

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5476582号
(P5476582)

(45) 発行日 平成26年4月23日(2014.4.23)

(24) 登録日 平成26年2月21日(2014.2.21)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40 Z N A

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 D

G O 1 N 33/531 (2006.01)

G O 1 N 33/531 A

G O 1 N 33/536 (2006.01)

G O 1 N 33/536 E

G O 1 N 33/537 (2006.01)

G O 1 N 33/537

請求項の数 9 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-155028 (P2009-155028)
 (22) 出願日 平成21年6月30日(2009.6.30)
 (65) 公開番号 特開2011-11987 (P2011-11987A)
 (43) 公開日 平成23年1月20日(2011.1.20)
 審査請求日 平成24年5月1日(2012.5.1)

(73) 特許権者 301022471
 独立行政法人情報通信研究機構
 東京都小金井市貫井北町4-2-1
 (74) 代理人 100130111
 弁理士 新保 斉
 (72) 発明者 原口 徳子
 東京都小金井市貫井北町4-2-1 独立
 行政法人情報通信研究機構内
 (72) 発明者 荒神 尚子
 東京都小金井市貫井北町4-2-1 独立
 行政法人情報通信研究機構内
 (72) 発明者 平岡 泰
 東京都小金井市貫井北町4-2-1 独立
 行政法人情報通信研究機構内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V r k 1 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Vrk1蛋白質のエピトープMPRVKAAQAGRQSSAKRHLに特異的に反応するポリクローナル抗体であって、

Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLを唯一のエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物(ヒトを除く)を免疫感作した後、その宿主動物(ヒトを除く)の体液を用いて単離精製することによって得られた

ことを特徴とするVrk1蛋白質抗体。

【請求項 2】

Vrk1蛋白質のエピトープMPRVKAAQAGRQSSAKRHLに特異的に反応するモノクローナル抗体であって、

Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLを唯一のエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物(ヒトを除く)を免疫感作した後、その宿主動物(ヒトを除く)の抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合してハイブリドーマを調製し、抗体を産生するハイブリドーマ細胞を単離精製することによって得られた

ことを特徴とするVrk1蛋白質抗体。

【請求項 3】

抗体を含有する免疫試薬であって、

抗体が請求項 1 または 2 のいずれかに記載のVrk1蛋白質抗体である

ことを特徴とするVrk1蛋白質免疫試薬。

10

20

【請求項 4】

Vrk1蛋白質のエピトープMPRVKAAQAGRQSSAKRHLに特異的に反応する抗体の製造方法であって、

Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLを唯一のエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物（ヒトを除く）を免疫感作し、

宿主動物（ヒトを除く）から得られる抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合して融合細胞を作製し、

その融合細胞の中から、Vrk1蛋白質と結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養する

ことを特徴とするVrk1蛋白質抗体の製造方法。

10

【請求項 5】

Vrk1蛋白質に特異的に反応する抗体の製造に用いる抗原であって、

Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLを唯一のエピトープとして有する

ことを特徴とするVrk1蛋白質抗体製造用抗原。

【請求項 6】

Vrk1蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 または 2 に記載のVrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

免疫染色法によって、抗原の局在を顕微鏡下で検知する

ことを特徴とするVrk1蛋白質の検知方法。

20

【請求項 7】

Vrk1蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 または 2 に記載のVrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

ウエスタンブロット法によって、抗原の存在を検知する

ことを特徴とするVrk1蛋白質の検知方法。

【請求項 8】

Vrk1蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 または 2 に記載のVrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

免疫沈降法によって、抗原の存在を検知する

ことを特徴とするVrk1蛋白質の検知方法。

30

【請求項 9】

Vrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 または 2 に記載のVrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

共免疫沈降法によって、抗原と特異的に複合体を形成する別の蛋白質を検知する

ことを特徴とするVrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞核に局在するVrk1蛋白質に特異的に反応する抗体と、それを含有するVrk1蛋白質免疫試薬、Vrk1蛋白質抗体の製造方法、Vrk1蛋白質抗体製造用の抗原、Vrk1蛋白質の検知方法、Vrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特定の蛋白質に特異的に結合する抗体は、ライフサイエンス分野の研究ツールなどとして頻用されている。細胞核に関する研究が活発になり、細胞核に局在する蛋白質に結合する抗体の需要が高まっている。

50

細胞核を構成する蛋白質に、リン酸化酵素の一種であるVrk1 (Vaccinia-related kinase 1) があることは既に公知である。Vrk1蛋白質はVaccinia virus がもっているB1 kinaseに似た構造をしている。

Vrk1蛋白質は、ウイルスの感染の際に重要な役割を果たすため、様々な研究が進められている。

【0003】

Vrk1蛋白質に特異的に結合する抗体には、市販されているものがあるが、特異性の程度が高くなく、研究用試薬としての信頼性が十分高くなかった。

抗体やその製法に関する従来技術には、特許文献1～7などもあるが、Vrk1蛋白質の抗体に関しての開示はなかった。

10

また、Vrk1蛋白質に関する従来技術(特許文献8～10)はあるが、単に言及している範囲にとどまっていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2006-312621 「3, 4-DGEに由来するAGEsに特異的に反応する抗体」

【特許文献2】特開平11-279200 「ジチロシンポリクローナル抗体とその製造方法並びにこれに用いる抗原及びその製造方法」

【特許文献3】特開平10-218896 「ポリクローナル抗体とその製造法並びにこれに用いる抗原及びその製造法」

20

【特許文献4】特開平10-72499 「ポリクローナル抗体および製造方法」

【特許文献5】特開2008-29353 「抗ヒト可溶性フィブリンモノクローナル抗体の製造方法」

【特許文献6】特開2007-314493 「モノクローナル抗体、その製造方法、及び用途」

【特許文献7】特開2007-244268 「イヌの造血前駆細胞を認識するモノクローナル抗体の製造方法」

【特許文献8】特開2008-161196 「修飾組換えワクシニアウイルスおよびその他の微生物、その使用」

30

【特許文献9】特開2005-295803 「蛋白質の識別方法」

【特許文献10】特表2009-519042 「細胞移植のための足場」

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】MCB, 2004, vol.24 No.23(10366-10380)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、特異性の高いVrk1蛋白質抗体と、それを含有するVrk1蛋白質免疫試薬、Vrk1蛋白質抗体の製造方法、Vrk1蛋白質抗体製造用の抗原、Vrk1蛋白質の検知方法、Vrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法を提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するために、本発明は次の構成を備える。

すなわち、本発明のVrk1蛋白質抗体は、Vrk1蛋白質に特異的に反応する抗体であって、Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLCをエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物を免疫感作した後、その宿主動物の体液を用いて単離精製することによって得られたことを特徴とする。

【0008】

ここで、抗原に、ポリペプチドMPRVKAAQAGRQSSAKRHLCのC末端にヘモシアニンを結合さ

50

せたものを用いてもよい。

【0009】

抗体をモノクローナル抗体としてもよい。

【0010】

抗体をポリクローナル抗体としてもよい。

【0011】

本発明のVrk1蛋白質免疫試薬は、上記Vrk1蛋白質抗体を含有する免疫試薬であることを特徴とする。

【0012】

本発明のVrk1蛋白質抗体の製造方法は、Vrk1蛋白質に特異的に反応する抗体の製造方法であって、Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLCをエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物を免疫感作し、宿主動物から得られる抗体産生細胞をミエロマ細胞と融合して融合細胞を作製し、その融合細胞の中から、Vrk1蛋白質と結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養することを特徴とする。

10

【0013】

本発明のVrk1蛋白質抗体製造用抗原は、Vrk1蛋白質に特異的に反応する抗体の製造に用いる抗原であって、Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLCをエピトープとして有することを特徴とする。

【0014】

本発明のVrk1蛋白質の検知方法は、Vrk1蛋白質を検知する方法であって、上記Vrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、免疫染色法によって、抗原の局在を顕微鏡下で検知することを特徴とする。

20

【0015】

ここで、上記Vrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、ウエスタンブロット法によって、抗原の存在を検知してもよい。

【0016】

上記Vrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、免疫沈降法によって、抗原の存在を検知してもよい。

【0017】

本発明のVrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法は、Vrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質を検知する方法であって、上記Vrk1蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、共免疫沈降法によって、抗原と特異的に複合体を形成する別の蛋白質を検知することを特徴とする。

30

【発明の効果】

【0018】

本発明は、上記構成を備えることにより次の効果を奏する。

すなわち、Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、MPRVKAAQAGRQSSAKRHLCをエピトープとして有する抗原を用いて抗体を生成することにより、特異性の高いVrk1蛋白質抗体を得ることができ、それを用いてVrk1蛋白質の検知や、Vrk1蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知を行える。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】(イ)本発明のVrk1蛋白質抗体を用い、免疫染色法によって抗原の局在を顕微鏡下で検知した写真 (ロ)同、ウエスタンブロット法によって抗原の存在を検知した写真
【図2】(イ)市販品のVrk1蛋白質抗体を用い、免疫染色法によって抗原の局在を顕微鏡下で検知した写真 (ロ)同、ウエスタンブロット法によって抗原の存在を検知した写真

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下、本発明の実施形態を、図面に示す実施例を基に説明する。なお、実施形態は下記の例示に限らず、本発明の趣旨から逸脱しない範囲で、前記特許文献など従来公知の技術

50

を用いて適宜設計変更可能である。

従来はVrk1蛋白質を特異的に結合する有効な抗体はなかったが、本発明者らは、Vrk1蛋白質を構成するアミノ酸配列のうちMPRVKAAQAGRQSSAKRHLCを抗原のエピトープとして有する抗原を用いて、マウスを免疫感作し、マウスから得られた抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合して融合細胞を作製し、その融合細胞の中から、Vrk1蛋白質と結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養することで、抗体を単離精製することに成功した。

【0021】

抗原の調整は常法によって行い、ポリペプチドMPRVKAAQAGRQSSAKRHLCは、例えば、Hisタグを付けて蛋白質を発現、精製、Hisタグの切り離し、精製、という過程で行える。得られた抗原の精製は、マスマススペクトルなどで確認できる。

10

ポリペプチドMPRVKAAQAGRQSSAKRHLCのC末端にヘモシアニン (keyhole polypeptide hemocyanin) を結合させたものが有用に用いられる。

【0022】

抗体の調製方法は、宿主動物への免疫感作を行うことにより抗体を産生する従来公知の方法を適宜利用できる。なお、抗体力価は、免疫開始時より経時的に採血を行い、ELISA法等により測定できる。

免疫感作させる宿主動物の種類は、特に制限されず、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、モルモット等の哺乳類、ニワトリ、ハト、アヒル、ウズラ等の鳥類などが使用できる。

抗原の投与方法も、特に制限されず、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与などが適宜利用できる。

20

【0023】

モノクローナル抗体を調製する場合には、例えば、免疫感作させた宿主動物における脾臓細胞やリンパ球様細胞等の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合して融合細胞を調製し、その融合細胞を増殖させ、特異性を持つ抗体を産生する融合細胞を単離精製すればよい。

ポリクローナル抗体を調製する場合には、免疫感作させた宿主動物の血清や腹水液等の体液を回収し、抗体を単離精製すればよい。

【0024】

ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体の精製方法も、特に制限されず、例えば、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などが適宜利用できる。

30

【0025】

抗体の産生をスクリーニングする方法も、特に制限されず、例えば、ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法などが適宜利用できる。

【0026】

このようにして得られる抗体は、それ自体を抗体として使用してもよいし、酵素処理等を施して得られる抗体の活性フラグメントとして使用してもよいし、他の薬剤等と混合させて試薬等として使用してもよい。

【0027】

40

本発明では、従来公知の免疫染色法やウエスタンブロット法や免疫沈降法を適宜利用して、Vrk1蛋白質を検知することができる。

免疫染色法は、抗体を用いて試料中の抗原を検出する組織化学的手法であり、本来不可視である免疫反応を可視化するために発色操作を伴う。また、電気泳動した蛋白質分子を特定の膜に転移させ、抗体で免疫染色する方法がウェスタンブロットティング法である。

【0028】

免疫反応には、抗原に直接反応する一次抗体を標識し、免疫反応を1度しか行わない直接法も、標識していない一次抗体を用いて1度目の免疫反応を行い、一次抗体を抗原とする別の二次抗体を標識し、さらに免疫反応させる間接法も利用できる。なお、一般に免疫反応を反復するほど増幅されるので検出感度を高めることができるが、特異性が低下する

50

。

【0029】

染色には、抗体に色素や蛍光色素を結合させる方法の他、標識として放射性同位元素を結合させておき印画紙に感光させるオートラジオグラフィーや、金銀粒子を結合させておき電子顕微鏡等で観察する金コロイド法や金コロイド銀増感法や、特定の酵素を結合させておき色素生成物の呈色を光学顕微鏡で観察する酵素抗体法や免疫ペルオキシダーゼ法などが適宜利用できる。

【0030】

また、免疫沈降法により、抗原と抗体を特異的に反応させ沈殿させることで、抗原を検出してもよい。通常は抗体をセファロースビーズなどの担体に結合させて沈殿しやすくす

10

【0031】

本発明では、共免疫沈降法によって、Vrk1蛋白質と特異的に複合体を形成する別の蛋白質を検知、蛋白質間の相互作用に関する知見を得ることも可能である。

共免疫沈降法は、免疫沈降法により、目的の蛋白質と特異的に複合体を形成する別の蛋白質との複合体を回収する方法である。これに、質量分析等を組み合わせて、既知の蛋白質と相互作用する未知の蛋白質の特定に利用してもよい。

【実施例】

【0032】

20

ポリペプチドMPRVKAAQAGRQSSAKRHLCのC末端にヘモシアニンを結合させて得た抗原を、マウスの腹腔内に注射して免疫感作し、そのマウスから得た抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合して融合細胞を作製し、その融合細胞の中から、Vrk1と結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養した。

培養に当たっては、浮遊細胞用のディッシュまたはフラスコを用い、1日で3倍を目安に希釈して植え継ぎを行った。最後の植え継ぎから7～10日ほどおいて細胞がほとんど死んだ状態になってから、遠心分離により上清を精製した。

保存には、例えば0.05%Na₂S₂O₃を加えて4℃に管理するのみで1年以上可能であり、-20℃以下にすれば長期可能である。

【0033】

30

図1(イ)は、本発明のVrk1蛋白質抗体を用い、免疫染色法によって抗原の局在を顕微鏡下で検知した写真、図1(ロ)は、ウエスタンブロット法によって抗原の存在を検知した写真である。同様に、図2(イ)は、市販品のVrk1蛋白質抗体を用い、免疫染色法によって抗原の局在を顕微鏡下で検知した写真、図2(ロ)は、ウエスタンブロット法によって抗原の存在を検知した写真である。

TIG-1細胞に、2種類のsiRNAをそれぞれ200pmolずつRNAi MAX試薬(Invitrogen)で導入した。処理3日後にウエスタンブロット法及び抗体染色法のためのサンプル調整を行い検定した。なお、2種類のsiRNAには、siRNA1-1(AAGAAAGAGAGTCCAGAAGTA)及びsiRNA1-2(AACAAGGAACCTGGTGTGAA)を用いた。これらの配列は非特許文献1に開示されている。

40

【0034】

図1(イ)及び図2(イ)における免疫染色法による写真では、本発明のVrk1蛋白質抗体を用いた場合も、市販品のVrk1蛋白質抗体(抗原N末)を用いた場合も、細胞核におけるVrk1蛋白質の局在が示された。

【0035】

図1(ロ)及び図2(ロ)におけるウエスタンブロット法による写真では、レーン番号1にRNAi処理を行っていないTIG-1細胞、レーン番号2にsiRNA1-1を導入してRNAi処理したTIG-1細胞、レーン番号3にsiRNA1-2を導入してRNAi処理したTIG-1細胞を示す。

図1(ロ)に示すように、本発明のVrk1蛋白質抗体を用いた場合、レーン番号1では、Vrk1蛋白質の分子量を示す50KD弱の部分に明確なバンドが認められる。しかし、レーン番

50

号 1 及び 2 では、同じ大きさの位置に殆どバンドが認められていない。これは、Vrk1 蛋白質の発現を特異的に抑制した結果の反映である。

一方、図 2 (ロ) に示すように、市販品の Vrk1 蛋白質抗体を用いた場合、レーン番号 1 ~ 3 のいずれでも、本発明の Vrk1 蛋白質抗体によるバンドより低い位置に、同じバンドが認められる。これは、Vrk1 蛋白質とは異なるものを認識していることの反映である。

【産業上の利用可能性】

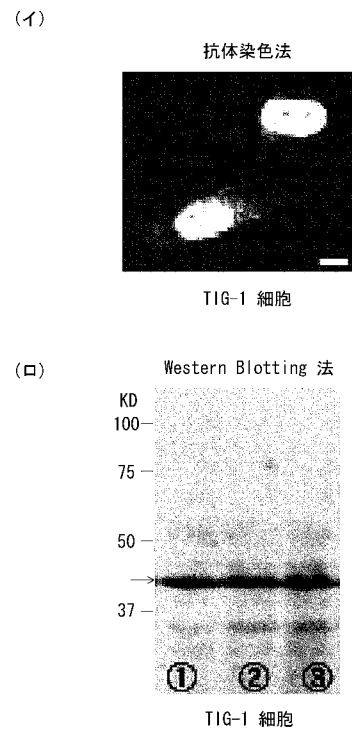
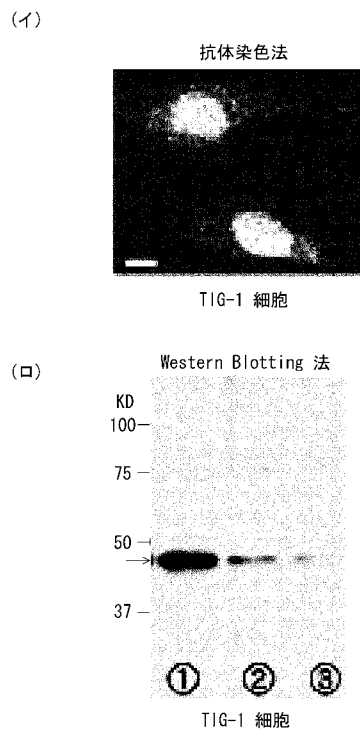
【0036】

本発明によると、細胞核に局在する Vrk1 蛋白質に対して特異性の高い抗体が得られるので、ライフサイエンス分野の研究に寄与する。例えば、生殖医療研究において問題になっている生殖細胞の形成異常など様々な生殖分裂や体細胞分裂の異常に由来する疾患の研究において、そのメカニズムを究明するのに有用である。また、Vrk1 蛋白質は、ウイルスの感染の際に重要な役割を果たすため、インフルエンザや HIV 等の感染を阻害する医薬としても活用でき、産業上利用価値が高い。

10

【図 1】

【図 2】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
G 0 1 N 33/577 (2006.01)			G 0 1 N 33/577		B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)			C 1 2 P 21/08		
C 0 7 K 7/08 (2006.01)			C 0 7 K 7/08		
C 1 2 N 15/02 (2006.01)			C 1 2 N 15/00		C
C 1 2 N 9/12 (2006.01)			C 1 2 N 9/12		

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 Homo sapiens vaccinia related kinase 1 (VRK1) mRNA. [online]. 1999-MAR-19 uploaded. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION No.NM_003384 (GI:4507902) [Retrieved on 2013-Oct-25].
Retrived from the internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/4507902?sat=8&satkey=498302>>

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d

专利名称(译)	Vrk1蛋白抗体，其制备方法，抗原，检测方法		
公开(公告)号	JP5476582B2	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	JP2009155028	申请日	2009-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人情报通信研究机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人情报通信研究机构		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人情报通信研究机构		
[标]发明人	原口德子 荒神尚子 平岡泰		
发明人	原口 德子 荒神 尚子 平岡 泰		
IPC分类号	C07K16/40 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/537 G01N33/577 C12P21/08 C07K7/08 C12N15/02 C12N9/12		
FI分类号	C07K16/40.ZNA G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/536.E G01N33/537 G01N33/577.B C12P21/08 C07K7/08 C12N15/00.C C12N9/12		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/DD01 4B050/DD11 4B050/LL03 4B050/LL05 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA53 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	仁新报		
其他公开文献	JP2011011987A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供具有高特异性的Vrk1蛋白抗体，含有其的Vrk1蛋白免疫试剂，产生Vrk1蛋白抗体的方法，产生Vrk1蛋白抗体的抗原，检测Vrk1蛋白的方法和检测另一种蛋白质与Vrk1蛋白质相互作用的方法。解决方案：通过使用具有MPRVKAAQAGRQSSAKRHLC作为构成Vrk1蛋白的氨基酸序列中的表位的抗原来获得与Vrk1蛋白特异性反应的抗体，以使宿主动物免疫和致敏，并使用宿主动物的体液进行分离和纯化。

抗体染色法



TIG-1 細胞