

ファージ提示法を用いた抗体作製

— 大腸菌ペリプラズム空間に発現させた組換え抗体の効率的精製法の検討 —

バイオスタッフ 室伏敬太* 中野道彦** 渡邊むつみ***
太田俊也*

Development of anti-norovirus monoclonal antibody using phage display techniques

- Purification of single chain fragment variable antibody from the periplasm of *Escherichia coli* -

Keita Murofushi, Michihiko Nakano, Mutsumi Tsuji and Toshiya Ohta

1. 目的

当センターでは、ファージ提示法によって獲得した抗体遺伝子を大腸菌に導入して、大腸菌のペリプラズム空間に抗体タンパク質を発現させている^{1)~4)}。抗体タンパク質を産業利用に供することを考慮すると、大量の抗体タンパク質を迅速かつ低コストで調製することが重要な課題となる。上記課題を解決するためには、抗体タンパク質の生産段階と精製段階のそれぞれについて最適な手法を検討する必要がある。本研究では、抗体タンパク質の精製段階について、従来までの手法に改善を施し、精製工程の簡略化とコストの削減を試みたのでその内容と結果を報告する。

2. 方法

当センターでは、これまで大腸菌から抽出したペリプラズム画分をスピнкаラムで濃縮して、分取型クロマトグラフィーとアフィニティーカラムを用いて精製を行っていた。しかし、スピнкаラムを用いた濃縮法では以下のような問題があった。1つ目は、濃縮のためにスピнкаラムを多数使用すること、また、不純物が多く残存するサンプルをカラムに通すためにカラムがすぐに劣化してしまうことにより、精製に必要なコストが高くなってしまった。2つ目は、スピнкаラムによる濃縮では濃縮効率が悪く、多量のサンプル溶液をアフィニティーカラムに通すこととなり、目的の抗体タンパク質の回収率が低下してしまう。3つ目は、スピнкаラムによる濃縮は遠心分離操作を繰り返し行う必要があるため、作業工程が煩雑となり多くの労力と時間を費やさなければなら

らなくなる。

そこで、本研究では、硫酸アンモニウムによる塩析を利用して、ペリプラズム画分の濃縮を試みた。大腸菌培養液からは多量のペリプラズム画分が抽出されるが、硫酸アンモニウムを添加してタンパク質を沈殿させれば濃縮が容易に行えると期待した。

2. 1 ペリプラズム画分の調製

- (1) scFv型抗体遺伝子と精製用のHis-tag遺伝子が組込まれたプラスミドベクターpCANTAB-5Eを大腸菌HB2151に導入し、4 lのスケールで培養して発現誘導を行った。
- (2) 培養液4 lを遠心分離（4℃、3,500×g、30分）で集菌して、ペレットを回収した。
- (3) ペレットにTS buffer（200mM Tris（pH8.0）+ 0.5M Sucrose）を400ml加えて再懸濁して、ボルテックスでよく懸濁させて、30分間水冷した。
- (4) 遠心分離（4℃、10,000×g、10分間）を行い、上清を回収してペリプラズム画分を得た。

2. 2 硫酸アンモニウム塩析法による濃縮

- (1) ペリプラズム画分をメスシリンダーで正確に秤量して、終濃度70%となるように硫酸アンモニウムを完全に溶解させて、4℃で一晩静置した。
- (2) 遠心分離（4℃、20,000×g、30分間）を行い、析出したタンパク質を沈殿として回収した。
- (3) ペレットを10mlの結合バッファー（20mM Phosphate, 500mM NaCl, 20mM Imidazole, pH7.4）に溶解して、口径0.45μmのシリンジフィルターに通して夾雑物を取り除いた。

*）現 微生物抗体開発プロジェクトスタッフ **）現 退職 ***）現 バイオ科

【ノート】

2. 3 FPLCシステムを用いた精製

2. 2で調製したサンプル溶液を、分取型液体クロマトグラフィーAKTA FPLC (GEヘルスケア社)を用いてHis-tag精製用カラムHisTrap HP (GEヘルスケア社、カラム容量1ml)に通して、抗体タンパク質をカラム中の担体に結合させ、溶液中のイミダゾール濃度を上げることによって抗体タンパク質を溶出させてフラクションを回収した。

精製で使用したバッファの組成を表1に示す。

表1 アフィニティー精製用バッファ組成

結合バッファ (Buffer A)	溶離バッファ (Buffer B)
20mM Phosphate	20mM Phosphate
500mM NaCl	500mM NaCl
20mM Imidazole	500mM Imidazole
pH7.4	pH7.4

3. 結果および考察

分取型クロマトグラフィーによる精製結果を図1に示す。サンプルをカラムに通じた直後にほとんどのタンパク質がカラムを素通りしているが、溶離バッファの比率を上げてバッファ中のイミダゾール濃度を高くすると、タンパク質の溶出が確認されたのでフラクションを回収した (図1の矢印)。

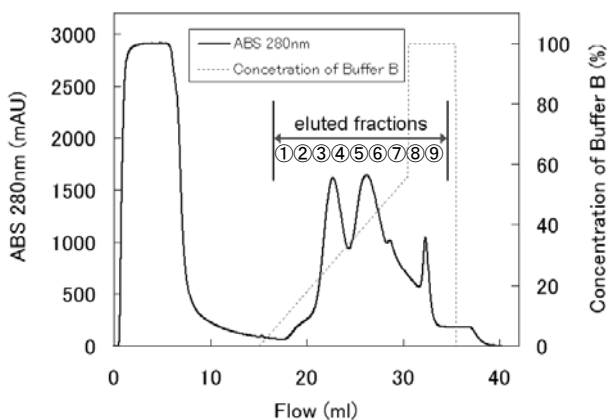


図1 アフィニティーカラムを用いた抗体精製

回収したフラクション9本について、それぞれのフラクション溶液をSDS-PAGEで確認した結果を図2に示す。夾雑タンパク質も若干存在しているが、抗体タンパク質と推定される30kD付近に主要なバンドがクロマトグラフのチャートと一致して確認された。なお、チャート上では複数のピークが観測されたが、これは抗体タンパク質が二量体や三量体を形成したためと予想される。

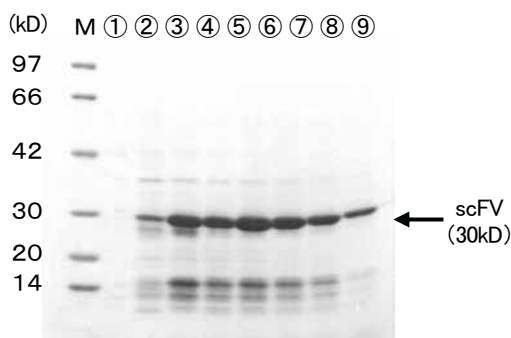


図2 回収したフラクションのSDS-PAGE

4. まとめ

スピンカラムを用いる代わりに、硫酸アンモニウム塩析法を応用することで、ペリプラズム画分から抗体タンパク質の濃縮を効率的かつ安価に行うことができた。また、濃縮効率が上がったことにより、アフィニティーカラムによる精製の簡便化と、抗体タンパク質の回収率の向上に貢献した。

参考文献

- 1) 太田、飯塚、山田：静岡県沼津工業技術センター研究報告，第14号, 11-13 (2006).
- 2) 山田、太田、飯塚：静岡県沼津工業技術センター研究報告，第14号, 14-15 (2006).
- 3) 太田、飯塚、山田：静岡県沼津工業技術センター研究報告，第15号, 19-20 (2007).
- 4) 太田、山田、飯塚：静岡県沼津工業技術センター研究報告，第15号, 21-22 (2007).