

3C13-3 フォトニック結晶材料を用いた免疫センサーの開発

○伴野 倫子, 横山 義之, 斉藤 真人, 高村 禪, 民谷 栄一
(北陸先端大学院)

【目的】抗体を認識素とする免疫センサーは医療分析、環境分析などに極めて有効である。しかしながら、従来から用いられている方法では、蛍光分子や酵素などの標識剤を必要とし、多段階の極めて煩雑な操作が必要とされる。そこで、本研究では、フォトニック結晶材料を用いた免疫センサーの開発を検討した。すなわち、ポリスチレンビーズの積層に起因する光学特性、ブラッグの反射を表す式の面間隔 (d 値) を温度応答性ゲルである相転移温度 32°C のN-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) の伸縮作用により変化させたフォトニック結晶の作製を行い、これと抗原抗体反応を組み合わせた視覚的な色の変化を指標とした免疫センサーの開発を試みた。【方法及び結果】直径4 mmの穴の開いたシリコンラバーシートが貼り付けられた、Si基板にポリスチレンビーズ (粒径 202nm) 溶液がそのチャンネル内へ滴下され、乾燥後、シリコンラバーシートは取り外された。架橋されたPoly-NIPAAmがその基板上へ塗布され、一晚静置後、架橋されたPoly-NIPAAmが塗布された試料を 15°C の蒸留水に浸し、デジタル顕微鏡及び分光器 (USB200) により、観察、測定した。結果、レッドシフト量は 15°C の蒸留水に浸す時間にあまり影響されることなく、架橋されたPoly-NIPAAmの架橋剤の配合率の減少とともに増加した。次に、ポリクロナル抗体を吸着させたポリスチレンビーズに抗原を反応させることによりビーズ同士が結合し、面間隔の変化量による抗原濃度に応じた色変化を検討したのでその結果についても報告する予定である。

Development of immuno sensor using photonic crystal material

○Michiko BANNO, Yoshiyuki YOKOYAMA, Masato SAITO,
Yuzuru TAKAMURA, Eiichi TAMIYA
(Sch. Materials Sci. JAIST)

Key words photonic crystal, polyclonal antibody, biosensor, poly-NIPAAm

3C13-5 培養B細胞株の変異機能を利用する新規な *in vitro* 抗体作製システム

ポスター
発表あり

○三宅 健司, 藤堂 景史, 曲 正樹, 金山 直樹, 大森 斉
(岡山大・工・生物機能)

Phage display法に代表される *in vitro* の抗体作製システムは、系自体に変異導入によるレパートリー多様化機能がないため、獲得できる抗体は初期のライブラリーに依存しており効率的に限界がある。そこで、自発的に抗体遺伝子を変異し続けるニワトリB細胞株DT40を用いて、変異導入と高親和性クローンの選択を組み合わせることにより、簡便かつ迅速に高親和性のモノクローナル抗体 (mAb) を取得できるシステムの確立を目指す。我々はDT40の抗体遺伝子への変異導入に必要な酵素であるAID発現制御により変異機能のON/OFF制御が可能でDT40-SWを樹立した。今回、DT40-SWを用いて実際に抗原特異的mAbの取得を試みた。まず、変異導入をAID-ONにした状態で培養し、DT40-SWの抗体レパートリーを多様化させた。次に、モデル抗原としてハプテンNPを結合させたBSAをbiotin化し、これが結合するクローンを streptavidin 磁気ビーズを用いて単離した。その結果、 1×10^7 細胞から39クローンを取得でき、そのうち7クローンはNP特異的であった。さらに、得られたクローンの親和性を上昇させるため、AID-ONの状態を培養し、セルソーターにより親和性の高い細胞のみを回収した。この操作を繰り返し、より親和性の高いクローンを獲得することができ、そして、AID-OFFにすることにより、有用な変異を固定したクローンとして取得できた。従って、DT40-SWを用いて、生体内で行われている親和性成熟と同等のプロセスで効率的に目的抗体を取得できるシステムを構築することが可能である。

Novel system for *in vitro* monoclonal antibody screening using mutation machinery in a B cell line

○Kenji MIYAKE, Kagefumi TODO, Masaki MAGARI,
Naoki KANAYAMA, Hitoshi OHMORI
(Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words B cell line, monoclonal antibody, affinity maturation

3C13-4 Generation and Screening of Monoclonal Antibodies Using Single-Step Single Cell RT-PCR linked *in vitro* Expression

○Muhamad Ali, Hideo NAKANO, Kiyotaka HITOMI
(Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

We have developed a simple and efficient expression-screening method for monoclonal antibodies on single-step single cell reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by *in vitro* expression and functional screening. Our method consist of (i) cDNA synthesis from single hybridoma cells, followed by (ii) single-step PCR amplification of the Lc and Hc (Fd portion) cDNAs separately using low concentration (50 nM) of the respective cDNA-specific primers with 5' homo-tag in the presence of the homotag-specific primer (500 nM), (iii) overlapping PCR of the amplified Lc and Hc cDNAs with the DNA cassettes for T7 promoter (PT7), Shine Dalgarno (SD) sequence and transcription terminator (term) to construct the following expression unit; PT7-SD-Lc-term and PT7-SD-Hc-term, and (iv) *in vitro* expression of these unit using our *Escherichia coli* S30 cell-free extract in an oxidative condition that enables functional Fab production. The Fab fragment synthesized in the cell-free system can be subjected to the subsequent functional screening such as ELISA without purification. This method is advantageous not only to labor-saving and cost-effectiveness but also, most notably, the elimination of the necessity of virtually two-step PCR for the prevention of cross-contamination.

Generation and Screening of Monoclonal Antibodies Using Single-Step Single Cell RT-PCR linked *in vitro* Expression

○Muhamad Ali, Hideo NAKANO, Kiyotaka HITOMI
(Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

Key words single cell, RT-PCR, cell-free protein synthesis, monoclonal antibody

3C14-1 beta-1,3-glucanase に相同な新規スギ花粉アレルゲンの同定

○黒田 美紗子¹, 秋 庸裕¹, 島田 弥生², 力丸 智史³, 大磯 勲³,
河本 正次¹, 橋本 邦彦³, 小埜 和久¹
(¹広島大院・先端・生命機能, ²科技振・プラザ広島,
³西川ゴム工業)

【目的】スギ花粉症は国民の約13~16%が罹患していると言われる代表的なアレルギー性疾患である。アレルゲン特異的免疫療法による根本的治療を行うためには、患者が感作したアレルゲン分子種を特定する診断技術が必要不可欠である。これまでに、スギ *Cryptomeria japonica* 花粉抽出物の二次元 IgE 免疫染色及び質量分析からなる網羅的アレルゲノーム解析によって、多数のスギ花粉症患者が感作している数々の重要なアレルゲンの存在を確認している。本講演では、スポットNo. 39のアレルゲン (CPA39) について報告する。【方法及び結果】患者血清40検体を用いた二次元IgE免疫染色で19検体が陽性反応を示したCPA39について、MALDI TOF-MSによる構造解析を行い、部分アミノ酸配列を得た。データベース情報をもとにオリゴプライマーを作成してPCRにより全長遺伝子を単離し、解析した結果、他種植物 (オリーブ, ラテックス等) 由来アレルゲンとして報告されている β -1,3-glucanase に高い相同性を示すことがわかった。バキュロウイルス-昆虫細胞系において発現した組換え型CPA39を各種クロマトで精製し、患者IgE反応活性をELISA法で調べたところ、28検体のうち17検体が陽性であった。

Identification of a new cedar pollen allergen homologous to beta-1,3-glucanase

○Misako KURODA¹, Tsunehiro AKI¹, Yayoi SHIMADA²,
Satoshi RIKIMARU³, Isago OISO³, Seiji KAWAMOTO¹,
Kunihiko HASHIMOTO³, Kazuhisa ONO¹
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.,
²Innovation Plaza Hiroshima, JST, ³Nishikawa rubber Co.Ltd.)

Key words pollinosis, cedar pollen allergen, allergenome, beta-1,3-glucanase