

(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2004-131450

(P2004-131450A)

(43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/26	C07K 16/26 ZNA	2G045
C07K 14/575	C07K 14/575	4B024
G01N 33/50	G01N 33/50 F	4H045
G01N 33/53	G01N 33/53 D	
// C12N 15/09	C12N 15/00 A	
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 17 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-299876 (P2002-299876)	(71) 出願人	391012442 京都大学長 京都府京都市左京区吉田本町36の1番地
(22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)	(74) 代理人	100072051 弁理士 杉村 興作
特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年8月25日 発行の「生化学 Vol. 74 No. 8 2002」に発表		(72) 発明者	森山 達哉 京都府宇治市五ヶ庄芝ノ東25-6
		(72) 発明者	前渊 元宏 京都府宇治市五ヶ庄戸ノ内18-1 ラポート安井305
		Fターム(参考)	2G045 AA20 BA13 BB02 BB24 BB29 BB35 DA12 DA13 DA36 DA54 FB03 FB06 4B024 AA11 BA01 BA31 CA04 DA06 EA04 GA11 HA01
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体、当該抗体を用いたスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 有用な抗体、及び当該抗体を用いたスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 本発明のポリクローナル抗体は、以下の(a)、又は(b)、すなわち、(a) 抗原ペプチド: Pro-Ile-Asp-Glu-Ala-Ile-Glu-Lys-Lys-Ile-Lys-Gln-Asp-Phe-Asn-Ser-Leu-Phe-Cys (b) 前記抗原ペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記アミノ酸配列と80%の相同性を有する抗原ペプチドに対するポリクローナル抗体であることを特徴とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a)、又は (b) に対するポリクローナル抗体。

(a) 抗原ペプチド: Pro - Ile - Asp - Glu - Ala - Ile - Glu - Lys - Lys - Ile - Lys - Gln - Asp - Phe - Asn - Ser - Leu - Phe - Cys

(b) 前記抗原ペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記アミノ酸配列と 80% の相同性を有する抗原ペプチド。

【請求項 2】

前記抗原ペプチドにハプテンが結合していることを特徴とする請求項 1 記載のポリクローナル抗体。 10

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 項に記載のポリクローナル抗体を用いる免疫スクリーニング方法。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 項に記載のポリクローナル抗体を用いて ELISA 法によって、レジスチン及び / 又はレジスチン類縁体を検出する方法。

【請求項 5】

さらに、レジスチン及び / 又はレジスチン類縁体に対するポリクローナル抗体を用いる請求項 3 又は 4 項に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 3 ~ 5 項のいずれか 1 項に記載の方法に使用するための標準物質及び / 又は試料物質を調製する方法であり、界面活性剤の存在下、前記標準物質及び / 又は前記試料物質を溶媒中で溶解し、前記標準物質及び / 又は前記試料物質中のタンパク質を変性させることを特徴とする方法。 20

【請求項 7】

界面活性剤が、SDS、Triton X - 100、ヘプチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、オクチルグルコシドからなる群から選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 6 項に記載の方法。

【請求項 8】

溶媒が、メルカプトエタノール、尿素、ジチオスレイトールからなる群から選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 6 又は 7 項に記載の方法。 30

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 項に記載の方法によって調製された前記標準物質及び / 又は試料物質の抽出液中のタンパク質又はペプチドを固定化し、前記界面活性剤及び前記溶媒を前記抽出液から除去し、前記タンパク質又はペプチドの定量を行なう方法。

【請求項 10】

前記定量を、前記タンパク質又はペプチドを染色することにより行なう請求項 10 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗体、当該抗体を用いたスクリーニング法、及び当該スクリーニングに用いることができる標準物質及び / 又は試料物質の調製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖尿病は、インスリン作用が不足し血糖値が上昇した病態であるが、その原因として、インスリン分泌の低下と、インスリン感受性の低下に大別できる。インスリン依存糖尿病 (I 型糖尿病) は膵インスリンの絶対的欠乏に由来する。インスリン非依存糖尿病 (II 型糖尿病) は肝臓、筋肉、脂肪などの抹消組織においてインスリン抵抗性が生じ、膵臓細胞からのインスリン分泌が追いつかなくなった状態である。インスリンの感受性の低下に 50

は、遺伝的な素因と後発的な要因がある。特に後発的な要因として、生体内においての脂肪細胞の過剰蓄積、つまり、肥満がインスリン抵抗性の発症に対する重要なリスクファクターであることが知られている。しかし、インスリン抵抗性と肥満との関連については、不明な部分が多い。

【0003】

また、脂肪組織は、主要なエネルギー貯蔵器官というだけでなく、他の臓器に比べて最も多くの内分泌タンパク質を発現している生体最大の内分泌臓器である。脂肪細胞から分泌されるTNF- α 、遊離脂肪酸(FFA)はインスリンのシグナル伝達を抑制することで、インスリン抵抗性を誘発させると考えられている。レジスチンも、インスリン抵抗性の原因となる因子として報告されたが、その詳細については不明である。レジスチンとは、システインの富むアミノ酸配列を有する約100アミノ酸の比較的小さい分泌タンパク質、ペプチドホルモンである。

10

【0004】

このようなレジスチンの中で、マウスレジスチンに対する抗体がCALBIOCHEM社により発売され、この抗体は、マウスレジスチンのアミノ酸残基83から91に相当する配列GSWDIREKのペプチドを免疫したものである事が知られている。

【0005】

レジスチンが肥満とインスリン抵抗性を繋ぐ重要な因子であることが報告されている(C. M. Steppan, S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, M. A. Lazar, "The hormone resistin links obesity to diabetes," Nature 409 (2001) 307-312)。この文献では、マウスを用いた実験により、大腸菌で発現させたレジスチンを抗原にして抗体を作製している。

20

【0006】

また、マウスレジスチンのN末部分を抗原にして抗体を作製し、培養細胞での実験が報告されている。(M. Fasshauer, J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, R. Paschke, "Tumor necrosis factor is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes," Biochem. Biophys. Res. Commun. 288 (2001) 1027-1031.)

30

【0007】

【(非)特許文献1】C. M. Steppan, S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, M. A. Lazar, "The hormone resistin links obesity to diabetes," Nature 409 (2001) 307-312.

【(非)特許文献2】M. Fasshauer, J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, R. Paschke, "Tumor necrosis factor is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes," Biochem. Biophys. Res. Commun. 288 (2001) 1027-1031.

40

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これまでにマウスの脂肪組織や血清中のレジスチン量を測定する測定キットは存在しない。また、インスリン抵抗性は生活習慣病の基盤に存在する病態で、その究症メカニズムや予防方法など不明な点が多い。最初の報告では、レジスチンの発現は、高脂肪食を与えた、あるいは遺伝的肥満マウスで増加し、インスリン抵抗性改善薬であるチ

50

アゾリン誘導体によって発現抑制されたことが知られていたが、依然として詳細なところは不明である。

【0009】

また、上述の配列 G S W D I R E K のペプチドを免疫した抗体においても、レジスチンのより正確な定量性に欠けるという欠点が存在し、脂肪組織や血清中のレジスチン量を測定する測定キットを開発させるほどには至っていなかった。

【0010】

そこで、本発明は、より正確にレジスチンを定量でき、最終的には、脂肪組織や血清中のレジスチン量をより高感度で測定し得る抗体、及び当該抗体を用いたスクリーニング法を提供することを目的とする。

10

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、本発明者らは、まず、マウスレジスチンのより免疫原性の高い特異的配列を鋭意研究し、本発明の抗体、当該抗体を用いたスクリーニング方法を見出した。

【0012】

本発明のポリクローナル抗体は、以下の(a)、又は(b)、すなわち、(a)抗原ペプチド：Pro-Ile-Asp-Glu-Ala-Ile-Glu-Lys-Lys-Ile-Lys-Gln-Asp-Phe-Asn-Ser-Leu-Phe-Cys、又は(b)前記抗原ペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記アミノ酸配列と80%の相同性を有する抗原ペプチド、に対するポリクローナル抗体であることを特徴とする。

20

【0013】

また、本発明のポリクローナル抗体の好ましい実施態様において、前記抗原ペプチドにハプテンが結合していることを特徴とする。

【0014】

また、本発明のスクリーニング方法は、請求項1又は2項に記載のポリクローナル抗体を用いる事を特徴とする。

【0015】

また、本発明のレジスチン及び/又はレジスチン類縁体の検出方法は、請求項1又は2項に記載のポリクローナル抗体を用いたELISA法によって、レジスチン及び/又はレジスチン類縁体を検出することを特徴とする。

30

【0016】

また、本発明のレジスチン及び/又はレジスチン類縁体の検出方法の好ましい実施態様において、さらに、レジスチン及び/又はレジスチン類縁体に対するポリクローナル抗体を用いることを特徴とする。

【0017】

また、本発明の標準物質及び/又は試料物質を調製する方法は、請求項3～5項のいずれか1項に記載の方法に使用するための標準物質及び/又は試料物質を調製する方法であり、界面活性剤の存在下、前記標準物質及び/又は前記試料物質を溶媒中で溶解し、変性させることを特徴とする。

40

【0018】

また、本発明の標準物質及び/又は試料物質を調製する方法の好ましい実施態様において、前記界面活性剤が、SDS、Triton X-100、ヘプチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、オクチルグルコシドからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0019】

また、本発明の標準物質及び/又は試料物質を調製する方法の好ましい実施態様において、前記溶媒が、メルカプトエタノール、尿素、ジチオスレイトールからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

50

【0020】

本発明のタンパク質又はペプチドの定量方法は、請求項6～8項に記載の方法によって調製された前記標準物質及び/又は試料物質の抽出液中のタンパク質又はペプチドを固定化し、前記界面活性剤及び前記溶媒を前記抽出液から除去し、前記タンパク質又はペプチドの定量を行なうことを特徴とする。

【0021】

また、本発明のタンパク質又はペプチドの定量方法の好ましい実施態様において、前記定量を、前記タンパク質又はペプチドを染色することにより行なう事の特徴とする。

【0022】

【発明の実施の形態】

まず、本発明のマウスレジスチンに対する抗ペプチド抗体について説明する。一般的に特異性の高い抗原特異的な抗体を得る場合の抗原ペプチドは抗原性の高いアミノ酸の連続した配列部位を用いるが、その場合、一般により長い配列の方が特異性の高い抗体ができる。そこで、本発明では、マウスレジスチンのアミノ酸配列のうち、P I D E A I D K K I K Q D F N S L F Cの19残基のペプチド配列を合成し、これを抗原として用いて特異性の高い抗体を得ようとした。

【0023】

本発明のポリクローナル抗体は、以下の(a)、又は(b)、すなわち、(a)抗原ペプチド：Pro - Ile - Asp - Glu - Ala - Ile - Glu - Lys - Lys - Ile - Lys - Gln - Asp - Phe - Asn - Ser - Leu - Phe - Cys、又は(b)前記抗原ペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記アミノ酸配列と80%の相同性を有する抗原ペプチド、に対するポリクローナル抗体である。当該抗原ペプチド：Pro - Ile - Asp - Glu - Ala - Ile - Glu - Lys - Lys - Ile - Lys - Gln - Asp - Phe - Asn - Ser - Leu - Phe - Cysは、レジスチンの一部に由来のものであり、本発明者らにより、抗原性の高い部分として見出されたものである。本発明において、当該ペプチド抗原のほか、前記抗原ペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記アミノ酸配列と80%の相同性を有する抗原ペプチドも含まれる。このような相同性を有する抗原ペプチドであっても高い抗原性を有するからである。

【0024】

当該抗原ペプチドは、例えば、マウスレジスチンの全アミノ酸配列を参考に、アミノ酸配列を精査し、抗原性の高いと考えられる部分を合成することによって、得ることができる。アミノ酸配列の合成方法は、固相合成法など常法により行なうことができる。

【0025】

また、本発明のポリクローナル抗体の好ましい実施態様において、前記抗原ペプチドにハプテンを結合させることができる。これは、本発明の抗体のように、タンパク質のある一部分に相当するペプチド(15 - 20アミノ酸程度)を抗原として抗体を得る場合は、ペプチド単独注射では、ほとんど抗体ができないおそれがあるからである。このような場合、合成したペプチドをハプテンと呼ばれるキャリアタンパク質に結合させ、その結合体をウサギなどに注射することで、ペプチドに対する抗体が出来易くなるという利点を有する。

【0026】

ハプテンとしてよく用いられるタンパク質については、特に限定されるものではなく、例えば、KLH(keyhole limpet hemocyanin)、アルブミン、ミオグロビン等を挙げることができる。汎用性が高いという観点から、ハプテンとしては、好ましくはKLH(keyhole limpet hemocyanin)である。

【0027】

本発明のレジスチンに対する抗体を得るには、まず、マウスレジスチンの部分アミノ酸配列に相当するペプチドをKLHなどのキャリアタンパク質と融合させた後、例えばフロイント完全アジュバントなどの免疫助成剤とともに、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなど

10

20

30

40

50

の動物に数回免疫し、そこから抗血清を得ることができる。

【0028】

動物から得られた抗血清は、まずプロテインAやプロテインGを固定化したカラムを用いる方法などにより、免疫グロブリン画分を精製することができる。その後、抗原を固定化したカラムに吸着後溶出処理するなどの方法により精製し、本発明のマウスレジスチンに対する特異的な抗体を得ることができる。得られた抗体は、場合によりさらにペプシン、パバイン等の酵素を用いる方法などで分解し、F(ab)₂、Fab、Fabなどの抗体機能を保持する部分分解物とすることもできる。勿論、本発明の抗体の定義には、これらの部分分解物も含まれる。このようにして得られる本発明のマウスレジスチンに対する抗体は、マウスレジスチンに特異的に反応する。

10

【0029】

次に、本発明のスクリーニング法について説明する。本発明のスクリーニング方法は、(a) 抗原ペプチド：Pro-Ile-Asp-Glu-Ala-Ile-Glu-Lys-Lys-Ile-Lys-Gln-Asp-Phe-Asn-Ser-Leu-Phe-Cys、又は(b) 前記抗原ペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記アミノ酸配列と80%の相同性を有する抗原ペプチド、に対するポリクローナル抗体、または、前記抗原ペプチドにハプテンが結合したものであるものに対するポリクローナル抗体を用いる。前記抗体を用いて、標的タンパク質、すなわち、レジスチン及びその類縁体を免疫スクリーニングすることが可能となる。当該抗体を1つ少なくとも1つ用いることで免疫スクリーニングは可能であるが、より高精度の検出を可能とするという観点から、2つ以上の異なる抗体を用いることが好ましい。これは、2つの異なる抗体を用いる理由は、抗体が抗原に結合する部位(エピトープ)が別であれば、捕捉用抗体で抗原の結合した部分(エピトープ)が隠れてしまうことなく、ひいては、検出抗体が結合しやすくなるという利点を有するからである。

20

【0030】

また、本発明のレジスチン及び/又はレジスチン類縁体の検出方法によれば、上記本発明のポリクローナル抗体を用いてELISA法によって、レジスチン及び/又はレジスチン類縁体を検出することができる。ELISAには、2抗体法、サンドイッチ法等いくつかの方法があるが、本発明は特に限定されるものではない。最も広く用いられているという観点から、サンドイッチ型ELISA法が好ましい。これは、2つの抗体で抗原を挟むものである。より高精度の検出を可能とするという観点から、2つ以上の異なる抗体を用いることが好ましい。これは、2つの異なる抗体を用いる理由は、抗体が抗原に結合する部位(エピトープ)が別であれば、捕捉用抗体で抗原の結合した部分(エピトープ)が隠れてしまうことなく、ひいては、検出抗体が結合しやすくなるという利点を有するからである。

30

【0031】

また、好ましい実施態様において、さらに、レジスチン及び/又はレジスチン類縁体に対するポリクローナル抗体を、上述の免疫スクリーニング法、ELISA法に用いることができる。当該抗体は、タンパク質を丸ごとウサギ等に注射し、抗血清を得ることにより作製することができる。この場合、一般に抗体価の高い抗体を得ることができる。本発明において、所謂野生型のレジスチンを用いて抗体を得てもよく、精製が容易等のために大量に調製しやすい組み換え体レジスチンを用いて抗体を得てもよい。

40

【0032】

要約すれば、得られた本発明の抗体は、種々の用途に使用することができる。好ましくは、マウスレジスチンを抗原抗体反応によって測定する測定方法及び測定キットの構成成分として使用される。測定方法としては酵素免疫測定法(EIA法)、放射性免疫測定法(RIA法)、蛍光標識免疫測定法(FIA法)、ポリスチレン粒子にこの抗体を感作したラテックス凝集法等の方法が適用できる。また、得られた抗体はウエスタンブロッティングなどの方法にも適用できる。

【0033】

50

E I A 法を適用する場合の標識酵素としては、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシターゼ、グルコースオキシターゼ、ガラクトシダーゼなどを用いることができる。R I A 法では、標識するアイソトープとしてヨウ素 125、ヨウ素 131 などが用いられる。F I A 法では、標識する蛍光物質として F I T C などが用いられる。本発明においては、E I A 法が好ましい測定法としてあげられ、サンドイッチ E L I S A 法が特に好ましい測定法としてあげられる。この場合、固相抗体としては後に述べる組み換え体マウスレジスチンを抗原として得た抗体を用いた。標識抗体に用いる抗体として前記の本発明の抗体を用いることが好ましい。

【0034】

さらに詳細に説明すれば、以下のようなものである。すなわち、この場合の測定キットについて 10
の一例を説明すると以下のようなものである。まず、前記マウスレジスチンに対する抗体（以下、抗マウスレジスチン抗体とする）を固相担体に固定化する（固相抗体）。固相担体としては、各種ポリスチレン製イムノプレート等があげられる。固相抗体を作成する際の抗体は、 $0.1 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で固定化に使用できるが、 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度が好ましい。ついで、非特異的反応を防ぐためにこの固相を蛋白質含有液で処理（ブロッキング処理）し洗浄して、固相とすることができる。ブロッキング処理に用いる蛋白質としては、ウシ血清アルブミン（以下、B S A と略す）のほか、各種アルブミン、ミルク、ゼラチン等の蛋白質があり、これらを単独又は組合せで使用できる。これらの蛋白質は、 $0.1 \sim 10\%$ （w/v）の濃度で使用するのが好ましく、 $1 \sim 5\%$ （w/v）の濃度で使用するのがより好ましい。以上により、固相抗体ができる。 20

【0035】

一方の検出用の抗体として酵素標識をした標識抗体を用意する。測定感度を上げるためには公知のアビジン - ビオチン法を用いることも可能である。例えば、ビオチン等の反応基を持つ抗マウスレジスチン抗体と、アビジン等の反応基を持つ酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等）を用いることができる。酵素活性の検出手段は、用いる酵素及び基質により異なるが、化学発光系による検出、比色系による検出などが好ましい。検出抗体の標識法には公知の各種方法が適用できる。例えばペルオキシダーゼで標識するには、マレイミド・ヒンジ法、サクシンイミド法等により直接両者を結合させることができる。検出抗体は、測定時に $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するのが好ましく、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するのがより好ましい。 30

【0036】

アビジン - ビオチン法を用いる場合、ビオチン等の反応基をもつ抗体は、 $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するのが好ましく、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するのがより好ましい。また、アビジン等の反応基をもつ酵素（例えばペルオキシダーゼ）は、 $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するのが好ましく、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するのがより好ましい。アビジン - ビオチン法を用いる場合、あらかじめビオチン等の反応基を持つ抗体とアビジン等の反応基を持つ酵素を反応させ、複合体を調製しておき、これを用いてもよい。この複合体は、 $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用するが、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度が好ましい。試薬キットには、その他、反応用緩衝液、洗浄液、酵素反応基質等が組み合わされる。 40

【0037】

比色系の場合には、例えば、テトラメチルベンジジン（T M B）等が基質としてよく用いられる。化学発光系の場合には、例えば、ルミノール類と過酸化水素の組合せが発光基質として用いられる。発光基質を含む発光試薬に含まれる脱脂粉乳又は卵白アルブミンは、最終濃度で $0.001 \sim 1\%$ （w/v）の濃度で使用するのが好ましいが、 $0.01 \sim 0.2\%$ （w/v）の濃度で使用するのがより好ましい。また、過酸化水素は、最終濃度で $0.4 \sim 5.0 \text{mM}$ の濃度で使用するのが好ましい。また、ルミノール類としてはルミノールのほか、イソルミノール等も使用できる。ルミノール類は最終濃度で $0.1 \sim 100 \text{mM}$ の濃度で使用するのが好ましいが、 $1 \sim 10 \text{mM}$ の濃度で使用するのがより好ましい。また、必要に応じてさらに増感剤が用いられるがこれは、ルミノールの一電子酸化を助 50

けて増感作用を有するもので、4 ヨードフェノール、4 ブロモフェノール、4 フェニルフェノール、2 クロロフェニルフェノール、4 (2-チエニル)フェノール、6 ヒドロキシベンゾチアゾール、4 [4-(2-メチル)チアゾリル]フェノール、4 [2-(4-メチル)チアゾリル]フェノール、4 (2-ベンゾチアゾリル)フェノール、3 (10-フェノチアジル) n-プロピル スルホン酸塩等が使用できる。増感剤は最終濃度で0.001~10 mMの濃度で使用するのが好ましいが、0.01~1 mMの濃度で使用するのがより好ましい。発光試薬中には、安定性等の性能を上げるために、グリセリン、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール等や界面活性剤を添加してもよい。

【0038】

次に、本発明の標準物質及び/又は試料物質を調製する方法について説明する。本発明の標準物質及び/又は試料物質を調製する方法は、請求項3~5項のいずれか1項に記載の方法に使用するための標準物質及び/又は試料物質を調製する方法であり、界面活性剤の存在下、前記標準物質及び/又は前記試料物質を溶媒中で溶解し、変性させることを特徴とする。界面活性剤としては、特に限定されるものではなく、例えば、SDS、Triton X-100、ヘプチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、オクチルグルコシドからなる群から選択される少なくとも1種とすることができる。

10

【0039】

また、溶媒としては、特に限定されるものではないが、メルカプトエタノール、尿素、ジチオスレイトールからなる群から選択される少なくとも1種とすることができる。

20

【0040】

なお、ここでは、タンパク質として、レジスチン及び/又はレジスチン類縁体を用いて説明するが、本発明の調整方法は、不溶性のタンパク質、不溶性凝集体を形成するタンパク質であれば、適用することができる。このような不溶性タンパク質としては、例えば、脂肪組織中に存在するタンパク質、レプチン、アディポネクチン、PAI-I、あるいは種々の膜タンパク質、さらにインクルージョンボディーを形成した発現タンパク質等を挙げることができる。

【0041】

標準物質である組み換え体レジスチンはポリヒスチジンタグを融合させたものを用いることができる。これを用いることによって、組み換え体の精製が容易となり、純度が高くなるという利点がある。精製した組み換え体レジスチン分子を5~30%、好ましくは約20%メルカプトエタノール含有SDSサンプルバッファーに一定濃度となるように溶解し、1~10分間、好ましくは約5分間煮沸処理を行うことによって完全に変性させることができる。検体である脂肪組織や血清に関しても同様の処理を行い、生体由来サンプルに含まれるレジスチン分子に関しても同様に完全に変性させることができる。こうして変性したサンプルをPBSにて、5~30、好ましくは10~25、より好ましくは約20倍に希釈して得た検体サンプル100マイクロLを捕捉用の固相抗体で処理されたたとえば96穴のエライザプレートに加えることができる。こうして標準物質および生体由来のレジスチン分子を捕捉したのち洗浄し、検出用抗体を加え、反応させることができる。こうして固相抗体・レジスチン分子・検出用標識抗体の3つの複合体が形成されるが、その量を標識抗体に存在するHRPなどの酵素反応によって生成した反応生成物の発色度、蛍光度、または発光度を測定することによって見積もることができる。

30

40

【0042】

また、脂肪組織は脂肪分を細胞・組織中に多量に含む特殊な組織である。レジスチンはこの脂肪組織で特異的に生合成され、血中へと分泌されホルモン様作用を起こすと考えられている。そこで、この脂肪組織に含まれるレジスチン量を測定するにはこの組織から定量的にレジスチンを含むタンパク質を抽出する必要がある。

【0043】

そこで、脂肪組織重量0.25g当たり0.5mlの10~30、好ましくは約20%メルカプトエタノール含有SDSサンプルバッファーをくわえ、超音波処理またはポリトロ

50

ンにて脂肪組織を完全に破碎することができる。このサンプル溶液をPBSにて20倍希釈し前述したようにエライザに供することができる。また脂肪組織中の総タンパク質量を測定し、最終的に脂肪組織に含まれるタンパク質量当たりどれだけのレジスチンタンパク質が存在するかを算出することができる。

【0044】

次に、本発明のタンパク質又はペプチドの定量方法を説明する。本発明のタンパク質又はペプチドの定量方法は、請求項6～8項に記載の方法、すなわち、前述の調製方法によって調製された前記標準物質及び/又は試料物質の抽出液中のタンパク質又はペプチドを固定化し、前記界面活性剤及び前記溶媒を前記抽出液から除去し、前記タンパク質又はペプチドの定量を行なうことを特徴とする。

10

【0045】

タンパク質又はペプチドは、標的となるタンパク質が、例えば脂肪組織中に存在しているならば、当該存在しているタンパク質すべてを意味する。

【0046】

なお、ここでは、標的として、レジスチン及び/又はレジスチン類縁体を用いて、また、総タンパク質として脂肪組織中に存在する全タンパク質を用いて説明するが、本発明は、これに限定されることを意図するものではない。というのは、本発明の定量方法は、上述の調製方法と同様に、不溶性のタンパク質、不溶性凝集体を形成するタンパク質であれば、適用することができるからである。このようなタンパク質についての説明は、調製方法で上述したものをそのまま当てはめることができる。

20

【0047】

また、タンパク質又はペプチドの固定化としては、特に限定されないが、例えば、ニトロセルロース膜やPVDF膜などの膜に固定化することができる。

【0048】

そして、好ましい実施態様において、前記定量を、前記タンパク質又はペプチドを染色することにより行なう。これによって、総タンパク質量と標的タンパク質量との比較がより容易となるからである。

【0049】

【実施例】

ここで、本発明の一実施例を説明するが、本発明は、下記の実施例に限定して解釈されることを意図するものではない。以下の実施例は、本発明の一実施態様を説明するための用いたものであり、特許請求の範囲に記載された本発明の要旨及び範囲を逸脱しない限り、いかなる変更等を排除するものではない。

30

【0050】

実施例1

本実施例において、本発明の抗体及び当該抗体と異なる抗体を用いて、ELISA法による免疫スクリーニングを行なった。

【0051】

まず、Steppanらのマウスレジスチンに関する報告(Nature, 409, 307-312, 2001)を参考にしてアミノ酸配列を精査し、抗原性が高いと考えられる部分アミノ酸配列(PIDEAIDKKIKQDFNSLFC)を合成し、これをキャリアタンパク質KLHに結合させてウサギに免疫し、性能に優れたポリクローナル型抗ペプチド抗体が得られた。

40

【0052】

すなわち、マウスレジスチンの部分アミノ酸配列(PIDEAIDKKIKQDFNSLFC)を合成し、キャリアタンパク質KLHと縮合させた。これをウサギ2羽に免疫し9週間後抗血清を得た。全採血して得られた血清からプロテインGカラムを用いてIgG画分を精製した。得られた抗血清をペプチド抗原カラムによってアフィニティー精製した。この抗体をHRP標識し、検出用抗体とした。

【0053】

50

次に、捕捉用の抗体を以下の手順で作成した。まず、マウスレジスチンにポリヒスチジンタグを融合させて大腸菌内で発現させた。具体的には、マウスレジスチンのヌクレオチド配列を参考にして、大腸菌発現用のプラスミドである p E T ベクターに組み込み、これを大腸菌に形質転換させた。大腸菌に I P T G を加えることによって組み込まれたベクターにコードされた組み換え体レジスチンタンパク質を誘導発現させた。

【0054】

誘導発現した菌体を遠心集菌し、懸濁バッファーに懸濁した後、超音波処理によって菌体を破碎した。破碎後、遠心分離によって可溶性画分と不溶性画分に分離した。両画分とも SDS PAGE に供したところ、発現タンパク質は不溶性画分に存在した。

【0055】

得られた組み換え体は不溶性凝集体を形成したので、これを 6 M 尿素を含むバッファーにて可溶化しニッケルカラムにてアフィニティー精製した。得られた組み換えレジスチンタンパク質をウサギに免疫し、抗体を得た。この抗体を捕捉用抗体とした。このようにして得られた 2 つの抗体がレジスチン分子を認識することをウエスタンブロッティング法にて確認した。そのうち、これらの 2 つの抗体を用いてサンドイッチ型 E L I S A を構築した。

【0056】

不溶性画分を尿素（塩酸グアニジン）にて可溶化しニッケルカラムを用いてポリヒスチジンタグの結合したマウスレジスチン分子を精製した。

【0057】

マウスレジスチン部分ペプチドの免疫と抗血清の調製

合成したマウスレジスチン部分ペプチドを K L H と結合させ、得られた結合物を等容量のフロイント完全アジュバントと混和し、ウサギ（ニュージーランドホワイト種）に 3 週間に 1 回の割合で計 4 回皮下免疫し、最終免疫日より 1 週間後に採血し、抗血清を得た。

【0058】

抗血清から総 I g G の精製

抗血清をプロテイン A 固定化カラムに加え、カラム容積の 5 倍量 P B S で洗浄後、100 m M クエン酸緩衝液（150 m M N a C l を含む、p H 4 . 0）で溶出し、総 I g G 画分を得た。

【0059】

組み換え体マウスレジスチンの発現

マウスレジスチンの c D N A を得るために、マウス脂肪細胞由来 m R N A から R e v e r T r a D a s h （商標、T o y o b o）を用いて R T - P C R 法でクローニングした。即ち、マウス脂肪組織から、m M A C S m R N A I s o l a t i o n K i t （商標、M i l t e n y i B i o t e c）を用いて m R N A を抽出し、この m R N A から逆転写法で一本鎖 c D N A を調製した。この一本鎖 c D N A を鋳型に、マウスレジスチン c D N A を増幅するため、プライマー 1（5' - A C T G A G T T G T G T C C T G C T A A G T C C T C T G C C - 3'）とプライマー 2（5' G A A C G G G T G G C T G T G C T G G A A A C C A C G C T - C - 3'）を用いてこれを増幅した。得られた P C R 産物を p P C R - S c r i p t A m p S K (+)（商標、S t r a t a g e n e）にクローニングした。レジスチンのシグナル配列を除いた O R F の 5' 末端に N d e I 認識部位とメチオニンをコードする配列を付加するために、プライマー No. 3（5' - C T G A A C T G C A T A T G T C C A G C A T G C C A C T G T G T C C C A T C G - 3'）を用意し、3' 末端に X h o I 認識部位を付加するためのプライマー No. 4（5' - C T T - C C C C G C T C G A G G G A A G C G A C C T G C A G C T T A C A G C A G - 3'）を用意して、上記プラスミドを鋳型とした P C R 増幅を行った。この項で示した配列では、開始コドン（M）を強調文字、制限酵素認識部位を下線で示した。この P C R 産物を N d e I と X h o I で消化し、プラスミド p E T - 3 0 X a - L I C (N o v a g e n) の N d e I と X h o I 認識部位に挿入した。このようにして構築した組み換え体レジスチンの発現プラスミドで大腸菌 B L 2 1 株を形質転換し、これを発現させた。

10

20

30

40

50

【0060】

組み換え体マウスレジスチンの精製

ヒスチジン・タグを付加した組み換え体レジスチンの発現プラスミドで形質転換した大腸菌 B L 2 1 株を 1 5 0 μ g / m l カナマイシンを含む L B 液体培地 [1 % (w / v) トリプトン、0 . 5 % (w / v) 酵母エキス、1 % (w / v) 塩化ナトリウム] に接種した。これを 3 7 °C で培養し、対数増殖期 (A ₆₀₀ が 0 . 4 - 0 . 6) に達した時点で、最終濃度 0 . 4 m M になるようにイソプロピル - 1 - チオ - β - D - ガラクトシドを添加し、3 0 °C で 3 時間培養を続けた。以後の遠心は 0 - 4 °C で、カラム操作は室温で行った。遠心により集めた B L 2 1 菌体 1 容量をトリス緩衝液 (p H 7 . 9) 5 容量に懸濁し、ソニケーターにて破碎した。ホモジネートを 1 2 0 0 0 × g で 3 0 分間遠心した。組み換え型レジスチンは不溶性だったので、ペレットを溶解用緩衝液 [2 0 m M トリス (p H 7 . 9) 、5 0 0 m M 塩化ナトリウム、5 m M イミダゾール、6 M 尿素、1 m M β - メルカプトエタノール] に溶かし、溶解用緩衝液で平衡化した H i s B i n d R e s i n カラム (商標、N o v a g e n) に結合させ、カラムを洗浄用緩衝液 [2 0 m M トリス (p H 7 . 9) 、5 0 0 m M 塩化ナトリウム、7 0 m M イミダゾール、6 M 尿素、1 m M β - メルカプトエタノール] で洗浄した。H i s B i n d R e s i n カラムに吸着したタンパク質を、溶出用緩衝液 [2 0 m M トリス (p H 7 . 9) 、5 0 0 m M 塩化ナトリウム、1 M イミダゾール、6 M 尿素、1 m M β - メルカプトエタノール] で溶出した。純粋な組み換え型レジスチンを含んだこの溶出液をセントリプラス - 3 (商標、A m i c o n) で濃縮し、N A P 2 5 カラム (商標、A m e r s h a m P h a r m a c i a) を用い緩衝液を 0 . 1 % トリフルオロ酢酸に交換した。最終的に真空中で凍結乾燥し、組み換え体レジスチン標品とした。

【0061】

精製組み換え体マウスレジスチンの免疫と抗血清の調製

抗原には組み換え体レジスチンを用いた。初回免疫はフロイントの完全アジュバンドと抗原溶液を混合し、ウサギに皮下注射した。以後、2、5、7 週間後の免疫は不完全アジュバンドと混合して行った。最終的に全採血を行い、抗マウスレジスチン血清を調製した。

【0062】

組み換え体マウスレジスチン抗体の精製

抗原として用いた組み換え体レジスチンをカラムに固定化し、抗血清中のマウスレジスチン抗体を吸着溶出処理することで、その精製を行った。

以上のようにして、本発明の抗体を得た。

【0063】

実施例 2

次に、本発明の抗体の有用性を評価した。具体的に比色系サンドイッチ E L I S A 法を用いて評価した。E L I S A のプロトコルを図 3 に示す。レジスチン E L I S A 用の標準品には組み換え型レジスチンを用いた。脂肪組織は 2 % S D S 、2 0 % β - M . E . を含むバッファー中でホモジネートおよび煮沸し、遠心後、水層を回収し、これを脂肪組織ホモジネートとした。E L I S A 用の試料には、この脂肪組織ホモジネートを P B S で 2 0 倍希釈したものを使用した。

【0064】

具体的に、実施例 1 で得た精製抗マウスレジスチン抗体を 1 0 μ g / m l になるように P B S にて希釈し、これをポリスチレン製 9 6 穴イムノプレート (旭テクノグラス社製) の各ウェルに 1 0 0 μ l 加え、4 °C で 1 晩静置した。この液を吸引除去し、ブロッキング剤であるゼプトブロック (商標、Z e p t o M e t r i x 社製) を各ウェルに 2 0 0 μ l 加え、室温で 2 時間静置し、固相担体上の未反応部分をブロックした。各ウェルを 0 . 1 % (v / v) T w e e n 2 0 (商標、I C I 社製) 含有 P B S (以下 P B S T と略す) で 3 回洗浄し、変性マウスレジスチンを P B S で希釈して調製した 5 n g / m l ~ 1 0 0 0 n g / m l のマウスレジスチンの標準液を各ウェルに 1 0 0 μ l 加え、4 °C で一晩静置

した。各ウェルをPBS-Tで5回洗浄し、上記8. で得たHRP標識抗マウスレジスチン抗体（ペプチド抗体）をPBS（以下希釈液と略す）で1000倍希釈に調製し、各ウェルに100 μ l加え室温で1時間静置した。各ウェルをPBS-Tで7回洗浄し、0.02%（v/v）過酸化水素と0.04%（w/v）TMB（テトラメチルベンジジン）を等量混合した基質液を各ウェルに100 μ l加えた。発色が見られたところ（約5分）で、反応停止液として各ウェルに1Mリン酸を100 μ l加えた。マイクロプレートリーダー（パーキンエルマー社製、ARVO）で450nmの吸光度を測定した。横軸にマウスレジスチン量を取り、縦軸に450nmの吸光度を取り、グラフにプロットしてマウスレジスチンの標準曲線とした。このグラフを図1に示す。

この結果、きれいな検量線が得られ、レジスチンの定量、分析に極めて有用であることが判明した。 10

【0065】

実施例3

次に、総タンパク質濃度の測定を行なった。定量的な解析のためには、脂肪組織に含まれるタンパク質のうちどれだけがレジスチンタンパク質であるかを評価する必要がある。したがって、脂肪組織抽出液の総タンパク質濃度を測定することが必要となる。しかしながら、界面活性剤SDSが高濃度に含まれ、また20%メルカプトエタノールが含まれるような本抽出溶液中のタンパク質濃度の測定は従来の汎用タンパク質測定キット等では不可能であった。

【0066】

そこで、今回は本抽出溶液をニトロセルロース膜にドットプロットした。アルブミンなどの標準タンパク質液（同抽出液に溶解）の希釈系列も同様にしてサンプルと同じ膜にドットプロットした。この膜を酢酸-メタノールで固定後、蛍光試薬であるSypro Ruby（Molecular Probes社製）にて染色し、蛍光スキャナTyphoon 8600（アマシャムファルマシア社製）にて検出し、スポットの強度を画像解析ソフトImageQuantにて定量した。標準タンパク質の希釈系列を定量した蛍光強度から換量線（図2）を作成し、サンプル中の総タンパク質濃度を算出した。この方法によってはじめて20%メルカプトエタノールを含むSDSサンプルバッファーからなるサンプル抽出液中の総タンパク質濃度が測定可能となった。これらの一連の手法によって、マウスにおける血清および脂肪組織中のレジスチン量を測定した。 20

【0067】

実施例4

次に実際に動物を用いて実験を行なった。動物実験のプロトコールを図4に示す。

【0068】

入手した動物は、1週間予備飼育を行った。正常マウスC57BL/6Jについては、平均体重が一定になるように2群に分け、通常食または高脂肪食を与えた。遺伝性肥満マウスdb/dbとKK-A^yについては予備飼育後、高脂肪食を与えた。2週間後、採血、脂肪組織（精巣周囲）摘出を行い、種々の解析に供した。

【0069】

図5は、高脂肪食を与えたマウスにおける脂肪組織及び血清中のレジスチン量を示す図である。通常食または高脂肪食を2週間与えたC57BL/6Jマウスの脂肪組織中のレジスチンをELISAで定量した（A グラフ）。血清中のレジスチンはウエスタンブロットで得られたシグナルをイメージスキャナーで読み取り、相対的に比較した（B グラフ）。B グラフ上のウエスタンブロットは、各群の血清を等量混合して行った。 40

【0070】

図6は、通常食群と高脂肪食群の各種血清パラメーターの比較を示す図である。さきほどの通常食または高脂肪食与えたC57BL/6Jマウスについて、インスリン抵抗性や脂質代謝に関連する血清中のパラメーターを測定した。データには示していないが、通常食群に対して高脂肪食群の体重、脂肪重量は有意に増加していた。

また、血清中のTNF- α も測定したが両群とも検出できなかった。

【0071】

図7は、遺伝的肥満マウスにおける脂肪組織及び血清中のレジスチン量を示す図である。図5の場合と同様に、Aグラフが各群の脂肪組織中のレジスチン量、Bグラフが血清レジスチンを相対的に比較した結果を示している。Bグラフ上のウエスタンブロットの結果も同様である。データには示していないが、RT-PCRにより遺伝子発現レベルで各群を比較したところ、正常マウス群に比べ、遺伝的肥満マウス両群でその発現が有意に減少していた。従って、ELISAでのレジスチンの測定結果は信頼に値するものと言える。

【0072】

図8は、正常マウスと遺伝的肥満マウスの各種血清パラメーターの比較を示す図である。さきほどの正常マウス群と遺伝的肥満マウス2群について、血清中の各種パラメーターを測定した。血清中のTNF- α も測定したが3群とも検出できなかった。

10

【0073】

以上のように、正常マウスにおいては高脂肪食を与えた場合、肥満傾向を示し、それに伴って脂肪組織及び血清中のレジスチンレベルが有意に低下することが本発明の抗体及び当該抗体を用いたスクリーニング方法によって明らかになった。これは、高脂肪食によってレジスチンの発現が低下することを遺伝子解析の手法(リアルタイムRT-PCR法)で確認した文献(Biochem. Biophys. Res. Commun., 289, 564-567, (2001))と同様の結果を与え、ひいては本発明のレジスチンタンパク質の定量方法が正しいことを支持する。

20

【0074】

さらに、遺伝的肥満マウスにおいて、正常マウスに比べて顕著な肥満傾向を示し、その場合の脂肪組織及び血清中のレジスチンレベルが有意に低いことが本発明の抗体及び当該抗体を用いたスクリーニング方法によって明らかになった。これは、遺伝的肥満マウスにおいてレジスチンの発現が著しく抑制されることを遺伝子解析の手法(ノーザンブロット解析)によって確認した文献(J. Biol. Chem., 276, 25651-25653, (2001))と同様の結果を与え、ひいては本発明のレジスチンタンパク質の定量方法が正しいことを支持する。

【0075】

【発明の効果】

本発明の抗体、及び当該抗体を用いたスクリーニング方法によれば、マウス脂肪組織中の全タンパク質当たりのレジスチン量や血清でのレジスチン濃度を正確に測定することが可能となるという有利な効果を有する。

30

【0076】

本発明の調製方法によれば、脂肪組織等の不溶性凝集体タンパク質であっても容易に調製することができ、免疫スクリーニング等に供することができるという有利な効果を奏する。

【0077】

また、本発明のタンパク質又はペプチドの定量法によれば、界面活性剤等の混入した不溶性のタンパク質又はペプチドであっても、効率的に当該界面活性剤を除去できるので、高精度でタンパク質又はペプチドを定量化できるという有利な効果を奏する。

40

【0078】

また、本発明の抗体は、マウス脂肪組織又は血清などの体液中のレジスチンに対して高感度かつ交差反応性がほとんどなくレジスチンに特異的であるので、比色系及び化学発光系ELISA法などのEIA法、RIA系、他の蛍光系、生物発光系の測定法において使用することにより高感度な測定が可能となる。さらに、研究用としてウエスタンブロットティング用にも使用できる。本発明の測定キット及び測定方法は、血清をはじめ、その生合成場所である脂肪組織中のレジスチンを高感度にかつ高濃度まで定量することが可能である。これらのことから、本発明はマウスを用いたレジスチン分子の変動等の解析において有効である。

【図面の簡単な説明】

50

【図1】マウスレジスチン標準物質を用いたELISA検量線を示す。

【図2】ドットプロットングと蛍光スキャナを用いた方法によるタンパク質量測定のための検量線

【図3】本発明の1実施態様におけるELISAプロトコルを示す。

【図4】動物実験のプロトコルを示す図である。

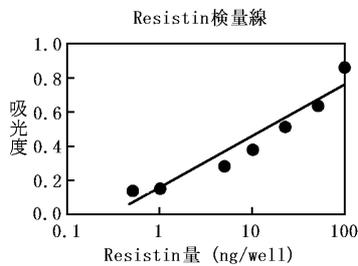
【図5】高脂肪食を与えたマウスにおける脂肪組織及び血清中のレジスチン量を示す図である。

【図6】通常食群と高脂肪食群の各種血清パラメーターの比較を示す図である。

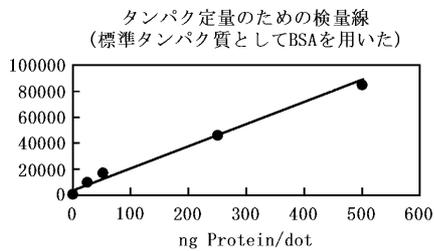
【図7】遺伝的肥満マウスにおける脂肪組織及び血清中のレジスチン量を示す図である。

【図8】正常マウスと遺伝的肥満マウスの各種血清パラメーターの比較を示す図である。

【図1】



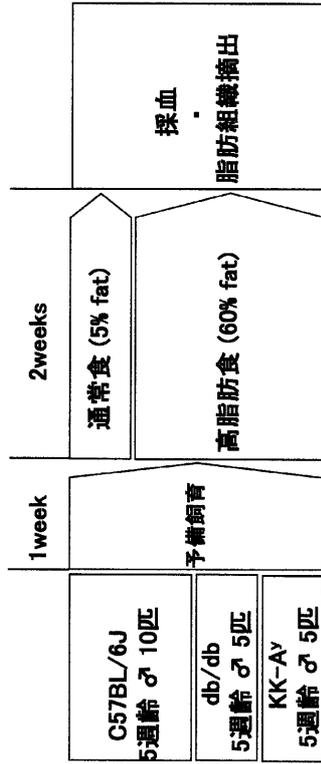
【図2】



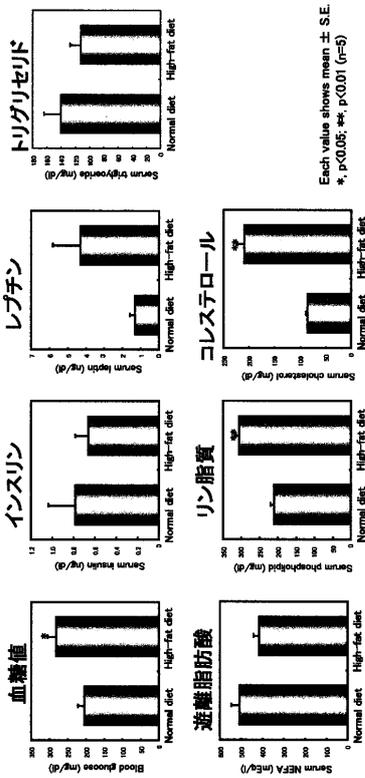
【図3】



【 図 4 】

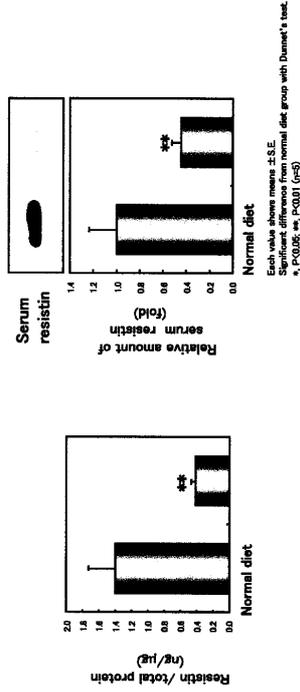


【 図 6 】



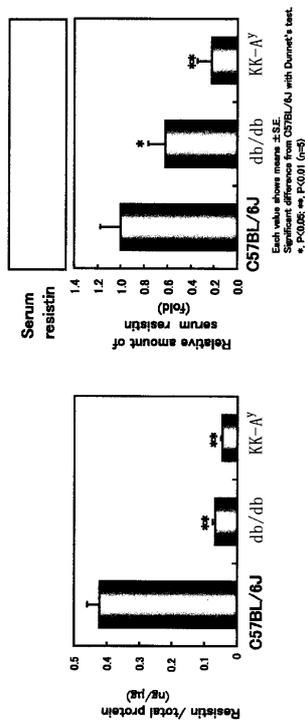
【 図 5 】

A. 脂肪組織中のレジスチン量 (ELISAによる定量)
 B. 血清中のレジスチン量 (ウエスタンブロットによる比較)

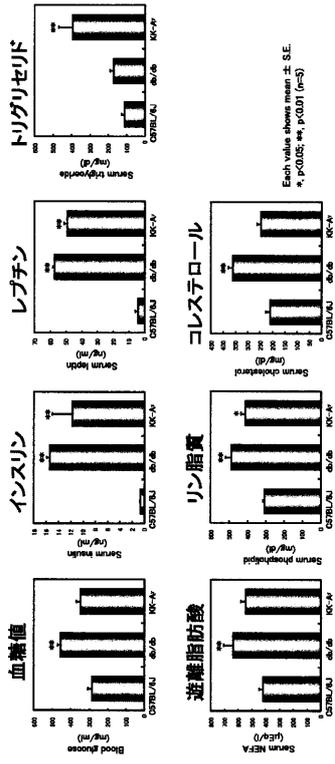


【 図 7 】

A. 脂肪組織中のレジスチン量 (ELISAによる定量)
 B. 血清中のレジスチン量 (ウエスタンブロットによる比較)



【 図 8 】



フロントページの続き

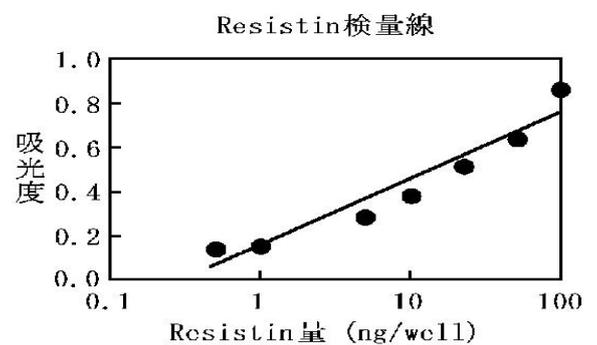
Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA17 CA40 DA75 EA50 FA72

专利名称(译)	抗体，使用所述抗体的筛选方法		
公开(公告)号	JP2004131450A	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002299876	申请日	2002-10-15
申请(专利权)人(译)	京都大学长		
[标]发明人	森山達哉 前渊元宏		
发明人	森山 達哉 前渊 元宏		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/575 C07K16/26 C12N15/09 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/26.ZNA C07K14/575 G01N33/50.F G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA20 2G045/BA13 2G045/BB02 2G045/BB24 2G045/BB29 2G045/BB35 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FB03 2G045/FB06 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供有用的抗体和使用该抗体的筛选方法。 SOLUTION：本发明的多克隆抗体具有以下 (a) 或 (b)：(A) 抗原肽：抗原肽的 Pro-Ile-Asp-Glu-Ala-Ile-Glu-Lys-Lys-Ile-Lys-Gln-Asp-Phe-Asn-Ser-Leu-Phe-Cys (b) 其特征在于它是针对抗原肽的多克隆抗体，该抗原肽被部分缺失，取代或添加，并且与氨基酸序列具有80%的同源性。 [选择图] 无

【 図 1 】



【 図 2 】