(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7697371号
(P7697371)

(45)発行日　令和7年6月24日(2025.6.24)

(24)登録日　令和7年6月16日(2025.6.16)

(51)国際特許分類		FI		
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C ZNA
G01N 33/545 (2006.01)		G01N	33/545	B
C07K 14/47 (2006.01)		C07K	14/47	
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	

請求項の数　7　（全22頁）

(21)出願番号　特願2021-561228(P2021-561228)
(86)(22)出願日　令和2年10月23日(2020.10.23)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/039893
(87)国際公開番号　WO2021/106453
(87)国際公開日　令和3年6月3日(2021.6.3)
審査請求日　令和5年8月18日(2023.8.18)
(31)優先権主張番号　特願2019-216784(P2019-216784)
(32)優先日　令和1年11月29日(2019.11.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2020-140434(P2020-140434)
(32)優先日　令和2年8月21日(2020.8.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
前置審査

(73)特許権者　000003160
東洋紡株式会社
大阪府大阪市北区梅田一丁目１３番１号
(72)発明者　三島　朱加
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡株式会社内
(72)発明者　角田　洋輔
滋賀県大津市堅田二丁目１番１号　東洋紡株式会社内
審査官　平林　由利子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　組換えＣ反応性タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

下記の（ａ）から（ｃ）のいずれかのポリペプチドからなる、ヒト由来のＣ反応性タンパク質を大腸菌で遺伝子組換えにより発現させ、取得したＣ反応性タンパク質の環化処理を行うことにより、該Ｃ反応性タンパク質の６５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、組換えＣ反応性タンパク質の製造方法。

（ａ）配列番号１または配列番号２に記載されたポリペプチド

（ｂ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド

（ｃ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列との同一性が９０％以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド

【請求項２】

Ｃ反応性タンパク質の環化処理を、ｐＨ７から１０の緩衝液中で、３７℃から５０℃の温度で６日以上行う、請求項１に記載の組換えＣ反応性タンパク質の製造方法。

【請求項３】

該Ｃ反応性タンパク質の７５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、請求項１または２に記載の組換えＣ反応性タンパク質の製造方法。

【請求項４】

該Ｃ反応性タンパク質の８５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、請求項１または２に記載の組換えＣ反応性タンパク質の製造方法。

【請求項５】

下記の（ａ）から（ｃ）のいずれかのポリペプチドからなる、６５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている組換えＣ反応性タンパク質の、抗Ｃ反応性タンパク質抗体が固定化されたラテックス粒子を用いた、ラテックス免疫比濁法により、検体中のＣ反応性タンパク質の定量における使用。

（ａ）配列番号１または配列番号２に記載されたポリペプチド

（ｂ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド

（ｃ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列との同一性が９０％以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド

【請求項６】

該Ｃ反応性タンパク質の７５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、請求項５に記載の検体中のＣ反応性タンパク質の定量における使用。

【請求項７】

該Ｃ反応性タンパク質の８５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、請求項５に記載の検体中のＣ反応性タンパク質の定量における使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、遺伝子組換え技術により生産されたＣ反応性タンパク質（Ｃ－ｒｅａｃｔｉｖｅ ｐｒｏｔｅｉｎ；以下、「ＣＲＰ」とも示す。）及びその用途に関する。より詳細には、ＣＲＰのＮ末端構造を変換された組換えＣＲＰ、及び、当該組換えＣＲＰを用いたキャリブレーター、管理血清、及び、抗体抗原反応によるＣＲＰの定量方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

ＣＲＰは肺炎球菌の莢膜のＣ多糖体と沈降反応を示すタンパク質であり、また急性期タンパク質の一種であることから代表的な炎症マーカーとしても知られている。感染症や炎症性疾患において、ＣＲＰの血中濃度は著しく増加し、また病状が回復に伴い急激に減少することから、ＣＲＰの定量は種々の疾患の重症度の判定、治療経過の観察の際の指標となる。健常人の血中のＣＲＰ濃度は、一般に０．３ｍｇ／ｄＬ以下であるが、炎症や炎症性疾患の患者の場合は、短時間で数百から数千倍にも急増する。このため、検体中のＣＲＰ測定において、低濃度から高濃度まで広範囲の濃度のＣＲＰを正確に測定することが求められている。

【０００３】

臨床検査分野における血中ＣＲＰ濃度の定量法として、抗原抗体反応を利用した測定方法があり、酵素免疫測定法、発光免疫測定法、ラテックス免疫比濁法、イムノクロマトグラフィー法等が知られている。特に、これらの測定方法のうち、ラテックス免疫比濁法が、操作が簡便かつ分析装置による測定の自動化が可能なことから日常検査に広く利用されている。ラテックス免疫比濁法では、濃度既知のキャリブレーターを用いた検量線から血中ＣＲＰ濃度を定量し、またその検量線の正確性は管理血清の測定により担保される。

【０００４】

上述のキャリブレーター及び管理血清には、腹水等のヒト体液から精製された天然型ＣＲＰが使用されているが、ＣＲＰ以外の血清成分が混入し、血中ＣＲＰ濃度の測定に影響を及ぼすリスクがある。また、ＣＲＰの単離、精製の段階で、生体原料となるヒト体液を取り扱うことから、病原性の二次感染のリスクもあり、製造における安全性にも課題がある。さらには、ヒト体液中のＣＲＰ含有量にはバラつきがあり、安定供給の側面からも問

題がある。一方、微生物等を利用した組換えＣＲＰは、ヒト体液を原料としないため、ヒト由来の血清成分の混入や二次感染のリスクがないことから、遺伝子工学技術による組換えタンパク質の安定的な発現システムを構築することができれば、目的のタンパク質を安定供給することができる。

【０００５】

微生物による組換えＣＲＰの発現に関しては、大腸菌や酵母等で成功例が既に報告されている（特許文献１，非特許文献１）。しかし、ラテックス免疫比濁法による組換えＣＲＰ濃度の測定において、ＣＲＰ高濃度域で実際のＣＲＰ濃度より測定値が低値で検出されるという問題があった。従って、キャリブレーターや管理血清等に組換えＣＲＰを診断薬原料として使用するには、ＣＲＰ高濃度域における測定の正確性を向上させる必要がある。

【０００６】

多くのタンパク質は翻訳後修飾により、化学的特性または構造的変換が起こる。翻訳後修飾の一つとして、グルタミンもしくはグルタミン酸のカルボキシル基とアミノ基が分子内縮合反応を起こすことによりピログルタミン酸に変換される、ピログルタミル化がある。動植物はピログルタミル化により修飾されたピログルタミルペプチドを多数保有しており、β―アミロイドやコラーゲン、ＩｇＧ$_2$等のタンパク質が存在する。ＣＲＰもピログルタミルペプチドである。しかしながら、組換えＣＲＰにはＮ末端がグルタミンのままのものと、ピログルタミル酸に変換されたものが混在していることが報告されている（非特許文献２）。このようなＣＲＰのＮ末端構造とラテックス免疫比濁法における抗体抗原反応との関係性については、これまでに報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

特許文献１：特開２０００－１４３８８号公報

【非特許文献】

【０００８】

非特許文献１：ＴＯＳＨＩＯ ＴＡＮＡＫＡ ｅｔ ａｌ．，ＢＩＯＣＨＥＭ ＢＩＯＰＨＹＳ ＲＥＳ ＣＯＭＭＵＮ．，２９５（２００２），ｐ１６３－１６６

非特許文献２：臨床検査，Ｖｏｌ．４６，Ｎｏ．９，ｐ９７３－９８１（２００２年9月）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

本発明の課題は、特にラテックス免疫比濁法を用いた場合に、ＣＲＰ高濃度域における測定の正確性を向上させることにある。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意研究を行った結果、組換えＣＲＰのＮ末端構造を変換することによって、上記課題を克服する方法を見出した。具体的には、インタクトＭＳにより測定して、全体の５５％以上のＮ末端がピログルタミル化された組換えＣＲＰを用いることで、ＣＲＰ高濃度域におけるＣＲＰ濃度を正確に測定することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【００１１】

本発明の具体的な態様としては、以下に示す通りである。

項１．遺伝子組換えにより生産されたＣ反応性タンパク質であって、該Ｃ反応性タンパク質の５５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている組換えＣ反応性タンパク質。

項２．該Ｃ反応性タンパク質の６５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、項１に記載の組換えＣ反応性タンパク質。

項３．該Ｃ反応性タンパク質の７５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、項１に記載の組換えＣ反応性タンパク質。

項４．該Ｃ反応性タンパク質の８５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている、項１

に記載の組換えＣ反応性タンパク質。
項５．組換えＣ反応性タンパク質が、細菌による組換えタンパク質である、項１から４のいずれかに記載の組換えＣ反応性タンパク質。
項６．細菌が大腸菌である項５に記載の組換えＣ反応性タンパク質。
項７．Ｃ反応性タンパク質がヒト由来である、項１から６のいずれかに記載の組換えＣ反応性タンパク質。
項８．Ｃ反応性タンパク質が、下記の（ａ）から（ｃ）のいずれかのポリペプチドからなる、項１から７のいずれかに記載の組換えＣ反応性タンパク質。
（ａ）配列番号１または配列番号２に記載されたポリペプチド
（ｂ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド
（ｃ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列との同一性が９０％以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド
項９．項１から８のいずれかに記載のＣ反応性タンパク質を含むキャリブレーター。
項１０．項１から８のいずれかに記載のＣ反応性タンパク質を含む管理血清項１１．項９に記載のＣ反応性タンパク質を含むキャリブレーターを用いて検体中のＣ反応性タンパク質を定量する方法。
項１２．項１０に記載のＣ反応性タンパク質を含む管理血清を用いて検体中のＣ反応性タンパク質を定量する方法。
項１３．抗Ｃ反応性タンパク質抗体が固定化されたラテックス粒子を用いた、ラテックス免疫比濁法により、項１１または１２に記載の検体中のＣ反応性タンパク質を定量する方法。
【発明の効果】
【００１２】
本発明の組換えＣＲＰは、ラテックス免疫比濁法によるＣＲＰ高濃度域における測定の正確性を向上させることができ、管理血清あるいはキャリブレーターに用いる診断薬用原料として有用である。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】実施例３において、組換えＣＲＰ１のＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った結果を示す図である。
【図２】実施例３において、組換えＣＲＰ２のＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った結果を示す図である。
【図３】実施例５において、各種ＣＲＰ１のＬＣ／ＭＳの溶出時間１．７～２．０分の平均の１０価のイオンを拡大したスペクトルの比較検討を行った結果を示す図である。
【図４】実施例５において、各種ＣＲＰ２のＬＣ／ＭＳの溶出時間１．７～２．０分の平均の１０価のイオンを拡大したスペクトルの比較検討を行った結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
（Ｃ反応性タンパク質のポリペプチド）
本発明の組換えＣＲＰは、例えばヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヤギなどに哺乳類に由来するＣＲＰが挙げられる。その中でも、ヒト、イヌ又はネコ由来のＣＲＰがより好ましく、さらにはヒト由来のＣＲＰが特に好ましい。
【００１５】
本発明の実施形態の一つは、下記の（ａ）～（ｃ）のいずれかのポリペプチドからなるＣＲＰである。
（ａ）配列番号１または配列番号２に記載されたポリペプチド。
（ｂ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個の

アミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド。
（ｃ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列との同一性が９０％以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド。
【００１６】
上記（ａ）のポリペプチドにおいて、配列番号１または配列番号２は２０６アミノ酸からなる成熟型ＣＲＰのアミノ酸配列である。本発明の組換えＣＲＰを、グラム陰性菌等で菌体外に発現させる場合には、宿主に合わせた適当な分泌シグナルを付与してもよく、その場合のアミノ酸配列は、配列番号３または配列番号４に示すように、全長で２２７アミノ酸からなる。この中で、２２位から２２７位までの２０６アミノ酸は配列番号１または配列番号２の成熟型ＣＲＰに相当し、メチオニンから２１位までは分泌シグナルのアミノ酸配列である。本発明の組換えＣＲＰを菌体内で発現させる場合には、分泌シグナルを削除してもよい。
【００１７】
本発明の組換えＣＲＰは、上記（ａ）に限定されるのではなく、
（ｂ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド、または、
（ｃ）配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列との同一性が９０％以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチド、
であってもよい。
【００１８】
上記（ｂ）のポリペプチドにおいて「数個」の下限は２個である。上限は抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性が維持される限り数は制限されないが、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造や抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を大きく損なわない範囲である必要がある。例えば、全アミノ酸の２０％未満に相当する数であり、好ましくは１５％未満に相当する数、さらに好ましくは１０％未満に相当する数、さらに好ましくは５％未満に相当する数、さらに好ましくは１％未満に相当する数である。換言すれば、個数とは、例えば、４１個以下、好ましくは３１個以下、さらに好ましくは２１個以下、さらに好ましくは１０個以下、さらに好ましくは５個以下、さらに好ましくは４個以下、さらに好ましく３個以下である。
【００１９】
上記（ｃ）のポリペプチドにおいて、上記（ａ）に示されるアミノ酸配列との同一性は８０％以上であることが好ましい。この同一性は、好ましくは８５％以上であり、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、より好ましくは９９％以上である。
【００２０】
アミノ酸配列の同一性は、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができる。本発明においては、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）が公開している相同性検索プログラムであるＢＬＡＳＴのウェブサイトにおいてｂｌａｓｔｐを選択しデフォルト（初期設定）のパラメータを用いることにより、同一性を算出する。
【００２１】
あるポリペプチドが抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するかどうかは、後述の「Ｃ反応性タンパク質の濃度測定方法」においてラテックス粒子の凝集反応が起こり、ＣＲＰ濃度が測定できるかどうかで判断する。
【００２２】
抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するタンパク質の改変体及びその遺伝子

は、例えばＴｒａｎｓｆｏｒｍｅｒＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ；Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ製、ＥＸＯＩＩＩ／Ｍｕｎｇ Ｂｅａｎ Ｄｅｌｅｔｉｏｎ Ｋｉｔ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ Ｓｉｔｅ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ；東洋紡製などの市販のキットやＰＣＲ法を利用して、配列番号１または配列番号２に記載のアミノ酸をコードする塩基配列を改変することによって得ることができる。得られた遺伝子によってコードされるタンパク質の抗原性は、例えば、得られた遺伝子を大腸菌に導入して形質転換体を作成し、この形質転換体を培養してタンパク質を生成させ、この形質転換体、この形質転換体の菌体破砕液もしくは精製したタンパク質を、後述の「Ｃ反応性タンパク質の濃度測定方法」で測定することによって確認することができる。

【００２３】

（Ｃ反応性タンパク質のＤＮＡ）

本発明の組換えＣＲＰをコードするＤＮＡは、例えばヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヤギなどに哺乳類に由来するＣＲＰをコードするＤＮＡが挙げられる。その中でも、ヒト、イヌ又はネコ由来のＣＲＰをコードするＤＮＡがより好ましく、さらにはヒト由来のＣＲＰをコードするＤＮＡが好ましい。

【００２４】

本発明の実施形態の一つは、下記の（ｄ）～（ｆ）のいずれかのＤＮＡからなるＣＲＰである。

（ｄ）上記（ａ）から（ｃ）のいずれかのＣＲＰのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ

（ｅ）配列番号５または配列番号６に示される塩基配列からなるＤＮＡ

（ｆ）配列番号５または配列番号６に示される塩基配列において、１若しくは数個の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加した塩基配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ

（ｇ）配列番号５または配列番号６に示される塩基配列との同一性が８０％以上である塩基配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ。

【００２５】

上記（ｄ）のＤＮＡにおいて、本発明のＣＲＰのアミノ酸配列は、上記の（ａ）～（ｃ）のいずれかに示されるＣＲＰのアミノ酸配列である。本発明のＤＮＡでは、前記アミノ酸配列における各アミノ酸に対応するコドンが複数ある場合は、その選択には特に制限はない。具体的には、（ｅ）配列番号５または配列番号６に示される塩基配列からなるＤＮＡが例示される。

【００２６】

なお、上述したように分泌シグナル配列を付与させる場合には、配列番号７または配列番号８に示されるＤＮＡを用いるのがよい。配列番号７または配列番号８は、上述の配列番号３または配列番号４のアミノ酸配列で示されるＣＲＰの全長における、２２位から２２７位までの２０６アミノ酸は成熟型ＣＲＰと、メチオニンから２１位までの分泌シグナルに相当する部分をコードしている。

【００２７】

また、本発明のＤＮＡは、上記のものに限定されるのではなく、

（ｆ）配列番号５または配列番号６に示される塩基配列において、１若しくは数個の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加した塩基配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ、または、

（ｇ）配列番号５または配列番号６に示される塩基配列との同一性が８０％以上である塩基配列からなり、かつ、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ、

であってもよい。

【００２８】

また、本発明のＣＲＰをコードするＤＮＡを、大腸菌等の由来生物以外の宿主に組込ん

で、本発明のＣＲＰを発現させる場合、発現効率向上のため、宿主生物のコドンユーセージに合わせて塩基配列を変更してもよい。

【００２９】

上記（ｆ）のＤＮＡにおいて、「数個」の下限は２個である。上限は、そのＤＮＡがコードするポリペプチドの抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性が維持されている限り数は制限されないが、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造や抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を大きく損なわない範囲である必要がある。例えば、改変前のポリペプチドの全アミノ酸の２０％未満に相当する数であり、好ましくは１５％未満に相当する数、さらに好ましくは１０％未満に相当する数、さらに好ましくは５％未満に相当する数、さらに好ましくは１％未満に相当する数である。換言すれば、個数とは、例えば、１２４個以下（全アミノ酸の２０％に相当する塩基数）、好ましくは９３個以下（１５％）、より好ましくは６２個以下（１０％）、より好ましくは３１個以下（５％）、より好ましくは２０個以下、より好ましくは１５個以下、より好ましくは１０個以下、より好ましくは５個以下、より好ましくは４個以下、さらに好ましく３個以下である。

【００３０】

上記（ｇ）のＤＮＡにおいて、配列番号５または配列番号６に示される塩基配列との同一性は８０％以上であることが好ましい。より好ましくは８５％以上であり、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上である。

【００３１】

塩基配列の同一性は、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができる。本発明においては、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）が公開している相同性検索プログラムであるＢＬＡＳＴのウェブサイトにおいてｂｌａｓｔｎを選択し、デフォルト（初期設定）のパラメータを用いることにより、同一性を算出する。

【００３２】

あるＤＮＡが、抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を有するポリペプチドをコードしているかどうかは、そのＤＮＡを、市販の発現ベクターに組み込み、適当な宿主で発現させて、得られたポリペプチドの抗Ｃ反応性タンパク質抗体に対する抗原性を後述の「Ｃ反応性タンパク質の濃度測定方法」においてラテックス粒子の凝集反応が起こり、ＣＲＰ濃度が測定できるかどうかにより判断することができる。

【００３３】

（Ｃ反応性タンパク質の製造方法）

本発明の別の実施形態は、上記のＤＮＡを組み込んだベクター、該ベクターを含む形質転換体、または、該形質転換体を培養することを含む組換えＣＲＰを製造する方法である。本発明の組換えＣＲＰは、その遺伝子を適当なベクターに挿入して組換えベクターを調製し、この組換えベクターで適当な宿主細胞を形質転換して形質転換体を調製し、この形質転換体を培養することによって容易に行うことができる。

【００３４】

ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種宿主細胞内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター、ウィルスベクター等が包含される。組換えベクターの調製は、特に限定されないが常法に従って行えばよく、例えば、これらのベクターに、本発明のＣＲＰの遺伝子を適当な制限酵素およびリガーゼ、あるいは必要に応じて、さらにリンカーもしくはアダプターＤＮＡを用いて連結することにより容易に行うことができる。また、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼのように増幅末端に一塩基を付加するようなＤＮＡポリメラーゼを用いて増幅作製した遺伝子断片であれば、ＴＡクローニングによるベクターへの接続も可能である。

【００３５】

また、宿主細胞としては、組換え発現系が確立しているものであれば特に制限されないが、好ましくは大腸菌、枯草菌、放線菌、麹菌、酵母といった微生物ならびに昆虫細胞、

動物細胞、高等植物などが挙げられる。より好ましくは微生物が挙げられ、特に好ましくは大腸菌（例えば、Ｋ１２株、Ｂ株など）が挙げられる。形質転換体の調製は、特に限定されないが、常法に従って行えばよい。宿主が大腸菌の場合、エシェリヒア・コリＣ６００、エシェリヒア・コリＨＢ１０１、エシェリヒア・コリＤＨ５α、エシェリヒア・コリＪＭ１０９、エシェリヒア・コリＢＬ２１などが用いられ、ベクターとしてはｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１９、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ、ｐＱＥ、ｐＥＴなどが例として挙げられる。宿主が酵母の場合は、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）、キャンデイダ・ウチリス（Ｃａｎｄｉｄａ ｕｔｉｌｉｓ）、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）などが好適な例として挙げられる。ベクターとしてはｐＡＵＲ１０１、ｐＡＵＲ２２４、ｐＹＥ３２などが挙げられる。宿主が糸状菌である場合は、例えば、アスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ），アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）等を例示することができる。

【００３６】

得られた形質転換体を、その宿主細胞に応じた適当な培養条件で一定期間培養すれば、組込まれた遺伝子により本発明の組換えＣＲＰが発現されて、形質転換体中に蓄積する。

【００３７】

形質転換体中に蓄積した本発明の組換えＣＲＰは、未精製のまま用いることができるが、精製したものを使用するのが好ましい。この精製方法としては、特に限定されないが、例えば、培養後の形質転換体あるいはその培養物を適当な緩衝液中でホモジナイズし、超音波処理や界面活性剤処理等により細胞抽出液を得、そこからタンパク質の分離精製に常套的に利用される分離技術を適宜組み合わせることにより行うことができる。このような分離技術としては、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、ホスホリルコリン固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、セファデックス（Ｓｅｐｈａｄｅｘ）ゲル（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス製）などによるゲルろ過、ＤＥＡＥセファロースＣＬ－６Ｂ （ＧＥヘルスケアバイオサイエンス製）、オクチルセファロースＣＬ－６Ｂ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス製）等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製標品を得ることができる。

【００３８】

（Ｃ反応性タンパク質のＮ末端環化方法）

本発明の組換えＣＲＰは、全体の５５％以上のＮ末端がピログルタミル化されている組換えＣＲＰであり、具体的には、Ｎ末端環化率が５５％以上と算出された組換えＣＲＰである。

【００３９】

本発明において、「Ｎ末端環化率」とは、組換えＣＲＰのうちのＮ末端がピログルタミル化されている組換えＣＲＰの比率を示す指標であり、後述の「Ｃ反応性タンパク質のＮ末端環化率測定方法」にしたがって算出される。Ｎ末端環化率は、後述の「Ｃ反応性タンパク質のＮ末端環化率測定方法」で測定した場合、組換えＣＲＰの５５％以上、好ましくは６０％以上、より好ましくは６５％以上、より好ましくは７０％以上、より好ましくは７５％以上、より好ましくは８０％以上、より好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上保持していることが望ましい。

【００４０】

本発明では、「Ｎ末端」とは、分泌シグナル配列が除去された成熟型ＣＲＰのＮ末端のことであり、具体的には、配列番号１または配列番号２に示されるアミノ酸配列において１位（又は配列番号３または配列番号４の２２位）のグルタミン、又は１位のグルタミンが分子内縮合反応を起こした後のピログルタミル酸をいう。１位のグルタミンは環化処理を施すことでピログルタミン酸に変換される。

【００４１】

本発明では、「環化処理」とは、上記Ｎ末端がグルタミンの状態（以下、「未環化型」という。）から上記Ｎ末端がピログルタミル酸の状態（以下、「環化型」という。）にＣＲＰの変換が促進される処理のことであり、酵素学的または非酵素学的な手法のどちらを選択しても良い。酵素学的手法としては、例えば、グルタミニルシクラーゼ等の酵素を適温で反応させることにより行うことができるが、酵素や温度条件はこれらに限定されない。非酵素学的手法は、緩衝液の種類、ｐＨ、処理温度、処理時間、ＣＲＰ濃度等を設定する必要があるが、ＣＲＰ、未環化型ＣＲＰ及び環化型ＣＲＰに悪影響を与えないような条件であれば良く、特に限定されない。下記に一例を示す。

【００４２】

環化処理に用いられる緩衝液としては、酢酸緩衝液、ＭＥＳ緩衝液、ＰＩＰＥＳ緩衝液などのグッド緩衝液、リン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液，ホウ酸緩衝液、グリシン緩衝液などが例示される。ｐＨ条件は、ｐＨ７～ｐＨ１２の範囲が好ましく、さらに好ましくはｐＨ７～ｐＨ１０である。温度条件は、４℃～５５℃が好ましく、さらに好ましくは３７℃～５０℃である。ＣＲＰ濃度は、０．１ｍｇ／ｄＬ～５００ｍｇ／ｄＬが好ましく、さらに好ましくは１０ｍｇ／ｄＬ～３００ｍｇ／ｄＬである。反応時間は、３０分～４週間が好ましく、さらに好ましくは１６時間～３週間である。

【００４３】

（Ｃ反応性タンパク質の濃度測定方法）

本発明において、ＣＲＰ濃度測定は以下の条件で行う。該ＣＲＰ濃度測定方法は、抗Ｃ反応性タンパク質抗体が固定化されたラテックス粒子と被検試料中のＣＲＰ（被検物質）が抗原抗体反応を起こし、当該ラテックス粒子の凝集反応の程度からＣＲＰ濃度を測定する方法である。なお、本発明で「ＣＲＰ濃度」という場合は、具体的には、特に記載のない限り、以下の方法で測定した値を意味する。

【００４４】

＜試薬＞

・デンカ生研社製ＣＲＰラテックスＸ２「生研」Ｒ１試薬（緩衝液）

・デンカ生研社製ＣＲＰラテックスＸ２「生研」Ｒ２試薬（ラテックス（抗ヒトＣＲＰポリクローナル抗体（ウサギ）結合ラテックス）浮遊液）

・デンカ生研社製ＣＲＰＸ２標準液Ｈ

＜測定試料＞

測定試料は、ＣＲＰ溶液であり、必要に応じて２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝溶液（０．１４Ｍ　塩化ナトリウム、２ｍＭ　塩化カルシウム；ｐＨ７．５）で希釈された後、使用する。また特定のＣＲＰ濃度に調製する場合は、ブラッドフォードプロテインアッセイにおいて値付けされたタンパク質濃度を基準として、希釈倍率を決定する。

＜測定方法＞

上記の測定試料、上記のＲ１試薬及び上記Ｒ２試薬を下記条件で日立７１８０形自動分析装置を用いて、試料中のＣＲＰ濃度（ｍｇ／ｄＬ）を測定する。ＣＲＰ濃度は、式（Ｉ）により算出される。

試料：　２．２μＬ

Ｒ１試薬：　１２０μＬ

Ｒ２試薬：　１２０μＬ

測定方法：　２ポイントエンド法（１８－３４）

主波長：　５４６ｎｍ

副波長：　８００ｎｍ

【００４５】
【数１】

CRP濃度（mg／dL）

＝{測定値（TEST）－測定値（BLANK）}×CRP溶液の希釈率　　･･･(I)

【００４６】
本発明において、ＣＲＰ高濃度域での組換えＣＲＰのラテックス試薬への反応性が改善されたかどうかを判断する方法は、上記方法で測定された天然型ヒトＣＲＰのＣＲＰ高濃度域でのＣＲＰ濃度値と、各種組換えＣＲＰにおいて、ＣＲＰ高濃度域でのＣＲＰ濃度値の乖離が５％以下である場合は、反応性が改善されたものと判断する。本発明における、ＣＲＰ高濃度域とは、ＣＲＰ濃度１０～３０ｍｇ／ｄＬの範囲をいうが、特にこれに限定されない。
【００４７】
（Ｃ反応性タンパク質のＮ末端環化率測定方法）
本発明において、組換えＣＲＰのＮ末端環化率測定は、以下の条件で行う。本測定方法は、質量分析により未環化型ＣＲＰのスペクトルと環化型ＣＲＰのスペクトルの１０価の各イオン強度を測定し、各イオン強度から未環化型ＣＲＰと環化型ＣＲＰの比率を算出する方法である。本発明で「未環化型ＣＲＰのスペクトル」とは、分子量２３０４５に該当するスペクトルのことをいい、また「環化型ＣＲＰのスペクトル」とは、分子量２３０２７に該当するスペクトルのことをいう。なお、本発明で「ＣＲＰのＮ末端環化率」という場合は、具体的には、特に記載がない限り、以下の方法で測定した値を意味する。
【００４８】
＜測定試料＞
測定試料は、ＣＲＰ溶液であり、必要に応じて超純水で希釈された後に使用する。
＜測定方法＞
上記の測定試料を、下記条件でＬＣ／ＭＳ装置を用いて、試料中の未環化型ＣＲＰのスペクトルと環化型ＣＲＰのスペクトルを測定する。
ＬＣ条件
装置：Ｗａｔｅｒｓ製　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ
カラム：Ｗａｔｅｒｓ製　Ｍａｓｓ　ＰＲＥＰ　Ｍｉｃｒｏ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇ　Ｃｏｌｕｍｎ　２０μｍ，２．１×５ｍｍ
移動相：Ａ　水／ギ酸混液（１０００：１），Ｂ　ＩＰＡ／ＡＣＮ／メタノール／ギ酸混液（５００：３００：２００：１）
カラム温度：５０℃
注入量：５μＬ
ＭＳ条件
装置：ＢＲＵＫＥＲＤＡＬＴＯＮＩＣＳ製　ｍｉｃｒｏＯＴＯＦ
イオン化法：ＥＳＩポジティブ
【００４９】
＜Ｎ末端環化率の算出方法＞
上記測定方法で得られた各ＣＲＰスペクトルの溶出時間１．７～２．０分の平均スペクトルの１０価の各イオン強度（ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ）を用いて、未環化型ＣＲＰと環化型ＣＲＰの比率を算出する方法による。本発明の「比率」とは、未環化型ＣＲＰと環化型ＣＲＰの２つのイオン強度の合計を１００とした場合の、環化型ＣＲＰのイオン強度の比率をいい、下記の式（ＩＩ）により算出される。
【００５０】
【数２】

N末端環化率（%）

＝環化型CRPのイオン強度／（未環化型CRPのイオン強度＋環化型CRPのイオン強度）×100

・・・(II)

【００５１】
以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。なお、実施例により、本発明が特に限定されるものではない。
【００５２】
実施例１　変異の導入および形質転換体の取得
（１）変異の導入
大腸菌由来アルカリホスファターゼ分泌シグナル配列（ＡＴＧＡＡＡＣＡＡＡＧＣＡＣＴＡＴＴＧＣＡＣＴＧＧＣＡＣＴＣＴＴＡＣＣＧＴＴＡＣＴＧＴＴＴＡＣＣＣＣＴＧＴＧＡＣＡＡＡＡＧＣＣ）と配列番号５または配列番号６のヒト由来成熟型ＣＲＰ配列を連結させた配列番号７または配列番号８の人工合成遺伝子を鋳型とし、配列番号９，１０のプライマーを用いて、ＣＲＰ遺伝子を増幅した。配列番号９はフォワードプライマー、配列番号１０はリバースプライマーである。本プライマーには制限酵素サイトＮｄｅＩ、または制限酵素サイトＢａｍＨＩがそれぞれ付加されている。増幅した遺伝子断片と、制限酵素ＮｄｅＩとＢａｍＨＩで切断されたベクタープラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＫＳＮ（＋）、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ（タカラバイオ製）を加えてインキュベーションすることにより、プラスミドを構築した。このようにして、ＣＲＰ遺伝子を大量に発現できるように設計された、配列番号７を含む組換えプラスミドｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ１と、配列番号８を含む組換えプラスミドｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ２を取得した。
【００５３】
（２）形質転換体の取得
（１）で構築したプラスミドを用いて、エシェリヒア・コリー（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）ＪＭ１０９株コンピテントセル（東洋紡製）を形質転換し、ＳＯＣ培地中で１ｈｒ、３７℃で培養後、ＬＢ寒天培地（グルコース１．０％、アンピシリン５０μｇ／ｍＬを含む）に展開し、コロニーである該形質転換体を取得した。ｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ１の導入で得られた形質転換体をエシェリヒア・コリーＪＭ１０９（ｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ１）と命名した。また上記と同様の方法でｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ２の導入で得られた形質転換体をエシェリヒア・コリーＪＭ１０９（ｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ２）と命名した。
【００５４】
実施例２　エシェリヒア・コリーにおけるＣＲＰ遺伝子の発現
実施例１にて取得した形質転換体エシェリヒア・コリーＪＭ１０９（ｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ１）のコロニーを、試験管内にて滅菌した５ｍＬのＬＢ液体培地（グルコース１．０％、アンピシリン１００μｇ／ｍＬを含む）へ植菌し、３７℃で１６時間培養した。得られた培養液を種培養液とし、１０本の２Ｌ容の坂口フラスコに入った５００ｍＬのＬＢ液体培地（グリセロール０．５％、塩化カルシウム０．０５％、ＩＰＴＧ　１ｍＭ、アンピシリン５０μｇ／ｍＬを含む）に植菌し、振とう数１８０ｒｐｍで３０℃、２４時間培養した。培養終了より菌体を遠心分離により集菌し、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（０．１４Ｍ　塩化ナトリウム、２ｍＭ　塩化カルシウム、ｐＨ７．５）に懸濁した後、フレンチプレス（Ｎｉｒｏ　Ｓｏａｖｉ製）にて破砕し、更に遠心分離を行い、上清液を粗精製液１として得た。また上記と同様の方法でエシェリヒア・コリーＪＭ１０９（ｐＢＫＳＮ＿ＣＲＰ２）から粗精製液２も取得した。
【００５５】
実施例３　組換えＣＲＰの精製
実施例２にて取得した粗精製液１に対し、ＰｉｅｒｃｅＴＭ　ｐ－Ａｍｉｎｏｐｈｅｎｙｌ　Ｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌ　Ｃｈｏｌｉｎｅ Ａｇａｒｏｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　ＳＣＩＥ

ＮＴＩＦＩＣ製）を用いたアフィニティー精製を行った。実施例２で使用した緩衝液２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（０．１４Ｍ　塩化ナトリウム、２ｍＭ　塩化カルシウム、ｐＨ７．５）で平衡化した前記樹脂を、粗精製液と混合して吸着させた樹脂を、前記緩衝液で洗浄し、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（０．１４Ｍ 塩化ナトリウム、２ｍＭ ＥＤＴＡ２ｍＭ、ｐＨ７．５）で溶出させた、組換えＣＲＰ溶液１を取得した。この溶液はさらに、中空糸膜を用いた加水濃縮によりＥＤＴＡを除きつつ、実施例２で使用した緩衝液２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（０．１４Ｍ　塩化ナトリウム、２ｍＭ　塩化カルシウム、ｐＨ７．５）へ置換され、さらに遠心式限外ろ過フィルター（メルク製）で適当な濃度まで濃縮して、純度の高い組換えＣＲＰ１を得た。取得した組換えＣＲＰ１を用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った結果を図１に示す。その結果、不純タンパク質がＳＤＳ－ＰＡＧＥでは検出できないレベルにまで、純度を向上させることに成功した。また上記と同様の方法で粗精製液２から純度の高い組換えＣＲＰ２も得た。得られたＣＲＰ２について、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った結果を図２に示す。ＣＲＰ１と同様に、不純タンパク質がＳＤＳ－ＰＡＧＥでは検出できないレベルにまで、純度を向上させることに成功した。

【００５６】

実施例４　組換えＣＲＰのＮ末端環化処理

実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１を、３７℃で８日間加温し、組換えＣＲＰのＮ末端がピログルタミル化により環化された、環化型組換えＣＲＰ１を取得した。環化処理では実施例２で使用した緩衝液２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（０．１４Ｍ　塩化ナトリウム、２ｍＭ　塩化カルシウム、ｐＨ７．５）を使用し、ＣＲＰ濃度は３００ｍｇ／ｄＬで実施した。また上記と同様の方法で組換えＣＲＰ２から環化型組換えＣＲＰ２を取得した。

【００５７】

実施例５　Ｎ末端環化率の測定

実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１と組換えＣＲＰ２、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１と環化型組換えＣＲＰ２、及びポジティブコントロールとして天然型ヒトＣＲＰ（Ｙａｓｈｒａｊ製）を、超純水にてＣＲＰ濃度１５０ｍｇ／ｄＬに調製したＣＲＰ溶液を上述した通りのＬＣ／ＭＳ条件で測定した（表１参照）。組換えＣＲＰ１の各サンプルの質量スペクトルにおいて、溶出時間１．７～２．０分の平均の１０価のイオンを拡大したものを図３に示す。

【００５８】

ｍ／ｚ　２３０５．４５は未環化型ＣＲＰのスペクトルを示し、またｍ／ｚ　２３０３．７４は環化型ＣＲＰのスペクトルを示す。天然型ヒトＣＲＰにおいて、環化型ＣＲＰのスペクトルが顕著に示された。一方、実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１において、未環化型ＣＲＰのスペクトルの方が環化型ＣＲＰのスペクトルより高いことが示された。これに対して、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１は、環化型ＣＲＰのスペクトルの方が未環化型ＣＲＰのスペクトルより明らかに高いことが示された。実施例４のＮ末端環化処理により、ＣＲＰのピログルタミル化が促進されたことが示された。また組換えＣＲＰ２と環化型組換えＣＲＰ２においても、図４に示すように同様の結果が得られた。

【００５９】

【表１】

時間（分）	流速（mL／分）	移動相B（%）
0.01	0.40	5
0.50	0.40	5
0.51	0.16	5
2.00	0.16	95
2.10	0.40	5
2.70	0.40	95
2.80	0.40	5
3.40	0.40	95
3.50	0.40	5
4.00	0.40	5

【００６０】
実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１と組換えＣＲＰ２、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１と環化型組換えＣＲＰ２、及び天然型ヒトＣＲＰにおいて、ＣＲＰのＮ末端環化率は、上述のＬＣ／ＭＳ条件で測定された未環化型ＣＲＰのスペクトルと環化型ＣＲＰのスペクトルの１０価の各イオン強度をもとに、各イオン強度から未環化型ＣＲＰと環化型ＣＲＰの比率から上述の式（II）で算出した。組換えＣＲＰ１、環化型組換えＣＲＰ１及び天然型ヒトＣＲＰのＮ末端環化率を表２に示す。実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１は、加温１日目、３日目、６日目、８日目に取得した環化型組換えＣＲＰ１を、上述の式（II）により、Ｎ末端環化率を算出した。また組換えＣＲＰ２、環化型組換えＣＲＰ２及び天然型ヒトＣＲＰのＮ末端環化率を表３に示す。実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ２は、加温１日目、３日目、６日目、８日目に取得した環化型組換えＣＲＰ２を、上述の式（II）により、Ｎ末端環化率を算出した。
【００６１】
天然型ヒトＣＲＰにおいて、Ｎ末端環化率は９５％であり、全体の９５％が環化型ＣＲＰであることが示される。一方、実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１と組換えＣＲＰ２においては、Ｎ末端環化率４０％と環化型ＣＲＰが全体の半分以下しか存在しないことが示される。これに対して、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１と環化型組換えＣＲＰ２は、加温１日目にＮ末端環化率４２％、加温３日目にＮ末端環化率５４％、加温６日目にＮ末端環化率６７％、加温８日目にＮ末端環化率７８％と、加温時間が長くなるに伴い、環化型組換えＣＲＰの割合が増加する傾向にあることが示された。
【００６２】

【表２】

サンプル	N末端環化率(%)
実施例3　組換えCRP1	40
実施例4　環化型組換えCRP1　加温1日目	42
実施例4　環化型組換えCRP1　加温3日目	54
実施例4　環化型組換えCRP1　加温6日目	67
実施例4　環化型組換えCRP1　加温8日目	78
天然型ヒトCRP	95

【００６３】
【表３】

サンプル	N末端環化率(%)
実施例3　組換えCRP2	40
実施例4　環化型組換えCRP2　加温1日目	42
実施例4　環化型組換えCRP2　加温3日目	54
実施例4　環化型組換えCRP2　加温6日目	67
実施例4　環化型組換えCRP2　加温8日目	78
天然型ヒトCRP	95

【００６４】
実施例６　ラテックス試薬によるＣＲＰ濃度測定
　ウシ血清アルブミン（シグマ製）を超純水にて、０．１、０．２、０．４、及び０．７５ｍｇ／ｍＬに希釈して標準液を調製した。各標準液６０μＬにプロテインアッセイ濃縮色素試薬（ＢｉｏＲａｄ製）６００μＬと超純水２．４ｍＬを添加し、室温にて５分間静置後に５９５ｎｍの吸光度を測定した。上述の５９５ｎｍの吸光度の測定値とウシ血清アルブミン濃度から検量線を作成した。実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１と組換えＣＲＰ２、実施例４取得した環化型組換えＣＲＰ１と環化型組換えＣＲＰ２、及び天然型ヒトＣＲＰを超純水にておいて、適当な濃度になるよう希釈し、標準液と同様な試薬、条件で調製し、５９５ｎｍの吸光度を測定した。各種ＣＲＰの測定値から、上述の検量線よりタンパク質濃度を算出した。上述のタンパク質濃度をもとに、タンパク質濃度１ｍｇ／ｄＬ、５ｍｇ／ｄＬ、１０ｍｇ／ｄＬ、３０ｍｇ／ｄＬになるように２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝溶液（０．１４Ｍ　塩化ナトリウム、２ｍＭ　塩化カルシウム、ｐＨ７．５）で希釈してＣＲＰ溶液を調製した。
【００６５】
　上述の各ＣＲＰ溶液のＣＲＰ濃度は、デンカ生研製ＣＲＰ－ラテックスＸ２の緩衝液を第１試薬、抗ヒトＣＲＰポリクローナル抗体（ウサギ）結合ラテックス浮遊液を第２試薬とし、前記第１試薬と第２試薬を組合せ、日立７１８０形自動分析装置を用いてＣＲＰ濃

度に依存的な粒子凝集塊の形成を測定した。具体的には、前記各ＣＲＰ溶液２．２μＬに、第１試薬１２０μＬを加えて３７℃で５分間加温後、第２試薬１２０μＬを加えて攪拌した。その後５分間の凝集形成に伴う吸光度変化（ΔｍＡｂｓ）を、主波長５４６ｎｍ、副波長８００ｎｍにて測定した。

【００６６】

表４に、実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１の測定値と、天然型ヒトＣＲＰの測定値に対する、各濃度における相対値を示す。また、表４には、実施例５で算出した各種ＣＲＰのＮ末端環化率も示す。さらに、実施例３にて取得した組換えＣＲＰ１、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ１及び天然型ヒトＣＲＰの測定値を表５に示す。上記と同様に、表６に、実施例３にて取得した組換えＣＲＰ２、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ２の測定値と、天然型ヒトＣＲＰの測定値に対する、各濃度における相対値を示す。また、表６には、実施例５で算出した各種ＣＲＰのＮ末端環化率も示す。さらに、実施例３にて取得した組換えＣＲＰ２、実施例４にて取得した環化型組換えＣＲＰ２及び天然型ヒトＣＲＰの測定値を表７に示す。

【００６７】

表４と表６より、Ｎ末端環化率４０％、４２％の組換えＣＲＰ１と組換えＣＲＰ２において、１０ｍｇ／ｄＬと３０ｍｇ／ｄＬのポイントにおける天然型ヒトＣＲＰの測定値との相対値が８９～９４％と、測定値に６～１１％の乖離があることが確認された。一方、Ｎ末端環化率５４％、６７％、７８％の環化型組換えＣＲＰ１と環化型組換えＣＲＰ２において、１０ｍｇ／ｄＬと３０ｍｇ／ｄＬのポイントにおける天然型ヒトＣＲＰの測定値との相対値が９５～１０４％と、測定値との乖離が５％以内に抑えられていた。本結果より、Ｎ末端環化率が５５％以上の環化型組換えＣＲＰ１と環化型組換えＣＲＰ２では１０ｍｇ／ｄＬと３０ｍｇ／ｄＬのＣＲＰ高濃度域でも、天然型ヒトＣＲＰとの乖離が５％以内に抑えることができることが示された。

【００６８】

【表４】

	実施例３ 組換えCRP１	実施例４ 環化型CRP１ 加温１日目	実施例４ 環化型CRP１ 加温３日目	実施例４ 環化型CRP１ 加温６日目	実施例４ 環化型CRP１ 加温８日目
N末端環化率	40%	42%	54%	67%	78%
理論値(mg/dL)	相対値(組換えCRP/天然型ヒトCRP)				
1	103%	100%	102%	104%	102%
5	98%	96%	100%	104%	101%
10	94%	89%	97%	102%	99%
30	91%	91%	95%	100%	101%

【００６９】

【表５】

	実施例３ 組換えCRP１	実施例４ 環化型CRP１ 加温１日目	実施例４ 環化型CRP１ 加温３日目	実施例４ 環化型CRP１ 加温６日目	実施例４ 環化型CRP１ 加温８日目	天然型 ヒトCRP
N末端環化率	40%	42%	54%	67%	78%	95%
理論値(mg/dL)	測定値(mg/dL)					
1	0.79	0.76	0.77	0.79	0.78	0.76
5	4.80	4.69	4.88	5.06	4.92	4.89
10	9.54	9.01	9.87	10.38	10.08	10.14
30	27.74	27.57	28.83	30.37	30.66	30.31

【００７０】

【表６】

	実施例３ 組換えCRP２	実施例４ 環化型CRP２ 加温１日目	実施例４ 環化型CRP２ 加温３日目	実施例４ 環化型CRP２ 加温６日目	実施例４ 環化型CRP２ 加温８日目
N末端環化率	40%	42%	54%	67%	78%
理論値(mg/dL)	相対値(組換えCRP/天然型ヒトCRP)				
1	103%	100%	102%	104%	102%
5	98%	96%	100%	104%	101%
10	94%	89%	97%	102%	99%
30	91%	91%	95%	100%	101%

【００７１】

【表７】

	実施例３ 組換えCRP２	実施例４ 環化型CRP２ 加温１日目	実施例４ 環化型CRP２ 加温３日目	実施例４ 環化型CRP２ 加温６日目	実施例４ 環化型CRP２ 加温８日目	天然型 ヒトCRP
N末端環化率	40%	42%	54%	67%	78%	95%
理論値(mg/dL)	測定値(mg/dL)					
1	0.79	0.76	0.77	0.79	0.78	0.76
5	4.80	4.69	4.88	5.06	4.92	4.89
10	9.54	9.01	9.87	10.38	10.08	10.14
30	27.74	27.57	28.83	30.37	30.66	30.31

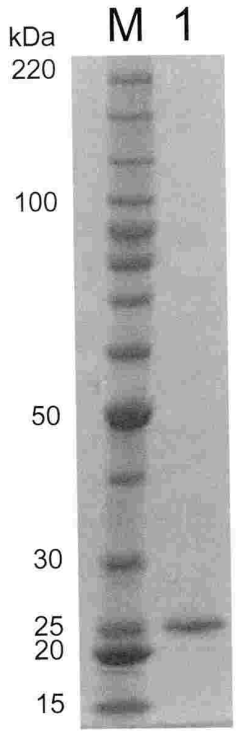
【産業上の利用可能性】

【００７２】

本発明のＣＲＰは、ＣＲＰが高濃度域での反応性に優れたラテックス試薬に用いる診断薬原料として、医療、診断の分野において特に有用なものである。

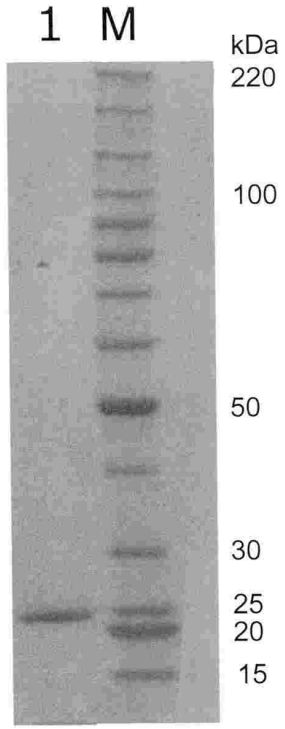
【図面】

【図１】



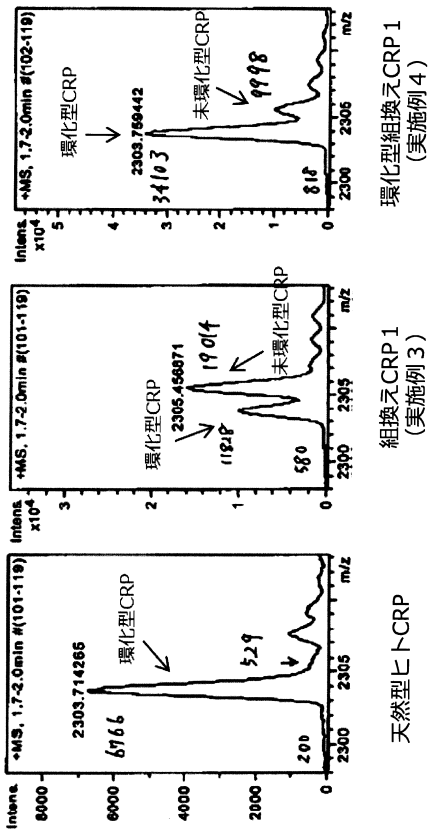
M Bench Mark (Invitorogen社)
1 組換えCRP１

【図２】

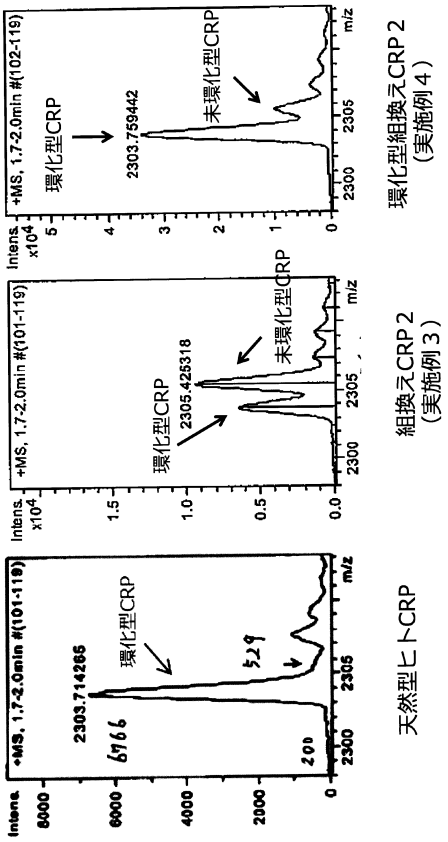


M Bench Mark (Invitorogen社)
1 組換えCRP２

【図３】



【図４】



【配列表】
0007697371000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０６－３１１８８４（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－０１４３８８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１１／１５５３５８（ＷＯ，Ａ１）
特表２０１８－５３５３９４（ＪＰ，Ａ）
特開２００６－３００７５８（ＪＰ，Ａ）
特開平０８－２３３８１６（ＪＰ，Ａ）
特開２０１１－２５７２４３（ＪＰ，Ａ）
OLIVEIRA, E. B. et al.，Primary structure of human C-reactive protein，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1977年，Vol.74, No.8，pp.3148-3151
XIA, D. Y. et al.，Primary Structure of Anodonta C-reactive Protein，Chin. J. Biochem. Mol. Biol.，2000年，Vol.16, No.2，pp.215-223

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　１／００－４１／００
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
Ｇ０１Ｎ　３３／００－３３／４６
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）