

## 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、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、炎症性疾患や組織破壊により上昇し、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 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<sup>1)</sup>。さらに、高感度 CRP (hs-CRP)測定<sup>2)</sup>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た。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米国では利用が推奨されている。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決定基のことである。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。

## 2. 実験操作

## &lt;CRP 遺伝子断片の増幅&gt;

CRP 遺伝子の一部 (Fig. 1)を増幅するため、ヒト全血から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、PCR を行った。得られた PCR 産物を精製し、未反応の試薬の除去を行った。

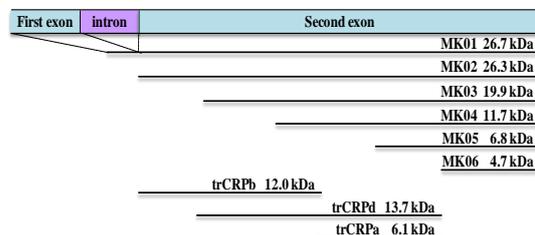


Fig. 1 Peptide Length of Recombinant CRP

## &lt;大腸菌を用いた組換え CRP 断片の発現&gt;

精製した CRP 遺伝子と pET100 (Invitrogen) を Ligation して組換え plasmid を作製した。その後 *E. coli* TOP10 cell (Invitrogen)を形質転換し、Ampicillin 入り LB plate にて一晚培養した。得られたコロニーを鋳型として PCR を行い、ゲル電気泳動にて目的位置にバンドが確認できたコロニーより、組換え 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 で *E. coli* BL21 (Invitrogen)を形質転換し、一晚攪拌培養した。培養液を新しい LB 培地に継代し、600 nm における吸光度が 0.6 になるまで培養した。その後、培養液に IPTG を加え、5 時間培養し、1 時間おきにサンプリングした。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。その後、遠心分離を行い、SDS-PAGE にてタンパク質の発現を確認した。

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

Naoko INOUE, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOHNO

### <Epitope 解析>

Western Blotting により、発現した CRP タンパク質を 8 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。

### <Latex 試薬の作製<sup>3)</sup>>

粒径 252 nm のカルボキシ基修飾 Latex 粒子(JSR)にグリシンをスペーサー分子として導入した。次に、抗 CRP モノクローナル抗体を感作させ、CRP の Latex 試薬を作製した。その後、標準 CRP 抗原(Dako)との反応評価を行った。

### 3. 実験結果および考察

作製した plasmid を鋳型とし、T7 primer を使用して PCR を行った結果、目的の位置にバンドを確認することができた(Fig. 2)。また、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。これより、目的遺伝子が導入されていることを確認した。

次に、発現したタンパク質を SDS-PAGE により確認した。その結果から、MK01-MK06, trCRPb, trCRPd 部位のタンパク質は封入体を形成していることが判明した。また、trCRPa に関しては、可溶性タンパク質であることが判明した。

発現したタンパク質を抗原として 8 種類の抗 CRP モノクローナル抗体との反応性を解析した結果を Table 1 に示す。これより、抗 CRP モノクローナル抗体 No. 4, 7, 8 の Epitope は MK06 部位(191-224 残基)にあり、抗 CRP モノクローナル抗体 No. 5 の Epitope は MK05 部位(165-190 残基)にあるといえる。またこれらの部位は trCRPb 部位とも反応しているため、アミノ酸配列を照らし合わせた。その結果、7 種類のアミノ酸モチーフ(TK-Q, E---EV, VF-K, G--FT, EV---P, TKP, V--KP)が見つかり、これが Epitope であると考えられる。

さらに、Epitope 解析済みの抗 CRP モノクローナル抗体を感作させて Latex 試薬を作製

した結果(Fig. 3)、Epitope の異なる抗体を混合感作した Latex 試薬は高い凝集反応性を示した。また検出下限においても、抗 CRP モノクローナル抗体を感作させた Latex 試薬は 10 ng/ml であるのに対し、混合感作させた Latex 試薬は 5 ng/ml であった。以上より、Epitope の異なる抗体を混合感作すると、CRP 抗原と Latex 試薬が結合する際に抗体同士による立体障害が低下し、凝集反応性が向上したと考えられる。

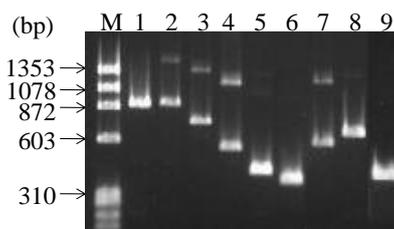


Fig. 2 Analysis of PCR products (M;Marker 4, 1:MK01, 2:MK02, 3:MK03, 4:MK04, 5:MK05, 6:MK06, 7:trCRPb, 8:trCRPd, 9:trCRPa)

Table 1 Western blot analysis of the epitope with monoclonal antibodies

| MoAb  | MK01 | MK02 | MK03 | MK04 | MK05 | MK06 | trCRPb | trCRPd | trCRPa |
|-------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|
| No. 1 | ++   | ++   | ++   | ++   | ND   | ND   | +      | +      | -      |
| No. 2 | ++   | ++   | ++   | ++   | ND   | ND   | +      | +      | -      |
| No. 3 | ++   | ++   | ++   | ++   | ND   | ND   | +      | +      | -      |
| No. 4 | ++   | ++   | ++   | ++   | +    | +    | +      | +      | -      |
| No. 5 | ++   | ++   | ++   | ++   | +    | -    | +      | +      | +      |
| No. 7 | ++   | ++   | ++   | ++   | +    | +    | +      | +      | -      |
| No. 8 | ++   | ++   | ++   | ++   | +    | +    | +      | +      | -      |
| No. 9 | ++   | ++   | ++   | ++   | ND   | ND   | +      | +      | -      |

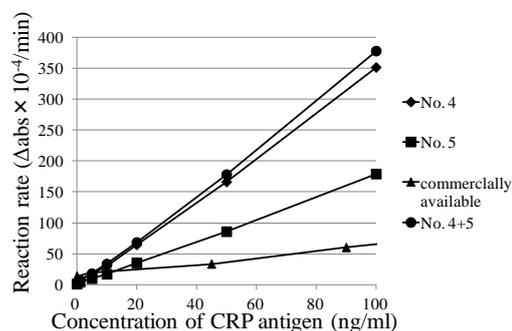


Fig. 3 Comparison of calibration curve for CRP antigen concentration of each antibody-sensitized latex reagent

### 4. 参考文献

- 1) Paul.M.Ridker et al, *Circulation*, **97**, 2007-2011 (1998)
- 2) Paul M. Ridker, et al, *Circulation*, **103**, 1813-1818 (2001)
- 3) Tomoe Komoriya et al, *Journal of Immunological Methods*, **373**, 63-66 (2011)