

(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2004-331633

(P2004-331633A)

(43) 公開日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577 B	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2003-152800 (P2003-152800)
 (22) 出願日 平成15年5月29日 (2003.5.29)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-63407 (P2003-63407)
 (32) 優先日 平成15年3月10日 (2003.3.10)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成15年5月24日 発行の「日本生化学会北陸支部 第21回大会 要旨集及び総会資料」に発表

(71) 出願人 803000023
 有限会社金沢大学ティ・エル・オー
 石川県金沢市角間町ヌ7番地金沢大学内
 (74) 代理人 100105809
 弁理士 木森 有平
 (72) 発明者 中西 義信
 石川県河北郡津幡町緑が丘1丁目138番地

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 DA02 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40
 DA50 DA76 EA50 FA34 FA72

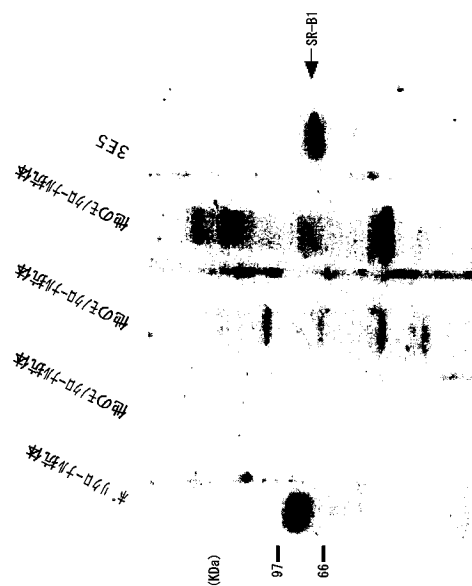
(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体及びその作製方法

(57) 【要約】

【課題】SR-BI分子の機能の解明に必要な不可欠なモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】マウスIgG1ノサブクラスに属し、ラットのクラスBスカベンジャー受容体タイプI (SR-BI) を認識するモノクローナル抗体である。ラットSR-BIのアミノ酸番号110~132に相当する配列を持つ合成ペプチド、ラットSR-BIのアミノ酸番号144~163に相当する配列を持つ合成ペプチド、あるいはラットSR-BIのアミノ酸番号192~439部分をヒト免疫グロブリンのFc領域に結合させたタンパク質を免疫原として作製される。作製されるモノクローナル抗体は、ウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法、蛍光抗体法、フローサイトメトリー法等の抗原タンパク質の検出方法に利用可能である。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マウス IgG1 / サブクラスに属し、ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I を認識するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸番号 110 ~ 132 に相当する配列を持つ合成ペプチドを免疫原とする請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸番号 144 ~ 163 に相当する配列を持つ合成ペプチドを免疫原とする請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸番号 192 ~ 439 部分をヒト免疫グロブリンの Fc 領域に結合させたタンパク質を免疫原とする請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸配列の少なくとも一部を含む合成ペプチドまたはタンパク質をマウスに投与した後、抗体産生細胞を採取し、前記抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマとし、クローン化したハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を分離抽出することを特徴とするモノクローナル抗体の作製方法。

20

【請求項 6】

前記合成ペプチドとして、ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸番号 110 ~ 132 に相当する配列を持つ合成ペプチドを用いることを特徴とする請求項 5 記載のモノクローナル抗体の作製方法。

【請求項 7】

前記合成ペプチドとして、ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸番号 144 ~ 163 に相当する配列を持つ合成ペプチドを用いることを特徴とする請求項 5 記載のモノクローナル抗体の作製方法。

【請求項 8】

前記タンパク質として、ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I のアミノ酸番号 192 ~ 439 部分をヒト免疫グロブリンの Fc 領域に結合させたタンパク質を用いることを特徴とする請求項 5 記載のモノクローナル抗体の作製方法。

30

【請求項 9】

前記抗体産生細胞が脾臓細胞であることを特徴とする請求項 5 記載のモノクローナル抗体の作製方法。

【請求項 10】

前記ミエローマ細胞が Sp2 / 0 - Ag14 であることを特徴とする請求項 5 記載のモノクローナル抗体の作製方法。

【請求項 11】

マウス IgG1 / サブクラスに属しラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I を認識するモノクローナル抗体を用い、これと反応する抗原タンパク質を検出することを特徴とする抗原タンパク質の検出方法。

40

【請求項 12】

ウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法、蛍光抗体法、フローサイトメトリー法から選ばれる 1 種であることを特徴とする請求項 11 記載の抗原タンパク質の検出方法。

【請求項 13】

前記モノクローナル抗体に標識となる 2 次抗体を反応させることを特徴とする請求項 12 記載の抗原タンパク質の検出方法。

【請求項 14】

マウス IgG1 / サブクラスに属しラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I を

50

認識するモノクローナル抗体により抗原タンパク質の活性を阻害し、当該抗原タンパク質の機能を解析することを特徴とする抗原タンパク質の機能解析方法。

【請求項15】

前記機能が、アポトーシス細胞貪食に関与する機能であることを特徴とする請求項14記載の抗原タンパク質の機能解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラットのクラスBスカベンジャー受容体タイプIに対するモノクローナル抗体及びその作製方法に関するものであり、さらには、このモノクローナル抗体を用いた抗原タンパク質検出方法、抗原タンパク質機能解析方法に関するものである。

10

【0002】

【従来の技術】

クラスBスカベンジャー受容体タイプI(以下、SR-BIと称する。)は、分子量約85キロダルトンの二回膜貫通型糖タンパク質であり、脂質代謝の盛んな組織やステロイドホルモンを産生する組織、例えば肝臓、脂肪細胞、精巣、副腎、肺等に多く存在する。SR-BIは、当初、酸化低密度リポタンパク質(OxLDL: oxidized low-density lipoprotein)の受容体として同定されたが、その後の研究により、生体では高密度リポタンパク質(HDL: high-density lipoprotein)特異的受容体として機能することが示され、そのコレステロール代謝

20

【0003】

また、SR-BIは、負電荷を持つ巨大分子や酸性リン脂質のリポソーム、さらにはアポトーシス細胞を認識することも示されており、例えば、アポトーシス細胞の貪食反応におけるSR-BIの関与が報告されている。アポトーシス細胞貪食反応は、4つの素過程、すなわちアポトーシス細胞周辺への食細胞の遊走、食細胞によるアポトーシス細胞の認識、食細胞によるアポトーシス細胞の取り込み、貪食されたアポトーシス細胞の食細胞内での輸送と処理、に分けることができる。これまでのこの分野の研究は、アポトーシス細胞選択認識を中心に行われてきており、アポトーシス細胞表面には貪食目印分子が出現し、食細胞はそれに対する特異的受容体で貪食すべき細胞を認識するという機構が想定されている。ここで、貪食目印分子には、糖鎖、タンパク質、リン脂質等、様々な種類の分子がその候補として挙げられているが、この中で、細胞膜リン脂質のホスファチジルセリン(PS)は、その報告例、認識する食細胞の種類、アポトーシス細胞表面への出現機構のいずれにおいても、最もよく知られた貪食目印分子である。食細胞上の貪食誘導性PS受容体として最初に同定されたのがSR-BIであり、これまでに精巣セルトリ細胞、卵巣theca細胞、胸腺nurse細胞がそれぞれの組織で生じたアポトーシス細胞を貪食する際に、SR-BIの関与が報告されている。

30

【0004】

さらに、本発明者らは、精子形成過程の少なくとも一部を再現できるラット精巣細胞の初代培養系を用いて、セルトリ細胞がアポトーシス精子形成細胞の貪食を行うことを明らかにした。また、このとき貪食反応がSR-BIの特異リガンドであるHDLやSR-BI特異抗体の添加により顕著に阻害されたことから、セルトリ細胞に発現するSR-BIがアポトーシス細胞の認識に関与することを報告している(非特許文献1参照)。

40

【0005】

【非特許文献1】

白土他、J. Biol. Chem. 274, 5901-5908 (1999)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、SR-BIは様々な組織に存在して脂質及びアポトーシス細胞取り込みに関与することが示されており、非マクロファージ系食細胞の主要な貪食誘導性PS受容体と

50

位置付けされる。さらに、マクロファージも発現することから、SR-BIは多くの食細胞に共通する受容体である可能性がある。したがって、SR-BI分子の機能を明らかにすることは、脂質代謝研究のみならず、生体内の有害な細胞を排除する仕組みの解明にも繋がるものと期待される。

【0007】

本発明は、このような状況に鑑みて提案されたものであり、SR-BI分子の機能の解明に必要不可欠なモノクローナル抗体及びその作製方法を提供することを目的とし、さらには、これを応用した抗原タンパク質の検出方法、機能解析方法を提供することを目的とする。

【0008】**【課題を解決するための手段】**

本発明のモノクローナル抗体は、マウスIgG1 / サブクラスに属し、ラットのクラスBスカベンジャー受容体タイプIを認識することを特徴とするモノクローナル抗体である。

10

【0009】

前記モノクローナル抗体は、具体的には、ラットのクラスBスカベンジャー受容体タイプI (SR-BI) のアミノ酸番号110~132に相当する配列を持つ合成ペプチド、ラットSR-BIのアミノ酸番号144~163に相当する配列を持つ合成ペプチド、あるいはラットSR-BIのアミノ酸番号192~439部分をヒト免疫グロブリンのFc領域に結合させたタンパク質を免疫原として作製される。

20

【0010】

作製に際しては、前述のようなラットSR-BIのアミノ酸配列の少なくとも一部を含む合成ペプチドまたはタンパク質をマウスに投与した後、抗体産生細胞(例えば脾臓細胞)を採取し、前記抗体産生細胞をミエローマ細胞(例えばSP2/0-Ag14)と融合させてハイブリドーマとし、クローン化したハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を分離抽出する。

【0011】

本発明のモノクローナル抗体は、抗原タンパク質の検出や、抗原タンパク質の活性の阻害から当該抗原タンパク質の機能の解析に利用することができ、SR-BI分子の機能を明らかにし、脂質代謝研究や生体内の有害な細胞を排除する仕組みを解明する上で、極めて有用である。

30

【0012】

例えば、抗原タンパク質の検出には、必ずしもモノクローナル抗体を用いる必要はないが、ポリクローナル抗体は供給量が限られており、また均一な標品が常に入手可能という訳ではない。ポリクローナル抗体の場合、動物血液から抗体を採取するため、その動物の全血液量分の抗体しか存在せず、入手量に限りがある。これに対して、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマを維持する限り半永久的に供給可能であり、また、長期に亘る研究において同一品質の試薬を利用できるという利点を有する。

【0013】

なお、本発明のモノクローナル抗体を利用可能な抗原タンパク質の検出方法としては、例えばウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法、蛍光抗体法、フローサイトメトリー法等を挙げることができ、この場合、必要に応じてモノクローナル抗体に標識となる二次抗体を反応させることで、その検出を容易なものとすることができる。

40

【0014】

また、本発明のモノクローナル抗体は、特定のタンパク質を認識し、特定部位に結合してその活性を阻害する性質を有することから、動物個体中でそのタンパク質(SR-BI)の働きを奪った時の影響を調べることで、当該タンパク質の機能阻害の解析に利用することができる。

【0015】

例えばSR-BIは、精巢中のセルトリ細胞に存在する。そこで、セルトリ細胞における

50

S R - B I の役割を知るために、生きたラットの精巣に抗体を注入してその影響、例えばその後精子形成が正常に行われているかどうかを調べる。ここで何らかの異常が認められれば、その現象に S R - B I が関与する可能性が生ずることになる。

【 0 0 1 6 】

通常はこのような実験には大量の抗体が必要であり、モノクローナル抗体を入手していなければ遂行することは不可能である。

【 0 0 1 7 】

【 発明の実施の形態 】

以下、本発明のモノクローナル抗体及びその作製方法、さらには、本発明のモノクローナル抗体を用いた抗原タンパク質の検出方法、機能解析方法について詳述する。

10

【 0 0 1 8 】

本発明のモノクローナル抗体は、マウス I g G 1 / サブクラスに属し、ラットのクラス B スカベンジャー受容体タイプ I (S R - B I) を認識する。ラットの S R - B I は、分子量約 8 5 k D a であり、図 1 に示すように、5 0 9 個のアミノ酸残基からなる二回膜貫通型糖タンパク質である。S R - B I には、細胞膜 (C M) 貫通領域と予想される疎水性アミノ酸に富む領域がアミノ酸の 9 ~ 3 2 番目、4 5 0 ~ 4 7 5 番目の 2 カ所に存在し、N 末端、C 末端に位置する細胞内領域はごく短い。

【 0 0 1 9 】

配列表に、ラットの S R - B I のアミノ酸配列を示す。なお、配列表においては、ラットセルトリ細胞、ハムスターの S R - B I 、マウスの S R - B I のアミノ酸配列も併せて示す。

20

【 0 0 2 0 】

S R - B I は、脂質代謝の盛んな組織やステロイドホルモンを産生する組織、例えば肝臓、脂肪細胞、精巣、副腎、肺等に多く分布し、H D L や A c L D L 、 O x L D L 、酸性リポソーム、アポトーシス細胞等をリガンドとする。S R - B ファミリーの一つである S R - B I は、H D L の取り込み及びアポトーシス細胞の認識における働きが注目されている分子である。

【 0 0 2 1 】

本発明のモノクローナル抗体は、前記のような S R - B I 分子の機能を明らかにし、例えば脂質代謝研究や生体内の有害な細胞を排除する仕組みを解明する上で極めて有用なものである。

30

【 0 0 2 2 】

本発明のモノクローナル抗体を作製するには、免疫原を被免疫動物 (マウス系統) に接種し、免疫する。免疫原の接種方法は、腹腔内投与、リンパ節内投与、皮内投与、脾内投与、血管内投与等、任意である。

【 0 0 2 3 】

免疫原としては、合成ペプチドや、ラット S R - B I の細胞外領域に相当するアミノ酸配列部分を結合させたタンパク質等を使用する。具体的には、先の配列表に示すラット S R - B I のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号 1 1 0 ~ 1 3 2 に相当する配列を持つ合成ペプチド、アミノ酸番号 1 4 4 ~ 1 6 3 に相当する配列を持つ合成ペプチド、あるいはアミノ酸番号 1 9 2 ~ 4 3 9 部分をヒト免疫グロブリンの F c 領域に結合させたタンパク質である。

40

【 0 0 2 4 】

そして、得られた免疫動物から、例えば脾臓細胞やリンパ節細胞等の抗体産生細胞を分離し、抗体産生細胞を得る。得られた抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合し、増殖を半永久化する。このとき、細胞融合に使用するミエローマ細胞としては、S p 2 / 0 - A g 1 4 (S P 2) のような細胞株を挙げることができる。次いで、融合した細胞 (ハイブリドーマ) を培養し、クローン化した後、抗 S R - B I 抗体を産生するハイブリドーマを選択し、目的とするモノクローナル抗体を分離抽出する。

【 0 0 2 5 】

50

以上により作製されるモノクローナル抗体は、抗原タンパク質の検出や、抗原タンパク質の活性の阻害から当該抗原タンパク質の機能の解析に利用することができる。適用可能な抗原タンパク質の検出方法としては、例えばウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法、蛍光抗体法、フローサイトメトリー法等を挙げることができる。

【0026】

例えば、ウェスタンブロッティング (Western blotting) は、タンパク質試料中に含まれる抗原タンパク質の分子量と含有量を決定する方法である。ウェスタンブロッティングでは、先ず、目的のタンパク質を含む試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、分子量に従って分離されたタンパク質を特殊な膜に写し取る。その膜にモノクローナル抗体を反応させ、さらにモノクローナル抗体を認識する二次抗体 (例えば抗マウス Ig G 抗体に色素、酵素、蛍光物質、放射性物質等を結合させたもの。) を反応させる。最後に、二次抗体の標識物質を検出して最初の試料中に含まれる抗原タンパク質の分子量と含有量を決定する。

10

【0027】

免疫組織化学は、動物臓器中のどの細胞に抗原タンパク質が含まれているか、あるいは細胞中のどの場所に抗原タンパク質が存在するかを決定する手法である。免疫組織化学に際しては、動物臓器については薄い (10 μm 程度) 切片を作成し、ばらばらにした細胞はそのままスライドガラスに貼り付ける。そこにモノクローナル抗体を反応させ、前記ウェスタンブロッティングの場合と同様の方法で二次抗体の標識物質を検出する。それらの試料を顕微鏡で解析して、抗原タンパク質の存在場所を決定する。

20

【0028】

蛍光抗体法は、前記免疫組織化学と同じ目的で利用される実験方法であり、主にばらばらにした細胞について適用される。ばらばらにした細胞をスライドガラスに貼り付け、そこにモノクローナル抗体を反応させる。次に、蛍光物質で標識された二次抗体を添加して反応させ、最後に蛍光顕微鏡で観察する。目的の抗原タンパク質が含まれる場所が顕微鏡下に光って見える。

【0029】

フローサイトメトリー (flow cytometry) は、ばらばらにした細胞群について、目的の抗原タンパク質を持つ細胞の割合を決定する方法である。フローサイトメトリーでは、細胞試料を、先ずモノクローナル抗体と、続いて蛍光物質で標識された二次抗体と反応させる。それをフローサイトメーターで解析し、抗原を有する細胞の数および抗原量を決定する。

30

【0030】

本発明のモノクローナル抗体は、当該モノクローナル抗体による目的タンパク質の機能阻害から、動物個体中でそのタンパク質の働きを奪ったときに見られる影響の解析に利用できる。

【0031】

このような抗 SR - BI モノクローナル抗体を用いた実験としては、例えばセルトリ細胞における SR - BI の役割を知るための実験等を挙げることができる。すなわち、SR - BI は精巣中のセルトリ細胞に存在する。そこで、セルトリ細胞における SR - BI の役割を知るために、生きたラットの精巣に抗体を注入してその影響を調べる。麻酔を施したラットの精巣を露出させ、精細管内にモノクローナル抗体を含む溶液を微量注入する。精巣を腹部に戻し、切開場所を縫合して、そのラットを一定期間飼育する。その後、精巣を取り出して、精子形成が正常に行われているかどうかを調べる。何らかの異常が認められたならば、その現象に SR - BI が関与する可能性が生まれる。

40

【0032】

【実施例】

以下、本発明の具体的な実施例について、実験結果を基に説明する。

【0033】

免疫原の調製

50

ラットSR-BIのアミノ酸番号110~132、あるいはアミノ酸番号144~163に相当する配列を持ち、且つアミノ末端にシステインが付加されたペプチドを合成した。なお、合成は、米国TANA Laboratories社に依頼した。これらのペプチドのシステインにペプチドの抗原活性を高める役割を果たすタンパク質(Keyhole limpet hemocyanin)を結合させて免疫原とした(これをKLH-ペプチドと称する。)。また一方、ラットSR-BIの細胞外領域に相当するアミノ酸番号192~439の部分をヒト免疫グロブリンのFc領域(目的タンパク質の精製のし易さと安定性に寄与する。)に結合させ、これにより得られたタンパク質をヒト培養細胞で発現させて精製したのも免疫原として用いた(これをSRBIecd-Fcと称する。例えば、河崎他, J. Biol. Chem. 277, 27559-27566(2002)を参照。)。これら合計3種類の免疫原を別々にマウスに接種して抗体生産を促した。

10

【0034】

マウスへの免疫

リン酸緩衝塩水(Phosphate-buffered saline)に溶かした25µgのKLH-ペプチド(2種類)、あるいは50µgのSRBIecd-Fcを、フロイント完全アジュバントとともに懸濁して、Balb/cマウスの腹腔に注射した。その2週間後に、同量の抗原をフロイント不完全アジュバントに懸濁して、同じマウスの腹腔に注射した。これをさらに2~4回繰り返した。

【0035】

ハイブリドーマの作成

最後の免疫から3日後に脾臓を摘出し、そこに含まれている細胞をばらばらにした。ポリエチレングリコールを用いた方法を利用して、それらの脾臓細胞をミエローマSP2/0-Ag14細胞と融合させた(融合により脾臓細胞の増殖が半永久化される)。融合した細胞(ハイブリドーマと呼ぶ)のみが生き残るような薬剤を含むHAT培地で培養し、生存して増えてきた細胞をクローン化(1種類の細胞だけにする作業)した。

20

【0036】

抗SR-BI抗体を生産するハイブリドーマの選択

クローン化したハイブリドーマの培養上清について、対応する免疫原を用いたELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法を利用して各免疫原に結合する抗体の有無を検定した。その結果、KLH-ペプチド110-132を免疫原にした場合では28クローン、KLH-ペプチド144-163では2クローン、そしてSRBIecd-Fcでは1クローンが抗SR-BI抗体を生産するハイブリドーマとして得られた。

30

【0037】

各モノクローナル抗体の性質の検定

得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体について、先ずサブクラスを調べた。その結果、全ての抗体がIgG1/2であった。

【0038】

これらの抗体を精製して、各種免疫実験に適用できるかどうかを検定した。その結果、表1に示すように、クローンによって適用できる免疫実験が異なるが、特に、KLH-ペプチド144-163を免疫原にした2クローン(6C7及び3D12)、及びSRBIecd-Fcを免疫原にした1クローン(3E5)において免疫実験に適用できることがわかった。

40

【0039】

【表1】

抗原名	抗原	Ig種類	ウエスタンブロッティング 未固定細胞	蛍光体法 未固定細胞	免疫組織化学 固定細胞組織切片	フローサイトメトリー 未固定細胞	活性中和 HDL由来脂質の取り込み
3D12	144-163-KLH	マウスIgG1, κ	x	図3、図4	x	図7	図8
3E5	192-439-ヒトFc	マウスIgG1, κ	図2	x	図5、図6	x	x

10

20

30

40

【 0 0 4 0 】

細胞の固定

以下、先に作製されたモノクローナル抗体を用いた免疫実験について説明するが、これらの免疫実験では、細胞が持つ抗原を検出する際に、細胞を固定するか否かの選択がある。

50

何も処理しない細胞では細胞膜がバリアーとなって、抗体が細胞内に入ることができない。これに対して、固定した細胞では、細胞膜の物質透過性が上昇して、抗体が細胞内部に侵入できるようになる。そのため、抗体による抗原検出反応を行うと、固定しない細胞では細胞表層に存在する抗原のみが検出されるのに対して、固定した細胞では細胞表層と細胞内部の抗原がすべて検出される。そこで、実験の目的によって、いずれの方法を採用するかを決めることとする。

【0041】

モノクローナル抗体 3 E 5 を用いたウェスタンブロッティングによる S R - B I の検出
ラットセルトリ細胞の抽出液中に含まれるタンパク質 20 μ g を SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、セミドライブロット装置を使ってポリフッ化ビニリデン (P V D F) 膜に移し取った後に、モノクローナル抗体 3 E 5 が結合するタンパク質を検出した。結果を図 2 に示す。

10

【0042】

10 μ g / ml のモノクローナル抗体 3 E 5 を反応させると単一のシグナルが検出され (図中右端部分)、これは既知のポリクローナル抗体が結合するシグナルと同じ位置に存在する (図中左端部分)。他のモノクローナル抗体ではこのようなシグナルは得られなかった。したがって、モノクローナル抗体 3 E 5 を用いることにより、ウェスタンブロッティングによって S R - B I を検出することが可能であることが判明した。

【0043】

モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いた蛍光抗体法による未固定細胞表層の S R - B I の検出

20

遺伝子導入により S R - B I を発現させたハムスター卵巣由来の培養細胞 (河崎他, J . Biol . Chem . 277 , 27559 - 27566 (2002) を参照。) について、未固定条件でモノクローナル抗体 3 D 1 2 を反応させ、さらに蛍光標識された抗マウス I g G 抗体を反応させた後に、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果を図 3 に示す。図 3 において、符号 G が S R - B I の位置を示す。なお、図 3 において、上 2 枚 (a) , (b) と下 2 枚 (c) , (d) は細胞の異なる位置の横断面を示す (上は中央寄りであり、下は上部寄りである。)。この結果は、モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いた蛍光抗体法により未固定細胞表層の S R - B I の検出が可能であることを示している。

【0044】

モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いた蛍光抗体法による未固定細胞表層の S R - B I の検出

30

ラット黄体細胞について、未固定条件でモノクローナル抗体 3 D 1 2 を反応させ、さらに蛍光標識した抗マウス I g G 抗体を反応させた後に落射蛍光顕微鏡で観察した。結果を図 4 に示す。図 4 (a) に示す暗視野画像において、色の薄い部分が S R - B I の位置を示す。この結果、モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いた免疫組織化学によって、未固定細胞表層の S R - B I の検出が可能であることがわかる。

【0045】

モノクローナル抗体 3 E 5 を用いた免疫組織化学による細胞全体の S R - B I の検出

パラホルムアルデヒドで固定したラット黄体細胞にモノクローナル抗体 3 E 5 を反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識された抗マウス I g G 抗体を反応させ、呈色反応を行った後に顕微鏡で観察した。結果を図 5 に示す。符号 B R が S R - B I の位置を、符号 B L が細胞核を示す。この結果から、モノクローナル抗体 3 E 5 を用いた免疫組織化学によって、固定した細胞全体の S R - B I の検出が可能であることがわかる。

40

【0046】

モノクローナル抗体 3 E 5 を用いた免疫組織化学による卵巣切片中の S R - B I の検出

パラホルムアルデヒドで固定して凍結したラット卵巣から切片を作製してモノクローナル抗体 3 E 5 を反応させ、次にペルオキシダーゼ標識された抗マウス I g G 抗体を反応させ、呈色反応を行った後に顕微鏡で観察した。結果を図 6 に示す。図 6 において、(a) は卵巣全体、(b) は黄体、(c) は卵胞の像を示す。また、符号 B R が S R - B I の位置

50

を、符号 B L が細胞核を示す。S R - B I は卵巣中の黄体と卵胞に存在する。この結果、モノクローナル抗体 3 E 5 を用いた免疫組織化学により、ラット組織切片での S R - B I の検出が可能であることがわかった。

【0047】

モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いたフローサイトメトリーによる細胞表層の S R - B I の検出

未固定の細胞にモノクローナル抗体 3 D 1 2 を反応させ、さらに蛍光標識された抗マウス I g G 抗体を反応させた後に、フローサイトメーターで解析した。結果を図 7 に示す。遺伝子導入により S R - B I を発現させたハムスター卵巣由来の培養細胞 (S R - B I 発現株) [図 7 (b)] は、導入前の細胞 (親株) [図 7 (a)] に比べて多量の 3 D 1 2 を結合させることがわかる。他のモノクローナル抗体は結合しない [図 7 (c)]。この結果より、モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いたフローサイトメトリーにより、細胞表層の S R - B I の検出が可能であることがわかる。

10

【0048】

モノクローナル抗体 3 D 1 2 の H D L 取り込みへの影響

培養した細胞を含む培地に蛍光標識された H D L (1 0 μ g / m l) を添加し、37 で 2 時間加温した。その後細胞をリン酸緩衝塩水 (P h o s p h a t e - b u f f e r e d s a l i n e) で洗浄し、細胞への蛍光標識 H D L の取り込みをフローサイトメトリーで解析した。結果を図 8 に示す。遺伝子導入により S R - B I を発現させたハムスター卵巣由来の培養細胞 (S R - B I 発現株) [図 8 (b)] には、導入前の細胞 (親株) [図 8 (a)] に比べて多量の H D L が取り込まれることがわかる。この反応をモノクローナル抗体 3 D 1 2 (5 0 μ g / m l) の存在のもとに行わせると、図 8 (c) に示すように、取り込み量は導入前の細胞を用いた反応とほぼ同程度まで低下した。他のモノクローナル抗体を添加しても、図 8 (d) に示すように、H D L の取り込みは影響を受けない。したがって、モノクローナル抗体 3 D 1 2 は、S R - B I の H D L 取り込み活性を阻害することがわかる。

20

【0049】

モノクローナル抗体 3 D 1 2 のアポトーシス細胞貪食への影響

モノクローナル抗体 3 D 1 2 のアポトーシス細胞貪食への影響を以下のように調べた。20 日齢ラットの精巣より単離したセルトリ細胞をモノクローナル抗体 3 D 1 2 または他のモノクローナル抗体と混ぜ、32.5 で 1 時間加温した。そのセルトリ細胞を同じ精巣より調製した精子形成細胞と 1 : 1 0 の割合で混ぜ、上記のモノクローナル抗体を存在させた状態で 32.5 で 2 時間加温後、精子形成細胞を取り込んだセルトリ細胞数を計測した。結果を図 9 に示す。図 9 には、貪食の程度を、抗体添加無しの時の貪食インデックス (総セルトリ細胞数あたりの精子形成細胞を貪食したセルトリ細胞数のパーセント) に対する相対値で示してある。図 9 に示されるように、セルトリ細胞による精子形成細胞の貪食は、モノクローナル抗体 3 D 1 2 の添加により阻害されたが、他のモノクローナル抗体によっては影響を受けなかった。したがって、モノクローナル抗体 3 D 1 2 によって機能が阻害される S R - B I が、セルトリ細胞による精子形成細胞の貪食に関与していることがわかる。

30

40

【0050】

【発明の効果】

以上の説明からも明らかなように、本発明によれば、S R - B I 分子の機能の解明に必要な不可欠なモノクローナル抗体を提供することが可能であり、さらには、これを応用した抗原タンパク質の検出方法、機能解析方法を提供することが可能である。特に、本発明のモノクローナル抗体は、各実験結果からも明らかなように、未固定細胞の表層に存在する抗原の検出が可能であること、抗原の機能を阻害する働きを有すること、均一な標品が大量に得られること等の特徴を有し、これまで不可能であった研究が可能になるという、極めて顕著な効果を奏するものである。

【配列表】

50

SEQUENCE LISTING

<110> Kanazawa University Technology Licensing Organization Ltd.
 <120> monoclonal antibody and manufacturing process for monoclonal antibody
 <130> 2003-037
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.1 10
 <210> 1
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 1

Met Gly Val Ser Ser Arg Ala Arg Trp Val Ala Leu Gly Leu Gly Val
 1 5 10 15 20
 Leu Gly Leu Leu Cys Ala Ala Leu Gly Val Ile Met Ile Leu Met Val
 20 25 30
 Pro Ser Leu Ile Lys Gln Gln Val Leu Lys Asn Val Arg Ile Asp Pro
 35 40 45
 Ser Ser Leu Ser Phe Gly Met Trp Lys Glu Ile Pro Val Pro Phe Tyr
 50 55 60
 Leu Ser Val Tyr Phe Phe Glu Val Val Asn Pro Ser Glu Val Leu Asn 30
 65 70 75 80
 Gly Gln Lys Pro Val Val Arg Glu Arg Gly Pro Tyr Val Tyr Arg Glu
 85 90 95
 Phe Arg Gln Lys Val Asn Ile Thr Phe Asn Asp Asn Asp Thr Val Ser
 100 105 110
 Tyr Ile Glu Asn Arg Ser Leu Arg Phe Gln Pro Asp Arg Ser Gln Gly
 115 120 125 40
 Ser Glu Ser Asp Tyr Ile Val Leu Pro Asn Ile Leu Val Leu Gly Gly

130	135	140	
Ala Val Met Met Glu Asp Lys Pro Thr Ser Leu Lys Leu Leu Met Thr			
145	150	155	160
Leu Gly Leu Val Thr Met Gly Gln Arg Ala Phe Met Asn Arg Thr Val			
	165	170	175
Gly Glu Ile Leu Trp Gly Tyr Glu Asp Pro Phe Val Asn Phe Leu Ser			
	180	185	190
Lys Tyr Phe Pro Asp Met Phe Pro Ile Lys Gly Lys Phe Gly Leu Phe			10
	195	200	205
Val Gly Met Asn Asp Ser Ser Ser Gly Val Phe Thr Val Phe Thr Gly			
	210	215	220
Val Gln Asn Phe Ser Lys Ile His Leu Val Asp Lys Trp Asn Gly Leu			
225	230	235	240
Ser Glu Val Asn Tyr Trp His Ser Glu Gln Cys Asn Met Ile Asn Gly			20
	245	250	255
Thr Ala Gly Gln Met Trp Ala Pro Phe Met Thr Pro Glu Ser Ser Leu			
	260	265	270
Glu Phe Phe Ser Pro Glu Ala Cys Arg Ser Met Lys Leu Thr Tyr Gln			
	275	280	285
Glu Ser Arg Val Phe Glu Gly Ile Pro Thr Tyr Arg Phe Thr Ala Pro			
290	295	300	30
Asp Thr Leu Phe Ala Asn Gly Ser Val Tyr Pro Pro Asn Glu Gly Phe			
305	310	315	320
Cys Pro Cys Arg Glu Ser Gly Ile Gln Asn Val Ser Thr Cys Arg Phe			
	325	330	335
Gly Ala Pro Leu Phe Leu Ser Gln Pro His Phe Tyr Asn Ala Asp Pro			
	340	345	350
Val Leu Ser Glu Ala Val Leu Gly Leu Asn Pro Asp Pro Lys Glu His			40
	355	360	365

Ser Leu Phe Leu Asp Ile His Pro Val Thr Gly Ile Pro Met Asn Cys
 370 375 380

Ser Val Lys Met Gln Leu Ser Leu Tyr Ile Lys Ser Val Lys Gly Val
 385 390 395 400

Gly Gln Thr Gly Lys Ile Glu Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Trp Phe
 405 410 415

Glu Gln Ser Gly Met Met Gly Gly Lys Thr Leu Asn Thr Phe Tyr Thr
 420 425 430

Gln Leu Val Leu Met Pro Gln Val Leu His Tyr Ala Gln Tyr Val Leu
 435 440 445

Leu Gly Leu Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Pro Ile Ile Tyr Gln Leu
 450 455 460

Arg Ser Gln Glu Lys Cys Phe Leu Phe Trp Ser Gly Ser Lys Lys Gly
 465 470 475 480

Ser Gln Asp Lys Glu Ala Met Gln Ala Tyr Ser Glu Ser Leu Met Ser
 485 490 495

Pro Ala Ala Lys Gly Thr Val Leu Gln Glu Ala Lys Leu
 500 505

<210> 2

<211> 509

<212> PRT

<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 2

Met Gly Gly Ser Ala Arg Ala Arg Trp Val Ala Val Gly Leu Gly Val
 1 5 10 15

Val Gly Leu Leu Cys Ala Val Leu Gly Val Val Met Ile Leu Val Met
 20 25 30

Pro Ser Leu Ile Lys Gln Gln Val Leu Lys Asn Val Arg Ile Asp Pro
 35 40 45

10

20

30

40

<210> 3

<211> 509

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

Met Gly Gly Ser Ser Arg Ala Arg Trp Val Ala Leu Gly Leu Gly Ala

1 5 10 15

10

Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ala Leu Gly Val Val Met Ile Leu Met Val

20 25 30

Pro Ser Leu Ile Lys Gln Gln Val Leu Lys Asn Val Arg Ile Asp Pro

35 40 45

Ser Ser Leu Ser Phe Gly Met Trp Lys Glu Ile Pro Val Pro Phe Tyr

50 55 60

Leu Ser Val Tyr Phe Phe Glu Val Val Asn Pro Asn Glu Val Leu Asn

65 70 75 80

20

Gly Gln Lys Pro Val Val Arg Glu Arg Gly Pro Tyr Val Tyr Arg Glu

85 90 95

Phe Arg Gln Lys Val Asn Ile Thr Phe Asn Asp Asn Asp Thr Val Ser

100 105 110

Phe Val Glu Asn Arg Ser Leu His Phe Gln Pro Asp Lys Ser His Gly

115 120 125

30

Ser Glu Ser Asp Tyr Ile Val Leu Pro Asn Ile Leu Val Leu Gly Gly

130 135 140

Ser Ile Leu Met Glu Ser Lys Pro Val Ser Leu Lys Leu Met Met Thr

145 150 155 160

Leu Ala Leu Val Thr Met Gly Gln Arg Ala Phe Met Asn Arg Thr Val

165 170 175

Gly Glu Ile Leu Trp Gly Tyr Asp Asp Pro Phe Val His Phe Leu Asn

180 185 190

40

Thr Tyr Leu Pro Asp Met Phe Pro Ile Lys Gly Lys Phe Gly Leu Phe	
195	200 205
Val Gly Met Asn Asn Ser Asn Ser Gly Val Phe Thr Val Phe Thr Gly	
210	215 220
Val Gln Asn Phe Ser Arg Ile His Leu Val Asp Lys Trp Asn Gly Leu	
225	230 235 240
Ser Lys Ile Asp Tyr Trp His Ser Glu Gln Cys Asn Met Ile Asn Gly	10
245	250 255
Thr Ser Gly Gln Met Trp Ala Pro Phe Met Thr Pro Glu Ser Ser Leu	
260	265 270
Glu Phe Phe Ser Pro Glu Ala Cys Arg Ser Met Lys Leu Thr Tyr Asn	
275	280 285
Glu Ser Arg Val Phe Glu Gly Ile Pro Thr Tyr Arg Phe Thr Ala Pro	
290	295 300
Asp Thr Leu Phe Ala Asn Gly Ser Val Tyr Pro Pro Asn Glu Gly Phe	
305	310 315 320
Cys Pro Cys Arg Glu Ser Gly Ile Gln Asn Val Ser Thr Cys Arg Phe	
325	330 335
Gly Ala Pro Leu Phe Leu Ser His Pro His Phe Tyr Asn Ala Asp Pro	
340	345 350
Val Leu Ser Glu Ala Val Leu Gly Leu Asn Pro Asn Pro Lys Glu His	30
355	360 365
Ser Leu Phe Leu Asp Ile His Pro Val Thr Gly Ile Pro Met Asn Cys	
370	375 380
Ser Val Lys Met Gln Leu Ser Leu Tyr Ile Lys Ser Val Lys Gly Ile	
385	390 395 400
Gly Gln Thr Gly Lys Ile Glu Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Trp Phe	
405	410 415
Glu Gln Ser Gly Ala Met Gly Gly Lys Pro Leu Ser Thr Phe Tyr Thr	40

420 425 430
 Gln Leu Val Leu Met Pro Gln Val Leu His Tyr Ala Gln Tyr Val Leu
 435 440 445
 Leu Gly Leu Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Pro Ile Ile Cys Gln Leu
 450 455 460
 Arg Ser Gln Glu Lys Cys Phe Leu Phe Trp Ser Gly Ser Lys Lys Gly
 465 470 475 480
 Ser Gln Asp Lys Glu Ala Ile Gln Ala Tyr Ser Glu Ser Leu Met Ser
 485 490 495
 Pro Ala Ala Lys Gly Thr Val Leu Gln Glu Ala Lys Leu
 500 505

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】SR - BI の構造を示す模式図である。

【図 2】モノクローナル抗体 3 E 5 を用いたウェスタンブロッティングによる SR - BI の検出結果を示す図である。 20

【図 3】モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いた蛍光抗体法による未固定細胞表層の SR - BI の検出結果を示す共焦点レーザー顕微鏡写真である。

【図 4】モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いた蛍光抗体法による未固定細胞表層の SR - BI の検出結果を示す落射蛍光顕微鏡写真である。

【図 5】モノクローナル抗体 3 E 5 を用いた免疫組織化学による細胞全体の SR - BI の検出結果を示す顕微鏡写真である。

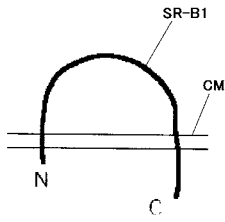
【図 6】モノクローナル抗体 3 E 5 を用いた免疫組織化学による卵巣切片中の SR - BI の検出結果を示す顕微鏡写真である。

【図 7】モノクローナル抗体 3 D 1 2 を用いたフローサイトメトリーによる細胞表層の SR - BI の検出結果を示す図である。 30

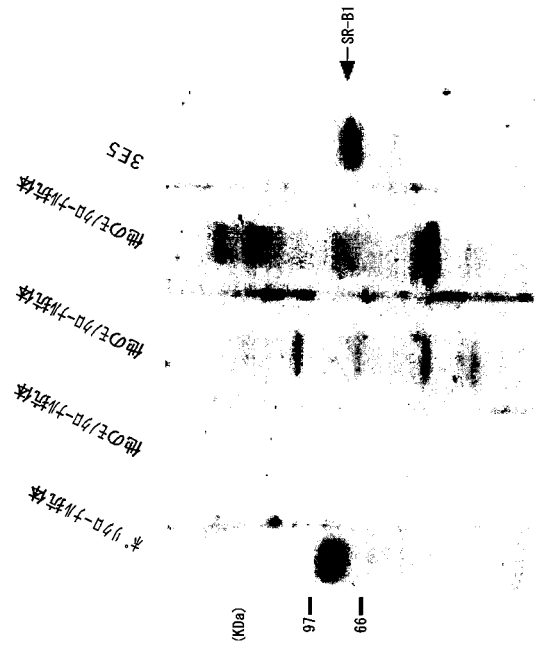
【図 8】蛍光標識された HDL の細胞への取り込みをフローサイトメトリーで解析した結果を示す図である。

【図 9】ラットセルトリ細胞による精子形成細胞の貪食反応の結果を示した図である。

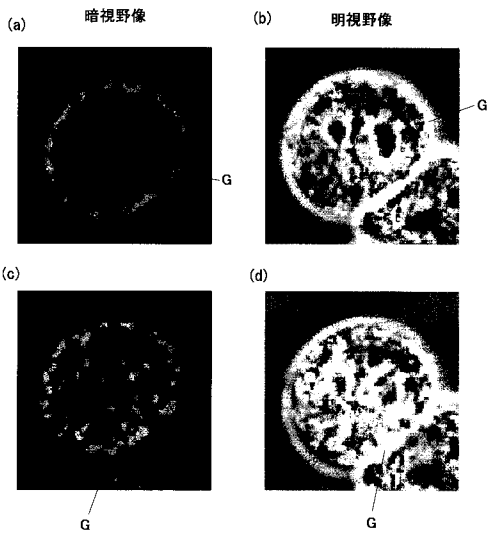
【 図 1 】



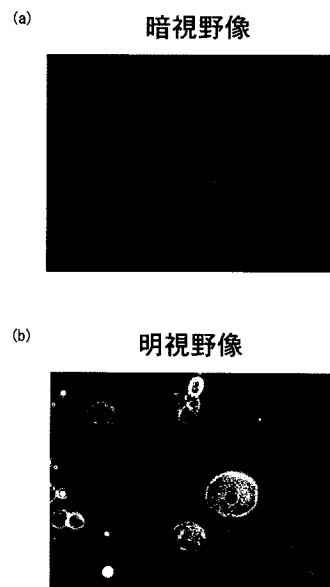
【 図 2 】



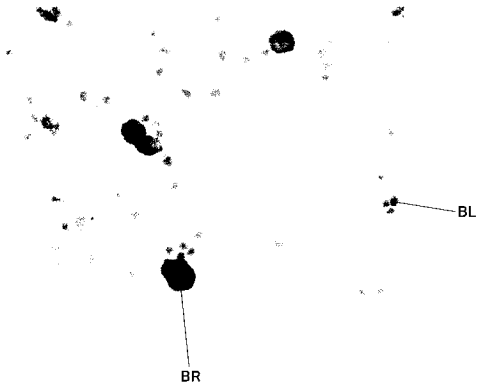
【 図 3 】



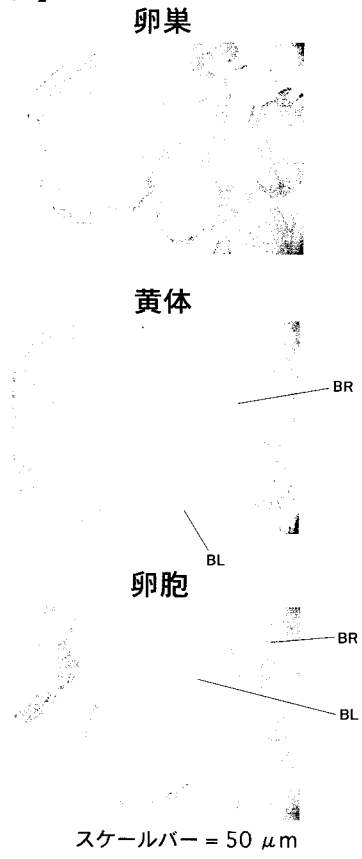
【 図 4 】



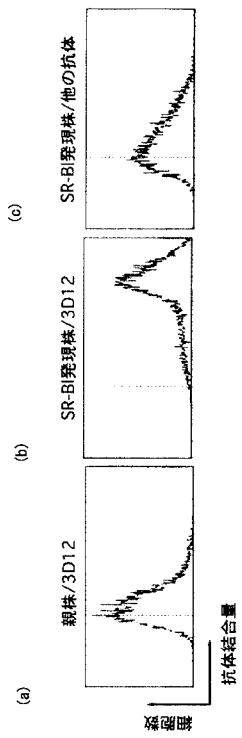
【 図 5 】



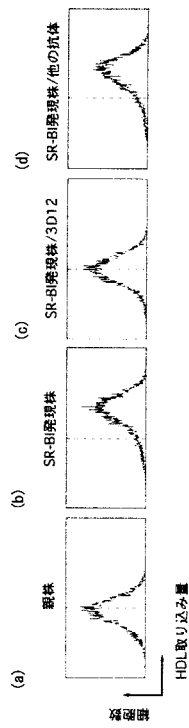
【 図 6 】



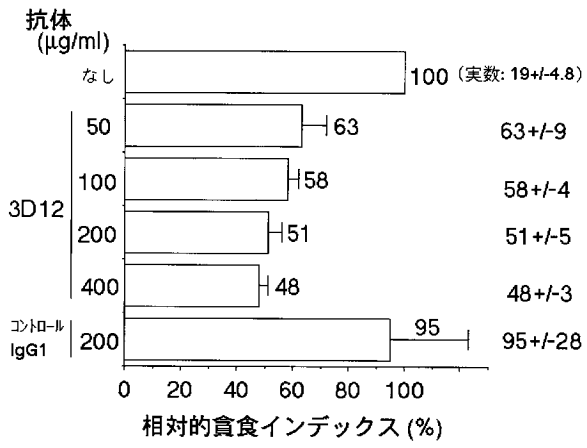
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



专利名称(译)	单克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	JP2004331633A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2003152800	申请日	2003-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	金泽UNIV TECH许可ORG		
申请(专利权)人(译)	有限公司金泽大学氏的EI-O		
[标]发明人	中西義信		
发明人	中西 義信		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/DA02 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA72		
优先权	2003063407 2003-03-10 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供阐明SR-BI分子功能所必需的单克隆抗体。单克隆抗体属于小鼠IgG1 / κ 亚类，可识别I类大鼠B类清道夫受体 (SR-BI)。具有对应于大鼠SR-BI的氨基酸编号110至132的序列的合成肽，具有对应于大鼠SR-BI的氨基酸编号144至163的序列，或对应于大鼠SR-BI的氨基酸编号192至439的序列的合成肽。通过使用与人免疫球蛋白Fc区结合的蛋白质作为免疫原来生产。产生的单克隆抗体可以用于诸如Western印迹法，免疫组织化学法，荧光抗体法，流式细胞仪法之类的用于检测抗原蛋白的方法。 [选择图]图2

