

(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2008-143795

(P2008-143795A)

(43) 公開日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28 ZNA	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
CO7K 7/06 (2006.01)	CO7K 7/06	
CO7K 7/08 (2006.01)	CO7K 7/08	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2006-329704 (P2006-329704)
(22) 出願日 平成18年12月6日 (2006.12.6)

(71) 出願人 304020177
国立大学法人山口大学
山口県山口市吉田1677-1
(72) 発明者 水上 洋一
山口県宇部市南小串1丁目1-1 山口大
学遺伝子実験施設内
Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA16 BA17
CA40 DA50 DA75 DA86 EA50
EA54 FA71

最終頁に続く

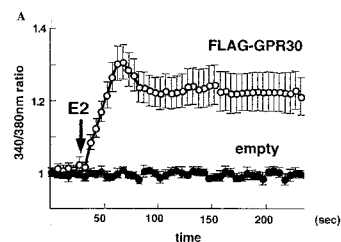
(54) 【発明の名称】 哺乳動物のエストロゲンレセプターを特異的に認識する抗体及びその作製方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】細胞膜上に存在するエストロゲン受容体(GPR30)を特異的に認識する抗体、及びその作製方法を提供する。

【解決手段】GPR30の特定のアミノ酸配列、好ましくは膜外露出領域に対応する11~15アミノ酸からなるエピトープのアミノ酸配列を抗原とし、これを非ヒト哺乳動物に免疫して得られる抗体、及びその作製方法。さらに該抗体を用いたGPR30の検出方法。抗体は、ポリクローナル抗体を用いる。

【選択図】図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 から配列番号 11 のうち少なくとも 1 つに記載のアミノ酸配列からなるエピトープを認識する、抗 G P R 30 抗体。

【請求項 2】

配列番号 1, 3, 5, 9 のうち少なくとも 1 つに記載のアミノ酸配列からなるエピトープを認識する、抗 G P R 30 抗体。

【請求項 3】

配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるエピトープを特異的に認識する、抗 G P R 30 抗体。

10

【請求項 4】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 から請求項 3 のうちいずれか 1 項に記載の抗 G P R 30 抗体。

【請求項 5】

配列番号 1 から配列番号 11 に記載のペプチドのうち少なくとも 1 種類を抗原とする、抗 G P R 30 抗体の作製方法。

【請求項 6】

配列番号 1, 3, 5, 9 に記載のペプチドのうち少なくとも 1 種類を抗原とする、抗 G P R 30 抗体の作製方法。

【請求項 7】

配列番号 9 に記載のペプチドを抗原とする、抗 G P R 30 抗体の作製方法。

20

【請求項 8】

請求項 1 から請求項 4 のうちいずれか 1 項に記載の抗 G P R 30 抗体を用いることを特徴とする、G P R 30 タンパク質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は女性ホルモン受容体タンパク質の認識・検出方法に関し、より詳しくは、哺乳動物の細胞膜上に存在するエストロゲン受容体タンパク質である G p r o t e i n - c o u p l e d r e c e p t o r 30 (G P R 30) タンパク質を特異的に認識する抗体及び抗体の作製方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

女性ホルモンの一種エストロゲンは月経周期の調節など女性の性活動を制御するほか、血管の拡張作用、コレステロールの調節、骨量バランスの調節など様々な生命維持機構の調節にはたらく物質であり、調節を受ける細胞（エストロゲン標的細胞）にはエストロゲンを認識しそのシグナルを伝達するための受容体タンパク質が存在することが知られている。エストロゲンによる調節は内分泌系、生殖器、骨組織、血管系で重要な役割を担っており、その異常は異常骨吸収、心血管疾患、中枢神経系傷害及びがんなど種々の疾患の発生や進行に関与すると考えられている。エストロゲン受容体の活性を調節するためのリガンドはこれらの疾患を治療・予防するための薬剤となりうることから、エストロゲン受容体とその作用機序を明らかにすることが極めて重要である。

40

【0003】

上記の認識から、エストロゲン受容体のうち特に細胞内に存在する D N A 結合型の受容体については多くの研究がなされており、遺伝子が単離されるなど成果も上がっている（特許文献 1 - 4）。細胞質内に存在するエストロゲン受容体は、エストロゲンが結合すると活性化されて核内に移行し、染色体上のエストロゲン応答配列に結合し、さらにエストロゲン - エストロゲン受容体複合体を認識する転写調節因子が結合して、標的となる遺伝子の発現が促されることなどが明らかにされてきている。一方、エストロゲンの刺激により遺伝子の発現を介さない細胞の応答、例えばカルシウムイオンの移動や一酸化窒素の生

50

成、チロシンキナーゼの活性化などが起こることから、エストロゲンに対しては細胞質内に存在する受容体だけではなく、細胞膜上に存在してシグナルを伝達する膜結合型の受容体の存在が予測されていたが、一般に膜タンパク質は可溶性タンパク質に比べて単離精製や機能解析が困難という問題があり、膜結合型エストロゲン受容体の実態については全く明らかではなかった。細胞膜上のタンパク質においては、その発現量や動態を可視化することが機能解析においては有効であることから、エストロゲンの刺激により活性化される細胞膜上のタンパク質を特異的に認識し、更なる解析を可能にする手法の開発が切望されていた。

【特許文献 1】特開 2001-352992 エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用

10

【特許文献 2】特表 2004-501607 新規エストロゲン調節性 G タンパク質 γ サブユニット：組成物および使用法

【特許文献 3】特表 2001-525319 エストロゲン受容体

【特許文献 4】特表平 11-502417 オーフアン レセプター

【非特許文献 1】Fujimoto, K., Mizukami Y. et al. 2001. Biochemichal et Biophysica Acta 1518: 173-177.

【非特許文献 2】Kimura M., Mizukami Y. et al. 2001. J. Biol. Chem. 276: 26453-26460.

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記の現状に鑑み、本発明は、細胞膜上に存在するエストロゲン受容体を、細胞膜上に存在する状態で特異的に認識し得る抗体、及びその作製方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題の解決のため、本発明者らは、細胞膜上に存在する種々の受容体タンパク質の解析を進め、エストロゲン (17β -エストラジオール; E_2) との関連が指摘されている G タンパク質結合型の膜受容体タンパク質の一種、GPR30 に着目して、GPR30 タンパク質を特異的に認識可能な抗体の作製を試みた。本発明者らはラットの一種ノルウェーラット (*Rattus norvegicus*) から GPR30 ホモログの遺伝子を単離し、その予想されるアミノ酸配列 (配列番号 12) から、膜貫通ドメイン (疎水性アミノ酸からなる Helix 構造など) と膜貫通ドメインとをつなぐ膜外露出部分こそが抗原として利用可能であると予測し、更に可溶化して立体構造の変化した膜タンパク質そのものを抗原とするのではなく、膜外露出部分のアミノ酸配列のみで十分抗原たり得ると予測して、膜外露出部分のアミノ酸配列を基に合成した種々の合成ペプチドを、抗原としてウサギに免疫する手法により抗体の作製を行った。この中から、特定の合成ペプチドを抗原としてウサギに免疫し得られる抗体が、細胞膜上の GPR30 タンパク質を特異的にかつ感度良く検出できることを見だし、GPR30 タンパク質と女性ホルモン刺激との関連性から GPR30 が確かにエストロゲン応答タンパク質であることを明らかにして、本発明を完成させた。

30

40

【0006】

すなわち本発明の第 1 の態様は、配列番号 1 から配列番号 11 のうち少なくとも 1 つに記載のアミノ酸配列からなるエピトープを認識する、抗 GPR30 抗体を提供する。

【0007】

本発明の第 2 の態様は、配列番号 1, 3, 5, 9 のうち少なくとも 1 つに記載のアミノ酸配列からなるエピトープを認識する、抗 GPR30 抗体を提供する。

【0008】

本発明の第 3 の態様は、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるエピトープを特異的

50

に認識する、抗 G P R 3 0 抗体を提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明の第 4 の態様は、抗体がポリクローナル抗体である、第 1 から第 3 の態様のうちいずれか 1 つに記載の抗 G P R 3 0 抗体を提供する。

【 0 0 1 0 】

本発明の第 5 の態様は、配列番号 1 から配列番号 1 1 に記載のペプチドのうち少なくとも 1 種類を抗原とする、抗 G P R 3 0 抗体の作製方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明の第 6 の態様は、配列番号 1 , 3 , 5 , 9 に記載のペプチドのうち少なくとも 1 種類を抗原とする、抗 G P R 3 0 抗体の作製方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明の第 7 の態様は、配列番号 9 に記載のペプチドを抗原とする、抗 G P R 3 0 抗体の作製方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明の第 8 の態様は、第 1 から第 4 の態様のうちいずれか 1 つに記載の抗 G P R 3 0 抗体を用いることを特徴とする、G P R 3 0 タンパク質の検出方法を提供する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 4 】

本発明の提供する抗 G P R 3 0 抗体を利用することにより、G P R 3 0 すなわちエストロゲン受容体にまつわる種々の物質の動態解析や創薬への応用が可能となる。一般に膜結合型の受容体タンパク質は界面活性剤などで可溶化してしまうと立体構造が失われ、これを用いて作製した抗体が生体では膜タンパク質を認識できないという傾向があるのに対して、本発明の提供する抗体が、生体内に実際に存在する状態の膜タンパク質を特異的に認識しうるため、その利用価値は高い。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 5 】

以下に本発明を実施するための最良の形態を述べる。本発明の第 1 の態様は、哺乳動物の細胞膜上に存在する女性ホルモン受容体である G P R 3 0 タンパク質を特異的に認識する、抗 G P R 3 0 抗体を提供する。G P R 3 0 は世界で初めてその働きが明らかになった膜結合型の女性ホルモン受容体であり、女性ホルモン受容異常に起因する疾患など、その解析は今後創薬や治療につながるものである。本発明は、この G P R 3 0 タンパク質を特異的に認識可能な抗体を提供するものであり、G P R 3 0 タンパク質、好ましくは配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、より好ましくはこのうち膜外露出領域である配列番号 1 から 1 1 のうちいずれか 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体、あるいはこれらの各のアミノ酸配列を認識する複数の抗体の混合物であっても良く、これらの抗体は疾患の解析や創薬などのツールとして利用可能である。

図 1 は、本発明者らが明らかにした配列番号 1 2 に記載のノルウェーラット (R a t t u s n o r v e g i c u s) 由来 G P R 3 0 のアミノ酸配列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=19424262>) を基に、S O S U I システム (<http://bpb.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を用いてその構造を解析した結果である。図中、中央部が細胞膜を貫通している領域であり、上側が細胞外を、下側が細胞内をそれぞれ表している。また配列番号 1 , 3 , 5 , 9 に記載の合成ペプチドを作成するために用いたアミノ酸配列に相当する部分を、配列番号と網掛けとで示している。図が示す通り、G P R 3 0 は疎水性アミノ酸からなる H e l i x ドメインが複数回膜を貫通する典型的な膜タンパク質であり、その予想される構造から、特に生きた細胞においては、特定の領域のみが抗原による認識を受ける領域 (エピトープ) として利用可能であると予測される。本図はあくまで計算上予想される構造を示すものであり、実際の構造を示すものではない。一般に G タンパク質結合型の受容体は 7 回膜貫通型であるため、図の膜貫通部のうち一つは脂質であるエストロゲンを結合するための構造である可能性が

10

20

30

40

50

ある。いずれにせよ、GPR30は複数の膜外に突き出した領域を持っているが、その全てが前記エピトープとして同様に利用可能なわけではなく、好ましくは図1の例における配列番号1, 3, 5, 9に記された配列のうち少なくとも一つ、または哺乳動物における前記配列の相同部分にあたる配列も含めた配列番号1から11のうち少なくとも一つ、より好ましくはこれらの配列のうちC末端に近く、膜貫通ドメインの影響を受けにくいと考えられる配列番号9(それに対応する他種哺乳類の配列10, 11含む)に記載のアミノ酸配列からなるエピトープを認識する抗体が本発明の態様としてあげられる。

本発明の提供する抗体は、例えば配列番号1から11のうちいずれか1つに記載のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体でも良いし、精製やクローニングのコストを抑え感度を上げるためにこれらのエピトープを標的としたポリクローナル抗体でも良い。

10

【0016】

本発明の提供する抗体を作出するための方法としては、立体構造を保ったままで精製されたGPR30タンパク質を抗原として非ヒト哺乳動物に免疫し、これらの動物に抗体を産生させても良いし、人工的に合成した細胞外突出部分のアミノ酸配列からなるオリゴペプチド、好ましくは配列番号1から11のうち少なくとも一つに記載のオリゴペプチド、より好ましくは配列番号1, 3, 5及び9に記載のオリゴペプチドを抗原として非ヒト哺乳動物に免疫し、抗体を産生させても良い。抗体を産生させる非ヒト哺乳動物、抗体を回収する方法などは通常分子生物学において用いられる手法や動物を適宜利用すれば良く、本発明を限定するものではないが、例えば動物としてラット、マウス、ウサギ、ヤギなどがあげられ、モノクローナル抗体であれば免疫した動物の脾臓細胞、ポリクローナル抗体であれば血清から抗体を回収すれば良い。

20

また本発明の提供する抗体を用いたGPR30タンパク質の検出方法としては、例えば光学顕微鏡下における免疫染色や免疫電顕など細胞や組織に存在するGPR30タンパク質を特異的に検出する方法や、この抗体をイムノカラムの様な態様で用い、種々のタンパク質が混在する試料からGPR30タンパク質を特異的にふるい分けるといった方法があげられる。下記に本発明の実施例を示すが、本発明は実施例にのみ限定されるものではない。

【実施例】

【0017】

(GPR30発現ベクターの設計) ノルウェーラットGPR30遺伝子の全長は、非特許文献1で本発明者らが明らかにした配列を用いた。この全長DNAをプラスミドp3xFLAG-CMV10またはpCMV-GFP(Sigma-Aldrich Co., USA)に規定の方法に従って導入した。FLAGは特定の数アミノ酸からなるタグ配列(DYKDDDDK)で、この配列に対する抗体を用いることによってトランスフェクションした細胞内における導入遺伝子の発現を検出できる。プラスミドへの遺伝子導入は非特許文献2の方法に従った。

30

【0018】

(GPR30ベクターによるトランスフェクション) 前記で作製したベクターを、HeLa細胞、COS細胞、H9c2細胞(80% confluent in 35mm diameter dishes)に導入した。これらの細胞をPBS(Phosphate-buffered saline)で3回洗い、作製したプラスミドDNAとリポフェクタミン2000を適量含む調製溶液(Serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium)をそれぞれ100μlずつ準備した。両溶液を混合し、20分間静置した。その後混合溶液を細胞培養液に直接加え、37℃、5%CO₂の条件で48時間培養して、細胞にプラスミドを導入した。

40

【0019】

(抗GPRポリクローナル抗体の作製) ウサギ抗GPR30ポリクローナル抗体は、次の方法で作製した。GPR30のアミノ酸配列の中から、膜外突出部分に相当する配列番号1, 3, 5及び9の合成アミノ酸配列(165-175、294-306、328-342、352-370)をそれぞれウサギに注射し、抗血清を回収してイムノプロッティ

50

ングに用いた。これらの抗体のうち、配列番号9のアミノ酸配列に対する抗体については、アフィニティカラムを通して精製し、スピンカラムを用いて濃縮しその後の解析に用いた。

【0020】

(免疫染色) GPR30タンパク質に対する免疫染色は以下の方法で行った。対象とする細胞を4%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、固定後0.5%のTriton X-100で5分間処理した。これらの細胞を10%FBS(Fatal bovine serum, in PBS)で1時間ブロッキングし、ブロッキング後の細胞に対して3%BSA(Bovine serum albumin)を含む抗体溶液(in PBS)で24時間、4℃の温度条件にて処理を行った。処理後、細胞をPBSで洗って結合しなかった抗体を除去し、Alexa488でラベルされた抗マウスIgG及びAlexa594でラベルされた抗ウサギIgG抗体(in PBS, 3%BSA含有)で1時間、室温条件下で2次抗体処理を行った。抗体処理した細胞は、蛍光顕微鏡(IX70, Olympus, JPN)にCCDカメラ(Cool SNAP HQ, Roper Scientific, USA)を取り付けて観察した。撮影した画像はMetamorph software(Universal Imaging Co., USA)で解析した。

10

【0021】

(免疫組織科学的解析及び免疫電顕) GPR30タンパク質の組織科学的解析及び免疫電顕の観察のため、Wistar Rat(Japan SLC Inc., JPN)を実験動物として用いた。動物実験は全て、山口大学の関係ガイドライン及び日本国の関係法令に従って行った。通常の飼育条件で飼育したラットをペントバルビタールNa(65mg/kg, i.p.)で麻酔し、手術により脳を取り出し、固定液(0.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸、in 0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4)で固定した。単離した脳の海馬を含む部分を包埋し、ミクロトーム(VT1000S, LEICA)で30µmの厚さの切片を作製し、10%NGS(Normal goat serum, in PBS)で2時間ブレインキュベートした。これらの切片を漂白溶液(50%メタノール、1.5%過酸化水素)で1時間、4℃にて漂白した。更に切片を1%水素化ホウ素ナトリウムで1時間、前処理し、洗浄溶液(0.05%NGS、0.3%Triton X-100, in PBS)で洗った後、1:500に希釈したウサギ抗GPR30ポリクローナル抗体の反応溶液(1%NGS、1%ブロッキング溶液, in PBS)で3日間、20℃にて交差反応させた。1次抗体処理後の切片を1:500に希釈(1%NGS in PBS)したビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体(Dako Cytomation, DEN)で3時間、20℃の温度下で処理し、その後セイヨウワサビペルオキシダーゼとウサギ抗セイヨウワサビペルオキシダーゼ抗体複合体(PAP, Dako Cytomation, 1:500)及びペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Dako Cytomation, 1:500)の混合溶液(in PBS)で3時間、20℃で2次抗体処理した。処理後の切片を0.02%のDAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Wako, JPN)と0.6%のNickel ammonium sulfat hexahydrate(Sigma-Aldrich)を含む染色溶液(0.05M Tris-HCl, 0.00008% H₂O₂, pH7.6)で10-15分間、室温にて染色した。染色後、切片を後固定溶液(1%OsO₄ in 0.1Mリン酸緩衝液)で1時間処理し、更に2%酢酸ウランで1時間処理を行い、エタノールのシリーズで脱水を行って観察用とした。超薄切片については、包埋した海馬を含む組織をReichert-Jung Ultracut OmU4 ultramicrotomeを用いて切片とし、H-7500電子顕微鏡(Hitachi, JPN)にて80kVで観察した。

20

30

40

抗GPR30抗体の特異性を確認するための対照としては、(1)抗GPR30抗体を通常のウサギ血清で置き換えて処理、(2)1:500希釈した抗GPR30抗体溶液に

50

過剰な抗原（合成ペプチド）を加え24時間において抗体を完全に吸着させ、その後使用するという“Adsorption test”の2種類の方法で確認した。対照の切片においては、いかなる抗体反応を示すシグナルも観察されなかった。

【0022】

（抗GPR30抗体によるGPR30の局在の観察）上述の方法で作製したFLAG-GPR30ベクターを導入したHeLa細胞において、遺伝子導入から24時間後に今回作製した抗GPR30抗体及び抗FLAG抗体の両方を用いて抗原の局在を観察した。作製した抗GPR30抗体の中では、配列9で示したGPR30のC末端側のアミノ酸配列を抗原とした抗体が最も反応が良かったため、以後の解析はこの抗体を用いて行った。その結果、抗GPR30抗体、抗FLAG抗体とも細胞表層とのみ反応を示し、両者のシグナルは一致していた。図2に両抗体による染色の結果（色調を反転、 $\times 600$ ）を示す。図2aは抗GPR30抗体を用いた蛍光染色像で、矢印で示した細胞の表層部分にのみシグナルが観察された。図中NucはDAPIによる核染色像を示す。またX-X'で示した線分は図3におけるシグナル強度解析に用いた部分を示している。図2bは抗FLAG抗体を用いた染色像を示しており、aと同様細胞表層に強いシグナルが観察された。図2cはaとbを重ね合わせたもので、aで観察されたシグナルとbで観察されたシグナルの局在が一致していることを示している。

図3Aは、図2aにおける線分X-X'上のシグナルの強さをMetamorph softwareを用いて解析したグラフを示し、縦軸は蛍光強度を、横軸は線分上の位置（両端が線分の起点と終点）を表す。またこの結果を細胞膜周辺領域と細胞質内領域に分けて、それぞれの値を積み上げたものが図3Bである。両方の結果より、抗GPR30抗体の表すシグナルは、細胞質内には無く専ら細胞膜上に存在することが確認された。

【0023】

（エストロゲン刺激によるGPR30の活性化）GPR30タンパク質がエストロゲン刺激により活性化されるかどうかを確認するため、エストロゲン刺激による標的細胞の代表的な応答の一つである細胞質内へのカルシウムイオンの流入を指標とし、FLAG-GPR30タンパク質を多量に発現しているHeLa細胞とインサートとしてGPR30を持たない「空の」ベクターを導入したHeLa細胞とを比較した。それぞれの細胞をカルシウム指示薬であるFura-2AM（ $1\mu\text{M}$ ）で30分間ブレインキュベートし、そこにE2（ $100\mu\text{M}$ ）を加え、直後から10分後までの340nm吸光/380nm吸光の比を取ってカルシウムイオンの動態を調べた。図4はその結果を示しており、グラフ横軸はE2添加からの時間（矢印E2がE2の添加時点）、縦軸が340nm吸光/380nm吸光の比（平均値 $\pm$ SE, $n=3$, 値が大きいほどカルシウムイオンの流入が多い）を表している。グラフ「empty」が示すとおり、GPR30を発現していないHeLa細胞ではカルシウムイオンの流入がほとんど起こらず、対照的にGPR30を大量発現しているHeLa細胞ではE2添加後すみやかにカルシウムイオンの流入が起こっていることが示された。図4Bは、FLAG-GPR30を発現しているHeLa細胞における、E2添加によるシグナルの変化を示したものである。AではE2を添加せずに1時間インキュベートした細胞を、BではE2を添加して1時間インキュベートした細胞をそれぞれ4%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、0.5%Triton X-100で3分間処理した後、抗FLAG抗体とAlexa 488ラベル抗マウスIgG抗体で標識しその蛍光を観察した。図中矢印で示したFLAG-GPR30のシグナルは、E2の添加後1時間で非常に増大しており、GPR30がE2の刺激によってカルシウムイオンの流入を引き起こすのと同時に、正のフィードバック効果によって自身の発現量も増大させることが示された。

【0024】

（ラット脳組織におけるGPR30の局在）免疫電顕的手法を用い、ラット脳組織（海馬）におけるGPR30の局在を検討した。図6がその結果を示したものであり、図右下のバーは $1\mu\text{m}$ を表し、Nucは核を、Cytoは細胞質を示す。重ね矢頭で示した抗GPR30抗体を示すシグナル（電子密度の大きなスポットとして現れる）は、細胞と細胞

の境界部分に限定して点在しており、本抗体が認識するタンパク質が細胞膜に結合したタンパク質であることが電顕レベルでも明らかとなった。

以上の実施例から、本発明の提供する抗 G P R 3 0 抗体が、膜結合型のエストロゲン (E 2) 受容体タンパク質を特異的に認識する能力を持った抗体であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 2 5 】

本発明の提供する抗体を利用することにより、膜結合型のエストロゲン受容体として世界で初めて明らかになった G P R 3 0 タンパク質の細胞内における動態を追跡することが可能となり、女性ホルモン受容に関連した種々の疾患につき、その治療薬の創薬や病体解析に極めて有効なツールを提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図 1】本発明者らが明らかにしたノルウェーラット G P R 3 0 タンパク質のアミノ酸配列から予想される、G P R 3 0 の膜貫通構造を示す。

【図 2】F L A G - G P R を発現した H e L a 細胞における、抗 G P R 抗体及び抗 F L A G 抗体による免疫染色像を示す。

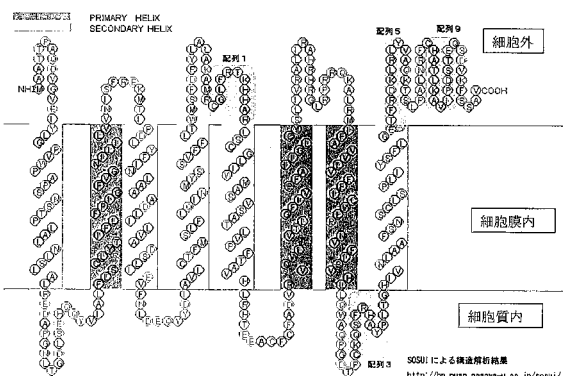
【図 3】図 2 a の X - X ' 線分上における蛍光シグナル強度を、数値化・グラフ化して示す。

【図 4】F L A G - G P R 3 0 遺伝子導入 H e L a 細胞と対照 H e L a 細胞における、エストロゲン E 2 添加の影響 (C a ²⁺ の流入) をグラフ化して示す。

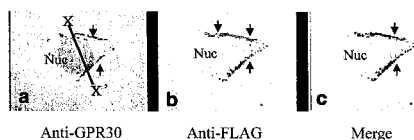
【図 5】F L A G - G P R 3 0 遺伝子導入 H e L a 細胞での、E 2 刺激前後における G P R 3 0 の局在の変化を示す。

【図 6】ラット脳組織における、抗 G P R 3 0 抗体を用いた免疫電顕像を示す。

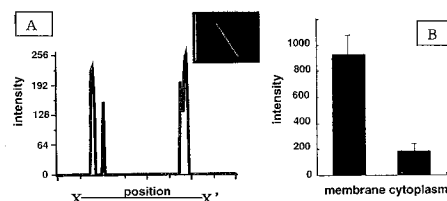
【図 1】



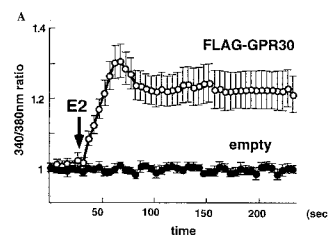
【図 2】



【図 3】



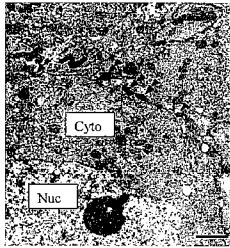
【図 4】



【図 5】



【 図 6 】



【 配 列 表 】

2008143795000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第1項適用申請有り 掲載期日：西暦2006年6月9日 掲載アドレス：http://www.sciencedirect.com/science?__ob=ArticleURL&__udi=B6WBK-4K4WG30-B&__user=949790&__handle=C-WA-A-ZC-ZC-MsSAYWB-UUW-U-U-ZC-U-U-AAZEUEEDBY-AAZZZYUCBY-AZWDBUAYV-ZC-U&__fmt=full&__coverDate=08%2F04%2F2006&__rdoc=38&__orig=browse&__srch=%23toc%236713%232006%23996539996%23626246!&__cdi=6713&view=c&__acct=C000049102&__version=1&__urlVersion=0&__userid=949790&md5=70e5d021e832d9e249a11481064cd61d

专利名称(译)	特异性识别哺乳动物雌激素受体的抗体及其制备方法		
公开(公告)号	JP2008143795A	公开(公告)日	2008-06-26
申请号	JP2006329704	申请日	2006-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人山口大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人山口大学		
[标]发明人	水上洋一		
发明人	水上 洋一		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.D C07K7/06 C07K7/08		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/FA71		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性识别细胞膜上存在的雌激素受体（GPR30）的抗体及其生产方法。 解决方案：通过用GPR30的特定氨基酸序列（优选由对应于膜外暴露区域的11至15个氨基酸组成的表位的氨基酸序列）免疫非人类哺乳动物而获得的抗体及其抗体， 制造方法。 此外，提供了使用该抗体检测GPR30的方法。 作为抗体，使用多克隆抗体。 [选择图]图4

