(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-519737
(P2024-519737A)
(43)公表日　令和6年5月21日(2024.5.21)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　33/542 (2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/542	ＡＺＮＡ　４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ　14/47　(2006.01)		Ｃ０７Ｋ	14/47	
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)		Ｃ０７Ｋ	19/00	
Ｃ０７Ｋ　14/435 (2006.01)		Ｃ０７Ｋ	14/435	

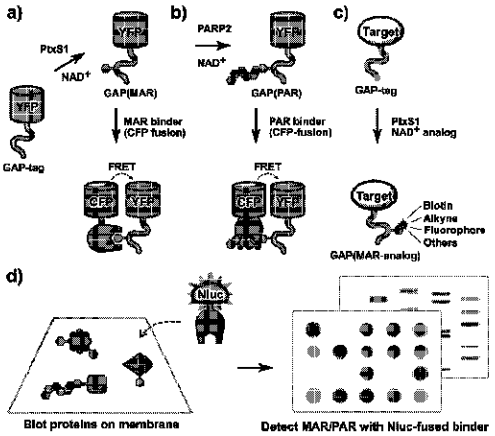
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全30頁）

(21)出願番号　特願2023-568450(P2023-568450)
(86)(22)出願日　令和4年5月6日(2022.5.6)
(85)翻訳文提出日　令和5年12月13日(2023.12.13)
(86)国際出願番号　PCT/FI2022/050305
(87)国際公開番号　WO2022/234194
(87)国際公開日　令和4年11月10日(2022.11.10)
(31)優先権主張番号　20215539
(32)優先日　令和3年5月6日(2021.5.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
フィンランド(FI)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　513240180
オウル ウュリオピスト
ＯＵＬＵＮ ＹＬＩＯＰＩＳＴＯ
フィンランド国 ９００１４ オウル ウュリオピスト ペンティ カイテラン カツ １
(74)代理人　100147485
弁理士　杉村 憲司
(74)代理人　230118913
弁護士　杉村 光嗣
(74)代理人　100195556
弁理士　柿沼 公二
(72)発明者　ラリ レーティオ
フィンランド国 ９００１４ オウル ウュリオピスト ピーオーボックス ８００
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出する方法および同方法を実施するためのキット

(57)【要約】
本発明は、ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出するための方法、キット、系および融合タンパク質を対象とし、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、前記方法は以下の：ｉ）第１の標識またはタグを含む第１の実体を提供するステップであって、前記実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、ステップと；ｉｉ）アッセイにおいて、前記第１の実体を第２の実体と接触させるステップであって、前記第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能であるか、または結合可能であると考えられる、ステップと；ｉｉｉ）前記第１の標識に由来するか、または前記タグによって局在化されるシグナルを測定するステップであって、前記第２の実体が前記第１の実体の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の実体と前記ＡＤＰリボシル基の間の結合相互作用が生じていない場合に検出されるシグナルとは



Figures 1a-1d.

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出する方法であって、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、以下のステップ：
ｉ）第１の標識またはタグを含む第１の実体を提供するステップであって、前記実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、ステップと；
ｉｉ）アッセイにおいて、前記第１の実体を第２の実体と接触させるステップであって、前記第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合することができるか、またはできると考えられる、ステップと；
ｉｉｉ）前記第１の標識に由来するか、または前記タグによって局在化されるシグナルを測定するステップであって、前記第２の実体が前記第１の実体の少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の実体と前記ＡＤＰリボシル基の間の結合相互作用が生じていない場合に検出されるシグナルとは異なるか、または異なって局在化される、ステップとを含む、方法。
【請求項２】
前記アミノ酸配列が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、または前記ＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、好ましくは、前記ＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはヘテロ三量体Ｇタンパク質のＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有する前記アミノ酸配列は、少なくとも４アミノ酸長の配列またはペプチドである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基の前記Ｓ－グリコシド結合を介した前記システイン残基への共役が百日咳毒素によって触媒されたものであり、前記ポリマーの場合、前記システイン残基に共役した前記ＡＤＰリボシル基が、好ましくはＰＡＲＰファミリー酵素によって伸長されたものである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記第１の実体が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応する少なくとも４アミノ酸長のＣ末端配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基が、Ｓ－グリコシド結合を介してＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のシステイン（Ｃ）に共役する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記第１の実体が、Ｃ末端配列$KX_1NLKX_2CGLX_3$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を含み、ここで、X_1はＥまたはＮであり、X_2はＥまたはＤであり、X_3はＦまたはＹである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記第１の実体が、好ましくは発光性または蛍光性のタンパク質ドメインまたは実体を含む融合タンパク質である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記第１の実体が、ＧＳＴタグまたはジゴキシゲニンタグのような結合または酵素タグを含む融合タンパク質である、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記第２の実体が、ペプチドまたはタンパク質に共役した前記ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能な生体高分子を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記生体高分子が、マクロドメイン、ＡＲＨファミリータンパク質、ＢＲＣＴドメイン、ＰＡＲ結合亜鉛モチーフ、およびＷＷＥドメインからなる群より選択される、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】
前記第２の実体が第２の標識を含み、ステップｉｉｉ）において、前記第１および第２の標識に由来するシグナルが測定され、前記第２の実体が前記第１の実体の少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の実体と前記ＡＤＰリボシル基の間の結合相互作用が生じていない場合に検出されるシグナルとは異なるか、または異なって局在化される、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記第１および第２の標識が別個の発光または蛍光標識である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
ステップｉｉ）において、阻害剤候補化合物もアッセイに加えられ、前記阻害剤候補は、前記第２の実体と、前記第１の実体に共役した前記ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーの間の結合相互作用を阻害することが知られているか、または阻害すると考えられる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記結合相互作用が前記阻害剤候補の存在下でのアッセイでは阻害され、前記阻害剤候補の非存在下でのアッセイでは阻害されない場合に、前記阻害剤候補化合物がＡＤＰリボシル結合の阻害剤であることが見出される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
ｉ）少なくとも１つのＡＤＰリボシル基がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む第１の発光性または蛍光性の融合タンパク質を提供するステップと；
ｉｉ）アッセイにおいて、前記第１の発光性または蛍光性の融合タンパク質を、ＡＤＰリボシル基を結合させることができる第２の発光性または蛍光性の融合タンパク質および阻害剤候補化合物と接触させるステップと；
ｉｉｉ）前記アッセイから発光または蛍光シグナルを測定するステップであって、前記第２の融合タンパク質が前記第１の融合タンパク質の少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の融合タンパク質と前記ＡＤＰリボシル基の間の相互作用が前記阻害剤候補化合物の存在によって阻害される場合に検出されるシグナルとは異なり、前記結合相互作用が前記阻害剤候補の存在下でのアッセイでは阻害され、前記阻害剤候補の非存在下でのアッセイでは阻害されない場合、前記阻害剤候補化合物は、ＡＤＰリボシル結合の阻害剤であることが見出される、ステップとを含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記第１および第２の融合タンパク質が緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはその誘導体を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
－前記第１の標識またはタグに共役した実体を提供する初期ステップであって、前記実体は、Ｇタンパク質のＧαサブユニットの Ｃ末端配列に対応する少なくとも４アミノ酸長のアミノ酸配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含む、初期ステップと；
－百日咳毒素を利用して、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１または２のシステイン残基に、NAD^+またはその類似体に由来する少なくとも１つのＡＤＰリボシル基を組み込んで、前記第１の実体を得る初期ステップと；
－任意に、前記第１の実体に共役したＡＤＰリボシル基を、ＰＡＲＰ酵素を使用してポリマーに伸長させる初期ステップとを含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出するためのキットであって、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、

－第１の容器中の：第１の標識またはタグを含む第１の実体であって、該実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、第１の実体と、
－第２の容器中の：第２の標識またはタグに共役した第２の実体であって、該第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能である、第２の実体とを含む、キット。
【請求項１８】
前記アミノ酸配列が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、好ましくは、前記Ｃ末端配列が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、少なくとも４アミノ酸長の配列またはペプチドである、請求項１７に記載のキット。
【請求項１９】
前記第１および第２の標識が別個の発光または蛍光ラベルである、請求項１８に記載のキット。
【請求項２０】
前記第１の実体が、ＧＳＴタグまたはジゴキシゲニンタグのような結合または酵素タグを含む融合タンパク質である、請求項１７または１８に記載のキット。
【請求項２１】
前記第１および第２の実体が、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはその誘導体もしくは変異体を含む融合タンパク質である、請求項１８に記載のキット。
【請求項２２】
前記第１の実体が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応する少なくとも４アミノ酸長のアミノ酸配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基が、Ｓ－グリコシド結合を介してＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のシステイン（Ｃ）に共役する、請求項１７～２１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２３】
前記第１の実体が、Ｃ末端配列$KX_1NLKX_2CGLX_3$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を含み、ここで、X_1はＥまたはＮであり、X_2はＥまたはＤであり、X_3はＦまたはＹである、請求項２２に記載のキット。
【請求項２４】
前記第２の実体が、ペプチドまたはタンパク質に共役した前記ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能な生体高分子を含む、請求項１７～２３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２５】
前記生体高分子が、マクロドメイン、ＡＲＨファミリータンパク質、ＢＲＣＴドメイン、ＰＡＲ結合亜鉛モチーフ、およびＷＷＥドメインからなる群より選択される、請求項２４に記載のキット。
【請求項２６】
第１のドメインと第２のドメインとを含む融合タンパク質であって、前記第２のドメインは、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含む、融合タンパク質。
【請求項２７】
前記Ｃ末端配列が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、少なくとも４アミノ酸長の配列またはペプチドである、請求項２６に記載の融合タンパ

ク質。
【請求項２８】
アミノ酸配列が、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するアミノ酸配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基が、Ｓ－グリコシド結合を介してＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のシステイン（Ｃ）に共役する、請求項２６または２７に記載の融合タンパク質。
【請求項２９】
前記アミノ酸配列が、Ｃ末端配列$KX_1NLKX_2CGLX_3$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を含み、ここで、X_1はＥまたはＮであり、X_2はＥまたはＤであり、X_3はＦまたはＹである、請求項２８に記載の融合タンパク質。
【請求項３０】
前記第１の実体が、好ましくは、ＧＦＰ（「緑色蛍光タンパク質」）、ＹＦＰ（「黄色蛍光タンパク質」）、ＣＦＰ（「シアン蛍光タンパク質」）、ｅＹＦＰ（「増強黄色蛍光タンパク質」）、ｅＣＦＰ（「増強シアン蛍光タンパク質」）、それらの誘導体および変異体からなる群より選択される、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３１】
前記類似体が、ビオチン化、蛍光性またはクリックケミストリー対応のNAD^+類似体に由来する、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３２】
前記第１のドメインが、発光標識、蛍光標識、結合タグ、またはＧＳＴタグもしくはジゴキシゲニンタグのような酵素タグを含む、請求項２６～３１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３３】
前記第１のドメインが、好ましくは、ＧＦＰ（「緑色蛍光タンパク質」）、ＹＦＰ（「黄色蛍光タンパク質」）、ＣＦＰ（「シアン蛍光タンパク質」）、ｅＹＦＰ（「増強黄色蛍光タンパク質」）、ｅＣＦＰ（「増強シアン蛍光タンパク質」）、それらの誘導体および変異体からなる群より選択される蛍光タンパク質である、請求項２６～３１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３４】
ｉ）第１のドメインと第２のドメインとを含む融合タンパク質であって、前記第２のドメインは、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、融合タンパク質と；
ｉｉ）好ましくは、マクロドメイン、ＡＲＨファミリータンパク質、ＢＲＣＴドメイン、ＰＡＲ結合亜鉛モチーフ、およびＷＷＥドメインからなる群より選択される生体高分子であって、前記融合タンパク質の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体を特異的に認識する、生体高分子とを含む系であって；
前記系において、前記生体高分子は、前記生体分子と前記融合タンパク質が一緒に連結され共役体を形成するように、前記融合タンパク質の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体に結合する、系。
【請求項３５】
前記第２のドメインが、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応する、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載の系。
【請求項３６】
前記系内の共役体の存在を検出する手段を含む、請求項３４または３５に記載の系。
【請求項３７】
前記手段は、バイオレイヤー干渉法技術を含む、請求項３５に記載の系。
【請求項３８】

前記第１のドメインが、発光標識、蛍光標識、結合タグ、またはＧＳＴタグもしくはジゴキシゲニンタグのような酵素タグを含む、請求項３３～３６のいずれかに記載の系。
【請求項３９】
前記第１のドメインが、好ましくは、ＧＦＰ（「緑色蛍光タンパク質」）、ＹＦＰ（「黄色蛍光タンパク質」）、ＣＦＰ（「シアン蛍光タンパク質」）、ｅＹＦＰ（「増強黄色蛍光タンパク質」）、ｅＣＦＰ（「増強シアン蛍光タンパク質」）、それらの誘導体および変異体からなる群より選択される蛍光タンパク質である、請求項３３～３６のいずれかに記載の系。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、生体分子間の相互作用を検出するためのアッセイ技術に関する。特に、本発明は、がん関連経路およびウイルス感染におけるＡＤＰリボシル化と相互作用するタンパク質の同定に関する。本発明の目的は、広範囲の加水分解性および非加水分解性のＡＤＰリボース結合体（ｂｉｎｄｅｒ）に対するハイスループットスクリーニングに適した頑強なアッセイ技術を提供することである。
【背景技術】
【０００２】
ＡＤＰリボシル化は、細胞内の多くの多様なプロセスの制御に関与する翻訳後修飾である。その生理学的重要性にもかかわらず、ＡＤＰリボースの移動、検出および除去の複雑な相互作用は、分子レベルではよく理解されていない。
【０００３】
ヒトゲノムには、ＡＤＰリボシル基を加水分解して除去することが可能なタンパク質（「イレイサー」）と同様に、ＡＤＰリボシル修飾タンパク質という多くの異なる結合体（「リーダー」）がコードされている（Teloni & Altmayer, 2016）。マクロドメインは、ヒトで知られているＡＤＰリボース結合体の中で最も大きなクラスの一つである。その多くは、ＡＤＰリボシルトランスフェラーゼ（ＰＡＲＰ９、ＰＡＲＰ１４、ＰＡＲＰ１５）またはヒストン（ｍａｃｒｏＨ２Ａバリアント）など、他のマルチドメインタンパク質の一部としてコードされている。ＭＤＯ１、ＭＤＯ２、ＰＡＲＧまたはＴＡＲＧ１などの他のマクロドメインは加水分解活性を持ち、ＡＤＰリボースシグナル伝達経路に不可欠な動作主体である。
【０００４】
ポリＡＤＰリボースの結合に主に関連するドメインは他にもいくつか存在する。これらの例は、ＡＰＬＦのＰＡＲ結合亜鉛フィンガー（ＰＢＺ）ドメイン、複数のＡＤＰリボシルトランスフェラーゼおよびＥ３ユビキチンリガーゼのＷＷＥドメインならびにＸＲＣＣ１のＰＡＲ結合モチーフ（ＰＢＭ）である（Teloni & Altmayer, 2016）。
【０００５】
病原性ウイルスのマクロドメインは、ＡＤＰリボース結合体のもう一つのクラスである。コロナウイルスまたはトガウイルスなどのウイルスは、宿主細胞内のタンパク質からＡＤＰリボースを除去することが可能なマクロドメインを持つことが知られている。これらのウイルスのマクロドメインは、宿主のＡＤＰリボシル化シグナル伝達機構を妨害することにより、宿主のウイルス防御メカニズムを弱めることが示唆されており、ウイルスの複製と病原性に必要であることが示されている。これらのマクロドメインを持つウイルスには、チクングニアウイルス、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ（ラクダインフルエンザ）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）が含まれる。
【０００６】
ＡＤＰリボシルトランスフェラーゼに対する阻害剤の開発は、主にがん治療薬の文脈で数十年来研究されてきたが、ＡＤＰリボースの結合体または加水分解体に対する阻害剤の開発は、近年になってようやく勢いを増してきた。ＡＤＰリボース結合タンパク質の阻害剤は、細胞内の複雑なＡＤＰリボースシグナル伝達機構の解読に役立つ貴重なツールとな

るだろう。また、これらの阻害剤は治療学的な可能性も示す可能性がある。さらに、ウイルスのマクロドメインを阻害してこれらのウイルスによって引き起こされる疾患と闘うことも現在研究されている。

【０００７】

ＡＤＰリボシル化基質タンパク質の加水分解を測定するこれまでのアッセイは、ＡＤＰリボースの非加水分解性結合体には直接適用できない（Ｗａｚｉｒ ｅｔ ａｌ., ２０２１）。ＡＤＰリボース結合についての既知のアッセイは複雑で高価であるか、またはハイスループットプロセスに適していないため、この分野では依然として改良の必要性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明の目的は、多種多様なＡＤＰリボシル結合体およびヒドロラーゼの検出にも適したアッセイを容易に開発できる系を設計することであった。本発明者らは、非加水分解性ＡＤＰリボースプローブを用いれば、加水分解性と非加水分解性ＡＤＰリボース結合体の両方の結合を測定できると考えた。

【０００９】

タンパク質では、多くの異なる残基がＡＤＰリボースの受容体として機能し得る。セリン、アスパラギン酸またはグルタミン酸などの残基はＯ－グリコシド結合を形成し、リジン、アルギニンまたはアスパラギンなどはＡＤＰリボースとＮ－グリコシド結合を形成する。さらに、あまり一般的な修飾ではないが、システイン残基との間で形成され得るＳ－グリコシド結合による化学的に安定な結合もある。多くの異なるＡＤＰリボシルヒドロラーゼが存在し、Ｏ－またはＮ－グリコシド結合からＡＤＰリボースを除去することができるが、現在までのところ、Ｓ－グリコシド結合を元に戻すことができる酵素はヒトでは報告されていない。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

細菌百日咳菌由来の百日咳毒素は、ヘテロ三量体Ｇタンパク質（Ｇαｉ）のαｉサブユニットの特定のＣ末端システイン残基へのＡＤＰリボースユニットの転移を効率的に触媒することが知られている。本発明がどのように機能するかを示す一例として、Ｇαｉを８－ｍｅｒペプチドに還元し、それを他のタンパク質のＣ末端に組換え的に融合させたところ、やはり効率的な修飾が観察され、アクセス可能なＣ末端を持つあらゆるタンパク質にＡＤＰリボースユニットを部位特異的に付加することができた。これを利用して、ＡＤＰリボースのリーダーまたはイレイサーと結合できる安定なＳ－グリコシド結合を持つＭＡＲ化ＹＦＰタンパク質を作製した。我々はさらに、ＭＡＲをＰＡＲに拡張する条件を見出すことによってこの系を拡張し、ＭＡＲおよびＰＡＲ結合体の結合を同様にプローブできるようにした。

【００１１】

従って、本発明は、ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出する方法であって、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、以下の：

ｉ）第１の標識またはタグを含む第１の実体を提供するステップであって、前記実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、ステップと；

ｉｉ）アッセイにおいて、前記第１の実体を第２の実体と接触させるステップであって、前記第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合することができるか、またはできると考えられる、ステップと；

ｉｉｉ）前記第１の標識に由来するか、または前記タグによって局在化されるシグナルを測定するステップであって、前記第２の実体が前記第１の実体の少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の実体と前記ＡＤＰリボシル基の間の結合相互作用が生じていない場合に検出されるシグナルとは異なるか、または異なって局在化される、ステップとを含む方法を提供する。

【００１２】
他の関連する態様において、本発明は、ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出するためのキットであって、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、
－第１の容器中の：第１の標識またはタグを含む第１の実体であって、該実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、第１の実体と、
－第２の容器中の：第２の標識またはタグに共役した第２の実体であって、該第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能である、第２の実体とを含む、キットを提供する。
【００１３】
他の関連する態様において、本発明は、第１のドメインおよび第２のドメインを含む融合タンパク質を提供し、ここで、前記第２のドメインは、Ｇタンパク質のＧαサブユニット、好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含む。
【００１４】
さらに関連する態様において、本発明は以下の
ｉ）第１のドメインと第２のドメインとを含む融合タンパク質であって、前記第２のドメインは、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、融合タンパク質と；
ｉｉ）好ましくは、マクロドメイン、ＡＲＨファミリータンパク質、ＢＲＣＴドメイン、ＰＡＲ結合亜鉛モチーフ、およびＷＷＥドメインからなる群より選択される生体高分子であって、該生体高分子は、前記融合タンパク質の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体を特異的に認識する、生体高分子とを含む系であって；
前記系において、前記生体高分子は、前記生体分子と前記融合タンパク質が一緒に連結され共役体（coupled entity）を形成するように、前記融合タンパク質の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体に結合する、系を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】図１ａ～ｄは、ＡＤＰリボシル結合タンパク質のｉｎ　ｖｉｔｒｏ相互作用研究とアッセイ開発のための分子ツールボックスの図である。図１ａは、百日咳毒素サブユニットＳ１（ＰｔｘＳ１）によるＣ末端Ｇα¡ベースの１０－ｍｅｒペプチド（ＧＡＰタグ）の部位特異的ＡＤＰリボシル化により、単一のＳ－グリコシド結合モノＡＤＰリボシル（ＭＡＲ）基が生成され得ることを示す図である。図１ｂは、ＧＡＰタグのＭＡＲ基が、ＰＡＲＰ２によってポリＡＤＰリボシル（ＰＡＲ）基に拡張されることを示す図である。この系は、ＦＲＥＴまたは他の結合技術により、モノまたはポリＡＤＰリボシル基と相互作用するタンパク質の結合を測定するために使用できる。図１ｃは、ＧＡＰタグが、ＮＡＤ$^{+}$類似体による部位特異的標識に使用できることを示す図である。図１ｄは、ナノルシフェラーゼ（Ｎｌｕｃ）と融合した高親和性ＡＤＰリボシル結合体を発光プローブとして用いることで、モノおよびポリＡＤＰリボシル化タンパク質をブロットベース法で高速、高感度かつ高選択的に検出することができることを示す図である。
【図２】図２ａ～ｄは、ツールキットコンポーネントの初期開発の図である。図２ａは、異なるＧα¡コンストラクトを用いたＰｔｘＳ１によるＡＤＰリボシル化の試験の図である。５０ｎＭ（＋）または２５０ｎＭ（＋＋）のＰｔｘＳ１で処理したときのシステイン－ＡＤＰｒアクセプタとして、非標識またはＹＦＰ融合の全長Ｇα¡コンストラクトと ＧＡＰタグ付きＹＦＰを試験した。対照として、バッファーまたはアクセプタのシステインをアラニンに変異させたＹＦＰ－ＧＡＰを用いた。反応物をニトロセルロースメンブレンにブロットし、Ｎｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１を用いて検出した。図２ｂは、ＧＡＰタグのＭ

ＡＲ基はＰＡＲＰ２によってＰＡＲに伸長されうることを示す図である。１０μＭのＹＦＰ－ＧＡＰまたはＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）を１ｍＭのＮＡＤ$^+$および４００ｎＭ（＋）もしくは４μＭ（＋＋）のＰＡＲＰ２または対照としてバッファーと混ぜた。反応をＳＤＳ－ＰＡＧＥで行い、クマシーブルーを用いるか、または、ウエスタンブロットを行い、Ｎｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１またはＮｌｕｃ－ＡＬＣ１を用いて検出することにより可視化した。図２ｃは、Ｎｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１によるＭＡＲとＰＡＲの検出の図である。図２ｄは、Ｎｌｕｃ－ＡＬＣ１によるＰＡＲの選択的検出の図である。ＹＦＰ－ＧＡＰ（±ＭＡＲ）またはＴＮＫＳ１（±ＰＡＲ）の希釈系列をニトロセルロースメンブレンにブロットした。

【図３】図３ａ～ｂは、Ｇα$_i$－タグが、ＮＡＤ$^+$類似体による部位特異的修飾の導入に使用できることを示す図である。図３ａは、ＧＡＰタグの部位特異的ビオチン化の図である。ＧＡＰタグ付きＹＦＰをＰｔｘＳ１の非存在下または存在下でＮＡＤ$^+$または６－ビオチン－１７－ＮＡＤ$^+$と混ぜた。反応物をニトロセルロースメンブレンにブロットし、ストレプトアビジン－ＨＲＰを用いてビオチンを検出した。図３ｂは、ＹＦＰ－ＧＡＰが、アルキン基を含むＮＡＤ$^+$または６－プロパルギルアデニン－ＮＡＤ$^+$を用いてＰｔｘＳ１によりＭＡＲ化されたことを示す図である。得られたタンパク質ＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）またはＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ－アルキン）またはバッファーをＣｙ３－アジドまたはＣｙ５－アジドと混合し、５ｍＭのアスコルビン酸ナトリウム、３００μＭのＣｕＳＯ$_4$、６００μＭのＬ－ヒスチジンを加えることにより銅（Ｉ）触媒によるアルキン－アジド環化付加反応を行った。試料を室温で３時間インキュベートし、ニトロセルロースメンブレンにブロットし、カラー画像を撮影した。未反応のＣｙ３－アジドまたはＣｙ５－アジドは、ＴＢＳ－Ｔでメンブレンを洗浄することにより除去し、カラー画像および蛍光画像を撮影した。

【図４】図４ａ～ｅは、ＹＦＰ－ＧＡＰと報告済みおよび潜在的なリーダーおよびイレイサーの相互作用の試験を示す図である。図４ａは、ＣＦＰ融合した潜在的なおよび確認済みのＡＤＰリボシル結合体とＭＡＲ化ＹＦＰ－ＧＡＰの相互作用を示す図である。１μＭのＣＦＰ融合タンパク質を、５μＭのＹＦＰ－ＧＡＰまたは５μＭのＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）と、２００μＭのＡＤＰリボースの非存在下または存在下で混ぜた。レシオメトリックＦＲＥＴシグナルを測定した。図４ｂは、ＧＡＰタグからのＡＤＰリボシル除去の試験の図である。１０μＭのＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）を、１μＭのＣＦＰ融合タンパク質または０．０１μＭ～１μＭのヘビ毒ホスホジエステラーゼＩ（ＳＶＰ）の非存在下（－）または存在下（＋）で調製した。試料を室温で２４時間インキュベートし、ニトロセルロースメンブレンにブロットした。検出はＮｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１で行った。図４ｃは、ポリＡＤＰリボシル結合体とＰＡＲ化ＹＦＰ－ＧＡＰの相互作用の図である。２５０ｎＭのＣＦＰ融合タンパク質を、５００ｎＭのＹＦＰまたは５００ｎＭのＹＦＰ－ＧＡＰ（ＰＡＲ）と１００μＭのＡＤＰリボースまたは２．５μＭの自動修飾ＰＡＲＰ２の非存在下または存在下で混ぜた。レシオメトリックＦＲＥＴシグナルを測定した。図４ｄは、１μＭのＣＦＰ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ　ｎｓｐ３と５μＭのＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）のＡＤＰリボースとの競合における代表的な用量反応曲線の図である。図４ｅは、２５０ｎＭのＣＦＰ－ＡＬＣ１と５００ｎＭのＹＦＰ－ＧＡＰ（ＰＡＲ）のＰＡＲ化ＰＡＲＰ２との競合における代表的な用量反応曲線の図である。

【図５】図５ａ～ｄは、ＡＤＰｒ結合を検出するために、様々なアッセイ技術が容易に利用できることを示す図である。図５ａは、ＦＲＥＴによる相互作用の測定の図である。図４ａに示したＣＦＰ－ＭＤＯ２とＹＦＰ－Ｇαｉ（ＭＡＲ）の２００μＭのＡＤＰリボースの非存在下（対照）または存在下でのレシオメトリックＦＲＥＴシグナル。図５ｂは、ＢＲＥＴによる相互作用の測定の図である。２００μＭのＡＤＰリボースの非存在下（対照）または存在下でのＮｌｕｃ－ＭＤＯ２とＹＦＰ－Ｇαｉ（ＭＡＲ）のレシオメトリックＢＲＥＴシグナル。図５ｃは、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎによる相互作用の測定の図である。ビオチン化ＭＤＯ２とＨｉｓタグ付きＭＡＲ化Ｇα$_i$を、ＡＤＰリボースの非存在下（対照）または存在下で、ストレプトアビジンドナービーズとキレートアクセプタビーズ

と混ぜた。発光シグナルはドナービーズの励起により検出した。図５ｄは、バイオレイヤー干渉法による相互作用の測定の図である。Ｈｉｓタグ付きＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）を光学センサー表面に結合させ、３．１６μＭのＡＤＰリボースの非存在下または存在下で、非標識ＭＤＯ２タンパク質の会合（０秒）または解離（１２０秒）後のシグナル変化を測定した。

【図６】図６ａ～ｆは、ＣＦＰタグ付きＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインを用いたＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）プローブに基づくスクリーニングアッセイの開発についての図である。図６ａは、ＣＦＰ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を用いたスクリーニングアッセイのシグナル検証の図である。１μＭのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を２００μＭのＡＤＰリボースの非存在下または存在下で５μＭのＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）と混ぜ、Ｚ’－ファクター０．７を算出した。図６ｂは、ＥＮＺＯ　ＦＤＡ承認薬ライブラリのスクリーニングの図である。１つの化合物が３０％以上の阻害を示し、さらなる検証に移された。図６ｃは、ヒット化合物スラミンの構造の図である。図６ｄは、スラミンを用いた用量反応曲線が、ＦＲＥＴベースのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインに対し８．７μＭのＩＣ$_{50}$を示す図である。図５ｅは、ＤＳＦによる、スラミンがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインの安定化を示すことを示す図である。図５ｆは、本研究で用いたヒトおよびウイルスのＡＤＰリボシル結合体に対するスラミンの阻害プロファイルの図である。阻害率は、ＹＦＰ－ＧＡＰ（ＭＡＲ）またはＹＦＰ－ＧＡＰ（ＰＡＲ）と混ぜたＣＦＰ融合結合体のレシオメトリックＦＲＥＴシグナルに基づいて計算した。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

「ＭＡＲ化」と「ＰＡＲ化」の両方を含む「ＡＤＰリボシル化」は、ポリ（ＡＤＰリボース）ポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）を含むＡＤＰリボシルトランスフェラーゼ、ＡＲＴＣ１－６のようなアルギニン特異的エクト酵素、および多くの細菌毒素などの酵素によって触媒される。ＡＤＰリボシルトランスフェラーゼの例としては、ヒトではＰＡＲＰ、細菌では細菌毒素ＤａｒＴがある。

【００１７】

「ＭＡＲ化」とは、ＡＤＰリボシル化によってタンパク質または核酸上に単一のモノ（ＡＤＰリボース）（ＭＡＲ）基が転移する場合を意味する。

【００１８】

「ＰＡＲ化」とは、ＡＤＰリボシル化によってタンパク質または核酸上に複数のＡＤＰリボース（ＡＤＰｒ）基が転移する場合を意味する。

【００１９】

「ＰＡＲＰファミリー酵素」または「ＰＡＲＰ」という用語は、ポリ（ＡＤＰリボース）ポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）を指し、ＡＤＰリボースの標的タンパク質への転移を触媒する能力を共有する関連酵素ファミリーである。ＰＡＲＰは、クロマチン構造の調節、転写、複製、組換えおよびＤＮＡ修復など、様々な細胞内プロセスにおいて重要な役割を果たしている。

【００２０】

本明細書において、「Ｇαサブユニット」または「Ｇαｉ」という用語は、膜結合型ヘテロ三量体Ｇタンパク質であるＧタンパク質の３種類のサブユニット（すなわち、アルファ（α）、ベータ（β）、ガンマ（γ）サブユニット）のうちの１つを指す。Ｇタンパク質はグアニンヌクレオチド結合タンパク質としても知られ、細胞内で分子スイッチとして働き、細胞外の様々な刺激から細胞内部へのシグナル伝達に関与するタンパク質ファミリーである。ヒトＧαサブユニットの配列例をＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４に示す。

【００２１】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために、本明細書では互換的に使用される。前記用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーと同様に、１つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の類似体または模倣体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。ポリペプチドは、

糖タンパク質を形成するために、例えば、炭水化物残基の付加によって修飾することができる。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、糖タンパク質および非糖タンパク質を含む。

【００２２】

「信号」という用語は、本明細書ではあらゆる物理的または化学的効果を指す。信号は、例えば、蛍光、発光、比色または電気的な発光信号であってもよいが、このリストは限定的なものではない。

【００２３】

「発光タンパク質」または「発光標識」という用語は、励起の際に吸収されたエネルギーの一部を、非熱起源のエネルギーを持つ光子の形で放出する性質を持つ実体またはドメインを指す。そのため、励起された分子をより低いエネルギー状態へと不活性化させることを伴う。言い換えれば、発光分子とは、発光を発生させるために適切な物質に作用することができる分子である。有利には、発光タンパク質または標識は、青色、黄色または緑色に発光する性質を有する。発光タンパク質は、当業者に既知のものの中から選択することができる。

【００２４】

「蛍光標識」とは、光エネルギーを吸収し（励起光）、非常に速く光子を放出することにより（放出光）、蛍光光の形で急速に復元する性質を持つ分子を指す。光子のエネルギーを吸収すると、分子は一般に電子的にエネルギーが与えられた状態になる。言い換えれば、それはフルオロフォアまたは蛍光色素である可能性がある。

【００２５】

「ＦＲＥＴ」という用語は、２つの発色団間で起こる蛍光共鳴エネルギー移動プロセスを指す。本明細書で使用される発色団は、例えば、蛍光性、発光性、および他の非蛍光性成分を含む。

【００２６】

「ＢＲＥＴ」という用語は、生物発光ドナー部分（すなわちＢＲＥＴエネルギードナー）と蛍光アクセプタ部分（すなわちＢＲＥＴエネルギーアクセプタ）の間の共鳴エネルギー移動（ＲＥＴ）を指す。

【００２７】

本明細書で使用される「タグ」という用語は、その最も広い意味で理解されることを意味し、ビオチンタグ、ＨＡタグ、Ｍｙｃタグ、Ｔ７、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧタグ、カルモジュリン結合タンパク質、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ、ｓｔｒｅｐタグ、ＫＴ３エピトープ、ＥＥＦエピトープ、緑色蛍光タンパク質およびそれらの変異体を含むがこれらに限定されない、任意の適切な酵素標識、蛍光標識、または放射性標識および適切なエピトープを含むがこれらに限定されない。「タグ」はまた、本発明のＭＡＲ化またはＰＡＲ化タンパク質のようなタンパク質を表面に結合および／または固定化する任意の手段であり得る。

【００２８】

「ドメイン」という用語は、本明細書では、ポリペプチド中の機能的アミノ酸配列、例えば、融合タンパク質に組み込んでもその機能を保持する、結合のための配列または翻訳後修飾の標的部位を包含すると解釈することができる。本発明は、部位特異的システインＡＤＰリボシル化に基づくＡＤＰリボシルのリーダーおよびイレイサーの結合アッセイを簡単かつ効率的にセットアップできるｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究のための系を提供する。我々はこの系を拡張し、ペプチドタグを有するＣ末端のタンパク質を、化学修飾したＮＡＤ$^{+}$類似体で修飾できることを実証した。この方法は、様々なｉｎ－ｖｉｔｒｏアッセイ系の開発に道を開くものである（図１）。スクリーニングへの応用可能性を示すため、我々は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２非構造タンパク質３のマクロドメインに対する結合アッセイを設定し、ＦＤＡ承認薬であるスラミンが適度な阻害剤であることを同定した。

【００２９】

具体的には、本発明は、ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出するため

の方法を対象とし、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、前記方法は以下の：

ｉ）第１の標識またはタグを含む第１の実体を提供するステップであって、前記実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、ステップと；

ｉｉ）アッセイにおいて、前記第１の実体を第２の実体と接触させるステップであって、前記第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合することができるか、またはできると考えられる、ステップと；

ｉｉｉ）前記第１の標識に由来するか、または前記タグによって局在化されるシグナルを測定するステップであって、前記第２の実体が前記第１の実体の少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルが、前記第２の実体と前記ＡＤＰリボシル基の間の結合相互作用が生じていない場合に検出されるシグナルと異なるように、前記アッセイが配置される、ステップとを含む。

【００３０】

好ましい実施形態において、前記アミノ酸配列は、Ｇタンパク質のＧαサブユニット、好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のＣ末端配列に対応するか、または前記ＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、好ましくは、前記ＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはヘテロ三量体Ｇタンパク質のＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有する前記アミノ酸配列は、少なくとも４個、より好ましくは最大５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０または３００アミノ酸長の配列またはペプチドである。

【００３１】

別の好ましい実施形態では、前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基と前記システイン残基との前記Ｓ－グリコシドを介した共役は、百日咳毒素によって触媒され、ポリマーの場合には、好ましくはＰＡＲＰファミリー酵素によって伸長される。

【００３２】

さらなる好ましい実施形態において、前記第１の実体は、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応する少なくとも４アミノ酸長のＣ末端配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基が、Ｓ－グリコシド結合を介してＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のシステイン（Ｃ）に共役する。

【００３３】

特定の好ましい実施形態において、前記第１の実体は、Ｃ末端配列$KX_1NLKX_2CGLX_3$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を含み、ここで、X_1はＥまたはＮであり、X_2はＥまたはＤであり、そしてX_3はＦまたはＹである。

【００３４】

さらに好ましい実施形態において、前記第１の実体は、好ましくは、限定されるものではないが、発光性または蛍光性のタンパク質ドメインまたは実体を含む融合タンパク質である。

【００３５】

さらに好ましい実施形態において、前記第１の実体は、限定されるものではないが、ＧＳＴタグまたはジゴキシゲニンタグのような結合または酵素タグを含む融合タンパク質である。

【００３６】

特に好ましい実施形態において、前記第２の実体は、ペプチドもしくはタンパク質に共役した前記ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合することができる生体高分子を含む。

【００３７】

さらに好ましい実施形態において、前記生体高分子は、限定されるものではないが、マクロドメイン、ＡＤＰリボシルアクセプタヒドロラーゼ（ＡＲＨ）ファミリータンパク質

、ＢＲＣＡ１　Ｃ末端（ＢＲＣＴ）ドメイン、ポリ（ＡＤＰリボース）結合亜鉛フィンガーモチーフ、およびポリＡＤＰリボースポリメラーゼ相同体の保存された球状ＷＷＥドメインからなる群より選択される。

【００３８】

特定の好ましい実施形態において、前記第２の実体は第２の標識を含み、ステップｉｉ）において、第１および第２の標識に由来するシグナルが測定され、ここで、前記第２の実体が前記第１の実体の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の実体と前記ＡＤＰリボシル基の間の結合相互作用が生じていない場合に検出されるシグナルとは異なるか、または異なって局在化される。

【００３９】

別の好ましい実施形態では、前記第１および第２の標識は、別個の発光または蛍光標識である。

【００４０】

特定の好ましい実施形態において、阻害剤候補化合物もステップｉｉ）のアッセイに加えられ、前記阻害剤候補化合物は、前記第２の実体と前記第１の実体に結合した前記ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーの間の結合相互作用を阻害することが知られているかまたは阻害すると考えられる。

【００４１】

別の実施形態において、前記阻害剤候補化合物は、前記結合相互作用が、前記阻害剤候補化合物の存在下でのアッセイにおいて阻害され、前記阻害剤候補化合物の非存在下でのアッセイにおいて阻害されない場合、ＡＤＰリボシル結合の阻害剤であることが見出される。

【００４２】

特定の好ましい実施形態において、本発明の方法は、以下の：

ｉ）少なくとも１つのＡＤＰリボシル基がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む第１の発光性または蛍光性の融合タンパク質を提供するステップと；

ｉｉ）アッセイにおいて、前記第１の発光性または蛍光性の融合タンパク質を、ＡＤＰリボシル基を結合させることができる第２の発光性または蛍光性の融合タンパク質および阻害剤候補化合物と接触させるステップと；

ｉｉｉ）前記アッセイから発光または蛍光シグナルを測定するステップであって、前記第２の融合タンパク質が前記第１の融合タンパク質の少なくとも１つのＡＤＰリボシル基に結合している場合に検出されるシグナルは、前記第２の融合タンパク質と前記ＡＤＰリボシル基の間の相互作用が前記阻害剤候補化合物の存在によって阻害される場合に検出されるシグナルとは異なり、前記結合相互作用が、前記阻害剤候補の存在下でのアッセイでは阻害され、前記阻害剤候補の非存在下でのアッセイでは阻害されない場合、前記阻害剤候補化合物は、ＡＤＰリボシル結合の阻害剤であることが見出される、ステップとを含む。

【００４３】

特定の好ましい実施形態において、前記第１および第２の融合タンパク質は、第１の融合タンパク質の蛍光タンパク質が、好ましくは、第２の融合タンパク質の蛍光タンパク質とは異なるように、以下の：ＧＦＰ（「緑色蛍光タンパク質」）、ＹＦＰ（「黄色蛍光タンパク質」）、ＣＦＰ（「シアン蛍光タンパク質」）、ｅＹＦＰ（「増強黄色蛍光タンパク質」）、ｅＣＦＰ（「増強シアン蛍光タンパク質」）、それらの誘導体および変異体からなる群より選択される蛍光タンパク質を含む。

【００４４】

さらに好ましい実施形態において、本発明の方法は、以下の：

－前記第１の標識またはタグに共役した実体を提供する初期ステップであって、前記実体は、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのｃ末端配列に対応する少なくとも４アミノ酸長のアミノ酸配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ

ＮＯ：２）を含む初期ステップと；
　－百日咳毒素を利用して、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１または２のシステイン残基に、ＮＡＤ＋またはその類似体に由来する少なくとも１つのＡＤＰリボシル基を組み込んで、前記第１の実体を得る初期ステップと；
　－任意に、前記第１の実体に共役した前記ＡＤＰリボシル基を、ＰＡＲＰ酵素を使用してポリマーに伸長させる初期ステップとを含む。
【００４５】
本発明はまた、ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーへの結合を検出するためのキットを提供し、前記基またはポリマーはペプチドまたはタンパク質に共役し、前記キットは以下の
　－第１の容器中の：第１の標識またはタグを含む第１の実体であって、該実体は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、第１の実体と、
　－第２の容器中の：第２の標識またはタグに共役した第２の実体であって、該第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役したＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能である、第２の実体とを含む。
【００４６】
キットの好ましい実施形態において、前記アミノ酸配列は、好ましくは、Ｇタンパク質のＧαサブユニット、好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．４のＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、より好ましくは、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有する前記Ｃ末端配列は、最も好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のＣ末端配列またはそれに対して少なくとも７５％の配列同一性を有する配列の、少なくとも４、より好ましくは最大５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０もしくは３００アミノ酸長の配列もしくはペプチドである。
【００４７】
別の好ましい実施形態では、前記第１および第２の標識は、限定されるものではないが、別個の発光または蛍光標識であり得る。
【００４８】
特に好ましい実施形態において、前記第１の実体は、ＧＳＴタグまたはジゴキシゲニンタグのような結合または酵素タグを含む融合タンパク質である。
【００４９】
特に好ましい実施形態では、前記第１および第２の実体は、限定されるものではないが、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはその誘導体もしくは変異体を含む融合タンパク質である。
【００５０】
特定の好ましい実施形態において、前記第１の実体は、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応する少なくとも４アミノ酸長のアミノ酸配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基が、Ｓ－グリコシド結合を介してＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のシステイン（Ｃ）に共役する。
【００５１】
別の好ましい実施形態において、前記第１の実体は、Ｃ末端配列$KX_1NLKX_2CGLX_3$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を含み、ここで、X_1はＥまたはＮであり、X_2はＥまたはＤであり、X_3はＦまたはＹである。
【００５２】
特に好ましい実施形態において、前記第２の実体は、ペプチドまたはタンパク質に共役した前記ＡＤＰリボシル基またはそのポリマーに結合可能な生体高分子を含む。
【００５３】

特定の好ましい実施形態において、前記生体高分子は、限定されるものではないが、マクロドメイン、ＡＲＨファミリータンパク質、ＢＲＣＴドメイン、ＰＡＲ結合亜鉛モチーフ、およびＷＷＥドメインからなる群より選択される。

【００５４】

本発明はまた、第１のドメインと第２のドメインとを含む融合タンパク質を提供し、前記第２のドメインは、Ｇタンパク質のＧαサブユニット、好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列は、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して共役するシステイン残基を含む。

【００５５】

前記融合タンパク質の好ましい実施形態において、前記Ｃ末端配列は、Ｇタンパク質のＧαサブユニット、好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有し、少なくとも４アミノ酸長の配列またはペプチドである。

【００５６】

別の好ましい実施形態において、前記第２のドメインの前記アミノ酸配列は、Ｇタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列に対応するアミノ酸配列ＣＧＬＦ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＣＧＬＹ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）を含み、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基が、Ｓ－グリコシド結合を介してＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のシステイン（Ｃ）に共役する。

【００５７】

別の好ましい実施形態において、第２のドメインの前記アミノ酸配列は、Ｃ末端配列ＫＸ$_1$ＮＬＫＸ$_2$ＣＧＬＸ$_3$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を含み、ここで、Ｘ$_1$はＥまたはＮであり、Ｘ$_2$はＥまたはＤであり、Ｘ$_3$はＦまたはＹである。

【００５８】

前記融合タンパク質の別の好ましい実施形態において、前記第１のドメインは、好ましくは、以下の：ＧＦＰ（「緑色蛍光タンパク質」）、ＹＦＰ（「黄色蛍光タンパク質」）、ＣＦＰ（「シアン蛍光タンパク質」）、ｅＹＦＰ（「増強黄色蛍光タンパク質」）、ｅＣＦＰ（「増強シアン蛍光タンパク質」）、それらの誘導体および変異体からなる群より選択される蛍光タンパク質である。

【００５９】

本発明はさらに、以下の

ｉ）第１のドメインと第２のドメインとを含む融合タンパク質であって、前記第２のドメインは、少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体がＳ－グリコシド結合を介して結合するシステイン残基を含むアミノ酸配列を含む、融合タンパク質と；

ｉｉ）好ましくは、マクロドメイン、ＡＲＨファミリータンパク質、ＢＲＣＴドメイン、ＰＡＲ結合亜鉛モチーフ、およびＷＷＥドメインからなる群より選択される生体高分子であって、前記生体高分子は、前記融合タンパク質の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体を特異的に認識する、生体高分子とを含む系であって；

前記系において、前記生体高分子は、前記生体分子と前記融合タンパク質が一緒に連結され共役体を形成するように、前記融合タンパク質の前記少なくとも１つのＡＤＰリボシル基またはその類似体に結合する、系を対象とする。

【００６０】

前記系の好ましい実施形態において、前記第２のドメインは、Ｇタンパク質のＧαサブユニット、好ましくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のＣ末端配列に対応するか、またはＧタンパク質のＧαサブユニットのＣ末端配列と少なくとも７５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００６１】

好ましい実施形態では、前記系は、該系内の前記共役体の存在を検出する手段を備える

。前記手段は、好ましくは、発光および蛍光標識ならびにこれらの標識から信号を受信することができるデバイスの群より選択され得る。

【００６２】

以下の実施例は、１つまたは複数の特定の用途における本発明の原理を例示するものであるが、形態、使用法および実施の詳細において、発明能力を発揮することなく、また本発明の原理および概念から逸脱することなく、多数の変更を行うことができることは、当業者には明らかであろう。従って、以下に記載する特許請求の範囲による場合を除き、本発明を限定することを意図していない。

【００６３】

本書では、「備える」および「含む」という動詞は、言及されていない特徴の存在を排除するものでも、要求するものでもない、開かれた限定として使用される。特許請求の範囲に記載された特徴は、特に明示しない限り、相互に自由に組み合わせることができる。さらに、本書を通じて「一つ（ａ）」または「一つ（ａｎ）」、すなわち単数形の使用は、複数形を排除するものではないことを理解されたい。

【００６４】

本明細書全体を通して、一実施形態またはある実施形態への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、または特性が、本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通じて様々な箇所で「一実施形態において」または「ある実施形態において」という表現が現れるが、必ずしもすべてが同じ実施形態を指すわけではない。例えば、約または実質的になどの用語を用いて数値に言及する場合、正確な数値も開示する。

【実施例】

【００６５】

材料と方法

クローニング

ＣＦＰまたはナノルシフェラーゼ融合タンパク質の発現コンストラクトを、配列およびライゲーションに依存しないクローニングによりｐＮＩＣ２８－ＣＦＰまたはｐＮＨ－Ｎｌｕｃにクローニングした。ｐＮＩＣ２８－ＣＦＰおよびｐＮＨ－Ｎｌｕｃは、ｐＮＩＣ２８－Ｂｓａ４またはｐＮＨ－ＴｒｘｔのＨｉｓ６－ｔａｇとＴＥＶプロテアーゼ切断部位の間にＣＦＰまたはナノルシフェラーゼの配列を挿入することにより調製した。他のタンパク質コンストラクトはｐＮＩＣ２８－ＢｓａまたはｐＮＩＣ－ＭＢＰベクターにクローニングした。

【００６６】

タンパク質発現

プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）または大腸菌Ｒｏｓｅｔｔａ２細胞に形質転換した。微量元素を含むＴＢ（Ｔｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ）自己誘導培地（Ｆｏｒｍｅｄｉｕｍ、英国、ノーフォーク、ハンスタントン）に８ｇ／Ｌのグリセロールと抗生物質を添加し、ＬＢで一晩培養した前培養物を１：１００で接種した。ＯＤ６００が約１になるまで、フラスコを３７℃で振盪しながらインキュベートした。温度を１８℃に設定し、一晩インキュベーションを続けた。４，２００×ｇ、３０分間、４℃で遠心して細胞を回収した。ペレットを溶解バッファー（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭ　イミダゾール）に懸濁した。再懸濁した細胞は精製まで－２０℃で保存した。

【００６７】

タンパク質の精製

すべてのコンストラクトを、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）によって最初に精製した。細胞を解凍し、超音波処理で溶解した。溶解液を遠心分離し、上清を濾過して、溶解バッファーで平衡化しＮｉ$^{2+}$でチャージした５ｍＬ　ＨｉＴｒａｐ　ＨＰカラムにロードした。カラムは、２－１０カラム容量の溶解バッファーと、１０－５０ｍＭのイミダゾールを含む２－１０カラム容量の溶解バッファーで洗浄した。溶

出は１００－５００ｍＭのイミダゾールを含む溶出バッファーで行った。ＩＭＡＣの後、ほとんどのタンパク質についてさらにサイズ排除精製を行った。最終的に、タンパク質は０．０４－３ｍＭの濃度に濃縮し、その後分注し、液体窒素で瞬間凍結し、－７０℃で保存した。

【００６８】

モノおよびポリＡＤＰリボシル化Ｇαｉタンパク質の調製

Ｃ末端のＧαｉ－ペプチドタグを持つＹＦＰをＩＭＡＣで精製し、２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、３５０ｍＭのＮａＣｌで透析した。ＹＦＰ－Ｇαｉを５０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファーｐＨ７．０で１００μＭに希釈し、１．５μＭの百日咳毒素の触媒Ｓ１ドメインおよび１５０μＭのβ－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドナトリウムと混ぜた。反応物を室温で１時間インキュベートした。反応が完全であることを確認するために、２回目の１５０μＭを反応物に加えた。インキュベーションを室温で１時間続けた。反応混合物をＩＭＡＣカラムにロードして、百日咳毒素、加水分解産物および未反応のNAD^+を除去した。ＩＭＡＣは、上記の精製手順で述べたように行った。バッファーを２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．５ｍＭのＴＣＥＰに交換し、続いて、ＭＡＲ化ＹＦＰ－ＧαｉをＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５遠心フィルターユニット（ＭＷＣＯ：１０ｋＤａ）を用いて約１ｍＭ濃度に濃縮した。このタンパク質を液体窒素で瞬間凍結し、－７０℃で保存した。

【００６９】

ＦＲＥＴ実験用のＰＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉを、ＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉから調製した。１０μＭのＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉを、４００ｎＭのＰＡＲＰ２（残基９０－５８３）と１ｍＭのNAD^+の存在下、５０ｍＭのＴｒｉｓ［ｐＨ８．０］と５ｍＭのＭｇＣｌ２を含むバッファー中で室温で２時間インキュベートした。その後、反応した試料を上記のようにＩＭＡＣを用いて精製して、ＰＡＲＰ２を除去した。Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５遠心フィルターユニット（ＭＷＣＯ：１０ｋＤａ）を用いて、試料バッファーを３０ｍＭのＨＥＰＥＳ［ｐＨ７．５］、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％ｇｌｙｃｅｒｏｌ、０．５ｍＭのＴＣＥＰに交換した。タンパク質を分注し、液体窒素で瞬間凍結し、－７０℃で保存した。

【００７０】

タンキラーゼ１のＰＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉの生産のため、ＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉを２００ｎＭのタンキラーゼ１ＳＡＭ触媒ドメイン二量体、１および１０ｍＭのNAD^+と共に、１０ｍＭのビストリスプロパン［ｐＨ７．０］、０．０１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むバッファー中でインキュベートした。反応は室温で１６時間行った。

【００７１】

ブロットベースのモノおよびポリＡＤＰリボシル化の検出

ドットブロット実験では、Ｅｃｈｏ６５０を用いて、試料溶液を乾燥ニトロセルロースメンブレンに１スポットあたり０．５μＬ移した。以下のステップはすべて室温で行った。スポットの乾燥後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔ中の１５ｍＬの５％（ｗ／ｖ）脱脂粉乳で１０分間シェーカー上でブロッキングした。ブロッキング溶液を捨て、メンブレンをＴＢＳ－Ｔ中の１％（ｗ／ｖ）脱脂粉乳中の０．１μｇ／ｍＬのｍｐＮａｎｏｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１　１５ｍＬとシェーカー上でインキュベートした。Ｎａｎｏｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１溶液を捨てた後、メンブレンを１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔでリンスし、１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔとともにシェーカー上で１５分間インキュベートした。１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔで最終リンス後、１０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファーｐＨ７．０で希釈した１：１０００ＮａｎｏＧｌｏ基質（Ｐｒｏｍｅｇａ）５００μＬを用いてメンブレンを画像化した。

【００７２】

ウエスタンブロットでは、まず１０μＬの試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｍｉｎｉ－Ｐｒｏｔｅａｎ　ＴＧＸ　４－２０％勾配ゲル、ＢｉｏＲａｄ）にかけた。次に、ＴｒａｎｓＢｌｏｔセミドライ系（ＢｉｏＲａｄ）を用いて、タンパク質をニトロセルロースメンブレン（Ｔｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ　Ｔｕｒｂｏ、ＢｉｏＲａｄ）に移した。移動後、メンブレン

を上記のドットブロットと同じ手順で処理した。Ｎａｎｏｌｕｃ－ｅＡＦ１５２１とＮａｎｏｌｕｃ－ＡＬＣ１は０．１μｇ／ｍＬで使用した。

【００７３】

Ｎｌｕｃ－ｅＡｆ１５２１とＮｌｕｃ－ＡＬＣ１の感度と選択性の試験

自動ＰＡＲ化ＴＮＫＳ１を作製するために、１０μＭのＴＮＫＳ１コンストラクトを、５０ｍＭのビストリスプロパンｐＨ７．０、０．０１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、０．５ｍＭのＴＣＥＰ中で１ｍＭのＮＡＤ$^+$と混ぜた。ＰＡＲを含まないＴＮＫＳ１を含む対照を作製するために、ＴＮＫＳ１コンストラクトを２μＭのヘビ毒ホスホジエステラーゼＩと混ぜることにより、大腸菌中での組換え発現中に生じた部分的な自己ＰＡＲ化を除去した。

【００７４】

６－ビオチン－１７－ＮＡＤ$^+$によるＹＦＰ－Ｇαｉの修飾試験

１０μＭのＹＦＰ－ＧαｉまたはＹＦＰ－Ｇαｉ（変異体）を１μＭのＮＡＤ$^+$または６－ビオチン－１７－ＮＡＤ$^+$（Ｂｉｏｌｏｇ）と混ぜた。反応物は０．５μＭのＰｔｘＳ１の非存在下または存在下で調製し、室温で１時間インキュベートした後、乾燥ニトロセルロースメンブレンにブロッティングした（乾燥ニトロセルロースメンブレンに試料溶液を１スポットあたり０．５μＬ、Ｅｃｈｏ６５０を使用）。メンブレンを乾燥させた後、１５ｍＬのブロッキングバッファー（ＴＢＳ中１％カゼイン、ＢｉｏＲａｄ）中で１０分間シェーカー上でブロッキングした。ブロッキング溶液を捨て、ブロッキングバッファー中の１：５０００のストレプトアビジン－ＨＲＰ１５ｍＬとともに１時間シェーカー上でインキュベートした。ストレプトアビジン－ＨＲＰ溶液を捨てた後、メンブレンを１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔでリンスし、１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔとともにシェーカー上で１５分間インキュベートした。最後に１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔでリンスした後、メンブレンをＥＣＬ溶液（ＢｉｏＲａｄ）を用いて画像化した。

【００７５】

６－Ｐａｒｇ－ＮＡＤ$^+$とＣｕＡＡＣによる添加のＣｙ３およびＣｙ５アジドでのＹＦＰ－Ｇαｉの修飾試験

ＹＦＰ－Ｇαｉ（６－ＰＡＲＧ－ＭＡＲ）を、ＮＡＤ$^+$の代わりに６－ＰＡＲＧ－ＮＡＤ$^+$を用いて、ＹＦＰ－Ｇαｉについて上述したように調製した。ＣｕＡＡＣによるＹＦＰ－Ｇαｉ（６－ＰＡＲＧ－ＭＡＲ）へのＣｙ３／Ｃｙ５の添加を試験するために、１５μＭのＹＦＰ－Ｇαｉ（６－ＰＡＲＧ－ＭＡＲ）またはＹＦＰ－Ｇαｉ（ＭＡＲ）を１０ｍＭのアスコルビン酸ナトリウム、５０μＭのＣｙ３－アジドまたはＣｙ５－アジド、および予め混ぜた３００μＭのＣｕＳＯ４と６００μＭのＬ－ヒスチジンと混ぜることにより、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５中で反応物を調製した。さらに、タンパク質を含まない対照も調製した。反応物は室温で３時間インキュベートした後、ニトロセルロースメンブレンにブロットした（１スポットあたり５μＬ）。メンブレンを１５ｍＬのＴＢＳ－Ｔで３０分間洗浄し、画像化した。蛍光イメージングは、Ａｚｕｒｅ６００イメージング系（Ａｚｕｒｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用い、それぞれＣｙ３またはＣｙ５フィルター設定を用いて行った。

【００７６】

ＦＲＥＴ測定

試料を４１０ｎＭで励起し、４７７ｎＭと５２７ｎＭの波長での発光を測定した。レシオメトリックＦＲＥＴ値（ｒＦＲＥＴ）を、５２７ｎｍでの蛍光強度を４７７ｎｍでの蛍光強度で割ることにより算出した。実験はアッセイバッファー（１０ｍＭのビストリスプロパンｐＨ７．０、３％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ２０，０００、０．０１％（ｖ／ｖ）ＴｒｉｔｏｎＸ－１００および０．５ｍＭのＴＣＥＰ）中で、特に断りのない限り１ウェルあたり１０μＬの容量で行った。

【００７７】

ＢＲＥＴ測定

反応を３８４ウェルの白色ＯｐｔｉＰｌａｔｅｓ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で行った

。反応量は１ウェルあたり４０μＬを用いた。５０ｎＭのＮｌｕｃ－ＭＤＯ２を１μＭのＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉと混ぜた。１：４０００のＮａｎｏＧｌｏ基質（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｎ１１１０）を加えることにより反応を開始した。反応物を５分間インキュベートし、発光を波長４４５－４７０ｎＭおよび５２０－５４５ｎＭでＴｅｃａｎ Ｓｐａｋマルチモードプレートリーダーを発光リードアウト、セットタイム１０ｍｓ、積分時間１００ｍｓ）で用いて測定した。レシオメトリックＢＲＥＴ値（ｒＢＲＥＴ）は、５２０－５４５ｎＭの発光強度を４４５－４７０ｎＭの発光強度で割って算出した。実験は、アッセイバッファー（１０ｍＭのビストリスプロパンｐＨ７．０、３％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ２０，０００、０．０１％（ｖ／ｖ）ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、０．５ｍＭのＴＣＥＰ）中で行った。

【００７８】

アルファスクリーン

反応を、３８４ウェルのフラットグレイＡｌｐｈａｐｌａｔｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用い、総容量２５μＬで行った。反応物は、（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５、１００ｍＭのＮａＣｌおよび０．１ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ）を含むバッファー中で３００ｎＭのＢｉｏ－ＭＤＯ２と混ぜた３００ｎＭのＨｉｓタグＧαｉ（ＭＡＲ）からなった。プレートを密封し、３００ｒｐｍで一定に振とうしながら、ＲＴで８０分間インキュベートした。最後に、５μｇ／ｍＬのニッケルキレートアクセプタとストレプトアビジンドナービーズをプレートに加え、さらに３時間インキュベートした。プレートにはブランクウェル（アッセイバッファーとＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎビーズのみ）、対照１（Ｂｉｏ－ＭＤＯ２、Ｈｉｓ－Ｇαｉ）および対照２（Ｂｉｏ－ＭＤＯ２、修飾Ｈｉｓ－Ｇαｉ、ＡＤＰｒ）が含まれた。発光は、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎ検出モジュール付きＴｅｃａｎ ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ１０００Ｐｒｏプレートリーダーを用いて読み取った。

【００７９】

バイオレイヤー干渉法

バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）アッセイを、Ｏｃｔｅｔ Ｒｅｄ系（Ｆｏｒｔｅ Ｂｉｏ）において、１０ｍＭのビストリスプロパン［ｐＨ７．０］、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１％ＢＳＡ、０．０２％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含むバッファー中で、３０℃、１５００ｒｐｍで振とうしながら行った。１０μｇ／ｍＬのＹＦＰ－ＧαｉまたはＭＡＲ化ＹＦＰ－ＧαｉをＮｉ$^{2+}$－ＮＴＡコートセンサーにロードし、その後バッファー中での洗浄ステップを続けた。ＭＤＯ２への会合は、センサーを０－２μＭのＭＤＯ２を含む溶液に１２０秒間浸漬することで測定し、解離ステップではセンサーをバッファーに１２０秒間浸漬した。

【００８０】

ＡＤＰリボース競合実験では、１０μｇ／ｍＬのＹＦＰ－Ｇα¡またはＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇα¡をＮｉ２＋－ＮＴＡコートセンサーにロードした。会合させるために、センサーを半対数希釈系列のＡＤＰｒ（１０ｎＭから１０μＭ）と混ぜた１００ｎＭのＭＤＯ２に１２０秒間浸漬し、次に解離ステップのためにバッファーに移した。

【００８１】

システイン－ＡＤＰリボシル加水分解アッセイ

すべての試料を、ブロッティングの前に室温で２４時間インキュベートした。１μＭのＣＦＰ融合タンパク質、または０．０１、０．１、１μＭのＳＶＰを、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５、２５ｍＭのＮａＣｌ、０．５ｍＭのＴＣＥＰ中で、１０μＭのＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉと混ぜた。インキュベーション後、１スポットあたり０．５μＬの反応混合物を、１０μＭのＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉの０．５μＬスポットの隣にブロットした。対照として、１０μＭの非ＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉを１０μＭのＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉの隣にブロットした。

【００８２】

ＦＤＡ承認薬ライブラリの付随的スクリーニング

スクリーニングのために、ＦＤＡ承認薬ライブラリ（Ｅｎｚｏ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎ

ｃｅｓ）からＤＭＳＯに溶解した１０ｍＭ化合物ストック４０ｎＬを３８４ウェル黒色低容量ポリプロピレンプレート（Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ）に移した。１μＭのＣＦＰ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインと５μＭのＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉを含む試料混合物をアッセイバッファー（１０ｍＭのビストリスプロパンｐＨ７．０、３％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ２０，０００、０．０１％（ｖ／ｖ）ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、および０．５ｍＭのＴＣＥＰ）中で調製し、Ｍａｎｔｉｓ（Ｆｏｒｍｕｌａｔｒｉｘ）を用いてウェルあたり２０μＬを分注した。５分間のインキュベーション後、ｒＦＲＥＴシグナルを測定した。２００μＭのＡＤＰリボース存在下または非存在下の試料混合物を、それぞれポジティブ対照およびネガティブ対照として使用した。

【００８３】

ＤＳＦによるスラミン結合の検証

タグのないＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインを１０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、２５ｍＭのＮａＣｌ、０．５ｍＭのＴＣＥＰバッファーで５μＭに希釈し、５ｘ　ＳＹＰＲＯ　Ｏｒａｎｇｅと混ぜた。試料は１０μＭ、５０μＭ、１００μＭまたは１ｍＭのスラミンで調製した。１ｍＭのＡＤＰリボースの存在下または非存在下の試料を対照として使用した。試料を９６ウェルｑＰＣＲプレートに移した。測定はＢｉｏＲａｄ　Ｃ１０００　ＣＦＸ９６サーマルサイクラーで行った。融解曲線のデータポイントを、２０－９５℃まで１分間隔で記録し、温度は１℃／分で上昇させた。データの解析は、正規化データの非線形回帰分析（Ｂｏｌｔｚｍａｎｎシグモイド方程式）を用いてＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　７で行った。

【００８４】

実施例１．ツールボックス研究用タンパク質の初期調製

本研究で用いたタンパク質はすべて大腸菌で組換え生産した。ブロットベースの方法でＡＤＰリボシル化を検出するツールとして、最近報告されたＡＤＰリボシルスーパー結合体ｅＡｆ１５２１（Nowak et al., 2020）をナノルシフェラーゼ付き融合たんぱく質として産生した。このタンパク質は、モノおよびポリＡＤＰリボシル化タンパク質を高感度に検出するためのシンプルで迅速なワンステッププロトコールで機能することがわかった（図２ｃおよび２ｄ）。

【００８５】

百日咳毒素によるＧαｉのモノＡＤＰリボシル化は、修飾が１残基で明確に定義され、システインを用いて安定なＳ－グリコシド結合を生成するので、ＡＤＰリボシルとの結合を調べるのに適したプローブとなると考えた。モノＡＤＰリボシル化Ｇαｉプローブを作製するために、ＹＦＰと融合したＧαｉの１０アミノ酸Ｃ末端ペプチドのみを修飾する百日咳毒素の能力を、全長Ｇαｉ変異体と比較して試験した（図２ａ）。その結果、融合ペプチドを効果的に修飾できることがわかった。

【００８６】

次に、Ｇαｉペプチドにポリ ＡＤＰリボシル鎖を導入することを目指した。我々は、先に修飾したＧαｉペプチドのモノＡＤＰリボシル基が、ＰＡＲＰ酵素によるポリＡＤＰリボースへの伸長の起点になると考えた。反応条件を最適化した結果、ＰＡＲＰ２はいずれもポリＡＤＰリボシル化Ｇαｉコンストラクトを生成できることがわかった（図２ｂ）。

【００８７】

実施例２．ＮＡＤ$^{+}$類似体で部位特異的に標識するためのタグとしてのＧαｉペプチド

Ｇαｉペプチドタグを用いれば、アクセス可能なＣ末端を備えるタンパク質をＡＤＰリボースで部位特異的に標識することができるが、この系を拡張すれば、タンパク質のＣ末端に化学的なＮＡＤ$^{+}$類似体を導入できると考えた。多くのＮＡＤ$^{+}$類似体がすでに存在し、ビオチン化、蛍光性およびクリックケミストリー対応のＮＡＤ$^{+}$類似体などが商業的に利用可能である。我々はまず、ビオチン化ＮＡＤ$^{+}$類似体を用いたＹＦＰ－Ｇαｉ－ペプチドタグ付きタンパク質の修飾をテストした。部位特異的修飾は、ストレプトアビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼを用いたドットブロットを用いて検出した（図３ａ）。

【００８８】

さらに、銅（Ｉ）触媒によるアジド基のアルキン－アジド環化付加反応を可能にする、６－プロパルギルアデニン－ＮＡＤ$^+$によるＹＦＰ融合Ｇαｉペプチドタグ修飾を試験した（図３ｂ）。ドットブロットにより、６－プロパルギルアデニン－ＮＡＤ$^+$で修飾したＧαｉペプチドを含むタンパク質には、蛍光色素Ｃｙ３およびＣｙ５を含むアジド基を付加することができたが、カノニカルＮＡＤ$^+$で修飾したＧαｉペプチドにはＣｙ３およびＣｙ５を付加することができなかった。

【００８９】

実施例３．確認されたＡＤＰリボシル結合体および潜在的なＡＤＰリボシル結合体との結合の評価

ＭＡＲ化Ｇαｉとの結合を試験するために、２７種類のタンパク質の組を選択した。これらのタンパク質をＣＦＰとの融合体として大腸菌で組換え生産し、ＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉコンストラクトとの結合の際のレシオメトリックＦＲＥＴシグナルを試験した（図４ａ）。相互作用を競合させるために、２００μＭのＡＤＰリボースを含むＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉと同様に対照として非ＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉコンストラクトを用いた。ＦＲＥＴシグナルが高いほど、結合パートナーの占有率が高く、したがって結合親和性が高いことに相関するが、蛍光体の距離および向きにも影響される。我々は、ＡＤＰリボースと結合することが以前に報告されているタンパク質が、対照と比較して高いＦＲＥＴシグナルを示し、ＭＡＲ化プローブと結合していることを示すことを見出した。ＡＲＨ１は低親和性でＡＤＰリボースと結合することが知られており、これがこのコンストラクトのＦＲＥＴシグナルを測定できなかった理由であろう。３つのヒストンマクロドメイン、マクロＨ２Ａ１．１、マクロＨ２Ａ１．２およびマクロＨ２Ａ２はすべて非常に類似した配列同一性を持つが、マクロＨ２Ａ１．１だけがＡＤＰリボースと結合する能力を持つ。これは、マクロＨ２Ａ１．１だけが対照よりも高いＦＲＥＴシグナルを示すという我々の観察と一致している。

【００９０】

システイン－ＡＤＰリボシル基への結合は、試験されたＡＤＰリボシル結合タンパク質のいくつか、あるいは大部分にとって生理学的意義はないだろうと予想される。Ｏ－またはＮ－グリコシド結合したＡＤＰリボースのいずれかに対して高い特異性を示すと考えられる結合体がないことと、システイン硫黄が結合を阻害しないことが確認されたＡＤＰリボシル結合タンパク質のいずれにおいても確認されたことは、驚きである。

【００９１】

システイン－ＡＤＰ－グリコシルヒドロラーゼ活性はヒト赤血球とミトコンドリアで検出されたが、システイン－ＡＤＰリボースのＳ－グリコシド結合を加水分解する能力を持つヒトの特異的酵素は今のところ同定されていない。上記のＣＦＰ融合コンストラクトをモノＡＤＰリボシル化ＹＦＰ－Ｇαｉと混ぜ、２４時間のインキュベーション後にドットブロットを用いてＡＤＰリボースの加水分解を試験した（図４ｂ）。ヘビ毒ホスホジエステラーゼＩを含む対照では、ＡＤＰリボース二リン酸結合の切断によるシグナルの消失が見られたが、試験したタンパク質はいずれも、試験した条件下ではＳ－グリコシド結合を加水分解できなかった。これらの発見は、ＭＤＯ１、ＴＡＲＧ１、ＡＲＨ３またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３のようなＯ－またはＮ－グリコシド結合を加水分解できるタンパク質のＡＤＰリボシル結合を測定するためのこの系の汎用性を強調するものである。次に、ポリＡＤＰリボシル基を含むＹＦＰ－Ｇαｉと混ぜた場合のＣＦＰ融合ポリＡＤＰリボシル結合体のレシオメトリックＦＲＥＴシグナルを試験した（図２ｂ）。ポリＡＤＰリボシル結合体は、ＰＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉとのレシオメトリックシグナルが対照よりも増加したことから、ＭＡＲ基ではなくＰＡＲとの結合が示唆された（図４ｃ）。代表的なモノまたはポリＡＤＰ結合体の用量反応曲線は、良好なシグナル品質を示す（図４ｄ、図４ｅ）。

【００９２】

我々は上記のＡＤＰリボシル結合の試験にＦＲＥＴを用いたが、ＭＡＲ化Ｇαｉとの結合は異なる結合技術でも測定できることを示した。このためにＭＤＯ２をタンパク質例と

して利用した。ＦＲＥＴ測定を目的としたＣＦＰ融合ＭＤＯ２とＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉの結合（図５ａ）と同様に、Ｎａｎｏｌｕｃ融合ＭＤＯ２を用いて、ＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉの相互作用時にＢＲＥＴシグナルを発生させた（図５ｂ）。

【００９３】

ＡＤＰリボシルのリーダーまたはイレイサー用のＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎプロトコールは存在するが、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎ技術に適応した我々の系を用いれば、そうでなければ加水分解するＭＤＯ２ドメイン（図５ｃ）の例で示したように、潜在的にどのようなリーダーやイレイサーでも、ＭＡＲ化Ｇαｉへの結合を直接プローブすることができる。

【００９４】

我々はさらに、近年、低分子化合物のスクリーニング法として普及しているバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ、図５ｄ）を用いて結合を示した。この方法では、解離定数などの速度論的結合パラメーターを簡単に定量化することもできる。

【００９５】

実施例４．ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインに対する阻害剤のスクリーニング

ＣＯＶＩＤ－１９のパンデミックに関する現状に鑑み、我々はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３のマクロドメインに対する低分子阻害剤のスクリーニングにこの結合系が適用できることを実証することにした。現在、世界中の研究者がこのマクロドメインに対する阻害剤を見出そうと努力している。コロナウイルスのｎｓｐ３マクロドメインはウイルスの複製に重要であることが示されており、低分子阻害剤はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）および他のウイルスによる感染症に対する治療薬として有望であり得る。

【００９６】

３８４ウェルプレートにおいて、ＣＦＰ融合ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインとＭＡＲ化ＹＦＰ－Ｇαｉを２００μＭのＡＤＰリボースの非存在下および存在下で混合することにより、交互に陽性および陰性対照のＦＲＥＴシグナルの質を評価した（図６ａ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２マクロドメインはＡＤＰリボースとの結合親和性が比較的低いと報告されているが（Ｋｄ＝１７μＭ）、それでもシグナルは陽性対照と陰性対照で十分な分離を示すことを発見した。Ｚ’－ファクターは０．７と計算され、このアッセイがハイスループットスクリーニングに適していることが示された。

【００９７】

化合物濃度２０μＭで、６４０個の低分子化合物を含むＥＮＺＯ　ＦＤＡ承認薬物ライブラリに対してスクリーニングを行った（図６ｂ）。スクリーニングより、スラミンという化合物のみが８２％の阻害率でヒットとみなされ、ＦＲＥＴベースのアッセイで試験したところ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインに対するIC_{50}は８．７μＭであった（図６ｃ、図６ｄ）。この化合物のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｎｓｐ３マクロドメインへの結合を確認するため、ＤＳＦ解析を行ったところ、濃度依存的にタンパク質の安定化が示された（図６ｅ）。興味深いことに、スラミンは広帯域の抗ウイルス薬および抗寄生虫薬として使用されており、細胞培養ベースのモデルにおいてはＳＡＲＳ－ＣｏＶ２感染を阻害することが報告されている。スラミンに関連する文献を調べたところ、ＤＮＡおよびＲＮＡポリメラーゼからサーチュイン、ＡＴＰアーゼおよびＧタンパク質共役受容体まで、多くの標的タンパク質を阻害することが報告されており、標的特異性が低いことがわかった。次に、本研究で生産されたウイルスとヒトのＡＤＰリボースリーダーとイレイサーの阻害について、スラミンを試験した（図６ｆ）。当然のことながら、スラミンは試験したタンパク質の多くに対して１０μＭでも強い阻害を示し、この化合物の標的特異性が低いことが確認された。

【００９８】

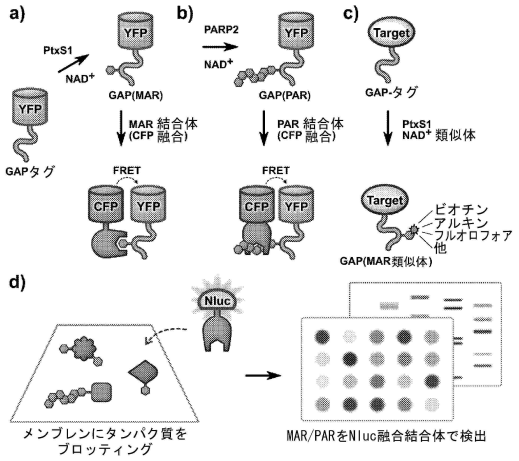
〔参考文献〕

Nowak K、Rosenthal F、Karlberg T、Butepage M、Thorsell A-G、Dreier B、Grossmann J、Sobek J、Imhof R、Luescher B、Schuler H、Pluckthun A、Leslie Pedriol¡DM、Hottiger MO.（2020）Engineering Af1521 improve

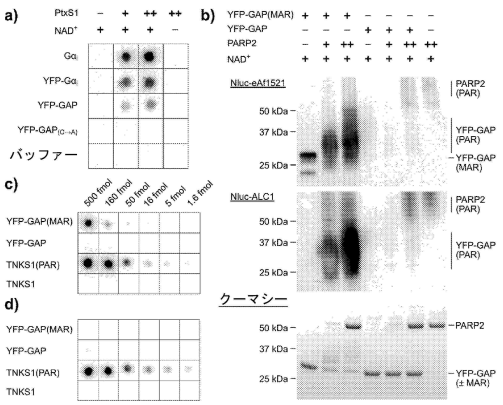
s ADP-ribose binding and identification of ADP-ribosylated proteins. Nat. Commun. 11:5199、https://doi.org/10.1038/s41467-020-18981-w
TeloniF and Altmeyer M.（2016）Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose. Nucleic Acids Res. 44:993-1006、doi: 10.1093/nar/gkv1383
Wazir S、MaksimainenmM、Alanen HI、Galera-Prat A、Lehtioe L.（2021）Activity-Based Screening Assay for Mono-ADP-Ribosylhydrolases. SLAS Discovery 26:67-76、doi: 10.1177/2472555220928911

【図面】

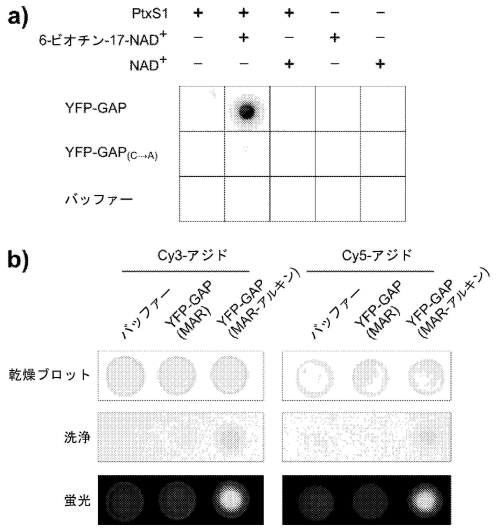
【図１】



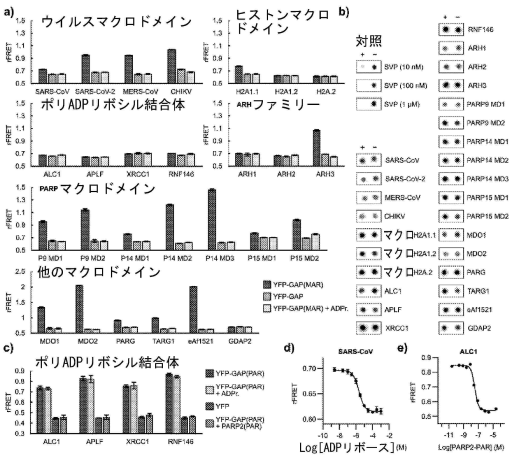
【図２】



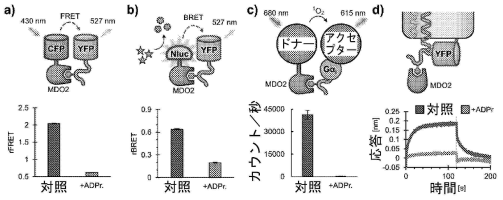
【図３】


a)
PtxS1
6-ビオチン-17-NAD+
NAD+
YFP-GAP
YFP-GAP(C→A)
バッファー
b)
Cy3-アジド
Cy5-アジド
バッファー
YFP-GAP (MAR)
YFP-GAP (MAR-アルキン)
乾燥ブロット
洗浄
蛍光

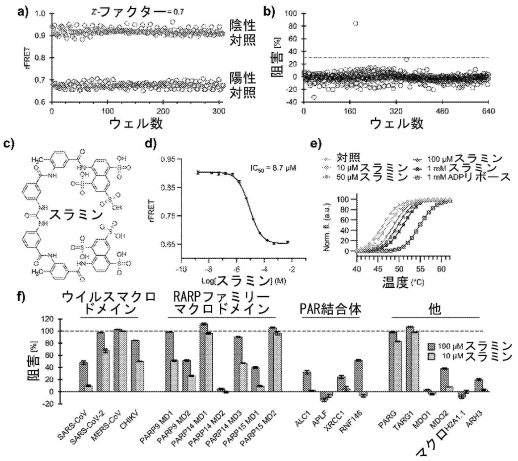
【図４】


ウイルスマクロドメイン
ヒストンマクロドメイン
対照
ポリADPリボシル結合体
ARHファミリー
PARPマクロドメイン
他のマクロドメイン
ポリADPリボシル結合体
SARS-CoV
Log[ADPリボース](M)
ALC1
Log[PARP2-PAR](M)

【図５】


FRET
BRET
ドナー
アクセプター
MDO2
対照
+ADPr
カウント／秒
応答
時間[s]

【図６】


z-ファクター=0.7
陰性対照
陽性対照
ウェル数
阻害[%]
スラミン
IC50 = 8.7 μM
Logスラミン](M)
対照
100 μMスラミン
1 mMスラミン
50 μMスラミン
1 mM ADPリボース
温度(°C)
ウイルスマクロドメイン
RARPファミリーマクロドメイン
PAR結合体
他
100 μMスラミン
10 μMスラミン

【配列表】
2024519737000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2022/050305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/542
ADD.

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)
G01N C07K

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)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARBONETTI N H ET AL: "Proteolytic cleavage of pertussis toxin S1 subunit is not essential for its activity in mammalian cells", BMC MICROBIOLOGY, vol. 5, no. 1, 3 February 2005 (2005-02-03), page 7, XP021002669, DOI: 10.1186/1471-2180-5-7 the whole document, in particular abstract; page 7, column 1, lines 11-14; page 12, "ADP-ribosyltransferase assay" ----- -/--	26-33

[X] 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	Date of mailing of the international search report
14 September 2022	23/09/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weber, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2022/050305

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YASHWANTH A ET AL: "Discovery of Compounds Inhibiting the ADP-Ribosyltransferase Activity of Pertussis Toxin", ACS INFECTIOUS DISEASES, vol. 6, no. 4, 3 January 2020 (2020-01-03), pages 588-602, XP055959180, DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00412 the whole document, in particular page 596, column 1, lines 40-46; figure forming part of the abstract; figure 4	26-33
X	WESTCOTT N P ET AL: "Chemical proteomics reveals ADP-ribosylation of small GTPases during oxidative stress", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 13, no. 3, 1 March 2017 (2017-03-01), pages 302-308, XP055611292, DOI: 10.1038/nchembio.2280 the whole document, in particular abstract; page 302, column 2, lines 32-35; page 305, column 2, lines 4-7	34-39
X	SCHULLER M ET AL: "Discovery of a Selective Allosteric Inhibitor Targeting Macrodomain 2 of Polyadenosine-Diphosphate-Ribose Polymerase 14", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 12, no. 11, 19 October 2017 (2017-10-19), pages 2866-2874, XP055959043, DOI: 10.1021/acschembio.7b00445	1,6-15, 17, 19-21, 24,25
Y	the whole document, in particular abstract; page 2872, sections "materials and plasmids" and "macrodomain alphascreen assay"; figure 1	2-5,16, 18,22,23
X	EKBLAD T ET AL: "Identification of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Macrodomain Inhibitors Using an AlphaScreen Protocol", SOCIETY FOR LABORATORY AUTOMATION AND SCREENING DISCOVERY, vol. 23, no. 4, 9 January 2018 (2018-01-09), pages 353-362, XP055584494,	1,6-15, 17, 19-21, 24,25
Y	the whole document, in particular abstract; page 355, sections "expression and purification of in vivo ..." and "alphascreen protein-protein interaction assay"; page 356, sections "screening compounds ..." and "alphascreen compound ..."; page 357, section "results and discussion"; figure 1	2-5,16, 18,22,23

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2022/050305

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COHEN M S ET AL: "Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 14, no. 3, 14 February 2018 (2018-02-14), pages 236-243, XP055959252, DOI: 10.1038/nchembio.2568 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/nchembio.2568> the whole document, in particular figure 3; page 238, column 1, lines 20-27; page 240, column 1, lines 19-21	2-5,16, 18,22,23
A	VOORNEVELD J ET AL: "Molecular Tools for the Study of ADP-Ribosylation: A Unified and Versatile Method to Synthesise Native Mono-ADP-Ribosylated Peptides", CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 27, no. 41, 26 March 2021 (2021-03-26), pages 10621-10627, XP055959179, DOI: 10.1002/chem.202100337 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/chem.202100337> the whole document, in particular page 10621, column 1, line 1 to column 2, line 4	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2022/050305

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,IQ,IR,IS,IT,JM,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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

０ オウル ウュリオピスト内

(72)発明者 スヴェン ソワ

フィンランド国 ９００１４ オウル ウュリオピスト ピーオーボックス ８０００ オウル ウュリオピスト内

(72)発明者 アルベルト ガレラ－プラット

フィンランド国 ９００１４ オウル ウュリオピスト ピーオーボックス ８０００ オウル ウュリオピスト内

Ｆターム（参考） 4H045 AA10 AA30 BA10 BA13 BA16 BA41 CA40 CA50 EA51 EA53

【要約の続き】

異なるか、または異なって局在化される、ステップとを含む。本発明のキットは、本発明の方法を実施するための手段を提供する。

【選択図】図１