

植物性病原菌代謝物の免疫学的迅速分析法の研究開発

日大生産工(院) ○島崎 健一

産総研 鳥村 政基 日大生産工 神野 英毅

1.緒言

植物の根に寄生して自ら分泌する毒素により植物を衰弱・枯死させる土壌微生物が存在する。その中でも近年白紋羽菌 (*Rosellinia necatrix* Prillieux) が果樹木に感染して被害をもたらす場合が多く見受けられ、これによる経済的被害は年々深刻化している¹⁾。農園などで一本の樹木が感染した場合、土壌を介して他の樹木へと感染が拡大する可能性が高く、そうした事態に陥らないよう早期に感染を発見し対策を施すことが必要となる。白紋羽感染木は外観調査で異常が認められた場合には、すでに感染がかなり進行しており手遅れであるとされている。したがって、感染の早期発見のためには、この白紋羽菌が産生し樹木内に吸収された毒素 CytochalsinE (以後 CytE と省略) を感染初期の段階で検出する手法の確立が強く望まれる。免疫学的測定 (immunoassay) は感度、特異性が高く、その特異抗体が得られれば迅速かつ低コストに多検体を検査することができる。通常、CytE のような低分子化合物を免疫してもその特異抗体を得ることはできない。低分子化合物 (ハプテン) をキャリアタンパク分子へ共有結合させることでコンジュゲートを合成し、このコンジュゲートを用いて免疫する必要がある。

今回 CytE の迅速・簡便な検出技術の開発を目的とし、CytE と種々のキャリアタンパクとの複合体を合成し、このコンジュゲートを用いてモノクローナルおよびポリクローナル抗体作製を試み、抗体活性評価に必要な

酵素免疫測定法の構築を行った。

2.実験操作

CytE は光安定性が低い化合物であるため随時遮光して使用した。本化合物の抗体を作製するために、ハプテン—キャリアコンジュゲート 4 種を合成した。キャリアタンパクには BSA (bovin serum albumin, Mw.66000), KLH (key limpet hemocyanin, Mw.1000000), OVA (ovalbumin, Mw.44000), Avidin (Mw.68000) を用いた。Borate-buffer (pH 8.0) にキャリアタンパクを溶解させ、攪拌下で CytE の活性エステルをゆっくり滴状に加えて 4 時間反応させた。反応終了後、ゲルろ過法を原理とした PD-10 カラム (担体: Sephadex-G-25) を用いて脱塩精製を行った。CytE への修飾状態の確認は、修飾前後のタンパクについてのマトリックス支援レーザー脱離・飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) や紫外外部吸収スペクトルの変化から評価した。その 4 種のコンジュゲートを免疫原としそれぞれマウスに免疫した。各免疫により得られた抗血清の本化合物に対する反応性は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法を基礎とした以下の手順によって評価を行った。免疫原に用いた 4 種のコンジュゲートをそれぞれポリスチレン製 96 穴プレートウェルに加え一晩かけて吸着固相化した。それぞれのウェルに固相抗原用いた以外のコンジュゲート由来の抗血清を加え反応させた

(抗原交差)。最後に二次抗体、酵素基質により発色させ反応性を調べた。— Fig.1

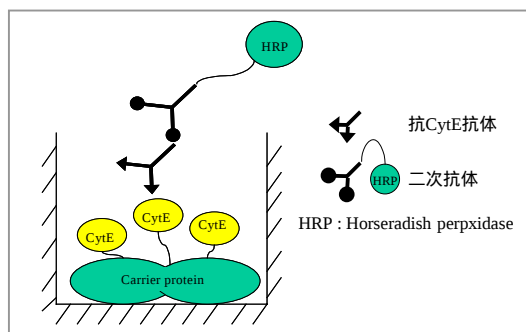


Fig.1 ELISA assay 系模式図

3.結果およびまとめ

合成したハプテンキャリアーコンジュゲートを MALDI-TOF-MS で評価したところ、BSA は1分子あたり約9.3分子、OVA は約1.8分子、本化合物がコンジュゲートされていることが確認できた。KLH は紫外外部吸収スペクトルの修飾前後で変化を確認した。合成コンジュゲートを免疫して得たマウス抗血清を上記の抗原を交差させた ELISA 法で評価したところ、Fig.3,4 が得られた。陰性コントロールの通常マウス血清に比べ KLH-CytE, OVA-CytE から得た抗血清に対して反応性を確認できた。今後、CytochalasinE 単体を直接取り扱うアッセイ系を確立させ反応性を確かめる必要がある。

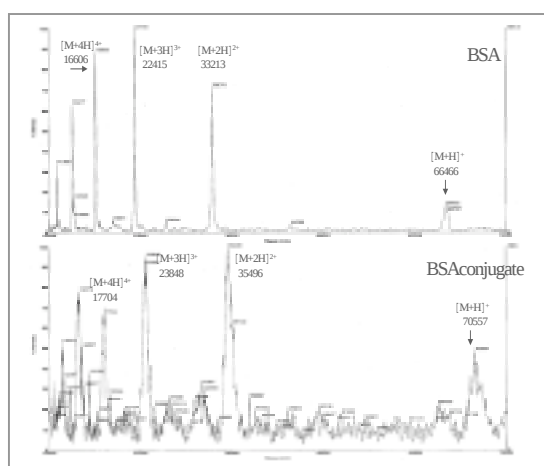


Fig.2 MALDI mass spectra of BSA(upper) and BSA conjugate(lower)

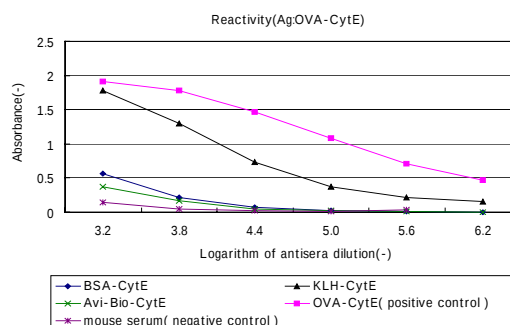


Fig.3

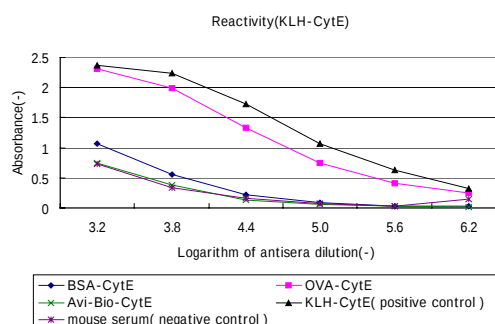


Fig.4

Fig.3,4 ELISA 492nm reaction curve for each carrier conjugate by direct assay. Legend shows antisera from each conjugate.

「参考文献」

- 1) Satoko Kanematsu *et al*, *AnnPhytopathol. Soc. Jpn*, 63:425-431(1997)