

Epitope 解析法を利用した CRP の新規診断薬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

近年 CRP の測定は様々な疾患の炎症マーカー、リスクファクターとして高頻度に行われているが、新規の臨床的意義を研究するためには測定のさらなる高感度化が必要となっている。本研究では、CRP 測定試薬の特異性を向上させるために CRP の Epitope に注目した。Epitope は通常 5~10 残基程度の領域であるが、抗体が直接結合する部位であるため、Epitope を利用した測定試薬の特異性の向上が期待される。また、解析した Epitope を利用した新たな検出法の開発も期待できる。

2.実験方法

【PCR(Polymerase chain reaction)】

まず、ヒト血液中の白血球成分から 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 の 1 つの subunit を部位特異的に増幅するため、7 種類の primer(MKF-01,MKF-02, MKF-03, MKF04,MKF-05,MKF-06,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 6 種類の PCR 増幅産物(Fig.1)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)の形質転換】

次に、宿主細胞に大腸菌(*E.coli*)を用いた遺伝子組換えを行った。CRP 遺伝子断片を pET-100/ D-TOPO vector [Invitrogen] にそれぞれサブクローニングし、氷上で TOP10 cell と混合した。ヒートショックにより組換え plasmid を TOP10 cell を形質転換し、Ampicillin 入り LB Plate に展開後 15h 培養した(37℃)。

【コロニーPCR】

Plasmid が導入されている cell のみを選択するため、コロニーを鋳型とした 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ため、plasmid の T7 promoter に相補的な primer を用いた PCR を合わせて行った。

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、15h 攪拌培養した(200rpm,37℃)。培養液から plasmid を抽出した。

【*E.coli*(BL21)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)の形質転換を行った。氷上で BL21 と plasmid を混合し、ヒートショックにより BL21 cell に plasmid を導入した。Ampicillin 入り LB 培地に全ての形質転換物に加え、15h 攪拌培養した(200rpm,37℃)。

【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ため、持続的にタンパク質の発現が増大する。

15h 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、それぞれ 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 $\times$ 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(16,000 $\times$ 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。

【Epitope 解析】

Lysis Buffer に溶解したペレットを各種 Immunoassay 法(ELISA, Western Blot, Latex 凝集反応)による検出および定量を行った。各種 Immunoassay 法には、以前作製した 4 種類の抗 CRP モノクローナル抗体(MoAb)(Lot.020210, Lot.050921, Lot.030700, Lot.CP80105)を使用し、各抗体の Epitope を解析した。

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

3.結果および考察

全血から抽出した DNA を鋳型とし、設計した 6 組の primer を用いて PCR を行った結果、いずれも目的部位の増幅に成功した。

さらに IPTG 誘導実験後の発現タンパク質を SDS-PAGE で検出した結果、5 種類の発現タンパク質においてバンドを検出することができた。

Western Blot, ELISA による発現タンパク質の検出結果を Table 1 に示す。この 2 つの結果より、MoAb Lot.020210, Lot.030700, Lot.CP80105 の Epitope はいずれも CRP の MK06 領域(173~206 残基)に存在することが分った。MoAb Lot.050921 は MK06 領域と反応を示さなかったことから、Epitope は他の 3 種類とは異なり、CRP の 147~172 残基に存在することが分かった。

Latex 凝集反応で発現タンパク質を測定するにあたり、4 種類の CRP MoAb 感作 Latex 試薬を作製し、検量線を作成した(Fig.2)。試薬の反応性は MoAb Lot.020210, Lot.050921, Lot.CP80105, Lot.030700 の順に高かった。Lot.030700 の試薬は反応性が低く、検量線に乱れがあったため Lot.020210, Lot.050921, Lot.CP80105 の試薬で実際に検体を測定した。

検体の測定には肝疾患検体と II 型糖尿病検体の 2 種類を使用した。肝疾患検体を測定した結果、MoAb 試薬の測定値はいずれも PoAb 試薬と相関性が見られなかったが、PoAb F(ab)'₂ 試薬と 1:1 の相関性が見られた(Fig.3)。II 型糖尿病検体においても同様の結果が得られた。

現在広く行われている検体測定においては、試薬の非特異的反応を防ぐために PoAb F(ab)'₂ 試薬を使用するのが主流となっている。しかし、今回の測定で MoAb 試薬を使用することで PoAb F(ab)'₂ 試薬と同様の結果が得られることが分かった。そこで今後 MoAb の Fc 部位を処理することで、さらに試薬の特異性の向上が期待出来ると言える。

【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

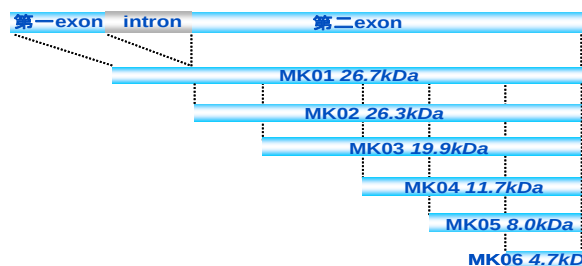


Fig.1 Gene sequences of human and recombinant CRP.

Table 1 Result of ELISA & Western Blot

MoAb	Isotype	Reactivity with Recombinant CRP					
		ELISA					
		MK01	MK02	MK03	MK04	MK05	MK06
MoAb Lot.020210	IgG2a κ	±	+	+	+	+	+
MoAb Lot.050921	IgG1 κ	±	+	+	+	+	-
MoAb Lot.030700	IgG1 κ	±	±	+	+	+	+
MoAb Lot.CP80105	IgG1 κ	±	+	+	+	+	+

MoAb	Isotype	Reactivity with Recombinant CRP					
		Western Blot					
		MK01	MK02	MK03	MK04	MK05	MK06
MoAb Lot.020210	IgG2a κ	±	+	+	+	+	+
MoAb Lot.050921	IgG1 κ	±	+	+	+	+	-
MoAb Lot.030700	IgG1 κ	±	+	+	+	+	+
MoAb Lot.CP80105	IgG1 κ	±	+	+	+	+	+

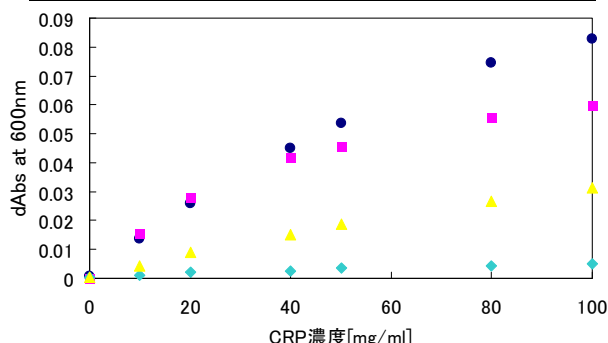


Fig.2 Calibration curve by Latex Photometric Immuno assay in variety of MoAbs (● MoAb Lot.020210, ◆ MoAb Lot.030700, ▲ MoAb Lot.050921, ■ MoAb Lot.CP80105)

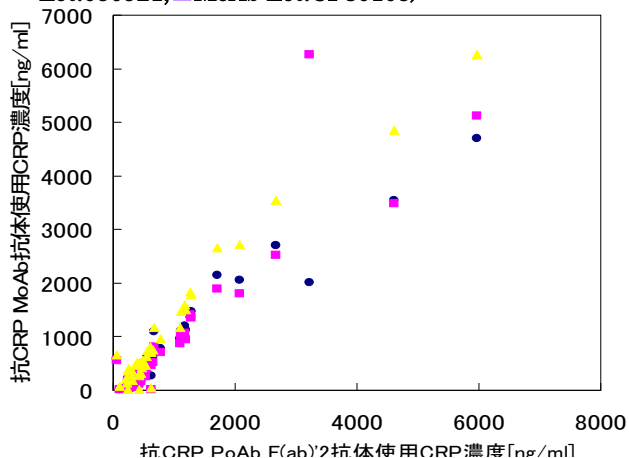


Fig.3 Comparison of F(ab)'₂ type and MoAbs in hepatitis patients by Latex Photometric Immuno assay (● MoAb Lot.020210, ■ MoAb Lot.050921, ▲ MoAb Lot.CP80105)