

Epitope 解析を用いた超高感度 CRP Latex 試薬の開発に関する研究

日大生産工(院) ○井上 直子

日大生産工 小森谷 友絵・吉宗 一晃・神野 英毅

1. 緒言

CRP (C-Reactive Protein)は、肺炎双球菌の C 多糖体と反応するタンパク質であり、正常ヒト血清中に微量(0.3 mg/dl)に存在する。血中の CRP 濃度は、細菌感染症や悪性リンパ腫、心筋梗塞などの炎症性疾患や組織破壊により上昇し、症状の回復により速やかに減少する性質を持つ。そのため、CRP 測定は代表的な炎症マーカーとして、病気の有無および経過観察などを目的に臨床検査で用いられている¹⁾。さらに、高感度 CRP (hs-CRP)測定が可能になり、CRP が血管の動脈硬化を反映し高値を示すことが報告されている²⁾。これより、高感度 CRP 測定は、心血管事故を発症する予知マーカーとして期待されている。今後 CRP 診断薬のさらなる高感度化、高精度化を可能にすることで、多くの病気における予知マーカーとして、新規の臨床的意義が期待できる。

本研究では、Latex 凝集法を利用した高感度 CRP 測定診断薬を作製するため、CRP の Epitope に注目した。Epitope とは、アミノ酸 5-10 残基程度からなる領域であり、抗体が結合する抗原の一部分のことである。Epitope を解析することで、別々の抗原部位を認識する抗 CRP モノクローナル抗体を混合させた試薬を作製し、高感度化を目指す。既往の研究より、CRP の N 末端側と C 末端側の断片の作製と Epitope は解析済みである。今回は CRP アミノ酸配列の 135-190 残基からなる断片 (trCRPe)の Epitope 解析を行った(Fig. 1)。

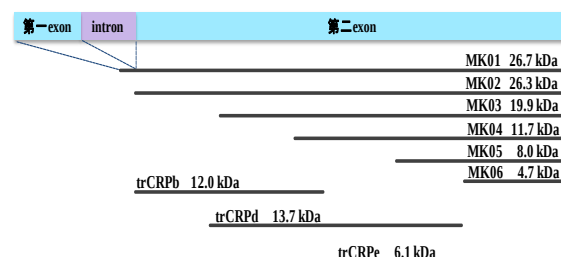


Fig. 1 Peptide Length of Recombinant CRP

2. 実験操作

[CRP 遺伝子断片の増幅]

ヒト全血から Magstration[®] System 6 GC (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 を鋳型として、設計した primer を用いて PCR を行い、アガロース I にて電気泳動後、目的 DNA を切り出し精製した。

Table 1 Primer Sequences for Recombinant CRP

Primer	Sequence	Tm(°C)	Length(bp)
Forward	5'-AATGGATCCAGGAAGAGTCTG-3'	63.19	22
Reverse	5'-CGCGTCTAGATCAGTTAATCTCATC-3'	63.86	25

[CRP 断片発現用組換え大腸菌の作製]

精製した目的 CRP 遺伝子と pCold[®]ProS2 DNA vector (Takara Bio)を、制限酵素 *Bam*HI と *Sac* I を用いて、制限酵素処理を行い、その後 DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara Bio)を用いて Ligation した。次に、氷上で *E. coli* TOP10 cell (Invitrogen)と Ligation 産物を混合し、ヒートショック(42°C, 30 sec)を行い、*E. coli* TOP10 に導入した。その後、Ampicillin 入り LB plate に展開し、培養(37°C, 18 hr)を行った。

Study on Development of Ultra-High Sensitive CRP Latex Reagent by Epitope Analysis.

Naoko INOUE, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOHNO

培養後、形成したコロニーを鋳型として PCR を行い、目的遺伝子の挿入が確認できたコロニーから plasmid を抽出した。また、GeXP (Beckman Coulter)を用いて組換え plasmid のシーケンス解析を行った。

さらに抽出した plasmid を同様の方法で *E. coli* BL21 (Invitrogen)に導入した。その後、Ampicillin 入り LB 培地に全ての形質転換物を加え、攪拌培養(37℃, 18 hr, 200 rpm)を行った。[IPTG 誘導による CRP 断片の発現誘導]

18 時間培養した培養液を LB 培地に継代し、600 nm における吸光度が 0.7 になるまで培養した。その後、培養液に IPTG を加え、30 時間培養し、6 時間おきにサンプリングをした。また、比較として IPTG 無添加の条件における培養も行った。サンプリングした培養液は遠心分離(16,000 rpm, 2 min)を行い、得られたペレットを Lysis Buffer に溶解し、凍結融解を行った。遠心分離(16,000 rpm, 10 min)を行い、SDS-PAGE にてタンパク質の発現を確認した。[Epitope 解析]

Western Blot 法により、発現したタンパク質を 5 種類の抗 CRP モノクローナル抗体にて検出し、Epitope を解析した。

3. 結果および考察

ヒト全血から抽出したゲノム DNA を用いて PCR を行った結果(Fig. 2)、目的とする CRP 遺伝子の 165 bp 付近にバンドが得られたことから、primer の最適アニーリング温度は 55.7℃であると考えられる。また、作製した plasmid のシーケンス解析を行った結果、作製した plasmid と CRP の塩基配列が 100%一致したため、目的遺伝子が導入されていることを確認した。

さらに、IPTG 誘導における発現タンパク質の SDS-PAGE の結果 (Fig. 3)より、IPTG 添加溶液の上清にのみバンドを検出することができた。よって、発現タンパク質は可溶性であると考えられる。

Western Blot 法による検出を行った結果 (Table 2)、今回作製した断片 trCRPe は、No. 4 と No. 6-8 の抗 CRP モノクローナル抗体の Epitope はアミノ酸 135-190 残基に存在せず、No. 5 の抗 CRP モノクローナル抗体の Epitope はアミノ酸 135-190 残基に存在していることが確認された。

現在、5 種類の抗体の Epitope 解析を終えたので、その他の 4 種類の抗体の Epitope 解析を行う予定である。

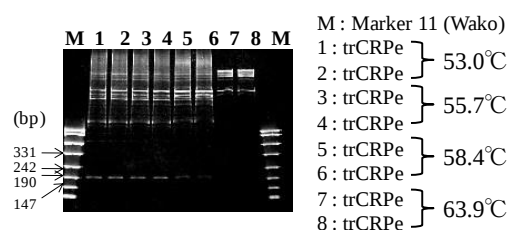


Fig. 2 PAGE Analysis of PCR Products for Recombinant CRP

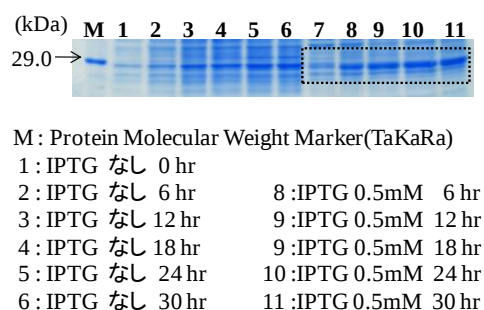


Fig. 3 SDS-PAGE Analysis of Recombinant CRP Fragment Expressed in *E. coli*

Table 2 Reactivity of the Anti-CRP Monoclonal Antibody with CRP Fragments by Western Blot Analysis

MoAb	Reactivity with recombinant CRP								
	MK01	MK02	MK03	MK04	MK05	MK06	trCRPe	trCRPd	trCRP
No. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	-
No. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No. 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-
No. 7	+	+	+	+	+	+	+	+	-
No. 8	+	+	+	+	+	+	+	+	-

4. 参考文献

- 1) Paul.M.Ridker et al, *Circulation*, **97**, 2007-2011, (1998)
- 2) Nader Rifai et al, *Clinical Chemistry*, **45**, 2136-2142, (1999)