

E308

固相リフォールディングを用いる Fab 固定化 PS plate の開発

(京工織大工芸科学) (正)熊田 陽一・(学)濱崎 今日子・○(学)中川 亜耶・
(京大再生医科学研) 有馬 祐介・岩田 博夫・(京工織大工芸科学) (正)岸本 通雅*

【緒言】

scFvやFab等の低分子抗体は組換え大腸菌で安価かつハイスループットに生産可能であり、診断用抗体素子としての利用が期待されている。特にFabはwhole抗体の抗原結合部位を有し高い特異的親和性を有するほか、重鎖 (H鎖)、軽鎖 (L鎖) の組合せによって多様な抗原特異性を創出することができる。したがってバイオチップ基板上に多様なFab断片 (Fabライブラリー) を固定化できれば抗体医薬や診断用抗体のスクリーニングに大いに役立つと考えられる。本研究では、Fabライブラリーチップの作製を目標とし、ポリスチレン基板上に固定化したH鎖、L鎖が抗原結合活性を得られる条件を検討した。

【実験操作】

リボヌクレアーゼ A (RNase) に特異的に相互作用するマウス抗体に PS-tag (PS19-6:RIIIRIRRR) を C 末端部に融合した Fab 遺伝子 (H-PS,L-PS) を構築した。遺伝子組換え操作によって PS-tag 融合 Fab を大腸菌内で過剰発現し、インクルージョンボディ内の PS-tag 融合 Fab を既報*にしたがって精製した。Fig.1 に示すように H-PS、L-PS を単独または逐次的に固相リフォールディングして PS 基板上に固定化、さらに活性回復させ、それらの抗原結合活性をサンドイッチ ELISA 法で評価した。

【結果および考察】

Fig.2 に基板上に固定化された抗 RNase Fab の抗原結合活性を示す。H-PS、L-PS 単独ではほとんど抗原結合活性を示さず、H-PS、L-PS 双方を基板上に固定化した際のみ抗原結合活性が検出できた。また L-PS/H-PS の順に固定化した場合で最も高い抗原結合活性が得られた。Fig.3 に示すように、共存尿素濃度を 0.1~8M に変えて固相リフォールディングを行った場合、H-PS/L-PS と L-PS/H-PS で高い抗原結合活性が得られた。特に 2M 尿素共存下で L-PS/H-PS の順に固定化した場合、最も高い抗原結合活性が得られた。以上の結果から、PS-tag を用いることで Fab を PS 基板上に活性を保持した形で固定化、さらに高い抗原結合活性を検出することに成功した。

今後、ヒト抗体の Fab の固定化ならびに固相リフォールディング条件を検討する予定である。

*引用文献

Kumada et al. Anal. Bioanal. Chem. 395, 759-765 (2009)

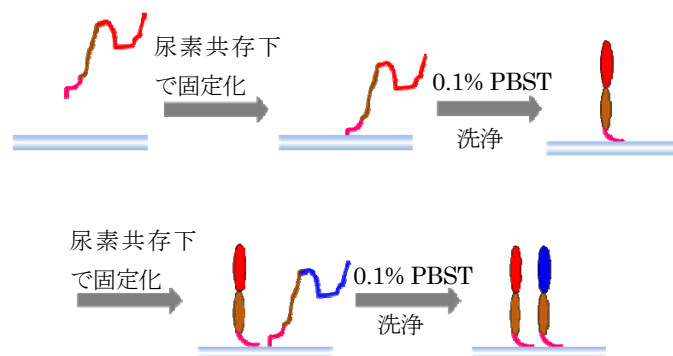


Fig.1 固相リフォールディングの概念図

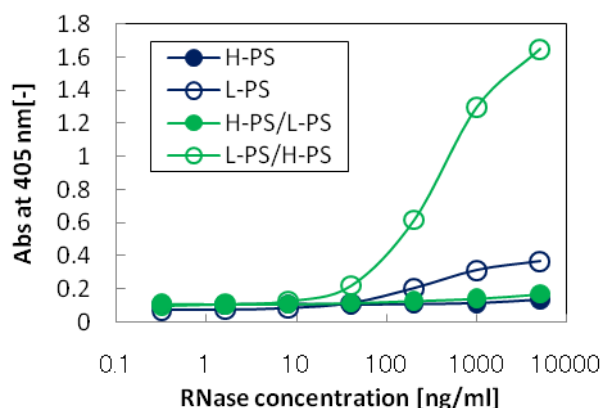


Fig.2 4M 尿素共存下で固定化した際の抗 RNase Fab の抗原結合活性

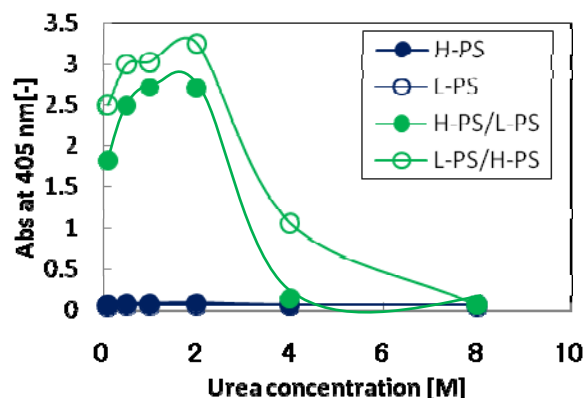


Fig.3 各尿素濃度共存下で固定化した際の抗 RNase Fab の抗原結合活性

*連絡先：075-724-7539

kishimoto@chem.kit.ac.jp