

E306

精製抗体を用いたオープンサンドイッチ測定系の構築

(東大院工・化生) ○ (学) 小島 峻吾・韓 忠勇 (信州大・農) (正) 伊原 正喜
(富士フィルム) 笠置 典之・森 寿弘・(東大院工・化生) (正) 上田 宏*

1. 緒言

オープンサンドイッチ免疫測定法(OS-IA)は、抗体の二個の抗原結合部位 V_H/V_L を用いる免疫測定法であり、 V_H/V_L 間の会合定数が抗原濃度依存的に変化することを利用している (1)。従来の競合免疫測定法と比べ低分子の高感度検出が可能であるが、測定素子の調製に煩雑なクローニング操作を必要とし、測定系の構築に時間を要するという問題があった。そこで今回、このような手間を省ける可能性を検討するため既存の完全長精製抗体を材料とした OS-IA の実施を試みた。

2. 実験方法

1) まず抗体に還元アルキル化処理を施して共有結合を切断し、次に 2) 半変性状態で重鎖と軽鎖を分離、3) 透析により二つのタンパクを再生し、4) 両鎖の再会合を ELISA あるいは SPR バイオセンサー Biacore により測定した (Fig.1)。4) においては定常領域(C_{HI} , C_L)同士の相互作用による再会合が予想され、これを防ぐためにヒト抗体の軽鎖定常領域(hC κ)を大腸菌で発現させて作製し、これと重鎖を混合することで C_{HI} をブロックする試みを行った。

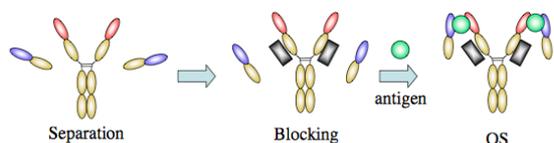


Fig. 1 精製抗体を用いた OS-ELISA

3. 結果

【重鎖・軽鎖の分離精製】今回は材料として、甲状腺疾患の診断マーカーとして知られるチロキシン(T4)認識抗体を用いた。まず重鎖と軽鎖を分離するため、ジチオトレイトール処理によって、両鎖間のS-S結合を切断し、次にモノヨード酢酸処理によるアルキル化で再結合を防いだ。分離精製は5M Urea, 1 M プロピオン酸, 500 mM NaCl存在下でのゲル濾過クロマトグラフィーにより行った。ÅKTAprimeのクロマトグラムとSDS-PAGEの結果をFig. 2に示す。

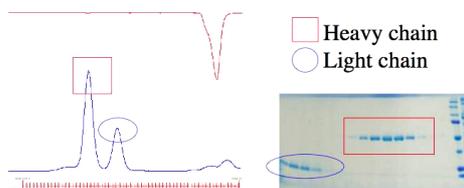


Fig. 2 重鎖・軽鎖の分離精製

【重鎖・軽鎖の ELISA 法による抗原結合能検討】分離精製透析後の抗原結合能を ELISA 法により検討した結果、重鎖または軽鎖単独の抗原結合能と比較して、重鎖と軽鎖両方を加えることで結合能が顕著に向上した。すなわち両者が再会合し抗原に結合しうることが確認された (Fig. 3)。

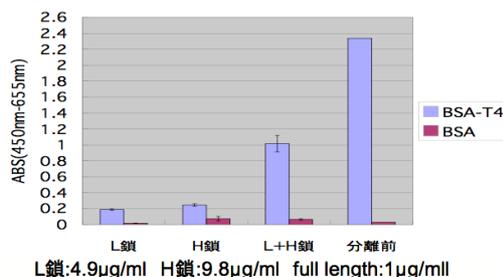


Fig. 3 ELISA による抗原特異的結合能の検討

【重鎖・軽鎖会合の Biacore 解析】次に重鎖・軽鎖の会合を Biacore を用いて検討した。リガンドとして軽鎖を固定化し、重鎖あるいは重鎖に 7 倍量の hC κ を混合したものをサンプルとして用いた。リガンドを固定しない対照の信号を引いたセンサーグラムを示す (Fig. 4)。hC κ の添加なしでは重鎖の非特異的結合により結合定数の算出が出来なかったが、添加により非特異的結合が顕著に減少し、やや強い軽鎖との結合定数 ($K_a = 3.8 \times 10^7 / M$) が算出された。

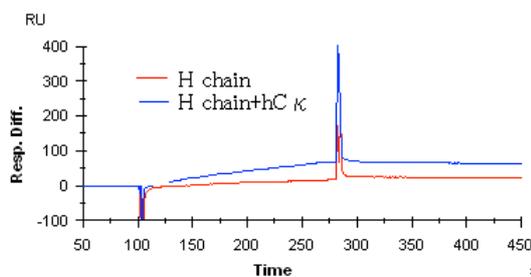


Fig. 4 Biacore による鎖間相互作用の測定

4. 結言

Biacore 解析より、今回用いた T4 抗体は抗原非存在時の V_H/V_L 間相互作用がやや強いことが示唆された。今後、ELISA 系を構築して相互作用の抗原依存性を検討するとともに、他の低分子認識抗体についても同様に OS-IA の実施を試みる。また L 鎖からの V_L 断片調製も試みる。

参考文献

(1) Ueda *et al.* (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 1714-1719.

*Email: hueda@chembio.t.u-tokyo.ac.jp