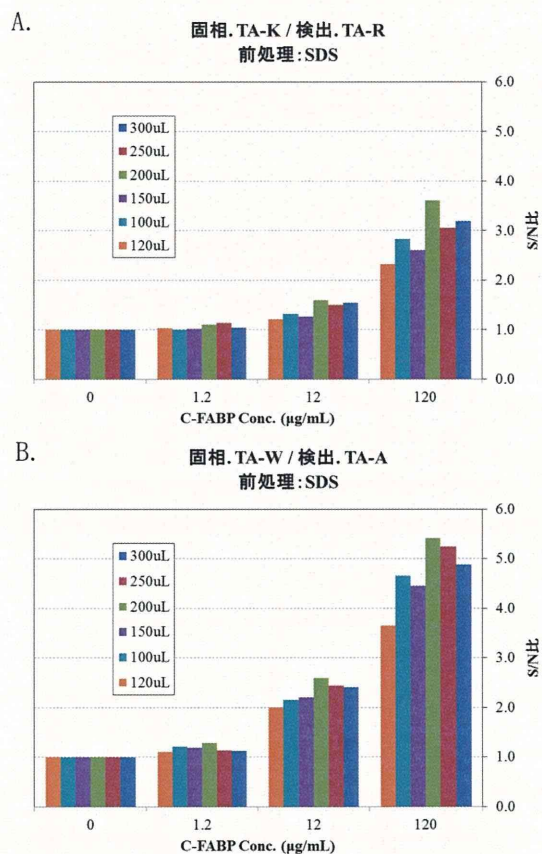


図15. 一次反応の容量検討

上記の各種条件検討によって試験的に決定したアッセイ条件を表 3 に示す。

表3. アッセイ条件のまとめ

C-FABP検出ELISAアッセイ条件	
抗体固相化プレート	固相化抗体濃度 1.0 μg
前処理	試料 + 1% SDS = 50 μL + 50 μL , 25°C, 10 min
反応プレートへの添加	前処理済試料 + 反応緩衝液 = 50 μL + 150 μL 容量 200 μL , SDS濃度 0.25%
1次反応	25°C, 60 min
2次反応	検出抗体濃度 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 25°C, 60 min
Avi-HRP 反応	Avi-HRP濃度 50000倍希釈(0.1 $\mu\text{g/mL}$), 25°C, 60 min
TMB 反応	25°C, 15 min \rightarrow 反応停止

本条件によって「固相. TA-K/検出. TA-R」と、「固相. TA-W/検出. TA-A」の 2 つの組み合わせの ELISA 系において、C-FABP を用いた検量線 (100, 50, 25, 12.5, 6.15, 3.125, 1.563 $\mu\text{g/mL}$) を作製した。なお、検量線のフィッティングカーブは 4-Parameter logistic model を用いて

解析を行った (図 16)。「固相. TA-K/検出. TA-R」を図 16 A と、「固相. TA-W/検出. TA-A」を図 16 B に示す。また、本検量線の回帰式を元に試料を試験的に測定し、C-FABP 濃度を算出した。表 4 ではそれぞれのカラム上部に ELISA 測定系の組み合わせ名 (「固相. TA-K/検出. TA-R」、「固相. TA-W/検出. TA-A」および L-ABP ELISA) を示し、実際の測定 OD と濃度換算値を示す。なお、表 4 中で灰色に示されたセルは測定 OD 値がバックグラウンド以下になった試料であり、測定値として信頼性が低いため参考値である。

その結果、検量線の R² 値は「固相. TA-K/検出. TA-R」系では 0.996、「固相. TA-W/検出. TA-A」系では 0.997 と高い寄与率が得られた。2 つの系を比較すると感度、最大シグナル強度共に「固相. TA-W/検出. TA-A」 > 「固相. TA-K/検出. TA-R」であり、「固相. TA-W/検出. TA-A」の方が優れた検出系であることが確認された。また、試験測定の結果、感度の低い「固相. TA-K/検出. TA-R」系で OD が正値を示した 2 試料については、感度の高い「固相. TA-W/検出. TA-A」系においても正の値を示している。また、同試料を L-FABP ELISA kit (CMIC) を用いて測定したところ、C-FABP の値と L-FABP の値の間に相関関係は見られなかったことから、本系が特異的な C-FABP のシグナルを反映していると考えられた。

以上の結果より、本検討によって C-FABP 検出 ELISA の試作系が構築できた。しかし、本試作系では C-FABP の正しい値付けを行っておらず、測定値はあくまでリコンビナント C-FABP Unit であり、また検出感度が非常に低い。そのた

め今後は C-FABP 濃度の値付けと抗体の最適化等を行い検出感度の改善を検討する必要があると考えている。

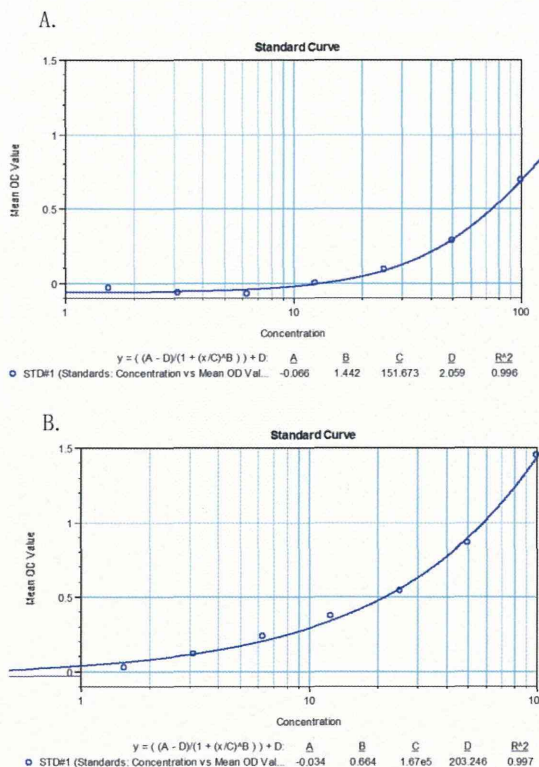


図16. C-FABP抗原の段階希釈検量線

表4. 試料の測定値

Sample	Wells	固相. TA-K/ 検TA-R		固相. TA-W/ 検TA-A		L-FABP ELISA	
		OD Values	Concentration	OD Values	Concentration	Concentration	Concentration
Un01	A3	-0.04	7204	0.029	855	0.6	
Un02	B3	-0.08	0	-0.056	0	4.2	
Un03	C3	-0.09	0	-0.058	0	0.9	
Un04	D3	-0.173	0	-0.068	0	69.5	
Un05	E3	-0.109	0	-0.003	289	1.0	
Un06	F3	-0.099	0	-0.047	0	1.1	
Un07	G3	-0.092	0	-0.054	0	5.0	
Un08	H3	0.071	23742	0.154	4473	9.5	
Un09	A4	-0.011	12256	-0.045	0	1.7	
Un10	B4	-0.096	0	-0.048	0	0.1	
Un11	C4	-0.046	6034	0.005	419	1.5	
Un12	D4	-0.154	0	-0.1	0	1.4	
Un13	E4	-0.168	0	-0.071	0	2.5	
Un14	F4	-0.07	0	-0.058	0	5.6	
Un15	G4	-0.074	0	-0.046	0	6.6	
Un16	H4	-0.045	6159	-0.002	311	1.0	
Un17	A5	-0.04	7263	-0.025	42	4.5	
Un18	B5	-0.078	0	-0.008	226	0.8	
Un19	C5	-0.095	0	-0.047	0	0.0	
Un20	D5	-0.151	0	-0.045	0	1.0	
Un21	E5	-0.125	0	-0.029	21	1.6	
Un22	F5	-0.091	0	-0.027	31	0.0	
Un23	G5	-0.063	1657	-0.023	57	23.7	
Un24	H5	-0.03	9133	0.011	517	1.3	
Un25	A6	0.057	21887	0.027	812	1.0	
Un26	B6	-0.014	11777	-0.035	0	1.1	
Un27	C6	-0.096	0	-0.058	0	0.4	
Un28	D6	-0.117	0	-0.04	0	0.1	
Un29	E6	-0.07	0	-0.052	0	0.5	

*測定値はC-FABP組換え蛋白質を基準にした換算濃度 (rC-FABP Unit = ng/mL)である

*L-FABP ELISAの測定値はng/mLを示す。

3. ヒト脂肪由来幹細胞に関連する微小環境因子・脂肪酸結合蛋白 (FABP) の高次構造解析

FABP ファミリーは 2 本の α ヘリックス鎖とアンチパラレルな 10 本の β 鎖からなる二枚貝様構造 (clam shell-like β -barrel structure) という特徴的な構造を有している。中でも本ファミリーに属する Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) は生体内において抗酸化的な役割を担っていることが知られている。この機能に関しては未だ明らかになっていない部分が多いが、*in vitro* の実験において L-FABP の 4 種のメチオニン残基の SH 基が酸化されることが抗酸化作用の本体である可能性が報告されている (J Lipid Res. 2009 Dec;50(12):2445-54.)。既存の報告から図 17-1 では C-FABP と L-FABP のアミノ酸配列の比較を示し Met を黄色に色付けた。また、図 17-2 では C-FABP と L-FABP の X 線結晶構造解析による立体構造モデルの比較を示す。図 17-2 A は C-FABP、図 17-2 B は L-FABP を示した。それぞれ左右の図は横に 90° 回転させた像を示し、それぞれのメチオニン残基を赤の ball and stick モデルで示す。この比較から同ファミリーの C-FABP 中のメチオニン残基は 5 箇所存在しており、そのうち L-FABP においても保存されているメチオニンは 3 箇所存在することが確認できた。このことから C-FABP が L-FABP と同様の抗酸化作用を有している可能性が考えられる。そこで本検討では L-FABP の *in vitro* 実験で用いられている AAPH と AMVN というラジカル発生剤を用いて C-FABP を酸化した後、MS 解析を行うことでメチオニンの酸化部位解析を行った。

```

C-FABP: 1  MATVQQLEGRWRLVDSKGFDEYMKELGVGI
L-FABP: 1  M-----SFGKYQLSQENFEAFMKAIGLPE

C-FABP: 31  ALRKMGAAMAKPDCIITCDGKNLTIKTESTL
L-FABP: 27  ELIQKGDIKGVSEIVQNGKHFKFTITAGS

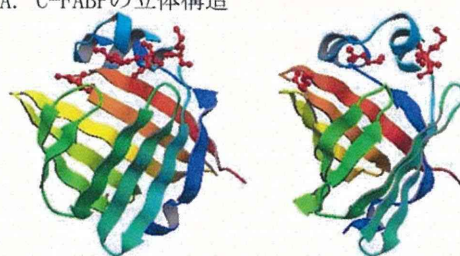
C-FABP: 61  KTTQFSCTLGEKFEETTADGRKTQTVCNFT
L-FABP: 57  KVIQNEFTVGEECELETMTGEKVKTVVQLE

C-FABP: 91  DGALVQHGEWDGKESTITRKLKDGKLVVEC
L-FABP: 87  GDNKLVTFKNI-----IKSVTELNGDIITNT

C-FABP:121  VMNVTCTRIYEKVE- 135
L-FABP:113  MTLGDIVFKRISKRI- 127
  
```

図17-1. C-FABPとL-FABPのアミノ酸配列比較

A. C-FABPの立体構造



B. L-FABPの立体構造

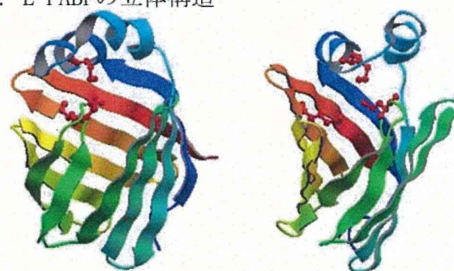


図17-2. C-FABPとL-FABPの立体構造比較 (PDBj)

3-1. C-FABP の酸化処理

上記ヒト C-FABP 組換え蛋白質を用いて実験を行う。水溶性ラジカル発生剤である AAPH と脂溶性ラジカル発生剤である AMVN は、L-FABP を用いた実験で酸化が確認された濃度である終濃度 200 mM, 50 mM で C-FABP と混和し、 37°C のインキュベータで 90 分間静置し酸化反応を行った。反応後、3K MWCO の限外濾過器を用いて 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液に溶媒を置換した。本試料を 5 mM 炭酸水素アンモニウム溶液中で $5\ \mu\text{g}$

C-FABP につき 50 ng のトリプシンを用いて 37°C, 6 時間消化反応を行い MS 解析試料とした。

MS解析はLTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) nanoLC system: ADVANCE UHPLC system (MICHROM Bioresources, Auburn, CA)を用いて行った。試料5 μ Lをトラップカラム (Lcolumn Micro 0.3 \times 5 mm; CERI, Japan)に吸着させた後、分離用キャピラリーカラム (Magic C18 AQ nano column, 0.1 \times 150 mm; MICHROM, Bioresources)でペプチドを分離した。

クロマトグラフィーの条件は、A液(0.1%ギ酸) B液(100%アセトニトリル) 0–15 min : B 5%–45%, 15–20 min : B 95%, 20–30 min : B 5%。流速 500 nL/min
イオンソース : XYZ Stage ion source (AMR)。スプレーチップ: Fortis Tip (AMR)
Spray voltage 1.8 kV, Scan range : 400 to 1800 m/z, Resolution 30000, Top 5 Data dependent Scanとした。

得られたマススペクトルからProteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific)を用いてMGF fileを作成し、in houseのMASCOTサーバでデータベース検索を行った。検索条件は、Database : Swissprot
Enzyme: trypsin, allow 1 missed cleavage, Taxonomy : Human, Valuable modification : dehydro Cys, oxidation
Met, Peptide tol. : 5 ppm, MS/MS tol. : 0.6 Daとした。

その結果、検出されたメチオニンを含むペプチドを図18に示す。検出されたメチオニンを含むペプチドは5種類存在し、③と④はメチオニンを2つ含んだN末側のリシン(K)の切れ残りの違いに由来する重複ペプチドが確認された。これは末端側に存在するメチオニンが酸化されること

でトリプシンの切断に影響したためではないかと考えている。

C-FABPアミノ酸配列
1-MATVQQLEGR WRLVDSKGFDEYMKELGVGI ALRKMAMAK PDCIITCDGK
51-NLTIKTESTL KTTQFSCSLG EKFEETTADG RKTQTVCNFT DGALVQHGEW
101-DGKESTITRK LKDGKLVVEC VMNNVTCTRI YEKVE

C-FABPのトリプシン消化により検出されたペプチド

- ① MATVQQLEGR
 - ② GFDEYMKELGVGI ALR
 - ③ KMGAMAKPDCIITCDGK
 - ④ MGAMAKPDCIITCDGK
 - ⑤ LVVECVMMNNVTCTR
- 重複ペプチド

図18. C-FABPのアミノ酸配列と検出されたMetを含むペプチド

その結果、ペプチドピーク①, ⑤ではメチオニンがAAPH, AMVNによる酸化をほとんど受けていないのに対して、ペプチドピーク④ではAMVNの酸化が僅かにすすんでおり、ペプチドピーク②, ③ではAAPHによる酸化が顕著に増加していることが確認された。なおペプチドピーク③, ④にはメチオニンが2箇所存在しているが、2箇所共に酸化されたと思われる分子量のピークは僅かにしか確認されなかったことから、どちらか部位選択的に酸化される可能性が示唆された。さらに、ペプチドピーク③, ④, ⑤にはペプチド内に2つのシステインが存在しており、ペプチド内ジスルフィド結合が存在する場合、プロトンが2つ外れることからS-S結合を含むピークは検出可能である。今回の結果では③, ④, ⑤のピークはほとんどがジスルフィド結合を形成したピークとして検出されたことから、酸化剤によりシステインも酸化されていることが確認された(データ未掲載)。

今回の結果から、C-FABPはAAPHによって顕著に酸化を受けることが確認され、そのメチオニン酸化部位はMet23と、Met35もしくはMet38のどちらかであり、各所に