

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6161548号  
(P6161548)

(45) 発行日 平成29年7月12日(2017.7.12)

(24) 登録日 平成29年6月23日(2017.6.23)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/68 (2006.01)  
GO 1 N 33/48 (2006.01)GO 1 N 33/68  
GO 1 N 33/48

B

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2014-10597 (P2014-10597)  
 (22) 出願日 平成26年1月23日 (2014.1.23)  
 (65) 公開番号 特開2015-137978 (P2015-137978A)  
 (43) 公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30)  
 審査請求日 平成28年3月17日 (2016.3.17)

(出願人による申告) 独立行政法人科学技術振興機構による独創的シーズ展開事業の委託開発「ペプチドマークーを用いた早期がん検査法」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願。

(73) 特許権者 390014960  
 シスメックス株式会社  
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号  
 (74) 代理人 100065248  
 弁理士 野河 信太郎  
 (74) 代理人 100159385  
 弁理士 甲斐 伸二  
 (74) 代理人 100163407  
 弁理士 金子 裕輔  
 (74) 代理人 100166936  
 弁理士 稲本 澄  
 (72) 発明者 川▲崎▼ 佳奈  
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号  
 シスメックス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペプチドの回収方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ペプチドとアルブミンとの複合体を含む液体試料と、中性アミノ酸、酸性アミノ酸またはその両方を含む試薬とを混合し、加熱処理することによりアルブミン自己会合体を形成させ、前記ペプチドを前記アルブミンから遊離させる工程と、

遊離した前記ペプチドを回収する工程と、  
 を含む、ペプチドの回収方法。

## 【請求項 2】

前記加熱処理が、マイクロ波照射によって行われる請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記加熱処理において、前記液体試料が120以上260以下に加熱される請求項1または2に記載の方法。

## 【請求項 4】

混合後または加熱処理後に形成された沈殿物を混合液から除去して、遊離した前記ペプチドを回収する工程をさらに含む、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

前記液体試料が、血液、血漿または血清である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 6】

前記ペプチドが、前記生体によって生成されたペプチドまたはその断片である、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7】**

ペプチドとアルブミンとの複合体を含む液体試料と、中性アミノ酸、酸性アミノ酸またはその両方を含む試薬とを混合し、加熱処理することによりアルブミン自己会合体を形成させ、前記ペプチドを前記アルブミンから遊離させる工程と、

遊離した前記ペプチドを検出する工程と、  
を含む、ペプチドの検出方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法に用いられる試薬であって、  
中性アミノ酸、酸性アミノ酸またはその両方を含む試薬。

**【発明の詳細な説明】**

10

**【技術分野】****【0001】**

本発明は、血液などの液体試料からペプチドを回収する方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

血液中には様々なペプチドが含まれているが、その中には、特定の病態にある生体において健常時とは異なる血中濃度を示すペプチドも存在する。そのようなペプチドは、臨床検査の分野において疾患のマーカーとして有用である。

**【0003】**

20

血液中にはアルブミンやグロブリンなどのタンパク質（以下、血中タンパク質ともいう）が含まれており、ペプチドは血中タンパク質と結合していることが多い。そのため、ペプチドの検出においては、血中タンパク質から遊離させることが好ましい。ペプチドを遊離させる技術として、特許文献 1 の技術が挙げられる。特許文献 1 に記載の方法は、ペプチド／アルブミン複合体を含む溶液を加熱処理することによって、ペプチド非結合性のアルブミン自己会合体を形成させ、ペプチドをアルブミンから遊離させる方法である。

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0004】**

【特許文献 1】米国特許出願公開第2012/0277407号明細書

30

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明は、液体試料からペプチドを高回収率及び高精製度で回収する方法を提供することを課題とする。

**【課題を解決するための手段】****【0006】**

本発明者は、鋭意研究の結果、ペプチドと血中タンパク質との複合体を含む液体試料と、特定のアミノ酸を含む試薬とを混合することによって高回収率あるいは高精製度でペプチドを回収できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

**【0007】**

40

かくして、本発明は、

ペプチドと血中タンパク質との複合体を含む液体試料と、中性アミノ酸、酸性アミノ酸またはその両方を含む試薬とを混合することにより前記ペプチドを前記血中タンパク質から遊離させる工程と、

遊離した前記ペプチドを回収する工程と、  
を含む、ペプチドの回収方法を提供する。

**【発明の効果】****【0008】**

本発明のペプチドの回収方法によれば、ペプチドと血中タンパク質との複合体を含む液体試料からペプチドを従来法よりも高回収率あるいは高精製度で回収することができる。

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0009】

【図1A】SDS-PAGEゲルのバンド強度のグラフである。

【図1B】SDS-PAGEゲルのバンド強度のグラフである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0010】

本発明のペプチドの回収方法（以下、単に「回収方法」ともいう）の遊離工程は、ペプチドと血中タンパク質との複合体を含む液体試料と、中性アミノ酸、酸性アミノ酸、またはその両方を含む試薬（以下、「アミノ酸を含む試薬」ともいう）とを混合することによりペプチドを血中タンパク質から遊離させる工程である。

10

## 【0011】

本発明の好ましい実施形態において、液体試料は生体試料である。生体試料としては、例えば、生体から採取した血液などの体液が挙げられる。また、血液から取得した血漿および血清も生体試料に含まれる。液体試料は希釀して用いることもでき、希釀率は当業者が適宜設定することができる。

## 【0012】

本明細書において、「血中タンパク質」とは、アルブミン、グロブリンなど、血液中に存在するタンパク質である。この血中タンパク質は、血液中で後述のペプチドと結合して複合体を形成しており、本実施形態の遊離工程によってペプチドを遊離する。また、ペプチドを遊離した血中タンパク質は遊離工程における処理中に凝集して沈殿する。

20

## 【0013】

本発明の実施形態において、回収されるペプチドは特に限定されず、天然起源のペプチドであってもよいし、合成ペプチドであってもよい。ペプチドの長さとしては、本発明の方法によって回収されるものであれば特に限定されない。液体試料中のポリペプチドのうち比較的大きいもの（たとえば、血中タンパク質など）は、本発明の遊離工程における処理により凝集して沈殿するが、比較的小さいもの（たとえば、オリゴペプチドなど）は、液中に遊離される。この遊離したポリペプチドが本発明の方法によって回収され得る「ペプチド」である。液体試料中の全てのポリペプチドが完全に沈殿するか完全に遊離するかのいずれかであるという訳ではなく、ポリペプチドによっては沈殿した凝集体にも含まれ、且つ遊離した成分の中にも含まれるものもある。このようなポリペプチドも、遊離した成分（たとえば、上清）に含まれ、回収が可能となるため、本発明の「ペプチド」に含まれる。なお、本発明の方法によれば、アミノ酸が130残基程度のペプチドであれば試料中に遊離するため、130残基未満のペプチドが回収に好適であるが、これに限定されない。なお、液体試料中にもともと存在するポリペプチドだけでなく、本発明の方法により処理する過程で断片化したポリペプチドも、遊離した成分に含まれるものであれば本発明における「ペプチド」に含まれる。

30

本発明の実施形態において、ペプチドの等電点は特に限定されず、ペプチドは塩基性ペプチド、酸性ペプチドおよび中性ペプチドのいずれであってもよい。

## 【0014】

本発明の実施形態において、ペプチドは、生体内で生成された分子に由来するものであってもよいし、生体外から進入した分子に由来するものであってもよい。生体内で生成された分子に由来するものとしては、生体内で生成されたペプチドや、生体内で生成されたポリペプチドの断片などが例示される。

40

本発明の実施形態において、ペプチドは、血液中に存在するバイオマーカーであってもよい。

そのようなバイオマーカーであるペプチドとしては、例えばグレリン、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、ブラジキニン、-エンドルフィン、C-peptide、C3fフラグメント、ITIH4フラグメント、Aペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。すなわち、本発明において、遊離されるペプチドには、これまでに同定されていない新規なアミノ酸配列を

50

有するペプチドも含み得る。

バイオマーカーを検出対象とする場合、本実施形態の方法は、たとえば特定の疾患の存在や疾患の進行度についての情報を取得するために利用することができる。即ち、バイオマーカーたるペプチドを本実施形態の方法によって生体試料から回収し、これを定性的および／または定量的に検出することにより、疾患の存在や疾患の進行度を判定する際の指標となりうる情報を取得することが想定される。

また、本発明の実施形態において、ペプチドは、生体に投与されたポリペプチド、その代謝物、あるいはこれらの断片であってもよい。この場合、本実施形態の方法は、たとえば薬剤感受性についての情報を取得するために利用することができる。即ち、薬剤として生体に投与されたポリペプチドやその代謝物を本実施形態の方法によって生体試料から回収し、これを定性的および／または定量的に検出することにより、当該薬剤の感受性等を判定する際の指標となりうる情報を取得することが想定される。

また、本発明の実施形態において、ペプチドは、検査対象の生体に由来するものではなく、生体外から生体内に侵入したものであってもよい。例として、病原体（細菌、ウイルス等）に由来するペプチドなどが挙げられる。この場合、本実施形態の方法は、たとえば病原体への感染についての情報を取得するために利用することができる。即ち、病原体を構成するタンパク質に由来するペプチドや病原体が生成した毒素（たとえば、ベロ毒素など）に由来するペプチドを本実施形態の方法によって生体試料から回収し、これを定性的および／または定量的に検出することにより、当該病原体への感染を判定する際の指標となりうる情報を取得することが想定される。

#### 【0015】

本発明の実施形態においては、塩基性アミノ酸は用いられない。塩基性アミノ酸はタンパク質の凝集防止剤として用いられるため、本実施形態のように血中タンパク質を凝集させることによりペプチドを回収する方法には好適ではないと考えられる。従って、本実施形態には中性アミノ酸または酸性アミノ酸が用いられる。中性アミノ酸としては、グリシン、トレオニン、アスパラギン、セリン、メチオニン、バリン、トリプトファン、グルタミン、イソロイシン、フェニルアラニン、アラニン、プロリン、ロイシンおよびシステインが挙げられ、酸性アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。中性アミノ酸を2種以上用いてもよく、酸性アミノ酸を2種以上用いてもよい。また、中性アミノ酸1種以上と酸性アミノ酸1種以上を併用してもよい。アミノ酸はL体またはD体のいずれであってもよく、天然アミノ酸または合成アミノ酸のいずれであってもよい。

#### 【0016】

本発明の実施形態において、「アミノ酸を含む試薬」は、上記のアミノ酸のうちの少なくとも1つを含むものであれば特に限定されず、固体であってもよいし、溶液状であってもよい。好ましくは、試薬は固体である。

アミノ酸を含む試薬が固体である場合、該試薬は、上記に列挙した各々のアミノ酸そのものであってもよいし、上記に列挙したアミノ酸のうちの少なくとも1種を含むアミノ酸の混合物であってもよく、本発明の実施に差支えのない範囲において上記に列挙したアミノ酸以外の成分を更に含んでいてもよい。

アミノ酸を含む試薬が溶液状である場合、該試薬は、上記に列挙したアミノ酸のうちの少なくとも1種のアミノ酸の溶液であり、本発明の実施に差支えのない範囲において上記に列挙したアミノ酸以外の成分を更に含んでいてもよい。溶媒は上記のアミノ酸の溶解に適したものであれば特に限定されず、当業者が適宜選択することができる。そのような溶媒としては、例えば水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などが挙げられる。

#### 【0017】

本発明の実施形態において、液体試料に対する試薬の添加量は、アミノ酸の最終濃度が血中のアミノ酸濃度よりも高くなるような量であれば特に限定されず、当業者が適宜設定することができる。そのような添加量は、好ましくはアミノ酸の最終濃度が1 mM以上、さらに好ましくは3 mM以上となる量である。

#### 【0018】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい実施形態において、本発明の回収方法は、液体試料と試薬との混合により得られた混合液を加熱処理する工程を更に含む。混合液の加熱処理における温度と時間は、混合液中のペプチドが熱によって完全には変性しない範囲であればよい。ここで「ペプチドが完全に変性する」とは、ペプチドが検出不可能なほどに変性することを意味する。

#### 【0019】

このような加熱処理温度は当業者が適宜設定することができるが、好ましくは50 以上 260 以下で行われ、より好ましくは100 以上260 以下、さらに好ましくは120 以上260 以下で行われる。

加熱処理時間もまた当業者が適宜設定することができるが、好ましくは30秒～5 分、より好ましくは 1～3 分で行われる。

加熱処理における昇温速度は特に限定されず、当業者が適宜設定することができる。

#### 【0020】

本発明の実施形態において、加熱処理の方法は、混合液を上記の温度で加熱できる方法であれば特に限定されず、当該技術において公知の方法から選択される。そのような方法としては、例えば外部からの熱伝導による加熱、マイクロ波による加熱などが挙げられる。

また、本発明の実施形態において、加熱処理に用いる装置は、混合液の温度を調節しながら加熱できる装置であれば特に限定されないが、例えば水熱反応器、マイクロ波照射装置などが挙げられる。

#### 【0021】

上記の工程によって、混合液中のペプチドと血中タンパク質との複合体から、血中タンパク質の自己会合体と考えられる沈殿物が形成される。特許文献1においては、アルブミンの自己会合体は、熱変性により高次構造が変化し、ペプチドと結合する能力をほとんど失っていると考えられると報告されている。したがって、特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明の回収方法のメカニズムを説明し得る1つの仮説としては、本発明の回収方法において、血中タンパク質の自己会合体と考えられる沈殿物が形成される際に、ペプチドが血中タンパク質から遊離されることが考えられる。

#### 【0022】

上記の沈殿物は、混合液に含まれる溶媒に不溶であり、加熱処理後の混合液中で沈殿する。すなわち、加熱処理後の混合液は、血中タンパク質の自己会合体と考えられる沈殿物とペプチドを含む上清画分とに分離される。

本発明の実施形態においては、上記の上清画分をサンプルとして用い、当該技術において公知の方法で解析することにより、ペプチドが血中タンパク質から遊離してフリーな状態で混合液中に存在していることを確認できる。そのような方法としては、例えば電気泳動法、質量分析法などが挙げられる。

#### 【0023】

本発明のペプチドの回収方法の回収工程において、加熱処理後の混合液から沈殿物を除去する方法は特に限定されない。例えば、薬さじなどで沈殿物を直接取り出してもよいし、市販のセパレータまたは濾紙などを用いて該沈殿物を除去してもよい。このように、本発明の回収方法は、加熱処理後の混合液から沈殿物を除去して、遊離したペプチドを含む上清画分を取得することによりペプチドを回収することができる。

#### 【0024】

上述したようにアルブミンの自己会合体はペプチドと結合することはないと考えられる。したがって、アルブミンを主成分として含む血中タンパク質の自己会合体と考えられる沈殿物がペプチドと結合するとは考えにくい。しかしながら、この沈殿物はスポンジのように吸水性を有するので、該沈殿物にはペプチドを含む上清画分が取り込まれることがある。

したがって、本発明の回収方法においては、除去した沈殿物からペプチドを含む上清を取得する工程をさらに含んでもよい。沈殿物からペプチドを含む上清を取得する方法とし

10

20

30

40

50

ては、例えば該沈殿物を限外ろ過チューブに入れて遠心することにより上清を搾り取ってもよいし、該沈殿物をホモジナイザーで攪拌することにより上清を取得してもよい。なお、この沈殿物からペプチドを含む上清を取得する方法においては、加熱処理を行う必要はない。

#### 【0025】

従来の方法として、血中タンパク質を除去するために、アルブミンと特異的に結合するカラムに血液試料を通し、アルブミンをカラムに吸着させて血液中に遊離しているペプチドを得るという手法がある。しかし、Lowenthalらの報告 (Clin. Chem., vol. 51, 1933-1 945(2005)) によれば、血清中では98%ものペプチドがアルブミンと結合することを報じている。つまり、アルブミンを吸着除去してペプチドを取得する方法では本実施形態の方法によれば、アルブミンと共にペプチドも除去されてしまうため、極めて微量のペプチドしか取得することができないという問題があった。

しかしながら、本実施形態によるとアルブミン等の血中タンパク質と結合したペプチドが遊離された後に回収されるため、より効率的なペプチド回収が可能となる。

#### 【0026】

また、本発明は、ペプチドの検出方法をも含む。この検出方法によると、上記の遊離工程によって遊離したペプチドは、従来公知の方法によって検出される。ここで、検出とは、定量的検出、定性的検出、半定量的検出（陰性、弱陽性、強陽性などの判定）を含む。この検出方法により得られた結果は、上述した疾患の判定、薬剤感受性、感染症の有無等の情報を取得するために用いられ得る。

#### 【0027】

以下に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0028】

##### 実施例 1

###### （1）ペプチドと血中タンパク質との複合体を含む液体試料の調製

ペプチドとして、ACTHの1位～24位のアミノ酸からなるACTH部分ペプチドを、赤色蛍光色素であるテトラメチルローダミン（TMR）で標識したTMR-ACTH部分ペプチド（株式会社バイオロジカ）を用いた。なお、ACTHは塩基性ペプチド（等電点pI = 10.64）である。健常者由来の全血（ProMedDx社から購入）を0.5×リン酸緩衝性生理食塩水（0.5×PBS[pH=7.4]）、塩化ナトリウム（最終濃度68.5 mM）、リン酸水素二ナトリウム（最終濃度4 mM）、塩化カリウム（最終濃度1.3 mM）、リン酸二水素カリウム（最終濃度0.7 mM））で10倍希釈し、得られた希釈液にACTH部分ペプチドの最終濃度が2 μMとなるように添加し、ペプチド／血中タンパク質複合体を含む液体試料を調製した。

#### 【0029】

###### （2）ペプチド／血中タンパク質複合体を含む液体試料の加熱処理

上記のペプチド／血中タンパク質複合体を含む液体試料に、各種アミノ酸（L-セリン、グリシン、L-アラニンおよびL(-)-プロリン（和光純薬工業株式会社製）、L-アスパラギン、L-フェニルアラニン、L-トレオニン、DL-メチオニン、L-トリプトファン、L-バリン、L-イソロイシンおよびL-リジン（シグマ-アルドリッヂ社製）、L-グルタミン（ICNバイオメディカルズ社製）、L-アルギニン（株式会社ナカライトスク製））またはアミノ酸誘導体であるポリグリシン（シグマ-アルドリッヂ社製）、トリメチルグリシン（和光純薬工業株式会社製）もしくはグリシルグリシン（和光純薬工業株式会社製）をそれぞれ下記の表1に示す最終濃度で添加して、ペプチド／血中タンパク質複合体とアミノ酸とを含む混合液を得た。

#### 【0030】

10

20

30

40

【表1】

アミノ酸	濃度
無添加	—
Gly (グリシン)	2000 mM
Gly (グリシン)	500 mM
Thr (トレオニン)	500 mM
Asn (アスパラギン)	150 mM
Gly+Thr	500 mM + 450 mM
Asn+Thr	90 mM + 300 mM
Ser (セリン)	500 mM
Met (メチオニン)	255 mM
Val (バリン)	500 mM
Trp (トリプトファン)	50 mM
Gln (グルタミン)	128 mM
Ile (イソロイシン)	150 mM
Phe (フェニルアラニン)	160 mM
Ala (アラニン)	500 mM
Pro (プロリン)	500 mM
TMG (トリメチルグリシン)	500 mM
(Gly)n (ポリグリシン)	0.05 % (w/v)
(Gly)2 (グリシルグリシン)	500 mM
Lys (リジン)	500 mM
Arg (アルギニン)	500 mM

## 【0031】

得られた混合液 (1.5 mL) を10 mL容のガラス試験管に移し、次にテフロン製の試験管用耐圧密封ホルダー (マイルストーンゼネラル株式会社) にて封じてから、マイクロ波照射装置 (MultiSYNTH型、マイルストーンゼネラル株式会社) を用いて、室温(25)から100まで30秒間で昇温し、その後100から160まで1分間で昇温することにより加熱処理を行った。加熱処理後の冷却は、前記のマイクロ波照射装置に接続されたエアコンプレッサー (YC-3R型、株式会社八重崎空圧) から圧縮空気を前記の耐圧密封ホルダーに吹き付けることで行った。冷却速度は、毎分20とした。対照として、アミノ酸またはアミノ酸誘導体を添加していない上記の液体試料 (1.5 mL) を同様に封じてから同様の加熱処理に供した。加熱処理後の混合液または液体試料中には、いずれも沈殿物が見られた。

## 【0032】

## (3) ペプチドおよび血中タンパク質の検出

加熱処理後の上清画分をサンプルとして、SDS-PAGEを行った。具体的には、10xローディングバッファー (タカラバイオ株式会社) および60% (w/w) グリセロール溶液の1:1混合

10

20

30

40

50

物であるサンプルバッファー（還元剤非添加）と上記サンプルとを混合し、ニューページ4-12%ビス-トリスゲルおよびニューページMES SDSランニングバッファー（共にライフテクノロジーズジャパン株式会社）を用いて200V（定電圧）で30分間、電気泳動を行った。泳動槽はエクセルシュアロックミニセル（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）、電源装置はパワーステーション1000XP（アトー株式会社）を用いた。電気泳動後のゲルについて、TMR-ACTH部分ペプチドを蛍光イメージヤー（Pharos FX Molecular Imager型、バイオラッドラボラトリーズ株式会社）を用いて検出し、HSAを銀染色により検出した。銀染色には銀染色キット「イージーステインシルバー」（アトー株式会社）を用いた。染色の各工程は以下の通りである。固定；固定液 100 mL（超純水40 mL + メタノール 50 mL + 酢酸10 mL + キット瓶S-1 1 mL）で10分間振とう、洗浄；超純水100 mLで10分間振とう×3回、染色；染色液（超純水100 mL + キット瓶S-2 1 mL）で10分間振とう、洗浄；超純水100 mLで30秒間振とう、発色液100 mL（超純水200 mL + キット瓶S-3 1 mL + キット瓶S-4 1 mL）で30秒間振とう、発色；発色液 100 mLで5～10分間振とう、停止；停止液 100 mL（超純水100 mL + 酢酸 1 mL）で10分間振とう、洗浄；超純水100 mLで5分間振とう×2回。振とう機はインビトロシェーカーWave-SI（タイテック株式会社）を用いた。これら蛍光イメージングおよび銀染色の結果に基づいて、画像処理ソフトウェアImageJ 1.46r（NIH）を用いてペプチドあるいはタンパク質残渣のデンシトメトリー値を求め、回収率および精製度をそれぞれ下記の式1および2に従って算出した。

$$\text{回収率} = (\text{アミノ酸添加時(水熱後)のデンシトメトリー値}) / (\text{アミノ酸無添加時(水熱後)のデンシトメトリー値}) \quad \dots \quad \text{式1}$$

$$\text{精製度} = (\text{アミノ酸無添加時(水熱後)のゲルデンシトメトリー値}) / (\text{アミノ酸添加時(水熱後)のゲルデンシトメトリー値}) \quad \dots \quad \text{式2}$$

#### 【0033】

なお、本実施例以降の実施例における「回収率」については、水熱反応を行い、アミノ酸を添加せずにペプチドを回収する従来技術よりも本発明が顕著な効果を奏することを示すため、上記式1の通り、本実施例の処理（水熱反応およびアミノ酸添加）後の測定試料を用いた場合のデンシトメトリー値と、対照の測定試料（従来技術である、アミノ酸無添加で水熱処理を行った測定試料）を用いた場合のデンシトメトリー値との比を用いた。「精製度」についても同様である。したがって、「回収率」および「精製度」は、対照の測定試料を1としたときの相対値として表される。

#### 【0034】

なお、蛍光イメージングにおいて検出されるアミノ酸添加時のペプチドのバンドはアミノ酸無添加時のペプチドのバンドよりも濃くなることが予想されるため、アミノ酸添加時のペプチドバンド領域におけるデンシトメトリー値は、アミノ酸無添加時(水熱後)のバンド領域におけるデンシトメトリー値よりも大きくなることが予想される。したがって、式1によって算出される回収率は、良好な回収率をもってペプチドを回収できた場合に大きくなると考えられる。

また、銀染色において検出されるアミノ酸無添加レーンの銀染色像はアミノ酸添加レーンの銀染色像よりも濃くなることが予想されるため、アミノ酸無添加レーン(水熱後)のゲルデンシトメトリー値は、アミノ酸添加レーンのゲルデンシトメトリー値よりも大きくなることが予想される。したがって、式2によって算出される精製度は、良好な精製度をもってペプチドを回収できた場合に大きくなると考えられる。

更に、アミノ酸添加効果を総合的に判断するための指標として、回収率×精製度の値を算出した。

結果を下記の表2に示す。

#### 【0035】

【表2】

アミノ酸	回収率	精製度	回収率 × 精製度
無添加(水熱後)	1	1	1
Gly 2000 mM	2.36	8.12	19.15
Gly 500 mM	1.56	4.72	7.36
Thr	3.08	2.46	7.59
Asn	3.11	1.75	5.44
Gly+Thr	2.35	2.2	5.18
Asn+Thr	2.35	1.93	4.54
Ser	2.62	1.61	4.22
Met	1.82	2.11	3.83
Val	1.85	2.05	3.8
Trp	2.51	1.2	3.02
Gln	2.3	1.28	2.95
Ile	2	1.36	2.72
Phe	1.64	1.41	2.32
Ala	1.07	2.04	2.18
Pro	1.43	1.3	1.86
TMG	0.82	0.94	0.78
(Gly)n	0.73	0.98	0.72
(Gly)2	0.12	1.03	0.12
Lys	0.11	0.68	0.07
Arg	ND	0.86	ND

## 【0036】

その結果、グリシン、トレオニン、アスパラギン、グリシン/トレオニンの組合せ、アスパラギン/トレオニンの組合せ、セリン、メチオニン、バリン、トリプトファン、グルタミン、イソロイシン、フェニルアラニン、アラニン及びプロリンについては、いずれを添加しても、アミノ酸を添加しない場合と比較して、回収率×精製度の数値が増大した。一方、トリメチルグリシン、ポリグリシン、グリシルグリシン、リジン及びアルギニンについては、いずれを添加しても回収率×精製度の数値の増大はみられない。

この結果から、グリシン、トレオニン、アスパラギン、グリシン/トレオニンの組合せ、アスパラギン/トレオニンの組合せ、セリン、メチオニン、バリン、トリプトファン、グルタミン、イソロイシン、フェニルアラニン、アラニン及びプロリンについては、いずれを添加しても、アミノ酸を添加しない場合と比較して、良好な回収率および精製度をもってペプチドを回収できることが示された。

## 【0037】

## 実施例2

## (1) ペプチドと血中タンパク質との複合体を含む液体試料の調製

全血を0.5×PBSで10倍希釈し、得られた希釈液にTMRで標識したBNP (TMR-BNP) (等電点pI = 10.95)、TMRで標識したIqp (TMR-Iqp) (等電点pI = 6.75) およびTMRで標識したC-p

10

20

30

40

50

peptide (TMR-C-peptide) (等電点pI = 3.45) (株式会社バイオロジカ)を2 μMの最終濃度で添加し、ペプチド／血中タンパク質複合体を含む液体試料を調製した。ここで、Iqpとは、IQ and ubiquitin like domain containing proteinの326-337番目の部分ペプチドの330番目のセリンをアスパラギン酸に置換したものである。

【0038】

(2) ペプチド／血中タンパク質複合体を含む液体試料の加熱処理

上記のペプチド／血中タンパク質複合体を含む液体試料に、グリシンを1500 mMの最終濃度で添加して、ペプチド／血中タンパク質複合体とアミノ酸とを含む混合液を得た。

得られた混合液 (1.5 mL) を10 mL容のガラス試験管に移し、次にテフロン製の試験管用耐圧密封ホルダー (マイルストーンゼネラル株式会社) にて封じてから、マイクロ波照射装置 (MultiSYNTH型、マイルストーンゼネラル株式会社) を用いて、室温(25)から100まで30秒間で昇温し、その後100から160まで1分間で昇温することにより加熱処理を行った。加熱処理後の冷却は、前記のマイクロ波照射装置に接続されたエアコンプレッサー (YC-3R型、株式会社八重崎空圧) から圧縮空気を前記の耐圧密封ホルダーに吹き付けることで行った。冷却速度は、毎分20とした。対照として、グリシンを含まず、各種ペプチドを含む上記の液体試料 (1.5 mL) を同様に封じてから同様の加熱処理に付し、この試料を用いて得られた回収率および精製度を1とした。加熱処理後の混合液または液体試料中には、いずれも沈殿物が見られた。

【0039】

(3) ペプチドおよび血中タンパク質の検出

加熱処理後の上清画分をサンプルとして用いて、各種ペプチドについての蛍光スペクトルを測定した。具体的には、上記のサンプル (0.6 mL) を石英セルに入れ、F-7000形分光蛍光光度計 (株式会社日立ハイテクノロジーズ製) を用いて励起光 (540 nm) を照射し、580 nmにおける蛍光スペクトルを測定した。この結果に基づいて、回収率をそれぞれ下記の式3に従って算出した。結果を下記の表3～6に示す。

回収率 = (アミノ酸添加時(水熱後)の蛍光スペクトル ピーク値\*) / (アミノ酸無添加時(水熱後)の蛍光スペクトル ピーク値) ··· 式3

\* : ピーク値は580 nm付近の極大値

なお、アミノ酸添加時の蛍光スペクトルのピーク値はアミノ酸無添加時の蛍光スペクトルのピーク値よりも大きくなることが予想される。したがって、式3によって算出される回収率は、良好な回収率をもってペプチドを回収できた場合に大きくなると考えられる。

【0040】

【表3】

ACTH部分ペプチド(等電点=10.64)			
グリシン添加	回収率	精製度	回収率×精製度
なし(水熱後)	1.00	1.00	1.00
あり	3.6	3.38	12.2

【0041】

【表4】

BNP(等電点=10.95)			
グリシン添加	回収率	精製度	回収率×精製度
なし(水熱後)	1.00	1.00	1.00
あり	3.6	3.09	11.0

【0042】

【表5】

Iqp(等電点=6.75)			
グリシン添加	回収率	精製度	回収率×精製度
なし(水熱後)	1.00	1.00	1.00
あり	3.2	2.50	8.00

【0043】

【表6】

C-peptide(等電点=3.45)			
グリシン添加	回収率	精製度	回収率×精製度
なし(水熱後)	1.00	1.00	1.00
あり	1.8	2.23	3.95

10

【0044】

その結果、TMR-ACTH(1-24)を用いた場合には12.2倍、TMR-BNPを用いた場合には11.0倍、Iqpを用いた場合には8.00倍、C-peptideを用いた場合には3.95倍も優れた回収率×精製度をもって、ペプチドを回収することができた。

20

この結果から、本発明の回収方法によれば、様々な等電点のペプチドを良好な回収率および精製度をもって回収できることが示された。

【0045】

実施例3

使用するアミノ酸をグリシン0 mM(無添加)、10 mM、100 mM、500 mMまたは1500 mMとしたこと、回収率の算出を実施例2と同様にして行ったこと以外は実施例1と同様にして、回収率および精製度を評価した。結果を下記の表7に示す。

【0046】

【表7】

30

アミノ酸最終濃度	回収率	精製度	回収率 × 精製度
無添加(水熱後)	1.00	1.00	1.00
10 mM	1.56	0.92	1.43
100 mM	3.79	1.44	5.45
500 mM	4.16	2.20	9.12
1500 mM	4.89	5.05	24.6

40

【0047】

その結果、グリシン最終濃度を10 mMとした場合には1.43倍、100 mMとした場合には5.45倍、500 mMとした場合には9.12倍、1500 mMとした場合には24.6倍も優れた回収率×精製度をもって、ペプチドを回収することができた。

この結果から、本発明の回収方法によれば、広範なアミノ酸濃度で良好な回収率および精製度をもってペプチドを回収できることが示された。

【0048】

実施例4

まず、健常者由来のヒト血清(ProMedD社から購入)を0.5 x PBSで10倍希釀し、モデルペプチドとしてのTMR標識ACTH部分ペプチドを添加した。得られた血清/ペプチドの混液1

50

.5 mLを160 °Cで加熱処理し、アミノ酸無添加サンプルについての蛍光イメージング像、銀染色像およびゲルデンシトメトリーのデータを実施例1と同様にして得た。上記の血清/ペプチドの混液に各種アミノ酸(グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンまたはシステイン；最終濃度は下記の表8に示す)を加えて得たアミノ酸添加サンプル(いずれも1.5 mL)についても同様の加熱処理を行い、各種アミノ酸添加サンプルについての蛍光イメージング像、銀染色像およびゲルデンシトメトリーのデータを実施例1と同様にして得た。得られたデータに基づいて、回収率および精製度を評価した。結果を下記の表8に示す。

【0049】

【表8】

10

アミノ酸および最終濃度		回収率	精製度	回収率 × 精製度
無添加 (水熱後)		1.00	1.00	1.00
グリシン	500 mM	5.55	2.27	12.61
アスパラギン	150 mM	5.68	2.12	12.04
アスパラギン酸	10 mM	3.39	0.73	2.48
	8 mM	14.01	2.27	31.78
	7 mM	14.05	2.47	34.73
	5 mM	5.78	1.98	11.44
グルタミン酸	10 mM	13.29	0.83	11.03
	8 mM	13.59	2.34	31.81
	7 mM	12.39	2.77	34.36
	5 mM	6.32	2.16	13.63
ロイシン	150 mM	5.13	1.33	6.85
	100 mM	4.49	1.27	5.68
システイン	500 mM	15.39	0.90	13.83
	100 mM	11.92	1.24	14.72
	50 mM	8.30	1.67	13.87
	20 mM	3.94	1.59	6.24

20

30

【0050】

その結果、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンおよびシステインのいずれを添加しても、アミノ酸を添加しない場合と比較して、回収率×精製度の数値が増大した。

40

この結果から、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンおよびシステインのいずれを添加しても、アミノ酸を添加しない場合と比較して、良好な回収率および精製度をもってペプチドを回収できることが示された。

40

【0051】

実施例5

アミノ酸としてアスパラギンを最終濃度150 mMで用いたこと、および、加熱処理温度を130 °C、140 °C、150 °Cまたは160 °Cとしたこと以外は実施例4と同様にして蛍光イメージング像、銀染色像およびゲルデンシトメトリーのデータを得た。なお、130 °C、140 °Cおよび150 °Cへの昇温は、室温(25 °C)から100 °Cまで30秒間で昇温し、その後1 °C/秒で昇温することにより100 °Cから各温度まで昇温した後、それぞれ30秒、20秒および10秒間各温度に

50

保持することによって行った。結果を下記の表9に示す。

【0052】

【表9】

実験条件	回収率	精製度	回収率 × 精製度
アミノ酸添加なし、加熱処理温度 160°C	1.00	1.00	1.00
Asn 添加、加熱処理温度 160°C	6.84	2.46	16.83
Asn 添加、加熱処理温度 150°C	4.70	2.01	9.46
Asn 添加、加熱処理温度 140°C	3.89	2.12	8.22
Asn 添加、加熱処理温度 130°C	2.44	2.13	5.21

【0053】

その結果、アミノ酸を添加しなかった場合と比較して、Asn添加後加熱処理工程において130 ~ 160 の温度に昇温した場合には、回収率が約2倍~7倍に、および、精製度が約2倍~約2.5倍に増大し、ペプチドの回収率×精製度の値が約5倍~約17倍に増大した。

この結果から、本発明のペプチド回収方法によれば、広範な加熱処理温度で優れた回収率および精製度をもってペプチドを回収できることが示された。

【0054】

実施例6

回収対象となるペプチドとして、129残基の卵白由来塩酸リゾチーム(Wako 120-02674 Lot LAQ6504; 約15 kDa)を用いた。このリゾチームをPBSに溶解し、ここに2 M グリシン溶液を添加し、測定試料1を得た。測定試料1におけるリゾチームの濃度は10mg/mL、グリシンの濃度は1 Mであった。測定試料1とトリス-リン酸混合系緩衝液(Tris・HCl[pH=7.0](最終濃度100 mM)、リン酸ナトリウム(最終濃度0.4 mM)およびNaCl(最終濃度6 mM))とを等量ずつ混合した溶液(水熱なし)を用いて、SDS-PAGEを行った。ゲルのバンド強度のグラフを図1Aに示す。また、1.4 mLの測定試料1を10 mL容バイアルに入れ、実施例1と同様の水熱反応を行った。水熱反応後の測定試料1、上記トリス-リン酸混合系緩衝液、リン酸ナトリウムおよびNaClを等量混合した溶液を用いてSDS-PAGEを行った。ゲルのバンド強度のグラフ化を図1Bに示す。

【0055】

図1Aにおいては、15 kDaの位置に大きなピークが見られた。これは、サンプル中に溶解しているリゾチームのサイズと一致する。図1Bにおいては、15 kDaの位置にピークを確認することができるが、リゾチームのPBS溶液のピーク(図1A)と比較してその大きさは大幅に低減している。その代わりに、3.5~10 kDaおよび3.5 kDa未満の位置にピークが検出された。これは、リゾチームが断片化されたものと考えられる。したがって、図1Bの結果から、本発明のペプチド回収方法を用いれば、リゾチームそのものを回収することもできるし、また、リゾチームの断片を回収することもできることが示された。

【0056】

比較例1

アミノ酸として塩基性アミノ酸であるアルギニン(5 mM、2 mM、または0.5 mM)またはリジン(5 mM、2 mM、または0.5 mM)を用いたこと以外は実施例4と同様にして、ペプチドの回収を試みた。

しかしながら、これらのアミノ酸では血中タンパク質が凝集せず、ペプチドの回収ができなかった。

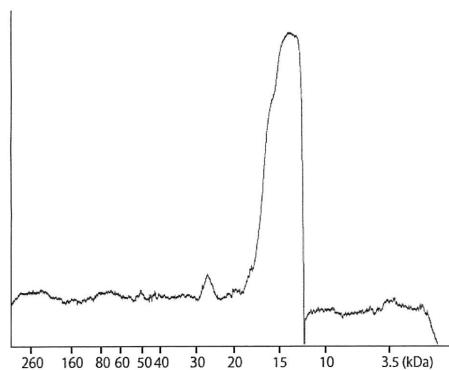
10

20

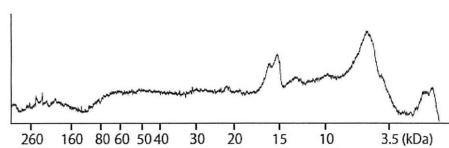
30

40

【図 1 A】



【図 1 B】



---

フロントページの続き

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開2012-233753(JP, A)

特開平04-309361(JP, A)

特開昭62-266071(JP, A)

国際公開第2011/062270(WO, A1)

国際公開第2009/025300(WO, A1)

米国特許出願公開第2005/0244904(US, A1)

特表2001-525172(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)