

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成22年12月24日(2010.12.24)

【公表番号】特表2009-513681(P2009-513681A)

【公表日】平成21年4月2日(2009.4.2)

【年通号数】公開・登録公報2009-013

【出願番号】特願2008-538212(P2008-538212)

【国際特許分類】

C 07 K	19/00	(2006.01)
C 12 Q	1/02	(2006.01)
C 12 Q	1/48	(2006.01)
C 12 Q	1/37	(2006.01)
C 12 Q	1/44	(2006.01)
C 07 K	14/00	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)
G 01 N	21/78	(2006.01)

【F I】

C 07 K	19/00	Z N A
C 12 Q	1/02	
C 12 Q	1/48	Z
C 12 Q	1/37	
C 12 Q	1/44	
C 07 K	14/00	
C 12 N	15/00	A
G 01 N	21/78	C

【手続補正書】

【提出日】平成22年10月29日(2010.10.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

i) 蛍光ポリペプチド；
 ii) 脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質；および
 iii) 標識

を含む、融合タンパク質であって、

蛍光ポリペプチドおよび標識が共鳴エネルギー移動(RET)ペアであり、脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質の切断により(i)および(ii)の間の共鳴エネルギー移動が減少する融合タンパク質。

【請求項2】

前記標識がルミネッセンス金属錯体である、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項3】

前記脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質がNEDD8、SUMO-1、UCHL3、SUMO-2、SUMO-3、SUMO-4、ISG15a、ISG15b、FAT10a、FAT10b、FUB1、UBL5、URM1、ATG8、Rubb1、Smtn3、Hub1、Urm1、およびATG12からなる群より選択されるポリペプチドまたは

そのフラグメントを含む、請求項 1 記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

前記蛍光ポリペプチドが GFP または YFP である、請求項 1 記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

以下の段階を含む、脱ユビキネーション活性のモジュレータを同定する方法であって：

a) 少なくとも 1 つの脱ユビキネーション酵素と融合タンパク質とを、脱ユビキネーション活性の少なくとも 1 つの被験モジュレータの存在下で接触させて被験試料を生成させる段階であって、

少なくとも 1 つの融合タンパク質が、蛍光ポリペプチド、ユビキネーション酵素ポリペプチド基質、および標識を含む、段階；

b) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに

c) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階；

ここで、該蛍光ポリペプチドおよび該標識が RET ペアであり、かつ脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質の切断により RET ペアのアクセプター部分およびドナー部分の間の共鳴エネルギー移動が減少する、方法。

【請求項 6】

以下の段階を含む、少なくとも 1 つの化合物の脱ユビキネーション活性を測定する方法：

a) 化合物と少なくとも 1 つの融合タンパク質とを接触させて被験試料を生成させる段階であって、

少なくとも 1 つの融合タンパク質が以下を含み：

i) 蛍光ポリペプチド；

i i) 脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質；および

i i i) 標識、

蛍光ポリペプチドおよび標識が RET ペアであり、脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質の切断により (i) および (i i i) の間の共鳴エネルギー移動が減少する段階；

b) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに

c) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの化合物および少なくとも 1 つの融合タンパク質を、少なくとも 1 つの脱ユビキチン化酵素と接触させて被験試料を生成させる段階を含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記標識がルミネッセンス金属錯体である、請求項 5 または請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

以下の段階を含む、化合物が脱ユビキネーション活性のモジュレータであるかどうかを決定する方法：

a) 該化合物を少なくとも 1 つの融合タンパク質を発現する細胞と接触させて被験試料を生成させる段階であって、該融合タンパク質が第 1 の標識および脱ユビキネーション酵素ポリペプチド基質を含む、段階；

b) 脱ユビキネーション活性に適切な条件下で被験試料をインキュベートする段階；

c) (b) の前、間、または後に、被験試料を、脱ユビキネーションの有無に基づいて少なくとも 1 つの融合タンパク質への弁別結合を示す結合パートナーと接触させる段階であって、該結合パートナーは第 2 の標識を含み、かつ該第 1 および第 2 の標識は RET ペアである、段階；

d) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに

e) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。

【請求項 10】

前記第 1 の標識が蛍光ポリペプチドでありかつ前記第 2 の標識がルミネッセンス金属錯体である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

前記結合パートナーが抗体または抗体フラグメントである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 2】

脱ユビキニーション酵素ポリペプチド基質が、ユビキチンポリペプチド、ユビキチンポリペプチドフラグメント、ユビキチン様ポリペプチド、またはユビキチン様ポリペプチドフラグメントである、請求項 5、6、または 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

蛍光発光が 2 つの波長で測定される、請求項 5、6、または 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 4】

2 つの波長での蛍光発光の比率が計算される、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

以下の段階を含む、試料の脱ユビキチン化活性を同定する方法：

a) i) 試料を、i ii) 基体上に固定された少なくとも 1 つまたは複数のポリペプチドと接触させる段階であって、少なくとも 1 つまたは複数のポリペプチドが検出可能部分に結合したユビキチンまたはユビキチン様のタンパク質を含み、脱ユビキチン化活性が基体からの検出可能部分の解離を生じさせる、段階；

b) 脱ユビキチン化活性に適切な条件下で (a) をインキュベートする段階；

c) 基体上の任意のポリペプチドに結合した検出可能部分を検出する段階。

【請求項 1 6】

a) パッケージ材料；ならびに

b) 請求項 1 記載の融合タンパク質

を含む、製品。

【請求項 1 7】

以下の段階を含む、少なくとも 1 つの化合物のユビキチン化活性を測定する方法：

a) 少なくとも 1 つの化合物を、少なくとも 1 つのタンパク質および少なくとも 2 集団のユビキトンと接触させて被験試料を生成させる段階であって、1 集団のユビキトンが R E T ペアのためのアクセプター部分を含み、もう 1 つの集団が R E T ペアのためのドナー部分で標識されている段階；

b) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに

c) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。

【請求項 1 8】

以下の段階を含む、少なくとも 1 つの化合物がユビキチン化活性を調節するか否かを判定する方法：

a) 少なくとも 1 つの化合物を、少なくとも 1 つのタンパク質および少なくとも 2 集団のユビキトンと接触させて被験試料を生成させる段階であって、1 集団のユビキトンが R E T ペアのためのアクセプター部分を含み、もう 1 つの集団が R E T ペアのためのドナー部分で標識されている段階；

b) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに

c) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。

【請求項 1 9】

以下の段階を含む、少なくとも 1 つの化合物のユビキチン化活性を測定する方法：

a) i) 少なくとも 1 つの化合物を、

i ii) ユビキチン、および

i iii) タンパク質

と接触させて被験試料を生成させる段階であって、タンパク質が ユビキニーション 基質と R E T ペアの第 1 の部分とを含む段階；

b) ユビキチン化のための適切な条件下で被験試料をインキュベートする段階；

c) (b) の前、間、または後のいずれかに、被験試料をユビキチンと結合する結合分子と接触させる段階であって、結合分子が R E T ペアの第 2 の部分で標識されている段階

- ;
- d) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに
 - e) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。

【請求項 2 0】

以下の段階を含む、少なくとも 1 つの化合物が ユビキチン化活性 のモジュレータであるか否かを判定する方法：

- a) i) 少なくとも 1 つの化合物を、
 - i i) ユビキチン、
 - i i i) タンパク質、および
 - i v) ユビキチン化酵素

と接触させて被験試料を生成させる段階であって、タンパク質が ユビキネーション基質 と R E T ペアの第 1 の部分とを含む段階；

- b) ユビキチン化のための適切な条件下で被験試料をインキュベートする段階；
- c) (b) の前、間、または後のいずれかに、被験試料をユビキチンと結合する結合分子と接触させる段階であって、結合分子が R E T ペア の第 2 の部分で標識されている段階；
- d) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；
- e) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階、ならびに
- f) 蛍光発光を対照試料と比較する段階。

【請求項 2 1】

以下の段階を含む、少なくとも 1 つのユビキチン化酵素またはユビキチン化様の酵素のための少なくとも 1 つの基質を検出する方法：

- a) i) 少なくとも 1 つのユビキチン化酵素またはユビキチン化様の酵素の 少なくとも 1 つの基質 を、
 - i i) 基体上に固定されたポリペプチド、および
 - i i i) 検出可能部分を含む、少なくとも 1 つのユビキチンまたはユビキチン様のタンパク質

と接触させる段階；

- b) ユビキチン活性またはユビキチン化様の活性を可能にする条件下で (a) をインキュベートする段階；
- c) 基体上の任意のポリペプチドに結合した検出可能部分を検出する段階。

【請求項 2 2】

- a) パッケージ材料；および
- b) 少なくとも 2 集団のユビキチン

を含む、製品であって、

1 集団のユビキチンが R E T ペアのためのアクセプター部分を含み、もう 1 つの集団が R E T ペアのためのドナー部分で標識されている、製品。

【請求項 2 3】

以下の段階を含む、化合物が翻訳後修飾のモジュレータであるか否かを判定する方法：

- a) 化合物と少なくとも 1 つの融合タンパク質を発現している細胞とを接触させて被験試料を生成させる段階であって、融合タンパク質が第 1 の標識および翻訳後修飾のための基質を含む段階；
- b) 翻訳後修飾のための適切な条件下で被験試料をインキュベートする段階；
- c) (b) の前、間、または後に、翻訳後修飾の有無に基づいて、被験試料を少なくとも 1 つの融合タンパク質への弁別結合を示す結合パートナーと接触させる段階であって、結合パートナーが第 2 の標識を含み、第 1 および第 2 の標識が共鳴エネルギー移動 (R E T) ペアである段階；および

- d) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに
- e) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。

【請求項 2 4】

以下の段階を含む、ホスホジエステラーゼ活性を検出する方法：

a) i) 試料を、

 i i) ホスホジエステラーゼの基質

と接触させて被験試料を生成させる段階であって、基質が R E T ペアの第 1 のメンバーを含む段階；

 b) ホスホジエステラーゼ活性に適切な条件下で (a) をインキュベートする段階；

 c) (b) の前、間、または後のいずれかに、被験試料を、ホスホジエステラーゼの切斷生成物の特異性を有する結合分子と接触させる段階であって、結合分子が R E T ペアの第 2 のメンバーを含み、切斷生成物が R E T ペアの第 1 のメンバーを含む段階；

 d) 被験試料を少なくとも 1 つの波長の光に曝露する段階；ならびに

 e) 被験試料からの蛍光発光を測定する段階。