

2Ga08

ナノ分子診断に向けたアレルゲン分子の作製

○河本 千佳¹, 野田 智秀², 河本 正次¹, 秋 庸裕¹, 黒田 章夫¹, 小埜 和久¹
(¹広島大院・先端・生命機能, ²広島大・ナノデバイス・バイオ研)

【目的】アレルギーの根治療法である特異的免疫療法を効果的かつ安全に行うためには、現行の生物種レベルでの検査ではなく、患者ごとに異なるアレルゲン感作状況を分子種レベルで特定することが必要となる。本研究ではバイオと半導体ナノデバイス技術との融合によるアレルゲン分子診断技術の開発に向けて、アレルゲンのシリカ基盤上への固定化、並びに同基盤上でのIgE抗体測定を評価することを目的とした。
【結果】モデルアレルゲンとしてダニの主要抗原 Der f 2 を選択し、これをシリカ基盤上に配置する目的でシリカ結合性タンパク質 (SBP) を Der f 2 に融合させた Der f 2-SBP を作製した。また SBP にはシリカ結合ドメインが二箇所存在することが明らかとなっており、半導体デバイスへの応用に向けてこれら機能ドメイン部分のみを用いた Der f 2-SBP も作製した。これらの融合タンパク質を、大腸菌 Rosetta-gami(DE3)pLysS 株ならびに分子シャペロン融合ベクターである pCold TF を用いた低温発現系に供したところ、可溶性タンパク質として発現させることに成功した。さらにこれら Der f 2-SBP は、ダニアレルゲン患者血清を用いた Western blot 解析により IgE 抗体との結合活性を有していることも確認された。現在、作製した Der f 2 並びに Der f 2-SBP のより詳細な抗原性の評価を行うと共に、半導体デバイスへの応用に向けた基礎的検討を進めている。

Production of allergen molecules towards nano-molecular diagnosis
○Chika KAWAMOTO¹, Tomohide NODA², Seiji KAWAMOTO¹, Tsumehiro AKI¹, Akio KURODA¹, Kazuhisa ONO¹
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²Res. Inst. Integ. Sci. Nanodev. Bio. Sys., Hiroshima Univ.)

Key words house dust mite allergen, Der f 2, silica binding protein

2Ga10

酵素を用いた抗体と機能性タンパク質の新規連結法の開発

○坂本 崇幸¹, 田中 勉², 福田 秀樹², 近藤 昭彦¹
(¹神戸大院・工, ²神戸大・自・研究環)

抗体に他の機能性タンパク質を結合させた融合タンパク質は様々な分野で応用されている。このような融合タンパク質は主に化学修飾法で作られているが、部位特異的な修飾が難しいためタンパク質の機能が失われたり副産物が生じたりという問題点がある。そこで、これらの問題を解決し特異的な修飾を可能とする新しい簡便なシステムの開発を行った。本研究ではタンパク質連結酵素を用いた whole の抗体との融合タンパク質調製法の開発を目指す。具体的な戦略として ZZ ドメインに酵素の基質配列となるタグ配列を付加し酵素を用いて他の機能性タンパク質と結合させる。そして、ZZ ドメインの Affinity を利用してこの ZZ-機能性タンパク質複合体を抗体に結合させ抗体の高機能化を目指す。これにより副産物を生じることなく、それぞれのタンパク質の機能を維持したまま融合タンパク質を調製できる。本研究では基質配列 LPETG を認識して T と G の間を切断し、N 末端に Gly5 を持つタンパク質と結合させる SortaseA (SrtA) というタンパク質連結酵素を用いた。今回、抗体と結合するタンパク質として、アルカリフォスファターゼ (AP) を選んだ。遺伝子改変により N 末端に Gly5 配列を付加した AP (Gly5-AP)、C 末端に LPETG 配列を付加した ZZ ドメイン (ZZ-LPETG) の発現ベクターを構築しそれぞれ発現、精製した。これら 2 種類のタンパク質を混合し SrtA を加えて 37℃ で 24h 静置した。その後 SDS-PAGE によりこれらの複合体 ZZ-AP が得られたことが確認できた。さらに、この複合体は抗体と混合するだけで ZZ ドメインを介して機能性タンパク質を抗体に結合できることも示された。

Enzyme-mediated antibody-protein conjugation
○Takayuki SAKAMOTO¹, Tsutomu TANAKA², Hideki FUKUDA², Akihiko KONDO¹
(¹Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.)

Key words sortase, protein conjugation, antibody

2Ga09

ポリスチレン親和性ペプチド標識抗体を用いる免疫測定の特性解析

○熊田 陽一¹, 濱崎 今日子¹, 尻谷 優希¹, 大瀬 琢人², 片倉 啓雄³, 中西 一弘⁴, 岸本 通雅¹
(¹京工繊大・物質, ²エンプラス研究所, ³阪大院・工・生命先端, ⁴岡山大・工・生物機能)

【目的】抗体の抗原に対する高い特異的親和性を利用した酵素固相免疫測定法 (ELISA) は医療診断、食品検査等を中心に広く用いられているが、モノクローナル抗体の生産コストが非常に高く、試薬量の削減が求められている。本研究では、独自に開発したポリスチレン親和性ペプチド (PS-tag) をモノクローナル抗体 (mAb) に標識し、ポリスチレンプレート (PS plate) に高親和的かつ部位特異的に固定化可能な新規リガンド抗体 (mAb-PS-tag) を調製した。mAb-PS-tag の PS plate に対する吸着特性ならびに PS plate 上における安定性を解析し、抗体試薬量の削減が可能かを検討した。
【方法および結果】マウス抗 TNF-α 抗体に PS-tag (KRAFIASRRIRRP) を化学修飾した mAb-PS-tag を調製した。様々な濃度および体積の抗体溶液を用いて親水性ならびに疎水性 PS plate に非標識抗体 (mAb) ならびに mAb-PS-tag を固定化し、固定化量ならびに残存抗原結合活性を Direct ELISA ならびに Sandwich ELISA によって評価した。その結果、mAb は固定化密度の減少に伴って抗原結合活性が著しく減少したのに対し、mAb-PS-tag は固定化密度に関わらず安定な固定化が可能であった。

Characterization of proteins genetically-fused with polystyrene binding peptides and application to immunoassay
○Yoichi KUMADA¹, Kyoko HAMASAKI¹, Yuki SHIRITANI¹, Takuhito Ohse², Yoshio KATAKURA³, Kazuhiro NAKANISHI⁴, Michimasa KISHIMOTO¹
(¹Dept. Chem. Mater. Sci., Kyoto Inst. Tech., ²Enplas Laboratories inc., ³Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ⁴Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words Monoclonal antibody, Polystyrene, Polystyrene binding peptide, Site-specific immobilization

2Ga11

軽鎖融合法による抗体酵素融合タンパク複合体の作製

○韓 忠勇¹, 伊原 正喜², 上田 宏^{1,2}
(¹東大院・工・化生, ²東大院・工・バイオ)

【目的】各種生体関連分子の特異的検出、定量に繁用される免疫測定法の実施においては酵素標識抗体の調製が不可欠である。しかし従来の化学結合法による調製では抗体分子の精製と修飾・反応物の精製が必須であり、また組換え抗体を用いた酵素融合タンパクの調製においては手間のかかる抗体遺伝子クローニングが必須という難点があった。これらの問題を回避するため、今回我々は抗体軽鎖とレポーター酵素との融合タンパクを抗体産生細胞で発現させることによる、抗原結合能と酵素活性の両者を持つ複合体の発現を試みた。
【方法】NP ((4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl) を特異的に認識する抗体の L 鎖 (λ1) と分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) をリンカーでつないだタンパクをコードするベクター、および酵素として二量体の SEAP のかわりに単量体である *Gaussia luciferase* (Gluc) を組み込んだ発現ベクターを作製した。次にこれらを抗 NP 抗体 IgM H 鎖発現ベクター pSV-V_H1 と共に Cos-1 細胞に導入し、発現されたタンパク質を回収し解析を行った。
【結果】Cos-1 細胞発現系において、L 鎖と SEAP 又は Gluc をリンカーでつないだ融合タンパク (V_LC_L-SEAP, V_LC_L-Gluc)、および L 鎖定常領域と SEAP 又は Gluc をリンカーでつないだ融合タンパク (C_L-SEAP, C_L-Gluc) の分泌発現に成功した。また V_LC_L-SEAP および V_LC_L-Gluc と H 鎖が会合した十分な抗原結合能と酵素活性を併せ持った複合体の発現が確認された。現在、ハイブリドーマ細胞でこれらの融合タンパク質を発現させ、目的の抗体酵素融合タンパク複合体が形成されるかどうか検討している。

Preparation of Antibody-Enzyme fusion complex by L-chain fusion method
○Chung Yong HAN¹, Masaki IHARA², Hiroshi UEDA^{1,2}
(¹Dept. Chem. Biotech., Sch. Eng., Univ. Tokyo, ²Dept. Bioeng., Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words antibody, fusion protein, ELISA