

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年4月23日(23.04.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/056659 A1

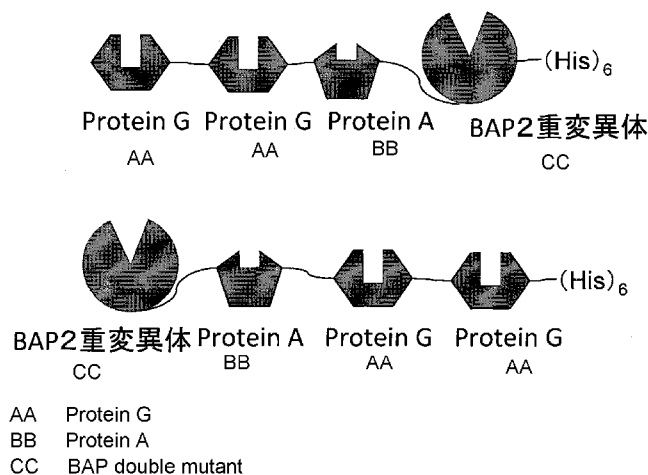
- (51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/315 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/077274
- (22) 国際出願日: 2014年10月6日(06.10.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-217048 2013年10月18日(18.10.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP). 日立アロカメディカル株式会社(HITACHI ALOKA MEDICAL, LTD.) [JP/JP]; 〒1818622 東京都三鷹市牟礼6丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 神谷 典穂(KAMIYA, Noriho); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 松葉 恭一(MATSUBA, Kyoichi); 〒1818622 東京都三鷹市牟礼6丁目2番1号 日立アロカメディカル株式会社内 Tokyo (JP). 永井 賢治(NAGAI, Kenji); 〒1818622 東京都三鷹市牟礼6丁目2番1号 日立アロカメディカル株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 Y K I 国際特許事務所 (YKI PATENT ATTORNEYS); 〒1800004 東京都武蔵野市吉祥寺本町一丁目34番12号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: FUSION PROTEIN FOR PROTEIN DETECTION, AND METHOD FOR DETECTING PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質検出用融合タンパク質およびタンパク質の検出方法

図1



(57) Abstract: A fusion protein for protein detection in which are fused: a protein domain including at least one among a C1 domain of protein G, a C2 domain of protein G, and a C3 domain of protein G; and a double mutant D153G/D330N in which the 153 amino acid residue Asp of Escherichia coli alkaline phosphatase (BAP) has been substituted by Gly and the 330 amino acid residue Asp has been substituted by Asn, a double mutant D153H/D330N in which the 153 amino acid residue Asp of Escherichia coli alkaline phosphatase (BAP) has been substituted by His and the 330 amino acid residue Asp has been substituted by Asn, or a double mutant K328R/D330N in which the 328 amino acid residue Lys of Escherichia coli alkaline phosphatase (BAP) has been substituted by Arg and the 330 amino acid residue Asp has been substituted by Asn.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2015/056659 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ (BAP) の153位のアミノ酸残基AspをGlyにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体D153G/D330N、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ (BAP) の153位のアミノ酸残基AspをHisにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体D153H/D330N、または大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ (BAP) の328位のアミノ酸残基LysをArgにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体K328R/D330Nとを融合したものであるタンパク質検出用融合タンパク質である。

明 細 書

タンパク質検出用融合タンパク質およびタンパク質の検出方法

技術分野

本発明は、タンパク質検出用融合タンパク質およびタンパク質の検出方法に関する。

背景技術

生体試料中には種々のタンパク質が存在するが、特定のタンパク質を検出、定量するための方法として、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 等が知られている。

ELISAは、試料中に含まれる抗原等の特定のタンパク質を、酵素標識した抗体を用い、抗原抗体反応を利用して定量的に検出する方法であり、免疫検査等において汎用されている手法の1つである。ELISAには、直接吸着法、サンドイッチ法、競合法等が知られている。

例えば、固相の表面に吸着させた目的物質（抗原）に対する1次抗体を抗原抗体反応により結合させる。未反応の1次抗体を洗い流した後、酵素標識した標識2次抗体を添加して、再び抗原抗体反応により結合させる。ここで未反応の標識2次抗体を洗い流し、発色基質を添加すると、抗原の量に比例して発色反応が起こる。生成した発色物質の吸光度を吸光度計等により測定し、濃度既知の標準品を用いて作成した標準曲線から、抗原の量を定量することができる。

しかし、このような方法では、目的物質（抗原）に特異的に結合する1次抗体に対して特異的に結合する標識2次抗体が必要となり、複数種類の目的物質（抗原）を検出する場合、複数種類の1次抗体に対して、それぞれに特異的に結合する標識2次抗体を用意する必要があり、汎用性が低い。

従来、タンパク質検出用の酵素としてアルカリホスファターゼが知られ、その中ではCIAP (Calf Intestine Alkaline Ph

o s p h a t a s e) が広く用いられている。C I A Pは牛小腸より精製したものが従来より広く使用されているが、近年、遺伝子組換えで作製したのもも販売されている。しかし、前者は生産コストが高く、品質を安定させることが難しい。また、後者では生産コストを低減するために酵母等で発現生産を行っているが、過剰に糖鎖付加が生じ、バックグラウンド、粘性等が問題となる場合が多い。また、C I A Pは、高活性であるが、安定性、特に熱安定性が劣っており、長時間、活性を維持することは難しく、加熱が必要な遺伝子関連のアプリケーションに使用できない。さらに、希釈した場合にもその活性が低下することから、長時間、低濃度で用いる実際のアプリケーションで高活性という特性は十分に生かされていない。

B A P (B a c t e r i a l A l k a l i n e P h o s p h a t a s e) は、安定性が高いが、C I A Pに比べるとその活性は数十分の一程度であり、活性が低いため、タンパク質検出にはほとんど用いられていない。

一方、標識2次抗体の代わりに、アルカリホスファターゼ等の酵素とプロテインGとを化学反応で結合した酵素標識プロテインGを用いる方法がある。プロテインGは、連鎖球菌の細胞壁由来タンパク質で、ほとんどの哺乳動物のI g Gと結合する性質を持つ。このような酵素標識プロテインGを用いれば多くの免疫種の1次抗体と結合可能であり、複数種類の目的物質(抗原)を検出する場合でも、それぞれに特異的に結合する抗体を用意しなくてもよく、汎用性が高い。

しかし、アルカリホスファターゼ等の酵素で標識した酵素標識プロテインGを用いる方法は、検出感度が低いという問題があった。また、熱安定性が低いものもあり、取扱中に失活する場合があった。

非特許文献1には、プロテインG (S p G) のC1ドメインをウミホタルルシフェラーゼのN末端に結合させた融合タンパク質を作製したが、抗体結合能はなかったこと、リンカーG G G G Sを両者間に挿入したのもも同じ結果であったことが記載されている。

非特許文献2には、プロテインGの遺伝子配列、アミノ酸配列、構造、各ドメインの機能等について記載されている。

非特許文献3には、BAPの特定の位置のアミノ酸残基を置換した2重変異体、例えば、D153G/D330N、D153H/D330N等が記載され、活性、安定性、至適pH、基質、金属イオンの親和性と活性について考察がされている。

特許文献1には、BAPの特定の位置のアミノ酸残基を置換した変異体D153G、K328Rおよび2重変異体V99A/K328Rについて記載され、サンドイッチELISA、競合法等の用途が記載されている。

特許文献2には、BAPの329位、330位、153/328位の変異体について記載され、抗原との融合タンパク質の作製と競合ELISAを行ったことが記載されている。

特許文献3には、K328R等のBAPの変異体について記載され、抗体に化学結合させてELISAを行ったことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

特許文献1：特許第3560972号公報

特許文献2：特開平9-098780号公報

特許文献3：特許第2620416号公報

非特許文献

非特許文献1：Engineering of functional chimeric protein G-Vargula luciferase, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 249(2), pp.147-152(1997)

非特許文献2：Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G, Biochem J., 267(1), pp.171-177(1990)

非特許文献3：Improving Escherichia coli Alkaline Phosphatase Efficacy by Additional Mutations inside and outside the Catalytic Pocket., Chembiochem., 2, pp.517-523, (2001)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

本発明は、汎用性が高く、検出感度が高く、かつ安定性の高いタンパク質検出用融合タンパク質およびそれを用いたタンパク質の検出方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明は、プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の153位のアミノ酸残基AspをGlyにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体D153G/D330N、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の153位のアミノ酸残基AspをHisにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体D153H/D330N、または大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の328位のアミノ酸残基LysをArgにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体K328R/D330Nとを融合したものであるタンパク質検出用融合タンパク質である。

また、前記タンパク質検出用融合タンパク質において、前記タンパク質ドメインが、プロテインAのBドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインが結合されたものであることが好ましい。

また、本発明は、タンパク質の検出方法であって、前記タンパク質検出用融合タンパク質と、対象物中に存在するタンパク質とを直接または間接的に結合させ、結合している前記タンパク質検出用融合タンパク質のアルカリホスファターゼ部分を標識部分として検出するタンパク質の検出方法である。

発明の効果

本発明では、プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、またはK328R/D330

Nとを融合させることにより、汎用性が高く、検出感度が高く、かつ安定性の高いタンパク質検出用融合タンパク質およびそれを用いたタンパク質の検出方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質の一例の構造を示す模式図である。

図2は、実施例1における、pG-D153G/D330N（pG結合部位：N末端）の発現量を示す図である（2SLN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-D153G/D330Nの泳動位置を示す）。

図3は、実施例1における、pG-D153G/D330N（pG結合部位：N末端）の発現量を示す図である（TMN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-D153G/D330Nの泳動位置を示す）。

図4は、実施例1における、pG-D153H/D330N（pG結合部位：N末端）の発現量を示す図である（2SLN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-D153H/D330Nの泳動位置を示す）。

図5は、実施例1における、pG-D153H/D330N（pG結合部位：N末端）の発現量を示す図である（TMN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-D153H/D330Nの泳動位置を示す）。

図6は、実施例1における、pG-K328R/D330N（pG結合部位：N末端）の発現量を示す図である（2SLN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す）。

図7は、実施例1における、pG-K328R/D330N（pG結合部位：N末端）の発現量を示す図である（TMN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す）。

図8は、実施例1における、pG-K328R/D330N（pG結合部位

: C末端)の発現量を示す図である(2SLN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す)。

図9は、実施例1における、pG-K328R/D330N(pG結合部位:C末端)の発現量を示す図である(TMN培地、培養上清 3mLスケールで培養、3連制、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す)。

図10は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質(pG-D153G/D330N)の精製を示す図である(ベクター:pBIC4, pBIC7, pBIC8、培地:2SLN、矢印はpG-D153G/D330Nの泳動位置を示す)。

図11は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質(pG-D153G/D330N)の精製を示す図である(ベクター:pBIC4, pBIC7, pBIC8、培地:TMN、矢印はpG-D153G/D330Nの泳動位置を示す)。

図12は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質(pG-D153H/D330N)の精製を示す図である(ベクター:pBIC7, pBIC8、培地:2SLN、矢印はpG-D153H/D330Nの泳動位置を示す)。

図13は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質(pG-D153H/D330N)の精製を示す図である(ベクター:pBIC7, pBIC8、培地:TMN、矢印はpG-D153H/D330Nの泳動位置を示す)。

図14は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質(pG-K328R/D330N(pG結合部位:N末端))の精製を示す図である(ベクター:pBIC4, pBIC8、培地:2SLN、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す)。

図15は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質(pG-K328R/D330N(pG結合部位:N末端))の精製を示す図である(ベクター:pBIC4, pBIC8、培地:TMN、矢印はpG-K3

28R/D330Nの泳動位置を示す)。

図16は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質 (pG-K328R/D330N (pG結合部位: C末端)) の精製を示す図である (ベクター: pBIC2, pBIC3, pBIC1、培地: 2SLN、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す)。

図17は、実施例2における、Ni-NTAカラムによる発現タンパク質 (pG-K328R/D330N (pG結合部位: C末端)) の精製を示す図である (ベクター: pBIC1, pBIC3、培地: TMN、矢印はpG-K328R/D330Nの泳動位置を示す)。

図18は、実施例3における、pG-D153G/D330NおよびpG-D153H/D330N精製標品 (Fr. 1) のALP活性を示す図である (45℃測定、図中数値は、9連測定の平均値±標準偏差)。

図19は、実施例3における、pG-K328R/D330N精製標品 (Fr. 1) のALP活性を示す図である (45℃測定、図中数値は、9連測定の平均値±標準偏差)。

図20は、実施例3における、pG-D153G/D330N (pG結合部位: N末端) のウエスタンブロット結果を示す図である。

図21は、実施例3における、pG-D153H/D330N (pG結合部位: N末端) のウエスタンブロット結果を示す図である。

図22は、実施例3における、pG-K328R/D330N (pG結合部位: N末端) のウエスタンブロット結果を示す図である。

図23は、実施例3における、pG-K328R/D330N (pG結合部位: C末端) のウエスタンブロット結果を示す図である。

図24は、pG-BAP変異体 (D153G/D330N) のアミノ酸配列を示す図である。

図25は、pG-BAP変異体 (D153H/D330N) のアミノ酸配列を示す図である。

図26は、pG-BAP変異体 (K328R/D330N (pG結合部位: N末端)) のアミノ酸配列を示す図である。

図27は、pG-BAP変異体(K328R/D330N (pG結合部位：C末端))のアミノ酸配列を示す図である。

図28は、pBICベクターマップを示す図である(分泌シグナルの下流に直接目的遺伝子を挿入した。プロモータ：B. choshinensis 由来P22, P2タンパク質遺伝子5'配列、Rep：プラスミド自己複製関連タンパク質、Ori：プラスミド複製開始点、Nm r：ネオマイシン耐性遺伝子)。

発明を実施するための形態

本発明の実施の形態について以下説明する。本実施形態は本発明を実施する一例であって、本発明は本実施形態に限定されるものではない。

本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質は、プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ(BAP)の2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、またはK328R/D330Nとを融合したものである。

本発明者らは、検出対象であるタンパク質と直接または間接的に結合するタンパク質ドメインとして、プロテインGに着目した。プロテインGは、連鎖球菌の細胞壁由来タンパク質で、ほとんどの哺乳動物のIgGと結合する性質を持つ。このプロテインGをアルカリホスファターゼ標識し、標識2次抗体等に代わるものとして利用できないかを検討した。

また、本発明者らは、検出感度および安定性に関与する酵素標識としてのアルカリホスファターゼとして、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ(BAP)の153位または328位のアミノ酸残基が活性に関与し、330位のアミノ酸残基が安定性に関与することに着目し、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ(BAP)の2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、およびK328R/D330Nを選択した。BAPの2重変異体であるD153G/D330NおよびD153H/D330Nは従来からよく用いられているCIAPに比べて安定性が高く、BAP(Wild type)に比べて高活性である。

ここで、BAPの2重変異体D153G/D330Nは、BAPの153位のアミノ酸残基AspをGlyにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換したものであり、D153H/D330Nは、BAPの153位のアミノ酸残基AspをHisにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換したものであり、K328R/D330Nは、BAPの328位のアミノ酸残基LysをArgにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換したものである。

本発明者らが鋭意検討したところ、プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、BAPの2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、またはK328R/D330Nとを融合させることにより、汎用性が高く、検出感度が高く、かつ安定性の高いタンパク質検出用融合タンパク質が得られることを見出した。

タンパク質ドメインとしては、プロテインGのIgG結合ドメインであるC1ドメイン、C2ドメインおよびC3ドメインのうち少なくとも1つを含むものであればよく、特に制限はないが、抗体から脱離しにくい等の点から、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインが連結されているものを含むことが好ましい。また、プロテインGの抗体等に対する反応性が向上する等の点から、プロテインAのEドメイン、プロテインAのDドメイン、プロテインAのAドメイン、プロテインAのBドメイン、プロテインAのCドメインのうち少なくとも1つを含むことが好ましく、プロテインAのBドメインを含むことがより好ましい。特に、プロテインAのBドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインが結合されたものであることが好ましい。

融合型アルカリホスファターゼのC末端側にプロテインGのC2ドメインを融合させたものでもよいし、N末端側に融合させたものでもよい。発現の安定性等の点から、融合型アルカリホスファターゼのN末端側にプロテインGのC2ドメインを融合させたものであることが好ましい。

本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質は、6個程度の連続する

ヒスチジン (His) 残基からなるタグペプチドの一種であるHisタグ等のタグを有していてもよい。

図1に、本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質の一例の構造を模式的に示す。本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質は、例えば、BAPの2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、またはK328R/D330NのN末端側に、プロテインAのBドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインが結合され、BAPの2重変異体のC末端側にHisタグが付加されたもの、BAPの2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、またはK328R/D330NのC末端側に、プロテインAのBドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインが結合され、プロテインGドメインのC末端側にHisタグが付加されたものである。

本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質は、遺伝子工学的手法により、プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、BAPの2重変異体D153G/D330N、D153H/D330N、またはK328R/D330Nとを融合した融合タンパク質として発現させて得ることができる。また、その際、プロテインGドメインまたはBAPの2重変異体のN末端側またはC末端側にHisタグ等のタグを付与してもよい。

融合タンパク質の精製は、N末端またはC末端に付加した精製用ペプチドタグ（例えば、(His)₆-tag（ヘキサヒスチジンタグ））を利用し、ゲル濾過クロマトグラフィ、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィ等により行うことができる。

融合タンパク質のアミノ酸配列の確認は当該タンパク質をコードするプラスミドベクターの遺伝子配列をDNAシーケンサにて確認することができる。融合タンパク質の精製の確認は、SDS-PAGE等で行うことができる。

本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質によれば、ほぼ全ての動物種の1次抗体を検出可能である。本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質の検出感度は、従来の標識プロテインGより高く、安定性も高い。ま

た、従来の標識2次抗体と検出感度は同等以上であり、汎用性が高い。本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質を用いれば多くの免疫種の(1次)抗体と結合可能であり、免疫種ごとに2次抗体を用意しなくてもよく、汎用性が高い。

このタンパク質検出用融合タンパク質は、バクテリア由来のタンパク質であり、翻訳後修飾の問題がなく、微生物の発現系で作製することができる。また、分泌発現系を利用すれば効率よく生産することができる。動物由来のものを抽出、精製したり、動物由来のものを動物細胞で発現生産する場合に比べて安価に製造することができる。

動物由来のCIA P等には糖鎖が含まれている。糖鎖は測定容器、メンブレン等に吸着する原因の1つであると言われており、高いバックグラウンドを生じることがある。しかし、BAPの2重変異体は、高バックグラウンドの原因となる糖鎖修飾が存在しないため、動物由来酵素でみられるバックグラウンドおよび高粘性によるハンドリングの問題等が生じにくい。

酵素部分はBAPに比べて高活性であり、CIA Pに比べると安定性に優れており、高温にもある程度耐性を有していることから、温度処理の必要な遺伝子検出(ハイブリダイゼーション)等における感度向上にも応用することができる。また、既存のpG-CIA Pに比べて高感度でタンパク質を検出することができる可能性がある。

<タンパク質の検出方法>

本実施形態に係るタンパク質の検出方法は、前記タンパク質検出用融合タンパク質と、対象物中に存在するタンパク質とを直接または間接的に結合させ、結合しているタンパク質検出用融合タンパク質のアルカリホスファターゼ部分を標識部分として検出する方法である。

本実施形態に係るタンパク質検出用融合タンパク質およびタンパク質の検出方法は、例えば、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫組織化学(免疫染色)等の基礎研究分野や、病理検査分野等に利用することができる。

実施例

以下、実施例および比較例を挙げ、本発明をより具体的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。なお、下記実施例中、室温とは20～25℃である。

[実施例1]

Brevibacillus 発現ベクターに pG-BAP 変異体の遺伝子断片を挿入し、発現ベクターの構築を行った。発現ベクターを構築できたものについては、形質転換および所定期間培養を実施し、培養上清と菌体を分離後、培養上清に含まれる目的タンパク質の生産量を確認した。

<材料および試験方法>

1. 発現ベクター (プラスミド)

Brevibacillus を用いた分泌発現では、目的タンパク質ごとに最適なタンパク質の合成速度および分泌シグナルが異なる可能性が示唆されている。そこで、2種のプロモータ (pBIC1, pBIC2, pBIC3, pBIC4 : P22プロモータ (配列番号9)、pBIC5, pBIC6, pBIC7, pBIC8 : P2プロモータ (配列番号10)) および4種の分泌シグナル (pBIC1, pBIC5 : 配列番号11、pBIC2, pBIC6 : 配列番号12、pBIC3, pBIC7 : 配列番号13、pBIC4, pBIC8 : 配列番号14) を組合せた、合計8種の発現用ベクターを使用した (図28参照)。

使用ベクター : pBIC1～pBIC8 [ヒゲタ醤油 (株) 提供]

2. 発現ベクター構築

pG-BAP 変異体の遺伝子断片 (pG-D153G/D330N、pG-D153H/D330N および pG-K328R/D330N) の発現用ベクターへの挿入には、酵素処理を必要としない簡便なプラスミド構築法である BIC 法 (Brevibacillus In vivo Cloning) を利用した。BIC 法では、目的タンパク質をコードする遺伝子の両端に、直鎖上の発現ベクターの両末端と相同な 15 bp の配列を付加した DNA をベクターと混合してコンピテントセルに導入する。菌体内で相同配列の組み換え反応が生じ、発現プラスミドが形成される。8種のベクターのうち、ベクター構築が可能であり、目的タンパク質発現用のベクターを取得できたものについては、下記の発現試験を実施した。

3. 分泌発現用宿主

Brevibacillus choshinensis HPD31-SP3株 [ヒゲタ醤油(株)提供]

4. *Brevibacillus* の形質転換 (DNA導入)

Brevibacillus choshinensis HPD31-SP3株をMT培地(20mM MgCl₂を添加したTM培地(表1参照))で37℃にて対数増殖期まで振盪培養し、遠心分離によって集菌した。次いで、50mM Tris-HCl (pH7.5)に懸濁し、遠心分離により集菌後、50mM Tris-HCl (pH8.5)に再懸濁し、37℃で60分間振盪した。振盪した懸濁液500μLの遠心分離を行って集菌し、2ng/μLの発現ベクターDNA溶液5μLと0.5M NaSO₃/70mM リン酸バッファ(pH6.3)50μLの混合液を加え、懸濁して5分間静置後、40% PEG6000/70mM リン酸バッファ(pH6.3)を150μL添加して、ボルテックスにより攪拌、懸濁した。

表1

TM 培地	
グルコース	10 g/L
ファイトンペプトン	10 g/L
エルリツヒ カツオエキス	5 g/L
粉末酵母エキス S	2 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg/L
(pH7.0 に調整)	

5. 形質転換体の選抜

形質転換を行った菌体は、遠心分離により集菌し、1mLのTM培地に懸濁

し、37℃で60分間振盪した。次いで、TMN（TM培地に10 μg/mLのネオマイシンを添加した寒天培地）に塗抹して、37℃、30時間培養し、形質転換体を選抜した。

6. 形質転換体の培養

3 mLのTMN培地、および2SLN培地（2SL培地（表2参照）に50 μg/mLのネオマイシンを添加）を16 mm径の試験管に分注し、前項で選抜したシングルコロニーを植菌した。30℃、120 rpmの条件で48時間振盪培養を行った。

表 2

2SL 培地	
グルコース	20 g/L
Bacto Soytone	40 g/L
Bacto Yeast Extract	5 g/L
MgSO ₄ ·2H ₂ O	100 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg/L

7. 菌体と培養上清の分離

遠心分離（5000 g、5分間）を行って、菌体と培養上清を分離した。培養上清は0.22 μmのろ過滅菌用フィルタを通して、菌体を除去した。

8. 発現確認

培養上清に等量の2×サンプルバッファを添加し、100℃で5分間変性した後、SDS-PAGEに供して、各サンプル中の生産タンパク質のサイズ確認、および発現生産量の推定、比較を行った。

<結果>

1. 菌体内および培養上清における発現確認

・ pG-D153G/D330N (pG結合部位：N末端)

pG-D153G/D330Nについては、ベクター2種類およびシグナルペプチド4種類の計8種類の組合せのうち、発現プラスミドの取得が可能であった4種類について発現試験を実施した。2SLN培地（培養上清）の場合は、pBIC4、pBIC7およびpBIC8で高いレベルの発現量が認められ、連制間の差異もほとんどなく、安定的な発現がなされていることが示唆された。TMN培地でも発現量が2SLN培地より多くなること以外は、同様の傾向であったが、pBIC6では、両培地とも目的タンパク質は、ほとんど生産されていないことがわかった（図2, 3）。pG-D153G/D330Nのアミノ酸配列を図24および配列番号1に、DNA配列を配列番号2に示す。

・ pG-D153H/D330N (pG結合部位：N末端)

5種類の発現ベクターを取得したpG-D153H/D330Nの場合は2SLNおよびTMN両培地で高発現が認められたものは、pBIC7およびpBIC8であり、TMN培地の方が発現量が多い傾向であった。連制間のばらつきも認められないことから、安定した発現を示す可能性が示唆された。pBIC1、pBIC5およびpBIC6においては、ほとんどpG-D153H/D330Nの発現は認められなかった（図4, 5）。pG-D153H/D330Nのアミノ酸配列を図25および配列番号3に、DNA配列を配列番号4に示す。

なお、pG-D153G/D330N、pG-D153H/D330N双方とも発現量の多いものは、SDS-PAGEのバンド強度から、g/Lレベルの生産量が期待された。

・ pG-K328R/D330N (pG結合部位：N末端)

pG-K328R/D330N (pG結合部位：N末端) の場合は、取得した4種の発現ベクターのうち、目的タンパク質が生産されていたのはpBIC4およびpBIC8であった。いずれも連制間のバラツキは小さく、安定な発現を示しており、培地別にみると、pBIC8ではTMN培地で発現量が若干多い傾向が認められた（図6, 7）。pG-K328R/D330N (pG結合部位：N末端) のアミノ酸配列を図26および配列番号5に、DNA配列を

配列番号6に示す。

・ pG-K328R/D330N (pG結合部位：C末端)

C末端にpGを結合したK328R/D330Nの場合、得られた発現ベクター3種 (pBIC1、pBIC2、pBIC3)のうち、2SLN培地では、すべてのベクターで目的タンパク質の生産が認められたが、TMN培地では、pBIC2の生産量が著しく少ない結果が得られた。pGをN末端に結合したものとC末端結合したものを比べると、生産が認められたものについては、目的タンパク質バンドの強度に大きな差があるとは考えられない。しかし、C末端結合のものは、3連製の試験で同等に生産されたものがなく、N末端結合のものに比べるとタンパク質発現に安定性を欠く可能性が示唆された (図8, 9)。pG-K328R/D330N (pG結合部位：C末端)のアミノ酸配列を図27および配列番号7に、DNA配列を配列番号8に示す。

[実施例2]

ブレヴィバチルスにて発現させたBAP変異体には、上述のようにヒスチジンタグ (H6 tag) がC末端に付加されており、Ni-NTAカラムを用いて、比較的簡便に精製を行うことができる。本実施例においては、培養上清から精製標品を取得した。

<材料および試験方法>

1. 目的タンパク質の精製

Ni-NTAカラムの一種であるHis SpinTrap Kit (28-9321-71/GE Healthcare)を用いて簡易精製を行った。精製操作は、添付の取扱説明書に準じたが、300~600 μ Lの培養上清を用い、カラム結合時の培養上清のイミダゾール濃度、そして結合 (洗浄) バッファの同濃度は40mM、溶出バッファの同濃度は500mMとした。また、培養上清をカラムに添加後、洗浄を3回行い、酵素溶出を2回実施して、溶出画分をそれぞれフラクション1, 2 (Fr. 1、Fr. 2)とした。

2. 脱塩および濃縮

精製された変異体酵素液には、高濃度のイミダゾールが含有しているが、予備検討の結果、酵素活性に悪影響を及ぼすことが判明したので、イミダゾール

を除去するために脱塩し、保存バッファ（下記）への溶媒交換を実施した。この操作には、ゲルろ過法（Zeba Desalt Spin Columns、89890/Thermo Scientific）、または限外ろ過法（Amicon Ultra Centrifugal Filters、10K membrane、UFC501024/Millipore）を用いた。溶媒交換した精製標品は、限外ろ過（同上）により4～5倍程度、濃縮を行い、4℃で保存した。

保存バッファ：100mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM NaCl、1mM MgCl₂、20μM ZnCl₂

3. 純度確認およびタンパク質定量

得られた精製標品は、SDS-PAGE法により純度を確認した。ゲルは、ミニプロティアン（登録商標）TGX（商標）プレキャストゲル（456-1036/Bio-Rad）を使用した。電気泳動後のゲルは、純水で洗浄し、CBB染色（Quick-CBB PLUS、178-00551/和光純薬）によりタンパク質バンドを可視化した。

タンパク質定量は、Micro BCA法（BCA Protein Assay Reagent Kit、23227/Thermo Scientific）によった。所定量の精製標品と検出試薬を等量混合後、60℃で1時間処理し、冷却した後、OD562を測定した。標準タンパク質としてBSA（Bovine Serum Albumin）を用いて検量線を作成し、タンパク質含量を求めた。

<結果>

1. Ni-NTAカラムによる精製

・ pG-D153G/D330N（pG結合部位：N末端）

発現試験において発現量の多かったpG-D153G/D330Nにおけるベクターおよび培地の組合せについて培養上清からNi-NTAカラムを用いて簡易精製を行った（図10、11）。供試したいずれの組合せ（pBIC4、pBIC7、pBIC8）も精製画分においては、夾雑タンパク質がほぼ除去されており、高純度の精製標品を得ることが可能であった。

・ pG-D153H/D330N

pG-D153H/D330Nの場合も2SLN培地およびTMN培地双方において、pBIC7およびpBIC8の組合せで高純度の標品を精製することが可能であった。また、精製標品の分子量についても、pG-D153G/D330Nと同様の結果であった(図12, 13)。

・ pG-K328R/D330N (pG結合部位: N末端)

2SLN培地を用いた場合、pBIC4についてはNi-NTAカラムによる精製が可能であり、純度の高い精製標品を得ることができた。しかしpBIC8については、カラム未結合画分に少量しかタンパク質が存在せず、その後のカラム洗浄においても同様であった。高濃度のイミダゾールを有する溶出バッファを用いてもほとんど出てこないことから、Ni-NTAカラムにタンパク質が強固に吸着されており回収不能となった可能性が示唆された(図14)。TMN培地の場合は、pBIC4、pBIC8双方とも目的タンパク質を精製することが可能であった(図15)。2SLN培地を用いた場合のみpBIC8がカラムに吸着する原因は、現状では不明である。

・ pG-K328R/D330N (pG結合部位: C末端)

pG-K328R/D330N (pG結合位置: C末端)についても、同様にタンパク質発現量が認められたものについて簡易精製を実施した(図16, 17)。2SLN培地では、pBIC1、pBIC2およびpBIC3、また、TMN培地では、pBIC1、pBIC3で精製標品を得ることができた。

[実施例3]

精製した各標品の酵素部分、および抗体結合タンパク質部分が実際に機能するか確認し、タンパク質検出試薬として利用できるか検討を行うために、アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定とウエスタンブロットにおける検出感度の比較を市販の試薬を対照として実施した。

<材料および試験方法>

1. ALP活性測定

酵素標品を酵素希釈バッファで所定濃度に希釈し、96穴マイクロプレートの各ウェルに5 μ L加えた。次いで、基質(p-NPP: p-ニトロフェニル

ホスフェート、149-02342/和光純薬) 溶液を95 μ L 添加し、基質の脱リン酸化により生じる吸光度変化 (OD410) をマイクロプレートリーダー (SH-9000 Lab/コロナ電気) を用いて、20~30 sec ごとに18回測定した。測定温度は、45°Cとした。酵素の比活性 (μ mol p-NP/mg protein/sec) は、既知濃度の酵素産物 (p-NP : p-ニトロフェノール、299-58641/和光純薬) の検量線を利用して求めた。なお、酵素の希釈、および基質、酵素産物の溶解、希釈には、下記のバッファを使用し、基質溶液の p-NPP 濃度は、1 mMとした。比較対照としては、ウシ小腸由来のALPであるCIAPを酵母発現させたもの (AP highly active rec. EIA Grade, CR, 03535452/Roche)、およびPLAP (Placental Alkaline Phosphatase, P3895/Sigma) を使用した。

酵素希釈バッファ : 100 mM DEA-HCl (pH9.5)、1 mM MgCl₂

基質、酵素産物希釈、溶解バッファ : 1 M DEA-HCl (pH9.5)、1 mM MgCl₂

2. ウエスタンブロットによる検出感度検討

抗原には、血清タンパク質であるヒト由来のTransferrin (Calbiochem/616419) を使用した。2×サンプルバッファで10 ng~3 pg/15 μ Lとなるように希釈列を作製し、1レーンあたり15 μ Lロードして、SDS-PAGEを行った。同じ希釈列のTransferrinが転写されたHybond P (PVDF) メンブレンを作製し、抗原抗体反応後、検出感度を比較した。詳しい手順および比較対照に用いた試薬を以下に示す。

サンプルバッファ (2×) : 62.5 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、25% グリセロール、0.01% BPB (Bromophenol blue, 029-02912/Wako)、10% メルカプトエタノール (M3148/Sigma)

SDS-PAGE (200V 定電圧条件、30min)

ゲル：ミニプロティアンTGXゲル10% (Bio-Rad/456-1035)

泳動バッファ：25mM Tris-HCl (pH8.3)、192mM グリシン、0.1% SDS

↓

ブロッキング (200mA 定電流条件、40min)

メンブレン：Hybond Pメンブレン (GEヘルスケア/RPN2020F)

転写バッファ：25mM Tris-HCl (pH8.3)、192mM グリシン、20%メタノール

↓

メンブレン洗浄 (TBS、3min ×2回)

TBS (20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2.68mM KCl)

↓

ブロッキング (5% Skim Milk Powder (198-10605/Wako) /TBST、室温、攪拌、60min)

TBST (0.1% Tween20/TBS)

↓

メンブレン洗浄 (TBST、5min ×3回)

↓

1次抗体反応 (室温、攪拌、60min)

抗体：Rabbit anti-human Transferrin antibody (DAKO/A0061) 1/2,000希釈 (4.3μg/mL TBST)

↓

メンブレン洗浄 (TBST、5min ×4回)

↓

pG-アルカリホスファターゼ反応 (室温、攪拌、60 min)

pG-BAP変異体精製標品、Fr. 1を使用

処理濃度: $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ TBST

↓

メンブレン洗浄 (TBST、5 min × 4回)

↓

発光検出

7, 200 secまで150 sec毎に画像取得。

測定器: ChemiDoc XRS+ (170-8265 J1PC/Bio-Rad)

発光基質: CDP-Star Ready-to-use (Roche/12041677001)

比較対照試薬

pG-CIAP (Protein G Alkaline Phosphatase Conjugated, PG00-05/Rockland)

<結果>

1. ALP活性

図18には、pG-D153G/D330NおよびpG-D153H/D330N (いずれもpG結合位置: N末端) のALP活性測定結果を示す。測定値のばらつきが若干、大きい、pG-D153G/D330Nの比活性は、 $350 \sim 450 \mu\text{mol p-NP}/\text{mg prot.}/\text{min}$ であり、TMN培地の方が比活性は、若干高い傾向にあった。

一方、pG-D153H/D330Nの比活性は、 $50 \mu\text{mol p-NP}/\text{mg prot.}/\text{min}$ 程度でpG-D153G/D330Nに比べるとその値は大幅に低いものであった。

図19には、pG-K328R/D330N (pG結合部位: N末端およびC末端) の活性測定結果を示す。N末端結合のものに若干、活性値の大小が認められるが、N末端、C末端ともその比活性は $200 \mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$ 程度であり、両者の間に大きな差はないものと考えられた。

以上の結果から、作製した pG-BAP 変異体の ALP 活性を高い方から示すと以下の通りであった。

pG-D153G/D330N > pG-K328R/D330N > pG-D153H/D330N

2. ウェスタンブロットによる検出感度

精製標品 (Fr. 1) を用いたウェスタンブロットを行い、発光検出を行った結果を図 20~23 に示す。pG-D153G/D330N は、pBIC8 (2SLN 培地) を除いて 3~10 pg の Transferrin を検出することが可能であった。対照の pG-CIAP は、100 pg 程度であることから、pG-D153G/D330N の検出感度は、10~30 倍高い可能性が示唆された (図 20)。一方、pG-D153H/D330N の検出感度は、30~100 pg であり、市販の pG-CIAP と大きな差はなく、その低い酵素活性が検出感度に反映されているものと考えられた (図 21)。pG-K328R/D330N の場合は、pG-D153G/D330N より若干、劣るが、pG を N 末端、C 末端に結合したものの双方とも 10 pg 程度の検出感度であり、対照の pG-CIAP より 10 倍程度高い可能性が示唆された (図 22, 23)。

以上の結果より、ブレビバチルスで分泌発現された目的タンパク質は抗体結合活性、ALP 活性を保持していることが明らかとなった。また、ウェスタンブロットという実際のアプリケーションにおいて、今回、供試した pG-D153G/D330N および pG-K328R/D330N は、市販の既存品に比べ、高い検出感度を示すことから、タンパク質検出試薬として有用であることが判明した。

K328R/D330N では、N 末端と、C 末端で ALP 活性、ウェスタンブロット双方とも性能差はほとんどなかった。

D153G/D330N、D153H/D330N では、pG の結合部位は N 末端しか検討していないが、これらの変異部位はリン酸、Mg²⁺ および Zn²⁺ の結合部位近傍であり、pG の結合部位を C 末端とした場合も立体構造変化によって pG の抗体結合活性が阻害されるとは考えにくく、性能面では同等の

結果が得られる可能性が高い。

K328R/D330Nにおいては、発現生産の安定性はN末端のものが優れていた。C末端にpGが結合したものは宿主内でベクターが安定して保持されにくいことが一因と考えられる。

請求の範囲

1. プロテインGのC1ドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインのうち少なくとも1つを含むタンパク質ドメインと、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の153位のアミノ酸残基AspをGlyにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体D153G/D330N、大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の153位のアミノ酸残基AspをHisにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体D153H/D330N、または大腸菌アルカリアルカリホスファターゼ（BAP）の328位のアミノ酸残基LysをArgにより置換し、330位のアミノ酸残基AspをAsnにより置換した2重変異体K328R/D330Nとを融合したものであることを特徴とするタンパク質検出用融合タンパク質。

2. 請求項1に記載のタンパク質検出用融合タンパク質であって、

前記タンパク質ドメインが、プロテインAのBドメイン、プロテインGのC2ドメインおよびプロテインGのC3ドメインが結合されたものであることを特徴とするタンパク質検出用融合タンパク質。

3. タンパク質の検出方法であって、

請求項1または2に記載のタンパク質検出用融合タンパク質と、対象物中に存在するタンパク質とを直接または間接的に結合させ、結合している前記タンパク質検出用融合タンパク質のアルカリホスファターゼ部分を標識部分として検出することを特徴とするタンパク質の検出方法。

図1

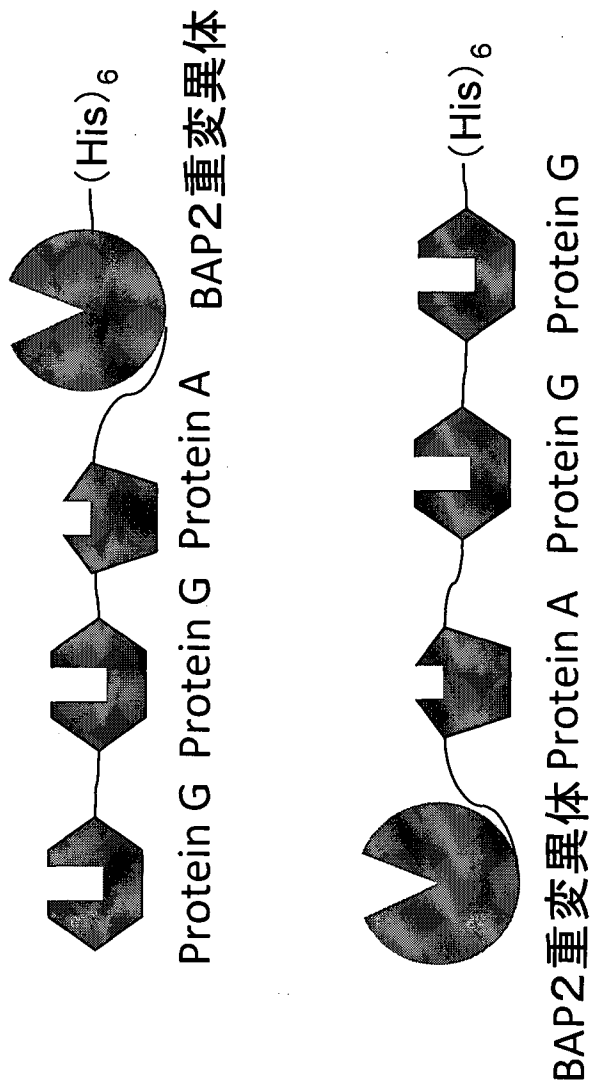


図2

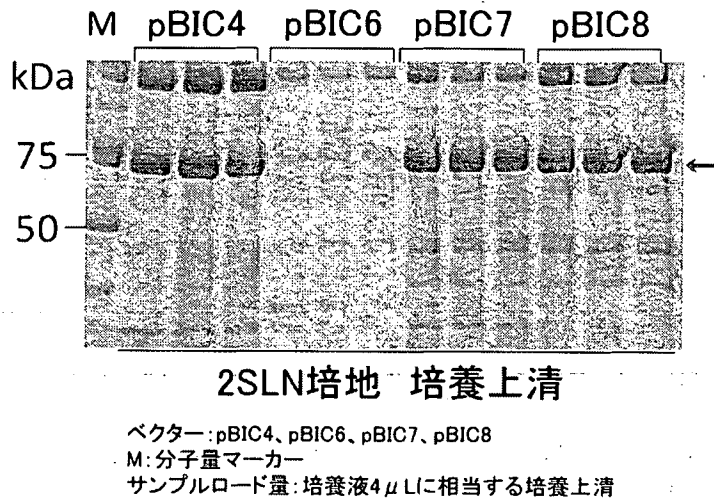


図3

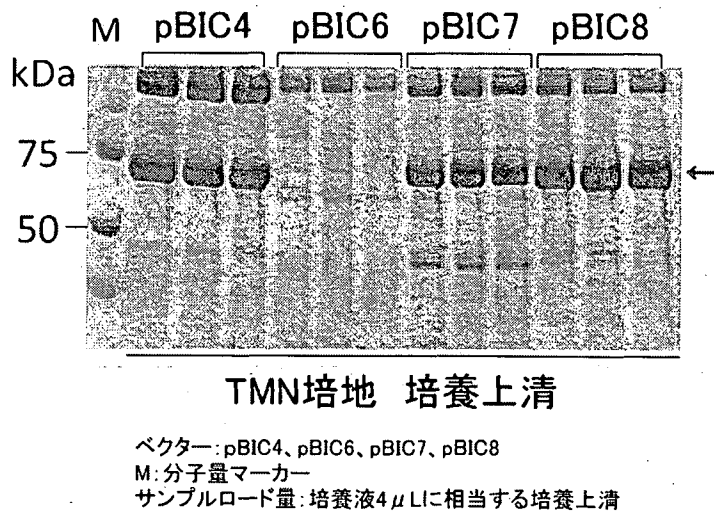
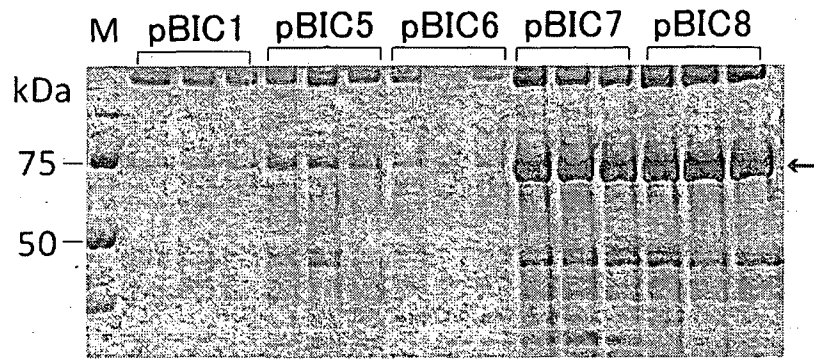


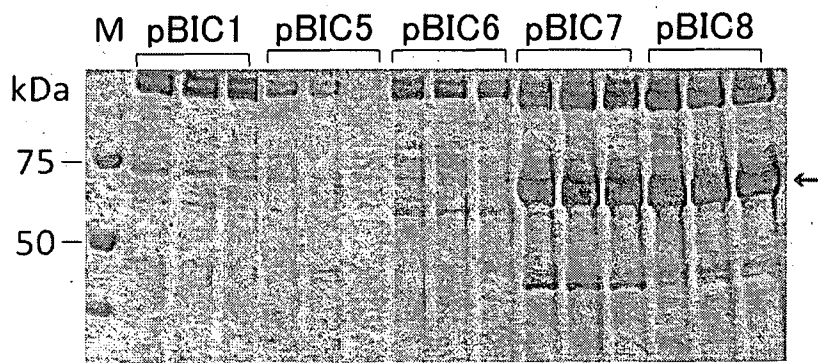
図4



2SLN培地 培養上清

ベクター: pBIC1、pBIC5、pBIC6、pBIC7、pBIC8
 M: 分子量マーカー
 サンプルロード量: 培養液4 μ Lに相当する培養上清

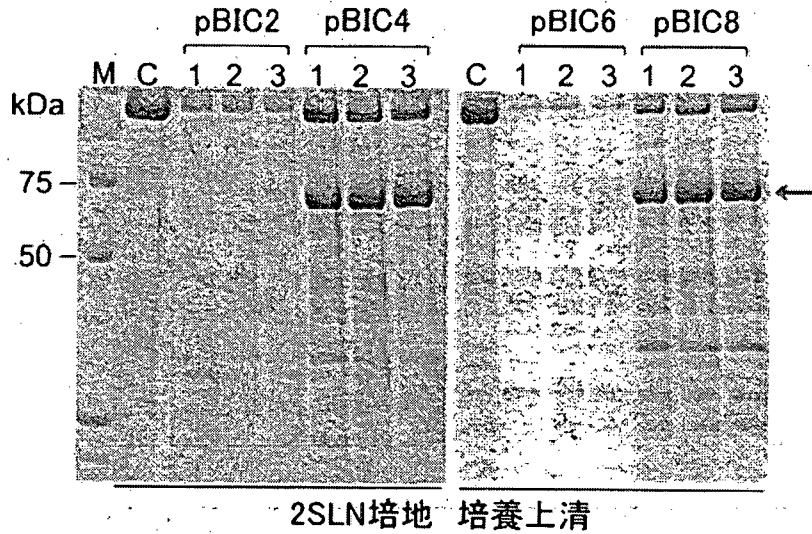
図5



TMN培地 培養上清

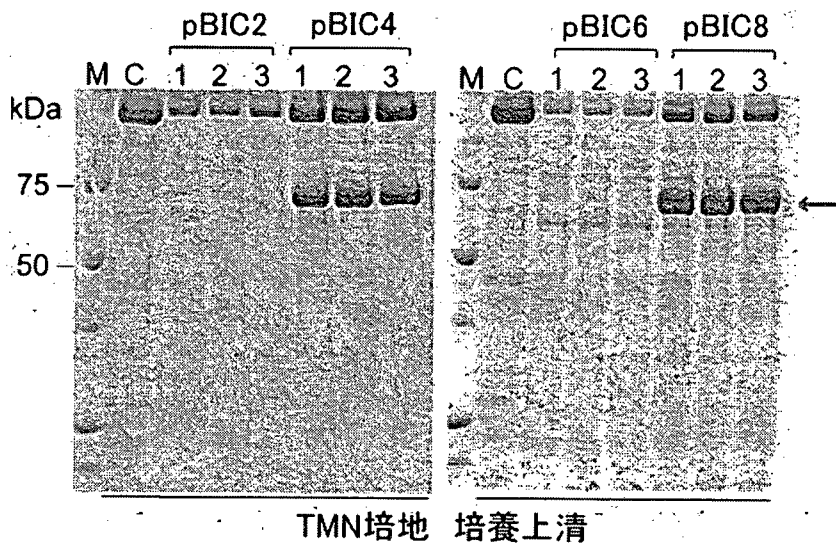
ベクター: pBIC1、pBIC5、pBIC6、pBIC7、pBIC8
 M: 分子量マーカー
 サンプルロード量: 培養液4 μ Lに相当する培養上清

図6



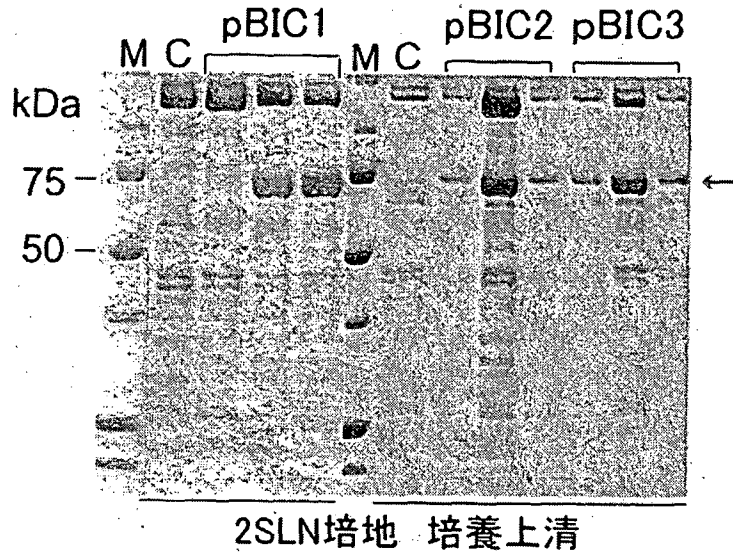
ベクター: pBIC2、pBIC4、pBIC6、pBIC8
 C: Mock (ベクターのみ)、M: 分子量マーカー
 サンプルロード量: 培養液4 μ Lに相当する培養上清

図7



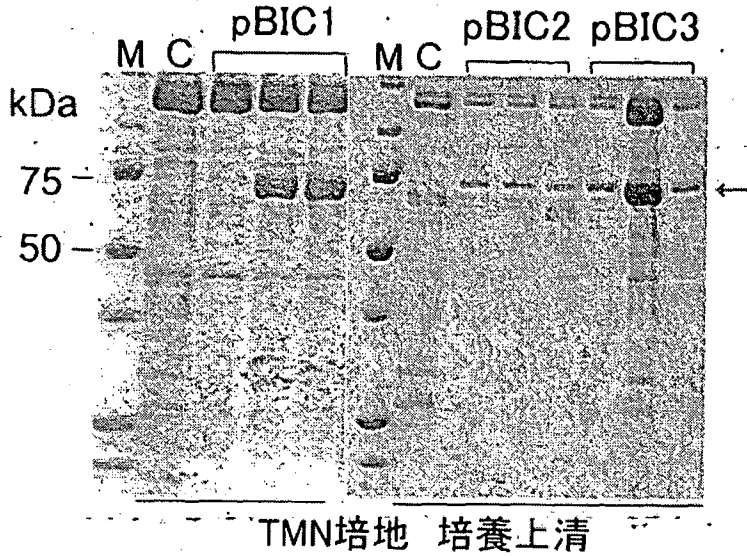
ベクター: pBIC2、pBIC4、pBIC6、pBIC8
 C: Mock (ベクターのみ)、M: 分子量マーカー
 サンプルロード量: 培養液4 μ Lに相当する培養上清

図8



ベクター: pBIC1、pBIC2、pBIC3
C: Mock (ベクターのみ) M: 分子量マーカー
サンプルロード量: 培養液4 μ Lに相当する培養上清

図9



ベクター: pBIC1、pBIC2、pBIC3
C: Mock (ベクターのみ) M: 分子量マーカー
サンプルロード量: 培養液4 μ Lに相当する培養上清

図10

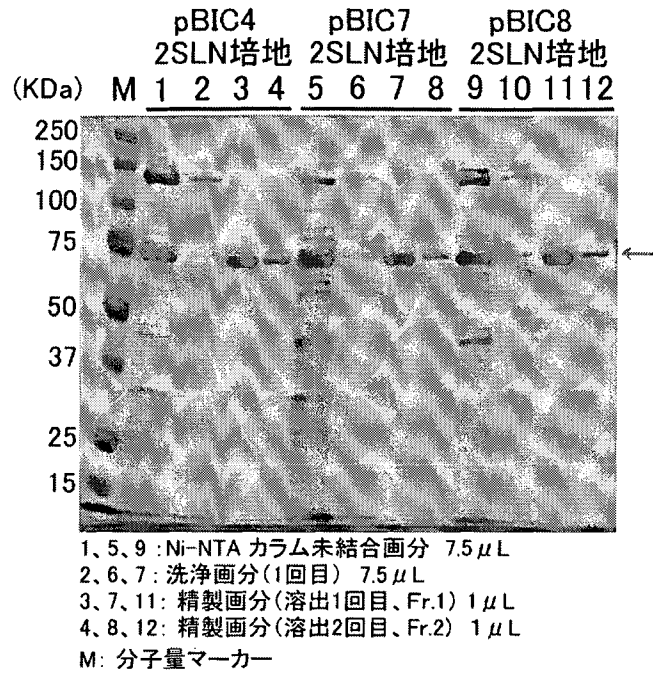


図11

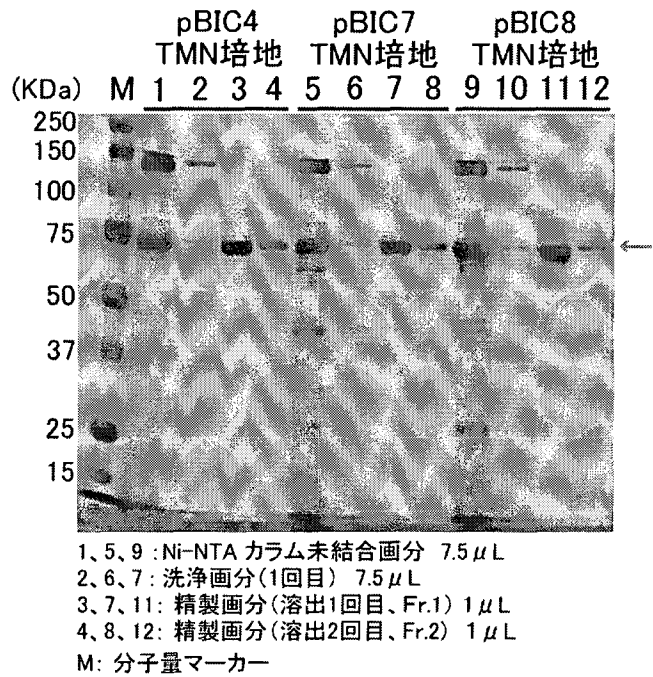


図12

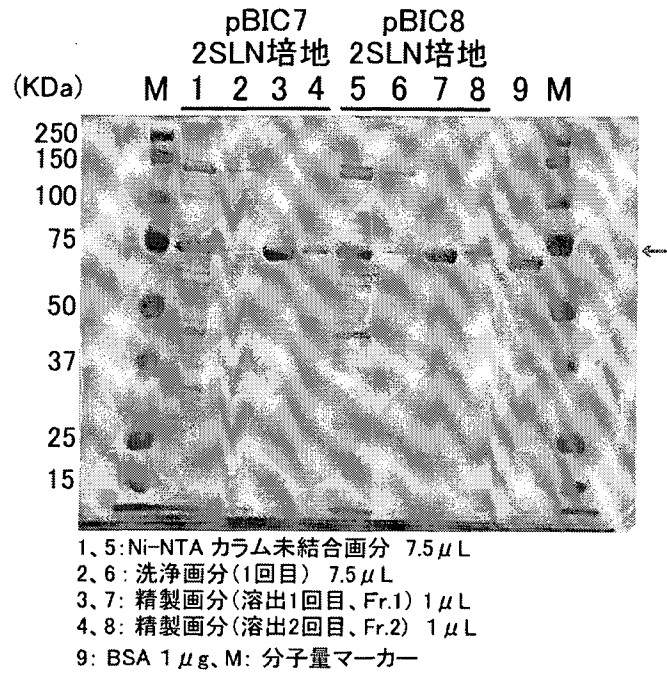


図13

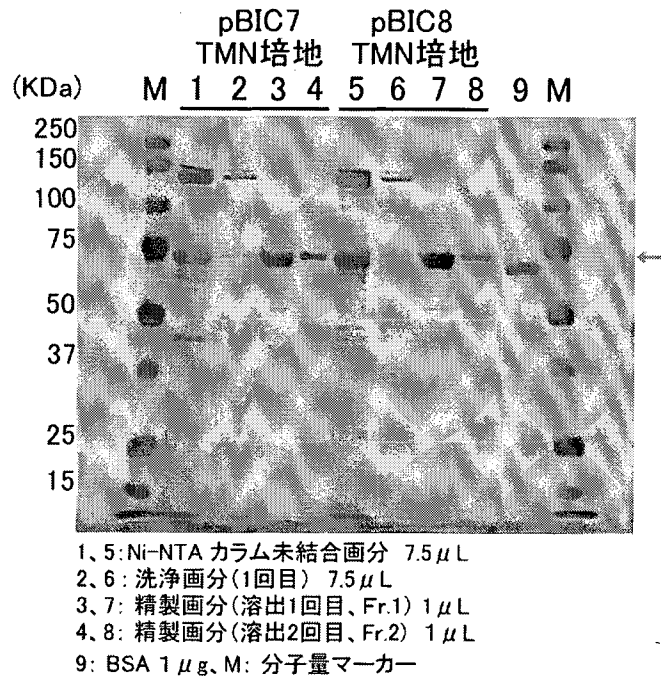


図14

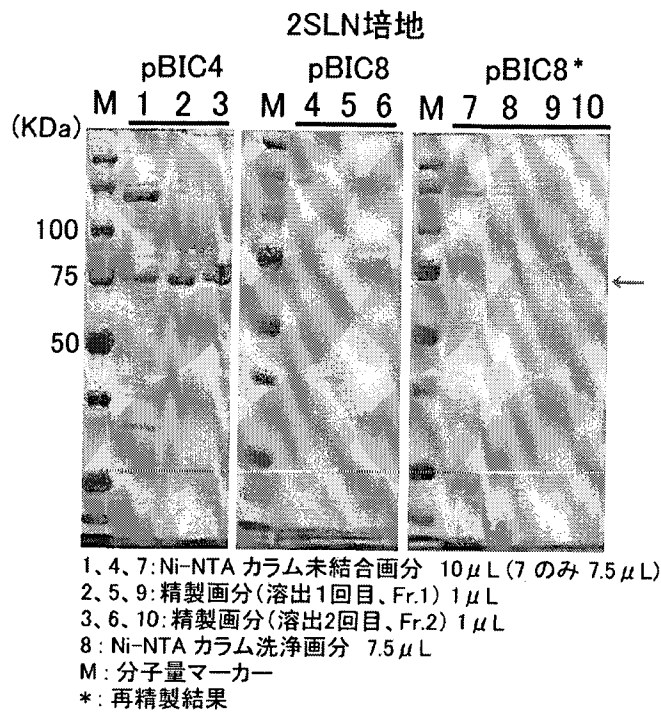


図15

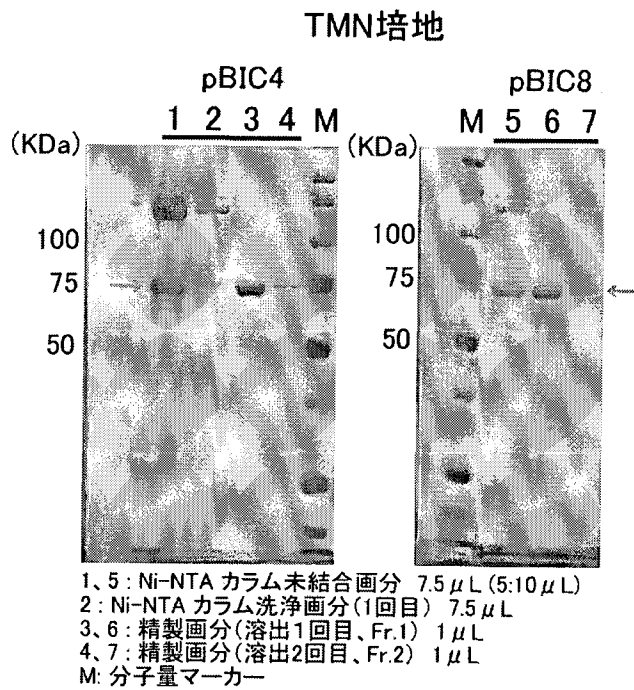


図16

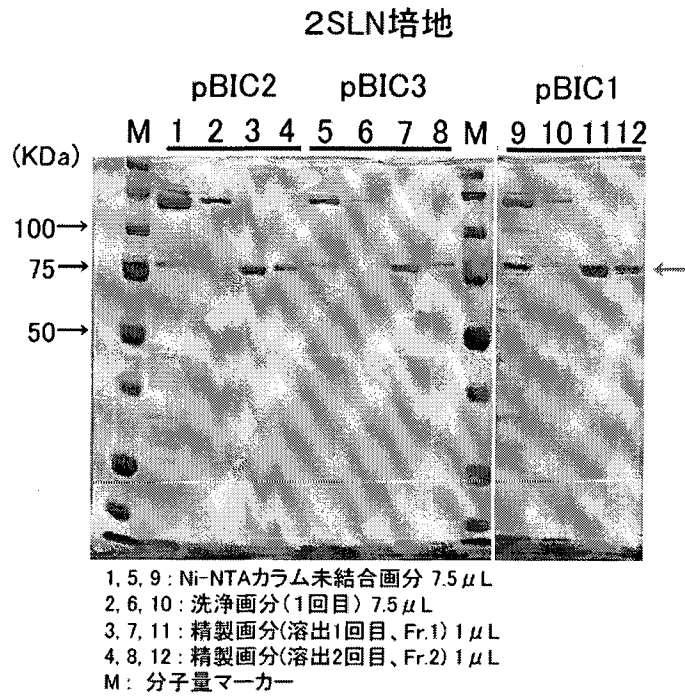


図17

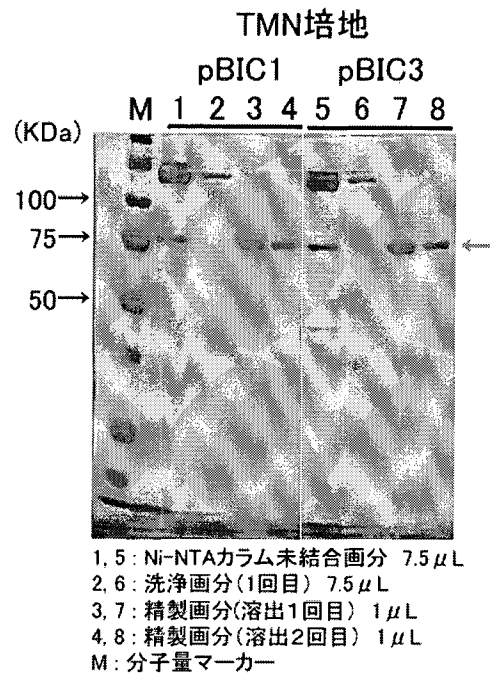


図18

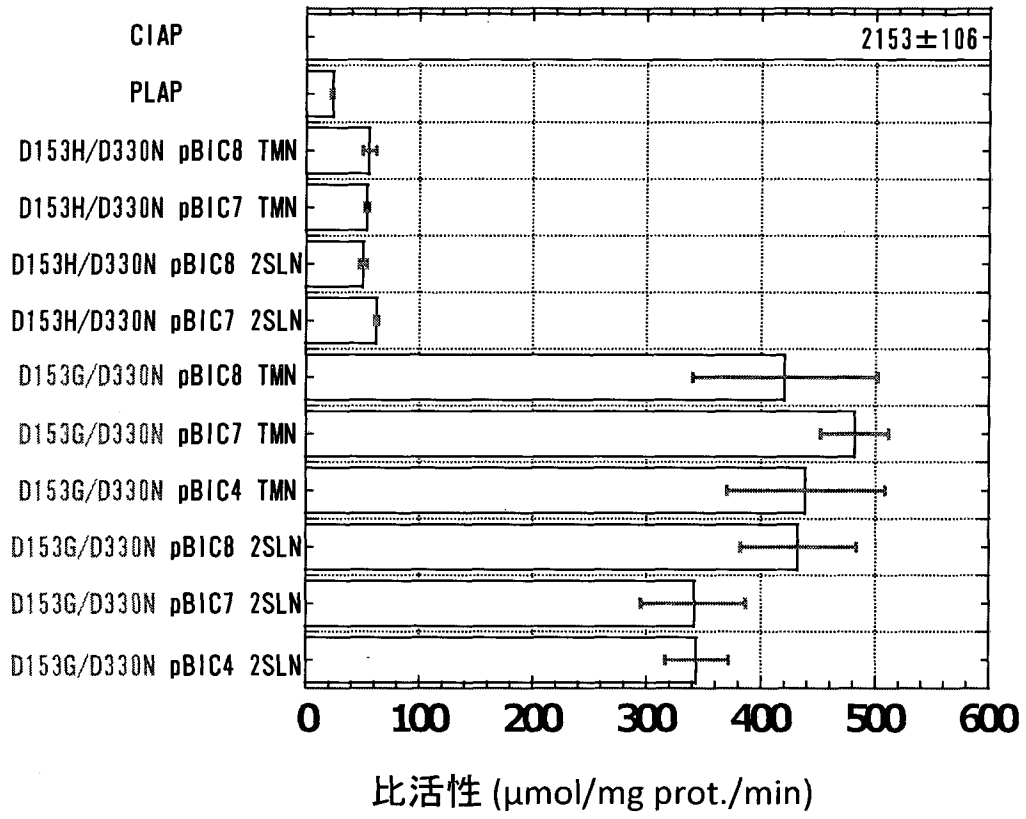


図19

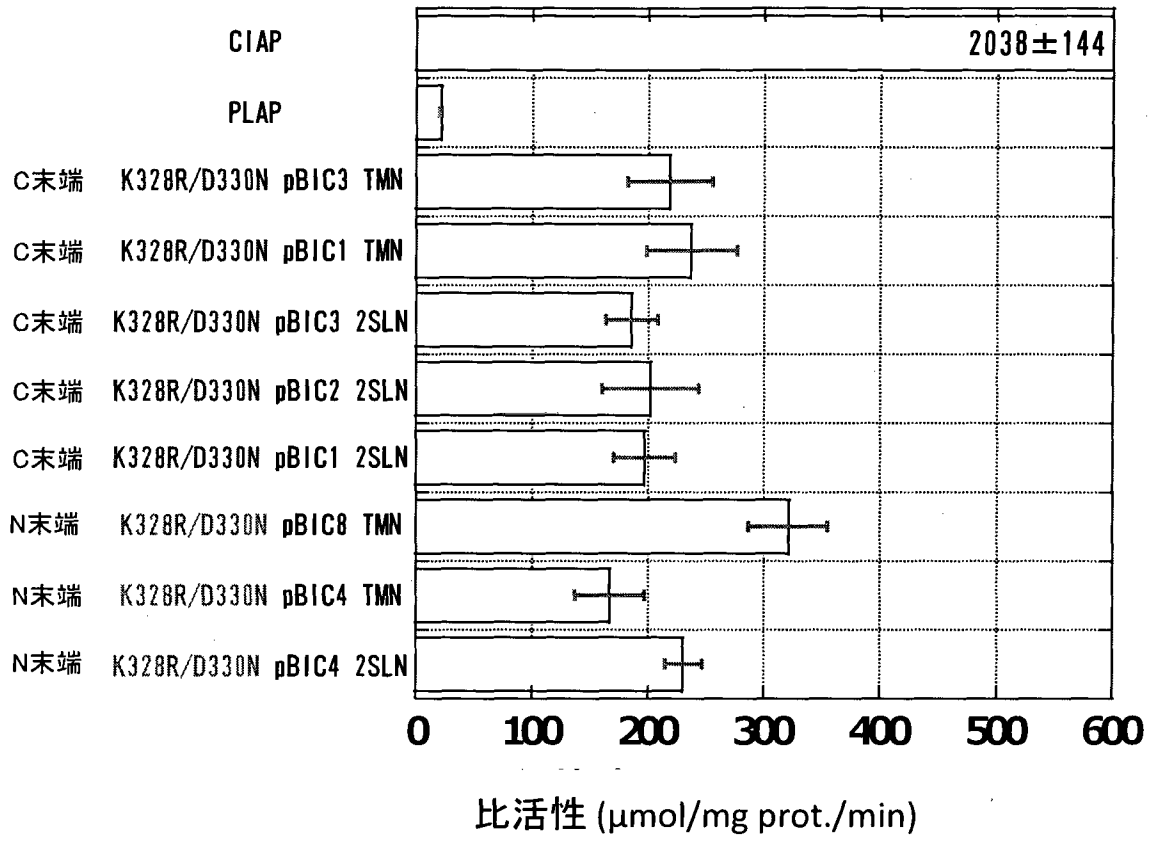
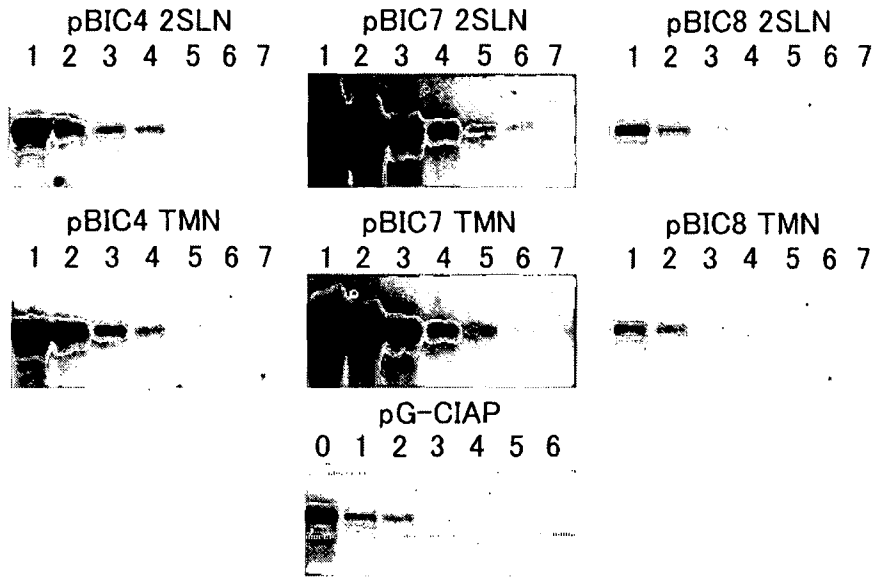
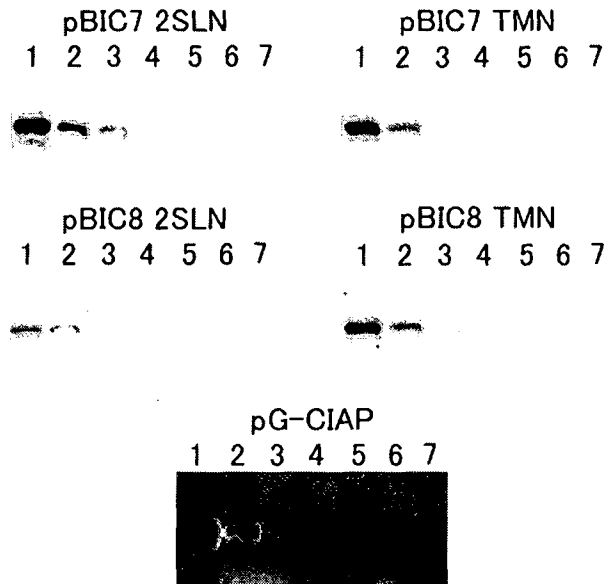


図20



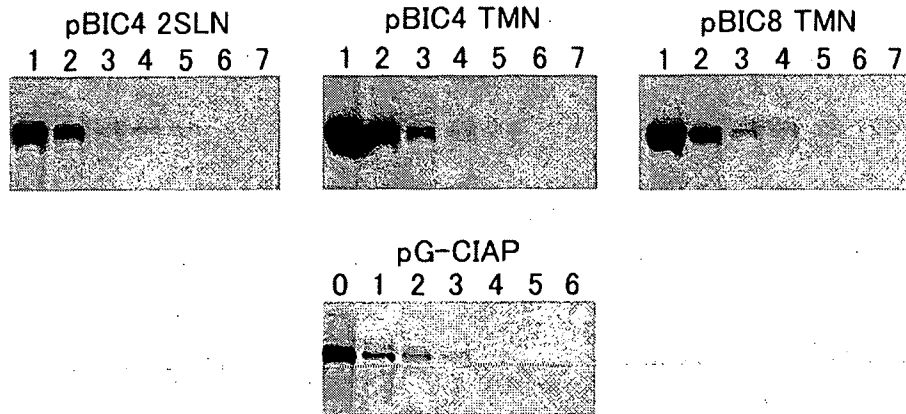
0: Transferrin 10 ng、1: 3 ng、2: 1 ng、3: 300 pg、4: 100 pg、
 5: 30 pg、6: 10 pg、7: 3 pg
 露光時間: 3,600sec.

図21



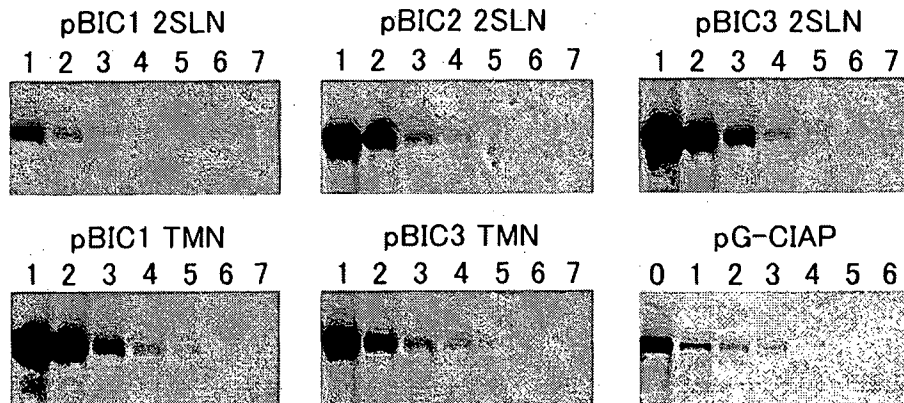
1: Transferrin 3 ng、2: 1 ng、3: 300 pg、4: 100 pg、
 5: 30 pg、6: 10 pg、7: 3 pg
 露光時間: 3,600sec.、処理濃度: 0.5 μg/mL

図22



0: Transferrin 10 ng、1: 3 ng、2: 1 ng、3: 300 pg、4: 100 pg、
 5: 30 pg、6: 10 pg、7: 3 pg
 露光時間: 3,600sec.、処理濃度: 0.5 μ g/mL

図23



0: Transferrin 10 ng、1: 3 ng、2: 1 ng、3: 300 pg、4: 100 pg、
 5: 30 pg、6: 10 pg、7: 3 pg
 露光時間: 3,600sec.、処理濃度: 0.5 μ g/mL

ADTYKLINGKTLKGETTTEAVDAAAEKVKQYANDNGVDGEWTYDDATKT
 FTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYAND
 NGVDGVWTYDDATKTFTVTEGGGSDVDNKFNKEQQNAFWELHLPNLNEE
QRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPKGGGGSTPEMPVLENRAAQG
 DITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAARNYAEGA
GGFFKGIDALPLTGQYTHYALNKKTKGKPDYVTDASAASATAWSTGVKTYNGALG
 VDIHEKDHP TILEMAKAAGLATGNVSTAELOGGGATPAALVAHVTSRKCYPGSAT
SEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQKTLRE
QAQARGYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLGLFADGNMPVRLGPKATYHIG
NIDKPAVTCIPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIELLSKNEKGGFFLQVEGASIDKQON
 HAANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAAHASQIVAPDTKA
PGLTQALNTKDGAVMVMMSYGNSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAAANVVGLTD
QTDLFYTMKAALGLKLEGSHHHHHHGGGGSMRHKGS

部分: Protein G、部分: Protein A、部分: BAP変異体酵素、
 部分: H6タグ、下線なし: リンカー、その他、
 部分: 変異部位

ADTYKLIVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVKQYANDNGVDGEWTYDDA
 TKFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFK
 QYANDNGVDGWTYDDATKFTVTEGGGSDVDNKFNKEQQNAFWEI
LHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPKGGGGSTPE
MPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILLIGDGM
GDSEITAARNYAEGAGGFFKIDALPLTGQYTHYALNKKTKGKPDYVTDSA
ASATAWSTGVKTYNGALGVDIHEKDHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELO
HATPAALVAHVTSRKCYPGSPATSEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNARADV
TLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAARGYQLVSDAASLNSVTEAN
QQKPLLGLFADGNMPVRLGPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPT
LAQMTDKAIELLSKNEKGGFFLQVEGASIDKQNHAAANPCGGQIGETVDLDEA
VQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTKAPGLTQALNTKDGAV
MVMSYGNSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAAANVGLTDQTDLFYTMKAA
LGLKLEGSHHHHHGGGGSMRHKGS

----- 部分: Protein G、 部分: Protein A、 部分: BAP変異体酵素、
 □ 部分: H6タグ、下線なし: リンカー、その他、
 == 部分: 変異部位

ADTYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVKQYANDNGVDGEWTY
 DDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAE
 TAEKAFKQYANDNGVDGWVWYDDATKFTVTEGGGSDVDNKFN
 KEQQNAFWELHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLN
 DAQAPKGGGSTPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAAL
 RDSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKGIDALPLT
 GQYTHYALNKKTKGKPDYVTD SAASATAWSTGVKTYNGALGVDIHEK
 DHPTILEMAKAAGLATGNVSTAEELQDATPAALVAHVTSRKYGPSA
 TSEKCPGNALEKGGKGSITEQLLNARADVTLGGGAKTFAETATAGE
 WQGKTLREQAARGYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGN
 MPVRWLGPKATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIE
 LLSKNEKGFLLQVEGASIDRQMHAAANPCGQIGETVDLDEAVQRALE
 FAKKEGNTLVIVTADHHAHQIVAPDTKAPGLTQALNTKDGAVMV
 MSYGNSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAANVVGLTDQDLDLFTYTMKA
 ALGLKLEGS[HHHHHH]GGGGSMRHKGS

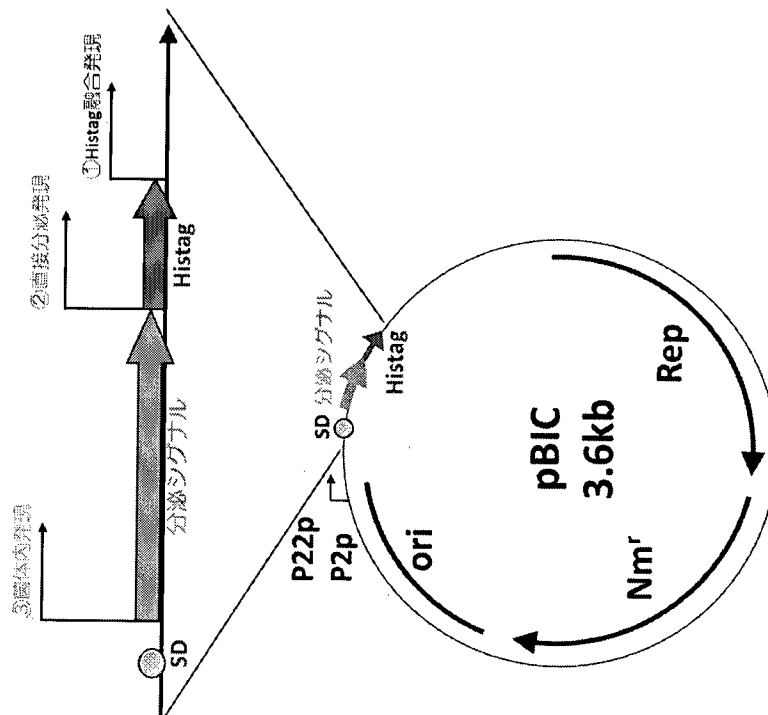
部分: Protein G、 部分: Protein A、 部分: BAP変異体酵素、
 部分: H6タグ、下線なし: リンカー、その他、
 部分: 変異部位

27

ADTEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILL
IGDGMGDSEITAARNYAEGAGGFFKGDALPLTGQYTHYALNKKTKGKPD
YVTDASAATAWSTGVKTYNGALGVDIHEKDHPHILEMAKAAGLATGNV
STAEIQDATPAALVAHVTSRKYGPSATSEKCPGNALEKGGKGSITEQLL
NARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAQAARGYQLVSDAASL
NSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVVRWLGPKATYHGNIDKPAVTCIPNPQ
RNDSVPTLAQMTDKAIELLSKNEKGFFLQVEGASIDRQNHAAANPCGQIG
ETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTKAPGLTQAL
NTKDGAVMVMYSYGNSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAAANVGLTDQTD
LFYTMKAALGLKLEGGGSDVDNKFNEQQNAFWELHLPNLNEEQRN
GFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKGGGGSTYKLVINGKTLKGET
TTEAVDAATAEKVKFYANDNGVDGEWYDDATKFTVTEKPEVIDASE
LTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWT
YDDATKFTVTEGSHHHHHHHGGGSMRHKGS

部分: Protein G、 部分: Protein A、 部分: BAP変異体酵素、
 部分: H6タグ、下線なし: リンカー、その他、
 部分: 変異部位

図28



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/077274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K19/00(2006.01)i, C12Q1/42(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C07K14/315(2006.01)n, C12N9/16(2006.01)n, C12N15/09(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)
C07K19/00, C12Q1/42, G01N33/68, C07K14/315, C12N9/16, C12N15/09

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/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUN S. and LEW A.M., Chimaeric protein A/protein G and protein G/alkaline phosphatase as reporter molecules, J. Immunol. Methods, 1992.07.31, Vol.152, No.1, p.43-48, abstract, fig. 5, page 48, left column, lines 25 to 30	1-3
Y	GORBATIUK O.B., et al., Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-BAPmut, Biopolym. Cell, 2013.02, Vol.29, No.1, p.49-54, abstract, fig. 1	1-3

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 06 January 2015 (06.01.15)	Date of mailing of the international search report 20 January 2015 (20.01.15)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/077274

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 9-98780 A (Commissariat A L'energie Atomique), 15 April 1997 (15.04.1997), claim 6 & US 5891699 A & EP 752475 A1 & FR 2736065 A	1-3
Y	ELIASSON M. et al., Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G, J. Biol. Chem., 1988.03.25, Vol.263, No.9, p.4323-4327, fig. 2	1-3
P,Y	JP 2014-100095 A (Kyushu University), 05 June 2014 (05.06.2014), abstract (Family: none)	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, C12Q1/42(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C07K14/315(2006.01)n, C12N9/16(2006.01)n, C12N15/09(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. C07K19/00, C12Q1/42, G01N33/68, C07K14/315, C12N9/16, C12N15/09		
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/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
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
Y	SUN S. and LEW A. M., Chimaeric protein A/protein G and protein G/alkaline phosphatase as reporter molecules, J. Immunol. Methods, 1992.07.31, Vol.152, No.1, p.43-48, 要約、図5、第48頁左欄第25-30行	1-3
Y	GORBATIUK O. B., et al., Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-BAPmut, Biopolym. Cell, 2013.02, Vol.29, No.1, p.49-54, 要約、図1	1-3
<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 「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 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06.01.2015	国際調査報告の発送日 20.01.2015	
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) 小金井 悟 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 9 6 1

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
Y	JP 9-98780 A (コミツサリア タ レネルギー アトミック) 1997.04.15, 請求項 6 & US 5891699 A & EP 752475 A1 & FR 2736065 A	1-3
Y	ELIASSON M. et al., Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G, J. Biol. Chem., 1988.03.25, Vol.263, No.9, p.4323-4327, 図 2	1-3
P, Y	JP 2014-100095 A (国立大学法人九州大学) 2014.06.05, 要約 (フ ァミリーなし)	1-3