

APCE のこれまでの歩みと今後の展望

志村清仁

福島県立医科大学医学部

APCE の原理 アフィニティプローブキャピラリー電気泳動 (APCE) は、微量試料に含まれる特定のタンパク質のアイソフォームをそれぞれ分離して定量できる方法である。APCE では目的物質に特異的に結合する分子を蛍光標識してもちいるが、これをアフィニティプローブ (AP) と呼ぶ。AP を試料に添加して生じる複合体を、そのままキャピラリー電気泳動 (CE) で分離して定量する (図1)。特にキャピラリー等電点電気泳動 (CIEF) を使うと、その焦点化効果によって検出感度は pM レベルに達する。プローブ分子の可能性はいろいろあるが、抗体は AP として重要性が高い。

APCE の最初の試み 本法は私が 1991-93 年に米国の Barry L. Karger 教授の研究室に留学したときに初めて行った。モノクローン抗体から調製した Fab' フラグメントを蛍光標識して AP とした。AP として用いるには、電荷的均一性の高いものが必要である。さもないと単一の標的分子に対して複数の複合体が生成してしまう。ハイブリドーマから得られるモノクローン抗体が電荷的に不均一であることはよく知られている。これに加えて、抗体の蛍光標識をアミノ基に対して行くと、不均一性はさらに増す。そこで、F(ab')₂ フラグメントを還元して Fab' フラグメントにしたときに露出する SH 基を蛍光標識し、ゲル等電点電気泳動で精製することによって AP を調製した。こうして得た AP を用いてヒト成長ホルモンの APCE を行くと、1 か所および 2 か所で脱アミドしたホルモンと、脱アミドしていない元のホルモンの 3 者を容易に分離検出できることがわかった (図2)。しかも、0.7 μL 中の数 pM の目的分子を 15 分ほどで分離検出することができた。

組換え AP モノクローン抗体からの AP の調製は収量が必ずしも多くなく、しかも市販のモノクローン抗体は高価である。そこで組換え抗体に着目した。組換え体では、標識のための Cys 残基の導入、アミノ酸の置換や付加による等電点の調節などが可能になる。また、一旦 DNA を確立すれば、比較的容易に AP を調製することができる (図3)。分子バイオホトニクス研究所との共同研究の中で、ヒトの α₁-アンチトリプシンに対する組換え AP を調製した。抗原に対して結合活性をもつ組換え AP を確かに調製

できた。ところが、どういう訳か α_1 -アンチトリプシンとの複合体を CIEF でうまく検出することができなかった。その原因は未だに謎だが、いつかまたこの謎に挑戦してみたい。

インスリンの APCE 協和メデックス株式会社より抗ヒトインスリン抗体産生ハイブリドーマを御恵与いただき、ヒトインスリンに対する組換え AP を調製した。この AP ではインスリンをうまく検出することができた (図 4)。調製した抗インスリン組換え Fab フラグメントは、抗原との複合体の解離速度が比較的高く、複合体の半減期は数分しかなかった。それでも、CIEF の分離は 5 分ほどで終了するので、十分に複合体を検出できた。

APCE で分離された複合体ゾーンでは、解離反応だけが進行する。一旦解離すると、AP と抗原はそれぞれの単独の等電点に向かって離れていってしまうからである。したがって、複合体ピークの減衰速度を測れば、複合体の解離反応速度を求めることができる。こうして求めた解離反応速度は、抗原アイソフォームの性質の違いを探るために利用できるようになるかもしれない。

マウスプリオンタンパク質の APCE 10 年ほど前に狂牛病問題が世間を騒がせた。プリオンタンパク質に対する組換え抗体を作られた広島大学の松田治男先生と共同研究する機会を得た。ニワトリの一本鎖抗体 (scFv) で、極めて純度の高い AP が得られた。ところが、またまた問題発生。思ったように複合体ピークを検出できなかった。原因はどうやら標準試料として用いた組換えマウスプリオンタンパク質のフォールディングがうまく行かず、APCE を行ったときに AP とともにキャピラリー内壁に沈着してしまうようだった。ところが、プリオンタンパク質を CNBr で処理して分解すると、はっきりと検出できるようになることがわかった (図 5)。このことから、たとえ対象物質が不溶性であっても、分解して可溶性断片とすることで分離検出可能な場合があることがわかった。

レーザー励起蛍光検出 CIEF APCE を始めた当初は CIEF を行うにも問題が山積していた。電気浸透を抑制する内壁コーティングの不安定性、蛍光性等電点マーカーの欠如、焦点化後に pH 勾配を検出点に移動させることによる再現性の低下などである。こうした問題に対し、安定な内壁コーティングの採用、蛍光性ペプチド等電点マーカーの開発、走査型レーザー励起蛍光検出装置の開発などを行うことにより、現在では極めて再現性の高い分離が行えるようになった (図 6)。

課題と展望 最後に残った課題は、塩を多量に含む生体試料から塩を効果的に除去する方法である。等電点電気泳動は高分離能を誇るが、塩の存在に弱いという欠点がある。1 μL の試料から、塩を効率よく除ける画期的な方法を今開発中である。この方法が完成すれば APCE の用途が飛躍的に拡大するものと期待される。