

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5137266号
(P5137266)

(45) 発行日 平成25年2月6日(2013.2.6)

(24) 登録日 平成24年11月22日(2012.11.22)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21

請求項の数 9 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-525286 (P2009-525286)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月30日 (2008.7.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/002049
 (87) 国際公開番号 W02009/016839
 (87) 国際公開日 平成21年2月5日 (2009.2.5)
 審査請求日 平成23年8月1日 (2011.8.1)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-201147 (P2007-201147)
 (32) 優先日 平成19年8月1日 (2007.8.1)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 上田 宏
 東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法人
 東京大学内
 (72) 発明者 小嶋 美樹
 東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法人
 東京大学内

審査官 飯室 里美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原濃度測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の V_H 領域を含むポリペプチド；所定のタンパク質；リンカーペプチド：前記タンパク質と結合する活性を有し、前記タンパク質との結合の有無が検出可能であるパートナータンパク質；及び、前記抗体の V_L 領域を含むポリペプチド；をこの順又はこの順の逆の順で含んでなり、

所定のタンパク質とパートナータンパク質との組み合わせが、ラクタマーゼの N 末端側フラグメントを含むタンパク質とラクタマーゼの C 末端側フラグメントを含むタンパク質との組み合わせであり、

前記 V_H 領域を含むポリペプチド及び V_L 領域を含むポリペプチドの抗原に対する結合の有無により前記タンパク質と前記パートナータンパク質の結合の有無が生じ、及び、前記タンパク質と前記パートナータンパク質の結合の有無を、ラクタマーゼのラクタマーゼ活性の変化により検出可能であることを特徴とする

融合タンパク質。

【請求項2】

リンカーペプチドが、A s p - L y s - S e r からなるアミノ酸配列であることを特徴とする請求項1に記載の融合タンパク質。

【請求項3】

ラクタマーゼの N 末端側フラグメントを含むタンパク質が、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であり、ラクタマーゼの C 末端側フラグメントを含むタン

10

20

パク質が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

所定のタンパク質；リンカーペプチド；パートナータンパク質の配列が、配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の融合タンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の DNA を有する組換えベクター。

10

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換細胞。

【請求項 8】

サンプル中の抗原を検出する方法であって、 V_H 領域を含むポリペプチド及び V_L 領域を含むポリペプチドが前記抗原に結合し得る請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の融合タンパク質又は請求項 7 に記載の形質転換細胞をサンプルに接触させる工程、及び、前記融合タンパク質又は前記形質転換細胞が発現する融合タンパク質における所定のタンパク質とパートナータンパク質の結合を、ラクタマーゼのラクタマーゼ活性の変化により検出する工程を有することを特徴とする抗原の検出方法。

20

【請求項 9】

所定のタンパク質とパートナータンパク質が、互いに結合していない場合に比べて互いに結合すると所定のタンパク質及び/又はパートナータンパク質が発揮するラクタマーゼ活性が変化するタンパク質である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の融合タンパク質又は請求項 7 に記載の形質転換細胞；及び、前記ラクタマーゼ活性の変化を検出し得る発色基質又は発光基質；を備えたことを特徴とする抗原の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体酵素融合タンパク質、及び、該抗体酵素融合タンパク質を用いた抗原の検出方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

抗体を用いた免疫測定法として、酵素標識固相免疫測定法 (ELISA) 等が広く用いられている。しかし、抗原が低分子である場合は、第一に抗体の抗原結合部位 (パラトープ) と抗原との界面積が小さくなるため、第二に抗原が小さすぎて感度の良いサンドイッチ法が適用できず競合法によって測定せざるを得ないため、ELISA 法等は低分子抗原に対しては感度が低下するという問題があった。そのため、低分子抗原についても非競動的に高感度で測定し得る方法が開発されている。

【0003】

例えば、非特許文献 1 には、低分子である 4-hydroxy-3-nitrophenacyl (NP) を高感度で検出する方法であって、NP に結合する B1-8 抗体の V_H 領域ポリペプチド及び大腸菌ガラクトシダーゼのフラグメントからなる融合タンパク質 (V_H 領域ポリペプチドはフラグメントの N 末端側に結合) と、前記抗体の V_L 領域ポリペプチド及び大腸菌ガラクトシダーゼのフラグメントからなる融合タンパク質 (V_L 領域ポリペプチドはフラグメントの N 末端側に結合) とを用いた方法が開示されている。この方法は、一方の融合タンパク質における V_H 領域ポリペプチドと、他方の融合タンパク質における V_L 領域ポリペプチドが、NP 抗原を介して相互作用すると、両融合タンパク質におけるフラグメントとフラグメントが結合し、その結果生じるガラクトシダーゼ活性の上昇 (いわゆる活性相補) を検出することによって、NP 抗原の検出を行う。この方法により、低分子抗原についても、従来の ELISA 法に比べて高感度で測定することが可能となっ

40

50

た。また、この方法は、通常のELISA法とは異なり、結合しなかった標識2次抗体（非競合法）や標識抗原（競合法）などを洗浄する操作を要することなく測定し得る測定法（ホモジニアス法）であり、測定装置の自動化が容易で迅速な測定が可能という点で、通常のELISA法に比べてメリットがあった。しかし、この方法により高感度で測定するには、用いる両融合タンパク質の濃度設定をある程度正確に行う必要があるなど、検出の簡便性、効率性、安定性などに関して改善の余地があった。

【0004】

【非特許文献1】Anal. Chem., 74, 2500-2504 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0005】

本発明は、上記背景技術を改善したもので、検出対象である抗原が低分子抗原であっても、より簡便、効率的、安定性良くかつ高感度で検出し得る検出方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、 V_H 領域ポリペプチドと酵素タンパク質の一部を含む融合タンパク質と、 V_L 領域ポリペプチドと上記酵素タンパク質の残部を含む融合タンパク質をリンカーペプチドで結合することによって、非特許文献1の方法の不十分な点を顕著に改善し得ることを見いだした。すなわち、本発明者らは、イミダクロプリド（ICP）を認識する抗体の V_H 領域ポリペプチド、ラクタマーゼ（BLA）の一部のポリペプチド、リンカーペプチド、前記BLAの別の一部のポリペプチド、及び、前記抗体の V_L 領域ポリペプチドをこの順で含んでなる融合タンパク質を発現させた大腸菌と、非常に低濃度のICP抗原とを接触させたところ、該大腸菌内のBLA活性がICP抗原の濃度依存的に、かつ、リンカーペプチドを持たない分子に比べて著しく感度良く上昇することを見だし、本発明を完成するに至った。

20

【0007】

すなわち具体的には本発明は（1）抗体の V_H 領域を含むポリペプチド；所定のタンパク質；リンカーペプチド：前記タンパク質と結合する活性を有し、前記タンパク質との結合の有無が検出可能であるパートナータンパク質；及び、前記抗体の V_L 領域を含むポリペプチド；をこの順又はこの順の逆の順で含んでなり、所定のタンパク質とパートナータンパク質との組み合わせが、ラクタマーゼのN末端側フラグメントを含むタンパク質とラクタマーゼのC末端側フラグメントを含むタンパク質との組み合わせであり、前記 V_H 領域を含むポリペプチド及び V_L 領域を含むポリペプチドの抗原に対する結合の有無により前記タンパク質と前記パートナータンパク質の結合の有無が生じ、及び、前記タンパク質と前記パートナータンパク質の結合の有無を、ラクタマーゼのラクタマーゼ活性の変化により検出可能であることを特徴とする融合タンパク質や、（2）リンカーペプチドが、Asp-Lys-Serからなるアミノ酸配列であることを特徴とする前記（1）に記載の融合タンパク質や、（3）ラクタマーゼのN末端側フラグメントを含むタンパク質が、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であり、ラクタマーゼのC末端側フラグメントを含むタンパク質が、配列番号7に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする前記（1）又は（2）に記載の融合タンパク質や、（4）所定のタンパク質；リンカーペプチド：パートナータンパク質の配列が、配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする前記（1）～（3）のいずれかに記載の融合タンパク質や、（5）前記（1）～（4）のいずれかに記載の融合タンパク質をコードするDNAや、（6）前記（5）に記載のDNAを有する組換えベクターや、（7）前記（6）に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換細胞や、（8）サンプル中の抗原を検出する方法であって、 V_H 領域を含むポリペプチド及び V_L 領域を含むポリペプチドが前記抗原に結合し得る前記（1）～（4）のいずれかに記載の融合タンパク質又は前記（7）に記載の形質転換細胞をサンプルに接触させる工程、

30

40

50

及び、前記融合タンパク質又は前記形質転換細胞が発現する融合タンパク質における所定のタンパク質とパートナータンパク質の結合を、ラクタマーゼのラクタマーゼ活性の変化により検出する工程を有することを特徴とする抗原の検出方法や、(9)所定のタンパク質とパートナータンパク質が、互いに結合していない場合に比べて互いに結合すると所定のタンパク質及び/又はパートナータンパク質が発揮するラクタマーゼ活性が変化するタンパク質である前記(1)~(4)のいずれかに記載の融合タンパク質又は前記(7)に記載の形質転換細胞；及び、前記ラクタマーゼ活性の変化を検出し得る発色基質又は発光基質；を備えたことを特徴とする抗原の検出用キットに関する。なお、本明細書中の配列は、5'側から3'側にかけて記載している。

【図面の簡単な説明】

10

【0008】

【図1】 V_H 領域ポリペプチド及び V_L 領域ポリペプチドの抗原に対する結合の有無による本発明の融合タンパク質の構造変化の模式図を示す。

【図2】本発明の抗体-円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクターのコンストラクト、及び、該ベクターの調製に用いたコンストラクトを示す図である。

【図3】抗体-リンカー欠如円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクターのコンストラクトを示す図である。

【図4】抗体-リンカー欠如円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクターの調製に用いたコンストラクト、及び、該コンストラクトの調製方法の概要を示す図である。

【図5】円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクターのコンストラクトを示す図である。

20

【図6】ICPの存在下又は非存在下での大腸菌の生育を示す図である。

【図7】アンピシリン存在下若しくは非存在下、及び、ICPやTCPの存在下又は非存在下での V_H -cpBLA- V_L /pET26/BL21株の生育を示す図である。

【図8】アンピシリン存在下若しくは非存在下、及び、ICPやTCPの存在下又は非存在下での V_H -split-cpBLA- V_L /pET26/C43株の生育を示す図である。

【図9】抗原(TCP若しくはICP)存在下又は非存在下で培養した V_H -cpBLA- V_L /pET26/BL21株の菌体を用いたウェスタンブロットの結果を示す図である。

30

【図10】 V_H -cpBLA- V_L /pET26/BL21株から部分精製したタンパク質のSDS-PAGEの結果を示す図である。

【図11】精製抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L)のICP結合活性を示す図である。

【図12】Nitrocefinを基質とした、精製抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L)のICP/TCP添加による活性変化を示す図である。

【図13】Fluorocillinを基質とした、精製抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L)のICP/TCP添加による活性変化を示す図である。

【図14】Fluorocillinを基質とした、精製抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L (219))のBGP-C7ペプチド添加による活性変化を示す図である。

40

【図15】Fluorocillinを基質とした、精製抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L (219))の各種BGPペプチド/ICP/TCP添加による活性変化を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の融合タンパク質としては、抗体の V_H 領域を含むポリペプチド；所定のタンパク質；リンカーペプチド：前記タンパク質と結合する活性を有し、前記タンパク質との結合の有無が検出可能であるパートナータンパク質；及び、前記抗体の V_L 領域を含むポリペプチド；をこの順又はこの順の逆の順で含んでなり、かつ、前記 V_H 領域を含むポリペプチド及び V_L 領域を含むポリペプチドの抗原に対する結合の有無により前記タンパク質

50

と前記パートナータンパク質の結合の有無が生じる融合タンパク質であれば特に制限されない。なお、 V_H 領域を含むポリペプチド及び V_L 領域を含むポリペプチドの抗原に対する結合の有無による本発明の融合タンパク質の構造変化の模式図を図1に示す。

【0010】

本発明の融合タンパク質に用いる V_H 領域を含むポリペプチド（以下、「 V_H 領域ポリペプチド」ともいう。）や V_L 領域を含むポリペプチド（以下、「 V_L 領域ポリペプチド」ともいう。）としては、所定の抗原に特異的に結合する抗体の V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチドであり、かつ、本発明の融合タンパク質において用いた場合に、 V_H 領域ポリペプチド及び V_L 領域ポリペプチドの抗原に対する結合の有無により、所定のタンパク質とそのパートナータンパク質の結合の有無が生じるものであれば特に制限されず、例えば4-hydroxy-3-nitrophenyl (NP)に結合するB1-8抗体の V_H 領域ポリペプチド（アミノ酸配列：配列番号1；塩基配列：配列番号2）や V_L 領域ポリペプチド（アミノ酸配列：配列番号3；塩基配列：配列番号4）、リゾチームに結合するHyHEL-10の V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチド（Nat. Biotechnol., 14, 1714-1718 (1996); J. Immunol. Methods, 224, 171-184 (1999)）、イミダクロプリド（ICP）に結合する抗体（33C3-1-1：FERM P-17094で寄託されたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体：特開2000-191698号公報）の V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチド、オステオカルシンC末ペプチドに結合する抗体KTM219の V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチド（Anal. Chem. 79, 6197 (2007)）を好ましく例示することができる。

なお、本発明の融合タンパク質に用いる V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチドとしては、 V_H 領域からなるポリペプチドや V_L 領域からなるポリペプチドを好ましく例示ことができ、また、所定の抗原に特異的に結合する限り、 V_H 領域の一部に変異や挿入、欠失を導入したポリペプチドや V_L 領域の一部に変異や挿入、欠失を導入したポリペプチドも用いることができる。該変異、挿入、欠失としては特に制限されないが、好ましくは10アミノ酸以下、より好ましくは5アミノ酸以下、さらに好ましくは3アミノ酸以下、さらにより好ましくは1アミノ酸以下の変異、挿入又は欠失である。

【0011】

本発明の融合タンパク質に用いる V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチドの調製方法としては特に制限されず、配列公知の抗体から調製してもよいし、また、慣用のプロトコール（例えば特表2006-523088号公報参照）を用いて、目的抗原に対する抗体を作製し、さらに、その抗体の V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチドをコードするDNA配列をクローニングするなどして、本発明の融合タンパク質に用いるポリペプチドやそれをコードするDNA配列を入手し、該DNA配列を適当な細胞で発現させるなどして調製してもよい。このような方法に従えば、検出対象とする所望の抗原に特異的に結合し得る V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチドをコードするDNA配列を容易に入手することができる。例えば、前述の特表2006-523088号公報には、ヒトIL-8に特異的に結合する抗体や、その V_H 領域及び V_L 領域の配列が記載されている。なお、調製した V_H 領域ポリペプチドや V_L 領域ポリペプチドが本発明の融合タンパク質に好適に用い得るかどうかは、後述の実施例記載のアッセイを行うことなどにより、容易に確認することができる。

【0012】

本発明の融合タンパク質に用いる所定のタンパク質やそのパートナータンパク質（以下、併せて「両タンパク質」ともいう。）としては、パートナータンパク質が前記タンパク質と結合する活性を有し、前記タンパク質との結合の有無が検出可能であり、かつ、本発明の融合タンパク質における V_H 領域ポリペプチド及び V_L 領域ポリペプチドの抗原に対する結合の有無により前記タンパク質と前記パートナータンパク質の結合の有無が生じるものであれば特に制限されないが、両タンパク質が結合すると、両タンパク質が結合していない場合に比べて、所定のタンパク質及び/又はパートナータンパク質が発揮する所定の酵素活性が変化（上昇、低下、発現又は消滅）する組み合わせ（特に、その酵素活性の

10

20

30

40

50

変化を発色基質や蛍光基質で視覚的に検出できる組み合わせ)等の、両タンパク質の結合の有無を簡便に検出し得る組み合わせを好ましく例示することができ、中でも、酵素タンパク質の一部を含むタンパク質と、前記酵素タンパク質の残部を含むタンパク質であって、両タンパク質が結合するとその酵素の酵素活性が変化(特に上昇又は発現)する組み合わせをより好ましく例示することができ、特定の酵素のN末端側のフラグメントを含むタンパク質とC末端側のフラグメントを含むタンパク質であって、両タンパク質が結合するとその酵素の酵素活性が変化(特に上昇又は発現)する組み合わせをさらに好ましく例示することができ、大腸菌由来のガラクトシダーゼのフラグメントとそのフラグメントの組み合わせや、大腸菌由来のラクタマーゼ(BLA)の24位~170位のアミノ酸配列からなるタンパク質(アミノ酸配列:配列番号5;塩基配列:配列番号6)とその168位~286位のアミノ酸配列からなるタンパク質(アミノ酸配列:配列番号7;塩基配列:配列番号8)をよりさらに好ましく例示することができる。なお、上記本発明における所定のタンパク質とパートナータンパク質は便宜上名称を区別しているだけであり、例えば、上記BLAの24位~170位のアミノ酸配列からなるタンパク質を所定のタンパク質とし、そのBLAの168位~286位のアミノ酸配列からなるタンパク質をパートナータンパク質としてもよいし、上記BLAの168位~286位のアミノ酸配列からなるタンパク質を所定のタンパク質とし、そのBLAの24位~170位のアミノ酸配列からなるタンパク質をパートナータンパク質としてもよい。

10

【0013】

本発明における上記両タンパク質が、大腸菌由来のガラクトシダーゼのフラグメントとそのフラグメントの組み合わせの場合は、これらの両フラグメントが結合すると、いわゆる活性相補が生じ、ガラクトシダーゼ活性が上昇する。ガラクトシダーゼ活性の上昇は、例えばGalacton-Plus(登録商標)(Applied Biosystems社製)等の化学発光基質を添加することにより、高感度で検出することができる。また、大腸菌由来のラクタマーゼ(BLA)の24位~170位のアミノ酸配列からなるタンパク質とその168位~286位のアミノ酸配列からなるタンパク質の組み合わせの場合は、これらの両タンパク質が結合すると、ラクタマーゼ活性が上昇する。ラクタマーゼ活性の上昇は、例えばニトロセフィン等の発色基質を添加したり(Nature Biotechnol., 20, 619-622 (2002))、Fluorocillin Green495/525 beta lactamase substrate (Invitrogen社製)等の蛍光基質を添加することにより、高感度で検出することができる。

20

30

【0014】

この他、本発明の両タンパク質として用い得ると考えられる組み合わせとして、ルシフェラーゼのN末端側フラグメントとそのC末端側フラグメントであって、両フラグメントが結合するとルシフェラーゼ活性が回復するもの(Anal. Chem., 75, 1584-1589 (2003))や、Cre酵素の59位までのフラグメントと60位以降のフラグメントであって、両フラグメントが結合するとCre活性が回復するもの(Nucleic Acids Research, 31, e131 (2003))や、ジヒドロ葉酸レダクターゼのN末端側フラグメントとC末端側フラグメントであって、両フラグメントが結合するとジヒドロ葉酸レダクターゼ活性が回復するもの(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 12141-12146 (1998))や、GFPのN末端側フラグメントとC末端側フラグメントを入れ替えて、C末端側フラグメントのC末端とN末端側フラグメントのN末端をインサクション配列(リンカー配列)で連結したGFPの円順列変異体(circular permutant)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 11241-11246 (1999))等を例示することができる。

40

【0015】

本発明の融合タンパク質に用いる両タンパク質としては、上記以外にも、公知の任意の酵素タンパク質等を用いることができる。特定の酵素の2つのフラグメントであって、両フラグメントが結合していないときはその酵素活性を発現しないか又は酵素活性が弱く、両フラグメントが結合すると酵素活性が発現するか又は酵素活性が上昇する(活性相補する)フラグメントの組み合わせは、公知のprotein-fragment complementation assays(Nature Biotechnol., 20, 619-622 (2002))やUSP 7, 160, 691により容易に作製すること

50

ができ、また、活性相補する両フラグメントがリンカー配列で連結されたものである円順列変異体 (circular permutant) についても、上述の文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 11241-11246 (1999)) 等に基づいて容易に作製することができる。

なお、活性相補する両フラグメントは、一部に重複する配列を有していてもよい。

【0016】

本発明の融合タンパク質に用いるリンカーペプチドとしては、本発明に用いる所定のタンパク質とそのパートナータンパク質を該リンカーペプチドにて連結した場合に、前記タンパク質とそのパートナータンパク質の結合や、その結合の有無の検出を妨げない限り特に制限されないが、本発明の融合タンパク質を用いた目的抗原の検出をより高感度で行うためには、リンカーペプチドの長さを適宜調節することが好ましい。本発明に用いる所定のタンパク質とそのパートナータンパク質として、大腸菌由来のラクタマーゼ (BLA) の24位～170位のアミノ酸配列からなるタンパク質 (N末端側フラグメント) とその168位～286位のアミノ酸配列からなるタンパク質 (C末端側フラグメント) の組み合わせを用いる場合は、そのリンカーペプチドとして、Asp-Lys-Ser (DKS) からなるアミノ酸配列 (塩基配列: gacaagagc) を好適に例示することができる。リンカーペプチドの好ましいアミノ酸数は、リンカーペプチドのアミノ酸数を変化させた複数のサンプルについて、後述の実施例記載のアッセイを行うことなどにより、容易に調べることができる。

10

【0017】

本発明の融合タンパク質は、 V_H 領域ポリペプチド及び V_L 領域ポリペプチドの抗原に対する結合や、所定のタンパク質とそのパートナータンパク質の結合や、所定のタンパク質とそのパートナータンパク質の結合の検出を妨げない限り、抗体の V_H 領域ポリペプチド; 所定のタンパク質; リンカーペプチド: 前記タンパク質と結合する活性を有し、前記タンパク質との結合の有無が検出可能であるパートナータンパク質; 及び、前記抗体の V_L 領域ポリペプチド; 以外にも、His-Tag等の精製用Tag配列などのポリペプチドを含んでいることが、容易に精製し得る点で好ましい。

20

【0018】

本発明の融合タンパク質をコードするDNAとしては、本発明の上記融合タンパク質をコードするDNAである限り特に制限されず、前述の V_H 領域ポリペプチド、所定のタンパク質、リンカーペプチド、パートナータンパク質、 V_L 領域ポリペプチドのDNA配列を、慣用のプロトコールを用いて、この順で配置することにより構築することができる。本発明の融合タンパク質をコードするDNAとして、具体的には、 V_H -cpBLA- V_L /pET26ベクターのNcoI-NoI断片を好適に例示することができる。

30

【0019】

本発明の組換えベクターとしては、上記の本発明の融合タンパク質をコードするDNAを含み、かつ本発明の融合タンパク質を発現することができる組換えベクターであれば特に制限されないが、 V_H -cpBLA- V_L /pET26ベクターを好適に例示することができる。

本発明の組換えベクターは、本発明のDNAを発現ベクターに適切にインテグレートすることにより構築することができる。かかる発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能であるものや、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものが好ましく、また、本発明の遺伝子を発現できる位置にプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御配列を含有しているものを好適に使用することができる。

40

【0020】

上記発現ベクターのうち、細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrP2、pBTac1、pBTac2 (いずれもロシュダイアグノスティクス社製)、pKK233-2 (GEヘルスケア社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pQE-30 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. US

50

A, 82, 4306 (1985)]、p T P 5、p C 1 9 4、p U C 1 8 [Gene, 33, 103(1985)]、p U C 1 9 [Gene, 33, 103 (1985)]、p S T V 2 8 (タカラバイオ社製)、p S T V 2 9 (タカラバイオ社製)、等を例示することができる。細菌用のプロモーターとしては、例えば、t r p プロモーター (P t r p)、l a c プロモーター (P l a c)、P L プロモーター、P R プロモーター、P S E プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、S P 0 1 プロモーター、S P 0 2 プロモーター、p e n P プロモーター等を挙げることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の形質転換細胞としては、上記本発明の組換えベクターが導入され、かつ上記本発明の融合タンパク質を発現する形質転換細胞であれば特に制限されないが、本発明の V_H -c p B L A - V_L / p E T 2 6 組換えベクターを大腸菌 B L 2 1 (D E 3 , p L y s S) 株に導入して得られる V_H -c p B L A - V_L / p E T 2 6 / B L 2 1 株を好適に例示することができる。上記形質転換細胞を作製する際の、宿主細胞への上記本発明の組換えベクターの導入方法としては、D a v i s ら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及び S a m b r o o k ら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション (transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞等を例示することができるが、X L 1 0 - G o l d 株や B L 2 1 株等の大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌を好適に例示することができ、大腸菌を特に好ましく例示することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の抗原の検出方法としては、サンプル中の抗原を検出する方法であって、 V_H 領域ポリペプチド及び V_L 領域ポリペプチドが前記抗原に結合し得る本発明の融合タンパク質又は本発明の形質転換細胞をサンプルに接触させる工程、及び、前記融合タンパク質又は前記形質転換細胞が発現する融合タンパク質における所定のタンパク質とパートナータンパク質の結合を検出する工程を有する方法であれば特に制限されず、また、抗原としては特に制限されないが、抗原が分子量 1 0 0 0 以下の低分子化合物等である場合に、特に本発明の抗原の検出方法のメリットを享受し得る。上記低分子化合物としては、イミダクロプリド等のネオニコチノイド系農薬、ポリ塩化ビフェニル、ビスフェノール A 等の環境汚染物質、マイコトキシン等の毒性物質、オステオカルシンペプチド等の生体物質等を好適に例示することができる。本発明の抗原の検出方法は、これらの物質を抗原として検出し得るため、疾患の臨床診断、食品の毒性検査、環境分析等に有利に応用することができる。

なお、本発明の抗原の検出方法では、通常の E L I S A 法とは異なり、本発明の融合タンパク質等とサンプルを接触した後の洗浄工程が不要であるため、抗原の検出を非常に簡便、迅速に行うことができる。

【 0 0 2 3 】

上記の本発明の融合タンパク質又は形質転換細胞のサンプルへの接触は、例えば本発明の融合タンパク質又は形質転換細胞とサンプルとを適当な溶媒に懸濁又は溶解するなどして行うことができる。ただし、本発明の形質転換細胞をそのまま用いる場合は、形質転換細胞が発現する本発明の融合タンパク質と対象抗原とが接触し得る必要があるため、対象抗原が形質転換細胞内に取り込まれるか、又は、形質転換細胞が発現する本発明の融合タンパク質が細胞外へ分泌されることを確認して用いることが好ましい。一方、本発明の形質転換細胞を破碎して用いる場合は、この点を確認する必要は特にない。

なお、本発明の抗原の検出方法においては、用いる本発明の融合タンパク質の濃度や形質転換細胞の濃度を適宜調節することが、より高い検出感度を得る観点から好ましい。より高い検出感度が得られる上記濃度は、融合タンパク質や形質転換細胞の種類などにより

10

20

30

40

50

異なるため一概にいうことはできないが、上記濃度を段階的に変えて実験を行うことにより容易に設定することができる。ただし、本発明の融合タンパク質はリンカーペプチドを有しているため、本発明の抗原の検出方法は、非特許文献1の方法に比べて、より高い検出感度をより安定的に得ることができる。

【0024】

また、上記所定のタンパク質とパートナータンパク質の結合の検出は、例えば前記タンパク質及び/又はパートナータンパク質が発揮する所定の酵素活性の変化(上昇、低下、発現又は消滅)、より好ましくは所定の酵素活性の上昇又は発現を検出することにより、簡便かつ高感度に行うことができる。上記所定の酵素活性の変化の検出は、例えば、反応系にその酵素の基質を含有させて、一定期間経過後の基質量の変化を検出することにより行うことができるが、より簡便かつ高感度に検出し得る観点から、酵素活性の変化を視覚的に検出し得る発色基質や蛍光基質などを用いることが好ましい。具体的には、所定のタンパク質とパートナータンパク質が、ガラクトシダーゼのフラグメントとそのフラグメントの組み合わせである場合は、Galacton-Plus(登録商標)(Applied Biosystems社製)等の化学発光基質を用いることにより、ガラクトシダーゼ活性の発現や上昇を発光や発光量の増加として検出することができ、ラクタマーゼ(BLA)の24位~170位のアミノ酸配列からなるタンパク質(N末端側フラグメント)とその168位~286位のアミノ酸配列からなるタンパク質(C末端側フラグメント)の組み合わせの場合は、ニトロセフィン等の発色基質や、CCF2/AM, Fluorocillin Green 495/525 beta lactamase substrate(Invitrogen社製)等の蛍光基質を用いることにより、ラクタマーゼ活性の発現や上昇を、発色又は発光や、発色量又は発光量の増加として検出することができる。発色や発光の有無、発色量や発光量は、レーザー顕微鏡等を用いることにより、高感度で検出することができる。

【0025】

また、本発明の抗原の検出方法において、本発明の形質転換細胞を用いる場合は、上記所定のタンパク質とパートナータンパク質の結合の検出を、該形質転換細胞の増殖速度の変化を調べることによってより安価に好適に行うこともできる。例えば、所定のタンパク質とパートナータンパク質が、ラクタマーゼ(BLA)の24位~170位のアミノ酸配列からなるタンパク質(N末端側フラグメント)とその168位~286位のアミノ酸配列からなるタンパク質(C末端側フラグメント)の組み合わせの場合、ラクタマーゼが、その形質転換細胞の宿主細胞の増殖を妨げるアンピシリンを分解する活性を有していることを利用して、上記所定のタンパク質とパートナータンパク質の結合を、形質転換細胞の増殖速度の上昇により検出することができる。形質転換細胞の増殖を利用した増殖アッセイの具体的な方法として、後述の実施例4に記載されている方法を好適に例示することができる。

【0026】

本発明の検出用キットとしては、所定のタンパク質とパートナータンパク質が、互いに結合していない場合に比べて互いに結合すると所定のタンパク質及び/又はパートナータンパク質が発揮する所定の酵素活性が変化するタンパク質である本発明の融合タンパク質又は本発明の形質転換細胞、並びに、前記酵素活性の変化を検出し得る発色基質又は発光基質を備えている限り特に制限されないが、サンプルが固体である場合にそれを懸濁するために用いる適当な溶媒をさらに備えていてもよい。

【0027】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、後述の実施例の概要を述べると、実施例1から2にかけて、本発明の融合タンパク質を発現するベクターを作製し、実施例6において、その本発明の融合タンパク質を発現する形質転換体の増殖アッセイを行い、その比較実験として、実施例3において、上記の本発明の融合タンパク質の分割変異体(上記の本発明の融合タンパク質において、リンカーを欠いたもの)を発現するベクターを作製し、実施例7において、その分割変異体を発現する形質転換体の増殖アッセイを行い、別の比較実験

10

20

30

40

50

の準備として、実施例 4 において、上記の本発明の融合タンパク質の抗体分子欠失変異体（上記の本発明の融合タンパク質において、その抗体分子を欠失したものを）を発現するベクターを作製した。また、実施例 5、8、9 は、上記の増殖アッセイの結果が、cpBLA の活性相補を反映したものであることを確認等する目的で行った。さらに、実施例 10、11 において、上記の本発明の融合タンパク質が、その分割変異体や、その抗体分子欠失変異体と比較して、抗原存在下での BLA 活性の上昇が著しいことを確認した。加えて、実施例 12 においては、上記の本発明の融合タンパク質における抗体分子を別の抗体分子に置き換え、その融合タンパク質が、その抗体分子に結合する抗原存在下において、その抗原依存的に BLA 活性が上昇することを確認することによって、本発明の融合タンパク質の汎用性を確認した。

10

【実施例 1】

【0028】

[円順列変異体 ラクタマーゼ (cpBLA) 遺伝子の調製]

野生型 ラクタマーゼ (野生型 BLA) の DNA 配列を鋳型とした PCR 法により、野生型 BLA タンパク質の 24 - 170 位のアミノ酸配列 (配列番号 5) をコードする DNA 断片 (配列番号 6) と、168 - 286 位のアミノ酸配列 (配列番号 7) をコードする DNA 断片 (配列番号 8) を調製した。より詳細には以下のような方法で調製を行った。

【0029】

まず、上記 PCR 法のプライマーとして、以下の 4 種類のプライマーを用意した。

BLA24rev (配列番号 9 : CATTGGGACAAGAGCCACCCAGAAACGCTGGTGA) 20

BLA170for (配列番号 10 : GGCGATATCGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC)

BLA168rev (配列番号 11 : GGCGATATCAATGAAGCCATACCAAAC)

BLA286for (配列番号 12 : TGGGTGGCTCTTGTCCTAATCAGTGA)

BLA24rev 及び BLA286for の 5' 末端にはリンカー配列 (配列番号 9 及び 12 の 7 ~ 15 番目の塩基配列) を配置し、BLA170for 及び BLA168rev の 5' 末端には作製した DNA 断片を挿入するための制限酵素切断部位として EcoRV の認識配列 (配列番号 10 及び 11 の 4 ~ 9 番目の塩基配列) を配置した。

なお、これらの 4 種類のプライマーは、Guntasらの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 11224-11229 (2005)) にならい、BLA の活性部位近傍の 168 位と 170 位を新規末端とする遺伝子断片を最終的に得るべく設計を行った。上記 24 - 170 位のアミノ酸配列をコードする DNA 断片の増幅には、BLA24rev 及び BLA170for を用い、上記 168 - 286 位のアミノ酸配列をコードする DNA 断片の増幅には、BLA168rev 及び BLA286for を用いた。

30

【0030】

また、上記 PCR 法の鋳型として、野生型 BLA 遺伝子をコードするベクター-pET20b (+) (メルク社製) を用い、酵素として Ex-Taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いた。具体的には、50 pmol ずつの 2 種類のプライマー、10 ng pET20b (+)、0.2 mM (反応溶液の最終濃度) dNTPs、10 µl Ex-Taq Buffer、5 unit Ex-Taq 1 µl を混合して 100 µl の反応溶液とし、94 °C、5 分間の後に、94 °C で 30 秒間、56 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間からなるサイクルを 25 サイクル繰り返した後、72 °C で 10 分間反応させた。この PCR により、野生型 BLA タンパク質の 24 - 170 位のアミノ酸配列をコードする DNA 断片と、168 - 286 位のアミノ酸配列をコードする DNA 断片を調製した。次いで、これらの 2 種類の DNA 断片を TAE 緩衝液を含む 1% アガロースゲルで電気泳動した後、目的のバンドを含むゲルを切り出し、Wizard (登録商標) SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ社製) を用いて精製した。

40

【0031】

得られた 2 種類の DNA 断片を用いた overlap extension PCR によって、本来の N 末端 (24 位のアミノ酸) と C 末端 (286 位のアミノ酸) を、DKS リンカー配列 (アミノ酸配列: Asp - Lys - Ser; 塩基配列: gacaagagc) を介して結合し、16

50

8位と170位がそれぞれ新たなN末端及びC末端であるPCR断片(円順列変異体遺伝子)を調製した(図2の左上のコンストラクト; cpBLA)。より詳細には、以下のような方法で調製を行った。

約100ngずつの2種類のPCR産物(野生型BLAタンパク質の24-170位のアミノ酸配列をコードするDNA断片と、168-286位のアミノ酸配列をコードするDNA断片)、0.2mM(反応溶液の最終濃度)dNTPs、10μl Ex-Taq Buffer、5unit Ex-Taqを混合して100μlの反応溶液とし、94、5分間の後に94で30秒間、58で30秒間、72で1分間からなるサイクルを10サイクル繰り返した後、72で10分間反応させた。このようにして作製した目的のBLA円順列変異体遺伝子をcpBLA(アミノ酸配列:配列番号13;塩基配列:配列番号14)と命名した。

10

【0032】

この後、cpBLAのDNAのみを増幅するため、さきほど得られた反応溶液に2種類のプライマー(BLA168rev及びBLA170for)を50pmolずつ、2.5unit Ex-Taqを加え、94で5分間の後に、94で30秒間、56で30秒間、72で1分間からなるサイクルを25サイクル繰り返した後、72で10分間反応させた。得られた反応溶液をアガロースゲルにて電気泳動し、目的サイズのDNA断片が増幅されていることを確認した。さらに、その目的サイズのバンド部分のゲルを切り出し精製した。

【0033】

20

精製して得られたDNA断片をpCR4-TOPO(Invitrogen社製)に組み込み、その塩基配列を確認した。より詳細な手順については以下に述べる。

pCR4-TOPO Vectorを使ったキットであって、Taqポリメラーゼで増幅した3'-dA突出末端を持つPCR産物をクローニング、シーケンスするのに適したTOPO TA Cloning Kit for Sequencing(Invitrogen社製)を使用した。1μlのpCR4-TOPO Vectorに対し、等モル量の上記精製DNA断片を加え、さらにSalt Solutionを1μl加えて室温で30分間放置した。このligation mixtureを氷上で溶かした大腸菌XL10-Gold株(Tet^r, (mcrA)183, (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA, lac, The, [F['], proAB, lacIqZ M15, Tn10(Tet^r), Tn5(Kan^r), Amy)に加え氷上で30分間放置した後、42で45秒ヒートショックを与え、200μlのSOC培地(1Lあたり20g bacto tryptone、5g bacto yeast extract、0.5g NaCl、0.2ml 5N NaOH、20ml 1M グルコース、10ml 1M MgCl₂、10ml 1M MgSO₄)を加え37で30分間キュアリングして形質転換し、予め10μlの0.4M IPTGと200μlの10mg/ml X-galを撒いておいた100μg/mlアンピシリン、1%グルコースを含むLB寒天培地プレート(1Lあたり10g bacto tryptone、5g bactoyeastextract、5g NaCl、0.2ml 5N NaOH、15g agar)にて37で一晩培養した。翌日、白いコロニー、青いコロニー各数個のうち白いコロニーを竹串でつつき、Taqポリメラーゼ(タカラバイオ)とT3、T7の2本のプライマーを用いてコロニーPCRを行なった。そのPCR産物をアガロースゲルにて泳動し、目的の大きさのバンドが確認できたコロニーのみを100μg/mlアンピシリンを含む滅菌LB液体培地(1Lあたり10g bacto tryptone、5g bactoyeastextract、5g NaCl、0.2ml 5N NaOH)に植菌して、37で一晩培養した。培養して得られた菌体から、Wizard(登録商標) plus SV Minipreps(プロメガ社製)を用いてプラスミドを抽出し、ABI3100DNAシーケンサーを用いて、BLA円順列変異体遺伝子(cpBLA)の配列を確認した。このcpBLAを有する上記プラスミドを、cpBLA/TOPOと命名した。

30

40

【実施例2】

【0034】

[抗体-円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクターの作製]

50

ネオニコチノイド系農薬イミダクロプリド (ICP) を認識する抗体 (33C3-1-1:FERMP-17094で寄託されたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体:特開2000-191698号公報) の可変領域をファージミドベクター-pIT2 (Nature Biotechnol., 18, 989-994 (2000)) に組み込み, これを用いて常法に従い一本鎖抗体 (scFv) 提示ファージを調製しその抗原結合能を確認した (scFv (ICP) / pIT2)。この scFv (ICP) / pIT2 から, 該抗体遺伝子をタンパク質大量発現用プラスミドベクターに移し替え, scFv (ICP) / pET26 を作製した。より詳細には以下のような方法で調製を行った。

【0035】

scFv (ICP) / pIT2 中の抗体遺伝子を, 目的タンパクをペリプラズムに分泌させ発現させることができ, かつカナマイシン耐性を示すプラスミド pET26b (+) (メルク社製) に組み込んだ。scFv (ICP) / pIT2 と, pET26b (+) 1 μ g に対し, 10 unit NcoI (New England Biolabs社製), 10 unit NotI (New England Biolabs社製), 5 μ l 10xNEB Buffer 3 (New England Biolabs社製), 5 μ l の 0.1% BSA (New England Biolabs社製) に滅菌水を加えて 50 μ l にし, 37 $^{\circ}$ C で 16 時間制限酵素処理した。この制限酵素処理物をアガロースゲル電気泳動を行い切り出し精製した scFv (ICP) 遺伝子断片 3 μ l と, 同様の制限酵素処理後に切り出し精製したベクター 2 μ l と, Ligation high (東洋紡社製) 5 μ l を加え, 16 $^{\circ}$ C で 30 分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応により得られた反応液のうち 5 μ l を用いて, 100 μ l の大腸菌 TOP10 株 (F-mcrA, (mrr-hsdRMS-mcrBC), 80lacZ M15, lacX74, deoR, recA1, araD139, (ara, leu)7697galU, galK, rpsL(Str^R)endA1, nupG) を形質転換し, 50 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地プレートにて 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日, コロニー数個を竹串でつつき, Taqポリメラーゼ (タカラバイオ社製) と T7 promoter と T7 terminator の 2 本のプライマーを用いてコロニー PCR を行った。その PCR 産物をアガロースゲルにて泳動し, 目的の大きさのバンドが確認できたコロニーのみを 50 μ g/ml カナマイシンを含む LB 液体培地 4 ml に植菌し, 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。培養して得られた菌体から scFv (ICP) / pET26 を抽出した。

【0036】

cpBLA をコードする DNA 断片を組み込むための制限酵素サイトとして, DraI サイトを scFv (ICP) / pET26 中のリンカー領域にクイックチェンジ (ストラタジーン社製:登録商標) を用いた PCR により導入した (図2の右上のコンストラクト)。この DraI サイトで切断することにより scFv (ICP) / pET26 は平滑末端を持つニアDNAとなり, EcoRV 処理により同じく平滑末端を生じる cpBLA 断片を組み込むことができる。DraI サイトを導入する PCR は以下のように行った。

15 pmol ずつの後述の 2 種類のプライマー, 1 ng scFv (ICP) / pET26, 0.2 mM (反応溶液の最終濃度) dNTPs, 2.5 unit PfuUltraHigh-Fidelity DNA Polymerase (ストラタジーン社製), 5 μ l 10xPfuUltra reaction Buffer (ストラタジーン社製) を混合して 50 μ l の反応溶液とし, 95 $^{\circ}$ C, 1 分間の後に, 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 55 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 68 $^{\circ}$ C で 15 分間からなるサイクルを 18 サイクル繰り返した。用いたプライマーの配列は以下のとおりである。Dra1rev (配列番号 15:GGTGGAGCGGTTTCAGGCTTTAAAGGCAGTGCCGGTGGCGGG) Dra1for (配列番号 16:CCCGCCACCGCCACTGCCTTTAAAGCCTGAACCGCCTCCACC) (配列番号 15 及び 16 の 19 ~ 24 番目の塩基配列はそれぞれ DraI 切断部位である)

【0037】

上記 PCR により得られた反応液に 1 μ l DpnI を加え, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理してメチル化された鋳型 DNA を分解し, 5 μ l を用いて, 100 μ l の大腸菌 TOP10 株を形質転換した。これを 50 μ g/ml カナマイシンを含む LB 寒天培地にて 37 $^{\circ}$ C で一晩培養し, 翌日生成したコロニー数個を竹串でつついて 50 μ g/ml カナマイシンを含

10

20

30

40

50

むLB寒天培地4mlに植菌し、37℃で一晩培養した。培養して得られた菌体からプラスミドを抽出した後、ABI3100DNAシーケンサーを用いて配列を決定し、所定の位置DraIサイトが導入されていることを確認した。

【0038】

次いで、DraIサイトが導入されたscFv(ICP)/pET26をDraIにて開裂したscFv(ICP)/pET26に、EcoRV処理したcpBLA断片を組み込み、抗体-円順列変異体酵素発現ベクターV_H-cpBLA-V_L/pET26(図2の中央下のコンストラクト)を作製した。より詳細な手順については以下に述べる。

1μg scFv(ICP)/pET26に20unit DraI(New England Biolabs, NEB社製)、10unit Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal(NEB社製)、10×NEB Buffer 4(NEB社製)に滅菌水を加えて50μlにし、37℃で16時間制限酵素処理した。ベクターのセルフライゲーションを防ぐため、制限酵素処理と同時にアルカリフォスファターゼにて末端の脱リン酸化も行った。また、cpBLA断片が組み込まれたpCR4-TOPOベクター1μg、20unit EcoRV(NEB社製)、10×NEB Buffer 3、5μlの0.1% BSAに滅菌水を加えて50μlにし、37℃で16時間制限酵素処理した。この制限酵素処理物をアガロースゲル電気泳動を行い切り出し精製したscFv(ICP)/pET26ベクター3μlと、同様の制限酵素処理後に切り出し精製したcpBLA断片3μlと、Ligation high 6μlを加え、16℃で30分ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応により得られた反応液のうち5μlを用いて100μlの大腸菌TOP10株を形質転換し、50μg/mlカナマイシンを含むLB寒天培地プレートにて37℃で一晩培養した。翌日、コロニー数個を竹串でつつき、TaqポリメラーゼとT7プロモーターとBLA170forの2本のプライマーを用いてコロニーPCRを行った。そのPCR産物をアガロースゲルにて泳動し、目的の大きさのバンドが確認できたコロニーのみを50μg/mlカナマイシンを含むLB液体培地4mlに植菌し、37℃で一晩培養した。培養して得られた菌体からV_H-cpBLA-V_L/pET26(抗体-円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクター)を抽出した。

【実施例3】

【0039】

[抗体-分割・円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクターの作製]

本発明の融合タンパク質におけるリンカーペプチドの意義を調べるため、V_H-cpBLA-V_L中のリンカーペプチドをコードする配列に代えて、stopコドン及びRBSをコードする配列を有する、V_H-split・cpBLA-V_L/pET26(抗体-分割・円順列変異体BLA混成タンパク質発現ベクター)を作製した。該ベクターのコンストラクトを図3に示す。このV_H-split・cpBLA-V_L/pET26は、図3に示すように、V_H-BLAc(V_H領域ポリペプチドと、野生型BLAタンパク質の168-286位のアミノ酸配列との融合タンパク質)と、BLAn-V_L(V_L領域ポリペプチドと、野生型BLAタンパク質の24-170位のアミノ酸配列との融合タンパク質)を発現するベクターである。V_H-split・cpBLA-V_L/pET26の作製は、図4に示すような概要にしたがって、以下のような方法で行なった。

【0040】

まず、図4に示すようなコンストラクトのpBR322を用意した。このpBR322に対して、BLAsigBack(配列番号17:TCACCATCACTAAGAAGGAGATATCATATGAGTATCAACATTTC)(5'末端から1~18番目のヌクレオチドがBLAHisForとのオーバーラップ領域)及びBLAdraFor(配列番号18:CGGCGACCGAGTTGCTCTTG)の2種類のプライマーを用いてPCRを行い、pBR322のアンピシリン耐性遺伝子から、シグナル配列を経て、BLA前半部に存在するDraIサイトまでを増幅してその断片(BLA-DraI断片)を得た。また、pBR322に対して、BLAbsaBack(配列番号19:ATGGAGCGGATAAAGTTGC)及びBLAHisFor(配列番号20:CCTTCTTAGTGATGGTGATGATGATGCCAATGCTTAATCAGTGAGGC)(5'末端から1~18番目のヌクレ

10

20

30

40

50

オチドがBLAsigBackとのオーバーラップ領域)の2種類のプライマーを用いてPCRを行い、pBR322のBLA後半部に存在するBsaIサイトからBLAタンパク質の296位までを増幅してその断片(BLA-BsaI断片)を得た。なお、BLAHisForの5'末端にはHis tagをコードする配列の相補鎖が含まれており、これによってV_H-BLAcのC末端に、精製のためのHis tagが付加される。BLA-DraI断片やBLA-BsaI断片を増幅するPCRは以下のように行った。

【0041】

50 pmol ずつの2種類のプライマー(BLA-DraI断片増幅用として、BLAsigBack及びBLAdraFor; BLA-BsaI断片増幅用としてBLAbsaBack及びBLAHisFor)、10 ng pBR322、0.2 mM (反応溶液の最終濃度)のdNTPs、10 μl 10' Ex-Taq buffer、5 unit Ex-Taqを混合して100 μlの反応溶液とし、95、5分間の後に、95で30秒間、50で30秒間、72で30秒間からなるサイクルを25サイクル繰り返した後、72で5分間反応させた。これらのPCRにより得られたBLA-DraI断片やBLA-BsaI断片を、TAE緩衝液を含む1.5%アガロースゲルでそれぞれ電気泳動した後、目的のバンドを含むゲルを切り出し精製した。

【0042】

次に、精製したBLA-DraI断片及びBLA-BsaI断片について、オーバーラップ・エクステンションPCRを行なうことによって、BLA-DraI断片とBLA-BsaI断片とを結合させた(図4の中央のコンストラクト参照)。オーバーラップ・エクステンションPCRは具体的に以下のような方法で行なった。

精製したBLA-DraI断片(約100 ng)及びBLA-BsaI断片(約100 ng)、0.2 mM (反応溶液の最終濃度)のdNTPs、10 ml 10' Ex-Taq buffer、5 unit Ex-Taqを混合して100 mlの反応溶液とし、95、5分の後に95で30秒間、55で30秒間、72で45秒間からなるサイクルを15サイクル繰り返した後、72で5分間反応させて反応液を得た。次いで、目的DNA断片をさらに増やすため、得られた反応溶液に、BLAbsaBackプライマー(50 pmol)、BLAdraForプライマー(50 pmol)、2.5 unit Ex-Taqを添加し、95で5分間の後に、95で30秒間、55で30秒間、72で45秒間からなるサイクルを25サイクル繰り返した後、72で5分間反応させて反応液を得た。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、目的サイズのDNA断片が増幅されていることを確認した。次いで、目的サイズ近辺のゲルを切り出し、目的サイズのDNA断片を精製した。

【0043】

精製して得られたDNA断片をpCR4-TOPO (Invitrogen社製)に組み込み、その塩基配列を確認した。より詳細な手順については以下に述べる。

pCR4-TOPO Vectorを使ったキットであって、Taqポリメラーゼで増幅した3'-dA突出末端を持つPCR産物をクローニング、シーケンスするのに適したTOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen社製)を使用した。1 μlのpCR4-TOPO Vectorに対し、等モル量の上記精製DNA断片を加え、さらにSalt Solutionを1 μl加えて室温で30分間放置した。このligation mixtureを氷上で溶かした大腸菌XL10-Gold株(Tet^r, (mcrA)183, (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA, lac, The, [F['], proAB, lacIqZ M15, Tn10(Tet^r), Tn5(Kan^r), Amy)に加え氷上で30分間放置した後、42で45秒ヒートショックを与え、200 μlのSOC培地(1 Lあたり20 g bacto tryptone、5 g bacto yeast extract、0.5 g NaCl、0.2 ml 5 N NaOH、20 ml 1 M グルコース、10 ml 1 M MgCl₂、10 ml 1 M MgSO₄)を加え37で30分間キュアリングして形質転換し、予め10 μlの0.4 M IPTGと200 μlの10 mg/ml X-galを撒いておいた100 μg/mlアンピシリン、1%グルコースを含むLB寒天培地プレート(1 Lあたり1

10

20

30

40

50

0 g bacto tryptone、5 g bacto yeast extract、5 g NaCl、0.2 ml 5 N NaOH、15 g agar)にて37 で一晩培養した。翌日、白いコロニー、青いコロニー各数個のうち白いコロニーを竹串でつつき、Taqポリメラーゼ(タカラバイオ)とT3、T7の2本のプライマーを用いてコロニーPCRを行なった。そのPCR産物をアガロースゲルにて泳動し、目的の大きさのバンドが確認できたコロニーのみを100 µg/mlアンピシリンを含む滅菌LB液体培地(1Lあたり10 g bacto tryptone、5 g bacto yeast extract、5 g NaCl、0.2 ml 5 N NaOH)に植菌して、37 で一晩培養した。培養して得られた菌体からプラスミドを抽出し、ABI3100 DNAシーケンサーを用いて、前述の精製DNA断片の配列を決定し、その配列が、分割・円順列変異体BLA(split·cpBLA)(図4の中央のコンストラクト参照)であることを確認した。このsplit·cpBLAを有する上記プラスミドを、split·cpBLA/TOPOと命名した。

10

【0044】

1 µgのsplit·cpBLA/TOPOに対し、10 unitのDraI、5 µlのNEBuffer 2を添加し、さらにmilliQ水を添加して50 µlに調整し、この溶液を37 で6時間処理後、5 unitのBsaIを添加し、これを50 で一晩静置して制限酵素処理を行った。1 µgのsplit·cpBLA/TOPOに代えて、1 µgのV_H-cpBLA-V_L/pET26を用いて、同様に、DraI及びBsaIで制限酵素処理を行なった。制限酵素処理して得られたそれぞれの溶液をアガロースゲルにて泳動して精製したDNA溶液各5 µlにLigation high ver. 2(東洋紡社製)をそれぞれ10 µl添加し、16 で30分間ライゲーション反応を行った。このライゲーション反応により得られた反応液のうち5 µlを用いて、100 µlの大腸菌TOP10株を形質転換し、50 µg/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地プレートにて37 で一晩培養した。翌日、シングルコロニーを4 mlのLBKにてさらに一晩培養後、得られた菌体からプラスミドを抽出し、そのプラスミドのDNA配列を確認した。DNA配列を確認した複数のプラスミドの中から、V_H-cpBLA-V_L/pET26におけるBsaIサイト・DraIサイト間の配列が、split·cpBLAにおけるBsaIサイト・DraIサイト間の配列に置換されたプラスミド(図4)を見いだし、このプラスミドをV_H-split·cpBLA-V_L/pET26と命名した(図3)。

20

30

【実施例4】

【0045】

[円順列変異体BLAタンパク質発現ベクターの作製]

本発明の融合タンパク質の1つであるV_H-cpBLA-V_L/pET26のコントロールとして、抗体遺伝子を持たない、cpBLAのみの発現ベクター(円順列変異体BLAタンパク質発現ベクター:cpBLA/pET26)(図5)を作製した。より詳細には以下のような方法で作製を行った。

【0046】

実施例1で作製したcpBLA/TOPOを鋳型とするPCRによって、末端にNcoIサイトとXhoIサイトが付加されたcpBLA遺伝子を増幅し、pET26b(+)に組み込んだ。このPCRは以下のように行なった。

40

50 pmolのBLA168Ncorev(配列番号21:CATGCCATGGCAATGAAGCCATACCAAC)(5'末端から5~10番目のヌクレオチドがNcoIサイト)、50 pmolのBLA170Xhofor(配列番号22:CCGCTCGAGGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC)(5'末端から4~9番目のヌクレオチドがXhoIサイト)、10 ngのV_H-cpBLA-V_L/TOPO(V_H-cpBLA-V_LをPCR4-TOPOに組み込んだプラスミド)、0.2 mM(反応溶液の最終濃度)のdNTPs、10 µlの10'Ex-Taq buffer、5 unitのEx-taqを混合して100 mlの反応溶液とし、94 で5分間の後に、94 で30秒間、65 で30秒間、72 で1分間からなるサイクルを25サイクル繰り返した後、72 で10分間反応させて反応液を得た。得られた反応

50

液をアガロースゲル電気泳動して精製を行った後、NcoI及びXhoIにて制限酵素処理した。この制限酵素処理した溶液をアガロースゲル電気泳動し、精製を行った。精製したDNA断片を、同じくNcoI及びXhoI処理並びに精製を行ったpET26b(+)に組み込んで、cpBLA/pET26とした(図5)。

【実施例5】

【0047】

[ICPの大腸菌に対する毒性の確認]

まず、後述の実施例6の増殖アッセイの前提として、ICPが大腸菌に対して毒性あるいは増殖促進活性がないことを調べるため、高濃度のICPを含む培地中での野生型BL21(DE3,pLysS)株の増殖を以下の方法により調べた。

BL21(DE3,pLysS)株を、 $37\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地プレートにおいて30にて一晚培養して生成したコロニーを竹串でつつき、 $37\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLB液体培地4mlに植菌し、27で一晚培養した。この前培養液40 μl を、 $37\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコール、 $100\text{ng}/\text{ml}$ のICPを含むLB液体培地4mlに植菌し、27で一晚培養しながら、Mini photo518R(タイテック社製)にて660nmにおける濁度の経時変化を測定した。また、ICPを含まないこと以外は同じLB液体培地を用いて、同様に濁度の経時変化を測定した。その結果を図6に示す。図6から分かるように、大腸菌BL21(DE3,pLysS)株は、ICPの有無に関わらずほぼ同様の増殖曲線を示した。したがって、ICPの大腸菌に対する毒性および増殖促進活性はないと考えられる。

【実施例6】

【0048】

[V_H-cpBLA-V_L発現株を用いた増殖アッセイ]

V_H-cpBLA-V_L(抗体酵素混成タンパク質)の発現株が、目的抗原の有無の検出に用い得るかどうかを調べるために、この抗体酵素混成タンパク質の目的抗原であるICP、およびICPの類似体でICPより交差反応性が低いことが確認されているチアクロプリド(TCP)を用いて、目的抗原が抗体酵素混成タンパク質に結合した場合に発揮されるBLA活性の基質となり得るアンピシリンを用いた増殖アッセイを行った。より詳細には以下のような方法で行った。

【0049】

まず、V_H-cpBLA-V_L(抗体酵素混成タンパク質)の発現株の作製を行った。 $0.5\mu\text{g}$ V_H-cpBLA-V_L/pET26を用いて100 μl のBL21(DE3,pLysS)株(F⁻, ompT, hsdSB, (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, (DE3), pLysS, Cmr)を形質転換し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンと $37\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地プレートにて30で一晚培養することにより、抗体酵素混成タンパク質発現株(V_H-cpBLA-V_L/pET26/BL21株)を作製した。一晚培養した上記LB寒天培地プレートに生じたコロニーを竹串でつつき、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンと $37\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLB液体培地4mlに植菌し、27で一晚培養した。この前培養液4 μl を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシン、 $37\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコール、1mM IPTG、0又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、0-10 ng/ml のICP又はTCPを含むLB液体培地4mlに植菌し、27で33時間培養しながら、Mini photo 518Rにて660nmにおける濁度の経時変化を測定した。その結果を図7に示す。

【0050】

図7から分かるように、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地において、測定開始後24時間前後から5-10 ng/ml で、また30時間前後から1 ng/ml という低濃度でICP濃度依存的な増殖が確認された。これに対し、TCPは同濃度のICPを添加した場合よりも遅れて30時間前後から増殖がみられ、10 ng/ml TCPを添加した場合に、1 ng/ml ICPを添加した場合と同程度の有意な増殖がみられた。一方、アンピシリンを含まない培地においては、アンピシリン含有培地よりも早く、抗原

10

20

30

40

50

の種類、濃度によらずほぼ同様の増殖が見られた(図7)。なお、日本の農作物における含有農薬の基準値は20 - 5000 ng/mlであり(http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/agrdtl.php?a_inq=8800)、今回の結果は、本発明の誘導タンパク質が対象抗原に対して十分な感度を有しているといえる。

【実施例7】

【0051】

[V_H-split-cpBLA-V_L発現株等を用いた増殖アッセイ]

上記実施例6のアッセイにおいて、V_H-cpBLA-V_L/pET26に代えて、V_H-split-cpBLA-V_L/pET26を用い、また、BL21(DE3,pLysS)株に代えて、毒性の高いタンパク質の過剰発現に適している大腸菌C43(DE3)株(Lucigen社製)を用いて、該株での発現を試みた。具体的には、0.5 μgのV_H-split-cpBLA-V_L/pET26を用いて、C43(DE3)株を形質転換し、50 μg/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地プレートにて30で一晚培養することにより、V_H-split-cpBLA-V_L発現株(V_H-split-cpBLA-V_L/pET26/C43株)を作製した。一晚培養した上記LB寒天培地プレートに生じたコロニーを竹串でつつき、50 μg/mlのカナマイシン含むLB(LBC)液体培地4mlに植菌し、27で一晚培養した。この前培養液10 μlを、1 mMのIPTG、0又は10 μg/mlのアンピシリン、10 ng/mlのICP又はTCPを含むLBKC液体培地1mlに植菌し、27で45時間培養した後の660 nmにおける濁度をMiniphotometer 518Rにて測定した。その結果を図8に示す。図8から分かるように、アンピシリン非添加時には、増殖の差は見られなかったものの、実施例6の場合より低い10 μg/mlのアンピシリン添加時に、ようやくICP依存的な増殖が確認された。しかし、100 μg/mlのアンピシリン添加時、および10 ng/ml未満のICPあるいはTCP添加時には有意な増殖を確認することが出来なかった。更にBL21(DE3,pLysS)株を用いた場合には増殖が見られなかったことから、V_H-split-cpBLA-V_LではV_H-cpBLA-V_Lに比べ低い抗原依存的酵素活性しか得られず、その結果低い抗原検出感度しか得られないものと考えられた。

【0052】

なお、同様の増殖アッセイを、cpBLA発現株(cpBLA/pET26/BL21株やcpBLA/pET26/C43株)を用いて行なったところ、いずれのcpBLA発現株においても、抗原依存的な増殖は見られず、アンピシリン非添加時には、抗原の有無にかかわらず増殖し、アンピシリン添加時にはすべてのサンプルにおいて増殖しなかった。

【実施例8】

【0053】

[Western blottingによる抗体酵素混成タンパク質発現の確認]

実施例6の増殖アッセイでは、培地中の抗原の有無や違いによって、V_H-cpBLA-V_L(抗体酵素混成タンパク質)の発現量が変化したことにより増殖速度の違いが生じた可能性を否定することはできないため、抗BLA抗体を用いたWestern blottingにより、抗体酵素混成タンパク質発現株中の抗体酵素混成タンパク質の発現量の確認を行った。より詳細には以下のような方法で行った。

【0054】

抗体酵素混成タンパク質発現株(V_H-cpBLA-V_L/pET26/BL21株)を50 μg/mlカナマイシンと37 μg/mlクロラムフェニコールを含むLB液体培地4mlに植菌し、27で一晚培養した。この前培養液4 μlを、50 μg/mlカナマイシン、37 μg/mlクロラムフェニコール、1 mM IPTG、10 ng/mlのICP又はTCPを含むLB液体培地4mlに植菌し、27で一晚培養した。また、ICP、TCPのいずれも含まないこと以外は同一の方法で一晚培養した。これらの培養によりOD₆₆₀が0.6程度にまで上昇した培養液100 μlを15000 rpmにて5分間遠心して菌体を回収し、SDS-PAGEを行った。泳動後のゲル中のタンパク質

のバンドをニトロセルロース膜（バイオラッド社製）に転写した後、このニトロセルロース膜をイムノブロック（大日本住友製薬社製）にて4 で一晩静置してブロッキングを行った。このニトロセルロース膜を、PBS-T（10 mM リン酸、145 mM NaCl、5 mM KCl、pH 7.2、0.1% Tween-20）にて5分間の洗浄することを3回繰り返した後、1/5000希釈したウサギ抗BLAポリクローナル抗体（Chemicon社製）を含む5%イムノブロック溶液にて室温で1時間反応させた。反応後のニトロセルロース膜を、PBS-Tにて3回洗浄した後、1/5000希釈したHRP-Goat anti Rabbit Igを含む5%イムノブロック溶液に浸して室温で1時間反応させた。反応後のニトロセルロース膜をPBS-Tにて3回洗浄した後、そのHRP活性をSuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate（Pierce社製）にて検出した。その結果を図9に示す。レーン1はICP存在下で培養した菌体サンプルを、レーン2はTCP存在下で培養した菌体サンプルを、レーン3はICP、TCPのいずれの抗原（Ag）も含まない培地で培養した菌体サンプルを表す。

10

【0055】

図9から分かるように、抗原の種類を問わず、すべてのサンプルにおいて58 kD付近にはほぼ同量のタンパク質（ V_H -cpBLA- V_L ）の発現が確認された（図9）。したがって、抗原（特にICP）添加による増殖速度の上昇は、抗体酵素混成タンパク質（ V_H -cpBLA- V_L ）の発現量の増加によるものではなく、抗原結合による抗体酵素混成タンパク質の構造安定化がもたらす酵素活性上昇によるものと考えられる。

20

【実施例9】

【0056】

[SDS-PAGEやWestern blottingによる抗体酵素混成タンパク質発現の確認]

抗体酵素混成タンパク質発現株（ V_H -cpBLA- V_L /pET26/BL21株）において、抗体酵素混成タンパク質（ V_H -cpBLA- V_L ）が実際に発現されているかを確認するために、抗体酵素混成タンパク質発現株からの抗体酵素混成タンパク質の部分精製を行った。より詳細には以下のような方法で行った。

【0057】

抗体酵素混成タンパク質発現株（ V_H -cpBLA- V_L /pET26/BL21株）を50 μ g/mlカナマイシンと37 μ g/mlクロラムフェニコールを含むLB液体培地4 mlに植菌し、27 で一晩培養した。この培養液を50 μ g/mlカナマイシン、37 μ g/mlクロラムフェニコールを含むLB液体培地（LBKC液体培地）250 mlに植菌し、O.D₆₀₀が約0.6に達したとき1 M IPTGを250 μ l加えて発現を誘導後、27 でさらに16時間培養した。その後、培養液を4 条件下6000 gで10分間遠心して回収した上清に107.5 gの硫酸アンモニウムを加え4 で一晩静置し、可溶性タンパク質を沈殿させた。この溶液を4 条件下10000 gで20分間遠心して上清を廃棄し、沈殿を10 ml TALON Buffer（50 mM リン酸、300 mM NaCl、pH 7.0）にて懸濁した。これに200 μ lのTALON金属アフィニティーカラム（クロンテック社製）を加え、説明書に従いバッチ/重力方式カラム精製法によりタンパク質を精製した。タンパク質の溶出にはElution Buffer（125 mM イミダゾール、50 mM リン酸、300 mM NaCl、pH 7.0）を用いた。この濃縮タンパク質を用いてSDS-PAGEを行った結果を図10に示す。

30

40

【0058】

図10から分かるように、レーン5の58 kD付近において、目的タンパク質である抗体酵素混成タンパク質（ V_H -cpBLA- V_L ）の分子量に相当するバンドを確認した。

【0059】

また、BL21（DE3,pLysS）株を、 V_H -cpBLA- V_L /pET26、 V_H -spliit-cpBLA- V_L /pET26、cpBLA/pET26のそれぞれのベクターにて形質転換して得られた V_H -cpBLA- V_L /pET26/BL21株、 V_H -

50

split・cpBLA-V_L/pET26/BL21株、cpBLA/pET26/BL21株を、前述のLBKC液体培地4mlにそれぞれ植菌し、27℃で一晩培養した。この培養液をLBKC液体培地250mlに植菌し、O.D₆₀₀が約0.6に達したとき1M IPTGを250μl加えて発現を誘導後、27℃でさらに16時間培養した。その後、培養液を4℃条件下6000gで10分間遠心して回収した上清に107.5gの硫酸アンモニウムを加え4℃で一晩静置し、可溶性タンパク質を沈殿させた。この溶液を4℃条件下10000gで20分間遠心して上清を廃棄し、沈殿を10ml TALON Buffer (50mM リン酸、300mM NaCl、pH7.0)にて懸濁した。これに200μlのTALON金属アフィニティーカラム(クロンテック社製)を加え、説明書に従いバッチ/重力方式カラム精製法によりタンパク質を精製した。タンパク質の溶出にはElution Buffer (125mM イミダゾール、50mM リン酸、300mM NaCl、pH7.0)を用いた。この濃縮タンパク質溶液10μlを用いてSDS-PAGEを行なった後、上記実施例8と同様の方法でWestern blottingを行なった結果、目的タンパク質の理論値付近の位置にそれぞれバンドを確認することができた。すなわち、V_H-cpBLA-V_L/pET26/BL21株については、58kD付近にV_H-cpBLA-V_Lと考えられるバンドが確認され、V_H-split・cpBLA-V_L/pET26/BL21株については、28kD付近にV_H-BLAc、31kD付近にBLAn-V_Lと考えられるバンドが確認され、cpBLA/pET26/BL21株については、30kD付近にcpBLAと考えられるバンドが確認された。

【実施例10】

【0060】

[抗体酵素混成タンパク質(V_H-cpBLA-V_L)等の抗原結合能の確認]

抗体酵素混成タンパク質(V_H-cpBLA-V_L)が実際に抗原(ICP)に結合する能力を有しているかどうか確認するために、以下のELISA実験を行った。

10μg/mlのICP-BSA又はBSAを含むPBS溶液をFalcon 3912マイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で16時間静置した。マイクロプレートから溶液を廃棄した後、そこに25%イムノブロックを含むPBSを200μl加え、室温で2時間置いてブロッキングを行った。次いで、マイクロプレートをPBS-Tで洗浄した後、上記実施例9で得られた50μg/mlの精製抗体酵素混成タンパク質(V_H-cpBLA-V_L)と5%イムノブロックを含むPBSを100μl加え室温で、90分間静置した。ここまでの操作で固相化された抗体酵素混成タンパク質(V_H-cpBLA-V_L)を検出するために、マイクロプレートをPBS-T洗浄後、5%イムノブロックを含むPBSで1/2000に希釈したHRP標識PentaHis(QIAGEN社製、東京)を加え室温で1時間静置した。その後マイクロプレートをPBS-Tで三回洗浄した後、あらかじめ調製した酵素反応溶液(50ml ELISA buffer、TMBZ(in DMSO)500μl、H₂O₂ 10μl)を各wellへ100μlずつ添加して反応を開始した。暗所で5分間反応させた後、3.2N H₂SO₄を50μlずつ添加して反応を止め、プレートリーダーで吸光度を測定した(450nm)。

【0061】

また、上記のELISA実験の方法において、V_H-cpBLA-V_Lに代えて、V_H-split・cpBLA-V_L(V_H-BLAc及びBLAn-V_L)又はcpBLAを用いて、同様のELISA実験を行い、同様に吸光度を測定したその結果を図11に示す。図11から分かるように、cpBLAの場合と比較すると、V_H-cpBLA-V_L、V_H-split・cpBLA-V_Lのいずれの場合も、有意なICP-BSA特異的な結合が確認されたが、V_H-cpBLA-V_Lの場合はV_H-split・cpBLA-V_Lの場合と比較しても顕著なICP-BSA特異的結合能が認められた。なお、V_H-split・cpBLA-V_LにおいてはV_H-BLAcとBLAn-V_Lの両方にHis tagが存在することを考慮すると、V_H-split・cpBLA-V_Lと比較したV_H-cpBLA-V_Lのシグナルの高さは、図11に示されている以上のものがあ

る。また、c p B L Aにおいては、I C P（抗原）の有無にかかわらず、同程度の低いシグナルを示していることから、B L Aのコンフォメーションが崩れ、非特異に結合している可能性がある。

【実施例 1 1】

【0062】

[抗体酵素混成タンパク質 ($V_H - c p B L A - V_L$) の抗原結合による活性変化]

抗体酵素混成タンパク質 ($V_H - c p B L A - V_L$) が抗原に結合することによって、実際に酵素活性の変化（上昇）が生じているかどうか確認するために、発色基質Nitrocefin (Calbiochem社製) 又は蛍光基質Fluorocillin (Invitrogen社製)、及び、実施例 9 で濃縮した $V_H - c p B L A - V_L$ を用いて以下の実験を行った。

10

【0063】

まず、実施例 9 で濃縮した $V_H - c p B L A - V_L$ タンパク質溶液 5 μ l、10 μ g / ml の I C P 又は T C P 5 μ l、及び、1 mM Nitrocefinを含む P B S 90 μ l を混合し、室温で 18 時間暗所に静置した。その後、その反応液について 490 nm の吸光度を測定することによって、ラクタマーゼの活性の変化を調べた。また、I C P や T C P に代えて P B S を用いた場合（図 1 2 中の「P B S」の項目）や、 $V_H - c p B L A - V_L$ タンパク質溶液を添加しなかった場合（図 1 2 中の「Nitrocefin」の項目）についても同様に 490 nm の吸光度を測定した。その結果を図 1 2 に示す。図 1 2 から分かるように、I C P を添加したサンプルにおいて、これを加えなかったサンプル（「T C P」、「P B S」、「Nitrocefin」）と比較して有意なシグナル上昇が観察された。すなわち、I C P 依存的なラクタマーゼ活性の上昇が認められた。また、T C P を添加したサンプルにおいても、I C P、T C P のいずれも添加しなかったサンプル（「P B S」）と比較してわずかながら有意な信号増加が観察された（ $n = 2$ ）。これにより、抗原添加により混成タンパク質の酵素活性が活性化されたと考えられる。

20

【0064】

次に、発色基質Nitrocefinに代えて蛍光基質Fluorocillinを用いて同様の実験を行なった。具体的には、実施例 9 で濃縮した $V_H - c p B L A - V_L$ タンパク質溶液 5 μ l、10 μ g / ml の I C P 又は T C P 5 μ l を混合し、4 にて 30 分間インキュベーションした後に、10 μ M Fluorocillinを含む P B S 90 μ l を添加し、室温で 30 分間反応を行なった後に、マイクロプレートリーダーGenios Pro (TECAN社製) を用いて、485 nm で励起し、535 nm の蛍光を測定した。 $V_H - c p B L A - V_L$ タンパク質溶液を添加しなかった場合の測定値をバックグラウンドとして引いた値を図 1 3 に示す。図 1 3 から分かるように、I C P を添加したサンプルにおいて、これを加えなかったサンプル（「T C P」、「P B S」）と比較して有意なシグナル上昇が観察された。すなわち、I C P 依存的なラクタマーゼ活性の上昇が認められた。

30

【実施例 1 2】

【0065】

[抗ペプチド抗体酵素混成タンパク質を用いたペプチドの検出例]

本発明の融合タンパク質（抗体酵素混成タンパク質）を用いた抗原検出システムの汎用性を確かめるため、上記の F v とは異なる抗体 F v を有する抗体酵素混成タンパク質を用いた検出系を構築し、同様の抗原依存的酵素活性変化が見られるかどうか検証した。すなわち、実施例 3 で作製した $V_H - c p B L A - V_L / p E T 2 6$ における V_H および V_L 遺伝子を、抗オステオカルシン C 末ペプチド抗体 K T M 2 1 9 (Anal. Chem. 79, 6197 (2007)) 由来のものに置き換えた抗体酵素混成タンパク質を用いて、抗原ペプチドの検出実験を行なった。この実験は具体的には以下のような方法で行なった。

40

【0066】

まず $V_H - c p B L A - V_L / p E T 2 6$ の V_L 遺伝子の交換、および 3' 側に存在する不要な X h o I サイトの除去のため、K T M 2 1 9 の V_L 遺伝子を以下のプライマーを用いて増幅した。50 pmol の M K b a c k 2 A (配列番号 23: GCGCAAGCTCAGTCGACG GAYATTGTMCSACMCARWCTMCA) (5' 末端から 12 ~ 17 番目のヌクレオチドが S a l I サ

50

イト)、50 pmolのV k N o t F o r (配列番号24: ATGGTGCTCGACTGCGGCCGCCCGTT
TTAT)、10 ngのp K S T 2 (K T M 2 1 9 ; Anal. Chem. 79, 6197 (2007))、0 .
2 mM (反応溶液の最終濃度)のd N T P s、10 μlの10´ Ex - T a q b u f f e r、5 unitのEx - T a qを混合して100 mlの反応溶液とし、94´ で5分間の
後に、94´ で30秒間、65´ で30秒間、72´ で1分間からなるサイクルを25
サイクル繰り返した後、72´ で10分間反応させて反応液を得た。更に得られた反応液
をアガロースゲル電気泳動により精製した。次に同様にして50 pmolのN o t d X b
a c k (配列番号25: GCAGTCGAGCACCATCACCACCACCAC)、50 pmolのp E T D r a
3 F o r (配列番号26: TGAGTGTGTTCCAGTTTGG)、10 ngのV_H - c p B L A - V_L
/ p E T 2 6を用いてp E T 2 6のN o t I - D r a I I I領域を含む断片を増幅し、得
られた反応液を同様に精製した。

10

【0067】

精製して得られたこれらのDNA断片、および、プライマーとしてM K b a c k 2 Aと
p E T D r a 3 F o rを用いて、実施例1と同様にオーバーラップ・エクステンションP
C Rを行い、得られたP C R産物を精製した後、該P C R産物を制限酵素S a l Iおよび
D r a I I Iで処理して精製し、S a l I - D r a I I I断片を得た。このS a l I - D r
a I I I断片を、同じくS a l IおよびD r a I I I処理並びに精製を行なったV_H - c
p B L A - V_L / p E T 2 6に組み込み、該プラスミドをV_H (I C P) - c p B L A -
V_L (219) / p E T 2 6とした。このプラスミドの配列を確認後、同様にしてプライ
マーM 1 3 R V (配列番号27: CAGGAAACAGCTATGAC)およびJ H 1 (配列番号28: ACT
GCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC)、およびテンプレートとしてp K S T 2 (K T M 2 1 9)を
用いてK T M 2 1 9 V H遺伝子をP C R増幅し、得られたP C R産物をN c o I及びX h
o Iにて制限酵素処理して精製し、N c o I - X h o I断片を得た。このN c o I - X h
o I断片を、同じくN c o I及びX h o I処理並びに精製を行ったV_H (I C P) - c p
B L A - V_L (219) / p E T 2 6に組み込み、該プラスミドをV_H - c p B L A - V_L
/ p E T 2 6 (219)とした。

20

【0068】

[不溶性タンパク質の発現と精製、およびリフォールディング]

V_H - c p B L A - V_L / p E T 2 6 (219)でB L 2 1 (DE3, pLysS)株を形質転
換し、50 μg/mlのカナマイシンと37 μg/mlのクロラムフェニコールを含むL
B寒天培地プレートにて30´ で一晚培養し、抗体酵素混成タンパク質発現株(V_H - c
p B L A - V_L / p E T 2 6 (219) / B L 2 1株)を作製した。コロニーを竹串でつ
つき、50 μg/mlのカナマイシンと37 μg/mlのクロラムフェニコールを含むL
B液体培地(L B C K培地)4 mlに植菌し、37´ で一晚培養した。この前培養液25
0 μlをL B C K培地250 mlに植菌して37´ で培養し、O D₆₀₀が0.6に達し
た時点で終濃度1 mMのI P T Gを添加して37´ で更に一晚培養した。その後、培養液
を4´ 条件下6000 gで10分間遠心して回収し、25 mlのT A L O N B u f f e r
に懸濁、氷上での超音波処理により菌体を破碎し、2.5 μlのB e n z o n a s e (Novagen社製)および終濃度1 mMのM g C l₂を加え氷上30分反応させてDNAを分
解した後、6000 g 10分間遠心して上清をとり除いた。その後残ったペレットに25
mlの1% T r i t o n X - 1 0 0、1 mM E D T Aを加えボルテックスし、6000
g 10分遠心する操作を3回繰り返して不溶性画分を洗浄した。

30

40

【0069】

洗浄した沈殿(不溶性画分)を10 ml 6 M塩酸グアニジン(G d n H C l)を含む
T A L O N B u f f e rにて懸濁した。この懸濁液に200 μlのT A L O N金属ア
フィニティーカラム(メルク社製)を加え、説明書に従った変性条件でのバッチ/重力方式
カラム精製法によりタンパク質を精製した。タンパク質の溶出にはE l u t i o n B u
f f e r (200 mM イミダゾール、50 mM リン酸、300 mM N a C l、5 .
4 M G d n H C l , p H 7 . 0)を用いた。

【0070】

50

溶出液中のタンパク質量をUVで定量し、溶出液のうち150 μ l(約320 μ gのタンパク質を含む)を分取し、終濃度10mMの2メルカプトエタノールと同1mM EDTAを加え、30 $^{\circ}$ Cで30分間おいたのち、Slide-A-Lyzer透析カセット(MW 10k cutoff, Pierce 社製)に移した。透析は、J. Immunol. Methods 219, 119 (1998)記載の透析外液(後述の透析外液1~5)ならびに方法に従って、500mLの透析外液に対して4 $^{\circ}$ Cで24時間ずつ計5回行い、最後に、4 $^{\circ}$ C、15krpmにて10min遠心して最終的に約1.7mLの可溶化サンプルを得た。この可溶化サンプルには、3.7 μ Mの抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L (219))が含まれていた。

透析外液1: 50mM TrisHCl, 3M GdnHCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0;

10

透析外液2: 50mM TrisHCl, 2M GdnHCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0;

透析外液3: 50mM TrisHCl, 1M GdnHCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 180 μ M GSSG, 400mM L-アルギニン, pH8.0;

透析外液4: 50mM TrisHCl, 0.5M GdnHCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0;

透析外液5: 50mM TrisHCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0;

【0071】

[抗体酵素混成タンパク質の活性測定]

20

上記により調製した抗体酵素混成タンパク質(V_H -cpBLA- V_L (219))を用い、Fluorocillinを用いて活性測定を行った。50 μ lのPBS中に終濃度0-2000ng/mlの抗原ペプチドBGP-C7、および終濃度300nMの抗体酵素混成タンパク質を混合し、黒色マイクロプレートウェルに分注した。これに50 μ l PBS中の2 μ M Fluorocillinを加えて28 $^{\circ}$ Cで60分反応させ、反応液の蛍光強度(485nmの励起光照射による535nmの蛍光強度)を測定した。なおこの際、抗体酵素混成タンパク質を加えない対照実験を行い、これらのウェルの蛍光強度をバックグラウンドとして減算した。この結果、図14に示すようにBGP-C7濃度依存的に有意な蛍光強度の増加がみられた。なお、本実験の測定は3連で行なった。図14中の黒丸は測定値の平均値を表し、エラーバーは1SDを示す。

30

【0072】

また、抗原としてBGP-C7以外のもの(BGP-C8, BGP-C10, ICP, TCP各終濃度1 μ g/ml)を用いて、同様の実験を行った。その結果を図15に示す。図15の結果から分かるように、KTM219を用いたオープンサンドイッチELISAで検出が可能なBGP-C8、BGP-C10(Anal. Chem. 79, 6197 (2007))では信号強度が増大したのに対し、特異的に認識されないICP、TCPではPBSと同じ信号強度しか得られなかった。なお、本実験の測定も3連で行なった。図15中のグラフの値は測定値の平均値を表し、エラーバーは1SDを示す。

【0073】

以上の実験結果より、本発明の融合タンパク質(抗体酵素混成タンパク質)を用いた抗原検出システムの汎用性と、目的抗原に対する特異性が示された。

40

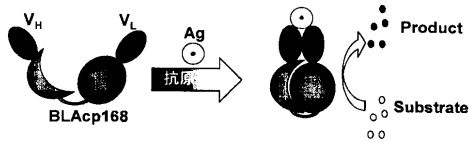
【産業上の利用可能性】

【0074】

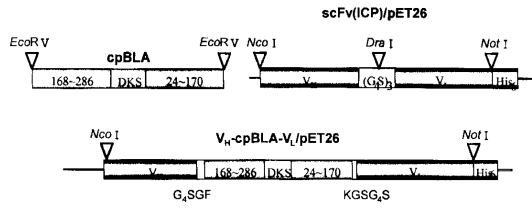
本発明によれば、検出対象である抗原が低分子抗原であっても、より簡便、効率的、安定性良くかつ高感度で検出することができる。また、本発明の抗原の検出方法は、通常のELISA法とは異なり、結合しなかった標識2次抗体(非競合法)や標識抗原(競合法)などを洗浄する操作を要することなく測定し得る測定法(ホモジニアス法)であり、測定装置の自動化が容易で(操作が簡便で熟練を要せずに)迅速な測定が可能という点で、通常のELISA法に比べて非常に大きなメリットがある。そのため、本発明は、臨床診断、食品検査、環境分析等における免疫測定系にきわめて有用に用いることができる。

50

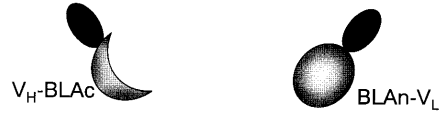
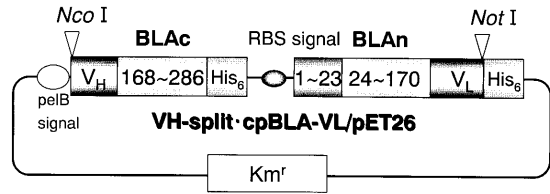
【 図 1 】



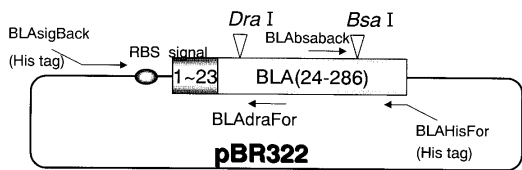
【 図 2 】



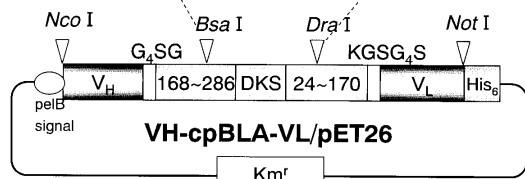
【 図 3 】



【 図 4 】



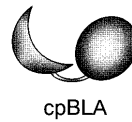
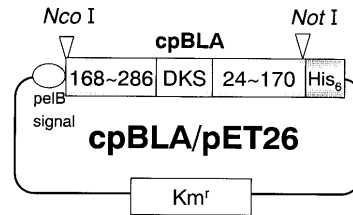
PCR/overlap extension PCR



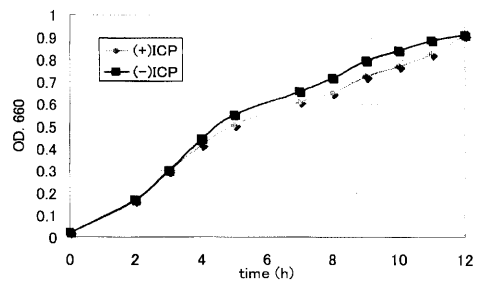
Bsa I / Dra I digestion
ligation

VH-split-cpBLA-VL/pET26

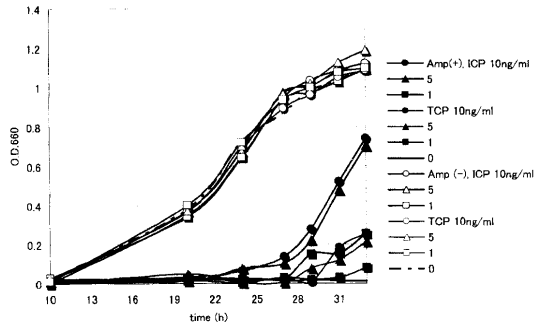
【 図 5 】



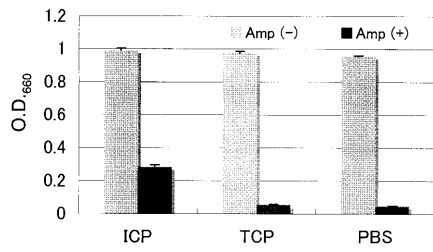
【 図 6 】



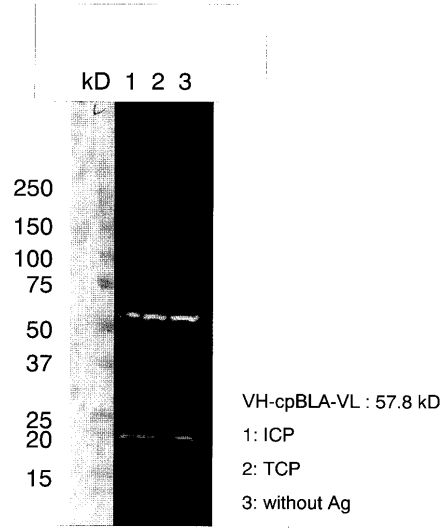
【 7 】



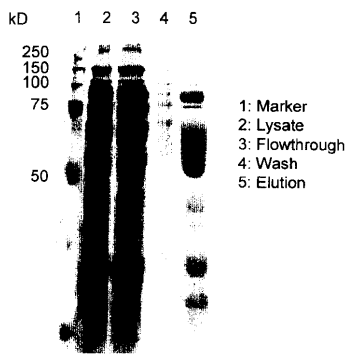
【 8 】



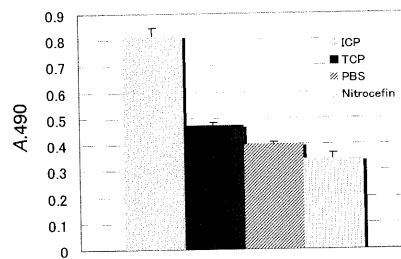
【 9 】



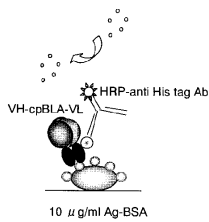
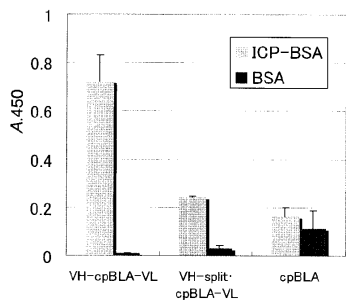
【 10 】



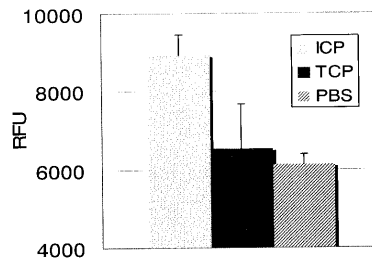
【 12 】



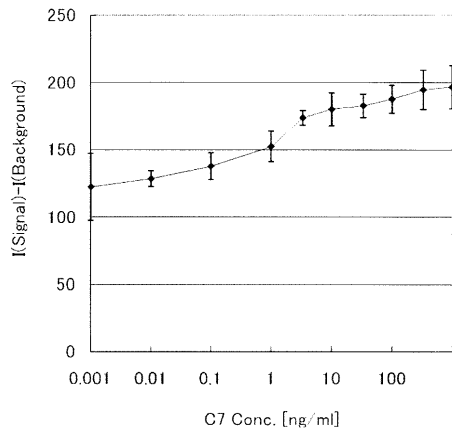
【 11 】



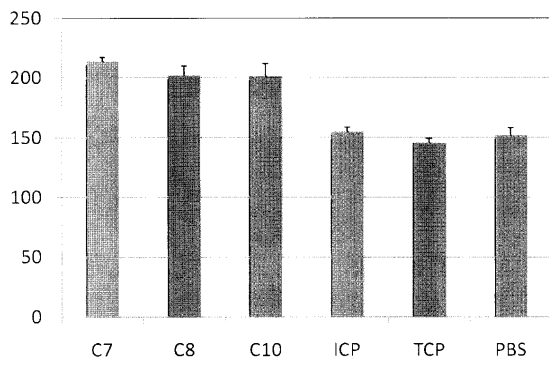
【 13 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 配列表 】

0005137266000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

(56) 参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 6 5 8 2 5 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 0 5 / 0 7 2 3 9 2 (W O , A 1)
Anal.Chem. , 2 0 0 2 年 , Vol.74 , p.2500-2504
Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 1 9 9 9 年 , Vol.96 , p.11241-11246
Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 2 0 0 2 年 , Vol.99 , No.6 , p.3469-3474

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/09 - 15/90
C07K 19/00
G01N 33/53
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)