

(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2006-143641

(P2006-143641A)

(43) 公開日 平成18年6月8日(2006.6.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	4B064
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-335441 (P2004-335441)	(71) 出願人	503359821
(22) 出願日	平成16年11月19日 (2004.11.19)		独立行政法人理化学研究所
			埼玉県和光市広沢2番1号
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	110000109
1. テフロン			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	小嶋 聡一
			埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
			理化学研究所内
		(72) 発明者	辰川 英樹
			埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人
			理化学研究所内
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CA21 CB30
			CC24 CE12 DA13
			4H045 AA11 BA30 CA40 DA76 DA86
			EA50 EA51 FA71 FA72 GA26
			HA06 HA07

(54) 【発明の名称】 架橋Sp1に特異的な抗体

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼを介する新しい細胞死（アポトーシス）の過程で生成する架橋不活性化された転写因子Sp1を特異的に認識する抗体を作製し、いままで特異的に検出することが困難であったトランスグルタミナーゼ依存アポトーシス経路を特異的に検出する方法を提供すること。

【解決手段】 架橋された転写因子Sp1を特異的に認識することができる抗体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

架橋された転写因子 S p 1 を特異的に認識することができる抗体。

【請求項 2】

ポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

架橋された転写因子 S p 1 が、分子量 4 5 万以上の活性を失った S p 1 である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の抗体。

10

【請求項 5】

架橋された転写因子 S p 1 が、S p 1 にトランスグルタミナーゼが作用することにより生成するものである、請求項 1 から 4 の何れかに記載の抗体。

【請求項 6】

未架橋の S p 1 は認識することができない、請求項 1 から 5 の何れかに記載の抗体。

【請求項 7】

架橋された転写因子 S p 1 を抗原として免疫動物に投与し、該免疫動物から採取した架橋 S p 1 抗体画分から S p 1 結合担体を用いた精製により未架橋 S p 1 を認識する抗体を除去することにより得られる、請求項 1 から 6 の何れかに記載の抗体。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 の何れかに記載の抗体を含む、アポトーシス検出試薬。

20

【請求項 9】

アポトーシスがトランスグルタミナーゼ依存性のものである、請求項 8 に記載の試薬。

【請求項 10】

請求項 1 から 7 の何れかに記載の抗体を用いて、アポトーシスを検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、架橋重合化された転写因子 S p 1 を特異的に認識する抗体、及びその利用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

アポトーシスは、個体発生過程での肢芽形成、自己反応性免疫細胞の除去、がん細胞の除去など多くの生物系で認められる計画的細胞死である。アポトーシスの形態的特徴としては、染色体の凝集、細胞核の断片化、細胞表層微纖毛の消失、及び細胞質の凝縮などである。アポトーシスの過程では、カスパーゼと称される一群のシステインプロテアーゼの活性化カスケードが起こる。その結果、最終的にカスパーゼ 3 によってヌクレアーゼインヒビターの inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) が分解されるためにヌクレアーゼの CAD が解き放たれて核に移行し、クロマチンの切断が引き起こされるが、カスパーゼ非依存のアポトーシス経路が存在することも知られていた（非特許文献 5）。

40

【0003】

トランスグルタミナーゼ (TG) は、タンパク質の Gln-Lys 残基間にイソペプチド結合を形成する一群の Ca^{2+} 依存性タンパク質架橋酵素である。血漿 TG、皮膚 TG、組織 TG など現在少なくとも 10 種類以上が知られており、その基質も多様である。発生過程における細胞死、肝臓・胸腺皮質・前立腺・乳腺・乾癬を起こした皮膚に見られる細胞死、神経疾患、H I V 感染、癌細胞の化学療法に伴う細胞死など、様々な生理的・病理的状況下において、アポトーシスに陥った組織・細胞は組織トランスグルタミナーゼを高発現することが知られており、組織トランスグルタミナーゼの発現誘導がアポトーシス誘起の一主要経路と考えられている（非特許文献 1～6）。

50

【0004】

組織トランスグルタミナーゼとアポトーシスとの関係に関するこれまでの研究から、トランスグルタミナーゼは核に移行して転写因子 Sp1 を架橋不活性化することにより細胞の生存に必要な遺伝子やアポトーシスを阻害する遺伝子の発現を停止させる結果、アポトーシスを誘導していること、そしてこの機構がカスパーゼ非依存的であることが示唆されている。即ち、アポトーシスを起こした細胞においては、トランスグルタミナーゼにより Sp1 が架橋されることが示唆されている（図1；非特許文献1～6）。

【0005】

アポトーシスの検出には、活性型カスパーゼ抗体（活性化の過程で切断された種々のカスパーゼの断面に対する抗体）や、カスパーゼの下流で切断されるクロマチンを検出する方法（TUNEL法）、カスパーゼの上流で動くチトクロームCの放出を検出する方法などが従来から用いられてきたが、トランスグルタミナーゼ依存アポトーシス経路は、カスパーゼ経路とは独立しており、上記した方法では特異的に検出することができなかった。

10

【0006】

架橋されていない Sp1 に対する抗体は既に市販されていたが、Sp1 がトランスグルタミナーゼで架橋重合化されると、架橋重合化の程度に従いこの抗体に対する抗原性が低下し、同抗体では架橋不活性化された Sp1 を検出することができなかった。架橋された Sp1 を特異的に認識できる抗体があれば、細胞内の架橋 Sp1 を検出・測定することにより、トランスグルタミナーゼ依存性のアポトーシスを検出できるが、このような抗体の作製は、これまでの所、報告がない。

20

【0007】

【非特許文献1】Tissue transglutaminase, a key enzyme involved in liver diseases, Hepatol Res. 29巻1号、2004年5月発行、Wu J, Zern MA., pp.1-8

【非特許文献2】生体内バイオハイブリッド反応：架橋多機能性酵素トランスグルタミナーゼによるタンパク質の機能変換、化学工業54巻12号、2003年12月発行、辰川英樹、小嶋聡一、pp.908-915

【非特許文献3】Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem Sci. 27巻10号、2002年10月発行、Fesus L, Piacentini M., pp.534-539

【非特許文献4】トランスグルタミナーゼ関連疾患の分子病態、実験医学18巻10号、2000年発行、一瀬白帝、小嶋聡一、pp.1421-1425

30

【非特許文献5】トランスグルタミナーゼとアポトーシス、生化学72巻3号、2000年発行、小嶋聡一、一瀬白帝、pp.198-202

【非特許文献6】トランスグルタミナーゼ：タンパク質架橋反応が司る多彩な生命現象、細胞工学18巻7号、1999年発行、小嶋聡一、一瀬白帝、pp.1030-1038

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼを介する新しい細胞死（アポトーシス）の過程で生成する架橋不活性化された転写因子 Sp1 を特異的に認識する抗体を作製し、今まで特異的に検出することが困難であったトランスグルタミナーゼ依存アポトーシス経路を特異的に検出する方法を提供することを解決すべき課題とした。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

トランスグルタミナーゼを介するアポトーシスでは、アポトーシスを誘導する種々の刺激を受けた細胞中でトランスグルタミナーゼが細胞の核に移行し、細胞の生存に必須である転写因子 Sp1 を架橋不活性化することが原因であることが最近わかってきた。本発明では、架橋不活性化した Sp1 だけを特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用いることにより、従来市販されている架橋されていない Sp1 に対する抗体では、特異的に検出できなかった（区別できなかった）トランスグルタミナーゼ依存アポトーシスに陥った

50

細胞や組織を、特異的に検出することが可能となった。

【0010】

即ち、本発明によれば、架橋された転写因子 Sp1 を特異的に認識することができる抗体が提供される。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体でもよいし、モノクローナル抗体でもよい。

好ましくは、架橋された転写因子 Sp1 は、分子量 45 万以上の活性を失った Sp1 である。

好ましくは、架橋された転写因子 Sp1 は、Sp1 にトランスグルタミナーゼが作用することにより生成するものである。

好ましくは、本発明の抗体は、未架橋の Sp1 は認識することができない。

10

【0011】

好ましくは、本発明の抗体は、架橋された転写因子 Sp1 を抗原として免疫動物に投与し、該免疫動物から採取した架橋 Sp1 抗体画分から Sp1 結合担体を用いた精製により未架橋 Sp1 を認識する抗体を除去することにより得られる抗体である。

【0012】

本発明の別の側面によれば、上記した本発明の抗体を含む、アポトーシス検出試薬が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の抗体を用いて、アポトーシスを検出する方法が提供される。

好ましくは、検出対象となるアポトーシスはトランスグルタミナーゼ依存性のものである。

20

【発明の効果】

【0013】

本発明の抗体を用いることにより、すでにトランスグルタミナーゼ依存アポトーシスの関与が示唆されている、肝疾患にける肝細胞のアポトーシスや、神経変性疾患における神経細胞のアポトーシス、抗癌剤による癌細胞のアポトーシスを検出するとともに、これまでトランスグルタミナーゼの関与が知られていなかった病態におけるトランスグルタミナーゼ依存アポトーシスの関与を検出することが可能となり、得られた知見を基に、例えばトランスグルタミナーゼに対する特異的な阻害剤や抗体を用いてトランスグルタミナーゼ依存アポトーシス経路をコントロールすることに基づく新しい治療・予防法が開発されるものと期待される。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の抗体は、架橋された転写因子 Sp1 を特異的に認識することを特徴とする抗体である。本発明で言う「架橋された転写因子 Sp1」とは、好ましくは Sp1 にトランスグルタミナーゼが作用することにより生成する架橋された Sp1 である。通常、このような架橋された Sp1 は、少なくとも 5 分子以上の Sp1 が架橋重合化したもので、分子量 45 万以上を有している。本発明の抗体は、好ましくは、未架橋の Sp1 を認識しない抗体である。トランスグルタミナーゼが基質タンパク質に作用すると基質となるリジン残基とグルタミン残基の間にイソペプチド結合という架橋構造が形成される。本発明の抗体は、好ましくは、トランスグルタミナーゼの作用によって Sp1 分子内および分子間に形成されるイソペプチド結合を含む構造（アミノ酸配列または立体構造）を認識する抗体である。

40

【0015】

本発明の抗体の具体例としては、架橋された転写因子 Sp1 を抗原として免疫動物に投与し、該免疫動物から採取した架橋 Sp1 抗体画分から Sp1 結合担体を用いた精製により未架橋 Sp1 を認識する抗体を除去することにより得られる抗体を挙げることができる。

【0016】

50

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れでもよい。本発明の抗体の作製は定法により行なうことができる。

【0017】

本発明の抗体は、例えば、架橋された転写因子 Sp1 を抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。抗原として用いる架橋された転写因子 Sp1 は、Sp1 にトランスグルタミナーゼを作用させることにより作製することができる。本発明では、例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。免疫感作の方法としては、当業者に公知の通常の免疫感作の方法を用いて、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。

10

【0018】

抗原投与は、例えば、7から30日、特に12から16日間隔で2または3回投与することができる。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05から2mg程度を目安とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹腔腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹腔腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント、RAS〔MPL(Monophosphoryl Lipid A)+TDM(Synthetic Trehalose Dicorynomycolate)+CWS(Cell Wall Skeleton) アジュバントシステム〕、水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等によっては、上記したアジュバントは使用しない場合もある。

20

【0019】

免疫感作した哺乳動物を0.5から4ヶ月間飼育した後、該哺乳動物の血清を耳静脈等から少量サンプリングし、抗体価を測定することができる。抗体価が上昇してきたら、状況に応じて抗原の投与を適当回数実施する。例えば10 μ g~1000 μ gの抗原を用いて追加免疫を行なうことができる。最後の投与から1~2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から通常の方法により血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、本発明のポリクローナル抗体を得ることができる。なお血清は、たとえば、56℃で30分間処理することによって補体系を不活性化してもよい。

30

【0020】

本発明の抗体は、特に、上記のようにして取得した架橋 Sp1 抗体画分から、Sp1 結合担体を用いた精製により、未架橋 Sp1 を認識する抗体を除去することにより得られるものであることが好ましい。Sp1 結合担体を用いた精製を行うことにより未架橋 Sp1 を認識する抗体を除去することによって、架橋された転写因子 Sp1 を特異的に認識することができ、未架橋の Sp1 は認識することができない抗体を取得することができる。

【0021】

また、本発明の抗体がモノクローナル抗体の場合、該モノクローナル抗体のグロブリンタイプは特に限定されず、例えば IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 等が挙げられる。また、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト化抗体又はヒト抗体でもよい。

40

【0022】

モノクローナル抗体の作製は、当業者に既知の方法により行うことができ、例えば、ハイブリドーマを用いた方法により行うことができる。本発明のモノクローナル抗体を産生する細胞株は特に制限されないが、例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマとして得ることができる。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

【0023】

50

抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、ポリクローナル抗体の場合と同様の架橋された転写因子Sp1を使用することができる。免疫される動物としてはマウス、ラット等が使用され、これらの動物への抗原の投与は常法に従って行う。例えば完全フロインドアジュバント、不完全フロインドアジュバントなどのアジュバントと抗原（架橋された転写因子Sp1）との懸濁液もしくは乳化液を調製し、これを動物の静脈、皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とをそれ自体公知の方法（G.Kohler et al., Nature, 256 495(1975)）により融合することにより、ハイブリドーマを作製することができる。

【0024】

10

細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスではP3X63Ag8、P3U1株、Sp2/0株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選抜にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）培地を常法に従って使用することができる。細胞融合により得られたハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングすることができる。更に、酵素免疫測定法（ELISA）等によりスクリーニングを行なうことにより、架橋された転写因子Sp1を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。

【0025】

このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、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などを適宜組み合わせて使用できる。

20

【0026】

また、上記したような各種抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント等が挙げられる。

【0027】

本発明の抗体は標識抗体として使用することもできる。標識抗体を作製することにより、架橋された転写因子Sp1の検出や測定を簡便に行うことができる。抗体の標識の種類及び標識方法は当業者に知られているものから適宜選択することができる。

30

【0028】

標識として酵素を使用する場合には、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ等を標識として使用することができる。これらの酵素を本発明の抗体又はその断片（F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント等）に標識する方法としては、酵素の糖鎖を過ヨウ素酸で酸化し、生成したアルデヒド基に該抗体などのアミノ酸を結合させる方法や、酵素にマレイミド基あるいはピリジルスルフィド基等を導入し、該抗体のFab'フラグメントに存在するチオール基と結合させる方法等を挙げることができる。

40

【0029】

標識として酵素を使用する場合、試験試料と標識抗体とをインキュベートした後、遊離した標識抗体を洗浄して除去してから、上記の標識酵素の基質を作用させて発色等で反応を測定することによって標識抗体を検出することができる。例えば、ペルオキシダーゼで標識される場合には、基質として過酸化水素、発色試薬としてジアミノベンジジンまたはオーフェニレンジアミンと組み合わせさせて褐色または黄色を生じる。グルコースオキシダーゼで標識される場合には、基質として、たとえば2,2'-アシドージ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS）等を用いる。

50

【0030】

標識として蛍光色素を使用する場合には、例えば、F I T C（フルオレセインイソチオシアネート）又はT R I T C（テトラメチルローダミンBイソチオシアネート）等の蛍光色素で本発明の抗体又はその断片を標識することができる。本発明の抗体又はその断片と蛍光色素との結合は常法によって行うことができる。

【0031】

標識として呈色標識物質を使用する場合には、例えば、コロイド金属および着色ラテックスなどを標識として使用できる。コロイド金属の代表例としては、金ゾル、銀ゾル、セレンゾル、テルルゾルおよび白金ゾルなどのそれぞれの分散粒子である金属コロイド粒子を挙げることができる。コロイド金属の粒子の大きさは、通常は、直径3～60 nm程度とされる。また、着色ラテックスの代表例としては、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスを挙げることができる。ラテックスとして天然ゴムラテックスのような天然ラテックスを使用することができる。着色ラテックスの大きさは、直径数十nm～数百nm程度から選択することができる。これらの呈色標識物質は市販品をそのまま使用することができるが、場合によりさらに加工し、または、それ自体公知の方法で製造することもできる。

【0032】

本発明の抗体又はその断片と呈色標識物質との結合は常法によって行うことができる。例えば、呈色標識物質が金ゾルの分散粒子である金コロイド粒子の場合には、通常は、抗体と金ゾルとを室温下で混合することによって両者を物理的に結合することが可能である。

【0033】

なお、標識としては、上記以外にもアフィニティー標識（例えば、ビオチン等）、又は、同位体標識（例えば、 125 I等）等を使用することもできる。

【0034】

本発明の標識抗体を用いた酵素抗体法、免疫組織染色法、免疫ブロット法、直接蛍光抗体法又は間接蛍光抗体法等の分析は当業者に周知の方法で行なうことができ、その実験条件も当業者ならば適宜選択することができる。

【0035】

本発明の抗体を用いることにより、生体試料又は組織中において、架橋された転写因子S p 1を検出又は測定することができ、これによりアポトーシスを検出・診断することができる。即ち、本発明の抗体は、アポトーシス検出試薬として使用することができる。本発明の抗体を用いたアポトーシス検出試薬、及びアポトーシス検出方法も本発明の範囲内である。検出対象となるアポトーシスは、好ましくはトランスグルタミナーゼ依存性のものである。

【0036】

上記の通り、本発明の抗体は、生体内における架橋された転写因子S p 1を検出又は測定することができ、これによりアポトーシスを検出・診断することができる。即ち、本発明の抗体は、転写因子S p 1の架橋が関与する疾患（肝疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患、各種硬化性疾患（肝硬変、動脈硬化、腎不全、強皮症など）、癌）及びアポトーシス関連疾患（例えば、アポトーシスの減少に起因する疾患としては悪性腫瘍（癌）、白血病、自己免疫性疾患、ウイルス感染疾患（H I V感染など）、増殖性皮膚疾患、慢性関節リウマチ、肝炎、および腎疾患などが挙げられ、アポトーシスの増加に起因する疾患としてはエイズ、神経変性疾患、骨髄異形成疾患、虚血性疾患、および中毒性肝疾患などが挙げられる）の診断薬として有用である。

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】

【0037】

実施例1：ヒト組換え転写因子S p 1の作製と精製

10

20

30

40

50

ヒト S p 1 cDNAを挿入したpIVEX plasmid vector 15 μ gを使用し、Rapid Translation System (RTS) 500 (ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて、転写／翻訳反応を行ない(最終容量1ml, 30 $^{\circ}$ C、18時間反応)、ヒスチジン標識したヒト組換え S p 1を大量に作製した。ヒト組換え S p 1はQIAGENのNi-NTAアフィニティーセファロースで精製した。RTS反応溶液50 μ lを溶解バッファー(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM イミダゾール, 20 mM 2-メルカプトエタノール, 0.1% Triton X-100, 10 $\times$ Complete protease inhibitor cocktail (Roche); pH 8.0)中で200 μ lのNi-NTAセファロースと4 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後に4 $^{\circ}$ C、8000 $\times$ g、10秒遠心した。沈殿したビーズを洗浄バッファー 1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 35 mM イミダゾール, 0.1% Triton X-100; pH 8.0)、及び、洗浄バッファー 2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM イミダゾール, 0.1% Triton X-100; pH 6.3) 1mlずつで順次洗った。洗い終わったビーズを100 μ lの溶出バッファー(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 0.1% Triton X-100; pH 5.9)中で4 $^{\circ}$ C、1時間インキュベーションした後にスピンカラム (Bio-Rad Laboratories)に移し、4 $^{\circ}$ C、800 $\times$ gで4分遠心して S p 1を溶出した。

10

【0038】

実施例2：架橋 S p 1 (抗原)の作製と免疫

精製した S p 1 (終濃度1 μ M)を試験管内で精製モルモット肝トランスグルタミナーゼ (TG; シグマ アルドリッチ) (終濃度1 μ M)とHBS反応バッファー(10 mM CaCl₂, 100 mM DTT, 0.6 mg/mlヘパリン)中で37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。この反応液を8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後にCBB染色により、架橋 S p 1のバンドを確認した(図2)。

20

架橋 S p 1 20 μ gを含むバンドを切り出し、テフロンホモジナイザーでホモジナイズして、アジュバンド(MPL +TDM +CWS Emulsion (RIB)) 0.5 mg/ml, 100 μ lと共にウサギ背中皮下に免疫した。免疫は情報に従い、初回免疫1ヶ月後から3ヶ月間毎週行った。

【0039】

実施例3：架橋 S p 1 抗体画分の精製

免疫前のウサギ、並びに追加免疫したウサギから毎週血液を採取し、情報に従い抗血清を得た。抗血清中の抗体の力価は架橋 S p 1をコートしたイムノプレートを用いたELISAにより評価し、1/1000希釈でOD1.2以上のものを抗体精製に用いた。抗体の精製はプロテインAセファロース (シグマ アルドリッチ)を用いて行った。得られた抗体の濃度はBCA assay kit (PIERCE)を用いて決定した。

30

【0040】

実施例4：TG結合セファロース、並びに S p 1 結合セファロースを用いた架橋 S p 1 抗体画分からのTG並びに S p 1 認識抗体の除去(架橋 S p 1 特異抗体の精製)

得られた抗体画分からTG及び架橋していない S p 1を認識する抗体を除去した。1 mgのTGを反応バッファー(0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl; pH 8.3)中で100 μ l NHSビーズと結合させた後に、過剰な活性基をエタノールアミンを用いて不活化させることによりTG結合セファロースを得た。S p 1 結合セファロースは上記の S p 1 精製の手順と同じように、50 μ lのRTS反応溶液を溶解バッファー(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM イミダゾール, 20 mM 2-メルカプトエタノール, 0.1% Triton X-100, 10 $\times$ Complete protease inhibitor cocktail (Roche); pH 8.0)中で200 μ lのNi-NTAセファロースと4 $^{\circ}$ Cで1時間反応させて作製した。これらのTG結合セファロース、並びに S p 1 結合セファロースを架橋 S p 1 抗体画分と4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、TGおよび架橋していない S p 1を認識する抗体を除去することで、架橋 S p 1 特異抗体を得た。

40

【0041】

実施例5：架橋 S p 1 特異抗体の抗原認識特異性(図3)

精製 S p 1 (終濃度200 nM)を精製モルモット肝TG(終濃度5 nM)とHBSバッファー(10 mM CaCl₂, 100 mM DTT)中、37 $^{\circ}$ Cで2日間反応させた。反応液を8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、分離したタンパク質をPVDF膜上に転写した後に、市販の S p 1 抗体(IC6 (Santa Cruz))(終濃度2 μ g/ml; レーン1及び2)並びに精製(TG結合セファロース、S p 1 結合セファロースを用いたTG認識抗体、非架橋 S p 1 認識抗体除去操作)前(レ

50

ーン3及び4)後(レーン5及び6)の架橋Sp1抗体(終濃度10 μ g/ml)を用いてウェスタンブロットを行った。発色は西洋ワサビパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体(終濃度0.5 μ g/ml)を用いてECL反応により行った。その結果、市販の架橋していないSp1に対する従来の抗体では架橋不活性化されたSp1が検出されないのに対して、今回作製した架橋Sp1特異抗体はこれを大変良く検出することがわかった。

【0042】

実施例6：架橋Sp1特異抗体による抗癌剤処理によりアポトーシスに陥った肝癌細胞の検出(図4)

ヒト肝癌細胞株(JHH, 1 $\times$ 10⁵個/ml)をカバーガラス入り培養皿に蒔き、抗癌剤である非環式レチノイド(AR, 終濃度10 μ M)で24時間処理した。その後、3.7%ホルムアルデヒドで細胞をカバーガラス上に固定し、0.3%Triton X-100で浸透化させた。H33258(カルビオケム、終濃度0.1 μ g/ml)及びそれぞれの抗体(免疫前の抗血清から精製した抗体(終濃度2.8 μ g/ml)、市販Sp1抗体(anti-Sp1 polyclonal antibody(シグマ アルドリッチ)(終濃度4 μ g/ml)、架橋Sp1特異抗体(終濃度4 μ g/ml))と4 $^{\circ}$ C、1晩インキュベーションした後に、二次抗体としてFITC結合ヒツジ抗ウサギIgG抗体(Jackson)(終濃度1 μ g/ml)を使用して染色を行った。結果は蛍光顕微鏡(ライカ)で観察し、写真に記録した。市販の架橋していないSp1に対する従来の抗体では、抗癌剤によりアポトーシスに陥った細胞と生きている細胞を見分けることができないが、今回作製した架橋Sp1特異抗体は、アポトーシスに陥った細胞のみ染色した。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、架橋不活性化Sp1認識抗体によるトランスグルタミナーゼ依存性アポトーシス経路の検出を示す。図1に示すように、アポトーシスのシグナル伝達経路は大きく分けて2つ存在すると考えられる。1つはカスパーゼが活性化されて最終的にDNAが断片化をされる経路であり、もう1つがトランスグルタミナーゼの発現が上がり、核に移行することでSp1などの転写因子やDNAを取り巻くヒストンタンパク質を凝集させる経路である。本発明の抗体は、このトランスグルタミナーゼで誘導したアポトーシスで引き起こされる架橋(凝集)したSp1を特異的に認識する抗体であり、トランスグルタミナーゼ誘導アポトーシスを検出し、その程度を調べることができる。

【図2】図2は、トランスグルタミナーゼによるSp1の架橋反応を示す。RTSで作製、精製したSp1と精製モルモット肝トランスグルタミナーゼ(終濃度各1 μ M)をHBS反応バッファー(10 mM CaCl₂, 100 mM DTT, 0.6 mg/mlヘパリン)中で37 $^{\circ}$ Cで図に示す異なる時間反応させた後に、反応液を8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、CBB染色により架橋Sp1、非架橋Sp1、TGを染色した。

【図3】図3は、架橋Sp1特異抗体の抗原認識特異性を示す。精製Sp1(終濃度200 nM)を精製モルモット肝TG(終濃度5 nM)の作用のあるなしで反応させたのちに、市販Sp1抗体(IC6 (Santa Cruz))(終濃度2 μ g/ml)並びに精製(TG結合セファロース、Sp1結合セファロースを用いたTG認識抗体、非架橋Sp1認識抗体除去操作)前後の架橋Sp1抗体(終濃度10 μ g/ml)を用いてウェスタンブロットを行った。レーン1、3、5：トランスグルタミナーゼによる架橋反応をかけなかったサンプル；レーン2、4、6：トランスグルタミナーゼによる架橋反応をかけたサンプル。レーン1及び2：市販Sp1抗体により検出されたバンド；レーン3及び4：精製前架橋Sp1抗体により検出されたバンド；レーン5及び6：精製後架橋Sp1抗体により検出されたバンド

【図4】図4は、抗癌剤処理によりアポトーシスに陥った肝癌細胞に見られる架橋Sp1特異抗体による染色像を示す。ヒト肝癌細胞株を抗癌剤非環式レチノイド(AR)もしくは対象としてARの溶剤であるエタノール(EtOH)で処理した後に、細胞を固定し、ヘキスト33258(Hoechst)を用いた核染色(青)と各種抗体(Antibody;免疫前抗体[Pre Immune]、市販Sp1抗体[Anti-Sp1]、架橋Sp1特異抗体[Anti-CL Sp1])を用いた免疫染色(緑)による2重染色を行った。

【 図 1 】

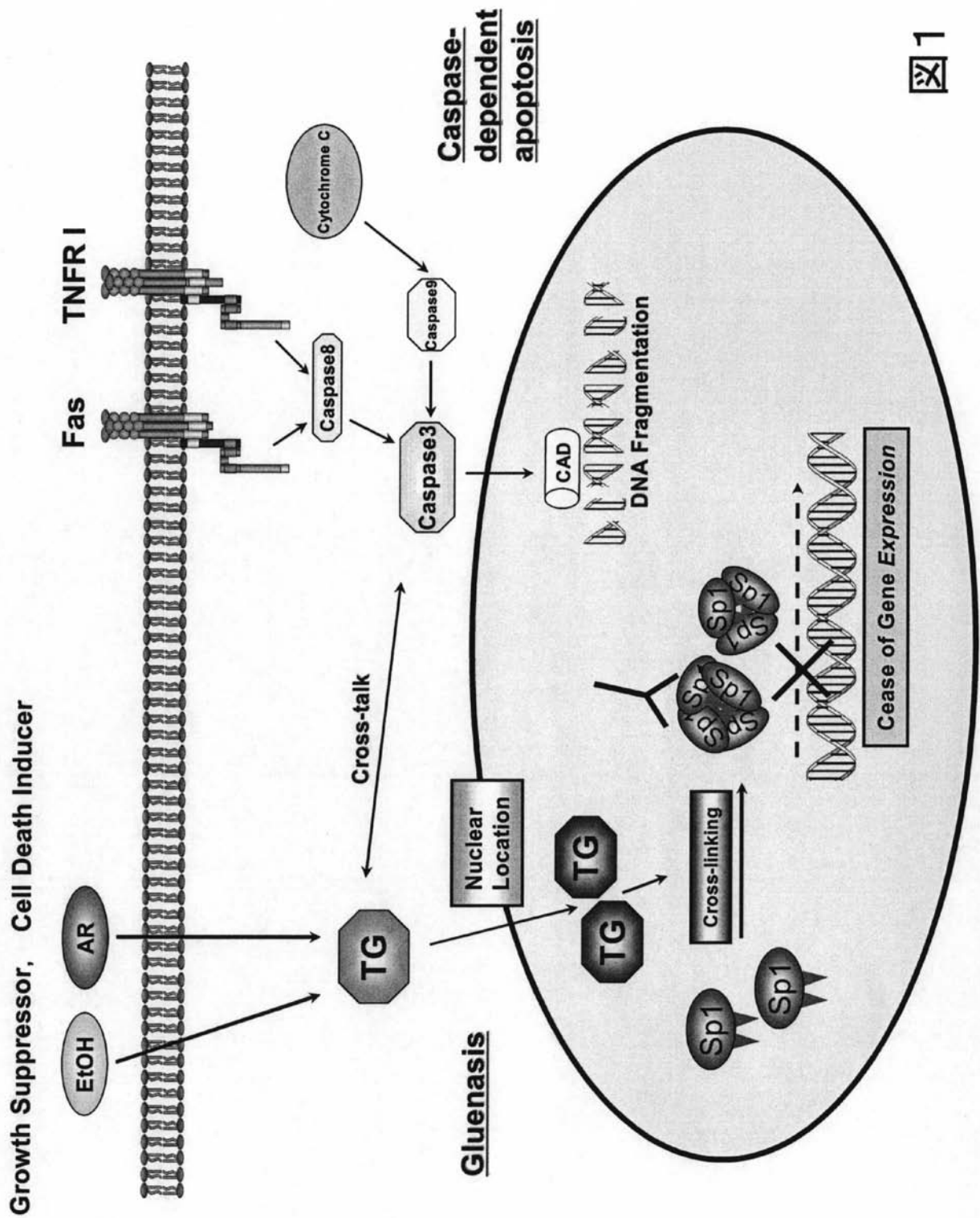
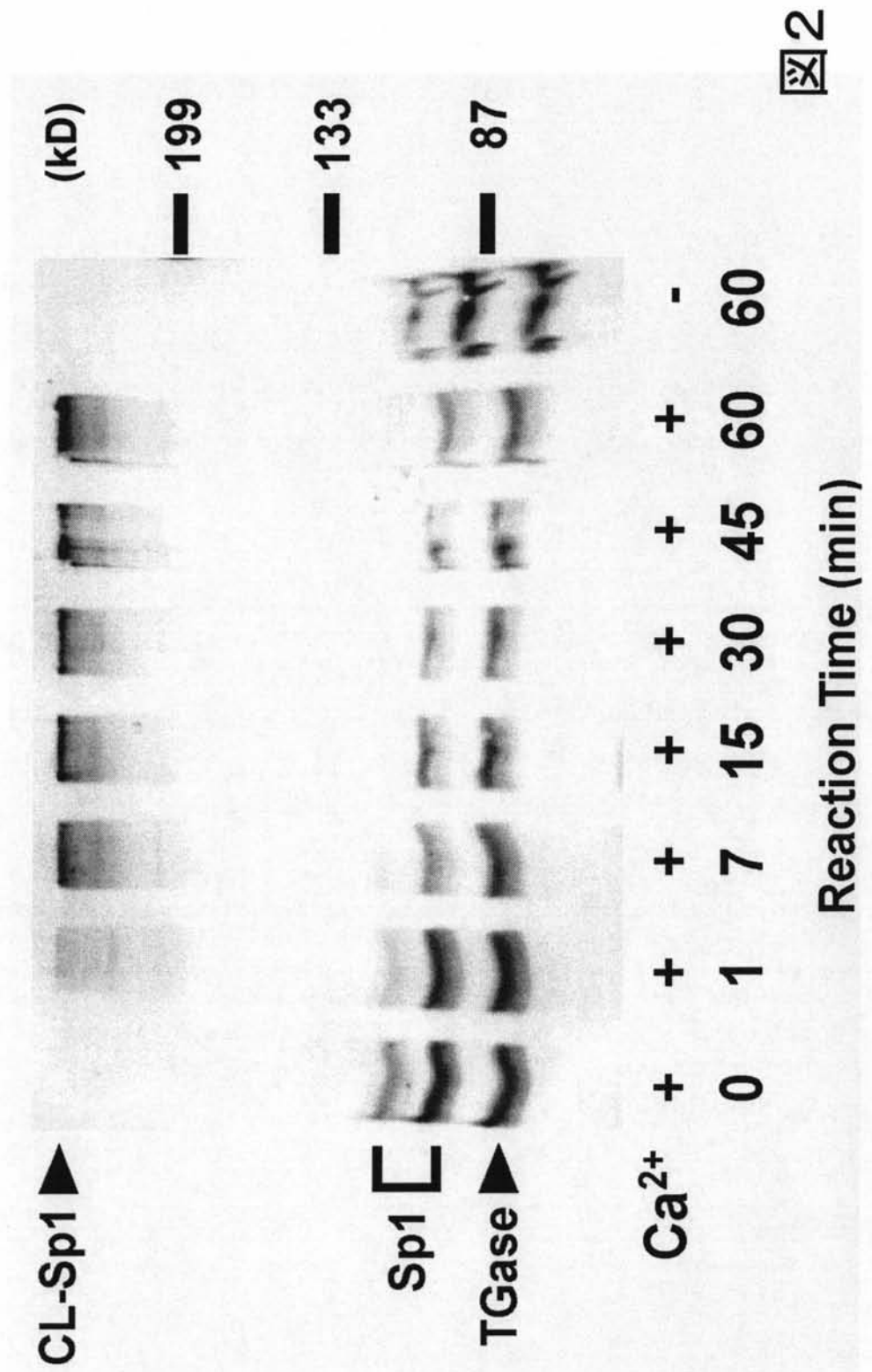


図 1

【 図 2 】

Time course in Sp1 Cross-linking with TGase



【図 3】

架橋Sp1抗体の抗原特異性検定

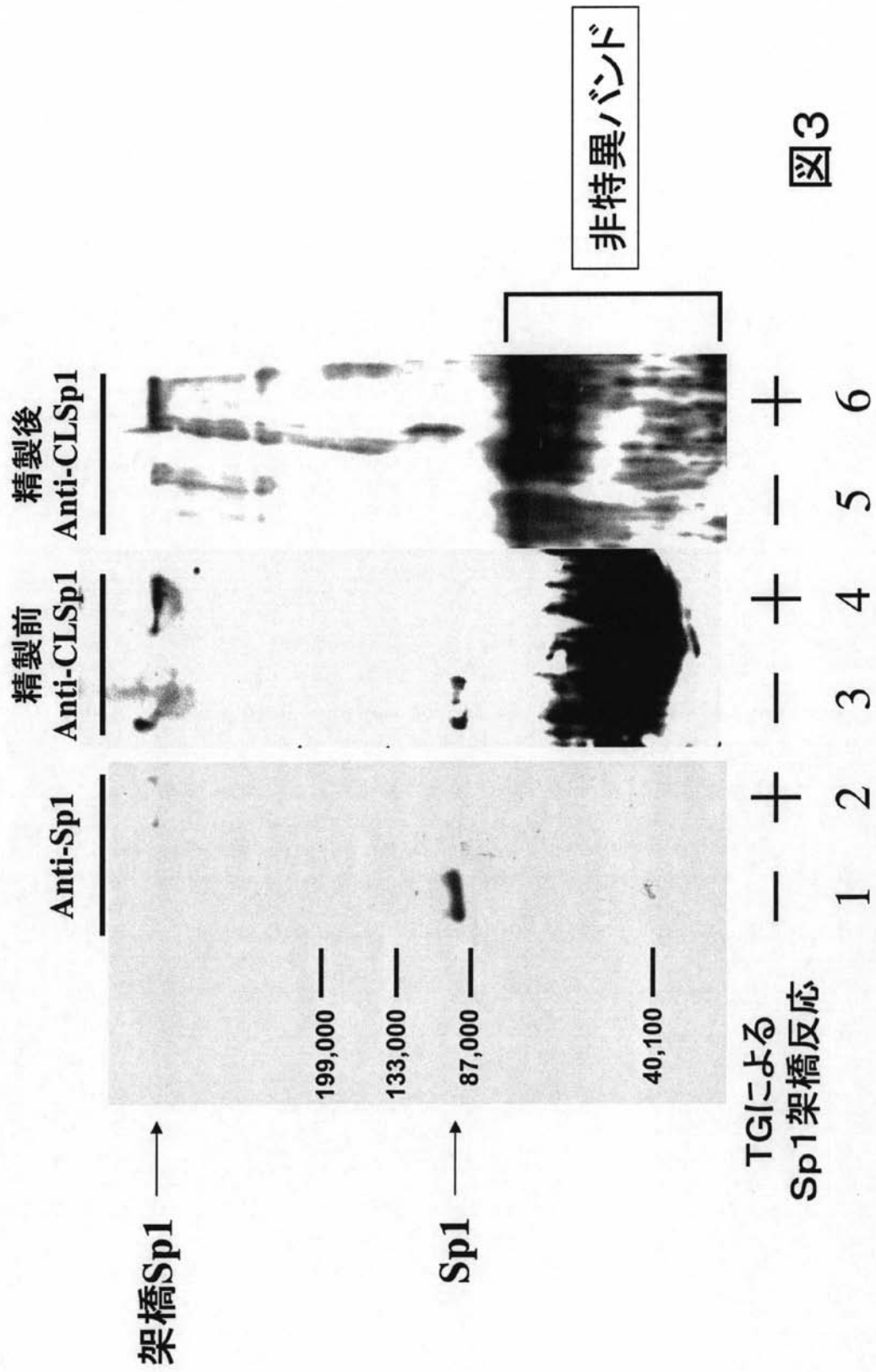


図3

【 図 4 】

架橋Sp1抗体を用いた免疫染色

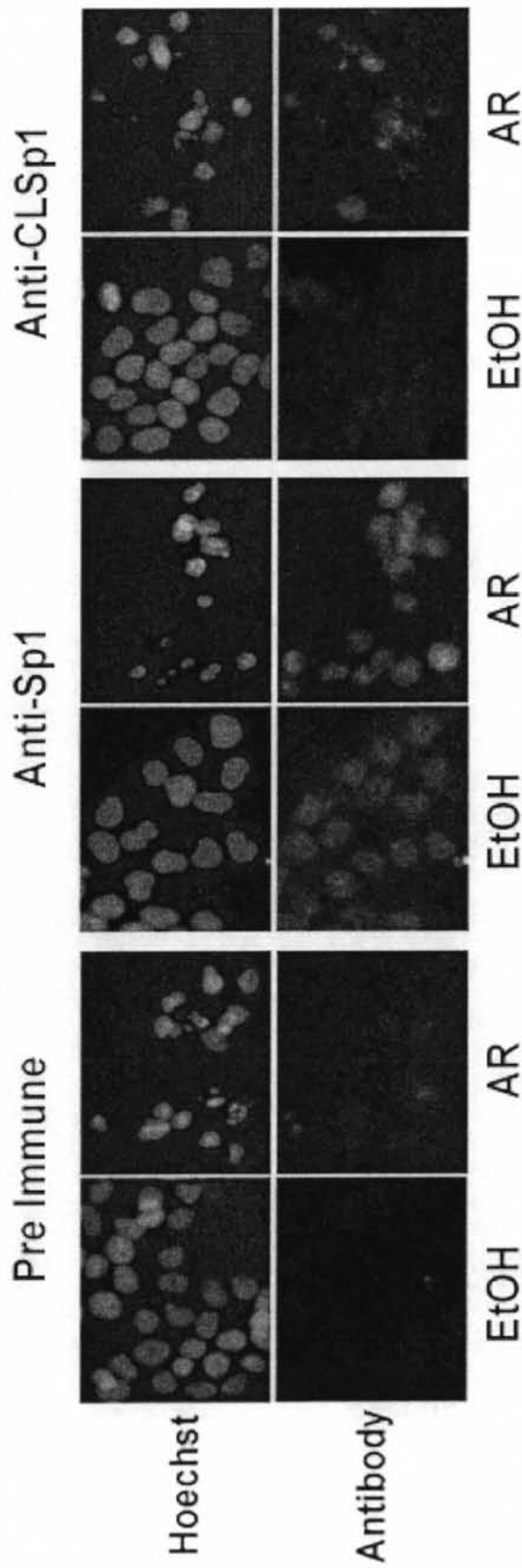


図4

专利名称(译)	特异于交联Sp1的抗体		
公开(公告)号	JP2006143641A	公开(公告)日	2006-06-08
申请号	JP2004335441	申请日	2004-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	小嶋聡一 辰川英樹		
发明人	小嶋 聡一 辰川 英樹		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CA21 4B064/CB30 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/BA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/GA26 4H045/HA06 4H045/HA07		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：产生一种特异性识别交联失活转录因子Sp1的抗体，该转录因子Sp1在由蛋白质交联酶转谷氨酰胺酶介导的新细胞死亡（细胞凋亡）过程中产生，并特异地检测它提供一种特异性检测难以转谷氨酰胺酶依赖性凋亡途径的方法。能够特异性识别交联转录因子Sp1的抗体。【选择图】无

