

(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
2010 年 10 月 7 日(07.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/114031 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) C07K 17/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/055887
- (22) 国際出願日: 2010 年 3 月 31 日(31.03.2010)
- (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 2009-087839 2009 年 3 月 31 日(31.03.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒1058422 東京都港区虎ノ門 2 丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP). 株式会社 ウイルス医科学研究所 (VIRUS IKAGAKU KENKYUSHO INC.) [JP/JP]; 〒5600082 大阪府豊中市新千里東町 1-4-2 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高倉 由光 (TAKAKURA, Yoshimitsu) [JP/JP]; 〒4380802 静岡県磐田市東原 700 番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP). 岡 直美 (OKA, Naomi) [JP/JP]; 〒4380802 静岡県磐田市東原 700 番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP). 近藤 一博 (KONDO, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒1058461 東京都港区西新橋 3 丁目 2 番 8 号 東京慈恵会医科大学内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外 (ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING SUBSTANCE IN BIOLOGICAL SAMPLE

(54) 発明の名称: 生物学的試料中の物質を検出する方法

(57) Abstract: Disclosed are: a method for detecting a substance in a biological sample; a carrier for use in the method; and a kit. The method comprises the following steps 1) to 4): 1) providing a carrier having a biotin-binding protein bound thereto, and a biotinylated protein comprising biotin and a protein capable of binding specifically to a substance to be detected and bound to biotin; 2) binding the biotinylated protein to the carrier provided in step 1) to produce a carrier having the biotinylated protein bound thereto; 3) adding the component (a) shown below and either one of the components (b-i) and (b-ii) shown below to the carrier having the biotinylated protein bound thereto prepared in step 2) and mixing the components and the carrier together; and 4) detecting the substance which has been bound specifically to the biotinylated protein: (a) a biological sample; (b-i) both a cell disruption extract which is prepared from a cell homogeneous to a host cell used for the expression of the biotin-binding protein and so on in step 1) and a biotin-binding protein; and (b-ii) a cell disruption extract prepared from a cell which is homogeneous to a host cell used for the expression of the biotin-binding protein and so on in step 1) and which has been so modified by a genetic engineering technology as to express the biotin-binding protein.

(57) 要約: 本発明は、生物学的試料中の物質を検出する方法、当該方法に使用する担体、及びキットに関する。本発明の方法は、1) ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体、及び、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質を準備し; 2) 工程 1) で準備した担体にビオチン化タンパク質を結合させて、ビオチン化タンパク質が結合した担体を作成し; 3) 工程 2) で作成したビオチン化タンパク質が結合した担体に、(a) 生物学的試料、及び (b-i) 工程 1) のビオチン結合性タンパク質等を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは (b-ii) 工程 1) のビオチン結合性タンパク質等を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を混合して添加する; そして、4) ビオチン化タンパク質と特異的に結合した被検物質を検出することを含む。

WO 2010/114031 A1

明 細 書

発明の名称： 生物学的試料中の物質を検出する方法

技術分野

[0001] 本発明は、生物学的試料中の物質を定性的、及び／又は、定量的に検出する方法に関する。本発明の方法により、特に生物学的試料中に微量に存在し、通常は検出が困難な物質の検出も可能である。

背景技術

[0002] 生物学的試料中の物質を検出するために、当該物質（被検物質）に対し特異的に結合する物質を利用する方法が、従来より広く用いられている。例えば抗原抗体反応を利用するいわゆるイムノアッセイや、核酸の鎖同士の水素結合を利用する核酸ハイブリダイゼーション等である。例えばイムノアッセイの場合、被検物質が抗体であれば抗原を、逆に被検物質が抗原であれば、抗体をマイクロプレートや微小ビーズ、あるいはセンサーチップなどの担体に固定化し、被検物質と反応させた後、抗原抗体反応の有無や程度を検出・測定する。

[0003] 固定化の汎用的な方法として、疎水結合、共有結合などが知られている。「疎水結合」は、担体の疎水性表面と、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質（以下、「特異的タンパク質」と呼称する場合がある）の疎水性部分との相互作用を利用して、担体と特異的タンパク質とを結合させるものであり、特別な試薬を必要としない点で簡便である。しかしながら、概して結合力は弱く、ELISA（Enzyme linked immunosorbent assay）等に用いる場合、結合後の洗浄操作等で、タンパク質が担体から離れてしまうことが多い。また、疎水結合により特異的タンパク質と担体を結合させた場合、そのタンパク質の多くが、その機能を完全に、あるいは部分的に失ってしまう場合がある。「共有結合」は、特異的タンパク質中の官能基（例えばアミノ基）と担体表面に配置された官能基（例えばカルボキシル基）との相互作用を利用するものであり、結合力は強い

。しかし、共有結合により特異的タンパク質と担体とを結合させた場合、疎水結合の場合と同様に、結合させたタンパク質においてしばしば、その機能を完全に、あるいは部分的に失ってしまう場合がある。

[0004] 疎水結合や共有結合の他にも、複数のヒスチジンをタンパク質の末端に融合させ、このヒスチジントグをもつ融合タンパク質を、表面にニッケルが配置された、例えばプロテインチップ等の基板などに結合させる方法が知られている。しかしながら、ヒスチジントグとニッケルイオンの相互作用はあまり強くなく、さらにニッケルイオンには、様々な生体分子との非特異的な結合が知られている。

[0005] あるいはまた、アビジンやストレプトアビジンのビオチン（ビタミンH）結合性を利用して、タンパク質を担体に結合させる方法が考案されている。アビジンは、卵白由来の糖タンパク質でビオチンに極めて強く結合する。アビジンとビオチンの相互作用は最も強い非共有結合の一つである（Green (1975) Adv Protein Chem 29: 85-133）。一方、ストレプトアビジンは放線菌由来のアビジン様タンパク質で、やはりビオチンと強く結合する。ビオチンは分子量244の低分子であり、様々な生体分子、例えばタンパク質や核酸、脂質、あるいは糖鎖などに、市販のキット等を用いて容易に結合させることができ、さらにビオチン化された分子の性質を変化させることが少ない。これまでに（ストレプト）アビジン-ビオチンの相互作用は、その作用力の強さから、例えば、抗原や抗体の検出など分子生物学や生化学の分野で、広範に用いられている（Green (1990) Methods Enzymol 184: 51-67）。アビジンやストレプトアビジンを利用して、タンパク質を担体に結合させる場合、まず（ストレプト）アビジンを共有結合や疎水結合によりマイクロプレートなどのような基板に結合し、さらにビオチン化したタンパク質と結合させることにより固定化させる方法がある。あるいはまた、ビオチンを結合させた基板に、まずアビジンを、アビジン-ビオチン結合によって結合させ、ここへビオチン化した所望のタンパク質を、アビジンの別のビオチ

ンポケットに結合させることで、基板ービオチンーアビジンービオチンー所望のタンパク質という順序で固定させる技術が報告されている（特開平４－２３６３５３）。このような方法で固定化したプレートを用いて被検物質を検出することができる。

[0006] 一般に、抗原や抗体といった被検物質に特異的に結合するタンパク質を疎水結合又は共有結合により結合させた固相を用いた特異的結合アッセイ系において、バックグラウンドシグナルの原因となる非特異結合を低減させることは、重要な課題である。この課題を解決する方法として、例えば、細菌成分抽出液を検出用試薬に含有させる方法（特開昭５９－９９２５７）、被検物質に特異的に結合する組換えタンパク質産生に使用したベクターと同種でありかつ当該タンパク質をコードする遺伝子を含まないベクターが導入された宿主細胞の培養成分を試料に添加する方法（特開平８－４３３９２）、被検物質に特異的に結合する組換えタンパク質を産生した細胞と同種であり、かつ当該タンパク質を含まない細胞からの水抽出液を加熱処理した後、その水溶性画分を試料に添加する方法（特開２００４－３０１６４６）などが提案されている。これらの方法により、非特異結合の抑制には一定の効果が見られている。

[0007] また、アビジンービオチン結合を利用したアッセイにおいても、被検物質に特異的にタンパク質を疎水結合、共有結合等により結合させた固相を用いたアッセイと同様に、バックグラウンドシグナルへの対処が大きな問題である。これに対し、上述の非特異抑制方法に加え、不活性化した（ストレプト）アビジンを結合させた固相に試料を接触させた後に、活性（ストレプト）アビジンを結合させた固相に接触させる方法（特開平８－１１４５９０）、アビジン結合固相にビオチン化物質を結合させた後に、ポリエチレングリコールとビオチンとの抱合体を接触させる方法（特開平１１－２１１７２７）やビオチン含有溶液を接触させる方法（特開２００２－４８７９４）などが提案されている。しかしながら、実用上の効果は十分とは言えなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開昭59－99257
特許文献2：特開平8－43392
特許文献3：特開2004－301646
特許文献4：特開平4－236353
特許文献5：特開平8－114590
特許文献6：特開平11－211727
特許文献7：特開2002－48794

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Green (1975) Adv Protein Chem
29 : 85－133
非特許文献2：Green (1990) Methods Enzymol
184 : 51－67

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、生物学的試料中の物質を定性的、及び／又は、定量的に検出する方法を提供することを目的とする。
- [0011] 本発明は特に、生物学的試料中に微量に存在する物質を、バックグラウンドシグナルを抑えつつ、定性的、及び／又は、定量的に検出・測定する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは、鋭意研究に努めた結果、ビオチン－ビオチン結合性タンパク質間の結合を用いて、被検物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質を担体に固定化した系において、特に生物学的試料中に微量に存在する物質の検出にあたり、バックグラウンドシグナルを低下する工夫を行って、本発明を想到した。具体的には、生物学的試料に細胞破碎抽出液及びビオチン結合性タンパク質を添加した場合において

、非特異結合を下げる効果が顕著であった。あるいは、ビオチン結合性タンパク質を添加する代わりに、遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を添加しても同様の効果が得られた。

[0013] 本発明は、以上の知見に基づき、アビジンービオチン結合を用いて、被検物質を特異的に検出する物質を担体に固定化した系において、非特異結合を減少させたより感度の高い検出方法を提供するものである。

[0014] 限定されるわけではないが、本発明は以下の態様を含む。

[0015] [態様 1]

生物学的試料中の物質を検出する方法であって、

1) ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体、及び、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質を準備し；

2) ビオチンービオチン結合性タンパク質間の結合を介して、工程 1) で準備した担体にビオチン化タンパク質を結合させて、ビオチン化タンパク質が結合した担体を作成し；

3) 工程 2) で作成したビオチン化タンパク質が結合した担体に、

(a) 生物学的試料、及び

(b-i) 工程 1) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは

(b-ii) 工程 1) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を混合して添加する；そして、

4) ビオチン化タンパク質と特異的に結合した被検物質を検出する

ことを含む、前記方法。

[0016] [態様 2]

態様 1 の工程 3 (b-i) において、細胞破碎抽出液として、任意のベクターを含む細胞から抽出した細胞破碎抽出液を添加する、態様 1 に記載の方法。

[0017] [態様 3]

ビオチン結合性タンパク質がタマビジン又はその変異体である、態様 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

[0018] [態様 4]

生物学的試料が、血液、血清、脳脊髄液、唾液、咽頭拭い液、汗、尿、涙、リンパ液、精液、腹水、及び母乳からなる群から選択される、態様 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

[0019] [態様 5]

生物学的試料を希釈するための剤であって、

- 1) 細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、又は
- 2) 遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含む剤。

[0020] [態様 6]

生物学的試料中の物質を検出するためのキットであって、

A) 検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質が、ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間結合によって結合している、担体；並びに、

B-i) A) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは

B-ii) A) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的

に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含む、生物学的試料を希釈するための剤；
を含むキット。

発明の効果

- [0021] 本発明の方法により、生物学的試料中の被検物質の検出において、バックグラウンドシグナルを抑え、より高感度な検出を安定的に行うことができる。本発明の方法により、特に生物学的試料中に微量に存在し、通常は検出や正確な定量が困難な物質の検出・測定も可能になる。

図面の簡単な説明

- [0022] [図1] 図1はBioEaseタグ（ビオチン化タグ）融合S I T H-1タンパク質の発現を示す。具体的には、図1 AはS I T H-1タンパク質検出のためのウェスタンブロッティングの結果、図1 Bはビオチン化タンパク質検出のための活性染色の結果である。
- [0023] BioEaseタグ融合S I T H-1タンパク質を発現させた大腸菌BL 21（DE3）を超音波破碎し、得られた大腸菌粗抽出液画分を、20 μ g 総タンパク質／レーンとなるようSDS-PAGE（15% アクリルアミドゲル）で展開し、その後PVDF膜に転写した。
- [0024] 具体的には、図1 Aが抗S I T H-1抗体（1／1000希釈）を反応後、アルカリフォスファターゼ（AP）標識抗ウサギIg G抗体（1／1000希釈）を反応させ、その後APによる染色を行った。図1 Bは、ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）（1／1000希釈）反応後の染色像である。図1 A、図1 BともにControlは発現ベクターのみをもつ大腸菌由来の抽出サンプルを示す。BioEaseタグ融合S I T H-1タンパク質の位置を矢印で示した。
- [0025] 図1 BのStreptavidin-HRP染色では、太いバンドが2本検出された。下方のバンドは、図1 Aの抗S I T H-1抗体で検出されない

ことから、S I T H-1 部位の一部が分解された B i o E a s e タグ付きタンパク質であると考えられた。

[図2] 図2は、各種の血清希釈液の非特異結合へ及ぼす効果を表すグラフである。血清を、P B S で希釈した区を白四角（破線）、P B S に精製タマビジン2（T M 2）を加えた液で希釈した区を白四角（実線）、発現ベクターのみを持つ大腸菌破碎抽出液で希釈した区をアスタリスク（破線）、発現ベクターのみを持つ大腸菌破碎抽出液に精製 T M 2 を加えた液で希釈した区をアスタリスク（実線）、T M 2 を発現させた大腸菌破碎抽出液で希釈した区を黒丸（実線）で示した。各グラフの縦軸（ルミネッセンス）は抗 S I T H-1 抗体の検出量を示し、横軸は段階希釈した抗 S I T H-1 抗体の希釈割合を示す。

[図3] 図3は、図2に示した結果から、抗 S I T H-1 抗体の希釈割合それぞれに関して、S/N比を求めたグラフである。

[0026] 血清を、P B S で希釈した区を白四角（破線）、P B S に精製タマビジン2（T M 2）を加えた液で希釈した区を白四角（実線）、発現ベクターのみを持つ大腸菌破碎抽出液で希釈した区をアスタリスク（破線）、発現ベクターのみを持つ大腸菌破碎抽出液に精製 T M 2 を加えた液で希釈した区をアスタリスク（実線）、T M 2 を発現させた大腸菌破碎抽出液で希釈した区を黒丸（実線）で示した。

発明を実施するための形態

[0027] I. 生物学的試料中の物質を検出する方法

本発明の検出方法は、

- 1) ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体、及び、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質を準備し；
- 2) ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間の結合を介して、工程1)で準備した担体にビオチン化タンパク質を結合させて、ビオチン化タンパク質が結合した担体を作成し；

3) 工程2)で作成したビオチン化タンパク質が結合した担体に、

(a) 生物学的試料、及び

(b-i) 工程1)のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは

(b-ii) 工程1)のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を混合して添加する；そして、

4) ビオチン化タンパク質と特異的に結合した被検物質を検出することを含む。

[0028] 1. 生物学的試料中の検出物質

本発明は、生物学的試料中の物質を検出する方法に関する。

[0029] 本発明における生物学的試料としては、検出対象となる物質が含まれうるものであれば特段限定されない。生物から採取された細胞、組織又はその破片等を含む試料、例えば体液、さらに好ましくは、血液、血清、脳脊髄液、唾液、咽頭拭い液、汗、尿、涙、リンパ液、精液、腹水及び母乳などである。

[0030] これらの体液は、必要に応じ希釈して用いる。希釈率は通常2倍ないし10000倍程度、好ましくは100倍ないし1000倍程度であるが、これに限定されない。希釈するための溶液は任意の緩衝液が使用されうるが、適当なブロッキング剤を含んでも良い。ブロッキング剤としては、非特異的な結合を抑制する効果が高いものが良く、BSAやカゼイン等、当業者に周知のブロッキング剤を使用することができる。

[0031] 本発明の被検物質としては、生物学的試料中の検出又は測定が望まれる物質であれば特段の制限はないが、抗体や抗原などのタンパク質やその断片、

ペプチド、核酸、ホルモン、糖質、糖脂質、あるいは生物学的試料中に含まれる細菌やウイルスなどを好ましく挙げることができる。

[0032] 本発明は生物学的試料中、濃度が低く従来の方法では検出や正確な定量が困難であった物質の測定も可能となる。例えば、被検物質が血清中の抗体であって、さらにその抗体価が低い場合（例えば、血清を1000倍希釈した場合には検出が難しいが、100倍希釈した場合に、ようやく検出が可能となるような低い抗体価の場合）には、血清の希釈率を抑制することが必要となり、その結果、血清中成分に由来する非特異的な結合も増加してしまうため、既存の方法では当該抗体の検出や定量は困難であるが、本発明の方法によって容易に検出、あるいはより正確に定量することが可能となる。

[0033] 限定されるわけではないが、本発明における被検物質が抗体の場合、例えば、Small protein encoded by the Intermediate Transcript of HHV-6（HHV-6の潜伏感染中間段階転写物によってコードされる小タンパク質）（SITH-1）に対する抗体が含まれる。その他にも、ヘルペスウイルスの上記以外の抗原に対する抗体、サイトメガロウイルス、肝炎ウイルス、HIVウイルス、HTLVウイルス、麻疹ウイルス、インフルエンザウイルスなどに由来するウイルス関連抗原に対する抗体、あるいはヘリコバクター・ピロリ菌などに由来する細菌関連抗原に対する抗体、あるいは菌類関連抗原に対する抗体などが挙げられる。

[0034] また、限定されるわけではないが、本発明における被検物質が抗原の場合、上記病原体由来の抗原や、癌抗原、前立腺特異抗原等が挙げられる。

[0035] PCT/JP2008/67300の記載内容に基づくSITH-1

（1）SITH-1タンパク質、核酸

SITH-1タンパク質、核酸の構造及び機能は、PCT/JP2008/67300に開示されており、その全内容が本明細書中に援用される。

[0036] SITH-1は、ヘルペスウイルスの潜伏感染に関与する因子、より詳細にはヘルペスウイルスの潜伏感染時に特異的に発現するタンパク質である。

ここで「ヘルペスウイルスの潜伏感染時に特異的に発現する」とは、ヘルペスウイルスが感染している宿主において、ヘルペスウイルスが潜伏感染している（増殖感染していない）際に、特異的に、ヘルペスウイルス由来の遺伝子又は遺伝子産物が発現することをいう。

[0037] S I T H-1 のタンパク質及び核酸としては、例えば、（a）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、及びこのタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

[0038] 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる S I T H-1 タンパク質は、後述する参考例に示すように、ヒトヘルペスウイルス-6（HHV-6）の潜伏感染時に特異的に発現するタンパク質として単離・同定されたものである。S I T H-1 タンパク質は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し、159 アミノ酸からなる、分子量約 17.5 kDa のタンパク質である。

[0039] S I T H-1 タンパク質は、S I T H-1 遺伝子の核酸によってコードされている。この S I T H-1 遺伝子の cDNA は、配列番号 3 に示すように、1795 塩基対（約 1.79 kbp）のサイズを有しており、954 番目から 956 番目の塩基配列が開始コドン（Kozak ATG）であり、1431 番目から 1433 番目の塩基配列が終止コドン（TAA）である。したがって、上記 S I T H-1 核酸は、配列番号 3 に示す塩基配列のうち、954 番目から 1430 番目までの塩基配列をオープンリーディングフレーム（ORF）として有しており、この ORF は、477 塩基対（約 0.48 kbp）のサイズを有している。S I T H-1 の cDNA のうち、ORF 領域を表す塩基配列を配列番号 2 に示す。なお、配列番号 2 に示す塩基配列は、ストップコドンの 3 塩基を含んで記載している。

[0040] S I T H-1 核酸は、HHV-6 が潜伏感染している細胞の細胞質において常に発現している一方、増殖感染細胞では発現が認められない。S I T H-1 タンパク質をコードする核酸は、これまでに報告した HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子（H6LT）と相補鎖の関係にある DNA にコードされ、その発現は、HHV-6 の潜伏感染の中間段階において増強する。これらの事

実から、S I T H-1 タンパク質は、H H V-6 の潜伏感染時に特異的に発現するタンパク質であると考えられる。

[0041] S I T H-1 タンパク質は、宿主タンパク質である C A M L (c a l c i u m-m o d u l a t i n g c y c l o p h i l i n l i g a n d、A c c e s i o n # ; U 1 8 2 4 2) と結合し、グリア細胞内カルシウム濃度を上昇させる。C A M L は宿主生体内において、脳とリンパ球に多く存在し、細胞内のカルシウム濃度を上昇させることが知られているタンパク質である。また、S I T H-1 タンパク質の発現による細胞内カルシウム濃度の上昇は、潜伏感染細胞内の全般的なシグナル伝達の活性化をもたらし、H H V-6 の効率的な再活性化に寄与するものと考えられる。

[0042] H H V-6 は脳内のグリア細胞で潜伏感染することが知られており、潜伏感染時や活性の高い潜伏感染状態である中間段階にある H H V-6 が S I T H-1 を発現させると、グリア細胞内のカルシウム濃度が上昇するものと考えられる。脳の細胞における細胞内カルシウム濃度の上昇は、気分障害などの精神障害と大いに関係するものと考えられている（理研年報 2 0 0 3）。

[0043] S I T H-1 タンパク質は、宿主のタンパク質である C A M L と結合する活性を保持し、細胞内カルシウム濃度を上昇させる機能を有するものである。また、S I T H-1 タンパク質を、このタンパク質が最も強く発現すると考えられる脳内のグリア細胞で発現させることにより、精神障害を誘導できる。それゆえ、S I T H-1 タンパク質は、ヘルペスウイルスの潜伏感染時又は再活性化初期に発現し、宿主に精神障害を生じさせる機能を有すると考えられる。

[0044] (2) S I T H-1 に対する抗体

S I T H-1 に対する抗体は、S I T H-1 タンパク質又はその変異体、あるいはそれらの部分ペプチドを抗原として、公知の方法によりポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体として得られる。公知の方法としては、例えば、文献 (H a r l o w らの「A n t i b o d i e s : A l a b o r a t o r y m a n u a l (C o l d S p r i n g H a r b o r L

aboratory, New York (1988))」、岩崎らの「単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA、講談社(1991)」に記載の方法が挙げられる。このようにして得られる抗体は、S I T H-1タンパク質の検出・測定などに利用できる。

[0045] 用語「抗体」は、免疫グロブリン(I g A、I g D、I g E、I g G、I g M及びこれらのF a bフラグメント、F (a b')₂フラグメント、F cフラグメント)を意味し、例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体及びヒト化抗体が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

[0046] 用語「S I T H-1タンパク質を認識する抗体」は、S I T H-1タンパク質に特異的に結合し得る完全な分子及び抗体フラグメント(例えば、F a b及びF (a b')₂フラグメント)を含むことを意味する。F a b及びF (a b')₂並びにS I T H-1抗体の他のフラグメントは、本明細書中で開示される方法、又は公知の方法に従って使用され得る。このようなフラグメントは、代表的には、パパイン(F a bフラグメントを生じる)又はペプシン(F (a b')₂フラグメントを生じる)のような酵素を使用するタンパク質分解による切断によって産生される。

[0047] 気分障害患者、又は、気分障害の可能性のある個体は、S I T H-1タンパク質の発現量が増加しており、その結果S I T H-1抗体価も上昇していると考えられる。本発明は、一態様において、生物学的試料中のS I T H-1抗体を検出することにより、気分障害患者又は気分障害の可能性のある個体を同定することを可能にする。

[0048] 2. 検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させた、ビオチン化タンパク質が結合した担体

本発明は、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させた、ビオチン化タンパク質が、ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間結合によって結合している、担体を利用する。

[0049] 本発明の担体は、

1) ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体、及び、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質を準備し；

2) ビオチンービオチン結合性タンパク質間の結合を介して、工程1)で準備した担体にビオチン化タンパク質を結合させて、ビオチン化タンパク質が結合した担体を作成する、
ことによって作成することができる。

[0050] 「ビオチン」とは、D-〔(+) -cis-ヘキサヒドロ-2-オキソ-1H-チエノー(3,4)-イミダゾール-4-吉草酸〕の一般名称である。ビタミンB群に分類される水溶性ビタミンの一種で、Vitamin B₇ (ビタミンB₇)とも呼ばれ、あるいは、ビタミンH、補酵素Rとも言われることもある。ビオチンは卵白中に含まれる糖タンパク質の一種、アビジンと非常に強く結合し、その吸収が阻害される。そのため、生卵白の大量摂取によってビオチン欠乏症を生じることがある。

[0051] 本明細書中において「ビオチン」とは、上記ビオチンの他、イミノビオチン(iminobiotin) (Hofmann et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:4666-4668) や、デスチオビオチン(desthiobiotin) (Hirsch et al. (2002) Anal Biochem 308:343-357)、あるいはビオシチン(biocytin)やBiotin sulfoxide等のビオチン類縁体も含む。

[0052] ビオチンーアビジン(ビオチン結合性タンパク質)複合体を用いたシステムは、生化学、分子生物学、組織免疫学やDNA分析、あるいは臨床検査などの分野で広く利用されている。

[0053] 本発明は、ビオチンービオチン結合性タンパク質の間の結合を利用して、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質を担体に固定することを含む。本発明において、「ビオチンービオチン結合性タンパク質の間の結合」を「アビジンービオチン結合」と呼称する場合がある。

[0054] ビオチン結合性タンパク質

ビオチン結合性タンパク質としては、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、AVRタンパク質 (Biochem. J., (2002), 363: 609-617)、ブラダビジン (Bradavidin) (J. Biol. Chem., (2005), 280: 13250-13255)、リザビジン (Rhizavidin) (Biochem. J., (2007), 405: 397-405)、タマビジン (WO02/072817) やこれらの変異体等、ビオチンと強く結合するタンパク質であれば、いずれも好適に使用することができる。好ましくは、ビオチンとの解離定数 (KD) が 10^{-8} M 以下、さらに好ましくは 10^{-10} M 以下、さらに好ましくは 10^{-12} M 以下である。但し、被検試料に添加するビオチン結合性タンパク質については、後述のとおりである。

[0055] ビオチン結合性タンパク質として、特に、大腸菌で高発現するタマビジンとその変異体を好ましく用いることができる。タマビジンは、食用キノコである担子菌タモギタケ (*Pleurotus conucopiae*) から発見されたビオチン結合性タンパク質である (WO02/072817、Takakura et al., (2009) FEBS J 276: 1383-1397)。タマビジンの変異体としては、例えば、高結合能・低非特異結合タマビジン (PCT/JP2009/64302) 等が挙げられる。

[0056] 本発明における「タマビジン」は、タマビジン1 (TM1)、タマビジン2 (TM2)、又はそれらの変異体を意味する。具体的には、本発明のタマビジンは典型的には、配列番号5若しくは配列番号7のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質、又は、配列番号4若しくは配列番号6の塩基配列を含んでなる核酸によってコードされるタンパク質、であってよい。あるいは、本発明のタマビジンは、配列番号5若しくは配列番号7のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質、又は、配列番号4若しくは配列番号6の塩基配列を含んでなる核酸によってコードされるタンパク質、の変異体であって、タマビジ

ン 1 又は 2 と同様のビオチン結合活性を有するタンパク質、あるいは、高結合能・低非特異結合の活性を有するタンパク質であってよい。本明細書において、タマビジン 1、タマビジン 2、及びそれらの変異体を総称して、単にタマビジンと呼ぶことがある。

[0057] タマビジン 1 又は 2 の変異体は、配列番号 5 又は 7 のアミノ酸配列において、1 又は複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を含んでなるタンパク質であって、タマビジン 1 又は 2 と同様のビオチン結合活性を有するタンパク質であってもよい。置換は、保存的置換であってもよく、これは、特定のアミノ酸残基を類似の物理化学的特徴を有する残基で置き換えることである。保存的置換の非限定的な例には、I l e、V a l、L e u 又は A l a 相互の置換のような脂肪族基含有アミノ酸残基の間の置換、L y s 及び A r g、G l u 及び A s p、G l n 及び A s n 相互の置換のような極性残基の間での置換などが含まれる。

[0058] アミノ酸の欠失、置換、挿入及び／又は付加による変異体は、野生型タンパク質をコードする DNA に、例えば周知技術である部位特異的変異誘発（例えば、N u c l e i c A c i d R e s e a r c h, V o l. 10, N o. 20, p. 6487-6500, 1982 参照、引用によりその全体を本明細書に援用する）を施すことにより作成することができる。本明細書において、「1 又は複数のアミノ酸」とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換、挿入及び／又は付加できる程度のアミノ酸を意味する。また、本明細書において「1 又は複数のアミノ酸」とは、場合により、1 又は数個のアミノ酸を意味してもよい。限定されるわけではないが、「1 または複数のアミノ酸」とは、50 個以内、好ましくは、40 個以内、30 個以内、20 個以内、10 個以内、8 個以内、5 個以内、3 個以内のアミノ酸を意味する。

[0059] タマビジン 1 又は 2 の変異体はさらに、配列番号 5 又は 7 のアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上、好ましくは 65% 以上、70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、96% 以上、97%

以上、98%以上又は99%以上、より好ましくは99.3%以上のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるタンパク質であって、タマビジン1又は2と同様のビオチン結合活性を有するタンパク質、あるいは、高結合能・低非特異結合の活性を有するタンパク質であってもよい。

[0060] 2つのアミノ酸配列の同一性%は、視覚的検査及び数学的計算によって決定してもよい。あるいは、2つのタンパク質配列の同一性パーセントは、Needleman, S. B. 及びWunsch, C. D. (J. Mol. Biol., 48: 443-453, 1970)のアルゴリズムに基づき、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ(UWGCG)より入手可能なGAPコンピュータープログラムを用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには: (1) Henikoff, S. 及び Henikoff, J. G. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992)に記載されるような、スコアリング・マトリックス、blosum62; (2) 12のギャップ加重; (3) 4のギャップ長加重; 及び (4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。

[0061] 当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。同一性のパーセントは、例えばAltschulら(Nucl. Acids. Res., 25, p. 3389-3402, 1997)に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ)のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる同一性検索の各種条件(パラメーター)は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。又は、2つのアミノ酸配列の同一性%は、遺

伝情報処理ソフトウェア G E N E T Y X Ver. 7 (ゼネティックス製) などのプログラム、又は、FASTA アルゴリズムなどを用いて決定してもよい。その際、検索はデフォルト値を用いてよい。

[0062] 2つの核酸配列の同一性%は、視覚的検査と数学的計算により決定可能であるか、又はより好ましくは、この比較はコンピュータ・プログラムを使用して配列情報を比較することによってなされる。代表的な、好ましいコンピュータ・プログラムは、遺伝学コンピュータ・グループ (GCG; ウィスコンシン州マディソン) のウィスコンシン・パッケージ、バージョン 10.0 プログラム「GAP」である (Devereux, et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12: 387)。この「GAP」プログラムの使用により、2つの核酸配列の比較の他に、2つのアミノ酸配列の比較、核酸配列とアミノ酸配列との比較を行うことができる。

[0063] なお、担体に結合する「ビオチン結合性タンパク質」は、ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間の結合を介して、ビオチン化タンパク質が結合した担体を作成するために利用されるものである。よって、限定されるわけではないが、上記タマビジン 1 又は 2 の変異体は、これらの野生型を利用してビオチン化タンパク質を形成した場合と比較して、ビオチン結合活性が大きく減少していないことが好ましい。

[0064] よって、非限定的に、タマビジン 1 の変異体は、配列番号 5 のアミノ酸配列において、N 1 4、S 1 8、Y 3 4、S 3 6、S 7 8、W 8 2、W 9 8、W 1 1 0、D 1 1 8 が改変されないことが好ましい。なお表記の、例えば Y 3 4 は、配列番号 5 のアミノ酸配列の第 3 4 番目のチロシン残基を意味する。あるいは、これらを改変する場合には、性質あるいは構造が類似したアミノ酸に改変することが好ましく、例えばアスパラギン (N 1 4) の場合は、グルタミン (Q) やアスパラギン酸 (D) へ、好ましくはアスパラギン酸へ、セリン (S 1 8、S 3 6、S 7 8) の場合は、スレオニン (T) あるいはチロシン (Y) へ、好ましくはスレオニンへ、チロシン (Y 3 4) の場合は、セリン (S) やスレオニン (T) あるいはフェニルアラニン (F) へ、好

ましくはフェニルアラニンへ、トリプトファン(W82、W98、W110)の場合は、フェニルアラニン(F)へ、アスパラギン酸(D118)の場合は、グルタミン酸(E)やアスパラギン(N)へ、好ましくはアスパラギンへ、それぞれ改変することが好ましい。

[0065] また、タマビジン2の変異体は、配列番号7のアミノ酸配列において、4つのトリプトファン残基(W69、W80、W96、W108)が改変されないことが好ましい。あるいは、これらを改変する場合には、性質あるいは構造が類似したアミノ酸、例えばフェニルアラニン(F)への改変が好ましい。また、ビオチンと直接相互作用すると考えられるアミノ酸残基(N14、S18、Y34、S36、S76、T78、D116)についても改変されないことが望ましい。あるいは、これらを改変する場合にはビオチンとの結合を維持できるよう、性質あるいは構造が類似したアミノ酸に改変することが好ましく、例えばアスパラギン(N14)の場合は、グルタミン(Q)やアスパラギン酸(D)へ、好ましくはアスパラギン酸へ、アスパラギン酸(D40)の場合は、アスパラギン(N)へ、セリン(S18、S36、S76)の場合は、スレオニン(T)あるいはチロシン(Y)へ、好ましくはスレオニンへ、チロシン(Y34)の場合は、セリン(S)やスレオニン(T)あるいはフェニルアラニン(F)へ、好ましくはフェニルアラニンへ、スレオニン(T78)の場合は、セリン(S)やチロシン(Y)へ、好ましくはセリンへ、アスパラギン酸(D116)の場合は、グルタミン酸(E)やアスパラギン(N)へ、好ましくはアスパラギンへ、それぞれ改変することが好ましい。

[0066] 本発明において、好ましいタマビジン改変体には以下のものが含まれる。
(PCT/JP2009/64302)。

[0067] 配列番号7に記載のアミノ酸配列、あるいはこの配列中に1から数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列、又はこの配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ビオチン結合活性を示すタンパク質において、以下のグループ

- 1) 配列番号7の104番目のアルギニン残基；
- 2) 配列番号7の141番目のリジン残基；
- 3) 配列番号7の26番目のリジン残基；及び
- 4) 配列番号7の73番目のリジン残基

から選択される1又は複数の残基が、酸性アミノ酸残基又は中性アミノ酸残基に置換されていることを特徴とする、改変型ビオチン結合タンパク質である。

[0068] より好ましくは、配列番号7において、104番目のアルギニン残基がグルタミン酸残基に置換されており、そして、141番目のリジン残基がグルタミン酸残基に置換されている、改変型ビオチン結合タンパク質（R104E-K141E）；

配列番号7において、40番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されており、そして、104番目のアルギニン残基がグルタミン酸残基に置換されている、改変型ビオチン結合タンパク質（D40N-R104E）；

配列番号7において、40番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されており、そして、141番目のリジン残基がグルタミン酸残基に置換されている、改変型ビオチン結合タンパク質（D40N-K141E）；並びに、

配列番号7において、40番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されており、104番目のアルギニン残基がグルタミン酸残基に置換されており、そして、141番目のリジン残基がグルタミン酸残基に置換されている、改変型ビオチン結合タンパク質（D40N-R104E-K141E）、

からなるグループから選択される、改変型ビオチン結合タンパク質である。

[0069] ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体

固体担体を構成する材料は、セルロース、テフロン（登録商標）、ニトロセルロース、アガロース、高架橋球形アガロース、デキストラン、キトサン

、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリプロピレン、ナイロン、ポリジビニリデンジフルオライド、ラテックス、ポリスチレンラテックス、シリカ、ガラス、ガラス繊維、金、白金、銀、銅、鉄、ステンレススチール、フェライト、シリコンウエハ、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリ乳酸、樹脂、多糖類、タンパク（アルブミン等）、炭素又はそれらの組合せ、などを含むがこれらに限定されない。また、一定の強度を有し、組成が安定し、かつ非特異結合が少ないものが好ましい。

[0070] 固体担体の形状は、ビーズ、磁性ビーズ、薄膜、微細管、フィルター、プレート、マイクロプレート、カーボンナノチューブ、センサーチップなどを含むがこれらに限定されない。薄膜やプレートなどの平坦な固体担体は、当該技術分野で知られているように、ピット、溝、フィルター底部などを設けてもよい。

[0071] 発明の一態様において、ビーズは、約 25 nm～約 1 mm の範囲の球体直径を有しうる。好ましい態様では、ビーズは約 50 nm～約 10 μ m の範囲の直径を有する。ビーズのサイズは特定の適用に応じて選択されうる。

[0072] 限定されるものではないが、例えば、高い検出感度が望まれる場合には、検出すべき物質とこれに特異的に結合する物質との接触頻度や洗浄操作の容易性といった観点から、固体担体として上記のようなビーズを好ましく使用することができる。

[0073] ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体を作製する方法として、ビオチン結合性タンパク質を、担体に直接結合させても良く、あるいはビオチン結合性タンパク質が予め固定化された担体を購入しても良い。あるいはまたビオチン化した担体に、ビオチンービオチン結合性タンパク質間結合を介して結合させてもよい。

[0074] ビオチン結合性タンパク質を直接結合させる方法としては、疎水結合や共有結合を用いる方法などがある。あるいは NEW ELISA Plate キット（住友ベークライト社）のようなマイクロプレートに、キット添付の

説明書きに従ってビオチン結合性タンパク質を直接結合、固定化させても良い。なお、アビジンやストレプトアビジンは例えばSIGMA社等から市販されている。

[0075] 疎水結合を利用する場合、担体の疎水性表面と、ビオチン結合性タンパク質の疎水性部分との相互作用を利用して結合させる。具体的には、ビオチン結合性タンパク質溶液を例えば、マイクロプレート等（例えばこれらに限定されるわけではないが、Nunc-Immuno? Plate（Nunc社）、SpectraPlate-96 HB（Perkin Elmer社）、あるいはReacti-Bind（商標）96-Well Plates Corner Notch（PIERCE社）等）の担体表面に直接接触させ、一定時間置くことでビオチン結合性タンパク質の疎水性部分と担体の疎水性部分との相互作用により結合、固定化させる。

[0076] 一方、共有結合の場合は、担体の表面に官能基を配置させ、これとビオチン結合性タンパク質中の官能基とを結合させる。このような結合のために、様々な官能基が表面に配置された各種担体が市販されており、好ましく用いることができる。例えばこれらに限定されるわけではないが、官能基が表面に配置されたマイクロプレートとしては、無水マレイン酸プレートとして例えばReacti-Bind（商標）Maleic Anhydride Activated Polystyrene 96-Well Plates（PIERCE社）が、活性型アミノ基プレートとして例えばImmobilizer?-Amino Modules/Plates（Nunc社）が、あるいはカルボキシル基プレートとして例えばELISA用プレートMS-8796F（96ウェル・Cタイプ・平底・カルボ）（住友ベークライト社）が挙げられる。また、官能基が表面に配置されたマイクロビーズとしては、高架橋アガロースビーズとして例えばSepharese（商標）（GEヘルスケアバイオサイエンス社）が、磁性ビーズとして例えばDynabeads（商標）（DynaI社）等が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。ビオチン結合性タンパク質と固体担体の連結は

、担体に添付された説明書に従えばよい。

[0077] 具体的には、これに限定されるわけではないが、以下のような、当業者に公知のタンパク質と固体担体のカップリング法を用いて行うことができる。例えば、表面をカルボキシル基が露出するよう修飾された固体担体のカルボキシル基とビオチン結合性タンパク質のアミノ基を、架橋試薬である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) の存在下でカップリング反応させることにより、ビオチン結合性タンパク質と固体担体を連結することができる。あるいは、表面が N-hydroxysuccinimide (NHS) により活性エステル化された固体担体にビオチン結合性タンパク質を一級アミノ基を含まない pH 6.5~9 の緩衝液中で混和し、固体担体表面のカルボキシル基とビオチン結合性タンパク質のアミノ基を結びつけることができる。あるいは、架橋試薬 BS3 (ビス [スルホスクシンイミジル] スベレート) や DSS (ジスクシンイミジルスベレート) を用いて、固体担体表面のアミノ基とビオチン結合性タンパク質のアミノ基を、あるいは架橋試薬 SPDP (N-スクシンイミジル 3-[2-ピリジルジチオ] プロピオネート) や GMBS (N-(4-マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミド) を用いて、固体担体表面のアミノ基とビオチン結合性タンパク質のチオール基を結びつけることができる。

[0078] ビオチン結合性タンパク質を固定化した担体としては、例えば、Reacti-Bind? Streptavidin Coated Plates (PIERCE社)、Nunc Streptavidin Coated 96 Micro Well? Plates (Nalge Nunc社) 等のマイクロプレート類、あるいは Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna1社)、MagnaBind? Streptavidin Beads (PIERCE社) 等の磁性ビーズ類などの市販品も挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

[0079] また、ビオチン結合性タンパク質は、上述のように、担体をビオチン化し、アビジン-ビオチン結合を介して結合することもできる。即ち、ビオチン

結合性タンパク質の多くが四量体であることを利用し、ビオチンが結合した担体にビオチン結合性タンパク質を結合させ、その後、さらにビオチン化したタンパク質を結合する方法である。

[0080] ビオチンを担体に結合させる方法として、例えばビオチン化試薬を用いる方法が挙げられる。ビオチン化試薬として例えば、PIERCE社製の（カッコ内は順にリンカー長、反応基）EZ-Link（登録商標）Sulfo-NHS-Biotin（13.5 Å、1級アミン）、EZ-Link（登録商標）Sulfo-NHS-LC-Biotin（22.4 Å、1級アミン）、EZ-Link（登録商標）Sulfo-NHS-LCLC-Biotin（30.5 Å、1級アミン）、EZ-Link（登録商標）PFP-Biotin（9.6 Å、アミン）、EZ-Link（登録商標）Maleimide-PEO₂-Biotin（29.1 Å、チオール基）、EZ-Link（登録商標）Biotin-PEO₂ Amine（20.4 Å、カルボキシル基）、EZ-Link（登録商標）Biotin-PEO₃-LC Amine（22.9 Å、カルボキシル基）、EZ-Link（登録商標）Biotin-Hydrazide（15.7 Å、アルデヒド基）、EZ-Link（登録商標）Biotin-LC-Hydrazide（24.7 Å、アルデヒド基）、EZ-Link（登録商標）NHS-Iminobiotin（13.5 Å、1級アミン）などを利用できるが、これらに限定されるものではない。

[0081] 上記ビオチン化試薬を用いて、マイクロプレート、微小ビーズ、あるいはセンサーチップなど所望の担体に、公知の方法を使用してビオチンを結合させることができる。例えば、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、トシル基、エポキシ基、マレイミド基、活性化エステルなど種々の官能基を持つ担体（例えば磁性ビーズ、セファロースビーズ、アガロースビーズ、ラテックスビーズ、マイクロタイタープレートなど）を用いる方法がある。この場合例えば、NHSエステルを含むビオチン化試薬を用いる場合は、DMSO（dimethyl sulfoxide）のような有機溶媒か、pH 7-9

のリン酸緩衝液で溶解し、アミノ基を持つ固定化担体に添加することによってビオチンを結合させることができる。また、例えばアミノ基を含むビオチン化試薬を用いる場合は、EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) のようなカルボジイミドを用いて固定化担体のカルボキシル基を活性化エステルに変換させた後、pH 5 付近の緩衝液で溶解したビオチン化試薬を添加して、ビオチンを結合させてもよい。なお、ビオチン化した固定化担体は、好ましくは未反応の官能基を不活性化した後、BSAなどでブロッキングする。

- [0082] また、ビオチン化された市販担体を利用することもできる。ビオチン化されたマイクロプレートとしては、例えば、Reacti-Bind (商標) Biotin Coated Polystyrene Plates (PIERCE社製) を利用できるが、これに限定されるものではない。ビオチン化された微小ビーズとしては、例えば、磁性ビーズとして、BioMag Biotin (Polysciences社製) が、ナノ磁性ビーズとして、コアフロント社製のnanomag (登録商標) -D biotin、nanomag (登録商標) -silica biotinが、ポリスチレン製マイクロビーズとして、Beadlyte (登録商標) Biotin Beads (Upstate社製) が、アガロースとしてSigma社製の、Biotin Agarose、2-iminobiotin-Agaroseが、高架橋アガロースとして、Biotin-Sepharose (バイオリサーチテクノロジー社製) を利用できるが、これらに限定されるものではない。

- [0083] 担体とビオチンと繋ぐリンカーの長さは、少なくとも5 Åより長いことが好ましく、より好ましくは13.5 Å以上である。

- [0084] このようなビオチン化担体に、ビオチン結合性タンパク質を接触させることにより、ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体を作製することができる。

[0085] ビオチン化タンパク質

本発明においては、被検物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させ、ビオチン化タンパク質を作製して、これをビオチン-ビオチン結合性タンパク質間結合を利用して担体に結合させてよい。

[0086] ビオチン化タンパク質の作製方法としては、特に限定するものではないが、ビオチン標識キット（例えばこれらに限定されるわけではないが、EZ-Link[®] NHS-LC-Biotin（PIERCE社）や、Biotin Labeling Kit-NH₂（DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES INC. 社）など）を用いて被検物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させてもよい。あるいは被検物質と特異的に結合するタンパク質の遺伝子を、ビオチン化配列を含むペプチドをコードするDNAと融合し、この融合遺伝子を発現するベクターを構築、任意の宿主においてビオチン化配列との融合タンパク質として発現させることにより、ビオチン化タンパク質を作製してもよい（Schwarz et al., (1988). J. Biol. Chem. 263: 9640-9645.）。このようなベクターとしてこれに限定されるわけではないが、例えばInvitrogen社のBioEase（商標）タグが含まれるベクターが挙げられる（本明細書の実施例1）。このうち哺乳類細胞発現用には、pcDNA（商標）6ベクターが、大腸菌発現用にはpET104ベクターが、あるいはDrosophila発現用にはpMT/BioEaseベクターがある。

[0087] さらに、上述の担体をビオチン化する際に用いた方法と同様の方法を、所望のタンパク質のビオチン化にあたって、好ましく利用することができる。すなわち、ビオチン化試薬を用いる方法が挙げられる。ビオチン化試薬として例えば、PIERCE社製の（カッコ内は順にリンカー長、反応基）EZ-Link（登録商標）Sulfo-NHS-Biotin（13.5 Å、1級アミン）、EZ-Link（登録商標）Sulfo-NHS-LC-Biotin（22.4 Å、1級アミン）、EZ-Link（登録

商標) S u l f o - N H S - L C L C - B i o t i n (30.5 Å、1級アミン)、E Z - L i n k (登録商標) P F P - B i o t i n (9.6 Å、アミン)、E Z - L i n k (登録商標) M a l e i m i d e - P E O ₂ - B i o t i n (29.1 Å、チオール基)、E Z - L i n k (登録商標) B i o t i n - P E O ₂ A m i n e (20.4 Å、カルボキシル基)、E Z - L i n k (登録商標) B i o t i n - P E O ₃ - L C A m i n e (22.9 Å、カルボキシル基)、E Z - L i n k (登録商標) B i o t i n - H y d r a z i d e (15.7 Å、アルデヒド基)、E Z - L i n k (登録商標) B i o t i n - L C - H y d r a z i d e (24.7 Å、アルデヒド基)、E Z - L i n k (登録商標) N H S - I m i n o b i o t i n (13.5 Å、1級アミン)などを利用できるが、これらに限定されるものではない。

[0088] このようなビオチン化試薬を用いて、所望のタンパク質に、公知の方法を使用してビオチンを結合させることができる。

[0089] 例えば、NHSエステルを含むビオチン化試薬を用いる場合は、DMSO (d e m e t h y l s u l f o x i d e) のような有機溶媒か、pH 7-9 のリン酸緩衝液で溶解し、所望のタンパク質に添加することによってビオチンを結合させることができる。また、例えばアミノ基を含むビオチン化試薬を用いる場合は、EDC (1 - e t h y l - 3 - (3 - d i m e t h y l a m i n o p r o p y l) c a r b o d i i m i d e h y d r o c h l o r i d e) のようなカルボジイミドを用いて、所望のタンパク質のカルボキシル基を活性化エステルに変換させた後、pH 5 付近の緩衝液で溶解したビオチン化試薬を添加して、ビオチンを結合させてもよい。

[0090] なお、このようにビオチン化試薬を用いてビオチン化タンパク質を作製する場合は、予め被検物質と特異的に結合するタンパク質を精製しておくことが好ましい。精製は、当該タンパク質が元来由来する生物から行っても良く、あるいは当該タンパク質をコードする遺伝子を、発現ベクターに組み込んで、所望の宿主細胞で遺伝子工学的に発現させてから、精製してもよい。宿

主細胞としては哺乳類細胞（例えば、非限定的に、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、チャイニーズハムスター等の齧歯類、あるいはイヌなどに由来する細胞）、昆虫細胞（バキュロウイルスを利用した発現系や *Drosophila* の系など）、酵母、大腸菌、植物、枯草菌などを挙げることができる。好ましくは大腸菌を挙げることができる。また、例えば、ヒトであれば *HEK293*、*HeLa*、*HepG2*、*293T*、齧歯類であれば *CHO*、*NIH3T3*、*PC12*、その他哺乳類であれば *COS-1*、*COS-7*、*MDCK*、*Ver o*、昆虫細胞であれば *Sf9*、*S2* などの確立された培養細胞系を、好ましく利用することもできる。あるいはまた、小麦胚芽抽出液や昆虫細胞抽出液などを利用した無細胞発現系を用いてタンパク質を発現させることもできる。

[0091] 発現ベクターに関しては、用いる宿主細胞に適したものを、当業者は適宜選択することができる。

[0092] 発現させたタンパク質の精製は当業者に周知の方法を使用できる。通常のイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせ用いてもよいが、精製のタグ配列を用いてもよい。この場合、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、セルロース結合タンパク質、キチン結合タンパク質、チオレドキシン結合タンパク質等との融合タンパク質として被検物質と特異的に結合するタンパク質を大腸菌や哺乳類などの任意の宿主で発現させ、各々グルタチオン、マルトース、セルロース、キチン、チオレドキシンとの親和性を利用して（例えばグルタチオン固定化カラムを用いて）精製しても良い。また予め被検物質と特異的に結合するタンパク質との融合部位にプロテアーゼの認識部位を導入しておけば、精製後にタグ配列を当該プロテアーゼで処理することにより、除去することもできる。プロテアーゼとしては、例えばエンテロキナーゼや *Factor Xa* など当業者に周知のものでよい。この他、*HisTag* や *Strep (II)-Tag* を用いて、各々イオン化したニッケル、*StrepTactin* が固定

化したカラムを用いて精製してもよい。さらに精製度を上げるために、複数のタグを被検物質と特異的に結合するタンパク質に融合させ、精製法を組み合わせてもよい。例えば、被検物質と特異的に結合するタンパク質の末端に His Tag と BioEASE（商標）（Invitrogen 社）等のビオチン化配列を融合させ、宿主で組換えタンパク質として発現させた後、ニッケルカラムで精製を行い、さらに低親和性アビジンや低親和性ストレプトアビジン（例えば SAM テイン、Roche 社）カラムで精製してもよい。

[0093] ビオチン化タンパク質の担体への結合

本発明においては、ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体と、ビオチン化タンパク質を準備し、両者を接触させることにより、アビジン-ビオチン結合を介して担体にタンパク質を結合させることができる。

[0094] 限定されるわけではないが、ビオチン化タンパク質を含む細胞破碎粗抽出液を、0.1 mg/ml ないし 5 mg/ml、好ましくは 0.2 mg/ml ないし 2 mg/ml の総タンパク質濃度で準備する。これを、10℃ ないし 40℃ で、好ましくは 20℃ ないし 30℃ で、5 分ないし 2 時間、好ましくは 30 分ないし 1 時間、ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体と接触させる。この操作により、ビオチン化タンパク質は、ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体に固定化される。さらにその後、0.05% ないし 1%、好ましくは 0.1% ないし 0.3% の Tween 20 などの界面活性剤を含む PBS あるいは TBS などの緩衝液中で、余分な細胞破碎粗抽出物を洗浄することが好ましい。

なお、このように細胞破碎粗抽出液を接触させることにより、ビオチン化タンパク質を結合させる場合、事実上、精製と固定化を同時に行ったことになる。従って、この場合、別途の精製作業は不要である。

[0095] あるいはまた、0.1 µg/ml ないし 5 µg/ml の濃度の精製したビオチン化タンパク質を、ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体と接触させてもよい。

[0096] 3. ビオチン化タンパク質が結合した担体への生物学的試料の添加

本発明の方法は、工程 3) において、工程 2) で作成した、ビオチン化タンパク質が結合した担体に、

(a) 生物学的試料、及び

(b) 工程 1) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液を混合して添加することを含む。

[0097] 細菌破碎抽出液の添加

一般に、担体を利用した検出方法において、バックグラウンドシグナルの原因となる非特異結合を低減させるため、細菌破碎抽出液を検出用試薬に含有させる方法（特開昭 59-99257）、被検物質に特異的に結合する組換えタンパク質産生に使用したベクターと同種でありかつ当該タンパク質をコードする遺伝子を含まないベクターが導入された宿主細胞の培養成分を試料に添加する方法（特開平 8-43392）、被検物質に特異的に結合する組換えタンパク質を産生した細胞と同種であり、かつ当該タンパク質を含まない細胞からの水抽出液を加熱処理した後、その水溶性画分を試料に添加する方法（特開 2004-301646）などが知られている。

[0098] 本発明者らは、鋭意研究の結果、ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間の結合を用いて検出用タンパク質を担体に結合した系において、より顕著な効果を得る方法を想到した。具体的には、被検試料を担体に接触させる際に、細胞破碎抽出液、並びにビオチン結合性タンパク質の両方を同時に存在させると好ましいことを見いだした。

[0099] 細胞破碎抽出液が由来する細胞は、大腸菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞など、特段の制限はない。しかし、ビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞であることが好ましい。例えば、ビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的

に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を大腸菌で調製した場合、細胞破碎抽出液も大腸菌から調製することが望ましい。また、無細胞系により、ビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させた場合は、使用した細胞破碎抽出液をそのまま、あるいは所望の緩衝液に懸濁して、使用することができる。ビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞の組み合わせに応じて、2種類ないしそれ以上の種類の細胞破碎抽出液を用いてもよい。

[0100] また、ビオチン結合性タンパク質及び／又は検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質は、遺伝子工学技術により発現させたものではなく、本来的にこれらのタンパク質を有する細胞から抽出・精製したものであってもよい。例えば、ビオチン結合性タンパク質としてタマビジンを用いる場合、担子菌タモギタケ (*Pleurotus conucopiae*) 細胞の細胞破碎抽出液を利用することもできる。このように、ビオチン結合性タンパク質及び／又は検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質を本来的に含んでいる細胞の破碎抽出液も、本発明の細胞抽出液に含まれる。

[0101] また、細胞破碎抽出液を調製するための細胞は、任意のベクター、好ましくは空ベクターを含んでもよい。空ベクターとは、ビオチン結合性タンパク質、被検物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はそのビオチン化タンパク質を発現させた時に用いたベクターと同種で、かつこれらのタンパク質をコードする遺伝子を含まないベクターである。また、例えば、これらの空ベクターにさらに任意の核酸を含む、任意のベクターであってもよい。あるいは、ビオチン結合性タンパク質、被検物質と特異的に結合するタンパク質及び／又はビオチン化タンパク質を発現させた時に用いたベクターとは、無関係の任意のベクターであってもよい。

[0102] また、細胞の破碎抽出液としては、細胞に由来する成分であれば特に制限されず、例えば、そのタンパク質成分、糖質成分、脂質成分又はその混合成

分を使用することができる。好ましくは、細胞の可溶性抽出物を使用することができる。

[0103] 細胞の破碎抽出液の調製方法としては、特に制限されず、各種の方法を使用することができる。通常、適切な培地で培養した細胞を、超音波などの物理的手段あるいは界面活性剤などを用いた化学的手段あるいは酵素処理等で破碎若しくは可溶化し、遠心分離又は濾過等の操作により、可溶性成分として調製することができる。また、保存寿命をのばすためには、遠心分離又は濾過等により清澄にした液に、例えばプロテアーゼインヒビターの添加、又はオートクレーブ処理等の加熱処理を施して、細胞由来の各種酵素等を抑制又は失活させることが好ましい。細胞の破碎抽出液を加える濃度は、生じる非特異反応の強さに応じて変えてもよく、該非特異反応を吸収するに十分な濃度を適宜設定することができる。

[0104] 細胞破碎抽出液を調製する具体的な方法の例としては、これに限定されるわけではないが、例えば大腸菌細胞の場合、大腸菌（ベクターを含んでもよく、またベクターにはビオチン結合性タンパク質をコードする遺伝子を含んでも良い）を、抗生物質を含むLB培地に接種し、OD600における吸光度が0.1ないし2、好ましくは0.25ないし1、さらに好ましくは0.4ないし0.6に達するまで、15℃ないし37℃、好ましくは25℃ないし37℃で振とう培養した後、0.01mMないし5mM、好ましくは0.1mMないし1mMのIPTGを添加し、さらに15℃ないし37℃、好ましくは25℃ないし37℃で、2時間ないし24時間、好ましくは4時間ないし16時間振とう培養を行う。培養液から遠心にて菌体を回収し、菌体を所望の緩衝液中に懸濁後、破碎し、破碎液を遠心し、その上清を大腸菌粗抽出液として回収すればよい。

[0105] 生物学的試料に、細胞破碎粗抽出液を混合する場合、限定されるわけではないが、試料に、所望の緩衝液（BSAやカゼイン、市販のブロッキング剤などを含んでも良い）で0.05mg/mlないし5mg/ml、好ましくは0.5mg/mlないし5mg/mlの総タンパク質濃度に調製した細胞

破碎粗抽出液を混合し、 10°C ないし 30°C で、好ましくは 20°C ないし 30°C で、1分ないし4時間、好ましくは10分ないし1時間反応させる。なお、生物学的試料が血清等の場合、通常血清を細胞破碎抽出液で10倍から10000倍、好ましくは100倍から1000倍、より好ましくは100倍から500倍に希釈して用いる。

[0106] ビオチン結合性タンパク質の添加

本発明の方法において、生物学的試料にビオチン結合性タンパク質を添加することにより、最終的にバックグラウンドシグナルを抑制することができる。

[0107] このようなビオチン結合性タンパク質は、上述の担体に結合させるビオチン結合性タンパク質と、同じであっても異なってもよい。また、野生型であっても変異体であってもよく、ビオチン結合能は野生型と比較して、同等であっても、高くてもよく、低くてもよい。また、添加の態様として、ビオチン結合性タンパク質（天然由来でも、遺伝子工学的に発現させたものでもよい）の粉末を直接添加してもよく、適当な液に溶解してから添加してもよい。また例えば、ビオチン結合性タンパク質を試料に直接添加するのではなく、試料と細胞破碎抽出液の混合物をビオチン結合性タンパク質を固定した担体で処理する（例えばカラムに通す）態様でもよい（工程b-i）。

[0108] ビオチン結合性タンパク質を細胞破碎粗抽出液に添加する場合、これに限定されるわけではないが、ビオチン結合性タンパク質の濃度は最終濃度で、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ないし $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ないし $100\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加する。当該細胞中でビオチン結合性タンパク質を遺伝子工学的に発現させる場合の、ビオチン結合性タンパク質の濃度に関しても、これに限定されるわけではないが、同様の濃度であっても良い。

[0109] あるいは、ビオチン結合性タンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞に導入し発現させ、当該宿主細胞を破碎して得られたビオチン結合性タンパク質を含む細胞抽出液として使用してもよい（工程b-ii）。この場合、ビオチン結合性タンパク質は所望の宿主で、当業者に周知の方法で発現されれば良

いが、被検物質と特異的に結合する所望のタンパク質及び／又は所望のビオチン化タンパク質を遺伝子工学的に発現させた場合は、その宿主と同種のものが好ましい。

[0110] 宿主が大腸菌の場合、ビオチン結合性タンパク質をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、これを大腸菌に導入し、タンパク質発現を誘導しつつ、大腸菌の培養を行なう。発現ベクターや宿主大腸菌株、培地成分、IPTG濃度や培養温度などの誘導条件は、ビオチン結合性タンパク質の発現に適した条件を適宜選択すればよい。

[0111] 担体への生物学的試料等の添加

担体への生物学的試料、及び、細胞破碎抽出液の添加は任意の方法で行うことができる。ただし、生物学的試料が担体と接触するよりも同時、あるいはそれよりも前に、生物学的試料が細胞破碎抽出液と接触しなければならない。すなわち、生物学的試料と細胞破碎抽出液が十分に接触すればよく、細胞破碎抽出液由来の成分は必ずしも最終的に生物学的試料とともに担体に添加される必要はない。例えば、細胞破碎抽出液成分を結合した担体を作成し、そこへ生物学的試料を処理したものを使用してもよい。具体的には、生物学的試料を、細胞破碎抽出液成分カラムに通す、などの態様が挙げられる。

[0112] なお、添加後は、特に限定されるわけではないが、生物学的試料及び細胞破碎抽出液を、担体と、10℃ないし30℃で、好ましくは20℃ないし30℃で、10分ないし4時間、好ましくは30分ないし2時間反応させる。

[0113] 4. 被検物質の検出方法

本発明の検出方法は、工程4)において、ビオチン化タンパク質と特異的に結合した被検物質を検出する。

[0114] 被検物質を検出する方法は、所望のタンパク質の性質に基づき、当業者が適切に選択できる。好ましいものとして、酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA、サンドイッチELISA法を含む）や放射性イムノアッセイ法（RIA）などのイムノアッセイ法、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法、表面プラズモン共鳴法などのようなアッセイ法が挙げられる。アビジン-

ビオチン結合を用いて固相化された、被検物質と特異的に結合・相互作用する物質に対し、被検試料を反応させた後、当該被検物質を検出する。

[0115] イムノアッセイにおいて、例えば測定すべき物質が抗体の場合、抗原を固定化し、被検試料中に存在する抗体を抗原と反応させ、当業者に周知の方法で検出される。例えば被検試料がヒト由来の場合、抗原に結合したヒト抗体を、抗ヒト抗体を用いて検出する。この際、この抗ヒト抗体は、蛍光や酵素、あるいは放射性同位元素で標識しておき、最終的に蛍光量や酵素活性、あるいは放射性量を測定することで、間接的に抗体の量を測定、定量する。また測定すべき物質が抗原の場合、その抗原のある部分（エピトープ）に対する抗体を固定化し、被検試料中に存在する抗原と反応させた後、さらにその抗原の別のエピトープに対する抗体を反応させる。この別のエピトープに対する二次抗体を上記のように標識しておけば、間接的に抗原の量を測定することができる。あるいはまた、核酸ハイブリダイゼーションアッセイでは、測定すべき核酸と相補的な配列領域を有する数十から数百、あるいは数千塩基の核酸をビオチン-ビオチン結合性タンパク質間結合を用いて固相化しておく。ここへ予め蛍光や放射性同位元素で標識した核酸を含む被検試料を反応させ、蛍光量や放射性量を測定する。

[0116] 上記標識は当業者に周知の方法で行えばよく、また市販の、蛍光や酵素標識された抗ヒト抗体等を用いてもよい。蛍光標識としては例えばフルオレセイン及びローダミンなどによる標識や、GFPなどの蛍光タンパク質による標識も考えられる。酵素標識としてはペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ、あるいはルシフェラーゼやグルコースオキシダーゼ等が利用され得るがこれらに限定されない。これらの酵素による測定のための基質は市販されており、例えばペルオキシダーゼの場合、TBAやケミルミネッセンス用の基質を用いることが出来る。また、放射性同位元素として例えば、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、イオウ (^{35}S)、及びトリチウム (^3H)、核酸の場合はリン (^{32}P) などが挙げられる。

[0117] 生物学的試料（サンプル）中に存在する抗原や抗体の量は、例えば、直線

回帰コンピューターアルゴリズムを使用して、標準的な調製物（例えば臨床検体の場合、健常者の標準試料若しくは典型的な患者の標準試料）中に存在する量との比較によって簡易に算出され得る。抗原や抗体を検出するためのこのようなアッセイ法は、例えば、ELISAについて、Iacobelliら、Breast Cancer Research and Treatment 11: 19-30 (1988) に記載されている。

[0118] あるいは、例えば、生物学的試料中の検出すべき物質、例えば、抗体が少ない場合（抗体価が低い場合）や、血清などの生物学的試料そのものに非特異的な結合が多い場合には、非特異結合によるバックグラウンドシグナルの影響が大きくなる。そのため、測定値よりバックグラウンドシグナルを適切に差し引くことで、検出したい物質をより正確に測定することが可能になる。差し引くバックグラウンドは実験系に応じて当業者が適切に判断しうる。

[0119] 例えば、このような態様の例として、血清中に存在するコラーゲンに対する抗体を検出する「ヒト／サル抗Ⅰ型及びⅡ型コラーゲンIgG抗体測定キット」（Chondrex社製）がある。このキットではサンプル測定値からバックグラウンドの値（血清は加えず二次抗体のみによる測定値）を差し引いて算出する。

[0120] また、血清のように、生物学的試料そのものに非特異的な結合が多い場合には、そのような非特異反応によるバックグラウンドを差し引くために、実施例2に記載したように、ビオチン化したSITH-1抗原（検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質）を、タマビジンを介して固定化した担体における測定値から、ビオチン化SITH-1抗原を固定化していない区（ただし担体にタマビジンは固定化されており、SITH-1抗原を固定化した区と同様に、BSAなどによるブロッキング操作は行われ、かつ抗SITH-1抗体（生物学的試料中の検出したい物質）を含む血清（生物学的試料）を添加した区）の測定値を差し引く態様も有効である。

また、好ましくは、試料が由来する生物（例えば、SITH-1の場合はヒト）が抗体を有しない任意のタンパク質（制限されるものではないが、上記

生物が哺乳類の場合は、例えばGFP（緑色蛍光タンパク質）などを挙げることができる）を固相化した区の測定値を差し引くことで、より正確に求めることが出来る。固定化の方法としては、特に限定はされないが、当該タンパク質をビオチン化し、ビオチン結合性タンパク質が固定化された担体に、ビオチンービオチン結合性タンパク質間の結合により固定化することが好ましい。

以上のような算出方法は、生物学的試料の性質や使用する抗体の特徴などを踏まえ、当業者が適切に設計、選択することができる。

[0121] 本発明の検出方法は、好ましくは血清中の抗体価の低い抗体を特異的に検出することが可能である。

[0122] I I. 生物学的試料の希釈剤

本発明はまた、生物学的試料中の物質を検出する系に用いる、生物学的試料を希釈するための剤を提供する。

[0123] 本発明の希釈剤は、

- 1) 細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、又は
- 2) 遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含む。

[0124] この希釈剤は、生物学的試料中の物質を検出する系において、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質が、ビオチンービオチン結合性タンパク質間結合によって結合している担体に、生物学的試料を添加する前に、生物学的試料を希釈するための剤である。本発明の希釈剤は、担体に結合しているタンパク質、即ち、ビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質、の製造過程によって、その組成を選択することが好ましい。

[0125] 具体的には、生物学的試料中の物質を検出する系において、ビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞を利

用することが好ましい。

[0126] 本発明の希釈剤は、１）細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質を含むものであってもよい。これは、本発明の生物学的試料中の物質を検出する方法において、工程３）（b-i）の態様に使用することができる。あるいは、２）遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含むものであってもよい。これは、工程３）（b-ii）の態様に使用することができる。

[0127] 「生物学的試料を希釈するための剤」は、細胞破碎抽出液（及びビオチン結合性タンパク質）そのものであってよく、あるいは、細胞破碎抽出液を生物学的試料とともにさらに希釈する剤であって、適当な緩衝液や市販の細胞希釈液あるいは血清希釈液などの溶剤を含んでもよい。

[0128] I I I. キット

本発明はまた、生物学的試料中の物質を検出するためのキットを提供する。本発明のキットは、

A) 検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質が、ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間結合によって結合している、担体；並びに、

B-i) A)のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは

B-ii) A)のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含む、生物学的試料を希釈するための剤；
を含む。

[0129] 「生物学的試料を希釈するための剤」は、細胞破碎抽出液（及びビオチン

結合性タンパク質) そのものであってよく、あるいは、細胞破碎抽出液を生物学的試料とともにさらに希釈する剤であって、適当な緩衝液や市販の細胞希釈液あるいは血清希釈液などの溶剤を含んでもよい。

実施例

[0130] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0131] 本明細書中の実施例では、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) 由来のS I T H-1タンパク質とビオチン化配列 (Invitrogen社のBioEaseタグ) との融合タンパク質を大腸菌で発現させ、そこから得られた大腸菌粗抽出液を直接タマビジン2 (以下、「TM2」と記載する) 固定化マイクロプレートに反応させ、融合タンパク質をタマビジン-ビオチン結合によりマイクロプレートに結合させた。

[0132] こうして得られたS I T H-1タンパク質結合プレートに、大腸菌粗抽出液で希釈したヒト血清 (ウサギ抗S I T H-1抗体を含む。市販のヒト血清には抗S I T H-1抗体が含まれないので、本試験では市販のヒト血清にウサギの抗S I T H-1抗体 (抗血清) を段階希釈して加えたものを検体として用いた。) を反応させ、ヒト血清中に含まれる抗S I T H-1抗体価を測定した。

[0133] 実施例1 S I T H-1とビオチン化配列 (BioEaseタグ) との融合タンパク質発現用ベクターの構築

S I T H-1タンパク質のN末側に、BioEaseタグが配置された融合タンパク質をコードする遺伝子を実験した。このBioEaseタグは生体内 (この場合大腸菌) において生体中のビオチン化酵素によってビオチン化される配列を含むペプチドタグである。BioEase-S I T H-1融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号8に、コードする塩基配列を配列番号9に示す。

[0134] 1-1. プライマーの設計

BioEase-SITH-1 融合遺伝子構築のために、まず、SITH-1 遺伝子を増幅させるためのプライマーを設計した。即ち、SITH-1 タンパク質のN末端部位をコードするDNA配列からなるプライマー (SITH1NtermGW-F) と、SITH-1 タンパク質のC末端部位を逆向きにコードするDNA配列からなるプライマー (SITH1CtermGW-R) を設計した。

[0135] SITH-1 と BioEase タグとの融合遺伝子構築用プライマーを表 1 にまとめた。

[0136] [表1]

SITH-1 遺伝子増幅用プライマー

名称	配列	長さ
SITH1NtermGW-F	GGATATGAAGAAAAAGTGTC	20mer
SITH1CtermGW-R	TTACACATTCATTTCAAGTT	20mer

[0137] (配列番号 10-11)

1-2. PCR

SITH-1 遺伝子 (ORF) (配列番号 2) に FLAG タグをつけた発現ベクター (PCT/JP2008/67300) の DNA を鋳型にして、プライマー SITH1NtermGW-F と SITH1CtermGW-R を用いて SITH-1 部位の増幅を行った。PCR 反応条件は、20 μ l の反応液中に鋳型 DNA を 500 ng、10 (ExTaq buffer (Takara 社) を 2 μ l、2.5 mM dNTP を 1.6 μ l、プライマーを各 20 pmol、5 U/ μ l ExTaq を 0.1 μ l 添加し、GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER) を用いて 96°C 3 分を 1 回、95°C で 1 分、60°C で 1 分、72°C で 2 分を 20 回、72°C 6 分を 1 回行った。その結果、477 bp の PCR 産物が得られた。

[0138] 1-3. クローニング

PCRによって得られたS I T H-1遺伝子を、ベクターp C R 8 / G W / T O P O (I n v i t r o g e n 社製)にクローニングした。ライゲーション反応はベクターキット添付の説明書に従った。大腸菌T B 1にエレクトロポレーション法を用いてDNAを導入し、常法 (S a m b r o o k e t a l . 1 9 8 9 , M o l e c u l a r C l o n i n g , A l a b o r a t o r y m a n u a l , 2 n d e d i t i o n) に従ってプラスミドDNAを抽出した。インサートの存在が確認されたプラスミドに関してM 1 3 プライマー (T a K a R a 社) と、A B I P R I S M 蛍光シーケンサー (M o d e l 3 1 0 G e n e t i c A n a l y z e r , P e r k i n E l m e r 社) を用いて塩基配列を決定し、設計した遺伝子の配列と比較して、変異がないことを確認した。

[0139] S I T H-1 遺伝子が組み込まれたプラスミドをエントリークローンとし、Gateway Systemを用いてBioEaseタグ融合タンパク質発現ベクターであるp E T 1 0 4 . 1 デスティネーションベクター (I n v i t r o g e n 社製) と組換え反応を行った。組換え産物を大腸菌T B 1 に形質転換し、プラスミドDNAを抽出し、このプラスミドをさらに大腸菌B L 2 1 (D E 3) に形質転換した。得られた大腸菌コロニーを鋳型に、S I T H 1 N t e r m G W - F と S I T H 1 C t e r m G W - R を用いてPCRによる挿入遺伝子部位の増幅を行い、挿入遺伝子の有無を確認した。

[0140] 以上の方法で、BioEaseタグ融合S I T H-1 タンパク質発現用のベクターB i o E a s e - S I T H 1 / p E T 1 0 4 . 1 を完成させた。

[0141] 1-4. 大腸菌発現

B i o E a s e - S I T H 1 / p E T 1 0 4 . 1 を導入した大腸菌B L 2 1 (D E 3) 、又は対照としてp T r c 9 9 A のみを導入した大腸菌B L 2 1 を、抗生物質アンピシリン (最終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含むLB培地 50 ml に接種し、OD 600 における吸光度が 0.5 に達するまで 30°C で振とう培養した。その後、 1 mM I P T G を添加し、さらに 30°C で 5

時間振とう培養した。培養液50mlから遠心にて菌体を回収した。菌体は0.1M HEPES/KOH (pH7.4) 3ml中に懸濁後、超音波により破碎した。破碎液を遠心(15,000rpm)し、その上清を大腸菌粗抽出液とした。

[0142] BioEaseタグ融合SITH-1タンパク質の発現を確認するため、粗抽出液中に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分画し、ウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングによるBioEaseタグ融合SITH-1の検出にはウサギ抗SITH-1抗体(未発表)とアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体(BIO RAD社製)を用いた。

[0143] 結果を図1Aに示す。BioEaseタグ融合SITH-1発現大腸菌からは、対照には存在しない約30kDaのバンドが検出された。このサイズはBioEaseタグ融合SITH-1の分子量28.6kDaとほぼ一致した。

[0144] さらに抗SITH-1抗体の代わりに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いて、シグナルを検出した。結果を図1Bに示す。対照にはシグナルが殆ど検出されなかった一方で、BioEaseタグ融合SITH-1を発現させた大腸菌粗抽出液からは、ストレプトアビジンと反応する(従ってビオチン化されていると考えられる)タンパク質に由来する太いバンドが2本検出された。しかもそのうち上のバンドは先のウェスタンブロッティングの際に検出されたバンドとほぼ同じサイズであった。以上のことから、ビオチン化SITH-1の発現に成功したことが示された。

[0145] なお、上記に加え、後のELISA実験に用いるため、pTrc99AやTM2/pTrc99A(WO 02/072817)を導入した大腸菌BL21に関しても上記と同様に、IPTG存在下で培養後、大腸菌粗抽出液を調製した。

[0146] 実施例2 ELISAによるヒト血清中抗SITH-1抗体の検出

精製TM2をNew ELISA plateキット(住友ベークライト

）を用いてマイクロプレートに固定化した。固定化方法はキット添付の説明書に従った。

[0147] 実施例1で得られたBioEaseタグ融合SITH-1タンパク質を発現した大腸菌粗抽出液を全タンパク質濃度が2mg/mlとなるように0.1M HEPES/KOH (pH7.4)で調製後、TM2固定化プレート(住友ベークライト、New ELISA)に100μl添加した。室温で1時間静置し、タマビジン-ビオチン結合によりBioEaseタグ融合SITH-1タンパク質をTM2固定化プレートに結合した。その後、プレートの各ウェルを0.1%Tween20を含むTBS緩衝液(TBST)で3回洗浄し、5μg/ml BSA/TBST 溶液を各ウェルに250μl添加し、室温で1時間静置し、ブロッキングを行った。その後、各ウェルはTBSTで3回洗浄した。

[0148] 次に、ヒト血清(Human Serum pool, Cosmo-Bio社製)をPBS、又は実施例1の(1-4)で調製した1mg総可溶性タンパク質/mlのpTrc99A導入大腸菌粗抽出液、又は1mg総可溶性タンパク質/mlのTM2/pTrc99A導入大腸菌粗抽出液で100倍希釈した溶液に、ウサギ抗SITH-1抗体を体積比で1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000となるように段階希釈して加えた。この(抗SITH-1抗体を含む)希釈したヒト血清を、BioEaseタグ融合SITH-1タンパク質をビオチン-タマビジン2結合を用いて固定化したプレートに、100μlずつ添加し、1時間室温で反応させた。

ウサギ抗SITH-1抗体(抗血清)の血清中抗体価は、典型的なうつ病(気分障害)患者の血清中抗SITH-1抗体価に比べ、およそ50倍程度高いと推定される。従って市販(健常者)ヒト血清に体積比で1/50量のウサギ抗SITH-1抗体(抗血清)を混ぜると、典型的なうつ病患者血清の擬似検体となると考えられる。よって、上記の抗体希釈率は、うつ病患者血清をおよそ10倍から80倍希釈して用いる場合と同程度とみなすことがで

きる。

さらに、血清の希釈に用いた大腸菌粗抽出液中におけるTM2の効果を確認するために、PBS若しくは上記pTrc99A導入大腸菌粗抽出液に、最終濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、精製TM2を加えた溶液を調製し、これを用いてヒト血清を100倍希釈した溶液に、上記と同様、ウサギ抗SITH-1抗体を体積比で1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000となるように段階希釈して加え、BioEaseタグ融合SITH-1を固定化したプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、1時間室温で反応させた。また対照として、何も結合させていないTM2固定化プレートに上記ブロッキング操作を行った後、上記と同様にPBS溶液や、pTrc99A導入あるいはTM2/pTrc99A導入大腸菌粗抽出液（ 1mg 総可溶性タンパク質/ ml ）、さらに精製TM2を加えたPBSや、精製TM2を加えたpTrc99A導入大腸菌粗抽出液で、100倍希釈したヒト血清に、段階的に希釈したウサギ抗SITH-1抗体を加えたものを $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で1時間反応させた。

[0149] 上記のように各種の希釈液で希釈したヒト血清に、ウサギ抗SITH-1抗体を段階希釈して加えたものを、担体に固定化したBioEaseタグ融合SITH-1タンパク質と反応させた後、TBSTで3回洗浄した。その後、SITH-1に結合したウサギ抗SITH-1抗体、ならびに各ウェル中で非特異的に結合していると考えられる血清中のヒトIgGを、それぞれ検出するために、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体、ならびにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を、それぞれTBSTで5000倍希釈した混合溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、1時間室温で静置した。その後、TBSTで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ活性を検出した。活性は各ウェルに、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE)を $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、5分間室温で静置した後発光量をプレートリーダーInfinite M200 (TECAN社製)によって測定した。なお、

データ値としては、ウサギ抗S I T H-1抗体の各濃度区それぞれにおいて、対照区（T M 2 プレートにB i o E a s e タグ融合S I T H-1を固定していないが、B S Aによりブロッキング操作は行なわれ、かつ各濃度の抗S I T H-1抗体を含むヒト血清を処理した区）の各発光量の測定も併せて行い、その対照区の値を、B i o E a s e タグ融合S I T H-1を固定化した区の発光量の値から差し引いた。これを血清中に含まれる抗S I T H-1抗体の検出量とした。さらに、各血清希釈液の効果の比較を行うために、S / N比を以下に示す式によって算出した。

$$S / N \text{ 比} = \frac{\text{抗S I T H-1抗体を各濃度で加えた区の抗S I T H-1抗体検出量}}{\text{抗S I T H-1抗体を加えない区の抗S I T H-1抗体検出量}}$$

[0150] 従って、S / N比が大きいほど検出感度が高いことを示している。

[0151] 結果を図2、図3に示す。血清中に含まれる抗S I T H-1抗体は、血清をP B Sで希釈した区では、非特異結合が多く、抗S I T H-1抗体を添加していない区でも高い発光量が検出された。また、この非特異結合は $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ T M 2 存在下でも改善されなかった。一方、血清をp T r c 9 9 A 導入大腸菌粗抽出液やT M 2 / p T r c 9 9 A 導入大腸菌粗抽出液、あるいはp T r c 9 9 A 導入大腸菌粗抽出液に $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ T M 2 を添加したもので希釈した区においては、S I T H-1抗体を加えない区におけるルミネッセンス値が相当低く、非特異結合が劇的に減少していた（図2）。

[0152] また図3に示したように、S / N比に関しては特にp T r c 9 9 A 導入大腸菌粗抽出液に $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ T M 2 を添加した区とT M 2 / p T r c 9 9 A 導入大腸菌粗抽出液を添加した区において高かった。

[0153] 以上のことから、T M 2 プレートにB i o E a s e タグ融合S I T H-1を固定化したプレートを用いた測定系において、T M 2 含有大腸菌粗抽出液でヒト血清を希釈することで、ヒト血清由来の非特異結合を減少させ、極めて低い濃度の抗S I T H-1抗体も感度良く定量的に検出できることが示された。

配列表フリーテキスト

- [0154] 配列番号 1 : S I T H - 1 のアミノ酸配列。
- [0155] 配列番号 2 : S I T H - 1 O R F の塩基配列。
- [0156] 配列番号 3 : S I T H - 1 c D N A の塩基配列。
- [0157] 配列番号 4 : タマビジン 1 の塩基配列。
- [0158] 配列番号 5 : タマビジン 1 のアミノ酸配列。
- [0159] 配列番号 6 : タマビジン 2 の塩基配列。
- [0160] 配列番号 7 : タマビジン 2 のアミノ酸配列。
- [0161] 配列番号 8 : B i o E a s e - S I T H - 1 融合タンパク質のアミノ酸配
列
- [0162] 配列番号 9 : B i o E a s e - S I T H - 1 融合タンパク質をコードする
塩基配列
- [0163] 配列番号 10 : P C R 用プライマー S I T H 1 N t e r m G W - F
- [0164] 配列番号 11 : P C R 用プライマー S I T H 1 N t e r m G W - R

請求の範囲

[請求項1]

生物学的試料中の物質を検出する方法であって、

1) ビオチン結合性タンパク質を結合させた担体、及び、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質を準備し；

2) ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間の結合を介して、工程1)で準備した担体にビオチン化タンパク質を結合させて、ビオチン化タンパク質が結合した担体を作成し；

3) 工程2)で作成したビオチン化タンパク質が結合した担体に、

(a) 生物学的試料、及び

(b-i) 工程1)のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは

(b-ii) 工程1)のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液

を混合して添加する；そして、

4) ビオチン化タンパク質と特異的に結合した披検物質を検出する

ことを含む、前記方法。

[請求項2]

請求項1の工程3(b-i)において、細胞破碎抽出液として、任意のベクターを含む細胞から抽出した細胞破碎抽出液を添加する、請求項1に記載の方法。

[請求項3]

ビオチン結合性タンパク質がタマビジン又はその変異体である、請

求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項4] 生物学的試料が、血液、血清、脳脊髄液、唾液、咽頭拭い液、汗、尿、涙、リンパ液、精液、腹水、及び母乳からなる群から選択される、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項5] 生物学的試料を希釈するための剤であって、

- 1) 細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、又は
- 2) 遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含む剤。

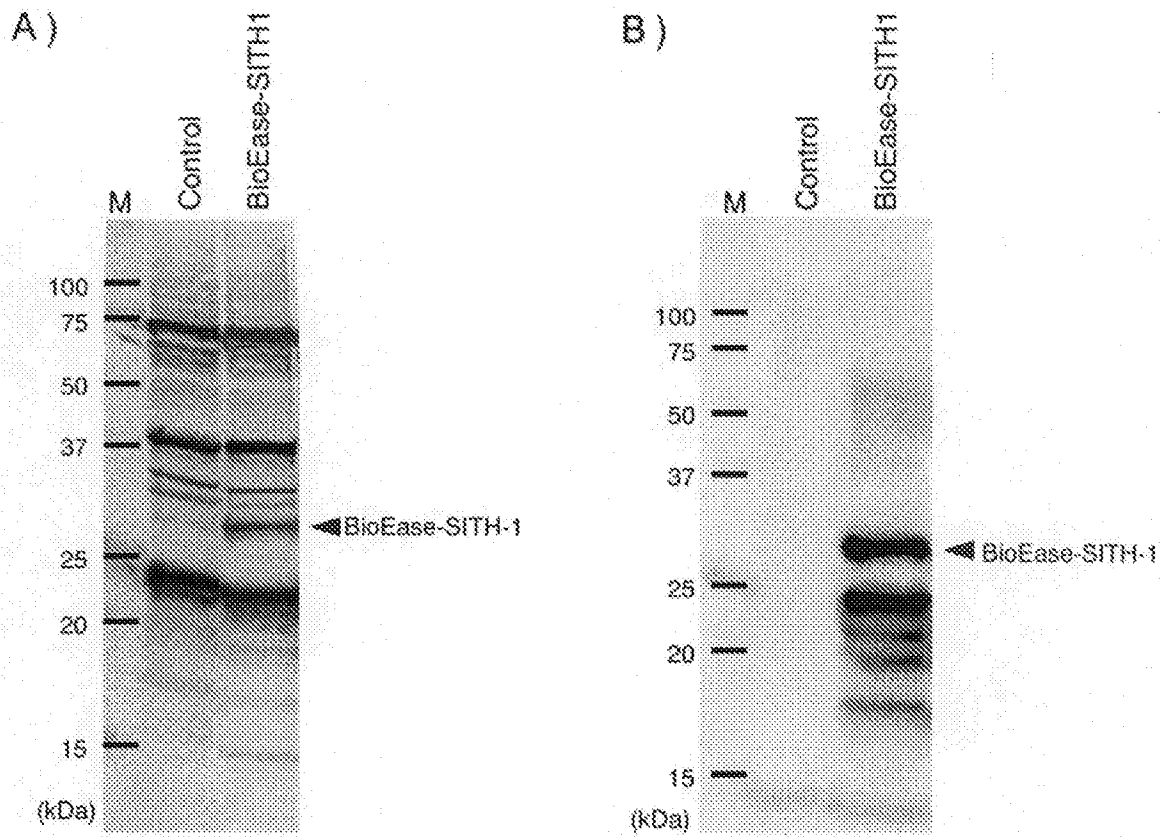
[請求項6] 生物学的試料中の物質を検出するためのキットであって、

A) 検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質にビオチンを結合させたビオチン化タンパク質が、ビオチン-ビオチン結合性タンパク質間結合によって結合している、担体；並びに、

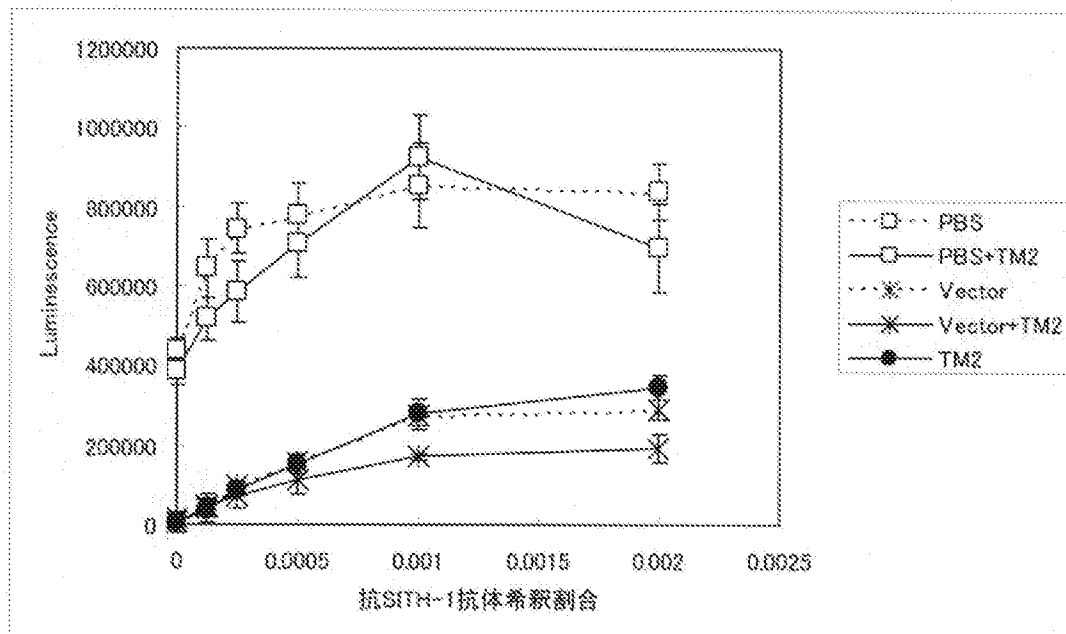
B-i) A) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞より調製した細胞破碎抽出液と、ビオチン結合性タンパク質、あるいは

B-ii) A) のビオチン結合性タンパク質、検出すべき物質と特異的に結合するタンパク質、及び／又はビオチン化タンパク質を発現させるのに利用した宿主細胞と同種の細胞に遺伝子工学技術によりビオチン結合性タンパク質を発現させた細胞から調製した細胞破碎抽出液を含む、生物学的試料を希釈するための剤；を含むキット。

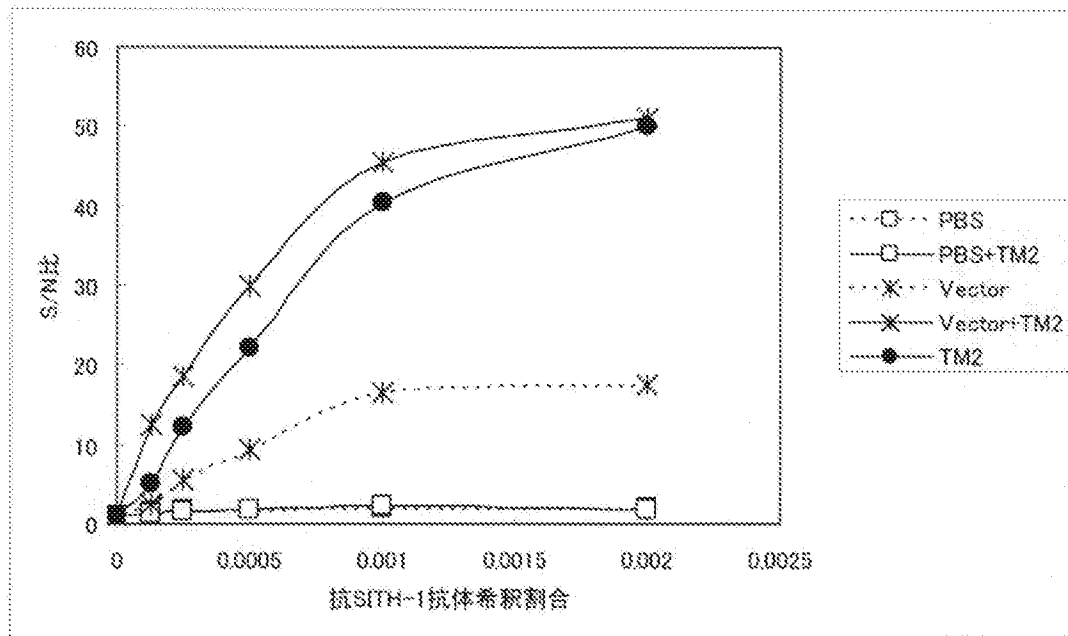
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/055887

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i, C07K17/00(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)

G01N33/48-98, C07K17/00

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-301646 A (Sysmex Corp.), 28 October 2004 (28.10.2004), (Family: none)	1-6
A	JP 11-211727 A (Boehringer Mannheim GmbH), 06 August 1999 (06.08.1999), & US 2002/0052009 A1 & EP 913690 A2 & DE 19748489 A	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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
11 June, 2010 (11.06.10)

Date of mailing of the international search report
29 June, 2010 (29.06.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
Int.Cl. G01N33/543 (2006.01)i, C07K17/00 (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（I P C））

Int.Cl. G01N33/48-98, C07K17/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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）

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
A	JP 2004-301646 A（シスメックス株式会社）2004.10.28,（ファミリーなし）	1-6
A	JP 11-211727 A（ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー） 1999.08.06, & US 2002/0052009 A1 & EP 913690 A2 & DE 19748489 A	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

1 1 . 0 6 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

2 9 . 0 6 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

山村 祥子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

2 J

9 2 1 7