世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5		(11) 国際公開番号	WO 94/09148
C12P 21/02, C12N 15/12 G01N 33/566	A1	(43) 国際公開日	1994年4月28日 (28.04.1994)

(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01480
(22) 国際出願日 1993年10月15日(15. 10. 93)

(30) 優先権データ

特願平4/277430	1992年10月15日(15. 10. 92)	JP
特願平4/345915	1992年12月25日(25. 12. 92)	JP
特願平4/345916	1992年12月25日(25. 12. 92)	JP
特願平4/345917	1992年12月25日(25. 12. 92)	JP
特願平4/345918	1992年12月25日(25. 12. 92)	JP

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)〔JP/JP〕
〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
三和敬史(MIWA, Keishi)〔JP/JP〕
〒569 大阪府高槻市古曽辺町1丁目9－1 東レ高槻寮 Osaka, (JP)
福山真弓(FUKUYAMA, Mayumi)〔JP/JP〕
〒525 滋賀県草津市野村1丁目24－7 Shiga, (JP)
内山竹彦(UCHIYAMA, Takehiko)〔JP/JP〕
〒189 東京都東村山市萩山4丁目10－48 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

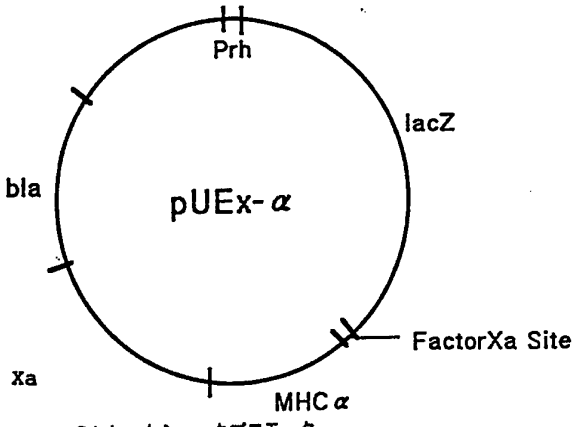
添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING MAJOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN CLASS II PROTEIN AND MATERIAL HAVING THE SAME IMMOBILIZED THEREON

(54) 発明の名称 主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の製造方法及びそれを固定化した材料

Prh : heat shock promoter
bla : β-lactamase gene
lacZ : β-galactosidase gene
MHCα : MHC class 2 subunit α gene
FactorXa site : recognition sequence of protease factor Xa

Vector for expressing MHC class 2 protein subunit α



Prh:ヒートショックプロモーター
bla:βラクタマーゼ遺伝子
lacZ:βガラクトシダーゼ遺伝子
MHCα:MHCクラス2αサブユニット遺伝子
FactorXa site:プロテアーゼFactorXaの認識配列

MHCクラス2蛋白αサブユニット発現用ベクター

(57) Abstract

A process for producing a major histocompatibility angiten class II protein (MHC class II) found, for example, on the surface of an antigen presenting cell; a material having the MHC class II immobilized thereon, prepared by linking the MHC class II, the subunits α and/or β of the MHC class II, or a part thereof to a material such as bead, fiber or hollow yarn through covalent linkage; and a superantigen-removing module prepared from the material. The invention also provides a method of detecting or assaying a superantigen by using the MHC class II or that part of the MHC class II which has an affinity for a superantigen, and an assay kit therefor.

(57) 要約

本発明は、抗原提示細胞表面などに見られる主要組織適合性抗原クラスII蛋白質（以下MHCクラスIIと略す）の製造方法およびMHCクラスIIあるいはMHCクラスIIのαおよび／またはβサブユニットあるいはその一部をビーズ、繊維、中空糸、などの材料に共有結合させることを特徴とするMHCクラスII固定化材料およびそれを用いるスーパー抗原除去モジュールを提供する。

本発明はまた、MHCクラスIIをあるいはスーパー抗原に親和性を有する該MHCクラスIIの一部分を用いたスーパー抗原を検出あるいは定量する方法およびそのための測定キットを提供する。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバードス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリー
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
TD チャード
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン共和国
VN ヴェトナム

明細書

主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の製造方法及びそれを固定化した材料

技術分野

本発明は、抗原提示細胞表面などに見られる主要組織適合性抗原クラスII蛋白質（以下MHCクラスIIと略す）の製造方法およびMHCクラスIIあるいはMHCクラスIIのαおよび／またはβサブユニットをビーズ、繊維、中空糸、などの材料に共有結合させることを特徴とするMHCクラスII固定化材料およびそれを用いるスーパー抗原除去モジュールに関する。

本発明はまた、MHCクラスIIをあるいはスーパー抗原に親和性を有する該MHCクラスIIの一部分を用いたスーパー抗原を検出あるいは定量する方法およびそのための測定キットに関する。

従来の技術

MHCクラスIIは、B細胞やマクロファージ、血管内皮細胞などの細胞表面に存在し、抗原提示の際に自己非自己を識別するために用いられる糖タンパク質である。近年になり、MHCクラスIIが細菌毒素等のスーパー抗原と称する一群の蛋白質に対する結合蛋白質であることが判明し、且つ自己免疫疾患においてMHCクラスIIのサブクラスに偏りがみられることなどから、医学・免疫学的に重要視され始めている。

スーパー抗原とは、従来の抗原と異なり抗原提示細胞内におけるプロセッシング過程を経ることなく、抗原提示細胞上のMHCクラスIIに結合し、さらにはこのMHCクラスIIとの複合体を形成することにより特定のV領域を有するT細胞を刺激し免疫系を異常に活性化させる一群の蛋白質である。

これまでに、黄色ブドウ球菌毒素や連鎖球菌毒素、エルシニア菌毒素、あるいはある種のウイルス蛋白質やヒートショック蛋白質が確認されているが、以後も特定化されていく可能性がある。

現在、MHCクラスIIを単離し入手するには、哺乳類細胞や昆虫細胞にMHCクラスIIの遺伝子を導入し発現させるか、あるいは天然に存在するMHCクラスIIをB細胞やマクロファージ、血管内皮細胞などの細胞膜中から精製してくる必要がある。

しかし、天然型ＭＨＣクラスⅡを細胞膜中より大量に得る場合、膜表面の発現量が少ないために、大量の細胞を必要とし、培養細胞を用いたとしても多くの時間と費用を要する。

また、哺乳類細胞や昆虫細胞に遺伝子技術を用いて組換え型ＭＨＣクラスⅡを産生させる場合にも、細胞の培養に費用と時間が多く必要である。

これまでに、主要組織適合性抗原クラスⅠに関しては大腸菌を用いた発現系による大量発系が報告されている（Ｋ．Ｃ．パーカーら、モレキュラー　イミュノロジー、２９巻、３７１頁（１９９２））が、ＭＨＣクラスⅡについては知られていなかった。

これまで、ＭＨＣクラスⅡ固定化材料としては、ＭＨＣクラスⅡを細胞表面上に発現させ、細胞ごとプレート上に吸着したものや、ＭＨＣクラスⅡのサブユニットの部分アミノ酸配列を合成し、材料上に吸着固定した材料は報告されている（Ｊ．Ｋ．ラッセルら、バイオケミカル　アンド　バイオフィジカル　リサーチコミュニケーションズ、１６８巻、６９６頁（１９９０）。

また、スーパー抗原を吸着する材料としては、スーパー抗原に対する抗体を固定化した材料が既に報告されており、スーパー抗原の免疫学的測定等に用いられている。

本発明は、細菌類を用いることにより生産性・操作性を容易にしたことを特徴とするＭＨＣクラスⅡの製造方法を提供するものである。

細菌類は昆虫や哺乳類由来の細胞と異なり、増殖速度も速く、かつ培地組成も牛胎児血清や増殖因子等の高価な組成を必要とせず、植え継ぎや培地交換などの操作を必要としない。

しかし、大腸菌などの細菌類中において哺乳類由来の蛋白質は細菌毒性等の問題により発現しない場合が多い。

本発明者らは、種々の発現ベクターを改良検討した結果、大腸菌や酵母菌、枯草菌等の細菌内においてＭＨＣクラスⅡを発現させることに成功し、効率よく大量に蛋白質を製造することを可能とした。

本発明はまた、医学的にはスーパー抗原を含むＭＨＣクラスⅡ親和性の、病因物質を対象とした血液浄化システムの開発を、また、免疫学的にはスーパー抗原

を含むＭＨＣクラスⅡ親和性の病因物質の単離精製や酵素免疫学的測定に用いる上記病因物質全般を結合できる材料を提供するものである。

ここで、上述したように、細胞ごと固定化した材料ではＭＨＣクラスⅡ以外の蛋白質等も固定されてしまい、未知の活性を持つ可能性があり、また、固定化密度も任意に変えることには限界がある。ＭＨＣクラスⅡのサブユニットの部分アミノ酸配列を合成し、材料上に吸着固定した材料は、緩衝液中から高濃度のスーパー抗原を検出する目的には使用できるが、血液中からのスーパー抗原の除去等の目的には吸着固定はリガンドの遊離が考えられ、使用できない。

また、部分配列のみではスーパー抗原に対する結合能が低く、スーパー抗原の検出および定量を行う場合に十分の性能が得られない。また、抗体固定化材料では、スーパー抗原１種類毎に異なった抗体を固定化した材料が各々必要になる。

発明の開示

本発明は、かかる従来技術の問題点を解消しようとするものであり、下記の構成を有する。すなわち、本発明は、

（１）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質をコードする遺伝子を用いて微生物を形質転換することを特徴とする主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質の製造方法、

（２）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質またはその一部分を共有結合により固定化した材料、

（３）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質のαサブユニットまたはその一部分を共有結合により固定化した材料、

（４）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質のβサブユニットまたはその一部分を共有結合により固定化した材料、

（５）上記（２）ないし（４）のいずれかに記載の材料を含むスーパー抗原除去モジュール、

（６）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質の４０アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を検出する方法、

（７）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質の４０アミノ酸残基以上の長さを有す

る部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を定量する方法、
に関する。

図面の簡単な説明

図１は、ＭＨＣクラスⅡαサブユニットを大腸菌内で発現させるための発現用ベクターの概略図を示す。

図２は、ＭＨＣクラスⅡβサブユニットを大腸菌内で発現させるための発現用ベクターの概略図を示す。

図３は、ＭＨＣクラスⅡ固定化ビーズによるＴＳＳＴ－１の緩衝溶液中からの除去量と、反応時間との関係を示す。

図４は、ＭＨＣクラスⅡを固定化した中空糸を用いた場合における、血清中からのＴＳＳＴ－１の除去量と、反応時間との関係を示す。

図５は、ＭＨＣクラスⅡ、ＭＨＣクラスⅡβサブユニットおよびβサブユニットの部分配列ペプチドを固定化したプレートを用いた酵素免疫測定（サンドイッチ法）におけるＳＥＡ濃度と４５０ｎｍの吸光度との関係を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明に用いたＭＨＣクラスⅡをコードする遺伝子は既に報告されているＤＮＡ配列（L. J. Stern et al., Cell, vol. 68, p465, (1992), D. A. Wettstein et al., J. Exp. Med., vol. 174, p219, (1991)）をもとにＰＣＲ用のＤＮＡプライマーを作成しＢ細胞等の人細胞中より常法、例えば「遺伝子増幅ＰＣＲ法（蛋白質・核酸・酵素臨時増刊）vol. 35 No. 17（１９９０）」に記載の方法、に従いＰＣＲ法により複製して得た。このＤＮＡのコードする蛋白質の調製法としては、遺伝子組換え技術を利用して大腸菌、酵母菌、昆虫細胞や哺乳類細胞内で発現させる方法が挙げられる。

このうち、増殖速度の速さなどの生産効率の高さ・培養条件等の操作性の良さから考えると大腸菌や酵母菌あるいは枯草菌を用いることがより好ましい。発現方法としては、本蛋白質をコードするＤＮＡあるいはその一部に蛋白質合成開始信号と終結信号、また、菌体外へ分泌させるときは分泌信号を付加した後、種々の公知の発現ベクターに結合させ、直接本発明の蛋白質あるいはその一部を発現させる方法、また、他のペプチド、例えば、インターロイキン２、マルトース結

合蛋白質、βガラクトシダーゼ、ｔｒｐＥ蛋白質等）との融合蛋白質として発現させる方法がある。また、発現後の蛋白質の精製のしやすさを考慮して、ＭＨＣクラスＩＩの活性が保たれるならば、ヒスチジンの６量体等を付加しても良い。

ＭＨＣクラスＩＩの細菌に対する毒性を考慮すると、発現の際に融合蛋白質などの形で不溶性の顆粒体を形成させるか、Ｔ７リボヌクレアーゼ・プロモーターやヒートショックプロモーター等の転写開始制御能の高いプロモーターを用いることが好ましい。ここで、融合蛋白質とＭＨＣクラスＩＩの間にプロテアーゼ（例えば活性化血液凝固第十因子（FactorXa）、ＩｇＡプロテアーゼ）の認識サイトや化学試薬（例えばシアノゲンブロマイド）による切断部位を導入することにより、発現後にプロテアーゼや化学試薬を用いて消化・分離することも可能である。発現後のＭＨＣクラスＩＩあるいはその一部の精製には公知の手法が用いられ、例えば、硫安沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水クロマトグラフィー等が挙げられ、また、メソッド　イン　エンザイモロジー（アカデミックプレス社　１９８０）に記載の方法が適応できる。また、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、チオレドキシン、プロチオニン、グルタチオンやβメルカプトエタノールなどを添加しサブユニットのジスルフィド結合を矯正してもよい。

また、αサブユニットおよびβサブユニットを別々に発現させた後に再構成するには、両サブユニットを等モル量ずつを混合し４℃～６０℃より好ましくは２０℃～４０℃の温度で５分以上より好ましくは６０分以上放置する。

また、混合するときに若干の変性剤（例えば１Ｍ尿素，１０％アセトニトリル等）を添加し、前述の温度範囲内で透析しつつ再構成することも可能である。

本発明におけるＭＨＣクラスＩＩを固定化した材料は、生体膜中より得られる天然型ＭＨＣクラスＩＩあるいはそのαおよび／またはβサブユニットあるいはそれらの一部分、あるいは細胞や細菌を形質転換し得られる組換え型ＭＨＣクラスＩＩあるいはそのαおよび／またはβサブユニットあるいはそれらの一部分をビーズ、繊維、中空糸、織物、プレート、チューブなどの材料上に共有結合を用いて結合することにより得られる。

この中で、ＭＨＣクラスＩＩは、大量に効率よく入手できることから、組換え型、

特に大腸菌あるいは酵母菌により産生されたものがより好ましい。

このように、ＭＨＣクラスⅡの発現、固定化法、担体の検討を進めることによりＭＨＣクラスⅡの活性を損なわない固定化材の開発に成功し本発明に至った。以下に詳細を説明する。

（１）ＭＨＣクラスⅡ

ＭＨＣクラスⅡは、Ｂ細胞・単核球などの抗原提示細胞をそのままあるいはガンマーインターフェロン等により刺激したものの細胞膜上から直接単離精製した天然型ＭＨＣクラスⅡあるいはＣＨＯ細胞、Ｌ細胞等の哺乳類由来の細胞や昆虫細胞を形質転換して得られるＭＨＣクラスⅡ産生細胞より精製する組換え型ＭＨＣクラスⅡを用いることができる。この中で、大量に効率よく入手できることから、組換え型、特に大腸菌や酵母菌あるいは枯草菌により産生されたものがより好ましい。また、ＭＨＣクラスⅡのサブユニットのみ、あるいはその部分配列の固定でも結合能はあるが、結合の強さから考えると、アミノ酸４０残基以上の分子量を有することが好ましく、より好ましくはαβ複合体を用いる。

（２）固定化法

固定化方法としては、共有結合、イオン結合、配位結合、疎水結合あるいは包括法を用いて結合あるいは吸着することにより得られるが、固定した蛋白質の遊離を防ぐためには共有結合がより好ましい。

また、蛋白質の固定にはタンパク質のアミノ基、カルボキシル基、スルフィド基を用いる方法が一般的であるが、ＭＨＣクラスⅡのＮ末端側にスーパー抗原の結合部位があることを考慮すると、カルボキシル基を用いた固定化方法がより好ましい。

（４）固定化担体

ＭＨＣクラスⅡを固定化する担体はポリメチルメタアクリレート、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリアリルアミン、ポリビニルアルコールあるいはそれらの誘導体等の合成高分子やセルロース、キトサンあるいはそれら誘導体等のような天然高分子、セラミックスや金属などの無機材料、で構成されるビーズ、繊維、中空糸、プレート、チューブなどを用いることができる。このうち、固定化材料としては官能基の挿入が容易な高分子化合物を用いることがより好ましく、形態とし

ては操作性や表面積の大きさから中空糸、ビーズ、繊維、織物等がより好ましい。

このようにしてにして得られるＭＨＣクラスⅡ固定化材料において、ＭＨＣクラスⅡの活性を最大に用いることの出来得る結合法を検討した結果、血液中に置いてもスーパー抗原を特異的に捕捉結合し得る血液浄化モジュールを確立し、本発明の成功に至った。

また、スーパー抗原を検出定量する方法としてＭＨＣクラスⅡあるいはＭＨＣクラスⅡαサブユニットあるいはβサブユニットあるいはそれらの部分配列ペプチドを用いることにより１種類の固定化材料で、スーパー抗原全てを捕捉できることが可能となった。

スーパー抗原に対する結合性は蛋白質の３次構造に影響されるため、スーパー抗原をより強く結合させるためにはアミノ酸残基数３０ｍｅｒ以上より好ましくは４０ｍｅｒ以上より好ましくはサブユニット全配列さらに好ましくはαおよびβサブユニットより構成されたＭＨＣクラスⅡが良い。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。但し、本発明が実施例に限定されるものではない。

実施例

実施例１

ＭＨＣクラスⅡαサブユニットの大腸菌内での発現

ＭＨＣクラスⅡのαサブユニットは以下のように作製した。

ヒートショックプロモーターを有し、βガラクトシダーゼおよび血液凝固因子のFactorXaの認識部位をコードする配列を持つpUEFのEcoRI サイトとXbaIサイトの間にＭＨＣクラスⅡαサブユニット遺伝子を挿入した。（図１）このベクターを用いて大腸菌を形質転換し、Ｌ培地中で３０℃、８時間培養後培地温度を４２℃に上昇させ１５分間誘導をかける。誘導後培地温度を３７℃にしさらに２時間培養した後培養液より大腸菌を回収した。

また、βガラクトシダーゼとの融合蛋白質にすることでパラアミノフェニル１－チオβ－Ｄ－ガラクトピラノシド固定化カラムを用いて精製可能であり、βガラクトシダーゼとＭＨＣクラスⅡの間にFactorXaの認識部位が存在するので、蛋白質発現後にFactorXaにより消化することで保護蛋白質であるβガラクトシダー

ゼを含まないＭＨＣクラスⅡαサブユニットを得ることができる。

実施例２

ＭＨＣクラスⅡのβサブユニットの不溶性蛋白質としての発現

ＭＨＣクラスⅡのβサブユニットは以下のように作製した。

トリプトファンプロモーターを有し、ｔｒｐＥ蛋白質およびＩｇＡプロテアーゼの認識部位をコードする配列を持つｐＴＩベクターのEcoRI サイトとHindIII サイトの間にＭＨＣクラスⅡβサブユニット遺伝子を挿入した（図２）。このベクターを用いて大腸菌を形質転換し、Ｍ９培地中で３７℃、８時間培養後インドールアクリル酸を用いて誘導をかける。誘導後、２時間培養した後培養液より大腸菌を回収した。

また、ｔｒｐＥ蛋白質と融合蛋白質にすることで目的の蛋白質は不溶性画分に沈澱してくる。不溶性画分を２Ｍ尿素を含むトリス緩衝液で洗浄後、８Ｍ尿素を含むトリス緩衝液を用いて目的の融合蛋白質を可溶化する。可溶化の際に、還元剤として１ｍＭジチオスレイトールや２％βメルカプトエタノールを添加すると回収率が向上しより好ましい。可溶化後直ちに、ゲルろ過法により分子量分画を行い、混入している脂質や他の不溶性の強い蛋白質と分離した後に、２０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）、５０ｍＭ塩化ナトリウム緩衝液中で透析する。透析後も沈澱物は得られず、融合蛋白質は１００％回収可能である。ここで、分子量分画を行わずに透析しても可溶化成分に目的蛋白質は得られるが、その大半は透析後に不溶性画分に沈澱してくる。

得られた可溶性画分をIgA プロテアーゼ消化後、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、等の方法により、保護蛋白質であるｔｒｐＥ蛋白質を含まないＭＨＣクラスⅡβサブユニットを得ることができる。疎水クロマトグラフやイオン交換クロマトグラフによる目的蛋白質を精製のプロテアーゼ消化前に行うことも可能である。

実施例３

ＭＨＣクラスⅡのα及びβサブユニットからの再構成

実施例１及び２で作成したＭＨＣクラスⅡのα及びβサブユニットをそれぞれの濃度が５ｍｇ／ｍｌになるように、８Ｍ尿素、１０ｍＭ塩化マグネシウム、１

００ｍＭ塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に溶解する。溶解後、蛋白質溶液を４℃で１Ｍ尿素を含む１０ｍＭ塩化マグネシウム、１００ｍＭ塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）中で透析する。透析後さらに３０℃で尿素を含まない１０ｍＭ塩化マグネシウム、１００ｍＭ塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）中で透析することによりＭＨＣクラスⅡ複合体を得ることが出来る。

実施例４

大腸菌を用いて産生したＭＨＣクラスⅡをビーズ上に固定化した。固定化はＭＨＣクラスⅡを１㎎/ml の濃度になるように５０ｍＭほう酸緩衝液（ｐＨ８．０）５mlで溶解した水溶液中にスクシンイミド基を有するキトサンビーズを１ml加え、４℃で８時間反応させた。反応後、０．５Ｍトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）５０mlにより、未反応の官能基の不活化と未反応蛋白質の洗浄を行った。固定化ビーズのアミノ酸分析の結果より固定化量はビーズ１ml当り２．３㎎蛋白であった。このようにして作成したＭＨＣクラスⅡ固定化ビーズおよびトリス塩酸緩衝液とのみ反応させたスクシンイミド基を有するキトサンビーズを各々０．５mlずつを１ng/ml の濃度で黄色ブドウ球菌外毒素（ＴＳＳＴ－１）を含む水溶液中に添加したところ図３に示すように、ＭＨＣクラスⅡ固定化ビーズにおいてのみ毒素の吸着が観察され、ＭＨＣクラスⅡが毒素との結合活性を有したまま材料上に共有結合により固定化されたことが示された。図３中、○はＭＨＣクラスⅡ固定化ビーズ、●は未反応ビーズを示す。ＭＨＣクラスⅡ固定化ビーズにおいてのみＴＳＳＴ－１濃度の低下が観察された。

実施例５

大腸菌を用いて産生したＭＨＣクラスⅡを中空糸膜上に固定化した。固定化はＭＨＣクラスⅡを１㎎/ml の濃度になるように５０ｍＭほう酸緩衝液（ｐＨ８．０）５mlで溶解した水溶液中にアミノ基を有するポリスルホン中空糸を１ｇを加え、４℃で８時間反応させた。

反応には触媒としてカルボジイミドを添加した。固定化中空糸のアミノ酸分析の結果より固定化量は中空糸１ｇ当り２．０㎎蛋白であった。このようにして作成したＭＨＣクラスⅡ固定化中空糸および未反応中空糸各々０．５ｇずつを用い

てモジュールを作製し1ng/ml の濃度で黄色ブドウ球菌外毒素（ＴＳＳＴ－１）を含む血清を循環させたところ図４に示すように、ＭＨＣクラスⅡ固定化中空糸においてのみ毒素の吸着が観察され、ＭＨＣクラスⅡ固定化中空糸により毒素の血液中からの除去が可能なことが示された。図４中、○：ＭＨＣクラスⅡ固定化中空糸、●は未反応中空糸を示す。ＭＨＣクラスⅡ固定化中空糸においてのみＴＳＳＴ－１の濃度低下が観察された。実施例６

Ｂ細胞より抽出したＭＨＣクラスⅡ及び大腸菌により発現したＭＨＣクラスⅡβサブユニット及びペプチド合成機により合成したＭＨＣクラスⅡのβサブユニットの部分アミノ酸配列（スーパー抗原との結合性があるとされる３０アミノ酸残基部分）を１０μｇ／ｍｌの濃度でＰＢＳ中に溶解した後、アミノ基を有する９６穴のマイクロプレートの各ウェルに０．１ｍｌずつ入れ、触媒としてカルボジイミドを添加し、４℃で１晩放置し蛋白質の固定化を行った。０．５％牛血清アルブミン（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ溶液でブロッキングを行い、その後各ウェルを洗浄液（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ）で洗浄した。

このＭＨＣクラスⅡ固定化プレートに黄色ブドウ球菌外毒素であり、スーパー抗原であるＳＥＡを反応させた。対照として、ＢＳＡのみを固定化したプレートを用いて同様にＳＥＡを反応させた。その後、抗ＳＥＡモノクローナル抗体（ビオチン標識）、アビジン化ペルオキシダーゼ、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジンを順次反応させ、その発色を測定した結果を図５に示した。ＢＳＡを固定化したプレートでは発色がほとんど認められなかったが、ＭＨＣクラスⅡ（約４００アミノ酸残基長）、βサブユニット（約２００アミノ酸残基長）、βサブユニットの部分配列ペプチド（５０アミノ酸残基と３０アミノ酸残基長）において発色が認められ、ＳＥＡの結合が確認された。○はＭＨＣクラスⅡ固定化プレート、△はβサブユニット固定化プレート、●はβサブユニット部分配列（５０アミノ酸残基）、▲はβサブユニット部分配列（３０アミノ酸残基）、■はコントロール（ＢＳＡプレート）を示す。

また、アミノ酸残基数の増加に従って検出感度も向上し、５０ｍｅｒ以上では１μｇ／ｍｌのＳＥＡが検出可能になる。ＭＨＣクラスⅡを固定化したプレートにおいてはＳＥＡ濃度が０～１μｇ／ｍｌの範囲において、また、ＭＨＣクラス

IIβサブユニットを固定化したプレートではＳＥＡ濃度が10^3～10^6 ng/mlの範囲において、発色とＳＥＡ濃度の間に良好な直線性を示し、ＳＥＡの定量も可能であることが示された。

産業上の利用可能性

本発明により、これまでは哺乳類細胞や昆虫細胞を利用して製造していた主要組織適合性抗原クラスII蛋白質を細菌を用いることで効率よく且つ安価に大量調整できるようになった。

本発明はまた、ＭＨＣクラスIIに親和性のある物質、例えば黄色ブドウ球菌外毒素などのスーパー抗原などを水溶液や血液、尿などの体液、食料品、飲料物中などから吸着、分離、検出、定量する際に、有効な材料を提供するものであり、医学・免疫学・生化学の研究や臨床、例えば、敗血症や自己免疫疾患等における治療システムを構築するうえで有効に活用され得る。

請求の範囲

（1）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質をコードする遺伝子を用いて微生物を形質転換することを特徴とする主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の製造方法。

（2）微生物が大腸菌、酵母菌および枯草菌から選ばれることを特徴とする請求項1記載の主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の製造方法。

（3）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質をコードする遺伝子を宿主細胞内で発現させる際に不溶性蛋白質として発現させた後、可溶性蛋白質に改質することを特徴とする請求項1記載の主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の製造方法。

（4）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質のαおよびβサブユニットを個別に作製した後に再構成することを特徴とする請求項1記載の主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の製造方法。

（5）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質またはその一部分を共有結合により固定化した材料。

（6）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質のαサブユニットまたはその一部分を共有結合により固定化した材料。

（7）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質のβサブユニットまたはその一部分を共有結合により固定化した材料。

（8）固定化用の担体として中空糸膜あるいは繊維あるいはビーズあるいは織物を用いることを特徴とする請求項5～7に記載の材料。

（9）請求項5～7のいずれかに記載の材料を内蔵したスーパー抗原除去モジュール。

（10）血液浄化用モジュールである請求項9記載のモジュール

（11）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスII蛋白質の40アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を検出する方法。

（12）主要組織適合性抗原クラスII蛋白質αサブユニット、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスII蛋白質αサブユニットの40アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を検出する方法。

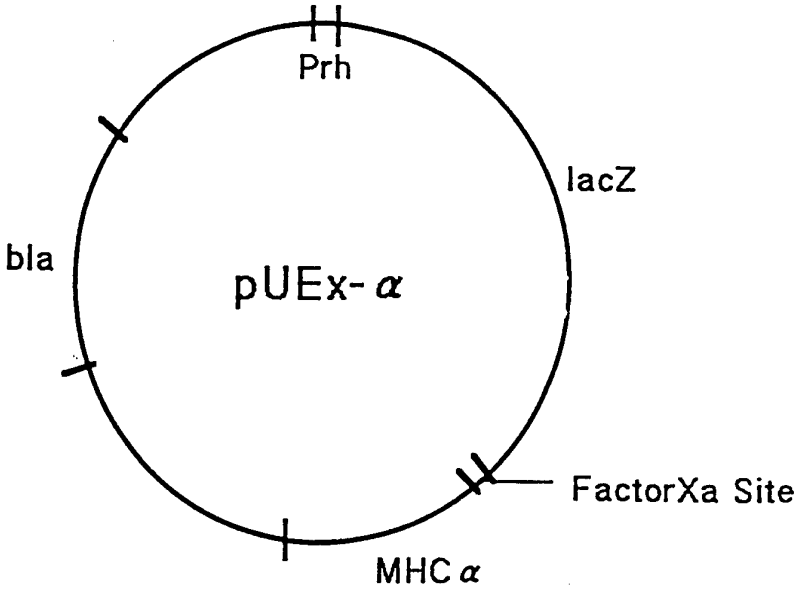
（１３）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質βサブユニット、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質βサブユニットの４０アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を検出する方法。

（１４）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質の４０アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を定量する方法。

（１５）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質αサブユニット、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質αサブユニットの４０アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を定量する方法。

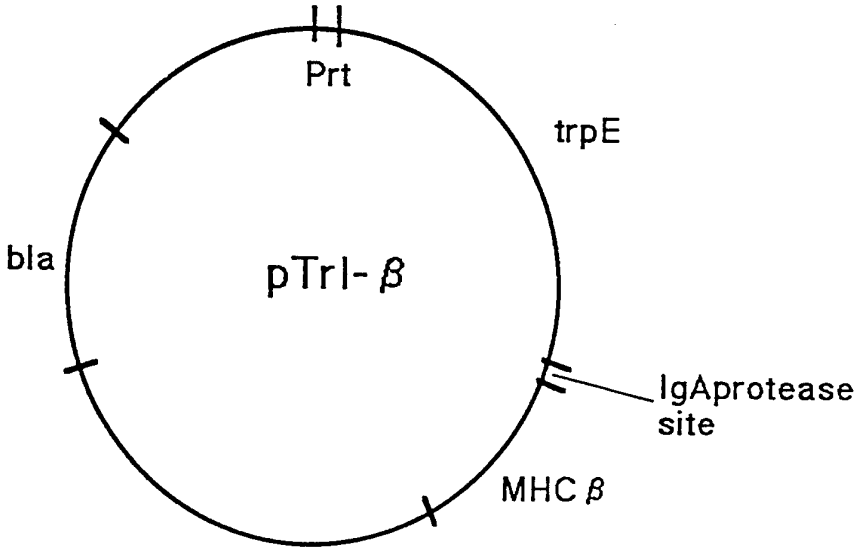
（１６）主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質βサブユニット、またはスーパー抗原との親和性を有する該主要組織適合性抗原クラスⅡ蛋白質βサブユニットの４０アミノ酸残基以上の長さを有する部分を用いることを特徴とする、スーパー抗原を定量する方法。

（１７）請求項１１～１６の方法を用いるスーパー抗原の検出および／または定量するキット。



Prh:ヒートショックプロモーター
bla:βラクタマーゼ遺伝子
lacZ:βガラクトシダーゼ遺伝子
MHCα：MHCクラス2αサブユニット遺伝子
FactorXa site：プロテアーゼFactorXaの認識配列

図1.ＭＨＣクラス２蛋白αサブユニット発現用ベクター



Prt:トリプトファンプロモーター
bla:βラクタマーゼ遺伝子
trpE:TrpE蛋白遺伝子
MHCβ：MHCクラス2βサブユニット遺伝子
IgAprotease site：IgAプロテアーゼの認識配列

図2.ＭＨＣクラス2蛋白βサブユニット発現用ベクター

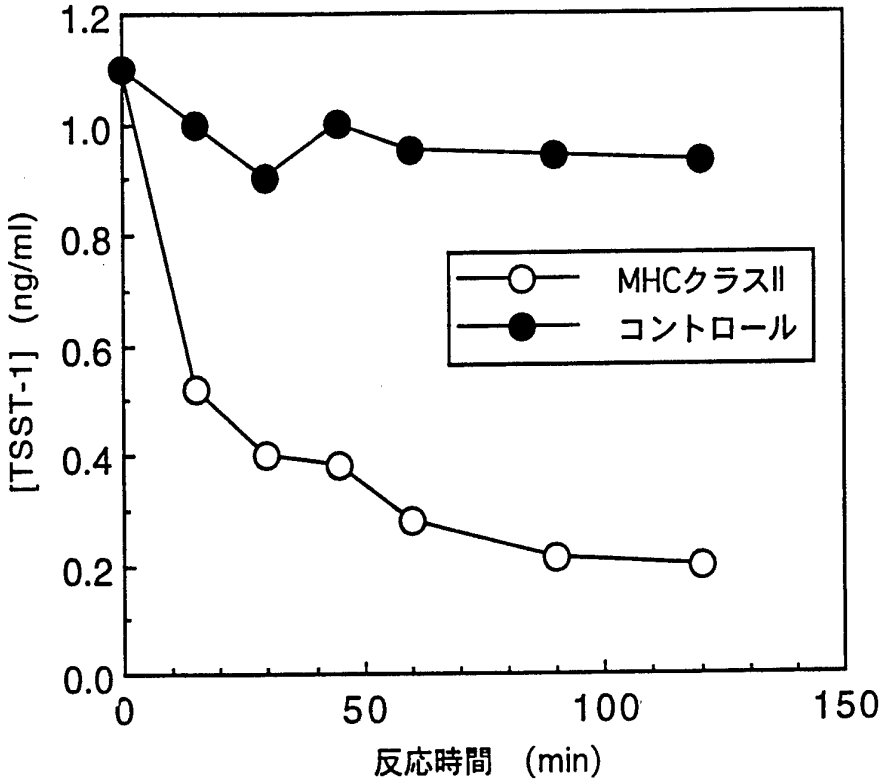

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
[TSST-1] (ng/ml)
0
50
100
150
反応時間 (min)
MHCクラスII
コントロール

図3

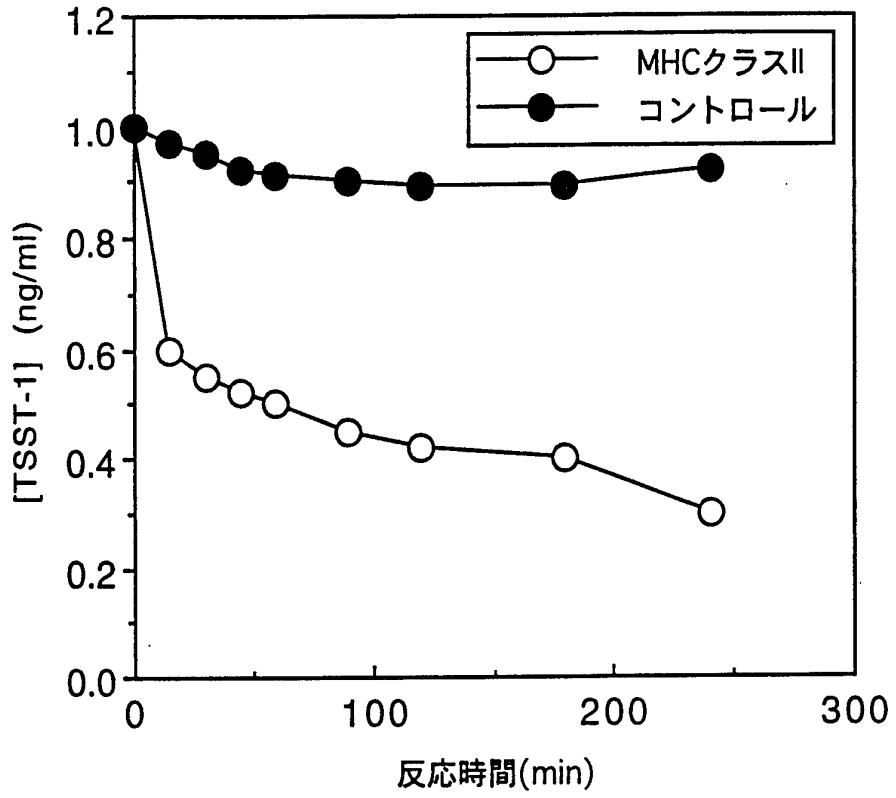

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
[TSST-1] (ng/ml)
0
100
200
300
反応時間(min)
MHCクラスII
コントロール

図4

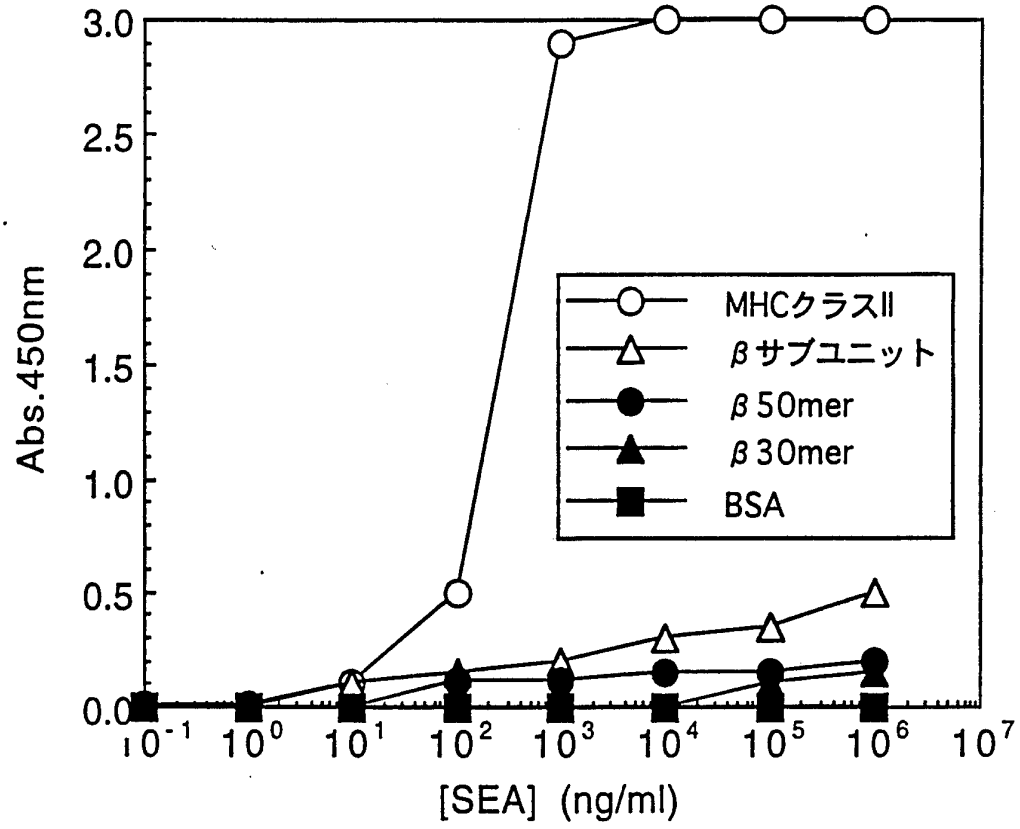

3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Abs.450nm
MHCクラスII
βサブユニット
β50mer
β30mer
BSA
10-1 10⁰ 10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷
[SEA] (ng/ml)

図5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP93/01480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^5 C12P21/02, C12N15/12, G01N33/566

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)

Int. Cl^5 C12P21/02, C12N15/12, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

BIOSIS, WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84 (1987), A. J. Korman, et. al. "Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors", p. 2150-2154	1-4
Y	Gene, Vol. 118, No. 1 (1992) W. Ito, et. al. "Development of a prokaryotic expression vector that exploits dicistronic gene organization", p. 87-91	1-4
Y	Mol. Immunol., Vol. 29, No. 3 (1992), K. C. Parker, et. al. "An HLA-A2/.beta. 2-microglobulin/peptide complex assembled from subunits expressed separately in Escherichia coli", p. 371-378	1-4
Y	Biochem. Biophys Res Commun., Vol. 168, No. 2 (1990) J. K. Russell, et. al. "The I-A-Beta-B region 65-85 is a binding site for the	

[X] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
January 6, 1994 (06. 01. 94)	January 25, 1994 (25. 01. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP93/01480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	superantigen staphylococcal enterotoxin A", p. 696-701	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 93/01480

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ C12P21/02, C12N15/12, G01N33/566

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. Cl⁵ C12P21/02, C12N15/12, G01N33/566

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

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）

BIOSIS, WPI, WPI/L

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	関連する請求の範囲の番号
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第84巻(1987), A. J. Korman, et al. 「Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors」 p. 2150-2154	1-4
Y	Gene, 第118巻, 第1号(1992) W. Ito, et al. 「Development of a prokaryotic expression vector that exploits dicistronic gene	1-4

☑ 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」先行文献ではあるが、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. 94

国際調査報告の発送日
25. 01. 94

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
郵便番号100
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）
佐伯裕子 印
4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）

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	関連する請求の範囲の番号
	organization」 p. 87－91	
Y	Mol. Immunol.，第29巻，第3号（1992），K. C. Parker，et al.「An HLA－A2/. beta. 2－microglobulin／peptide complex assembled from subunits expressed separately in Escherichia coli」 p. 371－378	1－4
Y	Biochem. Biophys Res Commun.，第168巻，第2号（1990）J. K. Russell，et al.「The I－A－Beta－B region 65－85 is a binding site for the superantigen staphylococcal enterotoxin A」 p. 696－701	5－17