

(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2009-50227

(P2009-50227A)

(43) 公開日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 W	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 H O 4 5
C O 7 K 14/775 (2006.01)	C O 7 K 14/775	
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2007-222001 (P2007-222001)
 (22) 出願日 平成19年8月29日 (2007. 8. 29)

(71) 出願人 000003975
 日東紡績株式会社
 福島県福島市郷野目字東1番地
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫
 (74) 代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘
 (72) 発明者 片野 義徳
 福島県郡山市富久山町福原字塩島1 日東
 紡績株式会社バイオケミカル研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えアポリポプロテイン

(57) 【要約】

【課題】新たな組換えアポリポプロテインの製造方法、組換えアポリポプロテインC - I、それに対する抗体、該抗体を用いるアポリポプロテインC - Iの測定法およびそれに用いるキットを提供することにある。

【解決手段】プロモーターとしてL a cプロモーター、チオレドキンをコードするDNA配列およびアポリポプロテインC - IをコードするDNA配列を含む発現プラスミドを大腸菌に導入して、該大腸菌にてチオレドキンとアポリポプロテインC - Iとの融合蛋白質を発現させ、該融合蛋白質からアポリポプロテインC - Iを回収することにより高純度の組換えアポリポプロテインC - Iが得られ、これを抗原として用いて、アポリポプロテインC - Iに対する抗体を調製することにより、天然のアポリポプロテインC - Iに対して特異性の高い抗体を得ることができる。この抗体を用いて、検体中のアポリポプロテインC - Iを免疫学的測定法により、正確に測定することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

大腸菌由来のプロモーター、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードする DNA 配列およびアポリポプロテインをコードする DNA 配列を有する組換えプラスミド発現ベクターを、大腸菌に導入し、導入された大腸菌を培養して、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質とアポリポプロテインとの融合蛋白質を発現させ、その融合蛋白質からアポリポプロテインを得ることを特徴とする組換えアポリポプロテインの製造方法。

【請求項 2】

アポリポプロテインがアポリポプロテイン C - I またはその変異体である請求項 1 の組換えアポリポプロテインの製造方法。

10

【請求項 3】

水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質がチオレドキシンまたはその変異体である請求項 1 または 2 の組換えアポリポプロテインの製造方法。

【請求項 4】

大腸菌由来のプロモーターが lac プロモーターまたは tac プロモーターである請求項 1 から 3 のいずれかの組換えアポリポプロテインの製造方法。

【請求項 5】

組換えプラスミド発現ベクターが、更に、発現した融合蛋白質を精製するための精製ペプチドをコードする DNA 配列を含む請求項 1 から 4 のいずれかの組換えアポリポプロテインの製造方法。

20

【請求項 6】

組換えプラスミド発現ベクターが、更に、発現した融合蛋白質からアポリポプロテインを遊離させるためのプロテアーゼ開裂ペプチドをコードする DNA 配列を含む請求項 1 から 5 のいずれかの組換えアポリポプロテインの製造方法。

【請求項 7】

大腸菌由来のプロモーター、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードする DNA 配列およびアポリポプロテインをコードする DNA 配列を有する組換えプラスミド発現ベクター。

【請求項 8】

組換えアポリポプロテイン C - I またはその変異体。

30

【請求項 9】

請求項 1 から 6 のいずれかの製造方法によって得られる請求項 8 の組換えアポリポプロテイン C - I またはその変異体。

【請求項 10】

請求項 8 または 9 の組換えアポリポプロテイン C - I を免疫源として哺乳動物に投与して得られる、組換えアポリポプロテイン C - I に対する抗体。

【請求項 11】

天然アポリポプロテイン C - I を免疫源として哺乳動物に投与して得られる抗体に比べて、天然アポリポプロテイン C - I に対する特異性が高い請求項 10 の抗体。

【請求項 12】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 10 または 11 の抗体。

40

【請求項 13】

請求項 10 から 12 のいずれかの組換えアポリポプロテイン C - I に対する抗体を用いて免疫測定法で検体中のアポリポプロテイン C - I を測定することを特徴とするアポリポプロテイン C - I の測定方法。

【請求項 14】

請求項 10 から 12 のいずれかの組換えアポリポプロテイン C - I に対する抗体を含む、アポリポプロテイン C - I を測定するためのキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、組換えアポリポプロテインに関する。更に詳細には、組換えアポリポプロテインの製造方法、該製造方法に用いる組換えプラスミド発現ベクター、該製造方法により得られる組換えアポリポプロテイン C - I、該組換えアポリポプロテイン C - I に対する抗体、該抗体を用いるアポリポプロテインの C - I の測定方法および該測定方法に用いるキットに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

生体中の数多くの蛋白質は、病気の有無・状態と関係し、臨床的に測定されてきている。その場合、蛋白質を測定する方法としては、その蛋白質に対する抗体を用いて、免疫的測定法によるものが一般的であり、その原理に基づき臨床検査薬が広く供給されている。

生体蛋白質の一つであるアポリポプロテイン C - I は、主として肝臓において産生される分子量 6 . 6 k D a の蛋白質であり、高脂血症の発症に関与していることが報告されている（非特許文献 1）。天然のアポリポプロテイン C - I およびそれを用いて作成した抗体は実際に商業的に供給されているにもかかわらず、アポリポプロテイン C - I を測定するための免疫測定法の試薬は、臨床検査試薬として使用されていない。

アポリポプロテイン C - I に関しては、近年、S E L D I - M S や M A L D I - M S のような質量分析計や H P L C 法の分析法の発展に伴い、それと病態との関係も新たに知られてきている。例えば、質量分析計や H P L C を用いて、アポリポプロテイン C - I のレベルが、卒中、敗血症、腫瘍、心疾患、クローン病発病の可能性と関係していることが報告されてきている（特許文献 1 および特許文献 2）。

臨床検査薬としては、アポリポプロテイン C - I を測定するためには、免疫学定測定法でそれを測定することが好ましいにも拘らず、これを免疫学的測定法で調べると、質量分析計で測定したものと結果が異なると指摘されている（特許文献 2）。

従って、アポリポプロテイン C - I を免疫学定測定法で測定するための臨床検査薬の開発が強く望まれている。

【 特許文献 1 】 国際公開第 W O 2 0 0 5 / 0 1 7 5 2 3 号パンフレット（特許公表 2 0 0 7 年 5 0 2 4 0 1 号公報）

【 特許文献 2 】 国際公開第 W O 2 0 0 5 / 0 3 8 4 6 1 号パンフレット（特許公表 2 0 0 7 年 5 0 6 0 7 5 号公報）

【 非特許文献 1 】 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999; 19; 47 2-484

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 3 】

このような状況下、本発明者らは、アポリポプロテイン C - I の免疫学的測定法の一つの問題として、市販の抗アポリポプロテイン C - I 抗体は、非特異反応が大きく、それは、その抗体を作成するために用いた抗原、すなわち、天然のアポリポプロテイン C - I に問題があるということを見出した。そこで、遺伝子工学的手法により、アポリポプロテイン C - I を作成することを試みた。組換えアポリポプロテイン C - I の製造を検討したが、これまで知られていない技術であり、成功するには困難を極めた。例えば、本発明者らの検討によるとヒトに近いマウス卵巣細胞を用いては、組換えアポリポプロテイン C - I を製造することはできなかった。また、大腸菌の菌体内では、アポリポプロテイン C - I を用いることなくリポプロテインが代謝されているためか、宿主細胞として大腸菌を用いて、通常の T 7 プロモーターや L a c プロモーターを用いても組換えアポリポプロテイン C - I を発現できなかった。

従って、本発明の課題は、天然から得られるアポリポプロテイン C - I に比べて純度が高く、非特異反応の少ない抗アポリポプロテイン C - I 抗体が作成可能な組換えアポリポプロテイン C - I の製造方法を提供することにある。更には、組換えアポリポプロテイン C - I に加えて他の組換えアポリポプロテインも製造するための製造方法を提供することにあ

10

20

30

40

50

る。また、本発明の課題は、非特異反応の少ない抗アポプロテインC-I抗体が作成可能な組換えアポリポプロテインC-I、該組換えアポリポプロテインC-Iに対する抗体、該抗体を用いるアポリポプロテインC-Iの測定方法および該測定方法に用いるキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、上記した課題を解決することを目的として鋭意研究した結果、プロモーターとして大腸菌由来のプロモーターを用い、宿主細胞として大腸菌を用いて、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質であるチオレドキシンとアポリポプロテインC-Iとの融合蛋白質として発現させることにより、高純度の組換えアポリポプロテインC-Iであって、非特異反応の少ない抗アポプロテインC-I抗体が作成可能な組換えアポリポプロテインC-Iが得られ、この製造方法は、他の組換えアポリポプロテインの製造に広く適用できること、また、この組換えアポリポプロテインC-Iを抗原として用いて作成した抗アポリポプロテインC-I抗体により天然のアポリポプロテインC-Iを免疫学的測定法により正確に測定できることを見出し、本発明を完成させるに至ったものである。

10

【0005】

従って、本発明は、大腸菌由来のプロモーター、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードするDNA配列およびアポリポプロテインをコードするDNA配列を有する組換えプラスミド発現ベクターを、大腸菌に導入し、導入された大腸菌を培養して、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質とアポリポプロテインとの融合蛋白質を発現させ、その融合蛋白質からアポリポプロテインを得ることを特徴とする組換えアポリポプロテインの製造方法に関する。

20

更に本発明は、大腸菌由来のプロモーター、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードするDNA配列およびアポリポプロテインをコードするDNA配列を有する組換えプラスミド発現ベクターに関する。

更に本発明は、組換えアポリポプロテインC-Iまたはその変異体に関する。

更に本発明は、組換えアポリポプロテインC-Iを免疫源として哺乳動物に投与して得られる、組換えアポリポプロテインC-Iに対する抗体に関する。

更に本発明は、組換えアポリポプロテインC-Iに対する抗体を用いて免疫測定法で検体中のアポリポプロテインC-Iを測定することを特徴とするアポリポプロテインC-Iの測定方法に関する。

30

更に本発明は、組換えアポリポプロテインC-Iに対する抗体を含む、アポリポプロテインC-Iを測定するためのキットに関する。

【発明の効果】

【0006】

プロモーターとして大腸菌由来のプロモーターを用い、宿主細胞として大腸菌を用いて、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質とアポリポプロテインとの融合蛋白質として発現させることにより、高純度の組換えアポリポプロテインが得られる。この方法により得られる高純度の組換えアポリポプロテインC-Iを抗原として用いて、アポリポプロテインC-Iに対する抗体を調製することにより、天然のアポリポプロテインC-Iに対して特異性の高い抗体を得ることができる。この抗体を用いて、検体中のアポリポプロテインC-Iを免疫学的測定法により、正確に測定することができる。従って、本発明で得られる組換えアポリポプロテインC-Iに対する抗体を臨床検査薬として用いることにより、卒中、敗血症、腫瘍、心疾患、クローン病発病の可能性などを正確に診断することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明においては、組換えアポリポプロテインは、大腸菌由来のプロモーター、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードするDNA配列およびアポリポプロテインをコードするDNA配列を有する組換えプラスミド発現ベクターを、大腸菌に導入し、導入

50

された大腸菌を培養して、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質とアポリポプロテインとの融合蛋白質を発現させ、その融合蛋白質からアポリポプロテインを得ることにより製造できる。

ここで用いる大腸菌由来のプロモーターとしては、例えば、*l a c*プロモーター、*t a c*プロモーター、*t r p*プロモーターなどが挙げられ、特に*l a c*プロモーター、*t a c*プロモーター、なかでも*l a c*プロモーターが好ましい。

【0008】

水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質としては、分子量が8000から60000の蛋白質が好ましく、例えば、チオレドキシン、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合蛋白質(MBP)あるいはこれらの変異体などが挙げられる。変異体としては、これらの蛋白質のアミノ酸配列において一つもしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列からなり、元の蛋白質と同様の機能を有する蛋白質が挙げられる。ここで同様の機能とは、アポリポプロテインとともに大腸菌において融合蛋白質として発現できる機能を指す。本発明では、大腸菌由来の水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質が好ましく、特に、チオレドキシンまたはその変異体、なかでも大腸菌由来のチオレドキシンまたはその変異体が好ましい。

これらの水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質のアミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列は各種文献に記載され公知である。

組換えプラスミド発現ベクターにおいては、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードするDNA配列は、アポリポプロテインをコードするDNA配列の上流側に位置しているのが好ましい。

【0009】

アポリポプロテインとしては、アポリポプロテインA、C、Eなどが好適であり、更にこれらのサブタイプ、例えば、アポリポプロテインA-I、C-I、C-II、C-III、E2、E3、E4などが挙げられる。あるいはこれらの変異体であってもよい。変異体としては、これらのアポリポプロテインのアミノ酸配列において一つもしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列からなり、元の蛋白質と同様の機能を有する蛋白質が挙げられる。ここで同様の機能とは、元のアポリポプロテインと同様の抗原性を有し同様の特異性を有する抗体産生能を指す。

これらのアポリポプロテインのなかでも、特にアポリポプロテインC-Iが好ましい。これらのアポリポプロテインのアミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列は各種文献に記載され公知である。

【0010】

本発明においては、組換えプラスミド発現ベクターは、更に、発現した融合蛋白質を精製するための精製ペプチドをコードするDNA配列を含むのが好ましい。精製ペプチドとしては、好ましくは、Hisタグ、FLAG、STREPなどのアフィニティー精製が可能となるペプチドが挙げられる。例えば、Hisタグは、ヒスチジン残基が連続して6から10個程度結合したものであり、融合蛋白質に結合させて用いる。このHisタグはキレート担体と相互作用するため、発現する融合蛋白質の精製が容易に行える。FLAGは8個のアミノ酸残基からなるペプチドタグで、融合蛋白質に結合させて発現させ、融合蛋白質を抗FLAG抗体を用いて精製することができる。STREPは、ストレプトアビジンに結合する8個のアミノ酸残基からなるペプチドタグであり、ストレプトアビジンとの可逆的な結合を利用して、融合蛋白質を精製できる。これらの精製ペプチドのなかでも、Hisタグが好ましい。これらの精製ペプチドをコードするDNA配列は、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードするDNA配列およびアポリポプロテインをコードするDNA配列の間に置かれて、あるいは、いずれかのDNA配列に連結して用いられる。

【0011】

本発明においては、組換えプラスミド発現ベクターは、更に、発現した融合蛋白質からアポリポプロテインを遊離させるためのプロテアーゼ開裂ペプチドをコードするDNA配

列を含むのが好ましい。プロテアーゼ開裂ペプチドとしては、例えば、トロンピン、ファクター X a、T E Vプロテアーゼ、P r e S c i s s i o nプロテアーゼなどのプロテアーゼによって開裂されるペプチドなどが挙げられる。これらのプロテアーゼ開裂ペプチドをコードする D N A 配列は、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質をコードする D N A 配列およびアポリボプロテインをコードする D N A 配列の間に位置し、アポリボプロテインをコードする D N A 配列の直ぐ上流に存在するのが好ましい。このようなプロテアーゼ開裂ペプチドをコードする D N A 配列を用いることにより、発現した融合蛋白質に、例えば、トロンピンなどを作用させることにより、融合蛋白質からアポリボプロテインを遊離させることができる。

【 0 0 1 2 】

上記した各種 D N A 配列を含む組換えプラスミド発現ベクターの構築は、例えば、図 1 に示すようにして行うことができる。すなわち、L a cプロモーター、大腸菌由来チオレドキシン、6 H i s タグおよびトロンピン開裂ペプチドをコードする D N A 配列を、上流側からこの順序で有するプラスミド p U C - T r x を調製し、他方、ヒトアポリボプロテイン C - I をコードする D N A 配列を有するプラスミド p T O P O - A p o C I を調製し、それぞれのプラスミドから、L a cプロモーター、大腸菌由来チオレドキシン、6 H i s タグおよびトロンピン開裂ペプチドをコードする D N A 配列を含む断片と、ヒトアポリボプロテイン C - I をコードする D N A 配列を含む断片を得て、それら断片を連結することによって、目的とする組換えプラスミド発現ベクター p U C - T r x - A p o C I を構築することができる。他の各種組換えアポリボプロテインを得るための組換えプラスミド発現ベクターも同様にして構築することができる。

【 0 0 1 3 】

組換えプラスミド発現ベクターを、大腸菌に導入し、導入された大腸菌を培養して、水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質とアポリボプロテインとの融合蛋白質を発現させるには、公知の方法を用いて通常の方法により行うことができる。発現した融合蛋白質は、上記した精製ペプチドを利用して精製し、精製した融合蛋白質から、上記したプロテアーゼ開裂ペプチドを利用してアポリボプロテインを遊離させて、目的とする組換えアポリボプロテインを製造することができる。

本発明の製造方法により、高純度の組換えアポリボプロテインが得られ、また、抗原として動物に免疫することにより、対応する天然アポリボプロテインに対して高い特異性を有する抗体産生を誘導する組換えアポリボプロテインが得られる。特に、本発明の製造方法により、天然アポリボプロテイン C - I に対して高い特異性を有する抗体産生を誘導する組換えアポリボプロテイン C - I が得られる。

【 0 0 1 4 】

本発明の製造方法により得られる組換えアポリボプロテイン C - I を免疫源として哺乳動物に投与することにより、組換えアポリボプロテイン C - I に対する抗体が得られる。抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよい。

ポリクローナル抗体は、組換えアポリボプロテイン C - I を哺乳動物に免疫して、免疫動物から血清を採取することにより調製することができる。モノクローナル抗体は、組換えアポリボプロテイン C - I を免疫源として哺乳動物を免疫し、その動物が産生する抗体産生細胞と骨髄腫瘍細胞とを融合させて得られるハイブリドーマによって調製することができる。

【 0 0 1 5 】

ハイブリドーマは、組換えアポリボプロテイン C - I を、フロイントの完全、不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳アジュバント等のアジュバントを用いて共に混和し、感作用アジュバント液を作製して数回に分けてマウス、ラット等の動物に免疫し、次いで免疫動物の脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髄腫瘍細胞（ミエローマ細胞）する細胞とを、ケーラーとミルスタインの定法（Nature.256,495.1975）によってポリエチレングリコールなどを用いることにより融合し、融合細胞から、アポリボプロテイン C - I を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって得ること

10

20

30

40

50

ができる。

ハイブリドーマは通常細胞培養に用いられる培地で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することができる。またハイブリドーマが由来する動物をあらかじめプリスタン処理しておき、その動物に細胞を腹腔内注射することによって腹水を貯留させ、その腹水からモノクローナル抗体を回収することもできる。

【0016】

本発明の抗体は、天然アポリポプロテインC-Iを免疫源として哺乳動物に投与して得られる抗体に比べて、天然アポリポプロテインC-Iに対する特異性が高いものである。本発明の抗体を用いた免疫測定法によって検体中のアポリポプロテインC-Iを高感度で且つ特異的に検出することができる。

ここで対象となる検体としては、血液、血清、血漿、骨などの組織等が挙げられる。

免疫測定法としては、酵素免疫測定法(EIA法)、免疫比濁測定法(TIA法)、ラテックス免疫凝集法(LATEX法)、電気化学発光法、蛍光法などを例示することができる。またイムノクロマト法、試験紙を利用した方法も有効である。これらの方法は、いずれも当業者に周知の方法でありこれら周知の方法をそのまま採用することができる。

例えば、酵素免疫測定法として、サンドイッチアッセイELISA法を例にとって以下に説明する。

ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ナイロン、ポリメタクリレートなどのそれ自体公知である固相に直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用して抗体を結合させる。次いで、検体を作用させて、アポリポプロテインC-Iを固相に結合した抗体に結合させ、固相を洗浄し、次いで対応する二次標識抗体、例えば、抗イムノグロブリン標識抗体を加えて更に2次反応させる。固相を再度洗浄し、発色基質などを加え反応させる。標識物質にHRPを用いた場合、基質には既知のDAB、TMBなどを用いることができ、標識物質はこれに限定されるものではない。例えば酵素だけではなく金コロイド、ユーロピウムなどの標識金属やFITC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFPなどの化学的、生物学的各種蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{51}Cr などの放射性物質など識別可能なあらゆる物質が挙げられる。

【0017】

本発明の測定方法を実施するときには、アポリポプロテインC-Iを免疫測定するためのキットであって、組換えアポリポプロテインC-Iに対する抗体を含むキットを用いて行える。このキットにおいては、抗体を固相支持体に吸着させてもよく、検体中のアポリポプロテインC-Iを抗体に結合させた後、固相支持体に吸着しなかった成分を除去するために、洗浄液を含むことができる。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含むトリス緩衝液を使用することができる。また、例えば、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム溶液等の酵素反応停止液、例えば、トリス等の緩衝液を含むこともできる。

【0018】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

組換えプラスミド発現ベクターの構築

A. ヒトアポリポプロテインC-IをコードするDNA断片の調製

図1に示す組換えヒトアポリポロテインC-I発現ベクターの構築において原料プラスミドとして用いる、ヒトアポリポプロテインC-IをコードするDNA配列を含むpTOPO-ApoCIを構築した。

(1) ヒトアポリポプロテインC-I遺伝子の獲得

ヒト肝癌細胞株HepG2(ATCC HB 8065)からISOGEN(ニッポンジーン社)を用いて全RNAを抽出した。続いて、First-Strand cDNA Synthesis Kit(GEヘルスケア バイオサイエンス社)を用い、推奨プロトコールにしたがって逆転写反応を行い、ポリ(A)含有mRNA由来の1本鎖cDNAを得た。

10

20

30

40

50

(2) ヒトアポリポロテインC - I 遺伝子のクローニング (p T O P O - A p o C I の構築)

Homo Sapiens Apolipoprotein CI (NCBI NM001645) の配列から 5' 末端プライマー (配列番号 1) 及び 3' 末端プライマー (配列番号 2) を設計し、上記 (1) で得た 1 本鎖 cDNA を鋳型とした PCR を行った。これらのプライマーには後の発現ベクター構築のために、5' 末端プライマーについては Nde I 制限酵素サイト、3' 末端プライマーについては BamHI 制限酵素サイトが付与されている。すなわち、KOD plus (東洋紡社) 1 単位、添付の 10 x PCR バッファー 5 µL を用い、0.25 µM 配列番号 1 及び配列番号 2 のオリゴヌクレオチド、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO₄、5% DMSO となるように反応溶液を調製し、98 1 分の熱処理の後、94 20 秒、65 90 秒、72 40 秒のサーマルサイクルを 30 回、74 5 分の伸長反応を行った。次いで得られた反応産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社) を用い、添付のプロトコールにしたがってクローニングした。M13 プライマー M4 及び M13 プライマー RV (タカラバイオ社) を用いたシークエンス解析を行ったところ、クローニングされた DNA 断片は配列番号 3 に示す配列であり、ヒトアポリポロテイン C - I 遺伝子であることを確認した。

10

【0019】

B. 発現ベクターの構築

図 1 に示すように、大腸菌由来 lac プロモーター、チオレドキシシン (Trx)、6 His タグおよび トロンピン開裂ペプチドをコードする DNA 配列を有するプラスミド pUC - Trx を調製し、他方、上記 A で構築した pTOPO - ApoCI を用い、それぞれのプラスミドから、lac プロモーター、チオレドキシシン、6 His タグおよび トロンピン開裂ペプチドをコードする DNA 配列を含む断片と、ヒトアポリポロテイン C - I をコードする DNA 配列を含む断片を得て、それら断片を連結することによって、目的とする組換えプラスミド発現ベクター pUC - Trx - ApoCI を構築した。同様に、T7 フェージ由来の T7 プロモーターを含む pET - Trx から組換えプラスミド発現ベクター pET - Trx - ApoCI を構築した。

20

【0020】

(1) T7 プロモーター、チオレドキシシンをコードする DNA 配列、6 His タグおよび トロンピン開裂ペプチドを含むプラスミド (p E T - T r x) の構築

30

pET24c (Novagen 社) から、大腸菌由来のチオレドキシシン (Trx) をコードする DNA 配列、6 His タグ (6 His) および トロンピン開裂ペプチド (Thrombin cleavage seq.) を含むチオレドキシシンリージョンの DNA 断片 (366 番目 - 692 番目) を得るために、NcoI 制限酵素サイトが付与されたチオレドキシシン 5' 末端プライマー (配列番号 4)、精製タグとなる 6 x ヒスチジン配列が付与された 3' 末端プライマー (配列番号 5) による PCR を行った。さらに得られる産物の 3' 末端に トロンピンプロテアーゼ開裂配列、Nde I 制限酵素サイトを付与するために 3' 末端プライマー (配列番号 6)、発現ベクターへのクローニングのための BamHI 制限酵素サイトが付与された 3' 末端プライマー (配列番号 7) を設計し PCR による伸長反応を行った。すなわち、KOD plus (東洋紡社) 1 単位、添付の 10 x PCR バッファー 5 µL を用い、0.25 µM 配列番号 4 及び配列番号 5 のオリゴヌクレオチド、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO₄、5% DMSO となるように反応溶液を調製し、98 1 分の熱処理の後、94 20 秒、65 90 秒、72 40 秒のサーマルサイクルを 30 回、74 5 分の伸長反応を行った。以下同様に、得られた PCR 産物の 1000 分の 1 希釈溶液に対して、配列番号 4 及び配列番号 6、次いで配列番号 4 及び配列番号 7 のオリゴヌクレオチドを用いた PCR を行った。最終的に得られた PCR 産物を NcoI 及び BamHI によって末端を処理し、同様に処理された、T7 プロモーターを含む pET21d (+) との間で Ligation - Convenience Kit (ニッポンジーン社) を用いライゲーション反応させ、T7 プロ

40

50

モーター、Trx(配列番号8)、6Hisおよびトロニン開裂ペプチドを含むpET-Trxを構築した。

【0021】

(2) lacプロモーター、チオレドキシンをコードするDNA配列、6Hisタグおよびトロニン開裂ペプチドを含むプラスミド(pUC-Trx)の構築

HindIII制限酵素サイトが付与されたチオレドキシンの5'末端プライマー(配列番号9)、EcoRI制限酵素サイトが付与された3'末端プライマー(配列番号10)を設計し、上記(1)で構築したpET-Trxを鋳型として、PCRを行った。すなわち、KOD plus(東洋紡社)1単位、添付の10xPCRバッファー5μLを用い、0.25μM配列番号4及び配列番号5のオリゴヌクレオチド、0.2mM dNTPs、1.5mM MgSO₄、5% DMSOとなるように反応溶液を調製し、98℃1分の熱処理の後、94℃20秒、65℃90秒、72℃40秒のサーマルサイクルを30回、74℃5分の伸長反応を行った。次いで得られたPCR産物をHindIII及びEcoRIによって末端を処理し、チオレドキシンをコードするDNA配列、6Hisタグおよびトロニン開裂ペプチドを含む断片を得、後のライゲーション反応に供した。

一方、lacプロモーターを含むpUC19のNdeI部位へ配列番号11に示すオリゴヌクレオチドを挿入した後に、これをHindIII及びEcoRIによって処理し、上記で得られたPCR産物とライゲーション反応を行い、pUC-Trxを構築した。

【0022】

(3) T7プロモーター制御によるヒトアポリポプロテインC-Iとチオレドキシ融合蛋白質発現ベクター(pET-Trx-ApoCI)の構築

ヒトアポリポプロテインC-I遺伝子は、上記AのpTOPO-ApoCIプラスミドをNdeI及びBamHIで消化することにより切り出し、pET-TrxのNdeIとBamHI制限酵素サイトの間に挿入することでpET-Trx-ApoCIを構築した。pET-Trx-ApoCIの概略図は図1の右上にaとして示す。

(4) lacプロモーター制御によるヒトアポリポプロテインC-Iとチオレドキシ融合タンパク質発現ベクター(pUC-Trx-ApoCI)の構築

上記(3)と同様、ヒトアポリポプロテインC-I遺伝子は、前述のpTOPO-ApoCIプラスミドをNdeI及びBamHIで消化することにより切り出し、pUC-TrxのNdeIとBamHI制限酵素サイトの間に挿入することでpUC-Trx-ApoCIを構築した。pUC-Trx-ApoCIの概略図を図1の右下にbとして示す。

【0023】

実施例2

組換えヒトアポリポプロテインC-Iの製造

実施例1で構築した組換え発現プラスミドを大腸菌に導入してヒトアポリポプロテインC-Iを製造した。

(1) ヒトアポリポプロテインC-IをコードするDNAを含む組換えプラスミドを含有する形質転換体の調製

実施例1のBで構築したヒトアポリポプロテインC-IをコードするDNA配列を有する組換えプラスミドであるpET-Trx-ApoCI及びpUC-Trx-ApoCIを用いて、大腸菌を常法により形質転換した。pET-Trx-ApoCIにおいては、T7プロモーターが機能するB株のDE3溶原菌BL21(DE3)またはC41(DE3)を形質転換してpET-Trx-ApoCI/BL21(DE3)及びpET-Trx-ApoCI/C41(DE3)を調製した。pUC-Trx-ApoCIにおいては、DE3が組み込まれていないK12株JM109またはB株BL21を形質転換してpUC-Trx-ApoCI/JM109及びpUC-Trx-ApoCI/BL21を調製した。

各々の形質転換体は、LBプレート培地(ポリペプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム1%、グルコース1%、カルベニシリン100μg/mL)上にて薬剤耐性

10

20

30

40

50

によってスクリーニングし、生じたシングルコロニーをTB培地（ポリペプトン1.2%、酵母エキス2.4%、グリセロール0.4%、17mMリン酸二水素カリウム、72mMリン酸水素二カリウム、グルコース2%、カルベニシリン200 μ g/mL）に接種し、各プロモーターの誘導物質であるIPTG（イソプロピルチオ-D-ガラクトピラノシド）を対数増殖中期（培養液のOD600=0.4~0.6）に添加、発現誘導を行った。培養液の遠心操作で得られる菌体ペレットを50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）中に懸濁し、超音波破碎を行った。この懸濁液の遠心操作によって得られる上清部分を可溶性画分とした。一方、沈殿部分は8M尿素、リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）中で再懸濁、可溶化を行った。この懸濁液の遠心操作によって得られる上清部分を不溶性画分とした。

10

【0024】

上記の各々の形質転換体の可溶性画分、不溶性画分についてNi-sepharose 6 Fast Flow（GEヘルスケア バイオサイエンス社）を用いたバッチ法により、精製タグとなる6xヒスチジン配列を含む組換えヒトアポリポプロテインC-Iのチオレドキシリン融合蛋白質の検出を行った。添付のプロトコールに基づいて、Ni-sepharose 6 Fast Flow レジンからの溶離液をトリシンSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Tricine-SDS-PAGE）によって解析した。結果を図2に示す。図2から分かるように、発現ベクターとして大腸菌由来のlacプロモーターを有するpUC-Trx-ApoCI/JM109及びpUC-Trx-ApoCI/BL21から得られる不溶性画分においてのみ、推定分子量20kDaを示す6xヒスチジン配列を含む組換えヒトアポリポプロテインC-Iのチオレドキシリン融合タンパク質のバンドがクマジーブリリアントブルー（CBB）染色によって確認できた。一方、以下に示すベクター及び大腸菌株の組み合わせにおいては、いずれも組換えヒトアポリポプロテインC-Iを含む蛋白質のバンドは確認できなかった。すなわち、T7プロモーターを有するpET-Trx-ApoCI/C41（DE3）、pET-Trx-ApoCI/BL21（DE3）、チオレドキシリンを含まないpET-ApoCI/C41（DE3）、pET-ApoCI/BL21（DE3）、または、lacプロモーターを有しチオレドキシリンを含まないpUC-ApoCI/JM109、pUC-ApoCI/BL21の組み合わせの場合、いずれも組換えヒトアポリポプロテインC-Iを含む蛋白質のバンドは確認できなかった。

20

30

【0025】

（2）組換えヒトアポリポプロテインC-Iの産生及び精製

上記TB培地（ポリペプトン1.2%、酵母エキス2.4%、グリセロール0.4%、17mMリン酸二水素カリウム、72mMリン酸水素二カリウム、グルコース2%、カルベニシリン200 μ g/mL）であらかじめ37℃で終夜培養したpUC-Trx-ApoCI/BL21の培養液30mLをオートクレーブ済みの3LのTB培地に接種し、培養器（丸菱バイオエンジニアリング社）により37℃通気攪拌培養した。6時間培養後、1M IPTG（イソプロピルチオ-D-ガラクトピラノシド）を3mL添加し、さらに4時間37℃で通気攪拌培養を続けた。培養終了後全培養液を遠心分離によって集菌し、-20℃に凍結した。凍結した菌体ペレットを50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）300mL中に懸濁し、超音波破碎を行った。この懸濁液の遠心操作によって得られる上清部分を可溶性画分とした。一方、沈殿部分は8M尿素、リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）300mL中で再懸濁、可溶化を行った。この懸濁液の遠心操作によって得られる上清部分を不溶性画分とした。

40

【0026】

不溶性画分からの組換えヒトアポリポプロテインC-Iの精製において、変性剤である尿素の除去は希釈、透析、脱塩カラム等の方法を用いることも可能であるが、本法では、アフィニティーカラム上での変性剤除去と変性タンパク質のリフォールディングを行った。すなわち、AKTA purifierクロマトグラフィシステム（GEヘルスケア バイオサイエンス社）制御下、バッファー1（50mMリン酸ナトリウム、0.5M塩

50

化ナトリウム、4 M 尿素 pH 7.8) で平衡化した His Trap FF 5 mL アフィニティカラム (GEヘルスケア バイオサイエンス社) に上記不溶性画分サンプル 50 mL をアプライし、バッファー 1 で非結合画分を分離し、バッファー 1 をバッファー 2 (50 mM リン酸ナトリウム、0.5 M 塩化ナトリウム、20 mM イミダゾール pH 7.4) との間で 100% 0% リニアグラジエントを行うことでカラム溶出液の尿素の除去を行った。次にバッファー 2 により溶出される画分を回収した後、バッファー 3 (50 mM リン酸ナトリウム、0.5 M 塩化ナトリウム、500 mM イミダゾール pH 7.4) との間で 0 100% リニアグラジエントを行うことで、目的タンパク質を溶出させた。各溶出画分をトリシン - SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Tricine - SDS - PAGE) によって解析した。結果を図 3 に示した。図 3 から分かるように、バッファー 2 及び (3) 溶出画分において、推定分子量 20 kDa を示す 6 × ヒスチジン配列を含む組換えヒトアポリポプロテイン C - I のチオレドキシニン融合タンパク質のバンドがクマジーブリリアントブルー (CBB) 染色によって確認できた。この段階で既に 80% 以上の純度を示す可溶性の 6 × ヒスチジン配列を含む組換えヒトアポリポプロテイン C - I のチオレドキシニン融合蛋白質が得られた。

10

20

30

40

50

【0027】

続いて得られた精製組換え蛋白質からチオレドキシニン及びヒスチジンタグを除去するために、トロンピンプロテアーゼを作用させた。すなわち基質である可溶性の 6 × ヒスチジン配列を含む組換えヒトアポリポプロテイン C - I のチオレドキシニン融合タンパク質 1 mg あたり 1U のトロンピンプロテアーゼを作用させ室温で終夜インキュベートした。直ちにバッファー 2 (50 mM リン酸ナトリウム、0.5 M 塩化ナトリウム、20 mM イミダゾール pH 7.4) に対して透析を行った後、His Trap FF 5 mL アフィニティカラム及び Hi Trap Benzamide FF 5 mL (GEヘルスケア バイオサイエンス社) にアプライし両者の素通り画分を回収した。さらに脱塩カラムによりバッファーを PBS に置換した後、濃縮することで精製組換えヒトアポリポプロテイン C - I を得た。

得られた精製組換えヒトアポリポプロテイン C - I は、トリシン - SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Tricine - SDS - PAGE) によって解析し、クマジーブリリアントブルー (CBB) 染色によって純度 95% 以上であることを確認し、市販のヤギ抗ヒトアポリポプロテイン C - I 抗体を用いたウェスタンブロッティングを常法にて行い、その抗原性を確認した。これらの結果は図 4 に示した。また組換えヒトアポリポプロテイン C - I の定量として、BSA を標準物質とした Lowry 法を行い、上記 3 L 培養 1 バッチから 3 mg 程度の組換えヒトアポリポプロテイン C - I が得られた。

【0028】

実施例 3

組換えヒトアポリポプロテイン C - I を免疫原としたモノクローナル抗体の作製

免疫原を実施例 3 で得た精製組換えヒトアポリポプロテイン C - I とした場合とヒト血漿由来の精製天然アポリポプロテイン C - I とした場合とで、得られる抗体の性能を比較するために、両者をそれぞれ抗原としたモノクローナル抗体の作製を行った。以下に組換えヒトアポリポプロテイン C - I を免疫原としたモノクローナル抗体の作製について記載するが、ヒト血漿由来の精製天然アポリポプロテイン C - I についても同種マウスの別個体を用いて同様の操作を行った。

(1) 精製組換えヒトアポリポプロテイン C - I によるマウスの免疫

精製組換えヒトアポリポプロテイン C - I を 1 mg / mL となるように PBS (pH 7.4) で調製し、等量のフロインド完全アジュバンド (和光純薬工業社) と乳化するまでよく混和した。調製した懸濁液 50 μ L を Balb / c 6 週齢 雌マウス (日本クレア社) にジエチルエーテル麻酔下にて腹腔内投与した。2 週間後には同量の組換えヒトアポリポプロテイン C - I をフロインド不完全アジュバンド (和光純薬工業社) と混和してフロインド完全アジュバンドの時と全く同様の操作により乳化懸濁液とし、それぞれマウスに感作した。以降 2 週間後に同様の操作を行い、4 回目には最終免疫として組換えヒト

アポリポrotein C - I を 1 mg / mL となるように PBS (pH 7 . 4) で調製し 50 μ L をマウス尾静脈注射により投与した。

【 0 0 2 9 】

(2) ハイブリドーマの確立

最終免疫より 3 日後に組換えヒトアポリポrotein C - I により感作済みのマウスよりジエチルエーテル麻酔下に外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し脾臓細胞を調製した。融合はケーラーとミルスタインの方法 (Nature . 256 , 495 . 1975) に従って行われ、ポリエチレングリコール (PEG 4000) (メルク社) を用いて脾細胞と骨髓腫細胞 P 3 - X 6 3 - A g 8 - U 1 (P 3 U 1) を融合した。組換えヒトアポリポrotein C - I 融合時の融合比率は脾臓細胞数 : 骨髓腫細胞 P 3 U 1 = (2 : 1) ~ (5 : 1) であった。融合細胞は 10 % FCS (インビトロジェン社) 、 MEM (I R V I N E 社) 、 H A T (コスモバイオ社) 培地に分散し 96 穴マイクロタイターカルチャープレート (住友ベークライト社) に分注して 37 $^{\circ}$ C 、 5 % CO₂ 条件にて培養した。

10

(3) 抗原プレート及び BSA プレートの作製

スクリーニング用抗原プレートとしては、ヒト血漿由来の精製天然ヒトアポリポrotein C - I (native ApoC - I) を抗原として感作した。すなわち、ヒト血漿由来のヒトアポリポrotein C - I (Athens Research & Technology 社) を PBS (pH 7 . 4) に溶解し、 1 μ g / 100 μ L / well となるように 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc 社) に分注した。プレートを 4 $^{\circ}$ C で 2 晩静置した後に 0 . 05 % Tween 20 (和光純薬工業社) を含む PBS で 3 回洗淨し、非特異的反応を抑えるために 1 . 5 % BSA (SIGMA 社) 及び 10 % サッカロース (和光純薬工業社) を含むブロッキング溶液を 200 μ L 分注して、更に 4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。

20

さらに、BSA との非特異的反応を調べるために、BSA プレートの作製も行った。すなわち、96 穴マイクロタイタープレート (Nunc 社) に抗原溶液を感作することなく 1 . 5 % BSA (SIGMA 社) 及び 10 % サッカロース (和光純薬工業社) を含むブロッキング溶液を 200 μ L 分注して、更に 4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。

【 0 0 3 0 】

(4) コロニーのスクリーニング

約 2 週間後にコロニーの生育を確認してスクリーニングを実施した。実施したスクリーニング方法を以下に述べる。

30

上記 (3) で作製した抗原プレートを 0 . 05 % Tween 20 (和光純薬工業社) を含む PBS で 3 回洗淨した後に、上記 (2) で得られた 3 種類のハイブリドーマの培養上清 100 μ L を反応させ、更に洗淨を行った後に 2 次抗体である HRP 標識抗マウス IgM グロブリン抗体 (Zymed 社) を加えて反応させた。洗淨後に HRP の発色基質である 3 mg / mL o - フェニレンジアミン (OPD) (ナカライ社) クエン酸発色溶液を 100 μ L 加えて一定時間の発色後、1 N 硫酸 (和光純薬工業社) を停止液として更に 100 μ L 添加し、測定波長 492 nm にて吸光度を測定した。その結果を表 1 に示す。

表 1 に示すように、免疫原を精製組換えヒトアポリポrotein C - I (組換え ApoC - I) とした場合は組換え ApoC - I モノクローナル抗体 3 種類、免疫原をヒト血漿由来の精製天然アポリポrotein C - I (天然 ApoC - I) とした場合は天然 ApoC - I モノクローナル抗体 3 種類を得ることができたが、組換え ApoC - I モノクローナル抗体は、BSA との非特異反応が少ないのに比べ、天然 ApoC - I モノクローナル抗体は、非特異的反応が大きいことが判明した。

40

【表 1】

抗体	プレートに用いた抗原	吸光度
組換えA p o C - I 抗体 (クローン1)	天然A p o C - I	2. 1 2 4
	B S A (ブランク)	0. 4 7 7
組換えA p o C - I 抗体 (クローン2)	天然A p o C - I	2. 1 2 5
	B S A (ブランク)	0. 4 7 0
組換えA p o C - I 抗体 (クローン3)	天然A p o C - I	2. 2 3 4
	B S A (ブランク)	0. 3 6 0
天然A p o C - I 抗体 (クローン1)	天然A p o C - I	2. 1 8 0
	B S A (ブランク)	1. 8 5 3
天然A p o C - I 抗体 (クローン2)	天然A p o C - I	2. 6 6 6
	B S A (ブランク)	1. 2 9 6
天然A p o C - I 抗体 (クローン3)	天然A p o C - I	2. 3 1 1
	B S A (ブランク)	0. 9 7 8

10

20

【0031】

上記で得られた組換えA p o C - I 抗体 (クローン3) を産生するハイブリドーマ (M o u s e - M a s e h y b r i d o m a A M A - 1) は、平成19年8月1日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、受領番号としてF E R M A B P - 1 0 8 8 9 が付与されている。

30

【産業上の利用可能性】

【0032】

プロモーターとしてL a c プロモーターなどの大腸菌由来のプロモーターを用い、宿主細胞として大腸菌を用いて、チオレドキンなどの水溶性であって大腸菌で発現し得る蛋白質とアポリポプロテインとの融合蛋白質として発現させることにより、高純度の組換えアポリポプロテインが得られる。この方法により得られる高純度の組換えアポリポプロテインC - I を抗原として用いて、アポリポプロテインC - I に対する抗体を調製することにより、天然のアポリポプロテインC - I に対して特異性の高い抗体を得ることができる。この抗体を用いて、検体中のアポリポプロテインC - I を免疫学的測定法により、正確に測定することができ、従って、組換えアポリポプロテインC - I に対する抗体を臨床検査薬として用いることにより、卒中、敗血症、腫瘍、心疾患、クローン病発病の可能性などを正確に診断することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】ヒトアポリポプロテインC - 1 とチオレドキンとの融合蛋白質を発現するための発現ベクターの構築を示す。

【図2】発現ベクターによって発現されたヒトアポリポプロテインC - 1 とチオレドキンとの融合蛋白質の検出結果を示す。

【図3】発現ベクターによって発現されたヒトアポリポプロテインC - 1 とチオレドキン

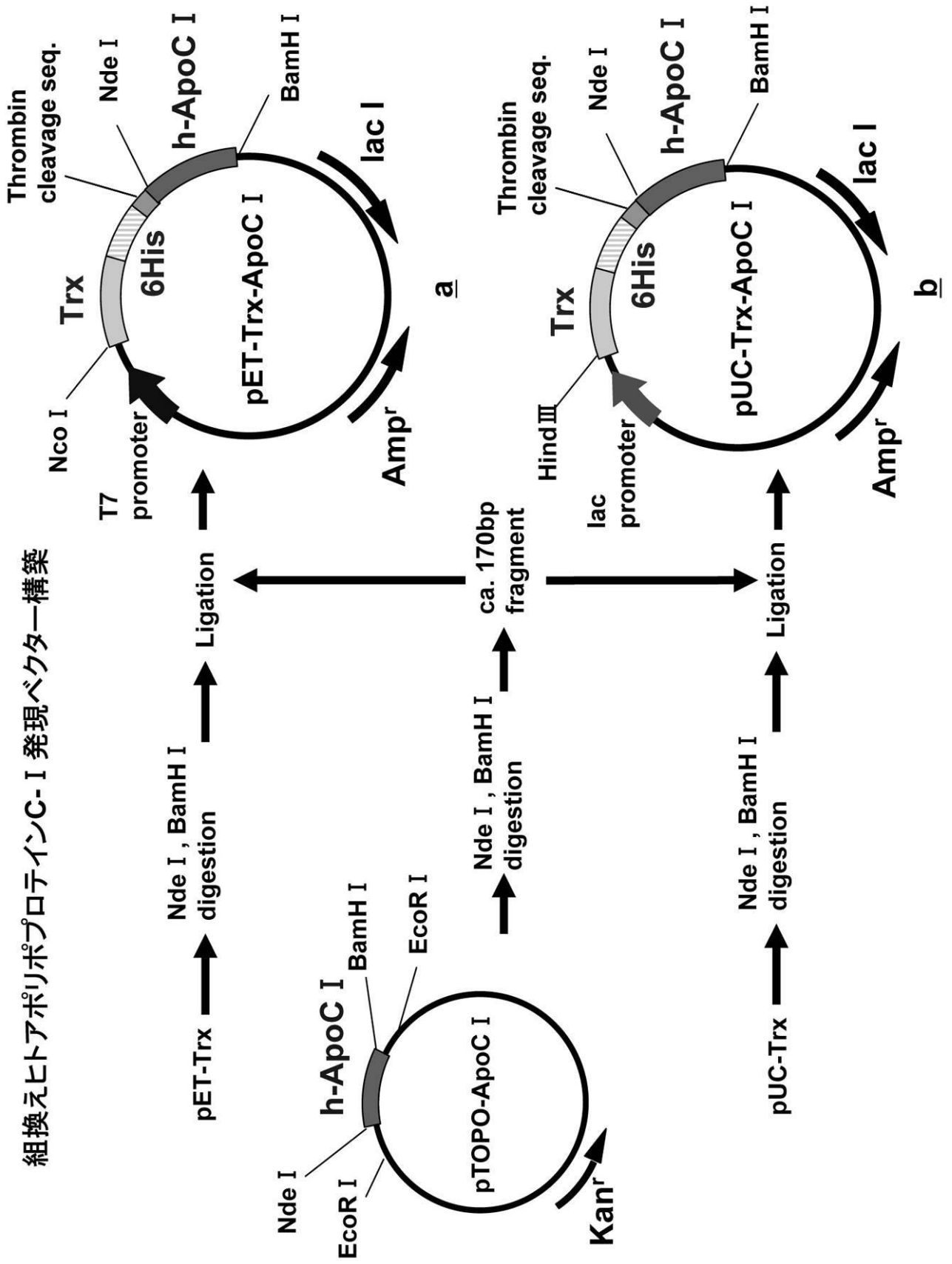
50

との融合蛋白質の、アフィニティークロマトグラフィーによるリフォールディングと精製結果を示す。

【図4】精製組換えヒトアポリポプロテインC - Iのトリシン - SDS - ポリアクリルアミド電気泳動およびウエスタンブロッティングの結果を示す。

【 図 1 】

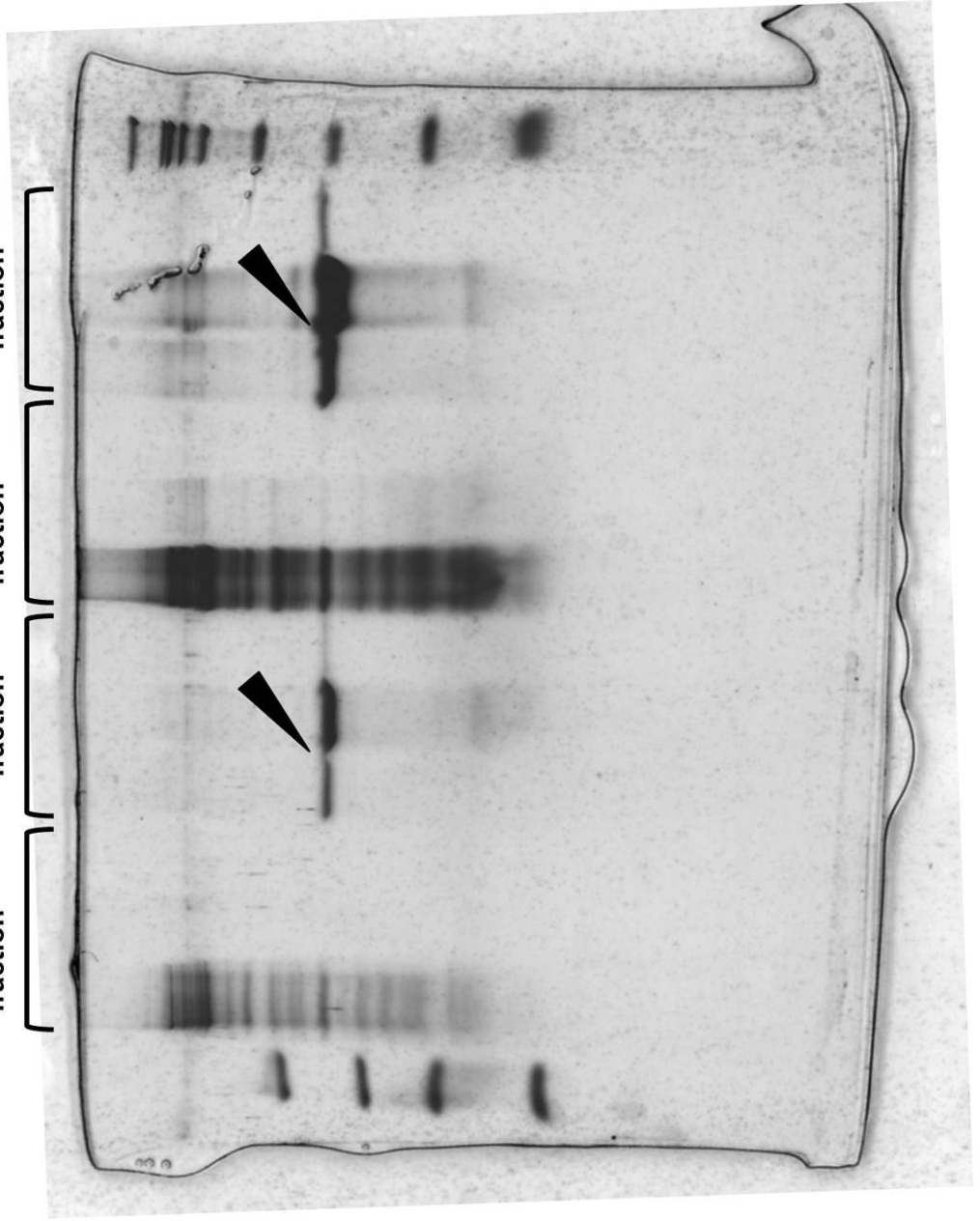
組換えヒトアポリポrotein C-I 発現ベクター構築



【 図 2 】

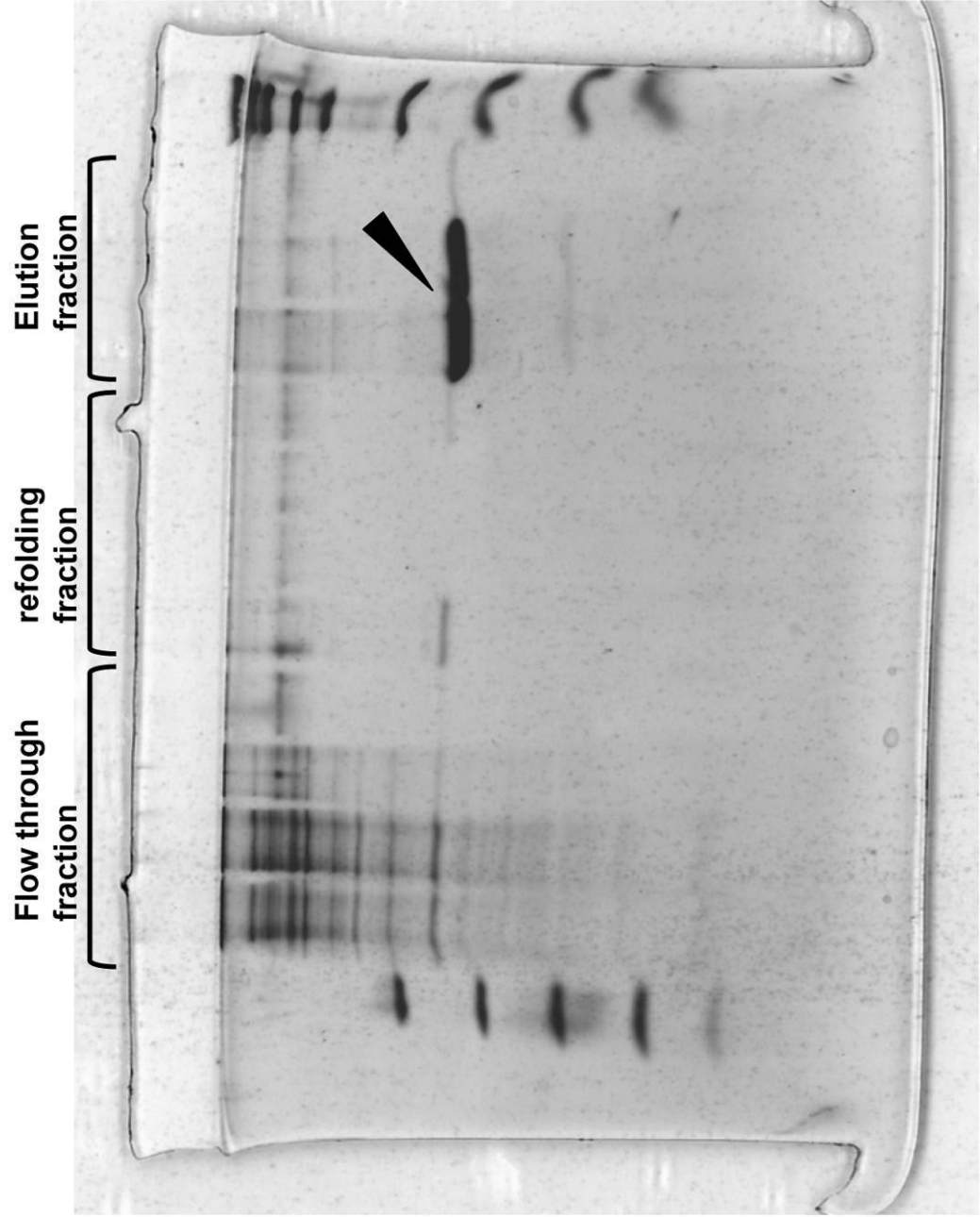
バッチ法による組換えヒトアポリポrotein C-I (チオレドキシシン融合タンパク質)の検出

pUC-Trx-ApoC1/JM109 pUC-Trx-ApoC1/BL21



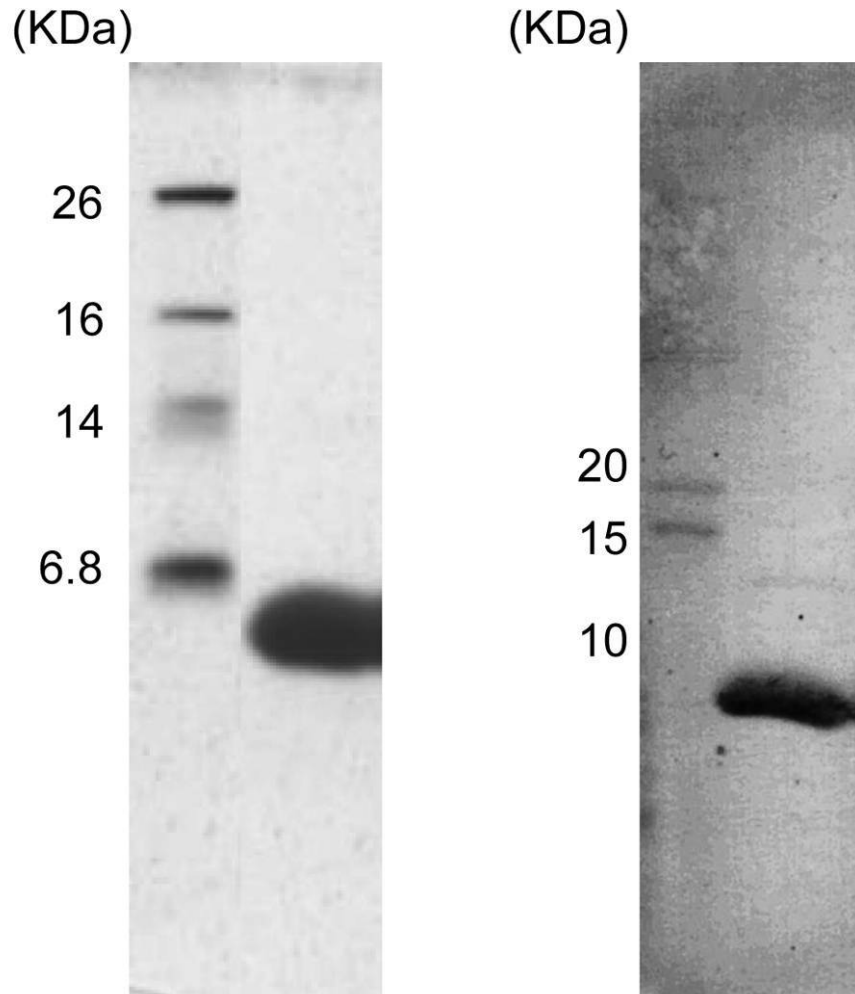
【 図 3 】

アフィニティークロマトグラフィーによる
組換えヒトアポリポrotein C-I (チオレドキシ融合タンパク質)のリフォールディングと精製



【 図 4 】

精製組換えヒトアポリポプロテインC-I の
トリシン-SDS-ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング



トリシン-SDS-PAGE (CBB染色)

ウェスタンブロッティング

【 配列表 】

[2009050227000001.app](#)

 フロントページの続き

- (72)発明者 清川 巖
 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内
- (72)発明者 大橋 建也
 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内
- (72)発明者 小島 良
 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内
- (72)発明者 片山 勝博
 東京都千代田区九段北 4 - 1 - 2 8 九段ファーストブレース 日東紡績株式会社内
- F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA53 BA80 CA04 CA07 CA20 DA06 EA04
 FA02 FA10 GA08 GA09 GA11 GA19 GA27 HA03 HA15
 4B064 AG01 AG27 CA01 CA02 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 CE02
 CE03 CE12
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
 EA50 FA71 FA72 FA74 GA05 GA15 GA26

专利名称(译)	重组载脂蛋白		
公开(公告)号	JP2009050227A	公开(公告)日	2009-03-12
申请号	JP2007222001	申请日	2007-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	片野義徳 清川 巖 大橋建也 小島良 片山勝博		
发明人	片野 義徳 清川 巖 大橋 建也 小島 良 片山 勝博		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 C12P21/02 C07K14/775 C07K16/18		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.W C12P21/02.C C07K14/775 C07K16/18 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA08 4B024/GA09 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE03 4B064/CE12 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA05 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	池田幸		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供产生新的重组载脂蛋白的方法，获得重组载脂蛋白C-1和针对其的抗体，并提供使用该抗体测定载脂蛋白C-1的方法和用于其的试剂盒。解决方案：通过将包含Lac启动子作为启动子的表达质粒，编码硫氧还蛋白的DNA序列和编码载脂蛋白CI的DNA序列转移至大肠杆菌，表达硫氧还蛋白和载脂蛋白CI的融合蛋白，获得高纯度重组载脂蛋白CI。大肠杆菌，从融合蛋白中回收载脂蛋白CI。通过使用载脂蛋白C-1作为抗原制备抗载脂蛋白C-1的抗体，获得对天然载脂蛋白C-1具有更高特异性的抗体。通过免疫学测定方法使用抗体精确测定样品中的载脂蛋白C-1。Z

抗体	プレートに用いた抗原	吸光度
組換えApoC-I抗体(クローン1)	天然ApoC-I	2.124
	B SA (ブランク)	0.477
組換えApoC-I抗体(クローン2)	天然ApoC-I	2.125
	B SA (ブランク)	0.470
組換えApoC-I抗体(クローン3)	天然ApoC-I	2.234
	B SA (ブランク)	0.360
天然ApoC-I抗体(クローン1)	天然ApoC-I	2.180
	B SA (ブランク)	1.853
天然ApoC-I抗体(クローン2)	天然ApoC-I	2.666
	B SA (ブランク)	1.296
天然ApoC-I抗体(クローン3)	天然ApoC-I	2.311
	B SA (ブランク)	0.978