

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/113988

発行日 平成24年10月11日 (2012.10.11)

(43) 国際公開日 **平成22年10月7日 (2010.10.7)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
GO1N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
GO1N 33/536 (2006.01)	G O 1 N 33/536 C	
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号 特願2011-507242 (P2011-507242)	(71) 出願人 304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町1577
(21) 国際出願番号 PCT/JP2010/055783	
(22) 国際出願日 平成22年3月24日 (2010.3.24)	
(31) 優先権主張番号 特願2009-83900 (P2009-83900)	(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(32) 優先日 平成21年3月31日 (2009.3.31)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 田丸 浩 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学 法人三重大学大学院 生物資源学研究科内
	Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA02 DA06 EA04 HA20 4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗GPCR抗体の製造方法および抗GPCR抗体

(57) 【要約】

抗哺乳類GPCR抗体の製造方法の提供および、当該方法によって得られる抗哺乳類GPCR抗体の提供。

哺乳類GPCRの全長または一部を魚類に曝露する等の方法によって、免疫を行うことで抗哺乳類GPCR抗体の製造を行い、この製造方法によって得られる抗哺乳類GPCR抗体を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳類の G 蛋白質共役型受容体 (G - p r o t e i n c o u p l e d r e c e p t o r 、 G P C R) の全長または一部を魚類に免疫する工程を含む、抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法。

【請求項 2】

魚類に免疫する工程が、哺乳類 G P C R の全長または一部をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターを大腸菌または酵母に導入する工程、および当該大腸菌または酵母を魚類に曝露する工程を含む工程である請求項 1 に記載の抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法。

【請求項 3】

哺乳類がヒトである請求項 1 または 2 に記載の抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法。

【請求項 4】

哺乳類 G P C R が、ヒト L G R (l e u c i n e - r i c h r e p e a t c o n t a i n i n g G - p r o t e i n c o u p l e d r e c e p t o r) である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法。

【請求項 5】

ヒト L G R が、ヒト L G R 3 (l e u c i n e - r i c h r e p e a t c o n t a i n i n g G - p r o t e i n c o u p l e d r e c e p t o r 3) またはヒト L G R 4 (l e u c i n e - r i c h r e p e a t c o n t a i n i n g G - p r o t e i n c o u p l e d r e c e p t o r 4) である請求項 4 に記載の抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法。

【請求項 6】

魚類がゼブラフィッシュ、金魚、フナまたはコイである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法。

【請求項 7】

哺乳類 G P C R の全長または一部を魚類に免疫する工程を含む製造方法によって得られる、抗哺乳類 G P C R 抗体。

【請求項 8】

魚類に免疫する工程が、哺乳類 G P C R の全長または一部をコードする遺伝子を含む発現ベクターが導入された大腸菌または酵母を魚類に曝露する工程である請求項 7 に記載の抗哺乳類 G P C R 抗体。

【請求項 9】

哺乳類 G P C R が、ヒト L G R である請求項 7 または 8 に記載の抗哺乳類 G P C R 抗体。

【請求項 10】

哺乳類 G P C R が、ヒト L G R 3 またはヒト L G R 4 である請求項 9 に記載の抗哺乳類 G P C R 抗体。

【請求項 11】

魚類がゼブラフィッシュ、金魚、フナまたはコイである、請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の抗ヒト G P C R 抗体。

【請求項 12】

H R P (H o r s e r a d i s h P e r o x i d a s e) で直接標識した魚類 I g M 抗体を用いる抗ヒト G P C R 抗体の検出方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗 G 蛋白質共役型受容体 (G - p r o t e i n c o u p l e d r e c e p t o r 、 以下、 G P C R とする) 抗体の製造方法および当該方法によって得られる抗 G P C R 抗体に関する。さらに詳しくは、抗哺乳類 G P C R 抗体の製造方法および当該方法によって得られる抗哺乳類 G P C R 抗体に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

GPCRは薬物受容体であり、ホルモンなどの生理活性物質が結合することによって、その情報を細胞内に伝達する働きが知られている。GPCRは、数千種類のタンパク質からなるシグナル伝達系のタンパク質ファミリーのひとつであり、このファミリーのタンパク質は、細胞膜を7回繰り返して貫通する構造を共通して有する（例えば、非特許文献1参照）。

このファミリーに属するタンパク質には、作用物質（リガンド）が不明なオーファン受容体も多く存在する。しかし、生体内で重要な機能を持つことが示唆されていることから、治療用抗体や診断薬等の標的分子として、近年盛んに研究されている。

【0003】

この研究において、様々な抗GPCR抗体の提供が望まれている。しかし、GPCRは上記のような複雑な立体構造を有することから、タンパク質の作製が難しく、従来のタンパク質を免疫する方法では、抗GPCR抗体を得ることができなかった。

そこで、*In silico*で標識分子の免疫領域を選択し、このcDNAをクローニングした発現ベクターを動物へ導入しハイブリドーマ細胞を作製するというDNA免疫法が開発された（例えば、非特許文献2参照）。この方法により、様々な抗GPCR抗体の製造が可能となり、各メーカーから販売されている。しかし、この抗体の製造方法では、免疫領域の選択やハイブリドーマ細胞の作製といった複数の手順を要し、手間や時間が係るという問題があった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】*Nature*, 2007 Oct 25; 449(7165): 1003-7. Epub 2007 Oct 14

【非特許文献2】*生物工学会誌*, 86(8), 384-386(2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、抗哺乳類GPCR抗体の製造方法の提供を課題とする。また、当該方法によって得られる抗哺乳類GPCR抗体の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ヒト等の哺乳類GPCRの全長または一部を魚類に免疫することで、抗哺乳類GPCR抗体が製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明の製造方法における魚類への免疫には、抗原となる哺乳類GPCRの全長または一部を発現し得る大腸菌をそのまま曝露することもでき、非常に簡便である。

【0007】

すなわち、本発明は次の(1)～(12)の抗哺乳類GPCR抗体の製造方法、該製造方法によって製造される抗哺乳類GPCR抗体等に関する。

(1) 哺乳類のGPCRの全長または一部を魚類に免疫する工程を含む、抗哺乳類GPCR抗体の製造方法。

(2) 魚類に免疫する工程が、哺乳類GPCRの全長または一部をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターを大腸菌または酵母に導入する工程、および当該大腸菌または酵母を魚類に曝露する工程を含む工程である上記(1)に記載の抗哺乳類GPCR抗体の製造方法。

(3) 哺乳類がヒトである上記(1)または(2)に記載の抗哺乳類GPCR抗体の製造方法。

(4) 哺乳類GPCRが、ヒトLGR(*leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor*、以下、L

10

20

30

40

50

G Rとする)である、上記(1)~(3)のいずれかに記載の抗哺乳類GPCR抗体の製造方法。

(5) ヒトLGRが、ヒトLGR3またはヒトLGR4である上記(4)に記載の抗哺乳類GPCR抗体の製造方法。

(6) 魚類がゼブラフィッシュ、金魚、フナまたはコイである上記(1)~(5)のいずれかに記載の抗哺乳類GPCR抗体の製造方法。

(7) 哺乳類GPCRの全長または一部を魚類に免疫する工程を含む製造方法によって得られる、抗哺乳類GPCR抗体。

(8) 魚類に免疫する工程が、哺乳類GPCRの全長または一部をコードする遺伝子を含む発現ベクターが導入された大腸菌または酵母を魚類に曝露する工程である、上記(7)に記載の抗哺乳類GPCR抗体。

(9) 哺乳類GPCRが、ヒトLGRである上記(7)または(8)に記載の抗哺乳類GPCR抗体。

(10) 哺乳類GPCRが、ヒトLGR3またはヒトLGR4である上記(9)に記載の抗哺乳類GPCR抗体。

(11) 魚類がゼブラフィッシュ、金魚、フナまたはコイである上記(7)~(10)のいずれかに記載の抗ヒトGPCR抗体。

(12) HRP(Horseradish Peroxidase、以下、HRPとする)で直接標識した魚類IgM抗体を用いる抗ヒトGPCR抗体の検出方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、抗哺乳類GPCR抗体の製造方法および当該方法によって得られる抗哺乳類GPCR抗体の提供が可能となった。本発明で得られる抗哺乳類GPCR抗体は、ヒト等の哺乳類GPCRに特異的に結合することから、哺乳類GPCRを標的分子とする治療用抗体や診断薬等に用い得る可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】ヒトLGR3(LRR)およびヒトLGR4(LRR)の発現を確認した図である(実施例)。

【図2】ヒトLGR3(LRR)およびヒトLGR4(LRR)の発現を確認した図である(実施例)。

【図3】ヒトLGR3(LRR)およびヒトLGR4(LRR)の発現を確認した図である(実施例)。

【図4】(A)抗ヒトLGR3抗体の発現の有無を確認した図である(実施例)。(B)抗ヒトLGR3抗体の蛍光検出の結果を示した図である(実施例)。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の「抗哺乳類GPCR抗体の製造方法」には、哺乳類GPCRの全長または一部を魚類に免疫する工程を含む、抗GPCR抗体が製造できる方法であればいずれの方法も含まれる。ここで哺乳類とは、いずれであってもよいが、例えばヒト、マウス、ラット等が挙げられる。

「哺乳類GPCRの全長または一部を魚類に免疫する工程」とは、哺乳類GPCRタンパク質の全部(すなわちアミノ酸配列の全長)または一部(すなわちポリペプチド)を魚類に注射したり、哺乳類GPCRの全長または一部をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターを大腸菌または酵母に導入し、この大腸菌や酵母を魚類に曝露したりして免疫することをいう。

哺乳類GPCRの「一部」としては、「抗哺乳類GPCR抗体」が製造できる部分であればGPCRのいずれの部分であってもよいが、特にGPCRのN末端にあるLeucine-rich repeat(以下、LRRとする)部分の全部または一部であることが好ましい。

10

20

30

40

50

このような部分としては、ヒトGPCRのひとつであるヒトLGRにおけるLRR部分が挙げられる。さらに詳しくはヒトLGR3のLRR部分(accession no. P16473(配列表配列番号1)、以下、ヒトLGR3(LRR)と示す)、またはヒトLGR4のLRR部分(accession no. NM_018490.2、(配列表配列番号2)、以下、ヒトLGR4(LRR)と示す)等が挙げられる。

【0011】

本発明の「抗哺乳類GPCR抗体」は、哺乳類GPCRを認識できる抗体であればいずれの抗体も含まれ、哺乳類GPCRの特定の部分のみを認識する抗体であってもよい。また、「GPCR」のうち、いずれのタンパク質を対象としてもよい。例えば、LGR等が挙げられ、さらに詳しくはLGR3、LGR4等が挙げられる。

10

【0012】

本発明の抗哺乳類GPCR抗体の製造に用いる「魚類」は、魚類であればいずれの魚であってもよいが、例えば、ゼブラフィッシュ、金魚、フナ、コイ等が挙げられる。

【0013】

本発明の「抗哺乳類GPCR抗体の検出方法」には、HRP等で直接標識した魚類IgM抗体を用いることができる。蛍光物質は従来知られているいずれの物質でもよいが、例えば3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride; DAB、Chemiluminescence (Nacalalai; 07880-70)等が挙げられる。蛍光物質を直接標識した抗体を用いることにより、高い検出感度で抗哺乳類GPCR抗体を検出することができる。

20

【0014】

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0015】

1. 抗原の調製

1) GPCR発現大腸菌の作製

哺乳類のGPCRとしてヒトLGR3(LRR)またはヒトLGR4(LRR)をそれぞれ発現用ベクター(pET15b、pET21bまたはpET22b、いずれもNovagen社製)に組み込み、LGR3(LRR)またはLGR4(LRR)発現ベクターとしてpET15b-hLGR3(LRR)、pET22b-hLGR3(LRR)またはpET21b-hLGR4(LRR)、pET22b-hLGR4(LRR)を作製した。

30

上記で作製した発現ベクターを大腸菌(BL21)にそれぞれ導入し、ヒトLGR3(LRR)またはヒトLGR4(LRR)の発現を試みた。それぞれの大腸菌が発現するタンパク質から、ヒトLGR3(LRR)またはヒトLGR4(LRR)の有無を、抗Hisタグ抗体(GEヘルスケア社製)を用いてウェスタンブロット法により解析した。

その結果、図1または2に示したように、ヒトLGR3(LRR)およびヒトLGR4(LRR)がいずれも発現したことが確認された。また、pET15b-hLGR3(LRR)を発現ベクターとして用いて発現させたヒトLGR3(LRR)は、大腸菌においてIPTG添加の有無にかかわらず、高発現することが確認された。なお、図1および2の(A)にはSDS-PAGEの結果を示し、(B)にはウェスタンブロットの結果を示した。

40

この結果より、これらの発現ベクターを導入した大腸菌が抗原として用い得ることが確認された。

【0016】

2) 免疫用飼料の作製

上記1)で作製した抗原タンパク質を発現する大腸菌をO.D.0.5付近まで培養し、発現誘導を行った後(誘導条件:pET:1mM IPTG, 25, 4時間;pColdTF:0.1mM IPTG, 15, 24時間)、2500g、10分間遠心分離

50

して集菌した。

湿重量で1gの大腸菌に対して2mlの100mg/mlアンピシリンナトリウムと4gのテトラミン粉末の割合となるよう混合し、ペースト状にして、エサ作製用テルモシリンジ（先をガスパーナーで熱し穴をふさいだ後、針（G21）で穴をあけたもの）で糸状の大腸菌入り餌とした。これを約2mmの粒状に刻み、免疫用飼料として用いた。

【0017】

2. 免疫動物（ゼブラフィッシュ）の調製

ゼブラフィッシュは水温27.5、明期14時間、暗期10時間で飼育したものを使用した。1試験区を50尾とし、合計6試験区、300尾のゼブラフィッシュを供した。幅60cm、奥行き30cm、高さ30cmの水槽に20Lの環境水をはり、その水槽を6個作成し、1水槽50尾で飼育した。

10

【0018】

3. 免疫

上記1.で調製した免疫用飼料をゼブラフィッシュに給餌することで、ヒトhLGR3（LR3）をそれぞれゼブラフィッシュに曝露した。

第1回目に曝露（これを0日目とする）してから10日目に第2回目の曝露を行い、16日目に血液を採取した。

曝露によってヒトLGR3に対する抗体またはヒトLGR4に対する抗体が得られたか否かはドットプロット法を用いて確認した。

20

【0019】

4. 確認

1) 抗体力価検出用タンパク質の作製

ヒトLGR3（LR3）またはヒトLGR4（LR4）を発現用ベクター（pColdTF、Takara社製）に組み込み、ヒトLGR3（LR3）またはヒトLGR4（LR4）発現ベクターとしてpColdTF-hLGR3（LR3）またはpColdTF-hLGR4（LR4）を作製した。

これらが大腸菌にそれぞれ導入し、ヒトLGR3（LR3）またはヒトLGR4（LR4）を発現させた。得られたタンパク質を精製し、市販抗Hisタグ抗体（GEヘルスケア社製）を用いてウェスタンブロット法により解析した。

その結果、図3に示したように、ヒトLGR3（LR3）およびヒトLGR4（LR4）は、いずれも可溶性画分に高発現していることが確認された。なお、図3（A）にはSDS-PAGEの結果を示し、図3（B）にはウェスタンブロットの結果を示した。このうち精製ヒトLGR3（LR3）を濃度既知のタンパク質標品として抗体の発現確認に用いた。

30

【0020】

2) 抗体の発現確認

上記3.の抗原曝露後のゼブラフィッシュより採取した血清について、HRPで直接標識（GEヘルスケア社製）した抗ゼブラフィッシュIgM抗体（本発明者研究室所有）を用いてドットプロット解析を行った。なお、比較として免疫をしていないマウス血清およびゼブラフィッシュ血清を用いた。

40

その結果、図4（A）に示したように、ヒトLGR3（LR3）（100ng）におけるドットプロットにおいて、優位にスポットが検出された。また蛍光強度を数値化した結果、図4（B）に示したように、抗原タンパク質であるヒトLGR3（LR3）が250ng以上では飽和しており、100ng以下の濃度で直線的な相関を示すことが確認された。

以上の結果より、ヒトLGR3発現大腸菌を曝露したゼブラフィッシュ血清は抗ヒトLGR3抗体を生産していることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0021】

本発明の製造方法により、魚類を用いたヒト等の哺乳類における抗哺乳類GPCR抗体

50

の製造が可能となった。本発明の製造方法は簡便であるため、容易に抗哺乳類GPCR抗体を製造することができる。また、本発明の製造方法によって得られる抗哺乳類GPCR抗体は、ヒト等の哺乳類のGPCRに特異的に結合することから、哺乳類GPCRを標的分子とする治療用抗体や診断薬等として用い得る可能性があり、これらの研究に役立てることもできる。

[配列表]

JPOXMLDOC01-seq1.app

SEQUENCE LISTING

<110> MIE University
 <120> The production method of anti GPCR antibody and the antibody.
 <130> MIE003
 <150> JP 2009-083900
 <151> 2009-3-31
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2295
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atgaggccgg cggacttgct gcagctggcg ctgctgctcg acctgcccag ggacctgggc 60
 ggaatggggt gttcgtctcc acctgcgag tgccatcagg aggaggactt cagagtcaac 120
 tgcaaggata ttcaacgcat cccagctta ccgaccagta gcgagactct gaagcttatt 180
 gagaotcaac tgagaactat tcaagtoat gcattttcta atctgcccac tatttcaga 240
 atctacgtat ctatagatgt gactctgcag cagctggaat cacactcctt ctacaattg 300
 agtaaagtga ctacataga aattoggaat accaggaact taacttaoat agaccctgat 360
 gccctcaaag agotccccct octaaagttc cttggcattt tcaaacctgg acttaaaatg 420
 ttcootgacc tgaccaaagi ttattccact gatataattt ttatacttga aattacagac 480
 aaccottaca tgacgtcaac cctgtgaat gcttttcagg gactatgoaa tgaaccttg 540
 acactgaagc tgtacaacaa cggctttact tcagttcaag gatatgcitt caatgggaca 600
 aagctggatg ctgtttacct aaacaagaat aaatacctga cagttattga caaagatgoa 660
 ttggaggag tatacagtg accaagcttg ctggacgtgt ctcaaaccag tgtoactgco 720
 ctccatcca aaggcotgga gcacctgaag gaactgatag caagaaacac ctggactcct 780
 aagaaacttc cactttcctt gattttcctt cacctcacac ggctgacct ttottaocca 840
 agccactgct gtgcttttaa gaatcagaag aaaatcagag gaatccttga gtccttgatg 900
 tgtaatgaga gcagtatgca gagcttgcg cagagaaaat ctgtgaatgo cttgaatagc 960
 cccctccacc aggaatatga agagaatctg ggtgacagca ttgttgggta caaggaaaag 1020
 tccaagtcc aggataotca taacaacgct cattattacg totttttga agaacaagag 1080
 gatgagatca ttggttttgg ccaggagctc aaaaacccc aggaagagac totacaagct 1140
 ttgacagcc attatgacta caccatattt ggggacagtg aagacatggt ggtaccoccc 1200
 aagtcgatg agttcaacco gtgtgaagac ataatgggct acaagttcot gagaattgtg 1260
 gtgtggttcg ttagtctgt ggotctctcg ggaatgtct ttgtctgtct tattctctct 1320
 accgccaact acaaatgaa cgtccccccg tttctcatgt gcaacctggc ctttgcggat 1380
 ttctgatgg ggatgtaoat gctcctcact gctctgtag acctctaac tcaactotgag 1440
 tactacaacc atgcoatga ctggcagaca ggccctgggt gcaacacggc tggtttctc 1500
 actgtcttg caagcgagtt atcgggtgat acgctgacgg tcatcaccct ggagcgtgg 1560
 tatgccatca ccttgcctat gcgcctggac cgggaagatcc gcctcaggca cgcattgtcc 1620

10

20

30

40

JPOXMLDOC01-seq1.app

atcatggttg ggggctgggt ttgctgcttc cttctogccc tgottccttt ggtgggaata 1680
 agtagctatg ccaagtcag tatctgctg occatggaca cagagacccc tcttgcctg 1740
 gcatatattg ttttgttot gacgtcaac atagttgctt tctcatctgt ctgctgctgt 1800
 tatgtgaaga tctacatcac agtcogaat cgcagtaga acccagggga caaagatacc 1860
 aaaattgcca agaggatggt tgtgtgato ttcaccgact tcatatgcat ggcccacac 1920
 tcattctatg ctctgctcgc aattgtaac aagcctctca tcaactgttag caactocaaa 1980
 atcttgcctg tactcttcta tccactaac tctgtgcca atocattctt ctatgctatt 2040
 ttcaccaagg ccttcagag gtagtgttc atctactca gcaagtttg catctgtaaa 2100
 cgcaggctc aggcatacag gggcagagg gttctccaa agaacagcac tcatattcag 2160
 gttcaaaagg ttaccacga catgaggcag ggtctccaca acatggaaga tctctatgaa 2220
 ctgattgaaa actccatct aaccccaag aagcaaggcc aatctcaga agagtatctg 2280
 caaacggitt tctaa 2295

10

<210> 2
 <211> 2856
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 2
 atgcggggc cgtagggtt gctctgttc ctgcctctg gctgctcgg ctggcgggg 60
 cccagcggc cggcgcggc tctctgctg cgcctctca gctgcgacgg cgcctctgg 120
 gtgactgtt cgggaaggg gctgacggc gtgcccagg gctcagcgc cttcaccac 180
 gcgtggata tcatatgaa caacattact cagttgccc aagatgcatt taagaacttt 240
 cctttctag aagactaca attggcggc aacgacctt cttttatca cccaaaggcc 300
 ttgtotggg tgaagaact caaagtcta acgctcaga ataactcatt gaaaacagta 360
 cccagtgaag ccattcagg gctgagctt ttgcagtct tgcgtttaga tgccaacct 420
 attactcag tcccggagg cagttttgaa ggaactgtt agttcggca tctgtgctg 480
 gatgacaaca gcttgcagg ggtgcctgt caccctctc gcaatctgc caccctacg 540
 gcgtgacct tggctctca caagatctc agcatcctg actttgcatt taccacact 600
 tcaagcctg tagttctca tctcataac aataaatta gaagcctgag tcaacactgt 660
 tttgatggc tagataact ggagacctt gactgaatt ataacttt ggggaattt 720
 cctcaggct taaagcctt tctagcctt aaagactg gatttcctg taattctatt 780
 totgttatc ctgatggag atttgatgt aatccactt taagaactat acattgtat 840
 gataatctc tctctttgt ggggaactc gcatttaca atttatctg tcttacttc 900
 ctatctctc gtggtgcaag catggtgag cagttccca atcttacag aactgtcac 960
 ctggaagtc tcaacttgc aggtacaaag ataagcagc tactaataa ttgtgtcaa 1020
 gaacaaaaga tcttaggac ttggactt tcttacaata atataagaga cttccaagt 1080
 tttaatggt gccatgctt ggaagaaatt tctttacag gtaatcaat ctaccaata 1140
 aaggaggca ctttcaagg cctgatatc ctaaggatto tagatctgag tagaaactg 1200
 atacatgaa ttcacagtag agcttttgc acacttggc caataactaa cctagatgta 1260

30

40

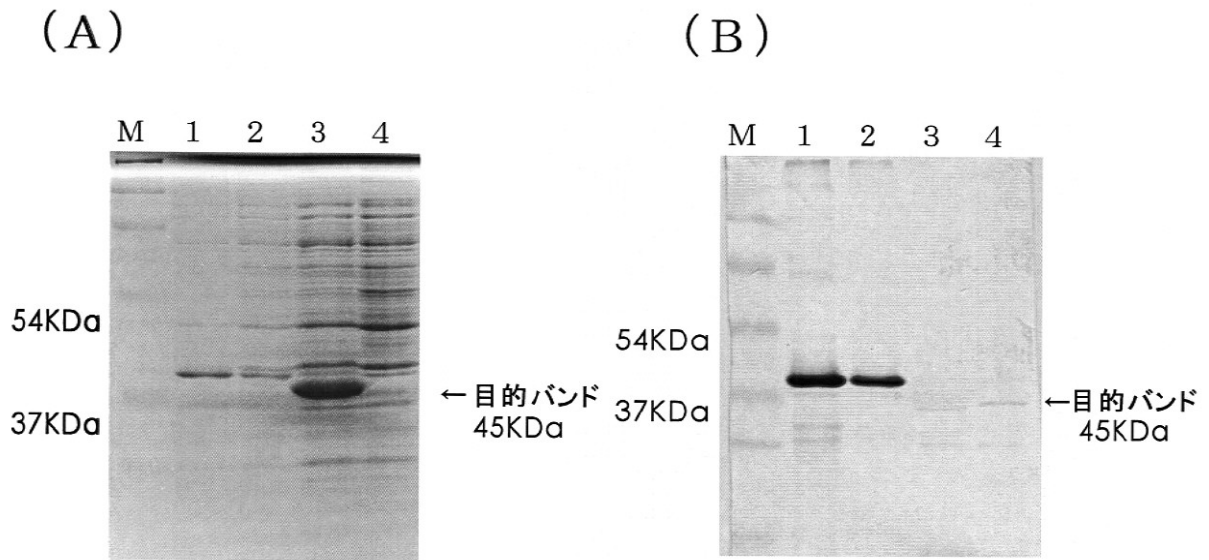
JPOXMLDOC01-seq1.app
 agtttcaatg aattaacttc ctttcotacg gaaggcootga atgggctaaa tcaactgaaa 1320
 cttgtgggca acttcaagot gaaagaagcc ttagcagcaa aagaactttgt taacctcagg 1380
 tctttatcag taccatgatg ttatcagtgc tgtgcatttt ggggttgtga ctottatgca 1440
 aatttaaca cagaagataa cagcctccag gaccacagtg tggcacagga gaaaggtact 1500
 gctgatgcag caaatgtcac aagcactctt gaaaatgaag aacatagtca aataattato 1560
 cattgtaaac ottoaacagg tgottttaag ccotgtgaat atttactggg aagctggatg 1620
 attogtotta ctgtgtgggt cattttcttg gttgcattat ttttcaacct gotigtatt 1680
 ttaacaacat ttgatcttg tacatcactg ccttctcca aattgttat aggcttgatt 1740
 tctgtgtota acttattoat gggaatctat actggcatcc taactttctt tgatgctgtg 1800
 tctgtgggca gattcgtgca atttggcatt tgggtggaaa ctggcagtgg ctgcaaagta 1860
 gctgggttcc ttgcagtttt ctctcagaa agtgccatat ttttattaat gotagcaact 1920
 gtgaaaagaa gcttatctgc aaaagatata atgaaaaatg ggaagagcaa tcatctcaaa 1980
 cagttccggg ttgtgcocct tttggcttcc ctagggtgta cagtagcagg ctgttttccc 2040
 cttttccata gagggaata ttotgcatca cccctttgtt tgcatttcc tacaggtgaa 2100
 acgccatcat taggatcac tgtaacgta gtgotattaa actactago atttttatta 2160
 atggccgita totacactaa gotatactgc aacttggaaa aagaggacot ctcaaaaaac 2220
 tcacaatcta gcatgattaa gcatgtogct tggctaactc tcaccaattg catcttttcc 2280
 tgccctgtgg cgttttttcc atttgcacca ttgatactg caatctctat cagcccogaa 2340
 ataatgaagt ctgttactct gatatttttt ccattgcctg cttgcctgaa tccagtctg 2400
 tatgttttct tcaaccocaa gtttaagaa gactggaagt tactgaagcg acgtgttacc 2460
 aagaaaagtg gatcagtttc agtttccatc agtagccaag gtggttctct ggaacaggat 2520
 ttctactacg actgtggcat gtactccatc ttgcagggca acctgactgt ttgcgactgc 2580
 tgcgaatcgt ttcttttaac aaagccagta tcatgcaaac acttgataaa atcacacagc 2640
 tgtctctgat tggcagtggc ttottgocaa agaactgagg gctactggtc cgactgtggo 2700
 acacagtogg cccactctga ttatgcagat gaagaagatt cctttgtctc agacagttct 2760
 gaccaggtgc aggctgttgg acgagcctgc ttctaccaga gtagaggatt ccttttgggt 2820
 cgctatgott acaatctacc aagagttaa gactga 2856

10

20

30

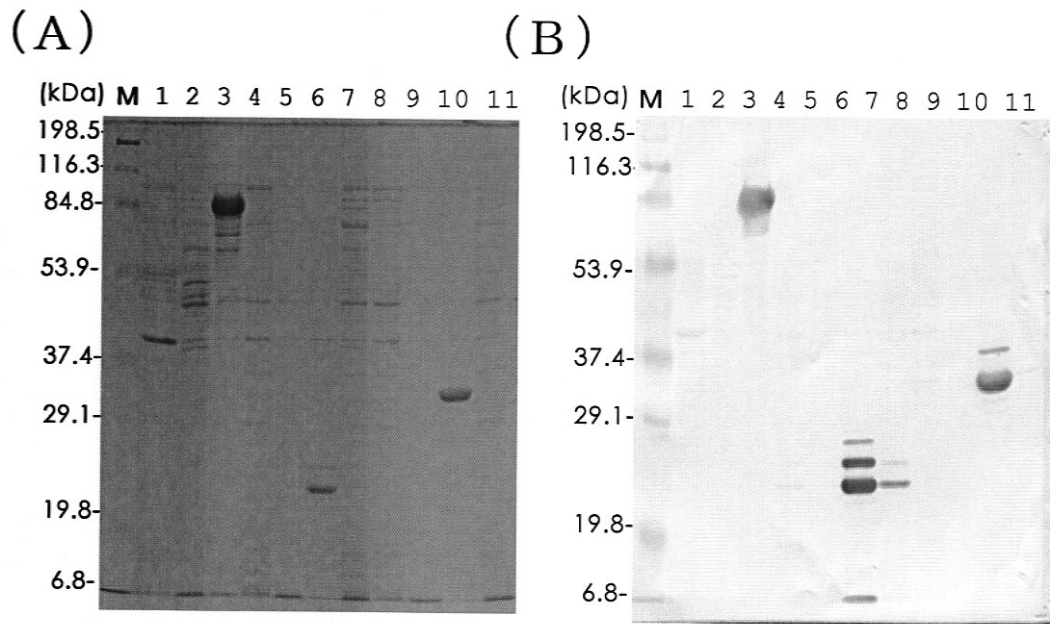
【 図 1 】



Prestained Marker

- 1, pET15b-hLGR3 1mM IPTG
- 2, pET15b-hLGR3 0mM IPTG
- 3, pET21b-hLGR4 1mM IPTG
- 4, pET21b-hLGR4 0mM IPTG

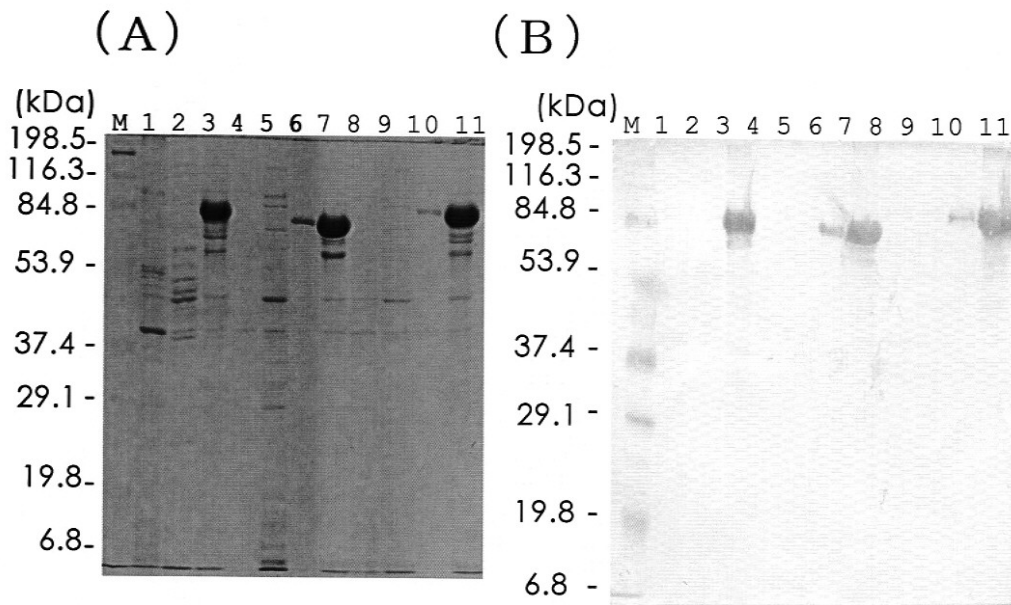
【 図 2 】



M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range

- 1, E. coli BL21 のみ, 不溶画分
- 2, E. coli BL21 のみ, 可溶画分
- 3, pColdTF-EGFP 可溶画分 (発現確認済みサンプル)
- 4, pET-22b-hLGR3 (LRR), 誘導前, 不可溶画分
- 5, pET-22b-hLGR3 (LRR), 誘導前, 可溶画分
- 6, pET-22b-hLGR3 (LRR), 誘導後 (IPTG 1mM), 不溶画分
- 7, pET-22b-hLGR3 (LRR), 誘導後 (IPTG 1mM), 可溶画分
- 8, pET-22b-hLGR4 (LRR), 誘導前, 不可溶画分
- 9, pET-22b-hLGR4 (LRR), 誘導前, 可溶画分
- 10, pET-22b-hLGR4 (LRR), 誘導後 (IPTG 1mM), 不溶画分
- 11, pET-22b-hLGR4 (LRR), 誘導後 (IPTG 1mM), 可溶画分

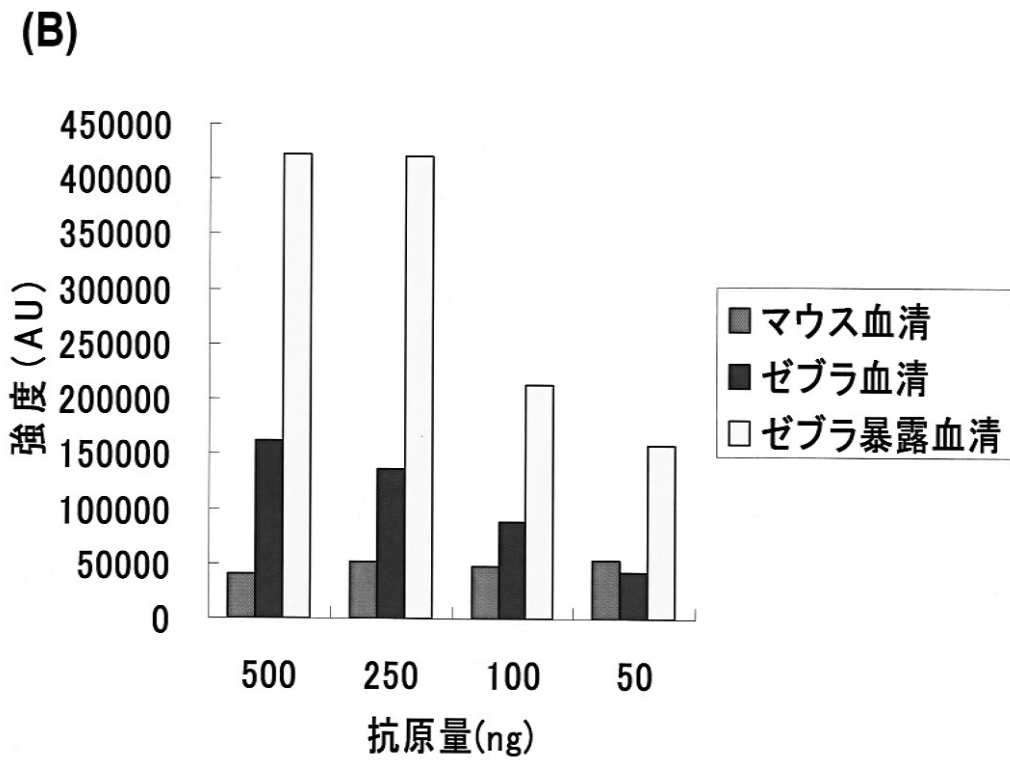
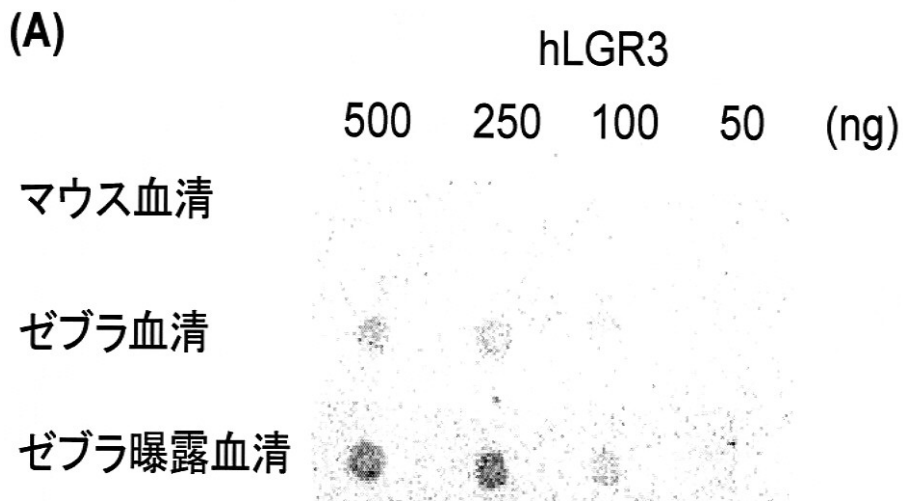
【 図 3 】



M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range

- 1, E. coli BL21 のみ, 不溶画分
- 2, E. coli BL21 のみ, 可溶画分
- 3, pColdTF-EGFP 可溶画分;
- 4, pColdTF-hLGR3, IPTG 誘導前, 不溶画分
- 5, pColdTF-hLGR3, IPTG 誘導前, 可溶画分
- 6, pColdTF-hLGR3, IPTG 誘導後, 不溶画分
- 7, pColdTF-hLGR3, IPTG 誘導後, 可溶画分
- 8, pColdTF-hLGR4, IPTG 誘導前, 不溶画分
- 9, pColdTF-hLGR4, IPTG 誘導前, 可溶画分
- 10, pColdTF-hLGR4, IPTG 誘導後, 不溶画分
- 11, pColdTF-hLGR4, IPTG 誘導後, 可溶画分

【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/055783
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i 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) C07K16/28, C12N15/09, G01N33/53 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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/X	JP 5-503849 A (Institut National De La Sante Et De La Recherche Medicale), 24 June 1993 (24.06.1993), & EP 510075 A2 & WO 1991/010735 A2	1-6, 12/7-11
Y/X	WO 2006/112401 A1 (Hamamatsu University School of Medicine), 26 October 2006 (26.10.2006), (Family: none)	1-6, 12/7-11
Y	Takeshi KOBAYASHI, "DNA Men'ekiho ni yoru Kotai no Sakusei", Journal of the Society for Bioscience and Bioengineering, Japan, 2008, vol.86, pages 384 to 386	1-12
<input checked="" 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 19 May, 2010 (19.05.10)		Date of mailing of the international search report 01 June, 2010 (01.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/055783

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-255892 A (Mie University), 04 October 2007 (04.10.2007), (Family: none)	1-12
Y	Shin'ichi AKIYAMA et al., "Development of antibody-producing system in fish for the recombinant products expressed by E. coli", Abstracts of the 59th annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2007, page 148, 3F11-4	1-12
Y	JP 2007-143497 A (Yutaka TAMARU), 14 June 2007 (14.06.2007), (Family: none)	1-12
P, X	Hisayoshi ISHIKAWA, "Hito GPCR ni Taisuru Gyorui Kotai Sakuseiho no Kaihatsu", Dai 32 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 2009 11 Gatsu, vol.32, no.vol.1, page 256	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/055783									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
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. C07K16/28, C12N15/09, G01N33/53											
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>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010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	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
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 請求項の番号									
Y/ X	JP 5-503849 A (アンステイテユ・ナシオナル・ドウ・ラ・サンテ・エ・ドウ・ラ・ルシエルシユ・メデイカル) 1993.06.24, & EP 510075 A2 & WO 1991/010735 A2	1-6, 12/ 7-11									
Y/ X	WO 2006/112401 A1 (国立大学法人浜松医科大学) 2006.10.26, (ファミリーなし)	1-6, 12/ 7-11									
Y	小林岳史, DNA 免疫法による抗体の作製, 生物工学会雑誌, 2008, vol. 86, p. 384-386	1-12									
<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、展示等に言及する文献 「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 19.05.2010		国際調査報告の発送日 01.06.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 福間 信子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3539								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 5 7 8 3
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 請求項の番号
Y	JP 2007-255892 A (国立大学法人三重大学) 2007.10.04, (ファミリーなし)	1-12
Y	秋山真一他, 大腸菌由来遺伝子組換え産物に対する魚類抗体生産系の開発, 第59回日本生物工学会大会講演要旨集, 2007, p.148, 3F11-4	1-12
Y	JP 2007-143497 A (田丸浩) 2007.06.14, (ファミリーなし)	1-12
P, X	石川文啓, ヒト GPCR に対する魚類抗体作製法の開発, 第32回日本分子生物学会年会講演要旨集, 2009 11 月, vol.32, no.vol.1 p.256	1-12

フロントページの続き

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

(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。

专利名称(译)	抗gpcr抗体的生产方法和抗gpcr抗体		
公开(公告)号	JPWO2010113988A1	公开(公告)日	2012-10-11
申请号	JP2011507242	申请日	2010-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人三重大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人三重大学		
[标]发明人	田丸浩		
发明人	田丸 浩		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/53 G01N33/536 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/2869 C07K2317/20 G01N2333/726		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.N G01N33/536.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA20 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2009083900 2009-03-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了关于产生抗哺乳动物GPCR抗体的方法和抗体本身的讨论。通过将鱼暴露于全长或截短的哺乳动物GPCR中进行免疫接种来生产抗哺乳动物GPCR抗体，并讨论了可以通过这种方法获得的抗哺乳动物GPCR抗体。

