

# 大腸菌で発現させた P450 CYP2D6 を 固相抗原とした ELISA 法の開発

木村 雅 浩

## I 緒 言

自己免疫性肝炎 (AIH: autoimmune hepatitis) は、自己免疫機序がその発症・進展に関わっていると考えられる自己免疫疾患である。AIH は、病状の進行が早く、早期に適切な治療が行われないと予後が悪いので、早期診断、早期治療が重要である。しかしながら、現在、AIH の確定診断法はなく、その他の肝疾患を除外することでしか診断できない。

AIH の確定診断の有力な候補として、「抗 CYP2D6 抗体」の測定が試みられている。しかしながら、一般的に抗 CYP2D6 抗体は、間接蛍光染色法で検出されているが、技術的に難しく、また、人ではなくラット肝臓細胞の切片を用いているという問題がある<sup>1)</sup>。

この問題を解決するため、以前に高感度抗 CYP2D6 抗体測定法としてラジオリガンドアッセイの開発をおこなった。この方法は立体構造を認識する抗体を捕らえられると考えられ、AIH の確定診断法の有力な候補であることを報告した<sup>2)3)</sup>。しかしながら、抗 CYP2D6 抗体測定法は、ラジオアイソトープを利用した測定法であるため、放射性同位体が扱える施設でのみ測定可能であり、汎用性の面で問題を残した。そこで、より汎用性があり、多くの自己抗体の測定法としての実用例のある ELISA 法での抗体測定を試みた。

ELISA 法による抗 CYP2D6 抗体測定は、すでに報告されており<sup>4)</sup>、MBL 社より、臨床診断用ではないが基礎研究を目的とした ELISA 法による抗 CYP2D6 抗体測定 kit が販売されている。しかしながら、以前に、この測定 kit とラジオリガンドアッセイの比較検討を行ったが、MBL 社の kit はラジオリガンドアッセイに比べ感度が悪く、抗原として用いた CYP2D6 にも問題があった<sup>3)</sup>。

この kit に使用されている抗原は大腸菌で発現されたものであるが、全長の CYP2D6 を発現したものではなかった。

CYP2D6 は N-末端の膜貫通部位を介して、主に肝臓の小胞体膜に存在し、様々な薬物代謝を行っている。この N-末端の膜貫通部位は CYP2D6 の機能に関与せず<sup>5)6)</sup>、抗 CYP2D6 抗体の抗原認識部位でないことも明らかにされている<sup>7)8)</sup>。そこで、CYP2D6 の膜貫通部位であると考えられている N-末端の 25 アミノ酸残基のみ取り除いた CYP2D6 を大腸菌で発現させて、これを固相抗原とした ELISA 法の開発を試みた。

## II 実験方法

### 1 pET28a(+)-CYP2D6 $\Delta$ 25 発現ベクターの構築

以前に構築した pET28a(+)-full-length wild-type CYP2D6 発現ベクターを鋳型として、

P450 CYP2D6 の膜貫通部位を除いたアミノ酸配列を Perkin-Elmer thermal cycler を用いて、PCR 法で増幅した。この PCR 断片を pET28a(+) 発現ベクターにライゲーションすることで、P450 CYP2D6 発現ベクターを構築した。詳細な実験方法は以下の通りである。

PCR の反応液は全量で 50  $\mu$ l とし、約 1ng の pET28a(+)-full-length wild-type CYP2D6 発現ベクターを鋳型として、KOD PLUS DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて、Perkin-Elmer thermal cycler で、PCR をおこなった。PCR の条件は、以下の通りである。94°C で 2 分間加温した後、94°C で 15 秒、65°C で 30 秒、68°C で 1 分間の加温を 25cycle おこなった。

PCR に用いたセンス側のプライマー、76U (5'-CGCGGTACCCGCCAACGCTGGGCTGCACG-3') は P450 CYP2D6 の 26 番目から 32 番目のアミノ酸の cDNA 配列に相当する。また、制限酵素 BamH I の認識配列を付加した (アンダーライン)。アンチセンス側のプライマー、1472L (5'-CCCAAGCTTGC GG GGCACAGCACAAAGCT-3) は P450 CYP2D6 の C 末端から 6 残基のアミノ酸の cDNA 配列に相当する。また、制限酵素 HindIII の認識配列を付加した (アンダーライン)。

PCR 増幅断片および pET28a(+) 発現ベクターを BamH I、Hind III で制限酵素処理した。制限酵素処理した PCR 増幅断片および pET28a(+) 発現ベクターを精製するため、1.5% アガロースゲルを用いて、50mV の一定電圧で電気泳動して分離した。電気泳動で分離後、PCR 増幅断片および pET28a(+) 発現ベクターのみを DE81 ペーパーに吸着させたのち、5M の NaCl で抽出した。

この制限酵素処理した PCR 増幅断片を制限酵素処理した pET28a(+) 発現ベクターに TAKARA ライゲーション kit Ver1 (TAKARA バイオテック社) を用いてライゲーションを行った。PCR 増幅断片をライゲーションした発現ベクターを pET28a(+)-CYP2D6 $\Delta$ 25 発現ベクターと呼ぶことにした。また、PCR 増幅断片に変異がないことを DNA オートシーケンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer) で確認した。

## 2 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の発現

pET28a(+)-CYP2D6 $\Delta$ 25 発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3) にヒートショックを与えることでトランスフォームした。この大腸菌を用いて P450 CYP2D6 を発現させた。また、発現させた P450 CYP2D6 たんぱく質を P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 と呼ぶことにした。

トランスフォームした大腸菌 BL21(DE3) を終濃度 30  $\mu$ g/ml になるようにカナマイシンを添加した 20ml の LB 培養液 (インビトロジェン社) に植菌し、一晚、37°C で振盪培養 (120rpm) を行った。この培養液を終濃度 30  $\mu$ g/ml になるようにカナマイシンを添加した 180ml の LB 培養液に加え、37°C で振盪培養 (120rpm) を行った。培養液の OD600nm での吸光度が 0.6 から 0.8 の間になった時点で、終濃度が 1mM になるように IPTG を添加して、さらに、3 時間、37°C で振盪培養 (120rpm) することで P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の発現を誘導した。

## 3 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の大腸菌からの抽出

誘導後の培養液を室温で 4000rpm、10 分間、遠心分離することで大腸菌体を回収した。大腸

菌から培養液を完全に取り除くために、20ml の PBS (137mM NaCl、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.68mM KCl、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4) に懸濁した後、室温で 4000rpm、10 分間、遠心分離することで大腸菌を 2 度、洗浄した。洗浄した大腸菌を、10ml の CelLytic™ B 液 (終濃度 5 μg/ml のデオキシリボヌクレアーゼと終濃度 0.2mg/ml のリゾチームを添加した) (シグマ) に懸濁し、室温で 10 分間、緩やかに転倒混和した。その後、室温で 4000rpm、10 分間、遠心分離し、上清を捨て、封入体を回収した。回収した封入体を、2 度、20ml の PBS に懸濁した後、室温で 4000rpm、10 分間、遠心分離することで洗浄した。洗浄した封入体を 2ml の CelLytic™ I B 液 (シグマ) に懸濁し、室温で 10 分間、緩やかに転倒混和した。その後、室温で 13000rpm、10 分間、遠心分離し、P450 CYP2D6 Δ25 の含まれる上清を回収した。

#### 4 P450 CYP2D6 Δ25 を抗原とした ELISA プレートの作成

20 μg/ml に P450 CYP2D6 Δ25 を CelLytic™ I B 液で希釈したものを固相化溶液として、ELISA プレートを作成した。

固相化溶液を ELISA プレート (F96 Nunc-Immuno™ Plates; ナルジェヌンクインターナショナル) に 100 μl ずつ各ウェルに分注し、4℃、24 時間放置した。固相化溶液を捨てた後、400 μl の 0.1M リン酸緩衝液 (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH、pH7.5) を各ウェルに分注して、ELISA プレートを 2 度、洗浄した。洗浄後、200 μl のブロッキング溶液 (0.1% ウシ血清アルブミン、0.05% Tween20、0.1M リン酸緩衝液) を各ウェルに分注して、25℃で 2 時間放置。ブロッキング溶液を捨てた後、400 μl の TTBS (20mM Tris-HCl、500mM NaCl、0.05% Tween20、pH8.0)、TBS (20mM Tris-HCl、500mM NaCl、pH8.0) でそれぞれ、2 度、洗浄後、良く水分を切って、室温で完全に乾燥させた。乾燥させた ELISA プレートはシールして、4℃で使用するまで保存した。

#### 5 抗 P450 CYP2D6 抗体の測定

反応溶液 (0.1% ウシ血清アルブミン、TTBS) で抗 P450 CYP2D6 血清 (RABBIT ANTI-HUMAN CYTOCHROM P450 ENZYME CYP2D6 POLYCLONAL ANTIBODY; CHMICOM INTERNATIONAL) を希釈し、固相化 ELISA プレートの各ウェルに 100 μl ずつ加えて、プレート振盪器で振盪させながら、25℃で 1 時間、反応させた。希釈血清を捨てた後、400 μl の TTBS で固相化 ELISA プレートを 5 度、洗浄した。洗浄後、反応液で 10000 倍に希釈したプロテイン A-HRP (アマシャムファルマシアバイオテック社) を各ウェルに 100 μl ずつ加えて、プレート振盪器で振盪させながら、25℃で 1 時間、反応させた。希釈したプロテイン A-HRP を捨てた後、400 μl の TTBS で 3 度、400 μl の TBS で 2 度、洗浄した。その後、100 μl ずつ TMB 試薬 (Kirkegaard & Perry 社) を各ウェルに分注して、プレート振盪器で振盪させながら、25℃で反応させた。30 分後、100 μl ずつ反応停止液 (Kirkegaard & Perry 社) を各ウェルに分注して、5 分以上 30 分以内にプレートリーダー (モデル 680 マイクロプレートリーダー; BIO RAD 社) で OD450nm での吸光度を測定した。尚、測定は全て 2 重測定

した。

## 6 その他の実験方法

P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 が発現していることを確かめるために、Laemmli の方法で SDS-PAGE を行った後、ウェスタンブロットをおこなった。ウェスタンブロットの抗体として、上記の抗 P450 CYP2D6 血清を 100 倍希釈したものを一次抗体とし、二次抗体は、10000 倍希釈したプロテイン A-HRP を用いた。また、発色試薬は TMB Membrane Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry 社) を使用した。たんぱく質濃度の定量は BIO RAD 社のプロテインアッセイ kit を用いて測定した。

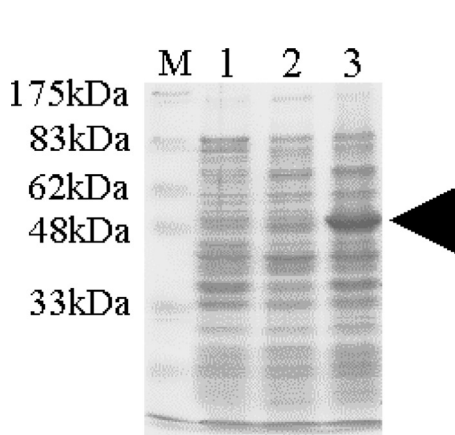


図1 大腸菌 BL21(DE3) の SDS-PAGE

M は分子量マーカー、レーン 1 は発現誘導前の大腸菌、レーン 2 は発現誘導をしない大腸菌、レーン 3 は終濃度 1mM になるように IPTG を培養液に加えて P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 発現誘導した大腸菌。レーン 1~3 は大腸菌を SDS サンプルバッファー (20%メルカプトエタノール、10%グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー、0.2%SDS、0.15M Tris-HCl、pH6.8) に懸濁後、5 分間煮沸したものを試料とした。矢印は P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の位置を示す。

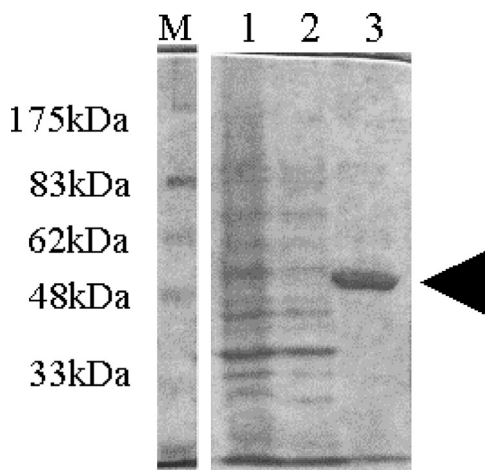


図2 大腸菌 BL21(DE3) 融解物上清と封入体の SDS-PAGE

M は分子量マーカー、レーン 1 は P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 発現誘導した大腸菌を SDS サンプルバッファーに懸濁後、5 分間煮沸したものを試料とした、レーン 2 は 10  $\mu$ g の大腸菌融解物上清、レーン 3 は 10  $\mu$ g の洗浄した封入体。レーン 1 は終濃度 1mM になるように IPTG を培養液に加えて P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 発現誘導した大腸菌。矢印は P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の位置を示す。

## III 結果と考察

### 1 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の発現

終濃度 1mM になるように IPTG を pET28a(+)-CYP2D6 $\Delta$ 25 発現ベクターをトランスフォームした大腸菌 BL21(DE3) 培養液に加え、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 が発現するのか検討した。図 1 に示したように、発現誘導前、発現誘導をしない大腸菌の融解物では、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の分子量に相当する約 50kDa 付近に P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 と考えられるバンドは認められなかった。

一方、発現誘導してから1時間後の大腸菌では、約50kDa付近に、発現誘導前、発現誘導をしない大腸菌の融解物では認められなかったバンドがはっきりと認められた。このことから、今回作成した pET28a(+)-CYP2D6 $\Delta$ 25 発現ベクターは大腸菌 BL21(DE3) の菌体内で P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 を発現することが予想できた。

次に、発現した P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 が可溶性画分に存在するのか、可溶化せずに封入体に取り込まれるのかについて検討した。誘導終了後の大腸菌培養液を遠心分離することで、培養液を取り除いた。その後、可溶性画分と不溶性画分である封入体に分けるために、終濃度 5  $\mu$ g/ml のデオキシリボヌクレアーゼと終濃度 0.2mg/ml のリゾチームを添加した CelLytic™B 液（この試薬は、上清に可溶性物質を溶かすが、封入体は溶かさない）で大腸菌を融解した。大腸菌を融解後、遠心分離することで、上清と封入体に分けた。これらの画分に P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 が存在するかを SDS-PAGE で調べた。図 2 から明らかのように、上清には P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 のバンドは認められないが、封入体には P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 のバンドが認められた。

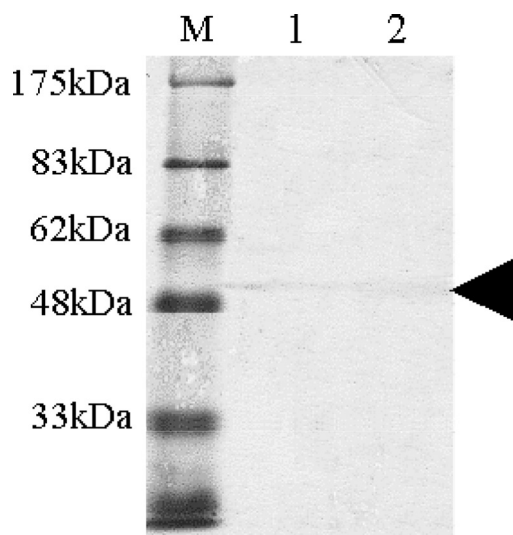


図 3 大腸菌 BL21(DE3) 融解物上清と封入体のウエスタンブロット

M は分子量マーカー、レーン 1 は 10  $\mu$ g の大腸菌融解物上清、レーン 2 は 10  $\mu$ g の洗浄した封入体。矢印は P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の位置を示す。

## 2 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の発現のウエスタンブロットによる確認

約 50kDa のバンドが P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 であることを確かめるためにウエスタンブロットを行った。図 3 に示すように、約 50kDa 付近にのみシグナルが得られたことから、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 は菌体内で発現し、封入体に取り込まれていることが分かった。

大腸菌は外来のたんぱく質を強制的に発現されると菌体を守るための防御機構として、外来たんぱく質を封入体に取り込む。したがって、今回のように、大腸菌の可溶性分画から封入体を精製することで、外来たんぱく質を 9 割以上の割合で粗精製できる。図 2、図 3 に示したように、精製した封入体には、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 のバンドしか認められなかった。これらの理由から、この粗精製 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 を固相抗原として ELISA をおこなった。

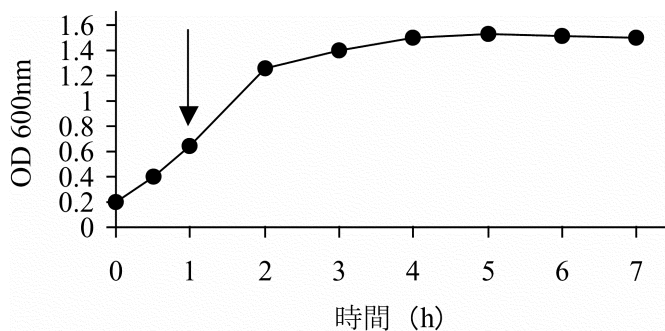


図4 大腸菌 BL21(DE3) の増殖曲線

矢印は終濃度 1mM になるように IPTG を大腸菌 BL21(DE3) 培養液に加えた時間を表す。

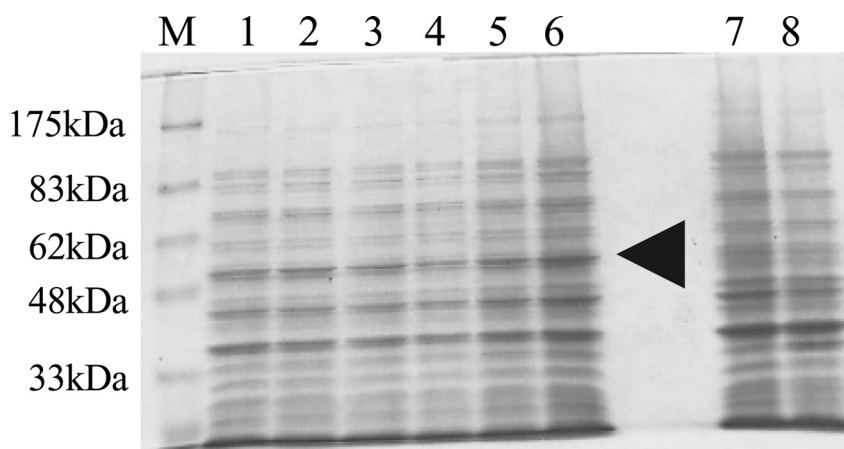


図5 誘導時間による P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の発現

M は分子量マーカー、レーン 1~6 は発現誘導後の時間を表し、それぞれ、誘導後、1、2、3、4、5、6 時間である。レーン 7 は誘導前、レーン 8 は発現誘導をしないで 6 時間培養した大腸菌 BL21 (DE3)。また、それぞれの大腸菌を SDS サンプルバッファーに懸濁後、5 分間煮沸したものを試料とした。矢印は P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の位置を示す。

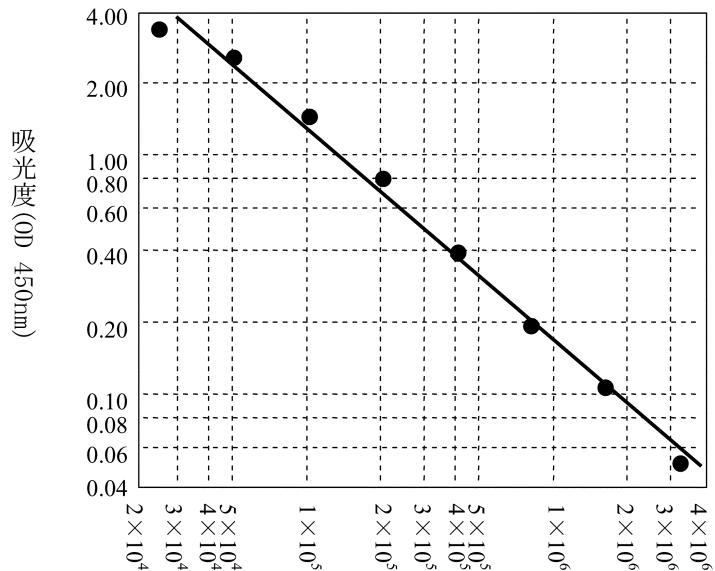
### 3 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 の発現条件

終濃度 1mM になるように IPTG を pET28a(+)-CYP2D6 $\Delta$ 25 発現ベクターをトランスフォームした大腸菌 BL21(DE3) 培養液に加え、その後の大腸菌 BL21(DE3) の増殖割合を OD600nm での吸光度変化として観察した。このように、吸光度変化を観察することで、発現誘導の時期と大腸菌を回収する時期について検討した。

発現誘導は、培養を始めて 1 時間後に、IPTG を添加することで行った。図 4 に示したように、この時点は、大腸菌の対数増殖期にあたり、最もたんぱく質の合成が多い時期でもある。したがって、菌体内で P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 をより多く発現させるためには、大腸菌の対数増殖期である吸光度 0.6~0.8 の間で、発現誘導することが良いと考えた。



次に、大腸菌を回収する時期であるが、培養開始5時間後で最も吸光度が高くなり、それ以降は減少傾向にあった(図4)。また、図5に示すように、各培養時期の大腸菌を回収して、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25の発現量をSDS-PAGEで確認した。各時期とも、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25の発現に大きな差は認められなかった。培養液の吸光度変化とP450 CYP2D6 $\Delta$ 25の発現量の変化から考えると、発現誘導開始3時間後に大腸菌を回収するのが最も良いと考えた。



抗 P450 CYP2D6 血清の希釈倍率  
図6 抗 P450CYP2D6 血清の希釈曲線

抗 P450CYP2D6 血清を反応溶液で 25600 倍希釈から 3276800 倍までの 2 倍希釈系列を作った。測定結果は両対数グラフに表している。

#### 4 P450 CYP2D6 $\Delta$ 25 を抗原とした ELISA プレート

図6にELISAの結果を示した。グラフを両対数で表すと25600倍希釈から3276800倍希釈まで、抗P450CYP2D6血清の希釈倍率に比例して吸光度が減少することが認められた。但し、25600倍希釈の血清では吸光度が3.0を越えてしまい、吸光度が頭打ちになってしまっているために、予想されるよりも低い値になったと思われる。

この結果から、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25を抗原としたELISA法は、定量的に抗CYP2D6抗体を測定できることが分かった。しかしながら、今回のP450 CYP2D6 $\Delta$ 25は粗精製であるので、患者血清を測定する際に、微量含まれていると考えられる大腸菌由来のたんぱく質に反応する血清があるかもしれない。実際に患者血清を測定して見なければどの程度の影響があるかは分からないが、いずれにせよ、さらに、P450 CYP2D6 $\Delta$ 25の精製度をあげる必要があるだろう。

## 参考文献

- 1) Rizzetto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973;15: 331-44.
- 2) Izumi Y, Kaneko A, Oku K, Kimura M, Tanaka S, Tada H, Tatsumi K, Takano T, Hidaka Y, Amino N. Development of liver dysfunction after delivery is possibly due to postpartum autoimmune hepatitis. A report of three cases. *J Intern Med*. 2002 Oct;252 (4): 361-7.
- 3) Kimura M, Tatsumi KI, Tada H, Izumi Y, Kaneko A, Kato M, Masuzawa M, Ikemoto M, Yabusaki Y, Hidaka Y, Amino N. Anti-CYP2D6 antibodies detected by quantitative radioligand assay and relation to antibodies to liver-specific arginase in patients with autoimmune hepatitis. *Clin Chim Acta*. 2002 Feb;316(1-2): 155-64.
- 4) Miyakawa H, Kikazawa E, Abe K, Kikuchi K, Fujikawa H, Matsushita M, Kawaguchi N, Morizane T, Ohya K, Kako M. Detection of anti-LKM-1 (anti-CYP2D6) by an enzyme-linked immunosorbent assay in adult patients with chronic liver diseases. *Autoimmunity*. 1999;30(2): 107-14.
- 5) Sakaguchi M, Mihara K, Sato R. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J*. 1987 Aug;6(8): 2425-31.
- 6) Kempf AC, Zanger UM, Meyer UA. Truncated human P450 2D6: expression in *Escherichia coli*, Ni(2+) -chelate affinity purification, and characterization of solubility and aggregation. *Arch Biochem Biophys*. 1995 Aug 20;321(2): 277-88.
- 7) Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest*. 1991 Oct;88(4): 1370-8.
- 8) Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies(LKM1). *Eur J Immunol*. 1993 May;23(5): 1105-11.