

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-505642

(P2009-505642A)

(43) 公表日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 5 4
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 B 0 2 4
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-526328 (P2008-526328)	(71) 出願人	305039998 コモンウェルス サイエントフィック アンド インダストリアル リサーチ オ ーガニゼーション オーストラリア国 2602 オーストラ リアン キャピタル テリトリー キャン プベル ライムストーン アヴェニュー
(86) (22) 出願日	平成18年8月18日 (2006. 8. 18)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月17日 (2008. 4. 17)	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(86) 国際出願番号	PCT/AU2006/001180	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02007/019634	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成19年2月22日 (2007. 2. 22)		
(31) 優先権主張番号	60/709, 473		
(32) 優先日	平成17年8月19日 (2005. 8. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アラクノカンパのルシフェラーゼ

(57) 【要約】

アラクノカンパ(双翅目)のゲノム内にある遺伝子によってコードされるルシフェラーゼペプチドのヌクレオチドおよびアミノ酸の配列を開示する。スペクトルのブルー部分内に発光スペクトルを有するルミネセンス反応を触媒する、機能上のATP依存性ルシフェラーゼを特に提供する。本発明は、単離されているペプチドおよび核酸分子;オルソログ、および酵素ペプチドの活性配列を同定する方法;ならびにルシフェラーゼペプチドのモジュレーターおよび基質を同定する方法を特に提供する。少なくとも2つのATP依存性ルシフェラーゼを利用するマルチレポーターアッセイを含む、アッセイの方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ルシフェラーゼ活性を示す単離されたペプチドであって、

- a. ルシフェラーゼ活性が、ATPに依存するルミネセンス反応の触媒を含み、
- b. ルミネセンス反応が、 $530 \pm 5\text{nm}$ 未満またはそれに等しい波長における最高発光強度で発光スペクトルを生成し、
- c. ペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列とアラインメントした場合に、配列番号4のアミノ酸配列と、R218の欠失、H245N、G315S、L342S、およびT343Sからなる群から選択されるアミノ酸配列における少なくとも1個の変更によって異なるアミノ酸配列を有する、ペプチド。

10

【請求項 2】

配列番号4のアミノ酸配列とアラインメントした場合に、A22Y、Y53A、L63T、E83D、F88Y、F89Y、P91I、A103C、Y109W、E113D、V139I、G160P、S198T、H212Q、R218の欠失、D224S、P225の欠失、G228D、P233K、P242Q、F243Y、H245N、L253M、Y255R、F273Y、Y280F、S298K、L300E、E311R、G315S、P318T、L319V、G339F、L342S、T343S、D375H、K380A、E389F、T408S、W417Y、L418V、D427N、L441I、I442V、K443M、Y444V、K445D、Q448A、A452T、L458I、V485L、V486T、G490R、V506L、R513K、V516C、T527A、およびK549を含めてそこからカルボキシ末端までの全ての残基の欠失からなる群から選択されるアミノ酸配列における少なくとも1個のさらなる変更によって配列番号4のアミノ酸配列とさらに異なるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離されたペプチド。

20

【請求項 3】

配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択される少なくとも10個の近接するアミノ酸のアミノ酸配列のフラグメントを含む、請求項1または請求項2に記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列の変異体のアミノ酸配列を含み、変異体が、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、もしくは配列番号9、またはその相補体からなる群から選択される配列を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、請求項1または請求項2に記載の単離されたペプチド。

30

【請求項 5】

配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離されたペプチド。

【請求項 6】

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも70パーセントの同一性を共有するアミノ酸配列を有する単離されたペプチド。

【請求項 7】

請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドに選択的に結合する抗体。

【請求項 8】

請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

40

【請求項 9】

請求項8に記載の核酸分子を含む遺伝子チップ。

【請求項 10】

請求項8に記載の核酸分子を含むトランスジェニック細胞。

【請求項 11】

請求項8に記載の核酸分子を含む核酸ベクター。

【請求項 12】

請求項11に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 13】

50

宿主細胞における対象の遺伝子またはその部分の発現をモニターする方法であって、(a)請求項8に記載の核酸分子を含み、対象のヌクレオチド配列または生成物をコードする核酸分子をさらに含むベクター構築物を宿主細胞中に導入するステップであって、請求項8に記載の核酸分子および対象の配列または生成物が同時発現されるステップと、(b)請求項8に記載の核酸分子の発現の存在を検出し、それによって対象の配列または生成物の発現をモニターするステップとを含む方法。

【請求項14】

アリコートサンプルにおいて少なくとも2つのレポーター酵素の活性を測定する方法であって、第1のレポーター酵素がルミネセンス反応を触媒することにより生成される光シグナルを測定することにより第1のレポーター酵素の活性に対してアッセイするステップと、少なくとも第2のレポーター酵素がルミネセンス反応を触媒することにより生成される光シグナルを測定することにより少なくとも第2のレポーター酵素の活性に対してアッセイするステップとを含み、少なくとも1つの第1または第2のレポーター酵素が、ATPに依存するルミネセンス反応の触媒を含むルシフェラーゼ活性を示し、 $530 \pm 5\text{nm}$ 未満またはそれに等しい波長で最大発光強度で発光スペクトルを生成する方法。

10

【請求項15】

少なくとも2つのレポーター酵素が両方ともATP依存性ルシフェラーゼである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

第1のレポーター酵素が請求項1に記載のペプチドを含む、請求項14に記載の方法。

20

【請求項17】

第1のレポーター酵素が請求項5に記載のペプチドを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

第2のレポーター酵素がルミネセンス反応を触媒し、ルミネセンス反応が 530nm を超える波長における最大発光強度で発光スペクトルを生成する、請求項14に記載の方法。

【請求項19】

同じアリコートサンプルに対してアッセイを行う、請求項14に記載の方法。

【請求項20】

アッセイが同時に進行する、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、概ねルシフェラーゼに関する。特に、本発明は、スペクトルの青色部分において最大強度で発光スペクトルを生成するATP依存性ルミネセンス反応を触媒するのに機能的であるルシフェラーゼ酵素のタンパク質およびペプチド、ならびにそのようなルシフェラーゼを利用するアッセイに関する。さらなる一態様では、本発明は、アラクノカンパ属(双翅目)の生物から単離したルシフェラーゼに関する。

【背景技術】

【0002】

分子事象を定性的または定量的にモニターするためのレポーター分子または標識の使用は、十分確立されている。これらは、医学的診断のための、産業環境における毒素および他の物質の検出のための、ならびに生物学、生物医学、および生化学における基礎、および応用研究のためのアッセイに見られる。このようなアッセイには、免疫アッセイ、核酸プローブハイブリダイゼーションアッセイ、およびレポーター酵素または他のタンパク質が特定のプロモーターの制御下で発現することにより生成されるアッセイが含まれる。レポーター分子、またはこのようなアッセイ系における標識には、放射性同位元素、蛍光物質、酵素、および化学ルミネセンス物質が含まれている。

40

【0003】

対象の事象をモニターまたは測定するために化学ルミネセンスを使用するアッセイ系には、生物発光の酵素であるルシフェラーゼの活性を測定するアッセイが含まれる。

50

【0004】

発光系は知られており、細菌、原虫、腔腸動物、軟体動物、魚類、ヤスデ、ハエ、真菌、蠕虫、甲殻類、ならびに甲虫、特にピロフォラス属のコメツキムシ、およびフォティヌス、フォツリス、およびルシオラ族のホタルを含む、多くのルミネセンスの生物体から単離されている。生物発光を表すさらなる生物体は、WO/2000/024878および1999/049019に列挙されている。また、生物発光の陸生の節足動物および昆虫の性質を列挙しているViviani, V.R.、(2002年)、Cell.Mol.Life Sci.、59巻、1833~1850頁を参照されたい。

【0005】

これらの生物体の多くでは、酵素は一酸素添加を触媒し、得られた遊離のエネルギーを利用して、分子を高エネルギー状態に励起する。励起された分子が自発的に基底状態に戻るときに、可視光が放出される。この放出された光は「生物発光」と呼ばれる。これ以降、これを単に「ルミネセンス」と呼ぶこともある。

10

【0006】

最初期の研究以来、甲虫のルシフェラーゼ(特に、一般の北アメリカホタル種のフォティヌス・ピラリスからのもの)が、生物発光を理解するための典型として貢献してきた。ルシフェラーゼの根本的な知識および応用は、典型的には、フォティヌス・ピラリスに由来する「ホタルのルシフェラーゼ」と呼ばれる単一の酵素をベースにしてきていた。しかし、世界中には、光を発する甲虫は、ざっと1800種類存在する。このように、フォティヌス・ピラリスのルシフェラーゼは、甲虫のルシフェラーゼの、大きな、かつ多様なグループの単なる一例である。全ての甲虫のルシフェラーゼは、同じ基質である、高エネルギー分子に変換されるポリヘテロ環有機酸(以降、別段の記載がなければ「ルシフェリン」と呼ぶ)の反応を触媒することが知られている。触媒された反応は、各々の場合で同一のメカニズムを伴う可能性がある。

20

【0007】

いわゆるホタルのルシフェラーゼを含む、甲虫のルシフェラーゼは、酵素の、アデニル酸形成性スーパーファミリーのメンバーである。甲虫のルシフェラーゼは、アシル-CoAリガーゼ、様々な他のCoAリガーゼ(例えば、4-クマロイル-CoAリガーゼ)、およびペプチド合成などの他のアデニル酸形成性酵素によって触媒される反応にいくつかの類似性を有する多段階の反応を触媒する。

【0008】

反応の第1段階は、D-ルシフェリンのカルボキシル炭素にアデニン-リン酸を付加して(アデニル化)、ルシフェリル-AMPを形成することである。ATPはAMPの供給源であり、他の反応生成物はピロリン酸塩である。このように、この反応は「ATP依存性」であり、または「ATPに依存している」。反応を前進させるために、おそらく、ピロリン酸塩の加水分解が用いられる。ルシフェリル-AMPは、酢酸およびリン酸の混酸の無水物である。これは比較的反応性である、というのは、アデニル基は、優れた脱離基であるからである。類似の酵素では、最初のステップは、それが酢酸塩でも、長鎖脂肪酸でも、4-クマロイルでも、またはアミノ酸でも、やはり基質分子上のカルボン酸塩のアデニル化である。

30

【0009】

CoA利用性酵素の場合には、アデニル化されたカルボン酸上のCoAスルフヒドリルの求核攻撃が一般的に存在し、結果としてCoAが基質に結合する。甲虫のルシフェラーゼの場合には、カルボニルにおける分子酸素の攻撃が存在し、高エネルギー性のジオキセタン中間体をもたらされ、これが引き続き、典型的にはスペクトルの緑色-黄色部分(550~570nm)内の光子プラス二酸化炭素を放出して崩壊する。

40

【0010】

ルシフェラーゼは、バイオセンシングのためのレポーター分子(レポーター系を用いて生物学系の性質を明らかにする)として特に有用であるという特徴を有している。バイオセンサー(生物学的な構成成分を含むセンサー)におけるシグナル伝達は、一般に2ステップのプロセス、すなわち生物学的な構成成分によるシグナル生成、ならびに電気的な構成成分によるシグナルの伝達および増幅を伴う。シグナル生成は、典型的には、結合または

50

触媒により実現される。

【0011】

これらの生化学的事象の電氣的シグナルへの変換は、典型的には、電気化学上または熱量上の検出方法に基づくものであり、これらの検出方法は、生化学反応の遊離エネルギーの変化によって制限される。殆どの反応では、これは2分子のATPに対する加水分解のエネルギー、すなわち約70kJ/moleより小さい。しかし、ルシフェラーゼにより励起されるルミネセンスは、はるかに高いエネルギー含量を保有している。ホタルのルシフェラーゼが触媒する反応から放出される光子(560nm)は、214kJ/アインシュタインを有する。ホタルのルシフェラーゼは、高い効率で、かつ非常なシグナル対ノイズの特性で、化学的エネルギーを光に変換する。D-ルシフェリンの1分子あたりの量子収量は、0.88である(Seliger およびMcElroy、1960年;SeligerおよびW.D、1960年)。したがって、この酵素は、非常に効率的な、化学的エネルギーのトランスデューサーである。

10

【0012】

しかし、知られているATP依存性ルシフェラーゼ、例えば甲虫のルシフェラーゼは、比較的狭い範囲内で発光スペクトルを放出する。530±5nm未満またはそれに等しい波長で最高発光強度を放出する甲虫のルシフェラーゼは知られていない(Viviani、2002年;Nakatsuら、2006年)。実際、知られているルシフェラーゼに対して構造的に修飾することにより発光スペクトルのエネルギーを低く(すなわち、より長い波長で最大発光強度に)することはできるが、発光スペクトルのエネルギーにおいて増大(すなわち、より短い波長に)することはできない。発光スペクトルを修飾するために現在考えられている構造的な修飾についてさらなる情報は、Nakatsuら(2006年)に見ることができる。

20

【0013】

ルシフェラーゼは、様々な供給源、および報告されているそのcDNAから直接単離されている。例えば、de Wetら、Molec.Cell.Biol、7巻、725~737頁(1987年);Masudaら、Gene、77巻、265~270頁(1989年);Nakatsuら(2006年);およびWoodら、Science、244巻、700~702頁(1989年)を参照されたい。検討中のルシフェラーゼをコードするcDNAで、当業者が、cDNAを発現するように形質転換された細菌(例えば、大腸菌)、酵母菌、培養中の哺乳動物細胞などから単離することによって大量のルシフェラーゼを調製するのは、全く単純明快である。あるいは、好適なプロモーター、および発現を制御するための他のシグナルの制御下で、そのような細胞において、プロモーターの活性を示すためのシグナルとしてルシフェラーゼ(および、最終的にはそれによって触媒される生物発光)を提供するために、cDNAを用いることができる。プロモーターの活性は、今度は、プロモーターの活性を誘発または阻止する物質の濃度など、モニターされるよう求められている別の因子を反映することができる。それらをコードする核酸からタンパク質を作成するために最近入手可能になっている様々な無細胞系も、やはりルシフェラーゼを作成するために用いることができる。

30

【0014】

ルシフェラーゼをコードするcDNAが容易に入手できることにより、転写および翻訳に関連する遺伝的事象のシグナルを送り、モニターし、または測定するために使用するアッセイにおいて、このようなcDNAの発現を合わせることによって、およびその結果として、そのような遺伝的事象に対する酵素を生成することによってルシフェラーゼをレポーターとして使用するのが可能になっている。

40

【0015】

例えば、ホタルのルシフェラーゼは、真核生物および原核生物において、プロモーターの活性を検出するのに広く使われている。ルシフェリンまたは他の基質、酸素、およびATPを含む、ルミネセンス反応に必要とされる基質は、入手可能であり、または生存細胞内で容易に入手可能になっている。

【0016】

マルチレポーターアッセイ

実験の正確さを向上するために、マルチの、デュアルの(またはダブルの)レポーターが

50

、通例、用いられている。「デュアルレポーター」の語は、単一系内での、2つの個々のレポーター酵素の同時の発現および測定を意味する。「マルチレポーター」の語は、単一系内での、2つまたはそれを超える個々のレポーター酵素の同時の発現および測定を意味する。一緒に用いる場合は、2つまたはそれを超える個々のレポーター酵素を、「コレポーター」と呼ぶことがある。マルチレポーターアッセイから現在、利益を得ている例には、2つの異なるレポーター遺伝子が同時に発現するように遺伝子操作されている個々の細胞または細胞の集団(例えば、培養物に分散されている細胞、分離された組織、または動物全体)が含まれる。最も頻繁には、ある遺伝子の活性が、特定の実験条件の影響をレポートし、一方で第2のレポーター遺伝子の活性が、それによって全セットの実験値が標準化され得る内部コントロールを提供する。実験上のレポーターの活性を、内部コントロールの活性に標準化することで、例えば、細胞の生存能または形質移入の効率における相違によりもたらされる実験上の変動性を最小にする。他の変動性のもととなるもの、例えば、ピペティング体積、細胞溶解の効率、およびアッセイ効率における相違は、効率的に排除され得る。このように、デュアルレポーターアッセイでは、外来性の影響を低減することにより、実験データのより信用できる解釈が可能になることが多い。

10

20

30

40

50

【0017】

デュアル酵素レポーター技術から恩恵を受けることがある、再構成された無細胞系は、実験上の、およびコントロールのレポーター酵素をコードする独立した遺伝材料の、同時の翻訳、または転写と翻訳の協調のために派生した細胞ライセートである。免疫アッセイは、同様に、単一サンプル内からの実験値およびコントロール値の両方のデュアルレポーター用デザインされ得る。

【0018】

現在、ホタルのルシフェラーゼ(luc)、レニラのルシフェラーゼ、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(lacZ)、 β -グルクロニダーゼ(GUS)、ならびに様々なホスファターゼ、例えば、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)、およびウテロフェリン(Uf; 酸ホスファターゼの1つ)をコードする遺伝子が複合され、遺伝子活性のコレポーターとして用いられている。以下の参照は、遺伝子活性のデュアルレポーターの目的で複合された形態で用いられる、これらの様々なレポーター遺伝子の代表例を提供するものである:lucおよびGUS:Leckie,F.ら、1994年;lucおよびCAT、ならびにlucおよびlacZ:Jain,V.K.およびMagrath,I.T.、1992年;CATおよびlacZ:Flanagan,W.M.ら、1991年。Promega Dual-Luciferase(商標)そのTechnical Manualに記載されている Reporter Assay system, the Dual-Glo(商標) Luciferase Assay System:製品E2920、E2940、およびE2980を使用するための指示書、改訂1/06, Part Number TM058;ならびにWood, K. V.、(1998年)The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays、Promega Notes 65、14頁、ならびにPromega pGL3 Luciferase Reporter Vectors (Promega Corporation、Madison、ウィスコンシン州から入手可能)ならびに米国特許第5,744,320号および第5,670,356号を参照されたい。

【0019】

あらゆるマルチレポーターアッセイの性能は、構成成分の酵素の化学の特徴およびコンパタビリティ(compatibility)、ならびに各々に対するそれぞれの結果に相関する能力によって制限される。非対応の酵素の必要性、またはアッセイ条件は、統合された、単一のアッセイ混合物または単一チューブのフォーマットにおいてコレポーターを使用しないことがあることを指図していることがある。理想的には、マルチレポーター系は、化学、温度、取扱いの要求、速さ、感度、検出機器の使用などの適合性の必要性のある、少なくとも2つの酵素アッセイを含む。

【0020】

マルチレポーター系の理想的な要求を満たすための試みでは、特に単一の遺伝子または種の様々なルシフェラーゼのクローンを、生物発光のレポーター系と一緒に利用することができる。しかし、混合物において各々のルシフェラーゼを区別する能力は、それらの発光スペクトルの幅によって制限されている。ルシフェラーゼからのルミネセンスの色にお

ける測定可能な変動が、レポーターとして2つまたはそれを超える様々なルシフェラーゼを利用する系に必要とされている。

【0021】

ルミネセンスの色の変動の一例は、カリブ海原産の大型のコメツキムシであるピロフォラス・ブラギオフタラマスに生じる。例えば、2003年9月4日発行の、米国特許出願第20030166905号を参照されたい。この甲虫には、前胸の背側の表面上に1対、腹部の腹側の割れ目に器官が1個、の2セットの発光器がある。4つの異なるルシフェラーゼのクローンが、腹側の器官から単離されており、LucPp1GR、LucPp1YG、LucPp1YE、およびLucPp1ORと命名されている。これらの酵素により触媒されるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は、緑色から橙色までの範囲の光を生成する。

10

【0022】

これら4つのルシフェラーゼによって触媒されるルシフェラーゼ-ルシフェリン反応からのスペクトルのデータは緑色(ピーク強度:546ナノメートル)、黄緑色(ピーク強度:560ナノメートル)、黄色(ピーク強度:578ナノメートル)、および橙色(ピーク強度:593ナノメートル)の光を放出する、殆ど等しい間隔の4つのオーバーラップするピークを示す。本明細書で用いられる、ピーク強度:546ナノメートルは、例えば、ルシフェラーゼが触媒するルミネセンス反応によって生成されるルミネセンスのスペクトルの最大発光が、546ナノメートルに、または約546ナノメートルに生じることを意味している。この文脈における「約」の語は、ピークまたは最大強度が生じる波長の測定における正確さの通常限界を意味する(ラムダマックスとしても知られる)。正確さの通常限界は、例えば、プラスまたはマイナス5ナノメートル(すなわち、 $\pm 5\text{nm}$)である。

20

【0023】

残念なことに、これらのルシフェラーゼが放出する光のピーク強度の波長は、殆ど50nmを超える範囲であるが、546nmおよび593nmにピークのあるものでも、スペクトル間に依然としてかなりのオーバーラップが存在する。使用したルミネセンス反応間のピーク強度の波長における相違を増大することは、このように、2つまたはそれを超えるルシフェラーゼを用いる系においてより大きな測定の正確さを得るのに大いに望ましい。特に、約530nm未満またはそれに等しい最大強度を生成するルミネセンス反応を触媒する新規なルシフェラーゼが、大いに望ましい。約530nmの、または約530nm未満のピーク強度は、スペクトルの青色部分内である。

30

【0024】

この必要性を満たすための試みの1つでは、ウミシイタケであるレニラ・レニフォルミス(*Renilla reniformis*)の青色放出性のルミネセンス系を、ホタルのルシフェラーゼとのデュアルレポーター系で活用している。ウミシイタケ(レニラ・レニフォルミスおよび近縁種)のルミネセンスは、青色スペクトルにあり、いくつかの応用では緑色-黄色のルミネセンスをしのぐ利点をもたらすものである。レニラの光反応の化学は、甲虫の光反応とは関連がなく、反応中間体は、甲虫のルシフェラーゼとは異なる経路によって産生される。特に、レニラのルシフェラーゼは、セレンテラジンのセレンテラミドへの酸化を触媒し、480nmで青色光を放出する。ジオキセタンの中間体が関与することがあるが、アデニル化は起こらない。レニラのルシフェラーゼは、甲虫のルシフェラーゼ、またはアデニル酸形成性の酵素とは、進化的に関連がない。例えば、米国特許第5,292,658号、および第5,418,155号を参照されたい。

40

【0025】

レニラのルシフェラーゼの利点および限界

レニラのルシフェラーゼ/セレンテラジン系の、遺伝子発現のレポーターとしての主な利点は、これは、甲虫のルシフェリンとは異なる基質を用いて、青色スペクトルにルミネセンスを示すことである。したがって、レニラのルシフェラーゼを、甲虫のルシフェラーゼ/ルシフェリンとの二重標識実験に用いてもよい。例えば、米国特許第5,744,320号を参照されたい。それにも関わらず、他の面では、レニラのルシフェラーゼは甲虫のルシフェラーゼに劣っている、というのは、セレンテラジン基質は、低レベルの非酵素性のルミネ

50

センスを表すからである。このレベルの内部ルミネセンスは、環境の疎水性に従って変化し、これら2つの現象とともにアッセイの絶対的な感度を著しく制限する。

【0026】

甲虫のルシフェラーゼは、この欠点に悩むことがない、というのは、おそらく、被酸化の基質(ルシフェリル-AMP)は、上記に記載したように、溶液では遊離で見られないが、合成されるものであり、一方ルシフェラーゼがかたく結合し、したがって酵素上でやはり酸化が生じて、非常に短命であるからである。

【0027】

レニラのルシフェラーゼのさらなる欠点は、反応がATPを利用しないので、ATP定量を伴う応用では、このルシフェラーゼを直接用いることができないことである。また、レニラのルシフェラーゼは、活性の、または消されていない甲虫のルシフェラーゼの存在下における、継続的なデュアル標識アッセイに適用できない。

【0028】

オルフェリア・フルトニ(*Orfelia fultoni*)

オルフェリア・フルトニは、北アメリカに見られる生物発光性のハエ(双翅目)である(Fulton, 1941年)。その一般的な生態学は、次の段落に記載するオーストララシアのハエのアラクノカンパ属と非常に類似している。Viviani、Hastingsら(Viviani、Hastingsら、2002年)によると、オルフェリアは、あらゆる他の昆虫由来のルミネセンスに対するよりも短い波長のラムダマックス=460nmで青色ルミネセンスを有する。興味深いことに、オルフェリアのルミネセンスはATP依存性ではなく、これは他の全ての昆虫のルミネセンスと区別される特徴であり、かつ、いくつかの穏やかな還元剤により刺激される。Viviani、Hastingsらは、オルフェリアのルシフェラーゼを、生化学的に部分的に特徴付けている(Viviani、Hastingsら、2002年)。

【0029】

アラクノカンパ(*Arachnocampa*)

東オーストラリア中に保護生息している青色発光性のツチボタルの存在は、何万年もの間オーストラリア原住民にはよく知られていたに違いない。ニュージーランドには、近縁種が大々的な密度で生じている。ツチボタルは、ケロプラチド(keroplastid)ハエの幼虫であり、その青色ルミネセンスを用いて粘着性のクモの巣中に獲物を引き込む。しかし、最初のヨーロッパの記載では、これらを、ヨーロッパのツチボタルであるランピリス・ナクティルカ(*Lampyris noctiluca*) (甲虫目、ホタル科)に関連する甲虫の幼虫であると、誤って同定した。オーストラレーシアのツチボタル(双翅目:ケロプラチダエ(*Keroplastidae*):アラクノカンピナエ(*Arachnocampinae*))の現在認められている種(Baker、2004年;Harrison、1966年;Pugsley、1983年)を、部分的に、表1に列挙する。

【0030】

【表1】

表1

名前 属(亜属)種(権威者)
アラクノカンパ(カンパラ)・リカルドサエ(Harrison)
アラクノカンパ(アラクノカンパ)・タスマニエンシス(Ferguson)
アラクノカンパ(カンパラ)・ギラウィーネンシス(Baker)
アラクノカンパ(カンパラ)・ギップスランデンシス(Baker)
アラクノカンパ(カンパラ)・オトウェイエンシス(Baker)
アラクノカンパ(カンパラ)・トロピクス(Baker)
アラクノカンパ(アラクノカンパ)・ブファロエンシス(Baker)
アラクノカンパ(カンパラ)・フラバ(Harrison)
アラクノカンパ(アラクノカンパ)・ルミノーサ(Skuse)

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

(Shimomura、Johnsonら、1966年)によると、アラクノカンパの発光スペクトルの最大は $487 \pm 5\text{nm}$ であり、アラクノカンパ・リカルドサエに対して(Lee、1976年)によって示されている訂正された発光スペクトルと緊密に一致している。Viviani、Hastingsら(2002年)は、アラクノカンパ・フラバについて最大発光 484nm を引用している。Lee(1976年)は、アラクノカンパのルシフェラーゼのルミネセンスは、ATPによって刺激され、 Mg^{++} を必要とすることも示した。発光の波長が短いということは、アラクノカンパのルシフェラーゼの基質は、甲虫のルシフェリンとは異なることを示唆しており(Wood、1983年)、実際、甲虫のD-ルシフェリンがアラクノカンパのルシフェラーゼを刺激することは未だ確認されていない(Lee、1976年;Wood、1983年;Viviani、Hastingsら、2002年)。

10

【 0 0 3 2 】

Wood(1983年)は、アラクノカンパの発光器の枯渇した冷抽出物におけるルミネセンスは、熱処理した抽出物を加えることにより再生することができることを示した。Viviani、Hastingsら(Viviani、Hastingsら、2002年)は、酸性の酢酸エチルを用いていくつかのアラクノカンパのルシフェリンを抽出することができ、TLCを用いて部分的な分離を行った。天然のアラクノカンパのルシフェリンに関して、構造上の情報は入手できない。Viviani、Hastingsら(2002年)によると、アラクノカンパのルシフェラーゼの分子量は、ゲルろ過により概算して、 36kDa 、すなわち、 62kDa であるホタルのルシフェラーゼの約半分の分子量である(Conti、Franksら、1996年)。

【 特許文献 1 】 WO/2000/024878

20

【 特許文献 2 】 WO/1999/049019

【 特許文献 3 】 米国特許第5,744,320号

【 特許文献 4 】 米国特許第5,670,356号

【 特許文献 5 】 米国特許出願第20030166905号

【 特許文献 6 】 米国特許第5,292,658号

【 特許文献 7 】 米国特許第5,418,155号

【 特許文献 8 】 米国特許第6,270,964号

【 特許文献 9 】 米国特許第6,324,345号

【 特許文献 10 】 米国特許第6,927,037号

【 特許文献 11 】 米国特許第6,690,461号

30

【 特許文献 12 】 米国特許第6,602,658号

【 特許文献 13 】 米国特許第6,602,657号

【 特許文献 14 】 米国特許第6,586,196号

【 特許文献 15 】 米国特許第6,503,723号

【 特許文献 16 】 米国特許第6,297,018号

【 特許文献 17 】 米国特許第6,171,809号

【 特許文献 18 】 米国特許第6,143,502号

【 特許文献 19 】 米国特許第6,068,979号

【 特許文献 20 】 WO/1999/066324

【 特許文献 21 】 米国特許第5,837,832号

40

【 特許文献 22 】 WO/1995/011995

【 特許文献 23 】 米国特許第5,807,522号

【 特許文献 24 】 米国特許第5,767,367号

【 特許文献 25 】 米国特許第5,750,870号

【 特許文献 26 】 米国特許第5,739,409号

【 特許文献 27 】 米国特許第5,689,049号

【 特許文献 28 】 米国特許第5,689,045号

【 特許文献 29 】 米国特許第5,674,731号

【 特許文献 30 】 米国特許第5,656,466号

【 特許文献 31 】 米国特許第5,633,155号

50

- 【特許文献 3 2】米国特許第5,629,470号
- 【特許文献 3 3】米国特許第5,595,896号
- 【特許文献 3 4】米国特許第5,576,198号
- 【特許文献 3 5】米国特許第5,538,879号
- 【特許文献 3 6】米国特許第5,484,956号
- 【非特許文献 1】Viviani, V.R.、(2002年)、Cell.Mol.Life Sci.、59巻、1833 ~ 1850頁
- 【非特許文献 2】de Wetら、Molec.Cell.Biol.、7巻、725 ~ 737頁(1987年)
- 【非特許文献 3】Masudaら、Gene、77巻、265 ~ 270頁(1989年)
- 【非特許文献 4】Woodら、Science、244巻、700 ~ 702頁(1989年)
- 【非特許文献 5】製品E2920、E2940、およびE2980を使用するための指示書、改訂1/06, Part Number TM058 10
- 【非特許文献 6】Wood, K. V.、(1998年)The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays、Promega Notes 65、14頁
- 【非特許文献 7】Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、1998年
- 【非特許文献 8】「Computational Molecular Biology」、Lesk, A. M.編集、Oxford University Press、New York、1988年
- 【非特許文献 9】「Biocomputing: Informatics and Genome Projects」Smith, D. W.編集、Academic Press、New York、1993年
- 【非特許文献 10】「Computer Analysis of Sequence Data, Part 1」Griffin, A. M.およびGriffin, H. G.編集、Humana Press、New Jersey、1994年 20
- 【非特許文献 11】「Sequence Analysis in Molecular Biology」、von Heinje, G.、Academic Press、1987年
- 【非特許文献 12】「Sequence Analysis Primer」Gribskov, M. およびDevereux, J.編集、M Stockton Press、New York、1991年
- 【非特許文献 13】Adachi, J.およびHasegawa, M.、1996年、Molphy Version 2.3.「Programs for molecular Phylogenetics based on maximum likelihood」Computer Science monographs、第28巻、A publication of the Institute of Statistical Mathematics、東京
- 【非特許文献 14】Felsenstein, J.、1989年、PHYLIP-Phylogeny Inference Package(バージョン3.2).Cladistics 5:164 ~ 166頁 30
- 【非特許文献 15】J.Mol.Biol.、48巻、444 ~ 453頁(1970年)
- 【非特許文献 16】Devereux, J.ら、Nucleic Acids Res.、12巻(1)、387頁(1984年)
- 【非特許文献 17】J.Mol.Biol.、215巻、403 ~ 10頁(1990年)
- 【非特許文献 18】Altschulら、Nucleic Acids Res.、25巻(17)、3389 ~ 3402頁、(1997年)
- 【非特許文献 19】Bowieら、Science、247巻、1306 ~ 1310頁(1990年)
- 【非特許文献 20】Cunninghamら、Science、244巻、1081 ~ 1085頁(1989年)
- 【非特許文献 21】Smithら、J.Mol.Biol.、224巻、899 ~ 904頁(1992年)
- 【非特許文献 22】de Vosら、Science、255巻、306 ~ 312頁(1992年)
- 【非特許文献 23】Contiら、Structure、4巻、287 ~ 298頁(1996年) 40
- 【非特許文献 24】「Proteins-Structure and Molecular Properties」、第2版、T.E.Crichton、W.H.Freeman and Company、New York(1993年)
- 【非特許文献 25】Wold, F.、Posttranslational Covalent Modification of Proteins、B.C.Johnson編集、Academic Press、New York、1 ~ 12巻(1983年)
- 【非特許文献 26】Seifterら、Meth.Enzymol.、182巻、626 ~ 646頁(1990年)
- 【非特許文献 27】Rattanら、Ann.N.Y.Acad.Sci.、663巻、48 ~ 62頁(1992年)
- 【非特許文献 28】「Molecular Cloning:A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Sambrook, J.、E.F.Fritsch、およびT.Manias編集、1989年
- 【非特許文献 29】「Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques」、Academic Press、Berger, S.L.およびA.R.Kimmel編集、1987年 50

- 【非特許文献30】 Songyangら、Cell、72巻、767～778頁(1993年)
- 【非特許文献31】 Lamら、Nature、354巻、82～84頁(1991年)
- 【非特許文献32】 Houghtonら、Nature、354巻、84～86頁(1991年)
- 【非特許文献33】 Harlow、「Antibodies」、Cold Spring Harbor Press(1989年)
- 【非特許文献34】 Krause, M. H.およびS. A. Aaronson、Methods in Enzymology、200巻、546～556頁(1991年)
- 【非特許文献35】 Lockhart, D. J. ら、1996年、Nat. Biotech.、14巻、1675～1680頁
- 【非特許文献36】 Schena, M. ら、1996年; Proc. Natl. Acad. Sci.、93巻、10614～10619頁
- 【非特許文献37】 Smithら、Gene、67巻、31～40巻(1988年)
- 【非特許文献38】 Amannら、Gene、69巻、301～315頁(1988年) 10
- 【非特許文献39】 Studierら、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology、185巻、60～89巻(1990年)
- 【非特許文献40】 Gottesman, S.、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology、185巻、Academic Press、San Diego、カリフォルニア州(1990年)119～128頁
- 【非特許文献41】 Wadaら、Nucleic Acids Res.、20巻、2111～2118頁(1992年)
- 【非特許文献42】 Baldariら、EMBO J.、6巻、229～234頁(1987年)
- 【非特許文献43】 Kujanら、Cell、30巻、933～943頁(1982年)
- 【非特許文献44】 Schultzら、Gene、54巻、113～123頁(1987年)
- 【非特許文献45】 Smithら、Mol. Cell Biol.、3巻、2156～2165頁(1983年)
- 【非特許文献46】 Lucklowら、Virology、170巻、31～39頁(1989年) 20
- 【非特許文献47】 Seed, B.、Nature、329巻、840頁(1987年)
- 【非特許文献48】 Kaufinanら、EMBO J.、187～195頁(1987年)
- 【非特許文献49】 Keownら(1990年)、Meth. Enzymol.、185巻、527～537頁
- 【非特許文献50】 Plant Biochemistry and Molecular Biology(Lea&Leegood編集、John Wiley&Sons)(1993年)、275～295頁
- 【非特許文献51】 Takaie, H.(1989年)、Breeding and display of the glow-worms, Arachnocampa spp.、Insectarium、第26巻、7月、216～219頁
- 【非特許文献52】 Takaie, H.(1997年)、「Ten years of the glow-worm (Arachnocampa richardsae) rearing at Tama Zoo -Fascination of a living milky way.」、Insectarium、34巻、11月、336～342頁 30
- 【非特許文献53】 Sakurai, Y.、R. Komatani、K. Tabata、およびH. Takaie、「On the glow-worm breeding at Tama Zoo.」
- 【非特許文献54】 Australian National Genomic Information Service(<http://www.angis.org.au>)
- 【発明の開示】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0033】
- 一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたペプチドを提供する。さらなる態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列の変異体のアミノ酸配列を含む単離されたペプチドを提供し、変異体は、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9、またはそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。 40
- 【0034】
- さらなる一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列のオルソログのアミノ酸配列を含む単離されたペプチドを提供し、オルソログは、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9、またはそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。 50

【0035】

またさらなる一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択される少なくとも10個の近接するアミノ酸のアミノ酸配列のフラグメントを含むアミノ酸配列を含む単離されたペプチドを提供する。特定の実施形態では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも70、80、または90パーセントの同一性を共有するアミノ酸配列を有する単離されたペプチドを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本発明の単離されたペプチドの分子量は、36キロダルトン(kD)を超える。これらのペプチドは、「本発明のペプチド」と呼ばれることがある。

【0036】

特に好ましい実施形態では、本発明は、 $530 \pm 5\text{nm}$ 未満またはそれに等しい波長で最大発光を表すスペクトルとのルミネセンス反応の触媒を担う、本発明のペプチドの酵素的に活性な部分を提供する。特に好ましい実施形態では、ルミネセンス反応はATP依存性である。

【0037】

本明細書に記載するように、 $\pm 5\text{nm}$ は、それによってそのような波長を特定することができる典型的な正確さを反映するものである。特に、好ましい実施形態のルミネセンス反応は、 $520 \pm 5\text{nm}$ 、 $510 \pm 5\text{nm}$ 、 $500 \pm 5\text{nm}$ 、または $490 \pm 5\text{nm}$ 未満の、またはそれに等しい波長で、最大発光強度で発光スペクトルを生成する。このようなルシフェラーゼ活性を示すこれらのペプチドは、「活性のルシフェラーゼ」または「ルシフェラーゼ活性を示す本発明のペプチド」、「機能的なルシフェラーゼ」、または本発明の「GWルシフェラーゼ」と呼ばれることがある。

【0038】

好ましい実施形態では、本発明は、ルシフェラーゼ活性を示す単離されたペプチドを提供し、ルシフェラーゼ活性は、ATP依存性ルミネセンス反応の触媒を含み、ルミネセンス反応は $530 \pm 5\text{nm}$ 未満またはそれに等しい波長で最大発光強度で発光スペクトルを生成する。一実施形態では、ペプチドは、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択される配列のアミノ酸の200から350に少なくとも70%の同一性を有する近接したアミノ酸配列を含む。

【0039】

さらなる特定の実施形態では、本発明は、ルシフェラーゼ活性を示す単離されたペプチドを提供し、ルシフェラーゼ活性は、ATP依存性ルミネセンス反応の触媒を含み、ルミネセンス反応は、 530nm 未満またはそれに等しい波長で最大発光強度で発光スペクトルを生成し、単離されたペプチドは、フォティヌスのルシフェラーゼ、例えば配列番号4とアラインメントした場合に、配列番号4のアミノ酸配列とR218の欠失、H245N、G315S、L342S、およびT343Sからなる群から選択されるアミノ酸配列における少なくとも1個の変更が異なるアミノ酸配列を有する。またさらなる実施形態では、このようなペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列とアラインメントした場合に、A22Y、Y53A、L63T、E83D、F88Y、F89Y、P91I、A103C、Y109W、E113D、V139I、G160P、S198T、H212Q、R218の欠失、D224S、P225の欠失、G228D、P233K、P242Q、F243Y、H245N、L253M、Y255R、F273Y、Y280F、S298K、L300E、E311R、G315S、P318T、L319V、G339F、L342S、T343S、D375H、K380A、E389F、T408S、W417Y、L418V、D427N、L441I、I442V、K443M、Y444V、K445D、Q448A、A452T、L458I、V485L、V486T、G490R、V506L、R513K、V516C、T527A、およびK549を含めてそこからカルボキシ末端までの全ての残基の欠失からなる群から選択されるアミノ酸配列における少なくとも1個の変更が配列番号4のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有する。本発明のペプチドは、配列番号4の配列に基づくが、上記に列挙し、または表5および以下の詳しい記載に列挙したアミノ酸配列の1つまたは複数の変更を組み入れたものを含む。

【0040】

さらに、好ましい実施形態では、ルシフェラーゼ活性を示す本発明の単離されたペプチドは、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択される

10

20

30

40

50

アミノ酸配列と少なくとも70パーセントの同一性を共有するアミノ酸配列を有する。

【0041】

特定の実施形態では、活性のルシフェラーゼペプチドは、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらなる態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列の変異体のアミノ酸配列を含む活性のルシフェラーゼペプチドを提供し、変異体は、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9、またはそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。

【0042】

さらなる一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列のオルソログのアミノ酸配列を含む、活性なルシフェラーゼペプチドを提供し、オルソログは、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9、またはそれらの相補体からなる群から選択される配列を有する核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。

【0043】

またさらなる一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択される少なくとも10個の近接するアミノ酸のアミノ酸配列のフラグメントを含むアミノ酸配列を含む、活性なルシフェラーゼペプチドを提供する。特定の実施形態では、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも70、80、または90パーセントの同一性を共有するアミノ酸配列を有する活性なルシフェラーゼペプチドを含む。いくつかの好ましい実施形態では、ルシフェラーゼ活性を示す本発明の活性なペプチドの分子量は、36キロダルトン(kD)を超える。

【0044】

本発明のさらなる態様には、本発明のペプチドに選択的に結合する抗体が含まれる。好ましい実施形態では、このような抗体は、(a)配列番号2で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号2で示されるアミノ酸配列の変異体のアミノ酸配列であって、変異体は、厳密な条件下で、配列番号1で示される核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列、(c)配列番号2で示されるアミノ酸配列のオルソログのアミノ酸配列であって、オルソログは、厳密な条件下で、配列番号1で示される核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列、(d)配列番号2で示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、フラグメントは少なくとも10個の近接するアミノ酸を含むフラグメントからなる群から選択される本発明のペプチドの存在の検出に使用が見出される。

【0045】

本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子をさらに包含する。本発明は、同様に、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列の変異体をコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9、またはそれらの相補体からなる群から選択される核酸分子とハイブリダイズする。さらに、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列のオルソログをコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、厳密な条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9、またはそれらの相補体からなる群から選択される核酸分子とハイブリダイズする。またさらに、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、および配列番号10、およびヌクレオチド配列の相補体であるヌクレオチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の少なくとも10個の近接するアミノ酸のフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0046】

本発明の範囲内に記載する核酸分子を、「本発明の核酸分子」と呼ぶことがある。本発明は、本発明の核酸分子の相補体であるヌクレオチド配列を含む。

【0047】

様々な他の実施形態では、本発明は、遺伝子チップ、トランスジェニック細胞、核酸ベクター、または宿主細胞内に含まれる本発明の核酸分子をさらに含む。

【0048】

本発明の方法は、サンプルにおいて本発明の核酸分子の存在を検出する方法を含む。したがって、特定の実施形態では、この方法は、厳密な条件下で本発明の核酸分子とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドとサンプルを接触させるステップと、オリゴヌクレオチドがサンプルにおける核酸分子と結合したか否かを決定するステップとを含む。

10

【0049】

本発明のさらなる方法は、例えば、宿主細胞中における対象の遺伝子またはその部分の発現をモニターする方法を含み、この方法は、(a)本発明の核酸分子を含み、対象のヌクレオチド配列または生成物をコードする核酸分子をさらに含むベクター構築物を宿主細胞中に導入するステップであって、本発明の核酸分子および対象の配列または生成物が同時発現されるステップと、(b)本発明の核酸分子の発現の存在を検出し、それによって対象の配列または生成物の発現をモニターするステップとを含む。

【0050】

本発明の特定の方法では、本発明の核酸分子は、ルシフェラーゼ活性を示すペプチドをコードする。したがって、本発明の好ましい方法では、本発明の核酸分子の発現の存在の検出は、ルシフェラーゼ活性に対するアッセイを含む。特に好ましい方法では、ルシフェラーゼ活性は、ATPに依存するルミネセンス反応の触媒を含み、ルミネセンス反応は、 $530 \pm 5\text{nm}$ 未満またはそれに等しい波長で最大発光強度で発光スペクトルを生成する。

20

【0051】

本発明の範囲内のさらなる実施形態では、発現ベクターは、プロモーターと作動可能に連結している本発明のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、プロモーターは、植物細胞、細菌細胞、動物細胞、および昆虫細胞からなる群から選択される細胞において機能的である。またさらなる実施形態では、ベクターは、対象のさらなる配列または生成物をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。さらなる配列または対象の生成物は、核酸、タンパク質、活性のルシフェラーゼ、またはそれらの酵素的に活性な部分であってよい。もちろん、さらなる実施形態では、本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞を含む。宿主細胞は、あらゆる適切な細胞であってよい。特定の実施形態では、宿主細胞は、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞、動物細胞、および細菌細胞からなる群から選択される。

30

【0052】

またさらなる態様では、本発明の方法は、宿主細胞に対象の核酸またはその部分を、形質転換または形質移入する方法を含み、この方法は、(a)ルシフェラーゼ活性を示すペプチドをコードする本発明の核酸分子を含み、ベクター構築物を宿主細胞中に導入するステップであって、ルシフェラーゼ活性を示すペプチドが発現されるステップと、(b)ルシフェラーゼ活性を検出し、それによって宿主細胞が形質転換され、または形質移入されたことを確立するステップとを含む。

40

【0053】

さらなる実施形態では、本発明の方法は、宿主細胞における制御エレメントの活性をモニターする方法を含み、この方法は、(a)本発明の核酸分子を含み、制御エレメントと作動可能に連結しているベクター構築物を宿主細胞中に導入するステップと、(b)ルシフェラーゼの存在を検出し、それによって制御エレメントの活性をモニターするステップとを含む。本実施形態における制御エレメントは、プロモーターまたはエンハンサーであってよい。本発明の核酸分子は、ルシフェラーゼ活性を示すペプチドをコードすることができる。ペプチドがルシフェラーゼ活性を示すこれらの実施形態では、ルシフェラーゼの存在の検出は、ルシフェラーゼ活性に対するアッセイによることができる。

50

【0054】

本発明のさらなる方法は、機能的なルシフェラーゼの推定上の基質として化合物を同定する方法を含み、この方法は、(a)本発明の核酸分子によってコードされる機能的なルシフェラーゼを、機能的なルシフェラーゼ活性に適する条件下で、少なくとも1つの候補化合物と接触させるステップと、(b)少なくとも1つの候補化合物が機能的なルシフェラーゼの推定上の基質であることをルシフェラーゼ活性の検出が示す、ルシフェラーゼ活性に対してアッセイするステップとを含む。本発明の方法を操作することにより同定される新規な化合物は、本発明の範囲内に特に含まれる。

【0055】

本発明の特に好ましい方法は、アリコートサンプルにおいて少なくとも2つのレポーター酵素の活性を測定する方法を含み、この方法は、第1のレポーター酵素がルミネセンス反応を触媒することにより生成される光シグナルを測定することにより第1のレポーター酵素の活性に対してアッセイするステップと、少なくとも第2のレポーター酵素がルミネセンス反応を触媒することにより生成される光シグナルを測定することにより少なくとも第2のレポーター酵素の活性に対してアッセイするステップとを含む。この方法は、アッセイが同じアリコートサンプルに対して行われる方法を含む。このような実施形態では、アッセイは任意の順番、グループ分け、または望ましいもしくは従来の時間順序で進行してよい。特定の実施形態では、アッセイは同時に進行する。さらなる、特定の実施形態では、少なくとも1つのアッセイを行った後に少なくとも第2のアッセイを行い、または少なくとも1つのアッセイを行って、引き続き他のアッセイ全てを行い、またはアッセイを逐次行う。特定の実施形態では、第1のレポーター酵素は、本発明の活性なルシフェラーゼを含む。もちろん、特に好ましい実施形態では、少なくとも1つのレポーター酵素は、ルシフェラーゼ活性を示すペプチドであり、この場合ルシフェラーゼ活性は、ATP依存性ルミネセンス反応の触媒を含み、ルミネセンス反応は、 $530 \pm 5\text{nm}$ 未満またはそれに等しい波長で最大発光強度で発光スペクトルを生成する。

【0056】

またさらなる実施形態では、少なくとも2つのレポーター酵素は、ATP依存性ルシフェラーゼである。特に好ましい実施形態では、第1のレポーター酵素はアラクノカンパのルシフェラーゼであり、第2のレポーター酵素は異なるルシフェラーゼである。「異なるルシフェラーゼ」は、ATP依存性であっても、またはなくても、あらゆる他のルシフェラーゼを意味する。特に好ましい異なるルシフェラーゼには、ホタルの、コメツキムシの、または鉄道虫のルシフェラーゼが含まれる。さらなる好ましいルシフェラーゼは、 530nm を超える波長で最大発光強度で発光スペクトルを生成するルミネセンス反応を触媒する。

【0057】

本発明の、他の目的、特徴、および利点が、以下の詳しい記載から明らかになるであろう。しかし、本発明の精神および範囲内での様々な変更、および修正形態は、この詳しい記載から当業者には明らかになるので、詳しい記載および特定の実施例は、本発明の特定の実施形態を示す一方で、説明のみの目的によって与えられるものであることを理解されたい。

【0058】

以下の図は、本明細書の部分を構成し、本発明のある態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、1つまたは複数のこれらの図面を、本明細書に提示する本発明の詳しい記載と組み合わせて参照することによって、よりよく理解されると思われる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0059】

以下の、特定の実施形態および実施例の詳しい記載は、説明によって提供されるものであり、限定によって提供されるものではない。禁忌または別段の記載がない限り、これらの記載において、かつ本明細書全般にわたり、「1つの(a)」および「1つの(an)」の語は、1つまたは複数の意味する。同様に「または」の語は、「および/または」を意味する。

【0060】

「含む」は、それだけには限定されないが、「含む」の語の後に続くものが何でも、含むことを意味する。したがって、「含む」の語の使用は、要素の列挙が必要とされており、または必須であるが、他の要素は任意選択であり、存在してもよく、またはしなくてもよいことを示す。「からなる」は、「からなる」の句の後に続くものは何でも、それを含み、それに限定されることを意味する。したがって、「からなる」の句は、要素の列挙が必要とされており、または必須であり、かつ、他の要素が存在しないことがあることを示す。「から本質的になる」は、句の後に列挙されるあらゆる要素を含むことを意味し、要素の列挙に対する公開に特定される活動または行動を妨害せず、またはそれに貢献しない他の要素に限定される。したがって、「から本質的になる」の句は、列挙された要素が必要とされており、または必須であるが、他の要素は、それらが列挙された要素の活性または作用に影響を及ぼすか、または及ぼさないかに応じて、任意選択であり、存在してもよく、または存在しなくてもよいことを示す。

10

【0061】

ある範囲の値が提供される場合、文脈によってその他の方法が明らかに指図されなければ、下限の単位の10分の1までの、各々の間の値、その範囲の上限と下限の間、およびその述べられた範囲におけるあらゆる他の提示された値または間の値が、本発明の範囲内に包含されることが理解される。これらの、より小さい範囲の上限および下限も、より小さい範囲に独立して含まれることがあり、本発明の範囲内にやはり包含され、一定の範囲における任意の特に除外される限界に左右される。

20

【0062】

ペプチド分子

本発明は、タンパク質のルシフェラーゼ酵素のファミリーのメンバーであるとして同定されているペプチド分子をコードするヌクレオチド配列を提供する。提供されるペプチド配列、および本明細書に記載する明らかな変異体は、本明細書で同定する特に同属性の変異体であり、本明細書に提供する情報を用いて、本発明の酵素、酵素ペプチド、ペプチド、またはタンパク質と呼ばれる。

【0063】

本発明は、一態様では、図1、2、4、5、10、12、14、または配列番号1、3、11、13、および15に示した核酸分子、ならびに作成および使用するために技術範囲内にある明らかなこれらの変異体全てによってコードされる、図2、3、5、11、13、15、または配列番号2、6、8、および10に開示した酵素ペプチドのアミノ酸配列からなり、または本質的になり、または含む。これら変異体のいくつかを、以下に詳しく記載する。

30

【0064】

本明細書で用いるように、ペプチドに、細胞物質が実質的になく、または化学的前駆体もしくは他の化学物質がない場合に、ペプチドは「単離」または「精製」されているという。本発明のペプチドは、均一性、または他の度合いの純度まで精製されていてよい。精製のレベルは、意図された使用に基づく。(単離された核酸分子の特徴を、以下に論じる)。

【0065】

いくつかの使用において「細胞物質が実質的でない」は、約30%未満(乾燥重量で)の他のタンパク質(すなわち、汚染性のタンパク質)、約20%未満の他のタンパク質、約10%未満の他のタンパク質、または約5%未満の他のタンパク質を有するペプチドの調製物を含んでいる。ペプチドが組換えで生成される場合は、培地が実質的になくてもよく、すなわち、培地がタンパク質調製物の体積の約20%未満を表す。

40

【0066】

「化学的前駆体または他の化学物質がない」という言葉は、その合成に關与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されているペプチドの調製物を含む。一実施形態では、「化学的前駆体または他の化学物質が実質的でない」という言葉は、約30%未満(乾燥重量で)の化学的前駆体もしくは他の化学物質、約20%未満の化学的前駆体もしくは他の化学物質、約10%未満の化学的前駆体もしくは他の化学物質、または約5%未満の化学的前駆体

50

もしくは他の化学物質を有する酵素ペプチドの調製物を含む。

【0067】

単離された酵素ペプチドは、天然にそれを発現する細胞から精製され、それを発現するように改変された細胞(組換え)から精製され、または知られているタンパク質合成法を用いて合成される。例えば、酵素ペプチドをコードする核酸分子を、発現ベクター中にクローニングし、発現ベクターを宿主細胞中に導入し、タンパク質が宿主細胞で発現される。次いで、タンパク質を、好適な精製スキームによって、標準のタンパク質精製技術を用いて、細胞から単離することができる。これらの技術の多くを、以下に詳しく記載する。

【0068】

一態様では、本発明は、提供されるアミノ酸配列からなるタンパク質を提供する。アミノ酸配列がタンパク質の最終のアミノ酸配列である場合に、タンパク質はアミノ酸配列からなる。

10

【0069】

さらなる一態様では、本発明は、提供されるアミノ酸配列から本質的になるタンパク質をさらに提供する。このようなアミノ酸配列が、ほんの少数のさらなるアミノ酸残基、例えば、約1個から約100個くらいのさらなる残基、典型的には最終のタンパク質における1個から約20個のさらなる残基とともに存在する場合に、タンパク質はアミノ酸配列から本質的になる。

【0070】

またさらなる一態様では、本発明は、提供されるアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。アミノ酸配列が、タンパク質の最終のアミノ酸配列の少なくとも部分である場合に、タンパク質はアミノ酸配列からなる。このような様式では、タンパク質は、単なるペプチドであってよく、またはそれと天然に関連するアミノ酸残基(近接するコードされた配列)、または異種性のアミノ酸残基もしくはペプチド配列などの、さらなるアミノ酸分子を有してもよい。このようなタンパク質は、少数のさらなるアミノ酸残基を有してもよく、または数百個またはそれを超えるさらなるアミノ酸を含んでもよい。様々なタイプのこれらのタンパク質を作成しまたは単離することができる方法の簡潔な記載を、以下に提供する。

20

【0071】

本発明の酵素ペプチドを、異種性の配列に付着させて、キメラまたは融合のタンパク質を形成してもよい。このようなキメラおよび融合のタンパク質は、酵素ペプチドに実質的に相同ではないアミノ酸配列を有する異種性のタンパク質に作動可能に連結している酵素ペプチドを含むことができる。「作動可能に連結している」は、酵素ペプチドおよび異種性のタンパク質が、各々の作動可能性が破壊されないように融合していることを示す。異種性のタンパク質は、酵素ペプチドのN末端またはC末端に融合してよい。

30

【0072】

いくつかの使用では、融合タンパク質は、酵素ペプチドそれ自体の活性には影響を及ぼさない。例えば、融合タンパク質には、それだけには限定されないが、酵素的な融合タンパク質、例えば、 α -ガラクトシダーゼ融合物、酵母菌2-ハイブリッドGAL融合物、ポリHis融合物、MYC-タグ付けした、HIタグ付けした、およびIgの融合物が含まれ得る。このような融合タンパク質、特にポリHis融合は、組換えの酵素ペプチドの精製を促進することがある。ある種の宿主細胞(例えば、哺乳動物の宿主細胞)では、異種性のシグナル配列を用いることにより、タンパク質の発現または分泌が増大することがある。

40

【0073】

いくつかの使用では、融合タンパク質は、タンパク質相補性アッセイ、すなわちPCAの成分であってよく、この場合、活性の酵素は2つのドメインに分割され、オリジナルの酵素の活性が回復するように第3の分子に誘引されることによって、一緒にされた相互作用的なドメインに各々が融合または付着している。例えば、米国特許第6,270,964号、および第6,342,345号を参照されたい。

【0074】

50

キメラまたは融合のタンパク質は、標準の組換えDNA技術によって生成することができる。例えば、様々なタンパク質配列をコードするDNAフラグメントを、従来技術に従ってインフレイムでライゲートする。別の一実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成装置を含む従来の技術により合成することができる。あるいは、引き続きアニールし、再増幅してキメラの遺伝子配列を産生することができる2つの連続した遺伝子フラグメント間に、相補的なオーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて、PCR増幅または遺伝子フラグメントのライゲーションを行うことができる(Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、1998年を参照されたい)。さらに、融合部分をすでにコードしている多くの発現ベクターが市販されている(例えば、GSTタンパク質)。核酸をコードする酵素ペプチドを、融合部分が酵素ペプチドにインフレイムで連結するように、このような発現ベクター中にクローニングしてもよく、これは、各成分の操作性を破壊せずに融合タンパク質を作成する一手段である。

10

20

30

40

50

【0075】

上記に記載したように、本発明は、また、天然に存在する成熟型のペプチド、ペプチドの対立形質または配列の変異体、天然に存在しない、組換えに由来するペプチドの変異体、ならびにペプチドのオルソログおよびパラログなどの、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の明らかな変異体を提供し、可能にする。当業者であれば理解するように、アラクノカンパ(双翅目)属から単離することができる本ペプチドのオルソログおよび類似体は、本発明のペプチドの好ましい実施形態である。このような変異体は、組換え核酸技術およびタンパク質の生化学の分野における技術分野で知られている技術を用いて容易に産生することができる。しかし、このような変異体は、本発明以前に開示された、あらゆる完全なアミノ酸配列を除外することが理解される。

【0076】

このような変異体は、本明細書に開示した分子技術および配列情報を用いて、容易に同定または作成することができる。さらに、このような変異体は、本発明の酵素ペプチドに対する配列または構造上の相同性をもとに、他のペプチドから容易に区別することができる。存在する同一性の度合いは、主に、ペプチドが機能的な変異体であるかまたは非機能的な変異体であるか、パラログのファミリーに存在する相違の量、およびオルソログ間の進化距離に基づく。

【0077】

2つのアミノ酸配列、または2つのヌクレオチド配列のパーセント同一性を決定するために、配列を最適の比較の目的でアラインメントする(例えば、最適のアラインメントのために、第1および第2のアミノ酸の一方または両方、またはヌクレオチド配列にギャップを導入してもよい)。好ましい一実施形態では、比較の目的で、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%、またはそれを超える長さの参照配列をアラインメントする。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応する位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合は、分子はその位置において同一である(本明細書で用いるように、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等しい)。2配列間のパーセント同一性は、2配列の最適のアラインメントに対して導入することが必要とされている、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【0078】

変異体は、好ましくは図2、3、もしくは5、または配列番号2に述べたアミノ酸配列と少なくとも60%の配列同一性、より好ましくは図2、3、もしくは5、または配列番号2に述べたアミノ酸配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有する。

【0079】

あるいは、上記に記載したように、配列同一性をペプチドの特定の領域、例えば、ルシフェリン結合ポケットに関して計算することができる。配列番号2に述べたアラクノカンパ種のルシフェラーゼ、および甲虫類のルシフェラーゼの代表的なメンバーであるフォテ

ィヌス・ピラリスのルシフェラーゼのアミノ酸配列の配列比較は、配列番号2の約201から350のアミノ酸に位置するルシフェリン結合ポケット領域にわたる配列同一性は約28%であるが、配列番号2のC末端領域351から530のアミノ酸にわたる配列同一性は、約41%であることを示している(表6)。N末端の1から200のアミノ酸にわたる配列同一性は、約29%である。したがって、本発明のペプチドは、好ましくは配列番号2のアミノ酸の201から350に少なくとも50%の配列同一性を有し、より好ましくは配列番号2のアミノ酸の201から350に少なくとも60、70、80、90、95、98、または99%の配列同一性を有する近接するアミノ酸配列を含む。あるいは、またはさらに、本発明のペプチドは、好ましくは配列番号2のアミノ酸の351から530に少なくとも50%の配列同一性を有し、より好ましくは配列番号2のアミノ酸の351から530に少なくとも60、70、80、90、95、98、または99%の配列同一性を有する近接するアミノ酸配列を含む。本発明のペプチドは、また、好ましくは配列番号2のアミノ酸の1から201に少なくとも50%の配列同一性を有し、より好ましくは配列番号2のアミノ酸の201から350に少なくとも60、70、80、90、95、98、または99%の配列同一性を有する近接するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

18のルミネセントの甲虫類からのルシフェラーゼのアミノ酸配列の比較では、完全に保存されている128個の残基が同定されている。アラクノカンバ種の対応する残基を比較する場合、これらの残基のうち55個が異なる(プラス、3個が欠失している)。アラクノカンバ・リカルドサエにおいて異なる55個の残基を、表5に記載する。好ましいペプチドは、表5に記載した55個のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基、すなわち、Y26、A54、T64、D84、Y89、Y90、I92、C104、W110、D114、I140、P161、T197、Q211、S219、D221、K226、Q235、Y236、N238、M246、R248、Y266、F273、K291、E293、R304、S308、T311、V312、F332、S335、S336、H367、A372、F381、S400、Y409、V410、N419、I433、V434、M435、V436、D437、A440、T444、I450、L477、T478、R481、L497、K504、C507、A518を含むアミノ酸配列を含む。他の好ましいペプチドは、アミノ酸約201から350におけるルシフェリン結合ポケット内にある表5に記載するアミノ酸に対応するアミノ酸残基、すなわち、Q211、S219、D221、K226、Q235、Y236、N238、M246、R248、Y266、F273、K291、E293、R304、S308、T311、V312、F332、S335、S336を含むアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 1 】

配列の比較、およびパーセント同一性の決定、および2配列間の類似性は、数学的アルゴリズムを用いて確立することができる(「Computational Molecular Biology」、Lesk, A. M. 編集、Oxford University Press、New York、1988年;「Biocomputing: Informatics and Genome Projects」Smith, D. W. 編集、Academic Press、New York、1993年;「Computer Analysis of Sequence Data, Part 1」Griffin, A. M.およびGriffin, H. G. 編集、Humana Press、New Jersey、1994年;「Sequence Analysis in Molecular Biology」、von Heinje, G.、Academic Press、1987年;ならびに「Sequence Analysis Primer」Gribskov, M. およびDevereux, J. 編集、M Stockton Press、New York、1991年)。

【 0 0 8 2 】

好ましい実施形態では、複数の配列アラインメントおよび系統樹は、PROTMLまたはPROTRAPSプログラム:PROTML (Adachi, J.およびHasegawa, M.、1996年、Molphy Version 2.3.「Programs for molecular Phylogenetics based on maximum likelihood」Computer Science monographs、第28巻、A publication of the Institute of Statistical Mathematics、東京); ならびにPROTPARS (Felsenstein, J.、1989年、PHYLP-Phylogeny Inference Package(バージョン3.2).Cladistics 5:164~166頁を用いて引き出される。

【 0 0 8 3 】

ペアワイズのアラインメント、ならびに配列同一性および相同性のレベルを、GCGソフトウェアパッケージにおけるBestFitプログラムを用いて決定する。2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を、GCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラム中に組み入れられている、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム(J.Mol.Biol.、48巻、444~453頁(1970年))を用いて決定することができる。Blossom62行列、またはPAM250行列のいずれか、

ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重量、および1、2、3、4、5、または6の長さ重量を用いて、アルゴリズムを使用する。2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性を、NSWgapdna.CMP行列、ならびに40、50、60、70、または80のギャップ重量、および1、2、3、4、5、または6の長さ重量で、GAPプログラムを用いて決定することができる(Devereux, J.ら、Nucleic Acids Res.、12巻(1)、387頁(1984年))。

【0084】

本発明の核酸およびタンパク質の配列を、さらに「問い合わせ配列」として用いて、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連の配列を同定するための、配列のデータベースに対する検索を行うことができる。このような検索は、AltschulらのNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて実行してもよい(J.Mol.Biol.、215巻、403~10頁(1990年))。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で実行して、本発明の核酸分子に相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長さ=3で実行して、本発明のタンパク質に相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較の目的でギャップ付アラインメントを得るために、Altschulら(Nucleic Acids Res.、25巻(17)、3389~3402頁、(1997年))に記載されているようにギャップ付BLASTを利用してもよい。BLASTおよびギャップ付BLASTプログラムを利用する場合は、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ(例えば、XBLASTおよびNBLAST)を用いることができる。

【0085】

本発明のペプチドの1つを含むタンパク質の、処理前の全長の形態、および成熟のプロセッシングされた形態を、本発明の酵素ペプチドの1つに対して完全な配列同一性を有するとして、かつ本明細書に提供する酵素ペプチドをコードする核酸によってコードされるとして、容易に同定することができる。

【0086】

酵素ペプチドの対立形質の変異体を、本明細書に開示する酵素ペプチドの少なくとも一部分と高度の配列同一性を有するアラクノカンパのルシフェラーゼのペプチドであるとして、容易に同定することができる。本明細書で用いられる2つのタンパク質(または、タンパク質の領域)が、アミノ酸配列が、典型的には、少なくとも約70~80%、80~90%、および最も高度には少なくとも約90~95%、またはそれを超えて相同性である場合は、高度の配列同一性がある。本発明によると、著しく相同のアミノ酸配列は、以下により完全に記載するような厳密な条件下で、アラクノカンパのルシフェラーゼのペプチドをコードする核酸分子とハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。

【0087】

酵素ペプチドのオルソログを、酵素ペプチドの少なくとも一部分に対してある程度の著しい配列同一性を有するとして、また別の生物体からの遺伝子によってコードされるとして、容易に同定することができる。好ましいオルソログは、アラクノカンパ属(双翅目)のメンバーとして分類される生物体から単離される。このようなオルソログは、タンパク質を産生する2つの生物体の関連性の度合いに応じて、以下により十分に記載するような中程度から厳密な条件下で、本明細書に開示される新規な核酸分子とハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。

【0088】

本発明の酵素ペプチドの天然に存在しない変異体を、組換えの技術を用いて容易に産生することができる。このような変異体には、それだけには限定されないが、酵素ペプチドのアミノ酸配列における欠失、付加、および置換が含まれる。例えば、1クラスの置換は、保存的なアミノ酸の置換である。このような置換は、同様の性質の別のアミノ酸によって、酵素ペプチドにおける所与のアミノ酸を置換するものである。保存的置換として典型的に見られるものは、脂肪族アミノ酸のAla、Val、Leu、およびIle間の、1つを別のもの

で置換するもの;ヒドロキシル残基のSerおよびThrの内部交換;酸性残基のAspおよびGluの交換;アミド残基AsnおよびGln間の置換;塩基性残基LysおよびArgの交換;ならびに芳香族残基PheおよびTyr間の置換である。どのアミノ酸の変化が表現型的にサイレントであり得

るかに関する手引きは、Bowieら、*Science*、247巻、1306～1310頁(1990年)に見ることができる。

【0089】

変異体の酵素ペプチドは、機能的なペプチド、例えば配列番号2のペプチドに比べて全ての機能において、不変であることができ、または、例えば、基質に結合する能力、または発光スペクトルにおけるシフトなど、1つまたは複数の活性における機能の変更または機能の喪失からなることがある。機能上の変異体は、保存的な変異のみ、または重大ではない残基もしくは重大ではない領域における変異を含むことができる。図6、表3および5、ならびに本明細書のさらなる詳細を用いて、重要なドメイン/領域を同定することができる。機能上の変異は、機能上で変更をもたらさないか、または取るに足りない変更をもたらす類似のアミノ酸の置換を含むこともある。

10

【0090】

一実施形態では、変異体はルシフェラーゼ活性を有し、このルシフェラーゼ活性は、ATP依存性ルミネセンス反応の触媒を含み、ルミネセンス反応は530nm未満のまたはそれに等しい波長で最大発光強度で発光スペクトルを産生する。変異体は、好ましくは、配列番号2のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性の少なくとも25%、より好ましくは配列番号2のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性の少なくとも40、50、60、70、80、90、または95%を有する。特に好ましい一実施形態では、変異体は、配列番号2のルシフェラーゼの少なくともルシフェラーゼ活性、またはそれを超える活性を有する。

【0091】

あるいは、アミノ酸置換は、いくらかの度合いで機能を変更することができる。このような変異体は、典型的には、1つまたは複数の非保存のアミノ酸の置換、欠失、挿入、逆位、もしくは切断、または重大な残基もしくは重大な領域における置換、挿入、逆位、もしくは欠失を含む。同様に、図6、表3および5、ならびに本明細書のさらなる詳細を用いて、重大なドメイン/領域におけるこのような変更を同定してもよい。機能の変更した変異体は、機能上、変化をもたらさず、または取るに足らない変化をもたらす類似のアミノ酸の置換も含むことができる。

20

【0092】

機能に不可欠なアミノ酸を、部位特異的変異誘発またはアラニン-スキャニング突然変異誘発などの当技術分野では知られている方法により、同定してもよい(Cunninghamら、*Science*、244巻、1081～1085頁(1989年))。後者の手順は、分子におけるあらゆる残基に単一のアラニンの突然変異を導入するものである。得られた突然変異の分子を、次いで、生物学的活性、例えば、酵素活性について試験し、シフトはアッセイにおける発光スペクトルである。結合パートナー/基質の結合にとって重大な部位を、結晶化、核磁気共鳴、または光親和性標識などの構造分析によって決定してもよい(Smithら、*J.Mol.Biol.*、224巻、899～904頁(1992年); de Vosら、*Science*、255巻、306～312頁(1992年))。フォティヌスのルシフェラーゼの結晶構造は知られており(Contiら、*Structure*、4巻、287～298頁(1996年))、機能に不可欠なアミノ酸の同定を行う場合に言及されることがある。例えば、Nakatsuら(2006年)を参照されたい。

30

【0093】

ペプチドまたは酵素ペプチドの配列は記載され、アミノ酸の位置は、「1」と番号付けられる開始のメチオニンから、カルボキシ末端のアミノ酸まで番号付けられている。特定の位置における特定のアミノ酸は、例えば、METすなわちメチオニンに対してMなど、アミノ酸の1文字表記で示され、その後、例えば、開始のメチオニンに対してM1など、関連のアミノ酸の位置番号が続く。状況から明らかであるように、本発明のペプチドのアミノ酸配列を、フォティヌスのルシフェラーゼなどの他のものといくらか比較する上で、比較が記載される順序は、列挙された位置が言及する関連のアミノ酸配列を示している。したがって、フォティヌス・ピラリスのルシフェラーゼとは異なるアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼにおける残基は、例えば、A343I351と書かれることがあり、これはアラクノカンパの配列の343位のアラニンが、フォティヌス・ピラリスの351位におけるイ

40

50

ソロイシンに対応することを示している。同様に、DEL213-214R218は、アルギニンが存在する場合のアラクノカンパの配列の残基213と214の間にあるフォティヌス・ピラリスの218位のアルギニンの欠失を示す。例えば、図6Aから図6Eに提供するアラインメントを参照されたい。

【0094】

アミノ酸配列またはペプチドにおける位置での置換は、アミノ酸に対する1文字表記によって示され、関連する非置換の配列またはペプチドの位置番号が続き、置換するアミノ酸の1つまたは複数の1文字呼称が続く。このように、例えば、天然のフォティヌス・ピラリスのルシフェラーゼの342位のロイシンのセリンでの置換は、L342Sと呼ばれる。この状況および本明細書に提供するさらなる詳細から、同様の呼称が明らかであろう。例えば、L342Sに対する代替の呼称は、L342 Sと示すことができる。同様に、さらなるルシフェラーゼ配列における同じ変更を、このような配列の任意の1つに関して、「Leuの、配列番号4のLeu₃₄₂とアラインメントする位置でのSerでの置換」と示すことができる。

10

【0095】

本発明は、ペプチドのフラグメントを含み、ペプチドのフラグメントからなるタンパク質およびペプチドの他に、ペプチドのフラグメント、特に図2、3、5、および配列番号2で同定される残基を含むものをさらに提供する。しかし本発明が関係するフラグメントは、本発明の前に公に開示される可能性のあるフラグメントを包含すると解釈すべきではない。

【0096】

分子のN末端を含む本発明のペプチドのフラグメントを、コード領域内の翻訳停止部位の遺伝子操作により産生することができる。あるいは、ポリペプチドを、プロテアーゼとして知られているタンパク質分解酵素で処置することで、様々なN末端、C末端、および内部のフラグメントを生成することができる。ある実施形態では、ペプチドを知られている方法により合成することができる。フラグメントの例には、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、またはそれを超える長さのアミノ酸の近接する残基が含まれ得る。これらのフラグメントを、沈澱(例えば、硫酸アンモニウム)、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー(イムノアフィニティークロマトグラフィーを含む)、または様々なサイズ分離(沈降、ゲル電気泳動、ゲルろ過)などの、知られている方法に従って精製することができる。

20

30

【0097】

このようなフラグメントを、酵素ペプチドの1つもしくは複数の生物学的活性を保持する能力に基づいて選択することができ、または、例えば、基質に結合し、もしくは免疫原として働く機能を行う能力に対して選択することができる。特に重要なフラグメントは、生物学的に活性なフラグメント、例えば、約10個またはそれを超える長さのアミノ酸であるペプチドである。このようなフラグメントは、典型的には、酵素ペプチドのドメインまたはモチーフ、例えば、活性部位、膜貫通ドメイン、基質結合性ドメイン、または酵素ペプチドの酵素的に活性な部分を含む。さらに、可能なフラグメントには、それだけには限定されないが、フラグメント、可溶性ペプチドフラグメント、および免疫原性の構造を含むフラグメントを含むドメインまたはモチーフが含まれる。予想されたドメインおよび機能的な部位は、当業者にはよく知られており、容易に入手できるコンピュータープログラム(例えば、PROSITE分析)によって容易に同定される。

40

【0098】

一実施形態では、フラグメントはルシフェラーゼ活性を有し、このルシフェラーゼ活性は、ATP依存性ルミネセンス反応の触媒を含み、ルミネセンス反応は、530nm未満またはそれに等しい波長で最大発光強度の発光スペクトルを産生する。好ましくは、フラグメントは、配列番号2のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性の少なくとも25%、より好ましくは配列番号2のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性の少なくとも40、50、60、70、80、90、または95%を有する。特に好ましい一実施形態では、フラグメントは、少なくとも配列

50

番号2のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性、またはそれを超える活性を有する。

【0099】

本発明のポリペプチドは、20個の天然に存在するアミノ酸と通常呼ばれる20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。さらに、末端のアミノ酸を含む多くのアミノ酸を、プロセシングおよび他の翻訳後修飾などの天然のプロセスによって、または当技術分野ではよく知られている化学的修飾技術によって修飾してもよい。酵素ペプチドに天然に生じる一般的な修飾は、基本的な教科書、詳細な研究書、および調査文献に記載されており、これらは当業者にはよく知られている。

【0100】

知られている修飾には、それだけには限定されないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有の架橋結合の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解性のプロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイルレーション(selenoylation)、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸からタンパク質へのトランスファー-RNA媒介性の付加、およびユビキチン化が含まれる。

【0101】

このような修飾は、当業者にはよく知られており、化学文献に十分詳しく記載されている。いくつかの特に一般的な修飾、例えば、グリコシル化、脂質の付加、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化、およびADP-リボシル化は、最も基本的な教科書に、例えば、「Proteins-Structure and Molecular Properties」、第2版、T.E.Creighton、W.H.Freeman and Company、New York(1993年)に記載されている。Wold、F.、Posttranslational Covalent Modification of Proteins、B.C.Johnson編集、Academic Press、New York、1~12巻(1983年);Seifterら、(Meth.Enzymol.、182巻、626~646頁(1990年))、およびRattanら、(Ann.N.Y.Acad.Sci.、663巻、48~62頁(1992年))など、この主題について多くの詳しい再考が入手可能である。

【0102】

したがって、本発明の酵素ペプチドは、置換されたアミノ酸残基が遺伝暗号によってコードされないものである誘導体または類似体も包含し、誘導体または類似体では、置換基が含まれ、成熟した酵素ペプチドは、酵素ペプチドの半減期を増大するための化合物(例えば、ポリエチレングリコール)などの別の化合物と融合し、またはさらなるアミノ酸が、リーダー配列もしくは分泌性の配列、または成熟した酵素を精製するための配列、またはプロタンパク質配列などの成熟した酵素ペプチドと融合している。

【0103】

タンパク質/ペプチドの使用

本発明のペプチドの潜在的な使用は、主に、タンパク質の供給源およびタンパク質のクラス/作用に基づいている。このような使用は、当技術分野では知られている本明細書に提供する情報、およびルーチンの実験を用いて容易に決定することができる。本発明のタンパク質(本発明の前に開示された可能性のある誘導体およびフラグメントを含む)は、ルシフェラーゼのメンバーに関連する酵素に関連する生物学的アッセイに有用である。このようなアッセイは、一般的に、ルシフェラーゼの、知られている酵素機能、または活性、または性質のあらゆるものに関連する。本発明のペプチド、フラグメント、またはルシフェラーゼを、当業者には知られており、それに対してルシフェラーゼペプチドまたはフラグメントを適切に当てはめることができるあらゆる方法または組成物に用いることもできる。例示の適用の非排他的なリストには、米国特許第6,927,037号、第6,690,461号、第6,602,658号、第6,602,657号、第6,586,196号、第6,503,723号、第6,297,018号、第6,171,809号、第6,143,502号、および第6,068,979号に開示されているものが含まれる。さらに、本発明の実施形態は、生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)として知られている技術におけ

10

20

30

40

50

る興奮性パートナーなどの適用に適している(例えば、WO/1999/066324を参照されたい)。

【0104】

本発明のタンパク質を用いて、生体液におけるタンパク質(または、その結合パートナーもしくはリガンド)のレベルを定量的に決定するようにデザインされたアッセイにおける試薬(標識された試薬を含む)として、ならびに、対応するタンパク質が優先的に発現される組織に対するマーカーとして、抗体を産生させ、あるいは別の免疫反応を誘発することができる。タンパク質が、別のタンパク質またはリガンドに、結合または潜在的に結合する場合(例えば、酵素-エフェクタータンパク質相互作用、または酵素-リガンド相互作用などにおいて)、結合の相互作用の阻害物質を同定するためのシステムを開発するために、タンパク質を用いて結合パートナー/リガンドを同定することができる。これらの使用の、任意の、または全てのは、市販製品として製品化するための、試薬のグレードまたはキットのフォーマットに開発することが可能である。

10

【0105】

上記に列挙した使用を実施するための方法は、当業者にはよく知られている。このような方法を開示している参考文献には、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Sambrook,J., E.F.Fritsch、およびT.Manias編集、1989年、および「Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques」、Academic Press、Berger,S.L.およびA.R.Kimmel編集、1987年が含まれる。

【0106】

ポリペプチドを用いて、その天然状態で、または変更された形態でタンパク質の酵素活性を修飾する化合物を同定してもよい。本発明の酵素、ならびに好適な変異体およびフラグメントを両方とも、酵素に結合し、またはルミネセンス反応に関与する能力に対して候補の化合物をアッセイするためのハイスループットのスクリーニングに用いてもよい。これらの化合物を、機能的な酵素に対してさらにスクリーニングして、酵素活性に対する化合物の効果を決定することができる。さらに、これらの化合物を動物または無脊椎動物系で試験して、活性/有効性を決定してもよい。酵素を所望の度合いまで活性化(作用薬)または不活性化(拮抗薬)する化合物を、やはり同定してもよい。

20

【0107】

さらに、本発明のタンパク質を用いて、酵素タンパク質と、酵素タンパク質が通常相互作用するシグナル経路の基質もしくは成分などの酵素タンパク質と通常相互作用をする分子、またはルミネセンス反応に関与する補助因子との間の相互作用を刺激し、または阻害する能力に対して化合物をスクリーニングすることができる。このようなアッセイは、典型的には、ルシフェラーゼのルミネセンス反応、またはルミネセンス反応の個々の反応ステップなど、酵素タンパク質またはフラグメントが、標的分子と相互作用できる条件下、タンパク質と標的との間の複合体の形成が検出できる条件下、または酵素タンパク質と標的の相互作用の生化学的結果が検出できる条件下で、酵素タンパク質を候補の化合物と組み合わせるステップを含む。

30

【0108】

候補の化合物には、例えば、(1)小型の有機および無機分子(例えば、合成のコンビナトリアル、または天然生成物のライブラリーから得た分子)、(2)抗体(例えば、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イデオタイプ、キメラ、および単鎖の抗体、ならびにFab、F(ab')₂、Fabの発現ライブラリーフラグメント、および抗体のエピトープ結合性フラグメント)、(3)リンペプチド(例えば、ランダム、および部分的に変性した、定方向のホスホペプチドライブラリーのメンバー、例えば、Songyangら、Cell、72巻、767~778頁(1993年)を参照されたい)、ならびに(4)Igテールの融合ペプチドおよびランダムペプチドライブラリーのメンバーを含む、可溶性ペプチドなどのペプチド(例えば、Lamら、Nature、354巻、82~84頁(1991年);Houghtonら、Nature、354巻、84~86頁(1991年)を参照されたい)、ならびにD-またはL-立体配置のアミノ酸から作られたコンビナトリアル化学由来の分子ライブラリーが含まれる。

40

【0109】

50

1つの候補化合物は、例えば、配列番号2のペプチドに対して基質の結合を競合する本発明の変異体のペプチドである。他の候補の化合物には、酵素の機能に影響を及ぼし、したがって基質に対して競合する、突然変異の酵素、または突然変異を含む好適なフラグメントが含まれる。したがって、例えば、より高い親和性で、基質に対して競合するフラグメント、または基質に結合するが遊離させないフラグメントを、本発明は包含する。

【0110】

本発明は、酵素活性を修飾(刺激または阻害)する化合物を同定するための、他のエンドポイントアッセイをさらに含む。アッセイは、典型的には、酵素活性を示すルミネセンス経路における事象のアッセイを伴う。酵素が媒介する生物学的または生化学的な機能のあらゆるものを、エンドポイントアッセイとして用いてもよい。特に、酵素を発現する細胞または組織の生物学的機能をアッセイしてもよい。

10

【0111】

本発明のタンパク質は、酵素と相互作用する化合物(例えば、結合パートナー、リガンド、または基質)を発見するようにデザインされた方法における、競合結合アッセイで有用である。したがって、化合物がポリペプチドに結合し、またはその他の方法で相互作用できるようにする条件下で、化合物を酵素ポリペプチドに曝露する。可溶性の酵素ポリペプチドも、混合物に加える。試験化合物が可溶性の酵素ポリペプチドと相互作用する場合は、酵素の標的から形成された複合体、または活性の量を増大、または低減してもよい。このタイプのアッセイは、化合物が酵素の特異的な領域との相互作用を求められている場合は、特に有用である。このように、標的の酵素領域と競合する可溶性のポリペプチドを、対象の領域に対応するペプチド配列を含むようにデザインする。

20

【0112】

対象の化合物またはタンパク質の無細胞のスクリーニングアッセイを行うために、非複合の形態の1つもしくは両方から複合体の分離を促進するために、酵素タンパク質もしくはフラグメント、またはその標的分子のいずれかを不働化することが望ましいことがある。

【0113】

上記のアッセイの1つまたは複数を単独または組み合わせて用いて、本発明の酵素の1つを変調する物質を同定してもよい。細胞ベースの、または無細胞の系を最初に用い、次いで望ましい他のモデル系は何でも活性を確認することが、一般的に好ましい。このようなモデル系は、当技術分野ではよく知られており、この状況で使用するの容易であり得る。本発明は、上記に記載したスクリーニングアッセイによって同定される、新規な薬剤または基質をさらに含む。

30

【0114】

本発明のペプチドは、活性なタンパク質の活性、特に他のルシフェラーゼに対して知られている活性および条件を診断するための標的も提供する。したがって、ペプチドを生物学的サンプルから単離し、異常なペプチドをもたらず遺伝的突然変異の存在に対してアッセイすることができる。これには、アミノ酸の置換、欠失、挿入、再編成(異常なスプライシング事象の結果として)、および不適切な翻訳後修飾が含まれる。分析方法には、電気泳動の移動性の変更、トリプシンペプチドの消化の変更、細胞ベースまたは無細胞のアッセイにおける酵素活性の変更、基質または抗体結合パターンにおける変更、等電点の変更、直接的なアミノ酸配列決定、およびタンパク質における突然変異を検出するのに有用なあらゆる他の知られているアッセイ技術が含まれる。このようなアッセイは、抗体のチップアレイなどの単一の検出フォーマットまたは複数の検出フォーマットで提供され得る。ペプチドを検出するための *in vitro* の技術には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウエスタンブロット、免疫沈降、および、抗体またはタンパク質結合性物質などの検出試薬を用いた免疫蛍光が含まれる。

40

【0115】

マルチレポーターアッセイ

本発明の本ペプチドは、マルチレポーターアッセイにおける使用に特に適している。実

50

験の正確さを改善するために、マルチの、デュアル(すなわちダブル)のレポーターが、通常用いられる。「マルチレポーター」の語は、単一系内の、2つまたはそれを超える個々のレポーター酵素の同時の発現および測定を意味する。一緒に用いる場合、これら個々のレポーター酵素を「コレポーター」と呼ぶことがある。遺伝子のレポーターでは、デュアルレポーターアッセイから現在恩恵を受けている例に、2つの異なるレポーター遺伝子を同時に発現するように遺伝子操作されている個々の細胞または細胞の集団(例えば、培地に分散した細胞、分離された組織、または動物全体)が含まれる。最も頻繁には、1つの遺伝子の活性が特定の実験条件の影響をレポートし、第2のレポーター遺伝子の活性が、それによって実験値の全セットが標準化され得る内部コントロールを提供する。内部コントロールの活性に対する実験上のレポーターの活性の標準化により、例えば、細胞の生存性または形質移入の効率における相違によりもたらされる実験上の変動性は最小になる。他の変動性のもととなるもの、例えば、ピペッティング体積、細胞溶解の効率、およびアッセイ効率における相違を、効率的に除去することができる。したがって、デュアルレポーターアッセイでは、外来の影響を低減することにより、実験上のデータのより信頼できる解釈が可能になることが多い。

10

20

30

40

50

【0116】

少なくとも2つのレポーターを使用するアッセイ(すなわち、デュアルレポーターアッセイ)から現在恩恵を受けている例には、2つの異なるレポーター遺伝子を同時に発現するように遺伝子操作された個々の細胞または細胞の集団(例えば、培地に分散した細胞、分離された組織、または動物全体)が含まれる。最も頻繁には、1つの遺伝子の活性が特定の実験条件の影響をレポートし、第2のレポーター遺伝子の活性が、それによって実験値の全セットが標準化され得る内部コントロールを提供する。

【0117】

マルチレポーター技術から恩恵を受け得る再構成された無細胞系は、同時翻訳用に引き出された細胞ライセート、または、実験上の、およびコントロールのレポーター酵素をコードする独立の遺伝材料の、転写および翻訳の連結である。免疫アッセイは、同様に、単一サンプル内の実験値およびコントロール値両方の複数のレポーター用デザインされている。例えば、Promega Dual-Luciferase(商標)レポーターアッセイシステム、およびPromega pGL3 Luciferase Reporter Vectors(Promega Corporation、Madison、ウィスコンシン州より入手可能)、ならびに米国特許第5,744,320号、および第5,670,356号を参照されたい。

【0118】

抗体

本発明は、本発明のペプチドの1つに選択的に結合する抗体、そのようなペプチドを含むタンパク質、ならびにその変異体およびフラグメントも提供する。本明細書で用いる抗体は、それが標的のペプチドに結合し、非関連のタンパク質に著しく結合しない場合は、標的ペプチドに選択的に結合する。抗体は、そのようなタンパク質が抗体のペプチドの標的のフラグメントまたはドメインと相同性を共有する限りは、標的のペプチドと実質的に相同ではない他のタンパク質にも結合する場合でも、依然としてペプチドに選択的に結合するとみなされる。この場合、ペプチドに対する抗体の結合は、ある程度の交差反応性にも関わらず依然として選択的であることが理解されよう。

【0119】

所与の標的のペプチドに対する抗体を産生または同定するための、多くの方法が知られている。そのような方法のいくつかは、Harlow、「Antibodies」、Cold Spring Harbor Press(1989年)によって記載されている。一般的には、抗体を産生するために、単離したペプチドを免疫原として用い、ラット、ウサギ、またはマウスなどの哺乳動物の生物体に投与する。全長のタンパク質、抗原のペプチドフラグメント、または融合タンパク質を用いてもよい。特に重要なフラグメントは、本明細書で同定されるドメインなどの機能的なドメイン、およびタンパク質のアラインメント方法を用い、図6に示すように容易に同定することができるものなど、配列の相同性またはファミリー間の相違のドメインをカバーす

るものである。

【0120】

抗体は、本明細書に記載するようにペプチドのあらゆる領域から調製することができる。しかし、好ましい領域には、機能/活性、または酵素/結合パートナーの相互作用に関するものが含まれる。図6Aから図6E、ならびに表3および5の情報は、実施例により本明細書に提供されるさらなる指示とともに用いて、特に重要な領域を同定することができ、様々な配列のアラインメントを用いて、保存された独特の配列フラグメントを同定することができる。

【0121】

抗原フラグメントは、典型的には、少なくとも8個の近接するアミノ酸残基を含む。しかし、抗原性のペプチドは、少なくとも10、12、14、16、またはそれを超えるアミノ酸残基を含むことができる。このようなフラグメントは、タンパク質の表面上、例えば、親水性領域に位置する領域に対応するフラグメントなど、物理的性質をもとに選択してもよく、または配列の独特さに基づいて選択してもよい。

【0122】

本発明の抗体の検出は、抗体を検出可能な物質に対して共役する(すなわち、物理的に連結する)ことにより促進することができる。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、ルミネセント材料、生物発光材料、および放射性材料が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチン、およびアビジン/ビオチンが含まれ、適切な蛍光材料の例にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリスリンが含まれ、ルミネセント材料の例にはルミノールが含まれ、生物発光材料の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、適切な放射性材料の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が含まれる。

【0123】

抗体を用いて、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準の技術により、本発明のタンパク質の1つを単離することができる。抗体は、細胞からの天然のタンパク質、および宿主細胞で発現された組換えで生成されたタンパク質の精製を促進することがある。さらに、このような抗体は、生物体における様々な組織間の、または正常でも異常でも発生の過程にわたる、タンパク質の発現のパターンを決定するために、細胞または組織における本発明のタンパク質の1つの存在を検出するのに有用である。さらに、発現の存在量およびパターンを評価するために、このような抗体を用いて、*in situ*で、*in vitro*で、または細胞ライセートもしくは上清でタンパク質を検出してよい。全長のタンパク質の遊離のフラグメントの抗体の検出を用いて、代謝回転を同定してもよい。

【0124】

抗体は、基質などの結合パートナーに対する酵素ペプチドの結合の阻止など、タンパク質の機能を阻害するのにも有用である。これらの使用を、分析がタンパク質の機能の阻害を伴う分析上の状況で適用してもよい。例えば、結合を阻止し、したがってペプチドの活性を変調する(アゴナイズまたは拮抗する)ために、抗体を用いてもよい。抗体を、機能に必要とされている部位、または細胞もしくは生物体に関連する完全なタンパク質に対する部位を含む特定のフラグメントに対して調製してもよい。

【0125】

本発明は、生物学的サンプルにおけるタンパク質の存在を検出するために、抗体を使用するためのキットも包含する。キットは、標識された、または標識可能な抗体などの抗体、および生物学的サンプルにおけるタンパク質を検出するための化合物または物質、サンプルにおけるタンパク質の量を決定するための手段、サンプルにおけるタンパク質の量をスタンダードと比較するための手段、ならびに使用のための指示を含むことができる。このようなキットを、単一のタンパク質またはエピトープを検出するために供給してもよく

10

20

30

40

50

、または抗体検出アレイにおけるなど、複数のエピトープの1つを検出するように構成してもよい。アレイは、以下に核酸アレイについて詳しく記載し、抗体アレイについて類似の方法が開発されている。

【0126】

核酸分子

本発明は、図1、2、4、5、ならびに配列番号1および3に記載する単離された核酸分子、ならびにそれらの様々な修飾またはフラグメントを提供する。特定の実施形態では、本発明は、本発明の酵素ペプチドまたはタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する(cDNA、転写物、およびゲノムの配列)。このような核酸分子は、本発明の酵素ペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列、その対立形質の変異体、またはそのオルソログもしくはパラログからなり、それらから本質的になり、または含むことができる。

10

【0127】

本明細書で用いられる「単離された」核酸分子は、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸から分離されたものである。好ましくは「単離された」核酸は、核酸がそれに由来する生物体のゲノムのDNAにおいて核酸に天然に隣接する配列(すなわち、核酸の5'および3'終末に位置する配列)がない。しかし、例えば、約5キロ塩基対(KB)、4KB、3KB、2KB、または1KB、またはそれ未満までの、いくつかの隣接するヌクレオチド配列、特に、同一遺伝子内であるが、ゲノム配列でイントロンによって分離される近接するペプチドをコードする配列、およびペプチドをコードする配列が存在することがある。重要な点は、核酸は、組換えの発現、プローブおよびプライマーの調製、ならびにヌクレオチド配列に特異的な他の使用など、本明細書に記載される特定の操作を受けることができるように、遠隔性の、かつ重要ではない隣接の配列から単離されることである。

20

【0128】

さらに、「単離された」核酸分子、例えば転写物またはcDNA分子は、他の細胞材料、または培地(組換え技術によって生成された場合)、または化学的前駆物質もしくは他の化学物質(化学的に合成された場合)が実質的になくてよい。しかし、核酸分子を他のコード配列または制御配列に融合してもよく、それでも単離されたとみなされる。

【0129】

例えば、ベクターに含まれている組換えDNA分子は単離されたとみなされる。単離されたDNA分子のさらなる例には、異種性の宿主細胞に維持されている組換えDNA分子、または溶液中(部分的にもしくは実質的に)精製されているDNA分子が含まれる。単離されたRNA分子には、本発明の単離されたDNA分子のin vivoまたはin vitroのRNA転写物、およびその新規なフラグメントが含まれる。本発明による単離された核酸分子は、合成で生成されたそのような分子をさらに含む。

30

【0130】

したがって、本発明は、本発明のヌクレオチド配列からなる核酸分子を提供する。核酸分子は、ヌクレオチド配列が核酸分子の完全なヌクレオチド配列である場合に、ヌクレオチド配列からなる。本発明は、本発明のヌクレオチド配列から本質的になる核酸分子をさらに提供する。核酸分子は、そのようなヌクレオチド配列が、最終の核酸分子にほんのわずかなさらなる核酸残基とともに存在する場合に、ヌクレオチド配列から本質的になる。本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含む核酸分子をさらに提供する。核酸分子は、ヌクレオチド配列が核酸分子の最終のヌクレオチド配列の少なくとも部分である場合に、ヌクレオチド配列を含む。このような様式では、核酸分子は、ヌクレオチド配列にすぎなくてもよく、または、それと天然に関連し、異種性のヌクレオチド配列である核酸残基などの、さらなる核酸残基を有してもよい。このような核酸分子は、少数のさらなるヌクレオチドを有してもよく、または数百もしくはそれを超えるさらなるヌクレオチドを含んでもよい。どのようにして様々なタイプのこれらの核酸分子を容易に作成または単離することができるかについての簡単な記載を、以下に提供する。

40

【0131】

単離された核酸分子は、成熟したタンパク質プラスさらなるアミノ末端もしくはカルボ

50

キシ末端のアミノ酸、または成熟したペプチドに対して内部のアミノ酸(例えば、成熟した形態が、1つを超えるペプチド鎖を形成する場合)をコードすることができる。このような配列は、数ある中でも、前駆体から成熟した形態へのタンパク質のプロセッシングで役割を果たし、タンパク質のトラフィッキングを促進し、タンパク質の半減期を延長もしくは短縮し、またはアッセイもしくは生成のためにタンパク質の操作を促進することができる。In situの場合では一般的であるように、さらなるアミノ酸は、細胞の酵素によって成熟したタンパク質からプロセッシングして除かれることがある。

【0132】

上記で述べたように、単離された核酸分子には、それだけには限定されないが、酵素ペプチドだけをコードする配列、成熟タンパク質およびさらなるコード配列をコードする配列、例えば、リーダー配列または分泌性の配列(例えば、プレ-プロ、もしくはプロ-タンパク質配列);さらなるコード配列があってもなくても、成熟ペプチド、プラスさらなる非コード配列をコードする配列、例えば、イントロンおよび非コードの5'および3'配列、例えば、転写、mRNAのプロセッシング(スプライシングおよびポリアデニル化シグナルを含む)、リボソーム結合、およびmRNAの安定において役割を果たす、転写されるが非翻訳の配列が含まれる。さらに、核酸分子は、例えば、精製を促進するペプチドをコードするマーカ配列に融合してよい。

10

【0133】

単離された核酸分子は、mRNAなどのRNAの形態であってよく、または、クローニングにより得られた、またはキメラの合成技術により、もしくはその組合せにより生成されたcDNAおよびゲノムのDNAを含むDNAの形態であってよい。核酸、特にDNAは、二本鎖でもよく、または一本鎖でもよい。一本鎖の核酸は、コード鎖(センス鎖)でもよく、または非コード鎖(アンチセンス鎖)でもよい。

20

【0134】

本発明は、本発明のペプチドのフラグメントをコードする核酸分子、および上記に記載する本発明の酵素タンパク質の明らかな変異体をコードする核酸分子をさらに提供する。このような核酸分子は、対立形質の変異体(同じ遺伝子座)、パラログ(異なる遺伝子座)、およびオルソログ(異なる生物体)など、天然に存在してよく、または組換えDNA法により、もしくは化学合成により構築してもよい。このような天然に存在しない変異体は、核酸分子、細胞、または生物体に適用するものを含む、突然変異誘発の技術により作成することができる。したがって、上記で論じたように、変異体は、ヌクレオチドの置換、欠失、逆位、および挿入を含むことができる。変異は、コード領域および非コード領域のいずれか、または両方で生じることができる。変異は、保存的、および非保存的両方のアミノ酸の置換を生成することができる。

30

【0135】

本出願で用いられる「ルシフェラーゼをコードする核酸分子」の語は、全細胞の核酸がないように単離された核酸分子を意味する。「機能的に等しいコドン」の語は、本明細書では、アルギニンまたはセリンに対する6個のコドンなど、同じアミノ酸をコードするコドンを意味し(表2)、以下の頁で論じるように生物学的に等しいアミノ酸をコードするコドンも意味するように用いられる。

40

【0136】

遺伝暗号の縮重を考慮して、配列が、少なくとも約50%、通常には少なくとも約60%、より通常には約70%、最も通常には約80%、好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは約95%、本発明のヌクレオチド配列に同一であるヌクレオチドを有する場合に、配列は記載したものと本質的に同じであるとみなされる。記載したものと本質的に同じである配列は、標準の条件下でポリヌクレオチドの相補体を含む核酸セグメントとハイブリダイズすることができる配列であると、機能的に定義することもできる。緊密に関連する配列の語は、実質的な配列類似性を有する配列、またはルシフェラーゼ機能(すなわち、ルミネセンスをもたらす1つまたは複数の活性)を行うタンパク質をコードし、もしくは本明細書に記載する類似の抗原性の反応を呼び起こすタンパク質をコードする配列を意味する。

50

緊密に関連する配列の語は、本明細書では、それが比較されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドと、最小の、または50%の類似性を有する配列を呼ぶために用いられる。

【0137】

本発明のDNAセグメントには、上記に記載するように、生物学的に機能が同等のルシフェラーゼのタンパク質およびペプチドをコードするものが含まれる。このような配列は、ヌクレオチド配列内、およびこのようにコードされるタンパク質に生じることが知られている、コドンの重複性、およびアミノ酸の機能的な等価性の結果として生じることがある。あるいは、機能的に等価なタンパク質またはペプチドを、組換えDNA技術の適用により作り出すことができ、組換えDNA技術では、交換されるアミノ酸の性質を考慮することに基づいてタンパク質構造における変化を操作することができる。変更は、下記に記載するように、部位特異的変異誘発技術を適用することにより操作してもよく、または無作為に導入し、望ましい機能に対して後にスクリーニングしてもよい。

10

【0138】

当然、本発明は、アラクノカンパのルシフェラーゼをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的であり、または本質的に相補的であるオリゴヌクレオチドも包含する。「相補的である」核酸配列は、標準のワトソン-クリックの相補ルールにしたがった塩基対形成の可能なものである。本明細書で用いられる「相補的な配列」の語は、上記に記載した同じヌクレオチドの比較によって評価し得るように、または本明細書に記載するもののような比較的厳密な条件下でポリヌクレオチドの核酸セグメントにハイブリダイズすることができるものと定義されるように、実質的に相補的であるヌクレオチド配列を意味する。

20

【0139】

あるいは、ハイブリダイズ性のセグメントは、より短いオリゴヌクレオチドであってよい。17塩基長の配列は、複合体のゲノムで1回だけ生じ、したがって、独特の標的配列を特定するのに十分でなければならない。より短いオリゴマーは、作成するのがより容易であり、*in vivo*の到達性を増大するが、ハイブリダイゼーションの特異性を決定するのに多数の他の因子が関与している。オリゴヌクレオチドの、その相補的な標的に対する結合親和性も配列特異性も、長さの増大とともに増大する。8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、またはそれを超える塩基対の例示のオリゴヌクレオチドを用いることが企図されるが、他のものも企図される。250、500、1000、1212、1500、2000、2500、3000、または3500塩基をコードするより長いポリヌクレオチド、およびそれより長いものも企図される。このようなオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、例えば、サザンプロットおよびノーザンプロットにおけるプローブとして、ならびに増幅反応におけるプライマーとして、またはワクチン用に、典型的に使用が見出される。

30

【0140】

【表 2】

表2

アミノ酸			コドン							
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU				
システイン	Cys	C	UGC	UGU						
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU						
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG						
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU						
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU				10
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU						
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU					
リジン	Lys	K	AAA	AAG						
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU		
メチオニン	Met	M	AUG							
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU						
プロリン		P	CCA	CCC	CCG	CCU				
	Pro									
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG						
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU		
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU		20
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU				
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU				
トリプトファン	Trp	W	UGG							
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU						

【 0 1 4 1 】

当然、本発明は、本発明のヌクレオチドの配列に相補的であり、または本質的に相補的であるオリゴヌクレオチドも包含する。「相補的である」核酸配列は、標準のワトソン-クリックの相補性ルールにしたがった塩基対形成の可能なものである。本明細書で用いられる「相補的な配列」の語は、上記に記載した同じヌクレオチド比較によって評価し得るように、または本明細書に記載するもののような比較的厳密な条件下でポリヌクレオチドの核酸セグメントにハイブリダイズすることができるものと定義されるように、実質的に相補的であるヌクレオチド配列を意味する。

【 0 1 4 2 】

フラグメントの長さは、その意図された使用に基づく。例えば、フラグメントはペプチドのエピトープ支持領域をコードしてもよく、またはDNAプローブおよびプライマーとして有用であってもよい。このようなフラグメントは、オリゴヌクレオチドプローブを合成するための知られているヌクレオチド配列を用いて単離することができる。次いで、標識したプローブを用いて、コード領域に対応する核酸を単離するために、cDNAライブラリー、ゲノムのDNAライブラリー、またはmRNAをスクリーニングすることができる。さらに、PCR反応でプライマーを用いて、遺伝子の特定の領域をクローニングする。プローブ/プライマーは、実質的に、精製されたオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド対を、典型的に含む。

【 0 1 4 3 】

当技術分野ではよく知られている方法を用いて、オルソログ、ホモログ、および対立形質の変異体を同定してもよい。ペプチドのセクションに記載したように、これらの変異体は、図のシートに示すヌクレオチド配列、またはこの配列のフラグメントに、典型的には60~70%、70~80%、80~90%、より典型的には少なくとも約90~95%またはそれを超えて相同であるペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる。このような核酸分子は、中程度から厳密な条件下で、図のシートに示すヌクレオチド配列、またはこの配列のフラ

グメントにハイブリダイズすることができるとして、容易に同定することができる。対立形質の変異体は、コードする遺伝子の遺伝的な遺伝子座によって、容易に決定することができる。

【0144】

本明細書で用いられ、当業者にはよく知られているように、核酸のハイブリダイゼーションに対する「高度に厳密な条件」、「中程度に厳密な条件」、および「低度に厳密な条件」は、Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel, F.M.ら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons、(1998年))の2.10.1~2.10.16頁、および6.3.1~6頁に説明されている。ハイブリダイゼーションの厳密さを決定する正確な条件は、イオン強度(例えば、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1 \times \text{SSC}$)、温度(例えば、室温、 42°C 、 68°C)、およびホルムアルデヒドなどの不安定化剤、またはSDSなどの変性剤の濃度に依存するだけでなく、ヌクレオチド配列の長さ、塩基の組成、ハイブリダイズ性の配列と他の同一でない配列内のその配列のサブセットの出現頻度との間のパーセントミスマッチなどの因子にも依存する。このように、高度、中程度、または低度に厳密な条件は、経験的に決定することができる。ハイブリダイゼーションが起こらない厳密さのレベルから、ハイブリダイゼーションが最初に観察されるレベルまで、ハイブリダイゼーション条件を変えることによって、所与の配列が、サンプルにおける最も類似した配列と(例えば、選択的に)ハイブリダイズできる条件を、決定することができる。

10

【0145】

例示の条件は、Krause, M. H.およびS. A. Aaronson、Methods in Enzymology、200巻、546~556頁(1991年)に記載されている。中程度から低度の厳密性条件に対する洗浄条件の決定を記載している、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons、(1998年)も参照されたい。洗浄は、ハイブリッドの相補性の最小レベルを決定するために、条件を通常設定するステップである。一般的には、相同のハイブリダイゼーションだけが起こる最低の温度から出発して、最終の洗浄温度がそれによって低減される各々のセルシウス温度(SSC濃度を一定に保って)により、ハイブリダイズする配列間のミスマッチの最高の割合において1%の増大が可能になる。一般的に、SSCの濃度を2倍にすることにより、約17%の T_m の増大がもたらされる。これらの指針を用いて、求められるミスマッチのレベルに応じて、高度の、中程度の、または低度の厳密性に対して、洗浄温度を経験的に決定することができる。

20

30

【0146】

例えば、低度の厳密性の洗浄は、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ を含む溶液で室温で10分間の洗浄を含むことができ、中程度の厳密性の洗浄は、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ を含む予め加温した溶液(42°C)で 42°C で15分間の洗浄を含むことができ、高度に厳密性の洗浄は、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ を含む予め加温した溶液(68°C)で 68°C で15分間洗浄することを含むことができる。さらに、洗浄を繰り返し、または逐次的に行って、当技術分野では知られている望ましい結果を得ることができる。等価の条件は、当技術分野では知られているように、実施例として与えられている1つまたは複数のパラメータを変化させ、一方で、標的の核酸分子と、用いるプライマーまたはプローブ間に、同程度の同一性または類似性を維持することにより決定することができる。

40

【0147】

使用する核酸分子

本発明の核酸分子は、プローブ、プライマー、化学的中間体に、および生物学的アッセイにおいて有用である。核酸分子は、全長のcDNAおよび記載したペプチドをコードするゲノムのクローンを単離するための、ならびにcDNAおよび同一または関連のペプチドを生成する変異体(対立遺伝子、オルソログなど)に対応するゲノムのクローンを単離するための、メッセンジャーRNA、転写RNA、またはcDNA、およびゲノムのDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。

【0148】

プローブは、提供する核酸分子の全体の長さに沿ってあらゆる配列に対応することがで

50

きる。しかし、論じたように、フラグメントは、本発明の前に開示されたフラグメントを包含するものとして解釈してはならない。

【0149】

核酸分子は、核酸分子のあらゆる所与の領域を増幅するための、PCRに対するプライマーとしてやはり有用であり、望ましい長さおよび配列のアンチセンスの分子を合成するのに有用である。上記に記載したように、アンチセンスの分子は、RNA干渉により発現の変調を実現するのに有効であるRNA構築物を、特に含む。

【0150】

核酸分子は、組換えのベクターを構築するのにも有用である。このようなベクターには、ペプチド配列の部分、またはペプチド配列の全てを発現する発現ベクターが含まれる。ベクターには、別の核酸分子配列中に、例えば細胞のゲノム中に組み込んで遺伝子または遺伝子生成物の *in situ* の発現を変えるために用いられる、挿入ベクターも含まれる。例えば、外来のコード配列を、1つまたは複数の特異的に導入される突然変異を含むコード領域の全部または部分で相同組換えすることにより、置換してもよい。

10

【0151】

核酸分子は、タンパク質の抗原部分を発現するのにも有用である。

【0152】

核酸分子は、*in situ* ハイブリダイゼーション法により核酸分子の染色体の位置を決定するためのプローブとしても有用である。

【0153】

核酸分子は、本発明の核酸分子の遺伝子の調節領域を含むベクターを作成するのにも有用である。

20

【0154】

核酸分子は、本明細書に記載する核酸分子から生成したmRNAの全部、または一部分に対応するリボザイムをデザインするのにも有用である。

【0155】

核酸分子は、ペプチドの部分または全部を発現するベクターを作成するのにも有用である。

【0156】

核酸分子は、核酸分子およびペプチドの一部分または全部を発現する宿主細胞を構築するのにも有用である。

30

【0157】

核酸分子は、核酸分子およびペプチドの全部または一部分を発現するトランスジェニック生物体を構築するのにも有用である。

【0158】

核酸分子は、核酸の発現の存在、レベル、形態、および分布を決定するためのハイブリダイゼーションプローブとしても有用である。したがって、プローブを、細胞、組織、および生物体における特定の核酸分子の存在を検出し、またはそのレベルを決定するために用いることができる。そのレベルが決定される核酸は、DNAでも、またはRNAでもよい。したがって、本明細書に記載するペプチドに対応するプローブを、所与の細胞、組織、または生物体における発現または遺伝子コピー数を評価するのに用いることができる。

40

【0159】

mRNAを検出するための *in vitro* の技術には、ノーザンハイブリダイゼーション、および *in situ* ハイブリダイゼーションが含まれる。DNAを検出するための *in vitro* の技術には、サザンハイブリダイゼーション、および *in situ* ハイブリダイゼーションが含まれる。

【0160】

酵素の核酸の発現のためのアッセイには、mRNAレベルなどの核酸のレベルまたはルミネセンス反応に關与する付随的な化合物に対する直接のアッセイを伴うことがある。さらに、シグナルまたは環境の物質もしくは条件に反応して、上方または下方制御される遺伝子の発現も、アッセイすることができる。この実施形態では、これらの遺伝子の調節領域は

50

、本発明のルシフェラーゼペプチドの1つまたは複数をコードするレポーター遺伝子に作動可能に連結していることがある。

【0161】

このように、酵素の遺伝子発現のモジュレーターを、細胞が候補の化合物と接触し、ルミネセンスのレベル(すなわち、強度またはスペクトル)を決定する方法で同定することができる。候補の化合物の存在下におけるルミネセンスの特徴(スペクトル、強度分布、絶対強度など)を、候補の化合物の非存在下のルミネセンスの特徴と比較する。候補の化合物を、次いで、この比較をもとにした核酸発現のモジュレーターとして同定し、例えば、異常な核酸の発現を特徴とする障害を処置するために用いてもよい。

【0162】

あるいは、酵素の核酸の発現のためのモジュレーターは、薬物または小分子が、タンパク質を発現する細胞および組織で酵素の核酸の発現を阻害するのであれば、本明細書に記載するスクリーニングアッセイを用いて同定される小分子または薬物であってよい。

【0163】

核酸分子は、細胞、組織、および生物体における酵素の遺伝子の発現を制御するためのアンチセンスの構築物として有用である。DNAのアンチセンスの核酸分子は、転写に關与する遺伝子の領域に相補的であるようにデザインされており、酵素タンパク質の転写を妨げ、したがってその生成を妨げる。アンチセンスのRNAまたはDNAの核酸分子は、mRNAとハイブリダイズして、したがってmRNAの酵素タンパク質への転写を阻止する。RNA干渉を行う技術および方法は、これらの技術に明らかに含まれている。

【0164】

本発明は、生物学的サンプルにおける酵素の核酸の存在を検出するためのキットも包含する。例えば、キットは、標識された、もしくは標識可能な核酸などの試薬、または生物学的サンプルにおける酵素の核酸を検出することができる物質、サンプルにおける酵素の核酸の量を決定するための手段、およびサンプルにおける酵素の核酸の量をスタンダードと比較するための手段を含むことがある。化合物または物質は、適切な容器に包装されていることがある。キットは、酵素タンパク質のmRNAまたはDNAを検出するためにキットを使用するための指示をさらに含むことがある。

【0165】

核酸アレイ

本発明は、提供される配列情報に基づく核酸分子のアレイまたはマイクロアレイなどの、核酸検出キットをさらに提供する。

【0166】

本明細書で用いられる「アレイ」または「マイクロアレイ」は、紙、ナイロン、および他のタイプの膜、フィルター、チップ、スライドガラス、またはあらゆる他の適切な固体の支持体などの、基体上に合成した、別個のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのアレイを意味する。一実施形態では、米国特許第5,837,832号、WO/1995/011995、Lockhart, D.J.ら、(1996年、*Nat. Biotech.*、14巻、1675~1680頁)、およびSchena, M.ら(1996年;*Proc. Natl. Acad. Sci.*、93巻、10614~10619頁)に記載されている方法に従ってマイクロアレイを調製し、使用する。他の実施形態では、このようなアレイを、米国特許第5,807,522号に記載されている方法によって生成する。

【0167】

マイクロアレイまたは検出キットは、通常、固体の支持体に固定されている合成のアンチセンスのオリゴヌクレオチドまたはcDNAのフラグメントのいずれかである、多数の独特な、一本鎖のヌクレオチド配列からなるのが好ましい。オリゴヌクレオチドは、好ましくは長さ約6~60ヌクレオチドであり、より好ましくは長さ15~30ヌクレオチドであり、最も好ましくは長さ約20~25ヌクレオチドである。あるタイプのマイクロアレイまたは検出キットでは、長さ7~20ヌクレオチドにすぎないオリゴヌクレオチドを用いるのが好ましいことがある。マイクロアレイまたは検出キットは、知られている5'、もしくは3'、をカバーするオリゴヌクレオチド、配列、全長の配列をカバーする連続したオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド、または配列の長さに沿って特定の領域から選択される独特のオリゴヌクレオチドを含むことができる。マイクロアレイまたは検出キットで用いるポリヌクレオチドは、対象の一遺伝子または遺伝子に特異的であるオリゴヌクレオチドであってよい。

【0168】

マイクロアレイまたは検出キットを用いたサンプル分析の一例では、生物学的サンプルからのRNAまたはDNAを、ハイブリダイゼーションプローブに作成してもよい。mRNAを単離し、cDNAを生成し、アンチセンスのRNA(aRNA)を作成するためのテンプレートとして使用する。aRNAを蛍光のヌクレオチドの存在下で増幅し、プローブの配列がマイクロアレイまたは検出キットの相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、標識したプローブをマイクロアレイまたは検出キットとインキュベートする。ハイブリダイゼーションが正確な相補性のマッチで、または相補性の劣る様々な度合いで起こるように、インキュベーション条件を調節する。ハイブリダイズしていないプローブを除去した後、スキャナーを用いて蛍光のレベルおよびパターンを決定する。スキャナー画像を調べて、相補性の度合い、およびマイクロアレイまたは検出キット上の各オリゴヌクレオチド配列の相対的な存在量を決定する。生物学的サンプルは、対象のあらゆる適切な供給源から得ることができる。検出システムを用いて、個々の配列の全てに対するハイブリダイゼーションの非存在、存在、および量を、同時に測定する。このデータを、配列、発現パターン、突然変異、変異体、またはサンプル間、種間、もしくは環境サンプル間の多型に対する大規模な相関試験に用いることができる。

10

【0169】

本発明の試験サンプルには、細胞、タンパク質、または細胞の膜抽出物、または粗製の環境サンプルさえも含まれる。上記に記載した方法で用いられる試験サンプルは、アッセイフォーマット、検出方法の性質、およびアッセイすべきサンプルとして用いられる組織、細胞、または抽出物に基づいて変わる。核酸抽出物または細胞を調製するための方法は当技術分野ではよく知られており、利用されるシステムに適合性であるサンプルを得るために、容易に適用することができる。

20

【0170】

本発明の別の実施形態では、本発明のアッセイを行うのに必要な試薬を含むキットを提供する。

【0171】

ベクター/宿主細胞

本発明は、本明細書に記載する核酸分子を含むベクターも提供する。「ベクター」の語は、核酸分子を輸送することができるビヒクル、好ましくは核酸分子を意味する。ベクターが核酸分子である場合は、核酸分子はベクターの核酸に共有結合している。本発明のこの態様では、ベクターには、プラスミド、一本鎖もしくは二本鎖のファージ、一本鎖もしくは二本鎖のRNAもしくはDNAウイルスのベクター、またはBAC、PAC、YAC、もしくはMACなどの人工の染色体が含まれる。

30

【0172】

ベクターは、核酸分子のさらなるコピーを複製し生成する場合は、染色体外のエレメントとして宿主細胞に維持され得る。あるいは、ベクターは宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主細胞が複製する場合に核酸分子のさらなるコピーを生成することができる。

40

【0173】

本発明は、維持のためのベクター(クローニングベクター)、または核酸分子を発現するためのベクター(発現ベクター)を提供する。ベクターは原核細胞、または真核細胞、または両方で(シャトルベクター)で機能することができる。

【0174】

発現ベクターは、宿主細胞において核酸分子の転写が可能になるように、ベクターにおいて核酸分子に作動可能に連結しているシス作用性の調節領域を含む。核酸分子を、転写に影響を及ぼすことができる別々の核酸分子とともに宿主細胞中に導入してもよい。したがって、第2の核酸分子は、ベクターから核酸分子の転写を可能にするための、シス調節

50

性の制御領域と相互作用するトランス作用性の因子を提供することができる。あるいは、トランス作用性の因子は、宿主細胞によって供給され得る。最終的には、トランス作用性の因子を、ベクター自体から生成することができる。しかし、いくつかの実施形態では、核酸分子の転写または翻訳は、無細胞系で起こることがあることが理解される。

【0175】

本明細書に記載されている核酸分子がそれに対して作動可能に連結することができる制御配列には、mRNAの転写を指示するためのプロモーターが含まれる。これには、それだけには限定されないが、バクテリオファージXからのレフトプロモーター(left promoter)、lac、TRP、および大腸菌からのTACプロモーター、SV40からの初期および後期プロモーター、CMV前初期プロモーター、アデノウイルスの初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスの末端反復配列が含まれる。

10

【0176】

発現ベクターは、転写を促進する制御領域の他に、リプレッサー結合部位およびエンハンサーなど、転写を変調する領域も含むことがある。例として、SV40のエンハンサー、サイトメガロウイルスの前初期エンハンサー、ポリオマのエンハンサー、アデノウイルスのエンハンサー、およびレトロウイルスのLTRエンハンサーが含まれる。

【0177】

発現ベクターは、転写開始および制御のための部位を含む他に、転写終結に必要な配列、および転写された領域では翻訳のためのリボソーム結合部位も含むことがある。発現のための他の調節性の制御エレメントには、開始および終結のコドン、ならびにポリアデニル化シグナルが含まれる。当業者であれば、発現ベクターで有用である多くの制御配列を知っている。このような制御配列は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、(1989年)に記載されている。

20

【0178】

核酸分子を発現するために、様々な発現ベクターを用いることができる。このようなベクターには、染色体の、エピソームの、およびウイルス由来のベクター、例えば、細菌のプラスミドに、バクテリオファージに、酵母菌のエピソームに、酵母菌人工染色体を含む酵母菌の染色体エレメントに、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、およびレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクターが含まれる。ベクターは、また、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝因子、例えば、コスミドおよびファージミドに由来するものなど、これらの供給源の組合せに由来してもよい。原核生物および真核生物の宿主に好適なクローニングおよび発現のベクターは、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、(1989年)に記載されている。

30

【0179】

制御配列は、1つまたは複数の宿主細胞において構成的発現をもたらす(すなわち、組織特異的)、あるいは、温度、栄養素添加物、またはホルモンもしくは他のリガンドなどの外来性の因子などの、1つまたは複数の細胞タイプにおける誘導性の発現を提供することができる。原核生物および真核生物の宿主に構成的および誘導性の発現を提供する様々なベクターは、当業者であればよく知っている。

40

【0180】

核酸分子を、よく知られている方法によって、ベクターの核酸中に挿入してもよい。一般的には、最終的に発現されるDNA配列を、DNA配列および発現ベクターを1つまたは複数の制限酵素とともに切断し、次いでフラグメントと一緒にライゲートすることにより発現ベクターに連結する。制限酵素の消化およびライゲーションのための手順は、当業者であればよく知っている。

【0181】

好適な核酸分子を含むベクターを、よく知られている技術を用いて、増殖または発現の

50

ために好適な宿主細胞中に導入してもよい。細菌細胞には、それだけには限定されないが、大腸菌、ストレプトミセス、およびネズミチフス菌が含まれる。真核細胞には、それだけには限定されないが、酵母菌、ショウジョウバエ(*Drosophila*)などの昆虫細胞、COSおよびCHO細胞などの動物細胞、ならびに植物細胞が含まれる。

【0182】

本明細書に記載するように、ペプチドを融合タンパク質として発現するのが望ましいことがある。したがって、本発明は、ペプチドの生成を可能にする融合ベクターを提供する。融合ベクターは、組換えのタンパク質の発現を増大し、組換えのタンパク質の溶解性を増大し、例えば、アフィニティー精製のためのリガンドとして働くことによりタンパク質の精製において助けとなることができる。タンパク質分解性の切断部位を、望ましいペプチドが、融合部分から最終的に分離されるように、融合部分の接合部で導入してもよい。タンパク質分解性の酵素には、それだけには限定されないが、因子Xa、トロンピン、腸管酵素が含まれる。典型的な融合の発現ベクターには、標的の組換えタンパク質に対して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合性タンパク質、またはタンパク質Aと融合する、それぞれpGEX(Smithら、Gene、67巻、31~40頁(1988年))、pMAL(New England Biolabs、Beverly、マサチューセッツ州)、およびpRIT5(Pharmacia、Piscataway、ニュージャージー州)が含まれる。適切な誘導性の非融合の大腸菌発現ベクターには、pTrc(Amannら、Gene、69巻、301~315頁(1988年))、およびpET11d(Studierら、Gene Expression Technology:Methods in Enzymology、185巻、60~89頁(1990年))が含まれる。

10

【0183】

宿主細胞の、組換えのタンパク質をタンパク質分解性に切断する能力が損なわれている場合、遺伝的なバックグラウンドを提供することによって、宿主細胞における、組換えのタンパク質の発現を最大にすることができる(Gottesman,S.、Gene Expression Technology:Methods in Enzymology、185巻、Academic Press、San Diego、カリフォルニア州(1990年)119~128頁)。あるいは、対象の核酸分子の配列を改変して、特定の宿主細胞、例えば大腸菌に対する優先的なコドン利用を提供してもよい(Wadaら、Nucleic Acids Res.、20巻、2111~2118頁(1992年))。

20

【0184】

核酸分子を、酵母菌で活動性である発現ベクターによって発現してもよい。酵母菌、例えば、出芽酵母における発現のためのベクターの例には、pYepSec1(Baldariら、EMBO J.、6巻、229~234頁(1987年))、pMFa(Kujanら、Cell、30巻、933~943頁(1982年))、pJRY88(Schultzら、Gene、54巻、113~123頁(1987年))、およびpYES2(Invitrogen Corporation、San Diego、カリフォルニア州)が含まれる。

30

【0185】

核酸分子は、例えば、バキュロウイルスの発現ベクターを用いて、昆虫細胞で発現させてもよい。培養した昆虫細胞(例えば、Sf9細胞)におけるタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスのベクターには、pAcシリーズ(Smithら、Mol.Cell Biol.、3巻、2156~2165頁(1983年))、およびpVLシリーズ(Lucklowら、Virology、170巻、31~39頁(1989年))が含まれる。

【0186】

本発明のある実施形態では、本明細書に記載する核酸分子を、哺乳動物の発現ベクターを用いて哺乳動物の細胞で発現させる。哺乳動物の発現ベクターの例には、pCDM8(Seed、B.、Nature、329巻、840頁(1987年))、およびpMT2PC(Kaufinanら、EMBO J.、6巻、187~195頁(1987年))が含まれる。

40

【0187】

本明細書に列挙する発現ベクターを、核酸分子を発現するのに有用である、当業者には入手可能なよく知られているベクターの例示によってのみ提供する。当業者であれば、本明細書に記載する核酸分子の増殖または発現を維持するのに適する他のベクターを知っている。これらは、例えば、Sambrook,J.、Fritsch,E.F.、およびManiatis,T.、Molecular Cloning:A Laboratory Manual.、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring

50

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989年に見られる。

【0188】

本発明は、本明細書に記載するヌクレオチド配列がベクター中にリバースの方向でクローニングされるが、アンチセンスRNAの転写を可能にする制御配列に作動可能に連結しているベクターも包含する。したがって、アンチセンスの転写物を、コード領域および非コード領域の両方を含む本明細書に記載する核酸分子の配列の全てに、または一部分に対して生成してもよい。このアンチセンスのRNAの発現は、センスRNAの発現(制御配列、構成的または誘導性の発現、組織特異的発現)に関する上記に記載した各々のパラメータに左右される。

【0189】

本発明は、本明細書に記載するベクターを含む組換えの宿主細胞にも関する。したがって、宿主細胞には、原核細胞、酵母菌などの、より下位の真核細胞、昆虫細胞などのその他の真核細胞、哺乳動物の細胞などの、より上位の真核細胞が含まれる。宿主細胞には、それだけには限定されないが、カイコの幼虫、CHO細胞、大腸菌、および酵母菌が含まれ得る。

【0190】

当業者であれば容易に利用できる技術により、本明細書に記載したベクター構築物を細胞中に導入することによって、組換えの宿主細胞を調製する。これには、それだけには限定されないが、リン酸カルシウム形質移入、DEAE-デキストラン媒介形質移入、陽イオン性脂質媒介形質移入、電気穿孔、形質導入、感染、リポフェクション、およびSambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989年)に見られるものなどの他の技術が含まれる。

【0191】

宿主細胞は、1つを超えるベクターを含むことがある。したがって、異なるヌクレオチド配列を、同じ細胞の異なるベクター上に導入することができる。同様に、核酸分子を、単独で、または、例えば、発現ベクターにトランス作用性の因子をもたらすものなどの、核酸分子に関連しない他の核酸分子と、導入することができる。1つを超えるベクターを細胞中に導入する場合、ベクターを個々に導入してもよく、同時導入してもよく、または核酸分子のベクターに連結してもよい。

【0192】

バクテリオファージおよびウイルスのベクターの場合は、これらを、感染および形質導入に対する標準の手順により、パッケージングされた、または封入されたウイルスとして、細胞中に導入することができる。ウイルスのベクターは、複製可能でもよく、または複製欠損でもよい。ウイルスの複製が欠損性である場合は、複製は、欠損を補う機能を提供する宿主細胞で起こる。

【0193】

ベクターは、組換えのベクター構築物を含む細胞亜集団の選択を可能にする選択可能なマーカーを一般的に含む。マーカーは、本明細書に記載する核酸分子を含む同じベクターに含まれていてもよく、または別々のベクター上にあってもよい。マーカーは、原核生物の宿主細胞に対してはテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性の遺伝子を含み、真核生物の宿主細胞に対してはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシンに耐性の遺伝子を含む。しかし、表現型の形質に対して選択をもたらすあらゆるマーカーが有効である。

【0194】

成熟したタンパク質を細菌、酵母菌、哺乳動物の細胞、および他の細胞で、好適な制御配列の制御下で生成し、一方、無細胞の転写および翻訳系をやはり用いて、本明細書に記載するDNA構築物に由来するRNAを用いてこれらのタンパク質を生成してもよい。

【0195】

酵素などのタンパク質を含む多重膜貫通ドメインで実現するのが困難である、ペプチドの分泌が望まれる場合は、好適な分泌シグナルをベクター中に組み入れる。シグナル配列

10

20

30

40

50

は、ペプチドに対して内在性でもよく、またはこれらのペプチドに対して異種性でもよい。

【0196】

ペプチドが培地中に分泌されない場合は、タンパク質を、凍結溶解、超音波処理、機械的破壊、溶解試薬の使用などを含む標準の破壊手順により、宿主細胞から単離してもよい。次いで、ペプチドを回復し、硫酸アンモニウム沈澱、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、または高速液体クロマトグラフィーを含むよく知られている精製方法によって精製してもよい。

10

【0197】

本明細書に記載するペプチドの組換えの生成における宿主細胞に応じて、ペプチドは、細胞に応じて様々なグリコシル化のパターンを有してもよく、または、細菌で生成される場合のように非グリコシル化でもよい。さらに、ペプチドは、宿主が媒介するプロセスの結果として、ある場合には、開始の修飾されたメチオニンを含んでもよい。

【0198】

ベクターおよび宿主細胞の使用

本明細書に記載するペプチドを発現する組換えの宿主細胞には、様々な使用がある。第1に、細胞は、さらに精製されて望ましい量の酵素タンパク質またはフラグメントを生成することができる酵素タンパク質またはペプチドを生成するのに有用である。このように、発現ベクターを含む宿主細胞は、ペプチドの生成に有用である。

20

【0199】

宿主細胞は、上記に記載したもの、および当技術分野では知られている他のフォーマットなどの、酵素タンパク質または酵素タンパク質のフラグメントを伴う細胞ベースのアッセイを行うのにも有用である。このように、天然の酵素タンパク質を発現する組換えの宿主細胞は、酵素タンパク質の機能を刺激または阻害する化合物をアッセイするのに有用である。

【0200】

宿主細胞は、その機能が影響を受けた酵素タンパク質の突然変異体を同定するのに有用である。突然変異体が天然に生じ、病原性を生じた場合は、突然変異を含む宿主細胞は、天然の酵素タンパク質に対するその機能によって示されないことがある突然変異の酵素タンパク質に対して望ましい影響(例えば、機能を刺激し、または阻害する)を有する化合物をアッセイするのに有用である。

30

【0201】

トランスジェニック

アラクノカンパのルシフェラーゼの核酸を用いて、トランスジェニックの、非ヒトの植物もしくは動物、または細胞系における部位特異的な遺伝子修飾を産生することができる。本発明のトランスジェニック細胞には、導入遺伝子として存在する本発明による1つまたは複数の核酸が含まれ、この定義内には、導入遺伝子を含むように形質転換された親細胞およびその子孫が含まれる。

40

【0202】

多くの実施形態では、トランスジェニック細胞は、本発明による核酸を、通常、内部に持たず、または含まない細胞である。トランスジェニック細胞が対象の核酸を天然に含むこれらの実施形態では、核酸は、その天然の位置以外の位置で細胞に存在し、すなわち、非天然の位置で細胞のゲノムの材料中に組み込まれる。

【0203】

トランスジェニック動物は、相同組換えにより作成することができ、この場合、内因性の遺伝子座が変更される。あるいは、核酸構築物を、ゲノム中にランダムに組み込む。安定に組み込むためのベクターには、プラスミド、レトロウイルス、および他の動物ウイルス、YAC、などが含まれる。

50

【0204】

本発明のトランスジェニックの生物体には、内在性の遺伝子の発現が排除されない場合には少なくとも低減される内在性のノックアウトである、細胞および多細胞性の生物体、例えば、植物および動物が含まれる。対象のトランスジェニックの生物体には、タンパク質またはその変異体が、通常発現されない細胞もしくは組織で発現され、またはそのような細胞もしくは組織に通常存在しないレベルで発現される、細胞および多細胞性の生物体、例えば、植物および動物も含まれる。相同組換えのためのDNA構築物は、本発明の遺伝子の少なくとも一部分を含み、遺伝子は望ましい遺伝的修飾を有し、標的の遺伝子座に対して相同性の領域を含む。ランダムな組込みのためのDNA構築物は、組換えを媒介するための相同の領域を含む必要がない。好都合なことに、ポジティブ選択およびネガティブ選択のためのマーカーが含まれ得る。

10

【0205】

相同組換えによって標的とする遺伝子修飾を有する細胞を産生するための方法は、当技術分野では知られている。哺乳動物に形質移入するための様々な技術については、Keownら(1990年)、Meth.Enzymol., 185巻、527~537頁を参照されたい。胚性幹(ES)細胞に対しては、ES細胞系を使用することができ、または胚細胞10個を、例えば、マウス、ラット、モルモットなどの宿主から新たに得てもよい。このような細胞は、好適な線維芽細胞-フィーダー層上で増殖し、または白血病抑制因子(LIF)の存在下で増殖する。ESまたは胚性細胞を形質転換した場合、これをトランスジェニック動物を生成するのに用いてもよい。形質転換後、細胞を、好適な培地においてフィーダー層上に塗抹する。構築物を含む細胞を、15個の選択培地を使用することにより、検出することができる。コロニーが増殖するのに十分な時間の後、これを取り、相同組換え、または構築物の組込みの出現について分析する。次いで、ポジティブであるコロニーを、胚の操作および、胚盤胞の注入に用いることができる。胚盤胞は、4~6週齢の過排卵したメスから得られる。ES細胞をトリプシン化し、修飾した細胞を、20個の胚盤胞の芽球中に注射する。注射後、胚盤胞を、偽妊娠したメスの各々の子宮角に戻す。次いで、メスに妊娠期間を満了させ、得られた子孫を構築物に対してスクリーニングする。異なる表現型の胚盤胞、および遺伝的に修飾した細胞を提供することにより、キメラの子孫を容易に検出することができる。キメラの動物を、修飾された遺伝子の存在についてスクリーニングし、修飾を有するオスとメスとを交配してホモ接合性の子孫を生成する。発達のいくつかの点で遺伝子の変更が致死性をもたらす場合は、組織または器官を、同種間の、もしくは類遺伝子の移植片、もしくは移植体として、またはin vitro培養物で維持することができる。トランスジェニック動物は、あらゆる非ヒトの哺乳動物、例えば、実験動物、家畜などであってよい。トランスジェニック動物を、モジュレーターに関する機能上の実験またはスクリーニングで、または当業者には提供され、もしくは知られている他の使用で用いることができる。

20

30

【0206】

トランスジェニック植物を、類似の様式で生成し、用いることができる。トランスジェニックの植物細胞および植物を調製する方法は、米国特許第5,767,367号、第5,750,870号、第5,739,409号、第5,689,049号、第5,689,045号、第5,674,731号、第5,656,466号、第5,633,155号、第5,629,470号、第5,595,896号、第5,576,198号、第5,538,879号、第5,484,956号に記載されている。トランスジェニック植物を生成する方法は、Plant Biochemistry and Molecular Biology(Lea&Leegood編集、John Wiley&Sons)(1993年)、275~295頁にも再考されている。

40

【0207】

簡潔に述べると、適切な植物の細胞または組織を、植物種の性質に応じて回収する。このようなものとして、ある場合には、プロトプラストを単離するが、このようなプロトプラストは、例えば、葉、ハイポクチル(hypocotyl)、根など、様々な異なる植物組織から単離することができる。プロトプラストを単離するために、回収した細胞を、細胞壁を除去するためにセルラーゼの存在下でインキュベートするが、この場合、正確なインキュベーション条件は、細胞が由来する植物または組織のタイプに応じて変化する。次いで、得ら

50

れたプロトプラストを、ふるいにかけて、遠心分離することによって、得られた細胞の残骸から分離する。プロトプラストを用いる代わりに、体細胞を含む胚形成性の外植片を、トランスジェニックの宿主を調製するために用いてもよい。細胞または組織の回収の後、外因性の対象のDNAを植物細胞中に導入する。このような導入には、様々な異なる技術が利用可能である。単離したプロトプラストでは、プロトプラストのネイキッドのDNA(例えば、PEGまたはPLOなど多価陽イオンの存在下で対象の外来のコード配列を含むプラスミドなど)とのインキュベート、および対象の外来の配列を含むネイキッドのDNAの存在下におけるプロトプラストの電気穿孔を含めた、DNA-媒介性の遺伝子移入のプロトコールにより、導入の機会が生じる。

【0208】

次いで、外来のDNAを上首尾に取り上げるプロトプラストを選択し、カルスに増殖させ、最終的には、好適な量および比率の、オーキシンおよびサイトカイニンなどの刺激因子と接触させることによりトランスジェニック植物中に増殖させる。胚形成の外植片では、標的の体細胞において外来性のDNAを導入する便利な方法は、粒子加速または「遺伝子銃」のプロトコールの使用によるものである。得られた外植片を、次いで、キメラ植物中に増殖させ、交雑し、トランスジェニックの子孫を得る。

【0209】

上記に記載したネイキッドのDNAの取組みの代わりに、トランスジェニック植物を生成する別の便利な方法は、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)媒介性の形質転換である。アグロバクテリウム媒介性の形質転換では、外来のDNAを含むコインテグレートベクターまたはバイナリーベクターを調製し、次いで、好適なアグロバクテリウム株、例えば、アグロバクテリウム・チュメファシエンス(*A. tumefaciens*)中に導入する。得られた細菌を、次いで、調製したプロトプラスト、または組織の外植片、例えば、リーフディスクとインキュベートし、カルスを生成させる。次いで、カルスを、選択的な条件下で増殖させ、選択し、増殖培地に曝して、最終的にトランスジェニック植物を生成するための、根およびシュートの増殖を誘導する。

【0210】

発現ベクターで有用な、あらゆる制御配列、または他の配列は、トランスジェニック配列の部分形成することができる。これには、すでに含まれない場合には、イントロンの配列、およびポリアデニル化シグナルが含まれる。組織特異的な制御配列は、特定の細胞に酵素タンパク質を直接発現させるための導入遺伝子に作動可能に連結してよい。

【0211】

(実施例)

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれるものである。以下の実施例で開示する技術は、本発明を實踐する上で良好に機能するように、本発明者らによって見出された技術を代表しており、したがって、それを實踐するための好ましい様式を構成するとみなしてもよいことを、当業者であれば理解すべきである。しかし、当業者であれば、本開示に照らし合わせて、開示されている特定の実施形態に多くの変更を行うことができ、依然として本発明の精神および範囲から逸脱することなしに同様または類似の結果を得ることができることを理解しなければならない。

【0212】

実施例で使用する種々の材料および方法

昆虫

NSW国立公園、およびWildlife Serviceから得たインフォームドコンセントの下でアラクノカンパ・リカルドサエ(*Arachnocampa richardsae*)の個体を回収した。アラクノカンパ・リカルドサエの幼虫100匹を、Newnes Railway Tunnel、地図番号8931、グリッド照合E414 N187、ニューサウスウェールズ州、オーストラリアから回収した。幼虫を研究室に輸送し、顕微鏡下で、発光器を死体の残部から解剖した。

【0213】

アラクノカンパ種は、当技術分野では知られている手段によって培養することができる

10

20

30

40

50

。Takaie,H(1989年)、Breeding and display of the glow-worms, *Arachnocampa* spp., *Insectarium*, 第26巻、7月、214~219頁;Takaie,H.(1997年)、「Ten years of the glow-worm (*Arachnocampa richardsae*) rearing at Tama Zoo -Fascination of a living milky way.」、*Insectarium*, 34巻、11月、336~342頁;Sakurai, Y., R. Komatani, K. Tabata、およびH. Takaie、「On the glow-worm breeding at Tama Zoo.」を参照されたい。

【0214】

RNAの単離

全RNAを、RNAqueous(商標)Micro Kit(Ambion)を用いて、組織を300 μ l溶解溶液で粉碎する以外は、製造元の指示に従って、1個の死体、または約10個の発光器のいずれかから単離した。

【0215】

cDNAライブラリー

死体および発光器を代表するcDNAを、Creator(商標)SMART(商標)cDNA Library Construction Kit(Clontech)を修飾して用いて構築した。最初に、鎖のcDNAを、記載されている長距離(LD)PCR法によって、1マイクログラムの増幅した全RNAおよびcDNAを用いて、20サイクルを用いて合成した。増幅した2本鎖cDNA 2マイクログラムに、製造元によって記載されたProteinase KおよびSfiI消化を受けさせ、cDNAサイズ分画カラム(Invitrogen)上で製造元の指示に従って分画化した。個々の分画(最高100ngの2本鎖cDNA)を、100ngのSfiI消化したpDNR-LIBとライゲートし、引き続き、ElectroMAX(商標)DH10 (商標)T1ファージ耐性大腸菌(Invitrogen)中に電気穿孔した。各DNAライブラリーのグリセロールストックを、非増幅のライブラリーを50%(v/v)グリセロール-LBで1:2に希釈することにより調製した。さらに、各発光器のcDNAライブラリーから独立に取った1056個のクローンのグリセロールストックを、低蒸発性の蓋付き96ウェルのポリスチレン製平底プレート(Becton Dickinson)に単一コロニーを10%(v/v)グリセロール-LB 100 μ lに接種し、37 $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートすることにより、調製した。これを、-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

【0216】

プラスミドの単離:

2つの発光器のcDNAライブラリー各々に対して(分画10のライブラリー、および分画9のライブラリー)、96個のランダムに取ったクローンからプラスミドDNAを調製した。

【0217】

96ウェルのプラスミドDNAの調製

プラスミドDNAを、Millipore Corporation(Beckman Coulter-Biomek2000 Workstation(商標)、Millipore Protocols, 2002年8月)によって供給される情報から修飾した方法に従って調製した。個々のコロニーを、滅菌96深型ウェルプレートに30 μ g/mLのクロラムフェニコールを含む、1.1mlの2xLuria Broth中に接種した。プレートをAeraSeal(商標)(Excel Scientific, Wrightswood, カリフォルニア州)で覆い、37 $^{\circ}$ Cで、320rpmに設定したオービタルシェーカーで24時間インキュベートした。プレートを室温で5分間、1500gで遠心分離し、上清をデカントし、プレートをティッシュ上でしっかりとたたくことにより、過剰の溶液をペレットから除去した。

【0218】

BioMek2000(商標)robotic workstation(Beckman Coulter)を用いて、溶液1(30mMグルコース、15mM Tris-HCl (pH8.0)、30mM Na₂EDTA、60 μ g/ml RNase) 150 μ lを各ウェルに加え、混合した。プレートを手操作で、3分間ボルテックスした。溶液2(0.2N NaOH、1%(w/v)SDS)150 μ lを加え、その後溶液3(3.6Mカリウム;6M酢酸塩)を加えた。ウェルの内容物を完全に混合し、粗製の溶解物300 μ lを、真空マニホールド上のPlasmid(商標)プレート(Millipore)上に配置したMultiScreen(商標)クリアリングプレート(Millipore)に移した。溶解物を、真空下でろ過した(7分間203mmHg)。クリアリングプレートを捨て、溶解物を、Plasmidプレート上で真空ろ過した(8分間508mmHg)。Plasmidプレートを、6分間同じ真空下で、ウェル1枚につき水200 μ lで洗浄した。真空を開放し、10mM Tris(pH8.0)35 μ lをPlasmidプレートの各ウェルに加え、このプレートを600rpmで15分間振盪した。プラスミドDNA

10

20

30

40

50

を含むウェルの内容物を、マルチチャンネルピペットで回収した。

【0219】

配列決定

クローンを、CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing(商標)を、Quick Start Kit(商標)(Beckman Coulter)、および100fmolのプラスミドDNAとともに用いて配列決定した。

【0220】

アラクノカンパ・リカルドサエの発光器のcDNAライブラリーからクローンをスクリーニングするためのドットプロットング

ツチポタルの発光器のcDNAライブラリー(分画9)のグリセロールストックからのクローンを、96ウェルのレプリケーター(V&P Scientific, Inc.)を用いて、Hybond-XL(商標)メンブレン(Amersham)上にスポットした。次いで、メンブレンを変性させ、中和し、製造元の指示に従って固定した。

10

【0221】

以下のプライマーを用いて調製した、796bpの ³²P-dATP標識したPCRプローブで、ドットプロットをプローブした:

フォワードプライマー GWLucScreenU 5'-GATGATAATGCACCAGAAAAG-3' クローン1E1のヌクレオチド142~162に対する(配列番号11)

リバースプライマー GWLucScreenL 5'-TTATAATATCCAGCATCACCA -3' クローン1E1のヌクレオチド938~918に対する(配列番号12)

【0222】

PCRプローブを、MillicanおよびBirdの方法(Millican and Bird、1997年)に従って、テンプレートとしてcDNAクローン1E1を用いて、TaqDNAポリメラーゼ(Invitrogen)で産生した。プロットをハイブリダイズし、メンブレンの製造元の指示に従って洗浄し、次いでX線フィルムに曝露した。プラスミドDNAを、1E1にハイブリダイズするクローンから精製し、挿入物を配列決定した。

20

【0223】

アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼをコードする全長のcDNAの構築

2バージョンの、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAを調製した。GWLuc#1(配列4)はコンセンサスのコード配列を含み、一方、GWLuc#2は、単一の、サイレントの、1308位におけるコンセンサスからの逸脱を含んでいた。GWLuc#1およびGWLuc#2は、3'UTRにおける単一の塩基でも異なる。

30

【0224】

GWLuc#1を、クローン8F5の5'領域、およびクローン4F12の3'領域を用いて構築した。クローン8F5は、ツチポタルの発光器のcDNAライブラリーの分画9(プレート8;位置F5)から単離した全長のcDNAである。これは、独特のBamHI部位(1030)の領域3'におけるコンセンサスとの、3つの相違を含んでいる。クローン4F12は、一部分のcDNAであり、長さ1.5kbであり、同じBamHI部位の3'は、コンセンサスのコード配列と正確に一致する。したがって、pDNR-LIBのMCSにおけるBamHI部位とXhoI部位との間のクローン8F5の3'末端が除去され、クローン4F12からの対応するフラグメントがクローン8F5にスプライスした。

40

【0225】

GWLuc#2を、上記に記載したのと同じ8F5クローンを用いて構築し、この場合、独特のBamHI部位の領域3'が、クローン1B6から挿入された対応するフラグメントと置き換わっていた(CでTを置換)。

【0226】

構築物を、Platinum Pfx(商標)DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いて、製造元の指示に従って、PCRによって増幅した。

【0227】

ルシフェリン抽出物の調製

分画を含むアラクノカンパのルシフェリン(以降、「GWルシフェリン」と呼ぶ)を、Viviani(Viviani、Hastingsら、2002年)に従って、アラクノカンパの発光器から調製した。ア

50

ラクノカンパ・リカルドサエからの90個の発光器を、0.1M熱クエン酸バッファーpH5でホモジナイズした。上清を95℃で5分間インキュベートし、0.1M HClでpH2.5~3.0に酸性化した。抽出物を、等体積の酢酸エチルで抽出し、窒素下で乾燥させた。残渣を、水に溶解した。

【0228】

複数の配列アラインメント

複数の配列アラインメントおよび系統樹を、PROTMLまたはPROTPARSプログラム: PROTML (Adachi, J. およびHasegawa, M., 1996年: Molphy Version 2.3、最大の尤度に基づく分子系統学に対するプログラム。Computer Science monographs, No.28, Institute of Statistical Mathematicsの出版物、東京); PROTPARS (Felsenstein, J., 1989年、PHYLIIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2) Cladistics 5: 164~166頁) を用いて導き出した。ペアワイズのアラインメント、ならびに配列の同一性および相同性のレベルを、BestFit (GCG) を用いて決定した。配列アラインメントプログラムを、Australian National Genomic Information Service (<http://www.angis.org.au>) によって提供されるBioManagerインターフェイスにより使用した。

10

【0229】

(実施例1)

アラクノカンパのルシフェラーゼをコードする核酸の単離

死体のcDNAライブラリーを、分画化した死体の2本鎖cDNAの分画8~10から構築し、発光器のcDNAライブラリーを、分画化した2本鎖cDNAの分画9および10から、それぞれ構築した。

20

【0230】

各々の発光器cDNAライブラリーから単離した96個のクローンのうち、92個および95個のクローンをそれぞれ配列決定し、成功した。各配列を、tBLASTxプログラムを用いてNCBIデータベースに対して問い合わせた。分画10の発光器のcDNAライブラリーからは、あらゆるルシフェラーゼに対してあらゆる相同性を有するとしてクローンは同定されなかったが、分画9の発光器のcDNAライブラリーからの5個のクローンは、ルミネセンスの甲虫のルシフェラーゼに対して相同性を有していた。クローン1E1(1275bp); 1B6(1163bp); 1F7(948bp); 1G12(768bp); および1C5(494bp)を完全に配列決定し、同じオープンリーディングフレームを代表する、独立に引き出された5'-切断した部分的なcDNAであることが示され、tBLASTx検索では、5個全てがフリクソスリックス・ビビアニ(*Phrixothrix vivianii*) およびフリクソスリックス・ヒトラス(*Phrixothrix hirtus*)からのルシフェラーゼに相同性を示した。これらの甲虫の種(甲虫類: フェンゴデス科)はルミネセントの幼虫を有し、「鉄道虫」として知られている。cDNA配列5個全てが5'末端で様々な程度に切断された。5個のクローンを配列分析すると、3'末端で11個の塩基の置換が確認され、そのうち3個はサイレントである。

30

【0231】

cDNAを増幅するためにブルーフリーディングDNAポリメラーゼを使用したにも関わらず(Advantage 2 Polymerase Mix, Clontech)、高レベルの推定上の配列の変異体が各増幅ステップの後に得られた。これは、真正の配列を決定し、この配列との単位複製配列を単離するために、複数の独立した単位複製配列の配列決定を必要とした。フォティヌス・ピラリスのルシフェラーゼを別のブルーフリーディングDNAポリメラーゼ(Pfx, Invitrogen)と増幅した場合に、類似の現象が観察された。ホタルおよびアラクノカンパのルシフェラーゼは、高比率のヌクレオチドダイアドが存在するという、普通ではない特徴を共有するが、これはこれらの配列を標的としたPCRのフィデリティが比較的劣ることをおそらく説明することができる。

40

【0232】

ツチボタルの発光器のcDNAライブラリー(分画9)のグリセロールストックからのクローンを、96ウェルのレプリケーター(V&P Scientific, Inc)を用いて、Hybond-XLメンブレン(Amersham)上にスポットした。メンブレンを、製造元の指示に従って、変性させ、中和し

50

、固定した。

【0233】

1E1由来のプロープでスクリーニングした発光器のcDNA含有コロニー960個のうち、29個(約3%)からポジティブのシグナルが得られた。メンブレンをレプリケーターと接触させる有効性は絶対的ではなかったため、これはポジティブの総数を低く見積もっていた可能性がある。1E1プロープでスクリーニングした分画9の死体のcDNAライブラリーからの約1000個のコロニーのうちで、ポジティブであるものは見出されなかった。

【0234】

最も強いハイブリダイゼーションシグナルを与えた21個のクローンを、フォワードプライマーとして5'ベクター配列に対して向けられているpDONR11BM13F、およびリバースプライマーとして1E1のヌクレオチド804~788に対して向けられているGWLuc484を用いて、PCRによりスクリーニングした。10個の標的のクローンから単位複製配列を得、それらが1E1の5'末端とのオーバーラップしていることを確認した。4個の単位複製配列が、1E1よりも長いことが示された。クローン4F12から得た、そのうちの1個は、1.1キロ塩基対の長さであり、全クローンの長さが1.5キロ塩基対であったことを示していた。クローン11B11、8F5、および6B6から得た、他の3個の単位複製配列は、1.3キロ塩基対で、全て同じ長さであり、各々のクローンが1.7塩基対の長さであることを示していた。

【0235】

アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの完全なオープンリーディングフレームの配列を、クローン1E1、1B6、1F7、1C5、1G12、および11B11、8F5、および6B6の配列決定によって推定した。少なくとも3個の、独立のクローンからの配列を、全ヌクレオチド位置で比較した。コンセンサスのヌクレオチド配列を、図1Aから図1B、すなわち配列番号1に示す。数の小さい番号の場合では、3個またはそれを超える配列決定をしたクローンのうち単に1個が、コンセンサスと異なる配列を有していた。これらの変異を、表3に列挙する。

【0236】

【表3】

表3. 配列決定したアラクノカンパ・リカルドサエの部分または全長のクローンにおける独特なヌクレオチド変異。

cDNAにおけるヌクレオチド位置	コンセンサス	変異体
190	G	C
215	T	C
613	T	C
654	T	C
702	T	C
920	A	T
1122	A	G
1159	A	C
1245	T	C
1291	A	G
1308	T	C
1310	T	C
1346	T	C
1491	A	C
1493	A	T

【0237】

クローン11B11、8F5、および6B6に共通する5'末端の上流のあらゆるさらなる非翻訳の配列を同定するために、PCRのスクリーニングを行った。ルシフェラーゼ遺伝子の5'末端を代表するcDNAクローンを、セミアンカーPCRにより、テンプレートとしてアラクノカン

パの発光器のcDNAを用いて得た。アラクノカンパの発光器のcDNAを構築する上で(Creator SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech)、LD-PCR合成)、SMART IV Oligoプライマーを増幅するcDNA全てに加えた。したがって、SMART IV Oligoプライマーの一部を用いて、PCR反応の5'末端に固定した:5'-CAACGCAGAGTGGCCATTA-3'(配列番号13)。ルシフェラーゼのcDNAのヌクレオチド514~494に向けられている、ルシフェラーゼ遺伝子に特異的なプライマー:5'-TGGCTTTTCTGGTGCATTATC -3'(配列番号14)を、リバースプライマーとして用いた。アリコートのアラクノカンパの発光器のcDNAプールを先に記載したように調製したが、消化およびサイズ分画の前に、テンプレートとして使用した。DNAをHotStarTaq DNAポリメラーゼ(Qiagen)で増幅した。単位複製配列(約500bp)を、pGEMTeasy(Promega)中にクローニングした。ルシフェラーゼのcDNAを保有すると確認された13個のクローンを配列決定した。このうち、8個が、推定の全長のルシフェラーゼのcDNAクローンである11B11、8F5、および6B6とちょうど同じ5'UTR配列を有していた。

10

【0238】

cDNAは、1つの翻訳フレームにおいて、単一の長いオープンリーディングフレームを示す。この配列は、配列番号2のものと対応する。ORFは、リボソームの開始に対して正しいAXXAUGGの状況で、AUGで開始し(Kozak、1986年;Kozak、1987年)、ヌクレオチド1621位で、UAAの終止コドンで終わる。タンパク質は、アミノ酸530個の長さで、他の昆虫のルシフェラーゼ、およびルシフェラーゼ様タンパク質と類似の長さである。

【0239】

ルシフェラーゼの計算上の分子量は58955であり、計算上の等電点は7.36である。それ自体は、フォティヌス・ピラリスのルシフェラーゼ(de Wetら、1987年)、および数々の他のホタルのルシフェラーゼよりも、わずかに小さい。アラクノカンパのルシフェラーゼの計算上の分子量は、ゲルろ過により決定した値と、実質的に異なっている。Viviani, Hastingsら(2002年)は、36kDaの分子量を教示している。

20

【0240】

(実施例2)

アラクノカンパのルシフェラーゼの配列の、他の昆虫のルシフェラーゼの配列との比較

アラクノカンパのルシフェラーゼの配列で、NCBIデータベースのtBLASTX検索をすると、キイロショウジョウバエ(*D.melanogaster*)、およびハマダラカ(*Anopheles gambiae*)からのルシフェラーゼ様タンパク質、ならびにフリキソスリックス・ビビアニ(*Phirixothrix viviani*)、ホタル、および他のルミネセントの甲虫からのルシフェラーゼとのヒットを回収した。アラクノカンパのルシフェラーゼと甲虫との間のアミノ酸の相同性は、アラクノカンパの配列のAsn 9で始まり、甲虫のルシフェラーゼにおける5位と9位の間に見られる保存されているアスパラギンに対応する(図6)。

30

【0241】

ヌクレオチドレベルでは、フリキソスリックス・ビビアニのルシフェラーゼと最高レベルの同一性(58.1%)があったが、フォティヌス・ピラリスとの同一性のレベル(57.1%)が殆ど同程度に高い(表4)。

【0242】

【表4】

表4. アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼと、2つの代表的なルミネセントの甲虫のルシフェラーゼおよび2つの非ルミネセントのハエのシフェラーゼ様タンパク質との間のペアワイズ配列比較の要約。フリキソスリックス・ヴィヴィアニは、NCBI配列データベースのtBLASTx検索においてアラクノカンパ・リカルドサエをクエリーとして用いて生成した最高のスコア付けルシフェラーゼヒットである。

	ヌクレオチド レベル	アミノ酸レベル	
	%同一性	%相同性	%同一性
フリキソスリックス・ヴィヴィアニのルシフェラーゼ(アミノ酸545個)	58.1	48.3	34.9
フォティヌス・ピラリスのルシフェラーゼ(アミノ酸550個)	57.1	45.7	33.0
キイロショウジョウバエのルシフェラーゼ様タンパク質(DroCG6178)(アミノ酸544個)	55.6	51.2	38.8
ハマダラカのルシフェラーゼ様タンパク質(AgCP8896)(アミノ酸493個の部分配列)	54.5	48.8	36.8

10

20

【0243】

キイロショウジョウバエおよびハマダラカのルシフェラーゼ様タンパク質は、わずかにより低レベルのヌクレオチド同一性を有する。アミノ酸レベルでは、キイロショウジョウバエのルシフェラーゼ様タンパク質で、最高レベルの同一性(38.8%)および相同性(51.2%)である。フリキソスリックス・ビビアニからの酵素では、機能上のルシフェラーゼと最高レベルの同一性(34.9%)および相同性(48.3%)である(表4)。明らかに、アラクノカンパ種のルシフェラーゼは、ホタルおよび他の甲虫のルシフェラーゼと同様、同じ遺伝子のスーパーファミリーに属する。アラクノカンパのルシフェラーゼは、ファミリーの新規なメンバーであり、甲虫のルシフェラーゼに離れて関連しているにすぎないことも明らかである。これはアミノ酸レベルでは、配列の類似性は、in vivoまたはin vitroでルミネセント活性のないルシフェラーゼ様タンパク質よりも高いという観察から強調される。

30

【0244】

コメツキムシ科からの1属、フェンゴデス科からの1属、ホタル科からの8属を代表する18種のルミネセントの甲虫からのルシフェラーゼ配列のアラインメントをもとにすると、甲虫のルシフェラーゼは、128個の絶対的に保存されているアミノ酸残基を共有する(図6)。ホタルのルシフェラーゼは、一貫してアミノ酸残基約550個の長さからなる。したがって、今日まで配列決定されている甲虫のルシフェラーゼのグループの全メンバーの中でも、約23%の残基が絶対的に保存されている。これとは対照的に、ルシフェラーゼ、アシル-CoAリガーゼ、およびペプチド合成酵素のスーパーファミリーの全メンバーの中では、たった7個の残基だけが完全に保存されている(Contiら、1996年)。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの配列は、128個の位置中58個で、甲虫のルシフェラーゼのコンセンサスのものと異なる(表3)。したがって、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼ配列は、ルミネセンスの問題に対して、ホタルによって表されたものと大いに異なる解決法を示している。

40

50

【 0 2 4 5 】

【 表 5 A 】

表5. 全ての甲虫のルシフェラーゼの中で完全に保存されているが、そこでアラクノカンパ・リカルドサエの配列が分岐する58残基のリスト

フォティヌス・ピラリス ^A における残基番号	全ての甲虫類のルシフェラーゼのコンセンサス残基	アラクノカンパ・リカルドサエにおける残基	アラクノカンパ・リカルドサエにおける残基番号 ^B	2つの双翅目のルシフェラーゼ様タンパク質に対する分類 [#]	
22	A	Y	26	ハマダラカ属の配列は入手不可能	
53	Y	A	54	1	10
63	L	T	64	3	
83	E	D	84	3	
88	F	Y	89	3	
89	F	Y	90	4	
91	P	I	92	4	
103	A	C	104	3	
109	Y	W	110	3	
113	E	D	114	3	
139	V	I	140	3	
160	G	P	161	4	
198	S	T	197	3	
212	H	Q	211	2	20
218	R	欠失	213-214	4	
224	D	S	219	4	
225	P	欠失	219-220	4	
228	G	D	221	5	
233	P	K	226	4	
242	P	Q	235	3	
243	F	Y	236	5	
245	H	N	238	3	
253	L	M	246	5	
255	Y	R	248	4	
273	F	Y	266	3	
280	Y	F	273	3	30
298	S	K	291	5	
300	L	E	293	4	
311	E	R	304	4	
315	G	S	308	3	
318	P	T	311	3	
319	L	V	312	3	
339	G	F	332	3	
342	L	S	335	4	
343	T	S	336	2	
375	D	H	367	3	
380	K	A	372	4	
389	E	F	381	3	40
408	T	S	400	1	
417	W	Y	409	3	
418	L	V	410	3	
427	D	N	419	3	
441	L	I	433	3	
442	I	V	434	3	
443	K	M	435	3	
444	Y	V	436	3	
445	K	D	437	3	
448	Q	A	440	3	
452	A	T	444	3	

【表 5 B】

表5(続き) フォティヌ ス・ピラリ ス ^A における 残基番号	全甲虫類のル シフェラーゼ のコンセンサ ス残基	アラクノカ ンパ・リカ ルドサエに おける残基	アラクノカンパ ・リカルドサエ における残基番 号 ^B	2つの双翅目のルシ フェラーゼ様タンパ ク質に対する分類 [#]
458	L	I	450	3
485	V	L	477	3
486	V	T	478	3
490	G	R	481	4
506	V	L	497	4
513	R	K	504	4
516	V	C	507	3
527	T	A	518	5
549	K	欠失	530 et seq.	3

表5に対する注:

A:アミノ酸550個の長さのフォティヌス・ピラリス(M15055)のルシフェラーゼ

B:アミノ酸530個の長さのアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼ

#ハマダラカ属のルシフェラーゼ様遺伝子に対して我々が配列決定した場合の57個の変更の中で:

1. アラクノカンパ・リカルドサエの残基は、2つの双翅目のルシフェラーゼ様配列の一方と同じであるが、他方とは同じではない。
2. 残基はアラクノカンパ・リカルドサエ、キイロショウジョウバエ、およびハマダラカに対して同じであるが、甲虫のコンセンサスとは異なる。
3. アラクノカンパ・リカルドサエの残基は甲虫のコンセンサスと異なるが、キイロショウジョウバエおよびハマダラカのルシフェラーゼ様タンパク質は、両方とも甲虫のコンセンサスと同じ残基を有する。
4. 3つの双翅目の遺伝子は全て、この位置で異なる残基を有する。
5. アラクノカンパ・リカルドサエの残基は甲虫のコンセンサスとは異なり、キイロショウジョウバエおよびハマダラカのルシフェラーゼ様タンパク質は、両方とも同じ残基を有し、それは甲虫のコンセンサスではない。

【 0 2 4 6 】

(実施例3)

重要なアミノ酸および位置の同定

今日までに試験した甲虫のルシフェラーゼは全て、同じD-ルシフェリンを使用している。変異原性の試験により、甲虫のルシフェラーゼの基質の結合性または触媒のメカニズムにおける数々の残基の重要性が明らかになっている。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼは、これらの重要な残基のサブセットで、配列が異なっている。ホタルのルシフェラーゼのアルギニン218は、本質的なルシフェリン結合性部位の残基であることが示されている(Branchini、Magyarら、2001年)。R218をグルタミン、リジン、またはアラニンで置換すると、ルシフェリンに対する K_M 値に15~20倍の増大がもたらされる。フラッシュ高さ(強度)は、野生型の値の、それぞれ33%、5%、および3.6%に低減し、 K_{cat} 値が低減する。3つの突然変異体全てにおいて、発光最大の波長も低減する。R218は、試験した18個の甲虫のルシフェラーゼ全てにおいて絶対的に保存されている、上述の残基の1つを表している。しかし、アラクノカンパのルシフェラーゼの対応する領域では、4個のアミノ酸残基が欠失している。アラクノカンパ・リカルドサエのN213とL214の間の欠失(表3)は、フォティヌス・ピラリスのR218に等しいアルギニンが生じると期待される位置を包含する(図6)。アラクノカンパ・リカルドサエの残基K205、G206、V207、およびH216は、欠失に及び、アラクノカンパおよび甲虫のルシフェラーゼ18個全部の間で絶対的に保存されている(図6)。欠失に直接接する、残基N213、N214、およびI215は、それぞれ10、2、および

2個の他の甲虫のルシフェラーゼに共通する。したがって、アラクノカンパのルシフェラーゼの基質結合性の特徴は、この領域において甲虫のルシフェラーゼの性質と実質的にかけ離れたものである。

【0247】

より広範囲の研究では(Branchini, Southworthら、2003年)、フォティヌス・ピラリスの活性部位の5 以内に位置すると考えられている15残基(R218、H245、G246、F247、F250、T251、G315、G316、G341、L342、T343、S347、A348、I351、K529)が、突然変異していた。太字の11残基が、D-ルシフェリンに対する K_M において、4倍またはそれを超える変化を示していた。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼにおける対応する位置の残基は、Brachiniによって同定された15ケースのうち10ケースにおいて異なっている(前掲文献; DEL 213~214 R218、N238H245、A239G246、T243F250、A244T251、S308G315、S335L342、S336T343、L339S347、A343I351; 図6も参照されたい)。アラクノカンパにおけるアミノ酸の置換または欠質の性質は、これら10個の位置の各々では、Brachiniらが試験した実験操作とは異なっており、これら10個の位置は以下に限定される:R218 K、Q、A(Branchini, Magyarら、2001年;Branchini, Southworthら、2003年);H245 F、D、A (Branchini, Magyarら、1998年;Branchini, Magyarら、2001年;Branchini, Southworthら、2003年);G246 A;F247 Y、L、A;F250 S、G;T251 A; G315 A;G316 A;G341 A;L342 A;T343 A;S347 A;A348 V;I351 A;K529 A (Branchini, Southworthら、2003年)。

10

【0248】

したがって、個々の置換としても、これらの残基のアラクノカンパのバージョンに対する前例は存在しない。さらに、Brachiniらが試験した結合部位残基のうち8個(R218、H245、F247、G315、G341、L342、T343、およびK529)は、アラインメントに使用した18個の甲虫のルシフェラーゼ全ての中で、絶対的に保存されている。アラクノカンパ・リカルドサエにおける対応する位置では(図6)、これらの残基のうち5個は、甲虫のルシフェラーゼにおける基質の結合ポケットを裏打ちする不変の残基のサブセットであり、対応するアラクノカンパの残基は、アラクノカンパ種のルシフェラーゼの特定されたセグメントと、フォティヌス・ピラリスの配列との間のパーセント類似性/同一性に反映されるように、60%を超えるケースにおいて異なる。

20

【0249】

【表6】

	ポリペプチド・セグメント(残基番号)		
	1~200	201~350	351~530(末端)
アラクノカンパ・リカルドサエ	43.4 / 28.6	38.0 / 27.3	52.8 / 41.1
アラクノカンパ・タスマニエンシス (A.tasmaniensis)	44.1 / 30.8	38.0 / 28.7	54.4 / 41.1

30

【0250】

結果は、GAP(GCG/ANGIS)を用いて得られた。得られたBESTFITの結果は、実質的に同じであったことに留意されたい。

40

【0251】

(実施例4)

他の双翅目、およびアラクノカンパのルシフェラーゼの進化上の起源のルシフェラーゼ様タンパク質に対する類似性

本発明のルシフェラーゼが甲虫のルシフェラーゼのコンセンサス配列と異なる58個のアミノ酸残基のうち57個が、キイロショウジョウバエおよびハマダラカの両方の「ルシフェラーゼ様」タンパク質に配列が利用可能である領域にある。ルシフェラーゼ様タンパク質が、これら57個の残基のうち33個で、その生物体がルミネセンスでなくても、甲虫のルシフェラーゼの配列に合致している(表5)。これらのコンセンサス残基に基づくと、アラク

50

ノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼは、進化上の圧力に曝されて、祖先のファミリーから逸脱したと思われる。我々の配列データに基づくと、ルミネセンスの甲虫およびハエのルシフェラーゼが、共通のルミネセントの先祖から進化したのか、甲虫類および双翅目において、アシル-CoAリガーゼファミリーのルシフェラーゼ様タンパク質から、ルミネセンスが独立に進化したのかを結論するのは不可能である。

【0252】

(実施例5)

アシル-CoAリガーゼ・スーパーファミリーの他のルシフェラーゼの分子系統発生におけるアラクノカンパのルシフェラーゼの位置

ルミネセンスの甲虫類からの18個の独特なルシフェラーゼ配列のPROTMLプログラムを用いた確固たる根拠のない系統発生的分析(図7)、キロシヨウジョウバエおよびハマダラカのルシフェラーゼ様タンパク質、マウスからのアシル-CoAリガーゼ、ならびにアラクノカンパ・リカルドサエからの新規なルシフェラーゼにより、ホタル(ホタル科:例えば、ヒメボタル属、フォティヌス、ランピリス、ルシオラ、およびマドボタル属)は、鉄道虫(フェンゴデス科:すなわち、フリクソスリックス種)およびコメツキムシ(コメツキムシ科:すなわちピロフォラス種)から分けられる。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼは、双翅目のルシフェラーゼ様タンパク質よりも、甲虫のルシフェラーゼに緊密に関連していたが、これら3種全てのルミネセントの甲虫のファミリーからはっきりと分類された。しかし、同じ配列の分子系統発生では、PROTPARSプログラム(示さず)を用いてマウスのアシル-CoAリガーゼと固定され、アラクノカンパのルシフェラーゼは、双翅目のルシフェラーゼ様タンパク質に対するアウトグループとして置かれた。

【0253】

(実施例6)

アラクノカンパのルシフェラーゼの発現

pETDuet-1:GWLuc#1の構築

GWLuc#1の全長のcDNAを、製造元の推奨に従って、1反応あたり10pmolのpETGWLucF、およびpETGWLucR PCRプライマーを用いて、Platinum PfxDNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いて増幅した:

pETGWLucF: GACACACCATGGCTTGTACTTCAGT(配列番号15)

pETGWLucR: GACGACCCTAGGTTACAATGTTCTCTTAAA(配列番号16)

【0254】

これらのプライマーは、全長のアラクノカンパのルシフェラーゼのcDNAの、NcoIおよびAvrII制限部位の5'および3'を導入する。精製されたPCR生成物は、pGEM T-easy Vector System Iマニュアル(Promega)に記載されているようにAテールであり、pGEM T-easy中にライゲートした。構築物を、大腸菌のDH5株中に電気穿孔し、CEQ2000 Dye Terminator Cycle SequencingをQuick Start Kit(Beckman Coulter)およびプラスミドDNA 50fmolと用いて配列決定した。エラーフリーのアラクノカンパのルシフェラーゼのcDNAの配列を含む構築物を、NcoIおよびAvrIIで切り取り、MCS1のNcoI部位およびMCS2のAvrII部位を用いて、Novagen pET-Duet1ベクター(EMD/Merck Biosciences, San Diego/Darmstadt)中に挿入した。得られたプラスミドを、pETDuet-1:GWLuc#1と呼んだ。プラスミドを、大腸菌のBL21(DE3)株に電気穿孔し、再び配列決定した。

【0255】

甲虫のルシフェラーゼ(フォティヌス・ピラリス)のコントロール

フォティヌス・ピラリスのluc遺伝子の全長の構築物(1653ヌクレオチド)を、pETDuet-1ベクター中に挿入してpETDuet-1:EFLucを得、ETDuet-1:GWLuc#1について記載したように、これを引き続き大腸菌株BL21(DE3)中に電気穿孔した。

【0256】

コントロールの発現ベクター

コントロールの発現ベクターであるpEDuet-1:コントロールを、HisおよびSタグをそれぞれMCS1およびMCS2から除去する、NcoI部位のMCS1 5'から、MCS2のAvrII部位までを切り

取ることにより、pETDuet-1から調製した。DNAポリメラーゼI(Klenow、NEB)を25mMの各dNTPとともに用いて、得られた5'のオーバーハングを末端充填した。反応を25℃で15分間インキュベートし、10mM EDTAを加え、75℃で20分間インキュベートすることにより反応を終結した。ベクターを精製し、平滑末端のライゲーションに対するFermentaの推奨に従って、5%(w/v)PEG8000の存在下でT4 DNAリガーゼ(Fermentas)を用いてセルフライゲーションした。コントロールのベクターを、pETDuet-1:GWLuc#1について記載されているように、引き続き大腸菌株BL21(DE3)中に電気穿孔した。

【0257】

前誘導

空のコントロールベクターであるpETDuet-1:コントロールベクター(BL21(DE3)中);pETDuet-1:EFLuc(ホタルのルシフェラーゼ)構築物(BL21(DE3)中);pETDuet-1:GWLuc(ツチボタルのルシフェラーゼ)#1構築物(BL21(DE3)中);および非形質転換のBL21(DE3)細胞の培養物2ミリリットル(mL)を、1Mグルコースを含むLB培地で、37℃、200rpmで一夜、インキュベートした。翌日、培養物を室温、1500rpmで3分間遠心分離し、ペレットを2mL LBに再懸濁した。LB50mLに、各培養物の1:50希釈を接種し、その後1000×アンピシリン50μLを加えた。これらの接種した溶液を、37℃で1時間インキュベートした後、誘導を開始した。培養物の吸光度を600nmで測定し(Abs600nm)、Abs600nm \geq 0.6を達成したときに、1mLのアリコート4本を除去し、室温で5分間、10000gで遠心分離し、細胞ペレットを-80℃で貯蔵した。

【0258】

誘導

残りの培養物の体積から、9mLのアリコート2本を、50mLコニカル遠心管に移した。アリコート1本に、IPTG(最終濃度0.4mM)を加えることによって誘導し、2本目は誘導しなかった(代わりに、等量の水を加えた)。非形質転換のBL21(DE3)培養物は誘導せず、20mLを250mLコニカルフラスコに移した。次いで、培養物全部を20℃、150rpmで48時間インキュベートし、その時間にAbs600nmを測定した。各培養物から250μLのアリコート3本を除去し、室温で、10000gで5分間遠心分離し、ペレットをタンパク質分析用に-80℃で貯蔵した。5mLのpETDuet-1:コントロール・ベクター、pETDuet-1:FFLucおよびpETDuet-1:GWLuc#1、および15mLのBL21(DE3)培養物を、清浄な遠心管中に移し、4℃、3000rpmで10分間遠心分離した。上清をデカントし、各ペレットを、氷冷した各々の開始体積のリン酸バッファー食塩水(pH7.4)(137mM NaCl、2.7mM KCl、4.3mM Na₂HPO₄)に再懸濁し、4℃、3000rpmで10分間再び遠心分離した。PBSをデカントし、最高濃度のサンプルと同じAbs600nmをもたらすように調節した氷冷したPBSにペレットを再懸濁した。

【0259】

タンパク質分析

タンパク質分析を、InvitrogenのNuPAGE(商標)Novex Bis-Trisゲルシステムを用いて、製造元の指示を用いて行った。凍結した細菌のペレットに、50mM DTTを含む1×NUPAGE(商標)ラウリルドデシル硫酸(LDS)サンプルバッファーを加えることにより溶解し、70℃で10分間加熱した。細菌ライセートを数回、30Gの針を通過させることにより、染色体DNAを剪断した。細菌の密度を測定することにより見積もって(Abs600×希釈ファクター)タンパク質濃度が殆ど等しい細菌のサンプル、およびSeeBlue(商標)着色済みスタンダード(Invitrogen)を、NUPAGE(商標)12%Bis-Trisゲル上にローディングし、約50分間一定の200Vで、1×NUPAGE(商標)抗酸化剤をXCell SureLock(商標)Mini-cell(Invitrogen)の上部チャンバーだけに加えたNUPAGE(商標)MOPS SDSランニング・バッファー(pH7.7、50mM MOPS、50mM Tris、0.1%(w/v)SDS、1mM EDTA)を用いて電気泳動した。

【0260】

ゲルをカセットから除去し、室温で10分間、穏やかにゆすりながら45%(v/v)メタノール-10%(v/v)酢酸で3回洗浄した。最終の洗浄の後、ゲルをFast染色液(16%(v/v)Fast Stainストック溶液(Fisher Biotec)、9%(v/v)メタノール、2%(v/v)酢酸)に浸し、穏やかにゆすりながら室温で一夜染色した。染色液をデカントし、ゲルを、最初は、室温で10分間、10

10

20

30

40

50

%(v/v)酢酸ですすぎ、その後10%(v/v)酢酸に貯蔵した。ゲルを、ビデオキャプチャー画像システムを用いて、透過された蛍光イルミネーションで写真撮影した。図8は、pETDuet1:FFLuc(トラック5)、またはpETDuet1:GWLuc#1(トラック8)いずれかの構築物で形質転換した、誘導したペレットのLDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動は、類似したパターンのタンパク質の発現を表したことを示している。IPTGで誘導した形質転換した細菌(pETDuet1:EFLucベクター)は、ホタルのルシフェラーゼに特徴的な、51kDaと64kDaとの間の途中(トラック5)に新しいバンドを表した。同様に、pETDuet1:GWLuc#1ベクターで形質転換した、IPTG誘導した細菌は、新しいバンド(トラック8)を表し、アラクノカンパのルシフェラーゼの発現が成功であったことを示していた。

【0261】

10

ライセートの調製

BL21(DE3)の非形質転換細胞40 μ Lを、pETDuet-1:コントロール、pETDuet-1:EFLuc、またはpETDuet-1:GELuc#1培養物50 μ Lと混合し、10 μ Lの1M H₂PO₄(pH7.8)、20mM EDTAを加えた。細胞混合物のアリコートドライアイス上で瞬間的に凍結し、-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。試験管を室温の水浴中に配置することにより、凍結した細胞を解凍した。細胞のアリコートを、新たに調製した溶解混合液(1 \times ルシフェラーゼ細胞培養物溶解試薬(CCLR, Promega)、1.25mg/mLリゾチーム(Sigma)、2.5mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma))300 μ Lと混合した。室温で10分間インキュベート後、ライセートをアリコートにし、-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵、または直ちに使用した。

【0262】

20

ルシフェリンアッセイ

このルシフェリンアッセイでは、アラクノカンパ由来のルシフェラーゼ(「ツチボタルのルシフェラーゼ」、または「GWルシフェラーゼ」)を含む細胞ライセート(上述)を使用した。細胞ライセートの10 μ Lアリコートを(別段の記載がなければ)、OptiPlate(商標)-96プレートのウェルに加えた。Tris-酢酸バッファー(pH7.75)、ATP、酢酸₂マグネシウム、およびD-ルシフェリン(Sigma)を含むバッファー混合液90 μ L(または最終体積を100 μ Lにする適切な体積)をライセートに加えて、それぞれ最終濃度を25mM、2mM、4mM、および0.4mMにする。あるいは、ルシフェラーゼアッセイバッファー10mLを、凍結乾燥したルシフェラーゼアッセイ基質を含むバイアルに混合することにより、市販のルシフェラーゼアッセイ試薬100 μ L(Promega)を調製し、特定の細胞ライセート20 μ Lに加えた。Wallac1420 Victor 2ルミノメーター(Perkin-Elmer)フラッシュキネティクスモードを用いて、全光出力を測定した。インテグレーション時間を、0.5秒に設定し、繰り返し回数を100に設定した。

30

【0263】

(実施例7)

アラクノカンパのルシフェラーゼの活性

アラクノカンパ由来のルシフェラーゼ(「ツチボタルのルシフェラーゼ」、または「GWルシフェラーゼ」)の細胞ライセート10 μ LにD-ルシフェリンを加えると、コントロールの細胞ライセートに比べて生物発光活性の増大をもたらした(図16)。甲虫の生物発光系と、アラクノカンパの生物発光系間には絶対的に交差反応性は存在しないと報告されている。異なる量および増大量のGWルシフェラーゼをD-ルシフェリンに加え、この反応が定量的であることを実証した(図17)。全ての場合で、用いるウェルの間隔を離すことによって、ウェル間にクロストークが確実に存在しないよう、注意を払った。甲虫のD-ルシフェリンを用いて、ライセート混合液に存在するGWルシフェラーゼを定量することができた(感度は、加えたGWルシフェラーゼのライセート1 μ Lあたり18.52CPSであった)(図18)。アッセイは、記載した様式で調製したツチボタルのルシフェラーゼを定量するのに、十分感度がある。

40

【0264】

コントロール

観察された生物発光の増強が、GWルシフェラーゼとD-ルシフェリンの相互作用によるも

50

のであったことを確認するために、数々のコントロール実験を行った。第1のコントロール実験は、GWルシフェラーゼの細胞ライセートを95 で5分間加熱し、その後D-ルシフェリンと混合することだけを伴った。細胞ライセートを含むGWルシフェラーゼを加熱した後、D-ルシフェリンを加えることで、生物発光の増強は完全に消失された(図19)。

【0265】

第2のコントロールは、GWルシフェラーゼの、ATP/Mg(それぞれ2mMおよび4mMの濃度)に対する反応を見るものであった。図20は、D-ルシフェリンの同時の添加あり、およびなしでの、ATP/Mgの添加に対するGWルシフェラーゼのライセート50 μ Lの反応を示す。生物発光における増強は、ATPまたはMgによってもたらされるのではなく、D-ルシフェリンの存在によってもたらされる。

10

【0266】

様々なルシフェラーゼをD-ルシフェリンと用いて、および様々な基質をGWルシフェラーゼと用いて、さらなるコントロールを行った。GWルシフェラーゼを、IPTGが誘導するショウジョウバエ様ルシフェラーゼで置換しても、非誘導の細胞ライセートに比べてD-ルシフェリンの添加時に生物発光のいかなる著しい増強ももたらさなかった(図21)。D-ルシフェリンを、生物発光の最も効率的なセレンテラジン基質(CLZN-hcp(1 μ / 100 μ l))で置換しても、コントロールの細胞ライセートに比べて、GWルシフェラーゼの添加時に、いかなる生物発光の増強ももたらさなかった(図22)。

【0267】

GWルシフェラーゼおよびD-ルシフェリンの混合時に観察された、生物発光の増強反応は、ATPの存在下でのこれら2つの成分に関わる特異的な相互作用によるものである。

20

【0268】

(実施例8)

アラクノカンパ・リカルドサエの生物発光系

粗製抽出物の調製:方法1

この方法は、Vivianiら(2002年)によって記載されたものから適合された。アラクノカンパの粗製抽出物を、発光器5個を0.5mLの冷抽出バッファー(27mMトリシン、7mM MgSO₄、0.2mM EDTA、10%グリセロール、および1%TritonX-100、pH7.4)でホモジナイズすることにより調製した。ホモジナイズ後、抽出物を、4 で、15分間15000gで遠心分離した。上清を98 で5分間加熱し、1mM ATP(最終濃度)を加えることにより、熱抽出物を調製した。ルシフェラーゼ活性を、熱抽出物10 μ Lを、Tris-HClバッファー(pH8)0.84mL、ツチボタルまたはホタルいずれかのルシフェラーゼ0.11mL、およびATP/Mg(40/80mM)0.05mLを含む反応バッファー溶液90 μ Lと混合することにより決定した。

30

【0269】

粗製抽出物の調製:方法2

第2の方法では、エッペンドルフチューブにおいて5個の凍結した発光器に酢酸エチル100 μ Lを加えることにより粗製抽出物を調製し、ホモジナイズ後抽出物を15000gで5分間遠心分離した。ホモジナイズのプロセスを行う間、発光器を含むエッペンドルフをドライアイス上に維持した。組成抽出物20 μ Lを、tris-酢酸バッファー(25mM)、酢酸マグネシウム(4mM)、およびATP(2mM)(全て最終濃度)を含む反応バッファー溶液と混合して最終体積を100 μ Lとすることにより、in vitroの生物発光アッセイを行った。

40

【0270】

GWルシフェラーゼアッセイ

tris-酢酸バッファー(25mM)、酢酸マグネシウム(4mM)、ATP(2mM)(全て最終濃度)、およびGWルシフェラーゼの細胞ライセートを含み、最終体積を100 μ Lとした反応バッファー溶液を、粗製抽出物20 μ Lに加えた。

【0271】

粗製抽出物の活性

Vivianiら(2002年)が記載したGWルシフェラーゼでの熱-冷抽出物の抽出実験を再現しようとした最初の調査は不成功であった。記載された通りに調製した粗製抽出物のサンプル

50

に、同時にATPを添加せずにGWルシフェラーゼを添加することで、閃光の生物発光活性がもたらされた。この効果は、ATPを同時に添加してGWルシフェラーゼをさらに添加したときに、再現可能であった。このタイプの閃光は、D-ルシフェリンに過剰のルシフェラーゼおよびATPを添加したときに、通常見られるタイプの閃光に特有である。

【0272】

ルミネセンスのスペクトル

D-ルシフェリンの存在下におけるGWルシフェラーゼ活性のポジティブの実証に続いて、D-ルシフェリン添加時の、GWおよびFF両方のルシフェラーゼの蛍光および生物発光のスペクトルを記録した。

【0273】

溶液の調製。アッセイバッファー溶液または市販のアッセイ試薬(Promega)450 μ Lを、示したように、対応するルシフェラーゼ50 μ Lと混合することにより、溶液0.5mLを調製した。混合は、1mLの蛍光光度計のキュベットで行い、Cary Eclipse蛍光測定器により、スキャンモードの波長を用いて、スペクトルを記録した。溶液を混合した直後に生物発光のスペクトルを記録し、示したように、それぞれのルシフェラーゼを添加する前および後に蛍光スペクトルを記録した。

【0274】

生物発光のスペクトル

D-ルシフェリン添加時の、GW(アラクノカンパ)およびFF(ホタル、フォティヌス)のルシフェラーゼの両方の標準化した生物発光のスペクトルを、図23に示す。GWルシフェラーゼの添加によって誘導された最高の生物発光は、440nmと480nmとの間にある。FFルシフェラーゼの代わりにGWルシフェラーゼを使用すると、555nmから530nm未満の発光スペクトルにおいて浅色性のシフトがもたらされる。FFルシフェラーゼに対して報告されている最大値は、pH7.6で562nmである。スペクトルの最大強度は、FFおよびGWのルシフェラーゼに対して、それぞれ90.98任意単位(a.u.)および3.12a.u.と、大幅に変動した。

【0275】

(実施例9)

他のアラクノカンパ種からの相同のルシフェラーゼの単離

数年間の間、Baker(2004年)において再考されたように、4種のオーストラリア種のルミネセントのアラクノカンパが認められた。これらは、アラクノカンパ・フラバ(*Arachnocampa flava*)、アラクノカンパ・リカルドサエ、アラクノカンパ・タスマニエンシス、およびニュージーランドに固有のアラクノカンパ・ルミノーサ(*Arachnocampa luminosa*)であった。最初の1組の種は、カンパラ(*Campara*)亜属、後者の1組はアラクノカンパ亜属と割り当てられている。Baker(前掲書)は、博士研究で、オーストラリアの生物発光性の双翅目は、少なくとも9種の生物学上の種に代表されるという確かな証拠を得た。すでに言及した4種の他に、Baker(前掲書)は、新たな5種のオーストラリア種、すなわち、アラクノカンパ・ブファロエンシス(*Arachnocampa buffaloensis*)、アラクノカンパ・トロピカス(*Arachnocampa tropicus*)、アラクノカンパ・ギラウィーネンシス(*Arachnocampa girraweensis*)、アラクノカンパ・ギップスランデンシス(*Arachnocampa gippslandensis*)、およびアラクノカンパ・オトウェイエンシス(*Arachnocampa otwayensis*)を記載している。アラクノカンパ種および北アメリカのオルフェリア・フルトニ(Fulton、1941年;Viviani、2002年)とは別に、双翅目、一般的にはケロプラタス(*Keroplatus*)種の他のルミネセンス種の報告がたまにあった(例えば、Sivinski、1998年;Baker、2004年に要約される)。これらの報告は、一般的に記述が不十分で、オーストラリアの動物相に特徴的な、地域的に豊富な集合体に通常見られない種に関するものである。我々は、PCRプライマーをデザインするためのアラクノカンパ・リカルドサエの配列、および、入手が容易ないくつかのアラクノカンパのオーストラリア種を例として用いて、他の生物発光性の双翅目から、ルシフェラーゼをコードする配列を単離する可能性を実証するために開始した。

【0276】

方法と結果

アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼ遺伝子の相同体を、他の3種のアラクノカンパから単離し、クローニングし、配列決定した。3つの種は、カンバラ亜属のアラクノカンパ・フラバ、およびアラクノカンパ・ギラウィーネンシス、ならびにアラクノカンパ亜属のアラクノカンパ・タスマニエンシスであった。これらの種の各々に対して、2個から5個の幼虫の検体を、その天然の生息地から収集し、24時間以内に生きた状態で実験室に輸送した。各々の種の検体を、リン酸食塩水、またはtris-緩衝食塩水の下で解剖した。周囲の組織がいくらか付着して切り出された発光器をプールし、-80 で瞬間的に凍結した。

【 0 2 7 7 】

A. RNA抽出

3種各々に対して、RNAqueous-Micro Kit(Ambion、カタログ番号1931)を用いて、製造元の指示に従って、2個または3個の発光器から全RNAを抽出した。

【 0 2 7 8 】

B. cDNA合成

1. 第1の鎖のcDNA合成:Creator SMART cDNAライブラリー構築キット(Clontech/BD Biosciences、カタログ番号K1053-1)からのプライマーを用いて、1本鎖のcDNAを合成した。製造元の指示に従って、反応を行った。キットに提供された逆転写酵素を、新鮮なPowerScript Reverse Transcriptase(BD Biosciences、カタログ番号639500)で直接置換した。

【 0 2 7 9 】

2. 第2の鎖のcDNA合成:2本鎖(ds)cDNAを、Creator SMART cDNAライブラリー構築キットで提供されたプライマーを用いて、長距離PCRによって合成した。先のセクションに記載したように合成した第1の鎖のcDNA 2 μ Lを用いて、キットの指示にしたがい、25回のサーマルサイクルの増幅を行った。キットにおけるDNAポリメラーゼを、新鮮なAdvantage cDNA Polymerase Mix(BD Biosciences、カタログ番号50595)で直接置換した。

【 0 2 8 0 】

C. PCRによるルシフェラーゼcDNAのクローニング

1. アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシス

アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスのルシフェラーゼcDNAの部分を、それぞれの2本鎖cDNAのプールから増幅した。HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen、カタログ番号203203)を用いて、相補的なアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼ遺伝子に対してデザインされたPCRプライマーで、PCR反応を行った(表6)。

【 0 2 8 1 】

10

20

30

【表7】

表6:本文および表7で言及したアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAプライマーの配列

	プライマーの名称	プライマーの配列	配列番号
F1	GWLO8F5F250	5'-AGAAAGGGCGATCGTGTG-3' 5'-GATGATAATGCACCAGAAAAG-3'	17
F2	GWLucScreenU		18
F3	GWLO91E1F250	5'-ACCATTGCCACTGTTTTATTGA-3' 5'-CATTTAATGGCACCAGGGTACT-3'	19
F4	GWLO91B6F12		20
F5	GWLO91F7F228	5'-ACCCGAAATTGCGAACTATGA-3'	21
R5	GWLucRS873	5'-AGTAAAACCAAACGCATTAG-3'	22
R6	GWLucRS757	5'-AAGGGAGGGTGAACACTGA-3'	23
R7	GWLucRS601	5'-CCATAAAATTGACGTACGACC-3'	24
R8	GWLucRS484	5'-CCAAGAAGGGCACCAGTTT-3'	25
R9	GWLucScreenL	5'-TTATAATATCCAGCATCACCA-3'	26
R10	GWLucRS326	5'-CAACGAACCATTCAAATCT-3' 5'-	27
R11	GWLucRS182	AATGCAAATAATACTTCACCACC-3'	28
R12	GWLucRS90	5'-GCCACCTTTAAGATGCTTG-3'	29
R13	GWLucRS42	5'-AACATTTTGCCAGCTGGATTC-3'	30

10

20

【0282】

アラクノカンパ・フラバに対して、プライマー対の30個の組合せを試験し(表7)、製造元の指示に従って、増幅のサーマルサイクルを40回行った。30個のプライマー対の組合せのうち29個が、期待したサイズの独特の生成物を増幅した。PCR生成物2個(表7)を、micro CLEAN DNA Clean up試薬(Astral、カタログ番号2MCL-5)で精製し、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNA配列に特異的なプライマーで配列決定した。BESTFITの比較により、アラクノカンパ・フラバのヌクレオチド配列は、先に決定したアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNA配列と96%同一であったことが示された。これによって、アラクノカンパ・フラバの配列の、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの相同体としての同一性が確認された。

30

【0283】

アラクノカンパ・ギラウィーネンシスに対して、先のセクションに記載したのと同じPCR条件を用いて、たった4個の組合せのアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの遺伝子に特異的なプライマーを試験した(表7)。プライマー対の組合せの4個全てが、期待したサイズの独特な生成物を増幅した。PCR生成物2個(表7)を精製し、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNA配列に特異的なプライマーで配列決定した。BESTFITの比較により、アラクノカンパ・ギラウィーネンシスのヌクレオチド配列は、先に決定したアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNA配列に96.5%同一であったことが示された。これによって、アラクノカンパ・ギラウィーネンシスの配列の、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの相同体としての同一性が確認された。

40

【0284】

アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスのルシフェラーゼのcDNAの5'および3'末端を、セミアンカーPCRによって別々に増幅した。各プライマー対はアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNA配列に特異的なプライマー、ならびに、アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスの2本鎖cDNAのcDNA合成に用いられるSMARTプライマーの一部分に相補的であった第2のプライマーを含んでいた(表8)。2本鎖cDNAを、テンプレートとして用い、製造元の指示に従ってPfx50 DNAポリメラーゼでタッチダウンPCR反応を行い、増幅のサーマルサイクルを40回行った。

【0285】

5'末端を増幅するために、プライマー対の2つの組合せを、両種で試験した(表9)。プラ

50

イマー対は両方とも、アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシス両方に対して予想されたサイズの独特の生成物を増幅した(表9)。

【0286】

3'末端を増幅するために、プライマー対の2つの組合せを、両種に対して試験した(表10)。プライマー対は両方とも、アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシス両方に対して予想されたサイズの独特の生成物を増幅した(表10)。両方の種に対して、3'および5'末端各々の増幅から1生成物を配列決定し、これによりルシフェラーゼのcDNAの5'末端および3'末端両方の配列が明らかになった。アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシス両方のルシフェラーゼ遺伝子では、ORFの最初の40個のヌクレオチドと最後の40個のヌクレオチドは、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAのORFのそれと同一であった。アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシス両方のルシフェラーゼ遺伝子に対する完全なORFを、Virginiaの発現のセクションに記載してあるpETGWLucFおよびpETGWLucRの2個のプライマーでタッチダウンPCRにより増幅した。テンプレートとして1本鎖のcDNA、およびPfx50 DNAポリメラーゼ(Invitrogen、カタログ番号12355-012)で反応を行い、製造元の指示に従って増幅した。1.6kbの単位複製配列を、全て配列決定した。アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスのルシフェラーゼのペプチド配列は、アラクノカンパ・リカルドサエからのルシフェラーゼ遺伝子に対して、それぞれ99.6%および99.8%同一であることが見出された。

10

【0287】

2. アラクノカンパ・タスマニエンシス

アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼのcDNAの、5'および3'末端両方を、セミアンカーPCRにより増幅した。各末端に対して、数々のプライマー対を試験した(表11、表12)。2本鎖cDNAをテンプレートとして用い、製造元の指示に従って、Pfx50 DNAポリメラーゼでタッチダウンPCR反応を行い、サーマルサイクルの増幅を40回行った。

20

【0288】

5'末端を増幅するために、6個のプライマー対の組合せを試験した。これらのうち2個が、予想されたサイズの独特な生成物を増幅した。生成物の1つ(表11)を、製造元の指示に従って、pJET1/bluntクローニングベクター(Fermentas、カタログ番号K1221)中に直接クローニングした。

30

【0289】

3'末端を増幅するために、2個のプライマー対の組合せを試験した。1対(表12)が、予想されたサイズの独特な生成物を増幅し、これをpJET1/bluntクローニングベクター中に直接クローニングした。2個のクローニングした生成物各々から4個のクローンを、pJET1配列決定用プライマーで配列決定した。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAに対するBESTFITのDNA配列比較により、5'末端では83%の同一性、および3'末端では88%の同一性が示された。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの遺伝子に対するBESTFITのペプチド配列比較では、5'末端および3'末端それぞれで、89%の同一性、および93%の同一性が示された。これらのデータにより、2個のPCR単位複製配列は、アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAの可能性のある相同体に由来したことが確認された。ORFの始まりと終わりの両方を同定した。完全なORFを増幅するために、アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼのORFの始まりと終わりに相補的であるプライマーをデザインした：

40

A. tasLucORF-F: 5'-ATGACTTCTACATCTGTGGA-3'; (配列番号31)

A. tasLucORF-R: 5'-TTACAATGTTGATCTTAAAATAC-3'; (配列番号32)

【0290】

【表 8】

表7:アラクノカンパ・フラバの2本鎖cDNAで試験したアラクノカンパ・リカルドサエのcDNAのプライマーの組合せ

フォワード プライマー	リバースプライマー								
	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13
F1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y,1.3kb *g	Y,1.3kb #*f,g
F2	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	Y,1.0kb *g	Y,1.1kb #*f,g
F3	-	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	Y
F4	-	-	-	-	N	Y	Y	Y	Y
F5	-	-	-	-	-	-	Y	Y	Y

Y:予想されたサイズが増幅された独特の生成物

N: 予想されたサイズが増幅された生成物がない

-:試験しなかったプライマーの組合せ

*g:アラクノカンパ・ギラウィーネンシスでも試験したプライマーの組合せ、および予想されたサイズが増幅された独特の生成物

#*f,g:配列決定したアラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスの生成物

【 0 2 9 1 】

【表 9】

表8:ルシフェラーゼのcDNAの5'末端および3'末端の増幅に用いられるプライマー配列

プライマーの名称	プライマーの配列	配列番号
#SMART-nF1	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAG-3'	33
#SMART-nF2	5'-CAACGCAGAGTGGCCATTA-3'	34
#CDSIII-R	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCG-3'	35
*GWLucRS1120	5'-TGGCTTTTCTGGTGCATTATC-3'	36
*GWLucRS1000	5'-CCCGTAGTACCAGATGTCAA-3'	37
*GWLuc1E1R10	5'-CATGTCGGCTTCAGTCCA-3'	38
*GWLucRS757	5'-AAGGGAGGGTGAACACTGA-3'	39
*GWLO91G12F236	5'-TTGGTACACTTATGCCTGGA-3'	40
*GWLO91C5F84	5'-CAATCCTGAAGCCTCCAAA-3'	41

#:SMART-由来のプライマー

*:アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNA配列プライマー

【 0 2 9 2 】

【表 1 0】

表9:アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスからの5'末端のルシフェラーゼの増幅に対して試験したプライマーの組合せ

	SMART-nF1	SMART-nF2
GWLucRS1120	-	Y,0.5kb*f,g
GWLucRS1000	Y	-

Y:予想されたサイズが増幅された独特の生成物

-:試験しなかったプライマーの組合せ

*f,g: アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスの両方に対して配列決定された生成物

【 0 2 9 3 】

【表 1 1】

表10: アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスからの3'末端のルシフェラーゼの増幅に対して試験したプライマーの組合せ

	CDSIII-R
GWLO91C5F84	Y,0.5kb*f,g
GWLO91G12F236	Y

Y: 予想されたサイズが増幅された独特の生成物

*f,g: アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスの両方に対して配列決定された生成物

10

【 0 2 9 4 】

【表 1 2】

表11: アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼの5'末端の増幅に対して試験したプライマーの組合せ

	SMART-nF1	SMART-nF2
GWLucRS1120	-	N
GWLucRS1000	N	-
GWLuc1E1R10	Y,0.4kb*	Y
GWLucRS757	N	N

Y: 予想されたサイズが増幅された独特の生成物

N: 予想されたサイズが増幅された生成物がない

-: 試験しなかったプライマーの組合せ

*: クローニングおよび配列決定された独特な生成物

20

【 0 2 9 5 】

【表 1 3】

表12: アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼの3'末端の増幅に対して試験したプライマーの組合せ

	CDSIII-R
GWLO91C5F84	N
GWLO91G12F236	Y,0.6kb*

Y: 予想されたサイズが増幅された独特の生成物

N: 予想されたサイズが増幅された生成物がない

*: クローニングおよび配列決定された独特な生成物

30

【 0 2 9 6 】

【表 1 4】

表13: アラクノカンパ4種に対するアミノ酸同一性/類似性のペアワイズ比較

	アラクノカンパ・リカルドサエ	アラクノカンパ・フラバ	アラクノカンパ・ギラウィーネンシス	アラクノカンパ・タスマニエンシス
アラクノカンパ・リカルドサエ	100	99.6	96.8	91.5
アラクノカンパ・フラバ	99.8	100	99.8	91.7
アラクノカンパ・ギラウィーネンシス	100	99.8	100	91.7
アラクノカンパ・タスマニエンシス	94.7	94.9	94.7	100

40

50

【0297】

先のセクションに記載したPCRの取組みを用いると、アラクノカンパ・フラバおよびアラクノカンパ・ギラウィーネンシスからだけではなく、アラクノカンパ・タスマニエンシスからルシフェラーゼのcDNAを単離するのも簡単だった。カンバラ亜属内の種間に我々が観察した配列相同性が高レベルであったことを考慮すると、本明細書に記載した技術を用いて、アラクノカンパ(カンバラ)・ギップスランデンシス(*gippslandensis*)、アラクノカンパ(カンバラ)・オトウェイエンシス、アラクノカンパ(カンバラ)・トロピカス(*tropicus*)、および実際に将来記載される可能性があるアラクノカンパ属カンバラ亜属のあらゆる他の種からルシフェラーゼを単離するのも簡単である。さらに、アラクノカンパ・リカルドサエに特異的なPCRプライマーを用いると、アラクノカンパ・タスマニエンシスからルシフェラーゼを単離するのは、必要以上の実験をしなくても可能であることを我々は実証した。したがって、アラクノカンパ・ルミノーサ、およびアラクノカンパ・バッファロエンシス(*buffaloensis*)、ならびに実際に将来記載される可能性があるアラクノカンパ属のあらゆる他の種を含む、アラクノカンパ亜属に分類される他の種類から相同のルシフェラーゼを回復するのは簡単であろうと、我々は結論付けている。もちろん、先に記載した方策および方法を用いて、アラクノカンパ亜属の他の種から相同のルシフェラーゼを回復するために、アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼの配列に特異的なプライマーを用いるのはさらにより簡単であろう。アラクノカンパ・フラバ、アラクノカンパ・ギラウィーネンシス、またはアラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼを単離するために、cDNAライブラリーのスクリーニングを行使する必要はなかった。しかし、先に記載したように、ライブラリーのスクリーニングの取組みは、アラクノカンパ属の他のメンバーからだけではなく、他の、より関連の隔たった、オルフェリア・フルトニまたはケロプラタス種などの青色ルミネセンス性の双翅目からも相同性のルシフェラーゼを回復する実行可能な方法であろう。

10

20

【0298】

我々は、2種程度に少ないアラクノカンパ種の発光器から相同のルシフェラーゼをコードする配列を単離することが容易にできたので、開示した方法を用いて、今までに単一の試料だけが直面しているSivinski(1998年)が言及した種などの青色ルミネセンス性の双翅目の単一の試料から相同のルシフェラーゼを増幅し、単離することは可能であろうということも確信している。

30

【0299】

(実施例10)

ツチボタルのルシフェラーゼの細菌の発現:発現ベクター、宿主細胞、誘導のレジメン、および融合タグ

GWLuc#1を細菌で発現させるための、代替の誘導レジメン、および発現構築物

細菌で発現されるGWLuc#1の発現および細胞内の分配を最適化しようと、以下のセクションに記載するように、誘導レジメンの以下の変数を操作した;(i)誘導期間、(ii)誘導温度、(iii)IPTC濃度、および(iv)大腸菌株(*Derewenda*, 2004年に再考)。利用する第2の方策は、GWLuc#1とタグとの間にN末端融合物であるチオレドキシン(*Trx*;例えば、*pET48b(+)*発現ベクター)および*NusA*(例えば、*pET50b(+)*発現ベクター)を作り出すことであった。これらのタグは、タンパク質の発現および溶解の両方にポジティブの効果があることが実証されている(*Hammarstrom*, *Hellgren*, *van den Berg*, *Berglund*, および *Hard*, 2002年に再考)。GWLuc#1融合タンパク質を作り出す能力をさらに実証するために、GWLuc#1とのN末端6His融合構築物も作り出した。Hisタグを選んだのは、これは金属イオンキレート・クロマトグラフィーを用いた精製が適用できるからである。

40

【0300】

細菌が発現したGWLuc#1およびFFLucの分割の分析

凍結した細菌ペレットを、新たに調製した溶解混合液(1×ルシフェラーゼ細胞培養液溶解試薬(CCLR)、リゾチーム1.25mg/ml)100μLで溶解した。室温で10分間インキュベートした後、ライセートを、室温で、16000gで20分間遠心分離した。上清を除去し、それに、50

50

mM DTTを含む1×NuPAGE(登録商標)ラウリルドデシル硫酸サンプルバッファーを加えた。50mM DTTを含む1×NuPAGE(登録商標)ラウリルドデシル硫酸サンプルバッファーを加えることによりペレットを溶解し、細菌ライセートを、30Gの針を数回通過させることにより染色体DNAを剪断した。上清、およびペレットのサンプルを、先に記載したようにInvitrogenのNuPAGE(登録商標)Novex Bis-Tris Gelシステムを用いて分析した。

【0301】

天然のGWLuc#1の細菌の発現に対する代替の誘導レジメン

大腸菌株BL21(DE3)で発現された天然のフォティヌス・ピラリス、およびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのpETDuet-1構築物に、代替の誘導レジメンを受けさせた。先に記載した通りに調製した前誘導の培養物から、5mlのアリコートを各々、50mlコニカル遠心管に移した。アリコートは誘導せず(等体積の0.4mM IPTGになるように水を加え)、または最終濃度が0.1mM、0.2mM、もしくは0.4mMになるようにIPTGを加えることによって誘導した。これらの培養物を、10 もしくは20 のいずれかで、150rpmで、24時間、48時間(10 および20)、または120時間(10 のみ)インキュベートし、その時間に、各培養物のAbs600nmを測定した。3個または4個の0.25~0.5mlのアリコートを各培養物から除き、室温で、10000gで5分間、遠心分離した。ペレットを、タンパク質分析用に-80で貯蔵した。

10

【0302】

天然のフォティヌス・ピラリスおよびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのpETDuet-1構築物を、DH5 およびBL21(DE3)大腸菌株について先に記載されている通りに、Rosetta-gami(商標)B(DE3)(Novagen)株の大腸菌中に電気穿孔した。培養物を、BL21(DE3)でpETDuet-1:GWLuc#1について先に記載されている通りに前誘導した。Abs600nm0.6~1.0を達成したら、5mlのアリコートを各々、50mlコニカル遠心管に移した。アリコートは誘導せず(等体積の0.4mM IPTGになるように水を加え)、または最終濃度が0.2mMもしくは0.4mMになるようにIPTGを加えることによって誘導した。これらの培養物を、10 もしくは20 のいずれかで、150rpmで、4時間(20 のみ)、24時間、48時間(10 および20)、または120時間(10 のみ)時間インキュベートし、その時間に、各培養物のAbs600nmを測定した。3個または4個の0.25~0.5mlのアリコートを各培養物から除き、室温で、10000gで5分間、遠心分離した。ペレットを、タンパク質分析用に80で貯蔵した。

20

【0303】

pETDuet-1におけるN末端6HisGWLuc#1融合タンパク質の構築

GWLuc#1の全長のcDNAを、Platinum PfxDNAポリメラーゼを用いて、製造元の推奨に従って、テンプレート2ng、ならびにプライマー-NHis-GWLuc#1(5'-GAgattcGATTGAGGGACGCATGGCTTGTACTTCAGT-3';配列番号42)、およびpETGWLucR(5'-GACGACcctaggTTACAATGTTCTCTTAA-3';配列番号16)10pmolを用いて20サイクル増幅した。これらのプライマーは、全長のアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAの、EcoRIおよびAvrII制限部位(小文字)5'および3'を導入する。精製した生成物は、先に記載したようにAテールであり、pGEM T-easy中にライゲートした。構築物を、大腸菌のDH5 株中に電気穿孔し、Quick Start KitおよびプラスミドDNA50fmolでCEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencingを用いて配列決定した。全長の、エラーフリーの構築物を、EcoRI(Fermentas)およびAvrIIで切り取り、EcoRI/AvrIIで線状化したpETDuet-1中に挿入し、得られたプラスミドをpETDuet:NHis-GWLuc#1と呼んだ。これらのプラスミドを、先に記載したように、大腸菌のBL21(DE3)株中に電気穿孔し、配列決定した。

30

40

【0304】

pET-48b(+)-AmpR:GWLuc#1およびpET50b(+)-AmpR:GWLuc#1の構築

各ベクターに存在するSphI制限酵素部位中にpTAL-Lucからアンピシリン耐性遺伝子を挿入することにより、発現ベクターであるpET-48b(+)(Trx N末端タグ)およびpET-50b(+)(Nusa N末端タグ)(Novagen、EMD Biosciences)上に、アンピシリン耐性を付与した。pTAL-Lucからのアンピシリン耐性遺伝子を(遺伝子に対して5'および3'のすぐ+10bpのネガティブ鎖上bp4148~3218)、Platinum PfxDNAポリメラーゼを用いて、製造元の推奨に従って、テ

50

ンプレート2ng、ならびに10pmolのプライマー-AmpRCasSphIF(5'-TAGCGAAgcatgcGGTCTGACAGTTACCAA-3';配列番号43)、およびAmpRCasSphIR(5'-CGTAAGCgcatgcTCTAAATACATTCAAATATG-3';配列番号44)を用いて20サイクル増幅した。各プライマーは、アンピシリン耐性遺伝子の5'および3'末端に、SphI制限酵素部位(小文字)を導入した。PCR生成物を、microCLEANを用いて精製し、SphI(New England Biolabs)で消化し、microCLEANを用いて再び精製した。SphIが消化したアンピシリン耐性遺伝子のPCR生成物を、脱リン酸した、SphIで線状化したpET-48b(+)またはpET-50b(+)中にライゲートし、大腸菌のDH5株中に電気穿孔し、Quick Start Kitおよび25fmolプラスミドDNAでCEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencingを用いて配列決定した。得られたプラスミドを、それぞれpET-48b(+)AmpR、およびpET-50b(+)AmpRと呼んだ。

10

【0305】

GWLuc#1の全長のcDNAを、Platinum PfxDNAポリメラーゼを用いて、製造元の推奨に従って、テンプレート2ng、ならびに10pmolのプライマー-GWLuc1FHRV3C(5'-gggacccATGGCTTGTA CTTACAG-3';配列番号45)、およびpETGWLucR(5'-GACGACcctaggTTACAATGTTCTCTTAAA 3';配列番号16)を用いて20サイクル増幅した。これらのプライマーは、全長のアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのcDNAの5'および3'側にSanDIおよびAvrII制限部位(小文字)を導入する。精製した生成物は、先に記載したようにAテールであり、それをpGEM T-easy中にライゲートした。構築物を、大腸菌のDH5株中に電気穿孔し、Quick Start KitおよびプラスミドDNA50fmolでCEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencingを用いて配列決定した。全長の、エラーフリーの構築物を、SanDI(Stratagene、La Jolla、カリフォルニア州)およびAvrIIで切り取り、SanDI/AvrIIで線状化したpET-48b(+)AmpRまたはpET-50b(+)AmpRのいずれかの中に挿入し、得られたプラスミドを、それぞれpET-48b(+)AmpR:GWLuc#1およびpET50b(+)AmpR:GWLuc#1と呼んだ。これらのプラスミドを、先に記載したように、大腸菌のBL21(DE3)株中に電気穿孔し、配列決定した。各発現ベクターのエラーフリーの構築物である、pET-48b(+)AmpR、pET48b(+)AmpR:GWLuc#1、pET-50b(+)AmpR、およびpET-50b(+)AmpR:GWLuc#1を、大腸菌のRosetta-gami(商標)B(DE3)株中に電気穿孔した。

20

【0306】

pETDuet:NHis-GWLuc#1、pET-48b(+)AmpR:GWLuc#1、および pET-50b(+)AmpR:GWLuc#1に対する誘導レジーム

BL21(DE3)におけるpETDuet-1:NHis-GWLuc#1の前誘導培養は、BL21(DE3)におけるpETDuet-1:GWLuc#1について先に記載した通りであった。アリコート(10ml)を、誘導せず(水を加えて等体積の0.4mM IPTGにした)、またはIPTGを加えて最終濃度0.4mMにすることにより誘導した。これらの培養物を、20 または37 のいずれかで、37 で1、2、3、5、および24時間、または20 で2、5、24、30、および48時間15rpmでインキュベートし、その時間に各培養物のAbs600nmを測定した。各培養物から0.5mlのアリコートを5本および1.5mlのアリコートを3本取り除き、室温で、10000gで5分間、遠心分離した。ペレットを、タンパク質分析用に80 で貯蔵した。

30

【0307】

Rosetta-gami(商標)B(DE3)におけるpET-48b(+)AmpR、pET-48b(+)AmpR:GWLuc#1、pET-50b(+)AmpR、およびpET-50b(+)AmpR:GWLuc#1の前誘導培養は、BL21(DE3)におけるpETDuet-1:GWLuc#1について先に記載した通りである。Abs600nm0.6~1.0を達成したら、各前誘導培養物から5mlのアリコートを、50mlコニカル遠心管に移した。アリコートを、誘導せず(水を加えて等体積の0.4mM IPTGにした)、またはIPTGを加えて最終濃度0.1mM、0.2mM、または0.4mMにすることにより誘導した。これらの培養物を、10 または20 のいずれかで、150rpmで24または48時間インキュベートし、その時間に各培養物のAbs600nmを測定した。各培養物から0.20~1.0mlのアリコートを4または5本取り除き、室温で、10000gで5分間、遠心分離した。ペレットを、タンパク質分析用に80 で貯蔵した。

40

【0308】

代替の誘導レジームおよび発現構築物で細菌が発現したGWLuc#1の生物発光アッセイ

Promega試薬バッファー100µLを細胞ライセート20µLに、または自家製バッファーを細

50

胞ライセートサンプルに加えることにより、先に記載したように、生物発光のアッセイを行った。フラッシュキネティクスモード(インテグレーション時間=0.5秒、および反復回数=100)を用いてWallac 1420 Victor 2ルミノメーター(Perkin-Elmer)で、またはPOLARstar OPTIMA(BMG)を生物発光モード(時間間隔=0.2秒、PMTに対する利得=4095、間隔の数=200、標準化時間=0.5秒)で操作して生物発光を記録した。

【0309】

結果

天然のルシフェラーゼは、両方ともある範囲の誘導レジームの下で細菌によって発現された。TrxおよびNusA N末端GWLuc#1融合構築物は、Rosetta-gami(商標)B(DE3)大腸菌株で上首尾に発現され、6His N末端GWLuc#1融合構築物は、37 で1時間、20 で2時間という早さで、BL21(DE3)で上首尾に発現された。

【0310】

代替のレジーム下で誘導されたpETDuet-1構築物とともに、Rosetta-gami(商標)B(DE3)大腸菌株で発現されたアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼをアッセイして、自家製バッファの添加時の生物発光活性を決定した。10 または20 で24時間インキュベートした培養物から調製したサンプルと比べた場合、最も活性な細胞ライセートは、20 で48時間培養物をインキュベートすることにより生成された。Rosetta-gami(商標)B(DE3)大腸菌株で発現されたアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの生物発光活性を、大腸菌株BL21(DE3)で発現されたものと比べた場合、約2のファクターの増強があった。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼはRosetta-gami(商標)Bにおけるよりも大腸菌BL21(DE3)においてはるかに高レベルで発現され、発現されたルシフェラーゼタンパク質の特異的な活性は、Rosetta-gami(商標)のB系におけるよりもはるかに高いことを意味していたことに、留意しなければならない。Rosetta-gami(商標)B(DE3)大腸菌株で発現されたチオレドキシン、およびNusAでタグ付けされたアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼは、本明細書に記載したあらゆる誘導レジームの下では、コントロールベクターのサンプルのものに比べて、いかなる有意の生物発光活性(P=0.05)も生成しなかった。

【0311】

細菌が発現した天然のフォティヌス・ピラリス(FFLuc)およびアラクノカンパ・リカルドサエ(GWLuc#1)のルシフェラーゼの細胞レベル下の分配を決定した。上清に優先的に分配されたゲルEFLucのタンパク質染色に基づくと、ペレット分画にはほんの少量だけが保持されていた。GWLuc#1は、非常に異なって分割され、著しい割合がペレットに分配されていた。ゲルのタンパク質染色を基にすると、その存在は上清には観察されなかった。どの誘導レジームの下でも、天然のアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの分配は、タンパク質染色に基づくと、ペレットから上清の分画へ移行することが観察されなかった。この観察により、EFLuc(ホタルのルシフェラーゼ)の生物発光の測定の感度は、D-ルシフェリンを加えるとGWLuc#1に対するよりもはるかに高くなる理由を説明することができる。

【0312】

(実施例11)

真核生物である出芽酵母におけるアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの発現出芽酵母における誘導可能な発現のためのpYES2:GWLuc#1の構築

「pET-48b(+)/AmpR:GWLuc#1およびpET-50b(+)/AmpR:GWLuc#1の構築」において先に使用し記載した、全長の、エラーフリーのGWLuc#1のcDNA構築物を含むpGEM T-easyクローンからのEcoRIフラグメントを切り取り、脱リン酸化したEcoRIで線状化したpYES2(Invitrogen)中に挿入した。このプラスミドを、pYES2:GWLuc#1と呼び、大腸菌のDH5 株中に電気穿孔した。GWLuc#1を正しい方向で含む形質転換体を、標準のPCRスクリーニングにより、プライマーT7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')およびpETGWLucRを用いて同定した。pYES2およびpYES2:GWLuc#1両方からのプラスミドDNAを、QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を用いて単離し、プラスミド1μgを、Yeast Transformation Kit(Sigma)を用いて出芽酵母株S28

10

20

30

40

50

8C(Invitrogen)を形質転換するのに用いた。酵母菌の形質転換体を、30℃で48時間、2%(w/v)グルコース(Sigma)を補ったYeast Synthetic Drop-Out Media Supplement without Uracil(SCCM-U)(Sigma)上で選択することにより、ウラシル原栄養性に対して選択した。pYES2:GWLuc#1の存在を、Y-DER(商標)Extraction Reagent Kit(Pierce、Rockford、イリノイ州)を用いてプラスミドDNAを抽出し、T7およびpETGWLucRを用いて上記に記載したPCRスクリーニングを繰り返すことによって再確認した。

【0313】

pYES2:GWLuc#1の誘導

2%(w/v)グルコースを含むSCCM-Uにおける、S288CにおけるpYES2、およびS288CにおけるpYES:GWLuc#1の培養物15mlを、絶えず振盪しながら28℃で一夜増殖させた。一夜培養物各々のAbs600nmを決定して、5mlでAbs600nm0.5を得るのに必要とされる培養物体積を計算した。各培養物の必要とされる体積を取り除き、1500gで5分間遠心分離して細胞をペレット状にした。ペレット状にした酵母菌細胞を、5mlの非誘導培地(2%(w/v)ラフィノース(Sigma)を含むSCCM-U)、または誘導培地(2%(w/v)ガラクトース(Sigma)および2%(w/v)ラフィノース(Sigma)を含むSCCM-U)のいずれかに再懸濁した。培養物を、絶えず振盪しながら28℃で24、48、および72時間インキュベートし、インキュベートの終わりに各培養物のAbs600nmを測定した。アリコート(0.1~0.5ml)を各培養物から取り除き、室温で5分間、10000gで遠心分離した。ペレットを、タンパク質分析用に80℃で貯蔵した。

10

【0314】

GWLuc#1を発現する出芽酵母のタンパク質分析を、以下の変更形態で記載するように行った。酵母菌には細胞壁が存在するので、溶解したサンプルを、100℃で5分間加熱した。

20

【0315】

ルシフェラーゼアッセイのための細胞ライセートの調製

細胞ペレットに、1×受動的溶解バッファー(Promega)を加えて、酵母菌細胞数を、Abs600nm $1=3 \times 10^7$ 細胞/mlに基づいて計算して 1.446×10^7 とした。受動的溶解バッファーをアッセイ直前に加え、混合時間は約15~20秒間であった。

【0316】

出芽酵母におけるアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの生物発光アッセイ

溶解バッファーを加えた後、細胞ライセート混合物25μLを自家製のアッセイバッファー75μLと混合し、先に記載したように、Wallac 1420 Victor 2ルミノメーター(Perkin-Elmer)での時間の関数として光の出力をモニターした。

30

【0317】

結果

ゲルをタンパク質染色しても、GWLuc#1構築物を保有する酵母菌株とそうではない酵母菌株との間のいかなる相違も明らかにならなかった。しかし、pYES2発現系は、pET-大腸菌発現系とは異なり、過剰発現系ではない。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのタンパク質を同定するために、さらなる実験は行わなかった。その代わりに、GWLuc#1を保有する株と、そうではないコントロール株を比較するために、ルシフェラーゼアッセイを行った。これは、活性のルシフェラーゼの存在をスクリーニングするには、SDS-PAGEおよびタンパク質染色よりも、はるかに感受性のある方法である。

40

【0318】

大過剰のDルシフェリン/ATPで、低濃度のあらゆるルシフェラーゼをアッセイした場合、生物発光は、期待され得る通り、短時間の突発の活性として現れた。図24は、28度で24、48、または72時間インキュベートした培養物から調製し、記録開始1.12秒後に測定した、GWLuc#1またはコントロールベクターいずれかの生物発光強度(CPS 0.5秒)を示している。72時間インキュベートした培養物から調製した細胞ライセートで最大の生物発光活性を達成し、GWLuc#1の活性はコントロールサンプルの活性よりも有意に高かった(P=0.05)。これは、GWLuc#1は、出芽酵母で上首尾に発現され、かなりの活性を示すことも示している。アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼが大腸菌株BL21(DE3)または出芽酵母のいずれかで発現する場合は生物発光の強度(CPS)は類似した大きさであるが(図24)、

50

前者における発現レベルは後者におけるよりもはるかに高く、発現されたルシフェラーゼの特異的な活性は、BL21(DE3)細菌株におけるよりも出芽酵母ではるかに大きいことを示唆している。

【 0 3 1 9 】

上記の明細書で言及した出版物および特許は全て、本明細書に参照として組み入れられる。記載されている方法の様々な変更形態および変形形態、ならびに本発明の系統は、当業者であれば、本発明の範囲および精神から逸脱することなしに明らかであろう。本発明を、特定の好ましい実施形態に関して記載したが、請求されるように本発明はこのような特定の実施形態に必要以上に制限されてはならないことを理解されたい。実際、本発明を行うための、上記に記載した様式の様々な変更形態は、分子生物学の分野または関連分野の技術者には明らかであり、以下の特許請求の範囲内にあることが企図される。

10

(参考文献)

以下の参考文献は、本明細書に記載するものに対して、これらが例示の手順、または他の補足的な詳細を提供する範囲で、本明細書に参照として特に組み入れられる。

U.S. Patent 5,484,956

U.S. Patent 5,538,879

U.S. Patent 5,576,198

U.S. Patent 5,595,896

20

U.S. Patent 5,629,470

U.S. Patent 5,633,155

U.S. Patent 5,656,466

U.S. Patent 5,670,356

U.S. Patent 5,670,356

U.S. Patent 5,674,731

U.S. Patent 5,689,045

30

U.S. Patent 5,689,049

U.S. Patent 5,739,409

U.S. Patent 5,744,320

U.S. Patent 5,744,320

U.S. Patent 5,750,870

U.S. Patent 5,767,367

U.S. Patent 5,807,522

U.S. Patent 5,837,832

40

U.S. Patent 6,068,979

U.S. Patent 6,143,502

U.S. Patent 6,171,809

U.S. Patent 6,270,964

U.S. Patent 6,297,018

U.S. Patent 6,342,345

U.S. Patent 6,503,723

50

- U.S. Patent 6,586,196
- U.S. Patent 6,602,657
- U.S. Patent 6,602,658
- U.S. Patent 6,690,461
- U.S. Patent 6,927,037
- U. S. Patent Application 20030166905 (2003)
- Adachi, J. Hasegawa, M. MOLPHY: programs for molecular phylogenetics, ver 2.3. 10
Institute of Statistical Mathematics, Tokyo (1996).
- Altschul, *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990)
- Amann *et al.*, Gene 69:301-315 (1988)
- Angers, S., A. Salahpour, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3684-9 (2000).
- Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, (1998).
- Baker, C. (2004). Australian glow-worms (Diptera: Keroplatidae: Arachnocampa spp.): 20
distribution, diversity, identity and management. Ph. D. Thesis, Department of Zoology
and Entomology, University of Queensland, Brisbane: 186pp.
- Baldari, *et al.*, EMBO J. 6:229-234 (1987).
- Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987 "Methods in Enzymology: Guide to
Molecular Cloning Techniques", Academic Press.
- Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).
- Branchini, B. R., R. A. Magyar, *et al.* Biochemistry 37(44): 15311-9 (1998). 30
- Branchini, B. R., R. A. Magyar, *et al.* Biochemistry 40(8): 2410-8 (2001).
- Branchini, B. R., T. L. Southworth, *et al.* Biochemistry 42(35): 10429-36 (2003).
- Conti *et al.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1996 Jul 1;52(Pt 4):876-8.
- Conti, E., N. P. Franks, *et al.* Structure 4(3): 287-298 (1996).
- Creighton, T. E., Proteins--Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., W. H. Freeman
and Company, New York (1993).
- Cunningham *et al.*, Science 244:1081-1085 (1989) 40
- Day, J. C., L. C. Tisi, *et al.*, Luminescence 19(1): 8-20 (2004).

- de Vos *et al.* *Science* 255:306-312 (1992)
- de Wet, J. R., K. V. Wood, *et al.* *Molecular and Cellular Biology* 7(2): 725-37 (1987).
- Derewenda, Z.S. (2004) *Methods* 34: 354-363.
- Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12(1):387 (1984)
- Elion E.A. (2003) Unit 3.17 – Constructing recombinant DNA molecules by the polymerase chain reaction. *In* Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA. 10
- Felsenstein, J. *Cladistics* 5: 164-166, 1989
- Flanagan, W. M. *et al.* (1991) *J. Virology*: 65, 769-786
- Fulton, B. B. *Annals of the Entomological Society of America* 34: 289-302 (1941).
- Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)119-128 20
- Gribskov, M. and Devereux, J., eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, 1991 20
- Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Humana Press, New Jersey, 1994
- Hammarström M., *et al.* (2002) *Protein Science* 11: 313-321.
- Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, (1989)
- Harrison, R. A.. *Pacific Insects* 8(4): 877-833 (1966). 30
- Houghten *et al.*, *Nature* 354:84-86 (1991)
- Jain, V. K. and Magrath, I. T., *BioTechniques*: 12, 681-683 (1992)
- Kaufinan *et al.*, *EMBO J.* 6:187-195 (1987)
- Keown *et al.* (1990), *Meth. Enzymol.* 185:527-537.
- Kozak, M., *Cell* 44(2): 283-92 (1986).
- Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15(20): 8125-48 (1987). 40
- Krause, M. H. and S. A. Aaronson, *Methods in Enzymology*, 200:546-556 (1991)
- Kujan *et al.*, *Cell* 30:933-943(1982)

- Lam *et al.*, Nature 354:82-84 (1991)
- Leckie, F. *et al.* BioTechniques: 17, 52-57 (1994)
- Lee, J. Photochemistry and Photobiology 24: 279-285 (1976).
- Lesk, A. M., ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, 1988
- Lockhart, D. J. *et al.*, Nat. Biotech. 14: 1675-1680, 1996. 10
- Lucklow *et al.*, Virology 170:31-39 (1989)
- Lundin, A. Methods Enzymol 305: 346-70 (2000).
- Masuda *et al.*, Gene 77, 265-270 (1989) and
- Millican, D. S. and I. M. Bird, Anal Biochem 249(1): 114-7 (1997).
- Nakatsu, T. *et al.* Nature 440:372-376 (2006).
- Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970) 20
- Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997)
- Plant Biochemistry and Molecular Biology (eds. Lea & Leegood, John Wiley & Sons)(1993) pp 275-295.
- Promega: Instructions for use of Products E2920, E2940, and E2980, revised 1/06, Part Number TM058. and Promega pGL3 Luciferase Reporter Vectors (available from Promega Corporation, Madison, Wis.)
- Pugsley, C. W., New Zealand Entomologist 7(4): 419-424 (1983). 30
- Rattan *et al.* (Ann. N.Y Acad. Sci. 663:48-62 (1992)
- Sakurai, Y., R. Komatani, K. Tabata and H. Takaie On the glow-worm breeding at Tama Zoo
- Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)
- Schena, M. *et al.* (1996 Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614-10619)
- Schultz *et al.*, Gene 54:113-123 (1987) 40
- Seed, B. Nature 329:840(1987)
- Seifter *et al.* (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) and

Seliger, H. H. and W. D. McElroy, Arch Biochem Biophys 88: 136-41 (1960).

Shimomura, Johnson *et al.* 1966

Shimomura, O., F. H. Johnson, *et al.*, Observations on the biochemistry of luminescence in the New Zealand glowworm, *Arachnocampa luminosa*. Bioluminescence in Progress. F. H. Johnson and Y. Haneda. Princeton, Princeton University Press: 487-494 (1966).

Smith *et al.*, Gene 67:31-40 (1988)

Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992)

10

Smith *et al.*, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165 (1983)

Smith, D. W., ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, 1993

Songyang *et al.*, Cell 72:767-778 (1993)

Studier *et al.*, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185:60-89 (1990)

Sivinski, J. M. (1998). Florida Entomologist 81(3): 282-292.

20

Takaie, H. (1989) Breeding and display of the glow-worms, *Arachnocampa* spp. Insectarium, vol.26 July: 214-219

Takaie, H. (1997) Ten years of the glow-worm (*Arachnocampa richardsae*) rearing at Tama Zoo –Fascination of a living milky way. Insectarium, vol 34 November: 336-342.

Viviani, Hastings *et al.* Photochem Photobiol. 75(1):22-7 (2002)

Viviani, V. R., Cell. Mol. Life Sci. 59:1833-1850 (2002)

von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, (1987)

30

Wada *et al.*, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118 (1992)

WO/1995/011995

WO/1999/066324

WO/2000/024878

WO1999/049019

Wold, F., Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983)

40

Wood, K. V., (1998) *The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays*, Promega Notes 65, page 14.

Wood *et al.*, *Science* 244, 700-702 (1989)

Wood, K. V., Evolution of bioluminescence in insects. VII International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Wiley, Chichester, UK (1983).

Xu, Y., D. W. Piston, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 151-6 (1999).

【図面の簡単な説明】

10

【0320】

【図1A】アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのコンセンサスのヌクレオチド配列(配列番号1)を示す図である。

【図1B】図1Aから続くアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのコンセンサスのヌクレオチド配列(配列番号1)を示す図である。

【図2A】アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの核酸配列および対応するアミノ酸配列を示す図である。

【図2B】図2Aから続くアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼの核酸配列および対応するアミノ酸配列を示す図である。

【図3】アラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼのコンセンサスのアミノ酸配列(配列番号2)を示す図である。

20

【図4】本発明のルシフェラーゼの核酸配列(配列番号3)を示す図である。

【図5A】本発明のルシフェラーゼペプチドの核酸配列および対応するアミノ酸配列を示す図である。

【図5B】図5Aから続く、本発明のルシフェラーゼペプチドの核酸配列および対応するアミノ酸配列を示す図である。

【図5C】図5Bから続く、本発明のルシフェラーゼペプチドの核酸配列および対応するアミノ酸配列を示す図である。

【図6A】18種のルミネセンスの甲虫、およびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼからのルシフェラーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

30

【図6B】図6Aから続く、18種のルミネセンスの甲虫、およびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼからのルシフェラーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図6C】図6Bから続く、18種のルミネセンスの甲虫、およびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼからのルシフェラーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図6D】図6Cから続く、18種のルミネセンスの甲虫、およびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼからのルシフェラーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図6E】図6Dから続く、18種のルミネセンスの甲虫、およびアラクノカンパ・リカルドサエのルシフェラーゼからのルシフェラーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

40

【図7】アシル-CoAリガーゼ・スーパーファミリーの他のルシフェラーゼの分子の系統発生におけるアラクノカンパのルシフェラーゼの位置を示す図である。

【図8】GWLuc#1からの本発明のペプチドの発現を示す図である。レーン番号は、左から右である。第1のレーンは、キロダルトン(kD)に標識した分子量のスタンダードを表す。他のレーンは、pETDuet-1:FFLuc(レーン3~5)、およびpETDuet-1:GWLuc#1(レーン6~8)で形質転換した大腸菌株BL21(DE3)を表す。レーン4および7は、IPTGなしで48時間インキュベートした培養物のサンプルを表す。レーン3および6は、培養物の前誘導のサンプルを表す。レーン5および8は、0.4mM IPTGの存在下で48時間インキュベートし、関連した構築物

50

を発現する培養物のサンプルを表す。

【図9】ホタルであるフォティヌス・ピラリスからのルシフェラーゼの天然のアミノ酸配列 (FFルシフェラーゼ; 配列番号4) を示す図である。

【図10】アラクノカンパ・フラバのルシフェラーゼをコードする核酸配列 (配列番号5) を示す図である。

【図11】アラクノカンパ・フラバのルシフェラーゼのアミノ酸配列 (配列番号6) を示す図である。

【図12】アラクノカンパ・ギラウィーネンシスのルシフェラーゼをコードする核酸配列 (配列番号7) を示す図である。

【図13】アラクノカンパ・ギラウィーネンシスのルシフェラーゼのアミノ酸配列 (配列番号8) を示す図である。

【図14】アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼをコードする核酸配列 (配列番号9) を示す図である。

【図15】アラクノカンパ・タスマニエンシスのルシフェラーゼのアミノ酸配列 (配列番号10) を示す図である。

【図16】本発明のルシフェラーゼによる生物発光の増強を示す図である。

【図17】本発明のルシフェラーゼの増大量による生物発光の定量的な反応を示す図である。

【図18】キャリブレーションプロットを示す図である。

【図19】熱変性による生物発光活性の解消を示す図である。

【図20】生物発光がルシフェリンおよびATPに依存することを示す図である。

【図21】生物発光の活性が本発明のペプチドに特異的であることを示す図である。

【図22】本発明のペプチドはセレンテラジンを基質として利用しないことを示す図である。

【図23】本発明のペプチドによって生成される最大の生物発光は、 530 ± 5 nm未満の波長で生じることを示す図である。

【図24】酵母菌における本発明の生物発光活性の発現を示す図である。

【図25A】4つのアラクノカンパのルシフェラーゼのペプチドの、複数の配列アラインメントを示す図である。

【図25B】図25Aの続きのアラインメントを示す図である。

10

20

30

【 図 4 】

GWLuc#1のスクレオチド配列

ATCAATGTCTTGTGAAATTCAGTGAACAAGGCTGTACTGTCAATGAATATATGATATGGCTCAGGACGGA
CCTTGTATGCTTTGAGGAGGCTAATTCATGATGTAATGAGCTTTAAACGATTTGAGAGCCAGAGGATGATGAGT
TCCAGTATTTGATGCTTTACAGAGGAAATTCGTCGCGCAATTTATTCATGAGACCTCCGAAACAGCTGAG
TGTCTTCAAGCTTATGGCATCGAAGAGGCGATCGTGTGATTTGCACTGATACCAAGATTTGATATCTTTTCAC
TTGATATGGAAACATGGCAGTTGGTCTATTACTGTCCAAATTAATTTTCAAGCATGAGCCAGCATGAACCA
TGTCTTATATATTCATGCTCCAGCTTTCTTTTGTTCGAAAGATTTTGGCAAGCATTTGCTGAAATTTGCTAG
AGAAATCCTTATGTAAGGACATATTTCTCTTGAATGATGTCACGAAAGCTTTGTAAGGATTTAAGATTT
TTTTGCTAATCCAAAGTGCCATGAAACCAATTTGATGTCAGCACAGCATGAAATTAACATTTGCCAC
TGTTTTATGCACTGCTGACTACGGATTTCTTAAGGTTTGGCTATATGCAATATATCTGATCCACTTCGTG
TCACTGGACATAGACTTACAGAGGCGCTTTTGTGTGATGACAGTACTGTAAGGTTTGTGTTTACTG
CATGATGAGACGTCATTTAATGGCACAGGCTACTCATTTGCAAGATATGACGAGAGAGGTTACTTATGATG
GCTTCAAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGACAGAAACCCGAAAT
GGAACTGATGTTGTGCTGATTTGAAAGCTTTTGTCTGCTGCAAGCATGAGGTTGCAATTTTATATCCAG
TAGTGAGAGAAATTTGGCTCAGGCTGATGCTCAATTTAGGTCAGGATTTGGCAAGGATATACATCCGAAACT
TGATGAAATTTGTAACAAAGAGGATGTTGGTCACTATGCTGAGGATTTGCAAGGATTTGGCAAGGATTTG
GTCCTCAAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGACAGAAACCCGAAAT
GGAACTGATGTTGTGCTGATTTGAAAGCTTTTGTCTGCTGCAAGCATGAGGTTGCAATTTTATATCCAG
ATCCAGAGGCTCCAAAGTGTGTAAGGATGAGGCTTATGATGATGCTGATGATGCTGATGATGATGATGAA
ATTTGAAATGCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GAACTCAAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGACAGAAACCCGAAAT
GATATTTGCTGATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
ACCTTATCCAGGATCTTAAGGATGCTGCTGCAATTTGATGAGAAATCCCAAAATCCGCTGCAAAATTTG
CTGCTATTTAAGGAGAACTGTAATGAAATTAATTTGTTCTTATTTAATTTGAATTAATGCGATGCTG
ATTAAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 4

【 図 5 A 】

GWLuc#1のスクレオチド配列とアミノ酸翻訳

ATCAATGTCTTGTGAAATTCAGTGAACAAGGCTGTACTGTCAATGAATATATGATATGGCTCAGGACGGA
1 60
TAGTTPAACAAACACTTTAAGAGTCACTGTACCAGCAATGAGCTCCTATTATACACT
M A C T S V N N I V
TATGCTCCTAAGCCGACCTTTGATGCTTTGAGGAGGCTAATTCGATGTTGTAATATGCA
61 120
ATACCAGGATTCGGCTGGAACTACAGAACCTTCCCGATTAAGCATACCACTTATAGT
Y G P K P T F D V L K E A N S Y G E Y A
TTTAAACGATTTGAGAGCCAGAGGATGATGAGGTTTCCGATTTGATGCTCCCTACAGAGAG
121 180
AAATTTGCTAACCTCGCTCTCCACTACTTCAAAGTCAATTAACACGGGATTTGCTCTC
F K R L R A R G D E V S V I D A L T G E
GAAATTCGTCATCCGATATTATGCTAAGACCGTGCACAGCGTGTGCTTCAAGCT
240 240
CCTTAAGCACTGAGCTATAAATACGTTCTGCGACGCTTTGCGACTACAGAAATGCA
E I R A S D I Y A K T V R T A E C L Q A
TATGCTCAGAAAGGCGCATCGTGTGGATTTGCACTGATACATGATTAATACAT
241 300
ATACCGTATGCTTTCCCGTAGCAGCACTAAGGCTCACTGATGATCACTTATGATA
Y G I R K G D R V G I C S D T M I E Y Y
TACATTTAATGGAAACATGGCAGTTGGTCTATTAATCTGCTCAATTTATTTCATGG
301 360
ATGTAACATTAACCTTTGACCGTCAACCAAGATATAGACAGGTTAATAAAGATACC
Y I V M G T M A V G A I C P I I S W
ACTGAGCCGATGATGAGCAGTCTTTAATAATTTCAATGCTCAACGTTTCTTTGTTTGG
361 420
TGACTTCGGCTACTTCTGTAAGAAATATAAAGTACAGGTTGCCAAAGAAACAGG
T E A D M N H A F N I S C P T V F V S
AAAATTTTCCCAAGCATTTGCTGAAATTTGTAAGGAAATCCCTTATGTAAGGACAT
421 480
TTTTCAAAACGTTGCTAAGAGCTTAACGATTTCTTTAGGAAATCATTTCCGTATA
K S I L P T I A R I A K R N P Y V K D I
ATTGCTTTGAT
481 540
TACAGAACTACTTACTGCTGCTTTTGGTAACTATTCGAAATTTCAAAAAACGA
I V F D D N A P E K P L I S F K D F L A
AATCCAAAGTCCATCAAAACCATTTGATTTGTAAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
541 600
TTAGTCTTACGGTATGTTTGGTAAACTAAGCACTTGGTGTCTGACTTTTATG
N P K V P S K P H F D C E P Q D M E N T
ATTGCCATGTTTATTGATCTGCTACTACGGTATTTCTAAGGTTTGTCTATATGG
601 660
TAACGGTCAAAATAACTGTAGACCATGATGCCATAAAGATTTCCAAACGATATAGC

FIG. 5A

【 図 5 B 】

I A T V L L T S G T T G I S X G V A I S -
661 720
CAATATATCTGATCCACTTCATGCTCACTGCAACAGAGATTACAGAGGCGCTATT
GTTATATGAGACTAGTGAAGTACAGTACAGTCACTGATTTCTGAATGCTTCCCGATAA
Q Y N L I R F H S L D T K T Y K K O L F -
721 780
TGTGTGAGCAGTACTCAAGGCTTGTGTTTATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AACACACTGAT
L C V A Q Y S N A F G F T A L M R R A F -
781 840
AATGGCACCAAGGCTACTTATGCTCAAGATACAGCAGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTACCGTGTGAT
N O T R V L H L P R Y D E K S Y L E C V -
841 900
CAAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGATGATGATGATGATGAT
GTTTAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGATGATGATGATGATGAT
Q K F K V N Y I S V H P P L M L S L A K -
901 960
AAACCCGAAATTTGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTTTGGCTTTAAGCTTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
K P H I A N Y D L S S L E R I Y C S G T -
961 1020
ACAGTGTGAT
TGTCACTGAT
T V S V R I L Y Q V A E R I G V K V R -
1021 1080
CAATTTATGAT
GTTAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGATGATGATGATGATGAT
Q P Y G S S E C L A V A Q S D E F T -
1081 1140
AAAGAGGTTGAT
TTTTCTTCAAGCAAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
K G S V G T L M P G I I G K V I H P E T -
1141 1200
GTTGCTTCTTGGCCAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CCAGGAGAGAGGCGCTTACTTCCGCAAGAACTTAAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
G A L L O P N E R O F L K F K A N S T M -
1201 1260
TATGATTTTCAAAATTCAGGTCATTTACATGATGTTACCTCCCTCCCTGATGATGCTGATGATGATGAT
ATACCAGTAAAGTGTAGGACTCGAGGTTTACCAATTTCTACTTCCCAATACAA
Y G Y F N N P E A S K V V K D E E G Y V -

FIG. 5B

【 図 5 C 】

AATGCTGAT
1261 1320
TTATGACCACTAGACCTATAATTAATTTCTTCAAACTTACCCAGCACTACTGATAT
N T G D A G Y Y N E R F E W F V D R L -
AAGATATGAT
1321 1380
TTCCTATATCAATACCGCTACCACTGCGAGCAAGGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
K D I V M V D G V A V A P T B N E T T I -
TGTCTTACCCGATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
1381 1440
AACGAGTACGCTATATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
L L H P D I I D A C V I G I S D G E G G -
GAATATATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
1441 1500
CTCTAATAAAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
E V L F A P L T K T R K E V T R K D V M -
GACTGAT
1501 1560
CTGAGCAAGCTTCTTGGTGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
D F V A R K L P Y P K H L K G O C Q F Y -
GATGAAATCCCAAGATCCAGCTGCAAAATTTGCTGATTTAAGGAGCAATG
1561 1620
CTACTTTATGGTCTTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
D E I P K N P A G K M L R R I L R G T L -
TAACTGAAAAAATTTGTTCTTATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAAT
1621 1680
ATTAACTTTTATTAAGCAAGAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
+
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1681 1711
GTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTT

FIG. 5C

【 図 6 A 】

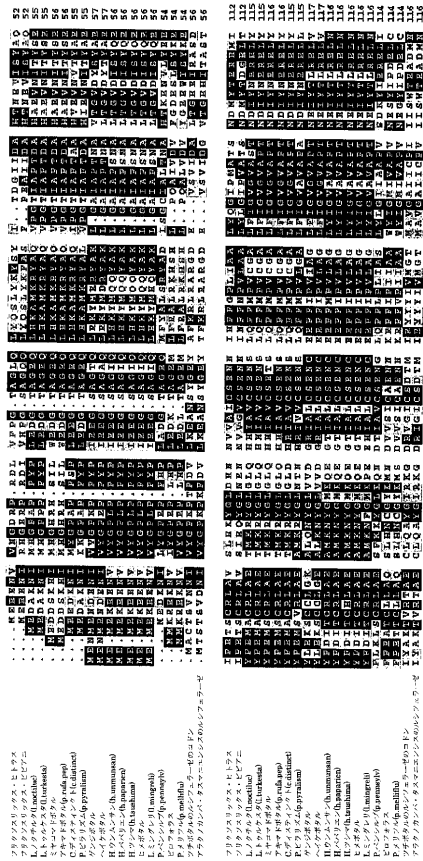


FIG. 6A

【 図 6 B 】

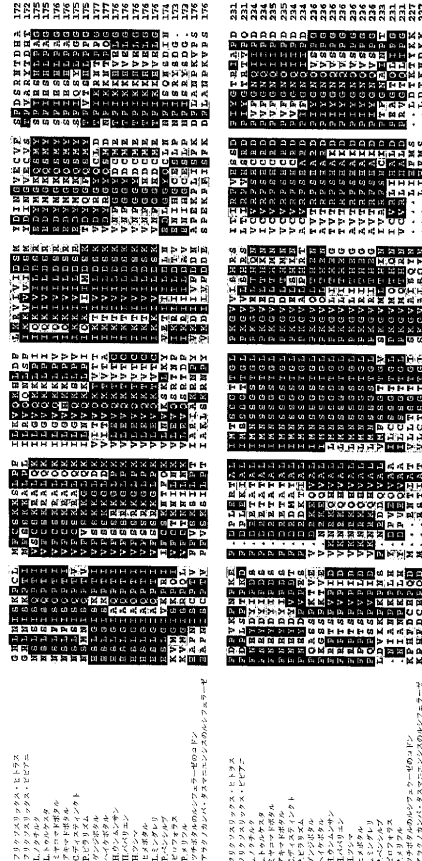


FIG. 6B

【 図 6 C 】

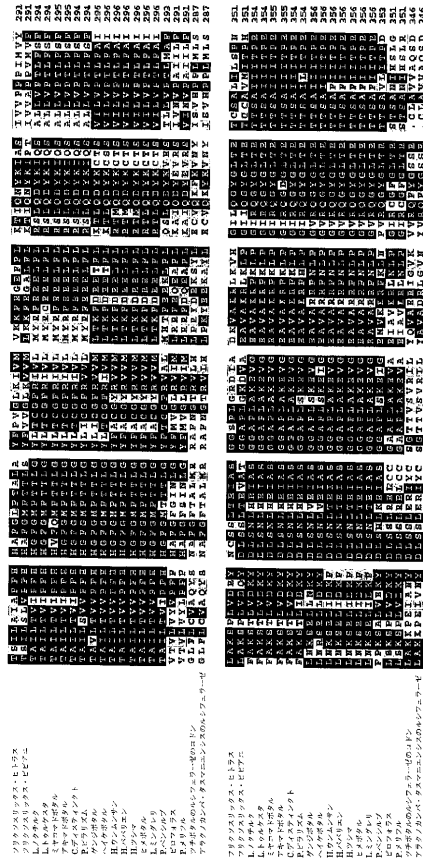


FIG. 6C

【 図 6 D 】



FIG. 6D

【 図 8 】

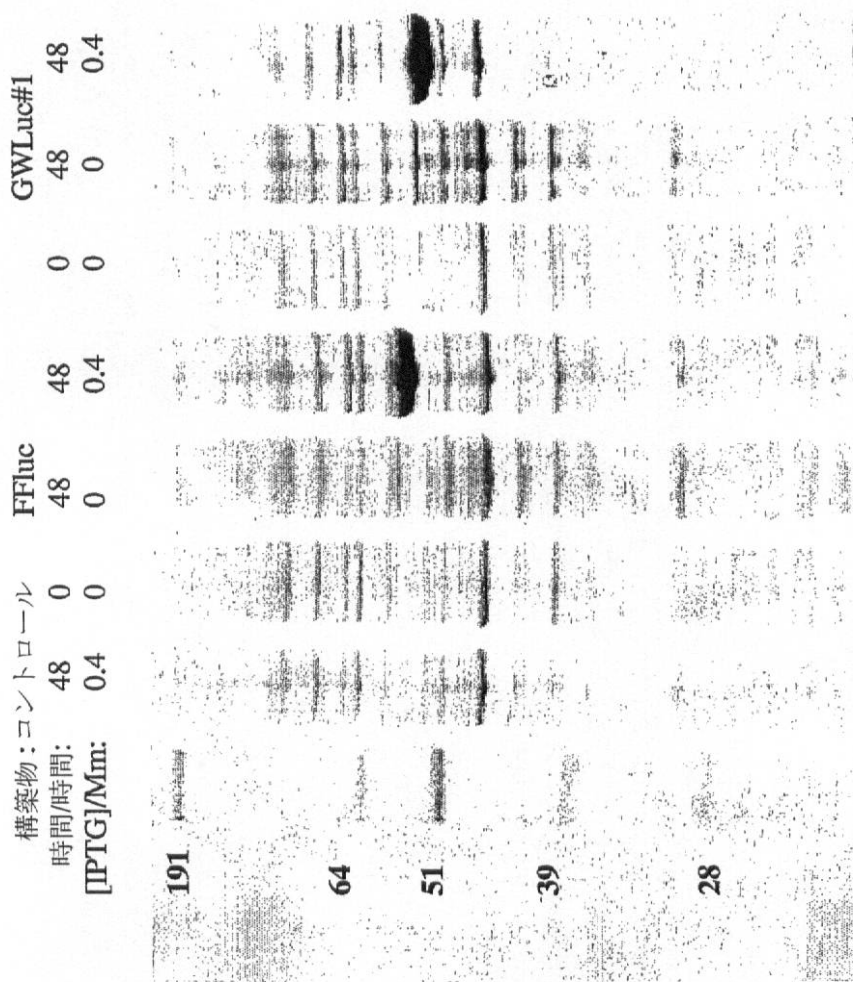


FIG. 8

【 図 20 】

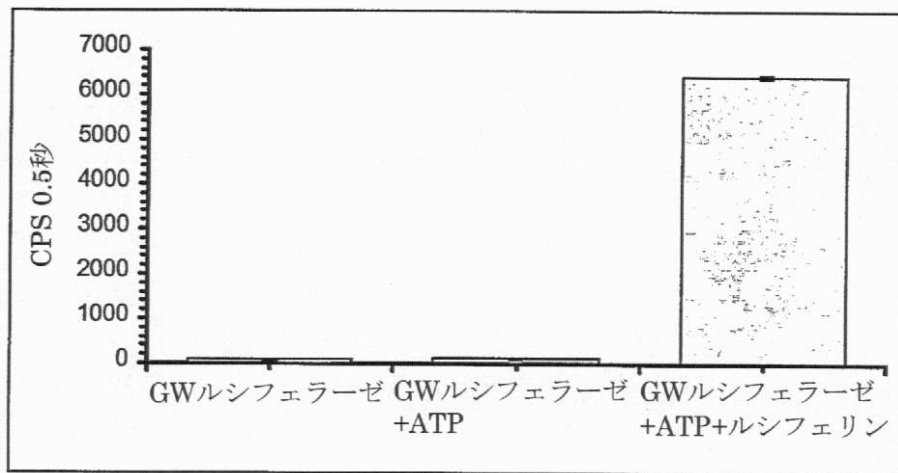


FIG. 20

【 図 2 1 】

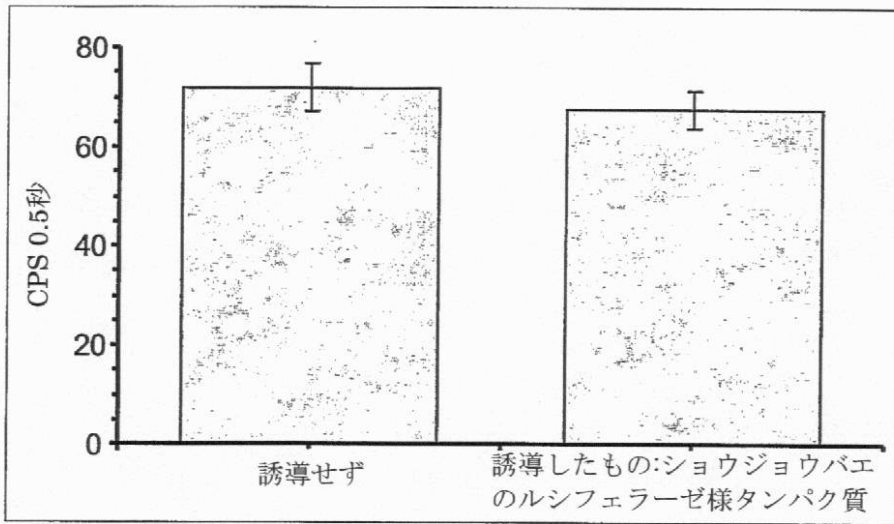


FIG. 21

【 図 2 2 】

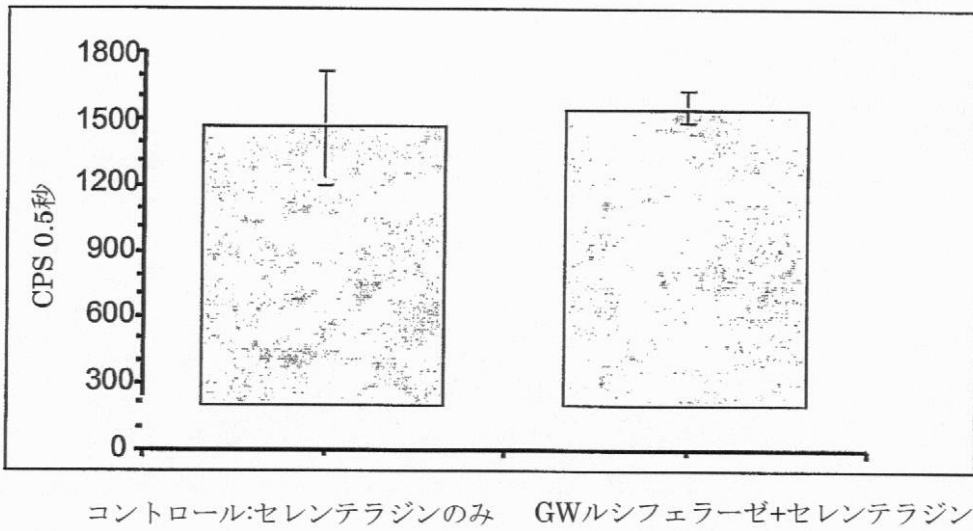


FIG. 22

【 図 2 4 】

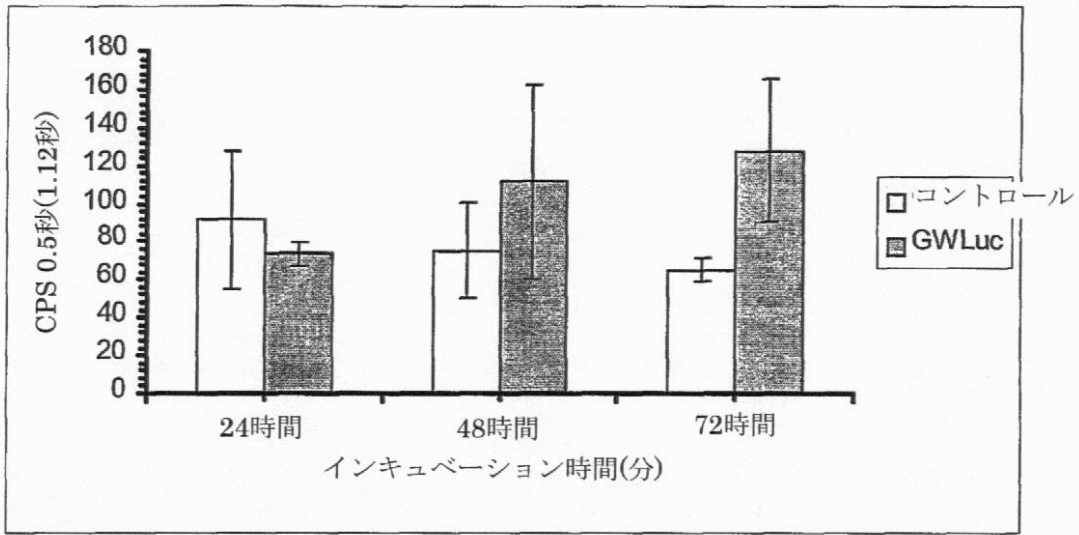


FIG. 24

【 配 列 表 】

[2009505642000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2006/001180
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. <i>C12N 9/02</i> (2006.01) <i>C12N 15/09</i> (2006.01) <i>C12N 15/53</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, CAPLUS, WPIDS: luciferase, mutation, mutant, 525 to 535 nm, <i>Arachnocampa</i> , firefly. DGENE: Blast for SEQ ID NO 4 and fragments of SEQ ID NO 4 comprising deletion R218 or H245N or G315S or L342S or T343S (each individual fragment being 10 aa in length comprising the mutation)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/038029 A2 (PROMEGA CORP) 28 Apr 2005 Example 4 – SEQ ID NO 103 (96% identical to applicants' SEQ ID NO 4 with any of the following changes: deletion R218, H245N, G315S, L342S, T343S)	
A	US 2005/0079567 A1 (KIM CHOI et al) 14 Apr 2005 Claim 5 – SEQ ID NO 4 (94 % identical to applicants' SEQ ID NO 4 with any of the following changes: deletion R218, H245N, G315S, L342S, T343S)	
A	Viviani VR (2002) The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases CMLS Cell Mol Life Sci 59: 1833-1850 entire document	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2006	Date of mailing of the international search report 31 OCT 2006	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer INES CARRIN Telephone No : (02) 6283 2435	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2006/001180

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Viviani VR et al (2002) The influence of Ala243 (Gly247), Arg 215 and Thr 226 (Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. Photochemistry and Photobiology 76(5): 538-544 whole document – Figure 2 and Table 1	
A	Viviani VR et al (1999) Cloning, sequence analysis, and expression of active <i>Phrixothrix</i> railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures Biochemistry 38:8271-8279 & GenBank AF139644 sequence identity = 34% when compared with SEQ ID NO 2 (<i>Arachnocampa</i>)	
A	Viviani VR et al (1999) Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle <i>Pyrearinus termitilluminans</i> luciferase. Photochemistry and Photobiology 70(2):254-60 whole document	
A	de Wet JR et al (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 7:725-737 & LUCI_PHOPY <i>Photinus pyralis</i> (north american firefly). luciferin 4-monooxygenase (ec 1.13.12.7) (luciferase) SwissProt Acc No P08659 – 01 Jan 1988 Sequence identity 98% (538/550) compared to applicants' SEQ ID NO 4 with any of the following changes: deletion R218, H245N, G315S, L342S, T343S	
A	EP 0449621B1 (KIKKOMAN CORP) 28 Aug 1996 whole document - Table 1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2006/001180

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos. 14 to 20 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 14 as currently drafted is not fully supported by the specification as the enzymes claimed are not necessarily those of the invention as defined in claim 1. Thus claims 14 and its dependent claims were searched insofar as they encompass polypeptides that display the luciferase activity as defined in claim 1.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- **Invention 1:** Modified protein and peptides of firefly luciferase with light emission spectra with maximum intensities in blue portion of spectrum (SEQ ID NO 4 with *any* of the following changes: deletion R218, H245N, G315S, L342S, T343S) and uses thereof, encompassing claims 1, 2 - in full; 3 to 5 and 7 to 20 (all in part).
- **Invention 2:** Proteins and peptides isolated from *Arachnocampa* with luciferase activity (SEQ ID NO 2, 6, 8 and 10) and uses thereof, encompassing claim 6 - in full, and claims 3 to 5 and 7 to 20 (all in part).

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2006/001180

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	2005079567	EP	1687399	WO	2005035719		
WO	2005038029	CA	2541765	EP	1673459	US	2005153310
EP	0449621	JP	3285683	US	5219737	US	5330906

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
G 0 1 N 21/76 (2006.01)	G 0 1 N	21/76	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヴァージニア・レイチ
オーストラリア・2 6 1 4・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・ページ・キャロン・ストリート・2 2

(72) 発明者 ミラ・マリア・デュマンシク
オーストラリア・2 9 0 3・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・オックスレイ・ファレリー・クローズ・3

(72) 発明者 スティーブン・チャールズ・トロウエル
オーストラリア・2 9 0 3・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・オックスレイ・ファレリー・クローズ・3

(72) 発明者 ヘレン・ダクレス
オーストラリア・2 6 0 2・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・オコナー・ブラックバット・ストリート・4

F ターム(参考) 2G054 AA06 AA08 CA22 CE01 CE08 EA02 EA03 EB01 GA03
4B024 AA11 BA08 CA04 DA06 EA04 GA14 HA11
4B050 CC04 DD11 KK13 LL03
4B063 QA01 QQ06 QQ22 QQ42 QQ63 QR02 QR24 QR33 QR40 QR59
QR62 QR75 QR80 QS05 QS36 QX02
4B065 AA26X AA90Y AB01 BA01 BD35 CA28 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA51 DA89 EA50 FA74