

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4988694号
(P4988694)

(45) 発行日 平成24年8月1日(2012.8.1)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
請求項の数 15 外国語出願 (全 114 頁)	

(21) 出願番号	特願2008-321467 (P2008-321467)	(73) 特許権者	509091848
(22) 出願日	平成20年12月17日(2008.12.17)		ノヴォ ノルディスク アー/エス
(62) 分割の表示	特願2003-544084 (P2003-544084)		デンマーク、ハウスヴェア ディーケー
原出願日	平成14年11月12日(2002.11.12)		2880、ノヴォ アレー
(65) 公開番号	特開2009-142279 (P2009-142279A)	(73) 特許権者	594202523
(43) 公開日	平成21年7月2日(2009.7.2)		モナシュ ユニバーシティ
審査請求日	平成21年1月16日(2009.1.16)		オーストラリア国、ビクトリア 3168
(31) 優先権主張番号	PA 2001 01681		、クレイトン、ウェリントン ロード (番
(32) 優先日	平成13年11月12日(2001.11.12)	(74) 代理人	100108855
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 金属イオンアフィニティークロマトグラフィーによるペプチドの精製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記からなる群から選択されるアミノ酸配列を備えたヒスチジン含有オリゴペプチド：

HHHNSWDHDI NR (配列番号 1)
 HTNIHQDQHNFHR (配列番号 2)
 HAMLDRADHGT R (配列番号 3)
 SLHEHHS GDNLR (配列番号 4)
 THYN AVHSHNTLQ (配列番号 5)
 DIHHWTDHLQSS TH (配列番号 6)
 LYNHYSHTAHVNL (配列番号 7)、

但し、前記アミノ酸配列が配列番号 1 であるときは、当該ヒスチジン含有オリゴペプチド
 はアミノ酸配列 HHHNSWDHDI NR からなる。

【請求項 2】

前記アミノ酸配列がアミノ酸配列 Met-Xaa を含む N 末端伸長部を有し、前記 Xaa
 がプロリン残基以外のアミノ酸残基である、請求項 1 に記載のヒスチジン含有オリゴペプ
 チド。

【請求項 3】

前記アミノ酸配列が、多くとも 10 アミノ酸残基のアミノ酸配列を備えた N 末端伸長部を
 有する、請求項 1 に記載のヒスチジン含有オリゴペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載された少なくとも 1 つのオリゴペプチドに目的のタンパク質分子のアミノ末端又はカルボキシ末端が融合したタンパク質を備えた融合タンパク質であるポリペプチド。

【請求項 5】

前記オリゴペプチドのアミノ酸配列の前記アミノ末端及びカルボキシ末端が、目的のタンパク質分子にそれぞれ融合する、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

酵素及び化学的切断部位からなる群から選択される切断部位に前記オリゴペプチドのアミノ酸配列が隣接して存在する、請求項 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記 2 つの対象タンパク質分子が同一タンパク質の分子である、請求項 5 又は 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記 2 つの対象タンパク質分子が異なる分子である、請求項 5 又は 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドを発現させる条件下で、適切な増殖培地中において、請求項 4 乃至 8 の何れか 1 項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物を備える宿主細胞を培養すること、及び前記培地から当該ポリペプチドを回収することにより取得可能なポリペプチド。

【請求項 10】

前記宿主細胞が *Escherichia coli* の菌株である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 4 乃至 8 の何れか 1 項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド構築物。

【請求項 12】

ベクターである、請求項 11 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 13】

請求項 11 又は 12 に記載のポリヌクレオチド構築物を含む宿主細胞。

【請求項 14】

Escherichia coli の菌株である、請求項 13 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 4 乃至 10 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを生産する方法であって、前記ポリペプチドを発現させる条件下で、適切な増殖培地中において、請求項 13 又は 14 に記載されている宿主細胞を培養することと、前記培地から前記ポリペプチドを回収することを備えた方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明は、とりわけ、固定化された金属イオンアフィニティークロマトグラフィーを用いたペプチド、特に、組換えタンパク質などのポリペプチドの単離および精製の分野に関する。

【発明の背景】

【0002】

ヒト又は動物の治療に使用するためのオリゴペプチドやポリペプチドなどの組換え（遺伝子操作が施された）ペプチド（特にタンパク質）の製造において重要なことは、特に（a）製造過程（典型的には、適切な微生物の選択株又は遺伝子修飾株を用いた発酵過程など）に存在することがある外来タンパク質や（b）製造過程中に導入されることがある望ましくない金属イオン（特に、重金属イオン）が、ほぼ完全に所望のタンパク質に混入し

10

20

30

40

50

ないように、十分に高い純度まで当該ペプチドを精製することである。

【0003】

固定化された金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC、immobilized metal ion affinity chromatography) は、多数の生体ポリマーの金属イオンに対する親和性の差を利用した用途の広い分離手法である。この技術では、予め多座配位のリガンドを用いて化学的に改変を施した表面を有する固相支持体マトリックス上に、適切な金属イオンをキレート化する。その結果生じる固定化された金属イオンキレート錯体は、相互作用するタンパク質の表面上に存在する1以上の電子供与基との配位能を有することになる (Sulkowski, E., Trends in Biotechnology, 3 (1985) 1-6; Porath, J., Carlsson, I., Olsson, I. and Belfrage, G., Nature, 258 (1975) 598-599; Kagedal, L., in "Protein Purification" (Ed., J.C. Janson, and L. Ryden), VCH Publishers (1989) pp.227-251; Zachariou, M. and Hearn, M.T.W., Biochemistry, 35(1996)202-211)。次いで、吸着したタンパク質／固定化された金属イオン錯体の熱力学的な安定性の差に基づいて、分離の選択性が得られる。その吸着錯体の安定性が最も低いタンパク質が最初に溶出され、これより安定な錯体を形成するタンパク質が後に溶出される。平衡結合定数の差が大きいほど (すなわち、各タンパク質／固定化金属イオン配位錯体の解離定数 (K_D) の差が大きいほど)、分離の程度は高くなる。このため、アミノ酸組成、特定のアミノ酸残基の表面分布、及びタンパク質のコンフォメーションは、IMAC系に対するタンパク質の親和性を決定する上で、何れも重要な役割を果たしている。その結果、電荷、分子サイズ、アミノ酸組成に関して性質が非常に似通っているが、三次構造が異なるタンパク質を分離することが可能となる。

【0004】

過去20年にわたるIMACの使用に関する研究の関心は、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} などの境界域にある硬さ (borderline hardness) (下記参照) の第一周期遷移金属イオンの利用に中心が向けられてきた。これらの金属イオンは、芳香族及び脂肪族の両アミン並びにカルボキシレート官能基に対して中程度の金属イオン安定度定数を示す (例えば、 $\log \beta$ 値が5乃至10) (Wong, J.W., Albright, R.L. and Wang, N.H.L., Separation and Purification Methods, 20(1991) 49-57; Zachariou, M., Traverso, I., Spiccia, L. and Hearn, M.T.W., Journal of Physical Chemistry, 100(1996) 12680-12690)。 M^{2+} イオンとこのような結合特性を示す多数の非拘束三座配位キレートを、支持体材料上に化学的に固定化することができる。対応する $\log \beta$ 値の大きさやこのため選択能が比較的低下するという制約にもかかわらず、イミノ二酢酸 (IDA) などの非拘束タイプのキレート化合物が、このようなIMAC研究において、これまで利用されてきたキレートリガンドの主流を成している [例えば、Kagedal, L., "Protein Purification" (Eds. J.C. Janson and L. Ryden), VCH Publishers (1989) pp227-251を参照]。固定化 M^{2+} -IDAを基礎とするIMAC系の使用例としては、固定化された Cu^{2+} -IDAを用いた発芽麦からの α -アミラーゼの精製 [Zawistowska, U., Sangster, K., Zawistowski, J., Langstaff, J. and Friessen, A.D., Cereal Chemistry, 65 (1988) 5413-5418]、及び固定化された Zn^{2+} -IDAを用いたヒト血漿からのヒト凝固因子VII [Weeransinghe, K.M., Scully, M.F. and Kadder, V.V., Biochimica Biophysica Acta, 839(1985) 57-65] 及び α 1-チオールプロテインナーゼの精製がある [Otsuka, S. and Yamanaka, T. (Eds), "Metalloproteins-Chemical Properties and Biological Effects" in "Bioactive Molecules", Kodansha Ltd, Tokyo (1988), pp18-45]。IDAを基礎としたIMAC手法の応用 (すなわち、固定化 Ni^{2+} -ニトリロ三酢酸 (Ni^{2+} -NTA) を用いた組換えタンパク質の精製 [Hochuli, E., Bannwarth, W., Doebeli, H. and Stuber, D., Bio/Technology, 6 (1988) 1321-1324] (NTAは、IDAの構造的相同物である)) は、固定化 Ni^{2+} -NTAキレート錯体へのさらに高い結合親和性をタンパク質に付与することによって、このIMAC吸着剤上にタンパク質を選択的に保持できるようにするポリヒスチジンペプチド (典型的には、ヘキサ- His) に対応するポリヌクレオチド配列を遺伝子レベルで取り込むことに依拠している。本出願では、

「吸着剤 (sorbent)」および「吸着体 (adsorbent)」という用語は、主として、金属イオンが配位結合した官能化ポリマー基材 (リガンドが固定化されたポリマー基材) を表すために用いられるが、これらの用語は、金属イオンが結合していない官能化ポリマー基材 (functionalized polymer substrate) を表すために用いられる場合もある。

【0005】

I D A 及び N T A を基礎とした I M A C 系の使用に関する上述の記載から明らかなように、I M A C 系とのタンパク質結合選択性を変化させる別の手段は、キレートライゲート (ligate) の構造を変更することである。しかし、ここ数年は、少数の新規 I M A C キレートライゲートが導入されているにすぎない。これらには、二座配位キレーターであるアミノヒドロキサム酸 (A H M) と 8-ヒドロキシキノリン (8-H Q) [Zachariou, M., Traverso, I., Spiccia, L. and Hearn, M.T.W., Journal of Physical Chemistry, 100(1996) 12680-12690] ; Ca^{2+} への親和性が I D A より高いカルボキシメチルアスパラギン酸 (C M-A S P) [Porath, J., Trends in Analytical Chemistry, 7(1988), 254-256; Mantovaara, T., Pertofz, H. and Porath, J., Biotechnology Applied Biochemistry, 11(1989), 564-569] ; リン酸基の関与によって Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Yb^{3+} などの「硬い (hard)」金属イオンをキレートすることができるオルトホスホセリン (O P S) [Zachariou, M., Traverso, I. and Hearn, M.T.W., Journal of Chromatography, 646(1993), 107-115] ; (2-ピリジルメチル) アミノ酢酸 (C P M A)、ジピコリルアミン (D P A)、シス又はトランス-カルボキシメチル-プロリンなどの他の三座配位ライゲート [Chaouk, H., Middleton S., Jackson W.R. and Hearn, M.T.W., International Journal of BioChromatography, 2(1997) 153-190; Chaouk, H. and Hearn, M.T.W., Journal of Biochemical and Biophysical Research Methods, 39(1999) 161-177]、四座配位のために M^{2+} イオンに対する親和性が I D A より大きく、配位部位が 1 つ失われているために、I D A 型の三座配位ライゲートに比べてタンパク質結合定数が低いニトリロ三酢酸 (N T A) などの四座配位リガンド [Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobell H., Gentz, R. and Stuber, D. Bio/Technology, 6(1988) 1321-1325]、5 つのドナー原子 (すなわち、T E P A の場合には、第一級アミン基の 2 つの窒素原子と第二級アミン基の 3 つの窒素原子、T E D の場合には、第二級アミン基の 2 つの窒素原子と 3 つのカルボキシル基由来の 3 つの酸素原子) を介して金属イオンを配位するテトラエチレンペンタミン (T E P A) [Hidaka Y., Park, H. and Inouye, M., FEBS Letters, 400(1997) 238-242] 又は N, N, N'-トリス (カルボキシメチル) エチレンジアミン (T E D) [Porath, J., Protein Expression & Purification, 3(1992) 263-281] などの五座配位リガンドに基づいた系が含まれる。

【0006】

クロマトグラフィー工程において、比較的穏やかな溶出条件を用いたときにも、固定化金属イオンイミノ二酢酸キレート (im-M^{n+} -I D A) 系では、金属イオンが相当漏出することが観察されている [Oswald, T., Hornbostel, G., Rinas, U. and Anspach, F.B., Biotechnology Applied Biochemistry, 25(1997) 109-115; Kagedal, L. in Protein Purification (eds. J.C. Janson and L Ryden) VCH Publishers, New York(1989), pp 227-251]。このため、選択性の調節という問題に加え、従来利用されてきた I D A 又は N T A を基礎とした系に比べて金属イオンの安定度定数を著しく増加させることが必要とされていたために、新しいクラスのキレートライゲートを開発することが望まれていた [Zachariou, M., Traverso, I., Spiccia, L. and Hearn, M.T.W., Analytical Chemistry, 69(1996) 813-822]。

【発明の簡単な説明】

【0007】

目的タンパク質のポリペプチド鎖に加えて、金属イオンと配位結合を形成し得る 1 つ以上の適切な位置にアミノ酸残基を組み込んだ共有結合オリゴペプチド鎖 (「タグ」と称することもある) が (所望のタンパク質自体のアミノ酸配列の伸長部分として) 含まれる「

融合タンパク質」の形態にすることにより、所望のタンパク質の金属イオン配位結合の強度及び／又は選択性が、融合タンパク質が結合する金属イオン用マトリックスとして少なくとも1つの金属イオン配位環式リガンド基を含む官能基で官能化したポリマー基材を使用することによって、著しく増加し得るという驚くべき発見がなされた。このようなマトリックスに対する融合タンパク質の結合の強度及び／又は選択性は、外来性タンパク質の結合の強度及び／又は選択性よりも一般にかなり大きいので、融合タンパク質を1つ以上の外来性タンパク質と共に含有する混合物から融合タンパク質を分離及び単離することが容易となる。

【0008】

したがって、本発明の第1の側面は、N、O及びSから独立に選択される少なくとも3つの金属イオン配位ドナー原子を含む少なくとも1つの金属イオン配位環式リガンド基を含む官能基で官能化したポリマー基材を提供する。本発明の第2の側面は、官能基中に環式リガンド基の少なくとも1つに配位する金属イオンをさらに含む、後者のタイプの官能化ポリマー基材に関する。本発明の別の側面は、このような官能化ポリマー基材を調製する方法である。

【0009】

本発明のさらに重要な側面は、

本発明に関連する融合タンパク質中に「タグ」として組み込むのに適したオリゴペプチド、

そのアミノ末端又はカルボキシ末端又は両方において、あるいは目的タンパク質の内部アミノ酸配列位置において、少なくとも1つのこのようなオリゴペプチドに融合している目的タンパク質を含む当該タイプの融合タンパク質、

このような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド構築体、例えばベクター、

このようなポリヌクレオチド構築体を含む宿主細胞、

当該タイプの融合タンパク質を産生する方法であって、融合タンパク質が発現され、その融合タンパク質が培地から回収される条件下にある増殖培地中で後者のタイプの宿主細胞を培養する方法、及び

目的タンパク質を精製する方法であって、（目的タンパク質を含む）このような融合タンパク質及び他のタンパク質（外来性タンパク質）を含有するタンパク質試料を、本発明による金属イオン含有官能化ポリマー基材と接触させる方法に関する。

【発明の詳細な説明】

【0010】

上述したように、本発明の第1の側面は、少なくとも1つの金属イオン配位環式リガンド基を含む官能基で官能化したポリマー基材に関し、この環式リガンド基は、N、O及びSからなる群から独立に選択される少なくとも3つの金属イオン配位ドナー原子を含む。一般に、環式リガンド基中の少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つ全部のこれらの金属イオン配位ドナー原子は、環原子（ring atom）であり、すなわち金属イオン配位環式リガンド基の環の一部を形成する。

【0011】

本発明に関連する有用なポリマー基材としては、水溶性ポリマー、実質的な水不溶性ポリマーなどがあり、極めて広範なポリマー材料から選択することができる。その例は以下の通りである。

【0012】

多糖及びその誘導体（アガロース、デキストラン、セルロース、ヘミセルロース、デンプン、キシランなど、及びこれらの多糖の誘導体を含む）。適切な多糖誘導体としては、一般に、当該多糖のヒドロキシ基の一部が誘導体化されてエーテル（例えば、メチルエーテルなどの低級アルキルエーテル）又はエステル（例えば、アセテート、プロピオネートなどの低級カルボン酸エステル）を形成する誘導体、並びに出発多糖又はその誘導体を適切な架橋試薬で処理することによって架橋した材料などがある。

【0013】

一般に、実質的な水不溶性ポリマーに基づく本発明の官能化ポリマー基材は、例えば、クロマトグラフィカラムへの充填、培地への直接導入（バッチ式使用）などに適しており、本発明に関連するタイプの用途に特に適した多糖としては、アガロース、デキストラン、それらの誘導体などがあり、それら様々な適切なタイプが市場で容易に入手可能である。すなわち、例えば、様々なアガロース製品は、Amersham Pharmacia Biotech、Uppsala、Swedenによって生産され、Sepharse（商標）の名称で市販されており、入手可能なグレードはSepharse（商標）2B、4B、6Bなどである。（2，3-ジブロモプロパノールによるSepharse（商標）の架橋によって調製される）これらの様々なグレードのアガロース架橋誘導体が、やはり同じ会社から入手可能であり、それぞれSepharse（商標）CL-2B、CL-4B及びCL-6B、Sepharse（商標）4及び6 Fast Flow、Sepharse（商標）6MB、Superose（商標）6及び12として市販されている。

【0014】

本発明に関連して使用するのに適切ないくつかのデキストランベースの材料又はデキストラン-アガロース複合材料は、やはりAmersham Pharmacia BiotechからSephadex（商標）、Superdex（商標）（例えば、Superdex（商標）30、75及び200）及びSephacryl（商標）の名称で入手可能である。Sephadex（商標）シリーズの製品は、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋して調製され、以下のグレードが入手可能である：Sephadex（商標）G-10、G-15、G-25、G-50、G-75、G-100、G-150及びG-200。Gナンバーが増加すると架橋度は減少する。Sephacryl（商標）シリーズは、アリル-デキストランをN，N'-メチレンビスアクリルアミドで架橋して調製され、Sephacryl（商標）S-100、S-200、S-300、S-400、S-500、S-1000などがある；後者の6つの製品は、細孔サイズ及び粒子径分布の範囲が異なる。Superdex（商標）シリーズの製品は、アリルデキストランを様々な組成のアガロース誘導体で架橋して調製される。

【0015】

ポリアルキレングリコール及びその誘導体（特に、ポリエチレングリコール（PEG）、すなわち一般式が $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ 又は $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ であり、一般に平均分子量が200-6000であるエチレングリコールの縮合ポリマーを含む）。いくつかのPEG（それぞれ平均分子量400、600、1500、4000及び6000のPEGを含む）が、様々な名称（例えば、Macrogol（商標）、PEG（商標）、Carbowax（商標）、Nycoline（商標）、Pluracol E（商標）、Poly-G（商標）、Polyglycol E（商標）、Solbase（商標））で様々な市販供給源から入手可能である。PEGは、一般に、水に可溶又は相溶し、エタノール及び芳香族炭化水素を含めたいくつかの他の有機溶媒に可溶である。水に可溶な低分子量成分を含む類似の（一般式 $\text{H}(\text{OC}_3\text{H}_6)_n\text{OH}$ を有する）ポリプロピレングリコールも本発明に用いるのに適している。このような適切なポリアルキレングリコールの誘導体としては、部分エーテル化誘導体、例えば、末端ヒドロキシ基の1つがメチルエーテル基などの低級アルキルエーテル基に転化された誘導体などがある。

【0016】

このようなポリマーは、担体材料に容易に固定化することができ、本発明の手順によってその後活性化され、次いで金属イオン結合大環状キレートリガンドで官能化又は誘導体化され得る基材が生成する。

【0017】

ポリビニルポリマー（ポリビニルアルコール、すなわちポリ酢酸ビニルの様々な分子量画分を一般に塩基又は酸加水分解で加水分解（「アルコール分解」）して通常生成されるヒドロキシルポリマー、及びその誘導体を含む）。「アルコール分解」の程度は、ポリ酢

酸ビニルの酢酸エステル基の加水分解を実質的に完結するまで進行させることによって、又はそれを所望のアルコール分解度で停止することによって変わり得る。ポリビニルアルコールは、通常、4つの分子量範囲、すなわち約250,000-300,000（超高粘度と称する）、約170,000-約220,000（高粘度と称する）、約120,000-150,000（中粘度と称する）及び約25,000-約35,000（低粘度と称する）の範囲で市販されている。一般に、ポリビニルアルコールの分子量が低いほど、水感受性、すなわち水への溶解し易さが高くなる。しかし、アルコール分解の程度も、ポリビニルアルコールの水溶解性及び他の諸特性に関して重要な役割を果たす。上述した全分類内のポリビニルアルコール、例えば、メチルエーテル誘導体などのそのエーテル誘導体が本発明に関連する。

10

【0018】

他の対象とするポリビニルポリマー材料としては、中圧及び低圧液体クロマトグラフィ用に設計された半硬質球状ゲル粒子である多孔質のToyopearl（商標）HWシリーズなどの材料がある。このような材料によって、活性化及び官能化／誘導体化の後、本発明に関連するIMAC吸収剤を調製するための別の選択肢が提供される。（Tosoh Corp、Yamaguchi、Japan及び他の供給源から入手可能な）Toyopearl（商標）HWゲルは、もっぱらC、H及びO原子のみを含有する親水性ビニルポリマーから合成される。入手可能なグレード（粒子及び細孔サイズによって異なる）は、Toyopearl（商標）HW-40、HW-40C、HW-40F、HW-40S、HW-50、HW-50F、HW-50S、HW-55、HW-55F、HW-55S、HW-65F、HW-65S及びHW-75Fなどである。

20

【0019】

ポリアクリルアミド及びその誘導体（Ultrogel（商標）AcAゲル（例えば、Amersham Pharmacia Biotechから入手可能なビーズ状の複合ポリアクリルアミド-アガロースゲル）などのポリアクリルアミドとアガロースベースの複合材料を含む）。Ultrogel（商標）AcAゲルシリーズには、AcA 22、AcA 34、AcA 44及びAcA 54などがある。数字はアクリルアミドとアガロースの割合を示し、すなわち、AcA 22は2%のアクリルアミドと2%のアガロースを含有する。これらの担体材料のヒドロキシル基を活性化することによって、IMAC吸収剤の調製方法が提供される。

30

【0020】

表面改質シリカ（LiChrospher（商標）Diol（E. Merck、Darmstadt、Germany）、Toyosoda（商標）TSKSW3000（Tosoh Corp、Yamaguchi、Japan）などのグリシジルプロポキシ変性多孔質シリカ、アミノプロピルジエトキシシランと適切な細孔サイズ及び適切な平均直径のシリカとの（適切な触媒の存在下での）反応によって調製されるアミノプロピル変性シリカ、及びメルカプトプロピルジエトキシシランと適切な細孔サイズ及び適切な平均直径のシリカとの（適切な触媒の存在下での）反応によって調製されるメルカプトプロピルシリカを含む）。あるいは、適切な細孔サイズ及び適切な平均直径のデキストラン変性又はブタジエン-ビニルコポリマー変性シリカを、クロマトグラフィの担体材料として使用することができる。このように誘導体化し、その後変性してそれぞれ新規なIMAC吸収剤を生成させるのに適切な「裸の」多孔質シリカは、E. Merck、（Darmstadt、Germany）、Tosoh Corporation、Yamaguchi、Japan）、Eka-Nobel AB（Goeteborg、Sweden）及びGrace Davison GmbH（Worms、Germany）を含めて様々な供給源から容易に入手可能である。

40

【0021】

表面改質金属酸化物（第2の金属酸化物を「ドーブ」したそれぞれの金属酸化物に基づくグリシジルプロポキシ変性多孔質ジルコニア、チタニア又はアルミナ、並びにそれらの変性体／変異体；アミノプロピルジエトキシシランと適切な細孔サイズ及び適切な平均直

50

径のジルコニア、チタニア又はアルミナとの（適切な触媒の存在下での）反応によって調製されるアミノプロピル変性ジルコニア、チタニア又はアルミナ；及びメルカプトプロピルジエトキシシランと適切な細孔サイズ及び適切な平均直径のジルコニア、チタニア又はアルミナとの（適切な触媒の存在下での）反応によって調製されるメルカプトプロピル変性ジルコニア、チタニア又はアルミナを含む）。あるいは、適切な細孔サイズ及び平均直径のデキストラン変性又はブタジエンービニルコポリマー変性ジルコニア、チタニア又はアルミナを、クロマトグラフィの担体材料として使用することができる。このように誘導体化し、その後変性してそれぞれ新規な I M A C 吸収剤を生成させるのに適切な「裸の」多孔質ジルコニア、チタニア又はアルミナは、Y M C Co. L t d. (K Y O T O, J a p a n)、G r a c e G m b H (W o r m s, G e r m a n y) 及び B i o S e p r a C o r p. (P a r i s, F r a n c e) を含めて様々な供給源から容易に入手可能である。

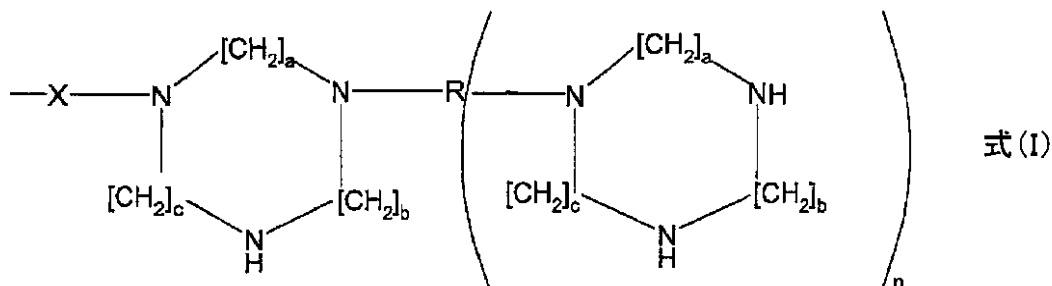
【0022】

本発明に適したポリマー基材としては、アガロース、デキストラン及びそれらの誘導体、例えば、上述したものの中から選択される材料などがある。

【0023】

本発明の一側面においては、本発明による官能化ポリマー基材中の金属イオン配位環式リガンド基は、少なくとも3つの金属イオン配位ドナー原子が少なくとも6つの環原子を含む環中に存在する複素環式基である。そのような官能化ポリマー基材の中でも、特に適切なタイプの複素環式基は、少なくとも6つの環原子を有するトリアザシクロアルカンから誘導される基と考えられ、このクラス内の官能化ポリマー基材における（上で定義した）官能基の好ましいタイプは、一般式（I）を有する官能基である。

【化6】



【0024】

式中、 n は0又は1-3の整数であり、

各トリアザシクロアルカン環中の a 、 b 及び c の各々は、互いに独立して、かつ他のあらゆるトリアザシクロアルカン環から独立した1-3の整数であり、

各トリアザシクロアルカン環中の各 $-CH_2-$ 基の1つ又は両方の水素原子は、互いに独立して、かつ他のあらゆるトリアザシクロアルカン環から独立して、ある置換基で任意に独立に置換することができ；

各トリアザシクロアルカン環中の各 $-NH-$ 基の水素原子は、互いに独立して、かつ他のあらゆるトリアザシクロアルカン環から独立して、ある置換基で任意に置換することができ；

n が0であるときは、 R は H 又はある置換基であり；

n が1であるとき、すなわち、官能基が2つのトリアザシクロアルカン環を含むときは、 R は、2つのトリアザシクロアルカン環を連結する（すなわち、各々に共有結合する）二官能基であり、この二官能基は任意に1つ以上の金属イオン配位ドナー原子を含み；

n が2又は3のとき、すなわち、官能基がそれぞれ3つ又は4つのトリアザシクロアルカン環を含むときは、 R は、それぞれ3つ又は4つのトリアザシクロアルカン環を連結する（すなわち、各々に共有結合する） $(n+1)$ 官能基であり、この $(n+1)$ 官能基は任意に1つ以上の金属イオン配位ドナー原子を含み；

Xはリンカー／スペーサー基である。

【0025】

本発明のこの後者の側面に関連して、上で定義した式(I)の官能基中の環-CH₂-基及び／又は環-NH-基中の水素原子を置換する上述の任意選択の置換基は、任意に置換される低級アルキル基及び任意に置換されるアリール基の中から適切に選択され、特に、上で定義した式(I)の官能基中の環-CH₂-基中の水素原子を置換するのに適切な任意選択の置換基の別の例は、任意に置換される低級アルコキシ基である。当該低級アルキル基、低級アルコキシ基又はアリール基上の任意選択の置換基は、必要に応じて、1つ以上の金属イオン配位ドナー原子、特に1つ以上のN、O又はSドナー原子を含むことができる。

10

【0026】

1つ以上の環-NH-基の水素原子を置換する任意選択の置換基としての低級アルキル基(メチル、エチル、プロピルなど)の場合、ある種の金属イオン[特に、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺又はZn²⁺などの「硬い」金属イオン又は「境界にある硬さの(borderline hardness)」金属イオン(下記参照)]に対する官能基の金属イオン配位特性に関連し得るこの低級アルキル基上のO含有置換基としてはカルボキシ／カルボキシレート(pHに応じて-COOH／-COO⁻)などがあり、したがって、環N原子上のこのような置換基の例は、カルボキシ置換低級アルキル基、特にカルボキシメチル(-CH₂COOH)(特に、対応する脱プロトン化体、すなわち-CH₂COO⁻)である。同様に、1つ以上の環N原子に結合した低級アルキル基上の置換基として存在し得る関連N含有基は、アミノ置換低級アルキル基、特に2-アミノエチル(-CH₂CH₂NH₂)又は3-アミノプロピル(-CH₂CH₂CH₂NH₂)などである。

20

【0027】

1以上の環N原子上の水素原子を置換する置換基として存在し、それ自体ある種の金属イオン[特に、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺又はZn²⁺などの「硬い」金属イオン又は「境界域にある硬さの」金属イオン(下記参照)]に対する官能基の金属イオン配位特性に関連し得る他の関連するタイプの任意選択の置換基としては、-PO₃H₂(又はその脱プロトン化体、すなわち、-PO₃H⁻)などがある。

【0028】

本発明に関連して使用する「低級アルキル基」という用語は、1-6個の炭素原子を有するあらゆる線状(直鎖)、分枝又は環式アルキル基を指す。線状アルキル基の例は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル及びヘキシルであり、分枝アルキル基の例は、イソプロピル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソペンチル及びイソヘキシルであり、環式アルキル基の例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシルである。一般に、1-3個の炭素原子を有する低級アルキル基が、本発明に適している。

30

【0029】

本発明に関連して使用する「低級アルコキシ基」という用語は、1-6個の炭素原子を有するあらゆる線状、分枝又は環式アルコキシ基を指す。線状アルコキシ基の例は、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシ及びヘキソキシであり、分枝アルコキシ基の例は、イソプロポキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、イソペントキシ及びイソヘキソキシであり、環式アルコキシ基の例は、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオキシ、シクロペンチルオキシ及びシクロヘキシルオキシである。一般に、1-3個の炭素原子を有する低級アルコキシ基が本発明に適している。

40

【0030】

本明細書に関連する「アリール」という用語は、あらゆる芳香族基を指し、炭素環式芳香族基と複素環式芳香族基の両方を含む。その例は、フェニル、ナフチル、ピリジル、テトラゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、インドリル、キノリニル、ピリミジニル、チアジアゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チエニル、フラニル又はオキサジアゾリルである。本発明に関連するアリール基上の適切な任意選択の置換基としては

50

、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、低級アルキル、低級アルコキシなどがある。

【0031】

「ハロゲン」という用語は、F、Cl、Br又はIを指す。

【0032】

したがって、上で定義した式(I)の官能基中の環-CH₂-基及び／又は環NH-基上の任意選択の置換基として関連する置換基としては、複素環式環中に1つ以上のN、O又はS原子を含む複素環式芳香族基などがある。また、上で定義した式(I)の官能基中の環-CH₂-基及び／又は環-NH-基上の任意選択の置換基として関連する別の置換基としては、複素環式環中に1つ以上のN、O又はS原子を含む飽和複素環式基などがあり、N-複素環式基が適している場合が多い。この状況において関連する飽和複素環式基の例は、2-アジリジル、2-及び3-アゼチジル(azetidyl)、2-及び3-ピロリジル、2-、3-及び4-ピペリジルなどである。上で定義した1つ以上の置換基、例えば低級アルキル、低級アルコキシ又はハロゲンは、必要に応じてこのような飽和複素環式基中に存在することができる。

10

【0033】

この状況において使用される「金属イオン配位ドナー原子」という用語は、(それが発生した基／置換基中に存在し)本発明に関連する金属イオンと配位結合(coordination bond)(錯体結合(complex bond)、ドナー結合(donor bond))を形成可能な原子、特にN、O又はS原子を表す。この状況において特に目的とする金属イオンは、本明細書で定義する「硬い」、「軟らかい」及び「境界にある」金属イオン(いくつかの遷移金属イオン及びある種の非遷移金属イオン)である(下記参照)。

20

【0034】

上で定義した式(I)の官能基中のリンカー又はスペーサー基(spacer group)Xは、リンカー又はスペーサーのあらゆる適切なタイプとすることができるが、一般に、二官能有機化合物(例えば、カルボキシル、チオール、アミノプロピル、ハロゲン及びエポキシなどの基から選択される少なくとも2つの反応性官能基を有する有機化合物)から、一方で、ポリマー基材上の適切な反応性官能基と反応し、もう一方で、金属イオン配位環式リガンド基上の適切な反応性官能基(一般にアミノ基又は置換アミノ基)と反応することによって誘導され得るリンカー又はスペーサーである。本発明に関連して一般に極めて有用なタイプのリンカー又はスペーサー基Xは、エピクロロヒドリンから、そのハロゲン末端が、例えば、当該ポリマー基材表面のヒドロキシ基と反応し、次いでそのエポキシ基が環式リガンド基中のアミノ基又は置換アミノ基と反応して誘導し得るものである。本明細書の実施例122のスキーム8にその概略を示す(下記参照)。

30

【0035】

本発明の極めて汎用的な側面においては、本発明の官能化ポリマー基材中のポリマー基材は、アガロース又はアガロース誘導体(例えば、Sephacrose(商標)ゲル)であり、金属イオン配位官能基は、1、2又は3トリアザシクロアルカン環を含む官能基などの1-4個のトリアザシクロアルカン環を含む(すなわち、nが0、1、2又は3である)上記式(I)で示されるタイプである。このような各トリアザシクロアルカン環は、1、4、7-トリアザシクロノン-1-イル基[すなわち、1、4、7-トリアザシクロノナン(tacn)から誘導される]、すなわちパラメータa、b及びc[式(I)参照]が各々2であるものが極めて適切であり得る。

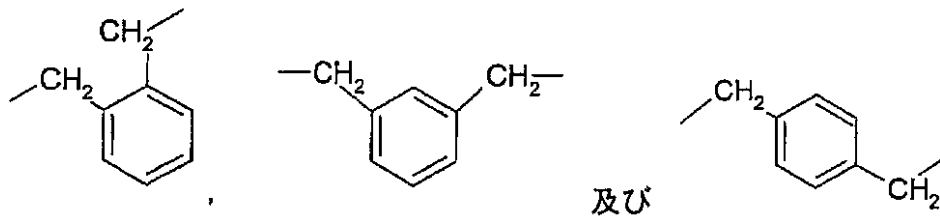
40

【0036】

官能基がそのような環をただ1つしか含まない(すなわちn=0)ときには、基Rは、水素であることが適切であり、官能基がそのような環を2つ含む(すなわちn=1)ときには、Rは、以下の

[CH₂]_m- (式中、mは2、3又は4である)、

【化 7】



【0037】

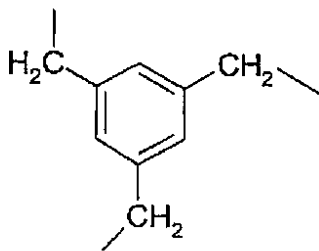
10

及びその置換誘導体から選択することが極めて適切であり、関連する任意選択の置換基としては上述したものなどがある。

【0038】

当該官能基がそのような環を3つ含む（すなわち $n = 2$ ）ときには、Rは、

【化 8】



20

【0039】

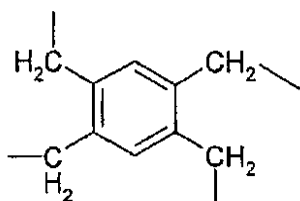
又はその置換誘導体のタイプの基であることが適切であり、関連する任意選択の置換基としてはやはり上述したものなどがある。

【0040】

当該官能基がそのような環を4つ含む（すなわち $n = 3$ ）ときには、Rは、

【化 9】

30



【0041】

40

又はその置換誘導体タイプの基であることが適切であり、関連する任意選択の置換基としてはやはり上述したものなどがある。

【0042】

リンカー又はスペーサー基Xは、エピクロロヒドリンとアガロース又はアガロース誘導体の形のポリマー基材との反応、及び得られた生成物とXと結合するトリアザシクロアルカン環の環-NH-基との後続反応によって、エピクロロヒドリンから誘導され得る基であることが極めて適切である。

【0043】

本明細書の開示から明らかなように、所望のタンパク質（目的タンパク質）を単離し精製する本発明によって使用される材料（官能化ポリマー基材）の重要な特徴は、官能基中

50

の環式リガンド基（例えば、1, 4, 7-トリアザシクロノン-1-イル基などのトリアザシクロアルキル基）にそれ自体が配位結合し、オリゴペプチド「タグ」が目的タンパク質のアミノ酸配列に結合している融合タンパク質のオリゴペプチド「タグ」部分のアミノ酸残基中のドナー原子に適切に選択的に配位結合できる金属イオンが材料中に存在することである。したがって、上述したように本発明の別の側面は、官能基中の環式リガンド基の少なくとも1つがそれに配位する金属イオンを有する官能化ポリマー基材に関する。一般に、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 及び Cr^{3+} から選択される金属イオンなどの二価（2+帯電）及び三価（3+帯電）の（非遷移金属イオンと遷移金属イオンの両方を含めた）金属イオンは、この状況に適している。本明細書の実施例に示すように（下記参照）、 Cu^{2+} は、この点で特に汎用の金属イオンであることが判明した。

10

【0044】

すでに簡単に示したように、本発明の別の側面は、本発明による官能化ポリマー基材を調製するためのプロセスに関し、このプロセスは、

第1及び第2の官能基を有する二官能試薬の第1の官能基と第1の反応を起こすことが可能な反応性官能基を有するポリマー基材を選択するステップであって、当該第1の反応の結果、ポリマー基材と二官能試薬の共有結合が形成され、得られた共有結合試薬の第2の官能基が、続いて、N、O及びSから独立に選択される少なくとも3つの金属イオン配位ドナー原子を含む金属イオン配位環式リガンド基を含む化学種中に存在する反応性官能基と第2の反応を起こすことができ、第2の反応の結果、当該化学種と共有結合試薬の共有結合が形成されるステップと、

20

このポリマー基材を二官能試薬と反応させるステップと、

得られた共有結合試薬を当該化学種と反応させるステップとを含む。

【0045】

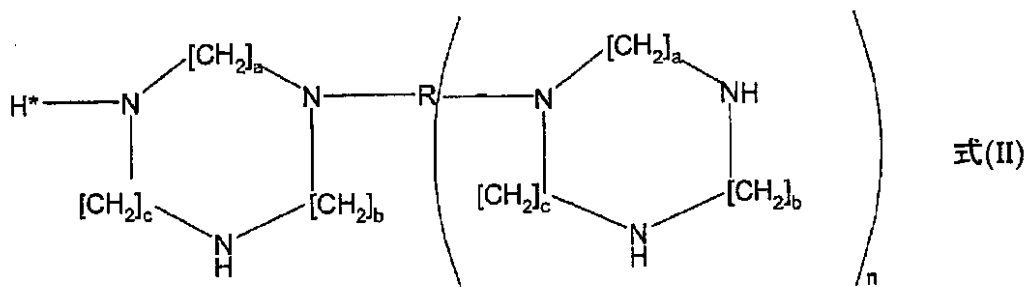
本発明による後者のプロセスに関連して、このプロセスで使用するポリマー基材、及び反応種中の金属イオン配位環式リガンド基は、本発明による官能化ポリマー基材に関連して上述したもののの中から選択することができる。使用する二官能試薬は、一般に、二官能有機化合物、例えば、カルボキシル、チオール、アミノプロピル、ハロゲン、エポキシなどの基から選択される少なくとも2つの反応性官能基を有する有機化合物である。エピクロロヒドリンは、表面ヒドロキシル基を有する多糖及びその誘導体を含めて、いくつかのタイプのポリマー基材に対する二官能試薬として特に有用である。

30

【0046】

本発明による官能化ポリマー基材に関連した上記考察から明らかなように、金属イオン配位環式リガンド基を含有する反応種は、（得られた官能化ポリマー基材生成物中の）上記式（I）に示すタイプの官能基を生じるものが適切である。本発明のプロセスで使用するのに適切な反応種は、下記一般式（II）の化学種などである。

【化10】



40

【0047】

パラメータ n 、 a 、 b 及び c の大きさ、並びに基 R の性質は、本発明による官能化ポリマー基材に関連して上述したものに对应する。また、各トリアザシクロアルカン環中の各 $-\text{CH}_2-$ 基の一方又は両方の水素原子は、互いに独立して、かつ他のあらゆるトリアザ

50

シクロアルカン環から独立して、ある置換基によって任意に且つ独立に置換することができる。この任意選択の置換基は、任意に、1つ以上の金属イオン配位ドナー原子（一般にN、O又はS）を含む。また、各トリアザシクロアルカン環中の各-NH-基の水素原子は、H*以外、互いに独立して、かつ他のあらゆるトリアザシクロアルカン環から独立して、ある置換基で任意に置換することができる。この任意選択の置換基は、任意に、1つ以上の金属イオン配位ドナー原子を含む。この状況における任意選択の置換基は、式（I）の官能基に関連して上述したものの中から同様に選択することが適切であり得る。

【0048】

上述の考察から明らかなように、アガロース及びアガロース誘導体（上述したSepharose（商標）製品など）は、本発明による上述のプロセスに関連するポリマー基材として、特に式（II）の化学種と組み合わせて適している。適切な二官能試薬はエピクロロヒドリンであり、これに関連してポリマー基材をエピクロロヒドリンと反応させるときに、ホウ化水素ナトリウムなどの還元剤を反応混合物中にさらに混合することが有利であり得る。

【0049】

本発明の範囲は、官能化ポリマー基材を調製するための上述したプロセスによって得られる又は得ることができる官能化ポリマー基材をさらに包含する。

【0050】

また、本発明の範囲は、その中の少なくとも1つの金属イオン配位環式基に配位する金属イオンをさらに含む本発明による官能化ポリマー基材を調製するためのプロセスも包含する。このプロセスは、本発明による官能化ポリマー基材を、当該金属イオン（例えば、上述した金属イオンの1つ）の無機塩〔例えば、硝酸塩、ハロゲン化物（フッ化物、塩化物、臭化物又はヨウ化物）、硫酸塩、過塩素酸塩、テトラフルオロホウ酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩又はリン酸塩〕又は有機塩〔例えば、カルボン酸塩（ギ酸塩、酢酸塩、プロパン酸塩又は安息香酸塩）、テトラフェニルホウ酸塩又はスルホン酸塩〕の水溶液と接触させることを含む。このようなプロセスによって得られる又は得ることができる金属イオン含有官能化ポリマー基材も本発明の範囲に属する。

【0051】

本発明による官能化ポリマー基材中の金属イオン配位大環状リガンドの選択基準、及び好ましいペプチドタグの位置、構造及び諸特性に関する基準

A：金属イオン配位大環状リガンドの選択基準：上述したように、本発明に関連して定義される官能化ポリマー基材の極めて重要で貴重な適用例は、タンパク質の精製におけるその金属イオンを含有する態様の使用である。当該タンパク質は、融合タンパク質の形をしており、目的タンパク質がそのアミノ又はカルボキシ末端においてオリゴペプチド「タグ」、特に本発明によるヒスチジン含有オリゴペプチドに融合している。また、目的タンパク質又はポリペプチドの2つの分子、あるいはそのアミノ又はカルボキシ末端がそれぞれオリゴペプチド「タグ」、特に本発明によるヒスチジン含有オリゴペプチドに結合している2つの異なる目的タンパク質又はポリペプチドの同時融合によって、新しい融合タンパク質構造が生成され、それによってオリゴペプチド「タグ」がエンドの位置（すなわち、内部の位置）に置かれて、目的タンパク質又はポリペプチドの2つの分子を連結する。特定の理論に拘泥するものではないが、本発明に関連して本発明者らが実施した研究において得られた結果に基づいて、本発明者らは、本発明のこの側面の根底にある現象は、金属イオン／リガンド錯体とN末端、C末端又はエンド位置のオリゴペプチド「タグ」として融合タンパク質内に存在する相補オリゴペプチド配列との分子相互作用を可能にし、金属イオン／リガンド錯体及び「タグ」のペプチド配列内のその同族の結合相手の分子サイズ及び表面配向によって決まる「分子カセット」とみなすことが適切であると考えられる。したがって、既述されたすべてのキレート系と比較して、導入したペプチド「タグ」によって組換えタンパク質を捕捉する本発明の官能化ポリマー基材における金属イオン結合キレートリガンド系の主要な特性及び利点は、少なくとも以下の特徴の非排他的なリストに関係付けることができると考えられる。

【0052】

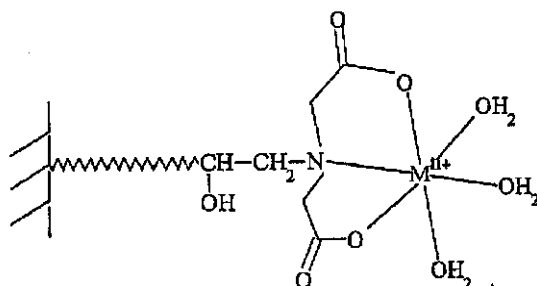
(a) 本発明のキレートリガンド系は、イミノ二酢酸（IDA）、ニトリロ三酢酸（NTA）及び同様のリガンドに基づく系によって得られるよりもはるかに高い安定度定数（すなわち、金属イオン結合定数）を有し、その結果、緩衝液によって誘導される又はタンパク質除去用金属イオンの漏洩による有害な望ましくない効果が大いに抑制される。

【0053】

(b) 本発明の金属イオン含有官能化ポリマー基材における金属イオン含有錯体の配位構造は、例えば、IDA又はNTAキレートリガンドを用いて観測される配位構造とは異なる。すなわち、電荷 $n+$ の金属イオン（M）では、 $n=2$ の場合の $M^{n+}-IDA$ 又は $M^{n+}-NTA$ の配位構造は八面体（下記スキーム1参照）であることが多い。

10

【化11】



20

【0054】

スキーム1. リガンドが配位八面体の1面を占有している従来のIDA又はNTA型キレートリガンドとの M^{n+} 錯体の配位構造の八面体配置の説明図。カルボキシル基由来の2つの酸素ドナー原子が互いに反対の位置（すなわち、トランス配置）にある別のリガンド配置も可能である。

【0055】

しかし、歪んだ三角錐体又は四角錐体に対応する配位構造も発生し得る。これは、IDA又はNTA型キレートリガンド系が、得られる選択性が限られ予測不可能な結果になる非拘束キレート系として挙動し得ることを意味する。このようなキレートリガンド系では、 Cu^{2+} は5又は6配位構造をとり易く、 Ni^{2+} はもっぱら6配位構造をとることも言える。これに対して、例えば、 $M^{n+}-tacn$ 、 $M^{n+}-dtne$ ／ $-dtnp$ リガンド系、並びに例えば、ビスー、トリスー及びテトラキス（ $tacn$ ）リガンド系〔その調製及び使用は実験の項（下記参照）に記載されており、本発明に関連する極めて有用なリガンド系である〕が、例えば、 Cu^{2+} と共にとる配位構造は、主に、リガンド上のすべての金属イオン配位ドナー原子が同一面にあり配位ポリ多面体の三角形の面を占めている四角錐体である。他の大環状リガンド、例えば、2つの窒素ドナー原子と1つの酸素ドナー原子を含むリガンド（ N_2O ）、2つの窒素ドナー原子と1つの硫黄ドナー原子を含むリガンド（ N_2S ）、及び1つの窒素ドナー原子と2つの硫黄ドナー原子を含むリガンド（ NS_2 ）の場合、類似の「三角形」構造が得られる。また、同様の構造が、ビス（ $tacn$ ）（ N_6 ）、トリス（ $tacn$ ）（ N_9 ）及びテトラキス（ $tacn$ ）（ N_{12} ）リガンド系によってとられる。その結果、本発明において使用する環式又は大環状リガンド系は、新規な固定化金属イオン親和性クロマトグラフィ（IMAC）システムに使用するのに極めて適した予測可能な拘束型配位構造となり、金属イオン、金属イオンと相互作用し得る溶媒和／緩衝液成分の性質に応じて、さらにはペプチド配列内のアミノ酸残基の性質及び配向に応じて、好ましいペプチド（オリゴペプチド）「タグ」構造の選択に対する基本原理が与えられ得る。

30

40

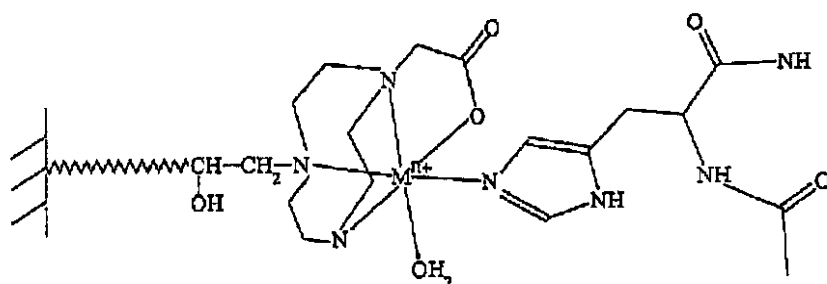
【0056】

したがって、本発明に関連して使用したオリゴペプチド「タグ」配列の設計及び選択の指針の1つは、これらの $tacn$ 、ビス（ $tacn$ ）、トリス（ $tacn$ ）及びテトラキス（ $tacn$ ）由来の金属イオン／大環状リガンド錯体及びそれらの構造的に関係する類

50

縁体及び誘導体の実質的にすべてが配位部位に対して三角形構造を有し、すなわち金属イオンに配位するときに、実質的にすべてのこれらの大環状リガンドが金属イオンの配位多面体の三角面を占有するということであった。この注目すべき特性は、本発明に織り込まれ、オリゴペプチド「タグ」への結合に対して（又は、さらに言えば、目的タンパク質のペプチド配列中のアミノ酸残基に対して）これまで可能であったよりも高い特異性／選択性を得るために利用された。したがって、この構造原理は、本発明者らが認識した後は、本明細書に開示する本発明の形成に重要な原理となった。本発明の環式又は大環状リガンド系と従来用いられたリガンド系との配位結合の配置に関するこの基本的な相違は、環式／大環状リガンド錯体の場合、金属イオンが大環状リガンドの「ひだ状の」面に位置し、「タグ付き」タンパク質（融合タンパク質）の入りの（incoming）オリゴペプチド「タグ」の接近及び配向が一方向になることを意味している。構造組織におけるこのような重要な相違の例は、（固定化 M^{n+} 含有N-カルボキシメチル化tacnリガンドに対する入りのヒスチジン残基のイミダゾイル基の配向配置を示した）下記スキーム2に示す配置を従来用いられたIDA又はNTA系と比較することによって示すことができる。

【化12】



【0057】

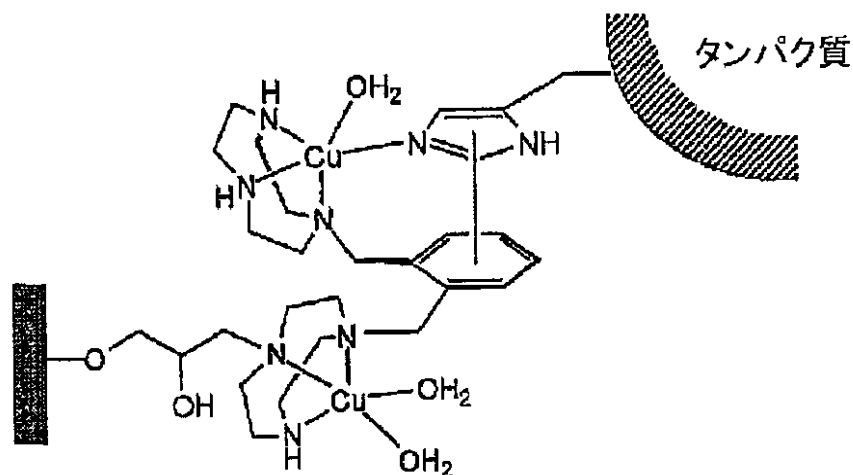
スキーム2.（この場合N-ドナーとして働く）入りのHis残基のイミダゾイル基の接近方向を示す、N-カルボキシメチル化tacnキレートリガンドと八面体配位した M^{n+} イオンの「ひだ状の（puckered）」配向配置。

【0058】

このN-カルボキシメチル化tacnの例は、さらに、入りのオリゴペプチド「タグ」に利用可能な部位の数を制御し、固定金属錯体の全電荷を調整し得ることを明示するものであり、それによってさらに結合相互作用を制御することが可能になる。本発明の一部を形成する他の三座配位単環大環状分子に対して類似の構造体を作製することができる。このことは、リガンド設計と金属イオンの適切な組み合わせによって、入りのオリゴペプチド「タグ」との結合相互作用を制御することが可能になるということをさらに明示するものである。また、類似のtacn、ビス(tacn)、トリス(tacn)及びテトラキス(tacn)由来の金属イオン／大環状リガンド錯体、並びにカルボキシメチル、アミノエチル、アミノプロピルなどの懸垂結合成分（pendant binding moieties）を有するそれらの構造的に関係する類縁体及び誘導体は、2つの金属配位部位が利用されて水和（aquo-hydrated）錯体又は加水分解錯体（hydrolytic complexes）を形成する単核大環状リガンドの場合にも使用することができる。例えば、スキーム3は、（o-キシレニル架橋中の）フェニル環のπ電子系とオリゴペプチド「タグ」又は融合タンパク質の（ヒスチジン残基中に存在する）イミダゾリル環との結合相互作用のさらなる可能性を示すo-キシレニル架橋ビス(tacn)型リガンドの（固定化） Cu_2 （di-copper）（II）錯体に対する配向アレイ（orientational array）を示している。N-カルボキシメチル、N-アミノエチル、N-アミノプロピル成分などの（1つ以上の第二級アミノ基に化学結合した）懸垂構造をさらに導入することによって、懸垂アームの電荷状態に応じて、金属イ

オンキレート化を進めることができる別の構造類縁体が提供される。

【化 1 3】



10

【0059】

スキーム 3. キレートリガンド中のイミダゾイル基とオルトジ置換フェニル環との $\pi \rightarrow \pi$ 相互作用の例における注目すべき特徴を示す、 Cu^{2+} 含有 α, α' -ビス (1, 4, 7-トリアザシクロノナニル) -オルト-キシレンキレートリガンドの配向アレイ。注：これらのビス系 (b i s - s y s t e m s) では、示差的に示した表面に接触可能な標的的目的タンパク質内のアミノ酸残基由来の 2 つのドナー基が、リガンドと同時に相互作用する可能性がある。あるいは、これらの残基は、タグのアミノ酸配列構造の一部として存在し得る。これは、本発明の側面を構成する特異的オリゴペプチドタグに対する好ましいアミノ酸配列の設計及び選択の根底にある考慮事項の 1 つであった。

20

【0060】

ビス系の場合、錯体が (スキーム 3 に示すように) 「開いた」形又はいくつかの Ni^{2+} 系で見られるような「サンドイッチ」の形 (スキーム 6 参照) のどちらであるかも考慮に入れる必要がある。当該タイプの大環状リガンド、特に、ビス、トリス及びテトラキス型リガンドの特徴がこのような極めて特殊なので、(a) 入りのオリゴペプチド「タグ」(又は、さらに言えば、目的タンパク質自体の表面接触可能なアミノ酸残基) に対する接近構造、(b) pH の影響、(c) O-及び/又は N-ドナー効果の相互作用の点で異なる好ましいアミノ酸配列を有するオリゴペプチド「タグ」に対する結合の選択性、(d) 極めて特異的な緩衝液イオン相互作用の結果、及び関与する大環状環単位数の点で、かなりの自由度がもたらされる。後者の諸特性はすべて、本新規発明の進歩性と重要性に寄与し、本発明者らの知る限りでは、オリゴペプチド「タグ」融合タンパク質の使用は、従来の I M A C システムでは実証されていなかった。

30

【0061】

(C) これまで検討された $2+$ 及び $3+$ に帯電した金属イオンのすべて、すなわち、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{3+} 及び Fe^{3+} では、溶出条件 (実験の項参照) の選択に関する本発明者らの研究は、金属イオン/大環状リガンド錯体は (錯体は全体として電気的中性ではあるが) 実際には僅かの正電荷を有するという事実にもかかわらず、固定化金属イオン/大環状リガンド錯体における入りのタンパク質上 (すなわち、オリゴペプチド「タグ」上及び/又はタンパク質自体の上) の金属イオン結合ドナー基と金属イオン上の配位可能な部位 (例えば、容易に置換可能な水分子、ハロゲン化物イオンなどによって当初占有されている配位部位) との配位結合 (電子供与) は、利用可能なときには、優勢な結合機序であることを明確に示している。これは、結合タンパク質の脱離が極めて選択的な溶出緩衝液条件を必要とすることから明らかである。例えば、従来使用された I D A 又は N T A を用いた I M A C システムに比べると、オリゴペ

40

50

チド「タグ」構造内の複数のアミノ酸残基が関与する協同的結合効果によって媒介される相互作用と共に、異なる（より高い）結合親和性を示すはるかに選択的な溶出条件を使用することができる。したがって、イオン強度依存性及びpH依存性の面で、従来用いられた非拘束型IDA又はNTA型キレートリガンドよりもはるかに有利な溶出挙動が認められたことは極めて驚くべきことであった。

【0062】

スキーム3の説明文で述べたように、ビス系では（並びにトリス及びテトラキス系でも）、タンパク質内の2つ（又はそれ以上）の示差的に示した表面に接触可能なアミノ酸残基由来の2つ（又はそれ以上）のドナー基と本発明のクラスのIMACリガンドとが同時に相互作用する可能性がある。しかし、この場合、所望の範囲の親和性をもたらすアミノ酸配列は、キレート金属イオンと当該特異的オリゴペプチド「タグ」とのそれぞれの相互作用に対して微調整することができるので、最適な相互作用を得るために、オリゴペプチド「タグ」配列内に適正に配置された適切なアミノ酸残基を提供することは、好ましい選択肢である。オリゴペプチド「タグ」のアミノ酸残基の側鎖内にドナー基を配向させて配置するこの考え方を利用することは、本発明の側面を構成する特異的オリゴペプチド「タグ」に対する好ましいアミノ酸配列パターンを設計し選択する際の基本的考慮事項の1つであった（下記セクションB及びDも参照されたい）。

【0063】

便宜上、説明を簡単にするために、この手法は、分子カセットシステムを形成すると考えることができる。固定化金属イオン／リガンド系、及びオリゴペプチド「タグ」の調整済みアミノ酸配列特性の両方によって、オリゴペプチド「タグ」内の同種配列を正確に認識することが可能な正しい原子距離で配置された固定化金属イオン／リガンド系内の結合部位を有する「分子ピンセット（molecular tweezers）」システムが形成される。

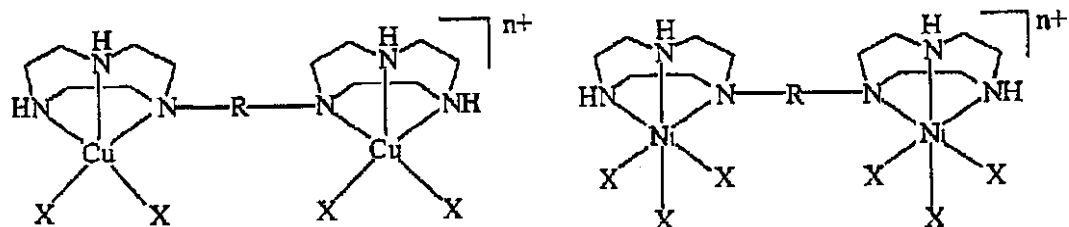
【0064】

(d) 本タイプのキレート大環状リガンドに結合したときに M^{n+} イオンの特徴を有することが証明された表面配向「ひだ状」三角配位構造を使用した結果、本タイプの大環状錯体は、境界にある「硬さ」の金属イオン、例えば Cu^{2+} 、又は「硬い」金属イオン、例えば Co^{3+} を含むIDA又はNTA型キレートリガンドで見られるものとは異なる加水分解挙動を示す。金属イオンに関連して本明細書において使用する「硬い」、「硬さ」及び「軟らかい」という用語の意味は、R. G. Pearson（例えば、S. F. A. Kettle, Coordination Chemistry, Thomas Nelson and Sons Ltd., 1969, pp. 48-49参照）によるものであることに留意されたい。尺度の一端にある「硬い」金属イオンは、リガンドへの結合に関してプロトンに匹敵するものであり、小さく、高い電荷を有することが多く、容易に変形し又は除去される原子価殻電子を欠いたものであり、例えば、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{3+} 及び Fe^{3+} である。尺度のもう一端にある「軟らかい」金属イオンは、大きく、低電荷であり、容易に変形し又は除去される原子価殻電子を有し、例えば、 Cu^{+} 、 Ag^{+} 及び Cd^{2+} である。その特性が硬い金属イオンと軟らかい金属イオンの境界にある、すなわち、境界にある硬さの金属イオンは、例えば、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 及び Cu^{2+} である。

【0065】

これは、本IMACシステムのpH依存性及び塩依存性が、従来用いられたシステムのそれとは異なり、添加又は溶出緩衝液における任意の有機溶媒、例えば、エタノール又はアセトニトリルの有無の影響も異なることを意味する。また、本IMACシステムが使用可能な配位構造のタイプは、より拘束の少ないIDA又はNTA型IMACシステムのそれとは異なる。これらの特徴は、スキーム4における Cu^{2+} 及び Ni^{2+} の開いた構造の二核ビス(tacn)リガンド錯体、スキーム5における Cu^{2+} 及び Ni^{2+} の単核非サンドイッチ構造、及びスキーム6におけるtacn及びビス(tacn)リガンドの単核 Cu^{2+} 及び Ni^{2+} サンドイッチ錯体の例で示されている。

【化 1 4】



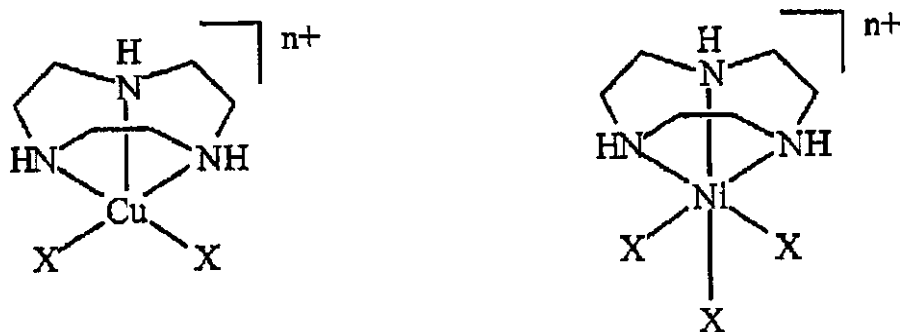
$R = (\text{CH}_2)_n$, $n = 2-4$, *o*-, *m* & *p*-キシリル; $X = \text{H}_2\text{O}$, ハロゲン化物, . . .

10

【0066】

スキーム 4. 非サンドイッチ型の二核銅 (II) 及びニッケル (II) ビス (tacn) 錯体

【化 1 5】



20

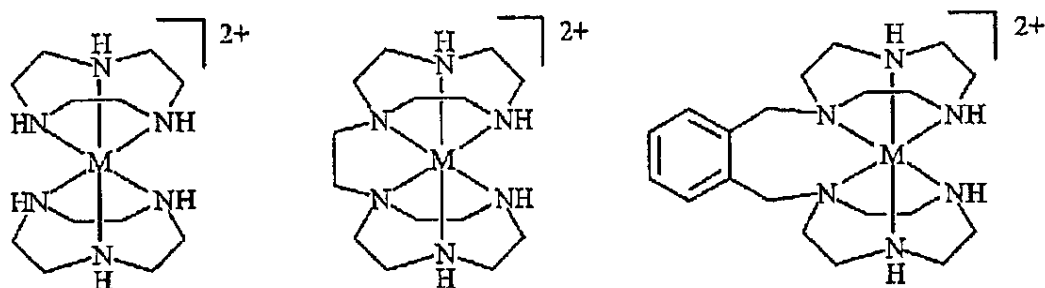
$X = \text{H}_2\text{O}$, ハロゲン化物, . . .

【0067】

スキーム 5. tacn 及びビス (tacn) リガンドの単核銅 (II) 及びニッケル (II) 非サンドイッチ錯体

30

【化 1 6】



40

$M = \text{Cu}$ 又は Ni

【0068】

スキーム 6. 単核銅 (II) 及びニッケル (II) tacn 及びビス (tacn) サンドイッチ錯体

本発明に関連するいくつかの特徴を挙げることができる。第 1 に、本固定化キレート大環状リガンドの配位構造は、異なる立体電子効果 (steri-electronic effects) パターンを生じ、金属イオン結合定数に関して異なる親和性をもたらす。第 2 に、スキーム 4-6 から明らかなように、単核及び二核の開いた構造、非サンドイ

50

ッチ及びサンドイッチ構造に対して金属イオンキレート錯体を固定化することによって、特に金属イオンの性質、キレートリガンドの化学構造、ビス（並びにトリス及びテトラキス）構造における架橋基Rの立体特性及びinhomogeneity特性、及び溶媒組成に応じて、分子認識の平衡が純粋な配位型相互作用から純粋なアニオン交換型相互作用に移行した、基本的に諸特性が異なる吸着剤が得られる。サンドイッチ及び非サンドイッチ構造の形成は、大環状分子の第二級アミン基を非配位基で官能化することによって制御できることに留意されたい。これらの特徴はすべて、これらのIMACシステムがオリゴペプチド「タグ」の配列特性(sequence attributes)を高い親和性で認識できるかどうかに影響する。実際、金属イオン結合中心間の分子距離、金属イオン結合中心間の相互作用配位部位表面への接近、オリゴペプチド「タグ」配列中の特異的アミノ酸残基との相互作用配位部位の表面接触性(facial accessibility)、分極率、これらの中心の溶媒和力、それぞれの結合エネルギー、したがってこれらの相互作用に対する親和性を含めて、架橋基Rの諸特性は、これらの新しいIMACシステムのいくつかの主要な側面を規定している。

10

【0069】

(e) 固定化金属イオン／大環状分子錯体の多くは着色しており、それらの紫外－可視吸収スペクトルの特質は、個々の配位金属イオンに特徴的であり、したがって、固定化吸着剤を含有する充填カラムのタンパク質結合現象並びに一般的状態／条件をいっそう良好に視覚化することができる。

【0070】

20

(f) 本発明の大環状リガンドのファミリーセットの魅力的特徴は、それらの合成経路の面での「コンビナトリアル」な関連性、並びに結合（官能基）特性である。これらの諸特性によって、本質的に同じタイプのシステム及びケミストリに基づいて生成され得る多種多様な選択性が利用できるようになる。このタイプの合成条件は、既知のIDA及びNTA型システムなどでは利用できない。

【0071】

(g) 様々な固定化金属イオン／キレート大環状リガンド錯体によって明らかにされた異なるpH依存性の結果、様々な金属イオンと所与の大環状リガンドを使用することによって、電気陰性度、金属イオンの空のd軌道構造及び充填効果に関する新規な選択性を得ることができ、したがって、（本明細書の多数の実施例によって実証されるように（下記参照）） Cu^{2+} の挙動は、意外なことに、 Ni^{2+} のそれとは異なり、 Ni^{2+} の挙動はやはり Zn^{2+} のそれとは異なる。

30

【0072】

(h) 上述したように、本発明のビス（大環状分子）リガンドの位相幾何学的特徴（並びに、トリス及びテトラキス系の位相幾何学的特徴）は、既知のIDA又はNTA型系、N, N, N'-トリス（カルボキシメチル）エチレンジアミン（TED）に基づく系、又は関係するタイプの非拘束型キレート系では得ることができないように、例えば、それらの疎水性、立体電子的特徴、金属イオン結合中心間の距離、固有の電荷、超分子集合体への傾向、金属イオン結合定数、あるいは様々な緩衝液イオン又は様々な溶媒和化学種に対する優先度を「微調整」することができる。これに関し、本明細書の実施例（下記参照）に示すように、これらの特性を利用して、適切な選択金属イオン、大環状リガンド系（例えば、本明細書に開示するビス－トリス－又はテトラキス－系）及び諸条件（溶出培地、pHなど）によって、多くの場合、「タグ無し」（未変性）タンパク質／ポリペプチドを極めて良好に精製することができると考えられる。また、本発明による金属イオン／リガンド吸収剤系の当該選択性及び結合特性によって、（溶出／精製後の溶液中ではなく）それが結合している吸収剤系上で、「タグ」を融合タンパク質からインサイチュで切断することが可能になり有利になる。

40

【0073】

(i) 本発明のモノ、ビス、トリス及びテトラキス型リガンドの合成経路は、従来の非拘束型IDA、NTAなどの系に対して使用される合成経路とは異なる。ドナー原子、例

50

えば、N-カルボキシメチル置換変異体をさらに含む懸垂アームを有する本発明のタイプのリガンドの変異体は、コンビナトリアル合成によって容易に調製することができる。したがって、異なるタイプのスペーサー（すなわち、大環状キレートリガンドを担体材料に連結する側鎖基、あるいはビス（t a c n）、トリス（t a c n）及びテトラキス（t a c n）系の場合、キレート錯体中の金属イオン間の距離を制御する構造的成分を介在させる側鎖基）、異なるリガンド構造、並びに異なるリガンド密度を、原則的には得ることができる。したがって、異なるタイプのスペーサーをリガンドの大環状区分に導入できることに加えて、大環状分子上の第二級アミン基を配位基又は非配位基のどちらかで官能化することによってリガンド配位特性を制御することができる。

【0074】

（j）同じ「コア」構造を、3つの窒素ドナー原子を用いて、すなわちN3リガンド（ビスリガンドの場合N6、トリスリガンドの場合N9、テトラキスリガンドの場合N12）として、又は類似のN2O、N2S、O2N又はS2Nリガンドとして（対応するビス、トリス及びテトラキスリガンドに対してはそれらの適切な倍数で）作製することができる。本発明に関連して使用されるタイプのリガンドのより高次の同族体（ペンタキス、ヘキサキス、ヘプタキスなど）も可能であり、本発明に関連していることに留意されたい。

【0075】

（k）（i）において示したように、固定化大環状「コア」リガンドを化学的に容易に誘導体化して、ドナー原子を含有する1つ以上の懸垂置換基を導入することができる。したがって、選択性に関する特性がやはり異なる別のクラスのMAC吸着剤を生成させることができる。例えば、懸垂カルボキシメチル基を含有するこのタイプの系も本発明の範囲内にあり、例えば、Ca²⁺特異的IMACシステムとして価値があるものと考えられる。このような懸垂置換基を有する対応するタイプのリガンド系は、IDA、NTA及び他の非拘束型クラスのキレート系から同様な方法で生成させることはできない。

【0076】

B：本発明に関連して使用される金属イオン大環状キレートリガンドに関連するペプチドタグの好ましい配列及び構造配置：セクションAで概説したように、適切なオリゴペプチド「タグ」を構築するために、いくつかの客観的基準を用いて、コンピューターデータベースから適切なアミノ酸配列を選択した。これらのオリゴペプチド「タグ」のいくつかの共通又は一般的諸特性によって、オリゴペプチド「タグ」が、組成又は構造に関して他のクラスの既知のオリゴペプチド「タグ」から区別される。これらの共通又は一般的諸特性は、以下のように要約することができる。

【0077】

（a）（アスパラギン酸残基又はグルタミン酸残基などの）酸性アミノ酸残基が、オリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列中のその配列番号がiであるヒスチジン残基（又は他の適切なN-ドナー残基）に対してi→i+1、i→i+2、i→i+3又はi→i+4位に位置し、当該酸性アミノ酸残基の側鎖成分とヒスチジン残基の原子距離（すなわち、酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基の平均距離）が本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致しているアミノ酸配列。

【0078】

（b）ヒスチジン残基が、別のヒスチジン残基（又は他の適切なN-ドナー残基）に対してi→i+1、i→i+2、i→i+3又はi→i+4配列位置にあり、2つのヒスチジン残基の側鎖成分の原子距離が、本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致しているアミノ酸配列。

【0079】

（c）（アラニン、ロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン又はグルタミン残基などの）非極性又は中性アミノ酸残基が、ヒスチジン残基に対してi→i+1、i→i+2、i→i+3又はi→i+4配列位置にあり、当該非極性又は中性アミノ酸残基の側鎖成分とヒスチジン残基の原子距離が本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内

10

20

30

40

50

の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致しているアミノ酸配列。

【0080】

(d) アミノ酸残基の配置によって、本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致している第1と第3、及び／又は第3と第5、及び／又は第5と第7、及び／又は第7と第9．．．（等）アミノ酸残基の各側鎖成分間の原子距離がもたらされるという条件で、第1、第3、第5、第7、第9．．．（等）アミノ酸残基が好ましくはヒスチジン残基又は（セリン、トレオニン又はチロシン残基などの）極性アミノ酸残基であるアミノ酸配列。

【0081】

(e) アミノ酸残基の配置によって、本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致している第2と第4、及び／又は第4と第6、及び／又は第6と第8、及び／又は第8と第10．．．（等）アミノ酸残基の各側鎖成分間の原子距離がもたらされるという条件で、第2、第4、第6、第8．．．（等）アミノ酸残基が好ましくは（アルギニン、リジン、ヒスチジン又はチロシン残基などの）イオン性又は極性アミノ酸残基又は（ロイシン、アラニン、バリン、フェニルアラニン、アスパラギン又はグルタミン残基などの）非極性アミノ酸残基であるアミノ酸配列。

【0082】

(f) アミノ酸残基の配置によって、本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致している少なくとも2つのアミノ酸残基、好ましくは第1と第3、及び／又は第3と第5、及び／又は第5と第7、及び／又は第7と第9．．．（等）アミノ酸残基の各側鎖成分間の原子距離がもたらされるという条件で、C末端アミノ酸残基が好ましくはヒスチジン又はアルギニン残基又は（ロイシン、アスパラギン又はグルタミン残基などの）非極性アミノ酸残基であるアミノ酸配列。

【0083】

(g) オリゴペプチドのN末端位が生合成によってアセチル化又はアシル化されていないオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0084】

(h) オリゴペプチド「タグ」の[Nozaki及びTanford (J. Biol. Chem. 238 (1963) 4074-4081; 同上245 (1970) 1648-1652) 及びEisenberg, D.、Weiss, R. M. 及びTerwilliger, T. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 140-144) によって計算及び定義された]疎水性モーメント(T)が $1 \leq T \leq 25$ であり、組換え融合タンパク質（オリゴペプチド「タグ」を含む宿主タンパク質）の[Richards, F.M. (Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering 6(1977)151-176) 及びWilce, M.C.J.、Aguilar, M.I. and Hearn, M.T.W. (Anal. Chem. 67(1995)1210-1219)]に従って計算される疎水性の全体的変化が0.3以下であるオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0085】

(i) 組換え融合タンパク質の等電点(pI)値に対するオリゴペプチド「タグ」配列の全体の寄与が、対応する野生型（タグ無し）宿主タンパク質（目的タンパク質）の値と比較して0.5以下であるオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0086】

(j) pH 7.0で $1.5 \leq q \leq 1.0$ の実効電荷(q)を有するオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0087】

(k) オリゴペプチドの等電点(pI)が $5.8 \leq pI \leq 8.5$ であるオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0088】

(1) フリー溶液 (free solution) 中又はキャピラリーゾーンの電気泳動条件下で、オリゴペプチドが、7.0 近い pH 及び $\leq 50 \text{ mM}$ のイオン強度 (I) で $100 \text{ nM} \leq K_{\text{assoc}} \leq 100 \text{ mM}$ の親和性定数 (K_{assoc}) を有する軟らかい、境界にある又は硬い金属イオンに対して親和性を示すオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0089】

(m) pH 7.0 のリン酸塩緩衝食塩水中 $\leq 300 \mu\text{M}$ のモル濃度で、オリゴペプチドがコイルドコイル構造を形成しないオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列。

【0090】

より特異的なレベルで、極めて有用な本発明の側面におけるように、当該オリゴペプチド「タグ」を (エンテロキナーゼ、第 IX a 因子などのエンドペプチダーゼ又はプロテアーゼを使用するのではなく、あるいは、例えば、臭化シアン、ヒドロキシルアミン、N-ブロモスクシンイミド、ヨードソ安息香酸、3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-インドレニンスカトール又は他の適切な化学試薬の使用に基づく化学手順を使用するのではなく) アミノペプチダーゼの使用によって融合タンパク質から切断できることが必要又は重要である場合、適切なアミノペプチダーゼとしては (カテプシン C 又は DPP I; E. C. 3.4.14.1 としても知られ、例えば、Aldrich-Sigma, St Louis, MO, U.S.A 又は Unizyme Laboratories, Hoersholm, Denmark から得られる) DAP-1 などのジペプチジルアミノペプチダーゼなどがあり、大腸菌及び他の適切な原核生物発現システム/宿主細胞における組換えタンパク質の発現に対するこのような「タグ」の所望の特性は、以下の基準を満たすと考えられる。

【0091】

(n) アミノ酸残基の配置によって本発明のタイプの金属イオン/大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致している第 1 と第 3、及び/又は第 3 と第 5、及び/又は第 5 と第 7、及び/又は第 7 と第 9... (等) アミノ酸残基の各側鎖成分間の原子距離がもたらされるという条件で、第 1、第 3、第 5、第 7、第 9... (等) アミノ酸残基がプロリン、アルギニン又はリジン残基ではないアミノ酸配列。

【0092】

(o) アミノ酸残基の配置によって本発明のタイプの金属イオン/大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致している第 2 と第 4、及び/又は第 4 と第 6、及び/又は第 6 と第 8、及び/又は第 8 と第 10... (等) アミノ酸残基の各側鎖成分間の原子距離がもたらされるという条件で、第 2、第 4、第 6、第 8... (等) アミノ酸残基がプロリン残基ではないアミノ酸配列。

【0093】

また、本発明の別の側面におけるように、エンドペプチダーゼを使用することによって当該オリゴペプチド「タグ」を融合タンパク質から切断することが可能である場合、このような「タグ」の適切な基準としては以下が含まれる。

【0094】

(p) エンドペプチダーゼ、例えば、第 II a 因子、第 X a 因子、エンテロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、トロンビン、フェリリン又は (K_{ex1} 又は K_{ex2} などの) K_{ex} などのエンドペプチダーゼに対する切断モチーフを含有する短いアミノ酸配列による、目的タンパク質のアミノ酸配列へのオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列の結合。

【0095】

また、本発明の別の側面におけるように、当該オリゴペプチド「タグ」を融合タンパク質から化学反応によって切断することが可能である場合、このような「タグ」の適切な基準としては以下が含まれる。

【0096】

(q) 化学試薬、例えば、ヒドロキシルアミン、臭化シアン、N-ブロモスクシンイミド、ヨードソ安息香酸、3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルサルフェニ

10

20

30

40

50

ル)ーインドレニンスカトール又は他の適切な化学試薬などの試薬に対する切断モチーフを含有する短いアミノ酸配列による、目的タンパク質のアミノ酸配列へのオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列の結合。

【0097】

また、本発明のさらに別の側面におけるように、アシルチオール自己連結再配列を使用するなどの自己切断／自己スプライシング偽酵素 (pseudoenzymatic) 反応によって、当該オリゴペプチド「タグ」を融合タンパク質から切断することが可能である場合、このような「タグ」の適切な基準としては以下が含まれる。

【0098】

(r) 親和性分離のための自己切断インテインドメインを含有するアミノ酸配列による、目的タンパク質のアミノ酸配列へのオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列の結合 (例えば、Wood, D. W., Derbyshire, V., Wu, W., Chartrain, M., Belfort, M. 及び Belfort, G. *Biotechnology Progress*, 16(2000) 1055-1063; Wood, D. W., Wu, W., Belfort, G., Derbyshire, V. 及び Belfort, M., *Nature Biotechnology*, 17(1999)889-892 参照)。

【0099】

真核生物発現システム、例えば、哺乳動物細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、組換えタンパク質の製造に使用される *Spodoptera frugiperda* 又は (*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* を含めて) 様々な商業的に重要な酵母細胞由来のパキウイルス形質移入昆虫 Sf 9 細胞の場合、これらのシステムを用いて以下を含むオリゴペプチド「タグ」配列を使用することが可能である。

【0100】

(s) オリゴペプチド「タグ」中の他のアミノ酸残基の配置によって、本発明のタイプの金属イオン／大環状リガンド錯体内の利用可能な各結合部位を隔てる原子距離に一致又はほぼ一致している第1と第3、及び／又は第3と第5、及び／又は第5と第7、及び／又は第7と第9... (等) アミノ酸残基、又は第2と第4、及び／又は第4と第6、及び／又は第6と第8... (等) アミノ酸残基の各側鎖成分間の原子距離がもたらされるという条件で、第1のアミノ酸残基がプロリン残基であるアミノ酸配列。

【0101】

(t) (DAP-1 などのアミノペプチダーゼが関与する酵素切断がオリゴペプチド「タグ」を除去する好ましい方法である場合) 第2のアミノ酸残基とそれ以降のアミノ酸残基がプロリン残基ではないアミノ酸配列。

【0102】

上記特性 (A) - (t) の1つ以上を示すオリゴペプチド「タグ」は本発明の範囲内にある。

【0103】

C: ペプチドタグの位置: 周知の分子生物学的手法及び技術を用いて、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 操作に基づいて、本発明によるオリゴペプチド「タグ」を目的タンパク質のアミノ末端、カルボキシ末端又は内部 (エンド) 位置に導入することができる。その結果、オリゴペプチド「タグ」をC末端に置いても、上述した IMAC 手順を本発明の大環状キレートリガンド系を用いて実施することができる。また、オリゴペプチド「タグ」、特に本発明によるヒスチジン含有オリゴペプチドを、目的タンパク質又はポリペプチドの2つの分子、あるいは2つの異なる目的タンパク質又はポリペプチドのそれぞれアミノ又はカルボキシ末端に同時に融合させることができ、それによって新しい融合タンパク質構造が形成され、オリゴペプチド「タグ」がエンド位置 (すなわち、内部位置) に置かれて目的タンパク質又はポリペプチドの2つの分子が連結される。本明細書の実施例に示すように (実験の項参照)、C末端のオリゴペプチド「タグ付き」組換えタンパク質は、新しい IMAC システムによって極めて効率的に捕捉され、選択的に精製されることが判明した。続いて、組換えタンパク質のC末端位置にあるオリゴペプチド「タグ」を除去するために、特異的カルボキシペプチダーゼを使用することができ、又は宿主タンパク質のC末端残基と「タグ」ペプチドのN末端残基の結合部に一義的な化学切断部位

を導入しなければならない。これらの切断部位の化学的諸特性を選択する基準は、科学文献から得られることが期待され、一方、カルボキシペプチダーゼ切断の動力学的最適化は、文献の例を基にすることができる。オリゴペプチド「タグ」配列及び宿主タンパク質のC末端アミノ酸配列の性質に応じて、適切なカルボキシペプチダーゼを、例えば、カルボキシペプチダーゼY (CpY) 又は亜鉛依存性カルボキシペプチダーゼとすることができる。適切なカルボキシペプチダーゼは、Worthington Biochemicals Corporation, Lakewood, New Jersey, U.S.A.を含むいくつかの供給源から入手可能である。

【0104】

D: 好ましいオリゴペプチドタグの置換要件: 上記セクションB、特にそのサブセクション(A) - (C) から明らかなように、許容されるアミノ酸置換反応を利用して、コンビナトリアル合成戦略によって最も容易に生成されるいくつかの変異体を生成させることができる。好ましいアミノ酸の選択に関しては、特に、コンビナトリアルによって誘導された変異体のアミノ酸配列を、セクションCで考察した標的タンパク質のN末端又はC末端のオリゴペプチド「タグ」を用いて、エキソペプチダーゼによって、又はジアミノペプチダーゼ、例えば、DAP-1 (上記参照) などのジペプチジルアミノペプチダーゼによって切断するしやすさに関して、セクションBで述べた基準に指針を見出すことができる。その結果、「好ましいオリゴペプチド「タグ」」の一般的定義に基づいて利用可能な合成候補の全数制限としてかなりの分子制約 (molecular constraints) を導入することができる。例えば、大腸菌などの原核生物発現系の場合、プロリン含有変異体は一般に除外される。第1、第3、第5、第7... (等) アミノ酸残基が、(DAP-1などの) ジアミノペプチダーゼによる切断に対して配列停止として働く結果「許されない」残基である、すなわちN-1切断反応後のこの部位における切断が動力学的に不適当である配列変異体の場合 (Pro、Arg及びLysは、このような「許されない」アミノ酸残基の例である)、又はこの部位における切断が動力学的に不適当であるので第2、第4、第6、第8... (等) アミノ酸残基が好ましくない配列変異体 (Metは、このようなアミノ酸残基の例である) の場合、オリゴペプチド「タグ」ライブラリのこのような変異体はコンピュータによって排除される。これらを考慮に入れると、例えば、対応するcDNAの複数の並行したPCR反応によってDNAレベルで生成されるオリゴペプチド「タグ」配列HHHNSWDHDINR (以後NT1と称する) 又はHTNIHQDQHNFHR (以後NT2と称する) の完全なコンビナトリアルライブラリ変異体は、期待される実用要件を示さない、又は期待される実用要件には不要であると考えられる。そうではなく、サブライブラリは、新しい固定化金属イオン/大環状リガンド錯体との結合相互作用の一部として特異的タンパク質成分 (又は、関係するタンパク質ファミリー) を含む、親和性成熟可能なオリゴペプチド「タグ」配列の生成に適切な構造変異体グループ、すなわち特異的大環状リガンドに対する所望の特徴の親和性を有し、DAP-1などの選択されたペプチダーゼによって除去可能である構造変異体グループである。この状況における「親和性成熟」という用語は、一次構造が親オリゴペプチド「タグ」(NT1又はNT2など; 上記参照) (すなわち、変異体) に関係するオリゴペプチド「タグ」配列 (すなわち、親オリゴペプチド「タグ」の変異体) の選択的使用を指し、これらのオリゴペプチド「タグ」変異体は、分子認識カセットとして、選択された固定化金属イオン親和性錯体とのより高い又はより低い結合親和性を生じるアミノ酸置換体であり、本発明の側面として上で開示した選択オリゴペプチド「タグ」配列変異体及び固定化金属イオン親和性錯体の親和性特性は、目的とする標的タンパク質の特異的特性に従って選択される。

【0105】

E: 好ましいペプチドタグの切断要件: 上記セクションB、C及びDに記載した基準が満たされる場合、本発明による好ましいオリゴペプチド「タグ」、例えば、NT1又はNT2のアミノ酸配列をN末端及び/又はC末端から切断することは、ジペプチジルアミノペプチダーゼ (例えば、DAP-1; 上記参照) 又は他のアミノペプチダーゼ、ジアミノペプチダーゼ若しくはトリアミノペプチダーゼを利用してオリゴペプチド「タグ」を除去

することに等しい。この場合、切断によって (des un oーオリゴペプチド「タグ」構造：

5' 1-2-3-4-5-6-7-... - [標的タンパク質] → 5' 2-3-4-5-6-7-... - [標的タンパク質] で示される) の例がもたらされる。ここでの重要な側面は、切断によってアミノ酸配列の「違相 (out-of-phase)」シフトが起こらないことを確実にすることである。これは、精製操作中のオリゴペプチド「タグ」と固定化金属イオン／リガンド錯体の相互作用に対して効果がない場合もあり得るが、融合タンパク質からのオリゴペプチド「タグ」のタンパク質分解切断を不十分にするアミノ酸残基の好ましくない配置をもたらす恐れがある。したがって、「同相の (in-phase)」切断変異体は、親オリゴペプチド「タグ」配列「ライブラリ」の特別なサブセット (T-サブセット) であり、組成又は配列上の特徴の類似性、及び IMA C 結合能力又は酵素による切断特性によって、それぞれの親オリゴペプチド「タグ」に関係付けられる。

10

【0106】

F：好ましいペプチドタグの欠失要件：内部アミノ酸残基を除去することによって、アミノ酸残基の規定の順序が混乱し、2つの結果がもたらされる。第1の結果は、痕跡オリゴペプチド「タグ」の分子認識用の好ましい結合モチーフに対する固定化金属イオン／大環状キレートリガンドの効果に関する。この効果は、アミノ酸配列における位相のずれとして表れ、アミノ酸残基「m」が欠失変異体において「m-x」残基になる。ここで、「x」は欠失アミノ酸又は配列である。このような変化は第2の効果をも有し、すなわち、D A P-1 切断性が大きく損なわれ得る。この場合、欠失によって、(des diーペプチド「タグ」構造：

20

5' 1-2-3-4-5-6-7-... - [標的タンパク質] → 5' 1-2-3-6-7-... - [標的タンパク質] で示される) の例がもたらされる。

【0107】

しかし、セクションB、C及びDで概説した基準を依然として満たす場合、欠失変異体を使用できることを、好ましいオリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列に対する選択要件の一部として加えることもできる。したがって、「同相の」欠失変異体は、親オリゴペプチド「タグ」配列「ライブラリ」の特別なサブセット (D-サブセット) であり、親オリゴペプチド「タグ」配列の IMA C 結合能力又は酵素切断特性に対するそれらの組成又は配列の類似性によっても関係付けられる。

30

【0108】

G：好ましいオリゴペプチドタグのモジュール化要件：上記セクションC、D、E及びFに概説した考慮事項に従って、オリゴペプチド「タグ」配列のモジュール化の基準を定めることができる。この場合、モジュールの再配置によって、(再配列テトラペプチド「タグ」構造：

5' 1-2-3-4-5-6-7-... - 14-15-16-17- [標的タンパク質] → 5' 1, 2-3-14-15-16-17-4-5-6-7-... - [標的タンパク質] で示される) の例がもたらされる。

【0109】

40

この考察から、1つ以上の好ましい「完全」長「タグ」の断片的な部分配列も、新しいペプチド「タグ」設計の基礎として含まれ得ることになる。このようにして、配列の一部のみが変えられ、その結果は、親配列のさらなるサブセット (M-サブセット) である。この場合、親ペプチド「タグ」から新しいペプチド「タグ」モジュールを作製する置換ブロックサイズは、IMA C 相互作用及び酵素切断に対して記載した基準に従わなければならない。

【0110】

H：好ましいオリゴペプチドタグ配列の方向性：生合成によって調製したオリゴペプチド「タグ」融合タンパク質を用いると、好ましい配列においてアミノ酸残基の順が逆転し得るかどうかについての疑問が生じる。例えば、オリゴペプチド「タグ」配列 NT 2 (上

50

記参照)の場合、逆転によって配列 $\text{---R-H-F-H-N-H-Q-D-Q-H-I-N-T-H---}$ が生成する。ただし、このような配列順の逆転が、多くの場合、1位(及びおそらく他の位置)で好ましくない残基をもたらすことに留意されたい。

【0111】

I: 好ましいペプチドタグのカセット配列の可能性 相補的な相互作用挙動の問題を、好ましいオリゴペプチド「タグ」配列及び使用した特異的IMACリガンドの性質に関して上で考察した。(唯一ではないが)主要なアミノ酸配列の選択基準は、バルクではなく、分子レベルでの対応する固定化金属イオン/リガンド錯体システムの余角 (complementary angular) 及び結合エネルギー性能面でのアミノ酸残基側鎖間の距離及び角度方向に関する。このため、好ましいオリゴペプチド「タグ」の選択は、IMACリガンドの選択にも依存し、そのため、2つの同族相手が関与するカセット相互作用の考え方が上で始めに想起された。この一般的な考え方は、本明細書に記載する新規なオリゴペプチド「タグ」システムの特異的な結合特性の多くを特徴付けるのに役立った。

10

【0112】

上記考察に関係して、ただしより具体的なレベルで、融合タンパク質(それ自体はポリペプチドである)からのオリゴペプチド「タグ」の切断が、アミノペプチダーゼ、例えば、DAP-1などのジペプチジル-アミノペプチダーゼの作用で起こる、タンパク質精製戦略に使用するのに極めて適していると考えられるオリゴペプチド「タグ」としては、以下から選択されるアミノ酸配列を含むオリゴペプチドなどがある。

【0113】

20

HHHNSWDHDINR	(本明細書ではNT1と略記する)	(配列番号1)
HTNIHQDQHNHFHR	(本明細書ではNT2と略記する)	(配列番号2)
HAMLDRAHDHGTR		(配列番号3)
SLHEHHSGDNLR		(配列番号4)
THYNAVHSHNTLQ		(配列番号5)
DIHHWTDHLQSSTH		(配列番号6)
LYNHYSHTAHVNHL		(配列番号7)

このようなペプチド(オリゴペプチド)「タグ」は、示したアミノ酸配列の1つに加えて、オリゴペプチド「タグ」のC末端又はN末端に結合した2-6又はそれ以上の追加のアミノ酸残基などの1つ以上の追加のアミノ酸残基を含むことができることを理解されたい。このような配列伸長は、伸長がオリゴペプチド「タグ」のN末端においてであり「タグ」システムを大腸菌などの原核生物発現系を用いて組換えタンパク質の産生に利用しようとするときには、例えば、2位と1位(1位のLysは、オリゴペプチド「タグ」のN末端から数えて最初のアミノ残基である)にあるMet-Lysなどのジペプチド単位であることが適切である。周辺質の分泌のない原核生物発現系の場合、オリゴペプチド「タグ」のN末端伸長の好ましい第1のアミノ酸残基は、配列Met-Xaaを含む。ここで、Xaaは、プロリン以外のあらゆるアミノ酸残基である。これらのアミノ酸配列伸長を含めることによって、原核生物宿主細胞における標的タンパク質の発現が増加する別の利点をもたらされる可能性がある。

30

【0114】

40

真核生物発現システムの場合、オリゴペプチド「タグ」のN末端伸長は、通常、伸長の第2のアミノ酸残基がプロリン残基ではないという条件で10以下、しばしば10未満のアミノ酸残基を含有することが適切である。

【0115】

同様に、配列伸長は、伸長がオリゴペプチド「タグ」のC末端においてであり「タグ」システムを大腸菌などの原核生物発現系を用いて組換えタンパク質の産生に利用しようとするときには、例えば、+1と+2位(+1位のValは、オリゴペプチド「タグ」のC末端から数えて最初のアミノ残基である)にあるVal-Aspなどのジペプチド単位であることが適切である。

【0116】

50

本発明のさらに別の側面は、以下のものを含む。

【0117】

上述の配列番号1-7中のオリゴペプチドなど1つ以上の上記基準に従う少なくとも1つのオリゴペプチドに、そのアミノ末端又はカルボキシ末端において融合した目的タンパク質を含む融合タンパク質であるポリペプチドであって、既述したように（上記参照）、目的タンパク質又はポリペプチドの2つの分子、あるいは2つの異なる目的タンパク質又はポリペプチドが、それぞれそれらのアミノ末端又はカルボキシ末端において、同一オリゴペプチド（すなわち、オリゴペプチド「タグ」）、適切には本発明によるヒスチジン含有オリゴペプチドに同時に結合し、オリゴペプチド（すなわち、「タグ」）がエンド位置（すなわち、内部位置）に置かれて目的タンパク質又はポリペプチドの2つの分子が連結された融合タンパク質構造を形成する融合タンパク質を、当該タイプの融合タンパク質が含み、このタイプの融合タンパク質構造において、オリゴペプチド「タグ」のアミノ酸配列に1つ以上の酵素又は化学切断部位が適切に隣接しているポリペプチド；

10

このようなポリペプチドをコードするベクターなどのポリヌクレオチド構築体；

このようなポリヌクレオチド構築体を含む宿主細胞（例えば、大腸菌などの原核生物）を、ポリペプチドの発現及び培養培地からのそのポリペプチドの回収が可能な条件下、適切な増殖培地中で培養することによって得られるポリペプチド；

このようなポリヌクレオチド構築体を含む宿主細胞、より具体的には原核生物細胞（例えば、大腸菌株）又は真核生物細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又はBHK、HEK若しくはCOSなどの他の哺乳動物細胞系）；及び

20

ポリペプチドの発現及びそのポリペプチドの培養培地からの回収が可能な条件下、適切な増殖培地中で当該タイプの宿主細胞を培養することを含む、当該タイプのポリペプチドを産生するための方法；

さらに別の本発明の側面は、目的タンパク質を精製するための方法に関し、この方法は、

本発明による少なくとも1つのオリゴペプチド（すなわち、オリゴペプチド「タグ」）にそのアミノ末端又はカルボキシ末端において融合している目的タンパク質を含む融合タンパク質（すなわち、オリゴペプチド（すなわち、「タグ」）が既述したエンド位置にある融合タンパク質を含めて、既述したタイプの1つの融合タンパク質）であるポリペプチドと、他の（外来性）タンパク質とを含有するタンパク質試料を、ポリペプチド（融合タンパク質）が金属イオン含有官能化ポリマー基材に結合してそれと錯体を形成する条件下で、本発明による金属イオン含有官能化ポリマー基材と接触させるステップと、

30

その錯体を緩衝溶液で洗浄して他の（外来性）タンパク質を除去するステップと、

結合ポリペプチドを洗浄した錯体から溶出させるステップとを含む。

【0118】

後者の方法は、さらに、例えば、化学的手段又は酵素手段（例えば、配列番号1-7として記載されたアミノ酸配列の1つを含む「タグ」の場合はジペプチジルアミノペプチダーゼなど）によって、ポリペプチド又は目的タンパク質からオリゴペプチド（「タグ」）を切断するステップを含むことができる。

40

【0119】

本発明は、後者の方法によって得られる又は得ることができる精製タンパク質も包含する。

【0120】

本発明において教示する精製方法に関連するポリペプチド又はタンパク質（目的ポリペプチド又はタンパク質）としては、哺乳動物タンパク質、例えば、ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンを含めた成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質； α -1-抗トリプシン；インシュリンA鎖；インシュリンB鎖；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；（第VIIaを含めた）第VII因子、第VII因子、第IX因子、組織

50

因子、フォンウィルブランド因子などの凝固因子；タンパク質Cなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベータ（t-P A）などのプラスミノゲンアクチベータ；ボンバジーン（b o m b a z i n e）；トロンビン；腫瘍壊死因子 α 及び β ；エンケファリナーゼ；R A N T E S (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質（M I P-1- α ）；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミュー管抑制物質；リラキシンA鎖；リラキシンB鎖；プロリラキシン（p r o r e l a x i n）；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；D N アーゼ；アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンD又はアクチビンE）；インヒビン（例えば、インヒビンA又はインヒビンB）；血管内皮増殖因子（V E G F）；ホルモン又は成長因子の受容体；インテグリン；タンパク質A又はD；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子（b o n e - d e r i v e d n e u r o t r o p h i c f a c t o r）（B D N F）などの神経栄養因子、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6（N T-3、N T-4、N T-5又はN T-6）、又はN G F- β などの神経成長因子；血小板由来成長因子（P D G F）；a F G F及びb F G Fなどの繊維芽細胞成長因子；表皮成長因子（E G F）；形質転換成長因子（T G F）、T G F- α 並びにT G F- β 1、T G F- β 2、T G F- β 3、T G F- β 4及び又はT G F- β 5を含めたT G F- β ；インシュリン様成長因子I及びII（I G F-I及びI G F-II）；d e s（1-3）I G F-I（脳I G F-I）；インシュリン様成長因子結合タンパク質；C D 3、C D 4、C D 8、C D 19、C D 20などのC Dタンパク質；エリスロポイエチン（E P O）；トロンボポイエチン（T P O）；骨誘導因子（o s t e o i n d u c t i v e f a c t o r s）；免疫毒素；骨形成タンパク質1-7（B M P 1-7）；インターフェロン α 、 β 、 γ などのインターフェロン；コロニー刺激因子（C S F）、例えば、M-C S F、G M-C S F又はG-C S F；インターロイキン（I L）、例えば、I L-1からI L-12；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞受容体；表面メンブレンタンパク質；崩壊促進因子（D A F）；例えば、A I D Sエンベロープの一部などのウイルス抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレシン；調節タンパク質；イムノアドヘシン；抗体；及びあらゆる上記ポリペプチド又はタンパク質の生物学的に活性な断片又は変異体などがある。

【0121】

本明細書で使用する「ポリヌクレオチド」という用語は、5'から3'末端へ読んだデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーを指す。ポリヌクレオチドとしては、RNA、DNAなどがあり、天然源から単離し、インビトロで合成し、又は天然と合成分子の組み合わせから調製することができる。ポリヌクレオチド分子の長さは、ヌクレオチド（「n t」と略記）又は塩基対（「b p」と略記）に換算して与えられる。「ヌクレオチド」という用語は、状況が許せば、一本鎖及び二本鎖分子の両方に使用される。この用語を二本鎖分子に適用するときは、全長を表すために使用され、「塩基対」という用語と等価であることを理解されたい。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は、長さがわずかに異なり、それらの末端は酵素切断の結果としてねじれている場合があることを当業者は認識すべきである。したがって、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドが対を形成している必要はない。このような不對末端は、一般に20 n t長を超えない。

【0122】

本明細書で使用する「宿主細胞」という用語は、ハイブリッド細胞を含む、異種DNAが発現され得るあらゆる細胞を表す。典型的な宿主細胞としては、細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、及びBHK、CHO、HEK、COS細胞などのヒト細胞を含めた哺乳動物細胞などがあるが、これらのみに限定されない。

【0123】

本明細書で使用する「ベクター」という用語は、宿主細胞において増幅可能なあらゆる核酸成分を指し、したがって、ベクターは、自己複製ベクター、すなわちその複製が染色体複製とは無関係な染色体外成分として存在するベクターとすることができ、例えばプラ

スミドである。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入すると、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体と共に複製されるものとして行うことができる。ベクターの選択は、それを導入すべき宿主細胞によって決定されることが多い。ベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルス、コスミドベクターなどがあるが、これらだけに限定されない。ベクターは、通常、複製開始点及び少なくとも1つの選択可能な遺伝子、すなわち容易に検出可能な産物、又はその存在が細胞成長にとって必須である産物をコードする遺伝子を含む。

【0124】

本明細書において、アミノ酸残基は、IUPAC-IUB生物学命名法委員会 (Commission on Biochemistry Nomenclature) (CBN) によって承認された略語を用いて表される。アミノ酸に関して、以下の略語で表されるアミノ酸は、天然のL型である。また、アミノ酸ペプチド配列の左末端及び右末端は、特段の指定がない限り、それぞれN末端及びC末端である。

【表A】

アミノ酸残基の略号

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
グリシン	Gly	G
プロリン	Pro	P
アラニン	Ala	A
バリン	Val	V
ロイシン	Leu	L
イソロイシン	Ile	I
メチオニン	Met	M
システイン	Cys	C
フェニルアラニン	Phe	F
チロシン	Tyr	Y
トリプトファン	Trp	W
ヒスチジン	His	H
リジン	Lys	K
アルギニン	Arg	R
グルタミン	Gln	Q
アスパラギン	Asn	N
グルタミン酸	Glu	E
アスパラギン酸	Asp	D
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T

【0125】

本明細書及び特許請求の範囲で使用する酵素分類は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biologyの推奨(1992)に従い、その(追加を含めた)最新版は、ワールドワイドウェブ上の <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/> で入手可能である。

【0126】

以下、添付の図面を参照しながら、本発明をさらに説明する。

【実験の部】

【0127】

特に指定しない限り、用いた試薬は全て、標準的な実験用試薬グレードの精製度又はさ

らに高い精製度のものであり、既存の製造者より入手した。 CH_3CN を4 Åのモレキュラーシーブで乾燥させた。セファロースTM CL-4 B及び他のタイプのセファロースTM、SuperoseTM及び関連するアガロースを基礎とした製品は、Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden) より購入した。全体に渡って、蒸留水又はMilli-QTM水を用いた。

【0128】

金属イオンを配位するリガンド

Richman-Atkins反応[J.E. Richman及びT.J. Atkins, Journal of the American Chemical Society, 96(1974) 2268; J.E. Richman, W.F. Oettle及びT.J. Atkins, Organic Synthesis 58(1978)86]を用いて、金属イオンに配位してするリガンド、1, 4, 7-トリアザシクロノナン (略称、tacn又はTACN) (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USAより購入可能)を調製しうる。後述のtacnのトリヒドロブロミド塩は、5M 臭化水素酸からの遊離リガンドの結晶化により得た。

10

【0129】

Wieghardtら[Inorg. Chem. 24 (1985) 1230]により記述されているようにして、1, 2-ビス(1, 4, 7-トリアザシクロノナニル)エタン (略称、dtne、DTNE又は L^{eth})及び1, 3-ビス(1, 4, 7-トリアザシクロノナニル)プロパン (略称、dtnp、DTNP又は L^{prop})を調製しうる。Sesslerら[Inorganic Chemistry, 29(1990) 4143]又はZhangら[Inorganic Chemistry, 34(1995) 2883]により記述されているようにして、1, 4-ビス(1, 4, 7-トリアザシクロノナニル)ブタン (略称、dtnb、DTNB又は L^{but})を調製しうる。後者3種類の化合物を、ヘキサキス-臭化水素塩として分離した。

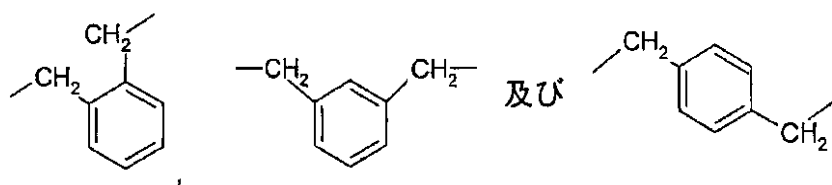
20

【0130】

Grahamら[Inorganic Chemistry, 36(1997) 6366]、又はFarrugia, L.J., Lovatt, P.A. 及びPeacock, R.D.[Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1997) 911-912]によって記述されているようにして、2個の1, 4, 7-トリアザシクロノナニル基の間に、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 架橋 ($n=2, 3$ 又は4)に代えて、o-, m-又はp-キシレン、すなわち、

【化17】

30



【0131】

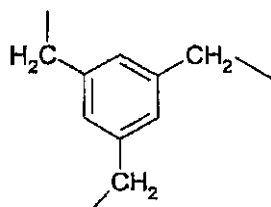
から誘導された架橋基を有する後者のビス(1, 4, 7-トリアザシクロノナニル)リガンドの類似体を、ヘキサキス-臭化水素塩として調製しうる。本明細書中においてこれらのリガンドは、それぞれ L^{ox} 、 L^{mx} 及び L^{px} と略す。

40

【0132】

中心に存在するメシチレン、すなわち、

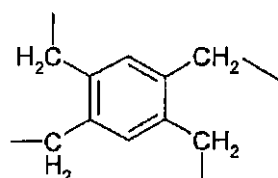
【化 18】



【0133】

から誘導された基に3つの1,4,7-トリアザシクロノナニル基が結合した対応するトリス(1,4,7-トリアザシクロノナニル)リガンド、並びに、中心に存在するズレーン、すなわち

【化 19】



【0134】

から誘導された基に4つの1,4,7-トリアザシクロノナニル基が結合したテトラキス(1,4,7-トリアザシクロノナニル)リガンドも、ノナキスー及びドデカキスー臭化水素塩として、それぞれ、Spicciaら[Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions(1997) 1092]及びGrahamら[Inorganic Chemistry, 39(2000) 1092]により記述されているように調製することができる。

【0135】

分析的定量及び物理的測定

窒素分析は、Dairy Technical Services Ltd., Melbourne, Australiaにより行われた。銅及びニッケル分析は、Varian AA-1475原始吸光分析装置を用いて行った。拡散反射電子スペクトルは、Cary 5G分光光度計により記録した。ESRスペクトルは、Varian E-12分光計を用い、約9.6 GHz (X-バンド)において操作して、77 Kにて記録し、g値が2.0036である α , α' -ジフェニル- β -ジピークリルヒドラジル(DPPH)を基準とした。試料は、標準的な内径3 mmの試験管に入れ測定し、液体窒素フロー式クリオスタット中で凍結させた。

【0136】

〔実施例1〕 固定化1,4,7-トリアザシクロノナン(im-tacn)を含む吸着剤(官能化基材)の調製

キレート試薬(tacn)をマトリックス(基材)上に固定化する第一段階では、エピクロロヒドリン(又はカルボニルジイミダゾールなど他の適切な活性化化合物)を用いてマトリックスを共有結合により活性化した。このため、セファロースTMCL-6Bゲル(19 g、湿重量)に10 mLの2 M NaOHと37.5 mgの水素化ホウ素ナトリウム(98%)を混合した。この混合物を25℃で2時間インキュベートした後、12 mLのエピクロロヒドリンを加え、混合物を25℃で一晩ゆっくりと攪拌した。こうして得たエポキシで活性化されたセファロースTMゲルを吸引ろ過により回収し、Milli-QTM水で完全に洗浄して残った未反応のエピクロロヒドリンを除去した。次に、水(30 mL)にtacnの三臭化水素酸塩5 mmolを溶解し、固体NaOHを加えてpHを11に調整し、最終容量を水で50 mLにして、0.1 M tacnのリガンド溶液を調製した。本溶液の一部(20 mL)を、上記のように調製したエポキシで活性化した10 g(吸引乾燥した重量)のセファロースTMCL-6Bに添加した。振盪ウォーターバスを

10

20

30

40

50

用いて、25℃でこの懸濁液を一晩混合した。得られた官能化ゲルの一部を吸引ろ過（ウォーターポンプ使用）により回収し、Milli-QTM水（5x200mL）、0.1M KNO₃（pH4.0）を含有する50mM 酢酸ナトリウム緩衝液50mL、最後にMilli-QTM水（5x200mL）でよく洗浄した。imtacn吸着剤の一部を次に20mLの20%（V/V）エタノール／水溶液に懸濁し、使用するまで4℃で保存した。

【0137】

〔実施例2〕 固定化ビス（1,4,7-トリアザシクロノナニル）エタン（im-dnte）を含む吸着剤（官能化基材）の調製

使用した0.1M dnterリガンド溶液の最終的な容量が25mLである点を除き、使用した操作は実施例1に述べたものと本質的に同様である。

【0138】

〔実施例3〕 固定化ビス（1,4,7-トリアザシクロノナニル）プロパン（im-dtnp）吸着剤を含む吸着剤（官能化基材）の調製

0.1M dtnpリガンド溶液の最終的な容量が25mLである点を除き、操作は実施例1に述べたものと本質的に同様である。

【0139】

〔実施例4〕 固定化金属イオン-imtacn吸着剤の調製

典型的には、約5g（湿重量）のimtacn吸着剤を、Milli-QTM水中に調製した50mM 境界域硬度の金属イオンの硝酸塩溶液50mL、すなわちCu(NO₃)₂、Ni(NO₃)₂、Zn(NO₃)₂、Co(NO₃)₂、Mn(NO₃)₂又はCr(NO₃)₃の50mM溶液と、25℃で30分間インキュベートした。次いで、前記様々な固定化金属イオン吸着剤（ゲル）を、Milli-QTM水（5x200mL）で完全に洗浄した。ゆるく結合した金属イオンを吸着剤から除去するために、0.1MのKNO₃を含有する50mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.0）を、50mLの緩衝液に対して5g（湿重量）の吸着剤という比率で、固定化金属吸着剤ゲルとともに10分間インキュベートした。次いで、Milli-QTM水を用いてゲルをよく洗浄した。続いて、様々な固定化金属イオン吸着剤（ゲル）の一部を、20mLの20%（V/V）エタノール水溶液に懸濁して、使用するまで4℃で保存した。

【0140】

〔実施例5〕 固定化金属イオン-imdnte吸着剤の調製

約5g（湿重量）のimdnte吸着剤を使用した以外、用いた操作は実施例4とまったく同様である。

【0141】

〔実施例6〕 固定化金属イオン-imdtnp吸着剤の調製

約5g（湿重量）のimdtnp吸着剤を使用した以外、用いた操作は実施例4とまったく同様である。

【0142】

〔実施例7〕 pH9.5の結合緩衝液と固定化Cu²⁺-imtacn吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

ヒト血清の調製

血液細胞とフィブリノゲンを取り除くため、新鮮なヒト血液サンプル（20mL）を4℃で24時間沈殿させた。血清上清をSorvallTM RT6000冷却遠心分離機（DuPont CO.、Newtown、CT、USA）を用い、5000xgと4℃で20分間遠心分離した。上清を除去し、5000xgと4℃でさらに20分間遠心分離した。上清を分取（0.2mL）し、1.5mLのチューブに入れて、-20℃で保存した。

【0143】

バッチ式クロマトグラフィー操作を用いたヒト血清タンパク質の単離

im-Cu²⁺-imtacn吸着剤（1mL）を、4.0cm（長さ）x0.8cm（内

10

20

30

40

50

径)のカラムなどのBio-RadTM Econo-column (Hercules、CA、USA)に充填して、20mM 炭酸ナトリウム及び0.1M NaClを含有するpH9.5の平衡緩衝液で平衡化させた(表1参照)。平衡緩衝液で5倍に希釈したヒト血清の分取試料(200μL)を平衡化カラムにロードした。ヒト血清サンプルを5分間にわたって載せた後、カラム壁からサンプルをゲル中に洗い流すために平衡緩衝液(300μL)を加えた。さらに5分間おいた後、未結合のタンパク質を溶出させるために平衡緩衝液(5mL)をカラム・リザーバーに導入した。

【0144】

回収した画分(約5.5mL)を未結合画分と呼んだ。

【0145】

結合したヒト血清タンパク質は、表1に示した一連の溶出緩衝液(5mL)を用いて吸着剤から溶出した。回収した画分を溶出画分と呼んだ。

【0146】

未結合画分と溶出画分のタンパク質含量は、Bio-RadTM Dyeとビシンコン酸(BCA)アッセイを用いて分析した(図1)。これらの画分のタンパク質は、SDS-PAGEによって同定した(図2)。吸着及び脱離操作はすべて室温で行った。

【0147】

[実施例8] pH7.0の結合緩衝液と固定化Cu²⁺-dtn^e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

使用した平衡緩衝液が0.1M NaClを含有する20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0(表2参照)である点と結合ヒト血清タンパク質を表2に示した一連の溶出緩衝液(5mL)を用いて吸着剤から溶出した点を除き、用いた操作は実施例7と実質的に同様である。結果を図3及び図4に示す。

【0148】

[実施例9] pH4.0の結合緩衝液と固定化Cu²⁺-dtn^e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

使用した緩衝液が0.1M NaClを含有する20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0(表3参照)である点と結合したヒト血清タンパク質を表3に示した一連の溶出緩衝液(5mL)を用いて吸着剤から溶出した点を除き、用いた操作は実施例7と実質的に同様である。結果を図5及び図2に示す。

【0149】

[実施例10] pH9.5の結合緩衝液と固定化Cu²⁺-dtn^p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B上のim-Cu²⁺-dtn^pである点を除き、用いた操作は実施例7と実質的に同様である。結果を図1及び図2に示す。

【0150】

[実施例11] pH7.0の結合緩衝液と固定化Cu²⁺-dtn^p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B上のim-Cu²⁺-dtn^pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3及び図4に示す。

【0151】

[実施例12] pH4.0の結合緩衝液と固定化Cu²⁺-dtn^p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B上のim-Cu²⁺-dtn^pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5及び図2に示す。

【0152】

[実施例13] pH9.5の結合緩衝液と固定化Ni²⁺-dtn^e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B上のim-Ni²⁺-dtn^eである点を除き、用いた操作は実質的に実施例7と同様である。結果を図1及び図6に示す。

【0153】

〔実施例14〕 pH7.0の結合緩衝液と固定化 Ni^{2+} -dtn_e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Ni^{2+} -dtn_eである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3及び図4に示す。

【0154】

〔実施例15〕 pH4.0の結合緩衝液と固定化 Ni^{2+} -dtn_e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Ni^{2+} -dtn_eである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5及び図6に示す。

10

【0155】

〔実施例16〕 pH9.5の結合緩衝液と固定化 Ni^{2+} -dtn_p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Ni^{2+} -dtn_pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例7と同様である。結果を図1及び図6に示す。

【0156】

〔実施例17〕 pH7.0の結合緩衝液と固定化 Ni^{2+} -dtn_p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Ni^{2+} -dtn_pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3及び図4に示す。

20

【0157】

〔実施例18〕 pH4.0の結合緩衝液と固定化 Ni^{2+} -dtn_p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Ni^{2+} -dtn_pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5及び図6に示す。

【0158】

〔実施例19〕 pH9.5の結合緩衝液と固定化 Co^{2+} -dtn_e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Co^{2+} -dtn_eである点を除き、用いた操作は実質的に実施例7と同様である。結果を図1に示す。

30

【0159】

〔実施例20〕 pH7.0の結合緩衝液と固定化 Co^{2+} -dtn_e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Co^{2+} -dtn_eである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3に示す。

【0160】

〔実施例21〕 pH4.0の結合緩衝液と固定化 Co^{2+} -dtn_e吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Co^{2+} -dtn_pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5に示す。

40

【0161】

〔実施例22〕 pH9.5の結合緩衝液と固定化 Co^{2+} -dtn_p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Co^{2+} -dtn_pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例7と同様である。結果を図1に示す。

【0162】

〔実施例23〕 pH7.0の結合緩衝液と固定化 Co^{2+} -dtn_p吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロース^{T M}CL-6B上の im-Co^{2+} -dtn_pである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3に示す。

50

【0163】

〔実施例24〕 pH4.0の結合緩衝液と固定化 Co^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Co^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5に示す。

【0164】

〔実施例25〕 pH9.5の結合緩衝液と固定化 Zn^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Zn^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例7と同様である。結果を図1及び図7に示す。

10

【0165】

〔実施例26〕 pH7.0の結合緩衝液と固定化 Zn^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Zn^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3及び図7に示す。

【0166】

〔実施例27〕 pH4.0の結合緩衝液と固定化 Zn^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Zn^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5及び図7に示す。

20

【0167】

〔実施例28〕 pH9.5の結合緩衝液と固定化 Zn^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Zn^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例7と同様である。結果を図1及び図7に示す。

【0168】

〔実施例29〕 pH7.0の結合緩衝液と固定化 Zn^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Zn^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例8と同様である。結果を図3及び図7に示す。

30

【0169】

〔実施例30〕 pH4.0の結合緩衝液と固定化 Zn^{2+} -dtnp吸着剤を用いたヒト血清タンパク質の分離と精製

用いた吸着剤がセファロースTMCL-6B上の im-Zn^{2+} -dtnpである点を除き、用いた操作は実質的に実施例9と同様である。結果を図5及び図7に示す。

【0170】

〔実施例31〕 固定化 Cu^{2+} -dtnp吸着剤をFPLCTMシステムとともに用いたヒト血清タンパク質の分離

これらの分離操作を通じて、プログラム化されたFPLCシステム(Pharmacia Fine Chemicals、Uppsala、Sweden)を用いた。 im-Cu^{2+} -dtnp/セファロースTMCL-6B吸着剤(1mL)をAmersham PharmaciaTM HR5/10カラム(充填容積5cm×内径0.5cm)に充填した。クロマトグラフィー操作を通じて、0.5mL/minの流速を用いた。カラムは平衡緩衝液(下記参照)を用いて平衡化させた。平衡緩衝液で5倍に希釈したヒト血清溶液(200μL)を、前記充填したカラムに200μLのインジェクションループを通じてロードした。洗浄及び濃度勾配溶出操作については全て下記に述べる。ヒト血清タンパク質のクロマトグラフィー操作経過をモニターし記録するために、PharmaciaTM UV-1 単一光路モニター(280nm)、REC-482 ツーチャンネルレコーダー、及びコンピューター化されたデータ自動記録装置を使用した。全ての画分はFRAC-100 画分コレクターで1mL画分として採集し、Bio-Rad^T

40

50

^M Dyeとビシンコニン酸(BCA)法を用いて分析した。ピーク画分はSDS-PAGEにより分析した。結果を図8及び図9に示す。

【0171】

im-Cu²⁺-dtn eカラムの溶出プロトコル

平衡緩衝液：20mM 炭酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH9.5

洗浄緩衝液：15mLの平衡緩衝液

溶出操作：1) pH線形勾配法で10mL、20分間(20mM 炭酸ナトリウム緩衝液／100mM NaCl、pH9.5から20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／100mM NaCl、pH4.0)

2) 塩濃度線形勾配法で10mL、20分間(20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0中の0.1Mから1.0M NaCl)

3) イミダゾール濃度線形勾配法で10mL、20分間(20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／1.0M NaCl、pH4.0中の0から250mMイミダゾール)

[実施例32] 固定化Cu²⁺-dtnp吸着剤をFPLCTMシステムとともに用いたヒト血清タンパク質の分離

im-Cu²⁺-dtnp／セファロースTMCL-6Bを吸着剤として用い、以下の溶出プロトコルを使用した点を除き、用いた操作は実質的に実施例31と同様である。結果を図10及び図11に示す。

【0172】

im-Cu²⁺-dtn pカラムの溶出プロトコル

平衡緩衝液：20mM 炭酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH9.5

洗浄緩衝液：5mLの平衡緩衝液

溶出操作：1) pH線形勾配法で5mL、10分間(20mM 炭酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH9.5から20mM酢酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH4.0)

2) 2mLの20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH4.0

3) 塩濃度線形勾配法で7mL、14分間(20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0中の0.1Mから1.0M NaCl)

4) 1mLの20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／1.0M NaCl、pH4.0

5) イミダゾール線形勾配法で5mL、10分間(20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／1.0M NaCl、pH4.0中で0から250mM イミダゾール)

6) 1mLの20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／1.0M NaCl及び250mM イミダゾール、pH4.0

[実施例33] 固定化Cu²⁺-dtnp吸着剤をFPLCTMシステムとともに用いたヒト血清タンパク質の分離

im-Cu²⁺-dtnp／セファロースTMCL-6Bを吸着剤として使用し、以下の溶出プロトコルを使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例31と同様である。結果を図12及び図13に示す。

【0173】

im-Cu²⁺-dtn pカラムの溶出プロトコル

平衡緩衝液：20mM 炭酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH9.5

洗浄緩衝液：10mLの平衡緩衝液

溶出緩衝液：緩衝液A：20mM 炭酸ナトリウム緩衝液／1.0M NaCl、pH9.5；

緩衝液B：20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／1.0M NaCl、pH4.0

溶出操作：1) 塩濃度線形勾配法で10mL、20分間(20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5中で0.1Mから1.0M NaCl)

- 2) 1 mLの緩衝液A
- 3) 直線濃度勾配法で5 mL、10分間（緩衝液Aから緩衝液B；最終緩衝液組成：緩衝液A 50%及び緩衝液B 50%）
- 4) 緩衝液Aと緩衝液Bの50：50（V/V）混合物を8 mL
- 5) 直線濃度勾配法で5 mL、10分間（50/50 V/Vの緩衝液A＋緩衝液Bから緩衝液B 100%に）
- 6) 10 mLの20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液/1.0 M NaCl、pH 4.0

〔実施例34〕 組換えタンパク質GST- δ ATPase-His₆タンパク質の結合についてのim-Cu²⁺-tacn吸着剤のスクリーニング

0.5 mLから20 mLまでのim-Cu²⁺-tacn/セファロースTM CL-6Bゲルを含有するBio-RadTM Econo-column [典型的なカラムサイズは4.0 cm（長さ）×0.8 cm（内径）から12 cm（長さ）×1.5 cm（内径）]（Hercules、CA、USA）を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、300 mM 塩化ナトリウム及び10%グリセロールを含む平衡緩衝液pH 8.0によって平衡化させた。部分的に精製された融合タンパク質GST- δ ATPase-His₆（E. Coli株K12 DH5 α lpha F'において産生される）の分取。DH5 α lpha F'株の起源と遺伝子型は次の通りである：F'、80 d lacZ Δ M15、end A1、rec A1、hsd R17（rk⁻、mk⁺）、sup E44、thi-1、gyr A96、rei A1、 Δ （lacZYA-arg F）U169、deo R、 λ^- 。[<http://wheat.dw.usda.gov/qppages/probes/strains.html>を参照]。細胞発現システムから回収したE. Coliの細胞ペレットを細胞破碎して得た目的の組換えタンパク質GST- δ ATPase-His₆を含有する粗E. Coli細胞破碎液（4.0 cm×0.8 cmのカラムには0.3 mLで、これより大きなカラムには比例して容量を増やした）をカラムにロードした。未結合のタンパク質と弱く結合したタンパク質を溶出するためには、平衡緩衝液（4.0 cm×0.8 cmのカラムには5 mL、これより大きなカラムには比例して容量を増やした）を使用した。タンパク質がそれ以上溶出されなくなったら、それぞれ、20 mM イミダゾール、40 mM イミダゾール、250 mM イミダゾールを含有する大量の平衡緩衝液（4.0 cm×0.8 cmのカラムには2 mL；これより大きなカラムには比例して容量を増やした）を順次流して結合したタンパク質を溶出させ、1 mLずつ画分を回収した。未結合画分と溶出画分のタンパク質濃度は、ビシンコニン酸（BCA）試薬（Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、USA）及びBio-RadTM Dye（BioRad、Richmond、CA、USA）法により測定し、酵素活性はGST基質1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン（CDNB）を用いて測定した。吸着剤に結合した融合タンパク質GST- δ ATPase-His₆のパーセンテージを表4に示す。

【0174】

〔実施例35〕 組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の結合についてのim-Ni²⁺-tacn吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B上のim-Ni²⁺-tacnである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例34と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質GST- δ ATPase-His₆のパーセンテージを表4に示す。

【0175】

〔実施例36〕 組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の結合についてのim-Zn²⁺-tacn吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B上のim-Zn²⁺-tacnである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例34と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質GST- δ ATPase-His₆のパーセンテージを表4に示す。

【0176】

〔実施例37〕 組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の結合について

の $\text{im-Co}^{2+}\text{-tacn}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Co}^{2+}\text{-tacn}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0177】

〔実施例 38〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Mn}^{2+}\text{-tacn}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Mn}^{2+}\text{-tacn}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

10

【0178】

〔実施例 39〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Cr}^{3+}\text{-tacn}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Cr}^{3+}\text{-tacn}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0179】

〔実施例 40〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtne}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Cu}^{2+}\text{-DTNE}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

20

【0180】

〔実施例 41〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Ni}^{2+}\text{-DTNE}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Ni}^{2+}\text{-DTNE}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0181】

〔実施例 42〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Zn}^{2+}\text{-DTNE}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-DTNE}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

30

【0182】

〔実施例 43〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Co}^{2+}\text{-DTNE}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Co}^{2+}\text{-DTNE}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

40

【0183】

〔実施例 44〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Mn}^{2+}\text{-DTNE}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Mn}^{2+}\text{-DTNE}$ である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 34 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0184】

〔実施例 45〕 組換え $\text{GST-}\delta\text{ATPase-His}_6$ タンパク質の結合についての $\text{im-Cr}^{3+}\text{-DTNE}$ 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 上の $\text{im-Cr}^{3+}\text{-DTNE}$ である点を

50

除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0185】

〔実施例 4 6〕 組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の結合についての im-Cu²⁺-DTNP 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B 上の im-Cu²⁺-DTNP である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0186】

〔実施例 4 7〕 組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の結合についての im-Ni²⁺-DTNP 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B 上の im-Ni²⁺-DTNP である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0187】

〔実施例 4 8〕 組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の結合についての im-Zn²⁺-DTNP 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B 上の im-Zn²⁺-DTNP である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0188】

〔実施例 4 9〕 組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の結合についての im-Co²⁺-DTNP 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B 上の im-Co²⁺-DTNP である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0189】

〔実施例 5 0〕 組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の結合についての im-Mn²⁺-DTNP 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B 上の im-Mn²⁺-DTNP である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0190】

〔実施例 5 1〕 組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の結合についての im-Cr³⁺-DTNP 吸着剤のスクリーニング

用いた吸着剤がセファロースTM CL-6B 上の im-Cr³⁺-DTNP である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 3 4 と同様である。吸着剤に結合した融合タンパク質 GST- δ ATPase-His₆ のパーセンテージを表 4 に示す。

【0191】

〔実施例 5 2〕 im-Cu²⁺-tacn セファロースTM CL-6B を吸着剤とするバッチ吸着操作を用いた E. Coli 細胞破碎液からの組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質の分離

実施例 3 4 のように得た粗 E. Coli 抽出液 (3 mL) を、300 mM の塩化ナトリウムと 10 % グリセロールを含有する 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0 (平衡緩衝液) の存在下で平衡化させた 1 mL の im-Cu²⁺-tacn/セファロースTM CL-6B ゲルと混合した。4℃で 30 分間インキュベートした後、4℃で 5 分間、3,000 × g で混合物を遠心分離にかけ、上清を取り除いた。未結合のタンパク質又は弱く結合したタンパク質を除去するため、ゲルのペレットを 5 mL の平衡緩衝液で 2 度洗浄した。次いで、洗浄したゲルを Bio-RadTM Econo-column (10 mL) (Hercules, CA, USA) に充填した。さらに平衡緩衝液 (20 mL)

10

20

30

40

50

を使用して、未結合のタンパク質又は弱く結合したタンパク質を溶出させた。

【0192】

125mMのイミダゾールを含有する平衡緩衝液、pH7.0（溶出緩衝液A）10mLと、250mMのイミダゾールを含有する平衡緩衝液、pH7.0（溶出緩衝液B）5mLを使用することによって、保持されたタンパク質を溶出させることができた。全ての画分（1mL）を回収してタンパク質含量と酵素活性を分析した。未結合画分と溶出画分のタンパク質濃度はビシンコニン酸（BCA）試薬（Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、USA）とBio-RadTM Dye（BioRad、Richmond、CA、USA）法により測定し、酵素活性はGST基質1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン（CDNB）を用いて測定した。結果を図14-16に示す。

10

【0193】

〔実施例53〕 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Ni}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例52と同様である。結果を図14-16に示す。

【0194】

〔実施例54〕 $\text{im-Zn}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の分離

20

用いた吸着剤が $\text{im-Zn}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例52と同様である。結果を図14-16に示す。

【0195】

〔実施例55〕 $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例52と同様である。結果を図14-16に示す。

【0196】

30

〔実施例56〕 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例52と同様である。結果を図14-16に示す。

【0197】

〔実施例57〕 $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例52と同様である。結果を図14-16に示す。

40

【0198】

〔実施例58〕 $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase-His₆タンパク質の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例52と同様である。結果を図14-16に示す。

【0199】

〔実施例59〕 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いたE. Coli細胞破碎液からの組換えGST- δ ATPase

50

e-His₆ タンパク質の分離

用いた吸着剤が im-Ni²⁺-dtnp セファロースTM CL-6B である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 52 と同様である。結果を図 14-16 に示す。

【0200】

〔実施例 60〕 im-Zn²⁺-dtnp セファロースTM CL-6B を吸着剤とするバッチ吸着操作を用いた E. Coli 細胞破碎液からの組換え GST- δ ATPase-e-His₆ タンパク質の分離

用いた吸着剤が im-Zn²⁺-dtnp セファロースTM CL-6B である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 52 と同様である。結果を図 14-16 に示す。

【0201】

〔実施例 61〕 im-Ni²⁺-tacn セファロースTM CL-6B を吸着剤とするクロマトグラフィー操作を用いた E. Coli 細胞破碎液からの組換え GST- δ ATPase-e-His₆ タンパク質の分離

im-Ni²⁺-tacn 吸着剤 (1 mL) を、5 cm の高さになるように Pharmacia HR5/10 カラム (充填容積 5 cm $\times$ 内径 0.5 cm) に充填した。クロマトグラフィー操作を通じて、0.5 mL/min の流速を用いた。Bio-RadTM

Econo-column (10 mL) の中で、平衡緩衝液 (300 mM 塩化ナトリウムと 10% グリセロールを含有する 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0) を用いてゲルを平衡化させた後、2 mL のインジェクションループを通じて、実施例 52 に記載されているように取得した 2 mL の E. Coli 抽出液を充填したカラムにロードした。次にゲルを 15 mL の平衡緩衝液で溶出させた。この溶出操作では、平衡緩衝液 (10 mL) 中のイミダゾールを 20 分間にわたって 0 mM から 250 mM まで増加させる線形グラジエントを用いた後、250 mM イミダゾールを含有する平衡緩衝液 5 mL で均一濃度溶出を行った。溶出タンパク質のクロマトグラフィー曲線をモニターし記録するために、PharmaciaTM UV-1 単一光路モニター (280 nm)、REC-482 ツーチャンネルレコーダーとコンピューター化した自動記録装置を使用した。全ての画分 (1 mL) は FRACTTM-100 画分コレクターで回収した。未結合画分と溶出画分のタンパク質濃度はビシンコニン酸 (BCA) 試薬 (Pierce Chemical Co.、Rockford, IL, USA) 及び Bio-RadTM Dye (BioRad, Richmond, CA, USA) 法により測定し、酵素活性は GST 基質 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を用いて測定した。ピーク画分は SDS-PAGE により性質決定した。結果を図 17-18 に示す。

【0202】

〔実施例 62〕 im-Cu²⁺-tacn セファロースTM CL-6B を吸着剤とするバッチ吸着操作を用いた酵母培養液からの rF. h カテプシン L5 の分離

im-Cu²⁺-tacn/セファロースTM CL-6B 吸着剤 (1 mL) を Bio-RadTM Econo-column (10 mL) に充填し、平衡緩衝液 (150 mM 塩化ナトリウムを含有する 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0) で平衡化させた。特定の組換え C 末端ヘキサヒスチジンタグ付き Fasciola hepatica カテプシン L5 (rF. h カテプシン L5) 発現システムを含有し、培地で成長させた被トランスフェクト Saccharomyces cerevisiae 酵母細胞から得た粗酵母抽出上清液 (30 mL) を im-Cu²⁺-tacn セファロースTM にロードした。ブレイクスルー画分 (未結合画分) は、後にタンパク質含量と酵素活性を決定するために回収した。次いで、10 mL の平衡緩衝液でカラムを洗浄して、未結合のタンパク質又は弱く結合したタンパク質を取り除いた。次に、タンパク質不純物を溶出させるために、150 mM 塩化ナトリウムを含有する 50 mM リン酸ナトリウム pH 6.0 を 10 mL 使用して洗浄操作を行った。その後、この洗浄緩衝液にさらにそれぞれ 125 mM イミダゾール (溶出緩衝液 A)、250 mM イミダゾール (溶出緩衝液 B)、及び 500 mM イミダゾール (溶出緩衝液 C) を含有する 3 種類の溶液各 5 mL を用いて結合タンパク質を溶出させた。ブレイクスルー、洗浄及び溶出操作における全て

10

20

30

40

50

の画分を回収して、BCA及びBio-RadTM DyeアッセイならびにSDS-PAGEによりタンパク質含量を分析した。酵素活性は、Barrett, A.J.[Biochemical Journal、187(1980) 909-912]ならびにBianastati, A.、Brown, M.A.、Kembhavi, A.A.、Nicklin, M.J.H.、Sayers, C.A.、Sunter, D.C.及びBarrett, A.J.[Biochemical Journal、211(1983) 129-138]に記載されている蛍光アッセイにより測定した。結果を図19に示す。

【0203】

[実施例63] im-Ni^{2+} -tacn/セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするバッチ吸着操作を用いた酵母培養液からのrF.h カテプシン L5の分離

用いた吸着剤が im-Ni^{2+} -tacn/セファロースTM CL-6Bである点を除いて、用いた操作は実質的に実施例62と同様である。結果を図19に示す。

10

【0204】

[実施例64] im-Cu^{2+} -tacn セファロースTM CL-6Bを吸着剤とするクロマトグラフィー操作を用いた酵母培養液からのrF.h カテプシン L5の分離

im-Cu^{2+} -tacn セファロースTM CL-6B吸着剤(0.5mL)を、2.5cmの高さまでPharmacia HR5/5カラム(充填容積 2.5cm×内径0.5cm)に充填した。組換えC末端ヘキサヒスチジンタグ付きFasciola hepatica カテプシン L5(rF.h カテプシン L5)を含む酵母上清(246mL)を、前記充填したカラムに0.2mL/分の流速でロードした。洗浄操作は、30mLの平衡緩衝液(150mM NaClを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH8.0)及び21mLの溶出緩衝液A(150mM NaClを含有する50mM リン酸ナトリウム、pH6.0)を使用して行った。次いで、緩衝液Aから緩衝液Bへの直線濃度勾配法(15mL、30分)でカラムからの溶出を行った後、5mLの緩衝液Bで均一濃度溶出を行った。溶出緩衝液Bは、150mM NaClと500mM イミダゾールを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0である。全ての画分(1mL)をFRAC-100 画分コレクターで回収した。タンパク質含量は、Bio-Radアッセイにより分析した。酵素活性は実施例62のような蛍光アッセイで測定した。ピーク画分はSDS-PAGEにより性質決定した。結果を図20及び図21に示す。

20

【0205】

[実施例65] im-Cu^{2+} -tacn セファロースTM CL-6Bを吸着剤として用いた酵母培養液からのヘキサヒスチジンタグ化組換えマラリア抗原頂端膜抗原-1(AMA-1)の分離

AMA-1を含む被トランスフェクトSaccharomyces cerevisiae酵母細胞の粗上清を透析緩衝液(150mM NaCl及び10%グリセロールを含有する50mMリン酸ナトリウム、pH8.0)を使用し4℃で一晩透析した後、新しい透析緩衝液を使用して4℃で4時間にわたる透析を2度行った。

30

【0206】

im-Cu^{2+} -tacn/セファロースTM CL-6B吸着剤(1mL)をBio-RadTM Econo-column(10mL)に充填した。カラムは平衡緩衝液(150mM 塩化ナトリウムを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH8.0)で平衡化させた。透析した酵母上清(45mL)を本カラムにロードした。ブレイクスルー(未結合)画分はタンパク質アッセイのために回収した。次いで、25mLの平衡緩衝液でカラムを洗浄し、未結合のタンパク質と弱く結合したタンパク質を取り除いた。次に、タンパク質不純物を溶出させるために計20mLの洗浄緩衝液(150mM NaClを含む50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0)を2度カラムに通した。150mM NaClと125mM イミダゾールを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0(溶出緩衝液A)、150mM NaClと250mM イミダゾールを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0(溶出緩衝液B)、150mM NaClと500mMイミダゾールを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、

40

50

pH 6.0 (溶出緩衝液C) という3つの緩衝液をそれぞれ順次5 mLずつ使用して結合タンパク質を溶出させた。ブレイクスルー画分ならびに洗浄及び溶出操作から得られた画分をウェスタンブロット分析のために回収した。結果を図22に示す。

【0207】

【実施例66】 $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtnp}$ /セファロースTM CL-6Bを吸着剤として用いた酵母培養液からのヘキサヒスチジンタグ化組換えマラリア抗原頂端膜抗原-1 (AMA-1) の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースTM CL-6Bである点を除き、用いた操作は実質的に実施例65と同様である。結果を図22に示す。

【0208】

【実施例67】 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤として用いた酵母培養液からのヘキサヒスチジンタグ化組換えマラリア抗原頂端膜抗原-1 (AMA-1) の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Ni}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bである点を除き、用いた操作は実質的に実施例65と同様である。結果を図22に示す。

【0209】

【実施例68】 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤として用いた酵母培養液からのヘキサヒスチジンタグ化組換えマラリア抗原頂端膜抗原-1 (AMA-1) の分離

用いた吸着剤が $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースTM CL-6Bである点を除き、用いた操作は実質的に実施例65と同様である。結果を図22に示す。

【0210】

【実施例69】 $\text{im-Cu}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6Bを吸着剤として用いた、組換え *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505株から単離したヘキサヒスチジンタグ化組換えタンパク質グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67/65) の精製

本研究で使用した緩衝液：

平衡緩衝液：300 mM 塩化カリウム、20 mM イミダゾール及び0.12% TritonTM X-100を含有する50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

洗浄緩衝液：1 M 塩化カリウム、40 mM イミダゾール及び0.12% TritonTM X-100を含有する50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

溶出緩衝液：A. 500 mM 塩化カリウム、125 mM イミダゾール及び0.12% TritonTM X-100を含有する50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、

B. 500 mM 塩化カリウム、250 mM イミダゾール及び0.12% TritonTM X-100を含有する50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、

C. 500 mM 塩化カリウム、500 mM イミダゾール及び0.12% TritonTM X-100を含有する50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

$\text{im-Cu}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6B吸着剤を平衡緩衝液で平衡化させた後、その0.2 mLを1.8 mLのエッペンドルフ・チューブに分け入れた。 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-NTA}$ カラム (Chelating SepharoseTM Fast Flow、Amersham Pharmacia、Uppsala、Sweden) を用いて予め分離された、部分精製タンパク質溶液 (500 μL) 及び *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505株で発現させて得られた粗タンパク質混合物をエッペンドルフチューブに加え、4℃で90分間インキュベートした。混合物を1000×gで1分間遠心分離にかけた後、上清を取り除いた。前記吸着剤を1 mLの平衡緩衝液で洗浄した後、続いてタンパク質不純物を取り除くために1 mLの洗浄緩衝液で5回洗浄した。それぞれ、0.5 mLの溶出緩衝液A、溶出緩衝液B、溶出緩衝液Cを順次4回使用して、結合タンパク質の溶出を行った。未結合画分、洗浄画分及び溶出画分はSDS-PAGE分析のために回収した。結果を図23に示す。

【0211】

【実施例 70】 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-tacn}$ /セファロースTM CL-6B を吸着剤として用いた、*Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 株から単離したヘキサヒスチジンタグ化組換えタンパク質グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67/65) の精製

用いた吸着剤が $\text{im-Ni}^{2+}\text{-tacn}$ /セファロースTM CL-6B である点を除き、用いた操作は実質的に実施例 69 と同様である。SDS-PAGE の分析結果を図 23 に示す。

【0212】

【実施例 71】 $\text{im-Cu}^{2+}\text{-tacn}$ /セファロースTM CL-6B を吸着剤として用いた、組換え *Pichia pastoris* 株から単離したヘキサヒスチジンタグ化組換えタンパク質グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67/65) の精製

$\text{im-Cu}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTM CL-6B ゲル (1 mL) を Bio-RadTM Econo-column に充填し、平衡緩衝液 (300 mM 塩化カリウム、0.1 mM 2-アミノエチルイソチオウロニウムブロミド、1 mM グルタミン、0.2 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、20 μM ピリドキサル-L-リン酸、及び 2 mM β -メルカプトエタノールを含有する 50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、Ni 緩衝液と表記) で平衡化させた。

【0213】

C 末端ヘキサヒスチジン「タグ」を含む組換えグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67/65) を *S. cerevisiae* BJ3505 株及び *Pichia pastoris* 株中で産生するための発現ベクターは、確立した方法 [Law, R.H.P., Rowley, M.J., MacKay, I.R. 及び Corner, B., Journal of Biotechnology 61(1998) 57-68; Papakonstantinou, T., Law, R.H.P., Gardiner, P., Rowley, M. J. 及び Mackay, I., Enzyme and Microbial Technology 26(2000) 645-652] を用いて作成した。

【0214】

P. pastoris の細胞破碎液から得た粗融合タンパク質 GAD67/65 は、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-NTA}$ Chelating SepharoseTM Fast Flow カラム (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて部分精製した。最適化を徹底的に試みたにも関わらず、融合タンパク質 GAD67/65 は、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-NTA}$ Chelating SepharoseTM Fast Flow 吸着剤を用いて、均一な形態で得ることができなかった。 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-NTA}$ カラムを用いた分離操作では、Ni 緩衝液中にさらに 250 mM イミダゾールを加えることによって、結合した GAD67/65 を溶出することができた。部分精製された融合タンパク質 GAD67/65 の溶液中のイミダゾール濃度は、Ni 緩衝液で希釈して 20 mM に調整した。次いで、0.2 mL/min の流速で、本溶液を $\text{im-Cu}^{2+}\text{-tacn}$ カラムにロードした。ブレイクスルー (未結合) 画分をタンパク質含量測定のために回収した。未結合の不純タンパク質又は弱く結合した不純タンパク質を取り除くために、20 mL の洗浄緩衝液 (40 mM イミダゾールを含む Ni 緩衝液、pH 8.0) でカラムを洗浄した。結合したタンパク質は、Ni 緩衝液、pH 8.0 中の 250 mM イミダゾールによって溶出し、画分 (0.5 mL) を回収した。ブレイクスルー画分、洗浄画分、及び溶出画分は、Bio-RadTM アッセイ及び SDS-PAGE 分析を用いたタンパク質含量の測定のために回収し、酵素活性は、「Papakonstantinou, T., Law, R.H.P., Gardiner, P., Rowley, M.J. 及び Mackay, I., Enzyme and Microbial Technology 26(2000) 645-652」の方法に従って測定した。SDS-PAGE の結果を図 24 に示す。

【0215】

【実施例 72】 様々な pH 条件下における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ /セファロースTM CL-6B 吸着剤へのミオグロビンの結合

Mettler AE50 5 桁天秤上で HMYO タンパク質を正確に秤量し、以下の平衡緩衝液中に希釈することによって、1.0 mg/mL のウマ骨格筋ミオグロビン (ho

10

20

30

40

50

rse skeletal muscle myoglobin、HMYO)を含有する試料を調製した:

緩衝液A: 0.5M 塩化ナトリウムを含有する20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0

緩衝液B: 0.5M 塩化ナトリウムを含有する20mM リン酸カリウム緩衝液、pH6.0

緩衝液C: 0.5M 塩化ナトリウムを含有する20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0

緩衝液D: 0.5M 塩化ナトリウムを含有する20mM リン酸カリウム緩衝液、pH8.0

緩衝液E: 0.5M 塩化ナトリウムを含有する20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5

吸引乾燥したim-M²⁺-dtne セファロースTMCL-6Bゲル(約0.05g)(ここで、M²⁺はCu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺又はCo²⁺を表す)を0.5mLのタンパク質溶液を含むDuraporeTMメンブレンチューブ(UltrafreeTM-CL、0.1μm、Nihon Millipore Kogyo K. K、Japan)の中で、時計回りのローテーター(RATEKTM Instruments、Mitcham、VIC、Australia)を用いてゆっくり回転させながら、25℃で90分間インキュベートした。上清を回収した後、SorvallTM RT6000冷却遠心分離機(DuPont Co.、Newtown、CT、USA)を用いて3000×gで混合物を遠心分離し、分析用逆相(RP)HPLC法を用いて、直ちにサンプルの遊離タンパク質濃度を分析した。結果を図25及び図26に示す。

【0216】

[実施例73] 様々なpH条件下におけるim-M²⁺-dtnp/セファロースTMCL-6B吸着剤へのミオグロビンの結合

im-M²⁺-dtnp セファロースTMCL-6B吸着剤を使用した点を除き、用いた操作は実質的に実施例72と同様である。結果を図25及び図26に示す。

【0217】

[実施例74] 様々なpH条件下におけるim-M²⁺-dtne セファロースTMCL-6B吸着剤へのリゾチームの結合

タンパク質がニワトリ卵白ゾチーム(hen egg white lysozyme、HEWL)である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例72と同様である。結果を図27及び図28に示す。

【0218】

[実施例75] 様々なpH条件下におけるim-M²⁺-dtnp セファロースTMCL-6B吸着剤へのリゾチームの結合

im-Mn²⁺-dtnp セファロースTMCL-6B吸着剤を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例74と同様である。結果を図27及び図28に示す。

【0219】

[実施例76] 様々なpH条件下におけるim-M²⁺-dtne セファロースTMCL-6B吸着剤へのチトクロムCの結合

タンパク質がウマ心臓チトクロムC(horse heart cytochrome C、HHC C)である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例72と同様である。結果を図29及び図30に示す。

【0220】

[実施例77] 様々なpH条件下におけるim-M²⁺-dtnp セファロースTMCL-6B吸着剤へのチトクロムCの結合

im-M²⁺-dtnp セファロースTMCL-6B吸着剤を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例76と同様である。結果を図29及び図30に示す。

【0221】

【実施例 78】 様々な pH 条件下における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn e}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤への α -ラクトアルブミンの結合

タンパク質が牛乳 α -ラクトアルブミン (cow milk α -lactalbumin、 α LAC) である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 72 と同様である。結果を図 31 及び図 32 に示す。

【0222】

【実施例 79】 様々な pH 条件下における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤への α -ラクトアルブミンの結合

$\text{im-Mn}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 78 と同様である。結果を図 31 及び図 32 に示す。

10

【0223】

【実施例 80】 様々な塩濃度における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn e}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤へのミオグロビンの結合

以下の平衡緩衝液を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 72 と同様である。

【0224】

緩衝液 F : 0.1 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

緩衝液 G : 0.5 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

20

緩衝液 H : 1.0 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

緩衝液 I : 2.0 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

緩衝液 J : 3.0 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 8.0

結果を図 33 に示す。

【0225】

【実施例 81】 様々な塩濃度における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤へのミオグロビンの結合

$\text{im-Mn}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 80 と同様である。結果を図 33 に示す。

30

【0226】

【実施例 82】 様々な塩濃度における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn e}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤へのリゾチームの結合

タンパク質がニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 80 と同様である。結果を図 34 に示す。

【0227】

【実施例 83】 様々な塩濃度における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤へのリゾチームの結合

$\text{im-Mn}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 82 と同様である。結果を図 34 に示す。

40

【0228】

【実施例 84】 様々な塩濃度における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn e}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤へのチトクロム C の結合

タンパク質がウマ心臓チトクロム C (HHCC) である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例 80 と同様である。結果を図 35 に示す。

【0229】

【実施例 85】 様々な塩濃度における $\text{im-M}^{2+}\text{-dtn p}$ セファロース^T MCL-6B 吸着剤へのチトクロム C の結合

50

i m-M n²⁺-d t n p セファロースTM CL-6B吸着剤を使用した点を除いて、用いた操作は実質的に実施例84と同様である。結果を図35に示す。

【表1】

表1.

実施例7、10、13、16、19、22、25、及び28で用いた平衡緩衝液と溶出緩衝液

平衡緩衝液	0.1M NaClを含む20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5
溶出緩衝液	1.0M NaClを含む20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5
	1.0M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH8.0
	1.0M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0
	1.0M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH6.0
	1.0M NaClを含む20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0
	1.0M NaClと250mM イミダゾールを含む20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0
	200mM EDTA、pH4.2

10

20

【表2】

表2.

実施例8、11、14、17、20、23、26、及び29で用いた平衡緩衝液と溶出緩衝液

平衡緩衝液	0.1M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0
溶出緩衝液	1.0M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0
	0.1M EDTAを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0

【表3】

30

表3

実施例9、12、15、18、21、24、27、及び30で用いた平衡緩衝液と溶出緩衝液

平衡緩衝液	0.1M NaClを含む20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0
溶出緩衝液	1.0M NaClを含む20mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0
	0.5M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH6.0
	0.5M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.0
	0.5M NaClを含む20mM リン酸カリウム緩衝液、pH8.0
	0.5M NaClを含む20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5
	1.0M NaClと250mM イミダゾールを含む20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5
	200mM EDTA、pH4.2

40

【表 4】

表4 300mM NaClと10%グリセロールを含有する50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH8. 0の結合条件下で、異なる $\text{im-M}^{2+}\text{-tacn}$ セファロースTMCL-6B、 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ セファロースTMCL-6B及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ /セファロースTMCL-6B吸着剤に結合した融合タンパク質GST- δ ATPase-His₆のパーセンテージ

金属結合リガンド	金属イオン					
	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Mn^{2+}	Cr^{3+}
Tacn	100±3	100±3	100±3	41±3	0±4	0±3
Dtne	100±3	51±3	0±2	0±1	0±1	20±1
Dtnp	100±3	97±3	33±3	13±1	0±2	0±1

10

【0230】

【実施例86】 NT1と称するオリゴペプチド「タグ」がN末端に融合されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を発現させるために使用できる発現プラスミドの構築

PCRテンプレートの消化：

20

GSTのソースはpGEX3 GSTである。これを制限エンドヌクレアーゼEcoRV及びBamHIで消化した。条件：約3.45 μg のプラスミド、20ユニットのBamHI、20ユニットのEcoRV、10mM Tris-HCl pH8.0、0.5mM MgCl_2 、100mM NaCl、1mM 2-メルカプトエタノール、総容量50 μL 。この混合物を37℃で2時間インキュベートした。2つのDNAフラグメントを1%アガロースゲル上で分離し、所望のフラグメントを単離した。

【0231】

PCR操作：

60 pmolのフォワードプライマー、60 pmolのリバースプライマー、2.5ユニットのDNAポリメラーゼ、0.5mM dNTP、10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl_2 、50mM KClを含む混合物に、GSTをコードする50 ngと25 ngのDNAフラグメントを加えた。反応混合物の容量は50 μL である。GST cDNAはPCRによって増幅した。概略を述べると、前記反応混合物をサーモサイクラーに入れ、最初の変性ステップを95℃で5分間行い、94℃、50℃及び72℃でそれぞれ1、2及び3分間を2サイクル行った後、94℃、55℃、72℃で1、2、及び3分間を40サイクル、次いで、最後の伸長ステップを72℃で5分間実施するという条件を使用した。反応混合物を1%アガロースゲルに流し、PCR産物を単離した。

30

【0232】

フォワードプライマーの配列： 5' -TTAATCATGAAACACCCACCACA
ACTCCTGGGACCAACGACATCAACCGTGTCGACCAGATGTCCCTATACTAGGT-3'

40

リバースプライマーの配列： 5' -TAAAAGCTTTTACAGATCCGATT
AAGG-3'

PCR産物末端の修飾：

約300 ngの上記単離されたPCR産物サンプルを、3ユニットのT4 DNAポリメラーゼ、10ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼ、1mM rATP、0.5mM dNTP、50mM Tris-HCl pH7.5、10mM MgCl_2 、1mM ジチオスレイトール (DTT) 及び5 μg のBSAを含有する100 μL の反応混合物に加えた。反応は37℃で1時間にわたり行った。次に、0.5 μL の0.5M EDT

50

Aを前記混合物に加え、75℃で10分間インキュベートした後、氷上で冷却した。DNAはフェノール／クロロフォルム抽出を行った後、エタノール沈殿により回収した。

【0233】

シャトルベクターへのライゲーション：

様々な量の修飾PCR産物（約36ng、12ng及び4ng）を含む10μLの反応溶液を、50ngのシャトルベクターpBluescript IISK+（SmaIで切断、脱リン酸化）、2.5ユニットのT4 DNAリガーゼ、40mM Tris-HCl pH7.8、10mM MgCl₂、10mM DTT及び0.5mM ATPと混合した。ライゲーション反応溶液は室温で一晩インキュベートした。

【0234】

DH5αの形質転換：

標準的な技法を用いて、塩化ルビジウムで処理したE. coli DH5α細胞を5μLの上記ライゲーション反応混合溶液で形質転換した。800μgのIPTG（Isopropyl-β-Thiogalactoside）とX-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド）を塗布したLB Ampプレート（トリプトン 10g/L、酵母抽出物 5g/L、NaCl 10g/L、寒天 15g/Lを添加しオートクレーブした後、アンピシリン 100mg/Lを追加）上に、様々な希釈した形質転換混合物を播種した。プレートは37℃で一晩インキュベートした。

【0235】

陽性クローンの同定：

修飾されたプラスミドDNAは、標準的な技術を用いて、上記のDH5α形質転換体から単離した。所望の挿入物を有するプラスミドを含むと考えられるクローンを同定するために、異なるクローンから得たプラスミドDNAを様々な制限エンドヌクレアーゼで消化した。多くのクローンから得たプラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼPvuIIで消化した。条件は、約300μgのDNA、10ユニットのPvuII、10mM Tris-HCl pH7.5、10mM MgCl₂、50mM NaCl、1mM DTE、容量20μL。温度は37℃で、反応時間は3時間であった。1%アガロースゲル上でDNAフラグメントを分離することにより、正しいサイズのフラグメントを含むプラスミドの同定が可能となった。PvuII酵素によるスクリーニングで選択したプラスミドに対して、制限エンドヌクレアーゼBspHIを用いた2回目のスクリーニングを行った。条件は、約300μgのDNA、10ユニットのBspHI、50mM 酢酸カリウム、20mM Tris-酢酸、10mM 酢酸マグネシウム、1mM DTT、pH7.9、容量20μL。温度は37℃で、反応時間は2時間であった。消化されたDNAを1%アガロースゲル上に流し、正しいサイズのフラグメントを含むプラスミドを同定した。

【0236】

両酵素によるスクリーニングで選択したクローンのプラスミド挿入物のDNA配列は、以下のように決定した。選択したクローンのPvuII消化物から単離された所望のプラスミドフラグメント約100ngを、DNA配列決定反応のテンプレートとして使用した。配列決定反応溶液は、100ngのプラスミドDNA、5pmolのプライマー、8μLのターミネーター前混合液、容量20μLであった。

【0237】

上記反応混合溶液を2つ調製し、一方を配列5'-AATTAACTCTCACTAAAGGG-3'のpBluescript T3プライマー、他方を配列3'-CGGGAATATCACTCAGCAATAATG-5'を有するpBluescript T7プライマーとした。以下の条件に従って、反応混合液をサーモサイクラーに加えた。最初の変性ステップを96℃で1分間、次に96℃、50℃及び60℃でそれぞれ30秒、15秒及び4分間を25サイクル。伸長産物は、標準技術を用いてエタノール／酢酸ナトリウム沈殿を実施することによって回収し、ペレットを乾燥し、DNA配列決定に供した。

【0238】

GST-NT1をコードする所望のプラスミド挿入物を含むクローンを同定した。DNA

10

20

30

40

50

A配列決定により、その配列が正しいことが証明された。

【0239】

挿入物の調製：

陽性クローン（所望の挿入物を有するpBlue-script）から得たプラスミドを制限エンドヌクレアーゼBspHI及びHindIIIとともにインキュベートした。条件は、約500ngのプラスミドDNA、20ユニットのBspHI、40ユニットのHindIII、50mM 酢酸カリウム、20mM Tris-酢酸、10mM 酢酸マグネシウム、1mM DTT、pH7.9、容量70μLであった。温度は37℃であり、反応時間は2.5時間であった。DNAフラグメントを2%アガロースゲル上で分離し、所望のフラグメントを単離した。

10

【0240】

発現ベクターの調製：

発現プラスミドpTrc 99A（Pharmacia Biotech）を制限エンドヌクレアーゼNcoI及びHindIIIとともにインキュベートした。条件は、約4.25μgのプラスミド、20ユニットのNcoI、20ユニットのHindIII、10mM Tris-HCl、pH8.0、5mM MgCl₂、100mM NaCl、1mM 2-メルカプトエタノール、容量200μLであった。温度は37℃であり、反応時間は2時間であった。2つのDNAフラグメントを1%アガロースゲル上で分離し、所望のフラグメントを単離した。

20

【0241】

プラスミドが両酵素によって完全に消化されたことを確認するために、単離したフラグメントをライゲートし、次にE. coli DH5α細胞を形質転換させるために使用した。概略に述べると、これは以下に行った。約50ngの単離されたフラグメント、2.5ユニットのT4 DNAリガーゼ、40mM Tris-HCl pH7.8、10mM MgCl₂、10mM DTT、0.5mM ATPを含む10μLの反応溶液を調製した。ライゲーション反応溶液を16℃で一晩インキュベートした。標準的な技法を用いて、塩化ルビジウム処理したE. coli DH5α細胞を5μLのライゲーション反応液で形質転換させた。異なる希釈度の形質転換物をLB Ampプレート上に播種した。プレートを37℃で一晩インキュベートした。形質転換コロニーが存在しないことによって、発現プラスミドが両酵素によって完全に消化されたことが確認された。

30

【0242】

NcoI/HindIIIで切断されたベクターpTrc 99Aへのライゲーション：

様々な量の挿入プレップDNA（約25ng、8.3ng及び2.75ng）を含有し、約50ngの発現プラスミドpTrc 99A（NcoI/HindIIIで切断）、2.5ユニットのT4 DNAリガーゼ、40mM Tris-HCl pH7.8、10mM MgCl₂、10mM DTT及び0.5mM ATPと混合した10μLの反応液を調製した。温度は16℃であり、反応時間は少なくとも1日であった。5μLの該反応混合溶液をE. coli DH5α細胞を形質転換するために使用した。修飾された発現プラスミドは、制限エンドヌクレアーゼEcoRV/HindIIIを使用した酵素スクリーニングを行うことによって、単離し同定した。

40

【0243】

発現細胞の形質転換：

標準的な技術を用いて、塩化ルビジウム処理したE. coli細胞株JM105を約100ngの修飾された発現プラスミドで形質転換した。プラスミド含有細胞を選択するために、異なる希釈度の形質転換細胞をLB Ampプレート上に播種した。

【0244】

〔実施例87〕 CT1と称するコントロールオリゴペプチド「タグ」（アミノ酸配列：MKHHHHHH）にN末端を融合したグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）を発現させるために使用できる発現プラスミドの構築

50

フォワードプライマーの配列が5'-TAAATCATGAAACATCACCATC
ACCATCACCCAGATGTCCCCCTATACTAGGT-3'である点を除いて、
操作は実質的に実施例86と同様である。

【0245】

陽性クローンの同定：

多くのクローンから得たプラスミドDNAを、制限エンドヌクレアーゼPvuIIとともにインキュベートした。条件は、約150μgのプラスミド、10ユニットのPvuII、10mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、50mM NaCl、1mM DTE、容量20μLであった。温度は37℃であり、反応時間は1時間であった。1%アガロースゲル上で2つのDNAフラグメントを分離して、正しいサイズのフラグメントを含むプラスミドの同定を可能とした。これらの選択したプラスミドに対して、制限エンドヌクレアーゼHindIII及びSalIを用いた2回目の酵素スクリーニングを行った。二重消化の条件は、約150μgのプラスミド、20ユニットのHindIII、20ユニットのSalI、50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、100mM NaCl、1mM DTE、容量40μLであった。温度は37℃であり、反応時間は4時間であった。消化されたDNAを1%アガロースゲル上に流し、正しいサイズのフラグメントを含むプラスミドを同定した。選択したプラスミドから得た約300ngの未切断DNAを、DNA配列決定のためのテンプレートとして使用した。他の配列決定条件は実施例86と同様である。

【0246】

GST-CT1をコードする所望のプラスミド挿入物を含むクローンを同定した。配列は、GSTの28番塩基がAからGに点突然変異されて、GSTの10番アミノ酸のイソロイシンがバリンに保存的に置換されている(AATからGTT)点を除き、正しいことが証明された。GSTの342番塩基がCからTに点突然変異されて、アスパラギン酸のサイレント突然変異が生じた(GACからGAU)。GSTの645番塩基がTからCに点突然変異されて、ヒスチジンのサイレント突然変異が生じた可能性がある(CATからCAC)。

【0247】

挿入物の調製：

陽性クローンから得たプラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼBspHI及びHindIIIとともにインキュベートした。条件は、約150ngのプラスミド、30ユニットのBspHI、60ユニットのHindIII、50mM 酢酸カリウム、20mM Tris-酢酸 pH7.9、10mM 酢酸マグネシウム、1mM DTT、容量100μL。温度は37℃であり、反応時間は22時間であった。

【0248】

[実施例88] CT2と称するコントロールオリゴペプチド「タグ」(アミノ酸配列：MKHQHQHQHQHQHQを有する)にN末端が融合されたグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)を発現させるために使用できる発現プラスミドの構築

CT2をコードするフォワードプライマーの配列が5'-TAAATCATGAAACACCAACACCAACATCAACATCAACATCAACATCAAGTCGAC
CCAGATGTCCCCCTATACTAGGT-3'である点を除いて、操作は実質的に実施例86と同様である。

【0249】

陽性クローンの同定：

異なるクローンから得た被修飾プラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼPvuIIのみで消化した。

【0250】

条件は、約300μgのプラスミド、20ユニットのPvuII、10mM Tris-HCl pH7.5、10mM MgCl₂、50mM NaCl、1mM DTE、容量30μLであった。温度は37℃であり、反応時間は3時間であった。1%アガロー

スゲルで2つのDNAフラグメントを分離して、正しいサイズのフラグメントを含むプラスミドを同定可能とした。所望のフラグメントを単離し、約100ngをDNA配列決定のためのテンプレートとして使用した。

【0251】

GST-CT2をコードする所望のプラスミド挿入物を含むクローンを同定した。DNA配列決定によって、その配列が正しいことが証明された。

【0252】

挿入物の調製：

陽性クローンから得たプラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼBspHI及びHindIIIとともにインキュベートした。条件は、約150ngのプラスミド、30ユニットのBspHI、60ユニットのHindIII、50mM 酢酸カリウム、20mM Tris-酢酸 pH7.9、10mM 酢酸マグネシウム、1mM DTT、容量100μLであった。温度は37℃であり、反応時間は約22時間であった。

【0253】

[実施例89] NT2と称するオリゴペプチド「タグ」がN末端に融合されたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を発現させるために使用できる発現プラスミドの構築

NT2をコードするフォワードプライマーの配列が5'-TAAATCATGAAACACACCAACATCCACCAAGGACCAAGCACAAACCACTTCCACCGTGTCTGACCAAGATGTCCCTATACCTAGGT-3'である点を除いて、用いた操作は実質的に実施例86と同様である。

【0254】

陽性クローンの同定：

GST-NT2をコードする所望のプラスミド挿入物を含むクローンを同定した。DNA配列決定によりその配列が正しいことが証明された。

【0255】

[実施例90] N末端タグ化GST融合タンパク質の小規模発現

E. coli細胞株JM105を実施例86-89に記載されているように形質転換するとともに、未修飾発現ベクターpTrc 99A及びGSTの親ベクターpGEX3XGSTにより形質転換した。LB Amp培地を含むペトリ皿上で、形質転換細胞を37℃で一晩増殖させた。100μg/mLのアンプシリンを補充したLB培地(トリプトン10g/L、酵母抽出物5g/L、NaCl 10g/L、オートクレーブ処理した)に前記ペトリ皿から得たシングルコロニーを接種し、37℃で振盪しながら一晩インキュベートした。100μg/mLのアンプシリンを補充した5mLの2×YT培地(トリプトン16g/L、酵母抽出物10g/L、NaCl 5g/L、pH7.0、オートクレーブ処理)(2×YTA)に、一晩培養した培養物の1/10希釈物を接種し、600nmでの吸光度(A₆₀₀)がpTrc形質転換体の場合には0.6-1.0、pGEX3XGST形質転換体の場合には0.6-0.8になるまで、37℃で振盪しながらインキュベートした。最終濃度が1mM(pTrc形質転換体)又は0.1m(pGEX3XGST形質転換体)になるようにIPTGを加えることによって、遺伝子発現を誘導した。誘導から5時間後(pTrc形質転換体)又は1時間後(pGEX3XGST形質転換体)に、1.5mLの培養液から細胞を採取した。300μLの氷冷した1×PBS(140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、pH 7.3)に細胞を再懸濁し、超音波で破碎した。ペレット化した後、細胞破碎液を回収し冷凍した。

【0256】

[実施例91] N末端タグ化GST融合タンパク質の大規模発現

大規模タンパク質発現に用いるために、各タグ化GST融合タンパク質の各クローンを選択した。100mLの培地(2×YTA)に一晩培養した培養物の1/100希釈物を接種した点を除き、実質的に実施例90に記載されているようにこれを行った。誘導後、

細胞を採取するまでに、培養物をさらに6時間インキュベートした。次に、5 mLの1×PBS中に細胞を再懸濁（GST-CT2を含む細胞の場合に限り、10 mL中に再懸濁）し、超音波で破碎した。最終濃度が1%になるようにTriton X-100を添加した後、融合タンパク質を可溶化しやすくするために30分間インキュベートした。ペレット化して後、細胞破碎液を回収し、冷凍した。

【0257】

〔実施例92〕 活性の測定

信頼性の高い機能的GST活性のアッセイは、CDNB（1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン）アッセイであり、該アッセイでは、GSTはグルタチオンによるCDNBの誘導化を触媒する。この複合体は波長340 nmの光学密度を測定することによりモニターできる。本アッセイは、情報冊子（GST Gene Fusion System、3rd edn.、Revision 1、Pharmacia Biotech）に概説されているとおりに行った。簡潔に述べると、各組換えGST融合タンパク質から得た10 µLの細胞破碎液のサンプルを、実施例90及び91に記載されているように、96ウェルのプレート中で、pH 6.5の100 mM KH₂PO₄、1 mM 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン（CDNB）及び1 mM 還元グルタチオンを含有する190 µLの反応混合溶液に添加し、5分間にわたって、1分置きにプレートリーダー中で340 nmの吸光度を測定した。本アッセイで測定したところによれば、4つの組換え融合タンパク質は何れも機能的なGST活性を示した。

【0258】

〔実施例93〕 Met-Lys-(His)₆ タグ化組換えグルタチオン-Sートランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1のバッチ方式による精製

Ni²⁺-tacn及びNi²⁺-NTAカラムを用いて、粗細胞破碎液（実施例91参照）を精製した。各カラムは充填容量が0.5 mLで、緩衝液B（緩衝液B=10 mM イミダゾールを追加した緩衝液A、pH 8.4；緩衝液A=445 mM NaCl、7.5 mM Na₂HPO₄及び2.5 mM NaH₂PO₄・2H₂O、pH 7.2）で平衡化させた。カラムに125 µLの粗細胞破碎液（総容量0.5 mLとなるように緩衝液Bで1/4に希釈）をロードした。次いで、溶出前に緩衝液Bでカラムを2度洗浄した。緩衝液1による溶出（緩衝液1=500 mM イミダゾールを追加した緩衝液A、pH 9.71）（1 mL）に続いて、10 M 水酸化ナトリウムでpH 8.0に調整された200 mMのマロン酸ナトリウム溶液（1 mL）による2度目の溶出を行う、2つの溶出操作を用いた。

【0259】

〔実施例94〕 Met-Lys-(His-Gln)₆ タグ化組換えグルタチオン-Sートランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2のバッチ方式による精製

操作は実施例93に記載のものと同一である。

【0260】

〔実施例95〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-Sートランスフェラーゼ（r-GST）融合タンパク質GST-NT1のバッチ方式による精製

操作は実施例93に記載のものと同一である。

【0261】

〔実施例96〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-Sートランスフェラーゼ（r-GST）融合タンパク質（GST-NT2）のバッチ方式による精製

操作は実施例93に記載のものと同一である。

【0262】

〔実施例97〕 Met-Lys-(His)₆ タグ化組換えグルタチオン-Sートランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1の段階的（均一濃度）溶出

粗細胞破碎液（実施例91参照）をNi²⁺-tacnカラムにロードした。カラムは充填容量が0.5 mLで、緩衝液C（緩衝液C=緩衝液B+50 mM イミダゾール、pH 9.0）で平衡化させた。緩衝液Cで1/4に希釈した125 µLの粗細胞破碎液を含

む0.5mLのサンプルをカラムにロードした。サンプルをカラムに通した後、カラムを緩衝液C(5mL)で洗浄した。一連の段階的(均一濃度)溶出を行った。各溶出では、様々な濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aを1mLずつ3回使用した。最初の溶出は、100mM イミダゾール pH9.3を追加した緩衝液Aを用いて行った。イミダゾールの濃度は、次の溶出に進むごとに50mMずつ増加させた。初回の様々な溶出条件から得られたサンプルを、分析のためにSDS-ポリアクリルアミドゲルにかけた。

【0263】

〔実施例98〕 Met-Lys-(His-Gln)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2の段階的(均一濃度)溶出
操作は実施例97に記載のものと同一である。

10

【0264】

〔実施例99〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質GST-NT1の段階的(均一濃度)溶出
操作は実施例97に記載のものと同一である。

【0265】

〔実施例100〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質GST-NT2の段階的(均一濃度)溶出
操作は実施例97に記載のものと同一である。

【0266】

〔実施例101〕 Met-Lys-(His)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1の2度目の段階的(均一濃度)溶出

20

2度目の段階的(均一濃度)溶出を行った。充填容量が0.5mLのNi²⁺-taccnカラムを緩衝液Bで平衡化させた。実施例90及び91に記載されているように、緩衝液D(緩衝液D=緩衝液A+12.5mMイミダゾール、pH8.5)で1/5に希釈した500μLの粗細胞破碎液を含む2.5mLのサンプルをカラムにロードした。フロースルー画分を2度カラムに再度ロードした。次いで、緩衝液B(5mL)をカラムに流した。一連の段階的(均一濃度)溶出を次に行った。各溶出では、様々な濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aを1mLずつ3回使用した。最初の溶出は、緩衝液A+25mMイミダゾールを用いて行った。100mMの濃度になるまで、次の溶出に進むごとに25mMずつイミダゾール濃度を増加させ、その後は50mMずつ増加させた。初回の様々な溶出条件から得られたサンプルを、分析のためにSDS-ポリアクリルアミドゲル分析にかけた。

30

【0267】

〔実施例102〕 Met-Lys-(His-Gln)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2の2度目の段階的(均一濃度)溶出

緩衝液Dで1/5に希釈した1mLの粗細胞破碎液を含む5mLのサンプルをカラムにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例101に記載のものと同様である。

【0268】

〔実施例103〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質GST-NT1の2度目の段階的(均一濃度)溶出

40

緩衝液Dで1/5に希釈した300μLの粗細胞破碎液を含む1.5mLのサンプルをカラムにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例101に記載のものと同様である。

【0269】

〔実施例104〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質GST-NT2の2度目の段階的(均一濃度)溶出

緩衝液Dで1/5に希釈した100μLの粗細胞破碎液を含む0.5mLのサンプルをカラムにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例101に記載のものと同様である。

50

【0270】

〔実施例105〕 N末端Met-Lys-(His)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1の小規模発現後に得られた様々なクローンのSDS-PAGE分析

細胞破碎液(実施例90参照)を分取して、SDSローディング緩衝液(還元状態)と混合し、100℃で1分間加熱した。次に、サンプルを12%SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードし、適切な時間にわたって泳動させた。60μLの細胞破碎液と30μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder(Gibco BRL)及び10KDa Protein Ladder(Gibco BRL)]をゲルにロードした。pGEX3XGST形質転換体を陽性対照として用いた。N末端タグ化組換えGST融合タンパク質のGST成分は、C末端のアミノ酸が1つ切断されている。親GSTはC末端にアミノ酸が14個追加された完全長タンパク質として発現される。したがって、親GSTのC末端にはアミノ酸が15個追加されており、N末端タグ化GST融合タンパク質のGST成分より約1.65KDa大きい泳動を示す。pTrcで形質転換されたE. coli株JM105を陰性対照として用いた。バンドを可視化するため、ゲルはクーマシーブルーで染色した。

10

【0271】

図36に示されたゲル1のポイント:

レーン1、GST-CT1 クローンNo. 1;レーン2、GST-CT1 クローンNo. 2;レーン5、GST-CT1 クローンNo. 3;レーン6、GST-CT1 クローンNo. 4;レーン7、GST-CT1 クローンNo. 5;レーン11、GST-CT1 クローンNo. 6;レーン12、GST-CT1 クローンNo. 7;レーン13、GST-CT1 クローンNo. 8;レーン14、GST-CT1 クローンNo. 9;レーン15、GST-CT1 クローンNo. 10;レーン8、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照;レーン9、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーがレーン3、4及び10に示されている。

20

【0272】

〔実施例106〕 N末端Met-Lys-(His-Gln)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2を小規模発現した後に得られた様々なクローンのSDS-PAGE分析

用いた操作は実質的に実施例105に記載のものと同様である。

30

【0273】

図37に示されたゲル2のポイント:

レーン1、GST-CT2 クローンNo. 1;レーン2、GST-CT2 クローンNo. 2;レーン3、GST-CT2 クローンNo. 3;レーン6、GST-CT2 クローンNo. 4;レーン7、GST-CT2 クローンNo. 5;レーン11、GST-CT2 クローンNo. 6;レーン12、GST-CT2 クローンNo. 7;レーン13、GST-CT2 クローンNo. 8;レーン14、GST-CT2 クローンNo. 9;レーン15、GST-CT2 クローンNo. 10;レーン8、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照;レーン9、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーが、レーン4、5及び10に示されている。

40

【0274】

〔実施例107〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT1を小規模発現した後に得られた様々なクローンのSDS-PAGE分析

用いた操作は実質的に実施例105に記載のものと同様である。

【0275】

図38に示されたゲル3のポイント:

50

レーン1、GST-NT1 クローンNo. 1；レーン2、GST-NT1 クローンNo. 2；レーン3、GST-NT1 クローンNo. 3；レーン4、GST-NT1 クローンNo. 4；レーン7、GST-NT1 クローンNo. 5；レーン11、GST-NT1 クローンNo. 6；レーン12、GST-T1 クローンNo. 7；レーン13、GST-NT1 クローンNo. 8；レーン14、GST-NT1 クローンNo. 9；レーン15、GST-NT1 クローンNo. 10；レーン8、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン9、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーが、レーン5、6及び10に示されている

【実施例108】 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT2を小規模発現した後に得られた様々なクロンのSDS-PAGE分析

用いた操作は実質的に実施例105に記載のものと同様である。

【0276】

図39に示されたゲル4のポイント：

レーン1、GST-NT2 クローンNo. 1；レーン2、GST-NT2 クローンNo. 2；レーン3、GST-NT2 クローンNo. 3；レーン4、GST-NT2 クローンNo. 4；レーン5、GST-NT2 クローンNo. 5；レーン11、GST-NT2 クローンNo. 6；レーン12、GST-NT2 クローンNo. 7；レーン13、GST-NT2 クローンNo. 8；レーン14、GST-NT2 クローンNo. 9；レーン8、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン9、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーが、レーン6、7及び10に示されている。

【0277】

【実施例109】 高発現レベルを基準に選択したGST融合タンパク質クロンの小規模タンパク質発現を行った後に得られた粗細胞破碎液のSDS-PAGE分析

5 μ Lの細胞破碎液と1 μ Lの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL)]をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例105に記載のものと同様である。バンドを可視化するためにゲルは銀染色を行った。

【0278】

図40に示されたゲル5のポイント：

レーン1、GST-CT1 クローンNo. 7；レーン2、GST-CT2 クローンNo. 6；レーン6、GST-NT1 クローンNo. 1；レーン7、GST-NT2 クローンNo. 7；レーン4、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン5、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーがレーン3に示されている

【実施例110】 N末端Met-Lys-(His)₆タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1のバッチ方式精製から回収された様々な画分のSDS-PAGE分析

バッチ方式の精製(実施例93参照)から回収した細胞破碎液及び画分をSDSローディング緩衝液(還元状態)と混合し、100℃で90秒加熱した。10 μ Lの精製画分サンプル、5 μ Lの陽性及び陰性対照細胞破碎液、組換え融合タンパク質を含む1.25 μ Lの細胞破碎液及び1 μ Lの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL)]を12%SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードし、適切な時間にわたり泳動させた。バンドを可視化するために、ゲルに銀染色を行った。

【0279】

図41に示されたゲル6のポイント：

レーン3-5はNi²⁺-tacnカラムから回収したサンプルを含み、レーン6-8は

Ni²⁺-NTAカラムから回収したサンプルを含む；レーン3及び6、洗浄2；レーン4及び7、溶出1；レーン5及び8、溶出2；レーン1、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン2、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照；レーン10、粗細胞破碎液。分子量マーカーがレーン9に示されている。

【0280】

〔実施例111〕 N末端Met-Lys-(His-Gln)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2のバッチ方式精製から回収された様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例94で述べたようなバッチ精製から回収した細胞破碎液と画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例110に記載のものと同様である。

【0281】

図42に示されたゲル7のポイント：

レーン3-5はNi²⁺-tacnカラムから回収したサンプルを含み、レーン6-8はNi²⁺-NTAカラムから回収したサンプルを含む。レーン3及び6、洗浄2；レーン4及び7、溶出1；レーン5及び8、溶出2；レーン1、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン2、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照；レーン9、粗細胞破碎液。分子量マーカーがレーン10に示されている。

【0282】

〔実施例112〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT1のバッチ方式精製から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例95で述べたようなバッチ精製から回収した細胞破碎液と画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例110に記載した操作と同様である。

【0283】

図43に示されたゲル8のポイント：

レーン5-7はNi²⁺-tacnカラムから回収したサンプルを含み、レーン8-10はNi²⁺-NTAカラムから回収したサンプルを含む；レーン5及び8、洗浄2；レーン6及び9、溶出1；レーン7及び10、溶出2。レーン1、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン2、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照；レーン3、粗細胞破碎液。分子量マーカーがレーン4に示されている

〔実施例113〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT2のバッチ方式精製から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例96で述べたようなバッチ精製から回収した細胞破碎液と画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例110に記載のものと同様である。

【0284】

図44に示されたゲル9のポイント：

レーン5-7はNi²⁺-tacnカラムから回収したサンプルを含み、レーン8-10はNi²⁺-NTAカラムから回収したサンプルを含む。レーン5及び8、洗浄2；レーン6及び9、溶出1；レーン7及び10、溶出2；レーン1、pTrcで形質転換されたE. coli JM105から成る陰性対照；レーン2、pGEX3XGSTで形質転換されたE. coli JM105から成る陽性対照；レーン4、粗細胞破碎液。分子量マーカーがレーン3に示されている。

【0285】

〔実施例114〕 N末端Met-Lys-(His)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1の段階的（均一濃度）溶出から回

10

20

30

40

50

収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例97で述べたように、GST-CT1を含む細胞破碎液を段階的に均一濃度で溶出した初回のサンプルを、SDSローディング緩衝液（非還元状態）と混合し、100℃で90秒加熱した。溶出画分の最初の1mLから得た10μLの分取試料と2.5μLの細胞破碎液を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードした。ゲルは適切な時間にわたり泳動させ、バンドを可視化するために銀染色を行った。

【0286】

図45に示されたゲル10のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aにより溶出を行った：レーン1、100mM；レーン3、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM；レーン10、500mM。細胞破碎液がレーン2に示されている。

10

【0287】

[実施例115] N末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例98で述べたように、段階的（均一濃度）溶出から回収した細胞破碎液の分取試料と画分をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例114に記載のものと同様である。

【0288】

20

図46に示されたゲル11のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aにより溶出を行った：レーン1、100mM；レーン2、150mM；レーン3、200mM；レーン4、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM；レーン10、500mM。細胞破碎液がレーン5に示されている。

【0289】

[実施例116] N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT1の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例99で述べたように、段階的（均一濃度）溶出から回収した細胞破碎液と画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例114に記載のものと同様である。

30

【0290】

図47に示されたゲル12のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aにより溶出を行った：レーン2、100mM；レーン3、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM；レーン10、500mM；細胞破碎液がレーン1に示されている。

【0291】

[実施例117] N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT2の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

40

実施例100で述べたように、段階的（均一濃度）溶出から回収した細胞破碎液と画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例114に記載のものと同様である。

【0292】

図48に示されたゲル13のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aにより溶出を行った：レーン1、100mM；レーン2、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM；

50

レーン10、500 mM。細胞破碎液がレーン3に示されている。

【0293】

〔実施例118〕 N末端Met-Lys-(His)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT1を2度目の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例101で述べたように、GST-CT1を含む細胞破碎液の2度目の段階的均一濃度溶出によって得られたサンプルを、SDS ローディング緩衝液（非還元状態）と混合し、100℃で90秒加熱した。溶出画分の最初の1mLから得た16μLの分取試料と0.5μLの分子量マーカー〔BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL)〕を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードした。ゲルは適切な時間にわたり泳動させ、バンドを可視化するために銀染色を行った。

10

【0294】

図49に示されたゲル14のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aを用いて溶出を行った：レーン2、25mM；レーン3、50mM；レーン4、75mM；レーン5、100mM；レーン6、150mM；レーン7、200mM；レーン8、250mM；レーン9、300mM；レーン10、350 mM。分子量マーカーがレーン1に示されている。

【0295】

〔実施例119〕 N末端Met-Lys-(His-Gln)₆ タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-CT2の2度目の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

20

実施例102で述べたように、段階的（均一濃度）精製から回収した画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例118に記載のものと同様である。

【0296】

図50に示されたゲル15のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aを用いて溶出を行った：レーン1、25mM；レーン3、50mM；レーン4、75mM；レーン5、100mM；レーン6、150mM；レーン7、200mM；レーン8、250mM；レーン9、300mM；レーン10、350 mM。分子量マーカーがレーン2に示されている。

30

【0297】

〔実施例120〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT1の2度目の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例103で述べたように、段階的（均一濃度）精製から回収した画分の分取試料をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例118に記載したものと同様である。

【0298】

図51に示されたゲル16のポイント：

以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aを用いて溶出を行った：レーン1、100mM；レーン2、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM、レーン10、500mM。分子量マーカーがレーン3に示されている。

40

【0299】

〔実施例121〕 N末端タグ化組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質GST-NT2の段階的（均一濃度）溶出から回収した様々な画分のSDS-PAGE分析

実施例104で述べたように、段階的（均一濃度）精製から回収した画分をゲルにロードした点を除き、用いた操作は実質的に実施例118に記載のものと同様である。

【0300】

50

図52に示されたゲル17のポイント：

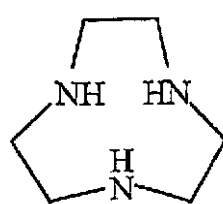
以下の濃度のイミダゾールを追加した緩衝液Aを用いて溶出を行った。レーン1、50 mM；レーン2、75 mM；レーン3、100 mM；レーン5、150 mM；レーン6、200 mM；レーン7、250 mM；レーン8、300 mM；レーン9、350 mM；レーン10、400 mM。分子量マーカーがレーン4に示されている。

【0301】

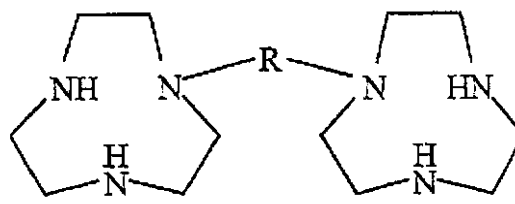
〔実施例122〕 セファロースTMCL-4Bへのビス（1，4，7-トリアザシクロノナン）リガンドの固定化

本実施例では、セファロースTMCL-4Bの表面上に事前に作製したリガンドを固定化する方法を示す。固定化した各種ビス（tacn）リガンド（L^{eth}、L^{prop}、L^{but}、L^{ox}、L^{mx}及びL^{px}と表記）とともに、前記リガンドtacn（＝1，4，7-トリアザシクロノナン）を下記のスキーム7に示す。これらの大環状高分子（macrocycle）およびビス（大環状高分子）のセファロースTMCL-4Bへの結合（共有結合）には、多糖類基材等のヒドロキシポリマー基材（ここでは、セファロースTMCL-4Bを例示した）の表面に1以上のアミノ基を含む分子を結合させるのに一般的な応用性がある技術を採用した。当該プロセスの第1段階では、エポキシ活性化ポリマー基材（本件の場合、エポキシ活性化セファロースTMCL-4Bゲル）を作製するために、塩基性条件下でエピクロロヒドリンによる前記基材（本件の場合、セファロースTMCL-4Bゲル）の処理を行う。次いで、前記リガンドの共有結合は、求電子性のエポキシド表面基を有するその構造中に存在する求核性第二級アミン基の反応を介して達成することができる。スキーム8（下記）には、当該ポリマー基材（例えば、セファロースTMCL-4B）の表面の模式図が示されており、リガンドは各ケースで単一のスペーサー基を介して付着している。前記リガンド内に2個以上の第二級アミン基が存在していると仮定すると、複数の固定化結合がある程度生じることがある。すなわち、少量のリガンドが、2個以上のエポキシド基と反応することによって、前記ポリマー基材表面に結合することがある。

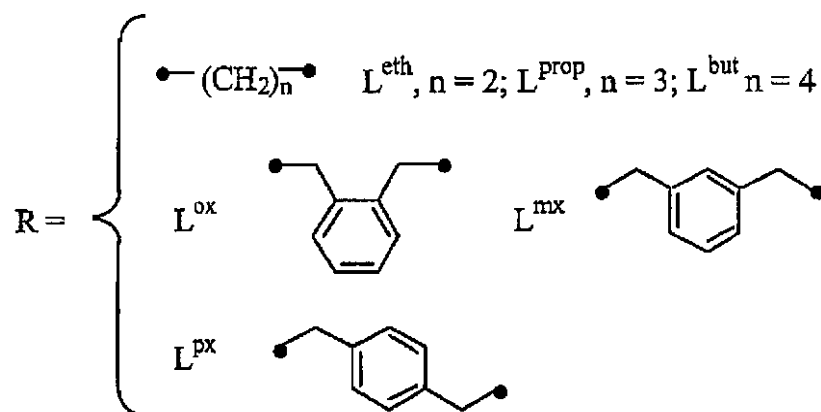
【化20】



tacn



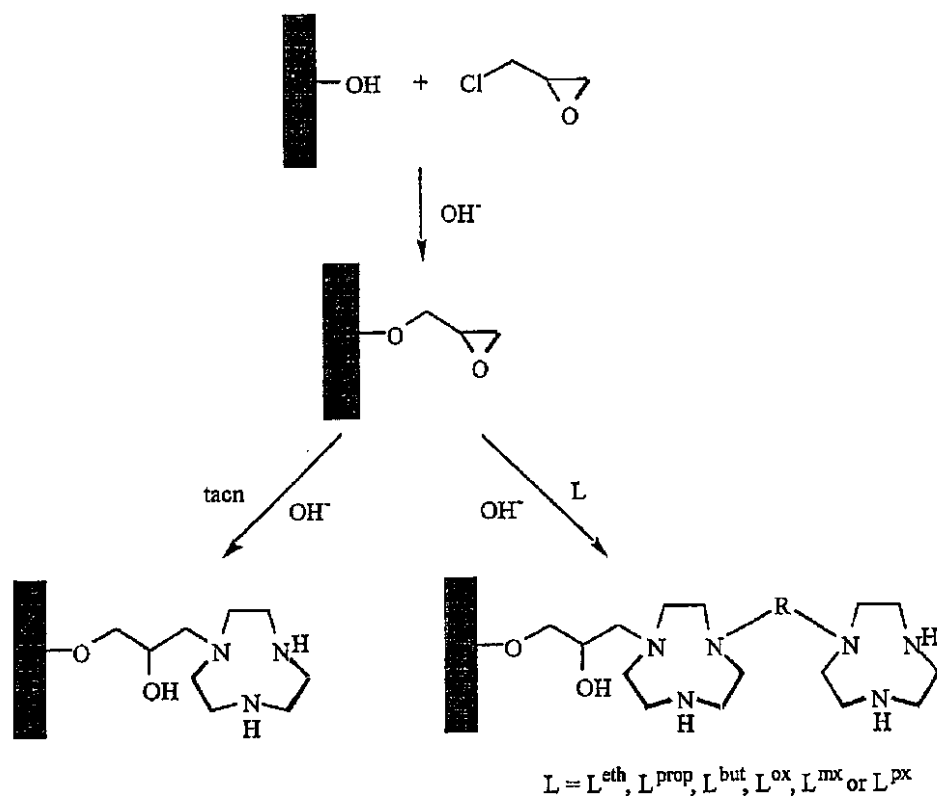
Bis(tacn) リガンド



【0302】

スキーム7 セファロースTMCL-4B上に固定化したリガンド

【化 2 1】



【0303】

スキーム 8 単一のスペーサー基を介したリガンドの共有結合

前記リガンドは吸着剤の唯一の窒素含有成分であるので、窒素分析によってリガンドの固定化の程度を測定することができた(表5、下記)。ビス(tacn)リガンドと比較した場合、固定化tacn吸着剤に高い表面吸着率(リガンド表面密度)が観察された。ビス(tacn)リガンド内の第二級アミン基はより多く用いることができるため、求電子性の表面のエポキシド基と統計的に反応し易いと予想されるにもかかわらず、このようなことが生じる。ビス(tacn)リガンドの方が表面吸着率が低かったのは、ビス(tacn)リガンドの方がスパンが大きいために、複数のエポキシド基と反応するリガンド数を増加させ、ゲル構造内の架橋レベルを高めたためであるかもしれない。さらに、ビス(tacn)リガンドのかさが大きいために、立体的に緻密度が高いtacnリガンドと同数のエポキシド基にはアクセスできないという可能性もある。

【表 5】

表5 窒素含量と tacn-及びビス(tacn)-セファロース™CL-4Bゲルのリガンドの計算表面密度

固定化したリガンド	%N(w/w) (±0.01)	リガンド表面密度 ($\mu\text{mol/g}$ 乾燥ゲル)
tacn	1.88	447
L^{but}	2.97	353
L^{ox}	3.05	363
L^{mx}	3.20	381
L^{px}	3.13	372

【0304】

[実施例 123] セファロース™CL-4Bの表面上へのビス(tacn)リガ

10

20

30

40

50

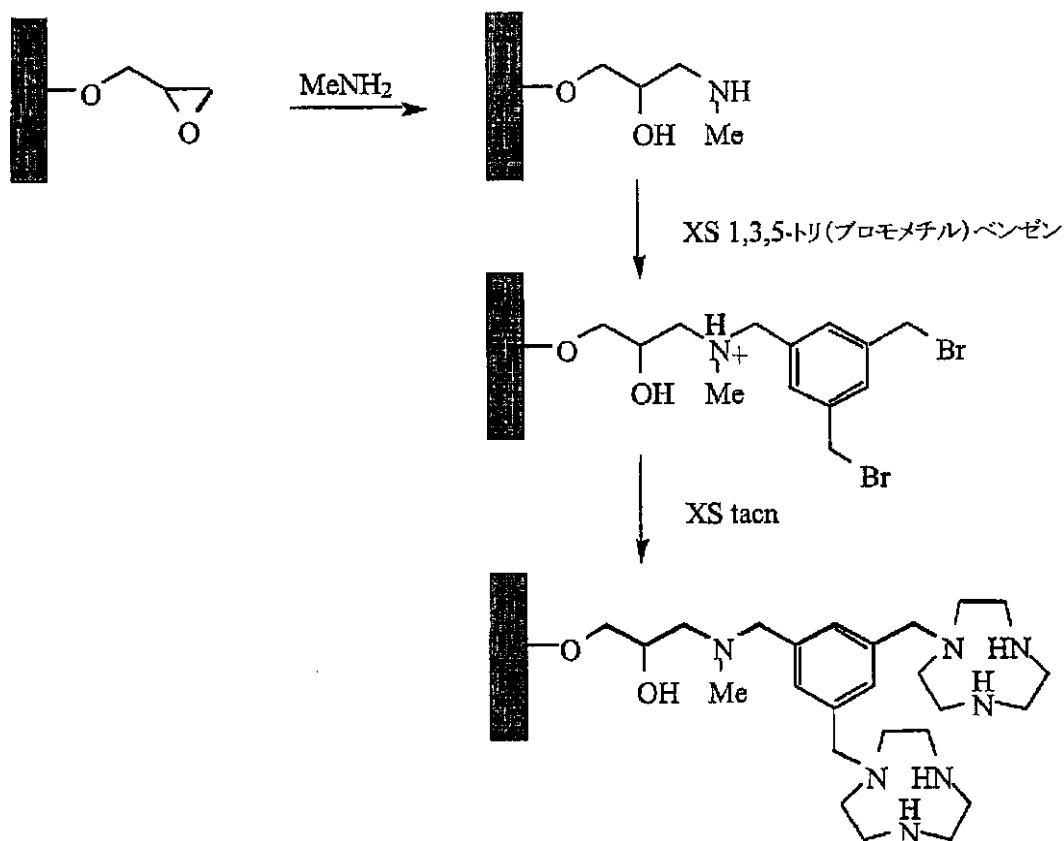
ドの構築

本実施例では、ビス(tacn)リガンドを多糖類基材(本実施例では、セファロースTM CL-4B)等のヒドロキシポリマー基材の表面上に構築するための(幅広い一般性があると考えられている)方法を示す。ポリマー支持体の表面上の適切なポリ(求電子体)に結合することにより、ビス(tacn)、トリス(tacn)、テトラキス(tacn)・・・等のその他の誘導体やこれらの構造的類縁体を構築することができるため、前記方法は幅広い一般性を有していると考えられる。ビス(tacn)リガンドの場合、前記合成方法では、トリス(求電子体)の求電子基のうち1つを用いてアミノ化したポリマー基材表面を処理し、次に、残り2個の求電子基をtacnマクロサイクルと反応させる(スキーム9参照、下記)。前述のように、当該ポリマー基材(本件ではセファロースTM CL-4Bゲル)をまずエポキシ活性化させ(例えば、実施例122を参照、上記)、表面をアミノ化するために過剰のメチルアミンと反応させる。次に、該分子の求電子基のうちの1つとアミノ化したゲル表面との間に反応を生じさせる目的で、大過剰(XSと省略)の1, 3, 5-トリ(プロモメチル)ベンゼンで前記活性化したポリマー基材を処理して、2個の求電子基を続くtacnとの反応に利用できる状態にし、固定化したビス(tacn)リガンドを構築する。反応性の高いベンジル誘導体の結合は、塩基を添加せずに行ってもよい(これは、プロモメチル基と固定化した第二級アミン基との縮合時に遊離されるプロトンが、生成された第三級アミンにプロトンを付加し、さらなる反応からある程度の保護を与えて、第四級窒素中心を生じるという予測と一致している)。

【0305】

このように、まずアミノ化してから完全に官能化したセファロースTM CL-4Bゲル上で行った窒素分析により、前記ゲル表面へのtacnの連結が成功したことが明らかになり、本材料の窒素含有量が3倍増加したことから確認される(表6)。

【化22】



【0306】

スキーム9 C結合型L^m×官能化ヒドロシルポリマー基材の合成(例えば、セファロースTM CL-4Bゲル)

10

20

30

40

50

【表 6】

表6 窒素含量と固定化したMeNH₂ー及びC結合L^{mx}セファロース™CLー4Bゲルの算出したリガンド密度

固定化したリガンド	%N(w/w)(±0.01)	リガンド表面密度(μmol/g 乾燥ゲル)
MeNH ₂	1.39	992
C 結合 L ^{mx}	4.27	343**

**前記2つのゲルの窒素含量間の差から算出した。ビス(tacn)リガンドの実際の表面密度は、架橋により小さくなっている可能性がある(前記参照)。

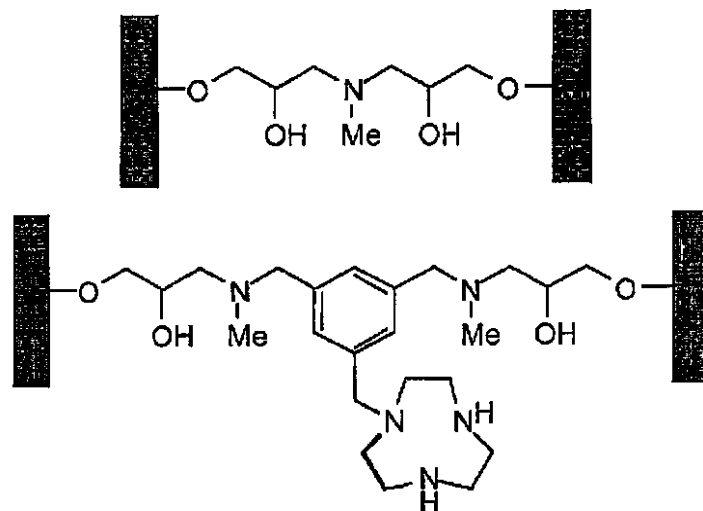
10

【0307】

スキーム 9 (上記を参照) に記載した固定化のスキームによると、最終ゲルの窒素含量は、単にアミノ化したゲルの約 7 倍の量となることが予想される。窒素含量が低かったことに関して考えられる説明は 2 つある。第一に、メチルアミンによるゲル表面のアミノ化に続いて、2 つの合成段階のうち一方又は両方で不完全な反応が生じた可能性がある。結果として、最終ゲルの表面上には、未反応のメチルアミン及び／又はブロモメチル基が数多く存在している可能性がある。第二に、スキーム 9 に示した 3 つの合成段階のうち何れか 1 つで、架橋が生じて、下記スキーム 10 に示されているような架橋分子種が発生した可能性がある。興味深いことに、固定化したリガンドの表面密度は、予め構築したビス(tacn)リガンドから調製した全てのゲルについて測定した表面密度とよく一致していた。

20

【化 23】



30

【0308】

スキーム 10 C 結合型 L^m x セファロース™CLー4Bゲルの合成中に形成される可能性がある架橋された 2 つの分子種の例

40

〔実施例 124〕 金属イオン結合に関する考証

本実施例では、新しい官能化ゲル上への Cu²⁺ と Ni²⁺ イオンの固定化、及びその生成物の性質決定について記述する。当該ゲルを適切な金属硝酸塩の溶液と混合した後に、弱く結合したイオンを除去するために、酢酸塩緩衝液 (pH 5) で洗浄することによって、固定化を達成した。ゲルによる Cu²⁺ イオンの急激な取り込みは、前記ゲルの色が青に変色することで直ちに識別できるが、Ni²⁺ の結合に関しては、適当な時間内に明るい紫ー青にゲルを着色するためには、温度を上昇させながらインキュベーションすることが不可欠であることがわかった。このため、Ni²⁺ イオンと当該固定化したリガンド間の反応は、極めて緩慢なようである。60℃で1時間のインキュベートした後における

50

、ゲルによる Cu^{2+} 及び Ni^{2+} の取り込みレベルは、対応するリガンド表面密度（表 7、下記参照）に基づいて予測した最大取り込みレベルのそれぞれ約 70% と 40% であることが明らかとなった。 Ni^{2+} 処理したゲルの場合、 Cu^{2+} イオンの溶液と混合すると前記ゲルの試料が青くなった事実によって、配位していないリガンドドナー原子が存在することが確認された。ニッケル (II) tacn 錯体は速度論的に不活性であることが知られているので、 Cu^{2+} イオンによる Ni^{2+} イオンの置換が原因である可能性はない（例えば、Yang, R と Zompa, L.J., Inorganic Chemistry, 15(1976) 1499; and Murphy, L.J. and Zompa, L.J., Inorganic Chemistry, 18(1979) 3278 を参照）。このような低い負荷の下では、固定化二核ニッケル (II) 錯体種が低いレベルで形成されるにすぎないと予測されること、及び（本発明に記載された態様で）ビス (tacn) リガンドの IMA C への付与を研究する重要な理由の一つがタンパク質の二核錯体への結合を探索することであったことに鑑みれば、 Ni^{2+} 添加した支持体は、対応する Cu^{2+} 添加した吸着剤よりも有利ではないように思われる。さらに、実際の面から見ると、使用する吸着剤の調製に過大な時間が費やされないように、IMA C 吸着剤による金属イオンの最大取り込みは相当な速さで達成しなければならない。このため、かかる観察と考察に基づいて、容量が大きい Cu^{2+} 添加吸着剤の実験に比重を置いた。

【表 7】

原子吸光分光法によって測定した、tacn 及びビス (tacn) で官能化セファロースTM CL-4B ゲルによる Cu^{2+} 及び Ni^{2+} の取り込み

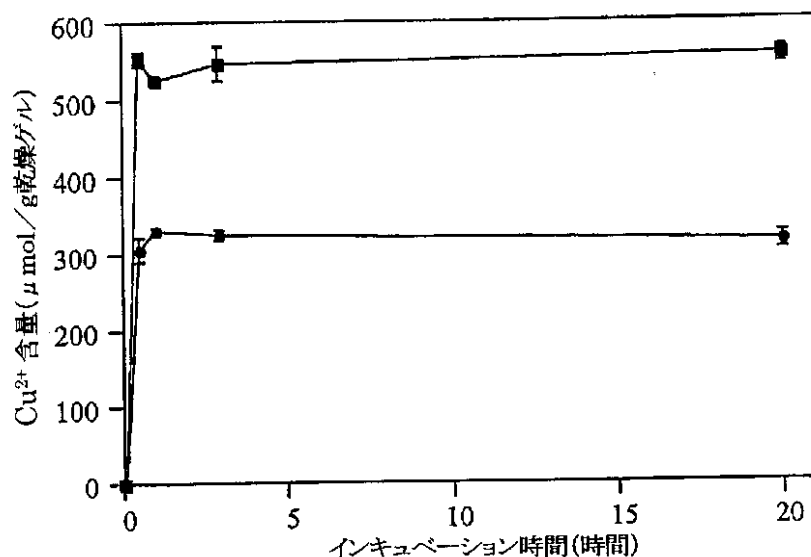
固定化した リガンド	Ni 含有量 ($\mu\text{mol/g}$ 乾燥ゲル)* (±5%)	Cu 含有量 ($\mu\text{mol/g}$ 乾燥ゲル)* (±5%)	Cu 含有量 ($\mu\text{mol/g}$ 湿潤ゲル)* (±5%)
tacn	185(41%)	305(68%)	11.1
L^{but}	293(42%)	506(72%)	18.3
L^{ox}	246(34%)	510(70%)	20.9
L^{mx}	267(35%)	552(72%)	20.4
L^{px}	246(33%)	553(74%)	21.2
C 結合型 L^{mx}	284(41%)	496(72%)	21.6

*括弧内の数値は、リガンド表面密度から算出した理論上の最大取り込みの割合として表した金属イオン含量である。

【0309】

官能化ゲルによる Cu^{2+} イオンの明白な急激な取り込みを確認するために、一連の小規模な実験を行って、平衡状態の達成に必要なインキュベーション時間を確定した。室温で 30 分間混合した後に生じる取り込みの増加をほとんど又は全く検出せずに、迅速に平衡状態に達することが本結果によって示された。代表的な取り込み曲線をスキーム 11 に示す。本研究の結果に基づいて、その後の Cu^{2+} 添加支持体の調製には、30 分の標準吸着時間を選択した。

【化 2 4】



10

【0310】

スキーム 11 tacn- (●) と L^{PX} (■) - 官能化セファローズTM CL-4B ゲルの経時的な Cu²⁺ の取り込み

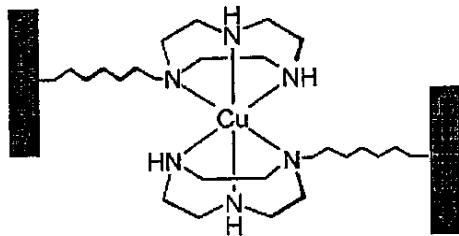
20

Ni²⁺ の取り込みとは異なり、Cu²⁺ の結合が最大に達しなかったのは、平衡の達成が遅いせいであるとは思われないので、その理由を考察することは興味深い。IDA-アガロース支持体への Cu²⁺ 結合に関しては、金属イオン対リガンドの割合がおおよそ 1 対 1 であると報告されているが（例えば、Porath, J. and Belew, M. Journal of Chromatography, 516(1990) 333; and Jiang, W. and Hearn, M.T.W. Analytical Biochemistry, 242(1996) 45を参照）、観察された約 70% という結合の程度は、N-ドナーのみを用いて又はエーテル型の O-ドナーとともに N-ドナーを用いて固定化リガンドを取り込んだ様々な支持体について観察された程度と合致している（例えば、Gros, C., Rabiet, F., Denat, F., Brandes, S., Collet, H., Guillard, R., Journal of the Chemical Society, Dalton Transaction, (1996) 1209; van Berkel, P.M., Driessen, W.L., Kodhaas, G.J.A.A., Reedijk, J., Sherrington, D.C. Journal of the Chemical Society, Chemical Communication (1995) 147; Dudler, V., Lindoy, L.F., Sallin, D., Schlaepfer, C.W., Australian Journal of Chemistry, 40(1987) 1557を例として参照）。これらの固定化された系のいくつかについて、結合が金属イオンに依存することは、3次元ポリマーネットワークに付随する立体効果の差を反映しているものと解釈されている（上記引用文中の van Berkel, P. M. らと Dudler, V. らを参照）。好ましくないコンフォメーション変化が誘発されると、このような立体障害により、幾つかの部位で、ある種の金属イオンを結合する能力が減少するか、又は特定部位への金属イオンのアクセスが制限される可能性がある。ここで報告した吸着剤に関しては、Cu²⁺ : リガンド比の減少は、CuL₂²⁺ 種の形成も原因の 1 つである可能性があり、ゲル表面上の隣接するリガンド (L

30

40

【化 2 5】



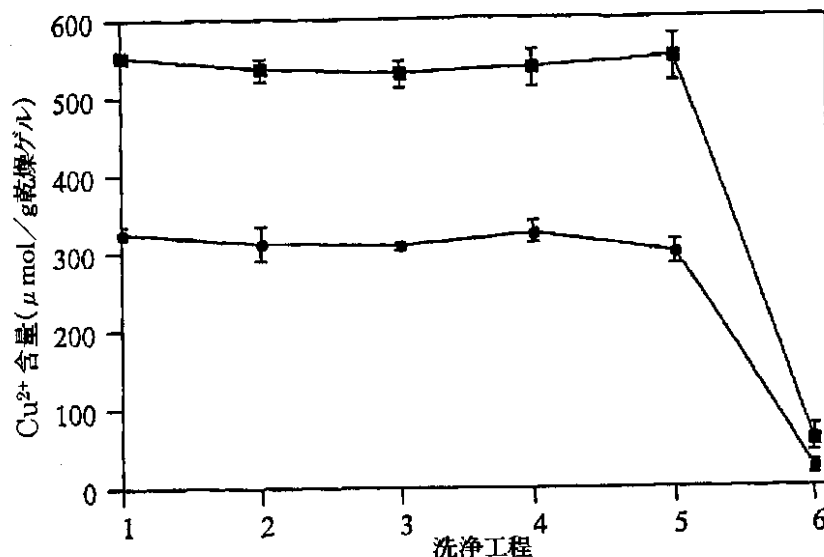
【0 3 1 1】

スキーム 1 2. 隣接する固定化リガンドを含んだ生じ得るサンドイッチ構造。本構造は、 Cu^{2+} 添加 tacn- 及びビス (tacn) - 官能化セファロースTM CL-4 B ゲルの表面上に形成される可能性がある。

【0 3 1 2】

IMAC に使用するための本発明の新規 Cu^{2+} 添加吸着剤の適合性を更に評価するために、後のタンパク質／ペプチド結合研究で使用する様々な異なる平衡化条件下で、金属イオン浸出 (leaching) に対する本システムの抵抗性を調べた。弱く結合した金属イオンを除去するために、金属イオン添加支持体を水と 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5) で洗浄した後に、以下の培養液のうち 1 つ (20 mM 酢酸緩衝液、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7)、20 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9)、200 mM イミダゾール、又は 200 mM Na_2EDTA 溶液) を用いて更に吸着剤を洗浄した。結果をスキーム 1 3 に示す。 Na_2EDTA 培地を除き、これらの培地では、金属イオンの浸出は無視できることが明らかとなり、固定化錯体の安定性が高いことが確認された。しかし、 Na_2EDTA で長時間処理すると、固定化 Cu^{2+} イオンの 80% 以上が溶出した。

【化 2 6】



【0 3 1 3】

スキーム 1 3. 各種溶液で洗浄した後の Cu^{2+} - tacn- (●) 及び -Lys- 官能化 (■) セファロースTM CL-4 B ゲル中の Cu^{2+} 含量。洗浄液 1 = 20 mM NaOAc / 1 M NaCl / pH 5; 洗浄液 2 = 20 mM NaOAc / 1 M NaCl / pH 5; 洗浄液 3 = 20 mM Na_2HPO_4 / 1 M NaCl / pH 7; 洗浄液 4 = 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / 1 M NaCl / pH 9; 洗浄液 5 = 200 mM イミダゾール; 洗浄液 6 = 200 mM Na_2EDTA 。

【0 3 1 4】

本発明の側面に関する本明細書の開示に関連する重要な平衡データを、下表 8 及び表 9 に示す。

【表 8 - 1】

表 8 tacn、ビス(tacn)及びIMACで使した関連リガンドの安定度定数データの概要

リガンド	反応	定数	遊離リガンド	セファロース™CL-4B 上に 固定化されたリガンド
tacn		pK _{a1} pK _{a2} pK _{a3} pK _{CuL} pK _{NiL} pK _{ZnL}	<2 ^{a, b} 6.80 ^{a, b} 10.4 ^{a, b} 15.0 ^a , 15.5 ^b 16.2 ^b 11.6 ^{a, b}	<2 ^a 5.40 ^a 10.30 ^a 14.1 ^a - 10.3 ^a
IDA		pK _{a1} pK _{a2} pK _{a3} pK _{CuL} pK _{NiL} pK _{ZnL}	1.79 ^c 2.55 ^c 9.26 ^c 10.63 ^d 8.07 ^e 7.00 ^f	N.D. ^c 2.67 ^c 8.67 ^c 8.05 ^c N.D. N.D.
NTA		pK _{a1} pK _{a2} pK _{a3} pK _{CuL} pK _{NiL} pK _{ZnL}	-1.6 ^g 2.40 ^g 9.56 ^g 12.96 ^d 11.54 ^h 10.44 ⁱ	N.D. N.D. N.D. N.D. N.D. N.D.

^aM.T.W.Hearn ら、本研究、^bR.Yang と L.J.Zompa, Inorg.Chem., 15, 1499, 1976; ^cM.Zachariou, I. Traverso, L.Spaccia, M.T.W.Hearn, J.Phys.Chem., 100, 12680, 1996. ^dA.Hulanicki, 及び T.Krawczyk, Anal.Chim.Acta, 158, 343, 1984. ^eG. Arena と V.Cucinotta, Inorg.Chim.Acta, 52, 275, 1981. ^fL. Anderegg, Helv.Chim.Acta, 47, 1801, 1964. ^gD.Sanna, I.Bodi, S Bouhsina と G.Micera, Dalton Trans, 3275, 1999. ^hG.Anderegg, Pure&Appl.Chem., 54, 2693, 1982. ⁱH Irving と M.Miles, J.Chem.Soc.(A), 727, 1966.

N.D.=未測定

10

20

30

【表 8 - 2】

ビス(tacn)誘導体	リンカー基	反応	定数	遊離リガンド ^a
L ^{eth}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	27.82 N.D.
L ^{prop}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	24.90 29.08
L ^{but}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	23.02 29.61
L ^{pent}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	21.6 29.64
L ^{hex}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	21.3 29.69
L ^{hept}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	21.2 29.48
L ^{oct}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	21.7 29.33
L ^{ox}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	22.19 N.D.
L ^{mx}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	19.8 27.7
L ^{px}			pK _{CuL} pK _{Cu2L}	N.D. 28.23

^aB. DasGupta, C. Katz, T. Israel, M. Watson, L. J. Zompa, Inorg. Chim. Acta. 292, 172, 1999; M. T. W. Hearn ら、本研究からデータを取得。
N.D. = 未測定

10

20

【表 9】

表9 pH=7.0における固定化Cu(II)tacn リガンド系へのモデルタンパク質
の結合作用を表す結合定数の比較

リガンド		金属イオン	モデルタンパク質	結合定数 (M^{-1})
tacn		Cu(II)	ミオグロブリン	2.2×10^5
IDA		Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	2.6×10^4 8.9×10^5
ビス(tacn) 誘導体	リンカー基	金属イオン	モデルタンパク質	結合定数 (M^{-1})
L^{eth}		Cu(II) Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	6.6×10^4 2.8×10^4
L^{prop}		Cu(II) Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	9.0×10^5 4.5×10^5
L^{but}		Cu(II) Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	2.7×10^5 1.1×10^5
L^{ox}		Cu(II) Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	7.9×10^5 0.25×10^5
L^{mx}		Cu(II) Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	38×10^5 0.30×10^5
L^{px}		Cu(II) Cu(II)	ミオグロブリンリゾチーム	78×10^5 0.28×10^5
N-(2-ピリ ジル-メチ ル)-アミ ノ		Cu(II)	ミオグロブリン	1.8×10^5

【0315】

〔実施例125〕 Cu^{2+} 添加ゲルのスペクトル特性に関する考証

吸着剤表面上に固定化した Cu^{2+} イオンの配位環境に関する情報を得るために、 Cu^{2+} 添加支持体の拡散反射率と ESR スペクトルを記録した。拡散反射率のスペクトルはそれぞれ、可視領域の約 640 nm に中心が存在する極めて広いバンドを示したが、溶液中の非固定化ビス(tacn) リガンドの銅(II) 錯体について観察されたものと類似しており、四角錐又は正方体が歪曲した八面体配位環境に銅(II) が存在していることを示唆している。「遊離」錯体に対して 1100 nm 付近に観察された低強度のバンドは、ゲルの拡散反射率のスペクトル中では分離されなかった。

【0316】

77 K で測定した Cu^{2+} 添加ゲルの X バンド ESR スペクトルは、各ケースで約 3200 G に強いシグナルを示し、核スピン 3/2 を有する単核の銅(II) 錯体に対して認められる代表的なシグナルであった。予想される 4 つの超微細シグナルのうち 3 つは明白に認識できたが、4 つ目のシグナルは g (垂直) ラインの下に隠れていた (Hathaway, b. J. In Comprehensive Coordination Chemistry; Wilkinson, G.、Gillard, R. D.、McCleverty, J. A. (Eds.)、Pergamon Press, Oxford, 1987, Vol. 5, p533 を参照)。tacn ゲルのシグナルの分離は良好であった。

ビス (t a c n) ゲルのものは幾分広めで、ゲル表面に固定化した際に前記リガンドの 2 つの半分部分が等しくならないことを示している。従って、各リガンドによって結合された 2 つの銅 (I I) 中心の配位環境は、わずかに異なると考えられる。吸着剤の E S R スペクトルは、S P 又は正方体が歪曲した八面体配位環境にある Cu^{2+} イオン特有のパラメータ (g (平行) = 2. 24、 g (垂直) = 2. 05 – 2. 07、 A (平行) = $170 \times 10^{-4} cm^{-1}$) を有する「遊離」銅 (I I) 錯体のスペクトルと極めて類似している (上記引用文中、H a t h a w a y, B. J. 参照)。それ故、ゲル表面上に存在する前記錯体種は、溶液中のリガンドによって形成される銅 (I I) 錯体と実際には類似している。

【0317】

[実施例 126] 実験の部の序言(上記参照)に記載した情報に加えて、本発明に関して特別に使用した様々な材料、試薬、及び操作について、以下でさらに詳述する。

【0318】

セファロースTM C L – 4 B 上への t a c n 及びビス (t a c n) リガンドの大規模な固定化

真空乾燥したセファロースTM C L – 4 B (300 g) を水 (5 × 300 mL) で徹底的に洗浄して、丸底フラスコに入れ、オーバーヘッド機械式スターラーを用いて 1 M N a O H (300 mL) 及び N a B H₄ (1. 2 g) と室温で 1 時間混合した。次に、エピクロロヒドリン (100 mL) を加えて、更に 6 時間、前記懸濁液を攪拌した。生成されたエポキシ活性化ゲルを減圧濾過によって収集して、水 (5 × 300 mL)、20 % E t O H / 水 (5 × 300 mL) で徹底的に洗浄し、さらにもう一度水 (5 × 300 mL) で洗浄した。各リガンドの 3. 75 mmol 量の臭化水素酸塩を水 (40 mL) に溶解することにより、リガンド t a c n 及びビス (t a c n) リガンド L^{e t h}、L^{p r o p}、L^{b u t}、L^{o x}、L^{m x} 及び L^{p x} の 75 mM 溶液を調製して、6 M N a O H で pH 11 に調節し、その後、水を加えて 50 mL にした。真空乾燥したエポキシ活性化ゲル 60 g 分に前記溶液を加えて、振盪式ウォーターバスを用いて 60 °C で 15 時間、前記懸濁液を混合した。生成された官能化ゲルを減圧濾過で収集し、水 (5 × 200 mL)、50 mM 酢酸 / 0. 1 M K N O₃ (pH 4) (2 × 200 mL) で洗浄後、もう一度水 (5 × 200 mL) で洗浄した。ゲルは、必要なときまで、20 % E t O H / 水に 4 °C で保管した。

【0319】

セファロースTM C L – 4 B 上へのビス (t a c n) リガンドの構築

真空乾燥したエポキシ活性化セファロース C L – 4 B ゲル (80 g) (前述のように調製) を 24 % メチルアミン水溶液中に懸濁し、この混合物を 60 °C で 15 時間、攪拌した。次に、生成されたアミノ化ゲルを減圧濾過により濾過して、水 (10 × 200 mL)、50 mM 酢酸 / 0. 1 M K N O₃ / pH 4 緩衝液 (4 × 100 mL) で洗浄し、もう一度水 (10 × 200 mL) で洗浄した。アミノ化したゲルの一部 (15 g) を窒素分析のために取り分けた。残りを、100 mL の 5 % トリエチルアミン / 水、20 % アセトニトリル / 5 % トリエチルアミン / 水、40 % アセトニトリル / 5 % トリエチルアミン / 水、60 % アセトニトリル / 5 % トリエチルアミン / 水、80 % アセトニトリル / 5 % トリエチルアミン / 水、95 % アセトニトリル / 5 % トリエチルアミンで 3 回ずつ連続して洗浄し、最後にアセトニトリル (6 × 100 mL) で洗浄した。その後、ゲルにアセトニトリルを加えて、総量 170 mL の懸濁液とした。アセトニトリル (30 mL) 中の 1, 3, 5 – トリス (ブromoメチル) ベンゼン (10 g、28 mmol) の溶液を加えて、その混合物を室温で 18 時間、速い速度で攪拌した。次に、前記ゲルを濾過して、アセトニトリル (5 × 100 mL) を用いて洗浄した。前記ゲルにアセトニトリルを添加して、総量 130 mL の懸濁液にした。次に、アセトニトリル (40 mL) 中の遊離塩基型 t a c n (6. 5 g、50 mmol) の溶液を加えて、その混合物を室温で 22 時間、勢いよく攪拌した。前記ゲルを濾過して、50 mL アセトニトリル、75 % アセトニトリル / 水、50 % アセトニトリル / 水、25 % アセトニトリル / 水、水、50 mM 酢酸 / 0. 1 M

KNO_3 / pH 4 緩衝液で連続して2回ずつ洗浄し、その後、再度、水で洗浄した。ゲルは20% EtOH / 水に4℃で保管した。

【0320】

リガンドー官能化セファロースTM CL-4B吸着剤の窒素分析

リガンドの固定化の程度を測定するために、官能化ゲルの窒素含有量を分析した。各ゲルにつき、20%アセトン／水（50 mL）中に、約20 gの真空乾燥した材料を2分間懸濁した。次に、ゲルが乾燥しきらないように注意しながら、静かに減圧濾過して溶媒の大部分を除去した（この段階でゲルが乾燥すると、吸着剤が凝集する原因になることがわかっていて）。このゲルを、全く同様の方法で更に20%アセトン／水で洗浄した。前記ゲルが純アセトン中に移行するまでアセトンの量を増加した（20%ずつ増加）溶液を用いて、この二重洗浄操作を繰り返した。次に、徹底的に真空乾燥する前に、このゲルを再度アセトン（50 mL）で洗浄した後、24時間、高真空の下で乾燥させた。Kjeldahl法を用いて、乾燥した吸着剤の総窒素含量を分析した。

10

【0321】

官能化セファロースTM CL-4B吸着剤上への Cu^{2+} 及び Ni^{2+} イオンの添加

該当する金属硝酸塩（5 mL）の50 mM水溶液を含む10 mLシンチレーションバイアルに真空乾燥した吸着剤のうち0.5 gを加え、60℃で1時間、倒置して混合した。 Cu^{2+} 添加に関しては、 Cu^{2+} の取り込みにおける経時的な変化を確立するために、0.5時間から20時間までの期間にわたって、一連の行程として室温でこの操作を実行した。次に、減圧濾過によりゲルを収集し、水（3×50 mL）、20 mM NaOAc / 1 M NaCl / pH 5 緩衝液（2×25 mL）、及び水（3×50 mL）で連続して洗浄し、前記溶液の添加と減圧濾過によるその除去の間に3分間の平衡時間を与えた。

20

【0322】

官能化セファロースTM CL-4B吸着剤上に Cu^{2+} 及び Ni^{2+} イオンを添加するための標準条件

室温で30分間、50 mLのシンチレーションバイアル中で、50 mMの $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ （50 mL）を用いて前記真空乾燥したゲルのうち4 gをインキュベートすることにより、官能化吸着剤上に Cu^{2+} イオンを大量に添加（結合）させたが、取り込みの予備実験（実施例124；上記参照）により、この時間で十分ことが示されていた。次に、金属イオン添加吸着剤を減圧濾過で収集して、水（5×100 mL）で洗浄し、20 mM NaOAc / 1 M NaCl / pH 5 緩衝液（50 mL）中に15分間懸濁した。前記ゲルを濾過し、更に一定分量（50 mL）のpH 5 緩衝液で洗浄後、水（3×100 mL）で洗浄して、3分間の洗浄平衡化の時間を維持した。

30

【0323】

緩衝液平衡化実験の選択に関する詳細

真空乾燥した Cu^{2+} 添加吸着剤0.5 gを20 mLシンチレーションバイアルに入れて、下記の溶液（10 mL）とともに、室温で所定の時間、インキュベートした。次に、さらに20 mM Na_2HPO_4 / 1 M NaCl / pH 7 緩衝液（10 mL）、続いて水（3×50 mL）で洗浄する前に前記ゲルを減圧濾過によって単離し、洗浄の間には3分間平衡化させた。

40

【0324】

溶液：1) 20 mM Na_2HPO_4 / 1 M NaCl / pH 7 緩衝液、10分
2) 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / 1 M NaCl / pH 9 緩衝液、10分
3) 200 mM イミダゾール、10分
4) 200 mM Na_2EDTA 、30分

Cu^{2+} ー及び Ni^{2+} ー添加セファロースTM CL-4B吸着剤の金属分析

金属イオン添加吸着剤の試料ごとに、約0.5 gの真空乾燥した材料を純アセトン中に移行させ、無金属イオンゲルに対して上述の方法を用いて高真空下で乾燥させた。次に、約20 gの乾燥させた吸着剤を正確に秤量して20 mLの密封シンチレーションバイアルに入れ、頻繁に倒置させながら、50℃で4時間にわたり4 M HCl （4 mL）中で消

50

化した。生成した明黄褐色の溶液を8 mLの容量になるように水で希釈した後、原子吸光分光法により銅の含有量を分析した。膨潤したゲル容積について吸着剤の金属含量を測定するために、50% (v/v) ゲル/水懸濁液の分取試料(1 mL)を用いて分析を繰り返し、ゲルを水中に沈降させ、ゲル上の液体量がベッド容量と等しくなるように調整することによって調製した。

【0325】

Cu²⁺ 添加セファロースTM CL-4B吸着剤の拡散反射率及びESR分光法

上記の操作に従って、高真空下で乾燥させたゲル試料を用いて、拡散反射率のスペクトルを記録した。20 mM NaOAc / 1 M NaCl / pH 5 緩衝液で洗浄したゲルの真空乾燥試料を用いて、ESRスペクトルを記録した。

10

【0326】

[実施例127] NT1 (配列番号1) と称されるオリゴペプチド「タグ」にN末端が融合された完全長の組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ〔r-GST (FL)〕を発現するために使用可能な発現プラスミドの構築 (GST (FL) - NT1 と称される融合タンパク質)

実施例86に記述したように、GSTをコードする配列のC末端を修飾して完全長の構築物を得るために、GST-NT1を発現するように構築されたプラスミドの部位特異的突然変異誘発 (SDM) を行った。リジン残基 (コドンAAA) をコードするようにGSTのSDMを行うことによって、単一塩基の変化が導入された (停止コドン(TAA)を変化させた)。N末端がタグ化された組換えGST融合タンパク質 (GST-NT1) 発現プラスミド中に存在するこの終止コドン除去すると、N末端がタグ化された組換えGST融合タンパク質 (GST-NT1) を発現するために使用できるプラスミドが得られ、該融合タンパク質においては、4 アミノ酸 Lys-Ser-Asp-Leu だけGSTのC末端がそれぞれ伸長する。C末端のリジン残基の復活により、完全長のGST配列に加えて、例えば、元の構築物を作製するために使用されたpGEX3XGSTベクターに由来する更に3つのC末端残基がコードされるので、これにより得られた発現プラスミドは、完全長グルタチオンS-トランスフェラーゼ〔GST (FL)〕と命名された。

20

【0327】

ストラタジーン社のQuickChangeTM 部位特異的突然変異誘発キット取扱説明書カタログ#200518改訂版#1000007に概略されている通りに、SDM操作を実行した。

30

【0328】

部位特異的突然変異誘発反応：

実施例86に記載されているように、N末端がタグ化されたGST融合タンパク質GST-NT1を発現するために構築された発現プラスミドを、鋳型DNAとして使用した。望ましい塩基の変更を導入するために使用したオリゴヌクレオチドは下記のとおりであり、下線が付されている。

【0329】

オリゴヌクレオチドNo. 1 : 5' GGCGACCATCCTCCTAAATCGGATCTGTAAAAGC3'

オリゴヌクレオチドNo. 2 : 5' GCTTTTACAGATCCGATTTAGGAGGATGGTTCGCC3'

40

125 ngのオリゴヌクレオチドNo. 1、125 ngのオリゴヌクレオチドNo. 2、5 µLの10X反応緩衝液、及び1 µLのdNTPを含む混合物に約25 ngのdsDNAテンプレートを加えた。前記反応混合物の量を二重蒸留水で50 µLになるように調節した。この混合物に2.5 UのPfu Turbo DNAポリメラーゼを添加し、反応混合物を鉱油で覆った。

【0330】

次に、前記反応混合物を下記の条件を使用してサーモサイクラーに入れた。(a) 最初の変性段階は95℃で30秒間、(b) その後、95℃、30秒間で12サイクル、(c) 55℃で1分間、(d) 続いて68℃で10分間。サーモサイクラーの休止時に、反応

50

物を取り出して、2分間、氷冷した。次に、増幅反応に10Uの制限酵素DpnIを加え、混合物を静かに且つ徹底的に攪拌した。続いて、前記混合物をマイクロ遠心分離機で1分間沈降させ、直ちに37℃で1時間インキュベートした。

【0331】

XL-1-Blue Supercompetent細胞への形質転換：

上記の反応から得た5μLのDpnI処理DNAを50μLのXL-1-Blue Supercompetent細胞に添加し、氷上でその混合物を30分間インキュベートした。次に、この混合物に対して、42℃で45秒間、ヒートパルスを行った後、2分間、氷冷した。0.5mLのSOC培地〔5mM MgCl₂及び、5mM MgSO₄、20mMグルコースを追加して濾過殺菌した5mLのSOB（トリプトン20g/L及び酵母エキス5g/L、2.5mM NaCl、625μM KCl、加圧滅菌処理）を添加した後に、形質転換反応を37℃1時間でインキュベートした。異なる希釈度の形質転換混合物をLB Ampプレート（寒天15g/Lにトリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、NaCl10g/Lを添加して加圧滅菌した後、アンピシリン100mg/Lを補充した）上に播種した。前記プレートを、37℃で一晩、インキュベートした。

10

【0332】

陽性クローンの同定：

標準的な技術を用いて、上記XL-1-Blue形質転換体から修飾されたプラスミドDNAを単離した。単離したプラスミドDNAのDNA塩基配列決定は下記のように実行した。約200ngの修飾されたプラスミドDNA、5pmolのプライマー、6μLのターミネーターを15μLの容積に事前に混合する。前記反応による混合物を2つ準備し、一方には、

20

(a) pTrc フォワードプライマー： 5' TTGACAAATTAATCATCCGGC3' を入れ、

他方には、

(b) pTrc リバースプライマー： 5' CCAGGCAAAATTCGTTTTATCAG3' を入れた。

【0333】

前記反応混合物を下記の条件を使用したサーモサイクラーに供した。(a) 最初の変性段階は96℃で1分間、その後、(b) 96℃で30秒間、(c) 45℃で15秒間及び(d) 60℃で4分間からなる25サイクル。標準的な技術を用いてエタノール/酢酸ナトリウム沈殿を行って、伸長生成物を回収し、ペレットを乾燥させて、DNA塩基配列の決定に供した。GST(FL)-NT1をコードする所望のプラスミドを含有するクローンを同定し、正しいことを確認した。

30

【0334】

発現細胞の形質転換：

標準技術を用いて、塩化ルビジウム処理した大腸菌細胞の菌株JM105、BL21、TOP10を、約100ngの修飾発現プラスミドでそれぞれ形質転換した。プラスミド含有細胞を選択するため、様々な希釈度の形質転換細胞をLB Ampプレート上に播種した。

40

【0335】

[実施例128] CT2と称されるオリゴペプチド「タグ」Met-Lys-(His-Gln)₆がN末端に融合された完全長組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ〔r-GST(FL)〕を発現するために使用可能な発現プラスミドの構築〔GST(FL)-CT2と称される融合タンパク質〕

GSTをコードする配列のC末端を修飾するために、実施例88に記載のGST-CT2を発現するために構築されたプラスミドの部位特異的突然変異誘発(SDM)を行った点を除いて、使用した操作は、基本的に実施例127に記述した操作と同一であった。

【0336】

[実施例129] NT2（配列番号2）と称されるオリゴペプチド「タグ」にN末

50

端が融合された完全長組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ〔r-GST (FL)〕を発現するために使用可能な発現プラスミドの構築〔GST (FL)-NT2と称される融合タンパク質〕

GSTをコードする配列のC末端を修飾するために、実施例89に記載のGST-NT2を発現するために構築されたプラスミドの部位特異的突然変異誘発(SDM)を行った点を除いて、使用した操作は、基本的に実施例127に記述した操作と同一であった。

【0337】

〔実施例130〕 大腸菌細胞株JM105中でのN末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST (FL)-CT2の大規模発現

実施例128に記述の通りに、GST (FL)-CT2発現プラスミドを用いて、大腸菌細胞株JM105を形質転換した。LB Amp培地を含むペトリ皿上で、形質転換した細胞を37℃で一晩繁殖させた。100 µg/mLアンピシリンを補充したLB培地(トリプトン10 g/L、酵母エキス5 g/L、NaCl 10 g/L、加圧滅菌処理)に、前記ペトリ皿の単一コロニーを播種し、一晩中振盪させながら37℃でインキュベートした。100 µg/mLアンピシリン(2×YTA)を補充した500 mLの2×YT培地(トリプトン16 g/L、酵母エキス10 g/L、NaCl 5 g/L、pH7.0、加圧滅菌処理)に、一晩培養物の1/100希釈液を播種した後、600 nmの吸光度(A₆₀₀)が0.6-1.0になるまで、37℃で振盪させながらインキュベートした。最終濃度が1 mMになるようにIPTGを加えることにより、遺伝子発現を誘導した。誘導から6-7時間後に、前記培地の細胞を採集した。25 mLの氷冷1×PBS(140 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄、pH7.3)中に細胞を再懸濁し、超音波処理することによって溶解した。ペレット化した後に、前記細胞破碎液を収集した。

【0338】

〔実施例131〕 大腸菌細胞株JM105中でのN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長〔r-GST (FL)〕(配列番号1)融合タンパク質、GST (FL)-NT1の大規模発現

実施例127に記載したようにGST (FL)-NT1発現プラスミドで大腸菌細胞株JM105を形質転換した点を除いて、使用した操作は、基本的に実施例130に記述した操作と同一であった。

【0339】

〔実施例132〕 大腸菌細胞株JM105中のN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長〔r-GST (FL)〕(配列番号2)融合タンパク質、GST (FL)-NT2の大規模発現

実施例129に記載したようにGST (FL)-NT2発現プラスミドで大腸菌細胞株JM105を形質転換した点を除いて、使用した操作は、基本的に実施例130に記述した操作と同一であった。

【0340】

〔実施例133〕 大腸菌細胞株BL21中でのN末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST (FL)-CT2の大規模発現

GST (FL)-CT2発現プラスミドで大腸菌細胞株BL21を形質転換した点を除いて、使用した操作は、基本的に実施例130に記述した操作と同一であった。

【0341】

〔実施例134〕 大腸菌細胞株BL21中のN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長〔r-GST (FL)〕(配列番号1)融合タンパク質、GST (FL)-NT1の大規模発現

GST (FL)-NT1発現プラスミドで大腸菌細胞株BL21を形質転換した点を除いて、使用した操作は、基本的に実施例131に記述した操作と同一であった。

【0342】

〔実施例135〕 大腸菌細胞株BL21中でのN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST(FL)](配列番号2)融合タンパク質、GST(FL)-NT2の大規模発現

GST(FL)-NT2発現プラスミドで大腸菌細胞株BL21を形質転換した点を除いて、使用した操作は実質的に実施例132に記述した操作と同一であった。

【0343】

〔実施例136〕 大腸菌細胞株TOP10中でのN末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST(FL)-CT2の大規模発現

GST(FL)-CT2発現プラスミドで大腸菌細胞株TOP10を形質転換した点を除いて、使用した操作は実質的に実施例130に記述した操作と同一であった。

【0344】

〔実施例137〕 大腸菌細胞株TOP10中でのN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST(FL)](配列番号1)融合タンパク質、GST(FL)-NT1の大規模発現

GST(FL)-NT1発現プラスミドで大腸菌細胞株TOP10を形質転換した点を除いて、使用した操作は実質的に実施例131に記述した操作と同一であった。

【0345】

〔実施例138〕 大腸菌細胞株TOP10中でのN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST(FL)](配列番号2)融合タンパク質、GST(FL)-NT2の大規模発現

GST(FL)-NT2発現プラスミドで大腸菌細胞株TOP10を形質転換した点を除いて、使用した操作は実質的に実施例132に記述した操作と同一であった。

【0346】

〔実施例139〕 大腸菌細胞株JM105で発現させたN末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST(FL)-CT2の精製

適切なクロマトグラフィーの吸着剤として、固定化したNi²⁺-tacn、Cu²⁺-tacn、Ni²⁺-dtne、Cu²⁺-dtne、Ni²⁺-dtnp、Cu²⁺-dtnp又はその他の金属イオンをキレートした大環状トリス-又はテトラキス-tacn系を用いて、基本的に実施例93に記述したバッチ法又はカラムクロマトグラフィー法によって、実施例128(上記)に記述したとおりに発現したN末端タグ化GST(FL)融合タンパク質GST(FL)-CT2を精製することができる。緩衝液B(緩衝液B=10mMイミダゾール、pH8.4を追加した緩衝液A;緩衝液A=445mM NaCl、7.5mM Na₂HPO₄及び2.5mM NaH₂PO₄・2H₂O、pH7.2)を用いて各カラムをインキュベートした。ゲル1mLにつき250μLの粗細胞破碎液(緩衝液Bで4分の1に希釈)をカラムに添加した。次に、溶出前に、緩衝液Bでカラムを2回洗浄した。以下の2つの溶出操作を使用した。緩衝液1(緩衝液1=50mM

イミダゾール、pH9.7を追加した緩衝液A)で溶出後に、2度目の溶出を200mM マロン酸ナトリウムで行った(これは、10M 水酸化ナトリウムでpH8.0に調節した)。あるいは、これらのGST融合タンパク質を、グルタチオンセファロースTM 4B(GS4B)を用いて精製することもできる。本ケースでは、Pharmacia Biotech出版の情報冊子GST Gene Fusion System第3版改訂1に従ってバッチ精製を行った。簡潔に記述すると、実施例130に記載したように、1XPBS(140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、pH7.3)で洗浄及び平衡化したベッド容積が0.75mLのGS4Bに、24mLの細胞破碎液を加えた。生じた混合物を室温で約1時間、繰り返し回転させながらインキュベートした。前記混合物を500Xgで5分間、遠心分離した。上清を収集して、ゲルを1XPBSで徹底的に洗浄した。融合タンパク質を溶出緩衝液

10

20

30

40

50

(50 mM トリス-HCl pH 8、10 mM 還元型グルタチオン) で溶出した。

【0347】

溶出液を収集後、残留している緩衝塩又はGS4Bを全て除去するために10 mLのエコノカラム(Bio-RadTM)にかけた。溶出液を室温で20分間、4.7 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)とともにインキュベートした後、4℃で緩衝液(20 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 6.9)で徹底的に透析した。透析後、タンパク質を0.45 μm 無菌フィルター(MilliporeTM)に通した。ウシ血清アルブミン(BSA)を標準として用いたビシンコニン酸(BCA)試薬(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)を使用して、濾過前及び濾過後のタンパク質濃度を測定した。その後、精製された融合タンパク質を4℃

10

【0348】

〔実施例140〕 大腸菌細胞株JM105中で発現させたN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)] (配列番号1) 融合タンパク質、GST (FL)-NT1のバッチ精製

実施例131に記述した通りに粗細胞破碎液を精製した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0349】

〔実施例141〕 大腸菌細胞株JM105中で発現させたN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)] (配列番号2) 融合タンパク質、GST (FL)-NT2のバッチ精製

20

実施例132に記述した通りに粗細胞破碎液を精製した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0350】

〔実施例142〕 大腸菌細胞株BL21中で発現させたN末端Met-Lys-(His-Gln)₆をタグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST (FL)-CT2のバッチ精製

実施例133に記述した通りに粗細胞破碎液を精製した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0351】

30

〔実施例143〕 大腸菌細胞株BL21中で発現させたN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)] (配列番号1) 融合タンパク質、GST (FL)-NT1のバッチ精製

実施例134に記述した通りに粗細胞破碎液を、EDTAとともにインキュベートされなかった精製タンパク質を用いて分画した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0352】

〔実施例144〕 大腸菌細胞株BL21中で発現させたN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)] (配列番号2) 融合タンパク質、GST (FL)-NT2のバッチ精製

40

実施例135に記述した通りに粗細胞破碎液を、EDTAとともにインキュベートされなかった精製タンパク質を用いて分画した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0353】

〔実施例145〕 大腸菌細胞株TOP10中で発現させたN末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST (FL)-CT2のバッチ精製

実施例136に記述した通りに粗細胞破碎液を、EDTAとともにインキュベートされなかった精製タンパク質を用いて分画した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

50

【0354】

〔実施例146〕 大腸菌細胞株TOP10中で発現させたN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)] (配列番号1) 融合タンパク質、GST (FL)-NT1のバッチ精製

実施例137に記述した通りに粗細胞破碎液を、EDTAとともにインキュベートされなかった精製タンパク質を用いて分画した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0355】

〔実施例147〕 大腸菌細胞株TOP10中で発現されたN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)] (配列番号2) 融合タンパク質、GST (FL)-NT2のバッチ精製

10

実施例138に記述した通りに粗細胞破碎液を、EDTAとともにインキュベートされなかった精製タンパク質を用いて分画した点を除いて、使用した操作は、実質的に実施例139に記述した操作と同様であった。

【0356】

〔実施例148〕 様々な大腸菌細胞株中で発現させたN末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST (FL)-CT2のMALDI-TOF MSによる分子量測定

実施例139、142、145に記載したように、様々な大腸菌株で発現精製された精製透析N末端タグ化GST (FL)-CT2融合タンパク質の分子量を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF-MS)によって測定した。非還元タンパク質試料がグルタチオンセファロースTM 4B (GS4B) 精製手順から発生したため、予想した理論上の分子量より[M+H]⁺の実験値の方が高くなり、実施例136及び142、145に記載したように、グルタチオン精製時に還元グルタチオン(GSH)によってGSTタンパク質がS-チオレートされるという事実と合致していた。しかし、βメルカプトエタノールを添加して前記タンパク質試料を還元後に脱塩すると、[M+H]⁺の実験値は予想理論分子量と一致した。従って、MALDI-TOF MSによって分析したタンパク質試料は全て、このようにして調製した。

20

【0357】

予め4.7mM EDTAとともにインキュベートされなかったタンパク質試料を、室温で20分間、このようにして処理した。次に、β-メルカプトエタノール(最終濃度50mM)とともに前記タンパク質をインキュベートした後に、C₁₈ ZipTipTM (MilliporeTM)を用いて脱塩し、分析を行うまで-20℃で保管した。破碎結晶(crushed-crystal)法を用いて、この試料をシナピン酸マトリックスに使用した。Voyager-DE STR生体分光光度法ワークステーションを用いてスペクトルを記録した。加速度ポテンシャル25kV、パルス遅延時間250ns、低マスゲート5KDa、グリッド電圧85%の陽イオンリニアモードで試料を分析した。1スペクトルにつき100ショットを撮り、5スペクトルを蓄積させた。

30

【0358】

GST (FL)-CT2の理論上の分子量は28,007.3ダルトンである。

40

【0359】

MALDI-TOF MSによる、大腸菌細胞株JM105中で発現させたGST (FL)-CT2の分子量測定

実施例139に記載したように、大腸菌細胞株JM105中で発現させたGST (FL)-CT2のスペクトルは、平均[M+H]⁺値の28,006±5.57ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

【0360】

MALDI-TOF MSによる、大腸菌細胞株BL21中で発現させたGST (FL)-CT2の分子量測定

50

実施例 1 4 2 に記載したように、大腸菌細胞株 B L 2 1 中で発現させた G S T (F L) - C T 2 のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 2 8, 0 0 8 . 1 0 $\pm$ 5 . 2 9 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

【 0 3 6 1 】

M A L D I - T O F M S による、大腸菌細胞株 T O P 1 0 中で発現させた G S T (F L) - C T 2 の分子量測定

実施例 1 4 5 に記載したように、大腸菌細胞株 T O P 1 0 に発現した G S T (F L) - C T 2 のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 2 8, 0 0 3 . 0 0 $\pm$ 3 . 4 6 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

10

【 0 3 6 2 】

[実施例 1 4 9] M A L D I - T O F M S による、様々な大腸菌細胞株中で発現させた N 末端タグ化組換えグルタチオン S - トランスフェラーゼ完全長 [r - G S T (F L)] (配列番号 1) 融合タンパク質、G S T (F L) - N T 1 の分子量測定

G S T (F L) - N T 1 の理論上の分子量が 2 7, 9 6 5 . 3 ダルトンであるという点を除けば、使用した操作は実質的に例 1 4 8 に記述したものと同一であるが、

M A L D I - T O F M S による、大腸菌細胞株 J M 1 0 5 中で発現させた G S T (F L) - N T 1 の分子量測定

実施例 1 4 0 に記載したように、大腸菌細胞株 J M 1 0 5 中で発現させた G S T (F L) - N T 1 のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 2 7, 9 5 3 . 0 0 $\pm$ 2 . 6 5 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは無傷のタンパク質と一致した。

20

【 0 3 6 3 】

M A L D I - T O F M S による、大腸菌細胞株 B L 2 1 中で発現させた G S T (F L) - N T 1 の分子量測定

実施例 1 4 3 に記載したように、大腸菌細胞株 B L 2 1 中で発現させた G S T (F L) - N T 1 のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 2 7, 9 5 1 . 0 0 $\pm$ 4 . 3 6 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

【 0 3 6 4 】

M A L D I - T O F M S による、大腸菌細胞株 T O P 1 0 中で発現した G S T (F L) - N T 1 の分子量測定

実施例 1 4 6 に記載されているとおりに、大腸菌細胞株 T O P 1 0 中で発現した G S T (F L) - N T 1 のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 2 7, 9 5 4 . 6 7 $\pm$ 6 . 6 6 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

30

【 0 3 6 5 】

[実施例 1 5 0] M A L D I - T O F M S による、様々な大腸菌細胞株中で発現させた N 末端タグ化組換えグルタチオン S - トランスフェラーゼ完全長 [r - G S T (F L)] (配列番号 2) 融合タンパク質、G S T (F L) - N T 2 の分子量測定

G S T (F L) - N T 2 の理論上の分子量が、2 8, 2 1 8 . 6 ダルトンである点を除いて、使用した操作は実質的に実施例 1 4 8 に記述したものと同一である。

40

【 0 3 6 6 】

M A L D I - T O F M S による、大腸菌細胞株 J M 1 0 5 中で発現させた G S T (F L) - N T 2 の分子量測定

実施例 1 4 1 に記載したように、大腸菌細胞株 J M 1 0 5 中で発現させた G S T (F L) - N T 2 のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 2 8, 2 0 8 . 0 0 $\pm$ 8 . 4 4 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

【 0 3 6 7 】

50

MALDI-TOF MSによる、大腸菌細胞株BL21中で発現させたGST (FL) -NT2の分子量測定

実施例144に記載したように、大腸菌細胞株BL21で発現させたGST (FL) -NT2のスペクトルは、平均 $[M+H]^+$ 値 28, 214.33 ± 5.86 ダルトンのシングルピークを示した。実験データは、変化を受けていないタンパク質のデータと合致していた。

【0368】

MALDI-TOF MSによる、大腸菌細胞株TOP10中で発現させたGST (FL) -NT2の分子量測定

実施例147に記載したように、大腸菌細胞株TOP10中で発現させたGST (FL) -NT2のMALDI-MSスペクトルは下記の通り。

【0369】

(a) 主ピーク (100%強度) の平均 $[M+H]^+$ 値は 28, 213.83 ± 6.05 ダルトン、

(b) マイナーピークは (約25%相対強度) の平均 $[M+H]^+$ 値は 27, 815.83 ± 8.04 ダルトン、

(c) マイナーピーク (約13%相対強度) の平均 $[M+H]^+$ 値は 26, 301.0 ± 6.90 ダルトンであった。

【0370】

無傷のタンパク質並びに最初の3基及び最初の15残基がそれぞれN末端で切断された少量のタンパク質を主に含有する精製試料と、実験データは一致していた。これらの種は、イタリック体で表記した以下のN末端アミノ酸を欠く末端切断型GST (FL) -NT2に対応する。

【0371】

マイナーピーク MKH ¹ TN I H Q D Q H N H F H R ----- [GST]

この種の理論上の分子量は 27, 822.11 ダルトンである。

【0372】

マイナーピーク MKHTN I H Q D Q H N H F H ¹ R ----- [GST]

この種の理論上の分子量は 26, 312.55 ダルトンである。

【0373】

[実施例151] N末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST (FL) -CT2のジペプチジルアミノペプチターゼ1 (DAP-1) 消化

等量のDTT (20mM) を添加して室温で4-6分間、混合物をインキュベートすることによって、N末端切断酵素ジペプチジルアミノペプチターゼ1 [例えば Aldrich-Sigma (St Louis, MO, USA) 又はUnizyme Laboratories (Horsholm, Denmark) から入手可能なDAP-1 (E.C. 3.4.14.1)] (10U/mL) を活性化した。消化反応混合物には、実施例139に記述の大腸菌細胞株JM105中で発現させたN末端タグ化GST (FL) -CT2タンパク質50µg及び12.5mUの活性化したDAP-1が含まれた。タンパク質が懸濁された緩衝液 (20mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH6.9) を加えることによって、前記反応混合物の量を70µLに調節した。次に、前記消化反応混合物をウォーターバスに入れて37℃で5分ないし約23時間にわたって、インキュベートした。

【0374】

インキュベーション時間の最後に、一定分量のDAP-1消化反応混合物を取り出し、SDS添加緩衝液 (還元性) を加えて反応を止めた。前記試料を100℃で90秒加熱した後に、引き続きSDSポリアクリルアミドゲル分析を行うために-20℃で保管した。

【0375】

さらに、インキュベーション期間の終了時に、DAP-1消化反応混合物をさらに分取

10

20

30

40

50

して、消化反応を止めるために室温で5分間、グアニジン-HCl（最終濃度1Mになるように加えた）とともにインキュベートした。次に、MALDI-TOF MSによる分析を引き続き行うために、この混合物を実施例148に記載したように更に調製した。簡潔に記述すると、停止した消化反応混合物にβ-メルカプトエタノール（最終濃度50mMになるように）を加え、C₁₈ ZipTipTMを用いた脱塩に先立って室温で15分間インキュベートした後に、-20℃で保管した。

【0376】

DAP-1消化の時点でタンパク質試料を評価し、それに対する陰性対照とするために、実施例139に記載したように、MALDI-TOF MSによる分子量の連続測定のために未消化（すなわち、非DAP-1処理）タンパク質GST（FL）-CT2の試料も調製した。C₁₈ ZipTipTMを用いた脱塩の前に、前記タンパク質試料に（最終濃度50mMになるように）β-メルカプトエタノールを追加した後、引き続きMALDI-TOF MS分析を行うまで-20℃で前記試料を保管した。

10

【0377】

実施例139に記載したように、未消化（すなわち、非DAP-1処理）タンパク質GST（FL）-CT2の試料にもSDS添加緩衝液（還元性）を追加し、その後SDSポリアクリルアミドゲル分析を行うために-20℃で保管する前に、100℃で90秒加熱した。

【0378】

〔実施例152〕 N末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST（FL）]（配列番号1）融合タンパク質、GST（FL）-NT1のDAP-1消化

20

以下の点を除き、操作は実質的に実施例151に記載したものと同一であった。実施例140に記載したように、精製N末端タグ化GST（FL）融合タンパク質GST（FL）-NT1を大腸菌細胞株JM105中で発現させ、緩衝液（20mM 酢酸ナトリウム、150mM NaCl、pH5.5）に対して更に透析を行った。透析後、標準物質としてウシ血清アルブミン（BSA）を用いたビシンコニン酸（BCA）試薬（Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、USA）を使用して、タンパク質の濃度を測定した。前記DAP-1消化反応混合物を、5分乃至約24時間にわたってインキュベートした。

30

【0379】

〔実施例153〕 N末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST（FL）]（配列番号2）融合タンパク質、GST（FL）-NT2のDAP-1消化

以下の点を除いて、N末端タグ化GST（FL）融合タンパク質GST（FL）-NT2のDAP-1消化の操作は、実質的に実施例151に記載した操作と同様であった。

【0380】

実施例141に記載したように、精製したN末端タグ化GST（FL）融合タンパク質GST（FL）-NT2を大腸菌細胞株JM105中で発現させ、緩衝液（20mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH6.3）に対して透析を行った。透析後、標準物質としてウシ血清アルブミン（BSA）を用いたビシンコニン酸（BCA）試薬（Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、USA）を使用して、タンパク質の濃度を測定した。前記消化反応混合物を、5分乃至約24時間にわたってインキュベートした。

40

【0381】

〔実施例154〕 N末端Met-Lys-(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質、GST（FL）-CT2のDAP-1消化の前後における分子量測定

GST（FL）-CT2をDAP-1で処理した。消化反応の条件は実施例151に記載されているとおりである。5分から約23時間のインキュベーション時間の最後に、一

50

定分量の消化反応物を取り出し、消化反応を停止させるために、室温で5分間、グアニジンHCl（最終濃度1Mになるように加えた）とともにインキュベートした。次に、この混合物を、MALDI-TOF MSによる後の分析のために、実施例148に記載したように、更に調製した。簡潔に記述すると、反応を停止した消化反応混合物にβ-メルカプトエタノール（最終濃度50mMになるように）を加え、C₁₈ ZipTipTMを用いて脱塩する前に、-20℃で保管した。次に室温で15分間インキュベートした。

【0382】

消化の時点でタンパク質試料を測定し、その陰性対照とするために、MALDI-TOF MSで引き続き分子量を測定するためのDAP-1消化の時点で、実施例139に記載したように、未消化（すなわち、非DAP-1処理）タンパク質の試料GST（FL）-CT2も調製した。実施例151に前述したように、C₁₈ ZipTipTMを用いて脱塩する前にβ-メルカプトエタノール（最終濃度50mMになるように）を前記タンパク質試料に追加した。次いで、後にMALDI-TOF MS分析を行うまで、前記試料を-20℃で保管した。

【0383】

上記の試料をMALDI-TOF-MSによって分析した。各試料を破碎結晶法を用いてシナピン酸マトリックスに適用した。Voyager-DE STRBioSpectrometry Workstationを用いてスペクトルを記録した。加速度ポテンシャル25kV、パルス遅延時間250ns、低マスゲート5kDa及びグリッド電圧85%の陽イオンリニアモードで試料を分析した。1スペクトルにつき100ショットを撮り、5スペクトルを集積した。

【0384】

スペクトルを図53に示す。非DAP-1処理GST（FL）-CT2融合タンパク質、すなわち、陰性対照のスペクトルは、28,013±3.21ダルトンの[M+H]⁺値を有するシングルピーク（標識1）を示した。GST（FL）-CT2（28,007.3ダルトン）の理論的な同位体の分子量と比較すると、観察された質量は、GST（FL）-CT2タンパク質が変化を受けていないことを示している。DAP-1消化GST（FL）-CT2（標識2）のスペクトルは、融合タンパク質をDAP-1で2時間処理すると分子量が減少することを示している。

【0385】

スペクトル2は、26,154±6ダルトンの平均[M+H]⁺値を有するメジャーピーク（2a）、25,931±7.51ダルトンの平均[M+H]⁺値を有するマイナーピーク（2b）を表している。これらの種は、イタリック体で表されているN末端アミノ酸を喪失した末端切断型のGST（FL）-CT2に対応する。

【0386】

ピーク（2a） MKHQHQHQHQHQH¹VDQMSP-----[GST]
（この種の理論的分子量は、26,156.3ダルトンである）

ピーク（2b） MKHQHQHQHQHQHQVQD¹QMSP-----[GST]
（この種の理論的分子量は25,942.1ダルトンである）

ここで、¹Vと¹Qは、DAP-1消化後に得られる末端切断されたGST（FL）-CT2バリエーションのN末端アミノ酸残基に対応する。DAP-1の特異性が顕著であることを前提にすれば、DAP-1の停止位置¹SP-----GSTまでさらに切断が起こる（ここで、¹SはN末端アミノ酸残基である）。

【0387】

〔実施例155〕 N末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST（FL）]（配列番号1）融合タンパク質GST（FL）-NT1のDAP-1消化の前後における分子量測定

以下の点を除き、操作は実質的に実施例154に記載したものと同様であった。

【0388】

GST（FL）-NT1をDAP-1で処理した。消化反応の条件は、実施例152に

記載されているとおりである。消化反応混合物を5分から約24時間にわたってインキュベートした。

【0389】

実施例140に記載したように、未消化の（すなわち、非DAP-1処理）タンパク質の試料GST (FL) -NT1も、DAP-1消化の時点で調製した。

【0390】

スペクトルを図54に示す。非DAP-1処理GST (FL) -NT1（すなわち、陰性対照）のスペクトルは、27, 972 ± 3.51ダルトンの[M+H]⁺値を有するシングルピーク（標識1）を示している。GST (FL) -NT1の予想される理論上の分子量27, 965.3ダルトンと比較すると、観察された質量はタンパク質が変化を受けていないことを示している。DAP-1消化（2時間）GST (FL) -NT1（標識2）のスペクトルは、DAP-1で処理した後に分子量が減少することを示している。

10

【0391】

スペクトル2は、26, 659 ± 6.81ダルトンの平均[M+H]⁺値を有するメジャーピーク（2a）を表している。また、25, 934 ± 3.21ダルトンの平均[M+H]⁺値を有するマイナーピーク（2b）、さらに、25, 680 ± 6.03ダルトンの平均[M+H]⁺値を有するマイナーピーク（2c）も表している。これらの種は、イタリック体で示された以下のN末端アミノ酸を喪失した末端切断型のGST (FL) -NT1に対応する。

【0392】

20

ピーク（2a） MKHHHNSWDH ¹ D I N R V D Q M S P — — — — [GST]
（この種の理論上の分子量は26, 654.9ダルトンである）

ピーク（2b） MKHHHNSWDHD I N R V D ¹ Q M S P — — — — [GST]
（この種の理論上の分子量は25, 942.1ダルトンである）

ピーク（2c） MKHHHNSWDHD I N R V D Q M ¹ S P — — — — [GST]
（この種の理論上の分子量は25, 682.80ダルトンである）

ここで、¹D・・・、¹Q・・・及び¹S・・・は、DAP-1消化後に得られる、GST (FL) -NT1の末端切断バリエーションのN末端アミノ酸残基に対応する。DAP-1の顕著な特異性を前提とすれば、DAP-1の停止位置¹S P — — — — — [GST]まで切断が起こる。シナピン酸（分子量が224.2Da増加）及びβ-メルカプトエタノール（MW78.13）の付加物に対応する副次的ピークもスペクトル中に明瞭に観察される。

30

【0393】

【実施例156】 N末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ完全長[r-GST (FL)]（配列番号2）融合タンパク質GST (FL) -NT2のDAP-1消化の前後における分子量測定

以下の点を除いて、操作は実質的に実施例154に記述したものと同様であった。

【0394】

GST (FL) -NT2をDAP-1で処理した。消化反応の条件は、実施例153に記載されているとおりである。消化反応混合物を5分乃至約24時間にわたってインキュベートした。

40

【0395】

実施例141に記載したように未消化の（すなわち、非DAP-1処理した）タンパク質GST (FL) -NT2の試料も、DAP-1消化時に調製した。

【0396】

スペクトルを図55に示す。非DAP-1処理GST (FL) -NT2（すなわち、陰性対照）のスペクトルは、28, 223 ± 2.89ダルトンの[M+H]⁺値を有するシングルピーク（標識1）を示している。GST (FL) -NT2の予想される理論分子量28, 218.6ダルトンと比較すると、観察された質量は、タンパク質が変化を受けていないことを示している。DAP-1消化した（2時間）GST (FL) -NT2（標識

50

2) のスペクトルは、DAP-1 による処理後に分子量が減少することを示している。

【0397】

スペクトル 2 は、25, 910 ± 9.16 ダルトンの平均 $[M+H]^+$ 値を有するメジャーピーク (2a)、25, 648 ± 12.86 ダルトンの平均 $[M+H]^+$ 値を有するマイナーピーク (2b) を表している。これらの種は、イタリック体で示された N 末端アミノ酸を喪失した末端切断型の GST (FL) - NT 2 に対応する。

【0398】

ピーク (2a) MKHTNIHQDQHNFHHRVD ^{1} QMS P — — [GST]
(この種の理論上の分子量は 25, 942.1 ダルトンである)

ピーク (2b) MKHTNIHQDQHNFHHRVDQM ^{1} SP — — [GST]
この種の理論上の分子量は 25, 682.8 Da である。

10

【0399】

ここで、 ^{1} Q・・・及び ^{1} S・・・は、DAP-1 消化後に得られる GST (FL) - NT 2 の末端切断バリエーションの N 末端アミノ酸残基に対応する。DAP-1 の顕著な特異性を前提とすれば、DAP の停止位置 ^{1} SP — — — — — [GST] まで切断が起こる。

【0400】

[実施例 157] 様々なオリゴペプチド構築物 [例えば、GST (FL) - CT 2、GST (FL) - NT 1 及び GST (FL) - NT 2] で N 末端にタグを施した様々な組換え完全長グルタチオン S-トランスフェラーゼ融合タンパク質の DAP-1 消化の前後における SDS-PAGE 分析

20

DAP-1 消化前及び消化後に、実施例 151、152、及び 153 に記載したように、様々な N 末端タグ化組換えグルタチオン S-トランスフェラーゼ完全長融合タンパク質の一定分量を、SDS 添加緩衝液 (還元性) と混合し、100℃で 90 秒間加熱した。次に、試料を 18% SDS-ポリアクリルアミドゲル上に添加して、適宜の時間展開させた。前記ゲル上に、0.4 µL の未消化 (すなわち、非 DAP-1 処理) タンパク質、0.6 µL の DAP 消化反応混合物、及び 8 µL の分子量マーカー [Benchmark Protein Ladder (Gibco BRL)] をゲルに添加した。バンドを可視化するために、前記ゲルを銀染色した。染色したゲルを図 56 に示す。

【0401】

[実施例 158] NT 1 と称されるオリゴペプチド構築物で N 末端にタグを施した組換え完全長グルタチオン S-トランスフェラーゼ [r-GST (FL)] (配列番号 1) 融合タンパク質 (すなわち、GST (FL) - NT 1) の DAP-1 消化前後における活性の測定

30

基本的に実施例 92 及び 152 に記述した操作で、DAP-1 消化反応混合物を調製した。簡潔に記述すると、等量の DTT (20 mM) を加え、室温で 4-6 分間前記混合物をインキュベートすることによって、DAP-1 [EC 3.4.14.1] (10 U/mL) を活性化した。前記消化反応混合物には、実施例 140 及び 152 に記載したように大腸菌細胞株 JM105 中で発現された 50 µg の N 末端タグ化 GST (FL) - NT 1 タンパク質及び 12.5 mU の活性化 DAP-1 が含有されていた。タンパク質を懸濁した緩衝液 (20 mM 酢酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 5.5) を加えることによって、前記反応混合物の量を 70 µL に調整した。次に、消化反応混合物をウォーターバスの中に入れ、37℃で約 24 時間インキュベートした。

40

【0402】

非 DAP-1 処理陰性対照反応混合物も調製した。操作は、DAP-1 を省略したことを除いて、基本的に上述のとおりであった。

【0403】

インキュベーションの休止時に、両反応の活性を測定した。機能的な GST 活性の信頼できるアッセイは、GST がグルタチオンによる CDNB の誘導体化を触媒する CDNB (1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン) アッセイである。340 nm の波長で光学密度を測定することによって、この錯体をモニターすることができる。Pharmacia

50

B i o t e c h 出版の情報冊子 G s t G e n e F u s i o n S y s t e m 第 3 版改訂 1 の概説通りにこのアッセイを行った。簡潔に記述すると、D A P - 1 消化前及び後の各反応混合物の 1 0 0 倍希釈物 1 0 μ L を、1 0 0 m M K H ₂ P O ₄、p H 6 . 5、1 m M 1 - クロロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン (C D N B)、1 m M 還元グルタチオンをキュベット中に含有する 1 0 0 μ L のアッセイ反応混合物に加えて、3 4 0 n m の吸光度を 1 分間隔で 5 分間測定した。本アッセイで測定したところ、G S T (F L) - N T 1 を含有する D A P - 1 消化前及び消化後の反応混合物は何れも、機能的な G S T 活性を示した。

【 0 4 0 4 】

[実施例 1 5 9] N T 2 と称されるオリゴペプチド構築物で N 末端にタグを施した組換え完全長グルタチオン S - トランスフェラーゼ [r - G S T (F L)] (配列番号 1) 融合タンパク質 (すなわち、G S T (F L) - N T 2) の D A P - 1 消化前後における活性の測定

10

下記の点を除いて、操作は、基本的に実施例 1 5 8 に記述したものと同様であった。

【 0 4 0 5 】

前記消化反応混合物には、実施例 1 4 1 及び 1 5 3 に記載したように大腸菌細胞株 J M 1 0 5 中で発現された 5 0 μ g の N 末端タグ化 G S T (F L) - N T 2 タンパク質及び 1 2 . 5 m U の活性化 D A P - 1 が含有されていた。タンパク質を懸濁した緩衝液 (2 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 6 . 3) を加えることによって、前記反応混合物の量を 7 0 μ L に調整した。次に、消化反応混合物をウォーターバスの中に入れ、3 7 ° C で約 1 2 時間インキュベートした。

20

【 0 4 0 6 】

非 D A P - 1 処理陰性対照反応混合物も調製した。操作は、D A P - 1 を省略したことを除いて、基本的に上述のとおりであった。

【 0 4 0 7 】

本アッセイで測定したところ、G S T (F L) - N T 2 を含有する D A P - 1 消化前及び消化後の反応混合物は何れも、機能的な G S T 活性を示した。

【 0 4 0 8 】

[実施例 1 6 0] 様々な N 末端タグ化 G S T 融合タンパク質の単一段階均一濃度溶出以下の様々なアフィニティータグ (すなわち、ヘキサヒスチジン (G S T - C T 1)、H i s - G l n の交互リピート (G S T - C T 2)、新しいタグ 1 (G S T - N T 1) と N T 2 (G S T - N T 2)) を、実施例 9 1 に記載されているように N 末端に融合させたグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) の大規模な発現から得られた粗細胞破碎液 (C C L) を、単一段階の均一濃度溶出操作によって精製した。粗細胞破碎液を N i ²⁺ - t a c n 及び C u ²⁺ - t a c n の両カラムにかけた。各カラム (1 0 m L エコノカラム、B i o - R a d ^{T M}) のベッド容積は 0 . 5 m L で、緩衝液 A 1 [緩衝液 A 1 = 緩衝液 A (2 0 m M リン酸緩衝液、5 0 0 m M N a C l、p H 8) + 1 0 m M イミダゾール、p H 8] により平衡化した。前記カラムに 0 . 5 m L (C C L) + 4 . 5 m L の緩衝液 A 1 を含有する 5 m L の試料を添加した。試料がカラムを通過した後に、カラムを緩衝液 A 1 (5 m L) で洗浄した。緩衝液 A 2 (緩衝液 A 2 = 緩衝液 A + 2 0 m M イミダゾール、p H 8) を用いて、2 度目の洗浄 (5 m L) を行った。3 × 1 m L の溶出緩衝液 (B A + 5 0 0 m M イミダゾール、p H 8) をカラムにロードすることによって溶出を行った。

30

40

【 0 4 0 9 】

[実施例 1 6 1] 単一段階均一濃度溶出を用いた様々な N 末端タグ化 G S T 融合タンパク質の精製で得られた前記第一の溶出画分の S D S - P A G E 分析

実施例 1 6 0 に記載したように、それぞれを N i ²⁺ - t a c n 及び C u ²⁺ - t a c n カラムにかけた様々な N 末端タグ化 G S T 融合タンパク質の単一段階均一濃度溶出から収集した第一の溶出分画を一定分量採って、S D S 添加緩衝液 (還元性) と混合し、1 0 0 ° C で 9 0 秒間加熱した。次に、試料を 1 5 % S D S - ポリアクリルアミドゲル上に添加

50

し、適切な時間にわたって展開した。16 μ Lの溶出分画と2 μ Lの分子量マーカー [Benchmark protein ladder (Gibco, BRL)] を前記ゲル上に添加した。バンドを可視化するために、前記ゲルを銀染色した。染色したゲルを図57に示す。

【0410】

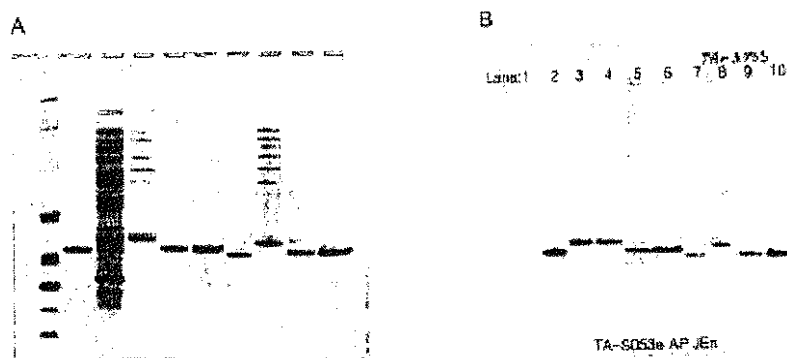
[実施例162] N末端にNT2-VDタグを施したヒト成長ホルモン (NT2-VD-hGH; MKHTNIHQDQHNFHRVD-hGH) の精製。DAP-1によるタグの切断と成熟hGHの単離

基本的に実施例127に記載したように生成されたプラスミド構築物を用いて、1リットルの振盪容器中でN末端タグ化融合タンパク質NT2-VD-hGH、すなわちMKHTNIHQDQHNFHRVD-hGHを発現した。ペレットを収集して水で洗浄した。次に、250 μ Lのリゾチーム (30 mg/mL) と1.25 μ Lのベンゾナーゼを加えることによって、溶解緩衝液 (20 mL 20 mM Na_2HPO_4 、500 mM NaCl 、pH 8) 中で250 mLの前記ペレットを溶解した。懸濁液を5°Cで1時間放置した後に、遠心分離を行った。上清を収集して80 mLの溶解緩衝液で希釈した後、3 mL/分の速度で15 mLの固定化 Ni^{2+} -tacnカラムに導入し、続けて150 mL緩衝液を加えた。次いで、2%溶出緩衝液 (20 mM Na_2HPO_4 、500 mM NaCl 、500 mL イミダゾール、pH 8) を含む150 mLの溶解緩衝液でカラムを洗浄した後、4%溶出緩衝液を含む150 mL溶解緩衝液で洗浄した。その後、75 mLの総量について、4%から100%の溶出緩衝液を用いて勾配溶出を行い、続いて100%溶出緩衝液75 mLを用いて溶出した。

【0411】

電気泳動法により所望の生成物を含有する溶出分画を同定して、プールし、20 mM Na_2HPO_4 、150 mM NaCl 、pH 6.3に対して脱塩した後、37°Cに加熱した。活性化DAP-1 (125 μ L DAP-1 + 25 μ L 100 mM DTT、室温で5分間インキュベートした) を脱塩画分に添加した後、270分の間に培地のpHを約6.3から5.1の間で何度も変化させた。次に、培地を週末まで5°C及びpH 5で放置した。その後、切断したプールを遠心分離して、上清を収集し、pH 8になるように調整して、1 mLの固定化 Ni^{2+} -tacnカラム上に導入した。次に、カラムを基本的に上述のように0.18 mL/分の流速で溶出し、hGHを含有するピークを収集した。下記のスキーム14に示されているように、SDS-Pageとウェスタンブロットによって分析した。

【化27】



【0412】

スキーム14. (A) コロイダルブルー染色を用いたSDS-Page (±還元) 及び

(B) 選択した試料のウェスタンブロット分析。レーン1-6：還元試料；レーン7-10 非還元試料（レーン1：分子量マーカー；レーン2：hGH標準；レーン3：溶解した生成物；レーン4：単離したタグ化hGH；レーン5：切断された生成物；レーン6：2度目の Ni^{2+} -tacnカラム溶出操作後に得られた切断生成物；レーン7：hGH標準；レーン8：溶解した生成物；レーン9：切断生成物；レーン10：2度目の Ni^{2+} -tacnカラム溶出操作後に得られた切断生成物

さらに、推定精度50ダルトンのMALDI-TOF MSによって多数の試料を分析し、単離したタグ化生成物の分子量が24,444ダルトンであることを明らかにした（理論値は24,402ダルトン）。切断と2度目の Ni^{2+} -tacnカラム溶出の後には、22,156ダルトンの分子量が測定された（理論値は24,125ダルトン）。hGH標準試料の分子量は22,147ダルトンであった。

10

【0413】

〔実施例163〕 Ni^{2+} -tacnカラム溶出後の Cu^{2+} -tacnカラム溶出によるCT2-VD-hGH（MKHQHQHQHQHQVD-hGH）の精製

基本的に実施例127に記載したように生成されたプラスミド構築物を用いて、1リットルの振盪容器中でN末端タグ化融合タンパク質CT2-VD-hGH、すなわちMKHQHQHQHQHQVD-hGHを発現した。ペレットを収集して水で洗浄した。次に、実施例162に記載したように、250mLから得られたペレットを溶解緩衝液中で溶解した。懸濁液を5℃で1時間放置した後に、懸濁液の遠心分離を行った。上清を収集して、その半分の量を40mLの溶解緩衝液で希釈後、1mL/分の速度で5mLの固定化 Ni^{2+} -tacnカラムに導入した後、20mL緩衝液を流した。次に、前記カラムを2%溶出緩衝液（20mM Na_2HPO_4 、500mM NaCl 、500mL イミダゾール、pH8）を含む50mLの溶解緩衝液で洗浄後、4%の溶出緩衝液を含む50mLの溶解緩衝液で洗浄した。その後、総量25mLに対して4%から100%の溶出緩衝液を用いて勾配溶出を行った後、100%の溶出緩衝液25mLを用いて溶出した。

20

【0414】

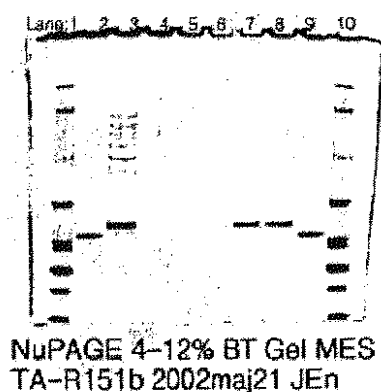
電気泳動により所望のタグ化生成物を含有する溶出画分を同定し、これをプールして、溶解緩衝液に対して脱塩した。脱塩したプールを溶解緩衝液で5倍に希釈し、5mLの Cu^{2+} -tacnカラム上に導入した。 Ni^{2+} -tacnカラムの溶出緩衝液と速度は上述のとおりであった。同様に、タグ化hGH生成物を含有するそれぞれの分画をプールし、脱塩した。

30

【0415】

下記のスキーム15に示されているように、選択した試料をSDS-Pageによって分析した。

【化28】



40

【0416】

50

スキーム 15. 非還元 SDS-PAGE。レーン 1: MW マーカー; レーン 2: hGH 標準; レーン 3: Ni^{2+} -t ac n カラム精製から得た透析プール; レーン 4: Cu^{2+} -t ac n カラムに Ni^{2+} -t ac n カラムから得たプールを導入した後のスループット; レーン 5: 洗浄 1; レーン 6: 洗浄 2; レーン 7: 標識 hGH 分画のプール; レーン 8: レーン 7 と同様であるが透析を行った; レーン 9: hGH 標準; レーン 10: MW マーカー

本結果から、2つの異なる M^{2+} -t ac n カラムを連続して用いることによって、非 hGH 関連物質の含量が著しく減少することが実証された。

【図面の簡単な説明】

【0417】

【図 1】20 mM 炭酸ナトリウム / 0.1 M NaCl、pH 9.5 の結合緩衝液と様々な金属イオンを用いた im-M^{n+} -dt ne 及び im-M^{n+} -dt np セファロースTM CL-6B カラムに対するヒト血清タンパク質の結合様式（ここで、それぞれ、 $\text{M}^{n+} = \text{Cu}^{2+}$, Co^{2+} , Zn^{2+} 及び Ni^{2+} ）。溶出は本明細書中の実施例（下記参照）の表 1 に要約されている操作を用いて行った。溶出されたタンパク質の割合 = (溶出された全タンパク質量 / 添加された全タンパク質量) $\times 100\%$ である。

【図 2】様々な試料添加条件下において、 im-Cu^{2+} -dt ne 及び im-Cu^{2+} -dt np セファロースTM CL-6B バッチカラムより回収した分画から選択した分画に対する SDS-PAGE プロファイル。レーン 1 = ヒト血清試料; レーン 2 及び レーン 3 = 試料添加 pH が 4.0 である場合の、 im-Cu^{2+} -dt ne セファロースTM CL-6B カラムからの漏出 / 洗浄及び溶出分画; レーン 4 及び レーン 5 = 試料添加 pH が 9.5 である場合の、 im-Cu^{2+} -dt ne セファロースTM CL-6B カラムからの漏出 / 洗浄及び溶出分画; レーン 6 及び レーン 7 = 添加 pH が 4.0 である場合の、 im-Cu^{2+} -dt np セファロースTM CL-6B カラムからの漏出 / 洗浄及び溶出分画; レーン 8 - 11 = 試料添加 pH が 9.5 である場合の、 im-Cu^{2+} -dt np セファロースTM CL-6B カラムからの漏出 / 洗浄及び溶出分画。NaCl 濃度を上昇させること、及び pH を低下させることにより、溶出を行った。; レーン 9 = 1 M NaCl、及び pH = 9.5、レーン 10 = pH 4.0、レーン 11 = pH 4.0 及び 250 mM イミダゾール; レーン 12 は分子量スタンダードを示す。ミオシンは 212 kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは 170 kDa、 β -ガラクトシダーゼは 116 kDa、トランスフェリンは 76 kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは 53 kDa である。

【図 3】20 mM リン酸カリウム緩衝液 / 0.1 M NaCl、pH 7.0 の結合緩衝液と様々な金属イオンを用いた im-M^{n+} -dt ne 及び im-M^{n+} -dt np セファロースTM CL-6B カラムに対するヒト血清結合様式（ここで、それぞれ、 $\text{M}^{n+} = \text{Cu}^{2+}$, Co^{2+} , Zn^{2+} 及び Ni^{2+} ）。溶出は、本明細書中の実施例（下記参照）に記載されている表 2 の操作を用いて行った。溶出されたタンパク質の割合 = (溶出された全タンパク質量 / 添加された全タンパク質量) $\times 100\%$ である。

【図 4】結合緩衝液の pH を 7.0 とした場合の im-Cu^{2+} -dt ne 及び im-Cu^{2+} -dt np 及び im-Ni^{2+} -dt ne 及び im-Ni^{2+} -dt np セファロースTM CL-6B バッチカラムより回収した分画から選択した分画に対する SDS-PAGE プロファイル。NaCl 濃度を 1.0 M まで上昇させ、0.2 M EDTA、pH 4.2 を添加することによって溶出を行った。レーン 1 = ヒト血清試料; レーン 2 及び 3 = im-Ni^{2+} -dt ne セファロースTM CL-6B カラムから得た漏出 / 洗浄及び溶出分画; レーン 4 = im-Ni^{2+} -dt np カラムから得た漏出 / 洗浄及び溶出分画; レーン 5 及び 6 = 1 M NaCl を含有する pH 7.0 の緩衝液又は 0.2 M EDTA、pH 4.2 を用いて、 im-Ni^{2+} -dt np セファロースTM CL-6B カラムから溶出した分画; レーン 7 = im-Cu^{2+} -dt ne カラムから得た漏出 / 洗浄分画; レーン 8 及び 9 = im-Cu^{2+} -dt ne セファロースTM CL-6B カラムから 1 M NaCl を含有する pH 7.0 の緩衝液又は 0.2 M EDTA、pH 4.2 を用いて溶出した分画; レーン 10 = im-Cu^{2+} -dt np カラムから得た漏出 / 洗浄及び

10

20

30

40

50

溶出分画；レーン11及び12 = $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから、1M NaClを含むpH7.0の緩衝液あるいは0.2M EDTA、pH4.2を用いて溶出した分画；レーン13は分子量スタンダードを示す。ミオシンは212kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは170kDa、 β -ガラクトシダーゼは116kDa、トランスフェリンは76kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは53kDa。

【図5】結合緩衝液が、様々な金属イオン、 $\text{M}^{n+} = \text{Cu}^{2+}$ 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 及び Ni^{2+} をそれぞれ含有する20mM 酢酸ナトリウム緩衝液／0.1M NaCl、pH4.0である際の、 $\text{im-Mn}^{2+}\text{-dt ne}$ 及び $\text{im-Mn}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムに対するヒト血清の結合様式。表3の方法を用いて溶出を行った。溶出されたタンパク質の割合 = (溶出された全タンパク質量／添加された全タンパク質量) × 100%である。

10

【図6】様々な試料添加条件下において、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dt ne}$ 及び $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bバッチカラムより回収した分画に対するSDS-PAGEプロファイル。レーン1 = ヒト血清試料；レーン2及び3 = 試料添加のpHが4.0である場合の、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dt ne}$ カラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン4及び5 = 試料添加のpHが9.5である場合の、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dt ne}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン6及び7 = 試料添加のpHが4.0である場合の、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dt np}$ カラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン8-13 = 試料添加のpHが9.5である場合の、 $\text{im-Ni}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画。NaCl濃度を上昇させることにより又はpHを低下させることにより、溶出を行った。；レーン9 = 1M NaCl及びpH9.5、レーン10 = pH8.0、レーン11 = pH7.0、レーン12 = pH6.0、レーン13 = pH4.0及び250mM イミダゾール；レーン14は分子量スタンダードを示す。ミオシンは212kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは170kDa、 β -ガラクトシダーゼは116kDa、トランスフェリンは76kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは53kDaである。

20

【図7】様々な添加条件下において、 $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt ne}$ 及び $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bバッチカラムより回収した分画のSDS-PAGEプロファイル。レーン1 = ヒト血清試料；レーン2及び3 = 試料添加のpHが4.0である場合の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt ne}$ カラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン4及び5 = 試料添加のpHが9.5である場合の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン6及び7 = 試料添加のpHが4.0である場合の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン8及び9 = 試料添加のpHが9.5である場合の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムからの漏出／洗浄及び溶出分画；レーン10及び11 = 試料添加のpHが7.0である場合の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt ne}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン12及び13 = 試料添加のpHが4.0である場合の $\text{im-Zn}^{2+}\text{-dt np}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラムから得た漏出／洗浄及び溶出分画；レーン14は分子量スタンダードを示す。ミオシンは212kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは170kDa、 β -ガラクトシダーゼは116kDa、トランスフェリンは76kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは53kDaである。

30

40

【図8】 $\text{im-Cu}^{2+}\text{-dt ne}$ セファロース^{T M}CL-6Bカラム（50mm×内径5mm）を用いて以下の溶出方法によって分画されたヒト血清タンパク質の溶出プロファイル：(I) pH9.5からpH4.0までのpH勾配、(II) 100-1000mMまでのNaCl濃度勾配、及び(III) 0-250mMまでのイミダゾール濃度勾配。流速は0.5mL/min。平衡緩衝液は、100mM NaClを含有する20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5であった。

【図9】図8から選択した分画のSDS-PAGEプロファイル。レーン1はヒト血清試

50

料を示す；レーン2は漏出／洗浄分画を示す；レーン3及び4はpH9.5からpH4.0のpH勾配下での溶出ピークを示す；レーン5はNaCl濃度勾配下の溶出における溶出ピークを示す；レーン6はイミダゾール濃度勾配溶出での溶出ピークを示す；レーン7は分子量スタンダードを示す。ミオシンは212kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは170kDa、 β -ガラクトシダーゼは116kDa、トランスフェリンは76kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは53kDaである。

【図10】 im-Cu^{2+} - dtnp セファロースTMCL-6Bカラム（50mm×内径5mm）を用いて以下の溶出方法によって分画されたヒト血清タンパク質の溶出プロファイル：（I）pH9.5-pH4.0までのpH勾配、（II）100-1000mMまでのNaCl濃度勾配、及び（III）0-250mMまでのイミダゾール濃度勾配。流速は0.5mL/min。平衡緩衝液は、100mM NaClを含む20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5であった。

10

【図11】図10から選択した分画のSDS-PAGEプロファイル。レーン1はヒト血清試料を示す；レーン2及びレーン3は漏出／洗浄分画を示す；レーン4及びレーン5はpH9.5-pH4.0のpH勾配による溶出の溶出ピークを示す；レーン6-8はNaCl濃度勾配下での溶出ピークを示す；レーン9-11はイミダゾール濃度勾配下での溶出における溶出ピークを示す；レーン12は分子量スタンダードを示す。ミオシンは212kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは170kDa、 β -ガラクトシダーゼは116kDa、トランスフェリンは76kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは53kDaである。

20

【図12】 im-Cu^{2+} - dtn セファロースTMCL-6Bカラム（50mm×内径5mm）でNaCl濃度勾配とpH勾配の組み合わせによって溶出されたヒト血清タンパク質の溶出プロファイル。実線（—）は波長280nmにおける各分画の紫外線吸収を示す。破線（- - -）はNaClの濃度を示す。破線一点一点破線（- · · - · · -）はpHを示す。流速は0.5mL/minであった。平衡緩衝液は100mM NaClを含む20mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.5であった。

【図13】図12から選択した分画のSDS-PAGEプロファイル。レーン1はヒト血清試料を示す；レーン2は漏出／洗浄分画を示す；レーン3はNaCl濃度勾配溶出時の溶出ピークを示す；レーン4は1M NaClを含むpH9.5の緩衝液による溶出時の溶出ピークを示す；レーン5は1M NaCl存在下でpH9.5-pH6.75のpH勾配によって溶出した際の溶出ピークを示す；レーン6は1M NaClを含むpH6.75の緩衝液によって溶出した際の溶出ピークを示す；レーン7はpH6.75-pH4.0のpH勾配による溶出及び1M NaClを含有するpH4.0の緩衝液によるイソクラティック（isocratic）溶出による溶出ピークを示す；レーン8は分子量スタンダードを示す。ミオシンは212kDa、還元型 α_2 -マクログロブリンは170kDa、 β -ガラクトシダーゼは116kDa、トランスフェリンは76kDa、グルタミンデヒドロゲナーゼは53kDaである。

30

【図14】 im-Cu^{2+} 、 im-Ni^{2+} 及び im-Zn^{2+} - tacn 、 -dtn 及び dtnp セファロースTMCL-6B吸着体及び im-Ni^{2+} -NTAセファロースTMCL-6B吸着体を用いて調製した種々のカラムに結合する、組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（r-GST）発現物質から、バッチ吸収法によって回収したE.coli細胞抽出液分画に存在する全タンパク質量及び酵素活性の割合。この結合実験では50mM Na_2HPO_4 緩衝液／300mM NaCl及び10% グリセロールを含有するpH8.0の平衡緩衝液を用いた。

40

【図15】この図が示しているのは、 im-Cu^{2+} 、 im-Ni^{2+} 及び im-Zn^{2+} - tacn 、 -dtn 及び dtnp セファロースTMCL-6Bカラム及び im-Ni^{2+} -NTAセファロースTMCL-6Bカラムから、125mM及び250mM イミダゾールを含む溶出緩衝液（50mM Na_2HPO_4 ／300mM NaCl及び10% グリセロール、pH7.0）によって溶出されうる結合タンパク質の量（カラムに添加した全タンパク質量に対する割合）及び、それに対応する、組換えグルタチオン-S

50

ートランスフェラーゼ (r-GST) 発現物質からの E. coli 細胞抽出液の分画化により回収された分画の GST 特異的活性である。

【図16】組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質を含有する E. coli の粗抽出液、その粗抽出液のクロマトグラフィー分離によるカラム漏出分画及び溶出分画の SDS-PAGE プロファイル。分子量スタンダードは以下の通りである：オボアルブミン、46 kDa；カルボニックアンヒドラーゼ、30 kDa；トリプシンインヒビター、21.5 kDa；リゾチーム、14.3 kDa、アプロチニン、6.5 kDa 及びインスリン B 鎖、3.4 kDa。パネル (a) 中のレーンはそれぞれ：レーン1、E. coli 粗抽出液；レーン2-4、それぞれ、 im-Cu^{2+} -tacn、-dtne 及び im-Cu^{2+} -dtne セファロースTM CL-6B カラムの漏出分画；レーン5、タンパク質の分子量スタンダード；レーン6-9、それぞれ、 im-Zn^{2+} -tacn、 im-Zn^{2+} -dtne、 im-Zn^{2+} -dtne、 im-Ni^{2+} -tacn 及び im-Ni^{2+} -dtne セファロースTM CL-6B カラムの漏出分画に相当する。同様に、パネル (b) のレーンは：レーン1-3が、それぞれ im-Cu^{2+} -tacn、-dtne 及び im-Cu^{2+} -dtne セファロースTM CL-6B カラムの溶出分画；レーン4はタンパク質の分子量スタンダード；レーン5-7は、それぞれ im-Ni^{2+} -tacn、 im-Ni^{2+} -dtne 及び im-Ni^{2+} -NTA セファロースTM CL-6B カラムからの溶出分画；レーン8及び9は、それぞれ、 im-Ni^{2+} -NTA 及び im-Ni^{2+} -dtne カラムから得られた漏出分画に相当している。組換え GST- δ ATPase-His₆ の移動位置を矢印で示す。

【図17】50 mM Na₂HPO₄ / 300 mM NaCl 及び 10% グリセロール、pH 8.0、流速 0.5 mL/min で平衡化した im-Ni^{2+} -tacn セファロースTM CL-6B 吸着体を用いた、E. coli 粗抽出液中の他のタンパク質からの組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質のクロマトグラフィー分離。組換え GST- δ ATPase-His₆ を含有する E. coli 粗抽出液を、充填カラムに添加した (1 mL の吸着体あたり 2 mL の E. coli 粗抽出液)。(カラム体積の) 15 倍量の平衡化緩衝液によって、結合しない、あるいは結合が弱いタンパク質を洗い流した。結合したタンパク質は、平衡化緩衝液中のイミダゾール濃度を 0-250 mM まで 20 分間に渡って直線的な勾配で上昇させることにより溶出させた。勾配溶出の完了後、200 mM EDTA を含む溶出緩衝液で洗い流した。回収した分画中の GST 活性を定量し、破線 (---) で示した。破線一点一点破線 (- · - · - · -) と実線 (—) は、それぞれイミダゾールの勾配及び、それぞれの分画の波長 280 nm における紫外線吸収を示している。

【図18】E. coli 粗抽出液 (レーン2) 及び、 im-Ni^{2+} -tacn セファロースTM CL-6B カラムを用いた E. coli 粗抽出液のクロマトグラフィー分離によって回収された組換え GST- δ ATPase-His₆ タンパク質 (図17で示した) を含む溶出分画 (レーン3) の SDS-PAGE プロファイル。タンパク質の分子量スタンダード (レーン1) は以下の通り：オボアルブミン、46 kDa；カルボニックアンヒドラーゼ、30 kDa；トリプシンインヒビター、21.5 kDa、リゾチーム、14.3 kDa。

【図19】 im-Ni^{2+} -NTA セファロースTM CL-6B カラムを用いて精製組換え Fasciola hepatica カテプシン L5 (rF. h カテプシン L5) をクロマトグラフィー分離し回収した分画、並びに im-Cu^{2+} -tacn 及び im-Ni^{2+} -tacn セファロースTM CL-6B カラムを用いて未精製酵母上清をクロマトグラフィー分離し回収した分画中で、蛍光基質 N-カルボベンゾキシー Phe-Arg-7-アミノ-4-メチルクマリンを用いた蛍光検出によって示された C 末端ヘキサヒスチジンタグ化組換え Fasciola hepatica カテプシン L5 (rF. h カテプシン L5) の酵素活性。洗浄は、50 mM Na₂HPO₄ / 500 mM NaCl、pH 8.0 の平衡化緩衝液を用いて行われた。溶出の手順1-4は、0 mM、125 mM、250 mM 又は 500 mM イミダゾールを含有する 50 mM Na₂HPO₄ / 5

00mM NaCl、pH6.0の溶出緩衝液で行われた。

【図20】 $\text{im-Cu}^{2+}-\text{tacn}$ セファロースTMCL-6B吸着体を用いて、*S. cerevisiae*の未精製上清中の他のタンパク質から、組換えC末端ヘキサヒスチジンタグ化組換え*Fasciola hepatica* カテプシンL5 (rF. hカテプシンL5) を分離した際の溶出プロファイル。未精製の酵母上清を50mM Na_2HPO_4 / 150mM NaCl、pH8.0の緩衝液を用いて0.2mL/minで一晩平衡化した充填カラムに添加した。結合しない、又は結合が弱いタンパク質は、それぞれカラム体積の50倍量の平衡化緩衝液及び洗浄緩衝液(50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaCl、pH6.0)で洗い流した。次に、洗浄緩衝液(50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaCl、pH6.0)中の0-500mM イミダゾールの直線的濃度勾配によって、結合したタンパク質を溶出した。濃度勾配による溶出が完了した後、カラムを200mM EDTAを含む溶出緩衝液で洗浄した。回収された分画中のrF. hカテプシンL5の活性は、蛍光分析によって定量し、破線一点破線(—・—・—)によって示した。破線(— — —)、及び実線(—)はそれぞれイミダゾール濃度の勾配及び分画中のタンパク質量を示している。

【図21】図20で示したような $\text{im-Cu}^{2+}-\text{tacn}$ セファロースTMCL-6Bカラムを用いて、組換えC末端ヘキサヒスチジンタグ付加*Fasciola hepatica* カテプシンL5 (rF. hカテプシンL5) を精製した際の各分画のSDS-PAGEプロファイル。レーン1=未精製試料、酵母上清；レーン2=漏出分画；レーン3=平衡化緩衝液(50mM Na_2HPO_4 / 150mM NaCl、pH8.0)を用いた際の洗浄分画；レーン4=洗浄緩衝液(50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaCl、pH6.0)を用いた際の洗浄分画；レーン5=洗浄緩衝液中で0-500mM イミダゾールの濃度勾配を用いて溶出した分画。およそ28.5-34.1kDaの範囲に見られるマイナーなバンドは、rF. hカテプシンL5の自己分解によってもたらされた断片のバンドである。タンパク質濃度が低い場合には、これらのバンドはSDS-PAGE上で認識し得ない；レーン6=分子量スタンダード。ホスホリラーゼBは103kDa、ウシ血清アルブミンは81kDa、オボアルブミンは46.9kDa、カルボニックアンヒドラーゼは34.1kDa、ダイズトリプシンインヒビターは28.5kDa及びリゾチームは20.2kDa；レーン7= $\text{im-Ni}^{2+}-\text{NTA}$ セファロースTMCL-6Bカラムから得られた、rF. hカテプシンL5分画。

【図22】 $\text{im-Ni}^{2+}-\text{tacn}$ (a)、 $\text{im-Cu}^{2+}-\text{tacn}$ (b)、 $\text{im-Cu}^{2+}-\text{dtnp}$ (c)、 $\text{im-Ni}^{2+}-\text{dtnp}$ (d) セファロースTMCL-6Bカラムから回収されたヘキサヒスチジンタグ付加 apical membrane antigen-1 (AMA-1) を含む分画のウェスタンブロットプロファイル。レーン1=分子量、ミオシンは209kDa、 β -ガラクトシダーゼは124kDa、ウシ血清アルブミンは80kDa、及びオボアルブミンは49kDa；レーン2=平衡化緩衝液(50mM Na_2HPO_4 / 150mM NaCl、pH8.0)を用いた洗浄分画；レーン3=50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaClを含むpH6.0の緩衝液による溶出分画；レーン4=50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaCl及び125mM イミダゾールを含有するpH6.0の緩衝液による溶出分画；レーン5=50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaCl及び250mM イミダゾールを含有するpH6.0の緩衝液による溶出分画；レーン6=50mM Na_2HPO_4 / 500mM NaCl及び500mM イミダゾールを含有するpH6.0の緩衝液による溶出分画；レーン7=添加試料、酵母上清；レーン8=コントロール試料、*Plasmodium chabaudi* adam i 溶解液。組換えAMA-1タンパク質は酵母*Saccharomyces cerevisiae*で発現した。

【図23】*Saccharomyces cerevisiae* BJ3505株より単離された組換えヘキサヒスチジンタグ付加グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD67/65)を、 $\text{im-Ni}^{2+}-\text{tacn}$ 、 $\text{im-Cu}^{2+}-\text{tacn}$ セファロースTMCL-6Bカラムを用いて回収した分画のSDS-PAGEプロファイル。SDS-PAGE

Eプロファイルは、以下の分画の解析を含むものである：グループ1 = 125 mM イミダゾールを含む緩衝液を用いて im-Ni^{2+} - tacn カラムから溶出された分画；グループ2 = 125 mM イミダゾールを含む緩衝液を用いて im-Cu^{2+} - tacn カラムから溶出された分画；グループ3 = 250 mM イミダゾールを含む緩衝液を用いて im-Ni^{2+} - tacn カラムから溶出された分画；グループ4 = 250 mM イミダゾールを含む緩衝液を用いて im-Cu^{2+} - tacn カラムから溶出された分画；グループ5 = 500 mM イミダゾールを含む緩衝液を用いて im-Ni^{2+} - tacn カラムから溶出された分画；グループ6 = 500 mM イミダゾールを含む緩衝液で im-Cu^{2+} - tacn カラムから溶出された分画；グループ7 = im-Ni^{2+} - tacn に結合しないタンパク質分画；グループ8 = im-Cu^{2+} - tacn に結合しないタンパク質分画；グループ9 = 添加試料、 im-Ni^{2+} -NTA カラムを用いて単離した組換え GAD67/65 タンパク質；グループ10 = 40 mM イミダゾールを含有する洗浄緩衝液を用いて im-Ni^{2+} - tacn カラムから得られた洗浄分画；グループ11 = 40 mM イミダゾールを含む洗浄緩衝液を用いて im-Cu^{2+} - tacn カラムから得られた洗浄分画

【図24】 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B カラムを用いて *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 株から単離し、回収したヘキサヒスチジンタグ化組換えタンパク質、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67/65) を含有する分画の SDS-PAGE 及びウエスタンブロットのプロファイル。 im-Ni^{2+} -NTA セファロース CL-6B カラムを用いて、*Pichia pastoris* から、添加試料を分離した。(A) 実験1の SDS-PAGE：レーン1：分子量スタンダード；レーン2： im-Ni^{2+} -NTA セファロースTM CL-6B を用いて精製した添加試料；レーン3： im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B からの漏出分画；レーン4：平衡化緩衝液を用いて得られた、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B からの洗浄分画；レーン5：250 mM イミダゾールを含有する緩衝液を用いて得られた、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B からの溶出分画；(B)：実験2の SDS-PAGE：レーン1：分子量スタンダード；レーン2： im-Ni^{2+} -NTA セファロースTM CL-6B を用いて精製した添加試料；レーン3： im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の漏出分画；レーン4：平衡化緩衝液を用いた際の、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B からの洗浄分画；レーン5及び6：250 mM イミダゾールを含有する緩衝液を用いた際の、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の溶出分画；レーン7：0.1 M ヒスチジンを含有する緩衝液を用いた際の、 im-Cu^{2+} - tacn セファロース CL-6B の溶出分画；レーン8：1% SDS を含有する緩衝液を用いて得られた、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の溶出分画。(C)：実験3の SDS-PAGE：レーン1：分子量スタンダード；レーン2： im-Ni^{2+} -NTA セファロースTM CL-6B を用いて精製した添加試料；レーン3： im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の漏出分画；レーン4：平衡化緩衝液を用いた際の、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の洗浄分画；レーン5：250 mM イミダゾールを含有する緩衝液を用いた際の、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の溶出分画；レーン6：0.2 M EDTA を含有する緩衝液を用いて得られた、 im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の溶出分画。(D) 実験3のウエスタンブロット：レーン1： im-Ni^{2+} -NTA セファロースTM CL-6B を用いて精製した添加試料；レーン2： im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の漏出分画；レーン3：平衡化緩衝液を用いた際の im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B からの洗浄分画；レーン4：250 mM イミダゾールを含有する緩衝液を用いた際の im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の溶出分画；レーン5：0.2 M EDTA を含有する緩衝液を用いた際の im-Cu^{2+} - tacn セファロースTM CL-6B の溶出分画。

【図25】様々な pH 条件下における、 im-M^{2+} - dtn 及び im-M^{2+} - dtnp セファロース CL-6B 吸着体に対する、ウマ筋肉ミオグロビン (HMYO) の結合

。本研究において、使用した緩衝液条件は、白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5であった。容量因子として、Y軸（ q^*/c^* ）は、平衡状態における、IMAC吸着体に結合したタンパク質の量と溶液中のタンパク質の量との比に基づいた、タンパク質に対するIMAC吸着体の見かけの親和性を示す。

【図26】様々なpH条件下における、 $im-M^{2+}-dtne$ 及び $im-M^{2+}-dtn$ pセファロースCL-6B吸着体に対する、ウマ筋肉ミオグロビン（HMYO）の結合
本研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5、であった。Y軸、相対的結合定数、 K_{rel} （ $1/\mu mol$ ）は、平衡状態において吸着体に固定化された金属イオン1モルあたりの結合を基にした相対的結合能を示す。

【図27】様々なpH条件下における、 $im-M^{2+}-dtne$ 及び $im-M^{2+}-dtn$ pセファロースCL-6B吸着体に対する、ウマ心臓チトクロムC（HCC）の結合。この研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5、であった。容量因子として、Y軸、 q^*/c^* は、平衡状態における溶液中のタンパク質量とIMAC吸着体に結合したタンパク質の割合に基づいた、IMAC吸着体のタンパク質への見かけの親和性を示す。

【図28】様々なpH条件下における、 $im-M^{2+}-dtne$ 及び $im-M^{2+}-dtn$ pセファロースCL-6B吸着体に対する、ウマ心臓チトクロムC（HCC）の結合。

【0418】

本研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B 20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C 20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D 20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E 20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5。Y軸、相対的結合定数、 K_{rel} （ $1/\mu mol$ ）は、平衡状態において吸着体に固定化された金属イオン1モルあたりの結合を基にした相対的結合能を示す。

【図29】様々なpH条件下における、 $im-M^{2+}-dtne$ 及び $im-M^{2+}-dtn$ pセファロースCL-6B吸着体に対する、ニワトリ卵白リゾチーム（HEWL）の結合。この研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5、であった。容量因子として、Y軸、 q^*/c^* は、平衡状態における溶液中のタンパク質量とIMAC吸着体に結合したタンパク質の割合に基づいた、IMAC吸着体のタンパク質への見かけの親和性を示す。

【図30】様々なpH条件下における、 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ 及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースCL-6B吸着体に対する、ニワトリ卵白リゾチーム（HEWL）の結合。この研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mMリン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mMリン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5。Y軸、相対的結合定数、 K_{rel} （ $1/\mu\text{mol}$ ）は、平衡状態において吸着体に固定化された金属イオン1モルあたりの結合に基づく相対的結合能を示す。

10

【図31】様々なpH条件下における、 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ 及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースCL-6B吸着体に対する、ウシ α -ラクトアルブミン（ αLAC ）の結合。この研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mMリン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mMリン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5、であった。容量因子として、Y軸 q^*/c^* は、平衡状態における溶液中のタンパク質の量とIMAC吸着体に結合したタンパク質との割合に基づいた、IMAC吸着体のタンパク質への見かけの親和性を示す。

20

【図32】様々なpH条件下における、 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ 及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロースCL-6B吸着体に対する、ウシ α -ラクトアルブミン（ αLAC ）の結合。この研究における緩衝液条件は：白抜き柱—緩衝液A、20mM 酢酸ナトリウム／500mM NaCl、pH4.0；右上斜線柱—緩衝液B、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH6.0；左上斜線柱—緩衝液C、20mM リン酸カリウム／500mM NaCl、pH7.0；斜め格子柱—緩衝液D、20mMリン酸カリウム／500mM NaCl、pH8.0；水平線柱—緩衝液E、20mM 重炭酸ナトリウム／500mM NaCl、pH9.5、であった。Y軸、 K_{rel} （ $1/\mu\text{mol}$ ）は、平衡状態において吸着体に固定化された金属イオン1モルあたりの結合を基にした相対的結合能を示す。

30

【図33】 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ 及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 吸着体へのモデルタンパク質HMYOの結合に対する、イオン強度の影響。固定化させた金属イオンは次のとおり、 Cu^{2+} （黒塗り柱）、 Ni^{2+} （白抜き柱）、 Zn^{2+} （格子柱）、及び Co^{2+} （付点柱）であった。緩衝液の条件は、緩衝液Aが20mMリン酸カリウム緩衝液／100mM NaCl、pH8.0、緩衝液Bが20mMリン酸カリウム緩衝液／500mM NaCl、pH8.0、緩衝液Cが20mMリン酸カリウム緩衝液／1M NaCl、pH8.0、緩衝液Dが20mM リン酸カリウム緩衝液／2M NaCl、pH8.0、緩衝液Eが20mM リン酸カリウム緩衝液／3M NaCl、pH8.0であった。

40

【図34】 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ 及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-6B}$ 吸着体へのモデルタンパク質HCCの結合に対する、イオン強度の影響。固定化させた金属イオンは次のとおり、 Cu^{2+} （黒塗り柱）、 Ni^{2+} （白抜き柱）、 Zn^{2+} （格子柱）、及び Co^{2+} （付点柱）であった。緩衝液の条件は、緩衝液Aが20mMリン酸カリウム緩衝液／100mM NaCl、pH8.0、緩衝液Bが20mM リン酸カリウム緩衝液／500mM NaCl、pH8.0、緩衝液Cが20mM リン酸カリウム緩衝液／1M NaCl、pH8.0、緩衝液Dが20mM リン酸カリウム緩衝液／2M NaCl、pH8.0、緩衝液Eが20mMリン酸カリウム緩衝液／3M NaCl、pH8.0であった。

【図35】 $\text{im-M}^{2+}\text{-dtne}$ 及び $\text{im-M}^{2+}\text{-dtnp}$ セファロース $\text{T}^{\text{M}}\text{CL-}$

50

6 B吸着体へのモデルタンパク質HEWLの結合に対する、イオン強度の影響。固定化させた金属イオンは次のとおり、 Cu^{2+} （黒塗り柱）、 Ni^{2+} （白抜き柱）、 Zn^{2+} （格子柱）、及び Co^{2+} （付点柱）であった。緩衝液の条件は、緩衝液Aが20mMリン酸カリウム緩衝液/100mM NaCl、pH8.0、緩衝液Bが20mMリン酸カリウム緩衝液/500mM NaCl、pH8.0、緩衝液Cが20mMリン酸カリウム緩衝液/1M NaCl、pH8.0、緩衝液Dが20mMリン酸カリウム緩衝液/2M NaCl、pH8.0、緩衝液Eが20mMリン酸カリウム緩衝液/3M NaCl、pH8.0であった。

【図36】N-末端(His)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-CT1の小スケール発現後の、複数のクローンに対するSDS-PAGE解析。分注した細胞溶解液（実施例90及び105参照）をSDSローディング緩衝液（還元）と混合し100℃で1分間加熱した。次に、これらの試料を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。およそ60μLの細胞溶解液と30μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL, Bethesda, MD, U. S. A) 及び10kDa Protein Ladder (Gibco BRL)]を同じゲルに添加した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに付加的に15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動距離に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE. coli株JM105細胞を用いた。バンドを可視化するために、泳動に用いたゲルをクーマシーブルー(Coomassie Blue)で染色した。

【0419】

図36で示すゲル1のポイント： レーン1、GST-CT1クローン番号1；レーン2、GST-CT1クローン番号2；レーン5、GST-CT1クローン番号3；レーン6、GST-CT1クローン番号4；レーン7、GST-CT1クローン番号5；レーン11、GST-CT1クローン番号6；レーン12、GST-CT1クローン番号7；レーン13、GST-CT1クローン番号8；レーン14、GST-CT1クローン番号9；レーン15、GST-CT1クローン番号10；レーン8、pTrcを用いて形質転換したE. coli JM105から成る陰性対照；レーン9、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE. coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーは、レーン3、4及び10に示す。

【図37】N-末端(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-CT2の小スケール発現後の、複数のクローンに対するSDS-PAGE解析。分注した細胞溶解液（実施例90及び105参照）をSDSローディング緩衝液（還元）と混合し100℃で1分間加熱した。次に、これらの試料を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。およそ60μLの細胞溶解液と30μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL, Bethesda, MD, U. S. A) 及び10kDa Protein Ladder (Gibco BRL)]を同じゲルに添加した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質のr-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに付加的な15アミノ酸が含有されることとなり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タ

ンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE.coli株JM105細胞を用いた。バンドを可視化するために、泳動に用いたゲルをクーマシーブルー(Coomassie Blue)で染色した。

【0420】

図37で示すゲル2のポイント： レーン1、GST-CT2クローン番号1；レーン2、GST-CT2クローン番号2；レーン3、GST-CT2クローン番号3；レーン6、GST-CT2クローン番号4；レーン7、GST-CT2クローン番号5；レーン11、GST-CT2クローン番号6；レーン12、GST-CT2クローン番号7；レーン13、GST-CT2クローン番号8；レーン14、GST-CT2クローン番号9；レーン15、GST-CT2クローン番号10；レーン8、pTrcを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陰性対照、レーン9、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーは、レーン4、5及び10に示す。

【図38】N-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-NT1の小スケール発現後の、複数のクローンに対するSDS-PAGE解析。分注した細胞溶解液(実施例90及び107参照)をSDSローディング緩衝液(還元)と混合し100℃で1分間加熱した。次に、これらの試料を12%SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。およそ60μLの細胞溶解液と30μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder(Gibco BRL, Bethesda, MD, U.S.A)及び10kDa Protein Ladder(Gibco BRL)]を同じゲルに添加した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに付加的な15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE.coli株JM105細胞を用いた。バンドを可視化するために、泳動に用いたゲルをクーマシーブルー(Coomassie Blue)で染色した。

【0421】

図38で示すゲル3のポイント： レーン1、GST-NT1クローン番号1；レーン2、GST-NT1クローン番号2；レーン3、GST-NT1クローン番号3；レーン4、GST-NT1クローン番号4；レーン7、GST-NT1クローン番号5；レーン11、GST-NT1クローン番号6；レーン12、GST-NT1クローン番号7；レーン13、GST-NT1クローン番号8；レーン14、GST-NT1クローン番号9；レーン15、GST-NT1クローン番号10；レーン8、pTrcを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陰性対照、レーン9、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陽性対照である。分子量マーカーは、レーン5、6及び10に示す。

【図39】N-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-NT2の小スケール発現後の、複数のクローンに対するSDS-PAGE解析。分注した細胞溶解液(実施例90及び108参照)をSDSローディング緩衝液(還元)と混合し100℃で1分間加熱した。次に、これらの試料を12%SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。およそ60μLの細胞溶解液と30μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder(Gibco BRL, Bethesda, MD, U.S.A)及び10kDa Protein Ladder(Gibco BRL)]を同じゲルに添加した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia, Upps

al a、Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端に1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに15アミノ酸が付加されることになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE.coli株JM105細胞を用いた。バンドを可視化するために、泳動に用いたゲルをクーマシーブルー(Coomassie Blue)で染色した。

【0422】

図39で示すゲル1のポイント： レーン1、GST-NT2クローン番号1；レーン2、GST-NT2クローン番号2；レーン3、GST-NT2クローン番号3；レーン4、GST-NT2クローン番号4；レーン5、GST-NT2クローン番号5；レーン11、GST-NT2クローン番号6；レーン12、GST-NT2クローン番号7；レーン13、GST-NT2クローン番号8；レーン14、GST-NT2クローン番号9；レーン8、pTrcを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陰性対照；レーン9、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーは、レーン6、7及び10に示す。

【図40】高レベルの発現を示すことにより選択したクローン由来のN-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質の小スケール発現後の、未精製細胞溶解液に対するSDS-PAGE解析。分注した細胞溶解液(実施例90及び108参照)をSDSローディング緩衝液(還元)と混合し100℃で1分間加熱した。次に、これらの試料を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。およそ2μLの細胞溶解液及び1μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL、Bethesda、MD、U. S. A)]を同じゲルに添加した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia、Uppsala、Sweden)を用いた。N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに付加的に15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE.coli株JM105細胞を用いた。バンドを可視化するために、泳動に用いたゲルを銀染色した。

【0423】

図40で示すゲル5のポイント： レーン1、GST-CT1クローン番号7；レーン2、GST-CT2クローン番号6；レーン6、GST-NT1クローン番号1；レーン7、GST-NT2クローン番号7；レーン4、pTrcを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陰性対照；レーン5、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陽性対照。分子量マーカーは、レーン3に示す。

【図41】発現レベルにより選択したクローンから得たN-末端(His)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-CT1のバッチ精製により回収した複数の分画のSDS-PAGE解析。細胞溶解液及びバッチ精製から回収した分画を分注した試料(実施例93参照)をSDSローディング緩衝液(還元)と混合し100℃で90秒間加熱した。およそ10μLの精製分画試料と、5μLのポジティブ及び陰性対照細胞溶解液、及び組換え融合タンパク質を含有する1.25μLの細胞溶解液、及び1μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL、Bethesda、MD、U. S. A)]を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。バンドを可視

10

20

30

40

50

化するために、泳動に用いたゲルを銀染色した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia、Uppsala、Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現させる。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに追加的に15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE.coli株JM105細胞を用いた。

【0424】

図41で示すゲル6のポイント： レーン3-5には、 Ni^{2+} -tacnセファロースTMCL-6Bカラムから回収したGST-CT1試料が添加され、レーン6-8には、 Ni^{2+} -NTAセファロースTMCL-6Bカラムから回収した試料が添加されている。レーン3及び6は、洗浄2のステップに対応し、レーン4及び7は溶出1のステップに対応し、レーン5及び8は、溶出2のステップに対応する。レーン1は、pTrcを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陰性対照、レーン2は、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陽性対照、レーン10は、未精製細胞溶解液である。分子量マーカーは、レーン9に示す。

【図42】高発現レベルを示すことにより選択したクローンから得たN-末端(His-Gln)₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-CT2のバッチ精製から回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。細胞溶解液及び、バッチ精製から回収した分画を分注した試料(実施例111参照)をSDSローディング緩衝液(還元)と混合し100℃で90秒間加熱した。およそ10μLの精製分画試料と、5μLのポジティブ及び陰性対照細胞溶解液、及び組換え融合タンパク質を含有する1.25μLの細胞溶解液、及び1μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder(Gibco BRL、Bethesda、MD、U.S.A)]を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。バンドを可視化するために、泳動を行ったゲルを銀染色した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia、Uppsala、Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに付加的に15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE.coli株JM105細胞を用いた。

【0425】

図42で示すゲル7のポイント： レーン3-5には、 Ni^{2+} -tacnセファロースTMCL-6Bカラムから回収したGST-CT2試料が添加され、レーン6-8には、 Ni^{2+} -NTAセファロースTMCL-6Bカラムから回収した試料が添加されている。レーン3及び6は、洗浄2のステップに対応し、レーン4及び7は溶出1のステップに対応し、レーン5及び8は、溶出2のステップに対応する。レーン1は、pTrcを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陰性対照、レーン2は、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE.coli JM105から成る陽性対照、レーン9は未精製細胞溶解液である。分子量マーカーはレーン10に示す。

【図43】発現レベルにより選択したクローンから得たN-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-NT1のバッチ精製から回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。細胞溶解液及びバッチ精製より回収した分画を分注した試料(実施例112参照)をSDSローディング緩衝液(還元)

と混合し100℃で90秒間加熱した。およそ10μLの精製分画試料と、5μLのポジティブ及び陰性対照細胞溶解液、及び組換え融合タンパク質を含有する1.25μLの細胞溶解液、及び1μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL, Bethesda, MD, U. S. A)]を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。バンドを可視化するために、泳動に用いたゲルを銀染色した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに結合させた形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに追加的に15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE. coli株JM105細胞を用いた。

【0426】

図43で示すゲル8のポイント：レーン5-7には、Ni²⁺-tacnセファロースTMCL-6Bカラムから回収したGST-NT1試料が添加され、レーン8-10には、Ni²⁺-NTAセファロースTMCL-6Bカラムから回収した試料が添加されている。レーン5及び8は、洗浄2のステップに対応し、レーン6及び9は溶出1のステップに対応し、レーン7及び10は、溶出2のステップに対応する。レーン1は、pTrcを用いて形質転換したE. coli JM105から成る陰性対照、レーン2は、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE. coli JM105から成る陽性対照、レーン3は、未精製細胞溶解液である。分子量マーカーは、レーン4に示す。

【図44】発現レベルにより選択したクローンから得たN-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-NT2のバッチ精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。細胞溶解液及びバッチ精製より回収した分画を分注した試料(実施例113参照)をSDSローディング緩衝液(還元)と混合し100℃で90秒間加熱した。およそ10μLの精製分画試料と、5μLのポジティブ及び陰性対照細胞溶解液、及び組換え融合タンパク質を含有する1.25μLの細胞溶解液、及び1μLの分子量マーカー[BenchMark Protein Ladder (Gibco BRL, Bethesda, MD, U. S. A)]を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、適当な時間、泳動を行った。バンドを可視化するために、泳動したゲルを銀染色した。陽性対照としてpGEX3XGST形質転換体(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた。N-末端にタグを付加させたr-GST融合タンパク質の、r-GSTコンポーネントのC-末端において1アミノ酸が切断されている。元のGSTは、C-末端に14個のアミノ酸をさらに付加した形で全長タンパク質として発現される。その結果として、元のGSTは、C-末端にさらに追加的に15アミノ酸を含有することになり、従って、N-末端タグ付加r-GST融合タンパク質のGSTコンポーネントよりも分子量として約1.65kDa大きい分子の移動度に相当する位置に移動する。陰性対照として、pTrcで形質転換させたE. coli株JM105細胞を用いた。

【0427】

図44で示すゲル8のポイント：レーン5-7には、Ni²⁺-tacnセファロースTMCL-6Bカラムから回収したGST-NT2試料が添加され、レーン8-10には、Ni²⁺-NTAセファロースTMCL-6Bカラムから回収した試料が添加されている。レーン5及び8は、洗浄2のステップに対応し、レーン6及び9は溶出1のステップに対応し、レーン7及び10は、溶出2のステップに対応する。レーン1は、pTrcを用いて形質転換したE. coli JM105から成る陰性対照、レーン2は、pGEX3XGSTを用いて形質転換したE. coli JM105から成る陽性対照、レーン4は、未精製細胞溶解液である。分子量マーカーは、レーン3に示す。

【図45】発現レベルにより選択したクローンから得たN-末端(His)₆-タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-CT1の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例97で記述されているように、GST-CT1を含有する細胞溶解液の段階溶出により得た試料をSDSローディング緩衝液(非還元)と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した分画の最初の1mLから10μLを分注したもの及び2.5μLの細胞溶解液を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-44に対する説明で記述しているように、このゲルに対して適当な時間泳動し、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0428】

図45で示すゲル10のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系(表1)を用いて分画を回収した。レーン1、100mM；レーン3、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM及びレーン10、500mM。細胞溶解液は、レーン2に示す。

【図46】発現レベルにより選択したクローンから得たN-末端(His-Gln)₆-タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-CT2の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例98で記述されているように、GST-CT2を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液(非還元)と混合し、100℃で90秒間加熱した。溶出した分画の最初の1mLから10μLを分注したもの及び2.5μLの細胞溶解液を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-44に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0429】

図46で示すゲル11のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系(表1)を用いて分画を回収した。レーン1、100mM；レーン2、150mM；レーン3、200mM；レーン4、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM及びレーン10、500mM。細胞溶解液は、レーン5に示す。

【図47】高発現レベルを示すことにより選択したクローンから得たN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質、GST-NT1の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例99で記述されているように、GST-NT1を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液(非還元)と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した分画の最初の1mLから10μLを分注したもの及び2.5μLの細胞溶解液を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-44に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、次に、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0430】

図47で示すゲル12のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系(表1)を用いて分画を回収した。レーン2、100mM；レーン3、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM及びレーン10、500mM。細胞溶解液は、レーン1に示す。

【図48】発現レベルに基づいて選択したクローンから得たN-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(r-GST)融合タンパク質GST-NT2の段階的精製から回収した複数の分画のSDS-PAGE解析。実施例100に記載されているように、GST-NT2を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液(非還元)と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した分画の最初の1mLから10μLを分注したもの及び2.5μLの細胞溶解液を12.5%のSDS-ポリアク

10

20

30

40

50

リルアミドゲルに添加した。図35-44に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、次に、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0431】

図48で示すゲル13のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系（表1）を用いて分画を回収した。レーン1、100mM；レーン2、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM及びレーン10、500mM。細胞溶解液は、レーン3に示す。

【図49】発現レベルに基づいて選択したクローンから得たN末端（His）₆タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ（r-GST）融合タンパク質GST-CT1の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例101で記述されているように、GST-CT1を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液（非還元）と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した各分画の最初の1mLからおよそ16μLを分注したもの及び0.5μLの分子量マーカーク BenchMark Protein Ladder（Gibco BRL、Bethesda、MD、U.S.A）を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-44に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、次に、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0432】

図49で示すゲル14のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系（表1）を用いて分画を回収した。レーン2、25mM；レーン3、50mM；レーン4、75mM；レーン5、100mM；レーン6、150mM；レーン7、200mM；レーン8、250mM；レーン9、300mM及びレーン10、350mM。分子量マーカークは、レーン1に示す。

【図50】高発現レベルを示すことにより選択したクローンから得たN-末端（His-Gln）₆-タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ（r-GST）融合タンパク質GST-CT2の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例102で記述されているように、GST-CT2を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液（非還元）と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した各分画の最初の1mLからおよそ16μLを分注したもの及び0.5μLの分子量マーカーク BenchMark Protein Ladder（Gibco BRL、Bethesda、MD、U.S.A）を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-45に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、次に、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0433】

図50で示すゲル15のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系（表1）を用いて分画を回収した。レーン1、25mM；レーン3、50mM；レーン4、75mM；レーン5、100mM；レーン6、150mM；レーン7、200mM；レーン8、250mM；レーン9、300mM及びレーン10、350mM。分子量マーカークは、レーン2に示す。

【図51】発現レベルにより選択したクローンから得たN-末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ（r-GST）融合タンパク質GST-NT1の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例103で記述されているようにGST-NT1を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液（非還元）と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した各分画の最初の1mLからおよそ16μLを分注したもの及び0.5μLの分子量マーカーク BenchMark Protein Ladder（Gibco BRL、Bethesda、MD、U.S.A）とを12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-45に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、次に、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0434】

図51で示すゲル16のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系（表1）を用いて分画を回収した。レーン1、100mM；レーン2、150mM；レーン4、200mM；レーン5、250mM；レーン6、300mM；レーン7、350mM；レーン8、400mM；レーン9、450mM及びレーン10、500mM。分子量マーカーは、レーン3に示す。

【図52】発現レベルにより選択したクローンから得たN末端タグ化組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ（r-GST）融合タンパク質GST-NT2の段階的精製より回収した複数の分画に対するSDS-PAGE解析。実施例104で記述されているように、GST-NT2を含有する細胞溶解液の段階溶出より得た試料をSDSローディング緩衝液（非還元）と混合し100℃で90秒間加熱した。溶出した各分画の最初の1mLから16μLを分注したもの及び0.5μLの分子量マーカー[Benchmark Protein Ladder (Gibco BRL, Bethesda, MD, U.S.A)]を12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した。図35-45に対する説明で記述しているように、このゲルを適当な時間泳動し、次に、バンドを可視化するためにゲルを銀染色した。

【0435】

図52で示すゲル17のポイント：次に挙げる濃度のイミダゾールを添加した緩衝液A系（表1）を用いて分画を回収した。レーン1、50mM；レーン2、75mM；レーン3、100mM；レーン5、150mM；レーン6、200mM；レーン7、250mM；レーン8、300mM；レーン9、350mM及びレーン10、400mM。分子量マーカーは、レーン4に示す。

【図53】スペクトル1：非-DAP-1-処理GST(FL)-CT2融合タンパク質に対するMALDI-TOF MSスペクトル、即ち、陰性対照。これは、単一のピーク（1と表示されているもの）を示し、 $[M+H]^+$ 値は $28,013 \pm 3.21$ Daである。GST(FL)-CT2の予想される理論上の同位体分子質量は $28,007.3$ Daである。このように、これらを比較すると、実測分子質量は、インタクトなGST(FL)-CT2タンパク質の予想値と一致する。スペクトル2：DAP-1-消化したGST(FL)-CT2に対して得られたMALDI-TOF MSスペクトルである。このスペクトルは、DAP-1で2時間処理を行った後、分子質量が低下したことを表す。スペクトル2は、 $[M+H]^+$ 値の平均値が $26,154 \pm 6$ Daであるメジャーピーク（2a）及び、 $[M+H]^+$ 値の平均値が $25,931 \pm 7.51$ Daであるマイナーピーク（2b）を示す。

【図54】スペクトル1：DAP-1-非処理GST(FL)-NT1融合タンパク質（即ち、陰性対照）に対するMALDI-TOF MSスペクトル。これは、単一のピーク（1と表示されているもの）を示し、 $[M+H]^+$ 値は $27,972 \pm 3.51$ Daである。GST(FL)-NT1の予想される理論上の分子質量が $27,965.3$ Daであることと比較すると、実測質量が、インタクトなGST(FL)-NT1タンパク質の予想値と一致する。スペクトル2：DAP-1-消化（2時間）したGST(FL)-NT1に対して得られたMALDI-TOF MSスペクトルである。このスペクトルは、DAP-1を用いて2時間処理を行った後に分子質量が低下していることを表す。スペクトル2は、 $[M+H]^+$ 値の平均値が $26,659 \pm 6.81$ Daであるメジャーピーク（2a）を示す。また、 $[M+H]^+$ 値の平均値が $25,934 \pm 3.21$ Daであるマイナーピーク（2b）及び $[M+H]^+$ 値の平均値が $25,680 \pm 6.03$ Daであるさらにマイナーピーク（2c）をも示す。

【図55】スペクトル1：DAP-1-非処理GST(FL)-NT2融合タンパク質に対するMALDI-TOF MSスペクトル、即ち、陰性対照。これは、単一のピーク（1と表示されているもの）を示し、 $[M+H]^+$ 値は $28,223 \pm 2.89$ Daである。GST(FL)-NT2の予想される理論的分子質量が $28,218.6$ Daであることと比較して、実測された理論上の分子質量はこのように、インタク

10

20

30

40

50

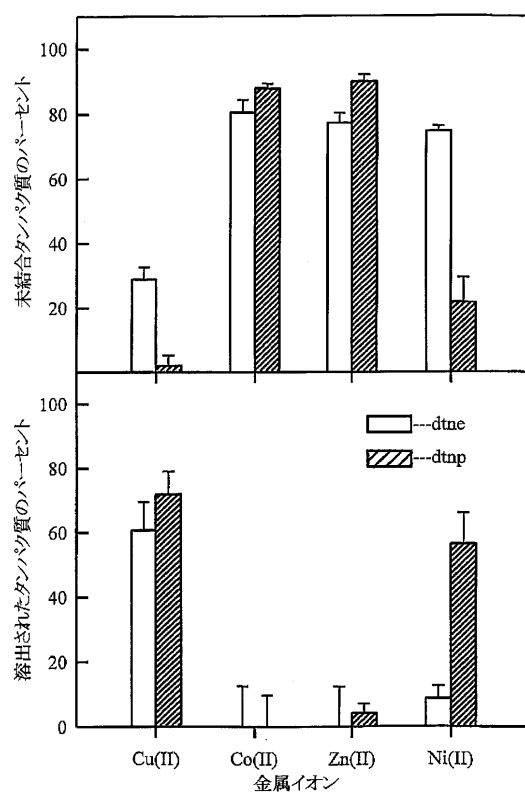
トなGST (FL) -NT2タンパク質の値と一致する。スペクトル2：DAP-1-消化(2時間)したGST (FL) -NT2に対して得られたMALDI-TOF MSスペクトルである。このスペクトルは、DAP-1で2時間処理を行った後に分子質量が低下していることを表す。スペクトル2は、 $[M+H]^+$ 値の平均値が25,910 $\pm$ 9,16 Daltonであるメジャーピーク(2a)及び $[M+H]^+$ 値の平均値が25,648 $\pm$ 12,86 Daltonであるマイナーピーク(2b)を示す。

【図56】ゲルのポイント： レーン4、DAP-1処理前のGST (FL) -CT2；レーン5、DAP-1処理後のGST (FL) -CT2；レーン6、DAP-1処理前のGST (FL) -NT1；レーン7、DAP-1処理後のGST (FL) -NT1；レーン8、DAP-1処理前のGST (FL) -NT2；レーン9、DAP-1処理後のGST (FL) -NT2。レーン1、3及び10は、試料を添加しなかった。分子量マーカーはレーン2に示す。

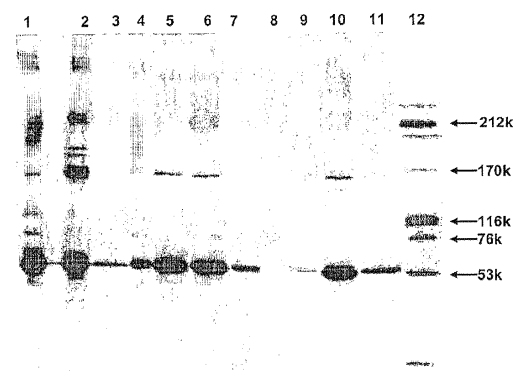
10

【図57】ゲルのポイント： レーン2、 Ni^{2+} -tacnカラムで精製したGST-CT1；レーン3、 Ni^{2+} -tacnカラムで精製したGST-CT2；レーン4、 Ni^{2+} -tacnカラムで精製したGST-NT1；レーン5、 Ni^{2+} -tacnカラムで精製したGST-NT2；レーン6、 Cu^{2+} -tacnカラムで精製したGST-CT1；レーン7、 Cu^{2+} -tacnカラムで精製したGST-CT2；レーン8、 Cu^{2+} -tacnカラムで精製したGST-NT1；レーン9、 Cu^{2+} -tacnカラムで精製したGST-NT2。分子量マーカーはレーン1に示す。

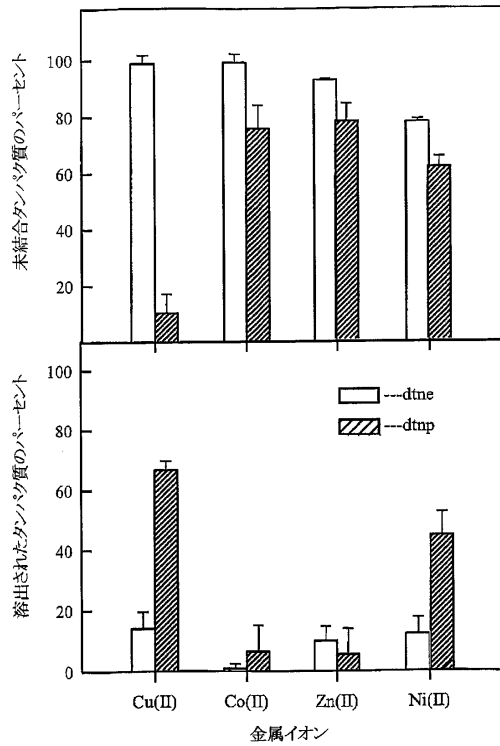
【図1】



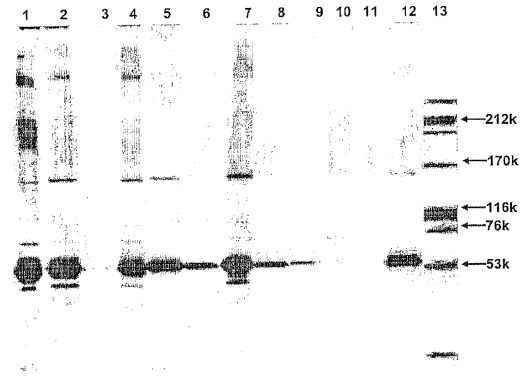
【図2】



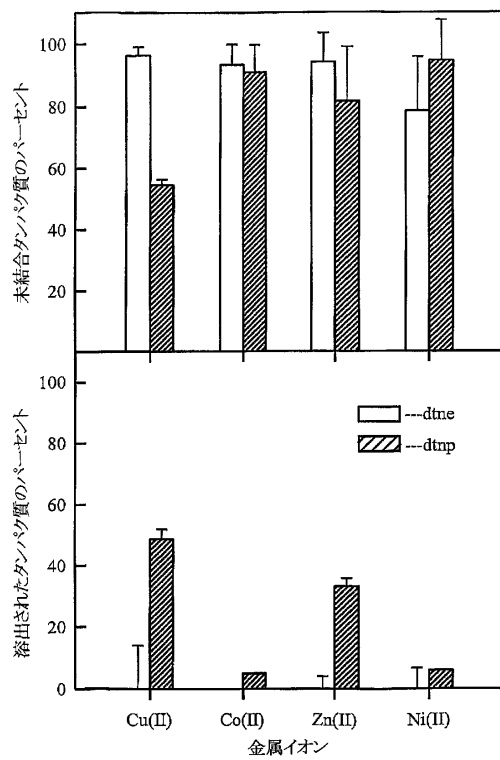
【図 3】



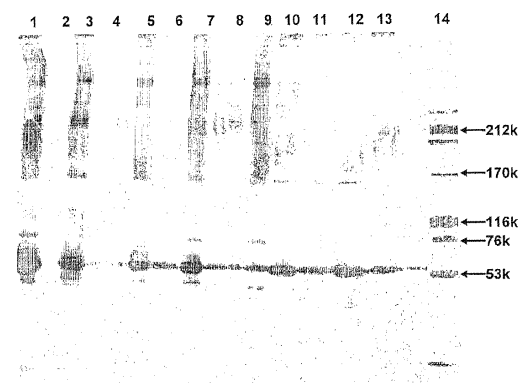
【図 4】



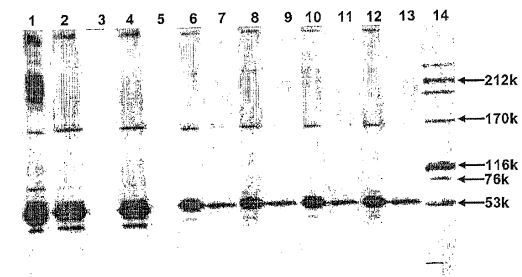
【図 5】



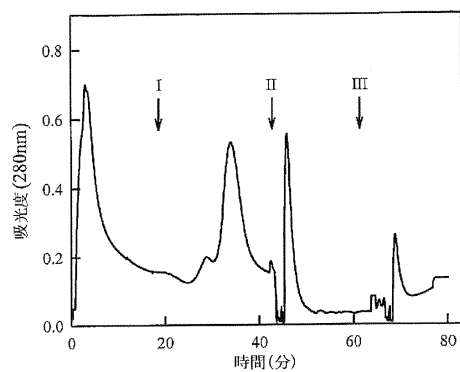
【図 6】



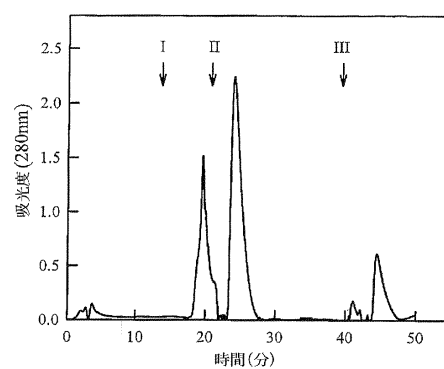
【図 7】



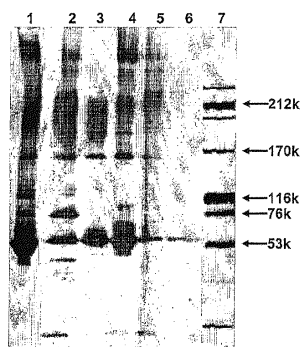
【図 8】



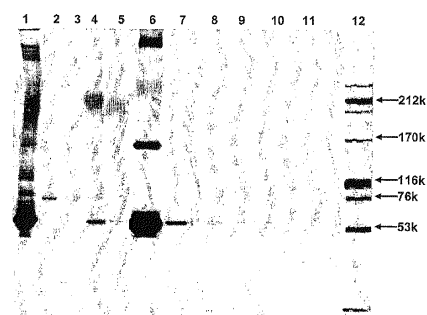
【図 10】



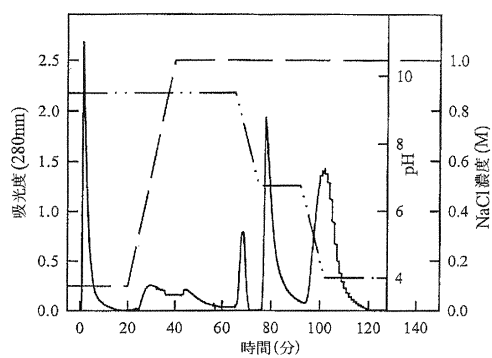
【図 9】



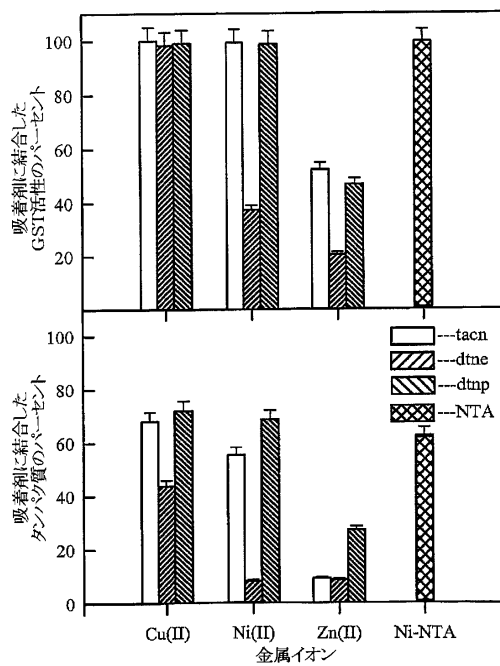
【図 11】



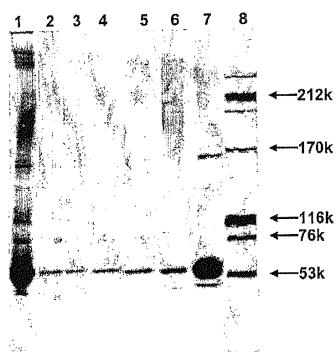
【図 12】



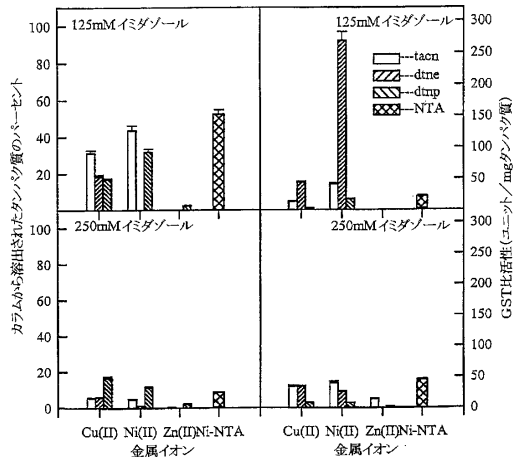
【図 14】



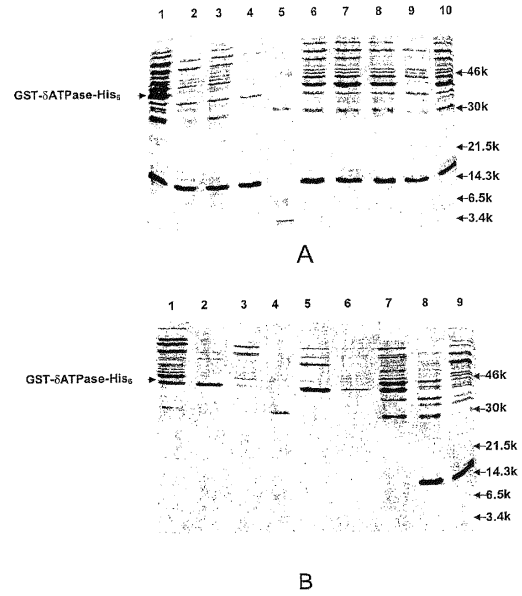
【図 13】



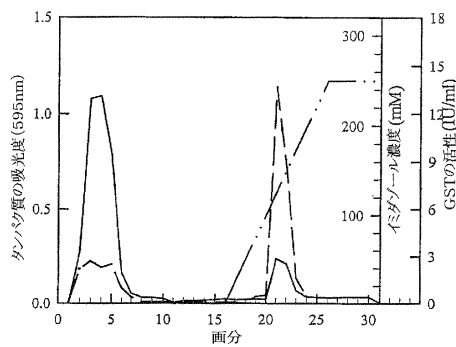
【図 15】



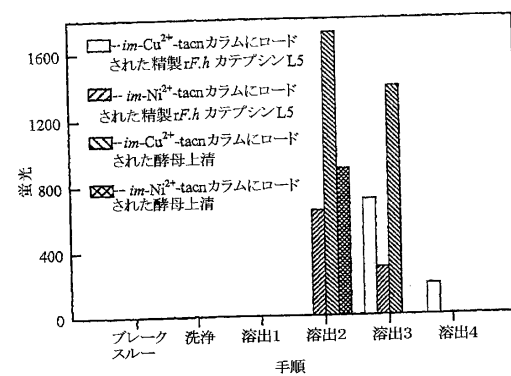
【図 16】



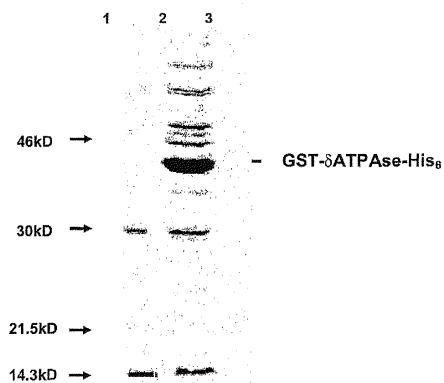
【図 17】



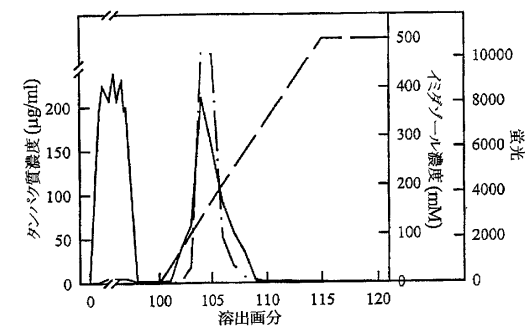
【図 19】



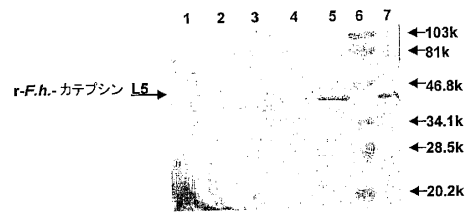
【図 18】



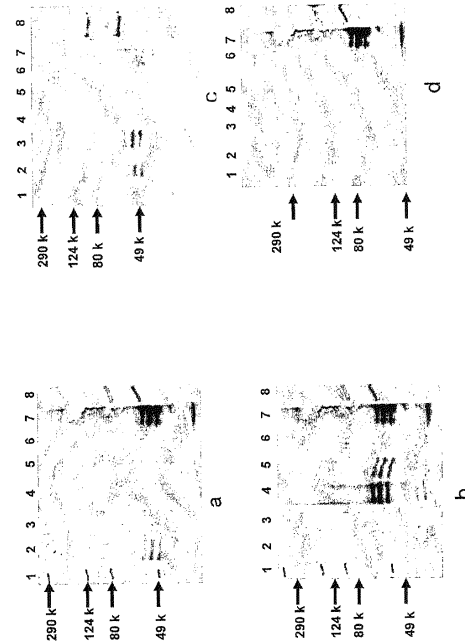
【図 20】



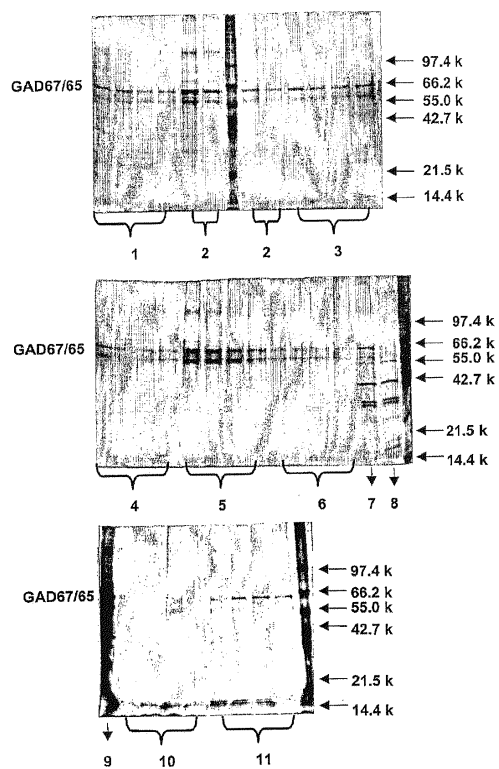
【図 2 1】



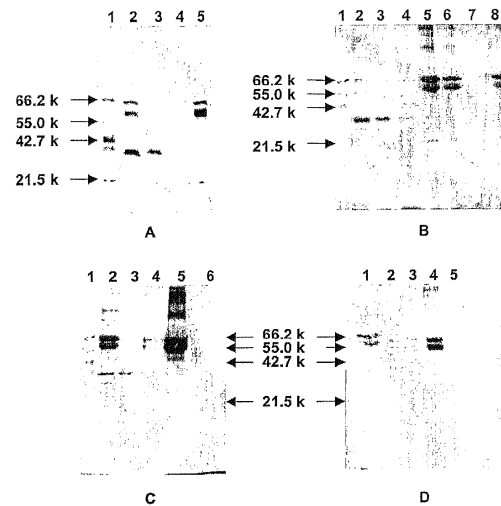
【図 2 2】



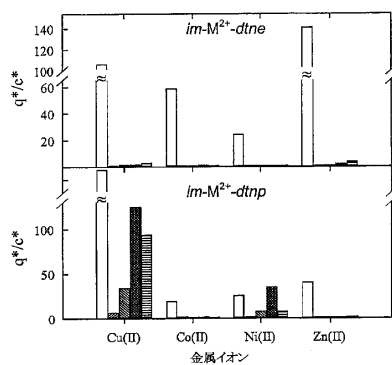
【図 2 3】



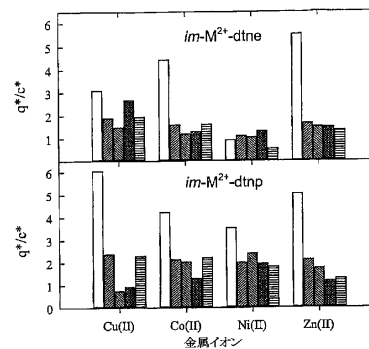
【図 2 4】



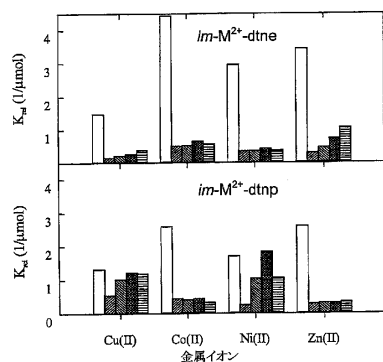
【図 25】



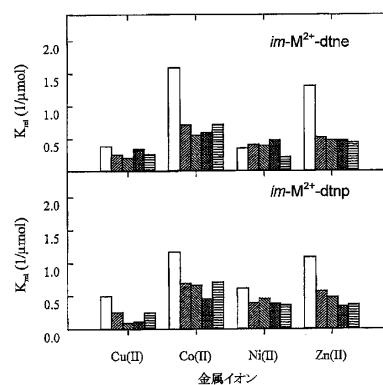
【図 27】



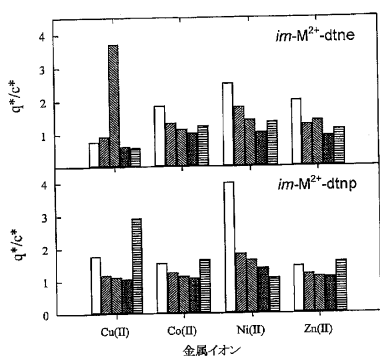
【図 26】



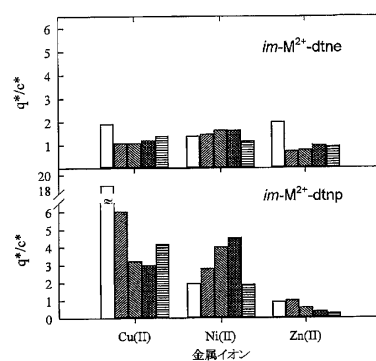
【図 28】



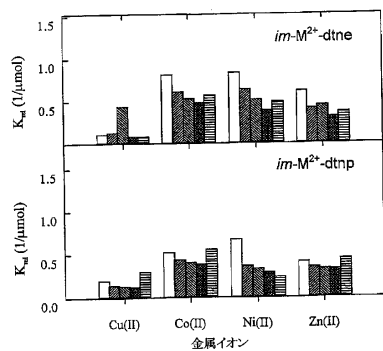
【図 29】



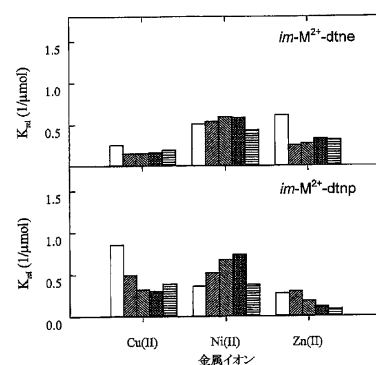
【図 31】



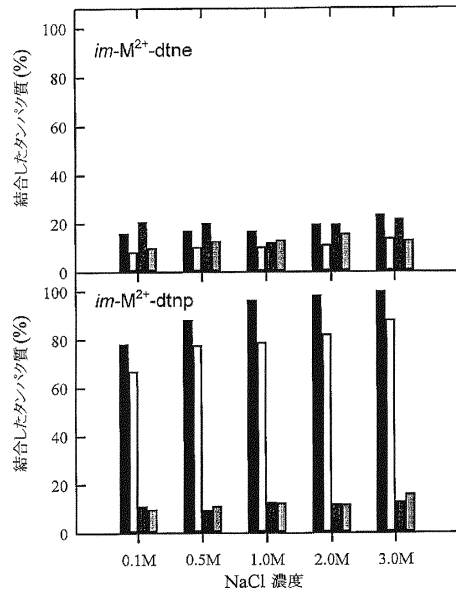
【図 30】



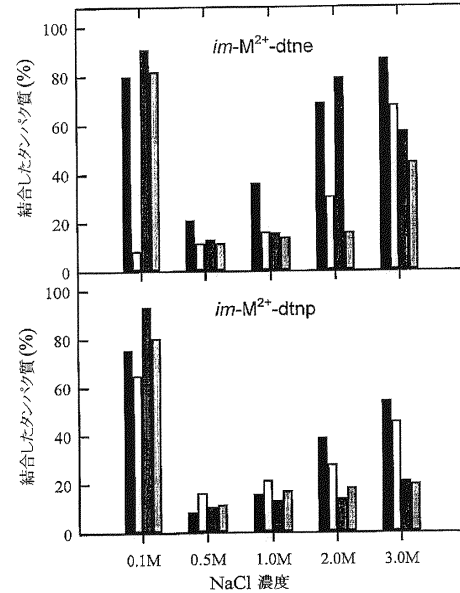
【図 32】



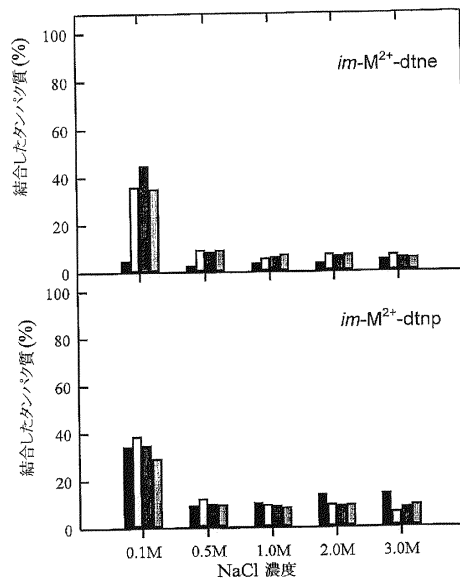
【図 3 3】



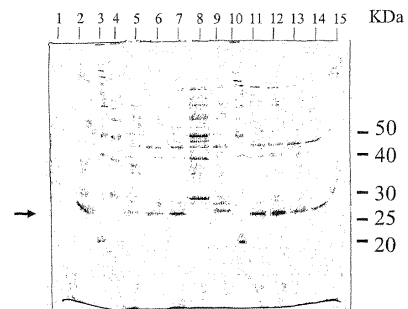
【図 3 4】



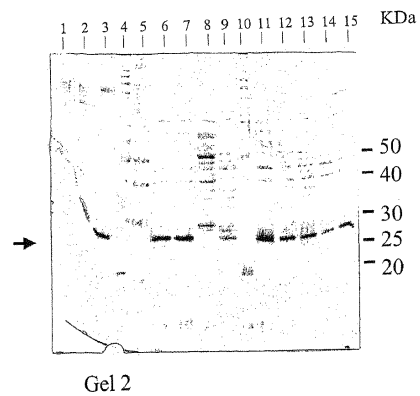
【図 3 5】



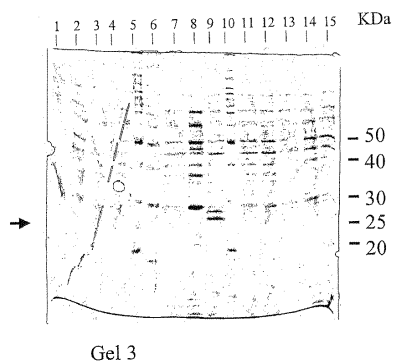
【図 3 6】



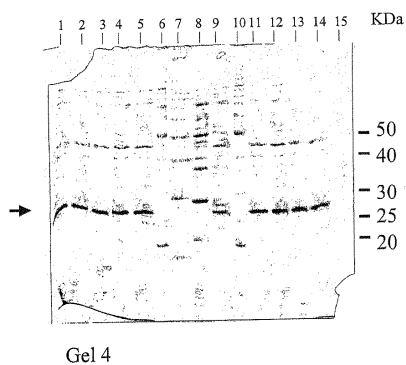
【図 3 7】



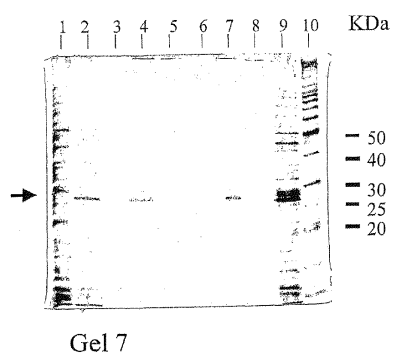
【図 3 8】



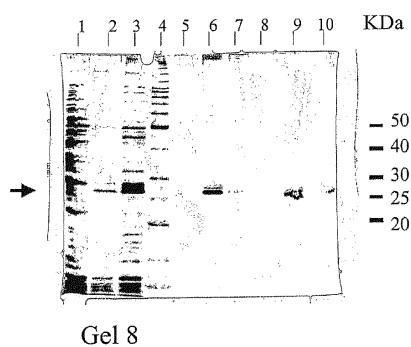
【図 3 9】



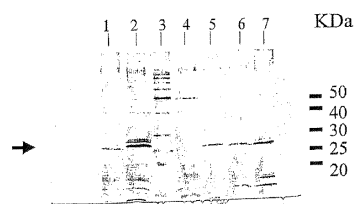
【図 4 2】



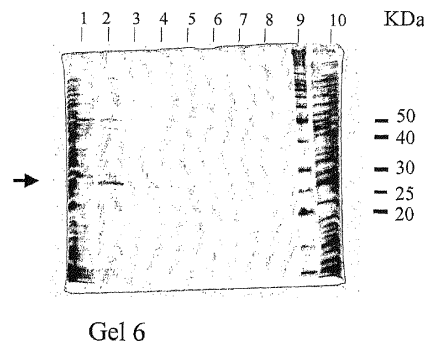
【図 4 3】



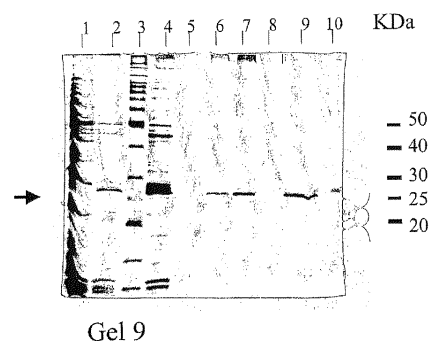
【図 4 0】



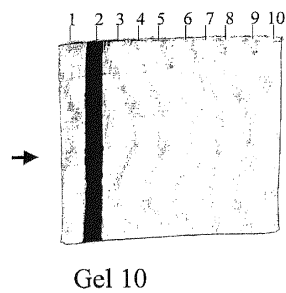
【図 4 1】



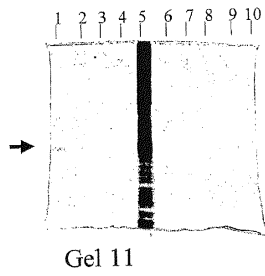
【図 4 4】



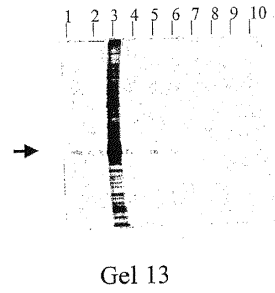
【図 4 5】



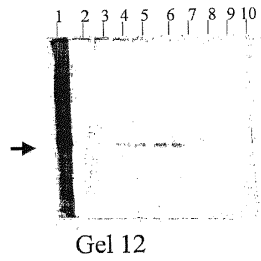
【図 4 6】



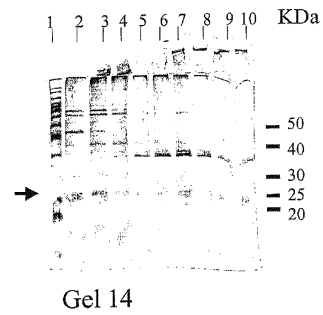
【図 4 8】



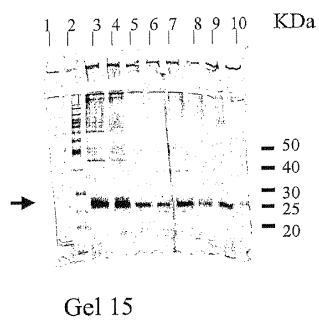
【図 4 7】



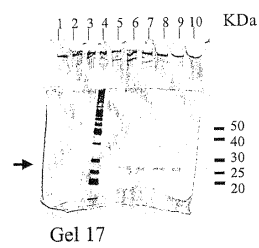
【図 4 9】



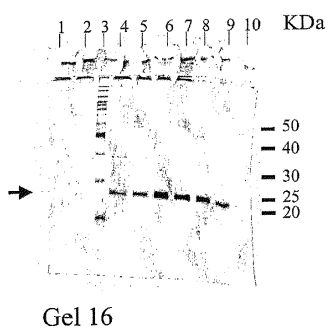
【図 5 0】



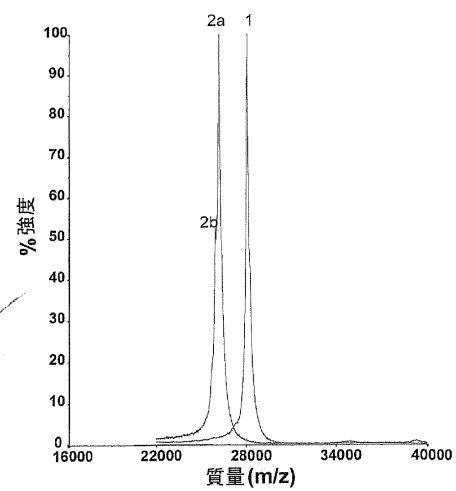
【図 5 2】



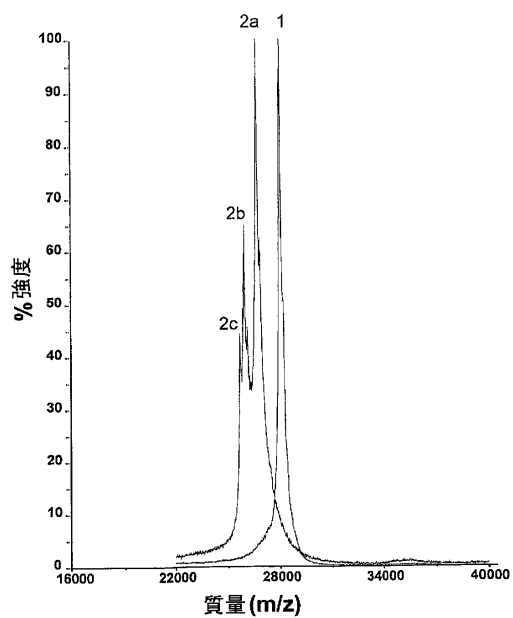
【図 5 1】



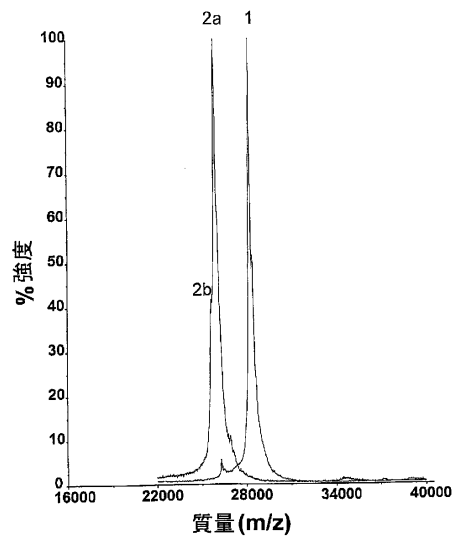
【図 5 3】



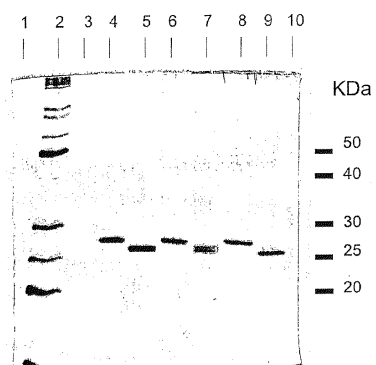
【図 5 4】



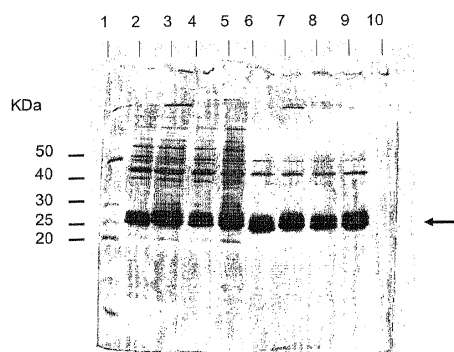
【図 5 5】



【図 5 6】



【図 5 7】



【配列表】

0004988694000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100100952
弁理士 風間 鉄也
- (72)発明者 ソーキルド・クリステンセン
デンマーク国、ディーケー ー 3 4 5 0 アレロッド、ベリスベイ 5 5
- (72)発明者 ミルトン・トーマス・ウィリアム・ハーン
オーストラリア国、ビクトリア 3 1 0 3、バルウィン、ユニオン・ロード 2 6 3
- (72)発明者 レオネ・スピッシア
オーストラリア国、ビクトリア 3 1 5 0、ウィーラーズ・ヒル、ラファエル・ドライブ 5 6
- (72)発明者 ウェイ・ジャン
オーストラリア国、ビクトリア 3 1 6 8、クレイトン、ベッドー・アベニュー 2 / 1 1
- (72)発明者 ジェーン・ゼアス・ムーネイ
オーストラリア国、ビクトリア 3 1 6 6、ヒュースデール、ダーンブラネ・ストリート 1 4
- (72)発明者 ビムビル・グラハム
オーストラリア国、ビクトリア 3 0 7 0、ノースコト、ゴードン・ストリート 1 4

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 Anal.Chem.,2001 Nov 1,73(21),p.5116-25
Biotechnol Prog.,2000 Jan-Feb,16(1),p.86-91
J Chromatogr A.,2000 Nov 10,898(1),p.83-94

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
UniProt/GeneSeq
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)
CAplus (STN)
WPI