

(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2004-305224

(P2004-305224A)

(43) 公開日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 1/113	C O 7 K 1/113		4 B O 6 4
C O 7 K 14/00	C O 7 K 14/00		4 H O 4 5
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00		
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C	

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-212035 (P2004-212035)	(71) 出願人	000237204 富士レビオ株式会社
(22) 出願日	平成16年7月20日 (2004. 7. 20)		東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号
(62) 分割の表示	特願平9-121803の分割	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
原出願日	平成9年4月24日 (1997. 4. 24)		
(31) 優先権主張番号	特願平8-134444	(72) 発明者	竹村 史典 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
(32) 優先日	平成8年5月1日 (1996. 5. 1)	(72) 発明者	上野 英一 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	伊藤 哲 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸結合ポリペプチド及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 ポリペプチドの抗原性を変化させずに性質を変化させた、修飾ポリペプチドを提供すること。

【解決手段】 ポリペプチドに核酸が結合して成る、核酸結合ポリペプチドを提供した。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ポリペプチドに核酸が結合して成る、核酸結合ポリペプチド。

**【請求項 2】**

前記ポリペプチドの末端に核酸が結合されたものである請求項 1 記載の核酸結合ポリペプチド。

**【請求項 3】**

前記核酸は、前記ポリペプチドに結合された核酸結合モチーフを介して結合されている請求項 1 又は 2 記載の核酸結合ポリペプチド。

**【請求項 4】**

前記ポリペプチド及び前記核酸結合モチーフは、遺伝子工学的的手法により融合ポリペプチドとして発現されたものである請求項 3 記載の核酸結合ポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記核酸結合モチーフは、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 4 記載の核酸結合ポリペプチド。

**【請求項 6】**

前記ポリペプチドは、免疫測定により測定すべき抗原である請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の核酸結合ポリペプチド。

**【請求項 7】**

ポリペプチドを遺伝子工学的的方法により生産し、生産されたポリペプチドに核酸を結合させ、生じた核酸結合ポリペプチドを可溶性画分から精製することを特徴とする、核酸結合ポリペプチドの生産方法。

**【請求項 8】**

前記ポリペプチドをコードする遺伝子と、核酸結合モチーフをコードする遺伝子との融合遺伝子を発現させることにより、該核酸結合モチーフを介して前記核酸を結合させる請求項 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

ポリペプチドから成る抗原、又は該抗原に対する抗体を免疫測定する免疫測定方法において、該ポリペプチドに核酸が結合された核酸結合ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする免疫測定方法。

**【請求項 10】**

前記核酸結合ポリペプチドは、ポリペプチドの末端に核酸が結合されたものである請求項 9 記載の免疫測定方法。

**【請求項 11】**

前記核酸は、前記ポリペプチドに結合された核酸結合モチーフを介して結合されている請求項 9 又は 10 記載の免疫測定方法。

**【請求項 12】**

前記ポリペプチド及び前記核酸結合モチーフは、遺伝子工学的的手法により融合ポリペプチドとして発現されたものである請求項 11 記載の方法。

**【請求項 13】**

前記核酸結合モチーフは、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 11 又は 12 記載の方法。

**【請求項 14】**

前記核酸結合ポリペプチドを結合した粒子を用いる凝集法により免疫測定を行う請求項 9 ないし 13 のいずれか 1 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、核酸結合ポリペプチド、その製造方法及び該核酸結合ポリペプチドを用いた

10

20

30

40

50

免疫測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

これまで遺伝子組換え操作で作製してきたタンパク質は目的とする特異的な立体構造を如何に維持しかつ抗原抗体反応に適合するかを意図して研究が行われてきた。その際に精製過程において変性操作が加わるため、天然型の構造を保ったまま精製し、それを免疫学的測定系に供与できない場合があった。また各種アッセイ系特有の反応に影響する因子が存在することもあり、しばしば期待通りの反応が起こらないことも知られている。

【0003】

例えば、免疫測定方法の1つとしていわゆる凝集法が知られている。この方法により例えば、あるタンパク抗原に対する抗体を測定する場合には、該抗原をラテックス粒子のような粒子に固定化した粒子と抗体を反応させ、抗体が存在すれば粒子が凝集するので吸光度測定等により凝集の程度を測定すれば試料中の該抗体を定量することが可能になる。ところが、この抗原として、遺伝子工学的的手法により生産したタンパク質を用いると、生産されたタンパク質は、測定すべき抗体との反応性を有しているにもかかわらず、これを粒子に固定化して凝集法による免疫測定を行うと、試料中に抗体が存在する場合でも凝集が起きないことがしばしばある。

【0004】

このような場合、これまでは生産されたタンパク質を後から修飾したり、融合タンパク質の形で発現したりして少しでも反応性を改善するように努力がなされてきた。しかし、抗原性(すなわち抗体との反応性)を維持したまま所望の性質を付与できるようにタンパク質を修飾することは困難であった。

【0005】

また、遺伝子工学的的手法によりタンパク質を生産した場合、タンパク質はしばしば不溶性タンパク質として生産される。これを精製する場合には、可溶化処理がなされるが、可溶化処理の間にタンパク質が変性し、本来の抗原性を喪失することもしばしばある。従って、遺伝子工学的的手法によりタンパク質を生産する場合に、可溶性タンパク質として生産されることが好ましい。

【0006】

【非特許文献1】J. of Virology, 64, 3319-3330(1990)

【非特許文献2】Biochim. Biophys. Acta, 950, 45-53(1988)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の目的は、ポリペプチドの抗原性を変化させずに性質を変化させた、修飾ポリペプチドを提供することである。さらにまた、本発明の目的は、遺伝子工学的的手法によりポリペプチドを生産する場合に、生産されたポリペプチドが可溶化画分中に得られるようにするポリペプチドの生産方法を提供することである。さらに、本発明の目的は、従来困難であったポリペプチド抗原を用いた免疫測定方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、ポリペプチドに核酸を結合することにより、ポリペプチドの抗原性を変化させることなくその性質を変化させることを見出し、また、核酸結合ポリペプチドを抗原として用いることにより、従来では不可能であった免疫測定が可能になる場合があることを見出した。また、遺伝子工学的的手法により生産されるポリペプチドに核酸を結合することにより、生産されたポリペプチドが可溶化画分中に得られることを見出した。

【0009】

すなわち、本発明は、ポリペプチドに核酸が結合して成る、核酸結合ポリペプチドを提供する。また、本発明は、ポリペプチドを遺伝子工学的的方法により生産し、生産されたポ

10

20

30

40

50

リペプチドに核酸を結合させ、生じた核酸結合ポリペプチドを可溶性画分から精製することを特徴とする、核酸結合ポリペプチドの生産方法を提供する。さらに、本発明は、ポリペプチドから成る抗原、又は該抗原に対する抗体を免疫測定する免疫測定方法において、該ポリペプチドに核酸が結合された核酸結合ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする免疫測定方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、ポリペプチドの抗原性に变化を与えずにポリペプチドの種々の性質を変化させた核酸結合ポリペプチドが初めて提供された。また、本発明により、従来不可能であった免疫測定も可能になった。さらに、本発明により、従来不溶性画分中に回収されていた、遺伝子工学的的手法により生産される遺伝子産物を可溶性画分中に回収する方法が初めて提供された。従って、本発明は、遺伝子工学や免疫測定の分野に大いに貢献するものと期待される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の核酸結合ポリペプチドは、上述のように、ポリペプチドに核酸を結合させることにより、ポリペプチドの抗原性を变化させずにポリペプチドの性質を変化させたものである。ここで、「ポリペプチド」とは、単独で抗原性を発揮できるものであればいかなるものでもよく、従って、それを構成するアミノ酸残基の数は6以上であればよく、好ましくは8以上である。また、「ポリペプチド」には、アミノ酸のみから成るものだけでなく、糖タンパク質、リポタンパク質等、ポリペプチドと糖や脂質等の他の成分との複合体も包含される。

20

【0012】

ポリペプチドに結合される核酸のサイズは特に限定されるものではなく、ポリペプチドの性質を変化させることができるサイズであればよい。通常、塩基数で100b~10Kb、好ましくは1Kb~5Kb程度である。また、ポリペプチドに結合される核酸はDNAでもRNAでもよい。また、結合される核酸の塩基配列は何ら限定されるものではなく、いかなる配列でも構わない。

【0013】

核酸は、ポリペプチドのどの部分に結合されていてもよい。例えば、ポリペプチドのN末端又はC末端に結合することができるがこれらに限定されるものではない。さらに、ポリペプチドに核酸を直接結合してもよいし、他の構造を介して間接的に結合してもよい。例えば、下記実施例では、ポリペプチドに核酸結合モチーフである他のポリペプチドを結合し、この核酸結合モチーフに核酸が結合されているが、このような態様も本願発明の範囲に包含される。

30

【0014】

ポリペプチドと核酸を結合させる方法は限定されるものではなく、ポリペプチドと核酸を結合できる方法であればいかなる方法でもよい。従って、ポリペプチドと核酸との結合様式は何ら限定されるものではなく、共有結合、イオン結合、配位結合、水素結合等、いかなる結合であってもよい。また、ポリペプチドを遺伝子工学的的手法により生産する場合には、ポリペプチドを核酸が結合した状態で発現させてもよいし、ポリペプチド発現後に核酸を結合させてもよい。例えば、発現させようとするポリペプチドの遺伝子情報に核酸を結合することで知られる核酸結合モチーフの遺伝子情報を含めて発現させると、核酸結合モチーフのついたポリペプチドが発現し、発現直後に宿主の核酸が自動的に結合し、核酸結合ポリペプチドとして精製できる。また、発現時に自動的に核酸が結合し得なかった場合でも発現後の核酸結合モチーフが結合したポリペプチドと核酸とを混合しておくこと、ポリペプチドが再構成し、核酸結合ポリペプチドを得ることができる。核酸結合モチーフは種々知られており、B型肝炎ウイルス(HBV)のHBc蛋白配列に存在する核酸結合モチーフ(J. of Virology, 64, 3319-3330(1990))、マウスの核酸結合蛋白であるプロタミン(Biochim. Biophys. Acta, 950, 45-53(1988))等、適宜用いることができる。なお

40

50

、HBVの核酸結合モチーフの塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2に、マウスプロタミン1の塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号15及び16に示す。

【0015】

本発明の核酸結合ポリペプチドは、ポリペプチドの抗原性を変化させずにポリペプチドの性質を変化させるたものであり得る。変化させるポリペプチドの性質としては、等電点、分子量、ポリペプチドの三次構造等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0016】

本願発明者らは、上記本発明の核酸結合ポリペプチドを、免疫測定方法の抗原として用いることにより、驚くべきことに、従来測定が不可能であった免疫測定方法においても免疫測定が可能になることを見出した。例えば、抗原を粒子に結合し、これを検体と反応させ、粒子の凝集を測定することにより検体中の抗体を測定する、凝集法と呼ばれる免疫測定方法において、粒子に結合する抗原として遺伝子工学的的手法により生産されたポリペプチドを用いた場合に、該ポリペプチドは対応抗体に対する反応性を有しているにもかかわらず、実際に凝集法により測定を行うと、検体中に抗体が存在しているにもかかわらず凝集が起きないことがある。ところが、粒子に結合する抗原として、本発明の核酸を結合したポリペプチドを用いると、検体中の抗体量に依存して粒子の凝集が起きる。本発明の免疫測定方法としては、凝集法に限らず、ELISA法等従来より公知のいずれの方法であってもよい。また、既知量の核酸結合ポリペプチドを検体に添加して競合法を行うことにより、検体中の該ポリペプチド抗原の測定を行うこともできる。本発明の免疫測定方法は、抗原として上記した、ポリペプチドに核酸が結合されたものを用いることを除き、従来より周知の方法により行うことができる。凝集法による免疫測定方法の詳細な一例が下記実施例に記載されている。

【0017】

ポリペプチドを遺伝子工学的手法で生産する場合、生産されたポリペプチドは多くの場合不溶性画分に得られる。このポリペプチドを回収して用いる場合にはポリペプチドの可溶化処理を行わなければならない。この可溶化処理によってポリペプチドの抗原性が変化する場合もしばしばある。従って、遺伝子工学的的手法により生産されるポリペプチドが可溶性画分に回収されることが望ましい。遺伝子工学的的手法によるポリペプチドの生産方法に本発明の方法を適用し、生産されたポリペプチドが自動的に宿主細胞中の核酸と結合するようにすると、得られる核酸結合ポリペプチドが可溶性画分に回収される。例えば、下記実施例に記載するように、発現させるポリペプチドを、HBcの核酸結合モチーフとの融合ポリペプチドとして発現させると、発現と同時に核酸結合モチーフに核酸が結合し、得られた核酸結合ポリペプチドは可溶性画分に回収される。従って、本発明はまた、ポリペプチドを遺伝子工学的的方法により生産し、生産されたポリペプチドに核酸を結合させ、生じた核酸結合ポリペプチドを可溶性画分から精製することを特徴とする、ポリペプチドの生産方法をも提供する。

【実施例】

【0018】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本願発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0019】

参考例1 HCVコア蛋白質(1~120aa)の発現

配列表の配列番号3に示したHCVコアポリペプチドをコードするDNA断片を、HCVコア領域を含むDNA断片を導入したプラスミドCKSC1150を鋳型分子として、PCR法にて増幅した後、制限酵素EcoRIとBamHIで水解した。次いで1%アガロースゲル電気泳動によりHCVコア領域を含むDNA断片370bpを分離した。このDNA断片を図1に示す発現用プラスミドpW6AのEcoRI-BamHI部位に挿入し、プラスミドpW6AHCVコア120を作製した。このプラスミドを用い、大腸菌B

10

20

30

40

50

L 2 1 ( D E 3 ) ( B r o o k h a v e n N a t i o n a l L a b o r a t o r y より入手)を形質転換させ、H C V コアポリペプチド120を発現するアンピシリン耐性の形質転換体大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 2 0 を得、H C V コア蛋白質(1~120aa)を発現させた。以下、本明細書中では、この発現蛋白質を120と記載する。120の塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号3及び4に示す。

#### 【0020】

##### 実施例1 プラスミドの作製

配列表の配列番号5及び配列番号3に示したH C V コアポリペプチド150及び120をコードするDNA断片を、H C V コア領域を含むDNA断片を導入したプラスミド C K S C 1 1 5 0 を鋳型分子として、P C R 法にて増幅した後、制限酵素 E c o R I と B a m H I で水解した。次いで1%アガロースゲル電気泳動によりH C V コア領域を含むDNA断片470bp及び370bpを分離した。このDNA断片を図1に示す発現用プラスミド p W 6 A の E c o R I - B a m H I 部位に挿入し、プラスミド p W 6 A H C V コア 1 5 0 及び p W 6 A H C V コア 1 2 0 を作製した。

10

#### 【0021】

一方、配列表の配列番号1に示すH B c 核酸結合モチーフをコードするDNA断片を、プラスミド p H B V - 1 1 ( N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 8 , 4 5 8 7 ( 1 9 9 0 ) ) を鋳型分子として、P C R 法にて増幅した後、制限酵素 B a m H I で水解した。次いで2%アガロースゲル電気泳動により核酸結合モチーフを含むDNA断片110bpを分離した。このDNA断片を上記プラスミド p W 6 A H C V コア 1 5 0 及び p W 6 A H C V コア 1 2 0 の B a m H I 部位に挿入した後、これらを用い大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) ( B r o o k h a v e n N a t i o n a l L a b o r a t o r y より入手)を形質転換させ、アンピシリン耐性の形質転換体大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 5 0 N A 及び大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 2 0 N A を得た。本明細書中では、この形質転換体が発現する核酸結合モチーフが結合した蛋白質を150NA及び120NAと記載する。150NAの塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号9及び10に、120NAの塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号7及び8に示す。

20

#### 【0022】

##### 実施例2 組換え蛋白質(150NA及び120NA)の発現

実施例1で作製した形質転換体を、50µg/mlのアンピシリンを含むLB培地2ml中37℃で培養した。予備培養にて600nmでODを0.6~0.8にした後、0.5mM IPTGを添加し発現誘導を行い、更に2時間培養した。1.5ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、100µlの緩衝液(10mM トリス-塩酸、pH8.0、0.1M塩化ナトリウム、1mM EDTA)に懸濁し、15分間の超音波破碎により完全に菌体を破碎した。これを菌体試料とする。

30

#### 【0023】

菌体試料8µlに3倍濃度のSDSポリアクリルアミド緩衝液(0.15Mトリス-塩酸、pH6.8、6% SDS、24%グリセロール、6mM EDTA、2% 2-メルカプトエタノール、0.003%プロモフェノールブルー)4µlを加え十分攪拌した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ニトロセルロースフィルターにウエスタンブロットを行って転写を行い、1%BSAによりブロッキング後、リン酸緩衝液(10mMリン酸、pH7.4、0.15M塩化ナトリウム)で200倍に希釈したH C V コア抗体陽性人血清を反応させた。更にペルオキシダーゼ酵素標識された抗ヒトIgGウサギポリクロナール抗体(ダコ社製)を反応させ、洗浄後10mlの基質発色液(0.01%過酸化水素水、0.6mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール)を添加し、発色させた。結果を図2に示す。図2に示したように大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 5 0 N A 及び大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 2 0 N A の菌体試料はH C V コア陽性ヒト血清で陽性反応を示した。

40

#### 【0024】

##### 実施例3 可溶性核酸結合120NA(120NA(+))の精製

50

実施例 1 で作製した大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 2 0 N A を L B 培地 3 7 条件下で培養した。予備培養にて 6 0 0 n m で O D 約 0 . 7 の濃度にしたのち、0 . 5 m M I P T G を添加し発現誘導を行った。2 . 5 時間培養後、遠心操作を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に 5 0 m M トリス - 塩酸緩衝液、p H 8 . 0、2 0 % エタノール、0 . 2 M 塩化ナトリウム、0 . 3 % オクチルチオグルコシド ( 以下本明細書中では O T G と記載する ) を 1 5 0 m l 加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、可溶性画分の核酸結合 1 2 0 N A ( 以下本明細書中では 1 2 0 N A ( + ) と記載する ) を回収した。5 0 m M トリス - 塩酸、p H 8 . 0、2 0 % エタノール緩衝液にシヨ糖を加え、それぞれシヨ糖濃度 5 0 %、3 0 %、2 0 % の緩衝液を作製し、これを積層した超遠心チューブに 1 2 0 N A ( + ) を含む可溶性画分を積層し、1 0 0 , 0 0 0 g 1 0、1 2 時間の条件下ベックマン超遠心機を用いて第一シヨ糖密度勾配超遠心を行った。約 3 0 % ~ 4 0 % シヨ糖濃度に 1 2 0 N A ( + ) を回収した。

10

#### 【 0 0 2 5 】

この 1 2 0 N A ( + ) 第一シヨ糖密度勾配回収画分を、0 . 3 M 塩化ナトリウム、0 . 1 % ミリスチルスルフォベタイン ( S B 3 - 1 4、シグマ社製 ) 5 0 m M グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 p H 1 0 . 0 で平衡化したスーパーデックス 2 0 0 ゲル濾過カラム ( ファルマシア社製 ) で精製した。分子量約 7 0 0 ~ 1 0 0 0 K D に 1 2 0 N A ( + ) を回収した。ついでこの 1 2 0 N A ( + ) 回収画分を、5 0 m M トリス - 塩酸、p H 8 . 0、2 0 % エタノール緩衝液にシヨ糖を加え、シヨ糖濃度 5 0 %、2 0 % の緩衝液を積層した超遠心チューブに積層し、1 0 0 , 0 0 0 g、1 0、1 2 時間の条件下、ベックマン超遠心機を用いて第二シヨ糖密度勾配超遠心を行い濃縮精製を行った。

20

#### 【 0 0 2 6 】

#### 参考例 2 不溶性 1 2 0 N A の精製

実施例 1 で作製した大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア 1 2 0 N A を L B 培地 3 7 条件下で培養した。予備培養にて 6 0 0 n m で約 0 . 7 の濃度にした後、0 . 5 m M I P T G を添加し発現誘導を行った。2 . 5 時間培養後、遠心操作を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に 5 0 m M トリス - 塩酸緩衝液、p H 8 . 0、2 0 % エタノール、0 . 2 M 塩化ナトリウム、0 . 3 % O T G を 1 5 0 m l 加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、不溶性画分の 1 2 0 N A を回収した。このうち不溶性画分を 6 M 尿素、5 0 m M グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 p H 1 1 . 7 で可溶化し、遠心操作を行い上清画分を回収した。

30

#### 【 0 0 2 7 】

この上清を、6 M 尿素、5 0 m M グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 p H 1 0 . 0 で平衡化した S F F 陽イオン交換カラム ( ファルマシア社製 ) でイオン交換精製した。塩化ナトリウムで溶出したところ、約 0 . 5 M 塩化ナトリウム溶出画分に 1 2 0 N A を回収した。ついでこの S F F 溶出画分を 6 M 尿素 - 0 . 5 M 塩化ナトリウム、5 0 m M トリス - 塩酸緩衝液 p H 9 . 6 で平衡化したスーパーデックス 2 0 0 ゲル濾過カラム ( ファルマシア社製 ) で精製した。分子量約 2 2 K D の部分に精製 1 2 0 N A を回収した。

#### 【 0 0 2 8 】

#### 実施例 4 1 2 0 N A 及び 1 2 0 N A ( + ) の物性確認

実施例 3 で精製した 1 2 0 N A ( + ) の O D 2 6 0 / 2 8 0 n m 比を測定したところ、約 2 . 0 であり、1 2 0 N A の O D 2 6 0 / 2 8 0 n m 比よりも大きくなっていることから核酸と共存していると判断した。また、1 2 0 N A がシヨ糖密度勾配超遠心において、ほとんどシヨ糖濃度 0 % に回収されるのに対して、1 2 0 N A ( + ) は、約 3 0 % ~ 4 0 % のシヨ糖濃度に回収された。このことにより 1 2 0 N A ( + ) は、密度も変化しているものと考えられる。1 2 0 N A ( + ) を、D N A 分解酵素又は R N A 分解酵素にて酵素処理を行ったところ、R N A 分解酵素により 1 2 0 N A ( + ) に含まれる核酸がすべて分解された。よって、1 2 0 N A ( + ) の構成核酸は R N A と考えられた。等電点電気泳動を行ったところ、1 2 0 N A ( + ) の等電点は p I 3 . 5 ~ 5 . 0 にかけて広く分布し、参考例 2 で精製した 1 2 0 N A の p I 1 2 . 8 4 とは大きく異なっていた。3 % アガロース

40

50

3%ポリアクリルアミドゲルを用いたNative電気泳動を行ったところ、エチジウムブロマイド染色による発光から、120NA(+)に核酸が含まれることを確認した。このエチジウムブロマイド染色に用いたゲルを用いて、ウエスタンブロット及びクマシーブリリアントブルー染色を行ったところ、エチジウムブロマイド染色で発光した部分と同位置に、ウエスタンブロットでは抗HCVコア抗体との反応性を認め、クマシーブリリアントブルー染色では蛋白の存在が確認できた。一方、参考例2で精製した120NAの等電点はpI12.84と強い陽電荷を帯び、上記と同じNative電気泳動では、ウエスタンブロット及びクマシーブリリアントブルー染色による120NAのゲルの中への移動が確認できなかった。

#### 【0029】

よって120NA(+)は、核酸と結合することにより見かけの分子量の巨大化、密度の変化、電荷の変化と120NAとは物性が大きく変化しており、ウエスタンブロット及び凝集反応に変化が無いことにより、抗原活性は保持されていると考えられる。

#### 【0030】

参考例3 リジン結合120(120K10)の発現

実施例1と同様に、塩基性アミノ酸であるリジンを連続で10残基結合させる遺伝子操作をpW6AHCVコア120に対して行い、pW6AHCVコア120K10を作成した。これを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体大腸菌BL21(DE3)/pW6AHCVコアK10を得た。以下、本明細書中ではこの形質転換体が発現する蛋白質を、120K10と記載する。

#### 【0031】

この形質転換体をLB培地37条件下で培養した。予備培養にて600nmでOD約0.7の濃度にした後、0.5mM IPTGを添加し発現誘導を行った。2.5時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に50mMトリス-塩酸緩衝液pH8.0、20%エタノール、0.2M塩化ナトリウム、0.3% OTGを150ml加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、可溶性画分及び不溶性画分の両方に、発現した120K10を回収した。50mMトリス-塩酸、pH8.0、20%エタノール緩衝液にショ糖を加え、ショ糖濃度50%、30%、20%の緩衝液を積層した超遠心チューブに120K10を含む可溶性画分を積層し、100,000g、10、12時間の条件下、ベックマン超遠心機を用いてショ糖密度勾配超遠心を行った。しかし120K10は50%、30%、20%ショ糖画分には回収されず上層に回収された。一方、不溶性画分を参考例2と同様にSFF陽イオン交換カラム(ファルマシア社製)及びゲル濾過により精製を行い、分子量約20KDの部分に精製120K10を回収した。

#### 【0032】

参考例4 HCVコア抗原陽性血清の測定

市販のHCV抗体測定試薬リバアッセイ(カイロン社製)を用いて、HCV抗体陽性血清の反応性を調べた。結果を表1に示す。HCV抗原c100(アミノ酸番号1569~1931)、c33c(アミノ酸番号1192~1457)、コア抗原c22(アミノ酸番号2~120)及びNS5(アミノ酸番号2054~2995)を用いて調べたところ、陽性血清1及び2共、コア抗原を含めて、全ての抗原領域に対し抗体を持つ血清であった。

#### 【0033】

##### 【表1】

表1 陽性血清の反応性試験

	c100	c33c	コア抗原c22	NS5	判定
陽性血清1	4+	4+	4+		陽性
陽性血清2	4+	4+	4+		陽性

#### 【0034】

実施例5 HCVポリペプチド抗原の免疫反応性試験

参考例1、2、3及び実施例3で得られたHCV蛋白質抗原を10mg/mlの濃度で

10

20

30

40

50

ゼラチン粒子（富士レビオ社製）に 0.15 M PBS、pH 7.1 にて固定し、参考例 4 で確認した陽性血清と、HCV コア抗原 c 2 2 を免疫して得られたモノクローナル抗体 # 2 - 7 を用いて、感作抗原の免疫反応性を検討した。

【0035】

リン酸緩衝液に 1% 濃度で懸濁した感作ゼラチン粒子 25  $\mu$ l と陽性血清または # 2 - 7 25  $\mu$ l とをマイクロタイタープレート（富士レビオ社製）中で 2 時間反応させ凝集像を判定した。結果を表 2 に示す。表 2 では、反応性を 2 n 希釈倍率で示し、4 以上の結果を陽性と判定した。HCV コア抗原を免疫して作製したモノクローナル抗体 # 2 - 7 はどの HCV コア抗原とも反応したが、実際の陽性血清が反応したのは 120NA (+) 感作粒子のみであった。

10

【0036】

【表 2】

表 2 HCV コア抗原の免疫反応性試験

コア抗原名	陽性血清 1	陽性血清 2	# 2 - 7
120NA (+)	6+	7	8
120NA	< 3	< 3	7
120K10	< 3	< 3	6
120	< 3	< 3	4

20

【0037】

実施例 6 120NA から 120NA (+) の再構成

実施例 1 で作製した大腸菌 BL 2 1 (DE 3) / pW 6 A HCV コア 120NA を用い、参考例 2 と同様に不溶性画分から HCV コア 120NA を精製した。120NA の分子量は約 22 KD、OD 260 / 280 nm 比は約 0.7 であった。これに、pW 6 A 由来の環状プラスミド DNA (4.7 Kbp)、6 M 尿素、20% ショ糖を加え、50 mM トリス塩酸緩衝液、0.15 M 塩化ナトリウム、20% ショ糖に対して透析を行い、120NA から 120NA (+) への再構成を行った。透析後再構成された 120NA (+) を、スーパーデックス 200 ゲル濾過カラム（ファルマシア社製）にて精製し、分子量 700 ~ 1000 KD 部分に 120NA (+) を回収した。50 mM トリス - 塩酸、pH 8.0、20% エタノール緩衝液にショ糖を加え、それぞれショ糖濃度 50%、20% の緩衝液を作製し、これを積層した超遠心チューブに回収した 120NA (+) を積層し、100,000 g、10、12 時間の条件下ベックマン超遠心機を用いて、ショ糖密度勾配超遠心を行った。約 40% ~ 50% ショ糖濃度に再構成した 120NA (+) を回収した。

30

【0038】

再構成を行った 120NA (+) は、OD 260 / 280 nm 比が再構成前の約 0.7 から約 1.7 に変化しておりゲル濾過による分子量及びショ糖密度勾配超遠心による比重の値がほとんど実施例 3 で精製した可溶性 120NA (+) と同じ数値を示すので、120NA (+) に再構成されたと考えられる。

【0039】

実施例 7 120 結合 120NA (120NA 120) 発現用形質転換体の構築

配列表の配列番号 3 に示した HCV コアポリペプチドをコードする DNA 断片を、HCV コア領域を含む DNA 断片を導入したプラスミド CKSC 1150 を鋳型分子として PCR 法にて増幅した後、制限酵素 Nhe I と Eco R I で水解した。次いで、1% アガロースゲル電気泳動により HCV コア領域を含む DNA 断片 370 bp を分離した。この DNA 断片を図 1 に示す発現用プラスミド pW 6 A の Nhe I - Eco R I 部位に挿入し、プラスミド pW 6 A HCV コア 120 (Nhe I / Eco R I) を作製した。

40

【0040】

次いで、配列表の配列番号 3 に示した HCV コアポリペプチドをコードする DNA 断片を、プラスミド CKSC 1150 を鋳型分子として PCR 法にて増幅した後、制限酵素 E

50

c o R I と B a m H I で水解した。次いで、1%アガロースゲル電気泳動によりH C V コア領域を含むD N A 断片370bpを分離した。このD N A 断片をプラスミドp W 6 A H C V コア120 ( N h e I / E c o R I ) の E c o R I - B a m H I 部位に挿入し、プラスミドp W 6 A H C V コア120 - 120を作製した。

#### 【0041】

さらに、配列表の配列番号1に示すH B c 核酸結合モチーフをコードするD N A 断片を、プラスミドp H B V - 11を鋳型分子として、P C R 法にて増幅した後、制限酵素E c o R I で水解した。次いで、2%アガロースゲル電気泳動により核配結合モチーフを含むD N A 断片110bpを分離した。このD N A 断片を上記プラスミドp W 6 A H C V コア120 - 120のE c o R I 部位に挿入した後、これを用い大腸菌B L 2 1 ( D E 3 ) を形質転換させ、120結合120N A (以下、本明細書中では120N A 120と記載する)を発現するアンピシリン耐性の形質転換体として、大腸菌B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア120N A 120を得た。

10

#### 【0042】

実施例8 不溶性120N A 120の精製

参考例2と同様に、大腸菌B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア120N A 120をL B 培地37条件下で培養した。予備培養にて600nmで約0.7の濃度にした後、0.5mM I P T G を添加し発現誘導を行った。2.5時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に50mM トリス - 塩酸緩衝液p H 8.0、20%エタノール、0.2M 塩化ナトリウム、0.3% O T G を150ml 加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。発現した120N A 120は、遠心後可溶性及び不溶性画分に回収された。このうち不溶性画分を6M 尿素、50mM グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液p H 11.0で可溶化し、遠心を行い上清画分を回収した。

20

#### 【0043】

この上清を、6M 尿素グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液p H 11.0で平衡化したS F F 陽イオン交換カラムでイオン交換精製した。塩化ナトリウムで溶出したところ、約0.5M 塩化ナトリウム溶出画分に120N A 120を回収した。次いでこのS F F 溶出画分を6M 尿素、0.5M 塩化ナトリウム、50mM トリス - 塩酸緩衝液p H 9.6で平衡化したスーパーデックス200ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)で精製した。約分子量40KDに精製120N A 120を回収した。120N A 120の塩基配列及びアミノ酸配列を、配列表の配列番号11及び12に示す。

30

#### 【0044】

実施例9 可溶性核酸結合120N A 120 ( 120N A 120 ( + ) ) の精製

実施例3と同様に、大腸菌B L 2 1 ( D E 3 ) / p W 6 A H C V コア120N A 120をL B 培地37条件下で培養した。予備培養にて600nmで約0.7の濃度にした後、0.5mM I P T G を添加し発現誘導を行った。2.5時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に50mM トリス - 塩酸緩衝液p H 8.0、20%エタノール、0.2M 塩化ナトリウム、0.3% O T G を150ml 加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、可溶性画分の核酸結合120N A 120 (以下、本明細書中では120N A 120 ( + ) と記載する)を回収した。50mM トリス - 塩酸緩衝液p H 8.0、20%エタノール緩衝液にシヨ糖を加え、それぞれシヨ糖濃度50%、30%、20%緩衝液を作製し、これを積層した超遠心チューブに120N A 120 ( + ) を含む可溶性画分を積層し、10000g、10、12時間の条件下、ベックマン超遠心機を用いて第一シヨ糖密度勾配超遠心を行った。約30%~40%シヨ糖濃度に120N A 120 ( + ) を回収した。

40

#### 【0045】

この120N A 120 ( + ) 第一シヨ糖密度勾配回収画分を、0.3M 塩化ナトリウム、0.3% O T G 、50mM グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液p H 10.0で平衡化したスーパーデックス200ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)で精製した。分子量約700~1000KDに120N A 120 ( + ) を回収した。次いでこの120N A 120

50

(+)回収画分を50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.0、20% エタノール緩衝液にシヨ糖を加え、シヨ糖濃度50%、20%の緩衝液を積層した超遠心チューブに積層し100,000g、10、12時間の条件下、ベックマン超遠心機を用いて第二シヨ糖密度勾配超遠心を行い濃縮精製を行った。

#### 【0046】

実施例10 120NA120から120NA120(+ )の再構成

実施例9で精製した120NA120のOD260/280nm比は約0.7であった。これに、制限酵素Hae3で十分に切断した子牛胸腺から精製したDNA(シグマ社製)約1.3~0.7Kbpと、6M尿素、20%シヨ糖、1.0M塩化ナトリウムを加え、50mMトリス - 塩酸緩衝液、0.3M塩化ナトリウムに対して4の条件下で透析を行い、120NA120から120NA120(+ )への再構成を行った。透析後再構成され可溶性となった120NA120(+ )を、120NA(+ )同様スーパーデックス200ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)にて精製し、分子量約700~1000KD部分に120NA120(+ )を回収した。OD260/280nm比は約0.7から約1.8に変化していた。

10

#### 【0047】

実施例11 核酸結合TP47(TP47C2NA)発現用形質転換体の構築

配列表の配列番号13に示したTP由来47KD抗原をコードするDNA断片を、TP47KD抗原領域を含むDNA断片を導入したプラスミドpW6A47C2を鋳型分子としてPCR法にて増幅した後、制限酵素EcoRIとBamHIで水解した。次いで、1%アガロースゲル電気泳動によりTP47KD抗原領域を含むDNA断片1.3Kbpを分離した。このDNA断片を図1に示す発現用プラスミドpW6AのEcoRI-BamHI部位に挿入し、プラスミドpW6A47C2(EcoRI/BamHI)を作製した。

20

#### 【0048】

一方、配列表の配列番号1に示すHBVコア核酸結合モチーフをコードするDNA断片を、プラスミドpHBV-11を鋳型分子として、PCR法にて増幅した後、制限酵素BamHIとHindIIIで水解した。次いで、2%アガロースゲル電気泳動により核酸結合モチーフを含むDNA断片110bpを分離した。このDNA断片を上記プラスミドpW6A47C2(EcoRI/BamHI)のBamHI-HindIII部位に挿入した後、これを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換させ、核酸結合TP47(以下、本明細書中ではTP47C2NAと記載する)を発現するアンピシリン耐性の形質転換体として、大腸菌BL21(DE3)/pW6A47C2NAを得た。

30

#### 【0049】

実施例12 不溶性TP47C2NAの精製

参考例2と同様に、実施例11で作製した大腸菌BL21(DE3)/pW6ATP47C2NAをLB培地37下で培養した。予備培養にて600nmで約0.7の濃度にした後、0.5mM IPTGを添加し発現誘導を行った。2.5時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に50mMトリス - 塩酸緩衝液pH8.0、20%エタノールを150ml加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。発現したTP47C2NAは、遠心後可溶性及び不溶性画分に回収された。このうち不溶性画分を8M尿素、50mMトリス - 塩酸緩衝液pH8.0で可溶化し遠心を行い上清画分を回収した。この上清を、8M尿素、酢酸ナトリウム緩衝液pH6.0で平衡化したSFF陽イオン交換カラムでイオン交換精製した。塩化ナトリウムで溶出したところで約0.5M塩化ナトリウム溶出画分にTP47C2NAを回収した。濃縮後このSFF溶出画分を6M尿素、0.5M塩化ナトリウム、50mMトリス - 塩酸緩衝液pH9.6で平衡化したスーパーデックス200ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)で精製した。約分子量100KDに精製TP47C2NAを回収した。TP47C2NAの塩基配列及びアミノ酸配列を、配列表の配列番号15及び16に示す。

40

#### 【0050】

50

### 実施例 13 可溶性核酸結合 TP47C2NA ( TP47C2NA ( + ) ) の精製

実施例 3 と同様に、実施例 11 で作製した大腸菌 BL21 ( DE3 ) / pW6ATP47C2NA を LB 培地 37 条件下で培養した。予備培養にて 600 nm で約 0.7 の濃度にした後、0.5 mM IPTG を添加し発現誘導を行った。2.5 時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.0、20% エタノール、0.3% OTG を 150 ml 加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、可溶性画分に核酸結合 TP47C2NA ( 以下、本明細書中では TP47C2NA ( + ) と記載する ) を回収した。50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.0、20% エタノール緩衝液にシヨ糖を加え、それぞれシヨ糖濃度 50%、30%、20% 緩衝液を作製し、これを積層した超遠心チューブに TP47C2NA ( + ) を含む可溶性画分を積層し、100,000 g、10、12 時間の条件下ベックマン超遠心機を用いて第一シヨ糖密度勾配超遠心を行った。約 30% ~ 45% シヨ糖濃度に TP47C2NA ( + ) を回収した。

#### 【0051】

この TP47C2NA 第一シヨ糖密度勾配回収画分を、0.3 M 塩化ナトリウム、0.3% OTG、50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.0 で平衡化したスーパーデックス 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) で精製した。分子量約 700 - 1000 KD に TP47C2NA ( + ) を回収した。次いでこの TP47C2NA ( + ) 回収画分を 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.0、20% エタノール緩衝液にシヨ糖を加え、シヨ糖濃度 50%、20% の緩衝液を積層した超遠心チューブに積層し 100,000 g、10、12 時間の条件下ベックマン超遠心機を用いて第二シヨ糖密度勾配超遠心を行い濃縮精製を行った。

#### 【0052】

### 実施例 14 TP47C2NA から TP47C2NA ( + ) の再構成

実施例 12 で精製した TP47C2NA の OD260 / 280 nm 比は約 0.6 であった。これに、制限酵素 Hae3 により十分に切断した子牛胸腺より精製した DNA (シグマ社製) 約 1.3 ~ 0.7 Kbp と、6 M 尿素、20% シヨ糖、1.0 M 塩化ナトリウムを加え、50 mM トリス緩衝液、0.3 M 塩化ナトリウムに対して 4 の条件下で透析を行い、TP47C2NA から TP47C2NA ( + ) への再構成を行った。透析後再構成され可溶性となった TP47C2NA ( + ) を、120 NA ( + ) 同様スーパーデックス 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) にて精製し、分子量約 700 ~ 1000 KD 部分に TP47C2NA ( + ) を回収した。OD260 / 280 nm 比は約 0.6 から約 1.8 に変化していた。

#### 【0053】

### 実施例 15 プロタミン 1 結合 120 ( 120 pro1 ) 発現用形質転換体の構築

配列表の配列番号 17 に示したマウスプロタミン 1 をコードする DNA 断片を単離した。マウスプロタミン 1 cDNA を鋳型分子として PCR 法にて増幅した後、制限酵素 EcoRI と BamHI で水解した。次いで、1% アガロースゲル電気泳動によりマウスプロタミン 1 領域を含む DNA 断片 160 bp を分離した。この DNA 断片を実施例 1 で作製したプラスミド pW6AHCV コア 120 ( NheI / EcoRI ) の EcoRI - BamHI 部位に挿入した後、これを用い大腸菌 BL21 ( DE3 ) を形質転換させ、マウスプロタミン 1 結合 120 ( 以下、本明細書中では 120 pro1 と記載する ) を発現するアンピシリン耐性の形質転換体として、大腸菌 BL21 ( DE3 ) / pW6AHCV コア 120 pro1 を得た。

#### 【0054】

### 実施例 16 120 pro1 の精製

参考例 2 と同様に、大腸菌 BL21 ( DE3 ) / pW6AHCV コア 120 pro1 を LB 培地 37 条件下で培養した。予備培養にて 600 nm で約 0.7 の濃度にした後、0.5 mM IPTG を添加し発現誘導を行った。2.5 時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.0、20% エタノー

ル、0.2 M 塩化ナトリウム、0.3% OTG を 150 ml 加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。発現した 120 pro 1 は、遠心後可溶性及び不溶性画分に回収された。このうち不溶性画分を 6 M 尿素、50 mM グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 pH 11.0 で可溶化し、遠心を行い上清画分を回収した。

【0055】

この上清を、6 M 尿素グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 pH 11.0 で平衡化した SFF 陽イオン交換カラムでイオン交換精製した。塩化ナトリウムで溶出したところで、約 0.5 M 塩化ナトリウム溶出画分に 120 pro 1 を回収した。次いでこの SFF 溶出画分を 6 M 尿素、0.5 M 塩化ナトリウム、50 mM トリス - 塩酸緩衝液 pH 9.6 で平衡化したスーパーデックス 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) で精製した。約分子量 22 KD に精製 120 pro 1 を回収した。120 pro 1 の塩基配列及びアミノ酸配列を、配列表の配列番号 19 及び 20 に示す。

10

【0056】

実施例 17 120 pro 1 から 120 pro 1 (+) の再構成

実施例 16 で精製した 120 pro 1 の OD 260 / 280 nm 比は、約 0.7 であった。これに、制限酵素 Hae 3 により十分に切断した子牛胸腺から精製した DNA (シグマ社製) 約 1.3 ~ 0.7 Kbp と、6 M 尿素、20% ショ糖、1.0 M 塩化ナトリウムを加え、50 mM トリス - 塩酸緩衝液、0.3 M 塩化ナトリウムに対して 4 の条件下で透析を行い、120 pro 1 から 120 pro 1 (+) への再構成を行った。透析後再構成され可溶性となった 120 pro 1 (+) を、120 NA (+) 同様スーパーデックス 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) にて精製し、分子量約 700 ~ 1000 KD 部分に 120 pro 1 (+) を回収した。OD 260 / 280 nm 比は約 0.7 から約 1.7 に変化していた。

20

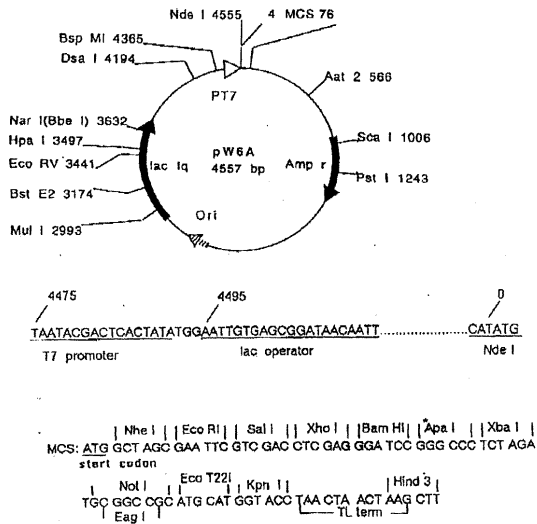
【図面の簡単な説明】

【0057】

【図 1】本発明の実施例において HCV コアタンパクの発現に用いたクローニングベクター pW6A の遺伝子地図である。

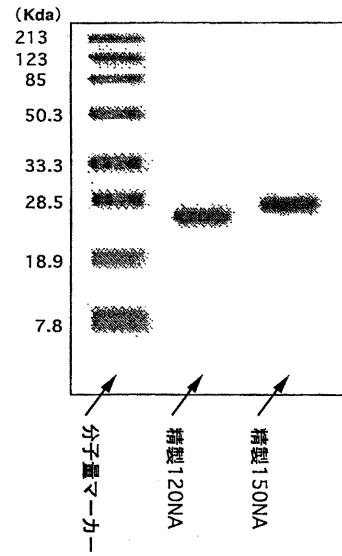
【図 2】本発明の実施例において遺伝子工学的手法により作製した HCV コア蛋白と、HCV コア陽性ヒト血清との反応性を示すウェスタンブロットの結果を示す模式図である。

【 図 1 】



【 図 2 】

ウエスタンブロット



## 【 配列表 】

2004305224000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成16年8月11日(2004.8.11)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ポリペプチドをコードする遺伝子と、配列番号 1 に示される核酸結合モチーフをコードする遺伝子との融合遺伝子を遺伝子工学的的手法により発現させることによって得られ、前記ポリペプチドに配列番号 2 に示される核酸結合モチーフを介して核酸が結合した核酸結合ポリペプチド。

【 請求項 2 】

ポリペプチドから成る抗原又は該抗原に対する抗体を免疫測定する免疫測定方法において、前記ポリペプチドをコードする遺伝子と、核酸結合モチーフをコードする遺伝子との融合遺伝子を遺伝子工学的的手法により発現させることによって得られ、前記ポリペプチドに核酸結合モチーフを介して核酸が結合した核酸結合ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする免疫測定方法。

【 請求項 3 】

前記核酸結合モチーフは、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 2 記載の方法。

【 請求項 4 】

前記核酸結合ポリペプチドを結合した粒子を用いる凝集法により免疫測定を行う請求項3記載の免疫測定方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本発明は、核酸結合ポリペプチド及び該核酸結合ポリペプチドを用いた免疫測定方法に関する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

従って、本発明の目的は、ポリペプチドの抗原性を変化させずに性質を変化させた、修飾ポリペプチドを提供することである。さらに、本発明の目的は、従来困難であったポリペプチド抗原を用いた免疫測定方法を提供することである。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

すなわち、本発明は、ポリペプチドをコードする遺伝子と、配列番号1に示される核酸結合モチーフをコードする遺伝子との融合遺伝子を遺伝子工学的手法により発現させることによって得られ、前記ポリペプチドに配列番号2に示される核酸結合モチーフを介して核酸が結合した核酸結合ポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、ポリペプチドから成る抗原又は該抗原に対する抗体を免疫測定する免疫測定方法において、前記ポリペプチドをコードする遺伝子と、核酸結合モチーフをコードする遺伝子との融合遺伝子を遺伝子工学的手法により発現させることによって得られ、前記ポリペプチドに核酸結合モチーフを介して核酸が結合した核酸結合ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする免疫測定方法を提供する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明により、ポリペプチドの抗原性に変化を与えずにポリペプチドの種々の性質を変化させた核酸結合ポリペプチドが初めて提供された。また、本発明により、従来不可能であった免疫測定も可能になった。従って、本発明は、遺伝子工学や免疫測定の分野に大いに貢献するものと期待される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

核酸は、ポリペプチドに核酸結合モチーフである他のポリペプチドを結合し、この核酸結合モチーフに核酸が結合される。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

本発明の核酸結合ポリペプチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子と、配列番号 1 に示される核酸結合モチーフをコードする遺伝子との融合遺伝子を遺伝子工学的手法により発現させることによって得られる。発現させようとするポリペプチドの遺伝子情報に核酸を結合することで知られる核酸結合モチーフの遺伝子情報を含めて発現させると、核酸結合モチーフのついたポリペプチドが発現し、発現直後に宿主の核酸が自動的に結合し、核酸結合ポリペプチドとして精製できる。また、発現時に自動的に核酸が結合し得なかった場合でも発現後の核酸結合モチーフが結合したポリペプチドと核酸とを混合しておくこと、ポリペプチドが再構成し、核酸結合ポリペプチドを得ることができる。核酸結合モチーフは種々知られており、B 型肝炎ウイルス (HBV) の HBc 蛋白配列に存在する核酸結合モチーフ (J. of Virology, 64, 3319-3330(1990))、マウスの核酸結合蛋白であるプロタミン (Biochim. Biophys. Acta, 950, 45-53(1988)) 等、適宜用いることができる。なお、HBV の核酸結合モチーフの塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 及び 2 に、マウスプロタミン 1 の塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号 15 及び 16 に示す。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 BA32 CA03 CA07 DA06 EA04 GA11  
4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CD12 DA13  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA54 CA02 CA40 DA86 EA50  
FA73 FA74

专利名称(译)	核酸结合多肽及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004305224A</a>	公开(公告)日	2004-11-04
申请号	JP2004212035	申请日	2004-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	竹村史典 上野英一 伊藤哲		
发明人	竹村 史典 上野 英一 伊藤 哲		
IPC分类号	G01N33/53 C07K1/113 C07K14/00 C07K19/00 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K1/113 C07K14/00 C07K19/00 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA32 4B024/CA03 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CD12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA54 4H045/CA02 4H045/CA40 4H045 /DA86 4H045/EA50 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	谷川荣次郎		
优先权	1996134444 1996-05-01 JP		
其他公开文献	JP3767616B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供具有改变的性质而没有改变多肽的抗原性的修饰的多肽。解决方案：核酸结合多肽通过将核酸结合到多肽上产生，其中核酸优选结合在多肽的末端。之

表1 陽性血清の反応性試験

	c100	c33c	コア抗原c22	NS5	判定
陽性血清1	4+	4+	4+		陽性
陽性血清2	4+	4+	4+		陽性