

Epitope 解析を利用した CRP の新規診断法の開発とその臨床的意義に関する研究

日大生産工(院) ○菊地 茉甫
日大生産工 神野 英毅

1. 緒言

体内に炎症や組織の崩壊が起こると、血液中に C-reactive protein(CRP)が大量に増加する。CRP は急性炎症や組織障害の有無とその程度を反映することから、その検査は細菌性感染症、心筋梗塞、悪性腫瘍などの疾患の重症度、経過、予知、治療効果の判定に極めて有効とされている。CRP の測定は一般化し高頻度に検査されているが、新規の臨床的意義を研究するためにはさらなる高感度化が必要となっている。本研究では、Cell line モノクローナル抗体を使用して CRP の epitope を解析することで、構造的な視点から抗体の特異性を分析し、epitope を利用した CRP の新規診断法の開発を目指す。

2. 実験方法

【PCR(Polymerase chain reaction)】

まず、ヒト血液中の白血球から DNA の抽出を行った。全血に 3 倍量の EDTA 溶液を加えて DNA を抽出した。

また、CRP の遺伝子配列を検索し、CRP 構造の 5 つの subunit のうち、1 つの subunit を増幅するための primer(MKF-01,MKR-01)を設計した。抽出した DNA を鋳型とし、設計した primer を用いて PCR を行った。得られた PCR 増幅産物(CRP 遺伝子断片)をクリスタルバイオレットゲルを用いて精製を行った。

【*E.coli*(TOP10)への形質転換】

PCR で増幅した CRP 遺伝子断片を元に、CRP タンパク質を発現させる必要がある。そこで、宿主細胞に大腸菌(*E.coli*)を用いた遺伝子組換えを行った。TOPO vector に精製した CRP 遺伝子断片を組み込み、氷上で TOP10 cell と混合した。この時、PCR 増幅産物を等倍、10 倍、100 倍にそれぞれ希釈して混合した。ヒートショックにより plasmid を TOP10 cell に導入し、Ampicillin 入り LB Plate に展開後一晩攪拌培養した(200rpm,37°C)。

【コロニー-PCR】

前日展開した LB Plate には多くのコロニーが形成されたが、全ての cell に plasmid が導入

されているわけではない。plasmid が導入されている cell のみを選択するために、cell を鋳型とし、primer(MKF-01,MKR-01)を用いて再び PCR を行った。また、plasmid の DNA 挿入部位に目的 DNA 配列が導入されているかを確認する為、plasmid の T7 promoter に相補的な primer(T7-F,T7-R)を用いて PCR を行った。

コロニー-PCR でバンドが確認できたコロニーのみを Ampicillin 入り LB 培地に継代し一晩攪拌培養した(200rpm,37°C)。培養液から plasmid を抽出した。

【*E.coli*(BL21)への形質転換】

抽出した plasmid からタンパク質を発現させるため、*E.coli*(BL21)へ再び形質転換を行った。氷上で BL21 と plasmid を混合し、ヒートショックにより cell に plasmid を導入した。Ampicillin 入り LB 培地に全ての形質展開物に加え、一晩攪拌培養した(200rpm,37°C)。

【IPTG による発現の誘導】

IPTG は β -ラクトースと構造がよく似ており、*E.coli* のラクトース(lac)オペロンの転写制御に大きく関わる物質である。ラクトースと異なり、 β -ガラクトシダーゼで分解されない為、持続的にタンパク質の発現が増大する。

一晩培養した培養液を新たな LB 培地に継代し、600nm における吸光度が 0.5 になった時点で培養液を 2 つに分けた。一方の培養液にのみ IPTG 終濃度が 1.0mM になるように加え、IPTG 誘導培養液と IPTG 非誘導液の両方を作製して培養を続け、1 時間おきに培養液を採取した(0~5h)。採取した培養液は遠心分離(16,000×g,1min)を行い、得られたペレットを凍結した。

【発現の検出】

IPTG 誘導実験で採取したペレットを Lysis Buffer に溶解し、液体窒素を用いて凍結融解を繰り返した。遠心分離(4°C,16,000×g,10min)を行い、得られたペレットと上清を SDS-PAGE 電気泳動により確認した。

また、IPTG 誘導実験で採取したペレットを

Study on gene recombinant CRP using epitope analysis
and its application to clinical diagnosis
Maho KIKUCHI and Hideki KOHNO

Lysis Buffer に溶解し、Latex 凝集反応により検出を行った。

3. 結果および考察

全血から抽出した DNA の吸光度を測定すると、260nm の時 0.13、280nm の時 0.08 であった。一般に純粋な核酸の DNA は $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$ であるとされるので、多少のタンパク質が混入してしまっていると考えられる。しかしながら、抽出した DNA をアガロース電気泳動で確認したところ、複数のバンドは検出されなかったため、鋳型として使用するには問題ないと判断した。また、一般的な DNA $1 \mu\text{g/ml}$ は $OD_{260} = 0.02$ なので、今回抽出した DNA は $6.5 \mu\text{g/ml}$ であると考えられた。

抽出した DNA を鋳型とし、primer (MKF-01, MKR-01) を使用して PCR を行った結果は以下ようになった (Fig.1)。増幅した DNA の 953bp 付近にバンドが確認できた。また、得られた PCR 増幅産物を精製した結果を Fig.2 に示す。PCR の時と同様に 953bp の位置にバンドが確認できた。

TOP10 への形質転換後のコロニーの形成において、等倍のプレートはコロニー数 42 個、10 倍のプレートにはコロニー数 15 個、100 倍のプレートはコロニー数 1 個となった。よって最も良い希釈倍率は 10 倍であると言えた。

10 倍希釈のプレートから 6 つのコロニーを選択し、コロニー-PCR を行った結果 2, 4 レーンのコロニーに目的遺伝子のバンドが確認できた。

IPTG 誘導実験では、SDS-PAGE の結果、ペレットを泳動したゲルに目的タンパク質の位置にバンドが確認できたが、とても薄いものだった (Fig.3)。

Fig.4 は CRP 濃度 0ng/ml と今回発現させたタンパク質のペレットを Lysis Buffer で希釈したものを LPIA-200 で測定した結果である。検量線より培養液 $500 \mu\text{l}$ に約 $200 \mu\text{g/ml}$ の CRP が発現していると考えられた。

今後、発現タンパク質の精製を行い、他の Immuno assay 法によっても epitope の有無を確認する。

【参考文献】

- 1) Jacqueline A. Taylor, Christopher J. Bruton, "Amino acid sequence homology between rat and human C-reactive protein" Biochem.J.1984
- 2) 松尾雄志, 田中俊夫 組換えヒト CRP の生産と臨床検査への応用 臨床病理 第 50 巻 第 1 号 2002

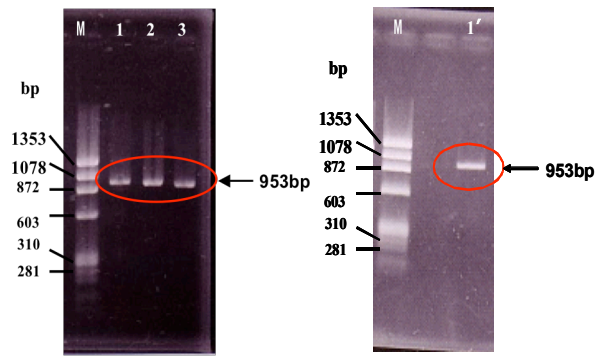


Fig.1 Detection of CRP gene amplified in PCR products

Fig.2 Purification of PCR products

1~3: PCR 増幅産物 1': 精製物

共通: Marker4 ($\phi \times 174/\text{Hae III}$ digest)

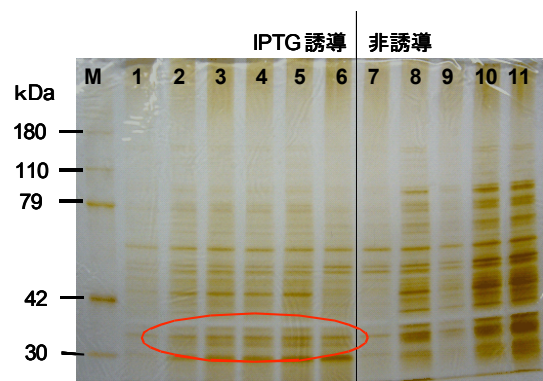


Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein during 5 hour of reaction by IPTG

Marker: Silver Stain MW Marker, High Range

1~6: 0~5h IPTG 誘導 7~8: 1~5h 非誘導

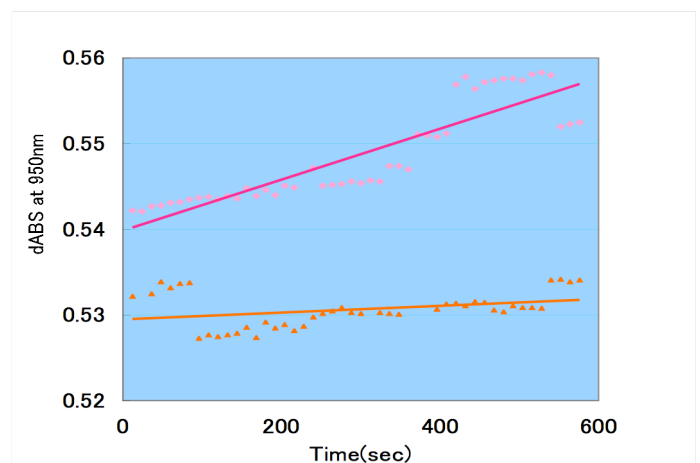


Fig.4 Measurement of recombinant CRP by Latex Photometric Immuno assay

● 発現タンパク質

■ CRP 0ng/ml