

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年11月25日(2010.11.25)

【公表番号】特表2010-510771(P2010-510771A)

【公表日】平成22年4月8日(2010.4.8)

【年通号数】公開・登録公報2010-014

【出願番号】特願2009-537717(P2009-537717)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/48	(2006.01)
C 1 2 Q	1/37	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
G 0 1 N	33/542	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/48	Z N A Z
C 1 2 Q	1/37	
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	5/00	B
G 0 1 N	33/542	A

【手続補正書】

【提出日】平成22年10月1日(2010.10.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞酵素により触媒されるタンパク質基質の翻訳後修飾を、均一培地中で検出する方法であって、翻訳後修飾反応が無傷生細胞で行われること、前記細胞がタンパク質基質及び第一カップリング領域を含んでなる融合タンパク質をコードする異種発現ベクターを含んでなる細胞であること、及び以下の段階、

- (i) 前記酵素の活性を調節できる、試験される化合物の存在下又は不存在下で、細胞をインキュベーションすること、
- (ii) タンパク質基質に存在する第一カップリング領域に特異的に結合できるカップリング剤と共有結合した、第一FRETパートナーのペアの第一蛍光化合物を、反応培地へ添加すること、
- (iii) 翻訳後修飾を受けたタンパク質基質の部位に特異的な結合領域に共有結合し、非修飾タンパク質基質には結合しない、第一FRETパートナーのペアの第二蛍光化合物を、反応培地に添加すること、
- (iv) サンプルによって放射された、前記翻訳後修飾を受けたタンパク質基質の量を表すFRETシグナルを測定すること、を含んでなることを特徴とする方法。

【請求項2】

段階(ii)又は(iii)の前に、前記細胞の透過化処理の段階を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記融合タンパク質がまた、第一カップリング領域とは異なる、翻訳後修飾の影響を受けない第二カップリング領域を含んでなること、及び前記方法が、以下の段階、

(i) 前記酵素の活性を調節できる、試験される化合物の存在下又は不存在下で、細胞をインキュベーションすること、

(ii) 段階(i)の際、2つの異なる測定媒体中でインキュベートされた前記細胞を分布させること、

(iii) タンパク質基質に存在する当該第一カップリング領域に特異的に結合できるカップリング剤と共有結合した、第一FRETパートナーのペアの第一蛍光化合物を、第一の測定媒体に添加すること、

(iv) 翻訳後修飾を受けたタンパク質基質の部位に特異的な結合領域に共有結合し、非修飾タンパク質基質には結合しない、第一FRETパートナーのペアの第二蛍光化合物を、この同じ第一の測定媒体に添加すること、

(v) 第一の測定媒体により放射された、前記翻訳後修飾を受けたタンパク質基質の量を表すFRETシグナルを測定すること、

(vi) タンパク質基質に存在する前記第一カップリング領域に特異的に結合できるカップリング剤に共有結合した、第一FRETパートナーのペアの第一蛍光化合物を、第二の測定媒体に添加すること、

(vii) 第二カップリング領域に特異的に結合できるカップリング剤と共有結合する、第二FRETパートナーのペアの第一蛍光化合物を構成要素とする、第三の化合物を、第二の測定媒体に添加すること、

(viii) 第二測定媒体により放射される、タンパク質基質の総量を表すFRETシグナルを測定すること、及び

(ix) 段階(viii)で測定されたシグナルで、段階(v)で測定されたシグナルを標準化すること、を含んでなることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項4】

段階(ii)の前、又は段階(iii)及び/又は(vi)の前に、前記細胞の透過化処理の段階を含んでなる、請求項3に記載の方法。

#### 【請求項5】

前記融合タンパク質がまた、第一カップリング領域とは異なる、翻訳後修飾の影響を受けない第二カップリング領域を含んでなること、及び前記方法が、以下の段階、

(i) 前記酵素の活性を調節できる、試験される化合物の存在下又は不存在下で、細胞をインキュベーションすること、

(ii) タンパク質基質に存在する第一カップリング領域に特異的に結合できるカップリング剤と共有結合した、第一FRETパートナーのペアの第一蛍光化合物を、測定媒体に添加すること、

(iii) 翻訳後修飾を受けたタンパク質基質の部位に特異的な結合領域に共有結合し、非修飾タンパク質基質には結合しない、第一FRETパートナーのペアの第二蛍光化合物を、測定媒体に添加すること、

(iv) 第一FRETパートナーのペアにより放射される、翻訳後修飾を受けたタンパク質基質の量を表すFRETシグナルを測定すること、

(v) 段階(iv)で測定したFRETシグナルを抑制する剤を測定媒体に添加すること、

(vi) 第二カップリング領域に特異的に結合できるカップリング剤と共有結合した第三蛍光化合物を測定媒体に添加すること、ここで第三蛍光化合物は、第二FRETパートナーのペア、及び同じ分光特性を有する第一及び第二のFRETパートナーのペアの構成要素となるよう、第一蛍光化合物と適合するものであって、

(vii) 第二FRETパートナーのペアにより放射される、総タンパク質基質の量を表すFRETシグナルを測定すること、

(viii) 段階(vii)で測定されたシグナルで、測定(iv)で測定されたシグナルを標準化すること、を含んでなることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項6】

段階 (ii)、(iii)、(v) 及び / 又は (vi) の前に置かれた、細胞の透過化処理の段階を含んでなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

FRET 抑制剤が、第一 FRET パートナーのペアの一方に特異的な結合領域を含んでなる化合物であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

- a) 第一蛍光化合物が、第一 FRET パートナーのペアの蛍光受容化合物であり、
- b) 第二蛍光化合物が、第一 FRET パートナーのペアの蛍光供与化合物であり、
- c) 第三蛍光化合物が、第二 FRET パートナーのペアの構成要素となるよう、第一蛍光化合物と適合する供与体であり、及び
- d) FRET 抑制剤が、第二蛍光化合物に特異的な結合領域、特に第一 FRET パートナーのペアの第二蛍光化合物に結合する抗体又は抗体断片を含んでなる化合物であることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

第二蛍光化合物が、希土類クリプテート又はキレートであること、及び FRET 抑制剤が、この希土類クリプテート又はキレートに特異的な抗体又は抗体断片であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法がまた、試験される化合物の存在下又は不存在下で得られるシグナルの比較の段階を含んでなり、ここでシグナルの違いはこの剤の翻訳後修飾への作用を表すことを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞がまた、翻訳後修飾を触媒する酵素、又は翻訳後修飾を導くカスケードの活性化に関与するタンパク質をコードする核酸配列を含んでなる、発現ベクターを含んでなることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記翻訳後修飾が、モノ ADP リボース化、ポリ ADP リボース化、アセチル化、グルタチオン化、O 結合型グルコシル化、N 結合型グルコシル化、メチル化、ニトロ化、リン酸化、プレニル化、SUMO 化、ユビキチン化、及びタンパク質分解からなる翻訳後修飾群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記翻訳後修飾を受けるタンパク質基質の部位に特異的な結合領域が、翻訳後修飾を受けるタンパク質基質の結合部位に特異的に結合する抗体、抗体断片、タンパク質又は核酸アブタマーからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第一カップリング領域及び / 又は存在する場合は第二カップリング領域が、

- a) 4 ~ 250 アミノ酸のタンパク質タグ、
- b) 自殺酵素又は自殺酵素の断片、
- c) ジヒドロフォレート還元酵素、

からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

- a) 第一又は存在する場合は第二カップリング領域が、タンパク質タグであり、及び
- b) 第一又は第二カップリング剤が、前記タンパク質タグに特異的な抗体又は抗体断片であることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

- a) 第一又は存在する場合は第二カップリング領域が、自殺酵素であり、及び
- b) 第一又は第二カップリング剤が、前記自殺酵素の基質であることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記自殺酵素がO(6)-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ(*snap tag*)である、請求項16に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記自殺酵素の基質が、ベンジルグアニン又はその誘導体の1つである、請求項17に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記自殺酵素が、デハロゲナーゼ(*halotag*)である、請求項16に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記自殺酵素の基質がクロロアルカンである、請求項19に記載の方法。

**【請求項 21】**

a) 第一又は存在する場合は第二カップリング領域が、ジヒドロフォレート還元酵素であり、及び

b) 第一又は第二カップリング剤が、トリメトプリンであることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記蛍光FRETパートナー化合物が、発光タンパク質；発光有機分子；超分子錯体；発光無機粒子からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記方法が、試験される化合物の添加の前に、化学的、薬理的、浸透的、電気的、熱的又は機械的な刺激から選択される、測定媒体の刺激段階を含んでなることを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記刺激段階が、翻訳後修飾を活性化又は阻害する剤を反応培地に添加することを含むことを特徴とする、請求項19に記載の方法。

**【請求項 25】**

1、2又は3の蛍光化合物が、蛍光化合物及びカップリング剤又は翻訳後修飾による修飾タンパク質基質の部位に結合する領域に加え、その後の透過化処理なしで、前記(1又は複数の)蛍光化合物が原形質膜を通過できる領域を含むことを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記蛍光化合物が原形質膜を通過できる領域が、エステル；膜輸送物質に運搬されるウイルス性ペプチド；コレステロール基、ビタミンE又は脂質鎖から選択されることを特徴とする、請求項25に記載の方法。

**【請求項 27】**

翻訳後修飾の研究に適した細胞であって、

a) タンパク質基質及び1又は2のカップリング領域を含んでなる融合タンパク質をコードする発現ベクター、及び

b) 翻訳後修飾を触媒する酵素をコードする核酸配列及び/又は翻訳後修飾に導くカスケードの活性化に関するタンパク質をコードする核酸配列を含んでなる発現ベクター、を含んでなることを特徴とする細胞。

**【請求項 28】**

前記発現ベクターが細胞DNA中に組み入れられることを特徴とする、請求項27に記載の細胞。

**【請求項 29】**

前記細胞が、不死化細胞であることを特徴とする、請求項27に記載の細胞。

**【請求項 30】**

前記細胞が、哺乳類の細胞、特にヒト細胞であることを特徴とする、請求項27に記載の細胞。