

(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2009-278908

(P2009-278908A)

(43) 公開日 平成21年12月3日(2009.12.3)

(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 D	4 B O 6 5
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 A	4 H O 4 5
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 1 5 A	
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 11 O L (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-133880 (P2008-133880)	(71) 出願人	306037311
(22) 出願日	平成20年5月22日 (2008. 5. 22)		富士フイルム株式会社
			東京都港区西麻布2丁目26番30号
		(71) 出願人	504137912
			国立大学法人 東京大学
			東京都文京区本郷七丁目3番1号
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	上田 宏
			東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大
			学法人東京大学内
		(72) 発明者	伊原 正喜
			東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大
			学法人東京大学内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗オステオカルシン抗体及びそれを用いた免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】オステオカルシンの高感度な免疫測定を可能とする新規な抗オステオカルシン抗体、並びに当該抗体を用いたオステオカルシンの高感度な免疫測定方法を提供することを解決すべき課題とした。

【解決手段】抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列に少なくとも1以上のアミノ酸変異を導入することにより得られるアミノ酸配列からなりペプチドであって、オープンサンドイッチ免疫分析におけるオステオカルシンの検出感度が、上記アミノ酸変異の導入前のペプチドを用いた場合よりも向上していることを特徴とする、上記ペプチド。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列に少なくとも 1 以上のアミノ酸変異を導入することにより得られるアミノ酸配列からなりペプチドであって、オープンサンドイッチ免疫分析におけるオステオカルシンの検出感度が、上記アミノ酸変異の導入前のペプチドを用いた場合よりも向上していることを特徴とする、上記ペプチド。

【請求項 2】

抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列において、少なくとも 1 以上の下記変異を有するアミノ酸配列からなるペプチド。

（1）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の10番目のアミノ酸残基がバリンである変異；

（2）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の31番目のアミノ酸残基がセリンである変異；

（3）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の37番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

（4）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の58番目のアミノ酸残基がトレオニンである変異；

（5）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の69番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

（6）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の82番目のアミノ酸残基がアルギニンである変異；

【請求項 3】

下記の何れかのペプチド。

（a）配列番号 2 に示す抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列において、少なくとも 1 以上の下記変異を有するアミノ酸配列からなるペプチド。

（1）配列番号 2 に示すアミノ酸配列の10番目のアミノ酸残基がバリンである変異；

（2）配列番号 2 に示すアミノ酸配列の31番目のアミノ酸残基がセリンである変異；

（3）配列番号 2 に示すアミノ酸配列の37番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

（4）配列番号 2 に示すアミノ酸配列の58番目のアミノ酸残基がトレオニンである変異；

（5）配列番号 2 に示すアミノ酸配列の69番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

（b）上記（a）に記載のペプチドのアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に認識できるペプチド。

【請求項 4】

下記の何れかのペプチド。

（a）配列番号 5 から 7 の何れかに記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

（b）配列番号 5 から 7 の何れかに記載のアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に認識できるペプチド。

【請求項 5】

下記の何れかのペプチド。

（a）配列番号 8 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

（b）配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に

10

20

30

40

50

認識できるペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 の何れかに記載のペプチドをコードする核酸。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸を含む、組み換えベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 から 5 の何れかに記載のペプチドを含む、オステオカルシン検出試薬。

【請求項 10】

請求項 1 から 5 の何れかに記載のペプチド、及び抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域 (VL) のアミノ酸配列からなるペプチドを少なくとも含む、オステオカルシン検出キット。

【請求項 11】

請求項 1 から 5 の何れかに記載のペプチドと被験試料とを接触させることを含む、オステオカルシンの免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オープンサンドイッチ免疫測定に適した抗オステオカルシン抗体、及びそれを用いたオステオカルシンの免疫測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

わが国の骨粗しょう症患者は、現在、女性が約800万人、男性が約200万人の合計1000万人と推定され、この数字は高齢化に伴い増加していくと考えられる。重度の骨粗しょう症患者は寝たきりを余儀なくされるために、定期的な診断による早期発見が重要である。骨粗しょう症のマーカー分子として、オステオカルシン (Bone Gla Protein (BGP)) と呼ばれるアミノ酸49残基、分子量5900のビタミンK依存性カルシウム結合蛋白質が知られている。BGPは骨代謝回転 (特に骨形成) と密接な関係があり、血中濃度を測定することにより、骨の代謝異常あるいは治療効果の指標となる。これまで、BGP検出は免疫測定が主流であったが (特許文献1～5)、サンドイッチ法を用いていたためにBGP分解物 (ペプチド) の測定は不可能であった。BGPは血液中で分解を受けるために、正確な骨代謝回転を評価するためには、BGPペプチドでの定量が望ましい (非特許文献1)。ペプチドの検出には、競合法による免疫測定法が適応可能であるが、血中BGP濃度は一ミリリットル当たり数ナノグラムと低いために、感度や再現性が問題となる。

【0003】

近年、オープンサンドイッチ (OS) 法と呼ばれる新しい免疫測定法による、非競合のBGP-C末端ペプチド測定法が開発された (非特許文献2)。オープンサンドイッチ (OS) 法とは、抗原を特異的に認識する抗体のV_H領域ポリペプチドおよびV_L領域ポリペプチドを調製し、一方のポリペプチドをレポーター分子で標識して標識化ポリペプチドとし、他方のポリペプチドを固相に固定して固定化ポリペプチドとし、抗原含有試料および標識化ポリペプチドを固相に接触させ、固定化ポリペプチドに結合した標識化ポリペプチドのレポーター分子の量を測定する方法である。OS法は、V_HとV_Lが抗原存在下において会合定数が増加する現象を利用した非競合免疫測定法であり、競合法よりも高い感度が得られるという利点を有する。すでに、抗BGP抗体であるKTM219を用いて、OS法によるBGP測定を行い、血中濃度と同程度の検出感度が得られている。しかし、実用化にはさらなる感度が求められている。

【0004】

【非特許文献1】 Bone 31, 2002, 62-69

【非特許文献2】 Anal. Chem. 79 (16), 6193-6200 (2007)

10

20

30

40

50

【特許文献1】特開2007-45834号公報

【特許文献2】特開平9-329600号公報

【特許文献3】特開平6-289020号公報

【特許文献4】特開平6-78788号公報

【特許文献5】特開平7-55804号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従来のBGP定量では、サンドイッチ法によって行われていたために、ほぼ全長のBGPの検出のみ可能であった。しかし、血中に放出されたBGPはプロテアーゼによる分解を受けて一部が検出不可能なペプチドとなるために、被験者のプロテアーゼ活性が高い場合には、血中濃度が低く見積もられる可能性があるという問題があった。一方で、ペプチドの定量には、質量分析や高速液体クロマトグラフィーなどの機器分析や競合法による免疫測定法が利用されている。しかし、機器分析では、血清中に含まれる多様な成分の中から様々な長さを持つBGPペプチドを同定することは困難であり、また高価な機器を必要とするといった問題がある。また、競合法による免疫測定法では感度に問題がある。OS法による免疫測定法では、BGPペプチドの非競合的免疫測定法が可能であり、感度においても競合法より優れており、また高価な装置も必要とせず、簡易迅速診断が可能である。これまで、抗BGP抗体、KTM219を用いたOS免疫測定系が開発され、正常な血中BGP濃度と同程度の検出感度（約1 ng/ml）が得られている。しかしながら、実用化を考えた場合、更なる高感度化が必要であった。即ち、本発明は、オステオカルシン(BGP)の高感度な免疫測定を可能とする新規な抗オステオカルシン抗体、並びに当該抗体を用いたオステオカルシンの高感度な免疫測定方法を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0006】

これまでに抗BGP抗体KTM219のVH及びVLを用いたオープンサンドイッチELISAが報告され、BGPペプチドの非競合的検出が可能となった（文献Lim et al. Anal.Chem. 79, 6193 (2007)）。今回、BGPに対するオープンサンドイッチELISAの検出感度の向上を目指し、エラープローンPCRによってVH遺伝子断片にランダム変異を導入したVH(BGP)ライブラリーを製作した。VH(BGP)ライブラリーは、スクリーニングを効率化するために、ファージミドベクターに組み込み、ヘルパーファージとともに大腸菌に導入することで、バクテリオファージ粒子表面にVHが融合されたファージライブラリーとして発現させた。スクリーニングでは、大腸菌由来マルトース結合蛋白質（MBP）との融合蛋白質として発現され、さらにビオチン化修飾されたVL、及び抗原（BGPペプチド）にファージライブラリーを混合し、強い複合体を形成したVH提示ファージを、ストレプトアビジン固定化ビーズを使って回収した。上記の通り、VHにランダム変異を導入しセレクションを行った結果、OS-ELISA測定系での感度が約0.1 ng/mlにまで向上した変異体O2AG2（VHにN31S、V37I、S58T、H82Rの4つの変異を有する）、O2AH2（VHにE10V、T69Iの2つの変異を有する）、single mutant（VHにV37Iの変異を有する）、及びtriple mutant（VHにV37I、S58T、H82Rの3つの変異を有する）を得るにいたった。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

【0007】

即ち、本発明によれば、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列に少なくとも1以上のアミノ酸変異を導入することにより得られるアミノ酸配列からなりペプチドであって、オープンサンドイッチ免疫分析におけるオステオカルシンの検出感度が、上記アミノ酸変異の導入前のペプチドを用いた場合よりも向上していることを特徴とする、上記ペプチドが提供される。

【0008】

本発明によればさらに、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列において、少なくとも1以上の下記変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドが提供される。

10

20

30

40

50

(1) Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の10番目のアミノ酸残基がバリンである変異；

(2) Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の31番目のアミノ酸残基がセリンである変異；

(3) Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の37番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

(4) Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の58番目のアミノ酸残基がトレオニンである変異；

(5) Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の69番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

10

(6) Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の82番目のアミノ酸残基がアルギニンである変異；

【0009】

本発明によればさらに、下記の何れかのペプチドが提供される。

(a) 配列番号2に示す抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列において、少なくとも1以上の下記変異を有するアミノ酸配列からなるペプチド。

(1) 配列番号2に示すアミノ酸配列の10番目のアミノ酸残基がバリンである変異；

(2) 配列番号2に示すアミノ酸配列の31番目のアミノ酸残基がセリンである変異；

(3) 配列番号2に示すアミノ酸配列の37番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

20

(4) 配列番号2に示すアミノ酸配列の58番目のアミノ酸残基がトレオニンである変異；

(5) 配列番号2に示すアミノ酸配列の69番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

(b) 上記(a)に記載のペプチドのアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に認識できるペプチド。

【0010】

本発明によればさらに、下記の何れかのペプチドが提供される。

30

(a) 配列番号5から7の何れかに記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号5から7の何れかに記載のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に認識できるペプチド。

【0011】

本発明によればさらに、下記の何れかのペプチドが提供される。

(a) 配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に認識できるペプチド。

40

【0012】

本発明によればさらに、上記した本発明のペプチドをコードする核酸が提供される。

本発明によればさらに、上記した本発明の核酸を含む、組み換えベクターが提供される。

。

本発明によればさらに、上記した本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

【0013】

本発明によればさらに、上記した本発明のペプチドを含む、オステオカルシン検出試薬

50

が提供される。

本発明によればさらに、上記した本発明のペプチド、及び抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列からなるペプチドを少なくとも含む、オステオカルシン検出キットが提供される。

本発明によればさらに、上記した本発明のペプチドと被験試料とを接触させることを含む、オステオカルシンの免疫測定方法が提供される。

【発明の効果】

【0014】

本発明の抗体をオープンサンドイッチELISAに用いた場合、検出感度が、従来の抗BGP抗体であるKTM219よりも10倍程度向上した。その結果、正常人の血中BGP濃度の下限値以下の約0.1ng/mlの抗原に対しても十分な感度を得られるようになり、再現性の高い実用的なBGPペプチド診断キットを提供することができる。さらに血中BGP濃度は、変形性骨炎、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、悪性腫瘍の骨転移、多発性骨髄腫、慢性関節リウマチなどによっても増加するが、副甲状腺機能低下症、甲状腺機能低下症、クッシング症候群などでは逆に血中濃度の低下が誘発されることが明らかになっている。従来のサンドイッチ法では測定可能な濃度域が二桁程度であったために、低濃度側と高濃度側に測定可能域を調節した2つの測定系が必要であった。しかしながら、本発明による高感度化によって、オープンサンドイッチ法の測定可能域が0.1~1000ng/mlへと拡張されたことで、骨粗しょう症患者とクッシング症候群患者を同じ測定系で診断することが可能になった。また、本発明のオープンサンドイッチ測定系を用いることで、BGP分解物の高感度定量が可能になったことから、分解物と未分解BGPの両者を合わせた全BGP定量が可能となるだけでなく、限外ろ過膜などによって分離した分解物と未分解物をそれぞれ定量することで、血中内BGP分解速度などを評価することも可能になり、基礎医学研究分野においても有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

本発明のペプチドは、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）に相当するペプチドであり、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列に少なくとも1以上のアミノ酸変異を導入することにより得られるアミノ酸配列からなりペプチドであって、オープンサンドイッチ免疫分析におけるオステオカルシンの検出感度が、上記アミノ酸変異の導入前のペプチドを用いた場合よりも向上していることを特徴とする。

【0016】

本発明のペプチドの具体例としては、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列において、少なくとも1以上の下記変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドである。

（1）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の10番目のアミノ酸残基がバリンである変異；

（2）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の31番目のアミノ酸残基がセリンである変異；

（3）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の37番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

（4）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の58番目のアミノ酸残基がトレオニンである変異；

（5）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の69番目のアミノ酸残基がイソロイシンである変異；

（6）Kabatの番号付け系で上記 VHのアミノ酸配列の82番目のアミノ酸残基がアルギニンである変異；

【0017】

Kabatの番号付け系とは、Kabat らによるEUインデックス（Kabat et. al., Sequences

10

20

30

40

50

of proteins of Immunological Interest, NIH, 1991 Fifth edition) による番号付け系を示す。

【0018】

本発明で用いることができる抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域 (VH) のアミノ酸配列の一例としては、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を挙げることができる。また、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなり、かつ抗オステオカルシン抗体の軽鎖可変領域 (VL) のアミノ酸配列からなるペプチドとともにオステオカルシンを特異的に認識できるペプチドを用いることもできる。

【0019】

本発明において「1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列」における「数個」とは、具体的には 1～20 個、好ましくは 1～10 個、更に好ましくは 1～5 個、特に好ましくは 1～3 個、最も好ましく 1 又は 2 個である。

【0020】

本発明のペプチドは、当該ペプチドをコードする核酸を発現ベクターに組み込み、ベクターを適当な宿主細胞に導入し、細胞もしくは細胞の培養上清から回収、精製することにより得ることができる。ベクターとしては、宿主細胞で自律的に増殖できるか、又は宿主細胞の染色体に組み込まれ得るファージ又はプラスミドを使用することができる。プラスミド DNA としては、大腸菌、枯草菌又は酵母に由来するプラスミドなどを用いることができ、ファージ DNA としては λ ファージ等が挙げられる。また、本発明においては、ファージミドベクターを使用することは好適である。ファージミドベクターは繊維状ファージゲノムの一部を含むようにして作製されたプラスミドであるために、ファージミドベクターを用いて大腸菌を形質転換した後、更にヘルパーファージに感染させる必要がある。これによって粒子形成のためのコート蛋白質が供給されて、ヘルパーファージ粒子とファージミド粒子が混合したファージが得られる。またより簡便な方法として、必要な DNA 配列を含むファージベクターを利用することもまた可能である。ファージベクターの場合には、当該ファージベクターを大腸菌に感染させることによって直接ファージを得ることが可能であり、ヘルパーファージを使用する必要はない。

【0021】

形質転換に使用する宿主としては、例えば、細菌 (大腸菌など)、酵母、動物細胞 (COS 細胞、CHO 細胞等)、昆虫細胞などを挙げることができるが、本発明のペプチドを発現できるものであれば特に限定されるものではない。宿主の形質転換の方法も特に限定されず、例えば、リン酸カルシウム方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リポフェクション法などが挙げられ、また各種市販のトランスフェクション試薬を用いて行うこともできる。

【0022】

形質転換体を培養後、本発明のペプチドが細胞内に生産される場合には、細胞を破碎することにより本発明のペプチドを回収することができる。また、本発明のペプチドが細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により細胞を除去する。その後、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロースなどを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用いることによって、本発明のペプチドを単離精製することができる。

【0023】

本発明においては、上記した本発明のペプチド (即ち、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域 (VH)) と被験試料とを接触させることによって、オステオカルシンを免疫学的

に測定することができる。例えば、抗オステオカルシン抗体の重鎖可変領域（VH及び軽鎖可変領域（VL）をコードする遺伝子を有するベクターを宿主細胞に導入し、宿主細胞外に分泌された抗体可変領域のVH断片又はVL断片の一方を含むタンパク質及び抗体可変領域のVH断片又はVL断片の他方を提示するファージを回収し、回収された抗体可変領域のVH断片又はVL断片の一方を含むタンパク質、及び抗体可変領域のVH断片又はVL断片の他方を提示するファージに、抗原を接触させて、VH断片、VL断片及び抗原の複合体を検出することによって、VHポリペプチドとVLポリペプチド間の相互作用を評価することができる。VH断片、VL断片及び抗原の複合体検出は、以下に説明するオープンサンドイッチイムノアッセイで行うことができる。

【0024】

蛋白質性の抗原は、サンドイッチ法と呼ばれる2種類の抗体を使う方法で測定されることが一般的である。サンドイッチ法は、抗原に同時に結合できる2種類の抗体を用意する必要があるが、特異性と感度が高いという利点を有している。しかし、分子量1000以下の小分子は小さすぎて、2種類の抗体でサンドイッチすることが困難である。即ち、分子量1000以下の小分子は抗原決定基が一つしかない単価抗原であるため、2種類の抗体でサンドイッチすることが困難となる。そのためこのような小分子は通常、競合法と呼ばれる方法で測定される。しかし競合法は、条件設定が難しく、感度が低い、測定操作にかなりの注意深さが必要、といった難点を有している。

【0025】

このような欠点のない、小分子でも非競合的に測定できる方法として、本発明者らは、オープンサンドイッチイムノアッセイという免疫測定法を報告している。この方法は基本的に、「抗体の可変領域（抗原結合部位）は抗原がないと不安定だが、抗原が結合すると安定化される」という原理を利用した方法である。抗体はH鎖とL鎖の2本の鎖で構成されるが、それぞれの抗原結合部位はVH、VLと呼ばれこれらが抗原を認識できる最小単位である可変領域Fvを構成する。最近ではファージ提示法などを用いて容易にVHとVLをコードする遺伝子断片をクローニングすることができるが、VHとVLの間の結合は非共有的で多くの場合不安定であり、これらをペプチドで結んで一本鎖抗体(scFv)として使われる場合がほとんどである。

【0026】

本発明者らは、この不安定なFvが、抗原が結合すると安定化する場合があり、それを利用すれば抗原濃度を簡便かつ迅速に、さらに感度よく測定できることを見出した。すなわち、VL断片をプレートに固定化しておき、これにVH断片にファージあるいはアルカリフォスファターゼを結合させたものと抗原を含むサンプルとを混ぜて一回洗浄した後にプレートに固定化されたファージあるいは酵素の量を測定すれば、それば抗原量と非常により相関を示すことを見いだしている(UEDA, H. et al. Nature Biotechnol. 14, 1714-1718(1996))。

【0027】

本発明によれば、例えば以下のような測定キットを作製することが可能である。

(1) 抗オステオカルシン抗体のVL断片をビオチン・アビジン相互作用を利用して、または物理的吸着を利用してチューブあるいはマイクロプレートに固定化する。

(2) 抗オステオカルシン抗体のVH断片とレポーター酵素（例えばアルカリフォスファターゼ）との融合蛋白質を作製しておき、これをサンプルと共にVLを固定化した固相と一定時間接触させる。

(3) 洗浄後、固相化された酵素活性を測定し、サンプル中の抗原濃度の指標とする。

【0028】

また、以下の測定キットを作製することも可能である。

(1) 抗オステオカルシン抗体のVH断片とVL断片を互いに吸収・蛍光スペクトル重なる2種類の蛍光色素（例えばフルオレセインとローダミン）で標識しておく。

(2) これらをサンプルと混合し、5分程度おいて短波長側の蛍光色素のみを励起光で励起する。2種類の蛍光色素由来の蛍光強度を測定することで、VH/VLの会合による蛍

10

20

30

40

50

光エネルギー移動現象を検出することができる。二つの蛍光強度の比をサンプル中の抗原濃度の指標とする。この方法では前の方法に比べて、短時間で洗浄操作なしに抗原濃度が測定できる。

【0029】

また、以下の測定キットを作製することもまた可能である。

(1) 抗オステオカルシン抗体のVH断片とVL断片を、それぞれ単体では活性がないか、低いと近接させると活性の増大する二種類の酵素断片（例えばLacZ $\Delta\alpha$ およびLacZ $\Delta\omega$ ）との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製しておく。

(2) 二種類の融合蛋白質とサンプルを混合し、一定時間おいたのち基質（例えば発光基質Galacton Plus, Tropix, Bedford, MA）と混合し、融合蛋白質複合体の活性を測定することでサンプル中の抗原濃度の指標とする。この方法では、前の2つの方法に比べてはるかに高感度に抗原濃度を測定することが可能であり、また洗浄操作を含まない。

【0030】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0031】

以下の実施例で使われる略語は以下の通りである。

2YT: 1.6%バクトトリプトン、1% イーストエクストラクト、0.5% NaClを含む培地

2YTAG: 100 μ g/mlアンピシリン及び 1% グルコースを含む2YT

2YTAK: 100 μ g/mlアンピシリン、50 μ g/mlカナマイシン及び 0.1% グルコース を含む2YT

2YTAGプレート: 100 μ g/ml アンピシリン及び 1% グルコース を含む2YT寒天培地

LB: 1%バクトトリプトン、0.5% イーストエクストラクト、0.5% NaClを含む培地

LBAC: 100 μ g/mlアンピシリン及び 34 μ l/mlクロラムフェニコールを含むLB

LBACプレート: 100 μ g/mlアンピシリン及び 34 μ l/mlクロラムフェニコールを含むLB寒天培地

LBAG: 100 μ g/mlアンピシリン及び 1% グルコースを含むLB

LBAGプレート: 100 μ g/mlアンピシリン及び 34 μ l/mlクロラムフェニコール、1% グルコースを含むLB寒天培地

LBAGプレート: 100 μ g/mlアンピシリン及び 1% グルコースを含むLB寒天培地

SOC: 2%バクトトリプトン、0.5% イーストエクストラクト、0.05% NaCl、2.5 mM KCl、20 mMグルコース、10 mM MgCl₂を含む培地

PBS: 137 mM NaClと2.7 mM KClを含む10 mM phosphate buffer(pH 7.2)

2% MPBS: 2%(w/v)スキムミルクを含むPBS

5% IBPBS: 5%(v/v)イムノブロック（大日本住友製薬、大阪）を含むPBS

20% IBPBS: 20%(v/v)イムノブロックを含むPBS

PBST: 0.1% triton-X100を含むPBS

TE: 1 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl(pH 8.0)

TAEバッファ: 1 mM EDTAを含む40mM Tris-acetate(pH 8.3)

TALONバッファ: 300 mM NaClを含む50 mMリン酸ナトリウム (pH7.0)

TALON溶出液: 500 mMイミダゾールを含むTALONバッファ(pH7.0)

IPTG: イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド

PCIA: フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール (25:24:1) の混合物

PEG/NaCl: 20% Polyethylene glycol 6000、2.5 M NaCl

DMSO: ジメチルスルホキシド、dimethyl sulfoxide

BGPC8: BGPのC末端8アミノ酸残基からなる合成ペプチド（アミノ酸配列: YRRFYGPV）

【0032】

すべての実験において、Milli-Q (Millipore Co., Billerica, MA)にて精製した水を用いた。以下、milliQ水と表記する。通常の試薬は特に表記のあるもの以外は、シグマ(St.

Louis, MO)、ナカライテスク(京都)、和光純薬(大阪)、関東化学(東京)のものを使用した。オリゴDNAはテキサスジェノミクスジャパン(東京)、またはInvitrogen(東京)にて合成した。

Polymerase chain reaction (PCR)には、T3000 thermocycler (Biometra, Goettingen Germany)を、DNA配列決定には、CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA)を使用した。

【0033】

大腸菌TG-1及びBL21(DE3)(pLysS)の遺伝子型は以下の通り。

TG-1: supE, hsd Δ 5, thi, Δ (lac-proAB)/F' [traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ Δ M15]

BL21(DE3)(pLysS): F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻), gal(λ cI 857, ind1, Sam7, nin5, lacU V5-T7gene1), dcm(DE3) [pLysS, Cam^r] 10

【0034】

PCRに用いたプライマー配列を以下に示す。

M13RV: 5'-caggaaacagctatgac-3' (配列番号9)

VH1for2Not : 5'-ctcatgcgccgctgaggagacgggtgaccgtgggtccc-3' (配列番号10)

pHENseq: 5'-ctatgcgcccccattca-3' (配列番号11)

【0035】

実施例1: MBP-VLの調製

MBP-VLは、プラスミドpMAL-VL(文献Lim et al. Anal.Chem. 79, 6193 (2007)参照)を大腸菌BL21(DE3)(pLysS)にヒートショック法で形質転換し、発現させた。プラスミド1 μ l (約100 ng)とBL21(DE3)(pLysS)コンピテントセル100 μ lを混合し氷上30min静置した後、42°C 45秒ヒートショックしすぐに2分氷上静置した。その後、SOC培地200 μ lを加え30分キュアリングし、LBACプレートに塗布して37°Cで一晩培養した。 20

【0036】

生じたコロニーを4 mlのLBACGに植菌し、30°Cで一晩振とう培養を行った。少量培養した培養液4mlを1000 mlのLBACに加え、30°Cで振とうし大量培養を行った。O.D.が0.5~0.6になったところで1000 mM IPTG 400 μ lを加え、さらに16°Cで一晩時間振とう培養した。菌体培養液を遠心分離機でそれぞれ上清と大腸菌のペレットに分離した後、上清からは硫安沈殿法で、ペレットからは超音波菌体破碎で、それぞれMBP-VLを以下のように回収した。 30

【0037】

上清約1000 mlに硫安430gを加えて、4°Cで一晩攪拌した後、遠心分離によってMBP-VLを含む不溶物を回収し、30 mlのTALON バッファーに懸濁した。ペレットは、30 mlのTALON バッファーに懸濁し、ふた付50 ml遠沈チューブに移して、ソニケーターで菌体破碎し、遠心分離によってMBP-VLを含む上清を回収した。

【0038】

上記で得られたMBP-VLを含む溶液は、TALONバッファーに対して透析した後、TARON affinity resin (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) 600 μ lに加えた。4°C、20分間ローテーターで攪拌した後、約2,000 gの遠心分離によってresinを回収し、さらにTALONバッファーを加えて10分間攪拌した後同様にresinを回収した。その後、TALON 溶出液を加えて、MBP-VLを含む上清を回収した後、PBSにバッファー交換し16%グリセロールで-80°C保存した。発現精製した蛋白はSDS-PAGEより確認を行った。 40

【0039】

実施例2: MBP-VLのビオチン化

精製した1 mlのMBP-VL溶液(PBSバッファー、500 μ g/ml)に対して、17.9 μ lのビオチン化試薬(PEO₄-Biotin (PIERCE Biotechnolgy, Rockford, IL))を加えて、4°Cにて2時間反応を行った。反応後、透析を行うことで未反応のビオチン試薬を除去した。

【0040】

実施例3: 野生型VH(BGP)をコードするファージミドベクターの調製

まず、spFv(BGP)9A/pKST2(文献Lim et al. Anal.Chem. 79, 6193 (2007)参照)を鋳型と 50

してPCRを行い、抗BGP抗体KTM219のVH断片を調製した。
PCRの条件は、以下の通りである。

【0041】

反応液組成

spFv(BGP)9A/pKST2 (約100 µg/ml)	1 µl	
フォワードプライマーVH1for2Not (50 µM)	1 µl	
リバープライマーM13RV (50 µM)	1 µl	
10x Ex taq buffer (Mg ²⁺ 20 mM) (Takara bio, 大津)	10 µl	
dNTP Mixture (2.5 mM each) (Takara bio)	8 µl	
5 U/µl Ex Taq DNA polymerase (Takara bio)	1 µl	10
milliQ 水	78 µl	

【0042】

反応サイクル

- 1、94℃ 5 min
- 2、94℃ 30 sec
- 3、55℃ 30 sec
- 4、72℃ 30 sec
- (2から4を25回)
- 5、72℃ 10 min
- 6、16℃ ∞

【0043】

PCR産物(VH(BGP))は、1.5%アガロースゲル(TAEバッファー)で電気泳動した後、400bp付近のバンドを切り出して、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Co., Madison, WI)を用いて抽出した。続いて、Nco I及びNot Iサイトで切断するために、得られた100 µlのVH断片(2 µg)に、1 µl Nco I (RocheApplied Science, Basel, Switzerland, 10 U)、1 µl Not I (Roche Applied Science 10 U)、4 µl 10x BSA溶液、4 µl 10x Hバッファー (Roche Applied Science)、15 µl milliQ水を添加し、37℃で一晩静置した。制限酵素処理されたVH断片は、上記と同様にアガロースゲル電気泳動、DNA抽出を行い、25 µlのmilliQ水に溶解した。VH断片(約100 µg/ml)とpIT2ベクター(約870 µg/ml、MRC Cambridge)を、それぞれ2 µl混合し、2.5 µl T4 DNA ligase (Takara bio, 1250 U)、10 µl 10xT4 buffer (Takara bio)、83 µl milliQ水を添加して、16℃にて一晩反応させた。制限酵素を完全に失活させるために等量のPCIAと混合した後、DNAを含む上清(74 µl)を回収し、7.4 µlの3 M酢酸ナトリウムと148 µlのエタノールを加えて、-80℃で20分静置、11,600 g 4℃ 20分の遠心分離の後、得られた沈殿を70% エタノールで洗浄し、乾燥後20 µlのmilliQ水に懸濁した。続いて、100 µlのエレクトロポレーション用TG-1コンピテントセルに対して4 µlのライゲーション反応液を加え、電気穿孔法によってライゲーション産物を細胞内に導入した後、直ちにSOC 900 µlを添加し、37℃にて30分間インキュベーションを行った。その後2YTAGプレートに塗布し、一晩37℃で培養して得られたコロニーを4 mlの2YTAGで一晩培養し、遠心分離によって集菌した大腸菌からQIAquick miniprep kit(Qiagen, Hilden, Germany)にてプラスミドDNAを抽出し、Beckman Coulter社のプロトコールに従ってシーケンス決定を行い、図1の遺伝子構造を確認した。

【0044】

実施例4：ライブラリーの作製

spFv(BGP)9A/pKST2を鋳型としてエラーブローンPCRを行い、ランダム変異が導入された抗BGP抗体KTM219のVH断片を調製した。

エラーブローンPCRの条件は、以下の通りである。

【0045】

反応液組成

spFv(BGP)9A/pKST2 (約100 µg/ml)	2 µl	50
--------------------------------	------	----

フォワードプライマー-VH1for2Not (50 μM)	2 μl	
リバースプライマー-M13RV (50 μM)	2 μl	
10x Ex taq buffer (Mg ²⁺ free) (Takara bio)	20 μl	
10 mM MnCl ₂	10 μl	
100 mM dATP	0.7 μl	
100 mM dCTP	0.8 μl	
100 mM dGTP	0.4 μl	
100 mM dTTP	2.7 μl	
2% Triton-X100	10 μl	
5 U/μl Taq DNA polymerase (Takara bio)	3.2 μl	10
milliQ 水	141.2 μl	

【0046】

反応サイクル

1、94℃ 5 min

2、94℃ 1 min

3、55℃ 1 min

4、72℃ 1 min

(2から4を30回)

5、72℃ 10 min

6、16℃ ∞

20

【0047】

PCR産物(VH(BGP)ライブラリー)は、1.5%アガロースゲル(TAEバッファー)で電気泳動した後、400bp付近のバンドを切り出して、Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて抽出した。続いて、Nco I及びNot Iサイトで切断するために、得られた100 μlのVH(BGP)ライブラリー(11 μg)に、4 μl Nco I (Roche Applied Science 40 U)、4 μl Not I (Roche Applied Science 40 U)、15 μl 10x BSA溶液、15 μl 10x Hバッファー (Roche Applied Science)、12 μl milliQ水を添加し、37℃で一晩静置した。制限酵素処理されたVH(BGP)ライブラリーは、上記と同様にアガロースゲル電気泳動を行い、DNA抽出を行った。さらにVH(BGP)ライブラリー溶液72 mlは、上記と同様にPCIA処理、エタノール沈殿を行った後、15 μl milliQに溶解した(収量 4.35 μg)。

30

【0048】

VH(BGP)ライブラリーを組み込むベクターは、以下の通り作製した。

まず、pIT2(66 μg, 200 μl)のNco I及びNot I処理を行った。また、セルフライゲーションによる寄与を軽減させる目的で、Nco IとNot I間に含まれるXho Iサイトでの切断も同時に行った。制限酵素処理は、10 μl Nco I (Roche Applied Science 100 U)、3 μl Not I (Roche Applied Science 120 U)、3 μl Xho I (Roche Applied Science 40 U)、30 μl 10x BSA溶液、30 μl 10x Hバッファー (Roche Applied Science)、19 μl milliQ水を添加し、37℃で6時間静置した。処理後は、上記と同様に、アガロースゲル電気泳動、DNA抽出、PCIA処理、エタノール沈殿を行い、26 μgの制限酵素処理ベクターを得た。

【0049】

40

VH(BGP)ライブラリーとpIT2ベクターのライゲーション反応と形質転換は、以下の通り行った。

VH(BGP)ライブラリー(290 μg/ml)とpIT2ベクター(870 μg/ml)を、それぞれ2.3、2.1 μlもしくは2.3、6.9 μl混合し、2.5 μl T4 DNA ligase (1250 U)、10 μl 10xT4 buffer、83 μl milliQ水を添加して、16℃にて一晩反応させた。その後、上記と同様に、PCIA処理、エタノール沈殿を行い、20 μlのmilliQ水に懸濁した。続いて、100 μlのエレクトロポレーション用TG-1コンピテントセルに対して4 μlのライゲーション反応液を加え、電気穿孔法によってライゲーション産物を細胞内に導入した後、直ちにSOC 900 μlを添加した。同じ操作を合計5回繰り返し、すべて混合した後、37℃にて30分間インキュベーションを行った。その後、一部をサンプリングして、残りにDMSO 377 μlを加えて-80

50

℃にて保存した。サンプリングした形質転換体を2YTAGプレートに塗布し、一晚37℃の培養で得られたコロニー数から、形質転換体は合計 1.3×10^8 クローン得られたことが見積もられた。またいくつかのコロニーを4 mlの2YTAGで一晩培養し、遠心分離によって集菌した大腸菌からQIAquick miniprep kitにてプラスミドDNAを抽出し、シーケンスを決定した。その結果、VH遺伝子当たり3.3個の置換が導入されており、またフレームシフト変異は約20%のクローンに起こっていることが明らかとなった。

【0050】

上記で保存した形質転換体（VH（BGP）/pIT2ライブラリー）を、1000 mlの2YTAGに植菌して、37℃にて培養し、OD₆₀₀が約0.5になった時点で培養液80 mlを分取し、KM13 helper phage (6.8×10^{11} cfu) を添加した。30℃30分間静置した後、3,300 gで菌体を遠心分離して、上清を捨て、320 ml 2YTAKに再懸濁し、バッフル付フラスコで30℃16時間、200 rpmで攪拌した。さらに、3,300 gの遠心分離によって回収した上清 320 mlに対して、80 mlのPEG/NaClを加えて、氷上で2時間静置した。その後、3,300 g 30分遠心分離によって得たペレットを10 ml TEにて懸濁し、11,600 g 10分遠心して大腸菌を取り除き、上清（VH(BGP)phageライブラリー）を回収した。

【0051】

実施例5：オープンサンドイッチ-パニング

VH(BGP)phageライブラリーから、抗原存在下にて、VLとの相互作用の強いクローンをセレクトするために、以下のようなオープンサンドイッチ-パニングを行った。

まず、VH(BGP)phageライブラリー (10^{10} cfu) とビオチン化MBP-VL溶液（終濃度0.5 mg/ml）12.5 μ l、BGPC8（終濃度1 ng/ml）を含む250 μ lの2% MPBSを調製し、室温30分間ローテーターで攪拌した後、60分間静置した。その間に、ストレプトアビジン固定化マグネチックビーズ（Dynal Biotech, Oslo, Norway）懸濁液12 μ lを2% MPBS 200 μ lと混合して、室温60分間静置した後、マグネチックセパレーター（12-Tube Magnet (Qiagen)）を用いてビーズを回収した。そこに、上記のVH(BGP)phageライブラリーとビオチン化MBP-VL溶液、BGPC8の混合液を添加し、室温15分間ローテーターで攪拌した。その後回収したビーズをPBS-Tで三回洗浄し、200 μ lの1mg/ml Trypsin溶液を加えて、15分間室温ローテーターで攪拌した。ファージ溶出液を半分に分け、一方をグリセロールストックへ、一方には900 μ lのTG-1培養液（OD₆₀₀ = 0.4）を加えて、37℃で30分静置し、11,600 gで10分間遠心した。ペレット（ファージ感染TG-1）は、50 ml 2YTAGに懸濁し、OD₆₀₀が約0.4になるまで、37℃で培養した。その後、半分はグリセロールストックへ、残りは上記の通りヘルパーファージを加えて、抗体提示ファージを調製し、2ラウンド目のパニングを行った。2ラウンド目のファージ溶出液で感染させたTG-1は2YTAGプレートに播種し、得られた多数のコロニーは、それぞれ4 ml LBAGに懸濁して上記の通りシーケンスを行うとともに、上記の通りファージを調製し、モノクローナルVH提示ファージを得た。

【0052】

実施例6：モノクローナルファージOS-ELISA

上で得られたモノクローナルVH提示ファージを用いてOS-ELISAを行った。

1 μ g/mlのMBP-VLを含むPBS溶液をFalcon3912マイクロプレートに1ウェルあたり100 μ lずつ分注し、4℃で一晩静置した。マイクロプレートから溶液を廃棄した後、そこに20% IBPBSを200 μ l加え、室温で2時間置いてブロッキングを行った。次いで、マイクロプレートをPBS-Tで洗浄した後、上記で得られた 10^{10} cfu/ml V_H提示ファージと様々な濃度（0～100 ng/ml）のBGPC8を含む5% IBPBSを100 μ l加え室温で、60分間静置した。ここまでの操作で固定化されたVH提示ファージを検出するために、マイクロプレートをPBS-T洗浄後、5% IBPBSで1/5000に希釈したHRP/anti-M13 Monoclonal Conjugate（GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place, England）を100 μ l加え室温で1時間静置した。その後マイクロプレートをPBS-Tで三回洗浄した後、あらかじめ調製した酵素反応溶液（50 ml 100 mM 酢酸ナトリウム pH6.0、500 μ l 10 mg/ml TMBZ（in DMSO）、10 μ l H₂O₂）を各wellへ100 μ lずつ添加して反応を開始した。暗所で約5分間反応させた後、3.2N H₂SO₄を50 μ lずつ添加して反応を止め、プレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した（対照は655 nm）。そ

の結果、野生型抗BGP抗体VH提示ファージを用いたモノクローナルファージOS-ELISAでは検出感度が約1 ng/mlであるのに対して、2つのクローン（02AG2、02AH2）ではそれぞれ約0.01 ng/ml、0.1 ng/mlと、有意に検出感度が改善されていることが明らかとなった（図2、図3）。シーケンスの結果、02AG2のVH（配列番号5）には、N31→S、V37→I、S58→T、H82→Rの4つのアミノ酸変異が、また02AH2のVH（配列番号8）にはE10→V、T69→Iの2つのアミノ酸変異が確認された。

【0053】

02AG2で観察された4つの変異のうち、V37→Iの変異のみを野生型に導入したsingle mutant（配列番号6）、V37→I及びS58→T、H82→Rの3つの変異を導入したtriple mutant（配列番号7）を、以下の通り作製した。

まず、それぞれ4つの変異部位を含むDNA断片を、野生型及び02AG2をコードするpIT2を鋳型とするPCRによって増幅した。条件を以下に示す。

【0054】

反応液組成

（鋳型）（約100 μg/ml）	1 μl	
フォワードプライマー-pHENseq(100 μM)	0.5 ml	
リバースプライマー-M13RV (100 μM)	0.5 μl	
10x Ex taq buffer (Mg ²⁺ 20 mM) (Takara bio)	10 μl	
dNTP mixture (2.5 mM each) (Takara bio)	8 μl	
5 U/μl Ex Taq DNA polymerase (Takara bio)	1 μl	20
milliQ 水	79 μl	

【0055】

反応サイクル

1、96°C 2 min	
2、94°C 30 min	
3、55°C 30 min	
4、72 18 sec	
（2から4を25回）	
5、72°C 5 min	
6、16°C ∞	30

【0056】

PCR産物はそれぞれWizard^R SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて精製した後、02AG2から増幅した37番目を含むDNA断片と、野生型から増幅したそれ以外の3つのDNA断片をそれぞれ当量混合し、以下の条件でoverlap extension PCRを行った。用いたプライマーはM13RVおよびpHENseqであった。

【0057】

DNA断片混合物	4 μl	
10x Ex taq buffer (Mg ²⁺ 20 mM) (Takara bio)	10 μl	
dNTP mixture (2.5 mM each)	8 μl	
5 U/μl Ex Taq DNA polymerase (Takara bio)	2 μl	40
milliQ 水	76 μl	

【0058】

反応サイクル

1、94°C 5 min	
2、94°C 30 sec	
3、56°C 30 sec	
4、72°C 40 sec	
（2から4を15回）	
5、プライマーを各100 μM 1μl、およびEx taq (Takara bio) 1 μlを添加	
6、94°C 5 min	50

- 7、58℃ 30 sec
 8、72℃ 40 sec
 (6から8を35回)
 9、72℃ 5 min
 10、16℃ ∞

【0059】

また、同様に野生型から増幅した31番目を含むDNA断片と、O2AG2から増幅したそれ以外の3つのDNA断片を混合して、overlap extension PCRを行った。用いたプライマーはM13RVおよびpHENseqであった。

【0060】

10

その結果、得られたsingle mutantとtriple mutantのVH断片を、上記と同様にファージミドベクターpIT2に挿入し、同様にモノクローナルファージOS-ELISAを行った(図2)。その結果、アミノ酸変異は、検出感度の改善に相加的な寄与を示していることが示唆された。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、野生型VH(BGP)をコードするファージミドベクターの構造を示す。

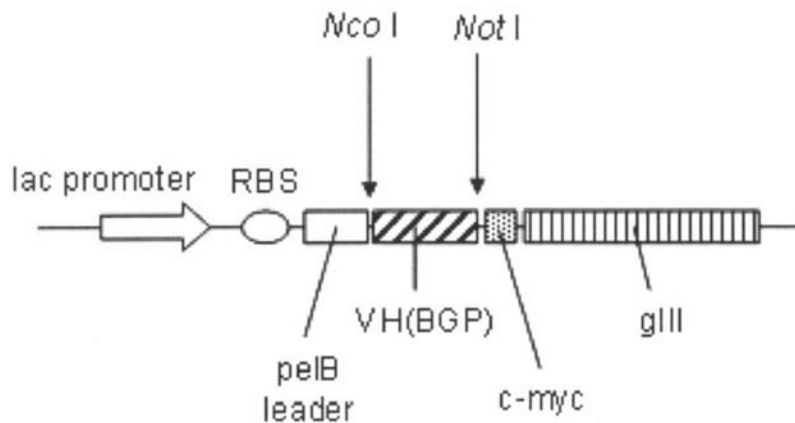
【図2】図2は、モノクローナルVH提示ファージを用いてオープンサンドイッチELISAを行った結果を示す。

【図3】図3は、モノクローナルVH提示ファージを用いてオープンサンドイッチELISAを行った結果を示す。

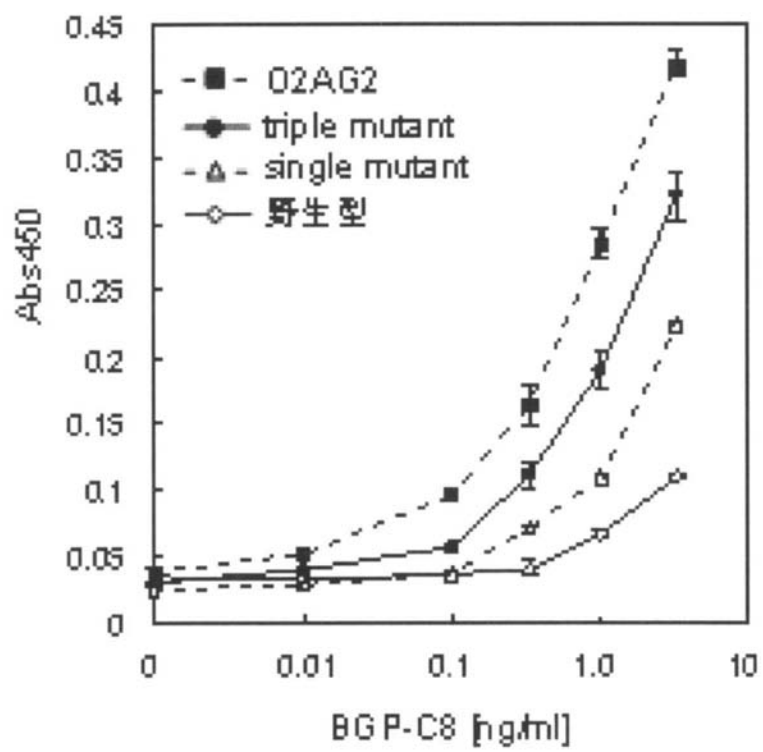
20

【図4】図4は、抗BGP抗体であるKTM219のVHドメイン(塩基配列を配列番号1に示し、アミノ酸配列を配列番号2に示す)及びVLドメイン(塩基配列を配列番号3に示し、アミノ酸配列を配列番号4に示す)を示す。

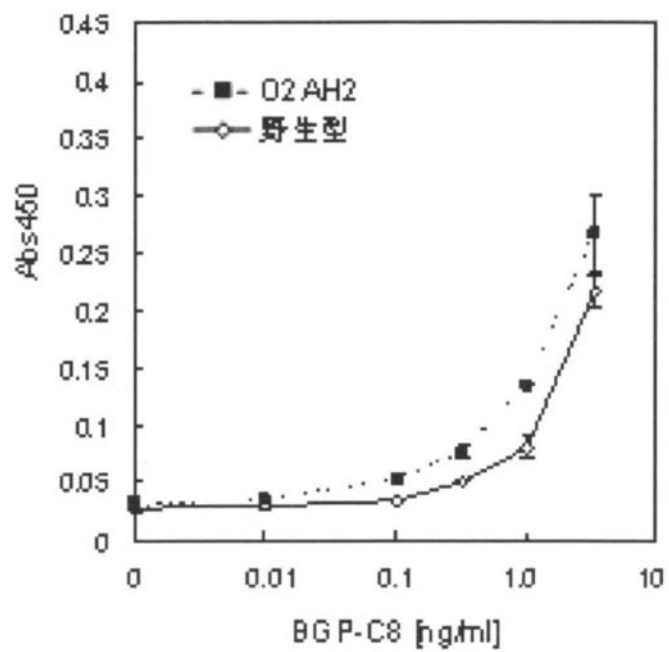
【図1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

V_H、V_Lドメインの配列(KTM219)

V_H

```

1 GAGGTACAGCTGGAGGAGTCTGGGGCTGAGTTTGTGAAGGCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG 60
  E V Q L E E S G A E F V K A G A S V K L
61 TCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTCAACAACACTACTGGATTCACTGGGTCAAACAGAGC 120
  S C K T S G Y T F N N Y W I H W V K Q S
121 CCAGGACAAGGCCTTGAATGGATCGGAGAAATTGATCCCTCTGATGGTTATTCTAACTAC 180
  P G Q G L E W I G E I D P S D G Y S N Y
181 AATCAAAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCTCCAGCACTGCCTAC 240
  N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y
241 ATGCACCTCAACAGTCTGACTTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGCAGCACT 300
  M H L N S L T S E D S A V Y Y C T S S T
301 TCGGTAGGAGGTTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGC 348
  S V G G S W G Q G T T V T V S S

```

V_L

```

1 GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC 60
  D I E L T Q S P L S L P V S L G D Q A S
61 ATCTCTTGACATCTAGTCAGAGCCTTCTACACAGTAATGGAGACACCTATTTACATTGG 120
  I S C T S S Q S L L H S N G D T Y L H W
121 TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACACTTTCCAACCGCTTT 180
  Y L Q K P G Q S P K L L I Y T L S N R F
181 TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCGGGGACAGATTTACACTCAAGATC 240
  S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
241 AGCAGAGTGGAGGCTGCGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAACACTCATGTTCCG 300
  S R V E A A D L G I Y F C S Q T T H V P
301 TACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGG 339
  Y T F G G G T K L E I K R

```

【配列表】

2009278908000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>
				A

(72)発明者 岩井 宏徒
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 森 寿弘
神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 CA04 DA06 EA04 GA11
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA46
4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	抗骨钙素抗体和使用其的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2009278908A	公开(公告)日	2009-12-03
申请号	JP2008133880	申请日	2008-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社 东京大学		
[标]发明人	上田宏 伊原正喜 岩井宏徒 森寿弘		
发明人	上田 宏 伊原 正喜 岩井 宏徒 森 寿弘		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/543.515.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种能够对骨钙蛋白进行高灵敏度免疫测定的新型抗骨钙素抗体，以及一种使用该抗体测量骨钙蛋白的高灵敏度免疫测定方法。 解决方案：肽由通过在抗骨钙素抗体的重链可变区（VH）的氨基酸序列中引入至少一个氨基酸突变而获得的氨基酸序列和开放夹心免疫测定中骨钙蛋白的检测灵敏度组成。上述肽与使用上述氨基酸突变导入前的肽的情况相比有所改善。 【选择图表】无

