

微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発（第2報）

— インフルエンザウイルスA型核タンパク質の大腸菌発現系の構築 —

微生物抗体開発プロジェクトスタッフ 松野正幸 室伏敬太 太田俊也

Efficient Single-chain Antibody Production Using Microorganisms (2nd report)

— Cloning and expression in Escherichia coli of influenza A virus nucleoprotein gene —

Masayuki Matsuno, Keita Murofushi and Toshiya Ohta

1. 緒言

我々は、ファージディスプレイ法を利用した一本鎖可変部抗体（scFv抗体）創製技術^{1) 2)}及び微生物を宿主とする組換えタンパク質生産技術を組み合わせ、インフルエンザウイルスA型（FluA）に親和性を有するscFv抗体の作製に取り組んでいる。

抗体を作製するためにはまず抗原が必要となる。ウイルス抗原の調製には一般的に細胞培養法や鶏卵培養法が用いられるが、精製抗原を得るには長期を要する。また、高病原性株ではこれもできない場合がある。一方、遺伝子組み換え技術による作製も基本的には可能である。特にインフルエンザウイルスは変異株が頻繁に現れるので、抗原を迅速に作製する技術開発が重要となる。

そこで、本研究では大腸菌を宿主とするインフルエンザウイルス抗原タンパク質発現系の構築を試みたので、実験手法及び結果について報告する。

2. 実験方法

2. 1 発現させる抗原タンパク質の検討

本研究では発現させる抗原としてインフルエンザウイルスA型核タンパク質（FluA-NP: influenza A virus nucleoprotein）を選択した。インフルエンザウイルスは外殻タンパク質に変異が入りやすいが、核タンパク質は比較的変異が少ないことが知られている。FluA-NPを抗原として作製された抗体は、インフルエンザウイルスA型に分類されるウイルス株を幅広く認識できると期待した。

2. 2 FluA-NP発現大腸菌の作製

(1) FluA-NP遺伝子を、高発現プラスミドベクター

（pET101/D-TOPO[®], Invitrogen製）に導入して、発現用プラスミドベクターpET101-ANPを作製した。

- (2) ヒートショック法により、pET101-ANPを大腸菌BL21（DE3）に導入した。
- (3) 抗生物質アンピシリンを含む寒天培地で培養することで、形質転換された大腸菌をFluA-NP発現大腸菌として単離した。
- (4) FluA-NP発現大腸菌を培養して、対数増殖期となった段階でIPTG添加による発現誘導を行い、FluA-NPを発現させた。
- (5) 遠心分離によって回収した菌体を超音波破碎装置（SONIFIER450, BRANSON製）で破碎して、FluA-NPを含む破碎液を回収した。
- (6) 磁気ビーズを用いた簡易精製キット（Mag-Extractor[®] -His-tag-, 東洋紡績製）によりFluA-NPを精製し、SDS-PAGEによりFluA-NP（約55 kDa）の存在を確認した。

2. 3 FluA-NPの大量培養および精製

- (1) 2. 1 で作製した大腸菌株を2ℓスケールで培養してFluA-NPの発現を行った。
- (2) 2. 1 (4)(5)と同様の操作を行った。
- (3) (2)で回収した破碎液を、分取型液体クロマトグラフィー装置（AKTA FPLC, GEヘルスケア製）により精製した³⁾。カラムは、His-tag精製用のHisTrap FF crude（GEヘルスケア製）を使用した。まず、破碎液をカラムに通して担体に結合させた後、溶液中のイミダゾール濃度を上昇させることで抗原タンパク質を溶出させ、フラクションを回収した。

【ノート】

(4) Flu抗原性の有無を確認するイムノクロマトグラフィ(IC)キット (イムノエース、ビーエル製) により、精製液のFlu抗原性を確認した。また、タンパク質定量キット (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit) を使用して、精製液に含まれるタンパク質を定量した。

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。サンプル流量が0～47mℓの範囲では、波長280nmの吸光度が最大値付近となっていることから、ほとんどのタンパク質がカラムを素通りしているとわかる。サンプル流量55mℓから、溶離バッファーの比率を徐々に上げることで、イミダゾール濃度を高くすると、サンプル流量65mℓ付近でタンパク質の溶出による吸光度のピークが確認できた。よって、この付近 (サンプル流量61～67mℓ) のフラクションを6本 (各1mℓ) 回収した。

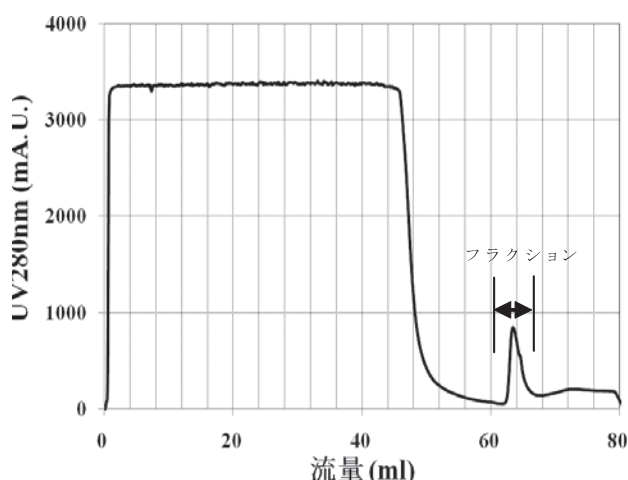


図1 アフィニティークラムを用いたFluA-NPの精製

フラクションは、回収した順に①～⑥の番号をつけ、これらについて実施したSDS-PAGEの結果を図2に示す。pET101-FluA-NP抗原タンパク質と推定される約55kDa付近に主要なバンドが確認できた。一方、それ以外のバンドも確認されたが、これは主に目的タンパク質の分解物であることが推察される。今回はマウス免疫用の抗原作製を目的としているため、分解物が存在していても問題ないと判断した。

続いて、ICキットによりこれらのフラクションの抗原性を調べたところ、FluA抗原性が認められた。また、フラクションを混合し、前述のキットを用いてタンパク質定量を行った。その結果、精製液には約8mgのFluA-NPを主成分とするタンパク質が含まれることが確認された。

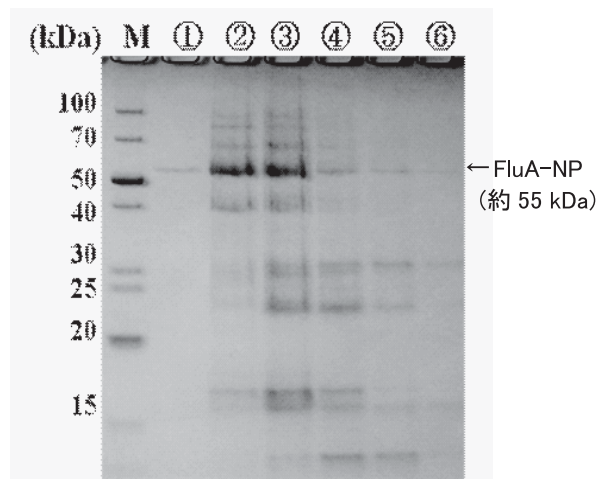


図2 回収したフラクションのSDS-PAGE

4. まとめ

FluA-NPをpETベクターに導入し、大腸菌を宿主として発現誘導させた。その後、抗原タンパク質を精製した結果、マウス免疫に必要な量のFluA-NPを得ることができた。

参考文献

- 1) A.R. Pope他: Construction and use of antibody gene repertoires, 1-40, Antibody engineering-A Practical Approach, IRL Press (1996).
- 2) I. Benhar他: Phage Display of Single-Chain Antibody Constructs, Current Protocols in Immunology, 10.19B.1-10.19B.31, John Wiley & Sons, Inc (2002).
- 3) 室伏、中野、渡邊、太田: 静岡県工業技術研究所研究報告、第3号, 63-64 (2010)