

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2005/090982**

発行日 平成20年2月7日 (2008.2.7)

(43) 国際公開日 **平成17年9月29日 (2005.9.29)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 8 1 C	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 7 5	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 F	
<b>CO 7 K 4/12 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 L	
	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2006-511349 (P2006-511349)	(71) 出願人	301070357 株式会社プロテインクリスタル
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/006223		大阪府大阪市中央区本町二丁目3番8号
(22) 国際出願日	平成17年3月24日 (2005.3.24)	(71) 出願人	591281220
(31) 優先権主張番号	特願2004-87841 (P2004-87841)		日本全薬工業株式会社
(32) 優先日	平成16年3月24日 (2004.3.24)		福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多角体タンパク質複合体を用いた検出法

**(57) 【要約】**

多角体病ウイルス由来の多角体タンパク質 (外殻タンパク質) が、結晶状態で目的タンパク質を内部または表面に取り込んで固定して形成された粒子状のタンパク質複合体であって、目的タンパク質が外殻タンパク質の内部または表面に固定された構造のタンパク質複合体を用いた該目的タンパク質に特異的に結合する物質の検出法の提供。 検体中の被検出物質を検出する方法であって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態に検体と接触させ、該接触によりできた多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体の存在を検出することを含む、被検出物質を検出する方法ならびに検体中の被検出物質を検出するキットであって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を固定した遊離の多角体タンパク質複合体を含む検出キット。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

検体中の被検出物質を検出する方法であって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見体と接触させ、該接触によりできた多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体の存在を検出することを含み、被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 2】

被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見体と接触させ、被検出物質を介して前記多角体タンパク質複合体を凝集させ、該凝集の存在を検出することを含み、請求項 1 記載の被検出物質を検出する方法。

10

## 【請求項 3】

被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見体と接触させ、多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体を形成させ、該多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体を、前記被検出物質に結合する物質であって、固相支持体に固定化した物質と接触させ、多角体タンパク質複合体-被検出物質-被検出物質と結合する物質の複合体を形成させ、該多角体タンパク質複合体-被検出物質-被検出物質と結合する物質の複合体の存在を検出することを含み、請求項 1 記載の被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 4】

多角体タンパク質複合体が、さらにシグナルを発生し得る標識タンパク質を固定している、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の被検出物質を検出する方法。

20

## 【請求項 5】

シグナルを発生し得る標識タンパク質がグリーン蛍光タンパク質 (GFP) である、請求項 4 記載の被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 6】

免疫検出法である請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 7】

多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がウイルスまたは細菌に対する抗体である、ウイルスまたは細菌感染を検出する、請求項 6 記載の被検出物質を検出する方法。

30

## 【請求項 8】

多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がアレルゲンである、検体中の抗アレルゲン抗体を検出する、請求項 6 記載の被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 9】

検体中の被検出物質を検出するキットであって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を固定した遊離の多角体タンパク質複合体を含む検出キット。

## 【請求項 10】

多角体タンパク質複合体が、さらにシグナルを発生し得る標識タンパク質を固定している、請求項 9 記載の検出キット。

## 【請求項 11】

凝集法を利用した検出キットであり、さらに凝集反応を行わせるためのプレートを含む請求項 9 または 10 に記載の検出キット。

40

## 【請求項 12】

免疫検出キットである、請求項 9 から 11 のいずれか 1 項に記載の検出キット。

## 【請求項 13】

多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がウイルスまたは細菌に対する抗体である、ウイルスまたは細菌感染を検出する、請求項 11 または 12 に記載の検出キット。

## 【請求項 14】

多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がアレルゲンである、検体中の抗アレルゲン抗体を検出する、請求項 11 または 12 に記載の検出キット。

50

## 【請求項 15】

検体中の被検出物質を検出する方法であって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を担体に結合させた状態で検体と接触させ、該接触によりできた多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体の存在を検出することを含む、被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 16】

酵素結合抗体法 (E L I S A) である請求項 15 記載の方法。

## 【請求項 17】

多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がウイルスまたは細菌に対する抗体である、ウイルスまたは細菌感染を検出する、請求項 15 または 16 に記載の被検出物質を検出する方法。 10

## 【請求項 18】

多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がアレルゲンである、検体中の抗アレルゲン抗体を検出する、請求項 15 または 16 に記載の被検出物質を検出する方法。

## 【請求項 19】

検体中の被検出物質を検出するキットであって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を固定した遊離の多角体タンパク質複合体が担体に結合された請求項 9 から 14 のいずれか 1 項に記載の検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

本発明は、多角体病ウイルス由来の多角体タンパク質 (外殻タンパク質) が、目的タンパク質を結晶状態で取り込んで形成された粒子状のタンパク質複合体であって、目的タンパク質が外殻タンパク質で包み込まれた構造のタンパク質複合体を用いた該目的タンパク質に特異的に結合する物質の検出に関する。

## 【背景技術】

細胞質多角体病ウイルス (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) は、レオウイルス科の Cypovirus 属に分類され、分節した 10 から 12 本の二本鎖 RNA (dsRNA) セグメントを有する球状ウイルスである。主に昆虫の中腸粘膜組織の円筒細胞で増殖し、このウイルスに感染した昆虫は感染細胞の細胞質に多角体と呼ばれるウイルス封入体が多数形成されるため、感染後期には中腸が白濁するのが特徴である。このウイルス封入体である多角体の中には数万個のウイルス粒子が固定されている。CPV は約 200 種の昆虫から見出されており、その RNA の泳動パターンから 12 の型に分類されている。 30

一方、バキュロウイルス科に分類される核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus, NPV) は核に多角体を作り、その中には多数の棒状ウイルス粒子が固定されている。また同科に属するウイルスで、顆粒病ウイルス (granulosis virus, GV) と呼ばれるウイルスも、細胞質にカプセルと呼ばれる封入体を形成するが、その中には 1 つのウイルスのみが固定されている。これらのバキュロウイルスの封入体も CPV の場合と同様に昆虫によって餌と共に食下されると中腸内がアルカリであるために溶解し、封入体内に固定されていたウイルスが放出されて感染が起る。 40

ウイルス封入体である多角体は、感染後期に合成される多角体タンパク質 (polyhedrin) が会合し結晶化した構造物である。この多角体を昆虫が餌と共に食下すると消化管の中で、多角体が溶解し、大量のウイルスが放出され感染が生じる。すなわち、多角体はウイルスを感染細胞まで運ぶベクターとしての機能を持っている。さらに、多角体はその中に固定したウイルスを乾燥や紫外線などから守る「金庫」としての役割も果たしている。特に、多くの溶媒や界面活性剤によっても溶解せず、またさらに細菌による腐敗によっても影響を受けず、固定されているウイルスは自身の感染力に関して全く影響を及ぼされない。

これまでの研究で、カイコ細胞質多角体病ウイルス (Bombyx mori cyt 50

oplasmic polyhedrosis viruses, BmCPV) は、10本に分節した二本鎖RNA (セグメント1~10をS1~S10と表記する) をゲノムにもち、多角体を構成するタンパク質である多角体タンパク質 (polyhedrin) は分子量は27k~30kであり、最も小さいセグメントであるS10によってコードされていることがわかっている。また、BmCPVのウイルス粒子はviral capsid protein 1:以下VP1と表記する (151kDa)、VP2 (142kDa)、VP3 (130kDa)、VP4 (67kDa)、VP5 (33kDa) の5種類のタンパク質から構成されており、<sup>125</sup>Iを用いたBmCPVの標識実験からVP1とVP3がウイルスの外殻を構成しているタンパク質であることが明らかになっている (非特許文献1参照)。また、ウサギの網状赤血球を用いたin vitro translation実験から、このウイルスの外殻タンパク質であるVP1とVP3はそれぞれS1とS4によってコードされていることがわかっている (非特許文献2参照)。

一方、ウイルス粒子が多角体に固定される現象は、S4にコードされているVP3とS10にコードされている多角体タンパク質の相互作用によるものであることが明らかにされている (非特許文献3参照)。例えば、VP3と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) からなる融合タンパク質をBmCPVのポリヘドリンとともに培養細胞中で発現させると、多角体にこの融合タンパク質が特異的に取り込まれる (非特許文献3参照)。この多角体を、アルカリ溶液 (pH11.0) で処理すると多角体が溶解し、中に固定されていた融合タンパク質が放出される。このことは、BmCPVの外殻タンパク質であるVP3がウイルス粒子を多角体中に固定させるためのシグナルとしての役割を担っていることを意味している。つまり、VP3をシグナルとして機能性タンパク質に導入し、ポリヘドリンとともに培養細胞中で発現すれば、産生されたタンパク質は発現と同時に多角体中に固定される。

本発明者らは、上述の背景技術に鑑みて、目的タンパク質の保護、保存、安定性向上に寄与するタンパク質複合体及びその製造方法に関する発明を完成し、先に出願した (特許文献1参照)。上記発明は、多角体中に高分子性の目的タンパク質を固定し、またその固定効率を高めることを目的としていた。さらに、多角体中に目的タンパク質を固定したタンパク質複合体のプロテインチップを開発し (特許文献2参照)、無細胞タンパク質合成系を利用して多角体中に目的タンパク質を固定したタンパク質複合体の製造する方法をも開発した (特許文献3参照)。該多角体中に目的タンパク質を固定したタンパク質複合体のプロテインチップを用いて化合物の検出が可能であったが、検出に約2時間要し、より迅速な検出系の開発が望まれていた。

動物やヒトが病原体に感染しているかどうかを調べる方法としては、(1) 病原体に対する特異的抗体の検索、(2) 病原体の分離、(3) 病原体の遺伝子の検出、があげられる。しかし現状では、いずれの方法も大掛かりな装置や熟練した技術を必要とし、さらに判定までの日数がかかるなどの問題を抱えていた。特に感染症の場合、どのような疾病が発生しているのか、あるいはどの範囲にまで蔓延しているのかを即座に判断し対応しなければならない。2004年に日本国 京都府丹波町で発生したようなトリインフルエンザウイルスによる24万羽の鶏の処分では膨大な経済的損失をもたらし、現在でも土中に埋められている殺処分された鶏と鶏ふんの最終処分費7億6千万円をどうするか決められていない。

この例を見ても明らかなように、新興・再興感染症と呼ばれる治療方法が確立されていない感染症のアウトブレイクに対応する手段としては、感染源をできるだけすみやかに検知し、その移動を極力最小限に抑えることが重要である。例えば、「病原体に対する特異的抗体の検索」についてはウイルス感染症の場合、その多くが中和抗体価の検出によることが多い。しかし、中和抗体価を測定する場合には一般に約1週間を要していた。一方、「病原体の分離」については病原体の分離・培養を要しており、この場合にも同様の時間を必要とする。また「病原体の遺伝子の検出」については、遺伝子操作やPCR装置などを必要としており、感染症が発生している現場や、病原体が持ち込まれる恐れのある場所での迅速な判定は不可能である。このため、比較的大掛かりな装置を必要としないことや

特殊な技術を必要としないことなどから、感染症の判定の多くがこの「病原体に対する特異的抗体の検索」に頼っているのが現状であるが、この方法でも判定までに時間を要するという欠点が見られた。しかし、最近ではヒトのインフルエンザのように患者が病院ですぐにインフルエンザウイルスに感染しているかどうかという判定ができるようになってきた。このように動物の感染症の診断も飼育現場などで迅速な判定ができれば、上記の昨年の丹波町での大規模な鶏の殺処分などといったことは避けられたかも知れない。また、トリインフルエンザウイルスの他にも動物や昆虫によって媒介される感染症がいくつも報告されつつあり、動物の感染症を迅速にしかも簡便に判定するキットの開発は単に経済的損失を防ぐのみならず、人命を保護するということにも直結する。

【特許文献1】 国際公開第W002/36785号パンフレット

10

【特許文献2】 特開2003-155300号公報

【特許文献3】 特開2003-319778号公報

【非特許文献1】 Lewandowski et al., J. Virol., 10, pp. 1053-1070, 1972

【非特許文献2】 McCrae and Mertens, Elsevier Biomedicals, pp. 35-41, 1983

【非特許文献3】 Ikeda et al., J. Virol., 75, pp. 988-995, 2001

【発明の開示】

本発明は、多角体病ウイルス由来の多角体タンパク質（外殻タンパク質）が、結晶状態で目的タンパク質を内部または表面に取り込んで固定して形成された粒子状のタンパク質複合体であって、目的タンパク質が外殻タンパク質の内部または表面に固定された構造のタンパク質複合体を用いた該目的タンパク質に特異的に結合する物質の迅速な検出法および該タンパク質複合体を含む目的タンパク質に特異的に結合する物質の検出キットの提供を目的とする。

20

目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体は、結晶状態の目的タンパク質の入手源として、あるいはプロテインチップ等への利用が考えられていた。本発明者らは、さらに該多角体タンパク質複合体の利用について鋭意検討を行い、該多角体タンパク質複合体が多角体タンパク質中に固定されたタンパク質に特異的に結合し得る物質の検出に利用できることを見出した。目的のタンパク質が固定された多角体タンパク質複合体は、その内部および表面に目的のタンパク質が固定されており、大きさが100nmから10 $\mu$ m程度の粒子形状を有しており、また比重も水に比べて大きい。多角体タンパク質複合体には目的のタンパク質が固定されているので、固定されたタンパク質に結合する物質と複合体を形成することができる。さらにある程度の大きさを有しているため、遊離の多角体タンパク質が多数集合することにより、該集合体を容易に認識することができる。すなわち、本発明者らは、被検出物質と被検出物質に特異的に結合し得る物質との結合を利用して遊離の多角体タンパク質を集合させ得ること、多角体タンパク質の集合体の存在を検出することにより、被検出物質の存在を検出できることを見出した。本発明者等は、多角体タンパク質複合体を集合させる方法として、多角体タンパク質複合体と多角体タンパク質に固定されたタンパク質に結合する物質との複合体を遠心分離操作等により集合させる方法、適当な固相支持体に局在固定化した、多角体タンパク質に固定されたタンパク質に特異的に結合し得る物質に多角体タンパク質を結合させて、前記局在固定化部位に多角体タンパク質を集合させる方法、および多角体タンパク質複合体と多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質と結合し得る物質を接触混合することにより、該物質を介して多角体タンパク質複合体が凝集集合させる方法を見出した。さらに、適当な検出手段により該集合体の存在を検出し、すなわち被検出物質の存在を検出しうることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明の方法によれば、十数分以内で被検出物質の検出が可能であり、多角体中に目的タンパク質を固定したタンパク質複合体のプロテインチップを用いた検出よりも迅速に検出が可能である。

30

40

本発明では、「迅速にしかも簡便に感染症を判定する」という目的から、ELISA法

50

の他に凝集法による血清中の特異的抗体の検出法を提供する。本発明により、抗原抗体反応を15～30分程度で肉眼で判定できる。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 検体中の被検出物質を検出する方法であって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見体と接触させ、該接触によりできた多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体の存在を検出することを含み、被検出物質を検出する方法、

[2] 被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見体と接触させ、被検出物質を介して前記多角体タンパク質複合体を凝集させ、該凝集の存在を検出することを含み、[1]の被検出物質を検出する方法、

[3] 被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見体と接触させ、多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体を形成させ、該多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体を、前記被検出物質に結合する物質であって、固相支持体に固定化した物質と接触させ、多角体タンパク質複合体-被検出物質-被検出物質と結合する物質の複合体を形成させ、該多角体タンパク質複合体-被検出物質-被検出物質と結合する物質の複合体の存在を検出することを含み、[1]の被検出物質を検出する方法、

[4] 多角体タンパク質複合体が、さらにシグナルを発生し得る標識タンパク質を固定している、[1]から[3]のいずれかの被検出物質を検出する方法、

[5] シグナルを発生し得る標識タンパク質がグリーン蛍光タンパク質(GFP)である、[4]の被検出物質を検出する方法、

[6] 免疫検出法である[1]から[5]のいずれかの被検出物質を検出する方法、

[7] 多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がウイルスまたは細菌に対する抗体である、ウイルスまたは細菌感染を検出する、[6]の被検出物質を検出する方法、

[8] 多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がアレルゲンである、検体中の抗アレルゲン抗体を検出する、[6]の被検出物質を検出する方法、

[9] 検体中の被検出物質を検出するキットであって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を固定した遊離の多角体タンパク質複合体を含む検出キット、

[10] 多角体タンパク質複合体が、さらにシグナルを発生し得る標識タンパク質を固定している、[9]の検出キット、

[11] 凝集法を利用した検出キットであり、さらに凝集反応を行わせるためのプレートを含む[9]または[10]の検出キット、

[12] 免疫検出キットである、[9]から[11]のいずれかの検出キット、

[13] 多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がウイルスまたは細菌に対する抗体である、ウイルスまたは細菌感染を検出する、[11]または[12]の検出キット、

[14] 多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がアレルゲンである、検体中の抗アレルゲン抗体を検出する、[11]または[12]の検出キット、

[15] 検体中の被検出物質を検出する方法であって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を担体に結合させた状態で検体と接触させ、該接触によりできた多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体の存在を検出することを含み、被検出物質を検出する方法、

[16] 酵素結合抗体法(ELISA)である[15]の方法、

[17] 多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がウイルスまたは細菌に対する抗体である、ウイルスまたは細菌感染を検出する、[15]または[16]の被検出物質を検出する方法、

[18] 多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質がアレルゲンである、検体中の抗アレルゲン抗体を検出する、[15]または[16]の被検出物質を検出する方法、ならびに

10

20

30

40

50

[19] 検体中の被検出物質を検出するキットであって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を固定した遊離の多角体タンパク質複合体がマイクロタイタープレート（or担体）に結合された[9]から[14]のいずれかの検出キット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2004-087841号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

図1は、Der f 15 遺伝子とVP3 遺伝子を連結した転写ユニットを示す図である。

図2は、本発明で用いる多角体タンパク質複合体の製造方法を示す図である。

図3は、本発明で用いる多角体タンパク質における目的のタンパク質であるダニアレルゲンDer f 15タンパク質が固定される態様を示す図である。 10

図4は、ダニアレルゲン自然感作犬血清（以下、ダニアレルギー罹患イヌ血清）を用いたDer f 15 固定化多角体凝集反応の結果を示すマイクロタイタープレートの写真である。

図5は、顕微鏡で観察したダニアレルギー罹患イヌ血清によるDer f 15 固定化多角体の凝集結果（拡大倍率100）を示す写真である。

図6は、顕微鏡で観察したダニアレルギー罹患イヌ血清によるDer f 15 固定化多角体の凝集結果（拡大倍率200）を示す写真である。

図7は、Gatewayクローニングシステムを用いた発現ベクターの構築の原理を示す図である。 20

図8は、デスティネーションベクター（組換えイヌジステンパーウイルス構造タンパク質）の構造を示す図である。図中、VP(X)は固定化シグナルを表し、VP(52): 137-292bp(52aa)、VP(Xba): 14-1364(450aa)、VP(A): 14-313bp(100aa)、VP(C): 137-292bp(52aa)がある。VP(X)の左の斜め線の部分は、6×His配列（塩基配列：ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCAT（配列番号11）、アミノ酸配列：Met Arg Gly Ser His His His His His His（配列番号12）を表す。また、VP(X)の右の斜め線部分は、PreScission Protease site（塩基配列：CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCC（配列番号13）、アミノ酸配列：Leu Glu Val Leu Phe 30  
Gln Gly Pro（配列番号14）を表し、横線の部分はAtt配列を表し、ドットの部分は、CDV-F, Hを表す。

図9は、組換えイヌジステンパーウイルス（CDV）構造タンパク質の発現を示す写真である。

図10は、イヌジステンパーウイルスのタンパク質を含む多角体タンパク質複合体の作製方法を示す図である。

図11は、イヌジステンパーウイルスのタンパク質を含む多角体タンパク質複合体のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

図12は、イヌジステンパーウイルスのタンパク質を含む多角体タンパク質複合体を用いた凝集反応の結果を示す写真である。 40

【発明を実施するための最良の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

1. タンパク質複合体の作製

本発明の検出方法においては、多角体病ウイルス由来の多角体タンパク質（外殻タンパク質）が、結晶状態で目的タンパク質を内部または表面に固定して形成された粒子状のタンパク質複合体であって、目的タンパク質が外殻タンパク質の内部または表面に固定された構造のタンパク質複合体を利用する。該タンパク質複合体をプロテインビーズともいう。

該タンパク質複合体は、国際公開第WO02/36785号パンフレットに記載の方法で作製することができる。該方法の概要は以下の通りである。 50

本発明の多角体病ウイルス由来の多角体タンパク質（外殻タンパク質）は、例えば昆虫の細胞質多角体病ウイルスコート外殻タンパク質であり、カイコ細胞質多角体病ウイルス（Bombyx mori polyhedrosis virus, BmCPV）の外殻タンパク質（細胞質多角体タンパク質）が例示される。

多角体タンパク質をコードする遺伝子を組込んだウイルスベクターは、例えばオートグラフィア・キヤルホニカ・核多角体病ウイルス（Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcNPV）由来のバキュロウイルスベクターに公知の方法、例えばJ. Gen. Virol., vol. 74, pp. 99-102, 1993に記載の方法を用いてポリヘドリン遺伝子を組込むことによって調製し得る。ポリヘドリン遺伝子を組込んだAcNPV由来のバキュロウイルスベクターとして、AcCP-Hが例示でき、該ベクターは、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターの下流にBmCPVのH系統の多角体タンパク質遺伝子を組込んである。

他方、目的のタンパク質をコードする遺伝子を組込んだウイルスベクターは、例えばカイコ細胞質多角体病ウイルス（BmCPV）の外層構成タンパク質のひとつであるVP3のC末端またはN末端に目的のタンパク質を連結した融合タンパク質をコードするキメラ遺伝子を作製し、次いで前記のオートグラフィア・キヤルホニカ・核多角体病ウイルス由来のバキュロウイルスベクターに導入することにより行われる。この場合もバキュロウイルス由来のプロモーターを目的のタンパク質をコードする遺伝子上流に連結すればよい。

ポリヘドリン遺伝子または目的のタンパク質をコードする遺伝子を組込んだベクターを構築する際には、プロモーターとして例えば、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターやp10プロモーターを発現させようとする遺伝子上流に組み込めばよい。

次に、このように調製した2種のウイルスベクターを昆虫の組織細胞に同時感染させる。同時感染させるには、この2種のウイルスベクターを液体状態で同時に昆虫細胞に接種し、室温で0.5～3時間放置して、ウイルスを細胞に十分に吸着させた後、ウイルス液を除去し、ウシ胎児血清を含む培養液を添加し、20～30℃で2～10日間培養すればよい。

次いで、この培養液から感染細胞を分離し、冷却しながら磨砕し、該磨砕液から過または遠心分離により多角体を含む固形分を回収することにより、目的のタンパク質が固定されたタンパク質複合結晶体が得られる。このようにして、結晶性多角体タンパク質に対し、質量比1/10～1/1000の範囲で目的のタンパク質微結晶を含むタンパク質複合結晶体が得られる。

細胞中で製造された目的のタンパク質が固定された多角体タンパク質複合体は、培養細胞をホモジナイザー等を用いて磨砕し、遠心分離を行うことにより回収することができる。該タンパク質複合体は培養細胞の状態、またはその磨砕片を除去した状態で保存し、被検出物質の検出に用いることができる。さらに、精製が必要な場合は、多角体の比重が1.28であることを利用して、ショ糖密度勾配遠心分離によりさらに高純度で精製することができる。

なお、目的タンパク質の固定とは、目的タンパク質が多角体タンパク質内に完全に包み込まれた状態と多角体タンパク質外に一部露出して埋入された状態とを含むことを意味する。目的タンパク質の固定は、目的タンパク質の包囲、包埋または封入ともいう。また、複合体の形状としては、立方体、直方体、円柱などの定形や不定形の粒子状が含まれる。固定される目的タンパク質の量を増加させたり、目的タンパク質のサイズを大きくすることができる。固定される目的タンパク質の量を増加させることにより、例えば検出の際の検出感度を高めることが可能である。

本発明のタンパク質複合体の製造において、外殻タンパク質であるVP3は、目的のタンパク質を多角体タンパク質に固定させる多角体固定シグナルとして作用する。この際、VP3の限定された領域を多角体固定シグナルとして有していてもよい。VP3の限定された領域は、N末端から40までに加え、41アミノ酸残基から79アミノ酸残基の範囲である。また、N末端から41アミノ酸残基から79アミノ酸残基の領域とその領域のN末端もしくはC末端に10アミノ酸残基付加したものも使用することも可能である。配列

10

20

30

40

50

番号1にBmCPVのS4をコードする遺伝子のDNA配列、配列番号2にS4のアミノ酸配列を示す。

例えば、以下のようにして本発明のタンパク質複合体を製造することができる。VP3をコードしているS4の1358番目と2711番目に存在する制限酵素サイトXbaI間を欠落させたVP3をコードする遺伝子/目的タンパク質(ダニアレルゲン、Derf15)をコードする遺伝子のキメラ遺伝子(VP3(XbaI)/Derf15)を作製する。次に、Autographa californica nucleopolyhedrovirus (AcNPV)由来のバキュロウイルスベクターに導入し、このVP3(XbaI)とDerf15の融合タンパク質を昆虫細胞Spodoptera frugiperda由来のIPLB-Sf21-AE(Sf21)で発現させる。その際、BmCPVの立方体の多角体を形成するために、ポリヘドリン遺伝子を組み込んだ組み換えAcNPV(AcCP-H)(J. Gen. Virol. 74, 99-102, 1993)も同時にSf21細胞に接種する。2つのウイルスに感染したSf21細胞から多角体を精製することができる。

このように、目的のタンパク質のN末端またはC末端に細胞質多角体病ウイルスの外層を構成するタンパク質であるVP3のアミノ酸配列を導入し、このVP3と目的のタンパク質の融合タンパク質をバキュロウイルスベクターで発現させるが、この際、細胞質多角体病ウイルスの多角体を発現するウイルスとともに、昆虫細胞に感染させることにより、多角体中に融合タンパク質が固定される。このために、バキュロウイルスベクターで発現させた外来タンパク質、すなわち目的のタンパク質が、細胞質多角体病ウイルスの構成タンパク質のN末端またはC末端に挿入されるように、細胞質多角体病ウイルスの構成タンパク質をコードするcDNAと外来タンパク質遺伝子とを結合させる。この際、構成タンパク質と外来タンパク質遺伝子のタンパク質をコードするORF(オープンリーディングフレーム)がインフレームになるようにする。このようにして、細胞質多角体病ウイルスの構成タンパク質と外来タンパク質を1つのタンパク質複合体として発現させることのできる組換えバキュロウイルスが形成される。

ここで、本発明でタンパク質複合体中に固定されるタンパク質は、本発明の多角体タンパク質複合体を用いたアッセイで検出しようとする物質(被検出物質)に特異的に結合し得るタンパク質である。例えば、検出しようとする物質に特異的に結合する抗体が挙げられる。また、検出しようとする物質が抗体である場合は、該抗体が特異的に結合する抗原が挙げられる。すなわち、検出しようとする物質と多角体タンパク質複合体に固定させるタンパク質が、受容体-リガンドあるいはリガンド-受容体の関係にあればよい。本発明の方法における被検出物質は限定されず、例えば、HIV、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ジステンパーウイルス等のウイルス、黄色ぶどう球菌、肺炎双球菌、腸管出血性大腸菌等の細菌などが挙げられる。また、ダニアレルゲン(例えばDerf15)などの各種アレルギーが挙げられる。インフルエンザウイルスの型として、A型(H2N2、H3N2、H1N1等)、B型、C型、ヒト分離型、トリ分離型(トリインフルエンザウイルス(H5N1、H7N2、H7N7等))、ブタ分離型(ブタインフルエンザウイルス)、その他ウマ等の哺乳類の分離型等のインフルエンザウイルスが挙げられる。また、これらに対する抗体も検出可能である。ウイルス、細菌、アレルギー等を検出する場合、これらの抗原に対する抗体が固定された本発明の多角体タンパク質複合体を用いればよいし、これらの抗原が固定された本発明の多角体タンパク質複合体を用いることによりこれらの抗原に対する抗体を検出することができる。抗アレルギー抗体等のアレルギーに特異的に結合し得る物質の検出に用いることができる。さらに、目的のタンパク質にグリーン蛍光タンパク質(GFP)等のタンパク質を融合させた形で発現させてもよい。目的のタンパク質をGFPと融合させてタンパク質複合体に固定した場合、該タンパク質複合体自体が蛍光を発生し得る。従って、被検出物質と結合した多角体タンパク質複合体が発生する蛍光をトレースすることにより、各種物質の検出を行うことができる。GFPには、種々の改変型GFPが知られており、これらの改変型GFPを本発明のGFPとして用いることもできる。このような改変型GFPとしてEGFP(enhanced gr

10

20

30

40

50

een fluorescent protein)、GFP<sub>UV</sub>、GFP<sub>mut 3.1</sub>、BFP<sub>2</sub> (すべてClonetech社から入手可能)、Venus (Nature Biotechnology January 2002 Vol. 20-1, 87-90)、S65Tが挙げられる。また、GFPの蛍光色の変異体である、EBFP (Blue)、ECFP (Cyan)、EYFP (Yellow) (すべてCLONTECH社から入手可能)も本発明のGFPとして使用できる。これらの改変型GFPは例えば、『実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座3 GFPとバイオイメージング』 宮脇敦史編、2000年10月25日第1版第1刷発行、羊土社 に詳細に記載されており、この記載を参照して入手することができる。なお、多角体タンパク質複合体に固定するタンパク質は、全体でもよいが、被検出物質と結合し得る部位が存在する限り断片でもよい。固定するタンパク質が抗体の場合は、全長抗体の他、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なりンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv)等の断片を固定すればよい。

さらに、複数の目的タンパク質を一つのタンパク質複合体中に固定化してもよい。この場合、それぞれの目的のタンパク質をコードする遺伝子を含む複数のベクターを調製し、ポリヘドリンをコードする遺伝子を含むベクターと同時に細胞で発現させればよい。例えば、以下のように検出しようとする物質に特異的に結合する目的のタンパク質の固定と同時に酵素、蛍光タンパク質、色素蛋白質等の、光などのシグナルを発生し得るタンパク質を固定すればよい。例えば、検出しようとする物質に特異的に結合するタンパク質と上述のGFPを同時に発現させれば、タンパク質複合体中に該タンパク質とGFPの両方が固定されるので、タンパク質複合体は、前記検出しようとする物質に結合するという機能および蛍光シグナルを発生するというトレーサーとしての機能を有するので、物質の検出に有利に用いることができる。また、蛍光タンパク質ではなく、適当な色を有する色素タンパク質を用いてもよい。この場合も、色素タンパク質の呈するシグナル(色)により、多角体タンパク質複合体をトレースすることができる。色素タンパク質として、例えばヘモグロビン、クロロフィルタンパク質等が存在する。さらに、多角体タンパク質複合体に適当な色素を結合させてもよく、該色素の呈する色により多角体タンパク質複合体をトレースすることができる。例えば、金コロイドを多角体タンパク質複合体に結合させればよい。

さらに、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素を目的のタンパク質と同時に多角体タンパク質に固定してもよい。このような酵素を固定化したタンパク質の存在は、該酵素に特異的な基質を用いることによる発色反応により発生するシグナル(色)を指標に検出することができるので、後述の被検出物質の検出に用いることができる。

さらに、上記では目的タンパク質を含むベクターと多角体タンパク質を含むベクターを別々に調製し、それらのベクターを細胞に導入し、タンパク質複合体を作製する方法を例示したが、目的タンパク質と多角体タンパク質を一つのベクター中に導入することもできる。例えば、オートグラフィア・キャルホニカ・核多角体病ウイルス (Autographa californica nucleopolyhedrovirus)由来のバキュロウイルスベクターに公知の方法、例えばJ. Gen. Virol., vol. 74, pp. 99-102, 1993に記載の方法を用いてポリヘドリン遺伝子を組み込み、さらにカイコ細胞質多角体病ウイルス (BmCPV)の外層構成タンパク質のひとつであるVP3 (全長または部分長)のC末端に目的のタンパク質を連結した融合タンパク質をコードするキメラ遺伝子をポリヘドリン遺伝子を組込んだオートグラフィア・キャルホニカ・核多角体病ウイルス由来のバキュロウイルスベクターに導入すればよい。このように、目的タンパク質と多角体タンパク質を一つのベクター中に導入した場合、多角体タンパク質の発現量と目的タンパク質の発現量の比を調節できるので、得られたタンパク質複合体中に固定される目的のタンパク質の量を調節することができる。この場合、バキュロウイルスベクター中に、バキュロウイルスのポリヘドリンをコードする遺伝子がプロモーターの下流に連結している転写ユニットおよび目的タンパク質をコードする遺伝子がプロモーター

の下流に連結している転写ユニットの少なくとも2つの独立した転写ユニットを組み込めばよい。ここで用いるプロモーターとしては、例えばポリヘドリンプロモーターやp10プロモーターが挙げられる。例えば、Gatewayクローニングシステムを用いることができる(図7)。図7中の左図の上は、attR配列を持ったデスチネーションベクター、下はattL配列を持つエントリークローンを示す。これらの2つのベクターを用いたLR反応によってin vitroでの組換え反応が起きる。図7中右図はDerf15c DNA配列を導入した発現ベクターである。

タンパク質複合体を産生するために用いる細胞は、ウイルスに感染できる細胞であれば限定されず、昆虫細胞も植物細胞も用いることができる。鱗翅目(Lepidoptera)に属するもの、特にシヤクガ科(Geometridae)、ヤマユガ(salurniidae) 10、カイコガ科(Bombycidae)、ヒトリガ科(Arctiidae)、ヤガ科(Noetuidae)に属するものが用いられる。入手が容易で取り扱いやすい点で、カイコ(Bombyxmori L)、ムガサン(Antheraea assamensis Helfer)、ネキリムシ(Peridromasp.)、アワヨトウ(Leucania unipunctata howorth)などが通常用いられている。また、昆虫体および植物体も用いることができる。昆虫体および植物体を用いての多角体タンパク質複合体の製造は、公知の方法により行うことができる。

さらに、無細胞翻訳系を利用して、本発明で用いるタンパク質複合体を作製することもできる。無細胞翻訳系による多角体タンパク質複合体の作製は、例えば特開2003-319778号公報の記載に従い行うことができる。 20

このようにして得られた多角体タンパク質複合体は、一辺が100nmから10 $\mu$ mの立方体、直方体または円柱上のタンパク質であり、該立方体の中に目的のタンパク質が固定され、一部のタンパク質は立方体内部に存在し、一部のタンパク質は、タンパク質の一部を外側に露出した状態で表面に存在する。

本発明の多角体タンパク質複合体中に目的のタンパク質が固定されているかどうかは、例えば金粒子で標識された目的のタンパク質に対する抗体を用いた免疫電子顕微鏡による観察により評価することができる。また、多角体タンパク質複合体がGFP等の蛍光タンパク質を含む場合は、蛍光測定することにより評価することができる。

本発明の多角体タンパク質複合体において、固定される目的のタンパク質は、結晶状態で固定される。タンパク質は、アモルファス状態である乾燥標品の状態よりも、結晶状態の方がより安定である。また、目的とするタンパク質は、多角体タンパク質によりコーティングされた状態にあるので、その点でも本発明の多角体タンパク質複合体中の目的のタンパク質の安定性は高い。このように、多角体タンパク質の安定性が高いので、長期間保存することができる。例えば、前述のようにして精製したタンパク質複合体は、乾燥させた状態でも、水に懸濁した状態でも長期間保存することができる。また、多角体タンパク質複合体中に固定された目的のタンパク質はその立体構造を維持したまま固定化されている。従って、抗原を固定化して該抗原に結合する抗体を検出しようとする場合、天然状態の立体構造が維持され、エピトープも維持されている。従って、立体構造の喪失による抗体との結合性の低下が起こらないので、本発明の多角体タンパク質複合体を利用することにより、被検出物質を高感度に検出することができる。また、多角体タンパク質中にGFP等の蛍光タンパク質や酵素等が固定されている場合は、これらのタンパク質も安定に存在し、長期間蛍光を発するという機能、酵素反応を触媒するという機能を保持し得る。 30 40

さらに、本発明で用いるタンパク質複合体は、調製したベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、所望の遺伝子を発現させるだけで製造でき、培養上清から容易に得られるので、少ない工程で大量に製造できる。例えば、培養上清中の多角体を水を用いて洗浄しつつ遠心分離等により回収するだけで、本発明の方法に用いることができる。これに対して、例えば抗原または抗体を感作したラテックス粒子を用いる従来の凝集法を行おうとした場合、所望の遺伝子を導入したベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、複雑な工程で純粋なりコンビナントタンパク質を精製させる必要がある。さらに、ラテックス粒子を調製し、所定の粒径の粒子を精製し、次いで前記のようにして調製した被検出物質に特異的 50

に結合する物質をラテックス粒子に結合させ、該物質が結合したラテックス粒子と結合していないラテックス粒子を分離するというように、製造工程が多い。この点でも、本発明のタンパク質複合体は有利に検出に用いることができる。

## 2. 目的のタンパク質が固定された多角体タンパク質複合体を遊離の状態を利用した被検出物質の検出

目的のタンパク質が固定された多角体タンパク質複合体を用いて以下のようにして、検体中に含まれる被検出物質の検出を行うことができる。この場合、目的のタンパク質が固定された多角体タンパク質複合体は、遊離の状態、すなわち適当な担体や支持体に結合していない状態で存在し、被検出物質と結合することにより集合し得る。

用いる検体は限定されず、例えば、全血、血清、血漿、尿、唾液、喀痰、汗または鼻、咽頭もしくは鼻咽頭の分泌物等の動物由来の生体試料、食物等の抽出液を用いることができる。被検出物質も限定されないが、上記検体中の抗原または抗体が例示できる。被検出物質が抗原の場合は、多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質は該抗原に特異的に結合する抗体であり、非検出物質が抗体の場合は、多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質は該抗体が特異的に結合する抗原である。

抗原抗体反応を利用した被検出物質の免疫検出において、抗原または抗体に結合した被検出物質と結合していない被検出物質を分離（B/F分離）する必要がある。本発明の多角体タンパク質複合体を該分離に利用することができる。すなわち、被検出物質に特異的に結合するタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を、被検出物質を含む検体と混合し、固定されたタンパク質と被検出物質を接触させ結合させる。次いで、多角体タンパク質複合体と検体との混合物を静置するか、または遠心分離することにより、多角体タンパク質複合体-被検出物質の複合体を沈殿させ、遊離の被検出物質と分離させる。その後、多角体タンパク質に結合した被検出物質を測定する。被検出物質の測定は、例えば被検出物質に特異的に結合する物質を西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素、 $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体、フルオレセイン等の蛍光物質等で標識したもの（標識試薬）を多角体タンパク質-被検出物質複合体に添加し、形成された多角体タンパク質-被検出物質-標識試薬複合体を標識物質の発するシグナルを指標に測定する。このような方法により検体中の被検出物質を検出することができる。また、多角体タンパク質複合体中に西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素が固定されていてもよい。この場合、前記の多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体に酵素の基質を添加することにより、多角体タンパク質複合体中に固定された酵素の触媒反応により、発色が生じ、多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体の存在を調べることができる。

また、被検出物質に対する抗原又は抗体を、多角体タンパク質中に固定した多角体タンパク質複合体を被検出物質を含む可能性のある検体と接触させ、被検出物質を介した多角体タンパク質複合体の免疫凝集反応を検出することにより検体中に被検出物質が含まれている否か、あるいは被検出物質の含有量を測定することができる。

凝集反応は、スライドグラス、96ウェル平底プレート、96ウェルU底プレート、96ウェルV底プレート等を用いて行わせることができる。96ウェルプレートを利用して凝集物の形成を目視により判定する場合、多角体タンパク質複合体の比重が大きいため、ウェル中での重量による落下速度が大きい。従って、重力によるウェル底への落下集合と被検出物質を介した凝集とを区別できるよう、平底プレートを用いるのが望ましい。

タンパク質複合体と検体を適当な緩衝液中で混合し、スライドグラス上またはプレートのウェル中に添加し、一定時間攪拌または静置し、凝集が生じたかどうかを測定すればよい。タンパク質複合体の量および検体の量は、検出しようとする被検出物質の種類や検体中の予測含有量等により、適宜決定することができる。例えば、タンパク質複合体 $10^7$ から $10^{10}$ /mlの $0.5\mu\text{L}$ を $9.5\mu\text{L}$ の緩衝液と混合し、さらに数十 $\mu\text{L}$ の生理食塩水または緩衝液を添加し、これに $10\mu\text{L}$ から $100\mu\text{L}$ の検体を混合すればよい。なお、タンパク質の複合体の濃度（単位体積当りの数）は、顕微鏡下で血球計算盤を用いて計測した。凝集反応を行う際に用いる緩衝液も限定されないが、例えばpH5~9、好

ましくは6～9のリン酸緩衝液、トリス緩衝液、炭酸緩衝液等を用いることができる。反応温度は、限定されないが、4℃～50℃、好ましくは15℃～40℃、さらに好ましくは30℃～40℃である。また、反応時間も限定されないが、好ましくは1分～30分である。また、凝集反応を行わせる際に、非特異的な反応を抑制するために、T r i t o n X-100、T w e e n 20、T w e e n 80等の適当な界面活性剤を添加してもよい。

凝集の有無は、肉眼で判定することができる。また、光学的機器を用いれば、大量にかつ正確に判定することができる。光学的機器を用いる場合、最終的な凝集像を得る必要は必ずしもなく、凝集反応に伴う反応液系の濁度の変化を測定すればよい。光学的機器による測定は、散乱光、吸光度または透過光強度を検出することにより行うことができる。また、タンパク質複合体がGFPなどの蛍光タンパク質を含む場合は、凝集物中の蛍光強度を測定してもよい。

10

さらに、本発明のタンパク質複合体をイムノクロマトグラフィーの標識試薬として用いることができる。イムノクロマトグラフィーにおいては、ニトロセルロース膜等の適当な固相支持体上に抗体等の被検出物質と結合し得る物質を固定化し、該固相支持体に毛管現象を利用して、金コロイド等の適当な標識物質で標識した被検出物質（標識試薬）と結合し得る物質と被検出物質の複合体を展開移動させる。この結果、固定化した物質-被検出物質-標識試薬の複合体が固相支持体上に形成され、該複合体から発する標識試薬のシグナル（金コロイドの場合は、被検出物質と結合し得る物質を固定化した固相支持体部分が赤くなる）を検出することにより、被検出物質を検出することができる。

被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を含むタンパク質複合体をイムノクロマトグラフィーにおける標識試薬として用いることができる。この際、タンパク質複合体が固相支持体上で認識し得るシグナルを発生するようにする必要があるが、例えば、蛋白質複合体を適当な色素で染色すればよい。また、タンパク質複合体を製造する際に、GFP等の蛍光タンパク質あるいは色素タンパク質等の色を発するタンパク質を固定させればよい。

20

イムノクロマトグラフィー装置の製造およびイムノクロマトグラフィーによる検出は公知の方法で行うことができる。

本発明の目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を用いた検出法によれば、被検出物質を30分以内、好ましくは15分以内、さらに好ましくは10分以内で検出することが可能である。

30

さらに、本発明の方法は、担体を用いた態様も包含する。ELISA用マイクロタイタープレートやスライドガラス等の担体に多角体タンパク質に結合し得る物質、例えば抗多角体タンパク質抗体または多角体タンパク質複合体に含まれる目的のタンパク質に結合し得る物質、例えば目的のタンパク質に対する抗体をあらかじめ結合させておく。多角体タンパク質複合体と被検出物質を含み得る検体試料とを混合し、多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見極め検体と接触させ多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体を形成させる。次いで、多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体を前記の多角体タンパク質または目的のタンパク質に結合し得る物質を固相化させた担体と接触させ、固相化物質-多角体タンパク質複合体-被検出物質複合体を形成させる。さらに、ここに被検出物質に結合し得る物質、例えば被検出物質に対する抗体をペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素や蛍光物質などで標識した2次抗体を接触させ、固相化物質-多角体タンパク質複合体-被検出物質-2次抗体複合体を形成させる。2次抗体による呈色または蛍光を測定することにより、被検出物質を測定することができる。この方法は、検体中の被検出物質を検出する方法であって、該被検出物質に特異的に結合し得るタンパク質を多角体に固定化し、この多角体タンパク質複合体を遊離の状態で見極め検体と接触させ、該接触によりできた多角体タンパク質複合体と被検出物質との複合体の存在を担体上で検出する方法である。

40

3. 目的のタンパク質が固定された多角体タンパク質複合体を担体に結合した状態で利用した被検出物質の酵素結合抗体法による（ELISA）検出

本発明の多角体タンパク質を用いて酵素結合抗体法（ELISA）により、被検出物質

50

を検出することができる。この場合、目的のタンパク質（抗体または抗原）を固定化した多角体タンパク質複合体をマイクロタイタープレート等の担体に吸着等により結合させる。この多角体タンパク質複合体を結合したマイクロタイタープレートやスライドグラスは使用時まで、保存しておくことができる。多角体タンパク質複合体を結合したELISA用マイクロタイタープレートやスライドグラス等の担体に固定化したタンパク質と結合し得る被検出物質（抗原または抗体）を含む試料を添加し、被検出物質と多角体タンパク質複合体を結合させ、さらにペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した2次抗体であって、被検出物質と結合する抗体を添加し、被検出物質-多角体タンパク質複合体-2次抗体の複合体を形成させ、酵素酵素の基質を添加して発色させ、発色を測定することにより、被検出物質を検出することができる。

10

ELISAにおいて、目的のタンパク質を固定化した多角体タンパク質複合体を固相化することにより、1ウェル当りの目的のタンパク質量を多くすることができる。また、多角体タンパク質複合体という、高分子量の物質を固相化するため、ウェルへの固相化効率や結合の強さも大きくなり、ウェルの洗浄工程でも離脱しにくい。また、従来のELISAにおいては目的タンパク質を直接ELISA用マイクロタイタープレートのウェル内表面に固相化していた。このため、マイクロタイタープレートのウェル内部の表面積に限りがあるため、固相化量には限度があった。しかしながら、本発明の多角体タンパク質複合体を用いる場合、多角体タンパク質複合体自体の固相化量に限りはあるが、多角体タンパク質複合体に含ませる目的のタンパク質量を多くすることにより、1ウェル当りに固相化される目的のタンパク質量を増加させることができ、従来のELISAよりも感度を上昇させることができる。さらに、抗原抗体反応において抗体は抗原の抗原決定基を認識して抗原に結合するが、この際抗体の認識のために抗原決定基の3次元構造が重要になってくる。従来のELISAにおいては目的タンパク質を直接ELISA用マイクロタイタープレートのウェル内表面に固相化していたため、固相化により固相化抗原または抗体の立体的構造が天然のものから変化し、抗体が抗原決定基を認識できなくなることがあった。本発明においては、目的のタンパク質は多角体タンパク質の中に埋め込まれるように天然の立体的構造を保持した状態で存在する。従って、従来のELISAのように固相化により抗原抗体反応の反応性が減少することがなく、従来法に比較して感度が高い。このように、目的のタンパク質を固定化した多角体タンパク質複合体を固相化した担体を用いること

20

30

により、従来のELISAと比較しても高感度かつ迅速な検出が可能になる。さらに、従来のELISAにおいて、担体に固相化した抗原または抗体は安定性が高くないので、調製後時間が経過するにつれ、反応性が低下した。従って、抗原または抗体を固相化した担体は、調製後すぐに使用するか、または乾燥後凍結保存しておく必要があった。本発明の多角体タンパク質複合体は、安定性が高いため、多角体タンパク質複合体を固相化した担体を室温や2~10℃で保存しておいても、反応性の低下は少ない。従って、本発明のELISAにおいて、多角体タンパク質複合体を固相化した担体の保存安定性が高いという利点もあり、担体調製後、長期間にわたって感度よく測定することができる。

40

また、従来ウイルス感染や感染細菌の診断において、中和抗体法による測定が主に行われていたが、該方法では測定に長時間を要し、また感度も高くなかった。本発明の目的のタンパク質を固定化した多角体タンパク質複合体を用いた酵素結合抗体法によれば、従来の中和抗体法に比較してウイルスまたは細菌感染を高感度かつ迅速に検出することができる。

また、酵素で標識した2次抗体の代わりに、蛍光物質、化学発光物質等で標識した抗体を用いてもよい。この場合は、最終的に蛍光物質、化学発光物質から発する光を測定することにより、被検出物質を検出することができる。

上記の説明では、抗原-抗体反応を利用する測定法について記載したが、抗原と抗体の組み合わせだけでなく、リガンドとリガンドレセプターの組み合わせ等の相互に結合する化合物同士の組み合わせを利用することにより、一方の化合物を検出することができる。

#### 4. 目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を含む検出用試薬

本発明は、目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を含む検出用試薬を包

50

含する。目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体は、目的のタンパク質に加えて、シグナルを発生し得るタンパク質を固定していてもよい。該検出用試薬において、目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体は乾燥状態であってもよく、この場合は用時に精製水、生理食塩水、適当な緩衝液等で復元して用いればよい。さらに、該検出用試薬において、目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体は、精製水、生理食塩水、適当な緩衝液等に懸濁した状態で存在していてもよい。目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を含む検出用試薬は、界面活性剤、抗菌剤等を含んでいてもよい。

さらに、本発明は、目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を含む検出用キットをも包含する。該キットは、前述の目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体を含む検出用試薬を含み、さらに凝集反応を行わせるプレート、イムノクロマトグラフィー装置ストリップ、ブロッシャー等を含む。また、目的のタンパク質を固定した多角体タンパク質複合体はマイクロタイタープレートやスライドガラス等の担体に結合されていてもよい。本発明は、多角体タンパク質複合体を結合させたマイクロタイタープレート等の担体をも包含する。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【実施例 1】

ダニアレルゲンを含む多角体タンパク質複合体の調製

ダニのアレルゲン Der f 15 を以下の方法でアレルゲンが固定された多角体タンパク質複合体を製造した。

##### 1. デスティネーションベクターの構築

###### (1) Reading Frame Cassette の決定

Invirogen 社の Gateway クローニングシステムを用いて、目的遺伝子であるダニアレルゲン Der f 15 遺伝子をバキュロウイルスベクター系に導入するためには、まず VP3 遺伝子と Der f 15 遺伝子からなるキメラ遺伝子を作製するためには、コドンの読み枠が連続して翻訳される必要があることから、この読み枠を調整するための適切な Gateway クローニングシステムの Reading Cassette を選択した。Gateway クローニングシステムのデスティネーションベクターに挿入するための VP3 断片は、S4 の XbaI サイト部分 (1~1358 bp) である。つまり、1358 bp でコドンにすると 2 bp 余分となるので、この部分に 1 bp を補い、フレームシフトが起こらないように設計された Cassette B を選択した。

###### (2) バキュロウイルスベクターの改変

バキュロウイルストランスファーベクターである pVL1392 (PharMingen 社製) のポリヘドリンプロモーター下流に、VP3 をコードする S4 cDNA を NotI/BamHI サイトでクローニングし、プラスミド pAcVP3 を作製した (Ikeda et al., 2001)。次に、これを XbaI で消化し、ライゲーションキット (Takara 社製) を用いてセルフライゲーションさせたプラスミド pAcVP3 (XbaI) を作製した

###### (3) Cassette B の挿入

pAcVP3 (XbaI) を XbaI で消化し、この XbaI サイトの平滑化、脱リン酸化処理を行ってから Cassette B とのライゲーションを行った。ライゲーション組成は以下の通りである。

## 反応液組成 (一試料あたり)

	液量	
5×T4 DNA ligase buffer	2.0 μl	
pAcVP3 (XbaI)	2.0 μl	
Frame Cassette B	10.0 μl	
<u>T4 DNA ligase</u>	<u>1 unit (1.0 μl)</u>	10
計	15.0 μl	

反応液は、室温で一時間インキュベートし、そのうち1.0 μlを100 g/lのDB. 3.1コンピテントセルでプロトコールに従い形質転換を行った。形質転換した大腸菌は30 μg/μlのクロラムフェニコール含む2×TYプレート(16.0 g Trypton, 10.0 g Yeast extract, 5.0 g NaCl/L)に接種し、37℃で一晩培養した。プレートに生じたコロニーを50 μg/mlのカナマイシンを含む1.5 mlの2×TY培地(16.0 g Trypton, 10.0 g Yeast extract, 5.0 g NaCl/L)に接種し、37℃で一晩培養した。プラスミドDNAの抽出はPromega社製のWizard<sup>R</sup> Plus SV Minipre 20  
ps DNA Purification Systemを用いてプロトコールに従って行った。このようにしてデステイネーションベクターを構築した。

## 2. エントリークロンの構築

(1) att B配列で修飾されたPCR産物の調製

BP反応に必要なatt B1配列(N末端側)、att B2配列(C末端側)で修飾されたPCR産物を得るため、プライマーを設計した(配列番号3および4)。その構造を以下に示す。

att B1 forward primer (アミノ末端)

Lys- Lys

30

5' - GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-

att B1

GGC-TNN- (Der f 15 遺伝子の配列) -3'

att B2 reverse primer (カルボキシル末端)

40

Lys- Tyr

5' - GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-

att B2

TGG-GTN- (Der f 15 遺伝子の配列) -3'

これらのプライマーを40 μMに濃度調節し、PCR反応を行った。その他反応にはA 50

mpli Ex Taq (Perkin-Elmer) および、付属の10×PCR buffer (100mM Tris-HCl [pH8.3] 500mM KCl 15mM MgCl<sub>2</sub>)、dNTP Mix (dATP dCTP dGTP dTTP 濃度各 2.0mM) を用いた。反応液量は50μlとし、Micro Amp reaction tube (Perkin-Elmer) に以下の反応液を調製した。

反応液組成 (一試料あたり)

	液量	
template	1.0μl	10
10×PCR buffer	5.0μl	
dNTP Mix	4.0μl	
滅菌蒸留水	38.8μl	
forward primer (40μM)	0.5μl	
reverse primer (40μM)	0.5μl	
<u>Ampli Ex Taq</u>	<u>0.2μl</u>	20
計	50.0μl	

反応にはGeneAmp PCR System2400あるいはGeneAmp PCR System9700 (いずれもPerkin-Elmer) を用いて行った。まず94℃で5分間インキュベートした後、94℃で1分間 (変性)、50℃で1分間 (アニーリング)、72℃で2分間 (伸長) の温度調節を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返した。その後は速やかに温度を下げ、反応を終了させた。PCRの増幅産物は、インサート部分を切り出すために制限酵素処理したあと1.0%のアガロースゲルで電気泳動を行い、それぞれの大きさにおけるバンドの有無を確認した。

(2) att-PCR産物の純化

プライマーやプライマーダイマーを除去するため、上記の50μlのPCR増幅産物に150μlのTEを加え、さらに100μlの30% PEG 8000/30mM MgCl<sub>2</sub>を加えてよく攪拌してから、10,000gで15分間遠心し、上清を除去した。これを50μlのTEに溶解し、そのうちの10.0μlを1%アガロースゲルで電気泳動してバンドを確認した。

(3) BP反応

att L配列をベクターの両末端にもつエントリークローンを得るためBP反応を行った。反応液量は10μlとし、1.5mlエッペンドルフチューブに室温で以下の組成を調製した。

10

20

30

40

## 反応液組成 (一試料あたり)

	液量	
BP reaction buffer (5×)	2.0 μl	
att -PCR 産物	1.0 μl	
pDONR201 vector 150 ng/ml	2.0 μl	
TE	3.0 μl	10
BP C <sub>LONASE</sub> Enzyme Mix	2.0 μl	
<hr/>		
計	10.0 μl	

反応液を調製後、25℃で一晩インキュベートしてから proteinase K液を 1 μl 加え、37℃で10分間インキュベートした。このうちの1 μlを1.5 ml チューブに移して50 μlの LIBRARY EFFICIENCY DH5 α コンピテン トセル (東洋紡社製) でプロトコールに従い形質転換を行った。 20

形質転換した大腸菌は、50 μg/ml のカナマイシンを含む 2×TY プレートに接種 し、37℃で一晩培養した。

プレートに生じたコロニーを50 μg/ml のカナマイシンを含む1.5 ml の2×T Y培地に接種し、37℃で一晩培養した。プラスミドDNAの抽出はPromega社製 の Wizard<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purificat ion Systemを用いてプロトコールに従い、行った。

## (4) エントリークロンの配列確認

(3) で得られたエントリークロンの配列を確認するため、以下のようなプライマー を設計した (配列番号5および6)。 30

proximal to att L1 TCG-CG T-TAA-CGC-TAG  
-CAT-GGA-TCT-C

proximal to att L2 GTA-AC-ATC-AG-AGA-TT  
T-TGA-GAC-AC

これらのプライマーを用いて、ダイデオキシ法によるPCR反応をGeneAmp P CR System 2400で行った。PCR反応の組成は以下に示す。

## 反応液組成 (一試料あたり)

	液量	
Template (プラスミド DNA)	3.0 μl	40
Buffer (10×)	1.0 μl	
D. W.	3.6 μl	
プライマー (4.0 pmol)	0.4 μl (1.6 pmol)	
BigDye Terminator	2.0 μl	
計	10.0 μl	

反応は96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で4分間の温度調整を1サイクルとし、これを25サイクル繰り返した。その後速やかに温度を下げ、反応を終了させた。その後プロトコールに従ってABI PRISM<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzerにより電気泳動を行い、塩基配列の解析を行った。

### 3. 発現ベクターの構築 (LR反応)

多角体に固定されるため必要なVP3配列と、目的遺伝子をキメラにもつ発現ベクターを得るためLR反応を行った(図1)。

#### 反応液組成 (一試料あたり)

	液量	
デスティネーションベクター (0.5 µg/ml)	0.6 µl	10
エントリークローン	0.5 µl	
LR Reaction Buffer	4.0 µl	
TE	9.9 µl	
Topo isomerase I	1.0 µl	
LR C <sub>LOXASE</sub> Enzyme Mix	4.0 µl	20
計	20.0 µl	

反応液を調製後、25℃で一晩インキュベートしてからproteinase K液を2 µl加え、37℃で10分間インキュベートした。このうちの1 µlを1.5 mlチューブに移して50 µlのLIBRARY EFFICIENCY DH5 αコンピテントセルを用いてプロトコールに従い形質転換を行った。

形質転換した大腸菌は、50 µg/mlのアmpiシリンを含む2×TYプレート (16.0 g Trypton, 10.0 g Yeast extract, 5.0 g NaCl/L) に接種し、37℃で一晩培養した。

プレートに生じたコロニーを50 µg/mlのアmpiシリンを含む1.5 mlの2×TY培地 (16.0 g Trypton, 10.0 g Yeast extract, 5.0 g NaCl/L) に接種し、37℃で一晩培養した。プラスミドDNAの抽出はPromega社のWizard<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプロトコールに従っておこなった。このようにしDerf 15 遺伝子発現トランスファーベクターpAcVP3/Derf 15を作製した。

### 4. 組換えウイルスの作製とSf21細胞での組換えタンパクの発現

#### (1) 組換えウイルスの作成

作製したDerf 15 遺伝子発現トランスファーベクターpAcVP3/Derf 15を25 µl (0.2 µg/µl) と線状化されたバキュロウイルスDNAであるBaculogold Baculovirus DNA (PharMingen) 2.0 µl (0.1 µg/µl) に、リポフェクチン (GIBCO BRL) 14.0 µlをピペットマンで混合した後、無血清培地TC-100に置き換えたSf21細胞 (1×10<sup>6</sup> cells/35 mmシャーレ) の上に滴下し、一日培養した。翌日無血清培地を抜き、10%仔ウシ胎児血清を含むTC-100培地と交換してさらに三日間培養し、培養上清を回収した。その後プラーク純化を行い、組み換えウイルスAcVP3/Derf 15を得た。

#### (2) Sf21細胞での組換えタンパク質の発現

(1) で得られた培養上清を 3, 0 0 0 r p m で 5 分間遠心し、上清 (ウイルス液) 2 0 0  $\mu$  l を S f 2 1 細胞 ( $1 \times 10^6$  c e l l s / 3 5 m m シャーレ) に滴下して室温で吸着させた。一時間後、ウイルス液を除去し、2 m l の 1 0 % 仔ウシ胎児血清を含む T C - 1 0 0 培地を加えて 2 7  $^{\circ}$ C で 4 日間インキュベートした (ウイルス接種)。この 4 日後の培養上清を回収し、これを大量発現の際のウイルス液として用いた。

5. 多角体の精製

(1) S f 2 1 細胞からの多角体の回収

A c V P 3 / D e r f 1 5 と A c C P - H をそれぞれ 5 p . f . u . / c e l l ずつ S f 2 1 細胞 ( $5 \times 10^7$  c e l l s p e r 7 5 c m <sup>2</sup> f l a s k ) に接種した。これによって、図 2 および図 3 に示す通り、D e r f 1 5 が多角体に固定化される。感染後 2 7  $^{\circ}$ C で 4 日間経過した細胞をフラスコから回収、遠心 (3, 0 0 0 r p m 1 0 m i n ) して沈殿を回収した。P B S 溶液 ( p h o s p h a t e - b u f f e r e d s a l i n e , 2 0 m M N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> , 2 0 m M N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> , 1 5 0 m M N a C l , p H 7 . 2 ) で洗浄した後、水中でホモジナイザーを用いて磨砕した。磨砕後、1 % T w e e n 2 0 ( B i o - R a d ) を加えて遠心 ( 1 5 , 0 0 0 r p m 5 m i n ) を繰り返し、多角体と細胞片を分離した。

10

得られた多角体複合体タンパク質は、滅菌水中で保存しておいた。

【実施例 2】

ダニアレルゲンを含む多角体タンパク質複合体を用いた検出

実施例 1 により得られた D e r f 1 5 タンパク質を固定化した多角体と目的タンパク質分子を固定化していない空の多角体の懸濁溶液 (  $5 \times 10^8$  の 8 乗個の多角体 / m l ) を 0 . 5  $\mu$  l とり、これにリン酸緩衝液 9 . 5  $\mu$  l 加えた。

20

平底 9 6 穴のマイクロタイタープレート ( F A L C O N 社 ) の各穴に 8 0  $\mu$  l のリン酸緩衝液を加えた。

次に、犬から採取した血清 1 0  $\mu$  l を加え、さらに上記の 1 0 倍希釈した多角体懸濁液 1 0  $\mu$  l を加え、振とう機で攪拌した。

振とう開始後、3 0 分を経過すると穴の中央付近に多角体の凝集塊が確認されるようになった ( 図 4 ) 。さらに、この凝集塊は顕微鏡下で図 5 及び 6 に示すとおり、明瞭に観察された。

【実施例 3】

30

外来ウイルス抗原を含む多角体タンパク質複合体を用いた検出

1. ウイルスと細胞の調製

B m C P V H 株は、細胞質に立方体の多角体を形成するウイルス株であり、この H 株の多角体タンパク質のみを発現するように構築された組換えバキュロウイルス A c C P - H を使用した。また、昆虫培養細胞は S p o d o p t e r a F r u g i p e r d a 由来の I P L B - S f 2 1 - A E ( S F 2 1 ) を、1 0 % 仔ウシ胎児血清を含む T C - 1 0 0 ( G I B C O B R L ) 培地で継代したものを使用した。

2. イヌジステンパーウイルスの H 及び F タンパク質の発現のためのベクターの構築

(1) エントリークローンの作製

40

イヌジステンパーウイルスの H 及び F タンパク質の N 末端に固定化シグナルを入れるために、以下 2 種類のプライマーの構築を行った。

プライマー 5' F ( N ) : 5' - C A C C C A A G C A A T C C A A T C T C T T A G - 3' ( 配列番号 7 )

プライマー 3' F ( C ) : 5' - T C A A T T A A A G G A A G A G C G C C T A A C - 3' ( 配列番号 8 )

プライマー 5' H ( N ) : 5' - C A C C T T T C A C C A A G T A T C A A C T A G - 3' ( 配列番号 9 )

プライマー 3' H ( C ) : 5' - T C A A G G T T T T G A A C G G T T A C - 3' ( 配列番号 1 0 )

50

イヌジステンパーウイルスF及びHタンパク質のcDNAがクローニングされているプラスミドCDV-F/pCRとCDV-H/pCRをテンプレートにプライマー5' F (N)とプライマー3' F (C)で、またプライマー5' H (N)とプライマー3' H (C)を用いてPCRを行った。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動で泳動した後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製)を用いてプロトコールに従って、精製した。精製したPCR産物は、以下で示す方法により、pENTR/D-TOPO (Invitrogen社製)ベクターにクローニングし、それぞれVP3-CDV-F/pENTRとVP3-CDV-H/pENTRを作製した。作製したエントリークローンはシークエンスにより配列の確認を行った。

10

(2) pENTR/D-TOPOへのクローニング

attL配列をPCR産物の両末端にもつエントリークローンを得るために、精製したPCR産物をpENTR/D-TOPOベクターにクローニングした。

反応液組成 (一試料あたり) は以下の通りであった。

精製 PCR 産物	4 $\mu$ l
Salt Solution	1 $\mu$ l
pENTR/D-TOPO vector 5ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
計	6 $\mu$ l

20

反応液を調整後25℃で15分インキュベートした。このうち2 $\mu$ lを1.5mlチューブに移して50 $\mu$ lのTOP10 Chemically Competent E. coliコンピテントセル (Invitrogen社製) でプロトコールに従い形質転換を行った。

形質転換した大腸菌は、50 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む2 $\times$ TYプレートに接種し、37℃で一晩培養した。

プレートに生じたコロニーを50 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む1.5mlの2 $\times$ TY培地に接種し、37℃で一晩培養した。プラスミドDNAの抽出はPromega社製のWizard<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプロトコールに従い行った。

30

(3) トランスファーベクターの選択

DESTINATIONベクターは多角体への固定化シグナル配列を目的タンパク質のN末側に挿入するためのベクターであるpAcVP3 (A)、pAcVP3 (C)と固定化シグナル配列の長さが450残基であるpAcVP3 (Xba)、また同じく52残基であるpAcVP3 (52)の4種類である (図8)。

(4) 発現ベクターの構築 (LR反応)

多角体に固定されるため必要なVP3配列と、目的遺伝子をキメラにもつ発現ベクターを得るためLR反応を行った。

40

反応液組成 (一試料あたり) は以下の通りであった。

	液量	
デスティネーションベクター (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l	
エントリークローン	0.5 $\mu$ l	
LR Reaction Buffer	4.0 $\mu$ l	
TE	9.9 $\mu$ l	
Topo isomerase I	1.0 $\mu$ l	10
LR C <sub>LOXASE</sub> Enzyme Mix	4.0 $\mu$ l	
計	20.0 $\mu$ l	

反応液を調製後、25℃で一晩インキュベートしてから proteinase K液を2  $\mu$ l 加え、37℃で10分間インキュベートした。このうちの1  $\mu$ l を1.5 ml チューブに移して50  $\mu$ l の LIBRARY EFFICIENCY DH5  $\alpha$  コンピテントセルを用いてプロトコルに従い形質転換を行った。

形質転換した大腸菌は、50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む2  $\times$  TYプレート (16.0 g Trypton, 10.0 g Yeast extract, 5.0 g NaCl/L) に接種し、37℃で一晩培養した。

プレートに生じたコロニーを50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む1.5 ml の2  $\times$  TY培地 (16.0 g Trypton, 10.0 g Yeast extract, 5.0 g NaCl/L) に接種し、37℃で一晩培養した。プラスミドDNAの抽出はPromega社のWizard<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプロトコルに従っておこなった。このようにしてイヌジステンパーウイルスF及びHタンパク質発現トランスファーベクター pAcVP3 (A) -F、pAcVP3 (C) -F、pAcVP3 (Xba) -F、pAcVP3 (52) -FとpAcVP3 (A) -H、pAcVP3 (C) -H、pAcVP3 (Xba) -H、pAcVP3 (52) -Hを作製した。

### 3. 組換えウイルスの作製とSf21細胞での組換えタンパクの発現

#### (1) 組換えウイルスの作成

作製したそれぞれ8種類のトランスファーベクター25  $\mu$ l (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) と線状化されたバキュロウイルスDNAであるBaeulogold Baculovirus DNA (PharMingen) 2.0  $\mu$ l (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) に、リポフェクチン (GIBCO BRL) 14.0  $\mu$ l をピペットマンで混合した後、無血清培地TC-100に置き換えたSf21細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/35mmシャーレ) の上に滴下し、一日培養した。翌日無血清培地を抜き、10%仔ウシ胎児血清を含むTC-100培地と交換してさらに三日間培養し、培養上清を回収した。その後プラーク純化を行い、組み換えウイルスAcVP3 (A) -F、AcVP3 (C) -F、AcVP3 - (Xba) -F、AcVP3 (52) -FとAcVP3 (A) -H、AcVP3 (C) -H、AcVP3 (Xba) -H、AcVP3 (52) -Hを得た。

#### (2) Sf21細胞での組換えタンパク質の発現

(1) で得られた培養上清を3,000 rpmで5分間遠心し、上清 (ウイルス液) 200  $\mu$ l をSf21細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/35mmシャーレ) に滴下して室温で吸着させた。一時間後、ウイルス液を除去し、2 ml の10%仔ウシ胎児血清を含むTC-100培地を加えて27℃で4日間インキュベートした (ウイルス接種)。この4日後の培養上清を回収し、これを大量発現の際のウイルス液として用いた。なお、目的タンパクの発現はSDS-PAGEで確認した。

#### 4. 多角体の精製

8種類の組み換えウイルスAcVP3(A)-F、AcVP3(C)-F、AcVP3(Xba)-F、AcVP3(52)-FとAcVP3(A)-H、AcVP3(C)-H、AcVP3(Xba)-H、AcVP3(52)-Hのそれぞれと多角体を作る組み換えウイルスAcCP-Hを両者5 p. f. u. / cell ずつSf21細胞( $5 \times 10^7$  cells per  $75 \text{ cm}^2$  flask)に接種した。これによって、AcCP-Hが作る多角体にイヌジステンパーウイルスのFもしくはHタンパク質が固定化される。感染後27°Cで4日間経過した細胞をフラスコから回収、遠心(3,000 rpm 10 min)して沈殿を回収した。PBS溶液(phosphate-buffered saline, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.2)で洗浄した後、水中でホモジナイザーを用いて磨砕した。磨砕後、1% Tween 20 (Bio-Rad)を加えて遠心(15,000 rpm 5 min)を繰り返し、多角体と細胞片を分離した。

得られたイヌジステンパーウイルスF及びHタンパク質固定化多角体は滅菌水中で保存した。

#### 5. 96穴マイクロタイタープレートを用いたELISA法による抗原抗体反応定量試験

96穴マイクロタイタープレート(FALCON社)の各ウェルにPBSを50  $\mu$  l入れ、次に多角体懸濁液( $1 \times 10^{10}$  個/ml)を2  $\mu$  l分注し、12時間放置した。上清を除きウェルを37°Cで12時間放置し、乾燥させた(多角体の吸着)。抗原抗体反応を行うまでは、この96穴マイクロタイタープレートは室温で保管した。

抗原抗体反応を見る場合、まずウェルをPBS(100 ml)で2回洗浄し、次にBlocking solution(5% W/V Gelatin/PBS)100 mlを加え37°C 2時間放置した。PBSで2回洗浄後、2倍段階希釈したイヌジステンパーウイルスで人工的に感作したイヌの血清(中和抗体価 512倍)を50 mlずつ加え室温で2時間反応させた。続いて、Wash Buffer(0.1% V/V Tween 20/PBS)100 mlで4回洗浄し、HRP-Dog IgG: Bethyl社製(10000倍希釈)を50 ml加え、室温で2時間反応させた。反応後、Wash Bufferで4回洗浄し、ABTS Solutionを100 ml加え室温で30分間反応させた。1% SDSを70 ml加え反応を停止させた後、反応液を100 mlずつ回収し405 nmで測定を行った。

Blocking solutionの組成は5% Gelatin/PBSで、Wash Bufferは0.1% Tween 20/PBSで、希釈Bufferは1% Gelatin/PBSである。

#### 6. 凝集法による抗原抗体反応の検出

イヌジステンパーウイルスのFタンパク質(VP3(C)-F)とHタンパク質(VP3(C)-H)を固定化した多角体と目的タンパク質分子を固定化していない空の多角体の懸濁液( $5 \times 10^8$  個の多角体/ml)を0.5  $\mu$  lとり、これにリン酸緩衝液9.5  $\mu$  l加えた。平底96穴のマイクロタイタープレート(FALCON社)の各穴に80  $\mu$  lのリン酸緩衝液を加えた。

次に、イヌジステンパーウイルスで人工的に感作したイヌから採取した血清(中和抗体価 512倍)10  $\mu$  lを加え、全量を100  $\mu$  lとし、振とう機で攪拌した。

本実施例において、以下の結果が得られた。

##### 1. イヌジステンパーウイルスF、Hタンパク質の多角体への固定化

組み換えウイルスAcVP3(A)-F、AcVP3(C)-F、AcVP3(Xba)-F、AcVP3(52)-FとAcVP3(A)-H、AcVP3(C)-H、AcVP3(Xba)-H、AcVP3(52)-HのそれぞれをSf21細胞に接種し、目的とするタンパク質が発現していることをSDS-PAGEで確認した(図9)。この結果から、多角体固定化シグナルが短い方が、後の抗原抗体反応の検出において非特異的な反応が生じないものと考え、Fタンパク質についてはAcVP3(C)-FとまたHタン

パク質の方はAcVP3(C)-Hを選択した。これらのウイルスをそれぞれ多角体タンパク質を発現する組み換えウイルスAcCP-Hと共にSf21細胞に同時に接種し(図10)、イヌジステンパーウイルスのF及びHタンパク質の多角体への固定化を試みた。このようにして得られた多角体複合体をプロテインビーズともいう。なお、多角体へのF及びHタンパク質の固定化の確認は精製して得られた多角体のSDS-PAGEで確認した(図11)

## 2. ELISA法による抗体価の測定

イヌジステンパーウイルスのF及びHタンパク質を固定化した多角体を96穴マイクロタイタープレートの各ウエルの底に貼り付け、十分乾燥させた後、抗原抗体反応を行った。イヌジステンパーウイルスに感作させたイヌの血清を2倍段階希釈し、各ウエルに加えて抗原抗体反応を行った。次に、この抗原抗体反応したイヌの抗体を酵素標識した抗イヌ抗体に対する二次抗体を用いて検出した。

一連の操作は以下のようにして行った。

1. 多角体懸濁液を分注し12時間放置(1本のチューブに作製して、その懸濁液を分注)

2. 上清を除きウエルを乾燥(多角体の吸着) 37℃12時間放置

3. ウエルをPBS(100ml)で2回洗浄

4. ブロッキング溶液(5%W/Vゼラチン/PBS)100mlを加え37℃2時間放置

5. PBSで2回洗浄

6. 2倍段階希釈した犬血清を50mlずつ加え室温2時間反応

7. Wash Buffer(0.1%V/V Tween20/PBS)100mlで4回洗浄

8. HRP-Dog IgG: Bethyl社製(10000倍希釈)を50ml加え室温2時間反応

9. 洗浄用バッファーで4回洗浄

10. ABTS Soln. 100ml加え室温30分間反応

11. 1%SDSを70ml加え反応を停止

12. 100mlずつ回収し405nmを測定

用いた希釈バッファーは、1%ゼラチン/PBSであった。

その結果、今回用いたイヌジステンパーウイルスに感作させたイヌ血清は中和抗体価としては512倍のイヌ血清を用いた。このサンプル血清を2倍段階希釈し反応の確認をしたところ、16、32、64、・・・、512倍はもとより、さらに1024、2048、4096倍までの希釈段階までその抗体の存在を検出できなかった。つまり、イヌジステンパーウイルス抗体の測定方法としては、中和抗体法よりも検出感度はさらに4~8倍程度高いことが示唆された(表1)。

【表 1】

表 1

(倍希釈)	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
CDV-F(CDV陽性血清)	0.336	0.284	0.251	0.196	0.132	0.083	0.046	0.016	0.005	0	0
CDV-F(正常血清)	0.116	0.104	0.065	0.033	0.009	0	0	0	0	0	0
△	0.17	0.18	0.186	0.163	0.123	0.083	0.046	0.016	0.005	0	0
CDV-H(CDV陽性血清)	0.253	0.2	0.169	0.125	0.083	0.046	0.015	0.003	0.001	0	0
CDV-H(正常血清)	0.136	0.072	0.04	0.017	0.001	0	0	0	0	0	0
△	0.117	0.128	0.129	0.108	0.082	0.046	0.015	0.003	0.001	0	0
H29S(CDV陽性血清)	0.131	0.073	0.045	0.029	0.008	0	0	0	0	0	0
H29S(正常血清)	0.091	0.05	0.026	0.013	0.003	0	0	0	0	0	0
△	0.04	0.023	0.019	0.016	0.005	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

清との反応を、中段はHタンパク質固定化プロテインビーズとイヌジステンパーウイルス抗血清との反応を、下段は空のプロテインビーズとイヌジステンパーウイルス抗血清との反応を示す。

表1に示すように、従来法よりもさらに4ないし8倍感度を上げることに成功した。また、この方法の場合、正常血清・CDV陽性血清と反応、プロテインビーズを96穴プレートに固定、ゼラチンを用いてブロッキング、ペルオキシダーゼ標識抗体と反応、発色および405nmの吸光度を測定の手続きを半日で完了することができ、約半日で血清中に含まれる抗体価を定量することが可能となる。

### 3. 凝集反応による抗原抗体反応の検出

イヌジステンパーウイルスのFタンパク質(VP3(C)-F)とHタンパク質(VP3(C)-H)を固定化したそれぞれの多角体及び目的タンパク質分子を固定化していない空の多角体の懸濁液( $5 \times 10^8$ 個の多角体/ml)を $0.5 \mu\text{l}$ とり、これにリン酸緩衝液 $9.5 \mu\text{l}$ 加えた。平底96穴のマイクロタイタープレートの各ウエルに $80 \mu\text{l}$ のリン酸緩衝液を加えた。これに、イヌジステンパーウイルスで感作したイヌから採取した血清 $10 \mu\text{l}$ (CDV陽性血清)および正常血清を加え、振とう機で攪拌した。

振とう開始後、15分から30分程度経過するとイヌジステンパーウイルスのFタンパク質もしくはHタンパク質を固定化した多角体を加えたウエルでは、その中央付近に多角体の凝集塊が確認されるようになった。さらに、この凝集塊は肉眼でも、また低倍率の顕微鏡下でも明瞭に観察された(図12)。

本発明の多角体タンパク質複合体を用いた酵素結合抗体法(ELISA)と従来法(中和抗体価測定法)を比較すると表2のようになる。

【表2】

表2

	従来法 (中和抗体価測定法)	多角体タンパク質 複合体を用いた 酵素結合抗体法(ELISA)	多角体タンパク質 複合体を用いた 凝集法	
培養細胞 ウイルス	ジステンパーウイルスとVero細胞 パルボウイルスと猫腎臓代細胞	不要	不要	30
判定までの 時間	最低1週間必要	半日	15分	
判定	細胞変性効果による判定	発色法	目視	
感度	512倍	2048倍~4096倍		40

表2に示すように、本発明の多角体タンパク質複合体(プロテインビーズ)を用いたほうが、短時間で、より高感度・簡便に血清中の抗体の検出(感染の有無の判定)を行うことが出来ることが判明した。

#### 【産業上の利用可能性】

本発明の検出法で用いる被検出物質に特異的に結合するタンパク質を固定させた多角体タンパク質複合体を該被検出物質と接触させることにより、集合させることができ、形成された集合体を検出することにより被検出物質を検出することができる。例えば、本発明の多角体タンパク質複合体は、免疫反応を利用した検出に利用することができる。多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質は、立体構造を維持しているため、立体構造の

喪失による反応性の低下も生じず、高感度に迅速に被検出物質を検出することが可能である。また、多角体タンパク質複合体に固定されたタンパク質は、結晶構造をとっており、また多角体タンパク質にコーティングされているので安定であるので、本発明の検出キットは安定に長期間保存できる。さらに、多角体タンパク質複合体は、目的のタンパク質と多角体タンパク質をコードするベクターを細胞に組込んで発現させることにより、容易に大量に得られるので、本発明の検出キットを容易に製造できる。

また、被検出物質に特異的に結合するタンパク質を固定させた多角体タンパク質複合体をマイクロタイタープレート等の担体に結合させ、該担体を用いて酵素抗体結合法で被検出物質を検出することもでき、該方法により高感度かつ迅速に検出することが可能である。

10

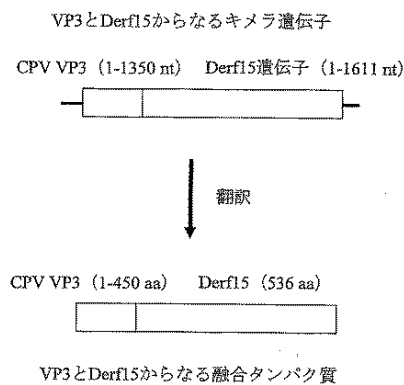
。本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

配列番号 3 ~ 6 プライマー

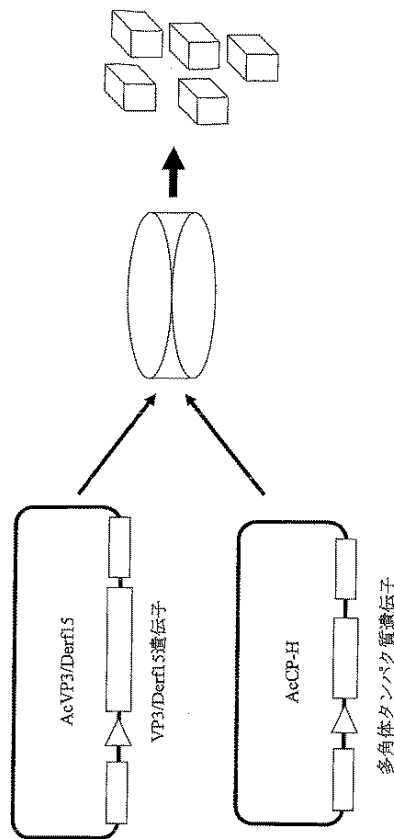
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2



【図 3】

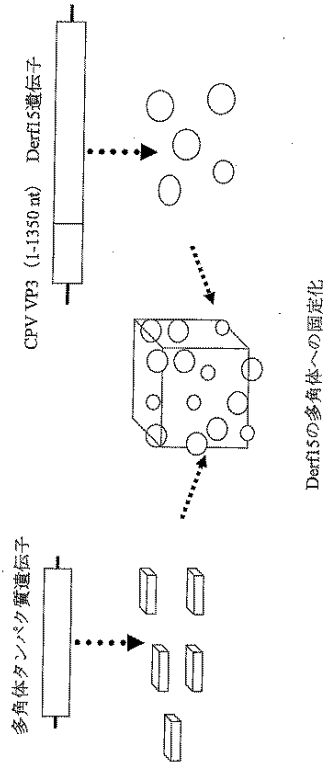


図 3

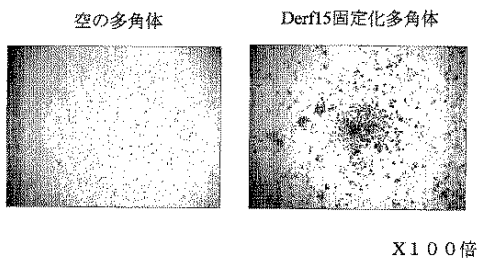
【図 4】

図 4



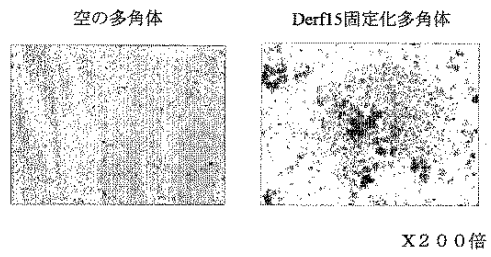
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



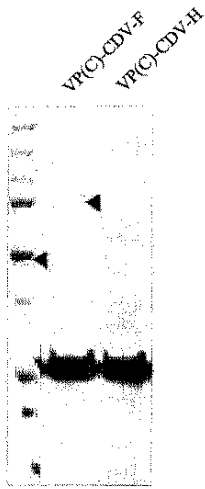
X100倍

X200倍



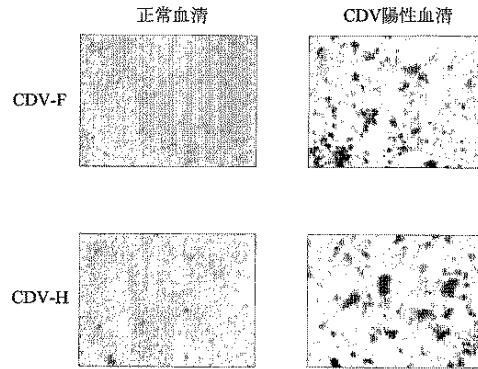
【図 1 1】

図 1 1



【図 1 2】

図 1 2



【配列表】

2005090982000001.xml

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/006223
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/543, C12Q1/04, 1/70, G01N33/53, 33/569//C12N15/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/543, C12Q1/04, 1/70, G01N33/53, 33/569//C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	NAKAZAWA et al., "Protein Chip ni yoru Tanpakushitsu Bunshikan Sogo Sayo no Sensing", Dai 20 Kai 'Sensor Micro machine to Oyo System' Symposium Koen Gaiyoshu, 2003 Nen, page 101	1-14/15-19
X/Y	IKEDA et al., "Konchu Virus no Takakutai o Riyo shita Protein Beads no Kaihatsu to sono Oyo", Dai 26 Kai The Molecular Biology Society of Japan, Nenkai Program · Koen Yoshishu, (2003), page 478	1-3, 6-14/4, 5, 15-19
X/Y	MORI et al., "Konchu Virus Takakutai eno Tanpakushitsu no Koteika to Laser-kako ni yoru Takakutai no Array", The Review of Laser Engineering, Vol.32, No.2, 15 February, 2004 (15.02.04), pages 89 to 93	15-19/1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 July, 2005 (01.07.05)		Date of mailing of the international search report 19 July, 2005 (19.07.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/006223								
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> G01N33/543, C12Q1/04, 1/70, G01N33/53, 33/569 // C12N15/09										
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> G01N33/543, C12Q1/04, 1/70, G01N33/53, 33/569 // C12N15/09										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2005年									
日本国実用新案登録公報	1996-2005年									
日本国登録実用新案公報	1994-2005年									
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus (JOIS)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号								
X/Y	中澤他「プロテインチップによるタンパク質分子間相互作用のセンシング」第 20回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム講演概要集 2003年 第101頁	1-14/15-19								
X/Y	池田他「昆虫ウイルスの多角体を利用したプロテインピースの開発とその応 用」 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003) 第478 頁	1-3,6-14/ 4,5,15-19								
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等而言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 01.07.2005	国際調査報告の発送日 19.7.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 9217								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/006223

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	森他「昆虫ウイルス多角体へのタンパク質分子の固定化とレーザー加工による多角体のアレイ」 レーザー研究 第32巻第2号(2004年2月15日)第89-93頁	15-19/1-14

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/53 Q  
C 0 7 K 4/12 Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 中澤 裕  
京都府京都市左京区松ヶ崎 京都工芸繊維大学 地域共同研究センター インキュベーションラボ  
ラトリー 株式会社プロテインクリスタル内

(72)発明者 池田 敬子  
京都府京都市左京区松ヶ崎 京都工芸繊維大学 地域共同研究センター インキュベーションラボ  
ラトリー 株式会社プロテインクリスタル内

(72)発明者 津久井 利広  
福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全業工業株式会社内

(72)発明者 鈴田 靖幸  
福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全業工業株式会社内

(72)発明者 梶本 庸右  
福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全業工業株式会社内

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA40 CA50 CA51 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

