

レートシクラーゼを受容体とし、腸管上皮細胞内の cGMP の上昇を起こすことが報告されている (16、17、19)。これら STI との類似性や上記事例は、EAST1 か下痢症の発現や下痢原性大腸菌の疫学に重要な位置を占める可能性を示し、今後、下痢症例の検査項目に EAST1 が必要だと考えられる。現在、EAST1 の検査には Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による EAST1 遺伝子 *astA* の検出が行われているか、EAST1 ペプチドを検出する方法は開発されておらず、実際に事例株が EAST1 ペプチドを産生しているかどうかは確かめられていない。

そこで、本研究では EAST1 の確定診断のために、ペプチドそのものを検出する免疫学的方法の開発を最終目的とし、ポリクローナル抗体 (pAb)、モノクローナル抗体 (mAb) の作製、及びリコンビナント EAST1 (rEAST1) の大腸菌発現系の構築を試みた。

## 【材料・方法】

### 1 抗体の作製

EAST1 の N 末端側の推定アミノ酸配列 [Arg-Arg-Pro-Ala-Ser-Ser-Tyr-Ala-Ser-Cys] (以下 N-1) と C 末端側のアミノ酸配列 [Cys-Gly-Arg-Thr-Thr-Lys-Pro-Ser-Leu-Ala-Thr] (以下 C-1) を抗原ペプチドとして設計した (TaKaRa により合成) (図 1)。2 種の抗原ペプチドそれぞれにクルタルアルデヒド法によりウシ血清アルブミン (PIERCE) を結合させた (2)。それぞれをオイルアシュハント (Wako) と混合し、ウサキ (ニューンラントホワイト) およびマウス (BALB/c) に免疫した。抗原ペプチドをアカロースケル (SulfoLink Kit, PIERCE) に固定化したカラムを用い、ウサキ抗血清からアフィニティークロマトグラフィーにより精製し pAb とした。

mAb の作製は以下のように行った。免疫したマウス脾細胞とミエローマ細胞 (X63Ag 653) をポリエチレンクリコール (PGE4000, MERCK) を用いて細胞融合した。抗原ペプチドをウェルに吸着させた ELISA によりハイブリトーマ培養上清をスクリーニングし、抗体産生ハイブリトーマを確立した。ハイブリトーマをプリステイン (SIGMA) 処置したマウス腹腔内 (BALB/c) に投与して得た腹水から mAb を精製した。IgG 型の抗体は Protein A Column (Amersham Pharmacia Biotech) により、IgM 型の抗体は Sephacryl S-300 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いたケル濾過により精製した。抗体のクラス、及びサブクラスの決定にはマウスイムノクロフリンタイピンクキント (Wako) を用いた。

## 2 リコンヒナント EAST1 (rEAST1) の作製

集団食中毒事例株大腸菌 O166 H15 (00-39-102 株) の染色体由来 EAST1 遺伝子 *astA* が挿入された pGEM-T Vector (西川禎一博士 (大阪市立大学) より分与) を鋳型とした。プライマー 1, 5'-tatgccatcaacacagtatatccg-3' およびプライマー 2, 5'-ggtcgagtgactgctttgtagt-3' を用いて、94°C1 分、49°C1 分、72°C1 分を 25 サイクルという条件で PCR (Thermal Cycler, ASTEC) を行った。ヒオチン結合タクトの融合タンパクを発現させる PinPoint Xa-1 T Vector (Promega) に PCR 産物を挿入し、大腸菌 JM109 に形質転換した。1 mM イソプロピル- $\beta$ -D-チオカラクトピラノシド (IPTG) 添加後、37°C で 9 時間培養 (LB medium) し、ヒオチン結合タクトのついた rEAST1 (B-rEAST1) を発現誘導させた。菌体を回収し、Cell Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 50 mM NaCl, 5% Glycerol) に懸濁した。超音波により菌体を破碎した (ULTRASONIC DISRUPTOR, TOMY)。これを遠心 (10,000 X g, 15 分間) し、その上清をアヒシン担体 (Promega) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した (図 2)。溶出には 5 mM のヒオチンを加えた Cell Lysis Buffer を用いた。リコンヒナントタンパクの発現の確認にはタイテオキン法によるシークエンス解析 (DSQ2000, SHIMADZU)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアヒシン (SIGMA) を用いたウエスタン・ブロット法を行った。

## 3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### ① pAb、mAb の抗体価の測定

N-1 または C-1 (10  $\mu$ g/ml) を ELISA プレートに 0.1 ml/well 加え、37°C で 1 時間インキュベートし抗原を吸着させた後、PBS で 4 倍希釈したフロノクエース (大日本製薬) 0.2 ml/well を加え、37°C で 1 時間インキュベートしフロノキンをを行った。0.05% Tween20-PBS (PBS-T) で 2 回洗浄後、pAb または mAb 0.1 ml/well を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。同溶液で 6 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した Anti-Rabbit IgG (BIORAD)、Anti-Mouse IgG (BIORAD)、Anti-Mouse IgM (BIOSOURCE) 0.1 ml/well を加え、37°C で 1 時間反応させた。過酸化水素と o-フェニレンジアミン (Wako) で発色後、分光光度計 (MICROPLATE READER MODEL 550, BIORAD) を用いて 450 nm での吸光度を測定した。

### ② B-rEAST1 と抗体との反応

作製した pAb、mAb および無関係な抗体 (本研究室で作製した抗クサガメヒテロンエンニン抗体) 10  $\mu$ g/ml を上記の条件でコーティング、フロノキンをした後、B-rEAST1 を 0.1 ml/well 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS-T で 6 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアヒシンと 37°C で 1 時間反応させ、過酸化水素と o-フェニ

レンシアミンで発色後、450 nm での吸光度を測定した。

### ③ competitive ELISA

N-1 または C-1 を上記の条件でコーティング、ブロッキングをした後、competitor となる N-1、C-1 または B-rEAST1 と抗体を 0.05 ml/well ずつ加え 37°C で 30 分間インキュベートした。PBS-T で 6 回洗浄後、ペルオキシターゼ標識した二次抗体と 37°C で 1 時間反応させ、過酸化水素と o-フェニレンシアミンで発色後、450 nm での吸光度を測定した。

## 4 その他

タンパクの定量は Bradford 法で行った (1)。SDS-PAGE は Laemmli 法に従い、15% ポリアクリルアミドゲルを使用した (8)。ウエスタン・ブロットはセミトライ型転写装置 (ATTO) を用いた。アカロース電気泳動には 2% アカロースゲルを用いた。

## 【結果】

### 1 抗体の作製と反応性

#### ① pAb の作製と反応性

C-1 および N-1 に対する pAb を得た。抗体価を ELISA で確認したところ、両抗体はともに抗体の濃度に依存して抗原ペプチドと反応した (表 1)。

#### ② mAb の作製と反応性

N-1 に対する 2 種の mAb を得た。それぞれを AN2C、AN5C とした。AN2C のサブクラスは IgG<sub>3</sub> だった。AN5A は IgM 型だった。C-1 に対する 1 種の mAb を得た。それを ACD2 とした。サブクラスは IgG<sub>2b</sub> だった。全ての抗体が抗体の濃度に依存して抗原ペプチドと反応した (表 1)。いずれの mAb も κ 鎖を持つ抗体であった。

### 2 rEAST1 の作製

アカロースゲル電気泳動法の結果、PCR 産物は *astA* の大きさ (116 bp) と一致した (図 3)。これを PinPoint Xa-1 T Vector に挿入し、大腸菌 JM109 に形質転換した。タイテオキシ法でインサートの塩基配列を確認したところ、大腸菌 O166 H15 由来 *astA* と塩基配列が一致した。1 mM IPTG 存在下で 37°C で 9 時間の培養を行ったところ、SDS-PAGE により 17.1 kDa のリコンヒナントタンパクの発現が確認された (図 4a)。

そのハントはペルオキシターセ標識ストレプトアヒシンと反応した (図 4b)。

大腸菌を菌体破砕した遠心上清から、アヒシン担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ (図 5)、SDS-PAGE により溶出分画中に 171 kDa と 156 kDa の位置にハントが確認された (図 6a)。さらに、2本のハントはともにストレプトアヒシンと反応した (図 6b)。また、今回の発現誘導においては、500 ml 培養液から 0.271 mg の B-rEAST1 が回収された (表 2)。

### 3 B-rEAST1 と抗体との反応

pAb Anti N-1 を用いて B-rEAST1 との反応性を ELISA により調べた結果、0.03 µg/ml 以上で B-rEAST1 の濃度に依存して吸光度が上昇したこと、また、それは無関係な抗体との反応よりも大きな上昇を示したこと、および抗原を B-rEAST1 からヒオチンに置換しても反応を示さなかったことから、pAb Anti N-1 が B-rEAST1 を特異的に認識していることが示唆された (図 7 および 8)。

pAb、mAb と B-rEAST1 との反応性をウエスタン・ブロット法で調べたが、反応性を示さなかった。

### 4 N-1 および C-1 を competitor とした competitive ELISA

#### ① pAb を用いた competitive ELISA

C-1 を competitor として pAb Anti C-1 0.1 µg/ml で、competitive ELISA を行ったところ、吸着させた C-1 と pAb との反応が competitor C-1 10.0 ng/ml 存在下で阻害が確認された (図 9)。

同様に、N-1 を competitor として pAb Anti N-1 0.05 µg/ml で、competitive ELISA を行ったところ、N-1 が 1.0 ng/ml 存在下で阻害が確認された (図 10)。

両抗体はともに無関係なペプチドは阻害しなかった (図 9 および 10)。

#### ② mAb を用いた competitive ELISA

N-1 を competitor として AN2C 0.3 µg/ml で、competitive ELISA を行ったところ、N-1 が 10 ng/ml 存在下で阻害が確認された (図 11)。

N-1 を competitor として AN5A 5 ng/ml で、competitive ELISA を行ったところ、N-1 が 1.0 µg/ml 存在下で阻害が確認された (図 12)。

両抗体はともに無関係なペプチドを阻害しなかった (図 11 および 12)。

ACD2 でも competitive ELISA を行ったが、C-1 が 1.0 µg/ml 存在下でも阻害が確認できなかった。

以上の結果より、pAb Anti N-1 を用いた competitive ELISA システムが EAST1 由来ペプチドを検出するのに最適であることがわかった。

## 5 B-rEAST1 を competitor とした competitive ELISA

B-rEAST1 を competitor として、pAb Anti N-1 0.05 µg/ml を用いた competitive ELISA を行ったところペプチド換算濃度 B-rEAST1 2.5 µg/ml まで阻害が確認できなかった (図 13)。

### 【考 察】

EAST1 に対する免疫抗体の作製にあたって、ウサキおよびマウスに免疫する抗原を合成ペプチドとした。EAST1 は、精製方法が確立されていないため、高純度の EAST1 を入手するのは不可能であった。しかし、EAST1 の推定アミノ酸配列は既に報告されていたので、本研究では合成ペプチドを免疫原とした (17)。本研究では、Hopp and Woods の理論を参考にして EAST1 の 38 個のアミノ酸から、親水性に富む 2 領域を選択した (6)。あるタンパク質を特異的に認識する抗体を作製するには 10 アミノ酸残基以上が必要であるとされている。それ以下では、その配列が他のタンパク質中にも存在する可能性が高くなり、抗体の特異性が低下すると考えられるので、本研究では 2 領域からそれぞれ 10 アミノ酸残基を選択した。合成ペプチド内でシステイン残基によるシスルフィド結合が形成されるのを防ぐために、システイン残基を 2 つ以上入れないように配慮した。それらを抗原として得られた pAb、mAb は ELISA による抗体価の測定や competitive ELISA の結果、mAb よりも pAb の方が抗体価が高く、低濃度でのペプチド検出が可能であることがわかった。抗体が認識する抗原エピトープはアミノ酸 5、6 残基とされているので、本研究で得られた精製 pAb は 2~3 種の抗体で構成されている可能性は否定できない (5)。よって、得られた pAb は mAb と同程度の特異性を持ち、mAb よりも高抗体価であったと考えられる。

次に rEAST1 の作製を試みた。rEAST1 は EAST1 検出 ELISA システムにおける標準曲線を得るために必須となる。EAST1 の N 末端側にヒオチン結合タンパクタグとして融合された rEAST1 (B-rEAST1) を大腸菌に発現させ、アヒシン担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーでリコンビナントタンパクの精製を試みた。部分精製物は 171 kDa と 156 kDa の位置にバンドが確認された。171 kDa のバンドは、タグとして発現するヒオチン結合タンパクが 130 kDa であるため、分子量の差からリコンビナントタンパクに 41 kDa の rEAST1 が含まれることが示唆された。156 kDa の位置に確認されたバンドについては 2 つの可能性が考えられた。発現された B-rEAST1 が大腸菌のプロテアーゼによって切断された、もしくは、EAST1 を構成するアミノ酸残基

の一部 (8 番目のアルキニンから 10 番目のプロリンまで、および 29 番目のクリニンと 30 番目のアルキニン) のコトン使用頻度が非常に低いため、アミノ酸の合成が途中で止まってしまったことか考えられた (11)。

本研究の大腸菌発現系から得られた部分精製 B-rEAST1 は 500 ml 培養で 0.271 mg たった。これは決して高い数値でないと考えられる。使用頻度が低いコトンが使われていることかその一因であろうか、発現させるタンパク (B-rEAST1) の回収量を向上させるために、予備実験として 25°C での培養、IPTG 低濃度での発現などを試みたか、本論文に記載した 37°C、1 mM IPTG の条件が最適だった。今後はまれなコトンの発現用にテサインされているコンピテントセル (BL21-CodonPlus, STRATAGENE) を用いての発現や、大腸菌以外の系での発現を検討することも重要であると思われる。

本研究で構築した大腸菌発現系から得られた B-rEAST1 は可溶性画分に含まれるものであった。すなわち、この発現系から得られた B-rEAST1 は尿素などを用いた変性条件下で精製されていないため、精製によって高次構造が大きく変化しておらず、B-rEAST1 中の EAST1 領域は native EAST1 の構造と類似のままであり、その活性を保った状態であると推察される。このことは全長の rEAST1 を免疫原とした抗体の作製において有用となるだろう。また、近年、EAST1 と同様に腸管クアニレートシクラーゼを活性化する STI や腸管内在性ホルモンのグアニリンで既に応用されている培養細胞 T84 を用いた rEAST1 アンゼイ法の確立への利用なども期待できる (3, 19, 21, 22)。

本研究では作製した pAb、mAb、および B-rEAST1 を用いた ELISA による検出法の開発も検討した。ELISA による検出として、Sandwich ELISA もしくは competitive ELISA が挙げられるか、本研究では EAST1 が Sandwich ELISA を適用するには小さすぎると考えたため、competitive ELISA による検出法の開発を選択した。まず、B-rEAST1 と抗体の ELISA での反応性を調べるために、作製した pAb、mAb をウェルにコーティングし、B-rEAST1 を抗原として反応させ、ペルオキシターゼ標識ストレプトアヒシンで発色させる ELISA を行った。その結果、すべての抗体で反応が確認された。その中で pAb Anti N-1 が最も良い反応を示した。また、抗原ペプチドを competitor とした competitive ELISA でも、pAb Anti N-1 が最もペプチド検出感度が高かったため、pAb Anti N-1 を用いて B-rEAST1 を competitor とした competitive ELISA を行った。その結果、ペプチド換算濃度 B-rEAST1 25  $\mu$ g/ml まで阻害が確認されなかった。その原因として、抗原とした抗原ペプチド (N-1) と B-rEAST1 の立体構造が異なることか考えられる。このことは作製した抗体と B-rEAST1 がウエスタン・ブロット法で反応しなかったことから推察された。立体構造の違いによる抗体の反応性の低下は抗ペプチド抗体の弱点の 1 つである。特に EAST1 は 2 本のシスルフィド結合を有する可能性があるため、3 本のシスルフィド結合を持つ STI や 2 本のシスルフィド結合を持つグ

アニリンのように、特異な立体構造を持つことが推察される (3、4、14、20)。

本研究において pAb Anti N-1 が抗原ペプチド (N-1) を competitor とした時は 10 ng/ml で阻害が確認された。この competitive ELISA システムを用いてサンプルを Trypsin など酵素処理することで、10~20 アミノ酸残基に切断し、直鎖状のペプチドとし、それと作製した pAb、mAb を反応させる検出法の構築が期待できる。また、別の EAST1 検出法として、rEAST1 にヒオチン結合タグがついていることを利用した系も考えられる。その方法は、本研究で B-rEAST1 と抗体との反応性を調べるために行った ELISA システムを利用するものであるか、B-rEAST1 と食中毒事例株の培養上清を混合し、もし培養上清中に EAST1 が存在すれば、ウェルに吸着させた抗体と B-rEAST1 の反応が阻害されるため、ペルオキシターゼ標識ストレプトアヒシンとヒオチン結合タグとの反応がなくなり発色しなくなるという competitive ELISA システムである。いずれの検出法も更なる検討を要するか、EAST1 検出法を開発することは、下痢原性大腸菌が原因である食中毒事例の疫学的調査に有用であるだけでなく、緒言でも述べたように、EAST1 遺伝子 *astA* は EAggEC だけでなく、EHEC、EPEC、ETEC からも検出されているので、それらから実際に EAST1 ペプチドが産生されていることが確認できれば、現在までの下痢原性大腸菌の分類法に一石を投じることになるだろう (18、23)。また、近年、*astA* がサルモネラからも検出されたという報告があるので、EAST1 検出はサルモネラによる食中毒事例の疫学的調査への応用も期待できる (15)。

#### 【参考文献】

- 1 Bradford, M M 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochem 72 248-254
- 2 Coligan, J E (ED) 1991 Coupling of synthetic peptide to carrier protein using glutaraldehyde Current protocol in immunology 9 4 3
- 3 Currie, M G, K F Fok, J Kato, R J Moore, F K Hamra, K L Duffin, and C E Smith 1992 Guanylin An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase Proc Natl Acad Sci USA 89 947-951

- 4 Garcia, K C , F J Sauvage, M Struble, W Henzel, D Reilly, and D V Goeddel 1993  
Processing and characterization of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*  
J Biol Chem 268 22397-22401
- 5 Geysen, H M , S J Rodda, T J Mason, G Tribbick, and P G Schoofs 1987  
Strategies for epitope analysis using peptide synthesis J Immunol Methods 102 259-274
- 6 Hopp, T P and K R Wood 1981 Prediction of protein antigenic determinants from amino  
acid sequences Proc Natl Acad Sci USA 78 3824-3828
- 7 Jerse, A E , J Yu, B D Tall, and J B Kaper 1990 A genetic locus of enteropathogenic  
*Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on  
tissue culture cells Proc Natl Acad Sci USA 87 7839-7843
- 8 Laemmli, U K 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
bacteriophage T4 Nature 227 680-685
- 9 Levine, M M , J P Nataro, H Karch, M M Baldini, J B Kaper, R E Black, M L  
Clements, and A D O'Brien 1985 The diarrheal response of humans to some classic  
serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an  
enteroadhesiveness factor J Infect Dis 152 550-559
- 10 Levine, M M 1987 *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic, enteropathogenic,  
enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent J Infect Dis 155 377-389
- 11 Nakamura, Y, T Gojobori, and T Ikemura 2000 Codon usage tabulated from international  
DNA sequence database status for the year 2000 Nucleic Acids Res 28 292
- 12 Nishikawa, Y, J Ogasawara, A Helander, and K Haruki 1999 An outbreak of  
gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166 Emerg Infect Dis 5 300
- 13 西川 禎一 2001 1997年から1999年の大阪市内散発下痢症患者における下痢  
原性大腸菌の分離状況 日本細菌学雑誌 56 329



- 14 Ozaki, H , T Sato, H Kubota, Y Hata, Y Katsube, and Y Shimonishi 1991 Molecular structure of the toxin domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli* A putative binding site for a binding protein on rat intestinal epithelial cell membranes J Biol Chem 266 5934-5941
- 15 Pariva de Sousa, C and J D Dubreuil 2001 Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 gene) in *Escherichia coli* and *Salmonella* Int J Med Microbiol 291 15-20
- 16 Savarino, S D , A Fasano, D C Robertson, and M M Levine 1991 Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model J Clin Invest 87 1450-1455
- 17 Savarino, S J , A Fasano, J Watson, B M Martin, M M Levine, S Guandalini, and P Guerry 1993 Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E coli* heat-stable toxin Proc Natl Acad Sci USA 90 3093-3097
- 18 Savarino, S J , A M Veigh, J Watson, A Cravioto, J Molina, P Echeverria, M K Bhan, M M Levine, and A Fasano 1996 Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E coli* J Infect Dis 173 1019-1022
- 19 Schulz, S , C K Green, P S Yuen, and D L Garbers 1990 Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor Cell 63 941-948
- 20 Shimonishi, Y, Y Hidaka, M Koizumi, M Hane, S Aimoto, T Takeda, T Miwatani, and Y Takeda 1987 Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* FEBS Lett 215 165-170
- 21 Uzzau, S , and A Fasano 2000 Cross-talk between enteric pathogens and the intestine Cell Microbiol 2 83-89
- 22 Visweswariah, S S , G Shanthi, and T S Balganesb 1992 Interaction of heat-stable enterotoxin with human colonic (T84) cells modulation of the activation of guanylyl cyclase Micro Pathog 12 209-218

- 23 Yamamoto, T, N Wakisaka, F Sato, and A Kato 1997 Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli* FEMS Microbiol Lett 147 89-95
- 24 八柳 潤, 木内 雄, 齊藤 志保子, 佐藤 宏康, 森田 盛大 1995 腸管集合性大腸菌耐熱性毒素エンテロトキシン-1(EAST-1)遺伝子を保有する,食中毒事例由来病原血清型大腸菌 感染症学雑誌 70 215-223
- 25 厚生労働省 食中毒発生状況(平成 12 年)

1 atgcatcaacacagtatatccgaagcccgatccagttatgcatcgtgcatatggt 60  
gc M P S T Q Y I R R P A S S Y A S C I W C

---

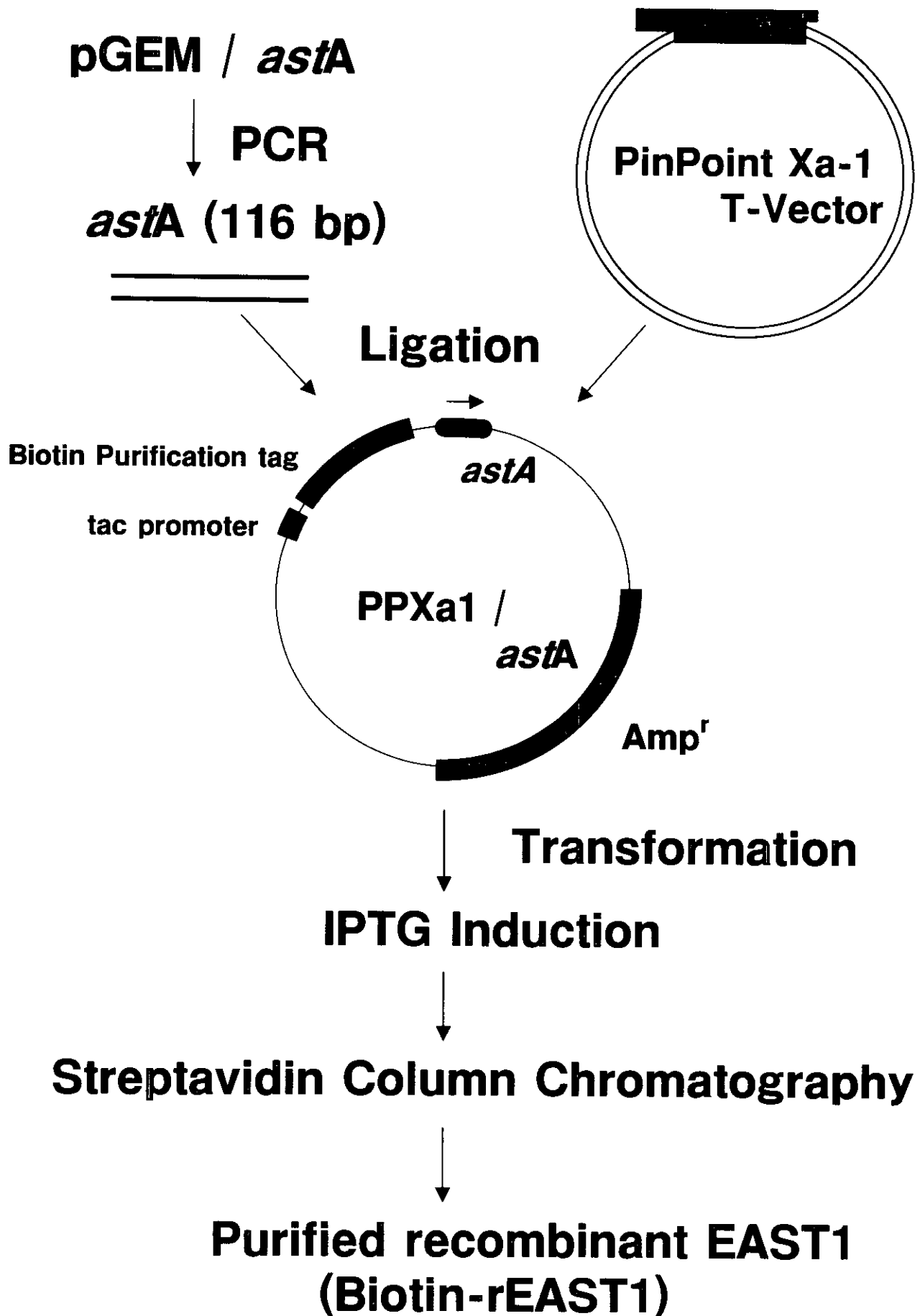
N-1 Peptide

61 caacagcctgccttcatgtcatggaaggactacaagcagtcactcgcgacc 114  
A T A C A S C H G R T T K Q S L A T

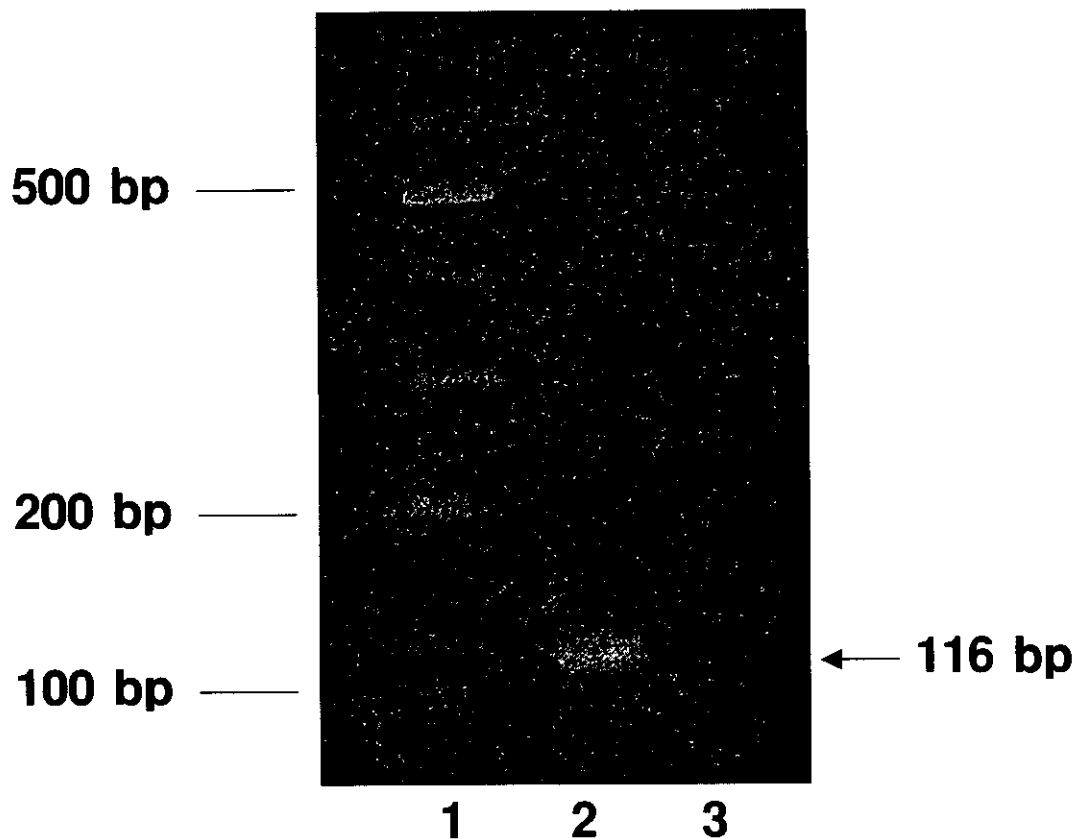
---

C-1 Peptide

図1 EAST1の塩基配列および推定アミノ酸配列と抗原ペプチド選択部位



**図2 B-rEAST1作製までのフローチャート**



**図3 PCR法によるEAST1遺伝子*astA*の増幅**

**2%アガロースゲル電気泳動**

**レーン1：分子量マーカー**

**レーン2： *astA*が挿入されたpGEM T-Vectorを  
鋳型とした**

**レーン3： *astA*が挿入されていないpGEM T-Vector  
を鋳型とした**

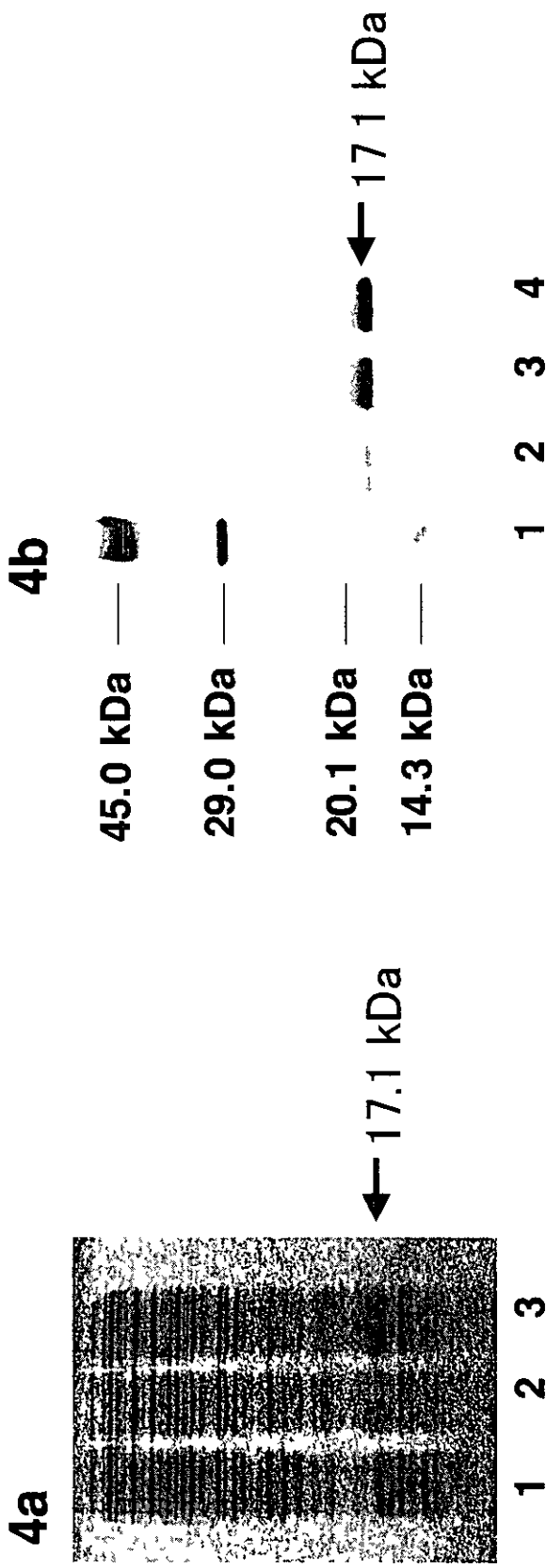


図4 リコンビナントタンパクの解析

a. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析 (CBB染色)

レーン1～3はIPTGによる発現誘導後0、4.5、9.0 hrの菌体懸濁液

b. ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いたウエスタン・ブロット法による解析

レーン1：分子量マーカー  
 レーン2～4はIPTGによる発現誘導後0、4.5、9.0 hrの菌体懸濁液

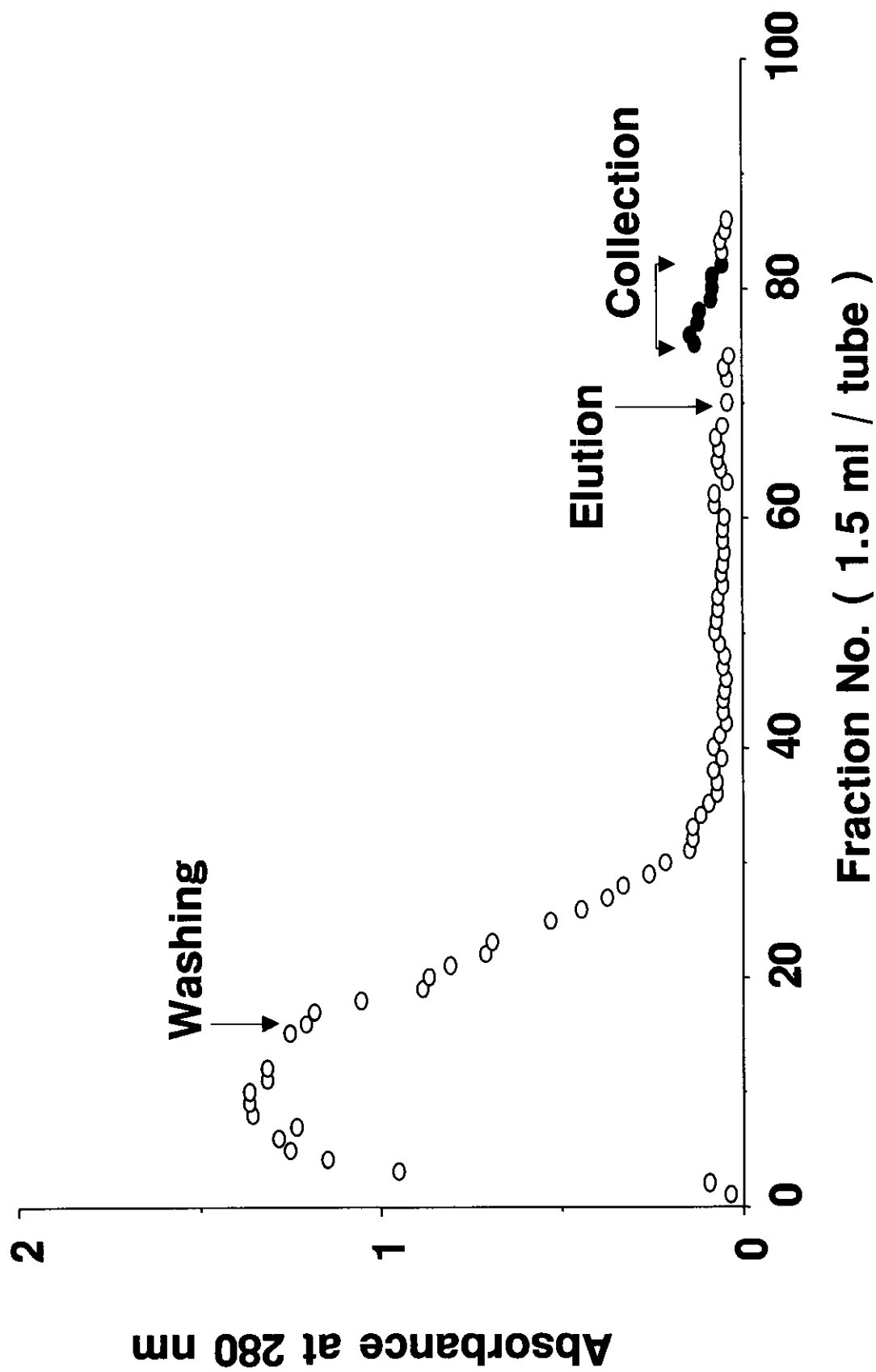
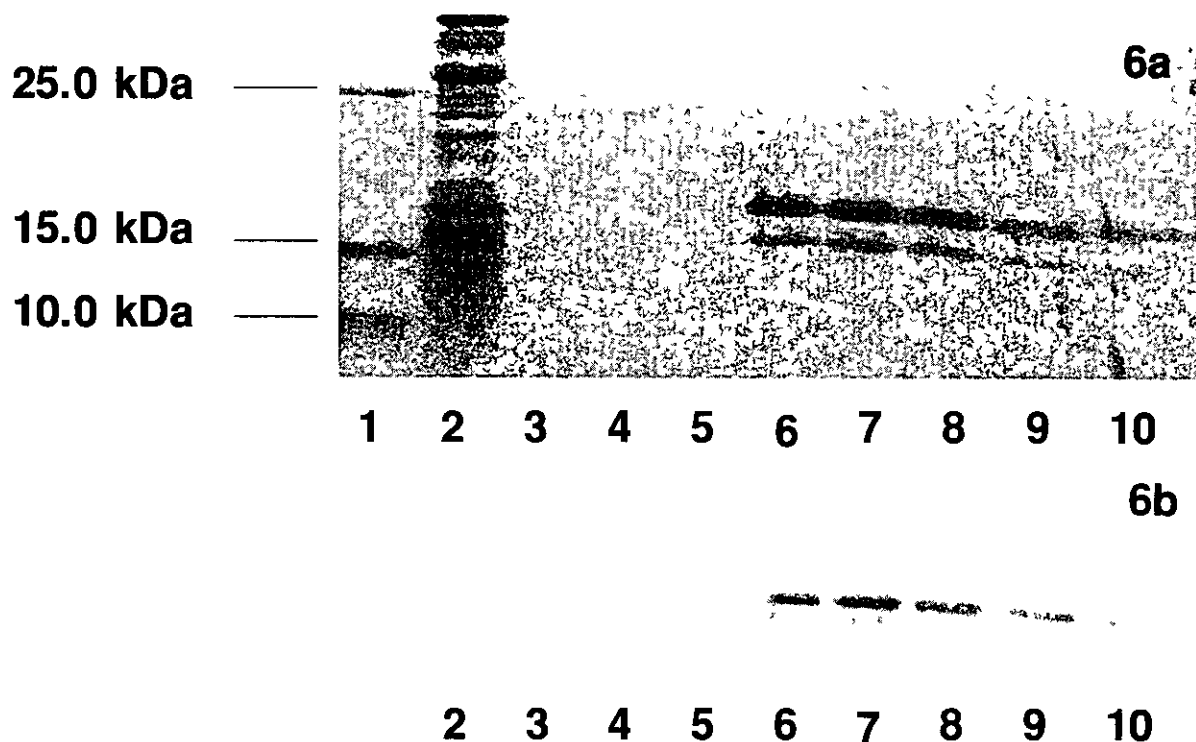


図5 アビジン担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによるB-rEAST1の溶出パターン



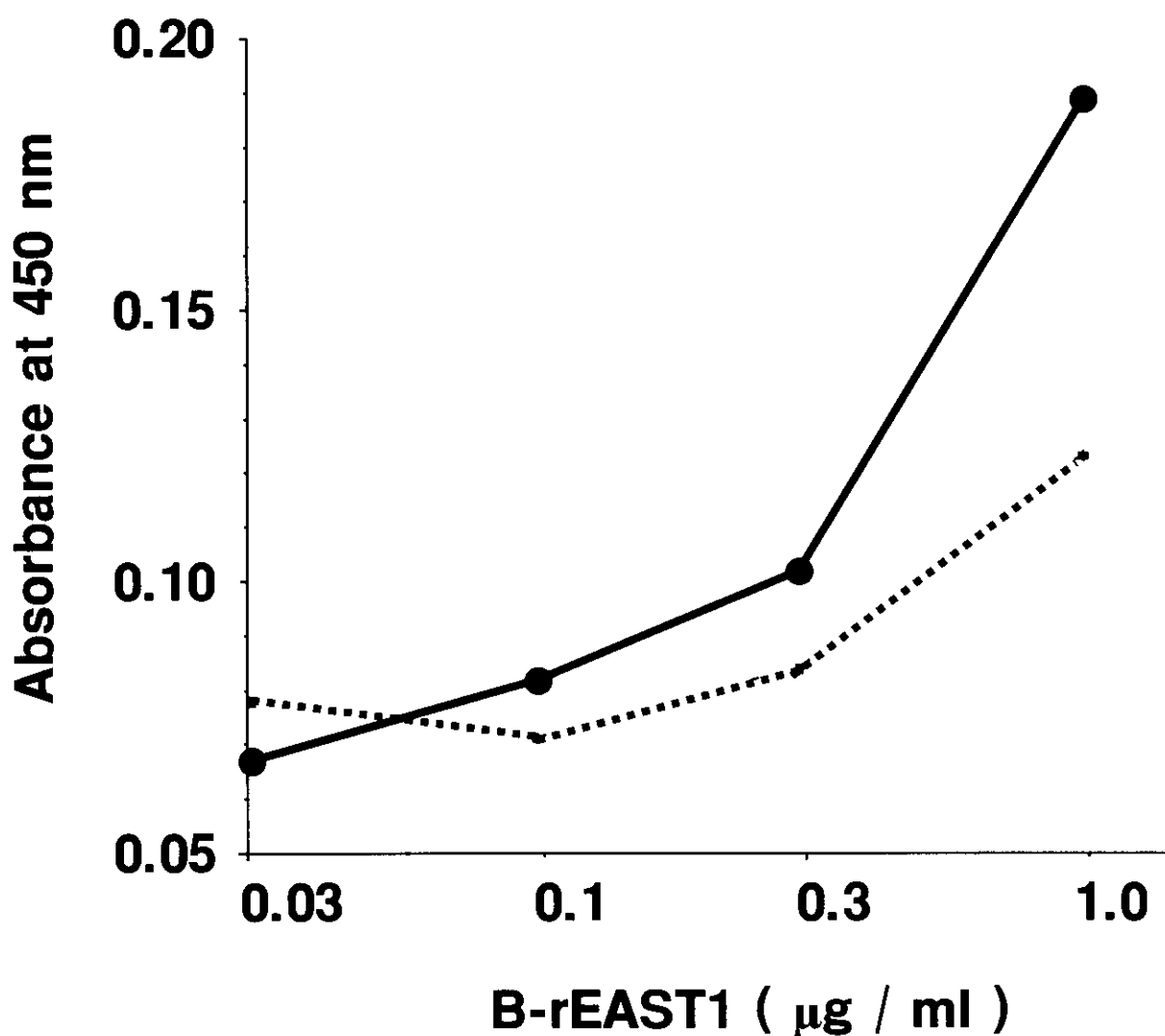
**図6 アビジン担体を用いたB-rEAST1の  
アフィニティークロマトグラフィーの解析**

**a. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析  
(CBB染色)**

**b. ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた  
ウエスタン・ブロット法による解析**

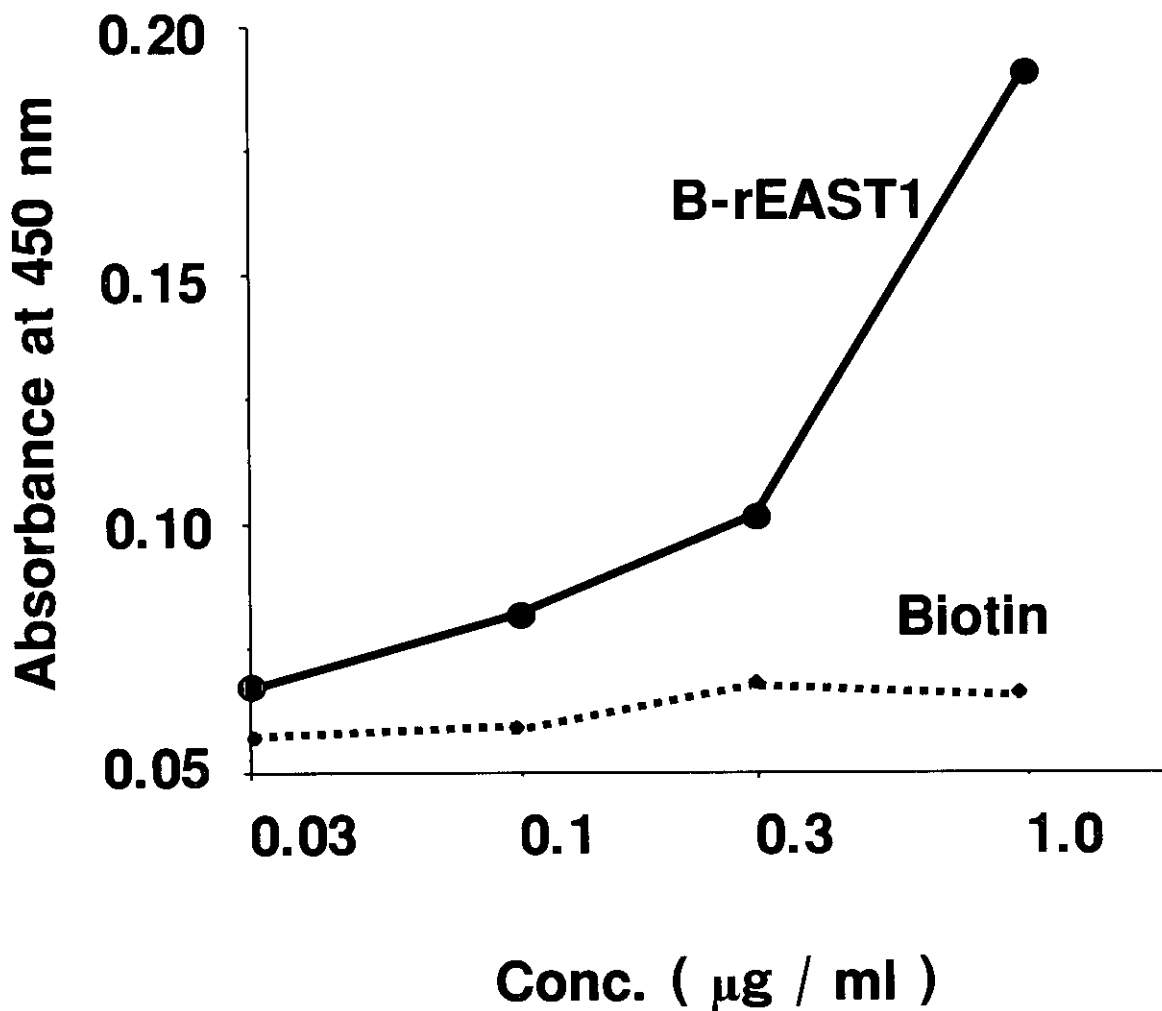
レーン1：分子量マーカー	レーン2：クルードサンプル
レーン3：フラクション29	レーン4：フラクション70
レーン5：フラクション73	レーン6：フラクション74
レーン7：フラクション75	レーン8：フラクション76
レーン9：フラクション81	レーン10：フラクション82





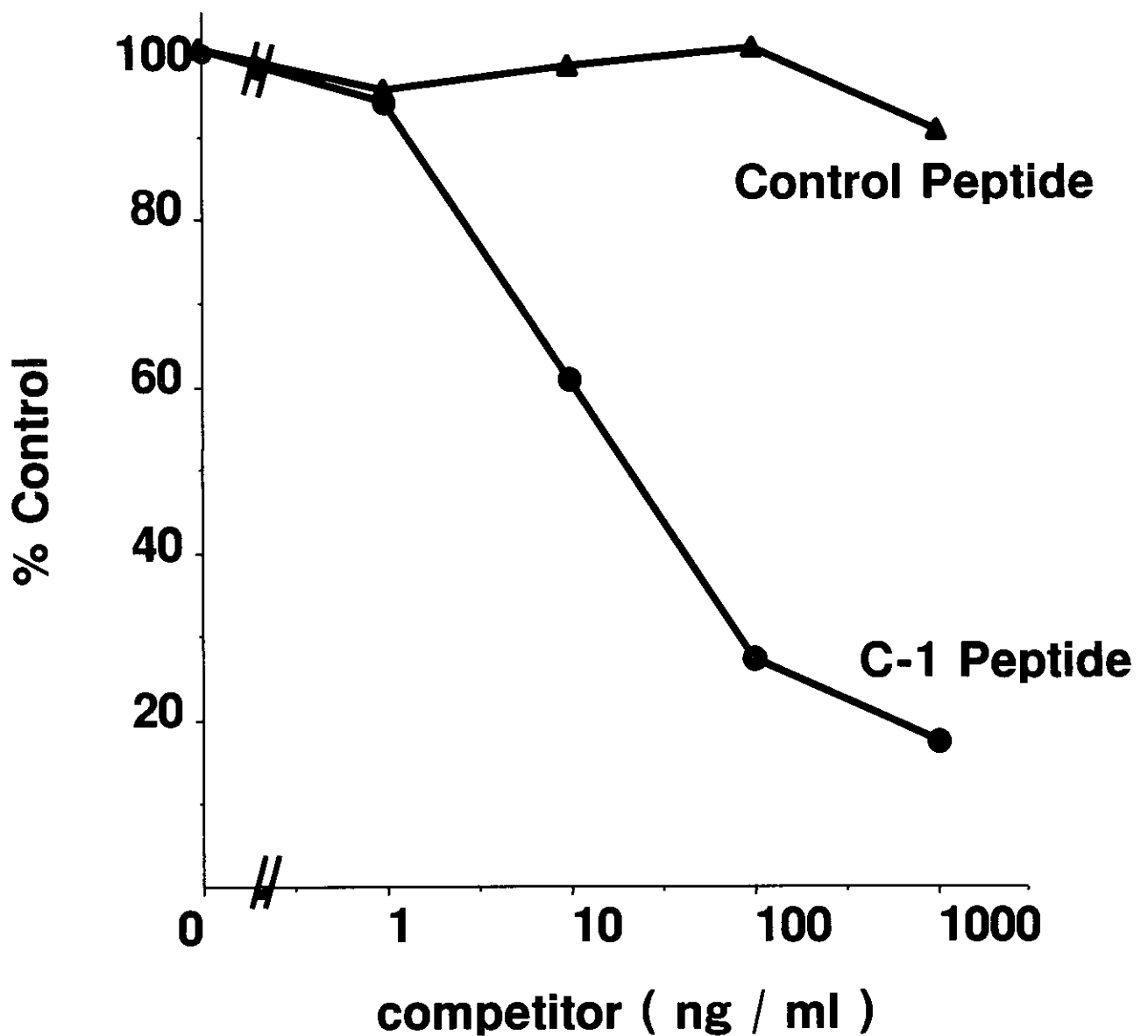
**図7 B-rEAST1とpAb Anti N-1  
および無関係な抗体との反応性**

横軸はペプチド換算濃度でのB-rEAST1濃度を示す。  
 実線はpAb Anti N-1を、破線はコントロール抗体を  
 用いた時のB-rEAST1との反応を示す。



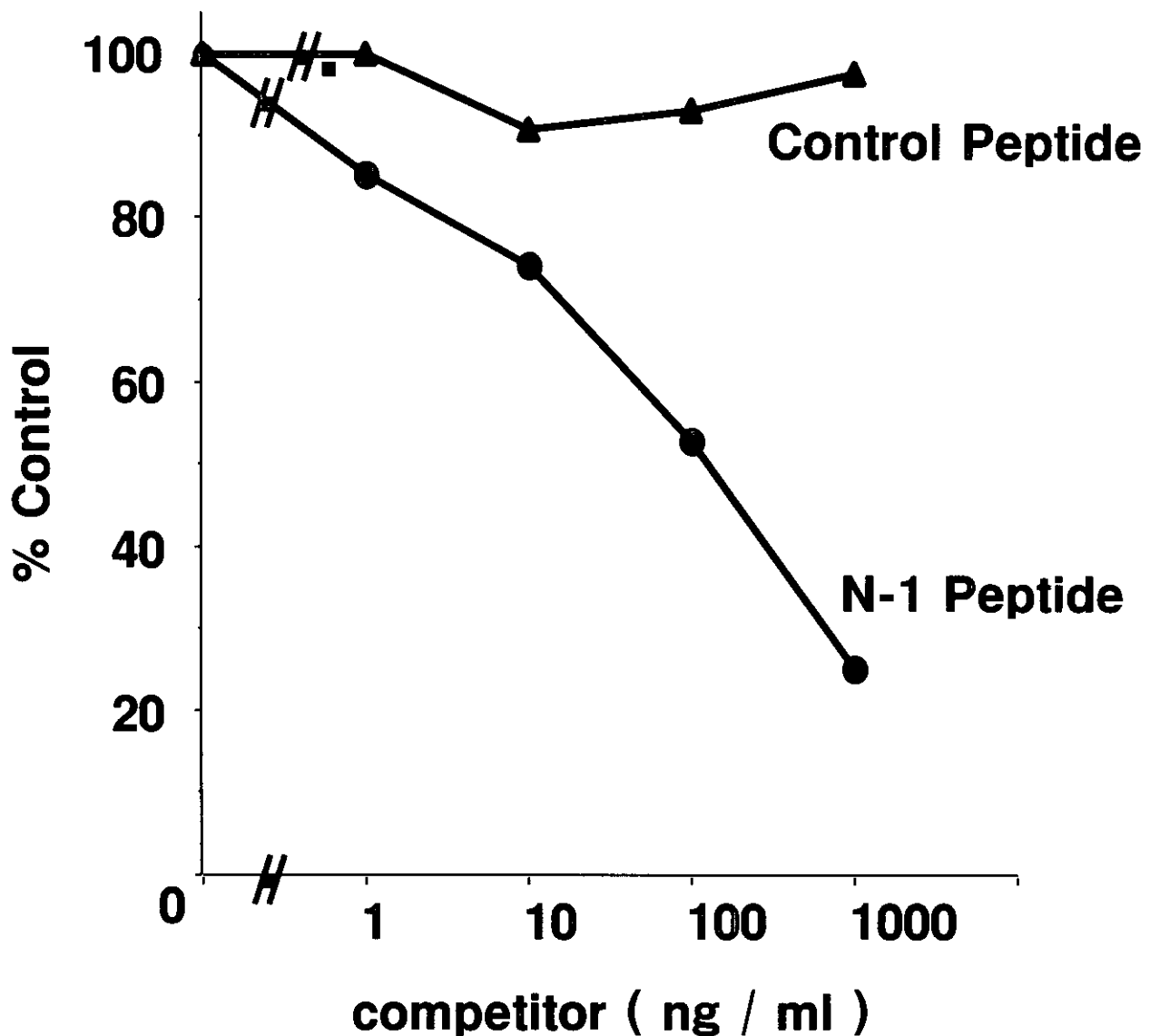
**図8 B-rEAST1およびビオチンのみを抗原とした時の抗体との反応性**

横軸はペプチド換算濃度を示す。



**図9 pAb Anti C-1を用いてのcompetitive ELISA**

縦軸はcompetitorが0の時の吸光度(450 nm)値を100%として換算したものを示す。Control PeptideにはN-1 Peptideを用いた。



**図10 pAb Anti N-1を用いてのcompetitive ELISA**

縦軸はcompetitorが0の時の吸光度(450 nm)値を100%として換算したものを示す。Control PeptideにはC-1 Peptideを用いた。