(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3633940号
(P3633940)

(45)発行日　平成17年3月30日(2005.3.30)　(24)登録日　平成17年1月7日(2005.1.7)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA
C07D 471/04	C07D 471/04	
C07D 501/59	C07D 501/59	
C12N 5/10	C12Q 1/34	
C12Q 1/34	C12Q 1/68	A

請求項の数 60　(全 65 頁)　最終頁に続く

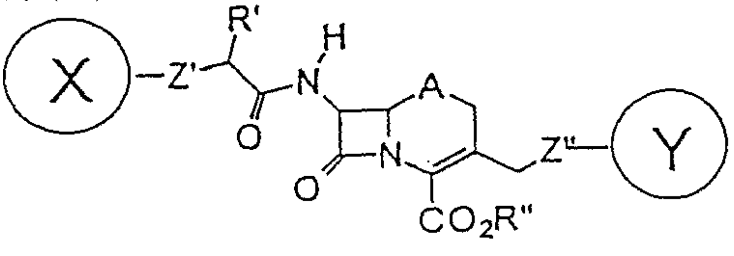
(21)出願番号	特願平8-529573
(86)(22)出願日	平成8年3月20日(1996.3.20)
(65)公表番号	特表平11-502714
(43)公表日	平成11年3月9日(1999.3.9)
(86)国際出願番号	PCT/US1996/004059
(87)国際公開番号	WO1996/030540
(87)国際公開日	平成8年10月3日(1996.10.3)
審査請求日	平成15年3月19日(2003.3.19)
(31)優先権主張番号	08/407,544
(32)優先日	平成7年3月20日(1995.3.20)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティー　オブ　カリフォルニア
アメリカ合衆国　９４６１２　カリフォルニア州　オークランド，レークサイド　ドライブ　３００番地　２２エヌディー　フロア
(74)代理人
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人
弁理士　石井　貞次
(74)代理人
弁理士　早川　康

最終頁に続く

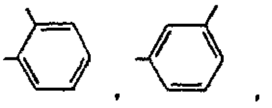
(54)【発明の名称】β－ラクタマーゼ用の基質およびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）：

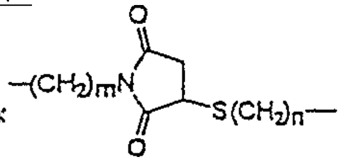


〔式中、
ＸおよびＹの一方は蛍光投与体部分またはその膜透過性誘導体であり、他方は消光体部分、受容体蛍光団部分またはその膜透過性誘導体であり；
R'はＨ、低級アルキル、（CH_2）$_n$OH、（CH_2）$_n$COOR″および＝NOJよりなる群から選ばれ、ここでｎは０または１～５の整数であり、ＪはＨ、Me、CH_2COOH、CHMeCOOHまたはCMe_2COOHであり；
Ｒ″はＨ、生理学的に許容される金属およびアンモニウムカチオン、－CHR^2OCO（CH_2）$_n$$CH_3$、－$CHR^2$OCOC（$CH_3$）$_3$、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、メトキシカルボニルオキシメチル、フェニル、メチルスルフィニルメチル、β－モルホリノエチル、ジアルキルアミノエチル、ジアルキルアミノカルボニルオキシ

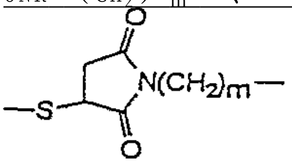
メチルよりなる群から選ばれ、ここでR^2はHおよび低級アルキルよりなる群から選ばれ；
AはS、O、SO、SO_2およびCH_2よりなる群から選ばれ；
Z'は直接結合、−$(CH_2)_n$$CONR^2$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$NR^2CO$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$NR^3CONR^2$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$NR^3CSNR^2$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$CONR^3$$(CH_2)_p$$CONR^2$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$−、−$(CH_2)_n$$NR^3CO$$(CH_2)_p$$S$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$S$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$O$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$NR^2$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$SO_2NR^2$$(CH_2)_m$−、−$(CH_2)_n$$CO_2$$(CH_2)_m$−、



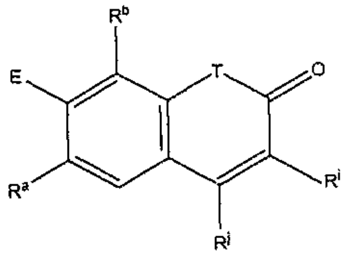
および



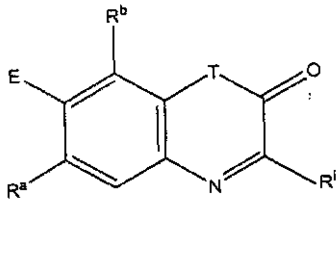
（ここで、R^2およびnは先に定義したとおりであり、R^3は水素および低級アルキルよりなる群から選ばれ、そしてmおよびpはそれぞれが０〜４の整数よりなる群から独立に選ばれる。）よりなる群から選ばれ；
Ｚ″が発色団中のＯ、ＮおよびＳよりなる群から選ばれるヘテロ原子への直接結合、−Ｏ$(CH_2)_n$−、−Ｓ$(CH_2)_n$−、−$NR^2$$(CH_2)_n$−、−$N^+R^2_2$$(CH_2)_n$−、−$OCONR^2$$(CH_2)_n$−、−$O_2C$$(CH_2)_n$−、−$SCSNR^2$$(CH_2)_n$−、−SCSO$(CH_2)_n$−、−Ｓ$(CH_2)_n$$CONR^2$$(CH_2)_m$−、−Ｓ$(CH_2)_n$$NR^2CO$$(CH_2)_m$−、および



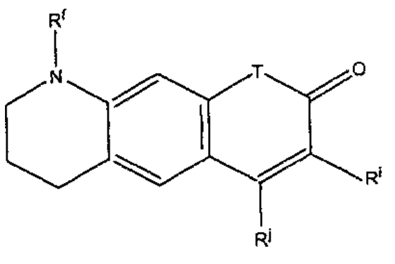
（ここで、R^2およびnは先に定義したとおりであり、mは０〜４の整数である。）よりなる群から選ばれる。〕
を有する化合物。
【請求項２】
R'がHおよびメチルよりなる群から選ばれる、請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
Ｒ″がHおよびアセトキシメチルよりなる群から選ばれる、請求項１に記載の化合物。
【請求項４】
Ａが−Ｓ−である、請求項１に記載の化合物。
【請求項５】
ＸおよびＹの１つが蛍光供与体部分の膜透過性誘導体、または消光体部分もしくは受容体蛍光団部分の膜透過性誘導体であり、ＸおよびＹの少なくとも１つが少なくとも１つのアシル化芳香族ヒドロキシル、アシル化アミン、またはアルキル化芳香族ヒドロキシルを含み、ここで該アシル基は１〜５個の炭素原子を含み、該アルキル基は−CH_2OC（Ｏ）alk、−CH_2SC（Ｏ）alk、−CH_2OC（Ｏ）Oalk、低級アシルオキシ−α−ベンジル、およびδブチロラクトニルよりなる群から選ばれ、alkは１〜４個の炭素原子の低級アルキルである、請求項１に記載の化合物。
【請求項６】
ＸおよびＹの少なくとも１つが少なくとも１つのアシル化芳香族ヒドロキシルを含み、該アシル基がアセチル、ｎ−プロピオニルまたはｎ−ブチリルである、請求項５に記載の化合物。
【請求項７】
前記の供与体が式II−VII:



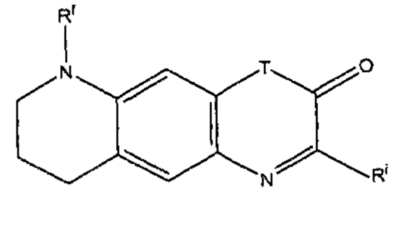
II



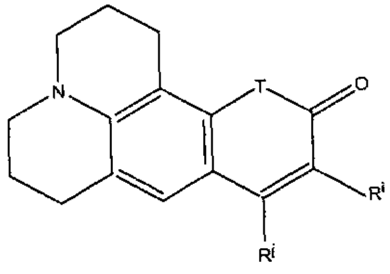
III



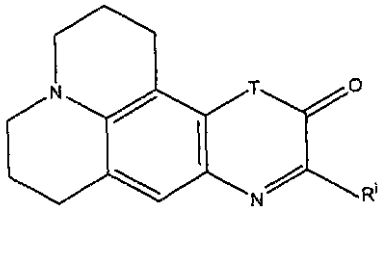
IV



V



VI



VII

〔式中、

R^aおよびR^bはそれぞれ独立に結合点、H、ハロゲンおよび低級アルキルよりなる群から選ばれ；

R^fは結合点、H、低級アルキルおよび$CH_2(CH_2)_n a$よりなる群から選ばれ；

R^iは結合点、H、ハロゲン、低級アルキル、CN、CF_3、フェニル、CO_2H、および$CONR^{g'}R^{h'}$よりなる群から選ばれ；

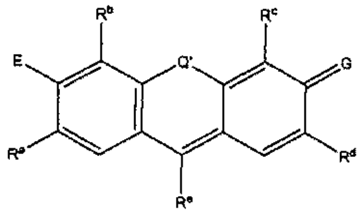
R^jは結合点、H、ハロゲン、低級アルキル、CN、CF_3、フェニル、CH_2CO_2H、および$CH_2CONR^{g'}R^{h'}$よりなる群から選ばれ；

EはH、OH、OR^kおよびNR^gR^hよりなる群から選ばれ；

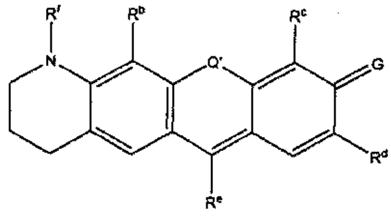
TはOおよびNR^kよりなる群から選ばれ；

ここで、R^g、$R^{g'}$、R^h、$R^{h'}$およびR^kはそれぞれ独立に結合点、H、低級アルキルおよび$CH_2(CH_2)_n a$よりなる群から選ばれ、aはHまたは結合点であり、nは先に定義したとおりである。〕

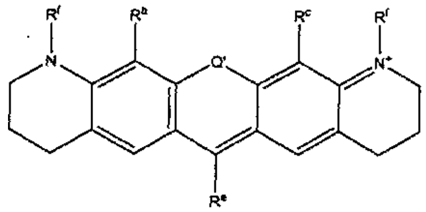
のクマリンであり、前記の消光体または受容体が式VIII－XII、XLVIおよびXLVII:



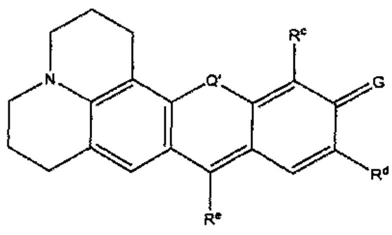
VIII



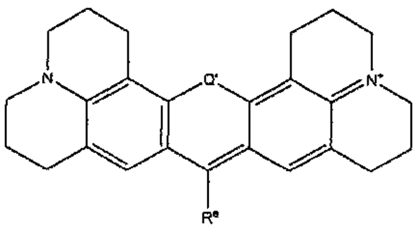
IX



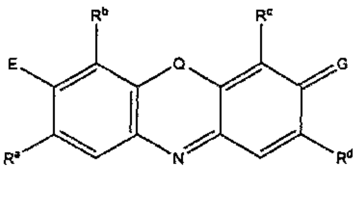
X



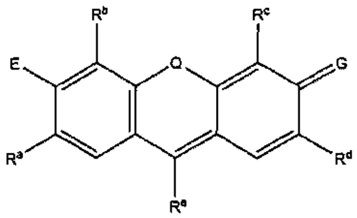
XI



XII

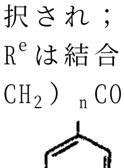


XLVI

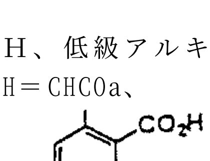


XLVII

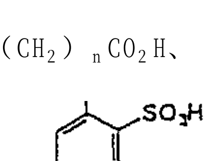
〔式中、
R^a、R^b、R^fおよびＥは先に定義したとおりであり；
R^cおよびR^dはそれぞれ独立に結合点、Ｈ、ハロゲンおよび低級アルキルからなる群から選択され；
R^eは結合点、Ｈ、低級アルキル、（CH_2）$_n$$CO_2$H、（$CH_2$）$_nCHaCO_2$H、CHa（$CH_2$）$_n$$CO_2$H、（$CH_2$）$_n$COa、CH＝CHCOa、



、



及び

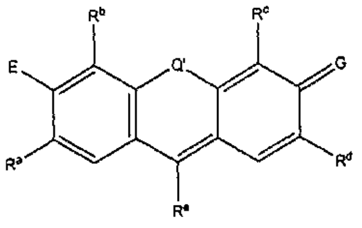


からなる群から選ばれ；
ＧはＯおよび$N^+R^{g'}R^{h'}$からなる群から選ばれ；
ＱはＯ、Ｓ、Ｃ（CH_3）$_2$およびNR^gからなる群から選ばれ；
Q'はＯ、CH_2、Ｃ（CH_3）$_2$、NR^kおよびSO_2からなる群から選ばれ；
ここで、R^g、$R^{g'}$、$R^{h'}$、R^k、ａおよびｎは先に定義したとおりであり、a'はＨまたは結合点である。〕
のフルオレセイン、ロドールおよびローダミンよりなる群から選ばれる、請求項１に記載の化合物。
【請求項８】

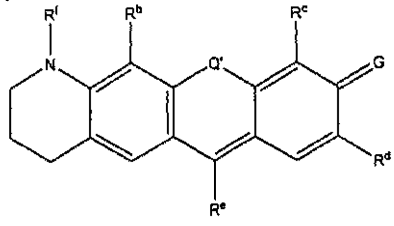
前記の供与体が前記の式II－VIIのクマリンおよび前記の式VIIIのフルオレセインよりなる群から選ばれる、請求項7に記載の化合物。

【請求項９】

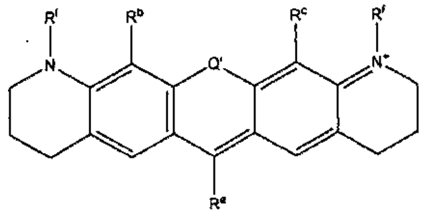
前記の消光体または受容体が式VIII－XII:



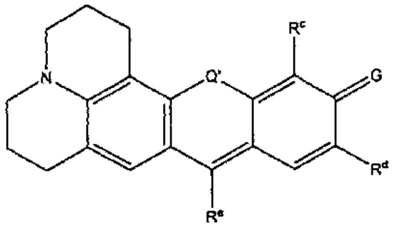
VIII



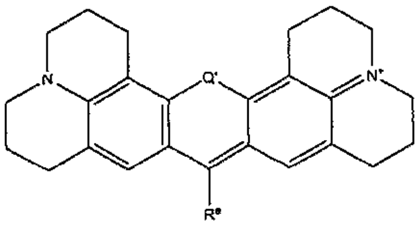
IX



X



XI



XII

〔式中、R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、Ｅ、ＧおよびQ'は先に定義したとおりである。〕

のフルオレセイン、ロドールおよびローダミンよりなる群から選ばれる、請求項１に記載の化合物。

【請求項１０】

前記の供与体が前記の式VIIIのフルオレセインであり、前記の消光体または受容体が前記の式VIII－XIIのロドールおよびローダミンよりなる群から選ばれる、請求項9に記載の化合物。

【請求項１１】

前記のクマリンが７－ヒドロキシクマリンおよび７－ヒドロキシ－６－クロロクマリンよりなる群から選ばれ、前記のフルオレセインがフルオレセインおよびジクロロフルオレセインよりなる群から選ばれる、請求項8に記載の化合物。

【請求項１２】

前記の供与体がフルオレセイン類であり、前記の消光体または受容体が式VIII（式中R^a、R^b、R^cおよびR^dはBrまたはClである。）のエオシンまたはテトラクロロフルオレセインよりなる群から選ばれる、請求項9に記載の化合物。

【請求項１３】

前記の消光体または受容体が前記の式VIII、IXまたはXIのロドールである、請求項9に記載の化合物。

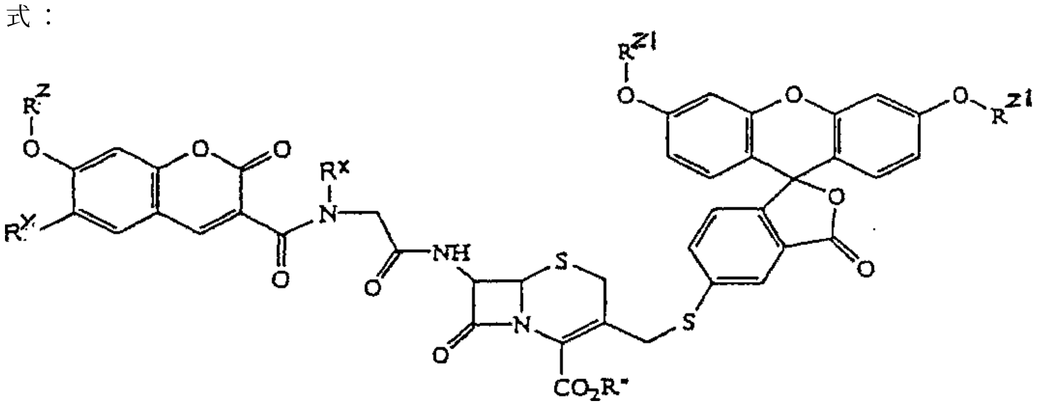
【請求項１４】

前記の消光体または受容体が前記の式VIII、ＸまたはXIIのローダミンである、請求項9に記載の化合物。

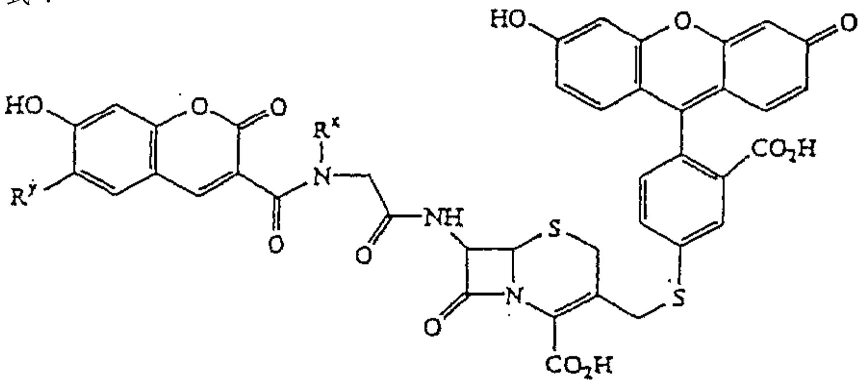
【請求項１５】

ＸおよびＹの少なくとも１つが芳香族ヒドロキシル基上にアセトキシメチル基を含む透過

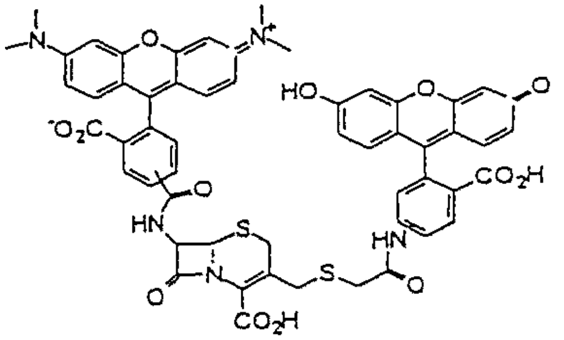
性誘導体である、請求項5に記載の化合物。
【請求項１６】
Z'が－（CH_2）$_n$CONR^2（CH_2）$_m$－である、請求項1に記載の化合物。
【請求項１７】
ｎおよびｍが０であり、R^2がＨである、請求項16に記載の化合物。
【請求項１８】
Ｚ″が－Ｓ（CH_2）$_n$－である、請求項1に記載の化合物。
【請求項１９】
ｎが０である、請求項18に記載の化合物。
【請求項２０】
式：



〔式中、
R^yはＨ、ClおよびBrよりなる群から選ばれ、
R^xはＨおよびメチルよりなる群から選ばれ、
R^ZおよびR^{Z1}は－Ｃ（Ｏ）alk、－CH_2OC（Ｏ）alk、－CH_2SC（Ｏ）alk、－CH_2OC（Ｏ）Oalk、低級アシルオキシ－α－ベンジル、およびδブチロラクトニルよりなる群から独立に選ばれ、ここでalkは１～４個の炭素原子の低級アルキルであり、
Ｒ″は１－（アシルオキシ）アルキルである。〕
で表される請求項8に記載の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体。
【請求項２１】
R^ZおよびR^{Z1}がアセチル、ブチリルおよびアセトキシメチルよりなる群から選ばれる、請求項20に記載の化合物。
【請求項２２】
式：



〔式中、
R^yはＨ、ClおよびBrよりなる群から選ばれ、そして
R^xはＨおよびメチルよりなる群から選ばれる。〕
で表される、請求項8に記載の化合物。
【請求項２３】
式（11）：

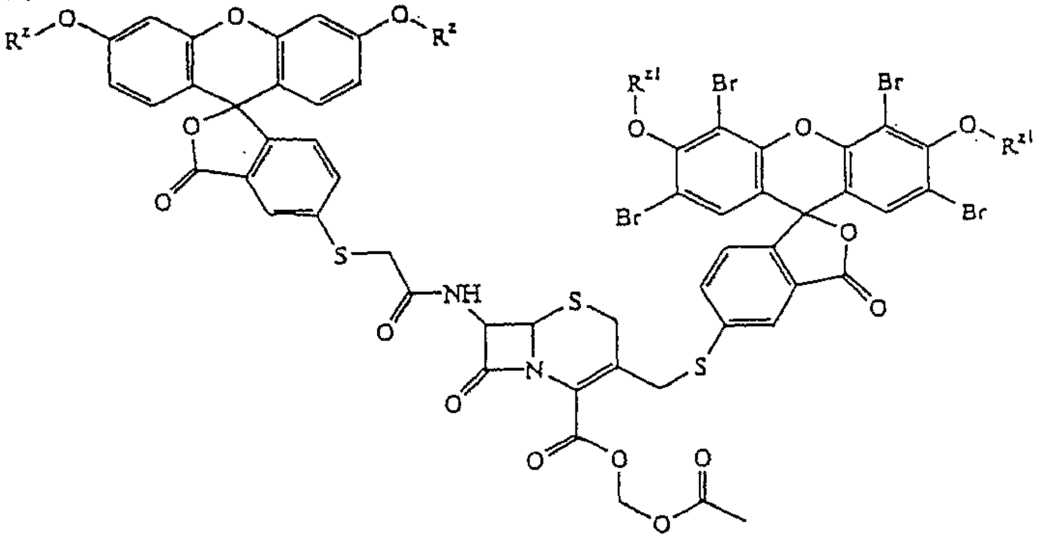


11

で表される請求項10に記載の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体。

【請求項２４】

式：

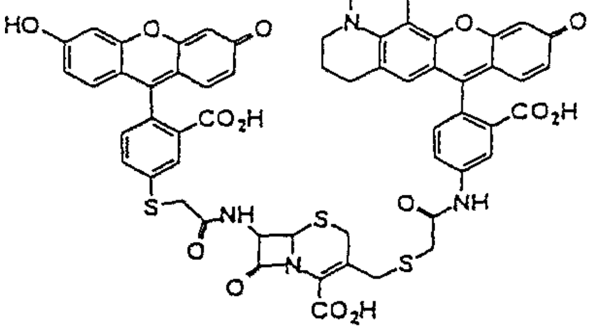


〔式中、R^ZおよびR^{Z1}は－Ｃ（Ｏ）alk、－CH_2OC（Ｏ）alk、－CH_2SC（Ｏ）alk、－CH_2OC（Ｏ）Oalk、低級アシルオキシ－α－ベンジル、およびδブチロラクトニルよりなる群から独立に選ばれ、ここでalkは１～４個の炭素原子の低級アルキルである。〕

で表される、請求項12に記載の化合物。

【請求項２５】

式（22）：

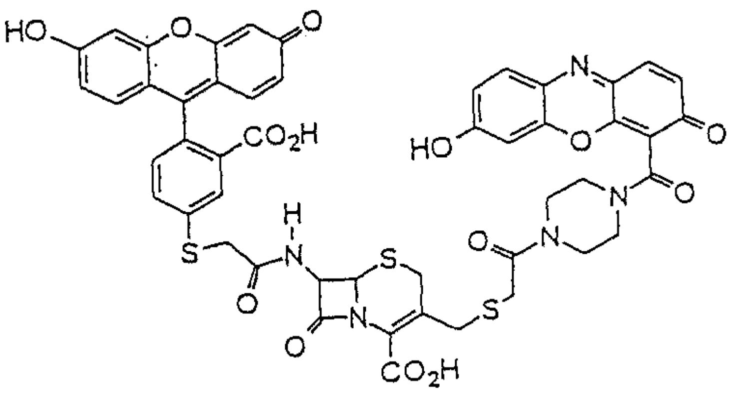


22

で表される請求項10に記載の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体。

【請求項２６】

式：（25）：



25

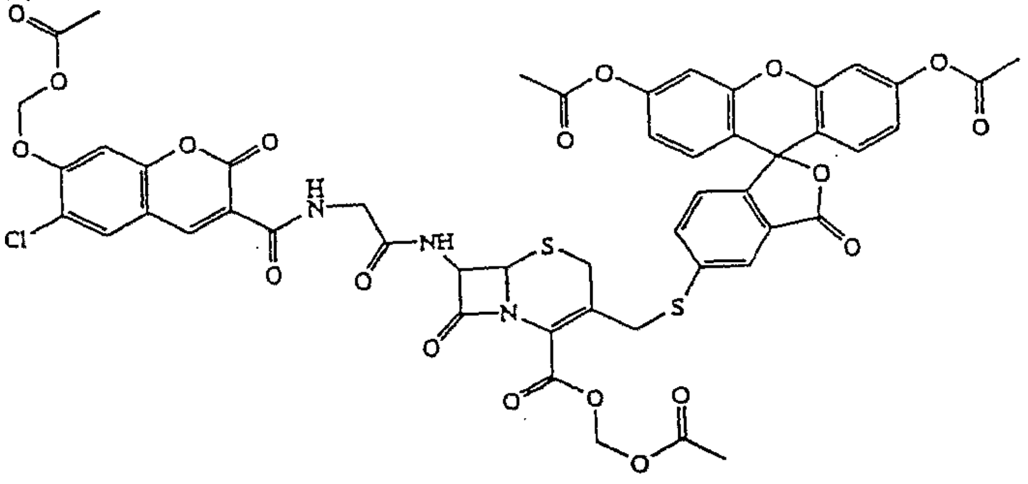
で表される請求項１に記載の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体。

【請求項２７】

R^yがClで、R^xがＨである、請求項22に記載の化合物。

【請求項２８】

式：



で表される、請求項11に記載の化合物。

【請求項２９】

R^ZおよびＲ″がアセトキシメチルであり、R^XがＨであり、そしてR^{Z1}がアセチルである、請求項21に記載の化合物。

【請求項３０】

R^yがＨであり、そしてR^xがメチルである、請求項22に記載の化合物。

【請求項３１】

前記の供与体が蛍光ユウロピウムおよびテルビウム錯体よりなる群から選ばれる、請求項１に記載の化合物。

【請求項３２】

前記の供与体がユウロピウムおよびテルビウムトリス－（ビピリジン）クリプタンドおよび関連染料よりなる群から選ばれる、請求項31に記載の化合物。

【請求項３３】

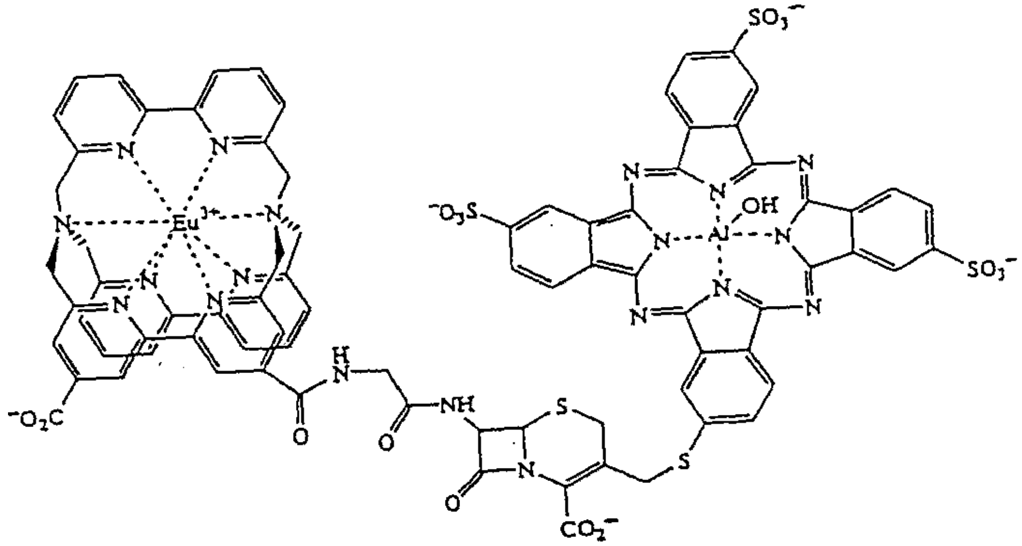
前記の消光体または受容体がフタロシアニン類および関連染料よりなる群から選ばれる、請求項１に記載の化合物。

【請求項３４】

前記の消光体または受容体がフタロシアニン類および関連染料よりなる群から選ばれる、請求項32に記載の化合物。

【請求項３５】

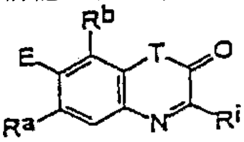
式：



で表される、請求項34に記載の化合物。

【請求項36】

前記のクマリンが式(III):



III

〔式中、

EはH、OH、OR^kおよびNR^gR^hよりなる群から選ばれ、

TはOおよびNR^kよりなる群から選ばれ、

R^aおよびR^bは結合点、H、ハロゲンおよび低級アルキルよりなる群から独立に選ばれ、

R^g、R^hおよびR^kは結合点、H、低級アルキルおよび$-CH_2(CH_2)_na$よりなる群から独立に選ばれ、

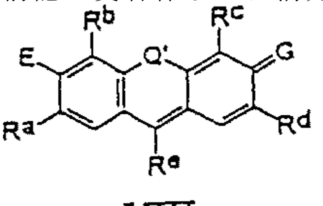
R^iは結合点、H、ハロゲン、低級アルキル、CN、CF_3、フェニル、CO_2Hおよび$CONR^gR^h$よりなる群から選ばれ、そして

aはHおよび結合点よりなる群から選ばれる。〕

の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体である、請求項6に記載の化合物。

【請求項37】

前記の受容体または消光体が式(VIII):



VIII

〔式中、

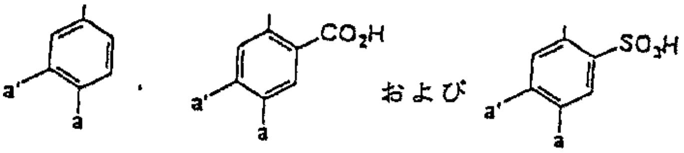
EはH、OH、OR^kおよびNR^gR^hよりなる群から選ばれ、

GはOおよび$N^+R^gR^h$よりなる群から選ばれ、

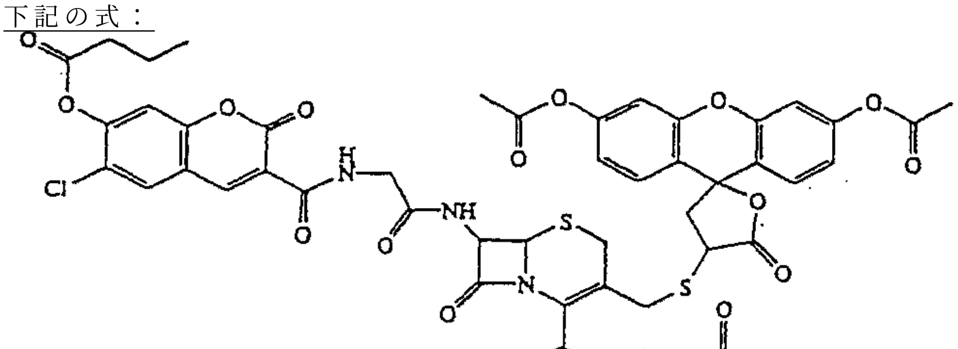
Q'はO、CH_2、$C(CH_3)_2$およびNR^gよりなる群から選ばれ、

R^a、R^b、R^cおよびR^dは結合点、H、ハロゲンおよび低級アルキルよりなる群から独立に選ばれ、

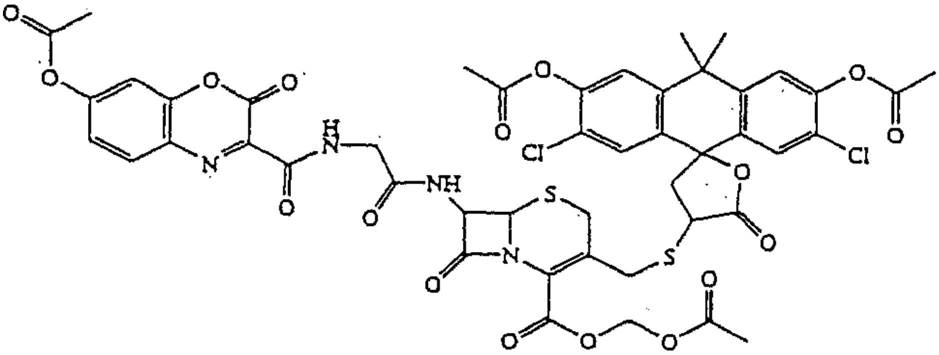
R^eは結合点、H、低級アルキル、$(CH_2)_nCO_2H$、$(CH_2)_nCHaCO_2H$、$CHa(CH_2)_nCO_2H$、$(CH_2)_nCOa$、$CH=CHCOa$、



よりなる群から選ばれ、
R^g、R^hおよびR^kは結合点、H、低級アルキルおよび－CH_2（CH_2）$_n$aよりなる群から独立に選ばれ、
ｎは０～５の整数であり、
ａおよびa'はＨおよび結合点よりなる群から独立に選ばれる。〕
の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体である、請求項７に記載の化合物。
【請求項３８】
前記の供与体が前記式II－VIIのクマリンおよびその膜透過性蛍光誘導体よりなる群から選ばれる、請求項37に記載の化合物。
【請求項３９】
Q'がＣ（CMe_2）$_2$で、ＧがＯである請求項38に記載の化合物またはその膜透過性蛍光原誘導体。
【請求項４０】
下記の式：



および



よりなる群から選ばれる、請求項38に記載の化合物。
【請求項４１】
試料がβ－ラクタマーゼ活性を含むか否かを判定する方法であって、
試料を、励起した際に蛍光共鳴エネルギー転移を示す請求項１～40のいずれか１項に記載の化合物と接触させ、
該化合物を励起させ、そして
該試料における蛍光共鳴エネルギー転移の度合を測定する、
ことを含んでなり、期待量よりも低い蛍光共鳴エネルギー転移度がβ－ラクタマーゼ活性の存在を示す方法。
【請求項４２】
試料中の蛍光共鳴エネルギー転移度の測定が、試料を基質と接触させた後に第１の時期と第２の時期に蛍光共鳴エネルギー転移度を測定し、その蛍光共鳴エネルギー転移度の差を調べることを含んでなり、その場合、蛍光共鳴エネルギー転移度の差が試料中の酵素の量

を表していることを特徴とする、試料中の酵素の量を測定するための、請求項41に記載の方法。

【請求項４３】

細胞中のβ－ラクタマーゼ活性の量を測定する方法であって、

β－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させた発現制御配列を含んでなる組換え核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞を用意し、

該細胞もしくは該細胞の抽出物またはならし培地を含む試料を、β－ラクタマーゼの基質としての請求項１～40のいずれか１項に記載の化合物と接触させ、そして

切断された基質の量を測定する、

ことを含んでなり、切断された基質の量がβ－ラクタマーゼ活性の量に関係している、前記方法。

【請求項４４】

前記の切断された基質の量を測定するステップが、前記化合物を励起させて試料中の蛍光共鳴エネルギー転移度を測定することを含み、その場合、期待量よりも低い蛍光共鳴エネルギー転移度がβ－ラクタマーゼ活性の存在を示す、請求項43に記載の方法。

【請求項４５】

前記の核酸配列が、クラスＡβ－ラクタマーゼをコードする、請求項43に記載の方法。

【請求項４６】

前記の核酸配列が、図７の配列１、配列２、配列３、配列４または配列５である、請求項45に記載の方法。

【請求項４７】

前記の細胞が動物細胞であり、β－ラクタマーゼが細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼである、請求項43に記載の方法。

【請求項４８】

一組の発現制御配列に機能的に連結させた遺伝子の発現をモニターする方法であって、

β－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させた発現制御配列を含んでなる組換え核酸分子でトランスフェクトされた真核宿主細胞を用意し、ただし、該真核細胞が真菌である場合はβ－ラクタマーゼが細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼであり、

該細胞もしくは該細胞の抽出物またはならし培地を含む試料を、β－ラクタマーゼの基質としての請求項１～40のいずれか１項に記載の化合物と接触させ、そして

切断された基質の量を測定する、

ことを含んでなり、切断された基質の量がβ－ラクタマーゼ活性の量に関係している、前記方法。

【請求項４９】

前記の切断された基質の量を測定するステップが、前記化合物を励起させて試料中の蛍光共鳴エネルギー転移度を測定することを含み、その場合、期待量よりも低い蛍光共鳴エネルギー転移度がβ－ラクタマーゼ活性の存在を示す、請求項48に記載の方法。

【請求項５０】

前記の核酸配列が、クラスＡβ－ラクタマーゼをコードする、請求項48に記載の方法。

【請求項５１】

前記の核酸配列が、図７の配列１、配列２、配列３、配列４または配列５である、請求項50に記載の方法。

【請求項５２】

前記の細胞が動物細胞であり、β－ラクタマーゼが細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼである、請求項48に記載の方法。

【請求項５３】

試験化合物が一組の発現制御配列に機能的に連結させた遺伝子の発現を変更するか否かを判定する方法であって、

β－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させた発現制御配列を含んでなる組換え核酸構築物でトランスフェクトされた真核宿主細胞を用意し、ただし、該真

核細胞が真菌である場合はβ－ラクタマーゼが細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼであり、
該細胞を試験化合物と接触させ、
該細胞または該細胞の抽出物を含む試料を、β－ラクタマーゼの基質としての請求項１～40のいずれか１項に記載の化合物と接触させ、そして
切断された基質の量を測定する、
ことを含んでなり、切断された基質の量がβ－ラクタマーゼ活性の量に関係している、前記方法。
【請求項５４】
前記の切断された基質の量を測定するステップが、前記化合物を励起させて試料中の蛍光共鳴エネルギー転移度を測定することを含み、その場合、期待量よりも低い蛍光共鳴エネルギー転移度がβ－ラクタマーゼ活性の存在を示す、請求項53に記載の方法。
【請求項５５】
前記の核酸配列が、クラスＡβ－ラクタマーゼをコードする、請求項53に記載の方法。
【請求項５６】
前記の核酸配列が、図７の配列１、配列２、配列３、配列４または配列５である、請求項55に記載の方法。
【請求項５７】
前記の細胞が動物細胞であり、β－ラクタマーゼが細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼである、請求項53に記載の方法。
【請求項５８】
前記β－ラクタマーゼの発現が、細胞内レセプター、細胞表面レセプターまたは細胞内シグナル伝達経路の成分の活性化または活性化の阻害により機能的に調節される、請求項53に記載の方法。
【請求項５９】
細胞質ゾルβ－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させた発現制御配列を含んでなる組換え核酸分子でトランスフェクトされた細胞を用意し、
該細胞を該発現制御配列の活性化を活性化するかまたは阻害する物質と接触させ、
該細胞を、基質に変換される請求項５の化合物と接触させ、
基質が個々の各細胞内で切断されるか否かを調べ、その場合、切断がβ－ラクタマーゼ活性を示しており、そして
所定のレベルのβ－ラクタマーゼ活性を有する細胞を選択し増殖させる、
ことを含んでなるクローン選択法。
【請求項６０】
選ばれた細胞を、活性化剤の不在下で、切断された基質が該細胞から実質的に消失しかつβ－ラクタマーゼのレベルが非活性化レベルに戻るのに十分な時間培養し、
その選ばれた細胞を、基質に変換される請求項５の化合物とともにインキュベートし、そして
基質を実質的に切断しなかった細胞を選択する、
ステップをさらに含む請求項59に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
本発明は、一般には化学および生物学の分野に関する。さらに特定すると、本発明は、遺伝子発現を測定する際に用いる組成物および方法に関する。
リポーター遺伝子アッセイは遺伝子のプロモーターの活性を測定するものである。それは、異種遺伝子を任意のプロモーターの制御下におき、その構築物を哺乳動物細胞のゲノムに導入することを可能にする分子生物学の手法を利用する［Gorman,C.M.ら,Mol.Cell Biol.2:1044－1051（1982）;Alam,J.and Cook,J.L.,Anal.Biochem.188:245－254（1990）］。プロモーターを活性化すると、内因性遺伝子と同様にまたはその代わりにリポーター遺伝子が誘導される。リポーター遺伝子は容易に検出し測定できるタンパク質をコードするようにデザインされる。通常それは市販の基質を生成物に変換する酵素である。この変換

反応はクロマトグラフィーか直接光学測定かのいずれかによって簡便に追跡でき、生産された酵素の定量が可能である。

リポーター遺伝子は多種多様の生物における遺伝子調節の研究のために種々のプラスミドに対して商業的に入手される［Alam and Cook,前掲］。関心のあるプロモーターを多数のクローニング部位に挿入することができるが、この目的のためにはプラスミド上のリポーター遺伝子の前に挿入する［Rosenthal,N.,Methods Enzymol.152:704－720（1987）;Shiau,A.and Smith,J.M.,Gene 67:295－299（1988）］。これらの遺伝子を細胞型または生物に導入するためには標準的な手法が用いられる［例えば、Molecular Cloning,Nolan,C.編,New York,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988中のSambrook,J.,Fritsch,E.F.and Maniatis,T.による「培養哺乳動物細胞内でのクローン化遺伝子の発現」に記載される手法］。その後、プラスミドが保有する耐性マーカーを用いて、成功裏にトランスフェクションされた細胞を選別することができる。

この手法は使用の容易さと大きなシグナル増幅のために遺伝子調節の研究においてますます普及しつつある。DNA→RNA→酵素→生成物→シグナルからなるカスケードの各ステップがこの順序で次にくるものを増幅する。このカスケードを下れば下るほど、大きな測定シグナルが得られる。

理想的なリポーター遺伝子アッセイでは、測定対象のプロモーターの制御下にあるリポーター遺伝子を一時的にまたは安定的に細胞にトランスフェクトする。レセプターを活性化すると転写および翻訳の結果により酵素レベルが変化する。存在する酵素の量は基質に対するその酵素作用により測定できる。基質は小型の非荷電分子であって、細胞外溶液に添加されると原形質膜を透過して酵素に出会うことができる。荷電分子も使用できるが、内因性の細胞酵素によって切断される基（例えば、細胞質エステラーゼにより切断されるエステル）でその電荷をマスクする必要がある。

さまざまな理由のために、酵素と相互作用した後でその蛍光スペクトルの変化を示す基質を使用することが特に望ましい。いくつかのアッセイでは、蛍光原基質が蛍光生成物に変換される。あるいは、蛍光基質がリポーター酵素での変換後に蛍光特性を変える。生成物は最大シグナルが得られるように強く蛍光を発し、しかも細胞内にとどまるように強い極性をもつほうがよい。

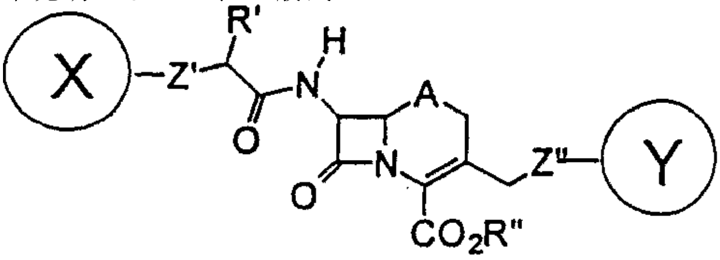
リポーターアッセイで可能な限り高い感度を達成するためには、単一のリポーター酵素によって生じるシグナルの量を最大にしなければならない。最適な酵素は飽和条件下で１秒につき10^5の基質分子を変換するだろう［Biochemistry,New York,W.H.Freeman and company,1981,pp.103－134中のStryer,L.によるIntroduction to enzymes］。β－ラクタマーゼは１秒につき約10^3の好適な基質分子を切断するだろう［Chang,Y.H.ら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2823－2827（1990）］。蛍光原基質を用いると、用いた染料のタイプに応じて、適当な波長の光で励起するとき、生成した蛍光生成物につき最高10^6の光子を得ることができる。シグナルは蛍光団の退色により終結する［Handbook of Biological Confocal Microscopy,Pawley,J.B.編,Plenum Publishing Corporation,1990,pp.169－178中のTsien,R.Y.and Waggoner,A.S.による「同焦点顕微鏡用の蛍光体：光物理および光化学」］。これらの数字はこのタイプの測定で得られる理論的なシグナル強度を示す。実際には、発生した光子のごくわずかな部分が検出されるが、このことは蛍光、生物発光または化学発光の場合に当てはまる。リポーター酵素用の良好な蛍光原基質は、高い吸光度や高い蛍光量子収量などの良好な光学特性のほかに、その酵素に対して高い代謝回転をもつ必要がある。

発明の概要

本発明の目的はβ－ラクタマーゼの基質化合物を提供することである。本発明の別の目的は膜透過性化合物を提供することである。膜透過性化合物は実質的に膜不透過性の化合物に転換され得る。

本発明の他の目的はβ－ラクタマーゼリポーター遺伝子を提供することである。本発明の更なる目的は、プロモーターを作動させるとリポーター遺伝子が発現されるように該プロモーターに機能的に連結されたβ－ラクタマーゼリポーター遺伝子を含む細胞を作製する

ことである。β－ラクタマーゼの発現は、β－ラクタマーゼによる加水分解後に光を発するβ－ラクタマーゼ基質を用いて測定される。
本発明の更なる目的は、生化学的活性をスクリーニングするために、細胞内のβ－ラクタマーゼリポーター遺伝子と本発明のβ－ラクタマーゼ基質化合物を使用することである。
本発明によると、一般式I:



〔式中、
XおよびYの一方は蛍光供与体部分またはその膜透過性誘導体であり、他方は消光体部分、受容体蛍光団部分またはその膜透過性誘導体であり；
R'はH、低級アルキル、$(CH_2)_nOH$、$(CH_2)_nCOOR$"および＝NOJよりなる群から選ばれ、ここでｎは０または１～５の整数であり、ＪはH、Me、CH_2COOH、CHMeCOOHまたはCMe_2COOHであり；
R"はH、生理学的に許容される金属およびアンモニウムカチオン、$-CHR^2OCO(CH_2)_nCH_3$、$-CHR^2OCOC(CH_3)_3$、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、メトキシカルボニルオキシメチル、フェニル、メチルスルフィニルメチル、βモルホリノエチル、ジアルキルアミノエチル、ジアルキルアミノカルボニルオキシメチルよりなる群から選ばれ、ここでR^2はHまたは低級アルキルよりなる群から選ばれ；
ＡはＳ、Ｏ、SO、SO_2およびCH_2よりなる群から選ばれ；
Z'はXのためのリンカーであり；そして
Z"はYのためのリンカーである〕
で表される蛍光原基質が提供される。
別の面において、本発明は試料がβ－ラクタマーゼ活性を含むか否かを判定する方法を提供する。この方法は、試料を本発明の基質化合物（該化合物が励起されるとき蛍光共鳴エネルギー転移を示す）と接触させ、該試料における蛍光共鳴エネルギー転移の度合を測定することを含む。期待量よりも低い蛍光共鳴エネルギー転移度がβ－ラクタマーゼ活性の存在を示す。この方法の一実施態様は試料中の酵素の量を測定するためのものである。この方法にしたがって試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の度合を測定するには、試料を基質と接触させた後に１回目と２回目に蛍光共鳴エネルギー転移度を測定し、その蛍光共鳴エネルギー転移度の差を求める。蛍光共鳴エネルギー転移度の差が試料中の酵素の量を表している。
他の面において、本発明は、脊椎動物細胞内で機能するように適合させた発現制御配列を、β－ラクタマーゼの発現をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結させてなる組換え核酸分子を提供する。本発明はまた、真核細胞内で機能するように適合させた発現制御配列を、細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼの発現をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結させてなる組換え核酸分子を提供する。いくつかの実施態様では、本発明はこれらの組換え核酸分子でトランスフェクトされた哺乳動物宿主細胞に関する。
別の面において、本発明は細胞に含まれるβ－ラクタマーゼ活性の量を測定する方法を提供する。この方法は、発現制御配列をβ－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させてなる組換え核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞を用意し、該細胞または該細胞の抽出物を含む試料をβ－ラクタマーゼの基質と接触させ、切断された基質の量を測定することを含むが、この場合切断された基質の量がβ－ラクタマーゼ活性の量に関係している。
別の面において、本発明は一組の発現制御配列に機能的に連結させた遺伝子の発現をモニターする方法を提供する。この方法は、発現制御配列をβ－ラクタマーゼの発現をコード

する核酸配列に機能的に連結させてなる組換え核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞を用意し（ただし、真核細胞が真菌である場合はβ－ラクタマーゼが細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼである）、該細胞または該細胞の抽出物またはならし培地を含む試料をβ－ラクタマーゼの基質と接触させ、切断された基質の量を測定することを含む。切断された基質の量がβ－ラクタマーゼ活性の量に関係している。

別の面において、本発明は、試験化合物が一組の発現制御配列に機能的に連結させた遺伝子の発現を変更するか否かを判定する方法を提供する。この方法は、発現制御配列をβ－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させてなる組換え核酸構築物でトランスフェクトされた宿主細胞を用意し（ただし、真核細胞が真菌である場合はβ－ラクタマーゼが細胞質ゾルβ－ラクタマーゼである）、該細胞を試験化合物と接触させ、該細胞または該細胞の抽出物を含む試料をβ－ラクタマーゼの基質と接触させ、そして切断された基質の量を測定することを含むが、この場合切断された基質の量がβ－ラクタマーゼ活性の量に関係している。これらの方法の一実施態様では、基質が本発明の化合物である。切断された基質の量を測定するステップは、該化合物を励起させて、試料における蛍光共鳴エネルギー転移の度合を測定することを含む。期待量よりも低い蛍光共鳴エネルギー転移度がβ－ラクタマーゼ活性の存在を示す。

別の面において、本発明は、発現制御配列を細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配列に機能的に連結させてなる組換え核酸分子でトランスフェクトされた細胞を用意し、該細胞を該発現制御配列の活性化を活性化するまたは阻害する物質と接触させ、該細胞と基質に変換される請求項５の化合物とを接触させ、基質が個々の各細胞内で切断されるか否かを調べ（その場合、切断がβ－ラクタマーゼ活性を示す）、所定のレベルのβ－ラクタマーゼ活性を有する細胞を選択し増殖させる、ことを含んでなるクローン選択法を提供する。更なる実施態様では、この方法は、選ばれた細胞を、活性化剤の不在下で、切断された基質が該細胞から実質的に消失しかつβ－ラクタマーゼのレベルが非活性化レベルに戻るのに十分な時間培養し、その選ばれた細胞を、基質に変換される請求項９の化合物とともにインキュベートし、そして基質を実質的に切断しなかった細胞を選択することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

図１（ａ）および１（ｂ）は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断前および切断後の化合物11（実施例１）のフルオレセイン（ａ）およびローダミン（ｂ）の発光スペクトルを示す。

図２は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断前および切断後の化合物17の発光スペクトルを示す。

図３は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断前および切断後の化合物22の発光スペクトルを示す。

図４は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断前および切断後の化合物25の発光スペクトルを示す。

図５は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断前および切断後の化合物CCF2の発光スペクトルを示す。

図６は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断前および切断後の化合物CCF1の発光スペクトルを示す。

図7Aは、本発明において有用な種々のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す表である。

図7B－Ｃは、配列１、すなわちKadonagaら（1984）により修飾された大腸菌RTEMのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

図7D－Ｅは、配列２、すなわちSer2→Arg、Ala23→Glyを有する野生型の分泌RTEM酵素のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

図7F－Ｇは、配列３、すなわちβ－グロビン上流リーダー、哺乳動物Kozak配列、シグナル配列のMet Glyによる置換を有するRTEM酵素のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

図7H－Ｉは、配列４、哺乳動物Kozak配列およびシグナル配列のMet Aspによる置換を有す

るRTEMβ－ラクタマーゼのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。
図7J－Kは、配列５、シグナル配列が置換されているBacillus licheniformisβ－ラクタマーゼのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

発明の説明

定義

本発明にしたがって本明細書中で用いる次の用語は、他に特記しないかぎり、次の意味をもつと定義される。

「蛍光供与体部分」とは、エネルギーを吸収して、そのエネルギーを別の蛍光原分子または化合物の一部分に転移させることができる蛍光原化合物のラジカルを指す。適当な供与体蛍光原分子としては、クマリンおよび関連染料、キサンテン染料、例えばフルオレセイン、ロドール（rhodol）およびローダミン、レゾルフィン、シアニン染料、ビマン（bimane）、アクリジン、イソインドール、ダンシル染料、アミノフタルヒドラジド、例えばルミノールおよびイソルミノール誘導体、アミノフタルイミド、アミノナフタルイミド、アミノベンゾフラン、アミノキノリン、ジシアノヒドロキノン、およびユウロピウムおよびテルビウム錯体ならびに関連化合物が挙げられるが、これらに限らない。

「消光体（quencher）」とは、蛍光供与体に結合したとき、該供与体からの発光を減少させることができる発色団分子または化合物の一部分を指す。消光は蛍光共鳴エネルギー転移、光誘導電子転移、システム間交差の常磁性増強、Dexter交換カップリング、および暗複合体の形成のような励起子カップリングを含むいくつかのメカニズムのいずれかによって起こる。本明細書中で用いる「受容体」は蛍光共鳴エネルギー転移を経て作動する消光体を意味する。多くの受容体は蛍光として転移エネルギーを再発光させることができる。例として、クマリンおよび関連蛍光体、キサンテン、例えばフルオレセイン、ロドールおよびローダミン、レゾルフィン、シアニン、ジフルオロボラジアザインダセン、およびフタロシアニンを挙げることができる。他の化学クラスの受容体は一般に転移エネルギーを再発光させない。例を挙げると、インジゴ、ベンゾキノン、アントラキノン、アゾ化合物、ニトロ化合物、インドアニリン、ジーおよびトリフェニルメタンなどである。

「染料」とは、紫外線を含むがこれに限らない、特定の周波数の光を吸収する分子または化合物の一部分を指す。「染料」と「発色団」は同義語である。

「蛍光団」とは蛍光を発する発色団のことである。

「膜透過性誘導体」とは一般式（式中、ＸおよびＹの少なくとも１つは少なくとも１個のアシル化芳香族ヒドロキシル、アシル化アミン、またはアルキル化芳香族ヒドロキシルを含み、ここでアシル基は１～５個の炭素原子を含み、アルキル基は－CH_2OC（Ｏ）alk、－CH_2SC（Ｏ）alk、－CH_2OC（Ｏ）Oalk、低級アシルオキシ－α－ベンジル、およびデルタブチロラクトニルよりなる群から選ばれ、alkは１～４個の炭素原子の低級アルキルである）の化合物の化学的誘導体を意味する。これらの誘導体は、親水性の基がマスクされてより疎水性の誘導体となるので、細胞膜をよりよく通過できる、すなわち膜透過性にされる。さらに、マスキング基は細胞内で蛍光原基質から切断されて誘導基質を生成するようにデザインされる。基質は膜透過性誘導体よりも親水性であるので、それは細胞の内部に捕捉されることになる。

「アルキル」とは、１～８個の炭素原子、好ましくは１～６個の炭素原子、最も好ましくは１～４個の炭素原子の直鎖、分枝および環状の脂肪族基を表す。

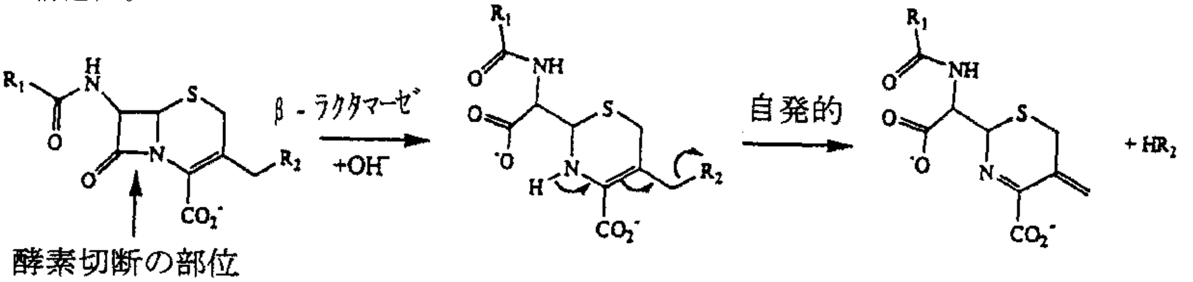
「低級アルキル」とは、１～４個の炭素原子の直鎖および分枝鎖のアルキル基を表す。

「脂肪族」とは、１～10個の炭素原子、好ましくは１～６個の炭素原子、最も好ましくは１～４個の炭素原子の飽和および不飽和のアルキル基を表す。

基質

β－ラクタマーゼはβ－ラクタムの加水分解をほぼ拡散制御的に触媒するという点において理想的酵素に近い（Christensen,H.et al.,Biochem.J.266:853－861,1990）。このクラスの酵素のその他の性質を調べてみて、これが細胞内リポーター酵素の役割に適していることが判明した。これらの酵素はペニシリンやセファロスポリンなどのβ－ラクタム抗生物質のβ－ラクタム環を切断してその過程で新しく荷電した部分を作り出す（O'Callagha

n,C.H.et al.,Antimicrob.Agents.Chemother.8:57－63,1968;Stratton,C.W.J.Antimicrob.Chemother.22,Suppl.A:23－35,1988）。第１世代のセファロスポリンを下図の左に示すが、その中で矢印はβ－ラクタマーゼによる切断部位を指す。このようにして生成した遊離のアミノ基（下図の真ん中の構造）がビニル基を介して電子密度を供与して、3'位から離核性の（nucleofugal）基であるR_2を不可逆的に切断するのを促進する。R_2はこのようにして遊離の状態になってR_1－セファロスポリンコンジュゲートから拡散する（下図の右の構造）。



β－ラクタマーゼはβ－ラクタム抗生物質に対する細菌の耐性を作る点で臨床的に関係しているので、今までによく性状決定がなされてきたクラスの酵素である（Waley,S.G.,Sci.Prog.72:579－597,1988;Richmond,M.H.et al.,Ann.N.Y.Acad.Sci.182:243－257,1971）。ほとんどのβ－ラクタマーゼがクローニングされてアミノ酸配列が決定されている（例えば、Ambler,R.P.,Phil.Trans.R.Soc.Lond.［Ser.B.］289:321－331,1980を参照）。β－ラクタマーゼをコードする遺伝子はアンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）として分子生物学者には知られており、首尾よく形質導入された細菌を選択するのによく使用されており（Castagnoli,L.et al.,Genet.Res.40:217－231,1982）；そのクローンは広く入手可能である。この酵素はβ－ラクタム環の加水分解を触媒し、ペプチドやタンパク質基質を受け付けない（Pratt,R.F.and Govardhan,C.P.,Proc.Natl.Acad.Sci,USA 81:1302－1306,1984;Murphy,B.P.and Pratt,R.F.,Biochemistry 30:3640－3649,1991）。この反応速度はよく研究されており、生成物阻害がない（Bush,K.and Sykes,R.B.,Antimicrob.Agents,Chemother.30:6－10,1986;Christensen et al.,1990,前出）。酵素基質は生成物よりも極性が少ない。

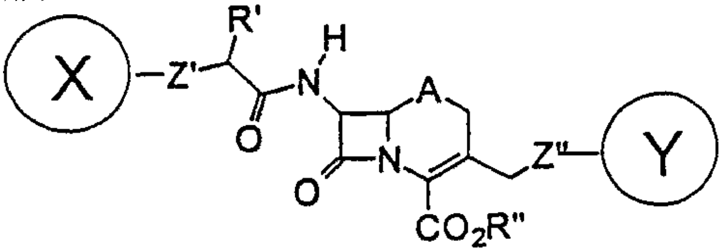
基質中のカルボキシ基はアセトキシメチルエステルで簡単にマスクすることができ（Jansen,A.B.A.and Russell,T.J.,J.Chem.Soc.2127－2132,1965;Daehne,W.et al.,J.Med.Chem.13:607－612,1970）、これは内在性の哺乳動物細胞内エステラーゼで容易に切断される。このエステラーゼによる変換とそれに続くβ－ラクタマーゼによるβ－ラクタムの切断によって、２つの陰電荷と第三級アミンを生成して、このアミンがプロトン付加する。現在までに、適当な性質をもつ蛍光原性（fluorogenic）基質は報告されていないが、種々のデザインの色原性（chromogenic）基質は複数報告されており、市販されている（Jones,R.N.et al.,J.Clin.Microbiol.15:677－683,1982;Jones,R.N.et al.,J.Clin.Microbiol.15:954－958,1982;O'Callaghan,C.H.et al.,Antimicrob.Agents.Chemother.1:283－288,1972）。

多数のβ－ラクタマーゼが単離されて性状決定されており、これらは全て本発明で使用するのに適している。最初に、β－ラクタマーゼは、その基質及び阻害剤の性質、ならびに分子量に基づいて種々のクラス（ⅠからⅤ）に分けられた（Richmond,M.H.and Sykes,R.B.,Adv.Microb.Physiol.9:31－88,1973）。最近になって、アミノ酸とヌクレオチド配列に基づく分類が導入された（Ambler,R.P.,Phil.Trans.R.Soc.Lond.［Ser.B.］289:321－331,1980）。クラスＡβ－ラクタマーゼは活性部位にセリンをもち、約29kdの分子量をもつ。このクラスにはpBR322のRTEM酵素などのプラスミドで媒介されるTEMβ－ラクタマーゼを含む。クラスＢβ－ラクタマーゼはシステイン残基に結合した活性部位亜鉛をもつ。クラスＣ酵素は活性部位セリンをもち、分子量は約39kdであるが、クラスＡ酵素とはアミノ酸の相同性がない。

本明細書で記載するリポーター遺伝子アッセイで使用する例示的β－ラクタマーゼのコー

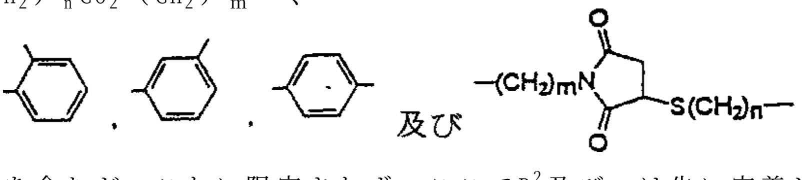
ディング領域を配列番号１（核酸配列）と配列番号２（アミノ酸配列）に示す。この配列を含むpTG2del1が文献に記載されている（Kadonaga,J.T.et al.,J.Biol.Chem.259:2149－2154,1984）。野生型pBR322β－ラクタマーゼの全コーディング配列も発表されている（Sutcliffe,J.G.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:3737－3742,1978）。当業者には明らかなように、この酵素及びβ－ラクタマーゼ活性をもつその他の同様なペプチド配列も本発明に使用するのに適している。β－ラクタマーゼリポーター遺伝子は、リポーター遺伝子の使用自体としては公知の方法（例えば、適当なプラスミドベクターの形で）でアッセイシステムで使用する。

適当なβ－ラクタマーゼと組み合わせて、本発明では以下の一般式Ｉの蛍光原性基質を使用する：



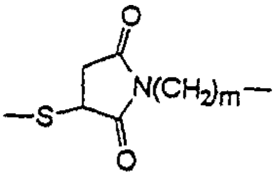
［式中、Ｘ及びＹの一方は蛍光供与体部分であり、他方は消光体（再発光してもしなくてもよい）であり;R'はＨ、低級アルキル、（CH_2）$_n$OH、（CH_2）$_n$COOR"及び＝NOJからなる群より選択され、ここでｎは０又は１～５の整数であり、そしてＪはＨ、Me,CH_2COOH、CHMeCOOH及びCMe_2COOHであり;R"はＨ、生理学的に許容できる金属及びアンモニウムカチオン、－CHR^2OCO（CH_2）$_n$$CH_3$、－$CHR^2$OCOC（$CH_3$）$_3$、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、メトキシカルボニルオキシメチル、フェニル、メチルスルフィニルメチル、β－モルホリノエチル、ジアルキルアミノエチル、及びジアルキルアミノカルボニルオキシメチルからなる群より選択され、ここでR^2はＨ及び低級アルキルからなる群より選択され;AはS,O,SO,SO_2及びCH_2からなる群より選択され；そしてZ'およびZ"は蛍光供与体部分と消光体部分のリンカーである］。

リンカーZ'およびZ"は蛍光供与体部分と消光体部分をセファロスポリン由来の骨格に結合させて一般式Ｉの化合物の合成を可能にする役割を果たす。一般式Ｉでは、Z'は骨格への直接結合を表してよく；あるいはZ'として使用するのに適したリンカーには以下のもの：－（CH_2）$_n$$CONR^2$（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$NR^2$CO（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$NR^3$$CONR^2$（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$NR^3$$CSNR^2$（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$CONR^3$（$CH_2$）$_p$$CONR^2$（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$－、－（$CH_2$）$_n$$NR^3$CO（$CH_2$）$_p$S（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$S（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$O（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$NR^2$（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$SO_2NR^2$（$CH_2$）$_m$－、－（$CH_2$）$_n$$CO_2$（$CH_2$）$_m$－、



を含むが、これに限定されず、ここでR^2及びｎは先に定義した通りであり;R^3は水素及び低級アルキルからなる群より選択され；そしてｍ及びｐのそれぞれは独立に０及び１～４の整数からなる群より選択される。特に好ましいのは、ｎ及びｍが０であるようなZ'基である。R^2がＨであるZ'基も特に好ましい。

Ｙ部分のために適したリンカーZ"は、染料の発色団中のヘテロ原子（例えば,O,N又はＳ）への直接結合、又は以下のもの：－Ｏ（CH_2）$_n$－、－Ｓ（CH_2）$_n$－、－NR^2（CH_2）$_n$－、－$N^+R^2_2$（CH_2）$_n$－、－$OCONR^2$（CH_2）$_n$－、－O_2C（CH_2）$_n$－、－$SCSNR^2$（CH_2）$_n$－、－SCSO（CH_2）$_n$－、－Ｓ（CH_2）$_n$$CONR^2$（$CH_2$）$_m$、－Ｓ（$CH_2$）$_n$$NR^2$CO（$CH_2$）$_m$及び



を含むが、これに限定されず、ここでR^2、ｎ及びｍは先に定義した通りであり；そしてｍは０～４の整数である。特に好ましいZ"基は－Ｓ（CH_2）ｎ－である。特に好ましいのはＨである。

好ましいR'基はＨ及びメチルを含む。特に好ましいのはＨである。好ましいR"基にはＨ及びアセトキシメチルを含む。好ましいR^2基はＨである。好ましいＡ基は－Ｓ－である。

好ましい面において、本発明の化合物は膜透過性である。特に好ましいのは、Ｘ及びＹの少なくとも１つが少なくとも１つのアシル化芳香族ヒドロキシル、アシル化アミン、又はアルキル化芳香族ヒドロキシルを含む化合物であり、ここでアシル基は１～５個の炭素原子を含み、アルキル基は－CH_2OC（Ｏ）alk、－CH_2SC（Ｏ）alk、－CH_2OC（Ｏ）Oalk、低級アシルオキシ－α－ベンジル、及びδ－ブチロラクトニル（式中、alkは１～４個の炭素原子を含む低級アルキルである）からなる群より選択される。特に好ましいのは、Ｘ及びＹの少なくとも１つが少なくとも１つのアシル化芳香族ヒドロキシルを含む化合物であり、ここでアシル基はアセチル、ｎ－プロピオニル又はｎ－ブチリルである。Ｘ及びＹの少なくとも１つが芳香族ヒドロキシル基上にアセトキシメチル基を含む化合物も特に好ましい。

別の好ましい面においては、消光体又は受容体は式VIII－XIIのフルオレセイン、ロドール又はローダミンである。好ましいのは、供与体が式VIIIのフルオレセインであり、消光体又は受容体が式VIII－XIIのロドール又はローダミンである化合物である。供与体が式VIIIのフルオレセインであり、消光体又は受容体が式VIIIのテトラハロフルオレセイン（式中,R^a、R^b、R^c、R^dは独立にBr又はClである）である化合物も好ましい。消光体又は受容体が式VIII、IX及びXIのロドールである化合物も好ましい。このような化合物の別の好ましい群は、消光体又は受容体が式VIII、Ｘ及びXIIのローダミンである化合物である。

別の面においては、供与体は式II－VIIのクマリンであり、消光体／受容体は式VIII－XII、XLVII又はXLVIIのフルオレセイン、ロドール又はローダミン、及びその膜透過性の蛍光原性誘導体である。特に好ましいのは、式VIIIのフルオレセイン消光体／受容体をもつ化合物である。特に好ましいのは、クマリンが７－ヒドロキシクマリン又は７－ヒドロキシ－６－クロロクマリンであり、フルオレセイン受容体がフルオレセイン又はジクロロフルオレセインである化合物である。

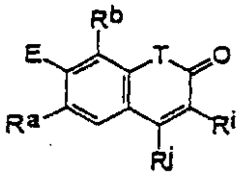
当業者には容易に理解できるように、蛍光共鳴エネルギー転移の効率は供与体蛍光団の蛍光量子収量（quantum yield）、供与体－受容体の距離、ならびに供与体の蛍光発光と受容体の吸収との重なり積分（overlap integral）に依存する。高い蛍光量子収量（好ましくは100％に近い率）をもつ供与体蛍光団を供与体の発光に合致する波長において大きな吸光係数をもつ受容体とペアにするときにエネルギー転移は最も効率がよい。蛍光エネルギー転移が上記のパラメーターに依存することが報告されており（Forster,T.（1948）Ann.Physik 2:55－75;Lakowicz,J.R.,Principles of Fluorescence Spectroscopy,New York:Plenum Press,1983;Herman,B.,Resonance energy transfer microscopy:Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture,Part B,Methods in Cell Biology,Vol 30,編集Taylor,D.L.及びWang,Y.L.,San Digo:Academic Press,1989,pp.219－243;Turro,N.J.,Modern Molecular Photochemistry,Menlo Park:Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc.,1978,pp.296－361）、スペクトルの重なり積分の表は当該技術分野の当業者は容易に入手できる（例えば、Berlman,I.B.,Energy transfer parameters of aromatic compounds,Academic Press,New York and London,1973）。蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が50％効率で起きる供与体蛍光団と受容体染料との間の距離をR_0と呼び、スペクトルの重なり積分値から計算できる。タンパク質における距離の測定によく用いられるフルオレセイン－テトラメチルローダミンの供与体－受容体ペアの場合、この距離R_0は約50－70Åである（dos Re

medios,C.G.et al.,J.Muscle Research and Cell Motility,8:97－117,1987）。このペアのエネルギー転移が90％を越える距離は約45Åである。セファロスポリン骨格に結合している場合には、供与体と受容体の距離は使用するリンカー及び発色団のサイズにより10Åから20Åである。距離が20Åの場合、供与体の90％がそのエネルギーを受容体に転移して供与体蛍光の90％消光よりもよい結果をもたらすためには、発色団ペアは30Åよりも大きな計算値R_0をもたなくてはならないだろう。β－ラクタマーゼによるこのようなセファロスポリンの切断は消光を減じ、供与体蛍光効率を10倍以上増加する。従って、本発明で教示する使用に適した供与体－受容体ペアを同定することは本質的に当業者には日常的なことである。

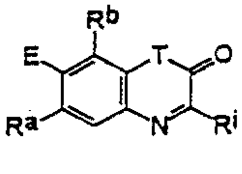
生細胞の細胞質中でのβ－ラクタマーゼ活性を測定するためには、大きな化合物の場合は基質の送達が問題となるので、大きな分子量の発色団よりは後述する小さい分子量の発色団の方が一般に好ましい。大きい分子、特に約1200ダルトン以上の分子は、小分子よりも細胞構成成分と結合しやすく、このためにβ－ラクタマーゼによる接近と切断から少なくともその一部を分離することともなる。

Ｘ及びＹとして使用するのに適した発色団は当業者に公知である。Ｘ及びＹとして使用するのに適した特定のクラスの発色団の一般構造を後述する。一般式II－XXXIVの化合物は、一般式Ｉの化合物中で特に適した供与体部分の基礎として作用する蛍光団の例示である。一般式の化合物中で受容体部分の基礎として用いるのに適した発色団は一般式II－LIVの化合物を含むが、これに限定されない。一般式XXXV－LIVの発色団は通常は効率よく再発光しない。

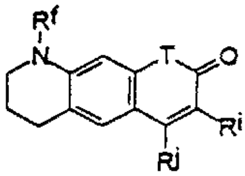
クマリン及び関連染料



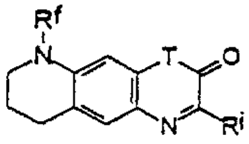
II



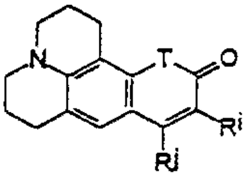
III



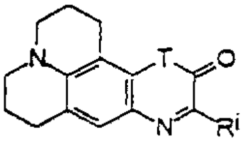
IV



V

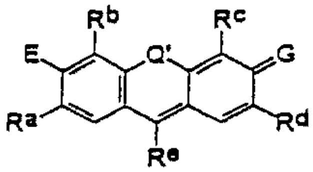


VI

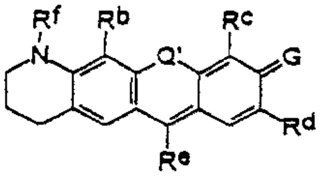


VII

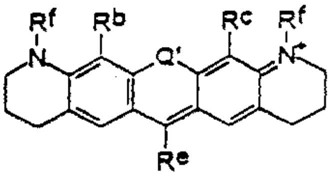
キサンテン染料（フルオレセイン、ロドール、及びローダミンを含む）



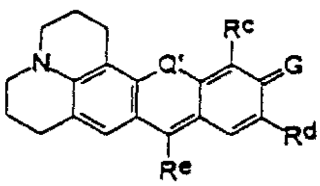
VIII



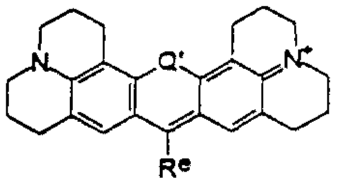
IX



X

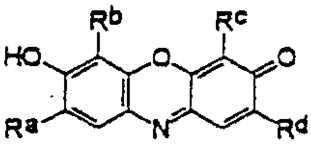


XI

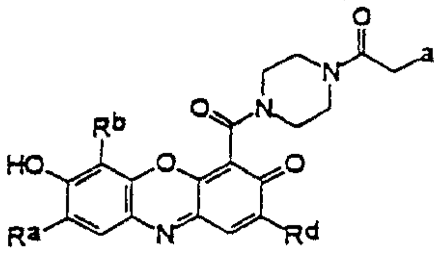


XII

レゾルフィン

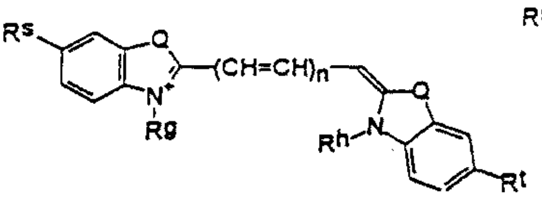


XIII

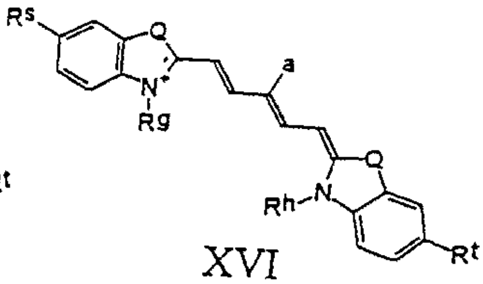


XIV

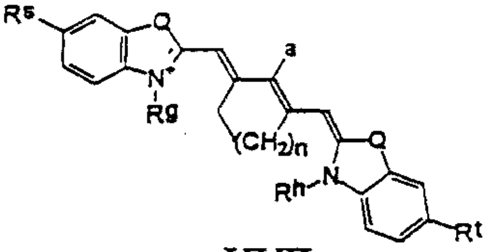
シアニン染料



XV

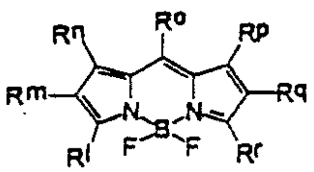


XVI



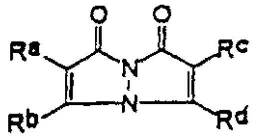
XVII

ジフルオロボラジアザインダセン染料



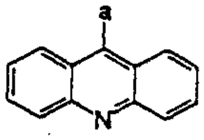
XVIII

ビマン

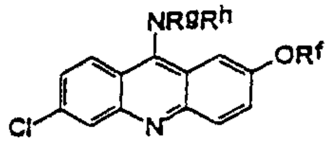


XIX

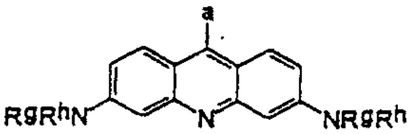
アクリジン



XX

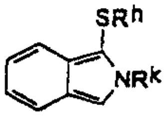


XXI

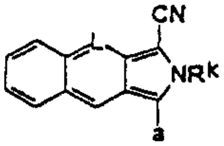


XXII

イソインドール

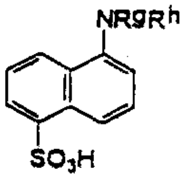


XXIII

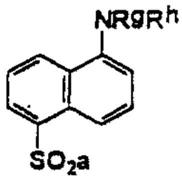


XXIV

ダンシル染料

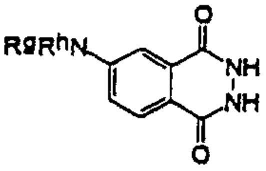


XXV

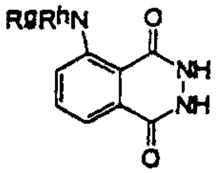


XXVI

アミノフタル酸ヒドラジド（ルミノール及びイソルミノール誘導体）

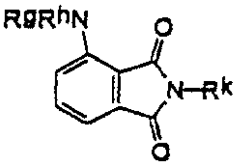


XXVII

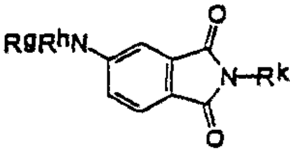


XXVIII

アミノフタルイミド

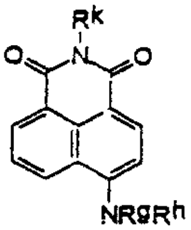


XXIX



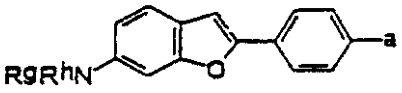
XXX

アミノナフタルイミド



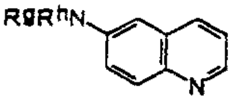
XXXI

アミノベンゾフラン



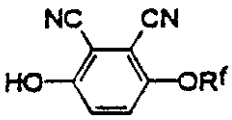
XXXII

アミノキノリン



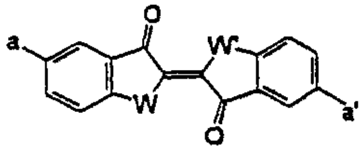
XXXIII

ジシアノヒドロキノン



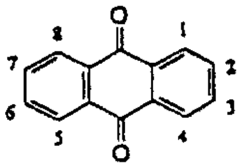
XXXIV

インジゴ染料



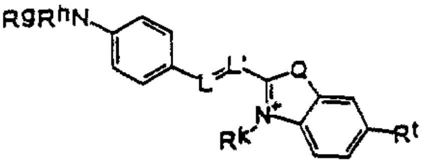
XXXV

アントラキノン染料

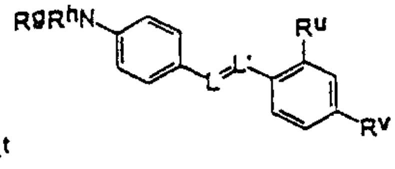


XXXVI

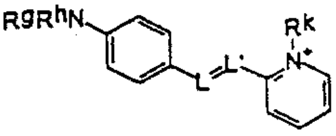
ポリメチン染料



XXXVII

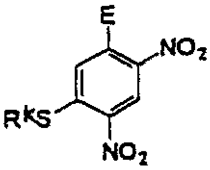


XXXVIII

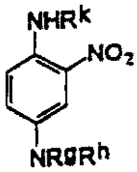


XXXIX

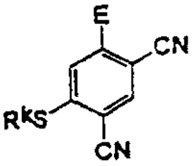
ニトロ染料及びシアノ誘導体



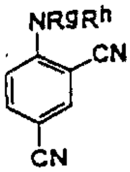
XL



XLI

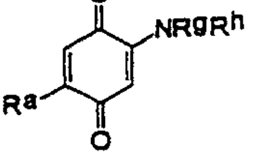


XLII

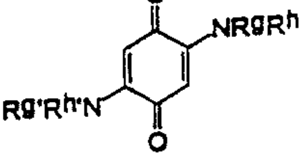


XLIII

キノン染料

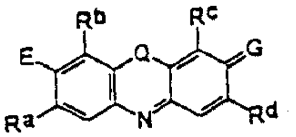


XLIV

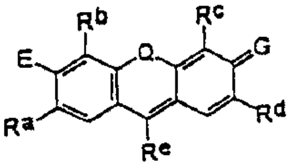


XLV

キサンテン染料

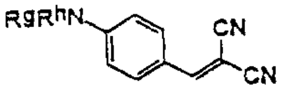


XLVI

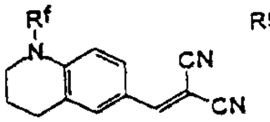


XLVII

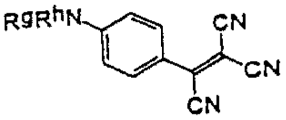
ジシアノビニル及びトリシアノビニル染料



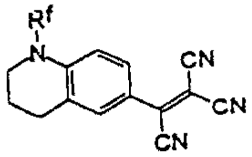
XLVIII



XLIX

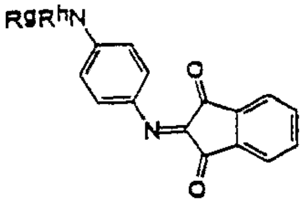


L



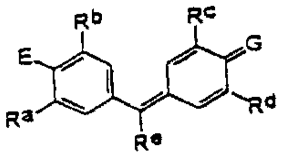
LI

インドアニリン染料（ニンヒドリン誘導体）

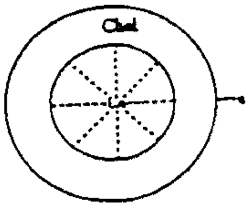


LII

ジー及びトリフェニルメタン染料

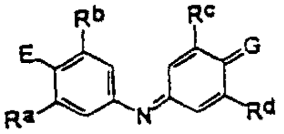


LIII

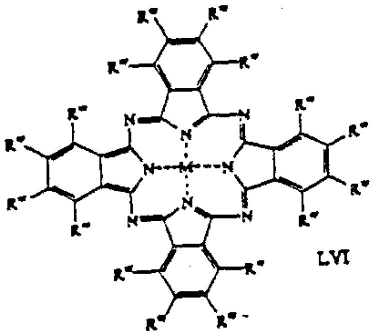


LV

インダミン及び関連染料



LIV



LVI

一般式II－LVIの化合物の好ましい態様において：

ａ及びa'はそれぞれ独立にＨ又は結合点（attachment point）（すなわち、染料成分が一般式Ｉのコア構造に結合する位置）であり；

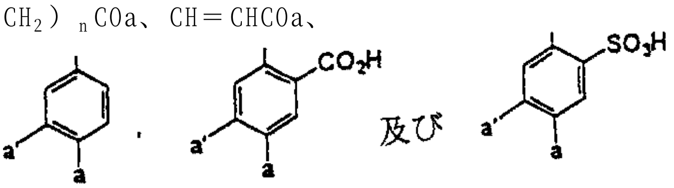
ＥはＨ、OH、OR^k及びNR^gR^hからなる群より選択され；

ＧはＯ及び$N^+R^{g'}R^{h'}$からなる群より選択され；

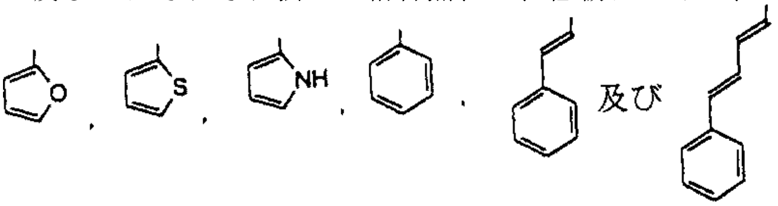
Ｌ及びL'はそれぞれ独立にCH及びＮからなる群より選択され；

ＭはＨ、Mg、Al、Si、Zn及びCuからなる群より選択され；

Ｑは O、S、C（CH_3）$_2$ 及びNR^gからなる群より選択され；
Q'は O、CH_2、C（CH_3）$_2$、NR^k及びSO_2からなる群より選択され；
Ｔは O 及びNR^kからなる群より選択され；
Ｗ及びW'はそれぞれ O、S、Se及びNHからなる群より選択され；
R^a、R^b、R^c及びR^dはそれぞれ独立に結合点、H、ハロゲン及び低級アルキルからなる群より選択され；
R^eは結合点、H、低級アルキル、（CH_2）$_n$$CO_2$H、（$CH_2$）$_nCHaCO_2$H、CHa（$CH_2$）$_n$$CO_2$H、（$CH_2$）$_n$COa、CH＝CHCOa、



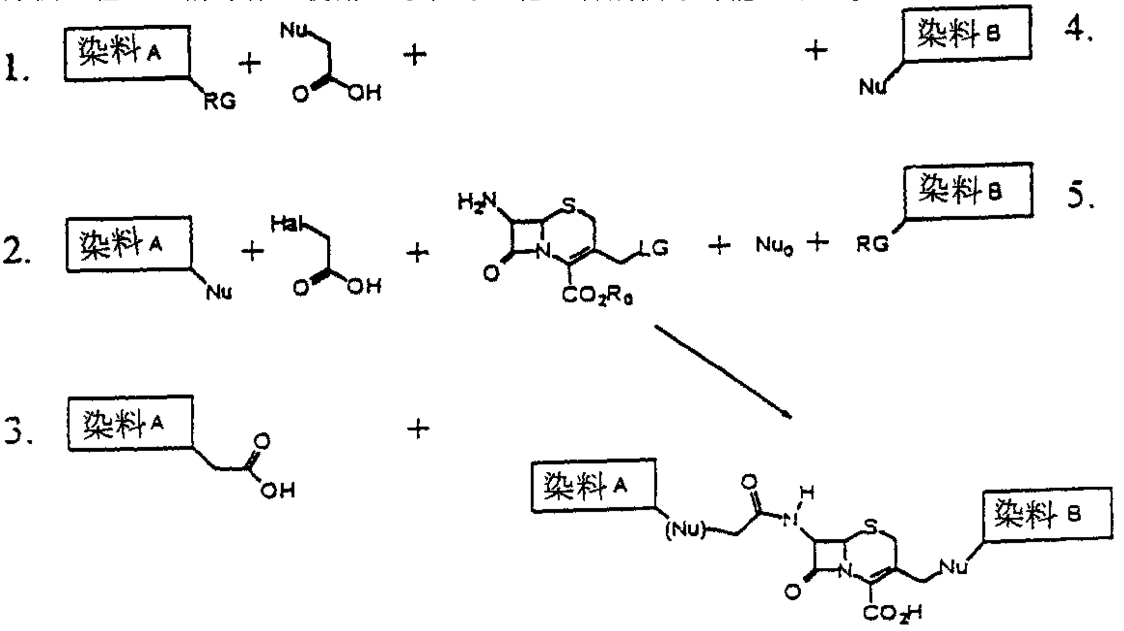
からなる群より選択され；
R^f、R^g、$R^{g'}$、R^h、$R^{h'}$及びR^kはそれぞれ独立に結合点、H、低級アルキル及びCH_2（CH_2）$_n$aからなる群より選択され；
R^iは結合点、H、ハロゲン、低級アルキル、CN、CF_3、フェニル、CO_2H及び$CONR^{g'}R^{h'}$からなる群より選択され；
R^jは結合点、H、ハロゲン、低級アルキル、CN、CF_3、フェニル、CH_2CO_2H及び$CH_2CONR^{g'}R^{h'}$からなる群より選択され；
R^l及びR^rはそれぞれ独立に結合点、H、低級アルキル、



からなる群より選択され；
R^m、R^n、R^p及びR^qはそれぞれ独立に結合点、H、低級アルキル及びフェニルからなる群より選択され；
R^oは結合点、H及び低級アルキルからなる群より選択され；
R^s及びR^tはそれぞれ独立に結合点、H、ハロゲン、低級アルキル及びOR^fからなる群より選択され；
R^u及びR^vはそれぞれ独立に結合点、H、ハロゲン、CN及びNO_2からなる群より選択され；
R^wはそれぞれ独立に結合点、H、COO^-、SO_3^-及びPO_3^{2-}からなる群より選択され；
LnはEu^{3+}、Ln^{3+}及びSm^{3+}からなる群より選択され；
Chelは、直径４～６Åの空洞に面しうる少なくとも６個そして好ましくは８～10個の供与体原子をもつ多座キレート剤であって、大員環であってもなくてもよく、300～400nmを吸収する発色団を含み、ChelがZ'又はZ"と結合しうる結合点を含む。適当なChel部分はユウロピウムトリスー（ビピリジン）クリプタンドである。一般式XXXIXのアントラキノン発色団では、１～８位のそれぞれが置換基Ｈ又はＥをもっていてよく、あるいは結合点として作用する。
ユウロピウムトリスー（ビピリジン）クリプタンド供与体は式XV－XVII、XXXVI、XLVI－XLVII、LIV及びLVIの受容体とペアにするのが好適である。テルビウムトリスー（ビピリジン）クリプタンド供与体は式VIII－XVIII、XXXVI－XLI及びXLV－LIV及びLVIの受容体とペアにするのが好適である。
ユウロピウムトリスー（ビピリジン）クリプタンド／フタロシアニン供与体／受容体ペアは、近赤から遠赤領域のエネルギーの発光によってβ－ラクタマーゼ活性を測定するのが望ましい場合には特に興味深い。
多くの応用では、一般式Ｉの化合物に疎水性と細胞膜透過性を与えるように誘導体化することが望ましい。誘導体をつくる基は細胞内で加水分解されて一般式Ｉの化合物を再生し

てこの化合物を細胞内に捕捉するようなものであるべきである。この目的のためには、染料構造中の全てのフェノール性ヒドロキシル又は遊離アミンがC_1－C_4アシル基（例えば、ホルミル、アセチル、ｎ－ブチリル）でアシル化されているか、あるいはその他の様々なエステル及びカーボネート（例えば、Bundgaard,H.,Design of Prodrugs,Elsevier Science Publishers（1985）,Chapter I,page 3以下参照、に記載のもの）に変換されていることが好ましい。フェノールは１－（アシルオキシ）アルキル、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、又はメトキシカルボニルオキシメチル基でアルキル化されていてもよい。フルオレセイン、ロドール、及びローダミンの場合、これらの染料中の酸部分をスピロラクトンに変換する結果ともなるので、この操作は特に有用である。膜透過性を促進するために、セファロスポリンの４－位にあるカルボキシルは、Ferres,H.Chem.Ind.1980:440,1980に記載されるような１－（アシルオキシ）アルキル、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、メトキシカルボニルオキシメチル、フェニル、メチルスルフィニルメチル、β－モルホリノエチル、２－（ジメチルアミノ）エチル、２－（ジエチルアミノ）エチル、又はジアルキルアミノカルボニルオキシメチル基でエステル化すべきでる。カルボキシルのために最も好ましいエステル化基はアセトキシメチルである。

一般式Ｉの化合物の一般的合成法を以下に記載する。当業者には明らかなように、以下の方法は種々の誘導体に使用でき、その他の合成法も可能である。



これらの化合物で、RGは求核性の反応基（例えば、ヨードアセトアミド、イソシアネート、イソチオシアネートなど）であり;Nuは求核性（例えば、－SH、－NH_2、－OHなど）であり;R_0はＨ又はエステル基（例えば、ベンズヒドリルエステル、ｔ－ブチルエステルなど）であり;Nu_0は二座の求核体（例えば、HS^-、$HSCH_2CH_2NH_2$、キサンテートなど）であり;Halはハロゲン（例えば、塩素、臭素、又はヨウ素）である。

セファロスポリン出発原料は、市販のセファロスポリン誘導体である７－アミノセファロスポラン酸又は７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸のベンズヒドリル又はｔ－ブチルエステル（R_0）である。求核反応基（RG）をもつ染料Ａ及びＢをカップリングする前に、そのフェノール性及び遊離のアミン残基をエステル化又はアルキル化しておくことが有利なことがある。染料Ａと染料Ｂとを結合させる順序は試薬の選択に依存する。染料Ａをアルキルアミドリンカーを介してセファロスポリンに結合する。これを行うには、求核性反応基（RG）をもつ染料Ａを二官能性の脂肪酸（例えば、アミノ－、メルカプト－又はヒドロキシアルキル酸）と反応させ、この酸をセファロスポリン７－アミンとカップリングする（上述の合成経路１）。あるいは求核基（例えば、アミン又はチオール）をもつ染料Ａをハロゲン化アルキル酸と反応させ、この酸をセファロスポリン７－アミンとカップリングする（合成経路２）。どちらの合成経路でも、２つの反応の順序は変えてもよい。

脂肪酸をもつ染料Ａをセファロスポリンと直接カップリングさせてもよい（合成経路３）。求核置換基をもつ染料Ｂは、脱離基（LG）の直接置換によってセファロスポリンの3'ー位にカップリングさせることができる（合成経路４）。求核反応基をもつ染料Ｂをカップリングした二座の求核体と反応させ、次いでこれを脱離基（LG）の置換によってセファロスポリンに結合する（合成結合５）が、ここで反応順序は変えてもよい。

いくつかの場合には、求核性基の１つをマスクした二座の求核体との第１反応を行うことが必要となる。次に第２のカップリングはこの保護基を除去した後に行う。両方の染料を結合した後、セファロスポリンエステルを切断する（R_0がＨでない場合）。膜透過性の基質を作るには、次いで酸を再エステル化してエステルとし、このエステルは哺乳動物細胞の細胞質環境によって脱保護される。細胞質の関与のないところに応用する場合には、染料上のフェノール又は遊離アミンをマスクするのに用いた全ての残っているアシル及びアルキル基を除去する。

本発明で使用するのに適した供与体と受容体クラスの好ましい組み合わせを表１に示す。これらの組み合わせを用いる一般式Ｉの化合物の態様においては、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が起きる。もちろん、当業者には容易に理解できるように、多くのその他の供与体及び受容体／消光体（再発光するものもしないものも含めて）の組み合わせが本発明での使用に適している。一般に、供与体と受容体ペアで適しているのは、供与体の発光スペクトルが受容体の励起スペクトルと有意に重複するものである。

表１

受容体 ＼ 供与体	II - VIII, XIX - XXI, XXIII - XXXIV	VII - XIV, XVII, XXII	XV - XVI, LV
II - VIII, XIX - XXI, XXIII - XXXIV	FRET		
VII - XIV, XVII, XXII	FRET	FRET	
XV - XVII	FRET	FRET	FRET
XL - XLV, XLVII - LII	FRET	FRET	
XXXV-XXXIX, XLVI-XLVII, LIII-LIV, LVI	FRET	FRET	FRET

特に興味のある蛍光供与体部分にはクマリン及びフルオレセインを含む。特に興味のある消光体にはフルオレセイン、ロドール及びローダミンを含む。興味のある組み合わせにはクマリン供与体と、フルオレセイン、ロドール又はローダミン消光体との組み合わせ、ならびにフルオレセイン供与体と、ロドール又はローダミン消光体との組み合わせを含む。

特に興味のある組み合わせには以下のものを含む：クマリン（例えば、７ーヒドロキシクマリン）又はそのクロロ誘導体とフルオレセイン又はそのジクロロ誘導体との組み合わせ；フルオレセインとエオシン又はテトラクロロフルオレセインとの組み合わせ；フルオレセインとロドール誘導体との組み合わせ；ならびにローダミンとフルオレセインとの組み合わせ。

ユウロピウムキレート供与体は、式XVーXVII、XXXVI、XLVIーXLVII、LIV及びLVIの受容体

とペアにするのが適している。テルビウムキレート供与体は、式VIII－XVIII、XXXVI－XLI及びXLV－LIV及びLVIの受容体とペアにするのが適している。ユウロピウム及びテルビウムキレート供与体は、非常に狭い発光ピークとミクロ秒～ミリ秒の励起状態寿命をもつために特に興味深く、このためバックグラウンドの蛍光及びナノ秒又はそれ以下の励起状態寿命をもつ散乱と容易に区別できる。

多くの用途において、一般式Ｉの化合物にもっと疎水性を与え、細胞膜透過性とするように誘導体化することが望ましい。誘導体を作る基は細胞内で加水分解を受けて一般式Ｉの化合物を再生し、細胞内にこれを捕捉するものであるべきである。この目的のためには、染料構造中の全てのフェノール性ヒドロキシル又は遊離アミンがC_1－C_4アシル基（例えば、ホルミル、アセチル、ｎ－ブチリル）でアシル化されているか、あるいはその他の様々なエステル及びカーボネート（例えば、Bundgaard,H.Design of Prodrugs,Elsevier Science Publishers（1985）,Chapter I,page 3以下参照、に記載のもの）に変換されていることが好ましい。フェノールは１－（アシルオキシ）アルキル、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、又はメトキシカルボニルオキシメチル基でアルキル化されていてもよい。フルオレセイン、ロドール、及びローダミンの場合、これらの染料中の酸部分をスピロラクトンに変換する結果ともなるので、遊離のフェノール性基のアシル化又はアルキル化は特に有用である。膜透過性を促進するためには、セファロスポリンの４－位にあるカルボキシルは、Ferres,H.Chem.Ind.1980:435－440,1980に記載されるような１－（アシルオキシ）アルキル、アシルチオメチル、アシルオキシ－α－ベンジル、δ－ブチロラクトニル、メトキシカルボニルオキシメチル、フェニル、メチルスルフィニルメチル、β－モルホリノエチル、２－（ジメチルアミノ）エチル、２－（ジエチルアミノ）エチル、又はジアルキルアミノカルボニルオキシメチル基でエステル化すべきでる。カルボキシルのために最も好ましいエステル基はアセトキシメチルである。

セファロスポリン骨格は２つの染料の間の切断可能なリンカーとして働く。セファロスポリン骨格は切断後に細胞内に２つの染料を保持するのに必要な電荷を提供する。一方の染料が、他方の染料が発光する（供与体蛍光団）波長において光を吸収する（消光体又は受容体発色団）ように染料を選択する。完全なセファロスポリンでは２つの染料は互いに近い位置にある。供与体蛍光団を励起するとき、供与体の蛍光に代えて供与体から受容体への蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が観察される（Forster,T.,Ann.Physik,2:55－75,1948）。もしも受容体が非蛍光性染料であるときは、エネルギーは溶媒に放出され、供与体の蛍光は消光する。受容体自身が蛍光染料である場合には、受容体の発光波長で蛍光の再発光が起きる。水などの極性溶媒中では、疎水性供与体と受容体蛍光団が短いたわみやすいリンカーで分離されているときにはスタッキング効果が起こりうる。基底状態でのこの会合のために、”暗複合体（dark complex）”が形成される（Yaron,A.et al.,Anal.Biochem.,95:228－235,1979）。この複合体では、いずれの蛍光団も発光できず、両方の染料の蛍光が消光される（Bojarski,C.and Sienicki,K.,Energy tranfer and migration in fluorescent solutions:Photochemistry and Photophysics,編集Rabek,J.F.Boca Raton:CRC Press,Inc.,1990,pp.1－57）。いずれの場合も、β－ラクタムの切断に伴って蛍光に大きな変化が起こり、これを用いてβ－ラクタマーゼ活性を測定できる。両方の染料は互いに拡散しているので、スタッキング及びエネルギー転移が破壊される。蛍光を発する供与体及び受容体染料をもつセファロスポリンをここではFRET－セファロスポリンと呼ぶ。

蛍光共鳴エネルギー転移は10－100Åの領域で効率が良いので、タンパク質及びペプチド中の分子距離の測定のための分光学的尺度として用いられてきた。このエネルギー転移は、供与体と受容体との間の距離の－６乗に比例する。この効率が高ければ高いほど、供与体の発光と受容体の吸光度が重複し、供与体の蛍光寿命（受容体がない場合）が長くなる。FRETは10－20Åの距離で極めて効率が良い。

セファロスポリンでは、もしも７－位と３－位で２つの最少スペーサーを含むものとすると、供与体と受容体の結合距離は10Å以上であり、最少10結合長である。正しい供与体－受容体ペアを選択した場合には、この距離でFRETは極めて効率が良い。便宜的には、FRET－セファロスポリンでは、７－アミンを結合した染料はセファロスポリン切断の極性加水

分解産物と結合したままで細胞質内にとどまる。いくつかの場合においては受容体がこの位置を占めることがあるが、この位置は供与体蛍光団が占めるのが最もよい。切断時には、消光体染料を失うために蛍光が増加する。

受容体蛍光団は一般に、求核攻撃に対して基質の最大安定性を与えるようなリンカーで結合される。好ましいリンカーはチオエーテル結合（－Ｓ－）であり、これは極めて安定であり、その誘導効果のためにβ－ラクタム環の求核体に対する反応性を減少する（Page,M.I.,Adv.Phys.Org.Chem.23:165－270,1987）。さらに、加水分解時に放出される遊離のチオール又はチオレート基は結合した蛍光団をしばしば消光し、加水分解時における蛍光に所望の大きな変化を加える。

本発明の蛍光原性基質は細胞外では最初無色で非蛍光性である。この基質は細胞膜を容易に通過して細胞質に入り、そこで内在性非特異的エステラーゼによって蛍光化合物に変換され、そしてその電荷によって細胞質内に捕捉されるように設計される。完全な分子中では、蛍光エネルギー転移が起こり、基質が励起されたときに特定波長で蛍光性となる。β－ラクタム環のラクタマーゼ切断の後、蛍光エネルギー転移の消失とともに蛍光部分の放出が起こる。修飾基質の励起によって異なる波長で蛍光が生じる。

本発明のアッセイシステムはさらに、リポーター遺伝子を含み、トランスフェクションが意図した所望の性質（例えばトランスフェクトされたレセプターの活性化後の、高い比率の単離細胞からの高いシグナル－対－ノイズ比での蛍光シグナル応答）をもつ安定にトランスフェクトされた細胞系を単離し、クローン選択するための有利で迅速な方法を提供する。最初の集団から安定にトランスフェクトされ遺伝的に操作された細胞をクローン選択するための現在の方法は主として、コロニーのレプリカプレーティング、１組のコロニーの試験、好ましいクローンの目視選択、好ましいクローンレプリカのピペッティングによる手動単離、及び長期間の細胞培養によって行われている。これらの方法は手間がかかり、時間も消費するものであり、薬剤スクリーニングに適したアッセイに使用できるクローンの作成に数カ月を要することもある。さらに、数百以上のクローンを手動法で選択して維持することは困難である。本発明のアッセイを用いることにより、細胞性β－ラクタマーゼリポーターシステムからの所望のシグナルを生細胞及び生存可能細胞内に維持できる。単細胞をアッセイして次の操作のために生存可能なまま維持できるので、コロニーのレプリカプレーティングは不要である。従って、最初にトランスフェクトした細胞の集団から、蛍光活性化されたセルソーター、例えばBecton Dickinson FACS Vantage™などの自動装置を用いて、最良の蛍光シグナルをもついくつかの個々の生細胞を容易に選択することができる。選択した細胞を回収して培養、増殖し、アッセイ及び薬剤スクリーニングのための所望の性質をもつクローン化細胞系を作製する。

当業者には明らかなように、本発明の新規な基質と適当なβ－ラクタマーゼとの組み合わせは、種々の広範なアッセイシステムに使用できる（例えば、米国特許第4,740,459号に記載のもの）。特に、本発明の蛍光原性基質は広範な生物学的に重要な環境、例えばヒト血清、細胞の細胞質及び細胞内コンパートメント、におけるβ－ラクタマーゼ活性の検出を可能にし、これによってペリプラズムに存在するβ－ラクタマーゼや分泌されたβ－ラクタマーゼの測定が可能となる。

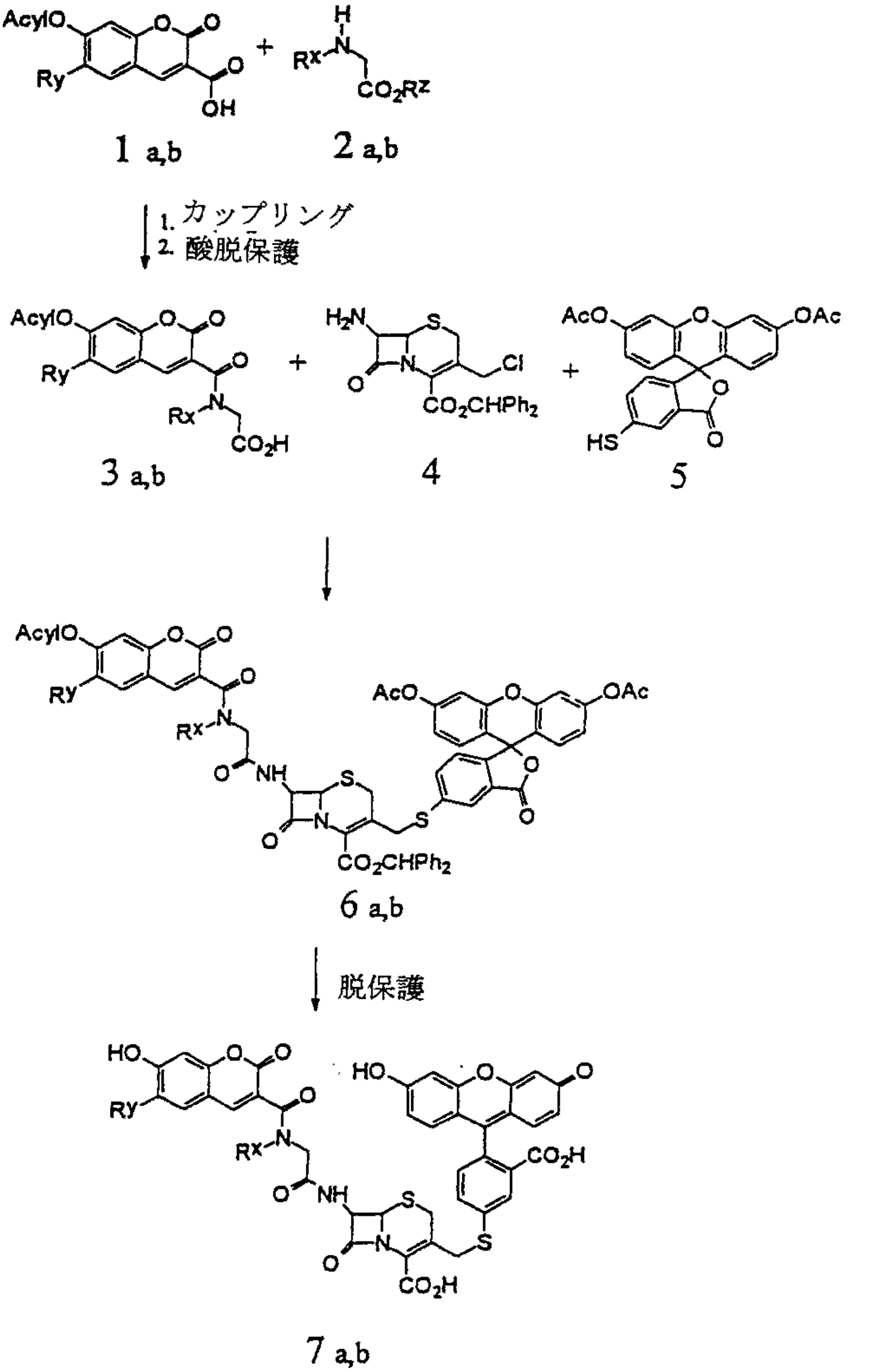
さらに、標的タンパク質をコードする遺伝子をβ－ラクタマーゼ遺伝子と融合し、β－ラクタマーゼの所在位置を免疫染色及び蛍光又は電子顕微鏡で検出することによってあらゆる標的タンパク質の発現を検出することができる。例えば、β－ラクタマーゼ融合タンパク質を本発明の基質を用いて細胞小器官の管腔中で検出できる。すなわち、融合タンパク質を含む細胞下コンパートメントのみが、切断された基質に特徴的な波長で蛍光を発し、一方その他の全ての部分は完全な分子に特徴的な波長で蛍光を発する。

完全な基質及び切断された基質はいずれも冷却（chilling）などの特別な処置を行わなくても細胞内によく維持される。色の変化（たとえそれが小さな個々の哺乳動物細胞中での変化であっても）は通常のカラー画像又は写真フィルムを用いる蛍光顕微鏡によって目視でき、蛍光シグナルは定量でき、さらに慣用のディジタル画像処理法によって増強できる。さらに、遺伝子の活性化はシグナル強度の変化によってというよりは、色の変化又は異

なる波長における２つの強度の比の変化によってむしろ検出されるので、本発明のアッセイは、変動的な細胞の漏れやすさ、基質の量、発光強度、検出の絶対感度及び染料の退色（bleaching）などの多くの人工的要因に対して比較的影響されない。

種々の基質（例えば、一般式17、22及び25の化合物）を調製し、その発光スペクトルをβ－ラクタマーゼによる切断の前後で測定した。これらの基質は血清及び細胞性タンパク質と強く結合するので、まずin vitroでのβ－ラクタマーゼ検出ができる。その疎水性のため、蛍光団がスタッキングし、このため完全な基質中で蛍光が消失する。β－ラクタマーゼは基質を切断し、スタッキングを軽減し、蛍光を発生させる。セファロスポリン上に供与体と受容体蛍光団のための逆転された位置をもつ化合物（例えば、化合物11、実施例１）は、同様の蛍光挙動を示す。

本発明の好ましい１つの態様では、一般式１の化合物を一般式２の化合物とカップリングして一般式３の化合物を製造する。次に市販の化合物４をジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて化合物３とカップリングさせ、生成物を化合物５と反応させて一般式６の化合物を得る。化合物６を脱保護して一般式７の化合物を製造する。例示的な態様では、Acylはアセチルであり、R^xはMeであり、そしてR^yはＨである（ａ）か、あるいはAcylはブチリルであり、R^xはＨであり、そしてR^yはClであり（ｂ）；そしてR^zはトリメチルシリル又はベンジルであった。



一般式６の化合物を修飾して膜透過性誘導体を得て、これを内在性非特異的エステラーゼの作用によって完全な細胞中で一般式７の対応する蛍光性化合物に変換した。これらの分子では、７－ヒドロキシクマリン部分からフルオレセイン部分へと蛍光共鳴エネルギー転移が起きており、化合物を約400nmで励起すると、緑蛍光を発する。β－ラクタム環の切断後、７－ヒドロキシクマリン部分を励起すると青蛍光になり；例示的態様では、約450nmでは蛍光が25倍増加し、515nmでは蛍光が３～４倍減少した。

遺伝子発現のモニター

本発明の基質は、一組の発現制御配列からの発現をモニターするためのリポーター遺伝子としてβ－ラクタマーゼを使用することを可能にする。ある面においては、本発明は、リポーター遺伝子としてβ－ラクタマーゼを用いることによって一組の発現制御配列からの遺伝子発現をモニターする方法を提供する。β－ラクタマーゼの発現をコードする核酸配

列と機能的に結合した発現制御配列を含む組換え核酸分子でトランスフェクトした細胞を提供する。

組換え核酸

本明細書では、「核酸分子」という語はDNA及びRNA分子の両方を含む。核酸分子がDNA配列をもつというときには、これは「Ｕ」を「Ｔ」で置換した対応のRNA配列をもつRNA分子も含むことが理解できよう。「組換え核酸分子」という語は、天然ではない核酸分子、及び天然では結合されない２つのヌクレオチド配列を含む核酸分子をいう。組換え核酸分子は人口の組み合わせ、例えば遺伝子操作法又は化学合成によって作製される。

β－ラクタマーゼをコードする核酸は当業者に公知の方法、例えば、図１中のDNA配列に基づくプライマーを用いるcDNAのポリメラーゼチェインリアクションによって得ることができる。PCR法は例えば、米国特許第4,683,195号;Mullis et al,Cold Spring Horbor Symp.Quant.Biol.51:263,1987;及びErlich,編集、PCR Technology,Stockton Press,NY,1989に記載されている。

発現ベクターの構築と、トランスフェクト細胞中での遺伝子の発現には同じく当業者に公知の分子クローニング法の使用を含む。Sambrook et al.,Molecular Cloning－－－A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,1989及びCurrent Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel et al.編集、［Current ProtocolsはGreen Publishing Associtates Inc.とJohn Wiley & Sons,Inc.のジョイントベンチャー（最新の補充板）］。

関心のあるポリペプチドの発現をコードする配列で細胞をトランスフェクトするのに用いる核酸は一般に、前記ポリペプチドの発現をコードする核酸配列と機能的に結合させた発現制御配列を含む発現ベクターの形で行う。本明細書では、ポリペプチドの「発現をコードする」核酸配列という語は、mRNAの転写と翻訳によって前記ポリペプチドを生産する配列をいう。当業者であれば誰でも理解できるように、これには同じアミノ酸配列をコードする全ての縮重核酸配列を含む。これにはイントロンなどを含む配列を含むことができる。本明細書では、「発現制御配列」という語は、これと機能的に結合している核酸配列の発現を制御する核酸配列をいう。発現制御配列が核酸配列の転写と翻訳をコントロールし制御するときに、発現制御配列は核酸配列と「機能的に結合」される。従って、発現制御配列には、適当なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質コーディング遺伝子の前のスタートコドン（すなわちATG）、イントロンのためのスプライシングシグナル、mRNAの正しい翻訳ができるような遺伝子の正しい読み枠の維持、ならびにストップコドンを含むことができる。

組換え核酸は、組換え核酸と機能的に結合した発現制御配列を含む発現ベクター中に導入することができる。発現ベクターは、適当なプロモーター、複製配列、マーカーなどを含めることによって原核又は真核細胞中で作用するように適合させることができる。

細胞をトランスフェクトするのに用いる組換え核酸は、β－ラクタマーゼをコードするヌクレオチド配列と機能的に結合した発現制御配列を含む。コードされるβ－ラクタマーゼは当業者に公知であるか、又は本明細書に記載のあらゆるものであってよい。これには例えば図７に示す酵素を含む。

本発明は、細胞質ゾルβ－ラクタマーゼの発現をコードするヌクレオチド配列と機能的に結合した非哺乳動物真核細胞中で作用するように適合させた発現制御配列を含む新規な組換え核酸分子を提供する。本明細書では、「細胞質ゾルβ－ラクタマーゼ」とは、細胞膜からの分泌のためのアミノ酸配列、例えばシグナル配列を欠失するβ－ラクタマーゼをいう。例えば、図７に示す配列１のポリペプチドでは、シグナル配列がアミノ酸Met－Serで置換されている。従って、発現時にこのβ－ラクタマーゼは細胞内に留まる。

本発明は、β－ラクタマーゼの発現をコードするヌクレオチド配列と機能的に結合した哺乳動物真核細胞中で作用するように適合させた発現制御配列を含む組換え核酸分子を提供する。

さらに、リボソーム結合部位とβ－ラクタマーゼの発現をコードするヌクレオチド配列が哺乳動物細胞に好適な配列を含むことが好ましい。このような配列は哺乳動物細胞中での

βーラクタマーゼの発現を向上させる。哺乳動物細胞中での発現に好ましい配列は、例えば、Kozak,M.J.Cell Biol.108:229－241,1989に記載されており、本明細書ではこれを「Kozak配列」と呼ぶ。図７の配列３中の細胞質ゾルβーラクタマーゼのためのヌクレオチド配列はヌクレオチドー９～４にKozak配列（GGTACCACCATGA）を含む。

哺乳動物細胞で用いるとき、発現制御配列は哺乳動物細胞中で作用するように適合されている。本発明の方法はあらゆる発現制御配列のセットからの発現を試験するのに有用である。特に、本発明は誘導可能な発現制御配列からの発現を試験するのに有用である。本明細書では、「誘導可能な発現制御配列」とは、それが機能的に結合される配列の発現を増加又は減少することによる生化学的シグナルに応答する発現制御配列をいう。例えば、ステロイドホルモンによって誘導される遺伝子の場合、発現制御配列にはホルモン応答エレメントを含む。ステロイドホルモンレセプターが応答エレメントと結合すると、これらの発現制御配列と機能的に結合した遺伝子の転写を誘導する。多くの遺伝子及び誘導可能な遺伝子のための発現制御配列が単離され、当業者に公知である。本発明はまた、構成的に活性な発現制御配列にも有用である。

トランスフェクトした細胞を、発現制御配列からのβーラクタマーゼの発現を試験する条件下でインキュベートする。細胞又は細胞抽出物を本発明のβーラクタマーゼ基質と、選択した試験条件下に、及び発現したあらゆるβーラクタマーゼによる基質の触媒を可能にする時間、接触させる。次にこの試料からの供与体部分を適当な紫外又は可視波長で励起する。試料中の蛍光共鳴エネルギー転移の程度を測定する。

もしも細胞がβーラクタマーゼを発現しなかった場合には、基質はほとんど切断されず、細胞中のFRET効率は高く、そして細胞又はこれに由来する試料の蛍光特性はこの効率を反映するであろう。もしも細胞が大量のβーラクタマーゼを発現した場合には、ほとんどの基質が切断される。この場合には、FRET効率は低く、タンデムな蛍光タンパク質構築体の合成率と比較して切断酵素が大量に存在すること又はその効率が高いことを反映する。ある面では、この方法は、どちらがより高い又は低い酵素活性をもつかを同定するために突然変異体を比較するのに使用できる。このような細胞は蛍光に基づいて蛍光セルソーターでソーティングすることができる。

また、細胞シグナル伝達又は活性化のアゴニスト、逆アゴニスト又はアンタゴニストとして作用する有力な薬剤候補を同定するために、試料又は試料プール（コンビナトリアルの又は合成の化合物、天然産物抽出物、又は海洋動物抽出物）をスクリーニングするためのリポーター遺伝子細胞に基づくアッセイを用いる分野の当業者には明らかなように、異なる制御エレメント／プロモーターの制御下にβーラクタマーゼを発現するように遺伝子操作された細胞（好ましくは哺乳動物細胞）と、本発明の新規なβーラクタマーゼ基質化合物の使用とを組み合わせることは、既知のリポーター遺伝子（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、Vargulaルシフェラーゼ、エクオリン、βーガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼを含むが、これに限定されない）ならびにその必要な基質に対して顕著な利点をもたらすであろう。

βーラクタマーゼの発現を制御するための適当な制御エレメント及びプロモーターを選択することによって、細胞内ホルモンレセプターの機能的応答を喚起又は阻害する試験物質の能力を検出又は測定するためのアッセイを構築することができる。これには、デキサメタゾン（J.Steroid Biochem.Molec.Biol.Vol.49,No.1,1994,pp.31－31）、グルココルチコイド、及び甲状腺ホルモンレセプター（米国特許第5,071,773号に記載するようなもの）を含むミネラルコルチコステロイドによって応答性ないしは誘導可能な発現制御配列を含む。このような細胞内レセプターにはさらに、レチノイド、ビタミンD3及びビタミンＡを含む（Leukemia Vol.8,Suppl.3,1994,pp.S1－S10;Nature,Vol.374,1995,pp.118－119;Seminars in Cell Biol.,Vol.5,1994,pp.95－103）。適当なプロモーター／エンハンサーエレメントを用いることによって特異性がでてくる。さらに、その他の制御エレメント又は特定プロモーターを選択することによって、特定遺伝子の発現に影響を及ぼす薬剤を同定できる。このような薬剤は、キナーゼ、転写因子、又はシグナル伝達体及び転写活性化剤などの分子のような特定シグナル伝達分子に作用することができる（Science Vol.264,

1994,p.1415－1421;Mol.Cell Biol.,Vol.16,1996,p.369－375）。有力な薬剤標的である特定の微生物又はウイルスプロモーターもこのような試験系でアッセイすることができる。

さらに、β－ラクタマーゼの発現を制御するための、ｃ－fos又はｃ－junなどのプロモーター（米国特許第5,436,128号;Proc.Natl.Acad.Sci.Vol.88,1991,pp.5665－5669）又は第２メッセンジャーに応答性の調節エレメント（Oncogene,6:745－751,1991）［環状AMP応答性エレメント、フォルボールエステル応答性エレメント（プロテインキナーゼＣ活性化に応答性）、血清応答性エレメント（プロテインキナーゼＣ依存性又は非依存性経路に応答性）及び活性化Ｔ細胞の核因子応答性エレメント（カルシウムに応答性）を含む］を含むプロモーター構築体を選択することによって、以下のクラスを含む（ただしこれに限定されない）細胞表面レセプターを調節する物質又は物質の混合物を検出又は測定するためのアッセイを構築することができる：エリスロポエチン、成長ホルモン、インターフェロン、及びインターロイキン（IL－８以外）及びコロニー刺激因子などのサイトカインスーパーファミリーのレセプター；ホルモンのためのＧ－タンパク質結合レセプター（米国特許第5,436,128号）、例えばカルシトニン、エピネフリン又はガストリン、パンクリン又は自己分泌媒介体、例えばソマトスタチン又はプロスタグランジン、及び神経伝達物質、例えばノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニン又はアセチルコリン；チロシンキナーゼレセプター、例えばインスリン成長因子、神経成長因子（米国特許第5,436,128号）。

さらに、電位依存性又はリガンド依存性のイオンチャンネルの活性を調節する物質（その調節が第２メッセンジャー、特にカルシウムの細胞濃度を変更する）（米国特許第5,436,128号）を同定するためのアッセイを構築することができる。関心のあるプロモーター、レセプター又はイオンチャンネルを本質的に発現する細胞、又はその中で適当なタンパク質が遺伝的に操作されている細胞を用いてアッセイを構築することができる。

発現制御配列も、細胞表面レセプターを調節する物質、又は細胞内レセプターを調節する物質に応答性のものでありうる。

ある物質又は物質の混合物が細胞外又は細胞内レセプターあるいはその他の細胞応答を活性化するか否かを測定するためには、所望のプロモーター／エンハンサーエレメントによって制御されたβ－ラクタマーゼを含む細胞を試験物質とともにインキュベートし、次いで基質を加えて、一定時間後に本発明の選択した化合物にとって適当な１または２の励起－発光ペアで蛍光シグナルを測定する（例えば、化合物CCF2を405nm近くと450nm近く、及び405nmと510nm近くの波長ペアで）。この得られた蛍光を、薬剤処理をしなかった対照試料と、そして可能な場合には既知の阻害剤又は既知の活性化剤を含む対照試料と比較する。試験ウエル中に見られる蛍光シグナルと、薬剤処理をしないウエル中に見られるシグナルとの比を用いて、活性薬剤の効果を決定する。96又はそれ以上のウエルを含むマイクロタイタープレート中のウエルで、あるいはゲルマトリックスや湿潤膜環境などの区切られていないアッセイ系でアッセイを行うことができる。検出は、Millipore Cytofluorなどのマイクロタイタープレート蛍光分析器、あるいはAstromedから市販されている１又はそれ以上のウエル、あるいは一定表面積中の１又はそれ以上のアッセイ点を分析できる画像装置によって行うことができる。生細胞の細胞質中に基質を保持する能力は、アッセイ媒質中の着色物質又は消光物質からのシグナル干渉を減少するので有利である。さらに、CCF2などの本発明の化合物からの蛍光シグナルは単細胞中でも容易に検出でき、従ってアッセイの小型化ができ、表面積当たりの試験数を増加できる。アッセイの小型化によって画像領域中の試料数が増加するので画像検出システムの処理数が増加する。

本発明のアッセイシステムはまた、リポーター遺伝子を含み、トランスフェクションが意図した所望の性質、例えば、トランスフェクトしたレセプターの活性化後の、単離した細胞の高い割合からの少なくとも10:1の高いシグナル－対－ノイズ比での蛍光シグナル応答、をもつ安定に形質転換された細胞系を単離しクローン選択する有利で迅速な方法を提供する。関心のあるベクターで最初にトランスフェクトした集団から満足のいくようにトランスフェクトされ遺伝子操作された細胞をクローン選択する現在の方法は、主として手動法であり、何回もの顕微鏡分析、目視による好ましいクローンの選択、手動ピペッティン

グ段階によるクローンの単離、及び長期間の細胞培養工程を含む。これらの工程は手間がかかり、時間を消費するものであり、薬剤スクリーニングに適したアッセイに使用できるクローンの作製に数カ月を要することもある。また、数百以上のクローンを手動法で選択し維持するのは困難である。本発明のアッセイを用いると、細胞性β－ラクタマーゼリポーターシステムからの所望のシグナルを生細胞及び生存可能細胞中に維持することができる。従って、最初にトランスフェクトした細胞集団から、Becton Dickinson FACS Vantageなどの蛍光活性化セルソーターのような自動装置を用いて、最良の蛍光シグナルをもついくつかの生細胞を迅速に選択できる。選択した細胞を回収して培養、増殖して、アッセイ及び薬剤スクリーニングのための所望の性質をもつクローン化細胞系を作製する。

さらに、β－ラクタム抗生物質に対する細菌耐性の存在（例えば、ヒト血清、膿、又は尿中の）を本発明の基質を用いて容易に検出できる。活性β－ラクタマーゼが存在するときのみ、完全な分子の蛍光スペクトルから切断産物に特徴的な蛍光スペクトルへの変化がある。本発明の基質がヒト血清に対して安定であるという点において、本発明の基質は従来の色原性基質であるNitrocephinやPADACよりも優れている。この新規な基質は、ヒト血清からの光学バックグラウンドがはるかに小さく、また蛍光対吸光度の検出限界が低いので、色原性基質CENTAよりも感受性でもある。

本発明は以下の実施例を参照することによりさらに良く理解されるであろうが、実施例は説明の目的のみを意図しており、付属の請求の範囲に規定する本発明の範囲を限定するものと解してはならない。

測定

FRETの程度は励起した構築体に特徴的な全てのスペクトル又は蛍光寿命によって測定でき、例えば、供与体からの蛍光シグナル強度、受容体からの蛍光シグナル強度、受容体の発光最大値近辺の蛍光振幅（amplitude）の、供与体の発光最大値近辺の蛍光振幅に対する比、又は供与体の励起状態寿命を測定することができる。例えば、リンカーの切断は供与体からの蛍光強度を増加し、受容体からの蛍光強度を減少し、受容体からの蛍光振幅の供与体からの蛍光振幅に対する比を減少し、そして供与体の励起状態寿命を増加する。

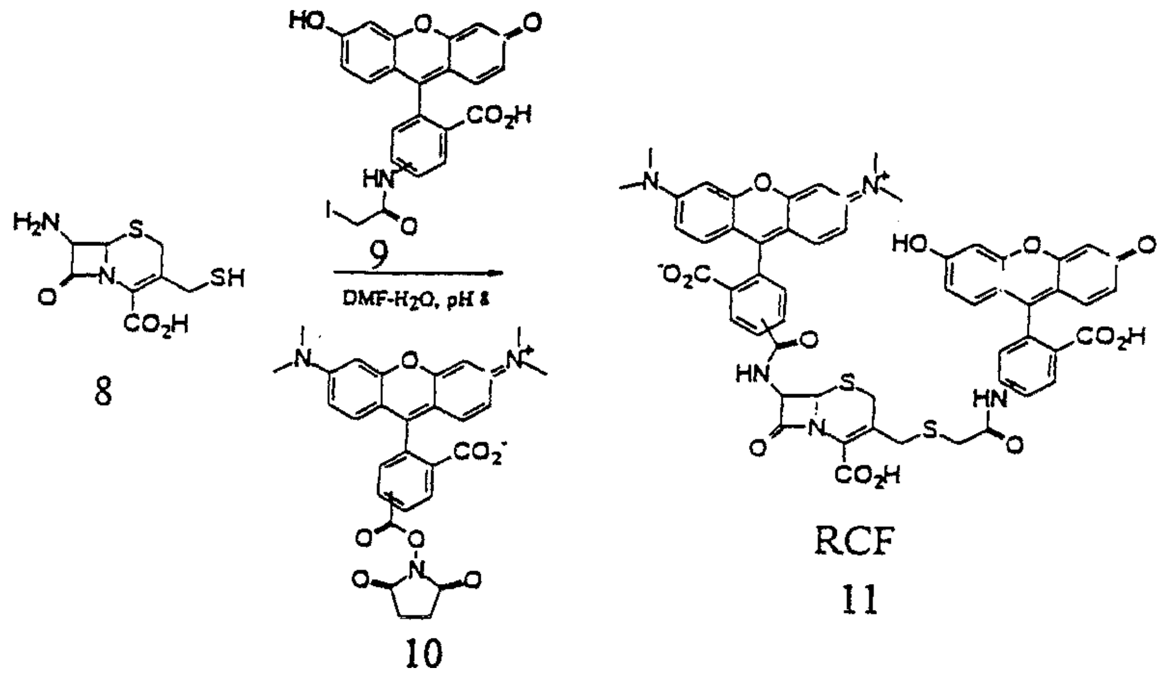
好ましくは、FRETの程度は、供与体部分と受容体部分からの蛍光量の比の変化の関数として決定し、このプロセスを「比率化（rationing）」と呼ぶ。励起波長における試料中の基質の絶対量、励起強度、及び濁度又はその他のバックグラウンド吸光度の変化は、供与体及び受容体双方からの蛍光強度に対してほぼ平行に影響する。従って、２つの発光強度の比は、いずれか一方の強度だけを用いるよりも切断をより強力にかつ好ましく測定できる。

同様に、供与体部分の励起状態寿命は、基質の絶対量、励起強度、又は濁度又はその他のバックグラウンド吸光度とは独立である。これを測定するには、ナノ秒の時間解像をもつ装置が必要である。ただし、ランタン系複合体の場合は例外であり、この場合にはミクロ秒からミリ秒で十分である。

Chel部分として好適な別の成分が以下の文献に記載されている:Vallarino,L.M.& Leif,R.C.,米国特許第5,373,093号;Sabbatini,N.et al.,Pure and Applied Chem.67:135－140,1995;Mathis,G.,Clinical Chem.41:1391－1397,1995;Horiguchi,D.,Chem.Pharm.Bull.42:972－975,1994;Takalo,H.et al.,Bioconjugate Chem.5:278－282,1994;Saha,A.K.et al.,J.Amer.Chem.Soc.115:11032,1993;Li,M.& Selvin,P.R.,J.Amer.Chem.Soc.117:8132－8138,1995。

試料中の蛍光は蛍光分析器を用いて測定される。一般に、第１波長をもつ励起源からの励起放射は励起光学系を通過する。励起光学系は試料を励起するための励起放射を引き起こす。これに応答して、試料中の蛍光性タンパク質が、励起波長とは異なる波長をもつ放射を発する。次に回収光学系が試料からの発光を回収する。装置にはスキャニング中に試料を特定温度に維持するための温度コントローラーを含んでいてよい。ある態様によると、個々のウエルを暴露用に位置付けするために、複数のウエルを保持するマイクロタイタープレートを多軸移動ステージ（multi－axis translation stage）で移動する。多軸移動ステージ、温度コントローラー、自動焦点機能、ならびに画像処理及びデータ回収に関連

するエレクトロニクスは、適切にプログラムされたディジタルコンピューターで操作できる。コンピューターはアッセイで回収したデータを提示用の別のフォーマットに変換することもできる。
蛍光性物質のアッセイを行う方法は当業者に公知であり、例えば以下の文献に記載されている:Lakowicz,J.R.,Principles of Fluorescence Spectroscopy,New York:Plenum Press,1983;Herman,B.,Resonance energy transfer microscopy:Fluorescence Microscopy of Living Cells in Cuture,Part B,Methods in Cell Biology,Vol.30,編集、Taylor,D.L.& Wang,Y.－L.,San Diego:Academic Press,1989,pp.219－243;Turro,N.J.,Modern Molecular Photochemistry,Menlo Park:Benjamin/Cummings Publishing Col,Inc.,1978,pp.296－361。
実施例
シリカゲルクロマトグラフィーは全て、Aldrichから購入したシリカゲル（Merck,グレード60、230～400メッシュ、60Å）を使用して行った。C_{18}逆相クロマトグラフィーには、J.T.Baker製のBakerbond Octadecylを使用した。溶媒（高圧液体クロマトグラフィー級）は、クロマトグラフィーにはそのまま使用し、また、合成の目的に対しては活性分子ふるい（３Å）上で脱水して使用した。
蛍光励起および発光スペクトルは、Spex Fluorolog 111またはK2フルオロメーター（ISS,Champaigne,IL）のいずれかにより、ローダミンＢ量子計数器を用いて比の形で測定した。蛍光エネルギー転移の効率は、β－ラクタマーゼで処理したときの供与体発光波長での総蛍光発光の変化から求めた。蛍光顕微鏡で像を作るために、２種類の結像機構を使用した。一方は、倒立蛍光顕微鏡のZeiss IM－35（Thornwood,NY）をシリコン増感標的（SIT）カメラ（Dage－MTI,Michigan City,IN）に連結したもので、文献に詳細に記載されている［Tsien,R.Y.（1986）「細胞質ゾルの遊離カルシウム濃度の蛍光測定および光化学操作のための新規テトラカルボキシレートキレート剤」Optical Methods in Cell Physiology,de Weer,P.& Salzberg,B.編、New York:Wiley,pp.327－345;TsienおよびHarootunian（1990）Cell Calcium 11:93－109］。他方は、低温電荷結合装置（CCD）カメラ（Photometrics,Tucson,AZ）が倒立蛍光顕微鏡（Zeiss Axiovert）に連結したものから成る。
蛍光共鳴エネルギー転移は、市販のフィルター（Omega Optical）を使用して供与体および受容体発光波長における蛍光強度の比をモニターすることにより求めた。
励起:360DF40、二色性鏡390DCLPまたは405DF15、二色性鏡420DRLP02
発光:450DF65（供与体の発光）
515EFLP（受容体の発光）
435EFLP（供与体および受容体の蛍光を同時に調べる）
実施例１（化合物11）
２個の染料分子が結合したセファロスポリンの光学特性を試験するために、下記のモデル化合物を合成した。

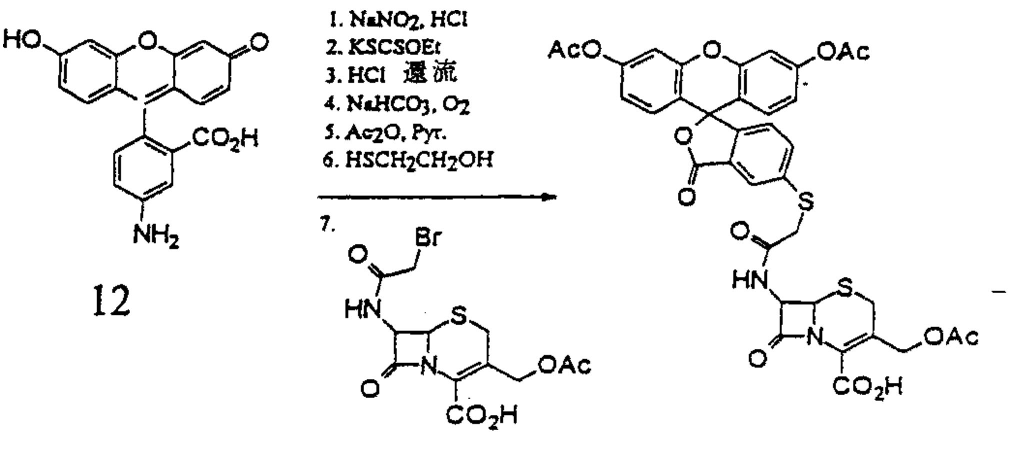


最初の合成工程は、７－アミノセファロスポラン酸を3'位のチオールおよび７－アミンを有する二官能性セファロスポリンに変換するものであった［Van Heyningen,E.およびBrown,C.N.,J.Med.Chem.8:174－181（1965）；特開昭50－18494,CA 85,97320d］。このセファロスポリンは次いで、チオール－反応性染料、次いでアミン－反応性染料と選択的に反応させる。チオール－反応性染料の5,（６）－ヨードアセトアミド－フルオレセインおよびアミン－反応性染料の5,（６）－カルボキシ－N,N,N',N'－テトラメチルローダミン－スクシンイミドを水性ジメチルホルムアミド（pH8）中でセファロスポリンに結合させた。その生成物をRCFと言う。

pH7のリン酸塩緩衝液中では、RCFは本質的に非蛍光性であり、フルオレセインもローダミンも各々の最大励起で励起されると、あまり蛍光を示さない。これは、発色団の重なり（「暗複合体（dark compex）」）を示す。β－ラクタマーゼで長く処理すると、β－ラクタムは切断され、両方の染料の蛍光が再び出現する（図１（ａ）および１（ｂ））。この実験から、適切な供与体－受容体の組み合わせの使用による蛍光消光の低下により、セファロスポリン中のβ－ラクタムのβ－ラクタマーゼ触媒による加水分解を測定することができることが確認される。

実施例２

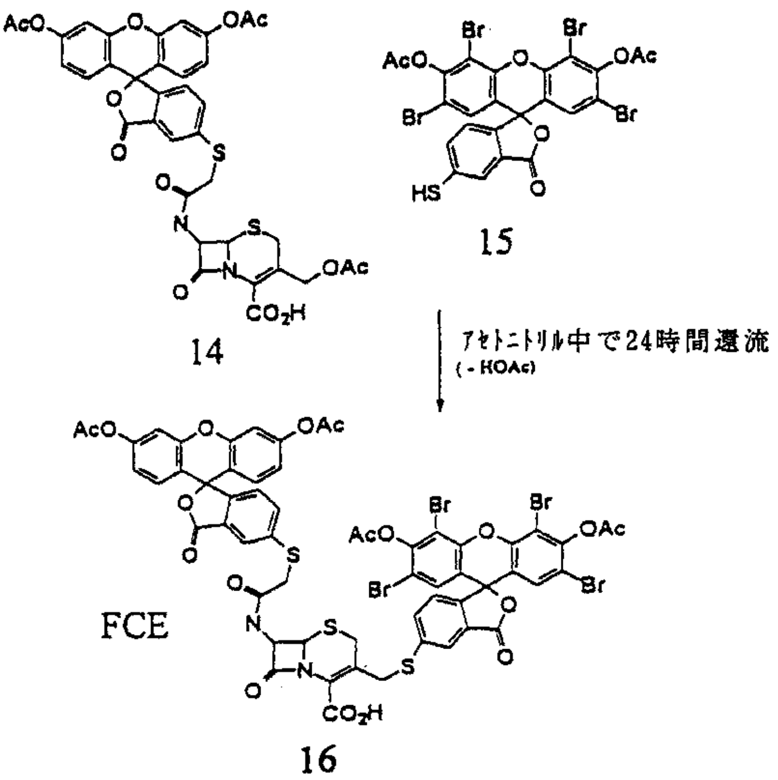
チオメチルリンカーの導入は、ジアゾ化による５－フルオレセインアミンの５－メルカプトフルオレセインへの変換、エチルキサンテートへの変換、および酸水溶液によるキサンテートの遊離スルフヒドリルへの分解によって行った。それを、フルオレセインのメルカプト基による臭化物の求核置換により７－ブロモアセトアミド－セファロスポラン酸に結合した。７－ブロモアセトアミド－セファロスポラン酸は、７－アミノセファロスポラン酸および臭化ブロモアセチルから合成した［Bunnell,C.A.ら、「セファロスポリンの工業的製造」Beta－Lactam Antibiotics for Clinical Use,Series:Clinical Pharmacology Vol.4,Queener,S.F.,Webber,J.A.およびQueener,S.W.編、New York:M.Dekker,1986,p.255－283］。



12 13 14

７β－〔（５－ジアセチルフルオレセイン）チオ〕アセトアミド－３－（アセトキシメチル）－３－セフェム－４－カルボン酸（14）を合成するために、窒素雰囲気下で、130mg（0.29ミリモル）の５－フルオレセインチオール二酢酸塩を10mlのジメチルホルムアミドに溶解し、pH8.0に調整した10mlの1Mリン酸カリウム緩衝液中の120mg（0.31ミリモル）の７β－ブロモアセトアミド－３－（アセトキシメチル）－３－セフェム－４－カルボン酸に添加した。その溶液を室温で８時間攪拌した後、溶媒を減圧除去した。残渣を10mlの水に溶解し、溶液のpHを注意深く希リン酸で５に調整した。この時点で非極性の副生物が沈殿し、遠心分離によって除去した。さらにpH2.7まで酸性化すると、標記化合物が沈殿し、これは、遠心分離により採取して、2mlのジエチルエーテル－テトラクロロメタン（1:2）で３回洗浄し、減圧脱水した。^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ2.08ppm（s,3H,酢酸塩）、δ3.36ppm、3.53ppm（2d,2H,J＝17.3Hz,C－２）、δ3.87ppm（s,2H,側鎖メチレン）、δ4.88ppm、5.16ppm（2d,2H,J＝13.6Hz,C－3'）、δ4.96ppm（d,1H,J＝4.9Hz,C－６）、δ5.81ppm（dd,1H,J_1＝8.2Hz,J_2＝4.9Hz,C－７）、δ6.85ppm（m,4H,キサンテン）、δ7.10ppm（s,2H,キサンテン）、δ7.15ppm（d,1H,J＝8.2Hz,アミド）、δ7.69ppm（d,1H,J＝8.2Hz,フタル酸）、δ7.91ppm（d,1H,J＝8.2Hz,フタル酸）、δ8.11ppm（s,1H,フタル酸）

５－フルオレセインアミンを臭素化して５－エオシンアミンを生じ、これを、５－メルカプトフルオレセインへの場合と同様にして５－メルカプトエオシンに変換した。５－メルカプトエオシン二酢酸塩によるセファロスポリン酢酸塩の求核置換では、FRET－セファロスポリンが、保護されたテトラアセチル誘導体として生じた。



５－エオシンアミンを合成するために、1.74g（５ミリモル）の５－フルオレセインアミンを30mlの氷酢酸に懸濁し、2.06ml（40ミリモル、100％過剰）の臭素を添加した。臭素を添加すると、フルオレセインアミンは溶解した。その溶液を90℃で６時間加熱し、その間に白色沈殿物が生成し始めた。フラスコに取り付けた氷冷トラップにより、臭素が大気中に逃げないようにした。次いで、過剰の臭素を蒸留により液体窒素冷却採集フラスコに回収した。１体積の水を酢酸溶液に添加して、溶液に残っている物質を沈殿させた。その沈殿を濾取し、1N水酸化ナトリウム水溶液に溶解した。氷酢酸の添加により、５－エオシンアミンを遊離アミンとして沈殿させた。エオシンアミンをほんの少しのクロロホルムに溶解し、メタノールを添加した。この溶液をロータリーエバポレーターにより濃縮すると、2.56g（3.85ミリモル、77％）のエオシンアミンが白色微粉末として得られた（エオシンアミン－スピロラクトン）。

５－エオシン－エチルキサンテート二酢酸塩を合成するために、670mg（１ミリモル）の５－エオシンアミンを2mlの濃硫酸および2mlの氷酢酸中で攪拌した。懸濁物を氷－塩を入れた浴槽により、０℃より２、３度低い温度に冷却すると、攪拌が困難な濃厚なペースト状に変わった。水1mlに溶かした200mg（2.9ミリモル）の硝酸ナトリウムを１時間にわたって滴下した。０℃においてさらに２時間経過後、20gの氷をゆっくり添加した。フラスコを、冷却下で高真空ポンプに取り付け、過剰の窒素ガスを除去した（注意！）。氷冷した飽和重炭酸ナトリウム水溶液を、固体が溶解して暗赤色の溶液になるまで添加した。200mg（1.2ミリモル）のエチルキサントゲン酸カリウムを添加すると、ピンク色の沈殿が生じた（キサントゲン酸５－エオシンジアゾニウム）。塩化ニッケル（II）の結晶少量を触媒として、窒素の発生とともにジアゾニウム塩を変換した。窒素の発生が止むと、生成物を1N塩酸で沈殿させた。その沈殿を濾取し、減圧脱水した。40℃で１時間、無水酢酸－ピリジン（1:1）で処理した。試薬を減圧除去した後、残渣を、酢酸エチル－ヘキサン（1:4）を溶離液としてシリカゲルクロマトグラフィーにかけた。所望の物質が最初に溶出した。110mg（0.13ミリモル、13％）の標記化合物が白色粉末として得られた。

５－エオシンチオール二酢酸塩のジスルフィド二量体（15の二量体）を合成するために、110mg（0.13ミリモル）の５－エオシン－エチルキサンテート二酢酸塩を10mlの濃（30％）アンモニア水溶液中で攪拌し、その溶液を70℃に加熱した。その溶液に空気をゆっくり通し、チオールを酸化してin situでジスルフィドにした。２時間後、溶媒を40℃でロータリーエバポレーターにより除去し、残渣を無水酢酸－ピリジン（1:1）で処理した。試

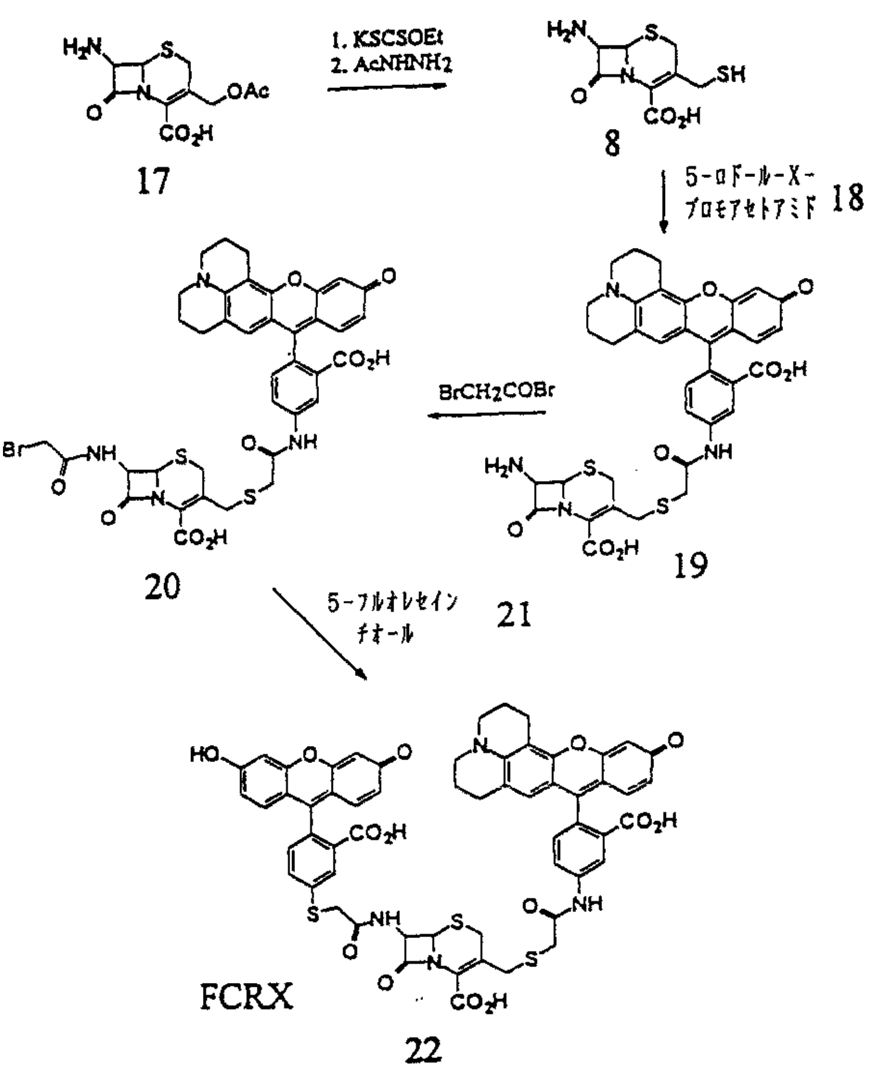
薬を減圧除去した後、残渣を、酢酸エチル－ヘキサン（1:4）を溶離液としてシリカゲルクロマトグラフィーにかけた。90mg（60μモル、91%）の標記物質が白色粉末として得られた。その化合物を、酢酸ナトリウムおよび20当量のメルカプトエタノールを添加してメタノールに溶解することにより、分解して単量体（15）とした。２時間後、メタノール溶液を３体積の５％酢酸水溶液に注入し、それによって沈殿した５－フルオレセインチオール単量体を遠心分離により集めた。その固体を、メルカプトエタノールの臭いがなくなるまで水で洗浄した。

ジアセチル－５－エオシンチオール（15）の７β－〔（５－ジアセチルフルオレセイン）チオ〕アセトアミド－３－（アセトキシメチル）－３－セフェム－４－カルボン酸（14）との結合およびアセチルエステラーゼによる脱アセチル化は、次のように行った。10mg（13μモル）の７β－〔（５－ジアセチルフルオレセイン）チオ〕アセトアミド－３－（アセトキシメチル）－３－セフェム－４－カルボン酸（14）および10mg（13μモル）のジアセチル－５－エオシンチオールを200μｌの無水アセトニトリルに溶解し、その溶液をアルゴン下でガラス管に封入した。その管を84℃（±２℃）の油浴に16時間保持した。次いで、それを切り開き、溶液をフラスコに移して、溶媒を減圧除去した。残渣を酢酸エチル－メタノール－酢酸（100:1:1）を溶離液としてシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーにかけた。酢酸塩の脱保護は、その物質を、37℃で24時間、50mMのリン酸塩緩衝液（pH7）中で橙皮アセチルエステラーゼとともにインキュベートすることにより行った。脱アセチル化物質はC_{18}逆相クロマトグラフィーによって精製した。溶離液は、段階的勾配濃度の25mMリン酸塩水溶液緩衝液（pH7）およびメタノールであった。フルオレセイン副生物が、その溶離液の33%および50%メタノールで溶出し、その後、66%メタノールで所望の物質が溶出した。

脱保護された化合物は、リン酸塩緩衝液中では、２個の疎水性染料が重なっているので、ほとんど蛍光を示さない。残りの蛍光は、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）による。この化合物は、RTEMβ－ラクタマーゼの良好な基質であり、FCEと言う。

前記化合物の切断により、515nmでの蛍光が約70倍増加する（図２）。前記化合物のこの蛍光特性は、メタノールを溶液に添加すると、FRETが著しく増加するので、染料の二量体生成に起因すると考えられる。メタノールが、蛍光団の重なりを引き起こす疎水的相互作用をこわす。

実施例３（化合物22）



７－アミノセファロスポラン酸の3'－酢酸塩をエチルキサンテートで置換し［Van HeyningenおよびBrown（1965），前出］、それを、アセチルヒドラジン水溶液で遊離スルフヒドリルに加水切断した［特開昭50－18494,CA85,97320d］。スルフヒドリル基をジメチルホルムアミド水溶液中で５－ブロモアセトアミド－ロドール－Ｘと反応させた。セファロスポリン－７－アミンをジオキサン水溶液中で臭化ブロモアセチルと反応させた後、５－フルオレセインチオールにより臭化物を置換すると、FRET－セファロスポリンが得られ、これは、50mMのリン酸塩緩衝液（pH7）中で本質的に非蛍光である。この化合物をFCRXと言う。

５－ロドール－Ｘ－ブロモアセトアミドの製造の第一工程は、９－（2'－カルボキシ－4'（5'）－ニトロベンゾイル）－８－ヒドロキシユロリジン（julolidine）の合成およびそれらの異性体の分離であった。10.1g（48ミリモル、92％純度）の４－ニトロフタル酸無水物を70℃で20mlのトルエンに溶解した。20mlの酢酸エチルに溶かした9.76g（50ミリモル、97％純度）の８－ヒドロキシユロリジンを添加し、その溶液を70℃で30分保持した。反応混合物を短床シリカゲルに通した後、酢酸エチルで溶離した。溶媒を減圧除去し、その固体を最少量の還流酢酸エチルに再溶解した。安息香酸に対してメタ位のニトロ基を有する異性体は、一夜で溶液から結晶化し、橙色の結晶が得られる（3.47g、第一画分）。さらに分別結晶化を行うと、純粋な異性体が得られた。結晶化した異性体の^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ1.91ppm（m,4H,脂肪族メチレン）、δ2.73ppm,2.46ppm（2m,4H,アニリンのメチレン）、δ3.26ppm（m,4H,ベンジルのメチレン）、δ6.32ppm（s,1H,ユロリジン）、δ7.53ppm（d,1H,J＝8.4Hz,フタル酸）、δ8.43ppm（dd,J_1＝8.4Hz,J_2＝2.2Hz,フタル酸）、δ8.90ppm（d,1H,J＝2.2Hz,フタル酸）

５－ロドール－Ｘ－アミン塩酸塩（ローダミン－Ｘと同様に命名）を合成するために、1.91g（5.0ミリモル）の９－（2'－カルボキシ－4'－ニトロ－ベンゾイル）－８－ヒドロキ

シユロリジンを5mlの濃（96%）硫酸中で攪拌した。700mg（6.4ミリモル、1.25当量）のレゾルシノールを15分かけて冷却しながら添加した。その懸濁物を室温で1.5時間攪拌した後、激しく攪拌しながら200mlの水に注入した。紫色の沈殿物を濾取し、5.3g（22ミリモル）の亜硫酸ナトリウム９水和物の助けによって水75mlに再溶解した。2.5g（44.6ミリモル）の無水重亜硫酸ナトリウムを添加し、その溶液を24時間還流した。次いで、室温に冷却した後、生成物を氷酢酸の添加により沈殿させた。固体を濾取し、100mlの半飽和塩酸水溶液で煮沸した。溶液をガラス製フリットにより熱濾過して硫黄を除去した。溶液の体積をロータリーエバポレーターにより10mlに減少させた。１体積の飽和食塩水を添加し、沈殿を濾取した。還流塩酸からの結晶化により、1.78g（3.85ミリモル、77%）の暗赤色結晶の５－ロドール－Ｘ－アミン塩酸塩が得られた。５－ニトロロドール－Ｘの^{1}HNMR（dDMSO）：δ1.90ppm,2.05ppm（2m,4H,脂肪族メチレン）、δ2.72ppm,3.03ppm（2m,4H,アニリンのメチレン）、δ3.66ppm（m,4H,ベンジルのメチレン）、δ6.90ppm（s,1H,キサンテン）、δ6.96ppm（dd,1H,J_1＝9.0Hz,J_2＝2.1Hz,キサンテン）、δ7.11ppm（d,1H,J＝9.0Hz,キサンテン）、δ7.22ppm（d,1H,J＝2.1Hz,キサンテン）、δ7.78ppm（d,1H,J＝8.4Hz,フタル酸）、δ8.70ppm（dd,1H,J_1＝8.4Hz,J_2＝2.4Hz,フタル酸）、δ8.91ppm（d,1H,J＝2.4Hz,フタル酸）;5－ロドール－Ｘ－アミン塩酸塩の^{1}HNMR（CD_3OD）：δ2.00ppm,2.14ppm（2m,4H,脂肪族メチレン）、δ2.75ppm,3.11ppm（2m,4H,アニリンのメチレン）、δ3.67ppm（m,4H,ベンジルのメチレン）、δ6.85ppm（s,1H,キサンテン）、δ6.94ppm（dd,1H,J_1＝9.0Hz,J_2＝2.1Hz,キサンテン）、δ7.13ppm（d,1H,J＝9.0Hz,キサンテン）、δ7.16ppm（d,1H,J＝2.1Hz,キサンテン）、δ7.55ppm（d,1H,J＝8.1Hz,フタル酸）、δ7.82ppm（dd,1H,J_1＝8.1Hz,J_2＝1.9Hz,フタル酸）、δ8.28ppm（d,1H,J＝1.9Hz,フタル酸）

５－ロドール－Ｘ－ブロモアセトアミド（18）の合成は、次のように行った。115mg（0.25ミリモル）の５－ロドール－Ｘ－アミン塩酸塩を180mg（2.1ミリモル）の重炭酸ナトリウムとともに2mlの水－ジオキサン（1:1）に溶解した。その溶液を氷冷し、175μｌ（２ミリモル）の臭化ブロモアセチルを20分かけて攪拌しながら添加した。次いで、溶液を室温で1.5時間保持した後、５体積の水を添加した。ジオキサンをロータリーエバポレーターにより除去し、生成物を酢酸の添加により残りの水溶液から沈殿させた。沈殿を濾別し、少量のクロロホルム－メタノール（1:1）に溶解した。シリカゲルを溶液に添加し、溶媒を減圧除去した。固体をシリカゲルカラムに入れ、生成物をメタノール－酢酸エチル（1:4）により溶離した。この溶離液はシリカゲルを若干溶解したので、溶離された物質に残った。^{1}HNMR（CD_3OD、10%dDMSO）：δ1.98ppm,2.12ppm（2m,4H,脂肪族メチレン）、δ2.72ppm,3.06ppm（2m,4H,アニリンのメチレン）、δ3.56ppm（m,4H,ベンジルのメチレン）、δ4.08ppm（s,2H,ブロモアセチル）、δ6.79ppm（dd,1H,J_1＝9.2Hz,J_2＝2.1Hz,キサンテン）、δ6.83ppm（s,1H,キサンテン）、δ6.90ppm（d,1H,J＝2.1Hz,キサンテン）、δ7.19ppm（d,1H,J＝9.2Hz,キサンテン）、δ7.24ppm（d,1H,J＝8.4Hz,フタル酸）、δ8.02ppm（dd,1H,J_1＝8.4Hz,$J_2\simeq$1Hz,フタル酸）、δ8.30ppm（d,1H,J$\simeq$1Hz,フタル酸）

７β－（ブロモアセトアミド）－３－〔〔〔（５－ロドール－Ｘ－アミド）メチル〕チオ〕メチル〕－３－セフェム－４－カルボン酸（20）を合成するために、4.5mg（10μモル）の５－ロドール－Ｘ－ブロモアセトアミド（18）をpH7.7に調整した0.5mlの250mMリン酸塩緩衝液および0.5mlのジメチルホルムアミドに溶解した。溶液を脱酸素化し、文献の手順に従って合成した10mg（40μモル）の７β－アミノ－３－（チオメチル）－３－セフェム－４－カルボン酸（８）/100μｌリン酸塩緩衝液をアルゴン雰囲気下で添加した。その溶液を30℃で２時間保持した。次いで、溶媒を減圧除去して残渣を1mlの水に溶解し、酢酸の添加により生成物を沈殿させた。沈殿を集め、生成物を、0.1%トリフルオロ酢酸/35%メタノール／水を溶離液として、C_{18}逆相クロマトグラフィーにより精製した。

上記生成物（19）を20mgの重炭酸ナトリウムとともに1mlのジオキサン－水（1:1）に溶解した。10μｌの臭化ブロモアセチルを氷上でその溶液に添加した。溶液を室温でさらに1.5時間保持した。20mgの重炭酸ナトリウムおよび10μｌの臭化ブロモアセチルを氷冷しながらその溶液に添加した。室温でさらに1.5時間保持した後、ジオキサンをロータリーエバポレーターにより除去し、生成物を1Mリン酸によりその水溶液から沈殿させ、遠心分離

により採取した。固体を希重炭酸塩水溶液に懸濁し、未溶解粒子を遠心分離により除去して捨てた。生成物を1Mリン酸により沈殿させ、フラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル；クロロホルムーメタノールー酢酸ー水（55:15:4:2））により精製した。この操作では、少量のシリカゲルが溶解した。

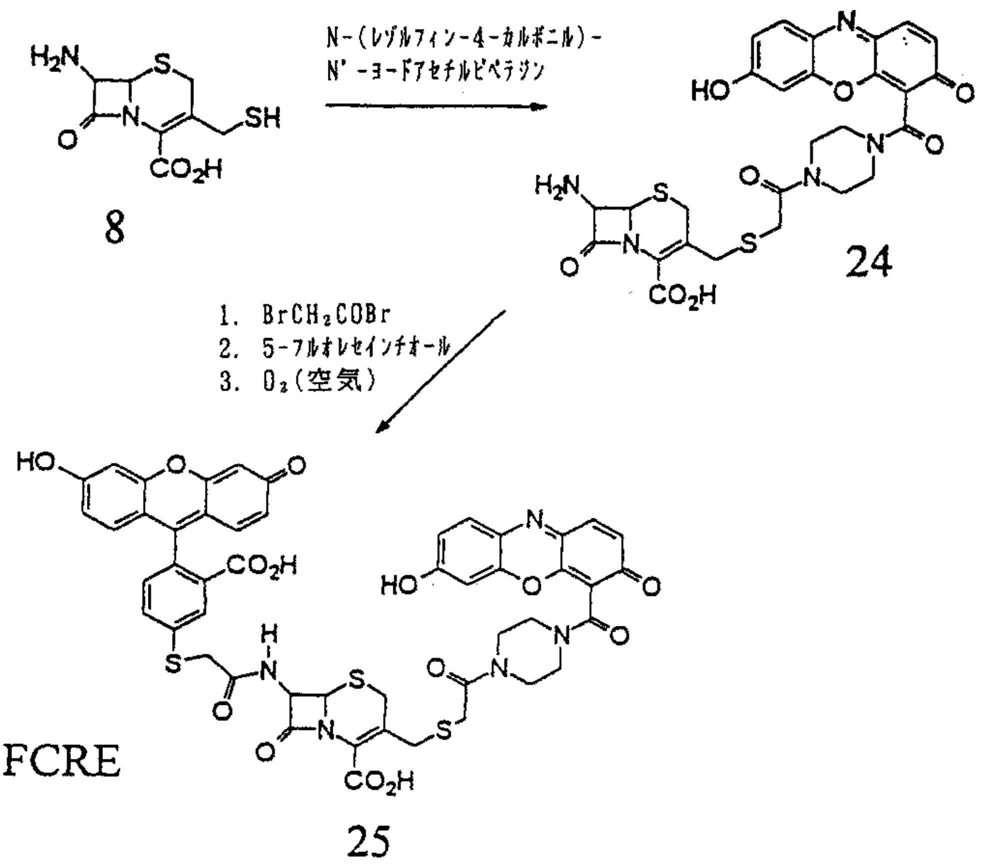
ジアセチルー５ーフルオレセインチオール（21）の７βー（ブロモアセトアミド）ー３ー〔〔〔（５ーロドールーXーアミド）メチル〕チオ〕メチル〕ー３ーセフェムー４ーカルボン酸（20）との結合は、次のように行った。７βー（ブロモアセトアミド）ー３ー〔〔〔（５ーロドールーXーアミド）メチル〕チオ〕メチル〕ー３ーセフェムー４ーカルボン酸を、ジメチルホルムアミドー（250mM水性リン酸塩緩衝液pH7.7）（1:1）を溶媒として使用し、アルゴン下で、50％過剰の５ーフルオレセインチオールと反応させた。生成物を、メタノールでの溶解および酢酸エチルでの沈殿を繰り返すことにより、過剰のフルオレセインチオールから精製した。

図３は、βーラクタマーゼによる処理の前後における、50mMリン酸塩緩衝液（pH7）でのこのFRETーセファロスポリンの蛍光発光スペクトルを示す。最初の低い蛍光は蛍光団の重なりによるもので、これは、非蛍光である基底状態の複合体を形成する。溶液にメタノールを添加すると、この重なりが破壊され、有効な蛍光共鳴エネルギー転移が生じると考えられる。

<u>実施例４</u>（化合物25）

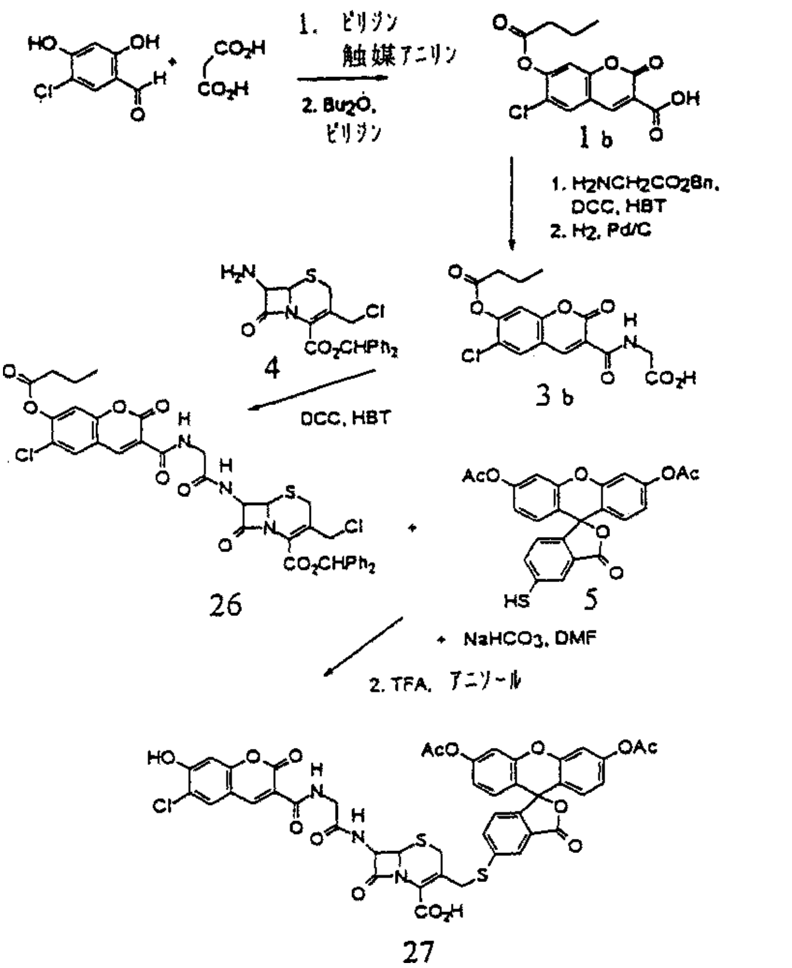
Nー〔レゾルフィンー４ーカルボニル〕ーN'ーヨードアセチルーピペラジン（Boehringer Mannheim）をフルオレセインのFRETー受容体としてのセファロスポリンに結合した。それをFCREと言う。

供与体としてのフルオレセインおよび消光体としてのレゾルフィンを有するFRETーセファロスポリンFCRE（25）を、ロドールーXー受容体を有するものと同様の方法によって調製した。Nー〔レゾルフィンー４ーカルボニル〕ーN'ーヨードアセチルーピペラジン（Boehringer Mannheim）をセファロスポリンの遊離3'ーチオールに結合した後、ブロモアセチル化および５ーフルオレセインチオールの添加を行った。プロトコールに反して、３当量の５ーフルオレセインチオールを添加した。最初の１当量は直ちにレゾルフィンを還元して未反応のジフルオレセインージスルフィドを形成したからである。空気にさらすことによりレゾルフィンを再酸化して最初の染料にした。



この化合物をβ－ラクタマーゼ触媒により加水分解すると、２個の蛍光断片が生じる。レゾルフィンの励起・発光スペクトルは、ロドールのスペクトルよりも長波長側で狭く、おそらく、未切断染料と酵素切断産物との間のスペクトル分離が良好に得られる。しかし、ロドールを受容体とする場合のように、水性リン酸塩緩衝液中では染料の重なりが生じ、暗複合体を形成する。β－ラクタマーゼ処理により、重なりが壊れ、供与体の蛍光が増加する（図４）。

実施例５（化合物7b）



2,4－ジヒドロキシ－５－クロロベンズアルデヒドを合成するために、21.7g（0.15モル）の４－クロロレゾルシノールを150mlの無水ジエチルエーテルに溶解し、27gの微粉末シアン化亜鉛（II）および0.5gの塩化カリウムを攪拌しながら添加した。懸濁物を氷冷した。強い塩化水素ガス流を、激しく攪拌しながらその溶液に吹き込んだ。約30分後、反応物は溶解した。塩化水素ガスの添加を、エーテル溶液に吸収されなくなるまで（約１時間）続けた。この間に、沈殿が生じた。懸濁物を氷上でさらに１時間攪拌した。次いで、固体を沈殿させた。エーテル溶液を固体から除去した。固体を100gの氷で処理し、水浴で100℃に加熱した。冷却すると、生成物が溶液から光沢のある板状晶として結晶化した。それを濾別し、水酸化カリウム上で脱水した。収量は15.9g（0.092モル、61%）であった。^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ6.23ppm（s,1H,フェノール）、δ6.62ppm（s,1H,フェニル）、δ7.52ppm（s,1H,フェニル）、δ9.69ppm（s,1H,ホルミル）、δ11.25ppm（s,1H,フェノール）

３－カルボキシ－６－クロロ－７－ヒドロキシクマリンを合成するために、5.76g（0.033モル）の2,4－ジヒドロキシ－５－クロロベンズアルデヒドおよび7.2g（0.069モル）のマロン酸を5mlの温ピリジンに溶解した。75μ１のアニリンを溶液に入れて攪拌し、反応を室温で３日間続けた。生成した黄色固体を砕いてより小さい小片にし、50mlのエタノールを添加した。クリーム色の懸濁物をガラス製フリットにより濾過し、固体を1N塩酸で３回洗浄し、次いで水で洗浄した。次いで、その固体を100mlの酢酸エチル、150mlのエタノールおよび10mlの半濃度の塩酸とともに攪拌した。溶媒の体積を減圧下で減少させ、沈殿は濾過により回収してジエチルエーテルで洗浄し、五酸化リンにより脱水した。4.97g（0.021モル、63%）の物質が白色粉末として得られた。^{1}HNMR（dDMSO）：δ6.95ppm（s,1H）、δ8.02ppm（s,1H）、δ8.67ppm（s,1H）

７－ブチリルオキシ－３－カルボキシ－６－クロロクマリンを合成するために、3.1g（12.9ミリモル）の３－カルボキシ－６－クロロ－７－ヒドロキシクマリンを100mlのジオキサンに溶解し、室温で２時間、5mlの無水酪酸、8mlのピリジンおよび20mgのジメチルアミノピリジンで処理した。反応溶液を、攪拌しながら、300mlのヘプタンに添加すると、白

色の沈殿が生じた。それを濾過により回収し、150mlの酢酸エチルに溶解した。未溶解物質を濾別し、濾液を50mlの1N塩酸／食塩水（1:1）で２回、次いで生理的食塩水で抽出した。溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水した。減圧蒸発させると、2.63g（8.47ミリモル、66%）の物質が得られた。^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ1.08ppm（t,3H,J＝7.4Hz,酪酸のメチル）、δ1.85ppm（m,2H,J_1〜J_2＝7.4Hz,酪酸のメチレン）、δ2.68ppm（t,2H,J＝7.4Hz,酪酸のメチレン）、δ7.37ppm（s,1H,クマリン）、δ7.84ppm（s,1H,クマリン）、δ8.86ppm（s,1H,クマリン）

７－ブチリルオキシ－３－ベンジルオキシカルボニルメチルアミノカルボニル－６－クロロクマリンの合成は、次のように行う。2.5g（8.06ミリモル）の７－ブチリルオキシ－３－カルボキシ－６－クロロクマリン、2.36g（16ミリモル）のヒドロキシベンズトリアゾール水和物および1.67g（8.1ミリモル）のジシクロヘキシルカルボジイミドを30mlのジオキサンに溶解した。o－ベンジルグリシンのトルエン溶液〔3.4g（10ミリモル）のベンジルグリシンのトシル塩を酢酸エチル－トルエン－飽和重炭酸塩水溶液－水（1:1:1:1、250ml）で抽出し、有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒の体積を5mlに減少させることにより調製〕をクマリン溶液に滴下した。反応を室温で20時間続けた後、沈殿を濾別し、酢酸エチルおよびアセトンでよく洗浄した。溶媒画分を一緒にしてロータリーエバポレーターにより50mlに減少させ、１体積のトルエンを添加して、体積をさらに30mlに減少させた。沈殿物質を濾過により回収し、200mlのクロロホルム－無水エタノール（1:1）に溶解した。溶液をロータリーエバポレーターにより50mlに減少させ、生成物を濾取し、減圧脱水すると、1.29gの標記物質が得られた。溶媒の体積をさらに減少させると、標記物質がもう１回得られた（0.64g）。総収量は1.93g（4.22ミリモル、52%）であった。^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ1.08ppm（t,3H,J＝7.4Hz,酪酸のメチル）、δ1.84ppm（m,2H,J_1〜J_2＝7.4Hz,酪酸のメチレン）、δ2.66ppm（t,2H,J＝7.4Hz,酪酸のメチレン）、δ4.29ppm（d,2H,J＝5.5Hz,グリシンのメチレン）、δ5.24ppm（s,2H,ベンジル）、δ7.36ppm（s,1H,クマリン）、δ7.38ppm（s,5H,フェニル）、δ7.77ppm（s,1H,クマリン）、δ8.83ppm（s,1H,クマリン）、δ9.15ppm（t,1H,J＝5.5Hz,アミド）

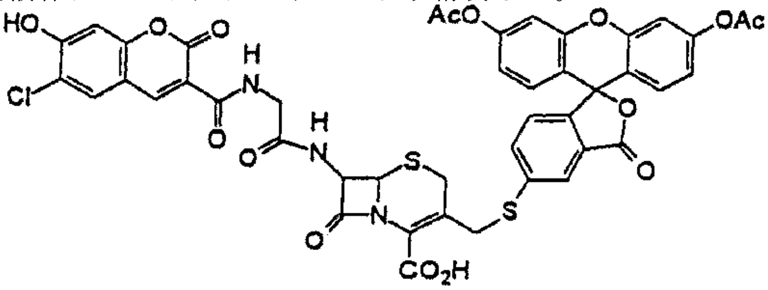
７－ブチルリルオキシ－３－カルボキシメチルアミノカルボニル－６－クロロクマリンを次のように合成した。920mg（２ミリモル）の７－ブチリルオキシ－３－ベンジルオキシカルボニルメチルアミノカルボニル－６－クロロクマリンを50mlのジオキサンに溶解した。100mgのパラジウム／炭素（10%）および100μlの酢酸を溶液に添加し、懸濁物を大気圧の水素雰囲気下、室温で激しく撹拌した。水素の吸収が終わった後、懸濁物を濾過した。炭素を含む生成物を25mlの沸騰ジオキサンで５回抽出した。ジオキサン溶液を一緒にして冷却すると、生成物が白色粉末として沈殿した。溶媒を20mlに減少させると、さらに物質が沈殿する。残りのジオキサン溶液を沸点まで加熱し、溶液が濁るまでヘプタンを添加する。乾燥粉末の重量は245mg、389mgおよび58mgであり、合わせて692mg（1.88ミリモル、94%）の白色物質が得られた。^{1}HNMR（dDMSO）：δ1.02ppm（t,3H,J＝7.4Hz,酪酸のメチル）、δ1.73ppm（m,2H,J_1〜J_2＝7.3Hz,酪酸のメチレン）、δ2.70ppm（t,2H,J＝7.2Hz,酪酸のメチレン）、δ4.07ppm（d,2H,J＝5.6Hz,グリシンのメチレン）、δ7.67ppm（s,1H,クマリン）、δ8.35ppm（s,1H,クマリン）、δ8.90ppm（s,1H,クマリン）、δ9.00ppm（t,1H,J＝5.6Hz,アミド）

７－ブチリルオキシ－３－カルボキシメチルアミノカルボニル－６－クロロクマリンの７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸ベンズヒドリルエステルとの結合は、次のように行った。368mg（１ミリモル）の７－ブチリルオキシ－３－カルボキシメチルアミノカルボニル－６－クロロクマリン、270mgのヒドロキシベンズトリアゾール水和物および415mg（１ミリモル）の７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸ベンズヒドリルエステルを40mlのジオキサン－アセトニトリル（1:1）に懸濁した。5mlのアセトニトリル中の260mg（1.25ミリモル）のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加し、懸濁物を36時間激しく撹拌した。沈殿を濾別し、溶液の体積をロータリーエバポレーターにより20mlに減少させた。50mlのトルエンを添加し、体積を30mlに減少させた。撹拌しながら50mlのヘプタンを添加し、懸濁物を氷冷した。沈殿を濾過により回収した。それを10mlのクロロホルムに再

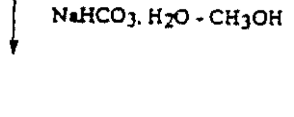
溶解し、残った未溶解の固体を濾過により除いた。２体積のヘプタンを添加すると標記物質が沈殿し、それを集めて減圧脱水すると、468mg（0.64ミリモル、64%）の灰白色の粉末が得られた。^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ1.08ppm（t,3H,J＝7.4Hz,酪酸のメチル）、δ1.84ppm（m,2H,J_1～J_2＝7.4Hz,酪酸のメチレン）、δ2.66ppm（t,2H,J＝7.4Hz,酪酸のメチレン）、δ3.54ppm（2d,2H,J＝18.3Hz,セファロスポリンのＣ－２）、δ4.24ppm（2d,2H,J＝5.8Hz,セファロスポリンの３メチレン）、δ4.37ppm（d,2H,J＝3.8Hz,グリシンのメチレン）、δ5.02ppm（d,1H,J＝4.9Hz,セファロスポリンのＣ－６）、δ5.89ppm（dd,1H,J_1＝9.0Hz,J_2＝5.0Hz,セファロスポリンのＣ－７）、δ6.96ppm（s,1H,ベンズヒドリル）、δ7.30～7.45ppm（m,12H,フェニル, クマリン, アミド）、δ7.79ppm（s,1H,クマリン）、δ8.84ppm（s,1H,クマリン）、δ9.28ppm（t,1H,J＝3.7Hz,アミド）

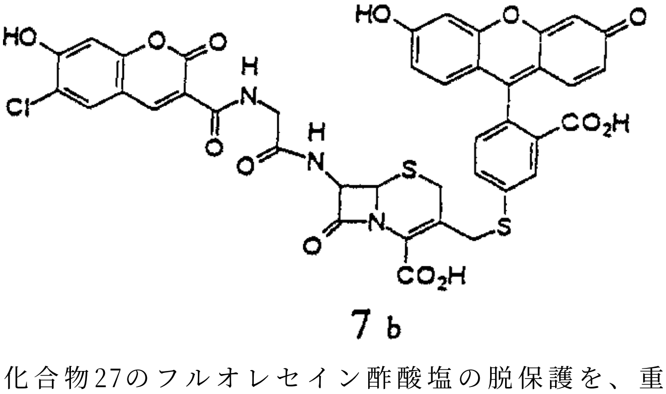
上記生成物と５－フルオレセインチオールとの結合は、次のように行った。90mg（0.2ミリモル）の５－メルカプトフルオレセイン二酢酸塩ジスルフィド二量体を10mlのクロロホルムに溶解し、アルゴン雰囲気下、25μｌのトリブチルホスフィンおよび25μｌの水で処理した。その溶液を室温で２時間保持し、次いで、20mgの重炭酸ナトリウム、25mgのヨウ化ナトリウムおよび110mg（0.15ミリモル）の上記化合物のジメチルホルムアミド（10ml）溶液に添加した。４時間後、溶媒を減圧除去し、残渣をジエチルエーテルで摩砕した。固体を酢酸エチル－アセトニトリル（1:1）に溶解した。溶媒を除去した後、残渣をジエチルエーテルとともにもう一度摩砕すると、157mg（0.13ミリモル、88%）のクリーム色の粉末物質が得られた。

上記化合物のサンプルを、室温で20分間、大過剰のトリフルオロ酢酸－アニソール（1:1）で処理した。試薬を減圧除去し、残渣をエーテルとともに摩砕した。0.5%の酢酸を含む45%のアセトニトリル水溶液における、その固体の高速液体クロマトグラフィーにより、酪酸エステルおよびジフェニルメチルエステルが切断した物質が得られる。それを、溶離液として５%の酢酸を含む45%アセトニトリル水溶液を使用した逆相C_{18}カラムでの高速液体クロマトグラフィーにより精製した。



27



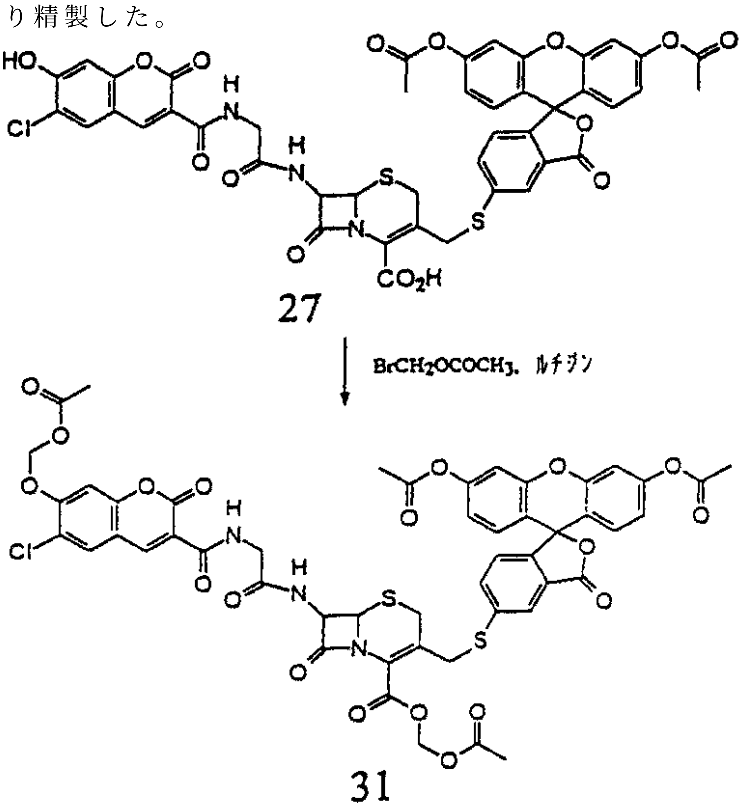


7 b

CCF2

化合物27のフルオレセイン酢酸塩の脱保護を、重炭酸ナトリウム／メタノール（室温、30分）によって行い、蛍光酵素基質CCF2を得た。それを、溶離液として0.5%の酢酸を含む35%アセトニトリル水溶液を使用した逆相C_{18}カラムでの高速液体クロマトグラフィーによ

り精製した。



化合物27を過剰の臭化アセトキシメチル／無水ルチジンとともに攪拌すると、基質の膜透過性誘導体（CCF2/ac_2AM_2）が得られた。それを、溶離液として0.5%の酢酸を含む65%アセトニトリル水溶液を使用した逆相C_{18}カラムでの高速液体クロマトグラフィーにより精製した。CCF2/ac_2AM_2は、細胞質で容易にCCF2に変換される。

実施例１～４と違って、基質CCF2では供与体および受容体染料は重ならない。基質は、リン酸塩緩衝液中では完全に蛍光性であり、「暗複合体」の生成はない（すなわち、メタノールを添加しても、希釈の影響を除くと、CCF2の蛍光スペクトルは変化しない。）。これは、実施例１～４のキサンテン染料（エオシン、ローダミン、ロドールおよびレゾルフィン）と比較して７－ヒドロキシクマリンがかなり小さく、極性が大きいことによる。

図５は、β－ラクタム環のβ－ラクタマーゼによる切断の前後における、50ミリモルのリン酸塩緩衝液（pH7.0）での化合物CCF2の発光スペクトルを示す。完全な基質では、７－ヒドロキシクマリン部分からフルオレセイン部分への有効なエネルギー転移が起こる。405nmで基質を励起すると、受容体である染料フルオレセインからの515nm（緑）での蛍光発光が得られる。エネルギー転移は、β－ラクタマーゼがβ－ラクタム環を切断すると乱れ、２個の染料の間の結合が促進される。また、生成物を405nmで励起すると、もっぱら供与体の蛍光発光が448nm（青）で得られる。供与体部分からの蛍光発光は、β－ラクタムの切断により25倍増加する。515nmでの蛍光は3.5分の１に減少し、残りの蛍光は全て、その発光スペクトルが緑の方に延びているので、７－ヒドロキシクマリンに由来する。基質における供与体の25倍の消光は、蛍光エネルギー転移の96%の効率に等しい。β－ラクタムの切断によるこの大きな蛍光変化は、実施例６および７に示すように、生きている哺乳類の細胞の細胞質におけるβ－ラクタマーゼの検出に容易に使用することができる。

セファロスポリンの７－ヒドロキシクマリン部分は、受容体の不在下での蛍光量子収率が98～100%であることが測定された。この値は、染料の補正した蛍光発光スペクトルの積分を励起波長での吸光度に匹敵する９－アミノアクリジン塩酸塩水溶液のものと比較することにより求めた。染料によって吸収された実質的に全ての光子が受容体への蛍光エネルギー転移を受けるので、７－ヒドロキシクマリンは理想の供与体染料である。

実施例６

Ｔ－細胞リンパ腫系Jurkatの細胞を、約10^{12}個のβ－ラクタマーゼ酵素分子/ml（約1.7nM;ペニシリナーゼ205TEM R^+、Sigma製）および充填マーカーとしてのデキストラン（40kd

）に複合させた1mg/mlのローダミンを含む等張性食塩水溶液（ハンクス平衡塩類溶液）に懸濁した。懸濁物を注射針（30ゲージ）に４回通した。これにより、細胞プラズマ膜の生き残り得る一時的な破壊が生じ、標識したデキストランおよびβ－ラクタマーゼを入れることができる。透過に成功した細胞はβ－ラクタマーゼを含み、ローダミンの励起波長で照射すると、蛍光顕微鏡により赤色の蛍光が得られた。その細胞を室温で30分間、５μＭの蛍光原性β－ラクタマーゼ基質（CCF2/ac_2AM_2）とともにインキュベートした。紫光（405nm）による照射によって、青色の蛍光および緑色の蛍光を示す細胞が認められた。マーカーとしてのローダミン－デキストランを吸収した全ての細胞は青の蛍光を示し、酵素を欠く細胞は緑の蛍光を示した。

実施例７

種々の哺乳類に由来する細胞系の細胞に、哺乳類プロモーターの制御下で、RTEMβ－ラクタマーゼ遺伝子を含むプラスミドを一時的にトランスフェクションした。その遺伝子は、いかなるシグナル配列をも欠く細胞質ゾルのβ－ラクタマーゼをコードし、配列番号１として示される。トランスフェクションの10～48時間後に、細胞を５μモルのCCF2/ac_2AM_2に１～６時間さらした。全ての場合において、蛍光顕微鏡で調べると、青の蛍光を示す細胞が検出された。トランスフェクションしなかった対照群の細胞では、青の蛍光を示す細胞は全く検出されなかった。蛍光測定値を定量するために、細胞をまずクマリン（450DF65）発光フィルターに通し、次いでフルオレセイン（515EFLP）発光フィルターに通して観察し、電荷結合装置（charge couple device）カメラで映像を記録した。COS－７（表２）およびCHO（表３）細胞におけるクマリンおよびフルオレセインの波長でのCCF2充填トランスフェクション細胞（青）および対照群（緑）の平均画素強度をまとめ、各集団に対して４個の代表的細胞の値を示す。基質CCF2は、単一の生存する哺乳類細胞において遺伝子発現を示した。

表２

ＣＯＳ－７（起源：ＳＶ４０形質転換アフリカグリーンモンキー腎臓細胞）

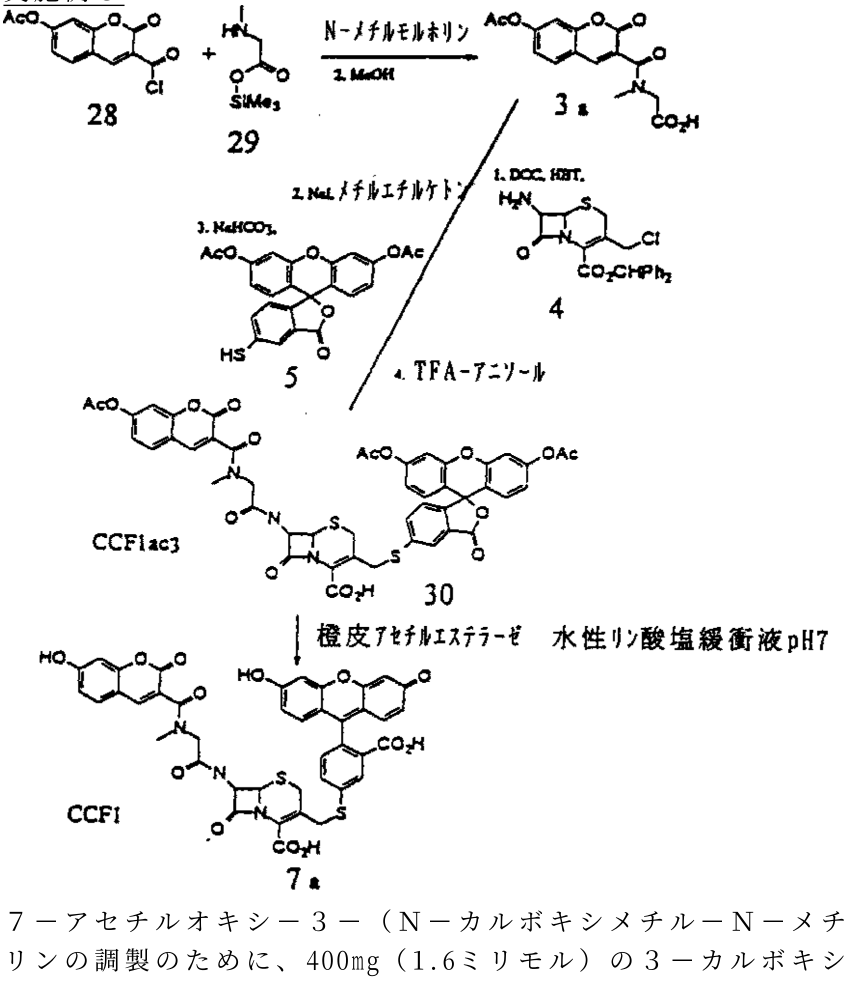
画素強度表	クマリン発光フィルター	フルオレセイン発光フィルター
青　細胞＃１	２７	２０
＃２	３４	２３
＃３	３１	３１
＃４	２２	３３
緑　細胞＃１	４	４３
＃２	４	４２
＃３	５	２０
＃４	３	２４

表３

ＣＨＯ（起源：チャイニーズハムスター卵巣細胞）

画素強度表		クマリン発光フィルター	フルオレセイン発光フィルター
青	細胞＃１	９８	１１２
	＃２	７０	１１３
	＃３	７６	９２
	＃４	５６	６７
緑	細胞＃１	９	１８０
	＃２	９	１０２
	＃３	７	１０１
	＃４	９	８３

実施例８



７－アセチルオキシ－３－（Ｎ－カルボキシメチル－Ｎ－メチルアミノカルボニル）クマリンの調製のために、400mg（1.6ミリモル）の３－カルボキシ－７－アセチルクマリンを4mlの塩化チオニルとともに20分間還流した。過剰の塩化チオニルを留去し、残渣（７－アセチルオキシ－３－クロロカルボニルクマリン）を水酸化カリウムペレット上で一晩減圧下で保存した。別の容器で、142.5mg（1.6ミリモル）のサルコシンを1.05ml（5.4ミリモル）のＮ－メチルトリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）に溶解し、室

温で16時間放置した。2mlの脱水アセトニトリルおよび187μl（1.7ミリモル）のN－メチルモルホリンを添加し、その溶液を氷上で固体の７－アセチルオキシ－３－クロロカルボニルクマリンに注いだ。氷上で20分攪拌した後、溶液を室温に温めた。４時間後、溶媒を減圧除去した。残渣をメタノールに溶解して酸を脱保護した後、溶媒を減圧除去した。固体を30mlの酢酸エチル－アセトニトリル（2:1）に溶解し、溶液を等量の1N塩酸で２回、および生理的食塩水で抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧除去し、固体を、ヘキサンの添加により、沸騰する酢酸エチルから結晶化した。316mg（1.0ミリモル、63%）の白色結晶固体が得られた。

７－アセチルオキシ－３－（N－カルボキシメチル－N－メチルアミノカルボニル）クマリンと７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸ベンズヒドリルエステルとの結合は、次のように行った。62mg（0.2ミリモル）の７－アセチルオキシ－３－（N－カルボキシメチル－N－メチルアミノカルボニル）クマリンを1mlの脱水塩化メチレンとともに攪拌し、これに、27mg（0.2ミリモル）のヒドロキシベンズトリアゾールおよび41mgのジシクロヘキシルカルボジイミドを添加した。82.6mg（0.2ミリモル）の７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸ベンズヒドリルエステルの塩化メチレン（1ml）溶液を５分かけて滴下した。反応物を室温で20時間攪拌した後、沈殿を濾別した。濾液を減圧蒸発させ、生成物を塩化メチレンに抽出した。溶媒をもう一度除去し、残渣を1mlの酢酸エチルに溶解した。３体積のヘキサンを添加すると生成物が沈殿し、これを遠心分離により回収した。49.9mg（70μモル、35%）の生成物を白色粉末として得た。

上記生成物のセファロスポリン3'－クロロ置換基の3'－ヨード置換基への変換は、次のように行った。49.9mg（70μモル）の上記生成物を室温で２時間、1.2mlの脱水メチルエチルケトンに溶解した52.5mgのヨウ化ナトリウム（５当量）とともに攪拌した。溶媒を減圧除去し、残渣を2mlの酢酸エチル－塩化メチレン（1:1）に溶解し、２%の冷チオ硫酸ナトリウム水溶液で抽出した後、生理的食塩水で２回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。わずかに橙色の粉末（32mg、40μモル、57%）を、さらに精製することなく次の反応で使用した。

上記生成物と５－メルカプトフルオレセインジアセテートとの結合（生成物$CCF1ac_3$ジフェニルメチルエステル）を、32mg（40μモル）のヨード誘導体を0.4mlのジメチルホルムアミドに溶解することにより行い、3.4gの重炭酸ナトリウムを添加した。22mg（50μモル）の５－メルカプトフルオレセインジアセテートを0.3mlの脱酸素ジメチルホルムアミドに溶解し、アルゴン雰囲気下でヨード化合物に添加した。２時間後、溶媒を減圧除去した。残渣を塩化メチレン－酢酸エチル（1:1）に懸濁した。有機溶液を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を除去し、残渣をエチルエーテル－ヘキサン（1:1）とともに摩砕した。フラッシュクロマトグラフィー（60メッシュのシリカゲル；酢酸エチル－トルエン（2:1））にかけると、4.2mg（４μモル、10%）の無色の生成物が得られた。

$CCF1ac_3$を得るためのジフェニルメチルエステルの切断は、次のように行った。4mg（４μモル）の$CCF1ac_3$ジフェニルメチルエステルを氷上で15分間、200μlのトリフルオロ酢酸－アニソール－塩化メチレン（10:1:10）で処理した。試薬を減圧除去し、残渣を0.5mlの酢酸エチルに溶解し、溶媒を減圧蒸発させた。エーテルを用いて固体を摩砕した後、0.5mlのメタノールに溶解した。メタノール溶液を2mlの水に添加すると、生成物が沈殿した。生成物を遠心分離によって回収し、減圧脱水した。2mg（２μモル、50%）の白色固体が得られた。化合物をさらに、溶離液として0.5%の酢酸を含む55%アセトニトリル水溶液を使用した逆相C_{18}カラムでの高性能液体クロマトグラフィーにより精製した。

β－ラクタマーゼによる切断の前後のCCF1の蛍光発光スペクトル（図６）を、50ミリモルの水性リン酸塩緩衝液（pH7）中の橙皮アセチルエステラーゼによる処理によってCCF1に変換してある$CCF1ac_3$のサンプルから得た。

基質CCF1は、実施例５の基質CCF2と類似した蛍光特性を有する。完全な基質では、７－ヒドロキシクマリン部分からフルオレセイン部分への有効なエネルギー転移が生じる。390nmで基質を励起すると、受容体染料フルオレセインからの515nm（緑）での蛍光発光が生じる。そのエネルギー転移は、β－ラクタマーゼがβ－ラクタム環を切断すると妨げられ、

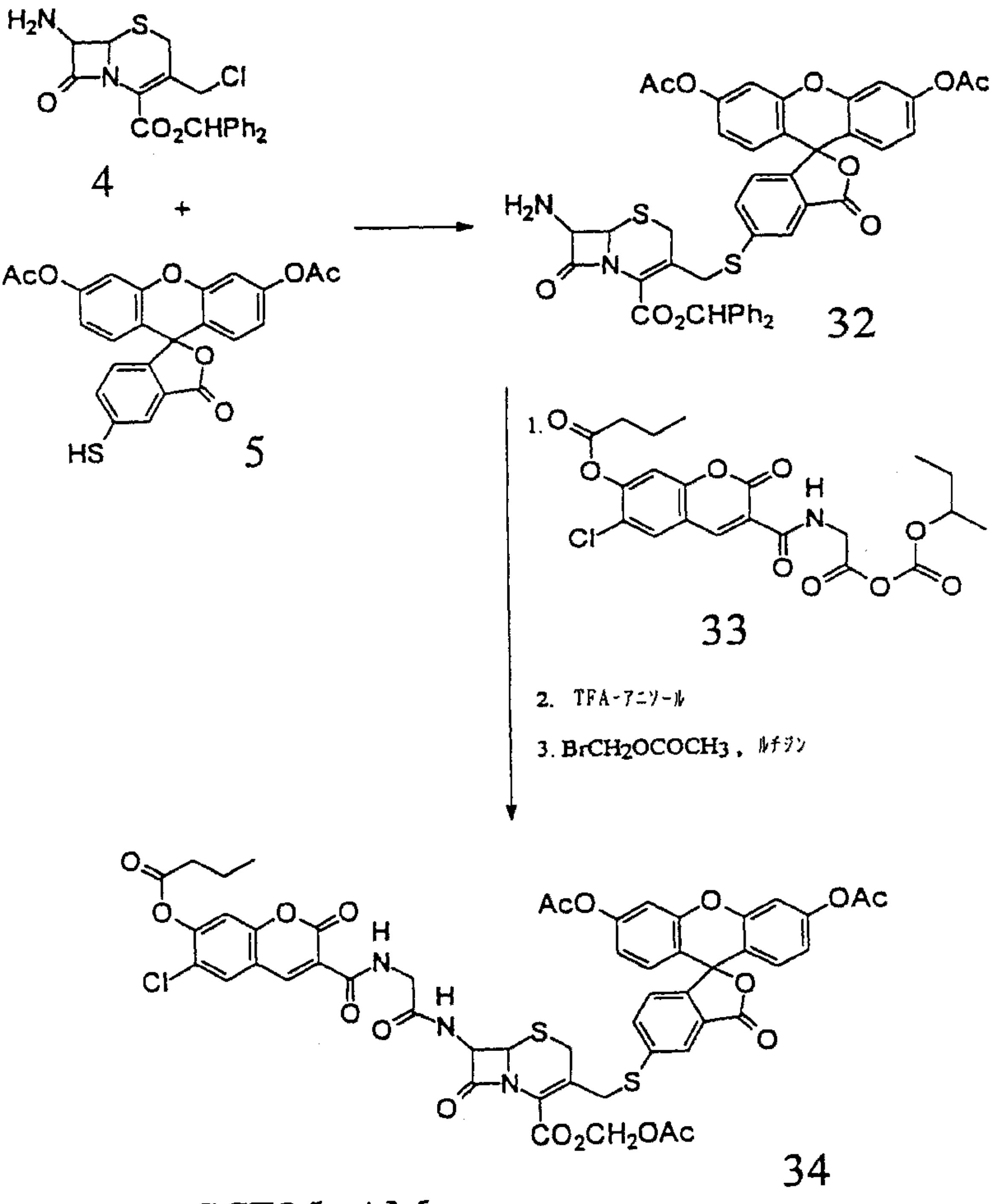
２個の染料の間の結合が切断される。また、390nmで生成物を励起すると、もっぱら460nm（青）で供与体の蛍光発光が生じる。供与体部分からの蛍光発光は、βーラクタムの切断により25倍増加する。515nmでの蛍光は３倍減少し、残りの蛍光は全て、その発光スペクトルが緑の方に延びているので、７ーヒドロキシクマリンに由来する。基質における供与体の25倍の消光は、蛍光エネルギー転移の96%の効率に等しい。βーラクタムの切断によるこの大きい蛍光変化は、実施例９に示すように、生きている哺乳類の細胞の細胞質におけるβーラクタマーゼの検出に容易に使用することができる。

実施例９

Ｔー細胞リンパ腫系Jurkatの細胞を約10^{12}個のβーラクタマーゼ酵素分子/ml（約1.7nM;ペニシリナーゼ205TEM R^+、Sigma製）および充填マーカーとしてのデキストラン（40kd）に複合させた1mg/mlのローダミンを含む等張性食塩水溶液（ハンクス平衡塩類溶液）に懸濁した。懸濁物を注射針（30ゲージ）に４回通した。これにより、細胞膜の生き残り得る一時的な破壊が生じ、標識したデキストランおよびβーラクタマーゼを入れることができる。透過に成功した細胞はβーラクタマーゼを含み、ローダミンの励起波長で照射すると、蛍光顕微鏡により赤色の蛍光が得られた。その細胞を室温で30分間、30μＭの蛍光原性βーラクタマーゼ基質$CCF1ac_3$とともにインキュベートした。紫外光（360nm）による照射によって、青色の蛍光および緑色の蛍光を示す細胞が認められた。マーカーのローダミンーデキストランを吸収した全ての細胞は青の蛍光を示し、酵素を欠く細胞は緑の蛍光を示した。

実施例10

CCF2の好ましい膜透過可能なエステルは次のように調製した。



CCF2/btAMac$_2$

５－フルオレセインチオールジアセテート（５）および７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸ベンズヒドリルエステルの結合は、次のように行った。450mg（１ミリモル）の５－メルカプトフルオレセインジアセテートジスルフィド二量体を30mlのクロロホルムに溶解し、窒素雰囲気中で50μｌの水および125μｌのトリブチルホスフィンにより処理すると、遊離の５－フルオレセインチオールが生じた。450mg（１ミリモル）の７－アミノ－3'－クロロセファロスポラン酸ベンズヒドリルエステル塩酸塩を、220μｌ（２ミリモル）のＮ－メチルモルホリンの助けによって10mlのアセトニトリルに溶解し、30分後に二つの溶液を合わせた。１時間後、溶媒の体積を5mlに減少させ、50mlの四塩化炭素を添加した。溶媒の体積を15mlに減少させ、撹拌しながらヘキサンを添加した。主にＮ－メチルモルホリン塩酸塩から成る最初の橙色の沈殿を濾別した。さらに２体積のヘキサンを添加すると、630mg（0.76ミリモル、76%）の白色物質が沈殿し、それを集めた。

上記生成物を７－ブチリルオキシ－３－カルボキシメチルアミノカルボニル－６－クロロ

クマリンと結合した。325mg（0.88ミリモル）の７－ブチリルオキシ－３－カルボキシメチルアミノカルボニル－６－クロロクマリンを15mlの熱脱水ジオキサンに溶解した。急速に冷却して、1mlのジオキサン中の110μｌ（１ミリモル）のＮ－メチルモルホリンおよび8mlの塩化メチレン中の115μｌ（0.9ミリモル）のクロロギ酸イソブチルを添加した。反応を０℃で30分保持した後、7mlの脱水塩化メチレン中の661mg（0.8ミリモル）の上記フルオレセイン－セファロスポリン付加生成物を添加した。溶液を室温に温め、３時間後に溶媒を減圧除去した。残渣を30mlの塩化メチレンに溶解し、１体積の10％酢酸水溶液で２回、水で１回抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水した。150mlの無水エタノールを添加し、溶媒の体積を50mlに減少させ、－20℃に冷却すると、生成物の沈殿（粗生成物、850mg）が得られた。精製は、溶離液として25％の酢酸エチル／トルエンを使用したシリカゲルクロマトグラフィーにより行った。250mg（0.21ミリモル、26％）の白色粉末生成物が得られた。

セファロスポリンベンズヒドリルエステルの切断は、トリフルオロ酢酸による処理によって行った。145mg（0.12ミリモル）の上記生成物を、０℃で20分間、トリフルオロ酢酸／塩化メチレン／アニソール（10/10/1）により処理した。試薬を減圧除去し、ジイソプロピルエーテルを用いて残渣を摩砕した。固体を1mlのジメチルスルホキシドに溶解し、生成物を25mlの水を添加することにより沈殿させた。さらに、0.5％の酢酸を含む40％～60％の段階的勾配のアセトニトリル水溶液を溶離液として、逆相C_{18}樹脂により精製すると、74mg（73μモル、60％）の白色粉末が得られた。

膜透過性アセトキシメチルエステルとしてのセファロスポリン酸の保護は、次のように行った。15mg（15μモル）の上記生成物を250μｌの塩化メチレンに溶解した。25μｌの酢酸ブロモメチルおよび50μｌのルチジンを溶液に添加した。反応を室温で７時間保持した後、試薬を減圧除去した。残渣を、酢酸エチルを溶離液として、シリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、15mg（14μモル、92％）の白色生成物が得られた。この化合物、すなわちCCF2/btAMac$_2$を、β－ラクタマーゼ活性の細胞内検出に使用した。

実施例11

細胞内レセプターの活性化の測定：細胞内グルココルチコイドレセプターの活性化を、マウスの乳癌ウイルスプロモーターにおけるグルココルチコイド反応性要素の転写活性調節能によって測定した。ステロイドに対するこの反応を、蛍光信号の適切な変化を招く基質CCF2上での増加する細胞内β－ラクタマーゼ活性として検出した。

シグナル配列のない大腸菌（E.coli）のRTEMβ－ラクタマーゼをコードするプラスミドの遺伝子（図７の配列１）を、マウス乳癌ウイルスプロモーターの転写制御下におき、哺乳類の発現ベクターに導入した。このベクターは、細菌内でのプラスミドの増幅のためのクロラムフエニコール耐性マーカーおよび哺乳類選択のためのネオマイシン耐性マーカーをも含む。そのベクターを、リン酸カルシウム沈殿法を使用して、新生ハムスター腎臓（BHK）培養細胞に導入した。次いで、抗生物質G418を使用して、プラスミドを細胞ゲノムへ安定に組み込むために細胞を選択した。20個のクローンのうちの一つを、ステロイド類似体デキサメタゾンへの暴露によるβ－ラクタマーゼ発現の著しい増加に対して選択した。

以下に、アゴニストであるデキサメタゾンを添加した後のこのクローンにおけるβ－ラクタマーゼ遺伝子発現の増加の測定を記載する。グルココルチコイド誘発性プロモーターの制御下でβ－ラクタマーゼを発現する、安定なBHK細胞クローンG941の細胞を、アゴニストの存在下または不在下で37℃の保温器に入れて保持した。細胞の入っているフラスコをアゴニストの添加後、種々の間隔をおいて保温器から取り出し、細胞を10μモルのCCF2/btAMac$_2$を含むハンクス平衡塩類溶液に移した。この化合物は、内因性細胞質エステラーゼにより、β－ラクタマーゼが接近可能な蛍光性基質CCF2に変換されるようになる。10分後、CCF2/btAMac$_2$を含む細胞上清を除去した。30分後、細胞の像を、エピ蛍光顕微鏡に取り付けた低温CCDカメラによって映し出した。蛍光測定値は、紫色励起光（フィルター400DF15）ならびに青（フィルター450DF65）および緑（フィルター535DF45）発光フィルターを使用して得た。青と緑との発光強度の比を測定した。その比は、どのくらいの基質が生成

物に変換されたかの尺度である。40x対物レンズを使用して、各々約60個の細胞を有する４個の視野の像を各時点で映し出した。その結果、β－ラクタマーゼの発現および産生の増加を反映する蛍光強度比の有意な増加が示される。

１μMのデキサメタゾンの存在下での時間	0.0時間	1.0時間	2.0時間	3.3時間
蛍光強度比の平均 450DF65 / 535DF45	0.21＋/－0.02	0.38＋/－0.05	0.42＋/－0.07	0.47＋/－0.08

実施例12

細胞表面レセプターの活性化の測定およびセカンドメッセンジャー反応性要素を介した細胞内信号：細胞表面レセプターの活性化は、細胞内メッセンジャー濃度の変化を引き起し、これは、細胞内転写因子活性を調整する。リンパ球では、メッセンジャーイオンカルシウムの細胞内濃度の増加により、活性化Ｔ－リンパ球の核因子（NFAT）の活性化が生じる。この現象は、NFAT認識部位を含むプロモーターでの転写を増加させる。NFAT部位の三量体を含むプロモーターの転写制御下におかれると調節されるβ－ラクタマーゼなどのリポーター遺伝子の転写を著しく増加させるには、カルシウムレベルの増加だけで十分である。

マウスＴ－リンパ球細胞系B3Zを、２個のプラスミドで一時的にコトランスフェクションした。一方のプラスミドは、強く、構成的に活性なサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの転写制御下で、細胞表面に位置するβ－アドレナリンレセプターを含む。他方のプラスミドは、NFAT部位の三量体を含むプロモーターの転写制御下での改善された哺乳類発現のために改変された大腸菌由来の細菌のRTEMβ－ラクタマーゼ遺伝子（配列番号＃３、最適哺乳類Kozak配列、β－グロビンリーダー配列、前配列は除去）を含む。それらのプラスミドを電気穿孔法を使用して細胞に導入した。0.5mlの電気穿孔緩衝液中の$5\ x\ 10^6$個の細胞を、Biorad Gene Pulser（250V,960μF,16μ秒）を使用して、各々10μｇの両方のプラスミドの存在下で電気穿孔した。トランスフェクションの24時間後、細胞をβ－アドレナリンアゴニストのイソプロテレノール（10μモル）の存在下または不在下で５時間インキュベートした。上清を除去し、10μモルの$CCF2/btAMac_2$を含むハンクス平衡塩類溶液で置き換えた。室温で20分後、細胞を新しい緩衝液で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。４％のイソプロテレノールで処理した細胞は、青色の蛍光を示した（励起フィルター400DE15、発光フィルター435nmロングパス）が、対照集団（アゴニストは不存在）では、青の蛍光を示す細胞は検出されなかった。２μMのイオノマイシンおよび50ng/mlのホルボールエステルで５時間、最大刺激すると、その集団に青の蛍光を示す細胞が20％生じた。

実施例13

種々の微生物に由来するβ－ラクタマーゼを、真核細胞、好ましくは哺乳類細胞でリポーター酵素として使用するために改変した。これらの酵素に対する細菌遺伝子は、細胞外空間に対する酵素を標的とするＮ－末端前配列（図７の配列２の最初の23個のアミノ酸）を含む。転位の後、前配列ペプチダーゼにより23個のアミノ酸の前配列が切断され、完全なβ－ラクタマーゼ酵素が放出される。その細菌の前配列を含む大腸菌由来のRTEMβ－ラクタマーゼ（図７の配列２）を、マウス乳癌ウイルスプロモーターの制御下にある哺乳類発現ベクターに導入した。この構成体を、標準的なリン酸カルシウム沈殿法を使用して新生

ハムスター腎臓細胞に導入した。β－ラクタマーゼ活性は細胞培養培地中で認められ、細胞ペレットでは活性は検出できなかった。培地におけるβ－ラクタマーゼ活性の量はステロイドに依存した。測定の前に36時間、１μＭのデキサメタゾンの存在下においた細胞は、対照よりも酵素の産生が３倍多かった。このことから、細菌の前配列（図７の配列２）を有するβ－ラクタマーゼは、哺乳類リポーター遺伝子活性の細胞外アッセイに有用である。

β－ラクタマーゼリポーターの好ましい使用は、細胞質で、酵素が産生され保持される場合である。従って、細菌のシグナル配列を除去し、３個の改変したRTEMβ－ラクタマーゼ遺伝子（図７の配列１、３および４）中の新しい翻訳開始部位としてのATG（メチオニン）で置き換えた。哺乳類細胞でのβ－ラクタマーゼの発現を増加させるために、図７の配列３および４のRTEMβ－ラクタマーゼを、哺乳類発現に対して最適化した改変リボソーム結合部位とともに構成させた〔Kozak,M.,J.Cell Biol.108:229－241（1989）〕。哺乳類翻訳機構との適合性を高めるために、配列番号＃３のβ－ラクタマーゼを、未翻訳の哺乳類β－グロビンリーダー配列の末端に挿入した。新規β－ラクタマーゼをコードするこれらの新規DNA配列の全てを、それらの転写を制御するサイトメガウイルスプロモーターとともに哺乳類発現ベクターに挿入した。組織培養した哺乳類細胞（Hela、COS－７、CHO、BHK）を、標準的リポフェクチン法を使用して、一時的にプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションの２～５日後、細胞を、蛍光基質CCF2の膜透過性誘導体（$CCF2/btAMac_2$）とともにインキュベートして、酵素の機能的発現をアッセイした。図７のcDNA配列２、３および４を含むプラスミドを用いてトランスフェクションした細胞の５～20％は、緑から青への蛍光の転換を示した。これは、発現したβ－ラクタマーゼによる細胞内に捕獲された基質の切断を示す。これに対して、トランスフェクションしていない、または偽トランスフェクションした対照群では、どの細胞も、未切断CCF2の緑の蛍光を示し、青の蛍光を示す細胞は認められなかった。これにより、内因性β－ラクタマーゼ活性の存在が確認された。

Bacillus licheniformisβ－ラクタマーゼの遺伝子を、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、Bacillus licheniformisの全DNAから単離した。オリゴヌクレオチドプライマーはβ－ラクタマーゼ分泌配列を除去し、DNA配列番号＃５を生じた。この遺伝子を、構成的に活性なサイトメガウイルスプロモーターの転写制御下で、pCDNA3哺乳類発現ベクターに挿入した。HeLa細胞を、リポフェクチンを使用して、10μｇプラスミド/$25cm^2$培養皿でトランスフェクションした。トランスフェクションの５日後、細胞を、100μモルの$CCF2/btAMac_2$の存在下でインキュベートすることにより、β－ラクタマーゼの機能性発現に対して試験し、エピ蛍光顕微鏡を用いて視覚検査を行った。30～40％の細胞は青の蛍光を示したが、トランスフェクションしていない対照では、緑の蛍光を示す細胞のみで、青の蛍光を示す細胞は検出できなかった。一時的トランスフェクションでは、典型的には、細胞の＜50％がトランスフェクションされる。

<u>実施例14</u>

プラスミドを、酵母延長因子EF－１αエンハンサーおよびプロモーターの制御下にある配列番号３（図７）のβ－ラクタマーゼを使用して構成した。このプラスミドを、基質CCF2（化合物7b）のカリウム塩とともに単細胞段階のゼブラフィッシュ（zebrafish）の胚に共注入した。対照として、胚に、基質CCF2のカリウム塩のみを注入した。３時間後、胚を、紫色の励起光（フィルター400DF15）および435nmのロングパス発光フィルターを使用して、エピ蛍光顕微鏡で観察した。プラスミドDNAを有する胚は青の蛍光を示したが、対照群では緑の蛍光を示した。

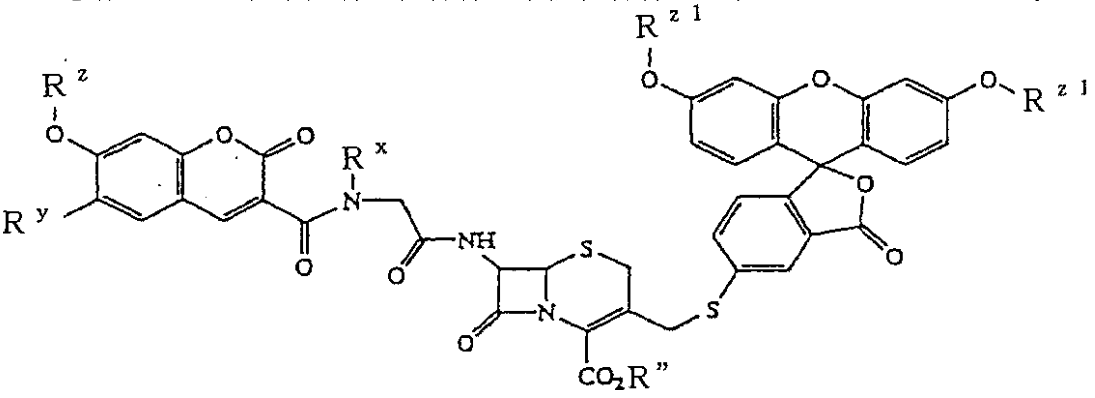
<u>実施例15</u>

配列番号３のβ－ラクタマーゼ遺伝子を、ガラスプロモーターの制御下にあるショウジョウバエ（Drosophila）形質転換ベクターにいれてクローン化し、野生型ショウジョウバエの胚に注入した。対照として、β－ラクタマーゼ遺伝子を間違った方向に挿入した。ショウジョウバエの胚を、Ｐ要素媒介形質転換を使用して生殖系形質転換を行った。形質転換およびそれに続くハエの全ての操作は、標準方法［karess R.E.およびRubin,G.M.,Cell 3

8,135,(1984)]を使用して行った。遅い段階で形質転換したpupeのOmatidiaを切断し、単細胞に解離した。細胞を40μモルのCCF2/btAMac$_2$(化合物34)とともに緩衝液中で20分間インキュベートし、洗浄して、エピ蛍光顕微鏡(励起フィルター400DF15、発光フィルター435nmロングパス)で観察した。適切な方向でβ－ラクタマーゼ遺伝子を形質転換したハエのOmatidia細胞は青の蛍光を示し、適切でない方向で遺伝子を含むOmatidia細胞は緑の蛍光を示した。

実施例16

ある態様において、本発明の化合物は下記化合物のいずれかであってもよい。



[式中、

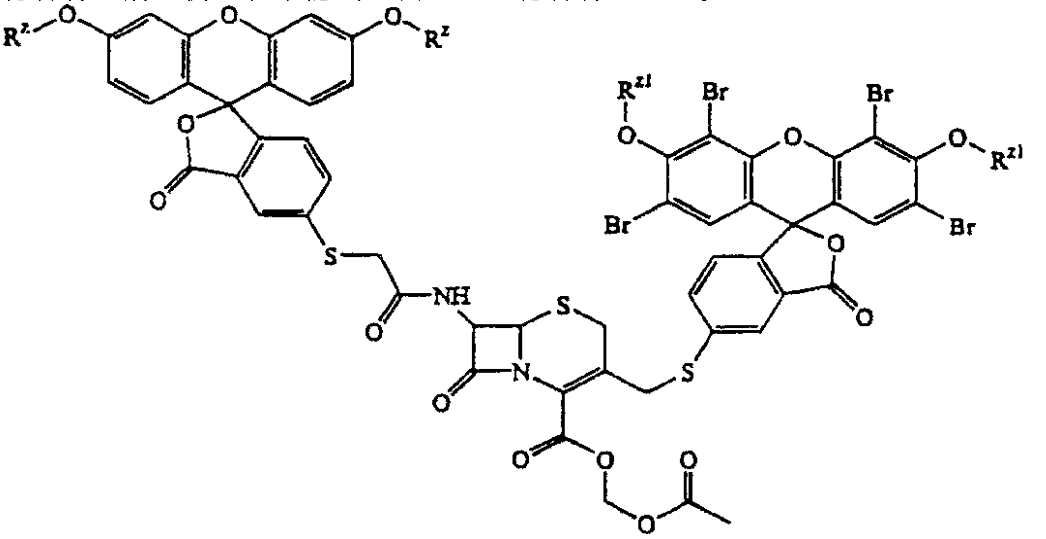
R^yはH、ClおよびBrから成る群から選択され；

R^XはHおよびメチルから成る群から選択され；

R^ZおよびR^{Z1}は独立して、－C(O)alk、－CH_2OC(O)alk、－CH_2SC(O)alk、－CH_2OC(O)Oalk、低級アシルオキシ－α－ベンジルおよびδブチロラクトニル(alkは炭素数1～4の低級アルキルである。)ならびにそれらの膜透過性蛍光原誘導体から成る群から選択され；

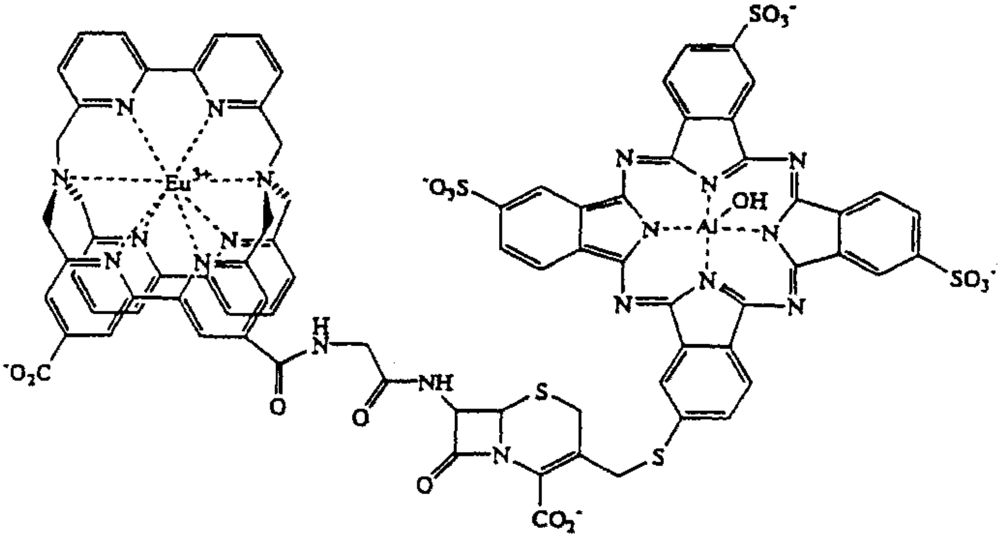
R"は1－(アシルオキシ)アルキルである。]

化合物の別の例は、下記式で表される化合物である。

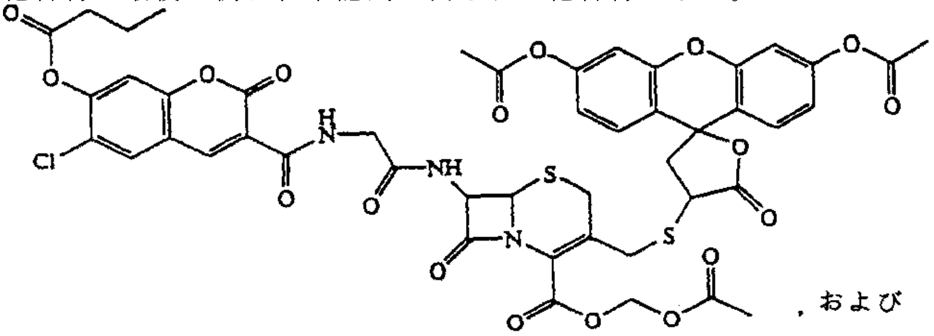


[式中、R^ZおよびR^{Z1}は独立して、－C(O)alk、－CH_2OC(O)alk、－CH_2SC(O)alk、－CH_2OC(O)Oalk、低級アシルオキシ－α－ベンジルおよびδブチロラクトニル(alkは炭素数1～4の低級アルキルである。)から成る群から選択さる。]

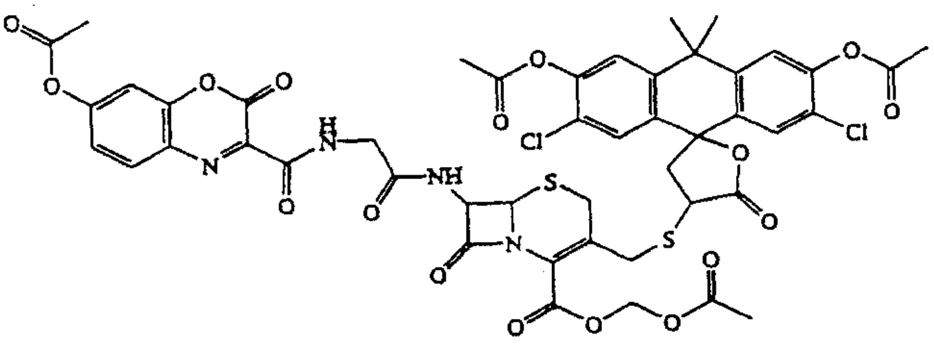
化合物のまた別の例は、下記式で表される化合物である。



化合物の最後の例は、下記式で表される化合物である。



，および



本出願で引用した文献および特許の全てを、各々の文献または特許に示されているのと同程度に、全ての目的のために、それらの全体を参考文献として本明細書に組み入れる。

本発明は、β－ラクタマーゼの新規基質、β－ラクタマーゼおよびそれらの使用方法を提供する。特定の実施例を記載したが、上記記載は説明のためのものであって、それらに限定するものではない。本発明の様々な変更は、本明細書を考慮すれば、当業者には明らかである。従って、本発明の範囲は、上記記載に限定されるべきではなく、添付する請求の範囲に関連して、それと等価の全範囲に従って決定すべきである。

本出願で引用した文献および特許の全てを、各々の文献または特許に示されているのと同程度に、全ての目的のために、それらの全体を参考文献として本明細書に組み入れる。

【図１（ａ）】

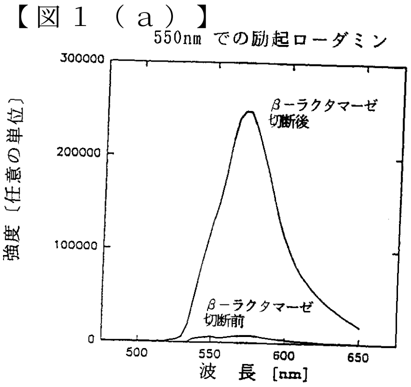


FIG. 1(a)

【図１（ｂ）】

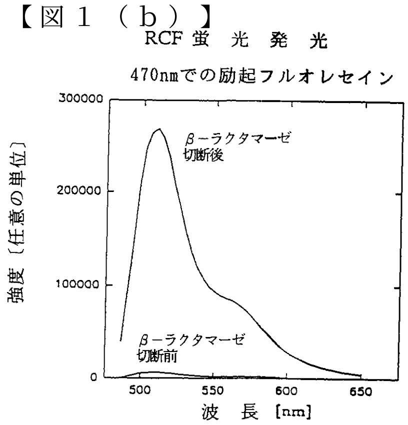


FIG. 1(b)

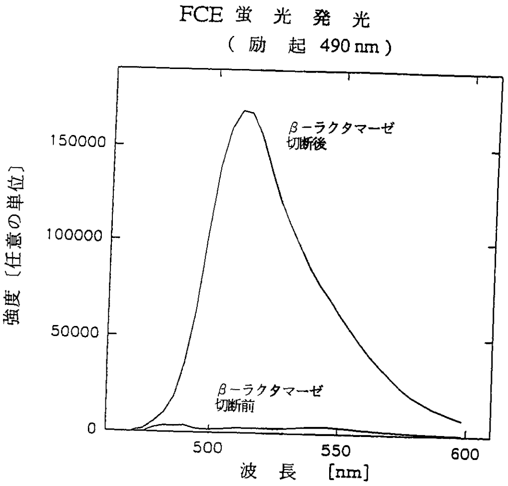
【図７Ｃ】

FIGURE 7C

```
 520                 530                 540                 550                 560
  *        *         *        *         *        *         *        *         *        *
TTA ACT GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA TTA ATA GAC TGG
Leu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp
 570                 580                 590                 600                 610
  *        *         *        *         *        *         *        *         *        *
ATG GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTT CTG CGC TCG GCC CTT CCG GCT
Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala
 620                 630                 640                 650                 660
  *        *         *        *         *        *         *        *         *        *
GGC TGG TTT ATT GCT GAT AAA TCT GGA GCC GGT GAG CGT GGG TCT C3C GGT
Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Gly
670                 680                 690                 700                 710
  *        *         *        *         *        *         *        *         *        *
ATC ATT GCA GCA CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT ATC GTA GTT ATC
Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg Ile Val Val Ile
720                 730                 740                 750                 760
*        *         *        *         *        *         *        *         *        *        *
TAC ACG ACG GGG AGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT AGA CAG ATC GCT
Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn Arg Gln Ile Ala
  770                 780                 790
     *        *         *        *         *        *
GAG ATA GGT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG
Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp
```

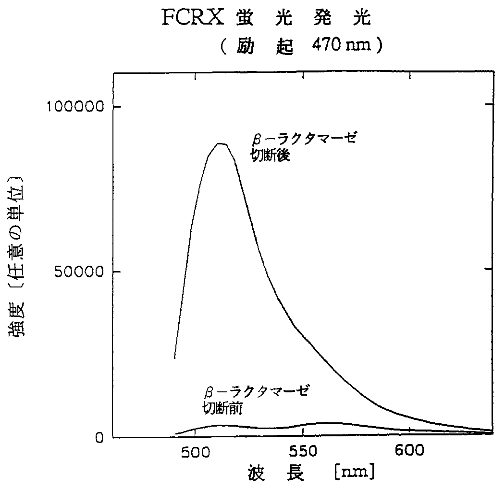
【図２】

FIG. 2



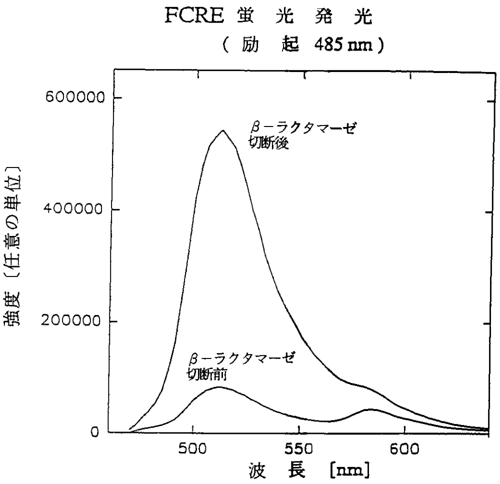
【図３】

FIG. 3



【図４】

FIG. 4



【図５】

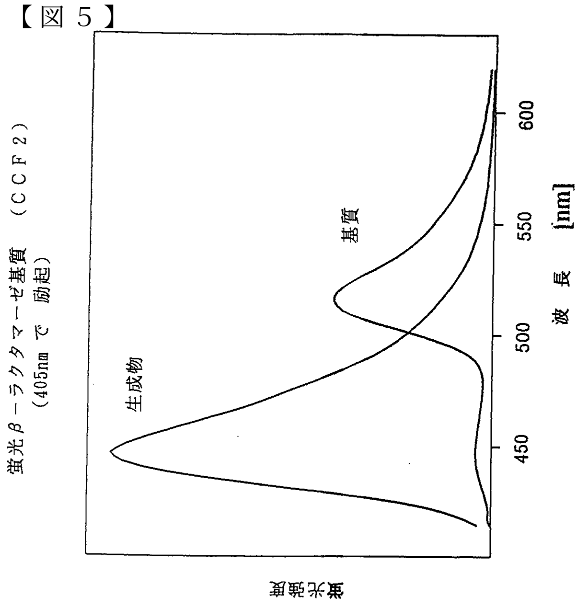


FIG. 5

【図６】

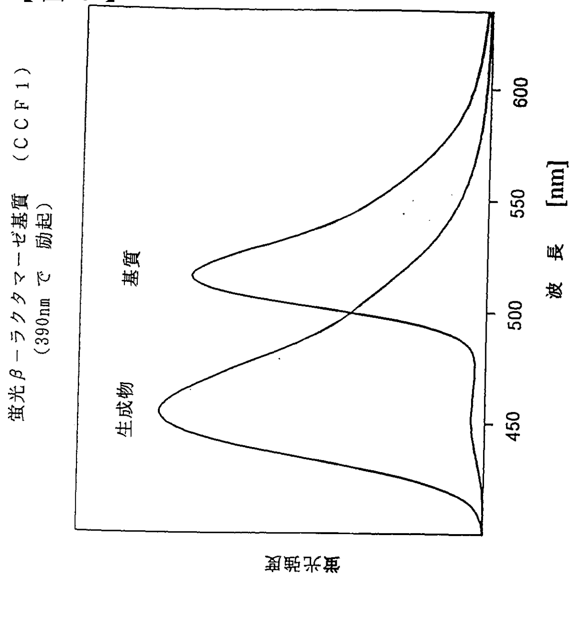


FIG. 6

【図７Ａ】

FIGURE 7A

配列番号	親β−ﾗｸﾀﾏｰｾﾞ遺伝子および文献	修飾	哺乳類発現ベクター	発現の位置
＃１	E. coli RTEM Kadonagaら	ｼｸﾞﾅﾙ配列を ATG TGA で置換	pMAM-neo ｸﾞﾙｺｺﾙﾁｺｲﾄﾞ誘導性	細胞質
＃２	E. coli RTEM Kadonagaら	野生型の分泌酵素配列中に２つの変化：ser 2 arg, ala 23 gly	pMAM-neo ｸﾞﾙｺｺﾙﾁｺｲﾄﾞ誘導性	細胞外に分泌
＃３	E. coli RTEM	β−ｸﾞﾛﾋﾞﾝ上流ﾘｰﾀﾞｰ：AAGCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCAACTTTCCG Kozak 配列：GGTACCACCATGG ｼｸﾞﾅﾙ配列を ATG GGG で置換	pCDNA 3 CMV ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ および pZEO SV40ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ	細胞質
＃４	E. coli RTEM	Kozak 配列：GGTACCACCATGG ｼｸﾞﾅﾙ配列を ATG GAC で置換（GACがCAT に代わる）	pMAM-neo ｸﾞﾙｺｺﾙﾁｺｲﾄﾞ誘導性	細胞質
＃５	Bacillus licheniform は749/C Neugebauerら	ｼｸﾞﾅﾙ配列の除去 新たなＮ末端 ATG	pCDNA 3 CMV ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ	細胞質

J. Kadonaga ら, J. Biol. Chem., 259: 2149 (1984)
K. Neugebauer ら, Nucleic Acid Res., 9: 2577 (1981)

【図７Ｂ】

FIGURE 7B

配列番号１：範囲１－７９５

Kadonagaら(1984)により修飾されたE.coli RTEM

```
          10          20          30          40          50
ATG AGT CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT GAA GAT CAG TTG
Met Ser His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala Glu Asp Gln Leu
         60          70          80          90          100
GGT GCA CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC GGT AAG ATC CTT
Gly Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu
       110         120         130         140         150
GAG AGT TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC ACT TTT AAA GTT
Glu Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val
      160         170         180         190         200
CTG CTA TGT GGC GCG GTA TTA TCC CGT GTT GAC GCC GGG CAA GAG CAA CTC
Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Ser Arg Val Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu
    210         220         230         240         250
GGT CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG TAC TCA CCA GTC
Gly Arg Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val
   260         270         280         290         300
ACA GAA AAG CAT CTT ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT
Thr Glu Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala
  310         320         330         340         350
GCC ATA ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC
Ala Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile
360         370         380         390         400
GGA GGA CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC AAC ATG GGG GAT CAT GTA
Gly Gly Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val
410         420         430         440         450
ACT CGC CTT GAT CGT TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC ATA CCA AAC GAC
Thr Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp
460         470         480         490         500         510
GAG CGT GAC ACC ACG ATG CCT GCA GCA ATG GCA ACA ACG TTG CGC AAA CTA
Glu Arg Asp Thr Thr Met Pro Ala Ala Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu
```

【図７Ｄ】

FIGURE 7D

配列番号２：範囲１－８５８

Ser2→Arg, Ala23→Gly を有する野生型の分泌RTEM酵素

```
          10          20          30          40          50
ATG AGA ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT TTT GCG GCA TTT
Met Arg Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe
         60          70          80          90          100
TGC CTT CCT GTT TTT GGT CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT
Cys Leu Pro Val Phe Gly His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala
       110         120         130         140         150
GAA GAT CAG TTG GGT GCA CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC
Glu Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser
      160         170         180         190         200
GGT AAG ATC CTT GAG AGT TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC
Gly Lys Ile Leu Glu Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser
    210         220         230         240         250
ACT TTT AAA GTT CTG CTA TGT GGC GCG GTA TTA TCC CGT GTT GAC GCC GGG
Thr Phe Lys Val Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Ser Arg Val Asp Ala Gly
   260         270         280         290         300
CAA GAG CAA CTC GGT CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG
Gln Glu Gln Leu Gly Arg Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu
  310         320         330         340         350
TAC TCA CCA GTC ACA GAA AAG CAT CTT ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA
Tyr Ser Pro Val Thr Glu Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu
 360         370         380         390         400
TTA TGC AGT GCT GCC ATA ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT
Leu Cys Ser Ala Ala Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu
410         420         430         440         450
CTG ACA ACG ATC GGA GGA CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC AAC ATG
Leu Thr Thr Ile Gly Gly Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met
460         470         480         490         500         510
GGG GAT CAT GTA ACT CGC CTT GAT CGT TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC
Gly Asp His Val Thr Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala
```

【図７Ｅ】

FIGURE 7E

```
         520         530         540         550         560
ATA CCA AAC GAC GAG CGT GAC ACC ACG ATG CCT GCA GCA ATG GCA ACA ACG
Ile Pro Asn Asp Glu Arg Asp Thr Thr Met Pro Ala Ala Met Ala Thr Thr
       570         580         590         600         610
TTG CGC AAA CTA TTA ACT GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA
Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln
      620         630         640         650         660
TTA ATA GAC TGG ATG GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTT CTG CGC TCG
Leu Ile Asp Trp Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser
     670         680         690         700         710
GCC CTT CCG GCT GGC TGG TTT ATT GCT GAT AAA TCT GGA GCC GGT GAG CGT
Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg
    720         730         740         750         760
GGG TCT CGC GGT ATC ATT GCA GCA CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT
Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg
   770         780         790         800         810
ATC GTA GTT ATC TAC ACG ACG GGG AGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT
Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn
  820         830         840         850
AGA CAG ATC GCT GAG ATA GGT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG
Arg Gln Ile Ala Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp
```

【図７Ｆ】

FIGURE 7F

配列番号３：範囲１－７９５

β－グロビン上流リーダー、哺乳動物Kozak 配列、

Met Gly によるシグナル配列の置換を有するRTEM酵素

```
AAGCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCAACTTTCCGGGTACCACC
          10          20          30          40          50
ATG GGG CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT GAA GAT CAG TTG GGT GCA
Met Gly His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala Glu Asp Gln Leu Gly Ala
60          70          80          90          100
CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC GGT AAG ATC CTT GAG AGT
Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu Ser
110         120         130         140         150
TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC ACT TTT AAA GTT CTG CTA
Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu Leu
160         170         180         190         200         210
TGT GGC GCG GTA TTA TCC CGT GAT GAC GCC GGG CAA GAG CAA CTC GGT CGC
Cys Gly Ala Val Leu Ser Arg Ile Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu Gly Arg
         220         230         240         250         260
CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG TAC TCA CCA GTC ACA GAA
Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr Glu
       270         280         290         300         310
AAG CAT CTT ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT GCC ATA
Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala Ala Ile
      320         330         340         350         360
ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC GGA GGA
Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile Gly Gly
     370         380         390         400         410
CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC AAC ATG GGG GAT CAT GTA ACT CGC
Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr Arg
    420         430         440         450         460
CTT GAT CAT TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC ATA CCA AAC GAC GAG CGT
Leu Asp His Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu Arg
```

【図７Ｇ】

FIGURE 7G

```
470 480 490 500 510
GAC ACC ACG ATG CCT GTA GCA ATG GCA ACA ACG TTG CGC AAA CTA TTA ACT
Asp Thr Thr Met Pro Val Ala Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu Leu Thr
520 530 540 550 560
GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA TTA ATA GAC TGG ATG GAG
Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met Glu
570 580 590 600 610
GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTT CTG CGC TCG GCC CTT CCG GCT GGC TGG
Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp
620 630 640 650 660
TTT ATT GCT GAT AAA TCT GGA GCC GGT GAG CGT GGG TCT CGC GGT ATC ATT
Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile
670 680 690 700 710 720
GCA GCA CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT ATC GTA GTT ATC TAC ACG
Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg Ile Val Val Ile Tyr Thr
730 740 750 760 770
ACG GGG AGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT AGA CAG ATC GCT GAG ATA
Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn Arg Gln Ile Ala Glu Ile
780 790
GGT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG
Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp
```

【図７Ｈ】

FIGURE 7H

配列番号４：範囲１－７９２

哺乳動物Kozak 配列およびMet Asp によるシグナル配列の置換を有するRTEM β－ラクタマーゼ

```
10 20 30 40 50
ATG GAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT GAA GAT CAG TTG GGT
Met Asp Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala Glu Asp Gln Leu Gly
60 70 80 90 100
GCA CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC GGT AAG ATC CTT GAG
Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu
110 120 130 140 150
AGT TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC ACT TTT AAA GTT CTG
Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu
160 170 180 190 200
CTA TGT GGC GCG GTA TTA TCC CGT ATT GAC GCC GGG CAA GAG CAA CTC GGT
Leu Cys Gly Ala Val Leu Ser Arg Ile Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu Gly
210 220 230 240 250
CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG TAC TCA CCA GTC ACA
Arg Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr
260 270 280 290 300
GAA AAG CAT CTT ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT GCC
Glu Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala Ala
310 320 330 340 350
ATA ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC GGA
Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile Gly
360 370 380 390 400
GGA CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC AAC ATG GGG GAT CAT GTA ACT
Gly Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr
410 420 430 440 450
CGC CTT GAT CAT TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC ATA CCA AAC GAC GAG
Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu
460 470 480 490 500 510
CGT GAC ACC ACG ATG CCT GTA GCA ATG GCA ACA ACG TTG CGC AAA CTA TTA
Arg Asp Thr Thr Met Pro Val Ala Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu Leu
```

【図７Ｉ】

FIGURE 7I

```
520 530 540 550 560
ACT GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA TTA ATA GAC TGG ATG
Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met
570 580 590 600 610
GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTT CTG CGC TCG GCC CTT CCG GCT GGC
Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly
620 630 640 650 660
TGG TTT ATT GCT GAT AAA TCT GGA GCC GGT GAG CGT GGG TCT CGC GGT ATC
Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile
670 680 690 700 710
ATT GCA GCA CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT ATC GTA GTT ATC TAC
Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg Ile Val Val Ile Tyr
720 730 740 750 760
ACG ACG GGG AGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT AGA CAG ATC GCT GAG
Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn Arg Gln Ile Ala Glu
770 780 790
ATA GGT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG
Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp
```

【図７Ｋ】

FIGURE 7K

```
520 530 540 550 560
GAA AAA CGC GAG CTT TTA ATC GAT TGG ATG AAA CGA AAT ACC ACT GGA GAC
Glu Lys Arg Glu Leu Leu Ile Asp Trp Met Lys Arg Asn Thr Thr Gly Asp
570 580 590 600 610
GCC TTA ATC CGT GCC GGA GCG GCA TCA TAT GGA ACC CGG AAT GAC ATT GCC
Ala Leu Ile Arg Ala Gly Val Pro Asp Gly Trp Glu Val Ala Asp Lys Thr
620 630 640 650 660
ATC ATT TGG CCG CCA AAA GGA GAT CCT GTC GGT GTG CCG GAC GGT TGG GAA
Gly Ala Ala Ser Tyr Lys Gly Asp Pro Val Gly Thr Arg Asn Asp Ile Ala
670 680 690 700 710
GTG GCT GAT AAA ACT GTT CTT GCA GTA TTA TCC AGC AGG GAT AAA AAG GAC
Ile Ile Trp Pro Pro Val Leu Ala Val Leu Ser Ser Arg Asp Lys Lys Asp
720 730 740 750 760
GCC AAG TAT GAT GAT AAA CTT ATT GCA GAG GCA ACA AAG GTG GTA ATG AAA
Ala Lys Tyr Asp Asp Lys Leu Ile Ala Glu Ala Thr Lys Val Val Met Lys
770 780
GCC TTA AAC ATG AAC GGC AAA
Ala Leu Asn Met A9((
```

【図７Ｊ】

FIGURE 7J

配列番号５：範囲１－７８６

シグナル配列が置換されている Bacillus licheniformis β－ラクタマーゼ

```
10 20 30 40 50
ATG AAA GAT GAT TTT GCA AAA CTT GAG GAA CAA TTT GAT GCA AAA CTC GGG
Met Lys Asp Asp Phe Ala Lys Leu Glu Glu Gln Phe Asp Ala Lys Leu Gly
60 70 80 90 100
ATC TTT GCA TTG GAT ACA GGT ACA AAC CGG ACG GTA GCG TAT CGG CCG GAT
Ile Phe Ala Leu Asp Thr Gly Thr Asn Arg Thr Val Ala Tyr Arg Pro Asp
110 120 130 140 150
GAG CGT TTT GCT TTT GCT TCG ACG ATT AAG GCT TTA ACT GTA GGC GTG CTT
Glu Arg Phe Ala Phe Ala Ser Thr Ile Lys Ala Leu Thr Val Gly Val Leu
160 170 180 190 200
TTG CAA CAG AAA TCA ATA GAA GAT CTG AAC CAG AGA ATA ACA TAT ACA CGT
Leu Gln Gln Lys Ser Ile Glu Asp Leu Asn Gln Arg Ile Thr Tyr Thr Arg
210 220 230 240 250
GAT GAT CTT GTA AAC TAC AAC CCG ATT ACG GAA AAG CAC GTT GAT ACG GGA
Asp Asp Leu Val Asn Tyr Asn Pro Ile Thr Glu Lys His Val Asp Thr Gly
260 270 280 290 300
ATG ACG CTC AAA GAG CTT GCG GAT GCT TCG CTT CGA TAT AGT GAC AAT GCG
Met Thr Leu Lys Glu Leu Ala Asp Ala Ser Leu Arg Tyr Ser Asp Asn Ala
310 320 330 340 350
GCA CAG AAT CTC ATT CTT AAA CAA ATT GGC GGA CCT GAA AGT TTG AAA AAG
Ala Gln Asn Leu Ile Leu Lys Gln Ile Gly Gly Pro Glu Ser Leu Lys Lys
360 370 380 390 400
GAA CTG AGG AAG ATT GGT GAT GAG GTT ACA AAT CCC GAA CGA TTC GAA CCA
Glu Leu Arg Lys Ile Gly Asp Glu Val Thr Asn Pro Glu Arg Phe Glu Pro
410 420 430 440 450
GAG TTA AAT GAA GTG AAT CCG GGT GAA ACT CAG GAT ACC AGT ACA GCA AGA
Glu Leu Asn Glu Val Asn Pro Gly Glu Thr Gln Asp Thr Ser Thr Ala Arg
460 470 480 490 500 510
GCA CTT GTC ACA AGC CTT CGA GCC TTT GCT CTT GAA GAT AAA CTT CCA AGT
Ala Leu Val Thr Ser Leu Arg Ala Phe Ala Leu Glu Asp Lys Leu Pro Ser
```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.^{7} ＦＩ

Ｃ１２Ｑ 1/68 Ｃ１２Ｎ 5/00 Ｂ

(72)発明者 ツィーン，ロジャー ワイ．
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州 ラホヤ，ノッティンガム プレイス ８５３５番地
(72)発明者 ツロカルニック，グレゴール
アメリカ合衆国 ９２１１７ カリフォルニア州 サンディエゴ，ジェメツ ドライブ ３３２９番地

審査官 斎藤 真由美

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)

C12N 15/00 - 90
C07D471/00 - 475/14
C07D501/00 - 62
C12N 1/00 - 7/08
C12Q 1/00 - 70
BIOSIS/WPI(DIALOG)
EUROPAT(QUESTEL)
PubMed,MEDLINE(STN)