明　細　書

発明の名称 ： 免疫グロブリン結合性新規ポリペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、免疫グロブリンに結合性を示し、かつ、化学的安定性に優れた、新規ポリペプチドに関する。

背景技術

[0002] 抗体は、抗原と呼ばれる物質に特異的に結合する機能、および、他の生体分子や細胞と協同して抗原を有する因子を無毒化・除去する機能を有する。抗体という名は、このような抗原に結合するという機能を重視した名前であり、物質としては「免疫グロブリン」と呼ばれる。

[0003] 抗体中の定常領域（抗原結合部位以外）で特異的に結合する物質（リガンド）は、抗体の精製や検出のために利用することが可能であり、定常領域に結合することで適応範囲も広がるため、産業的な価値も十分にある。抗体中の定常領域に特異的に結合するリガンドの代表的なものとして、プロテインＡやプロテインＧが挙げられる。

[0004] 抗体医薬や検査診断などの抗体関連産業の発達に伴い、これらのリガンドに化学的な安定性が要求されることが増えてきた。特に、ウイルス等の失活、または、リガンドを固定化した担体（ビーズやチップなど）の洗浄のためにアルカリが使用されるので、アルカリに対して高い安定性を有するリガンドに対するニーズは非常に多い。ポリペプチド型のリガンドは、一般的にアルカリに対して弱いので、極めて優れた結合特異性を生かしつつ、アルカリに対する耐性を向上させる技術に対する研究が盛んになされている（非特許文献１、２）。

[0005] 抗体に結合するリガンドのアルカリ耐性を向上させる技術としてはプロテインＡの２９位のＧｌｙを変異することでアルカリ耐性を付与する技術（特許文献１、２）、Ａｓｎを他のアミノ酸に置換することでアルカリ耐性を付与する技術（特許文献３、４）、プロテインＡのＣドメインまたはその変異体

を利用する技術（特許文献５、６）が挙げられる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開昭６２－１９００８７号公報

特許文献2：国際公開第２０１０／１１０２８８号パンフレット

特許文献3：特表２００２－５２７１０７号公報

特許文献4：特表２００５－５３８６９３号公報

特許文献5：特開２００６－３０４６３３号公報

特許文献6：特表２０１０－５０４７５４号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｌｉｎｈｕｌｔ　Ｍ．他　著、「ＰＲＯＴＥＩＮＳ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，ａｎｄ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ」２００４年、５５巻、４０７－４１６頁

非特許文献2：Ｐａｌｍｅｒ　Ｂ．他　著、「Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」、２００８年、１３４巻、２２２－２３０頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、免疫グロブリンに結合性を示し、かつ、アルカリに対する安定性に優れた、新規ポリペプチドを提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく、計算化学的手法およびタンパク質工学的手法を駆使し、これまでの技術開発によって得られたポリペプチドとは配列が異なり、かつ、より優れたアルカリ耐性を示す新規ポリペプチドを発明するに至った。

[0010] すなわち、本発明は、以下のアミノ酸配列：

ＲＦ$X_1$$X_2$ＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨ$X_3$ＰＮＬＴＥＥＱＲＮ$X_4$ＦＩＱ$X_5$ＬＸ$_6$$X_7$$X_8$ＰＳＶＳＲＥ$X_9$ＬＡＥＡ$X_{10}$$X_{11}$ＬＮＤＡＱＡＰ$X_{12}$

（前記アミノ酸配列中、

X_1 ＝ D， E， N，又は Q

X_2 ＝ E，又は R

X_3 ＝ L， M，又は I

X_4 ＝ A， E， F， R， Y，又は W

X_5 ＝ D， E， H， I， L， Q， R， S， T，又は V

X_6 ＝ H， I，又は R

X_7 ＝ D， I，又は R

X_8 ＝ D，又は E

X_9 ＝ I， L，又は V

X_{10} ＝ R，又は Q

X_{11} ＝ H，又は R

X_{12} ＝ R， G，又は K

である）

を含み、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とするポリペプチドに関する。

[0011] また、本発明は、以下のアミノ酸配列：

$Z_1Z_2Z_3$RFX_1X_2EQQNAFYEILHX_3PNLTEEQRNX_4FIQX_5L$X_6X_7X_8$PSVSREX_9LAEA$X_{10}X_{11}$LNDAQAPX_{12}

（前記アミノ酸配列中、

X_1 ＝ D， E， N，又は Q

X_2 ＝ E，又は R

X_3 ＝ L， M，又は I

X_4 ＝ A， E， F， R， Y，又は W

X_5 ＝ D， E， H， I， L， Q， R， S， T，又は V

X_6 ＝ H， I，又は R

X_7 ＝ Ｄ， Ｉ，又は Ｒ

X_8 ＝ Ｄ，又は Ｅ

X_9 ＝ Ｉ， Ｌ，又は Ｖ

X_{10} ＝ Ｒ，又は Ｑ

X_{11} ＝ Ｈ，又は Ｒ

X_{12} ＝ Ｒ， Ｇ，又は Ｋ

Z_1～Z_3 ＝ Ａ， Ｄ， Ｅ， Ｇ， Ｈ， Ｉ， Ｌ， Ｎ， Ｑ， Ｒ， Ｓ， Ｔ， Ｖ，又は Ｙ

である）

を含み、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とするポリペプチドに関する。

[0012] 前記ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列：

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＧ（配列番号１）、又は

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号２）

との配列同一性が９０％以上であることが好ましい。

発明の効果

[0013] 本発明のポリペプチドは、特にアルカリに対する安定性に優れるという特徴を有する。極めて過酷なアルカリ性条件下、例えば、０．１～１．０Ｍ水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）に、室温下で数時間暴露しても、免疫グロブリンへの結合性はほとんど失われない。

[0014] 免疫グロブリンに結合性を残し、アルカリ耐性に優れるプロテインＡ変異体は多く知られるが、本発明は、それらを有意に上回るアルカリ耐性を示す新規ペプチドを提供する。

[0015] 例えば、タンパク質の確認のために利用されるＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて、アルカリ条件下に長時間暴露されたタンパク質は、一般的に、切断や修飾を激しく受けて、アルカリ処理前のバンドの状態（濃さ、位置、および、本数

）を維持することが難しい。しかし、本発明で得られた新規ペプチドは、厳しいアルカリ性条件下に暴露された後も、処理前のバンドの状態を維持でき、その耐え得る条件は、公知のアルカリ耐性プロテインＡ変異体よりも厳しくすることが可能である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]実施例３及び比較例１の結果を示す。アルカリ処理（０、４、８、および、２４時間）後の、配列番号１３～１５のポリペプチドのＳＤＳ－ＰＡＧＥの図である。

[図2]実施例５及び比較例２の結果を示す。アルカリ処理（０、４、および、２４時間）後の、配列番号３８～４６のポリペプチドのＳＤＳ－ＰＡＧＥの図である。

発明を実施するための形態

[0017] 本明細書において、「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチド構造を有するあらゆる分子を含む。本発明のポリペプチドは約５０アミノ酸からなるため、一般的には、「タンパク質」、または、「（タンパク質の）ドメイン」と呼ばれることもあり、基本的に「ポリペプチド」と区別されるものではない。

[0018] 「免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質」とは、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン断片、および免疫グロブリン誘導体を含む表現である。「免疫グロブリンＧ誘導体」とは、例えば、ヒト免疫グロブリンＧの一部のドメインを他生物種の免疫グロブリンＧのドメインに置き換えて融合させたキメラ型免疫グロブリンＧや、ヒト免疫グロブリンＧのＣＤＲ（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　Ｒｅｇｉｏｎｓ）部分を他生物種抗体のＣＤＲ部分に置き換えて融合させたヒト型化免疫グロブリンＧ、Ｆｃ領域の糖鎖に分子改変を加えた免疫グロブリンＧ、ヒト免疫グロブリンＧのＦｖ領域とＦｃ領域とを融合させた人工免疫グロブリンＧなどの、改変型人工タンパク質を総称する名称である。また、Ｆｃ領域の立体構造を保持した上で、さらなる改変（断片化など）を施すことは可能である。よって

、本発明における「免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質」は、一般的にＦｃ領域と呼ばれる領域を、不足なく全て含有する免疫グロブリン分子、および、その誘導体に限定されるものではない。

[0019] 本発明の新規ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含み、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とする。

$RFX_1X_2EQQNAFYEILHX_3PNLTEEQRNX_4FIQX_5LX_6X_7X_8PSVSREX_9LAEAX_{10}X_{11}LNDAQAPX_{12}$

X_1 ＝ Ｄ， Ｅ， Ｎ，又は Ｑ

X_2 ＝ Ｅ，又は Ｒ

X_3 ＝ Ｌ， Ｍ，又は Ｉ

X_4 ＝ Ａ， Ｅ， Ｆ， Ｒ， Ｙ，又は Ｗ

X_5 ＝ Ｄ， Ｅ， Ｈ， Ｉ， Ｌ， Ｑ， Ｒ， Ｓ， Ｔ，又は Ｖ

X_6 ＝ Ｈ， Ｉ，又は Ｒ

X_7 ＝ Ｄ， Ｉ，又は Ｒ

X_8 ＝ Ｄ，又は Ｅ

X_9 ＝ Ｉ， Ｌ，又は Ｖ

X_{10} ＝ Ｒ，又は Ｑ

X_{11} ＝ Ｈ，又は Ｒ

X_{12} ＝ Ｒ， Ｇ，又は Ｋ

[0020] 好ましくは、以下のアミノ酸配列を含み、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とするポリペプチドである。

$Z_1Z_2Z_3RFX_1X_2EQQNAFYEILHX_3PNLTEEQRNX_4FIQX_5LX_6X_7X_8PSVSREX_9LAEAX_{10}X_{11}LNDAQAPX_{12}$

X_1 ＝ Ｄ， Ｅ， Ｎ，又は Ｑ

X_2 ＝ Ｅ，又は Ｒ

X_3 ＝ Ｌ， Ｍ，又は Ｉ

X_4 ＝ Ａ， Ｅ， Ｆ， Ｒ， Ｙ，又は Ｗ

X_5 ＝ Ｄ，Ｅ，Ｈ，Ｉ，Ｌ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，又は Ｖ

X_6 ＝ Ｈ，Ｉ，又は Ｒ

X_7 ＝ Ｄ，Ｉ，又は Ｒ

X_8 ＝ Ｄ，又は Ｅ

X_9 ＝ Ｉ，Ｌ，又は Ｖ

X_{10} ＝ Ｒ，又は Ｑ

X_{11} ＝ Ｈ，又は Ｒ

X_{12} ＝ Ｒ，Ｇ，又は Ｋ

Z_1～Z_3 ＝ Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｌ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，又は Ｙ

[0021] より好ましくは、以下のアミノ酸配列との配列同一性が９０％以上であり、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とするポリペプチドである。

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＧ（配列番号１）、又は

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号２）

[0022] 上記配列同一性は、９５％以上であることが更に好ましく、９８％以上であることが特に好ましい。また、本発明のポリペプチドより短いポリペプチドであっても、本発明のポリペプチド中の８０％以上、好ましくは９０％以上の配列（範囲）を含む場合は、本発明に含まれる。

[0023] ポリペプチドは、上記のアミノ酸配列が２個以上連結されたものであってもよい。連結する個数の下限は、２個以上、好ましくは３個以上、より好ましくは４個以上、更に好ましくは５個以上であり、上限は、２０個以下、好ましくは１０個以下、より好ましくは８個以下、更に好ましくは６個以下である。これらの多量体は、同一のアミノ酸配列からなる免疫グロブリン結合性ポリペプチド（ドメイン）同士の連結体であるホモダイマー、ホモトリマー

等のホモポリマーであってもよい。また、配列が異なる複数種類の免疫グロブリン結合性ポリペプチド同士の連結体であるヘテロダイマー、ヘテロトリマー等のヘテロポリマーであってもよい。

[0024] ポリペプチドの連結のされ方としては、リンカーとなるアミノ酸残基を介さず連結する方法、または、リンカーとなる１または複数のアミノ酸残基で連結する方法が挙げられるが、これらの方法に限定されるものではない。リンカーとなるアミノ酸残基の数に特に制限はなく、ポリペプチドの３次元立体構造を不安定化しないものが良い。

[0025] また、本発明のポリペプチドには、免疫グロブリン結合性ポリペプチド、または、それが２個以上連結されたポリペプチドが、１つの構成成分として、機能の異なる他のタンパク質と融合されて得られる融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質の例としては、アルブミンやＧＳＴ（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ）が融合したタンパク質を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、ＤＮＡアプタマーなどの核酸、抗生物質などの薬物、ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）などの高分子が融合されていてもよい。

[0026] 本発明のポリペプチドはアルカリ性条件下での化学的安定性に優れるという特徴を有する。「アルカリ性条件下」とは、洗浄または殺菌の目的を達成し得る程度のアルカリ性を指す。より具体的には、約０．０５～１．０Ｎの水酸化ナトリウム水溶液などが該当するが、これに限定されるものではない。「化学的安定性」とは、アミノ酸残基の化学変化などの化学修飾、および、アミド結合の転移や切断などの化学変性に対して、ポリペプチドがその機能を保持する性質を指す。本発明においてポリペプチドの機能保持とは、免疫グロブリンのＦｃ領域への結合活性（化学変性を受けずに親和性を保持しているポリペプチドの割合）が保持されることを指す。「化学的安定性」が高い程、アルカリ性溶液への浸漬処理の後も、免疫グロブリンのＦｃ領域への結合活性が低下する度合いが小さい。なお、本明細書中における「アルカリ耐性」という用語も、「アルカリ性条件下における化学的安定性」と同義で

ある。

[0027] 免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に対する親和性は、表面プラズモン共鳴原理を用いたＢｉａｃｏｒｅシステム（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）などのバイオセンサーによって試験することができるが、これに限定されるものではない。測定条件としては、本発明のポリペプチドが免疫グロブリンのＦｃ領域に結合した時の結合シグナルが検出できれば良く、温度２０～４０℃（一定温度）にて、ｐＨ６～８の中性条件にて測定することで簡単に評価することができる。

[0028] 結合パラメータとしては、例えば、親和定数（K_A）や解離定数（K_D）を用いることができる（永田他　著、「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法」、シュプリンガー・フェアラーク東京、１９９８年、４１頁）。本発明のポリペプチドの、免疫グロブリンのＦｃ領域に対する親和定数は、Ｂｉａｃｏｒｅシステムを利用して、センサーチップにヒトＩｇＧを固定化して、温度２５℃、ｐＨ７．４の条件下にて、各ドメイン変異体を流路添加する実験系で求めることができる。本発明に係るタンパク質について、ヒトＩｇＧへの親和定数（K_A）が1×10^5（M^{-1}）以上、より好ましくは1×10^6（M^{-1}）以上、更に好ましくは1×10^7（M^{-1}）であるタンパク質を好適に用いることができる。

[0029] ただし、アルカリ処理後の残存結合活性を求める場合には、結合パラメータとして、K_AやK_Dは不適切である。化学処理によって、タンパク質１分子の免疫グロブリンに対する結合能は変化しないからである。アルカリ処理後のタンパク質の残存結合活性を求める方法として、例えば、タンパク質をセンサーチップに固定化し、タンパク質を化学処理する前と後で、同一濃度の免疫グロブリンを添加したときの、結合シグナルの大きさ、または、理論的最大結合容量（Ｒｍａｘ）という結合パラメータを用いる方法が好ましいが、この方法に限定されない。例えば、免疫グロブリンを固定化し、化学処理前後のタンパク質を添加する実験系でも可能である。

[0030] アルカリ性条件下における化学的安定性は、免疫グロブリンに対する結合活

性だけでなく、ポリペプチド自体の物質としての安定性を指標として決定することもできる。例えば、電気泳動法によって、アルカリ処理前後のポリペプチドの泳動バンドを比較することで、アルカリ性条件下における化学的安定性を評価することが可能である。具体的には、ごく一般的なＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、デンシトメトリーによるバンド強度を解析することによって化学的安定性を比較可能である。デンシトメトリーによって分析したバンド強度を基準にすると、本発明のポリペプチドは、０．５Ｍ水酸化ナトリウム水溶液中で、２５℃で２４時間静置した後、当該処理をする前と比較して、５０％以上であることが好ましく、６０％以上であることがより好ましく、７０％以上であることが更に好ましく、８０％以上であることが特に好ましい。また、デンシトメトリーによって分析したバンド強度を基準にすると、本発明のポリペプチドは、０．５Ｍ水酸化ナトリウム水溶液中で、２５℃で３０時間静置した後、当該処理をする前と比較して、３０％以上であることが好ましく、４０％以上であることがより好ましく、５０％以上であることが更に好ましい。

[0031] 本発明のタンパク質は、タンパク質のアミノ酸配列をコードするＤＮＡをベクターに挿入し、該ベクターを含む形質転換体を培養することによって生産することができる。

[0032] 前記ＤＮＡは、その塩基配列を翻訳して得られるアミノ酸配列が、該タンパク質を構成するものであればいずれでも良い。そのようなＤＮＡは、通常用いられる公知の方法、例えば、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（以下、ＰＣＲと略す）法を利用して取得できる。また、公知の化学合成法で合成することも可能であり、さらに、ＤＮＡライブラリーから得ることもできる。当該ＤＮＡを構成する塩基配列は、コドンが縮重コドンで置換されていても良く、翻訳されたときに同一のタンパク質をコードしている限り、本来の塩基配列と同一である必要性は無い。

[0033] ＤＮＡの塩基配列を改変するための部位特異的な変異の導入は、組換えＤＮＡ技術、ＰＣＲ法等を用いて行うことができる。すなわち、組換えＤＮＡ技

術による変異の導入は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子中において、変異導入を希望する目的の部位の両側に適当な制限酵素認識配列が存在する場合に、それら制限酵素認識配列部分を前記制限酵素で切断し、変異導入を希望する部位を含む領域を除去した後、化学合成等によって目的の部位のみに変異導入したＤＮＡ断片を挿入するカセット変異法によって行うことができる。また、ＰＣＲによる部位特異的変異の導入は、例えば、タンパク質をコードする二本鎖プラスミドを鋳型として、＋およびー鎖に相補的な変異を含む２種の合成オリゴプライマーを用いてＰＣＲを行うダブルプライマー法により、行うことができる。

[0034] また、本発明の単量体タンパク質（１つのドメイン）をコードするＤＮＡを、意図する数だけ直列に連結することにより、多量体タンパク質をコードするＤＮＡを作製することもできる。例えば、多量体タンパク質をコードするＤＮＡの連結方法は、ＤＮＡ配列に適当な制限酵素部位を導入し、制限酵素で断片化した２本鎖ＤＮＡをＤＮＡリガーゼで連結することができる。制限酵素部位は１種類でもよいが、複数の異なる種類の制限酵素部位を導入することもできる。

[0035] また、多量体タンパク質をコードするＤＮＡにおいて、各々の単量体タンパク質をコードする塩基配列が同一の場合には、形質転換した際に宿主細胞内でＤＮＡの相同組み換えを誘発する可能性があるので、連結されている単量体タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列間の配列同一性が９０％以下であることが好ましく、８５％以下であることがより好ましい。

[0036] 前記ベクターは、前述したタンパク質、または、その部分アミノ酸配列をコードする塩基配列、およびその塩基配列に作動可能に連結された宿主で機能しうるプロモーターを含む。通常は、前述したタンパク質をコードする遺伝子を、適当なベクターに連結もしくは挿入することにより得ることができる。遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で自律複製可能なものであれば特に限定されず、プラスミドＤＮＡやファージＤＮＡをベクターとして用いることができる。例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、ｐＱＥ系

ベクター（キアゲン社製）、ｐＥＴ系ベクター（メルク社製）、および、ｐＧＥＸ系ベクター（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）のベクターなどが挙げられる。ブレビバチルス属細菌の遺伝子の発現に有用なプラスミドベクターとしては、例えば、枯草菌ベクターとして公知であるｐＵＢ１１０、または、ｐＨＹ５００（特開平２－３１６８２号公報）、ｐＮＹ７００（特開平４－２７８０９１号公報）、ｐＮＵ２１１Ｒ２Ｌ５（特開平７－１７０９８４号公報）、ｐＨＴ２１０（特開平６－１３３７８２号公報）、または、大腸菌とブレビバチルス属細菌とのシャトルベクターであるｐＮＣＭＯ２（特開２００２－２３８５６９号公報）などが挙げられる。

[0037] 本発明のタンパク質は、タンパク質発現を補助する作用、または、精製を容易にする作用がある公知の蛋白質との融合タンパク質として取得することができる。該タンパク質の例としては、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオンーＳートランスフェラーゼ（ＧＳＴ）等が挙げられるが、それらのタンパク質に限定されるものではない。本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードするＤＮＡと、ＭＢＰ或いはＧＳＴ等をコードするＤＮＡとを連結した状態で含むベクターを使用して、融合タンパク質を生産することができる。

[0038] 形質転換体は、宿主となる細胞へベクターを導入することにより得ることができる。宿主へのベクターの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法、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、アグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、または、ポリエチレングリコール法などが挙げられるが、これに限定されるものではない。また、得られた遺伝子の機能を宿主で発現する方法としては、本発明で得られた遺伝子をゲノム（染色体）に組み込む方法なども挙げられる。

[0039] 宿主となる細胞については、特に限定されるものではないが、安価に大量生産する上では、大腸菌、枯草菌、ブレビバチルス属、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）等のバク

テリア（真正細菌）を好適に使用しうる。

[0040] 本発明のタンパク質は、前記した形質転換細胞を培地で培養し、培養菌体中（菌体ペリプラズム領域中も含む）、または、培養液中（菌体外）に本発明のタンパク質を生成蓄積させ、該培養物から所望のタンパク質を採取することにより製造することができる。

[0041] また、本発明のタンパク質は、前記した形質転換細胞を培地で培養し、培養菌体中（菌体ペリプラズム領域中も含む）、または、培養液中（菌体外）に、本発明のタンパク質を含む融合タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該融合タンパク質を採取し、該融合タンパク質を適切なプロテアーゼによって切断し、所望のタンパク質を採取することによっても製造することができる。

[0042] 形質転換細胞の培養は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。培養に用いる培地は、該タンパク質を高効率、高収量で生産できるものであれば特に制限は無い。具体的には、グルコース、蔗糖、グリセロール、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸などの炭素源や窒素源を使用することが出来る。その他、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩等の無機塩類が必要に応じて添加される。栄養要求性の宿主細胞を用いる場合は、生育に要求される栄養物質を添加すればよい。また、必要であればペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシンなどの抗生物質が添加されても良い。

[0043] さらに、菌体内外に存在する宿主由来のプロテアーゼによる当該目的蛋白質の分解、低分子化を抑えるために、公知の各種プロテアーゼ阻害剤、すなわちＰｈｅｎｙｌｍｅｔｈａｎｅ ｓｕｌｆｏｎｙｌ ｆｌｕｏｒｉｄｅ（ＰＭＳＦ）、Ｂｅｎｚａｍｉｄｉｎｅ、４－（２－ａｍｉｎｏｅｔｈｙｌ）－ｂｅｎｚｅｎｅｓｕｌｆｏｎｙｌ ｆｌｕｏｒｉｄｅ（ＡＥＢＳＦ）、Ａｎｔｉｐａｉｎ、Ｃｈｙｍｏｓｔａｔｉｎ、Ｌｅｕｐｅｐｔｉｎ、Ｐｅｐｓｔａｔｉｎ Ａ、Ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｏｎ、Ａｐｒｏｔｉｎｉｎ、Ｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅｔｅｔｒａ ａｃｅｔｉｃ ａｃｉｄ（ＥＤＴ

Ａ）、および／または、その他市販されているプロテアーゼ阻害剤を適当な濃度で添加しても良い。

[0044] さらに、本発明のタンパク質を正しくフォールディングさせるために、例えば、ＧｒｏＥＬ／ＥＳ、Ｈｓｐ７０／ＤｎａＫ、Ｈｓｐ９０、Ｈｓｐ１０４／ＣｌｐＢなどの分子シャペロンを利用しても良い（例えば、共発現、または、融合タンパク質化などの手法で、本発明のタンパク質と共存させる）。なお、本発明のタンパク質の正しいフォールディングを目的とする場合には、正しいフォールディングを助長する添加剤を培地中に加える、および、低温にて培養するなどの手法もあるが、これらに限定されるものではない。

[0045] 大腸菌を宿主として得られた形質転換細胞を培養する培地としては、ＬＢ培地（トリプトン　１％、酵母エキス　０．５％、ＮａＣｌ　１％）、または、２ｘＹＴ培地（トリプトン　１．６％、酵母エキス　１．０％、ＮａＣｌ　０．５％）等が挙げられる。

[0046] ブレビバチルス属細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、ＴＭ培地（ペプトン　１％、肉エキス　０．５％、酵母エキス　０．２％、グルコース　１％、ｐＨ　７．０）、または、２ＳＬ培地（ペプトン　４％、酵母エキス　０．５％　、グルコース　２％、ｐＨ　７．２）等が挙げられる。

[0047] また、培養温度は、１５～４２℃、好ましくは２０～３７℃で、通気攪拌条件で好気的に数時間～数日培養することにより、本発明のタンパク質を、培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）、または、培養溶液（細胞外）に蓄積させて回収する。場合によっては、通気を遮断し嫌気的に培養してもよい。

[0048] 組換えタンパク質が分泌生産される場合には、培養終了後に、遠心分離、ろ過などの一般的な分離方法で、培養細胞と分泌生産されたタンパク質を含む上清を分離することにより生産された組換えタンパク質を回収することができる。

[0049] また、培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）に蓄積される場合にも、例

えば、培養液から遠心分離、ろ過などの方法により菌体を採取し、次いで、この菌体を超音波破砕法、フレンチプレス法などにより破砕し、および／または、界面活性剤等を添加して可溶化することにより、細胞内に蓄積生産されたタンパク質を回収することができる。

[0050] 本発明のタンパク質の精製はアフィニティークロマトグラフィー、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組み合わせることによって行うことができる。

[0051] 得られた精製物質が目的のタンパク質であることの確認は、通常の方法、例えばＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動、Ｎ末端アミノ酸配列分析、ウエスタンブロッティング等により行うことができる。

[0052] 本発明のタンパク質は、前記ＤＮＡを用いた無細胞タンパク質合成系を用いて製造することもできる。このような無細胞タンパク質合成系の例として、原核細胞由来、植物細胞由来、高等動物細胞由来の合成系が挙げられる。

[0053] 本発明のタンパク質は、免疫グロブリンに対して親和性を有することを特徴とするアフィニティーリガンドとして利用することができる。該リガンドを水不溶性の基材からなる担体に固定化して、アフィニティー分離マトリックスを得ることができる。

[0054] ここで、「アフィニティーリガンド」とは、抗原と抗体の結合に代表される、特異的な分子間の親和力に基づいて、ある分子の集合から目的の分子を選択的に捕集（結合）する物質（官能基）を指す用語であり、本発明においては、免疫グロブリンに対して特異的に結合するタンパク質を指す。本明細書においては、単に「リガンド」と表記した場合も、「アフィニティーリガンド」と同意である。

[0055] アフィニティーリガンドを固定化するための、水不溶性の基材からなる担体としては、ガラスビーズ、シリカゲルなどの無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレンなどの合成高分子や、結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストランなどの多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組

み合わせによって得られる有機ー有機、有機ー無機などの複合担体などが挙げられる。市販品としては、多孔質セルロースゲルであるＧＣＬ２０００、アリルデキストランとメチレンビスアクリルアミドを共有結合で架橋したＳｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－１０００、メタクリレート系の担体であるＴｏｙｏｐｅａｒｌ、アガロース系の架橋担体であるＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ４Ｂ、および、セルロース系の架橋担体であるＣｅｌｌｕｆｉｎｅなどを例示することができる。ただし、水不溶性担体は、例示したこれらの担体のみに限定されるものではない。

[0056] また、水不溶性担体は、本アフィニティー分離マトリックスの使用目的および方法からみて、表面積が大きいことが望ましく、適当な大きさの細孔を多数有する多孔質であることが好ましい。担体の形態としては、ビーズ状、モノリス状、繊維状、膜状（中空糸を含む）などいずれも可能であり、任意の形態を選ぶことができる。

[0057] リガンドの固定化方法については、例えば、リガンドに存在するアミノ基、カルボキシル基、または、チオール基を利用した、従来のカップリング法で担体に結合させることができる。カップリング法としては、担体を臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、ヒドラジン、および、過ヨウ素酸ナトリウムなどと反応させて担体を活性化し（あるいは担体表面に反応性官能基を導入し）、リガンドとして固定化する化合物とカップリング反応を行い固定化する方法、また、担体とリガンドとして固定化する化合物が存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化方法が挙げられる。また、リガンドと担体の間に複数の原子からなるスペーサー分子を導入しても良いし、担体にリガンドを直接固定化しても良い。この場合、固定化のために、本発明のタンパク質に対して、化学修飾しても良いし、固定化に有用なアミノ酸残基を加えても良い。固定化に有用なアミノ酸としては、側鎖に固定化の化学反応に有用な官能基を有しているアミノ酸が挙げられ、例えば

、側鎖にアミノ基を含むＬｙｓや、側鎖にチオール基を含むＣｙｓが挙げられる。本発明のタンパク質をリガンドとして固定化したマトリックスが本発明のタンパク質の効果を奏する限り、固定化のための修飾・改変方法は特に限定されない。

[0058] 具体的な固定化方法として、リガンドに存在するＬｙｓのεアミノ基を介して、従来のカップリング法で担体に共有結合される方法が好ましい。本発明のタンパク質は、Ｌｙｓを含まない場合があるので、その場合には、上述のように、固定化に有用なＬｙｓを付与した配列をポリペプチドに加えることが好ましく、Ｌｙｓを付与した配列はポリペプチドの末端に付与されることが好ましい。本発明における「Ｌｙｓを付与した配列」とは、少なくとも１個以上のＬｙｓを含有する配列であり、Ｌｙｓの数は、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～５個、更に好ましくは１～３個である。また、Ｌｙｓが複数ある場合には各々のＬｙｓが連続（隣接）している必要はない。また、末端にＬｙｓを付与した配列のアミノ酸残基数についても、特に制限は無く、Ｌｙｓ１個からなる配列であっても構わない。Ｌｙｓを付与した配列のアミノ酸残基数は、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、更に好ましくは１～５個である。「末端に付与」とは、基本的には、アミノ酸配列のＮ末端、または、Ｃ末端への付与を意味する。よって、本発明のポリペプチドの末端を置換変異することで、Ｌｙｓを付与しても構わない。

[0059] 「免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質」とは、本発明のタンパク質が結合するＦｃ領域側の部位を含むタンパク質のことであり、Ｆｃ領域を完全に含むタンパク質である必要はない。

[0060] これらの免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質の精製法は、すでに市販品として存在するカラムを用いたアフィニティーカラム・クロマトグラフィ精製法に準じる手順により達成することができる。すなわち、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を含有する緩衝液を中性となるように調整した後、該溶液をアフィニティー分離マトリックスを充填したアフィニティーカラムに通過させ、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を吸着さ

せる。次いで、アフィニティーカラムに純粋な緩衝液を適量通過させ、カラム内部を洗浄する。この時点では所望の免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質はカラム内の本発明のアフィニティー分離マトリックスに吸着されている。次いで、適切なｐＨに調整した酸性緩衝液（該マトリックスからの解離を促進する物質を含む場合もある）をカラムに通液し、所望の免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を溶出することにより、高純度な精製が達成される。アフィニティー分離マトリックスは、リガンド化合物や担体の基材が完全に機能を損なわない程度の、適当な強酸性、または、強アルカリ性の純粋な緩衝液（適当な変性剤、または、有機溶剤を含む溶液の場合もある）を通過させて洗浄することにより、再利用が可能である。

実施例

[0061] （実施例１）新規ポリペプチドの調製

配列番号３および４に記載のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを混合し、ポリメラーゼにＢｌｅｎｄ　Ｔａｑ（東洋紡績株式会社製）を用い、添付のプロトコルに従ってオーバーラップＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲ反応生成物である二本鎖ＤＮＡをアガロース電気泳動で抽出・精製し、制限酵素ＢａｍＨＩとＨｉｎｄＩＩＩ（いずれもタカラバイオ株式会社製）により切断した。同様の手法で、配列番号５および６に記載のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドから、ＰＣＲ反応にて目的の二本鎖ＤＮＡを得て、制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩとＥｃｏＲＩ（タカラバイオ株式会社製）により切断した。

[0062] プラスミドベクターｐＧＥＸ－２Ｔ（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）のマルチクローニングサイト中のＢａｍＨＩ／ＥｃｏＲＩサイトに、上記２種の二本鎖ＤＮＡをサブクローニングした。ライゲーション反応は、制限酵素ＢａｍＨＩとＥｃｏＲＩによる切断反応とＡｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（タカラバイオ株式会社製）による脱リン酸化反応を行ったベクターｐＧＥＸ－２Ｔと、上記２種の制限酵素処理済み二本鎖ＤＮＡを混合し、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ（東洋紡績株式会社製）を用い、添付の

プロトコルに従って行った。なお、上記２種の二本鎖ＤＮＡが、ＨｉｎｄＩＩＩ切断サイトで結合し、ｐＧＥＸ－２Ｔにサブクローニングしたときに、配列番号１をコードするように、配列番号３、４、５、６のＤＮＡを設計した。この配列番号１をコードするＤＮＡを含むｐＧＥＸ－２Ｔ（ライゲーション反応液）を用いて、大腸菌ＨＢ１０１細胞（タカラバイオ株式会社製）の形質転換を行い、定法によって、プラスミドＤＮＡを増幅・抽出した。

[0063] この発現プラスミドを鋳型として、（１）配列番号７および８のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてＰＣＲを行い、ＰＣＲ反応精製産物を制限酵素ＰｓｔＩとｃｆｒ１３Ｉ（タカラバイオ株式会社製）で処理し、インサート用二本鎖ＤＮＡを調製した。また、同じ鋳型を用いて、（２）配列番号９および１０のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてＰＣＲを行い、ＰＣＲ反応精製産物を制限酵素ｃｆｒ１３ＩとＥｃｏＲＩで処理し、インサート用二本鎖ＤＮＡを調製した。これら２種のインサート用二本鎖ＤＮＡを、（３）制限酵素（ＰｓｔＩ／ＥｃｏＲＩ）処理と脱リン酸化処理を施したブレビバチルス用発現ベクターｐＮＫ３２６０’（国際公開第２００６／００４０６７号パンフレット）と混合し、ライゲーション反応によって、配列番号１のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを持つ発現プラスミドを構築した。

[0064] また、上記と並行して、オリゴヌクレオチドプライマーについて、（１）では配列番号７および１１を、（２）では配列番号９および１２を使用し、制限酵素については、（１）ではＰｓｔＩとＸｈｏＩ（タカラバイオ株式会社製）、（２）では、ＸｈｏＩとＥｃｏＲＩを使用することで、配列番号２のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを持つ発現プラスミドを構築した。なお、遺伝子操作の都合から、Ｃ末端（２番目のリピートの最後）のアミノ酸残基はＬｙｓに置換されているが、Ｃ末端なので置換の有無によって評価結果は変わらない。

[0065] これらの発現プラスミドを用いて、ブレビバチルス・チョウシネンシスＦＹ－１株の形質転換を行った。形質転換は、公知の方法による電気導入法にて

実施した（「Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」、１９９７年、６１号、２０２－２０３頁）。なお、ブレビバチルス・チョウシネンシスＦＹ－１株は、ブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１－ＯＫ株（特開平６－２９６４８５号公報）に変異処理をして得られたＰｈｅ・Ｔｙｒ要求性株である。

[0066] ブレビバチルス・チョウシネンシスＦＹ－１組換え菌を、６０μｇ／ｍＬのネオマイシンを含む５ｍＬの３ＹＣ培地（ポリペプトン　３％、酵母エキス　０．２％、グルコース　３％、硫酸マグネシウム　０．０１％、硫酸鉄　０．００１％、塩化マンガン　０．００１％、塩化亜鉛　０．０００１％）にて、３０℃で３日間の振盪培養を行った。

[0067] 培養物を遠心処理して菌体を分離し、得られた培養上清から、ＳＰ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラム（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）を利用した陽イオン交換クロマトグラフィーにて、目的のポリペプチドを精製した。具体的には、酢酸ナトリウムを終濃度５０ｍＭになるように添加し、さらに塩酸でｐＨ４．０に調整した培養上清を、陽イオン交換用緩衝液Ａ（５０ｍＭ　$CH_3COOH-CH_3COONa$，ｐＨ４．０）にて平衡化したＳＰ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムに添加し、陽イオン交換用緩衝液Ａで洗浄後、陽イオン交換緩衝液Ａと陽イオン交換緩衝液Ｂ（５０ｍＭ　$CH_3COOH-CH_3COONa$，１Ｍ　ＮａＣｌ，ｐＨ４．０）を利用した塩濃度勾配にて、途中に溶出される目的のポリペプチドを分取した。次に、ＤＥＡＥ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラム（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）を利用した陰イオン交換クロマトグラフィーにて、目的のポリペプチドを精製した。具体的には、分取した目的タンパク質溶液を、超純水に透析し、陰イオン交換用緩衝液Ａ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．０）にて平衡化したＤＥＡＥ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムに添加し、陰イオン交換用緩衝液Ａで洗浄後、陰イオン交換緩衝液Ａと陰イオン交換緩衝液Ｂ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，０．３Ｍ　ＮａＣｌ，ｐＨ８．０）を利用した塩濃度勾配にて、途中に溶出される目的のポリペプチドを分取した。分取した目的のポリペプチド

溶液を、再び超純水に透析し、目的のポリペプチドのみを含む水溶液を最終精製サンプルとした。なお、以上のカラムを用いたクロマトグラフィーによるタンパク質精製は、全てＡＫＴＡｐｒｉｍｅ　ｐｌｕｓシステム（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）を利用して実施した。

[0068] 以上の工程を経て調製され、以後の実施例に用いた、２種類のポリペプチドのアミノ酸配列を、配列番号１３（配列番号１の２連結型）、配列番号１４（配列番号２の２連結型）として示す。

[0069] （実施例２）各種ポリペプチドのヒトＩｇＧとの親和性の解析

表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーＢｉａｃｏｒｅ　３０００（ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）を用いて、実施例１で取得した各種ポリペプチドの免疫グロブリンとの親和性を解析した。

[0070] ヒト血漿から分画したヒト免疫グロブリンＧ製剤（以後は、ヒトＩｇＧと記する）をセンサーチップに固定化し、各種タンパク質をチップ上に流して、両者の相互作用を検出した。ヒトＩｇＧのセンサーチップＣＭ５への固定化は、Ｎ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ（ＮＨＳ）、および、Ｎ－ｅｔｈｙｌ－Ｎ’－（３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ）ｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＥＤＣ）を用いたアミンカップリング法にて行い、ブロッキングにはＥｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅを用いた（センサーチップや固定化用試薬は、全てＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）。ヒトＩｇＧ溶液としてガンマガード（バクスター社製）を使用し、標準緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）に１．０ｍｇ／ｍＬになるよう溶解して調製した。このヒトＩｇＧ溶液を、固定化用緩衝液（１０ｍＭ　CH_3COOH－CH_3COONa、ｐＨ４．５）で１００倍に希釈した。ヒトＩｇＧは、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００付属のプロトコルに従い、センサーチップへ固定した。また、チップ上の別のフローセルに対して、ＥＤＣ／ＮＨＳにより活性化した後にＥｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅを固定化する処理を行うことで、ネガティブ・コントロールとなるリファレンスセルも用意した。

[0071] 実施例１に記載の方法で製造した各種ポリペプチドは、ランニング緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％　Ｐ－２０、ｐＨ７．４）を用いて、１０～１０００ｎＭの範囲で適宜調製し（各々について、異なるタンパク質濃度の溶液を３種類調製）、各々のポリペプチド溶液を、流速２０μＬ／ｍｉｎで３０秒間センサーチップに添加した。測定温度２５℃にて、添加時（結合相、９０秒間）、および、添加終了後（解離相、９０秒間）の結合反応曲線を順次観測した。各々の観測終了後に、４０ｍＭ　ＮａＯＨ（１５秒間）を添加してセンサーチップを再生した。この操作は、センサーチップ上に残った添加タンパク質の除去が目的であり、固定化したヒトＩｇＧの結合活性がほぼ完全に戻ることを確認した。得られた結合反応曲線（リファレンスセルの結合反応曲線を差し引いた結合反応曲線）に対して、システム付属ソフトＢＩＡ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎを用いた１：１の結合モデルによるフィッティング解析を行い、ヒトＩｇＧに対する親和定数（$K_A = k_{on} / k_{off}$）を算出した。

[0072] 配列番号１のポリペプチドの抗体への親和定数（K_A）は、配列番号１３のポリペプチドが２．１×10^8（M^{-1}）であり、配列番号１４のポリペプチドが２．６×10^8（M^{-1}）であった。ヒト免疫グロブリンに対して十分な親和性を有すると言える測定結果であった。

[0073] （実施例３）ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析による新規ポリペプチドのアルカリに対する安定性評価

実施例１で取得した各種ポリペプチドについて、アルカリ性条件下で一定時間インキュベートする処理を行った後の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上のバンドの状態を比較することで評価した。

[0074] アルカリ処理は次の方法で行った。２００μＭの各種ポリペプチドに対して、最終濃度が０．５ＭとなるようにＮａＯＨを加えて、２５℃にて４、８、および、２４時間インキュベートし、０．５Ｍ　ＨＣｌ（あらかじめｐＨが中性に戻ることを確認した一定容量）をポリペプチド溶液に対して添加することで中和し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルとした。アルカリ処理前（処理

後０時間）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルは、ポリペプチド濃度、溶液の組成が同じになるように、アルカリ処理時に加えるＮａＯＨ溶液、および、中和処理時に加えるＨＣｌ溶液を、あらかじめ混合させた溶液を加えることで調製した。電源搭載型ミニスラブ電気泳動槽パジェランに１５％ポリアクリルアミド・プレキャストゲル「ｅ・ＰＡＧＥＬ」（共にアトー株式会社製）を用いて、付属のマニュアル（定法）に従いＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った。染色・脱色処理後の電気泳動ゲルを画像読取装置ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＸＲＳ（バイオラッドラボラトリーズ株式会社製）を用いて電子画像化し、バンドの解析（デンシトメトリー）は、付属のソフトＱｕａｎｔｉｔｙ　Ｏｎｅ（バイオラッドラボラトリーズ株式会社製）にて、マニュアルに従って行った。図１にＳＤＳ－ＰＡＧＥの電子画像を示す。

[0075] アルカリ処理から２４時間後のバンド強度比（アルカリ処理前を１００％としたときの残存率）について、公知の高アルカリ耐性ポリペプチド（比較例１、配列番号１５、２連結型）が５５．０％であったのに対し、配列番号１３のポリペプチドが６０．９％、配列番号１４のポリペプチドが９１．６％であった。

[0076] 本発明で得られたポリペプチドは、厳しいアルカリ条件下でも優れた安定性を示すことが分かった。特に、配列番号１４（配列番号２がベース）のポリペプチドは、０．５Ｍ　ＮａＯＨ、２５℃で４時間インキュベートしても、バンド強度がほとんど変化しない（９９．８％）ことから、様々な局面で極めて実用性の高いポリペプチドであると言える。

[0077] （実施例４）新規ポリペプチドの調製

実施例１で取得した配列番号１をコードするＤＮＡを含むｐＧＥＸ－２Ｔを鋳型ＤＮＡとして、２種類のプライマーを用いて、クイックチェンジ法を実施し、新たな変異を含む発現プラスミドを取得した。クイックチェンジ法は、ＤＮＡポリメラーゼのＰｆｕ　Ｔｕｒｂｏ、および、メチル化ＤＮＡ（鋳型ＤＮＡ）切断酵素ＤｐｎＩ（ともにＳｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用い、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社のプロトコルに従い実施した。配列番号１６と１７

、または、配列番号１８と１９、または、配列番号２０と２１、または、配列番号２２と２３、配列番号２４と２５、配列番号２６と２７、配列番号２８と２９という、７通りのプライマーの組み合わせで、新たな変異を導入した発現プラスミドを調製した。さらに、配列番号１６と１７のプライマーを用いて調製した発現プラスミドを鋳型ＤＮＡとして、配列番号１８と１９のプライマーを用いて、もう一度変異を導入した発現プラスミドも調製した。したがって、新たに８種類の発現プラスミドを調製した。

[0078] これらの発現プラスミドを鋳型として、実施例１に記載の工程（１）～（３）の手法を用いて、以下に示す各々のアミノ酸配列（配列番号３０～３７）について、同じ配列のリピートとなるアミノ酸配列を有する４種類のポリペプチドをコードするＤＮＡを含む発現プラスミドを取得した。

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＱＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３０）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＩＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＱＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３１）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＩＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３２）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＨＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３３）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＥＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３４）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＬＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３５）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＴＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３６）

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＩＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号３７）

[0079] 各々のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号３８～４５に示す。なお、

実施例１と同様に、Ｃ末端（２番目のリピートの最後）のアミノ酸残基はＬｙｓに置換されているが、Ｃ末端なので置換の有無によって評価結果は変わらない。

[0080] これらの発現プラスミドを用いて、実施例１と同様の方法でポリペプチドを発現し、精製した。

[0081] （実施例５）ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析による新規ポリペプチドのアルカリに対する安定性評価

実施例４で取得した各種ポリペプチドについて、実施例３と同様の手法にて、アルカリ性条件下で一定時間インキュベートする処理を行った後の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上のバンドの状態を比較することで評価した。配列番号３８～４１のポリペプチドについては、４時間及び２４時間インキュベートした後の安定性を評価した。配列番号４２～４５のポリペプチドについては、３０時間インキュベートした後の安定性を評価した。なお、参照として配列番号１４のポリペプチドについても同様の操作を行った。

[0082] 図２にＳＤＳ－ＰＡＧＥの電子画像を示す。アルカリ処理を開始してから２４時間後のバンド強度比について、配列番号３８のポリペプチドが７３．４％、配列番号３９のポリペプチドが７９．０％、配列番号４０のポリペプチドが８５．６％、配列番号４１のポリペプチドが８２．８％であった。同様に、アルカリ処理を開始してから３０時間後のバンド強度比について、公知のアルカリ耐性ポリペプチド（比較例２、配列番号４６、２連結型）が２３．１％であったのに対し、配列番号１４のポリペプチドが４５．１％、配列番号４２のポリペプチドが４５．８％、配列番号４３のポリペプチドが４３．８％、配列番号４４のポリペプチドが４９．６％、配列番号４５のポリペプチドが６５．０％であった。したがって、これらのポリペプチドも、厳しいアルカリ条件下でも優れた安定性を示すことが分かった。

[0083] （比較例１）Ｃ－Ｇ２９Ａ．２ｄの調製および評価

Ｃ－Ｇ２９Ａ．２ｄはプロテインの Ｃドメインに変異Ｇ２９Ａを導入した等機能変異体であり、アルカリ耐性が非常に高いことで公知（特許文献５）

のポリペプチドである。この等機能変異体がタンデムに連結されたポリペプチド（配列番号１５）をコードするＤＮＡを、ＰｓｔＩ／ＥｃｏＲＩサイトで切断できるようにＰＣＲで増幅し、ベクターｐＮＫ３２６０’にサブクローニングした。実施例１と同様の方法で発現・精製を行い、実施例３と同様の方法でアルカリ耐性を評価した。

[0084] （比較例２）Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．２ｄの調製および評価

Ｃ－Ｇ２９Ａに変異Ｓ３３Ｅを導入したポリペプチドは、Ｃ－Ｇ２９Ａと同等のアルカリ耐性を示す公知のポリペプチドである（国際公開第２０１１／１１８６９９号公報）。この配列がタンデムに連結されたポリペプチド（配列番号４６）について、実施例１と同様の手法で発現・精製を行い、実施例３と同様の方法でアルカリ耐性を評価した。

請求の範囲

［請求項1］ 以下のアミノ酸配列：

$RFX_1X_2EQQNAFYEILHX_3PNLTEEQRNX_4FIQX_5LX_6X_7X_8PSVSREX_9LAEAX_{10}X_{11}LNDAQAPX_{12}$

（前記アミノ酸配列中、

X_1 ＝ D， E， N，又は Q

X_2 ＝ E，又は R

X_3 ＝ L， M，又は I

X_4 ＝ A， E， F， R， Y，又は W

X_5 ＝ D， E， H， I， L， Q， R， S， T，又は V

X_6 ＝ H， I，又は R

X_7 ＝ D， I，又は R

X_8 ＝ D，又は E

X_9 ＝ I， L，又は V

X_{10} ＝ R，又は Q

X_{11} ＝ H，又は R

X_{12} ＝ R， G，又は K

である）

を含み、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とするポリペプチド。

［請求項2］ 以下のアミノ酸配列：

$Z_1Z_2Z_3RFX_1X_2EQQNAFYEILHX_3PNLTEEQRNX_4FIQX_5LX_6X_7X_8PSVSREX_9LAEAX_{10}X_{11}LNDAQAPX_{12}$

（前記アミノ酸配列中、

X_1 ＝ D， E， N，又は Q

X_2 ＝ Ｅ，又は Ｒ

X_3 ＝ Ｌ， Ｍ，又は Ｉ

X_4 ＝ Ａ， Ｅ， Ｆ， Ｒ， Ｙ，又は Ｗ

X_5 ＝ Ｄ， Ｅ， Ｈ， Ｉ， Ｌ， Ｑ， Ｒ， Ｓ，Ｔ，又は Ｖ

X_6 ＝ Ｈ， Ｉ，又は Ｒ

X_7 ＝ Ｄ， Ｉ，又は Ｒ

X_8 ＝ Ｄ，又は Ｅ

X_9 ＝ Ｉ， Ｌ，又は Ｖ

X_{10} ＝ Ｒ，又は Ｑ

X_{11} ＝ Ｈ，又は Ｒ

X_{12} ＝ Ｒ， Ｇ，又は Ｋ

Z_1～Z_3 ＝ Ａ， Ｄ， Ｅ， Ｇ， Ｈ， Ｉ， Ｌ，Ｎ， Ｑ， Ｒ， Ｓ， Ｔ， Ｖ，又は Ｙ

である）

を含み、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とするポリペプチド。

［請求項3］ 以下のアミノ酸配列：

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＧ（配列番号１）、又は

ＡＤＮＲＦＮＲＥＱＱＮＡＦＹＥＩＬＨＬＰＮＬＴＥＥＱＲＮＡＦＩＱＳＬＲＤＤＰＳＶＳＲＥＩＬＡＥＡＲＲＬＮＤＡＱＡＰＲ（配列番号２）

との配列同一性が９０％以上である、請求項１又は２に記載のポリペプチド。