

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年4月29日(29.04.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/079656 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/54 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/034965

(22) 国際出願日: 2020年9月15日(15.09.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-193837 2019年10月24日(24.10.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 坂根 郁夫(SAKANE Fumio); 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 重信 和男, 外(SHIGENOBU Kazuo et al.); 〒1020094 東京都千代田区紀尾井町3番1号 K K Dビル7階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

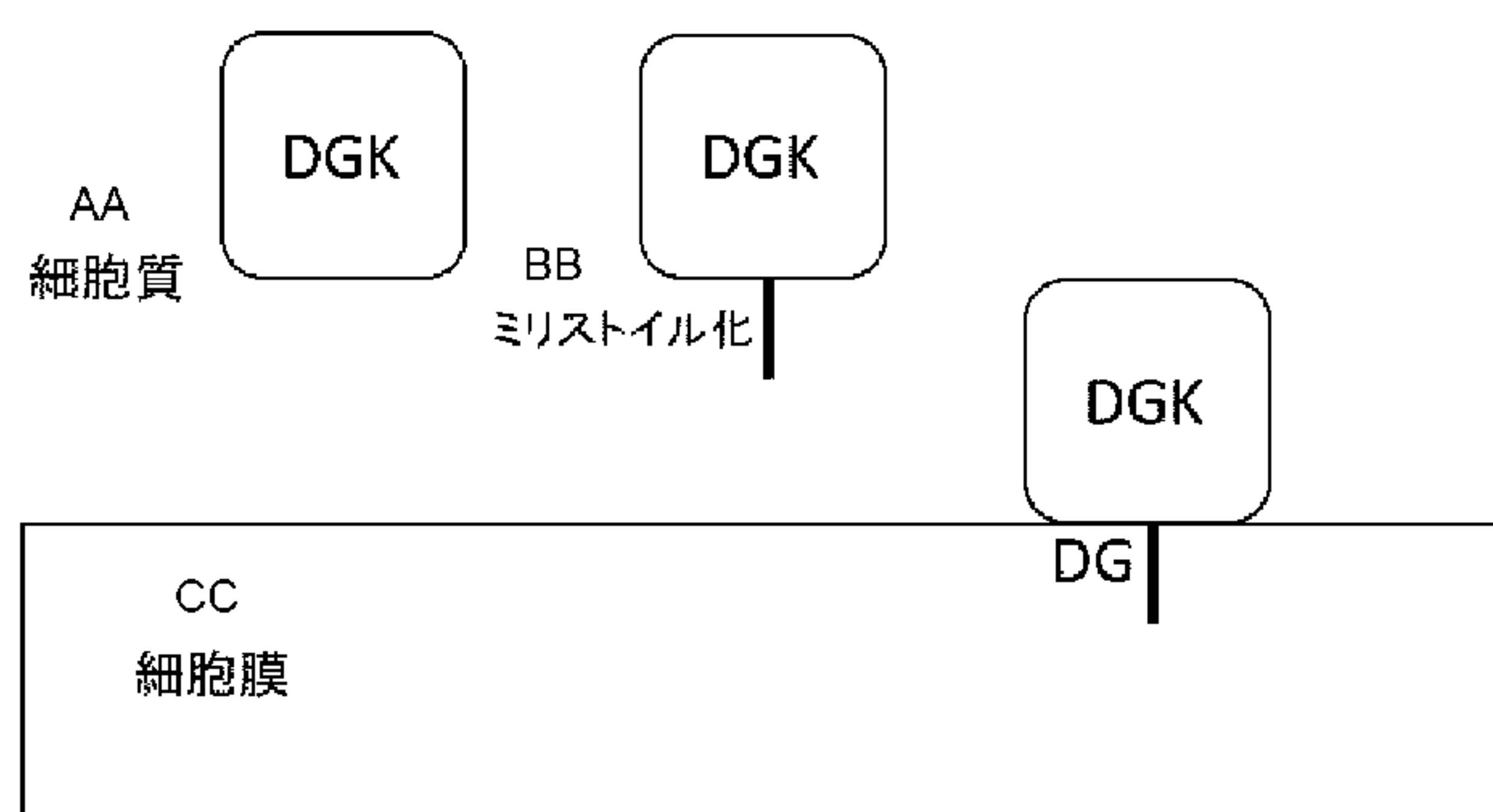
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,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

添付公開書類:

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

(54) Title: METHOD FOR MEASURING ACTIVITY OF LIPID-METABOLIZING ENZYME IN CELL, AND SUBSTANCE FOR USE IN MEASUREMENT OF ACTIVITY OF LIPID-METABOLIZING ENZYME IN CELL

(54) 発明の名称: 細胞内脂質代謝酵素活性測定法及び細胞内脂質代謝酵素活性測定用物質



AA Cytoplasm
BB Myristoylation
CC Cell membrane

(57) Abstract: Some types of DGK isozymes have been difficult to measure the activities thereof in cells. A method for measuring the activity of a diacylglycerol kinase comprises the steps of: introducing a diacylglycerol kinase having a myristoylation sequence into a cell; and measuring the amount of phosphatidic acid in the cell. The diacylglycerol kinase having a myristoylation sequence is at least one nucleotide sequence selected from the nucleotide sequences (1) to (3). (1) A nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1; (2) a nucleotide sequence having 90% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1; and (3) a nucleotide sequence having such a structure that 5 or less nucleotides in a nucleotide sequence comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 are deleted, substituted and/or added.

[続葉有]

(57) 要約：DGKアイソザイムの種類によっては、細胞内の活性を測定することが困難であった。ジアシルグリセロールキナーゼ活性測定法を、ミリストイル化配列を有するジアシルグリセロールキナーゼを細胞に導入する手順と、当該細胞内のホスファチジン酸の量を測定する手順を有するものとした。さらに、ミリストイル化配列を有するジアシルグリセロールキナーゼを、下記（１）～（３）のいずれか１つの塩基配列を有するものとした。（１）配列番号１で表される塩基配列；（２）配列番号１で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；（３）配列番号１で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。

明 細 書

発明の名称：

細胞内脂質代謝酵素活性測定法及び細胞内脂質代謝酵素活性測定用物質

技術分野

[0001] 本発明は、細胞内脂質代謝酵素活性測定法及び細胞内脂質代謝酵素活性測定用物質に関するものである。

背景技術

[0002] 薬を開発するには、in vitro（試験管内）での化合物の評価に加え、細胞内での対象酵素特異的な効果の検証が必須である。従来の、細胞内ジアシルグリセロールキナーゼ（脂質代謝酵素の一つ。以下「DGK」ということがある。）活性測定法は、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いた発明者らによるものが唯一である（非特許文献1）。ここで、キナーゼとは、生化学において、ATPなどの高エネルギーリン酸結合を有する分子からリン酸基を基質あるいはターゲット分子に転移する（リン酸化する）酵素の総称であり、リン酸化酵素とも呼ばれる。しかし、阻害化合物添加時のDGKアイソザイム特異的な活性の変動の測定に成功しているのは、DGKの α アイソザイムの常時活性化型変異体（N末側の活性制御（抑制）領域の欠損変異体）のみである（非特許文献2）。他の9種のアイソザイムの常時活性化型変異体や強力な活性刺激方法は知られておらず、従って、他の9種のアイソザイムの細胞内での活性測定は不可能であった。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Mizuno, S. et al. FEBS Open Bio, 2, 267-272 (2012)

非特許文献2：Liu, K. et al. Journal of Lipid Reserch., 57, 368-379 (2016)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] DGKアイソザイム特異的な活性を測定するには、DGKアイソザイムを過剰発現させた細胞での活性上昇がなければならない。そして、その上昇を化合物が阻害することで化合物の効果を測定する。しかし、これまで、過剰発現させた細胞での活性上昇があったのは、DGK α の常時活性化型変異体のみで、他のアイソザイムでは検出できていない。これは、他のアイソザイムでは、常時活性化することが出来ていなかったためである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決するために、本発明の一つの観点によれば、細胞内脂質代謝酵素活性測定法を、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素を細胞に導入する手順と、当該細胞内のホスファチジン酸の量を測定する手順を有するものとした。

[0006] 上記測定法において、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素が、下記(1)～(3)のいずれか1つの塩基配列を有すると望ましい。

- (1) 配列番号1で表される塩基配列；
- (2) 配列番号1で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；
- (3) 配列番号1で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。

[0007] また、本発明の他の観点によれば、脂質代謝酵素活性測定用物質を、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素を含有するものとした。

上記脂質代謝酵素活性測定用物質において、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素が、下記(1)～(3)のいずれか1つの塩基配列を有するものとする望ましい。

- (1) 配列番号1で表される塩基配列；
- (2) 配列番号1で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；
- (3) 配列番号1で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。

発明の効果

[0008] 本法は、従来不可能であった、DGK α 以外の9種のアイソザイムの細胞内で

の活性を特異的に測定することを可能にする。9種のDGKアイソザイムが関与する疾患は多々あり（例えば、種々の癌、癲癇、強迫性障害、双極性障害、自己免疫疾患、癌免疫、心臓肥大、高血圧、糖尿病、パーキンソン病、アルツハイマー病等）、これらの治療薬（DGKアイソザイムの活性制御剤）を開発する際に、細胞内での効果の評価が可能になり、開発の律速段階を克服し、開発の進行を大きく促進する。既に、複数の製薬企業が興味を示している。DGKアイソザイムの活性制御剤の開発は、世界規模で進んでおり、多くの製薬企業が興味を示す可能性がある。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明のジアシルグリセロールキナーゼ測定法の原理を示す図である。

[図2]COS-7細胞におけるAcGFP-DGK ζ とMyr-AcGFP-DGK ζ の発現量を示す図である。

[図3]COS-7細胞におけるAcGFP-DGK ζ とMyr-AcGFP-DGK ζ のPA分子種量への影響を示す図である。

[図4]COS-7細胞におけるMyr-AcGFP-DGK ζ とMyr-AcGFP-DGK ζ -KDの発現量を示す図である。

[図5]COS-7細胞におけるMyr-AcGFP-DGK ζ とMyr-AcGFP-DGK ζ -KDのPA分子種量への影響を示す図である。

[図6]COS-7細胞中のVector、DGK ζ 、Myr-DGK ζ 、Myr-DGK ζ -KDの分布を示す図である。

[図7]超遠心分離を使用して細胞分画を行った結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施形態の例を説明するが、本発明の実施形態は以下に説明する実施形態の例に限定されるものではない。

ミリスティル化（タンパク質へのミリスチン酸（疎水性のアンカー）付加）（図1）は、タンパク質を膜（疎水性）に移行させる。また、DGKアイソザイムは細胞質に局在しているが、それらの基質（ジアシルグリセロール（DG））は細胞の膜中に存在する。更に、DGK α の常時活性化型変異体は、野生型

は、細胞質に局在する。そこで、DGKアイソザイムをミリストイル化することで、膜に移行させて常時活性化のような状態にして、DGKアイソザイムの活性を強制的に高め、そして、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて活性を検出できると考えた（図1）。そして、実際に活性の増加を確かめ、従来の問題点を解決した。

[0011] すなわち、本発明の一つの観点によれば、脂質代謝酵素活性測定法を、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素を細胞に導入する手順と、当該細胞内のホスファチジン酸の量を測定する手順を有するものとした。

[0012] 上記測定法において、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素が、下記（1）～（3）のいずれか1つの塩基配列を有すると望ましい。

（1）配列番号1で表される塩基配列；

（2）配列番号1で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；

（3）配列番号1で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。

[0013] また、本発明の他の観点によれば、脂質代謝酵素活性測定用物質を、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素を含有するものとした。

[0014] 上記脂質代謝酵素活性測定用物質において、ミリストイル化配列を有する脂質代謝酵素が、下記（1）～（3）のいずれか1つの塩基配列を有するものとする望ましい。

（1）配列番号1で表される塩基配列；

（2）配列番号1で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；

（3）配列番号1で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。

実施例

[0015] 1. 要約

ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）に特異的な阻害剤は、がん免疫を活性化させる有望な抗がん剤になり得る。標的酵素の細胞内活性の検出はin vitroアッセイに加えて薬物スクリーニングにとっても不可欠であるが、細胞

内のDGK ζ の活性を検出することは困難である。本研究では、5'末端にN-ミリスチル化配列を持つAcGFP-DGK ζ cDNA (Myr-AcGFP-DGK ζ) を生成し、標的のDGK ζ を膜に近づけた。我々は、LC-MS/MSを使用して、ミリスチル化配列のないAcGFP-DGK ζ ではなく、Myr-AcGFP-DGK ζ が、いくつかのホスファチジン酸 (PA) 分子種の産生量を増加させることを示した。Myr-AcGFP-DGK ζ とは対照的に、その不活性変異体はPA産生量の増加は示さなかった。このことは、PA産生量の増加はDGKの活性に依存することを示唆している。この方法は、DGK ζ を標的とした薬剤の開発のための化学物質の選択に役に立ち、また、他のDGKアイソザイムを含む様々な可溶性 (非膜結合) 脂質代謝酵素にも適用できる。

[0016] 2. 緒言

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) に変換する。DGは、タンパク質キナーゼCs (PKCs)、Unc-13、キメリン、Rasグアニルヌクレオチド放出タンパク質の活性化因子である。一方で、PAは、哺乳類の標的であるラパマイシン、非定型PKC、C-Raf、Ras GTPase活性化タンパク質、セブンレスの息子 (グアニンヌクレオチド交換因子)、ホスファチジンイノシトール-4-リン酸キナーゼのような様々な病態生理学的に重要な酵素を調整する。したがってDGKは、2つの脂質セカンドメッセンジャーであるDGとPAのバランスを調整し、様々な生理学的および病理学的な事象に関わっていることが知られている。

[0017] 哺乳類のDGKは10個のアイソザイム (α – κ) で構成され、それらの構造的特徴に応じて5つのグループに分けられる (タイプI (α 、 β および γ)、II (δ 、 η および κ)、III (ε) IV (ζ 、 ι)、V (θ)) [1-4]。触媒ドメインに加えて、タイプIVのDGKアイソザイム (ζ 、 ι) は、N末端に2つのC1ドメイン、C末端にMARCKS (ミリスチル化アラニンリッチC-キナーゼ基質) ドメイン、4つのアンキリンリピート、そしてPDZドメインを有している。

[0018] 中でもDGK ζ は多機能なタンパク質である。DGK α (タイプI) に加えてDGK ζ は、T細胞受容体 (TCR) シグナル伝達およびT細胞活性化の減衰剤として作

用する。したがって、DGK ζ 欠損T細胞はex vivoおよびin vivoにおいてTCR刺激の応答が亢進する。これらの結果は、DGK ζ 特異的な阻害剤はTCRシグナル伝達を活性化し、結果としてがん免疫を活性化することで有望な抗がん剤になり得ることを示唆している。DGK ζ の欠損は、肥満とインスリン抵抗性に対する保護能の減少につながることを報告されている。加えて、DGK ζ はインスリン受容体基質-1と関連し、脂肪細胞においてGLUT-4転位を調節する。さらに、DGK ζ の作用により、DG量が減少し、細胞増殖が減衰することが報告されている。DGK ζ は、視床下部においてレプチンシグナル伝達経路を調整する。さらに、このアイソザイムはNIE-115神経芽種細胞の神経突起伸長を促進する。近年、我々はDGK ζ が16:0/16:0-PA分子種を生成し、そして、Neuro-2a神経芽腫細胞においてレチノイン酸／血清飢餓誘発神経突起伸長を促進することを実証した。したがってDGK ζ は、神経分化の初期および初期段階での神経突起の成長において役割を果たすことが示唆されている。DGK ζ に依存したDGからPAへの変換は、樹状突起の維持に重要な役割を果たす。さらにこのアイソザイムは、Gqタンパク質結合受容体アゴニストによって誘発される心肥大を抑制し、骨格筋リモデリング中の繊維サイズを調整する。

[0019] DGK ζ は生理学的小および病学的に重要であるため、魅力的な薬物ターゲットとして認識されている。標的酵素の細胞内活性の検出は、in vitroアッセイに加えて薬物スクリーニングにも不可欠である。しかし、DGK ζ の細胞内活性の検出は困難である。DGK ζ は核および細胞質に広く分布している。PAを生成するためには、DGK ζ を膜に移行させる必要がある。しかし、DGK ζ 刺激は、その排他的な膜局在を引き起こすが、そのメカニズムは解明されていない。負の調整ドメインを欠き、基質のある膜に移行するDGK α の活性変異体は生成することができるため、発明者らはすでに細胞でその活性アッセイを確立している。一方で、DGK ζ の活性変異体は未だ確立されていない。

[0020] ミリストイル化は、膜への移行を促進すると考えられる。そこで本検討では、標的のDGK ζ を膜に移行させるために、5'末端にc-SrcのN-ミリストイル化配列を持つAcGFP-DGK ζ cDNA（ミリストイル化（Myr-）AcGFP-DGK ζ ）を生

成した。Myr-AcGFP-DGK ζ と我々が近年確立した液体クロマトグラフィー（LC）-タンデム質量分析（MS/MS）DGKアッセイを用いて、発明者は細胞内でのDGK ζ の活性の検出を試みた。

[0021] 3. 材料および手法

（1）Myr-AcGFP-DGK ζ のcDNAコンストラクト

pMyr-AcGFPベクターを生成するために、pAcGFP-C1ベクター（タカラクロンテック）中のAcGFP翻訳開始部位にN-ミリスチル化シーケンス（5'-atggggagtagcaagagcaagcctaaggacccccagccagcgc-3'）（配列番号1）を挿入した。DGK ζ cDNA（UniProt accession ID:DGK ζ Q13574-2）をコードするPCRフラグメントであるpMyr-AcGFP-DGK ζ を構成するために、p3 $\times$ FLAG-CMV-human DGK ζ [38]をpMyr-AcGFPベクターのEcoR I-Sal Iサイトに連結させた。DGK ζ の不活性型変異体（DGK ζ -KD）はPCRに基づいた部位特異的変異誘発により生成した（Gly-355からAsp（G355D））。

[0022] 4. 細胞培養とトランスフェクション

COS-7細胞は、5%CO₂を含む37℃の大気中で、10%ウシ胎児血清添加（Biological Industries、Beit-Haemek、Israel）、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン（和光純薬工業）を含むDulbecco's Modified Eagle Medium（和光純薬工業）で維持した。細胞は、PolyFect 試薬（Qiagen）で製造元の説明通りにトランスフェクトした。

[0023] （1）ウェスタンブロッティング

COS-7細胞溶解物（20 μ g）をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し分離した。ウェスタンブロッティングには、抗GFP（Santa Cruz Biotechnology）および抗マウスIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を用いた。

[0024] （2）共焦点顕微鏡

pAcGFP、pAcGFP-DGK ζ 、pMyr-AcGFP-DGK ζ 、pMyr-AcGFP-DGK ζ -KDのトランスフェクションの24時間後、COS-7細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。カバーガラスは、Vectashield（Vector Laboratories）で固定した。蛍

光画像は、室温、 60×1.35 NAオイルのUPLSAP0を搭載したOlympus FV1000-D (IX81) 共焦点レーザー走査顕微鏡（オリンパス）を使用して取得した。AcGFP蛍光は488nmで励起された。画像はFV-10 ASWソフトウェア（オリンパス）を使用して取得した。

[0025] (3) 細胞分画

AcGFP alone、AcGFP-DGK ζ 、Myr-AcGFP-DGK ζ 、Myr-AcGFP-DGK ζ -KDが発現したCOS-7細胞（60mmディッシュ）は、 $500\mu\text{l}$ 氷冷溶解バッファー（50mM HEPES, PH 7.2, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM ジチオスレイトール、Complete™ EDTA浮遊プロテアーゼ阻害剤（Roche Diagnostics (Rotkreuz) , 1錠/50 ml）と1mMフェニルメチルスルホニルフルオリドに溶解した。細胞片を除去するために、細胞溶解液を350gで5分間、4°Cで遠心分離した。得られた上清は100,000 gで1時間、4°Cの条件で遠心分離した。上清とペレットをSDS-PAGE、ウェスタンブロッティングで分析した。

[0026] (4) LC-MS/MS

pMyr-AcGFP、pMyr-AcGFP-DGK ζ 、pMyr-AcGFP-DGK ζ -KDをトランスフェクションして24時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で回収した。Bligh and Dyer法により、細胞から全ての脂質を抽出した。簡単に言うと、サンプル $700\mu\text{l}$ にメタノール2 ml、クロロホルム700 μl を加えた。100 ngの28:0-PA (Avanti Polar Lipids) を内部標準として加えた。酸性リン脂質の回収率を上げるために3M HCl $100\mu\text{l}$ をサンプルに加えた。HCl添加後、サンプルを30秒ボルテックスした。室温で30分間インキュベートした後、1 mlの水を加え30秒ボルテックス後、1 mlのクロロホルムを加え30秒間ボルテックスした。相を分離するために、サンプルを1000×gで10分間遠心分離した。抽出された脂質を含む下相を新しいバイアルに移した。脂質を含む溶媒を窒素ガス下で乾燥させ、抽出した脂質を、 $100\mu\text{l}$ のクロロホルム/メタノール（2:1, v/v）で再構成した。抽出した脂質（10 μl ）を、Unison UK-Silicaカラム（3 μl , $150\times 2.0\text{mm}$ 1.d., Imtakt）を使用して、LCシステム（島津製作所）で、前述の通りに分離した。このLCシステムは、Analystソフトウェア（AB SCIEX）で制御

している。用いる勾配は、溶媒A（0.28%のアンモニアを含む、クロロホルム/メタノール（89:10））、溶媒B（0.28%のアンモニアを含むクロロホルム/メタノール/水（55:39:5））の2つである。勾配溶出のプログラムは、5分間20%B、10分間で20%から30%B、25分間で30%から60%B、5分間で60%B、1分間で60%から20%B、続いて14分間で20%Bとした。流出割合は0.3 ml/minであり、クロマトグラフィーは25°Cで行った。

[0027] LCシステムは、ターボスプレーイオン化源を備えたトリプル四重極タンデム質量分析計、Triple Quad™4500（AB SCIEX、Framingham）とオンラインで繋がれている。実験条件は次の通りである。イオンスプレー電圧—4500V、カーテングス—30 psi、衝突ガス6psi、温度300°C、脱クラスター電圧—160 V、入口電位—10 V、衝突エネルギー42V、衝突セル出口電位—11V、イオン源ガスI 70psi、イオン源ガスII 30psi。PA分子種は複数反応モニタリング（MRM）で検出した。イオン化されたPA種（ $[M-H]^-$ ）は、最初の四重極（Q1）で分離された。その後、産生したイオン（負のイオンモード中で m/z 153）は、衝突により誘発された解離によりQ2で断片化後、Q3で再選択された。各リン脂質種はX:Yの形で表される。ここで、Xは炭素原子の総数、Yはリン脂質の両方のアシル鎖の二重結合の総数である。

[0028] （5）統計分析

データは平均±SDとして表し、one-way ANOVAで分析した。その後、多重比較のためPrism 8（GraphPad Software、カリフォルニア州サンディエゴ、米国）を用いてTurkey post hoc testで分析した。

[0029] （6）結果

（a）Myr-AcGFP-DGK ζ の細胞内局在

発明者は初めに、COS-7細胞中に発現したMyr-AcGFP-DGK ζ の細胞内局在を、共焦点顕微鏡により確認した。ミリストイル化されていないAcGFP-DGK ζ は、細胞質、細胞核および核周囲領域に広く分布していた。しかし、Myr-AcGFP-DGK ζ は主に細胞膜と核周辺領域に局在していた（図6）。これらの結果は、DGK ζ ミリストイル化が膜局在化を誘導することを示唆する。DGK ζ の不活

性変異体 (Myr-AcGFP-DGK ζ -KD) も細胞膜と核周辺領域に分布していた (図 6)。したがって、膜局在化の誘導は、DGKの活性に非依存的であることが示唆された。

[0030] 膜局在がミリスチル化に依存するか検証するために、発明者は次に、超遠心分離を使用して細胞分画を行った。AcGFP-DGK ζ は 100,000g ppt (膜) 画分で一部のみ (約 60%) 回収された (図 7)。一方、Myr-AcGFP-DGK ζ と Myr-AcGFP-DGK ζ -KD は 100,000g ppt (膜) 画分で完全に (100%) 回収された (図 7)。このことは、ミリスチル化が AcGFP-DGK ζ の膜局在化を独占的に誘発することを示唆する。

[0031] (b) 細胞内の Myr-AcGFP-DGK ζ による PA 産生物の検出

Myr-AcGFP-DGK ζ と、近年開発された LC-MS に基づいた DGK アッセイを使用して、細胞内の DGK ζ 活性を測定した。pAcGFP alone (ベクター)、pAcGFP-DGK ζ 、pMyr-AcGFP-DGK ζ のいずれかを COS-7 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした 24 時間後、その細胞を SDS-PAGE した後、抗 GFP 抗体を用いてウェスタンブロッティングしたものを図 2 に示す。発明者は、AcGFP-DGK ζ と Myr-AcGFP-DGK ζ の発現レベルがほぼ同じであることを確かめた (図 2)。

[0032] AcGFP alone、AcGFP-DGK ζ 、Myr-AcGFP-DGK ζ を過剰発現させた COS-7 細胞における PA 分子種の量を LC-MS/MS で定量したものが図 3 である。LC-MS/MS 分析により、Myr-AcGFP-DGK ζ が PA 分子種の産生量を大幅に増加させることが分かった (図 3)。値は 4 つの独立した実験の平均 $\pm$ SD で表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。図 3 において、一番左の棒は、AcGFP alone (ベクター) の PA 分子種の量を、左から二番目の棒は、AcGFP-DGK ζ の PA 分子種の量を、左から三番目の棒は、Myr-AcGFP-DGK ζ の PA 分子種の量を示す。

[0033] 特に、30:1-PA (48% 増加)、30:0-PA (50% 増加)、32:3-PA (43% 増加)、32:2-PA (45% 増加)、32:1-PA (42% 増加)、32:0-PA (33% 増加)、38:6-PA (39% 増加)、38:5-PA (39% 増加) の産生量が、Myr-AcGFP-DGK ζ を発現させた COS-7 細胞において、ベクターのみを発現させた細胞と比較して有意に

増加した（図3、表1）。しかしながら、ミリストイル化されていないAcGFP-DGK ζ はPA分子種の産生量に影響を及ぼさなかった（図3）。ここでは、DGK ζ の実験データを示しているが、DGK ζ 以外のDGKアイソザイムでもミリストイル化によりPAの産生量が増加する。ベクターのみを発現させた細胞のPA分子種は、de novo合成、ホスホリパーゼDによるホスファチジルコリンの加水分解、内在性DGKアイソザイムによるDGのリン酸化のような複数の経路から生成されると考えられる。

[0034] [表1]

PA species	30:1-PA	30:0-PA	32:3-PA	32:2-PA	32:1-PA	32:0-PA	38:6-PA	38:5-PA
Relative amount	148%	150%	143%	145%	142%	133%	139%	139%

[0035] PA分子種の産生量の増加がDGK ζ の活性によるものかどうか確かめるために、発明者は続いてMyr-AcGFP-DGK ζ -KD（不活性型。KDは、Kinase-deadの略。）の影響を確認した。pAcGFP alone（ベクター）、pAcGFP-DGK ζ 、pMyr-AcGFP-DGK ζ のいずれかをCOS-7細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした24時間後、その細胞をSDS-PAGEした後、抗GFP抗体を用いてウェスタンブロッティングしたものを図4に示す。Myr-AcGFP-DGK ζ -KDの発現レベルはMyr-AcGFP-DGK ζ の発現レベルとほぼ同じであった（図4）。

AcGFP alone、Myr-AcGFP-DGK ζ 、Myr-AcGFP-DGK ζ -KDを過剰発現させたCOS-7細胞における主要なPA分子種（30:1-PA、30:0-PA）の量をLC-MS/MSで定量したものを図5に示す。値は4つの独立した実験の平均 $\pm$ SDで表す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。一番左の棒は、AcGFP alone（ベクター）のPA分子種の量を、左から二番目の棒は、Myr-AcGFP-DGK ζ の棒を、左から三番目の棒は、Myr-AcGFP-DGK ζ -KDのPA分子種の量を示す。Myr-AcGFP-DGK ζ での発現が大きく増加した30:1-PA、30:0-PAのLC-MS/MSの結果を示した（図5、表1）。Myr-AcGFP-DGK ζ において30:1-PA、30:0-PA分子種の産生量は大きく増加したが、これらのPA分子種の産生量はMyr-AcGFP-DGK ζ -KDにおいては増加しなかった（図5）

ため、PAの産生量の増加はDGK ζ 活性に依存していることが示唆される。これらの結果から、Myr-AcGFP-DGK ζ 発現COS-7細胞により引き起こされる、30:1-PA、30:0-PAなど個々のPA分子種の産生量の増加は、容易に検出できると言える。

[0036] (7) 考察

本検討で発明者は、細胞内のDGK ζ 活性を検出する新たな方法を提供した。これまで細胞内のDGK活性を検出することは困難であった。実際、ミリストイル化されていないDGK ζ は、個々のPA分子種の産生量の大きな増加は示さなかった(図3)。この難しさを克服するために我々は、ミリストイル化AcGFP-DGK ζ を生成した。ミリストイル化は、AcGFP-DGK ζ を、その基質が存在する細胞膜(図6)に移行させる。予測通り発明者は、30:1-PA、30:0-PAなどMyr-AcGFP-DGK ζ 活性由来のPA分子種の産生の検出に成功した(図3、表1)。以上より、Myr-AcGFP-DGK ζ は活性変異体として作用する可能性がある。

[0037] ミリストイル化されていないAcGFP-DGK ζ は約60%が100,000g ppt(膜)画分で検出された(図7)のに対し、Myr-AcGFP-DGK ζ はほぼ100%が100,000g ppt画分で検出された。さらに共焦点顕微鏡により、ミリストイル化はDGK ζ の膜局在を強くすることを示した(図6)。以上より、ミリストイル化は確かに膜局在を強めると言える。AcGFP-DGK ζ の約半分は膜画分にあったが、PA分子種の有意な増加を誘発しなかった(図3)。したがって、AcGFP-DGK ζ は膜との相互作用が弱いため、そこにあるDGを効率的に利用することはできないと考えられる。

[0038] 以前発明者らは、DGK ζ が主にNeuro-2aで、レチノイン酸および血清飢餓に誘発された神経芽腫細胞分化中に、16:0/16:0-PAを生成することを報告した。本検討では、Myr-AcGFP-DGK ζ が発現した細胞で、幅広いPA分子種が増加することを示した(図3)。ミリストイル化するとタンパク質は膜に移行するが、DGK ζ はランダムに膜に移行した可能性がある。実際、Myr-AcGFP-DGK ζ は原形質膜および核周辺領域に広く分布していた(図6)。神経芽腫細胞においては、DGK ζ は、レチノイン酸誘導細胞分化中に部分的に原形質膜に局在

する。さらに、インスリン受容体およびTCR刺激はDGK ζ の原形質膜局在を誘導する。したがって、Myr-AcGFP-DGK ζ のランダムな膜への局在は、幅広いPA分子種の産生を引き起こす可能性が考えられる。

[0039] この新しく開発された方法により、in vitroの混合ミセルのモデルと比較して、より生物学的条件（細胞膜上で）でDGK ζ の活性を分析することが可能となった。したがってこの方法は、DGK ζ を標的とする薬物の開発のためのin vitroで最初にスクリーニングする候補化合物の選択に役立つ。なぜなら、優れた薬剤を開発するためには、in vitroアッセイに加えて標的酵素の細胞活性の検出が必要だからだ。

[0040] 現在、有用なDGK ζ 選択的阻害剤はない。また、市販されているDGK阻害剤、R59022およびR59949はDGK ζ を効果的に阻害できなかった。そのため発明者は、ツール化合物を使用した阻害剤アッセイに適したアッセイシステムを検証することができなかった。しかし発明者は、化学物質によって阻害される酵素と同等のMyr-AcGFP-DGK ζ -KDの30:1-PA, 30:0-PA分子種の産生量レベルが、Myr-AcGFP-DGK ζ のそれよりも優位に低いことを実証した（図5）。したがってこのシステムは化合物の選択に適切に適用できる可能性が高い。

[0041] この新しいメソッドは、他のDGKアイソザイムにも適用可能である。多くのアイソザイムが可溶性（非膜結合）であり、サイトゾルおよび核に分布している。したがってDGKアイソザイムは、その活性を見やすくするためにサイトゾルから基質が多く存在する膜に移行する必要がある。DGK ζ がそうであったように（図3）、他のDGKアイソザイムも単に過剰発現させただけでは、PAの産生量の増加を示さないであろう。したがって、DGKアイソザイムの膜局在化は、それらの細胞内活性の検出に適用可能である。さらに本検討で提供した実験方法は、可溶性またはサイトゾルに分布する他の脂質代謝酵素にも適用できる可能性が高い。

[0042] 結論として、発明者は細胞内のDGK ζ 活性を検出する新たな方法を開発した。この新たな方法は、DGK ζ を標的とする薬剤の開発のための初期のin vitroスクリーニング後の化合物の選択に有用であろう。さらにこの方法は、他のD

GKアイソザイムを含む、様々な可溶性（非膜結合）脂質代謝酵素に適用可能であろう。

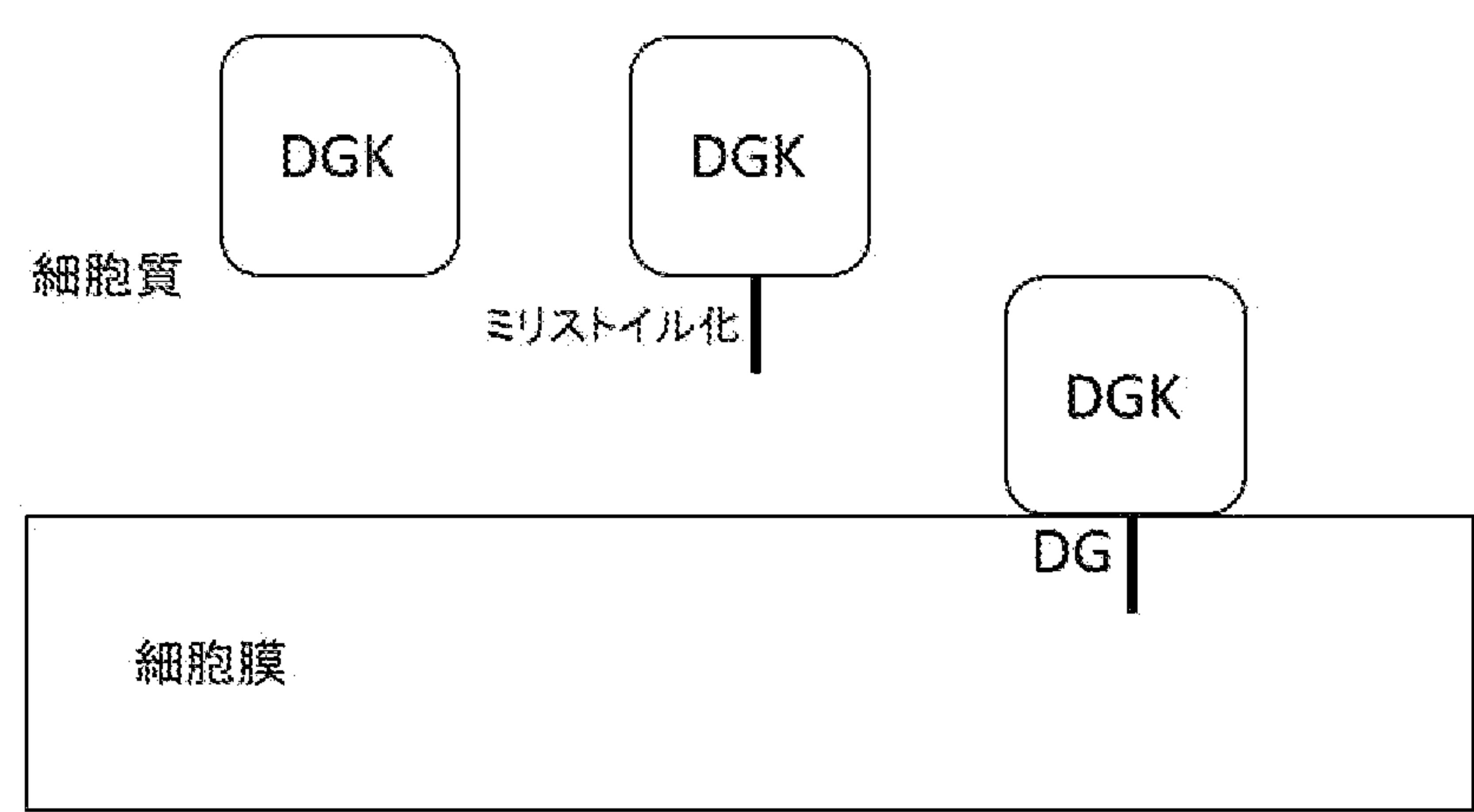
産業上の利用可能性

[0043] 本発明は、細胞内脂質代謝酵素活性測定法及び細胞内脂質代謝酵素活性測定用物質として産業上利用できる。

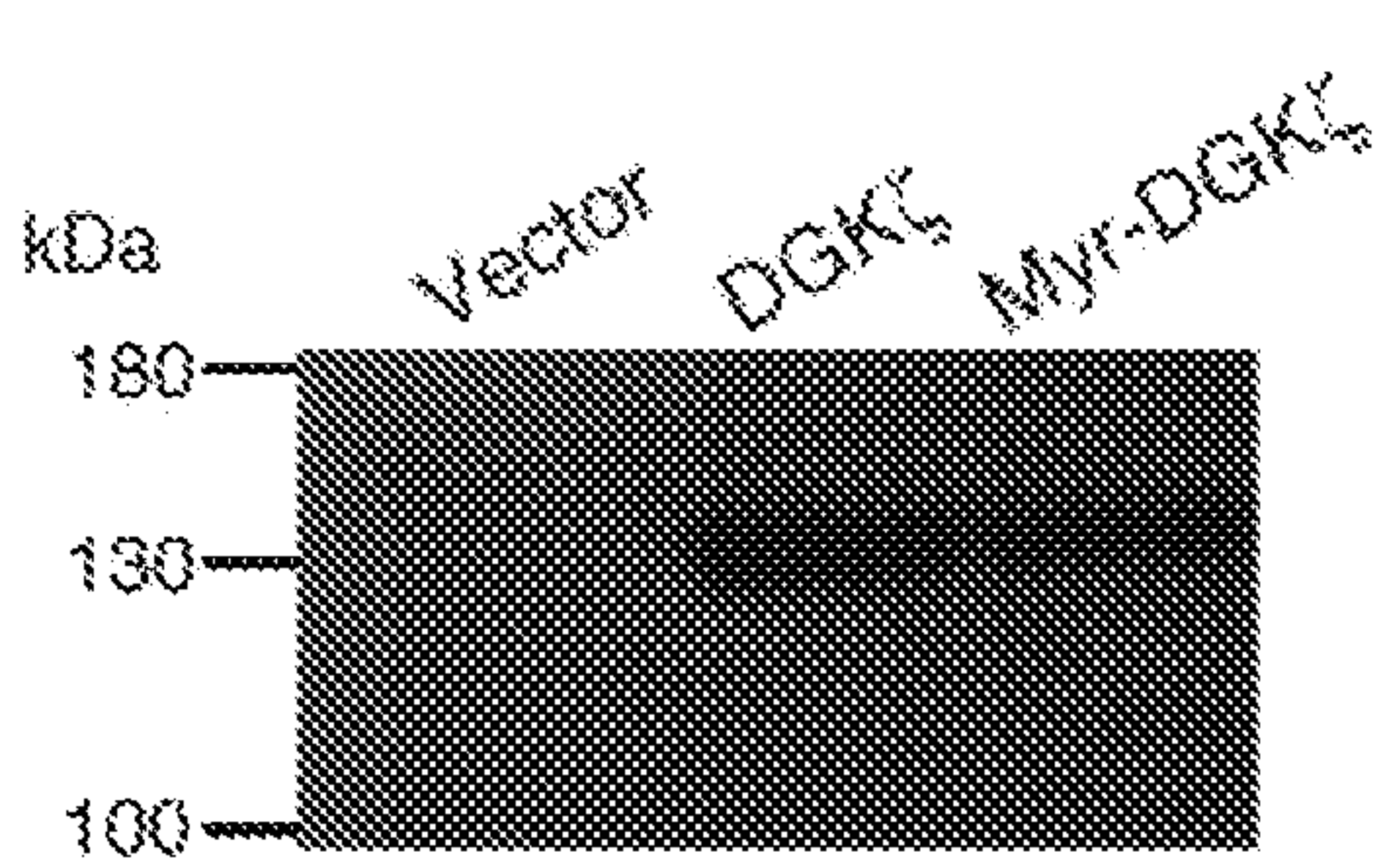
請求の範囲

- [請求項1] ミリスティル化配列を有する脂質代謝酵素を細胞に導入する手順と、当該細胞内のホスファチジン酸の量を測定する手順と、を有する脂質代謝酵素活性測定法。
- [請求項2] 前記ミリスティル化配列を有する脂質代謝酵素が、下記（１）～（３）のいずれか１つの塩基配列を有することを特徴とする請求項１記載の脂質代謝酵素活性測定法；
- （１）配列番号１で表される塩基配列；
- （２）配列番号１で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；
- （３）配列番号１で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。
- [請求項3] ミリスティル化配列を有する脂質代謝酵素を含有する可溶性脂質代謝酵素活性測定用物質。
- [請求項4] 前記ミリスティル化配列を有する脂質代謝酵素が、下記（１）～（３）のいずれか１つの塩基配列を有することを特徴とする請求項１記載の脂質代謝酵素活性測定用物質；
- （１）配列番号１で表される塩基配列；
- （２）配列番号１で表される塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列；
- （３）配列番号１で表される塩基配列で表される塩基配列の5個以内の塩基が、欠失、置換及び／又は付加された塩基配列。

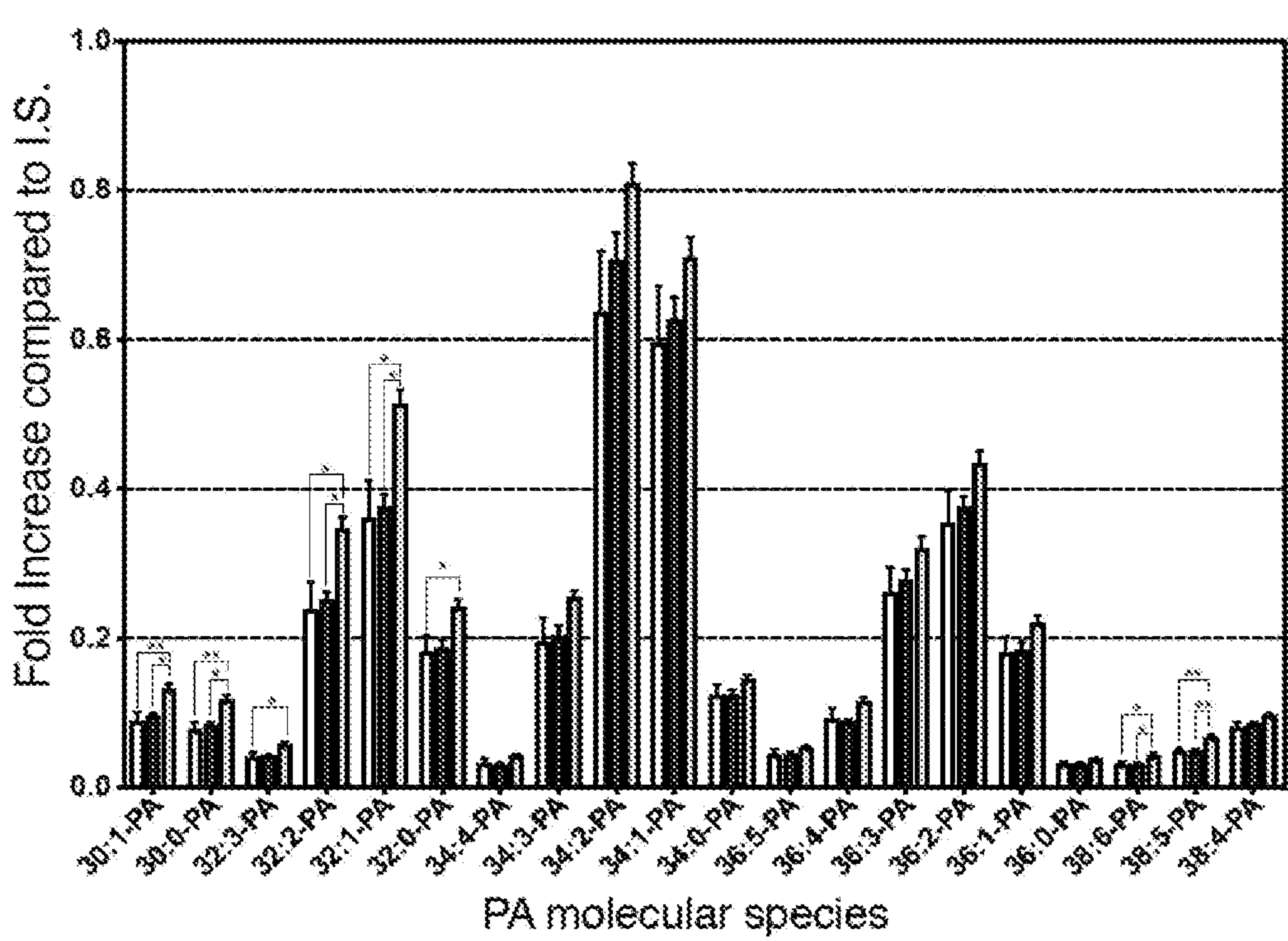
[図1]



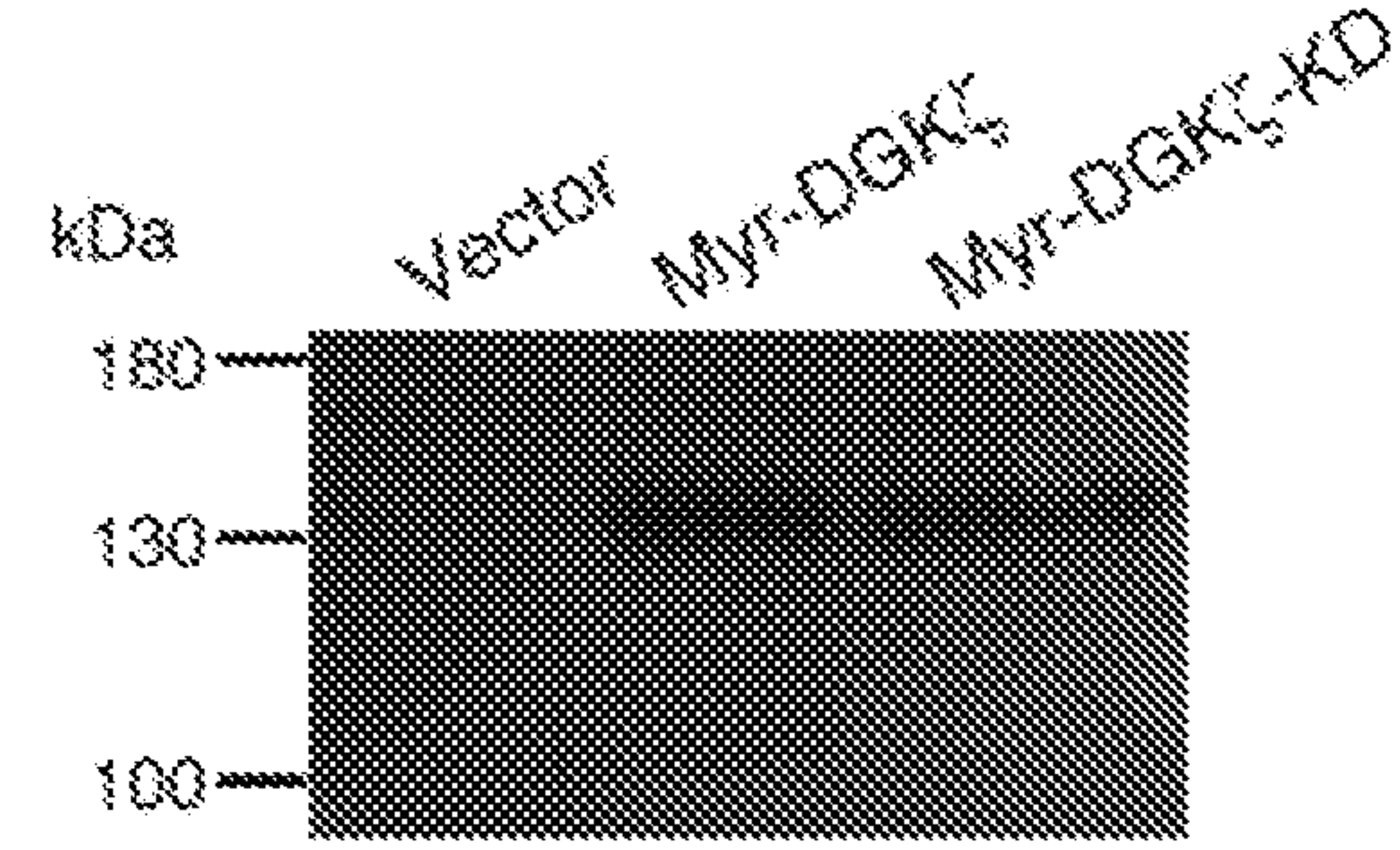
[図2]



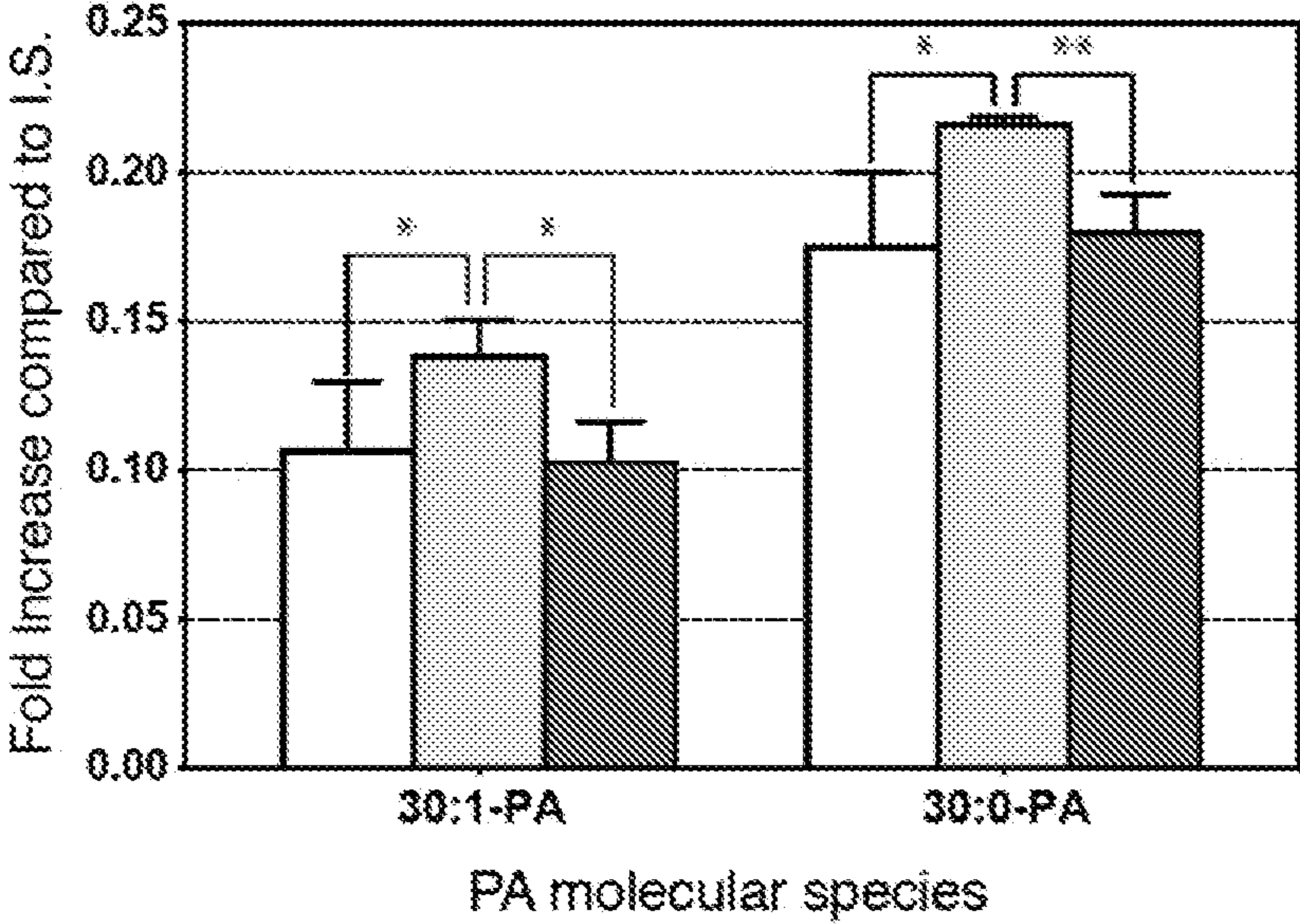
[図3]



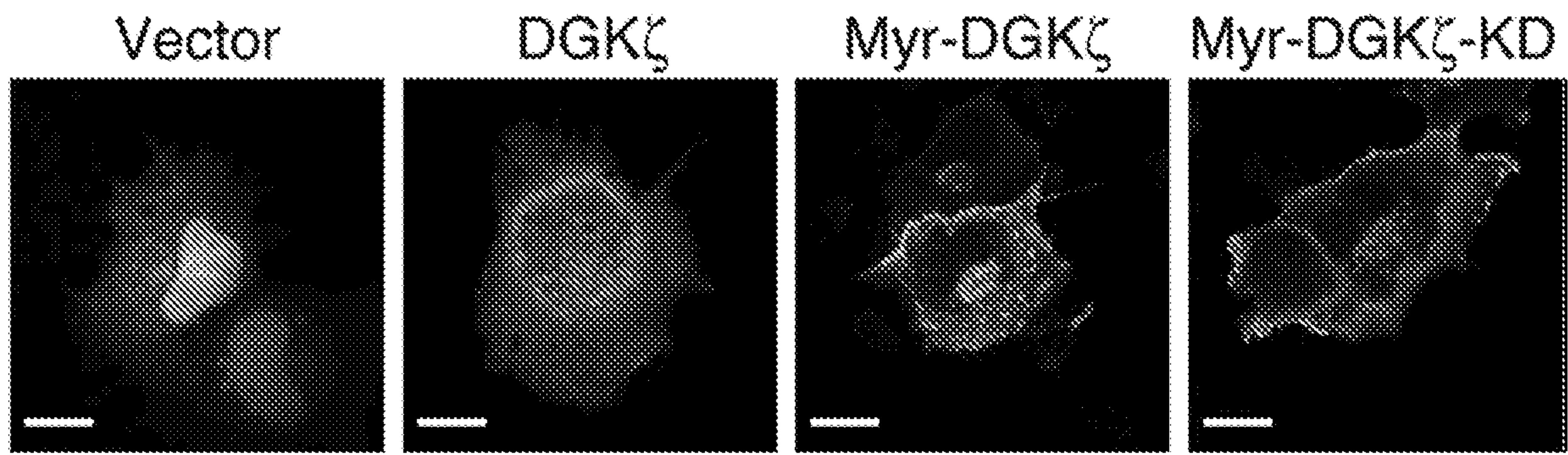
[図4]



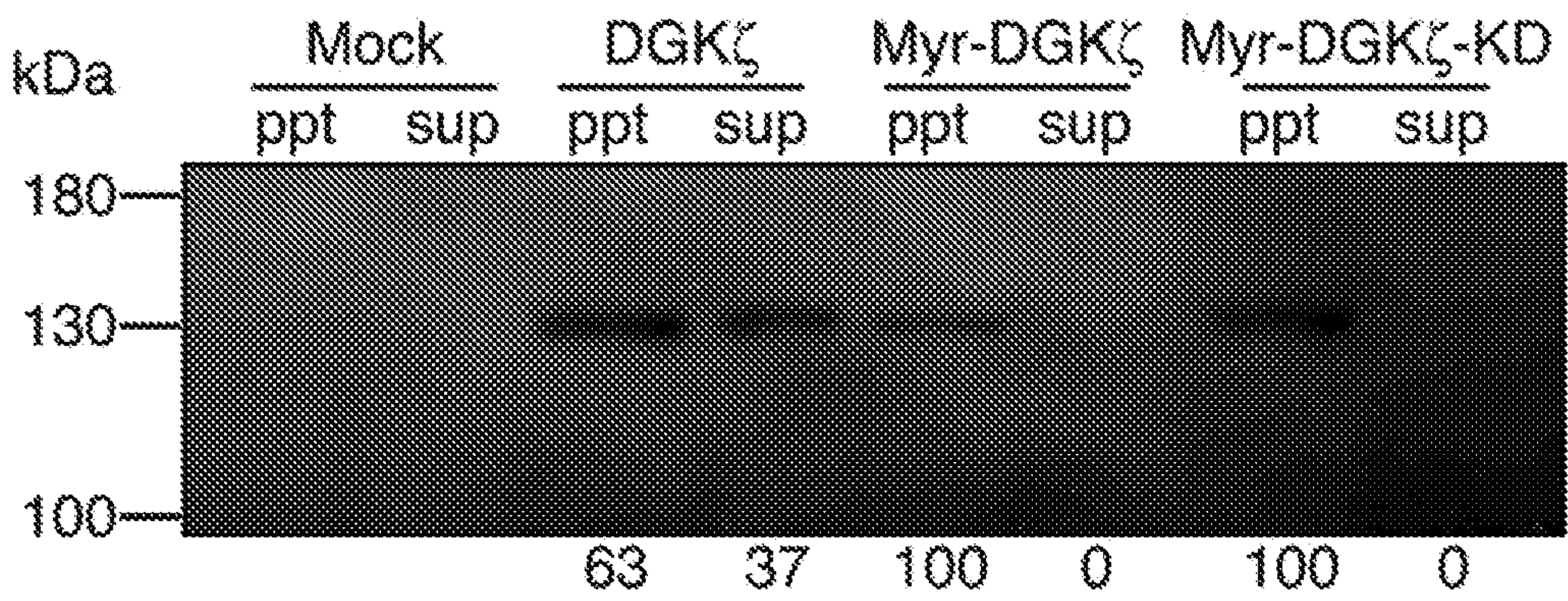
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/034965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C12N15/54(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12N9/12(2006.01)i		
FI: C12N15/54, C12N9/12, C12Q1/48ZZNA		
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)		
Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/00-3/00, C12N9/00-9/99		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996		
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020		
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020		
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),		
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	山田遙夢, 坂根郁夫, α-シヌクレイン N 末端領域の細胞内ホスファチジン酸センサーへの応用, 第 92 回日本生化学会大会講演要旨集, 04 September 2019, p. 260 ([2T11m-04]), first paragraph, second paragraph, (YAMADA, Yomu, SAKANE, Fumio, Abstract of Annual Meeting of the 92nd Japanese Biochemical Society) non-official translation (Application of α-synuclein N-terminal region to intracellular phosphatidic acid sensor)	1, 3 2, 4
Y	JP 9-503645 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIO UNIVERSITY) 15 April 1997 (1997-04-15), page 40, paragraph [0002] to page 41, paragraph [0001]	2, 4
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 November 2020		Date of mailing of the international search report 17 November 2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/034965

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-512362 A (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 23 April 2002 (2002-04-23), paragraph [0114]	2, 4
A	MIZUNO, S., et al., Diacylglycerol kinase-dependent formation of phosphatidic acid molecular species during interleukin-2 activation in CTLL-2 T-lymphocytes, FEBS Open Bio, 2012, vol. 2, pp. 267-272, entire text	1-4
A	LIU, K., et al., A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response, J. Lipid Res., 2016, vol. 57, pp. 368-379, entire text	1-4
P, X	HONDA, S. et al., Analytical method for diacylglycerol kinase ζ activity in cells using protein myristoylation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Lipids, 17 November 2019, vol. 54, pp. 763-771, entire text	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/034965

JP 9-503645 A	15 April 1997	WO 95/02684 A1 page 29, paragraph [0002] to page 30, paragraph [0002]
JP 2002-512362 A	23 April 2002	WO 99/54494 A2 page 26, paragraph [0003] US 2001/0003042 A1

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2020/034965
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/54(2006.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i FI: C12N15/54; C12N9/12; C12Q1/48 Z ZNA		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/00-15/90; C12Q1/00-3/00; C12N9/00-9/99		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2020年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2020年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	山田遙夢, 坂根郁夫, α -シヌクレインN末端領域の細胞内ホスファチジン酸 センサーへの応用, 第92回日本生化学会大会講演要旨集, 2019.09.04, p.260 ([2T11m-04])	1,3
Y	第1 - 2段落 第1 - 2段落	2,4
Y	JP 9-503645 A (ザ・ボード・オブ・トラスティーズ・オブ・ザ・リランド・スタン フォード・ジュニア・ユニバーシティ) 15.04.1997 (1997 - 04 - 15) 第40ページ第2段落-第41ページ第1段落	2,4
Y	JP 2002-512362 A (ライジェル・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッ ド) 23.04.2002 (2002 - 04 - 23) 段落 [0114]	2,4
A	MIZUNO, S., et al., Diacylglycerol kinase-dependent formation of phosphatidic acid molecular species during interleukin-2 activation in CTLL-2 T-lymphocytes, FEBS Open Bio, 2012, Vol.2, pp.267-272 全文参照	1-4
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 09.11.2020	国際調査報告の発送日 17.11.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 小林 薫 4B 6114 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	LIU, K., et al., A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response, J. Lipid Res., 2016, Vol.57, pp.368-379 全文参照	1-4
P, X	HONDA, S., et al., Analytical Method for Diacylglycerol Kinase ζ Activity in Cells Using Protein Myristoylation and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Lipids, 2019.11.17, Vol.54, pp.763-771 全文参照	1-4

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

☐ 紙形式又はイメージファイル形式（PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号）
2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

PCT/JP2020/034965

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	9-503645	A	15.04.1997	W0	95/02684	A1	
				第 2 9 ページ第 2 段落－第			
				3 0 ページ第 2 段落			
JP	2002-512362	A	23.04.2002	W0	99/54494	A2	
				第 2 6 ページ第 3 段落			
				US	2001/0003042	A1	