

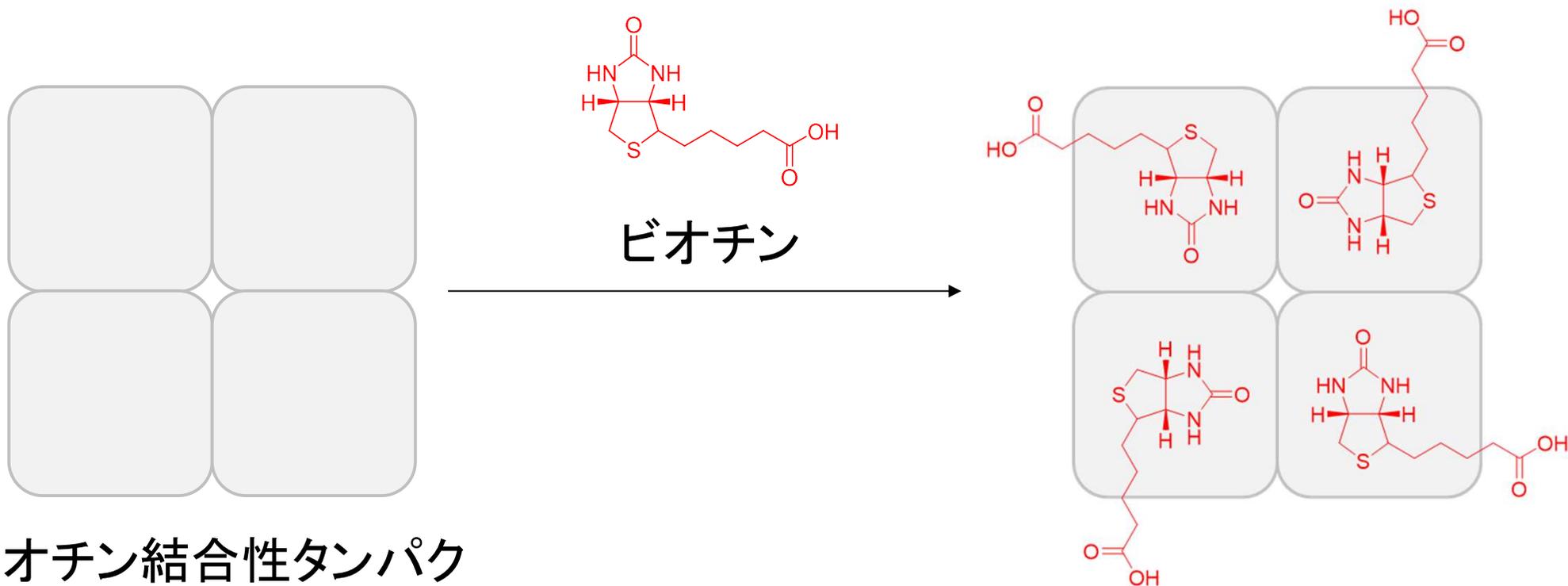
タンパク質のビオチン標識剤

埼玉大学 大学院理工学研究科
物質科学部門 物質機能領域

助教 松下 隆彦

2023年11月16日

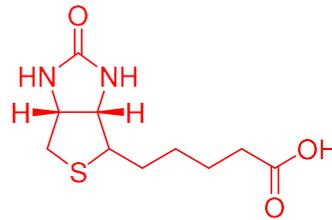
ビオチン-アビジン相互作用



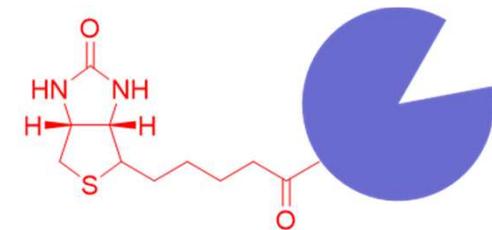
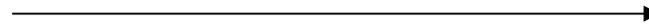
ビオチン結合性タンパク
(アビジン等)

最大で4分子のビオチンと
非常に強く結合する

ビオチン標識化合物



ビオチン



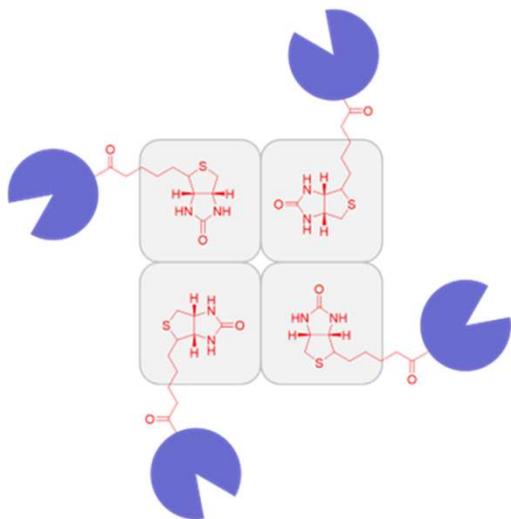
例

- 色素
- ペプチド
- 糖鎖
- 核酸
- タンパク質
- 細胞

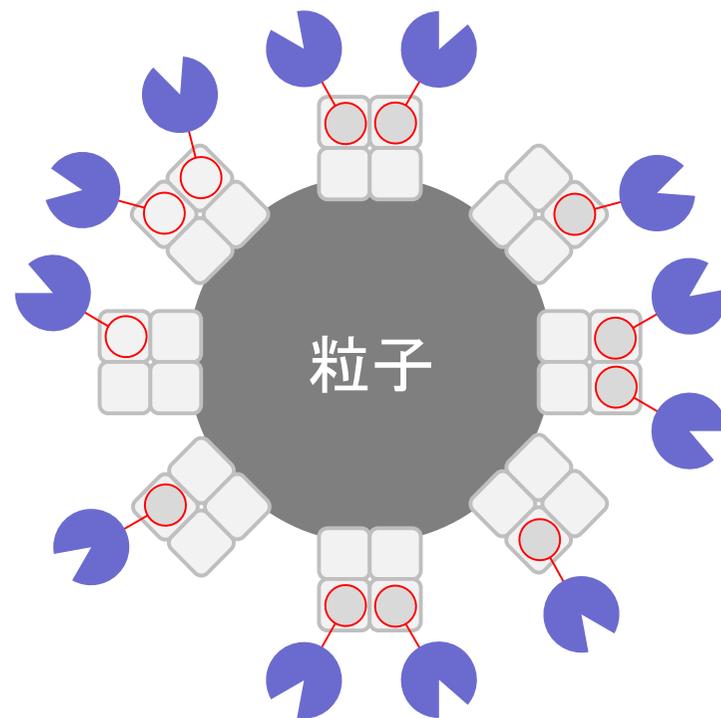
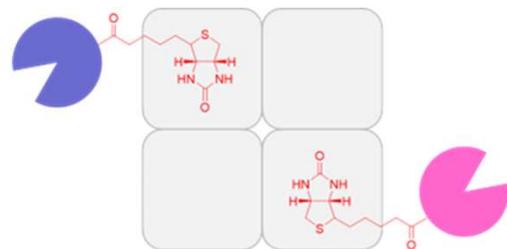
- ビオチン標識色素
- ビオチン標識ペプチド
- ビオチン標識糖鎖
- ビオチン標識核酸
- ビオチン標識抗体
- ビオチン標識細胞

ビオチン標識分子の利用

液相

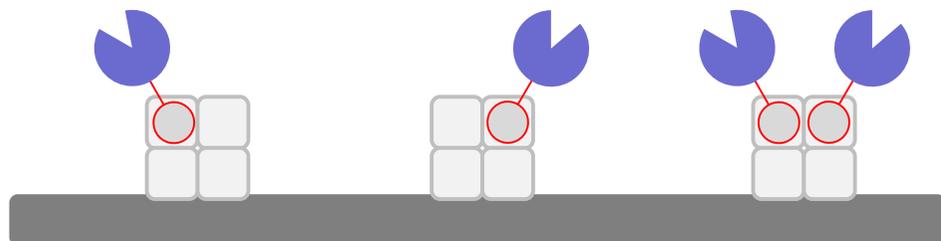


固相



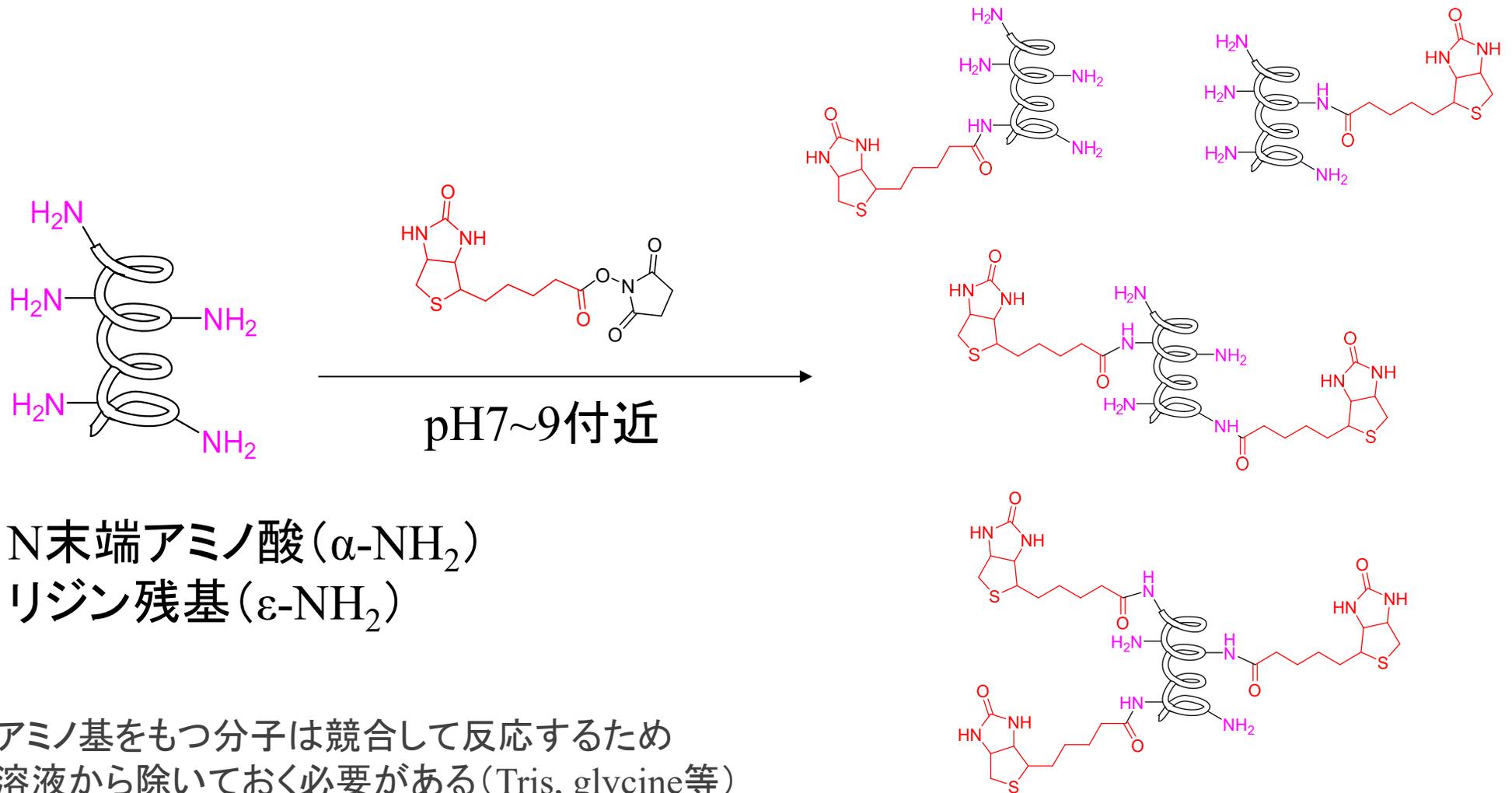
例

- 検出・診断
- 薬物送達
- 生体組織工学



プレート

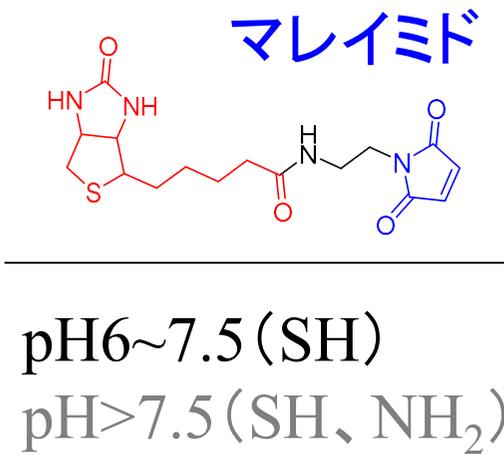
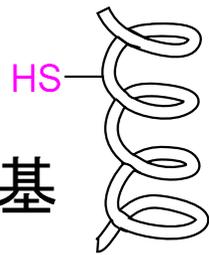
NH₂基を標的としたタンパク質のビオチン標識



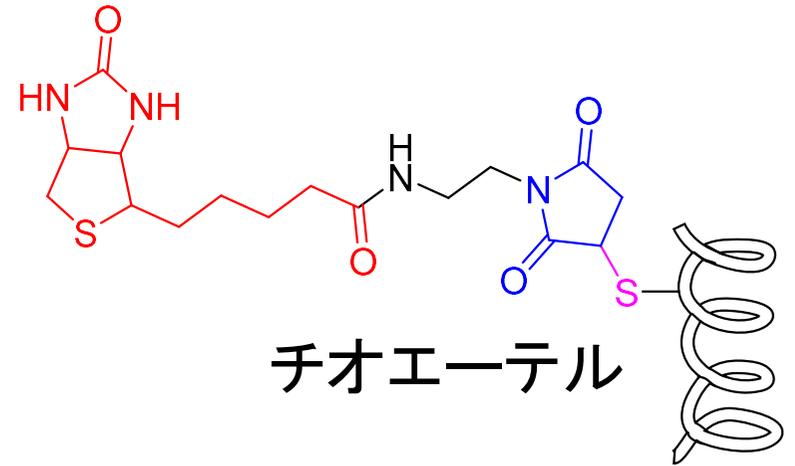
SH基を標的としたタンパク質のビオチン標識試薬

- SH基

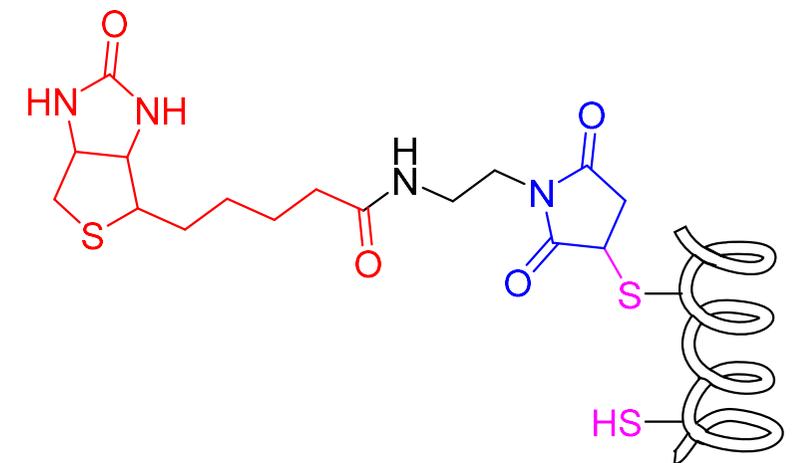
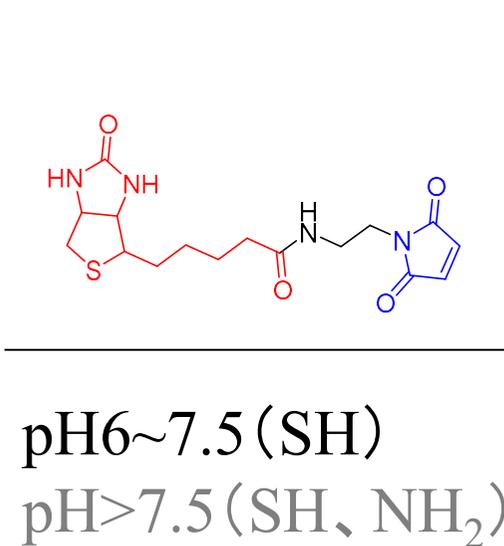
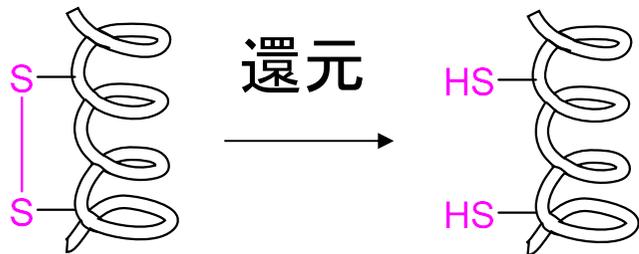
システイン残基



チオエーテル



- S-S結合

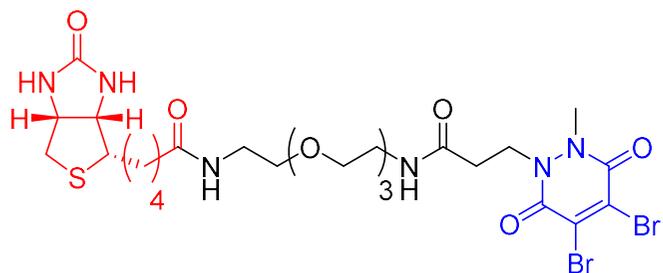


従来技術とその問題点

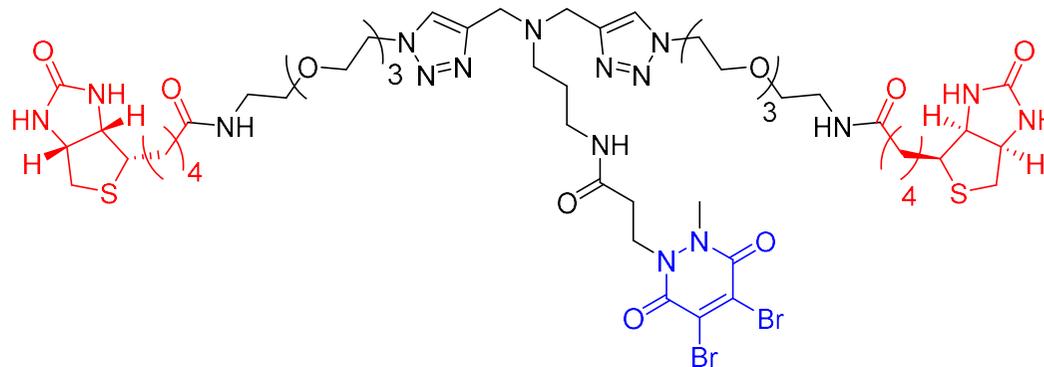
既に実用化されている

SH基を標的とするビオチン化試薬には、マレイミド基をもつビオチン化合物があるが、S-S結合を開裂して修飾するため、標識後のタンパク質は架橋を失い、高次構造が不安定になる問題があった。

タンパク質のビオチン標識剤



モノビオチン標識剤

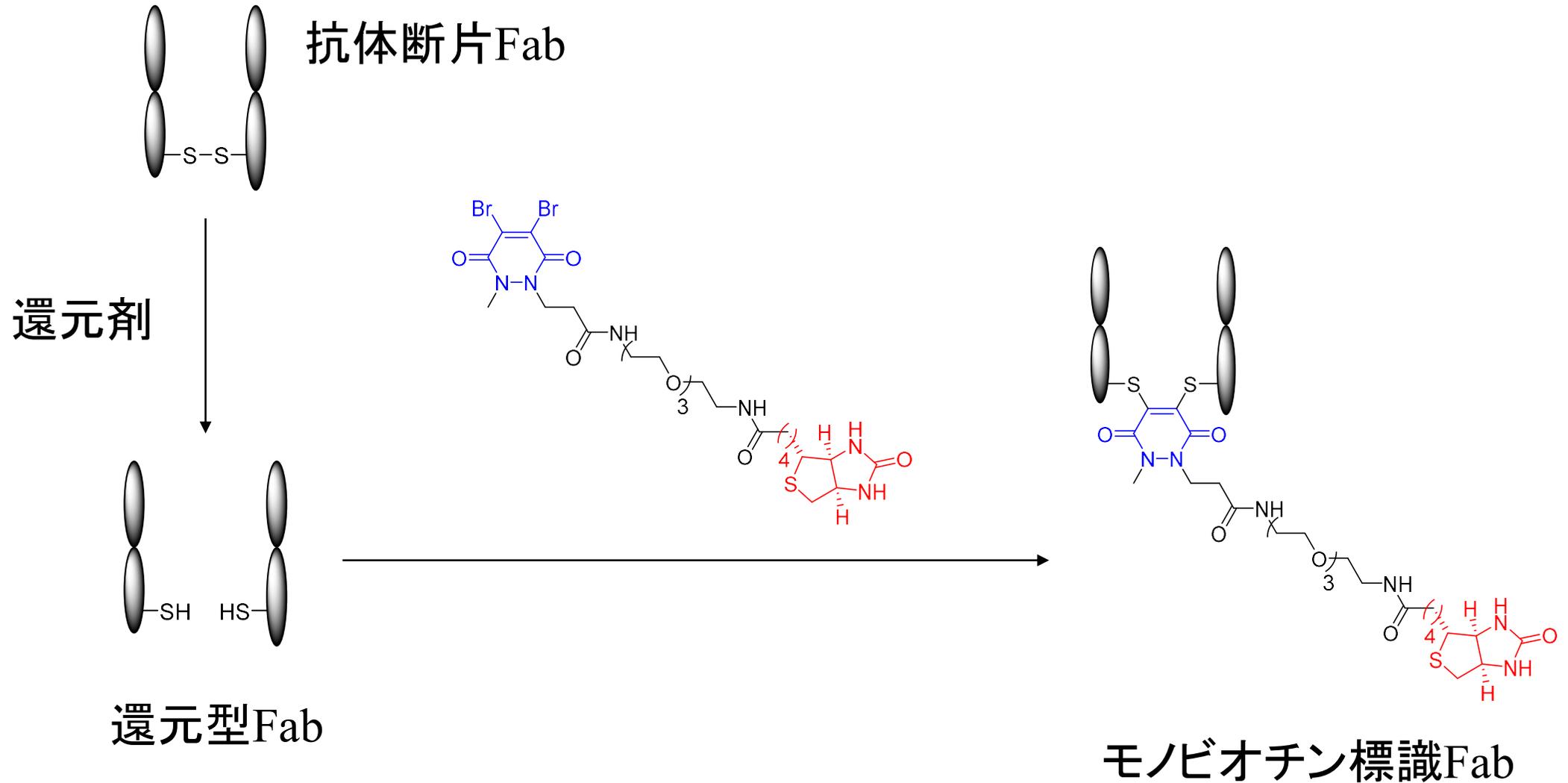


ダブルビオチン標識剤

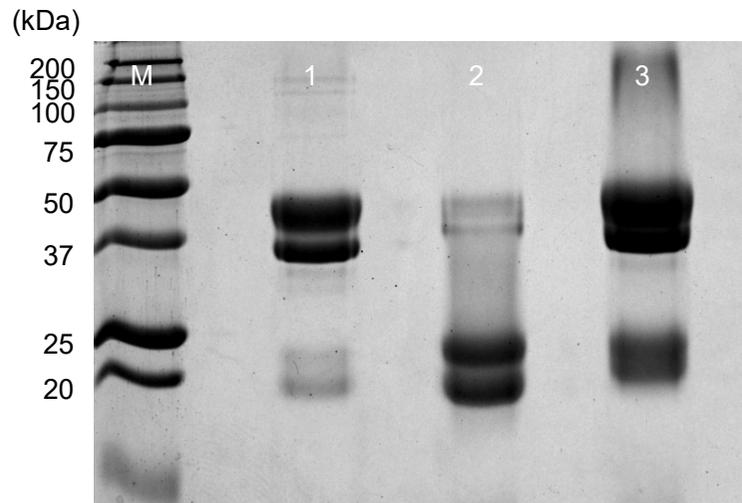
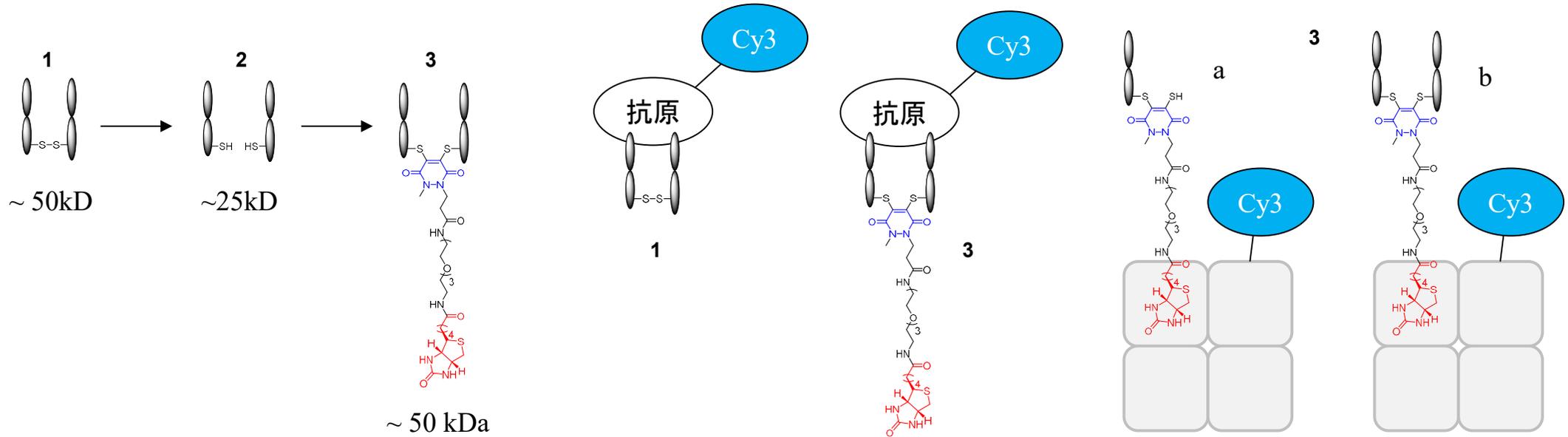
新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術は標識にともなう架橋の損失が問題点であったが、新技術では標識と同時に架橋を導入することに成功した。
- 従来は架橋を失っても問題のないタンパクへの標識に限られていたが、標識後のタンパク質が再架橋されるようになったため、標識前のタンパクの活性を維持したまま取り扱うことが可能となった。

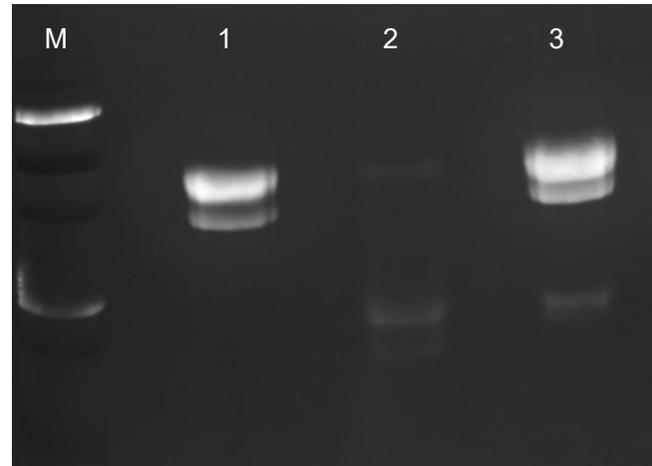
抗体断片Fabのモノビオチン標識



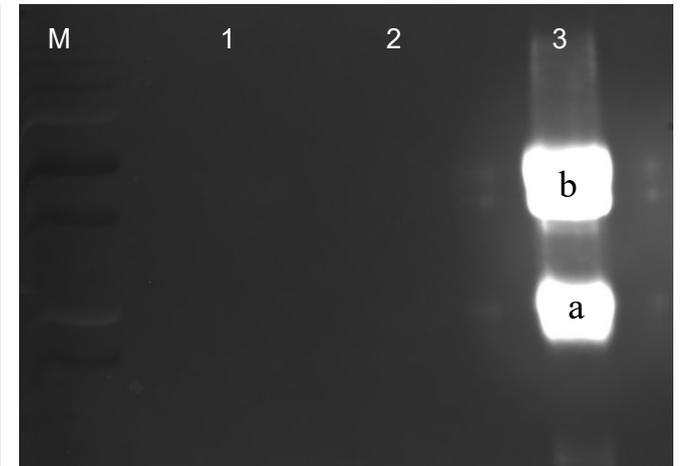
抗体断片Fabのモノビオチン標識



クマシーブルー染色

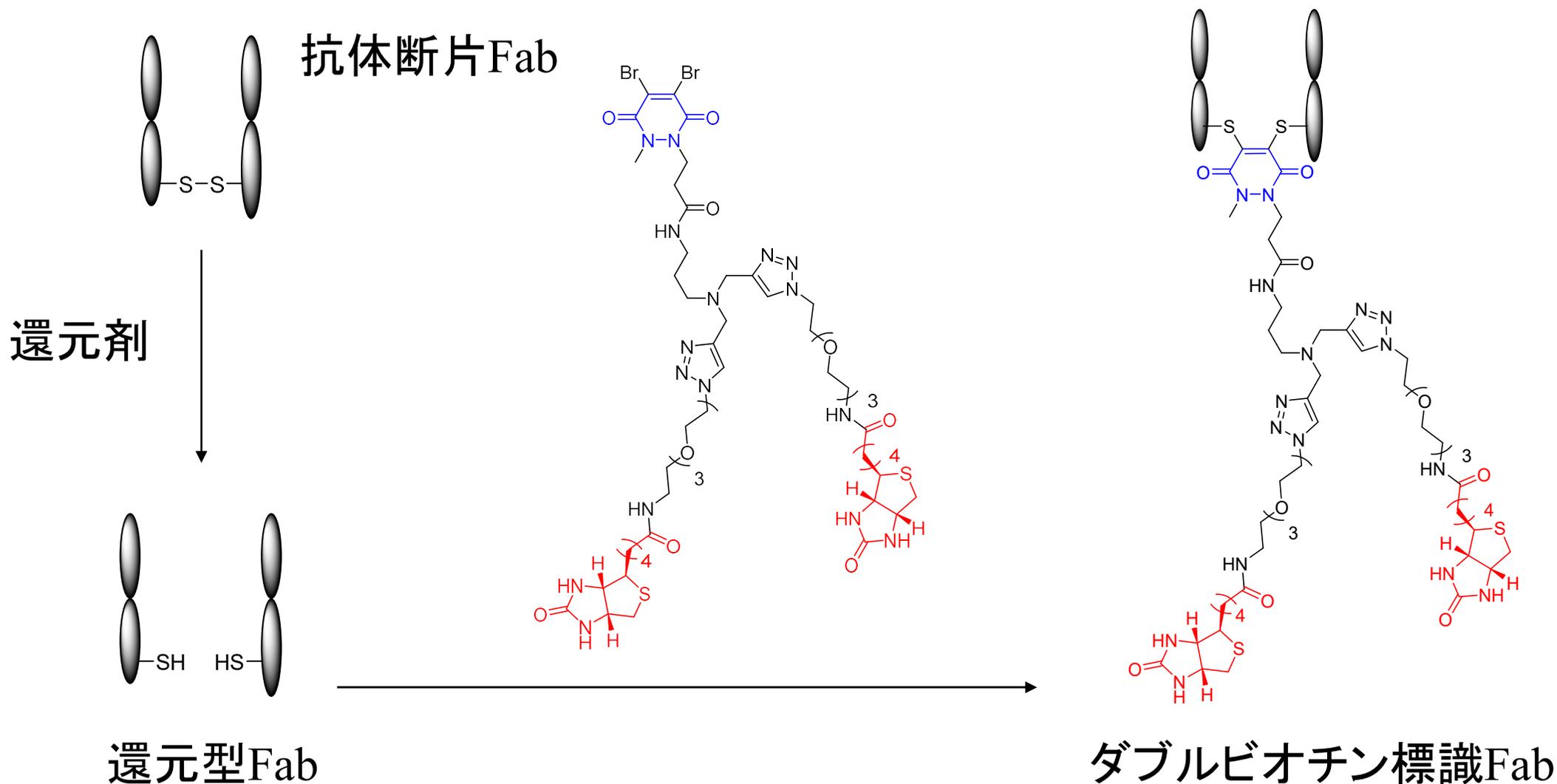


ウエスタンブロット
Cy3標識抗原(蛍光検出)

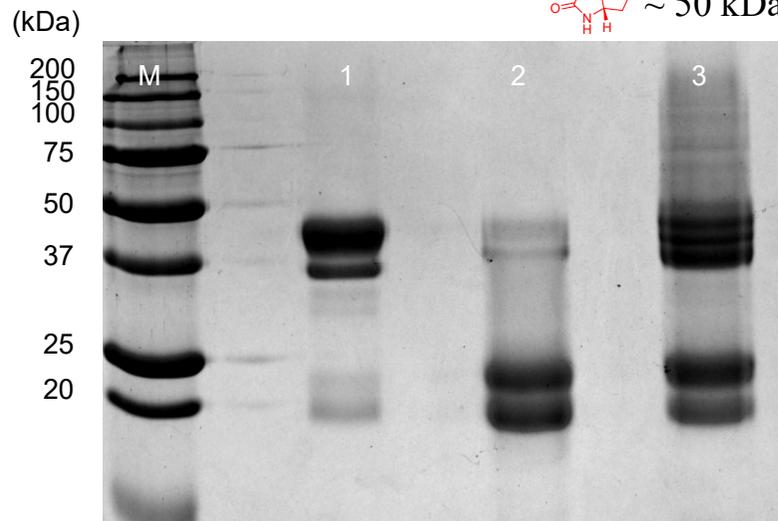
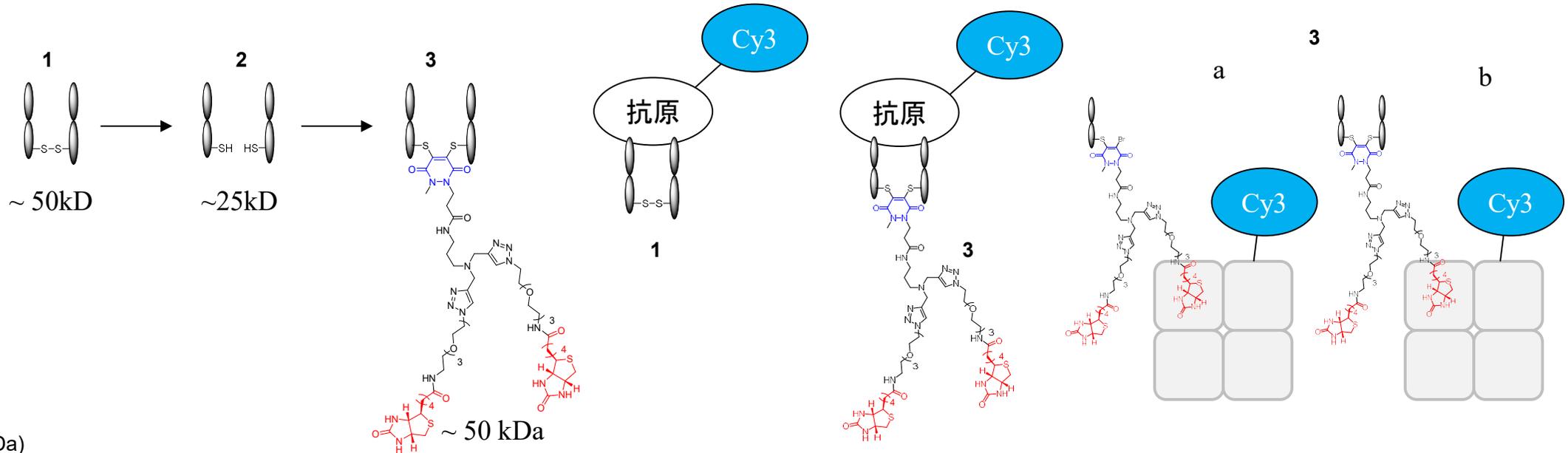


ウエスタンブロット
Cy3標識streptococcal protein(蛍光検出)

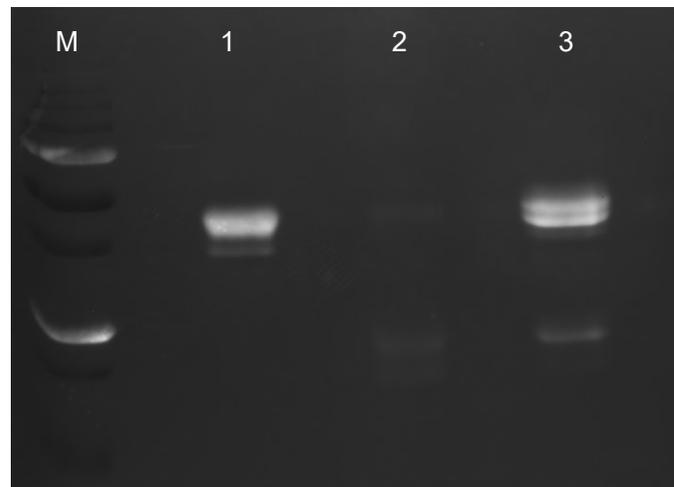
抗体断片Fabのダブルビオチン標識



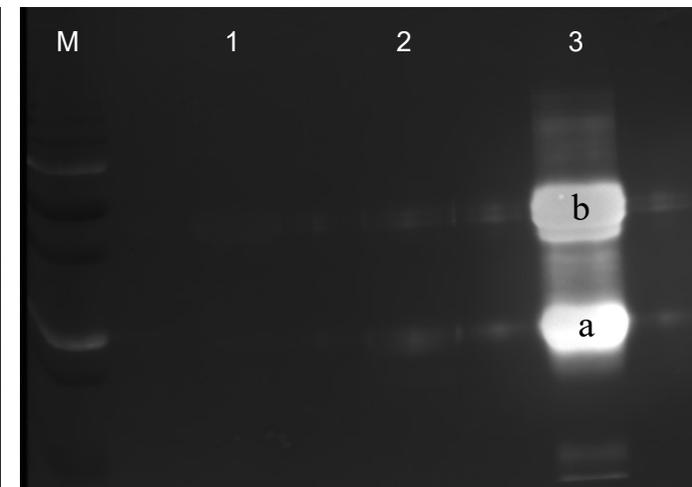
抗体断片Fabのダブルビオチン標識



クマシーブルー染色



ウエスタンブロット
Cy3標識抗原(蛍光検出)

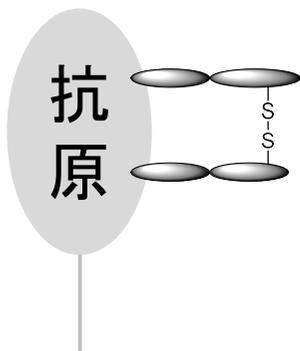


ウエスタンブロット
Cy3標識ストレプトアビジン(蛍光検出)

ビオチン標識Fabの活性評価

表面プラズモン共鳴法による
相互作用解析(Biacore X100)

センサーチップCM5



Fab

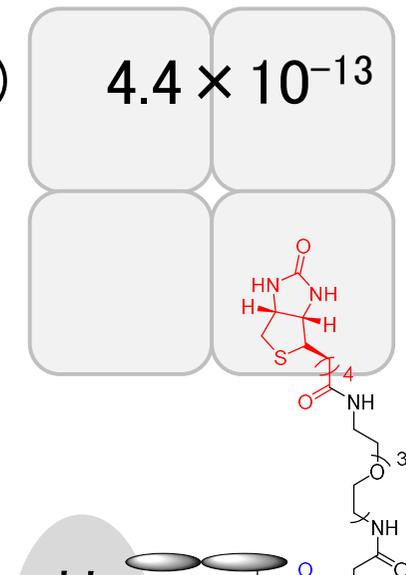
解離定数(M)

7.0×10^{-9}

streptavidin

解離定数(M)

4.4×10^{-13}



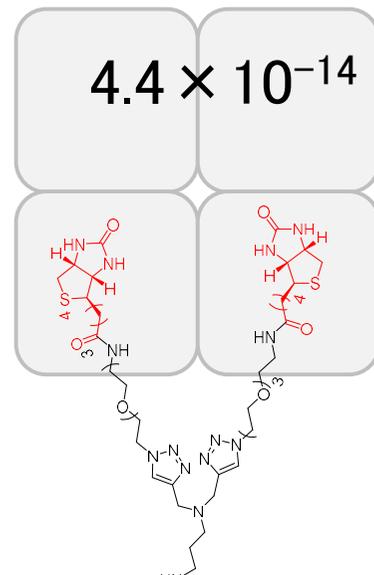
抗原

モノビオチン標識Fab

9.9×10^{-9}

streptavidin

4.4×10^{-14}



抗原

ダブルビオチン標識Fab

1.1×10^{-8}

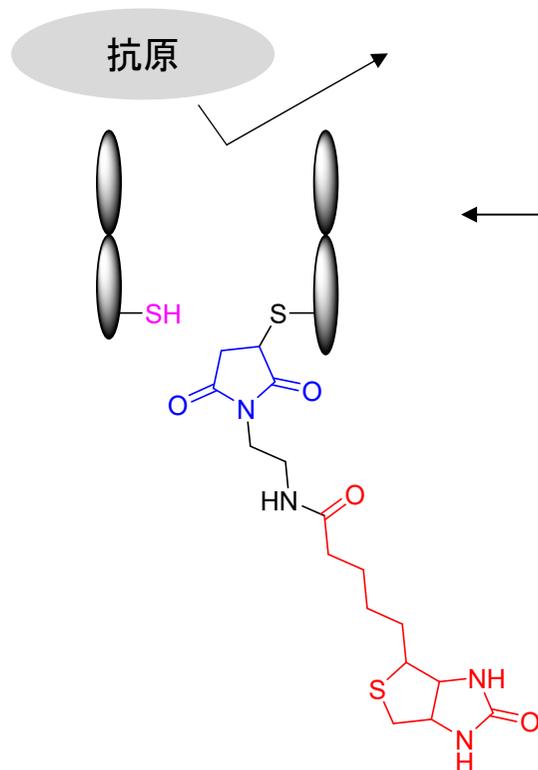
想定される用途1

- 本技術の特徴を生かすためには、**S-S結合をもつタンパク質のビオチン標識**に適用することで**品質保持**のメリットが大きいと考えられる。

想定される用途1

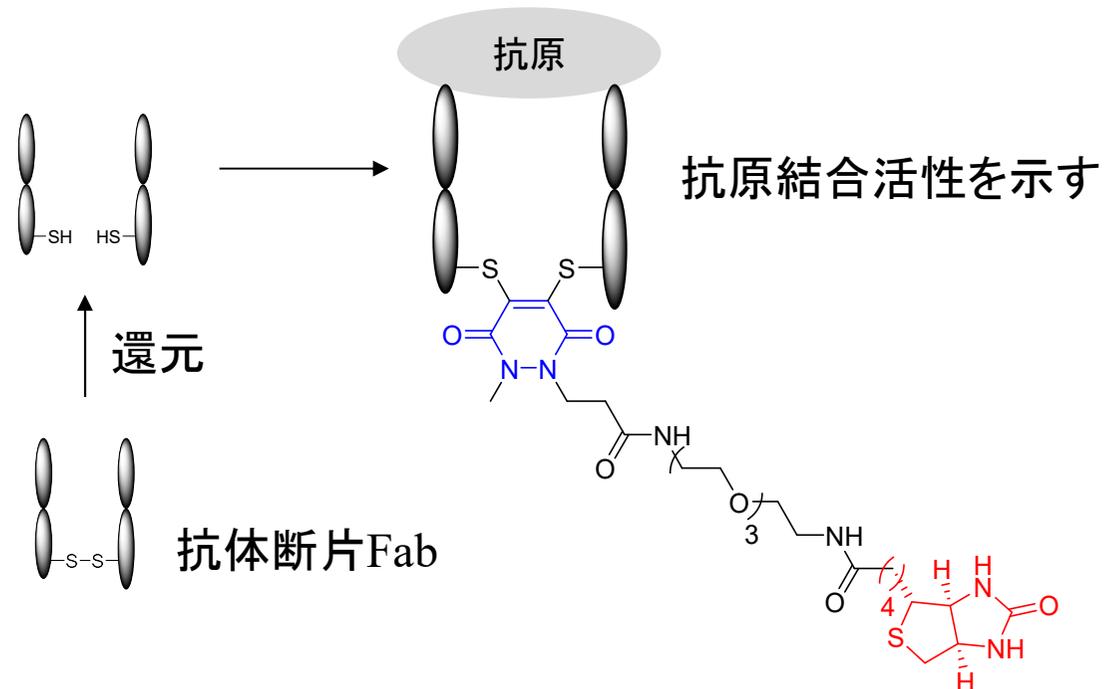
従来技術

ビオチン標識により架橋を失う
⇒高次構造が不安定化
⇒活性低下



新技術

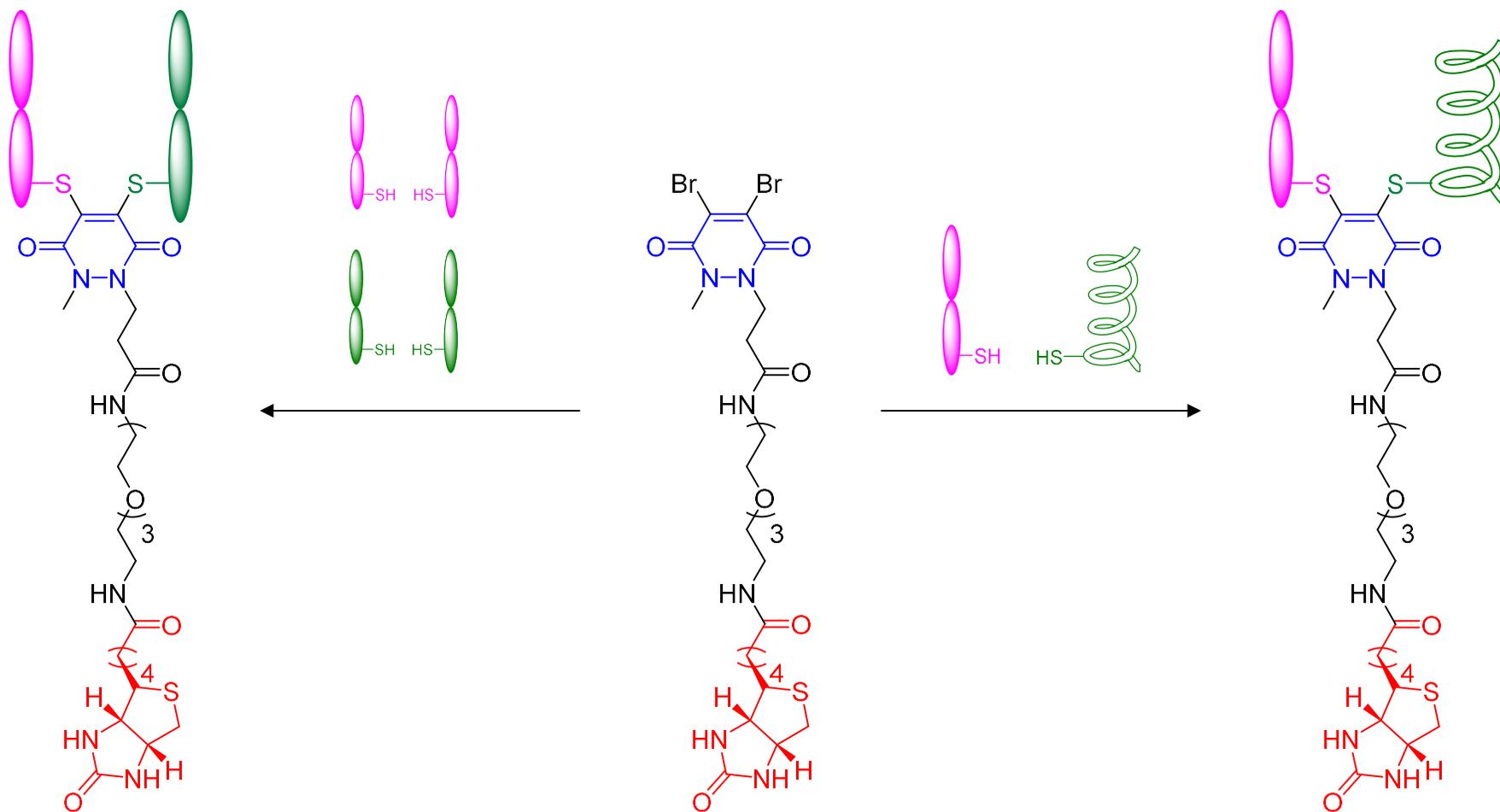
ビオチン標識とともに架橋される
⇒高次構造が安定化
⇒品質保持(活性維持)



想定される用途2

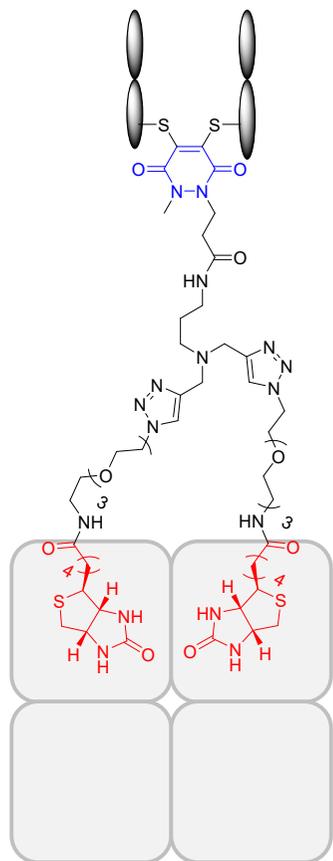
- また、本標識試薬が2つのSH基と反応する点に着目すると、2種類の異なる分子を本標識試薬で架橋するといった用途に展開することも可能と思われる。

想定される用途2

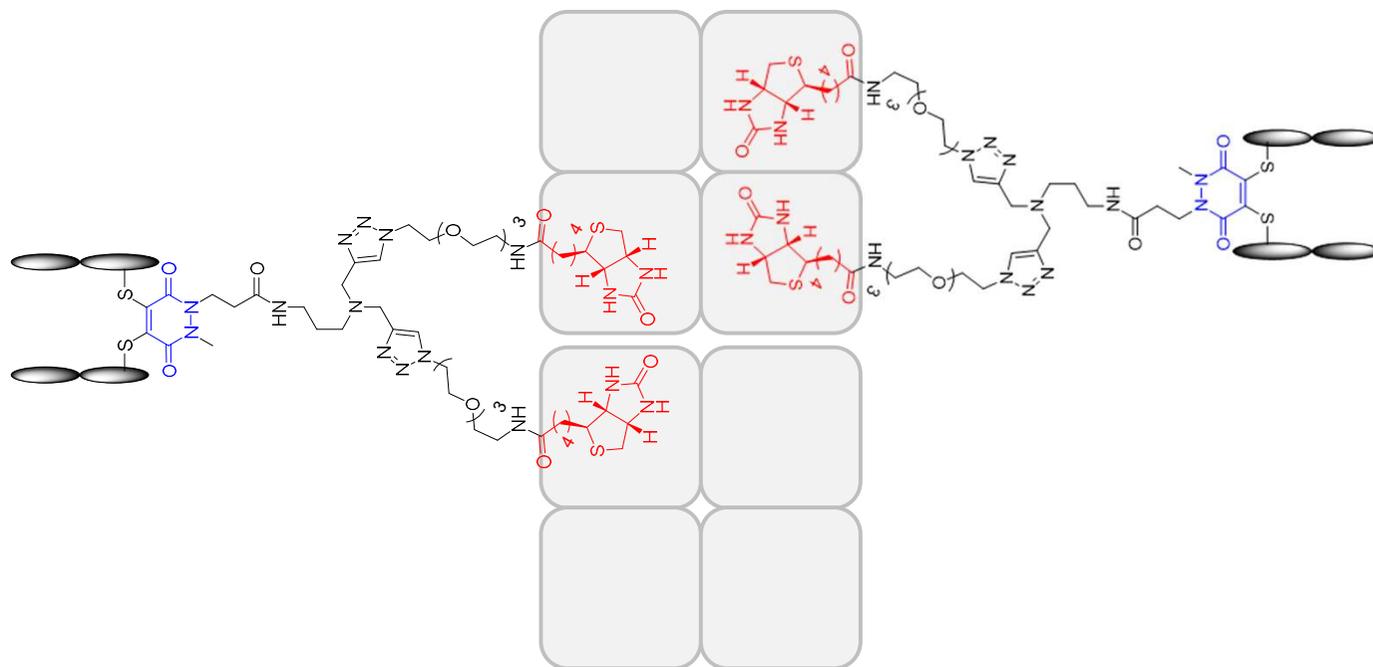


想定される用途3

タンパク質の配向制御



アビジンとタンパク質の交互積層化



実用化に向けた課題

- 現在、抗体断片Fabについて本標識試薬によるビオチン標識と同時に架橋が可能のところまで開発済み。しかし、他のタンパク質に適用可能かどうかの点が未解決である。
- 今後、種々のタンパク質について実験データを取得し、本標識試薬を適用していく場合の条件設定を行っていく。

企業への期待

- タンパク質の発現の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、ビオチン標識タンパクを開発中の企業、検出診断分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ビオチン標識剤、ビオチン標識されたタンパク質及びビオチン標識剤を含む免疫検査試薬
- 出願番号 : 特願2022-107195
- 出願人 : 埼玉大学
- 発明者 : 松下隆彦、松岡浩司、幡野健

産学連携の経歴

- 2008年-2013年 住友ベークライト社と共同研究実施
- 2018年-2019年 JST研究成果展開事業（A-STEP）に採択
- 2020年-2021年 JST研究成果展開事業（A-STEPトライアウト）に採択
- 2021年 JST研究成果展開事業（A-STEP機能検証フェーズ）に採択

お問い合わせ先

埼玉大学

オープンイノベーションセンター

T E L 048-858-3849

e-mail coic@gr.saitama-u.ac.jp