

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-2009

(P2016-2009A)

(43) 公開日 平成28年1月12日(2016.1.12)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 B O 2 4	
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K	16/46	4 B O 6 4	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2014-122773 (P2014-122773)	(71) 出願人	504139662
(22) 出願日	平成26年6月13日 (2014. 6. 13)		国立大学法人名古屋大学
			愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
		(71) 出願人	500254354
			公益財団法人科学技術交流財団
			愛知県豊田市八草町秋合 1 2 6 7 番 1
		(74) 代理人	100114362
			弁理士 萩野 幹治
		(72) 発明者	中野 秀雄
			愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大
			学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	兒島 孝明
			愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大
			学法人名古屋大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タグ付抗体

(57) 【要約】

【課題】 Fab抗体の形成効率を高める技術及びその用途を提供することを課題とする。

【解決手段】

VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を共発現させ、Fab抗体を得る。あるいは、VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を各々発現させた後、発現産物を混合し、Fab抗体を得る。ロイシンジッパーを構成する一対のペプチドの内、片方をコードする第1タグ配列を抗体H鎖遺伝子に付加しておき、他方をコードする第2タグ配列を抗体L鎖遺伝子に付加しておく。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップ、即ち、

(A) VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を共発現させるステップ、又は

(B) VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を各々発現させた後、発現産物を混合するステップ、

を含み、

ロイシンジッパーを構成する一对のペプチドの内、片方をコードする第1タグ配列が前記抗体H鎖遺伝子に付加されており、他方をコードする第2タグ配列が前記抗体L鎖遺伝子に付加されている、Fab抗体の調製法。

10

【請求項 2】

前記第1タグ配列の付加位置が前記抗体H鎖遺伝子の3'末端であり、前記第2タグ配列の付加位置が前記抗体L鎖遺伝子の3'末端である、請求項1に記載の調製法。

【請求項 3】

前記ロイシンジッパーが、ロイシン-ロイシン間の疎水結合に加え、正電荷アミノ酸-負電荷アミノ酸間の静電的相互作用により結合力を発揮する、請求項1又は2に記載の調製法。

【請求項 4】

前記第1タグ配列がリンカー配列を介して前記抗体H鎖遺伝子に付加されており、前記第2タグ配列がリンカー配列を介して前記抗体L鎖遺伝子に付加されている、請求項1～3のいずれか一項に記載の調製法。

20

【請求項 5】

宿主細胞を用いた発現系又は無細胞タンパク質合成系を用いて前記ステップを行う、請求項1～4のいずれか一項に記載の調製法。

【請求項 6】

前記抗体H鎖遺伝子と前記抗体L鎖遺伝子が、以下のステップ(i)～(viii)によって調製される、請求項1～5のいずれか一項に記載の調製法：

(i)単一のB細胞に由来するmRNAを用意するステップ；

(ii)前記mRNAを鋳型とした逆転写PCR法によりcDNAを調製するステップ；

30

(iii)5'末端に同一の第3タグ配列を含む複数のプライマーからなり、VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子を増幅可能なプライマーセットを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ；

(iv)5'末端に同一の第4タグ配列を含む複数のプライマーからなり、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を増幅可能なプライマーセットを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ；

(v)前記第3タグ配列を含む単一のプライマーを用い、ステップ(iii)の増幅産物を鋳型としてPCRを実施するステップ；

(vi)前記第4タグ配列を含む単一のプライマーを用い、ステップ(iv)の増幅産物を鋳型としてPCRを実施するステップ；

40

(vii)ステップ(v)の増幅産物である抗体H鎖遺伝子に前記第1タグ配列を付加するステップ；

(viii)ステップ(vi)の増幅産物である抗体L鎖遺伝子に前記第2タグ配列を付加するステップ。

【請求項 7】

前記抗体H鎖遺伝子と前記抗体L鎖遺伝子が、以下のステップ(I)～(IV)によって調製される、請求項1～5のいずれか一項に記載の調製法：

(I)単一のB細胞に由来するmRNAを用意するステップ；

(II)前記mRNAを鋳型とした逆転写PCR法によりcDNAを調製するステップ；

(III)前記cDNAを鋳型としたnested PCR法により前記抗体H鎖遺伝子を増幅させるステッ

50

ブ、

(IV)前記cDNAを鋳型としたnested PCR法により前記抗体L鎖遺伝子を増幅させるステップ。

【請求項 8】

ロイシンジッパーを構成する一対のペプチドの片方がH鎖に付加されており、他方がL鎖に付加されている、タグ付Fab抗体。

【請求項 9】

前記片方のペプチドの付加位置が前記H鎖のC末端であり、前記他方のペプチドの付加位置が前記L鎖のC末端である、請求項 8 に記載のタグ付Fab抗体。

【請求項 10】

前記ロイシンジッパーが、ロイシンーロイシン間の疎水結合に加え、正電荷アミノ酸ー負電荷アミノ酸間の静電的相互作用により結合力を発揮する、請求項 8 又は 9 に記載のタグ付Fab抗体。

【請求項 11】

前記片方のペプチドがリンカーを介して前記H鎖に付加されており、前記他方のペプチドがリンカーを介して前記L鎖に付加されている、請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載のタグ付Fab抗体。

【請求項 12】

前記リンカーがプロテアーゼ切断部位を含む、請求項 11 に記載のタグ付Fab抗体。

【請求項 13】

請求項 8 ～ 12 のいずれか一項に記載のタグ付Fab抗体からタグを除去して得られたFab抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗体の調製法に関する。詳細には、タグが付加されたFab抗体の調製法及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体は、単一のB細胞に由来するクローンから得られた抗体であり、高い特異性を示す。この特徴を活かし、臨床診断薬や治療薬としてモノクローナル抗体が利用されている。また、研究用ツール（分析、定量、分離、精製等）としてもモノクローナル抗体の利用価値は高い。近年、モノクローナル抗体をマウスーヒトキメラ抗体やヒト化抗体に変換することによって、ヒトに対する抗原性を低減させる技術が開発された。これに伴い、モノクローナル抗体の医薬としての開発が展開されている。実際、抗体医薬の拡大進歩はめざましく、抜本的治療薬や予防薬の存在しない医療分野にも光明を与え始めている。

【0003】

モノクローナル抗体分子及びその派生物であるFab抗体やscFv抗体（一本鎖抗体）の製造方法として、遺伝子工学的手法を利用した各種方法、例えば、ファージディスプレイ法、酵母表面ディスプレイ法、リボソームディスプレイ法、mRNAディスプレイ法等が開発されている。遺伝子工学的手法を利用して抗体分子を生産させる場合、動物細胞、酵母、大腸菌などが用いられる。

【0004】

動物細胞を用いる方法は、効率的な合成条件を見出すために多くの時間と多大な費用が必要となる。また、大腸菌や酵母による方法はタンパク質のフォールディングの効率が悪く、活性を有する分子の形成効率が低いという問題を抱える。一方、細胞を用いない合成系（無細胞タンパク質合成系）が開発され、抗体の生産にも利用されている。実際、本発明者らの研究グループは、無細胞タンパク質合成系を利用することにより、Fab抗体を効率的且つ迅速に調製可能な方法であるSICREX法（Single Cell RT-PCR Linked in Vitro E

10

20

30

40

50

xpression)の開発に成功している(特許文献1、非特許文献1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第4686682号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Biotechnol Prog. 2006 Jul-Aug;22(4):979-88.

【非特許文献2】J. Pestic. Sci. 28, 301-309, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

scFv抗体は、H鎖とL鎖の可変領域のみを短いリンカーで連結させたものであり、その分子量は約30kDaである。低分子量であるため、血管から組織への移行がスムーズに起こることや、低コスト且つ大量の生産が望めるなど、多くの利点を有する。しかしながら、scFv抗体には、H鎖とL鎖を繋ぐ順番やリンカー配列の影響を受けやすく、アフィニティーの低下がみられる等の問題がある(非特許文献2)。また、大腸菌で発現させた場合にはリフォールディングが必要であり、十分な活性を示さない場合もある。対照的にFab抗体は、その構造が故に安定性に優れ、また、新たにB細胞から調製する場合に短時間で調製可能である(非特許文献1)。その一方で、抗体の種類によってFab形成効率が異なり、所望の活性が得られない場合もある。大腸菌でFab抗体を調製する場合においては、分子間の会合がうまくいかず、活性を示す抗体が得られないことがある。

本発明の課題は、Fab抗体の有用性に注目し、Fab抗体の形成(H鎖とL鎖の会合)効率を高める技術及びその用途等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題に鑑みて検討を重ねる中で本発明者らは、Fab抗体の形成、即ちH鎖とL鎖のFd部分のフォールディングを補助するために、ロイシンジッパーを利用することを着想した。即ち、ロイシンジッパーを形成する一対のタグペプチドをH鎖(Hc)とL鎖(Lc)に付加し、HcとLc間のヘテロダイマー形成効率を高めるという戦略を考え、その有効性を、無細胞タンパク質合成系及び大腸菌を用いた発現系で調べることにした。検討の結果、いずれの発現系においても、活性型のFab形成効率が飛躍的に増大し、予想を上回る効果が得られることが明らかとなった。以下の発明は主としてこれらの成果に基づく。

[1] 以下のステップ、即ち、

(A) VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を共発現させるステップ、又は

(B) VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を各々発現させた後、発現産物を混合するステップ、

を含み、

ロイシンジッパーを構成する一対のペプチドの内、片方をコードする第1タグ配列が前記抗体H鎖遺伝子に付加されており、他方をコードする第2タグ配列が前記抗体L鎖遺伝子に付加されている、Fab抗体の調製法。

[2] 前記第1タグ配列の付加位置が前記抗体H鎖遺伝子の3'末端であり、前記第2タグ配列の付加位置が前記抗体L鎖遺伝子の3'末端である、[1]に記載の調製法。

[3] 前記ロイシンジッパーが、ロイシン-ロイシン間の疎水結合に加え、正電荷アミノ酸-負電荷アミノ酸間の静電的相互作用により結合力を発揮する、[1]又は[2]に記載の調製法。

[4] 前記第1タグ配列がリンカー配列を介して前記抗体H鎖遺伝子に付加されており、前記第2タグ配列がリンカー配列を介して前記抗体L鎖遺伝子に付加されている、[1]～[3]のいずれか一項に記載の調製法。

〔５〕宿主細胞を用いた発現系又は無細胞タンパク質合成系を用いて前記ステップを行う、〔１〕～〔４〕のいずれか一項に記載の調製法。

〔６〕前記抗体H鎖遺伝子と前記抗体L鎖遺伝子が、以下のステップ(i)～(viii)によって調製される、〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載の調製法：

(i)単一のB細胞に由来するmRNAを用意するステップ；

(ii)前記mRNAを鋳型とした逆転写PCR法によりcDNAを調製するステップ；

(iii)5'末端に同一の第３タグ配列を含む複数のプライマーからなり、VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子を増幅可能なプライマーセットを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ；

(iv)5'末端に同一の第４タグ配列を含む複数のプライマーからなり、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子を増幅可能なプライマーセットを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ；

(v)前記第３タグ配列を含む単一のプライマーを用い、ステップ(iii)の増幅産物を鋳型としてPCRを実施するステップ；

(vi)前記第４タグ配列を含む単一のプライマーを用い、ステップ(iv)の増幅産物を鋳型としてPCRを実施するステップ；

(vii)ステップ(v)の増幅産物である抗体H鎖遺伝子に前記第１タグ配列を付加するステップ；

(viii)ステップ(vi)の増幅産物である抗体L鎖遺伝子に前記第２タグ配列を付加するステップ。

10

20

〔７〕前記抗体H鎖遺伝子と前記抗体L鎖遺伝子が、以下のステップ(I)～(IV)によって調製される、〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載の調製法：

(I)単一のB細胞に由来するmRNAを用意するステップ；

(II)前記mRNAを鋳型とした逆転写PCR法によりcDNAを調製するステップ；

(III)前記cDNAを鋳型としたnested PCR法により前記抗体H鎖遺伝子を増幅させるステップ、

(IV)前記cDNAを鋳型としたnested PCR法により前記抗体L鎖遺伝子を増幅させるステップ。

〔８〕ロイシンジッパーを構成する一对のペプチドの片方がH鎖に付加されており、他方がL鎖に付加されている、タグ付Fab抗体。

30

〔９〕前記片方のペプチドの付加位置が前記H鎖のC末端であり、前記他方のペプチドの付加位置が前記L鎖のC末端である、〔８〕に記載のタグ付Fab抗体。

〔１０〕前記ロイシンジッパーが、ロイシンーロイシン間の疎水結合に加え、正電荷アミノ酸ー負電荷アミノ酸間の静電的相互作用により結合力を発揮する、〔８〕又は〔９〕に記載のタグ付Fab抗体。

〔１１〕前記片方のペプチドがリンカーを介して前記H鎖に付加されており、前記他方のペプチドがリンカーを介して前記L鎖に付加されている、〔８〕～〔１０〕のいずれか一項に記載のタグ付Fab抗体。

〔１２〕前記リンカーがプロテアーゼ切断部位を含む、〔１１〕に記載のタグ付Fab抗体。

40

〔１３〕〔８〕～〔１２〕のいずれか一項に記載のタグ付Fab抗体からタグを除去して得られたFab抗体。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】SICREX法の概要（一例）。

【図２】使用したプライマーの一覧。

【図３】使用したプライマーの一覧（続き）。

【図４】無細胞タンパク質合成系を構成する要素。

【図５】Fab-LZ（ロイシンジッパー）複合体の構成。

【図６】無細胞タンパク質合成系で合成したウサギIgG Fab-LZのサンドイッチELISA解析

50

の結果。尚、鋳型DNAなしで無細胞タンパク質合成を行ったネガティブコントロール（鋳型なし）と、プレートに抗原を固定していないネガティブコントロール（抗原コートなし）を比較に使用した。

【図 7】ウサギIgG Fab-LZのウェスタンブロット解析の結果。

【図 8】マウスFab（No.6）及びマウスFab（No.23）の非還元SDS-PAGE解析の結果。Sは培養上清、Pは沈殿。

【図 9】抗O-157マウスFab-LZ複合体の抗原結合活性（ELISAによる）。尚、鋳型DNAなしで無細胞タンパク質合成を行ったネガティブコントロール（鋳型なし）と、プレートに抗原を固定していないネガティブコントロール（抗原コートなし）を比較に使用した。

【図 10】抗リステリアウサギFab-LZ複合体の抗原結合活性（ELISAによる）。無細胞タンパク質合成系で発現させたFab-LZ複合体及びFabのELISA解析の結果。1ウェルあたり1細胞の条件で増幅させたPCR産物を鋳型としてFab-LZ複合体及びFabを無細胞タンパク質合成系で合成し、結合活性を測定した。尚、鋳型DNAなしで無細胞タンパク質合成を行ったネガティブコントロール（鋳型なし）と、プレートに抗原を固定していないネガティブコントロール（抗原コートなし）を比較に使用した。

【図 11】ウサギFab-LZの非還元SDS-PAGE解析の結果。Sは培養上清、Pは沈殿。

【図 12】使用したプライマーの一覧。

【図 13】使用したプライマーの一覧（続き）。

【図 14】使用したプライマーの一覧（続き）。

【図 15】使用したプライマーの一覧（続き）。

【図 16】使用したプライマーの一覧（続き）。

【図 17】使用したプライマーの一覧（続き）。

【図 18】無細胞タンパク質合成系を利用したFab-LZ複合体の構築。

【図 19】使用したプライマーの一覧。

【図 20】一細胞からの抗体遺伝子の増幅。L. monocytogenesで免疫化したウサギの末梢血を用いて1細胞/ウェルの条件でSICREXを行った。遺伝子増幅が確認された同細胞由来の重鎖及び軽鎖の遺伝子を無細胞タンパク質合成系での鋳型とした。レーン1-13はマイクロマニピレーターを用いて回収した単一細胞由来の遺伝子増幅であり、レーン14はB細胞濃縮後の溶液を1細胞/ウェルとなるように希釈したものを鋳型として遺伝子増幅したもの、レーン15も同様に5細胞/ウェルとなるように希釈したものを鋳型として遺伝子増幅を行った。レーン16は細胞なしで行ったネガティブコントロール。

【図 21】Fab-LZ複合体をコードする塩基配列の例。上段の配列（配列番号139）では、5'末端側から3'末端側に向かって順に、IgG型のVHとCH1をコードする配列、リンカーをコードする配列、LZAをコードする配列、及びHAタグをコードする配列が配置されている。下段の配列（配列番号140）では、5'末端側から3'末端側に向かって順に、IgG型のVLとCLをコードする配列、リンカーをコードする配列、LZBをコードする配列、及びFLAGタグをコードする配列が配置されている。

【図 22】無細胞タンパク質合成系で発現させたFab-LZ複合体及びFabのSDS-PAGE解析の結果。無細胞タンパク質合成系により発現させたFab-LZ複合体及びFabを非還元SDS-PAGEにより解析した。尚、「P.C.」はマウス触媒抗体6D9のFabでありポジティブコントロール、「N.C.」は鋳型を入れていないサンプルである。また、右側の矢印はFabのバンドの位置を示しており、中央付近の矢印はFab-LZ複合体のジスルフィド結合が形成された際にバンドが現れると予想される位置を示した。

【図 23】無細胞タンパク質合成系で発現させたFab-LZ複合体及びFabのSDS-PAGE解析の結果。無細胞タンパク質合成系により発現させたFab-LZ複合体及びFabを還元SDS-PAGEにより解析した。尚、「P.C.」はマウス触媒抗体6D9のFabでありポジティブコントロール、「N.C.」は鋳型を入れていないサンプルである。また、右側の矢印はHc又はLcのバンド位置を示し、中央付近の矢印はLZが付加されたHc又はLcのバンドの位置を示した。

【図 24】大腸菌で発現させたマウスFab-LZ複合体及びFabのELISA解析の結果。大腸菌で発現させ、細胞破碎液を培養液体積あたりの活性として算出した。

【図 2 5】V領域にLZを付加したときのELISAの結果。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の第1の局面はFab抗体の調製法に関する。本発明の調製法は、VH領域（重鎖可変領域）とCH1領域（重鎖定常領域1）をコードする抗体H鎖遺伝子と、VL領域（軽鎖可変領域）とCL領域（軽鎖定常領域）をコードする抗体L鎖遺伝子を発現させるステップを含む。一態様では、抗体H鎖遺伝子と抗体L鎖遺伝子を共発現させる（ステップ（A））。以下、「共発現ステップ」と呼称する）。即ち、同一の発現系で抗体H鎖遺伝子と抗体L鎖遺伝子を発現させる。一方、別の態様では、抗体H鎖遺伝子と抗体L鎖遺伝子を各々発現させる。この態様では、発現後に発現産物を混合し、抗体H鎖と抗体L鎖を会合させる。

10

【0011】

Fab抗体とは、VH領域及びCH1領域を備えたH鎖と、VL領域及びCL領域を備えたL鎖からなる断片抗体であり、Fc領域を含まない。以下の説明では、慣例に従い、Fab抗体を構成するH鎖のことをHc、それをコードする遺伝子のことをHc遺伝子とそれぞれ呼ぶことがある。同様に、Fab抗体を構成するL鎖のことをLc、それをコードする遺伝子のことをLc遺伝子とそれぞれ呼ぶことがある。

【0012】

本発明では、Fab抗体の形成率向上を図るためにロイシンジッパーを利用する。具体的には、ロイシンジッパーが付加されたFab抗体（本発明では、「タグ付Fab」と呼称する）が調製されるようにする。ロイシンジッパーを付加することにより、ロイシンジッパー特有の結合力がHcとLcの会合を補助し、Fab形成効率が向上する。

20

【0013】

ロイシンジッパーとは、タンパク質の二次構造のモチーフとして見出された特徴的な構造である（Science. 1988 Jun 24;240(4860):1759-64.）。ロイシンジッパーの構造は、ロイシン残基が α -ヘリックス構造をとりやすいアミノ酸配列の中に7個ごとに4~5個並ぶのを基本骨格とする。この骨格によって、ロイシン残基が α -ヘリックスの軸方向にほぼ1列に並び、別のロイシンジッパー構造中のロイシン残基の並びと疎水的に結合する。本発明では、このように特徴的なモチーフを含む、一对のペプチド（ロイシンジッパーペプチドA、ロイシンジッパーペプチドBと呼ぶ）を利用する。ロイシンジッパーペプチドAとロイシンジッパーペプチドBは高い親和性を持ち、ロイシンジッパーを形成する。ロイシンジッパーペプチドAは、ロイシンジッパーを形成できるように7残基毎にロイシンを含む。ロイシンジッパーペプチドBも同様に、7残基毎にロイシンを含む。これらのロイシンは、ロイシンジッパーペプチドAにおけるロイシン（ロイシンジッパーモチーフを構成するもの）に対応するように配置されている。ロイシンジッパーペプチドAとロイシンジッパーペプチドBの長さは特に限定されないが、短すぎると所望の効果、即ちロイシンジッパー構造による結合力を十分に発揮できなくなり、長すぎれば立体障害等によってHcとLcの会合や抗体の結合性（抗原の認識）に影響を及ぼすおそれがある。そこで、ロイシンジッパーペプチドAとロイシンジッパーペプチドBの長さは、例えば25~50残基、好ましくは28~35残基である。尚、ロイシンジッパーペプチドAとロイシンジッパーペプチドBの長さは原則として同一であるが、ロイシンジッパー構造を形成できる限りにおいて、両者に長さの相違があってもよい。

30

40

【0014】

様々な構成のロイシンジッパーを用いることができるが、好ましくは、ロイシン-ロイシン間の疎水結合に加え、正電荷アミノ酸-負電荷アミノ酸間の静電的相互作用により結合力を発揮するロイシンジッパーを採用する。このようなロイシンジッパー（説明の便宜上、「荷電型ロイシンジッパー」と呼ぶ）は高い結合力を示す。電荷保持ロイシンジッパーを用いる場合には、ロイシンジッパーペプチドAとロイシンジッパーペプチドBが、以下の(a)又は(b)の構造的特徴を有する。

(a) ロイシンジッパーペプチドAが正電荷アミノ酸（塩基性アミノ酸）を含む。ロイシンジッパーペプチドBはロイシンジッパーペプチドAの正電荷アミノ酸に対応する位置に負

50

電荷アミノ酸（酸性アミノ酸）を含む。

(b) ロイシンジッパーペプチドAが酸性アミノ酸を含む。ロイシンジッパーペプチドBはロイシンジッパーペプチドAの酸性アミノ酸に対応する位置に塩基性アミノ酸を含む。

【0015】

塩基性アミノ酸の例はリシン（K）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）であるが、この中でも、電荷の強さの理由から、KまたはRを選択するとよい。同様に、酸性アミノ酸の例はアスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）である。ロイシンジッパーペプチド中の電荷アミノ酸の数を多くすると静電的相互作用が高まり、ロイシンジッパーの結合力の向上を望める。そこで、ロイシンジッパーペプチド中の電荷アミノ酸の割合は例えば15%~50%、好ましくは20%~40%である。

10

【0016】

1993年O'sheaらは、GCN4ロイシンジッパーを改変した、ACID-p1(LZA)及びBASE-p2(LZB)と呼ばれるペプチドを設計した（Oshea, E. K., K. J. Lumb, and P. S. Kim, 1993, PEP TIDE VELCRO - DESIGN OF A HETERODIMERIC COILED-COIL: Current Biology, v. 3, p. 658-667.）。LZA、LZBはpHやイオン強度、温度などの物理的条件に影響を受けず、高い特異性とアフィニティーを持つヘテロダイマーを形成する（ $K_d = 3 \times 10^{-8}$ M）。電荷アミノ酸を豊富に含む一対のロイシンジッパーペプチドとしてLZA及びLZBを用いることができる。LZA及びLZBの配列を以下に示す。

(1) LZA（負電荷を保持するロイシンジッパーペプチド）

AQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQK（配列番号1）

20

尚、静電的相互作用のために、4番目、6番目、11番目、13番目、18番目、20番目、25番目、27番目にグルタミン酸（E）が配置されている。

(2) LZB（正電荷を保持するロイシンジッパーペプチド）

AQLKKKLQALKKKNAQLKWLQALKKKLAQK（配列番号2）

尚、静電的相互作用のために、4番目、6番目、11番目、13番目、18番目、20番目、25番目、27番目にリシン（K）が配置されている。

【0017】

本発明の調製法では、ロイシンジッパーが付加されたFab抗体を得るために、特徴的な構造のHc遺伝子とLc遺伝子を発現に供する。即ち、発現ステップに用いる抗体遺伝子として、ロイシンジッパーを構成する一対のペプチドの内、片方（ロイシンジッパーペプチドA）をコードする塩基配列（「第1タグ配列」と呼称する）が付加されたHc遺伝子と、他方（ロイシンジッパーペプチドB）をコードする塩基配列（「第2タグ配列」と呼称する）が付加されたLc遺伝子を用意する。このような特徴的なHc遺伝子とLc遺伝子を発現させ、ロイシンジッパーが付加されたFab抗体を得る。

30

【0018】

第1タグ配列の付加位置はHc遺伝子の5'末端又は3'末端である。第2タグ配列の付加位置は、第1タグ配列の付加位置に依存する。即ち、第1タグ配列をHc遺伝子の5'末端に付加する場合には、正しく会合したFab抗体の形成を補助するロイシンジッパーが構成されるように、第2タグ配列をLc遺伝子の5'末端に付加する。同様に、第1タグ配列をHc遺伝子の3'末端に付加する場合には、第2タグ配列をLc遺伝子の3'末端に付加する。

40

【0019】

好ましくは、第1タグ配列及び第2タグ配列の付加位置を抗体遺伝子の3'末端とする。このようにすると、C末端、即ち定常領域側にロイシンジッパーが付加されたFab抗体が得られる。当該抗体は、ロイシンジッパーが付加された状態のままでも、可変領域に依存した特異的な結合性を示すことになり、ロイシンジッパー部分を除去しなくとも、各種用途に利用可能となる。但し、ロイシンジッパー部分を除去した後に各種用途への利用に供してもよい。

【0020】

一方、第1タグ配列及び第2タグ配列の付加位置を抗体遺伝子の5'末端とした場合には、得られるタグ付Fab抗体はN末端、即ち可変領域側にロイシンジッパーが付加されたもの

50

となる。従って、通常の使用においては、事前にロイシンジッパーを除去する。ロイシンジッパーの除去にはプロテアーゼを利用することができる。例えば、プロテアーゼ切断部位を後述のリンカー内に含めれば、本発明の調製法を実施して得られたタグ付Fab抗体をプロテアーゼ処理することによって、ロイシンジッパーが除去され、タグのないFab抗体が得られる。プロテアーゼ処理の他、インテインを利用してロイシンジッパーを除去することにしてもよい。

【0021】

第1タグ配列及び第2タグ配列は直接又はリンカー配列（リンカーをコードする配列）を介して抗体遺伝子に連結される。後者の場合には、ロイシンジッパーがリンカーで連結されたタグ付Fab抗体が得られることになる。リンカーを用いることにより、Fab抗体部分とタグ部分（ロイシンジッパー）が、適度な柔軟性をもって連結されることになり、HcとLcの会合効率、及びロイシンジッパー構造の形成効率の向上が望める。リンカーとしては例えばペプチドリンカーが用いられる。ペプチドリンカーとは、直鎖状にアミノ酸が連結したペプチドからなるリンカーである。ペプチドリンカーの代表例は、グリシンとセリンから構成されるリンカー（GGSリンカーやGSリンカー）である。GGSリンカーは、GGSが1～数回、繰り返される配列からなる。繰り返し数は特に限定されないが、好ましくは2～6回、更に好ましくは2～4回である。一方、GSリンカーはGGGS（配列番号3）が1～数回、繰り返される配列である。GGSリンカー及びGSリンカーを構成するアミノ酸であるグリシンとセリンは、それ自体のサイズが小さく、リンカー内で高次構造が形成されにくい。従って、HcとLcの会合、及びロイシンジッパー構造の形成の際の障害になりにくい。

【0022】

Hc遺伝子とLc遺伝子は任意の方法によって用意することができる。上述の通り、本発明者らの研究グループは、SICREX法(Single Cell RT-PCR Linked in Vitro Expression)と呼称されるFab抗体の取得法を開発した。SICREX法は抗体産生細胞から短時間で所望の抗体を取得することを可能にする。本発明の好ましい一態様では、SICREX法を利用することによって、Hc遺伝子とLc遺伝子を簡便且つ短時間で調製するとともに、一連の操作の迅速化を図る。SICREX法(Biotechnol Prog. 2006 Jul-Aug;22(4):979-88.)の典型的な操作では、まず、ある特定の抗原に対して免疫性を与えられた非ヒト動物（例えばマウス、ラット、ウサギ）の脾臓や末梢血、或いはヒト末梢血等からB細胞を単離する。細胞数が1細胞/ウェルとなるように、単離したB細胞を含む溶液を希釈する。或いは、マイクロマニピレーター等を用いてB細胞を単離する。次に、逆転写PCR(RT-PCR)を用い、B細胞中のmRNAからcDNAを合成する。続いて、2段階PCRによりHc遺伝子とLc遺伝子をそれぞれ別々に増幅する。2段階PCRの1段階目では、同一のタグ配列が5'末端に付加された複数のcDNA特異的プライマー（第1プライマーセット）を用いる。1段階目のPCRの増幅産物を鋳型として2段階目のPCRを行う。2段階目のPCRでは、第1プライマーセットに用いたタグ配列と同一のタグ配列が5'末端に付加された単一のプライマーを用い、1段階目のPCRの増幅産物を特異的且つ効率的に増幅する。2段階目のPCRに使用する単一プライマーは、1段階目のPCRで得られる増幅産物の5'末端部分及び3'末端部分に相補的である。従って、単一のプライマーによる特異的な増幅が可能になる。以上の操作によって得られたHc遺伝子とLc遺伝子に対して、無細胞タンパク質合成系での発現に必要な要素（プロモーター、ターミネータなど）をオーバーラップPCRで結合させた後、必要な試薬を添加した一つの容器内でin vitro合成（転写及び翻訳）する。このようにして合成したFab抗体の抗原に対する結合能はELISA法等によって確認することができる。また、必要に応じて、結合能の高いものについてシークエンス解析を行う。尚、SICREX法の操作手順、条件、応用などについては、Biotechnol Prog. 2006 Jul-Aug;22(4):979-88.、J Biosci Bioeng. 2010 Jan;109(1):75-82等を参照することができる。

【0023】

SICREX法を利用して、本発明に用いるHc遺伝子とLc遺伝子を用意する場合には、例えば、以下のステップ(i)～(viii)を行うことになる。

(i) 単一のB細胞に由来するmRNAを用意するステップ

(ii) 前記mRNAを鋳型とした逆転写PCR法によりcDNAを調製するステップ

(iii) 5'末端に同一のタグ配列（第3タグ配列）を含む複数のプライマーからなり、VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子（Hc遺伝子）を増幅可能なプライマーセットを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ

(iv) 5'末端に同一のタグ配列（第4タグ配列）を含む複数のプライマーからなり、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子（Lc遺伝子）を増幅可能なプライマーセットを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ

(v) 前記第3タグ配列を含む単一のプライマーを用い、ステップ(iii)の増幅産物を鋳型としてPCRを実施するステップ

(vi) 前記第4タグ配列を含む単一のプライマーを用い、ステップ(iv)の増幅産物を鋳型としてPCRを実施するステップ

(vii) ステップ(v)の増幅産物である抗体H鎖遺伝子（Hc遺伝子）に第1タグ配列（ロイシンジッパーペプチドAをコードする配列）を付加するステップ

(viii) ステップ(vi)の増幅産物である抗体L鎖遺伝子（Lc遺伝子）に第2タグ配列（ロイシンジッパーペプチドBをコードする配列）を付加するステップ

【0024】

以上のステップの中で、特にステップ(vii)及び(viii)は本発明に特徴的である。ステップ(vii)及び(viii)におけるタグ配列は、上記SICREX法における、無細胞タンパク質合成系での発現に必要な要素の付加と同様に、オーバーラップPCRにより付加することができる。

【0025】

Hc遺伝子及びLc遺伝子の共発現に無細胞タンパク質合成系を用いる場合には、無細胞タンパク質合成系での発現に必要な要素の付加も行う。この操作は、ステップ(vii)及び(viii)の前又は後に行うことができる。或いは、第1タグ配列／第2タグ配列の付加と同時に行うことにしてもよい（即ち、無細胞タンパク質合成系での発現に必要な要素とタグ配列をまとめて付加する）。「無細胞タンパク質合成系での発現に必要な要素」としてプロモーターが用いられる。好ましくは、プロモーター及びターミネーターが併用される。更に好ましくは、プロモーター、ターミネーター及びリボソーム結合サイトが併用される。プロモーターとしては、T7プロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター等を用いることができる。また、ターミネーターとしては例えばT7ターミネーターを用いることができる。

【0026】

ところで、1段階目のPCRと2段階目のPCRに使用するプライマーを所定の量比で同時に使用することにより、2段階PCRを一つの操作（1段階PCR）で行うという、SICREX法の改良技術の報告（J. Biosci. Bioeng., Vol. 101, No.3, 284-286, 2006）もある。この報告に準じ、本発明の別の態様では、従来の2段階PCRに代え、1段階PCRによって抗体遺伝子を増幅させる。この態様の場合、上記ステップ(iii)～(vi)に代えて、以下のステップ(a)及び(b)を行うことになる。

(a) 5'末端に同一のタグ配列（第5タグ配列）を含む複数のプライマーからなり、VH領域とCH1領域をコードする抗体H鎖遺伝子（Hc遺伝子）を増幅可能なプライマーセットと、該プライマーセットよりも高濃度で使用される、前記第5タグ配列を含む単一のプライマーとを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ

(b) 5'末端に同一のタグ配列（第6タグ配列）を含む複数のプライマーからなり、VL領域とCL領域をコードする抗体L鎖遺伝子（Lc遺伝子）を増幅可能なプライマーセットと、該プライマーセットよりも高濃度で使用される、前記第6タグ配列を含む単一のプライマーを用い、前記cDNAを鋳型としてPCRを実施するステップ

【0027】

プライマーセットと単一プライマーの量比は例えば1：2～1：50、好ましくは1：5～1：20、更に好ましくは1：8～1：15である。

【0028】

上記の方法（ステップ(i)～(viii)）ではなく、外側のプライマーと内側のプライマーを使って２段階のPCRを行う方法（nested PCR法）によって抗体cDNAを特異的に増幅させることにしてもよい。この場合には、例えば、以下の(I)～(IV)のステップを行うことになる。

(I) 単一のB細胞に由来するmRNAを用意するステップ；

(II) 前記mRNAを鋳型とした逆転写PCR法によりcDNAを調製するステップ；

(III) 前記cDNAを鋳型としたnested PCR法により前記抗体H鎖遺伝子を増幅させるステップ、

(IV) 前記cDNAを鋳型としたnested PCR法により前記抗体L鎖遺伝子を増幅させるステップ。

10

【0029】

尚、L鎖については、例えば、図15に示した1stPCR(LC)セットを用いてPCRを行い、続いて2ndPCR(LC)プライマーセットを用いてPCRを行う（H鎖についても同様である）。各プライマーの5'末端にはタグ配列が付加されており、T7プロモーター及びT7ターミネーターをオーバーラップPCRにて付加することができる。

【0030】

ところで、Hc遺伝子とLc遺伝子の共発現ステップは、宿主細胞を用いた発現系又は無細胞タンパク質合成系で行うことができる。前者の場合、Hc遺伝子を発現可能に保持した発現ベクターと、Lc遺伝子を発現可能に保持した発現ベクターを用意し、これらの発現ベクターで適当な宿主を形質転換する。或いは、Hc遺伝子とLc遺伝子を共発現可能な発現ベクターによって宿主を形質転換する。そして、得られた形質転換体を、発現ベクターからの抗体遺伝子が発現可能な条件下で培養した後、形質転換体内又は培養液から、発現産物の会合体であるタグ付Fab抗体を回収する。

20

【0031】

Hc遺伝子と、Lc遺伝子を各々発現させた後、発現産物を混合するステップを行う態様の場合には、Hc遺伝子を発現可能に保持した発現ベクターで適当な宿主を形質転換する一方で、Lc遺伝子を発現可能に保持した発現ベクターで適当な宿主を形質転換する。得られた各形質転換体を培養した後、形質転換体内又は培養液から発現産物を回収する。その後、発現産物を混合して会合させ、タグ付Fab抗体を得る。

【0032】

30

宿主としては、細菌細胞（例えば大腸菌）、酵母細胞（例えば*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*）、糸状菌細胞（例えば*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*）、哺乳動物細胞（例えばCHO細胞、Sp2/0細胞、NS0細胞）等を例示することができる。好ましくは、宿主として大腸菌を採用する。大腸菌は目的タンパク質（この場合はタグ付Fab抗体）の効率的且つ大量の調製に適する。発現ベクターは宿主との関係を考慮して選択すればよい。形質転換、培養、回収等の各操作及び条件は常法に従えばよい。或いは、過去の報告に準じて各操作を行えばよい。

【0033】

無細胞タンパク質合成系とは、生細胞を用いるのではなく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸からタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞タンパク質合成系では一般に、細胞破碎液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したりリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

40

【0034】

タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: *Nature Biotech.*, 19, 751-755, 2001）。この合成系では、

50

バクテリアのタンパク質合成系を構成する3種類の開始因子、3種類の伸長因子、終結に関与する4種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる31種類の因子の遺伝子を大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

【0035】

無細胞タンパク質合成系には以下の利点がある。まず第1に、生細胞を維持する必要がないため操作性が良好で系の自由度も高い。したがって、目的のタンパク質の性質に応じて様々な修正や修飾を施した合成系を設計することが可能となる。次に、細胞系の合成では使用する細胞に毒性のあるタンパク質の合成は基本的にできないが、無細胞系ではそのような毒性のタンパク質であっても生産することができる。さらに、多種類のタンパク質を同時にかつ迅速に合成できることからハイスループット化が容易である。生産されるタンパク質の分離・精製が容易であるという利点も備え、これはハイスループット化に有利に働く。加えて、非天然型のアミノ酸を取り込ませるなどして非天然型タンパク質を合成することも可能であるという利点も併せ持つ。

【0036】

無細胞タンパク質合成系を採用することにすれば、本発明の調製法の一連の操作をSICR-EX法に準じて行うことができ、効率的且つ迅速にタグ付Fab抗体を調製することができる。

【0037】

現在広く利用されている無細胞タンパク質合成系には以下のものがある。即ち、大腸菌S30抽出液の系（原核細胞の系）、コムギ胚芽抽出液の系（真核細胞の系）、及びウサギ網状赤血球可溶化物の系（真核細胞の系）である。これらの系はキットとしても市販されており、容易に利用することが可能である。

【0038】

歴史的には大腸菌S30抽出液の系の開発が最も古く、この系を利用して様々なタンパク質の合成が試みられてきた。大腸菌30S画分は、大腸菌の集菌、菌体破碎、精製の工程を経て調製される。大腸菌30S画分の調製及び、無細胞転写・翻訳共役反応はPrattらの方法（Pratt, J. M.: Chapter 7, in “Transcription and Translation: A practical approach”, ed. by B. D. Hames & S. J. Higgins, pp. 179-209, IRL Press, New York (1984)）やEllmanらの方法（Ellman, J. et al.: Methods Enzymol., 202, 301-336(1991)）を参考にして行うことができる。

【0039】

コムギ胚芽抽出液の系は、高品質の真核生物タンパク質を効率的に合成できるという利点を有し、大腸菌S30抽出液の系では合成が困難な真核生物のタンパク質を合成する際によく利用される。最近になって、種子胚乳成分を洗浄除去した胚芽から抽出液を調製することによって高効率かつ安定な合成系が構築されることが報告され注目を集めている（Madin, K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 559-564, 2000）。その後、高翻訳促進能を有するmRNA非翻訳配列、PCRを利用した多品目機能解析用のタンパク質合成法、専用高発現ベクターの構築などの技術開発が行われ（Sawasaki, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 14652-14657, 2002）、様々な分野への応用が期待されている。

【0040】

コムギ胚芽抽出液は、コムギ胚芽をすり潰して遠心分離した後、上澄み液をゲルろ過で分離することによって得ることができる。翻訳反応については、Andersonらの方法（Anderson, C. W. et al.: Methods Enzymol., 101, 638-644(1983)）を参考にできる。改良法についても報告されており、例えば河原崎らの方法（Kawarasaki, Y. et al.: Biotechnol. Prog., 16, 517-521(2000)）やMadinらの方法（Madin, K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 559-564, 2000）等を参考にできる。その他、コムギ胚芽抽出液の系についてはWO 00/68412 A1、WO 01/27260 A1、WO 2002/024939 A1、WO 2005/063979 A1、特開平6-7134号公報、特開2002-529531号公報、特開2005-355513号公報、特開2006-042601

10

20

30

40

50

号公報、特開2007-097438号公報、特開2008-029203号公報等が参考になる。

【0041】

ウサギ網状赤血球可溶化物の系はグロブリン生産に適する。ウサギ網状赤血球可溶化物は、ウサギにフェニルヒドラジンを数日間静脈注射して貧血状態とし、所定期間後（例えば第8日目）に採血し、その後溶血させた液から超遠心分離処理などを経て得られる。ウサギ網状赤血球可溶化物の調製法は、JacksonとHuntの方法（Jackson, R. J. and Hunt, T.: Methods Enzymol., 96, 50-74(1983)）を参考にして行うことができる。

【0042】

尚、本発明の実施に際して利用できる無細胞タンパク質合成系は上記のものに限られるものではなく、例えば大腸菌以外のバクテリアやコムギ以外の植物の抽出液、昆虫由来の抽出液、動物細胞由来の抽出液、又はゲノム情報を基に構築した系などを利用してもよい。

10

【0043】

生成したタグ付Fab抗体は、常法（遠心分離、濾過、アフィニティクロマトグラフィーなど）によって回収することができる。Hc遺伝子及びLc遺伝子に回収用のタグ配列（例えばヒスチジンタグ）を組み込んでおけば、当該タグ配列を利用して容易かつ簡便に回収することが可能である。

【0044】

本発明の調製法によれば、ロイシンジッパーが付加されているという、特徴的な構造のFab抗体が得られる。そこで本発明の第2の局面は、ロイシンジッパーが付加されているタグ付Fab抗体を提供する。本発明のタグ付Fab抗体では、ロイシンジッパーを構成する一対のペプチドの片方（ロイシンジッパーペプチドA）がH鎖（Hc）に付加されており、他方（ロイシンジッパーペプチドB）がL鎖（Lc）に付加されている。ロイシンジッパーペプチドA及びBの付加位置、構造、その他の特徴は、上記第1の局面での説明に準ずる。また、リンカーの利用についても、上記第1の局面での対応する説明が援用される。

20

【0045】

本発明の抗体（タグ付Fab抗体、又はそれからタグを除去したFab抗体）に様々な修飾を施すことが可能である。例えば、低分子化合物、タンパク質（例えば酵素）、毒素、標識物質などを融合又は結合させ、機能の追加や特性の改変などを行うことができる。標識物質としては例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、オレゴングリーン等の蛍光色素、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素、ルミノール、アクリジン色素等の化学又は生物発光化合物、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{32}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 等の放射性同位体、及びビオチンを挙げることができる。一方、ヒト以外の動物種の抗体として本発明の抗体を作製した場合には、ヒト化抗体、ヒトキメラ化抗体等へ変換することにしてもよい。

30

【0046】

本発明の調製法は、研究ツール、診断薬、或いは医薬等として有用な抗体を得るための手段として利用可能である。例えば、本発明の調製法を利用して得た抗体を、特定の標的を捕捉、検出又は測定するための試薬として、各種免疫学的方法（例えばELISA法）に適用可能である。また、特定の被検者（例えば、特定の疾患に罹患した患者）に由来する抗体を調製することにし、得られた抗体を利用して診断（病態や治療効果の評価など）を行うことも可能である。一方、本発明の調製法を利用して得た抗体を、治療用抗体として利用することも可能である。例えば、特定の感染病に対して耐性を示す者の免疫細胞から調製された抗体は、当該感染病に対する治療用又は予防用抗体として利用できる可能性がある。尚、医薬へ適用する際には、タグが除去された抗体を用いることが好ましい。

40

【実施例】

【0047】

A. 無細胞タンパク質合成系を用いた抗体発現の効率化

無細胞タンパク質合成系は、種々の微生物や動物細胞などの生細胞を用いないため、遺伝子導入や培養といった煩雑な操作を必要とせず、なおかつ、わずか数時間でタンパク質

50

を合成できるという利点がある。SICREX法では、取得した抗体遺伝子を鋳型として無細胞タンパク質合成を行うことでFab抗体を合成し、合成したFab抗体をELISAによりスクリーニングしている（図1）。しかしながら、無細胞タンパク質合成系におけるFab抗体の発現量に改善の余地があり、また、Hc、Lc間のジスルフィド結合により形成されるFab形成効率が低い場合があることが、Fab抗体の効率的なスクリーニングの妨げとなっている。そこで、Fab抗体を構成するHcとLcのC末端にLZAとLZBをそれぞれ付加し、LZAとLZBの相互作用によりHc、Lcをペアリング（以下、「Fab-LZ複合体」と呼ぶ）させ、Fab形成効率を向上させることを目指した。

【0048】

1. 方法

1-1. LZA、LZBの無細胞タンパク質合成系を用いた抗体発現における有効性の検討

1-1-1. ウサギFab-LZ融合タンパク質発現プラスミドの構築

抗AβウサギIgG Fab抗体遺伝子を保持するプラスミドpIDTSMART-KAN:Ra_HcLcを鋳型とし、RaHc-pRSET-IFC-FwとRaHc-linker-Rv、RaLc-pRSET-IFC-FwとRaLc-linker-Rvをプライマーとして用い、それぞれHc遺伝子、Lc遺伝子を増幅させた(94℃ 15秒、50℃ 15秒、68℃ 30秒で25サイクル、Tks Gflex DNA polymeraseを使用)。また、pLZAを鋳型とし、LZA-FwとLZA-Rvを用いてLZA遺伝子を増幅した(94℃ 15秒、50℃ 15秒、68℃ 15秒で25サイクル、Tks Gflex DNA polymeraseを使用)。同様に、pLZBを鋳型とし、LZB-FwとLZB-Rvを用いてLZB遺伝子を増幅させた。増幅したHc遺伝子とLZA遺伝子、Lc遺伝子とLZB遺伝子を、それぞれRaHc-pRSET-IFC-FwとLZA-Rv、RaLc-pRSET-IFC-FwとLZB-Rvをプライマーとして用いたオーバーラップPCRにより連結させた(94℃ 15秒、50℃ 15秒、68℃ 90秒で25サイクル、Tks Gflex DNA polymeraseを使用)。また、pRSET-Bを鋳型として、pRSET-IFC-FwとpRSET-IFC-Rvを用いてインバースPCRを行い、pRSET線状化ベクターを得た。連結させた遺伝子をそれぞれ、In-Fusion-Cloning kit(Clontech)によりpRSET線状化ベクターにそれぞれ連結させ、pRSET-Ra-Hc-LZA、pRSET-Ra-Lc-LZBを構築した。構築したベクターをヒートショック法により大腸菌DH5α株へ形質転換した。このDH5α株をLB/chloramphenicolプレートへ植菌し、コロニーを採取し、この菌体の保持するプラスミドを抽出した。Big Dye Terminator Ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)を用い、抽出したプラスミドのシーケンス解析を行った。

【0049】

1-1-2. サンドイッチELISAを用いたLZ複合体形成の評価

PBSで2000倍希釈した抗FLAG-tag抗体(フナコシ)を1ウェルあたり50μlずつ分注し、4℃で一晩インキュベートし、Nuncイムノプレート(Thermo scientific)に固定した。プレートをPBSで1回洗浄した後、4% ブロックエース溶液(雪印)を400μlずつ分注し45分ブロッキングを行った。次にプレートをPBSTで2回洗った後、pRSET-Ra-Hc-LZAとpRSET-Ra-Lc-LZB鋳型とする無細胞タンパク質合成により合成されたウサギFab-LZ複合体を一次抗体として50μlずつウェルに加え、37℃で2時間反応させた。プレートを3回PBSTで洗った後、二次抗体として抗HA-biotin標識抗体(コスモ・バイオ)を2,000倍希釈した溶液を100μlずつウェルに加え、室温で2時間反応させた。3回PBSTで洗った後、PBSで2000倍希釈したstreptavidin-HRP(GE healthcare)を100μlずつウェルに加え、室温で2時間インキュベーションした。3回PBSTで洗った後、OPD基質溶液(2mg/ml o-phenylenediamine(和光純薬工業(株)), 0.009% H₂O₂)を100μlに加え37℃で10分から30分間反応させた。50μlの2M H₂SO₄を加え反応を停止させた後、492nmの吸光を測定した。測定はマイクロプレートリーダー(SPECTRA MAX 250 (Wako))を用いて行った。

【0050】

1-1-3. ウエスタンブロットを用いたFab形成効率の評価

1-1-2.と同様の条件でウサギFab-LZ複合体を合成し、反応液を非還元SDS-PAGEにより分離し、分離したタンパク質をニトロセルロース膜(Advantec)にTrans-blot SD cell(Bio-Rad)を用いて転写した。転写された膜を、4% ブロックエース溶液(雪印)を用いて1晩ブロッキングした。PBSTで洗った後、1-1-2.で用いた抗HA-tag抗体とstreptavidin-HRPを

用いて目的タンパク質を標識し、ECL発色試薬（アマシャム）とライトキャプチャーを用いて検出を行った。

【0051】

1-1-4. 抗0157マウスFab-LZ複合体発現のための鋳型DNA構築

抗0157マウス抗体遺伝子をコードするプラスミドを鋳型とし、図2、3に示したプライマーを用いて、No.6、No.16IgM、No.16IgG、No.23の4種類の抗0157マウスFab抗体を増幅させた。

【0052】

増幅させた抗体遺伝子に、無細胞タンパク質合成の際の転写・翻訳反応に必要な配列、T7P断片とT7T-LZA断片（Hc遺伝子に付加）、T7T-LZB断片（Lc遺伝子に付加）を以下に示す手順で付加した。上記T7P、T7T配列はpRSET-LZA、pRSET-LZBを鋳型としたPCR(94℃ 15秒、50℃ 15秒、68℃ 30秒で25サイクル、Tks Gflex DNA polymeraseを使用)によって増幅を行った。T7P断片はpRSETbを鋳型として、プライマーpRSET-T7PFOL-FとpRSET-T7PRを用いて増幅させた。また、T7T-LZA断片、T7T-LZB断片は、プライマーpRSET-T7TF-OL-RとLZAFw、pRSET-T7TF-OL-RとLZBFwをそれぞれ用いて増幅させた。続いて、T7P断片と、T7T-LZA断片又はT7T-LZB断片をオーバーラップPCRにより抗体遺伝子に付加し(Hc遺伝子にT7T-LZA断片、Lc遺伝子にT7T-LZB断片を付加)、プライマーOL-FとOL-Rを用いて増幅させた(94℃ 15秒、50℃ 15秒、68℃ 15秒で25サイクル、Tks Gflex DNA polymeraseを使用)。

【0053】

1-1-5. 抗0157マウスFab-LZ複合体の発現と活性評価

1-1-4.で構築した抗0157マウスFab-LZ複合体発現のためのDNAを鋳型として、無細胞タンパク質合成を行った。無細胞タンパク質合成には、大腸菌A19由来S30 extractと大腸菌BL21Star(DE3)由来S30 extractを用いた(図4)。また、ELISAを行い、抗原に対する結合活性を評価した。尚、抗原にはPBSで希釈した0-157(50 µg/ml)を用いた。

【0054】

1-1-6. 抗リステリアウサギFab-LZ複合体発現のための鋳型DNA構築

抗リステリアウサギFab抗体遺伝子に1-1-4.と同様の手順でT7P断片と、T7T-LZA断片又はT7T-LZB断片を付加した。尚、使用したプライマーは図2、3に示した。

【0055】

1-1-7. 抗リステリアウサギFab-LZ複合体の発現と活性評価

1-1-6.で構築した抗0157マウスFab-LZ複合体発現のためのDNAを鋳型として、無細胞タンパク質合成を行った。反応条件は1-1-5.と同様である。また、ELISAを行い、抗原に対する結合活性を評価した。尚、抗原にはPBSで希釈したリステリア(50 µg/ml)を用いた。また、二次抗体にはAnti-rabbit IgG (H+L)-poly HRP conjugated (コスモ・バイオ)を用いた。

【0056】

2. 結果及び考察

2-1. LZA、LZBの抗体発現における有効性の検討

触媒抗体6D9など、マウス抗体Fabの一部は大腸菌由来無細胞タンパク質合成系で合成した際に高いFab形成効率を示すが、必ずしもすべてのマウス抗体Fabの形成効率が高いというわけではない。また、活性型ウサギ抗体Fabが無細胞タンパク質合成系で発現された例はいまだ報告されていない。そこで、Hc、LcのC末端にそれぞれ正と負に荷電したロイシンジッパー-LZA、LZBを付加(図5)することで、LZA、LZB間での相互作用によりヘテロダイマーが形成され、Fab形成効率が向上されることを期待した。本項では、ウサギFabの形成効率と、ウサギ、マウス活性型Fabの合成量にLZA、LZBが及ぼす影響を評価した。

【0057】

2-1-1. サンドイッチELISAを用いたLZ複合体形成の評価

LZA、LZBのC末端にそれぞれHAタグ、FLAGタグを付加し、サンドイッチELISAを用いて、ウサギIgGFab-LZ複合体の形成の評価を行った。ウサギIgGFabのHc、LcのC末端にそれぞれHAタグ、FLAGタグを付加したものとシグナルを比較したところ、ウサギIgGFab-LZ複合体

がより高いシグナルを示した（図6）。したがって、ウサギIgGFab-LZ複合体が形成されたことが示唆された。

【0058】

2-1-2. ウエスタンブロットを用いたFab形成効率の評価

ウサギIgGFabは、Hc、Lc間のジスルフィド結合の結合効率が低いため、Fab形成効率が著しく低い。そこで、ウサギIgGFab-LZ複合体において、Hc、Lc間のジスルフィド結合が形成されているかを調べた。まず、ウサギIgGFab-LZ複合体を無細胞タンパク質合成系で合成した後、非還元SDS-PAGEとウエスタンブロットにより、無細胞タンパク質合成産物の解析を行った（図7）。ウサギIgGFabにおいては、Hc、Lc間のジスルフィド結合は検出できなかったが、ウサギIgGFab-LZ複合体において、Hc、Lc間のジスルフィド結合が検出された。これは、LZA、LZBがヘテロダイマーを形成したことにより、Hc、Lcが互いに近傍に位置する状態が保たれたため、Hc、Lc間のジスルフィド結合が、より形成されやすい環境になったことが要因だと考えられる。

10

【0059】

2-1-3. 抗0157マウスFab-LZ複合体の発現と活性評価

前述の通り、無細胞タンパク質合成系を用いて合成されたマウスFabにおいても、Fab形成効率が低いため、活性型Fabの合成量が低くなることがある。そこで、抗0157マウスFab-LZ複合体と抗マウスFabを、無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、発現量と活性をSDS-PAGEとELISAを用いて比較した。No.6IgMFabとNo.6IgMFab-LZ複合体において、Fab形成が認められた（図8）。また、No.6Fabと比較し、No.6Fab-LZ複合体の発現量は低くなったにもかかわらず、ELISAにおいては高いシグナルを示した（図9）。このことから、Fab-LZ複合体として発現させることで、Fab形成効率が向上し、活性型Fabの合成量が増大したと考えられる。一方で、No.16IgM、No.16IgG、No.23IgMについては、Fab、Fab-LZ複合体いずれにおいても抗原に対する結合活性を保持していなかった。また、これらいずれもFab形成が見られなかった。

20

【0060】

2-1-4. 抗リステリアウサギFab-LZ複合体の発現と活性評価

ウサギFabについても、マウスFabと同様にFab-LZ複合体として発現させ、活性型Fabの合成量が増大するかを調べた。ELISAとSDS-PAGEの結果をそれぞれ図10と図11に示す。SDS-PAGE解析においては、Fab、Fab-LZ複合体いずれにおいてもHc、Lc間のジスルフィド結合はほとんど見られなかったものの、ELISAにおいては全てのクローンにおいてFab-LZの方が高いシグナルを示した。この結果から、LZを導入することによって、ウサギFabはHc、Lc間のジスルフィド結合の形成の有無にかかわらずヘテロダイマー化することができ、抗原に対する結合活性を保持することができたと考えられる。

30

【0061】

3. まとめ

マウスFab及びウサギFabをFab-LZ複合体として発現させることによって、Fab形成効率の向上、及び活性型Fabの合成量増大に成功した。

【0062】

B. ウサギ末梢血由来Fab-LZ複合体の取得

ウサギ抗体の抗原決定部位のバリエーションはマウスに比べ豊富であり、かつウサギの免疫化や採血はヒトやマウスに比べ非常に容易である。ウサギ末梢血を用いたSICREX法の確立を目指し、以下の検討を行った。尚、ウサギを対象動物とした系を確立することで、高い結合活性を有する抗体遺伝子の獲得が可能になり、より効率的に実験等を進めることができると考えられる。

40

【0063】

1. 方法

1-1. ウサギの免疫化

Listeria monocytogenes（以下L.monocytogenes）の死菌体を抗原としてウサギ(NZW)に対して免疫した。一匹あたりL. monocytogenes (5×10^8 CFU) / PBS溶液1 mlに完全アジュ

50

バント1.5 mlを加え、ソニケーションした後全量を皮下注射により注入した。その2週間後、抗原 5×10^8 CFU/ PBS溶液1 mlに不完全アジュバント1.5 mlを加え、ソニケーションした後全量を皮下注射した。さらに10日後、抗原 5×10^8 CFU/ PBS溶液2.5 mlを皮下注射した。以上の実験は名古屋大学における動物実験等に関する取扱規定に従って行った。

【0064】

*L.monocytogenes*は、ヒトや動物などに広く生息するグラム陽性桿菌で、人畜共通感染症としてリステリア症を引き起こす原因菌として知られている。リステリア症は、乳幼児、高齢者、免疫不全者、基礎疾患のある人では脳脊髄膜炎や敗血症に進行する場合があります。致死率が高いことが報告されている。また、食品を感染経路とした感染症例も多数報告されていることから、食品衛生監視の中で重要視されるようになっている。食品からの*L.monocytogenes*の検査は、培養法が一般的であるが、検査に1週間かかるということから、サンプルを流すだけで迅速に*L.monocytogenes*の有無を確認することのできるイムノクロマトキット等が使われ始めている。そのため、食品業界における抗*L.monocytogenes*抗体の需要は今後も高まっていくと予想されることから、より安価かつ迅速に親和性の高い抗*L.monocytogenes*抗体を作製する方法を確立することは、食品企業の食の安全性確保において大きな利益をもたらすであろう。

【0065】

1-2. ウサギ末梢血からのリンパ細胞の単離

抗体価の上昇が確認できた個体から、名古屋大学における動物実験等に関する取扱規定に従い、耳静脈より採血を行った。得られた16 mlの血液サンプルを4 mlずつにわけ、2 mlのPBSを加え懸濁した。その後、4.5 mlずつのPancoll(フナコシ株式会社)を新しいサンプルチューブに入れ、その上に懸濁した血液サンプルを乗せるように加えた。サンプルチューブを遠心した(400×g, 40分, RT)。遠心後のサンプルは何層かに分離するが、最上層は血液のプラズマ層(血清層)であり、抗体価測定用に採取し、4℃に保存した。そしてその下の層にあるB細胞の集まりを新しいサンプルチューブに8 ml採取した。採取したB細胞溶液に3倍量のPBSを加え、400 gで10分遠心し、上清を捨て、1 mlのPBSに再懸濁した。これをリンパ細胞溶液とした。

【0066】

1-3. 非特異的結合リンパ細胞の除去

磁気ビーズと非特異的に結合するリンパ細胞を除くため、磁気ビーズを用いた非特異的結合リンパ細胞の除去を行った。尚、磁気ビーズはE. coli 0157に対するヤギポリクローナル抗体が結合した磁気ビーズであるNHビーズSepa-Max(登録商標) 0157(以下、NHビーズ)(コスモ・バイオ(株))又は、磁気ビーズ表面にストレプトアビジンが結合しているDynaBeads M-280 Streptavidin(以下、SAビーズ)(Invitogen)を使用した。1-2.調製したリンパ細胞溶液1 mlとNHビーズ又はSAビーズ5 µlを混合し室温で2分間静置した後、磁気スタンドにセットし、上清を回収し、これを以降の実験に用いた。

【0067】

1-4. 抗体提示B細胞(IgM提示B細胞)の濃縮

抗原に特異的に結合する抗体を細胞表面に提示する細胞の濃縮を行った。抗原と磁気ビーズの複合体を形成させた後、抗原とビーズ複合体と結合したB細胞を磁気スタンドを用いて回収することで、抗原特異的IgM提示B細胞の単離を行った。磁気ビーズにはSAビーズを使用し、抗原には*L. monocytogenes*の生菌体を使用した。

【0068】

1-4(a). 菌液の調製

抗原として用いる*L. monocytogenes*をBrain Heart Infusion(Bacto)でそれぞれ15時間振盪培養した。培養液を3,000 rpm、10分間遠心分離して上清を除き、PBSを加えて洗浄した。同様の操作を再度行った後、PBS 100 µlに懸濁して以下の操作に使用した。

【0069】

1-4(b). 抗原*L. monocytogenes* のビオチン化

抗原*L. monocytogenes* 50 µl(2.0×10^9 個)と100mM ビオチン 1 µl(終濃度 1 mM)を混合

し、50mM MESバッファー(pH=5.0)を加え100 μ lにした後、回転盤（マイクロチューブローター-MTR-103(アズワン株式会社)）を用いて室温で15分撹拌させた(1分間に7~8回転程度)。更に、EDCを3mg加えて回転盤を用いて室温で2時間撹拌させた。その後、遠心分離(3000rpm, 5分, RT)し、上清を捨て、沈殿を100 μ lのPBSに懸濁させた。これをビオチン化抗原溶液とした。

【0070】

1-4(c). ビオチン化抗原とSAビーズの複合体形成

ビオチン化抗原溶液100 μ lとSA beads 100 μ l(6×10^7 beads)を混合し、回転盤を用いて室温で1時間撹拌させた。PBS溶液200 μ lによる洗浄を行い、PBS溶液100 μ lに懸濁した。抗原とビーズの複合体を含む溶液を磁気スタンドにセットし氷上で10分間静置し、上清を除去して、ビーズを100 μ lのPBS溶液で洗浄した。再び磁気スタンドにセットし氷上で5分静置し、上清を除去して、100 μ lのPBSに懸濁した。抗原とビーズの複合体が形成されていることを、普通染色を用いて確認した。

【0071】

1-4(d). 抗原特異的抗体提示B細胞(IgM提示B細胞)の単離

1-4(c).で得られた抗原とビーズの複合体を含む溶液100 μ lとB細胞を含む溶液100 μ lを混合し、回転盤を用いて室温で1時間撹拌させた。磁気スタンドにセットし氷上で10分間静置し、上清を除去して、200 μ lのPBS溶液で洗浄した。再び磁気スタンドにセットし氷上で5分静置し、上清を除去して、200 μ lのPBSに懸濁した。この細胞を含む溶液の細胞濃度を、ビュルケルチュルク血球計測盤(日本臨床機器工業株式会社)と顕微鏡(OLYMPUS M021)を使用して測定した。

【0072】

1-5. マイクロマニピレーターを使用した一細胞の単離

1-4(d).で得られたリンパ細胞溶液から顕微鏡下でマイクロマニピレーターを用いて抗原特異的IgM提示B細胞を一細胞ずつ単離した。リンパ細胞溶液を 1.0×10^4 個/mlになるようにPBSで希釈し、シャーレに100 μ l撒いた。顕微鏡でビーズ-抗原-B細胞複合体を確認し、先端に2.5 μ lのPBSを充填したパスツールを用いて細胞を吸引することで単離し、D EPC water (Invitrogen)とRNase OUT(Invitrogen)が予め入っているマイクロチューブにパスツールの先端ごと折り、細胞を回収した。

【0073】

1-6. プライマーの再設計

ウサギの末梢血を用いたSICREX法の更なる効率化のため、ウサギの抗体遺伝配列に会合するプライマーを再設計した。尚、これらのプライマーは、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(Kabat et al.,1991)とIMGTのデータベースから配列データを集め、すべての配列をMultalinを用いて並び替えて比較し、抗体配列を網羅できるプライマーを設計した。

【0074】

1-7. 一細胞逆転写PCRと2段階PCRによる抗体遺伝子の増幅

用いたプライマーの配列を図12~15に示した。PCRはVeriti™ (Applied Biosystem, USA)もしくはC1000™ Thermal Cycler(Bio-Rad)を使用した。cDNAの調製はSUPERScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen, USA)を用い、製品のプロトコルに従って行った(47℃ 90分、70℃ 15分、4℃放置)。尚、その際、コンタミネーションの有無を確認するため、細胞が入っていないウェルをコントロールとして用いた。次にH鎖とL鎖の遺伝子を別々に増幅するため、合成したcDNAを鋳型として2段階のPCRを行った。1st PCRではLA Taq HS™ DNA polymerase(タカラバイオ(株))を用いた(94℃ 3分の後、94℃ 30秒、55℃ 45秒、72℃ 45秒で25サイクル、72℃ 7分、4℃放置)。続いて、1st PCR産物を鋳型とし、Tks Gflex DNA polymerase (タカラバイオ(株))を用いて2nd PCRを行った(94℃ 1分の後、98℃ 10秒、50℃ 15秒、68℃ 30秒で25サイクル、68℃ 7分、4℃放置)。尚、上記のPCR操作は全て96穴プレートを用いて行った。

【0075】

1-8. シークエンス解析

TAクローニングを行うため、LA TaqTM DNA polymerase(タカラバイオ(株))を用いたPCRにより、2nd PCR産物の配列の末端にAを付加した。続いて、PCR産物をpGEM-T easy vectorとDNA Ligation Kit (Mighty Mix)(タカラバイオ(株))を用いてTAクローニングを行った。ヒートショック法によってE. coli DH5 α コンピテントセルを形質転換し、終濃度アンピシリン50 μ l /ml、IPTG 40 μ l /ml、4 % X-galを無菌的に加えたLBプレートに塗布し、37℃で15時間培養した。得られた白コロニーを爪楊枝で採取し、20 μ lのNaOHに懸濁してアルカリ融解を行い、そのうちの1 μ lを鋳型としてPCRを行った(94℃ 5分の後、94℃ 10秒、50℃ 20秒、72℃ 1分30秒で25サイクル、72℃ 7分、4℃放置)。尚、このPCRでは図16に示したプライマーを用いた。PCR後の溶液をFast Geneゲル/PCR抽出キット(Fast Gene)により精製した。このうち1 μ lを鋳型としBig Dye Terminator Ver.3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用い、キットに添付されているプロトコルに従ってシークエンス反応を行った。尚、反応後、エタノール沈殿を行い、DNAを回収した。回収したDNAにHi-Di Formamide (Applied Biosystems)を15 μ l加え、名古屋大学遺伝子実験施設のABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)でシークエンス解析を行った。

10

【0076】

1-9. Fab発現のためのDNA構築

1-7.で得られた抗体遺伝子に無細胞タンパク質合成の際の転写・翻訳反応に必要な配列であるT7PとT7Tを以下に示す手順で付加した。上記T7P、T7T配列はそれぞれpRSET-B vector (Invitrogen)を鋳型としたPCRによって増幅を行った(94℃ 5分の後、96℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒で25サイクル、72℃ 7分、4℃放置)。T7P配列はプライマーpRSET-T7PFとpRSET-T7PRを用いて増幅した。また、T7T配列はプライマーpRSET-T7TF-OL-RとpRSET-T7TRを用いて増幅を行った。続いて、プロモーターとターミネーターを含む遺伝子断片をオーバーラップPCRによりIn-FとIn-Rを用いて増幅した(94℃ 1分の後、98℃ 10秒、50℃ 15秒、68℃ 45秒で25サイクル、68℃ 7分、4℃放置)。これらのPCRに用いたプライマーを図17に示した。

20

【0077】

1-10. 無細胞タンパク質合成系での抗体分子の合成

無細胞タンパク質合成反応は以前Jiangらによって開発された系(Jiang, X. P., Y. Ookubo, I. Fujii, H. Nakano, and T. Yamane, 2002, Expression of Fab fragment of catalytic antibody 6D9 in an Escherichia coli in vitro coupled transcription/translation system: Febs Letters, v. 514, p. 290-294.)に改善を加えた系で行った。オーバーラップPCR産物を鋳型として図4に示した無細胞タンパク質合成反応液を加え、30℃で1時間反応させた。この際、鋳型が入っていない無細胞タンパク質合成反応液をコントロールとしてインキュベートした。反応後は無細胞タンパク質合成反応液を氷上に移し、反応を停止させた。

30

【0078】

1-11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

まず、PBSで10 μ g/mlに希釈したL. monocytogenes 死菌体溶液を50 μ lずつ分注し、4℃で一晩インキュベートすることで抗原をプレートに固定した。プレートをPBSで1回洗浄した後、4% スキムミルク溶液を400 μ lずつ分注し45分ブロックングを行った。次にプレートをPBSTで2回洗った後、1-10.で調製した抗体分子(無細胞反応溶液をPBSで希釈した溶液)を50 μ lずつウェルに加え、37℃で2時間反応させた。プレートを3回PBSTで洗った後、二次抗体のAnti-rabbit IgM+IgG (H+L)-poly HRP conjugate(フナコシ(株))を2,000倍希釈した溶液を100 μ lウェルに加え、室温で2時間反応させた。3回PBSTで洗った後、OPD基質溶液(2 mg/ml o-phenylenediamine (和光純薬工業(株)), 0.009 % H₂O₂)を100 μ l加え37℃で10分から30分間反応させた。50 μ lの2 M H₂SO₄を加え反応を停止させた後、492 nmの吸光を測定した。測定はマイクロプレートリーダー(SPECTRA MAX 250 (Wako))を用いて行った。

40

【0079】

50

1-12. 抗*L. monocytogenes* ウサギFab-LZ複合体発現のためのDNA構築

1-7.で得られた抗体遺伝子をFab-LZ複合体として発現させるためのDNA構築を以下に示す手順で行った(図18)。プライマーraV-Lc-1FとH鎖及びL鎖の定常領域のC末端に特異的に結合するプライマーで増幅した(94℃ 1分、98℃ 10秒、55℃ 15秒、68℃ 30秒で25サイクル、68℃ 7分、4℃ 放置)。これらのPCRに用いたプライマーを図19に示した。増幅した遺伝子断片を鋳型として、1-1-4.に記載した方法と同様にオーバーラップPCRでT7PとLZ-T7Tを付加させた後(Hc遺伝子にT7T-LZA断片、Lc遺伝子にT7T-LZB断片を付加)、無細胞タンパク質合成系により発現させた。

【0080】

2. 結果・考察

2-1. 磁気ビーズを用いた抗体提示B細胞(IgM提示B細胞)の濃縮の検討

SAビーズと*L. monocytogenes*の複合体及び磁気スタンドを用いて抗原に特異的な抗体を提示する細胞を濃縮した。その結果、約10,000個の細胞が獲得できた。また、顕微鏡で観察したところ、SAビーズとB細胞が抗原である*L. monocytogenes*を介して結合している様子を観察することができた。この濃縮では抗原である*L. monocytogenes*と磁気ビーズの複合体で選択しているので、原理的には*L. monocytogenes*を認識するような抗体を提示している細胞が特異的に選択される。尚、磁気ビーズに非特異的に結合するB細胞を除去する操作を予め行っているため、この方法を用いて抗原に特異的な抗体を提示している細胞を濃縮できたと判断した。濃縮したB細胞溶液を顕微鏡下で磁気ビーズ-抗原-B細胞複合体を確認しながらマイクロマニピュレーターを用いて一細胞ずつ、合計13個の細胞を単離した。単離した13個の細胞をRT-PCRの鋳型として用いて一細胞RT-PCRを行った。

【0081】

2-2. RT-PCRと二段階PCRによる一細胞由来抗体遺伝子の増幅

1-5.で単離した抗原特異的抗体提示B細胞を用いて一細胞由来抗体遺伝子の増幅を試みた。マイクロマニピュレーターにより単離した13個の細胞を用いて逆転写反応と二段階のPCRにより抗体遺伝子を増幅し、電気泳動を行った(図20)。この結果、L鎖では13細胞中6細胞において約700bp付近にバンドが確認された。このことから、L鎖の場合には設計したプライマーがウサギのL鎖の抗体遺伝子配列を完全に網羅できていないことが示唆された。よって、L鎖の遺伝子増幅について、プライマーデザイン、PCR条件等さらなる改善を行う必要があると考えられる。一方、H鎖ではIgM型の抗体遺伝子の増幅が全細胞において約700bp付近にバンドが確認された。このことから、設計したプライマーはIgM型の抗体遺伝子配列を網羅できていたことが示唆された。また、IgG型のH鎖が全細胞中2細胞において遺伝子増幅を確認することができた。No.16は細胞を鋳型として入れていないネガティブコントロールとしたが、そのウェルでの抗体遺伝子増幅は確認できなかった。このことからコンタミネーションの可能性は低いことが示唆された。H鎖、L鎖、両遺伝子で増幅が確認できた6ペア(IgM : No.1, No.6, No.9, No.12 IgG : No.4, No.9)をシーケンス解析した(実験方法 : 1-8.)。

【0082】

2-3. シーケンス解析

H鎖、L鎖、両遺伝子で増幅が確認できた6ペア(IgM : No.1, No.6, No.9, No.12 IgG : No.4, No.9)についてシーケンス解析を行った。得られた塩基配列をBLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)のデータベースを用いて類似する塩基配列を検索した結果、No.1, No.6, No.9, No.12はIgM型抗体遺伝子であり、No.4, No.9はIgG型抗体遺伝子であることが確認された。今回、RT-PCRの鋳型として用いた細胞は抗体提示B細胞であると考えていたが、IgG型の抗体遺伝子も増幅することができた。その理由として、IgG型の抗体を提示する記憶細胞も濃縮したリンパ細胞溶液中に存在していたことで、記憶細胞由来の抗体遺伝子を増幅したものと考えられる。

【0083】

2-4. 無細胞タンパク質合成系を用いたウサギFabの発現とその活性測定

1細胞/ウェルの条件で行ったRT-PCR及び二段階PCRより得られたH鎖、L鎖の抗体遺伝子

のうち、H鎖とL鎖の両方において遺伝子の増幅及びシーケンス解析をしたウェル No.1, No.4, No.6, No.9M, No.9G, No.12 の6ペアを鋳型としてオーバーラップPCRを行い、無細胞タンパク質合成系に必要なプロモーターやターミネーターの配列を付加した。オーバーラップPCR産物を鋳型とし、無細胞タンパク質合成系で合成したFabのL. monocytogenesに対する結合能を確認するためにELISAを行ったところ、どのサンプルにおいても有意な結合活性を確認することが出来なかった。この原因として、H鎖とL鎖間のジスルフィド結合によるFab形成の効率が低いことが、結合活性に影響を与えているのではないかと考えた。そのため、SDS-PAGEでのFab発現の解析を行った。

【0084】

2-5. SDS-PAGEでのウサギFabの発現解析

取得した6ペア(ウェル No.1, No.4, No.6, No.9M, No.9G, No.12)の抗体遺伝子のオーバーラップPCR産物を鋳型とし、無細胞タンパク質合成系で抗体を発現させ、Fabの発現の有無を調べるため蛍光リジンを用いたSDS-PAGEを行った。H鎖、L鎖ともに抗体の発現は確認できたものの、Fabの形成は見られなかった。この結果の要因として、ウサギ抗体の分子内及びH鎖L鎖間のジスルフィド結合は、システインの位置関係が複雑であることから、無細胞タンパク質合成系を用いた発現ではジスルフィド結合によるFab形成の効率が低いことが考えられた。ジスルフィド結合が形成されないことには、結合活性を測定することができたため、FabではなくH鎖及びL鎖の可変領域をポリリンカーを介して結合させた一本鎖抗体(scFv)として無細胞タンパク質合成系を用いて発現させ、その結合活性を調べることにした。

【0085】

2-6. ウサギFab-LZ複合体の発現と活性測定に基づく有効性の検討

ロイシンジッパー(以下、LZ)はタンパク質二量体を形成させる機能を持つことで知られている。その機能により、H鎖とL鎖がLZにより会合することでジスルフィド結合の形成効率に寄与するのではないかと仮定した。その有効性について検討するため、以下の実験を行った。まず、一本鎖抗体(scFv)として発現させた場合に結合活性を確認することができたウェル No.1, No.4 に加えてNo.9M, No.9Gの抗体遺伝子のH鎖及びL鎖にオーバーラップPCRを用いて無細胞タンパク質合成系に必要なプロモーターやターミネーター、LZの配列を付加した。無細胞タンパク質合成系で合成したFab及びFab-LZ複合体のL. monocytogenesに対する結合能を確認するためにELISAを行ったところ、全てのFab-LZ複合体のサンプルがFabの5倍程度の結合活性を有することが確認できた。この結合活性の上昇が、LZの α -ヘリックスの接着力によるFab形成効率の上昇によるものなのかを確認するため、蛍光リジンを用いたSDS-PAGEによりFab-LZ複合体の発現を解析した。尚、Fab-LZ複合体をコードする塩基配列の代表例(クローンNo.4)を図21に示す。

【0086】

2-7. SDS-PAGEでのウサギFab-LZ複合体複合体の発現解析

無細胞タンパク質合成系でFab-LZ複合体を発現させ、蛍光リジンを用いたSDS-PAGEを行い、LZの有効性を検討した。非還元SDS-PAGE(図22)及び、還元SDS-PAGE(図23)を行った結果、H鎖、L鎖ともに発現は確認できたものの、Fabの形成は見られなかった。このことから、LZによるH鎖とL鎖の会合がジスルフィド結合の形成効率の上昇に寄与するのではないことが判明した。しかし、ジスルフィド結合の形成が不十分であってもLZ間での α -ヘリックスの接着力によりH鎖とL鎖が隣接し、本来のコンフォメーションを形成することで結合活性が上昇したのではないかと考えられる。このことから、LZをFabのC末端に融合させることで、Fabの結合活性の上昇に寄与することが示唆された。

【0087】

3. まとめ

顕微鏡及びマイクロマニピュレーターを使用することで、濃縮した抗体提示B細胞から一細胞ずつ単離することが可能になった。また、Fab-LZ複合体として発現させることにより、Fabでは測定できなかった結合活性を確認することができた。

【0088】

C. 大腸菌による組み換え発現

In vivoでの抗体調製においてもLZA及びLZBの相互作用が有効に作用するかを調べるために、マウス抗大腸菌0157抗体No. 6 (1-1-4.の実験と同様のもの) のFab及びFab-LZを、タンパク質発現用大腸菌Shuffle T7 express E. coli (New England Biorabs)により発現させ、ELISA法により評価した。

【0089】

1. 発現プラスミドの構築

発現プラスミドを以下の通り構築した。まず、Fab発現ベクターの構築においては、抗0157抗体No.6のHc及びLcのFab領域をそれぞれプライマー1F (TTAAGAAGGAGAtatacatATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC (配列番号125)) と17R (TCCTTCTAGATTATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGGTACCGCCTGGAATGGGCACATGC (配列番号126)) のセット及び2F (TAATAATCTGAAGGAGATATCATATGGATGTTTTGATGACCCAAAC (配列番号127)) と18R (CATCGTCGTCCTTGTA GTCGGAACCGCCACACTCTTTCCTGTTGAAGCTC (配列番号128)) のセットで増幅した(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 2分で25サイクル、KOD plus (東洋紡)を使用)。また、同様にpET22bベクター (Novagen製) をプライマーpET22b-F (ccGACTACAAGGACGACGATGACAAATAATAAGATCCGGCTGCTAACAAAGC (配列番号129)) と pET22b-R (CATATGTATATCTCCTTCTTAA (配列番号130)) のセットにて増幅した(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 4分で25サイクル、KOD plusを使用)。これらを制限酵素DpnI (タカラバイオ)にて処理した後、DNA精製キットFastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス)により精製し、Gibson Assembly システム(New England Biorabs)を用いて連結反応させた。これによりDH5alphaヒートショックコンピテントセルを形質転換し50 µg/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地へ塗布することにより目的のプラスミドを有するコロニーを得た。

【0090】

Fab-LZ発現ベクターの構築においては、上記と同様に、抗0157抗体No. 6のHc及びLcのFab形成領域をそれぞれプライマー1Fと19R (AGCTGGGCGCTCCCACCACCGCCTGGAATGGGCACATGCAGATCTTTG (配列番号131)) のセット及び2Fと20R (CTGGGCGCTCCCACCACCGCCCACTCTTTCC TGTGAAGCTC (配列番号132)) のセットで増幅した(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 2分で25サイクル、KOD plusを使用)。pRSET-LZA、pRSET-LZBを鋳型としLZA及びLZB領域を増幅するPCRにおいてはそれぞれプライマーセット15F (GGCGGTGGTGGGAGCGCCAGCTCGAAAAGGAG (配列番号133)) と16R (TGATATCTCCTTCTAGATTATTAAGCGTAATCTGGAACATC (配列番号134)) 及び8F (GGCGGTGGTGGGAGCGCCAGCTCAAGAAGAAG (配列番号135)) とr9R (ATCGTCGTCCTTGTAGTCGGAACCGCCCTTCTGGGCCAGCTTCTTCTTC (配列番号136))を使用した(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 20秒で25サイクル、KOD plusを使用)。増幅したHc及びLZAをオーバーラップPCRにより連結させ、Lc及びLZBも同様に連結させた(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分で25サイクル、KOD plusを使用)。オーバーラップPCR産物及び上記同様のpET22b-FとpET22b-Rのセットにて増幅した直鎖状pET22bをGibson Assemblyシステムにより連結させ、目的のプラスミドを得た。

【0091】

以上の方法により得たFab発現ベクター (以下、pET22b-m6Fab) 及びFab-LZ発現ベクター (以下、pET22b-m6Fab-LZ) でShuffle T7 express E. coliをヒートショック法により形質転換した。尚、pET22bにて同様に形質添加したものをネガティブコントロールとして以後使用した。

【0092】

2. 抗体発現実験

形質転換体を50 µg/mLのアンピシリンを含むLB培地 (以下、LBA培地) 3 mLに接種し、37℃にて一晩振とう培養した。このうち100 µLをLBA培地20 mLへ植菌し、30℃にてOD600=0.5となるまで振とう培養した。これに1MのIPTGを無菌的に終濃度1 mMとなるよう添加して氷冷した後、16℃にて24時間振とう培養した。8000 G、10分の遠心分離により菌体を回収し、PBSにて懸濁し再度遠心分離することにより培地成分を除去した。菌体に1.5 mLのPBS及び直径0.1 mmのジルコニアビーズを数十mg加え2 mLのチューブに移し、氷冷下において

ビーズ破砕機（トミー精工 Micro Smash, MS-100R）により細胞を破砕した（5000 rpm, 30秒を5回繰り返し）。これを13000 rpmにて5分間遠心分離し上清を細胞破砕可溶性画分とした。本各分は4℃にて保存し以後の実験に使用した。

【0093】

3. ELISA

以下の変更点以外は、1-1-5.で示した方法に従った。まず、Nunc polysoap 96 well plateにOD600=0.1となるようPBSにて懸濁したE. coli 0157（GTC 03904, ナショナルバイオリソースプロジェクトより入手）の加熱死菌体懸濁液もしくは0.4% BSA（PBS中）を50 μL滴下し、4℃にて一晩静置することによりそれぞれをコーティングした。1次抗体として上述の細胞破砕可溶性画分、2次抗体としてHRP標識抗マウスFab抗体（BET A90-100P）を使用した。また、ブロッキング剤として0.4% BSAを用いた。検出反応においては、BMブルーPOD基質・可溶性（Roche）50 μLを添加し、室温にて10分間反応させた後に1 M硫酸液を50 μL添加することにより反応を停止した。プレートリーダー（Tecan, M200）により450 nmの吸光度を測定した。本方法により、大腸菌培養液あたりの抗体活性を知ることができる。

【0094】

その結果、図24に示すように、0157を抗原とした際Fab-LZはFabの約7.5倍高いシグナルを示した。このことから、Fab-LZはin vivoにおいても活性を有する状態で生産され、さらに無細胞タンパク質合成系にて調製したときと同様にFabと比較して著しく高いシグナルを示すことがわかった。以上より、LZの付加はin vitro（無細胞系）のみならずin vitroでもその効果が有効であることが示された。

【0095】

D. 比較実験

比較対照として、HcとLcの可変領域（V領域）にLZA及びLZBを付加したものを上記同様に大腸菌により組み換え生産し、ELISAにより評価した。まず、Hc及びのV領域をプライマー1Fと21R（CTGGGCGCTCCCACCACCGCCGTAAGCAAACCAGTCCTCGTC（配列番号137））のセット及び2Fと12R（GCTCCCACCACCGCCAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCC（配列番号138））のセットにより増幅した。これをFab-LZの発現プラスミドを作製したときと同様にLZA及びLZBフラグメントとそれぞれオーバーラップPCRにより連結させ、最後に、VH-LZA、VL-LZBの断片及び直鎖状pET22bをGibson Assembly システムにより連結させた（構築プラスミドを以下、pET22b-m6V-LZと表記）。発現条件及びELISA条件は上記と同様であるが、一次抗体のネガティブコントロールとしてpET22b形質転換体の可溶性画分その他、PBSのみも用いた。また、二次抗体として、HRP標識抗マウスFab抗体の他、FLAGタグに対する抗体（HRP標識抗FLAGタグ抗体：GTX77454, GeneTex）を使用した。尚、m6Fab、m6Fab-LZ及びm6V-LZの全ての発現プラスミドにおいてLcのC末端側にFlagタグ配列が付加されている。

【0096】

ELISAの結果を図25に示す。Aは二次抗体としてHRP標識抗マウスFab抗体、Bは二次抗体としてHRP標識抗FLAGタグ抗体を使用したときのものである。ネガティブコントロールやm6Fab、m6V-LZと比較すると、m6Fab-LZのシグナルが最も高いことがわかった。m6V-LZはネガティブコントロールと差が見られず、抗体として機能していないものと考えられた。このことから、V領域にLZを付加してもLZの効果が得られない場合があり、Fabの末端にLZを付加することの有効性が裏づけられた。

【産業上の利用可能性】

【0097】

本発明の調製法によれば、活性のあるFab抗体を効率的に調製することが可能となる。特に、発現系として無細胞タンパク質合成系を利用した場合には、操作の簡便化及び迅速化が図られ、短時間でFab抗体を調製することができる。本発明の調製法で得られた抗体には、研究用ツール、診断薬、医薬など、様々な用途への利用が期待される。

【0098】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこ

の発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

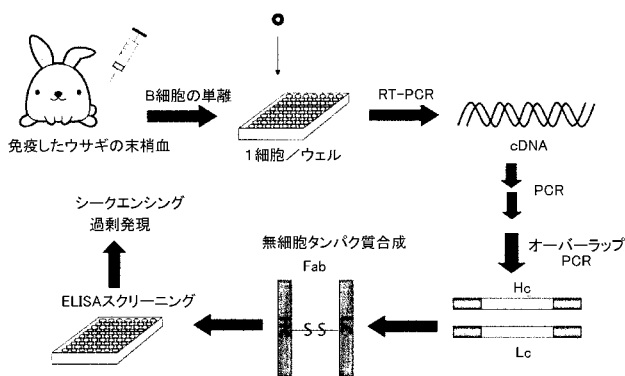
【配列表フリーテキスト】

【0099】

配列番号1：人工配列の説明：LZA
 配列番号2：人工配列の説明：LZB
 配列番号3：人工配列の説明：リンカー
 配列番号4～138：人工配列の説明：プライマー
 配列番号139：人工配列の説明：Hc-LZA複合体
 配列番号140：人工配列の説明：Lc-LZB複合体

10

【図1】



【図2】

pSKP-IFC-Fw	TAAGCTTGGCTGTTTGGCGG; 配列番号4
pSKP-IFC-Rv	ATGTATATCTCTGAGCTCGG; 配列番号5
HY-DebA-IFC-Fw	TCAGGAGATATACATATGAAAAAGATTGGCTGGCGCT; 配列番号6
HY-DebA-IFC-Rv	AAACAGCCAAGCTATATTTTCTGGGACAGATATTTCACT; 配列番号7
HY-DebC-IFC-Fw	TCAGGAGATATACATATGAAGAAGTTTATGTGTTACTTTG; 配列番号8
HY-DebC-IFC-Rv	AAACAGCCAAGCTATATTTTACCGCTGGTCATTTTGGTGTT; 配列番号9
mHc-pRSET-IFC-Fw	GAAAGAGATATACATATGCAGTCTGTGTAAGATCTGGTGG; 配列番号10
mHc-linker-Rv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号11
LZAFw	GGCGCTGGTGGAGCTGTGTGGCGCCAGCTGAAAGAGAGC; 配列番号12
LZARv	GCAGCGGATCATTAATTAAGCGTAATCTGGAACATGTAATGGTACATGATACCGGCTTCTGGGC; 配列番号13
raLc-pRSET-IFC-Fw	GAAAGAGATATACATATGGAGCTGTGTGACCCAGACCC; 配列番号14
raLc-linker-Rv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号15
LZBFw	GGCGCTGGTGGAGCTGTGTGGCGCCAGCTGAAAGAGAGC; 配列番号16
LZBRv	CTTGTAATCAGCGCCCTCTGGGCGCAGCTTCTTCTGAGGGCC; 配列番号17
RaHcH1ARv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号18
RaLcFLAGRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号19
No.6HcFw	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC; 配列番号20
No.6HcRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号21
No.6HcLZARv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号22
No.6LcFw	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC; 配列番号23
No.6LcRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号24
No.6LcLZBRv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号25
No.16HcHdMPw	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC; 配列番号26
No.16HcHdMRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号27
No.16HcHdMLZARv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号28
No.16HcHdGFw	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC; 配列番号29
No.16HcHdGRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号30
No.16HcHdGLZARv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号31
No.16LcFw	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC; 配列番号32
No.16LcRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号33
No.16LcLZBRv	CAGCTCCACCAACCCGCGCATGTGAGGGGCGCAACG; 配列番号34
No.23HcFw	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGGTCCAGCTGCAACAGTC; 配列番号35
No.23HcRv	GGCTTTGTAGCAGCGGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGATGTCGAGC; 配列番号36

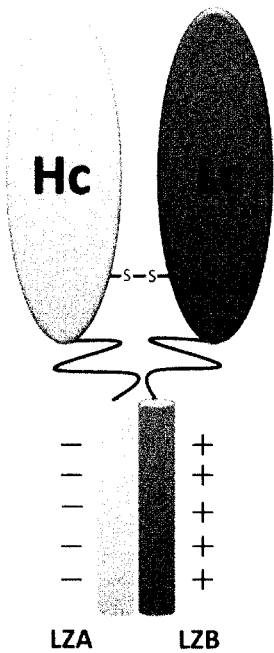
【 図 3 】

No.23LzFw	TTTAAGAAAGGAGATATACATATGGATGTTTGTGAGCCAAACTCCACTCTC: 配列番号37
No.23LzRv	GGCTTTGTAGCAGCCGGATTAAACACTCTTCCTGTGTAAGCTCTTG: 配列番号38
No.23LzLZBRv	CAGCTCCCACCACCGCCACACTCTTCCTGTGTAAGCTCTTG: 配列番号39
No.23HdLZARv	CAGCTCCCACCACCGCCTGGAAATGGGCACATGCAGATCTT: 配列番号40
pRSET+1FC-H/Ving-Fw	ACCATGTAACCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAATGATCCGGCTGCTAACAAAG: 配列番号41
pRSET+1FC-FLAGtag-Fw	GGGGGTGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAATGATCGGCTGCTAACAAAG: 配列番号42
pRSET+1FC-R	ATGTATATCTCCTCTTAAAGTTAAAC: 配列番号43
No.16LzGys-HARv	ACAATCCCTGGGCACAATTTCTTGTCCACGTGGTGC: 配列番号44
No.16LzGys-HAT7TFw	GAAAAATTGTGCCACGGGATTGTGGCGGTACCATGTACCCATACG: 配列番号45
pRSET+T7PR	ATGTATATCTCCTCTTAAAGTTAAACAAAAATTAT: 配列番号46
pRSET+T7TR	TCCGGCTGCTAACAAAGCC: 配列番号47
pRSET+TFP-OLF	CACTCGACATCGTAGCGCCCTGGTATCTTATAGTCCGTG: 配列番号48
pRSET+TTF-OLF-R	TCAACCAAGGACAAGCTTACAGGACGGGGAAAGCGCGGAA: 配列番号49
OLF	CACTCGACATCGTAGTGC: 配列番号50
OLF-R	TCAACCAAGGACAAGCTTACAG: 配列番号51

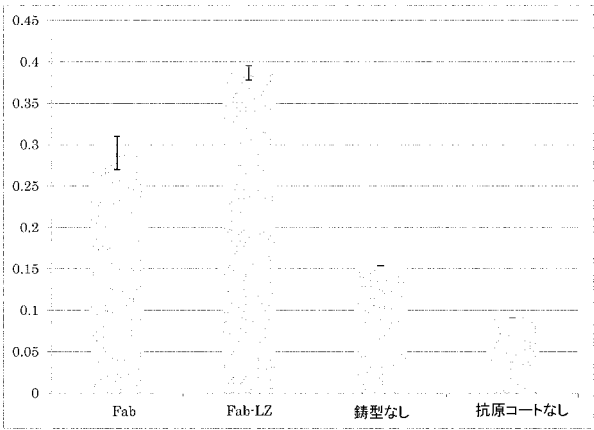
【 図 4 】

KOAc	100 mM
Mg(OAc) ₂	6 mM
リファンピシリン	0.01 mg/ml
クレアチンキナーゼ	0.16 mg/ml
GSSG	2 mM
GSH	0.1 mM
トリス酢酸(pH7.4)	55 mM
ATP	1.19 mM
GTP CTP UTP 混合物	1.11 mM
クレアチンリン酸ジナトリウム塩	60 mM
20 アミノ酸	2.1mM
フォルイン酸	34 µg/ml
<i>E.coli</i> tRNA	168 µg/ml
酢酸アンモニウム	35.8 mM
S30 抽出物 (BL21 Star (DE3)由来)	28.3 %(v/v)
鋳型 DNA	3.3~6.6 ng/µl

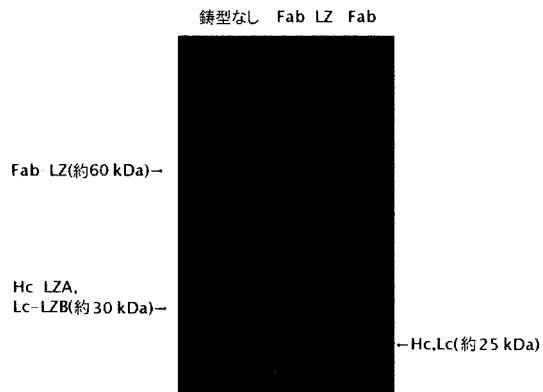
【 図 5 】



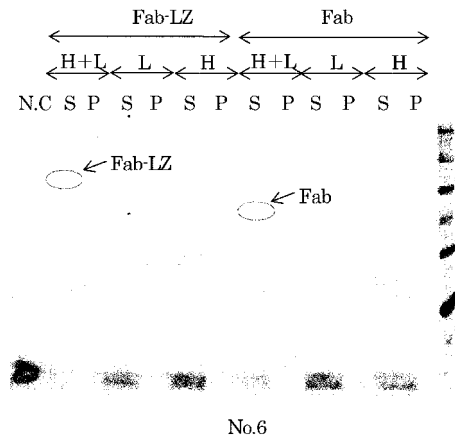
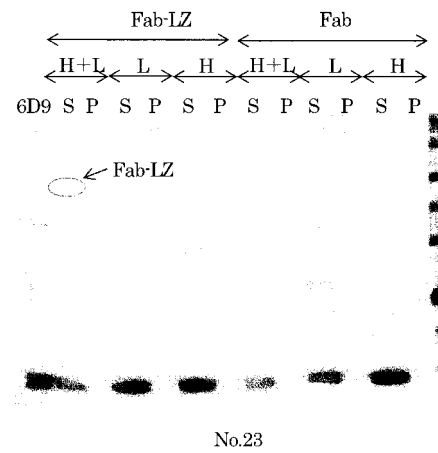
【 図 6 】



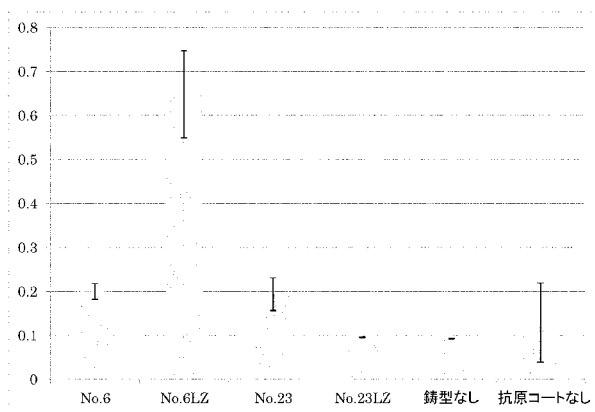
【図 7】



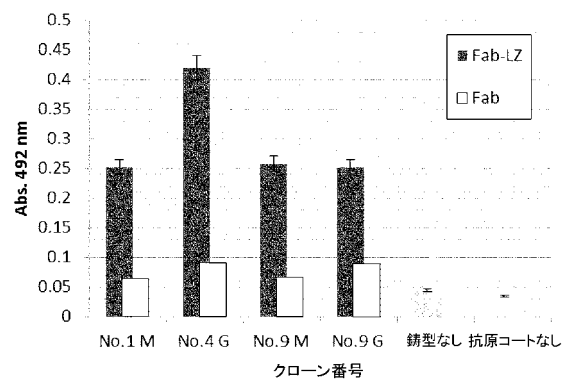
【図 8】



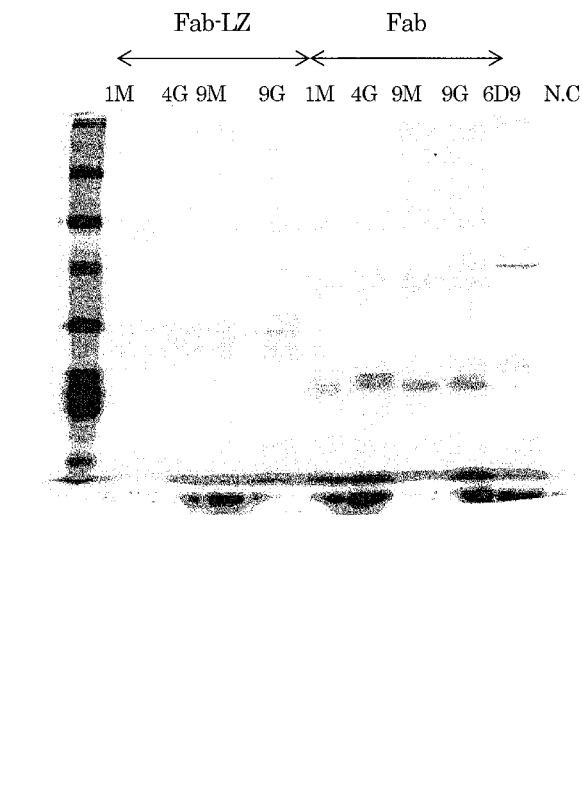
【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



【図 1 3】

2nd PCR (Hc)

名前	配列(5'→3')
ra-Hc-2nd-1F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGC AGC TGG AGC AGT CCG: 配列番号70
ra-Hc-2nd-2F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CCG TGA AGG AGT CCG: 配列番号71
ra-Hc-2nd-3F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CGT TGG AGG AGT CCG: 配列番号72
ra-Hc-2nd-4F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CCG TGG AGG AGT CCG: 配列番号73
ra-Hc-2nd-5F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGG AGC AGC TGA AGG AG: 配列番号74
ra-Hc-2nd-6F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CCG TGA AGG ACT CCG: 配列番号75
ra-Hc-2nd-7F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGG AGC AGT TGA AGG AGT C: 配列番号76
ra-Hc-2nd-8F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CCG TGG AGG AGT CC: 配列番号77
ra-Hc-2nd-9F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CCT TGG AGG AGT CC: 配列番号78
raClgM2	GGCTTTGTTAGCAGCGGATTAGGAAAGGACACTCGCAGGTC: 配列番号79

【図 1 2】

RT-PCR

名前	配列(5'→3')
raCL1-1	ACAGTCACCCCTATTGAAG: 配列番号52
raCL1-2	GCAGTCACCCCTGTTGAA: 配列番号53
raCL1-3	ACAGTTCTTCCTACTGAAGCT: 配列番号54
RaIgM-RT-PCR	GGACTTCGGTGTGCCAGA: 配列番号55

1st PCR (Lc)

名前	配列(5'→3')
raLS-Lc-1F	ATG GAC ACG AGG GCC CCC AC: 配列番号56
raCL1-1	ACAGTCACCCCTATTGAAG: 配列番号57
raCL1-2	GCAGTCACCCCTGTTGAA: 配列番号58
raCL1-3	ACAGTTCTTCCTACTGAAGCT: 配列番号59

1st PCR (Hc)

名前	配列(5'→3')
raLS-Hc-1F	ATG GAG ACT GGG CTG CGC TGG: 配列番号60
raClgM1	GGGAAAGGACACTCGCA: 配列番号61

2nd PCR (Lc)

名前	配列(5'→3')
ra-Lc-2nd-1F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CSC TTG TGA TGA CCC AGA CTC: 配列番号62
ra-Lc-2nd-2F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CAG CCG TGC TGC TGA CCC AGA: 配列番号63
ra-Lc-2nd-4F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG ACC CTR TGC TGA CCC AGA CTC: 配列番号64
ra-Lc-2nd-5F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CTC AAG TGC TGA CCC AGA CTC: 配列番号65
ra-Lc-2nd-1R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT ACC TAY TGA AGC TCT GGA CGA: 配列番号66
ra-Lc-2nd-2R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT AAC AGT CAC CCC TAT TGA AGC TCT GG: 配列番号67
ra-Lc-2nd-3R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT AGC AGT CAC CCC TGT TGA AGC TCT: 配列番号68
ra-Lc-2nd-4R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT ACA GTT CTT CCT ACT GAA GCT CAG G: 配列番号69

【図 1 4】

RT-PCR

名前	配列(5'→3')
raCL1-1	ACAGTCACCCCTATTGAAG: 配列番号80
raCL1-2	GCAGTCACCCCTGTTGAA: 配列番号81
raCL1-3	ACAGTTCTTCCTACTGAAGCT: 配列番号82
RaCH-RT-PCR	CTCGGGGTGCGTGAGAT: 配列番号83

1st PCR (Lc)

名前	配列(5'→3')
raLS-Lc-1F	ATG GAC ACG AGG GCC CCC AC: 配列番号84
raCL1-1	ACAGTCACCCCTATTGAAG: 配列番号85
raCL1-2	GCAGTCACCCCTGTTGAA: 配列番号86
raCL1-3	ACAGTTCTTCCTACTGAAGCT: 配列番号87

1st PCR (Hc)

名前	配列(5'→3')
raLS-Hc-1F	ATG GAG ACT GGG CTG CGC TGG: 配列番号88
Ra-Hc-1 st -1R	AGATCATGAGGGTCTCCTTC: 配列番号89

2nd PCR (Lc)

名前	配列(5'→3')
ra-Lc-2nd-1F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CSC TTG TGA TGA CCC AGA CTC: 配列番号90
ra-Lc-2nd-2F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CAG CCG TGC TGC TGA CCC AGA: 配列番号91
ra-Lc-2nd-4F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG ACC CTR TGC TGA CCC AGA CTC: 配列番号92
ra-Lc-2nd-5F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CTC AAG TGC TGA CCC AGA CTC: 配列番号93
ra-Lc-2nd-5F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGG CTC AAG TGC TGA CCC AGA CTC: 配列番号94
ra-Lc-2nd-1R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT ACC TAY TGA AGC TCT GGA CGA: 配列番号95
ra-Lc-2nd-2R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT AAC AGT CAC CCC TAT TGA AGC TCT GG: 配列番号96
ra-Lc-2nd-3R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT AGC AGT CAC CCC TGT TGA AGC TCT: 配列番号97
ra-Lc-2nd-4R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT ACA GTT CTT CCT ACT GAA GCT CAG G: 配列番号98

【図 15】

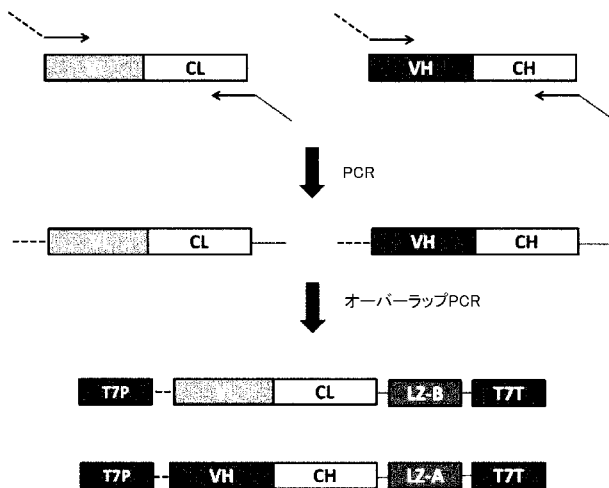
2nd PCR (Hc)

名前	配列(5'→3')
na-Hc-2nd 1F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGC AGC TGG AGC AGT CCG: 配列番号99
na-Hc-2nd 2F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CGG TGA AGG AGT CCG: 配列番号100
na-Hc-2nd 3F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CGT TGG AGG AGT CCG: 配列番号101
na-Hc-2nd 4F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CGC TGG AGG AGT CCG: 配列番号102
na-Hc-2nd 5F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGG AGC AGC TGA AGG AG: 配列番号103
na-Hc-2nd 6F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CGG TGA AGG ACT CCG: 配列番号104
na-Hc-2nd 7F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGG AGC AGT TGA AGG AGT C: 配列番号105
na-Hc-2nd 8F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CGG TGG AGG AGT CC: 配列番号106
na-Hc-2nd 9F	ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGC AGT CCT TGG AGG AGT CC: 配列番号107
Ra-Hc-2 nd -1R	GGC TTT GTT AGC AGC CGG ATT AGT GGG CAC GTG GGC TTG CTG: 配列番号108

【図 16】

名前	配列(5'→3')
M13-M1cc	CCAGTCACGCGTTGTA: 配列番号109
M13-RV	TCACACAGGAACAGCTATGAC: 配列番号110

【図 18】



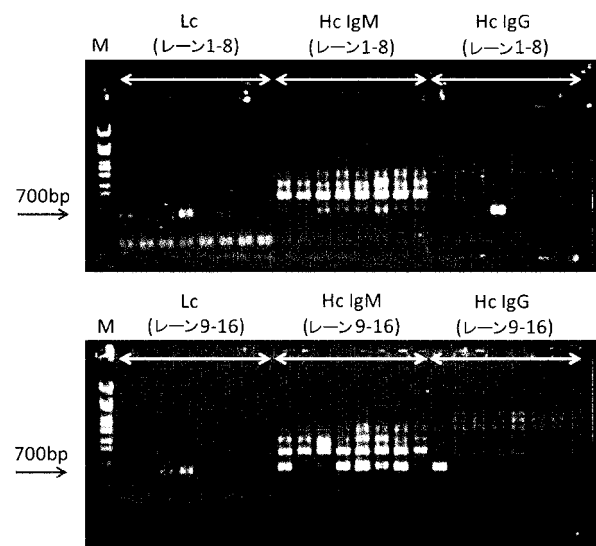
【図 19】

名前	配列(5'→3')
naClgM2-LZA	CAGCTCCCAACCAACCGCCGGAAAGGACACTCGCAGGTC: 配列番号119
naHc32nd1RLZA	CAGCTCCCAACCAACCGCGTGGCACTGGGCTTGCTG: 配列番号120
naLc2nd1RCysLZB	CAGCTCCCAACCAACCGCCACAGTTCTTCTCATYTAAGCTCTGACGA: 配列番号121
naLc2nd2RLZB	CAGCTCCCAACCAACCGCCACAGTCACCCCTATTGAAGCTCTGG: 配列番号122
naLc2nd3RLZB	CAGCTCCCAACCAACCGCCAGTCACCCCTGTTGAAGCTCT: 配列番号123
naLc2nd4RLZB	CAGCTCCCAACCAACCGCCAGTTCTTCTCACTGAAGCTCAGG: 配列番号124

【図 17】

名前	配列(5'→3')
Linker-nabHe1-F	ATCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCAGTCGGCTGGAGGAGTCC: 配列番号111
Linker-nabHe1-F	ATCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCAGTCGGTGGAGGAGTCC: 配列番号112
Linker-nabHe6-F	ATCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCAGTCGGTGGAGGAGTCC: 配列番号113
Linker-nabHe6-F	ATCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCAGTCAGTCGGTGGAGGAGTCC: 配列番号114
Linker-nabHe9-F	ATCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCAGTCGGTGGAGGAGTCC: 配列番号115
Linker-nabHe12-F	ATCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCAGTCAGTCGGTGGAGGAGTCC: 配列番号116
Ra-VH-R	GGCTTPTTAGCAGCTTGAATTAGATGTGACCAAGGTGCTT: 配列番号117
Linker-nabV1-R	AGAAACCGCCACCGCCGATCCACCACCTCCAGTAGGTGCAACTGGATCACC: 配列番号118

【図 20】

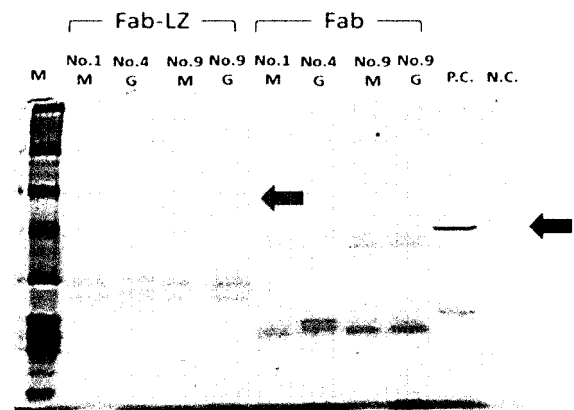


【図 2 1】

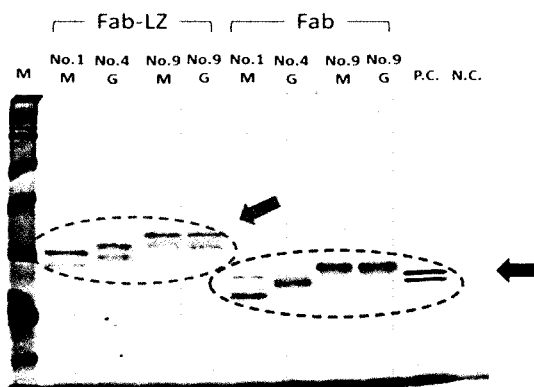
ATGCAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACTGCACAGCC
TCTGGATTCCCTTCAGTAGCAGTACTGGATATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTTGAGTGG
ATCGCATGCATTCTGTGTAGTAGTGGTAGCACTTACTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTGCCATT
TCCAGAGCCTCGTCCACACCGGTGACTTCCAAATGACCACTCTCACAGCCCGGACACGGCCACCTATTTC
TGTGCGAGAGCGGTGCTTATGCTGGTTGGGTCTGGACTTGTGGGGCCACGGCACCCCTGTCACCGTCTCC
TCAGGCGAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTACTGCGGGGACACACCAGCTCCACGGTG
ACCCGTGGCTGCTGGTCAAGGCTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAATCGGGCACCTCACC
AATGGGTACGCACTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCTCAGGCCTTACTCGGTGAGCAGCGTGTGAGCGTG
ACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAGTGGACAAGACCGTT
GGCCCTCGCATGCAGCAAGCCACCGTGGCGCGTGGTGGGAGCTGTGGTGGCGCCAGCTCGAAAAGGAG
CTGCAAGCCCTGGAGAAGGAGAACGCCAGCTCGAATGGGAGCTCCAGGCCCTGGAGAAGGAGCTGGCCAG
AAGGCGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAA (配列番号 139)

ATGGATGTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGGAGGAGCTGTGGGAGGCACAGTCAACATCAAGTGC
CAGGCCAGTCAGAAATTTACAGCAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTG
ATCTACAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGCAGTGGATCTGGGACAGAAATTC
ACTCTCAACATCAGCGACCTGGAGTGTCCGATGCTGCCACTTACTACTGCAATGTACTTGGTATGATAAT
ACTTATGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATC
TTCCCACCACTGCTGTAGTCAGTGGCACTGGAACAGTCAACATCGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCC
GATGTACACCTGACCTGGGAGTGGATGGCACCACCAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAACACCGCAG
AATTCGTCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCGACACACAGTACAACAGCCACAAA
GAGTACACCTGCAGGTGACCCAGGGCAGCACTCAGTCTGTCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTGGCGGT
GGTGGAGCTGTGGTGGCGCCAGCTCAAGAAGAAGCTGCAAGCCCTGAAGAAGAAGAAGCCAGCTCAAG
TGGAGCTCCAGGCCCTGAAGAAGAAGCTGGCCAGAAAGGCGGTGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAA
TGA (配列番号 140)

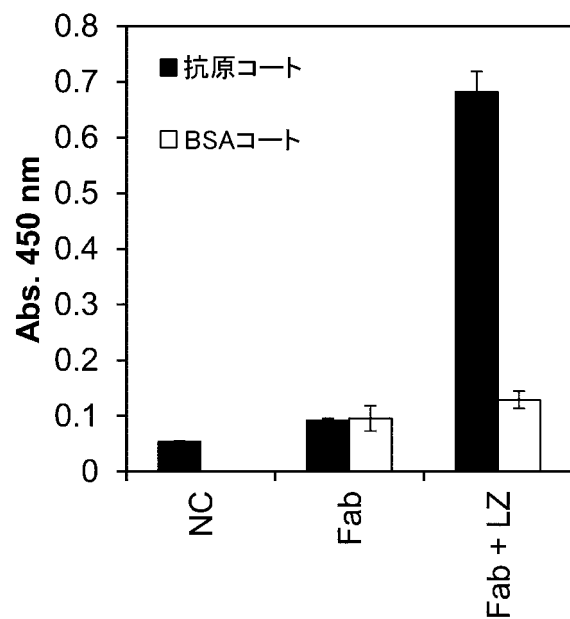
【図 2 2】



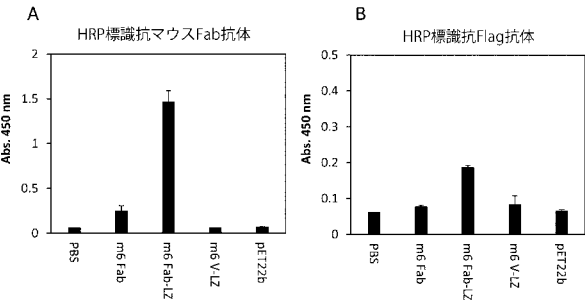
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【配列表】

2016002009000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 晃代

愛知県豊田市八草町秋合 1 2 6 7 番 1 公益財団法人科学技術交流財団内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 DA06 GA11 GA30 HA08

4B064 AG26 CA02 CA19 CA21 CA50 CC24 CD04 CD12 CD13 CD30

DA01 DA13 DA20

4H045 AA11 AA20 BA09 CA40 DA75 FA74