(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6358630号
(P6358630)
(45)発行日　平成30年7月18日(2018.7.18)　(24)登録日　平成30年6月29日(2018.6.29)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	ZNA
G01N 27/62	(2006.01)	G01N	27/62	V
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	A

請求項の数 5　(全 22 頁)

(21)出願番号　特願2016-183467(P2016-183467)
(22)出願日　平成28年9月20日(2016.9.20)
(65)公開番号　特開2018-48861(P2018-48861A)
(43)公開日　平成30年3月29日(2018.3.29)
審査請求日　平成29年9月5日(2017.9.5)

早期審査対象出願

(73)特許権者　504233638
株式会社森永生科学研究所
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６
(74)代理人　100137338
弁理士　辻田　朋子
(74)代理人　100196313
弁理士　村松　大輔
(72)発明者　小路　正博
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６号　株式会社森永生科学研究所内
(72)発明者　本庄　勉
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６号　株式会社森永生科学研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程を含むことを特徴とするプロテオーム中の特定タンパク質の免疫測定方法。
（１）試料中のタンパク質を分離する分離工程
（２）分離工程により分離されたタンパク質を質量分析法によって同定する質量分析工程
（３）分離工程により分離されたタンパク質に特異的に結合する抗ペプチド抗体を用いた免疫測定法により、前記試料中に含まれる前記分離されたタンパク質を測定する免疫測定工程
【請求項２】
前記質量分析工程の後に、前記抗ペプチド抗体を作製するための以下の工程を含むことを特徴とする、請求項１に記載の免疫測定方法。
（Ａ）分離工程により分離されたタンパク質を構成するアミノ酸配列のうち特異性の高い４アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を選択する選択工程
（Ｂ）前記選択工程で選択されたアミノ酸配列からなる部分ペプチドを合成するペプチド合成工程
（Ｃ）前記部分ペプチドを抗原として前記抗ペプチド抗体を作製する抗体作製工程
【請求項３】
前記免疫測定法が、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う方法であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の免疫測定方法。
【請求項４】

前記分離工程により分離されたタンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として前記質量分析工程を行い、
該質量分析工程において最も高い強度で検出されるシグナルの５０％以上の強度で検出されるシグナルに対応する１種又は２種以上のペプチド断片を構成するアミノ酸配列と少なくとも４アミノ酸残基が同一である、前記分離工程により分離されたタンパク質の部分ペプチドを抗原とする抗ペプチド抗体を前記免疫測定工程において用いることを特徴とする、請求項１～３の何れか一項に記載の免疫測定方法。
【請求項５】
２次元電気泳動により前記分離工程を行うことを特徴とする、請求項１～４の何れか一項に記載の免疫測定方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はプロテオーム中の特定のタンパク質を検出するための免疫測定方法、並びに、当該方法に用いる抗ペプチド抗体の製造方法及び該抗ペプチド抗体の製造のための抗原ペプチドの設計方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
プロテオームとは、細胞や組織、生物個体などの生物学的な系に存在するタンパク質の集合のことをいう。複数の系の間でプロテオームを比較することにより、生命現象を総合的に理解することが可能となる。プロテオームを網羅的に解析することにより生命現象にアプローチする手法をプロテオミクスという。
【０００３】
近年、質量分析法の発達により微量のタンパク質断片の質量を正確に測定することができるようになり、プロテオミクスに質量分析法を組み合わせた手法が開発された。具体的には、電気泳動やクロマトグラフィー法などによりプロテオーム中に含まれるタンパク質を分離し、複数の生物学的な系の間で発現に差異のあるタンパク質を特定し、これを断片化してその質量を測定し、得られたデータをゲノム解析から推定されるタンパク質のアミノ酸配列データと比較して同定することが可能となった。
このように質量分析法の発達によりプロテオミクス技術は飛躍的に進歩し、生命科学の基礎研究分野のみならず、癌などの人の疾患の原因タンパク質を探索する医科学分野においても盛んに行われるようになった（例えば特許文献１）。
【０００４】
質量分析により特定のタンパク質が同定された後には、同タンパク質の機能解析などのために、プロテオーム中の同タンパク質を検出することが求められる。そのため、プロテオーム中の特定のタンパク質を定性的ないし定量的に検出する手法が望まれてきた。
【０００５】
このような状況下、プロテオーム中の特定のタンパク質を定量する手法として、安定同位体を使用して、一方のサンプルを内部標準に見立て、質量分析でのピーク強度比から相対的定量を行う方法が提案された（非特許文献１）。
また、同位体ではなくシステイン残基に対する化学修飾を標識とするＩＣＡＴ法も提案されている（非特許文献１）。
【０００６】
ところで、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定手法が知られている（例えば、特許文献２、３）。本手法においては、イオン性界面活性剤によって変性したタンパク質を検出対象とする。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００７】
【特許文献１】特開２０１０－０７８４５５号公報

【特許文献２】特開２００４－２３９８８５号公報
【特許文献３】特開２００５－１０６６２９号公報
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. Vol.52.No.3, 106-129. 2004
【非特許文献２】Nature Methods 12, 725-731 (2015)
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
非特許文献１に記載されているような、安定同位体を使用してプロテオーム中の特定のタンパク質の相対的定量を行う方法に関しては、同位体標識されたタンパク質は本来の分子量と異なるため一般の検索エンジンが使用できないという欠点がある。
【００１０】
またＩＣＡＴ法については、標識であるビオチンがタンパク質の断片化を複雑化するため、質量分析によって帰属できないスペクトルデータが大量に生じてしまうという問題がある。
【００１１】
さらに、これら質量分析によって特定タンパク質の定量を行う手法については、還元アルキル化、酵素消化等の前処理の手間がかかり、また、多数の検体処理には時間がかかるといった質量分析に特有の問題もある。
【００１２】
このような状況から、プロテオーム中の特定のタンパク質を測定するための新規の技術の開発が望まれていた。
【００１３】
一方、タンパク質の定性的ないし定量的検出方法として免疫学的手法が広く用いられている。免疫学的手法は簡便な方法ではあるが、高い特異性を有するため、質量分析によって同定されたプロテオーム中の特定のタンパク質の検出には有用であると思われる。
【００１４】
しかし、通常、抗タンパク質抗体は、折り畳み構造をとった抗原タンパク質の表面構造、すなわち、抗原タンパク質の３次元構造を認識して結合する性質を有する。一方、質量分析はペプチド断片、すなわちタンパク質の一次構造を検出対象とする手法である。このように、抗タンパク質抗体を用いた免疫測定と質量分析は検出対象が異なるため、両測定手法による測定結果は必ずしも相関しないという問題があった。
【００１５】
そのため、作製した抗タンパク質抗体が、交差反応による擬陽性ではなく、質量分析によって同定したタンパク質と同一のタンパク質を検出していることの確実性を担保するために煩雑な試験を行うことが必要であった。このような試験としては、同定したタンパク質の遺伝子が欠損したノックアウト細胞を用いた試験や、同定したタンパク質のリコンビナントタンパク質を用いた試験などが挙げられる。
【００１６】
また、プロテオミクスにおいて新たに同定されたタンパク質は、これまで詳細な研究が進んでいない場合が多いため、そのタンパク質が市販されていることは稀である。そのため、同タンパク質を細胞や組織などから精製したり、また、同タンパク質のリコンビナントタンパク質を新たに作製し、これを抗原として抗体を作製する必要がある。
このように、プロテオミクスにおいて新たに同定されたタンパク質に対する抗タンパク質抗体を作製するには、多大な時間、費用、労力を必要とするという問題があった。
【００１７】
このような状況に鑑み、本発明の解決しようとする課題は、質量分析法との相関性の高い結果を得ることができる免疫測定を可能にする技術を提供することにある。
【課題を解決するための手段】

【００１８】
上記課題を解決する本発明は、以下の工程を含むことを特徴とするプロテオーム中の特定タンパク質の免疫測定方法である。
（１）試料中のタンパク質を分離する分離工程
（２）分離工程により分離されたタンパク質を質量分析法によって同定する質量分析工程
（３）分離工程により分離されたタンパク質に特異的に結合する抗ペプチド抗体を用いた免疫測定法により、前記試料中に含まれる前記分離されたタンパク質を測定する免疫測定工程
【００１９】
質量分析工程において検出の対象となるのはペプチド断片、すなわちタンパク質の一次構造である。一方、免疫測定工程において用いる抗ペプチド抗体も同様にタンパク質の一次構造を認識する。このように、質量分析工程と免疫測定工程における検出対象は同一であるため、本発明の免疫測定方法によれば、質量分析の結果と相関性の高い結果を得ることができる。
【００２０】
本発明の好ましい実施の形態では、前記質量分析工程の後に、前記抗ペプチド抗体を作製するための以下の工程を含む。
（Ａ）分離工程により分離されたタンパク質を構成するアミノ酸配列のうち特異性の高い４アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を選択する選択工程
（Ｂ）前記選択工程で選択されたアミノ酸配列からなる部分ペプチドを合成するペプチド合成工程
（Ｃ）前記部分ペプチドを抗原として前記抗ペプチド抗体を作製する抗体作製工程
【００２１】
このような形態の本発明の免疫測定方法によって得られる測定結果は、質量分析の結果と、より高い相関性を有する。つまり、かかる形態とすることで、交差反応による擬陽性ではなく、質量分析によって同定したタンパク質と同一のタンパク質を検出している確度が高く、信頼できる測定結果を得ることができる。
【００２２】
また、（Ａ）～（Ｃ）の工程により、時間、費用、労力を抑えながら、質量分析により同定されたプロテオーム中の特定タンパク質を特異的に検出可能な抗体を作製することができる。
【００２３】
本発明の好ましい実施の形態では、前記免疫測定法が、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う方法である。
イオン性界面活性剤の存在下にタンパク質を置くと変性し、折り畳み構造がほどけた状態となり、通常、内部に折り畳まれているアミノ酸配列に対しても抗ペプチド抗体が結合可能となる。
【００２４】
本発明の好ましい実施の形態では、前記分離工程により分離されたタンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として前記質量分析工程を行い、
該質量分析工程において最も高い強度で検出されるシグナルの５０％以上の強度で検出されるシグナルに対応する１種又は２種以上のペプチド断片を構成するアミノ酸配列と少なくとも４アミノ酸残基が同一である、前記分離工程により分離されたタンパク質の部分ペプチドを抗原とする抗ペプチド抗体を前記免疫測定工程において用いる。
このような抗ペプチド抗体を用いることにより、質量分析の結果との相関性に優れた免疫測定結果を得ることができる。
【００２５】
本発明の好ましい実施の形態では、２次元電気泳動により前記分離工程を行う。２次元電気泳動はタンパク質の分離手法として優れている。
【００２６】

本発明は免疫測定法により抗原タンパク質を検出するために用いる抗ペプチド抗体の製造のための抗原ペプチドの設計方法にも関する。

すなわち、本発明は、抗原タンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として質量分析を行った場合に、検出可能なシグナルに対応する１種又は２種以上のペプチド断片を構成するアミノ酸配列と少なくとも４アミノ酸残基が同一である、前記抗原タンパク質の部分ペプチドを第１の抗原候補とすることを特徴とする、抗原ペプチドの設計方法である。

【００２７】

本発明の設計方法によれば、質量分析と相関性の高い結果を得ることができる免疫測定方法を可能にする抗ペプチド抗体の製造のための抗原ペプチドを設計することができる。

【００２８】

本発明の好ましい形態では、前記ペプチド断片が、前記質量分析を行った場合に、最も高い強度で検出されるシグナルの５０％以上の強度で検出されるシグナルに対応する１種又は２種以上のペプチド断片である。

このような形態とすることにより、より質量分析と相関性の高い結果を得ることができる免疫測定方法を実現できる抗ペプチド抗体の製造のための抗原ペプチドを設計することができる。

【００２９】

本発明の設計方法は、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定方法に用いる抗ペプチド抗体の設計に応用することが有用である。

イオン性界面活性剤の存在下ではタンパク質は変性し、通常折り畳み構造の内部に収納されているアミノ酸配列も外部に露出する。そのため、抗原ペプチドの設計に当たり、タンパク質の三次元構造を考慮する必要が無い。

【００３０】

本発明の好ましい実施の形態では、前記第１の抗原候補のうち特異性の高いアミノ酸配列を含む部分ペプチドを第２の抗原候補とする。

このような実施の形態とすることにより、より特異性の高い抗ペプチド抗体を製造できる抗原ペプチドを設計することができる。

【００３１】

本発明の設計方法は、質量分析により同定されたタンパク質を検出するために用いる抗ペプチド抗体の製造に応用することが有用である。

また、本発明の設計方法は、プロテオミクスにおいて同定された特定のタンパク質を検出するために用いる抗ペプチド抗体の製造に応用することが有用である。

さらに、本発明の設計方法は、上述した免疫測定方法において用いる抗ペプチド抗体の製造に応用することが有用である。

【００３２】

本発明は、免疫測定法により抗原タンパク質を検出するために用いる抗ペプチド抗体の製造方法にも関する。

すなわち、本発明は、抗原タンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として質量分析を行った場合に、検出可能なシグナルに対応する１種又は２種以上のペプチド断片を構成するアミノ酸配列と少なくとも４アミノ酸残基が同一である、前記抗原タンパク質の部分ペプチドを抗原として用いることを特徴とする、抗ペプチド抗体の製造方法である。

【００３３】

本発明によれば、質量分析と相関性の高い結果を得ることができる免疫測定方法を可能にする抗ペプチド抗体を製造することができる。

【００３４】

本発明の好ましい実施の形態では、前記ペプチド断片が、前記質量分析を行った場合に、最も高い強度で検出されるシグナルの５０％以上の強度で検出されるシグナルに対応するペプチド断片である。

このような形態とすることにより、より質量分析の結果と相関性の高い免疫測定方法を実現できる抗ペプチド抗体を製造することができる。

【００３５】

本発明の製造方法は、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定方法に用いる抗ペプチド抗体の製造に応用することが有用である。

【００３６】

本発明の好ましい実施の形態では、前記部分ペプチドが、抗原タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、特異性の高いアミノ酸配列を含む。

かかる形態とすることにより、特異性の高い抗ペプチド抗体を製造することができる。

【発明の効果】

【００３７】

本発明の免疫測定方法によれば、質量分析の結果と相関性の高い結果を得ることができる。

また、本発明の製造方法及び設計方法によれば、質量分析と相関性の高い免疫測定方法を可能にする抗ペプチド抗体の製造、及び該抗ペプチド抗体の製造のための抗原ペプチドを設計することができる。

また、本発明の製造方法及び設計方法により提供される抗ペプチド抗体を用いれば、煩雑な工程を要する質量分析を行わずとも、簡易・簡便な免疫測定法により質量分析と相関した結果を得ることができる。そのため、本発明の製造方法及び設計方法によれば、質量分析では難しかった、多検体測定や日常的な管理測定を可能にする抗ペプチド抗体を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１】全長の特定タンパク質（上段）と、免疫測定工程で使用する抗ペプチド抗体を製造するために用いた抗原ペプチド（中段）、そして、質量分析工程で検出する、特定タンパク質をタンパク質分解酵素で消化したときに生じるペプチド断片（下段）を模式的に表した図である。

【図２】免疫測定工程において使用する抗ペプチド抗体のエピトープ配列が、共通アミノ酸配列から外れる場合を模式的に表した図である。

【図３】質量分析対象ペプチド断片を構成するアミノ酸配列の一部が、抗ペプチド抗体のエピトープ配列と重複している場合を模式的に表した図である。

【図４】質量分析対象ペプチド断片を構成するアミノ酸配列の全部が、抗ペプチド抗体のエピトープ配列と重複している場合を模式的に表した図である。

【図５】試料Ａと試料Ｂの２次元電気泳動後のゲルをクマシーブルーにより染色した染色図である。点線で囲まれたスポットは、試料Ａで特徴的に検出されたタンパク質のスポットである。

【図６】試料Ａの泳動図に特徴的なスポットのタンパク質の消化物に含まれる特定のペプチド断片のマススペクトルである。上段はイオン化工程における電圧を強く設定しフラグメントイオンを生じさせたときのスペクトルである。下段はイオン化工程における電圧を弱く設定し、同ペプチド断片の２種のプロトン化イオン（$[M+H]^{+}$、$[M+2H]^{2+}$）を生じさせたときのスペクトルである。

【図７】ブタ血清アルブミンのトリプシン消化物をＬＣ－ＴＯＦＭＳにより分析したときのクロマトグラムである。

【図８】ＥＬＩＳＡにより作成したブタ血清アルブミンの検量線である。

【図９】トリプシンによる切断部位を示したブタ血清アルブミンのＣ末端側のアミノ酸配列（上段）と、抗原ペプチドのアミノ酸配列（中段）と、ブタ血清アルブミン標準溶液をトリプシンによって酵素消化することによって生じた質量分析対象ペプチド断片のアミノ酸配列（下段）を表す図である。

【図１０】ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる質量分析の結果得られたＧＩＬＡペプチドイオン（配列番号６０）の面積値に基づき作成したブタ血清アルブミンの検量線である。

【図１１】ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる質量分析の結果得られたＦＶＩＥＩＲペプチドイオン（配列番号５９）の面積値に基づき作成したブタ血清アルブミンの検量線である。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

＜１＞免疫測定方法

本発明の免疫測定方法は、以下の３工程を含む。

（１）試料中のタンパク質を分離する分離工程

（２）分離工程により分離されたタンパク質を質量分析法によって同定する質量分析工程

（３）分離工程により分離されたタンパク質に特異的に結合する抗ペプチド抗体を用いた免疫測定法により、前記試料中に含まれる前記分離されたタンパク質を測定する免疫測定工程

以下、各工程について詳細に説明する。

【００４０】

（１）分離工程

分離工程は試料中のプロテオームに含まれるタンパク質を分離する工程である。試料は生物学的な系であれば特に限定されず、例えば、細胞、胚、組織または個体である。細胞とは、例えば、培養細胞、単細胞生物の細胞である。胚には、多細胞生物の発生初期の段階にある種々の細胞または細胞集団が含まれる。組織は、組織切片であってもよい。個体は、単細胞生物の個体および多細胞生物の個体を含む。

【００４１】

タンパク質の分離手法は特に制限されないが、液体クロマトグラフィー、電気泳動、限外ろ過などを例示することができ、特に好ましくは電気泳動を例示できる。

各分離手法に供する際の試料の調製方法は常法に従い行うことができる。

【００４２】

電気泳動としては、通常の１次元電気泳動であっても２次元電気泳動であってもよいが、分離能の高い２次元電気泳動を採用することが好ましい。

電気泳動の際に用いるバッファー、ゲルの種類、質量分析工程に供する特定タンパク質のスポットの選定、ゲルからの特定のタンパク質のスポットの切り出しに関しては、常法に従い行うことができる。

【００４３】

（２）質量分析工程

質量分析工程は、分離工程により分離されたタンパク質を質量分析法によって同定する工程である。

質量分析工程においては、まず、分離工程において分離したタンパク質をタンパク質分解酵素により処理し、ペプチド断片とする。

【００４４】

タンパク質分解酵素としては通常、タンパク質を質量分析計により分析する際に用いられる酵素を制限なく用いることができる。具体的には、トリプシン、キモトリプシン、Ａｓｐ－Ｎ、Ｇｌｕ－Ｃ、Ｌｙｓ－Ｃなどを用いることができる。

【００４５】

質量分析工程で用いる質量分析計は特に制限されない。具体的には、質量分析計の試料導入部が、高速液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）、ガスクロマトグラフ（ＧＣ）、キャピラリー電気泳動（ＣＥ）に直結している、ＬＣ－ＭＳ、ＧＣ－ＭＳ、ＣＥ－ＭＳを用いることができる。特にＬＣ－ＭＳを用いることが好ましい。

【００４６】

また、イオン源として、ＥＩ（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、電子イオン化）法、ＣＩ（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、化学イオン化）法、ＦＤ（Ｆｉｅｌｄ　Ｄｅｓｏｒｐｔｉｏｎ、電界脱離）法、ＦＡＢ（Ｆａｓｔ　Ａｔｏｍ　Ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ、高速原子衝撃）法、ＭＡＬＤＩ（Ｍａｔｒｉｘ　Ａｓｓｉｓｔｅｄ　Ｌａｓｅｒ　Ｄｅｓｏｒｐｔｉｏｎ　Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、マトリックス支援レーザー

脱離イオン化）法、ＥＳＩ（ＥｌｅｃｔｒｏＳｐｒａｙ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、エレクトロスプレーイオン化）法、ＡＰＣＩ（Ａｔｏｍｏｓｐｈｅｒｉｃ Ｐｒｅｓｓｕｒｅ Ｃｈｅｉｍｃａｌ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、大気圧化学イオン化）法、ＩＣＰ（Ｉｎｄｕｃｔｉｖｅｌｙ Ｃｏｕｐｌｅｄ Ｐｌａｓｍａ、誘導結合プラズマ）、ペニングイオン化を利用したＤＡＲＴ法、気相試料にリチウムイオンを付着させるイオン付着法（ＩＡ）などのいずれのイオン化法を採用する質量分析計をも用いることができる。

【００４７】

また、イオン化された試料を分離する部位である分析部として、磁場偏向型（Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｓｅｃｔｏｒ）、四重極型（Ｑｕａｄｒｕｐｏｌｅ，Ｑ）、イオントラップ型（Ｉｏｎ Ｔｒａｐ，ＩＴ）、飛行時間型（Ｔｉｍｅ－ｏｆ－Ｆｌｉｇｈｔ，ＴＯＦ）、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型（Ｆｏｕｒｉｅｒ－Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ Ｉｏｎ Ｃｙｃｌｏｔｒｏｎ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ，ＦＴ－ＩＣＲ）、加速器質量分析（Ａｃｃｅｌｅｒａｔｏｒ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ，ＡＭＳ）、そして、上記の分析法を複数組み合わせるタンデム型などの何れの分析部を採用する質量分析計であっても用いることができる。

【００４８】

質量分析の結果に基づくタンパク質の同定は常法に従い行うことができる。具体的には、断片ペプチド混合物のマススペクトルを測定することで得られたマススペクトルデータを用いて、タンパク質の配列データベースに対して検索を行い、データベースに登録されているタンパク質の中でマススペクトルデータと最も適合するアミノ酸配列を探し出し、タンパク質を同定することができる。

【００４９】

（３）免疫測定工程

免疫測定工程では、分離工程により分離されたタンパク質に特異的に結合する抗ペプチド抗体を用いた免疫測定法により、前記試料中に含まれる前記分離されたタンパク質を測定する。

【００５０】

免疫測定法の種類は特に制限されず、例えば、標識物質により標識した抗ペプチド抗体を用いた、イムノクロマト法、ＥＬＩＳＡ法等の免疫学的測定法を挙げることができる。

具体的には、不溶性担体に結合した抗ペプチド抗体に特定タンパク質を捕捉させた後に、該特定タンパク質を認識する標識抗体（二次抗体）を用いるサンドイッチ法、不溶性担体に結合した特定タンパク質を認識する抗体に該特定タンパク質を捕捉させた後に、標識した抗ペプチド抗体（二次抗体）を用いるサンドイッチ法、また、不溶性担体に結合した抗ペプチド抗体に試料中の特定タンパク質を標識化抗原の存在下で反応させる競合法などの公知の免疫測定法を利用することができる。これらのうち、高感度であるという点でサンドイッチＥＬＩＳＡが好ましい。

また、上記標識物質としては、アルカリフォスファターゼ、ＨＲＰ等の酵素、抗体のＦｃ領域、ＧＦＰ等の蛍光物質などを具体的に例示することができる。

【００５１】

免疫測定法としては、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う方法が好ましく挙げられる。イオン性界面活性剤の存在下にタンパク質を置くと変性し、折り畳み構造がほどけた状態となり、通常、内部に折り畳まれているアミノ酸配列に対しても抗ペプチド抗体が結合可能となる。

【００５２】

イオン性界面活性剤の添加の手順は特に制限されず、後述するようにイオン性界面活性剤を含む抽出溶媒により試料からタンパク質を抽出し、溶媒置換を行わずに抗原－抗体反応を行ってもよい。また、試料からのタンパク質の抽出後にイオン性界面活性剤を添加する形態としてもよい。

【００５３】

免疫測定工程においては、試料から特定タンパク質を抽出するための抽出工程を含むこ

とが好ましい。抽出工程で用いる抽出溶媒としては特に限定されないが、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒であることが好ましい。

【００５４】

水性溶媒としては、純水；塩化ナトリウム、塩化カリウムおよび重炭酸ナトリウム等の塩溶液；生化学分野で通常用いられる各種緩衝液、例えばリン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ－塩酸緩衝液およびクエン酸緩衝液；水酸化ナトリウム或いは塩酸等でｐＨを調節したアルカリ性溶液或いは酸性溶液等を基本とした溶媒が好ましく例示できる。

【００５５】

水性溶媒は、タンパク質の溶解度や抽出効率を追加的に向上させる補助成分として、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のようなキレート化合物、ホスホリパーゼのような酵素類およびＨＬＢ価調節のために非イオン性界面活性剤を含んでいてもよい。

【００５６】

また、水性溶媒は、抽出中或いは保存中の溶液内でのタンパク質の分解を制御するためのプロテアーゼ阻害剤や、微生物の繁殖を防止するアジ化ナトリウムなどの抗菌性物質、アスコルビン酸等の酸化防止剤を含んでいてもよい。

【００５７】

さらに水性溶媒は、特定タンパク質と抗ペプチド抗体との間の抗原－抗体反応を実行不能にしない範囲でグリセロールやエタノール等の極性有機溶媒を含んでいてもよい。

【００５８】

また、水性溶媒は、２－メルカプトエタノールやジチオスレイトール（ＤＴＴ）、シアノ水ホウ素化ナトリウム（ＳＣＢＨ）、ジメチルアミンボラン（ＤＭＡＢ）、水ホウ素化ナトリウム（ＳＢＨ）、亜硫酸ナトリウムやシステインに代表される還元剤を含んでいてもよい。

【００５９】

水性溶媒に含まれるイオン性界面活性剤は、タンパク質の溶解度や抽出効率を実質的に向上させ得るものであれば公知のいずれのものを用いてもかまわない。

好適には、イオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、ラウリルサルコシンナトリウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルピリジニウムおよびそれらの混合物から成る群より選択される。

特に、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）が好適なイオン性界面活性剤として挙げられる。

【００６０】

水性溶媒におけるイオン性界面活性剤の濃度は、特定タンパク質の実質的な可溶化や抽出を達成できる濃度であれば、いかなる濃度でもかまわないが、通常は、０．１％（Ｗ／Ｖ）以上であり、０．３％（Ｗ／Ｖ）以上、また０．５％（Ｗ／Ｖ）以上、さらには１０％（Ｗ／Ｖ）程度であってもよい。

【００６１】

また、水性溶媒におけるイオン性界面活性剤の濃度は、好ましくは０．１～１０％（Ｗ／Ｖ）であり、より好ましくは０．３～５％（Ｗ／Ｖ）であり、さらに好ましくは０．３～１％（Ｗ／Ｖ）である。

イオン性界面活性剤の濃度を前記範囲とすることによって、効率的に試料から特定タンパク質を抽出することができ、また、抗原－抗体反応の効率を向上させることができる。

【００６２】

抽出工程においては、公知の方法により試料中の特定タンパク質を抽出及び／又は可溶化することでタンパク質溶液を取得することができる。

具体的には、試料を含む水性溶媒をホモゲナイザーや超音波破砕機、すり鉢などで処理し、得られた懸濁液を遠心分離し、上清を回収することで、タンパク質溶液を得ることができる。

【００６３】

本発明においては、試料を含む水性溶媒をホモゲナイザーや超音波破砕機、すり鉢などで処理した後に、加熱することも好ましい。加熱によって特定タンパク質の抽出効率及び溶解効率を向上させることができる。

【００６４】

また、試料が固形物又は半固形物である場合には、あらかじめミキサー等で試料を破砕し、ミンチ状やペースト状にすることが、特定タンパク質の抽出効率及び溶解効率の観点から好ましい。

【００６５】

免疫測定工程においては、抽出工程で得られたタンパク質溶液を実質的に希釈することなく抗ペプチド抗体と接触させることが好ましい。

または、イオン性界面活性剤濃度が０．０３％（Ｗ／Ｖ）以下にならない範囲で希釈したタンパク質溶液と抗ペプチド抗体を接触させることが好ましい。

【００６６】

ここで、「接触させる」とは、タンパク質溶液中の特定タンパク質と抗ペプチド抗体の抗原－抗体反応を可能にすることができればその形態は限定されない。

【００６７】

免疫測定工程をサンドイッチ法又は競合法の形態とする場合には、タンパク質溶液を固相化された抗ペプチド抗体に接触させることで抗原－抗体複合体を形成することができる。

また、固相化された抗タンパク質抗体に補足された抗原タンパク質に、抗ペプチド抗体を接触させることにより、抗原－抗体複合体を形成することもできる。

このような方法としてはラテックス凝集法や、ＥＬＩＳＡ法が好ましく例示できる。

【００６８】

本発明に用いる抗体としては、特定タンパク質の部分ペプチドを抗原ペプチドとして生産された抗ペプチド抗体を用いる。抗ペプチド抗体としては抗原ペプチドを特異的に認識する抗体であれば特に制限されるものではなく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体の何れであっても用いることができる。

【００６９】

免疫測定工程において用いる抗ペプチド抗体は、市販のものを用いてもよいし、自ら新たに生産したものを用いてもよい。

【００７０】

ここで、抗ペプチド抗体の製造方法としては、（イ）抗原ペプチドをアルブミンやキーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合させて免疫動物に免疫する方法や、（ロ）特定タンパク質を免疫動物に免疫し、抗原ペプチドが担持されたカラムを用いて、免疫動物から取得した抗血清から抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を精製する方法などが挙げられる。

【００７１】

上記（イ）の方法による抗ペプチド抗体の生産は常法に従い行うことができる。

ポリクローナルである抗ペプチド抗体を生産する場合には、まず、キャリアと結合した抗原（特定タンパク質もしくはその部分ペプチド）をアジュバントとよく混合して、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、トリ、ウマ等の動物に投与し免疫する。免疫してから所定の期間の経過後に全採血を行い、抗血清を得る。この抗血清を塩析、カラム等により精製し、ポリクローナルである抗ペプチド抗体を得ることができる。

また、モノクローナルである抗ペプチド抗体を生産する場合には、まず、キャリアと結合した抗原ペプチドを免疫動物に免疫し、抗体を産生しているリンパ球として例えばマウス脾臓細胞と、ミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等にて細胞融合させ、ハイブリドーマを得る。この中より、抗原ペプチドに対する抗体を産生する細胞をスクリーニングし、その細胞を培養することによって、抗ペプチド抗体を得ることができる。

【００７２】

上記（ロ）の方法による抗ペプチド抗体の生産は、例えば以下のように行うことができ

る。

精製した特定タンパク質をマウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ等の免疫動物に免疫して抗血清を得る。

より好ましくは、精製した特定タンパク質に対して、加熱処理、ＳＤＳ等のイオン性界面活性剤による処理、また、イオン性界面活性剤と２－メルカプトエタノール、ジチオスレイトールや亜硫酸ナトリウム等の還元剤を併用した処理を加えることによって、免疫原とする変性した特定タンパク質を得る。このようにして得られた変性した特定タンパク質をマウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ等の免疫動物に免疫する。

【００７３】

このようにして免疫動物から得られた抗血清を、抗原ペプチドが担持された精製カラムを用いて精製する。

具体的には、抗原ペプチドをクロマトグラフィー用の樹脂、例えば、ＣＮＢｒ活性化セファロースやＨｉＴｒａｐ　ＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）に共有結合で固相化し、該固相化樹脂に抗血清を供する。そして、該抗血清中に含まれる抗原ペプチドを構成するアミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体を樹脂上に吸着させ、ついで、該樹脂上に吸着した前記ポリクローナル抗体を適切な緩衝液やカオトロピックイオン等を用いて溶出させる。これにより、抗原ペプチドに特異的に結合する抗ペプチド抗体を得ることができる。

また、上記精製の前に、変性した特定タンパク質が担持されたカラムを用いた中間精製を行ってもよい。

【００７４】

上記（イ）及び（ロ）の方法で用いる抗原ペプチドとしては、化学的に合成したもの、特定タンパク質をタンパク質分解酵素で切断して精製したもの、あるいは抗原ペプチドを構成するアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡの全部あるいは一部を常法によりベクターに組み込み、このベクターを用いて大腸菌等の宿主微生物もしくは培養細胞を形質転換し、形質転換した大腸菌等の宿主微生物・培養細胞を培養して産生させて得られるリコンビナントタンパク質やポリペプチドをアフィニティーカラムやニッケルカラム等で精製したもの等が挙げられる。

【００７５】

抗原タンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として質量分析を行った場合に、検出可能なシグナルに対応するペプチド断片（以下、質量分析対象ペプチド断片ともいう）のアミノ酸配列の一部と同一のアミノ酸配列を含むペプチド断片を抗原ペプチドとして製造された抗ペプチド抗体を用いることが好ましい（図１参照）。

このような抗ペプチド抗体を用いることにより、免疫測定工程における測定結果と、質量分析工程における測定結果の相関性を向上させることができる。

【００７６】

抗原ペプチドと質量分析対象ペプチド断片の共通するアミノ酸配列部分の長さ、すなわち、図１においてＸで示すアミノ酸配列（以下、共通アミノ酸配列ともいう）の長さは、好ましくは４アミノ酸残基以上であり、より好ましくは６アミノ酸残基以上であり、さらに好ましく１０アミノ酸残基以上である。

また、共通アミノ酸配列の長さは、抗原ペプチドの長さの、好ましくは１０％以上であり、より好ましくは２０％以上であり、さらに好ましくは３０％以上である。

共通アミノ酸配列のペプチド長を上記範囲とすることによって、信頼性の高い特定タンパク質の検出結果を得ることができる。

【００７７】

抗ペプチド抗体が特異的に認識するアミノ酸配列、すなわち、エピトープ配列は、共通アミノ酸配列から外れていてもよいが（図２）、質量分析対象ペプチド断片を構成するアミノ酸配列の一部（図３）又は全部（図４）が抗ペプチド抗体のエピトープ配列と重複していることが好ましい。

【００７８】

抗ペプチド抗体は、抗原タンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として質量分析を行った場合に、最も高い強度で検出されるシグナルの好ましくは５０％以上の強度、より好ましくは７０％以上の強度、さらに好ましくは９０％以上の強度、さらに好ましくは１００％の強度で検出されるシグナルに対応するペプチド断片と共通アミノ酸配列を有する抗原ペプチドにより製造されたものであることが特に好ましい。

【００７９】

免疫測定工程においては、質量分析工程の結果に基づき設計した抗ペプチド抗体を用いることが好ましい。すなわち、質量分析工程の後に以下の３工程を含む実施の形態とすることが好ましい。

（Ａ）分離工程により分離されたタンパク質を構成するアミノ酸配列のうち特異性の高い４アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を選択する選択工程

（Ｂ）前記選択工程で選択されたアミノ酸配列からなる部分ペプチドを合成するペプチド合成工程

（Ｃ）前記部分ペプチドを抗原として前記抗ペプチド抗体を作製する抗体作製工程

以下、各工程について詳述する。

【００８０】

（Ａ）選択工程

選択工程は、抗原ペプチドのアミノ酸配列を選択する工程である。具体的には、分離工程により分離されたタンパク質を構成するアミノ酸配列のうち特異性の高い４アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を選択する工程である。

選択する特異性の高いアミノ酸配列は４アミノ酸残基以上であればよいが、好ましくは６アミノ酸残基以上、さらに好ましく１０アミノ酸残基以上である。

【００８１】

ここで「特異性が高いアミノ酸配列」とは、異種間において特異性の高いアミノ酸配列だけでなく、同種におけるアイソフォームや同種同遺伝子由来のスプライシングバリアントを区別可能なアミノ酸配列も含む。

特異性の高いアミノ酸配列の選定は通常用いられる相同性解析ソフトを用いることができる。

【００８２】

また、選択工程においては、質量分析工程の結果に基づき抗原ペプチドのアミノ酸配列を選択してもよい。すなわち、質量分析工程における質量分析対象ペプチド断片との共通アミノ酸配列を含むアミノ酸配列を選択する形態とすることが好ましい。

【００８３】

また、選択工程において、共通アミノ酸の長さが、好ましくは４アミノ酸残基以上、より好ましくは６アミノ酸残基以上、さらに好ましく１０アミノ酸残基以上であるアミノ酸配列を選択することが好ましい。

【００８４】

また、選択工程において、共通アミノ酸配列の長さが、抗原ペプチドの長さの、好ましくは１０％以上、より好ましくは２０％以上、さらに好ましくは３０％以上であるアミノ酸配列を選択することが好ましい。

【００８５】

さらに、選択工程においては、質量分析工程で最も高い強度で検出されるシグナルの好ましくは５０％以上の強度、より好ましくは７０％以上の強度、さらに好ましくは９０％以上の強度、さらに好ましくは１００％の強度で検出されるシグナルに対応するペプチド断片との共通アミノ酸配列を含むアミノ酸配列を選択する形態とすることが好ましい。

【００８６】

（Ｂ）ペプチド合成工程

ペプチド合成工程は、選択工程で選択されたアミノ酸配列からなる部分ペプチド、つまり抗原ペプチドを合成する工程である。合成の方法は特に限定されず、化学的に合成する方法や、上述したように大腸菌等の宿主微生物もしくは培養細胞を形質転換し、形質転換

した大腸菌等の宿主微生物・培養細胞を培養して産生させる生物学的な合成方法が挙げられる。

【００８７】

（Ｃ）抗体作製工程

本工程は、上述の方法で合成した部分ペプチドを抗原として抗ペプチド抗体を作製する工程である。具体的には上記（イ）及び（ロ）の方法をそのまま適用することができる。

【００８８】

以上（Ａ）～（Ｃ）の工程により製造された抗ペプチド抗体を免疫測定工程において用いることにより、質量分析工程と相関性の高い測定結果を得ることができる。

【００８９】

＜２＞抗原ペプチドの設計方法

本発明は、抗原ペプチドを構成するアミノ酸配列のうちから、質量分析法との相関性の高い免疫測定方法を実現可能な抗ペプチド抗体のための抗原ペプチドの設計方法にも関する。

本発明は、抗原タンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として質量分析を行ったときの質量分析対象ペプチド断片と少なくとも４アミノ酸残基が同一である部分ペプチドを第１の抗原候補とすることを特徴とする。

【００９０】

第１の抗原候補の選択に当たっては、上の「＜１＞（Ａ）選択工程」の項目に記載した内容を適用することができる。

【００９１】

また、本発明の設計方法の好ましい実施の形態では、第１の抗原候補のうち特異性の高いアミノ酸配列を含む部分ペプチドを第２の抗原候補とする。

第２の抗原候補を選択する際の具体的形態についても、上の「＜１＞（Ａ）選択工程」の項目に記載した内容をそのまま適用することができる。

【００９２】

本発明の設計方法は、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定方法に用いる抗ペプチド抗体の抗原ペプチドの設計に応用することが好ましい。

イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定方法については、上の「＜１＞（３）免疫測定工程」の記載をそのまま適用することができる。

【００９３】

本発明の設計方法は、上記＜１＞の項目で述べた本発明の免疫測定方法に用いる抗ペプチド抗体の設計方法に応用することが好ましい。

【００９４】

＜３＞抗ペプチド抗体の製造方法

免疫測定法により抗原タンパク質を検出するために用いる抗ペプチド抗体の製造方法である。

本発明の製造方法は、抗原タンパク質をタンパク質分解酵素で処理したペプチド溶液を試料として質量分析を行った場合の質量分析対象ペプチド断片との共通アミノ酸配列（少なくとも４アミノ酸残基）を有する部分ペプチドを抗原ペプチドとすることを特徴とする。

【００９５】

抗原ペプチドについては、上の『＜１＞（３）免疫測定工程』の項目に記載した抗原ペプチドに関する記載を適用することができる。

【００９６】

抗原ペプチドとしては、抗原タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち特異性の高いアミノ酸配列を含むものが好ましい。「特異性が高いアミノ酸配列」については、上の「＜１＞（Ａ）選択工程」の項目に記載した内容を適用することができる。

【００９７】

本発明の製造方法においては、上述の抗原ペプチドを免疫動物を用いて抗ペプチド抗体

を製造する。本発明の製造方法における免疫の具体的な方法については、上の『＜１＞（３）免疫測定工程』の項目に記載した（イ）及び（ロ）の方法を適用することができる。

【００９８】

本発明の製造方法は、イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定方法に用いる抗ペプチド抗体の製造に応用することが好ましい。

イオン性界面活性剤の存在下で抗原－抗体反応を行う免疫測定方法については、上の「＜１＞（３）免疫測定工程」の記載をそのまま適用することができる。

【００９９】

＜４＞抗ペプチド抗体

本発明は、上述の設計方法により設計された抗原ペプチドにより製造された抗ペプチド抗体、及び上述の製造方法により製造された抗ペプチド抗体に関する。

本発明の抗ペプチド抗体は、質量分析と相関性の高い結果を得ることができる免疫測定方法を実現することができる。

そのため、本発明の抗ペプチド抗体は、質量分析により同定されたタンパク質の検出のために応用することが好ましい。さらには、本発明の抗ペプチド抗体をプロテオミクスにおいて同定されたタンパク質の検出のために応用すれば、プロテオミクス分野における昨今の課題であったプロテオーム中の特定タンパク質の定性的ないし定量的測定を実現することができる。

【０１００】

本発明の抗ペプチド抗体は、免疫測定工程、質量分析工程及び評価工程を含む評価方法により容易にその特異性ないし質量分析の結果との相関性を評価することができる。

【０１０１】

免疫測定工程と質量分析工程に供する試料は抗原タンパク質が含まれることが担保されているものであれば特にその形態は限定されない。

免疫測定工程と質量分析工程に供する試料としては抗原タンパク質の濃度が既知である標準溶液を用いることが好ましい。また、試料は抗原タンパク質以外のタンパク質及びペプチドを含まないことが好ましい。

【０１０２】

免疫測定工程及び質量分析工程の具体的な実施形態については、上記＜１＞に記載した内容を適用することができる。

【０１０３】

評価工程は免疫測定工程と質量分析工程の結果を比較する工程である。２つの工程に供した試料は抗原タンパク質を含んでいるのであるから、両工程ともに陽性の結果を示すはずである。このように両工程ともに陽性の結果を示した場合には、使用した抗ペプチド抗体は、質量分析の検出対象であるタンパク質と同一タンパク質を検出していることになる。この場合には抗ペプチド抗体は、質量分析と相関性のある免疫測定が可能であると評価することができる。

【０１０４】

一方、何れか一方の工程の結果が陽性であり、他方の工程の結果が陰性であった場合には、質量分析の検出対象であるタンパク質とは別の異なるタンパク質を検出していることになる。この場合には抗ペプチド抗体は、質量分析と相関性のある免疫測定が不可能であると評価することができる。

このように両工程の結果が一致しない原因としては、質量分析におけるタンパク質の同定に誤りがあったことや、抗ペプチド抗体の特異性に問題があることが考えられる。

【実施例】

【０１０５】

以下、本発明の免疫測定方法の実施例を示す。

＜１＞分離工程

複数のタンパク質を含む、プロテオームを模した試料Ａと試料Ｂを用意した。

試料Ａと試料Ｂをそれぞれ固定化ｐＨ勾配等電点電気泳動用ゲルに泳動し、それぞれの

試料に含まれるタンパク質を分離した。泳動後のゲルをクマシーブルーにより染色した染色図を図５に示す。

【０１０６】

＜２＞質量分析工程

図５において点線で囲んだ試料Ａの泳動図に特徴的なスポットを切り出し、ゲル内での還元、アルキル化及び消化（トリプシン）を行った。この消化物をサンプルとしてＬＣ－ＴＯＦＭＳにより質量分析し、マススペクトルを得た。図６にその例を示す。図６上段はイオン化工程における電圧を強く設定しフラグメントイオンを生じさせたときのスペクトルである。図６下段はイオン化工程における電圧を弱く設定し、同ペプチド断片の２種のプロトン化イオン（$[M+H]^{+}$、$[M+2H]^{2+}$）を生じさせたときのスペクトルである。

【０１０７】

このように質量分析により検出した複数のペプチド断片データをデータベースに照合した結果、２次元電気泳動により分離したタンパク質がブタ血清アルブミンであることを同定した。また、図６のマススペクトルに対応するペプチド断片はアミノ酸一文字標記でＦＶＩＥＩＲの配列（配列番号５９）であることが分かった。

【０１０８】

＜３＞抗ペプチド抗体の作製

（１）抗原ペプチドの選択

表１にブタ血清アルブミンの全配列を示す。このブタ血清アルブミンをトリプシンで切断した場合、配列中リジン及びアルギニンが連続している場合も切断されると仮定すると、理論上８７箇所での切断が起き、合計８８の断片が生じる（表２）。

【０１０９】

【表１】

［表1］

ブタ血清アルブミン配列（６０７アミノ酸）

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDTYKSEIAHRFKDLGEQYFKGLVLIA FSQHLQQCPYEEHVKLVREVTEFAKTCVADESAENCDKSIHTLFGDKLC AIPSLREHYGDLADCCEKEEPERNECFLQHKNDNPDIPKLKPDPVALCA DFQEDEQKFWGKYLYEIARRHPYFYAPELLYYAIIYKDVFSECCQAADK AACLLPKIEHLREKVLTSAAKQRLKCASIQKFGERAFKAWSLARLSQRF PKADFTEISKIVTDLAKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDTIS TKLKECCDKPLLEKSHCIAEAKRDELPADLNPLEHDFVEDKEVCKNYKE AKHVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRIAKIYEATLEDCCAKEDPPACYA TVFDKFQPLVDEPKNLIKQNCELFEKLGEYGFQNALIVRYTKKVPQVSTP TLVEVARKLGLVGSRCCKRPEEERLSCAEDYLSLVLNRLCVLHEKTPVS EKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYKPKEFVEGTFTFHADLCTLPEDE KQIKKQTALVELLKHKPHATEEQLRTVLGNFAAFVQKCCAAPDHEACFA VEGPKFVIEIRGILA

配列番号1

【表２】

[表2]

peptide No.	配列	アミノ酸数	配列番号
1	MK	2	-
2	WVTFISLLFLFSSAYSR	17	2
3	GVFR	4	3
4	R	1	-
5	DTYK	4	4
6	SEIAHR	6	5
7	FK	2	-
8	DLGEQYFK	8	6
9	GLVLIAFSQHLQQCPYEEHVK	21	7
10	LVR	3	-
11	EVTEFAK	7	8
12	TCVADESAENCDK	13	9
13	SIHTLFGDK	9	10
14	LCAIPSLR	8	11
15	EHYGDLADCCEK	12	12
16	EEPER	5	13
17	NECFLQHK	8	14
18	NDNPDIPK	8	15
19	LK	2	-
20	PDPVALCADFQEDEQK	16	16
21	FWGK	4	17
22	YLYEIAR	7	18
23	R	1	-
24	HPYFYAPELLYYAIIYK	17	19
25	DVFSECCQAADK	12	20
26	AACLLPK	7	21
27	IEHLR	5	22
28	EK	2	-
29	VLTSAAK	7	23
30	QR	2	-
31	LK	2	-
32	CASIQK	6	24
33	FGER	4	25
34	AFK	3	-
35	AWSLAR	6	26
36	LSQR	4	27
37	FPK	3	-
38	ADFTEISK	8	28
39	IVTDLAK	7	29
40	VHK	3	-
41	ECCHGDLLECADDR	14	30
42	ADLAK	5	31
43	YICENQDTISTK	12	32
44	LK	2	-

peptide No.	配列	アミノ酸数	配列番号
45	ECCDK	5	33
46	PLLEK	5	34
47	SHCIAEAK	8	35
48	R	1	-
49	DELPADLNPLEHDFVEDK	18	36
50	EVCK	4	37
51	NYK	3	-
52	EAK	3	-
53	HVFLGTFLYEYSR	13	38
54	R	1	-
55	HPDYSVSLLLR	11	39
56	IAK	3	-
57	IYEATLEDCCAK	12	40
58	EDPPACYATVFDK	13	41
59	FQPLVDEPK	9	42
60	NLIK	4	43
61	QNCELFEK	8	44
62	LGEYGFQNALIVR	13	45
63	YTK	3	-
64	K	1	-
65	VPQVSTPTLVEVAR	14	46
66	K	1	-
67	LGLVGSR	7	47
68	CCK	3	-
69	R	1	-
70	PEEER	5	48
71	LSCAEDYLSLVLNR	14	49
72	LCVLHEK	7	50
73	TPVSEK	6	51
74	VTK	3	-
75	CCTESLVNR	9	52
76	R	1	-
77	PCFSALTPDETYK	13	53
78	PK	2	-
79	EFVEGTFTFHADLCTLPEDEK	21	54
80	QIK	3	-
81	K	1	-
82	QTALVELLK	9	55
83	HK	2	-
84	PHATEEQLR	9	56
85	TVLGNFAAFVQK	12	57
86	CCAAPDHEACFAVEGPK	17	58
87	FVIEIR	6	59
88	GILA	4	60

【０１１０】

表２に示したペプチド断片のうち、特異性を考慮しアミノ酸が４以上のペプチドを選択した（合計５９）。この５９のペプチド断片と、上記質量分析工程において得られたブタ血清アルブミンのトリプシン消化物のクロマトグラムデータ（図７）を比較し、質量分析において強いシグナルを示し感度良く検出されるペプチド断片６個を選出した（表３）。

【０１１１】

【表３】

[表3]

peptide No.	アミノ酸配列	特異性について	配列番号
22	YLYEIAR	イヌ、ネコ、ヒト、ブタに共通して存在する配列	18
39	IVTDLAK	ブタのみに存在する配列	29
43	YICENQDTISTK	ブタのみに存在する配列	32
82	QTALVELLK	イヌ、ウシ、ヒツジ、ブタに共通して存在する配列	55
87	FVIEIR	ブタのみに存在する配列	59
88	GILA	ブタのみに存在する配列	60

【０１１２】

表３に示すペプチド断片６個のアミノ配列についてデータベースを用いて相同性検索し、そのアミノ酸配列の特異性の高さを解析した。その結果も表３に示す。

図７のクロマトグラムデータと表３の結果を比較すると、ＱＴＡＬＶＥＬＬＫ配列（配

列番号５５）と、ＹＬＹＥＩＡＲ配列（配列番号１８）は質量分析において感度良く検出できるが、他種のタンパク質にも同一の配列が存在し、特異性に劣る。一方、ＦＶＩＥＩＲ配列（配列番号５９）とＧＩＬＡ配列（配列番号６０）はブタに特異的な配列であった。

【０１１３】

そこで、質量分析において感度良く検出でき、かつ、特異性も高いＦＶＩＥＩＲ配列（配列番号５９）とＧＩＬＡ配列（配列番号６０）を含む、ＰＫＦＶＩＥＩＲＧＩＬＡ（配列番号６１）からなるペプチドを抗原ペプチドとして、抗ペプチド抗体を製造することとした。

【０１１４】

（２）抗ペプチド抗体の製造

ＰＫＦＶＩＥＩＲＧＩＬＡペプチド（配列番号６１）を認識する抗ペプチド抗体は以下の手順により製造した。

（２－１）中間精製カラムと精製カラムの作製

以下の方法で中間精製カラムと精製カラムを作製した。

１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．６％　ＳＤＳ、０．１Ｍ　Na_2SO_3を含む２０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．５）に精製ブタ血清アルブミンを１０ｍｇ／ｍＬの濃度で溶解し、沸騰水中に１０分間浸漬した後、流水で冷却した。

このようにして得た変性したブタ血清アルブミン２５ｍｇを５ｍｇ／ｍＬ樹脂の濃度で５ｍＬのクロマトグラフィー用の樹脂に結合して、中間精製カラムを作製した。

【０１１５】

また、ＰＫＦＶＩＥＩＲＧＩＬＡペプチド（配列番号６１）のＮ末端にシステイン残基を結合したペプチドを合成し、このペプチドをシステイン残基のチオール基を介して１００μｇ／ｍＬ樹脂の濃度でクロマトグラフィー用の樹脂に結合して、精製カラムを作製した。

【０１１６】

（２－２）中間精製工程

１３５℃で処理したブタ血清アルブミンを免疫したウサギから得た抗血清を４０，０００×ｇで２０分間遠心分離して上清を得た。

この上清１５０ｍＬを中間精製カラムに１ｍＬ／ｍｉｎの流速で通じた後、６０ｍＬのＰＢＳで洗浄した。

その後、中間精製カラムに０．１Ｍ　Ｇｌｙｃｉｎｅ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ２．３）を通じることにより、カラムに吸着したポリクローナル抗体を溶出した。

【０１１７】

溶出液は０．２ｍＬの１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．６）を含む試験管に２ｍＬずつ分取した。溶出液の各フラクションについて２８０ｎｍの吸光度（Ａ２８０）を測定し、Ａ２８０が０．５以上であったフラクションをプールした。

こうして得られた抗体量は約７０ｍｇであった（Ａ２８０＝１．４＝１ｍｇ／ｍＬとして計算）。

上記操作を４回繰り返し、約２８０ｍｇのポリクローナルな抗変性豚血清アルブミン抗体を得た。

【０１１８】

（２－３）精製工程

中間精製工程で得られたポリクローナルな抗変性豚血清アルブミン抗体を、ＰＫＦＶＩＥＩＲＧＩＬＡペプチド（配列番号６１）を担持した精製カラムに通じた後、１５ｍＬのＰＢＳで洗浄した。

その後、精製カラムに０．１Ｍ　Ｇｌｙｃｉｎｅ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ２．３）を通じることにより、カラムに吸着したポリクローナルな抗ペプチド抗体を溶出した。

【０１１９】

なお、精製カラムにより吸着されなかったポリクローナル抗体は、抗変性ブタ血清アル

ブミンポリクローナル抗体として回収した。

【０１２０】

溶出液は０．０５ｍＬの１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．６）を含む試験管に０．５ｍＬずつ分取した。溶出液の各フラクションについて吸光度を測定し、Ａ２８０が０．５以上のフラクションをプールした。

このようにして、ブタ血清アルブミンのＣ末端の前記アミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナルな抗ペプチド抗体を約２ｍｇ得た。

【０１２１】

＜４＞ＥＬＩＳＡの検量線の作成

（１）固相化プレートの作製

精製工程で得られた抗ペプチド抗体を５０ｍＭ　炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．６）によって１μｇ／ｍＬに調製し、０．１ｍＬずつ９６穴マイクロプレートに分注して室温で２時間静置した。

その後、ウェルから当該抗体溶液を捨て、１５０ｍＭ　ＮａＣｌと０．０２％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．４）で洗浄した後、１ｍｇ／ｍＬの卵白アルブミンを含む同緩衝液を２００μLずつ分注して室温で２時間静置した。このようにして、精製工程で得たポリクローナルな抗ペプチド抗体が固相化された固相化プレートを作製した。固相化プレートは使用時まで４℃で保存した。

【０１２２】

（２）ＥＬＩＳＡ

精製カラムにより吸着されなかった前記抗変性ブタ血清アルブミンポリクローナル抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼで標識し標識抗体を調製した。

【０１２３】

０．６％　ＳＤＳ、０．１Ｍ　亜硫酸ナトリウム、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０、１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）に、精製ブタ血清アルブミンを１０ｍｇ／ｍＬの濃度で溶解し、沸騰水中で１０分間加熱して流水中で冷却し、変性したブタ血清アルブミン含む溶液を得た。

この溶液を１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０、１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で希釈することで、表１に示す濃度の変性ブタ血清アルブミン標準溶液を調製した。

【０１２４】

そして、前記標準溶液を用いて、前記標識抗体と前記固相化プレートによるＥＬＩＳＡ測定を常法により行い、検量線を作成した。すなわち、固相化プレートのウェルに前記標準溶液を分注し静置した。静置後、緩衝液によってウェルを洗浄し、基質溶液をウェルに加え、比色定量を行った。

表４に前記標準溶液における変性ブタ血清アルブミンの濃度と、比色定量の結果を示し、図８に検量線を示す。

【０１２５】

【表４】

［表4］

ブタ血清アルブミン濃度（ng/mL）	0	2.5	5	10	20	40	80	160
吸光度（450 nm−630 nm）	0.24	0.306	0.368	0.467	0.628	0.887	1.245	1.657

＜５＞ＬＣ－ＭＳ／ＭＳの検量線の作成

ＥＬＩＳＡの検量線の作成に用いたものと同じ変性ブタ血清アルブミン標準溶液のうち、０μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、２０μｇ／ｍＬ、４０μｇ／ｍＬの変性ブタ血清アルブミンを含むものをトリプシンによって酵素消化した。そして、このトリプシン酵素消化液を試料として、四重極型分析部を２つ備えたタンデム型であるＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる質量分析を行った。具体的には、変性ブタ血清アルブミン標準溶液をトリプシンによって酵素消化することによって生じたＧＩＬＡペプチド（配列番号６０）とＦＶＩＥＩＲペプチド（図９下段）（配列番号５９）に対応するイオンをＭＲＭトランジションとして、面

積値に基づく定量分析を行った。結果を表５に示し、図１０及び１１に検量線を示す。

【０１２６】

【表５】

［表5］

ブタ血清アルブミン濃度(μ g/mL)	0	10	20	40
GILAペプチド面積値	0	4805	11881	23334
FVIEIRペプチド面積値	0	7749	21606	47077

（測定濃度：μ g／mL）

【０１２７】

＜６＞免疫測定（ＥＬＩＳＡ）

水及び牛乳にそれぞれ１０μｇ／ｍＬ、２０μｇ／ｍＬ、４０μｇ／ｍＬの濃度となるように、精製ブタ血清アルブミンを添加したブタ血清アルブミン添加食品を調製した。また、陰性対照として精製ブタ血清アルブミンを添加していない水及び牛乳も用意した。

これらブタ血清アルブミン添加／非添加食品を試料として、上で作製した固相化プレートを用いてＥＬＩＳＡを行った。ＥＬＩＳＡは試料を希釈した状態で行った。その結果得られた比色定量の結果を図８の検量線に当てはめることで、各試料におけるブタ血清アルブミンの定量値を算出した。結果を表６に示す。

【０１２８】

【表６】

［表6］

試料	試料におけるブタ血清アルブミン濃度			
	0 μ g/mL	10 μ g/mL	20 μ g/mL	40 μ g/mL
	測定濃度	測定濃度	測定濃度	測定濃度
水	0	7.07	13.6	33.2
牛乳	0	8.12	16.9	31.8

（測定濃度：μ g／mL）

＜７＞質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）

上記＜６＞で調製したブタ血清アルブミン添加／非添加食品を試料として、上記＜５＞と同様の方法でＬＣ－ＭＳ／ＭＳによりブタ血清アルブミンの質量分析を行った。その結果得られた各試料におけるＧＩＬＡペプチドイオン（配列番号６０）とＦＶＩＥＩＲペプチドイオン（配列番号５９）の面積値を図１０又は１１の検量線に当てはめることで、各試料におけるブタ血清アルブミンの定量値を算出した。結果を表７及び８に示す。

【０１２９】

【表７】

［表7］　GIALペプチドイオンの検出によるブタ血清アルブミンの定量結果

試料	試料におけるブタ血清アルブミン濃度							
	0 μ g/mL		10 μ g/mL		20 μ g/mL		40 μ g/mL	
	面積値	測定濃度	面積値	測定濃度	面積値	測定濃度	面積値	測定濃度
水	0	0	4866	8.8	11843	20.6	23397	40.1
牛乳	0	0	6865	12.2	12857	22.3	23931	41.0

（測定濃度：μ g／mL）

【表８】

［表8］　FVIEIRペプチドイオンの検出によるブタ血清アルブミンの定量結果

試料	試料におけるブタ血清アルブミン濃度							
	0 μ g/mL		10 μ g/mL		20 μ g/mL		40 μ g/mL	
	面積値	測定濃度	面積値	測定濃度	面積値	測定濃度	面積値	測定濃度
水	0	0	7789	8.1	21418	19.4	46829	40.5
牛乳	0	0	12099	11.7	23133	20.8	51787	44.6

（測定濃度：μ g／mL）

【０１３０】

＜８＞まとめ

上記＜６＞のＥＬＩＳＡの結果と上記＜７＞のＬＣ－ＭＳ／ＭＳの結果について相関性の検定を行った。具体的には、同一の試料をＥＬＩＳＡ及びＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより測定して得られた結果についてＰ値を求めた。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳについては、ＧＩＬＡペプチ

ドイオン（配列番号６０）とＦＶＩＥＩＲペプチドイオン（配列番号５９）を検出した結果について、それぞれＥＬＩＳＡの結果との相関性を求めた。結果を表９に示す。

【０１３１】

【表９】

［表9］

	試料	
	水	牛乳
ELISAの結果 vs LC-MS／MSの結果(GIALペプチドイオンの検出)	p=0.007	p=0.001
ELISAの結果 vs LC-MS／MSの結果(FVIEIRペプチドイオンの検出)	p=0.004	p=0.003

【０１３２】

表９に示すように、上記＜６＞のＥＬＩＳＡの結果と、上記＜７＞のＬＣ－ＭＳ／ＭＳの結果には有意な相関性がある。

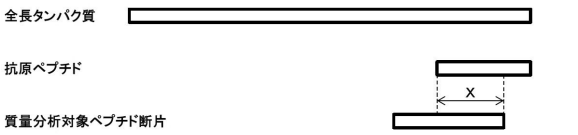
この結果は、本発明の免疫測定方法による測定結果は、共通するアミノ酸配列を有するペプチドを測定対象とする質量分析による測定結果と相関性が高く、精度に優れていることを示している。

【産業上の利用可能性】

【０１３３】

本発明はプロテオミクスに応用することができる。

【図１】

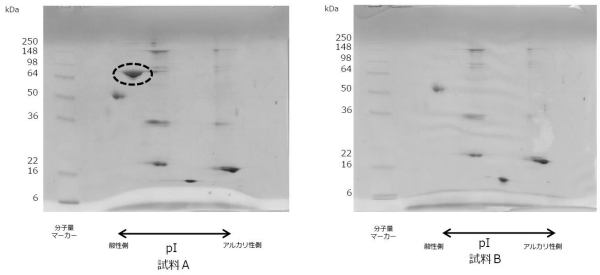


【図２】

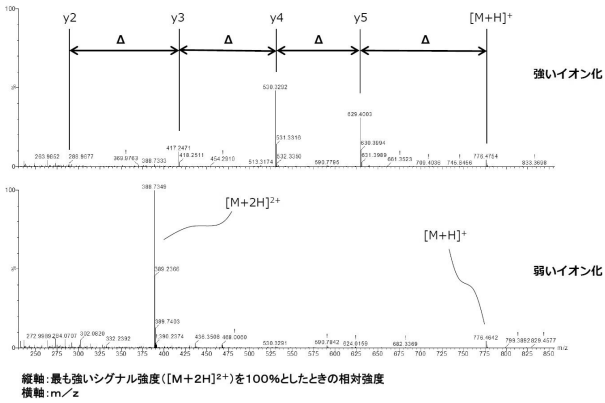
【図３】

【図４】

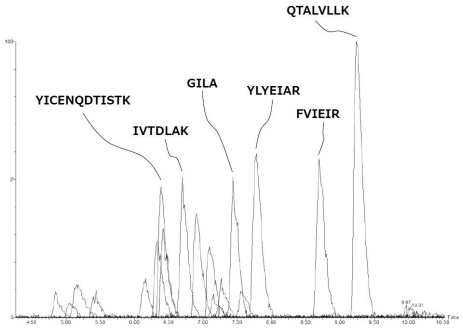
【図５】



【図６】

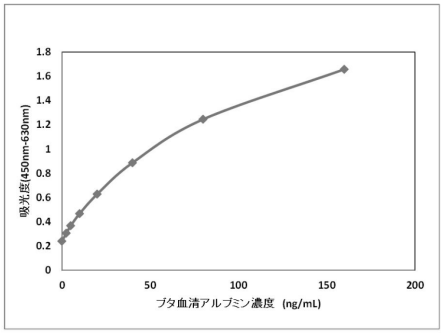


【図７】



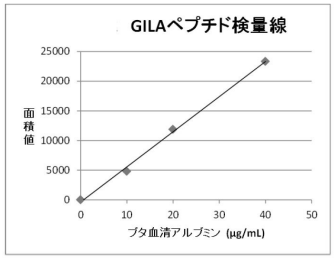
縦軸：最も強いシグナル強度（QTALVLLK）を100%としたときの相対強度
横軸：保持時間（分）

【図８】

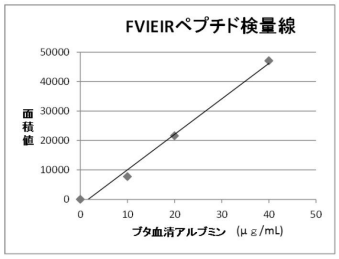


【図９】

【図１０】



【図１１】



【配列表】
0006358630000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　岡田　英樹
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６号　株式会社森永生科学研究所内
(72)発明者　栗原　圭
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６号　株式会社森永生科学研究所内

審査官　草川　貴史

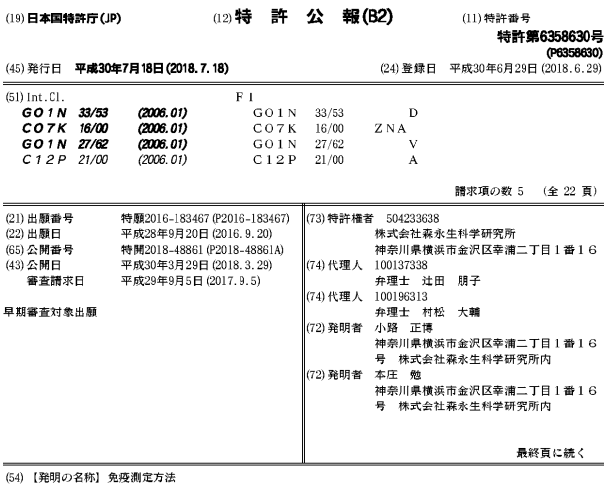
(56)参考文献　特開２０１２－２０７９５４（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－１８６１００（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５２５６４５（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／４８－３３／９８
Ｃ１２Ｐ　２１／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）

专利名称(译)	免疫测定方法		
公开(公告)号	JP6358630B2	公开(公告)日	2018-07-18
申请号	JP2016183467	申请日	2016-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所		
[标]发明人	小路正博 本庄勉 岡田英樹 栗原圭		
发明人	小路 正博 本庄 勉 岡田 英樹 栗原 圭		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/00 G01N27/62 C12P21/00		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/00.ZNA G01N27/62.V C12P21/00.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G041/HA02 2G041/LA08 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CE09 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/GA26 4H045/GA33		
代理人(译)	泰介村松		
其他公开文献	JP2018048861A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种能够进行与质谱法高度相关的免疫测定的技术。 一种免疫测定蛋白质组中特定蛋白质的方法，包括以下步骤：（1）分离过程以分离样品中的蛋白质 （2）通过质谱法鉴定通过分离过程分离的蛋白质的质谱法 （3）免疫测定步骤，使用特异性结合分离步骤中分离的蛋白质的抗肽抗体通过免疫测定法测量样品中包含的分离蛋白质 [选图]图1



(19) 日本国特許庁(JP)　(12) 特　許　公　報(B2)　(11) 特許番号 特許第6358630号 (P6358630)

(45) 発行日 平成30年7月18日 (2018.7.18)　(24) 登録日 平成30年6月29日 (2018.6.29)

(51) Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	ZNA
G01N 27/62	(2006.01)	G01N	27/62	V
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	A

請求項の数 5 （全 22 頁）

(21) 出願番号 特願2016-183467 (P2016-183467)
(22) 出願日 平成28年9月20日 (2016.9.20)
(65) 公開番号 特開2018-48861 (P2018-48861A)
(43) 公開日 平成30年3月29日 (2018.3.29)
審査請求日 平成29年9月5日 (2017.9.5)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 504233638
株式会社森永生科学研究所
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６
(74) 代理人 100137338
弁理士 辻田 朋子
(74) 代理人 100196313
弁理士 村松 大輔
(72) 発明者 小路 正博
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６号 株式会社森永生科学研究所内
(72) 発明者 本庄 勉
神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目１番１６号 株式会社森永生科学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫測定方法