

【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26年1月16日(2014.1.16)

【公開番号】特開2013-48628(P2013-48628A)

【公開日】平成25年3月14日(2013.3.14)

【年通号数】公開・登録公報2013-013

【出願番号】特願2012-226780(P2012-226780)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

G 0 1 N 33/542 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/48 Z N A Z

G 0 1 N 21/78 C

G 0 1 N 33/542 A

【手続補正書】

【提出日】平成25年11月20日(2013.11.20)

【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】

以下の(a)および(b)を含む、IRE-1αに対する基質：

(a)

(i) IRE-1αに対する切断部位からなるRNAループ；および

(ii) 4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド塩基対からなるヌクレオチドステム、を含むオリゴヌクレオチド分子、ならびに

(b) ドナー部分が励起された場合に検出可能な共鳴エネルギー移動を示す、ドナー部分およびアクセプター部分であって、ドナー部分がオリゴヌクレオチド分子の5'末端または3'末端の一方に結合し、且つアクセプター部分がオリゴヌクレオチド分子の5'末端または3'末端のもう一方に結合している、ドナー部分およびアクセプター部分。

【請求項2】

(i) IRE-1αに対する切断部位を含むRNAループ；および

(ii) 4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド塩基対からなるヌクレオチドステム、からなるオリゴヌクレオチド分子を含む、IRE-1αに対する基質。

【請求項3】

ヌクレオチド配列からなるRNAループが、以下からなる群より選択される、請求項1または2記載の基質：

5'-CCGAAGC-3'、5'-GCGAAGC-3'、5'-ACGAAGC-3'、5'-UCGAAGC-3'、5'-CCGAAGC-3'、5'-CGGAAGC-3'、5'-CAGAAGC-3'、5'-CUGAAGC-3'、5'-CCGAAGC-3'、5'-CCAAAGC-3'、5'-CCUAAGC-3'、5'-CCGAAGC-3'、5'-CCGGAGC-3'、5'-CCGUAGC-3'、5'-CCGCAGC-3'、5'-CCGAAGC-3'、5'-CCGAGGC-3'、5'-CCGAUGC-3'、5'-CCGACGC-3'、5'-CCGAAGC-3'、5'-CCGAAAC-3'、5'-CCGAAGC-3'、5'-CCGAAGA-3'、および 5'-CCGAAGU-3'。

【請求項4】

RNAループが、ヌクレオチド配列5'-CCGCAGC-3'からなる、請求項2記載の基質。

【請求項5】

オリゴヌクレオチドがSEQ ID NO: 3からなる、請求項1または2記載の基質。

【請求項 6】

ヌクレオチドシステムがDNAを含む、請求項1または2記載の基質。

【請求項 7】

ヌクレオチドシステムがRNAを含む、請求項1または2記載の基質。

【請求項 8】

ヌクレオチドシステムがヌクレオチドアナログを含む、請求項1または2記載の基質。

【請求項 9】

検出可能な標識をさらに含む、請求項2記載の基質。

【請求項 10】

ドナー部分およびアクセプター部分の少なくとも一つが蛍光タンパク質である、請求項1記載の基質。

【請求項 11】

ドナー部分およびアクセプター部分の各々が蛍光タンパク質である、請求項1記載の基質。

【請求項 12】

アクセプター部分が発光性部分である、請求項1記載の基質。

【請求項 13】

発光性部分が発光性タンパク質およびランタニドキレートからなる群より選択される、請求項12記載の基質。

【請求項 14】

アクセプター部分が、蛍光色素、クマリン、キサンテン、フルオレセイン、蛍光タンパク質、サーキュラリーパーミュテッド (circularly permuted) 蛍光タンパク質、ロードル (rhodol)、ローダミン、レゾルフィン、シアニン、ジフルオロボラジアザインダセン (difluoroboradiazaindacene)、フタロシアニン、インディゴ、ベンゾキノ、アントラキノ、アゾ化合物、ニトロ化合物、インドアニリン、ジフェニルメタン、トリフェニルメタン、および双性イオンアゾピリジニウム化合物からなる群より選択される、請求項1記載の基質。

【請求項 15】

ドナー部分が、蛍光色素、非蛍光色素、クマリン、キサンテン、ロードル、ローダミン、レゾルフィン、シアニン色素、ビマン (bimane)、アクリジン、イソインドール、ダンシル色素、アミノフタル酸ヒドラジド、アミノフタルイミド、アミノナフタルイミド、アミノベンゾフラン、アミノキノリン、ジシアノヒドロキノ、半導体蛍光ナノ結晶 (semiconductor fluorescent nanocrystal)、蛍光タンパク質、サーキュラリーパーミュテッド 蛍光タンパク質、および蛍光ランタニドキレートからなる群より選択される、請求項1記載の基質。

【請求項 16】

ドナー部分が、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、青色蛍光タンパク質 (BFP)、およびシアン蛍光タンパク質 (CFP)からなる群より選択される蛍光タンパク質である、請求項1記載の基質。

【請求項 17】

アクセプター部分が発光性タンパク質である、請求項1記載の基質。

【請求項 18】

発光性タンパク質が、エクオリン、オベリン、ルクス (lux) タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、フィコビリタンパク質、ホラジン (pholasin)、および緑色蛍光タンパク質からなる群より選択される、請求項17記載の基質。

【請求項 19】

ドナー部分およびアクセプター部分の少なくとも一つが蛍光色素である、請求項1記載の基質。

【請求項 20】

ドナー部分およびアクセプター部分の各々が蛍光色素である、請求項1記載の基質。

【請求項 2 1】

ドナー部分が、キサンテンである、請求項1記載の基質。

【請求項 2 2】

キサンテンが、6-カルボキシフルオレセイン (FAM)である、請求項21記載の基質。

【請求項 2 3】

ドナー部分が、シアニンである、請求項1記載の基質。

【請求項 2 4】

シアニンが、インドジカルボシアニン5 (Cy5)である、請求項23記載の基質。

【請求項 2 5】

アクセプター部分がダーククエンチャーである、請求項1記載の基質。

【請求項 2 6】

ダーククエンチャーが、QSY (商標) 色素である、請求項25記載の基質。

【請求項 2 7】

ダーククエンチャーが、BLACK HOLE QUENCHER (商標) (BHQ (商標))である、請求項25記載の基質。

【請求項 2 8】

以下の工程を含むIRE-1 α ポリペプチドのRNアーゼ活性を検出する方法：

(1)

(a)

(i) IRE-1 α に対する切断部位からなるRNAループ；

(ii) 4、5、6、7、8、9、または10リボヌクレオチド塩基対からなるヌクレオチドシステム；

を含むオリゴヌクレオチド分子；ならびに

(b) ドナー部分がオリゴヌクレオチド分子の5'末端または3'末端の一方に結合し、且つアクセプター部分がオリゴヌクレオチド分子の5'末端または3'末端のもう一方に結合しており、ドナー部分が励起された場合に検出可能な共鳴エネルギー移動を示す、ドナー部分およびアクセプター部分、

を含む基質とIRE-1 α ポリペプチドを接触させる工程；ならびに

(2) ドナー部分とアクセプター部分との間の共鳴エネルギー移動を検出する工程であって、それにより共鳴エネルギー移動における変化がIRE-1 α ポリペプチドのRNアーゼ活性を示す、工程。

【請求項 2 9】

試験化合物の存在下で共鳴エネルギー移動を検出する工程をさらに含む、請求項28記載の方法。

【請求項 3 0】

IRE-1 α ポリペプチドおよび基質が無細胞系中にある、請求項28記載の方法。

【請求項 3 1】

共鳴エネルギーにおける変化が、励起波長でのモル吸光係数、量子効率、励起スペクトル、発光スペクトル、最大励起波長、最大発光波長、2つの波長での励起振幅の比、2つの波長での発光振幅の比、励起状態寿命、異方性、放出された光の偏光、共鳴エネルギー移動、およびある波長での発光のクエンチングからなる群より選択される特性を決定することによって検出される、請求項28記載の方法。

【請求項 3 2】

IRE-1 α ポリペプチドが完全長IRE-1 α タンパク質である、請求項28記載の方法。

【請求項 3 3】

IRE-1 α ポリペプチドがキナーゼドメインを含む、請求項28記載の方法。

【請求項 3 4】

以下の工程を含むIRE-1 α ポリペプチドのRNアーゼ活性を検出する方法：

(1)

(i) IRE-1 α に対する切断部位を含むRNAループ；および

(ii) 4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド塩基対からなるヌクレオチドステム

；

からなるオリゴヌクレオチド分子を含むIRE-1 α に対する基質とIRE-1 α ポリペプチドを接触させる工程；ならびに

(2) 基質の切断を検出する工程。

【請求項 35】

試験化合物とIRE-1 α ポリペプチドを接触させる工程をさらに含む、請求項34記載の方法。

【請求項 36】

IRE-1 α ポリペプチドおよび基質が無細胞系中にある、請求項34記載の方法。

【請求項 37】

IRE-1 α ポリペプチドが完全長IRE-1 α タンパク質である、請求項34記載の方法。

【請求項 38】

IRE-1 α ポリペプチドがキナーゼドメインを含む、請求項34記載の方法。

【請求項 39】

1ヌクレオチドステムが4ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。

【請求項 40】

1ヌクレオチドステムが5ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。

【請求項 41】

1ヌクレオチドステムが6ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。

【請求項 42】

1ヌクレオチドステムが7ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。

【請求項 43】

1ヌクレオチドステムが8ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。

【請求項 44】

1ヌクレオチドステムが9ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。

【請求項 45】

1ヌクレオチドステムが10ヌクレオチド塩基対からなる、請求項1記載の基質。