

微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発 (第6報)

— バイオパンニングによる抗インフルエンザウイルスscFv抗体群のスクリーニング —

微生物抗体開発プロジェクトスタッフ 太田俊也 松野正幸 室伏敬太

Efficient Single-chain antibody production using Microorganisms (6th report)

— Screenig of anti - influenza virus scFvs by Biopanning —

Toshiya Ohta, Masayuki Matsuno and Keita Murofushi

1. 緒言

我々は、インフルエンザウイルスA型 (FluA) の核タンパク (NP) に対する抗体及びその遺伝子を獲得するために、迅速な抗体調整法として知られているファージディスプレイ法を実施した。今回は、前報^{1) 2)}で作製した精製組換え抗原を用いたバイオパンニング手法による抗体遺伝子群の濃縮までを報告する。

なお、本報告で作製する抗体は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域をリンカー配列で結合した一本鎖可変部抗体 (scFv : single chain Fv) である。

2. 実験方法

2. 1 抗体遺伝子ライブラリー

FluA-NPで免疫したマウス脾臓細胞遺伝子源として、Tag配列を導入したpCANTBファージミドベクターを用いて、A. R. Popeらの方法³⁾に準じて作製した 10^8 規模の抗体遺伝子ライブラリーを用いた。

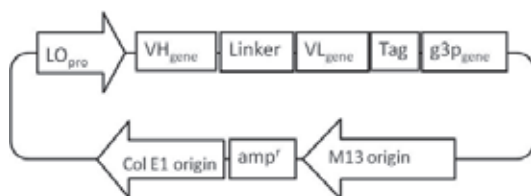


図1 pCANTBファージミドベクターの概念図

2. 2 バイオパンニング

バイオパンニングは次の方法で行った。

(1) マイクロプレート (マキシソープ、NUNC) の2レーンに抗原であるFluA-NPの組換えタンパクを適量のPBS緩衝液に溶解し、各ウエ

ルに $100 \mu l$ ずつ添加後、オーバーナイト、 $4^\circ C$ で静置し、吸着限界の十分量を固相化した (抗原プレート)。

(2) 抗原プレートを洗浄後、5%スキムミルク-PBSで、室温3時間静置し、ブロッキングを行った。

(3) 5%スキムミルク-PBS中に溶解させたファージ抗体ライブラリー (1×10^{13} Cfu程度) を抗原プレートに加え攪拌後、室温にて1時間静置した。

(4) 抗原プレートをPBSで5回洗浄後、終濃度0.1 Mとなるようにグリシンを加え、ときどき攪拌し室温に置いた。

(5) 20分後、5 mlチューブに抗原プレートの溶液の全量移して1/4量の2 M Tris-HCl (pH6.8) を加えて中和した。

(6) 中和したファージ溶液を、 $2 \times$ YT培地 (Difco) 中で濁度OD約0.5まで生育させて大腸菌XL1-blueに加えて、 $37^\circ C$ 1時間振とう培養して感染させた。

(7) 培養液の一部を適宜に希釈し $2 \times$ YTGaプレート ($2 \times$ YTに終濃度が2%グルコースと $100 \mu g/ml$ アンピシリンナトリウムとなるように加えた寒天プレート) に撒いた後、残りの培養液を $2 \times$ YTGaに懸濁し、1時間、 $37^\circ C$ で振とう培養し、M13helper phage (予想されるファージよりおよそ2ヶタ多い数) を添加後1時間、 $37^\circ C$ で培養し、さらに $50 \mu g/ml$ となるようにカナマイシンを加え、 $30^\circ C$ でオーバーナイト培養した。

(8) 培養終了した菌液を遠心し、その上清をPEG沈法によりファージを回収調整し2回目のスクリーニングに用いた。

(9) この操作を6回繰り返す、回収率が上昇したところで、いわゆるポリファージを1次抗体としたELISA試験を実施した。

2. 3 ポリファージELISA

(1) 抗原プレートとそのブロッキングは、2.2節(1)(2)と同様に準備した。

(2) 1次抗体は、バイオパンニングの各ラウンドのファージ溶液を50 μ lに5%スキムミルク/PBS溶液を等量添加し調整した。抗原プレートに1次抗体を添加し、良く攪拌後1時間室温に静置し、PBSで4回洗浄した。

(3) 2次抗体は、HRP標識Anti-M13antibody Conjugate (GEヘルスケア)を用い、付属マニュアル所定の濃度を5%スキムミルク/PBSで調整した。抗原プレートに2次抗体を添加し、良く攪拌後1時間室温に静置し、PBSで4回洗浄した。

(4) 発色基質であるABTS溶液を各ウェルに100 μ lずつに添加し攪拌後、37 $^{\circ}$ Cで20分間置き、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

3. 結果

バイオパンニングにおいて、その回数を増すごとに、FluA-NPに親和性のあるファージが濃縮されることが期待できる。そこで、ポリファージELISA試験を行なった。パンニング回数を横軸、吸光度を縦軸とした結果を図2に示す。この結果、パンニング操作4回目から反応が認められ、5回目、6回目でその値が顕著になった。このことにより、

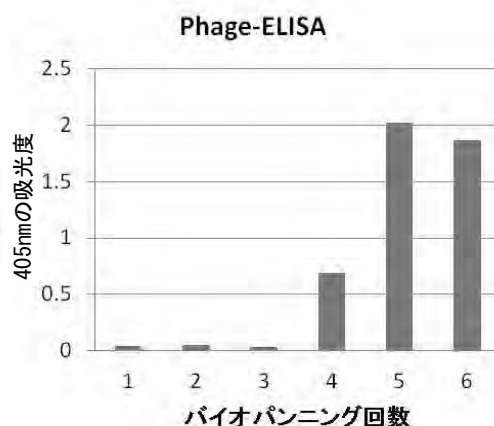


図2 ポリファージELISA

FluA-NPに吸着するファージが濃縮されたことが示唆された。

4. まとめ

FluA-NPの免疫ライブラリーより、バイオパンニング手法によりFluA-NPを認識する抗体遺伝子群を獲得できたものと推察した。

参考文献

- 1) 室伏敬太他：微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発（第4報）- 大腸菌を宿主とするインフルエンザウイルス核タンパク質の組換え生産技術の構築 -, 静岡県工業技術研究所研究報告, 第5号, 96-97 (2012).
- 2) 松野正幸他：微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発（第5報）- 大腸菌を宿主とするインフルエンザウイルス核タンパク質の作製および精製 -, 静岡県工業技術研究所研究報告, 第5号, 98-99 (2012).
- 3) Pope, A.R. et al. : Antibody Engineering, a Practical Approach (1st Edn.), IRL Press, 1-40 (1996).