

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6022470号
(P6022470)

(45) 発行日 平成28年11月9日 (2016. 11. 9)

(24) 登録日 平成28年10月14日 (2016. 10. 14)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
 C 0 7 K 19/00 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/15 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/19 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-541056 (P2013-541056)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月23日 (2011. 11. 23)
 (65) 公表番号 特表2014-500022 (P2014-500022A)
 (43) 公表日 平成26年1月9日 (2014. 1. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/062115
 (87) 国際公開番号 W02012/071549
 (87) 国際公開日 平成24年5月31日 (2012. 5. 31)
 審査請求日 平成26年7月2日 (2014. 7. 2)
 (31) 優先権主張番号 61/417, 062
 (32) 優先日 平成22年11月24日 (2010. 11. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500481499
 タカラ バイオ ユーエスエー, インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 43, マウンテン ビュー, テラ ベラ
 アベニュー 1290
 (74) 代理人 100078868
 弁理士 河野 登夫
 (74) 代理人 100114557
 弁理士 河野 英仁
 (72) 発明者 ビスグローブ, ドウェイン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア, マウン
 テン ビュー, テラ ベラ アベニュー
 1290

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分散型タンパク質形質導入ドメインを含む誘導性発現系転写モジュレータおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (i) 転写モジュレータ応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、
 (i i) 該転写モジュレータドメインに融合した発現調節ドメイン、および
 (i i i) 分散型タンパク質形質導入ドメイン

を有する転写モジュレータであって、

Tet Off Advanced 転写モジュレータ (配列番号 4) に対し、転写モジュレータドメインと発現調節ドメインとの間に 6 × HN 精製タグが導入され、及び／又は E 1 2 8 R の点突然変異が導入されていることを特徴とする転写モジュレータ。

【請求項 2】

アラニンリンカーと、Q 3 2 R、C 8 8 R、A 1 1 8 R、及び C 1 9 5 R からなる群より選択される一つ以上の点突然変異とが導入されていることを特徴とする請求項 1 に記載の転写モジュレータ。

【請求項 3】

(a) (i) 転写モジュレータ応答エレメント、(i i) プロモータおよび (i i i) コード配列を備える発現カセットを有する宿主細胞、ならびに

(b) 前記発現調節ドメインは前記転写モジュレータドメインに機能するように結合している、請求項 1 又は 2 に記載の転写モジュレータ

を備えることを特徴とする誘導性発現システム。

【請求項 4】

10

20

形質導入エンハンサーをさらに備えることを特徴とする請求項3に記載の誘導性発現システム。

【請求項5】

(a) (i) 転写モジュレータ応答エレメント、(ii) プロモータおよび(iii) コード配列を備える発現カセットを有する宿主細胞、

(b) (i) 前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、(ii) 該転写モジュレータドメインに機能するように結合した発現調節ドメインおよび(iii) 分散型タンパク質形質導入ドメインを有し、Tet Off Advanced転写モジュレータ(配列番号4)に対し、E128Rの点突然変異が導入されている転写モジュレータ、及び

(c) 核酸形質移入試薬

を備えることを特徴とする誘導性発現システム。

【請求項6】

発現メディエーターをさらに備えることを特徴とする請求項4又は5に記載の誘導性発現システム。

【請求項7】

請求項1又は2に記載の転写モジュレータをコードすることを特徴とする核酸。

【請求項8】

ベクター内に存在することを特徴とする請求項7に記載の核酸。

【請求項9】

細胞中に存在することを特徴とする請求項7に記載の核酸。

【請求項10】

宿主細胞におけるコード配列の発現を誘導する方法であって、

(a) (i) 転写モジュレータ応答エレメント、プロモータおよび前記コード配列を備える発現カセットと、(ii) 前記転写モジュレータドメインは発現メディエーターを介して前記転写モジュレータ応答エレメントに結合し、前記発現調節ドメインは前記転写モジュレータドメインに機能するように結合している、請求項1又は2に記載の転写モジュレータとを有する宿主細胞を提供する過程、ならびに

(b) 前記コード配列の発現誘導に十分な条件下に前記宿主細胞を維持する過程を有することを特徴とする方法。

【請求項11】

前記宿主細胞を形質導入エンハンサーに接触させる過程をさらに有することを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】

宿主細胞におけるコード配列の発現を誘導する方法であって、

(a) (i) 転写モジュレータ応答エレメント、プロモータおよび前記コード配列を備える発現カセットと、(ii) 発現メディエーターを介して前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、該転写モジュレータドメインに機能するように結合した発現調節ドメインおよび分散型タンパク質形質導入ドメインを有し、Tet Off Advanced転写モジュレータ(配列番号4)に対し、E128Rの点突然変異が導入されている転写モジュレータとを有する宿主細胞を提供する過程、

(b) 前記コード配列の発現誘導に十分な条件下に前記宿主細胞を維持する過程、ならびに

(c) 前記宿主細胞を核酸形質移入試薬に接触させる過程を有することを特徴とする方法。

【請求項13】

(a) (i) 転写モジュレータ応答エレメント、(ii) プロモータおよび(iii) クローニング部位を備える発現カセットを有するベクター、ならびに

(b) (i) 前記転写モジュレータドメインは調節タンパク質応答エレメントに結合し、前記発現調節ドメインは該転写モジュレータドメインに機能するように結合している、

10

20

30

40

50

請求項 1 又は 2 に記載の転写モジュレータ

を備えることを特徴とするキット。

【請求項 1 4】

形質導入エンハンサーをさらに備えることを特徴とする請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

(a) (i) 転写モジュレータ応答エレメント、(i i) プロモータおよび(i i i) クローニング部位を備える発現カセットを有するベクター、

(b) (i) 調節タンパク質応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、(i i) 該転写モジュレータドメインに機能するように結合した発現調節ドメインおよび(i i i) 分散型タンパク質形質導入ドメインを有し、T e t O f f A d v a n c e d 転写モジュレータ(配列番号 4) に対し、E 1 2 8 R の点突然変異が導入されている転写モジュレータ、並びに

(c) 核酸形質移入試薬

を備えることを特徴とするキット。

【請求項 1 6】

発現メディエーターをさらに備えることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

遺伝子を可逆的にオンおよびオフにする能力は、遺伝子の発現と機能の解析にとって、特にその産物が細胞にとって毒である遺伝子にとって大いに役に立つ。重金属、ステロイドホルモンおよびヒートショックタンパク質による調節に関与する、哺乳類細胞に内在する多数の誘導系が誘導性発現系に広く用いられている。しかしながら、誘導物質の多面的な効果がこれらの哺乳類誘導性プロモータを主に制限する。

【0 0 0 2】

2 つの主な種類の原核生物由来の系を様々な異なる細胞での遺伝子発現の調節に利用することに成功しているが、これらの系の種類は L a c ベースの系と T e t ベースの系である。両方の種類の系がリプレッサー／オペレータベースの系であり、それらの対応する原核生物のオペロン、l a c については大腸菌ラクトースオペロン、および t e t についてはトランスポゾン T n 1 0 テトラサイクリンオペロンから重要な配列を得ている。

【0 0 0 3】

t e t ベースの系は、目的の遺伝子の誘導性発現を必要とする実験で一般的に好まれる方法として広く採用され、広く認められている。その最初に報告された形態では、前記系は 2 つのプラスミドを使用し、1 つはトランス活性化因子、例えば、t T A ドメインまたは r t T A ドメインが融合した V P 1 6 ドメインを発現し、そして、他方はプロモータとトランス活性化因子応答配列に機能するように結合したコード配列を含む誘導性発現カセットを有する。この 2 プラスミド系を有する細胞株の構築には 2 段階の過程が関係する。第 1 の過程では、前記トランス活性化因子を安定的に発現する細胞株が構築され、トランス活性化因子応答性レポーターコンストラクトを用いる一過性形質移入によるクローン選択と発現解析によって特定される。第 2 の過程では、目的のコード配列を含む誘導性発現カセットを前の過程で作製された細胞株に導入し、そして、2 回目の選抜を実行して、前記コード配列の発現についてトランス活性化因子応答性誘導を示すクローンを特定する。

【0 0 0 4】

t e t ベースの誘導性発現系は、高い基底発現レベル、低い反応性および誘導薬剤の毒性を示す初期の系に見られるいくつかの欠点を有効に克服している。そのような系は様々なレベルの発現メディエーターに反応して、段階的に数桁の範囲にわたってコード配列の発現の誘導を達成することができる。また、そのような系は極めて万能であり、いくつかの種類の改変を受け入れることができ、目的の多様な細胞において特定の遺伝子またはその組合せの役割の研究が可能になる。そのような系は、遺伝子治療法および薬理的小分子

10

20

30

40

50

のスクリーニングを含む医療用途で使用可能である。そのような系の万能性によって、動物モデルまたは植物モデルにおける組織特異的または全体的な誘導性遺伝子発現を必要とする状況への適応が可能となり、インビボで遺伝子機能を研究する新しい道を開くことになる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第05589362号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0006】

本発明の態様は、分散型タンパク質形質導入ドメインを有する転写モジュレータを使用する誘導性発現系（誘導性発現システム）を含む。本発明の態様は、コード配列の発現を誘導するために前記系を使用する方法ならびに本発明の方法の実施に使用するキットをさらに含む。前記系、その構成要素、方法およびキットは様々な異なる用途に使用される。

【0007】

本発明のいくつかの態様において、誘導性発現系であって、（a）転写モジュレータ応答エレメント、プロモータおよびコード配列を含む発現カセットを含む宿主細胞、ならびに（b）前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、前記転写モジュレータドメインに機能するように結合した発現調節ドメインおよび分散型タンパク質形質導入ドメインを含む転写モジュレータ、を含む系が提供される。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータ応答エレメントはTet応答配列である。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータドメインはTet転写モジュレータドメインである。特定の実施形態において、前Tet転写モジュレータは、発現メディエーターが無いときに前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する。他の実施形態において、前記Tet転写モジュレータは、発現メディエーターが有るときに前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する。いくつかの実施形態において、前記系は発現メディエーター、例えば、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記分散型タンパク質形質導入ドメインは、3個以上の非連続的な塩基性アミノ酸残基でできている塩基性パッチを含む。いくつかの実施形態において、前記塩基性パッチ中の塩基性アミノ酸残基のパーセントは30パーセント以上である。いくつかの実施形態において、前記発現系は形質導入エンハンサー、例えば、DNA形質移入試薬をさらに含む。

20

30

【0008】

本発明のいくつかの態様において、転写モジュレータ応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、前記転写モジュレータドメインに融合した発現調節ドメインおよび分散型タンパク質形質導入ドメインを含む転写モジュレータが提供される。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータドメインはTet調節ドメインである。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータは、発現メディエーターが有るときに転写モジュレータ応答エレメントに結合する。他の実施形態において、前記転写モジュレータは、発現メディエーターが無いときに転写モジュレータ応答エレメントに結合する。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータは、Tet Off Advancedタンパク質（配列番号4）と比較して、1つ以上の点突然変異を含む。特定の実施形態において、前記の1つ以上の点突然変異は、Q32R、C88R、A118R、E128R、C195R、Q32K、C88K、A118K、E128KおよびC195Kからなる群より選択される。

40

【0009】

本発明のいくつかの態様において、転写モジュレータ、例えば、上述の実施形態のうちの1つの転写モジュレータをコードする核酸が提供される。いくつかの実施形態において、ベクター内に前記核酸が存在する。いくつかの実施形態において、細胞中に前記核酸が

50

存在する。

【0010】

本発明のいくつかの態様において、宿主細胞においてコード配列の発現を誘導するための方法であって、(i) 転写モジュレータ応答エレメント、プロモータおよび前記コード配列を含む発現カセット、および(ii) 発現メディエーターを媒体として前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、前記転写モジュレータドメインに機能するように結合した発現調節ドメインおよび分散型タンパク質形質導入ドメインを含む転写モジュレータ、を含む宿主細胞を提供すること、ならびに前記コード配列の発現誘導に十分な条件下で前記宿主細胞を維持することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態において、前記コード配列の発現に十分な様に、前記転写モジュレータの前記転写モジュレータ応答エレメントへの結合を仲介する発現メディエーターの濃度を前記宿主細胞にいて変化させることを前記方法は含む。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータ応答エレメントはTet応答配列であり、前記転写モジュレータはTet調節ドメインである。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータは、発現メディエーターが有るときに前記転写モジュレータ応答エレメントに結合し、そして、前記方法は前記コード配列の発現を誘導するために前記宿主細胞における前記発現メディエーターの濃度を上昇させることを含む。他の実施形態において、前記転写モジュレータは、発現メディエーターが無いときに前記転写モジュレータ応答エレメントに結合し、そして、前記方法は前記コード配列の発現を誘導するために前記宿主細胞における前記発現メディエーターの濃度を低下させることを含む。いくつかの実施形態において、前記発現メディエーターはテトラサイクリンおよびドキシサイクリンからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、前記分散型タンパク質形質導入ドメインは、3個以上の非連続的な塩基性アミノ酸残基でできている塩基性パッチを含む。いくつかの実施形態において、前記塩基性パッチ中の塩基性アミノ酸残基のパーセンテージは30以上である。いくつかの実施形態において、前記方法は前記宿主細胞を形質導入エンハンサー、例えば、DNA形質移入試薬と接触させることをさらに含む。

【0011】

本発明のいくつかの態様において、(a) 転写モジュレータ応答エレメント、プロモータおよびクロニング部位を含む発現カセットを含むベクター、ならびに(b) 前記調節タンパク質応答エレメントに結合する転写モジュレータドメイン、前記転写モジュレータドメインに機能するように結合した発現調節ドメインおよび分散型タンパク質形質導入ドメインを含む転写モジュレータ、を含むキットが提供される。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータ応答エレメントはTet応答配列である。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータドメインはTet転写モジュレータドメインである。いくつかの実施形態において、前記転写モジュレータは、発現メディエーターが無いときに前記転写モジュレータ応答エレメントに結合する。他の実施形態において、前記転写モジュレータは、発現メディエーターが有るときに転写モジュレータ応答エレメントに結合する。いくつかの実施形態において、前記分散型タンパク質形質導入ドメインは3個以上の非連続的な塩基性アミノ酸残基でできている塩基性パッチを含む。いくつかの実施形態において、前記塩基性パッチ中の塩基性アミノ酸残基のパーセンテージ数は30以上である。いくつかの実施形態において、前記キットは形質導入エンハンサー、例えば、DNA形質移入試薬をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記キットは対照細胞株をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記キットは発現メディエーター、例えば、テトラサイクリン、dox、エクダイソン、RU486、アプタマー、抗体およびタンパク質をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】 TetR DNA結合ドメイン(転写モジュレータドメイン)は灰色で、6×HN領域は黄色で、9×アラニンスペーサーは緑色で、そして3×VP16ドメイン(発現調節ドメイン)は青色で示され、p r O F 1 4中の突然変異の位置は赤色で示されるp

r O F 7（配列番号1）とp r O F 1 4（配列番号2）（T e t エクスプレス）のタンパク質配列を提供する図である。

【図1B】T e t R DNA結合ドメイン（転写モジュレータドメイン）は灰色で、6×HN領域は黄色で、9×アラニンスペーサーは緑色で、そして3×V P 1 6ドメイン（発現調節ドメイン）は青色で示され、p r O F 1 4中の突然変異の位置は赤色で示される、p r O F 7（配列番号1）とp r O F 1 4（配列番号2）（T e t エクスプレス）のタンパク質配列を提供する図である。

【図2】レポータ細胞株は、二方向性T R E t i g h t プロモータ（クロンテック社）の制御下でZ s G r e e nとホタルルシフェラーゼを共発現するH e L a細胞ベースの安定な細胞株（これ以降、「クローン19」と称する）であり、p r O Fタンパク質に曝露してから18時間後にルシフェラーゼの測定を行い、誘導倍率は、タンパク質を添加していない場合に対する倍率を意味する、様々なp r O F突然変異体によって引き起こされる誘導を比較するルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。

【図3】T e t R（P D B番号2 N S 7）の原型構造は、ピンクと青で色付けしたヘテロダイマーの2つのサブユニットを用いて示され、変異のおおよその位置は黄色で示される、3次元T e t R構造中のp r O F 1 4突然変異体の位置を示す図である。

【図4】T e t R（P D B番号2 N S 7）の原型構造は、ピンクと青で色付けしたヘテロダイマーの2つのサブユニットを用いて示され、アルギニン残基とリシン残基のおおよその位置は黄色で示される、T e t RとT e t エクスプレス中のアルギニン残基とリシン残基の位置を示す図である。

【図5】安定した二方向性T R E t i g h t Z s G r e e n / F L u c組込みカセットを有するH e L aレポータ細胞（クローン19）を96ウェルフォーマットでプレーティングし（ウェルあたり15,000細胞）、細胞が付着した後に、ウェルあたり0、5、10または20μLの形質導入ミックスを添加し、形質導入ミックスは、次の添加物、2%のL T X、0.6%のX f e c t、2%のリポフェクタミン2000（L i p o 2 0 0 0）、0.2mMのクロロキンまたは6μg/mLのポリブレンのうちの1つを含むO p t i m e m培地中のT e t エクスプレスタンパク質から成り、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行する、T e t エクスプレスの活性の向上を示すルシフェラーゼアッセイの結果を提供する図である。

【図6】クローン19H e L aレポータ細胞を96ウェルフォーマットでプレーティングし（ウェルあたり15,000細胞）、T e t エクスプレスタンパク質（O p t i m e m培地中）を提示した量の試薬と混合して前記細胞に添加し、試薬にはミラス社のT r a n s i t - s i Q u e s t、T r a n s i t - T K O、T r a n s i t - L T I、T r a n s i t - J u r k a t、T r a n s i t - 2 0 2 0またはクロンテック社のX f e c tが含まれ、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行する、T e t エクスプレスの活性の向上を示すルシフェラーゼアッセイの結果を提供する図である。

【図7A】クローン19H e L aレポータ細胞を96ウェルフォーマットでプレーティングし（ウェルあたり15,000細胞）、10μgのT e t エクスプレス（p r O F 1 4）または熱不活化T e t エクスプレス（75℃で5分間）を0、1、2または4μLのいずれかのX f e c tと混合して前記細胞に添加し、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行する、熱不活化したT e t エクスプレスを使用するルシフェラーゼアッセイの結果を提供する図である。

【図7B】クローン19H e L aレポータ細胞を96ウェルフォーマットでプレーティングし（ウェルあたり15,000細胞）、デオキシリボヌクレアーゼIで（150μLのT e t エクスプレスあたり10ユニット、37℃で30分間）前処理していないまたは前処理したT e t エクスプレスをX f e c tと混合して細胞に添加し、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行する、デオキシリボヌクレアーゼ処理ではT e t エクスプレスの活性は変化しないことを示す図である。

【図7C】クローン19H e L aレポータ細胞を12ウェルフォーマットでプレーティングし（ウェルあたり50,000細胞）し、2μLのリポフェクタミンL T Xを用いて0

10

20

30

40

50

． 5 μ g の pUC19 プラスミド（対照）、p r O F 7 プラスミド、p T e t O n A d v a n c e d プラスミドまたは p T e t O f f A d v a n c e d プラスミドを細胞に形質移入し、翌日にドキシサイクリンを 1 0 0 0 n g / m L まで添加し、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行したことを示す図である。

【図 8】ウェルあたり 5 0 , 0 0 0 細胞のクローン 1 9 H e L a レポータ細胞を 1 2 ウェルフォーマットでプレーティングし、X f e c t 試薬の存在下または非存在下で細胞を 0 、 1 、 1 0 または 1 0 0 μ g の T e t エクスプレス（または派生物）で処理し、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行する、X f e c t のトランス活性化への効果を示す図である。

【図 9】ウェルあたり 5 0 , 0 0 0 細胞のクローン 1 9 H e L a レポータ細胞を 1 2 ウェルフォーマットでプレーティングし、ミラス社の T r a n s i t - S i Q u e s t 試薬（ウェルあたり 1 μ L）の存在下で細胞をウェルあたり 0 、 5 、 1 0 、または 2 0 μ g の T e t エクスプレス（または派生物）で処理し、翌日にルシフェラーゼアッセイを実行する、E 1 2 8 R 突然変異の P T D 活性への効果を示す図である。

【図 1 0】各 p r O F タンパク質の分子量（Mw）、アミノ酸残基数（# a a）および等電点（I s o P t）が表に示され、p r O F 7 タンパク質、p r O F 1 4 タンパク質および p r O F 1 6 タンパク質の一般的な構造を示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 3】

本発明の態様は、分散型タンパク質形質導入ドメインを有する転写モジュレータを使用する誘導性発現系を含む。本発明の態様は、コード配列の発現を誘導するために前記系を使用する方法ならびに本発明の方法の実施に使用するキットをさらに含む。前記系、その構成要素、方法およびキットは様々な異なる用途に使用される。

【0 0 1 4】

本発明が、記載される特定の実施形態に限定されることはなく、当然のことながら、変更され得るものであるということが、本発明をさらに詳細に説明する前に理解されるものとする。本発明の範囲は添付の請求項によってのみ限定されるので、本明細書において使用される用語は単に特定の実施形態を説明することを目的とするものであり、限定的であることを意図したものではないということもまた理解されるものとする。

【0 0 1 5】

数値の範囲が提供される場合、文脈によって別途明確に指示されない限り下限の単位の 1 0 分の 1 まで、その範囲の上限と下限の間の各介在値およびその記載範囲内の他の任意の記載値または介在値が本発明に包含されると理解される。これらのより小範囲の上限と下限がそのより小範囲内に独立して含まれることが可能であり、また本発明に包含されるが、記載範囲内の任意の具体的に除外される限度に従属する。記載範囲が前記限度の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限度の一方または両方を排除する範囲もまた本発明に含まれる。

【0 0 1 6】

本明細書において、用語「約」を前置した数値を用いて一定の範囲が提示される。本明細書において用語「約」を使用して、それが先行する正確な数に逐語的サポートを提供し、ならびにその用語が先行する数に近い数、または近似する数を提供する。数が具体的に列挙した数に近い、または近似しているか判断する際、列挙されていないがそれに近い、または近似する数は、それが提示される文脈において、具体的に列挙された数と実質的に等価である数であり得る。

【0 0 1 7】

別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものと類似または同等の任意の方法および材料もまた、本発明の実施または試験において使用可能であるが、代表的例証的方法および材料がこれから説明される。

10

20

30

40

50

【0018】

本明細書で引用される全ての出版物および特許は、各々個々の出版物または特許が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、本明細書に参照により組み込まれ、そして、それと関連して刊行物が引用される方法および／または材料を開示および説明するために、本明細書に参照により組み込まれる。任意の刊行物の引用は出願日前のその開示についてのものであり、本発明が先行発明により、そのような出版物に先行する権限がないと認めることとして解釈すべきではない。さらに、提供された刊行の日付は実際の公開日と異なる可能性があり、それは個別に確認される必要があり得る。

【0019】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、「その(the)」という単数形は、文脈が明確に指定しない限り複数形の対象物を含むことに留意されたい。さらに、特許請求の範囲は、あらゆる任意的構成要素も除外するように作成してもよいことに留意されたい。したがって、この記述は請求要素の記載と関連した「だけ(solely)」、「のみ(only)」などのような排他的用語、または「消極的」限定を用いるための先行記述としての役割を果たすことを目的とする。

【0020】

本開示を読むことで当業者にとって明らかとなるように、本明細書で説明および例証される個々の実施形態のそれぞれは、本発明の範囲または精神から逸脱することなく他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴と容易に分離される、または組み合わせられることが可能である個別の構成要素および特徴を有する。列挙される事象の順番で、または、論理的に可能である他の任意の順番で任意の列挙される方法を実施することが可能である。

【0021】

誘導性発現系

先に要約したように、本発明の態様には誘導性発現系が含まれる。「誘導性発現系」は、恒常的発現プロトコル、すなわち、細胞内のコード配列の発現が、特定の発現メディエーター成分の有無に関係なく継続するプロトコルと比べて、誘導性発現プロトコル、すなわち、細胞のコード配列の発現が、与えられた刺激、例えば発現メディエーター化合物との接触に応答して生じるプロトコルを実行するのに必要な全ての構成要素を意味する。

【0022】

本発明の誘導性発現系は、転写モジュレータおよび転写モジュレータ応答エレメントを含み、(いくつかの場合では発現メディエーターの存在下に)前記転写モジュレータが前記転写モジュレータ応答エレメントに結合して、所望する通りに、コード配列の発現を制御可能に誘導するものである。本発明の態様には、以下に詳述するような分散型タンパク質形質導入ドメイン(PTD)を含む転写モジュレータが含まれる。いくつかの場合では、前記誘導性発現系は、原核生物のオペロン、例えば、lacオペロン、トランスポゾンTn10、テトラサイクリンオペロンなどをベースとする。いくつかの場合では、前記誘導性発現系は、真核生物のシグナル伝達経路、例えば、ステロイド受容体をベースとする発現系、例えば、エストロゲン受容体またはプロゲステロンをベースとする発現系、メタロチオネインをベースとする発現系；エクジソンをベースとする発現系をベースとする。したがって、転写モジュレータおよび転写モジュレータ応答エレメントは、様々な異なる野生型の系に由来する場合がある。単に説明の便宜上、これから、主にTetをベースとする系、すなわち、転写モジュレータおよび転写モジュレータ応答エレメントが、トランスポゾンTn10テトラサイクリンオペロンに由来する系に関して本発明をさらに説明する。しかしながら、本発明は、lac-応答配列、tet応答配列などの任意の原核生物系；ステロイド応答配列、血清応答配列、熱ショック応答配列、メタロチオネイン応答配列、転写因子結合ドメインなどの任意の真核生物系；HIV Rev応答配列などのウィルス系に由来する転写モジュレータおよび転写モジュレータ応答エレメントに容易に適用可能であるので、本発明は、これらに限定されない。

【0023】

特定の実施形態において、本発明の誘導性発現系は：（a）転写モジュレータに応答する誘導性発現カセットを含む宿主細胞；（b）分散型タンパク質形質導入ドメインを含む転写モジュレータ；および（c）発現メディエーターを含む。使用の際に（例えば、以下に詳述するような方法において）、コード配列の誘導性発現（例えば、目的の遺伝子、インヒビターRNA、他の非タンパク質コードRNAなど）が得られるように、異なる構成要素が作成される。これらの構成要素のそれぞれを、これから以下に詳細に説明する。

【0024】

宿主細胞

本発明の様々な実施形態において使用される宿主細胞は、系の転写モジュレータに応答する誘導性発現カセットを含む細胞である（以下に詳細に説明する）。誘導性発現カセットは、細胞内で、所望する通りに、染色体に組み込まれ、またはエピソームにより保持されていてもよい。染色体に組み込まれている場合、発現カセットは、安定的に宿主細胞の染色体の一部である。エピソームに保持されている場合、発現カセットは、宿主細胞の染色体の一部ではない、プラスミドなどのベクター、BACなどの人工染色体に存在する。誘導性発現カセットの長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、誘導性発現カセットの長さは、0.1 kb～150 kb、例えば5～10 kbを含む1～10 kbの範囲である。

【0025】

目的の誘導性発現カセットは、コード配列に機能するように結合している転写モジュレータ応答性プロモータを含んでいる。目的の誘導性発現カセットの転写モジュレータ応答性プロモータは、お互いに機能するように結合した転写モジュレータ応答エレメントおよび最小プロモータ配列の両方を含んでおり、転写モジュレータ応答エレメントは、発現カセットの特有の構成に依存し、最小プロモータ配列の上流または下流のいずれでもあり得る。転写モジュレータ応答エレメントとして興味深いのは、原核生物のオペロンのオペレーター配列、例えば、tetオペレーター配列である。いくつかの場合では、転写モジュレータ応答エレメントは、少なくとも1個のtetオペレーター配列を含んでいる。一実施形態において、転写モジュレータ応答エレメントは、2つ以上のtetオペレーター配列の複数コピー（例えば、多量体を形成し、またはコンカテマー化したコピー）を含んでいる。目的の1つの構成においては、tetオペレーター配列は、適切な間隔で、最小プロモータ配列の上流（すなわち、5'）に、ホスホジエステル結合で機能するように結合し、tetオペレーター配列に調節タンパク質（例えば、調節融合タンパク質）を結合させることにより目的のヌクレオチド配列の転写を可能にしている。転写モジュレータ応答エレメントの長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、この配列の長さは、5～1000塩基対、例えば15～35塩基対を含む10～100塩基対の範囲である。目的とする特定のtetオペレーター配列には、以下のtet転写モジュレータ応答性プロモータ中に見いだされるもの、すなわち、全てカリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から入手できる、P_{TRE} プロモータ、P_{TRE-Tight} プロモータ、およびP_{TREG3} プロモータが含まれるが、これらに限定されない。

【0026】

先に要約したように、転写モジュレータ応答性プロモータは、さらに転写モジュレータ応答エレメントと機能するように結合した最小プロモータ配列を含んでいる。目的の最小プロモータ配列は、それ自体は転写されないが、転写のための転写装置を位置につける役目を（少なくとも一部において）果たす配列である。「最小プロモータ」という用語には、結合している被転写コード配列のために転写の開始部位を規定するが、それ自体では、できたとしても、効率的に転写を開始することができない部分的プロモータ配列が含まれる。したがって、そのような最小プロモータの活性は、機能するように結合した転写モジュレータ応答エレメント（例えば、1つ以上のtetオペレーター配列）への転写モジュレータ（例えば、後述するような転写モジュレータタンパク質）の結合に依存する。目的の最小プロモータには、ヒトサイトメガロウイルスに由来する最小プロモータ（例えば、+75～-53位のヌクレオチド、+75～-31位のヌクレオチドなど）；ヒトHSV

チミジンキナーゼプロモータ；ヒトU6プロモータなどが含まれるが、これらに限定されない。目的のプロモータには、例えば、Gossen, M. および Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 に記載されているものが含まれる。最小プロモータ配列の長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、この配列の長さは25~1000、例えば50~100塩基対の範囲である。

【0027】

いくつかの場合では、tet 応答配列および最小プロモータは、任意の都合のよい配列であり得るリンカー配列によって分離されていてもよい。そのような実施形態において、転写モジュレータ応答エレメント（例えばtetオペレーター配列）と最小プロモータの間の距離は様々であり得るが、いくつかの場合では、tetオペレーター配列は、最小プロモータの上流500塩基対以内、例えば、300塩基対、例えば、200塩基対を含む400塩基対以内に位置する。

10

【0028】

目的とする特定の転写モジュレータ応答エレメントの構成には、10個のtetオペレーター配列と結合したサイトメガロウイルス最小プロモータ、10個のtetオペレーター配列と結合した単純ヘルペスウイルス最小tkプロモータなどが含まれるが、これらに限定されない。目的とする特定の転写モジュレータ応答性プロモータには、以下の市販の製品中に見いだされるもの、すなわち全てカリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から入手できる、P_{TRE} プロモータ、P_{TRE-Tight} プロモータ、およびP_{TREG3} プロモータが含まれる。

20

【0029】

先に要約したように、転写モジュレータが転写モジュレータ応答エレメントに結合して、コード配列が発現するように、転写モジュレータ応答性プロモータエレメントはコード配列に機能するように結合している。誘導性発現カセットのコード配列は、目的のタンパク質または目的の核酸（例えば、阻害性RNA）をコード化することができる。したがって、発現カセットのコード配列の転写および得られたmRNAの翻訳を誘導して、特定の実施形態において、宿主細胞または動物中で目的のタンパク質が産生される。あるいは、被転写コード配列は、活性RNA分子、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、リボザイム、miRNAなどをコードし得る。宿主細胞または動物中での活性RNA分子の発現は、宿主内で機能を調節するために用いることができる（例えば、タンパク質をコードするmRNAの転写を阻害することによる目的のタンパク質の産生の防止）。コード配列の長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、コード配列は、10塩基対~15,000塩基対、例えば100塩基対~1000塩基対を含む50塩基対~5,000塩基対の範囲の長さを有する。

30

【0030】

誘導性発現カセットのコード配列は、外来性または内在性であり得る。「外来性」コード配列は、宿主細胞、例えば宿主のゲノムに導入されるヌクレオチド配列である。外来性コード配列は、宿主のゲノムのどこかに存在する可能性が無く（例えば、外来性ヌクレオチド配列）、または宿主のゲノム内に存在する配列であるが、ゲノムの異なる部位に組み込まれている追加コピーの配列であり得る。「内在性」コード配列は、宿主のゲノム内に存在するヌクレオチド配列である。野生型プロモータが調節タンパク質応答配列と置換され、内在性遺伝子が誘導性発現カセットの一部となるように、内在性遺伝子がオペレーター配列と機能するように結合し、オペレーター配列組換えベクターと内在性遺伝子配列との間の相長的組換えにより本発明の誘導性発現カセットを作成することが可能である。

40

【0031】

誘導性発現カセットを含む宿主細胞は多種多様であり得る。宿主細胞は単細胞、細胞株、または多細胞生物の構成要素であり得る。いくつかの場合では、細胞は真核細胞である。目的とする特定の細胞型のいくつかの例には、細菌、酵母（例えば、出芽酵母（*S. cerevisiae*）、分裂酵母（*S. pombe*）、ピキア・パストリス（*P. pas*

50

t o r i s)、クルイペロミセス・ラクティス(K. l a c t i s)、ハンセンラ・ポリモルファ(H. p o l y m o r p h a)) ; 真菌、植物細胞および動物細胞が含まれる。目的の宿主細胞には、動物細胞が含まれ、ここで、動物細胞の特定の種類には、昆虫、線形動物、または哺乳動物の細胞が含まれるが、これらに限定されない。例示の目的で、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、マウス、非ヒト霊長類およびヒトの細胞を含む様々な哺乳動物細胞を用いることができる。様々な種のうちで、造血性、神経、グリア、間充織、皮膚、粘膜、間質、筋肉(平滑筋細胞を含む)、脾臓、網膜内皮、上皮、内皮、肝臓、腎臓、胃腸、肺、繊維芽細胞、ならびに他の細胞型などの様々な細胞型を用いることができる。目的の造血細胞には、赤血球、リンパ球または骨髄単球性系列、ならびに筋芽細胞および繊維芽細胞と関与する任意の有核細胞が含まれる。造血、神経、間質、筋肉、肝臓、肺、胃腸細胞などの幹細胞および前駆細胞、ならびにE S細胞、e p i - E S細胞、および人工多能性幹細胞(i P S細胞)などの間充織幹細胞でもまた興味深い。

10

【0032】

任意の都合のよいプロトコルを用いて宿主細胞を調製することができ、プロトコルは、標的細胞の性質、標的細胞の位置、例えば、インビボかインビトロか、などに依存して変更し得る。所望であれば、ウイルスベクターなどのベクターを、所望の通りに誘導性発現カセットを含むように細胞を操作するために使用することができる(例えば、カリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から市販されているようなレトロウイルスおよびアデノウイルスベクターを参照されたい)。宿主細胞および/または発現コンストラクトの性質に応じて、目的のプロトコルには、エレクトロポレーション、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿法、形質移入剤介在性導入、直接マイクロインジェクション、ウイルス感染などが含まれ得る。方法の選択は、通常は、形質転換される細胞のタイプ、形質転換が実施される環境(すなわち、インビトロ、エクスピボまたはインビボ)に依存する。これらの方法の全般的な考察は、Ausubelら、分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology), 第3版、WileyおよびSons, 1995に見出すことができる。目的の誘導性発現カセットを含むベクター核酸を細胞に導入した後、約1~24時間、時々、選択しながら、37℃で、通常にインキュベートする。宿主細胞内で発現カセットを長時間維持することが望ましい場合、安定的組み込みプロトコルを用いてもよい。

20

【0033】

所望であれば、宿主細胞はインビトロまたはインビボで操作してもよい。インビトロで操作される宿主細胞については、そのような細胞は、最終的に宿主生物に導入されることができる。細胞の性質に応じて、細胞を、多種多様の方法により、宿主生物、例えば哺乳動物細胞に導入することができる。注入により造血細胞を脈管系に投与することができ、ここで、 10^4 個以上の細胞、いくつかの場合では 10^{10} 個以下の細胞、例えば 10^8 個以下の細胞が投与される。使用される細胞の数は、様々な環境、導入の目的、細胞の寿命、用いられるプロトコル、例えば、投与の回数、細胞の増殖能力、治療薬の安定性、治療薬の生理的要求等に依存するであろう。あるいは、移植片として用い得る皮膚細胞については、細胞の数は、火傷または他の外傷に塗布される層のサイズに依存するであろう。筋芽細胞または繊維芽細胞については、細胞の数は 10^4 個以上であってもよく、いくつかの場合では 10^8 個以下であり、ここで、細胞は分散体として適用され、通常は目的の部位、またはその近くに注射される。細胞は生理的に許容される媒体中にあり得る。

30

40

【0034】

転写モジュレータ

先に要約したように、本発明の系の他の構成要素は転写モジュレータ(調節タンパク質とも呼ばれる)である。目的の転写モジュレータは、宿主細胞内で、例えば、上述したように、誘導性発現カセットの応答配列に結合することにより、例えば、上述したように、誘導性発現カセットの発現を調節、例えば、誘導または抑制するように構成される。目的の転写モジュレータの配列は様々であり得るが、いくつかの場合では、その配列は5~5000個、例えば100~700個のアミノ酸残基を含む。本発明の実施形態の転写モジ

50

ュレータは、転写モジュレータ（すなわち、調節性）ドメイン、発現調節ドメインおよび分散型タンパク質形質導入ドメインを含む融合タンパク質である。転写モジュレータのこれらの構成要素のそれぞれについて、以下に詳細に説明する。

【0035】

転写モジュレータ（すなわち、調節性）ドメインは、誘導性発現カセットの転写モジュレータ応答エレメントと結合するドメインである。転写モジュレータドメインは、発現メディエーターの存在下、または非存在下のいずれにおいても、応答配列と結合するように構成されている。発現メディエーターは、例えば、転写モジュレータのメディエーター結合ドメインで転写モジュレータと結合し、そうすることにより、転写モジュレータが転写モジュレータ応答エレメントと結合するか否かを媒介する化合物である。いくつかの場合では、転写モジュレータドメインは、発現メディエーターが有るときに応答配列と結合するが、発現メディエーターが無いときには結合しないものである。あるいは、いくつかの場合では、転写モジュレータドメインは、発現メディエーターが無いときに応答配列と結合するが、発現メディエーターが有るときには結合しないものである。転写モジュレータドメインの長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、転写モジュレータドメインは、5～1,000個のアミノ酸、例えば、5～15個のアミノ酸残基を含む、5～500個のアミノ酸の範囲である。

【0036】

転写モジュレータドメインとして興味深いのは、tetをベースとする転写モジュレータドメインであり、このモジュレータドメインは1つ以上のTetRドメイン、すなわち、野生型TetRタンパク質中に見いだされるドメイン、または野生型TetRタンパク質中に見いだされるドメインに由来するドメインを含む。

【0037】

例えば、転写モジュレータが発現メディエーターの非存在下で応答配列と結合する特定の実施形態において、転写モジュレータドメインは、野生型Tetリプレッサー内に見られるドメイン（テトラサイクリンなどの発現メディエーターの非存在下にtetオペレーター配列と結合するが、存在下には結合しない）であり得る。様々なクラスの様々な異なる野生型Tetリプレッサーを転写モジュレータドメインの供給源として使用することができ、目的の野生型Tetリプレッサーのクラスには、TetR(A)クラス、例えば、Tn1721トランスポゾンに担持されるTetリプレッサー（Allmeirら、(1992) Gene 111(1):11-20;NCBI(米国国立医学図書館、国立生物工学情報センタ)アクセッション番号X61367およびコードされるタンパク質配列のデータベース相互参照番号(GI:)GI:48198);TetR(B)クラス、例えば、Tn10テトラサイクリン耐性決定因子によってコードされるTetリプレッサー（Postleら、(1984) Nucleic Acids Research 12(12):4849-63,アクセッション番号X00694,GI:43052);TetR(C)クラス、例えば、プラスミドpSC101のテトラサイクリンリプレッサー（Brownら、(1985) Mol. Biol. Evol. 2(1):1-12,アクセッション番号M36272,GI:150496);TetR(D)クラス、例えば、サルモネラ・オルドネズ（Salmonella ordonez）において特定されたTetリプレッサー（Allardら、(1993) Mol. Gen. Genet. 237(1-2):301-5,アクセッション番号X65876,GI:49075);TetR(E)クラス、例えば、エンテロバクター科のメンバーから単離されたTetリプレッサー（Tovarら、(1988) Mol. Gen. Genet. 215(1):76-80,アクセッション番号M34933,GI:155020);TetR(G)クラス、例えば、ビブリオ・アンギラルム（Vibrio anguillarum）において特定されたTetリプレッサー（Zhaoら、(1992) Microbiol Immunol 36(10):1051-60,アクセッション番号S52438,GI:262929);TetR(H)クラス、例えば、パストレラ・ムルトシダ（Pasteurella multocida）から単離されたプラスミドpMV11によってコード

10

20

30

40

50

されるTetリプレッサー(Hansenら、(1993)Antimicrob. Agents. Chemother. 37(12):2699-705, アクセション番号U00792, GI:392872);TetR(J)クラス、例えば、プロテウス・ミラビリス(Proteus mirabilis)からクローニングされたTetリプレッサー(Magalhaesら、(1998)Biochim. Biophys. Acta. 1443(1-2):262-66, アクセション番号AF038993, GI:410-4706);TetR(Z)クラス、例えば、グラム陽性微生物、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)から単離されたpAG1プラスミドによってコードされるTetリプレッサー(Tauchら、(2000)Plasmid 44(3):285-91, アクセション番号AAD25064, GI:4583400)が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、転写モジュレータドメインは、クラスBのtetリプレッサー、例えば、Tn10由来Tetリプレッサーである。発現メディエーターの非存在下に応答配列と結合する、特定の転写モジュレータドメインの例には、以下の転写モジュレータ、Tet-Off転写モジュレータおよびTet-Off Advanced転写モジュレータ内に見出される転写モジュレータが含まれるが、これらに限定されない。両者とも、カリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から入手できる。

10

【0038】

他の例として、発現メディエーターの存在下で転写モジュレータが応答配列と結合する特定の実施形態において、転写モジュレータドメインは、発現メディエーターの存在下で調節性応答配列と結合するのみである、変異型Tetリプレッサードメイン内に見出されるドメインであり得る。変異型Tetリプレッサーと野生型Tetリプレッサーとのアミノ酸の相違は、1個以上のアミノ酸の置換、1個以上のアミノ酸の欠失、または1個以上のアミノ酸の付加であり得る。いくつかの場合では、本発明の変異型Tetリプレッサーは以下の機能特性を有する：1)ポリペプチドがTetオペレーター配列と結合することができる、すなわち、野生型TetリプレッサーのDNA結合特異性を維持している；2)野生型Tetリプレッサーと比較して、反対の様式で発現メディエーターによって調節される、すなわち、変異型Tetリプレッサーは、発現メディエーターの非存在下よりもむしろ発現メディエーターの存在下で調節性応答配列と結合するのみである。

20

【0039】

一実施形態において、上述の機能特性を有する変異型Tetリプレッサー転写モジュレータは、野生型Tetリプレッサーの配列中のアミノ酸残基を置換することによって作製される。例えば米国特許第5,789,156号に記載されたように、71、95、101および102位のアミノ酸においてアミノ酸置換を有するTn10由来Tetリプレッサーは、発現メディエーターの存在下に調節性応答配列と結合する。変異型Tetリプレッサーの所望の機能特性を維持する、これらのアミノ酸部位、または他のアミノ酸部位でのその他のアミノ酸の置換、欠失または付加は、本発明の方法の範囲内である。上記の変異の他に、さらなる適切な変異型Tetリプレッサー(例えば、上述した所望の機能特性を有する)を、米国特許第5,789,156号に記載された通りに、野生型Tetリプレッサーの突然変異生成および選択により作製することができる(実施例1)。変異型Tetリプレッサーは、例えば、以下のようにして作製および選択することができる。野生型Tetリプレッサーをコードする核酸(例えば、DNA)をランダム変異導入に供し、得られた変異核酸を発現ベクターに導入し、スクリーニングのために宿主細胞に導入する。置換型テトラサイクリン化合物が存在する場合にのみTetオペレーター配列に結合するTetリプレッサーの選択を可能にするようなスクリーニングアッセイを用いることができる。例えば、その中でTetオペレーター配列がLacリプレッサーをコードする遺伝子の発現を制御し、Lacリプレッサーが選択マーカー(例えば、薬剤耐性)をコードする遺伝子の発現を制御する大腸菌株中に、発現ベクター中の変異した核酸のライブラリーを導入することができる。細菌中でTetオペレーター配列にTetリプレッサーが結合することにより、Lacリプレッサーの発現が阻害され、その結果、選択可能なマーカー

30

40

50

一遺伝子の発現が誘導されるであろう。マーカー遺伝子を発現する細胞は、選択可能な表現型（例えば、薬剤耐性）に基づいて選択される。野生型Tetリプレッサーについては、テトラサイクリンの非存在下に、選択可能なマーカー遺伝子の発現が起こるであろう。変異型Tetリプレッサーをコードする核酸は、置換されたテトラサイクリン化合物の存在下でのみ、細菌中で選択マーカー遺伝子の発現を誘導することのできる核酸の能力に基づいて、この系を用いて選択することができる。

【0040】

標準的な分子生物学的方法、例えば、ヌクレオチド変異を組み込んだオリゴヌクレオチドプライマーを用いる部位特異的突然変異導入法またはPCR-突然変異導入法により、例えば、（例えば、上述したような、71、95、101および／または102位に）特定の

10

変異を有する変異型Tetリプレッサーを、野生型リプレッサーをコードする核酸にヌクレオチドの変異を導入することによって作製することができる。また、変異型Tetリプレッサーをライブラリーからの選択により特定する場合は、その変異した核酸をライブラリーベクターから回収することができる。

【0041】

発現メディエーターの存在下に発現を誘導する転写モジュレータの具体例には、以下の転写モジュレータ内に見いだされる転写モジュレータドメインが含まれるが、これらに限定されない。以下のモジュレータとは、Tet-On転写モジュレータ；Tet-On Advanced転写モジュレータおよびTet-On 3G転写モジュレータである（いずれも、カリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から入手できる）。

20

【0042】

前記転写モジュレータドメインに加え、転写モジュレータは、転写モジュレータドメインに機能するように結合している、例えば、融合している発現調節ドメインをさらに含んでいる。発現調節ドメインは、誘導性発現カセットの転写を調節するドメインであり、調節活性は、転写の活性化または抑制（suppression）（すなわち、抑制（repression））である。

【0043】

したがって、いくつかの場合では、発現調節ドメインは、真核生物細胞中で、転写を直接的または間接的に活性化する。これらの実施形態において、発現調節ドメインは、活性化ドメイン、すなわち、発現活性化ドメインと呼ばれる場合がある。これらの実施形態において、活性化ドメイン、それ自体が転写を活性化する活性を有している（すなわち、ドメインが転写を直接活性化する場合がある。発現活性化ドメインは、例えば、調節タンパク質と相互作用する転写活性化タンパク質のリクルートメントを通して、間接的なメカニズムにより転写を活性化することもできる。転写モジュレータ中に、任意の好都合な発現活性化ドメインが存在していてもよい。発現活性化ドメインの長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、5～1000、例えば5～15個のアミノ酸を含む5～500の範囲である。目的の発現活性化ドメインには、単純ヘルペスウイルス粒子タンパク質16（本明細書においてはVP16と呼び、そのアミノ酸配列はTriezenberg, S. J. ら、（1988）Genes Dev. 2:718-729に開示されている）、酸性転写活性化ドメイン、プロリンに富む転写活性化ドメイン、セリン／スレオニンに富む転写活性化ドメイン、およびグルタミンに富む転写活性化ドメインが含まれるが、これらに限定されない。酸性転写活性化ドメインの例には、既に説明したVP16領域、およびGAL4のアミノ酸残基753-881、NF- κ B RelAのアミノ酸残基416-550、またはRelAのアミノ酸残基535-545の多量体、およびCREBのアミノ酸残基165-252（CADドメイン）が含まれる。プロリンに富む転写活性化ドメインの例には、CTF/NF1のアミノ酸残基399-499、およびAP2のアミノ酸残基31-76が含まれる。セリン／スレオニンに富む転写活性化ドメインの例には、ITF1のアミノ酸残基1-427、およびITF2のアミノ酸残基2-451が含まれる。グルタミンに富む転写活性化ドメインの例には、Oct1のアミノ酸残基175-2

30

40

50

69、およびSp1のアミノ酸残基132-243が含まれる。上述の領域およびその他の有用な転写活性化ドメインのそれぞれのアミノ酸配列は、Seipel, K.ら. (EMBO J. (1992) 13: 4961-4968)に開示されている。

【0044】

上述したように、いくつかの場合では、発現活性化ドメインは、調節タンパク質と相互作用する転写活性化因子をリクルートすることにより、間接的に転写を活性化することができる。例えば、発現活性化ドメインは、宿主細胞内に存在する内在性活性化因子などの転写活性化タンパク質とのタンパク質-タンパク質相互作用を調節することができる。そのようなドメインの例には、ロイシンジッパー、ヘリックス・ループ・ヘリックスドメインおよびジンクフィンガードメインが含まれる。

10

【0045】

発現メディエーターの存在下に発現を誘導する発現活性化ドメインの具体例には、以下の転写モジュレータ内に見いだされる発現活性化ドメインが含まれるが、これらに限定されない。以下のモジュレータとは、Tet-On転写モジュレータ、Tet-On Advanced転写モジュレータおよびTet-On 3G転写モジュレータである（いずれも、カリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から入手できる）。

【0046】

先に概説したように、発現調節ドメインは、真核生物細胞内で転写を直接的または間接的に抑制するドメインであり得る。これらの実施形態において、発現調節ドメインは、抑制ドメイン、すなわち、発現抑制ドメインと呼ばれる場合がある。これらの実施形態において、抑制ドメイン自体が転写抑制活性を有している場合がある（すなわち、ドメインは、転写を直接抑制する）。「転写を抑制する」とは、発現抑制ドメインが存在しない対照の状態と比較して、少なくとも検出可能なほど転写活性が低下することを意味し、転写が検出可能でないレベルまで転写が阻害される実施形態を含む。発現抑制ドメインは、例えば、調節タンパク質と相互作用する転写抑制タンパク質のリクルートメントを通して、間接的なメカニズムにより転写を抑制することもできる。転写モジュレータ中に、任意の好都合な発現抑制ドメインが存在していてもよい。発現抑制ドメインの長さは様々であり得るが、いくつかの場合では、5~1000、例えば5~100個のアミノ酸を含む5~500の範囲である。目的の発現抑制ドメインには、以下の転写サプレッサー内に見いだされる抑制ドメインが含まれるが、つまり、Kruppelタンパク質、エングレイルドタンパク質、knirpsタンパク質、pairedタンパク質およびeven-skippedタンパク質（全てショウジョウバエ由来）；SIN3、GAL80およびTUP1タンパク質（全て出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）由来）；tetリプレッサー；Egr-1、WT1、RARα、KRAB、verA、YY1、ADE1B、E4B4、SCIP、kid-1、Znf2およびkox-1タンパク質等であるがこれらに限定されない。いくつかの場合では、ドメインは、Kid1などの様々なジンクフィンガータンパク質内に見いだされるKRABドメインである。特定の実施形態のうち興味深いものは、クロンテックラボラトリーズ社（マウンテンビュー、カリフォルニア州）から入手できるtTS転写モジュレータ内に見いだされる抑制ドメインである。

20

30

40

【0047】

調節性（すなわち、転写モジュレータ）ドメインおよび発現調節ドメインに加え、例えば、上述したように、本発明の転写モジュレータは、分散型タンパク質形質導入ドメイン、すなわち分散型PTDをさらに含んでいる。タンパク質形質導入は、細胞の細胞膜を通過するタンパク質の転位を意味する。タンパク質形質導入ドメインは、タンパク質にタンパク質形質導入能力を与える、タンパク質のドメインまたは領域を意味する。したがって、タンパク質形質導入ドメインは、細胞外部、例えば、細胞が存在する培地から細胞質に通過する能力を転写モジュレータに与える。したがって、転写モジュレータは細胞外部から細胞膜を通過して細胞の細胞質に流通することができる。

50

【0048】

本発明の転写モジュレータ中のタンパク質形質導入ドメインは分散型タンパク質導入ドメインである。分散型とは、タンパク質形質導入ドメインのアミノ酸が、ポリペプチド中に連続したアミノ酸の別個のドメインとして分けられているのではなく、ポリペプチドの全体にわたって分布していることを意味する。したがって、タンパク質形質導入ドメインは、タンパク質を三次元構造に折りたたまれると、タンパク質にタンパク質形質導入活性を与えるタンパク質表面上の「塩基性パッチ」を構成する複数の非連続的なアミノ酸残基からなる。言い換えると、タンパク質が立体構造をとるとすると、塩基性パッチの一部である、連続しない複数の残基の相互作用から、分散型タンパク質形質導入ドメインが生じる。「塩基性パッチ」は、3%以上、例えば、10%以上を含む5%以上の塩基性アミノ酸残基、すなわち、ヒスチジン（H）、リジン（K）またはアルギニン（R）を含む、折りたたまれたタンパク質の表面領域である。所与の塩基性パッチの塩基性残基の総数は様々であり得るが、いくつかの場合では、2～50個、例えば、5～20個を含む3～30個、例えば2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、いくつかの場合では、6個以上、8個以上、または10個以上、例えば20個以上の残基の範囲である。塩基性パッチの表面積は様々であり得るが、いくつかの場合では、5～10,000 Å²、例えば25～100 Å²の範囲である。分散型タンパク質形質導入ドメインの塩基性パッチは連続しないアミノ酸残基から生じるので、塩基性パッチに参与する（すなわち、そのメンバーである）いくつかの残基は、タンパク質の一次配列において非連続的である。したがって、分散型タンパク質形質導入ドメインの塩基性パッチに存在する2個以上の残基は、1以上の残基長、例えば3以上の残基長を含む2以上の残基長、例えば、4以上、5以上、10以上の残基長である領域またはドメインによって一次配列内でお互いに分離されている可能性がある。塩基性パッチに参与し、1個以上の介在性残基によって一次配列内で分離されている残基対の数は様々であり得るが、この数は2以上、3以上、4以上、5以上、10以上などである。したがって、分散型タンパク質形質導入ドメインは、それが見いだされるタンパク質の一次配列内で連続した残基から構成される「標準的な」タンパク質形質導入ドメインとは区別される。したがって、分散型タンパク質形質導入ドメインは、非標準的タンパク質形質導入ドメインとしてみなされ得る。

【0049】

いくつかの実施形態において、例えば、タンパク質が立体構造をとるとすると、タンパク質表面上に位置する中性残基および酸性残基を塩基性残基で置換してタンパク質表面上の塩基性残基パッチを作製することにより、非形質導入ポリペプチド内に分散型タンパク質形質導入ドメインを作製することができる。その結果、これらの変異により作製された分散型タンパク質形質導入ドメインは、変異型転写モジュレータが細胞膜を通過して形質導入することを促進するであろう。いくつかの実施形態において、細胞膜を通過する、いくらかの能力を示すタンパク質の形質導入は、タンパク質中の既存の分散型タンパク質形質導入ドメインを修飾することによって、例えば、タンパク質表面上の塩基性パッチのサイズまたは位置を修飾することによって改良することができる。言い換えると、転写モジュレータを、改良した分散型タンパク質形質導入ドメインを含むように変異させる。そのような修飾は、既存の分散型タンパク質形質導入ドメインよりも2倍以上、例えば、3倍以上、または4倍以上、いくつかの場合では5倍以上、6倍以上、7倍以上、または8倍以上、例えば、10倍以上、15倍以上、または20倍以上、タンパク質形質導入の効率を向上させることができる。分散型PTDを含む形質導入タンパク質は、任意の都合のよいプロトコルを用いて製造することができる。所望の分散型PTDを提供するためのコードタンパク質の配列中の標的とする変異を生成するための任意の都合のよいプロトコルを用いて、元の形質導入タンパク質をコードする核酸を変異させることができる。DNA配列またはそのような変異のタンパク質産物は、通常、本明細書に提供される配列と実質的に類似しているであろうが、例えば、それぞれ少なくとも1個のヌクレオチドまたはアミノ酸が異なり、少なくとも2個異なっているけれどもよいが、多くとも約10個のヌクレオチドまたはアミノ酸が異なっている。配列の変化は、置換、挿入、欠失またはその組み合わせ

であり得る。欠失は、さらに大きな変化、例えば、ドメインまたはエクソンの欠失、例えば連続した10、20、50、75、100、150またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失を含んでいてもよい。クローニングした遺伝子のインビトロにおける突然変異生成法は公知である。部位特異的突然変異生成のためのプロトコルの例は、Gustinら、(1993)、バイオテクニクス (Biotechniques) 14:22; Barany (1985), Gene 37:111-23; Colicelliら、(1985), Mol. Gen. Genet. 199:537-9; および Prentkiら、(1984), Gene 29:303-13に見出すことができる。部位特異的突然変異生成法は、Sambrookら、分子クローニング (Molecular Cloning) : 実験室指針 (A Laboratory Manual), CSH Press 1989, pp. 15. 3-15. 108; Weinerら、(1993), Gene 126:35-41; Sayersら、(1992), バイオテクニクス 13:592-6; JonesおよびWinistorfer (1992), バイオテクニクス 12:528-30; Bartonら、(1990), 核酸リサーチ (Nucleic Acids Res) 18:7349-55; MarottiおよびTomich (1989), Gene Anal. Tech. 6:67-70; ならびにZhu (1989), Anal Biochem 177:120-4に見出すことができる。分散型タンパク質形質導入ドメインを作製するために、または、例えば、改良されたタンパク質形質導入ドメインを作製するために既存のタンパク質形質導入ドメインを改変するために変異し得る中性残基または酸性残基は、任意の都合のよい方法、例えば、RaptorX、ESyPred3D、HHpred、Phyre、Phyre2などの公表されている3Dタンパク質モデリングソフトウェアを用いて決定することができる。同様に、これらの残基における変異が、タンパク質の形質導入を促進または向上することを確認するために用いることのできる任意の都合のよい方法は、免疫組織化学アッセイ、発現アッセイなどの任意の都合のよい方法により容易に確認することができる。

【0050】

いくつかの場合では、転写モジュレータは、転写モジュレータドメイン、発現活性化ドメインおよび分散型PTDに加え、1つ以上の追加のドメインを含んでいてもよい。転写モジュレータは、タンパク質タグドメイン、例えば、転写モジュレータのための精製タグとしての機能を果たすタグ配列を含んでいてもよい。任意の都合のよいタグ配列が使用され、米国特許第7, 176, 298号、米国特許出願公開第20090023898号（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載された配列が含まれるが、これらに限定されない。特定の目的のタグ配列には、6×Hisタグ、6×Hisタグなどが含まれるが、これらに限定されない。存在する場合、そのようなタグは長さが様々であり得るが、いくつかの場合では、5～500個のアミノ酸、例えば6～12個のアミノ酸を含む5～100個のアミノ酸の範囲である。タグは、転写モジュレータ内の任意の都合のよい部位に位置していてもよく、いくつかの場合では、タグドメインは、転写モジュレータドメインと発現活性化ドメインとの間に位置する。目的とする他の任意のドメインはスペーサドメインである。存在する場合には、スペーサドメインは長さが様々であり得るが、いくつかの場合では、2～50個、例えば5～15個のアミノ酸の範囲である。スペーサドメインの配列は任意の都合のよい配列であり得るが、いくつかの場合では、その配列は、ポリアラニン配列、ポリグリシン配列、または混合アミノ酸配列である。タグドメインと同様に、スペーサドメインは、転写モジュレータの任意の都合のよい部位に位置していてもよく、いくつかの場合では、タグドメインは転写モジュレータと発現活性化ドメインとの間に位置する。目的とする1つの構成は、例えば、以下に詳細に説明するp r O F 7およびp r O F 14タンパク質に見られるような、転写モジュレータドメイン-タグドメイン-スペーサドメイン-発現活性化ドメインである。

【0051】

先に概説したように、いくつかの実施形態において、転写モジュレータは、tet転写モジュレータ、例えば、Tet-Off、Tet-Off Advanced、Tet-

On、Tet-Off Advanced、Tet-Off-3GまたはrTS転写モジュレータである（これらは全てカリフォルニア州、マウンテンビューのクロンテックラボラトリーズ社から入手できる）。これらの特定の転写モジュレータのアミノ酸配列を以下に示す。

【0052】

【表1】

Tet-Off（配列番号：3）

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYS SRARTK
NNYGSTIEGLLDLPDDDAPEEAGLAAPRLSFLPAGHTRRLSTAPPTDVSLGDEL
HLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPPGFTPHDSAPYGALDMADFEFE
QMFTDALGIDEYGG

10

【0053】

【表2】

Tet-Off Advanced（配列番号：4）

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIICGLEKQLKCESGGPADALDDF
DLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPG

20

【0054】

【表3】

Tet-On（配列番号：5）

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLD RHHTHFCPLKGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRNGAKVHSDTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYS SRARTK
NNYGSTIEGLLDLPDDDAPEEAGLAAPRLSFLPAGHTRRLSTAPPTDVSLGDEL
HLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPPGFTPHDSAPYGALDMADFEFE
QMFTDALGIDEYGG

30

40

【0055】

【表 4】

Tet On Advanced (配列番号: 6)

MSRLDKSKVINGALELLNGVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
 LPIEMLDLRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
 KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEEQEHHQVAKEERET
 PTTDSMPPLLRQAIELFDRQGAEPALFGLLELIICGLEKQLKCESGGPADALDDF
 DLDMLPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPG

10

【0056】

【表 5】

Tet On-3G (配列番号: 7)

MSRLDKSKVINSALELLNGVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
 LPIEMLDLRHHTHSCPLEGESWQDFLRNNAKSYRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
 KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEEQEHHQVAKEERET
 PTTDSMPPLLRQAIELFDRQGAEPALFGLLELIICGLEKQLKCESGGPTDALDDF
 DLDMLPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPG

20

【0057】

【表 6】

tTS (配列番号: 8)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVRNKQTLNMN
 LSEAILAKHHTRSAPLPTEWQQFLQENALSFRKALLVHRD GARLHIGTSPTPP
 QFEQAE AQLRCLCDAGFSVEEALFILQSISHFTLGAVLEE QATNQIENNHVIDAA
 PPLLQEA FN IQARTSAEMAFHFG LKSLIFGFS AQLDEKKHTPIEDGNKPKKKRKL
 AVSVTFEDVA VLFTRDEWKKLDLSQRS LYREVMLENYSNLAS MAGFLFTKPKVI
 SLLQQGEDPW

30

【0058】

ある実施形態において、転写モジュレータは、これらの特定の転写モジュレータの突然変異体、例えば、改良型PTDを誘導するように変異された転写モジュレータであり得る。そのような例においては、転写モジュレータドメインは、Tet-Off、Tet-Off Advanced、Tet-On、Tet-On Advanced、Tet On-3GまたはtTS転写モジュレータと比較し、1つ以上の点突然変異を含んでいる場合がある。目的の点突然変異には、Q32R、C88R、A118R、E128R、C195R、Q32K、C88K、A118K、E128K、C195Kが含まれるが、これらに限定されない。本発明の所定のtet転写モジュレータは、前記特定の点突然変異のうち、記載された点突然変異の1つ以上、例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上を含む2つ以上を含んでもよい。この用途の目的のため、本発明のtet調節タンパク質のアミノ酸配列は、野生型TetRと75%以上、例えば、90%以上を含み、85%以上を含む80%以上のアミノ酸配列と、アミノ酸配列同一性を有している。

40

【0059】

発現メディエーター

宿主細胞および調節タンパク質に加え、(特定の実施形態に依存する)本発明の系は、さらに発現メディエーターを含んでもよい。目的の発現メディエーターは、例えば、

50

転写モジュレータのメディエーター結合ドメインで転写モジュレータと結合し、そうすることにより、上述したように、転写モジュレータが転写モジュレータ応答エレメントと結合するか否かを調節する化合物である。ある実施形態において、目的の発現メディエーターは低分子量化合物、例えば、1000ダルトン以下、例えば750ダルトン以下の分子量を有する化合物である。目的の発現メディエーターには、テトラサイクリン系抗生物質およびその類似体が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの場合では、発現メディエーターは、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンである。また、興味深いものは、これらの化合物の類似体、例えば、米国特許出願公開第20090257985号に記載された、置換型テトラサイクリン化合物である。目的とする、他のメディエーターには、メディエーター機能を有するエクジソン、RU486、アプタマー、抗生物質およびタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0060】

方法

本発明の態様には、さらに宿主細胞内で発現を誘導する方法が含まれ、宿主細胞はインビトロでもインビボでもあり得る。本発明の特定の実施形態の方法の実施において、発現メディエーターの濃度（例えば、上述したもの）は、分散型PTD転写モジュレータと、発現カセットのコード配列の発現が起こるのに十分な様式で、誘導発現カセットに対する応答を含む宿主細胞内で変化する。言い換えると、発現メディエーターの濃度は、転写モジュレータおよび誘導性発現カセットの両者を含む宿主細胞内で上昇または減少し、上昇または減少は、所望のコード配列発現を起こすのに十分である。いくつかの場合では、例えば、転写モジュレータが発現メディエーターの存在下に応答配列に結合する、これらの実施形態において、発現メディエーターの濃度は実質的に0からコード配列の発現を引き起こすのに十分な量まで上昇する。他の実施形態、例えば、転写モジュレータが発現メディエーターの非存在下に応答配列に結合するこれらの実施形態において、宿主細胞内部の発現メディエーターの濃度は、転写モジュレータがコード配列の発現を引き起こす濃度まで減少する。いくつかの場合では、例えば、転写モジュレータが、発現メディエーターの非存在下に応答配列に結合する方法においては、発現メディエーターが使用されないことに留意されたい。これらの実施形態において、例えば、発現が望ましい場合に宿主細胞を転写モジュレータと接触させることにより、発現メディエーターなしで転写モジュレータを使用することができる。

20

30

【0061】

本発明の方法の実施形態において使用される宿主細胞は、誘導性発現カセットと、分酸型PTDを含む、十分量の転写モジュレータの両者を含むものである。宿主細胞は、任意の都合のよい方法で提供することができる。いくつかの場合では、宿主細胞は、転写モジュレータ発現カセットと誘導性発現カセットとを含むベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次いで、宿主細胞中で、転写モジュレータの必要量を提供するのに十分な様式で転写モジュレータのコード配列を発現させることによって提供される。任意の都合のよい形質移入および発現プロトコルを用いることができ、Tet-Off（登録商標）およびTet-On（登録商標）遺伝子発現システム使用者マニュアル、クロンテックラボラトリーズ社、バージョン番号PR58969（2006）に記載されたものが含まれる。

40

【0062】

また、本発明の方法において使用される宿主細胞は転写モジュレータタンパク質が宿主細胞を形質導入する、すなわち、転写モジュレータタンパク質が宿主細胞により取り込まれるのに十分な条件下に、宿主細胞を、適当量の転写モジュレータタンパク質と接触させることにより提供することができる。これらの実施形態において、形質導入条件下に、宿主細胞を転写モジュレータタンパク質と接触させる。特定の例においては、細胞培養条件下に、ある量の転写モジュレータを、ある量の宿主細胞と接触させ、形質導入が起こるのに十分な時間、インキュベートする。ある例においては、細胞あたり1個の分子～細胞あたり $1 \times 10^E^{12}$ 個の分子、例えば、細胞あたり $7 \times 10^E^7$ 個の分子～細胞あたり $7 \times 10^E^8$ 個の分子の範囲の量の転写モジュレータタンパク質を、1～5000万、例えば

50

10,000~100,000個の範囲の量の宿主細胞と接触させる。任意の都合のよい培地を使用することができ、ここで、目的の培地には、RPMI、DMEM、OptiMEM等が含まれるが、これらに限定されない。細胞および転写モジュレータを、様々な時間、例えば、5分~5日、例えば1~4時間、様々な温度、例えば、4~42、例えば、30~37℃の範囲の温度でインキュベートする。したがって、特定の実施形態によれば、本発明の方法は、宿主細胞を、例えば、上述したような分散型タンパク質形質導入ドメインを含む転写モジュレータを用いて形質導入するステップを含む。

【0063】

これらのうちの特定の実施形態において、形質導入エンハンサーの存在下に、宿主細胞を転写モジュレータと接触させることができる。形質導入エンハンサーは、例えば、2倍、例えば、5または10倍以上を含む3倍以上、形質導入を増強させる化学物質である。形質導入エンハンサーとして興味深いものは核酸形質移入試薬であり、目的の核酸形質移入試薬には：クロンテックラボラトリーズ社由来のXfect（商標）形質移入試薬、ライフテクノロジーズ社由来のリポフェクタミンLTX形質移入試薬、ライフテクノロジーズ社由来のリポフェクタミン2000、ミラス社由来のSiQuest形質移入試薬、Transit-SiQuest形質移入試薬、Transit-TKO形質移入試薬、Transit-LTI形質移入試薬、Transit-Jurkat形質移入試薬、Transit-2020形質移入試薬、クロロキン、PEG等が含まれるが、これらに限定されない。使用される場合、形質導入エンハンサーは、培地中に任意の都合のよい濃度で含ませることができ、ここで、ある例においては、濃度は、0.001mg/mL~0.1mg/mL、例えば、0.001~0.01mg/mLを含む、0.0025~0.036mg/mLの範囲である。

【0064】

発現メディエーターが使用される実施形態において、転写モジュレータおよび誘導性発現カセットの両方を含む宿主細胞の準備に続き、宿主細胞中に発現メディエーターの濃度は、発現カセット中のコード配列の転写を起こすのに十分な量で上昇させたり、低下させたりする。したがって、宿主細胞中の発現メディエーターの量は、所望の通りに、コード配列の発現を起こすように上昇させたり、低下させたりする。

【0065】

発現メディエーターの濃度が宿主細胞中で上昇する例においては、宿主細胞を適当量の発現メディエーターと接触させてもよい。宿主細胞中で遺伝子発現をインビトロで誘導するために、発現メディエーターを含む培地中で細胞を培養することによって、宿主細胞を発現メディエーターと接触させる。発現メディエーターの存在下、インビトロで細胞を培養した場合、発現メディエーターの濃度を変化させてもよく、いくつかの場合では、10~1000ng/mLの範囲である。発現メディエーターは、既に細胞が培養されている培地に直接加えてもよく、または発現メディエーターを含まない培地から細胞を収集し、所望の発現メディエーターを含む新鮮な培地で培養してもよい。インビボで遺伝子発現を誘導するために、対象に発現メディエーターを投与することによって、対象内の宿主細胞を発現メディエーターと接触させる。一実施形態において、発現メディエーターをヒト対象または動物対象に投与する場合、投与量は、0.0005~1.0μg/mLの範囲の血清濃度を達成するように調整する。発現メディエーターは、遺伝子導入にとって十分なインビボ濃度を達成するのに効果的なあらゆる手段によって対象に投与することができる。投与の適切なモデルの例には、経口投与（例えば、飲料水中に発現メディエーターを溶解する）、徐放型ペレットおよび拡散ポンプの移植が含まれる。本発明の発現メディエーターをトランスジェニック植物に投与するために、植物に投与する水中に誘導剤を溶解することができる。

【0066】

発現メディエーターの濃度を低下させることによって発現メディエーターの濃度が変化する実施形態において、前述したものと反対のプロトコルを使用することができる。例えば、宿主細胞は、コード配列の発現を阻害するのに十分な量の発現メディエーターを含む

培地中で維持されるものであり得る。そのような例においては、宿主細胞を収集し、発現メディエーターを含まない新鮮培地中で培養することによって、コード配列の発現が誘導される。インビトロの実施形態については、動物または植物は、例えば、上述したように、発現メディエーターが投与されており、そして、所望により、コード配列の発現を誘導するために発現メディエーターの投与が中止されるものであり得る。

【0067】

いくつかの場合では、コード配列の発現が所望の量になった後、発現メディエーターの濃度を、発現誘導前のレベルまで戻して変えることによって発現を停止させることができる。

【0068】

所望であれば、前記ステップのいずれかのステップを、例えば、所望の発現量が達成されるまで繰り返してもよい。

【0069】

有用性

本発明の方法および組成物は、多面発現効果または細胞毒性を引き起こさずに、迅速に、効率的かつ制御された様式で遺伝子発現のスイッチの切り替え、または遺伝子発現のレベルの調節が可能であることが望ましい、様々な異なる用途において使用される。本発明の方法および組成物は、インビトロ用途およびインビボ用途の両方において使用される。方法および組成物が使用される用途には、真核細胞、植物および動物中での細胞発生および分化の研究；インビトロタンパク質生産；インビボタンパク質生産；インビボでの調節された遺伝子発現の画像化；ヒトの疾患の動物モデル；安定な細胞株の作製；インヒビターRNAの発現；薬剤スクリーニング、遺伝子治療等が含まれるが、これらに限定されない。目的の用途には、Freundlieb, "Tetシステム：強力な遺伝子誘導発現—初年度から15年間の進行中の成功談 (The Tet System: Powerful, Inducible Gene Expression—The first fifteen years of an ongoing success story)", クローン技術 (Clontechniques) (October 2007) に記載されたものが含まれるが、これらに限定されない。

【0070】

本発明の方法および組成物が使用される用途は、米国特許第5,888,981号、第5,866,755号、第5,789,156号、第5,654,168号、第5,650,298号、第6,004,941号、第6,271,348号、第6,271,341号、第6,783,756号、第5,464,758号、第6,252,136号、第5,922,927号、第5,912,411号および第5,859,310、ならびに米国特許出願公開第20090257985号にさらに記載されており、それらの文献に開示されている特定の用途の開示は、参照により本明細書により具体的に組み込まれる。

【0071】

キット

本発明のさらなる態様には、例えば誘導性遺伝子発現プロトコルに用いられるキットが含まれる。いくつかの例においては、本発明のキットは、ある量の上述したような分散型タンパク質形質導入ドメイン転写モジュレータ（または同じものをコードするベクター配列）とプロ誘導性 (pro-inducible) 発現カセットを含むベクターとを少なくとも含み、プロ誘導性発現カセットは、クローニング部位（例えば、制限酵素認識部位の形態で）、例えば多重クローニング部位 (MCS) と機能するように結合した転写修飾因子応答性プロモータ（例えば、上述したもの）を含む。キット中に存在する追加成分には、形質導入増強剤、例えば、DNA形質移入試薬；発現メディエーター、例えば、テトラサイクリンまたはdox；宿主細胞系；対照細胞株などが含まれるが、これらに限定されない。キットの様々な試薬成分は、別個の容器中に存在していてもよく、またはそれらのいくつか、もしくは全部が、所望により、単一の容器中で試薬混合物とあらかじめ混合されてもよい。

10

20

30

40

50

【0072】

前記成分に加え、本発明のキット（特定の実施形態において）には、本発明の方法を実施するための使用説明書がさらに含まれていてもよい。これらの使用説明書は、本発明のキット中に様々な形態で存在していてもよく、そのうちの1つ以上がキット中に存在していてもよい。そのような使用説明書が存在し得る1つの形態は、キットの梱包中、挿入された梱包中の、適切な媒体または基板に印刷された情報として、情報が印刷された一枚または複数の紙等である。そのような使用説明書のさらに他の形態は、コンピュータ読み取り可能な媒体、例えば、情報が記録されたディスク、コンパクトディスク（CD）である。存在し得る、そのような使用説明書のさらに他の形態は、離れた場所で情報にアクセスするためにインターネットを通して使用し得るウェブサイトアドレスである。

10

【0073】

実験

次の実施例は、本発明の実施法および使用法を当業者に完全に開示し、説明するために述べられるものであり、本発明者らが自分たちの発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではなく、以下の実験が実施された全ての、または唯一の実験であるを意味することを意図するものでもない。使用した数（例えば、量、温度など）については正確性を確実にするように努力しているが、ある程度の実験誤差とばらつきを考慮すべきである。他に指示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度はセルシウス度であり、圧力は大気圧または大気圧近くである。標準的な略記を用いることができる。例えば、b pは塩基対、k bはキロベース、p lはピコリッター、sまたはs e cは秒、m i nは分、hまたはh rは時間、a aはアミノ酸、k bはキロベース、n tはヌクレオチドなどである。

20

【0074】

実施例1：p r O F 1 4（すなわち、「T e t エクスプレス」）の作成

T e t エクスプレスを開発するために、クロンテック社のT e t - O f f（登録商標）A d v a n c e d 転写モジュレータのコード配列について、まず大腸菌での発現用にコドン最適化し、その後それを細菌用発現ベクターにクローンした。次に、図1Aに示すように、6×HN精製タグ（クロンテックラボラトリーズ社、マウンテンビュー、カリフォルニア州）とその後に9残基のアラニンリンカーをDNA結合ドメインとV P 1 6 活性化ドメインの間に導入してp r O F 7を作成した。その結果生じたp r O F 7を、t e t 応答性誘導性発現カセットを保持する宿主細胞の培地に添加すると、標準的タンパク質質導入ドメイン（P T D）（すなわち、別の明確なP T D）を必要とすることなくp r O F 7タンパク質がそれだけで哺乳類レポータ細胞をトランス活性化することができることが観察された。

30

【0075】

p r O F 7のタンパク質配列を調査して、明確なP T Dは同定されなかった。p r O F 7は、そのタンパク質の折り畳みにより形成されるような新規の分散型P T Dを含む可能性があるという仮説を立てた。3次元空間でのアルギニン残基とリシン残基のクラスター形成の結果、P T Dとして機能することができる塩基性パッチがタンパク質表面上に生じる可能性があった。リシン残基とアルギニン残基の位置をt e t Rの構造上に示すと、実際に塩基性パッチが観察された（図4を参照）。

40

【0076】

p r O F 7の形質導入活性を向上させることが可能であるか判定するために、点突然変異によりさらなるアルギニン残基を導入して前記塩基性パッチを拡大した。次のような14アルギニン残基を特定した：

1. タンパク質の表面に局在する。
2. アルギニン／リシンに富むパッチ近傍に位置する。
3. 5つの異なるクラスのT e t Rの間で異なる。我々は、その他のクラスのうちの1つ以上においてアルギニンである位置を好んだ。

前記の14アルギニン残基を無作為に組み合わせ導入して、その結果、27種の異なる

50

突然変異体コンストラクトが生じた。以下に報告するように、変異型タンパク質が作成された。下線は前記転写モジュレータードメイン (t e t R) を意味し、斜体は前記発現調節ドメイン (V P 1 6) を意味し、一続きのアラニンは前記リンカーを意味し、そして太字は形質導入活性を向上させるためになされたアルギニン置換を意味する。

【 0 0 7 7 】

【表 7】

p r O F 7 (配列番号 1)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEPALFGLLELIICGLEKQLKCESGGPKLHNHNH
 NNNHNHNEFAAAAAAAAAAGT *PADALDDFDLMLPADALDDFDLMLPADALDD*
FDLMLPG

10

【 0 0 7 8 】

【表 8】

p r O F 7 + E 1 2 8 R (配列番号 9)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLRNLYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEPALFGLLELIICGLEKQLKCESGGPKLHNHNH
 NNNHNHNEFAAAAAAAAAAGT *PADALDDFDLMLPADALDDFDLMLPADALDD*
FDLMLPG

20

【 0 0 7 9 】

【表 9】

p r O F 7 + Q 3 2 R (配列番号 10)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLARKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL
AIEMLD RHHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEK
QYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETP
TTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEPALFGLLELIICGLEKQLKCESGGPKLHNHNHNH
 HNNHNHNEFAAAAAAAAAAGT *PADALDDFDLMLPADALDDFDLMLPADALDDF*
DLDMLPG

30

【 0 0 8 0 】

40

【表 10】

p r O F 7 + C 1 9 5 R (配列番号 11)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIIRGLEKQLKCESGGPKLHNHNH
NHNHNHNEFAAAAAAAAAAGTPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPADALDD
FDLDMPLPG

10

【0081】

【表 11】

p r O F 7 + (Q 3 2 R、A 1 1 8 R、C 1 9 5 R) (配列番号 12)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLARKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL
AIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEK
QYETLENQLRFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETP
TTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIIRGLEKQLKCESGGPKLHNHNHNH
HNHNHNNEFAAAAAAAAAAGTPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPADALDDF
DLDMPLPG

20

【0082】

【表 12】

p r O F 7 + (Q 3 2 R、C 8 8 R、C 1 9 5 R) (配列番号 13)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLARKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL
AIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFR RALLSHRDGAKVHLGTRPTEK
QYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETP
TTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIIRGLEKQLKCESGGPKLHNHNHNH
HNHNHNNEFAAAAAAAAAAGTPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPADALDDF
DLDMPLPG

30

【0083】

【表 13】

p r O F 7 + (Q 3 2 R、C 8 8 R、A 1 1 8 R、C 1 9 5 R) (配列番号 14)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLARKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL
AIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFR RALLSHRDGAKVHLGTRPTEK
QYETLENQLRFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETP
TTDSMPPLL RQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIIRGLEKQLKCESGGPKLHNHNHNH
HNHNHNNEFAAAAAAAAAAGTPADALDDFDLDMLPADALDDFDLDMLPADALDDF
DLDMPLPG

40

【0084】

【表 1 4】

prOF14=prOF7+ (Q32R、C88R、A118R、E128R、C195R)
(配列番号2)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLARKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL
AIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRALLSHRDGAKVHLGTRPTEK
QYETLENQLRFLCQQGFSLRNALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETP
TTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLLELIIRGLEKQLKCESGGPKLHNHNHN
HNHNHNEFAAAAAAAGTPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDF
DLMDLPG

10

【0085】

【表 1 5】

prOF14 (−E128R) (配列番号15)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLARKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL
AIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRALLSHRDGAKVHLGTRPTEK
QYETLENQLRFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETP
TTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLLELIIRGLEKQLKCESGGPKLHNHNHN
HNHNHNEFAAAAAAAGTPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDF
DLMDLPG

20

【0086】

【表 1 6】

prOF12 (配列番号16)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLLELIICGLEKQLKCESGGPADALDDF
DLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPG

30

【0087】

【表 1 7】

prOF12 (+E128R) (配列番号17)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
LAIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRALLSHRDGAKVHLGTRPTE
KQYETLENQLAFLCQQGFSLRNALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
PTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLLELIICGLEKQLKCESGGPADALDDF
DLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPG

40

【0088】

【表 18】

p r O F 1 6 (配列番号 18)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDA
 LAIEMLDHRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTE
 KQYETLENQLAFLCQQGFSLLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
 PTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPALFLGLELIICGLEKQLKCESGGPKLHNHNH
 NHNHNHNEFAAAAAAAAAAAGTGASMQKLISEEDLGYPYDVPDYAGDYKDDDDK

10

【0089】

変異型タンパク質を精製し、そして、以前のとおりトランス活性化活性について選抜した。この選抜による最良の候補は090827#11と呼ばれるコンストラクトであり、それは5つの突然変異（Q32R、C88R、A118R、E128R、C195R）を含有した。図2、3および4にこのデータが要約されている。その結果生じたタンパク質はp r O F 1 4と名付けられ、その後にT e t エクスプレスと改名されている。

【0090】

実施例2：DNA形質移入試薬の使用による形質導入の向上

T e t エクスプレスタンパク質の開発中に、いくつかの異なるDNA形質移入試薬の共添加がT e t レポータ細胞株でのルシフェラーゼ活性を大いに増大させることに我々は気が付いた。T e t エクスプレスの開発の最中に、我々は、レポータプラスミドの一過性形質移入から安定的なレポータ細胞株の使用に切り替えた。これらの細胞は、Z s G r e e n 1とホタルルシフェラーゼをT R E - t i g h t プロモータ（クロンテックラボラトリーズ社、マウンテンビュー、カリフォルニア州）の制御下で発現する安定的に組み込まれたレポータを有するH e L a細胞ベースの細胞株である。これは、我々がT e t エクスプレスの活性を測定するためにDNA形質移入する必要はもはや無いことを意味した。我々は、観察されるT e t エクスプレスの活性がこの切り替えにより低下することに気が付き、そして、あるDNA形質移入試薬の存在下で形質導入を実行することにより活性が元の状態に復帰することが可能であることを判定した。形質導入を最も向上させた試薬にはクロンテック社のX f e c t、ライフテクノロジーズ社のリポフェクタミンL T Xおよび2000ならびにミラス社のS i Q u e s t 試薬が含まれる（図5および6）。

20

30

【0091】

図5は、T e t エクスプレスの活性の向上を示すルシフェラーゼアッセイの結果を提供する。安定した二方向性T R E t i g h t Z s G r e e n / F L u c 組込みカセットを有するH e L aレポータ細胞（クローン19）を96ウェルフォーマットでプレーティングした（ウェルあたり15,000細胞）。細胞が付着した後に、ウェルあたり0、5、10または20 μ Lの形質導入ミックスを添加した。形質導入ミックスは、次の添加物、2%のL T X、0.6%のX f e c t、2%のリポフェクタミン2000（L i p o 2000）、0.2mMのクロロキンまたは6 μ g/mLのポリブレンのうちの1つを含むO p t i m e m培地中のT e t エクスプレスタンパク質から成った。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。

40

【0092】

図6は、T e t エクスプレスの活性の向上を示すルシフェラーゼアッセイの結果を提供する。クローン19 H e L aレポータ細胞を96ウェルフォーマットでプレーティングした（ウェルあたり15,000細胞）。T e t エクスプレスタンパク質（O p t i m e m培地中）を提示した量の試薬と混合し、前記細胞に添加した。試薬にはミラス社のT r a n s i t - s i Q u e s t、T r a n s i t - T K O、T r a n s i t - L T I、T r a n s i t - J u r k a t、T r a n s i t - 2020またはクロンテック社のX f e c tが含まれた。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。

【0093】

50

向上効果を示したが、程度はそれほどではない他の試薬にはミラス社のTKO試薬、LTI試薬、Jurkat試薬および2020試薬、クロロキン、PEGが含まれる。向上効果があったとしても貧弱であった他の試薬にはポリブレンおよびDMSOが含まれる。

【0094】

図7Aは、熱不活化したTetエキスをプレスを使用するルシフェラーゼアッセイの結果を提供する。クローン19HeLaレポータ細胞を96ウェルフォーマットでプレーティングした（ウェルあたり15,000細胞）。10 μ gのTetエキスをプレスまたは熱不活化Tetエキスをプレス（75 $^{\circ}$ Cで5分間）を0、1、2または4 μ LのいずれかのXfectと混合し、前記細胞に添加した。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。図7Bに示されるように、デオキシリボヌクレアーゼ処理ではTetエキスの活性は変化しない。クローン19HeLaレポータ細胞を96ウェルフォーマットでプレーティングした（ウェルあたり15,000細胞）。デオキシリボヌクレアーゼIで（150 μ LのTetエキスをプレスあたり10ユニット、37 $^{\circ}$ Cで30分間）前処理していない、または前処理したTetエキスをプレスと混合し、細胞に添加した。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。図7Cでは、クローン19HeLaレポータ細胞を12ウェルフォーマットでプレーティングした（ウェルあたり50,000細胞）。2 μ LのリポフェクタミンLTXを用いて0.5 μ gのpUC19プラスミド（対照）、prOF7プラスミド、pTet On AdvancedプラスミドまたはpTet Off Advancedプラスミドを細胞に形質移入した。翌日に、ドキシサイクリンを1000ng/mLまで添加した。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。

【0095】

図7A～7Cに示されるような、観察されたルシフェラーゼ活性の増大は、タンパク質形質導入の向上というよりもむしろプラスミドDNA（すなわち、Tetエキスの細菌性発現ベクター）の混入に起因する可能性があるという懸念を表明した。実行した実験には、

1. デオキシリボヌクレアーゼでTetエキスをプレスタンパク質精製物を処理すること（効果なし）、
 2. 前記タンパク質精製物を70～75 $^{\circ}$ Cで5分間熱不活化すること（活性の喪失に至った）、
 3. Tetエキスをコードする細菌性発現ベクターの前記宿主レポータ細胞への直接的形質移入（効果なし）
- が含まれた。これらの実験の結果により、ルシフェラーゼ活性の増大の原因としてのプラスミドDNAの混入が除外された。

【0096】

図8はXfect（クロンテックラボラトリーズ社、マウンテンビュー、カリフォルニア州）のトランス活性化への効果を示す。ウェルあたり50,000細胞のクローン19HeLaレポータ細胞を12ウェルフォーマットでプレーティングした。Xfect試薬の存在下、または非存在下で細胞を0、1、10または100 μ gのTetエキスをプレス（または派生物）で処理した。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。

【0097】

図9は、E128R突然変異の効果を示す。ウェルあたり50,000細胞のクローン19HeLaレポータ細胞を12ウェルフォーマットでプレーティングした。ミラス社のTransit-SiQuest試薬（ウェルあたり1 μ L）の存在下で細胞をウェルあたり0、5、10、または20 μ gのTetエキスをプレス（または派生物）で処理した。翌日にルシフェラーゼアッセイを実行した。

【0098】

図10は、prOF7タンパク質、prOF14タンパク質およびprOF16タンパク質の一般的な構造を示す模式図を提供する（線図は一定の縮尺ではない）。各prOFタンパク質の分子量（Mw）、アミノ酸残基数（#aa）および等電点（IsoPt）が表に示されている。

【0099】

明確な理解を目的として、例証と実例により前記発明の詳細を記述してきたが、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく本発明に一定の変更および改変を行うことが可能であることが、本発明の教示に照らして当業者にとって容易に明らかとなる。

【0100】

したがって、前述のものは本発明の原理を例証するにすぎない。本明細書では明確に説明または示されていないが、本発明の原理を具現化し、そして、本発明の精神及び範囲内に含まれる様々な構成を当業者は考案可能であることが認識される。また、本明細書に列挙される実施例と条件的用語は全て、本発明者らが本技術分野をさらに発展させることになった本発明の原理および概念を読者が理解する助けとなることを主として意図したものであり、そのような特定の列挙した実施例および条件に限定されることが無いと解釈されるものとする。さらに、本発明の原理、態様および実施形態ならびにその特定の実施例を列挙している本明細書における記述は全て、その構造および機能の両方の同等物を包含するものと意図される。加えて、そのような同等物には現在公知の同等物および将来に開発される同等物、すなわち、構造に関わらず、同じ機能を果たす開発される任意の要素の両方が含まれると意図される。したがって、本発明の範囲は、本明細書において示され、説明される例示的な実施形態に限定されると意図されない。むしろ、本発明の範囲および精神は、添付の特許請求の範囲によって具現化される。

【0101】

米国特許法第119条(e)の定めにより、本願は2010年11月24日に提出された米国特許仮出願番号第61/417,062号の提出日時に対する優先権を主張するものである。その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【図1A】

FIG. 1A

```
MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHYKVKRAILLDAI
AIEMLDRHHHFCPLGEGSWQDFLENNAKSFRKALLSHRDGAKVELGTRPTEKQY
ETLENQLAFLLCQCGFSEENALYALSAVGHETLGGVLEDDQEHQVAKEREETPTDS
MPPLRQATLELFDHQGAEPAFLFGLLETLGLERQKCESSGGPKLHNHNHNHNHN
HNEFAAATAAAGTAPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDL
```

【図1B】

FIG. 1B

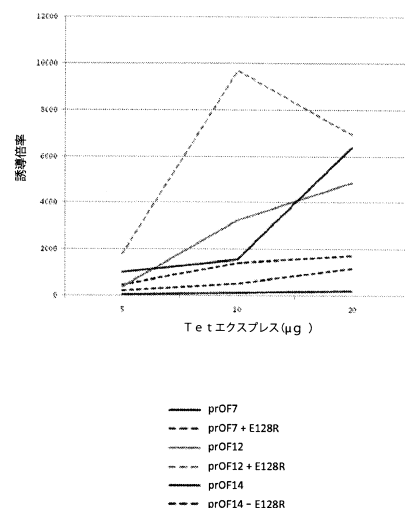
```
MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHYKVKRAILLDAI
AIEMLDRHHHFCPLGEGSWQDFLENNAKSFRKALLSHRDGAKVELGTRPTEKQY
ETLENQLAFLLCQCGFSEENALYALSAVGHETLGGVLEDDQEHQVAKEREETPTDS
MPPLRQATLELFDHQGAEPAFLFGLLETLGLERQKCESSGGPKLHNHNHNHNHN
HNEFAAATAAAGTAPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDLPADALDDFDLMDL
```

【図3】

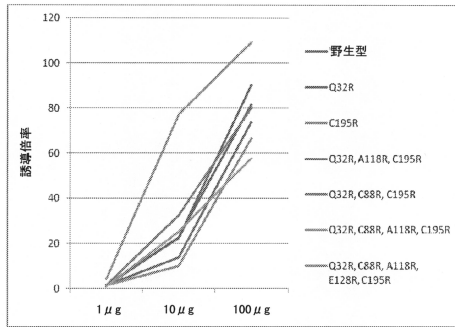
FIG. 3



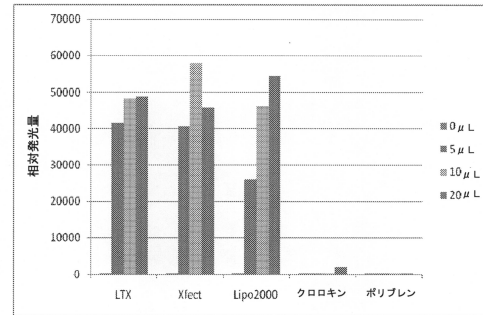
【図9】



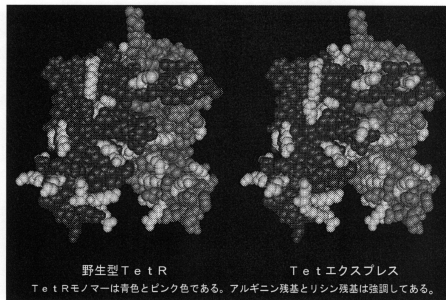
【図 2】



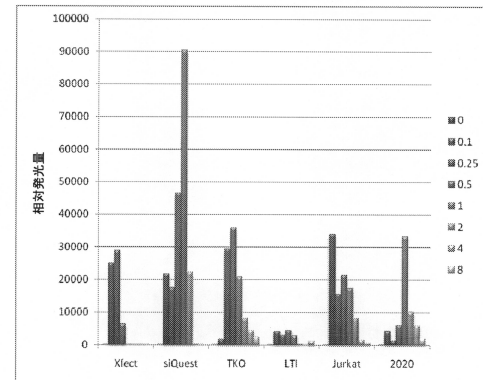
【図 5】



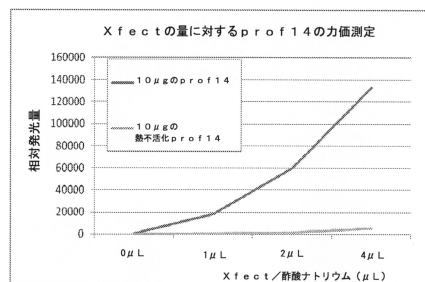
【図 4】



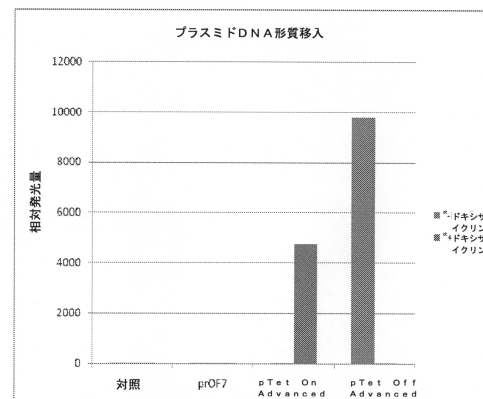
【図 6】



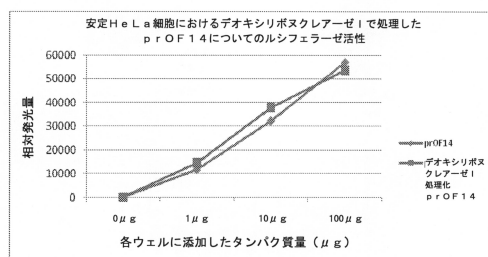
【図 7 A】



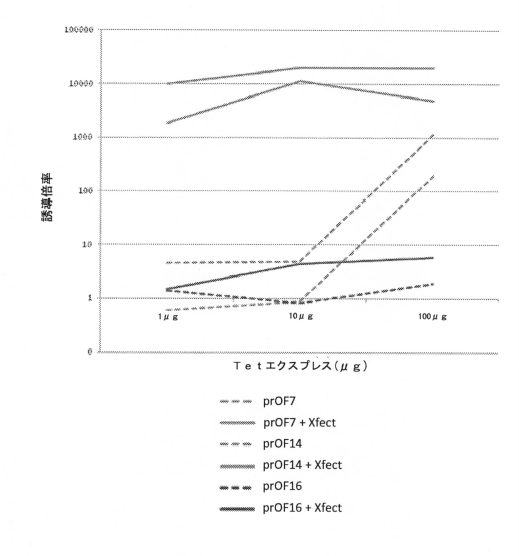
【図 7 C】



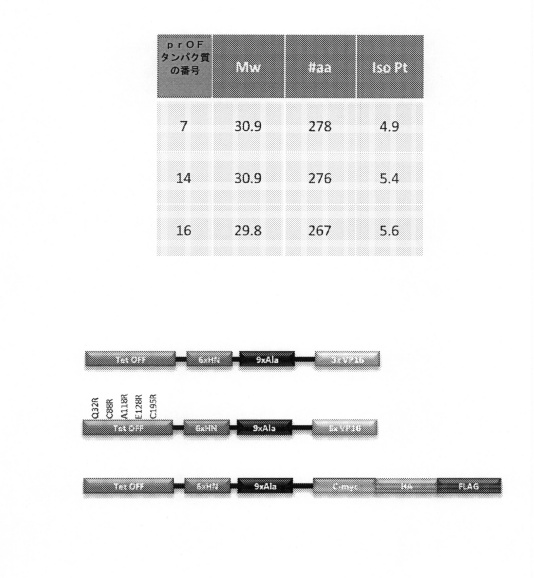
【図 7 B】



【図 8】



【図 10】



【配列表】

0006022470000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(72)発明者 サガワ, ヒロアキ
アメリカ合衆国 カリフォルニア, マウンテン ビュー, テラ ベラ アベニュー 1 2 9 0

審査官 厚田 一拓

(56)参考文献 特開2008-118967 (JP, A)
特表2006-502719 (JP, A)
特表2003-510019 (JP, A)
特開2010-085108 (JP, A)
Tet-Off Advanced Inducible Gene Expression System User Manual, 2007年, <<http://takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3945-1%5B6%5D.pdf>> [retrieved on 2015/06/30]
Nucleic Acids Res. [online], 2003年, Vol.31, No.23, p.e152, <www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC290287/pdf/gngl52.pdf> [retrieved on 2015-06-29]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q