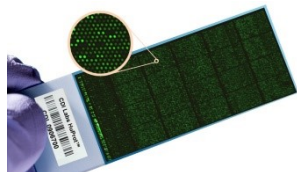


プレテインアレイとペプチドアレイを組み合わせた 抗体のバリデーションと抗原探索

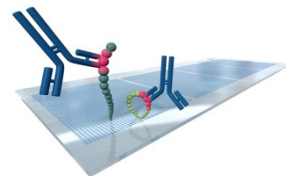
CDI社およびPEPperPRINT社マイクロアレイ 受託解析サービスを組み合わせた実用例



HuProt™マイクロアレイ



PEPperCHIP®マイクロアレイ

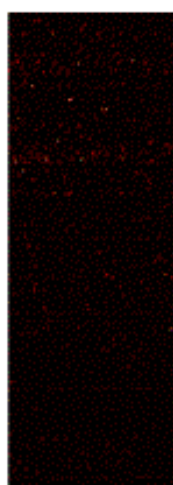


概要

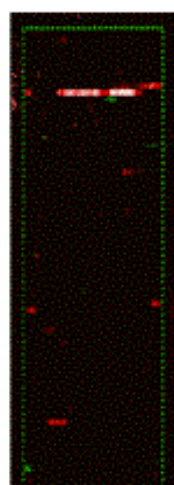
抗体は、抗体ベースのプロテオミクスや細胞生物学などの多くの研究領域で応用されていますが、診断用や研究用の抗体自体には触れられていません。しかし、抗体の特異性と、そのための信頼性のあるデータを生成する能力は、業界内で精査されています。高特異的な抗体は、信頼性があり再現性のあるデータを生成するための必要条件であり、抗体の特異性および交差反応を決定するための適切なバリデーション方法を早急に模索する必要があります。

ここでは、タンパク質とペプチドのマイクロアレイスクリーニングを組み合わせることによって、抗体を明確に検証するための直接的なアプローチを紹介します。ヒトトランスグルタミナーゼ2(TGM2)を標的とする、ZEDIRA社のマウスモノクローナル抗体、およびAtlas社のウサギポリクローナル抗体の2つの異なる市販の研究用抗体を比較しました。驚くべきことに、タンパク質とペプチドマイクロアレイ解析との間のいくつかの食い違いにもかかわらず、高度に検証されたウサギポリクローナル抗体の高い交差反応を観察しました。この結果は、免疫組織化学、ウェスタンブロットまたはRNAシーケンスなどのいくつかの検証方法の信頼性について疑問を投げかけます。しかし、タンパク質とペプチドを組み合わせたマイクロアレイスクリーニングは、抗体検証のための理想的なツールであるだけでなく、未知の抗原の同定と検証のためにも理想的なツールです。

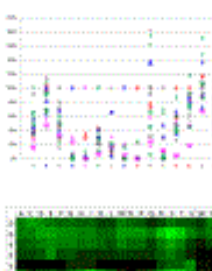
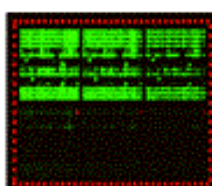
抗体のバリデーションワークフロー



タンパク質ヒット
バリデーション



エピトープ
項目別分類



HuProt™ヒトプロテオーム マイクロアレイ

- ・2万以上のタンパク質
- ・幅広い交差性プロファイリング
- ・抗原探索

PEPperCHIP®ペプチド マイクロアレイ

- ・1万以上のカスタムペプチド
- ・マルチの線状または立体配座
エピトープマッピング

PEPperMAP®エピトープ 置換スキャン

- ・エピトープの全アミノ酸による
全アミノ酸位置の交換
- ・保存および可変アミノ酸位置
の同定

2万以上のヒトタンパク質を用いた
HuProt™ヒトプロテオームマイクロアレイ
に対する抗体の最初のスクリーニングに
より、タンパク質レベルでの標的特異性
と標的外結合の決定!

抗体応答のさらなる検証のために、
PEPperCHIP®ペプチドマイクロアレイ
による交差反応および標的タンパク質
の多重高分解能エピトープマッピングを
適用!



これにより、抗体の実際のエピトープの
同定をもたらすだけでなく、観察された
交差反応についてのさらなる洞察も提
供可能に!!

HuProt™およびPEPperCHIPマイクロアレイの特長

①HuProt™のアレイテクノロジー

GSTおよびHis6がN末端にタグ付けされたタンパク質を発現・精製した後、従来のコントロールタンパク質(GSTやBSA、ヒストン、IgGなど)の他、線形回帰分析の使用や、放射線標識サンプルの解析、異なる解析ソフトウェアの使用を可能にする新たなコントロールと共に、スライドガラスにデュプリケートでプリントします。スライドは、追跡および保存のために、バーコードが付されています。各マイクロアレイは、GST免疫ブロットング(全タンパク質の98%が各分子量を認証)によってルーチ的に評価されています。

- ・世界最大級のヒトタンパク質搭載数 (ヒトタンパク質をコードする17,374の遺伝子、プロテオームの約87%を網羅)
- ・BSA等のコントロールを含むタンパク質をデュプリケートにスポット
- ・各タンパク質のN末端には、GSTおよびHis6がタグ付け (GST免疫ブロットングでプリンティングおよびコンテンツを確認)
- ・抗体やタンパク質、核酸と世界最大規模のヒトタンパク質コレクションとの相互作用を一度にプロファイリング

抗GST抗体でプローブされたHuProt™マイクロアレイのGST融合タンパク質



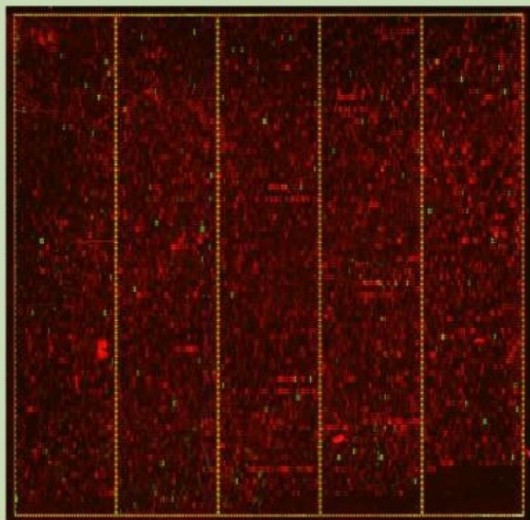
> 21,000
タンパク質

②PEPperCHIP®のアレイテクノロジー

高密度PEPperCHIPペプチドマイクロアレイは、24個のアミノ酸ナーカートリッジを備えた標準的なスライドガラスレーザープリンタでアミノ酸ナー粒子をデジタルレーザー印刷することによって生成されます。

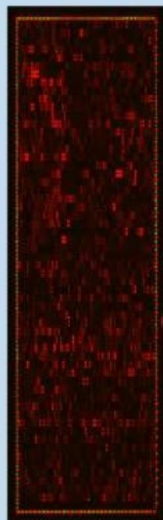
- ・非常に低い材料消費
- ・高いスポット密度 (1000ペプチド/cm²)
- ・デジタル印刷の柔軟性と生産時間の短縮
- ・通常の二重カップリング工程による高ペプチド品質
- ・経済的なカスタムおよび標準マイクロアレイソリューション

ディスカバリー
フォーマット



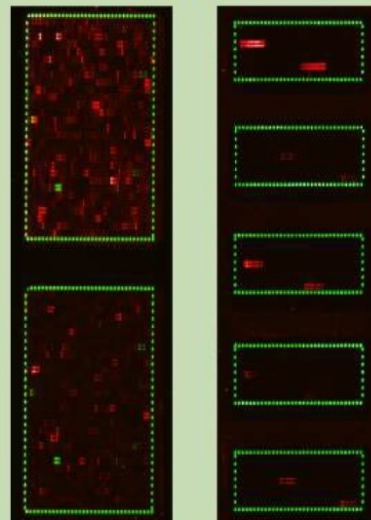
< 75,460
ペプチド

スタンダード
フォーマット



< 11,288
ペプチド

マッピング
フォーマット

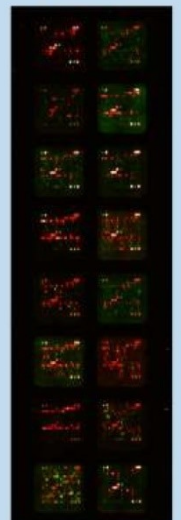


< 5,032
ペプチド



< 1,632
ペプチド

マルチプレックス
フォーマット

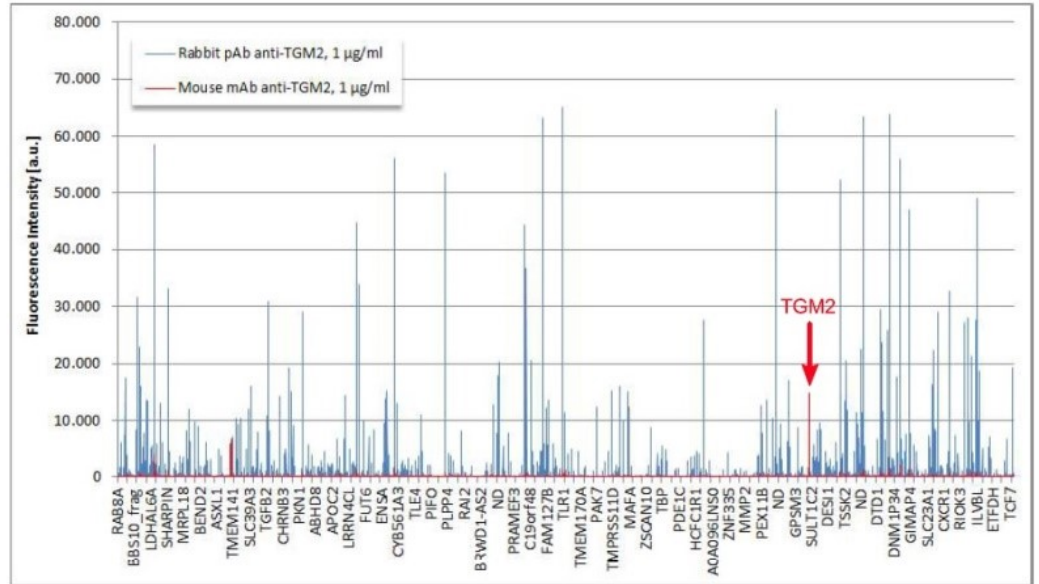
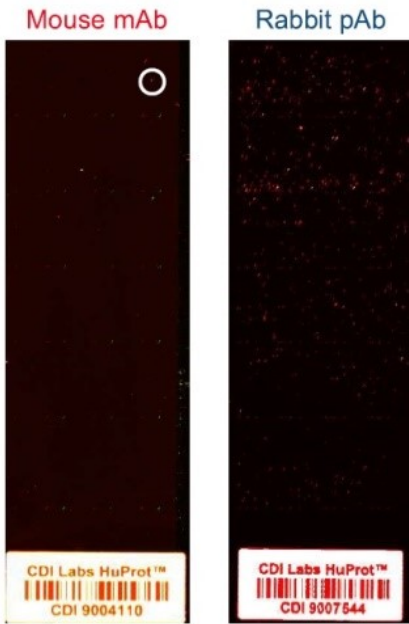


< 273
ペプチド

解析結果

①HuProt™プロテオームマイクロアレイ

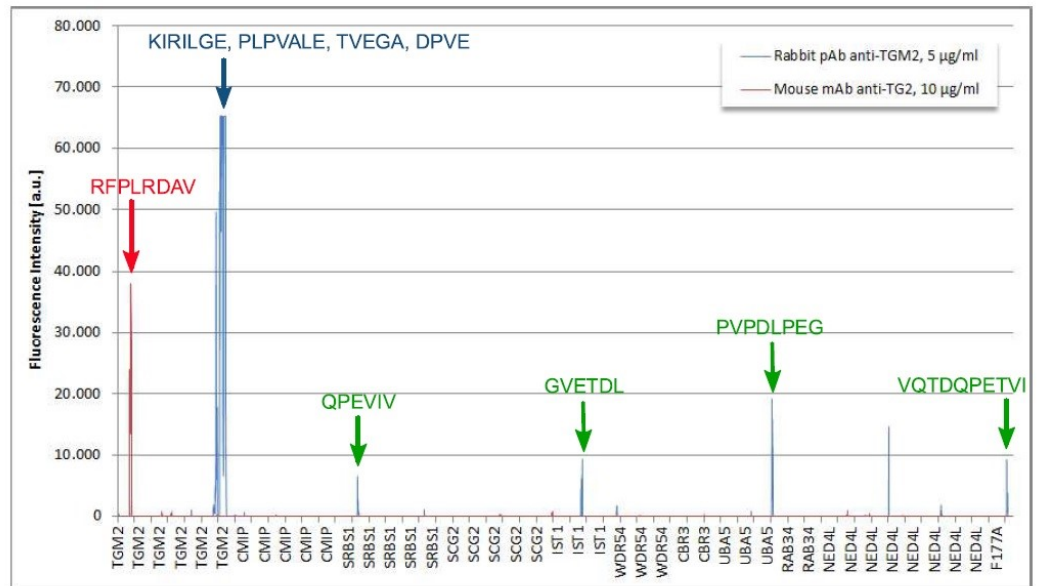
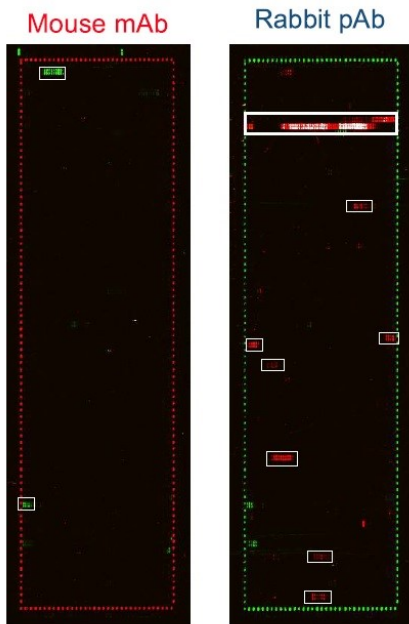
TGM2に対するマウスmAbおよびウサギpAbのHuProtヒトプロテオームマイクロアレイ、マイクロアレイスキャンおよび複合強度プロット
 マウス抗TGM2 mAb(赤ピーク)は、TGM2(丸/赤矢印)に対して主な応答を示し、そしてタンパク質CMIPおよびJHU07836.P082A01との弱い交差反応を示しました。高度なバリデーションが行われたウサギ抗TGM2 pAb(青ピーク)は、TGM2に対する応答に対して強い交差反応性を示しました。



②PEPperCHIP®ペプチドマイクロアレイ

TGM2に対するマウスmAbおよびウサギpAbのトップヒットタンパク質の多重化エピトープマッピング、マイクロアレイスキャンおよび複合強度プロット

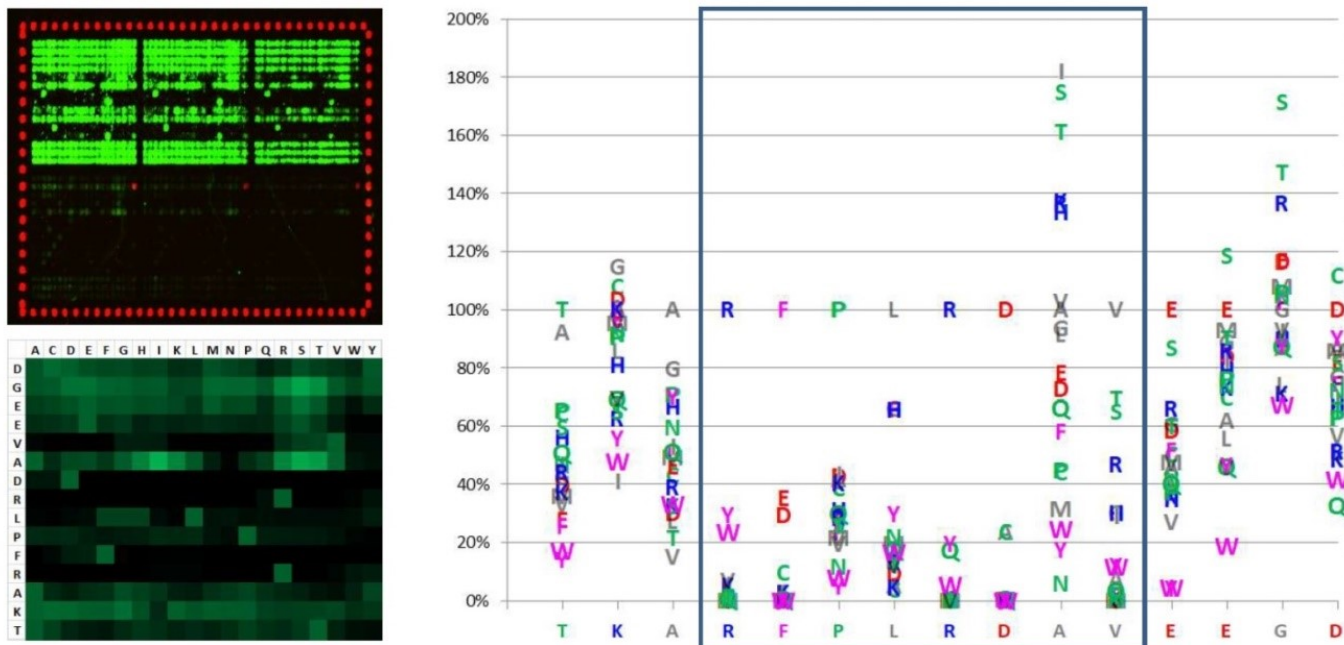
マウスmAbは、N末端TGM2エピトープREPLRDAV(赤矢印)を示し、オフターゲット結合は示しませんでした。ウサギpAbは、様々なC末端TGM2エピトープ(青矢印)に対して強いポリクローナル応答を示したが、TGM2エピトープと配列類似性を有するペプチド(緑矢印)とのいくつかの交差反応も示しました。オフターゲット結合は、タンパク質アレイと比較して弱い反応でした。



③PEPperMAP®エピトープ置換スキャン

TGM2に対するマウスmAbの野生型ペプチドTKARFPLRDAVEEGDのエピトープ置換スキャン、マイクロアレイスキャン、ヒートマップおよびアミノ酸置換プロット

100%の野生型ペプチドによるアミノ酸置換プロットは、提案されたエピトープRFPLRDAVをバリデーションし、そして7つの高度に保存された、または十分に保存されたアミノ酸位置として強調表示されました。このような多数の保存アミノ酸は、オフターゲット結合の可能性を減少させます。



マウス抗TGM2 mAbは、TGM2に対して明らかな反応を示し、タンパク質アレイ上で弱い交差反応を示しました。多重エピトープマッピングにおいては、交差反応を示しませんが、7つの保存されたアミノ酸位置を有する明確なエピトープを示しました。対照的に、高度にバリデーションされたウサギ抗TGM2 pAbは、タンパク質アレイに対して非常に強い交差反応を示したが、標的結合は示さなかった。そして、複数の弱いオフターゲット効果を伴う多重エピトープマッピングにおいては、強い標的結合を観察しました。

まとめ

新しい抗体バリデーションワークフローによって、ヒトTGM2に対するマウスモノクローナル抗体、および「強化されたバリデーション済み」ウサギポリクローナル抗体の試験を実施しました。3段階のアプローチは、タンパク質ヒット探索、ヒットバリデーションおよびエピトープ同定のための多重エピトープマッピング、保存および可変アミノ酸位置の詳細な分析のための最終的なエピトープ置換スキャンのためのタンパク質アレイスクリーニングに基づいています。これは、検証方法の比較と、2つの異なるタイプの研究用抗体のオフターゲット結合の解析を目的としています。

ウサギポリクローナル抗体はタンパク質マイクロアレイ上で強い交差反応を示し、標的結合は示しませんが、ペプチドマイクロアレイ上でマッピングされた多重エピトープにおいて、強い標的特異性およびより低い交差反応性であることが判明し、期待通りのものでした。マウスモノクローナル抗体については、より高い標的特異性、およびより少ないオフターゲット結合が見られました。多重エピトープマッピングは、抗体のエピトープに対応する単一の応答のみを示し、最後のエピトープ置換スキャンは7つのよく保存されたアミノ酸位置を強調表示しました(交差反応性が低く、オフターゲット結合がないことが前提条件)。

本掲載データは、PEGS (The Essential Protein Engineering Summit) 2019で発表されたPEPperPRINT社による実験データから、一部を引用しています。

フィルジェン 株式会社 

【お問い合わせ】 受託解析部

TEL : 052-624-4388 FAX : 052-624-4389

メール : biosupport@filgen.jp URL : <https://filgen.jp/>

代理店

(Apr.2019)