

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3692149号
(P3692149)

(45) 発行日 平成17年9月7日(2005.9.7)

(24) 登録日 平成17年6月24日(2005.6.24)

(51) Int.C1.⁷

F 1

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/53

Z

C 1 2 N 9/00

C 1 2 N 9/00

G O 1 N 33/566

G O 1 N 33/566

請求項の数 20 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願平9-538224

(86) (22) 出願日 平成9年4月21日(1997.4.21)

(65) 公表番号 特表2001-502048(P2001-502048A)

(43) 公表日 平成13年2月13日(2001.2.13)

(86) 國際出願番号 PCT/US1997/006578

(87) 國際公開番号 WO1997/040381

(87) 國際公開日 平成9年10月30日(1997.10.30)

審査請求日 平成16年3月8日(2004.3.8)

(31) 優先権主張番号 60/015,633

(32) 優先日 平成8年4月19日(1996.4.19)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 08/844,336

(32) 優先日 平成9年4月18日(1997.4.18)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ゼノゲン

アメリカ合衆国95129カリフォルニア
州 サンノゼ、ボウリンガー・ロード61
10番

(74) 代理人

弁理士 青山 葉

(74) 代理人

弁理士 岩崎 光隆

(72) 発明者 コンタグ、パメラ・アール
アメリカ合衆国95129カリフォルニア
州 サンノゼ、ボウリンガー・ロード61
10番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】特定のリガンドを標的とするバイオディテクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

選択物質を検出するためのバイオディテクターであって、

(a) 細胞外リガンド特異的部分が選択物質を選択的に認識し、その認識が細胞内シグナル変換ドメインを活性化する、細胞外リガンド特異的部分と細胞内シグナル変換ドメインを含むシグナル転換要素、

(b) 互いに別個の不活性形態および活性形態を持ち、かつ該活性化細胞内シグナル変換ドメインがその不活性形態を活性形態へと転換する、トランスデューサー、および

(c) 該トランスデューサーの該活性形態により活性化されて、検出可能なシグナルを生じる、応答要素

を含む、バイオディテクター。

【請求項 2】

該応答要素が、該トランスデューサーの活性形態により活性化される転写活性化要素を含む、請求の範囲第1項記載のバイオディテクター。

【請求項 3】

該応答要素が、更に、1または複数の遺伝子産物をコードする核酸を含み、遺伝子産物は検出可能なシグナルを発生するものであり、該核酸は該転写活性化要素に作動可能に連結している、請求の範囲第2項記載のバイオディテクター。

【請求項 4】

該検出可能なシグナルが光である、請求の範囲第3項記載のバイオディテクター。

10

20

【請求項 5】

該遺伝子産物が、バイオ発光、比色性反応または蛍光からなる群から選択される手段により検出可能である、請求の範囲第3項記載のバイオディテクター。

【請求項 6】

該核酸がルシフェラーゼオペロンを含む、請求の範囲第3項記載のバイオディテクター。

【請求項 7】

該細胞内シグナル変換要素が膜シグナルトランスデューサーである、請求の範囲第6項記載のバイオディテクター。

【請求項 8】

該膜シグナルトランスデューサーが、細菌性二成分制御系、真核生物レポーター媒介シグナルトランスデューサー、原核生物レポーター媒介シグナルトランスデューサーからなる群から選択される、請求の範囲第7項記載のバイオディテクター。 10

【請求項 9】

該物質が、微生物、ウイルス、レトロウイルス、タンパク質、糖、イオンからなる群から選択される、請求の範囲第6項記載のバイオディテクター。

【請求項 10】

選択物質の検出法であって、

(a) (i) 細胞外リガンド特異的部分が選択物質を選択的に認識し、その認識が細胞内シグナル変換ドメインを活性化する、細胞外リガンド特異的部分と細胞内シグナル変換ドメインを含むシグナル転換要素 20

(ii) 別個の不活性形態および活性形態を持ち、かつ該不活性形態が該活性化細胞内シグナル変換ドメインにより該活性形態へと転換される、トランスデューサー、および

(iii) 該トランスデューサーの該活性形態により活性化されて、検出可能なシグナルを生じる、応答要素

を含む、バイオディテクターを製造し、

(b) 該バイオディテクターを試料に加え、

(c) 該検出可能なシグナルを測定および定量し、

(d) 該検出可能なシグナルのレベルを該物質の存在および量と相関させる、ことを含む、方法。

【請求項 11】

該バイオディテクターの該応答要素が、該トランスデューサーの活性形態により活性化される転写活性化要素を含む、請求の範囲第10項記載の方法。 30

【請求項 12】

該応答要素が、更に、1または複数の遺伝子産物をコードする核酸を含み、遺伝子産物は該検出可能なシグナルを発生するものであり、該核酸は該転写活性化要素に作動可能に連結している、請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項 13】

該検出可能なシグナルが光である、請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項 14】

該遺伝子産物が、バイオ発光、比色性反応または蛍光からなる群から選択される手段により検出可能である、請求の範囲第12項記載の方法。 40

【請求項 15】

該核酸がルシフェラーゼオペロンを含む、請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項 16】

該物質が、微生物、ウイルス、レトロウイルス、タンパク質、糖、イオンからなる群から選択される、請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項 17】

該検出可能なシグナルが光検出システムによって検出される、請求の範囲第13項記載の方法。

【請求項 18】

該光検出システムが、照度計、分光光度計、蛍光計、C C D 検出器から選択される、請求の範囲第17項記載の方法。

【請求項19】

バイオディテクターまたは試料が固相支持体上に固定されている、請求の範囲第18項記載の方法。

【請求項20】

試料中に含まれる様々な物質を検出できるように、更に、固相支持体上に規則正しく並べて一連のバイオディテクターを固定することを含む、請求の範囲第19項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

I . 発明の分野

本発明は、分子を液体、気体状でまたは固体マトリクス上で検出および定量するためのバイオディテクターに関する。より具体的には、本発明は、標的物質と相互作用する際にレポーター遺伝子を発現する分子スイッチング機構を含むバイオディテクターに関する。本発明は更に、このようなバイオディテクターを用いて、選択された物質を高特異性および高感度で検出および定量する方法にも関する。

II . 発明の背景

生物学的試料、身体または環境中の低レベルの生物学的および無機的物質の検出は困難であることが多い。この種の検出アッセイは、一次抗体の結合、複数回の洗浄段階、二次抗体の結合、更なる洗浄段階、およびその検出システムによっては、更なる酵素的および洗浄段階を含み得る多数の段階を必要とする。このようなアッセイは更に、感度が悪くなり、不正確である。例えば、古典的なイムノアッセイは、感染症の30%を検出し損なうことがある。

分子プローブアッセイは、敏感であるが、高度熟練者と生物体の核酸配列が分かっていることを必要とする。核酸プローブの使用とポリメラーゼ連鎖反応（P C R）に基づくアッセイはいずれも、抽出のために複雑な操作を必要とし、かつ疾患状態または汚染物質の一次インジケーターであり得る核酸を検出できるにすぎない。いずれの種類のアッセイ形式も、検出対象の情報が僅かしか入手できない場合、その適用領域は限られている。

患者の身体的パラメーターを測定するための現在の非侵襲性手段、例えば、C A T またはM R I は、高価であり、入手し難いことが多い。よって、多くの医学的問題のモニタリングには、依然として時間がかかりかつ高価な試験が必要である。実際の試験から症状を確認するまでの時間は、非常に重要である。例えば、敗血症の場合、多くの患者が、感染確認し、その感染生物を同定する前に絶命してしまい、そのため処置が経験的で、効果も低いものとなる傾向にある。その他の例には、供給血を病原体についてスクリーニングする場合がある。

供給血が病原体フリーであることを確認するには、大きな労力を要する多くのアッセイが必要である。A I D S を引き起こすウイルスであるH I V - 1 の場合、現今のアッセイは、ウイルス自身ではなく抗H I V 抗体についてスクリーニングするものである。しかし、当ウイルスに曝露後に、抗体は検出できないが、血液が大量の感染性ウイルスを含んでなるという期間が何週間も続く。Clark et al., 1994, J. Infect. Dis. 170: 194-197; Piatak et al., 1993, Aids Suppl. 2:S65-71.

例えば、供給血がH I V - 1 フリーであることを確認するには、大きな労働力を要する高価な試験を幾つか実施しなければならない。更に、現在、初期スクリーニングに使用されている試験は、比較的低レベルで存在し得るウイルス自身を同定するのではなく、初期感染後数週間では存在しないH I V 抗体を指向するものである。Clark et al., 1994, J. Infect. Dis. 170:194-197; Piatak et al., 1993, Aids Suppl. 2: S65-71. よって、供給血のスクリーニングは、時間がかかる緩慢であるだけでなく、不正確でもある。

同様に、空気中および水中汚染などの環境において物質を検出する能力は、非常に重要である。例えば、地下水のモニタリング、工業プロセス、食物加工の制御および安価な多目的アッセイを使用する実時間での操作が望まれる。しかしながら、現存の方法は、このような“オンライン”モニタリングに適していない。

10

20

30

40

50

現存の方法に限界があるのには幾つかの理由がある。第1に、検出すべき物質を十分量入手するのが困難であり得る。例えば、対象となる生物学的物質が身体内部だけに存在する事が多いので、生物学的物質の検出は困難であり、またエクスピボモニタリング用に大量に入手するのも困難である。従って、少量の物質に使用するための感度のよいアッセイが必要である。このことは、シグナル増幅法が必要であることを示している。増幅法は、核酸の検出については確立されているが、抗原検出法にはない。

第2の問題は、標的物質が少量で存在し得るので、その存在の検出は時間のかかる高価な技術的副次関連プロセスを必要とするため、実時間での検知が困難であることである。例えば、血中細菌感染である敗血症の場合、血液試料 1 ~ 10 ml 中ほんの 1 ~ 2 細菌であろう。現今的方法は、検出のためにまず細菌を増殖させる必要がある。Askin, 1995, J. Obstet. Gynecol. Neonatal. Nurs. 24: 653-643. 処理の遅れや疾患の誤処理は生と死ほどの相違を意味するので、このタイムラグは好ましくない。10

これらの限界を回避する試みは他にもあり、抗体と放射性または蛍光標識とを組み合わせて用いるものである (Harlow et al., (1988), Antibodies. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory Press)。抗体ベースのアッセイは、典型的に、標的分子に対する抗体の結合、続いて、結合しなかった抗体全てを除去するための洗浄段階を含む。その標的分子に対する抗体の結合は、典型的に、同定用分子 (identifier molecule)、例えば、検出可能標識を含む標的分子特異的抗体を特異的に認識する二次抗体によって検出する。この段階の次に、複数洗浄段階もある。あるいは、標的特異的抗体は、検出可能標識に直接結合させてもよい。標識には、放射性トレーサー、蛍光標識および化学発光検出システムがある。Harlow and Lane, 1998, Antibodies. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press) .20

このような抗体ベースのアッセイを用いて特異的シグナルを発生させる必要のある一連の段階は、時間がかかり、また大きな労働力を要する。更に、これらのアッセイ型は、ある種のマトリクスに固定化させた抗原の検出に限定されている。この種の検出システムの例には、ウェスタン・プロット、免疫組織化学およびELISAがある。現在、放射性アイソトープおよび化学発光標識を用いて最大感度が達成されている。しかしながら、これらの検出システムの感度、即ち、バックグラウンドを超える特異的シグナルは、限定要因のままであることが多い。

同様に、バックグラウンド放射線は、放射性イムノアッセイ技術の感度を制限する。更に、これらの技術は、時間がかかり、高価である。最終的に、放射性アプローチは、それらが重大な廃棄物問題を提示するので、環境に敵対するものである。30

物質をモニタリングするその他のアプローチは、光の使用である。光は、容易に測定可能であり、非侵襲性かつ定量性であるという利点を有する。Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag) .

典型的な分光学では、光を物質に照射し、吸光度または光の散乱に基づき濃度を計算する。Von Bally et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag) . 光学技術は、光吸収または光散乱物質の濃度変化を検出する。Von Bally et al., (1982). Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag) . 近赤外分光学は、組織に浸透できる医療用プローブと同程度に機能する非イオン化性の比較的安全な放射線形態であることが証明されている。更に、これは、大容量でも十分に耐えられる。例えば、光は、現在、血中(Nellcor)または体内(Benaronイメージ)の酸素濃度を計算するのに、または体内(Sandia)のグルコースをモニターするのにも使用されている。Benaron and Stevenson, 1993, Science 259: 1463-1466; Benaron et al., 1993, in: Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring, G. Muller, B. Chance, R. Alfano and et al., eds. (Bellingham, WA USA: SPIE Press), pp. 3-9; Benaron and Stevenson, 1994, Adv. Exp. Med. Biol. 361: 609-617. しかしながら、現在の技術は、多くの物質が、容易かつ定量的に光学的に査定できる40

固有の分光学的シグナルを持たない点で制限される。Von Ballay et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer-Verlag). 更に、低濃度の物質の検出は、特に、組織などの生物学的媒体において、高いバックグラウンドシグナルによって阻害されることも多い。Von Ballay et al., (1982), Optics in Biomedical Sciences: Proceedings of the International Conference (Berlin, New York: Springer Verlag).

過去にわたり、光照射に基づくアッセイ、例えば、化学発光(Tatsu and Yoshikawa, 1990, Anal. Chem. 62:2103-2106)は、光を検出および定量する極めて感度のよい方法の開発として、大きな注目を集めた。Hooper et al., 1994, J. Biolumin. Chemilumin. 9: 113-112. 化学発光を利用する生物医学的研究の一例は、イムノアッセイおよび核酸検出用の E C L 検出システム(Amersham)である。生物学的アッセイに対する生物学的光源、バイオ発光は、光検出用の類似装置が必要であるので、化学発光検出の開発と平行して使用されてきた。Kricka, 1991, Clin. Chem. 37: 1472-1481. 最も普通に使用される生物学的光源の1つはルシフェラーゼ、*Photinus pyralis*(アメリカホタル)、*Renilla reniformis*(燐光性サンゴ)、*Photobacterium*(発光細菌種)を含むある種の生物体により合成される発光酵素である。一般に、ルシフェラーゼは、低分子量オキシドレダクターゼであり、酸素、ATP およびマグネシウムイオンの存在下でルシフェリンの脱水素を触媒する。このプロセス中、放出される約 96 % のエネルギーが可視光として現れる。検討のため、Jassim et al., 1990, J. Biolumin. Chemilumin. 5: 115-122参照。

光子検出感度および細菌および他の細胞を操作してバイオ発光タンパク質を発現させる能力により、環境研究における感度のよいバイオセンサーとして、このような細胞が使用できる。Guzzo et al., 1992, Toxicol. Lett. 64: 687-693; Heitzer et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 1487-1494; Karube and Nakanishi, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 54-59; Phadke, 1992, Biosystems 27: 203-206; Selifonova et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59: 3083-3090. 例えば、Selifonova et al. は、環境中の汚染物質検出用のバイオセンサーについて記載している。より具体的には、Hg(II)誘導性Tn21オペロンと、*Vivrio fischeri*由来のプロモーターなしのluxCDABEとの融合物を用いて、Hg(II)検出用の高感度バイオセンサーを構築している。

バイオ発光を特定条件、例えば、上記Hg(II)の存在の検出法として使用するシステム以外に、ルシフェラーゼアッセイは細胞生存能に左右されることから、ルシフェラーゼの構成性発現が細菌細胞の生存能を追跡するためのマーカーとして採用されている。例えば、ルシフェラーゼの構成性発現は、最近、細菌性疾患に対する薬剤およびワクチンの開発用に用いられている。具体的には、ルシフェラーゼ発現性を高めた*Mycrobacterium tuberculosis*株を採用して、マウスにおける抗微生物活性を評価した。Hickey et al., 1996, Antibacterial Agents and Chemotherapy 40: 400-407.

しかしながら、ルシフェラーゼを作動させる細菌受容体に頼るバイオセンサーは、ルシフェラーゼ遺伝子に融合させることができる既知のプロモーター領域に連結させた、対応する細菌受容体を持つような分子の検知に限られる。更に、マウスにおいて抗菌活性を試験するのに使用されるルシフェラーゼ発現性細菌は非特異的である。

従って、各種方法は、非常に特定された応用のためのバイオ発光センサーとして、一般にバイオ発光、特にルシフェラーゼを用いて探求されるが、本発明は、非常に広範囲の応用のための高感度かつ高選択性リガンド特異的バイオディテクターに関するものである。より具体的には、本発明は、予め定めたリガンドに光子放出で特異的に応答する系を用いて、リガンド特異的結合の選択性および抗体性能の融通性をバイオ発光検出感度と組み合わせるものである。こうして本発明の手法により、商業的に重要なあらゆる分子を検出する広範囲のアッセイの開発のための、極めて感度の良いバイオディテクターの製造が可能である。

III. 発明の概要

本発明は、選択物質を検出およびモニターするための標的化リガンド特異的バイオディテクターに関する。より具体的には、本発明のバイオディテクターは、容易に、例えば、所

10

20

30

40

50

望により検出される独特の特性を持つポリペプチドをコードする(4)レポーター遺伝子に作動可能に連結されるプロモーターなどの(3)応答要素(responsive element)を活性化する能力のあるその活性形態で、(2)トランスデューサー成分を活性化する能力のある細胞内シグナル変換ドメインに融合させた細胞外リガンド特異的結合部分を含む、(1)シグナル転換要素(element)を含む。よって、本発明のバイオディテクターは、標的物質、即ち、リガンドへの結合を検出可能なシグナルへと変換する。本発明の好ましい実施態様では、バイオディテクターにより発生するシグナルは、光であり、光検出装置により検出される。従って、対象となる物質が同定できる。

本発明は、更に、高感度および高特異性で選択物質を検出およびモニターするバイオディテクターなどを使用する方法に関する。本発明のバイオディテクターを使用する方法には、食品産業および農産業における汚染物質の検出、医学および研究における診断およびモニタリング、環境または防御設定における毒物または汚染物質の検出がある。10

【図面の簡単な説明】

図1は、バイオディテクターの主要成分を示す一般モデルを表す。バイオディテクターは、検知能を持つもの(表面上のY型構造)、伝達性成分(バイオディテクターの内側のY型構造の一部)および光放出性成分(小さい円)からなる。

図2は、分子レベルでのバイオディテクターのより詳細な図式を表す。

図3は、試料中の様々な物質を同時に検出できるように、固相支持体上に規則正しく並べたバイオディテクターを表す。

図4は、実施例1に詳説する、細菌ゲノムにおけるトランスポゾンの組込みにより生じるバイオディテクターを表す。ルシフェラーゼオペロンは、共にバイオ発光を示すことができる(遺伝子A、B、C、DおよびE由来の)5種のタンパク質をコードする。Chl、クロラムフェニコール耐性遺伝子；Kan、カナマイシン耐性遺伝子；Amp、アンピシリン耐性遺伝子；PO₄、ホスフェート基(トランスデューサーのアクチベーターとして)。20

図5は、バイオ発行サルモネラからの光放出に対するヒト血液の影響を表し、ほぼ単一の細胞検出を示す。

V. 定義

特記しない限り、本明細書で使用した全ての用語は、当業者により理解されるのと同じ意味を持つ。

本明細書で使用した用語“標的分子”は、検出および/または定量すべき物質を表す。30

本明細書で使用した用語“ルシフェラーゼ”は、特記しない限り、原核生物および真核生物のルシフェラーゼ、並びに変化に富むあるいは変更された物理的および/または放出特性を持つ変種を含む。

本明細書で使用した用語“バイオディテクター”は、標的分子との結合またはその他の相互作用に光学シグナルで応答する系を表す。

本明細書で使用した用語“光学シグナル”は、光モニタリング技術を用いて識別できるあらゆる生化学的反応または物質を表す。これには、光子放出、蛍光および吸光度がある。本明細書で使用した用語“光”は、特記しない限り、波長約220nmから約1100nmの間の電磁波を表す。

本明細書で使用した用語“プロモーター誘導”は、選択した誘導性遺伝子要素(element)の直接的または間接的活性化をもたらす事象を表す。40

VI. 発明の詳細な説明

A. 本発明の概観

本発明は、微生物、分子およびイオンを含む選択物質を検出およびモニターするための標的化リガンド特異的バイオディテクターに関する。本発明のバイオディテクターは、予め定めたリガンドの結合に光子放出で特異的に応答する系を採用することにより、リガンド特異的結合の特異性と選択性をバイオ発光検出の感度と組み合わせたものである。よって、本発明の手法により、あらゆる選択物質を検出およびモニターする広範囲のアッセイの開発のための感度の良いバイオディテクターの製造が可能である。

より具体的には、本発明のバイオディテクターは、“分子スイッチ”、即ち、シグナル伝50

達を介するリガンド特異的結合と、リガンド結合に対する応答における検出可能なレポーター分子の活性化との組合せに備えるものである。本発明のバイオディテクターは、細菌などの生存可能な生物系、またはリポソームなどの非生物系から成ることもできる。全体機構として、バイオディテクターは、リガンドを特異的に認識し、リガンドへの結合を測定可能なシグナル、例えば、光放出へと転換する能力を特徴とする。例えば、細菌をリガンド特異的バイオディテクターとして採用してもよく、これは、予め定めたりガンドに光子放出で特異的に応答する。

本発明のバイオディテクターは、広範囲の物質、例えば、ヒト血中の微生物、ウイルスおよび細菌、毒性分子、イオン、癌細胞、抗原、低分子(例えばグルコース)、pH、酸素および金属の高感度検出を可能にする。更に、本発明は、あらゆる選択物質を検出する広範囲のアッセイにおける、かかるバイオディテクターの使用に備えるものである。一般に、本発明のバイオディテクターは、トランスデューサー成分を活性化する能力のある細胞内シグナル変換ドメインに結合させた細胞外リガンド特異的結合部分を含む、シグナル転換要素を含む。このトランスデューサー成分はその活性形態で、容易に検出される独特の特性を持つ診断用ポリペプチドをコードするレポーター遺伝子に作動可能に連結させたプロモーターなどの、応答要素を活性化する能力がある。あるいは、レポーター分子は、シグナル転換要素のその他の細胞内シグナル変換ドメインに結合することにより、直接活性化される。よって、本発明のバイオディテクターは、標的物質、即ち、リガンドへの結合を検出可能なシグナルへと転換する。本発明の好ましい実施態様では、バイオディテクターにより発生するシグナルは、光であり、光検出装置により検出される。従って、この相互作用に基づき、標的化リガンドを定量および同定できる。10
20

B . バイオディテクター

本発明のバイオディテクターは、それらが標的化物質の存在に応答してインピボまたはインピトロのいずれかで検出可能なシグナルを発生させることを特徴とする。

具体的な一実施態様では、光が標的化物質の存在に応答してバイオディテクターにより発生される検出可能なシグナルである。正常組織および他の有機または無機物質から生じるバックグラウンド光は事実上ないので、このシステムの感度は、バイオディテクターのバックグラウンドノイズによってのみ制限される。より具体的には、本発明の標的化リガンド特異的バイオディテクターは、“分子スイッチ”を介して検出可能なタンパク質をコードするレポーター遺伝子に連結させたりガンド特異的ドメインからなる。そのため、レポーター遺伝子はリガンドの特異的ドメインへの結合に応答して活性化される。リガンド特異的結合部分は、対象の物質に選択的に結合するあらゆる抗体であり得る。“分子スイッチ”は、応答要素の活性化とリガンド結合とをつなぐシグナル伝達性成分である。伝達性分子は、ホスフェート領域または真核生物トランスデューサーを含むどの細菌の二成分制御系であってもよい。応答要素は、レポーター遺伝子に作動可能に連結させた誘導性プロモーターであり得る。このレポーター遺伝子の転写および翻訳により、光などの検出可能なシグナルを発生させる遺伝子産物が生じる。シグナルは適切な手段で検出され、シグナルが光の場合、この手段は光検出装置である。30

例えば、光放出バイオディテクター系のイメージングには、極めて低レベルの光、典型的には、単一光子事象を検出できる光検出器の使用が必要である。必要ならば、シグナルの位置特定は、イメージを構築できるまで光子放出を積分することにより測定できる。このような高感度光検出器の例には、単一光子事象を増強する装置(例えば、マイクロチャネルプレート増強器および光電子増倍管)がある。増強器はカメラの前に置いてもよい。更に、検出システムに固有のバックグラウンドノイズをこえる単一光子を検出できる感光カメラ(例えば、液体窒素で冷却したもの)もまた使用できる。40

一旦、光子放出イメージが作られると、典型的には、それをその対象の“普通の”反射光イメージ上に重ね、放出光子源に対して準拠座標系を提供する。この場合、このような“混成”イメージを分析して、対象中の標的の位置および/または量を測定する。殆どの情況で、光源のイメージは必要でない。試料から放出される光子数(例えば、照度計によつて検出される)を単純に定量したものが、光放出性レポーターの濃度を示す。よって、光50

子数は、特定の検出器が検知している標的化リガンドの量に比例する。イメージの必要性に束縛されることなく、光放出バイオディテクターに非常に近い位置に検出器を置くことができ、そして、アッセイの光学検出および感度を最適化できる。マイクロチャネルプレート増強器は、このような配置で使用でき、結果、単一光子が検出できる。このような装置は、現在、Hamamatsu Corporationにより製造されている。このHamamatsuシステムでは、溶解緩衝液、ルシフェラーゼおよび基質、ルシフェリンを固定化細胞上に噴霧することにより単一細胞のATP濃度をアッセイできる。

リガンド特異的バイオディテクターの全体機構は、図1に示す。図2は、好ましいバイオディテクターの分子機構をより具体的に示す。図示した例では、バイオディテクターは、細胞内シグナル変換ドメインに結合させた細胞外リガンド特異的結合部分、例えば、抗体を含む、トランスメンブレン標的特異的シグナル転換要素を発現する細菌細胞である。標的特異的シグナル転換要素は、“細胞外”成分と“細胞内”成分とを隔てる膜、例えば、細菌膜に組込まれる。リガンド特異的部分は、選択物質に結合する能力があり、細胞内シグナル変換ドメインの活性化を誘発する。すると今度は活性化細胞内シグナル変換ドメインが不活性トランスデューサーを活性トランスデューサーへと転換する。トランスデューサーは、活性形態に転換されたときに、レポーター遺伝子に作動可能に連結させたプロモーター要素(element)に結合できるという能力を特徴とする。レポーター遺伝子またはオペロンの転写および翻訳により、光などの検出可能なシグナルを発生する遺伝子産物を生じる。本発明の好ましい実施態様では、レポーターは、ルシフェラーゼ-オペロンであり、可視光を生成し、高感度で容易にモニター、測定および定量できる。

あるいは、このシグナル変換ドメインは、修飾レポーター分子に直接作用することもできる。このレポーター分子を修飾して、不活性状態で発現させ、次いで、これをシグナル変換ドメインとの直接的な相互作用により活性化できる。

予め定めた選択物質に応答する“光スイッチ”を提供するバイオディテクターは、現存のものを超える多数の利点を示す。第1に、このスイッチは、複雑な混合物中に存在する抗原の検出が可能であり、非結合抗体を洗浄除去する必要がなく、よって検出を簡便化できる。抗体に結合したリガンドが光を発生させ、また試料中にバックグラウンド光がないことから、洗浄してシグナル対ノイズ比率を低減する必要はなく、低いノイズが感度を増大し、そして、特異的相互作用のみが光を発生させる。

一旦、リガンドに結合すると、酵素カスケードが活性化されて、シグナルを伝達する働きをする。

更に、標的化リガンドが、例えば、病原菌の表面に豊富に発現されるならば、多くのバイオ検出性細菌が単一の標的に結合してシグナルを增幅する働きをし、結果、極めて感度のよい検出システムが得られるであろう。

また、バイオディテクターシステムのシグナル転換要素のリガンド特異的ドメインはカセットのように交換できるので、望まれるまたは選択されるあらゆる物質を認識する無制限数のバイオディテクターが製造できる。よって、本発明のバイオディテクターは、選択範囲の広さにかかわらず、あらゆる選択物質を認識するのに適合できる順応性のある一般的なシステムを提供するものである。対象の物質を標的とするバイオディテクターが迅速に開発できる。

本発明のバイオディテクターは、溶液状態または固定化センサープレート上でインビオで効果的であるので、多目的に利用できる。更に、これらのバイオディテクターのアレイが構築でき、異なる波長または“バイオセンサーチップ”的異なる位置で操作し、複数の作用要因、遺伝子、遺伝子産物またはその他の標的の同時モニタリングおよびスクリーニングが可能である。図3参照。例えば、バイオディテクターは、一段階で広範囲かつ強力に分析できるシステムを構築するために、ユニークなマルチディテクターアレイ配置で組み立てることもできる。例えば、このバイオディテクターは、普通のシグナル検出器具、発生したシグナルが光である場合、例えば電荷結合素子(CCD)チップであり得る、の頂部にあるゲル上に置いてもよい。CCDアレイはシグナルを空間的に認識するので、バイオディテクターアレイは、1つのセンサーチップ上に置いた複数個の異なるセンサーを用

10

20

30

40

50

いて、光ベースの分析に備えることもできる。従って、例えば、血液型、HIV曝露、肝炎状態、リンホカインプロフィールおよびCMV陽性についての分析を同時に実施できる。複合型感染も迅速かつ同時にスクリーニングできる。

光がレポーターにより発生されるシグナルである場合、光は、例えば組織を通して検出できるので、そのシグナルは非侵襲的に検出できる。出典明示により本明細書の一部とする同時係属合衆国特許出願08/270,631号参照。

更に、本発明のバイオディテクターは生体適合性であり、それ自体環境に優しいので、特に、放射能ベースのアッセイなどの有害廃棄物を伴うような方法と比較した場合、開発費用は比較的安く、使用者の負担も少ない。

本発明のバイオディテクターの更に重要な利点は、多くの診断試験を実施するのに必要な時間および労力の低減である。多くの試験および診断分野に共通の律速段階は、迅速な情報を見出すのに適した正確な検知および検出システムに対する要望である。その例には、AIDSウイルスおよびその他の血液運搬病原体に対する供給血のスクリーニング、組織培養または動物モデルにおける新規薬剤の研究および評価、および遺伝子治療後に産出される治療用タンパク質のモニタリングがある。例えば、HIVやその他の作用要因に対する供給血の強制スクリーニングは、現在のところ多くの試験を必要とする。内蔵されている確認試験により多くの血液運搬病原体を検出する安価で迅速かつ特異的なセンサーは、プロセスを顕著に合理化でき、使用者にかかる正味費用を低減する。同様に、リード化合物として知られている将来性ある新規薬剤の製薬会社による評価には、現在、入念かつ高価な組織培養や動物治検が必要である。薬物動態や効果のインビトロおよびインビボモニタリングを可能にする安価なセンサーや関連ハードウェアは、リード化合物開発を合理化する方法を模索する製薬会社にとって大きな価値を持つ。

要するに、本発明のバイオディテクターは、現在利用できる診断用検出システムを超える多くの利点を提供するものである。

1. バイオディテクターを保護するもの

バイオディテクターの生物学的成分は、実質的な相互作用を安定化する生存系または非生存系内含まれるか、そうでなければ、それらと結合させててもよい。これらの成分自体を配置することにより、特異性および選択性の大きい少数のリガンドを検出できるマイクロ検知システムが得られる。

生存系。最も典型的には、バイオディテクター系は、必要な全ての成分を含むように遺伝子操作した生存細胞である。生存系には、これらに限定されないが、原核生物、真核生物、ウイルス、レトロウイルス、ベクター、プラスミド、ファージ、形質転換真核細胞、例えば、リンパ球、マクロファージ、樹立細胞系列がある。最も典型的には、E. コリなどの遺伝子操作した細菌細胞を保護するものである。遺伝子的に修飾した細菌は、低コストで迅速に増殖させることができるので、バイオディテクター系として生存細胞を使用する利点は、一旦、最初のバイオディテクターを構築すれば、これらのバイオディテクターのプールが複製および増殖され得ることである。

“生存”バイオディテクター系の使用は、幾つかの利点を持つ。第1に、一旦、センサーを操作すれば、低コストでバイオディテクターの増殖が可能である。第2に、ディテクターを増殖継続させて、従来の無機センサーのように消耗するのではなく、むしろ組織内で展開させることができるシステムが可能である。第3に、生存バイオディテクターは、検出シグナルを增幅できる。例えば、1つの抗原が細菌の表面に結合すると、一連の光発生物質の製造を引き起こすことができ、それらが各自、繰り返し光を発生し得る。よって、1つの抗原が結合して、このシステムを適切に刺激することにより、1つの生存バイオセンサーから大量の光子が生産される。第4に、これらのバイオセンサーは、大多数、標的に結合し得るので、多くのバイオディテクター、即ち、細菌がそれぞれ結合事象を増幅し、高度の増幅を導くという結果になる。よって、最大高感度が達成できる。

非生存系。しかしながら、非生物バイオディテクターも製造できる。バイオディテクターシステムは、無生物ゲル、非生物カプセルおよびリポソームに入れることもでき、またそれ自体を体内に注入したり、プレート上に載せることもできる。更に、脂質二重層などの

10

20

30

40

50

、媒介代謝物を保護できるその他のものは全て、採用できる。

2 . シグナル転換要素

シグナル転換要素は、特定の物質に選択的に結合する“細胞外”部分と、トランスデューサーを活性化する能力のある“細胞内”部分とからなる。典型的に、シグナル転換要素は、細胞外リガンド結合部分、例えば、抗体および細胞内酵素部分からなるトランスメンブレン融合タンパク質であり、細胞外部分が選択的に結合すると活性化される。従って、シグナル転換要素は、特定の物質、即ち、リガンドの認識および結合を細胞内シグナルへと転換して、トランスデューサー成分の活性化をもたらすように設計し、次いでトランスデューサー成分がレポーター遺伝子の発現を制御するプロモーターを活性化する。

リガンド結合ドメイン。本発明により同定できる物質には、これらに限定されないが、タンパク質、ペプチド、糖、脂肪酸、イオン、細菌を含む微生物、ウイルスおよびレトロウイルスがある。従って、リガンド結合ドメインは、抗体、抗体フラグメント、細胞性レポーターまたはその他あらゆるリガンド結合ドメイン、例えば、スタフィロコッカスのプロテインAおよびG、マクロファージFc受容体、カルボヒドレート部分、またはイオン結合部分、例えば、ナトリウムおよびカリウムチャンネル由来のドメインであり得る。

具体的な実施態様では、リガンド結合ドメインは、抗体またはそれらの誘導体であり、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAbs)、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、Fab発現ライブラリーにより生産されるフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、および上記のもののエピトープ結合フラグメントがあるが、これらに限定されない。特に、モノクローナル抗体技術および、細菌細胞における機能的抗体の発現技術の近年の発達は、望まれるどの標的にも適したリガンド結合ドメインを同定できる融通性と容易さを増した。細菌細胞における抗体の発現についての詳細は、中でも、Collet et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89: 10026-10030およびHuse et al., 1989, Science 246: 1275-1281参照。

更に、抗体コード領域源は、その抗体の特異性が既知であり、そのまで單一クローンであるハイブリドーマ細胞系列からクローン化したものに限定されない。むしろ、大きい抗体ライブラリーを採用して、不特定範囲の抗原を検出するための大多数のバイオディクターが製造できるように、融合タンパク質を生産してもよい。

シグナル変換ドメイン。シグナル変換ドメインは、リン酸化、脱リン酸化、メチル化、アセチル化およびプロテアーゼ活性を含み得る幾つかのタンパク質修飾機能を持つ酵素または酵素の活性ドメインからなる。このような酵素には、タンパク質キナーゼ、ホスホリラーゼ、タンパク質メチラーゼ、アセチラーゼ、プロテアーゼ、プロテイナーゼK、セリンプロテアーゼその他がある。本発明の具体的な実施態様では、細菌ホスホリラーゼPhoQの活性ドメインを遺伝子融合で重鎖抗体cDNAの領域に融合させる。それ自体、発現した融合タンパク質と標的化抗原(リガンド)との相互作用は、抗体ホスホリラーゼ融合におけるコンフォメーション変化をもたらし、それが、特異的なホスホリラーゼ活性を活性化すると、リン酸化/脱リン酸化事象により、PhoP、トランスデューサータンパク質が活性化される。活性PhoPは、レポーターオペロンluxの発現を制御するために使用されるPhoプロモーターを活性化する。シグナル転換要素のトランスデューサー活性化ドメインは、それが特定の分子に結合すると、コンフォメーションまたは電荷を変えて、トランスデューサーの活性化をもたらすという特徴がある、このトランスデューサーは、リン酸化、グリコシリ化、メチル化、電子輸送、水素輸送、カルボキシリ化、脱水素化、酸化/還元またはその他の化学修飾により活性化できる。

3 . トランスデューサー

トランスデューサーは、リガンド結合時にシグナル転換要素により活性化される。トランスデューサーは、コンフォメーションや電荷の変化、化学アミノ酸の付加または除去、例えばリン酸化、グリコシリ化を認識し、それに応答でき、検出可能な応答を誘発する能力もあるあらゆる分子であり得る。

本発明の具体的な実施態様では、トランスデューサーの活性化が、転写活性化要素、例えば、プロモーターの活性化を直接的または間接的に誘発して、レポーター遺伝子またはレ

10

20

30

40

50

ポーターオペロンの活性化をもたらす。レポーター遺伝子またはオペロンの転写および翻訳により、次は検出可能なシグナル、たとえば光を発生する遺伝子産物が得られる。しかしながら、別の実施態様では、トランスデューサーの活性化により直接的に可視測定可能なシグナルを生じることもある。

4. レポーター遺伝子およびオペロン

広範囲のレポーター遺伝子またはレポーターオペロンが採用でき、それにはバイオ発光、比色性反応または蛍光を生じるようなものがある。例えば、レポーター遺伝子は、色素(Bonhoeffer, 1995, *Arzneimittelforschung* 45: 351-356)、例え細菌ロドプシン(Ng et al., 1995, *Biochemistry* 34: 879-890)、メラニン(Vitkin et al., 1994, *Photochemistry and Photobiology* 59: 455-462)、アクオリン(Molecular Probes, Seattle)、緑色蛍光タンパク質(GFP, Clonetech, Palo Alto; Chalfie et al., 1994, *Science* 263: 802-805; Cubitt et al., 1995, *TIBS* 20: 448-455)、黄色蛍光タンパク質(Daubner et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 8912-8916)、フラビン、バイオフラビノイド、ヘモグラビン(Chance et al., 1995, *Analytical Biochemistry* 227: 351-362; Shen et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8108-8112)、ヘム(Pieulle et al., 1996, *Biochem. Biophys. Acta* 1273: 51-61)、インディゴ染料(Murdock et al., 1993, *Biotechnology* 11: 381-386)、ペリジニン-クロロフィルaタンパク質(PCR)(Ogata et al., 1994, *FEBS Letters*, 356:367-371)またはピオシアニン(al-Shibib and Kanadela, 1993, *Acta Microbiologica Polonica* 42: 275-280)をコードできる。あるいは、レポーター遺伝子は、吸色性基質、例え、-ラクタマーゼ、発光および蛍光タンパク質を切断できる酵素、蛍光基質を持つ酵素をコードしていてもよく、あるいは、光学活性な化合物をコードする、または基質を光学活性化合物に転換できるその他の遺伝子である。更に別のものとして、レポーター遺伝子は、光タンパク質をコードすることもできる。それぞれの場合で、レポーターは、トランスデューサー成分の活性形態によって活性化される誘導性プロモーターに作動可能に連結させる。

本発明の具体的な実施態様では、バイオ発光レポーターを採用する。

バイオ発光ベースのレポーター遺伝子およびオペロン。ルシフェラーゼファミリーを含む数種のバイオ発光レポーター遺伝子が知られている(例え、Wood et al., 1989, *Science* 244: 700-702)。ルシフェラーゼファミリーの構成員は、様々な種類の原核生物および真核生物において同定されている。原核生物発光(lux)システム並びに対応するlux遺伝子に関するルシフェラーゼおよびその他の酵素は、*Vibrio*および*Photobacterium*属の海洋細菌から、また*photorhabdus*とも呼ばれる*Xenorhabdus*属の陸上細菌から単離された。ルシフェラーゼシステム(lux)を含む真核生物の例は、キタアメリカホタル*Photinus pyralis*である。ホタルルシフェラーゼは、詳細に研究されており、ATPアッセイにおいて広く使用されている。*Pyrophorus plagiophthalmus*、その他の種、コメツキムシ由来のルシフェラーゼをコードするcDNAがクローニングされ、発現されている(Wood et al., 1989, *Science* 244: 700-702)。このコメツキムシは、この種の異なるメンバーが、異なる色のバイオ発光を放出する点で珍しい。互いに95-99%の相同性を持つ4種のクローンが単離された。これらは、546 nm(緑色)、560 nm(黄緑色)、578 nm(黄色)および593 nm(オレンジ色)の光を放とする。

ルシフェラーゼは、ATP、NAD(P)Hなどのエネルギー源および基質、例え、ルシフェリン、デカナール(細菌酵素)またはコエレントリジンおよび酸素を必要とする。

基質ルシフェリンが発光するためには、ルシフェラーゼ酵素を供給する必要がある。そのため、ルシフェリンを供給する従来の方法は、ルシフェラーゼだけでなく、基質デカナール合成用の合成酵素も発見されるものである。この場合、Luxオペロンからこれらのタンパク質を発現する細菌において、酸素はバイオ発光にとって単なる付帯的要件である。例え、土壤細菌*Xenorhabdus luminescence*から得られるluxオペロン(Francman et al., 1990, *J. Bact.* 172: 5767-5773)は、形質転換E.コリに、ヘテロ二量体ルシフェラーゼの2つのサブユニットと3つのアクセサリータンパク質の発現によって光子を放出する能力を与えるので、レポーターオペロンとして使用できる(Francman et al., 前掲)。

10

20

30

40

50

X. luminescenceのlux遺伝子を発現するE. coliに最適なバイオ発光は、37で観察され(Szittner and Meighen 1990, J. Biol. Chem. 265: 16581-16587; Xi et al., 1991, J. Bact. 173: 1399-1405)、真核生物および他の原核発光生物由来のルシフェラーゼは低温で最適であるのとは対照的である(Campbell, 1988, Chemiluminescence, Principles and Applications in Biology and Medicine(Chichester, England: Ellis Horwood Ltd. and VCH Verlagsgesellschaft mbH))。よって、レポーターOペロンは、具体的な応用の性質と要件に従い選択できる。そのため、例えば、X. luminescence由来のルシフェラーゼは、動物での研究用マーカーとして使用するのに非常に適している。

ルシフェラーゼベクター構築物は、殆どの細菌や多くの真核生物細胞を含む様々な宿主細胞の形質転換に使用するのに適応させることができる。更に、ある種のウイルス、例えばウイルスや痘瘡ウイルスは、遺伝子操作して、ルシフェラーゼを発現させることができる。例えば、Kovacs and Mettenlieter, 1991, J. Gen. Virol. 72: 2999-3008は、ヘルペスウイルスにおけるホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子の安定な発現を教示している。Brasier and Ron, 1992, Meth. in Enzymol. 216: 386-396は、哺乳動物細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子構築物の使用を教示している。培養哺乳動物細胞からのルシフェラーゼ発現は、CCDイメージングを用いて巨視的(Israel and Honigman, 1991, Gene 104: 139-145)にも微視的(Hooper et al., 1990, J. Biolum. and Chemilum. 5: 123-130)にも研究されてきた。

C. 光放出バイオディテクターのイメージング

光放出バイオディテクターは、多くの方法でイメージングできる。かかるイメージングの概略並びに具体的な実施例は、下記である。

1. 光検出装置

バイオディテクターにより発生されるシグナルが光である本発明の一実施態様において、重要な特徴は、微かな光のイメージングを可能にするのに十分感度の高い光検出装置の選択である。更に、バイオディテクターを生存対象にて使用する場合、そのイメージングは、妥当な時間、好ましくは約30分以下でなければならず、イメージ構築装置から生じるシグナルを使用しなければならない。

極めて明るい光発生部分を使用し、および/またはイメージングする対象または動物の表面近くに局在する光放出コンジュゲートを検出することが可能な場合、一対の“暗視”ゴーグルまたは標準高感度ビデオカメラ、例えば、Silicon Intensified Tube(SIT)カメラ(例えば、Hamamatsu Photonic Systems, Bridgewater, NJ)を使用する。しかしながら、より典型的には、より感度のよい光検出法が要求される。

本発明の実施の際に起こり得るような極めて低い光レベルでは、単位面積当たりの光子束は、イメージングするコマが連続しないほど非常に低くなる。その代わり、互いに時間的かつ空間的に別個の個々の光子によって表される。モニターを観測すると、かかるイメージは、光のシンチレーションポイントとして現れ、それぞれ単一検出光子を示す。

これらの検出光子を時間毎にデジタルイメージプロセッサーで集積することにより、イメージ入手し、構築することができる。あるいは、そのシンチレーションポイントを数えて、数値で報告すれば、イメージ再構築段階を回避することによって分析を促進できる。各イメージポイントでのシグナルが明暗度を決める常用のカメラとは反対に、光子計数イメージングではシグナルの振幅は全く重要でない。その目的は、単にシグナル(光子)の存在を検出すること、およびその位置に関する経時毎のシグナルの出現を計数することである。

少なくとも2種類の下記光検出装置が、個々の光子を検出でき、イメージプロセッサーにより分析できるシグナルを発生できる。

ノイズ低減光検出装置。第1種目は、光子シグナルを増幅するのとは反対に、光子ディテクターのバックグラウンドノイズを低減することにより感度を達成する装置からなる。まず、ディテクターアレイを冷却することによりノイズを下げる。この装置は、“バック薄片化(backthinned)”冷却CCDカメラと呼ばれる電荷結合素子(CCD)カメラを含む。

より感度のよい器具では、例えば、液体窒素を用いて冷却し、CCDアレイの温度をおよ

10

20

30

40

50

そ - 1 2 0 にする。“バック薄片化”とは、光子が後に検出されるパス長(path length)を低くし、それによって量子効率を増大する、超薄バックプレートを表す。特に感度のよいバック薄片化低温C C Dカメラは、Photometrics, Ltd. (Tucson, AZ)から入手できるカメニシリーズ2 0 0の“T E C H 5 1 2”である。

光子增幅装置。第2種目の高感度光検出器には、光子が検出スクリーンにぶつかる前に光子を增幅する装置がある。この種には、マイクロチャネル増強器などの増強器付きC C Dカメラがある。マイクロチャネル増強器は、典型的に、カメラの検出スクリーンに対して垂直かつ同一範囲にあるチャネルの金属アレイを含有する。マイクロチャネルアレイは、試料、対象、またはイメージングする動物およびカメラの間に設置する。アレイチャネルに入る殆どの光子は、出て行く前にチャネルの側面に接触する。アレイ全域に電圧をかけると、多くの電子が各光子衝突から放出する。このような衝突から生じた電子が“ショットガン”パターンでその元のチャネルから出ると、それをカメラが検出する。

増強マイクロチャネルアレイを直列に設置することにより、一層高い感度を達成でき、すると最初の段階で生成された電子は、次に第2段階で電子の増幅シグナルをもたらす、しかしながら、感度の増大は、空間的解像度を犠牲にして達成されるので、それぞれの新たな増幅段階で減少してしまう。

本発明の実施に適したマイクロチャネル増強器ベースの単一光子検出装置の一例は、Hamamatsuから入手できる2 4 0 0シリーズである。

イメージプロセッサー。光子を計数する光検出装置により発生されるシグナルは、イメージプロセッサーにより処理して、例えば、モニターに表示したり、ビデオプリンターにプリントできるイメージを構築する必要がある。このようなイメージプロセッサーは、典型的には、上記の高感度光子計数カメラを含むシステムの一部として販売されており、よって、同じ販売元(例えば、Photometrics, Ltd. およびHamamatsu)から入手できる。他の販売元のイメージプロセッサーも使用できるが、機能的なシステムを得るには一般的に若干手間がかかる。

イメージプロセッサーは、普通、IBM社のコンパチブルP CまたはApple社のMacintosh (Apple Computer, Cupertino, CA)などのパーソナルコンピューターにつなげるが、場合によっては購入したイメージングシステムの一部として含まれていることもある。一旦イメージをデジタルファイル形態にすれば、様々なイメージ処理プログラム(例えば、“ADO BE PHOTOSHOP”, Adobe Systems, Adobe Systems, Mountain View, CA)によって操作でき、プリントできる。

2. 光子放出のイメージを構築する

例外的に明るい光を発生する部分により、および/または対象表面近くに光放出コンジュゲートが局在化することにより、一対の“暗視”ゴーグルまたは高感度ビデオカメラを用いてイメージを得た場合、そのイメージは、単に、ビデオモニターで見たり、モニターに表示するだけである。所望ならばビデオカメラからのシグナルをイメージプロセッサーに転用でき、そうするとメモリー中の個々のビデオフレームを分析またはプリント用に貯蔵でき、および/または分析およびプリント用のイメージをコンピューター上にデジタル化できる。

あるいは、光子計数法を用いるならば、光子放出の測定は数列を生成し、イメージプロセッサーにおいて各ピクセル位置で検出された光子の数を表す。これらの数を使用して、典型的には、光子計数を(固定した予め選択した値またはどのピクセルにおいても検出された最大数のいずれかに対して)正規化し、正規化した数をモニター上に表示される明るさ(グレースケール)または色(疑似色)に変換することにより、イメージを生成する。疑似色表示では、典型的な色の指定は下記のとおりである。光子計数ゼロのピクセルは黒、低い計数は青、計数が増大するにつれて高い波長の色とし、最大光子計数值を赤とした。モニター上の色の位置は、光子放出分布、よって、光放出コンジュゲートの位置を示す。

コンジュゲートについての準拠座標系を提供するため、典型的には、光子放出が測定された対象のグレースケールイメージを構築する。このようなイメージは、例えば、ほのかな室内光でイメージング室またはボックスのドアを開け、反射した光子を(典型的には、

10

20

30

40

50

光子放出を測定するのにかかる僅かの時間)測定する。グレースケールイメージは、光子放出を測定する前、あるいは後のいずれかに構築できる。

光子放出のイメージは、典型的には、グレースケールイメージに重ねて、その対象について光子放出の混成イメージを作る。

光放出コンジュゲートの経時的な位置特定および/またはシグナルに統いて、例えば、選択した生体適合性部分の分布および/または位置特定に対する処置効果の記録を望むならば、光子放出の測定またはイメージングを所定の時間間隔で繰り返して一連のイメージを構築する。その間隔は、ピコ秒(高速ゲートカメラ)または秒程度の短さから、インテグレーティングカメラの場合は数日または数週間であってよい。

D . 応用

10

バイオディテクターの具体的な応用には、疾患の診断、臨床関連物質、環境汚染の検出、食物汚染の検出がある。更に、本発明のバイオディテクターは、基礎研究および開発において多くの応用を見出している。

感染病の診断。このバイオディテクターは、血液または尿を含む体液、または組織および他の体液中の抗原の検出に使用できる。適切な標的抗原には、細菌病原体、ウイルス病原体、真菌病原体、血清タンパク質、リンホカイン、サイトカイン、サイトカイン、インターフェロン、- 2 ミクログロブリン、免疫グロブリン、ペプチドおよびポリペプチドがあるが、これらに限定されない。

細菌病原体を標的とする具体的な診断試験には、ライム病、ストレプトコッカス、サルモネラ、ツベルクロシス、スタフィロコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、リストリア、シゲラ、プロテウス、エンテロコッシ、クロストリジウム、ボルダテラ、バルトネラ、リケッチア、クラミジア、スピロヘータの診断があるが、これらに限定されない。ウイルス病原体を標的とする診断試験には、H I V - 1、H T L V - 1などのレトロウイルス、肝炎ウイルス(H B V、H C V、H A V)、E B V、C M V、単純ヘルペスI、単純ヘルペスIIおよびH H V - 6 を含むヘルペスウイルス、日本脳炎ウイルス、東洋および西洋脳炎ウイルスを含む脳炎、ロタウイルス、既知かつ更にヒトおよび動物ウイルス病原体として同定されたもの全て、およびアルツハイマーおよびクルツフェルト・ヤコブ病(プリオン)に関連するような異例の要因の検出があるが、これらに限定されない。標的真菌病原体には、クリプトコッカス、ヒトスプラズマ症、コクシジオイデス症、カンジダ、ジアルディアがあるが、これらに限定されない。

20

その他の臨床関連物質の検出。バイオディテクターの応答には、体液、例えば、血液または尿、または組織中の糖分子、脂肪酸、タンパク質または微生物などの臨床関連物質の検出があり得る。標的化抗原には、臓器の適切な機能を知らせる乳酸デヒドログナーゼなどの酵素、尿、グルコース、およびその他の分子、およびサイトカインがある。アルファフェトプロテインは、スピノビフィダ(spinobifida)診断の標的であり得る。ある種の細菌種またはその他の微生物は、腸および膣フローラなどの混合集団群中にそれらがあるかどうかを測定するための標的となる。ある範囲の疾患の診断および予防のために重要な診断標的は、リンホカインであろう。現今の方法では、リンホカインのプロフィールは、容易に測定できないが、それが測定できれば、疾患と疾患状態との関係について知られていない様々な特徴を解明できると期待されている。更に、重要な医学的応用は、囊胞性纖維症、鎌状赤血球貧血、ダウン症候群、フェニルケトン尿症、A D A欠乏症、サラセミア、成長ホルモン欠乏症、癌の疾患素質を含む遺伝病の妊娠初期診断であろう。最後に、本バイオディテクターは、例えば、グルコースレベルや薬剤レベルの実時間モニタリングにおける応用を見出すことができる。

30

農業的および獣医学的応用。上記の医学的応用は全て獣医学に応用できる。

環境汚染の検出。例えば、本バイオディテクターは、上水道における汚染検出のために使用できる。選択標的には、ジアルディア、クリプトコッカス、レジオネラ、クロストリジア毒素、エンテロバクター、E . コリ、原生動物、重金属があるが、これらに限定されない。更に、土壤集団中のある種の細菌が存在するかどうかが本バイオディテクターにより測定できる。土壤をスクリーニングして、環境中に放出され得る遺伝子操作生物体を追跡

40

50

できる。

食物汚染の検出。本バイオディテクターは、サルモネラ、大腸菌、スタフィロコッカス、クロストリジウムなどの細菌および真菌を含む食物中の汚染、ただしこれらに限定されない、を同定するのにも使用できる。

基礎研究および開発。本バイオディテクターは、基礎研究および開発において多くの応用を見出す。例として、ウェスタン・プロット、E L I S Aなどの標準イムノアッセイにおける検出システム、リンホカインプロフィールの測定、マイコプラズマを含む細胞培養汚染の検出がある。更に、本バイオディテクターは、C D 4、C D 8、接着帯(adhereins)などの細胞表面マーカーを検出するための発現アッセイにおける検出システムとして有用である。

非生物バイオディテクター。ある種の応用の場合、抗原性が論点(即ち、インビボ)である場合、非生物バイオディテクターが望まれることがある。例として、感染、組織損傷および他の病状のインビボ検出および位置特定がある。一般に不活性の小胞二重層または膜、あるいは非生物であって、かつ媒介代謝物を保護するその他のもの(リポソームなど)に、リガンドと接触して光を生じるような方法でバイオディテクター機構を封入すると、インビボでこのシステムが使用可能である。

下記の実施例は、本発明をより詳細に説明するものである。下記の製造例および実施例は、当業者が本発明をより明確に理解し実施できるようにするものである。しかしながら、本発明は、例示的実施態様により範囲を限定されるものではなく、その実施態様は本発明の単なる一態様の例示であることを意図しており、また機能的に関連する方法は、本発明の範囲内にある。実際に、本明細書に記載したもの以外に本発明を様々に修飾できることは、上記の説明および添付の図面から当業者には明らかである。かかる修飾は、添付の請求の範囲内にあると解釈される。

VII. 実施例

最初の3つの実施例は、特定遺伝子の発現とにシグナル伝達とを関連づけるのに使用できる3つの方法である。

A. 実施例1：特定遺伝子の調節とシグナル伝達とを関連づける（方法1）

下記の実施例は、特定遺伝子の調節とシグナル伝達とを関連づけるのに使用できる方法を例示説明する。

表面発現リガンド結合分子、例えば抗体へのリガンド結合により活性化されるプロモーターを同定するために、トランスポゾンを構築する。プロモーターのないレポーターシステムは、細菌中の様々な調節配列を同定するために使用される。Ronald et al., 1990, Gene 90: 145-148. トランスポゾンは、(i)(1)バイオ発光の遺伝子を含有するプロモーターなしのオペロン、(2)選択マーカー(カナマイシン耐性遺伝子；Kan)および(3)負のレギュレーター(ランダレプレッサー)；(ii)ラムダオペレーターにより発現される別の選択マーカー(クロラムフェニコール耐性遺伝子；Chl)；および(iii)構成的に発現させる第3の選択マーカー(アンピシリン耐性遺伝子；Amp)からなる。対象の抗体を発現する細菌細胞は、トランスポゾンで形質転換させる。トランスマンブレン抗体融合タンパク質のコンフォメーション変化は、lux構築物のプロモーター領域にメッセージを中断するよう設計されたトランスデューサーの活性化または化学修飾のシグナルとなる。陽性形質転換体は、得られたAmp耐性の測定により選択する。抗原の存在下で活性である(構成性発現を含む)プロモーターの後ろのトランスポゾンを含有する細胞は、抗原の存在下でKan耐性であり、抗原の不在下でオフであるプロモーターの後ろのトランスポゾンを含有する細胞は、抗原の不在下でChl耐性である。一連の増殖条件で継代培養することにより、抗原に応答してルシフェラーゼを適切に発現する所望の形質転換体が同定される。次いで、プロモーターを特性化でき、別のバイオディテクターを構築するのに使用できる。

図4は、実施例1に記載のようにして製造したバイオディテクターを図示する。図4Aに示したように、抗原の不在下では、融合タンパク質は、組込まれたトランスポゾンによりコードされるクローン化遺伝子の発現を制御するプロモーターにシグナルを伝達しない。そのため、提示したE.コリの表現型は、抗原不在下ではアンピシリン耐性、クロラムフ

10

20

30

40

50

エニコール耐性、カナマイシン耐性であり、バイオ発光性でない。アンピシリン耐性は、構成的に発現されて、組込まれたトランスポゾンの選択を支持するものである。

しかしながら、融合タンパク質へのリガンド結合により活性化された活性化トランスデューサーの結合によりプロモーターが作動すると、ルシフェラーゼオペロン、カナマイシン耐性遺伝子、およびラムダレプレッサーが発現する。ラムダレプレッサーは、ラムダオペロン上に働くことによって、クロラムフェニコール耐性遺伝子の発現を制止する。そのため、抗原の存在下における細胞の表現型の特徴は、アンピシリン耐性、カナマイシン耐性、クロラムフェニコール感受度およびバイオ発光である。

よって、上記のとおり、遺伝子の誘導および活性化により、抗原に対する所望の応答についての陽性選択が可能になる。より具体的には、記載のトランスポゾンを適切な部位でゲノム内に組込むような細菌細胞のみが選択操作に役立つのに対し、非応答細菌は死滅する。

B . 実施例 2 : 特定遺伝子の調節とシグナル伝達とを関連づける(方法 2)

下記の実施例は、特定遺伝子の調節とシグナル伝達とを関連づけるのに使用できる第 2 の方法を例示説明する。

抗体重鎖および遺伝子調節のためにシグナル伝達することが知られている表面タンパク質およびこのシグナルに影響を受けるプロモーターからなる融合タンパク質を、マーカー遺伝子の前部に置く。抗体軽鎖は、バイオディテクター中で同時発現し、別のリガンド特異性を与える(Borrebaeck et al., 1992, Biotechnology 10: 697-698)。細菌ホスファターゼは、細菌中の表面発現融合タンパク質を同定するのに通用することから、表面遺伝子融合の初期トランスメンブレンおよびシグナル伝達成分として選ばれており(Kohl et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 1069; Weiss and Orfanoudakis, 1994; J. Biotechnol. 33: 43-53)、比色性基質がホスファターゼ活性を測定するのに利用できる。抗体フラグメント - ホスファターゼ融合物は、リガンド結合特異性とホスファターゼ活性の両方を持って製造してきた(Kohl et al., 1991, Acad. Sci. 646: 106-114; Wels et al., 1992, Biotechnology 10: 1128-1132)。ホスファターゼ - 抗体融合物は、イムノアッセイ用の標識化抗体を製造するのに使用してきた(Carrier et al., 1995, J. Immunol. Methods 181: 177-186; Ducancel et al., 1993, Biotechnology 11: 601-605; Weiss et al., 1994, J. Biotechnol. 33: 43-53; Weiss and Orfanoudakis, 1994, J. Biotechnol. 33: 43-53 Wels et al., 1992, Biotechnology 10: 1128-1132)。更に、修飾細菌ホスファターゼに対する抗体は、ホスファターゼ機能を変えることが示されており(Brennan et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 5783-5787)、これはタンパク質 - タンパク質相互作用があそらくホスファターゼ分子のコンフォメーション変化によりホスファターゼ活性を変調できることを示している。細菌細胞表面上のホスファターゼ融合タンパク質の発現は、特定の遺伝子の発現を誘導する細胞内にシグナル、リン酸化を伝達する。このシステムを修飾して、マーカータンパク質、ルシフェラーゼとそのアクセサリータンパク質の発現を、リガンドの抗体 - ホスファターゼ融合タンパク質への結合に緊密に関連づけることができ、即ちリガンド依存性分子スイッチである。

C . 実施例 3 : 特定遺伝子の調節とシグナル伝達とを関連づける(方法 3)

下記の実施例は、特定遺伝子の調節とシグナル伝達とを関連づけるのに使用できる第 3 の方法を例示説明する。

実施例 1 および 2 に記載した方法は、ホスファターゼ - 抗体融合物を発現する細胞において上記トランスポゾンを併用したものである。

例えば、phoオペロンのもののようなトランスデューサー分子の活性化に特異的に応答する誘導性プロモーターに連結させたレポーター遺伝子を持つ細菌株を作る。次いで、pho膜タンパク質と抗体とを融合するベクター内にクローン化した抗体性能ライブラリーを上記細菌株内に入れる。その後、このバイオディテクターのライブラリーを、検出対象の特定分子に対して試験でき、適切なバイオディテクターを選択できる。こうして得られたバイオディテクターを大量に増やす。

D . 実施例 4 : 溶液状物質の検出

10

20

30

40

50

下記は、ウイルスおよび細菌抗原を全血や血漿などの溶液状で含むリガンドを検出するアッセイ例である。

検出および定量するリガンドを含有する試料を標準に沿って 96 ウェルプレート中で希釈(2 倍)する。特定のバイオディテクターを生存活性細胞として各ウェルに加え、直ちに分析した。プレートから生じるバイオ発光シグナルは、電荷結合素子(CCD カメラ)または照度計を用いて 96 ウェル形式で検出する。未知試料から生じた相対バイオ発光を定量用の標準曲線上にプロットした。

E . 実施例 5 : 固相支持体上の物質の検出

下記は、例えば、ウエスタン・プロット分析におけるニトロセルロースまたはナイロン膜などの固相支持体上の物質を特定のバイオディテクターを用いて検出するアッセイ例である。

10

標準法を用いて固相支持体(PVDF インモビロン膜、Millipore)にタンパク質を移した後、その膜を乾燥させ、細菌代謝の栄養分を含有する最小培地またはその他の透明緩衝液にて、生物学的活性細胞として特定のバイオディテクターを含有する皿に移す。室温で 30 分インキュベーション後、膜を取り出し、まだ湿っている間に、ジップロックまたは熱密閉プラスチックバックに密閉する。膜に結合したバイオディテクターから生じたバイオ発光シグナルは、X 線フィルム、CCD 検出器、またはその他の光感受性検出法を用いて検出する。シグナルは、標準イメージ分析ソフトウェアを用いて定量できる。

F . 実施例 6 : バイオ発光サルモネラからの光放出に対するヒト血液の影響

次の実施例に示したように、10 以下の細菌細胞は増強 CCD 検出器で検出できる。

ルシフェラーゼオペロンの構成性発現を付与するプラスミドで形質転換させておいたサルモネラ L B 5 0 0 0 株の 2 倍連続希釈物を、96 ウェルプレートに入れ、同一のものを 2 つ準備した。希釈物を、増殖培地 30 μl 単独(L B 5 0 0 0 と指定)のものと血液 30 μl を加えたものとで、その検出限度で散乱および吸収培地として血液の影響について測定した。各希釈物と、濃縮ウェルから試料を平板培養して得られたコロニー形成単位(CFU)数は図 5 に示す。CCD 検出器により得られたイメージの分析により測定される各ウェル毎の相対バイオ発光を示す(図 5)。もっと濃縮したウェルのシグナルは、スケール外であり、よってその数は、より高い濃度でも直線でない。

20

全ての文献は、その全体を本明細書の一部としている。

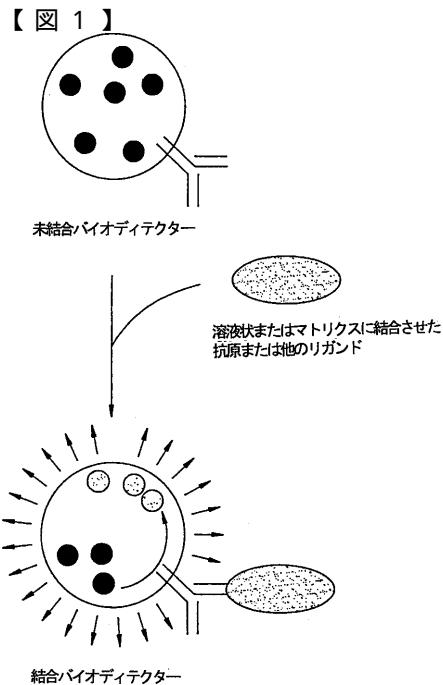


FIG. 1

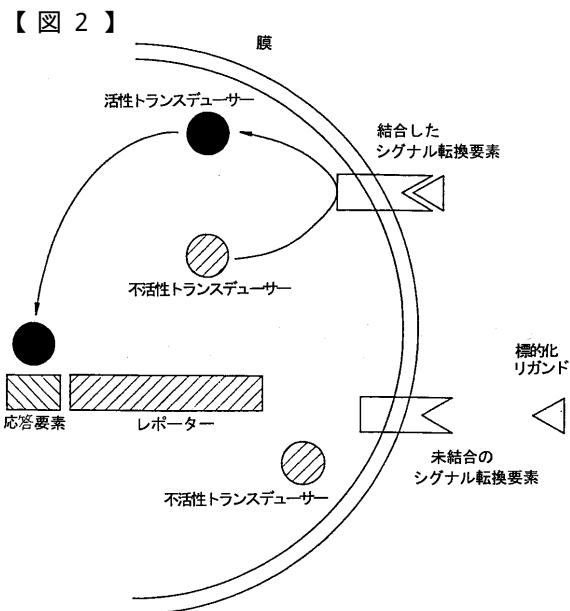


FIG. 2

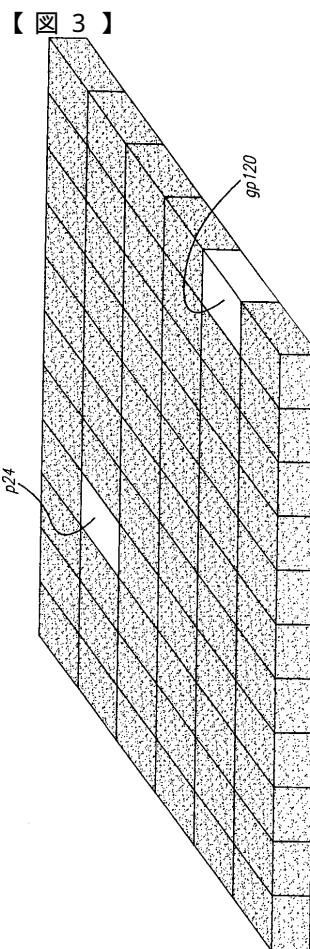


FIG. 3

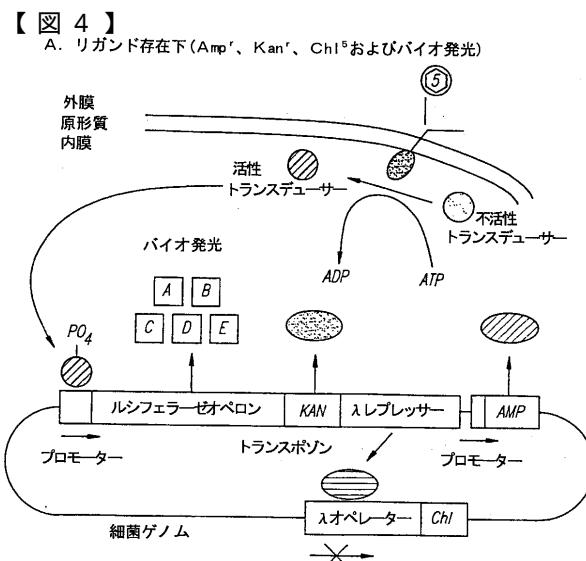
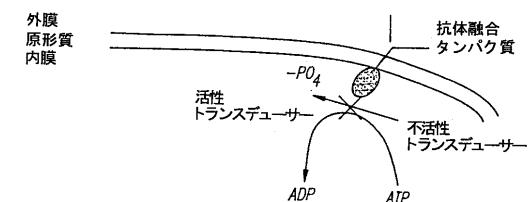
B. リガンド不在下(Amp^r、Chl^s、Kan^rおよびバイオ発光なし)

FIG. 4

【図5】

バイオ発光サルモネラからの
シグナルに対するヒト血液の影響

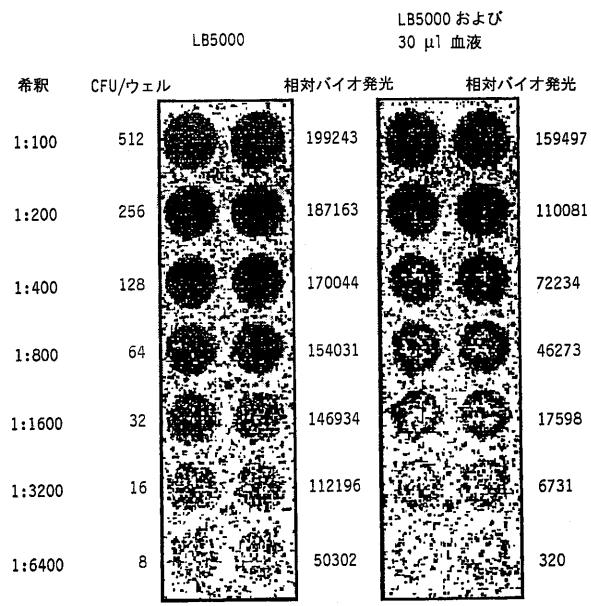


FIG. 5

フロントページの続き

(72)発明者 ベナロン , デイビッド・エイ
アメリカ合衆国94062カリフォルニア州 レッドウッド・シティ、バーチ・ストリート454
番

(72)発明者 コンタグ , クリストファー・エイチ
アメリカ合衆国95129カリフォルニア州 サンノゼ、ボウリンガー・ロード6110番

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平7 - 250689 (JP, A)
特表平4 - 504904 (JP, A)
米国特許第5281539 (US, A)
Journal of Bacteriology, 1991年11月, Vol.173, No.21, 6760-6765

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/53

G01N 33/566