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

特許第5718221号
(P5718221)

(45)発行日　平成27年5月13日(2015.5.13)　(24)登録日　平成27年3月27日(2015.3.27)

(51)Int.Cl.			F I		
C12Q	1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	ZNA
C12Q	1/48	(2006.01)	C12Q	1/48	Z
C12Q	1/26	(2006.01)	C12Q	1/26	
G01N	33/48	(2006.01)	G01N	33/48	M
G01N	33/483	(2006.01)	G01N	33/483	C

請求項の数 19　(全 24 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-511655 (P2011-511655)
(86)(22)出願日　平成21年6月1日(2009.6.1)
(65)公表番号　特表2011-521644 (P2011-521644A)
(43)公表日　平成23年7月28日(2011.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/003354
(87)国際公開番号　WO2009/145925
(87)国際公開日　平成21年12月3日(2009.12.3)
審査請求日　平成24年5月24日(2012.5.24)
(31)優先権主張番号　61/057,371
(32)優先日　平成20年5月30日(2008.5.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(73)特許権者　507373324
ホワイトヘッド　インスティテュート　フォー　バイオメディカル　リサーチ
アメリカ合衆国　マサセチューセッツ州　ケンブリッジ　ナイン　ケンブリッジ　センター
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞の空間的分離およびスクリーニングのための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
複数のウェルを含むマイクロデバイス上に細胞のライブラリを添加する段階であって、該ウェルは、該ウェル内において溶液中で細胞を空間的に分離し、該細胞は、１ウェルあたり平均して1個分布し、
該複数の細胞はそれぞれ、該ウェル内の該溶液中において少なくとも一つの酵素の変種を分泌する、段階；
該ウェル中の該溶液中における該分泌された酵素の変種を、少なくとも一つの光学シグナル基質と接触させる段階であって、
該少なくとも一つの光学シグナル基質によって生成された光学シグナルは、該ウェル内の該溶液中における該酵素の活性を示す、段階；および
該細胞によって分泌された変種の酵素活性を複数のパラメータに基づいて評価する段階であって、該酵素活性は、該一つまたは複数の光学シグナル基質によって生成された該光学シグナルの一つまたは複数の変化を経時的に検出することによって評価される、段階
を含む、液相において酵素のスクリーニングを行う方法。
【請求項２】
前記酵素が、プロテアーゼ、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、およびリガーゼからなる群より選択される、請求項1記載の方法。
【請求項３】

前記光学シグナルが蛍光シグナルである、請求項1記載の方法。
【請求項４】
前記酵素活性が、蛍光シグナルの強度の変化に基づき、前記マイクロデバイス内でリアルタイムでまたはニアリアルタイム（near-real-time）でモニターされる、請求項3記載の方法。
【請求項５】
前記接触させる段階が、競合アッセイとして、第1の光学シグナル基質と第2の光学シグナル基質をウェル内に導入することを含む、請求項1記載の方法。
【請求項６】
前記第1および第2の光学シグナル基質が、第1および第2の光学シグナル基質の特異性または選択性を直接モニターできるように異なる蛍光体によって修飾される、請求項5記載の方法。
【請求項７】
前記パラメータが、触媒速度、反応の特異性、反応速度効率、および基質結合親和性からなる群より選択される、請求項1記載の方法。
【請求項８】
前記複数のパラメータが並行して評価される、請求項7記載の方法。
【請求項９】
剛性の基質でマイクロデバイスを密封する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。
【請求項１０】
前記酵素の分子量が、600 Daより大きくかつ100,000 Da未満である、請求項2記載の方法。
【請求項１１】
前記細胞が真核細胞である、請求項1記載の方法。
【請求項１２】
前記真核細胞が酵母細胞である、請求項11記載の方法。
【請求項１３】
前記ウェルが、直径10μm～100μmの間である、請求項1記載の方法。
【請求項１４】
前記酵素が、変異体グリコシルトランスフェラーゼ（GTアーゼ）またはグリコシダーゼである、請求項1記載の方法。
【請求項１５】
前記GTアーゼが、複合炭水化物の迅速かつ大規模産生に関して化学合成と競合することができる、請求項14記載の方法。
【請求項１６】
酵素をコードする遺伝子を変異させることを含む工程によって前記変種を生成させる段階をさらに含む、請求項1記載の方法。
【請求項１７】
所望の酵素の変種を分泌する細胞を前記マイクロデバイスから回収する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。
【請求項１８】
前記回収する段階が、ガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレーションによるものである、請求項17記載の方法。
【請求項１９】
前記回収された細胞によって分泌される酵素の変種をコードする遺伝子をシークエンシングする段階をさらに含む、請求項18記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野

本発明は、細胞によってコードされる生体分子の表現型が、基質特異性および反応速度効率が含まれる多数のパラメータに基づいて評価される、個々のマイクロリアクターにおいて変種細胞のライブラリから特定のメンバーを単離するための方法を提供する。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景

酵素は、工業、農業、医学、および科学研究における触媒としてますます用いられている。その基質特異性、化学選択性、および環境との適合性により、酵素は、光学異性体として純粋な薬剤の合成、織物の加工、食品加工、医学的診断および治療、生体内変化、ならびにバイオレメディエーションなどの応用にとって長所を提供する。酵素は、高分子量ポリマーの改変に関して従来の化学プロセスより優れていることが証明されている。

【０００３】

ライブラリにおいて所望の特性を有する特異的メンバーを同定するために、酵素などの生体分子の遺伝子変種ライブラリを評価するには、産生された生体分子の表現型を特徴付けする段階と、生体分子を、それをコードするライブラリメンバーの遺伝子型に相関させる段階の双方が必要である。このようにして、所望の変種を選択してさらに評価する。酵素の機能が細胞の生存に直接連鎖している場合、定向進化、すなわちそれ以外の点では野生型である細胞から欠失されている必須の活性を回復させることは、特に成功することが証明されている。しかし、グリコシルトランスフェラーゼ（GTアーゼ）および他のトランスフェラーゼの場合のように、それ自身が選択可能な表現型を提供しない酵素の進化は、さらにより難しい。この種の酵素を進化させるために、化学的相補性、ファージディスプレイおよび細菌細胞表面ディスプレイが含まれる選択戦略が存在するが、現在の方法は、多様な酵素を工学操作するための容易なまたは一般化戦略を提供しない。新規生体分子に対する需要が大きくなるにつれて、改善された活性および新規触媒機能を有する酵素を工学操作するための新規戦略が緊急に必要である。

【発明の概要】

【０００４】

本発明は、細胞によってコードされる生体分子の表現型または活性が、基質特異性および反応速度効率を含む多数のパラメータに基づいて評価される、個々のマイクロリアクターにおいて変種細胞のライブラリから特定のメンバーを単離するための方法を提供する。

【０００５】

1つの局面において、本発明は、酵素を産生する細胞を特に分離するためにマイクロウェルを用いて、改善された触媒特性または変更された基質特異性を有する酵素が含まれる、分泌産物のライブラリを、新規表現型に関してスクリーニングするための組成物および方法に関する。

【０００６】

別の局面において、本発明は、溶液中で細胞を空間的に分離する複数のウェルを含有するマイクロデバイス上に細胞のライブラリを添加する段階を含む、液相において生体分子のスクリーニングを行う方法、たとえば定向進化生体分子スクリーニングを行う方法を提供する。細胞はウェルあたり約1個で分布して、複数の細胞が溶液中で少なくとも1つの生体分子の変種を分泌する。分泌された生体分子変種を、各々が所望の生体分子表現型または活性を示す少なくとも1つの光学シグナル基質に接触させて；および細胞によってコードされる生体分子の表現型を多数のパラメータに基づいて評価する。いくつかの場合において、「光学シグナル基質」は、1つまたは複数の単位、たとえば検出可能なマーカーに直接コンジュゲートされた抗体または他の特異的リガンドもしくは小分子タグの複合体である。たとえば、二要素反応（たとえば、トランスフェラーゼ酵素によって触媒されるX＋Y）において、第一の要素「Y」は、培養プレートなどの表面上に固定された抗体または他のリガンドによって捕捉され、第二の要素「X」は、蛍光タグ抗体などの光学基質によって検出される。このように、マイクロデバイスから所望の生体分子変種を分泌する細胞が単離される。

【０００７】
任意で、表現型は、細胞のライブラリにおける1つまたは複数の光学シグナル基質によって生成された1つまたは複数の光学シグナルの経時的変化を検出することによって評価され、そのような変化は、生体分子変種の所望の生体分子表現型または活性を示している。本発明は、生物活性を測定するために、様々な色素形成性の、蛍光発生性の、発光性のおよび蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）基質を利用する。多くのドナー／アクセプターFRET対が市販されている。これらには、5-カルボキシテトラメチルローダミン（TAMRA）／QSY-7（ジアリールローダミン誘導体）；ダンシル／エオジン；トリプトファン／ダンシル；フルオレセイン／テキサスレッド（ローダミン）；ナフタレン／ダンシル：ダンシル／オクタデシルローダミン（ODR）；ホウ素-ジピロメテン（BODIPY）／BODIPY；テルビウム／トーダミン（Thodamine）；ダンシル／フルオレセインイソチオシアネート（FITC）；ピレン／クマリン；5-(2-ヨードアセチルアミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸（IAEDANS）／IAFBPE／Cy5；およびユーロピウム／Cy5が含まれるがこれらに限定されるわけではない。好ましくは、光学シグナルは蛍光シグナルである。1つの局面において、生体分子表現型または活性は、蛍光シグナルの強度の変化に基づいてマイクロデバイスにおいてリアルタイムでまたはニアリアルタイム（near-real-time）でモニターされる。
【０００８】
本発明は、分泌された分子、ペプチド、ポリペプチド、プロテアーゼ、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、ヒドロゲナーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、ポリメラーゼなどの酵素、ならびに抗体、サイトカイン、ケモカイン、核酸、代謝物、小分子（＜1 kDa）および合成分子からなる群より選択される生体分子を提供する。たとえば、生体分子の分子量は、約100 Daより大きく、約100,000 Da未満である。または、生体分子の分子量は約600 Daより大きく、約30,000 Da未満；約800 Daより大きく、約10,000 Da未満；または約900 Daより大きく、約1,000 Da未満である。
【０００９】
1つのアプローチにおいて、酵素生体分子の活性は、酵素または他の生体分子が作用する2つまたはそれより多い要素の近位性を検出することによって評価される。たとえば、酵素は要素を結びつける（たとえば、リガーゼ）か、または要素を分離する（たとえば、リアーゼ）。先に記述したように、検出は、FRET対を用いて、またはその中で第一の要素がビオチニル化されて（およびアビジンに基づく試薬によって捕捉され）、第二の要素が蛍光タグによって標識される捕捉に基づくアッセイを用いて成就される。要素（基質）の会合の増加または減少は、酵素の変更された結合特異性／活性を反映する。
【００１０】
本発明は、触媒速度、反応の特異性、反応速度効率、および基質結合親和性からなる群より選択される多数のパラメータに基づいて、細胞によってコードされる生体分子の表現型を評価する段階を提供する。別の局面において、速度または基質認容性、およびpHまたは温度認容性が評価される。好ましくは、パラメータは並行して評価される。
【００１１】
本発明は、細胞によって分泌される生体分子をスクリーニングする段階を提供する。1つの局面において、細胞は真核細胞である。好ましくは、真核細胞は酵母細胞である。または、細胞は原核細胞である。
【００１２】
本発明はまた、たとえば各ウェルが1つの細胞のみを含有する、溶液中で細胞を空間的に分離するウェルを含有するマイクロデバイスを提供する。好ましくは、ウェルは、直径約10μm～約100μm、たとえば10μm、20μm、30μm、50μm、または75μmである。
【００１３】
1つの局面において、本発明は、マイクロデバイスから所望の生体分子変種を分泌する細胞を単離する段階を提供する。好ましくは、細胞は、ガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレーションによって単離される。任意で、本発明は、さらなる選択のために所望の生体分子にランダムに変異誘発させる段階を提供する。ランダム変異誘発のための適

した技術には、エラープローン（error-prone）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、コドンカセット変異誘発、デオキシリボ核酸（DNA）シャッフリング、付着伸長プロセス（StEP）、化学的変異誘発、および変異誘発株の使用が含まれる。または生体分子は生体分子を同定するためにシークエンシングされる。

【００１４】

調べられる生体分子には酵素が含まれる。たとえば、生体分子は、変異体グリコシルトランスフェラーゼ（GTアーゼ）、炭水化物プロセシング酵素、炭水化物結合タンパク質、グリコシダーゼ、または炭水化物に結合するレクチン親和性タンパク質である。好ましくは、GTアーゼは、複合炭化水素の迅速かつ大規模な産生に関して化学合成と競合することができる。または、生体分子は、サイトカイン、ケモカイン、抗体、または他の分泌された細胞代謝物である。

【００１５】

さらに別の局面において、本発明は、変更された基質選択性を有するより強力な触媒を同定するために既存のGTアーゼの定向進化を提供する。より具体的に、本発明は、炭水化物に基づく癌ワクチンおよび炭水化物含有抗体が含まれる、治療目的のための複合糖質の迅速かつ大規模な産生に関して化学合成と競合することができる変異体GTアーゼの同定を提供する。

【００１６】

本発明の他の特色および長所は、その好ましい態様の以下の説明から、および特許請求の範囲から明らかとなるであろう。本明細書において引用される全ての参考文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

[本発明1001]

以下の段階を含む、液相生体分子スクリーニングを行う方法：

細胞のライブラリをマイクロデバイスに添加する段階であって、該マイクロデバイスが溶液中で該細胞を空間的に分離させるウェルを含有し、該細胞がウェルあたり約1個で分布して、複数の細胞が該溶液中に少なくとも1つの生体分子の変種を分泌する、段階；

分泌された生体分子変種に、各々が所望の生体分子表現型または活性を示す少なくとも1つの光学シグナル基質を接触させる段階；

多数のパラメータに基づいて細胞によってコードされる生体分子の表現型を評価する段階；および

該マイクロデバイスから所望の生体分子変種を分泌する細胞を単離する段階。

[本発明1002]

表現型が細胞のライブラリにおける1つまたは複数の光学シグナル基質によって生成された1つまたは複数の光学シグナルの経時的な変化を検出することによって評価されて、そのような変化が生体分子の変種の所望の生体分子の表現型または活性を示している、本発明1001の方法。

[本発明1003]

光学シグナルが蛍光シグナルである、本発明1002の方法。

[本発明1004]

生体分子表現型または活性が、蛍光シグナルの強度の変化に基づいてマイクロデバイス内でリアルタイムでまたはニアリアルタイム（near-real-time）でモニターされる、本発明1003の方法。

[本発明1005]

生体分子が、ペプチド、ポリペプチド、プロテアーゼ、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、酵素、抗体、サイトカイン、ケモカイン、核酸、代謝物、小分子（＜1 kDa）および合成分子からなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1006]

生体分子の分子量が約600 Daより大きく、かつ約100,000 Da未満である、本発明1005の方法。

[本発明1007]
パラメータが、触媒速度、反応の特異性、反応速度効率、および基質結合親和性からなる群より選択される、本発明1001の方法。
[本発明1008]
パラメータが並行して評価される、本発明1007の方法。
[本発明1009]
細胞が真核細胞である、本発明1001の方法。
[本発明1010]
真核細胞が酵母細胞である、本発明1009の方法。
[本発明1011]
ウェルが、直径約10～100μmの間である、本発明1001の方法。
[本発明1012]
細胞がガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレーションによって単離される、本発明1001の方法。
[本発明1013]
生体分子にランダムに変異誘発させる段階をさらに含む、本発明1012の方法。
[本発明1014]
生体分子をシークエンシングする段階をさらに含む、本発明1012の方法。
[本発明1015]
生体分子が変異体グリコシルトランスフェラーゼ（GTアーゼ）またはグリコシダーゼである、本発明1001の方法。
[本発明1016]
GTアーゼが複合炭水化物の迅速かつ大規模産生に関して化学合成と競合することができる、本発明1015の方法。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】新しいまたは改善された機能を有する酵素を同定するための方法の概略図である。酵母細胞はマイクロリアクター内で関心対象タンパク質を分泌する。各細胞が自身のウェル内に含有されることから、各ウェルは1つのライブラリメンバーに対応する。本発明のスクリーニング後、細胞を回収して、さらなるスクリーニングラウンドにおいて、またはコードされるタンパク質の同定のために用いる。

【図２】ムチン型O-連結グリカンを示す図である。

【図３】ホウ素ジピロメテン二フッ化物（BODIPY）蛍光体（F）およびテトラメチルローダミン（TAMRA）消光剤（Q）を含有するタバコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼ触媒活性を検出するための基質を示す図である。

【図４】ppGalNAcTアーゼ-T1触媒活性を検出するための基質を示す図である。

【図５Ａ】例示的な抗腫瘍ワクチンを示す図である。

【図５Ｂ】例示的な抗寄生虫ワクチンを示す図である。

【図５Ｃ】例示的な抗菌ワクチンを示す図である。

【図５Ｄ】例示的な抗菌剤を示す図である。

【図６】グリコシルトランスフェラーゼBTG、MurG、およびGtfBの構造の比較を証明するダイアグラムである。

【図７】酵素の工学操作および触媒の開発のための定向進化の概略図である。

【図８Ａ】接触するガラス表面に基質／産物が捕捉される、タンパク質を、それらを分泌する細胞と相関させるための方法の概略図である。

【図８Ｂ】直径50～100μmのウェルを含有するデバイスの写真である。

【図８Ｃ】ピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞から分泌された産物のタンパク質マイクロアレイの顕微鏡写真である。

【図８Ｄ】マイクロウェルにおけるピキア・パストリス細胞の顕微鏡写真である。

【図９】ハイブリドーマ、ピキア・パストリス、およびサイトカイン分泌末梢血単核球（

PBMC）などの異なる細胞タイプにおけるタンパク質分泌レベルを比較するための標準曲線の顕微鏡写真である。
【図１０】マイクロマニピュレータを用いた細胞回収を証明する一連の顕微鏡写真である。
【図１１】トリプシン切断アッセイによってマイクロウェルにおける酵素代謝回転を検出するための方法を示すダイアグラムである。
【図１２】増加濃度（0.05μg/ml、0.5μg/ml、および5μg/ml）のトリプシンを10μg/ml FTC-カゼインと共にマイクロウェルにおいて1時間インキュベート後の蛍光シグナル強度を証明する一連の顕微鏡写真である。
【図１３】0.5μg/mlトリプシンを10μg/ml FTC-カゼインと共にマイクロウェルにおいて1および18時間インキュベート後の蛍光シグナル強度を描写する一連の顕微鏡写真である。
【図１４】HRV-3Cプロテアーゼアッセイによってマイクロウェルにおける酵素の代謝回転を検出するための方法を示すダイアグラムである。
【図１５】1×反応緩衝液含有培地（YPD培地）において100μg/ml FRETペプチドと共に室温（RT）で18時間インキュベート後のHRV-3Cプロテアーゼアッセイの結果を示す一連の顕微鏡写真である。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
発明の詳細な説明
その基質特異性、化学選択性、および環境との適合性により、酵素は、医学診断および治療において有用な光学異性体として純粋な薬剤の合成などの応用にとって長所を提供する。実際に、そのような酵素は、抗腫瘍ワクチン（たとえば、GM3、黒色腫関連糖スフィンゴリピッドを標的とする）、抗寄生虫ワクチン（たとえば、マラリアのグリコシルホスファチジルイノシトール（GPIアンカー）を標的とする）、抗菌ワクチン（たとえば、莢膜多糖類抗原インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）血清型b（HIB）を標的とする）、および他の抗菌剤が含まれる、多様な医学応用を有するオリゴ糖および複合糖質の合成において利用されている。例示的な抗腫瘍ワクチン、抗寄生虫ワクチン、抗菌ワクチン、および抗菌剤をそれぞれ、図5A～5Dに示す。グリコシル化生体分子を用いることは、構造および機能的関係に関する詳しい知識を必要とするのみならず、大規模に臨床で使用するために定義された構造に対するアクセスを必要とする。
【００１９】
多くの野生型酵素（すなわち、そのアミノ酸配列が天然に存在する生物において見いだされる配列と同じである）を改変することなく用いることができるが、酵素の物理的特性またはその化学活性が所望の適用と適合性でない多くの場合が存在する。望ましい可能性がある新規物理的特性には、たとえば、熱安定性、非水性溶媒、塩、金属、阻害剤、プロテアーゼ、pH極値に対する抵抗性等が含まれる。酵素の大きさを低減させること、共因子または他のタンパク質に対するその依存性を消失させること、宿主株におけるその発現を改善すること、および他の類似の変化も同様に、特定の適用にとって望ましい可能性がある。改善された化学活性には、たとえば増強された触媒速度、基質親和性および特異性、領域選択性、エナンチオマー選択性、産物阻害の低減、または変更されたpH活性プロフィールが含まれる可能性がある。加えて、代謝経路の一部として共に機能する1つまたは複数の酵素の特性を変更することが望ましい可能性がある。
【００２０】
改善された活性および新規触媒機能を有する酵素の需要が大きくなるにつれて、タンパク質変種のプールから所望の触媒を単離するために新しい方法が開発されている。酵素機能が細胞の生存に直接連鎖している場合、定向進化、すなわちそれ以外の点では野生型である細胞から欠失している必須の活性の回復は、特に成功することが証明されている。グリコシルトランスフェラーゼ（GTアーゼ）および他のトランスフェラーゼの場合のように、それ自身選択可能な表現型を提供しない酵素の進化は、かなりより難しい。本明細書に

おいて記述される発明の前には、多様な酵素を工学操作するための容易なまたは一般化された戦略を提供した方法はなかった。

【００２１】

単離された生体分子は、精製された天然のものか、合成によって産生されたか、または組み換えの化合物、たとえばポリペプチド、核酸、小分子、もしくは他の物質である。精製化合物は関心対象化合物の少なくとも60重量％（乾燥重量）である。好ましくは、調製物は、関心対象化合物の少なくとも75重量％、より好ましくは少なくとも90重量％、および最も好ましくは少なくとも99重量％である。純度は、任意の適当な標準的な方法によって、たとえばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定される。「精製された」または「実質的に精製された」とは、生体分子が由来する細胞または組織源からの細胞材料もしくは他の混入高分子、たとえば多糖類、核酸、もしくはタンパク質を実質的に含まない、生体分子またはその生物活性部分を意味する。「実質的に精製された」という句にはまた、化学合成された場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない生体分子が含まれる。「細胞材料を実質的に含まない」という言語には、それが単離された細胞の細胞成分から分離された生体分子の調製物が含まれる。

【００２２】

酵素の工学操作および触媒の開発のための定向進化

酵素工学操作および触媒の開発発明のための定向進化の概略図を図7に示す。本発明は、変異誘発および選択の反復ラウンドによって、既存の酵素足場から新規活性をうまく生成する能力を提供する。以下に詳細に記述されるように、さらなる選択またはスクリーニングのために所望の生体分子をランダムに変異誘発するための多くの技術が存在する。同様に選択およびスクリーニングのための多くの適した方法が存在する。当業者は、生体分子、たとえば関心対象タンパク質にとって利用可能な構造情報の量に基づいて、特異的技術を選ぶことができることを理解するであろう。個々の技術を選択する場合、ハイスループットを維持しながら遺伝子型と表現型との間の連鎖を維持することが非常に重要である。

【００２３】

スクリーニング戦略

本明細書において記述される本発明は、基質特異性および反応速度効率が含まれる多数のパラメータに基づいて細胞によってコードされる生体分子の表現型を評価する自動化可能なハイスループット法を提供する。この一般的な戦略によって、本来のまたは最小に変化させた基質を用いて多様な酵素のエクスビボスクリーニングを行うことができる。関心対象酵素は、細胞機構によって製造される。または、本発明によって、サイトカイン、ケモカイン、抗体、および代謝物が含まれる他の分泌された生体分子の所望の表現型に関する溶液中でのスクリーニングも行うことができる。

【００２４】

所望の特性（触媒速度、反応の特異性、基質結合親和性）を有するライブラリにおける特異的メンバーを同定するために、酵素などの生体分子の遺伝的変種のライブラリを評価するためには、産生された生体分子の表現型を特徴付けする段階、および生体分子を、それをコードするライブラリのメンバーの遺伝子型と相関させる段階の双方が必要である。このようにして、所望の変種を選択して、さらに評価することができる。生体分子の表現型および産生する細胞の遺伝子型を相関させる段階は難題である。本発明は、細胞によってコードされる生体分子の表現型が基質特異性および反応速度効率が含まれる多数のパラメータに基づいて評価される、個々のマイクロリアクターにおける変種細胞のライブラリから特定のメンバーを単離するための方法を提供する。ライブラリメンバーを空間的に分離することによって、各々を並行して評価することができ、所望の特徴を示すメンバーを、さらなる分析のためにマイクロリアクターからその後回収する。技術の重要な適用は、生体分子のインビトロ構築において用いるための多様な酵素の定向進化である。1つの例は、活性化ドナー分子からの糖を、絶対的に化学的に制御しながら適当なアクセプターに

転移させる変異体GTアーゼの同定法である。そのような酵素は、複合炭水化物の迅速で大規模な産生に関して化学合成と競合することができる。

【００２５】

酵素変種のライブラリから酵素を進化させる場合、所望の表現型を遺伝子型に連鎖させるために単純な戦略が必要である。個々の区画にライブラリメンバーを空間的に分離することによって、基質の取り込みまたは表面の付着の必要なく、独自の特性を有する変種を同定することができる。

【００２６】

この目的のために、本明細書において記述される本発明は、各々が関心対象タンパク質の変異体型を分泌する細胞、たとえば酵母細胞のライブラリを分離するために微小二次加工チャンバーを用いる（図1）。ポリ(ジメチルシロキサン)で作出される成型可能なスラブは、ソフトリソグラフィーおよびレプリカ成型によって二次加工されて、毒性ではなく気体透過性である生体適合性の材料のスラブである。ポリスチレンなどのいくつかの材料は堅いために、コンフォーマル接触（conformal contact）を許容せず、このように並行して産生される抗体の特異性を試験するための基質に対して、マイクロウェルを密封しないであろう。しかし、PDMSはそれが毒性ではなく、気体透過性であり、容易に圧縮されて堅い基質に対して隙間のない可逆的な密封を形成することから、この技術にとって適した材料である。そのような密封は、成型可能なスラブにおける任意の液体および／または細胞が漏出または流出することを遅らせるまたは防止する。

【００２７】

マイクロウェルに閉じこめられて、スライドガラスによって密封された細胞（利用可能な総培地がマイクロウェルの容積に限定されるように）は、直径50μmのウェルを含有するデバイスにおいてウェルあたりほぼ細胞1個で分布する。図8Cは、1つのピキア・パストリス細胞からのタンパク質マイクロアレイを描写して、図8Dは、8Cにおけるタンパク質マイクロアレイを分泌した細胞を示す。ヒトFcを発現するピキア・パストリス細胞をYPD培地において終夜生育させた。細胞を、50μmウェルを含有するポリジメチルシロキサン（PDMS）マイクロデバイスにウェルあたり細胞ほぼ1個でロードした。マイクロデバイスに、ヤギ抗ヒトFc抗体によって前処置したスライドガラスを接触させて、分泌されたFcを捕捉した。分泌されたタンパク質を90分間の間に捕捉して、得られたアレイをCy5コンジュゲートヤギ抗ヒトIg(H+L)抗体を用いて読み取った。ピキア・パストリス細胞を酵母細胞表面に関して蛍光色素を用いてマイクロウェルにおいて撮像した。図9は、ピキア・パストリスに関する分泌されたタンパク質レベルが、ハイブリドーマおよびサイトカイン分泌末梢血単核球（PBMC）などの他の細胞タイプに比較してどうかを示す。この標準曲線は、精製ヒトFcを用いて作製され、観察された強度の値を用いて、個々の細胞から捕捉された分泌に対して既定の濃度を割付した。ピキア・パストリス細胞に関して観察された分泌タンパク質の量は、アッセイの検出限界より十分に上であり、供給された酵素基質の代謝回転に関して適切な濃度レベルをマイクロウェルにおいて提供するはずである。これらの実験は、個々の酵母細胞からの分泌産物を検出できることを証明している。同様に、Love et al., 2006 Nat. Biotechnol, 24(6):703-707；WO 2007/035633を参照されたい。

【００２８】

特定の例において、分離された酵母細胞のライブラリを、酵素の代謝回転の成功により蛍光シグナルを生じる酵素基質によって調べる。シグナルの強度は産物形成と直接相関することから、ライブラリメンバーをリアルタイム蛍光モニタリングによって基質特異性に加えて酵素の反応速度に関して直接比較する。蛍光ウェルからのクローンをマイクロマニピュレーションを用いて回収して、進化および選択のさらなるラウンドにおいて用いた。マイクロマニピュレータを用いる細胞回収を図10に示す。マイクロマニピュレータによる回収後の酵母の生存率は、40～60％であった。

【００２９】

酵素を改善するための変異誘発技術

アミノ酸変化をコードする変異は、新規酵素活性を生成するために有用である。遺伝子

は当業者に公知の任意の方法を用いて、たとえば所定の生物のゲノムライブラリからクローンを単離することによって、ゲノムデオキシリボ核酸（DNA）もしくはメッセンジャーリボ核酸（mRNA）源からの、または非培養環境微生物のDNAの不均一な混合物からの発現クローンのライブラリからのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅によって、得られる（米国特許第5,958,672号）。酵素ならびに他の非触媒タンパク質およびペプチドをコードする遺伝子を変異させるために、当業者に周知である多数の方法が存在する。これらの方法には、合理的（たとえば、部位特異的変異誘発によって点突然変異体または点突然変異体の群を作製する）、および推計学的（たとえば、ランダム変異誘発、コンビナトリアル変異誘発および組み換え）技術の双方が含まれる。タンパク質デザインオートメーションと呼ばれる合理的デザインは、望ましい折り畳みを達成するために可能性があるタンパク質の配列を客観的に予測するためにアルゴリズムを用いる。

【００３０】

1つのクラスの技術は、点突然変異、たとえばエラープローンポリメラーゼ連鎖反応、およびオリゴヌクレオチド特異的変異誘発に頼る技術である（Cadwell and Joyce, 1992 PCR Methods Applic, 2:28-33；Kegler-Ebo DM, et al., 1994 Nuc Acids Res, 22(9):1593-1599）。これらの方法によって、所定のタンパク質内の1つの特異的位置で異なる20種のアミノ酸のいずれかを有するメンバーを含有する酵素ライブラリが産生される。

【００３１】

推計学的方法には、たとえば化学的変異誘発（Singer and Kusmierek, 1982 Annu Rev Biochem, 51 :655-93）、帰納的アンサンブル変異誘発（Arkin and Youvan, 1992 Proc Natl Acad Sci USA, 89(16):7811-5；Delagrave et al., 1993 Protein Eng, 6(3):327-31）、指数的アンサンブル変異誘発（Delagrave and Youvan, 1993 Biotechnology, 11(13): 1548-52）、連続的ランダム変異誘発（Chen and Arnold, 1991 Biotechnology, 9(11): 1073-7；Chen and Arnold, 1993 Proc Natl Acad Sci USA, 90(12):5618-22）、DNAシャッフリング（Stemmer, 1994 Proc Natl Acad Sci USA, 91(22): 10747-51；Stemmer, 1994 Nature, 370(6488):389-91）等が含まれる。組み換えは、DNAが切断されて、新しい組み合わせで再結合される有用な推計学的変異誘発技術である。最善の公知の組み換え法であるDNAシャッフリングによって、多数の遺伝子からの有用な変異を組み合わせることができる（Stemmer WPC, et al., 1994 Nature, 370:389-391）。付着伸長プロセス（StEP）は、インビトロ変異誘発およびポリヌクレオチド配列の組み換えにとって単純かつ効率的な方法である（Zhao H, et al., 1998 Nature Biotechnol, 16:258-261）。他の変異誘発技術には、化学的変異誘発および変異体株を用いることが含まれる（Lai Y, et al., 2004 Biotech Bioeng, 86:622-627；Coia G, et al., 1997 Gene, 201 :203- 209）。これらの技術を個々にまたは組み合わせて用いて変異を産生する。

【００３２】

所望の酵素またはタンパク質をコードするDNAを発現ライブラリから単離してシークエンシングする。変異誘発およびスクリーニングの段階を繰り返すことによって、新規酵素および他のタンパク質が人工的に作製される。この反復プロセスは定向進化として知られる。関心対象遺伝子は必ずしもプラスミド上で発現される必要はない。1つの局面において、それらは、宿主染色体に組み入れられた後に、または遺伝子の染色体コピーを変異させた結果として発現される。別の局面において、高い複雑度の発現ライブラリが、変異誘発を行わずに作製される。これは、環境微生物の混合物からの非常に不均一なゲノムDNAなどの、多数の異なる配列を既に含有する起源からDNAをクローニングおよび発現させることによって行われうる。

【００３３】

発現ライブラリの活性スクリーニング

本発明によって記述される方法によって、生体分子を機能に関してアッセイすることができる。1つの局面において、所望の生物活性に関するスクリーニングは、アプタマー、すなわち特異的標的分子に結合するオリゴ核酸またはペプチド分子を用いて行われる。別の局面において、所望の生物活性に関するスクリーニングは、マイクロデバイスにおける

マイクロウェルにおいて、蛍光発生基質による液相FRETに基づくアッセイを用いて行われる。別の局面において、生物活性は、基質／産物が抗体を用いて接触ガラス表面において捕捉される、固相支持蛍光（またはFRET）によってアッセイされる。好ましくは、基質の1つまたは複数の蛍光である。さらに別の局面において、所望の生物活性に関するスクリーニングは、1つまたは複数の基質が化学または酵素反応を用いて蛍光体によってさらに誘導体化される（すなわち、「クリック化学」、ソルターゼタグ付け、BirAビオチニル化等）固相支持親和性捕捉によって行われる。または、生体分子の機能は、双方の基質が親和性タグを有し、産物がサンドイッチELISAフォーマットにおいて検出される、固相支持抗体に基づく蛍光読み出しを用いてアッセイされる。好ましくは、二次抗体は蛍光体にコンジュゲートされる。

【００３４】

1つの局面において、所望の生物活性に関するスクリーニングは、酵素反応にとって適当である色素形成または蛍光発生化合物を、酵素を発現する宿主細胞に接触させる段階、および細胞またはその周囲における色の形成をモニターする段階によって行われる。米国特許第5,914,245号において記述される固相アッセイにおいて、これらの化合物は、それらが活性な酵素または酵素反応の産物に接触すると、吸光度、反射率、蛍光、または発光の測定可能な変化を生じることから、光学シグナル基質と呼ばれる。

【００３５】

本発明は、生物活性を測定するために、様々な色素形成、蛍光発生、発光、および蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）基質を提供する。典型的に、蛍光体は、1つの波長で電磁エネルギーを吸収して、第二の波長で電磁エネルギーを放射する。代表的な蛍光体には、1,5 IAEDANS；1,8-ANS；4-メチルウンベリフェロン；5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン；5-カルボキシフルオレセイン（5-FAM）；5-カルボキシナプトフルオレセイン；5-カルボキシテトラメチルローダミン（5-TAMRA）；5-FAM（5-カルボキシフルオレセイン）；5-HAT（ヒドロキシトリプタミン）；5-ヒドロキシトリプタミン（HAT）；5-ROX（カルボキシ-X-ローダミン）；5-TAMRA（5-カルボキシテトラメチルローダミン）；6-カルボキシローダミン6G；6-CR 6G；6-JOE；7-アミノ-4-メチルクマリン；7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD）；7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン；9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン；ABQ；酸フクシン；ACMA（9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン）；アクリジンオレンジ；アクリジンレッド；アクリジンイエロー；アクリフラビン；アクリフラビンフォイルゲンSITSA；エクオリン（光タンパク質）；AFP--自己蛍光タンパク質--（Quantum Biotechnologies）sgGFP、sgBFPを参照されたい；Alexa Fluor 350（商標）；Alexa Fluor 430（商標）；Alexa Fluor 488（商標）；Alexa Fluor 532（商標）；Alexa Fluor 546（商標）；Alexa Fluor 568（商標）；Alexa Fluor 594（商標）；Alexa Fluor 633（商標）；Alexa Fluor 647（商標）；Alexa Fluor 660（商標）；Alexa Fluor 680（商標）；アリザリンコンプレクソン；アリザリンレッド；アロフィコシアニン（APC）；AMC、AMCA-S；AMCA（アミノメチルクマリン）；AMCA-X；アミノアクチノマイシンD；アミノクマリン；アミノメチルクマリン（AMCA）；アニリンブルー；ステアリン酸アンスロシル（Anthrocyl stearate）；APC（アロフィコシアニン）；APC-Cy7；APTRA-BTC；APTS；アストラゾンブリリアントレッド4G；アストラゾンオレンジR；アストラゾンレッド6B；アストラゾンイエロー7 GLL；アタブリン；ATTO-TAG（商標）CBQCA；ATTO-TAG（商標）FQ；オーラミン；オーロホスフィンG；オーロホスフィン；BAO 9（ビスアミノフェニルオキサジアゾール）；BCECF（高いpH）；BCECF（低いpH）；硫酸ベルベリン；βラクタマーゼ；BFP青色シフト緑色蛍光タンパク質（GFP）（Y66H）；青色蛍光タンパク質；BFP/GFP FRET；バイメイン；ビスベンズアミド；ビスベンズイミド（Hoechst）；ビス-BTC；ブランコフォアFFG；ブランコフォアSV；BOBO（商標）-1 ；BOBO（商標）-3；Bodipy 492/515；Bodipy 493/503；Bodipy 500/510；Bodipy 505/515；Bodipy 530/10；Bodipy 542/563；Bodipy 18/568；Bodipy 564/517；Bodipy 576/589；Bodipy 581/591；Bodipy 630/650-X；Bodipy 650/665-X；Bodipy 665/676；Bodipy FI；Bodipy FL ATP；Bodipy FI-セラミド；Bodipy R6G SE；Bodipy TMR；Bodipy TMR-Xコンジュゲート；Bodipy TMR-X、SE；Bodipy TR

；Bodipy TR ATP；Bodipy TR-X SE；BO-PRO（商標）-1；BO-PRO（商標）-3；ブリリアントスルホフラビンFF；BTC；BTC-5N；カルセイン；カルセインブルー；Calcium Crimson（商標）；カルシウムグリーン；カルシウムグリーン-1 Ca.sup.2+色素；カルシウムグリーン-2 Ca.sup.2+；カルシウムグリーン-5N Ca.sup.2+；カルシウムグリーン-C18 Ca.sup.2+；カルシウムオレンジ；カルコフルオル白；カルボキシ-X-ローダミン（5-ROX）；カスケードブルー（商標）；カスケードイエロー；カテコラミン；CCF2（GeneBlazer）；CFDA；CFP-シアン蛍光タンパク質；CFP/YFP FRET；クロロフィル；クロモマイシンA；クロモマイシンA；CL-NERF；CMFDA；コエレンテラジン；コエレンテラジンcp；コエレンテラジンf；コエレンテラジンfcp；コエレンテラジンh；コエレンテラジンhcp；コエレンテラジンip；コエレンテラジンn；コエレンテラジンO；クマリンファロイジン；C-フィコシアニン；CPMメチルクマリン；CTC；CTCフォルマザン；Cy2（商標）；Cy3.1 8；Cy3.5（商標）；Cy3（商標）；Cy5.1 8；Cy5.5（商標）；Cy5（商標）；Cy7（商標）；シアンGFP；環状AMPフルオロセンサー（FiCRhR）；ダブシル；ダンシル；ダンシルアミン；ダンシルカダベリン；塩化ダンシル；ダンシルDHPE；フッ化ダンシル；4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）；ダポキシル；ダポキシル2；ダポキシル3' DCFDA；DCFH（ジクロロジヒドロフルオレセイン二酢酸塩）；DDAO；DHR（ジヒドローダミン123）；Di-4-ANEPPS；Di-8-ANEPPS（ノン・レシオ（non-ratio））；DiA（4-ジ-16-ASP）；ジクロロジヒドロフルオレセイン二酢酸塩（DCFH）；DiD-親油性トレーサー；DiD（DiIC18(5)）；DIDS；ジヒドローダミン123（DHR）；DiI（DiIC18(3)）；ジニトロフェノール；DiO（DiOC18(3)）；DiR；DiR（DiIC18(7)）；DM-NERF（高いpH）；2,4-ジニトロフェノール（DNP）；ドーパミン；DsRed；DTAF；DY-630-NHS；DY-635-NHS；EBFP；ECFP；EGFP；ELF 97；エオジン；エリスロシン；エリスロシンITC；エチジウムブロマイド；エチジウムホモ二量体-1（EthD-1）；ユークリシン；EukoLight；塩化ユーロピウム（III）；EYFP；ファストブルー；FDA；フォイルゲン（パラローズアニリン）；FIF（ホルムアルデヒド誘導蛍光）；FITC；フラゾオレンジ；Fluo-3；Fluo-4；フルオレセイン（FITC）；フルオレセイン二酢酸塩；フルオロエメラルド；フルオロ-ゴールド（ヒドロキシスチルバミジン）；Fluor-Ruby；FluorX；FM 1-43（商標）；FM 4-46；Fura Red（商標）（高いpH）；Fura Red（商標）/Fluo-3；Fura-2；Fura-2/BCECF；ゲナクリルブリリアントレッドB；ゲナクリルブリリアントイエロー10GF；ゲナクリルピンク3G；ゲナクリルイエロー5GF；GeneBlazer（CCF2）；GFP（S65T）；GFP赤色シフト（rsGFP）；GFP野生型、非UV励起（wtGFP）；GFP野生型、UV励起（wtGFP）；GFPuv；グロキサル酸；グラニュラーブルー；ヘマトポルフィリン；Hoechst 33258；Hoechst 33342；Hoechst 34580；HPTS；ヒドロキシクマリン；ヒドロキシスチルバミジン（フルオロゴールド）；ヒドロキシトリプタミン；インド-1、高カルシウム；インド-1、低カルシウム；インドジカルボシアニン（DiD）；インドトリカルボシアニン（DiR）；イントラホワイトCf；JC-1；JO-JO-1；JO-PRO-1；レーザープロ；ラウロダン；LDS 751（DNA）；LDS 751（RNA）；ロイコフォル PAF；ロイコフォルSF；ロイコフォルWS；リサミンローダミン；リサミンローダミンB；カルセイン/エチジウムホモ二量体；LOLO-1；LO-PRO-1；ルシファーイエロー；リゾトラッカーブルー；リゾトラッカーブルー-ホワイト；リゾトラッカーグリーン；リゾトラッカーレッド；リゾトラッカーイエロー；リゾセンサーブルー；リゾセンサーグリーン；リゾセンサーイエロー/ブルー；マググリーン；マグダラレッド（フロキシンB）；Mag-Fura Red；Mag-Fura-2；Mag-Fura-5；Mag-Indo-1；マグネシウムグリーン；マグネシウムオレンジ；マラカイトグリーン；マリナブルー；マキロンブリリアントフラビン10 GFF；マキシロンブリリアントフラビン8 GFF；メロシアニン；メトキシクマリン；Mitotracker Green FM；Mitotracker Orange；Mitotracker Red；マイトマイシン；モノブロモバイメイン；モノブロモバイメイン（mBBr-GSH）；モノクロロバイメイン；MPS（メチルグリーンピロニンスチルベン）；NBD；NBDアミン；ナイルレッド；ニトロベンズオキサジドール；ノルアドレナリン；ヌクレアファストレッド；ヌクレアイエロー；Nylosan Brilliant lavin E8G；Oregon Green；Oregon Green 488-X；Oregon Green（商標）；Oregon Green（商標）488；Oregon Green（商標）500；Oregon Green（商標）514；パシフィックブルー；パラローズアニリン（フォイルゲン

）；PBFI；PE-Cy5；PE-Cy7；PerCP；PerCP-Cy5.5；PE-テキサスレッド[Red 613]；フロキシンB（マグダラレッド）；Phorwite AR；Phorwite BKL；Phorwite Rev；Phorwite RPA；ホスフィン3R；フォトレジスト；フィコエリスリンB [PE]；フィコエリスリンR [PE]；PKH26（Sigma）；PKH67；PMIA；ポントクロムブルーブラック；POPO-1；POPO-3；PO-PRO-1；PO-PRO-3；プリムリン；プロシオンイエロー；ヨウ化プロピジウム（PI）；PyMPO；ピレン；ピロニン；ピロニンB；ピロザールブリリアントフラビン7GF；QSY 7；キナクリンマスタード；Red 613 [PE-テキサスレッド]；レゾルフィン；RH 414；Rhod-2；ローダミン；ローダミン110；ローダミン123；ローダミン5 GLD；ローダミン6G；ローダミンB；ローダミンB 200；ローダミンBエクストラ；ローダミンBB；ローダミンBG；ローダミングリーン；ローダミンファリシジン；ローダミンファロイジン；ローダミンレッド；ローダミンWT；ローズベンガル；R-フィコシアニン；R-フィコエリスリン（PE）；rsGFP；S65A；S65C；S65L；S65T；サファイアGFP；SBFI；セロトニン；セブロンブリリアントレッド2B；セブロンブリリアントレッド4G；セブロンブリリアントレッドB；セブロンオレンジ；セブロンイエローL；sgBFP（商標）；sgBFP（商標）（スーパーグローBFP）；sgGFP（商標）；sgGFP（商標）（スーパーグローGFP）；SITS；SITS（プリムリン）；SITS（スチルベンイソチオスルホン酸）；SNAFLカルセイン；SNAFL-1；SNAFL-2；SNARFカルセイン；SNARF1；ナトリウムグリーン；スペクトラムアクア；スペクトラムグリーン；スペクトラムオレンジ；スペクトラムレッド；SPQ（6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル）キノリニウム）；スチルベン；スルホローダミンB can C；スルホローダミンエクストラ；SYTO 11；SYTO 12；SYTO 13；SYTO 14；SYTO 15；SYTO 16；SYTO 17；SYTO 18；SYTO 20；SYTO 21；SYTO 22；SYTO 23；SYTO 24；SYTO 25；SYTO 40；SYTO 41；SYTO 42；SYTO 43；SYTO 44；SYTO 45；SYTO 59；SYTO 60；SYTO 61；SYTO 62；SYTO 63；SYTO 64；SYTO 80；SYTO 81；SYTO 82；SYTO 83；SYTO 84；SYTO 85；SYTOXブルー；SYTOXグリーン；SYTOXオレンジ；テトラサイクリン；テトラメチルローダミン（TRITC）；Texas Red（商標）；Texas Red-X（商標）コンジュゲート；チアジカルボシアニン（DiSC3）；Thiazine Red（登録商標）；チアゾールオレンジ；チオフラビン5；チオフラビンS；チオフラビンTCN；チオライト；チオゾールオレンジ；チノポールCBS（カルコフルオル白）；TMR；TO-PRO-1；TO-PRO-3；TO-PRO-5；TOTO-1；TOTO-3；TriColor（PE-Cy5）；TRITCテトラメチルローダミンイソチオシアネート；True Blue；TruRed；Ultralite；Uranine B；Uvitex SFC；wt GFP；WW781；X-ローダミン；XRITC；キシレンオレンジ；Y66F；Y66H；Y66W；イエローGFP；YFP；YO-PRO-1；YO-PRO-3；YOYO-1；YOYO-3、サイバーグリーン、チアゾールオレンジ（インターカレート色素）、量子ドットなどの半導体ナノ粒子、もしくはケージド（caged）蛍光体（光または他の電磁エネルギー源によって活性化されうる）、またはその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【００３６】

FRETにおいて用いるために適した広く多様な適したドナー（D）およびアクセプター（A）蛍光体が市販されている。プローブ対の選択は、システムの拘束のみならず所望の応用において用いられるペプチドの長さおよび配列によって影響を受ける。ペプチドの長さおよび配列は、プローブの付着のための標識部位に影響を及ぼすであろう。付着部位の間の距離は、FRETの距離依存性によりドナー／アクセプター対の選択に影響を及ぼす。多くのドナー／アクセプター対が市販されている。これらには、5-TAMRA/QSY-7；ダンシル／エオジン；トリプトファン/ダンシル；フルオレセイン/テキサスレッド（ローダミン）；ナフタレン/ダンシル；ダンシル/ODR；BODIPY/BODIPY；テルビウム；トーダミン；ダンシル/FITC；ピレン/クマリン；IAEDANS/IAFBPE/Cy5；およびユーロピウム/Cy5が含まれるがこれらに限定されるわけではない。ビオチンまたは他の低分子アフィニティタグは、西洋ワサビペルオキシダーゼまたは蛍光色素のような、抗ビオチン抗体またはアビジン／ストレプトアビジンタグ検出器によってタンパク質の検出において用いられる。

【００３７】

1つの局面において、指示薬化合物を用いて、産物と直接または間接的に相互作用することによって、酵素反応の1つまたは複数の産物を検出する。任意で、これらの指示薬化

合物は、光学シグナル基質溶液の一部として含まれる。たとえば、米国特許第5,914,245号は、蛍光色素ローダミンBとの脂肪酸の相互作用を検出するリパーゼアッセイを記述している。指示薬化合物を利用することができる他のアッセイには、プロトンが生成されるアッセイ、または膜貫通プロトン、電子、もしくはイオンの転移が酵素反応の際に起こるアッセイが含まれる。これらの活性は、基質溶液に様々な色素を含めることによって検出されうる。フルオレセインイソチオシアネート（FITC）は、フローサイトメトリーが含まれる広範囲の応用において用いられるフルオレセインの誘導体である。pHの変化をモニターするために用いられる例示的な蛍光指示薬色素には、pH範囲6～9に関してフルオレセインおよびセミナフトローダフルオロ（seminaphthorhodafluor）およびその誘導体、ならびにpH範囲3～7に関してリゾセンサー、オレゴングリーン、およびロドールならびにその誘導体が含まれる。これらの蛍光pH指示薬は、Molecular Probes（Eugene, Oreg.）から入手可能である。最大吸収波長がpHの関数として変化する発色団色素には、チモールブルー（およその有用なpH範囲1.2～2.8および8.0～9.6）、メチルオレンジ（pH 3.2～4.4）、ブロモクレゾールグリーン（pH 3.8～5.4）、メチルレッド（pH 4.2～6.2）、ブロモチモールブルー（pH 6.0～7.6）、およびフェノールレッド（pH 6.8～8.2）が含まれる。フェノールフタレイン（pH 8.2～10.0）は、pHがアルカリになると無色からピンク色になる。これらの比色pH指示薬は、Sigma-Aldrich（St. Louis, Mo.）から入手可能である。酵素活性を検出するためにpH指示薬を用いる多数の例が酵素学において存在する（Lowry et al., 1951 J Biol Chem, 193:265-275；Khalifah, 1971 J Biol Chem, 246(8):2561-73）。ブロモチモールブルーおよびフェノールレッドなどの指示薬は、溶液中の様々なヒドロラーゼの活性をアッセイするために用いられている（Moris- Varas et al., 1999 Bioorg Med Chem, (10):2183-8）。

【００３８】

ムチン型O-連結グリコシル化

高等真核生物におけるO-連結グリコシル化の最も量の多い型は、「ムチン型」として知られる（Hang H and Bertozzi C, 2005 Bioorg Med Chem, 13(17):5021-5034）。ムチン生合成における第一段階は、Tn-抗原を形成するために、セリンまたはトレオニン側鎖のヒドロキシル基に対するα-N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）付加である；この転移は、ポリペプチドN-アセチル-α-ガラクトサミニルトランスフェラーゼ（ppGalNAcTアーゼ）によって成就される（Ten Hagen et al., 2003 Glycobiol, 13(1): 1R-16R）。Tn-抗原は、多様なムチン型構造を産生するために下流のGTアーゼによってさらに仕上げされる（図2）。今日まで、ムチン型グリコシル化を含有する150を超える糖タンパク質が同定されており、その多くが疾患の進行に関係している（Hang 2005）。そのような1つの例は、癌上皮細胞におけるその発現の増加により腫瘍抗原として同定されている糖タンパク質であるMUC1であり、これは癌細胞の接着および腫瘍の浸潤の双方に関与する（Yu et al., 2007 J Biol Chem, 282(1):773-781；Kohlgraf et al., 2003 Cancer Res, 63(16):5011-5020）。癌関連ムチンは非常に免疫原性であり、免疫療法の標的として用いられる可能性がある（Hanisch and Ninkovic, 2006 Curr Prot Pep Sci, 7:307；Tarp and Clausen, In Press Biochem Biophys Acta）。

【００３９】

均一なムチン型O-連結糖ペプチドおよび糖タンパク質の合成

炭水化物ワクチンを開発するためには、大量の均一な糖ペプチドおよび糖タンパク質に対するアクセスが必要である（Grogan et al., 2002 Annu Rev Biochem, 71:593-634）。しかし、本来のまたは組み換え型糖タンパク質を単離しても、その各々が異なる生物学的特性を表示しうる限られた量の不均一な糖型を生じるに過ぎない（Freire et al., 2006 Glycobiol, 16(11):1150）。複合糖質の化学合成は、適切に保護されたグリコシルアミノ酸構築ブロックを用いる固相ペプチド合成（SPPS）によって均一な基質を提供する（Marcaurelle and Bertozzi, 2002 Glycobiol, 12(6):69R-77R）。本来の化学ライゲーションおよび発現されたタンパク質のライゲーションも同様に、より大きいペプチドおよびタンパク質さえにおいて糖を部位特異的に配置するために用いられている（Muir TW, 2003 An

nu Rev Biochem, 72:249-289）。本明細書において記述される本発明の前に、これらの合成法を成就するにはなおも特別に訓練された化学者を必要とした。本発明は、調製的規模での複合糖質の効率的な合成を行うことができる酵素の生成を提供し、これは治療目的のためのそれらの試験において大きく役立つ。

【００４０】

炭水化物含有天然物を合成するためのGTアーゼの進化

癌細胞の表面上で過剰発現される糖タンパク質および糖脂質が同定されたことにより、免疫療法の標的としてそれらが研究されるようになった（Slovin et al., 2005 Immunol Cell Biol, 83(4):418）。腫瘍関連炭水化物抗原は典型的に、低レベルで様々な糖型で発現されることから、炭水化物に基づく抗癌ワクチンを開発するために別個の複合糖質の十分量を単離することは難しい。本明細書において記述される本発明の前に、炭水化物を化学合成するための一般的な方法は、自動アセンブリの出現によって改善されているが（Plante et al., 2003 In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 58, pp 35-54）、立体化学制御およびドナー／アクセプター適合性にとって必須の十分な保護基の操作を成就するためにはなおも専門家を必要とする。複合糖質の化学合成のさらなる短所には、臨床での必要条件を満たすために大規模の量を生成することが難しいこと、および合成された材料を精製することが難しいことが含まれる。

【００４１】

自然は、活性化ドナー分子からの糖（たとえば、UDP糖）を、絶対的な化学制御／立体化学によって適当なアクセプター（たとえば、タンパク質／ペプチド、脂質、他の糖、および天然物アグリコン－ポリケチドおよびマクロライド）に転移させるためにグリコシルトランスフェラーゼ（GTアーゼ）を用いて炭水化物含有化合物を効率よく作出する。以下のGTアーゼは、3つの異なるドナーを用いて多様なアクセプターをグリコシル化するが、なおも非常に類似の折り畳みを有する：GtfB－バンコマイシンアグリコンへのグルコース転移、BTGβ-グルコシルトランスフェラーゼ、およびMurG－細胞壁生合成におけるGlcNAc転移。

【００４２】

ほとんどのGTアーゼは、非常に基質選択的であるが、広く多様なグリコシルアクセプターをグリコシル化するために用いられる構造モチーフは比較的少数である（Hu Y and Walker S, 2002 Chem Biol, 9:1287-1296）。本発明は、変更された基質選択性を有するより強力な触媒を同定するために既存のGTアーゼの定向進化を提供する。より具体的に、本発明は、炭水化物に基づく癌ワクチンが含まれる、治療目的のための複合糖質の迅速かつ大規模な産生に関して化学合成と競合することができる変異体GTアーゼの同定を提供する。

【００４３】

操作されたGTアーゼは、本来のグリコシル化の触媒効率を改善することによって、または非天然の糖残基を組み入れることによって、生物学的に関連する複合糖質の合成に関して非常に大きい潜在性を有する（Hancock et al., 2006 Curr Opin Chem Biol, 10(5):509-519）。しかし、本明細書において記述される本発明の前では、主としてGTアーゼ活性に基づいて変異体をスクリーニングおよび選択するための方法がなかったことから、定向進化によってGTアーゼを工学操作することに対してほとんど努力が行われていなかった。最近の例には、シアリロトランスフェラーゼ（Lairson et al., 2006 Nat. Chem. Biol., 2(12):724-728）およびグルコトランスフェラーゼ（Williams et al., 2007 Nat. Chem. Biol., 3(10):657-662）の工学操作が含まれるが、これらの場合において用いられるスクリーニング法の一般性は不明である。第一の方法は、蛍光基質をコンピテントクローンによって摂取させて、それらをフローサイトメトリーによってソーティングすることを必要とし、第二の方法は、アグリコンアクセプターとして蛍光分子自身を用いる。本明細書において記述される本発明は、本来のまたは最小に変化させた基質を用いて多様な酵素のエクスビボスクリーニングを許容する一般的戦略を提供する。

【００４４】

M13ファージディスプレイは、細胞に基づく表現型を提供しない酵素の工学操作および

選択において表現型と遺伝子型とを連結させる簡便な戦略である（Hoess R, 2001 Chem Rev, 101 :3205-3218）。ファージディスプレイ酵素の進化において、酵素および基質は、産物の親和性捕捉によってライブラリのデコンボリューションを可能にするためにファージの表面上で近位に結合する。最近、セレノシステイン残基を用いてファージの表面上に基質を付着させるために化学的に単純な方法が開発された（Love et al., 2006 Chembiochem, 7(5):753-756）。その試験において、細菌GTアーゼMurGは、ファージにおいて活性型で発現されるが、MurGの進化の成功は、ファージ結合酵素がファージ結合基質を利用することができないことにより成功しなかった。本発明によって提供される新しい技術は、方法を真核生物酵素に拡大して、変異体GTアーゼのライブラリをスクリーニングする改善された方法を提供する。

【００４５】

本明細書において記述される方法の1つの長所は、アッセイされる酵素またはそれらの酵素の基質を、いかなるタイプの固相支持体にも、たとえば固体表面、別の細胞等に付着させる必要がない点である。その上、本発明の方法は、分泌された生体分子を有する溶液中で行われる。本発明は、細胞の集塊である微小コロニーではなくて個々の細胞から分泌された生体分子をスクリーニングする段階を提供する。加えて、活性なクローンを分泌する細胞は、ガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレーションによってデバイスから回収されて、さらなる選択のためにランダムに変異誘発されるか、またはコードされる酵素を同定するためにシークエンシングされる。

【００４６】

本発明によって記述される方法のもう1つの顕著な特徴は、各々のライブラリメンバーの多数の特徴がスクリーニングプロセスの際に査定される点である。ファージ、細菌細胞、または酵母上の表面ディスプレイ法とは異なり、酵素の代謝回転速度を、測定された蛍光強度の変化に基づいてマイクロリアクターにおいてリアルタイムでモニターすることができる。異なる蛍光体によって改変された2つの基質を用いる競合アッセイによって、スクリーニングの際に基質特異性または選択性を直接モニターすることができる。これらの測定は、既存の技術よりさらなる進化ラウンドに関して同定および選択されたクローンにおいて多様性のより大きい程度を提供する。

【００４７】

応用

生物触媒は、バルク化学物質、薬剤、および食品成分の合成にとって重要なツールである。しかし、おそらく酵素の安定性、触媒特性、すなわち代謝回転速度、および基質範囲の制限により、そのような応用の数および多様性は限られている。生物触媒のツールキットにアクセスできることは、産業界が現在の制限を克服するために役立ち、一段階酵素的変換から代謝経路の工学操作による多段階微生物合成まで多くの新規応用の実現を可能にする。

【００４８】

炭水化物含有天然物の生合成は、従来の手段によるその合成が冗長な保護基の操作およびグリコシルドナー／アクセプター適合性を調べることを必要とすることから、産業において特に重要である。悪性細胞の表面上で過剰発現される糖タンパク質または糖脂質構築物に由来する治療ワクチンは、癌免疫療法にとって有望なアプローチである。

【００４９】

新規マクロライド系抗生物質の合成

抗生物質抵抗性細菌感染症の発生率の増加は、腸球菌感染患者を処置するために改善された構築物が必要であることを示している。多くのマクロライドおよびポリケチド抗生物質が、細胞標的の認識に関与して、それによって活性にとって必須である炭水化物を含有する（Walsh C, 2003 Antibiotics: Actions, origins, resistance. 1st ed.; American Society for Microbiology Press: Washington, D.C.）。糖置換基におけるおよび糖置換基周囲でのバンコマイシンおよびテイコプラニンなどの既存の糖ペプチド抗生物質の改変によって、オリタバンシンが含まれる新規処置の臨床試験に至った（Dong et al., 200

2 J Am Chem Soc, 124:9064-9065）。多様な炭水化物が天然物アグリコン、タンパク質、および脂質に付着するための触媒としてGTアーゼを適合させることは、治療物質として試験するための新規材料を提供するであろう。本発明によって提供される方法は、広範囲の基質を効率的にグリコシル化することができる酵素を同定して、複合糖質の迅速かつ大規模産生に関して化学合成と競合することができる触媒の生成へと移行する。

【実施例】

【００５０】

実施例1. 改善された触媒活性または変更された基質特異性に関して変異体酵素のライブラリをスクリーニングするための新規技術の開発

以下の実験は、（1）関心対象酵素を分泌する酵母細胞のライブラリを空間的に分離するための技術の例証、および（2）技術の感度を決定するために不活性な変種からの活性なプロテアーゼを発現する細胞の濃縮からなる。簡単に説明すると、関心対象タンパク質を分泌することができる酵母細胞のライブラリを、各ウェルが平均して、1つのライブラリメンバーを含有するように、直径50ミクロンのマイクロウェルにローディングする。デバイスにおける各区画を酵素基質によって並行して調べる；酵素の代謝回転が成功すれば蛍光シグナルを生じる。技術の実現可能性は、プロテアーゼで証明されている。

【００５１】

ウェルの微小二次加工アレイは、多様な生物学的応用のために用いられている。マイクロウェルは、単分子レベルで酵素学を研究するために有用であることが証明されており、直径が50～100μmであるウェルは、表面上に捕捉された分泌された産物をスクリーニングするために細胞を分離するために用いられている（Rondelez et al., 2005 Nat Biotechnol, 23(3):361-365；Love et al., 2006 Nat Biotechnol, 24(6):703-707）。後者の種類のマイクロデバイスは、光学顕微鏡において1日にそのようなデバイス10個を用いて妥当な大きさのライブラリ（10^6個のメンバー）のスクリーニングを行うことができる、典型的な顕微鏡スライドガラス（1"×3"）の大きさであるフットプリント上でウェルおよそ100,000個を含有する。

【００５２】

発現宿主の選択

本発明は、細胞によって分泌される生体分子をスクリーニングする段階を提供する。1つの局面において、細胞は原核細胞である。または、細胞は真核細胞である。好ましくは真核細胞は酵母細胞である。例示的な酵母細胞には、ピキア・パストリスが含まれる。プラスミドコードタンパク質を分泌する酵母細胞は、本発明の方法による進化のために酵素を発現させるために用いられる。酵母などの真核細胞発現宿主は、それらが妥当なタンパク質フォールディング、分泌、および翻訳後改変にとって必要な機構を含有することから、ppGalNAcTアーゼが含まれる多様な酵素の進化に関して細菌発現に対して長所を提供する。酵母はまた、各々のウェルが直径50μmである、ウェルあたり細胞1個の比率でマイクロデバイスを用いる空間的分離にとって理想的な大きさ（直径およそ5～10μm）である。加えて、酵母は、急速に分裂して、おそらく数時間以内に1つの細胞に由来するライブラリメンバーの遺伝子タイピングを行うことができる。

【００５３】

酵母細胞がコードされた酵素を分泌できるか否かは、細胞周期によって変化する；酵母は出芽プロセスの際にタンパク質分泌効率が最もよい。1つの局面において、分泌の大きい変動、または酵母が特定の関心対象タンパク質を分泌できないことは、酵母の表面ディスプレイを用いて回避される。酵母表面ディスプレイは、多様な抗体の進化において有用であり、いくつかの活性な酵素が酵母の表面上にこれまで表示されてきた（Gai and Wittrup, 2007 Current Opinion in Structural Biology, 17(4):467-473）。

【００５４】

モデル酵素による技術のバリデーション

考案した酵素選択戦略の実現可能性を、最初にタバコエッチウイルス（TEV）からの3C-型システインプロテアーゼについて試験する（Malcolm B, 1995 Protein Sci, 4(8): 143

9-1445）。残基151位でのTEVにおける触媒システインがアラニンに変異すると、触媒的に不活性な変種が得られる（Phan et al., 2002 J Biol Chem, 277(52):50564-50572）。TEVプロテアーゼの本来のおよび変異体種に関する遺伝子を含有するベクターを様々な比率（1：10,000、1：1000、1：100、1：10）で混合して、これを用いて、触媒的に活性な種を濃縮するためのモデルライブラリを作製する。ベクター混合物によって形質転換された酵母細胞を、先に概説するようにウェルに分離する（図1）。アッセイの感度は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）基質の一部としてのTEVプロテアーゼに関する最適な認識部位（ENLYFQG；SEQ ID NO: 1）を用いて決定される（選択肢1；図3）（Malcolm 1995；Behlke et al., 2005, Fluorescence and fluorescence applications. Integrated DNA Technologies）。グルタミンとグリシン残基の間でのペプチドが切断されると、分子内FRET消光を破壊して、それによって蛍光シグナルが得られる。

【００５５】

触媒活性および基質特異性の進化

活性な触媒を発現するクローンの濃縮が成功した後、TEVプロテアーゼの定向進化に関するモデル実験を行う。触媒活性に基づいてスクリーニングできるか否かをさらに証明するために、不活性なC151A変異体をエラープローンPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を用いてランダムに変異誘発させて、触媒的にコンピテントな変種を回収する。活性はおそらく残基151位での変異の直接逆転の結果として回復する可能性があるが、代替の変異を有するコンピテント変種を同定することが起こりうる。酵素の反応速度に関してスクリーニングできることが予想されることから、野生型TEVプロテアーゼと比較して触媒活性が増加したクローンを同定することが可能である。最後に、非天然基質の切断に関して野生型のTEVプロテアーゼの変異誘発から構築された変種のライブラリを試験する（選択肢2（2、X＝Ala）、図3）。各選択ラウンドの後、活性なクローンを分泌する細胞を、ガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレーションによってデバイスから回収する。回収されたクローンは、さらなる選択のためにランダムに変異誘発されるか、またはコードされた酵素を同定するためにシークエンシングされる。

【００５６】

実施例2. 改善された触媒活性を有する変異体GTアーゼの進化

以下の実験は、増加した触媒効率および変更された基質特異性を有するppGalNAcTアーゼ変種の進化からなる。マイクロデバイスを用いて、改善された触媒効率を有するppGalNAcTアーゼ-T1の変異体に関してスクリーニングする。ppGalNAcTアーゼ-T1は、腫瘍関連炭水化物エピトープであるTn-抗原を形成するためのSer/Thr残基へのα-GalNAcの転移に責任を有する。このスクリーンにおいて同定された変異体は、Tn-抗原のインビトロ合成のために用いられる。

【００５７】

ネズミppGalNAcTアーゼ-T1の最近の結晶構造から、このタンパク質が折り畳まれて明確な触媒およびレクチンドメインを形成することが示されている（Fritz et al., 2004 Proc Natl Acad Sci, 101 (43): 15307-15312）。エラープローンPCRを用いて、触媒ドメイン内で変異誘発させたppGalNAcTアーゼ-T1のランダムライブラリを作製する。形質転換体のライブラリは、既に記述されるように空間的に分離されており、蛍光基質を用いてこれをスクリーニングする（図4）。

【００５８】

蛍光ppGalNAcTアーゼ基質のデザインおよび合成

TAMRA-改変ペプチドアクセプターと共にフルオレセイン改変UDP-糖ドナーによって、グリコシル化後に2つの蛍光体の間でのFRETにより580 nmで産物が検出される（Behlke 2005）。ppGalNAcTアーゼ-T1および他の保持型GTアーゼのUDP-糖結合ポケットに関する構造情報に基づいて、C-2でフルオレセインを有するUDP-GalNAc基質（3）を、UDP-GlcNAcに関して既に報告されているように合成する（Fritz 2004；Patenaude 2002；Helm et al., 2003 J Am Chem Soc, 125:11168-11169）。ppGalNAcTアーゼ-T1によるグリコシル化に関して最適な基質配列（

(GAGAFFPTPGPAGAGK;SEQ ID NO: 2)
）を含有するアクセプターペプチド4を、市販の試薬を用いてC末端TAMRAによって合成する（Gerken et al., 2006 J Biol Chem, 281(43):32403-32416）。

【００５９】

回収されたクローンにおける活性の確認

ライブラリの選択および増幅の適切なラウンド後（典型的には4～6回）、活性なクローンを分泌する細胞を、ガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレーションによってデバイスから回収した後、さらなる選択のためにランダムに変異誘発するか、またはコードされる酵素を同定するためにシークエンシングする。コードされる酵素を、本来の非改変UDP-GalNAcおよびペプチド基質によって試験して、インビトロでTn-抗原を最善に合成することができる酵素を同定する。可能なライブラリメンバーを用いて、その免疫学的特性に関するさらなる試験のために、および抗癌ワクチンの開発における潜在的使用のためにTn-抗原を大量に合成する。

【００６０】

分泌されたまたは表面に表示された酵素は、酵素機能をアッセイするために組み入れられるかさの高い蛍光体を含有する合成基質を利用することができなくてもよい。1つの局面において、各基質内の蛍光体、特に改変されたUDP-GalNAcの位置を、容認版が達成されるまで変化させる。または、アジド官能化UDP糖は、インビボでグリコシル化を調べるためにルーチンで使用される；アジド基は、さらなる誘導体化および基質検出のための有用な化学タグである（Campbell et al., 2007 Molecular Biosystems, 3(3):187-194）。別の局面において、ppGalNAcTアーゼアクセプターペプチドは、サンドイッチ型のアッセイにおいてカップリングされた産物をレクチンまたは抗体によって捕捉してその後検出することができるようにビオチンによって改変される。1つの局面において、ビオチンタグは、ビオチンの天然のキレート剤である、それに結合したアビジン（同様に、ストレプトアビジンまたはニュートラビジン）を有するカラムと共にアフィニティクロマトグラフィーにおいて用いられる。または、このタグは、西洋ワサビペルオキシダーゼまたは蛍光色素と同様に、抗ビオチン抗体またはアビジン／ストレプトアビジンタグ検出器によるタンパク質の検出において用いられる。

【００６１】

変更された基質選択性を有する変異体ppGalNAcTアーゼの進化

ppGalNAcTアーゼ-T1に近縁の保持型グリコシルトランスフェラーゼの構造試験により、酵素の特異的残基がUDP-糖ドナーにおける部分（C-3およびC-4）に接触すると、UDP-GlcNAcよりもUDP-GalNAcに対する特異性を増強することが示された（Patenaude et al., 2002 Nat Struct Biol, 9(9):685-690；Fritz et al., 2006 J Biol Chem, 281(13):8613-8619）。先に記述した変異誘発T1変種のライブラリをフルオレセイン改変UDP-GlcNAcドナーによってスクリーニングすると、この非天然基質を転移させることができるクローンを生じて、GTアーゼの活性部位特異性に関する理解を改善する。

【００６２】

他のムチン型複合糖質の合成に対する拡大

先に記述された合成は、基質としてインビトロ合成Tn-抗原を用いて、シアリルTn-抗原を作出するために（図2）、シアリルトランスフェラーゼST6GalNAc-1を変異誘発することによって拡大される。様々なムチン型コア構造をインビトロ合成するための酵素の開発によって、多様な疾患に関係しているこのクラスの複合糖質の生物学的試験が可能となる。

【００６３】

実施例3. マイクロウェルにおける酵素の代謝回転－トリプシン切断アッセイ

以下の実験は、無細胞マイクロウェル系における酵素活性の検出を証明する。トリプシン切断アッセイによってマイクロウェルにおける酵素の代謝回転を検出するための方法を図11にダイアグラムにする。トリプシンの増加濃度（0.05μg/ml、0.5μg/ml、および5μg/ml）をマイクロウェルにおいて10μg/ml FTC-カゼインと共に1時間インキュベートした。図12において示されるように、観察された蛍光シグナルの強度はマイクロウェルにおけ

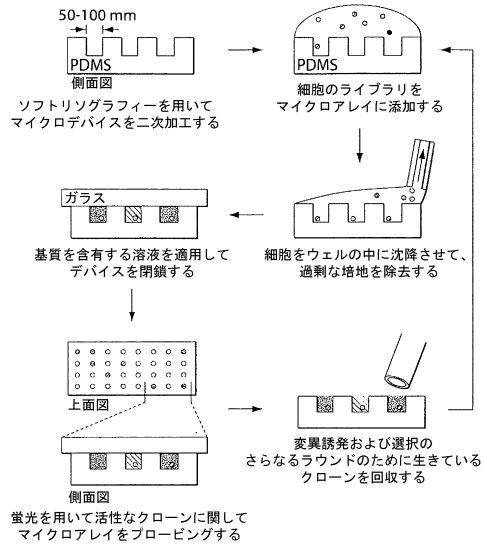
るトリプシンの濃度に依存した。異なる実験において、0.5μg/mlトリプシンをマイクロウェルにおいて10μg/ml FTC-カゼインと共にインキュベートして、顕微鏡写真を1時間および18時間で撮影した。図13において示されるように、観察された蛍光シグナルの強度は、インキュベーション時間に依存した。マイクロウェルは、マイクロウェルにおいて単離された酵素を調べるために既に用いられている。 JP2004309405A1；およびRondelez et al., 2005 Nat Biotechnol, 23(3):361-365を参照されたい。

【００６４】

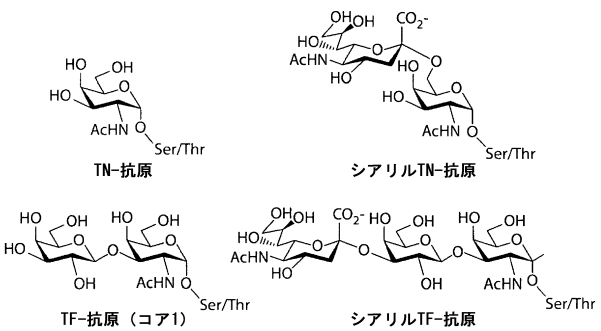
実施例4. マイクロウェルにおける分泌された酵素の代謝回転－HRV-3Cプロテアーゼアッセイ

以下の実験は、本発明のマイクロデバイス内で酵素、すなわち個々のピキア・パストリス（酵母）細胞によって分泌されたプロテアーゼが、FRETレポーター対を有するペプチド基質を切断して、それによって明るい蛍光シグナルを有する活性な酵素を含有する細胞が同定されることを証明する。具体的に、ピキア・パストリスは、ペプチド基質配列
(EDANS-A-L-E-V-L-F-Q/G-P-K-DABCYL; SEQ ID NO: 3)
を切断するヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ（HRV-3CP）を分泌するように遺伝子操作された。HRV-3CPアッセイによってマイクロウェルにおいて酵素の代謝回転を検出するための方法を図14においてダイアグラムにする。HRV-3CP酵素を分泌することができるピキア・パストリスをマイクロデバイスにローディングした。細胞を、マイクロデバイスにおいて、50 mM Tris、pH 7.0、150 mM NaCl、および1 mM EDTAを補充したYPDにおいて100μg/mlで供給されたFRETペプチド基質
(EDANS-A-L-E-V-L-F-Q/G-P-K-DABCYL; SEQ ID NO: 3)
の存在下で18時間インキュベートした。分泌された酵素は、基質の切断に成功して、蛍光シグナルが得られた。図15の左のパネルの矢印は、ウェルにおける細胞を指摘し、これは図15の右のパネルにおいて観察される明るい蛍光ウェルに対応する。

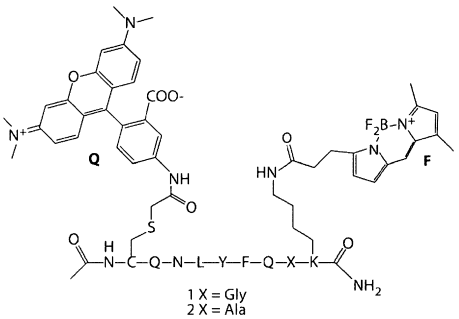
【図１】



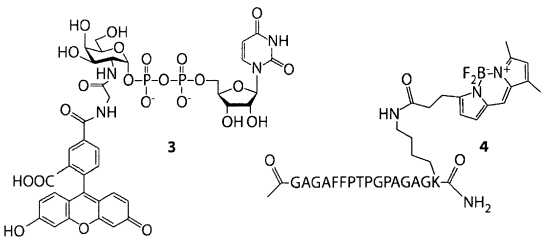
【図２】



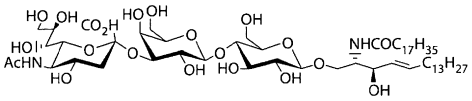
【図３】



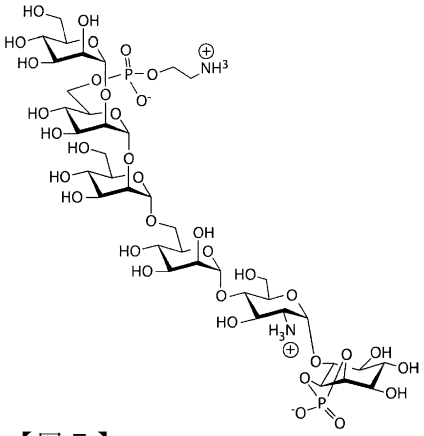
【図４】



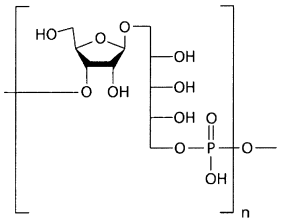
【図５Ａ】



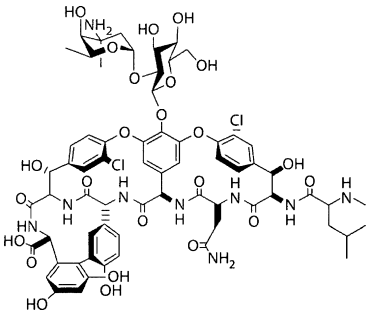
【図５Ｂ】



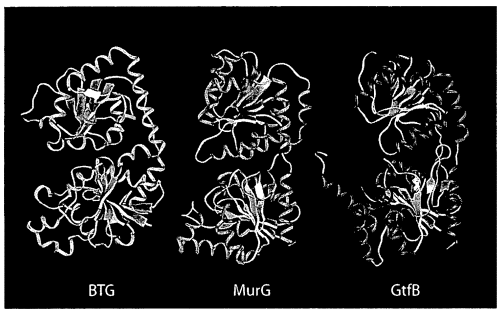
【図５Ｃ】



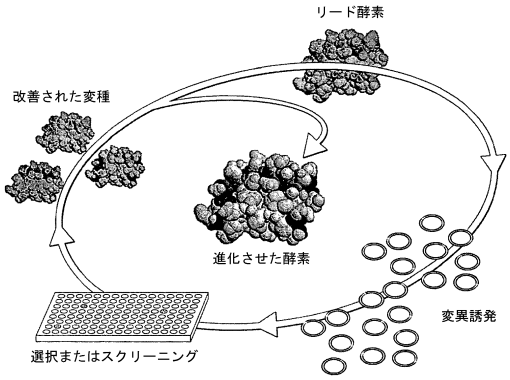
【図５Ｄ】



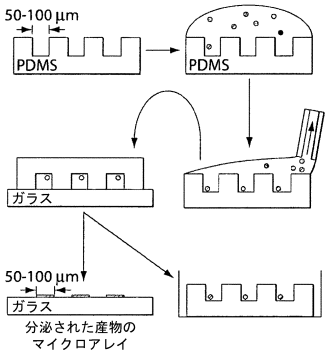
【図６】



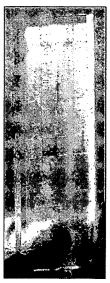
【図７】



【図８Ａ】



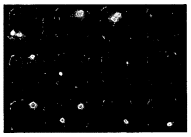
【図８Ｂ】



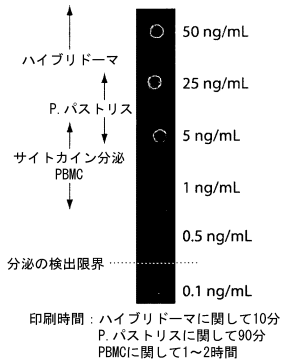
【図８Ｃ】



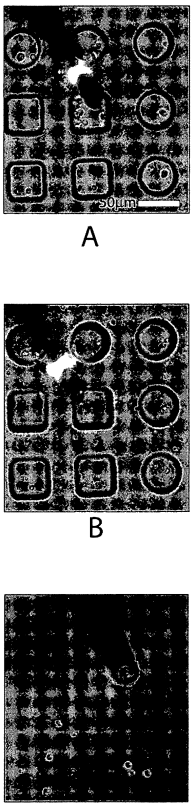
【図８Ｄ】



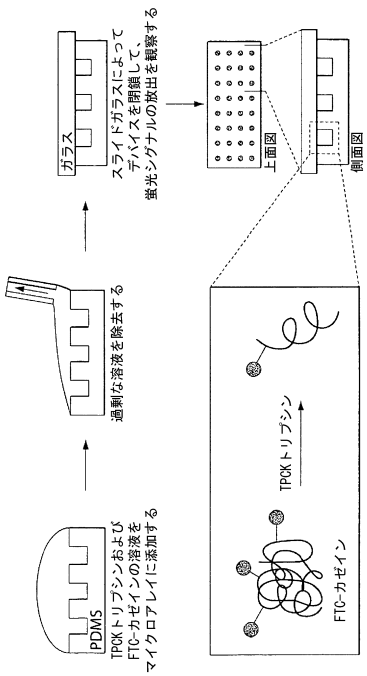
【図９】



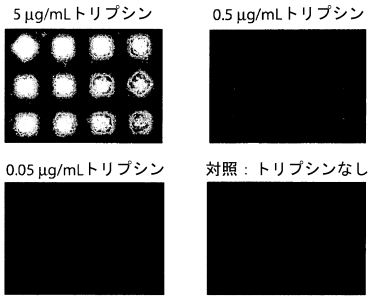
【図１０】



【図１１】

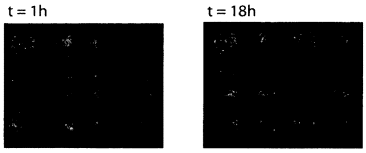


【図１２】



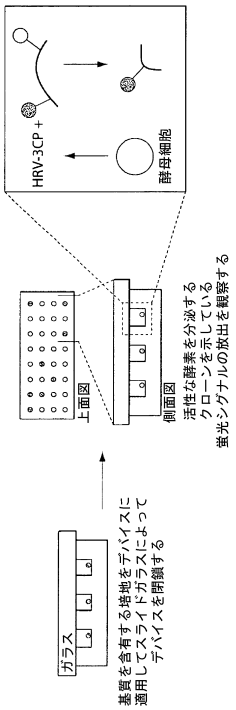
時間t＝1時間、10μg/ml FTC-カゼイン

【図１３】

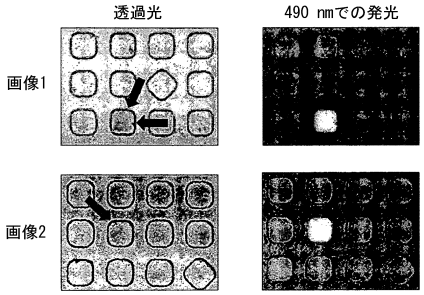


0.5μg/mlトリプシン；10μg/ml FTC-カゼイン

【図１４】



【図１５】



【配列表】

0005718221000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12M	*1/34*	*(2006.01)*	C12M	1/34	E
C07K	*7/06*	*(2006.01)*	C07K	7/06	
C07K	*7/08*	*(2006.01)*	C07K	7/08	

(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ラブ ジェイ. クリストファー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル サマー ストリート ２２７ ユニット ２
(72)発明者 ラブ ケリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル サマー ストリート ２２７ ユニット ２

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第２００７／０３５６３３（WO，Ａ１）
特開２００５－２５３４１２（ＪＰ，Ａ）
Journal of Bioscience and Bioengineering, ２００７年, Vol.104, No.3, p.241-243
Nature Biotechnology, ２００６年, Vol.24, No.6, p.703-707
Sensors and Actuators B, ２００６年, Vol.114, p.984-994
Nature Protocols, ２００８年 ２月, Vol.3, No.3, p.357-362
Bio Industry, ２００３年, Vol.20, No.7, p.60-67

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／００－１／７０
Ｃ１２Ｍ １／００－３／１０
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ