(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2007-267751
(P2007-267751A)
(43)公開日　平成19年10月18日(2007.10.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		4B064
C07K 17/14	(2006.01)	C07K	17/14		4H045
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	S	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	

審査請求 有　請求項の数 10　ＯＬ　（全 106 頁）

(21)出願番号　特願2007-151814 (P2007-151814)
(22)出願日　平成19年6月7日 (2007.6.7)
(62)分割の表示　特願2005-105155 (P2005-105155)の分割
原出願日　平成17年3月31日 (2005.3.31)
(31)優先権主張番号　特願2004-108388 (P2004-108388)
(32)優先日　平成16年3月31日 (2004.3.31)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

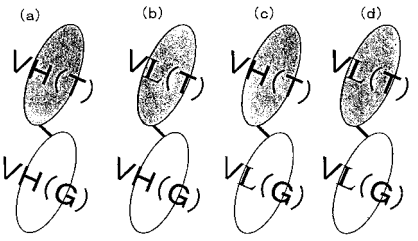
（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．テフロン

(71)出願人　000001007
キヤノン株式会社
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号
(74)代理人　100123788
弁理士　宮崎　昭夫
(74)代理人　100106138
弁理士　石橋　政幸
(74)代理人　100127454
弁理士　緒方　雅昭
(72)発明者　塩塚　秀則
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号　キヤノン株式会社内
(72)発明者　今村　剛士
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号　キヤノン株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】標的物質捕捉構造体

(57)【要約】
【課題】微細構造体において金と目的物質との結合に利用し得る、金と特異的に結合可
能な金結合性のタンパク質、かかるタンパク質をする複合タンパク質、及びこれらの標的
物質の検出への利用のための技術を提供すること。
【解決手段】抗金抗体またはその一部の金結合性部分を用いたタンパク質を構成する。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
金に対して結合性を有するタンパク質であって、前記タンパク質は抗体の少なくとも一部を含んでなることを特徴とするタンパク質。
【請求項２】
前記抗体の少なくとも一部を含む金結合部位を有する請求項１に記載のタンパク質。
【請求項３】
前記金結合部位が、Ｆ（ａｂ'）２、Ｆａｂ'、Ｆａｂ及びこれらの一部から選択された少なくとも１種を含んでなる請求項２に記載のタンパク質。
【請求項４】
前記金結合部位が、抗体可変領域（Ｆｖ）及びその一部から選択された少なくとも１種を含んでなる請求項２に記載のタンパク質。
【請求項５】
前記金結合部位が、
（１）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、その変異体及びこれらの一部、並びに
（２）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）、その変異体及びこれらに一部
から選択された少なくとも１種を含んでなる請求項４に記載のタンパク質。
【請求項６】
前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）が、配列番号：１～４８のアミノ配列の少なくとも一つを含んでなる請求項５記載のタンパク質。
【請求項７】
前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）の変異体が、配列番号：１～４８のアミノ配列の一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含み、金結合性を有している請求項４記載のタンパク質。
【請求項８】
前記抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が、配列番号：４９～５７のアミノ配列の少なくとも一つを含んでなる請求項５に記載のタンパク質。
【請求項９】
前記抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）の変異体が、配列番号：４９～５７のアミノ配列の一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含み、金結合性を有している請求項５記載のタンパク質。
【請求項１０】
解離定数が10^{-6}M以下である請求項１乃至５のいずれかに記載のタンパク質。
【請求項１１】
金結合性複合タンパク質であって、
（１）請求項１～１０のいずれかに記載の金に対して結合性を有するタンパク質を含む第一のドメインと、
（２）特定の物質に対する結合部位を有するタンパク質を含む第二のドメインと、
を有することを特徴とする金結合性複合タンパク質。
【請求項１２】
前記第一のドメインと複合体を形成する第三のドメイン及び前記第二のドメインと複合体を形成する第四のドメインの少なくとも一方を更に有する請求項１１記載の金結合性複合タンパク質。
【請求項１３】
前記第三のドメインが金結合性を有し、請求項１～１０のいずれかに記載のタンパク質を含む請求項１２記載の金結合性複合タンパク質。
【請求項１４】
以下の構造（１）～（７）のいずれかを含む請求項１３または１４に記載の金結合性複合タンパク質。
（１）前記第一のドメインと前記第二のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している

。
（２）前記第一のドメインと前記第二のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合してい
（３）前記第三のドメインと前記第四のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している
。
（４）前記第三のドメインと前記第四のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合してい
る。
（５）少なくとも前記第一のドメイン、第二のドメイン及び第三のドメインが一つのポリ
ペプチド鎖を形成している。
（６）少なくとも前記第一のドメイン、第二のドメイン及び第四のドメインが一つのポリ
ペプチド鎖を形成している。
（７）前記第一乃至第四のドメインの全てが一つのポリペプチド鎖を形成している。
【請求項１５】
基体とタンパク質を有する構造体であって、前記基体が表面の少なくとも一部に金を含み、前記タンパク質が請求項１１～１４のいずれかに記載された金結合性複合タンパク質であることを特徴とする構造体。
【請求項１６】
前記第二及び第四の少なくとも一方が、標的物質に対する結合性を有する請求項１５に記載の構造体。
【請求項１７】
請求項１１乃至１４のいずれかに記載の金結合性複合タンパク質をコードする核酸。
【請求項１８】
請求項１７記載の核酸を含むベクター。
【請求項１９】
請求項１５または１６に記載の構造体の製造方法において、
（１）前記基体を準備する工程、
（２）前記金結合性複合タンパク質を生成する工程、及び
（３）前記基体に前記金結合性複合タンパク質を配置する工程
を有することを特徴とする構造体の製造方法。
【請求項２０】
前記金結合性タンパク質の生成が、請求項１８記載のベクターを宿主細胞に導入することにより前記金結合性タンパク質を含むポリペプチド鎖を発現させることにより行なわれる請求項１９に記載の構造体の製造方法。
【請求項２１】
標的物質を検出するための検出用キットであって、請求項１５に記載の構造体を形成するための基体及び金結合性複合タンパク質と、該構造体への標的物質の結合を検出するための検出手段と、を有することを特徴とする標的物質検出用キット。
【請求項２２】
標識物質により標的物質を標識するための接続部材であって、
前記標的物質を結合する部位と前記標識物質を結合する部位をそれぞれ一以上有し、
これらの部位は互いに独立して被結合物質と結合し、
前記標識物質を結合する部位または前記標的物質を結合する部位の少なくとも１つが請求項１～１１のいずれかに記載のタンパク質を含む
ことを特徴とする接続部材。
【請求項２３】
前記標識物質または前記標的物質が金を含む金属、金属酸化物及び半導体化合物の少なくとも一以上を有する特徴とする請求項２２に記載の接続部材。
【請求項２４】
標的物質を標識物質に結合して標識し、該標識物質が結合した標的物質を検出することによる標的物質の検出方法において、
前記標識物質を請求項２２に記載の接続部材を介して前記標的物質に結合する工程と有

することを特徴とする標的物質の検出方法。
【請求項２５】
標的物質を検出するためのキットであって、
金を含む標識物質と、請求項２２に記載の接続部材と、標的物質に該標識物質が該接続部材を介して結合した状態を検出するための検出手段と、を有することを特徴とするキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、金結合性タンパク質、金結合性タンパク質を含む複合タンパク質、及びこれらの標的物質検出のための用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年の半導体微細加工技術の向上にともなうデバイスの小型化により、半導体産業は大きく発展してきた。リソグラフィーに代表される微細加工技術は、現在ではその加工精度は数百ナノメートルに達している。それらを応用した材料・デバイスの活躍の場は広く、光、電気等の通信、バイオ、エネルギーなど幅広い分野で期待されている。しかしながら、現在の微細加工技術の延長上で１００ナノメートル以下の加工を考えた場合、技術的な課題に加え、加工に要する時間及びコストと産業上で利用する上では課題が多く、適用可能な分野の広がりに応じて、これらに代わる新しい精密構造作製技術が切望されている。
【０００３】
このような中、従来のトップダウン方式の加工技術に代わり、原子や分子レベルで制御し、所望の構造と特性を作り込むボトムアップ方式による新規材料に向けた研究開発が活発におこなわれている。ボトムアップ式の精密構造作製技術の一例としては、金属表面上で分子配列制御した分子デバイスの開発等が挙げられ、そのような分子配列制御技術のひとつとして、物質が持つ自己組織化を利用した方法の利用が検討されている。最近の検討例としては、Ｌｉｎｄｓａｙら（Ｓｃｉｅｎｃｅ、３００：ｐ１４１３、２００３）は分子末端にチオール基を有するアルカンチオール及びアルカンジチオールを金基板上に配向させた自己組織化膜を用いて分子スィッチング機能の検討をおこなっている。
【０００４】
核酸、タンパク質に代表される生体分子は、その機能を発揮する為に原子レベルで制御された精密な構造を構築することが知られている。そのような生体分子の特性を利用し、生体分子を金属または金属酸化物、半導体上に配置した種々のデバイスへの生体分子の応用の検討も考えられている。このようなデバイス開発をするための第一段階として、生体分子を基板上に配置する微小な構造体を作製する技術が重要となる。例えば、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）や、各種の機能を有するアミノ酸配列を有するペプチドの金基板上における固定化を考えた場合、ＤＮＡ、ペプチドは化学的に合成することが可能であり、その際にこれらの物質の末端をチオール基（－ＳＨ）で化学修飾することにより、Ｓ－Ａｕ表面吸着を利用して金基板上にこれらの物質が配位することが広く知られている。これを利用してＤＮＡ、またはペプチドを金上に固定化した実験系及びデバイス化検討が行われている。
【０００５】
一方、酵素、抗体などの機能を有するタンパク質は高分子量を有し、このような高分子量の化合物を高次構造形成し、且つ機能を発揮するように化学的に合成することは大変難しく、現在も色々と検討が行われているが機能と高次構造を持ち合わした機能性タンパク質を合成するまでには未だ到達していない場合が多いのが実情である（Ｓｃｉｅｎｃｅ、３０２：ｐ１３６４、２００３）。機能性タンパク質を基板材料へ固定化する場合、基板との結合には、基板側をシランカップリング剤に代表される種々の表面処理剤で処理し、タンパク質側に前記表面処理面と結合できる官能基を導入することが一般的に行われている（Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、３：ｐ２５４、２００３）。しかしながら、このような機能

性タンパク質への反応性官能基の導入は、化学修飾によって行われることが一般的であり、非選択的に導入部位が決定されるために機能性タンパク質の機能発現部位を修飾されることで機能し難い形状で基板上に固定化され、得られる活性が低下する可能性があることが指摘されている。

【０００６】

遺伝工学的手法による結合部位をタンパク質に導入した融合タンパクを作製することも可能である。一例としては、低分子化合物であるビオチンと結合することが知られている（ストレプト）アビジンの全部もしくはビオチン結合部位を所望のタンパク質のＮ末端、Ｃ末端に遺伝子工学的に導入し、融合タンパク質として発現させ、所望の基板表面に配置したビオチンを介することによって固定化する方法が知られている。

【０００７】

また、最近では固定化する基板材料と結合できる５以上のアミノ酸からペプチドを取得し、所望のタンパク質と融合し融合タンパクを作製し、基材に結合、固定化させる技術が開示されている。Ｂｅｌｃｈｅｒらは、ファージディスプレー法によりＧａＡｓのある結晶面を特異的に認識できる１２アミノ酸からなるペプチドを開示し（Ｎａｔｕｒｅ、４０５：ｐ６６５、２０００）、生体材料の自己組織化能を用いたデバイス検討の新たな可能性を示した。更には、他の半導体（ＰｂＳ、ＣｄＳ）などに対する７乃至１４アミノ酸からなるペプチドのアミノ酸配列を開示している（ＷＯ０３／０２９４３１）。また、Ｂｒｏｗｎらにより、１４残基からなるアミノ酸配列を単位とする繰り返し構造を有するペプチドが金に対して親和性を示した幾つかのアミノ酸配列を開示している（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５：ｐ２６９、１９９７）。その他、これまでに金属（Ａｕ、Ｐｔ、Ｐｄ、Ａｇ）、金属酸化物（SiO_2、ＺｎＯ、Cr_2O_3、Fe_2O_3）、半導体に対する親和性ペプチドは前記ファージディスプレー法などにより多数取得されている。

【０００８】

このような基板材料親和性ペプチドを介して、所望の生体分子を基板上に固定化することにより生体分子間または異なる物質に対する相互作用により自己組織化的に、所望の機能・形状を周期的に有する構造体を構築することも可能である。例えば、前記Ｂｅｌｃｈｅｒらは、ＺｎＳ粒子と結合したＺｎＳ親和性ペプチドを提示したＭ１３ファージが自己組織化により配向することにより、液晶様フィルムを作製する技術を開示している（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９６：８９２、２００２）。

【０００９】

更に、上記のように、遺伝子工学的に、基板結合性部位を融合した所望の機能性タンパク質を作製することにより、機能性タンパク質の基板固定化を機能部位以外の所望の部位に設定して行うことが可能となることが幾つかの技術例よって示されている。しかしながら、基板材料親和性ペプチドを直接または数個のアミノ酸からなるリンカーを介して機能性タンパク質末端に連鎖して、固相（例えば基板）に結合させ、タンパク質の固定化を試みる場合、機能性タンパク質の活性部位（例えば、抗体の抗原結部位を構成する幾つかのアミノ残基）が基板に近接し、基板表面からの何らかの相互作用（例えば、静電作用等）を受け構造変化等が生じ、十分に所望の機能を発揮できない恐れがある。また、リンカーを更に長く設定した場合においても、リンカーとなるペプチドの分子運動の自由度が高いと機能性部位に近接に配置され、その機能を阻害することも考えられる。

【００１０】

上記のことから、本発明者らは機能性タンパク質リンカーを始めとする機能性高分子材料を固定化する基材結合部位は、固定化するタンパク質の所望の活性を阻害することなく、基板から一定の距離を確保するスペーサーとなる構造部分（足場構造）と基板と結合する部位を有することが必要であるという考えに至った。

【００１１】

このような足場構造を有する分子認識分子として、抗体が最もよく知られている。抗体は、動物が自らの体液中に侵入する様々な異物に対して、その異物表面の種々の構造を認

識して特異的に結合させ、その免疫系により無毒化させる自己防御機構の中で機能するタンパク質の一つである。その抗体の多様性（様様な異物に結合する為の違ったアミノ酸配列を持つ抗体数）は、動物個体あたり10^7乃至10^8種と見積もられている。その構造は長短二本ずつのポリペプチド鎖から形成され、長いポリペプチド鎖を重鎖、短いポリペプチド鎖を軽鎖とそれぞれ呼ばれる。

【００１２】

これら重鎖及び軽鎖はそれぞれ可変領域と定常領域を有している。軽鎖は、一つの可変領域（ＶＬ）および一つの定常領域（ＣＬ）の二ドメインから構成されるポリペプチド鎖であり、一方で重鎖は一つの可変領域（ＶＨ）と三つの定常領域（ＣＨ１乃至ＣＨ３）の四ドメインから構成されるポリペプチド鎖である。上記各々のドメインは、アミノ酸約１１０個からなり筒状の構造をとり、逆平行の向きに配置されたβシート群による層状構造が形成され、この層状構造をひとつのＳＳ結合により結合し、非常に安定した構造体を形成している。また、抗体の多様な抗原種への結合は前記可変領域（ＶＨまたはＶＬ）がそれぞれ有する三つの相補的決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ：ＣＤＲ）のアミノ酸配列の多様性に起因するものであることが知られている。前記ＣＤＲは、ＶＨまたはＶＬにそれぞれ３つあり、フレームワーク領域により分離されて配置され、対象となる認識部位の官能基の空間配置を認識することにより、より高度な特異的な分子認識を可能としている。

【００１３】

上記ＣＤＲの多様性は、骨髄幹細胞が抗体産生細胞であるＢリンパ細胞へ分化する際に、抗体遺伝子座で生じるＤＮＡ再編成に発揮される。重鎖ではＶＨ遺伝子断片、Ｄ遺伝子断片、ＪＨ遺伝子断片から構成され部分、軽鎖ではＶλまたはＶκ遺伝子断片、ＪλまたはＪκ遺伝子断片から構成される部分でＤＮＡ再編成を起こすことによって生じることが知られている。このようなＤＮＡ再編成はＢ細胞毎に独立に起こるため、ひとつのＢ細胞は１種類の抗体しか産生しない。しかし、個体内においてのＢ細胞全体では、多様な抗体の産生が可能となる。

【００１４】

上記のような特定物質に結合することのできる抗体は、従来、上記のように動物が有する免疫系における抗体産生機構を利用して人為的に作製され、様様な産業分野で利用されている。作製方法の一例としては、目的の抗原物質をアジュバンドと共に被免疫動物（ウサギ、ヤギ、マウス等）に一定間隔で免疫し、その血清中に損じする抗体を回収する方法がある。このようにして得られた抗体は、免疫に用いた抗原物質の表面には様々な構造を認識する複数の抗体の混合物である。このようにひとつの抗原に結合する複数の抗体を含む血清はポリクロナール抗体と呼ばれる。

【００１５】

一方、被免疫動物の脾臓には目的の抗原と結合する抗体を産生する多種のＢリンパ球が存在している。このような抗体産出Ｂ細胞を株化した腫瘍細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を作製する。前記のように一つのＢリンパ球は一種類の抗体を産出するものである。一種類の抗体を産出するＢ細胞を永代培養できる系を確立されている。このように作製された抗体は、モノクロナール抗体と呼ばれる。

【００１６】

前記抗体の構造を足場として用いた分子認識構造体として、特開平０５－０５５５３４号公報において、二つの異なる抗原を認識する多重結合性抗体及びそれを用いた多重膜形成方法が開示されている。この技術によれば、第一の抗原と第二の抗原を認識する融合抗体を得ることができる。更に、基板表面に、第一の抗原、前記融合抗体、第二の抗原を順次配置することにより、化学的な修飾をすることなく多重膜を形成できる。しかしながら、開示されている融合抗体を得るためには、動物細胞を用いる必要があり、コスト面及び作業煩雑さという点で問題がある。更に、多層膜を形成する場合においては基板表面上に予め前記融合タンパクが認識可能な抗原を配置する工程を設けなければならない。

【００１７】

上記抗体をある種のタンパク質分解酵素で処理して得られる抗体断片、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）２も親となる抗体と同様の抗原に対して結合能を持つことが知られている。

【００１８】

上記ＶＨ、ＶＬまたはそれらの複合体であるＦｖ、更には前記ＶＨまたはＶＬからなる複合体において、一方のカルボキシ末端と他方のアミノ末端数個のアミノ酸からなるペプチドを介して連結した一本鎖Ｆｖ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ：ｓｃＦｖ）等も同様にして親抗体と同様の抗原に対して結合性を示すことが知られている。

【００１９】

Ｓｋｅｒｒａ及びＢｅｔｔｅｒは、遺伝工学的な方法によって分泌シグナル配列をＮ末端に付加したＦａｂ型とＦｖ型抗体断片を大腸菌による抗体遺伝子の発現する方法を開示している（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：ｐ１０３８、１９８８）、（Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４０：ｐ１０４１、１９８８）。また、特表平０７－５０１４５１号公報において多価抗原結合タンパク質及びその製造方法、特表平０８－５０４１００号公報においては多価、及び多重特異性結合タンパク質及びその製造方法に関する技術をそれぞれ開示している。この二つの技術において、結合性タンパク質は一以上の抗原に結合する抗体可変領域部（ＶＨ及び／またはＶＬ）を含んでなるタンパク質であることを開示している。特表平０７－５０１４５１号公報においては、バンカルシノーマ抗原ＴＡＧ－７２、フルオレセインにそれぞれ認識する結合タンパク及びこれらを認識する二重特異性結合性タンパク質の構成、及びアミノ酸配列更にはそれらをコードする塩基配列を開示している。特表平０８－５０４１００号公報においては、実施例において特表平０８－５０４１００号にかかる出願の出願時において既知のタンパク質（細胞膜タンパク、癌抗原ＣＥＡ、ＦｃＲγ１等）や低分子化合物に対する抗体断片複合体からなる二価及び二重特異性結合タンパク質について開示している。

【００２０】

しかしながら、前記の開示技術では無機物質に代表される基板材料表面を直接的に認識し、結合する結合性タンパク質に関する技術に関しては開示されていない。そのために、前記結合性タンパク質を基板上に配置した構造体を作製する場合には、従来既知の方法、例えば、基板または前記結合性タンパク質を化学修飾し、共有結合により基板上に配置する等の方法によって配置しなければならない。また、金属や半導体物質の微粒子に結合させる際も、同様にして結合対象である微粒子または結合性タンパク質を化学的に修飾する必要があった。このような化学修飾は、タンパク質がその分子内に多数有するアミノ残基やカルボキシル基を標的とする場合が多く、その反応にかかわる部位は非選択的である。その為に、所望の活性を発揮する部位も基板固定または標識化部位になる恐れがあり、結果としてタンパク質の所望の活性を低下させる恐れがある。また、このような問題はマイクロデバイス化技術のみではなく、バイオセンサー等のセンシング素子を作製する上でも抗体等の標的物質を捕捉する分子をその捕捉機能を十分に発揮できる分子配向性をもって基板上に固定化することは重要な技術となる。

【００２１】

また、上記抗体と同様な足場構造を有するタンパク質に、多様な分子認識能を付与する研究も進められている。例えば、ａｎｔｉｃｏｌｉｎ（Ｒｅｖｉｅｗ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、７４：ｐ２５７、２００１）、フィブロネクチン　タイプIIIドメイン（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２８４：ｐ１１４１、１９９８）等が挙げられる。ａｎｔｉｃｏｌｉｎは、ｌｉｐｏｃａｌｉｎをベースに改変された捕捉タンパク質である。ｌｉｏｃａｌｉｎは、１６０乃至１８０アミノ残基からなるタンパク質で低水溶性物質の輸送・貯蔵として機能するタンパク質である。構造は、８つのβシートから構成される樽型の構造体である。前記βシート間を繋ぐ４つのループ構造により対象物を認識し、結合することができる。フィブロネクチンは、一般的に１００残基以下のアミノ酸からなるタンパク質であり、細胞外マトリクスとの接合や細胞間接合において重要な役割を担うタンパク質である。上記二つのタンパク質同様にβシート構造を有し、βシー

ト間のループ構造により標的物質を認識するタンパク質である。上記ａｎｔｉｃｏｌｉｎ、フィブロネクチンのβシート間のループ構造にランダムなアミノ酸配列導入し、新規の結合タンパク質を構築することが行われている。これらの分子は、分子認識部位とは別にβシートからなる強固な分子構造を有している為、所望の機能性高分子材料と融合することにより、基板を特異的に認識し、結合することにより固定化することができ、且つ固定化する高分子材料の所望の活性を阻害することなく、基板から一定の距離を確保するスペーサー機能も併せ持つことが期待される。しかしながら、前記抗体に代表される上記のような構造的に安定な足場構造を有する分子認識タンパク質において、金属、半導体材料に代表される無機物質を特異的に認識し、結合する例は今までは無い。

【００２２】

一方、各種物質（標的物質）の検出の分野においては、標的物質の検出および／または定量等は、特に、抗原および抗体のような蛋白質、並びに糖、レクチンおよび核酸に関しては、これまでいくつか確立されている。例えば、標的物質を特異的に認識・結合する抗体に標識物質を結合することにより、標識物質を介した検出または定量が可能となることが知られている。標識物質としては、金等の金属またはラテックス等の有機材料から微粒子、特定波長域の励起光により蛍光を発する蛍光物質やその蛍光物質を反応生成物とする酵素（例えばＨＲＰ等）を用いることが一般的である。抗体等のタンパク質を標識する方法としては、物理吸着による方法と反応活性のある官能基を標識物質／或いは被標識物質に導入し、それを架橋点として化学結合を形成する化学結合法が挙げられる。

【００２３】

以下、検出に用いられる抗体を一例として従来技術に関して述べる。特許第０３１０８１１５号明細書において、抗体に金微粒子を物理的に吸着させることにより金標識する方法の一例が示されている。この方法によれば、予め調整した金コロイド分散液にモノクローナール抗体を加え、遠心沈降処理して上清液を除去し、数度の洗浄工程を経てし、金標識抗体を得ることができる。

【００２４】

次に、抗体を化学結合法により標識する方法について、説明する。抗体はタンパク質のアミノ基、またはＳＨ基を有しており、これらに対し反応性を有する官能基を標識物質側に予め設けておくことにより、蛍光物質などの標識物質と抗体などの被標識物質との化学的な結合が可能となる。例えば、アミノ基と反応する、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドやイソチオシアネート基、ニトロアリールハライド基、酸クロリド基を有した標識物質を導入する方法が挙げられる。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドは、アミノ基とｐＨ７以上の環境下で効率よく反応し、非常に安定なアミド結合を形成することが知られ、タンパク質を標識するための架橋剤として広く用いられている（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｖｏｌ．１１、ｐｐ２２９１、１９７２）。タンパク質上のα位とリシン側鎖のε位のアミノ基がスクシンイミド基の反応ターゲットとなることができる。特に、ε位アミノ基が、一般的なスクシンイミドのターゲットと考えられている。例えば、金微粒子を標識物質として化学的に抗体などのタンパク質に結合させる場合、まず金微粒子を少なくとも一端にＳＨ基を有し、他方に前述のタンパク質の側鎖残基と反応性の高い官能基を有した化合物で修飾する。次いでタンパク質と前記反応性官能基と架橋することにより結合させることが可能である。しかし、これらの方法では、リジンやフリーのα－アミノ基を有する残基を非選択的に反応対象とする為に、標識される対象となる抗体等のタンパク質の機能を阻害する恐れがある。また、イソチアネート基を有する蛍光物質としてＦＩＴＣが知られているが、スクシイミドと同様にアミノ基に対する非特異な反応による被標識タンパク質の所望の特性低下が懸念される。

【００２５】

また、－ＳＨ基を架橋点とすることができる。ＳＨ基を利用する方法は、マレイミド法とピリジルジスルフィド法に大別できる。マレイミド法はＳＨ基選択的な反応基としてマレイミドを有する架橋剤を用いる方法で、温和な条件で選択的な架橋ができることが知られている。例えば、被結合対象が抗体の場合、抗体分子のヒンジ部のジスルフィドを開裂

させたＳＨ基は、抗原認識部分とは無関係であるため、ＳＨ基を修飾しても抗体の特異性が損なわれないことが期待される。このＳＨ基を架橋点にすることで所望の機能を損なうことなく標識物質を結合することが可能である。しかしながら、抗体全分子内にはＳＳ結合が１６箇所あり、その中には抗原認識部位であるＣＤＲ（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｄｉｓｉｓｉｏｎ　ｒｅｓｉｏｎ）を有する重鎖可変領域（ＶＨ）、軽鎖可変領域（ＶＬ）の構造を保持するためのＳＳ結合も含まれ、その還元箇所も部位特位的に行わなければ、その機能を損なう恐れがある。

【００２６】

特公平０４－０７０３２０号公報は、広範な種々の金属イオンと高い親和性をもつてキレート化する低分子量蛋白質であるメタロチオネインまたはそのフラグメントを用いたタンパク標識技術について開示している。この公報には、メタロチオネインはスルフヒドリル部分にて標識物質となる金属イオンと結合し、その他の官能基、例えば、アミン基、水酸基、カルボキシル基を架橋点として抗体等と結合させる技術が開示されている。メタロネオチン内においては金属イオン結合部位と被標識物質結合部位が区別されて、それぞれの被結合物質が結合することが可能であるが、被標識物質の結合部位は他の架橋方法と同様に定かではなく、上記と同様の問題点が依然として残る場合があると考えられる。

【００２７】

更に、前記のような化学架橋による標識物質に固定化方法による非選択的な修飾を解決する手段として、遺伝子工学的な修飾法が挙げられる。遺伝工学的手法により結合部位をタンパク質に導入した融合タンパクを作製することも可能である。一例としては、蛍光物質等の標識物質の末端に低分子化合物であるビオチンを化学的に導入し、前記ビオチンと結合することが知られている（ストレプト）アビジンの全部もしくはビオチン結合部位を所望のタンパク質のＮ末、Ｃ末に遺伝子工学的に導入し、融合タンパク質として発現させ、前記ビオチン－アビジン結合を介することによって目的のタンパク質と標識物質を結合させる方法が知られている。このように標識物質、例えば、蛍光物質に低分子化合物を導入し、それを認識し結合できるタンパク質を導入した目的のタンパク質との融合タンパク質を遺伝子工学的に作製し、選択的な結合部位を導入することができる。

【特許文献１】特表平０７－５０１４５１号公報
【特許文献２】特表平０８－５０４１００号公報
【特許文献３】特表平０７－５０１４５１号公報
【特許文献４】特公平０４－０７０３２０号公報
【特許文献５】特許第０３１０８１１５号明細書
【特許文献６】国際公開第０３／０２９４３１号パンフレット
【非特許文献１】Ｓｃｉｅｎｃｅ、３００：ｐ１４１３、２００３
【非特許文献２】Ｓｃｉｅｎｃｅ、３０２：ｐ１３６４、２００３
【非特許文献３】Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、３：ｐ２５４、２００３
【非特許文献４】Ｎａｔｕｒｅ、４０５：ｐ６６５、２０００
【非特許文献５】Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５：ｐ２６９、１９９７
【非特許文献６】Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９６：８９２、２００２
【非特許文献７】Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：ｐ１０３８、１９８８
【非特許文献８】Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４０：ｐ１０４１、１９８８
【非特許文献９】Ｒｅｖｉｅｗ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、７４：ｐ２５７、２００１
【非特許文献１０】Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２８４：ｐ１１４１、１９９８
【非特許文献１１】Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｖｏｌ．１１、ｐｐ２２９１、１９７２

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００２８】

しかしながら、前記の開示技術では無機物質に代表される基板材料表面や標識用物質を

分子選択的に認識し、結合する結合性タンパク質に関する技術に関しては開示されていない。そのために、前記結合性タンパク質または複合タンパク質を基板上に配置した構造体を作製する場合には、従来既知の方法、例えば、基板または前記結合性タンパク質を化学修飾し、共有結合により基板上に配置する等の方法によって配置しなければならない。また、金属や半導体物質の微粒子、及び標識用物質に結合させる際も、同様にして結合対象である微粒子または結合性タンパク質を化学的に修飾する必要があった。このような化学修飾は、タンパク質がその分子内に多数有するアミノ残基やカルボキシル基を標的とする場合が多く、その反応にかかわる部位は非選択的である。その為に、所望の活性を発揮する部位も基板固定または標識化部位になる恐れがあり、結果としてタンパク質の所望の活性を低下させる恐れがある。

【００２９】

また、このような問題はマイクロデバイス化技術のみではなく、バイオセンサー等のセンシング素子を作製する上でも抗体等の標的物質を捕捉する分子をその捕捉機能を十分に発揮できる分子配向性をもって基板上に固定化することは重要な技術となる。

【課題を解決するための手段】

【００３０】

本発明にかかる金と結合し得るタンパク質は、金に対して結合性を有するタンパク質であって、金に対する抗体の少なくとも一部を含む金結合部位を有することを特徴とするものである。

【００３１】

本発明にかかる金結合性複合タンパク質は、（１）請求項１～９のいずれかに記載の金に対して結合性を有するタンパク質を含む第一のドメインと、（２）特定の物質に対する結合部位を有するタンパク質を含む第二のドメインと、を有することを特徴とするものである。

【００３２】

一方、本発明にかかる構造体は、基体とタンパク質を有する構造体であって、前記基体が表面の少なくとも一部に金を含み、前記タンパク質が上記構成の金結合性複合タンパク質であることを特徴とするものである。

【００３３】

また、本発明にかかる核酸は上記構成の金結合性複合タンパク質をコードする核酸である。更に、本発明にかかるベクターはこの核酸を含むことを特徴とするものである。

【００３４】

更に、本発明に係る上記構成の構造体の製造方法は、（１）前記基体を準備する工程、（２）前記金結合性複合タンパク質を生成する工程及び（３）前記基体に前記金結合性複合タンパク質を配置する工程、を有することを特徴とする構造体の製造方法である。

【００３５】

本発明にかかる標的物質を検出するための検出用キットは、上記構成の構造体を形成するための基体及び金結合性複合タンパク質と、該構造体への標的物質の結合を検出するための検出手段と、を有することを特徴とする標的物質検出用キットである。

【００３６】

また、本発明にかかる標識物質により標的物質を標識するための接続部材は、標識物質により標的物質を標識するための接続部材であって、前記標的物質を結合する部位と前記標識物質を結合する部位をそれぞれ一以上有し、これらの部位は互いに独立して被結合物質と結合し、前記標識物質を結合する部位または前記標的物質を結合する部位の少なくとも１つが請求項１～１０のいずれかに記載のタンパク質を含むことを特徴とする接続部材である。

【００３７】

本発明にかかる標的物質の検出方法は、標的物質を標識物質に結合して標識し、該標識物質が結合した標的物質を検出することによる標的物質の検出方法において、前記標識物質を上記構成の接続部材を介して前記標的物質に結合する工程と有することを特徴とする

標的物質の検出方法である。

【００３８】

本発明にかかる標的物質を検出するためのキットは、標識物質と、上記構成の接続部材と、標的物質に該標識物質が該接続部材を介して結合した状態を検出するための検出手段と、を有することを特徴とするキットである。

【発明の効果】

【００３９】

本発明にかかる金結合性複合タンパク質は金結合部位と構造部を有することにより、これと連鎖して結合する機能性物質を金基板表面に固定化する際に、機能性物質は、その本来の機能に対する固定化の影響は及ばず、また、固定化に際して、なんらの試薬を利用していないため、その機能に影響を及ぼす化学反応を被ることもない。更には、金基板との距離を保つことにより機能性物質がその機能に影響を及ぼすような基板から相互作用を受けることもない。

【００４０】

更に、本発明の金結合性複合タンパク質は少なくとも金と、特定の物質に対する複数の結合部を有する。これにより、少なくとも（ｉ）表面の少なくとも１部に金を有する基板と（ii）本発明の金結合性複合タンパク質、更には（iii）本発明の金結合性複合タンパク質が結合できる特定の物質にから構成される多層体を形成する構造体とすることができる。この際、本発明にかかる金結合性複合タンパク質は抗体可変領域ドメインが有する立体的にも安定したβシート構造を有するため、金基板と特定の物質との結合部位の間に空間位置を保つことが可能であり、金また金以外の物質（例えば、標的物質）を結合する本金結合性タンパク質のドメイン（例えば、第二のドメイン）が、金を含む基板から何らかの相互作用を受けることがなく、結合能を保持することができる。また、これにより極めて薄膜な緻密な多層構造体を形成することが可能である。本発明の金結合性タンパク質によるこれらの特性を利用して、検出装置とすることができる。例えば、金薄膜上に所望の物質と結合可能な本発明の金結合性複合タンパク質を設けることで所望物質のセンシング素子とすることができる。その検出方法としては、光学的な手段、例えば表面プラズモン共鳴などを利用した手段を提供することができる。

【００４１】

一方、本発明にかかる金結合性タンパク質は、金を含む物質を標識物質とすることで、標的物質に金を含む標識物質を結合するための接続部材として利用可能である。この接続部材としての形態によれば、以下に示す代表的な効果を得ることができる。

【００４２】

第１の効果として、標的物質を結合する部位と標識物質を結合する部位をそれぞれ一以上有し、それぞれの結合部位は互いに独立して被結合物質と結合することにより、従来の標識方法で問題となっていた標識物質を結合した際に生じる被標識物質の標的物質結合能の低下が見られない、優れた標的物質を標識できる接続部材を提供することができる。第二の効果として、生体高分子であること、更にタンパク質であることにより、タンパク質の複数のアミノ残基と標的物質表面の相互作用に起因する高い結合性が期待できる。第三の効果として、接続部材が抗体可変領域であることによって、結合部位が高次構造により規定された立体配置で規定される為高い結合特異性が期待できる。第四の効果として、標識物質が金を含む物質であることにより、試料に対する散乱光量測定だけでなく、増強ラマンや局在プラズモンの原理を応用した光学的測定に加え、その電気特性を利用した電気測定も可能とすることができる。第四の効果として、本発明にかかる接続部材を利用することで、標的物質／接続部材／標識物質を同時または任意に加えることが可能な検出方法及び検出キットを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００４３】

以下、本発明にかかる金結合性タンパク質、それを用いた複合タンパク質およびこれらの用途について説明する。

（１）金結合性タンパク質
・抗体
本発明の金結合性タンパク質は、抗体の少なくとも一部を含んでなるものである。本発明の示すところの金との結合のために用いる抗体には、すべての脊椎動物のリンパ系細胞で産出される金に対する結合性を有する抗体、及びそれらのアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個または数個が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、その構造・機能において関連を有する、すなわち目的とする金結合性を維持したタンパク質が含まれる。抗体は、その特性（免疫学的または物理学的な）の分類において、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥに分類されるが、その何れの分類であってもよい。更には、これらが多量体を形成していてよい。例えば、ＩｇＡは２量体、ＩｇＭは５量体を形成するが金に結合しうる形状であれば何ら問題はない。また、その使用用途がｉｎ　ｖｉｔｒｏである場合は哺乳類に限らず、ＩｇＷ、ＩｇＹであっても問題ない。
【００４４】
・金結合性抗体の取得
本発明の金結合性を示す抗体を取得する方法としては、従来行われてきた抗血清調製技術、および細胞融合によるモノクローン抗体作製技術を適宜選択して行うことができる。例えば、本発明の結合対象となる金微粒子を適当な免疫動物に免疫し、抗体価の上昇を確認したところで血清中から抗体を回収する。前記免疫とは、抗原となる金微粒子を適当な溶媒、例えば生理食塩水などで適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要に応じてフロイント完全アジュバントを併用投与し、動物に１～２週間間隔で３～４回程度投与する方法が一般的である。このようにして免疫された動物を最終免疫後３日目に解剖し、摘出した脾臓から得られた脾臓細胞を免疫細胞として使用する。免疫する金微粒子として、１０ｎｍ以下であることがこのましく、より好ましくは２ｎｍ以下である。更には、血清アルブミン等のタンパク質を共有結合させてハプテン化させることが更に好ましい。従来から免疫反応を生じにくい抗原においても、ある種タンパク抗原と複合体とすることによりタンパク質抗原の一部として認識され、産出を誘導されると予想される。
【００４５】
得られる抗体はポリクローナルでも良いが、モノクローナルとすることによってより金に対する特異性に優れたクローンを選択することが可能となる。モノクローナルな抗体は、それを産生する細胞をクローニングすることによって得ることができる。一般的には、免疫動物から回収した脾臓等のイムノグルブリン産生細胞を癌化細胞と融合させることによってハイブリドーマを形成することができる（Ｇｕｌｆｒｅ　Ｇ．，Ｎａｔｕｒｅ　２６６．５５０－５５２，１９７７）。例えば、癌化細胞としてはマウス由来ミエローマＰ３／Ｘ６３－ＡＧ８．６５３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．　ＣＲＬ－１５８０）、Ｐ３／ＮＳＩ／１－Ａｇ４－１（ＮＳ－１）、Ｐ３／Ｘ６３－Ａｇ８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（Ｓｐ２／Ｏ，Ｓｐ２）、ＮＳ０、ＰＡＩ、Ｆ０あるいは BW５１４７、ラット由来ミエローマ２１０ＲＣＹ３－Ａｇ．２．３．、ヒト由来ミエローマＵ－２６６ＡＲ１、ＧＭ１５００－６ＴＧ－Ａ１－２、ＵＣ７２９－６、ＣＥＭ－ＡＧＲ、Ｄ１Ｒ１１あるいはＣＥＭ－Ｔ１５等のミエローマ細胞をあげることができる。
【００４６】
モノクローナルの抗体を産生する細胞のスクリーニングは、前記細胞をタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前記金微粒子に対する反応性を、例えばＲＩＡ（ｒａｄｉｏ　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）やＥＬＩＳＡ（ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｉｍｍｕｎｏ－ｓｏｌｖｅｎｔ　ａｓｓａｙ）等の酵素免疫測定法、免疫沈降等によって測定することができる。または、表面プラズモン共鳴（ｓｕｒｆａｃｅ　ｐｌａｓｍｏｎ　ｒｅｓｏｎａｎｃｅ：ＳＰＲ）装置を利用した金結合性を定量的に測定することも可能である。
【００４７】
・抗体断片

本発明で述べる抗体断片とは、モノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはＦ（ａｂ'）２、Ｆａｂ'、Ｆａｂ、Ｆｄ、Ｆｖ（ｖａｒｉａｂｌｅ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ）、ｓｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ）、ｄｓＦｖ（ｄｉｓｕｌｐｈｉｄｅ ｓｔａｂｉｌｉｓｅｄ Ｆｖ）あるいは可変領域（ＶＨ）または軽鎖可変領域（ＶＬ）からなる単ドメインｄＡｂ（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ）等が挙げられる。

【００４８】

ここで、「Ｆ（ａｂ'）２」及び「Ｆａｂ'」とは、抗体を、タンパク分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより得ることができる。抗体のヒンジ領域で２本の重鎖（Ｈ鎖）間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、ＩｇＧをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の２本のＨ鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて軽鎖可変領域（ＶＬ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）からなる軽鎖（Ｌ鎖）、及び重鎖可変領域（ＶＨ）と重鎖定常領域１（ＣＨ１）とからなる重鎖（Ｈ鎖）フラグメントがＣ末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な２つのフラグメントを得る。これら２つの相同な抗体フラグメントを各々Ｆａｂ'という。またＩｇＧをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の２本のＨ鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記２つのＦａｂ'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをＦ（ａｂ'）２という。

【００４９】

このような本発明の金結合性タンパク質は、上記Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）２であってもよい。また、ＶＨと前記ＣＨ１を結合したＦｄ断片であっても構わない。

【００５０】

さらには、抗体の可変領域部（Ｆｖ）またはその一部であってもよく、例えばＦｖを構成する重鎖可変領域（ＶＨ）や軽鎖可変領域（ＶＬ）またはその一部であってもよい。一方、前記ＶＨまたはＶＬからなる複合体において、一方のカルボキシ末端と他方のアミノ末端数個のアミノ酸からなるペプチドを介して連結した一本鎖Ｆｖ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ：ｓｃＦｖ）を利用することもできる。上記ｓｃＦｖを形成するＶＨ／ＶＬ間（順不同）に一以上のアミノ酸からなるリンカーを設けることが望ましい。アミノ酸リンカーの残基長については、ＶＨまたはＶＬと抗原との結合に必要な構造形成を妨げるような拘束力を持たないように設計することが重要である。具体的な例としては、アミノ酸リンカー長は、５乃至１８残基が一般的で１５残基が最も多く用いられ検討されている。これら断片は遺伝工学的な手法により得ることが可能である。

【００５１】

更には、ＶＨ、ＶＬが何れか単ドメインｄＡｂであっても構わないが、前記単ドメイン構造は一般的に不安定であることが多いのでＰＥＧ修飾等の化学修飾による安定化を施しても良い。また、重鎖抗体としてｉｎ ｖｉｖｏにおいても存在し、機能することができることが知られているラクダ重鎖抗体の可変領域ＶＨＨ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、３１１：ｐ１２３、２００１）、Ｎｕｒｓｅ ｓｈａｒｋのイムノグロブリン様分子の可変領域ＩｇＮＡＲであっても構わない。更には、ヒト又はマウス由来に代表される重鎖・軽鎖から構成される抗体分子のＶＨ、ＶＬを図１乃至図４のようにドメイン単体で使用する際にＶＨ／ＶＬ界面等を重鎖抗体の相当部分を参考に変異導入することによって安定性が向上させても良い。

【００５２】

金結合部位は、（１）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、その変異体及びこれらの一部、並びに（２）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）、その変異体及びこれらの一部、から選択された少なくとも１種を含んでなるものとすることができる。抗体重鎖可変領域（ＶＨ）としては、配列番号：１～４８のアミノ配列の少なくとも一つを含んでなるタンパク質を、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）としては、配列番号：４９～５７のアミノ配列の少なくとも一つを含んでなるタンパク質を好ましいものとして挙げることができる。これらの配列番号：１～５

７のアミノ配列のそれぞれの一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含み、金結合性を有しているタンパク質も同様に利用できる。

【００５３】

・金親和性抗体断片の取得

・酵素処理による取得

また、上記抗体をある種の酵素処理することで、前記抗体の抗原結合部位及び抗原結合能をある程度有した抗体断片を得ることもできる。例えば、前記得られた抗体をパパイン処理することによりＦａｂ断片またはその類似体を得るができ、ペプシン処理によってＦ（ａｂ'）$_2$断片またはその類似体が得られる。前記抗体断片は、前記酵素的手法の他に化学的分解して作製する方法もある。これら抗体断片も金に対して結合能を有するものであれば、何ら問題なく使用することができる。

【００５４】

本発明に係わる上記Ｆａｂ'、Ｆｖ、ＶＨまたはＶＬのｄＡｂを得る方法としては、遺伝工学的な手法を用いた取得も可能である。例えば、前記ＶＨまたはＶＬ遺伝子ライブラリーを作製し、それらをタンパク質として網羅的に発現させて、その遺伝子と対応させながら、金または標的物質に対する結合性により選択する方法がある。前記遺伝子ライブラリーは、たとえば、臍帯血、扁桃、骨髄、あるいは末梢血細胞や脾細胞等から得ることができる。例えば、ヒト末梢血細胞からｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。次に、ヒトＶＨ、ＶＬをコードする配列をプローブとして、ヒトＶＨまたはＶＬのｃＤＮＡライブラリーを作製する。例えば、ヒトＶＨファミリー（ＶＨ１乃至７）をファミリー毎に幅広く増幅することができるプライマーやヒトＶＬを増幅できるプライマーは公知である。これらＶＨ、ＶＬ毎にプライマーを組み合わせてＲＴ－ＰＣＲを行い、ＶＨ、ＶＬをコードした遺伝子を取得する。また、ファージディスプレー法を用いることも可能である。ファージディスプレー法は、ＶＨ、ＶＬまたはそれら含む複合体（例えば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ）をコードした遺伝子ライブラリーをファージ外殻タンパクをコードした遺伝子と結合し、ファージミドライブラリーを作製し、それらを大腸菌に形質転換し、種々のＶＨまたはＶＬを外殻タンパクの一部として有するファージとして発現させる。それらのファージを用いて、上記同様にして金また標的物質に対する結合性により選択することができる。ファージに融合タンパクとして提示されたＶＨまたはＶＬをコードする遺伝子は、ファージ内にファージミドにコードされているのでＤＮＡシークエンス解析をすることにより、特定することができる。

【００５５】

本発明は、上記金結合性タンパク質をコードする核酸をも含くむ。更に、それをタンパク質として宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、マウス、ヒト等由来の従来既知のタンパク発現用細胞）の形質転換し、上記金結合性タンパクを発現できるための遺伝子ベクターとなる核酸からなる構成物をも含む。一つの前記発現ベクターにより発現できる本発明の金結合性タンパク質は、抗体全分子、またはその抗体断片であるＦ（ａｂ'）２、Ｆａｂ、Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ＶＨ、ＶＬ、またはこれら複合体から選択して、設計することが可能である。ひとつの発現用ベクターに複数の前記断片をコードする場合、それぞれの抗体断片が独立した個々のポリペプチド鎖として発現させることができる。また、ドメイン間を連続して結合またはアミノ酸を介して結合させた一つのポリペプチド鎖として発現するベクター構成とすることも可能である。

【００５６】

本発明の金結合性タンパク質発現用ベクターの構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の導入遺伝子を発現させるために必要な構成等に組み込むことより、設計及び構築することができる。ベクター構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の構成等を参照し、構築することができる。また、大腸菌等を宿主細胞として用いる場合、外来遺伝子産物である本発明の金結合性タンパク質またその構成物を速やかに細胞質外に除外することで、プロテアーゼによる分解を少なくすることが可能である。ま

た、この外来遺伝子産物が菌体にとって毒性である場合でも、菌体外へ分泌することによりその影響を小さくすることができることが知られている。通常、既知の細胞質膜あるいは内膜を通過して分泌されるタンパク質の多くがその前駆体のＮ末端にシグナルペプチドを有し、分泌過程においてシグナルペプチダーゼにより切断され、成熟タンパク質となる。多くのシグナルペプチドはそのＮ末に塩基性のアミノ酸、疎水性アミノ酸、シグナルペプチダーゼによる切断部位と配置されている。

【００５７】

本発明の金結合性タンパク質をコードする核酸の５'側にシグナルペプチドであるｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより分泌発現させることができる。

【００５８】

また、ひとつのベクター中に本発明の金結合性タンパク質または複数の抗体断片から構成されるポリペプチド鎖をそれぞれ独立して複数挿入することも可能である。この場合、各ドメインまたはポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、分泌を促すことができる。更に、または一以上のドメインからなるポリペプチド鎖として発現させる場合、前記ポリペプチド鎖の５'末端に同様にしてｐｅｌＢをコードする核酸を配置することにより分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した本発明の金結合性タンパク質は、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。

【００５９】

また、発現させたタンパク精製時の作業の簡便さを考慮して、抗体分子、または独立した各抗体断片もしくは複数の抗体断片が連続して結合して形成されたポリペプチド鎖のＮまたはＣ末端に精製用のタグを遺伝子工学的に配置することが可能である。前記精製用タグとしては、ヒスチジンが６残基連続したヒスチジンタグ（以下、Ｈｉｓ×６）やグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのグルタチオン結合部位などが挙げられる。前記タグの導入方法としては、前記発現用ベクターにおける金結合性タンパク質をコードする核酸の５'または３'末端に精製タグをコードする核酸を挿入する方法や市販の精製タグ導入用ベクターを使用するなどが挙げられる。

【００６０】

以下に、上記発現ベクターを用いた本発明の金結合性タンパク質の製造方法について述べる。本発明の金結合性タンパク質、またはその構成要素となるポリペプチド鎖は、従来既知のタンパク発現用の宿主細胞に、宿主細胞に応じて設計した上記金結合性タンパク質発現用ベクターを形質転換し、宿主細胞内のタンパク合成システムを用いて、宿主細胞内に合成される。その後、宿主細胞内外に蓄積または分泌された目的タンパク質を細胞内部または細胞培養上清から精製することにより得ることができる。例えば、大腸菌を宿主細胞として用いる場合、本発明の金結合性タンパク質をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより細胞質外に分泌発現しやすい構成にすることができる。

【００６１】

ひとつの本発明の発現用ベクターで本発明の金結合性タンパク質を構成する複数のポリペプチド鎖を発現させる場合、各ポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、発現時に細胞質外への分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した本発明の金結合性タンパク質は、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。精製方法としては、前記精製タグがＨｉｓタグの場合、ニッケルキレートカラムやＧＳＴの場合、グルタチオン固定化カラムを使用することで精製することができる。

【００６２】

また、菌体内に発現した本発明の金結合性タンパクが不溶性顆粒で得ることも可能である。この場合、培養液から得られた菌体をフレンチプレスや超音波により破砕した細胞破砕液から前記不溶性顆粒を遠心分離することができる。得られた不溶性顆粒画分を尿素、

塩酸グアニジン塩を含むの従来既知の変性剤を含んだ緩衝溶液で可溶化した後に、変性条件下で前記同様なカラム精製することができる。得られたカラム溶出画分は、リフォールディング作業により、変性剤除去と活性構造再構築を行うことができる。リフォールディング方法としては、従来既知の方法から適宜用いることも可能である。具体的には、段階透析法や希釈法などを目的のタンパクに応じて用いることが可能である。

【００６３】

本発明の金結合タンパク質の各ドメインまたは各ポリペプチド鎖は、同一宿主細胞内で発現させることも可能であるし、別の宿主細胞を使用して発現した後に共存させて、複合体化させることも可能である。

【００６４】

更に、本発明の金結合性タンパク質をコードするベクターを用いて、細胞抽出液を用いて生体外でのタンパク質発現をすることも可能である。好適に用いられる細胞抽出液としては、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等が挙げられる。しかしながら、上記無細胞抽出液によるタンパク合成は一般的には還元条件下で行われる。その為に、抗体断片中のジスルフィド結合を形成させるために何らかの処理を行う方がより好ましい。

【００６５】

本発明の金結合性タンパク質の好ましい解離乗数（K_D）は、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０存在下のバッファー条件下で10^{-6}M以下であり、より好ましくは10^{-8}M以下である。上記条件において、ＢＳＡなど比較的に金への非特異的な吸着が多いとされるタンパク質材料であっても金への吸着ができないことを本発明者の検討において確認している。K_D値が10^{-6}M以下であれば、上記のような非特異吸着性のタンパク質の吸着挙動と十分に区別することが可能であり、更に10^{-8}M以下であることで固定化用のアンカー分子として十分に機能することができる。

【００６６】

・抗体断片タンパク発現

金結合性タンパク質を、所望の制限酵素、例えば上記の例ではＮｃｏＩ／ＮｈｅＩにより切断して金結合性抗体断片コードＤＮＡを得る。これを宿主細胞に応じた従来公知のタンパク発現用プラスミドに導入することで抗体断片を得ることができる。例えば、大腸菌の場合、菌体外発現またはペリプラズム画分から目的の抗体断片を回収したい場合、前記抗体断片コード遺伝子の上流に従来既知のシグナルペプチドを導入することができる。シグナルペプチドとしては、ｐｅｌＢ等が挙げられる。また、発現後、培養上清または菌体画分から目的タンパクを精製を容易にするために、従来既知の精製用タグを融合してもよい。具体的には、ヒスチジン６残基（Ｈｉｓ×６）やグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのグルタチオン結合部を導入し、融合タンパクとすることができる。これらは、Ｈｉｓタグの場合、ニッケル等の金属キレートカラムなどにより精製することが容易にできる。ＧＳＴタグの場合は、グルタチオンをセファロース等に担体に固定化したカラムにより精製することが可能である。

【００６７】

また、菌体内に発現した目的タンパクが不溶性顆粒で得ることができない場合、これらを尿素、塩酸グアニジン塩を含むの従来既知の緩衝溶液で可溶化した後に、リフォールディングを行うことも可能である。リフォールディング方法としては、従来既知の方法から適宜用いることも可能である。具体的には、段階透析法や希釈法などを目的のタンパクに応じて用いることが可能である。

【００６８】

これらで得られた抗体、及びそれらの断片、例えばＦａｂ、（Ｆａｂ'）２、Ｆｄ、ＶＨまたはＶＬまたは前記それらの複合体等のアミノ酸配列において、一もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列であっても金結合性を示すものであれば本発明の範囲から超えるものではない。

【００６９】

本発明の金結合性タンパク質の好ましい解離乗数（K_D）は、０.１％Ｔｗｅｅｎ２０存

在下のバッファー条件下で10^{-6}M以下であり、より好ましくは10^{-8}M以下である。上記条件において、ＢＳＡなど比較的に金への非特異的な吸着が多いとされるタンパク質材料であっても金への吸着ができないことを本発明者の検討において確認している。

【００７０】

K_D値が10^{-6}M以下であれば、上記のような非特異吸着性のタンパク質の吸着挙動と十分に区別することが可能であり、更に10^{-8}M以下であることで固定化用のアンカー分子として十分に機能することができる。

【００７１】

・金を有する被結合対象物

金を有する被結合対象物は、少なくともその表面の一部に金を有する物質から種々選択して用いることができる。免疫やパニング等により金結合性タンパク質を選択する際は、金以外の物質に対して吸着するタンパク質の混入を除くために被結合対象物表面は金のみであることがより望ましい。表面以外の内部コア基材となる材料は、金は勿論のことその他既知の種々の材料から選択して用いることができる。更に、粒子状、より好ましくは1乃至１００μｍφの微粒子にすることにより結合に係わる比表面積が増加して好ましく、またパニング終了時の回収の際も遠心分離により容易に回収することができる。また、下記のように市販の種々のプラスチックプレート、例えば培養シャーレ、９６穴タイタープレートに金蒸着して用いてもよい。この場合、金表面の接液面積及び攪拌による分子拡散効果を鑑みて、そのサイズ及びウェル数を決定することが好ましい。

【００７２】

被結合対象物の形状としては、平板、球形、針状、多孔状等、既知の形状から適宜選択して用いることができる。形成方法としては、物理的または化学的な蒸着方法や塩化金を用いた化学的な製造方法から適宜選択することができる。得られた金を含む表面は、酸化膜や副生成物、共雑等の不純物を除去するため、酸性溶液、アルカリ性溶液、有機溶媒等で予め洗浄して所望の金の露出状態を作製し、用いてもよい。

【００７３】

・基体

金結合性タンパク質と、表面の少なくとも一部が金から形成されている基体とから各種の用途に使用し得る構造体を得ることができる。この基体は、その表面の少なくとも一部に金を配置されたものであり、本発明の構造体を形成しうるものであればいかなる材質、形状のものも利用可能である。本発明に用いる基体の材質は、本発明の構造体を形成しうるものであればいかなる材質でもよく、金属、金属酸化物、無機半導体、有機半導体、ガラス類、セラミクス、天然高分子、合成高分子、プラスチックから選ばれる何れか１以上或いはその複合体を含んでなる材質である。本発明に用いる基体の形状は、本発明の構造体を形成しうるものであればいかなる形状でもよく、板状、粒子状、多孔体状、突起状、繊維状、筒状、網目状から選ばれる何れか１以上の形状を含んでなる形状である。

【００７４】

基体形成用の有機高分子化合物としては、スチレン、α－メチルスチレン、β－メチルスチレン、ｏ－メチルスチレン、ｍ－メチルスチレン、ｐ－メチルスチレン、２、４－ジメチルスチレン、ｐ－ｎ－ブチルスチレン、ｐ－ｔｅｒｔ－ブチルスチレン、ｐ－ｎ－ヘキシルスチレン、ｐ－ｎ－オクチルスチレン、ｐ－ｎ－ノニルスチレン、ｐ－ｎ－デシルスチレン、ｐ－ｎ－ドデシルスチレン、ｐ－メトキシスチレン、ｐ－フェニルスチレンなどのスチレン系重合性モノマー、メチルアクリレート、エチルアクリレート、ｎ－プロピルアクリレート、ｉｓｏ－プロピルアクリレート、ｎ－ブチルアクリレート、ｉｓｏ－ブチルアクリレート、ｔｅｒｔ－ブチルアクリレート、ｎ－アミルアクリレート、ｎ－ヘキシルアクリレート、２－エチルヘキシルアクリレート、ｎ－オクチルアクリレート、ｎ－ノニルアクリレート、シクロヘキシルアクリレート、ベンジルアクリレート、ジメチルフォスフェートエチルアクリレート、ジエチルフォスフェートエチルアクリレート、ジブチルフォスフェートエチルアクリレート、２－ベンゾイルオキシエチルアクリレートなどのアクリル系重合性モノマー、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ｎ－プロピ

ルメタクリレート、ｉｓｏ－プロピルメタクリレート、ｎ－ブチルメタクリレート、ｉｓｏ－ブチルメタクリレート、ｔｅｒｔ－ブチルメタクリレート、ｎ－アミルメタクリレート、ｎ－ヘキシルメタクリレート、２－エチルヘキシルメタクリレート、ｎ－オクチルメタクリレート、ｎ－ノニルメタクリレート、ジエチルフォスフェートエチルメタクリレート、ジブチルフォスフェートエチルメタクリレートなどのメタクリル系重合性モノマー、メチレン脂肪族モノカルボン酸エステル類、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、ベンゾエ酸ビニル、酪酸ビニル、安息香酸ビニル、ギ酸ビニルなどのビニルエステル類、ビニルメチルエーテル、ビニルエチルエーテル、ビニルイソブチルエーテル等のビニルエーテル類、ビニルメチルケトン、ビニルヘキシルケトン、ビニルイソプロピルケトン等のビニルケトン類などのビニル系重合性モノマー、からなる群より選択された重合性モノマーを重合させて製造された有機高分子化合物を挙げることができる。

【００７５】

また、例えば、無機系固形物の例としては、カオリナイト、ベントナイト、タルク、雲母等の粘土鉱物；アルミナ、二酸化チタン、酸化亜鉛、マグネタイト、フェライト、ＮｂＴａ複合酸化物、WO_3、In_2O_3、MoO_3、V_2O_5、SnO_2、等の金属酸化物；シリカゲル、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウムゲル等の不溶性無機塩；金、銀、プラチナ、銅等の金属；ＧａＡｓ，ＧａＰ，ＺｎＳ、ＣｄＳ、ＣｄＳｅ、等の半導体化合物、ガラス、シリコン、或いはこれらの複合体などを用いることができるが、勿論、これらに限定されるものではない。

【００７６】

本発明の基体は、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）、ジアセテート、トリセテート、セロハン、セルロイド、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリビニルクロライド、ポリビニリデンクロライド、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステルなどのプラスチックからなるフィルム、ポリビニルクロライド、ポリビニルアルコール、アセチルセルロース、ポリカーボネート、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエチレン、テフロン等からなる多孔性高分子膜、木板、ガラス板、シリコン基板、木綿、レーヨン、アクリル、絹、ポリエステルなどの布、上質紙、中質紙、アート紙、ボンド紙、再生紙、バライタ紙、キャストコート紙、ダンボール紙、レジンコート紙などの紙を用いて、膜状やシート状とすることもできるが、勿論、これらに限定されるものではない。なお、これら膜状やシート状の材料は、滑らかなものであっても、凹凸のついたものであっても良い。

【００７７】

基体の例としては、シリコンやシリカ、ガラス、石英ガラス等の基板及びそれらの基板にフォトリソグラフィーやエッチング、サンドブラスト等の手法で施された微小流路やホール（孔）、或いはそれらの表面に金や銀、白金の薄膜が施されたもの、ＰＤＭＳ（ポリジメチルシロキサン）やＰＭＭＡ（ポリメチルメタクリレート）、ＰＥＴ（ポリエチレンテレフタレート）ＰＣ（ポリカーボネート）ＰＳ（ポリスチレン）等の基板及び成型技術により施された微小流路やホール（孔）、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレンダイアモンド或いはそれらの集合体、アルミナ、カーボン、フラーレン、ＺｎＯ等からなるナノウイスカー、SiO_2、アルミノシリケート、その他のメタロシリケート、TiO_2、SnO_2、Ta_2O_5等からなるメソポーラス薄膜、微粒子、及びモノリス構造体、金、銀、銅、白金等の微粒子、マグネタイト、フェライト、ヘマタイト、ガンマ・ヘマタイト、マグヘマイト等の鉄酸化物微粒子、アルミニウムシリコン混合膜及びそれを陽極酸化したシリコン酸化物ナノ構造体、ポーラスアルミナ薄膜、アルミナナノホール構造体、シリコンナノワイヤー等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、本発明の基体の大きさは使用用途に応じて種々選択することが可能である。

・標的物質検出用のキット

本発明にかかる金結合性タンパク質に標的物質との結合性を付加した構成を用いて、標的物質検出用のキットを得ることができる。例えば、上記の構造体を形成するための基体及び金結合性複合タンパク質と、該構造体への標的物質の結合を検出するための検出手段

と、を有する標的物質検出用キットを構成することができる。例えば、標的物質への金結合性タンパク質を含むタンパク質への結合は、金結合性タンパク質含むタンパク質が結合した状態の標的物質に対して金または金を含む標識物質を付加して、これを物理的あるいは化学的な手法で検出することによって行うことができる。あるいは、標的物質が金を含むものであれば、金結合性タンパク質の金への結合性を利用して、金結合性タンパク質を金を含む標的物質に結合させ、この結合状態を標識を利用して検出することができる。この場合に用いる標識としては接続部材の説明において後述するものを利用できる。更に、例えば、光学的な変化、電気的な変化、あるいは熱的な変化などにおける物理量の変化によって標的物質と金結合性タンパク質との結合を検出することができる。

【００７８】

なお、かかる標的物質との結合性を付加した構成としては、後述する金結合性複合タンパク質や、金結合性タンパク質を標的物質と標識物質との結合部材として利用する場合を好ましいものとして挙げることができる。

【００７９】

・表面プラズモン共鳴装置

なお、金に対する金結合性タンパク質を含むタンパク質の結合は、例えば、従来既知の表面プラズモン共鳴測定装置で定量的に測定することができる。表面プラズモン共鳴は、一般にガラス基板上に設けた金薄膜上の屈折率変化を全反射角以下でガラス側から入射させた光によりガラス／金界面で生じるエバネセント波と金薄膜上の自由電子の共鳴（表面プラズモン共鳴）によって生じる共鳴角変化から測定する方法である。測定された屈折率変化を、被対象タンパク質の金への結合量として換算し、評価できる。

【００８０】

・解離定数（K_D）

「解離定数（K_D）」とは、「解離速度（ｋｄ）」値を「結合速度（ｋａ）」値で除して求められる値である。これらの定数は、前記モノクローナル抗体またはそれらの断片が金に対する親和性を表す指標として用いられる。前記定数は、種々の方法に従って解析することができるが、本発明においては、測定機器であるＢｉａｃｏｒｅ２０００（アマシャムファルマシア社製）を用い、前記装置に添付された解析ソフトに従って、得られた結合曲線から解析して得た。

【００８１】

（２）金結合性複合タンパク質

本発明にかかる金結合性複合タンパク質は、２以上のドメインから構成され、１以上のドメインが上記の構成の金結合性タンパク質を有するものである。この複合タンパク質には以下の構成のものが例示できる。

（ａ）上記構成の金結合性タンパク質を含む第一のドメインと、特定の物質に対する結合部位を有するタンパク質を含む第二のドメインと、を有する複合タンパク質。

（ｂ）上記の第一のドメインと第二のドメインに加えて、第一のドメインと複合体を形成する第三のドメイン及び前記第二のドメインと複合体を形成する第四のドメインの少なくとも一方を更に有する複合タンパク質。

【００８２】

なお、第二～第四のドメインの少なくとも１つは金結合性のタンパク質を有することができ、その場合は、上記構成の金結合性タンパク質を含有させることでこれらのドメインを形成できる。なお、第一～第四のドメインの被結合物質への結合性は各ドメインで独立して設定することができ、これらのドメインにおいて同じ結合性を有するドメインが２以上存在してもよく、異なる結合性のドメインからこれらのドメインを構成してもよい。

【００８３】

更に、記第一～第四のドメインから選択された少なくとも２種が同一ポリペプチド鎖中に含まれているものであってもよい。このような構成としては、以下の構成を含む場合を挙げることができる。

（１）第一のドメインと第二のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している構成。

（２）第一のドメインと第二のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合されている構成。
（３）第三のドメインと第四のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成する構成。
（４）第三のドメインと第四のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合されている構成。
（５）第一のドメインと第二のドメインを含んでなる第一のポリペプチド鎖と、第三のドメインと第四のドメインを含んでなる第二のポリペプチド鎖とからなる構成。
（６）第一のドメインと第二のドメインを含んでなる第一のポリペプチド鎖と、第三のドメインと第二のドメインを含んでなる第三のポリペプチド鎖とからなる構成。
（７）第一のドメインと第二のドメインを含んでなる第一のポリペプチド鎖と、第一のドメインと第四のドメインを含んでなる第四のポリペプチド鎖と、からなる構成。
（８）少なくとも第一のドメインと第二のドメイン、及び第三のドメインを含んでなる一つのポリペプチド鎖からなる構成。
（９）少なくとも第一のドメインと第二のドメイン、第四のドメインを含んでなる一つのポリペプチド鎖からなる構成。
（１０）第一～第四のドメインを含んでなる一つのポリペプチド鎖からなる構成。

【００８４】

・金結合性複合タンパク質

金結合性複合タンパク質の構成要素としてのタンパク質は、少なくとも二以上のアミノ酸が結合して形成されるポリペプチド鎖を少なくとも一以上含んでなり、それらポリペプチド鎖が特定の立体構造を形成するように折り畳まれて、固有の機能（変換、分子認識等）発揮できる分子のことを言う。また、本発明の金結合性複合タンパク質は、少なくとも金に対する結合部位を一以上有し、更に金もしくは金以外の物質との結合部位を少なくとも一以上有する、多価または多重特異性の結合性を示す複合タンパク質で、少なくとも以下を含んでなる複合化されたタンパク質である。好ましい構成としては、金に対する結合部位を有し、少なくとも抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）または重鎖可変領域（ＶＨ）の一部を含む第一のドメインと、特定の物質（以下、標的物質）に対する結合部位を有し、少なくともＶＨまたはＶＬの一部を含む第二のドメインを有するものを挙げることができる。（以下、金に結合するＶＨ、ＶＬをＶＨ（Ｇ）、ＶＬ（Ｇ）、標的物質に結合するＶＨ、ＶＬをＶＨ（Ｔ）、ＶＬ（Ｔ）とする。）

抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、前述したように抗体重鎖及び抗体軽鎖が有する可変領域である。抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、一般的には各々アミノ酸約１１０個からなり筒状の構造をとり、逆平行の向きに配置されたβシート群による層状構造が形成され、この層状構造をひとつのＳＳ結合により結合し、非常に安定した構造体を形成している。また、前記可変領域（ＶＨまたはＶＬ）は、抗体の多様な抗原への結合を決定する相補的決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ：ＣＤＲ）と呼ばれる部分を有することが知られている。前記ＣＤＲは、ＶＨまたはＶＬにそれぞれ３つあり、比較的に多様性の少ないアミノ酸配列であるフレームワーク領域により分離されて配置され、対象となる認識部位の官能基の空間配置を認識することにより、より高度な特異的な分子認識を可能としている。

【００８５】

以下に、本発明の金結合性複合タンパク質の一例について述べる。本発明の金結合性タンパク質の最小単位は、上記第一のドメインと上記第二のドメインから構成され、図１にその模式的な図を示す。その組み合わせ例としては、ＶＨ（Ｇ）－ＶＨ（Ｔ）、ＶＨ（Ｇ）－ＶＬ（Ｔ）、ＶＬ（Ｇ）－ＶＨ（Ｔ）、ＶＬ（Ｇ）－ＶＬ（Ｔ）といった組み合わせが挙げられる。この例では、金結合性複合タンパク質は、第一のドメインと第二のドメインは相補的な結合部位を形成することなく、第一のドメインが金、第二のドメインが標的物質へと独立して結合するものである。第一のドメインと第二ドメインは、独立したポリペプチド鎖であっても、ドメインが連続的に結合されたポリペプチド鎖であってもよいが

、ポリペプチド鎖が連続して結合されたポリペプチド鎖を形成することが、製造工程の簡略化及びその機能発現においてより好ましい形態である。第一のドメインと第二のドメインが連続して結合されたポリペプチド鎖の場合、第一のドメインと第二のドメインを直接連鎖してもよいし、一個以上のアミノ酸からなるリンカーを介して連鎖してもよい。アミノ酸からなるリンカーは１乃至１０個のアミノ酸からなるものであることが好ましい。より好ましくは１乃至５個のアミノ酸からなるものである。リンカーのアミノ酸長が１１乃至１５である場合、第一のドメインと第二のドメインは配置による制限が少なく、前記ドメイン間で相補的な結合形成（ｓｃＦｖ化）してしまう場合がある。このＶＨ／ＶＬ間の相補的な複合体形成を抑制するために、リンカー長を短くし、ドメイン間に構造的な制約を負荷することが有効であることが知られている。第一もしくは第二のドメインのそれぞれが標的物質に結合した場合にもたらされる構造変化の影響が互いの所望する標的物質に対する結合能に影響がないことが望ましい。このために、リンカーをα－ヘリックス等の二次構造を持たせたり、本来所望の結合特性に無関係なポリペプチドのドメンインを挿入することも所望の特性や生産性に著しい影響を与えない範囲において可能である。

【００８６】

更に、本発明の金結合性複合タンパク質は、第一のドメインと複合体を形成する、ＶＨまたはＶＬの一部を少なくとも含む第三のドメイン、または／及び第二のドメインと複合体を形成する、ＶＬまたはＶＨの少なくとも一部を含む第四のドメインを含んでなる構成であっても良い。第三のドメインは、第一のドメインは複合体を形成することにより、第一のドメインと相補的な金結合部位を形成しすることがより望ましい。

【００８７】

例えば、図２ａの模式図で示すように第一のドメインがＶＨ（Ｇ）である場合、第三のドメインは第一のドメインとＦｖを形成し得るＶＬであることが好ましく、より好ましくは第一のドメインと第三のドメインが金結合部位を連合して形成する構成である。

【００８８】

このように第一のドメインが第三のドメインがＦｖを形成することにより、構造的により安定化し、構造変化による機能低下を抑制することが期待できる。さらに、第三のドメインが第一のドメインと連合して金結合部位を形成することにより、更に結合能（例えば、結合速度の向上、解離速度の抑制等）を向上することも期待される。

【００８９】

更には、図２ｂに示すように第一のドメインと第三のドメインは、それぞれ独立したポリペプチド鎖として設けても、連鎖してなるポリペプチド鎖であってもよい。（例えば、図２ｂの模式図に示すように第三のドメイン－第一のドメイン－第二のドメイン。金及びターゲットに対して結合能が発揮されるように適宜その構成を決定することができる。）

また、別の例として、図３の模式図に示すような構成も可能である。つまり、前記第一のドメインと前記第二のドメインからなるポリペプチド鎖と第三のドメインと前記第二のドメインからなるポリペプチド鎖からなる複合体である。この場合、第一のドメインと第三のドメインから形成されるＦｖまたはＦｖ様複合体により金と結合し、上記第二のドメインにより標的物質に対して結合するアンカーとして第一のドメインが機能するものである。

【００９０】

また、本発明の金結合性タンパク質は、第二のドメインと複合体を形成する、少なくともＶＨまたはＶＬの一部からなる第四のドメインを含んだ構成であっても良い。第四のドメインは、前記第二のドメインとともに標的物質に対する結合部位を相補的に形成することが望ましい。例えば、図４ａの模式図に示すように、第二のドメインがＶＬである場合、第四のドメインは第二のドメインとＦｖを形成し得るＶＨであることが好ましく、より好ましくは第二のドメインと第四のドメインが前記標的物質に対する結合部位を連合して形成する構成である。また、図４ｂの模式図に示すように、第一のドメイン、第二のドメイン、及び第四のドメインが連鎖したポリペプチド鎖を形成してもよい。特に、図４ｂの構成において第一のドメインにて少なくとも表面の一部に金を有する基体と結合し、第二

及び第四のドメインにて標的物質と結合する場合、第一のドメインが基体との結合した際において不可逆的な構造変化をした場合においてもリンカー等を設計をすることにより第二及び第四のドメインの標的物質との結合能への影響を最小限に抑えるようにすることが可能である。

更に、図５の模式図に示すような構成も可能である。つまり、前記第一のドメインと前記第二のドメインからなるポリペプチド鎖と第一のドメインと前記第四のドメインからなるポリペプチド鎖からなる複合体である。この場合、第二のドメインと第四のドメインから形成されるＦｖまたはＦｖ様複合体により標的物質を結合し、上記両ポリペプチド鎖を金に対して結合するアンカーとして第一のドメインが機能するものである。

【００９１】

また、本金結合性タンパク質は第三及び第四のドメインをともに構成材料とすることが可能である。図６の模式図に示すように第三及び第四のドメインがそれぞれ独立したポリペプチド鎖であっても、図７の模式図に示すように連鎖されてなるポリペプチド鎖であってもよい。連鎖したポリペプチド鎖の場合、第三のドメインと第四のドメインを直接連鎖してもよいし、図７のように一以上のアミノ酸からなるリンカーを介して連鎖してもよい。リンカー長の設定については、前記と同様にアミノ酸からなるリンカーは１乃至１０アミノ酸であることが好ましい。より好ましくは１乃至５である。

【００９２】

また、図８の模式図に示すように前記第一乃至第四のドメインが一つのポリペプチド鎖内に連鎖されたものであってもよい。この場合、第一のドメインと第三のドメインが複合体を形成し金と結合し、第二のドメインと第四のドメインが複合体を形成し金及び金以外の物質に結合できるように配置できるように構成されるものである。その為に、前記リンカーをドメイン間に設けることが好ましい。例えば、第一及び第二のドメイン間、第三及び第四のドメイン間は１乃至５アミノ酸であり、第二及び第三のアミノ酸のドメイン間は１５乃至２５アミノ酸である。同じような構成において、第一のドメインと第二のドメイン、第三のドメインと第四のドメインをそれぞれ／双方とも入れ替えること可能である。

【００９３】

これら一本鎖ポリペプチド内における各ドメインの配列は、金またはターゲットに対する結合性、及び本金結合性タンパク質の長期安定性等、所望の特性に応じて適宜選択して決定することが可能である。

【００９４】

第一のドメインは、例えば、配列番号：１乃至配列番号：５７の中の少なくとも一つの配列を含んでなるものであり、これらのアミノ酸配列において、一個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列のものであっても金に対する結合性を保持できれば何ら問題はない。更には、上記のアミノ酸配列の一部を形成する配列またはそれらを含む複合体であっても金結合性を示すものであれば何ら問題なく本発明の金結合性タンパク質として使用することが可能である。配列番号：１乃至配列番号：５７を有する本発明のＶＨの具体例を配列番号：５８乃至配列番号：７４に、本発明のＶＬの具体例を配列番号：７５乃至配列番号：７７に示す。

【００９５】

第三のドメインは、配列番号：１乃至配列番号：５７から選ばれるアミノ酸を一以上有していることが望ましい、更には、配列番号：５８乃至配列番号：７７の中から第一のドメインに応じて適宜選択して設定することがより好ましい。

【００９６】

本発明は、上記金結合性複合タンパク質をコードする核酸をも含くむ。更に、それをタンパク質として宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、マウス、ヒト等由来の従来既知のタンパク発現用細胞）の形質転換し、上記金結合性タンパクを発現できるための遺伝子ベクターとなる核酸からなる構成物をも含む。本発明の金結合性タンパク質を構成しうる第一及び第三のドメインをコードする核酸の配列例を配列番号：９８乃至配列番号：１１６に示

す。

【００９７】

一つの前記発現ベクターにより発現できる本発明の金結合性タンパク質の各ドメインは、１乃至４のいずれかから選択して、設計することが可能である。ひとつの発現用ベクターに本発明の金結合性タンパク質の複数のドメインをコードする場合、それぞれのドメインが独立した個々のポリペプチド鎖として発現させることができる。また、ドメイン間を連続して結合またはアミノ酸を介して結合させた一つのポリペプチド鎖として発現するベクター構成とすることも可能である。本発明の金結合性タンパク質発現用ベクターの構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の導入遺伝子を発現させるために必要な構成等に組み込むことより、設計及び構築することができる。ベクター構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の構成等を参照し、構築することができる。また、大腸菌等を宿主細胞として用いる場合、外来遺伝子産物である本発明の金結合性タンパク質を速やかに細胞質外に除外することで、プロテアーゼによる分解を少なくすることが可能である。また、この外来遺伝子産物が菌体にとって毒性である場合でも、菌体外へ分泌することによりその影響を小さくすることができることが知られている。通常、既知の細胞質膜あるいは内膜を通過して分泌されるタンパク質の多くがその前駆体のＮ末端にシグナルペプチドを有し、分泌過程においてシグナルペプチダーゼにより切断され、成熟タンパク質となる。多くのシグナルペプチドはそのＮ末に塩基性のアミノ酸、疎水性アミノ酸、シグナルペプチダーゼによる切断部位と配置されている。

【００９８】

本発明の金結合性複合タンパク質をコードする核酸の５'側にシグナルペプチドであるｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより分泌発現させることができる。また、ひとつのベクター中に本発明の金結合性複合タンパク質を構成する各ドメインまたは複数のドメインから構成されるポリペプチド鎖をそれぞれ独立して複数挿入することも可能である。この場合、各ドメインまたはポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、分泌を促すことができる。更に、または一以上のドメインからなるポリペプチド鎖として発現させる場合、前記ポリペプチド鎖の５'末端に同様にしてｐｅｌＢをコードする核酸を配置することにより分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した本発明の金結合性複合タンパク質、あるいはその構成用途してのドメインは、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。また、発現させたタンパク精製時の作業の簡便さを考慮して、独立した各ドメインもしくは複数のドメインが結合して形成されたポリペプチド鎖のＮまたはＣ末端に精製用のタグを遺伝子工学的に配置することが可能である。前記精製用タグとしては、ヒスチジンが６残基連続したヒスチジンタグ（以下、Ｈｉｓ×６）やグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのグルタチオン結合部位などが挙げられる。前記タグの導入方法としては、前記発現用ベクターにおける金結合性タンパク質をコードする核酸の５'または３'末端に精製タグをコードする核酸を挿入する方法や市販の精製タグ導入用ベクターを使用するなどが挙げられる。

【００９９】

以下に、上記発現ベクターを用いた本発明の金結合性複合タンパク質の製造方法について述べる。

本発明の金結合性複合タンパク質、またはその構成要素となるポリペプチド鎖は、従来既知のタンパク発現用の宿主細胞に、宿主細胞に応じて設計した上記金結合性複合タンパク質発現用ベクターを形質転換し、宿主細胞内のタンパク合成システムを用いて、宿主細胞内に合成される。その後、宿主細胞内外に蓄積または分泌された目的タンパク質を細胞内部または細胞培養上清から精製することにより得ることができる。

【０１００】

例えば、大腸菌を宿主細胞として用いる場合、本発明の金結合性複合タンパク質をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより細胞質外に分泌発現しやすい構成にすることができる。ひとつの発

現用ベクターで本発明の金結合性複合タンパク質を構成する各ドメインを得るための複数のポリペプチド鎖を発現させる場合、各ポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、発現時に細胞質外への分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した本発明の金結合性タンパク質は、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。精製方法としては、前記精製タグがＨｉｓタグの場合、ニッケルキレートカラムやＧＳＴの場合、グルタチオン固定化カラムを使用することで精製することができる。

【０１０１】

また、菌体内に発現した本発明の金結合性複合タンパクを不溶性顆粒で得ることも可能である。この場合、培養液から得られた菌体をフレンチプレスや超音波により破砕した細胞破砕液から前記不溶性顆粒を遠心分離することができる。得られた不溶性顆粒画分を尿素、塩酸グアニジン塩を含むの従来既知の変性剤を含んだ緩衝溶液で可溶化した後に、変性条件下で前記同様なカラム精製することができる。得られたカラム溶出画分は、リフォールディング作業により、変性剤除去と活性構造再構築を行うことができる。リフォールディング方法としては、従来既知の方法から適宜用いることも可能である。具体的には、段階透析法や希釈法などを目的のタンパクに応じて用いることが可能である。

【０１０２】

本発明の金結合タンパク質の各ドメインまたは各ポリペプチド鎖は、各々を同一宿主細胞内で発現させてから複合化させることも可能であるし、別の宿主細胞を使用して発現した後に共存させて、複合体化させることも可能である。

【０１０３】

更に、本発明の金結合性タンパク質をコードするベクターを用いて、細胞抽出液を用いて生体外でのタンパク質発現をすることも可能である。好適に用いられる細胞抽出液としては、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等が挙げられる。しかしながら、上記無細胞抽出液によるタンパク合成は一般的には還元条件下で行われる。その為に、抗体断片中のジスルフィド結合を形成させるために何らかの処理を行う方がより好ましい。

【０１０４】

本発明の金結合性複合タンパク質の好ましい解離乗数（K_D）は、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０存在下のバッファー条件下で10^{-6}M以下であり、より好ましくは10^{-8}M以下である。上記条件において、ＢＳＡなど比較的に金への非特異的な吸着が多いとされるタンパク質材料であっても金への吸着ができないことを本発明者の検討において確認している。K_D値が10^{-6}M以下であれば、上記のような非特異吸着性のタンパク質の吸着挙動と十分に区別することが可能であり、更に10^{-8}M以下であることで固定化用のアンカー分子として十分に機能することができる。

【０１０５】

本発明の金を含む標的物質に対して結合能を有するこのような抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、または抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を取得する方法のひとつとして、前記ＶＨまたはＶＬ遺伝子ライブラリーを作製し、それらをタンパク質として網羅的に発現させて、その遺伝子と対応させながら、金または標的物質に対する結合性により選択する方法がある。前記遺伝子ライブラリーは、たとえば、臍帯血、扁桃、骨髄、あるいは末梢血細胞や脾細胞等から得ることができる。例えば、ヒト末梢血細胞からｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。次に、ヒトＶＨ、ＶＬをコードする配列をプローブとして、ヒトＶＨまたはＶＬのｃＤＮＡライブラリーを作製する。例えば、ヒトＶＨファミリー（ＶＨ１乃至７）をファミリー毎に幅広く増幅することができるプライマーやヒトＶＬを増幅できるプライマーは公知である。これらＶＨ、ＶＬ毎にプライマーを組み合わせてＲＴ－ＰＣＲを行い、ＶＨ、ＶＬをコードした遺伝子を取得する。また、ファージディスプレー法を用いることも可能である。ファージディスプレー法は、ＶＨ、ＶＬまたはそれら含む複合体（例えば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ）をコードした遺伝子ライブラリーをファージ外殻タンパクをコードした遺伝子と結合し、ファージミドライブラリーを作製し、それらを大腸菌に形質転換し、種々のＶＨまたはＶＬを外殻タンパクの一部として有するファージとして発現させる。そ

れらのファージを用いて、上記同様にして金また標的物質に対する結合性により選択することができる。ファージに融合タンパクとして提示されたＶＨまたはＶＬをコードする遺伝子は、ファージ内にファージミドにコードされているのでＤＮＡシークエンス解析をすることにより、特定することができる。

【０１０６】

更には、金または標的物質にて免疫した動物から目的の抗体を産出する細胞を採取し、上記と同じプライマーを使用し、ＶＨまたはＶＬの塩基配列及びアミノ酸配列を特定することができる。

【０１０７】

また、本発明の第三のドメイン、第四のドメインは標的物質に対して既知の抗体及び抗体断片の可変領域のアミノ配列を元に設計することができる。また、標的物質に対する抗体または抗体断片が未取得の場合、これに対する抗体を取得した後にアミノ酸配列を解析することにより、前記と同様にして設計することも可能である。前記第三のドメインと前記第四のドメインが供に本発明の金結合性タンパク質を構成するドメインであってもよい。このようにして、得られたＶＨまたはＶＬの塩基配列を用いて、本発明の金結合性複合タンパクを作製することが可能である。

【０１０８】

・金を有する被結合対象物

免疫やパニング等により金結合性タンパク質を選択する際に用いる被結合対象物としては、先に金結合性タンパク質の場合に例示したものが利用できる。

・基体

本発明に係る金結合性複合タンパク質は、基体との組み合わせることで種々の用途に利用できる構造体を得ることができる。この用途に利用できる基体としては、先に金結合性タンパク質の場合に例示したものが利用できる。

・標的物質

本発明にかかる金結合性複合タンパク質を、金との結合性を有するドメインと、標的物質に対して結合性を有するドメインとが含まれるように構成することで、標的物質検出用の複合タンパク質として利用することが可能となる。この検出対象としての標的物質としては、抗原抗体反応を用いた各手法によって抗原となり得る物質であれば如何なる分子も用いることが可能である。例えば、標的物質は、非生体物質と生体物質に大別される。

【０１０９】

非生体物質として産業上利用価値の大きいものとしては、環境汚染物質としての塩素置換数／位置の異なるＰＣＢ類、同じく塩素置換数／位置の異なるダイオキシン類、いわゆる環境ホルモンと呼ばれる内分泌撹乱物質（例：ヘキサクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、２，４，５－トリクロロ酢酸、２，４－ジクロロフェノキシ酢酸、アミトロール、アトラジン、アラクロール、ヘキサクロロシクロヘキサン、エチルパラチオン、クロルデン、オキシクロルデン、ノナクロル、１，２－ジブロモ－３－クロロプロパン　、ＤＤＴ、ケルセン、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、エンドスルファン（ベンゾエピン）、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキサイド、マラチオン、メソミル、メトキシクロル、マイレックス、ニトロフェン、トキサフェン、トリフルラリン、アルキルフェノール（炭素数５～９）、ノニルフェノール、オクチノニルフェノール、４－オクチルフェノール、ビスフェノールＡ、フタル酸ジ－２－エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ－ｎ－ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ベンゾ（ａ）ピレン、２，４ージクロロフェノール、アジピン酸ジ－２－エチルヘキシル、ベンゾフェノン、４－ニトロトルエン、オクタクロロスチレン、アルディカーブ、ベノミル、キーポン（クロルデコン）、マンゼブ（マンコゼブ）　、マンネブ、メチラム、メトリブジン、シペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ビンクロゾリン、ジネブ、ジラム、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル）等が挙げられる。

【０１１０】

生体物質としては、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質及びそれらの複合体から選択される生体物質が含まれ、更に詳しくは、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質から選択される生体分子を含んでなるものであり、具体的には、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アプタマー、遺伝子、染色体、細胞膜、ウイルス、抗原、抗体、レクチン、ハプテン、ホルモン、レセプタ、酵素、ペプチド、スフィンゴ糖、スフィンゴ脂質の何れかから選択された物質を含むものであれば、如何なる物質にも本発明を適用することができる。更には、前記の「生体物質」を産生する細菌や細胞そのものも、本発明が対象とする「生体物質」として標的物質となり得る。

【０１１１】

具体的なタンパク質としては、いわゆる疾病マーカーが挙げられる。例としては、胎児期に肝細胞で産生され胎児血中に存在する酸性糖蛋白であり、肝細胞癌（原発性肝癌）、肝芽腫、転移性肝癌、ヨークサック腫瘍のマーカーとなるα－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、肝実質障害時に出現する異常プロトロンビンであり、肝細胞癌で特異的に出現することが確認されるＰＩＶＫＡ－ＩＩ、免疫組織化学的に乳癌特異抗原である糖蛋白で、原発性進行乳癌、再発・転移乳癌のマーカーとなるＢＣＡ２２５、ヒト胎児の血清、腸および脳組織抽出液に発見された塩基性胎児蛋白であり、卵巣癌、睾丸腫瘍、前立腺癌、膵癌、胆道癌、肝細胞癌、腎臓癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌のマーカーである塩基性フェトプロテイン（ＢＦＰ）、進行乳癌、再発乳癌、原発性乳癌、卵巣癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ１５－３、膵癌、胆道癌、胃癌、肝癌、大腸癌、卵巣癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ１９－９、卵巣癌、乳癌、結腸・直腸癌、胃癌、膵癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ７２－４、卵巣癌（特に漿液性嚢胞腺癌）、子宮体部腺癌、卵管癌、子宮頸部腺癌、膵癌、肺癌、大腸癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ１２５、上皮性卵巣癌、卵管癌、肺癌、肝細胞癌、膵癌マーカーとなる糖蛋白であるＣＡ１３０、卵巣癌（特に漿液性嚢胞腺癌）、子宮体部腺癌、子宮頸部腺癌のマーカーとなるコア蛋白抗原であるＣＡ６０２、卵巣癌（特に粘液性嚢胞腺癌）、子宮頸部腺癌、子宮体部腺癌のマーカーとなる母核糖鎖関連抗原であるＣＡ５４／６１（ＣＡ５４６）、大腸癌、胃癌、直腸癌、胆道癌、膵癌、肺癌、乳癌、子宮癌、尿路系癌等の腫瘍関連のマーカー抗原として現在、癌診断の補助に最も広く利用されている癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、膵癌、胆道癌、肝細胞癌、胃癌、卵巣癌、大腸癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＤＵＰＡＮ－２、膵臓に存在し、結合組織の弾性線維エラスチン（動脈壁や腱などを構成する）を　特異的に加水分解する膵外分泌蛋白分解酵素であり、膵癌、膵嚢癌、胆道癌のマーカーとなるエラスターゼ１、ヒト癌患者の腹水や血清中に高濃度に存在する糖蛋白であり、肺癌、白血病、食道癌、膵癌、卵巣癌、腎癌、胆管癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫のマーカーとなる免疫抑制酸性蛋白（ＩＡＰ）、膵癌、胆道癌、乳癌、大腸癌、肝細胞癌、肺腺癌、胃癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＮＣＣ－ＳＴ－４３９、前立腺癌のマーカーとなる糖蛋白質であるγ－セミノプロテイン（γ－Ｓｍ）、ヒト前立腺組織から抽出された糖蛋白であり、前立腺組織のみに存在し、それゆえ前立腺癌のマーカーとなる前立腺特異抗原（ＰＳＡ）、前立腺から分泌される酸性ｐＨ下でリン酸エステルを水解する酵素であり、前立腺癌の腫瘍マーカーとして用いられる前立腺酸性フォスファターゼ（ＰＡＰ）、神経組織及び神経内分泌細胞に特異的に存在する解糖系酵素であり、肺癌（特に肺小細胞癌）、神経芽細胞腫、神経系腫瘍、膵小島癌、食道小細胞癌、胃癌、腎臓癌、乳癌のマーカーとなる神経特異エノラーゼ（ＮＳＥ）、子宮頸部扁平上皮癌の肝転移巣から抽出・精製された蛋白質であり、子宮癌（頸部扁平上皮癌）、肺癌、食道癌、頭頸部癌、皮膚癌のマーカーとなる扁平上皮癌関連抗原（ＳＣＣ抗原）、肺腺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、膵癌、卵巣癌、子宮癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるシアリルＬｅ^{X}－ｉ抗原（ＳＬＸ）、膵癌、胆道癌、肝癌、胃癌、大腸癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＳＰａｎ－１、食道癌、胃癌、直腸・結腸癌、乳癌、肝細胞癌、胆道癌、膵癌、肺癌、子宮癌のマーカーであり、特に他の腫瘍マーカーと組み合わせて進行癌を推測し、再発予知・治療経過観察として有用である単鎖ポリペプチドである組織ポリペプタイド抗原（ＴＰＡ）、卵巣癌、転移性卵巣癌、胃癌、大腸癌、胆道系癌、膵癌、肺癌のマーカーとなる母核糖

鎖抗原であるシアリルＴｎ抗原（ＳＴＮ）、肺の非小細胞癌、特に肺の扁平上皮癌の検出に有効な腫瘍マーカーであるシフラ（ｃｙｔｏｋｅｒａｔｉｎ；ＣＹＦＲＡ）、胃液中に分泌される蛋白消化酵素であるペプシンの２種（ＰＧ　Ｉ・ＰＧ　ＩＩ　）の不活性型前駆体であり、胃潰瘍（特に低位胃潰瘍）、十二指腸潰瘍（特に再発、難治例）、ブルンネル腺腫、ゾーリンガーエリソン症候群、急性胃炎のマーカーとなるペプシノゲン（ＰＧ）、組織障害や感染により、血漿中で変化する急性相反応蛋白であり、急性心筋梗塞等により心筋に壊死が起こると、高値を示すＣ－反応性蛋白（ＣＲＰ）、組織障害や感染により、血漿中で変化する急性相反応蛋白である血清アミロイドＡ蛋白（ＳＡＡ）、主に心筋や骨格筋に存在する分子量約１７５００のヘム蛋白であり、急性心筋梗塞、筋ジストロフィー、多発性筋炎、皮膚筋炎のマーカーとなるミオグロビン、骨格筋，心筋の可溶性分画を中心に存在し、細胞の損傷によって血液中に遊出する酵素であって、急性心筋梗塞、甲状腺機能低下症、進行性筋ジストロフィー症、多発性筋炎のマーカーとなるクレアチンキナーゼ（ＣＫ）（骨格筋由来のＣＫ－ＭＭ型，脳，平滑筋由来のＣＫ－ＢＢ型，心筋由来のＣＫ－ＭＢ型の３種のアイソザイム及びミトコンドリア・アイソザイムや免疫グロブリンとの結合型ＣＫ（マクロＣＫ））、横紋筋の薄いフィラメント上でトロポニンＩ，Ｃとともにトロポニン複合体を形成し，筋収縮の調節に関与している分子量３９，０００の蛋白であり、横紋筋融解症、心筋炎、心筋梗塞、腎不全のマーカーとなるトロポニンＴ、骨格筋・心筋いずれの細胞にも含まれる蛋白であり，測定結果の上昇は骨格筋，心筋の障害や壊死を意味するため、急性心筋梗塞症、筋ジストロフィー、腎不全のマーカーとなる心室筋ミオシン軽鎖Ｉ、また、近年ストレスマーカーとして注目されてきているクロモグラニンＡ、チオレドキシン、８－ＯｈｄＧ、等が挙げられる。

【０１１２】

・標的物質検出用キット

本発明にかかる金結合性複合タンパク質を用いて標的物質検出用のキットを構成することができる。例えば、第二ドメイン及び必要に応じて用いられる第四ドメインに標的物質に対して特異的に結合する抗体及びその変異体を用いた金結合性複合タンパク質と、金を含む表面を有する基体と、基体上に金結合性複合タンパク質を介して固定された標的物質を検出するための検出手段と、を含む標的物質検出用のキットを構成することができる。金基体上に金結合性複合タンパク質を介して固定された標的物質の検出には、前述の表面プラズモン共鳴測定装置を用いて測定することが可能である。また、金を少なくとも一部に含んだ基体を標識物質として標的物質を検出方法が利用できる。このような金基板と標的物質、標識物質と標的物質を仲介する物質としては、前述した金結合性複合タンパク質を利用できる。これらの標的物質を認識し、結合する抗体断片を用いて金結合性複合タンパク質を形成することにより本発明に使用することが可能である。

【実施例】

【０１１３】

以下、本発明の実施例として金に対して結合を示すタンパク質の取得とその評価について詳細に述べる。本発明は、本実施例の記載内容に何ら制限されるものではない。

【０１１４】

実施例１（抗体重鎖可変領域ＶＨライブラリーの作製）

ヒト成人末梢血Ｂリンパ球由来Ｆａｂライブラリーを鋳型として、ＶＨコード遺伝子を以下のｐｒｉｍｅｒを使用してＰＣＲ（タカラバイオ、ＬＡキット）にて推奨の方法に準じＤＮＡ複製を行う。プライマーは、以下のように設定した。

・ｂａｃｋ　ｐｒｉｍｅｒｓ

（配列番号：７８）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧ<u>ＣＣＡＴＧＧ</u>ＣＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣＴＧＧ－３'

（配列番号：７９）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧ<u>ＣＣＡＴＧＧ</u>ＣＣＣＡＧＲＴＹＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣＴＧＧ－３'

（配列番号：８０）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＳＴＲＣＡＧＣＴＧＣＡＧＳＡＧＴＣＲＧＧ－３'
（配列番号：８１）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＳＡＲＧＴＧＣＡＧＫＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧ－３'
（配列番号：８２）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＣＡＧＴＧＴＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＧ－３'
（配列番号：８３）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＡＣＡＧＳＡＧＴＧＧＧＧ－３'
・ｆｏｒｗａｒｄ　ｐｒｉｍｅｒｓ
（配列番号：８４）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＧＣＣ－３'
（配列番号：８５）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＡＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＴＴＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：８６）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴＣＣ－３'
（配列番号：８７）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣＣＣ－３'
（１）上記Ｆａｂライブラリーを鋳型とし、上記プライマーを用いてＰＣＲによるＶＨコード遺伝子の増幅を行う。ＰＣＲ条件：９５℃×１０ｍｉｎ、（９４℃×１ｍｉｎ、６０℃×２ｍｉｎ、７２℃×２ｍｉｎ）×３５ｃｙｃｌｅ、７２℃×６ｍｉｎ）。
【０１１５】
（２）タンパク発現用ベクターとして、ｐＬＵＣＫ（Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．２１８、ｐｐ６８２、１９９６）のマルチクローニングサイトを図１１に示すようにのように改良したプラスミドｐＲＡ－ＸＸを用意する。（ＨｉｎｄIIIにつづき、シグナルペプチドであるｐｅｌＢをコードする核酸配列を配置し、続いてＮｃｏＩ及びＥｃｏＲＩの間に、ＮｈｅＩ／ＳａｃII／ＳｐｅＩの順に制限酵素部位を設け、ＳａｃII／ＳｐｅＩの間にＨｉｓ×６をコードする核酸配列を設ける。また、アンピシリン耐性遺伝子、Ｔ７プラモーター、ｌａｃオペレーター、Ｔ７ターミネーター配列はｐｌｕｃｋと同じとした。）
（３）上記ＰＣＲ産物及び上記プラスミドをＮｃｏＩ／ＮｈｅＩ（それぞれＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）にて推奨の方法により制限酵素による切断を行う。
上記プラスミド制限酵素切断溶液を、スピンカラム　４００ＨＲ（アマシャムサイエンス）する。
（４）制限酵素により切断したＰＣＲ断片溶液を市販のゲル精製キット（ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐ　ｓｙｓｔｅｍ：　Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して精製する。
（５）上記二つの断片を、市販のＴ４リガーゼキット（Ｒｏｃｈｅ社）を業者推奨の方法にて調合しライゲーションを行う。図１２ａに示すＶＨコード遺伝子挿入ベクターを得る。
（６）ライゲーション産物を用いてエレクトロポレーションによる大腸菌ＤＳ１２Ｓ株の形質転換を行った。ラージスケールでプラスミドの調製を行った。
（７）これらプラスミド溶液を系列希釈し、それぞれの溶液をエレクトロポレーションに

て大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）の形質転換を行い、同溶液にＬＢ培地を７００μＬ添加した後に、３７℃にて一時間振盪培養した。培養液を６０００ｒｐｍで５分間遠心した後に、上清６５０μＬを廃棄した。
（８）残りの上清と沈殿画分を懸濁し、ＬＢ／Ａｍｐ．プレートに撒き、３７℃にて一晩静置した。その結果、最終的におよそ５×１０^{5}クローンを含む抗体ＶＨライブラリーを得た。
（９）次に、上記１０^{3}倍希釈プレート３枚から任意に１０００個のコロニーを選択し、以下の工程でタンパク粗抽出液を調整する。各コロニーをＬＢ／ａｍｐ．　３ｍＬ液体培地に植え継ぎ、２８℃にて６時間振盪培養を行う。次に、ＩＰＴＧを終濃度１ｍＭとなるように添加し、更に１２時間振盪培養を行った。
（１０）続いて、遠心（１０，５００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）により、培養画分、上清菌体画分を得た。
（１１）得られた菌体画分を氷中で冷却したオスモチック溶液（０．５Ｍスクロース、１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、０．５ｍＭＥＤＴＡ）２００μＬを加え、懸濁し、氷中で１０分間静置する。次に、冷やした滅菌水を１ｍＬを加え、氷中に１時間静置する。遠心（６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎ）した後、上清を透析バック（ＭＷＣＯ１０，０００）に入れ、外液をＴｒｉｓ＋０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０溶液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５００ｍＭ　ＮａＣｌ）として、６時間毎に外液を交換しながら１８時間透析を行う。

【０１１６】

上記工程で得られた透析内液を金結合性抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のスクリーニングのサンプルとした。

【０１１７】

実施例２（金結合性抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のスクリーニング）

金結合性抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のスクリーニング用基板として、金蒸着（厚み１００ｎｍ）した９６穴タイタープレートを用意した。実施例１で得られた１０００のサンプル溶液２５０μＬを各ｗｅｌｌに分注し、１時間緩やかに振盪する。上清を廃棄し、プレートを裏返し、紙タオル上で１０回叩き、水分を取り除く。洗浄工程として、Ｔｒｉｓ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０　２００μＬを各ｗｅｌｌに加え、１０分間緩やかに振盪し、この作業を３回繰り返す。ＨＲＰ結合抗Ｈｉｓ抗体（インビトロジェン社）を１：１０００でＴｒｉｓ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０溶液で希釈した抗体溶液　２００μＬを各ｗｅｌｌに分注し、１時間緩やかに振盪する。続いて、前記洗浄工程と同様の作業を行う。ＨＲＰ基質および発色材となるＤｅｔｅｃｔ　Ｒｅａｇｅｎｔ１及び２（アマシャムサイエンス社）各１００μＬずつを各ｗｅｌｌに分注し、１分間緩やかに浸透する。
ルミノールの化学発光量を定量する。

【０１１８】

上記により化学発光が認められた１５サンプルのコロニーを、ＬＢ／ａｍｐ．　１．５ｍＬに植え継ぎ、３７℃にて一晩振盪培養を行う。得られた菌体からＳＶ　ＭｉｎｉＰｒｅｐ　ＤＮＡ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（プロメガ社）を用いて、プラスミドを精製する。上記で得られた１７つのＶＬ提示ファージミドのＤＮＡ配列を以下の方法にて配列を決定する。シークエンス用プライマーは、発現用ベクターのＶＨコード遺伝子上流に位置するｐｅｌＢ配列部に設定する。シークエンス用のｐｒｉｍｅｒは以下のとおり。
ｐｅｌＢ－ｂａｃｋ
（配列番号：８８）５'－ｃｃｇｃｔ　ｇｇａｔｔ　ｇｔｔａｔ　ｔａｃｔｃ　ｇｃ－３'
上記ｐｒｉｍｅｒを使用し、業者推奨のシークエンス反応キットと反応液組成によりＢｉｇＤｙｅ－ＰＣＲ反応を行った。温度サイクルは９６℃×３ｍｉｎ→（９４℃×１ｍｉｎ→５０℃×１ｍｉｎ→６８℃×４ｍｉｎ）×３０ｃｙｃｌｅとする。次に、エタノール沈殿により精製した前記ＰＣＲ産物をシークエンサー（ＡＢＩ社製３７７）により塩基配列を決定した。その結果、配列番号：５８乃至配列番号：７４の各配列を得た。

【０１１９】

実施例３（抗体軽鎖可変領域ＶＬライブラリーの作製）
実施例１と同様方法により、ヒト末梢血細胞のＦａｂライブラリーからＶＬ遺伝子ライブラリーを作製する。プライマーは以下のとおり。
・ｂａｃｋ　ｐｒｉｍｅｒ
（配列番号：８９）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＭＣＡＴＹＣＡＧＷＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣ－３'
（配列番号：９０）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＡＴＲＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＹＣＡＧＷＣＴＣＣ－３'
（配列番号：９１）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＡＡＡＴＴＧＴＧＷＴＧＡＣＧＣＡＧＴＣＴＣＣ－３'
（配列番号：９２）
５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＡＣＡＴＣＧＷＧＨＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣ－３'
・ｆｏｒｗａｒｄ　ｐｒｉｍｅｒ
（配列番号：９３）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡＣＣＴＴＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９４）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９５）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＡＴＣＣＡＣＴＴＴＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９６）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＣＣＴＴＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９７）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＡＡＴＣＴＣＣＡＧＴＣＧＴＧＴＣＣＣ－３'
また、実施例１の（２）におけるタンパク発現用プラスミド作製を作製する際に、ＮｃｏＩ／ＳａｃII間のＮｈｅＩをＮｏｔＩに変更した以外は同様にしてプラスミドを作製し、用いた。さらに、実施例１の（１１）の工程終了時に得られたＶＬタンパク透析内液を、金結合性抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）のスクリーニングのサンプルとした。
【０１２０】
実施例４（金結合性抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）のスクリーニング）
スクリーニングサンプルを実施例３で得るサンプルとした以外は、実施例２と同様にして金結合性ＶＬのスクリーニングを行なう。その結果、配列番号：７５乃至配列番号：７７の各配列を得た。
【０１２１】
以下、実施例１のヒト末梢血細胞Ｆａｂ遺伝子ライブラリーより、ファージミド作製し、金結合性ＶＬ、またはＶＨをスクリーニングする。
【０１２２】
実施例５（金親和性ＶＬ提示ファージ群のスクリーニング）
以下の手順により、ＶＬ提示ファージライブラリーを作製し、金に結合性を示すファージ群の選択を行なう。
（１）ＶＬ提示用ファージミド
ヒト成人末梢血Ｂリンパ球由来Ｆａｂライブラリーを鋳型として、プライマーとして実

施例３で用いた配列番号：８９乃至配列番号：９７を用いてＶＬコード遺伝子を複製する。更に、Ｍ１３ファージのコートタンパクであるＰIIIタンパクのＮ末端の一部を欠損させ、更にＶＬタンパクが融合されて発現されるように作製されたＶＬ提示ファージミド（図１２ｂ）のライブラリを使用する。（Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ．　１９９６、２１８，ｐｐ６８２）

（２）ＶＬ断片提示ファージライブラリー作製

１）形質転換

上記ＶＬコード遺伝子ライブラリー（３５０ｎｇ／μＬ）１μＬを大腸菌ＤＨ１２Ｓ４０μＬにエレクトロポレーション（印加電圧：１．５ＫＶ、抵抗：１８６Ω容量：５０μＦ、）にて形質転換する。次に、以下の手順でＶＬ提示ファージライブラリーを調整する。

２）培養

（ｉ）形質転換後のＤＨ１２Ｓ溶液にＬＢ培地８００μＬ加え、３７℃にて１時間、振盪培養（１４０ｒｐｍ）する。

（ii）上記培養液を２０ｍＬ　ＬＢ培地＋終濃度アンピシリン１００μｇ／ｍＬ（ＬＢ／ａｍｐ．）に加え、３７℃にて３～４時間培養する。

（iii）ヘルパーファージであるＭ１３ＫＯ７　４０μＬを加え、更に１時間、１００ｒｐｍにて振盪培養する。

（iv）５０ｍｇ／ｍＬ　カナマイシン溶液を終濃度５０μｇ／ｍＬとなるように加えて、３７℃にて振盪培養（１００ｒｐｍ）を行なう。

３）ＶＬ提示ファージライブラリーの回収

（ｉ）上記培養液に２０％ＰＥＧ／５００ｍＭＮａＣｌを５ｍＬ加え、氷中に１時間以上放置する。

（ii）遠心（６５００ｒｐｍ×３５分間）にて、上清を丁寧に取り除く。

（iii）沈殿をＰＢＳバッファー５００μＬで懸濁し、ＶＬ提示ファージ溶液を得る。

４）ＶＬ提示ファージライブラリーのタイター評価

（ｉ）ＪＭ１０９グリセロールストック　１０μＬをＬＢに加え、３７℃にて振盪培養する。

（ii）上記３）で調整したＶＬ提示ファージ溶液をＬＢ培地により系列希釈溶液を準備する。

（iii）OD_{600}が～０．５となった（ａ）培養液７５０μＬに系列（$\times 10^{-6}$～10^{-10}）希釈液１０μＬを加え、３７℃にて１時間振盪培養する。

（iv）遠心（６０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）を行い、培養上清７００μＬを除く。

（ｖ）残った培地上清と沈殿をピペッティングにて懸濁し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、３７℃にて一晩静置する。

（ｖi）コロニーが１００以下となる希釈濃度プレート上に生じたコロニーをカウントして、ＶＬ提示ファージライブラリー溶液のタイター価とする。

【０１２３】

得られたＶＬ提示ファージライブライリー溶液：　5×10^{9}ｃｆｕ／μＬ（３）金微粒子を用いたＶＬパニング

上記作製したファージライブラリー溶液と金微粒子（１．５μｍφ：アルドリッチ社製）を用いて以下の方法によるパニング作業を５ラウンド繰り返し、金結合性ＶＬを提示するファージ群を選択することを目的とした。

【０１２４】

１）結合実験

（ｉ）滅菌済エッペンチューブ（１．５ｍＬ）に上記ファージ溶液（溶液中の全ファージ数が１０１０ｃｆｕとなる量）に対して、上記金微粒子溶液（５０ｍｇ／ＰＢＳ１ｍＬ）１０μＬ、更にＰＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を全量が１０００μＬになるように加え、結合反応溶液とした。

（ii）上記結合反応溶液を室温にて緩やかに回転させながら３０分間保持した。

（iii）上記（ii）を遠心（１０，０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）して、溶液上清を丁寧に廃棄する。
２）洗浄（非特異吸着物の洗浄）
（ｉ）上記エッペンチューブ中の金微粒子にＰＢＳＴ５００μＬを加え、室温にて緩やかに回転させながら１０分間保持する。
（ii）遠心（１０，０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）し、洗浄上清を丁寧に廃棄する。
（iii）上記（ｉ）及び（ii）を１０回繰り返す。
３）酸溶出と酸溶出画分のタイター評価
上記２）で得られた金微粒子に吸着したファージタイターを評価を以下の手順にて確認する。
３）－１　酸溶出
（ｉ）先浄後の金微粒子に対して、０．２ＭＧｌｙ－ＨＣｌ（ｐＨ２．２）１１５μＬ加えた。１分間緩やかに上下に回転させながら保持する。
（ii）遠心（１０，０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）にて、上清を酸溶出画分として回収する。
（iii）回収した酸溶出画分を１ＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ　１５μＬを加え、中和する。
（iv）中和後の酸溶出液１μＬを系列希釈し、前記タイター評価法によりタイター値を側定する。
（ｖ）残りの酸溶出画分をすばやく金微粒子画分と合わせ、再度懸濁する。
３）－２　タイター評価
（２）－３）、４）と同様にして、タイター評価を行い、以下のような結果を得る。
１ラウンド：９．８×10^{2} ｃｆｕ
２ラウンド：１．０×10^{3} ｃｆｕ
３ラウンド：７．８×10^{2} ｃｆｕ
４ラウンド：１．３×10^{3} ｃｆｕ
５ラウンド：１．１×10^{4} ｃｆｕ
４）再感染及びファージ増幅
４ラウンド目までは、３）で得られた金微粒子に吸着したファージ群を大腸菌に再感染工程を経ることによりファージ数を増幅させて、次パニング用のファージ溶液を準備する。
（ｉ）再感染及びファージ増幅用に大腸菌ＪＭ１０９をＬＢ培地２０ｍＬで３７℃にて振盪培養（１４０ｒｐｍ）する。
（ii）OD_{600}＝０．３～０．５となった（ａ）の大腸菌培養液に前記３）の金微粒子懸濁液を加え、３７℃にて１時間振盪培養（１４０ｒｐｍ）を行なう。
（iii）終濃度が１００μｇ／ｍＬになるようにアンピシリンを加え、振盪培養を３７℃にて２時間行なう。
（iv）ヘルパーファージＭ１３ＫＯ７　４０μＬを加え、振盪速度を１００ｒｐｍに落として３７℃にて培養を１時間行なう。
（ｖ）終濃度が５０μｇ／ｍＬになるようにカナマイシンを加え、振盪培養を３７℃にて終夜培養を行なう。
（ｖi）（２）－３）、４）と同様の操作により培養上清中のファージを回収し、ファージ溶液を作製する。さらに、タイター値を評価し、増幅されていることを確認する。
以下の増幅後に得られたタイター値を示す。
１ラウンド：２．４×10^{9} ｃｆｕ
２ラウンド：８．１×10^{8} ｃｆｕ
３ラウンド：１．８×10^{9} ｃｆｕ
４ラウンド：１．１×10^{10} ｃｆｕ
（iv）ファージＥＬＩＳＡ
１）ＥＬＩＳＡ用金蒸着基板の作製
実施例２と同じ金蒸着（厚み１００ｎｍ）を行った９６穴タイタープレート（ＢＤ社、ポリスチレン）を用いて、ファージＥＬＩＳＡ用の基板とする。

２）ＶＬ提示ファージ単クローン調整
前記（３）‐４）の５ラウンド目のタイター評価での×１０^{4}の希釈プレート上に発現した１１個のコロニーをからファージミドを以下の手順により回収する。
（ｉ）各コロニーをＬＢ／ａｍｐ．　２０ｍＬで３７℃にて培養する。
（ii）ヘルパーファージＭ１３ＫＯ７　４０μＬを加え、振盪速度を１００ｒｐｍに落として３７℃にて培養を１時間行なう。
（iii）終濃度が５０μｇ／ｍＬになるようにカナマイシンを加え、振盪培養を３７℃にて終夜培養を行なう。
（iv）（２）－３）、４）と同様の操作により培養上清中のファージを回収し、ファージ溶液を作製する。さらに、タイター値を評価し、増幅されていることを確認する。
以下の増幅後に得られたタイター値を示す
Ｎｏ．１：３．８×１０^{9}　ｃｆｕ
Ｎｏ．２：９．０×１０^{8}　ｃｆｕ
Ｎｏ．３：２．４×１０^{9}　ｃｆｕ
Ｎｏ．４：１．０×１０^{9}　ｃｆｕ
Ｎｏ．５：９．７×１０^{7}　ｃｆｕ
Ｎｏ．６：４．４×１０^{8}　ｃｆｕ
Ｎｏ．７：６．２×１０^{9}　ｃｆｕ
Ｎｏ．８：８．９×１０^{7}　ｃｆｕ
Ｎｏ．９：１．４×１０^{9}　ｃｆｕ
Ｎｏ．１０：１．１×１０^{10}　ｃｆｕ
Ｎｏ．１１：４．９×１０^{9}　ｃｆｕ
２）ファージ溶液の調整
１）で得られた各ファージ溶液をタイター値が１０^{9}ｃｆｕから順次１／１０となるように希釈系列を各２００μＬを以下の組成で作製する。
ＶＬ提示ファージ溶液：ｘμＬ
スーパーブロッキングバッファー（ＰＩＥＲＣＥ社）：２０μＬ
０．５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ：ｘ／５μＬ
ＰＢＳ：１８０－（６ｘ／５）μＬ
３）ＥＬＩＳＡ
（ｉ）金蒸着タイタープレートに系列希釈したＶＬ提示ファージ溶液をそれぞれ８０μＬ分注し、シェイカーで緩やかに１時間攪拌する。
（ii）ファージ溶液を取り除き、各ｗｅｌｌにＰＢＳＴ　９０μＬを分注して１０分間攪拌し、洗浄上清を廃棄する。この作業を３回繰り返す。
（iii）ＨＲＰ－Ａｎｔｉ　Ｍ１３イムノグロブリン／ＳＢＢ／ＰＢＳ（１／１０００：１：１０）溶液７５μｌを各ｗｅｌｌに分注した後に、シェイカーにて１時間緩やかに攪拌する。
（iv）上記イムノグロブリン溶液の上清を廃棄する。次に、ＰＢＳＴ　９０μＬ／ｗｅｌｌを分注し、１０分間攪拌し、洗浄上清を廃棄する。この洗浄作業を３回繰り返す。
（ｖ）ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔ　１、２（Ａｍａｓｈａｍ　ＢＩＯＳＩＥＮＣＥ）　を各３５μＬ／ｗｅｌｌずつ分注し、１分間緩やかに攪拌しながら反応させる。
（ｖi）ルミノールの発光強度を測定した。発光強度の高いＮｏ．1、Ｎｏ．２、Ｎｏ．３を金結合性ＶＬ提示ファージクローンとする。

【０１２５】
上記４つのファージクローンよりファージミドを単離し、金結合性ＶＬの塩基並びにアミノ酸配列を明らかにした。次に、発現ベクターを作製し、タンパクを発現させて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）金基板上に結合性を確認する。

【０１２６】
実施例６（金親和性ＶＬタンパクの取得）
（１）ファージミドの回収

実施例５（３）‐４）の５ラウンド目のタイター評価での×１０^{4}の希釈プレート上に発現した前記Ｎｏ．７に相当するコロニーからファージミドを以下の手順により回収した。

（ｉ）各コロニーをＬＢ／ａｍｐ．　１．６ｍＬで３７℃にて終夜培養する。

（ii）Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ　ＳＶ　ｐｌｕｓ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（ｐｒｏｍｅｇａ）を用い、業者推奨の方法にてファージミドを回収する。

（２）発現ベクター作製

上記３種のＶＬタンパクを発現する発現ベクターを以下の構成で構築する。実施例１の図１１に示すｐＲＡ－ＸＸ及上記（１）で得られたファージミドを各々のＮｃｏＩ及びＮｏｔＩを用いて制限酵素反応により切断する。得られたＶＬ断片をｐＲＡ－ＸＸに挿入し、ＶＬコード核酸を融合タンパクとして発現されるプラスミドｐＲＡ－ＶＬＮｏ，ｎ（ｎ：クローン番号）を作製する。（図１３）

（３）タンパク発現及び精製

以下、上記で得られた３つのＶＬタンパク発現用ベクターを用いてＶＬタンパクを発現させる。

１）形質転換

上記発現ベクターを用いて、ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテントセル４０μＬを形質転換する。形質転換は、ヒートショックを氷中→４２℃×９０ｓｅｃ→氷中の条件でおこなう。

ヒートショックにより形質転換した上記ＢＬ２１溶液にＬＢ培地７５０μＬを加え、一時間３７℃にて振盪培養を行なう。その後、６０００ｒｐｍ×５分間遠心を行い、培養上清６５０μＬを廃棄し、残った培養上清と沈殿となった細胞画分を攪拌し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、一晩３７℃にて静置する。

２）予備培養

プレート上のコロニーを無作為に選択し、３．０ｍＬ　ＬＢ／ａｍｐ．培地にて２８℃にて一晩振盪培養を行なう。

３）本培養

上記予備培養溶液を２×ＹＴ培地　７５０ＭＬに植え継ぎ、更に培養を２８℃にて継続する。ＯＤ６００が０．８を越えた時点で、終濃度が１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを加え、更に２８℃にて終夜培養を行なう。

４）精製

（ｉ）硫安沈殿

３）で得られた培養液を６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎ遠心し、培養上清を得た。

得られた培養上清重量を計測し、培養上清重量の６０％の硫酸アンモニウムを徐々に加える。一晩４℃にて攪拌する。

（ii）脱塩

（ｉ）液を８０００ｒｐｍ×２０ｍｉｎで遠心し、上清を廃棄する。得られた沈殿を２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／５００ｍＭ　ＮａＣｌ（以下、Ｔｒｉｓ溶液）１５ｍＬを加え、４℃にて一晩浸し、溶解させる。次に、得られた上記溶解液を透析用セルロースチューブ（三光純薬製）に入れ、外液をＴｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、脱塩を行なう。（外液は６時間毎に交換した）

（iii）金属キレートカラム

金属キレートカラム担体として、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いる。カラム調整やサンプル負荷、及び洗浄工程は、前記業者の推奨方法に準拠し、４℃にて行った。目的であるＨｉｓタグ融合のＶＬタンパク溶出は５００ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液にて行なう。

溶出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１５％）の結果、単一バンドであり、精製されていることを確認する。上記溶出液に対して、外液をＴｒｉｓ溶液として再び透析を行い、溶出液中のイミダゾールの除去を行なう。更に、外液をリン酸バッファー（以下、ＰＢＳ）に替え、バッファー置換を行い、ＳＰＲ用ＶＬタンパク溶液とする。

【０１２７】
実施例７（ＳＰＲ測定）
実施例６で得られたＶＬタンパク質の金に対する結合性をＳＰＲにて測定した。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用する。
以下の条件において測定を行なう。
ランニングバッファー：ＰＢＳＴ
温度：２５℃
流速：２０μＬ／ｍｉｎ
サンプル：ＶＬタンパク／ＰＢＳＴ
インジェクション量：２０μＬ
結合性が確認される結合カーブを得る（図９）。
【０１２８】
実施例８（ＶＬタンパクの塩基及びアミノ酸配列の決定）
上記で得られたＶＬ　Ｎｏ，７のＤＮＡ配列を以下の方法にて配列を決定した。
シークエンス用プライマーは、ＶＬコード遺伝子上流に位置するｐｅｌＢ配列部に設定した。シークエンス用のｐｒｉｍｅｒは以下のとおり。実施例２と同様に、
ｐｅｌＢ－ｂａｃｋ
（配列番号：８８）
５'－ｃｃｇｃｔ　ｇｇａｔｔ　ｇｔｔａｔ　ｔａｃｔｃ　ｇｃ－３'
のｐｒｉｍｅｒを使用し、業者推奨のシークエンス反応キットと反応液組成によりＢｉｇＤｙｅ－ＰＣＲ反応を行った。温度サイクルは９６℃×３ｍｉｎ→（９４℃×１ｍｉｎ→５０℃×１ｍｉｎ→６８℃×４ｍｉｎ）×３０ｃｙｃｌｅ→４℃とする。次に、エタノール沈殿により精製した前記ＰＣＲ産物をシークエンサー（ＡＢＩ社製３７７）により塩基配列を決定する。以下の結果を得る。Ｎｏ．７は実施例１２の配列番号：７６と同じ塩基配列である。
【０１２９】
実施例９（金親和性ＶＨ提示ファージ群のスクリーニング）
以下の手順により、ＶＨ提示ファージライブラリーを作製し、金に結合性を示すファージ群の選択を行なう。
（１）ＶＨ提示用ファージミド
実施例１と同様にヒト成人末梢血Ｂリンパ球由来Ｆａｂライブラリーを鋳型として、プライマーは実施例１と同様に配列番号：８０乃至配列番号：８９を使用する。ＶＨコード遺伝子を複製した。更に、Ｍ１３ファージのコートタンパクであるＰＩＩＩタンパクの末端の一部を欠損させ、更にＶＨタンパクが融合されて発現されるように作製されたＶＨ提示ファージミド（図１２ａ）のライブラリを使用する。
（２）ＶＨ提示ファージライブラリー作製
以下、（１）を用いたことを除いては実施例５（２）と同様にしてＶＨ提示ファージライブラリーを作製する。得られるＶＨ提示ファージライブライリー溶液：　1×10^{9} ｃｆｕ／μＬ
（３）金微粒子を用いたＶＨパニング
上記（２）で作製したファージライブラリー溶液を用いた以外は、実施例５（３）と同様に金結合性ＶＨを提示するファージ群を選択するパニングを行なう。
１）結合実験
以下、実施例５と同様の２）洗浄、３）酸溶出及びタイター評価を行った。
１ラウンド：9.8×10^{2} ｃｆｕ
２ラウンド：1.0×10^{3} ｃｆｕ
３ラウンド：7.8×10^{2} ｃｆｕ
４）再感染及びファージ増幅
実施例５と同様の方法で行った。以下の増幅後に得られたタイター値を示す

１ラウンド：２．４×１０^{9} ｃｆｕ
２ラウンド：８．１×１０^{8} ｃｆｕ
（４）ファージＥＬＩＳＡ
（1）ＥＩＳＡ用金蒸着基板の作製
実施例５と同様ファージＥＬＩＳＡ用の基板とした。
２）ＶＬ提示ファージ単クローン調整
前記ＶＨパニング作業の３ラウンド目のタイター評価での×１０^{4}の希釈プレート上に発現した２０個のコロニーからファージミドを実施例１と同様にして回収した。以下の得られたＶＨ提示ファージ単クローン溶液のタイター値を示す。
Ｎｏ．１：３．８×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．２：９．０×１０^{8} ｃｆｕ
Ｎｏ．３：２．４×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．４：１．０×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．５：９．７×１０^{7} ｃｆｕ
Ｎｏ．６：４．４×１０^{8} ｃｆｕ
Ｎｏ．７：６．２×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．８：８．９×１０^{7} ｃｆｕ
Ｎｏ．９：１．４×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．１０：１．１×１０^{10} ｃｆｕ
Ｎｏ．１１：４．９×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．１２：９．０×１０^{8} ｃｆｕ
Ｎｏ．１３：２．４×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．１４：１．０×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．１５：９．７×１０^{7} ｃｆｕ
Ｎｏ．１６：４．４×１０^{8} ｃｆｕ
Ｎｏ．１７：６．２×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．１８：８．９×１０^{7} ｃｆｕ
Ｎｏ．１９：１．４×１０^{9} ｃｆｕ
Ｎｏ．２０：１．１×１０^{10} ｃｆｕ
２）ファージ溶液の調整
１）で得られた各ファージ溶液をタイター値が１０^{9}ｃｆｕから順次１／１０となるように希釈系列を各２００μＬを以下の組成で作製した。
ＶＨ提示ファージ溶液：ｘμＬ
可溶化ＶＬ溶液（５０ｎｇ）：１μＬ
スーパーブロッキングバッファー（ＰＩＥＲＣＥ社）：２０μＬ
０．５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ： ｘ／５μＬ
ＰＢＳ：１７９－（６ｘ／５）μＬ
３）ファージＥＬＩＳＡ
実施例１と同様の作業にてファージＥＬＩＳＡを行った。
比較であるＶＨライブラリー溶液よりも発光強度の高い３クローンを金結合性ＶＨ提示ファージクローンとした。（Ｎｏ．２、４、６）
実施例１０（金親和性ＶＨタンパクの取得）
上記３ファージクローンよりファージミドを単離し、それらの発現ベクターを作製した後にタンパクを発現させて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）金基板上に結合性を確認する。更にそれらの金結合性ＶＨの塩基並びにアミノ酸配列を明らかにする。
（１）ファージミドの回収
３ラウンド目のタイター評価での×１０^{4}の希釈プレート上に発現した１５クローンに対応するコロニーからファージミドを以下の手順により回収した。
（ａ）各コロニーをＬＢ／ａｍｐ． １．６ｍＬで３７℃にて終夜培養した。
（ｂ）Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ ＳＶ ｐｌｕｓ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｓｙ

ｓｔｅｍ（ｐｒｏｍｅｇａ）を用い、業者推奨の方法にてファージミドを回収した。
（２）発現ベクター作製
上記３種のＶＨタンパクを発現する発現ベクターを以下の構成で構築する。
ＰＥＴ－１５ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社）のマルチクローニングサイトを変更し、ｐＵＴ－ＸＸとする。前記ｐＵＴ－ＸＸ及上記（１）で得られたファージミドを各々のＮｃｏＩ及びＮｈｅＩを用いて制限酵素反応により切断する。得られたＶＨ断片をｐＵＴ－ＸＸに挿入し、ＶＨコード核酸を融合タンパクとして発現されるプラスミドｐＲＡ－７ｓｎ，（ｎ：上記ファージクローン番号）を作製する。（図１４）
（３）タンパク発現及び精製
上記（発現ベクターを、個別の系において以下に記すタンパク発現及び精製工程で処理を行い、３種類（７ｓ２、７ｓ４、７ｓ６）のＶＨとして取得する。
１）形質転換
上記２つの発現ベクターを、それぞれ異なるＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテントセル溶液４０μＬを形質転換する。形質転換は、ヒートショックを氷中→４２℃×９０ｓｅｃ→氷中の条件でおこなう。ヒートショックにより形質転換した上記ＢＬ２１溶液にＬＢ培地７５０μＬを加え、一時間３７℃にて振盪培養を行った。その後、６０００ｒｐｍ×５分間遠心を行い、培養上清６５０μＬを廃棄し、残った培養上清と沈殿となった細胞画分を攪拌し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、一晩３７℃にて静置する。
２）予備培養
プレート上のコロニーを無作為に選択し、３．０ｍＬ　ＬＢ／ａｍｐ．培地にて２８℃にて一晩振盪培養を行う。
３）本培養
上記予備培養溶液を２×ＹＴ培地　７５０ＭＬに植え継ぎ、更に培養を２８℃にて継続した。ＯＤ６００が０．８を越えた時点で、終濃度が１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを加え、更に２８℃にて終夜培養を行う。
４）精製
目的のポリペプチド鎖を不溶性顆粒画分から以下の工程により精製する。
（ｉ）不溶性顆粒の回収
上記３）で得られた培養液を６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎにて遠心し、沈殿を菌体画分として得る。得られた菌体をトリス溶液（２０ｍＭ　トリス／５００ｍＭ　ＮａＣｌ）１５ｍｌに氷中にて懸濁する。得られた懸濁液をフレンチプレスにて破砕し、菌破砕液を得る。
次に、菌破砕液を１２，０００ｒｐｍ×１５ｍｉｎで遠心を行い、上清を除き、沈殿を不溶性顆粒画分として得る。
（ii）不溶性顆粒画分の可溶化
（ａ）で得られた不溶性画分を６Ｍ　塩酸グアニジン／トリス溶液　１０ｍＬを加えて、一晩浸漬する。次に、１２，０００ｒｐｍ×１０ｍｉｎで遠心し、上清を可溶化溶液として得る。
（iii）金属キレートカラム
金属キレートカラム担体として、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いる。カラム調整やサンプル負荷、及び洗浄工程は、前記業者の推奨方法に準拠し、室温（２０℃）にて行う。目的であるＨｉｓタグ融合のポリペプチドの溶出は６０ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液にて行う。溶出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１５％）の結果、単一バンドであり、精製されていることを確認する。
（iv）透析
上記溶出液に対して、外液を６Ｍ　塩酸グアニンジン／Ｔｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、溶出液中のイミダゾールの除去を行い、上記それぞれのポリペプチド鎖溶液を得る。
（ｖ）リフォールディング
上記と同様にして、ＶＨｇ－ＶＬｈ及びＶＨｈ－ＶＬｇのそれぞれのポリペプチド鎖溶

液を以下の工程により別個に、脱塩酸グアニンジンを透析（４℃）にて行いながらタンパク質のリフォールディングを行う。
a）　６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を用い、それぞれのポリペプチド鎖の盛る急行係数とΔＯ．Ｄ．（２８０ｎｍ－３２０ｎｍ）値から濃度７．５μＭのサンプル（希釈後体積１０ｍｌ）を調整する。次にβ－メルカプトエタノール（還元剤）を終濃度３７５μＭ（タンパク濃度５０倍）になるよう添加、室温、暗所で４時間還元を行う。このサンプル溶液を透析バック（ＭＷＣＯ：１４，０００）に入れ、透析用サンプルとする。
b）透析外液を６Ｍ塩酸グアニンジン／トリス溶液として、透析サンプルを浸漬し、緩やかに攪拌しながら６時間透析する。
c）外液の塩酸グアニジン濃度を３Ｍ、２Ｍと段階的に下げる。それぞれの外液濃度において、６時間透析する。
d）酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）を終濃度３７５μＭ、Ｌ－Ａｒｇを　終濃度０．４Ｍ）となるようにトリス溶液に加え、上記３）の２Ｍの透析外液を加え、塩酸グアニジン濃度が１Ｍとし、ｐＨをＮａＯＨで、ｐＨ８．０（４℃）に調整した溶液にて、１２時間緩やかに攪拌しながら透析する。
e）d）と同様の作業にて塩酸グアニジン濃度０．５Ｍの含Ｌ－Ａｒｇ　トリス溶液を整し、更に１２時間透析する。
f）最後にトリス溶液にて１２時間透析する。７）透析終了後、１００００ｒｐｍで約２０分遠心分離し凝集体と上清を分離する。

【０１３０】

上記で得られた３種のＶＨ溶液に対して、更に外液をリン酸バッファー（以下、ＰＢＳ）に替え、バッファー置換を行い、ＳＰＲ用ＶＨタンパク溶液とした。

【０１３１】

実施例１１（ＳＰＲ測定）

実施例１０で得られたＶＨタンパク質の金に対する結合性を実施例１５と同様にしてＳＰＲにて測定した。７ｓ２、７ｓ４、７ｓ６とも結合性が確認される結合カーブを得た。図１０に代表例を示す）。カーブフィッティングによって以下のK_Dを得た。７ｓ２：K_D＝５．０×１０M^{-8}
７ｓ４：K_D＝８．０×１０M^{-9}
７ｓ６：K_D＝３．０×１０M^{-7}

実施例１２（ＶＨタンパクの塩基及びアミノ酸配列の決定）

上記で得られた３つのＶＨ提示ファージミドのＤＮＡ配列を実施例２と同様の方法にて配列を決定した。シークエンス用プライマーは、ＶＨコード遺伝子上流に位置するｐｅｌＢ配列部に設定した。実施例２と同様のシークエンス用ｐｒｉｍｅｒを用い、同様の手順にて解析を行ない、異なる３配列を得た。それらが実施例１０で得られる配列番号：５９乃至配列番号：６１で同じ配列である。

【０１３２】

実施例１３（ＳＰＲによるＶＨ／ＶＬ複合体と金結合性実験）

実施例６で得たＶＬクローン：Ｎｏ．７と実施例１０で得たＶＨクローン：７ｓ２を各５０ｎＭＰＢＳＴ溶液を調整した。４℃にて一日間保存した。上記混合溶液を用いて、実施例７と同様にしてＳＰＲ測定を行った。その結果、実施例７または実施例１１に比べ低濃度で金との結合性を確認できた。混合することにより複合体（Ｆｖ）形成され構造安定化による結合性向上が示唆された。（図３）

実施例１４（金結合性ｓｃＦｖの取得）

実施例６で得たＶＬクローン：Ｎｏ．７と実施例１０で得たＶＨクローン：７ｓ２からなるｓｃＦｖを以下の手順にて作製した。
（１）発現ベクター作製
ＶＬ（Ｎｏ．７）コード遺伝子、リンカー（ＧＧＧＧＳ）×３、ＶＨ（７ｓ４）コード遺伝子、Ｈｉｓ×６（以下、Ｈｉｓタグ）連続して翻訳され、融合タンパクとして発現されるような発現ベクターを作製した。

具体的な作製方法については、図１５に記す。
プライマーとしては以下を用いる。
ｓｃＦｖ－Ｂ（配列番号：１１７）
５'－ＮＮＮＮＮＣＣＡＴＧＧＣＣＧＧＧＧＧＣＧＧＧＧＧＣＡＧＣＧＧＧＧＧＧＣＧＧＧ
ＧＧＣＡＧＣＧＧＧＧＧＣＧＧＧＧＧＣＡＧＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴ
ＣＴ－３'
ｓｃＦｖ－Ｆ（配列番号：１１８）
５'－ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＡＣＣＡＴＴＣＡＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＴ－３'
（２）タンパク発現及び精製
以下、上記で得られたｓｃＦｖタンパク発現用ベクターを用いてｓｃＦｖタンパクを発現・精製した。
１）タンパク発現
上記発現ベクターを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）を形質転換し、培養は２ｘＹＴ培地を用い２８℃で行う。Ｏ．Ｄ．$_{600}$＝約０．８となったところで、終濃度１ｍＭのＩＰＴＧにより発現を誘導し、一晩振盪培養する。菌体を６０００ｒｐｍ×２０ｍｉｎにて遠心を行い、培養上清画分と菌体画分を得た。これらサンプルを既知の方法によりＳＤＳ－ＰＡＧＥにより電気泳動を行い、目的のタンパクの発現量を確認した。その結果、培養上清画分への分泌は非常に少ないことがわかった。そこで目的タンパクを菌体画分から精製する為に以下の手順でサンプルを調製した。まず、菌体をＰＢＳ　１５ｍＬで再懸濁し、さらにＰＢＳ　２５ｍＬをえ、フレンチプレスによる菌体破砕を行った。得られた破砕液を１２００００ｒｐｍ×１５ｍｉｎで遠心を行い、沈殿画分を不溶性顆粒として得た。得られた不溶性顆粒を６Ｍ塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液で一晩浸漬し、可溶化し、金属キレートカラム用サンプルとした。
２）金属キレートカラム精製
ランニングバッファーを６Ｍ塩酸グアニジン／５ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液とし、溶出時のイミダゾール濃度を１００ｍＭ、展開温度を室温（２０℃）とした以外は実施例２と同様にして精製を行った。
３）透析
２）で得られた溶出画分を透析用セルロースチューブ（三光純薬製）に入れ、外液を６Ｍ塩酸グアニンジン／１ｍＭＥＤＴＡ／Ｔｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、イミダゾール除去を行った。（外液は６時間毎に交換した）
３）タンパク質の再構築
２）で得たｓｃＦｖ溶液をＴｒｉｓ溶液で７．５μＭに調整し、サンプルとした。上記溶液に対して、外液の塩酸グリシン濃度を段階的に下げることにより、内液中の塩酸グアニジン濃度を下げるとともにｓｃＦｖ構造の再構成を行った。
（ａ）　６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を用い、目的タンパクのアミノ酸配列から概算されるモル吸光係数とＯ．Ｄ．（２８０ｎｍ）か７．５μＭのサンプルを調整した。
（ｂ）　次にβ－メルカプトエタノール（還元剤）を終濃度３７５μＭになるよう添加、室温、暗所で４時間静置した。
（ｃ）　サンプルを前記と同様の透析膜に入れ、外液（６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液）に加え、４℃で約６時間透析する。
（ｄ）　以降、６時間毎に外液を２回交換した。その際に、外液の塩酸グアニジン濃度は３Ｍ→２Ｍと段階的に下げながら透析を行った。
（ｅ）　次に、酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）を終濃度３７５μＭ、Ｌ－Ａｒｇを　終濃度０．４Ｍ）となるようにＴｒｉｓ溶液に加え、更に上記（ｄ）の透析外液（２Ｍ）を加えることで塩酸グアニジン濃度を１Ｍとして、ｐＨをＮａＯＨで、ｐＨ８．０（ａｔ４℃）に調整した外液を用いて４℃で約１２時間透析する。
（ｆ）　（ｅ）と同様の作業にて０．５Ｍ塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を作製し、４℃で約１２時間透析する。
（ｇ）　最後に、外液をＴｒｉｓ溶液に交換して４℃で約１２時間透析する。

（ｈ） 透析終了後、１００００ｒｐｍで約２０分遠心分離し凝集体画分と上清画分を分離する。上清画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動で確認したところ、上清画分に目的のタンパクが可溶化されていることを確認した。ＶＬに前記Ｎｏ．７クローンを配し、ＶＨに７ｓ２を配したｓｃＦｖを取得した。

【０１３３】

実施例１５（ＳＰＲによるｓｃＦｖの金結合性評価）

実施例１４で得られたｓｃＦｖタンパク質の金に対する結合性を実施例３と同様にしてＳＰＲにて測定した。金結合性を示す結合カーブが得られた。（図１７）

実施例１６（Ａｕ特異性の確認）

実施例１５で得られたｓｃＦｖタンパク質の金特異性を確認した。確認用の基板として、３ｍｍ×５ｍｍのシリコン基板上に７０μｍφの大きさの円形パターニングを金蒸着（厚さ ５０ｎｍ）する。上記基板表面をイソプロピルアルコール、アセトン、塩酸と順次１０分間浸漬して表面洗浄する。（溶液を替える毎に純水にて洗浄、乾燥する。）上記基板を実施例６で得られたｓｃＦｖ溶液を１μＭに調整した溶液に１時間浸漬する。続いて、ＰＢＳＴにて１０分間緩やかに攪拌しながら洗浄する。この作業を３回繰り返し、洗浄液を捨てる。次に、上記基板を１００ｎＭ 抗Ｈｉｓタグ抗体／ＰＢＳＴ溶液に１時間緩やかに攪拌しながら浸漬する。続いて、ＰＢＳＴにて１０分間緩やかに攪拌しながら洗浄する。この作業を３回繰り返し、洗浄液を捨てる。更に、上記基板を１００μＭ ロドプシン結合抗ＩＧｇ抗体／ＰＢＳＴ溶液に１時間緩やかに攪拌しながら浸漬する。続いて、ＰＢＳＴにて１０分間緩やかに攪拌しながら洗浄する。この作業を３回繰り返し、洗浄液を捨てる。その後、蛍光顕微鏡にて基板を観察した。その結果、金蒸着した円形部のみに蛍光が観察され、シリコン部には蛍光は見られなかった。実施例１５で得られたｓｃＦｖの金特異性が確認できた。

【０１３４】

比較例１

実施例１６における１μＭ ｓｃＦｖで金蒸着シリコン基板を処理した以外は、同じ作業にて前記基板を処理した。蛍光顕微鏡による観察の結果、シリコン部のみだけでなく、金蒸着した円形部にも蛍光は確認できなかった。

【０１３５】

実施例１７（酸化珪素親和性ペプチド融合金結合性タンパクの作製）

酸化珪素親和性ペプチドＩＰＨＶＨＨＫＨＰＨＶを上記実施例ｓｃＦｖのＣ末端に融合したタンパク質を以下の工程により作製する。

(1) 発現ベクター作製

（ａ）上記（実施例１４）で得られたｐＵＴ－ｓｃＦｖ（ＶＬ#Ｎｏ，７×７ｓ４）をテンプレートして以下のプライマーを用い、ＰＣＲを行う。

ＳｉｓｃＦｖ－Ｂ（配列番号：１１９）

5'－ＮＮＮＮＮＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴ－3'

ＳｉｓｃＦｖ－Ｆ（配列番号：１２０）

5'－ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＣＡＣＧＴＧＧＧＧＧＴＧＣＴＴＧＴＧＧＴＧＣＡＣＧＴＧＣＡＴＧＧＧＧＡＴＡＡＣＣＡＴＴＣＡＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＴ－3'

尚、ＰＣＲは市販のＰＣＲキット（タカラバイオ ＬＡ－Ｔａｑキット）を使用し、業者推奨のプロトコールに従い行う。

（ｂ）その結果得られたＰＣＲ産物を２％アガロース電気泳動を行う。次に、ゲル抽出キット（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用してゲルから粗精製を行い、約４００ｂｐのＰＣＲ断片を得る。シークエンスの結果、目的の塩基配列を有することを確認する。

（ｃ）ｐＵＴ－ｓｃＦｖ（７ｓ４）及び上記（ｂ）で得られたＰＣＲ断片を、ＮｏｔＩ／ＳａｃIIを用いて、切断する。次いで、アガロース電気泳動を行い、Ｖｅｃｔｏｒ側及びＩｎｓｅｒｔ側でそれぞれ目的の断片を精製する。

（ｄ）上記（ｃ）でえら得た精製した核酸断片を、Ｖｅｃｔｏｒ：Ｉｎｓｅｒｔ＝１：５となるように混合し、実施例1と同様にしてライゲーション反応を行う。

以下、形質転換、プラスミド回収、挿入断片の確認については実施例６と同様に行う。

【０１３６】

（３）タンパク発現及び精製

上記得られた発現用プラスミドを用いて、実施例１０と同様の方法にてタンパク発現及び精製を行い、目的であるタンパク質を得る。

【０１３７】

実施例１８（金及びＨＥＬ結合性タンパク質の取得）

（１）金結合性ＶＨコード核酸断片の調整

金結合性ＶＨ（配列番号：６１）の５末端側に制限酵素ＮｃｏＩ切断部位、３'末端側に制限酵素ＮｈｅＩを配置したベクター導入用の金結合性ＶＨ（以下、ＶＨｇ）を作製するために、プライマーとして、

ｇＶＨ－Ｂ（配列番号：１２１）

５'－ＮＮＮＮＮ　ＣＣＡＴＧＧ　ＣＣＧＡＣ　ＣＡＧＧ　ＴＧＣＡＧ　ＴＴＧＧＴ　ＧＧＡＧＴ　ＣＴ－３'

ｇＶＨ－Ｆ（配列番号：１２２）

５'ＮＮＮＮＮ　ＧＣＴＡＧ　Ｃ　ＧＧＡＧＡ　ＣＧＧ　ＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴ－３'

を使用して、市販のＰＣＲキットを当業者の推奨する調合にてＰＣＲを行い、約３５０ｂｐの塩基対を得る。上記ＶＨＢ－Ｆを使用し、市販のシークエンス反応キットと反応液組成によりＢｉｇＤｙｅ－ＰＣＲ反応を行った。温度サイクルは９６℃×３ｍｉｎ→（９４℃×１ｍｉｎ→５０℃×１ｍｉｎ→６８℃×４ｍｉｎ）×３０ｃｙｃｌｅ→４℃とする目的のＶＨをコードする塩基配列を有する断片が得られたことを確認する。

（２）金結合性ＶＬコード核酸断片の調整

金結合性ＶＬ（配列番号：７６）の５末端側に制限酵素ＮｈｅＩ部位及びリンカー（ＧＧＧＧＳ）をコードする核酸、３'末端側にＨｉｓ×６に引き続き、制限酵素ＳａｃIIを配置したベクター挿入用の金結合性ＶＬ（以下、ＶＬｇ）（配列番号：９９）を作製するために、プライマーとして

ｇＶＬ－Ｂ（配列番号：１２３）

ＮＮＮＮＮ　ＧＣＴＡＧＣ　ＧＧＴＧＧＣＧＧＴＧＧＣＴＣＴ　ＧＡＡＡＴＴＧＴＧＴＴＧＡＣＧＣＡＧＴＣＴ、及び

ｇＶＬ－Ｆ（配列番号：１２４）

ＮＮＮＮＮ　ＣＣＧＣＧ　ＧＣＡＣＧ　ＴＴＴＡＡ　ＴＣＴＣＣ　ＡＧＴＣＧ　ＴＧＴ

を使用する以外は、（１）と同様にして核酸断片を得て、目的のＶＬの塩基配列を有することを確認する。

（３）ＨＥＬ結合性ＶＨコード核酸断片の調整

ＨＥＬ結合性ＶＨ（配列番号：１２５）の５末端側に制限酵素ＮｃｏＩ切断部位、３'末端側に制限酵素ＮｈｅＩを配置したベクター導入用のＨＥＬ結合性ＶＨ（以下、ＶＨｈ）を作製するために、プライマーとして、

ｈＶＨ－Ｂ（配列番号：１２６）

５'－ＮＮＮＮＮ　ＣＣＡＴＧＧ　ＣＣＧＡＣ　ＧＡＴＡＴＣＣＡＧＣＴＧＣＡＧＧＡＧＴＣＧＧＧＣＣＣ－３、及び

ｈＶＨ－Ｆ（配列番号：１２７）

５'ＮＮＮＮＮ　ＧＣＴＡＧ　Ｃ　ＧＧＡＧＡ　ＣＧＧ　ＴＧＡＣＧＴＣＴＧＴ－３

を使用する以外は、（１）と同様にして核酸断片を得て、目的のＶＨの塩基配列を有することを確認する。

（４）ＨＥＬ結合性ＶＬコード核酸断片の調整

ＨＥＬ結合性ＶＬ（配列番号：１２８）の５末端側に制限酵素ＮｈｅＩ切断部位及びリンカー（ＧＧＧＧＳ）をコードする核酸、３'末端側にＨｉｓ×６に引き続き、制限酵素ＳａｃII切断部位を配置したベクター挿入用のＨＥＬ結合性ＶＬ（以下、ＶＬｈ）を作製するために、プライマーとして、

ｈＶＬ－Ｂ（配列番号：１２９）

ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣＧＧＴＧＧＣＧＧＴＧＧＣＴＣＴＧＡＴＡＴＣＧＴＣＣＴＧＡＣ
ＣＣＡＧＡＧ、及び
ｈＶＬ－Ｆ（配列番号：１３０）
ＮＮＮＮＮ ＣＣＧＣＧ ＧＣＣＴＴ ＧＡＴＣＴ ＣＣＡＧＣ ＴＴＧＧＴ ＧＣ
を使用する以外は、（１）と同様にして核酸断片を得て、目的のＶＬの塩基配列を有することを確認する。

【０１３８】

実施例１９（発現ベクター作製）

上記４種の核酸断片用いてを２つの発現ベクターを以下の構成で構築する。

（１）ＶＨｇ－ＶＬｈ発現用ベクター（ｐＧＨＥＬ）の作製 （図１５）

（ｉ）ＶＨｇの挿入

前記プラスミドｐＵＴ－ＸＸを、制限酵素ＮｃｏＩ／ＮｈｅＩ（ともにＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社）で切断し、スピンカラム ４００ＨＲ（アマシャムサイエンス）する。次に、同様に制限酵素ＮｃｏＩ／ＮｈｅＩにて切断したＶＨｇを切断し、切断断片を市販のゲル精製キット（ＳＶ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ｕｐ ｓｙｓｔｅｍ： Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して精製する。上記二つの断片を、市販のＴ４リガーゼキット（Ｒｏｃｈｅ社）を業者推奨の方法にて調合しライゲーションを行う。

【０１３９】

ライゲーション溶液をＪＭ１０９コンピテントセル（Ｐｒｏｍｅｇａ社）４０μＬにヒートショック法により形質転換した後に、ＬＢ／アンピシリン（ａｍｐ．）プレートに撒き、３７℃にて一晩静置する。

【０１４０】

次に、プレート中から任意のコロニーをＬＢ／ａｍｐ． ３ｍＬ液体培地に植え継ぎ、３７℃にて一晩振盪培養を行う。その後、市販のＭｉｎｉＰｒｅｐｓキット（Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ：Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して、プラスミドを回収する

得られたプラスミドを、ｇＶＨ－Ｆを使用して前記シークエンス方法にて塩基配列を確認したところ、目的の断片が挿入されていることを確認する。

（ii）ＶＬＨの挿入

上記１）で得られたプラスミドｐＵＴ-ＶＨｇを制限酵素ＮｈｅＩ／ＳａｃIIで切断し、スピンカラム ４００ＨＲ（アマシャムサイエンス）する。次に、同様に制限酵素ＮｈｅＩ／ＳａｃIIにて切断したＶＬｈを得る。以下、上記（ａ）と同様にして、ライゲーション及び目的のＶＨｇ－ＶＬＨ発現用プラスミドｐＧＨＥＬであることを確認する。（確認用プライマーは、ｈＶＬ－Ｆ）

（２）ＶＨｈ－ＶＬｇ 発現用ベクター（ｐＨＧＯＬＤ）の作製（図１６）

（iii）ＶＨｈの挿入

上記（ｉ）と同様の方法にてＶＨｈをプラスミドｐＵＴに挿入し、得られたプラスミドが目的のプラスミドであることを確認する。（確認用プライマーは、ｈＶＨ－Ｆ）

（iv）ＶＬｇの挿入

ＶＬｇを上記（iii）で得られたプラスミドに上記（ｂ）と同様の方法にて挿入し、得られたプラスミドが目的のＶＨＨ－ＶＬｇ発現用ベクターｐＨＧＯＬＤであることを１）と同様にして確認する。（確認用プライマーは、ｇＶＬ－Ｆ）

実施例２０（タンパク発現及び精製）

上記実施例１９の（ii）で得られたＶＨｇ－ＶＬｈ、及び実施例１９の（iv）で得られたＶＨｈ－ＶＬｇのポリペプチドを発現する発現ベクターを、個別の系において以下に記すタンパク発現及び精製工程で処理を行い、それぞれポリペプチド鎖ＶＨｇ－ＶＬｈ及びＶＨｈ－ＶＬｇとして取得する。

１）形質転換

上記２つの発現ベクターを、それぞれ異なるＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテントセル溶液４０μＬを形質転換する。形質転換は、ヒートショックを氷中→４２℃×９０ｓｅｃ→

氷中の条件でおこなう。ヒートショックにより形質転換した上記ＢＬ２１溶液にＬＢ培地７５０μＬを加え、一時間３７℃にて振盪培養を行った。その後、６０００ｒｐｍ×５分間遠心を行い、培養上清６５０μＬを廃棄し、残った培養上清と沈殿となった細胞画分を攪拌し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、一晩３７℃にて静置する。

２）予備培養

プレート上のコロニーを無作為に選択し、３．０ｍＬ　ＬＢ／ａｍｐ．培地にて２８℃にて一晩振盪培養を行う。

３）本培養

上記予備培養溶液を２×ＹＴ培地　７５０ＭＬに植え継ぎ、更に培養を２８℃にて継続した。ＯＤ６００が０．８を越えた時点で、終濃度が１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを加え、更に２８℃にて終夜培養を行う。

４）精製

目的のポリペプチド鎖を不溶性顆粒画分から以下の工程により精製する。

（ｉ）不溶性顆粒の回収

上記３）で得られた培養液を６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎにて遠心し、沈殿を菌体画分として得る。得られた菌体をトリス溶液（２０ｍＭ　トリス／５００ｍＭ　ＮａＣｌ）１５ｍｌに氷中にて懸濁する。得られた懸濁液をフレンチプレスにて破砕し、菌破砕液を得る。

次に、菌破砕液を１２，０００ｒｐｍ×１５ｍｉｎで遠心を行い、上清を除き、沈殿を不溶性顆粒画分として得る。

（ii）不溶性顆粒画分の可溶化

上記（ｉ）で得られた不溶性画分を６Ｍ　塩酸グアニジン／トリス溶液　１０ｍＬを加えて、一晩浸漬する。次に、１２，０００ｒｐｍ×１０ｍｉｎで遠心し、上清を可溶化溶液として得る。

（iii）金属キレートカラム

金属キレートカラム担体として、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いる。カラム調整やサンプル負荷、及び洗浄工程は、前記業者の推奨方法に準拠し、室温（２０℃）にて行う。目的であるＨｉｓタグ融合のポリペプチドの溶出は６０ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液にて行う。溶出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１５％）の結果、単一バンドであり、精製されていることを確認する。

（iv）透析

上記溶出液に対して、外液を６Ｍ　塩酸グアニンジン／Ｔｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、溶出液中のイミダゾールの除去を行い、上記それぞれのポリペプチド鎖溶液を得る。

（ｖ）リフォールディング

上記と同様にして、ＶＨｇ－ＶＬｈ及びＶＨｈ－ＶＬｇのそれぞれのポリペプチド鎖溶液を以下の工程により別個に、脱塩酸グアニンジンを透析（４℃）にて行いながらタンパク質のリフォールディングを行う。

（ａ）　６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を用い、それぞれのポリペプチド鎖の盛る急行係数とΔＯ．Ｄ．（２８０ｎｍ－３２０ｎｍ）値から濃度７．５μＭのサンプル（希釈後体積１０ｍｌ）を調整する。次にβ－メルカプトエタノール（還元剤）を終濃度３７５μＭ（タンパク濃度５０倍）になるよう添加、室温、暗所で４時間還元を行う。このサンプル溶液を透析バック（ＭＷＣＯ：１４，０００）に入れ、透析用サンプルとする。

（ｂ）透析外液を６Ｍ塩酸グアニンジン／トリス溶液として、透析サンプルを浸漬し、緩やかに攪拌しながら６時間透析する。

（ｃ）外液の塩酸グアニジン濃度を３Ｍ、２Ｍと段階的に下げる。それぞれの外液濃度において、６時間透析する。

（ｄ）酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）を終濃度３７５μＭ、Ｌ－Ａｒｇを　終濃度０．４Ｍ）となるようにトリス溶液に加え、上記（ｃ）の２Ｍの透析外液を加え、塩酸グアニジン濃度が１Ｍとし、ｐＨをＮａＯＨで、ｐＨ８．０（４℃）に調整した溶液にて、１２

時間緩やかに攪拌しながら透析する。
（ｅ）上記（ｄ）と同様の作業にて塩酸グアニジン濃度０．５Ｍの含Ｌ－Ａｒｇ　トリス溶液を整し、更に１２時間透析する。
（ｆ）最後にトリス溶液にて１２時間透析する。
（ｇ）透析終了後、１００００ｒｐｍで約２０分遠心分離し凝集体と上清を分離する。
（ｖｉ）２量化画分の精製
　上記（ｖ）で得られた個々の５μＭ　ポリペプチド（ＶＨｇ－ＶＬｈ、ＶＨｈ－ＶＬｇ）溶液を混合し、４℃にて一晩する。次に、セファデックス７５カラム（カラム：バッファー　２０ｍＭ　トリス、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、流速　１ｍｌ／ｍｉｎ）にて二量体化した６０ｋＤａ相当（インジェクションから約１８分）のフラクションを得る。これをＳＰＲ測定用サンプルとする。
【０１４１】
　実施例２１（ＳＰＲ測定による金結合性評価）
　実施例２０で得られた2量化タンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例１５で得た２量化タンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。
ランニングバッファー：０．１％Ｔｗｅｅｎ２０／トリス溶液：ＴＢＳＴ
温度：２５℃
流速：２０μＬ／ｍｉｎ
サンプルインジェクション量：４０μＬ
　金に対する結合性を示すが結合カーブを得る（図１８）。
【０１４２】
　実施例２２（ＳＰＲ測定によるＨＥＬ結合性評価）
　実施例２１において金結合性をＳＰＲ評価したサンプルに引き続き、連続して１μＭ　ＨＥＬ溶液をインジェクションし、金に結合した２量化タンパク質画分のＨＥＬに対する結合性をＳＰＲにて測定する。図に示すＨＥＬに対する結合性を示すが結合カーブを得る（図１８）。
【０１４３】
　実施例２３（Ａｕ特異性の確認）
　実施例２２で得られた金結合性タンパク質及びＨＥＬが結合したＳＰＲチップの金基板を用いて以下の実験を引き続き行った。上記金基板を１μＭ　抗ＨＥＬ抗体／ＰＢＳＴ溶液をインジェクションする。その後、ＰＢＳＴにて洗浄する。更に、１μＭ　ロドプシン結合抗ＩＧｇ抗体／ＰＢＳＴ溶液をインジェクションした後に、ＰＢＳＴで洗浄する。その後、ＳＰＲ装置から上記ＳＰＲチップを取り出し、蛍光顕微鏡にて基板を観察する。その結果、金基板上にＳＰＲの流路上に蛍光が観察される。
【０１４４】
　比較例２
　未使用の金蒸着基板を用いて、実施例２３と同様の作業を行なう。その結果、金基板上に蛍光が観察されない。
【０１４５】
　実施例２４
　実施例２０における（ｉ）乃至（ｖ）と同様の工程で得られる巻き戻しポリペプチド鎖ＶＨｇ－ＶＬｈを作製し、５μＭ　ＶＨｇ－ＶＬｈ／トリス溶液を得る。
【０１４６】
　実施例２５
　実施例２４で得られるＶＨｇ－ＶＬｈ／トリス溶液を５００ｎＭにトリス溶液で希釈し、実施例２０と同様にして金基板に対する結合性をＳＰＲにより評価する。更に連続して１μＭ　ＨＥＬ溶液をインジェクションし、金に結合した２量化タンパク質画分のＨＥＬ

に対する結合性をＳＰＲにて測定する。金及びＨＥＬに対する結合性を示すが結合カーブを得る。

【０１４７】

実施例２６

実施例２５において、０．５μＭ　抗ＨＥＬ抗体　ＶＬ／トリス溶液を共存させた一晩静置してサンプルを調整する。

【０１４８】

実施例２７

実施例２６で調整したサンプルに対して、実施例１５と同様にして金基板に対する結合性をＳＰＲにより評価する。更に、実施例１６と同様にして、連続して１μＭ　ＨＥＬをインジェクションしてＨＥＬに対する結合性をＳＰＲにて測定する。結合性を示す結合カーブを得る。

実施例２８（ＨＥＬ検出イムノクロマトグラフィー装置の作製）

本発明の検出方法例としてＨＥＬを検出するイムノクロマトグラフィー装置を作製する。

１）抗ＨＥＬ抗体を固相化したイムノクロマトグラフィー用多孔質担体の作製

ニトロセルロースシート（ＢＡＳ－８５、シュライヒャー－シュエル社製）を５　ｍｍ×３０　ｍｍに切断し、その端より１０　ｍｍの位置に抗ＨＥＬ抗体溶液０．５　ｍｇ／ｍＬ（日本バイオテスト社製）を直線状に塗布し、検出部位を作製する。室温にて２時間静置させ、液体を乾燥し、抗体をシート状に固着する。１％スキムミルク（ディフコ社製）／ＰＢＳＴ溶液で、上記シートを２時間振盪してブロッキングを行った後、室温にて静置してイムノクロマトグラフィー用担体を用意する。

２）金標識抗ＨＥＬ抗体断片の調整及び保持担体の作製

（ｉ）金標識抗ＨＥＬ抗体断片の作製

実施例２０で作製した金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片を用いて以下の工程で作製する。金微粒子分散溶液（粒子径５０　ｎｍ、田中貴金属社製）に実施例２０で作製した金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片を加え充分混和して、室温、３時間反応を行う。未反応の金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片を除去するため１２，０００ｒｐｍ、５分間遠心分離を行い、上清を取り除き、沈降物を得た。得られた沈降物をＰＢＳＴ１．０　ｍＬで懸濁した。更に、上記条件において遠心を行う。得られた沈降物を、１％ＢＳＡ／ＰＢＳＴ１．０　ｍＬに懸濁する。

（ii）金標識抗ＨＥＬ抗体断片保持担体の作製

上記金標識抗ＨＥＬ抗体断片溶液５μＬ及び各種塩基の１０％水溶液５μＬをベンリーゼ不織布（旭化成社製）５　ｍｍ×５　ｍｍに含浸させ風乾し、金標識抗ＨＥＬ抗体断片保持担体を作製した。

３）試験片型イムノクロマトグラフィー装置の作製

上記1）で作製した上記イムノクロマトグラフィー用担体の一方の端から２．５　ｍｍの位置まで上記2）（ii）金標識抗ＨＥＬ抗体断片保持担体を重ねた。さらに上記抗体断片保持担体上に液体試料吸収用担体（ろ紙Ｎｏ．５２６　　アドバンテック東洋社製）を重ねた。また、免疫クロマトグラフィー用支持体のもう一方の端から５　ｍｍの位置まで過剰試料吸収部位用担体　（ろ紙Ｎｏ．５２６）を重ねた。最後に裏側にテープを貼り、全体を固定化して試験片型免疫クロマトグラフィー装置を作製した。標準ＨＥＬ溶液を用いた試験の結果、抗ＨＥＬ抗体固定化部が赤色に呈色するのが確認される。

【０１４９】

実施例２９（電気測定装置の作製）

金電極を用いたタンパク質検出法の一例を示す。

１）ガラス基板上に２つの金電極を設ける。電極間の距離は２０μｍとする。前記ガラス基板の金電極間に、０．１％ポリ－Ｌ－リジン（シグマ社）水溶液２０μＬを滴下し、３時間静置する。

次に、水洗浄を行った後にエタノールで洗浄処理を３回行い、乾燥する。

２）次いで、抗HELポリクローナル抗体（ＲＯＣＫＬＡＮＤ社）をＰｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、３、ｐｐ２５４（２００３）に基づいて上記（ａ）で得られたガラス基板への固定化を行う。
３）実施例２０で作製した金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片　ＰＢＳＴ溶液と２０ｎｍ金ナノ粒子（田中貴金属社製）を反応させる。（比較として、ＰＢＳＴ溶液）
４）　１）で得られた抗ＨＥＬ抗体固定化基板に、１μＭ　ＨＥＬ／ＰＢＳ溶液を付加する。
５）　次いで。３）に２）で得られた金結合タンパク質溶液を付加する。
６）　４）で得られた基板をＰＢＳ溶液にて３回洗浄する。その後、銀増幅溶液（シグマ・ケミカル社、Ｓｉｌｖｅｒ　Ｅｎｈａｎｃｅｅｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）中に５分間浸漬し、水で洗浄した。　電極間の電気抵抗が比較サンプルのＰＢＳＴのみと比べて低下することが確認される。

【０１５０】

実施例３０（ＶＨｇ－ＶＨｈタンパクの酵母発現ベクター作製）

（１）ＮｈｅＩ－ＶＨｈ－ＳａｃＩＩ断片の作製

同じく実施例１９にて作製したｐＨＧｏｌｄを鋳型に末端にそれぞれＮｈｅＩ／ＳａｃＩＩを有するＶＨｈ断片をＰＣＲにて作製する。
プライマーとして以下を用いる。
ＮｈｅＩ－ＶＨｈ＿ｆ（配列番号１３１）
ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ
ＶＨｈ－ＳａｃＩＩ＿ｒ（配列番号１３２）
ＮＮＮＮＮＣＣＣＧＣＧＧＡＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴ
上記プライマーを使用し、ｐｆｕ－ｔｕｒｂｏを当業者推奨方法によりＰＣＲを行う。得られるＰＣＲ反応液をアガロースゲル（２％）電気泳動を行い、約３５０ｂｐの断片を得ること確認する。

（２）ＶＨｇ－ＶＨｈＤＮＡ断片作製

上記実施例１９にて作成したｐＧＨＥＬのＶＬｈ部分に上記（１）で得られたＶＨｈ断片を導入する。上記（１）で得られたＰＣＲ断片及びｐＧＨＥＬをＮｈｅＩ／ＳａｃＩＩ（ともにタカラバイオ株式会社製）にて切断する。制限酵素反応は当業者推奨方法にて行う。得られる反応溶液をそれぞれアガロース電気泳動を行い、ゲル精製を行う。（ＰＣＲ断片：アガロース２％、ｐＧＨＥＬ：アガロース１％とする。）ゲル精製には、上述したゲル精製キットにて行う。上記で得られる制限酵素後のＰＣＲ断片が約３５０ｂｐ、プラスミド断片３０００ｂｐであることを確認し、以下、実施例１９と同様の方法にて新規プラスミドが得られる。得られるプラスミドをシークエンサーにより塩基配列を確認し、目的の塩基配列であることを確認する。（このプラスミドをｐＨｇＨｈとする。）

（３）酵母発現プラスミドへの挿入

ＰＣＲは上記同様の業者推奨方法による。
酵母（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｒｉｓ）発現プラスミドとしては、ｐＰＣＩＺαＡ（インビトロジェン社）を使用する。前記プラスミドのマルチクローニングサイトにあるＥｃｏＲＩ及びＳａｃＩＩを利用し、目的の遺伝子を導入する。
導入する遺伝子は（２）で得られるｐＨｇＨｈを鋳型として、ＰＣＲにより作製する。
プライマーとして
７ｓ４－ｆｗ－ＥｃｏＲ１ｓ（配列番号１３３）
ＡＡＧＣＴＧＡＡＴＴＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ
ＨＥＬＶＨ－ＳａｃＩＩ－ｒ（配列番号１３４）
ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＧＡＧＧＧＴ
得られるＰＣＲ断片と上記ｐＰＣＩＺαＡをＥｃｏＲＩ及びＳａｃＩＩにて順次切断し、上述と同様にしてゲル精製にて目的の断片をそれぞれ得る。ライゲーションは上述した方法により行い、上記と同様にしてライゲーション反応液を形質転換して、寒天プレートに撒く。この場合の寒天プレートは、トリプトン１０ｇ／酵母エキス５ｇ／ＮａＣｌ５ｇ／

寒天１５ｇ／ＬにＺｅｏｃｉｎを２５μｇ／Ｌになるように添加したものである。これにより選択されるコロニーを液体培地（トリプトン１０ｇ／酵母エキス５ｇ／ＮａＣｌ５ｇ、Ｚｅｏｃｉｎ　２５μｇ／Ｌ）で３７℃一晩培養し、プラスミドを回収後、シークエンサーにて配列を確認し、本実施例の目的であるＶＨｇ－ＶＨｈ：ＶＨ＿ｇｏｌｄ－ｌｉｎｋｅｒ（ＧＧＧＧＳ）－ＶＨ＿ＨＥＬを発現するプラスミドを得る。（ｐＰＣＩＺ－αＨＨとする）

実施例３１（ＶＨｇ－ＶＨｈタンパクの発現／精製）

ＶＨｇ－ＶＨｈの発現はＥａｓｙＳｅｌｅｃｔ　Ｐｉｃｈｉａ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｋｉｔ　Ｖｅｒ．Ｇ（インビトロジェン社）を用いて行う。形質転換体作製、タンパク作製及び精製（金属キレートカラム）については当業者推奨方法にて行う。金属キレートカラムにより得られる１Ｍイミダゾール溶出画分　５ｍＬをＴｒｉｓバッファー（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＧＴＡ：ｐＨ７．９）を外液として４℃にて透析を行う。外液交換は６時間毎に３回行う。

【０１５１】

続いて、Ｓｅｐｈａｄｅｘ７５（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて、ゲルろ過による精製（バッファー条件：５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ8.0、流速：０．７ｍＬ／ｍｉｎ）を４℃にて行う。得られる分画を濃縮後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１７．５％）及びＨＲＰ融合抗Ｈｉｓ抗体を用いて、上述と同様のｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇを行う。これにより、目的のタンパク質の分画を特定し、単一バンドに精製される。その中で、約２５ｋＤａの単量体タンパク質であることを示唆するピークを分取し、以下の評価を行う。（図１９）

実施例３２（ＳＰＲ測定による金結合性評価）

実施例３１で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例２０で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１と土曜とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２０）

実施例３３（ＶＨｇ－ＶＨｈタンパク変異体作製　－１）

実施例３０の金結合性ＶＨのＶ３７Ｌ、Ｇ４４Ｅ、Ｌ４５ＲとなるＶＨｇ変異体（配列番号：１３５、１３６）になるように実施例３０で得られるプラスミドｐＰＣＩＺ－α７ｓ４を鋳型にＱＣキット（STRATAGENE社製）を使用する。当業者の推奨方法により、以下のプライマーを使用し３度の作業により目的のプラスミドをえる。作業毎に一箇所ずつ変異を順次導入する。

【０１５２】

１箇所目の変異導入の為のＰＣＲプライマー

Ｖ３７Ｆ－ｆ（配列番号：１３７）

ＴＴＡＣＴＧＧＡＴＣＡＡＣＴＧＧＴＴＣＣＧＣＣＡＧＡＴＧＣＣＣＧＧ

Ｖ３７Ｆ－ｒ（配列番号：１３８）

ＣＣＧＧＧＣＡＴＣＴＧＧＣＧＧＡＡＣＣＡＧＴＴＧＡＴＣＣＡＧＴＡＡ

２箇所目の変異導入の為のＰＣＲプライマー

Ｇ４４Ｅ－ｆ（配列番号：１３９）

ＣＡＧＡＴＧＣＣＣＧＧＣＡＡＡＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＧＧＡＴＧＧＧＧ

Ｇ４４Ｅ－ｒ（配列番号：１４０）

ＣＣＣＣＡＴＣＣＡＴＴＣＣＡＧＴＴＣＴＴＴＧＣＣＧＧＧＣＡＴＣＴＧ

３箇所目の変異導入の為のＰＣＲプライマー

Ｌ４５Ｆ－ｆ（配列番号：１４１）

ＧＣＣＣＧＧＣＡＡＡＧＡＡＡＧＧＧＡＡＴＧＧＡＴＧＧＧＧＡＴＧ

Ｌ４５Ｆ－ｒ（配列番号：１４２）

ＣＡＴＣＣＣＣＡＴＣＣＡＴＴＣＣＣＴＴＴＣＴＴＴＧＣＣＧＧＧＣ

変異導入はシークエンスにて確認する。形質転換以降タンパク質発現までは実施例３１と同様の手段にて行う。約２５ｋＤａの単量体タンパク質のピークを用いて以下の評価を行う。

【０１５３】

実施例３４（ＳＰＲ測定による金結合性評価）

実施例３３で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例３３で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１と土曜とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２１）

実施例３５（ＶＨｇ－ＨＥＬｓｃＦｖタンパク変異体作製）

実施例３１のＨＥＬ結合性ＶＨの代わりにＨＥＬ結合性ｓｃＦｖ（配列番号：１４３、１４４）融合したタンパク質となるように置換する。ＨＥＬ結合性ｓｃＦｖは、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２００３、２７９、ｐｐ８９７９に示されたＨＥＬ結合ｓｃＦｖコード遺伝子を導入されたプラスミドを鋳型にＰＣＲにてＨＥＬ結合性ｓｃＦｖをコードするＤＮＡ断片を得る。ＰＣＲは前述の方法と同様、当業者の推奨方法により、以下のプライマーを使用する。

ｓｃＦｖ－ｆ（配列番号：１４５）

ＮＮＮＮＣＣＡＴＧＣＣＣＧＡＴＡＴＣＧＴＣＣＴＧＡＣＣＣＡＧ

ｓｃＦｖ－ｒ（配列番号：１４６）

ＡＧＣＴＡＣＣＧＣＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＧＡＧＧＧＴ

制限酵素反応以降は実施例３０と同様な手法により目的のプラスミドを得る。得られるプラスミドをシークエンスにより、目的とした遺伝子配列であることを確認する。また、形質転換以降タンパク質発現までは実施例３１と同様の手段にて行う。約３９ｋＤａの単量体タンパク質を得る。

【０１５４】

実施例３６（ＳＰＲ測定による金及びＨＥＬに対する二重結合性評価）

実施例３５で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例３１で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１及び２２と同様とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２２）

実施例３７（ＶＨｇ変異体－ＶＬｈ発現プラスミド作製）

実施例１９で得られる発現用プラスミド（ｐＧＨＥＬ）の金結合性ＶＨコード配列に配列番号：で示されるＤＮＡ配列を挿入する。挿入方法は、前記ｐＧＨＥＬを鋳型として、上述のＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）を用いて行う。得られるプラスミドが目的の配列であることを確認する。次いで、得られるプラスミドを用いて実施例２０と同様にしてタンパク質を発現精製、及びＶＨｈ－ＶＬｇとニ量化を行う。Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ７５を用いて、分子量約５０ｋＤａのタンパク画分を分画する。（図２３）

Ａ１４Ｐ－ｆ（配列番号：１４７）

ＧＡＧＣＡＧＡＧＧＴＧＡＡＡＡＡＧＣＣＡＧＧＧＧＡＧＴＣＴＣＴＧＡＡＧ

Ａ１４Ｐ－ｒ（配列番号：１４８）

ＣＴＴＣＡＧＡＧＡＣＴＣＣＣＣＴＧＧＣＴＴＴＴＴＣＡＣＣＴＣＴＧＣＴＣ

実施例３８（ＳＰＲによる金及びＨＥＬの二重結合性評価）

実施例３７で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条

件において測定を行う。サンプルとして、実施例３７で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１と同様とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２４）

実施例３９（ＶＨｇ－ＶＨｇタンパク質発現プラスミドの作製）

実施例３０のＶＨｈの代わりにＶＨｇをコードするＤＮＡ断片を用いる以外は同じ方法により実施例３０とどうような方法によりｐＰＣＩＺ－αＶＨｇ^{2}を作製する。上記で使用するＶＨｇをコードするＤＮＡ断片を作製するための鋳型としては実施例１０で得るｐＲＡ２－７ｓ４を用い、プライマーとしては

ＶＨｇ－ｆ（配列番号：１４９）

ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣ　ＧＧＣＧＧＧＧＧＣＧＧＴＡＧＣ　ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧ　ＧＴＧＧＡＧＴＣＴ

ＶＨｇ－ｒ（配列番号：１５０）

ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴ

を用いる。目的のプラスミドであることをシークエンスにて確認する。

【０１５５】

実施例４０（ＶＨｇ－ＶＬｇタンパクの作製）

実施例３１と同様の手法により目的タンパク質を精製する。分子量約２５ｋＤａのＶＨｇ－ＶＨｇの２量体からなるタンパク質を精製する。（図２５）

実施例４１（ＶＨｇ－ＶＬｇ４量体タンパク質発現プラスミドの作製）

実施例３９のＶＨｇ－ＶＨｇをつなぐリンカーＧＧＧＧＳをＧＳと変更した以外は同じ方法により実施例３０とどうような方法によりｐＰＣＩＺ－αＶＨｇ^{4}を作製する。上記で使用するＶＨｇをコードするＤＮＡ断片を作製するための鋳型としては実施例１０で得られるｐＲＡ２－7ｓ4を用い、プライマーとしては

ＶＨｇ４－ｆ（配列番号：１５１）

ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣ　ＧＧＣＡＧＣ　ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ

ＶＨｇ４－ｒ（配列番号：１５２）

ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴ

を用いる。目的のプラスミドであることをシークエンスにて確認する。

【０１５６】

実施例４２（金微粒子凝集反応）

実施例４０、４４で得られるタンパク質のそれぞれ５００μＭ／ＰＢＳＴ溶液を金微粒子（２０ｎｍφ：田中貴金属社製）を室温にてインキュベートする。いずれのタンパク質を用いた場合においても、金微粒子が凝集することが観察される。また、金微粒子／タンパク質混合溶液のスペクトル（λｍａｘ）が経時的に変化し、半値幅も拡大することが観察され、金微粒子間の距離が近接していることを示唆する結果を得る（図２６）。

（比較例２）

実施例３６において、５００ｎＭ　HELの代わりに５００ｎＭ　BSAとした以外は同じとする。BSAの結合は確認できない。実施例３５で得られる金基板上に結合するタンパク質はHELを特異的な結合することが示される。（図２７）

（比較例３）

抗HEL抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ社製）を用いて金基板上に直接固定化された抗体の結合能評価をSPR測定により行う。

（１）１０μＭ　抗ＨＥＬ抗体／ＰＢＳ溶液を作製する。

（２）（１）で得られる抗体溶液を１μＬ／ｍｉｎにて１００μＬインジェクションする。吸着した抗体分子のシグナルは１９０７Ｒ．Ｕである。

（３）続いて、１％カゼイン／ＰＢＳ溶液を（２）と同様な条件にてインジェクションする。

（４）更に、１％カゼイン／ＰＢＳ溶液　４０μＬを２０μＬ／ｍｉｎにてインジョクションを行い、金基板上がブロッキングされていることを確認する。

（５）次いで、１μＭ　ＨＥＬ　４０μＬを２０μＬ／ｍｉｎにてインジョクションを行い、図２８の結果を得る。

【０１５７】

その結果、金基板に固定された抗体分子は１９０７Ｒ．Ｕに対して結合したＨＥＬ分子は１１Ｒ．Ｕである。固定時の空間配置を考慮し、仮に抗体一分子が一つの抗原を基板上に固定されたと考えると抗体の約６％が標的物質を捕捉した計算となる。

一方で、上記実施例で示される本発明は基板上に固定される本発明のタンパク質の約２０～４０％以上が標的物質を捕捉することが示される。

更には、センサの捕捉分子となるタンパク質を固定する条件においても、溶液濃度／固定時間においても本発明の実施例は何ら特殊な化学物質や工程を行うことなく、従来既知の物理吸着法に比べ、優れた基板固定方法であることが示唆される結果を得る。

【産業上の利用可能性】

【０１５８】

本発明は、金に対する結合部位を一以上有し、且つ特定の物質に対する結合部位を有する金結合性タンパク質、及び前記金結合性タンパク質を固定化した金基板を含む構造体及びそれを利用した検出装置を提供する。本発明を適用することで得られる金結合性タンパク質を固定化した構造体からなる検出装置では、基板となる金を特異的に認識する結合部位することにより固定化されている為、前記タンパク質が有する他方の特定の物質（標的物質）を認識する結合部位が基板に固定化されることもなく、基板から間隔を確保して配向される。それにより、標的物質結合部位が基板からの結合能に対する影響を最小限に抑え、効率的かつ高配向に基板表面上に固定されたものとなる。

【０１５９】

つまり、本発明は、生体物質などの有機物を基体表面に固定化して、該有機物の有する種々の生理的機能を利用する、バイオセンサーやバイオリアクタを初めとする、各種の生体物質の機能を応用する製品の高性能化に利用可能であることが示唆される。

【０１６０】

一方、本発明は、標的物質を標識する接続部材であって、標的物質を結合する部位と前記標識物質を結合する部位をそれぞれ一以上有し、上記のそれぞれの結合部位は互いに独立して被結合物質と結合することを特徴とする接続部材を提供する。本発明を適用することで得られる従来の化学的な架橋法に行うことなく、目的のタンパク質を標識することが可能となる。これにより、標識に際して問題であった標的物質に対する種々のタンパク質の結合能に対する影響を最小限に抑え、製造効率的を向上させることが可能である。つまり、本発明は、生体物質などの接続部材を基体表面に固定化して、該接続部材の有する種々の生理的機能を利用する、バイオセンサー等の各種の生体物質の機能を応用する製品の高性能化に利用可能であることが示唆される。

【図面の簡単な説明】

【０１６１】

【図１】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図２】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図３】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図４】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

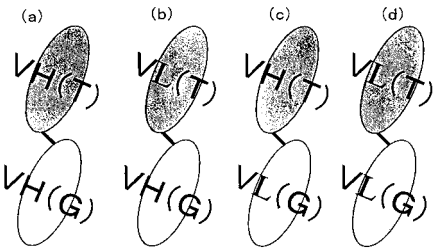
【図５】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図６】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

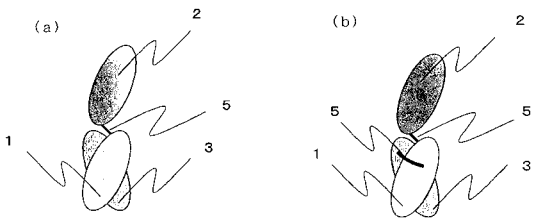
【図７】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図

である。
【図８】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。
【図９】本発明で得られるＶＬのＳＰＲ評価の一例を示す図である。
【図１０】本発明で得られるＶＨのＳＰＲ評価の一例を示す図である。
【図１１】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。
【図１２】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。
【図１３】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。
【図１４】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。
【図１５】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。
【図１６】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。
【図１７】本発明で得られるｓｃＦｖのＳＰＲ評価の一例を示す図である。
【図１８】実施例２１におけるＳＰＲチャートである。
【図１９】実施例３１におけるＧＰＣチャートである。
【図２０】実施例３２におけるＳＰＲチャートである。
【図２１】実施例３４におけるＳＰＲチャートである。
【図２２】実施例３６におけるＳＰＲチャートである。
【図２３】実施例３７におけるＧＰＣチャートである。
【図２４】実施例３８におけるＳＰＲチャートである。
【図２５】実施例４０におけるＧＰＣチャートである。
【図２６】実施例４２における含金微粒子溶液吸光曲線である。
【図２７】比較例２におけるＳＰＲチャートである。
【図２８】比較例３におけるＳＰＲチャートである。

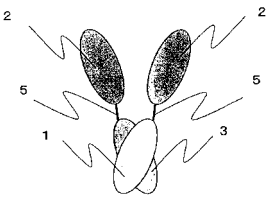
【図１】



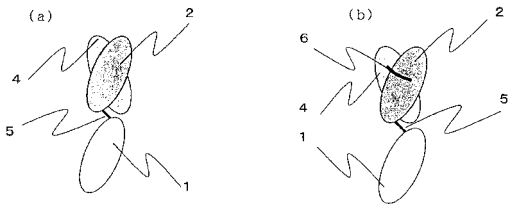
【図２】



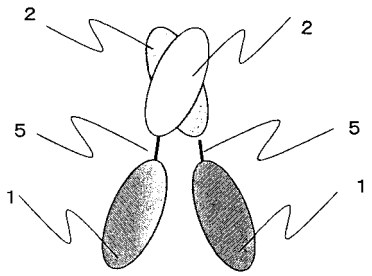
【図３】



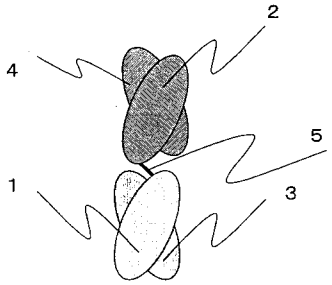
【図４】



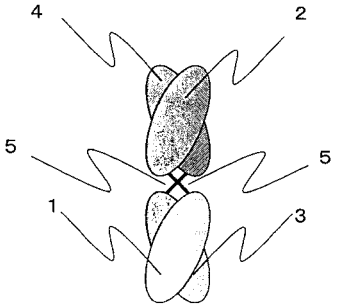
【図５】



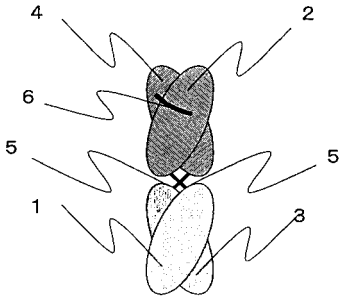
【図６】



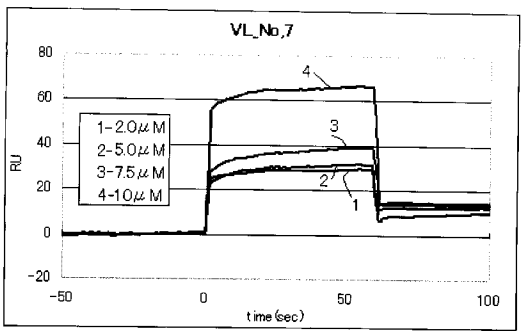
【図７】



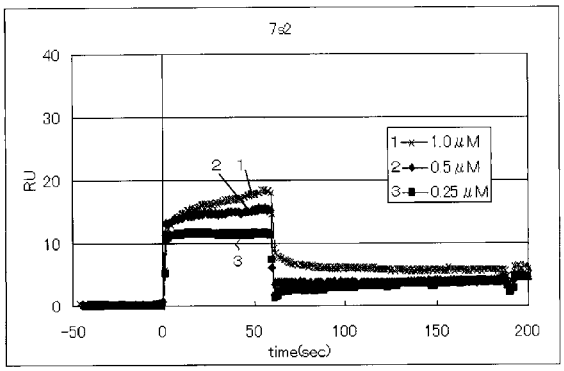
【図８】



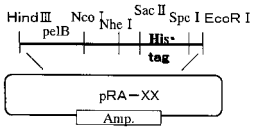
【図９】



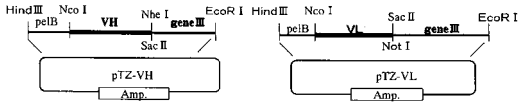
【図１０】



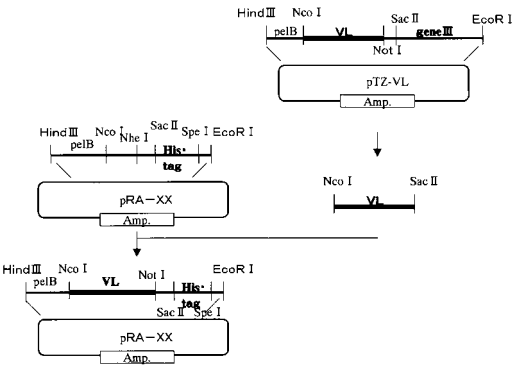
【図１１】



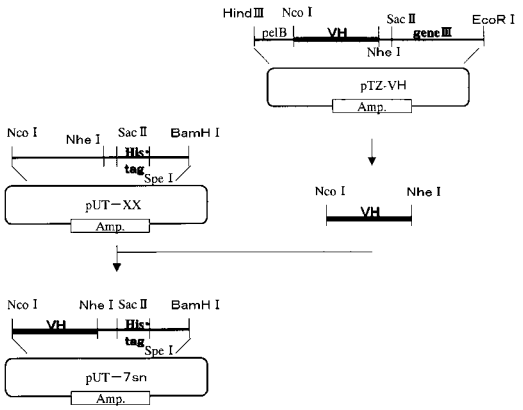
【図１２】



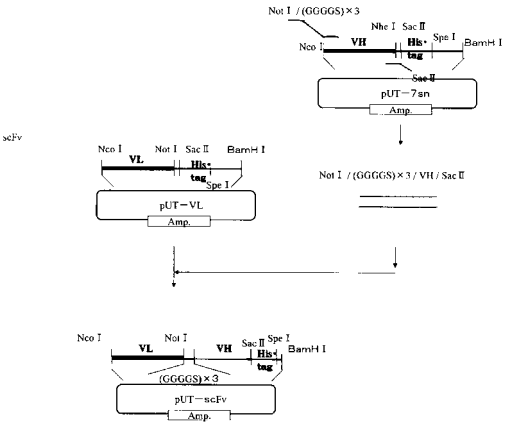
【図１３】



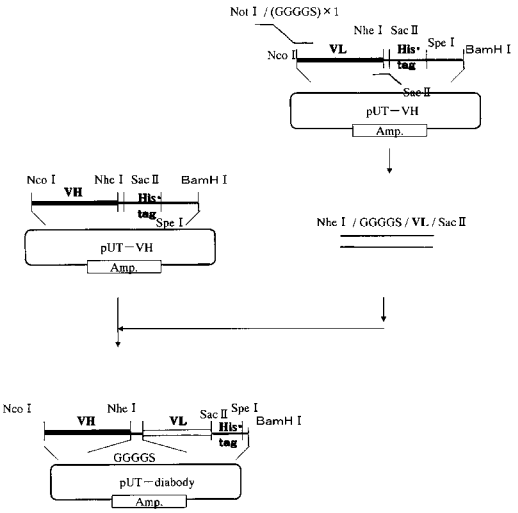
【図１４】



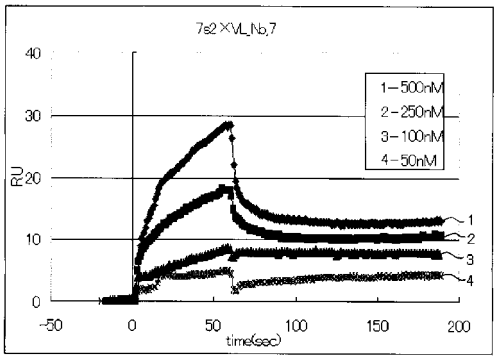
【図１５】



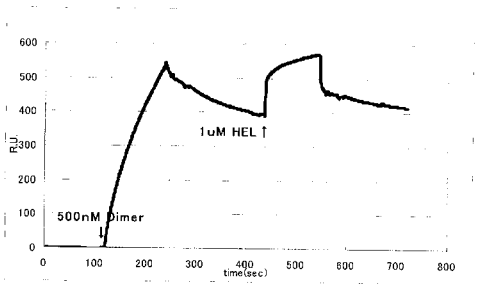
【図１６】



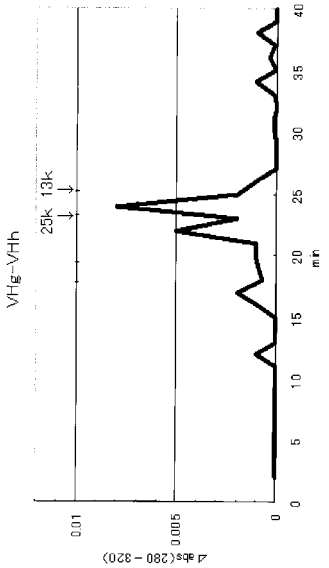
【図１７】



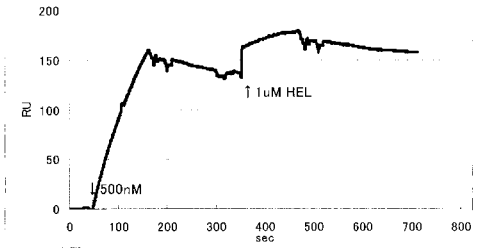
【図１８】



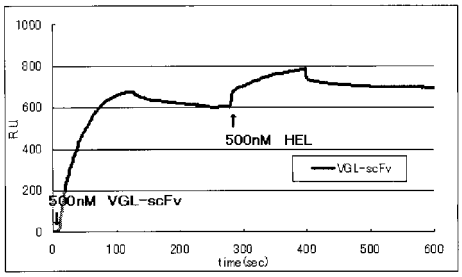
【図１９】



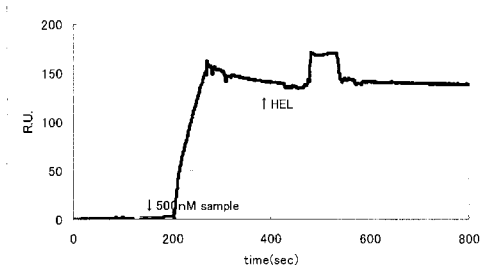
【図２０】



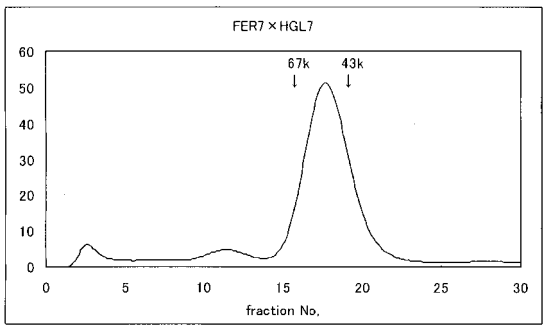
【図２２】



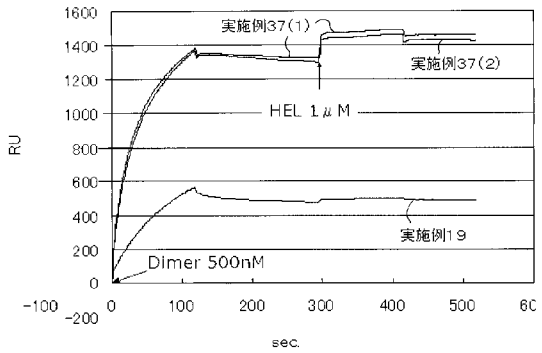
【図２１】



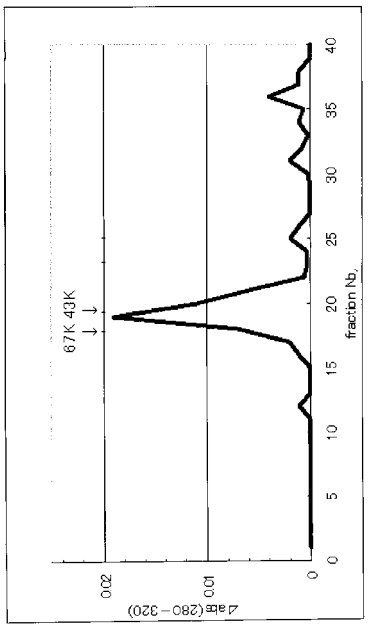
【図２３】



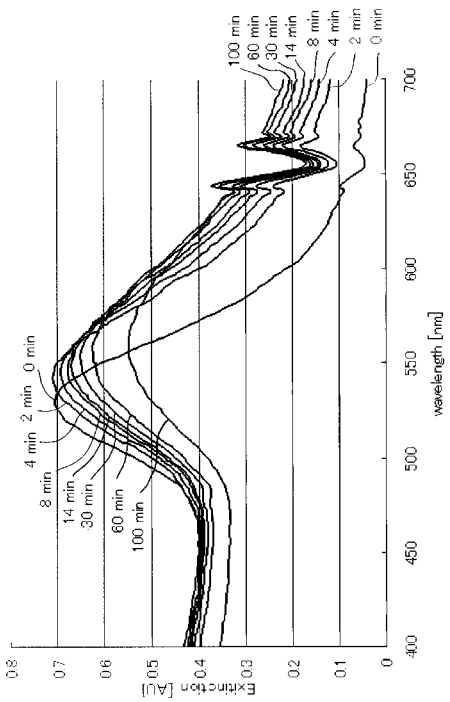
【図２４】



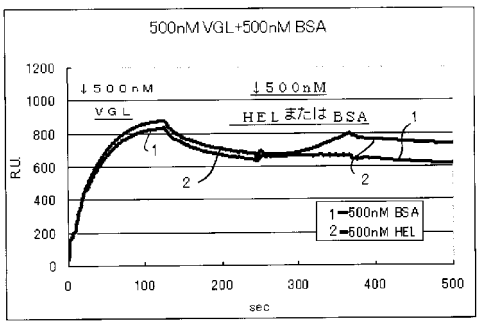
【図２５】



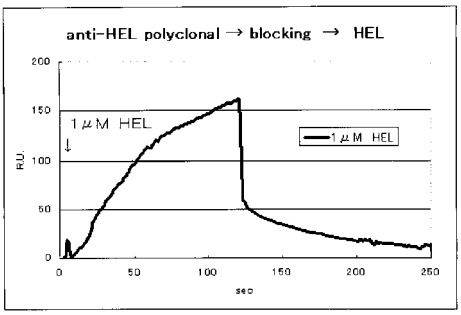
【図２６】



【図２７】



【図２８】



【配列表】
2007267751000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成19年6月26日(2007.6.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
基体と、該基体の表面に配置されたタンパク質とからなる標的物質捕捉構造体であって、
前記基体の表面が金からなる部分を有し、
前記タンパク質が第一のドメインと第二のドメインとを有し、
前記第一のドメインが前記基体が有する金からなる部分を特異的に認識して捕捉する部位であり、
前記第二のドメインが標的物質を捕捉する部位であり、
前記基体への前記タンパク質の配置が、前記基体が有する金からなる部分を前記タンパク質が有する前記第一のドメインが特異的に認識して捕捉することによってなされていることを特徴とする標的物質捕捉構造体。
【請求項２】
前記第一のドメインが、Ｆ（ａｂ´）２、Ｆａｂ´、Ｆａｂおよびこれらの一部の少なくとも一種を含んでいることを特徴とする請求項１に記載の標的物質捕捉構造体。
【請求項３】
前記第一のドメインが
（１）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、前記抗体重鎖可変領域の変異体、前記抗体重鎖可変領域の一部、前記抗体重鎖可変領域の変異体の一部、
（２）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）、前記抗体軽鎖可変領域の変異体、前記抗体軽鎖可変領域の一部、前記抗体軽鎖可変領域の変異体の一部
から選択された少なくとも一種を含んでいることを特徴とする請求項１または２に記載の標的物質捕捉構造体。
【請求項４】
前記第一のドメインが、配列番号：１～４８に示されるアミノ酸配列のうち少なくとも一つの配列を含む前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含んでいることを特徴とする請求項３に記載の標的物質捕捉構造体。
【請求項５】
前記第一のドメインが、配列番号：１～４８に示されるアミノ酸配列のうちの一つの配列の一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含む前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）の変異体を含んでいることを特徴とする請求項３に記載の標的物質捕捉構造体。
【請求項６】
前記第一のドメインが、配列番号：４９～５７に示されるアミノ配列のうち少なくとも一つの配列を含む前記抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含んでいることを特徴とする請求項３に記載の標的物質捕捉構造体。
【請求項７】
前記第一のドメインが、配列番号：４９～５７に示されるアミノ酸配列のうちの一つの配列の一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含む前記抗体重鎖可変領域（ＶＬ）の変異体を含んでいることを特徴とする請求項３に記載の標的物質捕捉構造体。

【請求項８】
前記タンパク質が、前記基体の金からなる部分を特異的に認識して捕捉する部位である第三のドメインと、前記標的物質を捕捉する第四のドメインとを、更に有し、
前記第一～第四のドメインが以下の（１）～（７）のいずれかの関係を有していることを特徴とする請求項１～７のいずれかに記載の標的物質捕捉構造体。
（１）前記第一のドメインと前記第二のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している
（２）前記第一のドメインと前記第二のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合している
（３）前記第三のドメインと前記第四のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している
（４）前記第三のドメインと前記第四のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合している
（５）少なくとも前記第一のドメイン、第二のドメイン及び第三のドメインが一つのポリペプチド鎖を形成している
（６）少なくとも前記第一のドメイン、第二のドメイン及び第四のドメインが一つのポリペプチド鎖を形成している
（７）前記第一乃至第四のドメインの全てが一つのポリペプチド鎖を形成している
【請求項９】
前記タンパク質と前記基体との間の解離定数が10^{-6}M以下であることを特徴とする請求項１～８のいずれかに記載の標的物質捕捉構造体。
【請求項１０】
前記基体が球形をなしていることを特徴とする請求項１～９のいずれかに記載の標的物質捕捉構造体。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、標的物質捕捉構造体に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
近年の半導体微細加工技術の向上にともなうデバイスの小型化により、半導体産業は大きく発展してきた。リソグラフィーに代表される微細加工技術は、現在ではその加工精度は数百ナノメートルに達している。それらを応用した材料・デバイスの活躍の場は広く、光、電気等の通信、バイオ、エネルギーなど幅広い分野で期待されている。しかしながら、現在の微細加工技術の延長上で１００ナノメートル以下の加工を考えた場合、技術的な課題に加え、加工に要する時間及びコストと産業上で利用する上では課題が多く、適用可能な分野の広がりに応じて、これらに代わる新しい精密構造作製技術が切望されている。
【０００３】
このような中、従来のトップダウン方式の加工技術に代わり、原子や分子レベルで制御し、所望の構造と特性を作り込むボトムアップ方式による新規材料に向けた研究開発が活発におこなわれている。ボトムアップ式の精密構造作製技術の一例としては、金属表面上で分子配列制御した分子デバイスの開発等が挙げられ、そのような分子配列制御技術のひとつとして、物質が持つ自己組織化を利用した方法の利用が検討されている。最近の検討例としては、Ｌｉｎｄｓａｙら（Ｓｃｉｅｎｃｅ、３００：ｐ１４１３、２００３）は分子末端にチオール基を有するアルカンチオール及びアルカンジチオールを金基板上に配向させた自己組織化膜を用いて分子スィッチング機能の検討をおこなっている。
【０００４】

核酸、タンパク質に代表される生体分子は、その機能を発揮する為に原子レベルで制御された精密な構造を構築することが知られている。そのような生体分子の特性を利用し、生体分子を金属または金属酸化物、半導体上に配置した種々のデバイスへの生体分子の応用の検討も考えられている。このようなデバイス開発をするための第一段階として、生体分子を基板上に配置する微小な構造体を作製する技術が重要となる。例えば、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）や、各種の機能を有するアミノ酸配列を有するペプチドの金基板上における固定化を考えた場合、ＤＮＡ、ペプチドは化学的に合成することが可能であり、その際にこれらの物質の末端をチオール基（－ＳＨ）で化学修飾することにより、Ｓ－Ａｕ表面吸着を利用して金基板上にこれらの物質が配位することが広く知られている。これを利用してＤＮＡ、またはペプチドを金上に固定化した実験系及びデバイス化検討が行われている。

【０００５】

一方、酵素、抗体などの機能を有するタンパク質は高分子量を有し、このような高分子量の化合物を高次構造形成し、且つ機能を発揮するように化学的に合成することは大変難しく、現在も色々と検討が行われているが機能と高次構造を持ち合わした機能性タンパク質を合成するまでには未だ到達していない場合が多いのが実情である（Ｓｃｉｅｎｃｅ、３０２：ｐ１３６４、２００３）。機能性タンパク質を基板材料へ固定化する場合、基板との結合には、基板側をシランカップリング剤に代表される種々の表面処理剤で処理し、タンパク質側に前記表面処理面と結合できる官能基を導入することが一般的に行われている（Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、３：ｐ２５４、２００３）。しかしながら、このような機能性タンパク質への反応性官能基の導入は、化学修飾によって行われることが一般的であり、非選択的に導入部位が決定されるために機能性タンパク質の機能発現部位を修飾されることで機能し難い形状で基板上に固定化され、得られる活性が低下する可能性があることが指摘されている。

【０００６】

遺伝工学的手法による結合部位をタンパク質に導入した融合タンパクを作製することも可能である。一例としては、低分子化合物であるビオチンと結合することが知られている（ストレプト）アビジンの全部もしくはビオチン結合部位を所望のタンパク質のＮ末端、Ｃ末端に遺伝子工学的に導入し、融合タンパク質として発現させ、所望の基板表面に配置したビオチンを介することによって固定化する方法が知られている。

【０００７】

また、最近では固定化する基板材料と結合できる５以上のアミノ酸からペプチドを取得し、所望のタンパク質と融合し融合タンパクを作製し、基材に結合、固定化させる技術が開示されている。Ｂｅｌｃｈｅｒらは、ファージディスプレー法によりＧａＡｓのある結晶面を特異的に認識できる１２アミノ酸からなるペプチドを開示し（Ｎａｔｕｒｅ、４０５：ｐ６６５、２０００）、生体材料の自己組織化能を用いたデバイス検討の新たな可能性を示した。更には、他の半導体（ＰｂＳ、ＣｄＳ）などに対する７乃至１４アミノ酸からなるペプチドのアミノ酸配列を開示している（ＷＯ０３／０２９４３１）。また、Ｂｒｏｗｎらにより、１４残基からなるアミノ酸配列を単位とする繰り返し構造を有するペプチドが金に対して親和性を示した幾つかのアミノ酸配列を開示している（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５：ｐ２６９、１９９７）。その他、これまでに金属（Ａｕ、Ｐｔ、Ｐｄ、Ａｇ）、金属酸化物（SiO_2、ＺｎＯ、Cr_2O_3、Fe_2O_3）、半導体に対する親和性ペプチドは前記ファージディスプレー法などにより多数取得されている。

【０００８】

このような基板材料親和性ペプチドを介して、所望の生体分子を基板上に固定化することにより生体分子間または異なる物質に対する相互作用により自己組織化的に、所望の機能・形状を周期的に有する構造体を構築することも可能である。例えば、前記Ｂｅｌｃｈｅｒらは、ＺｎＳ粒子と結合したＺｎＳ親和性ペプチドを提示したＭ１３ファージが自己組織化により配向することにより、液晶様フィルムを作製する技術を開示している（Ｓｃ

ｉｅｎｃｅ，２９６：８９２、２００２）。

【０００９】

更に、上記のように、遺伝子工学的に、基板結合性部位を融合した所望の機能性タンパク質を作製することにより、機能性タンパク質の基板固定化を機能部位以外の所望の部位に設定して行うことが可能となることが幾つかの技術例よって示されている。しかしながら、基板材料親和性ペプチドを直接または数個のアミノ酸からなるリンカーを介して機能性タンパク質末端に連鎖して、固相（例えば基板）に結合させ、タンパク質の固定化を試みる場合、機能性タンパク質の活性部位（例えば、抗体の抗原結部位を構成する幾つかのアミノ残基）が基板に近接し、基板表面からの何らかの相互作用（例えば、静電作用等）を受け構造変化等が生じ、十分に所望の機能を発揮できない恐れがある。また、リンカーを更に長く設定した場合においても、リンカーとなるペプチドの分子運動の自由度が高いと機能性部位に近接に配置され、その機能を阻害することも考えられる。

【００１０】

上記のことから、本発明者らは機能性タンパク質リンカーを始めとする機能性高分子材料を固定化する基材結合部位は、固定化するタンパク質の所望の活性を阻害することなく、基板から一定の距離を確保するスペーサーとなる構造部分（足場構造）と基板と結合する部位を有することが必要であるという考えに至った。

【００１１】

このような足場構造を有する分子認識分子として、抗体が最もよく知られている。抗体は、動物が自らの体液中に侵入する様々な異物に対して、その異物表面の種々の構造を認識して特異的に結合させ、その免疫系により無毒化させる自己防御機構の中で機能するタンパク質の一つである。その抗体の多様性（様様な異物に結合する為の違ったアミノ酸配列を持つ抗体数）は、動物個体あたり10^{7}乃至10^{8}種と見積もられている。その構造長短二本ずつのポリペプチド鎖から形成され、長いポリペプチド鎖を重鎖、短いポリペプチド鎖を軽鎖とそれぞれ呼ばれる。

【００１２】

これら重鎖及び軽鎖はそれぞれ可変領域と定常領域を有している。軽鎖は、一つの可変領域（ＶＬ）および一つの定常領域（ＣＬ）の二ドメインから構成されるポリペプチド鎖であり、一方で重鎖は一つの可変領域（ＶＨ）と三つの定常領域（ＣＨ１乃至ＣＨ３）の四ドメインから構成されるポリペプチド鎖である。上記各々のドメインは、アミノ酸約１１０個からなり筒状の構造をとり、逆平行の向きに配置されたβシート群による層状構造が形成され、この層状構造をひとつのＳＳ結合により結合し、非常に安定した構造体を形成している。また、抗体の多様な抗原種への結合は前記可変領域（ＶＨまたはＶＬ）がそれぞれ有する三つの相補的決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ：ＣＤＲ）のアミノ酸配列の多様性に起因するものであることが知られている。前記ＣＤＲは、ＶＨまたはＶＬにそれぞれ３つあり、フレームワーク領域により分離されて配置され、対象となる認識部位の官能基の空間配置を認識することにより、より高度な特異的な分子認識を可能としている。

【００１３】

上記ＣＤＲの多様性は、骨髄幹細胞が抗体産生細胞であるＢリンパ細胞へ分化する際に、抗体遺伝子座で生じるＤＮＡ再編成に発揮される。重鎖ではＶＨ遺伝子断片、Ｄ遺伝子断片、ＪＨ遺伝子断片から構成され部分、軽鎖ではＶλまたはＶκ遺伝子断片、ＪλまたはＪκ遺伝子断片から構成される部分でＤＮＡ再編成を起こすことによって生じることが知られている。このようなＤＮＡ再編成はＢ細胞毎に独立に起こるため、ひとつのＢ細胞は１種類の抗体しか産生しない。しかし、個体内においてのＢ細胞全体では、多様な抗体の産生が可能となる。

【００１４】

上記のような特定物質に結合することのできる抗体は、従来、上記のように動物が有する免疫系における抗体産生機構を利用して人為的に作製され、様様な産業分野で利用されている。作製方法の一例としては、目的の抗原物質をアジュバンドと共に被免疫動物（ウ

サギ、ヤギ、マウス等）に一定間隔で免疫し、その血清中に損じする抗体を回収する方法がある。このようにして得られた抗体は、免疫に用いた抗原物質の表面には様々な構造を認識する複数の抗体の混合物である。このようにひとつの抗原に結合する複数の抗体を含む血清はポリクロナール抗体と呼ばれる。

【００１５】

一方、被免疫動物の脾臓には目的の抗原と結合する抗体を産生する多種のＢリンパ球が存在している。このような抗体産出Ｂ細胞を株化した腫瘍細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を作製する。前記のように一つのＢリンパ球は一種類の抗体を産出するものである。一種類の抗体を産出するＢ細胞を永代培養できる系を確立されている。このように作製された抗体は、モノクロナール抗体と呼ばれる。

【００１６】

前記抗体の構造を足場として用いた分子認識構造体として、特開平０５－０５５５３４号公報において、二つの異なる抗原を認識する多重結合性抗体及びそれを用いた多重膜形成方法が開示されている。この技術によれば、第一の抗原と第二の抗原を認識する融合抗体を得ることができる。更に、基板表面に、第一の抗原、前記融合抗体、第二の抗原を順次配置することにより、化学的な修飾をすることなく多重膜を形成できる。しかしながら、開示されている融合抗体を得るためには、動物細胞を用いる必要があり、コスト面及び作業煩雑さという点で問題がある。更に、多層膜を形成する場合においては基板表面上に予め前記融合タンパクが認識可能な抗原を配置する工程を設けなければならない。

【００１７】

上記抗体をある種のタンパク質分解酵素で処理して得られる抗体断片、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）２も親となる抗体と同様の抗原に対して結合能を持つことが知られている。

【００１８】

上記ＶＨ、ＶＬまたはそれらの複合体であるＦｖ、更には前記ＶＨまたはＶＬからなる複合体において、一方のカルボキシ末端と他方のアミノ末端数個のアミノ酸からなるペプチドを介して連結した一本鎖Ｆｖ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ：ｓｃＦｖ）等も同様にして親抗体と同様の抗原に対して結合性を示すことが知られている。

【００１９】

Ｓｋｅｒｒａ及びＢｅｔｔｅｒは、遺伝工学的な方法によって分泌シグナル配列をＮ末端に付加したＦａｂ型とＦｖ型抗体断片を大腸菌による抗体遺伝子の発現する方法を開示している（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：ｐ１０３８、１９８８）、（Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４０：ｐ１０４１、１９８８）。また、特表平０７－５０１４５１号公報において多価抗原結合タンパク質及びその製造方法、特表平０８－５０４１００号公報においては多価、及び多重特異性結合タンパク質及びその製造方法に関する技術をそれぞれ開示している。この二つの技術において、結合性タンパク質は一以上の抗原に結合する抗体可変領域部（ＶＨ及び／またはＶＬ）を含んでなるタンパク質であることを開示している。特表平０７－５０１４５１号公報においては、バンカルシノーマ抗原ＴＡＧ－７２、フルオレセインにそれぞれ認識する結合タンパク及びこれらを認識する二重特異性結合性タンパク質の構成、及びアミノ酸配列更にはそれらをコードする塩基配列を開示している。特表平０８－５０４１００号公報においては、実施例において特表平０８－５０４１００号にかかる出願の出願時において既知のタンパク質（細胞膜タンパク、癌抗原ＣＥＡ、ＦｃＲγ１等）や低分子化合物に対する抗体断片複合体からなる二価及び二重特異性結合タンパク質について開示している。

【００２０】

しかしながら、前記の開示技術では無機物質に代表される基板材料表面を直接的に認識し、結合する結合性タンパク質に関する技術に関しては開示されていない。そのために、前記結合性タンパク質を基板上に配置した構造体を作製する場合には、従来既知の方法、例えば、基板または前記結合性タンパク質を化学修飾し、共有結合により基板上に配置する等の方法によって配置しなければならない。また、金属や半導体物質の微粒子に結合さ

せる際も、同様にして結合対象である微粒子または結合性タンパク質を化学的に修飾する必要があった。このような化学修飾は、タンパク質がその分子内に多数有するアミノ残基やカルボキシル基を標的とする場合が多く、その反応にかかわる部位は非選択的である。その為に、所望の活性を発揮する部位も基板固定または標識化部位になる恐れがあり、結果としてタンパク質の所望の活性を低下させる恐れがある。また、このような問題はマイクロデバイス化技術のみではなく、バイオセンサー等のセンシング素子を作製する上でも抗体等の標的物質を捕捉する分子をその捕捉機能を十分に発揮できる分子配向性をもって基板上に固定化することは重要な技術となる。

【００２１】

また、上記抗体と同様な足場構造を有するタンパク質に、多様な分子認識能を付与する研究も進められている。例えば、ａｎｔｉｃｏｌｉｎ（Ｒｅｖｉｅｗ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、７４：ｐ２５７、２００１）、フィブロネクチン タイプIIIドメイン（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２８４：ｐ１１４１、１９９８）等が挙げられる。ａｎｔｉｃｏｌｉｎは、ｌｉｐｏｃａｌｉｎをベースに改変された捕捉タンパク質である。ｌｉｏｃａｌｉｎは、１６０乃至１８０アミノ残基からなるタンパク質で低水溶性物質の輸送・貯蔵として機能するタンパク質である。構造は、８つのβシートから構成される樽型の構造体である。前記βシート間を繋ぐ４つのループ構造により対象物を認識し、結合することができる。フィブロネクチンは、一般的に１００残基以下のアミノ酸からなるタンパク質であり、細胞外マトリクスとの接合や細胞間接合において重要な役割を担うタンパク質である。上記二つのタンパク質同様にβシート構造を有し、βシート間のループ構造により標的物質を認識するタンパク質である。上記ａｎｔｉｃｏｌｉｎ、フィブロネクチンのβシート間のループ構造にランダムなアミノ酸配列導入し、新規の結合タンパク質を構築することが行われている。これらの分子は、分子認識部位とは別にβシートからなる強固な分子構造を有している為、所望の機能性高分子材料と融合することにより、基板を特異的に認識し、結合することにより固定化することができ、且つ固定化する高分子材料の所望の活性を阻害することなく、基板から一定の距離を確保するスペーサー機能も併せ持つことが期待される。しかしながら、前記抗体に代表される上記のような構造的に安定な足場構造を有する分子認識タンパク質において、金属、半導体材料に代表される無機物質を特異的に認識し、結合する例は今までは無い。

【００２２】

一方、各種物質（標的物質）の検出の分野においては、標的物質の検出および／または定量等は、特に、抗原および抗体のような蛋白質、並びに糖、レクチンおよび核酸に関しては、これまでいくつか確立されている。例えば、標的物質を特異的に認識・結合する抗体に標識物質を結合することにより、標識物質を介した検出または定量が可能となることが知られている。標識物質としては、金等の金属またはラテックス等の有機材料から微粒子、特定波長域の励起光により蛍光を発する蛍光物質やその蛍光物質を反応生成物とする酵素（例えばＨＲＰ等）を用いることが一般的である。抗体等のタンパク質を標識する方法としては、物理吸着による方法と反応活性のある官能基を標識物質／或いは被標識物質に導入し、それを架橋点として化学結合を形成する化学結合法が挙げられる。

【００２３】

以下、検出に用いられる抗体を一例として従来技術に関して述べる。特許第０３１０８１１５号明細書において、抗体に金微粒子を物理的に吸着させることにより金標識する方法の一例が示されている。この方法によれば、予め調整した金コロイド分散液にモノクローナール抗体を加え、遠心沈降処理して上清液を除去し、数度の洗浄工程を経てし、金標識抗体を得ることができる。

【００２４】

次に、抗体を化学結合法により標識する方法について、説明する。抗体はタンパク質のアミノ基、またはＳＨ基を有しており、これらに対し反応性を有する官能基を標識物質側に予め設けておくことにより、蛍光物質などの標識物質と抗体などの被標識物質との化学的な結合が可能となる。例えば、アミノ基と反応する、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドや

イソチオシアネート基、ニトロアリールハライド基、酸クロリド基を有した標識物質を導入する方法が挙げられる。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドは、アミノ基とｐＨ７以上の環境下で効率よく反応し、非常に安定なアミド結合を形成することが知られ、タンパク質を標識するための架橋剤として広く用いられている（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｖｏｌ．１１、ｐｐ２２９１、１９７２）。タンパク質上のα位とリシン側鎖のε位のアミノ基がスクシンイミド基の反応ターゲットとなることができる。特に、ε位アミノ基が、一般的なスクシンイミドのターゲットと考えられている。例えば、金微粒子を標識物質として化学的に抗体などのタンパク質に結合させる場合、まず金微粒子を少なくとも一端にＳＨ基を有し、他方に前述のタンパク質の側鎖残基と反応性の高い官能基を有した化合物で修飾する。次いでタンパク質と前記反応性官能基と架橋することにより結合させることが可能である。しかし、これらの方法では、リジンやフリーのα－アミノ基を有する残基を非選択的に反応対象とする為に、標識される対象となる抗体等のタンパク質の機能を阻害する恐れがある。また、イソチアネート基を有する蛍光物質としてＦＩＴＣが知られているが、スクシイミドと同様にアミノ基に対する非特異な反応による被標識タンパク質の所望の特性低下が懸念される。

【００２５】

また、－ＳＨ基を架橋点とすることができる。ＳＨ基を利用する方法は、マレイミド法とピリジルジスルフィド法に大別できる。マレイミド法はＳＨ基選択的な反応基としてマレイミドを有する架橋剤を用いる方法で、温和な条件で選択的な架橋ができることが知られている。例えば、被結合対象が抗体の場合、抗体分子のヒンジ部のジスルフィドを開裂させたＳＨ基は、抗原認識部分とは無関係であるため、ＳＨ基を修飾しても抗体の特異性が損なわれないことが期待される。このＳＨ基を架橋点にすることで所望の機能を損なうことなく標識物質を結合することが可能である。しかしながら、抗体全分子内にはＳＳ結合が１６箇所あり、その中には抗原認識部位であるＣＤＲ（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｄｉｓｉｓｉｏｎ　ｒｅｓｉｏｎ）を有する重鎖可変領域（ＶＨ）、軽鎖可変領域（ＶＬ）の構造を保持するためのＳＳ結合も含まれ、その還元箇所も部位特位的に行わなければ、その機能を損なう恐れがある。

【００２６】

特公平０４－０７０３２０号公報は、広範な種々の金属イオンと高い親和性をもつてキレート化する低分子量蛋白質であるメタロチオネインまたはそのフラグメントを用いたタンパク標識技術について開示している。この公報には、メタロチオネインはスルフヒドリル部分にて標識物質となる金属イオンと結合し、その他の官能基、例えば、アミン基、水酸基、カルボキシル基を架橋点として抗体等と結合させる技術が開示されている。メタロネオチン内においては金属イオン結合部位と被標識物質結合部位が区別されて、それぞれの被結合物質が結合することが可能であるが、被標識物質の結合部位は他の架橋方法と同様に定かではなく、上記と同様の問題点が依然として残る場合があると考えられる。

【００２７】

更に、前記のような化学架橋による標識物質に固定化方法による非選択的な修飾を解決する手段として、遺伝子工学的な修飾法が挙げられる。遺伝工学的手法により結合部位をタンパク質に導入した融合タンパクを作製することも可能である。一例としては、蛍光物質等の標識物質の末端に低分子化合物であるビオチンを化学的に導入し、前記ビオチンと結合することが知られている（ストレプト）アビジンの全部もしくはビオチン結合部位を所望のタンパク質のＮ末、Ｃ末に遺伝子工学的に導入し、融合タンパク質として発現させ、前記ビオチン－アビジン結合を介することによって目的のタンパク質と標識物質を結合させる方法が知られている。このように標識物質、例えば、蛍光物質に低分子化合物を導入し、それを認識し結合できるタンパク質を導入した目的のタンパク質との融合タンパク質を遺伝子工学的に作製し、選択的な結合部位を導入することができる。

【特許文献１】特表平０７－５０１４５１号公報
【特許文献２】特表平０８－５０４１００号公報
【特許文献３】特表平０７－５０１４５１号公報

【特許文献４】特公平０４－０７０３２０号公報
【特許文献５】特許第０３１０８１１５号明細書
【特許文献６】国際公開第０３／０２９４３１号パンフレット
【非特許文献１】Ｓｃｉｅｎｃｅ、３００：ｐ１４１３、２００３
【非特許文献２】Ｓｃｉｅｎｃｅ、３０２：ｐ１３６４、２００３
【非特許文献３】Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、３：ｐ２５４、２００３
【非特許文献４】Ｎａｔｕｒｅ、４０５：ｐ６６５、２０００
【非特許文献５】Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５：ｐ２６９、１９９７
【非特許文献６】Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９６：８９２、２００２
【非特許文献７】Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：ｐ１０３８、１９８８
【非特許文献８】Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４０：ｐ１０４１、１９８８
【非特許文献９】Ｒｅｖｉｅｗ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、７４：ｐ２５７、２００１
【非特許文献１０】Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２８４：ｐ１１４１、１９９８
【非特許文献１１】Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｖｏｌ．１１、ｐｐ２２９１、１９７２
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００２８】
しかしながら、前記の開示技術では無機物質に代表される基板材料表面や標識用物質を分子選択的に認識し、結合する結合性タンパク質に関する技術に関しては開示されていない。そのために、前記結合性タンパク質または複合タンパク質を基板上に配置した構造体を作製する場合には、従来既知の方法、例えば、基板または前記結合性タンパク質を化学修飾し、共有結合により基板上に配置する等の方法によって配置しなければならない。また、金属や半導体物質の微粒子、及び標識用物質に結合させる際も、同様にして結合対象である微粒子または結合性タンパク質を化学的に修飾する必要があった。このような化学修飾は、タンパク質がその分子内に多数有するアミノ残基やカルボキシル基を標的とする場合が多く、その反応にかかわる部位は非選択的である。その為に、所望の活性を発揮する部位も基板固定または標識化部位になる恐れがあり、結果としてタンパク質の所望の活性を低下させる恐れがある。
【００２９】
また、このような問題はマイクロデバイス化技術のみではなく、バイオセンサー等のセンシング素子を作製する上でも抗体等の標的物質を捕捉する分子をその捕捉機能を十分に発揮できる分子配向性をもって基板上に固定化することは重要な技術となる。
【課題を解決するための手段】
【００３０】
本発明は、
基体と、該基体の表面に配置されたタンパク質とからなる標的物質捕捉構造体であって、
前記基体の表面が金からなる部分を有し、
前記タンパク質が第一のドメインと第二のドメインとを有し、
前記第一のドメインが前記基体が有する金からなる部分を特異的に認識して捕捉する部位であり、
前記第二のドメインが標的物質を捕捉する部位であり、
前記基体への前記タンパク質の配置が、前記基体が有する金からなる部分を前記タンパク質が有する前記第一のドメインが特異的に認識して捕捉することによってなされていることを特徴とする標的物質捕捉構造体である。
【００３１】
前記第一のドメインが、Ｆ（ａｂ´）２、Ｆａｂ´、Ｆａｂおよびこれらの一部の少なくとも一種を含んでいることが好ましい。

【００３２】
前記第一のドメインが
（１）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、前記抗体重鎖可変領域の変異体、前記抗体重鎖可変領域の一部、前記抗体重鎖可変領域の変異体の一部、
（２）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）、前記抗体軽鎖可変領域の変異体、前記抗体軽鎖可変領域の一部、前記抗体軽鎖可変領域の変異体の一部
から選択された少なくとも一種を含んでいることが好ましい。
【００３３】
前記第一のドメインが、配列番号：１～４８に示されるアミノ酸配列のうち少なくとも一つの配列を含む前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含んでいることが好ましい。
【００３４】
前記第一のドメインが、配列番号：１～４８に示されるアミノ酸配列のうちの一つの配列の一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含む前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）の変異体を含んでいることが好ましい。
【００３５】
前記第一のドメインが、配列番号：４９～５７に示されるアミノ配列のうち少なくとも一つの配列を含む前記抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含んでいることが好ましい。
【００３６】
前記第一のドメインが、配列番号：４９～５７に示されるアミノ酸配列のうちの一つの配列の一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含む前記抗体重鎖可変領域（ＶＬ）の変異体を含んでいることが好ましい。
【００３７】
前記タンパク質が、前記基体の金からなる部分を特異的に認識して捕捉する部位である第三のドメインと、前記標的物質を捕捉する第四のドメインとを、更に有し、
前記第一～第四のドメインが以下の（１）～（７）のいずれかの関係を有していることが好ましい。
（１）前記第一のドメインと前記第二のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している
（２）前記第一のドメインと前記第二のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合している
（３）前記第三のドメインと前記第四のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している
（４）前記第三のドメインと前記第四のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合している
（５）少なくとも前記第一のドメイン、第二のドメイン及び第三のドメインが一つのポリペプチド鎖を形成している
（６）少なくとも前記第一のドメイン、第二のドメイン及び第四のドメインが一つのポリペプチド鎖を形成している
（７）前記第一乃至第四のドメインの全てが一つのポリペプチド鎖を形成している
【００３８】
前記タンパク質と前記基体との間の解離定数が10^{-6}Ｍ以下であることが好ましい。
【００３９】
前記基体が球形をなしていることが好ましい。
【発明の効果】
【００４０】
本発明で用いる金結合性複合タンパク質は金結合部位と構造部を有することにより、これと連鎖して結合する機能性物質を金基板表面に固定化する際に、機能性物質は、その本来の機能に対する固定化の影響は及ばず、また、固定化に際して、なんらの試薬を利用していないため、その機能に影響を及ぼす化学反応を被ることもない。更には、金基板との距離を保つことにより機能性物質がその機能に影響を及ぼすような基板から相互作用を受けることもない。
【００４１】

更に、本発明で用いる金結合性複合タンパク質は少なくとも金と、特定の物質に対する複数の結合部を有する。これにより、少なくとも（ｉ）表面の少なくとも一部に金を有する基板と（ii）金結合性複合タンパク質、更には（iii）金結合性複合タンパク質が結合できる特定の物質から構成される多層体を形成する構造体とすることができる。この際、金結合性複合タンパク質は抗体可変領域ドメインが有する立体的にも安定したβシート構造を有するため、金基板と特定の物質との結合部位の間に空間位置を保つことが可能であり、金または金以外の物質（例えば、標的物質）と結合する本金結合性複合タンパク質のドメイン（例えば、第二のドメイン）が、金を含む基板から何らかの相互作用を受けることがなく、結合能を保持することができる。また、これにより極めて薄膜な緻密な多層構造体を形成することが可能である。金結合性複合タンパク質によるこれらの特性を利用して、検出装置とすることができる。例えば、金薄膜上に所望の物質と結合可能な金結合性複合タンパク質を設けることで所望物質のセンシング素子とすることができる。その検出方法としては、光学的な手段、例えば表面プラズモン共鳴などを利用した手段を提供することができる。

【００４２】

一方、本発明にかかる金結合性タンパク質は、金を含む物質を標識物質とすることで、標的物質に金を含む標識物質を結合するための接続部材として利用可能である。この接続部材としての形態によれば、以下に示す代表的な効果を得ることができる。

【００４３】

第１の効果として、標的物質を結合する部位と標識物質を結合する部位をそれぞれ一以上有し、それぞれの結合部位は互いに独立して被結合物質と結合することにより、従来の標識方法で問題となっていた標識物質を結合した際に生じる被標識物質の標的物質結合能の低下が見られない、優れた標的物質を標識できる接続部材を提供することができる。第二の効果として、生体高分子であること、更にタンパク質であることにより、タンパク質の複数のアミノ残基と標的物質表面の相互作用に起因する高い結合性が期待できる。第三の効果として、接続部材が抗体可変領域であることによって、結合部位が高次構造により規定された立体配置で規定される為高い結合特異性が期待できる。第四の効果として、標識物質が金を含む物質であることにより、試料に対する散乱光量測定だけでなく、増強ラマンや局在プラズモンの原理を応用した光学的測定に加え、その電気特性を利用した電気測定も可能とすることができる。第五の効果として、前記接続部材を利用することで、標的物質／接続部材／標識物質を同時または任意に加えることが可能な検出方法及び検出キットを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００４４】

以下、本発明に用いる金結合性複合タンパク質、金結合性タンパク質およびその用途について説明する。

（１）金結合性タンパク質

・抗体

金結合性タンパク質は、抗体の少なくとも一部を含んでなるものである。前記金との結合のために用いる抗体には、すべての脊椎動物のリンパ系細胞で産出される金に対する結合性を有する抗体、及びそれらのアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個または数個が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、その構造・機能において関連を有する、すなわち目的とする金結合性を維持したタンパク質が含まれる。抗体は、その特性（免疫学的または物理学的な）の分類において、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥに分類されるが、その何れの分類であってもよい。更には、これらが多量体を形成していてよい。例えば、ＩｇＡは２量体、ＩｇＭは５量体を形成するが金に結合しうる形状であれば何ら問題はない。また、その使用用途がｉｎ　ｖｉｔｒｏである場合は哺乳類に限らず、ＩｇＷ、ＩｇＹであっても問題ない。

【００４５】

・金結合性抗体の取得

金結合性を示す抗体を取得する方法としては、従来行われてきた抗血清調製技術、および細胞融合によるモノクローン抗体作製技術を適宜選択して行うことができる。例えば、結合対象となる金微粒子を適当な免疫動物に免疫し、抗体価の上昇を確認したところで血清中から抗体を回収する。前記免疫とは、抗原となる金微粒子を適当な溶媒、例えば生理食塩水などで適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要に応じてフロイント完全アジュバントを併用投与し、動物に１～２週間間隔で３～４回程度投与する方法が一般的である。このようにして免疫された動物を最終免疫後３日目に解剖し、摘出した脾臓から得られた脾臓細胞を免疫細胞として使用する。免疫する金微粒子として、１０ｎｍ以下であることがこのましく、より好ましくは２ｎｍ以下である。更には、血清アルブミン等のタンパク質を共有結合させてハプテン化させることが更に好ましい。従来から免疫反応を生じにくい抗原においても、ある種タンパク抗原と複合体とすることによりタンパク質抗原の一部として認識され、産出を誘導されると予想される。

【００４６】

得られる抗体はポリクローナルでも良いが、モノクローナルとすることによってより金に対する特異性に優れたクローンを選択することが可能となる。モノクローナルな抗体は、それを産生する細胞をクローニングすることによって得ることができる。一般的には、免疫動物から回収した脾臓等のイムノグルブリン産生細胞を癌化細胞と融合させることによってハイブリドーマを形成することができる（Ｇｕｌｆｒｅ Ｇ．，Ｎａｔｕｒｅ ２６６．５５０－５５２，１９７７）。例えば、癌化細胞としてはマウス由来ミエローマＰ３／Ｘ６３－ＡＧ８．６５３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ－１５８０）、Ｐ３／ＮＳＩ／１－Ａｇ４－１（ＮＳ－１）、Ｐ３／Ｘ６３－Ａｇ８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（Ｓｐ２／Ｏ，Ｓｐ２）、ＮＳ０、ＰＡＩ、Ｆ０あるいは ＢＷ５１４７、ラット由来ミエローマ２１０ＲＣＹ３－Ａｇ．２．３．、ヒト由来ミエローマＵ－２６６ＡＲ１、ＧＭ１５００－６ＴＧ－Ａ１－２、ＵＣ７２９－６、ＣＥＭ－ＡＧＲ、Ｄ１Ｒ１１あるいはＣＥＭ－Ｔ１５等のミエローマ細胞をあげることができる。

【００４７】

モノクローナルの抗体を産生する細胞のスクリーニングは、前記細胞をタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前記金微粒子に対する反応性を、例えばＲＩＡ（ｒａｄｉｏ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）やＥＬＩＳＡ（ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ ｉｍｍｕｎｏ－ｓｏｌｖｅｎｔ ａｓｓａｙ）等の酵素免疫測定法、免疫沈降等によって測定することができる。または、表面プラズモン共鳴（ｓｕｒｆａｃｅ ｐｌａｓｍｏｎ ｒｅｓｏｎａｎｃｅ：ＳＰＲ）装置を利用した金結合性を定量的に測定することも可能である。

【００４８】

・抗体断片

本発明における抗体断片とは、モノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはＦ（ａｂ'）２、Ｆａｂ'、Ｆａｂ、Ｆｄ、Ｆｖ（ｖａｒｉａｂｌｅ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ）、ｓｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ）、ｄｓＦｖ（ｄｉｓｕｌｐｈｉｄｅ ｓｔａｂｉｌｉｓｅｄ Ｆｖ）あるいは可変領域（ＶＨ）または軽鎖可変領域（ＶＬ）からなる単ドメインｄＡｂ（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ）等が挙げられる。

【００４９】

ここで、「Ｆ（ａｂ'）２」及び「Ｆａｂ'」とは、抗体を、タンパク分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより得ることができる。抗体のヒンジ領域で２本の重鎖（Ｈ鎖）間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、ＩｇＧをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の２本のＨ鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて軽鎖可変領域（ＶＬ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）からなる軽鎖（Ｌ鎖）、及び重鎖可変領域（ＶＨ）と重鎖定常領域１（ＣＨ１）とからなる重鎖（Ｈ鎖）フラグメントがＣ末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な２つのフラグメントを得る。これら２つの相同な抗体フラグメントを各々Ｆａｂ

'という。またＩｇＧをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の２本のＨ鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記２つのＦａｂ'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをＦ（ａｂ'）２という。

【００５０】

このような金結合性タンパク質は、上記Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）２であってもよい。また、ＶＨと前記ＣＨ１を結合したＦｄ断片であっても構わない。

【００５１】

さらには、抗体の可変領域部（Ｆｖ）またはその一部であってもよく、例えばＦｖを構成する重鎖可変領域（ＶＨ）や軽鎖可変領域（ＶＬ）またはその一部であってもよい。一方、前記ＶＨまたはＶＬからなる複合体において、一方のカルボキシ末端と他方のアミノ末端数個のアミノ酸からなるペプチドを介して連結した一本鎖Ｆｖ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ：ｓｃＦｖ）を利用することもできる。上記ｓｃＦｖを形成するＶＨ／ＶＬ間（順不同）に一以上のアミノ酸からなるリンカーを設けることが望ましい。アミノ酸リンカーの残基長については、ＶＨまたはＶＬと抗原との結合に必要な構造形成を妨げるような拘束力を持たないように設計することが重要である。具体的な例としては、アミノ酸リンカー長は、５乃至１８残基が一般的で１５残基が最も多く用いられ検討されている。これら断片は遺伝工学的な手法により得ることが可能である。

【００５２】

更には、ＶＨ、ＶＬが何れか単ドメインｄＡｂであっても構わないが、前記単ドメイン構造は一般的に不安定であることが多いのでＰＥＧ修飾等の化学修飾による安定化を施しても良い。また、重鎖抗体としてｉｎ　ｖｉｖｏにおいても存在し、機能することができることが知られているラクダ重鎖抗体の可変領域ＶＨＨ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、３１１：ｐ１２３、２００１）、Ｎｕｒｓｅ　ｓｈａｒｋのイムノグロブリン様分子の可変領域ＩｇＮＡＲであっても構わない。更には、ヒト又はマウス由来に代表される重鎖・軽鎖から構成される抗体分子のＶＨ、ＶＬを図１乃至図４のようにドメイン単体で使用する際にＶＨ／ＶＬ界面等を重鎖抗体の相当部分を参考に変異導入することによって安定性が向上させても良い。

【００５３】

金結合部位は、（１）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、その変異体及びこれらの一部、並びに（２）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）、その変異体及びこれらの一部、から選択された少なくとも１種を含んでなるものとすることができる。抗体重鎖可変領域（ＶＨ）としては、配列番号：１～４８のアミノ配列の少なくとも一つを含んでなるタンパク質を、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）としては、配列番号：４９～５７のアミノ配列の少なくとも一つを含んでなるタンパク質を好ましいものとして挙げることができる。これらの配列番号：１～５７のアミノ配列のそれぞれの一個もしくは数個のアミノ酸が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を一つ以上含み、金結合性を有しているタンパク質も同様に利用できる。

【００５４】

・金親和性抗体断片の取得

・酵素処理による取得

また、上記抗体をある種の酵素処理することで、前記抗体の抗原結合部位及び抗原結合能をある程度有した抗体断片を得ることもできる。例えば、前記得られた抗体をパパイン処理することによりＦａｂ断片またはその類似体を得るができ、ペプシン処理によってＦ（ａｂ'）2断片またはその類似体が得られる。前記抗体断片は、前記酵素的手法の他に化学的分解して作製する方法もある。これら抗体断片も金に対して結合能を有するものであれば、何ら問題なく使用することができる。

【００５５】

本発明に係わる上記Ｆａｂ'、Ｆｖ、ＶＨまたはＶＬのｄＡｂを得る方法としては、遺伝工学的な手法を用いた取得も可能である。例えば、前記ＶＨまたはＶＬ遺伝子ライブラ

リーを作製し、それらをタンパク質として網羅的に発現させて、その遺伝子と対応させながら、金または標的物質に対する結合性により選択する方法がある。前記遺伝子ライブラリーは、たとえば、臍帯血、扁桃、骨髄、あるいは末梢血細胞や脾細胞等から得ることができる。例えば、ヒト末梢血細胞からｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。次に、ヒトＶＨ、ＶＬをコードする配列をプローブとして、ヒトＶＨまたはＶＬのｃＤＮＡライブラリーを作製する。例えば、ヒトＶＨファミリー（ＶＨ１乃至７）をファミリー毎に幅広く増幅することができるプライマーやヒトＶＬを増幅できるプライマーは公知である。これらＶＨ、ＶＬ毎にプライマーを組み合わせてＲＴ－ＰＣＲを行い、ＶＨ、ＶＬをコードした遺伝子を取得する。また、ファージディスプレー法を用いることも可能である。ファージディスプレー法は、ＶＨ、ＶＬまたはそれら含む複合体（例えば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ）をコードした遺伝子ライブラリーをファージ外殻タンパクをコードした遺伝子と結合し、ファージミドライブラリーを作製し、それらを大腸菌に形質転換し、種々のＶＨまたはＶＬを外殻タンパクの一部として有するファージとして発現させる。それらのファージを用いて、上記同様にして金また標的物質に対する結合性により選択することができる。ファージに融合タンパクとして提示されたＶＨまたはＶＬをコードする遺伝子は、ファージ内にファージミドにコードされているのでＤＮＡシークエンス解析をすることにより、特定することができる。

【００５６】

上記金結合性タンパク質をコードする核酸を用い、それをタンパク質として宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、マウス、ヒト等由来の従来既知のタンパク発現用細胞）を形質転換し、上記金結合性タンパクを発現できるための遺伝子ベクターとなる核酸からなる構成物を得ることもできる。一つの前記発現ベクターにより発現できる金結合性タンパク質は、抗体全分子、またはその抗体断片であるＦ（ａｂ'）２、Ｆａｂ、Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ＶＨ、ＶＬ、またはこれら複合体から選択して、設計することが可能である。ひとつの発現用ベクターに複数の前記断片をコードする場合、それぞれの抗体断片が独立した個々のポリペプチド鎖として発現させることができる。また、ドメイン間を連続して結合またはアミノ酸を介して結合させた一つのポリペプチド鎖として発現するベクター構成とすることも可能である。

【００５７】

金結合性タンパク質発現用ベクターの構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の導入遺伝子を発現させるために必要な構成等に組み込むことより、設計及び構築することができる。ベクター構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の構成等を参照し、構築することができる。また、大腸菌等を宿主細胞として用いる場合、外来遺伝子産物である金結合性タンパク質またその構成物を速やかに細胞質外に除外することで、プロテアーゼによる分解を少なくすることが可能である。また、この外来遺伝子産物が菌体にとって毒性である場合でも、菌体外へ分泌することによりその影響を小さくすることができることが知られている。通常、既知の細胞質膜あるいは内膜を通過して分泌されるタンパク質の多くがその前駆体のＮ末端にシグナルペプチドを有し、分泌過程においてシグナルペプチダーゼにより切断され、成熟タンパク質となる。多くのシグナルペプチドはそのＮ末に塩基性のアミノ酸、疎水性アミノ酸、シグナルペプチダーゼによる切断部位と配置されている。

【００５８】

金結合性タンパク質をコードする核酸の５'側にシグナルペプチドであるｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより分泌発現させることができる。

【００５９】

また、ひとつのベクター中に金結合性タンパク質または複数の抗体断片から構成されるポリペプチド鎖をそれぞれ独立して複数挿入することも可能である。この場合、各ドメインまたはポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、分泌を促すことができる。更に、または一以上のドメインからなるポリペプチド鎖とし

て発現させる場合、前記ポリペプチド鎖の５'末端に同様にしてｐｅｌＢをコードする核酸を配置することにより分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した金結合性タンパク質は、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。

【００６０】

また、発現させたタンパク精製時の作業の簡便さを考慮して、抗体分子、または独立した各抗体断片もしくは複数の抗体断片が連続して結合して形成されたポリペプチド鎖のＮまたはＣ末端に精製用のタグを遺伝子工学的に配置することが可能である。前記精製用タグとしては、ヒスチジンが６残基連続したヒスチジンタグ（以下、Ｈｉｓ×６）やグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのグルタチオン結合部位などが挙げられる。前記タグの導入方法としては、前記発現用ベクターにおける金結合性タンパク質をコードする核酸の５'または３'末端に精製タグをコードする核酸を挿入する方法や市販の精製タグ導入用ベクターを使用するなどが挙げられる。

【００６１】

以下に、上記発現ベクターを用いた金結合性タンパク質の製造方法について述べる。金結合性タンパク質、またはその構成要素となるポリペプチド鎖は、従来既知のタンパク発現用の宿主細胞に、宿主細胞に応じて設計した上記金結合性タンパク質発現用ベクターを形質転換し、宿主細胞内のタンパク合成システムを用いて、宿主細胞内に合成される。その後、宿主細胞内外に蓄積または分泌された目的タンパク質を細胞内部または細胞培養上清から精製することにより得ることができる。例えば、大腸菌を宿主細胞として用いる場合、金結合性タンパク質をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより細胞質外に分泌発現しやすい構成にすることができる。

【００６２】

ひとつの発現用ベクターで金結合性タンパク質を構成する複数のポリペプチド鎖を発現させる場合、各ポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、発現時に細胞質外への分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した金結合性タンパク質は、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。精製方法としては、前記精製タグがＨｉｓタグの場合、ニッケルキレートカラムやＧＳＴの場合、グルタチオン固定化カラムを使用することで精製することができる。

【００６３】

また、菌体内に発現した金結合性タンパクが不溶性顆粒で得ることも可能である。この場合、培養液から得られた菌体をフレンチプレスや超音波により破砕した細胞破砕液から前記不溶性顆粒を遠心分離することができる。得られた不溶性顆粒画分を尿素、塩酸グアニジン塩を含む従来既知の変性剤を含んだ緩衝溶液で可溶化した後に、変性条件下で前記同様なカラム精製することができる。得られたカラム溶出画分は、リフォールディング作業により、変性剤除去と活性構造再構築を行うことができる。リフォールディング方法としては、従来既知の方法から適宜用いることも可能である。具体的には、段階透析法や希釈法などを目的のタンパクに応じて用いることが可能である。

【００６４】

金結合性タンパク質の各ドメインまたは各ポリペプチド鎖は、同一宿主細胞内で発現させることも可能であるし、別の宿主細胞を使用して発現した後に共存させて、複合体化させることも可能である。

【００６５】

更に、金結合性タンパク質をコードするベクターを用いて、細胞抽出液を用いて生体外でのタンパク質発現をすることも可能である。好適に用いられる細胞抽出液としては、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等が挙げられる。しかしながら、上記無細胞抽出液によるタンパク合成は一般的には還元条件下で行われる。その為に、抗体断片中のジスルフィド結合を形成させるために何らかの処理を行う方がより好ましい。

【００６６】
金結合性タンパク質の好ましい解離乗数（K_D）は、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０存在下のバッファー条件下で10^{-6}M以下であり、より好ましくは10^{-8}M以下である。上記条件において、ＢＳＡなど比較的に金への非特異的な吸着が多いとされるタンパク質材料であっても金への吸着ができないことを本発明者の検討において確認している。K_D値が10^{-6}M以下であれば、上記のような非特異吸着性のタンパク質の吸着挙動と十分に区別することが可能であり、更に10^{-8}M以下であることで固定化用のアンカー分子として十分に機能することができる。
【００６７】
・抗体断片タンパク発現
金結合性タンパク質を、所望の制限酵素、例えば上記の例ではＮｃｏＩ／ＮｈｅＩにより切断して金結合性抗体断片コードＤＮＡを得る。これを宿主細胞に応じた従来公知のタンパク発現用プラスミドに導入することで抗体断片を得ることができる。例えば、大腸菌の場合、菌体外発現またはペリプラズム画分から目的の抗体断片を回収したい場合、前記抗体断片コード遺伝子の上流に従来既知のシグナルペプチドを導入することができる。シグナルペプチドとしては、ｐｅｌＢ等が挙げられる。また、発現後、培養上清または菌体画分から目的タンパクの精製を容易にするために、従来既知の精製用タグを融合してもよい。具体的には、ヒスチジン６残基（Ｈｉｓ×６）やグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのグルタチオン結合部を導入し、融合タンパクとすることができる。これらは、Ｈｉｓタグの場合、ニッケル等の金属キレートカラムなどにより精製することが容易にできる。ＧＳＴタグの場合は、グルタチオンをセファロース等に担体に固定化したカラムにより精製することが可能である。
【００６８】
また、菌体内に発現した目的タンパクが不溶性顆粒で得ることができない場合、これらを尿素、塩酸グアニジン塩を含む従来既知の緩衝溶液で可溶化した後に、リフォールディングを行うことも可能である。リフォールディング方法としては、従来既知の方法から適宜用いることも可能である。具体的には、段階透析法や希釈法などを目的のタンパクに応じて用いることが可能である。
【００６９】
これらで得られた抗体、及びそれらの断片、例えばＦａｂ、（Ｆａｂ'）２、Ｆｄ、ＶＨまたはＶＬまたは前記それらの複合体等のアミノ酸配列において、一もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列であっても金結合性を示すものであれば本発明の範囲から超えるものではない。
【００７０】
金結合性タンパク質の好ましい解離乗数（K_D）は、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０存在下のバッファー条件下で10^{-6}M以下であり、より好ましくは10^{-8}M以下である。上記条件において、ＢＳＡなど比較的に金への非特異的な吸着が多いとされるタンパク質材料であっても金への吸着ができないことを本発明者の検討において確認している。
【００７１】
K_D値が10^{-6}M以下であれば、上記のような非特異吸着性のタンパク質の吸着挙動と十分に区別することが可能であり、更に10^{-8}M以下であることで固定化用のアンカー分子として十分に機能することができる。
【００７２】
・金を有する被結合対象物
金を有する被結合対象物は、少なくともその表面の一部に金を有する物質から種々選択して用いることができる。免疫やパニング等により金結合性タンパク質を選択する際は、金以外の物質に対して吸着するタンパク質の混入を除くために被結合対象物表面は金のみであることがより望ましい。表面以外の内部コア基材となる材料は、金は勿論のことその他既知の種々の材料から選択して用いることができる。更に、粒子状、より好ましくは1乃至１００μｍφの微粒子にすることにより結合に係わる比表面積が増加して好ましく、

またパニング終了時の回収の際も遠心分離により容易に回収することができる。また、下記のように市販の種々のプラスチックプレート、例えば培養シャーレ、９６穴タイタープレートに金蒸着して用いてもよい。この場合、金表面の接液面積及び攪拌による分子拡散効果を鑑みて、そのサイズ及びウェル数を決定することが好ましい。

【００７３】

被結合対象物の形状としては、平板、球形、針状、多孔状等、既知の形状から適宜選択して用いることができる。形成方法としては、物理的または化学的な蒸着方法や塩化金を用いた化学的な製造方法から適宜選択することができる。得られた金を含む表面は、酸化膜や副生成物、共雑等の不純物を除去するため、酸性溶液、アルカリ性溶液、有機溶媒等で予め洗浄して所望の金の露出状態を作製し、用いてもよい。

【００７４】

・基体

金結合性タンパク質と、表面の少なくとも一部が金から形成されている基体とから各種の用途に使用し得る構造体を得ることができる。この基体は、その表面の少なくとも一部に金を配置されたものであり、本発明の構造体を形成しうるものであればいかなる材質、形状のものも利用可能である。本発明の構造体に用いる基体の材質は、本発明の構造体を形成しうるものであればいかなる材質でもよく、金属、金属酸化物、無機半導体、有機半導体、ガラス類、セラミクス、天然高分子、合成高分子、プラスチックから選ばれる何れか１以上或いはその複合体を含んでなる材質である。本発明に用いる基体の形状は、本発明の構造体を形成しうるものであればいかなる形状でもよく、板状、粒子状、多孔体状、突起状、繊維状、筒状、網目状から選ばれる何れか１以上の形状を含んでなる形状である。

【００７５】

基体形成用の有機高分子化合物としては、スチレン、α－メチルスチレン、β－メチルスチレン、ｏ－メチルスチレン、ｍ－メチルスチレン、ｐ－メチルスチレン、２、４－ジメチルスチレン、ｐ－ｎ－ブチルスチレン、ｐ－ｔｅｒｔ－ブチルスチレン、ｐ－ｎ－ヘキシルスチレン、ｐ－ｎ－オクチルスチレン、ｐ－ｎ－ノニルスチレン、ｐ－ｎ－デシルスチレン、ｐ－ｎ－ドデシルスチレン、ｐ－メトキシスチレン、ｐ－フェニルスチレンなどのスチレン系重合性モノマー、メチルアクリレート、エチルアクリレート、ｎ－プロピルアクリレート、ｉｓｏ－プロピルアクリレート、ｎ－ブチルアクリレート、ｉｓｏ－ブチルアクリレート、ｔｅｒｔ－ブチルアクリレート、ｎ－アミルアクリレート、ｎ－ヘキシルアクリレート、２－エチルヘキシルアクリレート、ｎ－オクチルアクリレート、ｎ－ノニルアクリレート、シクロヘキシルアクリレート、ベンジルアクリレート、ジメチルフォスフェートエチルアクリレート、ジエチルフォスフェートエチルアクリレート、ジブチルフォスフェートエチルアクリレート、２－ベンゾイルオキシエチルアクリレートなどのアクリル系重合性モノマー、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ｎ－プロピルメタクリレート、ｉｓｏ－プロピルメタクリレート、ｎ－ブチルメタクリレート、ｉｓｏ－ブチルメタクリレート、ｔｅｒｔ－ブチルメタクリレート、ｎ－アミルメタクリレート、ｎ－ヘキシルメタクリレート、２－エチルヘキシルメタクリレート、ｎ－オクチルメタクリレート、ｎ－ノニルメタクリレート、ジエチルフォスフェートエチルメタクリレート、ジブチルフォスフェートエチルメタクリレートなどのメタクリル系重合性モノマー、メチレン脂肪族モノカルボン酸エステル類、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、ベンゾエ酸ビニル、酪酸ビニル、安息香酸ビニル、ギ酸ビニルなどのビニルエステル類、ビニルメチルエーテル、ビニルエチルエーテル、ビニルイソブチルエーテル等のビニルエーテル類、ビニルメチルケトン、ビニルヘキシルケトン、ビニルイソプロピルケトン等のビニルケトン類などのビニル系重合性モノマー、からなる群より選択された重合性モノマーを重合させて製造された有機高分子化合物を挙げることができる。

【００７６】

また、例えば、無機系固形物の例としては、カオリナイト、ベントナイト、タルク、雲母等の粘土鉱物；アルミナ、二酸化チタン、酸化亜鉛、マグネタイト、フェライト、Ｎｂ

Ｔａ複合酸化物、WO_3、In_2O_3、MoO_3、V_2O_5、SnO_2、等の金属酸化物；シリカゲル、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウムゲル等の不溶性無機塩；金、銀、プラチナ、銅等の金属；ＧａＡｓ，ＧａＰ，ＺｎＳ、ＣｄＳ、ＣｄＳｅ、等の半導体化合物、ガラス、シリコン、或いはこれらの複合体などを用いることができるが、勿論、これらに限定されるものではない。

【００７７】

基体は、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）、ジアセテート、トリセテート、セロハン、セルロイド、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリビニルクロライド、ポリビニリデンクロライド、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステルなどのプラスチックからなるフィルム、ポリビニルクロライド、ポリビニルアルコール、アセチルセルロース、ポリカーボネート、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエチレン、テフロン等からなる多孔性高分子膜、木板、ガラス板、シリコン基板、木綿、レーヨン、アクリル、絹、ポリエステルなどの布、上質紙、中質紙、アート紙、ボンド紙、再生紙、バライタ紙、キャストコート紙、ダンボール紙、レジンコート紙などの紙を用いて、膜状やシート状とすることもできるが、勿論、これらに限定されるものではない。なお、これら膜状やシート状の材料は、滑らかなものであっても、凹凸のついたものであっても良い。

【００７８】

基体の例としては、シリコンやシリカ、ガラス、石英ガラス等の基板及びそれらの基板にフォトリソグラフィーやエッチング、サンドブラスト等の手法で施された微小流路やホール（孔）、或いはそれらの表面に金や銀、白金の薄膜が施されたもの、ＰＤＭＳ（ポリジメチルシロキサン）やＰＭＭＡ（ポリメチルメタクリレート）、ＰＥＴ（ポリエチレンテレフタレート）、ＰＣ（ポリカーボネート）、ＰＳ（ポリスチレン）等の基板及び成型技術により施された微小流路やホール（孔）、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレンダイアモンド或いはそれらの集合体、アルミナ、カーボン、フラーレン、ＺｎＯ等からなるナノウイスカー、SiO_2、アルミノシリケート、その他のメタロシリケート、TiO_2、SnO_2、Ta_2O_5等からなるメソポーラス薄膜、微粒子、及びモノリス構造体、金、銀、銅、白金等の微粒子、マグネタイト、フェライト、ヘマタイト、ガンマ・ヘマタイト、マグヘマイト等の鉄酸化物微粒子、アルミニウムシリコン混合膜及びそれを陽極酸化したシリコン酸化物ナノ構造体、ポーラスアルミナ薄膜、アルミナナノホール構造体、シリコンナノワイヤー等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、基体の大きさは使用用途に応じて種々選択することが可能である。

・標的物質検出用のキット

金結合性タンパク質に標的物質との結合性を付加した構成を用いて、標的物質検出用のキットを得ることができる。例えば、上記の構造体を形成するための基体及び金結合性複合タンパク質と、該構造体への標的物質の結合を検出するための検出手段と、を有する標的物質検出用キットを構成することができる。例えば、標的物質への金結合性タンパク質を含むタンパク質への結合は、金結合性タンパク質含むタンパク質が結合した状態の標的物質に対して金または金を含む標識物質を付加して、これを物理的あるいは化学的な手法で検出することによって行うことができる。あるいは、標的物質が金を含むものであれば、金結合性タンパク質の金への結合性を利用して、金結合性タンパク質を金を含む標的物質に結合させ、この結合状態を標識を利用して検出することができる。この場合に用いる標識としては接続部材の説明において後述するものを利用できる。更に、例えば、光学的な変化、電気的な変化、あるいは熱的な変化などにおける物理量の変化によって標的物質と金結合性タンパク質との結合を検出することができる。

【００７９】

なお、かかる標的物質との結合性を付加した構成としては、後述する金結合性複合タンパク質や、金結合性タンパク質を標的物質と標識物質との結合部材として利用する場合を好ましいものとして挙げることができる。

【００８０】

・表面プラズモン共鳴装置

なお、金結合性タンパク質を含むタンパク質の金に対する結合は、例えば、従来既知の表面プラズモン共鳴測定装置で定量的に測定することができる。表面プラズモン共鳴は、一般にガラス基板上に設けた金薄膜上の屈折率変化を全反射角以下でガラス側から入射させた光によりガラス／金界面で生じるエバネセント波と金薄膜上の自由電子の共鳴（表面プラズモン共鳴）によって生じる共鳴角変化から測定する方法である。測定された屈折率変化を、被対象タンパク質の金への結合量として換算し、評価できる。

【００８１】

・解離定数（K_D）

「解離定数（K_D）」とは、「解離速度（ｋｄ）」値を「結合速度（ｋａ）」値で除して求められる値である。これらの定数は、前記モノクローナル抗体またはそれらの断片が金に対する親和性を表す指標として用いられる。前記定数は、種々の方法に従って解析することができるが、本発明においては、測定機器であるＢｉａｃｏｒｅ２０００（アマシャムファルマシア社製）を用い、前記装置に添付された解析ソフトに従って、得られた結合曲線から解析して得た。

【００８２】

（２）金結合性複合タンパク質

金結合性複合タンパク質は、２以上のドメインから構成され、１以上のドメインが上記の構成の金結合性タンパク質を有するものである。この複合タンパク質には以下の構成のものが例示できる。

（ａ）上記構成の金結合性タンパク質を含む第一のドメインと、特定の物質に対する結合部位を有するタンパク質を含む第二のドメインと、を有する複合タンパク質。

（ｂ）上記の第一のドメインと第二のドメインに加えて、第一のドメインと複合体を形成する第三のドメイン及び前記第二のドメインと複合体を形成する第四のドメインの少なくとも一方を更に有する複合タンパク質。

【００８３】

なお、第二～第四のドメインの少なくとも１つは金結合性のタンパク質を有することができ、その場合は、上記構成の金結合性タンパク質を含有させることでこれらのドメインを形成できる。なお、第一～第四のドメインの被結合物質への結合性は各ドメインで独立して設定することができ、これらのドメインにおいて同じ結合性を有するドメインが２以上存在してもよく、異なる結合性のドメインからこれらのドメインを構成してもよい。

【００８４】

更に、記第一～第四のドメインから選択された少なくとも２種が同一ポリペプチド鎖中に含まれているものであってもよい。このような構成としては、以下の構成を含む場合を挙げることができる。

（１）第一のドメインと第二のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成している構成。

（２）第一のドメインと第二のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合されている構成。

（３）第三のドメインと第四のドメインが一本のポリペプチド鎖を形成する構成。

（４）第三のドメインと第四のドメインが一以上のアミノ酸を介して結合されている構成。

（５）第一のドメインと第二のドメインを含んでなる第一のポリペプチド鎖と、第三のドメインと第四のドメインを含んでなる第二のポリペプチド鎖とからなる構成。

（６）第一のドメインと第二のドメインを含んでなる第一のポリペプチド鎖と、第三のドメインと第二のドメインを含んでなる第三のポリペプチド鎖とからなる構成。

（７）第一のドメインと第二のドメインを含んでなる第一のポリペプチド鎖と、第一のドメインと第四のドメインを含んでなる第四のポリペプチド鎖と、からなる構成。

（８）少なくとも第一のドメインと第二のドメイン、及び第三のドメインを含んでなる一つのポリペプチド鎖からなる構成。

（９）少なくとも第一のドメインと第二のドメイン、第四のドメインを含んでなる一つのポリペプチド鎖からなる構成。

（１０）第一～第四のドメインを含んでなる一つのポリペプチド鎖からなる構成。

【００８５】

・金結合性複合タンパク質

金結合性複合タンパク質の構成要素としてのタンパク質は、少なくとも二以上のアミノ酸が結合して形成されるポリペプチド鎖を少なくとも一以上含んでなり、それらポリペプチド鎖が特定の立体構造を形成するように折り畳まれて、固有の機能（変換、分子認識等）発揮できる分子のことを言う。また、金結合性複合タンパク質は、少なくとも金に対する結合部位を一以上有し、更に金もしくは金以外の物質との結合部位を少なくとも一以上有する、多価または多重特異性の結合性を示す複合タンパク質で、少なくとも以下を含んでなる複合化されたタンパク質である。好ましい構成としては、金に対する結合部位を有し、少なくとも抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）または重鎖可変領域（ＶＨ）の一部を含む第一のドメインと、特定の物質（以下、標的物質）に対する結合部位を有し、少なくともＶＨまたはＶＬの一部を含む第二のドメインを有するものを挙げることができる。（以下、金に結合するＶＨ、ＶＬをＶＨ（Ｇ）、ＶＬ（Ｇ）、標的物質に結合するＶＨ、ＶＬをＶＨ（Ｔ）、ＶＬ（Ｔ）とする。）

抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、前述したように抗体重鎖及び抗体軽鎖が有する可変領域である。抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、一般的には各々アミノ酸約１１０個からなり筒状の構造をとり、逆平行の向きに配置されたβシート群による層状構造が形成され、この層状構造をひとつのＳＳ結合により結合し、非常に安定した構造体を形成している。また、前記可変領域（ＶＨまたはＶＬ）は、抗体の多様な抗原への結合を決定する相補的決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ：ＣＤＲ）と呼ばれる部分を有することが知られている。前記ＣＤＲは、ＶＨまたはＶＬにそれぞれ３つあり、比較的に多様性の少ないアミノ酸配列であるフレームワーク領域により分離されて配置され、対象となる認識部位の官能基の空間配置を認識することにより、より高度な特異的な分子認識を可能としている。

【００８６】

以下に、金結合性複合タンパク質の一例について述べる。金結合性複合タンパク質の最小単位は、上記第一のドメインと上記第二のドメインから構成され、図１にその模式的な図を示す。その組み合わせ例としては、ＶＨ（Ｇ）－ＶＨ（Ｔ）、ＶＨ（Ｇ）－ＶＬ（Ｔ）、ＶＬ（Ｇ）－ＶＨ（Ｔ）、ＶＬ（Ｇ）－ＶＬ（Ｔ）といった組み合わせが挙げられる。この例では、金結合性複合タンパク質は、第一のドメインと第二のドメインは相補的な結合部位を形成することなく、第一のドメインが金、第二のドメインが標的物質へと独立して結合するものである。第一のドメインと第二ドメインは、独立したポリペプチド鎖であっても、ドメインが連続的に結合されたポリペプチド鎖であってもよいが、ポリペプチド鎖が連続して結合されたポリペプチド鎖を形成することが、製造工程の簡略化及びその機能発現においてより好ましい形態である。第一のドメインと第二のドメインが連続して結合されたポリペプチド鎖の場合、第一のドメインと第二のドメインを直接連鎖してもよいし、一個以上のアミノ酸からなるリンカーを介して連鎖してもよい。アミノ酸からなるリンカーは１乃至１０個のアミノ酸からなるものであることが好ましい。より好ましくは１乃至５個のアミノ酸からなるものである。リンカーのアミノ酸長が１１乃至１５である場合、第一のドメインと第二のドメインは配置による制限が少なく、前記ドメイン間で相補的な結合形成（ｓｃＦｖ化）してしまう場合がある。このＶＨ／ＶＬ間の相補的な複合体形成を抑制するために、リンカー長を短くし、ドメイン間に構造的な制約を負荷することが有効であることが知られている。第一もしくは第二のドメインのそれぞれが標的物質に結合した場合にもたらされる構造変化の影響が互いの所望する標的物質に対する結合能に影響がないことが望ましい。このために、リンカーをα－ヘリックス等の二次構造を持たせたり、本来所望の結合特性に無関係なポリペプチドのドメンインを挿入することも所望の特性や生産性に著しい影響を与えない範囲において可能である。

【００８７】

更に、金結合性複合タンパク質は、第一のドメインと複合体を形成する、ＶＨまたはＶＬの一部を少なくとも含む第三のドメイン、または／及び第二のドメインと複合体を形成する、ＶＬまたはＶＨの少なくとも一部を含む第四のドメインを含んでなる構成であっても良い。第三のドメインは、第一のドメインは複合体を形成することにより、第一のドメインと相補的な金結合部位を形成しすることがより望ましい。

【００８８】

例えば、図２ａの模式図で示すように第一のドメインがＶＨ（Ｇ）である場合、第三のドメインは第一のドメインとＦｖを形成し得るＶＬであることが好ましく、より好ましくは第一のドメインと第三のドメインが金結合部位を連合して形成する構成である。

【００８９】

このように第一のドメインが第三のドメインがＦｖを形成することにより、構造的により安定化し、構造変化による機能低下を抑制することが期待できる。さらに、第三のドメインが第一のドメインと連合して金結合部位を形成することにより、更に結合能（例えば、結合速度の向上、解離速度の抑制等）を向上することも期待される。

【００９０】

更には、図２ｂに示すように第一のドメインと第三のドメインは、それぞれ独立したポリペプチド鎖として設けても、連鎖してなるポリペプチド鎖であってもよい。（例えば、図２ｂの模式図に示すように第三のドメイン－第一のドメイン－第二のドメイン。金及びターゲットに対して結合能が発揮されるように適宜その構成を決定することができる。）

また、別の例として、図３の模式図に示すような構成も可能である。つまり、前記第一のドメインと前記第二のドメインからなるポリペプチド鎖と第三のドメインと前記第二のドメインからなるポリペプチド鎖からなる複合体である。この場合、第一のドメインと第三のドメインから形成されるＦｖまたはＦｖ様複合体により金と結合し、上記第二のドメインにより標的物質に対して結合するアンカーとして第一のドメインが機能するものである。

【００９１】

また、金結合性複合タンパク質は、第二のドメインと複合体を形成する、少なくともＶＨまたはＶＬの一部からなる第四のドメインを含んだ構成であっても良い。第四のドメインは、前記第二のドメインとともに標的物質に対する結合部位を相補的に形成することが望ましい。例えば、図４ａの模式図に示すように、第二のドメインがＶＬである場合、第四のドメインは第二のドメインとＦｖを形成し得るＶＨであることが好ましく、より好ましくは第二のドメインと第四のドメインが前記標的物質に対する結合部位を連合して形成する構成である。また、図４ｂの模式図に示すように、第一のドメイン、第二のドメイン、及び第四のドメインが連鎖したポリペプチド鎖を形成してもよい。特に、図４ｂの構成において第一のドメインにて少なくとも表面の一部に金を有する基体と結合し、第二及び第四のドメインにて標的物質と結合する場合、第一のドメインが基体との結合した際において不可逆的な構造変化をした場合においてもリンカー等を設計することにより第二及び第四のドメインの標的物質との結合能への影響を最小限に抑えるようにすることが可能である。

【００９２】

更に、図５の模式図に示すような構成も可能である。つまり、前記第一のドメインと前記第二のドメインからなるポリペプチド鎖と第一のドメインと前記第四のドメインからなるポリペプチド鎖からなる複合体である。この場合、第二のドメインと第四のドメインから形成されるＦｖまたはＦｖ様複合体により標的物質を結合し、上記両ポリペプチド鎖を金に対して結合するアンカーとして第一のドメインが機能するものである。

【００９３】

また、本金結合性複合タンパク質は第三及び第四のドメインをともに構成材料とすることが可能である。図６の模式図に示すように第三及び第四のドメインがそれぞれ独立したポリペプチド鎖であっても、図７の模式図に示すように連鎖されてなるポリペプチド鎖であってもよい。連鎖したポリペプチド鎖の場合、第三のドメインと第四のドメインを直接

連鎖してもよいし、図７のように一以上のアミノ酸からなるリンカーを介して連鎖してもよい。リンカー長の設定については、前記と同様にアミノ酸からなるリンカーは１乃至１０アミノ酸であることが好ましい。より好ましくは１乃至５である。

【００９４】

また、図８の模式図に示すように前記第一乃至第四のドメインが一つのポリペプチド鎖内に連鎖されたものであってもよい。この場合、第一のドメインと第三のドメインが複合体を形成し金と結合し、第二のドメインと第四のドメインが複合体を形成し金及び金以外の物質に結合できるように配置できるように構成されるものである。その為に、前記リンカーをドメイン間に設けることが好ましい。例えば、第一及び第二のドメイン間、第三及び第四のドメイン間は１乃至５アミノ酸であり、第二及び第三のアミノ酸のドメイン間は１５乃至２５アミノ酸である。同じような構成において、第一のドメインと第二のドメイン、第三のドメインと第四のドメインをそれぞれ／双方とも入れ替えること可能である。

【００９５】

これら一本鎖ポリペプチド内における各ドメインの配列は、金またはターゲットに対する結合性、及び本金結合性複合タンパク質の長期安定性等、所望の特性に応じて適宜選択して決定することが可能である。

【００９６】

第一のドメインは、例えば、配列番号：１乃至配列番号：５７の中の少なくとも一つの配列を含んでなるものであり、これらのアミノ酸配列において、一個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列のものであっても金に対する結合性を保持できれば何ら問題はない。更には、上記のアミノ酸配列の一部を形成する配列またはそれらを含む複合体であっても金結合性を示すものであれば何ら問題なく金結合性タンパク質として使用することが可能である。配列番号：１乃至配列番号：５７を有するＶＨの具体例を配列番号：５８乃至配列番号：７４に、ＶＬの具体例を配列番号：７５乃至配列番号：７７に示す。

【００９７】

第三のドメインは、配列番号：１乃至配列番号：５７から選ばれるアミノ酸を一以上有していることが望ましい、更には、配列番号：５８乃至配列番号：７７の中から第一のドメインに応じて適宜選択して設定することがより好ましい。

【００９８】

上記金結合性複合タンパク質をコードする核酸を用いて、それをタンパク質として宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、マウス、ヒト等由来の従来既知のタンパク発現用細胞）の形質転換し、上記金結合性タンパクを発現できるための遺伝子ベクターとなる核酸からなる構成物を得ることもできる。金結合性複合タンパク質を構成しうる第一及び第三のドメインをコードする核酸の配列例を配列番号：９８乃至配列番号：１１６に示す。

【００９９】

一つの前記発現ベクターにより発現できる金結合性複合タンパク質の各ドメインは、１乃至４のいずれかから選択して、設計することが可能である。ひとつの発現用ベクターに金結合性複合タンパク質の複数のドメインをコードする場合、それぞれのドメインが独立した個々のポリペプチド鎖として発現させることができる。また、ドメイン間を連続して結合またはアミノ酸を介して結合させた一つのポリペプチド鎖として発現するベクター構成とすることも可能である。金結合性複合タンパク質発現用ベクターの構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の導入遺伝子を発現させるために必要な構成等に組み込むことより、設計及び構築することができる。ベクター構成は、選択する宿主細胞に応じて既知のプロモーター等の構成等を参照し、構築することができる。また、大腸菌等を宿主細胞として用いる場合、外来遺伝子産物である金結合性複合タンパク質を速やかに細胞質外に除外することで、プロテアーゼによる分解を少なくすることが可能である。また、この外来遺伝子産物が菌体にとって毒性である場合でも、菌体外へ分泌することによりその影響を小さくすることができることが知られている。通常、既知の細胞質膜あるいは内膜を通過して分泌されるタンパク質の多くがその前駆体のＮ末端にシグナルペプチ

ドを有し、分泌過程においてシグナルペプチダーゼにより切断され、成熟タンパク質となる。多くのシグナルペプチドはそのＮ末に塩基性のアミノ酸、疎水性アミノ酸、シグナルペプチダーゼによる切断部位と配置されている。

【０１００】

金結合性複合タンパク質をコードする核酸の５'側にシグナルペプチドであるｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより分泌発現させることができる。また、ひとつのベクター中に金結合性複合タンパク質を構成する各ドメインまたは複数のドメインから構成されるポリペプチド鎖をそれぞれ独立して複数挿入することも可能である。この場合、各ドメインまたはポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、分泌を促すことができる。更に、または一以上のドメインからなるポリペプチド鎖として発現させる場合、前記ポリペプチド鎖の５'末端に同様にしてｐｅｌＢをコードする核酸を配置することにより分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した金結合性複合タンパク質、あるいはその構成用途してのドメインは、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。また、発現させたタンパク精製時の作業の簡便さを考慮して、独立した各ドメインもしくは複数のドメインが結合して形成されたポリペプチド鎖のＮまたはＣ末端に精製用のタグを遺伝子工学的に配置することが可能である。前記精製用タグとしては、ヒスチジンが６残基連続したヒスチジンタグ（以下、Ｈｉｓ×６）やグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのグルタチオン結合部位などが挙げられる。前記タグの導入方法としては、前記発現用ベクターにおける金結合性タンパク質をコードする核酸の５'または３'末端に精製タグをコードする核酸を挿入する方法や市販の精製タグ導入用ベクターを使用するなどが挙げられる。

【０１０１】

以下に、上記発現ベクターを用いた金結合性複合タンパク質の製造方法について述べる。

【０１０２】

金結合性複合タンパク質、またはその構成要素となるポリペプチド鎖は、従来既知のタンパク発現用の宿主細胞に、宿主細胞に応じて設計した上記金結合性複合タンパク質発現用ベクターを形質転換し、宿主細胞内のタンパク合成システムを用いて、宿主細胞内に合成される。その後、宿主細胞内外に蓄積または分泌された目的タンパク質を細胞内部または細胞培養上清から精製することにより得ることができる。

【０１０３】

例えば、大腸菌を宿主細胞として用いる場合、金結合性複合タンパク質をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢに代表される従来既知のシグナルペプチドをコードする核酸を配することにより細胞質外に分泌発現しやすい構成にすることができる。ひとつの発現用ベクターで金結合性複合タンパク質を構成する各ドメインを得るための複数のポリペプチド鎖を発現させる場合、各ポリペプチド鎖をコードする核酸の５'側にｐｅｌＢをコードする核酸を配置し、発現時に細胞質外への分泌を促すことができる。このようにシグナルペプチドをＮ末端に融合した金結合性複合タンパク質は、ペリプラズマ画分及び培地上清から精製することができる。精製方法としては、前記精製タグがＨｉｓタグの場合、ニッケルキレートカラムやＧＳＴの場合、グルタチオン固定化カラムを使用することで精製することができる。

【０１０４】

また、菌体内に発現した金結合性複合タンパクを不溶性顆粒で得ることも可能である。この場合、培養液から得られた菌体をフレンチプレスや超音波により破砕した細胞破砕液から前記不溶性顆粒を遠心分離することができる。得られた不溶性顆粒画分を尿素、塩酸グアニジン塩を含む従来既知の変性剤を含んだ緩衝溶液で可溶化した後に、変性条件下で前記同様なカラム精製することができる。得られたカラム溶出画分は、リフォールディング作業により、変性剤除去と活性構造再構築を行うことができる。リフォールディング方法としては、従来既知の方法から適宜用いることも可能である。具体的には、段階透析法

や希釈法などを目的のタンパクに応じて用いることが可能である。

【０１０５】

金結合性複合タンパク質の各ドメインまたは各ポリペプチド鎖は、各々を同一宿主細胞内で発現させてから複合化させることも可能であるし、別の宿主細胞を使用して発現した後に共存させて、複合体化させることも可能である。

【０１０６】

更に、金結合性複合タンパク質をコードするベクターを用いて、細胞抽出液を用いて生体外でのタンパク質発現をすることも可能である。好適に用いられる細胞抽出液としては、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等が挙げられる。しかしながら、上記無細胞抽出液によるタンパク合成は一般的には還元条件下で行われる。その為に、抗体断片中のジスルフィド結合を形成させるために何らかの処理を行う方がより好ましい。

【０１０７】

金結合性複合タンパク質の好ましい解離乗数（K_D）は、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０存在下のバッファー条件下で10^{-6}M以下であり、より好ましくは10^{-8}M以下である。上記条件において、ＢＳＡなど比較的に金への非特異的な吸着が多いとされるタンパク質材料であっても金への吸着ができないことを本発明者の検討において確認している。K_D値が10^{-6}M以下であれば、上記のような非特異吸着性のタンパク質の吸着挙動と十分に区別することが可能であり、更に10^{-8}M以下であることで固定化用のアンカー分子として十分に機能することができる。

【０１０８】

金を含む標的物質に対して結合能を有するこのような抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、または抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を取得する方法のひとつとして、前記ＶＨまたはＶＬ遺伝子ライブラリーを作製し、それらをタンパク質として網羅的に発現させて、その遺伝子と対応させながら、金または標的物質に対する結合性により選択する方法がある。前記遺伝子ライブラリーは、たとえば、臍帯血、扁桃、骨髄、あるいは末梢血細胞や脾細胞等から得ることができる。例えば、ヒト末梢血細胞からｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。次に、ヒトＶＨ、ＶＬをコードする配列をプローブとして、ヒトＶＨまたはＶＬのｃＤＮＡライブラリーを作製する。例えば、ヒトＶＨファミリー（ＶＨ１乃至７）をファミリー毎に幅広く増幅することができるプライマーやヒトＶＬを増幅できるプライマーは公知である。これらＶＨ、ＶＬ毎にプライマーを組み合わせてＲＴ－ＰＣＲを行い、ＶＨ、ＶＬをコードした遺伝子を取得する。また、ファージディスプレー法を用いることも可能である。ファージディスプレー法は、ＶＨ、ＶＬまたはそれら含む複合体（例えば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ）をコードした遺伝子ライブラリーをファージ外殻タンパクをコードした遺伝子と結合し、ファージミドライブラリーを作製し、それらを大腸菌に形質転換し、種々のＶＨまたはＶＬを外殻タンパクの一部として有するファージとして発現させる。それらのファージを用いて、上記同様にして金また標的物質に対する結合性により選択することができる。ファージに融合タンパクとして提示されたＶＨまたはＶＬをコードする遺伝子は、ファージ内にファージミドにコードされているのでＤＮＡシークエンス解析をすることにより、特定することができる。

【０１０９】

更には、金または標的物質にて免疫した動物から目的の抗体を産出する細胞を採取し、上記と同じプライマーを使用し、ＶＨまたはＶＬの塩基配列及びアミノ酸配列を特定することができる。

【０１１０】

また、第三のドメイン、第四のドメインは標的物質に対して既知の抗体及び抗体断片の可変領域のアミノ配列を元に設計することができる。また、標的物質に対する抗体または抗体断片が未取得の場合、これに対する抗体を取得した後にアミノ酸配列を解析することにより、前記と同様にして設計することも可能である。前記第三のドメインと前記第四のドメインが供に金結合性複合タンパク質を構成するドメインであってもよい。このようにして、得られたＶＨまたはＶＬの塩基配列を用いて、金結合性複合タンパクを作製するこ

とが可能である。

【０１１１】

・金を有する被結合対象物

免疫やパニング等により金結合性タンパク質を選択する際に用いる被結合対象物としては、先に金結合性タンパク質の場合に例示したものが利用できる。

・基体

金結合性複合タンパク質は、基体との組み合わせることで種々の用途に利用できる構造体を得ることができる。この用途に利用できる基体としては、先に金結合性タンパク質の場合に例示したものが利用できる。

・標的物質

金結合性複合タンパク質を、金との結合性を有するドメインと、標的物質に対して結合性を有するドメインとが含まれるように構成することで、標的物質検出用の複合タンパク質として利用することが可能となる。この検出対象としての標的物質としては、抗原抗体反応を用いた各手法によって抗原となり得る物質であれば如何なる分子も用いることが可能である。例えば、標的物質は、非生体物質と生体物質に大別される。

【０１１２】

非生体物質として産業上利用価値の大きいものとしては、環境汚染物質としての塩素置換数／位置の異なるＰＣＢ類、同じく塩素置換数／位置の異なるダイオキシン類、いわゆる環境ホルモンと呼ばれる内分泌撹乱物質（例：ヘキサクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、２，４，５－トリクロロ酢酸、２，４－ジクロロフェノキシ酢酸、アミトロール、アトラジン、アラクロール、ヘキサクロロシクロヘキサン、エチルパラチオン、クロルデン、オキシクロルデン、ノナクロル、１，２－ジブロモ－３－クロロプロパン　、ＤＤＴ、ケルセン、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、エンドスルファン（ベンゾエピン）、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキサイド、マラチオン、メソミル、メトキシクロル、マイレックス、ニトロフェン、トキサフェン、トリフルラリン、アルキルフェノール（炭素数５～９）、ノニルフェノール、オクチノニルフェノール、４－オクチルフェノール、ビスフェノールＡ、フタル酸ジ－２－エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ－ｎ－ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ベンゾ（ａ）ピレン、２，４ージクロロフェノール、アジピン酸ジ－２－エチルヘキシル、ベンゾフェノン、４－ニトロトルエン、オクタクロロスチレン、アルディカーブ、ベノミル、キーポン（クロルデコン）、マンゼブ（マンコゼブ）、マンネブ、メチラム、メトリブジン、シペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ビンクロゾリン、ジネブ、ジラム、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル）等が挙げられる。

【０１１３】

生体物質としては、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質及びそれらの複合体から選択される生体物質が含まれ、更に詳しくは、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質から選択される生体分子を含んでなるものであり、具体的には、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アプタマー、遺伝子、染色体、細胞膜、ウイルス、抗原、抗体、レクチン、ハプテン、ホルモン、レセプタ、酵素、ペプチド、スフィンゴ糖、スフィンゴ脂質の何れかから選択された物質を含むものであれば、如何なる物質にも本発明を適用することができる。更には、前記の「生体物質」を産生する細菌や細胞そのものも、本発明が対象とする「生体物質」として標的物質となり得る。

【０１１４】

具体的なタンパク質としては、いわゆる疾病マーカーが挙げられる。例としては、胎児期に肝細胞で産生され胎児血中に存在する酸性糖蛋白であり、肝細胞癌（原発性肝癌）、肝芽腫、転移性肝癌、ヨークサック腫瘍のマーカーとなるα－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、肝実質障害時に出現する異常プロトロンビンであり、肝細胞癌で特異的に出現することが確認されるＰＩＶＫＡ－ＩＩ、免疫組織化学的に乳癌特異抗原である糖蛋白で、原発性進行乳癌、再発・転移乳癌のマーカーとなるＢＣＡ２２５、ヒト胎児の血清、腸および

脳組織抽出液に発見された塩基性胎児蛋白であり、卵巣癌、睾丸腫瘍、前立腺癌、膵癌、胆道癌、肝細胞癌、腎臓癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌のマーカーである塩基性フェトプロテイン（ＢＦＰ）、進行乳癌、再発乳癌、原発性乳癌、卵巣癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ１５－３、膵癌、胆道癌、胃癌、肝癌、大腸癌、卵巣癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ１９－９、卵巣癌、乳癌、結腸・直腸癌、胃癌、膵癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ７２－４、卵巣癌（特に漿液性嚢胞腺癌）、子宮体部腺癌、卵管癌、子宮頸部腺癌、膵癌、肺癌、大腸癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＣＡ１２５、上皮性卵巣癌、卵管癌、肺癌、肝細胞癌、膵癌マーカーとなる糖蛋白であるＣＡ１３０、卵巣癌（特に漿液性嚢胞腺癌）、子宮体部腺癌、子宮頸部腺癌のマーカーとなるコア蛋白抗原であるＣＡ６０２、卵巣癌（特に粘液性嚢胞腺癌）、子宮頸部腺癌、子宮体部腺癌のマーカーとなる母核糖鎖関連抗原であるＣＡ５４／６１（ＣＡ５４６）、大腸癌、胃癌、直腸癌、胆道癌、膵癌、肺癌、乳癌、子宮癌、尿路系癌等の腫瘍関連のマーカー抗原として現在、癌診断の補助に最も広く利用されている癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、膵癌、胆道癌、肝細胞癌、胃癌、卵巣癌、大腸癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＤＵＰＡＮ－２、膵臓に存在し、結合組織の弾性線維エラスチン（動脈壁や腱などを構成する）を　特異的に加水分解する膵外分泌蛋白分解酵素であり、膵癌、膵嚢癌、胆道癌のマーカーとなるエラスターゼ１、ヒト癌患者の腹水や血清中に高濃度に存在する糖蛋白であり、肺癌、白血病、食道癌、膵癌、卵巣癌、腎癌、胆管癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫のマーカーとなる免疫抑制酸性蛋白（ＩＡＰ）、膵癌、胆道癌、乳癌、大腸癌、肝細胞癌、肺腺癌、胃癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＮＣＣ－ＳＴ－４３９、前立腺癌のマーカーとなる糖蛋白質であるγ－セミノプロテイン（γ－Ｓｍ）、ヒト前立腺組織から抽出された糖蛋白であり、前立腺組織のみに存在し、それゆえ前立腺癌のマーカーとなる前立腺特異抗原（ＰＳＡ）、前立腺から分泌される酸性ｐＨ下でリン酸エステルを水解する酵素であり、前立腺癌の腫瘍マーカーとして用いられる前立腺酸性フォスファターゼ（ＰＡＰ）、神経組織及び神経内分泌細胞に特異的に存在する解糖系酵素であり、肺癌（特に肺小細胞癌）、神経芽細胞腫、神経系腫瘍、膵小島癌、食道小細胞癌、胃癌、腎臓癌、乳癌のマーカーとなる神経特異エノラーゼ（ＮＳＥ）、子宮頸部扁平上皮癌の肝転移巣から抽出・精製された蛋白質であり、子宮癌（頸部扁平上皮癌）、肺癌、食道癌、頭頸部癌、皮膚癌のマーカーとなる扁平上皮癌関連抗原（ＳＣＣ抗原）、肺腺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、膵癌、卵巣癌、子宮癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるシアリルＬｅ^{X}－ｉ抗原（ＳＬＸ）、膵癌、胆道癌、肝癌、胃癌、大腸癌のマーカーとなる糖鎖抗原であるＳＰａｎ－１、食道癌、胃癌、直腸・結腸癌、乳癌、肝細胞癌、胆道癌、膵癌、肺癌、子宮癌のマーカーであり、特に他の腫瘍マーカーと組み合わせて進行癌を推測し、再発予知・治療経過観察として有用である単鎖ポリペプチドである組織ポリペプタイド抗原（ＴＰＡ）、卵巣癌、転移性卵巣癌、胃癌、大腸癌、胆道系癌、膵癌、肺癌のマーカーとなる母核糖鎖抗原であるシアリルＴｎ抗原（ＳＴＮ）、肺の非小細胞癌、特に肺の扁平上皮癌の検出に有効な腫瘍マーカーであるシフラ（ｃｙｔｏｋｅｒａｔｉｎ；ＣＹＦＲＡ）、胃液中に分泌される蛋白消化酵素であるペプシンの２種（ＰＧ　Ｉ・ＰＧ　ＩＩ　）の不活性型前駆体であり、胃潰瘍（特に低位胃潰瘍）、十二指腸潰瘍（特に再発、難治例）、ブルンネル腺腫、ゾーリンガーエリソン症候群、急性胃炎のマーカーとなるペプシノゲン（ＰＧ）、組織障害や感染により、血漿中で変化する急性相反応蛋白であり、急性心筋梗塞等により心筋に壊死が起こると、高値を示すＣ－反応性蛋白（ＣＲＰ）、組織障害や感染により、血漿中で変化する急性相反応蛋白である血清アミロイドＡ蛋白（ＳＡＡ）、主に心筋や骨格筋に存在する分子量約１７５００のヘム蛋白であり、急性心筋梗塞、筋ジストロフィー、多発性筋炎、皮膚筋炎のマーカーとなるミオグロビン、骨格筋，心筋の可溶性分画を中心に存在し、細胞の損傷によって血液中に遊出する酵素であって、急性心筋梗塞、甲状腺機能低下症、進行性筋ジストロフィー症、多発性筋炎のマーカーとなるクレアチンキナーゼ（ＣＫ）（骨格筋由来のＣＫ－ＭＭ型，脳，平滑筋由来のＣＫ－ＢＢ型，心筋由来のＣＫ－ＭＢ型の３種のアイソザイム及びミトコンドリア・アイソザイムや免疫グロブリンとの結合型ＣＫ（マクロＣＫ））、横紋筋の薄いフィラメント上でトロポニンＩ，Ｃとと

もにトロポニン複合体を形成し，筋収縮の調節に関与している分子量３９，０００の蛋白であり、横紋筋融解症、心筋炎、心筋梗塞、腎不全のマーカーとなるトロポニンＴ、骨格筋・心筋いずれの細胞にも含まれる蛋白であり，測定結果の上昇は骨格筋，心筋の障害や壊死を意味するため、急性心筋梗塞症、筋ジストロフィー、腎不全のマーカーとなる心室筋ミオシン軽鎖Ｉ、また、近年ストレスマーカーとして注目されてきているクロモグラニンＡ、チオレドキシン、８－ＯｈｄＧ、等が挙げられる。

【０１１５】

・標的物質検出用キット

金結合性複合タンパク質を用いて標的物質検出用のキットを構成することもできる。例えば、第二ドメイン及び必要に応じて用いられる第四ドメインに標的物質に対して特異的に結合する抗体及びその変異体を用いた金結合性複合タンパク質と、金を含む表面を有する基体と、基体上に金結合性複合タンパク質を介して固定された標的物質を検出するための検出手段と、を含む標的物質検出用のキットを構成することができる。金基体上に金結合性複合タンパク質を介して固定された標的物質の検出には、前述の表面プラズモン共鳴測定装置を用いて測定することが可能である。また、金を少なくとも一部に含んだ基体を標識物質として標的物質を検出方法が利用できる。このような金基板と標的物質、標識物質と標的物質を仲介する物質としては、前述した金結合性複合タンパク質を利用できる。これらの標的物質を認識し、結合する抗体断片を用いて金結合性複合タンパク質を形成することにより本発明に使用することが可能である。

【実施例】

【０１１６】

以下、本発明の実施例として金に対して結合を示すタンパク質の取得とその評価について詳細に述べる。本発明は、本実施例の記載内容に何ら制限されるものではない。

【０１１７】

実施例１（抗体重鎖可変領域ＶＨライブラリーの作製）

ヒト成人末梢血Ｂリンパ球由来ＦａｂライブラリーＦを鋳型として、ＶＨコード遺伝子を以下のｐｒｉｍｅｒを使用してＰＣＲ（タカラバイオ、ＬＡキット）にて推奨の方法に準じＤＮＡ複製を行う。プライマーは、以下のように設定した。

・ｂａｃｋ　ｐｒｉｍｅｒｓ

（配列番号：７８）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣＴＧＧ－３'

（配列番号：７９）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＲＴＹＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣＴＧＧ－３'

（配列番号：８０）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＳＴＲＣＡＧＣＴＧＣＡＧＳＡＧＴＣＲＧＧ－３'

（配列番号：８１）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＳＡＲＧＴＧＣＡＧＫＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧ－３'

（配列番号：８２）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＣＡＧＴＧＴＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＧ－３'

（配列番号：８３）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＡＣＡＧＳＡＧＴＧＧＧＧ－３'

・ｆｏｒｗａｒｄ　ｐｒｉｍｅｒｓ

（配列番号：８４）

５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴ

ＧＣＣ－３'
（配列番号：８５）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＡＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＴＴＧＴ
ＣＣＣ－３'
（配列番号：８６）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴ
ＴＣＣ－３'
（配列番号：８７）
５'－ＡＴＴＣＴＣＧＡＣＴＧＣＴＡＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＧＴ
ＣＣＣ－３'
（１）上記Ｆａｂライブラリーを鋳型とし、上記プライマーを用いてＰＣＲによるＶＨコード遺伝子の増幅を行う。ＰＣＲ条件：９５℃×１０ｍｉｎ、（９４℃×１ｍｉｎ、６０℃×２ｍｉｎ、７２℃×２ｍｉｎ）×３５ｃｙｃｌｅ、７２℃×６ｍｉｎ）。

【０１１８】

（２）タンパク発現用ベクターとして、ｐＬＵＣＫ（Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ．２１８、ｐｐ６８２、１９９６）のマルチクローニングサイトを図１１に示すようにのように改良したプラスミドｐＲＡ－ＸＸを用意する。（ＨｉｎｄIIIにつづき、シグナルペプチドであるｐｅｌＢをコードする核酸配列を配置し、続いてＮｃｏＩ及びＥｃｏＲＩの間に、ＮｈｅＩ／ＳａｃII／ＳｐｅＩの順に制限酵素部位を設け、ＳａｃII／ＳｐｅＩの間にＨｉｓ×６をコードする核酸配列を設ける。また、アンピシリン耐性遺伝子、Ｔ７プラモーター、ｌａｃオペレーター、Ｔ７ターミネーター配列はｐｌｕｃｋと同じとした。）

（３）上記ＰＣＲ産物及び上記プラスミドをＮｃｏＩ／ＮｈｅＩ（それぞれＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）にて推奨の方法により制限酵素による切断を行う。
上記プラスミド制限酵素切断溶液を、スピンカラム ４００ＨＲ（アマシャムサイエンス）する。

（４）制限酵素により切断したＰＣＲ断片溶液を市販のゲル精製キット（ＳＶ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ｕｐ ｓｙｓｔｅｍ： Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して精製する。

（５）上記二つの断片を、市販のＴ４リガーゼキット（Ｒｏｃｈｅ社）を業者推奨の方法にて調合しライゲーションを行う。図１２ａに示すＶＨコード遺伝子挿入ベクターを得る。

（６）ライゲーション産物を用いてエレクトロポレーションによる大腸菌ＤＳ１２Ｓ株の形質転換を行った。ラージスケールでプラスミドの調製を行った。

（７）これらプラスミド溶液を系列希釈し、それぞれの溶液をエレクトロポレーションにて大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）の形質転換を行い、同溶液にＬＢ培地を７００μＬ添加した後に、３７℃にて一時間振盪培養した。培養液を６０００ｒｐｍで５分間遠心した後に、上清６５０μＬを廃棄した。

（８）残りの上清と沈殿画分を懸濁し、ＬＢ／Ａｍｐ．プレートに撒き、３７℃にて一晩静置した。その結果、最終的におよそ５×１０5クローンを含む抗体ＶＨライブラリーを得た。

（９）次に、上記１０3倍希釈プレート３枚から任意に１０００個のコロニーを選択し、以下の工程でタンパク粗抽出液を調整する。各コロニーをＬＢ／ａｍｐ． ３ｍＬ液体培地に植え継ぎ、２８℃にて６時間振盪培養を行う。次に、ＩＰＴＧを終濃度１ｍＭとなるように添加し、更に１２時間振盪培養を行った。

（１０）続いて、遠心（１０，５００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）により、培養画分、上清菌体画分を得た。

（１１）得られた菌体画分を氷中で冷却したオスモチック溶液（０．５Ｍスクロース、１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、０．５ｍＭＥＤＴＡ）２００μＬを加え、懸濁し、氷中で１０分間静置する。次に、冷やした滅菌水を１ｍＬを加え、氷中に１時間静置す

る。遠心（６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎ）した後、上清を透析バック（ＭＷＣＯ１０，０００）に入れ、外液をＴｒｉｓ＋０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０溶液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５００ｍＭ　ＮａＣｌ）として、６時間毎に外液を交換しながら１８時間透析を行う。

【０１１９】

上記工程で得られた透析内液を金結合性抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のスクリーニングのサンプルとした。

【０１２０】

実施例２（金結合性抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のスクリーニング）

金結合性抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のスクリーニング用基板として、金蒸着（厚み１００ｎｍ）した９６穴タイタープレートを用意した。実施例１で得られた１０００のサンプル溶液２５０μＬを各ｗｅｌｌに分注し、１時間緩やかに振盪する。上清を廃棄し、プレートを裏返し、紙タオル上で１０回叩き、水分を取り除く。洗浄工程として、Ｔｒｉｓ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０　２００μＬを各ｗｅｌｌに加え、１０分間緩やかに振盪し、この作業を3回繰り返す。ＨＲＰ結合抗Ｈｉｓ抗体（インビトロジェン社）を１：１０００でＴｒｉｓ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０溶液で希釈した抗体溶液　２００μＬを各ｗｅｌｌに分注し、１時間緩やかに振盪する。続いて、前記洗浄工程と同様の作業を行う。ＨＲＰ基質および発色材となるＤｅｔｅｃｔ　Ｒｅａｇｅｎｔ１及び２（アマシャムサイエンス社）各１００μＬずつを各ｗｅｌｌに分注し、１分間緩やかに浸透する。
ルミノールの化学発光量を定量する。

【０１２１】

上記により化学発光が認められた１５サンプルのコロニーを、ＬＢ／ａｍｐ．　１．５ｍＬに植え継ぎ、３７℃にて一晩振盪培養を行う。得られた菌体からＳＶ　ＭｉｎｉＰｒｅｐ　ＤＮＡ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（プロメガ社）を用いて、プラスミドを精製する。上記で得られた１７つのＶＬ提示ファージミドのＤＮＡ配列を以下の方法にて配列を決定する。シークエンス用プライマーは、発現用ベクターのＶＨコード遺伝子上流に位置するｐｅｌＢ配列部に設定する。シークエンス用のｐｒｉｍｅｒは以下のとおり。

ｐｅｌＢ－ｂａｃｋ

（配列番号：８８）５'－ｃｃｇｃｔ　ｇｇａｔｔ　ｇｔｔａｔ　ｔａｃｔｃ　ｇｃ－３'

上記ｐｒｉｍｅｒを使用し、業者推奨のシークエンス反応キットと反応液組成によりＢｉｇＤｙｅ－ＰＣＲ反応を行った。温度サイクルは９６℃×３ｍｉｎ→（９４℃×１ｍｉｎ→５０℃×１ｍｉｎ→６８℃×４ｍｉｎ）×３０ｃｙｃｌｅとする。次に、エタノール沈殿により精製した前記ＰＣＲ産物をシークエンサー（ＡＢＩ社製３７７）により塩基配列を決定した。その結果、配列番号：５８乃至配列番号：７４の各配列を得た。

【０１２２】

実施例３（抗体軽鎖可変領域ＶＬライブラリーの作製）

実施例１と同様方法により、ヒト末梢血細胞のＦａｂライブラリーからＶＬ遺伝子ライブラリーを作製する。プライマーは以下のとおり。

・ｂａｃｋ　ｐｒｉｍｅｒ

（配列番号：８９）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＭＣＡＴＹＣＡＧＷＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣ－３'

（配列番号：９０）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＡＴＲＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＹＣＡＧＷＣＴＣＣ－３'

（配列番号：９１）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＡＡＡＴＴＧＴＧＷＴＧＡＣＧＣＡＧＴＣＴＣＣ－３'

（配列番号：９２）

５'－ＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＧＡＣＡＴＣＧＷ

ＧＨＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣ－３'
・ｆｏｒｗａｒｄ　ｐｒｉｍｅｒ
（配列番号：９３）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡＣＣＴＴ
ＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９４）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＧＣＴＴＧ
ＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９５）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＡＴＣＣＡＣＴＴＴ
ＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９６）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＣＣＴＴ
ＧＧＴＣＣＣ－３'
（配列番号：９７）
５'－ＴＴＣＴＣＧＡＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＴＴＴＡＡＴＣＴＣＣＡＧＴＣＧ
ＴＧＴＣＣＣ－３'

また、実施例１の（２）におけるタンパク発現用プラスミド作製を作製する際に、ＮｃｏＩ／ＳａｃII間のＮｈｅＩをＮｏｔＩに変更した以外は同様にしてプラスミドを作製し、用いた。さらに、実施例１の（１１）の工程終了時に得られたＶＬタンパク透析内液を、金結合性抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）のスクリーニングのサンプルとした。

【０１２３】

実施例４（金結合性抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）のスクリーニング）

スクリーニングサンプルを実施例３で得るサンプルとした以外は、実施例２と同様にして金結合性ＶＬのスクリーニングを行なう。その結果、配列番号：７５乃至配列番号：７７の各配列を得た。

【０１２４】

以下、実施例１のヒト末梢血細胞Ｆａｂ遺伝子ライブラリーより、ファージミド作製し、金結合性ＶＬ、またはＶＨをスクリーニングする。

【０１２５】

実施例５（金親和性ＶＬ提示ファージ群のスクリーニング）

以下の手順により、ＶＬ提示ファージライブラリーを作製し、金に結合性を示すファージ群の選択を行なう。

（１）ＶＬ提示用ファージミド

ヒト成人末梢血Ｂリンパ球由来Ｆａｂライブラリーを鋳型として、プライマーとして実施例３で用いた配列番号：８９乃至配列番号：９７を用いてＶＬコード遺伝子を複製する。更に、Ｍ１３ファージのコートタンパクであるＰIIIタンパクのＮ末端の一部を欠損させ、更にＶＬタンパクが融合されて発現されるように作製されたＶＬ提示ファージミド（図１２ｂ）のライブラリを使用する。（Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．　１９９６、２１８，ｐｐ６８２）

（２）ＶＬ断片提示ファージライブラリー作製

１）形質転換

上記ＶＬコード遺伝子ライブラリー（３５０ｎｇ／μＬ）１μＬを大腸菌ＤＨ１２Ｓ４０μＬにエレクトロポレーション（印加電圧：１．５ＫＶ、抵抗：１８６Ω容量：５０μＦ、）にて形質転換する。次に、以下の手順でＶＬ提示ファージライブラリーを調整する。

２）培養

（ｉ）形質転換後のＤＨ１２Ｓ溶液にＬＢ培地８００μＬ加え、３７℃にて１時間、振盪培養（１４０ｒｐｍ）する。

（ii）上記培養液を２０ｍＬ　ＬＢ培地＋終濃度アンピシリン１００μｇ／ｍＬ（ＬＢ／

ａｍｐ．）に加え、３７℃にて３～４時間培養する。
（ｉｉｉ）ヘルパーファージであるＭ１３ＫＯ７　４０μＬを加え、更に１時間、１００ｒｐｍにて振盪培養する。
（ｉｖ）５０ｍｇ／ｍＬ　カナマイシン溶液を終濃度５０μｇ／ｍＬとなるように加えて、３７℃にて振盪培養（１００ｒｐｍ）を行なう。
３）ＶＬ提示ファージライブラリーの回収
（ｉ）上記培養液に２０％ＰＥＧ／５００ｍＭＮａＣｌを５ｍＬ加え、氷中に１時間以上放置する。
（ｉｉ）遠心（６５００ｒｐｍ×３５分間）にて、上清を丁寧に取り除く。
（ｉｉｉ）沈殿をＰＢＳバッファー５００μＬで懸濁し、ＶＬ提示ファージ溶液を得る。
４）ＶＬ提示ファージライブラリーのタイター評価
（ｉ）ＪＭ１０９グリセロールストック　１０μＬをＬＢに加え、３７℃にて振盪培養する。
（ｉｉ）上記３）で調整したＶＬ提示ファージ溶液をＬＢ培地により系列希釈溶液を準備する。
（ｉｉｉ）ＯＤ600が～０．５となった（ａ）培養液７５０μＬに系列（×10^{-6}～10^{-10}）希釈液１０μＬを加え、３７℃にて１時間振盪培養する。
（ｉｖ）遠心（６０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）を行い、培養上清７００μＬを除く。
（ｖ）残った培地上清と沈殿をピペッティングにて懸濁し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、３７℃にて一晩静置する。
（ｖｉ）コロニーが１００以下となる希釈濃度プレート上に生じたコロニーをカウントして、ＶＬ提示ファージライブラリー溶液のタイター価とする。
【０１２６】
　得られたＶＬ提示ファージライブライリー溶液：　５×１０9ｃｆｕ／μＬ（３）金微粒子を用いたＶＬパニング
　上記作製したファージライブラリー溶液と金微粒子（１．５μｍφ：アルドリッチ社製）を用いて以下の方法によるパニング作業を５ラウンド繰り返し、金結合性ＶＬを提示するファージ群を選択することを目的とした。
【０１２７】
　１）結合実験
（ｉ）滅菌済エッペンチューブ（１．５ｍＬ）に上記ファージ溶液（溶液中の全ファージ数が１０１０ｃｆｕとなる量）に対して、上記金微粒子溶液（５０ｍｇ／ＰＢＳ１ｍＬ）１０μＬ、更にＰＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を全量が１０００μＬになるように加え、結合反応溶液とした。
（ｉｉ）上記結合反応溶液を室温にて緩やかに回転させながら３０分間保持した。
（ｉｉｉ）上記（ｉｉ）を遠心（１０，０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）して、溶液上清を丁寧に廃棄する。
２）洗浄（非特異吸着物の洗浄）
（ｉ）上記エッペンチューブ中の金微粒子にＰＢＳＴ５００μＬを加え、室温にて緩やかに回転させながら１０分間保持する。
（ｉｉ）遠心（１０，０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）し、洗浄上清を丁寧に廃棄する。
（ｉｉｉ）上記（ｉ）及び（ｉｉ）を１０回繰り返す。
３）酸溶出と酸溶出画分のタイター評価
　上記２）で得られた金微粒子に吸着したファージタイターを評価を以下の手順にて確認する。
３）－１　酸溶出
（ｉ）先浄後の金微粒子に対して、０．２ＭＧｌｙ－ＨＣｌ（ｐＨ２．２）１１５μＬ加えた。１分間緩やかに上下に回転させながら保持する。
（ｉｉ）遠心（１０，０００ｒｐｍ×５ｍｉｎ）にて、上清を酸溶出画分として回収する。
（ｉｉｉ）回収した酸溶出画分を１ＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ　１５μＬを加え、中和する。

（iv）中和後の酸溶出液１μＬを系列希釈し、前記タイター評価法によりタイター値を側定する。
（ｖ）残りの酸溶出画分をすばやく金微粒子画分と合わせ、再度懸濁する。
３）－２　タイター評価
（２）－３）、４）と同様にして、タイター評価を行い、以下のような結果を得る。
１ラウンド：９．８×１０２ ｃｆｕ
２ラウンド：１．０×１０３ ｃｆｕ
３ラウンド：７．８×１０２ ｃｆｕ
４ラウンド：１．３×１０３ ｃｆｕ
５ラウンド：１．１×１０４ ｃｆｕ
４）再感染及びファージ増幅
　４ラウンド目までは、３）で得られた金微粒子に吸着したファージ群を大腸菌に再感染工程を経ることによりファージ数を増幅させて、次パニング用のファージ溶液を準備する。
（ｉ）再感染及びファージ増幅用に大腸菌ＪＭ１０９をＬＢ培地２０ｍＬで３７℃にて振盪培養（１４０ｒｐｍ）する。
（ii）ＯＤ600＝０．３～０．５となった（ａ）の大腸菌培養液に前記３）の金微粒子懸濁液を加え、３７℃にて１時間振盪培養（１４０ｒｐｍ）を行なう。
（iii）終濃度が１００μｇ／ｍＬになるようにアンピシリンを加え、振盪培養を３７℃にて２時間行なう。
（iv）ヘルパーファージＭ１３ＫＯ７　４０μＬを加え、振盪速度を１００ｒｐｍに落として３７℃にて培養を１時間行なう。
（ｖ）終濃度が５０μｇ／ｍＬになるようにカナマイシンを加え、振盪培養を３７℃にて終夜培養を行なう。
（ｖi）（２）－３）、４）と同様の操作により培養上清中のファージを回収し、ファージ溶液を作製する。さらに、タイター値を評価し、増幅されていることを確認する。
以下の増幅後に得られたタイター値を示す。
１ラウンド：２．４×１０９ ｃｆｕ
２ラウンド：８．１×１０８ ｃｆｕ
３ラウンド：１．８×１０９ ｃｆｕ
４ラウンド：１．１×１０10 ｃｆｕ
（iv）ファージＥＬＩＳＡ
１）ＥＬＩＳＡ用金蒸着基板の作製
　実施例２と同じ金蒸着（厚み１００ｎｍ）を行った９６穴タイタープレート（ＢＤ社、ポリスチレン）を用いて、ファージＥＬＩＳＡ用の基板とする。
２）ＶＬ提示ファージ単クローン調整
　前記（３）‐４）の５ラウンド目のタイター評価での×１０４の希釈プレート上に発現した１１個のコロニーをからファージミドを以下の手順により回収する。
（ｉ）各コロニーをＬＢ／ａｍｐ．　２０ｍＬで３７℃にて培養する。
（ii）ヘルパーファージＭ１３ＫＯ７　４０μＬを加え、振盪速度を１００ｒｐｍに落として３７℃にて培養を１時間行なう。
（iii）終濃度が５０μｇ／ｍＬになるようにカナマイシンを加え、振盪培養を３７℃にて終夜培養を行なう。
（iv）（２）－３）、４）と同様の操作により培養上清中のファージを回収し、ファージ溶液を作製する。さらに、タイター値を評価し、増幅されていることを確認する。
以下の増幅後に得られたタイター値を示す
Ｎｏ．１：３．８×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．２：９．０×１０８　ｃｆｕ
Ｎｏ．３：２．４×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．４：１．０×１０９　ｃｆｕ

Ｎｏ．５：９．７×１０７　ｃｆｕ
Ｎｏ．６：４．４×１０８　ｃｆｕ
Ｎｏ．７：６．２×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．８：８．９×１０７　ｃｆｕ
Ｎｏ．９：１．４×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．１０：１．１×１０10　ｃｆｕ
Ｎｏ．１１：４．９×１０９　ｃｆｕ
２）ファージ溶液の調整
１）で得られた各ファージ溶液をタイター値が１０9ｃｆｕから順次１／１０となるように希釈系列を各２００μＬを以下の組成で作製する。
ＶＬ提示ファージ溶液：ｘμＬ
スーパーブロッキングバッファー（ＰＩＥＲＣＥ社）：２０μＬ
０．５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ：ｘ／５μＬ
ＰＢＳ：１８０－（６ｘ／５）μＬ
３）ＥＬＩＳＡ
（ｉ）金蒸着タイタープレートに系列希釈したＶＬ提示ファージ溶液をそれぞれ８０μＬ分注し、シェイカーで緩やかに１時間攪拌する。
（ii）ファージ溶液を取り除き、各ｗｅｌｌにＰＢＳＴ　９０μＬを分注して１０分間攪拌し、洗浄上清を廃棄する。この作業を３回繰り返す。
（iii）ＨＲＰ－Ａｎｔｉ　Ｍ１３イムノグロブリン／ＳＢＢ／ＰＢＳ（１／１０００：１：１０）溶液７５μｌを各ｗｅｌｌに分注した後に、シェイカーにて１時間緩やかに攪拌する。
（iv）上記イムノグロブリン溶液の上清を廃棄する。次に、ＰＢＳＴ　９０μＬ／ｗｅｌｌを分注し、１０分間攪拌し、洗浄上清を廃棄する。この洗浄作業を３回繰り返す。
（ｖ）ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔ　１、２（Ａｍａｓｈａｍ　ＢＩＯＳＩＥＮＣＥ）　を各３５μＬ／ｗｅｌｌずつ分注し、１分間緩やかに攪拌しながら反応させる。
（ｖｉ）ルミノールの発光強度を測定した。発光強度の高いＮｏ．1、Ｎｏ．２、Ｎｏ．３を金結合性ＶＬ提示ファージクローンとする。
【０１２８】
上記４つのファージクローンよりファージミドを単離し、金結合性ＶＬの塩基並びにアミノ酸配列を明らかにした。次に、発現ベクターを作製し、タンパクを発現させて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）金基板上に結合性を確認する。
【０１２９】
実施例６（金親和性ＶＬタンパクの取得）
（１）ファージミドの回収
実施例５（３）‐４）の５ラウンド目のタイター評価での×１０4の希釈プレート上に発現した前記Ｎｏ．７に相当するコロニーからファージミドを以下の手順により回収した。
（ｉ）各コロニーをＬＢ／ａｍｐ．　１．６ｍＬで３７℃にて終夜培養する。
（ii）Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ　ＳＶ　ｐｌｕｓ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（ｐｒｏｍｅｇａ）を用い、業者推奨の方法にてファージミドを回収する。
（２）発現ベクター作製
上記３種のＶＬタンパクを発現する発現ベクターを以下の構成で構築する。実施例１の図１１に示すｐＲＡ－ＸＸ及上記（１）で得られたファージミドを各々のＮｃｏＩ及びＮｏｔＩを用いて制限酵素反応により切断する。得られたＶＬ断片をｐＲＡ－ＸＸに挿入し、ＶＬコード核酸を融合タンパクとして発現されるプラスミドｐＲＡ－ＶＬＮｏ，ｎ（ｎ：クローン番号）を作製する。（図１３）
（３）タンパク発現及び精製
以下、上記で得られた３つのＶＬタンパク発現用ベクターを用いてＶＬタンパクを発現させる。

１）形質転換
上記発現ベクターを用いて、ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテントセル４０μＬを形質転換する。形質転換は、ヒートショックを氷中→４２℃×９０ｓｅｃ→氷中の条件でおこなう。
ヒートショックにより形質転換した上記ＢＬ２１溶液にＬＢ培地７５０μＬを加え、一時間３７℃にて振盪培養を行なう。その後、６０００ｒｐｍ×５分間遠心を行い、培養上清６５０μＬを廃棄し、残った培養上清と沈殿となった細胞画分を攪拌し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、一晩３７℃にて静置する。
２）予備培養
プレート上のコロニーを無作為に選択し、３．０ｍＬ　ＬＢ／ａｍｐ．培地にて２８℃にて一晩振盪培養を行なう。
３）本培養
上記予備培養溶液を２×ＹＴ培地　７５０ＭＬに植え継ぎ、更に培養を２８℃にて継続する。ＯＤ６００が０．８を越えた時点で、終濃度が１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを加え、更に２８℃にて終夜培養を行なう。
４）精製
（ｉ）硫安沈殿
３）で得られた培養液を６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎ遠心し、培養上清を得た。
得られた培養上清重量を計測し、培養上清重量の６０％の硫酸アンモニウムを徐々に加える。一晩４℃にて攪拌する。
（ii）脱塩
（ｉ）液を８０００ｒｐｍ×２０ｍｉｎで遠心し、上清を廃棄する。得られた沈殿を２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／５００ｍＭ　ＮａＣｌ（以下、Ｔｒｉｓ溶液）１５ｍＬを加え、４℃にて一晩浸し、溶解させる。次に、得られた上記溶解液を透析用セルロースチューブ（三光純薬製）に入れ、外液をＴｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、脱塩を行なう。（外液は6時間毎に交換した）
（iii）金属キレートカラム
金属キレートカラム担体として、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いる。カラム調整やサンプル負荷、及び洗浄工程は、前記業者の推奨方法に準拠し、４℃にて行った。目的であるＨｉｓタグ融合のＶＬタンパク溶出は５００ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液にて行なう。
溶出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１５％）の結果、単一バンドであり、精製されていることを確認する。上記溶出液に対して、外液をＴｒｉｓ溶液として再び透析を行い、溶出液中のイミダゾールの除去を行なう。更に、外液をリン酸バッファー（以下、ＰＢＳ）に替え、バッファー置換を行い、ＳＰＲ用ＶＬタンパク溶液とする。
【０１３０】
実施例７（ＳＰＲ測定）
実施例６で得られたＶＬタンパク質の金に対する結合性をＳＰＲにて測定した。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用する。
以下の条件において測定を行なう。
ランニングバッファー：ＰＢＳＴ
温度：２５℃
流速：２０μＬ／ｍｉｎ
サンプル：ＶＬタンパク／ＰＢＳＴ
インジェクション量：２０μＬ
結合性が確認される結合カーブを得る（図９）。
【０１３１】
実施例８（ＶＬタンパクの塩基及びアミノ酸配列の決定）
上記で得られたＶＬ　Ｎｏ，７のＤＮＡ配列を以下の方法にて配列を決定した。

シークエンス用プライマーは、ＶＬコード遺伝子上流に位置するｐｅｌＢ配列部に設定した。シークエンス用のｐｒｉｍｅｒは以下のとおり。実施例２と同様に、
ｐｅｌＢ－ｂａｃｋ
（配列番号：８８）
５'－ｃｃｇｃｔ　ｇｇａｔｔ　ｇｔｔａｔ　ｔａｃｔｃ　ｇｃ－３'
のｐｒｉｍｅｒを使用し、業者推奨のシークエンス反応キットと反応液組成によりＢｉｇＤｙｅ－ＰＣＲ反応を行った。温度サイクルは９６℃×３ｍｉｎ→（９４℃×１ｍｉｎ→５０℃×１ｍｉｎ→６８℃×４ｍｉｎ）×３０ｃｙｃｌｅ→４℃とする。次に、エタノール沈殿により精製した前記ＰＣＲ産物をシークエンサー（ＡＢＩ社製３７７）により塩基配列を決定する。以下の結果を得る。Ｎｏ．７は実施例１２の配列番号：７６と同じ塩基配列である。

【０１３２】

実施例９（金親和性ＶＨ提示ファージ群のスクリーニング）

以下の手順により、ＶＨ提示ファージライブラリーを作製し、金に結合性を示すファージ群の選択を行なう。

（１）ＶＨ提示用ファージミド

実施例１と同様にヒト成人末梢血Ｂリンパ球由来Ｆａｂライブラリーを鋳型として、プライマーは実施例１と同様に配列番号：８０乃至配列番号：８９を使用する。ＶＨコード遺伝子を複製した。更に、Ｍ１３ファージのコートタンパクであるＰＩＩＩタンパクの末端の一部を欠損させ、更にＶＨタンパクが融合されて発現されるように作製されたＶＨ提示ファージミド（図１２ａ）のライブラリを使用する。

（２）ＶＨ提示ファージライブラリー作製

以下、（１）を用いたことを除いては実施例５（２）と同様にしてＶＨ提示ファージライブラリーを作製する。得られるＶＨ提示ファージライブライリー溶液：　１×１０９ｃｆｕ／μＬ

（３）金微粒子を用いたＶＨパニング

上記（２）で作製したファージライブラリー溶液を用いた以外は、実施例５（３）と同様に金結合性ＶＨを提示するファージ群を選択するパニングを行なう。

１）結合実験

以下、実施例５と同様の２）洗浄、３）酸溶出及びタイター評価を行った。
１ラウンド：９．８×１０２ ｃｆｕ
２ラウンド：１．０×１０３ ｃｆｕ
３ラウンド：７．８×１０２ ｃｆｕ

４）再感染及びファージ増幅

実施例５と同様の方法で行った。以下の増幅後に得られたタイター値を示す
１ラウンド：２．４×１０９ ｃｆｕ
２ラウンド：８．１×１０８ ｃｆｕ

（４）ファージＥＬＩＳＡ

(1) ＥＩＳＡ用金蒸着基板の作製

実施例５と同様ファージＥＬＩＳＡ用の基板とした。

２）ＶＬ提示ファージ単クローン調整

前記ＶＨパニング作業の３ラウンド目のタイター評価での×１０４の希釈プレート上に発現した２０個のコロニーからファージミドを実施例１と同様にして回収した。以下の得られたＶＨ提示ファージ単クローン溶液のタイター値を示す。
Ｎｏ．１：３．８×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．２：９．０×１０８　ｃｆｕ
Ｎｏ．３：２．４×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．４：１．０×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．５：９．７×１０７　ｃｆｕ
Ｎｏ．６：４．４×１０８　ｃｆｕ

Ｎｏ．７：６．２×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．８：８．９×１０７　ｃｆｕ
Ｎｏ．９：１．４×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．１０：１．１×１０10　ｃｆｕ
Ｎｏ．１１：４．９×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．１２：９．０×１０８　ｃｆｕ
Ｎｏ．１３：２．４×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．１４：１．０×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．１５：９．７×１０７　ｃｆｕ
Ｎｏ．１６：４．４×１０８　ｃｆｕ
Ｎｏ．１７：６．２×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．１８：８．９×１０７　ｃｆｕ
Ｎｏ．１９：１．４×１０９　ｃｆｕ
Ｎｏ．２０：１．１×１０10　ｃｆｕ

２）ファージ溶液の調整

１）で得られた各ファージ溶液をタイター値が１０9ｃｆｕから順次１／１０となるように希釈系列を各２００μＬを以下の組成で作製した。

ＶＨ提示ファージ溶液：ｘμＬ
可溶化ＶＬ溶液（５０ｎｇ）：１μＬ
スーパーブロッキングバッファー（ＰＩＥＲＣＥ社）：２０μＬ
０．５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ：　ｘ／５μＬ
ＰＢＳ：１７９－（６ｘ／５）μＬ

３）ファージＥＬＩＳＡ

実施例１と同様の作業にてファージＥＬＩＳＡを行った。

比較であるＶＨライブラリー溶液よりも発光強度の高い３クローンを金結合性ＶＨ提示ファージクローンとした。（Ｎｏ.２、４、６）

実施例１０（金親和性ＶＨタンパクの取得）

上記３ファージクローンよりファージミドを単離し、それらの発現ベクターを作製した後にタンパクを発現させて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）金基板上に結合性を確認する。更にそれらの金結合性ＶＨの塩基並びにアミノ酸配列を明らかにする。

（１）ファージミドの回収

３ラウンド目のタイター評価での×１０4の希釈プレート上に発現した１５クローンに対応するコロニーからファージミドを以下の手順により回収した。

（ａ）各コロニーをＬＢ／ａｍｐ．　１．６ｍＬで３７℃にて終夜培養した。
（ｂ）Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ　ＳＶ　ｐｌｕｓ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（ｐｒｏｍｅｇａ）を用い、業者推奨の方法にてファージミドを回収した。

（２）発現ベクター作製

上記３種のＶＨタンパクを発現する発現ベクターを以下の構成で構築する。

ＰＥＴ－１５ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社）のマルチクローニングサイトを変更し、ｐＵＴ－ＸＸとする。前記ｐＵＴ－ＸＸ及上記（１）で得られたファージミドを各々のＮｃｏＩ及びＮｈｅＩを用いて制限酵素反応により切断する。得られたＶＨ断片をｐＵＴ－ＸＸに挿入し、ＶＨコード核酸を融合タンパクとして発現されるプラスミドｐＲＡ－７ｓｎ，（ｎ：上記ファージクローン番号）を作製する。（図１４）

（３）タンパク発現及び精製

上記（発現ベクターを、個別の系において以下に記すタンパク発現及び精製工程で処理を行い、３種類（７ｓ２、７ｓ４、７ｓ６）のＶＨとして取得する。

１）形質転換

上記２つの発現ベクターを、それぞれ異なるＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテントセル溶液４０μＬを形質転換する。形質転換は、ヒートショックを氷中→４２℃×９０ｓｅｃ→氷中の条件でおこなう。ヒートショックにより形質転換した上記ＢＬ２１溶液にＬＢ培地

７５０μＬを加え、一時間３７℃にて振盪培養を行った。その後、６０００ｒｐｍ×５分間遠心を行い、培養上清６５０μＬを廃棄し、残った培養上清と沈殿となった細胞画分を攪拌し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、一晩３７℃にて静置する。

２）予備培養

プレート上のコロニーを無作為に選択し、３．０ｍＬ　ＬＢ／ａｍｐ．培地にて２８℃にて一晩振盪培養を行う。

３）本培養

上記予備培養溶液を２×ＹＴ培地　７５０ＭＬに植え継ぎ、更に培養を２８℃にて継続した。ＯＤ６００が０．８を越えた時点で、終濃度が１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを加え、更に２８℃にて終夜培養を行う。

４）精製

目的のポリペプチド鎖を不溶性顆粒画分から以下の工程により精製する。

（ｉ）不溶性顆粒の回収

上記３）で得られた培養液を６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎにて遠心し、沈殿を菌体画分として得る。得られた菌体をトリス溶液（２０ｍＭ　トリス／５００ｍＭ　ＮａＣｌ）１５ｍｌに氷中にて懸濁する。得られた懸濁液をフレンチプレスにて破砕し、菌破砕液を得る。

次に、菌破砕液を１２，０００ｒｐｍ×１５ｍｉｎで遠心を行い、上清を除き、沈殿を不溶性顆粒画分として得る。

（ii）不溶性顆粒画分の可溶化

（ａ）で得られた不溶性画分を６Ｍ　塩酸グアニジン／トリス溶液　１０ｍＬを加えて、一晩浸漬する。次に、１２，０００ｒｐｍ×１０ｍｉｎで遠心し、上清を可溶化溶液として得る。

（iii）金属キレートカラム

金属キレートカラム担体として、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いる。カラム調整やサンプル負荷、及び洗浄工程は、前記業者の推奨方法に準拠し、室温（２０℃）にて行う。目的であるＨｉｓタグ融合のポリペプチドの溶出は６０ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液にて行う。溶出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１５％）の結果、単一バンドであり、精製されていることを確認する。

（iv）透析

上記溶出液に対して、外液を６Ｍ　塩酸グアニンジン／Ｔｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、溶出液中のイミダゾールの除去を行い、上記それぞれのポリペプチド鎖溶液を得る。

（ｖ）リフォールディング

上記と同様にして、ＶＨｇ－ＶＬｈ及びＶＨｈ－ＶＬｇのそれぞれのポリペプチド鎖溶液を以下の工程により別個に、脱塩酸グアニンジンを透析（４℃）にて行いながらタンパク質のリフォールディングを行う。

a）　６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を用い、それぞれのポリペプチド鎖のモル吸光係数とΔＯ．Ｄ．（２８０ｎｍ－３２０ｎｍ）値から濃度７．５μＭのサンプル（希釈後体積１０ｍｌ）を調整する。次にβ－メルカプトエタノール（還元剤）を終濃度３７５μＭ（タンパク濃度５０倍）になるよう添加、室温、暗所で４時間還元を行う。このサンプル溶液を透析バック（ＭＷＣＯ：１４，０００）に入れ、透析用サンプルとする。

b）透析外液を６Ｍ塩酸グアニンジン／トリス溶液として、透析サンプルを浸漬し、緩やかに攪拌しながら６時間透析する。

c）外液の塩酸グアニジン濃度を３Ｍ、２Ｍと段階的に下げる。それぞれの外液濃度において、６時間透析する。

d）酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）を終濃度３７５μＭ、Ｌ－Ａｒｇを　終濃度０．４Ｍ）となるようにトリス溶液に加え、上記３）の２Ｍの透析外液を加え、塩酸グアニジン濃度が１Ｍとし、ｐＨをＮａＯＨで、ｐＨ８．０（４℃）に調整した溶液にて、１２時間緩やかに攪拌しながら透析する。

e）d）と同様の作業にて塩酸グアニジン濃度０．５Ｍの含Ｌ－Ａｒｇ　トリス溶液を整し、更に１２時間透析する。
f）最後にトリス溶液にて１２時間透析する。７）透析終了後、１００００ｒｐｍで約２０分遠心分離し凝集体と上清を分離する。
【０１３３】
上記で得られた３種のＶＨ溶液に対して、更に外液をリン酸バッファー（以下、ＰＢＳ）に替え、バッファー置換を行い、ＳＰＲ用ＶＨタンパク溶液とした。
【０１３４】
実施例１１（ＳＰＲ測定）
実施例１０で得られたＶＨタンパク質の金に対する結合性を実施例１５と同様にしてＳＰＲにて測定した。７ｓ２、７ｓ４、７ｓ６とも結合性が確認される結合カーブを得た。図１０に代表例を示す）。カーブフィッティングによって以下のK_Dを得た。７ｓ２：K_D＝５．０×１０M^{-8}
７ｓ４：K_D＝８．０×１０M^{-9}
７ｓ６：K_D＝３．０×１０M^{-7}
実施例１２（ＶＨタンパクの塩基及びアミノ酸配列の決定）
上記で得られた３つのＶＨ提示ファージミドのＤＮＡ配列を実施例２と同様の方法にて配列を決定した。シークエンス用プライマーは、ＶＨコード遺伝子上流に位置するｐｅｌＢ配列部に設定した。実施例２と同様のシークエンス用ｐｒｉｍｅｒを用い、同様の手順にて解析を行ない、異なる３配列を得た。それらが実施例１０で得られる配列番号：５９乃至配列番号：６１で同じ配列である。
【０１３５】
実施例１３（ＳＰＲによるＶＨ／ＶＬ複合体と金結合性実験）
実施例６で得たＶＬクローン：Ｎｏ．７と実施例１０で得たＶＨクローン：７ｓ２を各５０ｎＭＰＢＳＴ溶液を調整した。４℃にて一日間保存した。上記混合溶液を用いて、実施例７と同様にしてＳＰＲ測定を行った。その結果、実施例７または実施例１１に比べ低濃度で金との結合性を確認できた。混合することにより複合体（Ｆｖ）形成され構造安定化による結合性向上が示唆された。（図３）
実施例１４（金結合性ｓｃＦｖの取得）
実施例６で得たＶＬクローン：Ｎｏ．７と実施例１０で得たＶＨクローン：７ｓ２からなるｓｃＦｖを以下の手順にて作製した。
（１）発現ベクター作製
ＶＬ（Ｎｏ．７）コード遺伝子、リンカー（ＧＧＧＧＳ）×３、ＶＨ（７ｓ４）コード遺伝子、Ｈｉｓ×６（以下、Ｈｉｓタグ）連続して翻訳され、融合タンパクとして発現されるような発現ベクターを作製した。
具体的な作製方法については、図１５に記す。
プライマーとしては以下を用いる。
ｓｃＦｖ－Ｂ（配列番号：１１７）
５'－ＮＮＮＮＮＣＣＡＴＧＧＣＣＧＧＧＧＧＣＧＧＧＧＧＣＡＧＣＧＧＧＧＧＣＧＧＧＧＧＣＡＧＣＧＧＧＧＧＣＧＧＧＧＧＣＡＧＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ－３'
ｓｃＦｖ－Ｆ（配列番号：１１８）
５'－ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＡＣＣＡＴＴＣＡＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＴ－３'
（２）タンパク発現及び精製
以下、上記で得られたｓｃＦｖタンパク発現用ベクターを用いてｓｃＦｖタンパクを発現・精製した。
１）タンパク発現
上記発現ベクターを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）を形質転換し、培養は２ｘＹＴ培地を用い２８℃で行う。Ｏ．Ｄ．600＝約０．８となったところで、終濃度１ｍＭのＩＰＴＧにより発現を誘導し、一晩振盪培養する。菌体を６０００ｒｐｍ×２０ｍｉｎにて遠心を行い

、培養上清画分と菌体画分を得た。これらサンプルを既知の方法によりＳＤＳ－ＰＡＧＥにより電気泳動を行い、目的のタンパクの発現量を確認した。その結果、培養上清画分への分泌は非常に少ないことがわかった。そこで目的タンパクを菌体画分から精製する為に以下の手順でサンプルを調製した。まず、菌体をＰＢＳ　１５ｍＬで再懸濁し、さらにＰＢＳ　２５ｍＬをえ、フレンチプレスによる菌体破砕を行った。得られた破砕液を１２０００ｒｐｍ×１５ｍｉｎで遠心を行い、沈殿画分を不溶性顆粒として得た。得られた不溶性顆粒を６Ｍ塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液で一晩浸漬し、可溶化し、金属キレートカラム用サンプルとした。

２）金属キレートカラム精製

ランニングバッファーを６Ｍ塩酸グアニジン／５ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液とし、溶出時のイミダゾール濃度を１００ｍＭ、展開温度を室温（２０℃）とした以外は実施例２と同様にして精製を行った。

３）透析

２）で得られた溶出画分を透析用セルロースチューブ（三光純薬製）に入れ、外液を６Ｍ塩酸グアニンジン／１ｍＭＥＤＴＡ／Ｔｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、イミダゾール除去を行った。（外液は６時間毎に交換した）

３）タンパク質の再構築

２）で得たｓｃＦｖ溶液をＴｒｉｓ溶液で７．５μＭに調整し、サンプルとした。上記溶液に対して、外液の塩酸グリシン濃度を段階的に下げることにより、内液中の塩酸グアニジン濃度を下げるとともにｓｃＦｖ構造の再構成を行った。

（ａ）　６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を用い、目的タンパクのアミノ酸配列から概算されるモル吸光係数とＯ．Ｄ．（２８０ｎｍ）か７．５μＭのサンプルを調整した。

（ｂ）　次にβ－メルカプトエタノール（還元剤）を終濃度３７５μＭになるよう添加、室温、暗所で４時間静置した。

（ｃ）　サンプルを前記と同様の透析膜に入れ、外液（６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液）に加え、４℃で約６時間透析する。

（ｄ）　以降、６時間毎に外液を２回交換した。その際に、外液の塩酸グアニジン濃度は３Ｍ→２Ｍと段階的に下げながら透析を行った。

（ｅ）　次に、酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）を終濃度３７５μＭ、Ｌ－Ａｒｇを　終濃度０．４Ｍ）となるようにＴｒｉｓ溶液に加え、更に上記（ｄ）の透析外液（２Ｍ）を加えることで塩酸グアニジン濃度を１Ｍとして、ｐＨをＮａＯＨで、ｐＨ８．０（ａｔ４℃）に調整した外液を用いて４℃で約１２時間透析する。

（ｆ）　（ｅ）と同様の作業にて０．５Ｍ塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を作製し、４℃で約１２時間透析する。

（ｇ）　最後に、外液をＴｒｉｓ溶液に交換して４℃で約１２時間透析する。

（ｈ）　透析終了後、１００００ｒｐｍで約２０分遠心分離し凝集体画分と上清画分を分離する。上清画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動で確認したところ、上清画分に目的のタンパクが可溶化されていることを確認した。ＶＬに前記Ｎｏ．７クローンを配し、ＶＨに７ｓ２を配したｓｃＦｖを取得した。

【０１３６】

実施例１５（ＳＰＲによるｓｃＦｖの金結合性評価）

実施例１４で得られたｓｃＦｖタンパク質の金に対する結合性を実施例３と同様にしてＳＰＲにて測定した。金結合性を示す結合カーブが得られた。（図１７）

実施例１６（Ａｕ特異性の確認）

実施例１５で得られたｓｃＦｖタンパク質の金特異性を確認した。確認用の基板として、３ｍｍ×５ｍｍのシリコン基板上に７０μｍφの大きさの円形パターニングを金蒸着（厚さ　５０ｎｍ）する。上記基板表面をイソプロピルアルコール、アセトン、塩酸と順次１０分間浸漬して表面洗浄する。（溶液を替える毎に純水にて洗浄、乾燥する。）上記基板を実施例６で得られたｓｃＦｖ溶液を１μＭに調整した溶液に１時間浸漬する。続いて、ＰＢＳＴにて１０分間緩やかに攪拌しながら洗浄する。この作業を３回繰り返し、洗浄

液を捨てる。次に、上記基板を１００ｎＭ　抗Ｈｉｓタグ抗体／ＰＢＳＴ溶液に1時間緩やかに攪拌しながら浸漬する。続いて、ＰＢＳＴにて１０分間緩やかに攪拌しながら洗浄する。この作業を3回繰り返し、洗浄液を捨てる。更に、上記基板を１００μＭ　ロドプシン結合抗ＩＧｇ抗体／ＰＢＳＴ溶液に1時間緩やかに攪拌しながら浸漬する。続いて、ＰＢＳＴにて１０分間緩やかに攪拌しながら洗浄する。この作業を3回繰り返し、洗浄液を捨てる。その後、蛍光顕微鏡にて基板を観察した。その結果、金蒸着した円形部のみに蛍光が観察され、シリコン部には蛍光は見られなかった。実施例１５で得られたｓｃＦｖの金特異性が確認できた。

【０１３７】

比較例1

実施例１６における1μＭ　ｓｃＦｖで金蒸着シリコン基板を処理した以外は、同じ作業にて前記基板を処理した。蛍光顕微鏡による観察の結果、シリコン部のみだけでなく、金蒸着した円形部にも蛍光は確認できなかった。

【０１３８】

実施例１７（酸化珪素親和性ペプチド融合金結合性タンパクの作製）

酸化珪素親和性ペプチドＩＰＨＶＨＨＫＨＰＨＶを上記実施例ｓｃＦｖのＣ末端に融合したタンパク質を以下の工程により作製する。

（1）発現ベクター作製

（ａ）上記（実施例１４）で得られたｐＵＴ－ｓｃＦｖ（ＶＬ#Ｎｏ，７×７ｓ４）をテンプレートして以下のプライマーを用い、ＰＣＲを行う。

ＳｉｓｃＦｖ－Ｂ（配列番号：１１９）

5'－ＮＮＮＮＮＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴ－3'

ＳｉｓｃＦｖ－Ｆ（配列番号：１２０）

5'－ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＣＡＣＧＴＧＧＧＧＧＴＧＣＴＴＧＴＧＧＴＧＣＡＣＧＴＧＣＡＴＧＧＧＧＡＴＡＡＣＣＡＴＴＣＡＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＴ－3'

尚、ＰＣＲは市販のＰＣＲキット（タカラバイオ　ＬＡ－Ｔａｑキット）を使用し、業者推奨のプロトコールに従い行う。

（ｂ）その結果得られたＰＣＲ産物を２％アガロース電気泳動を行う。次に、ゲル抽出キット（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用してゲルから粗精製を行い、約４００ｂｐのＰＣＲ断片を得る。シークエンスの結果、目的の塩基配列を有することを確認する。

（ｃ）ｐＵＴ－ｓｃＦｖ（７ｓ４）及び上記（ｂ）で得られたＰＣＲ断片を、ＮｏｔＩ／ＳａｃIIを用いて、切断する。次いで、アガロース電気泳動を行い、Ｖｅｃｔｏｒ側及びＩｎｓｅｒｔ側でそれぞれ目的の断片を精製する。

（ｄ）上記（ｃ）でえら得た精製した核酸断片を、Ｖｅｃｔｏｒ：Ｉｎｓｅｒｔ＝１：５となるように混合し、実施例1と同様にしてライゲーション反応を行う。

以下、形質転換、プラスミド回収、挿入断片の確認については実施例６と同様に行う。

【０１３９】

（３）タンパク発現及び精製

上記得られた発現用プラスミドを用いて、実施例１０と同様の方法にてタンパク発現及び精製を行い、目的であるタンパク質を得る。

【０１４０】

実施例１８（金及びＨＥＬ結合性タンパク質の取得）

（１）金結合性ＶＨコード核酸断片の調整

金結合性ＶＨ（配列番号：６１）の5末端側に制限酵素ＮｃｏＩ切断部位、3'末端側に制限酵素ＮｈｅＩを配置したベクター導入用の金結合性ＶＨ（以下、ＶＨｇ）を作製するために、プライマーとして、

ｇＶＨ－Ｂ（配列番号：１２１）

5'－ＮＮＮＮＮ　ＣＣＡＴＧＧ　ＣＣＧＡＣ　ＣＡＧＧ　ＴＧＣＡＧ　ＴＴＧＧＴ　ＧＧＡＧＴ　ＣＴ－3'

ｇＶＨ－Ｆ（配列番号：１２２）

５'ＮＮＮＮＮ　ＧＣＴＡＧ　Ｃ　ＧＧＡＧＡ　ＣＧＧ　ＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴ－３'
を使用して、市販のＰＣＲキットを当業者の推奨する調合にてＰＣＲを行い、約３５０ｂｐの塩基対を得る。上記ＶＨＢ－Ｆを使用し、市販のシークエンス反応キットと反応液組成によりＢｉｇＤｙｅ－ＰＣＲ反応を行った。温度サイクルは９６℃×３ｍｉｎ→（９４℃×１ｍｉｎ→５０℃×１ｍｉｎ→６８℃×４ｍｉｎ）×３０ｃｙｃｌｅ→４℃とする目的のＶＨをコードする塩基配列を有する断片が得られたことを確認する。
（２）金結合性ＶＬコード核酸断片の調整
金結合性ＶＬ（配列番号：７６）の５末端側に制限酵素ＮｈｅＩ部位及びリンカー（ＧＧＧＧＳ）をコードする核酸、３'末端側にＨｉｓ×６に引き続き、制限酵素ＳａｃIIを配置したベクター挿入用の金結合性ＶＬ（以下、ＶＬｇ）（配列番号：９９）を作製するために、プライマーとして
ｇＶＬ－Ｂ（配列番号：１２３）
ＮＮＮＮＮ　ＧＣＴＡＧＣ　ＧＧＴＧＧＣＧＧＴＧＧＣＴＣＴ　ＧＡＡＡＴＴＧＴＧＴＴＧＡＣＧＣＡＧＴＣＴ、及び
ｇＶＬ－Ｆ（配列番号：１２４）
ＮＮＮＮＮ　ＣＣＧＣＧ　ＧＣＡＣＧ　ＴＴＴＡＡ　ＴＣＴＣＣ　ＡＧＴＣＧ　ＴＧＴ
を使用する以外は、（１）と同様にして核酸断片を得て、目的のＶＬの塩基配列を有することを確認する。
（３）ＨＥＬ結合性ＶＨコード核酸断片の調整
ＨＥＬ結合性ＶＨ（配列番号：１２５）の５末端側に制限酵素ＮｃｏＩ切断部位、３'末端側に制限酵素ＮｈｅＩを配置したベクター導入用のＨＥＬ結合性ＶＨ（以下、ＶＨｈ）を作製するために、プライマーとして、
ｈＶＨ－Ｂ（配列番号：１２６）
５'－ＮＮＮＮＮ　ＣＣＡＴＧＧ　ＣＣＧＡＣ　ＧＡＴＡＴＣＣＡＧＣＴＧＣＡＧＧＡＧＴＣＧＧＧＣＣＣ－３、及び
ｈＶＨ－Ｆ（配列番号：１２７）
５'ＮＮＮＮＮ　ＧＣＴＡＧ　Ｃ　ＧＧＡＧＡ　ＣＧＧ　ＴＧＡＣＧＴＣＴＧＴ－３
を使用する以外は、（１）と同様にして核酸断片を得て、目的のＶＨの塩基配列を有することを確認する。
（４）ＨＥＬ結合性ＶＬコード核酸断片の調整
ＨＥＬ結合性ＶＬ（配列番号：１２８）の５末端側に制限酵素ＮｈｅＩ切断部位及びリンカー（ＧＧＧＧＳ）をコードする核酸、３'末端側にＨｉｓ×６に引き続き、制限酵素ＳａｃII切断部位を配置したベクター挿入用のＨＥＬ結合性ＶＬ（以下、ＶＬｈ）を作製するために、プライマーとして、
ｈＶＬ－Ｂ（配列番号：１２９）
ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣＧＧＴＧＧＣＧＧＴＧＧＣＴＣＴＧＡＴＡＴＣＧＴＣＣＴＧＡＣＣＣＡＧＡＧ、及び
ｈＶＬ－Ｆ（配列番号：１３０）
ＮＮＮＮＮ　ＣＣＧＣＧ　ＧＣＣＴＴ　ＧＡＴＣＴ　ＣＣＡＧＣ　ＴＴＧＧＴ　ＧＣ
を使用する以外は、（１）と同様にして核酸断片を得て、目的のＶＬの塩基配列を有することを確認する。
【０１４１】
実施例１９（発現ベクター作製）
上記４種の核酸断片用いてを２つの発現ベクターを以下の構成で構築する。
（１）ＶＨｇ－ＶＬｈ発現用ベクター（ｐＧＨＥＬ）の作製　（図１５）
（ｉ）ＶＨｇの挿入
前記プラスミドｐＵＴ－ＸＸを、制限酵素ＮｃｏＩ／ＮｈｅＩ（ともにＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）で切断し、スピンカラム　４００ＨＲ（アマシャムサイエンス）する。次に、同様に制限酵素ＮｃｏＩ／ＮｈｅＩにて切断したＶＨｇを切断し、切断断片を市販のゲル精製キット（ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐ　ｓ

ｙｓｔｅｍ：　Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して精製する。上記二つの断片を、市販のＴ４リガーゼキット（Ｒｏｃｈｅ社）を業者推奨の方法にて調合しライゲーションを行う。

【０１４２】

ライゲーション溶液をＪＭ１０９コンピテントセル（Ｐｒｏｍｅｇａ社）４０μＬにヒートショック法により形質転換した後に、ＬＢ／アンピシリン（ａｍｐ．）プレートに撒き、３７℃にて一晩静置する。

【０１４３】

次に、プレート中から任意のコロニーをＬＢ／ａｍｐ．　３ｍＬ液体培地に植え継ぎ、３７℃にて一晩振盪培養を行う。その後、市販のＭｉｎｉＰｒｅｐｓキット（Ｐｌｕｓ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ：Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して、プラスミドを回収する

得られたプラスミドを、ｇＶＨ－Ｆを使用して前記シークエンス方法にて塩基配列を確認したところ、目的の断片が挿入されていることを確認する。

（ii）ＶＬＨの挿入

上記１）で得られたプラスミドｐＵＴ-ＶＨｇを制限酵素ＮｈｅＩ／ＳａｃIIで切断し、スピンカラム　４００ＨＲ（アマシャムサイエンス）する。次に、同様に制限酵素ＮｈｅＩ／ＳａｃIIにて切断したＶＬｈを得る。以下、上記（ａ）と同様にして、ライゲーション及び目的のＶＨｇ－ＶＬＨ発現用プラスミドｐＧＨＥＬであることを確認する。（確認用プライマーは、ｈＶＬ－Ｆ）

（２）ＶＨｈ－ＶＬｇ　発現用ベクター（ｐＨＧＯＬＤ）の作製（図１６）

（iii）ＶＨｈの挿入

上記（ｉ）と同様の方法にてＶＨｈをプラスミドｐＵＴに挿入し、得られたプラスミドが目的のプラスミドであることを確認する。（確認用プライマーは、ｈＶＨ－Ｆ）

（iv）ＶＬｇの挿入

ＶＬｇを上記（iii）で得られたプラスミドに上記（ｂ）と同様の方法にて挿入し、得られたプラスミドが目的のＶＨＨ－ＶＬｇ発現用ベクターｐＨＧＯＬＤであることを１）と同様にして確認する。（確認用プライマーは、ｇＶＬ－Ｆ）

実施例２０（タンパク発現及び精製）

上記実施例１９の（ii）で得られたＶＨｇ－ＶＬｈ、及び実施例１９の（iv）で得られたＶＨｈ－ＶＬｇのポリペプチドを発現する発現ベクターを、個別の系において以下に記すタンパク発現及び精製工程で処理を行い、それぞれポリペプチド鎖ＶＨｇ－ＶＬｈ及びＶＨｈ－ＶＬｇとして取得する。

１）形質転換

上記２つの発現ベクターを、それぞれ異なるＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテントセル溶液４０μＬを形質転換する。形質転換は、ヒートショックを氷中→４２℃×９０ｓｅｃ→氷中の条件でおこなう。ヒートショックにより形質転換した上記ＢＬ２１溶液にＬＢ培地７５０μＬを加え、一時間３７℃にて振盪培養を行った。その後、６０００ｒｐｍ×５分間遠心を行い、培養上清６５０μＬを廃棄し、残った培養上清と沈殿となった細胞画分を攪拌し、ＬＢ／ａｍｐ．プレートに撒き、一晩３７℃にて静置する。

２）予備培養

プレート上のコロニーを無作為に選択し、３．０ｍＬ　ＬＢ／ａｍｐ．培地にて２８℃にて一晩振盪培養を行う。

３）本培養

上記予備培養溶液を２×ＹＴ培地　７５０ＭＬに植え継ぎ、更に培養を２８℃にて継続した。ＯＤ６００が０．８を越えた時点で、終濃度が１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを加え、更に２８℃にて終夜培養を行う。

４）精製

目的のポリペプチド鎖を不溶性顆粒画分から以下の工程により精製する。

（ｉ）不溶性顆粒の回収

上記３）で得られた培養液を６０００ｒｐｍ×３０ｍｉｎにて遠心し、沈殿を菌体画分

として得る。得られた菌体をトリス溶液（２０ｍＭ　トリス／５００ｍＭ　ＮａＣｌ）１５ｍｌに氷中にて懸濁する。得られた懸濁液をフレンチプレスにて破砕し、菌破砕液を得る。
次に、菌破砕液を１２，０００ｒｐｍ×１５ｍｉｎで遠心を行い、上清を除き、沈殿を不溶性顆粒画分として得る。
（ii）不溶性顆粒画分の可溶化
上記（ｉ）で得られた不溶性画分を６Ｍ　塩酸グアニジン／トリス溶液　１０ｍＬを加えて、一晩浸漬する。次に、１２，０００ｒｐｍ×１０ｍｉｎで遠心し、上清を可溶化溶液として得る。
（iii）金属キレートカラム
金属キレートカラム担体として、Ｈｉｓ－Ｂｉｎｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いる。カラム調整やサンプル負荷、及び洗浄工程は、前記業者の推奨方法に準拠し、室温（２０℃）にて行う。目的であるＨｉｓタグ融合のポリペプチドの溶出は６０ｍＭイミダゾール／Ｔｒｉｓ溶液にて行う。溶出液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１５％）の結果、単一バンドであり、精製されていることを確認する。
（iv）透析
上記溶出液に対して、外液を６Ｍ　塩酸グアニンジン／Ｔｒｉｓ溶液として４℃にて透析を行い、溶出液中のイミダゾールの除去を行い、上記それぞれのポリペプチド鎖溶液を得る。
（ｖ）リフォールディング
上記と同様にして、ＶＨｇ－ＶＬｈ及びＶＨｈ－ＶＬｇのそれぞれのポリペプチド鎖溶液を以下の工程により別個に、脱塩酸グアニンジンを透析（４℃）にて行いながらタンパク質のリフォールディングを行う。
（ａ）　６Ｍ　塩酸グアニジン／Ｔｒｉｓ溶液を用い、それぞれのポリペプチド鎖のモル吸光係数とΔＯ．Ｄ．（２８０ｎｍ－３２０ｎｍ）値から濃度７．５μＭのサンプル（希釈後体積１０ｍｌ）を調整する。次にβ－メルカプトエタノール（還元剤）を終濃度３７５μＭ（タンパク濃度５０倍）になるよう添加、室温、暗所で４時間還元を行う。このサンプル溶液を透析バック（ＭＷＣＯ：１４，０００）に入れ、透析用サンプルとする。（ｂ）透析外液を６Ｍ塩酸グアニンジン／トリス溶液として、透析サンプルを浸漬し、緩やかに攪拌しながら６時間透析する。
（ｃ）外液の塩酸グアニジン濃度を３Ｍ、２Ｍと段階的に下げる。それぞれの外液濃度において、６時間透析する。
（ｄ）酸化型グルタチオン（ＧＳＳＧ）を終濃度３７５μＭ、Ｌ－Ａｒｇを　終濃度０．４Ｍ）となるようにトリス溶液に加え、上記（ｃ）の２Ｍの透析外液を加え、塩酸グアニジン濃度が１Ｍとし、ｐＨをＮａＯＨで、ｐＨ８．０（４℃）に調整した溶液にて、１２時間緩やかに攪拌しながら透析する。
（ｅ）上記（ｄ）と同様の作業にて塩酸グアニジン濃度０．５Ｍの含Ｌ－Ａｒｇ　トリス溶液を整し、更に１２時間透析する。
（ｆ）最後にトリス溶液にて１２時間透析する。
（ｇ）透析終了後、１００００ｒｐｍで約２０分遠心分離し凝集体と上清を分離する。
（ｖi）２量化画分の精製
上記（ｖ）で得られた個々の５μＭ　ポリペプチド（ＶＨｇ－ＶＬｈ、ＶＨｈ－ＶＬｇ）溶液を混合し、４℃にて一晩する。次に、セファデックス７５カラム（カラム：バッファー　２０ｍＭ　トリス、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、流速　１ｍｌ／ｍｉｎ）にて二量体化した６０ｋＤａ相当（インジェクションから約１８分）のフラクションを得る。これをＳＰＲ測定用サンプルとする。
【０１４４】
実施例２１（ＳＰＲ測定による金結合性評価）
実施例２０で得られた２量化タンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被

結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例１５で得た２量化タンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。
ランニングバッファー：０．１％Ｔｗｅｅｎ２０／トリス溶液：ＴＢＳＴ
温度：２５℃
流速：２０μＬ／ｍｉｎ
サンプルインジェクション量：４０μＬ
　金に対する結合性を示すが結合カーブを得る（図１８）。
【０１４５】
　実施例２２（ＳＰＲ測定によるＨＥＬ結合性評価）
　実施例２１において金結合性をＳＰＲ評価したサンプルに引き続き、連続して１μＭ　ＨＥＬ溶液をインジェクションし、金に結合した２量化タンパク質画分のＨＥＬに対する結合性をＳＰＲにて測定する。図に示すＨＥＬに対する結合性を示すが結合カーブを得る（図１８）。
【０１４６】
　実施例２３（Ａｕ特異性の確認）
　実施例２２で得られた金結合性タンパク質及びＨＥＬが結合したＳＰＲチップの金基板を用いて以下の実験を引き続き行った。上記金基板を１μＭ　抗ＨＥＬ抗体／ＰＢＳＴ溶液をインジェクションする。その後、ＰＢＳＴにて洗浄する。更に、１μＭ　ロドプシン結合抗ＩＧｇ抗体／ＰＢＳＴ溶液をインジェクションした後に、ＰＢＳＴで洗浄する。その後、ＳＰＲ装置から上記ＳＰＲチップを取り出し、蛍光顕微鏡にて基板を観察する。その結果、金基板上にＳＰＲの流路上に蛍光が観察される。
【０１４７】
　比較例２
　未使用の金蒸着基板を用いて、実施例２３と同様の作業を行なう。その結果、金基板上に蛍光が観察されない。
【０１４８】
　実施例２４
　実施例２０における（ｉ）乃至（ｖ）と同様の工程で得られる巻き戻しポリペプチド鎖ＶＨｇ－ＶＬｈを作製し、５μＭ　ＶＨｇ－ＶＬｈ／トリス溶液を得る。
【０１４９】
　実施例２５
　実施例２４で得られるＶＨｇ－ＶＬｈ／トリス溶液を５００ｎＭにトリス溶液で希釈し、実施例２０と同様にして金基板に対する結合性をＳＰＲにより評価する。更に連続して１μＭ　ＨＥＬ溶液をインジェクションし、金に結合した２量化タンパク質画分のＨＥＬに対する結合性をＳＰＲにて測定する。金及びＨＥＬに対する結合性を示すが結合カーブを得る。
【０１５０】
　実施例２６
　実施例２５において、０．５μＭ　抗ＨＥＬ抗体　ＶＬ／トリス溶液を共存させた一晩静置してサンプルを調整する。
【０１５１】
　実施例２７
　実施例２６で調整したサンプルに対して、実施例１５と同様にして金基板に対する結合性をＳＰＲにより評価する。更に、実施例１６と同様にして、連続して１μＭ　ＨＥＬをインジェクションしてＨＥＬに対する結合性をＳＰＲにて測定する。結合性を示す結合カーブを得る。
実施例２８（ＨＥＬ検出イムノクロマトグラフィー装置の作製）
　検出方法例としてＨＥＬを検出するイムノクロマトグラフィー装置を作製する。
１）抗ＨＥＬ抗体を固相化したイムノクロマトグラフィー用多孔質担体の作製　ニトロセ

ルロースシート（ＢＡＳ－８５、シュライヒャーシュエル社製）を５　ｍｍ×３０　ｍｍに切断し、その端より１０　ｍｍの位置に抗ＨＥＬ抗体溶液０．５　ｍｇ／ｍＬ（日本バイオテスト社製）を直線状に塗布し、検出部位を作製する。室温にて２時間静置させ、液体を乾燥し、抗体をシート状に固着する。１％スキムミルク（ディフコ社製）／ＰＢＳＴ溶液で、上記シートを２時間振盪してブロッキングを行った後、室温にて静置してイムノクロマトグラフィー用担体を用意する。

２）金標識抗ＨＥＬ抗体断片の調整及び保持担体の作製

（ｉ）金標識抗ＨＥＬ抗体断片の作製

実施例２０で作製した金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片を用いて以下の工程で作製する。金微粒子分散溶液（粒子径５０　ｎｍ、田中貴金属社製）に実施例２０で作製した金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片を加え充分混和して、室温、３時間反応を行う。未反応の金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片を除去するため１２，０００ｒｐｍ、５分間遠心分離を行い、上清を取り除き、沈降物を得た。得られた沈降物をＰＢＳＴ１．０　ｍＬで懸濁した。更に、上記条件において遠心を行う。得られた沈降物を、１％ＢＳＡ／ＰＢＳＴ１．０　ｍＬに懸濁する。

（ii）金標識抗ＨＥＬ抗体断片保持担体の作製

上記金標識抗ＨＥＬ抗体断片溶液５μＬ及び各種塩基の１０％水溶液５μＬをベンリーゼ不織布（旭化成社製）５　ｍｍ×５　ｍｍに含浸させ風乾し、金標識抗ＨＥＬ抗体断片保持担体を作製した。

３）試験片型イムノクロマトグラフィー装置の作製

上記1）で作製した上記イムノクロマトグラフィー用担体の一方の端から２．５　ｍｍの位置まで上記2）（ii）金標識抗ＨＥＬ抗体断片保持担体を重ねた。さらに上記抗体断片保持担体上に液体試料吸収用担体（ろ紙Ｎｏ．５２６　アドバンテック東洋社製）を重ねた。また、免疫クロマトグラフィー用支持体のもう一方の端から５　ｍｍの位置まで過剰試料吸収部位用担体　（ろ紙Ｎｏ．５２６）を重ねた。最後に裏側にテープを貼り、全体を固定化して試験片型免疫クロマトグラフィー装置を作製した。標準ＨＥＬ溶液を用いた試験の結果、抗ＨＥＬ抗体固定化部が赤色に呈色するのが確認される。

【０１５２】

実施例２９（電気測定装置の作製）

金電極を用いたタンパク質検出法の一例を示す。

１）ガラス基板上に２つの金電極を設ける。電極間の距離は２０μｍとする。前記ガラス基板の金電極間に、０．１％ポリ－Ｌ－リジン（シグマ社）水溶液２０μＬを滴下し、３時間静置する。

次に、水洗浄を行った後にエタノールで洗浄処理を３回行い、乾燥する。

２）次いで、抗HELポリクローナル抗体（ＲＯＣＫＬＡＮＤ社）をＰｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、３、ｐｐ２５４（２００３）に基づいて上記（ａ）で得られたガラス基板への固定化を行う。

３）実施例２０で作製した金／ＨＥＬ二重特異性抗体断片　ＰＢＳＴ溶液と２０ｎｍ金ナノ粒子（田中貴金属社製）を反応させる。（比較として、ＰＢＳＴ溶液）

４）　１）で得られた抗ＨＥＬ抗体固定化基板に、１μＭ　ＨＥＬ／ＰＢＳ溶液を付加する。

５）　次いで。３）に２）で得られた金結合タンパク質溶液を付加する。

６）　４）で得られた基板をＰＢＳ溶液にて３回洗浄する。その後、銀増幅溶液（シグマ・ケミカル社、Ｓｉｌｖｅｒ　Ｅｎｈａｎｃｅｅｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）中に5分間浸漬し、水で洗浄した。　電極間の電気抵抗が比較サンプルのＰＢＳＴのみと比べて低下することが確認される。

【０１５３】

実施例３０（ＶＨｇ－ＶＨｈタンパクの酵母発現ベクター作製）

（１）ＮｈｅＩ－ＶＨｈ－ＳａｃＩＩ断片の作製

同じく実施例１９にて作製したｐＨＧｏｌｄを鋳型に末端にそれぞれＮｈｅＩ／Ｓａｃ

ＩＩを有するＶＨｈ断片をＰＣＲにて作製する。
プライマーとして以下を用いる。
ＮｈｅＩ－ＶＨｈ＿ｆ（配列番号１３１）
ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ
ＶＨｈ－ＳａｃＩＩ＿ｒ（配列番号１３２）
ＮＮＮＮＮＣＣＣＧＣＧＧＡＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴ
上記プライマーを使用し、ｐｆｕ－ｔｕｒｂｏを当業者推奨方法によりＰＣＲを行う。
得られるＰＣＲ反応液をアガロースゲル（２％）電気泳動を行い、約３５０ｂｐの断片を得ること確認する。
（２）ＶＨｇ－ＶＨｈＤＮＡ断片作製
上記実施例１９にて作成したｐＧＨＥＬのＶＬｈ部分に上記（１）で得られたＶＨｈ断片を導入する。上記（１）で得られたＰＣＲ断片及びｐＧＨＥＬをＮｈｅＩ／ＳａｃＩＩ（ともにタカラバイオ株式会社製）にて切断する。制限酵素反応は当業者推奨方法にて行う。得られる反応溶液をそれぞれアガロース電気泳動を行い、ゲル精製を行う。（ＰＣＲ断片：アガロース２％、ｐＧＨＥＬ：アガロース１％とする。）ゲル精製には、上述したゲル精製キットにて行う。上記で得られる制限酵素後のＰＣＲ断片が約３５０ｂｐ、プラスミド断片３０００ｂｐであることを確認し、以下、実施例１９と同様の方法にて新規プラスミドが得られる。得られるプラスミドをシークエンサーにより塩基配列を確認し、目的の塩基配列であることを確認する。（このプラスミドをｐＨｇＨｈとする。）
（３）酵母発現プラスミドへの挿入
ＰＣＲは上記同様の業者推奨方法による。
酵母（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｒｉｓ）発現プラスミドとしては、ｐＰＣＩＺαＡ（インビトロジェン社）を使用する。前記プラスミドのマルチクローニングサイトにあるＥｃｏＲＩ及びＳａｃＩＩを利用し、目的の遺伝子を導入する。
導入する遺伝子は（２）で得られるｐＨｇＨｈを鋳型として、ＰＣＲにより作製する。
プライマーとして
７ｓ４－ｆｗ－ＥｃｏＲ１ｓ（配列番号１３３）
ＡＡＧＣＴＧＡＡＴＴＣＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ
ＨＥＬＶＨ－ＳａｃＩＩ－ｒ（配列番号１３４）
ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＧＡＧＧＧＴ
得られるＰＣＲ断片と上記ｐＰＣＩＺαＡをＥｃｏＲＩ及びＳａｃＩＩにて順次切断し、上述と同様にしてゲル精製にて目的の断片をそれぞれ得る。ライゲーションは上述した方法により行い、上記と同様にしてライゲーション反応液を形質転換して、寒天プレートに撒く。この場合の寒天プレートは、トリプトン１０ｇ／酵母エキス５ｇ／ＮａＣｌ５ｇ／寒天１５ｇ／ＬにＺｅｏｃｉｎを２５μｇ／Ｌになるように添加したものである。これにより選択されるコロニーを液体培地（トリプトン１０ｇ／酵母エキス５ｇ／ＮａＣｌ５ｇ、Ｚｅｏｃｉｎ　２５μｇ／Ｌ）で３７℃一晩培養し、プラスミドを回収後、シークエンサーにて配列を確認し、本実施例の目的であるＶＨｇ－ＶＨｈ：ＶＨ＿ｇｏｌｄ－ｌｉｎｋｅｒ（ＧＧＧＧＳ）－ＶＨ＿ＨＥＬを発現するプラスミドを得る。（ｐＰＣＩＺ－αＨＨとする）
実施例３１（ＶＨｇ－ＶＨｈタンパクの発現／精製）
ＶＨｇ－ＶＨｈの発現はＥａｓｙＳｅｌｅｃｔ　Ｐｉｃｈｉａ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｋｉｔ　Ｖｅｒ．Ｇ（インビトロジェン社）を用いて行う。形質転換体作製、タンパク作製及び精製（金属キレートカラム）については当業者推奨方法にて行う。金属キレートカラムにより得られる１Ｍイミダゾール溶出画分　５ｍＬをＴｒｉｓバッファー　（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＧＴＡ：ｐＨ７．９）を外液として４℃にて透析を行う。外液交換は６時間毎に３回行う。
【０１５４】
続いて、Ｓｅｐｈａｄｅｘ７５（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて、ゲルろ過による精製（バッファー条件：５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１

ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ8.0、流速：０．７ｍＬ／ｍｉｎ）を４℃にて行う。得られる分画を濃縮後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（アクリルアミド１７．５％）及びＨＲＰ融合抗Ｈｉｓ抗体を用いて、上述と同様のｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇを行う。これにより、目的のタンパク質の分画を特定し、単一バンドに精製される。その中で、約２５ｋＤａの単量体タンパク質であることを示唆するピークを分取し、以下の評価を行う。（図１９）

実施例３２（ＳＰＲ測定による金結合性評価）

実施例３１で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例２０で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１と土曜とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２０）

実施例３３（ＶＨｇ－ＶＨｈタンパク変異体作製　－１）

実施例３０の金結合性ＶＨのＶ３７Ｌ、Ｇ４４Ｅ、Ｌ４５ＲとなるＶＨｇ変異体（配列番号：１３５、１３６）になるように実施例３０で得られるプラスミドｐＰＣＩＺ－α７ｓ４を鋳型にＱＣキット（STRATAGENE社製）を使用する。当業者の推奨方法により、以下のプライマーを使用し３度の作業により目的のプラスミドをえる。作業毎に一箇所ずつ変異を順次導入する。

【０１５５】

１箇所目の変異導入の為のＰＣＲプライマー

Ｖ３７Ｆ－ｆ（配列番号：１３７）

ＴＴＡＣＴＧＧＡＴＣＡＡＣＴＧＧＴＴＣＣＧＣＣＡＧＡＴＧＣＣＣＧＧ

Ｖ３７Ｆ－ｒ（配列番号：１３８）

ＣＣＧＧＧＣＡＴＣＴＧＧＣＧＧＡＡＣＣＡＧＴＴＧＡＴＣＣＡＧＴＡＡ

２箇所目の変異導入の為のＰＣＲプライマー

Ｇ４４Ｅ－ｆ（配列番号：１３９）

ＣＡＧＡＴＧＣＣＣＧＧＣＡＡＡＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＧＧＡＴＧＧＧＧ

Ｇ４４Ｅ－ｒ（配列番号：１４０）

ＣＣＣＣＡＴＣＣＡＴＴＣＣＡＧＴＴＣＴＴＴＧＣＣＧＧＧＣＡＴＣＴＧ

３箇所目の変異導入の為のＰＣＲプライマー

Ｌ４５Ｆ－ｆ（配列番号：１４１）

ＧＣＣＣＧＧＣＡＡＡＧＡＡＡＧＧＧＡＡＴＧＧＡＴＧＧＧＧＡＴＧ

Ｌ４５Ｆ－ｒ（配列番号：１４２）

ＣＡＴＣＣＣＣＡＴＣＣＡＴＴＣＣＣＴＴＴＣＴＴＴＧＣＣＧＧＧＣ

変異導入はシークエンスにて確認する。形質転換以降タンパク質発現までは実施例３１と同様の手段にて行う。約２５ｋＤａの単量体タンパク質のピークを用いて以下の評価を行う。

【０１５６】

実施例３４（ＳＰＲ測定による金結合性評価）

実施例３３で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例３３で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１と土曜とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２１）

実施例３５（ＶＨｇ－ＨＥＬｓｃＦｖタンパク変異体作製）

実施例３１のＨＥＬ結合性ＶＨの代わりにＨＥＬ結合性ｓｃＦｖ（配列番号：１４３、１４４）融合したタンパク質となるように置換する。ＨＥＬ結合性ｓｃＦｖは、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２００３、２７９、ｐｐ８９７９に示されたＨＥＬ結合ｓｃＦｖコード遺伝子を導入されたプラスミドを鋳型にＰＣ

ＲにてＨＥＬ結合性ｓｃＦｖをコードするＤＮＡ断片を得る。ＰＣＲは前述の方法と同様、当業者の推奨方法により、以下のプライマーを使用する。
ｓｃＦｖ－ｆ（配列番号：１４５）
ＮＮＮＮＣＣＡＴＧＣＣＣＧＡＴＡＴＣＧＴＣＣＴＧＡＣＣＣＡＧ
ｓｃＦｖ－ｒ（配列番号：１４６）
ＡＧＣＴＡＣＣＧＣＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＧＡＧＧＧＴ
制限酵素反応以降は実施例３０と同様な手法により目的のプラスミドを得る。得られるプラスミドをシークエンスにより、目的とした遺伝子配列であることを確認する。また、形質転換以降タンパク質発現までは実施例３１と同様の手段にて行う。約３９ｋＤａの単量体タンパク質を得る。

【０１５７】

実施例３６（ＳＰＲ測定による金及びＨＥＬに対する二重結合性評価）
実施例３５で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例３１で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１及び２２と同様とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２２）
実施例３７（VHg変異体－VLh発現プラスミド作製）
実施例１９で得られる発現用プラスミド（ｐGHEL）の金結合性VHコード配列に配列番号：で示されるＤＮＡ配列を挿入する。挿入方法は、前記ｐＧＨＥＬを鋳型として、上述のＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）を用いて行う。得られるプラスミドが目的の配列であることを確認する。次いで、得られるプラスミドを用いて実施例２０と同様にしてタンパク質を発現精製、及びＶＨｈ－ＶＬｇとニ量化を行う。
Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ７５を用いて、分子量約５０ｋＤａのタンパク画分を分画する。（図２３）
Ａ１４Ｐ－ｆ（配列番号：１４７）
ＧＡＧＣＡＧＡＧＧＴＧＡＡＡＡＡＧＣＣＡＧＧＧＧＡＧＴＣＴＣＴＧＡＡＧ
Ａ１４Ｐ－ｒ（配列番号：１４８）
ＣＴＴＣＡＧＡＧＡＣＴＣＣＣＣＴＧＧＣＴＴＴＴＴＣＡＣＣＴＣＴＧＣＴＣ
実施例３８（ＳＰＲによる金及びＨＥＬの二重結合性評価）
実施例３７で得られるタンパク質画分の金に対する結合性をＳＰＲにて測定する。ＳＰＲ測定装置として、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ社製）を使用し、被結合物の金基板としては同社のＳＩＡ－ｋｉｔ　Ａｕの金蒸着ガラス基板を使用した。以下の条件において測定を行う。サンプルとして、実施例３７で得られるタンパク質画分　５００ｎＭ（前記と同様にして、吸光度より算出）を使用する。実施条件は実施例２１と同様とする。金に対する結合性を示すが結合カーブを得る。（図２４）
実施例３９（ＶＨｇ－ＶＨｇタンパク質発現プラスミドの作製）
実施例３０のＶＨｈの代わりにＶＨｇをコードするＤＮＡ断片を用いる以外は同じ方法により実施例３０とどうような方法によりｐＰＣＩＺ－αＶＨｇ2を作製する。上記で使用するＶＨｇをコードするＤＮＡ断片を作製するための鋳型としては実施例１０で得るｐＲＡ２－７ｓ４を用い、プライマーとしては
ＶＨｇ－ｆ（配列番号：１４９）
ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣ　ＧＧＣＧＧＧＧＧＣＧＧＴＡＧＣ　ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ
ＶＨｇ－ｒ（配列番号：１５０）
ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴ
を用いる。目的のプラスミドであることをシークエンスにて確認する。

【０１５８】

実施例４０（ＶＨｇ－ＶＬｇタンパクの作製）

実施例３１と同様の手法により目的タンパク質を精製する。分子量約２５ｋＤａのＶＨｇ－ＶＨｇの２量体からなるタンパク質を精製する。（図２５）
実施例４１（ＶＨｇ－ＶＬｇ４量体タンパク質発現プラスミドの作製）
実施例３９のＶＨｇ－ＶＨｇをつなぐリンカーＧＧＧＧＳをＧＳと変更した以外は同じ方法により実施例３０とどうような方法によりｐＰＣＩＺ－αＶＨｇ4を作製する。上記で使用するＶＨｇをコードするＤＮＡ断片を作製するための鋳型としては実施例１０で得られるｐＲＡ２－7ｓ4を用い、プライマーとしては
ＶＨｇ４－ｆ（配列番号：１５１）
ＮＮＮＮＮＧＣＴＡＧＣ　ＧＧＣＡＧＣ　ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣＴ
ＶＨｇ４－ｒ（配列番号：１５２）
ＮＮＮＮＮＣＣＧＣＧＧＡＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＴ
を用いる。目的のプラスミドであることをシークエンスにて確認する。
【０１５９】
実施例４２（金微粒子凝集反応）
実施例４０、４４で得られるタンパク質のそれぞれ５００μＭ／ＰＢＳＴ溶液を金微粒子（２０ｎｍφ：田中貴金属社製）を室温にてインキュベートする。いずれのタンパク質を用いた場合においても、金微粒子が凝集することが観察される。また、金微粒子／タンパク質混合溶液のスペクトル（λｍａｘ）が経時的に変化し、半値幅も拡大することが観察され、金微粒子間の距離が近接していることを示唆する結果を得る（図２６）。
（比較例２）
実施例３６において、５００ｎＭ HELの代わりに５００ｎＭ BSAとした以外は同じとする。BSAの結合は確認できない。実施例３５で得られる金基板上に結合するタンパク質はHELを特異的な結合することが示される。（図２７）
（比較例３）
抗HEL抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ社製）を用いて金基板上に直接固定化された抗体の結合能評価をSPR測定により行う。
（１）１０μＭ 抗ＨＥＬ抗体／ＰＢＳ溶液を作製する。
（２）（１）で得られる抗体溶液を１μＬ／ｍｉｎにて１００μＬインジェクションする。吸着した抗体分子のシグナルは１９０７Ｒ．Ｕである。
（３）続いて、１％カゼイン／ＰＢＳ溶液を（２）と同様な条件にてインジェクションする。
（４）更に、１％カゼイン／ＰＢＳ溶液 ４０μＬを２０μＬ／ｍｉｎにてインジョクションを行い、金基板上がブロッキングされていることを確認する。
（５）次いで、１μＭ ＨＥＬ ４０μＬを２０μＬ／ｍｉｎにてインジョクションを行い、図２８の結果を得る。
【０１６０】
その結果、金基板に固定された抗体分子は１９０７Ｒ．Ｕに対して結合したＨＥＬ分子は１１Ｒ．Ｕである。固定時の空間配置を考慮し、仮に抗体一分子が一つの抗原を基板上に固定されたと考えると抗体の約６％が標的物質を捕捉した計算となる。
一方で、上記実施例で示される本発明は基板上に固定されるタンパク質の約２０～４０％以上が標的物質を捕捉することが示される。
更には、センサの捕捉分子となるタンパク質を固定する条件においても、溶液濃度／固定時間においても本発明の実施例は何ら特殊な化学物質や工程を行うことなく、従来既知の物理吸着法に比べ、優れた基板固定方法であることが示唆される結果を得る。
【産業上の利用可能性】
【０１６１】
本発明は、金に対する結合部位を一以上有し、且つ特定の物質に対する結合部位を有する金結合性タンパク質、及び前記金結合性タンパク質を固定化した金基板を含む構造体及びそれを利用した検出装置を提供する。本発明を適用することで得られる金結合性タンパク質を固定化した構造体からなる検出装置では、基板となる金を特異的に認識する結合部

位することにより固定化されている為、前記タンパク質が有する他方の特定の物質（標的物質）を認識する結合部位が基板に固定化されることもなく、基板から間隔を確保して配向される。それにより、標的物質結合部位が基板からの結合能に対する影響を最小限に抑え、効率的かつ高配向に基板表面上に固定されたものとなる。

【０１６２】

つまり、本発明は、生体物質などの有機物を基体表面に固定化して、該有機物の有する種々の生理的機能を利用する、バイオセンサーやバイオリアクタを初めとする、各種の生体物質の機能を応用する製品の高性能化に利用可能であることが示唆される。

【０１６３】

一方、本発明は、標的物質を標識する接続部材であって、標的物質を結合する部位と前記標識物質を結合する部位をそれぞれ一以上有し、上記のそれぞれの結合部位は互いに独立して被結合物質と結合することを特徴とする接続部材を提供する。本発明を適用することで得られる従来の化学的な架橋法に行うことなく、目的のタンパク質を標識することが可能となる。これにより、標識に際して問題であった標的物質に対する種々のタンパク質の結合能に対する影響を最小限に抑え、製造効率的を向上させることが可能である。つまり、本発明は、生体物質などの接続部材を基体表面に固定化して、該接続部材の有する種々の生理的機能を利用する、バイオセンサー等の各種の生体物質の機能を応用する製品の高性能化に利用可能であることが示唆される。

【図面の簡単な説明】

【０１６４】

【図１】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図２】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図３】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図４】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図５】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図６】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図７】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図８】本発明にかかる複合タンパク質の一例における、構造体の構成を模式的に示す図である。

【図９】本発明で得られるＶＬのＳＰＲ評価の一例を示す図である。

【図１０】本発明で得られるＶＨのＳＰＲ評価の一例を示す図である。

【図１１】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。

【図１２】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。

【図１３】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。

【図１４】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。

【図１５】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。

【図１６】本発明の実施例を説明する為のベクター模式図である。

【図１７】本発明で得られるｓｃＦｖのＳＰＲ評価の一例を示す図である。

【図１８】実施例２１におけるＳＰＲチャートである。

【図１９】実施例３１におけるＧＰＣチャートである。

【図２０】実施例３２におけるＳＰＲチャートである。

【図２１】実施例３４におけるＳＰＲチャートである。

【図２２】実施例３６におけるＳＰＲチャートである。

【図２３】実施例３７におけるＧＰＣチャートである。
【図２４】実施例３８におけるＳＰＲチャートである。
【図２５】実施例４０におけるＧＰＣチャートである。
【図２６】実施例４２における含金微粒子溶液吸光曲線である。
【図２７】比較例２におけるＳＰＲチャートである。
【図２８】比較例３におけるＳＰＲチャートである。

フロントページの続き

(72)発明者　熊谷　泉
宮城県仙台市青葉区川内元支倉３５番地　川内住宅９－３０７

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 BA41 CA04 CA20 DA06 EA04 GA14
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 CE02 CE12 DA13
4H045 AA11 BA63 DA76 EA50 FA82 GA15 GA26