

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/137441

発行日 平成29年4月6日 (2017.4.6)

(43) 国際公開日 平成27年9月17日 (2015.9.17)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 C 0 8 5	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 7	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18		4 H 0 4 5	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

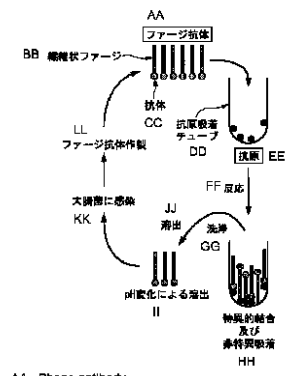
出願番号	特願2016-507819 (P2016-507819)	(71) 出願人	304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/057287	(74) 代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
(22) 国際出願日	平成27年3月12日 (2015.3.12)	(74) 代理人	100140774 弁理士 大浪 一徳
(31) 優先権主張番号	特願2014-52535 (P2014-52535)	(74) 代理人	100152146 弁理士 伏見 俊介
(32) 優先日	平成26年3月14日 (2014.3.14)	(74) 代理人	100161207 弁理士 西澤 和純
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	林 宣宏 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント、ミリストイル化タンパク質検出キット、医薬、遺伝子、及びベクター

(57) 【要約】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。



- AA Phage antibody
- BB Fibrous phage
- CC Antibody
- DD Antigen-adsorbing tube
- EE Antigen
- FF Reaction
- GG Washing
- HH Specific binding or nonspecific adsorption
- II Elution due to pH change
- JJ Elution
- KK Infected in Escherichia coli
- LL Phage antibody construction

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a 1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、

(b 1) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、

(c 1) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d 1) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、

(e 1) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、

(f 1) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを有する請求項 1 に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する請求項 1 又は 2 に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

(a 2) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、

(b 2) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、

(c 2) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

10

20

30

40

50

(d2) 配列番号11に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号11に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

(e2) 配列番号12に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H2と、

(f2) 配列番号13に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号13に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H3と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項6】

配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1と、配列番号9に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L2と、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L3と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号11に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1と、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H3と、を含む重鎖可変ドメインを有する請求項5に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項7】

配列番号11に示されるアミノ酸配列と、配列番号12に示されるアミノ酸配列と、配列番号13に示されるアミノ酸配列と、配列番号8に示されるアミノ酸配列と、配列番号9に示されるアミノ酸配列と、配列番号10に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する請求項5又は6に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項8】

配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する請求項5～7のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項9】

(a3) 配列番号15に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号15に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L1と、

(b3) 配列番号16に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号16に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L2と、

(c3) 配列番号17に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号17に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L3と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d3) 配列番号18に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号18に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

(e3) 配列番号19に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号19に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H2と、

(f3) 配列番号20に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号20に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H3と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

40

50

【請求項 10】

配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - L 1 と、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - L 2 と、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び / 又は、

配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - H 1 と、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - H 2 と、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを有する請求項 9 に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する請求項 9 又は 10 に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 12】

配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

(a 4) 配列番号 25 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む CDR - L 1 と、

20

(b 4) 配列番号 26 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む CDR - L 2 と、

(c 4) 配列番号 27 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む CDR - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び / 又は、

(d 4) 配列番号 28 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む CDR - H 1 と、

30

(e 4) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む CDR - H 2 と、

(f 4) 配列番号 30 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む CDR - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 14】

配列番号 25 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - L 1 と、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - L 2 と、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び / 又は、

配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - H 1 と、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - H 2 と、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を含む CDR - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを有する請求項 13 に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 15】

配列番号 28 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列と、配列番

50

号 26 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する請求項 13 又は 14 に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 16】

配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを有することを特徴とするミリスティル化タンパク質検出キット。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含有することを特徴とする医薬。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする DNA からなることを特徴とする遺伝子。

【請求項 20】

(g1) 配列番号 22 に示される塩基配列からなる DNA、

(h1) 配列番号 22 に示される塩基配列において、1 ~ 数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、

(i1) 配列番号 22 に示される塩基配列と同一性が 80% 以上である塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、又は、

(j1) 配列番号 22 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、からなることを特徴とする遺伝子。

【請求項 21】

(g2) 配列番号 23 に示される塩基配列からなる DNA、

(h2) 配列番号 23 に示される塩基配列において、1 ~ 数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、

(i2) 配列番号 23 に示される塩基配列と同一性が 80% 以上である塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、又は、

(j2) 配列番号 23 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、からなることを特徴とする遺伝子。

【請求項 22】

(g3) 配列番号 24 に示される塩基配列からなる DNA、

(h3) 配列番号 24 に示される塩基配列において、1 ~ 数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、

(i3) 配列番号 24 に示される塩基配列と同一性が 80% 以上である塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、又は、

(j3) 配列番号 24 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする DNA、からなることを特徴とする遺伝子。

【請求項 23】

(g4) 配列番号 32 に示される塩基配列からなる DNA、

10

20

30

40

50

(h4) 配列番号32に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、

(i4) 配列番号32に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、

(j4) 配列番号32に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、からなることを特徴とする遺伝子。

【請求項24】

請求項19~23のいずれか一項に記載の遺伝子を発現ベクターに挿入してなることを特徴とする組換えベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗ミリスチル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント、ミリスチル化タンパク質検出キット、医薬、遺伝子、及びベクターに関する。本願は、2014年3月14日に、日本に出願された特願2014-052535号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

cAMP依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニットの一次配列決定の際にN末端にミリスチン酸が結合していることが発見されてから(非特許文献1参照。)、現在までに100以上のミリスチル化タンパク質が報告され、全タンパク質の数パーセントがミリスチル化を受けているとゲノム配列から推定されている(非特許文献2参照。)

【0003】

ミリスチル化とは、タンパク質のN末端に炭素数14個の飽和脂肪酸であるミリスチン酸が付加される翻訳後修飾の一種であり、この修飾はすべての真核生物に普遍的に存在するN-ミリスチル転移酵素(NMT: N-myristoyl transferase、非特許文献3参照。)によって翻訳と同時に行われる。

ミリスチル化は、翻訳時にペプチド鎖がリボソームに結合した状態で、メチオニンアミノペプチダーゼによるN末端のメチオニンの除去により露出したグリシンのアミノ基に、NMTがミリスチン酸をアミド結合で付加することで生じる(非特許文献4参照。)。ミリスチル化にはコンセンサス配列は存在しないが、N末端から1番目がグリシンであることは必須であり、2番目は電荷を持たないアミノ酸(但し、プロリン、芳香族アミンを除く)、5番目は電荷を持たないアミノ酸、特にセリンが存在する 경우가多く、6番目はプロリン以外のアミノ酸である、という傾向がある(非特許文献5参照。)

【0004】

細胞内シグナル伝達系に關与するタンパク質に多く見られるミリスチル化は、タンパク質と細胞膜との可逆的な相互作用のために機能している。例えば、HIV遺伝子産物であるNefや、癌遺伝子産物であるSrc kinaseはミリスチル化がタンパク質の機能発現に關与していることが報告されている(非特許文献6,7参照。)。また、N末端グリシンに変異をいれミリスチル化できないようにしたタンパク質では細胞膜に結合できず、その結果、がんの転移活性がなくなる場合もあることも示唆されている。

【0005】

タンパク質-膜間、あるいはタンパク質-タンパク質間の特異的相互作用を介して、タンパク質の細胞内局在や活性の制御を行うことにより細胞内情報伝達に深く關与しているミリスチル化タンパク質の検出は、それぞれの細胞の動作メカニズムを理解するための重要な知見を与える(非特許文献8,9参照。)

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Carr, S. A., et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1982) vol.79, pp.6128-6131.

【非特許文献2】Maurer-Stroh, S., et.al., J. Mol. Biol., (2002) vol. 317, pp. 541-557.

【非特許文献3】Towler, D.A., et.al., J. Biol. Chem., (1987) vol. 262, pp. 1030-1036.

【非特許文献4】Rudnick, D.A., et.al., J. Biol. Chem., (1990) vol. 265, pp. 13370-13378.

【非特許文献5】Towler, D.A., et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1987) vol. 84, pp. 2708-2712.

【非特許文献6】Wang, J.K., et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (2000) vol. 97, pp. 394-399.

【非特許文献7】Cross, F.R., et.al., Mol. Cell. Biol., (1984) vol. 4, pp. 1834-1842.

【非特許文献8】Spiegel, A.M., et.al., Trends Biochem. Sci., (1991) vol.16, 338-341.

【非特許文献9】Magee, T., et.al., Curr. Opin. Cell Biol., (2005) vol. 17, pp. 190-196.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、未知のミリストイル化タンパク質の存在が推定されているものの、化学的に安定で反応性の低いミリストイル基を簡便に検出する方法はこれまで存在しなかった。

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、相互作用だけで認識できる抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント、ミリストイル化タンパク質検出キット、医薬、遺伝子、及びベクターを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、抗体と抗原の分子間相互作用だけで抗体をクローニングすることが出来る抗体ライブラリー技術を用いて、抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明は、下記の特徴を有する抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント、ミリストイル化タンパク質検出キット、医薬、遺伝子、及びベクターを提供するものである。

【0010】

(1) (a1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L1と、

(b1) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L2と、

(c1) 配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L3と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d1) 配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

10

20

30

40

50

(e 1) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、

(f 1) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【 0 0 1 1 】

(2) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び / 又は、

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を有する重鎖可変ドメインを含む前記 (1) に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(3) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する前記 (1) 又は (2) に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(4) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する前記 (1) ~ (3) のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【 0 0 1 2 】

(5) (a 2) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、

(b 2) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、

(c 2) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び / 又は、

(d 2) 配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、

(e 2) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、

(f 2) 配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【 0 0 1 3 】

(6) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び / 又は、

配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 1 2 に示されるア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H3と、を含む重鎖可変ドメインを有する前記(5)に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(7)配列番号11に示されるアミノ酸配列と、配列番号12に示されるアミノ酸配列と、配列番号13に示されるアミノ酸配列と、配列番号8に示されるアミノ酸配列と、配列番号9に示されるアミノ酸配列と、配列番号10に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する前記(5)又は(6)に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(8)配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する前記(5)~(7)のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【0014】

(9)(a3)配列番号15に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号15に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L1と、

(b3)配列番号16に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号16に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L2と、

(c3)配列番号17に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号17に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L3と、

20

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d3)配列番号18に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号18に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

(e3)配列番号19に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号19に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H2と、

(f3)配列番号20に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号20に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H3と、

30

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【0015】

(10)配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1と、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L2と、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L3と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号18に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1と、配列番号19に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H3と、を含む重鎖可変ドメインを有する前記(9)に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

40

(11)配列番号18に示されるアミノ酸配列と、配列番号19に示されるアミノ酸配列と、配列番号20に示されるアミノ酸配列と、配列番号15に示されるアミノ酸配列と、配列番号16に示されるアミノ酸配列と、配列番号17に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する前記(9)又は(10)に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(12)配列番号21に示されるアミノ酸配列を有する前記(9)~(11)のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【0016】

(13)(a4)配列番号25に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号25に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配

50

列を含む C D R - L 1 と、

(b 4) 配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、

(c 4) 配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d 4) 配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、

(e 4) 配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、

(f 4) 配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有することを特徴とする抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(1 4) 配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを有する前記 (1 3) に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(1 5) 配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有する前記 (1 3) 又は (1 4) に記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

(1 6) 配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列を有する前記 (1 3) ~ (1 5) のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント。

【 0 0 1 7 】

(1 7) 前記 (1) ~ (1 6) のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを有することを特徴とするミリスティル化タンパク質検出キット。

(1 8) 前記 (1) ~ (1 6) のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含有することを特徴とする医薬。

(1 9) 前記 (1) ~ (1 6) のいずれか一つに記載の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする D N A からなることを特徴とする遺伝子。

【 0 0 1 8 】

(2 0) (g 1) 配列番号 2 2 に示される塩基配列からなる D N A 、

(h 1) 配列番号 2 2 に示される塩基配列において、1 ~ 数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする D N A 、

(i 1) 配列番号 2 2 に示される塩基配列と同一性が 8 0 % 以上である塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする D N A 、又は、

(j 1) 配列番号 2 2 に示される塩基配列からなる D N A と相補的な塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、

10

20

30

40

50

かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、からなることを特徴とする遺伝子。

【0019】

(21)(g2)配列番号23に示される塩基配列からなるDNA、
 (h2)配列番号23に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、
 (i2)配列番号23に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、
 (j2)配列番号23に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、からなることを特徴とする遺伝子。

10

【0020】

(22)(g3)配列番号24に示される塩基配列からなるDNA、
 (h3)配列番号24に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、
 (i3)配列番号24に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、
 (j3)配列番号24に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、からなることを特徴とする遺伝子。

20

【0021】

(23)(g4)配列番号32に示される塩基配列からなるDNA、
 (h4)配列番号32に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、
 (i4)配列番号32に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、
 (j4)配列番号32に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリストイル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、からなることを特徴とする遺伝子。(24)前記(19)~(23)のいずれか一つに記載の遺伝子を発現ベクターに挿入してなることを特徴とする組換えベクター。

30

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、相互作用だけで認識できる抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを提供することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】抗体ライブラリーに用いられるファージの構造を示す図である。

【図2】抗体ライブラリーのスクリーニング方法(パニング)の概要を示す図である。

【図3】ファージディスプレイ用の抗体発現ベクターを示す図である。

【図4】実施例におけるNAP22の発現検討結果である。

【図5】実施例におけるNAP22の精製検討結果である。

【図6】実施例におけるmyrNAP22の発現検討結果である。

【図7】実施例におけるmyrNAP22の質量分析結果である。

【図8】実施例における抗体ライブラリーのスクリーニング方法の概要を示す図である。

50

【図 9】実施例におけるピアコアを用いた相互作用解析結果である。

【図 10】実施例におけるピアコアを用いた相互作用解析結果である。

【図 11】実施例におけるピアコアを用いた相互作用解析結果である。

【図 12】実施例におけるモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果である。

【図 13】実施例におけるモノクローナル抗体の発現チェックの結果、及びビーズへの結合量のチェック結果である。

【図 14】実施例におけるモノクローナル抗体を用いた免疫沈降の検討結果である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

10

<抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント>

[第一実施形態]

本実施形態の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント（以下、本実施形態の抗体ともいう。）は、

（a1）配列番号1に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L1と、

（b1）配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L2と、

20

（c1）配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L3と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

（d1）配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

（e1）配列番号5に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H2と、

30

（f1）配列番号6に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H3と、

を含む重鎖可変ドメインを有する。

更に、抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントは、本実施形態の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1と、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L2と、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L3と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1と、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号6に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H3と

40

、を含む重鎖可変ドメインを含むことが好ましい。

尚、本発明において、CDRはcomplementarity-determining regionを意味する。

【0025】

本実施形態の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントは、ミリスティル化されたタンパク質のミリスティル基を特異的に認識するものである。従って、ミリスティル基特異的認識能を保持していれば、前記（a1）～（f1）の配列番号1～6に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されていてもよい。

ここで、欠失、置換、又は付加されてもよいアミノ酸の数としては、1～5個が好まし

50

く、1 ~ 2個がより好ましい。

【0026】

更に、発現精製が容易であることから、本実施形態の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントは、抗原を認識するために必要な最小単位である重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインをフレキシブルなペプチドリンカーで結合した単可変ドメインフラグメントであることが好ましい。即ち、s c F v抗体であることが好ましい。

具体的には、本実施形態の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号4に示されるアミノ酸配列と、配列番号5に示されるアミノ酸配列と、配列番号6に示されるアミノ酸配列と、配列番号1に示されるアミノ酸配列と、配列番号2に示されるアミノ酸配列と、配列番号3に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有することが好ましく、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有することがより好ましい。

10

【0027】

本実施形態の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントの製造方法としては、特に限定されず、通常用いられる動物免疫法やハイブリドーマによる抗体作製法を用いてもよい。

しかしながら、動物細胞の増殖速度が遅く時間がかかる、動物に有害（致死性）な抗原は使用出来ない、エピトープ（抗体の抗原結合部位）や結合力が限られた特定の抗体しか得られない、抗体遺伝子を得るのが困難、等の問題があることから、抗体と抗原の分子間相互作用のみで抗体遺伝子をクローニングできる、ファージ抗体ライブラリーを用いたモノクローナル抗体の作製方法を用いることが好ましい。

20

抗体ライブラリーは、1固体の動物、あるいは、複数の固体の動物から全ての抗体遺伝子をクローニングし、その全ての可変ドメインを組み換え体の形（s c F v抗体）でそれぞれひとつの繊維状ファージ（例えば、M13）の外郭タンパク質に融合して発現させることで、全ての抗体を漏れなく提示したファージのセットを作製する技術である（図1参照）。図2に示すように、かかる抗体ライブラリーを用いてファージ上に提示された抗体のセットを用いてパニングを行うことによって、目的の抗ミリスティル化タンパク質抗体が選択される。パニングのサイクルを数回繰り返すことによって抗体ライブラリーの中から、抗原であるミリスティル基との親和性の高い抗ミリスティル化タンパク質抗体を取得することができる。

パニングでは、標的タンパク質（抗原）であるミリスティル化タンパク質をプレートに固定化し、ファージ抗体を反応させ、結合しなかったファージは洗浄し、結合したファージ抗体を溶出し大腸菌（例えば、DH12S）に感染させて増殖させる、という操作を繰り返す。これにより、抗原分子に発現した抗体が結合するかしないかだけで抗体を選択することが可能である。

30

また、実施例において示すように、ミリスティル化タンパク質をビーズに固定化してもよい。（1）提示される抗原分子の絶対数の増加、（2）適切な抗原部位の露出の2つの観点から、ビーズを用いたビーズスクリーニングが好ましい。

【0028】

抗体ライブラリーとしては、非免疫ライブラリー、免疫ライブラリー、合成ライブラリー等が挙げられる。非免疫ライブラリー及び免疫ライブラリーは、由来となる動物が体内で作製した抗体遺伝子を全てクローニングすることで作製する。このとき、非免疫ライブラリーでは免疫していない動物を、免疫ライブラリーでは目的の抗原で免疫した動物を使用する。前者ではどのような抗原も使用可能で、エピトープや結合力が異なる様々な抗体が得られる。後者では特異性が高く結合力が強い抗体が得られることが多い。合成ライブラリーは抗体の可変領域の中でも特に多様性を持つCDR領域の遺伝子をランダムなアミノ酸で置換をしたライブラリーである。この場合は多様性が得られるが、実際の生体内では機能する抗体だけが生み出されるのとは異なり、そこには不具合のある抗体が多数含まれている可能性があることが問題となる。

40

本実施形態においては、非免疫ライブラリー、免疫ライブラリーを用いることが好ましく、免疫ライブラリーを用いることがより好ましい。

50

【0029】

抗体ライブラリーは必ずしも免疫が必要ではなく、動物がもつ全ての抗体が候補となることから、毒物や本発明の抗体のような本来は生体内に大量に存在して免疫反応を惹起することが難しい分子に対する抗体も取得することが可能である。

また生体内では抗原による刺激が繰り返されることでより親和性の高い抗体を産出していくアフィニティマチュレーション（抗体親和性成熟）がなされているが、遺伝子に変異を入れることやパニングを繰り返すことでこの現象を *in vitro* で再現できる。また抗体分子とともに抗体の遺伝子も得ることができるため、継続的な抗体の生産が可能となることや、抗体分子の改変も出来ることもメリットのひとつである。

【0030】

ファージディスプレイ用の抗体発現ベクターとしては、例えば図3に示すベクターが挙げられる（藤田保健衛生大学、黒澤研究室より供与）。図3に示すベクターにおいて、抗体は一本鎖抗体（scFv）として、最初はファージ外膜の一部であるcp3と融合した形で発現される。次に、抗体を介して抗原に結合したファージからこのベクターを回収し、SalI処理を行うことでcp3遺伝子を除去すると、protein Aが融合したscFv抗体が得られる。そのため、得られたscFv抗体は、protein Aが結合するIgGを固相化したカラムで簡便に精製され得る。

【0031】

[第二実施形態]

本実施形態の抗体は、

(a2) 配列番号8に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L1と、

(b2) 配列番号9に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L2と、

(c2) 配列番号10に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号10に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-L3と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d2) 配列番号11に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号11に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

(e2) 配列番号12に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H2と、

(f2) 配列番号13に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号13に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含むCDR-H3と、

を含む重鎖可変ドメインを有する。

更に、本実施形態の抗体は、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L1と、配列番号9に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L2と、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含むCDR-L3と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号11に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H1と、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むCDR-H3と、を含む重鎖可変ドメインを含むことが好ましい。

【0032】

本実施形態の抗体は、前記(a2)～(f2)の配列番号8～13に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されていてもよい。

【0033】

更に、本実施形態の抗体は、s c F v抗体であることが好ましく、配列番号11に示されるアミノ酸配列と、配列番号12に示されるアミノ酸配列と、配列番号13に示されるアミノ酸配列と、配列番号8に示されるアミノ酸配列と、配列番号9に示されるアミノ酸配列と、配列番号10に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有することがより好ましく、配列番号14に示されるアミノ酸配列を有することが特に好ましい。

【0034】

[第三実施形態]

本実施形態の抗体は、

(a3) 配列番号15に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号15に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、

(b3) 配列番号16に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号16に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、

(c3) 配列番号17に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号17に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d3) 配列番号18に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号18に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、

(e3) 配列番号19に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号19に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、

(f3) 配列番号20に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号20に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有する。

更に、本実施形態の抗体は、配列番号15に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号18に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号19に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを含むことが好ましい。

【0035】

本実施形態の抗体は、前記(a3)~(f3)の配列番号15~20に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されていてもよい。

【0036】

更に、本実施形態の抗体は、s c F v抗体であることが好ましく、配列番号18に示されるアミノ酸配列と、配列番号19に示されるアミノ酸配列と、配列番号20に示されるアミノ酸配列と、配列番号15に示されるアミノ酸配列と、配列番号16に示されるアミノ酸配列と、配列番号17に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有することがより好ましく、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有することが特に好ましい。

【0037】

[第四実施形態]

本実施形態の抗体は、

(a4) 配列番号25に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号25に示されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、

(b4) 配列番号26に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号26に示されるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、

(c 4) 配列番号 27 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、

を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

(d 4) 配列番号 28 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、

(e 4) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、

(f 4) 配列番号 30 に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されているアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、

を含む重鎖可変ドメインを有する。

更に、本実施形態の抗体は、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は、

配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む重鎖可変ドメインを含むことが好ましい。

【0038】

本実施形態の抗体は、前記(a 4)～(f 4)の配列番号 25～30 に示されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されていてもよい。

【0039】

更に、本実施形態の抗体は、s c F v 抗体であることが好ましく、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列と、をこの順に有することがより好ましく、配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を有することが特に好ましい。

【0040】

< 遺伝子 >

本発明の遺伝子は、上述した本発明の抗ミリスチル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする D N A からなる。該遺伝子は、本発明の抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインをコードする D N A を含むものであれば、特に限定されず、重鎖可変ドメインをコードする D N A を含む遺伝子、及び、軽鎖可変ドメインをコードする D N A を含む遺伝子の二つの遺伝子からなるものであってもよい。

ハンドリングしやすさの観点からは、上述した s c F v 抗体をコードする D N A の塩基配列と相溶性(塩基配列の同一性)が高い塩基配列であることが好ましい。

【0041】

[第一実施形態]

本実施形態の遺伝子は、上述した第一実施形態の抗ミリスチル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする D N A からなり、具体的には、以下の (g 1)～(j 1) のいずれかの塩基配列からなる D N A である。

(g 1) 配列番号 22 に示される塩基配列からなる D N A、

(h 1) 配列番号 22 に示される塩基配列において、1～数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードする D N A、

(i 1) 配列番号 22 に示される塩基配列と同一性が 80% 以上、好ましくは 85% 以上

10

20

30

40

50

、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、
 (j1) 配列番号22に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA

【0042】

ここで、欠失、置換、又は付加されてもよい塩基の数としては、1~30個が好ましく、1~15個がより好ましく、1~10個が特に好ましく、1~5個が最も好ましい。

【0043】

本発明及び本願明細書において、「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL 2nd EDITION (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方法が挙げられる。例えば、5xSSC(20xSSCの組成: 3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸溶液, pH7.0)、0.1重量% N-ラウロイルサルコシン、0.02重量%のSDS、2重量%の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬、及び50%ホルムアミドから成るハイブリダイゼーションバッファー中で、55~70℃で数時間から一晩インキュベーションを行うことによりハイブリダイズさせる条件を挙げることができる。なお、インキュベーション後の洗浄の際に用いる洗浄バッファーとしては、好ましくは0.1重量% SDS含有1xSSC溶液、より好ましくは0.1重量% SDS含有0.1xSSC溶液である。

【0044】

[第二実施形態]

本実施形態の遺伝子は、上述した第二実施形態の抗ミリスチル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするDNAからなり、具体的には、以下の(g2)~(j2)のいずれかの塩基配列からなるDNAである。

(g2) 配列番号23に示される塩基配列からなるDNA、

(h2) 配列番号23に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、

(i2) 配列番号23に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、
 (j2) 配列番号23に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA

【0045】

[第三実施形態]

本実施形態の遺伝子は、上述した第三実施形態の抗ミリスチル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするDNAからなり、具体的には、以下の(g3)~(j3)のいずれかの塩基配列からなるDNAである。

(g3) 配列番号24に示される塩基配列からなるDNA、

(h3) 配列番号24に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、

(i3) 配列番号24に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、
 (j3) 配列番号24に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスチル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA

【0046】

10

20

30

40

50

[第四実施形態]

本実施形態の遺伝子は、上述した第四実施形態の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするDNAからなり、具体的には、以下の(g4)~(j4)のいずれかの塩基配列からなるDNAである。

(g4) 配列番号32に示される塩基配列からなるDNA、

(h4) 配列番号32に示される塩基配列において、1~数個の塩基が欠失、置換又は付加されている塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、

(i4) 配列番号32に示される塩基配列と同一性が80%以上である塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA、又は、

(j4) 配列番号32に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列からなり、かつミリスティル化タンパク質認識能を有するタンパク質をコードするDNA

10

【0047】

<抗ミリスティル化タンパク質抗体組換えベクター>

本発明の組換えベクターは、上述した本発明の遺伝子を発現ベクターに挿入してなるものであり、具体的には、発現ベクターに、抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするDNAを、制限酵素部位を介して挿入してなるものである。本発明の組換えベクターに挿入されるDNAとしては、配列番号22に示される塩基配列からなるDNA、配列番号23に示される塩基配列からなるDNA、配列番号24に示される塩基配列からなるDNA、又は配列番号32に示される塩基配列からなるDNAが好ましい。

20

【0048】

本発明に用いられる発現ベクターとしては、宿主細胞に抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる細胞系ベクター；適当な細胞から抽出されたタンパク質合成能を有する成分からなるタンパク質翻訳系において抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる無細胞系ベクターが挙げられる。

細胞系ベクターとしては、宿主細胞に適した公知の発現ベクターが用いられる。例えば、大腸菌においてはpBR322誘導体に代表されるColE系プラスミド、p15Aオリジンを持つpACYC系プラスミド、pSC系プラスミド、Bac系等のF因子由来ミニFプラスミドが挙げられる。その他、trcやtac等のトリプトファンプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター、T5プロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター等を有する発現ベクターも挙げられる。

30

遺伝子が組込まれた組換えベクターの宿主への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、カルシウム処理された菌体を用いるコンピテント細胞法や、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、プラスミドベクター以外にもファージベクターを用いて、菌体内に感染させ導入する方法によってもよい。

【0049】

無細胞系ベクターとしては、細胞系ベクターにおいて挙げられたT7プロモーターを有する発現ベクターやT3プロモーターを有する発現ベクター；SP6プロモーター又はT7プロモーターを有するpEU系プラスミド等の小麦無細胞タンパク質合成用ベクター等が挙げられる。

40

【0050】

無細胞系ベクターを用いたタンパク質合成においては、先ず、転写系を用いて、抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントのDNAを転写して、mRNAを合成する。係る転写系としては、RNAポリメラーゼにより転写させる従来公知のものが挙げられる。RNAポリメラーゼとしては、例えばT7RNAポリメラーゼが挙げられる。

50

次いで、翻訳系である無細胞タンパク質合成系を用いて、mRNAを翻訳し、タンパク質を合成する。この系にはリボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、解離因子、アミノアシルtRNA合成酵素等、翻訳に必要な要素が含まれている。このようなタンパク質翻訳系として、大腸菌抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等が挙げられる。更に、上記翻訳に必要な要素が独立に精製された因子のみからなる再構成型無細胞タンパク質合成系が挙げられる。

細胞系ベクター又は無細胞系ベクターを用いて合成されたタンパク質から抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを精製して用いることができる。精製方法としては、塩析法や各種クロマトグラフィーを用いた方法が挙げられる。発現ベクターが目的タンパク質のN末端又はC末端にヒスチジンタグ等のタグ配列を発現するように設計されている場合には、ニッケルやコバルト等、このタグに親和性を有する物質を用いたアフィニティーカラムによる精製方法が挙げられる。その他、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー等、適宜組み合わせることで精製することにより、精製抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントの純度を高めることができる。

【0051】

<ミリスティル化タンパク質検出キット>

本発明のミリスティル化タンパク質検出キットは、上述した本発明の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを有するものであれば特に限定されない。例えば、本発明のミリスティル化タンパク質検出キットとして、サンドイッチ法により比色定量するELISAキットが挙げられる。具体的には、本発明の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントでコートされた96ウェルプレートと、HRP(Horseshoe peroxidase)等の酵素で標識した2次抗体と、該酵素の色原性基質と、を含む。

本発明のミリスティル化タンパク質検出キットによれば、ウエスタンブロット等を行わずとも簡便にかつ短時間で試料中のミリスティル化タンパク質の検出をすることができる。

【0052】

<医薬>

本発明の医薬は、抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含有する。上述したように、タンパク質のミリスティル化は、癌遺伝子産物であるSrc kinase等細胞内シグナル伝達系に關与するタンパク質や、Nef等のHIV遺伝子産物において報告されている。本発明の抗ミリスティル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントが中和抗体として機能する場合には、これを有効成分として含有する本発明の医薬は、種々の疾患に対する治療効果が期待される。

本発明の医薬の治療効果が期待される対象疾患としては、例えばヒトの固形がん等が挙げられる。ヒトの固形がんとしては、例えば、脳がん、頭頸部がん、食道がん、甲状腺がん、小細胞がん、非小細胞がん、乳がん、胃がん、胆のう・胆管がん、肝がん、膵がん、結腸がん、直腸がん、卵巣がん、絨毛上皮がん、子宮体がん、子宮頸がん、腎盂・尿管がん、膀胱がん、前立腺がん、陰茎がん、睾丸がん、胎児性がん、ウイルスがん、皮膚がん、悪性黒色腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、ユ-イング腫、軟部肉腫などが挙げられる。

また、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患；糖尿病等も挙げられる。

【0053】

本発明の医薬における製剤化の例としては、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に使用されるものが挙げられる。または、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用されるものが挙げられる。更には、薬理学上許容される担体若しくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせることで、一般に認め

10

20

30

40

50

られた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化されたものが挙げられる。

【0054】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常製剤実施に従って処方することができる。

10

【0055】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0056】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

20

【0057】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0058】

本発明の医薬の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

30

【0059】

非経口的に投与する場合は、その1回の投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(体重60kgとして)においては、通常、1日当り約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。

【0060】

また、本発明の一側面は、治療のための前記抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

40

また、本発明の一側面は、治療的に有効量の前記抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を提供する。

また、本発明の一側面は、治療剤を製造するための前記抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントの使用を提供する。

また、本発明の一側面は、前記抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメントの有効量を、治療を必要とする患者に投与することを含む、治療方法を提供する。

【実施例】

50

【0061】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0062】

(抗原作製)

[発現株の決定]

NAP22 (neuronal axonal membrane protein 22 kDa: 脳に特異的に発現しているミリスチル化蛋白質) の発現には、pET14b vector にラット由来 NAP22 遺伝子の挿入されたプラスミド (pET14b__NAP22) を持つ大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いた。pET14b__NAP22 で形質転換した BL21 (DE3) 株を 100 μg/mL のアンピシリン (以下「Amp.」と記す。) を含む LB プレート (以下、LBA プレートと記す。) で 37 °C、一晩培養した。

10

生育したコロニーのうち、5つを pick up し、100 μg/mL の Amp. を含む LB 培地 (以下、LBA 培地と記す。) 5 mL で 37 °C、一晩培養した。各前培養液から、1) プラスミド抽出、2) グリセロールストック作製、3) 発現確認を行った。

【0063】

1) プラスミド抽出

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega 社) を用いて、上述した前培養液 2 mL 分のプラスミドを抽出した。1% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い 5 つのコロニーすべてからプラスミドが抽出されていることを確認した。

20

【0064】

2) グリセロールストック作製

あらかじめ 15 分間の UV 照射により滅菌したグリセロールを終濃度 15% になるように各前培養液と混和し、20 μL x 10 本で分注し -80 °C で保存した。

【0065】

3) 発現確認

5 つのコロニーの各前培養液 100 μL をそれぞれ LBA 培地 5 mL に加え、30 °C で培養した。OD₆₀₀ = 0.84 で、誘導前培養液 1 mL を取り分けた後、IPTG を終濃度 1.0 mM となるよう加えた。さらに 8 時間、30 °C で培養し、その後、誘導後菌体として 1 mL 分の菌体を 12,000 rpm、3 min、4 °C で回収した。先に取り分けた誘導前培養液 1 mL についても同様の方法で誘導前菌体を回収した。

30

回収した誘導前・後菌体それぞれを 60 μL cell lytic B (SIGMA 社) で懸濁し、12,000 rpm、10 min、4 °C で培養上清を回収した。続いて、95 °C、15 min で上清を煮沸し、生じた沈殿を 12,000 rpm、15 min、4 °C の遠心により除去した。これを改めて誘導前・後サンプルとし、発現量を 12.5% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって確認した。

結果を図 4 に示す。図 4 より、最も多く発現している clone 2 を NAP22 の発現株とし、大量発現を行った。

40

【0066】

[NAP22 の大量発現]

発現株となるコロニーのグリセロールストック 10 μL を LBA 培地 3 mL に加えた。37 °C、一晩培養した後、この前培養液 2 mL を LBA 培地 200 mL に加え、30 °C で本培養を行った。4 時間後、誘導前培養液 2 mL を取り分けた後、終濃度 1 mM となるよう IPTG を加え、さらに 8 時間、30 °C で培養を続けた。その後、10,000 rpm、15 min、4 °C で菌体を回収し誘導後菌体とした。

【0067】

[NAP22 の精製]

NAP22 の精製には疎水性クロマトグラフィーを利用した。上記の手順に従い、200

50

mL LBA培地でNAP22を発現させ、10,000rpm、15min、4℃で菌体を回収した。この培養液200mL分の誘導後菌体を12mLのTEG溶液(10mM Tris-HCl、0.2mM EGTA、pH7.5)で懸濁した。BRANSON SONIFIER 250を用いてDuty Cycle: 50%、Output control: power 4、5min sonication 2.5min intervalを氷上にて3回繰り返すことで、菌体を破碎した。12,000rpm、30min、4℃で遠心し、上清を回収した。

続いて、終濃度2.5%で過塩素酸を添加し、氷上で10min incubateした。12,000rpm、30minで遠心し、上清を回収した。この上清に80%飽和硫酸アンモニウム溶液となるように、硫酸アンモニウムを加えた。4℃で一晩攪拌しながら硫酸沈殿を行い、10,000rpm、60minで遠心した。沈殿を回収し、40%飽和の硫酸アンモニウムを加えた40%飽和硫酸アンモニウムTEG溶液で可溶化した。この可溶画分を精製前サンプルとし、AKTAPrime(GE Healthcare社)を用いてFPLCにかけた。

精製にはHiPrep Phenyl FF(high sub)16/10カラム(GE Healthcare社)を用いた。あらかじめ40%飽和硫酸アンモニウムTEG溶液で平衡化した本カラムに5mLの精製前サンプルをインジェクトし、40%飽和硫酸アンモニウムTEG溶液を流速1mL/min、10min流し、洗浄した。Elution bufferとして0%飽和硫酸アンモニウムTEG溶液を調製し、流速1mL/min、30minで硫酸アンモニウムの割合を40%から0%へと段階的に減少させることで、タンパク質を溶出した。FPLC後、吸光度の値からタンパク質を含むと考えられるfractionに関して12.5%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。

結果を図5に示す。図5中、矢印で示したバンドがNAP22を示す。シングルバンドが確認されたfraction110~120の画分がタンパク溶液として使用可能であると考え、この区間の画分を精製NAP22として回収した。

精製が確認されたfractionを回収し、Amicon Ultra4、10,000MWCO(Millipore社)を用いて8,000rpm、4℃でTris緩衝液からPBS緩衝液へのbuffer置換と濃縮を行った。濃縮後、advanced protein assay kit(cytoskeleton社)を用いて、bradford法によりタンパク質の濃度を定量した。

【0068】

[myrNAP22の作製]

myrNAP22はNAP22とN-myristoyl transferase(以下NMTと略す。)の共発現株を構築し、作製した。

上記3)発現確認により最も発現量の多いとされたNAP22発現株にyeast N-myristoyl transferase cDNAを組み込まれたpBB131ベクターを導入した。

【0069】

上記3)発現確認により最も発現量の多いとされたNAP22発現株をコンピテントセル化した。

NAP22発現株のグリセロールストックを起こし、LBAプレートで37℃、一晩培養した。プレート上で生育した直径2~3mmのコロニーを一つpick upし、50mLのSOB培地(組成は表1参照。)で18℃、200rpmで培養した。40時間後、 $OD_{600} = 0.60$ で培養を止め、氷上で10min冷やした。4℃、3,000rpm、10minで遠心し、菌体を回収した。続いて、氷冷したTransformation buffer20mLで菌体を懸濁、on iceで10min incubateした後、4℃、3,000rpm、10minで遠心し、上清を除去した。再び5mLのtransformation bufferにて菌体を懸濁し、終濃度7%のDMSOを加えた後、on iceにて10min静置した。その後、100μLずつに

10

20

30

40

50

分注し、液体窒素にて瞬間冷凍させ、 -80°C で保存した。

尚、Transformation bufferは表2の組成をKOHでpH6.7~6.8に調整し、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.45g添加し、milliQで500mLにメスアップし、フィルター滅菌して調製した。

【0070】

【表1】

SOB培地	
Bacto trypton	20g
Bacto Yeast Extract	5g
5M NaCl	2mL (final 10mM)
2M KCl	1.25mL (final 2.5mM)
milliQ	Up to 1000mL
total	1000mL
使用直前に 2Mg^{2+} を100倍希釈で加える	

10

【0071】

【表2】

Transformation buffer	
PIPES	1.5g
CaCl_2	1.1g
KCl	9.3g
milliQ	Up to 400mL

20

【0072】

[発現株の構築]

このコンピテントセルにyeast N-myristoyl transferase cDNAが組み込まれたpBB131ベクター(pBB131_yNMT)をヒートショック法にて導入した。

30

$1\mu\text{L}$ のpBB131_yNMTと $20\mu\text{L}$ のNAP22発現株コンピテントセルを混和した。 30min 、on iceにて静置した後、 42°C 、 45sec でインキュベートし、ただちに 2min 、on iceに静置した。 4 倍量のLB培地を加えて混合し、 37°C 、1時間で振盪培養した。培養後、 $50\mu\text{L}$ を $50\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含むLBAプレート(以下、「LBAKプレート」と記す。)、残り $50\mu\text{L}$ をLBAプレートにまき、 37°C 、一晩培養した。コントロールとして、形質転換していないNAP22発現株コンピテントセル $20\mu\text{L}$ を、LB培地 $80\mu\text{L}$ で希釈した後、LBAK、LBAプレートに各 $50\mu\text{L}$ ずつまき、同様に 37°C 、一晩培養した。

生育したコロニーを5つpick upし、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含むLBA培地(以下、「LBAK培地」と記す。)2mLで 37°C 、一晩培養した。各前培養液から

40

1)プラスミド抽出、2)グリセロールストック作製、3)発現確認を行った。

【0073】

1)プラスミド抽出

前培養液1mLを用い、上記と同様の方法で抽出、アガロース電気泳動を行い確認した。

【0074】

2)グリセロールストック作製

各前培養液 $140\mu\text{L}$ を用い、上記と同様の方法で行った。

【0075】

3)発現確認

50

5つのクローンの各前培養液400 μ LをそれぞれLB AK培地20mLに加え、30で培養した。O.D₆₀₀ = 0.89で、誘導前培養液2mLを取り分けた後、IPTGを終濃度1.0mMとなるように加えた。さらに8時間、30で培養し、その後、誘導後菌体として18mL分の菌体を12,000rpm、15min、4で回収した。

回収した誘導後菌体を表3で示したInitial buffer 1.2mLで懸濁した後、懸濁液を600 μ Lずつエッペンドルフチューブに分注した。BRANSON SONIFIER 250を用いてDuty Cycle: 50%、Output control: power 3、30min sonication 1min intervalを2回繰り返した。これを12,000rpm、10min、4で遠心し、培養上清を回収した。これを誘導後サンプルとした。

誘導前培養液2mLからは12,000rpm、5min、4の遠心処理により、誘導前菌体を回収した。240 μ L cell lytic Bを加え、ピペティングにより菌体を破碎した後、2,000rpm、5min、4で培養上清を回収し誘導前サンプルとした。

5つのクローンに関して、上記のサンプルを調製し、myrNAPの発現を12.5%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにて確認した。結果を図6に示す。コントロールのバンドを基準にmyrNAP 22と考えられるバンドは矢印で示したものである。誘導をかけたことによる発現量をもっとも高いと考えられるのはclone 2であった。

このclone 2をmyrNAP 22発現株の候補とした。

【0076】

【表3】

Initial buffer

50mM Tris (pH7.5)
2mM EDTA
100mM NaCl
0.2mM PMSF

【0077】

[ミリスチル化の確認]

この候補株で発現したタンパク質がミリスチル化されているかを、MALDI-TOF MSによる質量分析で確認した。図7中、Aは、NAP 22の結果を示し、Bは、myrNAP 22の結果を示す。NAP 22で確認されたピークからの213.5Da (ミリスチル基の分子量に相当する)のずれを考慮すると、Bのピークはミリスチル化されたNAP 22と考えるのが妥当である。

【0078】

[myrNAP 22の大量発現]

上記でタンパク質の発現とそのミリスチル化が確認された株を用いて、200mLスケールでmyrNAP 22を大量発現させた。myrNAP 22発現株のグリセロールストックを起こし、LB AK培地3mLに植菌し、37、一晩培養した。この前培養液をLB AK 200mLに加え、30、4時間培養した。終濃度1mM IPTGで発現誘導をかけ、その後8時間培養を続けた。

12,000rpm、15min、4で遠心し、菌体を回収した後、12mLのinitial bufferを加え、上記と同様の方法でsonicationを行った。回収した可溶画分を95、15minで上清を煮沸し、生じた沈殿を12,000rpm、15min、4の遠心により除去した。さらに、終濃度10mMとなるようCaCl₂を加え、12,000rpm、15min、4の遠心により、上清をタンパク質溶液として回収した。そのうち6mL分のタンパク質溶液に関して、透析によりbufferをPBS緩衝液へと置換した。その後、この6mL誘導後サンプルをAmicon Ul

tra15、10,000 MWCOを用いて8,000rpm、15min、4で1mLに濃縮した。これをPBS系誘導後サンプルとした。一方、透析を行わなかった6mLタンパク質溶液に関してもAmicon Ultra15、10,000 MWCOを用いた濃縮を同様に行い、Tris系誘導後サンプル1mLを回収した。大量培養によるmyrNAP22の発現とそのミリストイル化の確認は、SDS-PAGEと質量分析を用いて行った。

【0079】

(ラビット免疫ライブラリーの作製)

[total RNAの抽出]

ミリストイル基は、分子量が小さく、かつ生体内に含まれるものであるため、ミリストイル基をそのまま免疫しても、抗原性を示さない。そこでKLH(Keyhole limpet hemocyanin、450kDa-13000kDa)にミリストイル基をコンジュゲートさせた。ミリストイル基は結合するタンパク質のN末端がグリシンでないと結合しない、またKLHも被結合分子がペプチド又はタンパク質でないと結合しないことから、条件を満たすようにリンカー用のペプチドを挟んで両者をマレイミド法で結合させた。リンカーペプチドにはミリストイル化タンパク質の中で天然には存在しない配列を設計した。具体的には、ミリストイル化タンパク質のN末端の配列傾向、KLH結合用にC末端はシステインにする必要があることを踏まえて下記のように設計した。

myristoyl-GKRKC-KLH(myrKLHと略す。)

【0080】

myrKLHによる免疫を7回行ったラビット(SPF Japanese White rabbit)から脾臓を抽出し、すぐにRNAlater RNA Stabilization Reagent(QIAGEN社製)により安定化した後、ハサミを用いて細かくした。抽出した脾臓の一部(50mg)からRNeasy kit(QIAGEN社製)を用いてtotal RNAを抽出した。吸光度にて抽出したtotal RNAの濃度を見積もった。

【0081】

[cDNAの合成]

抽出したtotal RNA 30μgをSuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen社製)とrandom primer(Invitrogen社製)を用いてcDNAを合成した。

【0082】

【表4】

total RNA 溶液	70 μL
random primer (1 μg/μL)	1.5 μL
10mM dNTP mix	6 μL
DEPC water	0.5 μL
Total	78 μL

【0083】

表5に示す組成の溶液を混合し、65 5分、氷上2分インキュベートした。

【0084】

【表5】

5×First-strand buffer	24 μL
0.1M DTT	12 μL

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

表 4 に示す組成の溶液に、表 5 に示す組成の溶液をさらに混合し、42 2分インキュベートした。次いで、この溶液に逆転写酵素 6 μL をさらに混合し、42 50分、70 15分、氷上5分インキュベートした。次いで、RNAを分解するために、この溶液に Ribonuclease H (Invitrogen社製)を加え、37 20分インキュベートした。次いで、合成したcDNA溶液を、QIAquick purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製した。

【 0 0 8 6 】

[PCR法の最適サイクル数の検討]

合成したcDNAを鋳型として用い、各抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR法にて、各抗体遺伝子を増幅した。その際に最適なサイクル数を見積もった。各特異的プライマーはそれぞれ可変領域の両端にあるV遺伝子群(V primer)、J遺伝子群(J primer)に共通する配列をミックスしたものである。

各遺伝子の増幅におけるサイクル数を24サイクルから36サイクルに振り分けてPCR反応を行い、増幅産物をそれぞれアガロース電気泳動で確認した。PCR反応における反応液の組成を表6に示し、PCR反応の反応条件を表7に示す。

【 0 0 8 7 】

【表6】

溶液組成	
cDNA溶液	1 μL
dNTP mix	16 μL
10×PCR Buffer	10 μL
V primer	1 μL
J primer	1 μL
LA Taq (TaKaRa社製)	1 μL
MilliQ	70 μL

【 0 0 8 8 】

【表7】

反応条件		H chain	k chain	λ chain
94℃	3 min	1 cycle	1 cycle	1 cycle
94℃	1 min	24-36 cycle	24-36 cycle	24-36 cycle
65℃	2 min			
72℃	1 min			
4℃	∞	1 cycle	1 cycle	1 cycle

【 0 0 8 9 】

[コントロールによるレポーターチェック]

逆転写したcDNAが十分なレポーターを保有しているかを予測するためにレポーターチェックを行った。各鎖に特異的なプライマーを用いて、最適サイクル数でそれぞれ抗体遺伝子を増幅した。

各PCR反応溶液を1/5等量の6×Loading Dye (TaKaRa社製)と混ぜ、2%アガロースゲルで電気泳動し、コントロールとDNA量を比較することでレポーターを見積もった。

【 0 0 9 0 】

[PCR法による抗体遺伝子の増幅]

十分なレポーターを含んでいることを確認した上で検討した最適サイクル数により抗体遺伝子を増幅した。PCR反応における反応液の組成を表8に示し、PCR反応の反応

条件を表9に示す。

【0091】

【表8】

溶液組成	
cDNA溶液	10 μ L
dNTP mix	160 μ L
10 \times PCR Buffer	100 μ L
V primer	1 μ L
J primer	10 μ L
LA Taq (TaKaRa社製)	10 μ L
MilliQ	700 μ L
Total	1000 μ L

10

【0092】

【表9】

反応条件		Hchain	kchain	λ chain
94 $^{\circ}$ C	3min	1 cycle	1 cycle	1 cycle
94 $^{\circ}$ C	1min	26 cycle	26 cycle	29 cycle
65 $^{\circ}$ C	2min			
72 $^{\circ}$ C	1min			
4 $^{\circ}$ C	∞	1 cycle	1 cycle	1 cycle

20

【0093】

各PCR反応液をフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈殿をした後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて精製した。各反応溶液を1/5等量の6 \times Loading Dye (TaKaRa社製)と混ぜ、2%アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドがあることを確認した。

【0094】

30

[軽鎖ライブラリーの作製]

精製した抗体遺伝子の軽鎖(k鎖、鎖)、及び図3に記載のファージディスプレイ用の抗体発現ベクターをNcoI、AscIで制限酵素処理をした。各抗体遺伝子4 μ gに、10 \times bufferを10 μ L、NcoI、AscIを各1.2 μ L加え37 $^{\circ}$ で2時間インキュベートした。vector30 μ gに、10 \times bufferを18 μ L、NcoI、AscIを各9 μ L加え37 $^{\circ}$ で2時間インキュベートした。

制限酵素処理後の抗体遺伝子をQIA PCR purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、制限酵素処理後のベクターをQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、アガロース電気泳動にて切断を確認した。

40

制限酵素処理済みのサンプルを、以下の反応組成で15 $^{\circ}$ 、3時間、ライゲーションを行った。

【0095】

【表 10】

	k	λ
vector	180 μ L (2.9 μ g)	60 μ L (0.9 μ g)
抗体遺伝子	18 μ L (1.2 μ g)	7 μ L (400 ng)
10×Buffer	22 μ L	8 μ L
T4 DNA Ligase	1.5 μ L	1 μ L
MilliQ water	—	up to 80 μ L

10

【0096】

k鎖、鎖のライゲーション産物をアガロース電気泳動にて確認をし、エタノール沈殿を行った。そのサンプル各5 μ LとDH12S 100 μ Lを混合し、エレクトロポレーション法にて(25 μ F、2.5 kV、200)形質転換し、2×YT培地10 mLで37 1時間培養し、その一部(100 μ L、10 μ L、1 μ L)をLBGAプレートにまき、37 一晚インキュベートした。また、10 mL培養液に2×YTGA 190 mLを加え30 一晚培養した。

用いた培地の組成を以下に示す。

2×YT: triptone 16 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g (1 L)

2×YTGA: 2×YT + Amp final 20 μ g/mL, Glucose final 1%

LBプレート: triptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g (1 L)

LBGAプレート: LBプレート + Amp final 20 μ g/mL, Glucose final 1%

【0097】

各培養液200 mLからMaxi prep (QIAGEN社製)を用いてプラスミドを抽出し、アガロース電気泳動で目的のバンドを確認し、これをそれぞれラビット免疫k鎖、鎖ライブラリープラスミドとした。プレートのコロニー数からレポーターを見積もり、コロニーを10個ピックアップして、選択したコロニーから抽出したプラスミドDNAの塩基配列を解析した。シーケンス反応に用いた溶液の組成を表11に示し、シーケンス反応の条件を表12に示す。

【0098】

【表 11】

溶液組成	
Ready Reaction Premix	0.4 μ L
Big Dye Sequencing Buffer	1.8 μ L
1 μ M forward primer	3.2 μ L
50 μ g/ml Template	100 ng - 300 ng
MilliQ water	up to 10 μ L
Total	10 μ L

40

【0099】

【表 1 2】

反応条件		
96℃	1 min	1 cycle
96℃	10 sec	25 cycle
50℃	5 sec	
60℃	4 min	
4℃	∞	1 cycle

【0100】

10

[重鎖軽鎖抗体ライブラリーの作製]

精製した重鎖遺伝子 (H鎖) と軽鎖 (k鎖、λ鎖) ライブラリーを Sfi I で 50、2 時間制限酵素処理をした。具体的には、4 μg 重鎖遺伝子に、10 × buffer を 10 μL、Sfi I を 6 μL 加え、50 で 2 時間インキュベートしアガロース電気泳動にて切断を確認した。また、軽鎖 k 鎖遺伝子と軽鎖 λ 鎖遺伝子を 9 : 1 に混合した軽鎖ライブラリー 5 μg に、10 × buffer を 20 μL、Sfi I を 10 μL 加え、50 で 2 時間インキュベートしアガロース電気泳動にて切断を確認した。

さらに重鎖遺伝子、軽鎖ライブラリーに Xho I を 5 μL 加え 37 2 時間インキュベートし、アガロース電気泳動にて切断を確認した。軽鎖ライブラリーについては、制限酵素処理後、エタノール沈殿をし、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) で精製した。軽鎖ライブラリーに重鎖遺伝子を組み込むために、以下の反応組成で 15、3 時間、ライゲーションを行った。

20

【0101】

【表 1 3】

軽鎖ライブラリー	0.6 g
重鎖遺伝子	2 μg
10 × Buffer	5 μL
T4 DNA Ligase	5 μL
MilliQ water	up to 50 μL

30

【0102】

重鎖のライゲーション産物を電気泳動にて確認をし、エタノール沈殿を行った。そのサンプル 19 μL と DH12S 100 μL を混合し、エレクトロポレーション法にて形質転換し、2 × YT 培地 1000 mL に加え、37 1 時間培養し、その一部 (100 μL、10 μL、1 μL) を LBGA プレートにまき、37 一晩インキュベートした。また培養液に Glucose final 1%、Ampiciline final 20 μg/ml になるように加え、30 一晩培養した。プレートのコロニー数からレパトリ数を見積もり、コロニーを 10 個ピックアップして、選択したコロニーから抽出したプラスミド DNA の塩基配列を解析した。シーケンス反応に用いた溶液の組成は、表 1 1 と同様であり、シーケンス反応の条件は、表 1 2 と同様である。

40

【0103】

[プラスミド抽出]

上記 [重鎖軽鎖抗体ライブラリーの作製] において、30 一晩培養した培養液 200 mL から、Maxi prep (QIAGEN 社製) カラムを 1 本使用してプラスミドを抽出し、これをラビット抗体ライブラリープラスミドとした。

【0104】

[グリセロールストックの作製 1]

上記 [重鎖軽鎖抗体ライブラリーの作製] の培養液のうち 40 mL を 8000 rpm、4、10 分遠心し菌体を回収した。上清を捨て 40% グリセロールを 500 μL 加えて

50

懸濁し - 80 で保存した。同じものを計4本作り、これをラビット抗体ライブラリーグリセロールストックとした。

【0105】

[cp3 formの作製1]

上記[重鎖軽鎖抗体ライブラリーの作製]において、一晚培養した培養液0.5mLを2xYTAI 10mLに加え30 一晚培養した。この培養液を10000rpm、4、10分遠心し上清を回収し、飽和硫酸を同量加え、10000rpm、4、10分遠心し上清を完全に捨てきり硫酸沈殿を行った。沈殿をNaN₃ (final 0.05%)入りPBS 1mLで懸濁、10000rpm、4、10分遠心し上清を回収した。これをラビット抗体ライブラリーcp3 form溶液とした。

10

用いた培地及び試薬の組成を以下に示す。

培地組成

2xYTAI: 2xYT + Ampiciline final 20µg/ml, Isopropyl - D - 1 - thiogalactopyranoside (IPTG) final 0.5mM

試薬組成

PBS: NaCl (final 137mM), KCl (final 2.7mM), NaHPO₄ (final 10mM), KH₂PO₄ (final 1.76mM) pH 7.4

20

【0106】

[ファージ抗体の作製1]

上記[重鎖軽鎖抗体ライブラリーの作製]において、一晚培養した培養液1mLを2xYT培地20mLに加えOD = 0.56になるまで37 にて振盪培養し、M13ヘルパーファージKO7を1mL加え1.5時間感染させた。その後、終濃度50µg/mLカナマイシンを加え、感染効率の確認のため10µLの培養液を取り分けた後、30、一晚培養した。取り分けた培養液は希釈系列を作製し、1/10µL分、1/100µL分、1/1000µL分でそれぞれ一晚、37 LBAKプレートにて培養した。

200mL液体培地から10,000rpm、4、10minの遠心により菌体を除去し、ファージ抗体を含む培養上清を回収した。20%ポリエチレングリコール(以下「PEG」と略す。)を4mL加え、ボルテックスにより激しく混和した後、10min、Room Temperature(以下「R.T.」と略す。)で静置した。続いて、10,000rpm、4、10minの遠心により上清を除去した後、再度10,000rpm、4、5minで上清を完全に取り除いた。残った沈殿を0.05% NaN₃ / PBSにて400µLで懸濁し、溶解しなかった不純物を12,000rpm、4、5minの遠心で除去した。回収した上清を0.45µmのフィルターで滅菌し、これをファージ抗体溶液とした。

30

この溶液に含まれるファージ抗体のタイターを確認した。まず、菌株DH12Sを2xYT培地でO.D₆₀₀ = 0.5まで培養した。続いて、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹倍希釈したファージ抗体溶液10µLを、DH12S(O.D₆₀₀ = 0.5)の菌液1mLにそれぞれ加え、ファージを大腸菌に感染させた。1.5時間後、各感染後菌液50µLずつをLBAプレートにまき、37、一晚培養した。

40

用いた培地及び試薬の組成を以下に示す。

培地組成

2xYTAI: 2xYT + Ampiciline final 20µg/mL, Kanamycine final 50µg/mL

LBAK: LB培地 + Ampiciline final 20µg/mL, Kanamycine final 50µg/mL

試薬組成

PEG: PEG6000 20%, NaCl 2.5M

50

【0107】

[グリセロールストックの作製]

上記の前培養液 140 μ L を用いてグリセロールストックを作製した。作製方法は前記と同様であった。

【 0108 】

[抗原ビーズの作製]

スクリーニングを行うために作製した myrNAP22 を用いた抗原ビーズを作製した。ストレプトアビジンを介したビーズへの固定化のために、myrNAP22 をビオチン化した。

【 0109 】

[myrNAP22 のビオチン化]

ビオチン化は Biotin Labeling kit - NH₂ (DOJINDO 社) を用いて行った。上記 SDS-PAGE の結果をもとに、myrNAP22 の濃度を見積もり、約 50 μ g の myrNAP22 を含むサンプル溶液を、PBS で希釈した 1/10 \times W S buffer 200 μ L と混和した。あらかじめ純水で湿らせておいた Amicon Ultra4、10,000 MWCO を用いて、5,000 g、R.T.、15 min で遠心し、不純物除去・濃縮を行った。ろ液を捨て、再度同様の方法で洗浄した後、サンプル約 20 μ L を回収し、1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。

DMSO 10 μ L で付属の NH₂-Reactive Biotin を懸濁し、100 μ L reaction buffer と共に 10 μ L 全量をサンプルに添加した。37、12 min、incubate した後、1 \times W S buffer 200 μ L でピペティングし、あらかじめ純水で湿らせておいた Amicon Ultra4、10,000 MWCO を用いて 5,000 g、R.T.、15 min で遠心した。ろ液を破棄し、サンプルを回収し、再度同様の方法で洗浄した後、約 20 μ L のサンプルを回収し、W S buffer を用いて 200 μ L までメスアップした。これをビオチン化 myrNAP22 (以下、「Bio-my rNAP22」と記す。) とした。

【 0110 】

[ビーズへの固定化]

Invitrogen 社の Dynabeads (登録商標) MyOne (商標) Streptavidin T1 (10 mg/mL) 250 μ L を用意した。マグネットトラッパーを用いて上清を破棄した後、0.05% Tween in TBS (以下「TBS-T0.05」と記す。) 400 μ L を用いて懸濁、上清を破棄した。これを 2 回繰り返しビーズを洗浄した後、TBS-T0.05 400 μ L で懸濁し、上記で作製した Bio-my rNAP22 溶液 10 μ L (= 約 3.5 μ g に相当) と混和した。4 で一晩回転攪拌した後、フリーのストレプトアビジンをマスクするために、ビオチンが付加された 1 mM GAP43-pep (Biotin-HHHHHH-MLCCMRRTK) を 6 μ L 加えた。1 時間、4、回転攪拌した後、マグネットトラッパーを用いて、未反応物を除去した。これを素通り画分とし、続いて、0.05% Tween in PBS (以下「PBS-T0.05」と記す。) 400 μ L で懸濁、マグネットトラッパーを用いて洗浄という操作を 2 回繰り返した。各ろ液を画分 wash1・wash2 として回収した。最終的にビーズを 2% BSA in PBS 400 μ L で懸濁し、これを myrNAP22 の抗原ビーズとした。

【 0111 】

[スクリーニング]

スクリーニング前の presoaking solution を表 14 のように調製し、1 時間、R.T.、回転攪拌にて反応させた。

【 0112 】

10

20

30

40

【表 1 4】

P r e s o a k i n g s o l u t i o n	
2% BSA	150 μ L
GAP 43由来ペプチド	300 μ L
ファージ抗体ライブラリー	100 μ L
1% Triton-X 100 in PBS	up to 1500 μ L
Total	1500 μ L

【0113】

10

1時間の反応の後、作製したmyrNAP22抗原ビーズを400 μ L加え、1時間、R.T.、回転攪拌でファージ抗体ライブラリーと反応させた(図8参照)。終了後、マグネットトラッパーを用いてる液を捨て、続いて1% Triton X-100 in PBS(以下「PBS-TX1」と略す。)700 μ Lで懸濁し、る液を捨てた。この操作を5回繰り返し洗浄した後、700 μ LのPBSで懸濁した。

平行して菌株DH12Sを2 \times YT培地でO.D₆₀₀ = 0.5まで培養した。この培養液1 mLを、ライブラリーと反応したmyrNAP22抗原ビーズ700 μ Lと試験管内で混和させ、1時間、37、180 rpmで振盪培養した。1時間後、100 mL 2 \times YTA + Glucose培地(以下YTGAと略す。)に移し、一部をプレート培養用に取り分けた後、一晚、130 rpm、37で振盪培養した。プレート培養は100 mL培地から50 μ L、5 μ L、1 μ Lで取り分け、それぞれをLBAプレートで37、一晚培養した。

20

培養終了後、100 mLを次の3つの用途にそれぞれ取り分けた。すなわち、1)グリセロールストック、2)ファージ抗体調整、3)抗体タンパク質発現である。

【0114】

1) グリセロールストック作製

上記の培養液60 mLを取り分け、2本のグリセロールストックを作製した。30 mL \times 2本分の培養液を10,000 rpm、4、15 minで遠心し、菌体を回収した。回収した菌体を50%グリセロール500 μ Lで激しく懸濁し、これを1stスクリーニングライブラリグリセロールストックとして、-80で保存した。

30

【0115】

2) ファージ抗体調整

上記の培養液500 μ Lを5 mL 2 \times YT培地に移し、そこにM13KO7ヘルパーファージ50 μ Lを加え1時間、37で感染させた。その後、全量40 mLとなるように2 \times YTAを加え、さらに終濃度50 μ Mカナマイシンを添加し、30、一晚震盪培養した。

培養終了後、10,000 rpm、4、15 minで遠心し、上清を回収した。20% PEGを5 mL添加し、vortexにて激しく混和した。5 min、R.T.にてincubateした後、10,000 rpm、4、10 min遠心し、上清を除去した。再度、8,000 rpm、4、5 minで遠心し、上清を完全に除去した。生じた沈殿物を0.05% NaN₃ in PBS 1 mLで懸濁し、1.5 mLエペンドルフチューブに移した。これを12,000 rpm、4、10 minで遠心し、上清を回収した。この上清を0.45 μ mのフィルターを通して滅菌し、これを1stスクリーニングファージ抗体とした。

40

【0116】

この一連のスクリーニング操作を3回繰り返し、それぞれを1st、2nd、3rdスクリーニングとした。各スクリーニング段階でそれぞれの培養液を用いて、1)グリセロールストック作製、2)ファージ抗体調整を行った。

【0117】

[モノクローナル抗体作製]

50

各スクリーニングでのプレート培養からモノクローナル抗体の作製を行った。各スクリーニング段階のプレート培養にて生育したコロニーをpick upし、各cp3 formモノクローナル抗体の発現とその一部の抗体遺伝子のアミノ酸配列の決定を試みた。

【0118】

[cp3 form発現]

ファージの感染した大腸菌の一部をプレート培養した。各プレートからコロニーをpick upし、それぞれを2×YTA培地 2 mLで、37℃、一晚培養した。各前培養液50 μLを終濃度1 mMのIPTGを含む2×YTA培地(以下2×YTA Iと略す。) 1 mLに継代し、さらに30℃、一晚培養した。また、各前培養液70 μLを50%グリセロール30 μLと混和し、各モノクローナル抗体グリセロールストックとした。

12,000 rpm、4℃、5 minの遠心により上清を回収し、各cp3 formモノクローナル抗体溶液とした。続いて、硫酸沈殿による濃縮を行った。サンプルと等量の飽和硫酸を加え、vortexを用いて激しく混和した後、5 min、R.T.でincubateした。12,000 rpm、4℃、7 minで遠心し、生じた沈殿をサンプルの1/10量の0.05% NaN₃ in PBSで懸濁した。再び12,000 rpm、4℃、7 minで遠心し、不溶物を除去し、これを最終的なcp3 formモノクローナル抗体溶液とした。

【0119】

[ELISAを用いた発現確認]

発現させたcp3 formモノクローナル抗体溶液、各50 μLをそれぞれPBS 50 μLと混和し、Nunc Plate F8WELLMOD Maxisorp(Thermo scientific社)の各wellにそれぞれ4 μL、一晚、震盪させながらコーティングした。

終了後、各抗体溶液を破棄し、PBSで各wellの洗浄を2回行った。続いて、2% BSA + 0.05% NaN₃ in PBS 200 μLを添加し、37℃、1時間、静置してブロッキングした。ブロッキング終了後、PBSで3回洗浄し、一次抗体として1/2000× cp3 antibody in PBST 0.05 100 μLを添加した。1時間、R.T.で振盪しながら反応させた後、抗体溶液を破棄し、PBSで3回洗浄した。続いて、二次抗体として1/4000× IgG(H+L chain)(Rabbit)pAb-HRP(MBL社) in PBST 0.05 100 μLを添加し、1時間、R.T.で振盪しながら反応させた。抗体溶液を破棄し、PBSで3回洗浄した後、検出のためにOPD tabletを用いた基質溶液を作製し200 μLを各wellに添加した。添加してから5分後、2N H₂SO₄ 75 μLを添加することで酵素反応を停止し、490 nmの発色をBioRad micro platerで検出した。

1stスクリーニングから53個、2ndスクリーニングから47個、3rdスクリーニングから8個、計108個をモノクローナル化した。

【0120】

[SDS-PAGEを用いた発現確認]

発現量を見積もるために、発現したcp3 formモノクローナル抗体を12.5%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、SYPRO Ruby(invitrogen社)染色を行った。泳動の終わったゲルを取り出し、表12に示す固定液に浸し30 min、2回ゲルを振とうした。milliQで10 min、振とうしながらゲルをゆすいだ後、SYPRO Rubyに浸し、遮光下で一晩振とうした。ゲルを10 min、milliQでゆすぎ、遮光下で表15に示す脱色液に浸しながら30 min振とうした。遮光下でmilliQに浸し10 min洗浄し、Ettan DIGE(GE Healthcare社)によりゲルを撮影した。

【0121】

10

20

30

40

【表 15】

	固定液	脱色液
メタノール	500 ml	100 ml
酢酸	70 ml	70 ml
milliQ	430 ml	830 ml
Total	1000 ml	

10

【0122】

[プラスミド抽出]

作製したグリセロールストックを起こし、 $2 \times$ YTA 5 mL で 37 °C、一晩振盪培養した。終了後、培養液 2 mL 分の菌体を 12,000 rpm、4 °C、7 min の遠心により回収し、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドを抽出した。プラスミドの抽出はアガロース電気泳動で確認した。

【0123】

[アミノ酸配列決定]

アガロース電気泳動の結果をもとにプラスミドの濃度を見積もった。表 16 の組成で PCR 反応溶液を調製し、表 17 の反応条件で PCR を行うことで、抗体遺伝子を増幅させた。反応後、125 mM EDTA 5 μ L、100% EtOH 60 μ L を添加しタッピングした。20 min、-20 °C でインキュベートし、12,000 rpm、20 min、4 °C で遠心分離して上清を取り除いた。70% EtOH 60 μ L を添加し、12,000 rpm、10 min、4 °C で遠心分離して再び上清を取り除いた。エッペンドルフチューブのフタを開けて、5 min 室温で乾燥させ、ホルムアミド 20 μ L を添加、ピペティングした。95 °C、3 min でヒーティングブロックして、解析した。

20

【0124】

【表 16】

PCR 反応溶液	
Ready Reaction Premix	2 μ L
BIG Dye sequencing buffer	2 μ L
1 μ M forward primer	3.2 μ L
Template	150~300 ng
milliQ	up to 202 μ L
Total	202 μ L

30

40

【0125】

【表 17】

PCR 条件		
96℃	1 min	25 サイクル
96℃	10 sec	
50℃	5 sec	
60℃	4 min	
4℃	∞	

【0126】

10

[モノクローナル抗体の性能評価]

各 cp3 form モノクローナル抗体の特異性を評価するために ELISA を行った。上記で発現させた NAP22、myrNAP22 それぞれの抗原吸着量を確認した。発現させた NAP22、myrNAP22 について、それぞれ 10 μg、5 μg、2.5 μg、1.25 μg、0.675 μg、0.3375 μg のタンパク質を含む 100 μL PBS を調製し、Nunc Plate F8WELLMOD Maxisorp の各 well にそれぞれ 4、一晩、震盪させながらコーティングした。

終了後、各抗原溶液を破棄し、PBS で各 well の洗浄を 2 回行った。続いて、2% BSA + 0.05% NaN₃ in PBS 200 μL を添加し、37、1 時間、静置してブロッキングした。ブロッキング終了後、PBS で 3 回洗浄し、一次抗体として 1/100 x - NAP22 (M-65) : sc-66995 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY 社) in PBST 0.05 100 μL を添加した。1 時間、R.T. で振盪しながら反応させた後、抗体溶液を破棄し、PBS で 3 回洗浄した。続いて、二次抗体として 1/4000 x - IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP (MBL 社) in PBST 0.05 100 μL を添加し、1 時間、R.T. で振盪しながら反応させた。抗体溶液を破棄し、PBS で 3 回洗浄した後、検出のために OPD tablet を用いた基質溶液を作製し 200 μL を各 well に添加した。添加してから 5 分後、2 N H₂SO₄ 75 μL を添加することで酵素反応を停止し、490 nm の発色を BioRad micro plater で検出した。

20

1st ~ 3rd スクリーニングにおいて、発色強度比 (myrNAP / NAP) の高かったクローンの ELISA の結果を表 18 に示す。

30

【0127】

【表 18】

クローン ID	NAP	myrNAP	myrNAP / NAP
21	0.007	0.120	16.538
161	0.155	1.457	9.427
187	0.019	1.251	66.117

【0128】

40

[SPR法を用いた結合力評価]

抗体の抗原との結合力を定量するために、SPR法を用いた。解析には BIAcore-X (GE Healthcare 社) を用いた。リガンドには上記で精製した NAP22、myrNAP22 を用いた。濃度は NAP22 については SDS-PAGE と紫外吸収法、myrNAP22 については SDS-PAGE に加え Bradford 法を用いて算出した。アナライต์には、発色強度比 (myrNAP / NAP) の高かった上記 3 つのクローンの未精製 cp3 form モノクローナル抗体を用いた。cp3 form の濃度は、12.5% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、SYPRO Ruby 染色の結果から見積もった。アナライットのコントロールとして、抗体遺伝子をクローニングする前のベクター (pTZ19R_original) で形質転換された大腸菌でタ

50

ンパク質を発現させ、その l y s a t e を用いた。

【 0 1 2 9 】

[B I A c o r e 測定]

リガンドを結合させるセンサーチップは、アミノカップリング法で結合させる C M 5 を用いた。ランニングバッファーとして H B S (1 0 m M H E P E S 1 5 0 m M N a C l p H 7 . 5) を用いてシステムを置換した後、リガンド希釈用緩衝液の最適 pH を検討した。1 0 m M s o d i u m a c e t a t e p H 4 . 0 、 4 . 5 、 5 . 0 各固定化緩衝液でリガンド溶液を希釈し、1 0 μ L / m i n で流した。最も固定化量の多い緩衝液を最適 pH とした。1 0 0 m M N H S : 4 0 0 m M E D C = 1 : 1 混合液を 5 μ L / m i n で 1 4 分 7 0 μ L 流し、センサーチップ上のカルボキシル基を活性化させたのち、2 つの流路のうち一方に最適 pH の固定化緩衝液で希釈したリガンド溶液を 5 μ L / m i n 、 7 分、3 5 μ L 流し結合させた。リガンドが結合していることを確認した後、1 M e t h a n o l a m i n e h y d r o c h l o r i d e (p H 8 . 5) を 5 μ L / m i n 、 7 分、3 5 μ L 流し、ブロッキングをした。残るもう一つの流路はカルボキシル基の活性化の後、ただちにブロッキングを行いコントロール流路とした。続いて上述したアナライトを 2 0 μ L / m i n 、 3 m i n 、 6 0 μ L で流し、リガンドとの相互作用を測定した。3 m i n 後からは解離もモニタリングした。反応終了後は N a O H を 3 0 μ L / m i n 、 1 m i n 、 3 0 μ L 流すことでセンサーチップを再生した。

10

結果を図 9 ~ 図 1 1 に示す。また、各抗体の N A P 2 2 、 m y r N A P 2 2 それぞれに対する K D 値を表 1 9 に示す。このように、m y r N A P 2 2 に対して特異性の高い抗体が得られた。

20

【 0 1 3 0 】

【 表 1 9 】

クローンID	NAP22	myrNAP22
21	5.57×10^{-6}	5.11×10^{-9}
161	4.32×10^{-6}	4.26×10^{-6}
187	6.90×10^{-6}	1.79×10^{-8}

30

【 0 1 3 1 】

[c p 3 f o r m モノクローナル抗体を用いた w e s t e r n b l o t t i n g]

上述した c l o n e 2 1 , 1 6 1 , 1 8 7 を用いた W e s t e r n b l o t t i n g を行った。

未精製 N A P 2 2 、精製 m y r N A P 2 2 の 3 段階希釈系列を調製して 1 2 . 5 % アクリルアミドゲルで S D S - P A G E を行った。S D S - P A G E の間に、P V D F メンブレンをメタノールに 6 0 秒ほど浸したのち、m i l l i Q でゆすぎ、表 2 0 に示す組成の S e m i - W e t t r a n s f e r B u f f e r に一時間以上浸し、振盪した。泳動が終わったゲルを、t r a n s f e r B u f f e r に浸したろ紙とメンブレンで空気が入り込まないように挟み、2 5 V 、 1 0 0 m A / メンブレンの条件で 9 0 分間転写した。

40

【 0 1 3 2 】

【表 20】

Semi-Wet transfer buffer	
25mM Tris (pH8.3), 192 mM glycine	10ml
Methanol	15ml
milliQ	75ml
total	100ml

10

【0133】

転写の終わったメンブレンを0.05% Tween20 in TBS (以下「TBS-T0.05」と略す。)で5分間ゆすぎ、5% Skim-milk in TBS-T0.05で室温、1時間ブロッキングした。続いて5% skim milk in TBS-T0.05で5倍希釈した上記3つのクローンを一次抗体として用いて反応させた。二次抗体にはモノクローナル抗体のcp3を認識できる1/2000x - cp3 antibody in TBS-T0.05を用いた。この二次抗体はrabbit由来IgG型であるので、三次抗体に1/4000x - IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP (MBL社) in TBS-T0.05を用いることで、検出可能であった。また、NAP22, myrNAP22の存在を確認するために、1/100x - NAP22 (M-65) : sc-66995 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社) in TBS-T0.05を用いたWestern blottingも行った。この場合二次抗体には1/4000x - IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP (MBL社) in TBS-T0.05を用いた。抗体反応の後はその都度TBS-T0.05で10 min x 3回洗浄を行った。二次(三次)抗体反応後に、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE社)を用いて化学発光させ、image scanner ATTOを用いて発光を検出した。

20

結果を図12に示す。図12Aに示すように、コントロールとして行った - NAP22 antibody によるWestern blottingではNAP22、myrNAP22 どちらのレーンにも抗体が反応したバンドが検出された。

30

図12B~図12Dに示すように、本発明に係るモノクローナル抗体、特にclone 21や167ではミリスチル化を受けていないNAP22のレーンにはほとんどバンドが検出されず、myrNAP22に対する特異性が確認された。

また、上記3つのクローンについて全て遺伝子配列を確認したところ、4種類のクローンが得られたことが確認された。CDR領域の決定はIgG BLASTを参考にした。

クローン21のアミノ酸配列は配列番号7で表され、クローン161のアミノ酸配列は配列番号14で表され、クローン187のアミノ酸配列は配列番号21で表される。

【0134】

40

上記1st~3rdスクリーニングにおいて、発色強度比(myrNAP/NAP)の高かったクローンとして、クローン119に注目した。クローン119のELISAの結果を表21に示す。

【0135】

【表 21】

クローンID	NAP	myrNAP	myrNAP/NAP
119	0.148	0.920	6.216

【0136】

50

[抗体ビーズの調製]

図3に示した抗体発現ベクターには、3'末端にProtein Aをコードする配列が挿入されている(図3中、PAの部分)。そのため、この発現ベクターを用いて作製した抗体には、Fc部分のC末端側にProtein Aがついている。このProtein Aを介してIgGセファロースビーズにクローン119を結合させた。

詳細に説明すると、クローン119の発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌(JM-109)を前培養後、1Lの0.5mM IPTGを含む2xYT培地で30、12h培養した。培養液を遠心後、上清を回収し、硫酸沈殿で得られた沈殿をPBS、40mLに溶かして抗体溶液を得た。

次いで、IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare社製) 50 μ Lをカラムに充填し、先に得られた抗体溶液(40mL)を、全量、そのカラムに通して反応させて抗体ビーズを得た。

抗体ビーズを、SDS elution buffer (2% SDS, 100mM Tris-HCl pH7.5, 10% glycerol, 0.5mM EDTA, 100mM DTT, BPB)で溶出して、結合したクローン119の発現チェックとビーズへの結合量のチェックをSDS-PAGEにて行った。クマシー染色した結果を図13に示す。

図13中、レーン1は、ビーズに結合していたクローン119を示し、レーン2は、コントロールとして用いたビーズに結合していたコントロールクローン(ライブラリーからランダムにクローニングした抗体クローン)を示す。40kDaの位置にバンドが確認でき、2種類の抗体のバンドが同じ濃さであることから、等量のクローン119及びコントロールクローンをそれぞれのビーズに結合できたことが確認された。

【0137】

[免疫沈降]

得られた抗体ビーズが、抗原を免疫沈降できるかどうかの確認を行った。抗体ビーズ80 μ L(クローン119 4 μ g)を[myrNAP22の大量発現]で調製したリコンビナントmyrNAP22と4一晚反応させた後、遠心分離し、上清を用いて12.5%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。クマシー染色した結果を図14に示す。

図14中、レーン1は、クローン119を用いたものの上清を示し、レーン2は、コントロールクローンをを用いたものの上清を示し、レーン3は、インプットに用いたリコンビナントmyrNAPを示す。レーン3とレーン1を比較すると、レーン1のシグナル強度は、レーン3のシグナル強度の61%であった。一方、レーン2とレーン3を比較すると、レーン2のシグナル強度は、レーン3のシグナル強度の90%であった。即ち、クローン119を用いてインプットの約30%~40%のmyrNAP22抗原を免疫沈降できることが確認された。

【0138】

本実施例においてこのように特異性の高い抗体が多種類得られた理由として、ビーズスクリーニングを用いたことによる(1)提示される抗原分子の絶対数の増加(2)適切な抗原部位の露出、の2点が挙げられる。本実施例で用いたビーズは1mgあたり1,000pmolの分子と結合できる。

プレートスクリーニングで1つのwellあたりに固相化できるタンパク量が約10pmolであることを考えると、提示される抗原分子の数には数十倍以上の差があることになる。加えて、プレートスクリーニングには、プレートに吸着していることで部分的にまったく抗体が反応できない箇所ができてしまう、という大きな問題点がある。

本実施例で抗原として用いたミリストイル基は、タンパク質を膜へアンカーできるほど疎水性に富んでいる。そのため、疎水性相互作用を利用したプレート吸着方法では、この脂肪酸部分がプレートと面する形になってしまい、抗体との反応が妨げられている可能性も十分考えられる。

一方、ビーズスクリーニングでは、ビーズの表面に抗原が提示されることで、脂肪酸部分も含む一つの抗原分子の様々な面に対し抗体集団が相互作用することが可能になったと推

10

20

30

40

50

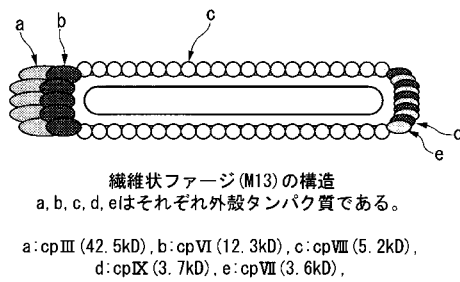
測される。このように抗原の絶対量、そして提示の仕方に変化があったことで、特異性の高い多種類のモノクローナル抗体を得ることが可能になったと考察される。

【産業上の利用可能性】

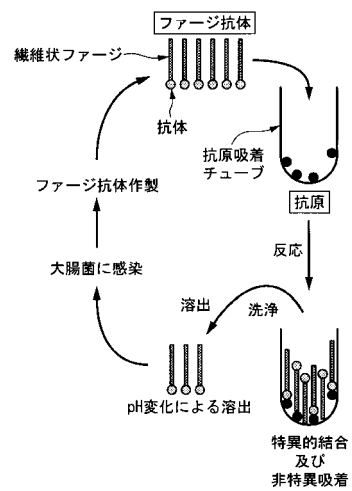
【0139】

相互作用だけで認識できる抗ミリストイル化タンパク質抗体又はその抗原結合フラグメント、ミリストイル化タンパク質検出キット、医薬、遺伝子、及びベクターを提供できる。

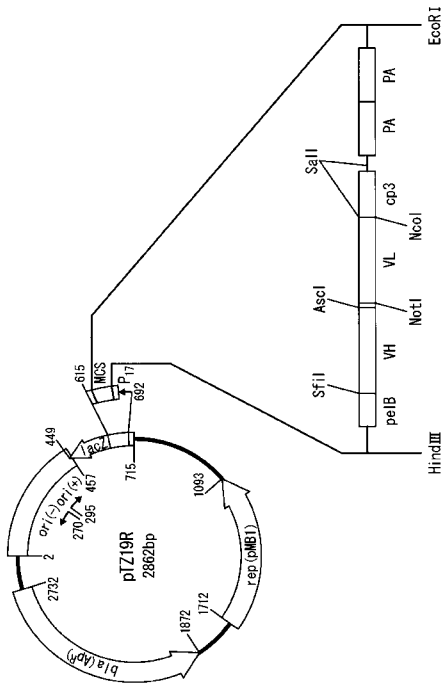
【図1】



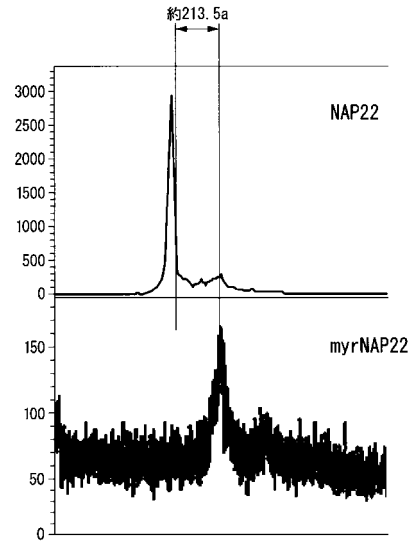
【図2】



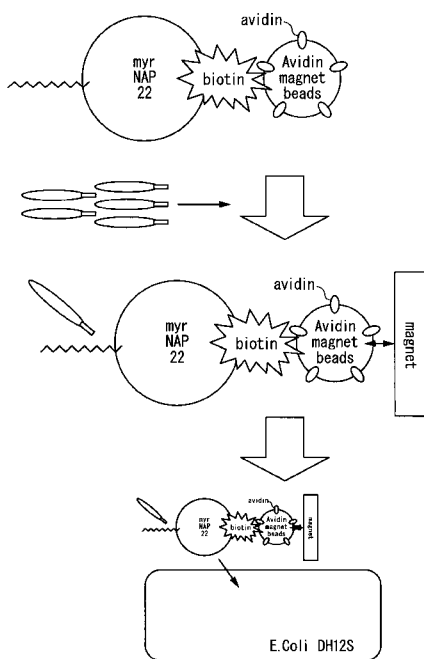
【 図 3 】



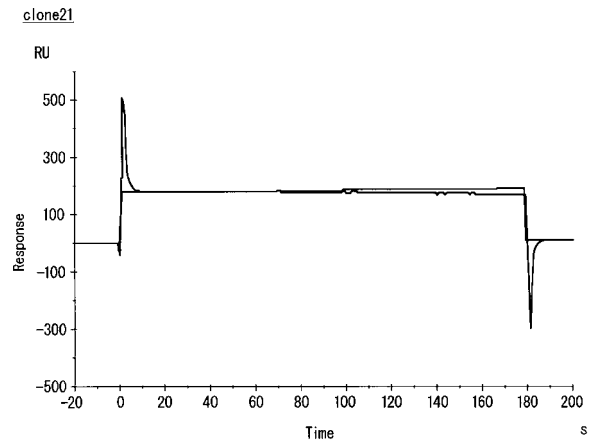
【 図 7 】



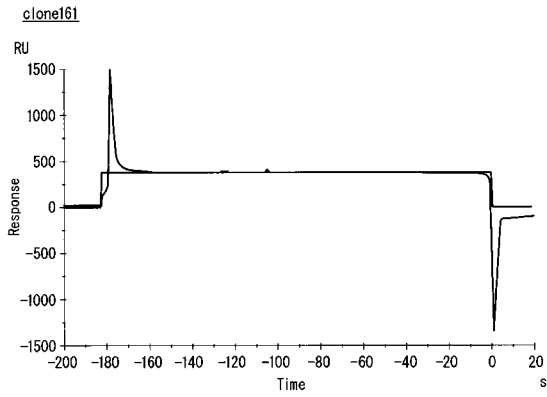
【 図 8 】



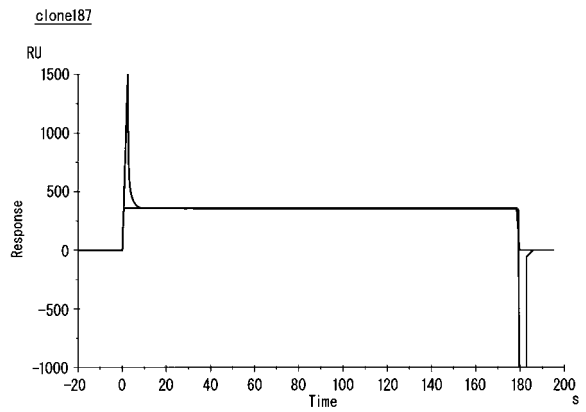
【 図 9 】



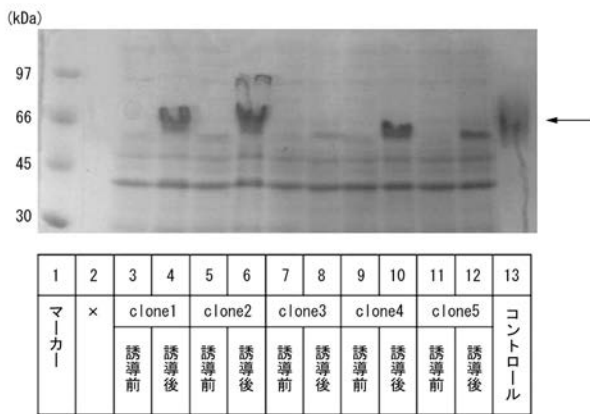
【 図 1 0 】



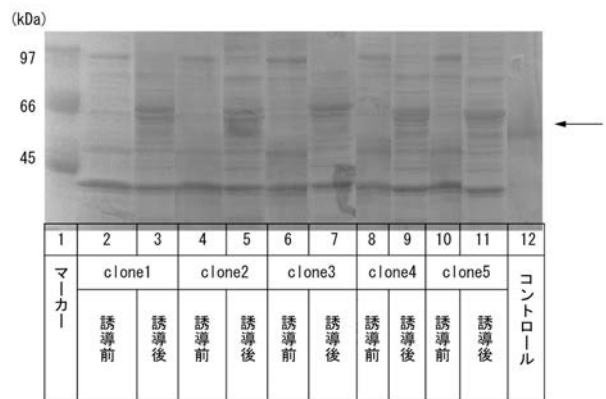
【 図 1 1 】



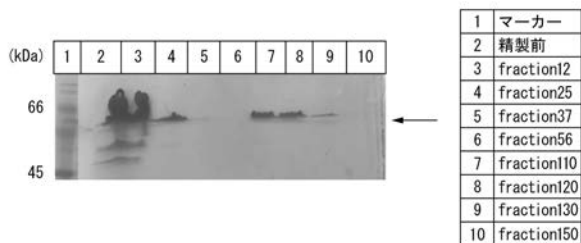
【 図 4 】



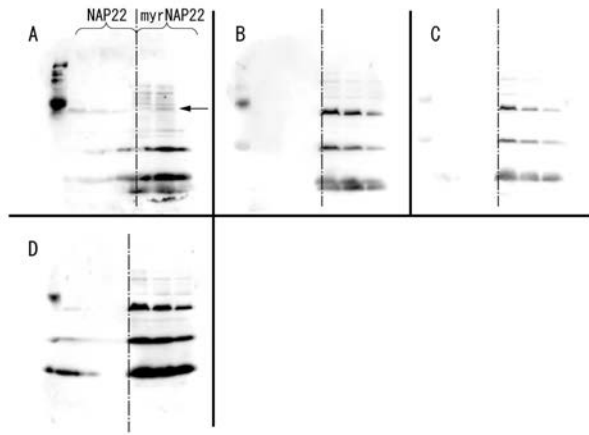
【 図 6 】



【 図 5 】

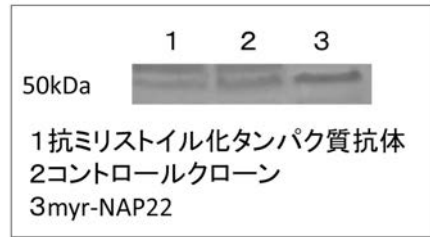


【 図 1 2 】



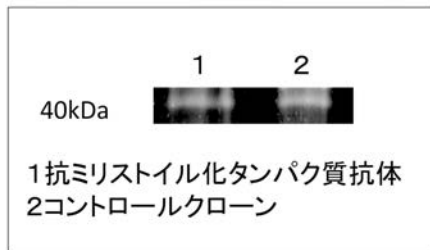
各モノクローナル抗体によるWestern blottingの結果
 (A) α -NAP22 (M-65) : sc-66995 (B) clone 21
 (C) clone 161 (D) clone 187

【 図 1 4 】



50kDa
 1 抗ミリスチル化タンパク質抗体
 2 コントロールクローン
 3 myr-NAP22

【 図 1 3 】



40kDa
 1 抗ミリスチル化タンパク質抗体
 2 コントロールクローン

【 配 列 表 】

[2015137441000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/057287
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K39/395, A61P3/10, A61P25/16, A61P25/28, A61P35/04, C07K16/18, G01N33/53, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-153980 A (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 June 1994 (03.06.1994), claims; examples (Family: none)	1, 5, 9, 13, 17-24
X	Shozo SHOJI et al., "Antibodies to an NH ₂ -terminal myristoyl glycine moiety can detect NH ₂ -terminal myristoylated proteins in the retrovirus-infected cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989.07.31, Vol.162, No.2, p.724-732	1, 5, 9, 13, 17-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 June 2015 (01.06.15)		Date of mailing of the international search report 09 June 2015 (09.06.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/057287

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuchika FURUISHI et al., "A novel monoclonal antibody to N-myristoyl Glycine Moiety Found a new N-myristoylated HIV-1 p28 ^{99g} Protein in HIV-1-infected cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, Vol.222, p.344-351	1, 5, 9, 13, 17-24
X	JP 3-80097 A (Shozo SHOJI), 04 April 1991 (04.04.1991), claims; examples (Family: none)	1, 5, 9, 13, 17-24
Y	Yuri OKUYAMA et al., "Development of Anti N-myristoylated Protein Antibodies using Antibody Library", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Yoshishu, vol.35th, 2012, page 1P-0073	1-24
Y	JP 2005-500049 A (Novartis AG.), 06 January 2005 (06.01.2005), claims; paragraph [0005]; example 4 & WO 03/008579 A2 & EP 1412498 A2 & US 2005/0079572 A1	1-24
Y	Pedro TEJERO-DIEZ et al., "Microscale purification of proteins exhibiting anomalous electrophoretic migration: application to the analysis of GAP-43 phosphorylation", Analytical Biochemistry, 1999, Vol.274, p.278-282	1-24
P,X	JP 2014-209891 A (Tokyo Institute of Technology), 13 November 2014 (13.11.2014), claims (Family: none)	1-24

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 7 2 8 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P3/10, A61P25/16, A61P25/28, A61P35/04, C07K16/18, G01N33/53, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
CAplus/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	JP 6-153980 A (日水製薬株式会社) 1994.06.03, 特許請求の範囲, 実施例, (ファミリーなし)	1, 5, 9, 13, 17-24	
X	Shozo SHOJI et al., "Antibodies to an NH ₂ -terminal myristoyl glycine moiety can detect NH ₂ -terminal myristoylated proteins in the retrovirus-infected cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989.07.31, Vol.162, No.2, p.724-732	1, 5, 9, 13, 17-24	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 01.06.2015		国際調査報告の発送日 09.06.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 坂崎 恵美子	4 B 9 4 5 1
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 7 2 8 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Kazuchika FURUISHI et al., "A novel monoclonal antibody to N-myristoyl Glycine Moiety Found a new N-myristoylated HIV-1 p28 ^{gag} Protein in HIV-1-infected cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, Vol. 222, p. 344-351	1, 5, 9, 13, 17-24
X	JP 3-80097 A (庄司省三) 1991.04.04, 特許請求の範囲, 実施例, (ファミリーなし)	1, 5, 9, 13, 17-24
Y	奥山友梨等, "抗体ライブラリを用いた抗タンパク質N-ミリスチル化抗体の開発", 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, Vol. 35th, 2012, p. 1P-0073	1-24
Y	JP 2005-500049 A (ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト) 2005.01.06, 特許請求の範囲, 【0005】, 実施例4など, & WO 03/008579 A2 & EP 1412498 A2 & US 2005/0079572 A1	1-24
Y	Pedro TEJERO-DIEZ et al., "Microscale purification of proteins exhibiting anomalous electrophoretic migration: application to the analysis of GAP-43 phosphorylation", Analytical Biochemistry, 1999, Vol. 274, p. 278-282	1-24
P, X	JP 2014-209891 A (国立大学法人東京工業大学) 2014.11.13, 特許請求の範囲など, (ファミリーなし)	1-24

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC21 CC23 EE01 GG01 GG08
 4C087 AA10 BC83 CA12 MA17 MA35 MA37 MA52 MA66 NA14 ZA02
 ZA16 ZB26 ZC35
 4H045 AA11 BA41 DA76 EA20 FA71 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。