

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年8月23日(23.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/111772 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/053705
- (22) 国際出願日: 2012年2月16日(16.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-032378 2011年2月17日(17.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人東京医科歯科大学(National University
Corporation Tokyo Medical and Dental University)
[JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番
45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 石井 智浩
(ISHII, Tomohiro) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区

湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科
歯科大学内 Tokyo (JP). 中田 隆夫(NAKATA,
Takao) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁
目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学
内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 正林 真之(SHOBAYASHI, Masayuki); 〒
1000005 東京都千代田区丸の内1-7-1 2
サピアタワー Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: POLYPEPTIDE, ISOLATED NUCLEIC ACID, RECOMBINANT VECTOR, GENE TRANSFER KIT, TRANSFORM-
ANT, AND METHOD FOR REGULATING INTRACELLULAR CALCIUM SIGNALING

(54) 発明の名称: ポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、お
よび細胞内カルシウムシグナルの調節方法

【図1】

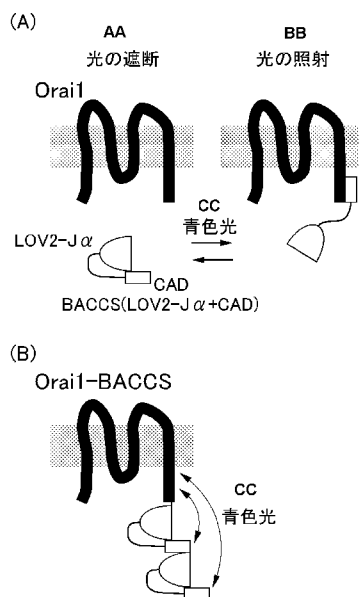


FIG. 1:
AA LIGHT BLOCKAGE
BB LIGHT IRRADIATION
CC BLUE LIGHT

(57) Abstract: Provided is a polypeptide for the optical control of calcium signaling, the polypeptide allowing for easy spatial control and manipulation of calcium signaling. This polypeptide is composed of an amino acid sequence including: an LOV2 domain composed of SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO: 1; a Jα domain composed of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or an amino acid sequence maintaining a function as an LOV2-Jα optical switch and having a predetermined mutation in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or 3; and SEQ ID NO: 4 or a CAD domain which is able to activate the calcium channel Orai1 and has a predetermined mutation in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; wherein the LOV2 domain, the Jα domain, and the CAD domain are arranged, from an N terminus to a C terminus, in the order of LOV2 domain, Jα domain, CAD domain, and wherein a polypeptide is used without an amino acid sequence interposed between the C terminus of the Jα domain and the N terminus of the CAD domain.

(57) 要約: カルシウムシグナルの空間的な制御および操作が容易な、カルシウムシグナルを光制御するポリペプチドを提供すること。配列番号1または配列番号1と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるLOV2領域と、配列番号2、配列番号3、またはLOV2-Jαの光スイッチとしての機能を維持し、かつ配列番号2もしくは3のアミノ酸配列において、所定の変異を有するアミノ酸配列からなるJα領域と、配列番号4、またはカルシウムチャネルOrai1を活性化でき、かつ、配列番号4のアミノ酸配列において、所定の変異を有するCAD領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、LOV2領域、Jα領域およびCAD領域は、N末端からC末端に向かって、LOV2領域、Jα領域およびCAD領域の順で配置され、Jα領域のC末端とCAD領域のN末端との間にアミノ酸配列が介在していないポリペプチドを使用する。



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

ポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、
形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調節方法

技術分野

[0001] 本発明は、カルシウムシグナルを光制御するポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調節方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、基礎医学研究において、細胞内シグナルの機能等の解明のために、光刺激によって細胞内シグナルを制御するシステムが使用されてきている（非特許文献1；非特許文献2）。例えば、神経機能研究の分野においては、このようなシステムとして、光刺激によって神経細胞の膜電位を変化させることができるチャンネルロドプシン2（バクテリア由来の光受容イオンチャンネル）が使用されている。

[0003] また、光刺激によって細胞内シグナルを制御するシステムとして、目的の細胞シグナルタンパク質の機能ドメインと、植物等に由来するタンパク質に含まれる光感受性領域とを融合することによって作製されたポリペプチドも使用される。このようなポリペプチドの具体的な例として、オートムギの光受容体タンパク質であるフォトロピン1由来の光感受性領域L O V 2 - J α と、動物の細胞骨格制御タンパク質R a c 1との融合タンパク質が挙げられる。当該融合タンパク質は、光の照射によって局所的に細胞の形態を変化させることができる（非特許文献3）。

[0004] 細胞内シグナルの中でも、カルシウムシグナルは、カルシウムチャンネルを介して、受精、細胞増殖、発生、学習と記憶、筋収縮および分泌等の様々な細胞機能において重要な作用を有することが知られており、生体内のほぼ全ての細胞において重要な機能を有する（非特許文献4）。そのため、カルシ

ウムシグナルを光刺激によって制御できるシステムの確立が熱望されており（非特許文献5）、このようなシステムの確立のために様々な試みがなされてきた。

- [0005] 光刺激によってカルシウムシグナルを制御する従来のシステムとしては、ケージドカルシウムを使用したシステムが挙げられる（非特許文献1；非特許文献2）。ケージドカルシウム等のケージド化合物は、光刺激によって分解される有機合成分子である。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Kramer, R. H., Fortin, D. L. & Trauner, D. New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 544–552 (2009)
- 非特許文献2: Rana, A. & Dolmetsch, R. E. Using light to control signaling cascades in live neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 617–622 (2010)
- 非特許文献3: Wu, Y. I. ら A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461, 104–108 (2009)
- 非特許文献4: Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21 (2000)
- 非特許文献5: Liu, X. & Tnegawa, S. Optogenetics 3.0. *Cell* 141, 22–24 (2010)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] ケージドカルシウムを使用したシステムによれば、カルシウムシグナルを迅速に活性化させることができるものの、ケージドカルシウムは低分子であるために拡散しやすく、カルシウムシグナルの空間的な制御が容易ではない。また、ケージドカルシウムを使用したシステムにおける、ケージドカルシウムを細胞外から導入する工程は操作が難しく、特に動物等への応用において限界があった。

[0008] 本発明は、上記現状に鑑み、カルシウムシグナルを容易に光制御できるポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調節方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、オートムギ由来の光感受性タンパク質であるフォトトロピンのL O V 2 - J α 領域のアミノ酸配列の所定部分と、カルシウムチャネルO r a i 1の制御タンパク質であるS T I M 1のC A D領域のアミノ酸配列の所定部分とを組み合わせたポリペプチドにより、上記課題を解決できることを見出した。

[0010] すなわち、本発明は、

配列番号1または配列番号1と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるL O V 2領域と、

配列番号2、配列番号3、またはL O V 2 - J α の光スイッチとしての機能を維持し、かつ配列番号2もしくは3のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるJ α 領域と、

配列番号4からなるC A D領域と、またはカルシウムチャネルO r a i 1を活性化でき、かつ配列番号4のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるC A D領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

上記L O V 2領域、上記J α 領域および上記C A D領域は、N末端からC末端に向かって、上記L O V 2領域、上記J α 領域および上記C A D領域の

順で配置され、

上記 J α 領域の C 末端と上記 C A D 領域の N 末端との間にアミノ酸配列が介在していないポリペプチド (B A C C S) を提供する。

[0011] また、本発明者らは、カルシウムチャネル O r a i 1 のアミノ酸配列と、B A C C S とを組み合わせたポリペプチドによっても上記課題を解決できることを見出した。

[0012] すなわち、本発明は、

配列番号 5、またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号 5 のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなる O r a i 1 領域と、

第 1 の B A C C S 領域と、

第 2 の B A C C S 領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

上記 O r a i 1 領域、上記第 1 の B A C C S 領域および上記第 2 の B A C C S 領域は、N 末端から C 末端に向かって、上記 O r a i 1 領域、上記第 1 の B A C C S 領域および上記第 2 の B A C C S 領域の順で配置されるポリペプチド (O r a i 1 - B A C C S) も提供する。

[0013] O r a i 1 - B A C C S における上記 O r a i 1 領域の C 末端と上記第 1 の B A C C S 領域の N 末端の間には第 1 のリンカーが介在してもよい。

[0014] O r a i 1 - B A C C S における上記第 1 の B A C C S 領域の C 末端と上記第 2 の B A C C S 領域の N 末端の間には第 2 のリンカーが介在してもよい。

[0015] また、本発明者らは、B A C C S をタンデムに 2 つつなげたポリペプチドによっても上記課題を解決できることを見出した。

[0016] すなわち、本発明は、

第 1 の B A C C S 領域と、

第 2 の B A C C S 領域と、を含み、かつ、

配列番号 5 またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号 5

のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるOrai1領域を含まないアミノ酸配列からなるポリペプチド(BACCS×2)も提供する。

[0017] BACCS×2における上記第1のBACCS領域のC末端と上記第2のBACCS領域のN末端の間にはリンカーが介在してもよい。

[0018] 本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸も提供する。

[0019] 本発明はまた、上記核酸を含む組み換えベクターも提供する。

[0020] 本発明はまた、上記組み換えベクターを含む遺伝子導入キットも提供する。

[0021] 本発明はまた、上記組み換えベクターを含み、単離された細胞または非ヒト動物である形質転換体も提供する。

[0022] 本発明はまた、上記形質転換体に照射する光の強度を操作することによって、上記形質転換体の細胞内カルシウムシグナルを調節する細胞内カルシウムシグナルの調節方法も提供する。

[0023] 本発明はまた、上記ポリペプチドが、BACCSであり、かつ、上記細胞がOrai1を発現している細胞内カルシウムシグナルの調節方法も提供する。

[0024] 本発明はまた、上記ポリペプチドがOrai1-BACCSである細胞内カルシウムシグナルの調節方法も提供する。

発明の効果

[0025] 本発明によれば、カルシウムシグナルを容易に光制御できるポリペプチドが提供される。

図面の簡単な説明

[0026] [図1] (A)は、「BACCS」の模式図を示し、(B)は、「Orai1-BACCS」の模式図を示す。

[図2A]様々な動物種におけるOrai1、Orai2およびOrai3のアミノ酸配列の比較を示す。

[図2B]様々な動物種におけるSTIM1のCAD領域のアミノ酸配列の比較を示す。

[図3]様々な植物種におけるLOV2-J α におけるJ α 領域のアミノ酸配列の比較を示す。

[図4] (A) は、LOV2-J α の明変異体にCAD領域を融合したタンパク質 (LOV_{light}-CAD) の模式図を示す。(B) は、黄色蛍光タンパク質を組み込まれたOrail (Orail-YFP) のHEK293細胞中の局在のイメージング (左図)、赤色蛍光タンパク質を組み込まれたLOV_{light}-CAD (tdTomato-LOV_{light}-CAD) のHEK293細胞中の局在のイメージング (中央図)、およびこれらの2つの結果をマージした結果 (右図) を示す。(C) は、CAD領域のN末端側を様々に欠損させたことによる、LOV_{light}-CADの細胞膜への移行の有無についての結果を示す。

[図5] (A) は、LOV2-J α の暗変異体にCAD領域を融合したタンパク質 (LOV_{dark}-CAD) の模式図を示す。(B) は、黄色蛍光タンパク質を組み込まれたOrail (Orail-YFP) のHEK293細胞中の局在のイメージング (左図)、赤色蛍光タンパク質を組み込まれたLOV_{dark}-CAD (tdTomato-LOV_{dark}-CAD) のHEK293細胞中の局在のイメージング (中央図)、およびこれらの2つの結果をマージした結果 (右図) を示す。(C) は、LOV2-J α の暗変異体によるCAD領域の機能の阻害を妨げない (すなわち、LOV_{dark}-CADを細胞膜へ局在させない) J α 領域のアミノ酸配列についての4つの候補 (膜への局在化が「なし」であるもの) の同定結果を示す。

[図6] (A) は、ポリペプチド (tdTomato-LOV (404-538) -CAD (347-448))、OrailおよびNFAT-GFPを共発現させたHEK293細胞中における、光を遮断した場合のポリペプチドの局在のイメージング (上図)、および470nmの光 (青色光) を20分照射した場合のポリペプチドの局在のイメージング (下図) を示す。(B)

は、L O V 2 領域のアミノ酸配列、様々な J α 領域のアミノ酸配列、および C A D 領域のアミノ酸配列を結合させたポリペプチド (L O V - C A D) による、N F A T 転写因子の核移行の有無、および L O V - C A D の細胞膜への移行の有無の結果を示す。

[図7] (A) は、赤色蛍光タンパク質、B A C C S、2 A ペプチドおよび O r a i 1 を順に N 末端から C 末端へ融合させたポリペプチド (m C h e r r y - B A C C S - 2 A - O r a i 1) を H E K 2 9 3 細胞中で発現させ、470 nm の光 (青色光) を試験期間中継続して照射した後の、カルシウム蛍光プローブである F l u o - 4 を使用したカルシウムイメージング結果を示す。左図は m C h e r r y の蛍光による、ポリペプチド発現細胞の同定結果を示す。中央図および右図は、それぞれ、光刺激前および光刺激後のカルシウムイメージング結果を示す。(B) は、8 つの細胞におけるカルシウム濃度の経時変化を示す。

[図8] (A) は、赤色蛍光タンパク質を組み込まれた O r a i 1 - B A C C S (O r a i 1 - m C h e r r y - B A C C S $\times$ 2) を H E K 2 9 3 細胞中で発現させ、470 nm の光 (青色光) を試験期間中継続して照射した後の、カルシウム蛍光プローブである F l u o - 4 を使用したカルシウムイメージング結果を示す。左図は m C h e r r y の蛍光による、ポリペプチド発現細胞の同定結果を示す。中央図および右図は、それぞれ、光刺激前および光刺激後のカルシウムイメージング結果を示す。(B) は、H A タグおよび／または蛍光物質を組み込まれた O r a i 1 - B A C C S を発現した H E K 2 9 3 細胞におけるカルシウム濃度の経時変化を示す。(C) は、H A タグおよび蛍光物質を組み込まれた O r a i 1 - B A C C S (O r a i 1 - H A - B A C C S $\times$ 2 - I R E S - Y F P) を H E K 2 9 3 細胞に発現させ、光の照射および光の遮断を 3 回行った際の、赤色蛍光カルシウムセンサーである R h o d - 3 を用いたカルシウムイメージングによって観察された細胞内カルシウム濃度の経時変化を示す。

[図9] (A) は、O r a i 1 に B A C C S を 1 つだけ融合させ、赤色蛍光タン

パク質を組み込んだポリペプチド (Orai1-tdTomato-BACCS×1) および転写因子NFATに黄色蛍光タンパク質を組み込んだポリペプチド (NFAT-YFP) をHEK293細胞中で共発現させ、470nmの光 (青色光) を20分間照射した後の結果を示す。(B)は、対照実験として、BACCSを2つタンデムにつなげ、赤色蛍光タンパク質を組み込んだOrai1-tdTomato-BACCS×2、NFAT-GFPをHEK293細胞中で共発現させ、470nmの光 (青色光) を20分間照射した後の結果を示す。

[図10] (A)は、Orai1-BACCSに、Orai1の変異 (Orai1 (L273D)) を組み込んだOrai1 (L273D)-BACCS×2の模式図を示す。(B)は、HAタグおよび蛍光物質を組み込まれたOrai1 (L273D)-BACCS (Orai1 (L273D)-HA-BACCS×2-igY) を発現するHEK293細胞に、470nmの光 (青色光) を照射する前、および10分間照射した後の、赤色蛍光カルシウムセンサーであるRhod-3を使用したカルシウムイメージングを示す。

[図11] (A)は、STIM1のCDI (Calcium dependent inactivation) 領域を含むようにCAD領域のC末端を伸長したポリペプチド (Orai1-BACCS (347-630)×2) の模式図を示す (斜線部がCDI領域を示す)。(B)は、HAタグおよび蛍光物質を組み込まれたOrai1-BACCS (Orai1-HA-BACCS×2-igY) およびOrai1-BACCS (347-630) (Orai1-HA-BACCS (347-630)×2-igY) を発現した細胞について、赤色蛍光カルシウムセンサーであるRhod-3を使用したカルシウムイメージング結果を示す。

[図12] (A)は、「BACCS×2」の模式図を示す。(B)は、BACCS×2-igY (B×2) およびOrai1-HA-BACCS×2-igY (OB×2) を発現した細胞それぞれについてのカルシウムイメージング結果を示す。

[図13] B A C C S × 2 − i g Y (B × 2) および Y F P − B A C C S × 2 (Y B × 2) を発現した細胞についてのカルシウムイメージング結果を示す。

発明を実施するための形態

[0027] (B A C C S)

本発明は、オートムギの光受容体タンパク質であるフォトリピン1の光感受性領域である L O V 2 − J α 領域のアミノ酸配列と、カルシウムチャネル O r a i 1 の制御タンパク質である S T I M 1 の C A D 領域のアミノ酸配列と、を含むポリペプチド (B l u e l i g h t − a c t i v a t e d C a l c i u m C h a n n e l S w i t c h 、以下「B A C C S」と呼ぶ) を提供する。B A C C S を発現させた細胞においては、細胞中の内在性の O r a i 1 、または細胞に遺伝子導入することによって B A C C S と共に発現させた O r a i 1 を、青色光の照射によって開くことができる。青色光の照射によって活性化された O r a i 1 は、青色光を遮断することで不活性の状態に戻る。また、B A C C S は、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって容易に細胞特異的に発現させることができるため、O r a i 1 の活性を局所的に制御できる。従って、B A C C S によれば、カルシウムシグナルの空間的な制御を容易に行うことができる。また、B A C C S は、照射する光の強度の操作のみによってその機能を制御できるため、容易な操作によってカルシウムシグナルを制御することができる。

[0028] (L O V 2 − J α)

オートムギ由来のフォトリピン1の光感受性は、フォトリピン1中のアミノ酸404−543位の領域に依存しており、当該領域は L O V 2 − J α と呼ばれる (H a r p e r ら、2003) 。 L O V 2 − J α は、青色領域である447nmの吸収極大波長を有するため (S a l o m o n ら、2000) 、青色光の照射によって構造が変化する。具体的には、光が遮断されている状態では、L O V 2 領域および J α 領域が疎水結合によって結合している。一方、光が照射されている状態では、L O V 2 領域および J α 領域の疎水結合が外れる。これを「明状態」と呼ぶ。L O V 2 − J α にシグナルタン

パク質が融合した状態では、光が遮断されている状態において、 $LOV2-J\alpha$ がシグナルタンパク質の立体障害として機能する。一方、光が照射されている状態では、 $LOV2-J\alpha$ の構造が変化し、シグナルタンパク質の立体障害が解消される。その結果、所望の細胞内シグナルを生じさせることができる。

[0029] $LOV2-J\alpha$ を明状態にするための光は、青色領域の波長（510 nm以下）であればよい。例えば、市販の青色LEDを使用することによって $LOV2-J\alpha$ の構造を容易に変化させることができる。また、光の照射時間は特に限定されないが、ミリ秒単位の照射によって、 $LOV2-J\alpha$ を効率よく明状態にすることができる（Nakasonoら、2008）。

[0030] また、 $LOV2-J\alpha$ の明状態を解除するためには、照射する光の波長を510 nmよりも長波長にするか、光を遮断すればよい。

[0031] [LOV2領域]

本発明のポリペプチドを構成する $LOV2-J\alpha$ のうち、LOV2領域は、オートムギ由来のフォトトロピンのアミノ酸配列の404-522位に対応する。

[0032] LOV2領域は、多くの植物間で保存されており、例えば、オートムギのLOV2領域のアミノ酸配列との相同性は、アジアイネのフォトトロピン1；81%、シロイヌナズナのフォトトロピン1；87%、シロイヌナズナのフォトトロピン2；83%、エンドウマメのフォトトロピン1；87%、ソラマメのフォトトロピン1；トウモロコシのフォトトロピン1；95%、トマトのフォトトロピン1；87%である。

[0033] LOV2領域が機能的である植物種のLOV2領域は、オートムギのアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有している。このようなアミノ酸配列を用いることによって、BACCSが光感受性作用を発揮できると考えられる。アミノ酸配列にLOV2領域の機能に関わる領域が含まれているかどうかは、例えば、得られるポリペプチドに対して青色光を照射または遮断し、円偏光二色性スペクトルを観察することによって特定できる。従って、オー

トムギのLOV2領域を様々な植物種由来の配列または合成配列に置き換えることも可能である。例えば、本発明のポリペプチドを構成するLOV2領域に相当するアミノ酸配列として、オートムギ由来のフォトトロピンのアミノ酸配列の404-522位と、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を使用することができる。

[0034] [J α 領域]

本発明のポリペプチドを構成するLOV2-J α のうち、J α 領域は、オートムギ由来のフォトトロピンのアミノ酸配列の523-535位または523-538位に対応する。

[0035] J α 領域は、BACCSが、光の照射によってOrai1を開き、光の遮断によってOrai1を閉じるという所望の反応（以下、このような反応を「光スイッチ」と呼ぶ）をするために重要な領域である。なぜならば、BACCSにおけるJ α 領域のアミノ酸配列は、Orai1の制御タンパク質であるCAD領域のアミノ酸配列との間にアミノ酸配列を介在させずに直接結合しているため、この結合部位の構造によっては、光の遮断状態においてシグナルタンパク質であるCAD領域の立体障害が解消されてしまう。その結果、光の遮断状態においてもCAD領域がOrai1に結合し、Orai1が活性化されることになり、Orai1の制御タンパク質としてのCAD領域の機能が阻害されないからである。例えば、これまで、LOV2-J α の404-546位（Wuら、2009）および404-543位（Sticklandら、2008）を使用した光感受性ポリペプチドが作製されてきたものの、光を遮断した際にも光スイッチが完全には切れず、シグナルが遮断されない等の問題があった。これは、LOV2領域の存在によって生じる、シグナルタンパク質のシグナル機能部位における立体障害が不十分であることによるものと考えられる。

[0036] J α 領域としてフォトトロピンのアミノ酸配列523-535位または523-538位を有するBACCSは、光に対する所望の反応を示す。これ

らの配列を有するBACCSは、細胞において、青色光の照射によって、カルシウムシグナルを調節することができるため好ましい。J α 領域としてフォトリロピンのアミノ酸配列523-538位を有するBACCSは、光に応答してカルシウムシグナルを強く調節できるため特に好ましい。J α 領域としてフォトリロピンのアミノ酸配列523-535位を有するBACCSも、光を遮断した状態でカルシウムシグナルを誘導してしまうものの、光の照射によってシグナルの強さを調節することができる。

[0037] また、LOV2-J α が機能するためにはJ α 領域の1532、A536、1539のアミノ酸が疎水性である必要があることが報告されている(Harperら、2004)。そのため、BACCSを作製する際には、J α 領域におけるこれらの部位が疎水性アミノ酸になるようにする必要がある。例えば、BACCSを構成するアミノ酸配列においては、LOV2-J α (404-538)とCAD領域のつなぎ目に位置する、疎水性アミノ酸である「L(ロイシン)」が、LOV2-J α の光スイッチとしての機能に重要な役割を果たしている。つまり「L」はCAD領域に由来するが、同時に、LOV2-J α の539番目のアミノ酸としても機能している。この「L」は、J α 領域と直接結合しているCAD領域がOri1を活性化させる場合においても重要である。このため、光を遮断した状態においては、J α 領域のこの「L」は、LOV2領域との疎水結合に利用され、その結果、CAD領域がOri1と相互作用することが阻害されることになる。

[0038] 本発明者らが鋭意検討した結果、フォトリロピンのアミノ酸配列の523-535位または523-538位に対応するJ α 領域を有するBACCSであれば、照射する光の強度の操作に応じてOri1の活性化を制御できることを見出した。ただし、上記J α 領域のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列であって、LOV2-J α の光スイッチとしての機能を維持するアミノ酸配列を有するBACCSについても、照射する光の強度の操作に応じてCAD領域の機能を発揮させ、または阻害することで、同様に所望の反応を生じさせることができるため、本発明

の範囲に含まれる。ここで、「1もしくは複数のアミノ酸配列が置換されたアミノ酸配列」とは、本発明のポリペプチドを構成するJ α 領域である、オートムギ由来のフォトリポンのアミノ酸配列の523-535位または523-538位と、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を指す。アミノ酸配列にLOV2-J α の光スイッチとしての機能を維持するアミノ酸配列が含まれているかどうかは、例えば、得られるポリペプチドについて、円偏光二色性スペクトル等を観察することによって特定できる。

[0039] (CAD領域)

本発明のポリペプチドを構成するCAD領域は、ヒトSTIM1のCAD領域のアミノ酸配列の347-448位に対応する。当該CAD領域は、単独でカルシウムチャネルOrai1の活性を制御できる。BACCS中のLOV2-J α が光の照射によって明状態になると、CAD領域が活性化し、Orai1と結合し、その結果Orai1を活性化させる。

[0040] ただし、カルシウムチャネルOrai1を活性化でき、かつ上記CAD領域のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列を有するBACCSについても、カルシウムチャネルOrai1の活性を制御できるため、本発明の範囲に含まれる。ここで、「1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列」とは、本発明のポリペプチドを構成するCAD領域である、ヒトSTIM1のCAD領域のアミノ酸配列の347-448位と、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列のことをいう。アミノ酸配列にカルシウムチャネルOrai1を活性化するアミノ酸配列が含まれているかどうかは、例えば、当該アミノ酸配列をOrai1領域と共発現させ、カルシウムイオンの流入があるかどうかを、NFATの局在を観察することによって特定できる。

[0041] (Orai1-BACCS)

また、本発明は、BACCSを、カルシウムチャネルOrai1のアミノ

酸配列のC末端にタンデムに2つつなげたタンパク質（以下、「O r a i 1－B A C C S」と呼ぶ）も提供する。

[0042] B A C C Sは、内在性のO r a i 1が発現した場合、または細胞内でO r a i 1遺伝子と共発現した場合等に、カルシウムイオンチャネルであるO r a i 1を光依存的に開閉することができる。そのため、O r a i 1とB A C C Sを結合させ、単一のポリペプチドとして発現させることによって、O r a i 1とB A C C Sとの空間的距離を近づけることができ、B A C C Sのみからなるポリペプチドと比較して、さらに効率の良い光活性化カルシウムチャネルとして機能する。

[0043] O r a i 1とC A D領域が1：2の比で存在する場合に、O r a i 1を効率的に活性化させることができ、さらに、O r a i 1のC末端にC A D領域をタンデムに2つつなげた場合にO r a i 1が構成的に活性化されることが報告されている（L i ら、2010）。そこで、本発明者らは、O r a i 1のC末端にB A C C Sをタンデムに2つつなげた構造を有するO r a i 1－B A C C Sを作製した。

[0044] (O r a i 1)

カルシウムチャネルO r a i 1は、細胞膜上に局在し、ストア作動性カルシウム流入に関与するストア作動性カルシウムチャネルである。O r a i 1の活性は、小胞体に局在する小胞体タンパク質S T I M 1のC A D領域によって制御される（H o g a n ら、2010）。O r a i 1は特に免疫細胞において重要な作用を有する。

[0045] O r a i 1を活性化するヒトS T I M 1内の領域として、C A D（アミノ酸342－448位；P a r k ら、2009）、S O A R（アミノ酸344－442位；Y u a n ら、2009）、O A S F（アミノ酸233－450位または474位；M u i k ら、2009）、C C B 9（アミノ酸339－444位；K a w a s a k i ら、2009）が同定されている。なお、ヒトS T I M 1内のアミノ酸342－440位の領域は、O r a i 1を活性化することができない（P a r k ら、2009）。

[0046] 本発明のポリペプチドを構成する *Orai1* は、ヒト *Orai1* のアミノ酸配列の 1-301 位に対応する。

[0047] *Orai1* は、*Orai2* および *Orai3* との配列類似性が高いだけでなく、線虫、ヒト等の様々な種間で保存されている (Hogan ら、2010)。そのため、*Orai1-BACCS* を構成する *Orai1* の配列は、ヒト由来のものだけではなく、様々な種のホモログであっても、カルシウムチャネルとして機能する可能性が極めて高い。従って、本発明のポリペプチドを構成する *Orai1* としてこれらのホモログを代用できる。また、ヒト *Orai1* がカルシウムチャネルとして機能するための領域が保存されているのであれば、ヒト *Orai1* のアミノ酸配列の 1-301 位において 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されていても、本発明のポリペプチドを構成する *Orai1* として使用することができる。ここで、「1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加」とは、本発明のポリペプチドを構成する *Orai1* である、ヒト *Orai1* のアミノ酸配列の 1-301 位と、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を指す。アミノ酸配列に *Orai1* がカルシウムチャネルとして機能するための領域が含まれているかどうかは、例えば、当該アミノ酸配列を CAD 領域と共発現させ、カルシウムイオンの流入があるかどうかを、NFAT の局在を観察することによって特定できる。

[0048] (リンカー)

Orai1-BACCS を構成する、*Orai1* の C 末端と第 1 の BACCS の N 末端との間、および第 1 の BACCS の C 末端と第 2 の BACCS の N 末端との間にはそれぞれ、アミノ酸配列の小断片 (以下、「リンカー」と呼ぶ) が介在してもよい。当該リンカーは、蛍光タンパク質 (mCherry、YFP 等) 等であってもよい。*Orai1-BACCS* にこのようなリンカーが含まれることにより、細胞内の *Orai1-BACCS* の発現を容易に検出することができる。

[0049] *Orai1* の C 末端と第 1 の BACCS の N 末端との間に介在するリンカ

一は、立体障害を回避する観点から、20残基以上のアミノ酸配列からなるリンカーであってもよい。

[0050] 第1のBACCSのC末端と第2のBACCSのN末端との間に介在するリンカーは、立体障害を回避する観点から、25残基以上のアミノ酸配列からなるリンカーであってもよい。

[0051] (BACCS×2)

また、本発明は、BACCSをタンデムに2つつなげたタンパク質（以下、「BACCS×2」と呼ぶ）も提供する。

[0052] CADは2量体の形態で1つのOrailと相互作用し、Orailを効率的に活性化させることができることが報告されている（Lira、2010）。そのため、タンデムに2つつながれたBACCS（すなわち、BACCS×2）によれば、効率よくCADを2量体様の構造にすることができるため、内因性Orailを効率的に活性化できる。

[0053] BACCS×2を構成する、第1のBACCS領域のC末端と、第2のBACCS領域のN末端との間には、リンカーが介在してもよい。BACCS×2において、リンカーは、第1のBACCS領域のN末端や、第2のBACCS領域のC末端に付加されてもよい。例えば、第1のBACCS領域のN末端のリンカーとしては蛍光タンパク質（mCherry、YFP等）等が挙げられる。第2のBACCS領域のC末端のリンカーとしては2Aペプチド等が挙げられる。BACCS×2にこのようなリンカーが含まれることにより、細胞内のBACCS×2の発現を容易に検出することができる。

[0054] BACCS×2に含まれるリンカーは、立体障害を回避する観点から、25残基以上のアミノ酸配列からなるリンカーであってもよい。

[0055] (製法)

本発明のポリペプチドは、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸をベクターに組み込み、当該ベクターを大腸菌や細胞（ヒト腎臓由来のHEK293細胞等）等に導入することによって、ポリペプチドとして

大量に発現させることができる。

[0056] (核酸)

本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸は、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。例えば、アミノ酸配列情報からプライマーを作成し、PCR等によってクローニングしたLOV2-J α 領域をコードする核酸や、CAD領域をコードする核酸を、ライゲーション反応等によってつなげることにより本発明のポリペプチドをコードする核酸を単離することができる。

[0057] 本願明細書で使用される用語「核酸」には、DNA、RNA等が含まれる。

[0058] (組み換えベクター)

本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸を含む組み換えベクターは、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。例えば、任意のプラスミドを、任意の制限酵素(BglII、Sall等)で切断し、その切断部位に、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸をリガーゼで結合させることによって作製できる。

[0059] 本願明細書で使用される用語「組み換えベクター」は、組み換えDNA実験等において異種DNAの運搬に使用されるDNAを指す。本発明の組み換えベクターとしては、例えば、本発明のポリペプチドを発現するDNA断片、任意の制限酵素認識部位、任意の複製開始点等を有するクローニングベクターや、本発明のポリペプチドを発現するDNA断片、転写開始点等を有する発現ベクター等が挙げられる。

[0060] また、本発明の範囲には、このような組み換えベクターを含む遺伝子導入キットも含まれる。当該キットを使用して遺伝子導入を行うことで、本発明のポリペプチドを容易に発現させることができる。当該キットには、例えば、本発明の組み換えベクター、形質転換用試薬、取扱説明書等が含まれるが、これに限定されない。

[0061] (形質転換体)

上記の組み換えベクターを含む形質転換体は、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。本願明細書で使用される用語「形質転換体」は、単離された細胞または非ヒト動物である。細胞としては特に限定されず、任意の細胞株（例えば、ヒト腎臓由来のHEK293細胞、HEK293T細胞等）を使用できる。また、非ヒト動物としては特に限定されず、大腸菌、哺乳類（マウス、ラット等）、モデル動物等を使用できる。

[0062] 本発明の形質転換体は、例えば、単離された細胞に、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、ウイルス等によって組み換えベクターを導入することによって、単離された細胞の形質転換体を得られる。また、非ヒト動物の受精卵前核中へDNA顕微注入、ES細胞への相同組み換え、組み換えウイルスによる感染等を行うことによって非ヒト動物の形質転換体を得られる。本発明のポリペプチドは、上記のような公知の技術によって容易に細胞特異的に発現させることができるだけでなく、追加の薬剤等を使用することなく、照射する光の強度の操作のみによってその機能を発揮させることができるため、特に、非ヒト動物に対して容易かつ安全に応用できる。

[0063] （本発明のポリペプチドを使用した応用）

さらに、本発明によれば、上記形質転換体に照射する光の強度を操作することによって、上記形質転換体の細胞内カルシウムシグナルを調節することができる。光の強度の操作とは、上記形質転換体に照射される光の波長、光の照射時間、および光の照射量等の調節を指す。例えば、上記形質転換体に対する青色領域の波長の光の照射によって細胞内カルシウムシグナルを活性化することができる。また、上記形質転換体に対する510nm以下の波長の光の遮断によって細胞内カルシウムシグナルを不活性化することができる。

[0064] 例えば、BACCSを使用すれば、Orai1を発現している細胞における細胞内カルシウムシグナルを調節できる。また、Orai1-BACCSを使用すれば、Orai1を発現している細胞だけではなく、Orai1を

発現していない細胞における細胞内カルシウムシグナルを調節できる。

[0065] *Orai1*とCAD領域が1:2の比で存在する場合に、*Orai1*を効率的に活性化させることができ、細胞内カルシウムシグナルの応答性が上昇することが知られている（Lira, 2010）。これを踏まえると、*Orai1*に対するBACCSの発現量比が*Orai1*:BACCS=1:2以下となると、細胞内カルシウムシグナルの応答性が低下すると考えられる。*Orai1*を発現している細胞においては、内因性*Orai1*に対するBACCSの割合が*Orai1*:BACCS=1:2以下となりにくくするために、内因性*Orai1*の量に応じて、BACCS×2（BACCSのみをタンデムに2つ発現させたもの）、BACCS×2-2A-*Orai1*（*Orai1*:BACCS=1:2）やBACCS×2-IRES-*Orai1*（*Orai1*:BACCS=1:4~1:10）等を好適に使用できる。なお、IRES（internal ribosome entry site）とは、メッセンジャーRNAの途中から翻訳を開始させることができる配列である。IRES依存的な翻訳は、多くの場合、5'キャップ依存的な翻訳の20~50%の効率であることが報告されている（Mizoguchiら, 2000）。つまり、例えばBACCS×2-IRES-*Orai1*においては、IRES依存的な*Orai1*の翻訳は、5'キャップ依存的なBACCSの翻訳に対して20~50%の効率であると予測されるため、IRESを含む組み換え体によれば、*Orai1*とBACCSとの発現量比を効率的に調整できる。一方、*Orai1*を発現していない細胞においては、内因性*Orai1*が存在しないため、*Orai1*とBACCS×2の融合蛋白（*Orai1*-BACCS×2）を好適に使用できる。

[0066] このように、本発明によれば、照射する光の強度を操作することによって形質転換体の細胞内のカルシウムチャネルの活性化を制御することにより、細胞内カルシウムイオンの流入の調節ができるため、細胞内カルシウムイオン濃度やカルシウムイオンによって活性化される細胞内の生理現象（例えば、筋収縮、シナプス伝達、分泌、細胞分化等）を調節できる。

[0067] 本発明のポリペプチドは、カルシウムシグナルに関連する基礎医学または生命科学分野の研究や医薬品の開発において有利に使用することができる。本発明のポリペプチドを使用する基礎医学または生命科学の分野としては特に限定されず、筋収縮の制御、神経伝達シグナル、免疫応答、発生、および分泌制御等の分野の研究において使用できる。また、研究手法としては、*in vitro*、*in situ*、または*in vivo*等の系において使用できる。

[0068] 本発明のポリペプチドは、医薬品の開発においても使用でき、例えば、糖尿病、高血圧等の疾病における創薬ターゲットの評価、新薬候補化合物のスクリーニング等に使用できる。

実施例

[0069] 以下の実施例に基づき、本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。なお、本実施例においては、オートムギのフォトロピン1のLOV2-J α 領域、ヒトのOrai1、およびヒトのSTIM1のCAD領域を使用した。

[0070] (実施例1：LOV2-J α とCADの結合部位の最適化に関する検討)

LOV2-J α とCADの結合部位の配列に関して最適な組み合わせを特定するため、LOV2-J α と、CADとを結合させたポリペプチド（以下、「LOV-CAD」と呼ぶ）を作製し、光刺激によってOrai1を活性化できるLOV-CADをスクリーニングした。なお、LOV2-J α の構造は、J α 領域のC末端側に結合する領域を制御すると考えられるため、ポリペプチドの作製時には、LOV2-J α の塩基配列のC末端側と、CADの塩基配列N末端側とを結合させる必要がある。

[0071] (1) LOV-CADを発現する組み換えベクターの作製

以下に、LOV2-J α (404-538) およびCAD (347-448) の塩基配列を組み込んだプラスミドの作製例を示す。他のポリペプチドを発現するプラスミドも同様に作製した。なお、フォトロピン1 LOV2-J α (ID 22024, PA-Rac1)、Orai1-YFP

(ID 19756)、STIM1-CFP (ID 19755) および NFAT-GFP (ID 11107) のプラスミドは、Addgene 社より購入した。

LOV-CAD を、制限酵素 (BglII) 認識配列が組み込まれた LOV2 の PCR 断片と、制限酵素 (SalI) 認識配列が組み込まれた CAD 領域の PCR 断片との、リコンビナント PCR による融合遺伝子として得て、これを PCR サーマルサイクラーによって増幅した。使用したプライマーと鋳型を以下に示す。

[0072] [表1]

<BglIII-LOV (404-538) の増幅のために使用したプライマー>

T119:5' -GGACTCAGATCTTTGGCTACTACACTGAACG

T177:5' -CTTCTGAAGATTTTCTGCAGTTTCTTAATCAG

鋳型: フォトトロピン 1 LOV2-J α

<CAD (347-448)-SalI の増幅のために使用したプライマー>

T178:5' -CTGCAGAAAATCTTCAGAAGTGGCTGCAGCTG

T118:5' -GGTACCGTCGACTCAGTGGATGCCAGGGTTGTTG

鋳型: STIM1-CFP

<BglIII-LOV (404-538)-CAD (347-448)-SalI の増幅のために使用したプライマー>

T119:5' -GGACTCAGATCTTTGGCTACTACACTGAACG

T118:5' -GGTACCGTCGACTCAGTGGATGCCAGGGTTGTTG

鋳型: BglIII-LOV (404-538) および CAD (347-448)-SalI

[0073] 得られた PCR 産物を、BglIII と SalI を使用して制限酵素処理した。次いで、制限酵素処理された PCR 産物を、赤色蛍光タンパク質レポーターベクターである ptdTomato-C1 ベクターの BglIII-SalI サイトにライゲーションし、ポリペプチド tdtTomato-LOV (404-538)-CAD (347-448) の組み換えベクター (以下、「ptdTomato-BACCS」と呼ぶ) を作製した。なお、ptdTomato-C1 ベクターは、pEGFP-C1 (クロンテック社製) の GFP 配列を tdtTomato で置換したものである。さらに、当該組み換えベクターから転写される mRNA の安定性を高め、導入遺伝子の発現を増強することができる、ウッドチャック肝炎ウイルス由来の転写後制御エレメン

トWPREを3'非翻訳領域に挿入した組み換えベクター（以下、「p t d T o m a t o - B A C C S - W P R E」と呼ぶ）を作製した。

[0074] (2) CAD領域のN末端配列に関する検討

L O V 2 - J α の塩基配列に結合するCAD領域の塩基配列のN末端配列について、O r a i 1の活性化に必要な最小領域を検討した。

検討のために、L O V 2領域の光照射条件下における構造を模倣した変異体（以下、「明変異体」と呼ぶ）およびL O V 2領域の光遮断条件下における構造を模倣した変異体（以下、「暗変異体」と呼ぶ）を作製した。例えば、J α 領域のアミノ酸配列は、I 5 3 2 E、A 5 3 6 E、I 5 3 9 E、D 5 4 0 Rの変異によって明変異体になることが知られている（H a r p e r ら、2 0 0 4）。本実施例では、明変異体として、J α 領域に、リコンビナントPCRによりI 5 3 9 E変異（I 5 3 9 E）を導入した。また、暗変異体として、L O V 2領域に、リコンビナントPCRによってC 4 5 0 A変異（C 4 5 0 A）を導入した。以下、当該明変異体であるL O V 2 - J α を、「L O V l i t」、当該暗変異体であるL O V 2 - J α を「L O V d a r k」と呼ぶ。L O V l i tおよびL O V d a r kは、それぞれ、光の照射の有無に関わらず、光が照射された状態の構造、および光が遮断された状態の構造を有している。

まず、L O V l i t（4 0 4 - 5 4 6）に、N末端を様々に欠損させたCAD領域（3 4 2 - 4 4 8から3 5 0 - 4 4 8）を融合したタンパク質（以下、「L O V l i t - C A D」と呼ぶ）を作製した（図4 A）。L O V l i t - C A Dを、O r a i 1と共にH E K 2 9 3細胞中で共発現させ、以下の手順でL O V l i t - C A Dの細胞内局在を観察した。

赤色蛍光タンパク質であるt d T o m a t oを、L O V l i t - C A DのN末端側に融合したポリペプチドとして発現するように、組み換えベクター「p t d T o m a t o - L O V l i t - C A D - W P R E」を作製した。また、同様に、黄色蛍光タンパク質をC末端側に組み込んだO r a i 1を発現するように、組み換えベクター「O r a i 1 - Y F P」も作製した。p

t d T o m a t o - L O V I i t - C A D - W P R E および O r a i 1 - Y F P を、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (インビトロジェン社製) を使用して、H E K 2 9 3 細胞に遺伝子導入し、当該細胞を 1 0 % 仔ウシ血清 (G i b c o 社製) 入り M E M (ナカライテスク株式会社製) (以下、「M E M + 1 0 % F B S」と呼ぶ) 培地中で培養した。遺伝子導入の 2 4 ~ 4 8 時間後に、暗室において、細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで固定し、t d T o m a t o の蛍光の局在をコンフォーカル顕微鏡 (商品名; Z e i s s L S M 5 1 0、カールツァイス社製) で観察した。

O r a i 1 は細胞膜上に発現するため、O r a i 1 と結合した L O V I i t - C A D は、細胞膜に局在する (図 4 B)。なお、J α 領域の 5 4 6 番目のアミノ酸と C A D 領域の 3 4 7 番目のアミノ酸はともに「L」であるため、L O V I i t (4 0 4 - 5 4 6) - C A D (3 4 8 - 4 4 8) は L O V I i t (4 0 4 - 5 4 5) - C A D (3 4 7 - 4 4 8) とも解釈できる点に注意されたい。O r a i 1 を活性化する領域としては、C A D (3 4 7 - 4 4 8) が N 末端に関して最小領域であることが分かった。(図 4 C)。

[0075] (3) L O V 2 - J α の C 末端配列に関する検討

C A D 領域 (3 4 7 - 4 4 8) を含むように、L O V d a r k の C 末端の長さを様々に変えてポリペプチド (以下、「L O V d a r k - C A D」と呼ぶ) を作製した (図 5 A)。L O V d a r k - C A D は、O r a i 1 を活性化させるのに十分な C A D 領域を含むため、L O V d a r k のタンパク質構造による立体障害がない場合は、O r a i 1 と結合できる。本項では、L O V d a r k が立体障害となり O r a i 1 と結合できないポリペプチドを探索する。O r a i 1 と結合できない L O V d a r k - C A D は、細胞質に分布するポリペプチドとして認められた (図 5 B)。

L O V 2 - J α の C 末端側の、C A D 領域とのつなぎ目に関しては、上記「(2) C A D 領域の N 末端配列に関する検討」で説明した重要な疎水性アミノ酸 (I 5 3 2, A 5 3 6, I 5 3 9) の配列を変化させないようにアミノ酸配列のつなぎ方を工夫した。当該疎水性アミノ酸配列を変化させる場合

においても、LOV2-J α 領域に結合したCAD領域の配列によってLOV2-J α 領域のアミノ酸の特性が変化しないように（すなわち、J α 領域中の532番目、536番目、539番目のアミノ酸が疎水性アミノ酸になるように）アミノ酸配列のつなげ方を工夫した。

図5Cに示す15種類のポリペプチドおよびOrai1を、HEK293細胞中で共発現させたところ、LOV dark (404-542)、LOV dark (404-539)、LOV dark (404-538)、およびLOV dark (404-535)は、細胞膜への局在化が阻害された。

[0076] (4) 光によるOrai1の活性化についてのNFATを使用した検証

本発明のポリペプチドが、光の照射によってOrai1を活性化できるかどうかについて、カルシウムシグナルにより核に移行することが知られる転写因子NFATを使用して検証した。

まず、4つの候補の野生型LOV (404-542、404-539、404-538、404-535)にCAD (347-448)を融合したタンパク質を、Orai1、および核移行シグナルを検出するためのレポーター遺伝子NFAT-GFPと共にHEK293細胞中で共発現させた。

具体的には、3つのプラスミド、ptdTomato-LOV-CAD-WPRE、Orai1 (Orai1-YFP (Addgene社製) からYFPを除去して作製した) およびNFAT-GFPを、HEK293細胞に遺伝子導入し、当該細胞をMEM+10%FBS培地中で培養した。遺伝子導入から24~48時間後、暗室にて、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。これを暗条件における試料とし、図6に「暗」として示した。また、遺伝子導入から24~48時間後、培地をMEM+10%FBS培地からLeibovitz's培地に変え、470nmの光を20分照射した後に4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。これを明条件における試料とし、図6に「明」として示した。

それぞれのサンプルについて、光を遮断した場合と、470nmの光を照

射した場合におけるNFATの局在を観察した。NFATの細胞内局在をコンフォーカル顕微鏡（商品名；Zeiss LSM510、カールツァイス社製）で観察した結果を図6Aに示す。

LOV（404-542）-CAD（347-448）およびLOV（404-539）-CAD（347-448）を導入した細胞においては、光を照射してもNFATの核への局在化の効率が悪かった。また、LOV（404-535）-CAD（347-448）を導入した細胞においては、光の照射によってNFATが効率よく核へ局在化したものの、光を遮断した状態においてもNFATの核への局在化が見られた（図6B）。

一方、LOV（404-538）-CAD（347-448）を導入した細胞においては、光を遮断した状態ではNFATが細胞質中で認められ、光を照射した状態では、NFATが核で認められた（図6AおよびB）。

[0077] 以上の結果を踏まえ、LOV（404-538）-CAD（347-448）を、Orai1を光制御できるポリペプチドの候補とした。当該ポリペプチドを以下、BACCS（Blue light-activated Calcium Channel Switch）と呼ぶ。BACCSのアミノ酸配列では、LOV2-J α とCAD領域のつなぎ目に位置する「L」が重要な役割を果たしていると思われる。LOV2-J α が光スイッチとして機能するためにはこの部位のアミノ酸が疎水性である必要がある（Harperら、2004）。つまり、この「L」が、光を遮断した状態において、LOV2領域およびJ α 領域の構造を安定化させていると考えられている。一方、この「L」は、CAD領域がOrai1を活性化させる場合においても重要であるため、光照射によりJ α 領域がLOV2領域から離れて「L」が融合タンパク質の表面に露出したときにのみOrai1を活性化することができると推測される。

[0078] （5）カルシウムイメージングによる検証

BACCSによって活性化された細胞内カルシウムシグナルを直接的に観察するために、カルシウムセンサーを使用して以下の手順でカルシウムイメ

ージングを行った。

蛍光タンパク質を組み込まれたBACCSの組み換えベクター（p t d T o m a t o - B A C C S - W P R E または p m C h e r r y - B A C C S - W P R E）、およびBACCSと共にO r a i 1を同時に発現させる組み換えベクター（p t d T o m a t o - B A C C S - 2 A - O r a i 1 - W P R E）を作製した。p t d T o m a t o - B A C C S - 2 A - O r a i 1 - W P R Eは、T h o s e a a s i g n a v i r u s由来の2 Aペプチド（F e l i p e ら、2006）の22アミノ酸およびO r a i 1をt d T o m a t o - B A C C SのC末端に融合させた構成となっている。タンパク質への翻訳の際に、2 Aペプチド配列が存在していると、その2 Aペプチドを挟む前後のポリペプチドが繋がらずに、2つのポリペプチドとして発現する。すなわち、p t d T o m a t o - B A C C S - 2 A - O r a i 1 - W P R Eは1回の翻訳によって、2つの分離したポリペプチド（t d T o m a t o - B A C C S および O r a i 1）として発現する。

このように、BACCSと共にO r a i 1を同時に発現できる組み換えベクターによれば、2つのタンパク質の発現を同時に制御できるため、タンパク質発現細胞において発現するBACCSおよびO r a i 1の比を一定にすることができる。

まず、O r a i 1 - Y F P プラスミドから、組み換えベクターO r a i 1 - s t o p c o d o n - S a l I（以下、「p O r a i 1 - S a l I」と呼ぶ）を作製した。

実施例1で作製したp t d T o m a t o - B A C C S - W P R E中の、制限酵素認識部位であるB s p E I - S a l Iサイトで挟まれたBACCSを、p O r a i 1 - S a l Iを制限酵素（B s p E I および S a l I）で処理した断片と置き換えて、p t d T o m a t o - B s p E I - O r a i 1 - W P R Eを作製した。

p t d T o m a t o - B s p E I - O r a i 1 - W P R E中のB s p E Iサイトに、BACCSおよび2 Aペプチドを融合させたB s p E I - L O V

(404-538)-CAD(347-448)-2A-BspEIを挿入し、ptdTomato-BACCS-2A-Orai1-WPREを作製した。このプラスミド中のtdTomatoを制限酵素(AgeIおよびBglII)で処理して得られた断片を、赤色蛍光タンパク質レポーターベクターであるpmCherry-C1ベクターを制限酵素(AgeIおよびBglII)処理した断片と置き換えることで、組み換えベクターpCherry-BACCS-2A-Orai1-WPREを作製した。

[0079] 当該組み換えベクターをHEK293細胞に遺伝子導入し、MEM+10%FBS培地中でBACCSとOrai1を同時発現させた。遺伝子導入から24~36時間後に、青色光(470nm)で発現細胞を刺激し、カルシウムイオン蛍光インジケータであるFluo-4またはRhod-3(インビトロジェン社製)を添加し、カルシウム濃度の変化を観察した(図7A)。観察は5秒間毎のタイムラプスで、コンフォーカル顕微鏡(商品名;BioRad MRC1024、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製)で行った。それぞれの細胞について、 ΔF (蛍光変化量)/ F_0 (光刺激前の蛍光強度)を算出し、観察終了時点の値が1になるように ΔF を基準化し、縦軸にプロットし、横軸に時間(秒)を示した結果を図7Bに示す。図7Bに示される通り、BACCS-2A-Orai1発現細胞において、光の照射によるカルシウム濃度の上昇が認められた。

各組み換えベクターを作製するために使用したプライマーおよび鋳型を以下に示す。

[0080]

[表2]

<2A ペプチドの増幅のために使用したプライマー>

T190: 5' -GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATC

T191: 5' -ACCGGTGATCCCGGTGCGGGGCCGGGATTTCTCCACGTCCCCG

鋳型: なし

<2A ペプチド-BspEI の増幅のために使用したプライマー>

T213: 5' -TGGCATCCACGAGGGCAGGGGAAGTCTTCT

T215: 5' -GAAGTCCGGATGCATGGGGCCGGGA

鋳型: 2A ペプチド

<BspEI-LOV (404-538)-CAD (347-448) の増幅のために使用したプライマー>

Tomato-C2: 5' -ACCACCTGTTCTGTACGGC

T212: 5' -CCCTGCCCTCGTGGATGCCAGGGTTGTTGAC

鋳型: ptdTomato-LOV (404-538)-CAD (347-448)

<BspEI-LOV (404-538)-CAD (347-448)-2A-BspEI の増幅のために使用したプライマー>

Tomato-C2: 5' - ACCACCTGTTCTGTACGGC

T215: 5' - GAAGTCCGGATGCATGGGGCCGGGA

鋳型: BspEI-LOV (404-538)-CAD (347-448) および 2A ペプチド-BspEI

[0081] (実施例2: O r a i 1 と B A C C S とのポリペプチドの作製)

B A C C S は、内在性の O r a i 1 が発現した場合、または O r a i 1 遺伝子と共発現した場合等に、カルシウムイオンチャネル O r a i 1 を光依存的に開閉することができる。そこで、O r a i 1 と B A C C S を結合させ、単一のポリペプチドとして発現させることによって、カルシウム流入を制御できるポリペプチドを作製した。O r a i 1 と C A D は 1 : 2 の比で存在する場合に最も効率よく O r a i 1 を活性化させることができ、O r a i 1 の C 末端に C A D をタンデムに 2 つつなげた場合に O r a i 1 が構成的に活性化されることが報告されている (L i ら、2010)。そこで、O r a i 1 の C 末端に B A C C S を 2 つタンデムにつなげた組み換えベクターを以下の手順で作製した。

[0082] (1) p O r a i 1 - t d T o m a t o - B A C C S × 2 - W P R E の作製

翻訳効率を上げるために O r a i 1 - Y F P の開始コドンの 5' 末端側に k o z a k 様配列 (C C A C C) を挿入した。具体的には、当該プラスミド中の O r a i 1 - Y F P 中の制限酵素認識部位である B g l I I I - B s p E

I サイトに、制限酵素 (X h o I) 認識部位および K o z a k 配列 (以下、「K Z K」と略す) を有する下記のリンカーを挿入した。

[0083] [表3]

T188: 5' - GATCCTCGAGCCACCATGCAT

T189: 5' - CCGGATGCATGGTGGCTCGAG

[0084] また、並行して、実施例 1 と同様に、組み換えベクター p t d T o m a t o - B A C C S - W P R E を作製し、その制限酵素認識部位である N h e I - A g e I サイトに、制限酵素 (X h o I) 認識部位を有する下記のリンカーを挿入し、組み換えベクター (p X h o I - A g e I - t d T o m a t o - B A C C S - W P R E) を作製した。

[0085] [表4]

T202: 5' - CTAGCGCTCTCGAGGAATTCA

T203: 5' - CCGGTGAATTCTCGAGAGCG

[0086] p K Z K - O r a i 1 - Y F P を制限酵素 (X h o I および A g e I) によって処理し、得られた DNA 断片を、p X h o I - A g e I - t d T o m a t o - B A C C S - W P R E 中の X h o I - A g e I サイトに挿入し、組み換えベクター (p K Z K - O r a i 1 - t d T o m a t o - B A C C S - W P R E) を作製した。

当該組み換えベクター中の O r a i 1 と t d T o m a t o との間には、O r a i 1 - Y F P に由来する、制限酵素認識部位である E c o R I - A g e I サイトを有するリンカーが含まれるが、当該制限酵素認識部位を除去する目的で、この E c o R I - A g e I サイトを下記の配列に置き換えた。得られた組み換えベクター (p K Z K - O r a i 1 - l i n k e r 2 - t d T o m a t o - B A C C S - W P R E) のアミノ酸配列は変化していない。

[0087] [表5]

T226: 5' - AATTCTCCAGTCCACGGTGCCACGGGCCAGAGATCCA

T227: 5' - CCGGTGGATCTCTGGCCCGTGGACCGTGGACTGGAG

[0088] 下記のプライマーおよび鋳型を使用して、P C R サーマルサイクラーによ

って増幅した。得られたPCR産物（BglIII-BamHI断片）を、pKZK-Orai1-linker2-tdTomato-BACCS-WPRE中のtdTomatoとBACCSの間の制限酵素認識部位であるBglIIIサイトに挿入し、組み換えベクター（pKZK-Orai1-linker2-tdTomato-BACCS-L1-BACCS-WPRE、以下「pOrai1-tdTomato-BACCS×2-WPRE」と呼ぶ）を作製した。「L1」はLiら（2010）が作製したOrai1-L2-CAD（336-485）-L1-CAD（336-485）中の「L1」のアミノ酸配列を参考にした。

[0089] [表6]

<L1（25 アミノ酸リンカー配列）のPCR増幅のために使用したプライマー>

T228: 5' -GGAGGTCAGGAGGAAGTGGAGGAGGTATCCTGCAGTCTCGGGTG

T229: 5' - TCCAGAACCGCCTGAACCACCACTGCCACCCCGAGACTGCAGGATA

鋳型:なし

<L1-BamHIのPCR増幅のために使用したプライマー>

T231: 5' - TGGCATCCACGGAGGGTCAGGAGGAAGTGG

T232: 5' - GGACTTGGATCCAGAACCGCCTGAACCACCAC

鋳型:L1

<BglIII-BACCSのPCR増幅のために使用したプライマー>

Tomato-C2: 5' - ACCACCTGTTCTGTACGGC

T230: 5' - CTGACCCTCCGTGGATGCCAGGGTTGTTGA

鋳型: ptdTomato-BACCS-WPRE

<BglIII-BACCS-L1-BamHIのPCR増幅のために使用したプライマー>

Tomato-C2: 5' - ACCACCTGTTCTGTACGGC

T232: 5' - GGACTTGGATCCAGAACCGCCTGAACCACCAC

鋳型: BglIII-BACCS および L1-BamHI

[0090] (2) pOrai1-Cherry-BACCS×2-WPRE、pOrai1-YFP-BACCS×2-WPREおよびpOrai1-BACCS×2-WPREの作製

pOrai1-tdTomato-BACCS×2-WPREを制限酵素（AgeIおよびBglIII）で処理して得られたtdTomato部分を、蛍光タンパク質融合発現ベクターpmCherry-C1を制限酵素（A

g e l および B g l I I I) で処理して得られた断片と置き換えて、組み換えベクター (p O r a i 1 - C h e r r y - B A C C S × 2 - W P R E) を作製した。また、p O r a i 1 - t d T o m a t o - B A C C S × 2 - W P R E 中の t d T o m a t o (A g e I - B g l I I I 断片) を、黄色蛍光タンパク質発現ベクター p E Y F P - C 1 の A g e I - B g l I I I と置き換えて、組み換えベクター (p O r a i 1 - Y F P - B A C C S × 2 - W P R E) を作製した。また、p O r a i 1 - t d T o m a t o - B A C C S × 2 - W P R E 中の t d T o m a t o (A g e I - B g l I I I 断片) を、下記リンカーと置き換えて、組み換えベクター (p O r a i 1 - B A C C S × 2 - W P R E) を作製した。

[0091] [表7]

T233: 5' - CCGGTCGGAGGAAGCGGTG

T234: 5' - GATCCACCGCTTCTCCGA

[0092] (3) p O r a i 1 - H A - B A C C S × 2 - W P R E の作製

下記のプライマーおよび鋳型を使用して、PCRサーマルサイクラーによって増幅した。得られたPCR産物 (3 x H A タグ配列) を、p O r a i 1 - B A C C S × 2 - W P R E 中の制限酵素認識部位である A g e I サイトに挿入し、組み換えベクター (p O r a i 1 - H A - B A C C S × 2 - W P R E) を作製した。

[0093] [表8]

< 3xHA 断片の増幅のために使用したプライマー >

T001: 5' - GGATACCCCTATGACGTTCCAGATTATGCTGGAAGCTATCCATACGATGTCCCCGACTAC

T002: 5' - TCCGGCATAGTCTGGCACATCGTAGGGATAGGAGCCAGCGTAGTCGGGGACATCGTATGG

鋳型: なし

< AgeI-3xHA-AgeI 断片の増幅のために使用したプライマー >

T236: 5' - GATCCACCGGTCGGAGGATACCCCTATGACGTTTC

T237: 5' - CTCCGACCGGTGGGGCATAGTCTGGCACATCGTAG

鋳型: 3xHA

[0094] (4) p O r a i 1 - H A - B A C C S × 2 - i g Y - W P R E 、 および p O r a i 1 - H A - B A C C S × 2 - i m T m - W P R E の作製

p O r a i 1 - H A - B A C C S × 2 - W P R E 発現細胞を蛍光により可

視化するために、IRES-gapYFP (Imaiら、2006; 以下、「igY」と略す) またはIRES-membrane-tdTomato-myc (Muzumdarら、2007; 以下、「imTm」と略す) を、pOrai1-HA-BACCS×2-WPREの3' 非翻訳領域の制限酵素認識部位であるSalIサイトに挿入し、組み換えベクター (それぞれ、pOrai1-HA-BACCS×2-igY-WPRE、pOrai1-HA-BACCS×2-imTm-WPRE) を作製した。なお、IRES (internal ribosome entry site) 配列は、メッセンジャーRNAの途中から翻訳を開始させることができる配列である。例えば、Orai1-HA-BACCS×2-igYのメッセンジャーRNAからは、Orai1-HA-BACCS×2とgapYFPという、2つのポリペプチドが翻訳される。

上記組み換えベクターによる発現産物は、Orai1とBACCSの間に、21アミノ酸リンカー (Orai1-BACCS×2)、57アミノ酸リンカー (Orai1-HA-BACCS×2)、258アミノ酸リンカー (Orai1-mCherry-BACCS×2)、498アミノ酸リンカー (Orai1-tdTomato-BACCS×2)、261アミノ酸リンカー (Orai1-YFP-BACCS×2) のいずれかが挿入されたコンストラクトとなる。

いずれにおいても、470nmの光 (青色光) の照射によって、効率よくカルシウム濃度が上昇した (図8B、略記はそれぞれ、Che; Orai1-mCherry-BACCS×2、T; Orai1-tdTomato-BACCS×2、HA; Orai1-HA-BACCS×2-imTm、を示す)。なお、カルシウム濃度の変化は実施例1と同様に算出した。また、Orai1-mCherry-BACCS×2をHEK293細胞中で発現させ、470nmの光 (青色光) を試験期間中継続して照射した後の、カルシウム蛍光プローブであるFluo-4を使用したカルシウムイメージング結果を図8Aに示す。

O r a i 1 と B A C C S の間のリンカーの長さに関して、本実験により、最短で 21 アミノ酸で機能することが確認された。さらに、光の照射および遮断を繰り返すことで、カルシウムチャネルの開閉を制御できることを確認した（図 8 C）。

[0095] （実施例 3：O r a i 1 に結合させる B A C C S の数の検討）

O r a i 1 と C A D は 1：2 の比で存在する場合に O r a i 1 を効率よく活性化させることができるという報告がある（L i ら、2010）。そこで、O r a i 1 と C A D の比が O r a i 1－B A C C S の作用に与える影響を検証すべく、O r a i 1 に B A C C S を 1 つだけ結合したポリペプチドを作製し、実施例 1（4）同様に、N F A T を使用した核移行アッセイを行った。

実施例 2（1）の中で作製した p K Z K－O r a i 1－t d T o m a t o－B A C C S×1－W P R E を、O r a i 1 に B A C C S を 1 つだけ結合したポリペプチド（O r a i 1－t d T o m a t o－B A C C S×1）として使用した。

核移行シグナルを検出するためのレポーター遺伝子 N F A T－G F P から、制限酵素（A g e I および S a c I）で N F A T を切り出し、これを蛍光タンパク質発現ベクター p E Y F P－N 1 の制限酵素認識部位である A g e I－S a c I サイトに挿入し、組み換えベクター（N F A T－Y F P）を作製した。

O r a i 1－t d T o m a t o－B A C C S×1 および N F A T－Y F P を、H E K 293 細胞中で共発現させ、470nm の光（青色光）を 20 分間照射した。その結果、N F A T－Y F P の蛍光（図 9 A 中「N F A T－Y F P」）は細胞質中にのみ認められ、核において観察されず、N F A T の核移行が認められなかった。つまり、O r a i 1 に B A C C S を 1 つしか結合していないポリペプチドによる O r a i 1 の活性化は困難であることが示された。

対照実験として、O r a i 1－t d T o m a t o－B A C C S×2、N F

A T-G F PをH E K 2 9 3細胞中で共発現させた。4 7 0 n mの光を2 0分間照射することでN F A Tは核に移行した（図9 B中「N F A T-G F P」）。

[0096]（実施例4：O r a i 1の変異体を使用したB A C C Sの光応答の検討）

C A D領域によるO r a i 1の活性化が抑制されるO r a i 1の変異（O r a i 1（L 2 7 3 D））を、O r a i 1-C A D-C A D（O r a i 1のC末端にC A Dをタンデムに2つつなげたコンストラクトによって構成的に活性化されている）に導入すると、構成的なカルシウムの流入は観察されない（L i ら、2 0 1 0）。

そこで、O r a i 1に不活性型変異L 2 7 3 DをリコンビナントP C Rによって導入し、さらにH Aタグおよび蛍光物質を組んだ組み換えベクター（O r a i 1（L 2 7 3 D）-H A-B A C C S×2-i g Y）を作製した（図1 0 A）。これをH E K 2 9 3細胞に導入してカルシウムシグナルを観察した。

O r a i 1（L 2 7 3 D）-H A-B A C C S×2に4 7 0 n mの光（青色光）を照射する前、および1 0分間照射した後の、赤色蛍光カルシウムセンサーであるR h o d - 3によるカルシウムイメージング結果を、図1 0 Bに示す。図1 0 Bに示される通り、光の照射の前後で細胞内カルシウム濃度に変化は認められなかった。

また、B A C C SのL O V 2-J αを暗変異体にしたポリペプチド（O r a i 1-H A-B A C C S（d a r k）×2）を作製した。O r a i 1-H A-B A C C S（d a r k）×2を発現するH E K 2 9 3細胞に4 7 0 n mの光（青色光）を照射しても、細胞内のカルシウム濃度の上昇は認められなかった（データは示していない）。

以上から、B A C C Sが光に応答してO r a i 1に作用し、O r a i 1を活性化させることが示された。

[0097]（実施例5：C D I領域を含むO r a i 1-B A C C Sについての検討）

S T I M 1のC D I（C a l c i u m d e p e n d e n t i n a c t

ivation) (アミノ酸470-491位)領域は、Orai1を素早く不活性化するのに必要な領域を含む(Mullinsら、2009)。そのため、Orai1-BACCSにCDI領域を組み込むことによって、一旦活性化されたOrai1をすぐに不活性化できるカルシウムチャネルが得られる可能性がある。

そこで、CDI領域を含むようにOrai1-BACCSにおけるCAD領域のC末端を伸長し(伸長されたCAD領域を「CAD(347-630)」と示す)、これにHAタグおよび蛍光物質が組み込まれた組み換えベクター(Orai1-HA-BACCS(347-630)×2-igY; 図11A)を作製した。CAD(347-630)のDNA断片は、プラスミドSTIM1-CFPからPCRによって増幅し、上記実施例1と同様の手順でBACCS(347-630)を作製した。

これらの組み換えベクターをHEK293細胞中で発現させ、当該細胞に470nmの光(青色光)を照射し、赤色蛍光カルシウムセンサーであるRhod-3を使用したカルシウムイメージングを行った。測定開始50秒後から10分間470nmの光(青色光)を照射し、その後15分間、暗条件で観察した。

その結果、Orai1-HA-BACCS(347-630)×2-igYにおいては光の照射によって細胞内カルシウムの濃度が上昇した。しかし、その後、予想に反してカルシウムの濃度の減少(すなわち、Orai1の不活性化)がすぐに認められることはなく、光を遮断しても、細胞内カルシウム濃度が低下しなかった(図11B、略記はそれぞれ、WT; CDI領域を含まないOrai1-BACCS、CDI; CDI領域を含むOrai1-BACCS、を示す)。なお、カルシウム濃度の変化は実施例1と同様に算出した。この結果は、Orai1-BACCSにCDI領域を導入することは適切ではなく、また、Orai1-BACCSを構成するCAD領域のC末端側の配列の長さがOrai1-BACCSの作用において重要であることを示唆している。

[0098] L O V 2 - J α 内の G 5 2 8 A 変異および N 5 3 8 E 変異の 2 重変異 (G V M L I K K T A E N から A V M L I K K T A E E) によって、L O V 2 の光スイッチとしてのダイナミックレンジが大きくなることが報告されている (S t r i c k l a n d ら、2 0 1 0)。このような 2 重変異を N F A T アッセイに使用した 4 つの野生型 L O V (4 0 4 - 5 4 2、4 0 4 - 5 3 9、4 0 4 - 5 3 8、4 0 4 - 5 3 5) に導入し、4 7 0 n m の光を照射した。その結果、いずれのコンストラクトにおいても N F A T が核へ移行せず、光スイッチがオンにならなかった (データは示していない)。

[0099] (実施例 6 : B A C C S $\times$ 2 の作製)

O r a i 1 発現ベクターを使用せずに、B A C C S $\times$ 2 が単独でどの程度 O r a i 1 を活性化できるかを調べるために、B A C C S を 2 つタンデムにつなげた組み換えベクターを以下の手順で作製した。本例では、H E K 2 9 3 T で発現している内在性の O r a i 1 に対して B A C C S $\times$ 2 が及ぼす影響を検討した。

[0100] (1) p B A C C S $\times$ 2 - W P R E の作製

下記のプライマーおよび鋳型を使用して、P C R サーマルサイクラーによって増幅した。得られた P C R 産物 (A g e I - B a m H I 断片と B a m H I - S a l I 断片) を、p O r a i 1 - H A - B A C C S $\times$ 2 - W P R E 改変ベクター (インサートの開始コドン近傍の配列を、下記リンカーで N h e I - X h o I - K Z K - 開始コドン - A g e I に改変したもの) の A g e I - S a l I 断片を除いたベクターに挿入し、組み換えベクター (p B A C C S $\times$ 2 - W P R E) を作製した (図 1 2 A)。

上記組み換えベクターによる発現産物は、実施例 2 における p O r a i 1 - H A - B A C C S $\times$ 2 - W P R E 発現産物中の B A C C S $\times$ 2 の領域と同一のアミノ酸配列を有し、かつ、N 末端に 1 0 アミノ酸 (M G P V G G S G G S)、C 末端に 9 アミノ酸 (G G S G G S G L V) が付加されている。これらは融合タンパク質を作製する際にリンカーとして利用できるように付加したものである。

[0101] [表9]

<NheI-BACCS-BamHI 断片の増幅のために使用したプライマー>

T139: TAAGACCGACCGACAGTTCC

T290: TCCTCCGGATCCTCCGTGGATGCCAGGGTT

鋳型: Orail-HA-BACCS×2

<BamHI-BACCS-SalI 断片の増幅のために使用したプライマー>

T267: GTGGGAGGATCCGGAGGAAGTGGAGGAGGTATC

T291: GTCAGAGTCGACTTAGACTAGTCCGCTACCTCCAGAGCCGCCGTGGATGCCAGGGTTGT

TGAC

鋳型: Orail-HA-BACCS×2

<NheI-XhoI-KZK-開始コドン-AgeI リンカー>

T321: CTAGCCTCGAGGCCACCATGGGA

T322: CCGGTCCCATGGTGGCCTCGAGG

[0102] (2) pBACCS×2-igY-WPREの作製

上記で得られた pBACCS×2-WPRE 発現細胞を蛍光により可視化するために、実施例2と同様に、igYを、pBACCS×2-WPREの3'非翻訳領域の制限酵素認識部位であるSalIサイトに挿入し、組み換えベクター(pBACCS×2-igY-WPRE)を作製した。

BACCS×2-igYを発現するHEK293T細胞に対してカルシウムイメージングを行った。カルシウム蛍光プローブとしてRhod-3(赤色蛍光カルシウムセンサー)を用いた。観察開始50秒後から、コンフォーカル顕微鏡の442nmの波長のレーザーを5秒毎に照射して細胞を刺激した後、それぞれの細胞について、蛍光強度変化を検討した。各時点での蛍光強度として、 ΔF (蛍光変化量)/ F_0 (光刺激前の蛍光強度)を算出した。 $\Delta F/F_0$ の値を縦軸にプロットし、横軸に時間(秒)を示した結果を図12Bに示す。比較試験としてOrail-HA-BACCS×2-igYを発現するHEK293T細胞で同様にカルシウムイメージングを行った。なお、図中のB×2はBACCS×2-igY(解析細胞数n=45)を、OB×2はOrail-HA-BACCS×2-igY(解析細胞数n=35)を示す。各時点の $\Delta F/F_0$ は、各細胞についての平均値として標準誤差と共に示した。青色光照射開始時に認められる、わずかな蛍光強度の上昇

は、測定機器によるノイズである。

図12Bに示される通り、BACCS×2はOrai1発現ベクターを使用しなくとも内在性のOrai1を活性化でき、Orai1-HA-BACCS×2よりも効率よくカルシウム濃度を上昇させることが認められた。

[0103] (3) pYFP-BACCS×2-WPREの作製

BACCS×2のN末端に蛍光タンパク質を融合できることを確認するために、下記のプライマーおよび鋳型を使用して、PCRサーマルサイクラーによって増幅した。得られたPCR産物(NheI-AgeI断片)をpBACCS×2-WPREのNheI-AgeIサイトに挿入し、組み換えベクター(pYFP-BACCS×2-WPRE)を作製した。YFP-BACCS×2を発現するHEK293T細胞に対してカルシウムイメージングを行った。併せて、BACCS×2-igYを発現するHEK293T細胞に対してもカルシウムイメージングを行った。カルシウム蛍光プローブとしてRhod-3(赤色蛍光カルシウムセンサー)を用いた。観察開始50秒後から、470nm波長のLEDランプを継続的に照射して細胞を刺激した。それぞれの細胞について、上記同様に $\Delta F/F_0$ を算出して縦軸にプロットし、横軸に時間(秒)を示した結果を図13に示す。なお、図中のB×2はBACCS×2-igY(解析細胞数n=5)を、YB×2はYFP-BACCS×2(解析細胞数n=5)を示す。各時点の $\Delta F/F_0$ は、各細胞についての平均値として標準誤差と共に示した。

図13に示される通り、N末端へタンパク質を融合しても、BACCS×2は内在性のOrai1を活性化でき、効率よくカルシウム濃度を上昇させることが認められた。

[0104] [表10]

<NheI-YFP-AgeI断片の増幅のために使用したプライマー>

T281: AGGTGGAGATCTGCTAGCGCCACCATGGTGAGCAAGGG

T282: TCCACCGACCGGTCCCTTGTTACAGCTCGTCCATGC

鋳型: EYFP

[0105] STIM1はSTIM2との配列類似性が高く、線虫、ヒト等の様々な種

間で保存されている（図2B；Yuanら、2009より改変）。図2Bの略記はそれぞれ、H. sap；ヒト、B. tau；ウシ、P. tro；チンパンジー、E. cab；ウマ、G. gal；ニワトリ、M. mus；マウス、R. nor；ラット、S. scr；ブタ、X. lae；アフリカツメガエル、D. rer；ゼブラフィッシュ、D. mel；ショウジョウバエ、A. gam；蚊、N. vit；宝石バチ、C. ele；線虫、を示す。

[0106] 同様に、Orai1はOrai2およびOrai3との配列類似性が高く、線虫、ヒト等の様々な種間で保存されている（図2A）。図2Aの略記はそれぞれ、h；ヒト、m；マウス、z；ゼブラフィッシュ、x；アフリカツメガエル、d；ショウジョウバエ、ce；線虫、を示す。

[0107] また、J α 領域も、様々な植物種で高度に保存されている（図3）。図3の略記はそれぞれ、Os；イネ フォトリポシン1、Zm；トウモロコシ フォトリポシン1、At；シロイヌナズナ フォトリポシン1およびフォトリポシン2、Ps；エンドウマメ フォトリポシン1、Vf；ソラマメ フォトリポシン1、Ac；ホウライシダ フィトクロム3、As；オートムギ フォトリポシン1、を示す（Harperら、2004より引用）。

[0108] さらに、LOV2領域も、前述のように多くの植物間で保存されており、例えば、オートムギのLOV2領域のアミノ酸配列との相同性は、アジアイネのフォトリポシン1；81%、シロイヌナズナのフォトリポシン1；87%、シロイヌナズナのフォトリポシン2；83%、エンドウマメのフォトリポシン1；87%、ソラマメのフォトリポシン1；トウモロコシのフォトリポシン1；95%、トマトのフォトリポシン1；87%である。

[0109] これらのことから、各領域は、様々な種ホモログで代用できる可能性がある。

[0110] 以下に、本実施例で使用したプラスミドのコンストラクトを示す。

[0111]

[表11]

1. tdTomato-BACCS のコンストラクト

tdTomatoLOV(404-538)CAD(347-448)

MVSKGEEVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFA
WDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQD
GTLIYKVKMRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQALKLKDGGH
YLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHFLGHGTGS
TGSGSSGTASSEDNNMAVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLK
VTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLV
TVTQDSSLQDGTLIYKVKMRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQ
ALKLKDGGRYLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHH
LFLYGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNC
RFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYF
IGVQLDGTGEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLV
AKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEI
LCGFQIVNNPGIH

[0112] [表12]

2. tdTomato-BACCS-2A-Orai1 のコンストラクト

tdTomatoBACCS2AOrai1

MVSKGEEVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFA
WDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQD
GTLIYKVKMRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQALKLKDGGH
YLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHFLGHGTGS
TGSGSSGTASSEDNNMAVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLK
VTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLV
TVTQDSSLQDGTLIYKVKMRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQ
ALKLKDGGRYLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHH
LFLYGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNC
RFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYF
IGVQLDGTGEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLV
AKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEI
LCGFQIVNNPGIHEGRGSLTTCGDVEENPGPMHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRR
RSGDGEPPGAPPPPSAVTYPDWIGQSYSEVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRT
SALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPGLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSN
VHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAFSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTS
KPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIASSTTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDROFQELNE
LAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA

[0113]

[表13]

3. mCherry-BACCS-2A-Orai1 のコンストラクト

mCherryBACCS

2A

Orai1

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPPYEGTQTAKLKVTKGGP
LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDS
SLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLK
DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKL DITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGM
DELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGP
ETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQL
DGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG
AEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGF
QIVNNPGIHEGRGSLTTCGDVEENPGPMHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRS
DGEPPGAPPPPSAVTYPDWIGQSYSEVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSA
LLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPGLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNV
HNLNSVKESPHERMHRHIELAWAFSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSK
PPASGAAANVSTSGITPGQAAIASTTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNEL
AEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA

[0114] [表14]

4. Orai1-BACCS×2 のコンストラクト

Orai1Linker2BACCSL1

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRS
GDGEPPGAPPPPSAVTYPDWIGQSYSE
VMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPGL
LIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAFST
VIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAIASTT
IMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA
RILOSTVPRARDPPVGGSGGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEIL
GRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKG
DVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWQLTHEVEVQYYNIKKQNAE
KQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHR
WQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILOSRGGSGGSGGSLATTLERIEKNFVITDPR
LPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYT
KSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQK
WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHK
ILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[0115]

[表15]

5. Orai1-Cherry-BACCS×2 のコンストラクト

Orai1Linker2CherryBACCSL1

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGE
GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYCLKLSFPEGFKW
ERVMNFEDGGVVVTVDSSLDGGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERM
YPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY
TIVEQYERAEGRHSTGGMDELKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQL
TEYSREEILGRNCRFLOGPETDRATVRKIRDAIDNOTEVTVOLINYTKSGKKFWNLFHLO
PMRDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLOKWLOLTHEVEVOYY
NIKKONAEKOLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKOALSEVTA
ALRERLHRWQOIEILCGFOIVNNPGIHGGSGGSGGGIQLSRGGSGGSGGSGSLATTLERIE
KNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLOLTEYSREEILGRNCRFLOGPETDRATVRKIRDAIDNOTE
VTVOLINYTKSGKKFWNLFHLOPMRDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRDAAEREGVMLIK
KTAENLOKWLOLTHEVEVOYYNIKKONAEKOLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHS
SSLDDVDHKILTAKOALSEVTAALRERLHRWQOIEILCGFOIVNNPGIH

[0116]

[表16]

6. Orai1-YFP-BACCS×2 のコンストラクト

Orai1Linker2YFPBACCSL1

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSRGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKL YLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT
YGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQER
TIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMAD
KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALSKDPNEK
RDHIMVLLEFVTAAGITLGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFL
QLTEYSREEILGRNCRFLOGPETDRATVRKIRDAIDNOTEVTVOLINYTKSGKKFWNLF
HLOPMRDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLOKWLQTHEVE
VOYYNIKKONA EKOLLVAKEGA EKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKOAL
SEVTAALRERLHRWOOIEILCGFOIVNNPGIHGGSGGSGGGIILQSRGGSGGSGGSGSLAT
TLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLOGPETDRATVRKIRDA
IDNOTEVTVOLINYTKSGKKFWNLFHLOPMRDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRDAAE
REGVMLIKKTAENLOKWLQTHEVEVOYYNIKKONA EKOLLVAKEGA EKIKKKRNTL
FGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKOALSEVTAALRERLHRWOOIEILCGFOIVNNPGIH

[0117]

[表17]

7. Orai1-HA-BACCS×2 のコンストラクト

Orai1Linker2HABACCSL1

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVGGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAPPVGGSG
GSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLOLTEYSREEILGRNCRFLOGPETDRATVR
KIRDAIDNOTEVTVOLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRD
AAEREGVMLIKKTAENLOKWLQLTHEVEVOYYNIKKQNAEKOLLVAKEGAEKIKKKR
NTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQOIEILCGFOIVNPNPG
IHGSGSGSGGGILQSRGGSGSGSGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLOLTE
YSREEILGRNCRFLOGPETDRATVRKIRDAIDNOTEVTVOLINYTKSGKKFWNLFHLQPM
RDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLOKWLQLTHEVEVOYYNIK
KQNAEKOLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALR
ERLHRWQOIEILCGFOIVNPNPGIH

[0118] [表18]

8. Orai1-mCherry-BACCS のコンストラクト

Orai1Linker2mCherryBACCS

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGE
GRPYEGTOTAKLKVTGGPLPFAWDILSPOFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKW
ERVMNFEDGGVVTVDSSLODGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMOKKTMGWEASSERM
YPEDGALKGEIKORLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY
TIVEOYERAEGRHSTGGMDELYKSGRLSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLOL
TEYSREEILGRNCRFLOGPETDRATVRKIRDAIDNOTEVTVOLINYTKSGKKFWNLFHLQ
PMRDOKGDVOYFIGVOLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLOKWLQLTHEVEVOYY
NIKKQNAEKOLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTA
ALRERLHRWQOIEILCGFOIVNPNPGIH

[0119]

[表19]

9. Orai1-tdTomato-BACCS のコンストラクト

Orai1Linker2tdTomatoBACCS

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPP
GLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWA
FSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAI
ASTTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDROFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPG
SHYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEEVIKEFMREFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRP
YEGTQAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWER
VMNFEDGGLVTVTODSSLODGTLIYVKMRGTNFPPDGPVMOKKTMGWEASTERLYP
RDGVLKGEIHOALKLKDGGHYLVFEKTIYMAKKPVOLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTI
VEQYERSEGRHHLFLGHGTGSTGSGSSGTASSEDNNMAVIKEFMREFKVRMEGSMNGH
EFEIEGEGEGRPYEGTQAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKK
LSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTODSSLODGTLIYVKMRGTNFPPDGPVMOKKTM
GWEASTERLYPRDGVLKGEIHOALKLKDGGRYLVEFKTIYMAKKPVOLPGYYYVDTKL
DITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHLFLYGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDN
PIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLOQPETDRATVRKIRDAIDNQTETVTVQLINYTKSG
KKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLO
LTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILT
AKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[0120] [表20]

10. Orai1-BACCS のコンストラクト

Orai1BACCS

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSY
SEVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYP
PGLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELA
WAFSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQ
AAAIASSTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDROFQELNELAEFARLQDQLDHRGDH
PLTPGSHYAGPVATRSATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRN
CRFLOQPETDRATVRKIRDAIDNQTETVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDV
QYFIGVQLDGTTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLOLTHEVEVQYYNIKKQNAEK
QLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHR
WQQIEILCGFQIVNNPGIH

[0121]

[表21]

11. BACCS×2 のコンストラクト

BACCSL1

MGPVGGSGGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETD
RATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGT
AAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGT
FHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGI
LQSRGGSGGSGGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQ
GPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGT
EHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNT
TLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGG
SGLV

[0122] [表22]

12. YFP-BACCS×2 のコンストラクト

YFPBACCSL1

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTT
FGYGLQCFAFYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKDTLVNRIELK
GIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFIRHNIEDGSGVQLADHYQQNTPIG
DGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGPVGGSGGSLATTL
ERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTE
VTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGT
EHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGT
FHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGS
LATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAI
DNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGT
EHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGT
FHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGLV

[0123] (参考文献)

1. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21 (2000).

2. de Felipe, P. et al. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. Trends Biotechnol. 24, 68–75 (2006).

3. Harper, S. M., Christie, J. M. & Gardner, K. H. Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity. Biochemistry 43, 16184–16192 (2004).

4. Harper, S. M., Neil, L. C. & Gardner, K. H. Structural basis of a phototropin light switch. Science 301, 1541–1544 (2003).

5. Hogan, P. G., Lewis, R. S. & Rao, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. Annu. Rev. Immunol. 28, 491–533 (2010).

6. Imai, T., Suzuki, M. & Sakano, H. Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. Science 314, 657–661 (2006).

7. Kawasaki, T., Lange, I. & Feske, S. A minimal regulatory domain in the C

terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 49–54 (2009).

8. Kramer, R. H. , Fortin, D. L. & Trauner, D. New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 544–552 (2009).

9. Li, Z. et al. Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell Res.* (2010).

10. Liu, X. & Tonegawa, S. Optogenetics 3. 0. *Cell* 141, 22–24 (2010).

11. Muik, M. et al. A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *J. Biol. Chem.* 284, 8421–8426 (2009).

12. Mullins, F. M. , Park, C. Y. , Dolmetsch, R. E. & Lewis, R. S. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRA

C channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 15495–15500 (2009).

13. Muzumdar, M. D. , Tasic, B. , Miyamichi, K. , Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. Genesis 45, 593–605 (2007).

14. Park, C. Y. et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. Cell 136, 876–890 (2009).

15. Rana, A. & Dolmetsch, R. E. Using light to control signaling cascades in live neurons. Curr. Opin. Neurobiol. 20, 617–622 (2010).

16. Salomon, M. , Christie, J. M. , Knieb, E. , Lempert, U. & Briggs, W. R. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. Biochemistry 39, 9401–9410 (2000).

17. Strickland, D. , Moffat, K. & Sosnick, T. R. Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. Pr

oc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 10709–10714 (2008).

18. Strickland, D. et al. Rationally improving LOV domain-based photoswitches. Nat. Methods 7, 623–626 (2010).

19. Wu, Y. I. et al. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. Nature 461, 104–108 (2009).

20. Yuan, J. P. et al. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. Nat. Cell Biol. 11, 337–343 (2009).

21. Nakasone, Y., Eitoku, T., Zikihara, K., Matsuoka, D., Tokutomi, S. & Terazima M. Stability of dimer and domain-domain interaction of Arabidopsis phototropin 1 LOV2. J. Mol. Biol. 383, 904–913 (2008).

22. Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., & Hayakawa, T. IRES-dependent second gene expression is

significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. Mol Ther. 1, 376-82 (2000).

請求の範囲

[請求項1] 配列番号1または配列番号1と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるLOV2領域と、

配列番号2、配列番号3、またはLOV2-J α の光スイッチとしての機能を維持し、かつ配列番号2もしくは3のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるJ α 領域と、

配列番号4、またはカルシウムチャネルOrailを活性化でき、かつ配列番号4のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるCAD領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

前記LOV2領域、前記J α 領域および前記CAD領域は、N末端からC末端に向かって、前記LOV2領域、前記J α 領域および前記CAD領域の順で配置され、

前記J α 領域のC末端と前記CAD領域のN末端との間にアミノ酸配列が介在していないポリペプチド。

[請求項2] 配列番号5またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号5のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるOrail領域と、

請求項1記載のポリペプチドからなる第1のBACCS領域と、

請求項1記載のポリペプチドからなる第2のBACCS領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

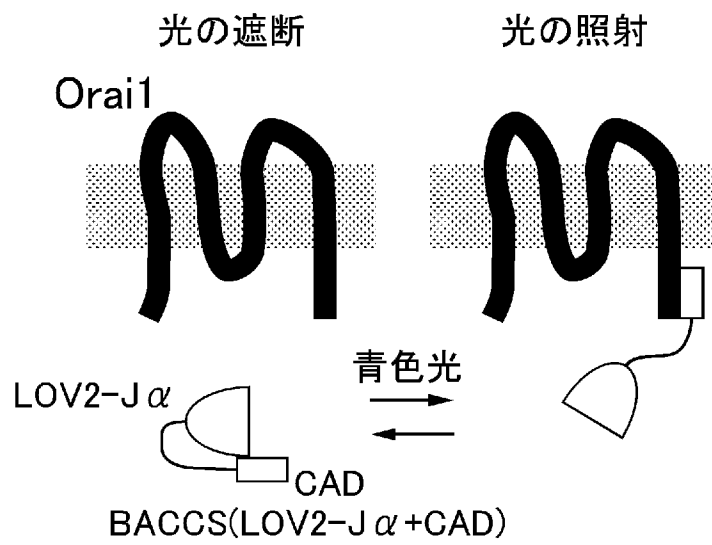
前記Orail領域、前記第1のBACCS領域および前記第2のBACCS領域は、N末端からC末端に向かって、前記Orail領域、前記第1のBACCS領域および前記第2のBACCS領域の順で配置されるポリペプチド。

[請求項3] 前記Orail領域のC末端と前記第1のBACCS領域のN末端の間に第1のリンカーが介在する請求項2記載のポリペプチド。

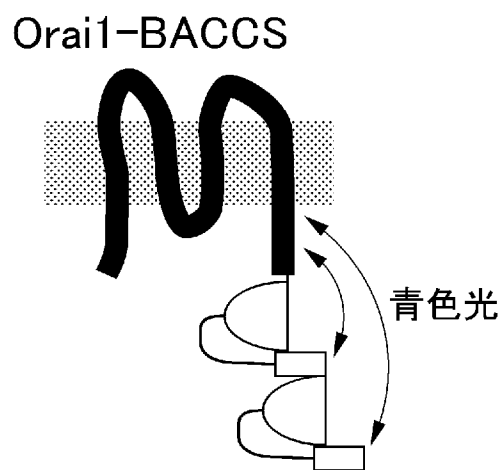
- [請求項4] 前記第1のB A C C S領域のC末端と前記第2のB A C C S領域のN末端の間に第2のリンカーが介在する請求項2または3に記載のポリペプチド。
- [請求項5] 請求項1記載のポリペプチドからなる第1のB A C C S領域と、
請求項1記載のポリペプチドからなる第2のB A C C S領域と、を含み、かつ、
配列番号5またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号5のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるO r a i 1領域を含まないアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- [請求項6] 前記第1のB A C C S領域のC末端と前記第2のB A C C S領域のN末端の間にリンカーが介在する請求項5に記載のポリペプチド。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする単離された核酸。
- [請求項8] 請求項7に記載の核酸を含む組み換えベクター。
- [請求項9] 請求項8に記載の組み換えベクターを含む遺伝子導入キット。
- [請求項10] 請求項8に記載の組み換えベクターを含み、単離された細胞または非ヒト動物である形質転換体。
- [請求項11] 請求項10記載の形質転換体に照射する光の強度を操作することによって、前記形質転換体の細胞内カルシウムシグナルを調節する細胞内カルシウムシグナルの調節方法。
- [請求項12] 前記ポリペプチドは、請求項1、5または6のいずれか1項に記載のポリペプチドであり、かつ、前記細胞はO r a i 1を発現している請求項11に記載の細胞内カルシウムシグナルの調節方法。
- [請求項13] 前記ポリペプチドは、請求項2～4のいずれか1項に記載のポリペプチドである請求項9に記載の細胞内カルシウムシグナルの調節方法。

[図1]

(A)



(B)

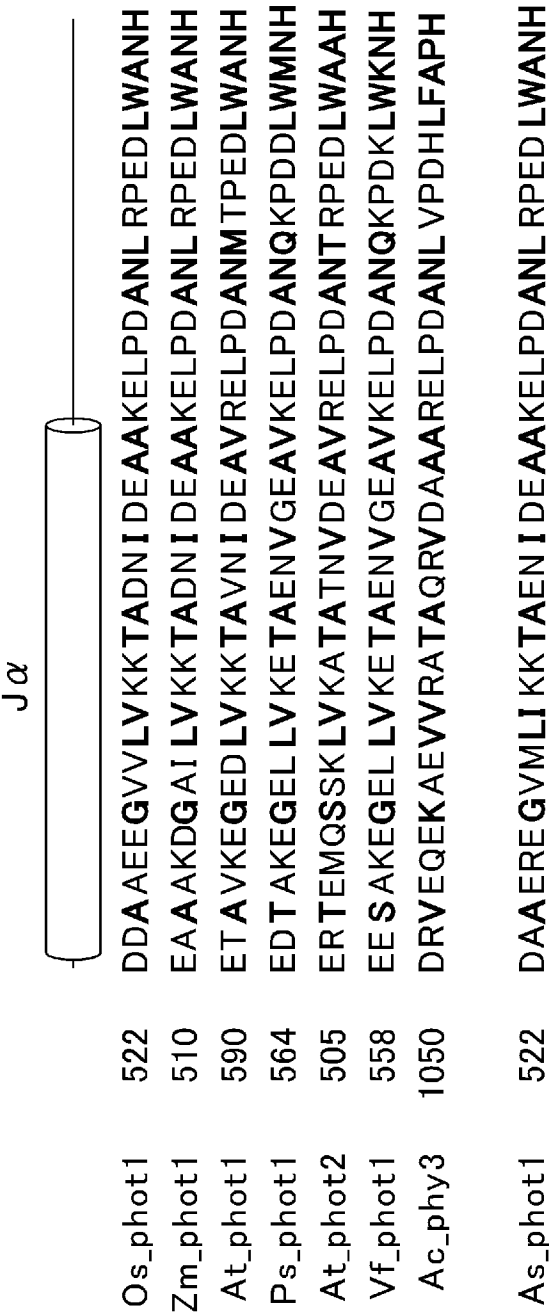


[illegible]

[図2B]

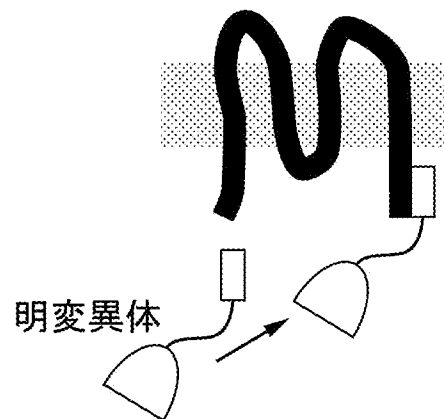
H. sap	STIM1	344	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
B. tau	STIM1	342	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
P. tro	STIM1	270	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
E. cab	STIM1	344	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
G. gal	STIM1	270	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
M. mus	STIM1	344	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
R. nor	STIM1	344	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
S. scr	STIM1	344	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLLVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
X. lae	STIM1	333	PDALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAEKQLMLAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LCGFOIVN
D. rer	STIM1	338	PEALQKWLQLTHE	EVOYNIKKQNAERQLOVAKEGAER	KKRNT	FGTFHVAHS	SSDDVDHKT	TAKOALSEVTAAALRERLHRWQOIE	LTGFTLVH
D. mel	STIM	410	PPQLQSWLQVTHE	ESKNHOKKRTSAEKQLOSAKEACEK	KKRSS	VGAFVSTHG	KSDDVDRS	VEARIALGDVTNELQERLHRWQOIE	TCGLNIVN
A. gam	STIM	314	POGLQSWLQVTHE	ENKHHIRKRIKMAEKQLEQAKACEK	KKRSS	VGAFVSTHG	KSDDVDRS	VEARIALNDVTNDLQERLHRWQOIE	TMLGFGIVN
N. vit	STIM	276	PVGLQHWLQVTHE	ENKSYMKKQSAEKQLOSAKEACEK	KKRSS	VGAFVSTHG	KSDDVDRS	VEARIALNEVTALQERLHRWQOIE	LCGFNITN
C. ele	STIM	287	PLALQPLRRTCENHAF	LEKQKQDCFKEMKEAIEWVDRLOKKQGSVLS	KLATGAASISDQVDSKI	FALKSRMEKIH	TLTRETQERWQOIES	LCGFPPLY	

[図3]



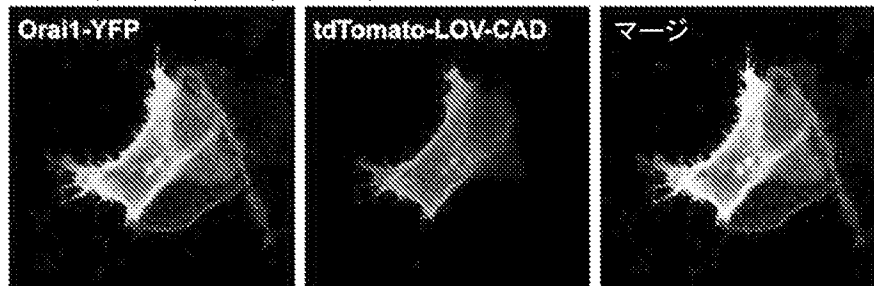
[図4]

(A)

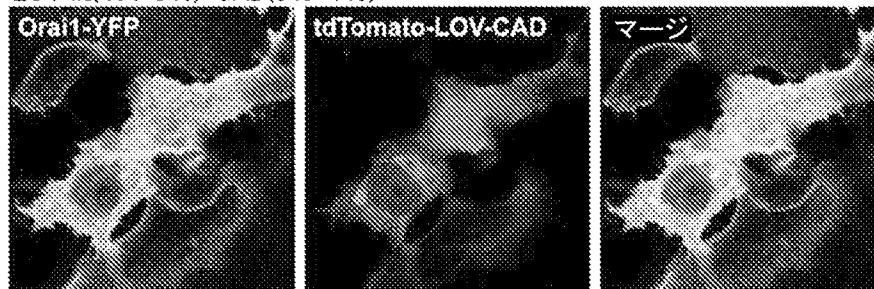


(B)

LOV lit(404-546)-CAD(348-448)



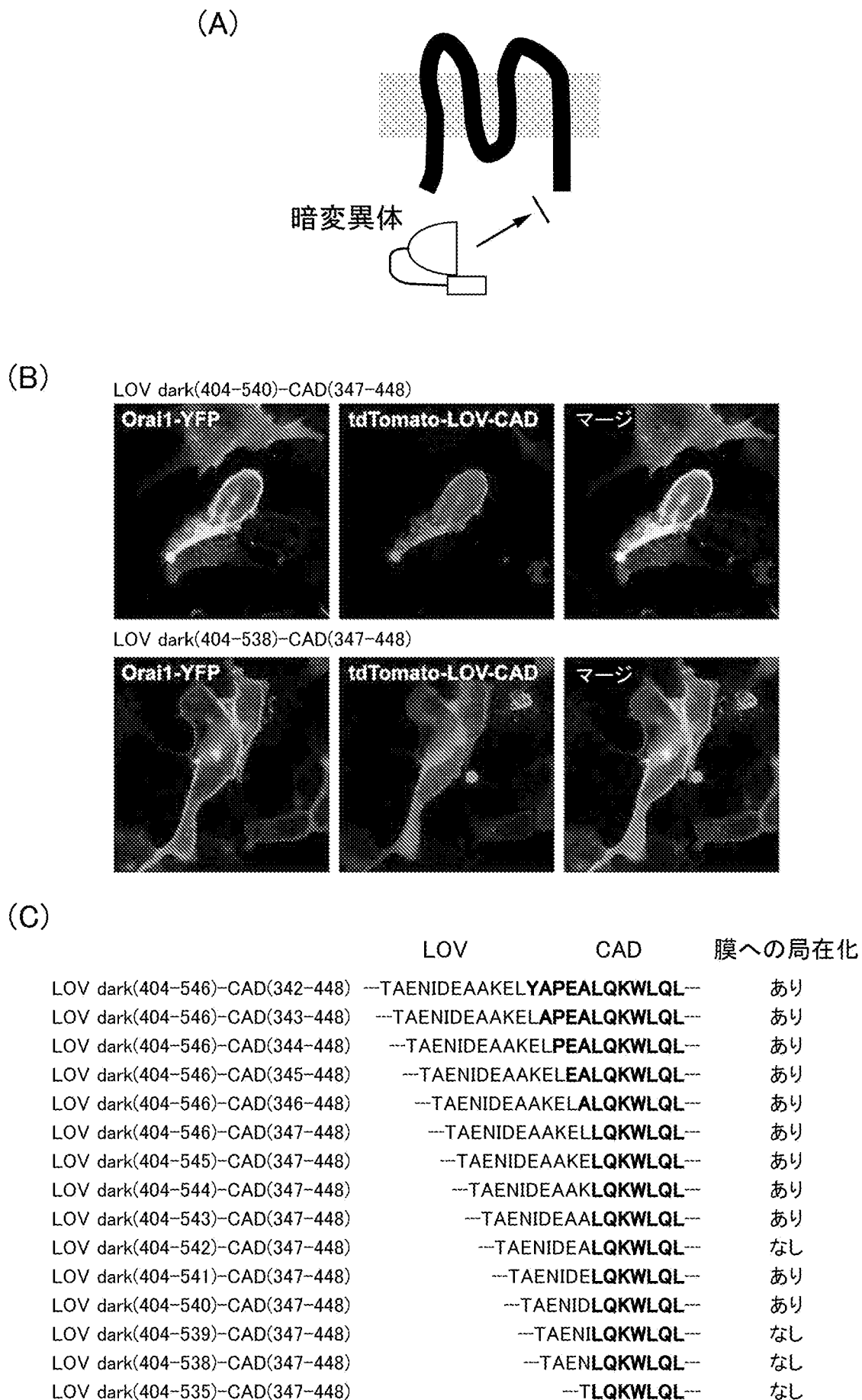
LOV lit(404-546)-CAD(349-448)



(C)

	LOV	CAD	膜への局在化
LOV lit(404-546)-CAD(342-448)	--TAENIDEAAKELYAPEALQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(343-448)	--TAENIDEAAKELAPEALQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(344-448)	--TAENIDEAAKELPEALQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(345-448)	--TAENIDEAAKELEALQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(346-448)	--TAENIDEAAKELALQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(347-448)	--TAENIDEAAKELLQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(348-448)	--TAENIDEAAKELQKWLQL--		あり
LOV lit(404-546)-CAD(349-448)	--TAENIDEAAKELKWLQL--		なし
LOV lit(404-546)-CAD(350-448)	--TAENIDEAAKELWLQL--		なし
LOV lit(404-545)-CAD(348-448)	--TAENIDEAAKEQKWLQL--		なし
LOV lit(404-544)-CAD(348-448)	--TAENIDEAAKQKWLQL--		なし
LOV lit(404-543)-CAD(348-448)	--TAENIDEAAQKWLQL--		なし

[図5]

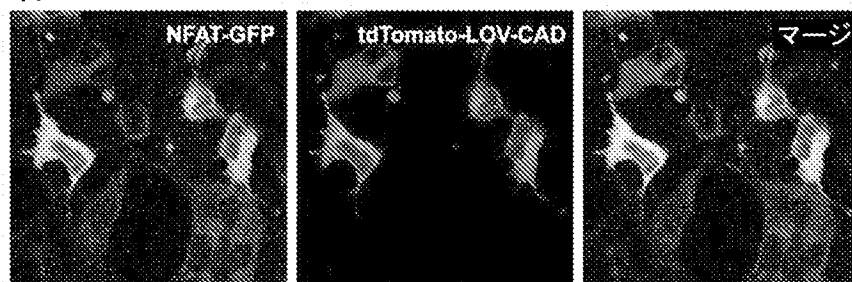


[図6]

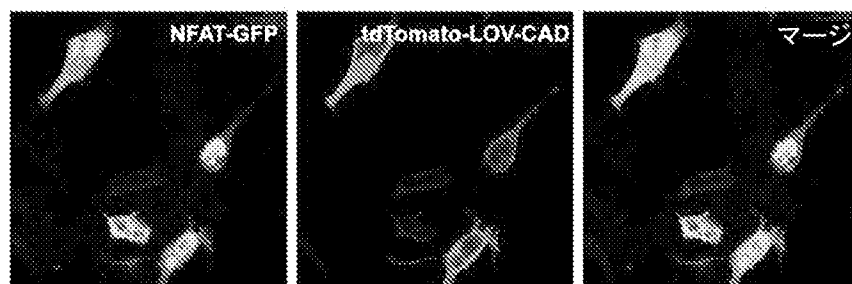
(A)

tdTomato-LOV(404-538)-CAD(347-448) / Orail / NFAT-GFP

暗



明

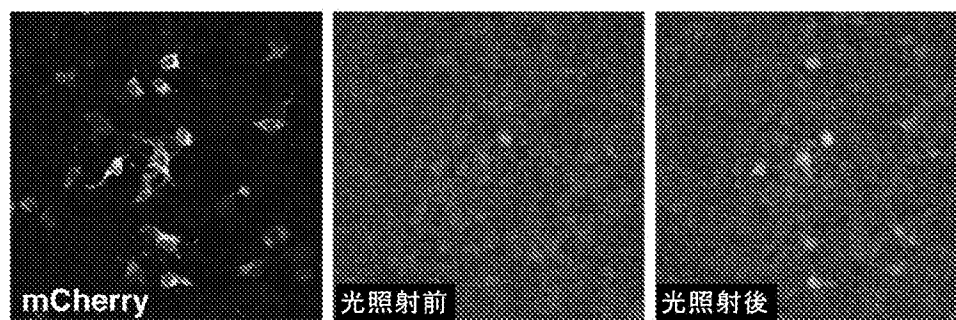


(B)

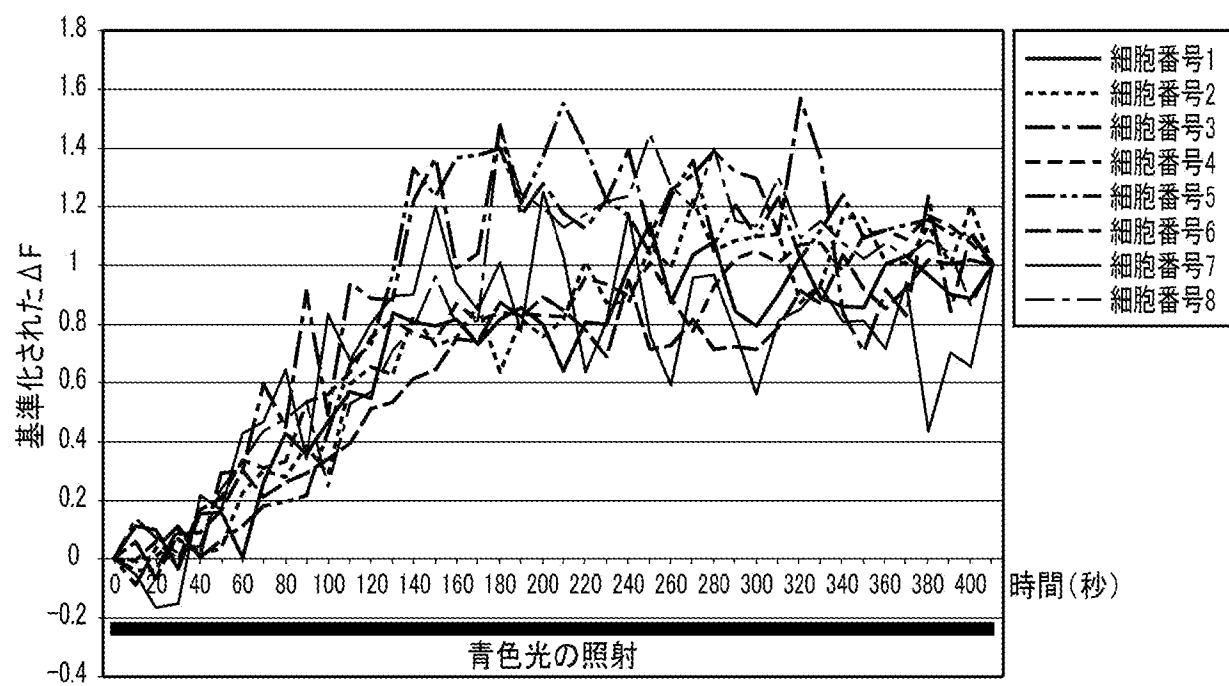
	NFAT の 核局在化		膜への局在化	
	暗	明	暗	明
LOV(404-542)-CAD(347-448)	—	—	—	—
LOV(404-539)-CAD(347-448)	—	+/-	—	—
LOV(404-538)-CAD(347-448)	—	++	—	++
LOV(404-535)-CAD(347-448)	+	++	++	++

[図7]

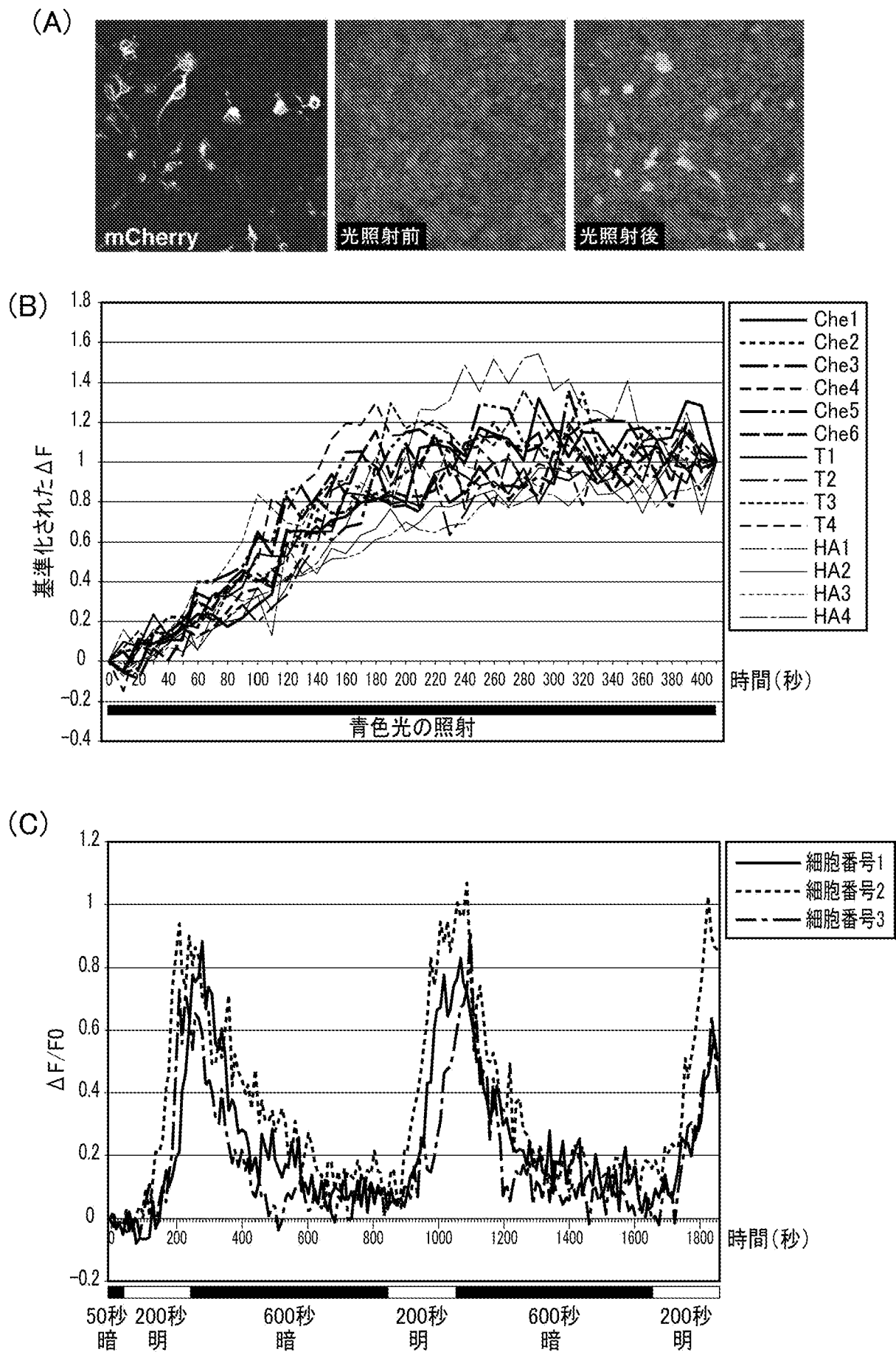
(A)



(B)

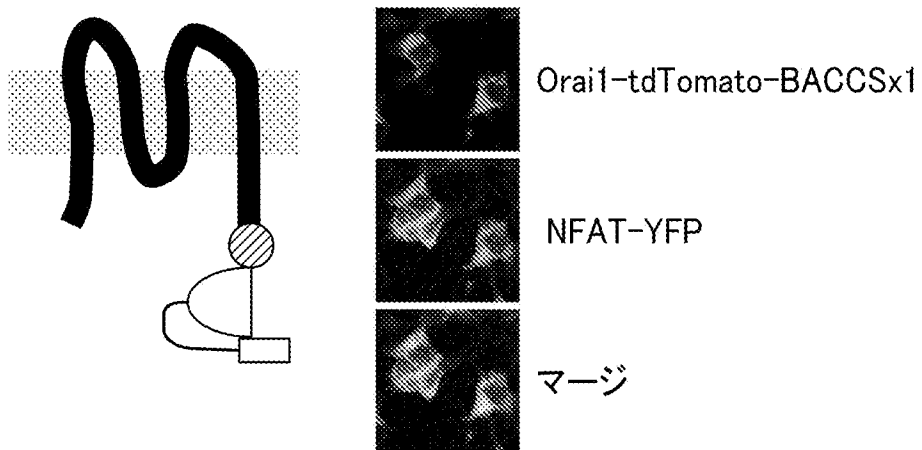


[図8]

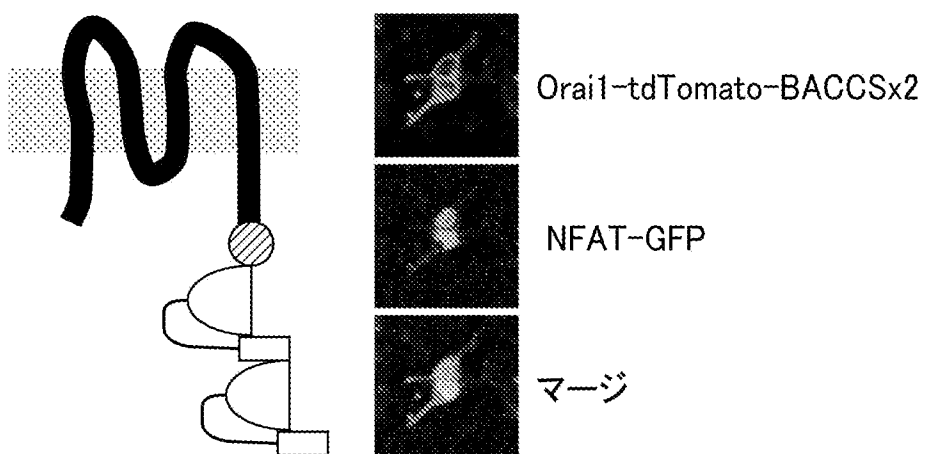


[図9]

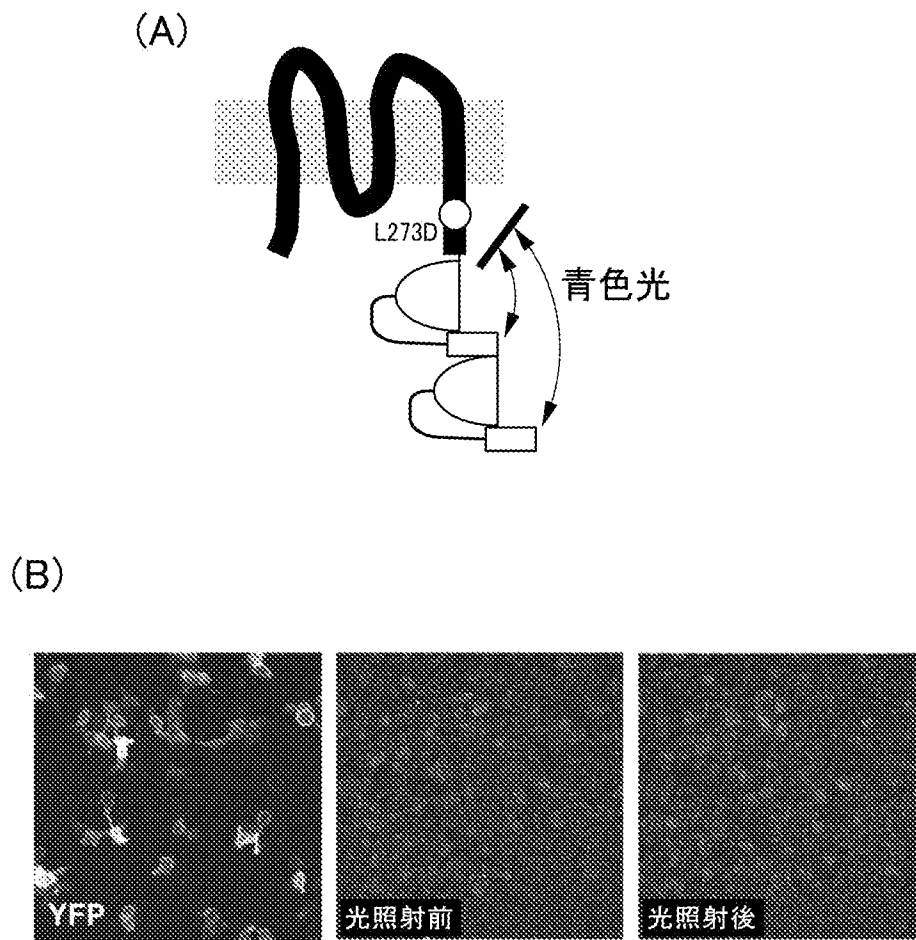
(A) Orai1-tdTomato-BACCSx1 / NFAT-YFP



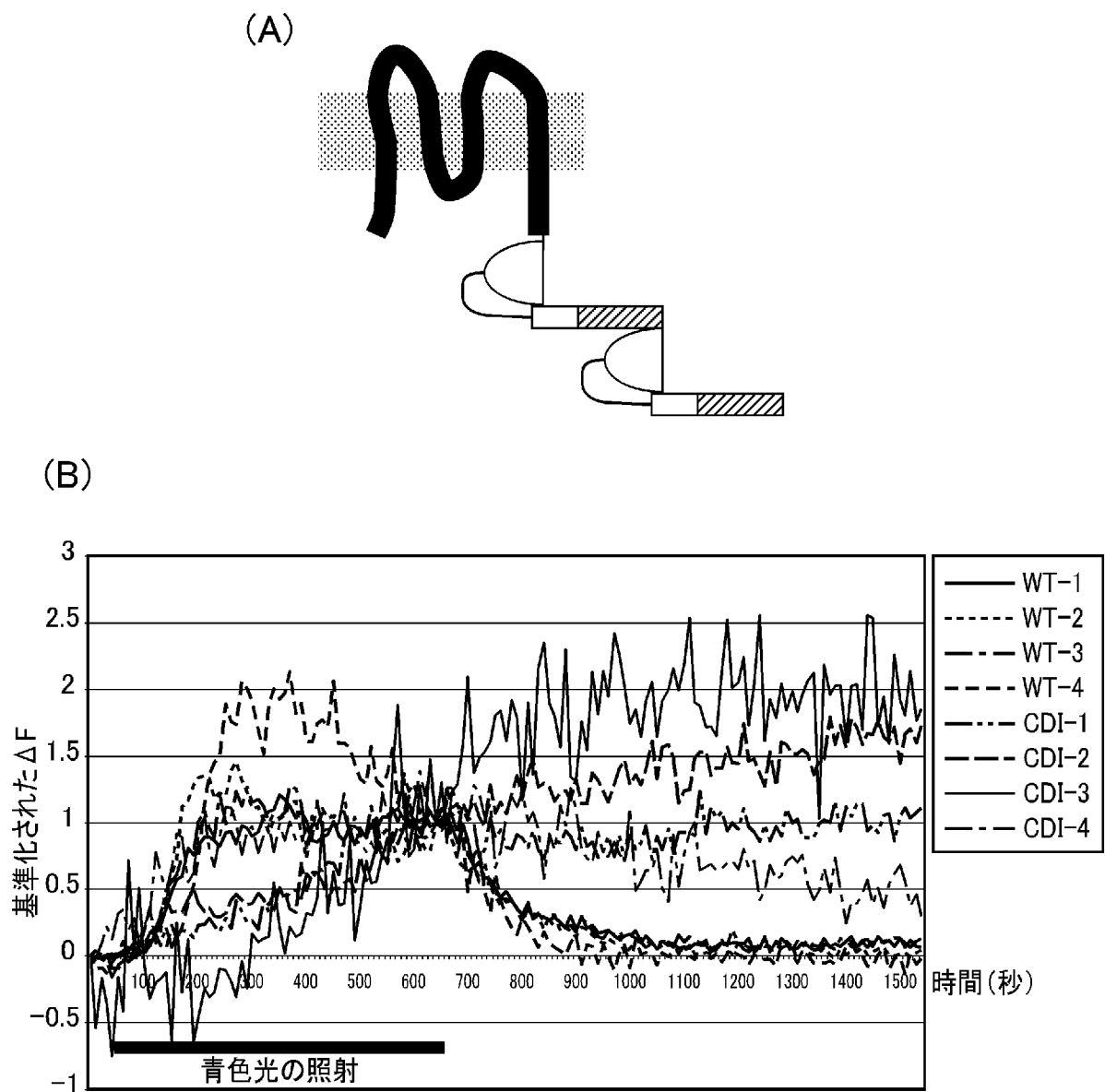
(B) Orai1-tdTomato-BACCSx2 / Orai1 / NFAT-GFP



[図10]

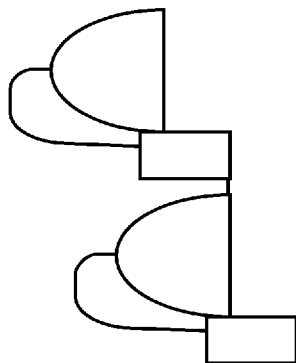


[図11]

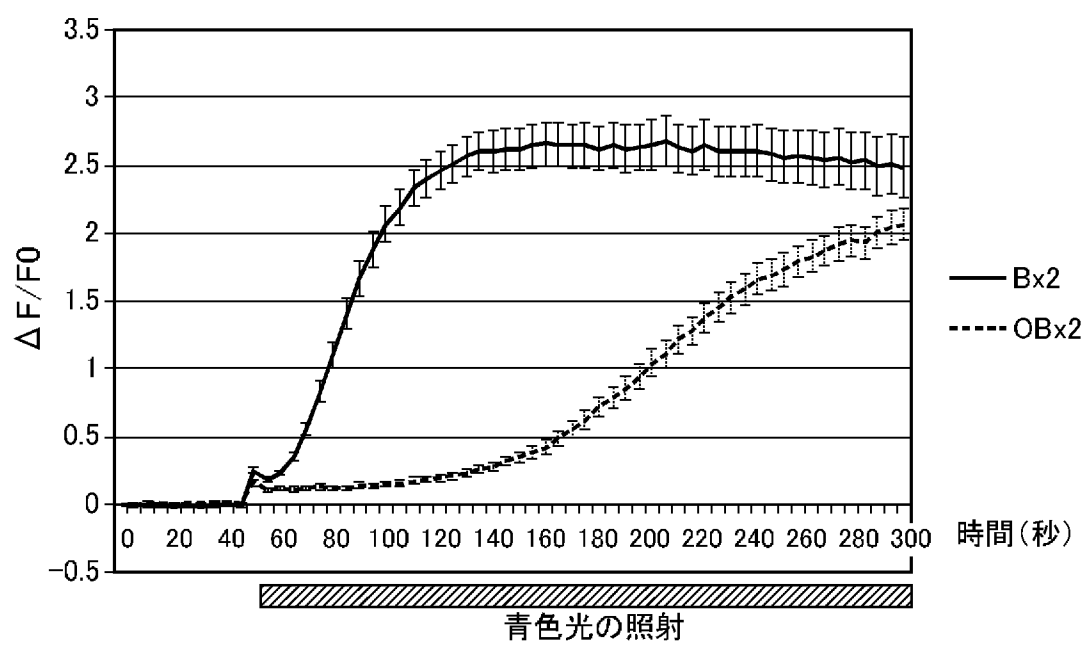


[図12]

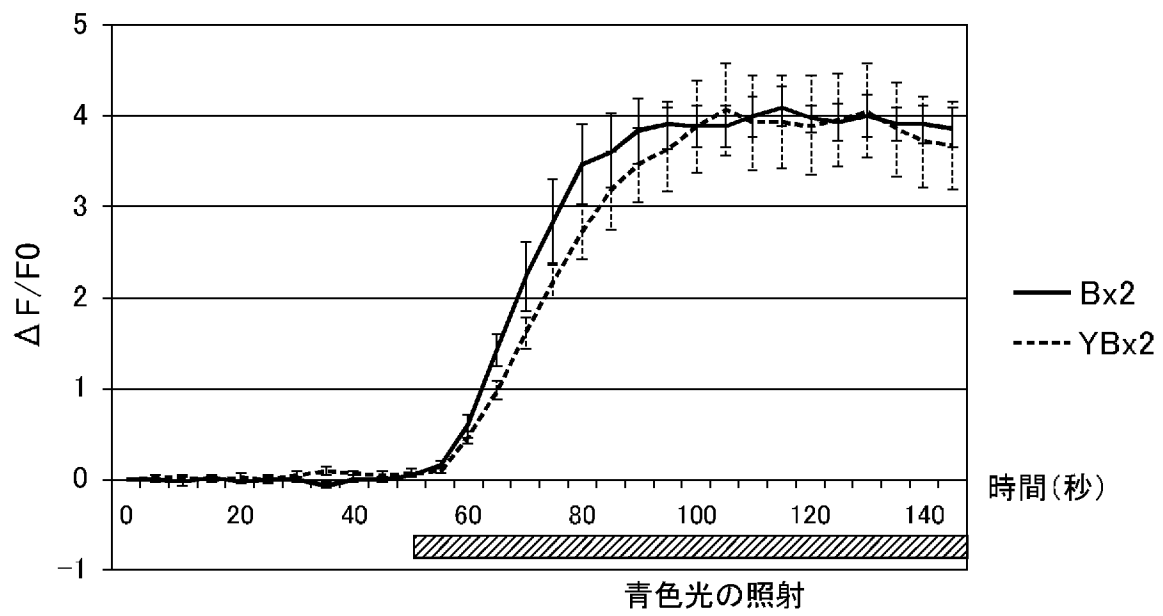
(A) BACCS × 2



(B)



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)i,
C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, A01K67/027, C07K14/00-19/00, C12N1/00-7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN),
GenBank/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU,Y., et al., "A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells" Nature, 2009, Vol.461, No.3, p.104-108	1-13
Y	PARK,C.Y., et al., "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orail" Cell, 2009, Vol.136, p.876-890	1-13
Y	LI,Z., et al., "Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orail subunits" Cell Res., 2010.09.14, Vol.21, p.305-315, online	2-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March, 2012 (16.03.12)

Date of mailing of the international search report
03 April, 2012 (03.04.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAO,X., et al., "Estimation of the available free energy in a LOV2-J α photoswitch" Nature Chem.Biol., 2008, Vol.4, No.8, p.491-497	1-13
A	JP 2009-533062 A (The Queen's Medical Center), 17 September 2009 (17.09.2009), & EP 2013627 A2 & US 2008/0096227 A1 & WO 2007/121186 A2 & CA 2648588 A & CA 2648588 A & CA 2648588 A & AU 2007238225 A	1-13
A	WO 2010/099401 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY), 02 September 2010 (02.09.2010), (Family: none)	1-13
A	WO 2011/002977 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL), 06 January 2011 (06.01.2011), (Family: none)	1-13
A	WO 2009/097133 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY, L.L.C.), 06 August 2009 (06.08.2009), & US 2011/0004955 A1	1-13
A	RANA,A & DOLMETSCH,R.E. "Using light to control signaling cascades in live neurons" Cur.Opinion Neurobiol., 2010, Vol.20, p.617-622	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, A01K67/027, C07K14/00-19/00, C12N1/00-7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
 GenBank/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WU, Y., et al., "A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells" Nature, 2009, Vol. 461, No. 3, p. 104-108	1-13
Y	PARK, C. Y., et al., "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1" Cell, 2009, Vol. 136, p. 876-890	1-13
Y	LI, Z., et al., "Graded activation of CRAC channel by binding of	2-13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 6 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

水落 登希子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 5 4 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	different numbers of STIM1 to Orail subunits” Cell Res., 2010.09.14, Vol.21, p.305-315, online	
A	YAO,X., et al.,” Estimation of the available free energy in a LOV2-J α photoswitch” Nature Chem.Biol., 2008, Vol.4, No.8, p.491-497	1-13
A	JP 2009-533062 A (ザ・クイーンズ・メディカル・センター) 2009.09.17, EP 2013627 A2 & US 2008/0096227 A1 & WO 2007/121186 A2 & CA 2648588 A & CA 2648588 A & CA 2648588 A & AU 2007238225 A	1-13
A	WO 2010/099401 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2010.09.02, (ファミリーなし)	1-13
A	WO 2011/002977 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 2011.01.06, (ファミリーなし)	1-13
A	WO 2009/097133 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY, LLC) 2009.08.06, & US 2011/0004955 A1	1-13
A	RANA,A & DOLMETSCH,R.E. “Using light to control signaling cascades in live neurons” Cur.Opinion Neurobiol., 2010, Vol.20, p.617-622	1-13