

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5397932号  
(P5397932)

(45) 発行日 平成26年1月22日(2014.1.22)

(24) 登録日 平成25年11月1日(2013.11.1)

(51) Int.Cl.	F I
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18 ZNA
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D
<b>GO1N 33/531 (2006.01)</b>	GO1N 33/531 A
<b>GO1N 33/536 (2006.01)</b>	GO1N 33/536 E
<b>GO1N 33/537 (2006.01)</b>	GO1N 33/537

請求項の数 10 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-133885 (P2008-133885)	(73) 特許権者	301022471
(22) 出願日	平成20年5月22日(2008.5.22)		独立行政法人情報通信研究機構
(65) 公開番号	特開2009-280520 (P2009-280520A)		東京都小金井市貫井北町4-2-1
(43) 公開日	平成21年12月3日(2009.12.3)	(74) 代理人	100130111
審査請求日	平成23年5月16日(2011.5.16)		弁理士 新保 斉
		(72) 発明者	原口 徳子
			東京都小金井市貫井北町4-2-1 独立行政法人情報通信研究機構内
		(72) 発明者	荒神 尚子
			東京都小金井市貫井北町4-2-1 独立行政法人情報通信研究機構内
		(72) 発明者	平岡 泰
			東京都小金井市貫井北町4-2-1 独立行政法人情報通信研究機構内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Nuf2蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Nuf2蛋白質のエピトープCGGDYSAKIDKTAELKRKMFKMSに特異的に反応するポリクローナル抗体であって、

Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDKTAELKRKMFKMSを唯一のエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物(ヒトを除く)を免疫感作した後、その宿主動物(ヒトを除く)の体液より単離精製することによって得られた

ことを特徴とするNuf2蛋白質抗体。

【請求項2】

Nuf2蛋白質のエピトープCGGDYSAKIDKTAELKRKMFKMSに特異的に反応するモノクローナル抗体であって、

Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDKTAELKRKMFKMSを唯一のエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物(ヒトを除く)を免疫感作した後、その宿主動物(ヒトを除く)の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを調製し、抗体を産生するハイブリドーマ細胞を単離精製することによって得られた

ことを特徴とするNuf2蛋白質抗体。

【請求項3】

宿主動物(ヒトを除く)がウサギであり、宿主動物(ヒトを除く)の体液が血清である請求項1または2に記載のNuf2蛋白質抗体。

【請求項4】

10

20

抗体を含有する免疫試薬であって、  
抗体が請求項 1 ないし 3 に記載のNuf2蛋白質抗体である  
ことを特徴とするNuf2蛋白質免疫試薬。

【請求項 5】

Nuf2蛋白質のエピトープCGGDYSAKIDEKTAELKRKMFKMSに特異的に反応する抗体の製造方法であって、

Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFKMSを唯一のエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物（ヒトを除く）を免疫感作し、

宿主動物（ヒトを除く）による抗体の産出が略最大になった時に、その宿主動物（ヒトを除く）の体液を抽出し、

その体液から抗体を単離精製する

ことを特徴とするNuf2蛋白質抗体の製造方法。

【請求項 6】

Nuf2蛋白質に特異的に反応する抗体の製造に用いる抗原であって、

Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFKMSを唯一のエピトープとして有する

ことを特徴とするNuf2蛋白質抗体製造用抗原。

【請求項 7】

Nuf2蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 ないし 3 に記載のNuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

免疫染色法によって、抗原の局在を顕微鏡下で検知する

ことを特徴とするNuf2蛋白質の検知方法。

【請求項 8】

Nuf2蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 ないし 3 に記載のNuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

ウエスタンブロット法によって、抗原の存在を検知する

ことを特徴とするNuf2蛋白質の検知方法。

【請求項 9】

Nuf2蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 ないし 3 に記載のNuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

免疫沈降法によって、抗原の存在を検知する

ことを特徴とするNuf2蛋白質の検知方法。

【請求項 10】

Nuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質を検知する方法であって、

請求項 1 ないし 3 に記載のNuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、

共免疫沈降法によって、抗原と特異的に複合体を形成する別の蛋白質を検知する

ことを特徴とするNuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞核に局在するNuf2蛋白質に特異的に反応する抗体と、それを含有するNuf2蛋白質免疫試薬、Nuf2蛋白質抗体の製造方法、Nuf2蛋白質抗体製造用の抗原、Nuf2蛋白質の検知方法、Nuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特定の蛋白質に特異的に結合する抗体は、ライフサイエンス分野の研究ツールなどとして

10

20

30

40

50

頻用されている。細胞核に関する研究が活発になり、細胞核に局在する蛋白質に結合する抗体の需要が高まっている。

細胞核を構成するセントロメアタンパク質にNuf2があることが既に知られている（非特許文献1など）。

【非特許文献1】Human NUF2 interacts with centromere-associated protein Eand is essential for a stable spindle microtubule-kinetochore attachment. Liu Det al., J Biol Chem 282:21415-24 (2007)

【0003】

生物種を越えて共通に、体細胞分裂から減数分裂に移行すると、染色体の配置が、セントロメアが束ねられた構造からテロメアが束ねられた構造へと、核内で劇的に変化する。本発明者らは、分裂酵母細胞を用いて、体細胞分裂期にセントロメアをSPB に留める分子や減数分裂前期にテロメアをSPB に留める分子の検索を行い、分裂酵母とヒトで共通に存在するセントロメアタンパク質Nuf2およびテロメアタンパク質Rap1 を同定した。Nuf2蛋白質の働きを解析した結果、染色体の分離に必須の働きをもつことが明らかになった。

10

【0004】

Nuf2蛋白質に特異的に結合する抗体には、市販されているものがあるが（ABCAM社製品、<http://www.abcam.co.jp/index.html?datasheet=17058>）、特異性の程度が高くなく、研究用試薬としての信頼性が十分高くはなかった。

抗体やその製法に関する従来技術には、特許文献1～7などもあるが、Nuf2蛋白質の抗体に関する開示はなかった。

20

【0005】

【特許文献1】特開2006-312621「3,4-DGEに由来するAGESに特異的に反応する抗体」

【特許文献2】特開平11-279200「ジチロシンポリクローナル抗体とその製造方法並びにこれに用いる抗原及びその製造方法」

【特許文献3】特開平10-218896「ポリクローナル抗体とその製造法並びにこれに用いる抗原及びその製造法」

【特許文献4】特開平10-72499「ポリクローナル抗体および製造方法」

【特許文献5】特開2008-29353「抗ヒト可溶性フィブリンモノクローナル抗体の製造方法」

30

【特許文献6】特開2007-314493「モノクローナル抗体、その製造方法、及び用途」

【特許文献7】特開2007-244268「イヌの造血前駆細胞を認識するモノクローナル抗体の製造方法」

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、特異性の高いNuf2蛋白質抗体と、それを含有するNuf2蛋白質免疫試薬、Nuf2蛋白質抗体の製造方法、Nuf2蛋白質抗体製造用の抗原、Nuf2蛋白質の検知方法、Nuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法を提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するために、本発明は次の構成を備える。  
すなわち、本発明のNuf2蛋白質抗体は、Nuf2蛋白質に特異的に反応する抗体であって、Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFMSをエピトープ（抗原決定基）として有する抗原を用いて、宿主動物を免疫感作した後、その宿主動物の体液より単離精製することによって得られたことを特徴とする。

【0008】

ここで、宿主動物をウサギとし、宿主動物の体液を血清としてもよい。

【0009】

50

抗体をポリクローナル抗体としてもよい。

【0010】

抗体をモノクローナル抗体としてもよい。

【0011】

本発明のNuf2蛋白質免疫試薬は、上記Nuf2蛋白質抗体を含有する免疫試薬であることを特徴とする。

【0012】

本発明のNuf2蛋白質抗体の製造方法は、Nuf2蛋白質に特異的に反応する抗体の製造方法であって、Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFMSをエピトープとして有する抗原を用いて、宿主動物を免疫感作し、宿主動物による抗体の産出が略最大になった時に、その宿主動物の体液を抽出し、その体液から抗体を単離精製することを特徴とする。

10

【0013】

本発明のNuf2蛋白質抗体製造用抗原は、Nuf2蛋白質に特異的に反応する抗体の製造に用いる抗原であって、Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFMSをエピトープとして有することを特徴とする。

【0014】

本発明のNuf2蛋白質の検知方法は、Nuf2蛋白質を検知する方法であって、上記Nuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、免疫染色法によって、抗原の局在を顕微鏡下で検知することを特徴とする。

20

【0015】

ここで、上記Nuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、ウエスタンブロット法によって、抗原の存在を検知してもよい。

【0016】

上記Nuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、免疫沈降法によって、抗原の存在を検知してもよい。

【0017】

本発明のNuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知方法は、Nuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質を検知する方法であって、上記Nuf2蛋白質抗体と、細胞または組織の蛋白質画分を有する試料を用い、共免疫沈降法によって、抗原と特異的に複合体を形成する別の蛋白質を検知することを特徴とする。

30

【発明の効果】

【0018】

本発明は、上記構成を備えることにより次の効果を奏する。

すなわち、Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFMSをエピトープとして有する抗原を用いて抗体を生成することにより、特異性の高いNuf2蛋白質抗体を得ることができ、それを用いてNuf2蛋白質の検知や、Nuf2蛋白質と相互作用する別の蛋白質の検知を行える。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下、本発明の実施形態を、図面に示す実施例を基に説明する。なお、実施形態は下記の例示に限らず、本発明の趣旨から逸脱しない範囲で、前記特許文献など従来公知の技術を用いて適宜設計変更可能である。

40

従来はNuf2蛋白質を特異的に結合する有効な抗体はなかったが、本発明者らは、Nuf2蛋白質を構成するアミノ酸配列のうちCGGDYSAKIDEKTAELKRKMFMSを抗原のエピトープとして有する抗原を用いて、ウサギを免疫感作し、その抗体の産出が略最大になった時に血清を抽出し、抗体を単離精製することに成功した。

【0020】

抗体の調製方法は、宿主動物への免疫感作を行うことにより抗体を産生する従来公知の方法を適宜利用できる。

50

免疫感作させる宿主動物の種類は、特に制限されず、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、モルモット等の哺乳類、ニワトリ、ハト、アヒル、ウズラ等の鳥類などが使用できる。

抗原の投与方法も、特に制限されず、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与などが適宜利用できる。

【0021】

ポリクローナル抗体を調製する場合には、免疫感作させた宿主動物の血清や腹水液等の体液を回収し、抗体を単離精製すればよい。

モノクローナル抗体を調製する場合には、例えば、免疫感作させた宿主動物における脾臓細胞やリンパ球様細胞等の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを調製し、そのハイブリドーマを増殖させ、特異性を持つ抗体を産生するハイブリドーマ細胞を単離精製すればよい。

10

【0022】

ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体の精製方法も、特に制限されず、例えば、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などが適宜利用できる。

【0023】

抗体の産生をスクリーニングする方法も、特に制限されず、例えば、ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法などが適宜利用できる。

【0024】

このようにして得られる抗体は、それ自体を抗体として使用してもよいし、酵素処理等を施して得られる抗体の活性フラグメントとして使用してもよいし、他の薬剤等と混合させて試薬等として使用してもよい。

20

【0025】

実施例：

図1は、抗原の精製を確認したマススペクトルである。

抗原の調整は常法によって行い、ペプチドは、Hisタグを付けて蛋白質を発現、精製、Hisタグの切り離し、精製、という過程で行った。グラフのピークにより目的の分子イオンが示され、得られた抗原ペプチドの品質の良さが確認された。

【0026】

図2は、ウサギへの免疫スケジュールを示した表であり、図3は、その免疫による抗体力価の変化を示した表である。

30

抗原の溶液を、等量のフロイント完全アジュバントと混合してエマルジョン化させ、ウサギの背部皮下20箇所投与した。投与量は、蛋白質量で2mgとした。

隔週投与し、2次免疫以降では、等量のフロイント不完全アジュバントと混合したエマルジョンを用い、投与量は、蛋白質量で1mgとした。

【0027】

初回の免疫開始時より経時的に採血を行い、ELISA法により抗体力価を測定した。

採血は、耳静脈から行い血清量で2mlとした。7週後に全採血を、頸動脈から行い血清量で78mlを得た。抗体力価は、4回の免疫で十分な上昇が確認された。

40

【0028】

図4は、本発明のNuf2蛋白質抗体を用い、免疫染色法によって、抗原の局在を顕微鏡下で検知した写真である。

培養細胞の細胞核にある染色体を染めるDAPI染色（ピンク色）と共に、Nuf2蛋白質（緑色）の局在が示された。図4（a）は、細胞周期がprometaphase、図4（b）は、細胞周期がmetaphaseのものである。

【0029】

図5は、本発明のNuf2蛋白質抗体を用い、ウエスタンブロット法によって、抗原の存在を検知した写真である。

図示の例では、500倍、1000倍、5000倍に希釈したものを示した。5000倍

50

に希釈したものでも、Nuf2蛋白質の分子量を示す50kDaで特異的なバンドを確認できた。

【0030】

本発明では、従来公知の免疫染色法やウエスタンブロット法や免疫沈降法を適宜利用して、Nuf2蛋白質を検知することができる。

免疫染色法は、抗体を用いて試料中の抗原を検出する組織化学的手法であり、本来不可視である免疫反応を可視化するために発色操作を伴う。また、電気泳動した蛋白質分子を特定の膜に転移させ、抗体で免疫染色する方法がウエスタンブロッティング法である。

【0031】

免疫反応には、抗原に直接反応する一次抗体を標識し、免疫反応を1度しか行わない直接法も、標識していない一次抗体を用いて1度目の免疫反応を行い、一次抗体を抗原とする別の二次抗体を標識し、さらに免疫反応させる間接法も利用できる。なお、一般に免疫反応を反復するほど増幅されるので検出感度を高めることができるが、特異性が低下する。

10

【0032】

染色には、抗体に色素や蛍光色素を結合させる方法の他、標識として放射性同位元素を結合させておき印画紙に感光させるオートラジオグラフィや、金銀粒子を結合させておき電子顕微鏡等で観察する金コロイド法や金コロイド銀増感法や、特定の酵素を結合させておき色素生成物の呈色を光学顕微鏡で観察する酵素抗体法や免疫ペルオキシダーゼ法などが適宜利用できる。

20

【0033】

また、免疫沈降法により、抗原と抗体を特異的に反応させ沈殿させることで、抗原を検出してもよい。通常は抗体をセファロースビーズなどの担体に結合させて沈殿しやすくする。なお、ポリクローナル抗体は、複数の部位を認識するため、モノクローナル抗体よりも適しているが、非特異的吸着も起こりやすい。

【0034】

本発明では、共免疫沈降法によって、Nuf2蛋白質と特異的に複合体を形成する別の蛋白質を検知、蛋白質間の相互作用に関する知見を得ることも可能である。

共免疫沈降法は、免疫沈降法により、目的の蛋白質と特異的に複合体を形成する別の蛋白質との複合体を回収する方法である。これに、質量分析等を組み合わせて、既知の蛋白質と相互作用する未知の蛋白質の特定に利用してもよい。

30

【産業上の利用可能性】

【0035】

本発明によると、細胞核に局在するNuf2蛋白質に対して特異性の高い抗体が得られるので、ライフサイエンス分野の研究に寄与する。例えば、生殖医療研究において問題になっている生殖細胞の形成異常など様々な生殖分裂や体細胞分裂の異常に由来する疾患の研究において、そのメカニズムを究明するのに有用であり、産業上利用価値が高い。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】抗原のマスマスペクトル

40

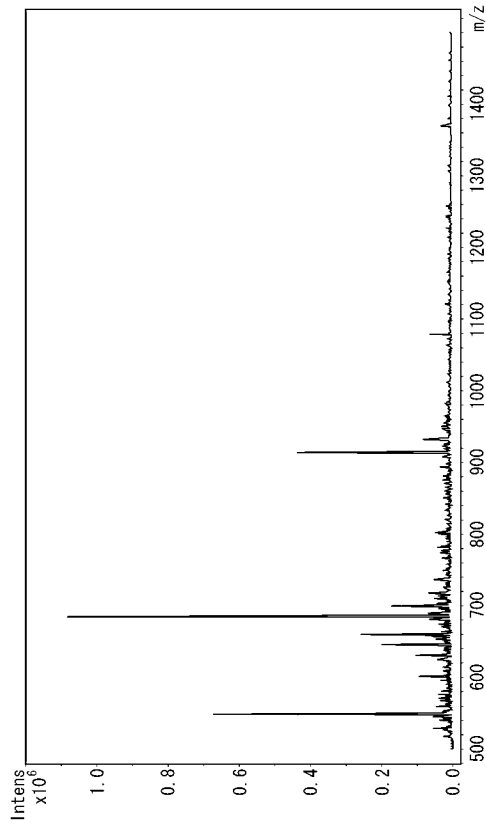
【図2】ウサギへの免疫スケジュールを示した表

【図3】免疫による抗体力価の変化を示した表

【図4】本発明のNuf2蛋白質抗体を用い、免疫染色法によって抗原の局在を顕微鏡下で検知した写真(a)は、細胞周期がprometaphase、(b)は、細胞周期がmetaphase

【図5】本発明のNuf2蛋白質抗体を用い、ウエスタンブロット法によって抗原の存在を検知した写真

【 図 1 】



【 図 2 】

免疫スケジュール

週	0	2	4	6	7	8
月/日	1/17	1/31	2/14	2/28	3/7	3/14
免疫	1st	2nd	3rd	4th		
採血	免疫前採血		測定採血	測定採血	測定採血	全採血
抗体力価測定					○(0, 4, 6w分含む)	

【 図 3 】

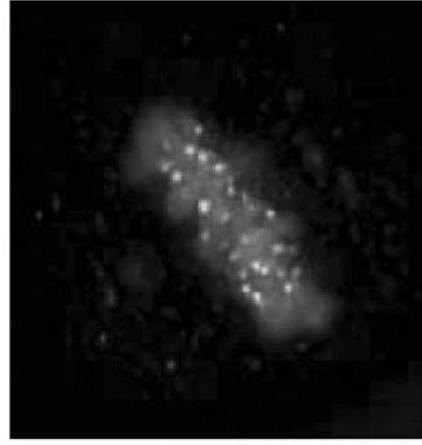
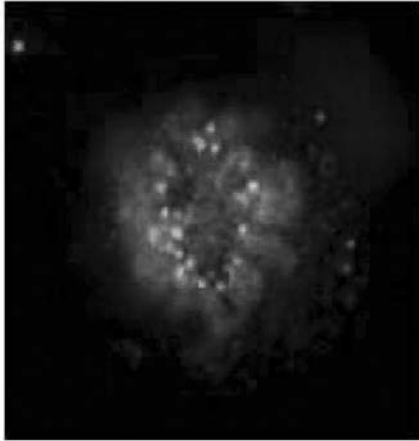
抗体力価 (A <sub>492nm</sub> )	抗体滴希釈倍率		
	1 X 10 <sup>2</sup>	1 X 10 <sup>3</sup>	2.5 X 10 <sup>4</sup>
動物番号	採血日 (週)		
1	1/17 (0w)	0.014	
	2/14 (4w)	1.0以上	1.0以上
	2/28 (6w)	1.0以上	1.0以上
	3/7 (7w)	1.0以上	1.0以上

免疫スケジュール

【 図 4 】

(a)

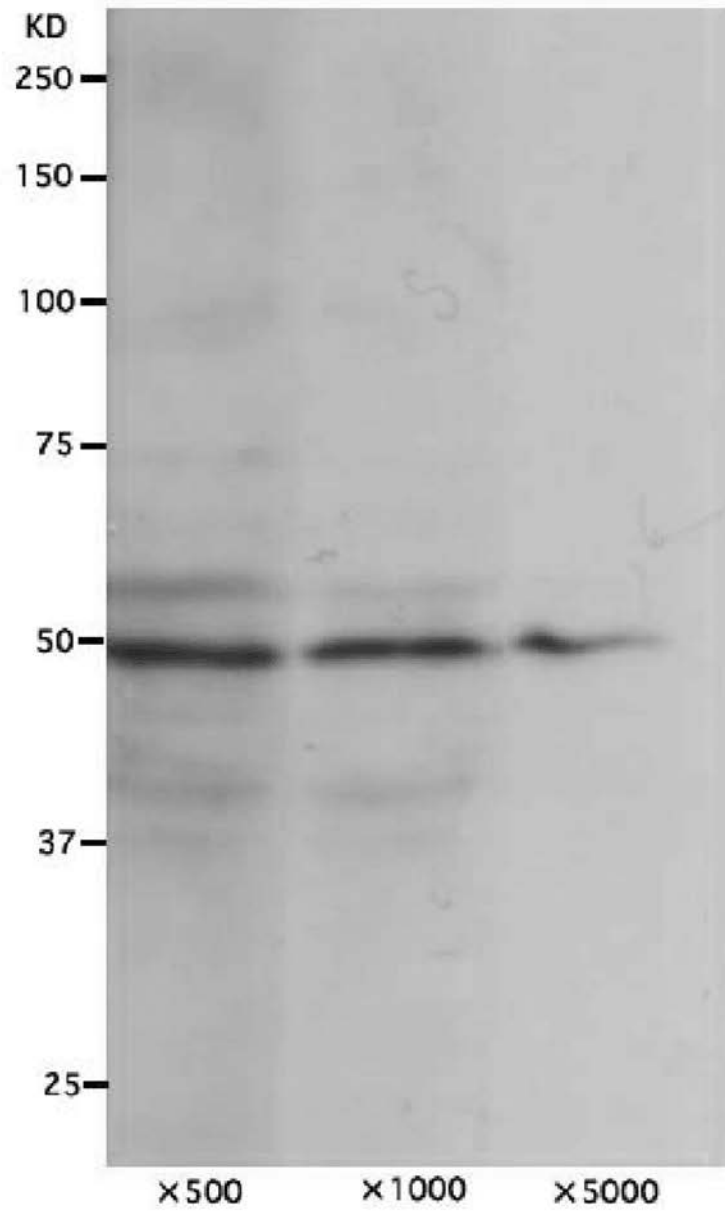
(b)



10 μm

DAPI (染色体)/huNuf2  
固定: MeOH  
希釈倍率: 500倍

【 図 5 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/577	B
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>		C 1 2 P 21/08	
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>		C 0 7 K 14/47	
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>		C 1 2 N 15/00	C

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 Chromosoma, (2004), 113, [1], p.1-15

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

P u b M e d

R E G I S T R Y ( S T N )

专利名称(译)	Nuf2蛋白抗体，其制备方法，抗原，检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5397932B2</a>	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	JP2008133885	申请日	2008-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人情报通信研究机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人情报通信研究机构		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人情报通信研究机构		
[标]发明人	原口 德子 荒神 尚子 平岡 泰		
发明人	原口 德子 荒神 尚子 平岡 泰		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/537 G01N33/577 C12P21/08 C07K14/47 C12N15/02		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/536.E G01N33/537 G01N33/577.B C12P21/08 C07K14/47 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	仁新报		
其他公开文献	JP2009280520A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供对Nuf2蛋白高度特异的抗体作为构成细胞核的着丝粒蛋白，含有其的Nuf2蛋白免疫试剂的制备方法，用于产生Nuf2蛋白抗体的抗原，检测方法Nuf2蛋白和另一种蛋白的检测方法与Nuf2蛋白相互作用。解决方案：Nuf2蛋白抗体是与Nuf2蛋白特异性反应的抗体，通过使用在构成Nuf2蛋白的氨基酸序列中具有CGGDYSAKIDEKTAELKRKMFMS作为表位（抗原决定基团）的抗原对宿主动物进行免疫，然后进行分离而获得。来自宿主动物的体液和净化。兔子的血清等可用于免疫。 Z

抗体力価 (400nm)	抗体稀释倍率	1X10 <sup>2</sup>	5X10 <sup>3</sup>	2.5X10 <sup>4</sup>
		1.0%以上	1.0%以上	0.075
抗体番号	抗体日(週)	1/17(0)	2/14(4)	2/28(6)
		0.04	1.0%以上	1.0%以上
		1.0%以上	1.0%以上	1.0%以上
		1.0%以上	1.0%以上	0.983