

Epitope 解析法による超高感度 CRP 検査薬の開発に関する研究

日大生産工(院) ○寺島 裕 日大生産工 小森谷 友絵
日大生産工 神野 英毅

1. 緒言

CRP (C-Reactive Protein)は、代表的な急性期タンパク質であり、健常者の血中濃度は 0.3 mg/dl 以下が正常値とされる。また、CRP は急性の組織障害、炎症、感染症などにより生体が侵襲されると血中濃度は正常値から数千倍まで増加し、症状の回復に伴い速やかに減少する性質を持つ。そのため、CRP の測定は病気の有無及び経過観察などを目的に臨床検査で広く用いられている^{1~2)}。これまで CRP の測定において感度の優劣は問題とされず、優れた測定法はあまり必要とされなかった。しかし、近年の Latex 凝集法の発展による CRP の高感度測定により肥満といった本来関連がないとされた症状においても CRP の上昇が明らかになってきた³⁾。よって、今後 CRP 測定診断薬の高感度・高精度測定化はより多くの疾患並び炎症マーカーなどとして臨床診断で用いる事が期待できる。

本研究では特異性の高い CRP モノクローナル抗体を用いて、CRP 測定試薬の高感度測定化、具体的には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 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 を利用することで今まで漠然としていた試薬の反応部位を明確にでき、試薬の特異性の向上を図ることができる。

2. 実験方法

2.1 PCR(Polymerase chain reaction)

全血 100 µl から Magtration[®]System 6GC (プ

レシジョン・システム・サイエンス株式会社)を用いてゲノム DNA の抽出を行った。次に CRP 遺伝子の一部を増幅するため primer を設計した(Table 1)。抽出したゲノム DNA を鋳型とし、設計した primer と KOD plus キット(東洋紡績(株))を用いて PCR を行った。その後 PCR 産物を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)を用いて処理を行った後、クリスタルバイオレットゲルにて精製を行った。

Table 1 Primer for recombinant CRP

Primer	Sequence(5'-3')	Tm(°C)	Length(bp)
61~360 F	CACCGACATGTCGAGGAAG	64.5	19
61~360 R	TCAGGACTCCCAGCTTGAC	64.7	21
361~588 F	CACCGCCTCAGGATCGTG	71.5	19
361~588 R	TCACCCGCCAAGATAGATGGT	67.6	21

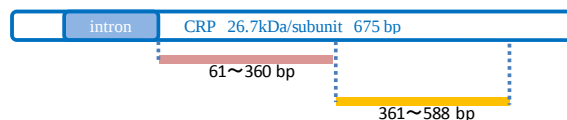


Fig. 1 Structure of human CRP and recombinant CRP

2.2 遺伝子組換え操作

精製を行った PCR 産物を pET-100/D-TOPO vector (Invitrogen)にサブクローニングし、氷上で TOP10 Cell (Invitrogen)を混合した後、ヒートショック(42°C 30 sec)を行い、組換え plasmid を大腸菌(*E.coli*)に導入した。その後、Ampicillin 入り LB Plate に展開し培養(37°C 15 hr)を行った。培養後は、形成したコロニーから組換え plasmid を確認するために PCR を行い、組換え plasmid を確認できたコロニーから plasmid を抽出し、BL21 に形質転換を行い、Ampicillin 入り LB 培地で一晚培養(37°C 200 rpm 15 hr)を行った。

2.3 IPTG によるタンパク質発現の誘導

Study on Development of Hypersensitization CRP Examination Reagent by Epitope Analysis Method

Yutaka TERASHIMA, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

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 ガラクシタ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。一晚培養を行った培養液を新たな LB 培地に継代して一時間培養を行った後、二つに分けた。一方の培養液にのみ IPTG 終濃度が 1.0 mM になるよう加え、IPTG 誘導培養液と IPTG 非誘導培養液の両方で五時間培養を続け、一時間おきに培養液を採取した。採取した培養液は遠心分離(16,000 rpm, 1 min)を行い、得られたペレットを Lysis Buffer に溶解し、液体窒素を用いて凍結融解を繰り返した。その後、遠心分離(16,000 rpm, 10 min)を行い、得られたペレットと上清を SDS-PAGE により確認した。

2.4 Epitope 解析

発現したタンパク質を SDS-PAGE にて確認を行い、MoAb No. 1, 2, 4, 5, 6 を用いて Western Blot 法にて Epitope 部位の解析を行った。

3. 結果および考察

3.1 PCR(Polymerase chain reaction)

抽出した DNA を鋳型とし、設計した 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(Fig. 2)。

3.2 遺伝子組換え操作

組換え plasmid の T7 promoter 領域と相補的な T7 primer を用いて PCR を行った結果、目的部位の増幅が確認できた。また、CEQ8800(Beckman coulter)を用いて組換え plasmid の DNA sequence の解析を行った結果、組換え plasmid の DNA sequence と一致したため、遺伝子組換え操作に成功したと言える(Fig. 2)。

3.3 Epitope 解析

組換え Plasmid を *E.coli*(BL21)に導入し、その後 IPTG により目的とするタンパク質の発現を行った結果、SDS-PAGE にて目的位置にバンドを確認することができた。

WesternBlot の結果を Table 2 に示す。結果より今回作製した CRP 断片の 61~360 bp では、MoAb No. 5, 7 は陽性反応を示したことから MoAb No. 5, 7 の Epitope はこの部位に存在すると思われる。今回陽性反応を示さなかった MoAb No. 1, 4 の Epitope は 361~675 bp の間に存在するのではないかとと思われる。

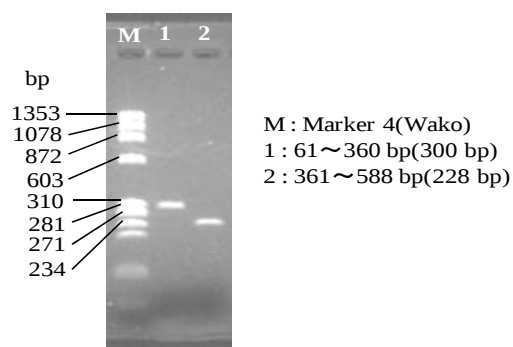


Fig. 2 Result of PCR(Agarose gel electrophoresis)

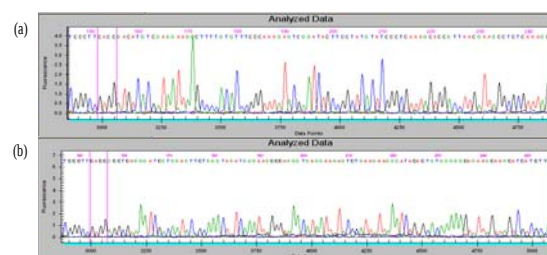


Fig. 3 Sequence of recombinant plasmid by CEQ8800
(a) 61~360 bp, (b) 361~588 bp

Table 2 Result of Western Blot with cell line anti CRP IgG monoclonal antibodies

MoAb	Isotype	Reactivity with Recombinant CRP	
		Western Blot	
		61~360 bp	361~588 bp
MoAb No. 1(Lot:cp40002)	IgG1 κ	—	ND
MoAb No. 4(Lot:040826)	IgG2a κ	—	ND
MoAb No. 5(Lot:040827)	IgG1 κ	+	ND
MoAb No. 7(Lot:040828)	IgG1 κ	+	ND

4. 参考文献

- 1) Schultz, D.R., and Arnold P. I. : Seminars in Arthritis and Rheumatism 20, (1990) p129-147
- 2) Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH : Circulation, 97, (1998) p2007-2011
- 3) Shizukiyo Ishikawa : Metabolic Syndrome and C-Reactive Protein in the general population, Circ j 71 (2007), p26-31.