

D104 Antibody Chip 構築のための低分子抗体ハイスループット生産・固定化技術の開発

(京工織大工芸科学) ○(正)熊田 陽一* · 高瀬 祐太 · 尻谷 優希 · (正)岸本 通雅

【緒言】

近年、ELISAに代わる次世代免疫診断技術として、スライドガラスやプラスチック基盤上の微小領域に多種類の特異抗体をスポット固定した Antibody Chip の利用が注目されている。Antibody Chip を用いる免疫測定は、多項目抗原の同時検出や採血量の削減が期待されているが、従来の Whole 抗体を固相化して用いる場合、それらの生産・精製コストが極めて高く、固定化時の不安定性から著しく検出感度が低下する。本研究では、これまでの研究でポリスチレン親和性ペプチド(PS-tag)を導入した一本鎖抗体(scFv-PS-tag)を親水性ポリスチレン(PS)基板上において固相化し、scFv 固定化 PS 基板を用いて ELISA の高感度化ならびにコスト削減に成功している。本研究では、Antibody Chip 構築のためにマイクロプレートを用いる scFv-PS-tag のハイスループット生産ならびにインクルージョンボディからの直接固相化の可能性について検討した。

【実験操作】

マイクロプレートを用いる scFv-PS-tag の生産

本研究では、マウス由来抗 CRP 抗体をモデルとして用い、scFv および 3 種類の PS-tag 融合 scFv (scFv-PS, scFv-(PS), scFv-PSII) の遺伝子を導入した大腸菌 Rosetta (DE3) (Novagen) 株を作製した。96 ウェル ディープウェルプレートの各ウェルに、IPTG での発現誘導が不要な Overnight Express TB medium (Novagen, OE 培地) を 1ml 加え、初期菌体濃度が $OD_{600} = 0.1$ となるように植菌した。37°C、1400 rpm で 24 時間培養後、遠心分離によって菌体を回収した。封入体中に発現された低分子抗体を既報に従って精製し、DC protein assay (Bio-Rad)によって定量した。OE 培地ならびに IPTG による発現誘導が必要な 2xYT 培地を用いるフラスコ培養も実施し、生産性を比較した。

PS-tag 融合低分子抗体の固相化と評価

4M Urea-1%PBST に希釈した精製または未精製の PS-tag 融合低分子抗体を親水性 PS plate 内に 100 μ l 添加し、室温で 3 時間インキュベートし、これらを固定化した。PBST で洗浄後、さらに、固定化された scFv の抗原結合活性をサンドイッチ ELISA で評価した。

【結果および考察】

scFv および PS-tag 融合 scFv 遺伝子を導入した組換え大腸菌を OE 培地で発現したところ、最終菌体濃度は従来の 2YT-IPTG 培地と比較しておよそ 4 倍高くなった。また、OE 培地を用いるマイクロプレート培養においても最終菌体濃度はフラスコ培養とほぼ同じであった。Table 1 にフラスコならびにマイクロプレート培養における各 scFv の生産性を示す。フラスコ培養において OE 培地を用いた場合、従来の 2xYT 培地よりも高い生産性が得られた。また、OE 培地を用いるマイクロプレート培養では、およそ 1g/L もの scFv が生産されていることが明らかとなった。次に、マイクロプレート培養において、各ウェル間における scFv 発現量の違いを SDS-PAGE で確認した。Fig.1 に示すとおり、ウェル間における発現誤差は非常に少なく、効率的に scFv が不溶性画分に発現されていることが明らかとなった。不溶性画分に発現された各 scFv を未精製のまま親水性 PS

plate 上で固相化し、ELISA によって抗原結合活性を評価した。Fig.2 に示すとおり、未精製の PS-tag 融合 scFv を固定化した場合でも抗原検出が可能であったが、精製済みの PS-tag 融合 scFv に比べてシグナル強度は低下した。したがって、封入対中の夾雑物が PS-tag を阻害していることが示唆された。今後、固定化条件を改善し、更なる高感度化を試みる。

Table 1 フラスコ培養およびマイクロプレート培養における scFv の生産性

	scFv の生産性 [mg/L]		
	フラスコ 2xYT-IPTG (150 mL)	フラスコ OE (50 mL)	マイクロプレート OE (1 mL)
CRP3 scFv	108	415	1187
CRP3 scFv-PS	125	626	969
CRP3 scFv-(PS)	117	460	1013
CRP3 scFv-PS II	102	599	974

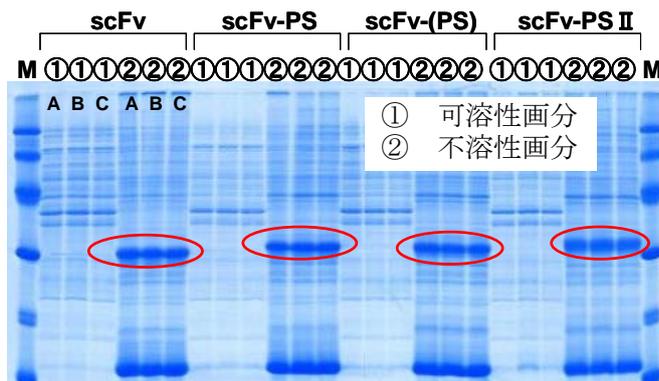


Fig. 1 ウェル間における scFv の発現量の違い

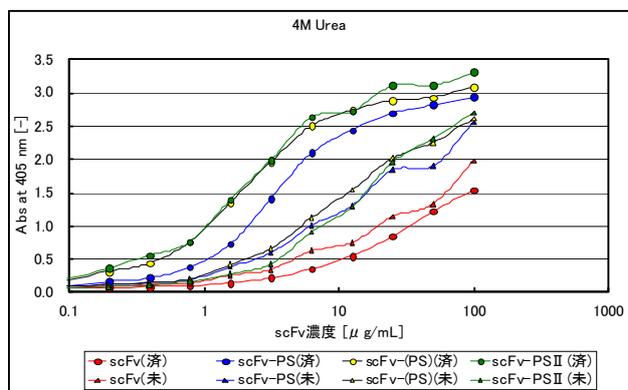


Fig.2 未精製および精製 scFv を固定化した PS plate を用いる抗原検出

* E-mail: kumada@chem.kit.ac.jp