

Epitope 解析法を用いた超高感度 CRP 臨床検査試薬開発に関する研究

日大生産工(院) ○寺島 裕

日大生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

1. 緒言

近年 Latex 凝集法などの開発により高感度 CRP(hs-CRP)測定が可能となり、動脈硬化病変を基礎とする疾患群では、血中 CRP が局所的には微量だが高濃度に存在することが明らかとなった。また、CRP が血管の動脈硬化を反映し高値を示すことから、現在高感度 CRP 測定は、冠動脈疾患を有さない健常人および、心血管患者における心臓死、急性心筋梗塞、急性冠症候群、脳卒中などの心血管事故を発症する予知因子として有用とされている¹⁾。そのため、心血管事故を予測する上で従来の CRP 測定感度を高めた高感度 CRP 測定試薬が必要とされる。本研究では特異性の高い抗 CRP モノクローナル抗体(MoAb)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 はアミノ酸 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. 実験操作

2.1 CRP 遺伝子断片の作製及び増幅

ヒト全血 100 µl から Magstration[®]System 6GC (PSS)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)を用いて PCR を行った。その後 PCR 産物は Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up

System (Promega)を用いて精製を行った。

Table 1 Primer for recombinant CRP

Primer	Sequence(5'-3')	Tm(°C)	Length(bp)
trCRPb F	CACCGACATGTCGAGGAAG	64.5	19
trCRPb R	TCAGGACTCCCAGCTTGTACA	64.7	21
trCRPd F	CACCGGGTACAGTATTTTC	56.9	19
trCRPd R	TCAGTTAATCTCATCTGGTGA	57.2	21

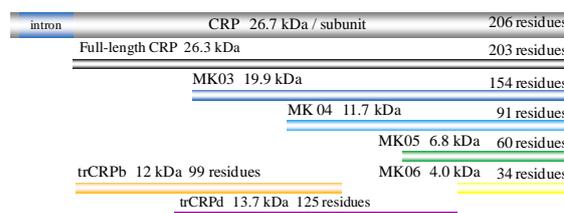


Fig. 1 Structure human CRP and recombinant CRP

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 (30 sec, 42°C)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(18 hr, 37°C)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(invitrogen)に形質転換を行い、Ampicillin 入り LB 培地で一晩攪拌培養(18 hr, 37°C)を行った。

2.3 IPTG による CRP 断片の発現誘導

一晩攪拌培養を行った培養液を新たな LB 培地に継代して 1 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 5 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 3 回行った。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

SDS-PAGE にて CRP 断片タンパク質の発現を確認した後、MoAb No.4, 5, 6, 7, 8 を用いて Westan Blot 法にて Epitope 部位の解析を行った。

3. 結果及び考察

3.1 CRP 遺伝子断片の作製及び増幅

ヒト全血から抽出した DNA を鋳型とし、設計した Primer を用いて PCR を行った結果、目的とする分子量付近にバンドが確認できた。よって、いずれも目的部位の増幅に成功したと思われる。

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 は目的とする CRP 断片の 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。

3.3 IPTG による CRP 断片の発現誘導

組換え Plasmid を *E.coli*(BL21)に導入し、その後 IPTG により目的とする CRP 断片タンパク質の発現を行った結果、IPTG 添加培養液のペレットのみ SDS-PAGE にて目的位置にバンドを確認することができた。このことから、IPTG による CRP 断片タンパク質の発現誘導に成功したと思われる(Fig. 2)。

3.4 Epitope 解析

IPTG による CRP 断片タンパク質の発現を行った後、MoAb No.4, 5, 6, 7, 8 を用いて Westan Blot 法にて Epitope 部位の解析を行った結果、すべての CRP 断片タンパク質におい

て各 MoAb は反応を示した。CRP のアミノ酸残基配列には、類似したアミノ酸残基配列 E***EV、G***FT、TK*Q などがいくつか存在している。よって、各 MoAb の CRP に対する Epitope は、重複するアミノ酸残基である可能性が高いと推測される。

5. まとめ

各 MoAb の Epitope は重複するアミノ酸残基である可能性が推測され、今後は数残基程度のアミノ酸残基を合成し、Westan Blot 法、ELISA 法、Latex 凝集法にて詳細な Epitope 解析を行う必要がある。

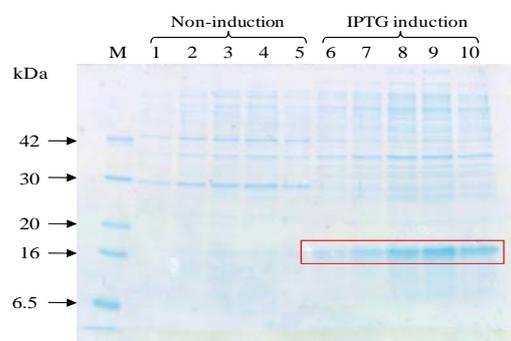


Fig. 2 Expressed trCRPb protein induced by IPTG in pellet samples

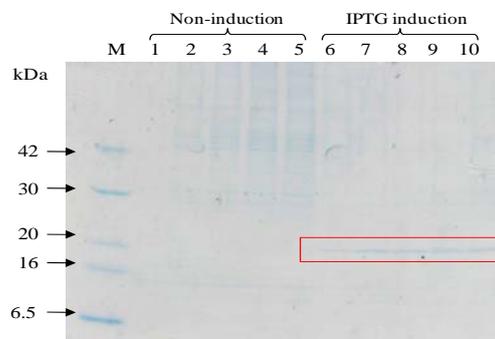


Fig. 3 Expressed trCRPd protein induced by IPTG in pellet samples

M : Molecular Weight Marker Low Range(Wako)

Lane 1-5 : Non-induction incubated from 1h to 5h

Lane 6-10 : IPTG induction incubated from 1h to 5h

Table 2 Result of recombinant CRP -Anti CRP MoAbs reaction

MoAb	Isotype	Reactivity with recombinant CRP						
		Full-length CRP	MK03	MK04	MK05	MK06	trCRPb	trCRPd
No. 4	IgG2a κ	+	+	+	+	+	-	+
No. 5	IgG1 κ	+	+	+	+	-	-	+
No. 6	IgG1 κ	+	ND	+	ND	ND	-	+
No. 7	IgG1 κ	+	+	+	+	+	-	+
No. 8	IgG1 κ	+	+	+	+	+	-	+

+ : Positive reaction
- : Negative reaction

5. 参考文献

- 1) Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH :
Circulation, 97, (1998) p2007-2011