

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7545999号
(P7545999)

(45)発行日 令和6年9月5日(2024.9.5)

(24)登録日 令和6年8月28日(2024.8.28)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
請求項の数 17 (全31頁)				
(21)出願番号	特願2021-570521(P2021-570521)	(73)特許権者	521229005	
(86)(22)出願日	令和2年5月27日(2020.5.27)		オクタント, インク.	
(65)公表番号	特表2022-536257(P2022-536257 A)		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル 6 7 番・ストリート 1 4 6 4	
(43)公表日	令和4年8月15日(2022.8.15)	(74)復代理人	110003797	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/034685		弁理士法人清原国際特許事務所	
(87)国際公開番号	WO2020/243164	(74)代理人	100082072	
(87)国際公開日	令和2年12月3日(2020.12.3)		弁理士 清原 義博	
審査請求日	令和5年4月28日(2023.4.28)	(72)発明者	チャン, レオン イェン-リー	
(31)優先権主張番号	62/853,637		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル 6 7 番・ストリート 1 4 6 4	
(32)優先日	令和1年5月28日(2019.5.28)	(72)発明者	クーバー, アーロン ロス	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 転写リレー系

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

転写リレー系であって、

a) 応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、外因性の合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記外因性の合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸と、

b) 合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸であって、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記レポーターをコードする前記ヌクレオチド配列の5'であり、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記外因性の合成転写因子によって結合でき、前記レポーターは、固有の分子識別子を含み、前記外因性の合成転写因子は、第1の転写因子由来のDNA結合ドメインおよび第2の転写因子由来の転写活性化ドメインを含む、レポーター核酸、

とを含む、転写リレー系。

【請求項2】

前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列、FOSプロモーターヌクレオチド配列または血清応答エレメントヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の転写リレー系。

【請求項 3】

前記 DNA 結合ドメインは、G a l 4、P P R 1、L a c 9 または L e x A 由来である、請求項 1 または 2 に記載の転写リレー系。

【請求項 4】

前記 DNA 結合ドメインは、配列番号 1 に示す配列と同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の転写リレー系。

【請求項 5】

前記転写活性化ドメインは、V P 6 4、p 6 5 および R t a を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の転写リレー系。

【請求項 6】

前記転写活性化ドメインは、配列番号 1 4 に示す配列と同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の転写リレー系。

【請求項 7】

前記外因性の合成転写因子は、ポリペプチド配列を含み、前記ポリペプチド配列は、P E S T または C L 1 ポリペプチド配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の転写リレー系。

【請求項 8】

前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、G a l 4、P P R 1、L a c 9 または L e x A によって結合できるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の転写リレー系。

【請求項 9】

前記レポーターは、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、または分泌型胎盤アルカリホスファターゼを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の転写リレー系。

【請求項 10】

前記固有の分子識別子は、試験ポリペプチドに特有である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の転写リレー系。

【請求項 11】

前記転写因子核酸は、転写抑制因子によって結合できる、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の転写リレー系。

【請求項 12】

前記転写因子核酸は、前記外因性の合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされる mRNA の 5' 非翻訳領域を伸長させる、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列を含む、請求項 11 に記載の転写リレー系。

【請求項 13】

前記外因性の合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされる mRNA の前記 5' 非翻訳領域は、前記外因性の合成転写因子の翻訳を低減する 1 つ以上の配列を含む、請求項 12 に記載の転写リレー系。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載のリレー系を含む哺乳動物細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載のリレー系を含む哺乳動物細胞集団。

【請求項 16】

前記哺乳動物細胞または前記哺乳動物細胞集団は、レポーター活性において低い生体変動係数を含む、請求項 14 または 15 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【請求項 17】

応答エレメント調節プロモーターの活性に対する試験剤の効果を試験する方法であって

10

20

30

40

50

、請求項 1 4 または 1 5 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団と、試験物質を接触させる工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年5月28日に出願された米国仮特許出願第62／853，637号の利益を主張するものであり、当該出願の全体は、引用によって本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0002】

細胞シグナル伝達経路応答を照合するか、細胞シグナル経路のアンタゴニストまたはアゴニストをスクリーニングするか、あるいは新規細胞シグナル伝達経路を発見するのに有用な核酸、系および方法が本明細書に記載されている。当技術分野において以前から知られている方法は、レポーター分子をコードする核酸の近位にある内因性の応答エレメント調節プロモーターを利用する。これらの方法は、細胞の内因性の応答エレメント結合プロモーターの「漏れがある」という性質により、レポーター分子のバックグラウンドシグナルの度合いが高いという欠点がある。また、これらの方法は、変動係数が高いという欠点がある。最後に、このような方法は、レポーター活性化の絶対値が低く、結果として、シグナル対ノイズが低いという欠点がある。本開示の核酸および系は、合成転写因子結合部位に対して非常に選択的である非内因性の合成転写因子を使用することによって、生体変動レベルを低減させ、レポーターシグナルのシグナル対ノイズ比を上昇させ、バックグラウンドシグナルを低減させる。よって、レポーター分子の転写は、内因性の転写因子によって開始されないで、バックグラウンドシグナルを低減させ、レポーターのシグナル対ノイズを上昇させるのに役立つ。これらの核酸および系は、Gタンパク質共役型受容体、受容体チロシンキナーゼ、イオンチャネルおよび核内受容体などのシグナル伝達経路の低分子または生物学的アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするのに有用である。広義の態様では、系は、核酸であって、前記核酸は、a) 合成転写因子リーディングフレームの5'末端の近位にある応答エレメント調節プロモーターと、b) 合成転写因子によって結合可能なプロモーターエレメントであって、前記プロモーターエレメントは、レポーター遺伝子リーディングフレームの5'末端の近位にある、プロモーターエレメントと、をコードする、核酸を含む。この系では、レポーター遺伝子は、レポーターアッセイの多重化が可能のように固有の分子識別子(UMI)を含んでもよい。

【0003】

一態様では、転写リレー系であって、前記転写リレー系は、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸と、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸であって、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記レポーターをコードする前記ヌクレオチド配列の5'であり、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子によって結合できる、レポーター核酸と、を含む、転写リレー系が本明細書に記載されている。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列、FOSプロモーターヌクレオチド配列または血清応答エレメントヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、第1の転写因子由来のDNA結合ドメインおよび第2の転写因子由来の転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、Gal4、PPR1、Lac9またはLexA由来である。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、配列番号1に示す配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記

10

20

30

40

50

DNA結合ドメインは、配列番号1に示す配列と少なくとも約95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列変異を含む。ある実施形態では、前記転写活性化ドメインは、VP64、p65およびRtaを含む。ある実施形態では、前記転写活性化ドメインは、配列番号14に示す配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記転写活性化ドメインは、配列番号14に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記転写活性化ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列変異を含み、前記配列変異は、転写活性を上昇または低減させる。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号10に示すアミノ酸配列変異を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、前記合成転写因子を不安定化するポリペプチド配列を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子を不安定化する前記ポリペプチド配列は、PESTまたはCL1ポリペプチド配列を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、Gal4、PPR1、Lac9またはLexAによって結合できるヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、レポーターは、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型胎盤アルカリホスファターゼまたは固有の分子識別子を含む。ある実施形態では、前記レポーターは、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼまたは分泌型胎盤アルカリホスファターゼおよびUMIを含む。ある実施形態では、前記固有の分子識別子は、試験ポリペプチドに特有であり、前記試験ポリペプチドは、前記レポーター核酸によってコードされる。ある実施形態では、前記転写因子核酸は、転写抑制因子によって結合できる、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記転写因子核酸は、合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされるmRNAの5'非翻訳領域を伸長させる、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされるmRNAの前記5'非翻訳領域は、前記合成転写因子の翻訳を低減させる1つ以上の配列を含む。ある実施形態では、前記転写因子核酸および前記レポーター核酸は、単一の核酸の成分である。ある実施形態では、前記リレー系を含む細胞が本明細書に記載されている。ある実施形態では、前記細胞は、真核細胞を含む。ある実施形態では、前記細胞は、哺乳動物細胞を含む。ある実施形態では、転写因子核酸、レポーター核酸、あるいは転写因子核酸とレポーター核酸の両方は、単一のコピーとして細胞のゲノムに組み込まれる。ある実施形態では、前記リレー系を含む細胞集団が本明細書に記載されている。ある実施形態では、前記細胞集団は、真核細胞集団を含む。ある実施形態では、前記細胞集団は、哺乳動物細胞集団を含む。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、高い基礎レポーター活性を含む。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、高い基礎レポーター活性を含み、高い基礎レポーター活性は、バックグラウンドより少なくとも約30倍大きく、バックグラウンドは、レポーターを含まない親細胞または細胞株において観察されるレポーター活性レベルである。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、レポーター活性において低い生体変動係数を含む。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、低い生体変動係数を含み、レポーター活性における低い生体変動係数は、約0.5より低い。

【0004】

ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターの活性に対する試験剤の効果を試験する方法であって、前記方法は、細胞または細胞集団と、前記試験物質を接触させる工程を含む、方法が本明細書に記載されている。ある実施形態では、前記試験剤は、化学物質である。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1A】転写リレー系の概略図を図示し、転写因子核酸（左）およびレポーター核酸（右）を示す。

【図1B】固有のRNA配列を含むレポーターをコードする核酸配列を図示する。

【図2】半無作為に組み込まれたCRE-Gal4-VPRの複数のコピーと共に、単一で組み込まれたCRE-ルシフェラーゼを保有する細胞（灰色）、および、単一の組み込まれたUAS-ルシフェラーゼを保有する細胞（黒色）のレポーター産出を示す。

【図3】3回繰り返して実施した、図2に図示する各試料の変動係数を示す。

【図4】転写リレー系の誘導倍率（fold induction）に対する、Gal4-VPRプロモーターヌクレオチド配列の配列タグ（デグロンタグ）の不安定化の効果を示す。

10

【図5】NFATリレー系のアイソタイプの細胞株から生成された細胞ライブラリを示す。細胞株は、陽性コントロール化合物を用いて、Gq共役型GPCRにおけるNFATリレーレポーター活性を検出する能力をスクリーニングした。偽発見率（FDR）が、0.01より低い、あるいはmax_Qが3より大きいシグナルを生成した、受容体と化合物の組み合わせは、有意なヒットとみなした。このスクリーニングでは、ライブラリcb29およびcb37が最も有意なヒットを引き起こした。

【図6】細胞ライブラリを生成するために使用したアイソタイプの細胞株の変動対基礎活性を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0006】

一態様では、転写リレー系であって、前記転写リレー系は、（a）応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸と、（b）合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸であって、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記レポーターをコードする前記ヌクレオチド配列の5'であり、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子によって結合できる、レポーター核酸と、を含む、転写リレー系が本明細書に記載されている。

30

【0007】

別の態様では、応答エレメント調節プロモーターの活性に対する試験物質の効果をアッセイする方法であって、前記方法は、（a）細胞と試験物質を接触させる工程であって、前記細胞は、（i）応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸と、（ii）合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸であって、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記レポーターをコードする前記ヌクレオチド配列の5'であり、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子によって結合できる、レポーター核酸と、を含む、接触させる工程と、（b）前記レポーターの転写を測定する少なくとも1つのアッセイを実施する工程と、を含む、方法が本明細書に記載されている。

40

【0008】

以下の記載では、様々な実施形態を完全に理解することができるように、ある特定の詳細が示されている。しかし、当業者であれば、これらの詳細がなくとも、提示されている実施形態を実践できることが理解されよう。文脈が特別に必要としない限り、以下の明細書と請求項の全体にわたって、単語「含む（comprise）」およびその変更形態（例えば、「含む（comprises）」または「含んでいる（comprising）」）は、開かれた包括的な意味で、すなわち、「含むがこれに限定されない」という意味

50

で解釈されるものとする。本明細書および添付の請求項で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、その内容がそれ以外のものを明確に指示していない限り、複数の指示物を含む。用語「または」は、その内容がそれ以外のものを明確に指示していない限り、「および／または」を含む意味で一般に用いられていることにも留意されたい。さらに、本明細書で提示されている見出しは、便宜上のものであり、請求されている実施形態の範囲や意味を解釈するものではない。

【0009】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、述べられた量の10%付近の量を指す。

【0010】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に使用され、最小の長さに限定されない。提示されるポリペプチド鎖および他のペプチド、例えば、リンカーおよび結合ペプチドを含むポリペプチドは、天然および／または非天然のアミノ酸残基を含むアミノ酸残基を含んでもよい。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化などを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、生来または天然の配列に関する修飾を含んでもよい。これらの修飾は、部位特異的突然変異導入によるもののよう意図的であってよく、あるいはタンパク質を産生する宿主の突然変異またはPCR増幅によるエラーによるもののよう偶発的であってもよい。

【0011】

参照ポリペプチド配列に関するパーセント(%)配列同一性は、配列をアライメントし、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントである。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、様々な既知の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成できる。比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するのに必要なアルゴリズムを含む、配列をアライメントするための適切なパラメータを決定できる。しかし、本明細書での目的のために、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社によって著作され、そのソースコードは、米国著作権庁(ワシントンD.C., 20559)に使用者用書類と共に提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムは、ジェネンテック社(カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)から公に入手可能であり、あるいはソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。すべての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

【0012】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対する%アミノ酸配列同一性(代わりに、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対するある%アミノ酸配列同一性を有するまたは含む所与のアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される: 分率 X/Y の100倍であって、式中、 X は、配列アライメントプログラムALIGN-2のAおよびBのプログラムアライメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y は、B中のアミノ酸残基数の全数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、AのBへの%アミノ酸配列同一性は、BのAへの%アミノ酸配列同一性と等しくないことが認識されるであろう。特に断らない限りは、本明細書で使用されるすべての%アミノ酸配列同一性値は、直ぐ上の段落に記載されるようにALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

【0013】

用語「同一性」、「同一」または「パーセント同一性」は、参照配列と比較して核酸配列を記載するために本明細書で使用される場合、Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, modified as in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993)に記載される式を使用して決定できる。このような式は、Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990)のbasic local alignment search tool (BLAST)プログラムに組み入れられる。配列のパーセント同一性は、本出願の出願日現在に最新版のBLASTを使用して決定できる。

【0014】

本明細書に記載の系のポリペプチドは、核酸によってコードできる。核酸は、2つ以上のヌクレオチド塩基を含むポリヌクレオチドの一種である。ある実施形態では、核酸は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に転写するために使用できるベクターの成分である。本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、それが連結している別の核酸を輸送可能な核酸分子を指す。ベクターの一種は、宿主細胞の染色体DNAに組み込まれるゲノム組み込み型ベクターまたは「組み込み型ベクター」である。ベクターの別の一種は、「エピソード」ベクター、例えば、染色体外で複製可能な核酸である。作動可能に連結している遺伝子の発現を指向することが可能なベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。好適なベクターは、プラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、ウイルスベクターなどを含む。発現ベクターにおいて、転写を制御するために使用される調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルは、哺乳動物、細菌、ウイルスまたは昆虫遺伝子由来であってもよい。通常、複製起点によって付与される宿主中での複製能や、形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子をさらに取り込むことができる。ウイルス、例えばレンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどに由来するベクターを用いることができる。プラスミドベクターは、染色体位置への組み込みのために線形化できる。ベクターは、ゲノム中の規定された位置または制限された部位のセットに部位特異的な組み込みを指向する配列を含んでもよい（例えば、A₁ttP-A₂ttB組み換え）。さらに、ベクターは、組み込みのために転移可能エレメント由来の配列を含んでもよい。

【0015】

本明細書で使用される場合、用語「トランスフェクション」または「トランスフェクトされる」は、実験で一般的に使用されるプロセスを通して、意図的に細胞に外因性の核酸を導入する方法を指す。トランスフェクションは、例えば、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ウイルス形質導入またはエレクトロポレーションによって達成できる。トランスフェクションは、一過性のものであるか、あるいは安定的なもののいずれかであってもよい。

【0016】

本明細書で使用される場合、用語「トランスフェクション効率」は、細胞集団が外因性の核酸を取り込んだ程度あるいは割合を指す。トランスフェクション効率は、系の全細胞集団と比較して、外因性の核酸を取り込んだ所与の細胞集団のパーセント(%)として測定できる。トランスフェクション効率は、一過的または安定的にトランスフェクトされた細胞の両方で測定できる。

【0017】

本明細書で使用される場合、用語「生理活性ポリペプチド」は、遺伝子の発現を調整する細胞によって発現するポリペプチドを指す。生理活性ポリペプチドは、刺激に応じて、または任意の他の機構によって、1つ以上の仲介分子またはポリペプチドを介するシグナル伝達によって、遺伝子の発現を直接調整できる。生理活性ポリペプチドは、膜貫通型ポリペプチド（受容体またはチャンネルタンパク質など）、細胞内ポリペプチド（シグナル形質導入仲介体）、細胞外ポリペプチドまたは分泌ポリペプチドであってもよい。

【0018】

本明細書で使用される場合、「レポーター活性」は、レポーターの経験的な読み出しを指す。例えば、ルシフェラーゼレポーターは、適切な基質で培養されると、発光読み出しを有する。蛍光タンパク質のような他のレポーターは、基質を必要としない場合があるが、例えば顕微鏡または蛍光プレートリーダーを介して測定できる。

【0019】

系の概要

本明細書に記載の系、核酸および方法は、応答エレメント結合プロモーターの有無および／または活性化レベルについてスクリーニングするのに有用である。本明細書に記載の核酸、系および方法は、従来のレポーター系より低いバックグラウンドシグナルレベルで転写の活性化を可能にする。ある実施形態では、応答エレメント結合プロモーターは、細胞シグナル伝達カスケードの終わりに活性化される。ある実施形態では、応答エレメント結合プロモーターの存在は、物理的または化学的な刺激などの外部刺激の前後に測定されるか、平行して実施されるコントロール条件と比較されてもよい。化学的な刺激とは、アゴニストまたはアンタゴニストの低分子または生物学的分子であってもよい。ある実施形態では、系は、医薬品発見の目的のためにスクリーニングするのに有用である。系は、応答エレメント調節プロモーター、合成転写因子プロモーター、合成転写因子およびレポーターを含む核酸を最低限含む。応答エレメント調節プロモーターは、合成転写因子の5'に位置し、応答エレメント結合プロモーターが存在する場合、合成転写因子の転写を活性化する。翻訳に際して、合成転写因子はその後、レポーターをコードする核酸配列の5'に位置する合成転写因子プロモーターに結合できる。合成転写因子プロモーターは、結合したまま、レポーターをコードする核酸配列の転写を活性化する。ある実施形態では、レポーターは、ポリペプチドである。ある実施形態では、レポーターは、UMIである。系のさらなる任意の特徴には、転写抑制因子によって結合できる応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列が含まれる。ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列は、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列によってコードされるmRNAの5'非翻訳領域を伸長させる。ある実施形態では、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列によってコードされるmRNAの5'非翻訳領域は、合成転写因子の翻訳を低減させる1つ以上の配列を有する。

【0020】

図1Aには、本発明の非限定的な一実施形態が示されている。左には、転写因子核酸(100)が示されている。転写因子核酸(100)上に、合成転写因子(104)をコードするヌクレオチド配列の5'位の応答エレメント調節プロモーター核酸(102)が存在する。右には、レポーター核酸(110)があり、これは、レポーターをコードするヌクレオチド配列(114)の5'である合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列(112)を含有する。ある実施形態では、転写因子核酸およびレポーター核酸は、別々の核酸分子、例えば、別々のプラスミドまたはウイルスベクター上に存在する。ある実施形態では、転写因子核酸およびレポーター核酸は、直鎖状である。ある実施形態では、転写因子核酸およびレポーター核酸は、同じ核酸上に存在し、この核酸は、プラスミド、ウイルスベクター、直鎖状構造または任意の他の構造であってもよい。

【0021】

図1Bには、レポーターをコードするヌクレオチド配列の非限定的な一実施形態が示されている。レポーターをコードするヌクレオチド配列(114)は、レポーターポリペプチドをコードする核酸配列(122)と、UMIをコードする核酸配列(124)とを含む。配列(124)は、固有の分子識別子(UMI)としても知られている。UMIは、特定の生理活性ポリペプチドを同定することができ、結果として、応答エレメント調節プロモーター核酸(102)の活性化をもたらす。非限定的な例として、生理活性ポリペプチドは、数百の既知のものの中の一つの特定のGタンパク質共役型受容体を含んでもよい。よって、UMIエレメントは、多重フォーマットでいくつかの異なる生理活性ポリペプチドのシグナル伝達を容易にかつ迅速に照合することができる。さらに、提供されるリレー系

は、応答エレメント調節プロモーターを用いてバックグラウンドシグナル伝達を低減させる。これによって、より正確な定量化が可能になり、そして、生理活性ポリペプチドを活性化し得る化合物における任意の多重スクリーニングにおける試験化合物の偽陽性数を低減させる。ある実施形態では、レポーターポリペプチドをコードする核酸配列は、存在しない。ある実施形態では、UMIをコードする核酸配列は、存在しない。ある実施形態では、UMIをコードする核酸配列は、レポーターポリペプチドをコードする核酸配列の5'である。ある実施形態では、レポーターポリペプチドをコードする核酸配列は、UMIをコードする核酸配列の5'である。

【0022】

ある実施形態では、レポーターをコードする核酸は、レポーターポリペプチドをコードする。ある実施形態では、前記レポーターポリペプチドは、直接検出可能である。ある実施形態では、前記レポーターポリペプチドは、タンパク質の基質に対する酵素活性の際に検出可能なシグナルを生成する。ある実施形態では、レポーターポリペプチドの検出は、定量的に達成できる。ある実施形態では、前記レポーターポリペプチドは、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型胎盤アルカリホスファターゼ、またはそれらの組み合わせを含む。前記レポーターポリペプチドがルシフェラーゼタンパク質であるある実施形態では、基質の非限定的な例には、ホタルルシフェリン、ラチアルシフェリン、バクテリアルシフェリン、セレンテラジン、渦鞭毛藻ルシフェリン、ヴァルグリンおよび3-ヒドロキシヒスビジンが含まれる。

【0023】

ある実施形態では、レポーターをコードする核酸は、UMIをコードする。前記UMIは、核酸に固有のヌクレオチドの短い配列を含む。前記UMIは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20ヌクレオチド長以上であってもよい。前記UMIは、次世代シーケンシング法など、前記UMIの配列決定可能な任意の好適な方法で検出可能である。前記UMIの検出方法は、定量的なものであってもよく、これには、次世代シーケンシング法が含まれる。

【0024】

ある実施形態では、創薬での使用のための、転写因子核酸をコードする核酸と、レポーター核酸とを含む系を展開する方法が本明細書に記載されている。ある実施形態では、方法は、核酸が内在化されて細胞によって発現される（例えば、トランスフェクトされる）のに十分な条件下で、核酸と細胞または細胞集団を接触させる工程と、細胞と物理的または化学的な刺激を接触させる工程と、1つ以上のアッセイによって、レポーターエレメントの活性化を決定する工程と、を含む。ある実施形態では、方法は、転写因子核酸をコードする核酸とレポーター核酸とを含む細胞または細胞集団を接触させる工程と、1つ以上のアッセイによってレポーターエレメントの活性化を決定する工程とを含む。

【0025】

応答エレメント調節プロモーター

応答エレメントは、特定の転写因子に結合して遺伝子の転写を調節できる、遺伝子プロモーター領域内にあるDNAの短い配列である。ある応答エレメントは、あるプロモーターに特異的である。いくつかの応答エレメントは、内因性の転写因子によって結合可能である。同じ応答エレメントの複数のコピーは、ヌクレオチド配列の異なる部分に位置し、同じ刺激に応答して異なる遺伝子を活性化できる。本明細書に記載の系に取り込まれる応答エレメントの非限定的な例には、cAMP応答エレメント(CRE)、B認識エレメント、AhR応答エレメント、ダイオキシン応答エレメントまたは異物応答エレメント、HIF応答エレメント、ホルモン応答エレメント、血清応答エレメント、レチノイン酸応答エレメント、ペルオキシソーム増殖因子ホルモン応答エレメント、金属応答エレメント、DNA損傷応答エレメント、IFN刺激応答エレメント、ROR応答エレメント、グルココルチコイド応答エレメント、カルシウム応答エレメントCaRE1、抗酸化剤応答エレメント、p53応答エレメント、甲状腺ホルモン応答エレメント、成長ホルモン応答エレ

メント、ステロール応答エレメント、ポリコム応答エレメントおよびビタミンD応答エレメントが含まれる。

【0026】

応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、遺伝子の転写を調節するためにプロモーターおよび他の分子の補充を補助する1つ以上の応答エレメントを含有する、核酸の領域である。細胞は、遺伝子の転写を調整するために内因性のタンパク質を利用する多数の応答エレメント調節ヌクレオチド配列を含有する。内因性の応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列がレポーターの転写を直接調節する状況では、内因性のプロモーターの存在により、高いレベルのバックグラウンドシグナルが存在する。系を含有する細胞に内在していない転写因子によってレポーターの転写を調節する系は、内因性の転写因子によってレポーターの転写を調節する系に比べて利点がある。このような系の利点の1つは、前記レポーターが、低いバックグラウンドを産生することである。

10

【0027】

ある実施形態では、本発明の転写リレー系は、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸を含む。前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子ヌクレオチド配列によってコードされる合成転写因子の発現を制御するように作用する。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列、FOSプロモーターヌクレオチド配列、血清応答エレメントヌクレオチド配列、またはこれらの組み合わせを含む。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、FOSプロモーターヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、血清応答エレメントヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列、FOSプロモーターヌクレオチド配列および／または血清応答エレメントヌクレオチド配列の任意の組み合わせを含む。

20

30

【0028】

ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターは、転写因子によって結合可能である。一般的な転写因子の非限定的な例には、LexA、Gal4、VP16（単純ヘルペスウイルス由来）、熱ショック因子（HSF）、NFAT、CREB、またはそれらの組み合わせが含まれる。本明細書に記載の系は、レポーターアッセイで一般的にまたは潜在的に使用可能な任意の転写因子またはその組み合わせに適合する。

【0029】

ある実施形態では、前記応答エレメント調節プロモーターは、内因性の転写因子によって結合される。内因性の転写因子は、生物、組織または細胞に天然に存在する転写因子である。内因性の転写因子が存在するかは、前記転写リレーが存在する系に依存する。ある実施形態では、前記内因性の転写因子は、バックグラウンド速度で合成転写因子の転写を促進する。

40

【0030】

ある実施形態では、前記転写因子核酸は、転写抑制因子によって結合できる、前記応答エレメント調節プロモーター核酸配列の近位にあるヌクレオチド配列を含む。転写抑制因子は、遠位にあるヌクレオチド配列の転写を阻害する。一般的な転写抑制因子の非限定的な例には、TetR、lac抑制因子、KRAB抑制因子、およびそれらの組み合わせが含まれる。本明細書に記載の系は、レポーターアッセイで一般的にまたは潜在的に使用可

50

能な任意の抑制因子またはその組み合わせに適合する。

【0031】

ある実施形態では、前記転写因子核酸は、合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされるmRNAの5'非翻訳領域を伸長させる、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列の近位にあるヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされるmRNAの前記5'非翻訳領域は、前記合成転写因子の翻訳を低減する1つ以上の配列を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子の翻訳を低減させる前記1つ以上の配列は、前記合成転写因子の翻訳を低減させる二次構造を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子の翻訳を低減させる前記1つ以上の配列は、RNA結合タンパク質による結合に影響を及ぼす配列を含む。ある実施形態では、前記合成転写因子の翻訳を低減させる前記1つ以上の配列は、上流オープンリーディングフレームを含む。

10

【0032】

アッセイ方法

以上に記載の系は、様々な方法を使用して有効に利用できる。系は、定常状態と、物理的または化学的な刺激に応答するときとの両方で、細胞シグナル伝達経路の活性を照合する方法において有用である。レポーターエレメントが特定のレポーターエレメントに結合したUMI配列を含む場合、系は多重アッセイで展開できる。

【0033】

非限定的かつ例示的な一例では、複数の細胞は、マルチウェルプレートの1つのウェルでインキュベートされる。複数の細胞は、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸でトランスフェクトされる。細胞は既に、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸を含むか、あるいは前記転写因子核酸でトランスフェクトされてもよい。その後、トランスフェクトされた細胞は、化学的な刺激に接触される。レポーター遺伝子が発現するのに十分な時間の経過後に、細胞溶解物は回収され、前記レポーター遺伝子の活性化が定量化される。この例では、レポーター遺伝子の存在が上昇することにより、前記応答エレメント調節プロモーターに結合する転写因子の活性の上昇を引き起こした化学的な刺激を示す。ある実施形態では、細胞シグナル伝達カスケードに続いて、前記応答エレメント調節プロモーターに結合する前記転写因子の活性が上昇する。

20

30

【0034】

前記レポーター遺伝子が基質と相互作用の際に検出可能なシグナルを生成する酵素を含む実施形態では、前記レポーター遺伝子の活性化を定量化するために、当技術分野において既知の標準的なアッセイが利用できる。前記レポーター遺伝子が蛍光分子を含む実施形態では、前記レポーター遺伝子の活性化は、蛍光顕微鏡法または蛍光プレートリーダーによって測定でき、細胞溶解を必要としなくてもよい。前記蛍光分子は、生細胞におけるレポーターの活性化を測定するのに有用である。前記レポーター遺伝子がUMIを含む実施形態では、mRNAは、逆転写され、UMIの配列決定は、次世代シーケンシング技術を用いて行われる。

40

【0035】

ある実施形態では、アッセイは、6、12、24、48、96または384ウェルフォーマットなどのマルチウェルフォーマットで実施される。ある実施形態では、各ウェルに、異なる試験化学物質が供給されるか、あるいは2重ウェル、3重ウェルまたは4重ウェルに、試験化学物質が供給される。アッセイはまた、1つ以上の陽性コントロールウェルまたは1つの陰性コントロールウェルを含んでもよい。

【0036】

合成転写因子

合成転写因子は、遺伝子の発現を標的にして調節可能な人工タンパク質である。いくつかの合成転写因子は、複数の異なる遺伝子由来のドメインを含有するキメラタンパク質であ

50

る。ある実施形態では、合成転写因子は、1つの遺伝子由来のDNA結合ドメインおよび別の遺伝子由来の転写調節ドメインを含む。

【0037】

本明細書に記載の方法、核酸および系では、転写活性ポリペプチドが転写因子核酸にコードされる。ある実施形態では、前記転写活性ポリペプチドは、合成転写因子である。ある実施形態では、前記合成転写因子は、キメラタンパク質である。ある実施形態では、前記合成転写因子は、第1の転写因子由来のDNA結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、第2の転写因子由来の転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記第1の転写因子は、前記第2の転写因子と異なる。

【0038】

ある実施形態では、前記合成転写因子は、いずれの内因性の転写因子に比べて、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列に高い特異性を有する。ある実施形態では、前記合成転写因子は、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列に結合し、内因性のプロモーターによって結合可能でない。ある実施形態では、前記合成転写因子の場合は、結果として、内因性の転写因子を用いた場合に生じるものより、レポーターのバックグラウンド産生が低い。

【0039】

ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、本発明の転写リレー系を含有する細胞に内在していない。ある実施形態では、第1の転写因子由来の前記DNA結合ドメインは、Gal4、PPR1、LexA、Lac9、またはそれらの組み合わせ由来である。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、MKLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLI FPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVS（配列番号1）に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、MKKKNSKKSNRTDSKRGDSNGSKSRTACKRCRKKKCDSCKRCAKVCVSDATGKDVRSYVDRAVMMRVKYGVDTKRGNATSDDDKKYSSSVSS（配列番号2）に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、MKSRTACKRCRLKKIKCDQEFPSCKRCAKLEVP
CVSSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLI FPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETD
MPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQRQLTVS（配列番号4）に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、MNKKSSSEVMHQACV ECRQQKSKCDAHERAPEPCTKCAKKNVPCIVYSPQVVRTPLTRAHLTEMENRVAELEQFLKELFPVWDIDRLLQQKDTYRIRELLTMGSTNTVPGLASNNIDS SLEQPVAFGTAQPAQSLSSTDPAVQSQAYPMQPV（配列番号5）に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、MNKKSSSEVMHQACKRCRLKKIKCDQEFPSCKRCLKYNLDCVYSPQVVRTPLTRAHLTEMENRVAELEQFLKELFPVWDIDRLLQQKDTYRIRELLTMGSTNTVPGLAS

10

20

30

40

50

NNIDSSLEQPVAFGTAQPAQSLSTDP AVQSQA YPMQPV (配列番号7) に示すアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、MNKKSSSEVMHQACKRCRLKKIKCDQEFPSCKRCAKLEVP CVYSPQVVRTPLTRAHLTEMENRVAELEQFLKELFPVWDID RLLQQKDTYRIRELLTMGSTNTVPGLASNNIDSSLEQPVA FGT AQPAQSLSTDP AVQSQA YPMQPV (配列番号8) に示すアミノ酸配列を含む。

【0040】

ある実施形態では、前記DNA結合ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列変異を含む。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、R15W、K23P、K23T、K23W、K23M、K23N、F68R、F68Q、L69P、L70P、Q9E、Q9A、Q9N、R15K、R15A、R15M、K18R、K18A、K18M、K23R、K23A、K23M、またはそれらの組み合わせである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、R15Wである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Pである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Tである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Wである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Mである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Nである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、F68Rである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、F68Qである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、L69Pである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、L70Pである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、Q9Eである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、Q9Aである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、Q9Nである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、R15Kである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、R15Aである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、R15Mである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K18Rである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K18Aである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K18Mである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Rである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Aである。ある実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列変異は、K23Mである。

【0041】

ある実施形態では、第2の転写因子由来の転写活性化ドメインは、VP64、p65およびRtaならびにそれらの組み合わせ由来である。ある実施形態では、前記転写活性化ドメインは、RAGKPIPNPLLLGLDSTDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSPKKKRK VGSQYLPD TDDRHRIEEK RKRTYETFKSIMKKSPFSGPTD PRPPPRRI AVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSSLSTINYDEF PTMVFPSGQIISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSAL AQAPAPVPV LAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQL QFDD EDL GALLGNSTDP AVFTDLASVDNSEFQQLLNQGI P VAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPL GAPGL PNGLLSGDEDFSS IADMDFSALLSQISSGSGSGSRDSREG MFLPKPEAGSAISDVFE GREVCQPKRIRPFHP PGSPWANR PLPASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEA SHLLEDPEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAICGQMDL SHPPPRGHLDELTTTLESMTE DLNLDSP LTP ELN EILDTF LNDECLLHAMHISTGLSIFDTS LF (配列番号14) に示すアミノ酸配列を含む。

【0042】

ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 14 に示す配列と少なくとも 90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 14 に示す配列と少なくとも 90% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 14 に示す配列と少なくとも 95% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 14 に示す配列と少なくとも 97% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 14 に示す配列と少なくとも 98% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 99% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 14 に示す配列と 100% 同一である VPR アミノ酸配列を有する転写因子をコードする。

【0043】

ある実施形態では、合成転写因子上にある転写活性化ドメインは、転写活性化を上昇または低減させるアミノ酸配列変異を含む。ある実施形態では、転写活性化を上昇または低減させるアミノ酸配列変異を含む前記転写活性化ドメインは、配列番号 14 の配列変異である。

【0044】

ある実施形態では、転写因子核酸の核酸配列によってコードされる合成転写因子は、「デグロン」とも呼ばれる、前記合成転写因子を不安定化するポリペプチド配列を含む。ある実施形態では、前記転写因子を不安定化する前記ポリペプチド配列は、PEST ポリペプチド配列を含む。PEST ポリペプチド配列は、複数のアミノ酸を含有するポリペプチド配列であり、前記ポリペプチド配列は、アミノ酸プロリン、グルタミン酸、セリンおよび／またはトレオニンに富む。ある実施形態では、前記転写因子を不安定化する前記ポリペプチド配列は、CL1 ポリペプチド配列を含む。CL1 ポリペプチド配列は、分解シグナルとして機能し、結果として得られる合成転写因子は、半減期が短いものになる。ある実施形態では、前記合成転写因子を不安定化する前記ポリペプチド配列は、レポーターのバックグラウンドシグナルを低減させるのを補助する。

【0045】

ある実施形態では、前記合成転写因子は、GAL4-VP16 のキメラ転写因子を含む。ある実施形態では、前記転写因子は、GAL4-VPR のキメラ転写因子を含む。GAL4-VPR キメラ転写因子の配列は、MKLLSSIEQACDICKLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLEVESRLE RLEQLFLLIFFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNV NKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSEESSNKGQR QLTVSASGSGRAGKPIPNPLLGLDSTDALDDFDLDMLGSD ALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSPK KKRKVGSGYLPD TDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSPFS GPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPTSSSLSTIN YDEFPTMVFP SGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAM VSALAQAAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEA LLQLQFDDLEDL GALLGNSTDP AVFTDLASVDNSEFQQLLN QGIPVAPHHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLG APGLPNGLLSGDEDFSS IADMDFSALLSQISSGSGSGSRD SREGMFLPKPEAGSAISDVFE GREVCQPKRIRPFHPPGSP WANRPLPASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPPLDPAPAV TPEASHLLEDPEETSQAVKALREMA DTVIPQKEEAAICG QMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTE DLNLDSP LTPELNEI LDTFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTS LF (配列番号 10) に示す配

列によって表される。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 97% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号 10 に示す配列と 100% 同一であるアミノ酸配列を有する転写因子をコードする。

【0046】

ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列によって表される Gal4 の DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と少なくとも 90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と少なくとも 97% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 1 に示す配列と 100% 同一であるアミノ酸配列を有する DNA 結合ドメインを含む。

【0047】

ある実施形態では、前記合成転写因子は、RAGKPIPNPLLGLDSTDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSPKKKRKV（配列番号 11）に示すアミノ酸配列によって表される VP64 由来の転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と少なくとも 90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と少なくとも 97% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 11 に示す配列と 100% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。

【0048】

ある実施形態では、前記合成転写因子は、QYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIKKSPFSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPSPGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPVLPAGPPQAVAPPAP

K P T Q A G E G T L S E A L L Q L Q F D D E D L G A L L G N S T D P A V F T D L
A S V D N S E F Q Q L L N Q G I P V A P H T T E P M L M E Y P E A I T R L V T G
A Q R P P D P A P A P L G A P G L P N G L L S G D E D F S S I A D M D F S A L L
S Q I S S (配列番号 12) に示すアミノ酸配列によって表される p 65 由来の転写活性
化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 12 に示す配列と
少なくとも 90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸
配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列
番号 12 に示す配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメ
インを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 12 に示す配列と少なく
とも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態で
は、前記合成転写因子は、配列番号 12 に示す配列と少なくとも 97% 同一であるアミノ
酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配
列番号 12 に示す配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ド
メインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 12 に示す配列と少な
くとも 99% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態
では、前記合成転写因子は、配列番号 12 に示す配列と 100% 同一であるアミノ酸配列
を有する転写活性化ドメインを含む。

【0049】

ある実施形態では、前記合成転写因子は、R D S R E G M F L P K P E A G S A I S D
V F E G R E V C Q P K R I R P F H P P G S P W A N R P L P A S L A P T P T G P V
H E P V G S L T P A P V P Q P L D P A P A V T P E A S H L L E D P D E E T S Q A
V K A L R E M A D T V I P Q K E E A A I C G Q M D L S H P P P R G H L D E L T T
T L E S M T E D L N L D S P L T P E L N E I L D T F L N D E C L L H A M H I S T
G L S I F D T S L F (配列番号 13) に示すアミノ酸配列によって表される R t a 由来
の転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 13 に
示す配列と少なくとも 90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であ
るアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因
子は、配列番号 13 に示す配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する転写
活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 13 に示す配
列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある
実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 13 に示す配列と少なくとも 97% 同一で
あるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写
因子は、配列番号 13 に示す配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を有する転
写活性化ドメインを含む。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 13 に示す
配列と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。あ
る実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号 13 に示す配列と 100% 同一であるア
ミノ酸配列を有する転写活性化ドメインを含む。

【0050】

合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列

合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、合成転写因子によって結合可能な核酸
の配列である。ある実施形態では、前記合成転写因子ヌクレオチド配列は、内因性の転写
因子によって結合されない。前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、レポー
ター分子の転写を活性化するために前記合成転写因子の補充を補助する。前記レポーター
分子は、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列の 3' に位置する核酸にコードさ
れる。

【0051】

本明細書に記載の方法、核酸および系では、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配
列は、レポーター核酸にコードされる。前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列
は、転写因子核酸にコードされる合成転写因子によって結合できる。前記合成転写因子プ
ロモーターヌクレオチド配列は、レポーターをコードするヌクレオチド配列の 5' に位置す

る。ある実施形態では、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、内因性の転写因子によって結合されない。ある実施形態では、前記合成転写因子は、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列に非常に特異的である。

【0052】

ある実施形態では、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、Gal4、PPR1、Lac9またはLexAによって結合できる。ある実施形態では、前記合成転写因子は、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドによって結合できる。

【0053】

ある実施形態では、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、Gal4、PPR1、Lac9またはLexAのアミノ酸配列変異によって結合できる。ある実施形態では、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、配列番号1のアミノ酸配列変異で結合できる。

10

【0054】

レポーターエレメント

レポーター核酸は、合成転写因子によって結合できる調節エレメントと、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを最低限含む。レポーターをコードする前記ヌクレオチド配列は、前記合成転写因子によって結合できる前記調節エレメントの下流である。前記合成転写因子は、前記レポーターの発現を調節する。

【0055】

ある実施形態では、レポーターをコードするヌクレオチド配列は、レポーター遺伝子を含む。ある実施形態では、前記レポーター遺伝子は、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼおよび分泌型胎盤アルカリホスファターゼから選択されるレポーターをコードする。これらのレポータータンパク質は、特定の酵素活性についてアッセイできるか、あるいは蛍光レポーターの場合は、蛍光発光についてアッセイできる。ある実施形態では、蛍光タンパク質は、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）またはシアン色蛍光タンパク質（CFP）を含む。

20

【0056】

ある実施形態では、レポーター遺伝子をコードするヌクレオチド配列は、固有の配列識別子（UMI）をコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、前記UMIは、試験ポリペプチドに特有であり、前記試験ポリペプチドは、前記レポーター核酸によってコードされる。概して、前記UMIは、8ヌクレオチド長と20ヌクレオチド長の間であるが、それを超える長さであってもよい。ある実施形態では、前記UMIは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20ヌクレオチド長以上である。ある実施形態では、前記UMIは、8ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、9ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、10ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、11ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、12ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、13ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、14ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、15ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、16ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、17ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、18ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、19ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、20ヌクレオチド長である。ある実施形態では、前記UMIは、20ヌクレオチド長を超える。

30

40

【0057】

本明細書に記載の系は、合成転写因子結合を介してレポーター遺伝子の活性化を制御する多数の異なる調節配列を利用することができる。調節配列は、合成転写因子ポリペプチドによって結合できるものである。概して、調節配列は、UMI、レポーター遺伝子、あるいはその両方の5'であるように構成される。ある実施形態では、調節配列は、合成転写

50

因子によって結合できる Gal4、PPR1または LexA-UASを含む。

【0058】

ある実施形態では、前記レポーターは、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼまたは分泌型胎盤アルカリホスファターゼおよびUMIを含む。ある実施形態では、前記UMIは、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼまたは分泌型胎盤アルカリホスファターゼのレポーター核酸の5'にコードされる。ある実施形態では、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼまたは分泌型胎盤アルカリホスファターゼをコードするヌクレオチド配列は、前記UMIの5'である。

10

【0059】

UMIの転写は、特定のリレー系とレポーターの関連性を示すので、UMIによって、同じアッセイ内で異なる転写リレー系の多重化が可能になる。UMIは、同じアッセイ内で異なる転写リレー系の多重決定が可能になるように十分な多様性が可能な任意の長さであってもよい。前記長さは、少なくとも100、500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000または10,000の転写リレー標的を分化させるのに十分でなければならない。ある実施形態では、前記異なる転写リレー系は、異なる細胞に存在する。ある実施形態では、前記異なる転写リレー系は、同じ細胞に存在する。

20

【0060】

レポーターエレメントは、5'UTR、3'UTR、あるいはその両方をさらに含んでもよい。UTRは、レポーターエレメントとは異種であってもよい。

【0061】

レポーター活性化

レポーター分子の活性化は、ルシフェラーゼタンパク質、β-ガラクトシダーゼタンパク質、β-グルクロニダーゼタンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼタンパク質、分泌型胎盤アルカリホスファターゼタンパク質を検出するために標準的なアッセイを使用して決定できる。概して、基質に対するタンパク質酵素活性に基づいて検出可能なシグナルが産生される酵素アッセイがある。例えば、ルシフェラーゼ発現は、ルシフェラーゼ基質が存在するときはルミノメーターによって測定できる。蛍光レポーターは、基質を必要とせず、シグナルは、蛍光顕微鏡法または蛍光プレートリーダーによって測定できる。蛍光レポーターは、生細胞におけるレポーターの活性化を測定するのに特に有用である。

30

【0062】

レポーター分子が固有のRNA配列を含む実施形態では、レポーター活性化は、固有のRNA配列の配列決定を可能にする任意の好適な方法で、好ましくは、マルチプレックス法で配列決定を可能にする方法で測定できる。このような方法には、24時間の間に少なくとも約100,000、1,000,000、10,000,000または100,000,000のDNAまたはRNA塩基に関する情報を生成することができるスループットの高い配列決定方法が含まれる。ある実施形態では、次世代シーケンシング技術は、固有のRNA配列の配列を決定するために使用される。次世代シーケンシングは、パイロシーケンシング、合成による配列決定、1分子シーケンシング法、第2世代シーケンシング、ナノポアシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシングまたはハイブリダイゼーションによるシーケンシングなどの多数の種類のシーケンシングを包含する。次世代シーケンシングプラットフォームには、Illumina社(RNA-Seq)およびHelicos社(Digital Gene Expression、すなわち「DGE」)市販のものが含まれる。次世代シーケンシング法には、1) Margulies et al., Nature (2005) 437:376-380 (2005)、ならびに米国特許第7,244,559号、第7,335,762号、第7,211,390号、

40

50

第7, 244, 567号、第7, 264, 929号、第7, 323, 305号に記載の方法および機器が含まれるがこれらに限らない454/Roche Lifesciences、2) 米国特許仮出願第11/167046号、ならびに米国特許第7501245号、第7491498号、第7, 276, 720号、ならびに米国特許出願公開第20090061439号、第20080087826号、第20060286566号、第20060024711号、第20060024678号、第20080213770号および第20080103058号に記載されるようなHelicos Biosciences Corporation (マサチューセッツ州ケンブリッジ)、3) Applied Biosystems (例えばSOLiDシーケンシング)、4) Dover Systems (例えばPolonator G.007シーケンシング)、5) 米国特許第5, 750, 341号、第6, 306, 597号および第5, 969, 119号に記載されるようなIllumina, Inc.、ならびに6) 米国特許第7, 462, 452号、第7, 476, 504号、第7, 405, 281号、第7, 170, 050号、第7, 462, 468号、第7, 476, 503号、第7, 315, 019号、第7, 302, 146号、第7, 313, 308号、ならびに、米国特許出願公開第20090029385号、第20090068655号、第20090024331号および第20080206764号に記載されるようなPacific Biosciencesによって市販のものが含まれるが、これらに限らない。このような方法および機器は、例としてここに提示されているが、限定するように意図されていない。

【0063】

マーカー

ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、選択ポリペプチドまたはマーキングポリペプチドをコードする1つ以上のさらなる遺伝子をさらに含む。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、トランスフェクトされた細胞に抗生物質耐性を付与するポリペプチドをコードする1つ以上のさらなる遺伝子をさらに含む。例えば、核酸は、抗生物質耐性から、ネオマイシン耐性/G418耐性、ピューロマイシン耐性、ゼオシン耐性またはブラストサイジン耐性に至るまでを付与する抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーを含んでもよい。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、細胞表面上に発現されるエピトープタグを含むポリペプチドをコードする1つ以上のさらなる遺伝子をさらに含む。これによって、アフィニティー精製または細胞分取し、記載の核酸でトランスフェクトされた細胞を集めることを可能にする。ある実施形態では、エピトープタグは、c-My cタグ、赤血球凝集素(HA)タグ、ヒスチジンタグ、V5タグまたはFLAGタグを含む。ある実施形態では、本明細書に記載の核酸は、蛍光ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるプロモーターレス遺伝子をさらに含む。このような遺伝子は、特定の位置またはランディングパッドにトランスフェクションが組み込まれるように意図され、標的化される場合に有用である。これらの場合、細胞ゲノムの「ランディングパッド」は、プロモーターレス遺伝子のプロモーターの不足を補うことができ、かつ、意図したゲノム位置に組み込まれた場合にのみプロモーターレス遺伝子の発現をもたらすことができるプロモーターを含む。正しい組み込みの細胞は、フローサイトメトリーと細胞分取によって選択できる。この種類のマーカーはまた、確実に、意図した核酸の単一のコピーのみがゲノムに組み込まれるようにし、異所性過剰発現を回避するのに役立つことができる。ある実施形態では、バイトポリペプチドをコードする核酸は、トランスフェクトされた細胞に抗生物質耐性を付与するポリペプチドをコードする遺伝子、細胞表面上に発現されるエピトープタグを含むポリペプチドをコードする遺伝子、または蛍光ポリペプチドをコードするプロモーターレス遺伝子を含む。

【0064】

細胞

本明細書に記載の方法において有用な細胞は、概して、合成転写因子およびレポーターエレメントをコードする1つ以上の外因性の核酸をトランスジェニックに容易に付与できるものである。合成転写因子およびレポーターエレメントをコードする系の核酸は、リン

酸カルシウムトランスフェクション、脂肪系トランスフェクション（例えば *Lipofectamine*（商標）、*Lipofectamine-2000*（商標）、*Lipofectamine-3000*（商標）または *Fugene*（登録商標）HD）、エレクトロポレーションまたはウイルス形質導入などの当技術分野において既知の方法を使用して好適な細胞株にトランスフェクトまたは形質導入できる。細胞はまた、適切な組織培養容器でコンフルエントまたはほぼコンフルエントになるまで増殖させられた同じ種類の細胞集団であってもよい。

【0065】

ある実施形態では、使用される細胞は、合成転写因子をコードする核酸、レポーターエレメントを含む核酸、あるいはその両方のいずれかの核酸の安定した組み込みを含む。安定した細胞株は、直鎖状プラスミドの無作為組み込み、ウイルス組み込みあるいはトランスポゾン指向型組み込み、または指向型組み込みを使用して、例えば、*AttP*と*AttB*との部位間での部位特異的組み換えを使用して生成できる。ある実施形態では、核酸のいずれかは、*AAVS1* 部位などの安全な着地部位にコードされる。

【0066】

ある実施形態では、系で使用される細胞または細胞集団は、真核細胞である。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、哺乳動物細胞である。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、ヒト細胞である。ある実施形態では、細胞または細胞集団は、*SH-SY5Y*（ヒト神経芽細胞癌）、*Hep G2*（ヒト白色人肝細胞癌）、*293*（*HEK 293* としても知られる）（ヒト胎児腎）、*RAW 264.7*（マウス単球マクロファージ）、*HeLa*（ヒト子宮頸部類上皮癌）、*MRC-5*（*PD 19*）（ヒト胎児肺）、*A2780*（ヒト卵巣癌）、*CACO-2*（ヒト白色人結腸腺癌）、*THP 1*（ヒト単球性白血病）、*A549*（ヒト白色人肺癌）、*MRC-5*（*PD 30*）（ヒト胎児肺）、*MC7F*（ヒト白色人乳腺癌）、*SNL 76/7*（マウス細胞株 *SI-M* 胚線維芽細胞）、*C2C12*（マウス *C3H* 筋芽細胞）、*Jurkat E6.1*（ヒト白血病性 T 細胞リンパ芽球）、*U937*（ヒト白色人組織球性リンパ腫）、*L929*（マウス *C3H/An* 結合組織）、*3T3 L1*（マウス胚）、*HL60*（ヒト白色人骨髓性白血病）、*PC-12*（ラット副腎褐色細胞腫）、*HT29*（ヒト白色人結腸腺癌）、*OE33*（ヒト白色人食道癌）、*OE19*（ヒト白色人食道癌）、*NIH 3T3*（マウススイス *NIH* 胚）、*MDA-MB-231*（ヒト白色人乳腺癌）、*K562*（ヒト白色人慢性骨髓性白血病）、*U-87 MG*（ヒト膠芽腫星細胞腫）、*MRC-5*（*PD 25*）（ヒト胎児肺）、*A2780 cis*（ヒト卵巣癌）、*B9*（マウス B 細胞ハイブリドーマ）、*CHO-K1*（チャイニーズハムスター卵巣）、*MDCK*（コッカースパニエルイヌ腎臓）、*1321 N1*（ヒト脳星状細胞腫）、*A431*（ヒト扁平上皮癌）、*ATDC5*（マウス *129* 奇形癌 *AT805* 由来）、*RCC4 PLUS VECTOR ALONE*（ネオマイシン耐性を付与する空の発現ベクター、*pcDNA3* で安定的にトランスフェクトさせた腎細胞癌細胞株 *RCC4*）、*HUVEC*（*S200-05n*）（プレスクリーニングされたヒト臍静脈内皮細胞（*HUVEC*））、新生児、*Ver o*（アフリカミドリザル腎臓）、*RCC4 PLUS VHL*（*pcDNA3-VHL* で安定的にトランスフェクトさせた腎細胞癌細胞株 *RCC4*）、*Fao*（ラット肝細胞癌）、*J774A.1*（マウス *BALB/c* 単球マクロファージ）、*MC3T3-E1*（マウス *C57BL/6* 頭蓋冠）、*J774.2*（マウス *BALB/c* 単球マクロファージ）、*PNT1A*（*SV40* で不死化させた思春期後のヒト正常前立腺）、*U-2 OS*（ヒト骨肉腫）、*HCT 116*（ヒト大腸癌）、*MA104*（アフリカミドリザル腎臓）、*BEAS-2B*（ヒト正常気管支上皮）、*NB2-11*（ラットリンパ腫）、*BHK 21*（クローン *13*）（シリアンハムスター腎臓）、*NS0*（マウス骨髓腫）、*Neuro 2a*（アルビノマウス神経芽細胞腫）、*SP2/0-Ag14*、マウス×マウス非産生性骨髓腫、*T47D*（ヒト乳腫瘍）、*1301*（ヒト T 細胞白血病）、*MDCK-II*（コッカースパニエルイヌ腎臓）、*PNT2*（*SV40* で不死化させたヒト正常前立腺）、*PC-3*（ヒト白色人前立腺癌）、*TF1*（ヒト赤白血病）、*COS-7*（*SV40* で形質転換させたアフリカミドリザル腎臓）、*M*

DCK (コッカースパニエルイヌ腎臓)、HUV EC (200-05n)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC)、新生児、NCI-H322 (ヒト白色人細気管支肺癌)、SK.N.SH (ヒト白色人神経芽細胞腫)、LNCaP.FGC (ヒト白色人前立腺癌)、OE21 (ヒト白色人食道扁平上皮癌)、PSN1 (ヒト膵臓腺癌)、ISHIKAWA (ヒトアジア人子宮内膜線癌)、MFE-280 (ヒト白色人子宮内膜腺癌)、MG-63 (ヒト骨肉腫)、RK 13 (BVDV陰性ウサギ腎臓)、EoL-1細胞 (ヒト好酸球性白血病)、VCaP (ヒト前立腺癌転移)、tsA201 (SV40で形質転換させたヒト胚腎臓)、CHO (チャイニーズハムスター卵巣)、HT 1080 (ヒト線維肉腫)、PANC-1 (ヒト白色人膵臓)、Saos-2 (ヒト原発性骨原性肉腫)、線維芽細胞増殖培地 (116K-500)、線維芽細胞増殖培地キット、ND7/23 (マウス神経芽細胞腫×ラットニューロンハイブリッド)、SK-OV-3 (ヒト白色人卵巣腺癌)、COV434 (ヒト卵巣顆粒膜腫瘍)、Hep 3B (ヒト肝細胞癌)、Ver o (WHO) (アフリカミドリザル腎臓)、Nthy-ori 3-1 (ヒト甲状腺濾胞上皮)、U373 MG (ウブサラ) (ヒト膠芽腫星細胞腫)、A375 (ヒト悪性黒色腫)、AGS (ヒト白色人胃腺癌)、CAKI 2 (ヒト白色人腎細胞癌)、COLO 205 (ヒト白色人結腸腺癌)、COR-L23 (ヒト白色人肺大細胞癌)、IMR 32 (ヒト白色人神経芽細胞腫)、QT 35 (日本ウズラ線維肉腫)、WI 38 (ヒト白色人胎児肺)、HMEI (ヒト腫瘍悪性黒色腫)、HT55 (ヒト大腸癌)、TK6 (ヒトリンパ芽球、チミジンキナーゼヘテロ接合体)、SP2/0-AG14 (ACFREE) (非分泌性、無血清、動物成分 (AC) 不含マウス×マウスハイブリドーマ)、AR42J、またはラット膵外分泌腫瘍、あるいはそれらの任意の組み合わせである。

【0067】

本明細書に記載の細胞および細胞株は、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸を含む。ある実施形態では、細胞株は、哺乳動物細胞株である。ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターは、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列、FOSプロモーターヌクレオチド配列または血清応答エレメントヌクレオチド配列である。ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターは、NFAT応答エレメント調節プロモーターである。ある実施形態では、細胞株は、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸であって、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記レポーターをコードする前記ヌクレオチド配列の5'であり、前記合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子によって結合できる、レポーター核酸を含む。

【0068】

ある実施形態では、細胞株は、高い基礎レポーター活性を含む。ある実施形態では、高い基礎レポーター活性は、バックグラウンドより少なくとも約5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%大きく、バックグラウンドは、レポーターを含まない細胞または細胞株において観察されるレポーター活性レベルである。このような比較のために、概して、コンパレータとして使用される細胞または細胞株は、レポーターを含む細胞株の親になる (例えば、レポーターを有するHEK293対レポーターを有さないHEK293)。

【0069】

ある実施形態では、細胞株は、高い基礎レポーター活性を含む。ある実施形態では、高い基礎レポーター活性は、バックグラウンドより少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、32倍、50倍、75倍、100倍、200倍、500倍、750倍、1,000倍、2,000倍、5,000倍、10,000倍または20,000倍大きく、バックグラウンドは、レポータ

ーを含まない細胞または細胞株において観察されるレポーター活性レベルである。ある実施形態では、細胞株は、高い基礎レポーター活性を含む。ある実施形態では、高い基礎レポーター活性は、バックグラウンドより少なくとも約30倍大きく、バックグラウンドは、レポーターを含まない細胞または細胞株において観察されるレポーター活性レベルである。ある実施形態では、高い基礎レポーターは、バックグラウンドより少なくとも約32倍大きく、バックグラウンドは、レポーターを含まない細胞または細胞株において観察されるレポーター活性レベルである。このような比較のために、概して、コンパレータとして使用される細胞または細胞株は、レポーターを含む細胞株の親になる（例えば、レポーターを有するHEK293対レポーターを有さないHEK293）。

【0070】

ある実施形態では、細胞株は、基礎レポーター活性において低い変動を含む。ある実施形態では、基礎レポーター活性における低い変動は、約0.6未満の生体変動係数である。ある実施形態では、基礎レポーター活性における低い変動は、約0.5未満の生体変動係数である。ある実施形態では、基礎レポーター活性における低い変動は、約0.4未満の生体変動係数である。ある実施形態では、基礎レポーター活性における低い変動は、約0.3未満の生体変動係数である。ある実施形態では、基礎レポーター活性における低い変動は、約0.2未満の生体変動係数である。ある実施形態では、基礎レポーター活性における低い変動は、約0.1未満の生体変動係数である。

【0071】

理論に拘束されるわけではないが、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸であって、前記応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列は、前記合成転写因子をコードする前記ヌクレオチド配列の5'である、転写因子核酸を含む少なくとも2つ、3つ、4つまたは5つ以上のコピーを含むクローン細胞株を選択することによって、変動の低減と、高い基礎活性レベルとが得られる。ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターは、cAMP応答エレメントヌクレオチド配列、NFAT転写因子応答エレメントヌクレオチド配列、FOSプロモーターヌクレオチド配列または血清応答エレメントヌクレオチド配列である。ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターは、NFAT応答エレメント調節プロモーターである。ある実施形態では、細胞株は、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸の1つのコピーのみを含む。ある実施形態では、細胞株は、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸の2つのコピーのみを含む。ある実施形態では、細胞株は、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含み、組み込まれずに、あるいはエピソームの状態に維持されたレポーター核酸を含む。ある実施形態では、細胞株は、細胞シグナル伝達タンパク質のcDNAあるいはイントロンレスバージョンをコードする核酸をさらに含む。ある実施形態では、細胞シグナル伝達タンパク質は、GPCRあるいはGPCRサブユニットである。

【0072】

ある実施形態では、細胞は、Gタンパク質共役型受容体ファミリーメンバーをコードする核酸を含む。Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、7回（パス）膜貫通型ドメイン受容体としても知られているが、リガンド結合細胞表面シグナル伝達タンパク質である。リガンドがGPCRに結合すると、GPCRのコンホメーション変化を引き起こし、それによって、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）として機能することが可能になる。GPCRは、その後、GTPのためのGタンパク質に結合したGDPを変換することによって、附随Gタンパク質を活性化することができる。その後、Gタンパク質のαサブユニットは、結合したGTPと共に、βサブユニットとγサブユニットから分離することができ、αサブユニットタイプ（Gαs、Gαi/o、Gαq/11、Gα12/13）に直接依存する細胞内シグナル伝達タンパク質または標的機能タンパク質にさらに影響を及ぼす。少なくとも約800のGPCRがヒトゲノムにコードされており、これらは、大き

10

20

30

40

50

くクラス A、B および C に分けられ、本明細書の系に利用できる。ある実施形態では、G タンパク質共役型受容体ファミリーメンバーをコードする核酸は、ゲノムに組み込まれることができる。ある実施形態では、G タンパク質共役型受容体ファミリーメンバーをコードする核酸は、エピソームとして維持されることができる。

【0073】

ある実施形態では、細胞は、受容体チロシンキナーゼファミリーメンバーをコードする核酸を含む。受容体チロシンキナーゼ (RTK) は、多数のポリペプチド増殖因子、サイトカインおよびホルモンに対する高親和性細胞表面受容体である。受容体チロシンキナーゼは、正常な細胞プロセスの主要な調節因子であるだけでなく、多数の種類の癌の発症と進行において重大な役割を持つことが示されてきた。RTK には、多数のクラスが存在し、そのいずれのメンバーも本明細書に記載の系で利用できる。ある実施形態では、RTK は、RTK クラス I (EGF 受容体ファミリー) (ErbB ファミリー)、RTK クラス II (インスリン受容体ファミリー)、RTK クラス III (PDGF 受容体ファミリー)、RTK クラス IV (VEGF 受容体ファミリー)、RTK クラス V (FGF 受容体ファミリー)、RTK クラス VI (CKK 受容体ファミリー)、RTK クラス VII (NGF 受容体ファミリー)、RTK クラス VIII (HGF 受容体ファミリー)、RTK クラス IX (Eph 受容体ファミリー)、RTK クラス X (AXL 受容体ファミリー)、RTK クラス XI (TIE 受容体ファミリー)、RTK クラス XII (RYK 受容体ファミリー)、RTK クラス XIII (DDR 受容体ファミリー)、RTK クラス XIV (RET 受容体ファミリー)、RTK クラス XV (ROS 受容体ファミリー)、RTK クラス XVI (LTK 受容体ファミリー)、RTK クラス XVII (ROR 受容体ファミリー)、RTK クラス XVIII (MUSK 受容体ファミリー)、RTK クラス XIX (LMR 受容体) または RTK クラス XX (未決定) メンバーを含む。ある実施形態では、RTK ファミリーメンバーをコードする核酸は、ゲノムに組み込まれることができる。ある実施形態では、RTK ファミリーメンバーをコードする核酸は、エピソームとして維持されることができる。

【0074】

また、NFAT 応答エレメントを含む哺乳動物細胞株が本明細書に記載されている。ある実施形態では、NFAT 応答エレメントを含む哺乳動物細胞株は、cb29 を含む。

【0075】

また、NFAT 応答エレメントを含む哺乳動物細胞株が本明細書に記載されている。ある実施形態では、NFAT 応答エレメントを含む哺乳動物細胞株は、cb37 を含む。

【0076】

系の使用方法

本発明のポリヌクレオチド配列は、細胞にトランスフェクトされると利用できる。トランスフェクションは、リポフェクションを含むがこれらに限らない様々なトランスフェクション剤、リン酸カルシウム沈澱、ウイルス形質導入またはエレクトロポレーションによって達成できる。トランスフェクションは、一過性のものであるか、あるいは安定的なものであってもよい。トランスフェクションが安定的なものである実施形態では、安定的にトランスフェクトされた細胞は、後に使用するために凍結またはバンクできる。

【0077】

ある実施形態では、単一の核酸リレー系は、細胞集団にトランスフェクトされる。ある実施形態では、1、2、3、4、5、10 または 100 以上の核酸リレー系は、細胞集団にトランスフェクトされる。ある実施形態では、2つの核酸リレー系は、細胞集団にトランスフェクトされる。ある実施形態では、3つの核酸リレー系は、細胞集団にトランスフェクトされる。ある実施形態では、4つの核酸リレー系は、細胞集団にトランスフェクトされる。ある実施形態では、5つの核酸リレー系は、細胞集団にトランスフェクトされる。複数の核酸リレー系で細胞集団がトランスフェクトされるある実施形態では、前記複数の核酸リレー系は、異なる応答エレメント調節プロモーターを含む。前記複数の核酸リレー系が異なる応答エレメント調節プロモーターを含むある実施形態では、前記複数の核酸

リレー系は、異なるレポーターを含む。ある実施形態では、前記異なるレポーターは、U M Iを含む。

【0078】

本発明の核酸でトランスフェクトされた細胞集団は、任意の大きさであってもよい。ある実施形態では、細胞集団は、1,000、10,000、100,000、1,000,000または10,000,000以上の細胞を含む。ある実施形態では、1つ以上の転写リレー系で少なくとも約1,000以上の細胞がトランスフェクトされる。ある実施形態では、1つ以上の転写リレー系で少なくとも約10,000以上の細胞がトランスフェクトされる。ある実施形態では、1つ以上の転写リレー系で少なくとも約100,000以上の細胞がトランスフェクトされる。ある実施形態では、1つ以上の転写リレー系で少なくとも約1,000,000以上の細胞がトランスフェクトされる。ある実施形態では、1つ以上の転写リレー系で少なくとも約10,000,000以上の細胞がトランスフェクトされる。

10

【0079】

ある実施形態では、本発明の核酸系は、マルチウェルプレート実験で利用できる。本発明の核酸リレー系に適合したマルチウェルプレートの非限定的な例には、6、12、24、48、96、384または1,536ウェルプレートが含まれる。ある実施形態では、マルチウェルプレートの各ウェルは、単一の転写リレー系でトランスフェクトされた細胞集団を含む。ある実施形態では、マルチウェルプレートの各ウェルは、複数の転写リレー系でトランスフェクトされた細胞集団を含む。ある実施形態では、各ウェルは、各細胞集団が単一の核酸リレー系でトランスフェクトされた複数の細胞集団を含む。ある実施形態では、各ウェルは、各細胞集団が複数の核酸リレー系でトランスフェクトされた複数の細胞集団を含む。

20

【0080】

ある実施形態では、本発明の転写リレー系でトランスフェクトされた細胞に試験剤が適用される。ある実施形態では、前記細胞に前記試験剤を接触させた後に、レポーター分子の転写の活性化レベルが測定される。ある実施形態では、前記検査剤は、化学物質、低分子、生体分子、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、アプタマー、またはそれらの任意の組み合わせである。ある実施形態では、細胞集団に単一の試験剤が適用される。ある実施形態では、細胞集団に複数の試験剤が適用される。

30

【0081】

ある実施形態では、本発明の転写リレー系は、試験剤に対するGPCRの反応を測定するように適合される。本発明の核酸系は、任意のGPCR受容体と使用するように適合できる。ある実施形態では、前記転写リレー系は、cAMP応答エレメント調節プロモーターを利用することによって、GPCR受容体と使用するように適合される。GPCRの非限定的な例には、5-ヒドロキシトリプタミン受容体、アセチルコリン受容体、アデノシン受容体、アドレナリン受容体、アンジオテンシン受容体、アペリン受容体、胆汁酸受容体、ボンベシン受容体、ブラジキニン受容体、カンナビノイド受容体、ケメリン受容体、ケモカイン受容体、コレシストキニン受容体、ドーパミン受容体、エンドセリン受容体、ホルミルペプチド受容体、遊離脂肪酸受容体、ガラニン受容体、グレリン受容体、糖タンパク質ホルモン受容体、性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体、GPR18、GPR55、GPR119、Gタンパク質共役型エストロゲン受容体、ヒスタミン受容体、ヒドロキシカルボン酸受容体、キスペプチン受容体、ロイコトリエン受容体、LPA受容体、S1P受容体、メラニン凝集ホルモン受容体、メラノコルチン受容体、メラトニン受容体、モチリン受容体、ニューロメジンU受容体、神経ペプチドFF/神経ペプチドAF受容体、神経ペプチドS受容体、神経ペプチドW/神経ペプチドB受容体、神経ペプチドY受容体、ニューロテンシン受容体、オピオイド受容体、オプシン受容体、オレキシン受容体、オキソグルタル酸受容体、P2Y受容体、血小板活性化因子受容体、プロキネチン受容体、プロラクチン放出ペプチド受容体、プロスタノイド受容体、プロテアーゼ活性化受容体、QRF受容体、リラキシンファミリーペプチド受容体、ソマトスタチン受容体、コ

40

50

ハク酸受容体、タキキニン受容体、サイトロロピン放出ホルモン受容体、微量アミン受容体、ウロテンシン受容体、バソプレシンおよびオキシトシン受容体、カルシトニン受容体、コルチコトロピン放出因子受容体、グルカゴン受容体ファミリー、副甲状腺ホルモン受容体、VIPおよびPACAP受容体、カルシウム感知受容体、GABAB受容体、代謝型グルタミン酸受容体、味覚1受容体、f r i z z l e dクラス受容体、接着クラスGPCR、オーファン受容体、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0082】

本発明の核酸は、当技術分野において一般的な多数のベクターに適合する。ベクターの非限定的な例には、ゲノム組み込み型ベクター、エピソーマルベクター、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、バクテリア人工染色体および酵母人工染色体が含まれる。本発明の核酸に適合するウイルスベクターの非限定的な例には、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス由来のベクターが含まれる。ある実施形態では、本発明の核酸は、ゲノム内の規定された位置または制限された部位のセットに部位特異的な組み込み（例えば、A t t P - A t t B 組み換え）を指向する配列を含むベクターに存在する。

【0083】

ある実施形態では、本明細書に記載の転写リレー系は、単一のベクターに取り込まれる。ある実施形態では、前記単一のベクターは、一過的に細胞にトランスフェクトされる。ある実施形態では、前記単一のベクターは、安定的に細胞にトランスフェクトされる。

【0084】

ある実施形態では、前記転写リレー系は、2つのベクターにわたって分けられる。ある実施形態では、応答エレメント調節プロモーターヌクレオチド配列と、合成転写因子をコードするヌクレオチド配列とを含む転写因子核酸が、第1のベクターに取り込まれ、合成転写因子プロモーターヌクレオチド配列と、レポーターをコードするヌクレオチド配列とを含むレポーター核酸は、第2のベクターに取り込まれる。ある実施形態では、前記第1のベクターおよび前記第2のベクターは、一過的に細胞にトランスフェクトされる。ある実施形態では、前記第1のベクターおよび前記第2のベクターは、安定的に細胞にトランスフェクトされる。ある実施形態では、前記第1のベクターは、安定的に細胞にトランスフェクトされ、前記第2のベクターは、一過的に細胞にトランスフェクトされる。ある実施形態では、前記第1のベクターは、一過的に細胞にトランスフェクトされ、前記第2のベクターは、安定的に細胞にトランスフェクトされる。

【0085】

本明細書またはその一部に記載の転写リレー系を含むベクターは、多数の周知の分子生物学技術を使用して構成できる。増幅、クローニング、突然変異誘発、形質転換などを含むこのような多数のプロトコルの詳細のプロトコルは、例えば Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (supplemented through 2012) John Wiley & Sons, New York 10 (“Ausubel”); Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (4th Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2012 (“Sambrook”); および Abelson et al. Guide to Molecular Cloning Techniques (Methods in Enzymology) volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (“Abelson”) に記載されている。

【実施例】

【0086】

以下の例示的な実施例は、本明細書に記載の組成物および方法の代表的な実施形態であり、何ら限定することを意味するものではない。

【0087】

実施例 1 – CRE 活性化について GPCR 受容体をスクリーニングする実施例

この実施例では、GPCR シグナル伝達を誘導する潜在的な化合物についてスクリーニングするために、図 1 A および図 1 B に構成されている核酸を含む転写リレー系を使用する。この実施例では、図 1 A の核酸は、cAMP 応答エレメント (CRE) の活性化を含み、これは、結果として (Gal4 DNA 結合ドメインと、キメラ活性化ドメイン VP64-p65-Rta とを含む) 合成転写因子 Gal4-VPR の発現をもたらす。図 1 B の核酸は、Gal4-VPR 合成転写因子によって結合されて活性化できるプロモーターを含み、これは、結果としてルシフェラーゼ遺伝子と、UMI をコードする遺伝子とを含むレポーターエレメントの発現をもたらす。使用される細胞は、図 1 A および図 1 B の系をコードする、安定的に組み込まれた核酸と、所与の GPCR とを含む。各 UMI は、所与の GPCR に対応付けられ、CRE の発現が、特定の GPCR にマップされることを可能にする。これによって、アッセイの多重化が可能になる。

【0088】

1 日目、96 ウェルアッセイプレートの DMEM に 35,000 細胞/ウェルで細胞をプレATINGする。2 日目、培地を 0.5% FBS + DMEM に交換する。3 日目、培地を取り除き、25 uL の Opti-mem に、所望の濃度の試験化合物を加える。約 4 時間後、培地を取り除き、RNA の抽出のために lysis buffer に置き換える。RNA は、標準的な方法またはキットを使用して抽出し、その後、標準的なアッセイによって定量化する。その後、シーケンシングライブラリの調製後に、Illumina 社の MiSeq で RNA シーケンスを実施する。

【0089】

実施例 2 – NFAT 活性化について GPCR 受容体をスクリーニングする実施例

この実施例では、GPCR シグナル伝達を誘導する潜在的な化合物についてスクリーニングするために、図 1 A および図 1 B に構成されている核酸を含む転写リレー系を使用する。この実施例では、図 1 A の核酸は、活性化 T 細胞応答エレメントの核因子 (NFAT) の活性化を含み、これは、結果として (Gal4 DNA 結合ドメインと、キメラ活性化ドメイン VP64-p65-Rta とを含む) 合成転写因子 Gal4-VPR の発現をもたらす。図 1 B の核酸は、Gal4-VPR 合成転写因子によって結合されて活性化できるプロモーターを含み、これは、結果としてルシフェラーゼ遺伝子と、UMI をコードする遺伝子とを含むレポーターエレメントの発現をもたらす。使用される細胞は、図 1 A および図 1 B の系をコードする、安定的に組み込まれた核酸と、所与の GPCR とを含む。各 UMI は、所与の GPCR に対応付けられ、CRE の発現が、特定の GPCR にマップされることを可能にする。これによって、アッセイの多重化が可能になる。

【0090】

1 日目、96 ウェルアッセイプレートの DMEM に 35,000 細胞/ウェルで細胞をプレATINGする。2 日目、培地を 0.5% FBS + DMEM に交換する。3 日目、培地を取り除き、25 uL の Opti-mem に、所望の濃度の試験化合物を加える。約 4 時間後、培地を取り除き、RNA の抽出のために lysis buffer に置き換える。RNA は、標準的な方法またはキットを使用して抽出し、その後、標準的なアッセイによって定量化する。その後、シーケンシングライブラリの調製後に、Illumina 社の MiSeq で RNA シーケンスを実施する。

【0091】

実施例 3 – 複数の GPCR の CRE 活性化について GPCR 受容体をスクリーニングする実施例

この実施例では、GPCR シグナル伝達を誘導する潜在的な化合物についてスクリーニングするために、各々が図 1 A および図 1 B に構成されている複数の核酸を含む 100 以上の転写リレー系を使用する。この実施例では、図 1 A の各核酸は、cAMP 応答エレメント (CRE) の活性化を含み、これは、結果として (Gal4 DNA 結合ドメインと、キメラ活性化ドメイン VP64-p65-Rta とを含む) 合成転写因子 Gal4-VPR の発現をもたらす。図 1 B の各核酸は、Gal4-VPR 合成転写因子によって結合

されて活性化できるプロモーターを含み、これは、結果としてルシフェラーゼ遺伝子と、UMIをコードする遺伝子とを含むレポーターエレメントの発現をもたらす。使用される細胞集団はそれぞれ、図1Aおよび図1Bの系をコードする、安定的に組み込まれた核酸と、所与の単一のGPCRとを含む。各細胞集団が単一の固有のGPCRをコードする100以上の複数の細胞集団と一緒に混合して、混合細胞集団を形成する。各UMIは、所与のGPCRに対応付けられ、CREの発現が、特定のGPCRにマップされることを可能にする。これによって、アッセイの多重化が可能になる。

【0092】

1日目、96ウェルアッセイプレートのDMEMに35,000細胞/ウェルで前記混合細胞集団をプレーティングする。2日目、培地を0.5%FBS+DMEMに交換する。3日目、培地を取り除き、25μLのOpti-memに、所望の濃度の試験化合物を加える。約4時間後、培地を取り除き、RNAの抽出のためにlysis bufferに置き換える。RNAは、標準的な方法またはキットを使用して抽出し、その後、標準的なアッセイによって定量化する。その後、シーケンシングライブラリの調製後に、Illumina社のMiSeqでRNAシーケンスを実施する。

【0093】

実施例4-転写リレーを使用してレポーター産物を増幅する

この実施例の実験では、転写リレー系を使用すると、転写リレーを有さない系と比較して、ルシフェラーゼシグナルが増加し、ルシフェラーゼシグナルの変動係数が低下することを示す。半無作為に組み込まれたCRE-Gal4-VPRの複数のコピーと共に、単一で組み込まれたCRE-ルシフェラーゼを保有するHEK293由来の細胞、または、単一で組み込まれたUAS-ルシフェラーゼを保有する細胞を、白色壁のポリ-L-リシンをコートした96ウェルプレートの100μLのDMEM+10%FBSに30,000細胞/ウェルでプレーティングする。45ngのドキシサイクリンを有する50μLのOpti-memを細胞の上に加えた。24時間後に、DMSOを加えた。表示された期間にわたって、細胞をDMSOで処理した。表示されたインキュベーション時間の後に、培地を吸引して、35μLのDMEMと置き換え、そして、製造業者の説明書に従ってBright-Glo Luciferase Assayキット[Promega]を使用して、細胞をアッセイした。半無作為に組み込まれたCRE-Gal4-VPRの複数のコピーと共に、結果として生じる、単一で組み込まれたCRE-ルシフェラーゼを保有する細胞（灰色）と、単一で組み込まれたUAS-ルシフェラーゼを保有する細胞（黒色）のルシフェラーゼ活性化の発現を図2に示す。実験は技術的に3回繰り返して実施し、図3に各試料の変動係数を算出した。

【0094】

実施例5-Gal4-VPRのデグロンタグを使用して、転写リレーの誘導倍率(fold induction)を増強する

この実施例の実験では、転写リレー系のGal4-VPRにデグロンタグを含むと、ルシフェラーゼシグナルの誘導倍率が増加することを示す。単一で組み込まれたTRE-CRM3::UAS-ルシフェラーゼ二重遺伝子カセットと、多重に半無作為に組み込まれたFOS-Gal4-VPR-CP(デグロン)またはFOS-Gal4-VPR(デグロンなし)とを保有するHEK293由来の細胞を、白色壁のポリ-L-リシンをコートした96ウェルプレートの100μLのDMEM+10%FBSに30,000細胞/ウェルでプレーティングした。45ngのドキシサイクリンを有する50μLのOpti-memを細胞の上に加えた。24時間後に、8時間にわたって、細胞をDMSOまたは1μMのカルバコールで処理した。表示されたインキュベーション時間の後に、培地を吸引して、35μLのDMEMと置き換え、そして、製造業者の説明書に従ってBright-Glo Luciferase Assayキット[Promega]を使用して、細胞をアッセイした。結果としてもたらされる、カルバコールにおけるルシフェラーゼ活性対DMSOにおけるルシフェラーゼ活性の比率を、図4にプロットする。

【0095】

実施例 6 – N F A T 応答エレメントを含む細胞株

この実施例に記載の細胞株は、組み込まれた N F A T ー応答エレメント転写リレー（合成転写因子の N F A T プロモーター駆動転写）のコピーを有する。これらの細胞株は、コピー数および組み込み部位の面で異種の遺伝子プールとして生成した。このプールから、単一の細胞クローンを単離して拡張させた。これらの株をさらに使用して、G P C R および U A S ー ルシフェラーゼバーコードレポーターを組み込み、N F A T シグナル伝達の多重化を検出する能力を試験した。これらの 10 の細胞ライブラリから、コントロールアゴニストに対して、最も大きい数の明確な G P C R ヒットを検出することができたものを 2 つ同定したが、これらは、図 5 に示しているように c b 2 9（クローン c 7 1 3 から構成されている）および c b 3 7（クローン c 7 0 8 から構成されている）である。

10

【 0 0 9 6 】

重要なことに、これらの 2 つの細胞ライブラリを生じさせたアイソタイプの細胞株が、共通した 2 つの特性を共有していたことを見出した。第 1 に、これらの細胞株は、刺激されていない状態で最も多量のレポーター発現を示していた（図 6 「基礎活性ーリバーストランスフェクション」を参照）。第 2 に、おそらく依存的に、対応する 2 つの細胞ライブラリは、最も低いレベルの変動を示していた（図 6 「B C V」を参照）。

【 0 0 9 7 】

本発明の好ましい実施形態が本明細書で示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないことが当業者には明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく多数の変形、変更および置換を思いつくであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態の様々な代替が、本発明の実施において採用され得ることを理解されたい。

20

【 0 0 9 8 】

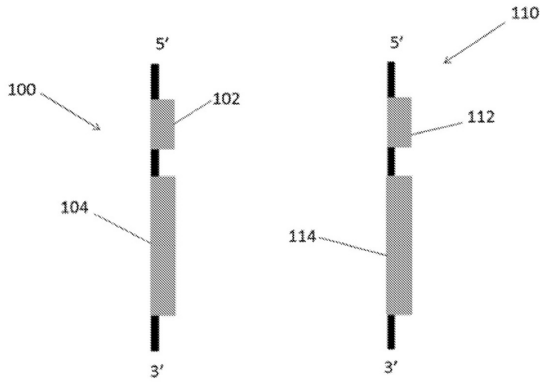
本明細書で言及されているすべての刊行物、特許出願、発行済み特許、およびその他の文書は、個々の刊行物、特許出願、発行済み特許、またはその他の文書が具体的かつ個別に、その全体が参照により組み込まれると示されているように、参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる文章に含まれている定義は、それらが本開示の定義に矛盾する程度で除外される。

30

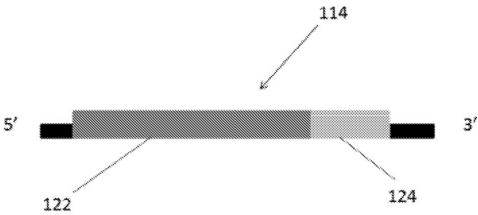
40

50

【図面】
【図 1 A】

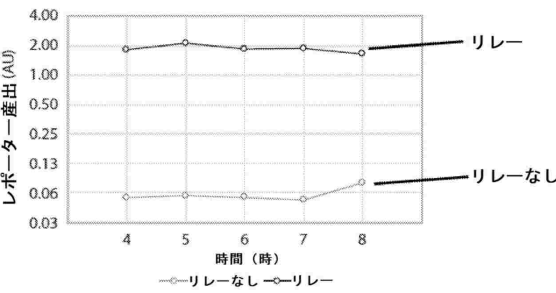


【図 1 B】

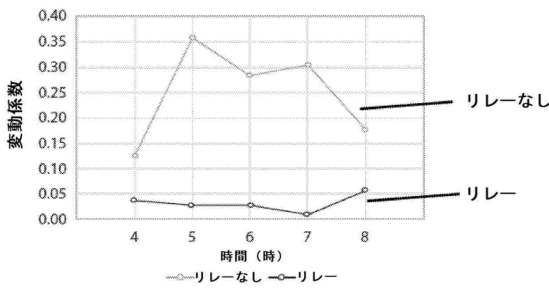


10

【図 2】



【図 3】



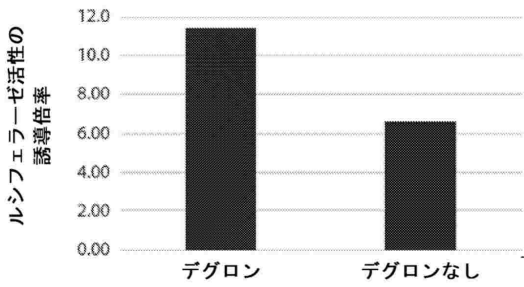
20

30

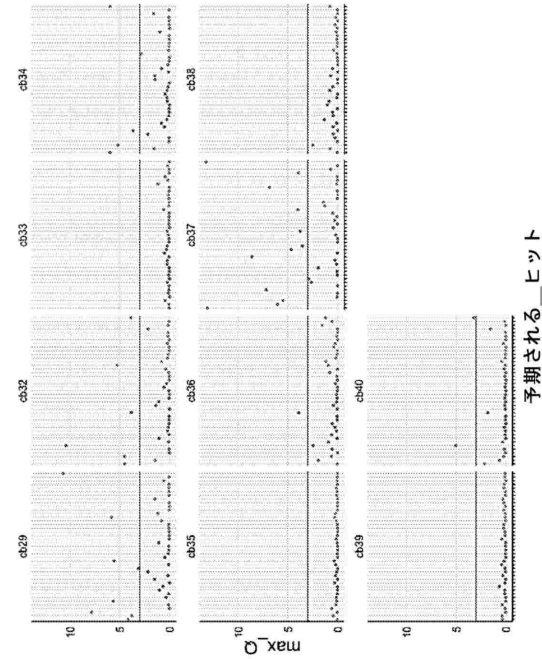
40

50

【図 4】



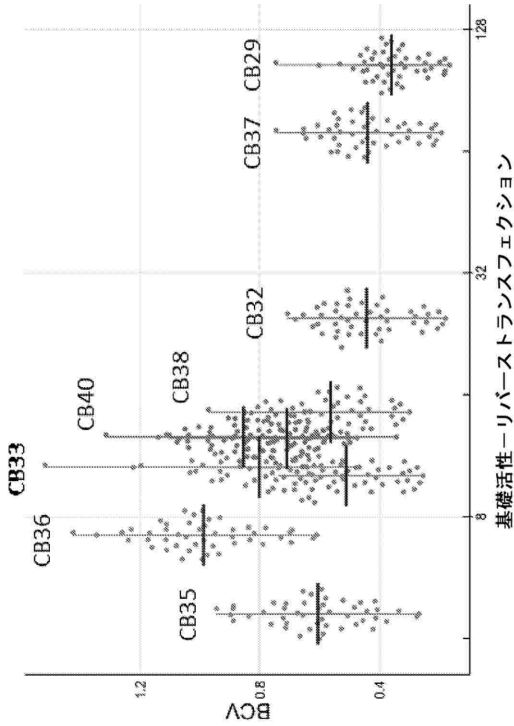
【図 5】



10

20

【図 6】



30

40

【配列表】

0007545999000001.app

50

フロントページの続き

ニア州 エメリービル 67番・ストリート 1464

(72)発明者 チャン, ヘンリー

アメリカ合衆国 94608 カリフォルニア州 エメリービル 67番・ストリート 1464

審査官 松本 淳

(56)参考文献 特表2004-508288 (JP, A)

特表2003-512827 (JP, A)

特表2020-509850 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/00-1/38

C12N 5/00-5/28

C12N 9/00-9/99

C12Q 1/00-3/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)