

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6708633号  
(P6708633)

(45) 発行日 令和2年6月10日 (2020.6.10)

(24) 登録日 令和2年5月25日 (2020.5.25)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/48 (2006.01)  
GO 1 N 33/53 (2006.01)  
C 1 2 N 15/00 (2006.01)  
C 1 2 N 1/15 (2006.01)  
C 1 2 N 1/19 (2006.01)

GO 1 N 33/48 P  
GO 1 N 33/53 D  
C 1 2 N 15/00  
C 1 2 N 1/15  
C 1 2 N 1/19

請求項の数 26 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-515812 (P2017-515812)  
(86) (22) 出願日 平成27年9月21日 (2015.9.21)  
(65) 公表番号 特表2017-534851 (P2017-534851A)  
(43) 公表日 平成29年11月24日 (2017.11.24)  
(86) 国際出願番号 PCT/CA2015/050924  
(87) 国際公開番号 W02016/041093  
(87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016.3.24)  
審査請求日 平成30年9月18日 (2018.9.18)  
(31) 優先権主張番号 62/052,738  
(32) 優先日 平成26年9月19日 (2014.9.19)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国 (US)

(73) 特許権者 510303442  
ザ ロイヤル インスティテューション  
フォー ザ アドバンスメント オブ ラ  
ーニング/マクギル ユニバーシティ  
カナダ国、エイチ3エー Oジー4、ケベ  
ック、モントリオール、845 シャーブ  
ルック ストリート ウェスト  
(73) 特許権者 512123824  
ユニベルシテ ドゥ モントリオール  
カナダ国、アッシュ3セ 3ア7 モント  
リオール (ケベック)、ブルバール エ  
ドゥアールーモンブティ 2900  
(74) 代理人 100099759  
弁理士 青木 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞における生体分子の局在化及び輸送をモニタリングするためのバイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Renilla 緑色蛍光タンパク質 (Renilla GFP) または Renilla  
ルシフェラーゼタンパク質 (Renilla Luc) で標識された目的のタンパク質を  
含む第1の構成成分と、

Renilla GFP または Renilla Luc で標識された細胞区画標的化部  
分を含む第2の構成成分と

を含み、

前記目的のタンパク質が前記 Renilla GFP で標識される場合、前記細胞区画標  
的化部分は前記 Renilla Luc で標識され、前記目的のタンパク質が前記 Ren  
illa Luc で標識される場合、前記細胞区画標的化部分は前記 Renilla G  
FP で標識される

目的のタンパク質の輸送及び/または局在化を評価するバイオセンサー。

【請求項 2】

前記目的のタンパク質は前記 Renilla Luc で標識され、前記細胞区画標的化  
部分は前記 Renilla GFP で標識される、請求項 1 に記載のバイオセンサー。

【請求項 3】

前記目的のタンパク質が、i) エフェクタータンパク質、ii) 低分子 GTP アーゼに  
結合するタンパク質、iii) - アレスチンポリペプチド、iv) 細胞表面受容体タン  
パク質、v) G タンパク質サブユニットポリペプチド、vi) シグナル伝達ペプチド、v

10

20

i i ) アダプタータンパク質、v i i i ) 受容体の刺激により形質膜へ動員されるタンパク質、i x ) 受容体の刺激により形質膜から隔離されるタンパク質、または x ) それらのフラグメントである、請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサー。

【請求項 4】

前記低分子 G T P アーゼに結合するタンパク質が、R h o 結合ポリペプチドである、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

【請求項 5】

前記目的のタンパク質が細胞表面受容体である、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

【請求項 6】

前記細胞表面受容体が G タンパク質共役型受容体 ( G P C R ) または受容体チロシンキナーゼ ( R T K ) である、請求項 5 に記載のバイオセンサー。

10

【請求項 7】

前記目的のタンパク質がプレクストリン相同 ( P H ) ドメインを含む、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

【請求項 8】

前記目的のタンパク質が P L C 1 の P H ドメインを含む、請求項 7 に記載のバイオセンサー。

【請求項 9】

前記目的のタンパク質がホルボールエステル / ジアシルグリセロール結合ドメインを含む、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

20

【請求項 10】

前記目的のタンパク質が P K C ( C 1 b ) のホルボールエステル / ジアシルグリセロール結合ドメインを含む、請求項 9 に記載のバイオセンサー。

【請求項 11】

前記目的のタンパク質が、少なくとも 1 つの S H 2 及び / または S H 3 ドメインを含むアダプタータンパク質あるいはそのフラグメントである、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

【請求項 12】

前記細胞区画標的化部分が、形質膜 ( P M ) 標的化部分、エンドソーム標的化部分、ゴルジ標的化部分、リソソーム標的化部分、ペルオキシソーム標的化部分、オートファゴソーム標的化部分、リボソーム標的化部分、ミトコンドリア標的化部分、細胞骨格標的化部分または核標的化部分である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

30

【請求項 13】

前記細胞区画標的化部分が形質膜 ( P M ) 標的化部分またはエンドソーム標的化部分である、請求項 12 に記載のバイオセンサー。

【請求項 14】

前記 P M 標的化部分が、( a ) パルミトイル化、ミリストイル化及び / もしくはプレニル化シグナル配列、ならびに / または ( b ) 多塩基配列を含む、請求項 13 に記載のバイオセンサー。

【請求項 15】

前記 P M 標的化部分が、アミノ酸配列 M G C I K S K G K D S ( 配列番号 1 )、G K K K K K S K T K C V I M ( 配列番号 7 )、C M S C K C V L S ( 配列番号 47 )、C M S C K C C I L ( 配列番号 43 )、または S P K K G L L Q R L F K R Q H Q N N S K S ( 配列番号 8 ) を含む、請求項 14 に記載のバイオセンサー。

40

【請求項 16】

前記エンドソーム標的化部分が、F Y V E ドメインを含む、請求項 13 に記載のバイオセンサー。

【請求項 17】

前記エンドソーム標的化部分が、ヒト e n d o f i n の残基 739 ~ 806 ( 配列番号 20 ) を含む、請求項 16 に記載のバイオセンサー。

50

## 【請求項 18】

前記エンドソーム標的化部分が、前記 Renilla Luc もしくは前記 Renilla GFP の C 末端に融合している、及び/または、前記目的のタンパク質が、前記 Renilla Luc もしくは前記 Renilla GFP の N 末端に融合している、請求項 13、16 及び 17 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

## 【請求項 19】

前記目的のタンパク質が、前記 Renilla Luc の N 末端に融合している - アレスチンポリペプチドであり、かつ、前記細胞区画標的化部分が、前記 Renilla GFP の C 末端の端部に融合している、形質膜 (PM) 標的化部分またはエンドソーム標的化部分である、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

10

## 【請求項 20】

前記目的のタンパク質が、前記 Renilla Luc の N 末端に融合している GPCR であり、かつ、前記細胞区画標的化部分が、前記 Renilla GFP の C 末端の端部に融合している、形質膜 (PM) 標的化部分またはエンドソーム標的化部分である、請求項 5 に記載のバイオセンサー。

## 【請求項 21】

前記第 1 及び第 2 の構成成分が、50 ~ 500 個のアミノ酸の可動性ポリペプチドリッカーにより共有結合的に連結している、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

## 【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のバイオセンサーの前記第 1 及び/または第 2 の構成成分をコードする、核酸。

20

## 【請求項 23】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のバイオセンサーを発現する、宿主細胞。

## 【請求項 24】

作用物質が細胞中の目的のタンパク質の輸送を調節するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在及び不在で請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のバイオセンサーにおける BRET シグナルを測定することを含み、前記作用物質の不在下と比べた存在下での前記 BRET シグナルの差が、前記作用物質が前記細胞中の前記目的のタンパク質の前記輸送を調節することを示す、前記方法。

30

## 【請求項 25】

第 1 及び第 2 の条件間の細胞区画における生体分子の量の調節を評価する方法であって、

前記生体分子に結合するタンパク質マーカーで標識された Renilla 緑色蛍光タンパク質 (Renilla GFP) を含む第 1 の構成成分と

前記タンパク質マーカーで標識された Renilla ルシフェラーゼタンパク質 (Renilla Luc) を含む第 2 の構成成分とを含むバイオセンサーを提供することと、

前記第 1 及び第 2 の条件下の BRET 受容体シグナルを測定することとを含み、

40

前記第 1 及び第 2 の条件間の前記 BRET シグナルの差が、前記第 1 及び第 2 の条件間の前記細胞区画における前記生体分子の量の調節を示す、前記方法。

## 【請求項 26】

前記第 1 の条件が作用物質の存在であり、前記第 2 の条件が作用物質の不在である、請求項 25 に記載の方法。

## 【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、2014 年 9 月 19 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 052 , 738

50

号の利益を主張し、これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、一般に、タンパク質などの生体分子の局在化、移送及び輸送、例えば、細胞表面受容体エンドサイトーシス、再循環、ならびに受容体及びエフェクターの細胞内輸送の評価／モニタリングに関する。

【背景技術】

【0003】

タンパク質輸送は、タンパク質が細胞の1つの領域から別の領域に再配置される能動的プロセスである。膜及びそれらのタンパク質構成成分は、複数の構成成分及び経路を有する機構を介して常に入れ替わっている。Gタンパク質共役型受容体(GPCR)及び上皮増殖因子受容体(EGFR)などの細胞表面受容体の活性を調節する1つの機構は、受容体エンドサイトーシスを介するものである。GPCRでは、リガンド誘発性受容体エンドサイトーシスが、クラスリン被覆小胞のような特殊化された区画を介してPMからの受容体の除去を誘導することができ、これには、連結された受容体へのエンドサイトーシスアダプターである - アレスチンの動員を伴う(Claining, Laporte et al., 2002)。内部移行受容体を、多様なリソソーム及び再循環経路に向けて、ヘテロ三量体Gタンパク質を介した細胞シグナル伝達の強度及び持続時間に本質的に反対の効果を生じることができ、 - アレスチンのシグナル伝達足場を介して、細胞内膜から特定のシグナル伝達事象を促進することもできる(Hanyaloglu and von Zastrow 2008; Posner and Laporte 2010)。治療上の利点が、GPCR / - アレスチン複合体の細胞内標的化を促進する薬物において提案されているが、いくつかの受容体にとって、PMへの再循環も、生理学的応答の適切な維持にとって必須である。

【0004】

したがって、受容体輸送の簡素で信頼性の高いモニタリング系が、受容体エンドサイトーシスの機構を研究するため及びGPCRなどの細胞表面受容体に作用する効率的な治療薬を開発するための鍵である。例えば、アンギオテンシンII 1型受容体(AT1R)は、それが高血圧症、肥大症、線維症及びアテローム性動脈硬化症を含む心血管疾患の発症に関与し(Hunyady and Catt 2006)、心保護機能を有するリガンドが、受容体及び細胞内AT1R / - アレスチン信号伝達複合体の内部移行も促進しうるので、薬物開発において相当注目されている。したがって、GPCRなどの受容体の内部移行を誘発する薬物の傾向を、定量的で高い効率性をもって効率的に評価するアッセイを開発することによって、大きな利点が生じうる。

【0005】

本記載は、多数の文書を参照しているが、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、以下の項目1～73に関する。

1. Renilla 緑色蛍光タンパク質(Renilla GFP)またはRenilla アルシフェラーゼタンパク質(Renilla Luc)で標識された目的のタンパク質を含む第1の構成成分と、

Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された細胞区画標的化部分を含む第2の構成成分と

を含み、

前記第1のタンパク質が前記Renilla GFPで標識される場合、前記細胞区画標的化部分は前記Renilla Lucで標識され、前記第1のタンパク質が前記Renilla Lucで標識される場合、前記細胞区画標的化部分は前記Renilla GFPで標識される目的のタンパク質の輸送及び／または局在化を評価するバイオセンサー

。



## 【 0 0 0 7 】

2 . 前記目的のタンパク質は前記 R e n i l l a L u c で標識され、前記細胞区画標的化部分は前記 R e n i l l a G F P で標識される、項目 1 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 0 8 】

3 . 前記目的のタンパク質が、R h o 結合ポリペプチド、 $\gamma$ -アレスチンポリペプチド、細胞表面受容体または G タンパク質サブユニットポリペプチドである、項目 1 または 2 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 0 9 】

4 . 前記目的のタンパク質が R h o 結合ポリペプチドである、項目 3 に記載のバイオセンサー。

10

## 【 0 0 1 0 】

5 . 前記目的のタンパク質が細胞表面受容体である、項目 3 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 1 】

6 . 前記細胞表面受容体が G タンパク質共役型受容体 ( G P C R ) である、項目 5 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 2 】

7 . 前記細胞区画標的化部分が、形質膜 ( P M ) 標的化部分、エンドソーム標的化部分、ゴルジ標的化部分、リソソーム標的化部分、ペルオキシソーム標的化部分、オートファゴソーム標的化部分、リボソーム標的化部分、ミトコンドリア標的化部分、細胞骨格標的化部分または核標的化部分である、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載のバイオセンサー。

20

## 【 0 0 1 3 】

8 . 前記細胞区画標的化部分が形質膜 ( P M ) 標的化部分である、項目 7 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 4 】

9 . 前記 P M 標的化部分またはそのフラグメントが、P M に局在化している P M タンパク質またはそのフラグメントである、項目 8 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 5 】

1 0 . 前記 P M タンパク質またはそのフラグメントが、( a ) パルミトイル化、ミリストイル化及び/もしくはプレニル化シグナル配列、ならびに/または ( b ) 多塩基配列を含む、項目 9 に記載のバイオセンサー。

30

## 【 0 0 1 6 】

1 1 . 前記パルミトイル化及び/またはミリストイル化シグナル配列が、ヒト S r c ファミリーキナーゼ L y n からのものである、項目 1 0 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 7 】

1 2 . 前記 P M 標的化部分が、アミノ酸配列 M G C I K S K G K D S ( 配列番号 1 ) を含む、項目 1 1 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 8 】

1 3 . 前記多塩基配列及びプレニル化シグナル配列が、ヒト K R A S スブライス変異体 b からのものである、項目 1 2 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 1 9 】

1 4 . 前記 P M 標的化部分が、アミノ酸配列 G K K K K K S K T K C V I M ( 配列番号 7 ) を含む、項目 1 3 に記載のバイオセンサー。

40

## 【 0 0 2 0 】

1 5 . 前記 P M 標的化部分が、h R a s からのパルミトイル化配列及びプレニル化シグナル配列を含む、項目 1 0 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 2 1 】

1 6 . 前記 P M 標的化部分が、アミノ酸配列 C M S C K C V L S ( 配列番号 4 7 ) を含む、項目 1 5 に記載のバイオセンサー。

## 【 0 0 2 2 】

1 7 . 前記 P M 標的化部分が、h R a s からのパルミトイル化配列及び R a l 1 からのブ

50

レニル化シグナル配列を含む、項目 10 に記載のバイオセンサー。

【0023】

18．前記PM標的化部分が、アミノ酸配列CMSCCKCCL（配列番号43）を含む、項目17に記載のバイオセンサー。

【0024】

19．前記PMタンパク質またはそのフラグメントがカベオリン1である、項目9に記載のバイオセンサー。

【0025】

20．前記PM標的化多塩基配列が、ヒトGRK5からのものである、項目10に記載のバイオセンサー。

【0026】

21．前記PM標的化部分が、アミノ酸配列SPKKGLLQRLFKRQHQNNSKS（配列番号8）を含む、項目20に記載のバイオセンサー。

【0027】

22．(i) 前記PM標的化部分が、ヒトSrcファミリーキナーゼLynからのパルミトイル化及び/またはミリストイル化シグナル配列を含み、前記RenillaLucまたは前記RenillaGFPのN末端に融合している、あるいは(ii) 前記PM標的化部分が、(a) ヒトKRASスプライス変異体bもしくはHRASからの多塩基配列及びプレニル化シグナル配列、(b) HRASからのパルミトイル化配列及びRal1からのプレニル化シグナル配列、(c) カベオリン1もしくはそのフラグメント、または(d) ヒトGRK5からの多塩基配列を含み、前記RenillaLucまたは前記RenillaGFPのC末端に融合している、項目8～21に記載のバイオセンサー。

【0028】

23．前記細胞区画標的化部分がエンドソーム標的化部分である、項目7に記載のバイオセンサー。

【0029】

24．前記エンドソーム標的化部分が、エンドソームに局在化しているエンドソームタンパク質またはそのフラグメントである、項目23に記載のバイオセンサー。

【0030】

25．前記エンドソームタンパク質またはそのフラグメントが、FYVEドメインを含む、項目24に記載のバイオセンサー。

【0031】

26．前記エンドソーム標的化部分が、ヒトendofinのFYVEドメインを含む、項目23～25のいずれか1つに記載のバイオセンサー。

【0032】

27．前記エンドソーム標的化部分が、ヒトendofinの残基739～806（配列番号20）を含む、項目26に記載のバイオセンサー。

【0033】

28．前記エンドソームタンパク質またはそのフラグメントが、Rabタンパク質またはそのフラグメントである、項目23に記載のバイオセンサー。

【0034】

29．前記Rabタンパク質がRab4またはRab11である、項目28に記載のバイオセンサー。

【0035】

30．前記エンドソーム標的化部分が、前記RenillaLucまたは前記RenillaGFPのC末端に融合している、項目23～29のいずれか1つに記載のバイオセンサー。

【0036】

31．前記目的のタンパク質が、前記RenillaLucまたは前記Renilla

10

20

30

40

50

GFPのN末端に融合している、項目23～30のいずれか1つに記載のバイオセンサー。

【0037】

32．前記細胞区画標的化部分がゴルジ標的化部分である、項目7に記載のバイオセンサー。

【0038】

33．前記ゴルジ標的化部分が、ゴルジに局在化しているゴルジタンパク質またはそのフラグメントである、項目32に記載のバイオセンサー。

【0039】

34．前記ゴルジ標的化部分が、ゴルジに局在化しているeNOS1タンパク質またはそのフラグメントである、項目33に記載のバイオセンサー。

10

【0040】

35．前記ゴルジ標的化部分が、ヒトeNOS1の残基1～73（配列番号42）を含む、項目34に記載のバイオセンサー。

【0041】

36．前記第1及び第2の構成成分が、可動性リンカーにより共有結合的に連結している、項目1～35のいずれか1つに記載のバイオセンサー。

【0042】

37．前記可動性リンカーが、約50～約500個のアミノ酸のポリペプチドである、項目36に記載のバイオセンサー。

20

【0043】

38．前記可動性リンカーが、約300個のアミノ酸のポリペプチドである、項目37に記載のバイオセンサー。

【0044】

39．項目1～38のいずれか1つに記載のバイオセンサーの第1及び/または第2の構成成分をコードする、核酸。

【0045】

40．項目39に記載の核酸を含む、ベクター。

【0046】

41．項目1～38のいずれか1つに記載のバイオセンサーを発現する、宿主細胞。

30

【0047】

42．作用物質が細胞中の目的のタンパク質の輸送を調節するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在及び不在下で項目1～38のいずれか1つに記載のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することを含み、

前記作用物質の不在下と比べて存在下での前記BRETシグナルの差が、前記作用物質が前記細胞中の前記目的のタンパク質の輸送を調節することを示す、前記方法。

【0048】

43．作用物質が細胞において目的の細胞表面受容体の内部移行を誘発するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在及び不在下で項目8～22のいずれか1つに記載のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することを含み、

40

前記作用物質の不在下と比べて存在下でより低いBRETシグナルが、前記作用物質が目的の細胞表面受容体の前記内部移行を誘発することを示す、前記方法。

【0049】

44．細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環を評価する方法であって、

(a) 本明細書において定義されたPM標的化部分を含む第1及び第2のバイオセンサーを、前記受容体の内部移行を誘発するリガンドの存在下で接触させることと、

(b) 前記接触の後に第1のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することと、

(c) 前記第2のバイオセンサーを洗浄して、前記リガンドを除去することと、

(d) 前記洗浄の後に第2のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定すること

50

と、

(e) 第1及び第2のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを比較して、細胞表面における目的の内部移行受容体の前記再循環を決定することと

を含み、

前記第1のバイオセンサーと比べて前記第2のバイオセンサーのより高いBRETシグナルが、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環を示す、前記方法。

【0050】

45．洗浄の後にステップ(d)及び(e)をそれぞれ別の時間に反復して、目的の内部移行受容体の再循環の動力学的を研究することを更に含む、項目44に記載の方法。

【0051】

46．作用物質が、エンドソーム区画において目的の細胞表面受容体の輸送を誘発するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在及び不在で項目23～31のいずれか1つに記載のバイオセンサーのBRETシグナルを測定することを含み、前記作用物質の不在下と比べて存在下におけるより高いBRETシグナルが、前記作用物質が前記エンドソーム区画において前記目的の細胞表面受容体の輸送を誘発することを示す、前記方法。

【0052】

47．前記方法が、複数のバイオセンサーを使用して実施され、前記バイオセンサーが、それぞれ異なるエンドソーム標的化部分を含む、項目46に記載の方法。

【0053】

48．作用物質が、目的の受容体の薬理学的シャペロンとして作用するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在及び不在で項目8～22のいずれか1つに記載のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することを含み、前記作用物質の不在下と比べて存在下におけるより高いBRETシグナルが、前記作用物質が前記目的の受容体の薬理学的シャペロンとして作用することを示す、前記方法。

【0054】

49．作用物質が、目的の受容体の薬理学的シャペロンとして作用するかを決定する方法であって、

Renilla緑色蛍光タンパク質(Renilla GFP)またはRenillaルシフェラーゼタンパク質(Renilla Luc)で標識された前記目的の受容体と、Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された小胞体(ER)標的化部分とを含むバイオセンサーを提供することであって、前記受容体が前記Renilla GFPで標識される場合、前記ER標的化部分は前記Renilla Lucで標識され、前記受容体が前記Renilla Lucで標識される場合、前記ER標的化部分は前記Renilla GFPで標識される、前記提供することと、

前記作用物質の存在及び不在でBRET受容体シグナルを測定することと

を含み、

前記作用物質の不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの減少が、前記作用物質が前記受容体の薬理学的シャペロンとして作用することを示す、前記方法。

【0055】

50．前記受容体が突然変異受容体である、項目48または49に記載の方法。

【0056】

51．前記受容体がGタンパク質共役型受容体(GPCR)である、項目48～50のいずれか1つに記載の方法。

【0057】

52．前記GPCRが、メラノコルチン-4受容体(MC4R)またはバソプレシン2受容体(V2R)である、項目51に記載の方法。

【0058】

53．前記受容体がイオンチャネルである、項目48～52のいずれか1つに記載の方法。

【0059】

54．前記イオンチャネルが電位開口型カリウムチャネルである、項目53に記載の方法。

【0060】

55．前記電位開口型カリウムチャネルがhERGである、項目54に記載の方法。

【0061】

56．前記受容体には前記RenillaLucで標識され、前記PM標的化部分またはER標的化部分には前記RenillaGFPで標識される、項目48～55のいずれか1つに記載の方法。

【0062】

57．前記PM標的化が、項目9～22のいずれか1つにおいて定義されたPM標的化部分である、項目48～56のいずれか1つに記載の方法。

【0063】

58．作用物質が、形質膜への - アレスチンの動員を誘発するかを決定する方法であって、

Renilla緑色蛍光タンパク質(RenillaGFP)またはRenillaルシフェラーゼタンパク質(RenillaLuc)で標識された前記 - アレスチン、RenillaGFPまたはRenillaLucで標識された形質膜(PM)標的化部分、及びGPCRを含む細胞または膜調製物を含むバイオセンサーを提供することであって、前記 - アレスチンが前記RenillaGFPで標識される場合、前記PM標的化部分は前記RenillaLucで標識され、前記 - アレスチンが前記RenillaLucで標識される場合、前記PM標的化部分は前記RenillaGFPで標識される、前記提供することと、

前記作用物質の存在及び不在でBRET受容体シグナルを測定することとを含み、

前記作用物質の不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの増加が、前記作用物質が形質膜への前記 - アレスチンの動員を誘発することを示す、前記方法。

【0064】

59．前記 - アレスチンが前記RenillaLucで標識される、項目58に記載の方法。

【0065】

60．前記PM標的化部分PM標的化が、項目9～22のいずれか1つにおいて定義されたPM標的化部分である、項目58または59に記載の方法。

【0066】

61．第1及び第2の条件間の細胞区画における生体分子の量の調節を評価する方法であって、

前記生体分子に結合するタンパク質マーカーで標識されたRenilla緑色蛍光タンパク質(RenillaGFP)を含む第1の構成成分と前記タンパク質マーカーで標識されたRenillaルシフェラーゼタンパク質(RenillaLuc)を含む第2の構成成分とを含むバイオセンサーを提供することと、

前記第1及び第2の条件下のBRET受容体シグナルを測定することとを含み、

前記第1及び第2の条件間のBRETシグナルの差が、前記第1及び第2の条件間の前記細胞区画における前記生体分子の量の調節を示す、前記方法。

【0067】

62．前記第1の条件が作用物質の存在であり、前記第2の条件が作用物質の不在である、項目61に記載の方法。

【0068】

63．前記生体分子がリン脂質である、項目61または62に記載の方法。

【0069】

64．前記リン脂質がホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)である

10

20

30

40

50

、項目 6 3 に記載の方法。

【 0 0 7 0 】

6 5 . 前記タンパク質マーカーがプレクストリン相同 ( P H ) ドメインを含む、項目 6 4 に記載の方法。

【 0 0 7 1 】

6 6 . 前記 P H ドメインが、 P L C 1 の P H ドメインである、項目 6 5 に記載の方法。

【 0 0 7 2 】

6 7 . 前記生体分子が二次メッセンジャーである、項目 6 1 または 6 2 に記載の方法。

【 0 0 7 3 】

6 8 . 前記二次メッセンジャーがジアシルグリセロール ( D A G ) である、項目 6 7 に記載の方法。

10

【 0 0 7 4 】

6 9 . 前記タンパク質マーカーが、ホルボールエステル / ジアシルグリセロール結合ドメインを含む、項目 6 8 に記載の方法。

【 0 0 7 5 】

7 0 . 前記タンパク質マーカーが、 P K C ( C 1 b ) のホルボールエステル / ジアシルグリセロール結合ドメインを含む、項目 6 9 に記載の方法。

【 0 0 7 6 】

7 1 . 前記タンパク質マーカーが、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む、項目 7 0 に記載の方法。

20

【 0 0 7 7 】

7 2 . B R E T シグナルが、プレート読み取り機または顕微鏡検査法を使用して測定される、項目 4 2 ~ 7 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 7 8 】

7 3 . 前記 *Renilla luc* が *Renilla reniformis* ルシフェラーゼ II ( *Rluc II* ) である、及び / または前記 *Renilla GFP* が *Renilla reniformis GFP* ( *rGFP* ) である、項目 1 ~ 3 8 のいずれか 1 つに記載のバイオセンサー、または項目 4 2 ~ 7 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 7 9 】

本発明の他の目的、利点及び特徴は、添付図面を参照しながら、例示のためだけに提示されている以下の特定の本発明の実施形態の非限定的記載を読むことによって、更に明白になる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 0 】

【図 1 A】図 1 A ~ 1 F は、生物発光共鳴エネルギー転移 ( B R E T ) に基づいた G P C R エンドサイトーシスセンサーの生成を示す。図 1 A ~ 1 C : G P C R エンドサイトーシスを評価 / モニタリングする B R E T に基づいたセンサーの 3 つの立体配置である。形質膜における受容体 ( 図 1 A ) 及び - アレスチン ( 図 1 C ) の量をモニターするため、l y n キナーゼのアシル化部分 ( M G C I K S K G K D S ) を r G F P の N 末端に標識することによって、r G F P を形質膜に係留する。図 1 B、1 C : 受容体 ( 図 1 B ) または - アレスチン ( 図 1 C ) のいずれかがエンドソームを標的にするかを検査するため、エンドソームにセンサーを繋ぎ止めている e n d o f i n の F Y V E ドメイン ( アミノ酸 7 3 9 ~ 8 0 6 ) を、r G F P の C 末端と融合させた。l y n - r G F P ( 図 1 D ) または r G F P - e n d o f i n F Y V E ( 図 1 E ) のいずれかを発現している H E K 2 9 3 S L 細胞を、共焦点蛍光顕微鏡検査法に付した。r G F P - e n d o f i n F Y V E 発現細胞を、5 0 0 n M のワートマニンで 4 0 分間処理した ( 図 1 E、右側パネル )。スケールバーは 1 0 μ m である。

40

【図 1 B】図 1 A ~ 1 F は、生物発光共鳴エネルギー転移 ( B R E T ) に基づいた G P C R エンドサイトーシスセンサーの生成を示す。図 1 A ~ 1 C : G P C R エンドサイトーシスを評価 / モニタリングする B R E T に基づいたセンサーの 3 つの立体配置である。形質

50

膜における受容体（図1A）及び - アレスチン（図1C）の量をモニターするため、*lyn* キナーゼのアシル化部分（MGCIKSKGKDS）を *rGFP* のN末端に標識することによって、*rGFP* を形質膜に係留する。図1B、1C：受容体（図1B）または - アレスチン（図1C）のいずれかがエンドソームを標的にするかを検査するため、エンドソームにセンサーを繋ぎ止めている *endofin* のFYVEドメイン（アミノ酸739～806）を、*rGFP* のC末端と融合させた。*lyn-rGFP*（図1D）または *rGFP-endofinFYVE*（図1E）のいずれかを発現しているHEK293SL細胞を、共焦点蛍光顕微鏡検査法に付した。*rGFP-endofinFYVE* 発現細胞を、500nMのワートマニンで40分間処理した（図1E、右側パネル）。スケールバーは10μmである。

10

【図1C】図1A～1Fは、生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）に基づいたGPCRエンドサイトーシスセンサーの生成を示す。図1A～1C：GPCRエンドサイトーシスを評価/モニタリングするBRETに基づいたセンサーの3つの立体配置である。形質膜における受容体（図1A）及び - アレスチン（図1C）の量をモニターするため、*lyn* キナーゼのアシル化部分（MGCIKSKGKDS）を *rGFP* のN末端に標識することによって、*rGFP* を形質膜に係留する。図1B、1C：受容体（図1B）または - アレスチン（図1C）のいずれかがエンドソームを標的にするかを検査するため、エンドソームにセンサーを繋ぎ止めている *endofin* のFYVEドメイン（アミノ酸739～806）を、*rGFP* のC末端と融合させた。*lyn-rGFP*（図1D）または *rGFP-endofinFYVE*（図1E）のいずれかを発現しているHEK293SL細胞を、共焦点蛍光顕微鏡検査法に付した。*rGFP-endofinFYVE* 発現細胞を、500nMのワートマニンで40分間処理した（図1E、右側パネル）。スケールバーは10μmである。

20

【図1D】図1A～1Fは、生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）に基づいたGPCRエンドサイトーシスセンサーの生成を示す。図1A～1C：GPCRエンドサイトーシスを評価/モニタリングするBRETに基づいたセンサーの3つの立体配置である。形質膜における受容体（図1A）及び - アレスチン（図1C）の量をモニターするため、*lyn* キナーゼのアシル化部分（MGCIKSKGKDS）を *rGFP* のN末端に標識することによって、*rGFP* を形質膜に係留する。図1B、1C：受容体（図1B）または - アレスチン（図1C）のいずれかがエンドソームを標的にするかを検査するため、エンドソームにセンサーを繋ぎ止めている *endofin* のFYVEドメイン（アミノ酸739～806）を、*rGFP* のC末端と融合させた。*lyn-rGFP*（図1D）または *rGFP-endofinFYVE*（図1E）のいずれかを発現しているHEK293SL細胞を、共焦点蛍光顕微鏡検査法に付した。*rGFP-endofinFYVE* 発現細胞を、500nMのワートマニンで40分間処理した（図1E、右側パネル）。スケールバーは10μmである。

30

【図1E】図1A～1Fは、生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）に基づいたGPCRエンドサイトーシスセンサーの生成を示す。図1A～1C：GPCRエンドサイトーシスを評価/モニタリングするBRETに基づいたセンサーの3つの立体配置である。形質膜における受容体（図1A）及び - アレスチン（図1C）の量をモニターするため、*lyn* キナーゼのアシル化部分（MGCIKSKGKDS）を *rGFP* のN末端に標識することによって、*rGFP* を形質膜に係留する。図1B、1C：受容体（図1B）または - アレスチン（図1C）のいずれかがエンドソームを標的にするかを検査するため、エンドソームにセンサーを繋ぎ止めている *endofin* のFYVEドメイン（アミノ酸739～806）を、*rGFP* のC末端と融合させた。*lyn-rGFP*（図1D）または *rGFP-endofinFYVE*（図1E）のいずれかを発現しているHEK293SL細胞を、共焦点蛍光顕微鏡検査法に付した。*rGFP-endofinFYVE* 発現細胞を、500nMのワートマニンで40分間処理した（図1E、右側パネル）。スケールバーは10μmである。

40

【図1F】図1F：受容体エンドサイトーシスの際の受容体、*lyn-rGFP* 及びFY

50

VEドメインの同時可視化である。HEK293SL細胞に、B2R-CFP、lyn-rGFP及びmCherry-endofinFYVEを一時的に形質移入した。上側パネルは、基礎状態を示し、下側パネルは、ブラジキニン誘発性B2Rエンドサイトーシスを示した。スケールバーは10µmである。

【図1G】図1G：endofinFYVEセンサーのmCherry標識変異体も、EEに集合しているRab5と共に共局在化した。

【図2A】図2A～2Fは、BRETにより測定された用量及び時間依存性AT1Rエンドサイトーシスを示す。図2A：HEK293SL細胞に、lyn-rGFP10( )またはlyn-rGFP( )のいずれかと共にAT1R-RlucIIを形質移入した。細胞を様々な濃度のAngIIと共に40分間インキュベートし、次にBRETを、「材料及び方法」に記載されているように測定した。

10

【図2B】図2B：HEK293SL細胞に、GFP10-endofinFYVEまたはrGFP-endofinFYVEのいずれかと共にAT1R-RlucIIを形質移入した。

【図2C】図2C：HEK293SL細胞に、GFP10-endofinFYVEまたはrGFP-endofinFYVEのいずれかと共にAT1R及びarr2-RlucIIを形質移入した。lyn-rGFP(図2D)またはrGFP-endofinFYVE(図2E)のいずれかと共にAT1R-RlucIIが形質移入された細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37で示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比の変化は、対照(AngII処理なし)群において観察されたBRET比の率として表される。データは、2～6回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

20

【図2D】図2C：HEK293SL細胞に、GFP10-endofinFYVEまたはrGFP-endofinFYVEのいずれかと共にAT1R及びarr2-RlucIIを形質移入した。lyn-rGFP(図2D)またはrGFP-endofinFYVE(図2E)のいずれかと共にAT1R-RlucIIが形質移入された細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37で示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比の変化は、対照(AngII処理なし)群において観察されたBRET比の率として表される。データは、2～6回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

30

【図2E】図2C：HEK293SL細胞に、GFP10-endofinFYVEまたはrGFP-endofinFYVEのいずれかと共にAT1R及びarr2-RlucIIを形質移入した。lyn-rGFP(図2D)またはrGFP-endofinFYVE(図2E)のいずれかと共にAT1R-RlucIIが形質移入された細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37で示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比の変化は、対照(AngII処理なし)群において観察されたBRET比の率として表される。データは、2～6回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

【図2F】図2F：図2D及び2Eをそれぞれ最大応答に正規化し、一緒にプロットした。

40

【図3A】図3A～3Fは、AngII誘発性BRET変化による受容体エンドサイトーシス及び-アレスチン2の過剰発現を遮断する効果を示す。HEK293SL細胞に、pcDNAまたはダイナミンK44Aのいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3A)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3B)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3C)を形質移入した。細胞を、0.45Mのスクロースの不在下(対照、 )、DynK44A、 )または存在下( )で20分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAngIIで40分間刺激した。HEK293SL細胞に、pcDNAまたは-アレスチン2のいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3D)またはAT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(

50



図3E)を形質移入した。

【図3B】図3A～3Fは、Ang II誘発性BRET変化による受容体エンドサイトーシス及び - アレスチン2の過剰発現を遮断する効果を示す。HEK293SL細胞に、pcDNAまたはダイナミンK44Aのいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3A)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3B)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3C)を形質移入した。細胞を、0.45Mのスクロースの不在下(対照、DynK44A、)または存在下( )で20分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAng IIで40分間刺激した。HEK293SL細胞に、pcDNAまたは - アレスチン2のいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3D)またはAT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3E)を形質移入した。

10

【図3C】図3A～3Fは、Ang II誘発性BRET変化による受容体エンドサイトーシス及び - アレスチン2の過剰発現を遮断する効果を示す。HEK293SL細胞に、pcDNAまたはダイナミンK44Aのいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3A)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3B)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3C)を形質移入した。細胞を、0.45Mのスクロースの不在下(対照、DynK44A、)または存在下( )で20分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAng IIで40分間刺激した。HEK293SL細胞に、pcDNAまたは - アレスチン2のいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3D)またはAT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3E)を形質移入した。

20

【図3D】図3A～3Fは、Ang II誘発性BRET変化による受容体エンドサイトーシス及び - アレスチン2の過剰発現を遮断する効果を示す。HEK293SL細胞に、pcDNAまたはダイナミンK44Aのいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3A)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3B)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3C)を形質移入した。細胞を、0.45Mのスクロースの不在下(対照、DynK44A、)または存在下( )で20分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAng IIで40分間刺激した。HEK293SL細胞に、pcDNAまたは - アレスチン2のいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3D)またはAT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3E)を形質移入した。

30

【図3E】図3A～3Fは、Ang II誘発性BRET変化による受容体エンドサイトーシス及び - アレスチン2の過剰発現を遮断する効果を示す。HEK293SL細胞に、pcDNAまたはダイナミンK44Aのいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3A)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3B)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3C)を形質移入した。細胞を、0.45Mのスクロースの不在下(対照、DynK44A、)または存在下( )で20分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAng IIで40分間刺激した。HEK293SL細胞に、pcDNAまたは - アレスチン2のいずれかと共に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図3D)またはAT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図3E)を形質移入した。

40

【図3F】図3F：小胞酸性化阻害剤バフィロマイシンA(Baf)及びクロロキン(CQ)の存在下でのAT1Rのエンドサイトーシスである。細胞を、BRET測定の前に様々な濃度のAng IIと共に40分間インキュベートした。示されている値は、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.である。

【図4A】図4A～4Eは、様々な受容体におけるエンドサイトーシスBRETバイオセ

50

ンサーにより得られる用量応答曲線を示す。図4A: HEK293SL細胞に、AT1R-RlucII、B2R-RlucII、V2R-RlucII、または<sub>2</sub>AR-RlucIIのいずれかと共に、lyn-rGFPを形質移入した。

【図4B】図4B: HEK293SL細胞に、AT1R-RlucII、B2R-RlucII、V2R-RlucII、または<sub>2</sub>AR-RlucIIのいずれかと共に、rGFP-endofinFYVEを形質移入した。細胞を、様々な濃度の図に記載されている対応する同族リガンドと共に、37℃で30分間(図4A)または40分間(図4B)インキュベートし、次にBRETを測定した。

【図4C】図4C: HEK293SL細胞に、AT1R、B2R、V2R、<sub>2</sub>AR、またはFP受容体構築物のいずれかと共に、arr2-RlucII及びGFP-endofinFYVEを形質移入した。細胞を、BRET測定の前に様々な濃度の対応する同族リガンドと共に40分間インキュベートした。それぞれの受容体への同族リガンドは、以下であった。AT1R、AngII(四角); B2R、ブラジキニン(BK、三角); V2R、AVP(丸)またはオキシトシン(OT、星形); <sub>2</sub>AR、イソプロテレノール(ISO、逆三角形); FP、PGF2 $\alpha$ (菱形)。(a)~(c)のデータは、2~3回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

【図4D】図4D: RlucII-GRB2及びrGFP-endofinFYVE間のBRETによるEGFRエンドサイトーシスのモニタリングである(GRB2はEGFRと相互作用し、EGFR内部移行に参加する)。HEK293SL細胞に、RlucII-GRB2及びrGFP-endofinFYVEと共にEGFRを形質移入した。細胞を、様々な濃度のEGFと共に37℃で30分間インキュベートし、次にBRETを測定した。図4Dの結果は、2つの独立した実験のうちの1つの代表的な実験の三連の平均 $\pm$ S.E.である。

【図4E】図4E: ハイスループットスクリーニング(HTS)のアッセイの堅牢度を示すZ'値の評価である。HEK293に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE、またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVEを同時形質移入し、48ウェルプレートで平板培養し、100nMのAngIIにより37℃で20分間刺激して、受容体を形質膜から消失させ、受容体とアレスチン2の両方をエンドソームに蓄積させた。細胞表面受容体エンドサイトーシスを、BRET2により評価した。BRET値を、提示されたグラフにウェル毎に表し、Z'値を、AngII処理群においてそれぞれ0.64、0.73及び0.79により評価し、これは、エンドソームへの受容体内部移行についての堅牢なアッセイを示している。

【図5A-B】図5A~5Cは、エンドサイトーシスBRETアッセイによるリガンド除去の後の受容体の再循環についてのモニタリングを示す。図5A: HEK293SL細胞に、lyn-rGFPと共にAT1R-RlucIIを形質移入した。細胞を、100nMのAngIIの不在下(対照)または存在下で30分間インキュベートし、次に細胞を洗浄し、AngIIの不在下で45分間更にインキュベートした。BRET比の変化は、対照(AngII処理なし)群において観察されたBRET比の率として表される。データは、4回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。図5B: V2R-RlucII、B2R-RlucII、AT1R-RlucII、または<sub>2</sub>AR-RlucIIのいずれかと共にlyn-rGFPを発現するHEK293SL細胞を、V2Rでは100nMのAVP、B2Rでは100nMのBK、AT1Rでは100nMのAngII及び<sub>2</sub>ARでは1 $\mu$ MのISOである同族リガンドを用いて、図5Aに記載された細胞再循環に付した。受容体再循環は、リガンド洗い流しの45分後のBRET比の増加率として表される。全ての値は、データは、3~4回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

【図5C】図5C: HEK293SL細胞に、rGFP-endofinFYVEと共にAT1R-RlucIIを形質移入した。細胞を、100nMのAngIIの不在下(対照)または存在下で30分間インキュベートし、次に細胞を洗浄し、AngIIの不在下

10

20

30

40

50

で45分間更にインキュベートした。BRET比の変化は、対照(Ang II処理なし)群において観察されたBRET比の率として表される。データは、3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

【図6A】図6A～6Fは、AT1Rの輸送及び選別におけるAng II類縁体の効果を示す。図6A: AT1R-RlucII/rGFPendofinFYVEを発現するHEK293SL細胞を、100nMのAng II(四角)、100nMのSI(三角)または1μMのDVG(丸)にいずれかと共に、示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比は、最大Ang II応答(60分間)を100%に、基礎(リガンドなし)を0%に正規化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。HEK293SL細胞に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図6B)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6C)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6D)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAng II(四角)、SI(三角)またはDVG(丸)と共に、BRET測定の前に30分間(図6B)または40分間(図6C、6D)インキュベートした。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

10

【図6B】図6A～6Fは、AT1Rの輸送及び選別におけるAng II類縁体の効果を示す。図6A: AT1R-RlucII/rGFPendofinFYVEを発現するHEK293SL細胞を、100nMのAng II(四角)、100nMのSI(三角)または1μMのDVG(丸)にいずれかと共に、示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比は、最大Ang II応答(60分間)を100%に、基礎(リガンドなし)を0%に正規化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。HEK293SL細胞に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図6B)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6C)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6D)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAng II(四角)、SI(三角)またはDVG(丸)と共に、BRET測定の前に30分間(図6B)または40分間(図6C、6D)インキュベートした。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

20

【図6C】図6A～6Fは、AT1Rの輸送及び選別におけるAng II類縁体の効果を示す。図6A: AT1R-RlucII/rGFPendofinFYVEを発現するHEK293SL細胞を、100nMのAng II(四角)、100nMのSI(三角)または1μMのDVG(丸)にいずれかと共に、示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比は、最大Ang II応答(60分間)を100%に、基礎(リガンドなし)を0%に正規化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。HEK293SL細胞に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図6B)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6C)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6D)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAng II(四角)、SI(三角)またはDVG(丸)と共に、BRET測定の前に30分間(図6B)または40分間(図6C、6D)インキュベートした。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

30

40

【図6D】図6A～6Fは、AT1Rの輸送及び選別におけるAng II類縁体の効果を示す。図6A: AT1R-RlucII/rGFPendofinFYVEを発現するHEK293SL細胞を、100nMのAng II(四角)、100nMのSI(三角)または1μMのDVG(丸)にいずれかと共に、示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比は、最大Ang II応答(60分間)を100%に、基礎(リガンドなし)を0%に正規化した。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。HEK293SL細胞に、AT1R-RlucII/lyn-rGFP(図6B)、AT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6C)またはAT1R/arr2-RlucII/rGFP-endofinFYVE(図6D)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAng II(四角)、SI(三角)またはDVG(丸)と共に、BRET測定の前に30分間(図6B)または40分間(図6C、6D)インキュベートした。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均±S.E.として表される。

50

YVE (図6C)またはAT1R / arr2 - RLucII / rGFP - endofinFYVE (図6D)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAngII (四角)、SI (三角)またはDVG (丸)と共に、BRET測定の前に30分間 (図6B)または40分間 (図6C、6D)インキュベートした。データは、少なくとも3回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

【図6E】図6E及び6F: HEK293SL細胞に、rGFP - rab4 (図6E)またはrGFP - rab11 (図6F)のいずれかと共にAT1R - RLucIIを形質移入した。細胞を、100nMのAngII (四角)、100nMのSI (三角)または1 $\mu$ MのDVG (丸)にいずれかと共に、示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比の変化は、対照 (リガンド処理なし) 群において観察されたBRET比の率として表される。データは、3回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

10

【図6F】図6E及び6F: HEK293SL細胞に、rGFP - rab4 (図6E)またはrGFP - rab11 (図6F)のいずれかと共にAT1R - RLucIIを形質移入した。細胞を、100nMのAngII (四角)、100nMのSI (三角)または1 $\mu$ MのDVG (丸)にいずれかと共に、示された時間にわたってインキュベートし、次にBRETを測定した。BRET比の変化は、対照 (リガンド処理なし) 群において観察されたBRET比の率として表される。データは、3回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

【図7A】図7A及びBは、無傷細胞 [<sup>125</sup>I] AngII結合アッセイにより評価したAT1R内部移行を示す。図7A: HEK293SL細胞に、AT1R単独 ( )、AT1R - RLucII単独 ( )またはlyn - rGFPを伴ったAT1R - RLucII ( )のいずれかを一時的に形質移入した。細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37℃で30分間インキュベートし、次に、「材料及び方法」に記載されているように無傷細胞 [<sup>125</sup>I] AngII結合アッセイに付した。図7B: pcDNA ( )、ダイナミンK44A ( )または - アレスチン2 ( )のいずれかと共にAT1R - RLucII / Lyn - rGFPを発現するHEK293SL細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37℃で30分間インキュベートし、次に、下記 (実施例1) に記載されているように無傷細胞 [<sup>125</sup>I] AngII結合アッセイに付した。受容体エンドサイトーシスを、細胞表面受容体の損失率として表した。データは、3回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

20

30

【図7B】図7A及びBは、無傷細胞 [<sup>125</sup>I] AngII結合アッセイにより評価したAT1R内部移行を示す。図7A: HEK293SL細胞に、AT1R単独 ( )、AT1R - RLucII単独 ( )またはlyn - rGFPを伴ったAT1R - RLucII ( )のいずれかを一時的に形質移入した。細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37℃で30分間インキュベートし、次に、「材料及び方法」に記載されているように無傷細胞 [<sup>125</sup>I] AngII結合アッセイに付した。図7B: pcDNA ( )、ダイナミンK44A ( )または - アレスチン2 ( )のいずれかと共にAT1R - RLucII / Lyn - rGFPを発現するHEK293SL細胞を、100nMのAngIIの不在下または存在下において37℃で30分間インキュベートし、次に、下記 (実施例1) に記載されているように無傷細胞 [<sup>125</sup>I] AngII結合アッセイに付した。受容体エンドサイトーシスを、細胞表面受容体の損失率として表した。データは、3回の独立した実験の平均 $\pm$ S.E.として表される。

40

【図8】V2Rの高い基礎エンドソーム局在化を示す。mCherry - endofinFYVEと共にV2R - YFPを一時的に発現するHEK293SL細胞を、共焦点顕微鏡検査法に付した。スケールバーは10 $\mu$ mである。

【図9A】図9Aは、mCherry - FYVEを伴った、rGFP - rab4及びrGFP - rab11の小胞局在化を示す。HEK293SL細胞に、rGFP - rab4 (左側)またはrGFP - rab11 (右側)のいずれかを形質移入し、次に共焦点顕微鏡検査法に付した。

50

【図9B】図9B～9Dは、Ang II 媒介AT1R 内部移行に対するG<sub>q</sub> 阻害の効果を示す。図9B：HEK293SL 細胞に、Lyn - rGFP と共にAT1R - RLuc II を形質移入した。細胞を、100 nM のUbo の不在下（- Ubo ）または存在下（+ Ubo ）で30 分間インキュベートし、次に、BRET 測定の前に様々な濃度のAng II で30 分間刺激した。

【図9C】図9C：HEK293SL 細胞に、rGFP - FYVE と共にAT1R - RLuc II を形質移入した。細胞を、100 nM のUbo の不在下（- Ubo ）または存在下（+ Ubo ）で30 分間インキュベートし、次に、BRET 測定の前に様々な濃度のAng II、SI、またはDVG で40 分間刺激した。

【図9D】図9D：細胞に、rGFP - rab4 またはrGFP - rab11 のいずれかと共にAT1R - RLuc II を形質移入した。細胞を、100 nM のUbo の不在下（- Ubo ）または存在下（+ Ubo ）で30 分間インキュベートし、次に、100 nM のAng II、100 nM のSI、または1  $\mu$ M のDVG により、rGFP - rab4 では10 分間、rGFP - rab11 では30 分間刺激し、次にBRET を測定した。BRET 比の変化は、対照（リガンド処理なし）群において観察されたBRET 比の率として表される。データは、3 回の独立した実験の平均 $\pm$  S.E. として表される。

【図10A】図10A 及び10B は、機能的救出を評価する、BRET に基づいた薬理的シャペロン（PC）アッセイ及び隔離アッセイの原理を描写している。図10A：薬理的シャペロン（PC）アッセイは、薬理的シャペロン救出タンパク質の再局在化に基づいており、このタンパク質はさもなければ異なる細胞内区画に留まっている。再局在化は、BRET を使用して、優先的には形質膜標的化配列（rGFP - CAAX、Lyn - rGFP またはGFP - PB、これらの記載は図11D を参照すること）を有するrGFP により、検出及び測定される。hERG などの誤って折り畳まれた受容体及びチャネルは、細胞内区画に留まり、薬理的シャペロン媒介救出の際に形質膜に移行する。このアッセイでは、受容体にはRLuc II が、膜にはrGFP が優先的に標識されており、BRET シグナルは、膜におけるRLuc II 標識化タンパク質の密度に比例している。誤って折り畳まれたタンパク質は、突然変異体またはWT タンパク質のいずれかでありうる。作動薬への曝露によって内部移行する受容体では、救出された受容体の機能を、図10B に描写されている作動薬誘発性隔離アッセイ（図1A に描写されているBRET に基づいたセンサーに本質的に対応する）の使用により評価することができる。

【図10B】図10B：BRET に基づいた作動薬誘発性隔離アッセイの原理である。形質膜（PM）マーカーに、GFP（G）などのBRET 受容体を標識し、目的のPC 救出受容体（例えば、PC 救出GPCR）に、RLuc（R）などのBRET 供与体を標識する。作動薬の不在下（左側）では、受容体はPM に留まり、BRET 受容体標識化PM マーカーと共局在化しており、したがって強力なBRET 受容体シグナルをもたらす。しかし、作動薬の存在下（右側）では、受容体は内部移行し、したがってPM におけるBRET 供与体標識化受容体の密度が減少し、このことはBRET 受容体シグナルの減少をもたらす。このアッセイは、同じウェルにおいて、受容体のPC 媒介細胞表面救出に続いて実施することができ、したがって受容体生物学の2 つの異なる局面をモニターする均一系アッセイにおいてである。

【図11A】図11A～D は、薬理的シャペロンの特性を検出するセンサーを確認及び最適化するのに使用される構築物を示す。図11A～C：シャペロン救出アッセイは、ヒトGPCR の野生型（WT）及び天然に生じる置換（メラノコルチン受容体4：hMC4R 及びバソプレシン受容体2：hV2R）、ならびにBRET 供与体を標識した電位開口型カリウムチャネルH2（hERG）を用いて開発及び試験した。受容体には、RLuc II をC 末端に標識した。hERG チャネルには、RLuc II を残基379 と同等の位置に内部的に標識し、残基373～379 の配列をリンカー3 及びリンカー4 のそれぞれの側に複製した（図11C を参照すること）。可動性リンカーを、受容体/チャネルとRLuc II 標識の間に使用した。リンカーの配列は、図11A にはMC4R 構築物（リンカー1）、図11B にはV2R 構築物（リンカー2）及び図11C にはhERG 構築物（

10

20

30

40

50

リンカー 3 及び 4 ) のものを示した。

【図 1 1 B】図 1 1 A ~ D は、薬理学的シャペロンの特性を検出するセンサーを確認及び最適化するのに使用される構築物を示す。図 1 1 A ~ C : シャペロン救出アッセイは、ヒト GPCR の野生型 (WT) 及び天然に生じる置換 (メラノコルチン受容体 4 : hMC4R 及びバソプレシン受容体 2 : hV2R)、ならびに BRET 供与体を標識した電位開口型カリウムチャンネル H2 (hERG) を用いて開発及び試験した。受容体には、RlucII を C 末端に標識した。hERG チャンネルには、RlucII を残基 379 と同等の位置に内部的に標識し、残基 373 ~ 379 の配列をリンカー 3 及びリンカー 4 のそれぞれの側に複製した (図 1 1 C を参照すること)。可動性リンカーを、受容体 / チャンネルと RlucII 標識の間に使用した。リンカーの配列は、図 1 1 A には MC4R 構築物 (リンカー 1)、図 1 1 B には V2R 構築物 (リンカー 2) 及び図 1 1 C には hERG 構築物 (リンカー 3 及び 4) のものを示した。

10

【図 1 1 C】図 1 1 A ~ D は、薬理学的シャペロンの特性を検出するセンサーを確認及び最適化するのに使用される構築物を示す。図 1 1 A ~ C : シャペロン救出アッセイは、ヒト GPCR の野生型 (WT) 及び天然に生じる置換 (メラノコルチン受容体 4 : hMC4R 及びバソプレシン受容体 2 : hV2R)、ならびに BRET 供与体を標識した電位開口型カリウムチャンネル H2 (hERG) を用いて開発及び試験した。受容体には、RlucII を C 末端に標識した。hERG チャンネルには、RlucII を残基 379 と同等の位置に内部的に標識し、残基 373 ~ 379 の配列をリンカー 3 及びリンカー 4 のそれぞれの側に複製した (図 1 1 C を参照すること)。可動性リンカーを、受容体 / チャンネルと RlucII 標識の間に使用した。リンカーの配列は、図 1 1 A には MC4R 構築物 (リンカー 1)、図 1 1 B には V2R 構築物 (リンカー 2) 及び図 1 1 C には hERG 構築物 (リンカー 3 及び 4) のものを示した。

20

【図 1 1 D】図 1 1 D : BRET 受容体 (rGFP) には、異なる形質膜またはゴルジ装置標的化配列を標識した。N 末端には、Lyn キナーゼのパルミトイル化及びミリスチル化シグナル配列 (Lyn-)、C 末端には、KRAS スプライス変異体 b の多塩基配列及びプレニル化シグナル配列 (-CAAX)、C 末端には、ヒト GRK5 の多塩基配列 (-PB)、C 末端には、hRas の形質膜標的化パルミトイル化配列及びプレニル化シグナル配列、C 末端には、hRas の形質膜標的化パルミトイル化配列及び Ral1 のプレニル化シグナル配列、C 末端には、ヒトカベオリン 1 (カベオラのマーカー)、ならびに N 末端には、ヒト eNOS1 のゴルジ標的化配列 (残基 1 ~ 73) で標識された。リンカー 5、6 及び 7 を、rGFP と形質膜標的化配列の Lyn、CAAX 及び PB のそれぞれとの間に使用した。リンカー 8 を、rGFP と、hRAS (CAAX) 及び hRAS / Ral1 (CAAX = CCIL) のパルミトイル化 / プレニル化配列との間、ならびに rGFP とカベオリン 1 との間に使用した。リンカー 9 を、eNOS のゴルジ標的化配列 (1 ~ 73) と rGFP との間に使用した。

30

【図 1 2 A】図 1 2 A 及び B は、形質膜を標的にする rGFP の 2 つの形態の異なる比 (滴定) の試験を示す。受容体への BRET 供与体の滴定及び PC 救出アッセイを、形質移入細胞において実施し (96 ウェルプレートの 10 ウェルへの様々な量の rGFP 構築物 + 24 ng の受容体構築物)、続いて、シャペロン (DCPMP (N - ((2R) - 3 (2, 4 - ジクロロフェニル) - 1 - (4 - (2 - ((1 - メトキシプロパン - 2 - イルアミノ) メチル) フェニル) ピペラジン - 1 - イル) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) プロピオンアミド)、10 μM) または ビヒクル (DMSO) のいずれかにより 16 時間処理した。HEK293 に、hMC4R (R165Q) - RlucII 構築物、ならびに異なる量の rGFP - CAAX (図 1 2 A) 及び rGFP - PB 構築物 (図 1 2 B) を形質移入した。BRET 比は、RlucII 構築物発現 (生物発光により評価) に対する GFP 構築物発現 (蛍光により評価) の関数として報告されている。

40

【図 1 2 B】図 1 2 A 及び B は、形質膜を標的にする rGFP の 2 つの形態の異なる比 (滴定) の試験を示す。受容体への BRET 供与体の滴定及び PC 救出アッセイを、形質移入細胞において実施し (96 ウェルプレートの 10 ウェルへの様々な量の rGFP 構築物

50

+ 24 ng の受容体構築物)、続いて、シャペロン (DCPMP (N - ((2R) - 3 (2, 4 - ジクロロフェニル) - 1 - (4 - (2 - ((1 - メトキシプロパン - 2 - イルアミノ) メチル) フェニル) ピペラジン - 1 - イル) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) プロピオンアミド)、10 μM) またはビヒクル (DMSO) のいずれかにより 16 時間処理した。HEK293 に、hMC4R (R165Q) - RLucII 構築物、ならびに異なる量の rGFP - CAX (図 12A) 及び rGFP - PB 構築物 (図 12B) を形質移入した。BRET 比は、RLucII 構築物発現 (生物発光により評価) に対する GFP 構築物発現 (蛍光により評価) の関数として報告されている。

【図 13A】図 13A ~ C は、受容体及び rGFP - CAX の異なる比で wt 及び突然変異 MC4R の細胞表面発現及び機能性 PC 媒介救出を示す。HEK293 に、rGFP - CAX 構築物 (96 ウェルプレートの 10 ウェルに 72 ng のプラスミド)、ならびに 3 つの異なる量 (グラフに示されているように、10 ウェルに 6、12 及び 24 ng) の hMC4R wt - RLucII (図 13A)、hMC4R (P299H) - RLucII (図 13B) 及び hMC4R (R165Q) - RLucII (図 13C) を同時形質移入した。細胞表面発現及び機能性 (作動薬誘発性隔離) の PC 媒介救出を、形質移入細胞において BRET2 により評価し、続いてシャペロン (DCPMP、10 μM、中実黒色及び灰色棒) またはビヒクル (DMSO、白色棒) のいずれかにより 16 時間処理した。灰色棒は、受容体隔離を誘発するために作動薬 (アルファ - MSH) に 1 時間曝露された、DCPMP 処理細胞から得たデータを表す。予測されたように、DCPMP 処理は、未処理細胞 (白色棒) と比較して、BRET シグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。作動薬処理は、DCPMP 処理で処理されたが作動薬に曝露されなかった細胞 (黒色棒) と比較して、BRET シグナルの減少 (灰色棒) により明らかなように、隔離を誘発する。wt (図 13A) 及び R165Q 突然変異 (図 13C) 受容体は、DCPMP と - MSH (10 μM、37 °C で 1 時間) の両方に感受性があったが、P299H 突然変異 MC4R は、PC 救出されなかった (図 13B)。このアッセイの最適な範囲は、6 ng の供与体によって既に得られており、形質移入供与体構築物の量の増加は、hMC4R (P299H) の測定可能な救出をもたらさなかった。

【図 13B】図 13A ~ C は、受容体及び rGFP - CAX の異なる比で wt 及び突然変異 MC4R の細胞表面発現及び機能性 PC 媒介救出を示す。HEK293 に、rGFP - CAX 構築物 (96 ウェルプレートの 10 ウェルに 72 ng のプラスミド)、ならびに 3 つの異なる量 (グラフに示されているように、10 ウェルに 6、12 及び 24 ng) の hMC4R wt - RLucII (図 13A)、hMC4R (P299H) - RLucII (図 13B) 及び hMC4R (R165Q) - RLucII (図 13C) を同時形質移入した。細胞表面発現及び機能性 (作動薬誘発性隔離) の PC 媒介救出を、形質移入細胞において BRET2 により評価し、続いてシャペロン (DCPMP、10 μM、中実黒色及び灰色棒) またはビヒクル (DMSO、白色棒) のいずれかにより 16 時間処理した。灰色棒は、受容体隔離を誘発するために作動薬 (アルファ - MSH) に 1 時間曝露された、DCPMP 処理細胞から得たデータを表す。予測されたように、DCPMP 処理は、未処理細胞 (白色棒) と比較して、BRET シグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。作動薬処理は、DCPMP 処理で処理されたが作動薬に曝露されなかった細胞 (黒色棒) と比較して、BRET シグナルの減少 (灰色棒) により明らかなように、隔離を誘発する。wt (図 13A) 及び R165Q 突然変異 (図 13C) 受容体は、DCPMP と - MSH (10 μM、37 °C で 1 時間) の両方に感受性があったが、P299H 突然変異 MC4R は、PC 救出されなかった (図 13B)。このアッセイの最適な範囲は、6 ng の供与体によって既に得られており、形質移入供与体構築物の量の増加は、hMC4R (P299H) の測定可能な救出をもたらさなかった。

【図 13C】図 13A ~ C は、受容体及び rGFP - CAX の異なる比で wt 及び突然変異 MC4R の細胞表面発現及び機能性 PC 媒介救出を示す。HEK293 に、rGFP - CAX 構築物 (96 ウェルプレートの 10 ウェルに 72 ng のプラスミド)、ならびに 3 つの異なる量 (グラフに示されているように、10 ウェルに 6、12 及び 24 ng)

10

20

30

40

50

の hMC4R wt - RLucII (図13A)、hMC4R (P299H) - RLucII (図13B) 及び hMC4R (R165Q) - RLucII (図13C) を同時形質移入した。細胞表面発現及び機能性 (作動薬誘発性隔離) の PC 媒介救出を、形質移入細胞において BRET2 により評価し、続いてシャペロン (DCPMP、10  $\mu$ M、中実黒色及び灰色棒) またはビヒクル (DMSO、白色棒) のいずれかにより 16 時間処理した。灰色棒は、受容体隔離を誘発するために作動薬 (アルファ - MSH) に 1 時間曝露された、DCPMP 処理細胞から得たデータを表す。予測されたように、DCPMP 処理は、未処理細胞 (白色棒) と比較して、BRET シグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。作動薬処理は、DCPMP 処理で処理されたが作動薬に曝露されなかった細胞 (黒色棒) と比較して、BRET シグナルの減少 (灰色棒) により明らかなように、隔離を誘発する。wt (図13A) 及び R165Q 突然変異 (図13C) 受容体は、DCPMP と - MSH (10  $\mu$ M、37 で 1 時間) の両方に感受性があったが、P299H 突然変異 MC4R は、PC 救出されなかった (図13B)。このアッセイの最適な範囲は、6 ng の供与体によって既に得られており、形質移入供与体構築物の量の増加は、hMC4R (P299H) の測定可能な救出をもたらさなかった。

【図13D】図13Dは、rGFP - CAAX (Kras) をコードする多シストロン構築物を示し、WT または突然変異 hMC4R のいずれかが HeK293 細胞に一時的に発現した。この図は、細胞表面発現の PC 救出において類似した結果を示し (白色棒: DMSO 対黒色棒: 10  $\mu$ M の DCPMP)、機能的救出は、作動薬誘発性隔離 (+アルファ - MSH、灰色棒) により測定されるように、多シストロン及び非多シストロン構築物から得ることができる (図13A ~ C)。シャペロンにより前処理されない細胞の作動薬誘発性隔離が示されている (横線の棒)。

【図13E】図13Eは、形質膜における BRET の増加により明らかなように、細胞内に留まっていることが知られている V2R 突然変異体の PC 媒介救出を示す。細胞表面発現の PC 媒介救出を、形質移入細胞において BRET1 により評価し、続いてシャペロン (SR121463、10  $\mu$ M、中実黒色棒) またはビヒクル (DMSO、白色棒) のいずれかにより 16 時間処理した。

【図14A】図14A及び14Bは、WT 及び突然変異 (R165Q) MC4R 細胞表面発現の 2 つの PC 媒介機能性救出についての用量応答曲線を示す。HEK293 に、rGFP - CAAX 構築物及び hMC4R wt - RLucII または hMC4R (R165Q) - RLucII 構築物 (96 ウェルプレートの 10 ウェルに 72 ng の rGFP 構築物 + 24 ng の受容体構築物) を同時形質移入した。細胞表面発現の PC 媒介救出の用量応答、続く様々な濃度の DCPMP (図14A) 及び化合物 1 (図14B) による 16 時間の処理を、BRET2 によって評価した。hMC4R WT - RLucII (上側曲線) または hMC4R (R165Q) - RLucII (下側曲線) から得られる結果は、対数目盛として表されるシャペロン濃度の関数として報告されている。EC50 及び他の曲線パラメーターが、それぞれのグラフの下方に示されている。

【図14B】図14A及び14Bは、WT 及び突然変異 (R165Q) MC4R 細胞表面発現の 2 つの PC 媒介機能性救出についての用量応答曲線を示す。HEK293 に、rGFP - CAAX 構築物及び hMC4R wt - RLucII または hMC4R (R165Q) - RLucII 構築物 (96 ウェルプレートの 10 ウェルに 72 ng の rGFP 構築物 + 24 ng の受容体構築物) を同時形質移入した。細胞表面発現の PC 媒介救出の用量応答、続く様々な濃度の DCPMP (図14A) 及び化合物 1 (図14B) による 16 時間の処理を、BRET2 によって評価した。hMC4R WT - RLucII (上側曲線) または hMC4R (R165Q) - RLucII (下側曲線) から得られる結果は、対数目盛として表されるシャペロン濃度の関数として報告されている。EC50 及び他の曲線パラメーターが、それぞれのグラフの下方に示されている。

【図15A】図15A ~ 15Dは、アッセイの堅牢度を示す Z' 値の評価を示す。HEK293 に、rGFP - CAAX 構築物及び hMC4R wt - RLucII (図15A 及び 15B) または hMC4R (R165Q) - RLucII (図15C 及び 15D) 構築

10

20

30

40

50



物（96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのrGFP構築物+24 ngの受容体構築物）を同時形質移入した。細胞表面発現は、図15A及び15Cではセレンテラジン400 aを使用してBRET2により、セレンテラジンHを使用してBRET1により（図15B及び15D）評価し、続いて10 µMのDCPMP（48ウェル）とビヒクル（DMSO）（48ウェル）で16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにウェル毎に表し、Z'値は、hMC4R wt受容体では0.63、突然変異R165Q突然変異hMC4Rでは0.82で評価され、両方の受容体が堅牢なアッセイであることを示している。

【図15B】図15A～15Dは、アッセイの堅牢度を示すZ'値の評価を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物及びhMC4R wt-RlucII（図15A及び15B）またはhMC4R（R165Q）-RlucII（図15C及び15D）構築物（96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのrGFP構築物+24 ngの受容体構築物）を同時形質移入した。細胞表面発現は、図15A及び15Cではセレンテラジン400 aを使用してBRET2により、セレンテラジンHを使用してBRET1により（図15B及び15D）評価し、続いて10 µMのDCPMP（48ウェル）とビヒクル（DMSO）（48ウェル）で16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにウェル毎に表し、Z'値は、hMC4R wt受容体では0.63、突然変異R165Q突然変異hMC4Rでは0.82で評価され、両方の受容体が堅牢なアッセイであることを示している。

【図15C】図15A～15Dは、アッセイの堅牢度を示すZ'値の評価を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物及びhMC4R wt-RlucII（図15A及び15B）またはhMC4R（R165Q）-RlucII（図15C及び15D）構築物（96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのrGFP構築物+24 ngの受容体構築物）を同時形質移入した。細胞表面発現は、図15A及び15Cではセレンテラジン400 aを使用してBRET2により、セレンテラジンHを使用してBRET1により（図15B及び15D）評価し、続いて10 µMのDCPMP（48ウェル）とビヒクル（DMSO）（48ウェル）で16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにウェル毎に表し、Z'値は、hMC4R wt受容体では0.63、突然変異R165Q突然変異hMC4Rでは0.82で評価され、両方の受容体が堅牢なアッセイであることを示している。

【図15D】図15A～15Dは、アッセイの堅牢度を示すZ'値の評価を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物及びhMC4R wt-RlucII（図15A及び15B）またはhMC4R（R165Q）-RlucII（図15C及び15D）構築物（96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのrGFP構築物+24 ngの受容体構築物）を同時形質移入した。細胞表面発現は、図15A及び15Cではセレンテラジン400 aを使用してBRET2により、セレンテラジンHを使用してBRET1により（図15B及び15D）評価し、続いて10 µMのDCPMP（48ウェル）とビヒクル（DMSO）（48ウェル）で16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにウェル毎に表し、Z'値は、hMC4R wt受容体では0.63、突然変異R165Q突然変異hMC4Rでは0.82で評価され、両方の受容体が堅牢なアッセイであることを示している。

【図16A】図16A及び16Bは、BRETに基づいた細胞表面発現アッセイに対するDMSOの影響の評価を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物及びhMC4R wt-RlucII（図16A）またはhMC4R（R165Q）-RlucII（図16B）構築物（96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのrGFP構築物+24 ngの受容体構築物）を同時形質移入した。細胞表面評価についてのBRETに基づいたアッセイが、異なるレベルのDMSOに感受性があるかを評価するため、細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて、PC処理の際に増量濃度のDMSO（3%まで）の存在下で10 µMのDCPMP（右側棒）またはビヒクル（DMSO、左側棒）により16時間処理した。提示されているように、得られた結果は、このアッセイが少なくとも3%

10

20

30

40

50

のDMSOに抵抗性があることを示し、これは、化合物のHTS用途及び特徴決定と一致している。

【図16B】図16A及び16Bは、BRETに基づいた細胞表面発現アッセイに対するDMSOの影響の評価を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物及びhMC4R wt-RlucII(図16A)またはhMC4R(R165Q)-RlucII(図16B)構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのrGFP構築物+24 ngの受容体構築物)を同時形質移入した。細胞表面評価についてのBRETに基づいたアッセイが、異なるレベルのDMSOに感受性があるかを評価するため、細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて、PC処理の際に増量濃度のDMSO(3%まで)の存在下で10  $\mu$ MのDCPMP(右側棒)またはビヒクル(DMSO、左側棒)により16

10

時間処理した。提示されているように、得られた結果は、このアッセイが少なくとも3%のDMSOに抵抗性があることを示し、これは、化合物のHTS用途及び特徴決定と一致している。

【図17A】図17A及び17Bは、形質移入された及び安定したrGFP細胞系におけるMC4R及びV2R発現のPC媒介救出を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24 ng)のhMC4R(R165Q)-RlucII(図17A)またはhV2R(Y128S)-RlucII(図17B)を同時形質移入した。異なるレベルのrGFP-CAAXを安定して発現する(低、中程度(中)及び高程度(高))ように選択されたHEK293細胞に、同じ量の受容体構築物を形質移入した。MC4Rの細胞表面発現のPC媒介救出をBRET2により評価し、続いて、10  $\mu$ MのDCPMPにより、V2R(Y128S)-RlucII発現細胞では、10  $\mu$ MのSR121463シャペロン(逆作動薬及び薬理学的シャペロン特性を有する既知の拮抗薬、Serradeil-Le Gal C., Cardiovasc Drug Rev. 2001, 19(3): 201-14)により、またはビヒクル(DMSO)により、16時間処理した。データを、ビヒクル(DMSO)で処理された細胞において観察されたBRETシグナルの%として、MC4R及びV2R発現細胞について表した。提示されたデータは、より高いレベルのrGFP-CAAXを発現する安定した細胞系によって、より良好な応答を得ることができることを示している。高いレベルのrGFP-CAAXを発現する安定した細胞系(安定:高)を使用して、受容体-RlucIIを同時発現する細胞系を確立することができる。

20

30

【図17B】図17A及び17Bは、形質移入された及び安定したrGFP細胞系におけるMC4R及びV2R発現のPC媒介救出を示す。HEK293に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72 ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24 ng)のhMC4R(R165Q)-RlucII(図17A)またはhV2R(Y128S)-RlucII(図17B)を同時形質移入した。異なるレベルのrGFP-CAAXを安定して発現する(低、中程度(中)及び高程度(高))ように選択されたHEK293細胞に、同じ量の受容体構築物を形質移入した。MC4Rの細胞表面発現のPC媒介救出をBRET2により評価し、続いて、10  $\mu$ MのDCPMPにより、V2R(Y128S)-RlucII発現細胞では、10  $\mu$ MのSR121463シャペロン(逆作動薬及び薬理学的シャペロン特性を有する既知の拮抗薬、Serradeil-Le Gal C., Cardiovasc Drug Rev. 2001, 19(3): 201-14)により、またはビヒクル(DMSO)により、16時間処理した。データを、ビヒクル(DMSO)で処理された細胞において観察されたBRETシグナルの%として、MC4R及びV2R発現細胞について表した。提示されたデータは、より高いレベルのrGFP-CAAXを発現する安定した細胞系によって、より良好な応答を得ることができることを示している。高いレベルのrGFP-CAAXを発現する安定した細胞系(安定:高)を使用して、受容体-RlucIIを同時発現する細胞系を確立することができる。

40

【図18A】図18A~18E: hERGチャネル(非GPCR)のリガンドを検出する

50

PC救出アッセイである。hERGとrGFP-CAAXの異なる比でのwt(図18A)及び突然変異(G601S、図18B)hERGの細胞表面発現及び機能性PC媒介救出である。HEK293細胞に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24ng)のhERG wt-RlucII(図18A)及びhERG(G601S)-RlucII(図18B)を同時形質移入した。細胞表面発現のPC媒介救出を、BRET2により評価し、続いてシャペロン(アステミゾール、10μM、中実黒色棒)またはビヒクル(DMSO、白色棒)のいずれかにより16時間処理した。アステミゾール処理は、ビヒクル処理細胞と比較して、BRETシグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。wt(図18A)及びG601S突然変異(図18B)hERGは、両方ともPC処理に感受性があり、hERGに結合し、シャペロンとして異なる有効性で作用することが知られているリガンドを特徴決定するために使用した(図18C及びD)。図18Eでは、hERG(G601S)-RlucII構築物によるアッセイの堅牢度をZ'値で評価した。細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて10μMのアステミゾール(48ウェル)とビヒクル(DMSO)(48ウェル)により16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにおいてウェル毎に表し、Z'値は0.622で評価され、ハイスループットスクリーニング用途に適応可能である堅牢なアッセイであることを示している。

【図18B】図18A~18E:hERGチャネル(非GPCR)のリガンドを検出するPC救出アッセイである。hERGとrGFP-CAAXの異なる比でのwt(図18A)及び突然変異(G601S、図18B)hERGの細胞表面発現及び機能性PC媒介救出である。HEK293細胞に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24ng)のhERG wt-RlucII(図18A)及びhERG(G601S)-RlucII(図18B)を同時形質移入した。細胞表面発現のPC媒介救出を、BRET2により評価し、続いてシャペロン(アステミゾール、10μM、中実黒色棒)またはビヒクル(DMSO、白色棒)のいずれかにより16時間処理した。アステミゾール処理は、ビヒクル処理細胞と比較して、BRETシグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。wt(図18A)及びG601S突然変異(図18B)hERGは、両方ともPC処理に感受性があり、hERGに結合し、シャペロンとして異なる有効性で作用することが知られているリガンドを特徴決定するために使用した(図18C及びD)。図18Eでは、hERG(G601S)-RlucII構築物によるアッセイの堅牢度をZ'値で評価した。細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて10μMのアステミゾール(48ウェル)とビヒクル(DMSO)(48ウェル)により16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにおいてウェル毎に表し、Z'値は0.622で評価され、ハイスループットスクリーニング用途に適応可能である堅牢なアッセイであることを示している。

【図18C】図18A~18E:hERGチャネル(非GPCR)のリガンドを検出するPC救出アッセイである。hERGとrGFP-CAAXの異なる比でのwt(図18A)及び突然変異(G601S、図18B)hERGの細胞表面発現及び機能性PC媒介救出である。HEK293細胞に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24ng)のhERG wt-RlucII(図18A)及びhERG(G601S)-RlucII(図18B)を同時形質移入した。細胞表面発現のPC媒介救出を、BRET2により評価し、続いてシャペロン(アステミゾール、10μM、中実黒色棒)またはビヒクル(DMSO、白色棒)のいずれかにより16時間処理した。アステミゾール処理は、ビヒクル処理細胞と比較して、BRETシグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。wt(図18A)及びG601S突然変異(図18B)hERGは、両方ともPC処理に感受性があり、hERGに結合し、シャペロンとして異なる有効性で作用することが知られているリガンドを特徴決定

10

20

30

40

50

するために使用した(図18C及びD)。図18Eでは、hERG(G601S)-RlucII構築物によるアッセイの堅牢度をZ'値で評価した。細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて10µMのアステミゾール(48ウェル)とビヒクル(DMSO)(48ウェル)により16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにおいてウェル毎に表し、Z'値は0.622で評価され、ハイスループットスクリーニング用途に適応可能である堅牢なアッセイであることを示している。

【図18D】図18A~18E:hERGチャネル(非GPCR)のリガンドを検出するPC救出アッセイである。hERGとrGFP-CAAXの異なる比でのwt(図18A)及び突然変異(G601S、図18B)hERGの細胞表面発現及び機能性PC媒介救出である。HEK293細胞に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24ng)のhERG wt-RlucII(図18A)及びhERG(G601S)-RlucII(図18B)を同時形質移入した。細胞表面発現のPC媒介救出を、BRET2により評価し、続いてシャペロン(アステミゾール、10µM、中実黒色棒)またはビヒクル(DMSO、白色棒)のいずれかにより16時間処理した。アステミゾール処理は、ビヒクル処理細胞と比較して、BRETシグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。wt(図18A)及びG601S突然変異(図18B)hERGは、両方ともPC処理に感受性があり、hERGに結合し、シャペロンとして異なる有効性で作用することが知られているリガンドを特徴決定するために使用した(図18C及びD)。図18Eでは、hERG(G601S)-RlucII構築物によるアッセイの堅牢度をZ'値で評価した。細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて10µMのアステミゾール(48ウェル)とビヒクル(DMSO)(48ウェル)により16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにおいてウェル毎に表し、Z'値は0.622で評価され、ハイスループットスクリーニング用途に適応可能である堅牢なアッセイであることを示している。

【図18E】図18A~18E:hERGチャネル(非GPCR)のリガンドを検出するPC救出アッセイである。hERGとrGFP-CAAXの異なる比でのwt(図18A)及び突然変異(G601S、図18B)hERGの細胞表面発現及び機能性PC媒介救出である。HEK293細胞に、rGFP-CAAX構築物(96ウェルプレートの10ウェルに72ngのプラスミド)、ならびに3つの異なる量(グラフに示されているように、10ウェルに6、12及び24ng)のhERG wt-RlucII(図18A)及びhERG(G601S)-RlucII(図18B)を同時形質移入した。細胞表面発現のPC媒介救出を、BRET2により評価し、続いてシャペロン(アステミゾール、10µM、中実黒色棒)またはビヒクル(DMSO、白色棒)のいずれかにより16時間処理した。アステミゾール処理は、ビヒクル処理細胞と比較して、BRETシグナルの増加により明らかなように、細胞表面発現の増加を誘発する。wt(図18A)及びG601S突然変異(図18B)hERGは、両方ともPC処理に感受性があり、hERGに結合し、シャペロンとして異なる有効性で作用することが知られているリガンドを特徴決定するために使用した(図18C及びD)。図18Eでは、hERG(G601S)-RlucII構築物によるアッセイの堅牢度をZ'値で評価した。細胞表面発現をBRET2により評価し、続いて10µMのアステミゾール(48ウェル)とビヒクル(DMSO)(48ウェル)により16時間処理した。BRET値を、提示されたグラフにおいてウェル毎に表し、Z'値は0.622で評価され、ハイスループットスクリーニング用途に適応可能である堅牢なアッセイであることを示している。

【図19A】図19Aは、形質膜におけるGPCRへの-アレスチン動員をモニタリングするバイオセンサーの立体配置を示す。BRET受容体(例えば、rGFP、GFP10)に、PM標的化部分を標識し(したがって、BRET受容体をPMに繋ぎ止め)、-アレスチンに、BRET供与体(例えば、RlucII)を標識する。GPCR作動薬(Aと表される)の存在下では、-アレスチンはGPCRへ動員され、したがって形質膜でのRlucII-アレスチンの濃度が増加し、このことはRlucIIとPM標

10

20

30

40

50

識化 GFP との間のエネルギー転移 (BRET) の増加をもたらす。

【図 19 B】図 19 B 及び 19 C は、増加用量の作動薬イソプロテレノール (iso) による刺激後の、異なる PM 標的化部分 (Lyn、CAAX 及び PB-GRK5) ならびに BRET 受容体 (rGFP 及び GFP10) での、クラス A の GPCR である 2AR における - アレスチン<sub>1</sub> 及び - アレスチン<sub>2</sub> それぞれの動員の BRET 比の増加を示す。rGFP-CAAX (四角) を有する - アレスチン-RlucII 移行センサーは、両方の受容体にとって最適な範囲を提供する。

【図 19 C】図 19 B 及び 19 C は、増加用量の作動薬イソプロテレノール (iso) による刺激後の、異なる PM 標的化部分 (Lyn、CAAX 及び PB-GRK5) ならびに BRET 受容体 (rGFP 及び GFP10) での、クラス A の GPCR である 2AR における - アレスチン<sub>1</sub> 及び - アレスチン<sub>2</sub> それぞれの動員の BRET 比の増加を示す。rGFP-CAAX (四角) を有する - アレスチン-RlucII 移行センサーは、両方の受容体にとって最適な範囲を提供する。

10

【図 19 D】図 19 D 及び 19 E は、増加用量の作動薬 AVP による刺激後の、異なる PM 標的化部分 (Lyn、CAAX 及び PB-GRK5) ならびに BRET 受容体 (rGFP 及び GFP10) での、クラス B の GPCR である V<sub>2</sub>R における - アレスチン<sub>1</sub> 及び - アレスチン<sub>2</sub> それぞれの動員の BRET 比の増加を示す。

【図 19 E】図 19 D 及び 19 E は、増加用量の作動薬 AVP による刺激後の、異なる PM 標的化部分 (Lyn、CAAX 及び PB-GRK5) ならびに BRET 受容体 (rGFP 及び GFP10) での、クラス B の GPCR である V<sub>2</sub>R における - アレスチン<sub>1</sub> 及び - アレスチン<sub>2</sub> それぞれの動員の BRET 比の増加を示す。

20

【図 19 F】図 19 F は、異なる PM 標的化部分 (Kras の CAAX、Hras の CAAX、hRas の形質膜標的化パルミトイル化配列及び Ral1 (CCIL) のプレニル化シグナル配列)、ならびに rGFP に標識したカベオラ構造カベオリン1 のマーカを使用して評価された、増加用量の作動薬イソプロテレノール (iso) による刺激後の、2AR への - アレスチン<sub>2</sub> の動員を示す。rGFP-CAAX (四角) を有する - アレスチン-RlucII 移行センサーは、形質膜での密度の増加を示す。rGFP-CAAX マーカーから得た応答と対照的に、2AR の刺激は、カベオラでの - アレスチン<sub>2</sub> の密度の減少をもたらす。

【図 19 G】図 19 G は、AT1R 刺激の後の形質膜での アレスチン<sub>2</sub> の移行における用量応答曲線を示す。HEK293SL 細胞に、Lyn-rGFP、または rGFP-CAAX もしくは GFP10-CAAX のいずれかと共に AT1R 及び arr2-RlucII を形質移入した。細胞を、BRET 測定の前に様々な濃度の AngII と共に室温で 6 分間インキュベートした。データは基礎 BRET の率として表される。データは、3 回の独立した実験の平均 ± S.E. である。

30

【図 19 H】図 19 H ~ 19 J は、アレスチン<sub>2</sub>-RlucII / rGFP-CAAX バイオセンサー、ならびに図 19 C、19 E 及び 19 G それぞれの受容体から得た Z' 値を示す。受容体媒介 アレスチン動員をモニターするこのアッセイは、少なくとも 0.74 の Z' 値 (0.74、0.80 及び 0.838) をもたらし、クラス A 及び B の GPCR の両方にとってスクリーニング (ハイスループットスクリーニングを含む) が適応可能である。

40

【図 19 I】図 19 H ~ 19 J は、アレスチン<sub>2</sub>-RlucII / rGFP-CAAX バイオセンサー、ならびに図 19 C、19 E 及び 19 G それぞれの受容体から得た Z' 値を示す。受容体媒介 アレスチン動員をモニターするこのアッセイは、少なくとも 0.74 の Z' 値 (0.74、0.80 及び 0.838) をもたらし、クラス A 及び B の GPCR の両方にとってスクリーニング (ハイスループットスクリーニングを含む) が適応可能である。

【図 19 J】図 19 H ~ 19 J は、アレスチン<sub>2</sub>-RlucII / rGFP-CAAX バイオセンサー、ならびに図 19 C、19 E 及び 19 G それぞれの受容体から得た Z' 値を示す。受容体媒介 アレスチン動員をモニターするこのアッセイは、少なくとも 0.7

50

4のZ'値(0.74、0.80及び0.838)をもたらし、クラスA及びBのGPCRの両方にとってスクリーニング(ハイスループットスクリーニングを含む)が適応可能である。

【図20A】図20A及び20Bは、RLucII-PH(PLC1)と、rGFP-PH(PLC1)またはLyn-rGFPもしくはrGFP-CAAXとのBRETにより検出された、形質PIP2量におけるAngII用量依存性減少を示す。HEK293SL細胞に、rGFP-PH(PLC1)、Lyn-rGFPまたはrGFP-CAAXのいずれかと共にAT1R及びHA-RLucII-PH(PLC1)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAngIIと共に室温で1分間インキュベートし、次にBRETを測定した。結果は、単一の代表的実験における三連の平均±S.E.である。

10

【図20B】図20A及び20Bは、RLucII-PH(PLC1)と、rGFP-PH(PLC1)またはLyn-rGFPもしくはrGFP-CAAXとのBRETにより検出された、形質PIP2量におけるAngII用量依存性減少を示す。HEK293SL細胞に、rGFP-PH(PLC1)、Lyn-rGFPまたはrGFP-CAAXのいずれかと共にAT1R及びHA-RLucII-PH(PLC1)を形質移入した。細胞を、様々な濃度のAngIIと共に室温で1分間インキュベートし、次にBRETを測定した。結果は、単一の代表的実験における三連の平均±S.E.である。

【図21A】図21Aは、形質膜におけるGPCRへの-アレスチン動員をモニタリングする単分子バイオセンサーの立体配置を示す。BRET受容体(例えば、rGFP、GFP10)に、PM標的化部分を標識し(したがって、構築物をPMに繋ぎ止め)、可動性リンカーを、BRET受容体と、-アレスチンに結合されているBRET供与体(例えば、RLucII)との間に配置する。GPCR作動薬(Aと表される)の存在下では、-アレスチンはGPCRへ動員され、したがって形質膜でのRLucII-アレスチンの濃度が増加し、このことはRLucIIとPM標識化GFPとの間のエネルギー転移(BRET)の増加をもたらす。

20

【図21B】図21Bは、異なる長さの可動式リンカーを有する単分子バイオセンサーを使用して、AVPによる刺激後のV2Rへの-アレスチン2の動員を評価するBRET比を示す。

【図21C】図21C~21Eは、単分子バイオセンサーを使用する、異なるGPCR(AT1R、V2R及び2AR)による-アレスチン2の動員の用量応答曲線を示す。

30

【図21D】図21C~21Eは、単分子バイオセンサーを使用する、異なるGPCR(AT1R、V2R及び2AR)による-アレスチン2の動員の用量応答曲線を示す。

【図21E】図21C~21Eは、単分子バイオセンサーを使用する、異なるGPCR(AT1R、V2R及び2AR)による-アレスチン2の動員の用量応答曲線を示す。

【図22A】図22Aは、形質膜へのPKC(C1b)のジアシルグリセロール-(DAG-)結合ドメインの移行を測定する、単分子バイオセンサーの概略図を示す。バイオセンサーは、PM標的化ドメイン/部分(Mem)、BRET受容体(例えば、GFP10)、可動性リンカー、BRET供与体(例えば、RLucII)及びPKC、C1bのDAG結合ドメインを含む。PLCを活性化すると、膜PIP2は、IP3及びDAGに加水分解される。DAG富化は、C1bドメインを膜に結合させ、BRET受容体(例えば、GFP10)及びBRET供与体(例えば、RLucII)を互いに近づけて、より高いBRETシグナルを誘発する。

40

【図22B】図22Bは、アンギオテンシンIIへのAT1R曝露後のDAGセンサー活性化の動力学を示す。HEK293細胞を安定して発現するAT1Rに、単分子DAGセンサーのDNA及びBRETをコードする構築物を形質移入した。BRETレベルを4秒毎にモニターした。AngII(最終濃度100nM)を、16回のBRET測定(64秒)後に加えた。データは、代表的な実験の三連の平均±SDである。

【図22C】図22C~22Eは、アンギオテンシンII(ANGII)によるアンギオテンシンII受容体(AT1R)の活性化(図22C)、2つの天然リガンドのプロスタグランジン2(PGF2、中実菱形)及びプロスタグランジンE2(PGE2、中空

50

丸)によるプロスタグランジンF受容体(FP)の活性化(図22D)、ウロテンシンII(UTII)によるウロテンシンII受容体(GPR14)の活性化(図22E)の後に形質膜で産生されたDAGのレベルを表す、単分子DAGセンサーから得た用量応答曲線を示す。これらのリガンドから得たEC<sub>50</sub>値(ANGII = 5.3 nM、PGF2 = 11 nM、PGE2 = 90 nM及びUTII = 1.7 nM)は、別の関連アッセイ(カルシウム流入)及び結合について既に公表されているデータに類似している。

【図22D】図22C~22Eは、アンギオテンシンII(ANGII)によるアンギオテンシンII受容体(AT1R)の活性化(図22C)、2つの天然リガンドのプロスタグランジン2(PGF2、中実菱形)及びプロスタグランジンE2(PGE2、中空丸)によるプロスタグランジンF受容体(FP)の活性化(図22D)、ウロテンシンII(UTII)によるウロテンシンII受容体(GPR14)の活性化(図22E)の後に形質膜で産生されたDAGのレベルを表す、単分子DAGセンサーから得た用量応答曲線を示す。これらのリガンドから得たEC<sub>50</sub>値(ANGII = 5.3 nM、PGF2 = 11 nM、PGE2 = 90 nM及びUTII = 1.7 nM)は、別の関連アッセイ(カルシウム流入)及び結合について既に公表されているデータに類似している。

【図22E】図22C~22Eは、アンギオテンシンII(ANGII)によるアンギオテンシンII受容体(AT1R)の活性化(図22C)、2つの天然リガンドのプロスタグランジン2(PGF2、中実菱形)及びプロスタグランジンE2(PGE2、中空丸)によるプロスタグランジンF受容体(FP)の活性化(図22D)、ウロテンシンII(UTII)によるウロテンシンII受容体(GPR14)の活性化(図22E)の後に形質膜で産生されたDAGのレベルを表す、単分子DAGセンサーから得た用量応答曲線を示す。これらのリガンドから得たEC<sub>50</sub>値(ANGII = 5.3 nM、PGF2 = 11 nM、PGE2 = 90 nM及びUTII = 1.7 nM)は、別の関連アッセイ(カルシウム流入)及び結合について既に公表されているデータに類似している。

【図22F】図22Fは、単分子DAGセンサーにより測定されたBRET応答が、PLC活性化及びジアシルグリセロールの同時発生的産生を反映することを示す。単分子DAGセンサーを一時的に発現するHEK293細胞は、PLC(2、3、1、2、1アイソフォーム)の直接活性化因子である、5 µMのm-3m3FBSに、示された時間にわたって曝露された。PLC活性化は、形質膜におけるDAGレベルの持続的増加を反映する、BRETの増加をもたらす。

【図22G】図22G及び22Hは、DAGバイオセンサーの堅牢度を示す。Z'値は、DAGバイオセンサーについて決定し、ウロテンシンII(図22G)またはプロスタグランジンF受容体(図22H)を一時的に発現するHEK293を、DAGバイオセンサーと共に使用した。細胞を、BRET測定のX分前に、100 nMの作動薬(図22GではUro11、または図22HではPGF2)に曝露した。

【図22H】図22G及び22Hは、DAGバイオセンサーの堅牢度を示す。Z'値は、DAGバイオセンサーについて決定し、ウロテンシンII(図22G)またはプロスタグランジンF受容体(図22H)を一時的に発現するHEK293を、DAGバイオセンサーと共に使用した。細胞を、BRET測定のX分前に、100 nMの作動薬(図22GではUro11、または図22HではPGF2)に曝露した。

【図23A】図23Aは、形質膜へのPKC(C1b)のジアシルグリセロール-(DAG-)結合ドメインの移行を測定する、バイオセンサーの概略図を示す。バイオセンサーは、BRET受容体(例えば、rGFP)及びPKC、C1bのDAG結合ドメインに連結したBRET供与体(例えば、RLucII)に結合している、PM標的化ドメイン/部分を含む。PLCを活性化すると、膜PIP<sub>2</sub>は、IP<sub>3</sub>及びDAGに加水分解される。DAG富化は、C1bドメインを膜に結合させ、BRET受容体(例えば、rGFP)及びBRET供与体(例えば、RLucII)を互いに近づけて、より高いBRETシグナルを誘発する。

【図23B】図23B~23Dは、DAGバイオセンサーを使用した、ヒスタミンH1受容体(H1R)(図23B)、ブラジキニン受容体B2(BKRB2)(図23C)、ド

10

20

30

40

50

ーパミンD2受容体(D2R)(図23D)及び2AR(図23E)の活性化後の形質膜でのC1bの動員の用量応答曲線を示す。Gq共役型受容体(H1R及びBKRB2)活性化は、GqファミリーのGタンパク質であるG15の同時発現の不在下で検出可能な応答を本質的にもたらさないGi共役型受容体(D2R)またはGs共役型受容体よりも、良好なシグナルをもたらす。

【図23C】図23B~23Dは、DAGバイオセンサーを使用した、ヒスタミンH1受容体(H1R)(図23B)、ブラジキニン受容体B2(BKRB2)(図23C)、ドーパミンD2受容体(D2R)(図23D)及び2AR(図23E)の活性化後の形質膜でのC1bの動員の用量応答曲線を示す。Gq共役型受容体(H1R及びBKRB2)活性化は、GqファミリーのGタンパク質であるG15の同時発現の不在下で検出可能な応答を本質的にもたらさないGi共役型受容体(D2R)またはGs共役型受容体よりも、良好なシグナルをもたらす。

10

【図23D】図23B~23Dは、DAGバイオセンサーを使用した、ヒスタミンH1受容体(H1R)(図23B)、ブラジキニン受容体B2(BKRB2)(図23C)、ドーパミンD2受容体(D2R)(図23D)及び2AR(図23E)の活性化後の形質膜でのC1bの動員の用量応答曲線を示す。Gq共役型受容体(H1R及びBKRB2)活性化は、GqファミリーのGタンパク質であるG15の同時発現の不在下で検出可能な応答を本質的にもたらさないGi共役型受容体(D2R)またはGs共役型受容体よりも、良好なシグナルをもたらす。

【図23E】図23B~23Dは、DAGバイオセンサーを使用した、ヒスタミンH1受容体(H1R)(図23B)、ブラジキニン受容体B2(BKRB2)(図23C)、ドーパミンD2受容体(D2R)(図23D)及び2AR(図23E)の活性化後の形質膜でのC1bの動員の用量応答曲線を示す。Gq共役型受容体(H1R及びBKRB2)活性化は、GqファミリーのGタンパク質であるG15の同時発現の不在下で検出可能な応答を本質的にもたらさないGi共役型受容体(D2R)またはGs共役型受容体よりも、良好なシグナルをもたらす。

20

【図24A】図24Aは、Gタンパク質の移行及び活性化を測定するバイオセンサーの概略図を示す。バイオセンサーは、BRET受容体(例えば、rGFP)及びGタンパク質サブユニット、例えば、G(G隔離に基づいたセンサー)またはG(G隔離に基づいたセンサー)に結合したBRET供与体(例えば、RLucII)に結合したPM標的化ドメイン/部分(例えば、CAAXドメイン)を含む。作動薬(A)によりGPCRを活性化すると、Gタンパク質サブユニットはGPCRから放出され、したがって形質膜におけるGタンパク質サブユニットの量/密度が低減し、より低いBRETシグナルをもたらす。BRETの変化は、rGFPマーカーで標識された膜のサブドメインまたは細胞内区画からの移行(BRETの減少)、またはそれへの移行(BRETの増加)も反映しうる。

30

【図24B】図24B及び24Cは、イソプロテレノールによる1AR(図24B)または2AR(図24C)の刺激に応答して、形質膜(rGFP-CAAXKras)からの様々なRLucII標識化Gサブユニットの隔離を示す。実験の前、HEK293細胞には、-アドレナリン作動性受容体、WTG1サブユニット、RLucII標識化Gサブユニット(示されているもの)及びWTG15をコードする構築物を、同時形質移入した。RLucII-G1サブユニットとの組み合わせは、これらの2つの受容体にとって用量応答曲線を確立する最適な範囲を提供する。

40

【図24C】図24B及び24Cは、イソプロテレノールによる1AR(図24B)または2AR(図24C)の刺激に応答して、形質膜(rGFP-CAAXKras)からの様々なRLucII標識化Gサブユニットの隔離を示す。実験の前、HEK293細胞には、-アドレナリン作動性受容体、WTG1サブユニット、RLucII標識化Gサブユニット(示されているもの)及びWTG15をコードする構築物を、同時形質移入した。RLucII-G1サブユニットとの組み合わせは、これらの2つの受容体にとって用量応答曲線を確立する最適な範囲を提供する。

50



【図24D】図24Dは、 $\beta$ -アドレナリン作動性受容体、WT G 1サブユニット、RLucII標識化G 1サブユニット及びWT G 1 5をコードする構築物が一時的に形質移入されたHEK293細胞のイソプロテレノールによる 1AR (丸) 及び 2AR (三角) の刺激後の、rGFP-CAAX (Kras) からの作動薬促進RLucII標識化G 1 1隔離における用量応答曲線を示す。観察されたEC<sub>50</sub>は、これらの受容体におけるイソプロテレノールの報告されたkdに類似している。

【図24E】図24Eは、イソプロテレノールによる 1ARの刺激後の、rGFP-CAAX Kras (丸)、rGFP-CAAX Hras (四角) 及びrGFP-CAAX CCIL (三角) からの作動薬促進RLucII標識化Gs隔離における用量応答曲線を示す。3つのPMマーカーにおいて観察された効力は、4.4 nM (rGFP-CAAX Kras) から847 nM (rGFP-CAAX CCIL) まで及び、異なるリガンドの薬理学が、特定のマーカーによりモニターされたドメインにおいて明らかに異なりうることを示している。

【図24F】図24Fは、1  $\mu$ Mのイソプロテレノールによる示された時間にわたる 1ARの刺激後の、rGFP-CAAX Kras (丸)、rGFP-CAAX Hras (四角) 及びrGFP-CAAX CCIL (三角) からの作動薬促進RLucII標識化Gs隔離における動力学を示す。最大応答は、3つのPMマーカーにより測定して、大部分が刺激の5分以内に到達している。したがって、図24EにおけるEC<sub>50</sub>の差は、用量応答曲線が最大応答で確立されたので、動力学の差によって誘導されたものではない。

【図24G】図24Gは、イソプロテレノールによる 1ARの刺激後の、rGFP-CAAX CCIL (三角)、rGFP-CAAX Hras (四角) 及びゴルジ-rGFP (eNOS1のゴルジ標的化ドメイン、菱形) からの作動薬促進RLucII標識化G 1 2隔離における用量応答曲線を示す。基礎BRETは、G 1 2がゴルジマーカーと共局在化したことを示している。しかし、大部分のG 1 2の作動薬誘発性移行は、PMマーカーの使用により観察され、ゴルジでは最小限のものしか観察されない。これらの結果は、Gs及びG 1 2の両方を、受容体の刺激後に観察できることを示している。

【図24H】図24Hは、プロトタイプ作動薬のU46619によるトロンボキサンA2受容体アイソフォーム (Tp R) の刺激後の、rGFP-CAAX Kras (丸)、rGFP-CAAX Hras (四角)、rGFP-CAAX CCIL (三角) 及びゴルジ-rGFP (eNOS1のゴルジ標的化ドメイン、菱形) への作動薬促進RLucII標識化Gq移行における用量応答曲線を示す。用量応答曲線は、Tp R、G q pos 118RLucII (G qの残基118の後ろに挿入されたRLucII)、WT G 5及びG 1をコードする、特定のGq阻害剤であるUbo-Qicで20分間前処理された、またはされない構築物が一時的に形質移入されたHEK293細胞から得た。基礎BRETは、GqがrGFP-CAAX Kras (中実丸) とほぼ共局在化していること及びUbo-Qic (中空丸) による前処理が、このマーカーを有するGqの密度を更に増加することを示しており、U46619への応答範囲を平滑にしている。他のマーカーにより得られる用量応答曲線は、Gq遮断薬に曝露されない細胞のみにおいて、Gq密度の増加 (BRETの増加; rGFP-CAAX Hras、rGFP-CAAX CCIL及びゴルジでは、それぞれ中実四角、中実三角及び中実菱形) を示す。Gq阻害剤により前処理された細胞では、これらのマーカーによる応答は観察されない (rGFP-CAAX Hras、rGFP-CAAX CCIL及びゴルジでは、それぞれ中空四角、中空三角及び中空菱形)。これらの結果は、Gタンパク質の移行が、少なくともGqでは活性化に関連していること及び作動薬刺激への応答において両方の隔離またはサブドメインへの動員を観察することが可能であることを実証した。

【図25A】図25Aは、形質膜へのタンパク質キナーゼN1 (PKN) のRho結合ドメインの移行によるRho活性化を測定する、バイオセンサーの概略図を示す。バイオセンサーは、BRET受容体 (例えば、rGFP) 及びPKNのRho結合ドメインに連結したBRET供与体 (例えば、RLucII) に結合している、PM標的化ドメイン/部

10

20

30

40

50

分を含む。Gタンパク質が活性化されると、RhoGEFは、Gq及びG12/13ファミリーのものなどの活性化されたGサブユニットに動員される、または活性化されたGから放出されたGに動員される。このGEFは、Rhoファミリーの低分子Gタンパク質を活性化する。活性化されると、Rhoは、活性化されたRhoと特異的に相互作用するドメインを有する特定のエフェクターを動員し、PKNがこれらのエフェクターのうちの1つである。この特性に基づいて、Rho活性化をモニターするセンサーは、PKN1 Rho結合ドメイン(CRIB)を、BRET供与体であるRLucIIを含有する発現ベクターにサブクローニングすること及び活性化されたRhoが位置する形質膜への移行をモニターすることによって、作り出した。移行は、BRET受容体(例えば、rGFP)及びBRET供与体(例えば、RLucII)を互いに近づけて、より高いBRETシグナルを誘発する。

10

【図25B】図25Bは、作動薬(U46619)によるTPR刺激後の、形質膜マーカーのrGFP-CAAX Kras(丸)、rGFP-CAAX Hras(逆三角形)及びrGFP-CAAX(CCIL、三角)への作動薬促進PKN-RLucII移行における用量応答曲線を示す。用量応答曲線は、TPR、PKN-RLucII及び形質膜rGFPマーカーをコードする構築物が一時的に形質移入されたHEK293細胞から得た。TPRは、RhoAを活性化することが知られている、プロトタイプGq/12/13共役型受容体である。

【図25C】図25Cは、AT1RをアンジオテンシンIIに曝露した後の、Rhoセンサー活性化の動力学を示す。HEK293SL細胞に、PKN-CRIB-RLucII及びrGFP-CAAXと共にAT1Rをコードする構築物を形質移入した。最初に細胞を、2秒毎にBRET測定する前に、100nMのUbo-Qic(FR900359としても知られている特定のGq阻害剤)の不在下または存在下で30分間インキュベートした。タイロード液(非刺激)またはAngII(刺激、最終濃度100nM)を、30秒後に注入した。データは、代表的な実験の異なる時点での読み取りの二回の平均である。

20

【図25D】図25D~25Fは、異なるAngIIリガンドによるRho活性化に対するGq阻害の影響を示す。HEK293SL細胞に、PKN-CRIB-RLucII及びrGFP-CAAXと共にAT1Rをコードする構築物を形質移入した。細胞を、100nMのUbo-Qic(Gq阻害剤)の不在下(実線)または存在下(点線)で30分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAngIIまたは類縁体で4分間刺激した。データをAngIIのEmaxに正規化した。データは、3~4回の独立した実験の平均±S.E.として表される。AngII、hAngIII、SVdF、SBpa、hSarmesin及びSIなどのGq活性化リガンドは、uboの存在下で低減された有効性及び右方向へシフトした効力を示した(図25D及びE)。Gqの遮断は、DVG、サララシン及びTRV媒介Rho活性化に影響を与えず、それは、これらのリガンドがGqを活性化しないからである。SIIは、ubo処理によるEC50の変化のみを示し、SIIがGq/11を弱く活性化することを示唆している。

30

【図25E】図25D~25Fは、異なるAngIIリガンドによるRho活性化に対するGq阻害の影響を示す。HEK293SL細胞に、PKN-CRIB-RLucII及びrGFP-CAAXと共にAT1Rをコードする構築物を形質移入した。細胞を、100nMのUbo-Qic(Gq阻害剤)の不在下(実線)または存在下(点線)で30分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAngIIまたは類縁体で4分間刺激した。データをAngIIのEmaxに正規化した。データは、3~4回の独立した実験の平均±S.E.として表される。AngII、hAngIII、SVdF、SBpa、hSarmesin及びSIなどのGq活性化リガンドは、uboの存在下で低減された有効性及び右方向へシフトした効力を示した(図25D及びE)。Gqの遮断は、DVG、サララシン及びTRV媒介Rho活性化に影響を与えず、それは、これらのリガンドがGqを活性化しないからである。SIIは、ubo処理によるEC50の変化のみを示し、SIIがGq/11を弱く活性化することを示唆している。

40

50

【図25F】図25D～25Fは、異なるAngIIリガンドによるRho活性化に対するGq阻害の影響を示す。HEK293SL細胞に、PKN-CRIB-RLucII及びrGFP-CAAXと共にAT1Rをコードする構築物を形質移入した。細胞を、100nMのUbo-Qic(Gq阻害剤)の不在下(実線)または存在下(点線)で30分間インキュベートし、次に、BRET測定の前に様々な濃度のAngIIまたは類縁体で4分間刺激した。データをAngIIのEmaxに正規化した。データは、3～4回の独立した実験の平均±S.E.として表される。AngII、hAngIII、SVdF、SBpa、hSarmesin及びSIなどのGq活性化リガンドは、uboの存在下で低減された有効性及び右方向へシフトした効力を示した(図25D及びE)。Gqの遮断は、DVG、サララシン及びTRV媒介Rho活性化に影響を与えず、それは、これらのリガンドがGqを活性化しないからである。SIIは、ubo処理によるEC<sub>50</sub>の変化のみを示し、SIIがGq/11を弱く活性化することを示唆している。

10

【図25G】図25Gは、AT1R及びアセチルコリン受容体によるRho活性化に対するGq阻害の影響を示す。HEK293SL細胞に、PKN-CRIB-RLucII及びrGFP-CAAXと共にAT1Rをコードする構築物を形質移入した。細胞を、BRET測定の前に100nMのAngIIまたは100μMのカルバコール(CCh)のいずれかにより70秒間刺激する前、100nMのUboの不在下(対照)または存在下でインキュベートした。結果は、UboがAngII媒介BRET増加を部分的に遮断し、CCh媒介応答を完全に遮断することを示し、GqがAngII及びCChによるRho活性化において役割を果たすことを示唆している。データは、代表的な実験の三連の平均±SDである。

20

【図25H】図25Hは、Rhoセンサー活性化のRho阻害剤に対する効果を示す。AT1R、PKN-crib-RLucII及びrGFP-CAAXを発現するHEK293SL細胞を、タイロート液中の3μg/mlのC3毒素(Rho阻害剤、Cytoskeleton, Inc.)と共に37℃で約4時間インキュベートし、次に100nMのAngIIにより室温で70秒間刺激した。C3毒素は、作動薬媒介BRET増加を完全に消滅させ、Rho活性をモニターするセンサーを確認している。

【図25I】図25Iは、形質膜へのPKN移行がRho活性化に依存していることを示す。TPR及びPKNセンサー(PKN-RLucII+CAAX-rGFP)を一時的に発現するHEK293細胞を、Rho阻害剤(CT04、Cytoskeleton, Inc.)により一晩前処理し、または前処理せず、100nMのU46619(TPR作動薬)、1μg/mlのRho活性化剤II(CN03、Cytoskeleton, Inc.)、またはビヒクルに曝露した。Rho阻害剤は、TPR媒介応答を消滅させたが、Rho活性化剤は応答を誘発し、Rho活性をモニターするこのセンサーを確認している。

30

【図26A】図26A及び26Bは、単分子融合構築物のRLucII及び異なるBRET受容体から得たBRET転移を示す。rGFPを使用して得たBRETシグナルは、典型的なBRET1(Venus)及びBRET2(GFP2)受容体から得たものより10倍を超えて高かった。図26Aは、RLucIIがVenus、GFP2及びrGFPと対形成したときのエネルギー転移の差を示す。図26Bは、Venus-、GFP2-及びrGFP-融合構築物から計算されたBRET比を示す。

40

【図26B】図26A及び26Bは、単分子融合構築物のRLucII及び異なるBRET受容体から得たBRET転移を示す。rGFPを使用して得たBRETシグナルは、典型的なBRET1(Venus)及びBRET2(GFP2)受容体から得たものより10倍を超えて高かった。図26Aは、RLucIIがVenus、GFP2及びrGFPと対形成したときのエネルギー転移の差を示す。図26Bは、Venus-、GFP2-及びrGFP-融合構築物から計算されたBRET比を示す。

【図26C】図26Cは、rGFP増強BRETシグナルを使用して、形質膜へのベータアレステチンの動員などの密度-BRETに基づいたアッセイにおいても、顕微鏡検査法によってBRETをモニターできることを示す。この実験に使用されたアッセイは、プレー

50

ト読み取り機を使用して測定した、図19Cに提示されたものに類似している。HEK293細胞に、2AR、アレスチン2-RLucII及び形質膜マーカーのrGFP-CAAX(Kras)をコードする構築物を一時的に形質移入した。イソプロテレノールによる刺激は、形質膜においてのみBRETシグナルレベルの増加を誘発し、BRETシグナルの増加が、形質膜へのアレスチンの動員を反映することを示している。

【図27A】図27Aは、AT1Rエンドサイトーシスの調節因子のスクリーニングの結果を示す。AT1R-RLucII及びrGFP-FYVEを一時的に形質移入した後、HEK293細胞を384ウェル白色組織培養処理プレート(Greiner)に分配し、更に24時間かけて増殖させた。化合物を、化合物のサブライブラリーに応じて最終濃度15µMまたは5µg/mlで、384Magnetic Pintool(V&P scientific)を使用して加える。作動薬の様式では、化合物を37で30分間インキュベートした。GFP蛍光は、Envision(商標)(Perkin-Elmer(登録商標))の使用によって赤色であり、セレンテラジン400aを、マルチドロップ384(Thermo-Scientific(登録商標))の使用により最終濃度5µMで加えた。BRETシグナルを読み取る前に、細胞を室温でインキュベートした(RLucは480nmであり、rGFPは530nmであった)。拮抗薬の様式では、化合物を37で30分間インキュベートした。アンギオテンシンIIを10nM(EC<sub>80</sub>)で加え、37で更に30分間インキュベートした。残りのアッセイは、作動薬の様式と同じように実施した。データを、ActivityBase(IDBS)の使用により分析し、アンギオテンシンIIの活性化に基づいて作動薬%または阻害%として報告した。エンドソームを標的にするAT1Rの増強剤(シグナルを100%超増加する)及び阻害剤(シグナルを50%超遮断する)として作用する30及び42個の化合物が、それぞれ示されている。

【図27B】図27Bは、エンドソームへのB2R及びアレスチン2のエンドサイトーシスについてのスクリーニングにおける化合物番号21の効果を示し、図27Cは、エンドソームへのB2Rのエンドサイトーシスについてのスクリーニングにおいて特定された、化合物番号10及び29の効果を示す。形質移入の1日前に、HEK293SL細胞を、35mmガラス底皿に100,000個の細胞/皿の密度で播種した。細胞に、B2R-YFP+mCherry-FYVE(図27Bの左側及び中央、ならびに27C)、またはB2R+アレスチン2-YFP(図27C)を形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を30分間にわたって血清飢餓にし、ビヒクル(図27B左側及び27C左側)、化合物21(図27B中央及び右側)、化合物10(図27C中央)、または化合物29(図27C右側)のいずれかにより37で30分間前処理した。次に細胞を、ブラジキニン(1µM)を用いて、または用いないで(未処理)15分間刺激した。試料を、アルゴン(514nm)及びHeNe I(543nm)レーザーを使用するZeiss(商標)LSM-510 Metaレーザー走査顕微鏡により分析し、画像(2048×2048画素)を、63×油浸レンズの使用により収集した。

【図27C】図27Bは、エンドソームへのB2R及びアレスチン2のエンドサイトーシスについてのスクリーニングにおける化合物番号21の効果を示し、図27Cは、エンドソームへのB2Rのエンドサイトーシスについてのスクリーニングにおいて特定された、化合物番号10及び29の効果を示す。形質移入の1日前に、HEK293SL細胞を、35mmガラス底皿に100,000個の細胞/皿の密度で播種した。細胞に、B2R-YFP+mCherry-FYVE(図27Bの左側及び中央、ならびに27C)、またはB2R+アレスチン2-YFP(図27C)を形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を30分間にわたって血清飢餓にし、ビヒクル(図27B左側及び27C左側)、化合物21(図27B中央及び右側)、化合物10(図27C中央)、または化合物29(図27C右側)のいずれかにより37で30分間前処理した。次に細胞を、ブラジキニン(1µM)を用いて、または用いないで(未処理)15分間刺激した。試料を、アルゴン(514nm)及びHeNe I(543nm)レーザーを使用するZeiss(商標)LSM-510 Metaレーザー走査顕微鏡により分析し、画像(2048×2

10

20

30

40

50

0.48画素)を、63×油浸レンズの使用により収集した。

【発明を実施するための形態】

【0081】

発明の開示

本明細書に記載されている研究において、本発明者たちは、受容体及び他のタンパク質などのタンパク質の細胞内局在化及び輸送(例えば、受容体内部移行、再循環、エキソサイトーシス)を評価/モニターすることを可能にする、BRETに基づいたバイオセンサーを開発した。GPCR及びイオンチャネルをモデルとして使用して、本発明者たちは、renillaのBRET対であるRLucII-rGFPに基づいた感度の良い方法を、受容体及び - アレスチン内部移行、ならびに異なる細胞区画へのこれらの輸送のリアルタイムモニタリング及び薬理的プロファイリングのため、また輸送制御因子の特定の

ために開発した。これらのセンサーは、所定の細胞局在における、または所定の細胞区画における、受容体と比べた供与体の濃度または密度の変化に依存しており、これは(多くの場合に従来のBRETアッセイに当てはまる)直接的なタンパク質間相互作用と無関係に、調節因子によって促進され、異なる細胞局在/区画における大部分のタンパク質輸送にとって、更に応用性及び適応性がある。代表的なRLucII/rGFP BRET対などのrenillaのBRET対系の使用は、非常に堅牢で再現性のある応答をもたらし、伝統的なBRET1(RLuc/Venus)またはBRET2(RLucII/GFP10)対と比較して約5~10倍を超えてダイナミックレンジを増加することが見出された。一般に、シグナルのダイナミックレンジは、RLuc/Venus対(BRET比の0.04~0.08)を使用すると非常に狭く、RLucII/GFP10対を使用するバイオセンサー型から得られるものに類似している(実施例3及び12、図2A~2C及び19A~19Eを参照すること)。この非常に浅いダイナミックレンジは、受容体及びエフェクター輸送における微妙な変化の分析を大きく制限し、アッセイをハイスループットスクリーニング(HTS)にとって非効率な感度にする。本明細書に記載されている感度の良いバイオセンサーは、下記のことにより有用でありうる。

細胞表面受容体内部移行及び再循環(すなわち、受容体が内部移行の後に形質膜に戻る)のリアルタイムモニタリング。このことは、形質膜からの異なる受容体(例えば、GPCR、RTK)の除去を確かめること、逆に、エンドサイトーシスを誘発した後、リガンドの除去後にPMのBRETシグナルの回復を介する受容体の再循環をモニターすることを可能にする。このことは、受容体輸送のエンドサイトーシスの制御、薬理学及び経路特異性の研究も可能にする。

異なる細胞内区画における受容体及び - アレスチン輸送のリアルタイムモニタリング。このことは、受容体(例えば、GPCR)のクラスリン-及び - アレスチン依存性内部移行、ならびに再循環エンドソーム(END)などの、受容体/ - アレスチン複合体の別個の細胞区画への差次的輸送の評価を可能にする。

受容体(例えば、GPCR)及び - アレスチン輸送の薬理的プロファイリング。これらは、別個の細胞区画への受容体/ - アレスチン複合体の輸送を制御するリガンドの傾向を評価すること、ならびに受容体の初期内部移行及びPMでの受容体(例えば、GPCR)の循環の両方に対する薬物の効果をモニターすることを可能にする。

ハイスループットスクリーニング(HTS)を介した調節因子の輸送の特定。アッセイは再現性があり、感度が良いので、受容体(例えば、GPCR)及び他のタンパク質輸送の調節因子を特定するハイスループットスクリーニングを可能にする。原理証明は、AT1Rによって及びこの受容体輸送の新たな小分子制御因子の特定によって、またB2R(実施例17)のような他のGPCRによって、提供された。

受容体の発現を救出することができる作用物質(シャペロン)の特定。シャペロンアッセイは、受容体シグナル伝達と無関係であり、大部分は、特定の標的(受容体)の立体配置を安定化する、またはそれに影響を及ぼすリガンドを検出する結合アッセイである。したがって、不偏的なシグナル伝達において、オルソステリック及びアロステリックリガンドをスクリーンする興味深いアッセイである。この結合アッセイを更に使用して、作用物

質の「オフターゲット (off-target)」効果を特定すること、すなわち、特定の標的に対して特定された作用物質が、また、1つ以上の追加の標的と交差反応するかを決定することができる (このことは、作用物質が、本明細書に記載されているバイオセンサーの使用により1つ以上の追加の標的を「救出」するかを決定することによって、評価することができる)。

受容体へのタンパク質 (例えば、アダプターまたはシグナル伝達タンパク質) の動員 (例えば、GPCRへの - アレスチン動員、Gタンパク質サブユニットの隔離、受容体活性化を反映する、受容体チロシンキナーゼ (RTK) への Grb2 の動員) のモニタリング / 評価。

#### 【0082】

異なる細胞区画マーカーが、それらの選択区画 (例えば、形質膜 (PM) またはエンドソーム (END)) に留まっており、受容体 (または アレスチン、Gタンパク質サブユニット、エフェクターなどの他の標識化タンパク質) のみが、リガンドによる調節 (例えば、作動薬刺激、拮抗薬阻害、または薬理学的シャペロン) によって1つの区画から他の区画に移動するので、PMからENDへの輸送タンパク質の追跡を可能にし、このことは、BRETSigナルの減少 (PM-rGFP / 受容体-RLucIIアッセイ) 及び / または増加 (END-rGFP / 受容体-RLucIIアッセイ) によってそれぞれ明らかになりうる。加えて、PM-rGFP / 受容体-RLucII系を使用して、受容体の再循環を、エンドサイトーシス後のリガンド洗い流しによってモニターすることができる。このアッセイは、受容体のエンドサイトーシス / 再循環を表することに限定されず、薬理学的シャペロンの特定及び特徴決定 (実施例7~11を参照すること) にも、エキソサイトーシス及びタンパク質移行過程を評価 / モニターすることにも適応可能である。したがって、異なる細胞内区画の間の任意の種類のタンパク質移動 (輸送) を、本明細書に記載されているバイオセンサーの使用により高感度で定量的に評価することができる。

#### 【0083】

また、これらのバイオセンサーを、タンパク質 (例えば、受容体、細胞内タンパク質) 輸送のみならず、細胞内のタンパク質及び他の生体分子の任意の種類の局所濃度または密度の変化をモニターすることにも適用することができる。このことは、2つの方法で実行することができる。第1には、rGFPまたはRLucIIに特定の細胞内オルガネラまたは細胞区画マーカーで標識されている場合、任意の特定の条件下で異なる細胞内局在化において目的のタンパク質を追跡することが可能でありうる。第2には、本発明のバイオセンサーを適用して、タンパク質の局所濃度または密度、ならびに脂質または他の生体分子 (例えば、二次メッセンジャー) の局所密度をモニターすることができる。RLucII-rGFP対を適用して、PLC-1-PHDメインを使用する膜PI(4,5)P<sub>2</sub>生成を検出した (実施例13、図20A及びB)。基礎状態では、PLC-1-PH-RLucII及び、PLC-1-PH-rGFP (またはLynもしくはCAAXなどのPM標的化部分に融合されたrGFP) は、PI(4,5)P<sub>2</sub>が位置するPMに局在化し、それによって局所濃度はBRETSigナルを生成するのに十分に高くなる。ホスホリパーゼC (PLC) が活性化されると、PI(4,5)P<sub>2</sub>は加水分解され、PLC-1-PHDメイン標識化RLucII及びrGFPは、サイトゾルの中に分散し、rGFP及びRLucIIの局所濃度を低減し、したがってBRETSigナルを低減する。同様に、PKC (C1b) のDAG結合ドメインを使用して、IP<sub>3</sub>及びDAGへのPIP<sub>2</sub>の加水分解を測定してもよい (図22A及び23A)。DAG富化は、C1bドメインを膜に結合させ、BRETSigナル受容体 (例えば、PM標的化部分に連結されている、rGFP) 及びBRETSigナル供与体 (例えば、C1bに連結されている、RLucII) を互いに近づけて、より高いBRETSigナルを誘発する。同じ理論的根拠によって、任意の種類のタンパク質隔離も検出することができる。ある実施形態において、輸送は、受容体内部移行及び / または再循環である。

#### 【0084】

したがって、第1の態様において、本発明は、目的のタンパク質 / ポリペプチドの局在

10

20

30

40

50

化及び/または輸送を評価するバイオセンサーであって、Renilla 緑色蛍光タンパク質 (Renilla GFP) または Renilla ルシフェラーゼタンパク質 (Renilla Luc) で標識された目的のタンパク質/ポリペプチドを含む第1の構成成分と、Renilla GFP または Renilla Luc で標識された細胞区画標的化部分を含む第2の構成成分とを含み、前記目的のタンパク質/ポリペプチドが前記 Renilla GFP で標識される場合、前記細胞区画標的化部分は、前記 Renilla Luc で標識され、前記目的のタンパク質/ポリペプチドが前記 Renilla Luc で標識される場合、前記細胞区画標的化部分は、前記 Renilla GFP で標識される、バイオセンサーを提供する。

【0085】

用語「目的のタンパク質/ポリペプチド」は、任意のタンパク質/ポリペプチド(未変性、突然変異、可溶性、もしくは膜結合)、またはそのフラグメント/部分を指し、1つ以上の細胞区画へのその局在化、移行及び/または動員が評価される。目的のタンパク質は、例えば、受容体、受容体刺激によって形質膜へ動員される、または形質膜から隔離されるタンパク質、核に移行するタンパク質などでありうる。ある実施形態において、目的のタンパク質は、受容体(すなわち、形質膜に結合または包埋していることが見出されるタンパク質)である。ある実施形態において、受容体は、リガンド(例えば、作動薬)結合によって内部移行する。ある実施形態において、受容体は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)である。「GPCR」は、完全長未変性GPCR分子、ならびに突然変異GPCR分子を指す。GPCRのリストは、参照により本明細書に組み込まれる Foord et al (2005) Pharmacol Rev. 57, 279-288、ならびに GPCR の最新リストは、IUPHAR-DB データベース (Harmar AJ, et al. (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. Nucl. Acids Res. 37 (Database issue): D680-D685; Sharman JL, et al., (2013) IUPHAR-DB: updated database content and new features. Nucl. Acids Res. 41 (Database Issue): D1083-8) において入手可能である。

【0086】

別の実施形態において、受容体は、イオンチャネル、例えば電位開口型イオンチャネル(例えば、ナトリウム、カルシウム、カリウムチャネル)である。イオンチャネルのリストは、IUPHAR-DB データベース(上記の参考文献を参照すること)において入手可能である。

【0087】

別の実施形態において、目的のタンパク質/ポリペプチドは、アダプタータンパク質(例えば、シグナル伝達アダプタータンパク質)、その変異体/フラグメントである。アダプタータンパク質は、シグナル伝達経路において主要な細胞の補助であるタンパク質であり、タンパク質結合パートナーと一緒に連結し、かつより大きなシグナル伝達複合体の作成を促進する様々なタンパク質結合モジュール(例えば、SH2 及び/または SH3 ドメイン)を含有する。これらのタンパク質は、通常、それ自体あらゆる固有の酵素活性を欠いているが、代わりに、タンパク質複合体の形成を導く、特異的なタンパク質間相互作用を媒介する。アダプタータンパク質の例には、MyD88、Grb2 及び SHC1 が含まれる。

【0088】

別の実施形態において、目的のタンパク質は、 - アレスチン、 - アレスチン変異体またはその活性部分/フラグメント、例えば、 - アレスチン-1 (参照配列: アイソフォーム1では NP\_004032.2、アイソフォーム2では NP\_064647.1) または - アレスチン-2 (参照配列: アイソフォーム1では NP\_004304.1、アイソフォーム2では NP\_945355.1、アイソフォーム3では NP\_0012

10

20

30

40

50

4 4 2 5 7 . 1、アイソフォーム 4 では NP\_\_0 0 1 2 4 4 2 5 8 . 1、アイソフォーム 5 では NP\_\_0 0 1 2 4 4 2 5 9 . 1 及びアイソフォーム 6 では NP\_\_0 0 1 2 4 4 2 6 0 . 1 ) である。

#### 【0089】

別の実施形態において、目的のタンパク質は、Gタンパク質サブユニット、Gタンパク質サブユニット変異体、またはその活性部分/フラグメント、例えば、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、もしくはG<sub>3</sub>サブユニットまたはその活性フラグメントである。

#### 【0090】

したがって、別の態様において、本発明は、Gタンパク質及び/またはGPCR活性化を評価するバイオセンサーであって、Renilla緑色蛍光タンパク質(Renilla GFP)またはRenillaルシフェラーゼタンパク質(Renilla Luc)で標識されたGタンパク質サブユニットまたはその活性フラグメントを含む第1の構成成分と、Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識されたPM標的化部分を含む第2の構成成分とを含み、前記Gタンパク質サブユニットが前記Renilla GFPで標識される場合、前記PM標的化部分は、前記Renilla Lucで標識され、前記Gタンパク質サブユニットが前記Renilla Lucで標識される場合、前記PM標的化部分は、前記Renilla GFPで標識される、バイオセンサーを提供する。

#### 【0091】

別の態様において、本発明は、GPCRリガンドがGタンパク質サブユニットの活性を調節するかを評価するバイオセンサーであって、Renilla緑色蛍光タンパク質(Renilla GFP)またはRenillaルシフェラーゼタンパク質(Renilla Luc)で標識された前記Gタンパク質サブユニットまたはその活性フラグメントを含む第1の構成成分と、Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識されたPM標的化部分を含む第2の構成成分とを含み、前記Gタンパク質サブユニットが前記Renilla GFPで標識される場合、前記PM標的化部分は、前記Renilla Lucで標識され、前記Gタンパク質サブユニットが前記Renilla Lucで標識される場合、前記PM標的化部分は、前記Renilla GFPで標識される、バイオセンサーを提供する。

#### 【0092】

ある実施形態において、前記Gタンパク質サブユニットまたはその活性フラグメントは、前記Renilla Lucで標識され、前記PM標的化部分は、前記Renilla GFPで標識される。ある実施形態において、Gタンパク質サブユニットは、G<sub>1</sub>サブユニット、例えば、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub>、G<sub>4</sub>、G<sub>5</sub>、G<sub>6</sub>、G<sub>7</sub>、G<sub>8</sub>、G<sub>9</sub>、G<sub>10</sub>、G<sub>11</sub>、G<sub>12</sub>、またはG<sub>13</sub>である。別の実施形態において、Gタンパク質サブユニットは、G<sub>q</sub>サブユニット、例えば、G<sub>q</sub>、G<sub>s</sub>、G<sub>i1</sub>、G<sub>i2</sub>、G<sub>i3</sub>、G<sub>t-cone</sub>、G<sub>t-rod</sub>、G<sub>t-gus</sub>、G<sub>z</sub>、GoA、GoB、Go1f、G<sub>11</sub>、G<sub>12</sub>、G<sub>13</sub>、G<sub>14</sub>、またはG<sub>15</sub>/G<sub>16</sub>である。別の実施形態において、Gタンパク質サブユニットは、G<sub>12</sub>、例えば、G<sub>12</sub>、G<sub>13</sub>、G<sub>14</sub>、またはG<sub>15</sub>(G<sub>15</sub>-SもしくはG<sub>15</sub>-L)である。

#### 【0093】

別の実施形態において、目的のタンパク質は、DAGに結合するタンパク質、またはその活性部分/フラグメント、例えば、ホルボールエステル/ジアシルグリセロール結合ドメイン(DAG結合ドメイン)である。ある実施形態において、DAG結合ドメインは、PKC(C1b)のものである。DAG結合ドメイン(一般に、C1ドメインと呼ばれる)を含む他のタンパク質には、例えば、AKAP13、ARAF、ARHGAP29、ARHGEF2、BRAAF、CDC42BPA、CDC42BPB、CDC42BPG、CHN1、CHN2、CIT、DGKA、DGKB、DGKD、DGKE、DGKG、DGKH、DGKI、DGKK、DGKQ、DGKZ、GMIP、HMHA1、KSR1、KSR2、MYO9A、MYO9B、PDZD8、PRKCA、PRKCB1、PRKC

10

20

30

40

50



D、PRKCE、PRKCG、PRKCH、PRKCI、PRKCN、PRKCQ、PRKCZ、PRKD1、PRKD2、PRKD3、RACGAP1、RAF1、RASGRP、RASGRP1、RASGRP2、RASGRP3、RASGRP4、RASSF1、RASSF5、ROCK1、ROCK2、STAC、STAC2、STAC3、TENC1、UNC13A、UNC13B、UNC13C、VAV1、VAV2及びVAV3が含まれる。

#### 【0094】

別の実施形態において、目的のタンパク質は、PLC<sub>1</sub>、またはPI(4,5)P<sub>2</sub>に結合することができるその活性部分/フラグメント、例えばPLC<sub>1</sub>のプレクストリン相同(PH)ドメインである。

10

#### 【0095】

別の実施形態において、目的のタンパク質は、低分子GTPアーゼに結合するタンパク質(Expasy ENZYMEエントリ: EC<sub>3.6.5.2</sub>)である。低分子GTPアーゼは、Gタンパク質のサブユニットの遠縁である、分子質量21kDaを有する約50個の酵素のファミリーであり、細胞増殖制御(Rasサブファミリー)、膜小胞輸送及び脱殻(uncoating)(Rab及びARFサブファミリー)、核タンパク質移入(Ranサブファミリー)、ならびに細胞骨格の組織化(Rho及びRacサブファミリー)に関与する。ある実施形態において、目的のタンパク質は、低分子GTPアーゼのRasスーパーファミリーの1つ以上のメンバー、例えば、GTPアーゼのRas、Rho、Ran、Rab及びArfのファミリーに結合するタンパク質である。そのような低分子GTPアーゼの局在化/移行は、Ras結合ドメイン(RBD)を含むポリペプチド、例えば、RAF1のRBDまたは、A85K置換を含むその変異体(Rasにより高い親和性を有する)の使用により、評価することができる。RBDを含む他のタンパク質には、ARAF、BRAF、RGS12、RGS14、TIAM1及びPI3Kが含まれる。したがって目的のタンパク質は、低分子GTPアーゼに結合するタンパク質、または低分子GTPアーゼに結合する能力を維持するそのフラグメントの変異体の全て/未変性の配列を含んでもよい。

20

#### 【0096】

更なる実施形態において、目的のタンパク質は、低分子GTPアーゼのRhoスーパーファミリーの1つ以上のメンバー、Rho(A、B及びC)、Rac(Rac1、2、3、もしくはRhoG)、またはCdc42(Cdc42、RhoQ、もしくはRhoJ)に結合するタンパク質である。別の実施形態において、目的のタンパク質は、Rhoタンパク質(RhoA、RhoB及び/もしくはRhoC、好ましくはRhoA)、またはその活性フラグメント、例えば、Cdc42/Rac相互作用的結合(CRIB)ドメインに結合するタンパク質である。CRIBドメイン(EMBL-EBI/Interpro受入番号IPR000095)は、低分子GTPアーゼの多くの推定下流エフェクター(例えば、Cdc42p-及び/またはRho様低分子GTPアーゼ)に存在し、かつ約15~16個のアミノ酸を含む、GTPアーゼ結合ドメイン(GBD、p21結合ドメイン、PBDとも呼ばれる)のN末端部分内の保存領域である。CRIBドメインを含むタンパク質には、哺乳類活性化Cdc42関連キナーゼ(ACK)、哺乳類p21活性化キナーゼ(PAK1~PAK4)、Rhotekin(RTKN)、哺乳類ウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク質(WASP)、セリン/トレオニンタンパク質キナーゼN(PKN、タンパク質キナーゼC関連キナーゼ、PRKとも呼ばれる)などのタンパク質キナーゼCスーパーファミリーのキナーゼが含まれる。ある実施形態において、目的のタンパク質は、ヒトPKN1(Uniprot参照: Q16512-1)またはPKN2(Uniprot参照: Q16513)、好ましくはPKN1のCRIBドメインを含む。ヒトPKN1のCRIBドメインは、配列VQSEPRSWSLLEQLG(配列番号40)を含み、これは未変性ヒトPKN1(Uniprot参照: Q16512-1)の残基6~20に相当する。

30

40

#### 【0097】

50

したがって、別の態様において、本発明は、低分子GTPアーゼ（例えば、Rho）の活性化を評価するバイオセンサーであって、Renilla緑色蛍光タンパク質（Renilla GFP）またはRenillaルシフェラーゼタンパク質（Renilla Luc）で標識された前記低分子GTPアーゼに結合するドメイン（例えば、CRIBドメイン）を含むポリペプチドを含む第1の構成成分と、Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識されたPMまたはエンドソーム標的化部分を含む第2の構成成分とを含み、前記低分子GTPアーゼに結合するドメイン（例えば、CRIBドメイン）を含む前記ポリペプチドが前記Renilla GFPで標識される場合、PMまたはエンドソーム標的化部分は、前記Renilla Lucで標識され、前記低分子GTPアーゼに結合するドメイン（例えば、CRIBドメイン）を含む前記ポリペプチドが前記Renilla Lucで標識される場合、前記PMまたはエンドソーム標的化部分は、前記Renilla GFPで標識される、バイオセンサーを提供する。ある実施形態において、低分子GTPアーゼは、Rhoタンパク質（例えば、RhoA）である。ある実施形態において、低分子GTPアーゼに結合するドメインは、ヒトPKN1のCRIBドメインなどのCRIBドメインである。ある実施形態において、第2の構成成分は、PM標的化部分を含む。

#### 【0098】

Renillaルシフェラーゼという用語は、本明細書において使用されるとき、生物発光に使用され、かつRenilla reniformisまたはRenilla mulleriなどのRenilla属の生物体から誘導される、酸化酵素を指す。Renilla生物体またはその変異体からの未変性ルシフェラーゼ、例えば、Renilla reniformisルシフェラーゼ（Rluc）の未変性形態（アミノ酸配列に関して）が、またはRluc IIもしくはRluc 8などのその変異体が含まれる。用語「Rluc II」は、未変性Renillaルシフェラーゼに対して以下のアミノ酸置換：A55T、C124A及びM185Vを含む、Renilla reniformisルシフェラーゼの変異形態を指す。ある実施形態において、Rluc IIは、実施例1に描写されている配列（配列番号10）を含む。用語「Rluc 8」は、未変性Renillaルシフェラーゼに対して以下のアミノ酸置換：A55T、C124A、S130A、K136R、A143M、M185V、M253L及びS287Lを含む、Renilla reniformisルシフェラーゼの変異形態を指す。未変性Renilla mulleriルシフェラーゼのアミノ酸配列は、GenBank受入番号AAG54094.1によって開示されている。

#### 【0099】

用語「Renilla GFP」は、Renilla reniformisまたはRenilla mulleriなどのRenilla属の生物体から誘導される、緑色蛍光タンパク質を指す。Renilla生物体からの未変性GFP、またはその変異体が含まれる。ある実施形態において、Renilla GFPはRenilla reniformis GFP（本明細書において、「rGFP」と呼ばれる）であり、更なる実施形態において、Renilla reniformis GFPの未変性形態（アミノ酸配列に関して）である。ある実施形態において、rGFPは、実施例1に描写されている配列（配列番号11）を含む。未変性Renilla mulleri GFPのアミノ酸配列は、GenBank受入番号AAG54098.1によって開示されている。Renillaルシフェラーゼ及び/またはRenilla GFPの核酸配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されうる（すなわち、「ヒト化」であり、例えばヒト化型のRenilla mulleri GFPについては、WO2002057451を参照すること）。

#### 【0100】

共鳴エネルギー転移（RETと略される）は、重複する発光/吸収スペクトルを有する、2つの発色団の間のエネルギー転移を表す機構である。2つの発色団（「供与体」と「受容体」）が互いに短い距離（例えば、10～100オングストローム）の範囲内にあり

10

20

30

40

50

、これらの遷移双極子が適切に配向されている場合、供与体発光団は、その励起状態エネルギーを、非放射性双極子間カップリングを介して受容体発光団に転移することができる。生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) は、供与体生物発光団 (bioluminophore) (renilla ルシフェラーゼなどの生物発光酵素) 及び受容体蛍光団 (例えば、renilla GFP) の間の非放射性エネルギー転移に基づいている。

#### 【0101】

用語「細胞区画標的化部分」は、Renilla GFPまたはRenilla Luc (例えば、融合タンパク質など) に結合したとき、これらを、例えば、形質膜 (または脂質ラフトなどの形質膜の特定のサブドメイン)、エンドソーム (例えば、初期及び/または後期エンドソーム)、リソソーム、ファゴソーム、リボソーム、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置、核などの、細胞内の特定の区画、オルガネラまたは局在に向かわせ、それによって、Renilla GFPまたはRenilla Lucの有効濃度を増加する、生体分子、好ましくはポリペプチドまたはペプチドを指す。そのようなマーカーは、典型的には、標的にされた特定の区画において高いレベルで通常見出される、タンパク質 (またはその適切なフラグメント) である。タンパク質を、細胞内の特定の区画、オルガネラ、または局在に向かわせるペプチドは、当該技術において知られており、例えば、小胞体 (ER) シグナルペプチド、またはER回収配列、核局在化シグナル (NLS) ペプチド及びミトコンドリア局在化シグナル (MLS) ペプチドが含まれる。

#### 【0102】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、形質膜 (PM) 標的化部分である。Renilla GFPまたはRenilla LucをPMへ動員することができる任意の部分、バイオセンサーに使用することができる。したがって、Renilla GFPまたはRenilla Lucを、形質膜において見出される任意のタンパク質 (例えば、受容体、もしくはPMにおいて見出される任意の他のタンパク質)、またはそのフラグメントに融合させてもよい。そのようなタンパク質の例は、カベオリン - 1であり、これは、多くの細胞型において見出されるカベオラ (形質膜の小さな (50 ~ 100 nm) 陥入に相当する一種の脂質ラフト) の主要な構成成分である。CAV1遺伝子の選択的スプライシングにより生成される、カベオリン - 1の2つのアイソフォームが特定されており、カベオリン - 1 (残基2 ~ 178を含む) 及びカベオリン - 1 (32 ~ 178配列に相当する) である。そのような部分の他の例には、ミリスチル化、パルミチル化及びプレニル化、ならびに多塩基ドメインなどの、タンパク質脂質化/脂肪酸アシル化のためのシグナル配列を含むペプチド/ポリペプチドが含まれる。いくつかのタンパク質は、ミリスチル化、パルミチル化及び/またはプレニル化されることが知られており (例えば、Yes、Fyn、Lyn、Lck、Hck、Fgrなどのタンパク質キナーゼ及びホスファターゼ、Gタンパク質、一酸化窒素シンターゼ、ADPリボシル化因子 (ARF)、カルシウム結合タンパク質、及びMARCKSなどの膜または細胞骨格関連構造タンパク質 (例えば、Wright et al., J Chem Biol Mar 2010; 3(1): 19 - 35; Alcart - Ramos et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Volume 1808, Issue 12, December 2011, Pages 2981 - 2994を参照すること)、したがって、これらのタンパク質のいずれかのミリスチル化、パルミチル化及びプレニル化シグナル配列をバイオセンサーに使用することができる。ある実施形態において、ミリスチル化及び/またはパルミチル化配列は、Lynキナーゼのものである。

#### 【0103】

## 【数 1】

ある実施形態において、PM膜標的化部分は、CAAXモチーフ（Cはシステイン残基であり、AAは2つの脂肪族残基であり、Xはアミノ酸を表す）を含む。CAAXモチーフは、翻訳後修飾を指示する特定のアミノ酸配列をC末端に有する一群のタンパク質と定義される、「CAAXタンパク質」において見出される。CAAXタンパク質は、プレラミンA、ラミンB1及びラミンB2などの核ラミン（中間径フィラメント）、Ras、Rho、Rac及びCdc42などのRas及び多数のGTP結合タンパク質（Gタンパク質）、いくつかのタンパク質キナーゼ及びホスファターゼなどが含まれる、多種多様な分子を包含する（例えば、Gaout et al., *Am J Transl Res.* 2009;1(3):312-325を参照すること）。CAAXモチーフまたはボックスをC末端の端部に有するタンパク質は、典型的には、タンパク質が形質膜または核膜に移動し、異なる機能を発揮する前に、プレニル化プロセスを必要とする。ある実施形態において、CAAXボックスは、ヒトRASファミリータンパク質、例えば、HRAS、NRAS、Ral-A、KRAS4AまたはKRAS4bから誘導される。最後のC末端残基のRAS、NRAS、KRAS4AまたはKRAS4b（超可変領域またはHVRと呼ばれる）が下記に描写され、最小限の推定形質膜標的化領域はイタリック体で表記されており、CAAXボックスは下線付きである（例えば、Ahearn et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13:39-51, January 2012を参照すること）。HRAS:

*KLNPDES***GP***GC***MSCKCVLS**（配列番号33）、NRAS:

*KLNSSDDGTQ***GC***MGLP***CVVM**（配列番号34）、KRAS4A:

*KISKEEKTPG**CV***KIKKCIIM**（配列番号35）；KRAS4b:

*KMSKDGGKKKKKSKTK***CVIM**（配列番号36）；Ral-A/Ral1:

*KNGKKKRKSLAKRIRER***CCIL**（配列番号37）。

## 【0104】

## 【数 2】

ある実施形態において、PM標的化部分は、KRAS4bからの配列

**GKKKKKKSKTKCVIM**（配列番号7）を含む。別の実施形態において、PM標的化部分は、hRASからの形質膜標的化パルミトイル化配列及びRal-A/Ral1からのプレニル化シグナル配列（配列：**CMSCKCCIL**、配列番号43）を含む。

## 【0105】

## 【数 3】

いくつかのタンパク質は、R a s 低分子GTPアーゼ、ホスファターゼPTEN、非受容体チロシンキナーゼS r c、アクチン制御因子WASP及びMARCKS、ならびにGRK5などのGタンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) などの、PMを標的にする非脂質多塩基ドメインも含有する。ある実施形態において、多塩基ドメインは、GRK5からのものであり、配列：SPKKGLLQRLFKRQHQNNSKS (配列番号8) を含む。

10

## 【0106】

特定の態様において、本発明は、(i) Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された - アレスチンを含む第1の構成成分と、(ii) Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された形質膜 (PM) 標的化部分及びGPCRを含む第2の構成成分とを含む細胞または膜調製物を含み、前記 - アレスチンが前記Renilla GFPで標識される場合、前記PM標的化部分は前記Renilla Lucで標識され、前記 - アレスチンが前記Renilla Lucで標識される場合、前記PM標的化部分は前記Renilla GFPで標識される、バイオセンサーを提供する。そのようなバイオセンサーは、形質膜に位置するGPCRへの - アレスチンの動員をモニター / 測定することに有用でありうる。

20

## 【0107】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、エンドソーム標的化部分である。いくつかのエンドソーム標的化部分 / マーカーが当該技術において知られており、タンパク質のRabファミリー (RAB4、RAB5、RAB7、RAB9及びRAB11)、マンノース6 - リン酸受容体 (M6PR)、カベオリン - 1及び - 2、トランスフェリン及びその受容体、クラスリン、ならびに初期エンドソーム自己抗原1 (EEA1)、Rabenosyn - 5、受容体活性化のSmadアンカー (anchor) (SARA)、Vps27p及びEndofinなどのFYVEドメインを含むタンパク質が含まれる。いくつかのマーカーは、初期エンドソーム (例えば、RAB4、トランスフェリン及びその受容体、ならびにFYVEドメインを含むタンパク質) に対してより特異的であり、他のものは、後期エンドソーム (例えば、RAB7、RAB9及びM6PR) に対してより特異的であり、他のものは、再循環エンドソーム (例えば、RAB11、RAB4) に対してより特異的である。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、エンドソーム局在化に関連付ける / 向けることができる。

30

## 【0108】

ある実施形態において、エンドソーム標的化部分は、FYVEドメインを含む。FYVEドメインは、3つの保存要素であるN末端のWxxD、中央のRR/KHHCR及びC末端のRVCモチーフにより定義される。ある実施形態において、エンドソーム標的化部分は、EndofinのFYVEドメイン、例えば、ヒトEndofinの残基のおよそ739から806を含む。

40

## 【0109】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、例えば、LAMP1及びLAMP2などのリソソーム標的化部分である。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、リソソーム局在化に関連付ける / 向けることができる。

## 【0110】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、例えば、PMP70、PXMP2及びカタラーゼなどのペルオキシソーム標的化部分である。したがって、これらのタンパク質

50

またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、ペルオキシソーム局在化に関連付ける／向けることができる。

【0111】

ある実施形態において、細胞区画標的化領域は、例えば、ATG (AuToPhaGy 関連) ファミリータンパク質 (ATG4、ATG5、ATG16、ATG12、Lambert et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 14, 759-774 (2013) を参照すること)、LC3A/B及びSQSTM1/p62などのオートファゴソーム標的化部分である。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、オートファゴソーム局在化に関連付ける／向けることができる。

10

【0112】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、リボソーム標的化部分である。いくつかのエンドソーム標的化部分／マーカーが、当該技術において知られており、リボソームタンパク質 (L7a、S3及びS6) が含まれる。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、リボソーム局在化に関連付ける／向けることができる。

【0113】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、小胞体 (ER) 標的化部分である。いくつかのER標的化部分／マーカーが、当該技術において知られており、Erp72、Erp29、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI)、GRP78 (HSPA5)、GRP94 (HSP90B1) 及びGRP58 (PDIA3) などのHSP70ファミリータンパク質、カルネキシン及びカルレチキュリンが含まれる。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、ER局在化に関連付ける／向けることができる。

20

【0114】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、ゴルジ標的化部分である。いくつかのゴルジ標的化部分／マーカーが、当該技術において知られており、eNOS (例えば、そのN末端部分、J. Liu et al., Biochemistry, 35 (1996), pp. 13277-13281)、GM130、Golgin-97、58Kタンパク質、トランスゴルジネットワーク膜タンパク質2 (TGN2)、TGN46、TGN38、マンノシダーゼ2、シンタキシン6、GM130 (GOLGA2)、Golgin-160、Membrin (GS27)、GS28、コートマー (Coatomer) タンパク質、Rbet1及びRCAS1が含まれる。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、ゴルジ装置局在化に関連付ける／向けることができる。ある実施形態において、ゴルジ標的化部分は、ヒトeNOSタンパク質のN末端部分、例えば、ヒトeNOS1の残基1~73 (配列番号42)。

30

【0115】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、ミトコンドリア標的化部分である。いくつかのミトコンドリア標的化部分／マーカーが、当該技術において知られており、AIF、COX IV、チトクロムC、ヘキソキナーゼI、SOD1、SDHA、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、VDAC、TOMM22、UCP1、UCP2、UCP3、PHB1、Galpha12 (またはそのN末端、Andreeva et al., FASEB J. 2008 Aug; 22 (8): 2821-31. Epub 2008 Mar 26)、Bclファミリーメンバーのタンパク質またはそのフラグメント、例えば、Bcl-XL (RKQGQERFNRFLLTGMTVAGVVLLGSLFSRK、配列番号87、Mossalam et al., Mol Pharm. 2012 May 7; 9 (5): 1449-1458) のフラグメントが含まれる。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはrGFPに融合し

40

50

て、これらを、ミトコンドリア局在化に関連付ける／向けることができる。核標的化部分は、新たに合成されたタンパク質をミトコンドリアに向ける10～70アミノ酸長のペプチドであるミトコンドリア標的化シグナルも、含むことができる。これはN末端において見出され、疎水性及び陽性荷電アミノ酸の交互パターンからなり、両親媒性ヘリックスを形成する。ミトコンドリア標的化シグナルは、続いてタンパク質をミトコンドリアマトリックスなどのミトコンドリアの異なる領域に向ける、追加のシグナルを含有することができる。

#### 【0116】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、核標的化部分である。いくつかの核標的化部分／マーカーが、当該技術において知られており、ラミンA/C、ヌクレオポリン(NUP)、ASHL2、ESET、ヒストン、LSD1、PARPなどのDNA修復酵素及びP84/THOC1が含まれる。したがって、これらのタンパク質またはその適切なフラグメントをRenilla LucまたはRenilla GFPに融合して、これらを、核局在化に関連付ける／向けることができる。核標的化部分は、核局在化シグナルまたは配列(NLS)を含むこともでき、これは、核移送により細胞核に移入されるタンパク質を標識するアミノ酸配列である。典型的には、このシグナルは、タンパク質表面に曝露された陽性荷電リシンまたはアルギニンの1つ以上の短配列からなる。最適に特徴決定された移送シグナルは、核内タンパク質移入のための伝統的なNLS(cNLS)であり、これは、塩基性アミノ酸の1つ(単一部分(monopartite))または2つ(二部分)の区間からなる。単一部分cNLSは、SV40大型T抗原NLS(<sup>126</sup>PKKKRRV<sup>132</sup>) (配列番号38)により例示され、二部分cNLSは、ヌクレオプラスミンNLS(<sup>155</sup>KRPAAATKKAGQAKKKK<sup>170</sup>) (配列番号39)により例示される。

#### 【0117】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、核外搬出配列(NES)である。NESは、核移送の使用により核膜孔複合体を介して細胞核から細胞質に搬出されるように向けられるタンパク質における、短アミノ酸配列(典型的には、4個の疎水性残基)である。そのようなNESの配列は、例えばLxxLxxLxLであり、ここで、「L」は疎水性残基(多くの場合、ロイシン)であり、「x」は任意の他のアミノ酸である。サイトゾルから核に移行するタンパク質(例えば、ERKまたはMDM2)において、BRETシグナルの減少は、NES部分の使用によって検出される。

#### 【0118】

ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、細胞骨格標的化部分、例えば、アクチンもしくはそのフラグメント、またはイノシトール-1,4,5-トリスホスフェート-3-キナーゼ-A(ITPKA)のN末端F-アクチン結合ドメインなどのアクチン結合ドメイン(ABD)を含むタンパク質である(Johnson and Schell, Mol. Biol. Cell December 15, 2009 vol. 20 no. 24 5166-5180)。ある実施形態において、細胞骨格標的化部分は、配列:MGVADLIKKEFESISKEE(配列番号88)を含むペプチドである(“Lifeact”, Riedl et al., Nat Methods, 2008 Jul; 5(7): 605)。

#### 【0119】

別の態様において、本発明は、第1及び第2の条件間の細胞区画における生体分子の量の調節(増加または減少)を評価するバイオセンサーであって、前記生体分子に結合するタンパク質マーカーで標識されたRenilla緑色蛍光タンパク質(Renilla GFP)を含む第1の構成成分と、前記タンパク質マーカーで標識されたRenillaルシフェラーゼタンパク質(Renilla Luc)を含む第2の構成成分とを含むバイオセンサーを提供する。

#### 【0120】

別の態様において、本発明は、第1及び第2の条件間の細胞区画における生体分子の量

10

20

30

40

50

の調節（増加または減少）を評価するバイオセンサーであって、Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された前記生体分子に結合するタンパク質マーカを含む第1の構成成分と、Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された細胞区画標的化部分を含む第2の構成成分とを含み、前記タンパク質マーカがRenilla GFPで標識される場合、前記細胞区画標的化部分は、Renilla Lucで標識され、その逆も同様である、バイオセンサーを提供する。

#### 【0121】

そのようなバイオセンサーを、第1及び第2の条件間の、例えば、作用物質の存在下または不在下での細胞区画における生体分子の量の調節を評価する方法に使用することができる。作用物質が細胞区画（例えば、PM）において生体分子の量を増加する場合、BRETTシグナルは、作用物質の存在下で増加し、その逆も同様である。

10

#### 【0122】

タンパク質マーカは、前記生体分子に結合する任意のタンパク質またはそのフラグメントであってもよく、したがって、前記細胞区画におけるその濃度または密度は、前記細胞区画における前記生体分子（例えば、cAMP及びcGMPなどの環状ヌクレオチド、IP<sub>3</sub>、DAG、PIP<sub>3</sub>、Ca<sup>2+</sup>イオンを含む二次メッセンジャー）の濃度または密度によって左右される。例えば、PMにおけるPLC1局在化は、PIP<sub>2</sub>及び/またはPIP<sub>3</sub>の存在によって左右される。PMにおけるPI(4,5)P<sub>2</sub>の濃度が減少する場合（ホスホリパーゼC(PLC)がPI(4,5)P<sub>2</sub>の加水分解のために活性化されるときに生じる）、PLC1は、サイトゾルに拡散して、PMにおけるその濃度/密度を低減する。したがって、Renilla Luc及びRenilla GFP標識化PLC1（もしくはそのフラグメント、例えば、配列番号25）により、またはRenilla LucもしくはRenilla GFP標識化PLC1及びRenilla LucもしくはGFP標識化PM標的化部分を使用してBRETTにより測定されうる、PMにおけるPLC1（または、PHドメインなどの、PIP<sub>2</sub>及び/またはPIP<sub>3</sub>に結合するそのフラグメント）の濃度を、PMにおける生体分子の濃度または密度の指標として使用してもよい。同様に、特定のタンパク質のPHドメイン及びPhox相同ドメイン（PXドメイン）（例えば、akt及びPLD1）は、PIP<sub>3</sub>と相互作用し、したがって、PIP<sub>3</sub>結合に選択性があるPHまたはPXドメインを含むタンパク質マーカを、PMにおけるPIP<sub>3</sub>の濃度または密度の指標として使用することができる。別の例は、C1ドメイン（ホルボールエステル/ジアシルグリセロール結合ドメインとしても知られている）であり、例えば、タンパク質キナーゼのN末端部分に見出される。また、PLC1は、PIP<sub>3</sub>を含む異なるリン脂質に結合することができる。C1ドメインは、ジアシルグリセロール（DAG）に結合し、したがってC1ドメインを含むタンパク質マーカを、PMにおけるDAGの濃度または密度の指標として使用することができる。したがって、二次メッセンジャーなどの生体分子に結合することができ、前記細胞区画におけるその濃度または密度が前記生体分子の濃度または密度によって左右される任意のタンパク質またはタンパク質ドメインを、そのようなバイオセンサーに使用することができる。

20

30

#### 【0123】

用語「生体分子」は、細胞により産生されうる、または細胞に存在しうる任意の分子、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸（DNAもしくはRNA）、脂質もしくは脂肪酸、リン脂質、糖（多糖）、またはATP、AMP、ADP、ヒスタミンなどの任意の他の化合物を指す。ある実施形態において、生体分子は、二次メッセンジャー（すなわち、細胞表面の受容体で受け取るシグナルをサイトゾル及び/または核中の標的分子に伝達する分子）、例えば、環状AMP、環状GMP、イノシトール三リン酸（IP<sub>3</sub>）、ホスファチジルイノシトール（例えば、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェートまたはPIP<sub>2</sub>、ホスファチジルイノシトール3,4,5-トリホスフェートまたはPIP<sub>3</sub>）、ジアシルグリセロール（DAG）、Ca<sup>2+</sup>である。ある実施形態において、生体分子は、ジアシルグリセロール及びホスファチジルイノシトールなどのPMに見

40

50



出される疎水性分子（例えば、リン脂質）である。

【0124】

変異体は、本明細書において使用されるとき、参照（例えば、未変性）配列に少なくとも60%の同一性または類似性を有し、その所望の活性、例えば、標的タンパク質に結合する及び/または細胞区画に移行する能力を保持する、タンパク質/ポリペプチドを指す。更なる実施形態において、変異体は、参照（例えば、未変性）配列に少なくとも65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の類似性または同一性を有し、その所望の活性を保持する。「類似性」及び「同一性」は、2つのポリペプチド分子間の配列類似性/同一性を指す。類似性または同一性は、整列された配列におけるそれぞれの位置を比較することによって決定することができる。10  
アミノ酸配列間の類似性または同一性の程度は、配列により共有される位置での整合または同一アミノ酸の数の関数である。類似性または同一性の比較にとって配列の最適な整列は、Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482の局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443の相同性整合アルゴリズム、Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索方法及びこれらのアルゴリズムのコンピューター処理（例えば、Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, Wis., U.S.A. によるGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA）などの様々な20  
アルゴリズムを使用して実施することができる。配列類似性または同一性は、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10に記載されているBLASTアルゴリズムを使用して（公表された初期設定を使用して）決定することもできる。BLAST分析を実施するソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を介して入手することができる。

【0125】

Renilla LucまたはRenilla GFPを、細胞区画標的化部分のN末端、内部、またはC末端に融合させることができる。ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、PM標的化部分であり、前記Renilla Lucまたは前記Renilla GFPのN末端の端部に融合されている。ある実施形態において、細胞区画標的化部分は、エンドソーム標的化部分であり、前記Renilla Lucまたは前記Renilla GFPのC末端の端部に融合されている。30

【0126】

Renilla LucまたはRenilla GFPを、目的タンパク質のN末端、内部（例えば、実施例に記載されている内部RlucIIを有するGサブユニットを参照すること）、またはC末端に融合させることができる。ある実施形態において、Renilla LucまたはRenilla GFPは、目的のタンパク質のN末端の端部に融合している。別の実施形態において、Renilla LucまたはRenilla GFPは、目的のタンパク質のC末端の端部に融合している。40

【0127】

ある実施形態において、目的のタンパク質はRenilla Lucで標識され、細胞区画マーカーはRenilla GFPで標識されている。

【0128】

他のドメインまたはリンカーが、上記の第1及び/または第2の構成成分のN末端、C末端、または内部に存在してもよい。ある実施形態において、Renilla LucまたはRenilla GFPは、目的のタンパク質または細胞区画標的化部分に、直接的（例えば、ペプチド結合を介して）、または適切なリンカー部分、例えば、1個以上のアミノ酸のリンカー（例えば、ポリグリシンリンカー）、もしくは別の種類の化学リンカー50

(例えば、炭水化物リンカー、脂質リンカー、脂肪酸リンカー、ポリエーテルリンカー、PEGなど)を介して「間接的」に、共有結合的に連結されうる。ある実施形態において、1つ以上の追加のドメイン(複数可)を、上記に定義された構成成分の前(N末端)、その間、または後ろ(C末端)に挿入することができる。ある実施形態において、Renilla Luc及び/またはRenilla GFPは、ペプチド結合を介して、目的のタンパク質及び/または細胞区画標的化部分に共有結合的に連結されている。ある実施形態において、ペプチドリinkerは、Renilla LucまたはRenilla GFPと、目的のタンパク質または細胞区画標的化部分との間に存在する。ある実施形態において、リンカーは、約4~約50個のアミノ酸、約4~約40、30、もしくは20個のアミノ酸、または約5~約15個のアミノ酸、例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個のアミノ酸を含む。更なる実施形態において、リンカーは、下記の実施例1及び/または図11A~11Dに記載されているリンカーのうちの1つである。

#### 【0129】

ある実施形態において、第1及び第2の構成成分は、一緒に連結されて、単分子バイオセンサーをもたらす。第1及び第2の構成成分は、リンカーにより、好ましくは可動性ポリペプチドリinkerにより共有結合する。ある実施形態において、可動性ポリペプチドリinkerは、約50個から約500~1000個のアミノ酸のランダムアミノ酸配列の長さに相当する、例えば、約100個から約400~500個のアミノ酸、好ましくは約200~400個のアミノ酸、例えば約300個のランダムアミノ酸配列の長さに相当する長さを有する。更なる実施形態において、可動性リンカーは、約50個から約500~1000個のアミノ酸のランダムアミノ酸配列、例えば、約100個から約400~500個のアミノ酸、好ましくは約200~400個のアミノ酸、例えば約300個のアミノ酸のランダムアミノ酸配列を含む。可動性アミノ酸リンカー、より詳細には最小限の球状及び最大限の不規則性を有するリンカーを設計する方法は、当該技術において知られている。これは、例えばGlobPlot 2.3プログラムを使用して達成することができる。配列を更に最適化して、推定凝集ホットスポット、局在化ドメイン、ならびに/または相互作用及びリン酸化モチーフを排除することができる。そのような単分子バイオセンサーは、無傷の細胞、ならびに膜調製物においてBRETの評価を可能にする。

#### 【0130】

別の実施形態において、本発明は、上記に定義された第1及び/または第2の構成成分(複数可)をコードする核酸を提供する。ある実施形態において、核酸は、ベクター/プラスミドに存在し、更なる実施形態では、発現ベクター/プラスミドに存在する。そのようなベクターは、プロモーター、エンハンサー及び/または他の制御因子配列などの1つ以上の転写制御配列(複数可)に作動可能に連結している上記の定義された第1及び/または第2の構成成分(複数可)をコードすることができる、核酸配列を含む。ある実施形態において、核酸は、第1及び第2の構成成分をコードする(多シストロン構築物)。

#### 【0131】

用語「ベクター」は、核酸分子を指し、それが連結した別の核酸を移送することができる。好ましいベクターの一つの種類は、エピソーム、すなわち、染色体外複製の可能な核酸である。好ましいベクターは、それらが連結する核酸の自己複製及び/または発現を可能にするものである。作動可能に連結している遺伝子の発現を指示することができるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。本発明の組み換え発現ベクターは、当業者に既知の標準的な技術によって構築することができ、例えば、Sambrook et al. (1989)によるMolecular Cloning: A Laboratory Manualにおいて見出すことができる。様々な戦略がDNAのフラグメントを連結するために利用可能であり、その選択は、DNAフラグメントの末端の性質に応じて決まり、当業者によって容易に決定されうる。本発明のベクターは、細菌及び宿主細胞におけるベクターの増殖及び選択を促進する他の配列要素を含有することもできる。加えて、本発明のベクターは、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位のためにヌク

レオチド配列を含むことができる。選択的マーカー及びレポーター遺伝子などのためのコード配列は、当業者に良く知られている。

【 0 1 3 2 】

本発明の核酸配列を含む組み換え発現ベクターを、細胞（宿主細胞）に導入することができ、定義された組み換え発現ベクターからタンパク質コード領域を発現することができる生細胞が含まれることがある。生細胞には、培養細胞及び生存生物体内の細胞の両方が含まれる。したがって、本発明は、本発明の組み換え発現ベクターを含有する宿主細胞も提供する。用語「細胞」、「宿主細胞」及び「組み換え宿主細胞」は、本明細書において交換可能に使用される。そのような用語は、特定の対象の細胞のみならず、そのような細胞の継代または潜在的な継代のことも指す。突然変異または環境の影響のいずれかに起因して、特定の修飾が続く世代に生じることがあるので、そのような継代は、事実、親細胞と同一ではない場合があるが、依然として、本明細書に使用される用語の範囲内に含まれる。

10

【 0 1 3 3 】

ベクターDNAを、従来の形質転換または形質移入技術を介して細胞に導入することができる。用語「形質転換」及び「形質移入」は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介形質移入、リポフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション及びウイルス媒介形質移入を含む、外来性核酸を宿主細胞に導入する技術を指す。宿主を形質転換する、または宿主に形質移入するのに適した方法は、例えば、*Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989))* 及び他の実験室マニュアルにおいて見出すことができる。「転写制御配列/要素」は、作動可能に連結しているタンパク質コード配列の転写を誘発または制御する、開始及び終止シグナル、エンハンサー及びプロモーター、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナルなどのDNA配列を指す一般的な用語である。第1の核酸配列は、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的に関連して配置されるときに、第2の核酸配列と「作動可能に連結」される。例えば、プロモーターは、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、コード配列と作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は、連続的であり、必要であれば、リーディングフレームにおいて2つのタンパク質コード領域を結合する。しかし、例えばエンハンサーが、一般に、数千ベースでプロモーターから離れているときに機能し、イントロン配列が様々な長さのものでありうるので、いくつかのポリヌクレオチド要素は、作動可能に連結しうるが、連続的ではない。

20

30

【 0 1 3 4 】

別の態様において本発明は、第1の構成成分をコードする第1の核酸及び第2の構成成分をコードする第2の核酸を含むキットを提供する。

【 0 1 3 5 】

別の態様において、本発明は、上記に定義された第1及び/または第2の構成成分（複数可）を含む、または発現する細胞を提供する。別の実施形態において、細胞は、上記に定義された第1及び/または第2の構成成分（複数可）をコードする核酸により形質移入または形質転換されている。本発明は、例えば、当該技術に周知の培養培地及び試薬を使用して、本発明の第1及び/または第2の構成成分（複数可）を発現する、上記に記載されたものなどの組み換え発現系、ベクター及び細胞を更に提供する。細胞は、上記に記載された第1及び/または第2の構成成分（複数可）を発現することができる任意の細胞でありうる。タンパク質の発現に適した宿主細胞及び方法は、当該技術において良く知られている。上記に記載された構成成分（複数可）を発現することができる任意の細胞を、使用することができる。例えば、哺乳類細胞などの真核宿主細胞（例えば、マウス、ラット及びハムスター細胞系などの齧歯類細胞、ヒト細胞/細胞系）を使用することができる。別の実施形態において、上記に記述された細胞は、ヒト細胞系、例えば、胎児腎細胞系（例えば、HEK293またはHEK293T細胞）である。

40

50

## 【 0 1 3 6 】

ある実施形態において、上記に記述されたバイオセンサーは、第 1 及び第 2 の構成成分を含む、または発現する細胞を含む。別の実施形態において、上記に記述されたバイオセンサーは、第 1 及び第 2 の構成成分を含む膜調製物を含む。

## 【 0 1 3 7 】

別の態様において、本発明は、第 1 及び第 2 の条件下における細胞中の目的のタンパク質の輸送を比較する方法であって、前記第 1 の条件下で本明細書に定義されているバイオセンサーの B R E T シグナルを測定することと、前記第 2 の条件下で本明細書に定義されているバイオセンサーの B R E T シグナルを測定することを含み、前記第 1 及び第 2 の条件間の前記 B R E T シグナルの差が、前記第 1 及び第 2 の条件下での前記目的のタンパク質の輸送における差を示す、前記方法を提供する。ある実施形態において、第 1 の条件は、活性化なしであり、第 2 の条件は、（例えば、作動薬を使用した）活性化であり、その逆も同様である。別の実施形態において、第 1 の条件は、阻害なしであり、第 2 の条件は、（例えば、拮抗薬を使用した）阻害であり、その逆も同様である。

## 【 0 1 3 8 】

別の態様において、本発明は、作用物質が、細胞区画において目的のタンパク質の密度または濃度を調節する（増加または減少する）かを決定する方法であって、前記作用物質の存在下及び不在下で、本明細書に定義されているバイオセンサーの B R E T シグナルを測定することを含み、前記作用物質の不在下と比べた存在下での前記 B R E T シグナルの差が、前記作用物質が細胞区画において前記目的のタンパク質の密度または濃度を調節する（増加または減少する）ことを示す、前記方法を提供する。B R E T シグナルの増加は、作用物質が、細胞区画において前記目的のタンパク質の密度または濃度を増加することを示し、一方、B R E T シグナルの減少は、作用物質が、細胞区画において前記目的のタンパク質の密度または濃度を減少することを示す。

## 【 0 1 3 9 】

B R E T シグナルを測定する方法及び装置は、当該技術において良く知られている。B R E T シグナルは、例えば、R e n i l l a G F P シグナルの強度（光強度）を決定することにより、及び／または R e n i l l a L u c により放出されたシグナルもしくは光の強度に対する、R e n i l l a G F P により放出されたシグナルもしくは光の強度の比（B R E T 比）を計算することにより、測定することができる。B R E T シグナルは、R e n i l l a ルシフェラーゼ（供与体）及び／または r G F P（受容体）発光を検出する適切なフィルターセットを備えた、マイクロプレート読み取り機または顕微鏡を使用して測定することができる。

## 【 0 1 4 0 】

適切な細胞区画標的化部分を選択することによって、任意の細胞区画（P M、E R、ゴルジ、ミトコンドリア、エンドソームなど）への目的のタンパク質の輸送を評価／モニターすることが可能である。例えば、所定の条件または作用物質が、ミトコンドリアへの目的のタンパク質の輸送に影響を与えるかを決定するため、R e n i l l a G F P または R e n i l l a L u c で標識されたミトコンドリア標的的部分を含むバイオセンサーを、使用することができる。作用物質の存在下または所定の条件下における B R E T シグナルの（作用物質の不在下または異なる条件と比べた）増加は、ミトコンドリアへの目的のタンパク質の「動員」（すなわち、ミトコンドリアにおける目的のタンパク質の濃度／密度の増加）を示す。対照的に、作用物質の存在下または所定の条件下における B R E T シグナルの（作用物質の不在下または異なる条件と比べた）減少は、ミトコンドリアにおける目的のタンパク質の濃度／密度の減少を示す。適切な細胞区画標的化部分を使用することによって、類似した手法を使用して、異なる細胞区画へのタンパク質の輸送について研究することができる。

## 【 0 1 4 1 】

ある実施形態において、本方法は、作用物質または条件がエンドソーム区画において目的の細胞表面受容体の輸送を誘発（すなわち、増加）する（すなわち、エンドソームにお

いて目的のタンパク質の濃度 / 密度を増加する)かを決定することを含む。

【0142】

したがって、別の態様において、本発明は、エンドソーム区画における目的の細胞表面受容体の輸送を比較する方法であって、前記第1の条件下で本明細書に定義されているエンドソーム標的化部分を含むバイオセンサーのBRETシグナルを測定することと、前記第2の条件下で本明細書に定義されているエンドソーム標的化部分を含むバイオセンサーのBRETシグナルを測定することとを含み、前記第1及び第2の条件間のBRETシグナルの差が、前記第1及び第2の条件下での前記エンドソーム区画での前記目的のタンパク質の輸送における差を示す、前記方法を提供する。

【0143】

別の態様において、本発明は、作用物質が、エンドソーム区画における細胞の目的の細胞表面受容体の輸送を誘発(すなわち、増加)するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在下及び不在下で、エンドソーム標的化部分、好ましくは、本明細書に定義されているFYVEドメイン(例えば、EndofinのFYVEドメイン)を含むエンドソーム標的化部分を含むバイオセンサーのBRETシグナルを測定することを含み、前記作用物質の不在下と比べた存在下でのより高いBRETシグナルが、前記作用物質が前記エンドソーム区画における目的の細胞の細胞表面受容体の輸送を誘発(すなわち、増加)する(すなわち、エンドソームにおける目的のタンパク質の濃度 / 密度を増加する)ことを示す、前記方法を提供する。

【0144】

本明細書に記載されている実験において示されているように、それぞれ異なるエンドソーム標的化部分を含む(例えば、第1のバイオセンサーが初期エンドソームの標的化部分を含み、第2のバイオセンサーが後期エンドソームの標的化部分を含む)複数のバイオセンサーを使用して、エンドソーム経路にわたるタンパク質の輸送を評価 / モニターすることが可能である。

【0145】

別の態様において、本発明は、第1及び第2の条件下における目的の細胞の細胞表面受容体の内部移行を比較する方法であって、前記第1の条件下で本明細書に定義されているPM標的化部分を含むバイオセンサーのBRETシグナルを測定することと、前記第2の条件下で本明細書に定義されているPM標的化部分を含むバイオセンサーのBRETシグナルを測定することとを含み、前記第1及び第2の条件間の前記BRETシグナルの差が、前記第1及び第2の条件下での前記目的の細胞表面受容体の内部移行における差を示す、前記方法を提供する。

【0146】

別の態様において、本発明は、作用物質が、細胞において目的の細胞表面受容体の内部移行 / 隔離を誘発するかを決定する方法であって、前記作用物質の存在及び不在下で、本明細書に定義されているPM標的化部分を含むバイオセンサーのBRETシグナルを測定することを含み、前記作用物質の不在下と比べて存在下におけるより低いBRETシグナルが、前記作用物質が目的の細胞表面受容体の内部移行 / 隔離を誘発することを示す、前記方法を提供する。

【0147】

本明細書に記載されているバイオセンサーは、更に、内部移行した受容体が細胞表面に再循環するかを決定し、再循環するのであれば、受容体再循環の動力学を評価することを可能にする。

【0148】

別の態様において、本発明は、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環をモニターする方法であって、(a)本明細書において定義されたPM標的化部分を含むバイオセンサーを、前記受容体の内部移行を誘発するリガンドの存在下で接触させることと、(b)バイオセンサーにおける第1のBRETシグナルを測定することと、(c)前記バイオセンサーを洗浄して、前記リガンドを除去することと、(d)前記洗浄の後にバイオセ

10

20

30

40

50

ンサーにおける第2のBRETシグナルを測定することと、(e)前記第1及び第2のシグナルを比較して、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環を決定することと、を含み、前記第1のBRETシグナルと比べてより高い第2のBRETシグナルが、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環を示す、前記方法を提供する。

【0149】

別の態様において、本発明は、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環をモニターする方法であって、(a)本明細書において定義されたPM標的化部分を含む第1及び第2のバイオセンサーを、前記受容体の内部移行を誘発するリガンドの存在下で接触させることと、(b)前記接触の後に、第1のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することと、(c)前記第2のバイオセンサーを洗浄して、前記リガンドを除去することと、(d)前記洗浄の後に、第2バイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することと、(e)第1及び第2のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを比較して、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環を決定することと、を含み、前記第1バイオセンサーと比べて、前記第2のバイオセンサーにおけるより高いBRETシグナルが、細胞表面における目的の内部移行受容体の再循環を示す、前記方法を提供する。

10

【0150】

ある実施形態において、本方法は、洗浄の後にステップ(d)及び(e)をそれぞれ別の時間に反復して、目的の内部移行受容体の再循環の動力学を研究することを更に含む。

【0151】

別の態様において、本発明は、第1の条件及び第2の条件間におけるGタンパク質及び/またはGPCR活性の調節をモニターする方法であって、前記第1の条件下で本明細書に定義されているGタンパク質及び/またはGPCRの調節をモニターするバイオセンサーのBRETシグナルを測定することと、前記第2の条件下で本明細書に定義されているGタンパク質及び/またはGPCRの調節をモニターするバイオセンサーのBRETシグナルを測定することとを含み、前記第1及び第2の条件間のBRETシグナルの差が、前記第1及び第2の条件間でのGタンパク質及び/またはGPCR活性の調節を示す、前記方法を提供する。

20

【0152】

ある実施形態において、第1の条件は、試験化合物(例えば、推定阻害剤または作動薬)の不在であり、第2の条件は、試験化合物の存在であり、その逆も同様である。試験化合物の存在下でより低いBRETシグナルは、試験化合物が作動薬であることを示す。

30

【0153】

別の態様において、本発明は、GPCRリガンドが目的のGタンパク質サブユニットの活性を調節するかを決定する方法であって、前記GPCRリガンドの存在または不在下で本明細書に定義されているGタンパク質及び/またはGPCRの調節をモニターするバイオセンサーのBRETシグナルを測定することを含み、前記GPCRリガンドの不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの差が、前記GPCRリガンドが目的のGタンパク質サブユニットの活性を調節することを示す、前記方法を提供する。

【0154】

別の態様において、本発明は、第1の条件及び第2の条件間における低分子GTPアーゼの活性の調節をモニターする方法であって、前記第1の条件下で本明細書に定義されている低分子GTPアーゼの活性化を評価するバイオセンサーのBRETシグナルを測定することと、前記第2の条件下で本明細書に定義されている低分子GTPアーゼの活性化を評価するバイオセンサーのBRETシグナルを測定することとを含み、前記第1及び第2の条件間のBRETシグナルの差が、前記第1及び第2の条件下での低分子GTPアーゼの活性の調節を示す、前記方法を提供する。

40

【0155】

ある実施形態において、第1の条件は、試験化合物(例えば、推定阻害剤または作動薬)の不在であり、第2の条件は、試験化合物の存在であり、その逆も同様である。試験化合物の存在下でのより高いBRETシグナルは、試験化合物が作動薬であること(PMま

50

たはエンドソームでの低分子GTPアーゼの動員)を示す。

【0156】

別の態様において、本発明は、試験作用物質が、低分子GTPアーゼ(例えば、Rhoタンパク質)の活性を調節するかを決定する方法であって、前記試験作用物質の存在または不在で本明細書に定義されている低分子GTPアーゼの活性化を評価するバイオセンサーのBRETシグナルを測定することを含み、前記試験作用物質の不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの差が、前記試験作用物質が前記低分子GTPアーゼの活性を調節することを示す、前記方法を提供する。

【0157】

本明細書に記載されているバイオセンサーを使用して、薬理的シャペロン(PC)による目的のタンパク質(例えば、ERから適切に退出していない欠陥タンパク質)の「救出」を、評価/モニターすることも可能である。用語「薬理的シャペロン」(「PC」)は、本明細書において使用されるとき、タンパク質(例えば、受容体)に結合し、以下の効果の1つ以上を有する分子を指す。(i)タンパク質の安定した分子立体配置の形成を増強する。(ii)ERから別の細胞位置、好ましくは未変性細胞位置へのタンパク質の正確な輸送を増強する。すなわち、タンパク質のER関連分解を防止する。(iii)立体配置的に不安定な凝集、すなわち、誤って折り畳まれたタンパク質を防止する。(iv)タンパク質の少なくとも部分的に野生型の機能、安定性及び/または活性を回復または増強する。ならびに/あるいは(v)タンパク質の異なる折り畳みを誘発する。したがって、タンパク質の薬理的シャペロンは、タンパク質に結合する分子であり、タンパク質の正確な折り畳み、輸送、非凝集及び/もしくは活性をもたらす、ならびに/またはタンパク質の折り畳みを調節する(シャペロンの不在下での折り畳みと異なるタンパク質の折り畳みを誘発する)。

【0158】

リソソーム蓄積障害(LSD)に関連する酵素の小分子阻害剤が、突然変異酵素の折り畳み及び活性の両方を救出し、野生型酵素の折り畳み及び活性を増強することが以前に示されている(米国特許第6,274,597号、同第6,583,158号、同第6,589,964号、同第6,599,919号及び同第6,916,829号を参照すること)。特に、LSDに関連する突然変異酵素の特異的競合阻害剤である、グルコース及びガラクトースの小分子誘導体の投与は、突然変異酵素のインビボ及びインビトロ安定性を効果的に増加し、突然変異酵素の活性を増強したことが発見された。この戦略の背後にある元々の理論は、以下である。突然変異酵素タンパク質がERにおいて不正確に折り畳まれるので(Ishii et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996; 220: 812-815)、酵素タンパク質は、正常な移送経路(ERゴルジ装置 エンドソーム リソソーム)において遅くなり、急速に分解される。したがって、突然変異タンパク質の正確な折り畳みを安定化する化合物は、突然変異タンパク質の活性部位特異的シャペロンとして機能し、ER品質管理系からの順調な脱出を促進する。酵素阻害剤が触媒中心を占有して、細胞及び動物における酵素立体配置の安定化をもたらす。これらの特異的シャペロンは、酵素の活性部位において結合したので、「活性部位特異的シャペロン(ASSC)」と呼ばれた。

【0159】

突然変異酵素を救出することに加えて、ASSCは、ER分泌及び組み換え野生型酵素の活性を増強する。ASSCは、過剰発現野生型酵素の折り畳みを促進し、これはさもなければER品質制御系において遅くなり、その理由は酵素の過剰発現及び過剰産生がERの能力を超えていてタンパク質凝集及び分解をもたらすためである。したがって、折り畳みの際に酵素の安定した分子立体配置を誘発する化合物は、「シャペロン」として機能し、ERからの退出のために酵素を正確な立体配置に安定化する。上記に示されたように、酵素では、1つのそのような化合物が、予想外なことに、酵素の競合的阻害剤であることが分かった。

【0160】

10

20

30

40

50

LSDに加えて、多数の多様な疾患が、現在、非未変性タンパク質立体配置の採用によって引き起こされる「コンフォメーション病 (conformational diseases)」として認識されており、これは、ERにおけるタンパク質の遅延をもたらし、最終的にタンパク質の分解をもたらすことがある (Kuznetsov et al., N. Engl. J. Med. 1998; 339: 1688 - 1695; Thomas et al., Trends Biochem. Set 1995; 20: 456 - 459; Bychkova et al., FEBS Lett. 1995; 359: 6 - 8; Brooks, FEBS Lett. 1997; 409: 115 - 120)。例えば、小型合成化合物は、腫瘍抑制タンパク質 p53 の突然変異形態の DNA 結合ドメインを安定化し、それによってタンパク質が活性立体配置を維持できることが見出された (Foster et al., Science 1999; 286: 2507 - 10)。受容体の合成は、小分子受容体拮抗薬及びリガンドにより救出されることが示されている (Morello et al., J. Clin. Invest. 2000; 105: 887 - 95; Petaja-Repo et al., EMBO J. 2002; 21: 1628 - 37)。膜チャネルタンパク質及び他の形質膜トランスポーターの薬理的救出も、チャネル遮断薬または基質の使用によって実証されている (Rajamani et al., Circulation 2002; 105: 2830 - 5; Zhou et al., J. Biol. Chem. 1999; 274: 31123 - 26; Loo et al., J. Biol. Chem. 1997; 272: 709 - 12; Pedemonte et al., J. Clin. Invest. 2005; 115: 2564 - 71)。したがって、本明細書に記載されているバイオセンサーは、タンパク質の発現及び/または正確な成熟を救出するシャペロンを特定することに有用であり、このことは、次に、上記に記載された1つ以上のタンパク質の発現及び/または適切な成熟における欠陥に関連する疾患の治療にも有用でありうる。

#### 【0161】

別の態様において、本発明は、作用物質が、目的の受容体の薬理的シャペロンとして作用するかを決定する方法であって、

Renilla GFPまたはRenilla Luc、好ましくはRenilla Lucで標識された前記目的の受容体及びRenilla GFPまたはRenilla Luc、好ましくはRenilla GFPで標識された形質膜 (PM) 標的化部分を含む細胞を含むバイオセンサーを提供することであって、前記受容体が前記Renilla GFPで標識される場合、前記PM標的化部分は前記Renilla Lucで標識され、前記受容体が前記Renilla Lucで標識される場合、前記PM標的化部分は前記Renilla GFPで標識される、前記提供することと、

前記作用物質の存在及び不在下でBRET受容体シグナルを測定することと、を含み、

前記作用物質の不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの増加が、前記作用物質が前記受容体の薬理的シャペロンとして作用することを示す、前記方法を提供する。

#### 【0162】

別の態様において、本発明は、作用物質が、目的のタンパク質の薬理的シャペロンとして作用するかを決定する方法であって、

Renilla GFPまたはRenilla Lucで標識された前記目的のタンパク質及びrGFPまたはRenilla Lucで標識された小胞体 (ER) 標的化部分を含む細胞を含むバイオセンサーを提供することであって、前記タンパク質が前記Renilla GFPで標識される場合、前記ER標的化部分は前記Renilla Lucで標識され、前記タンパク質が前記Renilla Lucで標識される場合、前記ER標的化部分は前記Renilla GFPで標識される、前記提供することと、

前記作用物質の存在及び不在下でBRET受容体シグナルを測定することとを含み、

前記作用物質の不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの減少が、前記作用物質が



前記受容体の薬理学的シャペロンとして作用することを示す、前記方法を提供する。

【0163】

上記に記述された方法は、本明細書に記載されている実験において示されているように、未変性タンパク質 / 受容体または突然変異受容体を使用して実施することができる。本明細書に記載されている実験は、バイオセンサーが、GPCR、ならびに非GPCR受容体（電位依存性カリウムチャネル）の救出を測定するのに適していることを更に示し、これらが任意のタンパク質または受容体の救出をモニターすることに使用されうる証拠を提供している。ある実施形態において、タンパク質は、未変性GPCRまたは突然変異GPCRである。更なる実施形態において、GPCRは、未変性メラノコルチン - 4受容体（MC4R）または突然変異MC4Rである。ある実施形態において、突然変異MC4Rは、MC4Rポリペプチドの低減された、または不正確な細胞内折り畳みをもたらす、1個以上の突然変異を含有する。例示的な突然変異は、以下である。P78L、R165Q、R165W、I125K、C271Y、A175T、I316L、I316S、I317T、N97D、G98R、N62S、C271R、S58C、N62S、N97D、Y157S、I102S、L106P、L250Q、Y287X、P299H、S58C、コドン211におけるCTCT及びコドン244へのTGAT挿入。別の実施形態において、GPCRは、未変性V2Rまたは突然変異V2Rである。更なる実施形態において、突然変異V2Rは、Y128SまたはW164S置換を含む。別の実施形態において、タンパク質は、イオンチャネル、未変性イオンチャネル、または突然変異イオンチャネルであり、更なる実施形態では、hERGなどの電位開口型カリウムチャネルである。

10

20

【0164】

ある実施形態において、作用物質が薬理学的シャペロンとして作用するかを決定する上記の方法は、救出されたタンパク質 / 受容体が機能的であるかを、例えばリガンドを使用して決定することを更に含む。

【0165】

別の態様において、本発明は、作用物質が、形質膜（PM）での - アレスチンの動員を誘発するかを決定する方法であって、

Renilla GFPまたはRenilla Luc、好ましくはRenilla Lucで標識された前記 - アレスチン、Renilla GFPまたはRenilla Luc、好ましくはRenilla GFPで標識された形質膜（PM）標的化部分及びGPCRを含む細胞または膜調製物を含むバイオセンサーを提供することであって、前記 - アレスチンが前記Renilla GFPで標識される場合、前記PM標的化部分は前記Renilla Lucで標識され、前記 - アレスチンが前記Renilla Lucで標識される場合、前記PM標的化部分は前記Renilla GFPで標識される、前記提供することと、

30

前記作用物質の存在及び不在下でBRET受容体シグナルを測定することとを含み、

前記作用物質の不在下と比べた存在下でのBRETシグナルの増加が、前記作用物質がPMでの前記 - アレスチンの動員を誘発することを示す、前記方法を提供する。

【0166】

40

上記に記述された方法は、バイオセンサーを、ルシフェリンなどのRenilla Lucの基質と接触させて、rGFPにより受容される（rGFPを励起する）エネルギーを（光の形態で）生じることを含む。ルシフェリンの非限定例には、セレンテラジン（セレンテラジン400A（DeepBlueC（商標））、セレンテラジンH及びNanolight（商標）のProLume Purple（商標）などのe-セレンテラジンの類縁体）、VivRen（商標）（Promegaから）、Latialシフェリン（（E）-2-メチル-4-（2,6,6-トリメチル-1-シクロヘキサ-1-イル）-1-ブテン-1-オールホルメート）、細菌ルシフェリン、渦鞭毛藻類ルシフェリンなどの、イミダゾピラジノンに基づいた化合物であるD-ルシフェリンが含まれる。ある実施形態において、基質は、セレンテラジン400A、セレンテラジンH、またはProL

50

ume Purple (商標)である。

#### 【0167】

本明細書において使用されるとき、用語「作用物質」は、生物活性について試験される、任意の分子、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、有機小分子、多糖、ポリヌクレオチドなどを指すために使用される。そのような作用物質は、合成または天然の化合物ライブラリーを含むいくつもの供給源から得ることができる。例えば、無作為化オリゴヌクレオチドの発現を含む、多種多様な有機化合物及び生体分子の無作為及び指向性合成のための多数の手段が、利用可能である。あるいは、細菌、真菌、植物及び動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが利用可能である、または容易に産生される。加えて、天然または合成的に生成されたライブラリー及び化合物は、従来の化学的、物理的及び生化学的な方法によって容易に修飾される。

10

#### 【0168】

陽性対照及び陰性対照を、本方法 / アッセイに使用することができる。対照及び試験試料により複数回実施して、統計的に有意な結果を得ることができる。

#### 【0169】

ある実施形態において、上記に記述された方法は、ハイスループット方法 (ハイスループットスクリーニング、HTS) である。用語「ハイスループットスクリーニング」(HTS) は、本明細書において使用されるとき、多数 (数百、数千) の化合物を、標的分子への結合活性または生物学的活性について急速に並行してスクリーンすることを可能にする方法を指す。そのような HTS 方法は、典型的には、数個のウェル、例えば、384、1536 または 3456 個のウェルを有するマイクロタイタープレートにおいて実施される。HTS では、読み取りシグナルは、高い感度、精度及び再現性で検出されることが重要である。

20

#### 【実施例】

#### 【0170】

本発明を実施するための様式

本発明は、以下の非限定例によって更に詳細に説明される。

#### 【0171】

実施例 1：材料及び方法

材料。アンギオテンシン II (Ang II; [Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe]、配列番号)、ポリオルニチン、ポリ-D-リシン、イソプロテレノール、アルギニン-バソプレシン (AVP)、ブラジキニン、Sigma (登録商標) からのものであった。プロスタグランジン F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>)、プロスタグランジン E<sub>2</sub> 及び u46619 は、Cayman Chemical (登録商標) (Ann Arbor, MI) からのものであった。[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] - Ang II (SI) 及び [Asp<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup>, Gly<sup>8</sup>] - Ang II (DVG) [Sar<sup>1</sup> - Val<sup>5</sup> - D - Phe<sup>8</sup>] Ang II (SVdF) 及び [Sar<sup>1</sup> - D - Ala<sup>8</sup>] Ang II (TRV120027) は、University of Sherbrooke (Canada, QC) において合成された。UBO-QIC は、Institute for Pharmaceutical Biology of the University of Bonn (Germany) から得た。ヨウ素 125 は、PerkinElmer (登録商標) から得た。ダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM)、ウシ胎児血清、OPTI-MEM (登録商標) 及び他の細胞培養試薬は、Invitrogen (登録商標) から購入した。セレンテラジン 400a、セレンテラジン H 及び Prolume Purple1 は、Goldbio (登録商標)、Biotium、または Nanolight Technology のいずれかから購入した。ポリエチレンイミン (PEI、25 kDa、線状) は、Polysciences (Warrington, PA, USA) から購入した。サケ精子 DNA は、Life Technologies (ThermoFisher) から購入した。Phusion DNA ポリメラーゼは、Thermo Scientific (登録商標) からのものであった。制限酵素及び T4

30

40

50

DNAリガーゼは、NEB（登録商標）から得た。

【0172】

プラスミド及び構築物。lyn-GFP10の構築物では、ヒトlynキナーゼ最初の11個の残基のコード配列(MGCICKSKGKDS、配列番号1)及びGFP10の全コード領域を、GeneScript（登録商標）(Piscataway, NJ)において合成し、注入の使用によりpcDNA3.1/zeo(-)にサブクローンした(Clontech（登録商標）, CA)。lyn-rGFPは、lyn-GFP10構築物においてGFP10のコード配列を、PCR増幅により生成されたヒト化rGFPに代えることによって生成した。StreptagII融合GFP10を、GeneScript（登録商標）において合成し、pcDNA3.1/zeo(-)にサブクローンした(STII-GFP10)。ヒトendofinのFYVEドメイン(アミノ酸739~806)を、Bio Basic（登録商標）Inc. (Ontario, Canada)において合成し、STII-GFP10構築物のインフレーションにサブクローンした(GFP10-endofinFYVE)。rGFP-endofinFYVEは、GFP10-endofinFYVEのFYVEドメインを、pcDNA3.1(+)のインフレーションにヒト化rGFPを含有するベクターに挿入することによって生成した。rGFP-rab4及びrGFP-rab11は、rGFP-endofinFYVEのFYVEドメインを、PCR増幅rab4及びrab11コード配列にそれぞれ代えることによって生成した。RlucII融合AT1Rを生成するため、シグナルペプチドを含有するヒトAT1Rコード配列及びFlag配列をPCR増幅し、NheI及びHindIII部位を介してRlucIIも含有するpcDNA3.1/hygro(+)のインフレーションにサブクローンした。プラスミドコード化ヒトarr2-RlucIIは、以前に記載されている(Quoyer, Janz et al. 2013)。RlucII標識化受容体は、MC4R-Venus構築物の公表された構築物(P. Rene et al. J Pharmacol Exp Ther. 2010 Dec; 335(3): 520-32)及びhV2R wt(Morello, J. P., et al., J Clin Invest, 2000. 105(7): p. 887-95)を使用して、PCRによって得た。RlucII標識化受容体は、D. DeBlois(Universite de Montreal, Montreal, Canada)からの好意による提供物であるプラスミドコード化hERGを使用して、PCRによって得た。Renilla reniformis GFP(rGFP)構築物は、合成コード配列(GeneScript, USA)から、PCRによって得た。RlucII及びrGFP標識化PHドメイン: PLC1のPHドメインは、PLC1イメージクローン(image clone)(IMAGE: 5769665)をテンプレートとして使用してPCR増幅した。PCR産物を使用して、XbaI及びHindIII部位へのサブクローンにより、GFP10-endofinFYVEのendofinFYVEドメインを交換した。GFP10-PH(PLC1)のPHドメインを、pcDNA3.1(+)にヒト化rGFPを含有するベクター、またはpcDNA3.1(+)のインフレーションにHA-RlucIIを含有するベクターのいずれかに挿入した(それぞれ、rGFP-PH(PLC1)及びHA-RlucII-PH(PLC1))。hMC4R-RlucII: 融合タンパク質のhMC4R wt-RlucII、hMC4R(R165Q)-RlucII及びhMC4R-(P299H)-RlucIIをコードするプラスミドは、MC4R-Venus構築物のMC4RからPCR増幅によって得て、ヒト化RenillaルシフェラーゼII(hRlucII)配列(以前に報告されたhRlucの変異体(Leduc, Breton et al. 2009))のN末端においてインフレーションでpcDNA3.1 RlucIIベクターにサブクローンした(リンカー配列: VGGGGSKLPAT、配列番号2)。hV2R-RlucII: V2R置換のY128Sは、Quick Change(商標)突然変異キット(Agilent Technologies Santa Clara, USA)により、部位指定突然変異誘発を使用して作成した。融合タンパク質のhV2R wt-RlucII及びhV2R(Y128S)-RlucIIをコードす

10

20

30

40

50

るプラスミドは、V2Rコード配列のPCR増幅によって得て、hRlucII配列のN末端においてインフレーションでpcDNA3.1 RlucIIベクターにサブクローンした(リンカー配列: GGSGLKLPAAT、配列番号3)。hERG-RlucII: 融合タンパク質のhERG wt-RlucII及びhERG(G601S)-RlucIIをコードするプラスミドは、hERGの残基1~379、hERGの残基373~1159及びRlucIIをコードする3つのフラグメントのPCR増幅によって得て、Gibson Assembly(New England Biolabs)pcDNA3.1(+ )ベクターによってサブクローンした(RlucIIのN末端のリンカー: NA A I R S G G、配列番号4及びRlucIIのC末端のリンカー: G G N A A I R S、配列番号5)。rGFP-CAAX: 融合タンパク質のrGFP-CAAXをコードするプラスミドは、リンカーをコードする逆方向プライマーを有するrGFPコード配列(配列: G S A G T M A S N N T A S G、配列番号6)、ならびにKRASスブライス変異体bの形質膜標的化多塩基配列及びプレニル化シグナル配列: - G K K K K K K S K T K C V I M(名称: C A A X、配列番号7)のPCR増幅によって得た。CAAX形質膜標的化配列は、rGFPコード配列のC末端のインフレーションにある。PCRフラグメントは、pcDNA3.1(+ )ベクターにサブクローンされる。rGFP-PB: 融合タンパク質のrGFP-PBをコードするプラスミドは、PCR増幅及びGibson組み立てを使用して、rGFP-CAAXのCAAXモチーフをGRK5形質膜標的化ドメイン(PB、配列: S P K K G L L Q R L F K R Q H Q N N S K S、配列番号8)に代えることによって得た。完全ベクターpcDNA3.1(+ )rGFP-CAAXは、オリゴコード化PBを使用するPCRにより増幅される。PCR反応産物は、DpnIにより消化され、精製され、Gibson組み立て反応により再環状化される。RlucII-GRB2のクローニング: ヒトGRB2変異体1のコード配列を、PCR増幅し、GRB2及びRlucIIの間に小さい可動性リンカー(配列: G S A G T、配列番号9)を有するベクターpcDNA3.1(+ )RlucIIにおけるRlucIIのC末端にサブクローンした。全てのPCRを、Phusion(登録商標)DNAポリメラーゼの使用によって実施した。全て構築物を、使用する前にDNA配列決定によって確認した。

#### 【0173】

細胞培養及び一時的形質移入。ヒト胎児腎臓293(HEK293)細胞を、10%ウシ胎児血清、100単位/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを補充したダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)に、5%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下において37℃で維持した。HEK293SL細胞を、5%ウシ胎児血清及び20µg/mlのゲンタマイシンを補充したDMEMにおいて培養した。細胞を、5%CO<sub>2</sub>及び90%湿度により37℃で増殖させた。

#### 【0174】

リン酸カルシウムを使用した形質移入。HEK293SL細胞に、リン酸カルシウム方法を使用して形質移入した(Fessart, Simaan et al. 2005)。細胞を、形質移入の1日前に、100mmの皿毎に約7.5×10<sup>5</sup>の密度で播種し、形質移入を以前に記載されたとおりに実施した(Fessart, Simaan et al. 2005)。形質移入の18時間後、培地を交換し、細胞を、続く実験のために分けた。全てのアッセイを、形質移入の48時間後に実施した。

#### 【0175】

ポリ(エチレンイミン)(PEI)を使用した形質移入。実験の2日前に、6ウェルプレートのHEK293細胞を、カルシウムまたはマグネシウムを含有しないPBDで洗浄し、脱離させ、形質移入剤としてPEIを(PEI/DNAを3対1の比で)使用して、示されたプラスミドにより形質移入し、次にポリ-L-オルニチン臭化水素酸塩で前処理された96ウェルプレートに、ウェル1つあたり35000細胞の密度で直接播種した。

#### 【0176】

安定したrGFP-CAAX細胞系。6ウェルプレートのHEK293細胞を、リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、形質移入剤としてポリエチレンイミン25-kDA線状

10

20

30

40

50

(PEI)を(PEI/DNAを3対1の比で)使用して、1.2  $\mu$ gのrGFP-CAAXコード化構築物/ウェルで形質移入した(Hamdani, Rochdi et al. 2007)。rGFP-CAAX構築物は、ハイグロマイシン抵抗性のためにもコードしており、形質移入された細胞をT75皿に播種し、選択(100  $\mu$ g/mlのハイグロマイシン)を4週間にわたって維持し、ハイグロマイシン抵抗性細胞をGFP蛍光に対して、異なるレベルのrGFP-CAAXを発現する個体群にFACS選別した。

#### 【0177】

図1B~9D、25D~25FのBRET測定。形質移入した翌日に細胞を脱離させ、ポリオルニチン被覆白色96ウェルプレートに、ウェル1つあたり約25000細胞の密度で再平板培養した。翌日、細胞を、予熱したタイロド緩衝液(140 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、1 mMのCaCl<sub>2</sub>、12 mMのNaHCO<sub>3</sub>、5.6 mMのD-グルコース、0.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.37 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mMのHEPES、pH 7.4)で一回洗浄し、次に、タイロド緩衝液中の様々な濃度のリガンドで示された回数、または単一濃度のリガンドで様々な回数によって37 °Cで刺激した。再循環実験では、細胞を、リガンドにより37 °Cで30分間刺激した後、氷冷タイロド緩衝液により3回、またはタイロド緩衝液により1回/酸(50 mMのクエン酸ナトリウム、pH 4.0)により3回/タイロド緩衝液により2回、洗浄した。全ての洗浄ステップは、氷上で実施した。次に細胞を、更に、タイロド緩衝液と共に水浴において37 °Cで45分間インキュベートした。細胞透過性基質であるセレンテラジン400aを、BRET測定の3~4分前に、タイロド緩衝液中5  $\mu$ Mの最終濃度で加えた。測定は、RlucIIのRenillaルシフェラーゼ(供与体)及びGFP10またはrGFP(受容体)発光をそれぞれ検出するため、410  $\pm$  80 nm及び515  $\pm$  30 nmのフィルターセットを備えたSynergy 2(BioTek(登録商標))マイクロプレート読み取り機を使用して実施した。BRETシグナルは、RlucIIの発光強度に対するGFP10またはrGFPの発光強度の比を計算することによって決定した。全てのBRET測定は、37 °Cで三連で実施した。

#### 【0178】

細胞表面発現及び機能性のPC救出を評価するBRETアッセイ(隔離アッセイ)。図12A~18Eにおいて、HeK293細胞に、このセクションに記載されたPEIを使用して、一時的に形質移入した。96ウェルプレート毎に形質移入されたDNAは、以下のとおりである。図12A及び12Bでは、2.4 ngのhMC4R-RlucIIコード化構築物及び増加量のrGFP-CAAX(Kras)を図12Aでは9.6 ngまで、図12BではrGFP-PBを9.6 ngまで用い、図13A~13Cでは、0.6、1.2または2.4 ngのhMC4R-RlucII及び4.8 ngのrGFP-CAAX(Kras)を用い、図13Dでは、2.4 ngの多シストロンrGFP-CAAX(Kras)/MC4R-RlucII構築物を用い、図13Eでは、1.2 ngのhV2R-RlucII及び4.8 ngのrGFP-CAAX(Kras)を用い、図14A~16Bでは、2.4 ngのhMC4R-RlucII及び7.2 ngのrGFP-CAAX(Kras)を用い、rGFP-CAAX(Kras)を安定して発現しているHeK293細胞には、0.6、1.2または2.4 ngのhMC4R-RlucIIが形質移入され、図17Aでは、0.6、1.2または2.4 ngのhV2R-Y128S-RlucIIを用い、図17B、図18A及び18Bでは、0.6、1.2または2.4 ngのhERG-RlucII及び4.8 ngのrGFP-CAAX(Kras)を用い、図18C~18Eでは、0.6 ngのhERG-RlucII及び7.2 ngのrGFP-CAAX(Kras)を用いる。96ウェルプレートに播種された形質移入細胞を、形質移入の2日後に実施されるBRETアッセイの前に、薬理的シャペロン(MC4Rには、DCPMP(N-(2R)-3-(2,4-ジクロロフェニル)-1-(4-(2-(1-メトキシプロパン-2-イルアミノ)メチル)フェニル)ピペラジン-1-イル)-1-オキソプロパン-2-イル)プロピオンアミド)もしくは化合物1、V2Rには、SR121463、hERGには、アステミゾール、シサプリド、キニジン、ジチアゼム

(Diti azem)、アミオダロン及びアセトアミノフェン)またはビヒクルにより16時間から18時間にわたって、それぞれの図において示されたように処理した。BRETアッセイでは、細胞をPBSで1回洗浄し、タイロード緩衝液の中に放置した。次に細胞を、MC4Rのために、10  $\mu$ Mの - MSHにより37 で1時間、任意選択で処理して、細胞表面に発現された受容体の隔離を誘発する作動薬の関数として、機能性のPC救出を評価した(図13)。Rluc基質であるCoel-400a(BRET2実験用)またはセレンテラジンH(BRET1実験用、図13E、ならびに15B及び15D)を、最終濃度の2.5  $\mu$ Mで加え、細胞を更に5分間にわたって更にインキュベートした。次にBRET値を、以下のフィルターを備えたMithras LB940 Multimode Microplate Readerの使用により収集した。BRET2には、400 nm  $\pm$  70 nm(エネルギー供与体)及び515 nm  $\pm$  20 nm(エネルギー受容体)、BRET1には、480 nm  $\pm$  20 nm(エネルギー供与体)及び530 nm  $\pm$  20 nm(エネルギー受容体)。BRET値は、Rluc IIの発光に対する受容体の発光の比を計算することによって決定した。

#### 【0179】

rGFPマーカーを使用した形質膜への アレスチン動員。図19B~19Dでは、HEK293細胞に、前に記述されたPEIを用いて、96ウェルプレートのウェル1つあたり、3 ngの アレスチン1-Rluc II(図19B及び19D)、または アレスチン2-Rluc II(図19C及び19E)+4.8 ngのPMマーカー(rGFP-CAAX=赤色三角、GFP10-CAAX=円、rGFP-PB=緑色三角及びLyn-rGFP=四角)+10 ngのV2R(図19D及び19E)、または40 ngの 2AR(図19B及び19C)を形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、示された用量により37 で10分間刺激した。次にCoel-400aを最終濃度の2.5  $\mu$ Mで加え、更に5分間インキュベートした。BRETをTristar Microplate Reader(Berthold Technologies)の使用により37 で測定した。データを、GFP10-CAAX(Kras)構築物により得た最大応答の比として正規化した。図19Fでは、PEI:DNAの3:1の比のssDNA及びPEIにより2  $\mu$ gに補完された、200 ngの 2AR、20 ngの - アレスチン2-Rluc II、800 ngのrGFP-CAAXの形質移入ミックスを、3 mlのHek293SLに加える(350,000細胞/ml)。細胞を、ポリ-D-リシン前処理プレートに播種した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロード液+1 mMのCaCl<sub>2</sub>により37 で60分間プレインキュベートし、次に、示された用量のイソプロテレノールにより37 で2分間処理した。次にCoel-400aを最終濃度の2.5  $\mu$ Mで加え、更に6分間インキュベートした。BRETをTristar Microplate Reader(Berthold Technologies)の使用により37 で測定した。図19C、19E、19H及び19Iでは、HEK293細胞に、前に記載されたPEIを用いて、96ウェルプレートのウェル1つあたり、3 ngの アレスチン2-Rluc II(図19C及び19E)+4.8 ngのrGFP-CAAX(Kras)+10 ngのV2R(図19I)、または40 ngの 2AR(図19H)を形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、96ウェルの半分を、100 nMのAVP(図19H)または1  $\mu$ Mのイソプロテレノール(図19H)により、プレートの残りの半分をビヒクルにより、37 で10分間刺激した。次にCoel-400aを最終濃度の2.5  $\mu$ Mで加え、更に5分間インキュベートした。BRETをTristar Microplate Reader(Berthold Technologies)の使用により37 で測定した。Z'値を、Zhang et al.(Zhang, Chung et al. 1999)により記載されたように計算した。図19J及び19Gでは、Hek293SL細胞を、100 mmの皿に播種し、その翌日、細胞に、600 ngのAT1Rと共に90 ngの アレスチン2-Rluc II及び480 ngのrGFP-CAAX(Kras)を、前に記載されたリン酸カルシウム方法により形質移入した(図19J)。形質移入の24時間後、細胞を96ウェルプレートで再平板培養し、そ

の翌日、BRET測定の前に、細胞を洗浄し、96ウェルプレートの半分を100 nMのAng II (図19J) 及びプレートの残りの半分をピヒクルにより、室温で6分間刺激した。(図19G) HEK293SL細胞には、100 mmの皿において、Lyn-rGFP (480 ng)、rGFP-CAAX (480 ng) またはGFP10-CAAX (480 ng) のいずれかと共に、AT1R (600 ng) 及び アレスチン2-RlucII (90 ng) を形質移入した。翌日、細胞を、96ウェルプレートで再平板培養した。形質移入の48時間後、細胞を、BRET測定の前に様々な濃度のAng IIにより6分間刺激した。セレンテラジン400 a (最終濃度5  $\mu$ M) を、2分間のAng II刺激の後に加えた。BRETは、Synergy2 (BioTek (登録商標)) マイクロプレート読み取り機を使用して室温で測定した。Z' 値を、Zhang et al. (Zhang, Chung et al. 1999) により記載されたように計算した。

#### 【0180】

アレスチン動員単分子センサー。図21Bでは、PEI:DNAの3:1の比のssDNA及びPEIにより1  $\mu$ gに補完された、200 ngのV2R-pRK5、50 ngの2ARの、異なるリンカーを有する単分子センサーを、1.2 mlのHEK293SLに加えた。細胞を、ポリ-D-リシン前処理プレートに播種した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート液+1 mMのCaCl<sub>2</sub>により37 で60分間ブレインキュベートし、次にAVP (100 nM) により37 で10分間処理した。セレンテラジン400 a (Coel-400 a) (Biotium) を最終濃度の2.5  $\mu$ Mで加え、更に5分間インキュベートした。BRET比をMithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies) の使用により37 で測定した。1xの形質移入: 図21Cでは、PEI:DNAの3:1の比のssDNA及びPEIにより4  $\mu$ gに補完された、400 ngのsphAT1R、200 ngの2ARの、200個の残基長さのリンカーを有する単分子センサーを、7 mlのHEK293SLに加えた。細胞を、ポリ-D-リシン前処理プレートに播種した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート液+1 mMのCaCl<sub>2</sub>により37 で60分間ブレインキュベートし、次に異なる濃度のリガンドにより37 で5分間処理した。セレンテラジン400 a (Coel-400 a) (Biotium) を最終濃度の2.5  $\mu$ Mで加え、更に5分間インキュベートした。BRET比をMithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies) の使用により37 で測定した。

#### 【0181】

単分子DAGセンサー。図22B及びCでは、hAt1AR (約50 fmol/mg) を安定して発現するHEK293SL細胞を、10% FBS及び20  $\mu$ g/mlのゲンタマイシンを補充したDMEMにおいて培養し、75,000細胞/100 mm皿の密度で播種し、翌日に、前に記載されたリン酸カルシウム方法を使用して、DAG単分子センサーをコードする150 ngの構築物を一時的に形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、Coel-400 aを最終濃度の5  $\mu$ Mまで加え、3分間インキュベートした。図22Bでは、BRETを4秒毎に測定し、次にAng IIを64秒の時点で、最終濃度の100 nMで加え、作動薬促進刺激の動力学を評価した。データは、代表的な実験の三連の平均 $\pm$ SDである。図22Cでは、細胞を、BRET測定の1分前に、示されている濃度のAng IIで刺激した。データは、6回の独立した実験の平均 $\pm$ SEである。図22D及びEでは、HEK293SL細胞に、fugene:DNAの2:1比を用いるRocheのプロトコールに従って、FuGENE HDを形質移入した。ssDNAにより1  $\mu$ gに補完された、単分子センサーをコードする10 ngの構築物及び400 ngの受容体 (図22DではFP、22EではGPR14) を、6ウェルプレートの1ウェル毎に形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート緩衝液中で1時間インキュベートした。次に細胞を、それぞれのリガンド (図22DではPGF2及びPGE2、22EではウロテンシンII) により、示された用量で1分間刺激し、次にCoel-400 aを最終濃度の2.5  $\mu$ Mで更に5分間加えた。図22Fでは、細胞

に図22Dと同様に形質移入したが、構築物をコードする単分子DAGセンサーのみを用いた。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート緩衝液中で1時間インキュベートした。Coe1-400aを最終濃度の2.5 μMで更に5分間加えた。次に細胞を、5 μMのm-3m3FBSまたはビヒクルのみにより示された時間にわたって刺激した。図22G及び22Hでは、細胞に、図22E及び22Dと同様にそれぞれ形質移入した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート緩衝液中で1時間インキュベートした。96ウェルプレートの半分のウェルを100 nMのリガンド(図22HではPGF2、22GではウロテンシンII)により1分間刺激し、残りの半分はビヒクルで刺激した。次にCoe1-400aを最終濃度の2.5 μMで、更なる5分間のインキュベーションのために加えた。図22D~22Hでは、BRET比をMithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies)の使用により37 °Cで測定した。

#### 【0182】

rGFPマーカーへのC1b動員に基づいたDAGセンサー。図23B~Dでは、HEK293細胞に、既に記載されているPEIを使用して、100 ngのRlucII-C1b、500 ngのrGFP-CAAX(Kras)及び100 ngの、ヒトヒスタミン1型(H1R、Gq共役型受容体)、ヒトブラジキニン2型(BKRB2、Gq共役型受容体)、ヒトドーパミン2型(D2R、Gi共役型受容体、陰性対照として使用)の受容体のいずれかを形質移入し、ssDNAにより1 μgに補完された。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート緩衝液中において室温で1時間インキュベートした。細胞を、示された用量の対応する作動薬(H1Rにはヒスタミン、BKRB2にはカリジン及びD2Rにはドーパミン)と共に5分間インキュベートした。次にProlume Purple(商標)を最終2 μMで更に5分間加えた。BRET測定を、Synergy Neo Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc)の使用によって実施した。図23Eでは、PEI:DNAの3:1の比のssDNA及びPEIにより1 μgに補完された、100 ngの2AR、20 ngのRlucII-C1b、400 ngのrGFP-CAAX(Kras)及び100 ngのWT G15または100 ngの空ベクター(Mock)のいずれかを、1.2 mlのHEK293SL(350000細胞/ml)に加える。細胞を、ポリ-D-リシン前処理プレートに播種した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート液+1 mMのCaCl<sub>2</sub>により37 °Cで60分間ブレインキュベートした。次にセレンテラジン400aを最終濃度の2.5 μMで加え、6分間インキュベートした。次に細胞を、示された用量のイソプロテレノールで1分間処理した。BRETをTristar Microplate Reader (Berthold Technologies)の使用により37 °Cで測定した。

#### 【0183】

Gタンパク質移行に基づいたセンサー。図24B~Dでは、PEI:DNAの3:1の比のssDNA及びPEIにより1 μgに補完された、100 ngのHA-1ARまたはHA-2AR、5 ngの示されたRlucII-G、100 ngのWT G15、100 ngのWT G1、200 ngのrGFP-CAAX(Kras)を、1.2 mlのHeK293SL(350,000細胞/ml)(図24B及びC)または2×~3 mlのHEK293SL(350,000細胞/ml)(図24D)に加える。細胞を、ポリ-D-リシン前処理プレートに播種した。形質移入の48時間後、細胞を洗浄し、タイロート液+1 mMのCaCl<sub>2</sub>により37 °Cで60分間ブレインキュベートした。次にセレンテラジン400aを最終濃度の2.5 μMで加え、6分間インキュベートした。次に細胞を、1 μM(図24B及びC)または示された用量(図24D)のイソプロテレノールのいずれかによって2分間処理した。BRETをTristar(登録商標)Microplate Reader (Berthold Technologies)の使用により37 °Cで測定した。図24E~Gでは、PEI:DNAの3:1の比のssDNA及びPEIにより1 μgに補完された、100 ngのHA-1AR、30 ngのG



s p o s 6 7 R l u c I I または G 1 2 p o s 8 4 R l u c I I、1 0 0 n g の W T G 5、1 0 0 n g の W T G 1、4 0 0 n g の r G F P - C A A X またはゴルジマーカー ( e N O S ( 1 - 7 3 ) - r G F P ) を、2 x ~ 3 m l の H E K 2 9 3 S L ( 3 5 0 , 0 0 0 細胞 / m l ) に加える。細胞を、ポリ - D - リシン前処理プレートに播種した。形質移入の 4 8 時間後、細胞を洗浄し、タイロート液 + 1 m M の C a C l <sub>2</sub> により 3 7 で 6 0 分間ブレインキュベートした。次に P r o l u m e P u r p l e ( 商標 ) を最終濃度の 2 μ M で加え、6 分間インキュベートした。次に細胞を、イソプロテレノールの 1 μ M で示された時間にわたって ( 図 2 4 F )、または示された用量 ( 図 2 4 E 及び G ) によって 4 分間処理した、またはしなかった。B R E T を T r i s t a r ( 登録商標 ) M i c r o p l a t e R e a d e r ( B e r t h o l d T e c h n o l o g i e s ) の使用により 3 7 で測定した。図 2 4 H では、P E I : D N A の 3 : 1 の比の s s D N A 及び P E I により 1 μ g に補完された、2 0 0 n g の T P R、3 0 n g の G q p o s 1 1 8 R l u c I I、1 0 0 n g の W T G 5、1 0 0 n g の W T G 1、4 0 0 n g の r G F P - C A A X またはゴルジマーカー ( e N O S ( 1 - 7 3 ) - r G F P ) を、1 . 2 m l の H E K 2 9 3 S L ( 3 5 0 , 0 0 0 細胞 / m l ) に加える。細胞を、ポリ - D - リシン前処理プレートに播種した。形質移入の 4 8 時間後、細胞を洗浄し、タイロート液 + 1 m M の C a C l <sub>2</sub> により 3 7 で 6 0 分間ブレインキュベートした。1 0 0 n M の U b o - Q i c と共に、または伴わないで 2 0 分間インキュベートした。次に細胞を、示された用量の U 4 6 6 1 9 で 6 分間処理した。次に C o e l - 4 0 0 a を最終濃度の 2 . 5 μ M で加え、更に 5 分間インキュベートした。B R E T を T r i s t a r M i c r o p l a t e R e a d e r ( B e r t h o l d T e c h n o l o g i e s ) の使用により 3 7 で測定した。

#### 【 0 1 8 4 】

P K N に基づいた R h o A 活性化アッセイ。図 2 5 B ~ D では、H E K 2 9 3 S L 細胞を、6 % ウシ胎児血清 ( F B S ) 及び 2 0 μ g / m l のゲンタマイシンを補充した D M E M において 3 7 で増殖させた。細胞を、1 0 0 m m 皿毎に  $7 . 5 \times 10^5$  細胞の密度で播種し、翌日に、前に記載されたリン酸カルシウム方法を使用して、P K N - c r i b - R l u c I I ( 9 0 n g ) 及び r G F P - C A A X ( 4 8 0 n g ) と共に、A T 1 R ( 3 μ g ) をコードする構築物により一時的に形質移入した。2 4 時間後、細胞を脱離させ、ポリオルニチン被覆 9 6 ウェル白色プレートに、ウェル 1 つあたり培地中 2 5 0 0 0 細胞の密度で播種した。翌日に、細胞をタイロート緩衝液で 1 回洗浄し、8 0 μ l のタイロート緩衝液中に 3 7 で放置した。示された場合は、細胞を U b o - Q i c の 1 0 0 n M で 3 0 分間、または C 3 毒素の 3 μ g / m l ( 図 2 5 I ) により 3 7 で 4 時間処理した。細胞の刺激及び B R E T 測定を、室温で実施した。B R E T シグナルは、C o e l - 4 0 0 a を最終濃度の 5 μ M まで添加し、S y n e r g y 2 ( B i o T e k ( 登録商標 ) ) マイクロプレート読み取り機を使用してモニターした。フィルターセットは、R l u c I I の R e n i l l a ルシフェラーゼ ( 供与体 ) 及び r G F P ( 受容体 ) 発光を検出するため、 $410 \pm 80$  nm 及び  $515 \pm 30$  nm であった。図 2 5 B では、P E I : D N A の 3 : 1 の比の s s D N A 及び P E I により 2 μ g に補完された、2 0 0 n g の T P R、2 0 n g の P K N - R l u c I I、6 0 0 n g の C A A X - r G F P の形質移入ミックスを、3 m l の H e k 2 9 3 S L に加える ( 3 5 0 0 0 0 細胞 / m l )。細胞を、ポリ - D - リシン前処理プレートに播種した。形質移入の 4 8 時間後、細胞を洗浄し、タイロート液 + 1 m M の C a C l <sub>2</sub> により 3 7 で 3 0 分間ブレインキュベートし、次に最終濃度の 2 . 5 μ M で C o e l - 4 0 0 a と共にブレインキュベートし、6 分間インキュベートした。細胞を、示された用量の U 4 6 6 1 9 により 2 分間刺激した。B R E T を、B R E T 4 0 0 - G F P 2 / 1 0 フィルターセット ( 受容体、 $515 \pm 20$  nm 及び供与体、 $400 \pm 70$  nm のフィルター ) を備えた、T r i s t a r M i c r o p l a t e R e a d e r ( B e r t h o l d T e c h n o l o g i e s ) の使用により 3 7 で測定した。図 2 5 I 及び J では、P E I : D N A の 3 : 1 の比の s s D N A 及び P E I により 2 μ g に補完された、2 0 0 n g の T P R、2 0 n g の P K N - R l u c I I、6 0 0 n g の

C A A X - r G F P の形質移入ミックスを、3 ml の H e k 2 9 3 S L に加える ( 3 5 0 , 0 0 0 細胞 / m l ) 。細胞を、ポリ - D - リシン前処理プレートに播種した。形質移入の 2 4 時間後、示される場合には R h o 阻害剤 ( C T 0 4 、 C y t o s k e l e t o n , I n c ) を、最終濃度の 2  $\mu$  g / m l で一晩加えた。形質移入の 4 8 時間後、細胞を洗浄し、タイロート液 + 1 m M の C a C l <sub>2</sub> により 3 7 ° で 6 0 分間ブレインキュベートし、次に、示されたように、1 0 0 n M の U 4 6 6 1 9 または 1  $\mu$  g / m l の R h o 活性化剤 I I ( C N 0 3 、 C y t o s k e l e t o n , I n c ) により 3 7 ° で 1 分間処理した。次に C o e l - 4 0 0 a を最終濃度の 2 . 5  $\mu$  M で加え、更に 5 分間インキュベートした。B R E T を T r i s t a r M i c r o p l a t e R e a d e r ( B e r t h o l d T e c h n o l o g i e s ) の使用により 3 7 ° で測定した。

10

#### 【 0 1 8 5 】

無傷細胞の [ <sup>1 2 5</sup> I ] - A n g I I 結合。[ <sup>1 2 5</sup> I ] - A n g I I を I o d o g e n 方法によって調製し、その比放射能は、以前に記載されている自己置換及び飽和実験 ( Z i m m e r m a n , B e a u t r a i t e t a l . 2 0 1 2 ) によって決定した。細胞表面受容体の密度は、[ <sup>1 2 5</sup> I ] - A n g I I をトレーサーとして使用する 4 ° で の結合アッセイによって評価した。A T 1 R または A T 1 R - R l u c I I のいずれかを発現する H E K 2 9 3 S L 細胞を、形質移入の 1 日後に、ポリオルニチン被覆 2 4 ウェルプレートのウェル 1 つあたり約 1 2 0 , 0 0 0 個の細胞の密度で播種した。翌日に、細胞を、2 0 m M の H E P E S を有する予熱した D M E M ( D M E M - H ) で 1 回洗浄し、次に 1 0 0 n M の A n g I I の不在下または存在下において D M E M - H 中に 3 7 ° で 3 0 分間インキュベートした。プレートを氷冷酸 ( 5 0 m M のクエン酸ナトリウム、p H 4 . 0 ) によりそれぞれ 5 分間かけて氷上で 3 回素早く洗浄して、刺激を停止させ、残留した表面結合及び非結合 A n g I I リガンドの両方を除去した。残有酸を除去及び中和するため、細胞を氷冷タイロート緩衝液により更に 2 回洗浄した。次に細胞を、結合緩衝液 ( 0 . 2 % B S A 、 5 0 m M の T r i s 、 1 0 0 m M の N a C l <sub>2</sub> 、 5 m M の M g C l <sub>2</sub> 、 p H 7 . 4 ) 中 0 . 5 m l の [ <sup>1 2 5</sup> I ] - A n g I I ( 約 2 5 0 , 0 0 0 c p m ) と共に 4 ° で一晩インキュベートした。非特異的結合は、1  $\mu$  M の A n g I I の存在下で決定した。翌日、細胞を、カルシウム及びマグネシウムを有する氷冷 P B S で 3 回洗浄し、0 . 5 m l の 0 . 5 N N a O H / 0 . 0 5 % S D S を加えた。放射能は、P e r k i n E l m e r W i z a r d ( 登録商標 ) 1 4 7 0 自動 計数器を使用して数えた。タンパク質量は、製造会社の使用説明書に従い、いくらかの変更を加えて、B i o - r a d ( 登録商標 ) P r o t e i n A s s a y キットによって測定した。簡潔には、放射標識 A n g I I を伴うことなくインキュベートする以外は細胞を上記と同じように処理し、次に、洗浄した後、N a O H / S D S の代わりに、2 m l の希釈 P r o t e i n アッセイ試薬を加えた。ピペットを使用して混合した後、試料をプラスチックキュベットに移し、吸光度を 5 9 5 n m で測定した。

20

30

#### 【 0 1 8 6 】

共焦点顕微鏡検査法。形質移入の 1 日前に、H E K 2 9 3 S L 細胞を、3 5 m m ガラス底皿に 1 0 0 , 0 0 0 細胞 / 皿の密度で播種した。細胞に、B 2 R - C F P 、 L Y N - r G F P 及び m C h e r r y - e n d o f i n F Y V E を一時的に形質移入した。形質移入の 4 8 時間後、細胞を 3 0 分間にわたって血清飢餓にし、未処理 ( 無処理 ) のまま放置した、またはブラジキニン ( 1  $\mu$  M ) で 1 5 分間処理した。試料を、アルゴン ( 5 1 4 n m ) 及び H e N e I ( 5 4 3 n m ) レーザーを使用する Z e i s s L S M - 5 1 0 M e t a レーザー走査顕微鏡により分析し、画像 ( 2 0 4 8 × 2 0 4 8 画素 ) を、6 3 × 油浸レンズの使用により収集した。C F P 及び G F P を検出するため、U V 及びアルゴンレーザーは、4 0 5 n m 及び 5 1 4 n m の励起フィルター、ならびに B P 4 2 0 ~ 4 8 0 n m または B P 5 0 5 ~ 5 5 0 n m の発光フィルターをそれぞれ使用した。m C h e r r y 検出では、H e N e レーザーは、5 4 3 n m の励起フィルター及び L P 5 6 0 n m の発光フィルターのセットを使用した。

40

#### 【 0 1 8 7 】

50

BRET顕微鏡検査法／画像化。HEK293S細胞を、10%FBS、100単位/mlのペニシリン及び0.1mg/mlのストレプトマイシンを補充したDMEMにおいて培養し、ポリ-D-リシン被覆ガラス底35mm培養皿に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/皿の密度で平板培養した。翌日、細胞に、製造会社プロトコールに従って、皿1つあたり1 $\mu$ gのDNA及び3 $\mu$ lの試薬を使用するX-treme GENE HP試薬(Roche)を使用して、RLucII融合(BRET供与体)及びrGFP融合(BRET受容体)構築物を形質移入した。図26A及び26B(発光スペクトル測定)では、細胞に、Venus、GFP2またはrGFPにN末端が融合したRLucIIを100g/皿により形質移入した。細胞を、5mMのEDTAを補充した1mlのPBSの添加により培養物表面から脱離させ、PBSに再懸濁する。ルシフェラーゼ基質として、1 $\mu$ MのProlume Purple(Nanolight Technology)を加え、発光スペクトルを、基質を添加した2分後にSynergy Neoプレート読み取り機(Biotek)により得た。図26C(発光顕微鏡検査法)では、細胞に、100ng/皿のHA-2AR、50ng/皿のアレスチン2-RLucII及び500ng/皿のrGFP-CAAXを形質移入した。細胞を、1mlの改変ハanks平衡塩溶液(138mMのNaCl、5.33mMのKCl、0.44mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.33mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、4.16mMのNaHCO<sub>3</sub>、1.0mMのCaCl<sub>2</sub>、1.0mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのHEPES、pH7.4)で1回洗浄し、顕微鏡に設置した。10 $\mu$ MのProlume Purple(Nanolight Technology)を皿に添加した。BRET画像は、フィルター交換器(Lambda10-2, Sutter instrument)を有する60 $\times$ 対物(Apochromat TIRF, NA1.49, Nikon)及び画像化カメラ(PIXIS1024, Princeton instruments)を備えた、Nikon(登録商標)Ti-U顕微鏡を使用して得た。セレンテラジンを加えた直後に、カメラのシャッターを閉じて、空白画像を90秒間かけて得た。次に画像を、BRET供与体(410/80nm)及びBRET受容体(480LPまたは510/40nm)波長に対応するフィルターをそれぞれ90秒間用いて得た。画像を5分毎に得て、空白画像値を、BRET供与体及び受容体画像の対応する画素から差し引いて、カメラの暗電流及び標準化雑音からもたらされる光子計数を除去した。それぞれの時点において、BRET比の画像を、以下のMetaMorphソフトウェア、バージョン7.8(Molecular Devices)の画素算術関数を使用して生成した。画素色相：受容体画像の計数を供与体画像で割り、初期設定の虹色の色相(紫色が最低(典型的には、0.0)、赤色が最高(典型的には、2.0))に配分することにより計算されたBRETレベル、画素明度：自動明度による供与体画像の値。

#### 【0188】

Z'値の決定。BRET1及びBRET2アッセイは、rGFP-CAAX構築物及びhMC4Rwt-RLucIIまたはhMC4R(R165Q)-RLucII構築物が同時形質移入され(図15A~15Dに示されている)、96ウェルプレートの半分が、薬理学的シャペロン(10 $\mu$ MのDCPMP)により、プレートのもう半分が対応するビヒクル(DMSO)により処理された、細胞において実施した。Z'値を、Zhang et al.(Zhang, Chung et al., 1999)により記載されたように計算した。0.4を超えるZ'値は、堅牢なアッセイであるとみなされる。

#### 【0189】

DMSOに対する抵抗性の評価。リガンド及び化合物ライブラリーは、多くの場合にDMSOに溶解されている。細胞表面を評価するBRETに基づいたアッセイが、化合物ライブラリーから選択されたリガンドの用量応答曲線に通常は到達するDMSOの濃度に感受性があるかを評価するため、形質移入された細胞を、図16に示されているように、異なる濃度のDMSOを含有するウェルにおいて10 $\mu$ MのDCPMPにより、またはビヒクル(DMSO)により処理した。次にBRET値を以前に記載されたようにして得た。

#### 【0190】

データ分析。リガンド媒介エンドソーシスの $t_{1/2}$ 及びEC<sub>50</sub>値の推定値は、Gr

10

20

30

40

50

a p h P a d (登録商標) P r i s m 曲線当てはめプログラムを使用して計算した。この研究の全体を通して提示される曲線は、最良適合を表しており、同様にこの G r a p h P a d (登録商標) P r i s m プログラムを使用して生成した。

【0191】

配列：本明細書において使用されるポリペプチド及び構築物のアミノ酸配列を、下記に描写する。

R l u c I I

MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSEFINYYDSE  
KHAENAVIFLHGNATSSYLWRHVVPHEPVARCIIIPDLIG  
MGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELNLPPKKIIFVGH  
WGAALAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIE  
EDIALIKSEEGEKMVLNNFFVETVLP SKIMRKLEPEEFA  
AYLEPFKEKGEVRRPTLSWP REIPLVKGGKPDVVQIVRNY  
NAYLRASDDL PKMFI ES DP GFFSNAIVEGAKKFPNTEFVK  
VKGLHFSQEDAPDEM GK YIKSFVERVLKNEQ (配列番号10)

10

r G F P : R e n i l l a r e n i f o r m i s 緑色蛍光タンパク質

MDLAKLGLKEVMPTKINLEGLVGDHAFSMEGVGEGNILEG  
TQEVKISVTKGAPLPFAFDIVSVAFSYGNRAYTGYPEEIS  
DYFLQSFPPEGFTYERNIRYQDGGTAIVKSDISLEDGKFIV  
NVDFKAKDLRRMGPMQ QDIVGMQPSYESMYTNVTSVIGE  
CIIAFKLQTGKHFTYHMRTVYKSKKPVETMPLYHF IQHRL  
VKTNVD TASGYVVQHETAIAAHSTIKKIEGSLP (配列番号11)

20

G F P 10

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY  
GKLTTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSTYGVQCFSRYPDHMK  
QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTL  
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNYNPHNVYIMADKQKN  
GIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNH  
YLFTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK (

30

配列番号12) hMC4R WT: ヒト野生型メラノコルチン4受容体

MVNSTHRGMHTSLHLWNRSSSYRLHSNASESLGKGYSDGGC  
YEQLFVSPPEVFVTLGVISLLENILVIVAI AKNKNLHSPMY  
FFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTDAQSFTVN  
IDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVD RYFTIFYALQYHNI  
MTVKRVGIIISCIWAAC TVSGILFIIYS DSSAVIICLITM  
FFTMLALMASLYVHMF LMARLHIKRIAVLP GTGAIRQGAN  
MKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIF YISCPQNPYCVCF  
MSHFNL YLILIMCNSIIDPLIYALRSQE LRKTFKEIICCY  
PLGGLC DLSRY (配列番号13)

40

hMC4R (R165Q): 突然変異R165Q - hMC4R、細胞内に留まり、PC救出可能

MVNSTHRGMHTSLHLWNRSSSYRLHSNASESLGKGYSDGGC  
YEQLFVSPPEVFVTLGVISLLENILVIVAI AKNKNLHSPMY  
FFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTDAQSFTVN  
IDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVD RYFTIFYALQYHNI  
MTVKQVGIIISCIWAAC TVSGILFIIYS DSSAVIICLITM  
FFTMLALMASLYVHMF LMARLHIKRIAVLP GTGAIRQGAN  
MKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIF YISCPQNPYCVCF

50

MSHFNL Y L I L I M C N S I I D P L I Y A L R S Q E L R K T F K E I I C C Y  
P L G G L C D L S S R Y ( 配列番号 14 )

hMC4R ( P 2 9 9 H ) : 突然変異 P 2 9 9 H - hMC4R、細胞内に留まり、大部分  
が PC 救出不可能

MVNSTHRGMHTS L H L W N R S S Y R L H S N A S E S L G K G Y S D G G C  
Y E Q L F V S P E V F V T L G V I S L L E N I L V I V A I A K N K N L H S P M Y  
F F I C S L A V A D M L V S V S N G S E T I V I T L L N S T D T D A Q S F T V N  
I D N V I D S V I C S S L L A S I C S L S I A V D R Y F T I F Y A L Q Y H N I  
M T V K R V G I I I S C I W A A C T V S G I L F I I Y S D S S A V I I C L I T M  
F F T M L A L M A S L Y V H M F L M A R L H I K R I A V L P G T G A I R Q G A N  
M K G A I T L T I L I G V F V V C W A P F F L H L I F Y I S C P Q N P Y C V C F  
MSHFNL Y L I L I M C N S I I D H L I Y A L R S Q E L R K T F K E I I C C Y  
P L G G L C D L S S R Y ( 配列番号 15 )

10

hV2R WT : ヒト野生型バソプレシン 2 受容体

M L M A S T T S A V P G H P S L P S L P S N S S Q E R P L D T R D P L L A R A E  
L A L L S I V F V A V A L S N G L V L A A L A R R G R R G H W A P I H V F I G H  
L C L A D L A V A L F Q V L P Q L A W K A T D R F R G P D A L C R A V K Y L Q M  
V G M Y A S S Y M I L A M T L D R H R A I C R P M L A Y R H G S G A H W N R P V  
L V A W A F S L L L S L P Q L F I F A Q R N V E G G S G V T D C W A C F A E P W  
G R R T Y V T W I A L M V F V A P T L G I A A C Q V L I F R E I H A S L V P G P  
S E R P G G R R R G R R T G S P G E G A H V S A A V A K T V R M T L V I V V V Y  
V L C W A P F F L V Q L W A A W D P E A P L E G A P F V L L M L L A S L N S C T  
N P W I Y A S F S S S V S S E L R S L L C C A R G R T P P S L G P Q D E S C T T  
A S S S L A K D T S S ( 配列番号 16 )

20

hV2R ( Y 1 2 8 S ) : 突然変異 Y 1 2 8 S - hV2R、細胞内に留まり、PC 救出可  
能

M L M A S T T S A V P G H P S L P S L P S N S S Q E R P L D T R D P L L A R A E  
L A L L S I V F V A V A L S N G L V L A A L A R R G R R G H W A P I H V F I G H  
L C L A D L A V A L F Q V L P Q L A W K A T D R F R G P D A L C R A V K Y L Q M  
V G M Y A S S S M I L A M T L D R H R A I C R P M L A Y R H G S G A H W N R P V  
L V A W A F S L L L S L P Q L F I F A Q R N V E G G S G V T D C W A C F A E P W  
G R R T Y V T W I A L M V F V A P T L G I A A C Q V L I F R E I H A S L V P G P  
S E R P G G R R R G R R T G S P G E G A H V S A A V A K T V R M T L V I V V V Y  
V L C W A P F F L V Q L W A A W D P E A P L E G A P F V L L M L L A S L N S C T  
N P W I Y A S F S S S V S S E L R S L L C C A R G R T P P S L G P Q D E S C T T  
A S S S L A K D T S S ( 配列番号 17 )

30

hERG WT : ヒト野生型の電位開口型カリウムチャネル H 2

M P V R R G H V A P Q N T F L D T I I R K F E G Q S R K F I I A N A R V E N C A  
V I Y C N D G F C E L C G Y S R A E V M Q R P C T C D F L H G P R T Q R R A A A  
Q I A Q A L L G A E E R K V E I A F Y R K D G S C F L C L V D V V P V K N E D G  
A V I M F I L N F E V V M E K D M V G S P A H D T N H R G P P T S W L A P G R A  
K T F R L K L P A L L A L T A R E S S V R S G G A G G A G A P G A V V V D V D L  
T P A A P S S E S L A L D E V T A M D N H V A G L G P A E E R R A L V G P G S P  
P R S A P G Q L P S P R A H S L N P D A S G S S C S L A R T R S R E S C A S V R  
R A S S A D D I E A M R A G V L P P P P R H A S T G A M H P L R S G L L N S T S  
D S D L V R Y R T I S K I P Q I T L N F V D L K G D P F L A S P T S D R E I I A  
P K I K E R T H N V T E K V T Q V L S L G A D V L P E Y K L Q A P R I H R W T I  
L H Y S P F K A V W D W L I L L L V I Y T A V F T P Y S A A F L L K E T E E G P  
P A T E C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E  
E V V S H P G R I A V H Y F K G W F L I D M V A A I P F D L L I F G S G S E E L

40

50

I G L L K T A R L L R L V R V A R K L D R Y S E Y G A A V L F L L M C T F A L I  
 A H W L A C I W Y A I G N M E Q P H M D S R I G W L H N L G D Q I G K P Y N S S  
 G L G G P S I K D K Y V T A L Y F T F S S L T S V G F G N V S P N T N S E K I F  
 S I C V M L I G S L M Y A S I F G N V S A I I Q R L Y S G T A R Y H T Q M L R V  
 R E F I R F H Q I P N P L R Q R L E E Y F Q H A W S Y T N G I D M N A V L K G F  
 P E C L Q A D I C L H L N R S L L Q H C K P F R G A T K G C L R A L A M K F K T  
 T H A P P G D T L V H A G D L L T A L Y F I S R G S I E I L R G D V V V A I L G  
 K N D I F G E P L N L Y A R P G K S N G D V R A L T Y C D L H K I H R D D L L E  
 V L D M Y P E F S D H F W S S L E I T F N L R D T N M I P G S P G S T E L E G G  
 F S R Q R K R K L S F R R R T D K D T E Q P G E V S A L G P G R A G A G P S S R  
 G R P G G P W G E S P S S G P S S P E S S E D E G P G R S S S P L R L V P F S S  
 P R P P G E P P G G E P L M E D C E K S S D T C N P L S G A F S G V S N I F S F  
 W G D S R G R Q Y Q E L P R C P A P T P S L L N I P L S S P G R R P R G D V E S  
 R L D A L Q R Q L N R L E T R L S A D M A T V L Q L L Q R Q M T L V P P A Y S A  
 V T T P G P G P T S T S P L L P V S P L P T L T L D S L S Q V S Q F M A C E E L  
 P P G A P E L P Q E G P T R R L S L P G Q L G A L T S Q P L H R H G S D P G S (

配列番号 18)

h E R G ( G 6 0 1 S ) : 突然変異 G 6 0 1 S - h E R G、細胞内に留まり、P C 救出可能

M P V R R G H V A P Q N T F L D T I I R K F E G Q S R K F I I A N A R V E N C A  
 V I Y C N D G F C E L C G Y S R A E V M Q R P C T C D F L H G P R T Q R R A A A  
 Q I A Q A L L G A E E R K V E I A F Y R K D G S C F L C L V D V V P V K N E D G  
 A V I M F I L N F E V V M E K D M V G S P A H D T N H R G P P T S W L A P G R A  
 K T F R L K L P A L L A L T A R E S S V R S G G A G G A G A P G A V V V D V D L  
 T P A A P S S E S L A L D E V T A M D N H V A G L G P A E E R R A L V G P G S P  
 P R S A P G Q L P S P R A H S L N P D A S G S S C S L A R T R S R E S C A S V R  
 R A S S A D D I E A M R A G V L P P P P R H A S T G A M H P L R S G L L N S T S  
 D S D L V R Y R T I S K I P Q I T L N F V D L K G D P F L A S P T S D R E I I A  
 P K I K E R T H N V T E K V T Q V L S L G A D V L P E Y K L Q A P R I H R W T I  
 L H Y S P F K A V W D W L I L L L V I Y T A V F T P Y S A A F L L K E T E E G P  
 P A T E C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E  
 E V V S H P G R I A V H Y F K G W F L I D M V A A I P F D L L I F G S G S E E L  
 I G L L K T A R L L R L V R V A R K L D R Y S E Y G A A V L F L L M C T F A L I  
 A H W L A C I W Y A I G N M E Q P H M D S R I G W L H N L G D Q I G K P Y N S S  
 S L G G P S I K D K Y V T A L Y F T F S S L T S V G F G N V S P N T N S E K I F  
 S I C V M L I G S L M Y A S I F G N V S A I I Q R L Y S G T A R Y H T Q M L R V  
 R E F I R F H Q I P N P L R Q R L E E Y F Q H A W S Y T N G I D M N A V L K G F  
 P E C L Q A D I C L H L N R S L L Q H C K P F R G A T K G C L R A L A M K F K T  
 T H A P P G D T L V H A G D L L T A L Y F I S R G S I E I L R G D V V V A I L G  
 K N D I F G E P L N L Y A R P G K S N G D V R A L T Y C D L H K I H R D D L L E  
 V L D M Y P E F S D H F W S S L E I T F N L R D T N M I P G S P G S T E L E G G  
 F S R Q R K R K L S F R R R T D K D T E Q P G E V S A L G P G R A G A G P S S R  
 G R P G G P W G E S P S S G P S S P E S S E D E G P G R S S S P L R L V P F S S  
 P R P P G E P P G G E P L M E D C E K S S D T C N P L S G A F S G V S N I F S F  
 W G D S R G R Q Y Q E L P R C P A P T P S L L N I P L S S P G R R P R G D V E S  
 R L D A L Q R Q L N R L E T R L S A D M A T V L Q L L Q R Q M T L V P P A Y S A  
 V T T P G P G P T S T S P L L P V S P L P T L T L D S L S Q V S Q F M A C E E L  
 P P G A P E L P Q E G P T R R L S L P G Q L G A L T S Q P L H R H G S D P G S (

配列番号 19)

L y n : L y n キナーゼのバルミトリル化及びミリストイル化シグナル配列

M G C I K S K G K D S ( 配列番号 1 )

C A A X - K r a s : k R a s スプライス変異体 b の形質膜標的化多塩基配列及びプレニル化シグナル配列

G K K K K K S K T K C V I M ( 配列番号 7 )

P B : ヒト G R K 5 の形質膜標的化多塩基配列

S P K K G L L Q R L F K R Q H Q N N S K S ( 配列番号 8 )

e n d o f i n の F Y V E ドメイン

Q K Q P T W V P D S E A P N C M N C Q V K F T F T K R R H H C R A C G K V F C G  
V C C N R K C K L Q Y L E K E A R V C V V C Y E T I S K ( 配列番号 20 )

R a b 4

M S E T Y D F L F K F L V I G N A G T G K S C L L H Q F I E K K F K D D S N H T  
I G V E F G S K I I N V G G K Y V K L Q I W D T A G Q E R F R S V T R S Y Y R G  
A A G A L L V Y D I T S R E T Y N A L T N W L T D A R M L A S Q N I V I I L C G  
N K K D L D A D R E V T F L E A S R F A Q E N E L M F L E T S A L T G E N V E E  
A F V Q C A R K I L N K I E S G E L D P E R M G S G I Q Y G D A A L R Q L R S P  
R R A Q A P N A Q E C G C ( 配列番号 21 )

R a b 11

M G T R D D E Y D Y L F K V V L I G D S G V G K S N L L S R F T R N E F N L E S  
K S T I G V E F A T R S I Q V D G K T I K A Q I W D T A G Q E R Y R A I T S A Y  
Y R G A V G A L L V Y D I A K H L T Y E N V E R W L K E L R D H A D S N I V I M  
L V G N K S D L R H L R A V P T D E A R A F A E K N G L S F I E T S A L D S T N  
V E A A F Q T I L T E I Y R I V S Q K Q M S D R R E N D M S P S N N V V P I H V  
P P T T E N K P K V Q C C Q N I ( 配列番号 22 )

シグナルペプチド - F l a g - ヒト A T 1 R ( s p F l a g - A T 1 R )

M K T I I A L S Y I F C L V F A D Y K D D D D A M I L N S S T E D G I K R I Q D  
D C P K A G R H N Y I F V M I P T L Y S I I F V V G I F G N S L V V I V I Y F Y  
M K L K T V A S V F L L N L A L A D L C F L L T L P L W A V Y T A M E Y R W P F  
G N Y L C K I A S A S V S F N L Y A S V F L L T C L S I D R Y L A I V H P M K S  
R L R R T M L V A K V T C I I I W L L A G L A S L P A I I H R N V F F I E N T N  
I T V C A F H Y E S Q N S T L P I G L G L T K N I L G F L F P F L I I L T S Y T  
L I W K A L K K A Y E I Q K N K P R N D D I F K I I M A I V L F F F F S W I P H  
Q I F T F L D V L I Q L G I I R D C R I A D I V D T A M P I T I C I A Y F N N C  
L N P L F Y G F L G K K F K R Y F L Q L L K Y I P P K A K S H S N L S T K M S T  
L S Y R P S D N V S S S T K K P A P C F E V E ( 配列番号 23 )

h G R B 2 v 1、ヒト G R B 2 変異体 1

M E A I A K Y D F K A T A D D E L S F K R G D I L K V L N E E C D Q N W Y K A E  
L N G K D G F I P K N Y I E M K P H P F G N D V Q H F K V L R D G A G K Y F L W  
V V K F N S L N E L V D Y H R S T S V S R N Q Q I F L R D I E Q V P Q Q P T Y V  
Q A L F D F D P Q E D G E L G F R R G D F I H V M D N S D P N W W K G A C H G Q  
T G M F P R N Y V T P V N R N V ( 配列番号 24 )

P L C 1 の P H ドメイン

D S G R D F L T L H G L Q D D E D L Q A L L K G S Q L L K V K S S S W R R E R F  
Y K L Q E D C K T I W Q E S R K V M R T P E S Q L F S I E D I Q E V R M G H R T  
E G L E K F A R D V P E D R C F S I V F K D Q R N T L D L I A P S P A D A Q H W  
V L G L H K I I H H S G S M D Q R Q K L Q H W I H S C L R K A D K N K D N K M S  
F K E L Q N F L K E L N I ( 配列番号 25 )

H A 標識

M Y P Y D V P D Y A ( 配列番号 26 )

ヒト e N O S 1 の残基 1 ~ 73

M G N L K S V A Q E P G P P C G L G L G L G L G L C G K Q G P A T P A P E P S R

10

20

30

40

50

A P A S L L P P A P E H S P P S S P L T Q P P E G P K F P R V K N ( 配列番号 4 2 )

カベオリン 1

M S G G K Y V D S E G H L Y T V P I R E Q G N I Y K P N N K A M A D E L S E K Q  
V Y D A H T K E I D L V N R D P K H L N D D V V K I D F E D V I A E P E G T H S  
F D G I W K A S F T T F T V T K Y W F Y R L L S A L F G I P M A L I W G I Y F A  
I L S F L H I W A V V P C I K S F L I E I Q C I S R V Y S I Y V H T V C D P L F  
E A V G K I F S N V R I N L Q K E I ( 配列番号 4 4 )

リンカー 1 : h M C 4 R と R l u c I I との間のリンカー

V G G G G S K L P A T ( 配列番号 2 )

10

リンカー 2 : h V 2 R と R l u c I I との間のリンカー

G G S G L K L P A T ( 配列番号 3 )

リンカー 3 : h E R G の残基 3 7 9 の後ろの R l u c I I の N 末端におけるリンカー配列  
N A A I R S G G ( 配列番号 4 )

リンカー 4 : h E R G の残基 3 7 3 の前の R l u c I I の N 末端におけるリンカー配列  
G G N A A I R S ( 配列番号 5 )

リンカー 5 : L y n の形質膜標的化配列 ( L y n ) と r G F P との間のリンカー

L S N A T ( 配列番号 2 7 )

リンカー 6 : r G F P と、k R A S の多塩基 / プレニル化配列 ( C A A X ) との間のリン  
カー

20

G S A G T M A S N N T A S G ( 配列番号 2 8 )

リンカー 7 : r G F P と、G R K 5 の多塩基配列 ( P B ) との間のリンカー

G G S G L K L P A T ( 配列番号 3 )

リンカー 8 : r G F P と、h R A S ( C A A X ) 及び h R A S / R a 1 1 ( C A A X = C  
C I L ) のパルミトイル化 / プレニル化配列との間、r G F P とカベオリン 1 との間、  
R l u c I I と G R B 2 との間のリンカー

G S A G T ( 配列番号 9 )

リンカー 9 : e N O S のゴルジ標的化配列 ( 1 ~ 7 3 ) と、r G F P との間のリンカー

G S N A T ( 配列番号 4 1 )

リンカー 10 : ( i ) r G F P と、( i i ) e n d o f i n の F Y V E ドメイン、R a b  
4 または R a b 1 1 との間

30

G S G G S G S G G L E ( 配列番号 2 9 )

リンカー 11 : s p F l a g - A T 1 R と R l u c I I との間

G G S G G K L P A T ( 配列番号 3 0 )

リンカー 12 : R l u c I I と、P L C 1 の P H ドメインとの間

G N A S G T G S G G S G S G G L E M ( 配列番号 3 1 )

リンカー 13 : r G F P と、P L C 1 の P H ドメインとの間

G S G G S G S G G L E ( 配列番号 2 9 )

リンカー 14 : H A 標識と R l u c I I との間

S N A K L ( 配列番号 3 2 )

40

h V 2 R ( W 1 6 4 S ) : 突然変異 W 1 6 4 S - h V 2 R、細胞内に留まり、P C 救出可  
能

M L M A S T T S A V P G H P S L P S L P S N S S Q E R P L D T R D P L L A R A E  
L A L L S I V F V A V A L S N G L V L A A L A R R G R R G H W A P I H V F I G H  
L C L A D L A V A L F Q V L P Q L A W K A T D R F R G P D A L C R A V K Y L Q M  
V G M Y A S S Y M I L A M T L D R H R A I C R P M L A Y R H G S G A H W N R P V  
L V A S A F S L L L S L P Q L F I F A Q R N V E G G S G V T D C W A C F A E P W  
G R R T Y V T W I A L M V F V A P T L G I A A C Q V L I F R E I H A S L V P G P  
S E R P G G R R R G R R T G S P G E G A H V S A A V A K T V R M T L V I V V V Y  
V L C W A P F F L V Q L W A A W D P E A P L E G A P F V L L M L L A S L N S C T

50



NPWIIYASFSSSVSSELRSL LCCARGRTPPSLGPQDESC T T  
ASSSLAKDTS S (配列番号 46)

CAAX (Hras) : hRas からの形質膜標的化パルミトリル化配列及びプレニル化シグナル配列

CMSCKCVLS (配列番号 47)

CAAX (CCIL) : hRas からの形質膜標的化パルミトリル化配列及び Ral1 からのプレニル化シグナル配列

CMSCKCCIL (配列番号 43)

hMC4R N62S 突然変異メラノコルチン 4 受容体、細胞内に留まり、PC 救出可能

MVNSTHRGMHTSLHLWNRSSSYRLHSNASESLGKGYSDGGC  
YEQLFVSPEVFVTLGVISLLESILVIVAI AKNKNLHSPMY  
FFICSLAVADM LVS VSN GSE TIVITLLNSTDTDAQSFTVN  
IDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVD RYFTIFYALQYHNI  
MTVKR VGI IISCIWA ACTVSGILFIIYS DSSAVIICLITM  
FFTMLALMASLYVHMFLMARLHIKRIAVLP GTGAIRQGAN  
MKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPQNPYCVCF  
MSHFNL YLILIMCNSIIDPLIYALRSQELRKTFKEIICCY  
PLGG L C D L S S R Y (配列番号 48)

hMC4R R165W 突然変異メラノコルチン 4 受容体、細胞内に留まり、PC 救出可能

MVNSTHRGMHTSLHLWNRSSSYRLHSNASESLGKGYSDGGC  
YEQLFVSPEVFVTLGVISLLENILVIVAI AKNKNLHSPMY  
FFICSLAVADM LVS VSN GSE TIVITLLNSTDTDAQSFTVN  
IDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVD RYFTIFYALQYHNI  
MTVKW VGI IISCIWA ACTVSGILFIIYS DSSAVIICLITM  
FFTMLALMASLYVHMFLMARLHIKRIAVLP GTGAIRQGAN  
MKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPQNPYCVCF  
MSHFNL YLILIMCNSIIDPLIYALRSQELRKTFKEIICCY  
PLGG L C D L S S R Y (配列番号 49)

単分子 DAG センサー

MGC I K S K G K D S L S N A M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G  
H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L  
S Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G  
N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N  
Y N P H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q  
N T P I G D G P V L L P D N H Y L F T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V  
T A A G I T L G M D E L Y K G T G T A A K E G E K Q K G A M Q P S E Q Q R G K E  
A Q K E K N G K E P N P R P E Q P K P A K V E Q Q E D E P E E R P K R E P M Q L  
E P A E S A K Q G R N L P Q K V E Q G E E R P Q E A D M P G Q A Q S A M R P Q L  
S N S E E G P A R G K P A P E E P D E Q L G E P E E A Q G E H A D E P A P S K P  
S E K H M V P Q M A E P E K G E E A R E P Q G A E D K P A P V H K P K K E E P Q  
R P N E E K A P K P K G R H V G R Q E N D D S A G K P E P G R P D R K G K E K E  
P E E E P A Q G H S L P Q E P E P M P R P K P E V R K K P H P G A S P H Q V S D  
V E D A K G P E R K V N P M E G E E S A K Q A Q Q E G P A E N D E A E R P E R P  
A S G G A R E A M T S K V Y D P E Q R K R M I T G P Q W W A R C K Q M N V L D S  
F I N Y Y D S E K H A E N A V I F L H G N A T S S Y L W R H V V P H I E P V A R  
C I I P D L I G M G K S G K S G N G S Y R L L D H Y K Y L T A W F E L L N L P K  
K I I F V G H D W G A A L A F H Y S Y E H Q D K I K A I V H A E S V V D V I E S  
W D E W P D I E E D I A L I K S E E G E K M V L E N N F F V E T V L P S K I M R  
K L E P E E F A A Y L E P F K E K G E V R R P T L S W P R E I P L V K G G K P D

10

20

30

40

50

V V Q I V R N Y N A Y L R A S D D L P K M F I E S D P G F F S N A I V E G A K K  
F P N T E F V K V K G L H F S Q E D A P D E M G K Y I K S F V E R V L K N E Q G  
S G S G F N I D M P H R F K V H N Y M S P T F C D H C G S L L W G L V K Q G L K  
C E D C G M N V H H K C R E K V A N L C G ( 配列番号 5 0 )

## 単分子 アレスチン 1 センサー

M G C I K S K G K D S L S N A M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G  
H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L  
S Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G  
N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N  
Y N P H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q  
N T P I G D G P V L L P D N H Y L F T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V  
T A A G I T L G M D E L Y K G T G T A A K E G E K Q K G A M Q P S E Q Q R G K E  
A Q K E K N G K E P N P R P E Q P K P A K V E Q Q E D E P E E R P K R E P M Q L  
E P A E S A K Q G R N L P Q K V E Q G E E R P Q E A D M P G Q A Q S A M R P Q L  
S N S E E G P A R G K P A P E E P D E Q L G E P E E A Q G E H A D E P A P S K P  
S E K H M V P Q M A E P E K G E E A R E P Q G A E D K P A P V H K P K K E E P Q  
R P N E E K A P K P K G R H V G R Q E N D D S A G K P E P G R P D R K G K E K E  
P E E E P A Q G H S L P Q E P E P M P R P K P E V R K K P H P G A S P H Q V S D  
V E D A K G P E R K V N P M E G E E S A K Q A Q Q E G P A E N D E A E R P E R P  
A S G G A R E A M T S K V Y D P E Q R K R M I T G P Q W W A R C K Q M N V L D S  
F I N Y Y D S E K H A E N A V I F L H G N A T S S Y L W R H V V P H I E P V A R  
C I I P D L I G M G K S G K S G N G S Y R L L D H Y K Y L T A W F E L L N L P K  
K I I F V G H D W G A A L A F H Y S Y E H Q D K I K A I V H A E S V V D V I E S  
W D E W P D I E E D I A L I K S E E G E K M V L E N N F F V E T V L P S K I M R  
K L E P E E F A A Y L E P F K E K G E V R R P T L S W P R E I P L V K G G K P D  
V V Q I V R N Y N A Y L R A S D D L P K M F I E S D P G F F S N A I V E G A K K  
F P N T E F V K V K G L H F S Q E D A P D E M G K Y I K S F V E R V L K N E Q G  
S G S A G T A G D K G T R V F K K A S P N G K L T V Y L G K R D F V D H I D L V  
D P V D G V V L V D P E Y L K E R R V Y V T L T C A F R Y G R E D L D V L G L T  
F R K D L F V A N V Q S F P P A P E D K K P L T R L Q E R L I K K L G E H A Y P  
F T F E I P P N L P C S V T L Q P G P E D T G K A C G V D Y E V K A F C A E N L  
E E K I H K R N S V R L V I R K V Q Y A P E R P G P Q P T A E T T R Q F L M S D  
K P L H L E A S L D K E I Y Y H G E P I S V N V H V T N N T N K T V K K I K I S  
V R Q Y A D I C L F N T A Q Y K C P V A M E E A D D T V A P S S T F C K V Y T L  
T P F L A N N R E K R G L A L D G K L K H E D T N L A S S T L L R E G A N R E I  
L G I I V S Y K V K V K L V V S R G G L L G D L A S S D V A V E L P F T L M H P  
K P K E E P P H R E V P E N E T P V D T N L I E L D T N D D D I V F E D F A R Q  
R L K G M K D D K E E E E D G T G S P Q L N N R ( 配列番号 5 1 )

## 単分子 アレスチン 2 センサー

M G C I K S K G K D S L S N A M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G  
H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L  
S Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G  
N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N  
Y N P H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q  
N T P I G D G P V L L P D N H Y L F T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V  
T A A G I T L G M D E L Y K G T G T A A K E G E K Q K G A M Q P S E Q Q R G K E  
A Q K E K N G K E P N P R P E Q P K P A K V E Q Q E D E P E E R P K R E P M Q L  
E P A E S A K Q G R N L P Q K V E Q G E E R P Q E A D M P G Q A Q S A M R P Q L  
S N S E E G P A R G K P A P E E P D E Q L G E P E E A Q G E H A D E P A P S K P  
S E K H M V P Q M A E P E K G E E A R E P Q G A E D K P A P V H K P K K E E P Q

10

20

30

40

50

RPNEEKAPKPKGRHVGRQENDDSAGKPEPGRPDDRKGKEKE  
PEEPAQGHSLPQEPEPMRPKPPEVRKKPHPGASPHQVSD  
VEDAKGPERKVNPMEEESAQAQQEGPAENDEAERPERP  
ASGGAREAMTSKVYDPEQRKRMITGPGQWWARCKQMNVLDS  
FINYYDSEKHAENAVIFLHGNAATSSYLWRHVVPPIEPVAR  
CIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPK  
KIIFVGHDWGAAALAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIES  
WDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVLNNFFVETVLP SKIMR  
KLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPD  
VVQIVRNYNAYLRASDDL PKMFIESDPGFFSNAIVEGAKK  
FPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEM GK YIKSFVERVLKNEQG  
SGSAGTAG EKPGTRVFKKSSPNCKLTVYLGKRDFVDHLDK  
VDPVDGVLVDPDY LKDRKVFTLTCAFRYGREDDL DV LGL  
SFRKDLFIATYQAFPPVPNP RPPTRLQDRLLRKL GQHAH  
PFFFTIPQNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDFEIRAFCAKS  
LEEKSHKRNSVRLVIRKVQFAPEKPGPQPSAETTRHFLMS  
DRSLHLEASLDKELYHGEPLNVNVHVTNNSTKT VKKIKV  
SVRQYADICLFSTAQYKCPVAQLEQDDQVSPSSSTFCVKYT  
ITPLLSDNREKRGLALD GK LKHEDTNLASSTIVKEGANKE  
VLGILVSYRVKVKLVVSRGGDVSVELPFVLMHPKPHDHIP  
LPRPQSAAPETDVPVDTNLIEFDTNYATDDDIVFEDFARL  
RLKGMKDDDDYDDQLC (配列番号52)

10

20

84位にRluCIIが挿入されたヒトG 12サブユニット

MSGVVRTLSRCLLP AEAGGARERRAGSGARDAEREARRRS  
RDIDALLAREERRAVRRLVKILL LGAGESGKSTFLKQMRII  
HGREGS GGGSMTSKVYDPEQRKRMITGPGQWWARCKQMN  
LDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPPIEP  
VARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLN  
LPKKIIFVGHDWGAAALAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDV  
IESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVLNNFFVETVLP SK  
IMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGG  
KPDVVQIVRNYNAYLRASDDL PKMFIESDPGFFSNAIVEG  
AKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEM GK YIKSFVERVLKN  
EQSGGGGSGTFDQKALLEFRDTIFDNILKGSRVLV DARDK  
LGIPWQYSENEEHGMFLMAFENKAGLPVEPATFQLYVPAL  
SALWRDSGIREAFSRRSEFQLGESVKYFLDNLDRI GQLEY  
MPTEQDILLARKATKGIVEHDFVIKKIPFKMVDVGGQRSQ  
RQKWFQCFD GITSILFMVSSSEYDQVLMEDRRTNRLVESM  
NIFETIVNNKLFFNVSIILFLNKMDLLVEKVKT VSIKKHF  
PDFRGDPHRLEDVQRYLVQCFDRKRNRNRSKPLFHHFTTAI  
DTENVRFVFHAVKDTILQENLKDIMLQ (配列番号53)

30

40

118位にRluCIIが挿入されたヒトG qサブユニット

MTLESIMACCLSEEAKEARRINDEIERQLRRDKRDARREL  
KLLLLLGTGESGKSTFIKQMRIIHGSGYSDEDKRGFTKL VY  
QNIIFTAMQAMIRAMDTLKIPYKYEHNK AHAQLVREVDVNA  
AIRSTRMTSKVYDPEQRKRMITGPGQWWARCKQMNVLDSFI  
NYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPPIEPVARCI  
IPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKI  
IFVGHDWGAAALAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWD  
EWPDI EEDIALIKSEEGEKMVLNNFFVETVLP SKIMRKL

50

E P E E F A A Y L E P F K E K G E V R R P T L S W P R E I P L V K G G K P D V V  
Q I V R N Y N A Y L R A S D D L P K M F I E S D P G F F S N A I V E G A K K F P  
N T E F V K V K G L H F S Q E D A P D E M G K Y I K S F V E R V L K N E Q C T N  
A A I R S E K V S A F E N P Y V D A I K S L W N D P G I Q E C Y D R R R E Y Q L  
S D S T K Y Y L N D L D R V A D P A Y L P T Q Q D V L R V R V P T T G I I E Y P  
F D L Q S V I F R M V D V G G Q R S E R R K W I H C F E N V T S I M F L V A L S  
E Y D Q V L V E S D N E N R M E E S K A L F R T I I T Y P W F Q N S S V I L F L  
N K K D L L E E K I M Y S H L V D Y F P E Y D G P Q R D A Q A A R E F I L K M F  
V D L N P D S D K I I Y S H F T C A T D T E N I R F V F A A V K D T I L Q L N L  
K E Y N L V ( 配列番号 5 4 )

10

6 7 位に R l u c I I が挿入されたヒト G S サブユニット

M G C L G N S K T E D Q R N E E K A Q R E A N K K I E K Q L Q K D K Q V Y R A T  
H R L L L L G A G E S G K S T I V K Q M R I L H V N G S G G G G S M T S K V Y D  
P E Q R K R M I T G P Q W W A R C K Q M N V L D S F I N Y Y D S E K H A E N A V  
I F L H G N A T S S Y L W R H V V P H I E P V A R C I I P D L I G M G K S G K S  
G N G S Y R L L D H Y K Y L T A W F E L L N L P K K I I F V G H D W G A A L A F  
H Y S Y E H Q D K I K A I V H A E S V V D V I E S W D E W P D I E E D I A L I K  
S E E G E K M V L E N N F F V E T V L P S K I M R K L E P E E F A A Y L E P F K  
E K G E V R R P T L S W P R E I P L V K G G K P D V V Q I V R N Y N A Y L R A S  
D D L P K M F I E S D P G F F S N A I V E G A K K F P N T E F V K V K G L H F S  
Q E D A P D E M G K Y I K S F V E R V L K N E Q S G G G G S F N G E G G E E D P  
Q A A R S N S D G E K A T K V Q D I K N N L K E A I E T I V A A M S N L V P P V  
E L A N P E N Q F R V D Y I L S V M N V P D F D F P P E F Y E H A K A L W E D E  
G V R A C Y E R S N E Y Q L I D C A Q Y F L D K I D V I K Q A D Y V P S D Q D L  
L R C R V L T S G I F E T K F Q V D K V N F H M F D V G G Q R D E R R K W I Q C  
F N D V T A I I F V V A S S S Y N M V I R E D N Q T N R L Q E A L N L F K S I W  
N N R W L R T I S V I L F L N K Q D L L A E K V L A G K S K I E D Y F P E F A R  
Y T T P E D A T P E P G E D P R V T R A K Y F I R D E F L R I S T A S G D G R H  
Y C Y P H F T C A V D T E N I R R V F N D C R D I I Q R M H L R Q Y E L L ( 配列  
番号 5 5 )

20

30

ヒト G 1 サブユニット

M S E L D Q L R Q E A E Q L K N Q I R D A R K A C A D A T L S Q I T N N I D P V  
G R I Q M R T R R T L R G H L A K I Y A M H W G T D S R L L V S A S Q D G K L I  
I W D S Y T T N K V H A I P L R S S W V M T C A Y A P S G N Y V A C G G L D N I  
C S I Y N L K T R E G N V R V S R E L A G H T G Y L S C C R F L D D N Q I V T S  
S G D T T C A L W D I E T G Q Q T T T F T G H T G D V M S L S L A P D T R L F V  
S G A C D A S A K L W D V R E G M C R Q T F T G H E S D I N A I C F F P N G N A  
F A T G S D D A T C R L F D L R A D Q E L M T Y S H D N I I C G I T S V S F S K  
S G R L L L A G Y D D F N C N V W D A L K A D R A G V L A G H D N R V S C L G V  
T D D G M A V A T G S W D S F L K I W N ( 配列番号 5 6 )

40

ヒト G 1 サブユニット

M P V I N I E D L T E K D K L K M E V D Q L K K E V T L E R M L V S K C C E E V  
R D Y V E E R S G E D P L V K G I P E D K N P F K E L K G G C V I S ( 配列番号 5  
7 )

ヒト G 2 サブユニット

M A S N N T A S I A Q A R K L V E Q L K M E A N I D R I K V S K A A A D L M A Y  
C E A H A K E D P L L T P V P A S E N P F R E K K F F C A I L ( 配列番号 5 8 )

ヒト G 3 サブユニット

M K G E T P V N S T M S I G Q A R K M V E Q L K I E A S L C R I K V S K A A A D  
L M T Y C D A H A C E D P L I T P V P T S E N P F R E K K F F C A L L ( 配列番号

50

59)

ヒトG 4サブユニット

MKEGMSNNSTTSSISQARKAVEQLKMEACMDRVKVSQAAD  
LLAYCEAHVREDPLIIPVPASENPFREKKFFCTIL (配列番号  
60)

ヒトG 5サブユニット

MSGSSSVAAAMKKVVQQLRLEAGLNRVKVSQAADLKQFCL  
QNAQHDP LLTGVSSTNPF RPQKVC SFL (配列番号61)

ヒトG 7サブユニット

MSATNNIAQARKLVEQLRIEAGIERIKVSKAASDLMSYCE  
QHARNDP LLVGVPASENPFKDKKPC IIL (配列番号62)

10

ヒトG 8サブユニット

MSNNMAKIAEARKTVEQLKLEVNIDRMKVSQAAAE LLAF C  
ETHAKDDP LVTVPAAENPF RD KRLFCVLL (配列番号63)

ヒトG 9サブユニット

MAQDLSEKDLLKMEVEQLKKEVKNT RIPISKAGKEIKE YV  
EAQAGNDP FLKGIPEDKNPFKEKGGCLIS (配列番号64)

ヒトG 10サブユニット

MSSGASASALQRLVEQLKLEAGVERIKVVSQAAAE LQQYCM  
QNACKDALLVGVPAGSNPFREPRSCALL (配列番号65)

20

ヒトG 11サブユニット

MPALHIEDLPEKEKLKMEVEQLRKEVKLQRQQVSKCSEEI  
KNYIEERSGEDPLVKGIPEDKNPFKEKGC V I S (配列番号66  
)

ヒトG 12サブユニット

MSSKTASTNNIAQARRTVQQLRLEASIERIKVSKASADLM  
SYCEEHARSDP LLIGIPTSENPFKDKKTC IIL (配列番号67)

ヒトG 13サブユニット

MEEWDVPQMKKEVESLKYQLAFQREMA SKTIPE LLKWIED  
GIPKDPFLNPDL MKNNPWVEK GKCTIL (配列番号68)

30

ヒトG 15サブユニット

MARSLTWRC CPWCLTEDEKAAARVDQE INRI LLEQKKQDR  
GELKLL L L L G P G E S G K S T F I K Q M R I I H G A G Y S E E E R K G F R P  
LVYQNI FVSMRAMIEAMERLQIPFSRPESKH HASLVMSQD  
PYKVTTFEKRYAAAMQWLWRDAGIRACYERRREFHLLDSA  
VYYLSHLERITEEGYVPTAQDVLRSRMP TTGINEYCF SVQ  
KTNLRIVDVGGQKSERKKWIHCFENVIALIY LASLSEYDQ  
CLEENNQENRMKESLALFGTILELPWFKSTSVILFLNKTD  
ILEEKIPTSHLATYFPSFQGPQDAEAAKRFILDMYTRMY  
TGCVDGPEGSKKGARSRR LFSHYTCATDTQNI RKVFKDVR  
DSVLARYLDEINLL (配列番号69)

40

ヒトタンパク質キナーゼ1(PKN)のRh o結合ドメイン(CRIB)

VQSEPRSWSLLEQLGLAGADLAAPGVQQQLELERERLRRE  
IRKELKLKEGAENLRRATTDLGRSLGPVELLLRGSSRRLD  
LLHQQLQE (配列番号70)

RlucIIと、PKN1のRh o結合ドメインとの間のリンカー

GSASAGTATMASDA (配列番号71)

ヒトPKC のDAG結合ドメインC1b

FNIDMPHRFKVHNYMSPTFC DHCGSL LWGLVKQGLKCEDC  
GMNVHHKCREKVANLCG (配列番号72)

50

## ヒト 1 アドレナリン作動性受容体 ( 1 AR )

MGAGV LVLGASEPGNLS SAAPLPDGAATAARLLVPASPPA  
SLLPPASESPEPLSQQWTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVI  
VAIAKT PRLQTLTNLFIMSLASADLVMGLLVVPFGATIVV  
WGRWEYGSFFCELTWSVDVLCVTAS IETLCVIALDRYLA I  
TSPFRYQSLLTRARARGLVCTVWAI SALSFLPILMHWWR  
AESDEARRCYNDPKCCDFVTNRAYA IAS SVVSFYVPLCIM  
AFVYLRV FREAQKQVKKIDSCERRFLGGPARPPSPSPSPV  
PAPAPPPGPPRPA AAAAATAPLANGRAGKRRPSRLVALREQ  
KALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKA FHRELVPDRLFV  
FFNWLGYANS AFNPIIYCRSPDFRKA FQGLLCCARRAARR  
RHATHGDRPRASGCLARP GPPSPGAASDDDDDDVVGATP  
PARLLEPWAGCNGGAAADSDSSSLDEPCRP GFASESKV ( 配列  
番号 73 )

10

## ヒト 2 アドレナリン作動性受容体 ( 2 AR )

MGQPGNGSAFL LAPNRSHAPDHDVTQQRDEVWVVG MGIVM  
SLIVLAIVFGNVLVITAI AKFERLQTVTNYFITSLACADL  
VMGLAVVPFGAAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTAS  
IETLCVIAVDRYFAITSPFKYQSLLTKNKARV IILMVWIV  
SGLTSFLPIQMHWYRATHQEAINCYANETCCDFFT NQAYA  
IASSIVSFYVPLVIMVFVYSRVFQEAKRQLQKIDKSEGRF  
HVQNL SQVEQDGR TGHGLRRSSSKFCLKEHKALKTLGIIMG  
TFTLCWLPFFIVNIVHVIQDNLIRKEVY ILLNWIGYVNSG  
FNPLIYCRSPDFRIAFQELLC LRRSSSLKAYGNGYSSNGNT  
GEQSGYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVP SDNID  
SQGRNCSTNDSLL ( 配列番号 74 )

20

## ヒトプロスタグランジン2 受容体アイソフォーム a ( FP )

MSMNNSKQLVSPA AALLSNTT CQTENRLSVFFSVIFMTVG  
ILSNSLAIAI LMKAYQRFRQKSKASFLL LASGLVITDFFG  
HLINGAIAV FVYASDKEWIRFDQSNVLC SIFGICMVFSGL  
CPLLLGSVMAIERCIGVT KPIFHSTKITSKHVKMMLS GVC  
LFAVFIALLPILGHRDYKI QASRTWC FYNTEDIKDWE DRF  
YLLLF SFLGLLALGVSLLCNAITGITLLRVKFKSQQH RQG  
RSHHLEMVIQLLAIMCVSCICWSPFLVTMANIGINGNHS L  
ETCETT LFA LRMATWNQILD PWVYILLRKAVLKNLYKLAS  
QCCGVHVISLHIWELSS IKNSLKVA AIS ESPVAEKSAST ( 配列  
番号 75 )

30

## ヒトトロポキサンA2 受容体アイソフォーム ( TP R )

MWPNGSSSLGPCFRPTNITL EERRLIA SPWF AASF CVVGLA  
SNLLALS VLAGARQGGSHTRSSFLTFLCGLVLTDFLGLLV  
TGTIVVSQHAALFEWHAVDPGCR LCRFMGVVMIFFGLSPL  
LLGAAMASERYLGITRPF SRPAVASQRRAWATVGLVWAAA  
LALGLLP LLGVGRYTVQYPG SWCFLT LGAESGDVA FGLLF  
SMLGGLSVGLSFL LNTVSVATLCHVYHGQEAAQQRPRDSE  
VEMMAQLLGIMVVASVCWLPLL VFIAQT VLRNPPAMSPAG  
QLSRTTEKELLIYLRVATWNQILD PWVYILFRRAVLRRLQ  
PRLSTRPRSLSLQPQLTQRSGLQ ( 配列番号 76 )

40

## ヒトウロテンシンII 受容体 ( GPR14 )

MALTPESPSSFPGLAATGSSVPEPPGGPNATLNS SWASPT  
EPSSLEDLVATGTIGTLLSAMGVVG VGNAYTLVVTCRSL

50

RAVASMYVYVVNLALADLLYLLSIPFIVATYVTKEWHFGD  
VGCRVLFGLDFLTMHASIFTLTVMSSERYAAVLRPLDTVQ  
RPKGYRKLLALGTWLLALLTLPLVMLAMRLVRRGPKSLCL  
PAWGPRAHRAYLTLFATSIA GPGLLIGLLYARLARAYRR  
SQRASFKRARRPGARALRLVLGIVLLFWACFLPFWLWQLL  
AQYHQAPLAPRTARIVNYLTTCCLTYGNSCANPFLYTLLTR  
NYRDHLRGRVRGPGSGGGRGPVPSLQPRARFQRCSGRSL  
SCSPQPPTDSLVLAPAAPARPAPEGPRAPA (配列番号77)

ヒトヒスタミン1型受容体(H1R)

MSLPNSSCLLEDKMCENKTTMASPQLMPLVVVLSTICLV  
TVGLNLLLVLYAVRSEKRLHTVGNLYIVSLSVADLIVGAVV  
MPMNILYLLMSKWSLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSIFI  
LCIDRYRSVQQPLRYLK YRTKTRASATILGAWFLSFLWVI  
PILGWNHFMQQTSVRREDKCE TDFYDVTWFKVMTAII NFY  
LPTLLMLWFYAKIYKAVRQHCQHRELINRSLPSFSEIKLR  
PENPKGDAKKPGKESPWEVLKRKPKDAGGGSVLKSPSQTP  
KEMKSPVVFSQEDDREVDKLYCFPLDIVHMQAAAEGSSRD  
YVAVNRSHGQLKTDEQGLNTHGASEISEDQMLGDSQSFSR  
TDSDTTTTETAPGKGKLRSGSNTGLDYIKFTWKRLRSHSRQ  
YVSGLHMNRERKAAKQLGFIMAAFILCWIPYFIFFMVIAF  
CKNCCNEHLHMFTIWLGYINSTLNPLIYPLCNENFKKTFK  
RILHIRS (配列番号78)

ヒトブラジキニン2型受容体(BKRB2)

MFS PWKISMFLSVREDSVPTTASF SADMLNVT LQGPTLNG  
TFAQSKCPQVEWL GWLNTIQPPFLWVLFVLATLENIFVLS  
VFCLHKSSCTVAEIYLG NLAADLILACGLPFWAITISNN  
FDWLFGETLCRVVNAIISMNLYSSICFLMLV SIDRYLALV  
KTMSMGRMRGV RWAKLYSLVIWGCTLLSSPMLVFR TMKE  
YSDEGHNV TACVISYPSLIWEVFTNM LNVVGFLPLSVI  
TFCTMQIMQVLRNNEMQKFKEIQTE RRATVLLVLLVLLFI  
ICWL PPFQISTFLDTLHRLGILSSCQDERIIDVITQIASFM  
AYSNSCLNPLVYVIVGKRFRKKSWEVYQGV CQKGGCRSEP  
IQMENSMTLRTSISVERQIHKLQDWAGSRQ (配列番号79)

ヒトドーパミン2型受容体アイソフォーム1(D2R)

MDPLNLSWYDDDLERQNWSPFNGSDGKADRPHYNYAYATL  
LTLLIAVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTTNYLIVSLAVAD  
LLVATLVMPWVVYLEVVG EWKF SR IHCDIFVTL DVMCTA  
SILNLC AISIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVW  
VLSFTISCP LFLGLNNADQNECIIANPAFVVYSSIVSFYV  
PFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKR VNTKRSSRAFRAHLRAPL  
KGNCTHPEDMKLCTVIMKSN GSFPVNR RRVEAARRAQELE  
MEMLSSTSPPERTRYSPIPP SHHQLTLPDP SHHGLHSTPD  
SPA KPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTS LKTMSR  
RKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIICWL PFFITHILNIHCD  
CNI PPVLYSAFTWLGYVNSAVNP I IYTTFNIEFRKAFLKI  
LHC (配列番号80)

GFP2-RlucII融合物

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY  
GKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVCFSRYPDHMK  
QHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTL

10

20

30

40

50

VNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKN  
GIKVNFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH  
YLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKG  
GGGGDIEFLQPGSGGGGGM TSKVYDPEQRKRMITGPQWWA  
RCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRH  
VVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLT  
AWFELNLNLPKKIIFVGHWDWGAALAFHYSYEHQDKIKAI VH  
AESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVL ENNFFV  
ETVLP SKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPRE  
IPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDL PKMFIESDPGFF  
SNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEM GKYIKSF  
VERVLKNEQ (配列番号 81)

10

rGFP - RLucII 融合物

MDLAKLGLKEVMPTKINLEGLVGDHAFSMEGVGEGNILEG  
TQEVKISVTKGAPLPFAFDIVSVAFSYGNRAYTGYPEEIS  
DYFLQSFPEGFTYERNIRYQDGGTAIVKSDISLEDGKFIV  
NVDFKAKDLRRMGPMQQDIVGMQPSYESMYTNVTSVIGE  
CIIAFKLQTGKHFTYHMRTVYKSKKPVE TMPLYHF IQHRL  
VKTNVDTASGYVVQHETAIAAHSTIKKIEGSLPGGGGGDI  
EFLQPGSGSGGGGGM TSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMN  
VLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVP HIE  
PVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELN  
NLNLPKKIIFVGHWDWGAALAFHYSYEHQDKIKAI VHAE  
SVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVL ENNFFVET  
VLP SKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPRE  
IPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDL PKMFIESDPGFF  
SNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEM GKYIKSF  
VERVLKNEQ (配列番号 82)

20

Venus - RLucII 融合物

MVSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY  
GKLTCLKLIC TTGKL PVPWP TLT TLTGLYGLQC FARYPDHMK  
QHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTL  
VNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYITADKQKN  
GIKANFKIRHNI EDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH  
YLSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKG  
GGGGDIEFLQPGSGGGGGM TSKVYDPEQRKRMITGPQWWA  
RCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRH  
VVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLT  
AWFELNLNLPKKIIFVGHWDWGAALAFHYSYEHQDKIKAI VH  
AESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVL ENNFFV  
ETVLP SKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPRE  
IPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDL PKMFIESDPGFF  
SNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEM GKYIKSF  
VERVLKNEQ (配列番号 83)

30

アレスチン (1 及び 2) と RLucII との間のリンカー

KLPAT (配列番号 84)

ヒト アレスチン 1

MGDKGTRVFKKASPNGKLT VYLGKRDFVDHIDLVD PVDGV  
VLVDPEYLKERRVYVTLTCAFRYGREDL DVLGLTFRKDLF  
VANVQSFP PAPERD KKLPLTRLQERLIK KLGEHAYPFTFEIP

40

50



P N L P C S V T L Q P G P E D T G K A C G V D Y E V K A F C A E N L E E K I H K  
 R N S V R L V I R K V Q Y A P E R P G P Q P T A E T T R Q F L M S D K P L H L E  
 A S L D K E I Y Y H G E P I S V N V H V T N N T N K T V K K I K I S V R Q Y A D  
 I C L F N T A Q Y K C P V A M E E A D D T V A P S S T F C K V Y T L T P F L A N  
 N R E K R G L A L D G K L K H E D T N L A S S T L L R E G A N R E I L G I I V S  
 Y K V K V K L V V S R G G L L G D L A S S D V A V E L P F T L M H P K P K E E P  
 P H R E V P E N E T P V D T N L I E L D T N D D D I V F E D F A R Q R L K G M K  
 D D K E E E E D G T G S P Q L N N R ( 配列番号 8 5 )

ヒト アレスチン 2

M G E K P G T R V F K K S S P N C K L T V Y L G K R D F V D H L D K V D P V D G  
 V V L V D P D Y L K D R K V F V T L T C A F R Y G R E D L D V L G L S F R K D L  
 F I A T Y Q A F P P V P N P P R P P T R L Q D R L L R K L G Q H A H P F F F T I  
 P Q N L P C S V T L Q P G P E D T G K A C G V D F E I R A F C A K S L E E K S H  
 K R N S V R L V I R K V Q F A P E K P G P Q P S A E T T R H F L M S D R S L H L  
 E A S L D K E L Y Y H G E P L N V N V H V T N N S T K T V K K I K V S V R Q Y A  
 D I C L F S T A Q Y K C P V A Q L E Q D D Q V S P S S T F C K V Y T I T P L L S  
 D N R E K R G L A L D G K L K H E D T N L A S S T I V K E G A N K E V L G I L V  
 S Y R V K V K L V V S R G G D V S V E L P F V L M H P K P H D H I P L P R P Q S  
 A A P E T D V P V D T N L I E F D T N Y A T D D D I V F E D F A R L R L K G M K  
 D D D Y D D Q L C ( 配列番号 8 6 )

【 0 1 9 2 】

実施例 2 : G P C R 輸送のために新たな B R E T センサーの生成及び検証

Renilla reniformis GFP ( r G F P ) に基づいた新たな B R E T 受容体を、受容体内部移行及び アレスチンによるエンドソームへの標的化について、評価するために生成した。これらの B R E T 受容体は、形質膜またはエンドソームにおける特異的発現のために改変され、B R E T 供与体 : R L u c I I 標識化 G P C R 及び アレスチンと共に使用した ( 図 1 A ~ C ) 。本明細書に開示されている B R E T アッセイは、特定のタンパク質間相互作用ではなく、受容体に対する供与体の局所濃度の変化に基づいており、したがって、タンパク質相互作用及びその複合体の結合活性における要件によって制限を受けない。その形質膜局在化では、r G F P には、最初に l y n ドメインを標識した。L y n - r G F P は、H E K 2 9 3 細胞に発現したとき、主に形質膜に局在化した ( 図 1 D 及び F ) 。更に、endofin F Y V E ドメインを r G F P に付加すると ( r G F P - endofin F Y V E ) 、明らかに独占的なエンドソーム局在化を示した ( 図 1 E 、左側パネル ) 。endofin F Y V E センサーの m C h e r r y 標識変異体 ( m C h e r r y - F Y V E ) も、E E に集合している低分子 G タンパク質 R a b 5 と共に共局在化した ( 図 1 G ) 。注目すべきことに、ワートマニンを使用して P I 3 K を遮断すると、r G F P - endofin F Y V E をサイトゾル及び拡大エンドソーム小胞へ非局在化し ( 図 1 E 、右側パネル ) 、P I 3 P 結合を介したエンドソームの繋ぎ止めと一致した。G P C R 輸送を可視化するため、C F P を標識したブラジキニン B 2 受容体 ( B 2 R - C F P ) を使用し、l y n - r G F P 及び m C h e r r y - endofin F Y V E を同時に発現させた ( 図 1 F ) 。基礎状態では、B 2 R - C F P は、l y n - r G F P と共に形質膜に局在化した ( 上側パネル ) 。作動薬により刺激すると、B 2 R - C F P は、l y n - r G F P から分離し、エンドソームの中に移動し、そこで m C h e r r y - endofin F Y V E と共に共局在化した ( 下側パネル ) 。形質膜及びエンドソームマーカーの両方 ( すなわち、l y n - r G F P 及び G F P - endofin F Y V E のそれぞれ ) が対応する区画に留まっているので、受容体のみが、作動薬によって 1 つの細胞区画から別の細胞区画に再分配され、この系を、B R E T の使用によって受容体輸送を動的に追跡するのに適したものにしている。

【 0 1 9 3 】

実施例 3 : - アレスチンを用いた A T 1 R 内部移行及びそのエンドソームへの輸送の評

価

BRET実験を実施して、受容体エンドサイトーシスをモニターした。 - アレスチンと共にクラスリン経路を輸送され、かつエンドソームに向けられている別のGPCRである(Hein, Meinel et al. 1997; Zhang, Barak et al. 1999; Anborgh, Seachrist et al. 2000; Oakley, Laporte et al. 2000; Gaborik, Szaszak et al. 2001) アンギオテンシン1型受容体のC末端ドメインに、RlucIIを融合させた(AT1R-RlucII)。放射性リガンド結合を使用して、改変AT1R-RlucIIが非標識化受容体と同じ程度で内部移行したかを最初に検証した(図7A)。AT1R-RlucII及びlyn-rGFPの同時発現は、形質膜からの受容体の効率的な作動薬媒介除去を妨げず(図7A)、この内部移行は、 - アレスチン2の発現により更に増加した、または優性ネガティブDynamin K44A(DynK44A、図7B)により阻害された。形質膜における共局在化と一致して、AT1R-RlucII及びlyn-rGFPの発現は、基礎状態での高いBRET比を明らかにした(図2A)。シグナルは、生細胞へのAngIIの負荷及び形質膜からの受容体の除去の後に、濃度依存的に急速に減少した。一方、lyn-GFP10の発現は、より低い基礎及びAngII誘発BRET比変化の両方を生じた。意外なことに、AT1R-RlucIIを、GFP10-endofinFYVEではなくrGFP-endofinFYVEと共に発現すると、AngII媒介BRET変化(BRET)に7.7倍の増加をもたらした(図2B)。同様に、AT1Rを、 - アレスチン2-RlucIIと、GFP10-endofinFYVEではなくrGFP-endofinFYVEと共に発現すると、BRETに4.5倍の増加をもたらした(図2C)。形質膜からの受容体エンドサイトーシス及びそのエンドソームへの標的化の一時的な過程は、次に、形質膜またはエンドソームBRET受容体センサー(例えば、lyn-rGFP及びrGFP-endofinFYVE、それぞれ)のいずれかと共にAT1R-RlucIIを使用することによって、解決された。形質膜からのAT1Rの消失( $t_{1/2}$  約3分)は、そのエンドソームへの蓄積( $t_{1/2}$  約9分)よりも速かった(図2D~F)。

#### 【0194】

AT1R内部移行及び - アレスチンによるエンドソームへの標的化を制御できる程度を、次に調査した。クラスリン被覆ピット調査において鍵である、Dynaminの優性ネガティブのDynamin K44A(DynK44A)及びスクロースの両方を、エンドサイトーシス遮断薬として使用した(Zhang, Ferguson et al. 1996)。形質膜及びエンドソームにおけるAngII媒介BRET応答(AT1R-RlucII/lyn-rGFP及びAT1R-RlucII/rGFP-endofinFYVE、それぞれ)は、DynK44Aの発現によって効率的に阻害された(図3A及びB)。DynK44Aの存在下でのエンドソームにおけるAT1R/ - アレスチン複合体の蓄積の欠如と一致して、微小のAngII媒介BRET比変化が、 - アレスチン2-RlucIIとrGFP-endofinFYVEとの間に観察された(図3C)。同様に、スクロースは、形質膜においてAT1R-RlucIIとlyn-rGFPとの間及びエンドソームにおいてAT1R-RlucIIと、 - アレスチン2-RlucIIまたはrGFP-endofinFYVEのいずれかとの間のAngII誘導BRET応答を有効に遮断した(図3A~C)。驚くべきことに、DynK44Aの過剰発現またはスクロース処理は、(lyn-rGFPを用いた)形質膜において基礎BRET比を減少したが(図3A)、(rGFP-endofinFYVEを用いた)エンドソームでは減少しなかった。 - アレスチン発現は、AT1Rエンドサイトーシスを促進する(Gaborik, Szaszak et al. 2001)。小胞酸性化阻害剤のバフィロマイシンA(Baf)及びクロロキン(CQ)は、受容体分解及びAT1R再循環を防止し(Heinz et al, Mol Endocrinol. 1997 Aug; 11(9): 1266-77)、両方ともエンドソームにおけるAT1Rの作動薬媒介蓄積を増加した(図3F)。作動薬媒介GPCRエンドサイトーシスにおける重要な役割と一致

10

20

30

40

50

して、アレスチン2の過剰発現は、受容体の内部移行（AT1R-RlucII及びlyn-rGFP）とそのエンドソームへの標的化（AT1R-RlucII及びrGFP-endofinFYVE）の両方において、50%を超えてAngII媒介BRETを増強した（図3D及びE）。AngII媒介AT1Rエンドサイトーシスに対するDynK44Aまたは -アレスチン2の効果も、リガンド結合実験により検証し、BRETアッセイにおいて観察されたものと一致したことが見出された（図7B）。まとめると、これらの結果は、AT1Rエンドサイトーシス及び -アレスチンによるエンドソームへの輸送を用量及び時間依存的にモニターする、BRETに基づいたアッセイの有用性を強調している。

【0195】

10

実施例4：エンドサイトーシスの測定及び様々な受容体のエンドソームへの輸送

異なるGPCRにRlucIIを標識して、これらの輸送を検査した。バソプレシンV2受容体-RlucII（V2R-RlucII）がlyn-rGFPにより発現すると、AVPはBRET比応答を用量依存的に減少した。AngII刺激AT1Rと同様に、AVPは、V2Rの内部移行をnM範囲（それぞれ1.1nM及び7.8nM）のEC<sub>50</sub>で促進した（図4A）。一方、V2Rに低い親和性を有する（Barberis, Audigier et al. 1992）オキシトシンは、低い効力で受容体の内部移行を促進した（図4A、EC<sub>50</sub> = 2.2μM）。B2R-RlucII及び2アドレナリン作動性受容体（2AR）-RlucIIも、それぞれ、それらの同族リガンドであるブラジキニン及びイソプロテレノールによるBRET比の用量依存的減少を示した。しかし、本発明者たちは、受容体間の基礎BRET比において差を観察した。エンドソームへの受容体の輸送が確かめられたとき、B2R-RlucII及び2AR-RlucIIは、BRET比における作動薬媒介増加に異なる効力も示した（図4B）。注目すべきことに、V2R-RlucII及びrGFP-endofinFYVEは、B2R及び他の受容体と比較して高い基礎BRET比を示したが（図4B）、本発明者たちは、AVP刺激によるBRET比の強い増加を依然として検出することができた。このより高い基礎シグナルは、顕微鏡検査法によって示唆されているように、V2Rの高い基礎エンドソーム局在化によって引き起こされた可能性があった（図8）。事実、B2Rと対照的に、V2RとmCherry-endofinFYVEの共局在化は、作動薬刺激の不在下においてより多く存在した（図1及び8）。次に、エンドソームへの作動薬媒介受容体 / -アレスチン標的化を、異なるGPCRによりarr2-RlucII及びrGFP-endofinFYVEを使用して検査した。AT1R、V2R及びB2Rは、作動薬の刺激を受けると、基礎の6~8倍のBRET比を促進し（図4C）、これは、 -アレスチンを伴ってエンドソームに輸送されるクラスBのGPCRの輸送と一致した（Oakley, Laporte et al. 2000）。しかし、イソプロテレノールによる2ARの刺激は、BRETシグナルの生成に失敗しており、エンドソームへの -アレスチンを伴わないクラスAのGPCRの内部移行と一致した（Oakley, Laporte et al. 2000）。オキシトシンは、エンドソームへのV2R / -アレスチン複合体の非常に僅かな輸送を示し、一方、内部移行しない（Goupil, Wisehart et al. 2012）PGF2受容体（FP）では、基礎に対するBRET比の増加は、作動薬刺激の際に検出されなかった（図4C）。これらの結果は、異なるクラスのGPCRのリガンド媒介輸送の研究における、これらの形質膜及びエンドソームBRETセンサーの使用を支持している。図4Dは、形質膜及びエンドソームBRETセンサーを、上皮増殖因子受容体（EGFR）、受容体チロシンキナーゼ（RTK）などの他の種類の受容体（すなわち、非GPCR）のエンドサイトーシス及び輸送の研究にも使用できることを示す。図4Eは、AngII刺激後のAT1R-RlucII / rGFP-endofinFYVEバイオセンサーの0.73を超えるZ'値を示し、エンドソームにおける受容体内部移行の堅牢でHTSに適合するアッセイを示している。

20

30

40

【0196】

実施例5：BRETを使用した受容体再循環の研究

50

GPCR 内部移行の後、多くの受容体は、形質膜に戻るよう循環する、または他の細胞内区画に輸送されることが示されている (Tsao, Cao et al., 2001)。作動薬を除去した後の受容体輸送の力学を、異なる rGFP / RLucII BRET センサー対の使用により評価した。形質膜への受容体再循環では、Ang II が 30 分間負荷された、AT1R - RLucII 及び lyn - rGFP を発現する細胞を洗浄して、作動薬を除去し、BRET 測定の前に更に 45 分間回復させた。結果は、Ang II で前処理した細胞では、BRET 比は対照と比較しておよそ 50 % 減少し、シグナルは、作動薬除去の 45 分後に対照の約 90 % に回復したことを示す (すなわち、約 80 % の受容体が形質膜に再循環した。図 5 A)。同じ概念図式が、RLucII 標識化 B2R、2AR 及び V2R に当てはまった。これらの知見は、80 % を超えるエンドサイトーシス B2R 及び 2AR が細胞表面に再循環し、一方、僅か約 30 % のエンドサイトーシス V2R が形質膜に戻るよう再循環したことを明らかにした (図 5 B)。これらの結果は、以前の研究 (Innamorati, Sadeghi et al., 1998; Tsao and von Zastrow 2000; Zimmerman, Simaan et al., 2011) と十分一致している。初期エンドソームにおける受容体の消失は、次に AT1R - RLucII 及び rGFP - endoFinFYVE を使用してモニターした。30 分間の Ang II 処理は、非刺激細胞 (対照、図 5 C) と比較して BRET 比を 3 倍増加した。Ang II を除去した 45 分後、BRET 比は、基礎の 1.5 倍であり、75 % の AT1R が、細胞表面に戻るよう再循環することにより、または別のエンドサイトーシス選別によって、初期エンドソームから消失したことを示唆している。これらの結果は、エンドサイトーシスの BRET アッセイを、形質膜への受容体再循環及びエンドソーム選別の力学のモニターに適用できる証拠を提供している。

#### 【0197】

図 26 A ~ 26 C は、異なる区画へのアレスチンの移行 / 動員によってもたらされる BRET シグナルの変化を、BRET 顕微鏡検査法によって測定できること、ならびに BRET 受容体としての rGFP の使用が、Venus 及び GFP2 などの他の BRET 受容体と比較して強い BRET シグナルをもたらすことを示している。BRET に基づいた顕微鏡検査法の画像化は、多様な刺激に応答した別個の細胞内区画への RLuc 標識化タンパク質の移行をモニターする、画像に基づいた多重的画像化の可能性を開いている。

#### 【0198】

実施例 6 : アンギオテンシン類縁体による AT1R の差次的選別

次にリガンド媒介受容体エンドサイトーシスを、異なる AT1R リガンドの使用によって検査した。Ang II、SI 及び DVG は、明白な偏向シグナル伝達特性を有することが以前に示されている (Zimmerman, Beutraut et al., 2012)。エンドソームへの AT1R - RLucII の輸送を一時的に制御する能力を、rGFP - endoFinFYVE の使用によって最初に評価した。結果は、エンドソームへの AT1R の輸送の初期比率は、リガンドとのインキュベーション (例えば、0 ~ 5 分間、図 6 A) の際に類似していた。しかし、DVG 結合 AT1R は、10 分で最大内部移行を達成し、一方、SI は、20 分後によりやく最大効果を生じ、両方のリガンドは、初期エンドソームにおいて、AT1R 濃度の促進において Ang II より有効性がそれぞれ 40 % 及び 20 % 少なかった。40 分の最大内部移行を基準として、AT1R 内部移行を促進する異なる Ang II リガンドの効力及び有効性を比較した。図 6 B に示されているように、Ang II、SI 及び DVG は、AT1R - RLucII と lyn - rGFP の BRET 比を、リガンドの最大濃度で同じ程度に減少した。Ang II 及び SI は、AT1R 内部移行を促進する同じ傾向 (それぞれ 1.3 nM 及び 1.5 nM) を有したが、DVG は有効性が少なかった (75 nM)。SI 及び DVG の両方とも、Ang II と比較してエンドソームに少ない受容体蓄積を促進したが (図 6 C)、これらの効力の相対的な順番は、AT1R 内部移行の促進と同じままであった。興味深いことに、SI 及び DVG は、Ang II と比較して、エンドソームへの受容体を伴う - アレスチン 2 の輸送を弱く促進した (図 6 D)。まとめると、これらの知見は、異なる Ang II リガンドが明白な

AT1R / - アレスチン2複合体選別を引き起こす証拠を提供している。

#### 【0199】

AT1Rの潜在的な差次的細胞内輸送を試験するため、エンドソームの他のBRETに基づいたセンサーを、Rabタンパク質(Rab)にrGFPを標識することによって生成した。Rabは、多数の細胞内区画の間の小胞輸送を調整し、GPCR輸送がたどる経路の特定に使用されてきた(Seachrist及びFerguson 2003)。Rab5は、エンドサイトーシス及び短い循環の再循環の両方において見出され、一方、Rab4は、短及び長い循環の再循環小胞において見出され、Rab11は、長いサイクルの再循環小胞及びリソソームに向けられた小胞において見出される(Seachrist及びFerguson 2003)。rGFP-endofinFYVE標識エンドソームが主にRab5陽性であるので、rGFP標識化Rab4(rGFP-Rab4)及びRab11(rGFP-Rab11)を生成した。rGFP-Rab4及びrGFP-Rab11は、HEK293細胞に発現されたとき、両方とも良好な小胞局在化を示した(図9A)。AT1R-RLucII/rGFP-Rab4発現細胞を、AngII、SIまたはDVGと共にインキュベートしたとき、BRET比は、経時的に増加した(図6E)。興味深いことに、SI及びDVG刺激は、AngIIよりも有意に高いBRETシグナルを生成した(5及び10分、図6E)。10分目に、SI及びDVGにより増加したBRET比は、AngIIの2倍を超えていた。シグナルは、SI及びDVGでは10分後、AngIIでは30分目に横ばいになった。rGFP-Rab4に類似して、rGFP-Rab11も、AngIIより全体的に高いBRETシグナルを、SI及びDVGによって明らかにした(図6F)。AT1R-RLucII/rGFP-Rab11のシグナルは、rGFP-Rab4と比較してゆっくりと経時的に増加し、それぞれ速い及び遅い再循環におけるRab4及びRab11を伴う以前の知見と十分に一致している(Hunyady, Baukal et al. 2002; Li, Li et al. 2008)。rGFP-Rab4及びrGFP-Rab11 BRETアッセイの両方においてSI及びDVGは、有意な差を示さなかった。これらの結果は、SI及びDVGが、AngIIと比べて、AT1RをRab4またはRab11陽性小胞に誘導し、Rab5陽性小胞にあまり誘導しない証拠を提供している。

#### 【0200】

近年の証拠は、Gタンパク質が膜輸送にいくつかの機能を果たすことを示唆しているが、AT1R輸送におけるGqの役割は、研究が不十分ある。BRETに基づいたセンサーを使用して、阻害性Gqが受容体内部移行にどのように影響を与えたかを評価した。Gqを不活性状態に特異的に止める阻害剤であるUbo-QICによる細胞の処理は、PMES BRETアッセイにより評価して、AngII依存性AT1R内部移行を防止しなかった(図9B)。しかし興味深いことに、阻害性Gqは、Rab5含有エンドソームへのAngII結合AT1Rの標的化を、25%を超えて低減した(図9C)。Gqの活性化におけるDVG及びSIの欠失と一致して、Ubo-QICは、これらのエンドソームにおける受容体のリガンド媒介蓄積に効果がなかった。阻害性Gqは、Rab4及びRab11小胞においてAngII結合AT1Rを増加したが、DVGまたはSIにより促進された、エンドソームへの受容体の選別に関してほとんど効果がなかった(図9D)。これらの知見は、AT1R選別が異なるリガンドにより偏向されうること示唆している。

#### 【0201】

実施例7：機能性の救出を評価する、BRETに基づいた薬理学的シャペロン(PC)アッセイ及び隔離アッセイ

細胞表面発現を測定するため、RLucII標識化タンパク質と、細胞内局在化標識により形質膜に位置するエネルギー受容体(rGFP)とのBRETにおいて検出された、RLucII標識化タンパク質の形質密度(図10A、受容体)に基づいて、アッセイを開発した。図10Aにおいて、rGFP局在化に使用された標識の例は以下である。KRASスプライス変異体bの多塩基配列及びプレニル化シグナル配列(CAAX)、Lyn

10

20

30

40

50

」キナーゼのパルミトリル化及びミリスチル化シグナル配列 (L y n)、ならびにヒト G R K 5 の形質膜標的化多塩基配列 (P B)。R l u c I I を標識した、さもなければ E R に留まっているンパク質の細胞表面発現 P C 救出を評価するアッセイの概略図が、図 1 0 A に提示及び記載されている。細胞表面発現を評価する B R E T に基づいたアッセイを、図 1 0 B に描写及び記載されている、受容体の作動薬誘発性隔離の評価に使用することもできる。大部分の G P C R 及び他の受容体は、作動薬刺激の際に、内部移行する、または形質膜のサブドメインに隔離される。受容体の細胞表面発現の P C 救出後の隔離アッセイを、作動薬結合、したがって機能性を反映している受容体活性化の評価に使用することができる。この研究に使用される異なる構築物が図 1 1 に記載されている。図 1 1 A には、M C 4 R - R l u c I I の記載があり、図 1 1 B には、V 2 R - R l u c I I の記載があり、図 1 1 C には、非 G P C R の例として使用された、電位開口型カリウムチャネル (h E R G) の記載がある。個別の形質膜標的化配列を有する 3 つの異なる r G F P 構築物を、図 1 1 D に記載されているように試験した。提示されている大部分のアッセイでは、r G F P - C A A X 及び M C 4 R - R l u c I I 構築物を使用して、アッセイの堅牢度、D M S O への抵抗性及び機能性救出について、作動薬促進隔離を誘発する M C 4 R 作動薬 ( - M S H) の使用により評価することによって説明した。

#### 【 0 2 0 2 】

細胞表面発現アッセイの最適化では、2 つの異なる形質膜標的化配列を r G F P (図 1 1 D に記載されている構築物及び標識) について試験した。K R A S フラグメント標識は、脂質化 (r G F P - C A A X、プレニル化) 及び多塩基ドメインの組み合わせにより形質膜に向けて標的化され、G R K 5 フラグメント標識は、r G F P 融合タンパク質の脂質化を必要としない多塩基ドメイン (r G F P - P B) により形質膜に向けて標的化される。図 1 2 では、2 つの r G F P 構築物 (図 1 2 A = r G F P - C A A X 及び図 1 2 B = r G F P - P B) の滴定は、突然変異 h M C 4 R (R 1 6 5 Q) - R l u c I I を一時的に発現する細胞から得られた。図 1 2 A に示されているように、D C P M P 処理は、r G F P - C A A X では可飽和 B R E T 応答をもたらし、この構築物を、続く実験用を選択した。

#### 【 0 2 0 3 】

r G F P - C A A X 及び 3 つの形態の h M C 4 R 細胞を一時的に発現している細胞である、M C 4 R の細胞表面発現及び機能性の P C 媒介救出の最適化及び検証のため、w t 受容体 (h M C 4 R W T - R l u c I I)、P C 救出可能突然変異 M C 4 R (h M C 4 R - R 1 6 5 Q - r l u c I I) 及び D C P M P 処理に抵抗性がある (非 P C 救出性である) ことが知られている突然変異 M C 4 R を、P C 処理及び作動薬媒介隔離を誘発する 1 時間の作動薬処理後の細胞表面発現について試験した。受容体と r G F P - C A A X の 3 つの異なる比について、試験した。示されているように、D C P M P 処理は、W T 及び R 1 6 5 Q M C 4 R では B R E T シグナルの増加をもたらしたが、P 2 9 9 H 突然変異 M C 4 R ではもたらさなかった。D C P M P 処理後に細胞表面に発現した w t 及び R 1 6 5 Q 突然変異 M C 4 R は、両方とも、図 1 3 A ~ C に記載されている作動薬誘発性隔離を示した。9 6 ウェルプレートの 1 0 ウェルあたり 2 4 n g のプラスミド DNA と同等の条件を、隔離アッセイのために選択した。図 1 3 D は、バイオセンサーの異なる構成成分を、同じ m R N A からコード化及び同時発現することができる (多シストロン構築物)。r G F P - C A A X (K r a s) をコードする多シストロン構築物及び W T または突然変異 h M C 4 R のいずれかを、細胞表面発現の P C 救出を示すために使用した。多シストロン構築物は、供与体と受容体の固定比の利点及びウイルス感染のためまたは安定した細胞系の確立のために 1 つの構築物のみを使用する可能性を提供する。図 1 3 E は、シャペロン S R 1 2 1 4 6 3 による、細胞内に留まっていることが知られている V 2 R 突然変異体 (Y 1 2 8 S 及び W 1 6 4 S) の P C 媒介救出を示す。

#### 【 0 2 0 4 】

実施例 8 : B R E T に基づいた細胞表面発現アッセイを、シャペロンの効力及び有効性の薬理学的評価に使用することができる。

本アッセイを、PC特性を有する薬物を特徴決定することにより使用できるか確認するため、用量応答曲線を、rGFP-CAAX及びhMC4R-WT-RlucII構築物またはhMC4R(R165Q)-RlucII構築物のいずれかを共発現する細胞の2つの異なるPC(DCPMP及び化合物1)処理によって得た(図14)。用量応答曲線の特徴は、以前に記載されたFACSに基づいたアッセイ(P. Rene et al., J Pharmacol Exp Ther. 2010 Dec; 335(3): 520-32)により得られるデータに匹敵し、BRETに基づいたアッセイを、リガンドの特徴決定に使用できることが示された。

#### 【0205】

Z'値を、MC4R細胞表面発現のPC媒介救出のために決定して、開発されたBRETに基づいたアッセイの堅牢度を評価した。Z'値は、hMC4R-WT-RlucII(図15A及び15B)とhMC4R(R165Q)-RlucII(図15C及び15D)の両方について得た。細胞表面発現は、図15A及び15Cではセレンテラジン400aを使用してBRET2により、セレンテラジンHを使用してBRET1により(図15B及び15D)評価し、続いて10µMのDCPMP対ビヒクルで16時間処理した。Z'値を評価し、hMC4R-WT受容体では0.63を超えており、突然変異R165Q突然変異hMC4Rでは0.82を超えていた。結果は、このアッセイの堅牢度が、WT-MC4Rであってもスクリーニング用途の要件に適合することを示している。

#### 【0206】

実施例9: DMSOに対する抵抗性の評価

リガンド及び化合物ライブラリーは、多くの場合にDMSOに溶解されている。細胞表面を評価するBRETに基づいたアッセイが、化合物ライブラリーから選択されたリガンドの用量応答曲線に通常は到達するDMSOの濃度に感受性があるかを評価するため、hMC4R-WT-RlucII及びhMC4R(R165Q)-RlucIIを発現する細胞を、異なる濃度のDMSOを含有するウェルにおいて10µMのDCPMPにより、またはビヒクル(DMSO)により処理した。図16に示されているように、このアッセイは、少なくとも3%のDMSOに対して抵抗性があり、これは、ハイスループットスクリーニング(HTS)用途及び用量応答曲線における化合物の特徴決定に適合する。

#### 【0207】

実施例10: 安定した細胞系の生成

バイオセンサーを安定して発現する細胞は、通常、スクリーニングの目的にとって好ましい。次にMC4R及びV2R発現のPC媒介救出を、rGFP-CAAXを一時的に発現している細胞及び安定したrGFP-CAAX細胞系において評価して、安定した細胞系において達成されたrGFP-CAAXのレベルが、スクリーニング用途の堅牢なアッセイに適合するかを決定した。3つの異なる量(グラフに示されているように、10個のウェルに6、12及び24ng)のhMC4R(R165Q)-RlucII(図16A)またはhV2R(Y128S)-RlucII(図16B)を、異なるレベルのrGFP-CAAX(低、中、高)を発現する安定した系に形質移入して、またはrGFP-CAAX構築物と共に、HEK293細胞に同時形質移入して、BRET供与体と受容体の異なる比を試験した。MC4Rの細胞表面発現のPC媒介救出を、図17に示されているように、BRET2によって評価した。提示されたデータは、より高いレベルのrGFPを発現する安定した細胞系によって、より良好な応答を得ることができることを示している。これらの安定した細胞系を使用して、受容体-RlucII及びrGFP-CAAXの両方を発現する細胞系を確立することができ、これはスクリーニング用途にとって有用である。

#### 【0208】

実施例11: イオンチャネルのPC媒介細胞表面救出を検出するバイオセンサー

BRETに基づいたPC場界細胞表面発現アッセイをhERGと結合する薬物の特定及び特徴決定に使用できるかを確認するため、RlucII標識化構築物を、hERGのWT配列及び既知の細胞内に留まる突然変異体(G601S)を使用して作成し、細胞表面

10

20

30

40

50

発現のアステミゾール媒介救出について試験した(図18A及びB)。用量応答曲線は、wt-hERG(図18C)及び突然変異体(図18D)構築物を用いて、異なる有効性及び効力でhERGに対してリガンド及び薬理学的シャペロンとして作用することが知られている薬物によって得た。用量応答曲線の特徴は、ELISAに基づいた阿世にから得たデータに匹敵した((HERG-Lite:Wible BA et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2005, 52(1):136-45)。hERG-(G601S)を使用して得たZ'値(図18E)は、このBRETに基づいたアッセイが、堅牢であり、HTSなどのハイスループット用途に使用して、異なる天然に生じる突然変異hERGの細胞表面発現を救出することができるhERGシャペロンを特定すること、またはhERG結合を介して媒介されるオフターゲット効果を有することができる薬物を特定すること、が可能である。

10

#### 【0209】

実施例12:GPCRへの-アレスチン動員をモニターするバイオセンサー

次に、GPCR(すなわち、GPCRが局在化している形質膜)への-アレスチン(-arr)動員をモニターすることが可能であるかを、形質膜における受容体と比べた供与体の濃度/密度の変化に依存するBRETバイオセンサーの使用によって試験した。図19Aに示されているように、BRET受容体(例えば、GFP)に、PM標的化部分を標識し(したがって、BRET受容体をPMに繋ぎ止め)、-アレスチンに、BRET供与体(例えば、RLucII)を標識する。GPCR作動薬の存在下では、-アレスチンはGPCRへ動員され、したがって形質膜でのRLucII--アレスチンの濃度が増加し、このことはRLucIIとPM標識化GFPとの間のエネルギー転移(BRET)の増加をもたらす。

20

#### 【0210】

図19B及び19Cは、イソプロテレノール(iso)及びAVPそれぞれの増加用量による刺激の後、-アレスチンに低い親和性を有するクラスA受容体 $\mu_2$ AR(図19B及び19C)と-アレスチンに高い親和性を有するクラスB受容体 $V_2$ R(図19D及び19E)の2つの異なるGPCRによる、-アレスチン $_1$ (図19B及び19D)ならびに-アレスチン $_2$ (図19C及び19E)のBRET比の増加を示す。この結果は、適切なBRETシグナルが、異なるPM標的化部分(GRK5の多塩基ドメインなどの非脂質に基づいた標的化部分を含む)及び異なるBRET受容体を使用して得られること、最適なシグナルが、BRET受容体としてCAAX(Kras)PM標的化部分及びrGFPを使用して得られることを示している(三角)。図19Fは、rGFP-CAAX、LynまたはPBを有するarr-RLucIIを使用すると、全て、GFP10-CAAXなどの伝統的なRLucII:GFP10BRET対よりも大きなBRET応答を生じたことを示している。この-アレスチン動員をモニターするアッセイは、有利なことに、受容体の修飾を必要とせず、クラスA及びBの両方の授与体にとって(HTSを含む)スクリーニング用途に適応性がある堅牢なアッセイももたらす(少なくとも0.74のZ'値、図19G及びH)。図21A~21Eは、例えば膜抽出物における実験の実施を可能にする、単分子バイオセンサーを使用した-アレスチン移行の評価を示す。300個のアミノ酸の可動性ポリペプチドリンカーは、短いポリペプチドリンカーと比べて良好なBRETシグナルを提供した(図21C)。

30

40

#### 【0211】

実施例13:形質膜におけるPI(4,5)P<sub>2</sub>の量をモニターするバイオセンサー

バイオセンサーを適用して、PLC $_1$ -PHドメインを使用する膜PI(4,5)P<sub>2</sub>生成を検出した。基礎状態では、PLC $_1$ -PH-RLucII及び、PLC $_1$ -PH-rGFP(またはLyn-rGFPもしくはrGFP-CAAX)は、PI(4,5)P<sub>2</sub>が位置するPMに局在化し、それによって局所濃度/密度は検出可能なBRETシグナルを生成するのに十分に高くなる。ホスホリパーゼC(PLC)が、リガンドAngIIによるAT1Rの活性化を介して活性化される(したがって、PI(4,5)P<sub>2</sub>の加水分解が誘発される)とき、RLucII及びrGFPで標識されたPLC $_1$ -P

50



Hドメインはサイトゾルに拡散し、これによってrGFP及びRlucIIの局所濃度が低減され、したがってBRETシグナルが用量依存的に減少した(図20A及びB)。

#### 【0212】

実施例14：形質膜におけるジアシルグリセロール(DAG)をモニターするバイオセンサー

PLCを活性化すると、膜PIP<sub>2</sub>は、IP<sub>3</sub>及びDAGに加水分解される。イノシトール三リン酸はサイトゾルに拡散するが、DAGは、その疎水性のために形質膜に留まる。図22A及び23Aは、形質膜へのPKC(C1b)のジアシルグリセロール-(DAG-)結合ドメインの移行を測定する、バイオセンサーの概略図を示す。バイオセンサーは、BRET受容体(例えば、rGFP、GFP10)及びPKC、C1bのDAG結合ドメインに連結したBRET供与体(例えば、RlucII)に結合している、PM標的化ドメイン/部分を含む。PIP<sub>2</sub>の後の形質膜におけるDAG富化は、C1bドメインを膜に結合させ、BRET受容体(例えば、rGFP)及びBRET供与体(例えば、RlucII)を互いに近づけて、より高いBRETシグナルを誘発する。図22Aに描写されているバイオセンサーでは、BRET受容体及びBRET供与体構成成分は、一緒に連結されており(単分子バイオセンサー)、このことは、例えば膜抽出物における実験の実施を可能にし、これらの構成成分は、図23Aに描写されているバイオセンサーでは、別々に発現している。図22B~22H及び図23B~23Eに描写されている結果は、形質膜におけるDAG蓄積が、両方のバイオセンサーを使用してモニターされうること示している。図22Fは、N-(3-トリフルオロメチルフェニル)-2,4,6-トリメチルベンゼンスルホンアミド(m-3M3FBS)を使用するPLCの直接活性を示し、このことは、膜PIP<sub>2</sub>からIP<sub>3</sub>及びDAGへの加水分解を誘発し(したがって、膜におけるDAGの量を増加し)単分子バイオセンサーを使用して検出されるBRETシグナルの増加をもたらした。

#### 【0213】

実施例15：Gタンパク質サブユニット隔離をモニターするバイオセンサー

作動薬の不在下では、Gタンパク質サブユニットは形質膜に局在化する。作動薬(A)を使用したGPCR活性化を受けると、Gタンパク質サブユニットは、形質膜から放出される。BRET受容体(例えば、rGFP、GFP10)に結合しているPM標的化ドメイン/部分及びGタンパク質サブユニットに連結しているBRET供与体を使用して、PMからのGタンパク質サブユニットの放出によりもたらされるBRETシグナルの減少をモニターすることによって、GPCR活性化をモニターすることが可能である(図24A)。図24B及び24Cは、異なるRlucII標識化Gサブユニットを使用したイソプロテレノールによる1AR及び2ARそれぞれの活性化の後のBRET比の変化を示し、G<sub>1</sub>及びG<sub>11</sub>が主に1ARのシグナル伝達に関与し、G<sub>1</sub>が主に2ARのシグナル伝達に関与する証拠を提供している。図24D~24Hは、GPCRの作動薬刺激の後の異なる細胞区画への異なるGタンパク質サブユニットの隔離/移行が、バイオセンサーを使用してモニターされうること示している。

#### 【0214】

実施例16：RhoA活性化をモニターするバイオセンサー

Rho活性化についてのバイオセンサーは、形質膜に局在化するRho(Rho-GTP)の活性形態と結合するPKNのCRIBドメインの、形質膜への動員を、BRETを使用してモニターすることによって設計された。BRET対は、BRET供与体としてのPKNのRlucII標識化CRIBドメイン及び受容体としての形質膜結合rGFP(rGFP-CAAX)である(図25A)。図25B~25Gは、PKNのCRIBドメインが、Gq/12/13に結合したGPCRの作動薬刺激により形質膜に移行すること及び移行が、特異的Gq阻害剤の存在下で減少することを示している。図25H~25Jは、Rhoバイオセンサーを使用して測定した、BRET比に対するRho調節因子の効果を示している。BRET比は、Rho活性化剤の存在下で増加し、Rho阻害剤の存在下で減少し、アッセイの特異性が確認されている。

## 【0215】

実施例17：局在化／輸送バイオセンサーを使用したハイスループットスクリーニングによるAT1Rの制御因子の特定

arr2-RlucII及びrGFP-FYVEを有するAT1Rを使用し、115,000個をスクリーンして、エンドソームにおけるAT1RのAngII媒介局在化を増強または阻害する化合物をBRETアッセイにより特定した。30個の増強剤及び42個の阻害剤が特定された(図27A)。図27Bは、スクリーンで特定された化合物番号21(Traf21)が、未処理で作動薬刺激された細胞と比較して、エンドソームへのB2R-YFPまたはarr2-YFPの標的化をブロックすることを示している。図27Cは、スクリーンで特定された化合物番号10(Traf10)及び番号29(Traf29)が、未処理で作動薬刺激された細胞と比較して、エンドソームへのB2R-YFPまたはarr2-YFPの標的化を増強したことを示している。これらの結果は、本明細書に記載されているバイオセンサーを使用して、ハイスループットスクリーニングによりタンパク質局在化／輸送の制御因子(例えば、作動薬、拮抗薬)を特定できることを示している。

10

## 【0216】

本発明は、本明細書上記において、特定の実施形態によって記載されてきたが、添付されている特許請求の範囲に定義される発明の主題の精神及び性質から逸脱することなく、変更することができる。特許請求の範囲において、語「comprising(含む)」は、制約のない用語として使用され、語句「including, but not limited to(含まれるが、これらに限定されない)」と実質的に同等である。単数形「a」、「an」及び「the」には、特に文脈により明確に指示されない限り、対応する複数対象を含む。

20

## 【0217】

## 参考文献

Claing, A., S. A. Laporte, et al. (2002). "Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins." *Prog Neurobiol* 66(2): 61-79.

30

Hanyaloglu, A. C. and M. von Zastrow (2008). "Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 537-568.

Hunyady, L. and K. J. Catt (2006). "Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II." *Mol Endocrinol* 20(5): 953-970.

40

Molinari, P., I. Casella, et al. (2008). "Functional complementation of high-efficiency resonance energy transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells." *Biochem J* 409(1): 251-261.

Posner, B. I. and S. A. Laporte (2010). "Cellular signalling: Peptide hormones and growth factors." *Prog Brain Res* 181: 1-16.

Toth, D. J., J. T. Toth, et al. (2012). "Acute

50

depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor." *J Cell Sci* 125(Pt 9):2185-2197.

Ward, W.W. and H.H. Seliger (1976). "Action spectrum and quantum yield for the photoinactivation of mnemiopsin, a bioluminescent photoprotein from the Ctenophore mnemiopsis SP." *Photochem Photobiol* 23(5):351-363.

P. Rene et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Dec;335(3):520-32

Morello, J.P., et al., *J Clin Invest*, 2000. 105(7):p.887-95

Wible BA et al. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005, 52(1):136-45

Serradeil-Le Gal C. *Cardiovasc Drug Rev*. 2001, 19(3):201-14

Anborgh, P.H., J.L. Seachrist, et al. (2000). "Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors." *Mol Endocrinol* 14(12):2040-2053.

Barberis, C., S. Audigier, et al. (1992). "Pharmacology of oxytocin and vasopressin receptors in the central and peripheral nervous system." *Ann N Y Acad Sci* 652:39-45.

Fessart, D., M. Simaan, et al. (2005). "c-Src regulates clathrin adapter protein 2 in interaction with beta-arrestin and the angiotensin II type 1 receptor during clathrin-mediated internalization." *Mol Endocrinol* 19(2):491-503.

Gaborik, Z., M. Szaszak, et al. (2001). "Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor." *Mol Pharmacol* 59(2):239-247.

Goupil, E., V. Wisehart, et al. (2012). "Biasing the prostaglandin F2alpha receptor responses toward EGFR-dependent transactivation of MAPK." *Mol Endocrinol* 26(7):1189-1202.

Hein, L., L. Meinel, et al. (1997). "Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand." *Mol Endocrinol* 11(9):1266-1277.

10

20

30

40

50

Hunyady, L., A. J. Baukal, et al. (2002). "Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor." *J Cell Biol* 157(7):1211-1222.

Innamorati, G., H. M. Sadeghi, et al. (1998). "A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5):2222-2226.

Li, H. H. F. Li, et al. (2008). "Rab4 and Rab11 coordinately regulate the recycling of angiotensin II type I receptor as demonstrated by fluorescence resonance energy transfer microscopy." *J Biomed Opt* 13(3):031206.

Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (2000). "Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors." *J Biol Chem* 275(22):17201-17210.

Quoyer, J., J. M. Janz, et al. (2013). "Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(52):E5088-5097.

Seachrist, J. L. and S. S. Ferguson (2003). "Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases." *Life Sci* 74(2-3):225-235.

Tsao, P., T. Cao, et al. (2001). "Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* 22(2):91-96.

Tsao, P. I. and M. von Zastrow (2000). "Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis." *J Biol Chem* 275(15):11130-11140.

Zhang, J., L. S. Barak, et al. (1999). "Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes." *J Biol Chem* 274(16):10999-11006.

Zhang, J., S. S. Ferguson, et al. (1996). "Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization." *J Biol Chem* 271(31):18302-18305.

Zimmerman, B., A. Beutrait, et al. (2012). "

10

20

30

40

50

Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs." *Sci Signal* 5(221):ra33.

Zimmerman, B., M. Simaan, et al. (2011). "Role of ssarrestins in bradykinin B2 receptor-mediated signalling." *Cell Signal* 23(4):648-659.

【図 1 A】

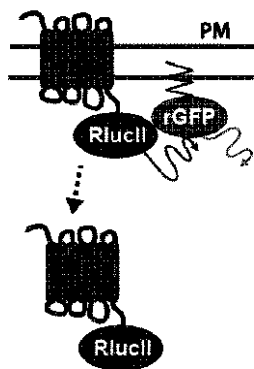


FIG. 1A

【図 1 B】

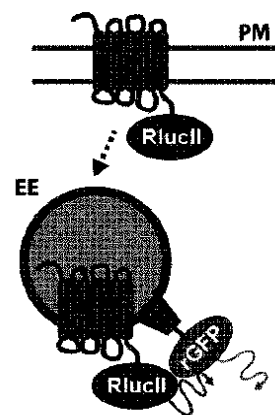


FIG. 1B

【図 1 C】

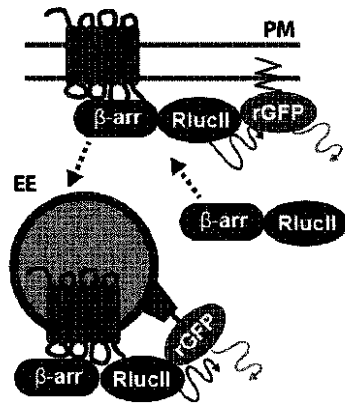


FIG. 1C

【図 1 D】

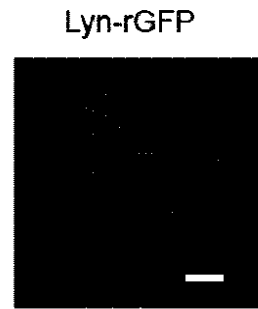
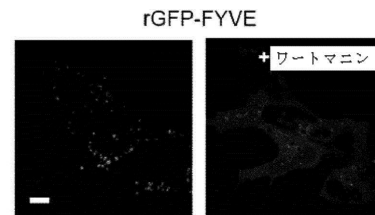


FIG. 1D

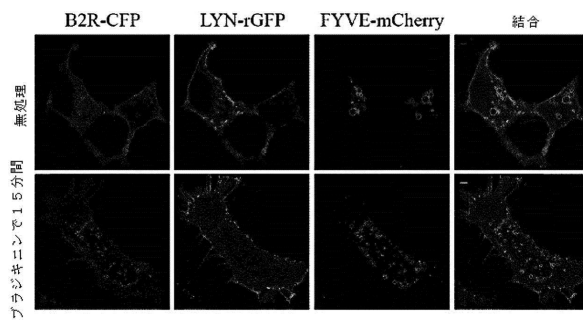
【図 1 E】

図 1 E



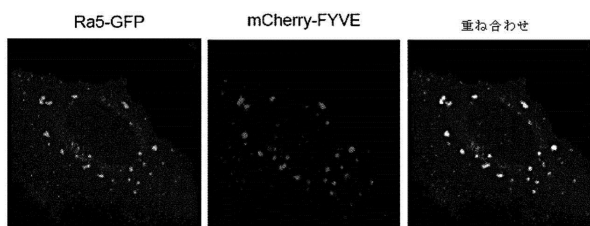
【図 1 F】

図 1 F



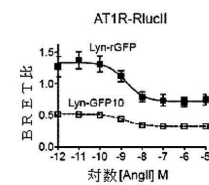
【図 1 G】

図 1 G



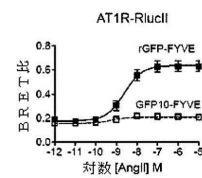
【図 2 A】

図 2 A



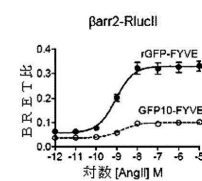
【図 2 B】

図 2 B



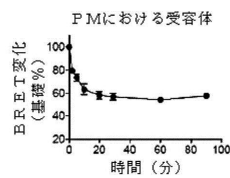
【図 2 C】

図 2 C



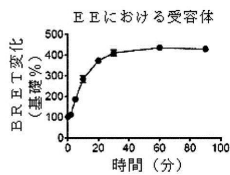
## 【図 2 D】

図 2 D



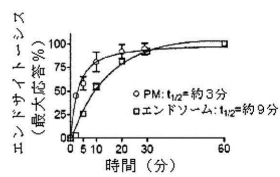
## 【図 2 E】

図 2 E



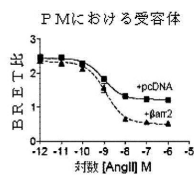
## 【図 2 F】

図 2 F



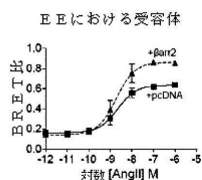
## 【図 3 D】

図 3 D



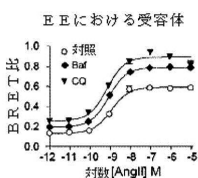
## 【図 3 E】

図 3 E



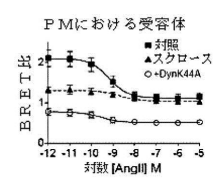
## 【図 3 F】

図 3 F



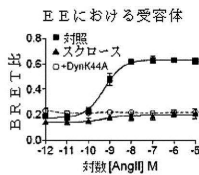
## 【図 3 A】

図 3 A



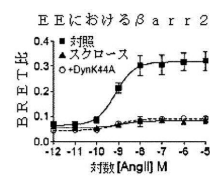
## 【図 3 B】

図 3 B



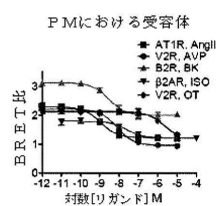
## 【図 3 C】

図 3 C



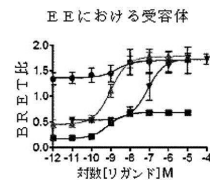
## 【図 4 A】

図 4 A



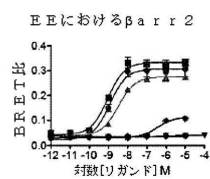
## 【図 4 B】

図 4 B



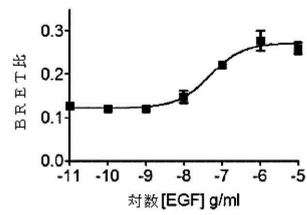
## 【図 4 C】

図 4 C



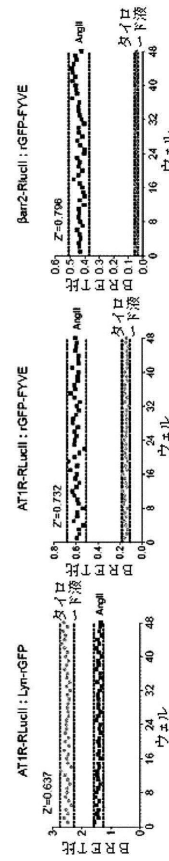
## 【図 4 D】

図 4 D



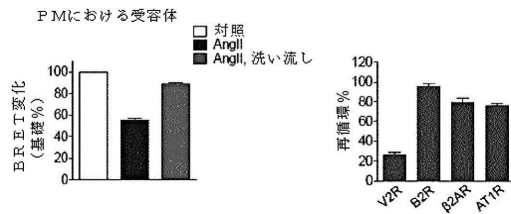
## 【図 4 E】

図 4 E



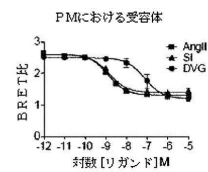
## 【図 5 A - B】

図 5 A-B



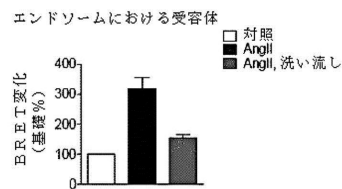
## 【図 6 B】

図 6 B



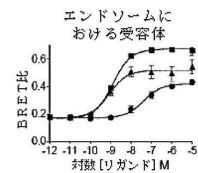
## 【図 5 C】

図 5 C



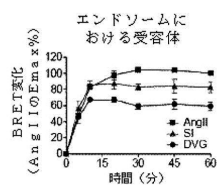
## 【図 6 C】

図 6 C



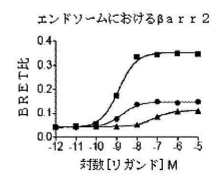
## 【図 6 A】

図 6 A



## 【図 6 D】

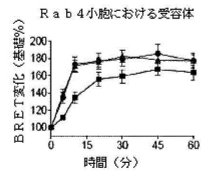
図 6 D





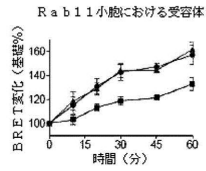
## 【図 6 E】

図 6 E



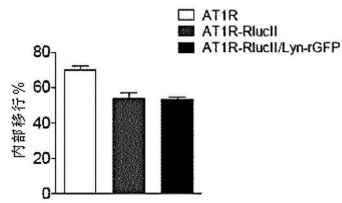
## 【図 6 F】

図 6 F



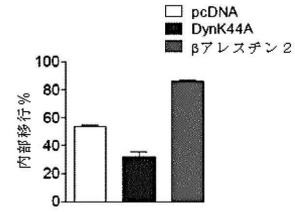
## 【図 7 A】

図 7 A



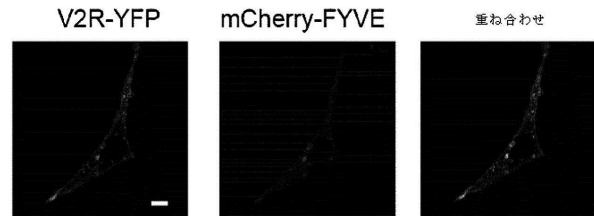
## 【図 7 B】

図 7 B



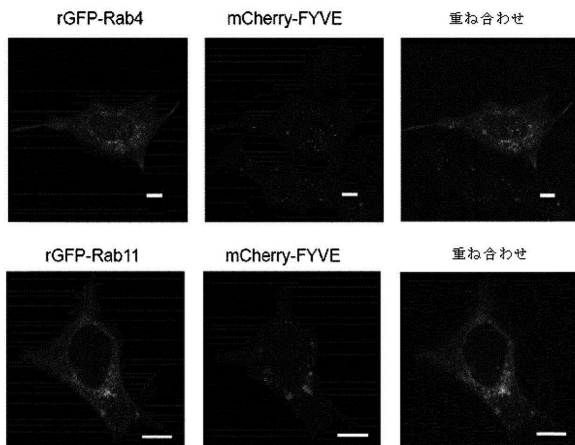
## 【図 8】

図 8



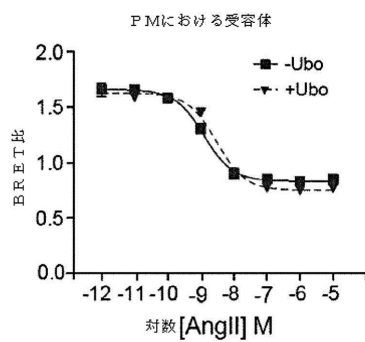
## 【図 9 A】

図 9 A



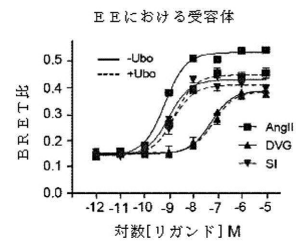
## 【図 9 B】

図 9 B



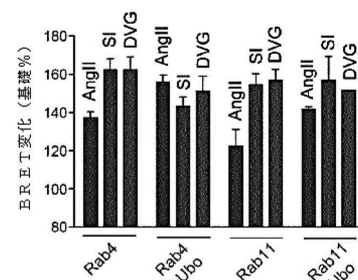
## 【図 9 C】

図 9 C



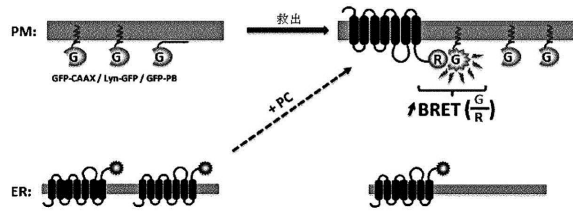
## 【図 9 D】

図 9 D



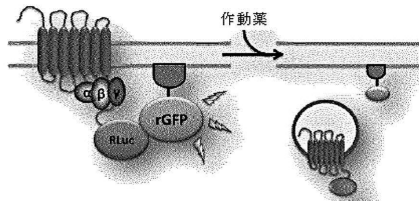
【図10A】

図10A



【図10B】

図10B



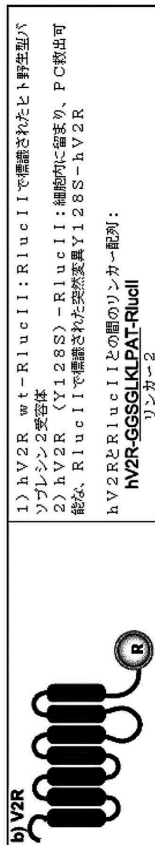
【図11A】

図11A



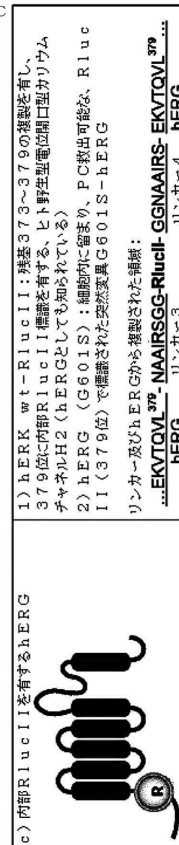
【図11B】

図11B



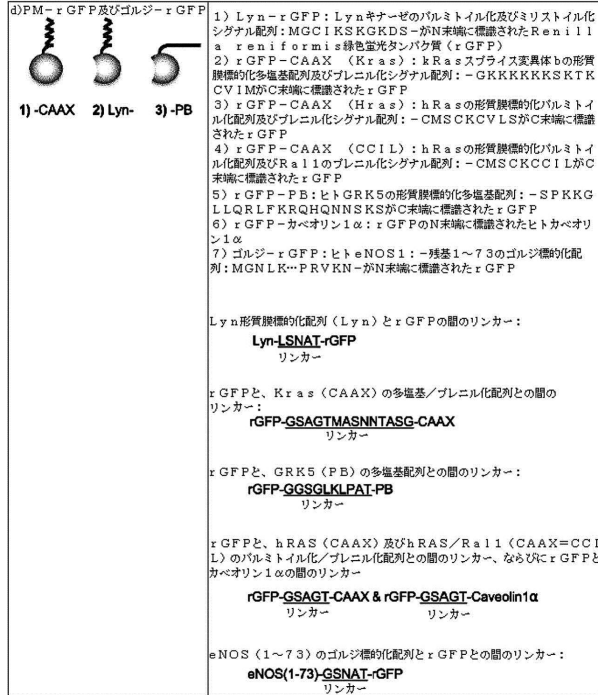
【図11C】

図11C



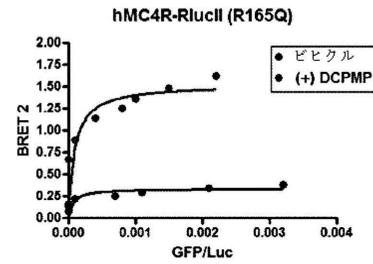
## 【図 1 1 D】

図 1 1 D



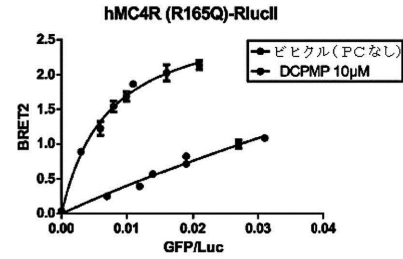
## 【図 1 2 A】

図 1 2 A



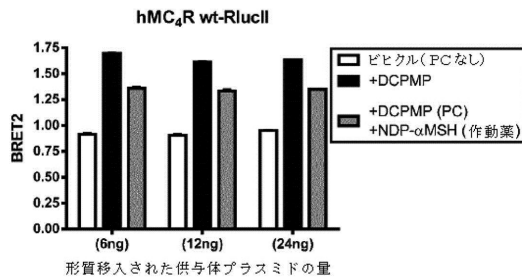
## 【図 1 2 B】

図 1 2 B



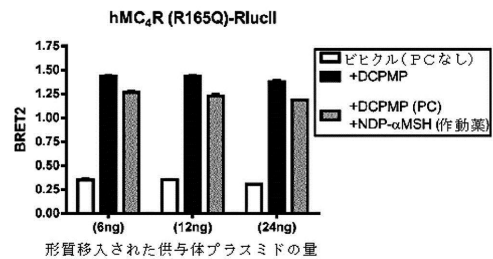
## 【図 1 3 A】

図 1 3 A



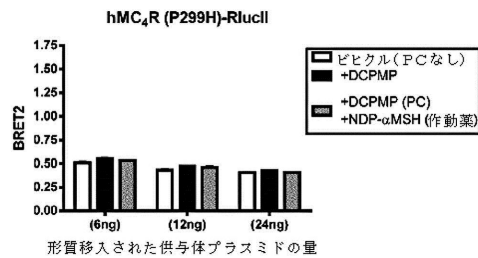
## 【図 1 3 C】

図 1 3 C



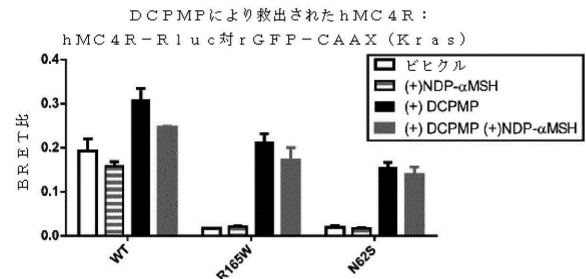
## 【図 1 3 B】

図 1 3 B



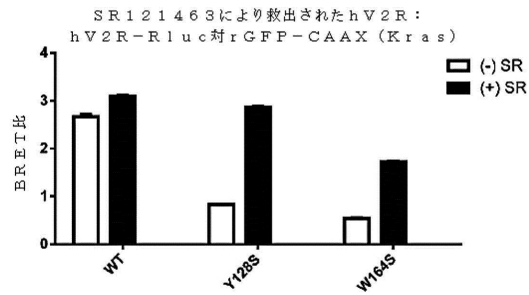
## 【図 1 3 D】

図 1 3 D



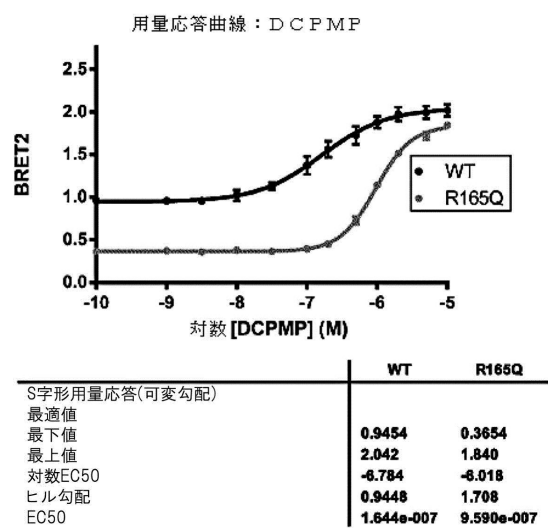
【図 1 3 E】

図 1 3 E



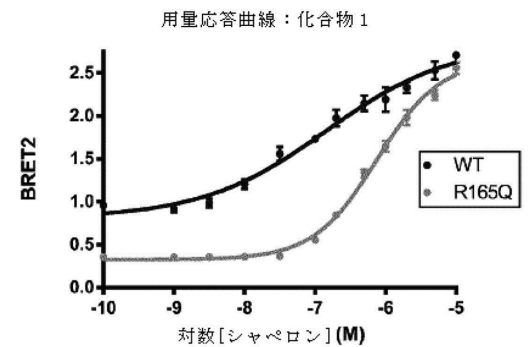
【図 1 4 A】

図 1 4 A



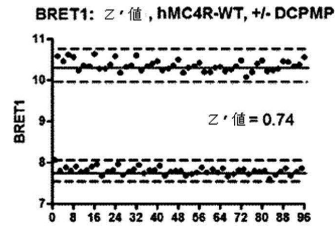
【図 1 4 B】

図 1 4 B



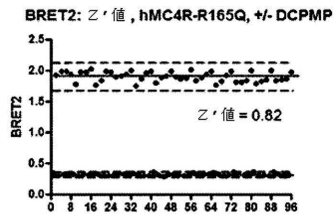
【図 1 5 B】

図 1 5 B



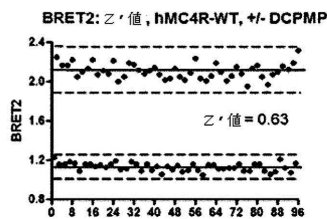
【図 1 5 C】

図 1 5 C



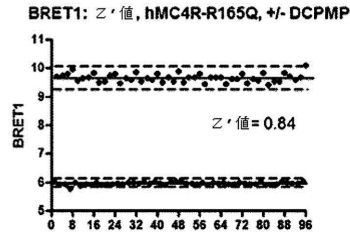
【図 1 5 A】

図 1 5 A



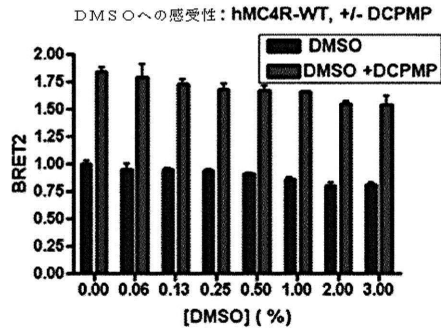
## 【図 15 D】

図 15 D



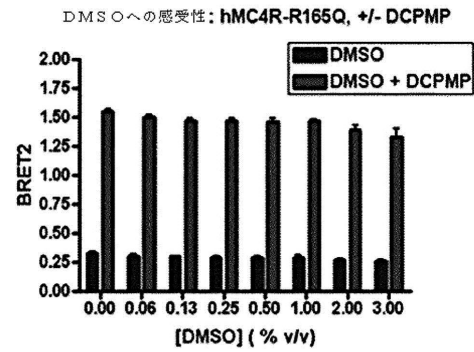
## 【図 16 A】

図 16 A



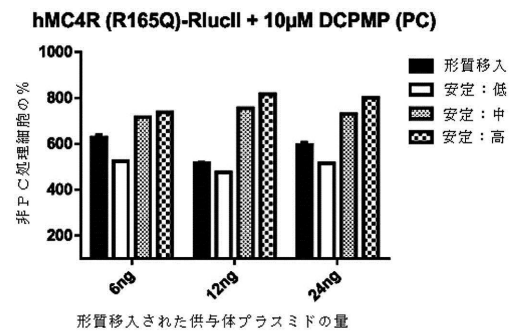
## 【図 16 B】

図 16 B



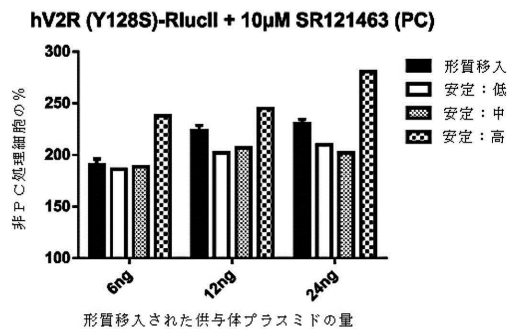
## 【図 17 A】

図 17 A



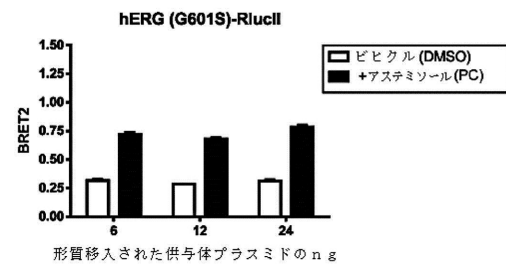
## 【図 17 B】

図 17 B



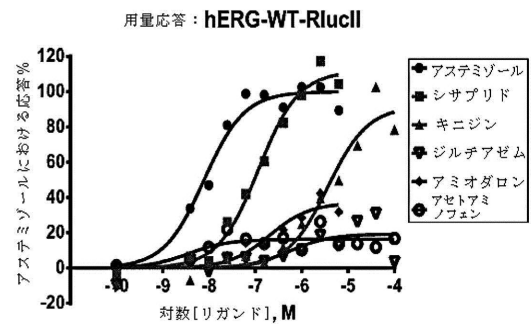
## 【図 18 B】

図 18 B



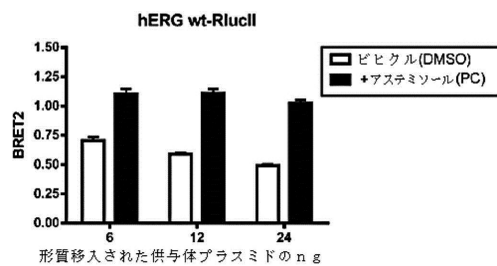
## 【図 18 C】

図 18 C



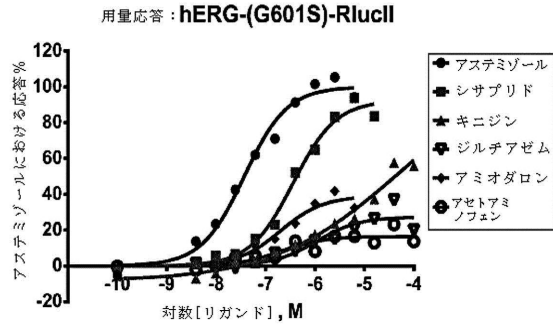
## 【図 18 A】

図 18 A



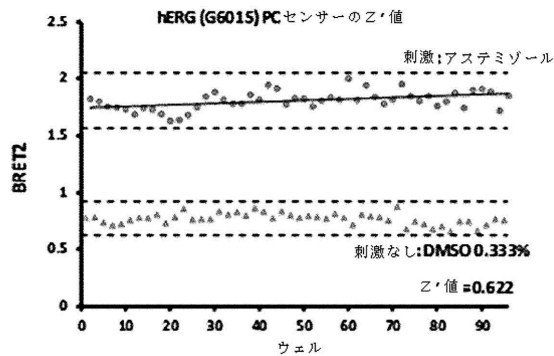
## 【図18D】

図18D



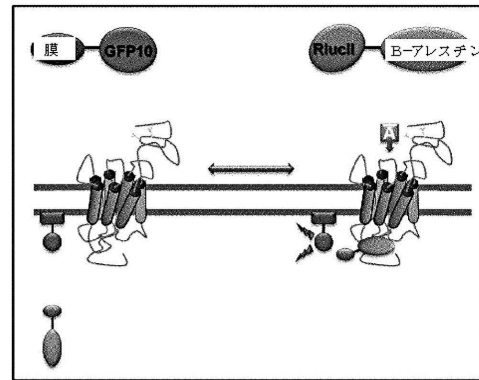
## 【図18E】

図18E



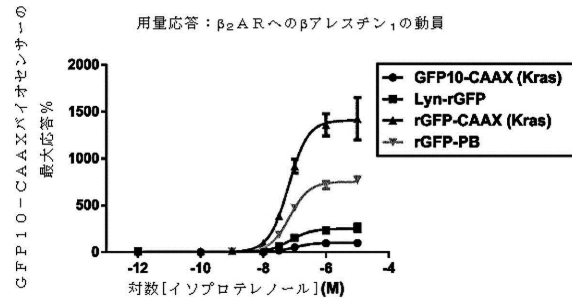
## 【図19A】

図19A



## 【図19B】

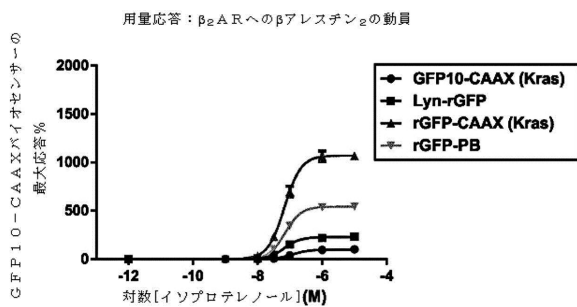
図19B



	GFP10-CAAX	Lyn-rGFP	rGFP-CAAX	rGFP-PB
対数EC50	-7.040	-7.130	-7.192	-7.156

## 【図19C】

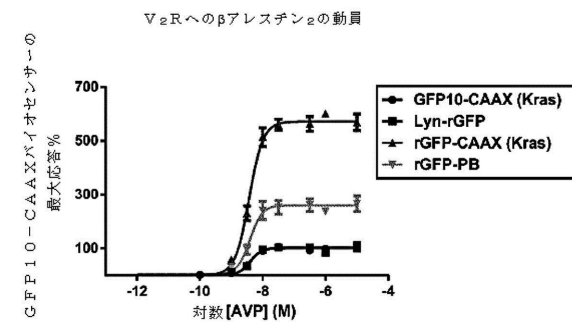
図19C



	GFP10-CAAX	Lyn-rGFP	rGFP-CAAX	rGFP-PB
対数EC50	-6.912	-7.170	-7.164	-7.145

## 【図19E】

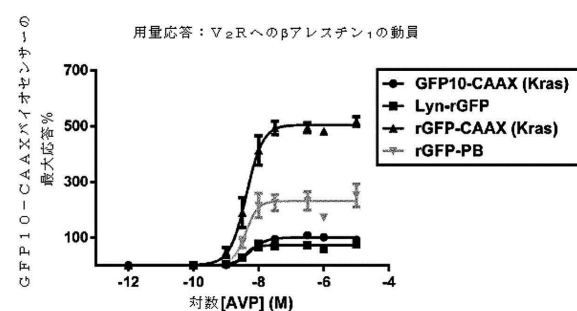
図19E



	GFP10-CAAX	Lyn-rGFP	rGFP-CAAX	rGFP-PB
対数EC50	-8.403	-8.378	-8.429	-8.404

## 【図19D】

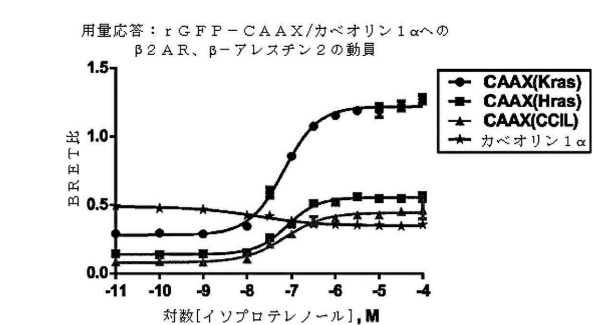
図19D



	GFP10-CAAX	Lyn-rGFP	rGFP-CAAX	rGFP-PB
対数EC50	-8.260	-8.432	-8.375	-8.395

## 【図19F】

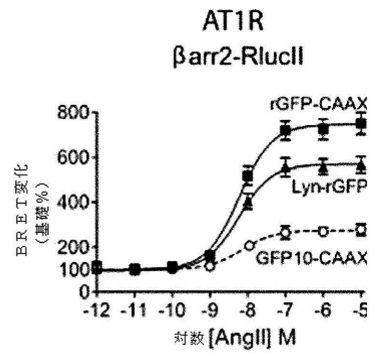
図19F



	CAAX(Kras)	CAAX(CCIL)	CAAX(Hras)	カベオリン1 $\alpha$
対数EC50	-7.179	-7.155	-7.103	-7.767

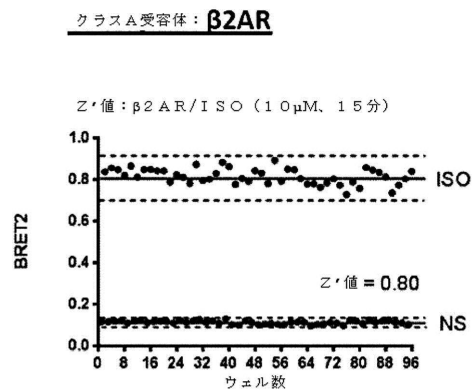
## 【図19G】

図19G



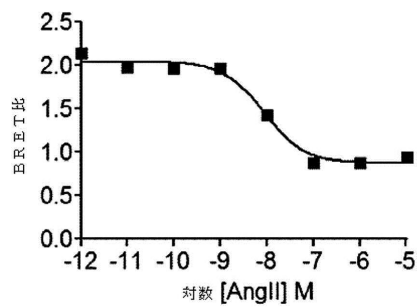
## 【図19H】

図19H



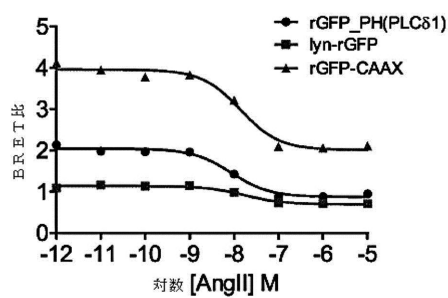
## 【図20A】

図20A



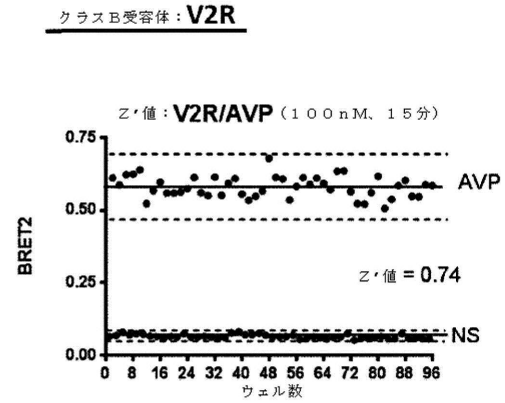
## 【図20B】

図20B



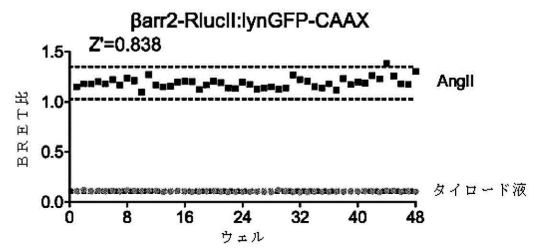
## 【図19I】

図19I



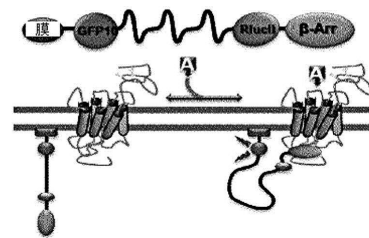
## 【図19J】

図19J



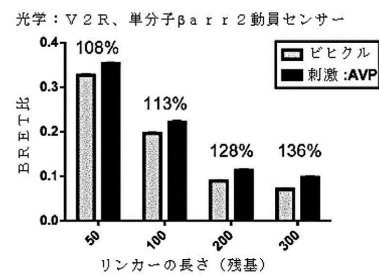
## 【図21A】

図21A



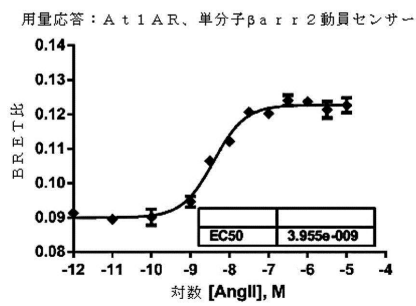
## 【図21B】

図21B



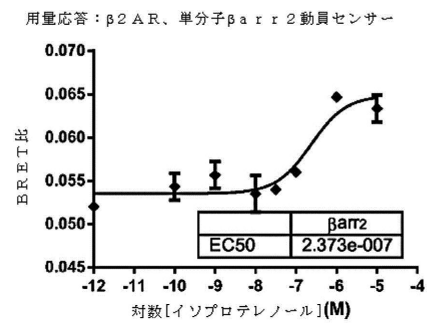
## 【図 2 1 C】

図 2 1 C



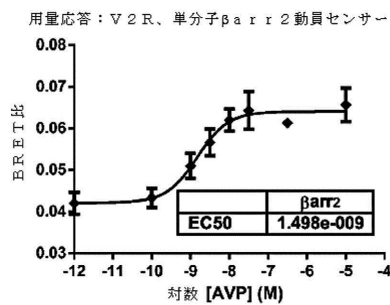
## 【図 2 1 E】

図 2 1 E



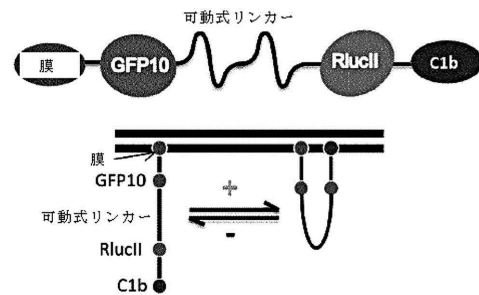
## 【図 2 1 D】

図 2 1 D



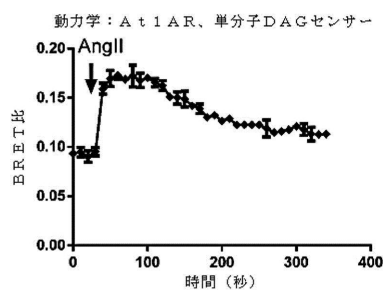
## 【図 2 2 A】

図 2 2 A



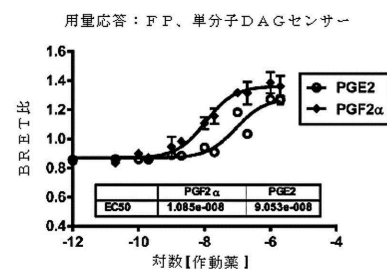
## 【図 2 2 B】

図 2 2 B



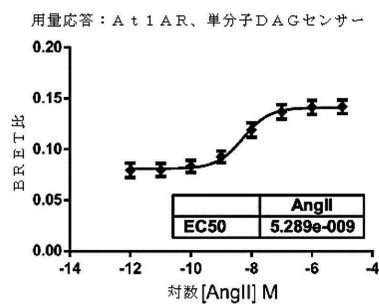
## 【図 2 2 D】

図 2 2 D



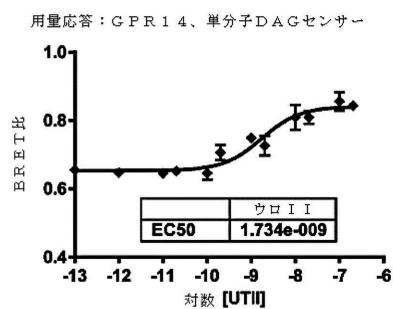
## 【図 2 2 C】

図 2 2 C



## 【図 2 2 E】

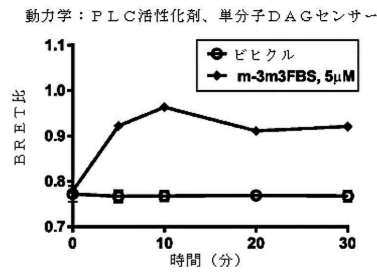
図 2 2 E





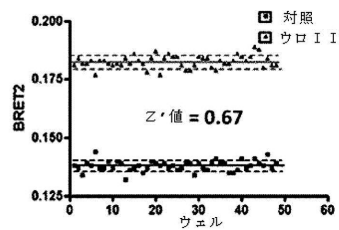
## 【図 2 2 F】

図 2 2 F



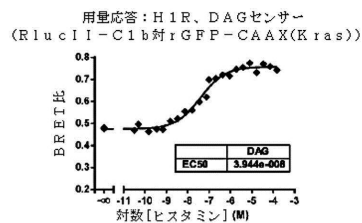
## 【図 2 2 G】

図 2 2 G



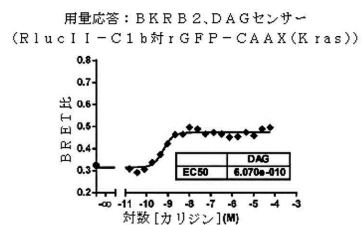
## 【図 2 3 B】

図 2 3 B



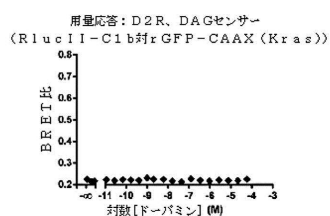
## 【図 2 3 C】

図 2 3 C



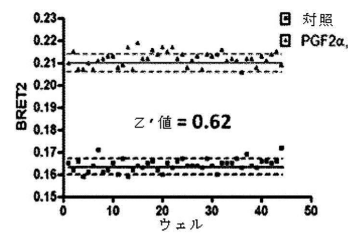
## 【図 2 3 D】

図 2 3 D



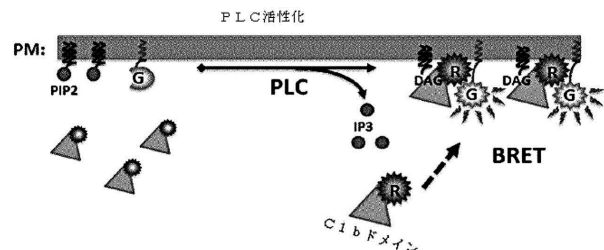
## 【図 2 2 H】

図 2 2 H



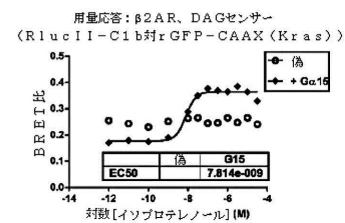
## 【図 2 3 A】

図 2 3 A



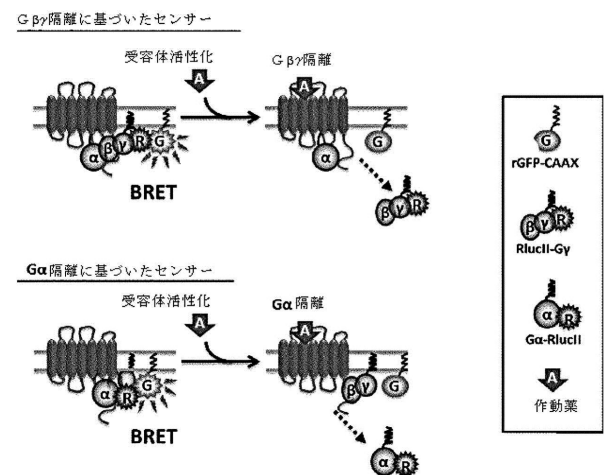
## 【図 2 3 E】

図 2 3 E



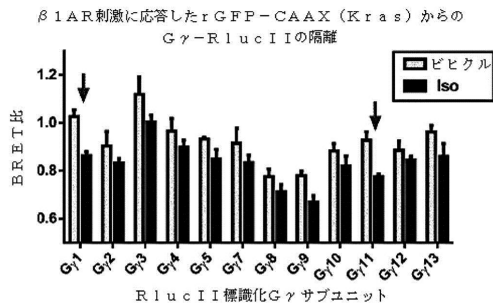
## 【図 2 4 A】

図 2 4 A



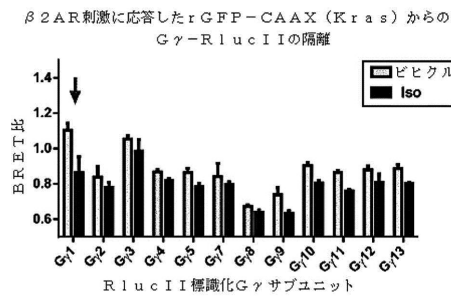
## 【図 2 4 B】

図 2 4 B



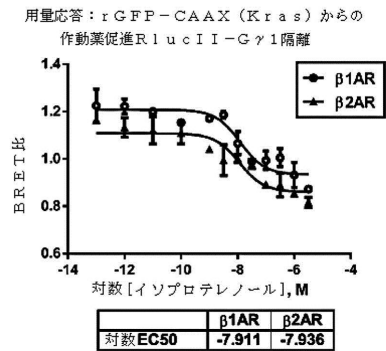
## 【図 2 4 C】

図 2 4 C



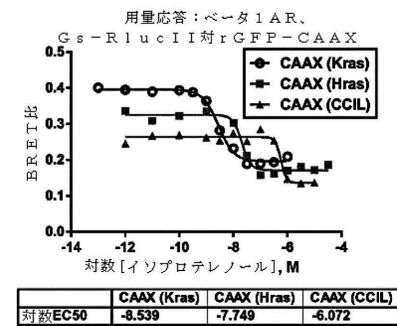
## 【図 2 4 D】

図 2 4 D



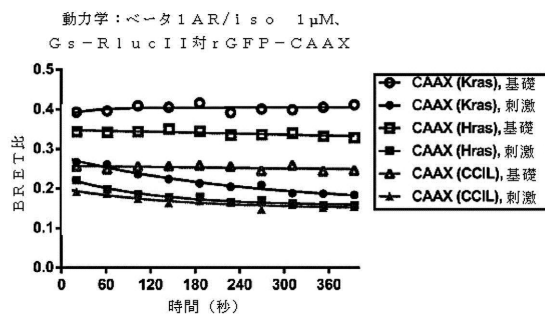
## 【図 2 4 E】

図 2 4 E



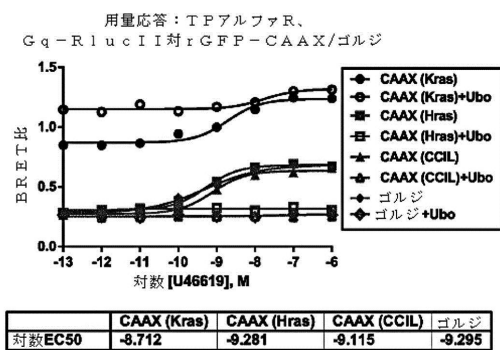
## 【図 2 4 F】

図 2 4 F



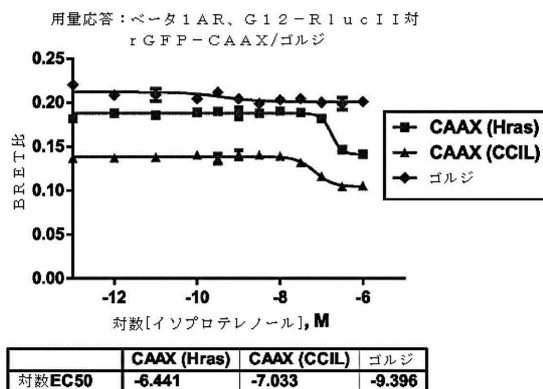
## 【図 2 4 H】

図 2 4 H



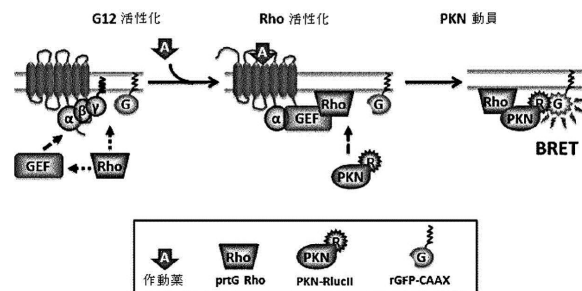
## 【図 2 4 G】

図 2 4 G



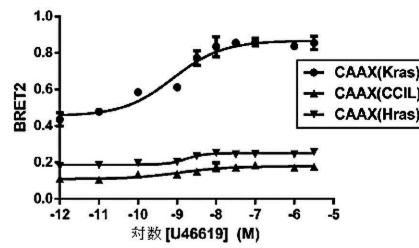
## 【図 2 5 A】

図 2 5 A



## 【図 25 B】

図 25 B

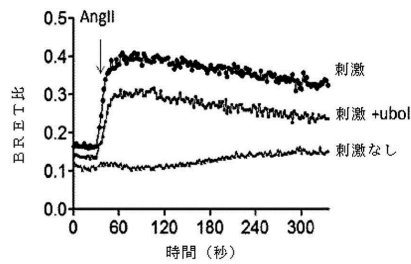
用量応答: TP $\alpha$ R、PKN-RlucII 対 rGFP-CAAX

	CAAX(Kras)	CAAX(CCIL)	CAAX(Hras)
対数EC50	-9.107	-8.943	-8.773

## 【図 25 C】

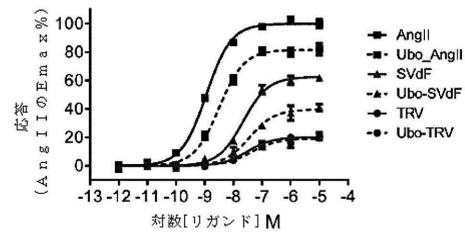
図 25 C

At1AR 刺激への PKN センサーの応答の動力学



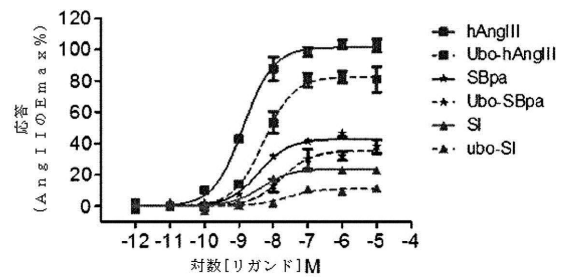
## 【図 25 D】

図 25 D

用量応答: At1AR、Rho 活性化センサー:  
PKN-RlucII 対 rGFP-CAAX (Kras)

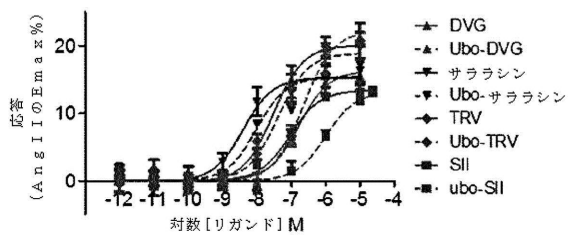
## 【図 25 E】

図 25 E



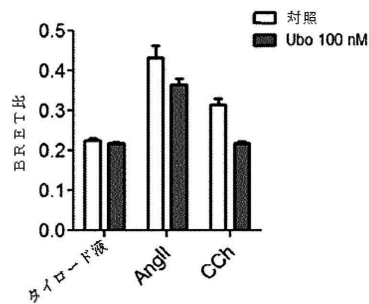
## 【図 25 F】

図 25 F



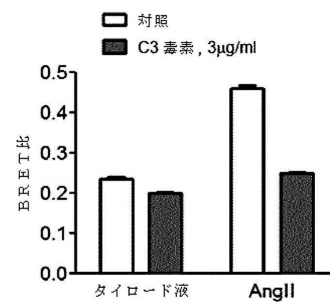
## 【図 25 G】

図 25 G



## 【図 25 H】

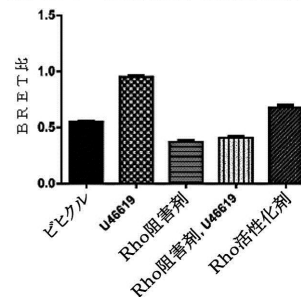
図 25 H



## 【図 25 I】

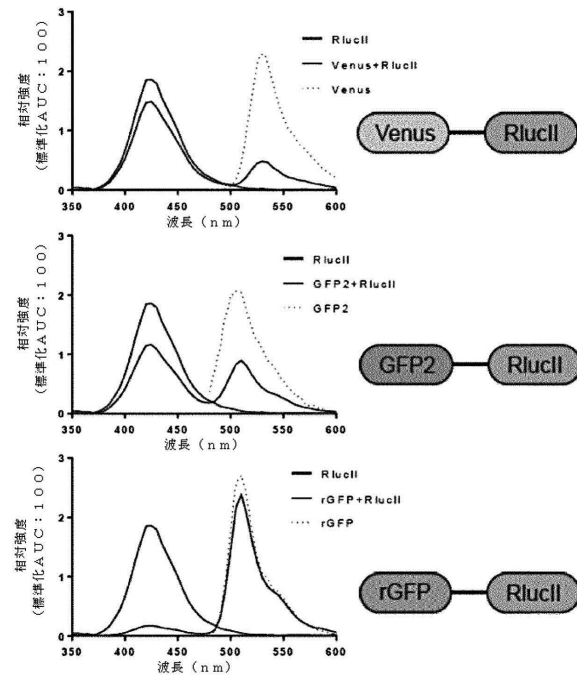
図 25 I

PKN センサーの応答に対する Rho 調節因子の効果



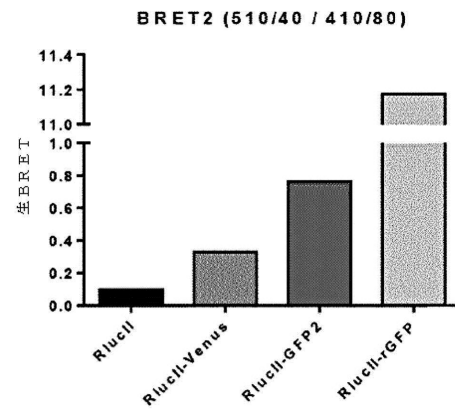
## 【図 26 A】

図 26 A



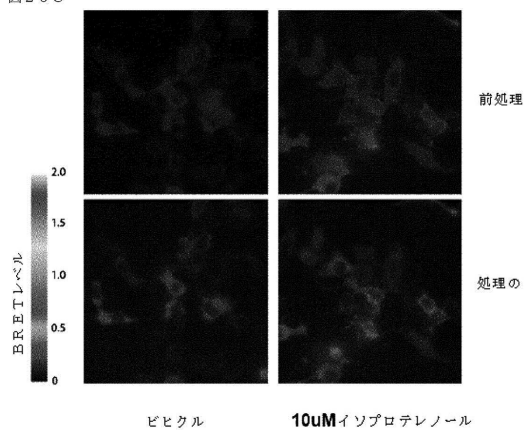
## 【図 26 B】

図 26 B



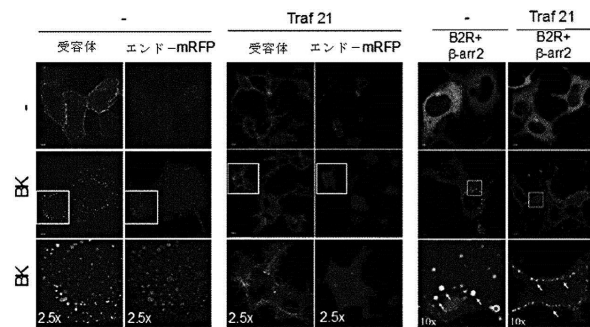
## 【図 26 C】

図 26 C



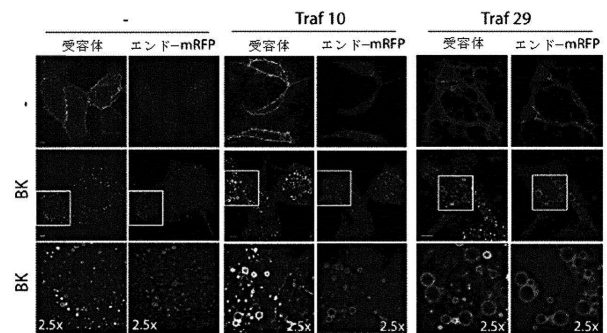
## 【図 27 B】

図 27 B



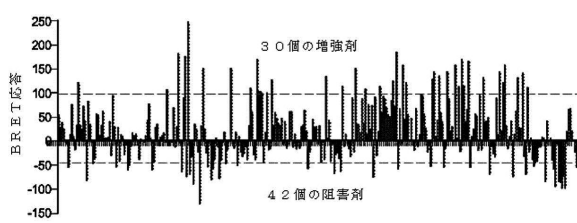
## 【図 27 C】

図 27 C



## 【図 27 A】

図 27 A



【配列表】

0006708633000001.app

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- |         |       |           |         |       |
|---------|-------|-----------|---------|-------|
| C 1 2 N | 1/21  | (2006.01) | C 1 2 N | 1/21  |
| 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  |
| C 0 7 K | 1/13  | (2006.01) | C 0 7 K | 1/13  |
| C 0 7 K | 19/00 | (2006.01) | C 0 7 K | 19/00 |
- (74)代理人 100077517  
弁理士 石田 敬
- (74)代理人 100087871  
弁理士 福本 積
- (74)代理人 100087413  
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100197169  
弁理士 柴田 潤二
- (72)発明者 ステファヌ アラン ラポルト  
カナダ国, ケベック アシュ 2 ベ 2 テ 8 , ウトルモン, アブニュ プラット 8 3 8
- (72)発明者 ユン ナムグン  
カナダ国, ケベック アシュ 9 エール 5 ジ 5 , ポワント - クレア, アブニュ ショセ 1 1 1
- (72)発明者 ミシェル ブピエ  
カナダ国, ケベック アシュ 3 テ 1 ベ 7 , モントリオール, シュマン ドゥ ラ コート - サン  
ト - カトリーヌ 2 7 0 2
- (72)発明者 クリスチャン ルグイユ  
カナダ国, ケベック ジ 1 ウ 3 ペ 4 , モントリオール, クリストフ コロン 1 0 5 1 4
- (72)発明者 ミレイユ オーゲ  
カナダ国, ケベック アシュ 7 セ 1 ウ 5 , ラバル, リュ ドゥ ラ ファブリック 5 1 9 5
- (72)発明者 ビクトリヤ ルカシェバ  
カナダ国, ケベック アシュ 9 エール 4 ア 3 , ポワント - クレア, ドゥルマル アブニュ 4 6  
7
- (72)発明者 小林 弘幸  
カナダ国, ケベック アシュ 2 アシュ 1 イグレック 9 , モントリオール, リュ シャボ 5 2 3  
9
- (72)発明者 ドニ ドブロワ  
カナダ国, ケベック アシュ 2 エム 1 エス 8 , モントリオール, リュ バジル - ルティエ, 8 7  
4 5
- (72)発明者 エティエンヌ ドウレット  
カナダ国, ケベック ジ 7 イグレック 3 ベ 3 , サン - ジェローム, リュ ブリエール, 3 0 2

審査官 三好 貴大

- (56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 1 6 4 2 9 ( J P , A )  
特表 2 0 1 3 - 5 1 2 6 6 4 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 0 5 / 1 0 5 8 5 0 ( W O , A 1 )  
LAN, T.-H. et al., Sensitive and High Resolution Localization and Tracking of Membrane

Proteins in Live Cells with BRET, *Traffic*, 2012年, Vol. 13, pp. 1450-1456  
MOLINARI, P. et al., Functional complementation of high-efficiency resonance energy transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells, *Biochemical Journal*, 2008年, Vol. 409, pp. 251-261  
BALLA, A. et al., Demonstration of Angiotensin II-induced Ras Activation in the trans-Golgi Network and Endoplasmic Reticulum Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer-based Biosensors, *the Journal of Biological Chemistry*, 2010年11月, Vol. 286, No. 7, pp. 5319-5327

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )