

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3676978号

(P3676978)

(45) 発行日 平成17年7月27日(2005.7.27)

(24) 登録日 平成17年5月13日(2005.5.13)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 0 7 K 1/22
C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/37
C 1 2 Q 1/68
G O 1 N 33/53

C O 7 K 1/22
C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/37
C 1 2 Q 1/68
G O 1 N 33/53

Z
D

請求項の数 16 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-565150 (P2000-565150)
(86) (22) 出願日 平成11年8月17日 (1999.8.17)
(65) 公表番号 特表2002-522085 (P2002-522085A)
(43) 公表日 平成14年7月23日 (2002.7.23)
(86) 国際出願番号 PCT/EP1999/006022
(87) 国際公開番号 W02000/009716
(87) 国際公開日 平成12年2月24日 (2000.2.24)
審査請求日 平成13年5月2日 (2001.5.2)
(31) 優先権主張番号 98115448.7
(32) 優先日 平成10年8月17日 (1998.8.17)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500262197
ユーロペーイシェ ラボラトリウム フュ
ール モレキュラーバイオロジー (イーエ
ムビーエル)
ドイツ連邦共和国 デー - 6 9 1 1 7 ハ
イデルベルク、メイヤーホフシュトラーセ
1
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(72) 発明者 セラフィン、バートランド
ドイツ連邦共和国 デー - 6 9 1 6 8
ヴィエスロッホ、バーグンダーヴェグ 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質および／または生体分子もしくはタンパク質複合体の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体分子複合体を精製するための方法であり、

(a) 生体分子複合体の 1 以上のサブユニットをコードする、1 以上の異種核酸を含む発現環境を提供するステップであって、該サブユニットが少なくとも 2 つの異なるアフィニティータグに融合し、かつ、そのうち 1 つはブドウ球菌 (Staphylococcus) プロテイン A の 1 以上の IgG 結合ドメインからなる、前記ステップ、

(b) アフィニティータグとの融合タンパク質として、1 以上の天然形態のサブユニットの発現を促進する条件下、および 1 以上のサブユニットと、1 以上のサブユニットと複合体を形成することのできる可能な他の成分との複合体の形成を可能にする条件下で、該発現環境を維持するステップ、

(c) 少なくとも 2 つの異なるアフィニティー精製段階を組み合わせることにより、1 以上のサブユニットを精製するステップであって、1 以上のサブユニットを、アフィニティータグの 1 つに選択的に結合することができる支持材に 1 つの該アフィニティータグを介して結合させ、支持材に結合していない物質を除去した後、1 以上のサブユニットを支持材から分離することを含む、前記ステップ、
を含んでなる前記方法。

【請求項 2】

生体分子複合体を検出するための方法であり、

(a) 生体分子複合体の 1 以上のサブユニットをコードする、1 以上の異種核酸を含む

10

20

発現環境を提供するステップであって、該サブユニットが少なくとも2つの異なるアフィニティータグに融合し、かつ、そのうち1つはブドウ球菌（Staphylococcus）プロテインAの1以上のIgG結合ドメインからなる、前記ステップ、

(b) アフィニティータグとの融合タンパク質として、1以上の天然形態のサブユニットの発現を促進する条件下、および1以上のサブユニットと、1以上のサブユニットと複合体を形成することのできる可能な他の成分との複合体の形成を可能にする条件下で、該発現環境を維持するステップ、

(c) 少なくとも2つの異なるアフィニティー精製段階を組み合わせることにより、1以上のサブユニットを精製するステップであって、1以上のサブユニットを、アフィニティータグの1つに選択的に結合することができる支持材に1つの該アフィニティータグを介して結合させ、支持材に結合していない物質を除去した後、1以上のサブユニットを支持材から分離することを含む、前記ステップ、

(d) 1以上のサブユニットを検出するステップ、
を含んでなる前記方法。

【請求項3】

生体分子複合体を精製するための方法であり、

(a) 生体分子複合体の少なくとも2のサブユニットをコードする、1以上の異種核酸を含む発現環境を提供するステップであって、各サブユニットが少なくとも1つの異なるアフィニティータグに融合し、かつ、そのうち1つはブドウ球菌（Staphylococcus）プロテインAの1以上のIgG結合ドメインからなる、前記ステップ、

(b) アフィニティータグとの融合タンパク質として、2以上の天然形態のサブユニットの発現を促進する条件下、および2以上のサブユニットと、2以上のサブユニットと複合体を形成することのできる可能な他の成分との複合体の形成を可能にする条件下で、該発現環境を維持するステップ、

(c) 少なくとも2つの異なるアフィニティー精製段階を組み合わせることにより、該複合体を精製するステップであって、2以上のサブユニットを、アフィニティータグの1つに選択的に結合することができる支持材に1つの該アフィニティータグを介して結合させ、支持材に結合していない物質を除去した後、該複合体を支持材から分離することを含む、前記ステップ、
を含んでなる前記方法。

【請求項4】

生体分子複合体を検出するための方法であり、

(a) 生体分子複合体の少なくとも2のサブユニットをコードする、1以上の異種核酸を含む発現環境を提供するステップであって、各サブユニットが少なくとも1つの異なるアフィニティータグに融合し、かつ、そのうち1つはブドウ球菌（Staphylococcus）プロテインAの1以上のIgG結合ドメインからなる、前記ステップ、

(b) アフィニティータグとの融合タンパク質として、2以上の天然形態のサブユニットの発現を促進する条件下、および2以上のサブユニットと、2以上のサブユニットと複合体を形成することのできる可能な他の成分との複合体の形成を可能にする条件下で、該発現環境を維持するステップ、

(c) 少なくとも2つの異なるアフィニティー精製段階を組み合わせることにより、該複合体を精製するステップであって、2以上のサブユニットを、アフィニティータグの1つに選択的に結合することができる支持材に1つの該アフィニティータグを介して結合させ、支持材に結合していない物質を除去した後、該複合体を支持材から分離することを含む、前記ステップ、

(d) 2以上のサブユニットを検出するステップ、
を含んでなる前記方法。

【請求項5】

生体分子複合体が、タンパク質、ペプチド、ポリペプチドおよび／または核酸を含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6】

特異的タンパク質分解性切断部位が、1以上の融合タンパク質中、1以上のサブユニットと1つ以上のアフィニティータグとの間に存在し、該切断部位が1つ以上のアフィニティータグの除去を促進する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

特異的タンパク質分解性切断部位が酵素切断部位である、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

特異的タンパク質分解性切断部位がTEVプロテアーゼNIAの切断部位である、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

タンパク質分解性切断部位を用いて、ステップ(c)の1以上のサブユニットを、支持材に結合しているブドウ球菌 (Staphylococcus) プロテインAのIgG結合ドメインから切断する、請求項6、7または8記載の方法。

【請求項 10】

ステップ(c)のアフィニティー精製が、

(i) 1以上のサブユニットを、ブドウ球菌 (Staphylococcus) の1つ以上のIgG結合ドメインを介してこのIgG結合ドメインと特異的に結合することができる支持材に結合させ、支持材に結合していない物質を除去し、そして1以上のサブユニットを、特異的タンパク質分解性切断部位を介してIgG結合ドメインを切除することにより支持材から分離すること、ならびに

(ii) サブユニットを、他のアフィニティータグを介してこのアフィニティータグと特異的に結合することができる第2の支持材に結合させ、支持材に結合していない物質を除去し、サブユニットを支持材から分離すること、を含んでなる、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

ステップ(ii)がステップ(i)の前に行なわれる、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

1以上の融合タンパク質が、その他の1つ以上のアフィニティータグを除去するための第2の特異的タンパク質分解性切断部位を含む、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項 13】

アフィニティータグのうち1つが、少なくとも1つのカルモジュリン結合ペプチドからなる、請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

【請求項 14】

化学試薬を用いて、1以上のサブユニットを支持材から分離する、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

ステップ(d)の検出がポリアクリルアミドゲル電気泳動により行われる、請求項2または4記載の方法。

【請求項 16】

1以上の融合タンパク質と複合体を形成することができる物質を検出および／または精製するための、請求項1～15のいずれか1項記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は生体分子、タンパク質、タンパク質および／または生体分子複合体、生体分子複合体のサブユニット、細胞成分、細胞小器官、更には細胞全体などの物質を精製するための方法に関する。本発明はまた、該方法に用いる融合タンパク質および関連するその他の対象物に関する。

【0002】

タンパク質の発現および精製方法は、目的のタンパク質の構造、活性、他のタンパク質と

10

20

30

40

50

の相互作用、核酸などを研究するためには不可欠である。現在のところ利用できる方法は、発現ベクターを用いてトランスフェクトされた、あるいはバキュロウイルスにより感染させた、細胞または細菌などの系を利用する。

【0003】

個々のタンパク質を研究するためには、まず、活性試験、相互作用アッセイ、構造決定などの生物学および生化学的分析を行う、十分な量の特定タンパク質を得ることが必要である。そのために、目的のタンパク質をコードする遺伝子を、それらのタンパク質を適切な宿主細胞で発現させるベクターにクローニングする。通常、タンパク質は高レベルで発現する。この過剰発現により大量のタンパク質が生成されるが、細胞内のいわゆる封入体に存在する不溶性タンパク質を生じさせるという欠点をしばしば有している。そこで、過剰発現されたタンパク質は分析前に再溶解しなくてはならない。そのような方法は、発現されたタンパク質の重量分析に基づく従来のタンパク質検出方法（ポリアクリルアミドゲル、ウェスタンブロット法など）には功を奏するが、その他の研究およびタンパク質複合体についてのアッセイには適していない。タンパク質を過剰発現させるのに現在用いられているプロトコルは、例えば真核生物のタンパク質が細菌において発現される場合のように、目的のタンパク質が通常は発現されない宿主細胞で普通行われる。不溶性であること以外にも、この方法で発現するタンパク質は、正しいプロセッシングやグリコシル化などの転写後または翻訳後の適正な修飾の欠如をしばしば示す。

10

【0004】

その他の欠点は、複合体の1サブユニットの発現は、相同系の場合でさえ、すべての複合体成分の生産を増加させることにはならず、極端な場合では、その目的のタンパク質を異常な複合体に誤ってターゲティングするという結果にすらなることがある（例えば the proteasome, Swafieldら, 1996, Nature 379, 658参照）。

20

【0005】

従って基礎レベルで発現したタンパク質の精製が、多くの場合必須であるが、適切なプロトコルの確立には膨大な生化学的知識が必要であるため、適する精製プロトコルは容易には得ることができない。精製スキームの開発は、標的タンパク質の化学的／物理的性質を試行錯誤法により評価しなくてはならず、そのような分析をそれぞれのタンパク質について繰り返しおこなわなくてはならないため、煩雑で時間のかかるものとなっている。

【0006】

タンパク質の精製については、アフィニティー精製法が知られている。アフィニティークロマトグラフィー用のキットおよび装置は市販されている。通常、目的とするポリペプチドの融合タンパク質およびアフィニティータグを、上述した発現系などのいずれかの系で発現させ、融合タンパク質を抽出して、そしてそれを、アフィニティータグに特異的に結合する物質でコーティングされている、アフィニティークラムに充填された樹脂マトリックスなどの支持材に適用する。標的タンパク質がアフィニティータグを介してマトリックスに結合した後、結合していない物質はマトリックスを洗浄するだけで除去できる。その後、融合タンパク質を、化学試薬または特定の温度やpH条件を利用してマトリックスから溶離しうる。通常アフィニティータグは高親和力で結合するため、次に溶離をおこなうためには、強力な条件が必要であるが、それは目的のタンパク質をしばしば破壊、損傷、変性しうる。

30

40

【0007】

アフィニティータグは、特異的な結合パートナーに高親和力で結合しうる基または部分を有する。さまざまなアフィニティータグが当業界で知られており、タンパク質の精製に広く使用されている。例えば、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来プロテインAのIgG結合ドメイン、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、セルロース結合ドメイン、ポリアルギニン、ポリシステイン、ポリヒスチジン、ポリフェニルアラニン、カルモジュリンまたはカルモジュリン結合ドメインなどが挙げられる。これらは、特異的な結合パートナーにより被覆された、適切なマトリックスに高親和力で結合する。プロテインAの場合、IgGでコーティングされたセファロースが、プロテイン

50

Aドメインを有する融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーに用いられている(Sengerら, 1998, EMBO J., Vol. 17, 2196-2207)。その他の例は、Sassenfeld, TIBTECH, 1990, p.88で検討されている。カルモジュリン結合ペプチドをコードするカセットを含むプラスミドベクターは、Stratagene社から入手できる。

【0008】

通常、融合タンパク質はただ1つのアフィニータグで標識されて、1つの精製ステップで精製される。これはしばしば、残留する不純物のために問題を引き起こす。ほとんどの従来方法が持つその他の制限は、細菌中のタンパク質発現にしか適していないことである。W096/40943は、膜に固定されるかまたは分泌された形態で、グラム陽性菌において、融合タンパク質を発現させる方法を開示している。固定されたタンパク質は、TEVプロテ

10

【0009】

しばしばアフィニータグは、アフィニティー精製ステップの後、TEVプロテアーゼなどの特定のプロテアーゼの作用により融合タンパク質から除去される。しかしながら、このことは、精製された画分が実質的な量の該プロテアーゼを含有し(Sengerら、1998)、このプロテアーゼによってタンパク質調製物の用途が非常に制限されることを意味している。そこで本発明の目的は、現在知られている方法の欠点をなくして、融合タンパク質としてアフィニティー標識された標的タンパク質だけでなく、これらのタンパク質と結合可能なその他の物質も効率的に精製できる、タンパク質および／または生体分子もしくはタ

20

【0010】

本発明によると、タンパク質、生体分子、タンパク質または生体分子の複合体、そのサブユニット、細胞成分、細胞小器官、および細胞全体から選択される物質を精製する1つの方法は、以下のステップ：

(a) 1つ以上のポリペプチドおよび／または1つ以上の生体分子複合体のサブユニットをコードする1つ以上の異種核酸を含む発現環境を提供するステップであって、該ポリペプチドおよび／または該サブユニットが少なくとも2種類の異なるアフィニータグに融合し、かつそのうち1つはブドウ球菌(Staphylococcus)プロテインAの1つ以上のIgG

30

結合ドメインからなる、前記ステップ、

(b) アフィニータグの融合タンパク質として、1つ以上の天然形態のポリペプチドまたはサブユニットの発現を促進する条件下で発現環境を維持するステップ、

(c) 少なくとも2種類の異なるアフィニティー精製段階を組み合わせることにより、1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットを検出および／または精製するステップであって、該精製段階の各々が、1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットを、アフィニータグの1つと選択的に結合することができる支持材に1つのアフィニータグを介して結合させ、支持材に結合していない物質を除去した後、1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットを支持材から分離することを含む、前記ステップ、

40

【0011】

タンパク質または生体分子の複合体を検出および／または精製するのに特に適した、本発明の他の方法は、以下のステップ：

(a) 少なくとも2つの生体分子複合体のサブユニットをコードする1つ以上の異種核酸を含む発現環境を提供するステップであって、該サブユニットの各々が、異なるアフィニータグの少なくとも1つに融合し、かつそのうち1つはブドウ球菌(Staphylococcus)プロテインAの1つ以上のIgG結合ドメインからなる、前記ステップ、

(b) アフィニータグとの融合タンパク質として、1つ以上の天然形態のサブユニットの発現を促進する条件下、および1つ以上のサブユニットと、1つ以上のサブユニットと複合体を形成することのできる可能な他の成分との複合体の形成を可能にする条件下で

50

、該発現環境を維持するステップ、

(c) 少なくとも2種類の異なるアフィニティー精製段階を組み合わせることにより、複合体を検出および／または精製するステップであって、該精製段階の各々が、1つ以上のサブユニットを、アフィニティータグの1つと選択的に結合することができる支持材に1つのアフィニティータグを介して結合させ、支持材に結合していない物質を除去した後、複合体を支持材から分離することを含む、前記ステップ、
を含んでなる。

【0012】

本発明の目的においては、生体分子はタンパク質、ペプチド、または核酸もしくはその他の生体分子であってもよい。生体分子複合体とは、少なくとも2つの生体分子、好ましくは、他のタンパク質と結合した少なくとも1つのタンパク質（そのためサブユニットと呼ばれる）、またはその他の物質（例えば核酸であってもよい）と結合した少なくとも1つのタンパク質を意味する。生体分子複合体は、核内snRNPまたは抗原／抗体複合体などの天然のものであってもよいし、あるいは突然変異標的DNAに結合した突然変異DNA結合タンパク質などの人工的なものであってもよい。本発明により発現したポリペプチドまたはサブユニットを1つ以上のサブユニットとして含み、および／またはアフィニティーステップにより解離されないように充分安定的に結合したその他の成分を更に含む複合体分子はいずれも、本発明の方法により検出および／または精製されうる生体分子複合体である。タンパク質複合体とは、通常、タンパク質サブユニット同士の複合体を意味する。

【0013】

精製しようとするタンパク質の核酸配列は、適切な宿主細胞または無細胞発現系で発現を駆動するのに適した核酸にクローニングできるように、既知のものであるか、少なくとも入手可能なものでなくてはならない。タンパク質複合体を精製しようとする場合、そのサブユニットの少なくとも1つの核酸配列が既知であるか、または入手可能なものでなくてはならない。

【0014】

従って本発明により精製しようとするタンパク質の発現を駆動する異種核酸は、選択された宿主細胞または無細胞系でそれを保持することを可能にする適切な配列（プロモーターおよび、必要であれば、エンハンサーやポリA部位などのその他の制御配列など）を含む。

【0015】

原則的には、ポリペプチドまたはサブユニットを発現する異種の核酸と適合する宿主細胞であれば、発現環境として適している。これらの細胞は、細菌などの原核細胞であってもよく、あるいは酵母、菌類または哺乳動物細胞などの真核細胞であってもよい。好ましくは、精製しようとするタンパク質もしくはサブユニットまたはタンパク質複合体を、上記天然宿主で発現させる。この方法は大変効率的であるので、タンパク質は基礎レベルで好ましく発現される。これは、封入体形成を回避し、また特定のタンパク質の多くが有すると思われる、細胞に及ぼす毒作用の危険性を減少させるという利点を持っている。更に、これは複合体に会合していないか、または異常な複合体に会合した余分なタンパク質サブユニットの精製を回避する（上記参照）。

【0016】

融合タンパク質をコードする異種核酸を選択された宿主細胞に導入した後、該細胞を融合タンパク質の発現を可能にする条件下で培養する。

【0017】

すでに記載したように、転写制御配列は、細胞中で融合タンパク質が過剰に発現されるのではなく、基礎レベルで発現されるように選択するのが好ましい。これは、タンパク質が天然の形で発現されることを確実にする。天然の形とは、本明細書においては、天然の正しいタンパク質3次構造またはそれに比較的近い構造をしている、つまりタンパク質が適正にフォールディングされていることを意味する。更に好ましくは、タンパク質はまた適正にプロセッシングされ、通常の転写後および翻訳後の修飾を示すであろう。適正なフォー

10

20

30

40

50

ルディングは、発現したポリペプチドがタンパク質複合体のサブユニットである場合は特に重要である。なぜなら、それは天然の形で存在する場合にのみ、複合体の他のサブユニットに結合するためである。しかしながら、突然変異のタンパク質を発現することも可能である。これらも天然の立体構造を有しうる。そのような突然変異サブユニットは、例えば、突然変異複合体（すなわち、その他いくつかの突然変異したサブユニットを含む複合体）を精製するために用いうる。

【0018】

精製しようとするタンパク質またはサブユニットに応じて、融合タンパク質は細胞内で発現されるか、または培養培地に分泌される。あるいは、それは、膜など他の細胞コンパートメントにターゲティングされるかもしれない。タンパク質に応じて、適切な方法を用いて融合タンパク質を細胞および／または培地から抽出する。細胞小器官の膜や細胞膜などの細胞小器官の特定の細胞下位置にターゲティングされた融合タンパク質が発現される場合、これらの小器官または細胞そのものが、これらの膜タンパク質の結合を介して精製されうる。細胞や細胞小器官を、本発明の融合タンパク質に結合する、それらの表面上で天然に発現されたタンパク質を介して精製することも可能である。

10

【0019】

更に、生体分子またはタンパク質の複合体／サブユニット、または本発明により生成される融合タンパク質と結合するかまたは複合体を形成することのできるその他の物質を精製しうる。これらの物質は、直接またはリンカーメディエーターを介して融合タンパク質に結合しうる。本明細書において、リンカーメディエーターとは、2つ以上の生体分子が、互いに直接結合しなくても、複合体の一部となるように結合できれば、どのようなものであってもよい。

20

【0020】

本発明によると、ポリペプチドまたはサブユニットの発現に、無細胞系を用いることもできる。これらは、転写因子、酵素、リボソームなど、核酸からタンパク質の発現を引き起こすのに必要なすべての成分を提供しなくてはならない。in vitroでの転写および翻訳系はキットとして市販されており、これらの系について詳細に記載する必要はない（例えば、翻訳用のウサギ網状赤血球溶解物系など）。無細胞系またはin vitro系は、複合体形成も可能でなくてはならない。

【0021】

本発明によると、精製については、特定の精製段階で用いられるアフィニティータグの適切な結合パートナーによりコーティングされたマトリックスを含むアフィニティークラムで、アフィニティークロマトグラフィーを行うことが好ましい。

30

【0022】

本発明の方法によると、2つのアフィニティー段階を行う。基本的には、各アフィニティー段階は、予め抽出されたタンパク質を、そのアフィニティータグの1つを介して、該アフィニティータグの適切な結合パートナーにより被覆された支持材に結合するという結合することを含む。その後、結合していない物質は除去され、最終的には精製すべきタンパク質を支持材から回収する。これは、2つの方法で行われうる。第1の可能性は、用いるタグに応じて例えばpH、塩またはバッファー濃度を变化させるなどの従来の溶離技術を単に利用することである。第2の可能性は、支持材に結合しているアフィニティータグを、タンパク質分解的に切除することによって、精製すべきタンパク質を支持材から放出させることである。このようにして、タンパク質を末端切断融合タンパク質の形で、またはすべてのアフィニティータグが切除された場合は、標的ポリペプチドまたはサブユニットそのものとして回収しうる。

40

【0023】

本発明の1実施形態によると、1つのポリペプチドと2種類の異なるアフィニティータグとの融合タンパク質が発現され、このタグのうち1つは、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来プロテインAのIgG結合ドメインを1つ以上含む。

【0024】

50

より好ましくは、特異的なタンパク質分解性切断部位が、融合タンパク質において1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットと1つ以上のアフィニティータグとの間に存在し、その結果タンパク質分解性切断によりアフィニティータグの少なくとも1つ、特にプロテインAのIgG結合ドメインを除去できる。

【0025】

タンパク質分解性切断は、化学的方法によりまたは酵素を用いて実行しうる。

【0026】

アフィニティータグの1つを切り出すのに用いられる、タンパク質分解性切断部位は、好ましくは酵素切断部位である。数個のプロテアーゼがあり、それは切断する短いアミノ酸配列に対して非常に特異的である。これらのうちの1つは、タバコエッチ病ウイルス (To 10
bacco Etch Virus; TEV) の特異的切断部位であり、それはTEVプロテアーゼNIAにより切断される。組換え型TEVプロテアーゼはGibco BRL社から入手できる。好ましくは、TEV切断部位を切断部位として用いて、融合タンパク質からプロテインAドメインを除去する。

【0027】

更により好ましくは、IgGに結合するプロテインAを用いたアフィニティーステップは、まず、1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットを、ブドウ球菌 (Staphylococcus) 由来の1つ以上のIgG結合ドメインを介してこのIgG結合ドメインと特異的に結合することができる支持材に結合し、支持材に結合していない物質を除去し、そしてIgG結合ドメインを特異的タンパク質分解性切断部位を介して切除することにより、1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットを支持材から分離すること、により行う。次に他のアフィニティータ 20
グを用いて、更に従来の溶離ステップを介してタンパク質を精製する。該ステップは、ポリペプチドまたはサブユニットを、他のアフィニティータグを介してこのアフィニティータグと特異的に結合することができる第2の支持材に結合させ、支持材に結合していない物質を除去して、ポリペプチドまたはサブユニットを支持材から分離することを含む。

【0028】

タンパク質が、発現環境および支持材に低濃度で存在している場合、結合した物質を支持材から放出させるには、大量のプロテアーゼが必要である。すなわち、基質濃度が低い場合、効率的なタンパク質分解反応を引き起こすには高レベルの酵素が必要である。そのため第2精製ステップは、残存する挟雑物およびプロテアーゼを除去するのに重要である。プロテアーゼの除去により、好ましくはタンパク質分解活性が調製物に及ぼすマイナスの 30
影響が取り除かれる。

【0029】

しかしながら、いくつかの場合においては、アフィニティータグを全て除去することが望ましく、その場合、目的のポリペプチド／サブユニットを支持材から分離するために、2つ以上の異なるタンパク質分解性切断部位を利用することも可能である。

【0030】

本発明による方法により、目的のタンパク質の効率的な精製が促進されるだけでなく、例えばリンカーメディエーターのような分子の複合体 (ポリペプチドまたはサブユニットが直接的／間接的に結合しているか、または複合体を形成している) に存在する成分を探して検出することもできる。これにより、複合体混合物からでも潜在的に薬剤となる可能性 40
がある特定の物質を選択的に捕捉できるようになるであろう。

【0031】

本発明の第2実施形態によると、発現した融合タンパク質を含むサブユニットだけでなく、発現したタンパク質と直接的に結合する、すなわち、融合タンパク質と直接結合するか、または生体分子複合体を形成するために、他の分子を介して間接的に結合できるその他の物質も検出／精製しうる。生体分子またはタンパク質複合体のサブユニットの融合タンパク質を本発明に従って精製する場合、融合タンパク質に結合している他の複合体成分が、精製ステップの後でもなおサブユニットと結合し、それらも同様に検出／精製できるように、アフィニティーステップが選択される。

【0032】

生体分子複合体は、細胞複合体などの発現環境で形成されうる。あるいは、他の複合体成分を、*in vitro*で複合体を形成させるために、すでに発現されているサブユニットに添加してもよいし、または融合タンパク質を含むサブユニットが、アフィニティーステップで支持材にすでに結合している場合に添加してもよい。

【0033】

同じ複合体の2つ（またはそれ以上）のサブユニットを、それぞれ融合タンパク質として、異なるアフィニティータグを用いて発現させることもできる。サブユニットが結合している場合、それらは一連のアフィニティーステージ（それぞれの段階で複合体は異なるタグで標識されたサブユニットを介して結合する）により、その他の複合体成分とおそらく一緒に検出／精製されうる。2つ以上のアフィニティータグは、複合体の1つのサブユニット

10

【0034】

精製ステップは、上記のように行いうる。

【0035】

いくつかのポリペプチドは、1つ以上の複合体に存在し、全ての複合体の成分が精製されうる。

【0036】

単一の複合体Aが目的の場合は、Aのサブユニットも1つ含有している他の複合体Bを、そのAのサブユニットを1つのタグと融合させ、またBに特異なサブユニットを異なるタグと融合させることにより取り去ることもできる。タグ標識されたBのサブユニットは、特定の支持材に結合する。その支持材に結合していない画分を第2アフィニティーステップで用いると、複合体Bは第1アフィニティーステージで除去（取り去る）されているためにもはや存在しないことになる。多くの同じような手法の大筋が、当業者により考察および設計されうる。

20

【0037】

本発明に従って用いることのできるIgG結合ドメイン以外の更なるアフィニティータグは、従来のアフィニティータグのいずれであってもよい。好ましくは、第2アフィニティータグは、少なくとも1つのカルモジュリン結合ペプチド(CBP)から構成されるものである。カルモジュリン結合ペプチドはアフィニティータグとして、すでに記載および市販されている(Stratagene社)。カルモジュリン結合ペプチドを用いる場合、対応する精製ステップは、カルモジュリンによりコーティングされた支持材を用いて行われる。カルモジュリン結合ペプチドタグは、低濃度のカルシウム存在下でカルモジュリンに結合する。続いて、それは化学薬剤（例えばEGTAなどのキレート剤）を用いて溶離しうる。好ましくは、溶離ステップでおよそ2mM EGTAを添加する。

30

【0038】

本発明のその他の態様は、少なくとも2つのアフィニティータグに融合した1つ以上のポリペプチドまたはサブユニットを含む融合タンパク質であり、このアフィニティータグのうち1つは、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）プロテインAのIgG結合ドメインを少なくとも1つ含む。

40

【0039】

本発明による、その他の融合タンパク質は、好ましくはIgG結合ドメインを切除するためのタンパク質分解性切断部位を更に含むか、または第2のタグが1つ以上のCBPを表すものである。ここでも、当業者であれば、用いるアフィニティーステップに応じて、融合タンパク質中のタグ、切断部位、ポリペプチドおよび／またはサブユニットの最も適した組合せを選択および構築しうる。融合タンパク質は、上記の精製、検出または捕捉の手法を行い得るように構築することができる。

【0040】

融合タンパク質を構築する可能性がいくつかある。原則的には、アフィニティータグは、発現させようとするポリペプチドまたはサブユニットのNまたはC末端のいずれかの近傍に

50

融合しうる。タグをポリペプチドまたはサブユニットと融合させる順番は重要ではないが、使用するアフィニティープロトコルによって選択しうる。CBPなどの小ペプチドは、核酸のリーディングフレームが変化しない限り、目的のポリペプチド内に融合することさえできる。好ましくは、タグはポリペプチドまたはサブユニットと同じ末端の付近に配置する。IgG結合ドメインが完全融合タンパク質のNまたはC末端に位置し、それに続いてタンパク質分解性切断部位、その他のタグおよびポリペプチドまたはサブユニットが位置することが特に好ましい。

【0041】

融合タンパク質は、第2アフィニティータグを除去するために、第2タンパク質分解性切断部位も含みうる。アフィニティータグと切断部位の最も好ましい組合せは、ブドウ球菌 (Staphylococcus) のプロテインAドメインを第1アフィニティータグ (TEVプロテアーゼを介して切り出すことができる) として用い、そして少なくとも1つのカルモジュリン結合ペプチドを第2のアフィニティータグ (末端切断融合タンパク質を例えば2mM EGTAなどのキレート剤を用いて溶離可能である) として用いたものである。

10

【0042】

本発明のその他の態様は、上記のような融合タンパク質をコードする異種核酸である。

【0043】

本発明の更なる態様は、本発明の融合タンパク質をコードする異種核酸を少なくとも1つ含むベクターである。このベクターは、特定の宿主細胞または無細胞系で融合タンパク質の発現を促進する配列の制御下で核酸を含む。該制御配列は、プロモーター、および必要であればエンハンサーやポリA部位などの配列を含む。プロモーターおよび他の制御配列は、融合タンパク質が不溶性物質としてではなく可溶性の形態で産生されるよう、基礎レベルで好ましく発現されるように選択する。好ましくは、融合タンパク質は、該タンパク質が天然の立体構造になるように適正にフォールディングしうるような方法でも発現しうる。好ましくは、1つ以上の選択マーカーも、原核細胞または真核細胞で保持されるようにベクターに存在させる。基本的なクローニングベクターは、Sambrookら, Molecular Cloning, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に記載されている。ベクターの例としては、プラスミド、バクテリオファージ、その他のウイルスベクターなどである。

20

【0044】

好ましい実施形態において、アフィニティータグを組合せて予め作成したカセットを含有するベクターを構築し、そこに目的のポリペプチドまたはサブユニットをコードする核酸を、ポリヌクレオチドリンカーなどのマルチクローニング部位を利用して挿入しうる。このように、本発明によるベクターは、目的のポリペプチドやサブユニットについてのコード配列は含有しないが、従来のクローニング方法による核酸配列を、ポリヌクレオチドリンカーの1つの部位に挿入することによって本発明の融合タンパク質をコードするベクターが生じるように、上記の成分および好ましいユニークな制限部位を有する1つ以上のポリヌクレオチドリンカーを含有する。

30

【0045】

更に好ましい実施形態において、ベクターは、アフィニティータグの1つが黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) プロテインAの1つ以上のIgG結合ドメインからなる少なくとも1つの異なるアフィニティータグ、および更なる核酸を挿入するための少なくとも1つのポリヌクレオチドリンカーをそれぞれ含有する2つ以上のカセットの形で異種核酸配列を含む。このようなベクターを用いて、各々異なるタグで標識された2つのタンパク質複合体サブユニットを発現することが可能である。

40

【0046】

本発明によるベクターは、安定的にまたは一過性に宿主細胞に導入することができ、それらは染色体外にあってもよいし宿主ゲノム中に組み込まれていてもよい。また、それらを用いて組換え細胞またはトランスジェニック動物などの生物を産生してもよい。

【0047】

50

本発明のその他の目的は、本発明の異種核酸またはベクターを含む細胞である。これらの細胞は、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞または哺乳動物細胞など、原核細胞であっても真核細胞であってもよく、ベクターまたは核酸をそれらの細胞に、Sambrookら（上記）に説明が見られる従来の方法やプロトコルにより、安定的または一過性に導入（形質転換）しうる。

【0048】

本発明の更なる態様は、好ましくは支持材と共に上述のベクターを含有する、アフィニティーステップを行うための試薬キットである。支持材は、特異的にアフィニティータグと結合しうる部分、例えばアフィニティータグとしてカルモジュリン結合ペプチドを用いる場合はカルモジュリンでコーティングされた樹脂、またはプロテインAドメインからなるアフィニティータグについてはIgGでコーティングされた樹脂などを有している。また、そのようなキットは、タンパク質精製、特にアフィニティークロマトグラフィー用のバッファーおよびその他の従来物質を含みうる。更に好ましくは、該キットは、タンパク質を分解しうる化学試薬やプロテアーゼなどのタンパク質分解試薬および／またはキレート剤などの化学試薬を少なくとも1つ提供する。該プロテアーゼは、融合タンパク質をタンパク質分解的に切断しうるものである。2種のタンパク質分解性切断部位が用いられる場合は、キットは2つのプロテアーゼを含むことが好ましい。

10

【0049】

以下の実施例および図面は、本発明およびその実施用途を例示するが、それらは本発明の範囲を限定することを意図しない。

20

【0050】

実施例

実施例 1

酵母由来のタンパク質複合体の精製

酵母タンパク質とCBP-TEV-プロテインA二重タグとの融合物をコードするベクターを、標準的方法を用いて構築した。該融合タンパク質は、合計24個のサブユニットを有する、酵母のタンパク質複合体の1つのサブユニットである。プラスミドを酵母細胞に形質転換し、タンパク質を発現する細胞培養物2Lを調製した。タンパク質は、フレンチプレスを用いて培養細胞から抽出した。複合体は、IgGに結合したビーズに結合させて、TEVプロテアーゼ切断により溶離し、溶離された物質をカルモジュリン含有ビーズに結合させ、その後EGTAを用いて溶離することにより精製した。TEV切断を除くすべてのステップは、0-4℃で行われた。

30

【0051】

第1アフィニティーステップ(IgGステップ)は以下のように行った。200μl IgG-セファロースビーズ懸濁液(Pharmacia 17-0969-01)を、5ml IPP 150-IgGバッファー(10mM トリス-Cl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% NP40)を含有するエコノカラム(Econocolumn)中で洗浄した。およそ2Lの酵母培養物に相当する10mlの抽出物を、トリス-Cl pH 8.0, NaClおよびNP40中で、IPP 150-IgGバッファーの濃度に調整した。この抽出溶液を200μl IgG-セファロースビーズと混合し、エコノカラム中で2時間回転させた。結合していない画分を捨てて、結合した物質を有するビーズを、初めに30ml IPP 150-IgGバッファー、次に10ml TEV切断バッファー(10mM トリス-Cl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5mM EDTA, 1mM DTT)を用いて洗浄した。

40

【0052】

標的タンパク質を以下のようにビーズから切断し、放出させた。洗浄したエコノカラムを1ml TEV切断バッファーおよび30μl TEVプロテアーゼで充填し、16℃のインキュベーターで2時間回転させた。溶出液を重力流により回収した。

【0053】

第2アフィニティーステップ(カルモジュリンアフィニティーステップ)を以下のように行った。前述の溶出液を3ml IPP 150-カルモジュリン結合バッファー(10mM βメルカプトエタノール, 10mM トリス-Cl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM 酢酸マグネシウム, 1mM イミダゾ

50

ール, 2mM CaCl_2 , 0.1% NP40)と混合した。適量の CaCl_2 を更に添加して、TEV切断バッファに由来するEDTAをブロッキングした。この混合物を、5ml IPP 150-カルモジュリン結合バッファで予め洗浄しておいた、200 μl カルモジュリンビーズスラリー(Stratagene社 214303)を含むエコノカラムで1時間回転させた。

【0054】

30ml IPP 150-カルモジュリン結合バッファで洗浄した後、タンパク質複合体を、200 μl IPP 150-カルモジュリン溶離バッファ(10mM β メルカプトエタノール, 10mM トリス-CI pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM 酢酸マグネシウム, 1mM イミダゾール, 2mM EGTA, 0.1% NP40)を5回連続的に添加して溶離した。

【0055】

サンプルをドライアイスで凍結させて -80°C で保存した。タンパク質を、TCA沈殿(A. BensadounおよびD. Weinstein (1976), Anal. Biochem. 70, 241)により濃縮した。該タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出し、続いてゲルをクーマシーブルーで染色した。タンパク質精製の結果(図1に示されたゲル)により、用いられた手法が非常に効率的であることが示される。予測されたタンパク質サブユニットの全て(この場合は24個)を検出する。

【0056】

実施例 2

同様の手法を、酵母由来の他の2つのタンパク質またはタンパク質-RNA複合体についておこない、予測される全てのタンパク質サブユニットを、本発明の方法を用いて検出した。それらはCBC(キャップ結合複合体)およびU1 snRNPである。精製されたU1 snRNPは、図2および3に示す。CBC複合体は、すべての場合においてなお活性を有し、純度は良好であることが示された。この方法は1日で完了しうするため、比較的安価で時間もそれほどかからない。U1 snRNPについては、Neubauerら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 385-390)が、16Lの培養物から抽出した同じ複合体(U1 snRNP)の精製を行ったことは注目に値する。目的のタンパク質複合体が、その後銀染色によってわずかに可視化され、いくつかの挟雑物がなお観察された。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、酵母RNA-タンパク質複合体の分画されたタンパク質を示すクーマシー染色ゲルを示す。質量分析法により同定されたタンパク質を1~24で標識する。この複合体において、バンド1、3、8~11、16~24は予測されたものである。バンド2、4~7は、配列から考えて、正しい複合体成分の候補と思われるタンパク質を表す。バンド12~14は、潜在的な挟雑物(リボソームタンパク質)を表す。バンド15は、この特定の調製物に残存するTEVプロテアーゼの痕跡量を表す。これは、通常は見られない(例えば図2参照)。バンド4~6は、同じ遺伝子に由来しており、代替的翻訳産物または分解産物を示している可能性がある。バンド16は混合物であり、正しい複合体タンパク質のほかに、挟雑するリボソームタンパク質を含む。

【図2】 図2は、酵母U1 snRNPの分画されたタンパク質部分を示す、クーマシー染色ゲルを示す。10個の特異的タンパク質が、質量分析法により同定された。Neubauerら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 385-390)により報告された、キャップアフィニティーステップおよびNi-NTAカラムを用いた精製から得られた、銀染色されたゲルと比較する。この精製法では挟雑物が低レベルであることに特に注意されたい。

【図3】 図3は、クーマシーで染色されたゲルを示す。精製されたU1 snRNPは、CBP結合/EGTA溶離のみ(レーン1)、プロテインA結合/TEV溶離のみ(レーン3)または両ステップ(レーン7)のいずれかを用いて分析した。右側の矢印は、U1 snRNP特異的タンパク質を指示する。レーン2、4および8は、1段階法または2段階法をそれぞれ用いて、標識タンパク質が存在しない抽出物から得られたバックグラウンドシグナルを示しており、これにより純粋な物質を得るには2段階法が必要であることが示される。レーン6は、分子量マーカーである。レーン7は、レーン3および4で(必要量のプロテアーゼしか用いない場合でも)多量に存在する挟雑物としても認められうるTEVプロテアーゼである。

10

20

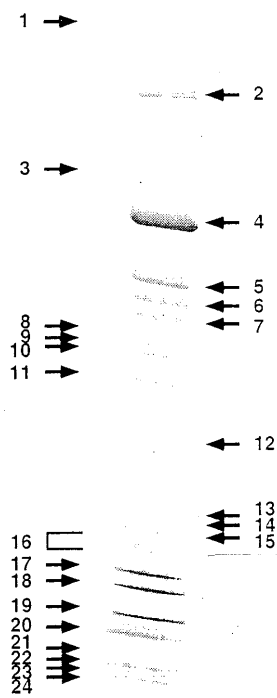
30

40

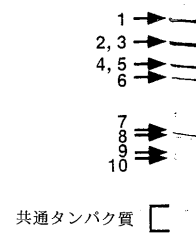
50

このこともまた、第2精製ステップの必要性を示す。

【図 1】

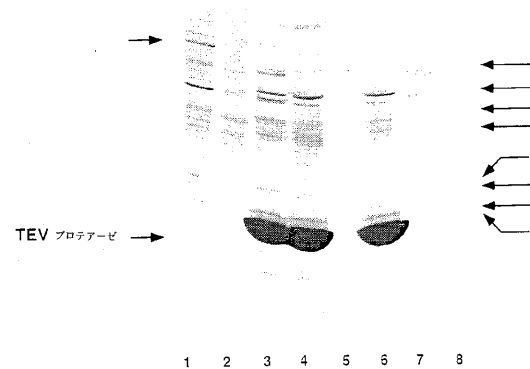


【図 2】



【図 3】

IgG ビーズ	-	+	+
TEV 切断	-	+	+
カルモジュリンビーズ	+	-	+
抽出物	タグ	野生型	タグ
	分子量	Tev	タグ
			野生型



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 0 7 K 14/31	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 14/31	
C 1 2 N 15/09	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/00	C 1 2 P 21/00	C

(72)発明者 リガウト、グイラウム
フランス国 エフー６９００７ リヨン、ル ペレ シェヴリー、２６

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第９６／０４０９４３（WO, A 1）
Vaccine,1993,Vol.11,No.12,p.1247-1252
AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES,1994,Vol.10,No.6,p.665-674
Gene,1995,Vol.164,p.45-47
The EMBO Journal,1998,Vol.17,No.8,p.2196-2207
Gene,1997,Vol.186,p.55-60

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)