

## 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 —

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 (5th report)

— Production and purification of influenza virus nucleoprotein in *Escherichia. coli* —

Masayuki Matsuno, Keita Murofushi and Toshiya Ohta

### 1. 緒言

我々は、抗原とするインフルエンザウイルスA(B)型の核タンパク質 (FA(B)N; influenza A(B) virus nucleoprotein) 遺伝子を、コールドショック発現ベクター-pCold ProS2に導入することで、目標の核タンパク質を迅速かつ大量に誘導発現するpCold ProS2-FA(B)Nプラスミドベクターを開発した<sup>1)</sup>。これらを用いてFA(B)Nを大量に誘導発現させた後、高純度の核タンパク質を得るために、二段階の液体クロマトグラフィーによる精製を試みたので、実験手法および結果について報告する。

### 2. 実験方法

大腸菌破碎液上清から目標の核タンパク質を精製する際、これまでHis-tagと親和性を持つニッケルカラムを用いてきたが、得られたタンパク溶液には夾雑タンパク質が含まれており<sup>2)</sup>、抗体探索用の抗原としては純度が不十分であった。そこで、これまでのHis-tag精製に加えて、新たな精製用タグを付加して二段階精製を行い、高純度の核タンパク質を得ることを検討した。タンパク質精製のタグは多岐にわたる<sup>3)</sup>が、今回作製しているFA(B)Nは分子量が約82 kDa(88 kDa)とかなり大きいため、新たなタグはできるだけ低分子量であることが望ましく、かつ高純度に精製できるもの選抜した結果、Strep-tagを採用した。これはアミノ酸8残基からなる低分子タグであり、Strep-Tactinとの強力な親和性で高純度の精製ができることを期待した。

#### 2.1 核タンパク質の大量培養および精製

(1) pCold ProS2-FA(B)Nを導入し、形質転換

されたFA(B)N発現大腸菌を1 lスケールで培養し、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、目的のタンパク質を発現させた。

(2) 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、FA(B)Nを含む破碎液を回収した。

(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・ジャパン(株)) により精製した。まずはHisTrap HP (GEヘルスケア・ジャパン(株)) カラムを用いてHis-tag精製を行った。破碎液をカラムに通じ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。

(4) (3)で得たタンパク質溶液をさらにStrepTrap HP (GEヘルスケア・ジャパン(株)) カラムに通じてStrep-tag精製を行った。溶液中のタンパク質を、担体に固定化されたStrep-Tactinテトラマーに結合させた後、Strep-tagの競合剤であるデスチオビオチンの液中濃度を上昇させることで核タンパク質を溶出させ、フラクションを回収した。

(5) (4)の精製液を限外ろ過により濃縮した。

#### 2.2 精製した核タンパク質の評価

インフルエンザ抗原性の有無を検査するイムノクロマトグラフィー (IC) キット (イムノエース、(株) タウンズ製) により、精製液の抗原性を確認した。

## 【ノート】

## 3. 結果および考察

分取型クロマトグラフィーによるStrep-tag精製結果を図1に示す。His-tag精製したFBN溶液をStrep-Tactinカラムに通じ、Strep-tag精製を行った。15 ml付近からデスチオピオチン濃度を徐々に高くし、サンプル流量17 ml付近で目標の核タンパク質に由来するピークが現れたため、付近のフラクションを回収し、限外ろ過フィルタにより濃縮した。

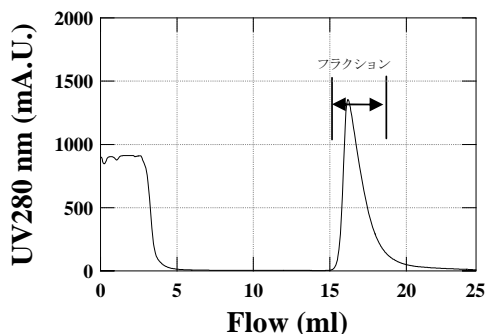


図1 Strep-Tactinカラムを用いたFBNの精製

得られた精製液をSDS-PAGEに供した結果、インフルエンザB型抗原タンパク質と推定される約88 kDa付近に単一のバンドが確認できた(図2)。これまでHis-tag精製だけでは単一の核タンパク質を得られなかったが、この結果によりStrep-tag精製が有効であることが示された。

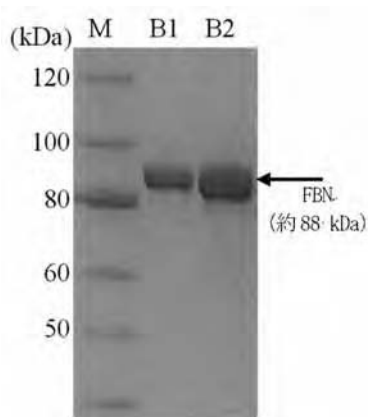


図2 精製したインフルエンザB型核タンパク質のSDS-PAGE (FANの結果は省略)

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、FluB抗原性が認められ、抗原濃度がICキットのバンド強度に対応することを確認した(図3)。

また、インフルエンザウイルスA型についても、

同様の手法により核タンパク質を主成分とする精製液を作製した。これらの作製抗原は、濃縮しても不溶化することもなく、マウスへの免疫源や抗体探索用に利用可能と推定された。

FBNの質量 (ng)	ICキット写真
650	
65	
6.5	
0.65	
ProS2 (10 ng) (コントロール)	

図3 ICキットによる希釈系FBN抗原性の判定 (FANは省略)

## 4. まとめ

大腸菌を宿主として、pCold ProS2ベクターに導入されたA型インフルエンザウイルス3株およびB型インフルエンザウイルス2株由来の核タンパク質を1 lスケールで培養し、ニッケルカラムおよびStrep-Tactinカラムで二段階精製した結果、マウス免疫に必要な量の核タンパク質を高純度かつ高濃度で得ることができた。

## 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-, 静岡県工業技術研究所研究報告, 第4号, 113-114 (2011).
- 3) K. Terpe: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 523-533 (2003).