

(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2019-510494

(P2019-510494A)

(43) 公表日 平成31年4月18日(2019.4.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62	Z N A Z 2 G O 4 5
<b>G O 1 N 33/58 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/58	Z 4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 15/31 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/31	4 H O 4 5
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63	Z
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-549769 (P2018-549769)	(71) 出願人	511293629 マーケット ユニバーシティー
(86) (22) 出願日	平成29年3月24日 (2017. 3. 24)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ミル
(85) 翻訳文提出日	平成30年10月24日 (2018. 10. 24)		ウォーキー ピーオー ボックス 1 8 8
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/024051		1
(87) 国際公開番号	W02017/165788	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成29年9月28日 (2017. 9. 28)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	62/312, 772	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成28年3月24日 (2016. 3. 24)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 定量的鞭毛蛍光マーカーおよび標準物質

(57) 【要約】

蛍光マーカーの長さに沿って規則的に点在する既知コピー数の蛍光標識されたタンパク質を含む蛍光マーカーが開示される。蛍光マーカーは、蛍光顕微鏡法において、蛍光標識された試料を定量化するために使用され得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

複数コピーの構造タンパク質（SP）によって形成された管状または円柱状の生物学的構造を含む蛍光マーカであって、該生物学的構造が、該生物学的構造の長さに沿って規則的に点在する複数コピーの蛍光標識されたタンパク質（FP）を含む、蛍光マーカ。

## 【請求項2】

生物学的構造の長さ96nm当たり2個のFPを含む、請求項1記載の蛍光マーカ。

## 【請求項3】

構造タンパク質がらせん状の配置で集合している、請求項1または2記載の蛍光マーカ。

10

## 【請求項4】

構造タンパク質がチューブリンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

## 【請求項5】

チューブリンが、チューブリン（SEQ ID NO:6もしくはそのバリエーション）、チューブリン（SEQ ID NO:7もしくはそのバリエーション）、またはヘテロダイマーとしてのチューブリンとチューブリンとの組み合わせである、請求項4記載の蛍光マーカ。

## 【請求項6】

生物学的構造が微小管またはダブルット微小管である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

20

## 【請求項7】

生物学的構造がタンパク質性微小管またはタンパク質性ダブルット微小管である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

## 【請求項8】

生物学的構造が、A微小管およびB微小管を含むダブルット微小管である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

## 【請求項9】

蛍光標識されたタンパク質が、蛍光タンパク質のアミノ酸配列に融合した、微小管に関連したラジアルスポークタンパク質（RSP）のアミノ酸配列を含む融合タンパク質である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

30

## 【請求項10】

蛍光タンパク質のアミノ酸配列が、RSPのアミノ酸配列のC末端に融合している、請求項9記載の蛍光マーカ。

## 【請求項11】

蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質（GFP）、mNeonGreenタンパク質（NG）、またはそれらの蛍光性バリエーションである、請求項9または10記載の蛍光マーカ。

## 【請求項12】

RSPが、微小管構造へと集合するラジアルスポークタンパク質3（RSP3）またはそのバリエーションである、請求項9～11のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

40

## 【請求項13】

RSP3が、SEQ ID NO:1、またはSEQ ID NO:1と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するそのバリエーションのアミノ酸配列を含む、請求項12記載の蛍光マーカ。

## 【請求項14】

蛍光タンパク質が、SEQ ID NO:2もしくはSEQ ID NO:3、またはSEQ ID NO:2もしくはSEQ ID NO:3と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するそれらのバリエーションのアミノ酸配列を含む、請求項9～13のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

## 【請求項15】

50

融合タンパク質が、SEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:5、またはSEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:5と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するそれらのバリエーションのアミノ酸配列を含む、請求項9~12のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

【請求項16】

蛍光標識されたタンパク質が、  
蛍光標識に結合するアダプタータンパク質のアミノ酸配列に融合した、ラジアルスポークタンパク質(RSP)のアミノ酸配列  
を含む融合タンパク質である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

【請求項17】

生物学的構造が、複数コピーの前記管状または円柱状の生物学的構造を含む軸系である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

【請求項18】

生物学的構造が、9+2構造を含む軸系である、請求項17記載の蛍光マーカ。

【請求項19】

生物学的構造が、軸系を含む鞭毛である、前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカ。

【請求項20】

軸系が、複数コピーの前記管状または円柱状の生物学的構造を含む、請求項19記載の蛍光マーカ。

【請求項21】

前記請求項のいずれか一項記載の蛍光マーカが固定化されている、固体基板。

【請求項22】

スライドである、請求項21記載の固体基板。

【請求項23】

蛍光顕微鏡法の実施中に、請求項1~20のいずれか一項記載の蛍光マーカからの、または該蛍光マーカが固定化されている請求項21もしくは22記載の固体基板からの蛍光を検出する工程を含む、蛍光顕微鏡法を実施するための方法。

【請求項24】

請求項1~20のいずれか一項記載の蛍光マーカを基板に適用する工程、および蛍光顕微鏡法の実施中に該蛍光マーカからの蛍光を検出する工程を含む、蛍光顕微鏡法を実施するための方法。

【請求項25】

固体基板がスライドである、請求項24記載の方法。

【請求項26】

蛍光試料を同じ基板または異なる基板に適用する工程、および蛍光顕微鏡法の実施中に該試料からの蛍光を検出する工程をさらに含む、請求項24または25記載の方法。

【請求項27】

マーカの蛍光標識が試料の蛍光標識と同じである、請求項26記載の方法。

【請求項28】

マーカの蛍光標識が試料の蛍光標識と異なる、請求項26記載の方法。

【請求項29】

蛍光タンパク質のアミノ酸配列に融合した、微小管に関連したラジアルスポークタンパク質(RSP)のアミノ酸配列  
を含む、融合タンパク質。

【請求項30】

蛍光タンパク質のアミノ酸配列が、RSPのアミノ酸配列のC末端に融合している、請求項29記載の融合タンパク質。

【請求項31】

蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質(GFP)、mNeonGreenタンパク質(NG)、または

10

20

30

40

50

それらの蛍光性バリエーションである、請求項29または30記載の融合タンパク質。

【請求項32】

RSPが、微小管構造へと集合するラジアルスポークタンパク質3 (RSP3) またはそのバリエーションである、請求項29～31のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項33】

RSP3が、SEQ ID NO:1、またはSEQ ID NO:1と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するそのバリエーションのアミノ酸配列を含む、請求項32記載の融合タンパク質。

【請求項34】

蛍光タンパク質が、SEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:5、またはSEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:5と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するそれらのバリエーションのアミノ酸配列を含む、請求項29～33のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項35】

SEQ ID NO:4またはSEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含む、請求項29～34のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項36】

蛍光標識に結合するアダプタータンパク質のアミノ酸配列に融合した、ラジアルスポークタンパク質 (RSP) のアミノ酸配列を含む、融合タンパク質。

【請求項37】

請求項29～36のいずれか一項記載の融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項38】

プロモーターに機能的に連結された請求項37記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項39】

請求項38記載の発現ベクターを含む、単離された細胞。

【請求項40】

原核細胞である、請求項39記載の単離された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連特許出願の相互参照

本願は、その内容全体が参照によって本明細書に組み入れられる2016年3月24日に出願された米国仮出願第62/312,772号に基づく35 U.S.C. § 119(e)による優先権の恩典を主張するものである。

【0002】

本発明は、蛍光顕微鏡法において有用であり得る蛍光マーカールおよび標準物質に関する。具体的には、本発明は、蛍光顕微鏡法において有用であり得る蛍光標識された鞭毛に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

生物学的分子マーカーは、多様な生物学的的方法における貴重なツールである。例えば、DNAマーカーまたはタンパク質マーカーは、生物医学における一般的な手法であるゲル電気泳動において、それぞれの分子のサイズおよび存在量を推定するために不可欠である。残念ながら、研究および診断において使用される極めて一般的な方法論である蛍光顕微鏡法を実施する時に、関心対象の分子の数を推定するために容易に使用することができる等価なマーカーは、存在しない。

10

20

30

40

50

## 【0004】

本明細書において、本発明者らは、蛍光顕微鏡法において生物学的分子マーカーとして使用され得る蛍光鞭毛を開示する。蛍光鞭毛は、典型的には、既知の周期で蛍光鞭毛に存在する、換言すると、鞭毛の単位長さ当たりの既知の組換え蛍光タンパク質数で蛍光鞭毛に存在する、組換え蛍光タンパク質を含む。従って、組換え蛍光タンパク質は、蛍光鞭毛において既知の化学量論を有するため、鞭毛からの蛍光を測定することができ、組換え蛍光タンパク質1個当たりの相対蛍光を容易に決定することができる。蛍光鞭毛の蛍光を、蛍光標識された試料分子の蛍光と比較することによって、蛍光標識された試料分子の数を、極めて容易に定量化することができる。従って、開示された蛍光鞭毛は、蛍光アッセイにおけるマーカー標準物質として有用である。

10

## 【発明の概要】

## 【0005】

## 概要

蛍光マーカーが開示される。開示された蛍光マーカーは、蛍光標識された試料を定量化するかまたは蛍光標識された試料を他の方法で査定するため、蛍光顕微鏡法において利用され得る。

## 【0006】

開示された蛍光マーカーは、典型的には、蛍光マーカーを蛍光顕微鏡法において使用するのに適切であるようにする寸法を有する管状または円柱状の生物学的構造を含む。蛍光マーカーの生物学的構造には、タンパク質性微小管、またはダブレット微小管、軸系、もしくは鞭毛（例えば、真核生物の鞭毛）などのタンパク質性微小管を含むマクロ構造が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。

20

## 【0007】

開示された蛍光マーカーの生物学的構造は、典型的には、複数コピーの少なくとも1種の構造タンパク質（SP）によって形成される。例えば、複数コピーの構造タンパク質は、非共有結合的に相互に会合するかまたは集合し、らせん状のコンフォメーションを有していてもよい生物学的構造を形成することができる。生物学的構造を形成する適切な構造タンパク質には、チューブリン、チューブリン、またはヘテロダイマーのようなそれらの組み合わせなどの、チューブリンタンパク質が含まれ得る。

## 【0008】

蛍光マーカーの生物学的構造は、複数コピーの蛍光標識されたタンパク質（FP）を含む。蛍光タンパク質は、生物学的構造の長さに沿って規則的に点在しており、従って、蛍光タンパク質は生物学的構造において周期性を示すことができる。蛍光タンパク質は、生物学的構造の長さに沿って規則的に点在しているため、生物学的構造は、生物学的構造の単位長さ当たりの蛍光タンパク質の既知の化学量論を有し、生物学的構造の長さを測定することによって、構造内に存在する蛍光タンパク質の数を推定することができる。さらに、蛍光マーカーの蛍光強度を測定し、蛍光タンパク質1個当たりの強度を計算することができる。

30

## 【0009】

蛍光標識されたタンパク質は、蛍光タンパク質部分と、生物学的構造と会合するかまたは生物学的構造内で融合タンパク質へと集合する部分とを含む融合タンパク質を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。生物学的構造と会合するかまたは生物学的構造内で融合タンパク質へと集合する部分は、融合タンパク質のアンカー部分とも呼ばれ、このアンカー部分は、蛍光タンパク質部分を生物学的構造にアンカリングされる。蛍光タンパク質部分は、直接またはペプチドリンカーを介して、アンカー部分に融合しており、蛍光タンパク質部分は、アンカー部分のC末端、N末端、または任意の位置に融合してよい。

40

## 【0010】

例えば、生物学的構造が、微小管、または、軸系もしくは鞭毛などの微小管およびダブレット微小管を含むマクロ構造である場合、例えば、融合タンパク質のアンカー部分とし

50

て、生物学的構造の融合タンパク質のために適切なタンパク質またはそのバリエーションには、微小管に関連したラジアルスポーク（RS）タンパク質またはそのバリエーションが含まれ得る。適切なRSタンパク質には、ラジアルスポークタンパク質3（RSP3）が含まれ得る。例えば、融合タンパク質の蛍光タンパク質部分として、生物学的構造の融合タンパク質のために適切なタンパク質またはそのバリエーションには、緑色蛍光タンパク質（GFP）、高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）、mNeonGreenタンパク質（NG）、高感度青色蛍光タンパク質（EBFP）、mCherry蛍光タンパク質、tdTomato蛍光タンパク質、高感度シアン蛍光タンパク質（ECFP）、Midoriishi-Cyan1タンパク質、AmCyan1タンパク質、Azami-Greenタンパク質、mAzami-Green1タンパク質、ZsGreen1、高感度黄色蛍光タンパク質（EYFP）、Venusタンパク質、ZsYellowタンパク質、Kusabira-Orange1タンパク質、およびmKusabira-Orange 1タンパク質が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。示されるように、本明細書中に開示された融合タンパク質は、蛍光タンパク質またはそのバリエーションのアミノ酸配列に融合した、鞭毛のラジアルスポークタンパク質（RSP）またはそのバリエーションのアミノ酸配列を含んでよい。

#### 【0011】

蛍光タンパク質部分の代わりに、開示された融合タンパク質は、アダプタータンパク質またはアダプタータンパク質の一部（即ち、および「アダプター部分」）に融合したアンカー部分を含み、融合タンパク質のアダプター部分がフルオロフォア標識に結合してもよい。適切なアダプタータンパク質には、非タンパク質性フルオロフォア標識を含んでいてもよい、ストレプトアビジンがコンジュゲートされているフルオロフォア標識に結合するビオチン化ポリペプチドが含まれ得る。従って、開示された蛍光標識された融合タンパク質は、ストレプトアビジンがコンジュゲートされているフルオロフォア標識に結合するビオチン化アダプターポリペプチドに融合したアンカー部分を含んでよい。

#### 【0012】

本明細書中に開示された融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドも、本明細書において企図される。ポリヌクレオチドは、例えば、発現ベクターにおいて、プロモーターに機能的に連結されていてよい。融合タンパク質を発現する発現ベクターを含む単離された細胞も、企図される。例えば、本明細書に開示される蛍光マーカが生物学的構造を含む場合、融合タンパク質および/または融合タンパク質を含む生物学的構造が産生されるよう、単離された細胞を培養することができる。

#### 【0013】

開示された蛍光マーカは、任意で、固体基板、例えば、蛍光顕微鏡法において利用され得る顕微鏡スライドに固定化されてもよい。従って、蛍光顕微鏡法を実施する方法も、本明細書において企図される。本法は、本明細書中に開示された蛍光マーカを利用し、蛍光顕微鏡法を実施しかつ/または蛍光マーカを画像化しながら、蛍光マーカからのまたは蛍光マーカが固定化された固体基板からの蛍光を検出する工程を含み得る。

#### 【0014】

蛍光顕微鏡法を実施するための開示された方法において、開示された蛍光マーカを、顕微鏡スライドなどの固体基板に適用することができる。その後、蛍光顕微鏡法を実施する前に、蛍光標識された試料をスライドに適用することができる。次いで、蛍光マーカからの蛍光を検出することができ、および/または蛍光マーカを画像化することができる。次いで、同時にまたは非同時に、蛍光顕微鏡法の実施中に、蛍光標識された試料からの蛍光を検出することができ、および/または蛍光標識された試料を画像化することができる。蛍光顕微鏡法を実施する方法において、マーカの蛍光標識は、試料の蛍光標識と同じであってもよいしまたは異なってもよい。蛍光マーカを、蛍光標識された試料と別々に画像化してもよいし、および/または蛍光マーカを、蛍光標識された試料と一緒に画像化してもよい。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1】クラミドモナス（Chlamydomonas）鞭毛の9+2軸系。（A、B）軸系の横断面および

縦断面。ラジアルスポーク（白色矢印）は、9本の外側ダブレットの各々にアンカリングされており、96nm毎に一对として出現した。（C）各ラジアルスポークは、2個のRSP3を含有しており、C末端がスポークヘッド領域に近い。96nmリピートのデジタルレンディションは、RSP3（左、EMデータベースID、5845；Oda et al., 2014）およびRSP3-ストレプトアビジン（右、EMデータベースID、5847）を有する鞭毛の低温電子断層撮影法から得られた。矢印、ストレプトアビジンタグ。バー、100nm。

【図2 A】RSP3-NG鞭毛はRSP3-GFP鞭毛より明るい。鞭毛内のRSP3-FP存在量のウェスタンブロット分析。野生型細胞（WT）、pf14細胞（RSP3変異体）、およびRSP3-NGトランスジェニックまたはRSP3-GFPトランスジェニックを発現するpf14細胞から、鞭毛試料を採集した。RSP3、および負荷対照としての外側ダイニンアームサブユニットIC78について、プロットを探索した。 10

【図2 B】RSP3-NG鞭毛はRSP3-GFP鞭毛より明るい。RSP3-NGトランスジェニック細胞（左）およびRSP3-GFPトランスジェニック細胞（右）の生細胞蛍光顕微鏡法。矢印、鞭毛。

【図2 C】RSP3-NG鞭毛はRSP3-GFP鞭毛より明るい。バックグラウンドの減算前の画像（上パネル）および減算後の画像における、RSP3-NG鞭毛およびRSP3-GFP鞭毛の蛍光強度の比較。細胞は顕微鏡法の前に共に混合された。示された領域において代表的な区域（矢印）の強度を測定し、強度プロファイルとしてプロットした。バー、10 μm。

【図3 A】RSP3-NGを有する鞭毛の蛍光強度の定量化。個々のRSP3-NG鞭毛は、類似の強度を有していた。各鞭毛を、ImageJプログラムを使用して、中央領域（上パネル）において測定した。相対強度をチャートにプロットした（下パネル、左）。最高強度の平均値を、ヒストグラムに提示した（下パネル、右）。 20

【図3 B】RSP3-NGを有する鞭毛の蛍光強度の定量化。重複領域は非重複領域のほぼ2倍の強度であった。重複領域（矢印、上パネル）および近傍の非重複領域の区域を測定した。ピーク強度（左下パネル）および平均値（右下パネル）をヒストグラムにプロットした。灰色、重複領域；青色、非重複領域。バー、10 μm。

【図4】RSP3-NGを有する外側ダブレットの蛍光強度。（A）ポリ-L-リジンによってコーティングされたスライドに付着した展開されたRSP3-NG鞭毛。展開は、カバーガラスを前後に穏やかに動かすことによる剪断力によって誘導された（上パネル）。部分展開された鞭毛（四角で囲まれた領域）を拡大した（下パネル）。色付きの線でマークされた三つの領域を測定した。赤色、3本のサブファイバー；オレンジ色、2本のサブファイバー；青色、完全領域（中央パネル）。相対強度を測定し、プロファイルプロットとして提示する（下パネル）。（B）未付着のRSP3-NG鞭毛の剪断によって生成された蛍光粒子（上パネル）。部分展開された鞭毛および断片化粒子（四角で囲まれた領域）を拡大した（中央パネル）。三つの領域における相対強度を測定し、プロットした（下パネル）。青色矢印、完全領域；赤色矢印、展開されたサブファイバー；緑色矢印、小粒子。バー、5 μm。 30

【図5 A】NGは、メタノール固定後、強度は低下したが蛍光を保持していた。メタノール処理されたRSP3-NG鞭毛または未処理のRSP3-NG鞭毛。ポリ-L-リジンによってコーティングされたスライドに固定化されたRSP3-NG鞭毛を、最初に-20℃メタノールで固定した。再水和および未固定鞭毛の添加の後に蛍光画像を得た（上パネル）。区域の相対強度（中央パネル）および平均値（下パネル）を測定した。青色、未固定；赤色、固定；矢印および灰色、固定された鞭毛における重複領域。 40

【図5 B】NGは、メタノール固定後、強度は低下したが蛍光を保持していた。EB1-NGを発現するWT細胞。ポリ-L-リジンによってコーティングされたスライドに固定化された細胞を、最初にメタノールで固定した。再水和および生細胞の添加の後に蛍光画像を得た（左パネル）。EB1-NGコメットは、1秒露光または10秒露光に関わらず、固定された細胞において類似した点状のヘッド（オレンジ色矢印）を有していた。対照的に、生細胞におけるコメット（青色矢印）は、成長中の微小管の伸長のため、10秒曝露後に、より長く見えた。マークされたコメットの相対強度を測定した（右パネル）。バー、10 μm。

【図6 A】蛍光強度標準物質としてのRSP3-NG鞭毛の適用。（A、B）鞭毛の先端にEB1-NGを有するRSP3-NG鞭毛と、細胞体にEB1-NGコメットを有するものとの比較。RSP3-NGまたは 50

EB1-NGを発現する細胞を、同じ焦平面において鞭毛の蛍光を画像化するため、スライドガラスに付着させた(A)。対応する強度測定値を右パネルにプロットした。青色、RSP3-NG；赤色、EB1-NG。

【図6B】蛍光強度標準物質としてのRSP3-NG鞭毛の適用。(A、B)鞭毛の先端にEB1-NGを有するRSP3-NG鞭毛と、細胞体にEB1-NGコメットを有するものとの比較。細胞体のコメットを測定するため、画像取得の前に、EB1-NG細胞を、単離されたRSP3-NG鞭毛と混合した(B)。対応する強度測定値を右パネルにプロットした。青色、RSP3-NG；赤色、EB1-NG。

【図6C】蛍光強度標準物質としてのRSP3-NG鞭毛の適用。(C、D)ミトコンドリアターゲットティングされたCOX4-GFPを発現するかまたはサイトゾルにSis1-GFPを発現する酵母株との、単離されたRSP3-NG鞭毛の比較。COX4-GFPはミトコンドリアチューブを装飾した(C中の緑色および赤色の矢印)。蛍光強度プロファイルは、Cox4-GFPの強度が、1個の細胞についてはRSP3-NG鞭毛のものと同様であり、他については2倍超高輝度であることを示した。

【図6D】蛍光強度標準物質としてのRSP3-NG鞭毛の適用。(C、D)ミトコンドリアターゲットティングされたCOX4-GFPを発現するかまたはサイトゾルにSis1-GFPを発現する酵母株との、単離されたRSP3-NG鞭毛の比較。Sis1-GFPの画分はスポット(D中の赤色円)に濃縮されていた。スポット(赤色円)の平均強度(全強度/選択された領域の面積)を、10本のRSP3-NG鞭毛の2 $\mu$ mセグメントのものと同様と比較した(青色四角)。ピーク強度の平均値を、ヒストグラムにプロットした。

【図7】蛍光鞭毛の多様化。現在の蛍光鞭毛は、RSP3-GFPまたはRSP3-NeonGreenを発現する藻類株に由来する。多様化のための一つの方式は、mCherryもしくはtdTomatoなどの異なる色の蛍光タンパク質に切り替えること；または化学反応を介してAlexa 488などの蛍光化合物にコンジュゲートされ得るSNAPタグタンパク質に切り替えることである。現在のDNA構築物は、タンパク質タグの容易な切り替えのために設計された。SNAPタグは、顧客が独自の標準物質を作出することを可能にするであろう。あるいは、蛍光担体RSP3を、異なる鞭毛タンパク質に切り替えることができる。これは、より高輝度である鞭毛を作成すること、または少なくとも2種を有することを可能にするであろう。

【発明を実施するための形態】

【0016】

詳細な説明

本明細書中に開示された主題は、以下および本願全体に示されるようないくつかの定義を使用して記載される。

【0017】

特記しない限り、本明細書において使用された用語は、関連技術分野の当業者による従来の用法に従って理解されるべきである。以下に提供される用語の定義に加えて、明細書、態様、および特許請求の範囲において使用されるように、「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その(the)」という用語は、その用語が使用される前後関係に応じて、一つまたは複数を意味し得ることを理解すべきである。例えば、「鞭毛」という用語は、「一つまたは複数の鞭毛」を意味すると解釈されるべきである。

【0018】

本明細書において使用されるように、「約」、「およそ」、「実質的に」、および「有意に」は、当業者によって理解され、それらが使用される前後関係に応じてある程度変動するであろう。それらが使用される前後関係があっても、当業者に明らかでないこれらの用語の使用が存在する場合、「約」および「およそ」は、特定の用語のプラスまたはマイナス10%を意味し、「実質的に」および「有意に」は、特定の用語のプラスまたはマイナス>10%を意味するであろう。

【0019】

本明細書において使用されるように、「含む(include)」および「含む(including)」という用語は、「含む(comprise)」および「含む(comprising)」という用語と同じ

10

20

30

40

50

意味を有する。「含む (comprise)」および「含む (comprising)」という用語は、特許請求の範囲に記載された成分に加えて付加的な成分の内含を許容する「非制限的な」接続用語であると解釈されるべきである。「なる」および「からなる」という用語は、特許請求の範囲に記載された成分以外の付加的な成分の内含を許容しない「制限的な」接続用語であると解釈されるべきである。「から本質的になる」という用語は、部分的に制限的であり、特許請求の範囲に記載された主題の性質を基本的に改変しない付加的な成分の内含のみを可能にすると解釈されるべきである。

#### 【0020】

本明細書において使用されるように、「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、アミド結合によって接合されたアミノ酸残基のポリマーを含む生物学的分子をさす。「アミノ酸残基」という用語には、アラニン (AlaまたはA)、システイン (CysまたはC)、アスパラギン酸 (AspまたはD)、グルタミン酸 (GluまたはE)、フェニルアラニン (PheまたはF)、グリシン (GlyまたはG)、ヒスチジン (HisまたはH)、イソロイシン (IleまたはI)、リジン (LysまたはK)、ロイシン (LeuまたはL)、メチオニン (MetまたはM)、アスパラギン (AsnまたはN)、プロリン (ProまたはP)、グルタミン (GlnまたはQ)、アルギニン (ArgまたはR)、セリン (SerまたはS)、トレオニン (ThrまたはT)、バリン (ValまたはV)、トリプトファン (TrpまたはW)、およびチロシン (TyrまたはY) の残基からなる群に含有されるアミノ酸残基が含まれるが、これらに限定されるわけではない。「アミノ酸残基」という用語には、ホモシステイン、2-アミノアジピン酸、N-エチルアスパラギン、3-アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、アラニン、アミノプロピオン酸、アロヒドロキシリジン酸、2-アミノ酪酸、3-ヒドロキシプロリン、4-アミノ酪酸、4-ヒドロキシプロリン、ペペリジン酸、6-アミノカプロン酸、イソデスモシン、2-アミノヘプタン酸、アロイソロイシン、2-アミノイソ酪酸、N-メチルグリシン、サルコシン、3-アミノイソ酪酸、N-メチルイソロイシン、2-アミノピメリン酸、6-N-メチルリジン、2,4-ジアミノ酪酸、N-メチルバリン、デスモシン、ノルバリン、2,2'-ジアミノピメリン酸、ノルロイシン、2,3-ジアミノプロピオン酸、オルニチン、およびN-エチルグリシンからなる群に含有されるアミノ酸残基も含まれ得る。典型的には、ペプチドのアミド結合は、1個のアミノ酸の骨格のアミノ基と、もう1個のアミノ酸の骨格のカルボキシル基とから形成される。

#### 【0021】

本明細書において使用されるように、「タンパク質」または「ポリペプチド」とは、「ペプチド」と比べて比較的長いアミノ酸のポリマーと定義される。タンパク質またはポリペプチドは、典型的には、50アミノ酸、60アミノ酸、70アミノ酸、80アミノ酸、90アミノ酸、または100アミノ酸を超えるアミノ酸長を有し、「ペプチド」とは、典型的には、50アミノ酸、40アミノ酸、30アミノ酸、20アミノ酸、またはそれ未満の長さの、短いアミノ酸のポリマーと定義される (Garrett & Grisham, Biochemistry, 2<sup>nd</sup> edition, 1999, Brooks/Cole, 110)。

#### 【0022】

本明細書において企図されるタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、非アミノ酸モエティを含むよう、さらに修飾されてもよい。修飾には、アシル化 (例えば、O-アシル化 (エステル)、N-アシル化 (アミド)、S-アシル化 (チオエステル))、アセチル化 (例えば、タンパク質のN末端またはリジン残基のいずれかにおけるアセチル基の付加)、ホルミル化、リポイル化 (例えば、C8官能基であるリポ酸の付加)、ミリストイル化 (例えば、C14飽和酸であるミリスチン酸の付加)、パルミトイル化 (例えば、C16飽和酸であるパルミチン酸の付加)、アルキル化 (例えば、リジン残基またはアルギニン残基におけるメチルなどのアルキル基の付加)、イソプレニル化またはプレニル化 (例えば、ファルネソールまたはゲラニルゲラニオールなどのイソプレノイド基の付加)、C末端におけるアミド化、グリコシル化 (例えば、糖タンパク質をもたらす、アスパラギン、ヒドロキシリジン、セリン、またはトレオニンのいずれかへのグリコシル基の付加) が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。糖の非酵素的付加と見なされる糖化とは別に、ポ

リシアリル化（例えば、ポリシアル酸の付加）、グリピエーション（glypiation）（例えば、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー形成、水酸化、（例えば、甲状腺ホルモンの）ヨウ素化、およびリン酸化（例えば、一般的には、セリン、チロシン、トレオニン、またはヒスチジンへのリン酸基の付加）。

#### 【0023】

開示されたタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドのバリエーションも、本明細書において企図される。本明細書において使用されるように、「バリエーション」とは、参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照ペプチド分子と異なるアミノ酸配列を有するタンパク質、ポリペプチド、またはペプチド分子をさす。バリエーションは、参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照ペプチドと比べて、アミノ酸残基の1個または複数個の挿入、欠失、または置換を有してよい。バリエーションには、参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照ペプチドの断片が含まれ得る。例えば、参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照ペプチドは、SEQ ID NO:1~7のアミノ酸配列のいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。RSP3バリエーション分子は、SEQ ID NO:1として提示されるRSP3全長ポリペプチドと比べて、少なくとも1個のアミノ酸残基の1個または複数個の挿入、欠失、または置換を有する。

10

#### 【0024】

「欠失」とは、参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照ペプチドと比べて、1個または複数個のアミノ酸残基の欠如をもたらすアミノ酸の変化をさす。欠失は、参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照ペプチドと比べて、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、50個、100個、200個、またはそれ以上のアミノ酸残基を除去する。欠失には、内部欠失または末端欠失（例えば、参照ポリペプチドのN末端短縮、C末端短縮、もしくは両方）が含まれ得る。

20

#### 【0025】

「断片」とは、配列は同一であるが、参照配列より長さが短いアミノ酸配列の一部分である。断片には、参照配列の全長より少なくとも1アミノ酸残基短いものまでが含まれ得る。例えば、断片は、それぞれ、参照ポリペプチドの5~1000個の連続アミノ酸残基を含み得る。いくつかの態様において、断片は、参照ポリペプチドの少なくとも5個、10個、15個、20個、25個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、150個、250個、または500個の連続アミノ酸残基を含んでいてもよい。断片は、好ましくは、分子の特定の領域から選択され得る。「少なくとも断片」という用語には、全長ポリペプチドが含まれる。断片には、全長と比べて（即ち、SEQ ID NO:1~7のいずれかと比べて）N末端短縮、C末端短縮、または両方が含まれ得る。RSP3の断片は、RSP3の連続アミノ酸配列を含むかまたはから本質的になることができる。

30

#### 【0026】

「挿入」および「付加」という単語は、1個または複数個のアミノ酸残基の付加をもたらすアミノ酸配列の変化をさす。挿入または付加とは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、150個、200個、またはそれ以上のアミノ酸残基をさすことができる。

#### 【0027】

融合タンパク質も本明細書において企図される。「融合タンパク質」とは、本明細書中に開示される少なくとも1個の第1のタンパク質（例えば、RSP3またはそのバリエーション）の、本明細書中に開示される少なくとも1個の第2の異種タンパク質またはそのバリエーション（例えば、GFPまたはNG）の分子との融合によって形成されたタンパク質をさす。異種タンパク質は、第1のタンパク質のN末端、C末端、または両端において融合してよい。融合タンパク質は、好ましくは、遺伝子融合によって、相互に会合した、第1のタンパク質の少なくとも断片またはバリエーションと、第2の異種タンパク質の少なくとも断片またはバリエーションを含む（即ち、融合タンパク質は、第1のタンパク質の全部または一部分をコードするポリヌクレオチドが、第2の異種タンパク質の全部または一部分をコードするポリヌクレオチドとインフレームで接合されている核酸の翻訳によって生成される）。第1

40

50

のタンパク質および第2の異種タンパク質は、融合タンパク質に含まれた後、各々、融合タンパク質の「部分」、「領域」、または「モエティ」と本明細書において呼ばれる場合がある（例えば、RSP3もしくはそのバリエーションを含んでよい「タンパク質部分」、または蛍光タンパク質もしくはそのバリエーションを含んでよい「第2の異種タンパク質部分」）。

#### 【0028】

「相同性」とは、二つ以上のポリペプチド配列の間の配列類似性、または交換可能に、配列同一性をさす。相同性、配列類似性、および配列同一率は、当技術分野における方法を使用して決定され、本明細書中に記載され得る。

#### 【0029】

ポリペプチド配列に適用される「パーセント同一性」および「%同一性」という語句は、標準化されたアルゴリズムを使用して整列化された少なくとも二つのポリペプチド配列の間の残基マッチの割合をさす。ポリペプチド配列整列化の方法は周知である。いくつかの整列化方法は、保存的アミノ酸置換を考慮に入れる。前記においてより詳細に説明されたそのような保存的置換は、一般に、置換の部位における電荷および疎水性を維持し、従って、ポリペプチドの構造（従って、機能）を保存する。アミノ酸配列のパーセント同一性は、当技術分野において理解されるように決定され得る（例えば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第7,396,664号を参照）。一般的に使用されており、自由に利用可能な配列比較アルゴリズムのスイートは、NCBI (Bethesda, Md.) を含むいくつかの供給元からそのウェブサイトで入手可能である、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410) によって提供される。BLASTソフトウェアスイートは、既知のアミノ酸配列を多様なデータベースからの他のアミノ酸配列と整列化するために使用される「blastp」を含む様々な配列分析プログラムを含む。

#### 【0030】

パーセント同一性は、例えば、特定のSEQ ID番号によって定義される明確なポリペプチド配列の全長において測定されてもよいし、またはより短い長さにおいて、例えば、より大きい明確なポリペプチド配列から得られた断片、例えば、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも70個、もしくは少なくとも150個の連続残基の断片の長さにおいて測定されてもよい。そのような長さは、例示的なものに過ぎず、本明細書、表、図面、または配列表に示された配列によってサポートされる任意の断片長が、パーセント同一性を測定することができる長さを記載するために使用され得る。

#### 【0031】

特定のポリペプチド配列の「バリエーション」とは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトで入手可能な「BLAST 2 Sequences」ツールと共にblastpを使用して、ポリペプチド配列のうちの一つのある長さにおいて特定のポリペプチド配列と少なくとも50%の配列同一性を有するポリペプチド配列と定義され得る (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250を参照)。そのようなポリペプチドの対は、例えば、ポリペプチドのうちの一つのある明確な長さにおいて、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、またはそれ以上の配列同一性を示し得る。「バリエーション」は、参照ポリペプチドと実質的に同じ機能的活性を有し得る。例えば、バリエーションは、PEDFに関連する一つまたは複数の生物学的活性を示し得る。「実質的に単離されたまたは精製された」核酸またはアミノ酸の配列が、本明細書において企図される。「実質的に単離されたまたは精製された」という用語は、天然環境から除去された核酸またはアミノ酸の配列を意味し、天然に関連している他の成分を、少なくとも60%含まず、好ましくは、少なくとも75%含まず、より好ましくは、少なくとも90%含まず、さ

10

20

30

40

50

らに好ましくは、少なくとも95%含まない。

【0032】

本明細書において企図されるアミノ酸配列またはタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドは、参照アミノ酸配列に対する保存的アミノ酸置換を含んでよい。例えば、バリエーション、変異体、もしくは誘導体ペプチドは、参照分子に対する保存的アミノ酸置換を含んでよい。「保存的アミノ酸置換」とは、参照ポリペプチドの特性に最小に干渉すると予測される、あるアミノ酸の異なるアミノ酸との置換である置換である。換言すると、保存的アミノ酸置換は、参照ポリペプチドの構造および機能を実質的に保存する。以下の表は、本明細書において企図される例示的な保存的アミノ酸置換のリストを提供する。

元の残基	保存的置換
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Glu, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Glu	Asn, Glu, His
Gln	Asp, Glu, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Glu, Lys
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Glu, Lys
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

10

20

【0033】

保存的アミノ酸置換は、一般に、(a) 例えば、シートもしくはヘリックスコンフォメーションとしての、置換の区域におけるポリペプチド骨格の構造、(b) 置換の部位における分子の電荷もしくは疎水性、および/または(c) 側鎖のかさを維持する。

30

【0034】

開示されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはそれらのバリエーションは、参照ポリペプチドによって示される一つまたは複数の機能的または生物学的な活性(例えば、RSP3によって示される一つまたは複数の機能的または生物学的な活性)を有し得る。例えば、断片などのバリエーションタンパク質は、RSP3、GFP、またはNGなどの参照タンパク質に関連した一つまたは複数の生物学的活性を示し得る。RSP3のバリエーションは、ダイマー形成ならびに微小管および軸糸との会合を含むが、これらに限定されるわけではない、RSP3に関連した一つまたは複数の生物学的活性を示し得る。

【0035】

ポリヌクレオチド、例えば、本明細書中に開示されるポリペプチドおよびタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列(例えば、SEQ ID NO:1~7のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、またはSEQ ID NO:1~7のいずれかと少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドバリエーションをコードするDNA)も、本明細書中に開示される。

40

【0036】

「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「核酸」、および「核酸配列」という用語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド(これらの用語は交換可能に使用され得る)、またはそれらの断片をさす。これらの語句は、(一本鎖であってもよいしまたは二本鎖であってもよく、センス鎖を表してもよいしまたはアンチセンス

50

鎖を表してもよい)ゲノム起源、天然起源、または合成起源のDNAまたはRNAもさす。

【0037】

ポリヌクレオチド配列に関して、「パーセント同一性」および「%同一性」という用語は、標準化されたアルゴリズムを使用して整列化された少なくとも二つのポリヌクレオチド配列の間の残基マッチの割合をさす。そのようなアルゴリズムは、二つの配列の間の整列化を最適化し、従って、二つの配列のより有意義な比較を達成するため、標準化された再現可能な方式で、比較される配列にギャップを挿入することができる。核酸配列のパーセント同一性は、当技術分野において理解されるように決定され得る(例えば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第7,396,664号を参照)。一般的に使用されており自由に利用可能な配列比較アルゴリズムのスイートは、NCBI(Bethesda, Md.)を含むいくつかの供給元からそのウェブサイトで入手可能である、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって提供される。BLASTソフトウェアスイートは、既知のポリヌクレオチド配列を、多様なデータベースからの他のポリヌクレオチド配列と整列化するために使用される「blastn」を含む様々な配列分析プログラムを含む。二つのヌクレオチド配列の直接的な対比較のために使用される「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールも、利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、NCBIウェブサイトにおいてアクセスされ、インタラクティブに使用され得る。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastnおよびblastp(前述)の両方のために使用され得る。

10

【0038】

ポリヌクレオチド配列に関して、パーセント同一性は、例えば、特定のSEQ ID番号によって定義される明確なポリヌクレオチド配列の全長において測定されてもよいし、または、より短い長さにおいて、例えば、より大きい明確な配列から得られた断片、例えば、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも70個、少なくとも100個、もしくは少なくとも200個の連続ヌクレオチドの断片の長さにおいて測定されてもよい。そのような長さは、例示的なものに過ぎず、本明細書、表、図面、または配列表に示された配列によってサポートされる任意の断片長が、パーセント同一性を測定することができる長さを記載するために使用され得ることが理解される。

20

【0039】

ポリヌクレオチド配列に関して、「バリエーション」、「変異体」、または「誘導体」とは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトで入手可能な「BLAST 2 Sequences」ツールと共にblastnを使用して、核酸配列のうちの一つのある長さにおいて特定の核酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有する核酸配列と定義され得る(Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250を参照)。そのような核酸の対は、ある明確な長さにおいて、例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

30

40

【0040】

複数のコドンが単一のアミノ酸をコードし得る遺伝暗号の縮重のため、高度の同一性を示さない核酸配列であっても、類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。全て実質的に同じタンパク質をコードする複数の核酸配列を作製するため、この縮重を使用して、核酸配列を変化させ得ることが理解される。例えば、本明細書において企図されるポリヌクレオチド配列は、タンパク質をコードすることができ、特定の宿主における発現のためにコドン最適化され得る。当技術分野において、ヒト、マウス、ラット、ブタ、大腸菌、植物、およびその他の宿主細胞を含む多数の宿主生物について、コドン使用頻度表が準備されている。

【0041】

50

「組換え核酸」は、天然に存在しない配列であるか、またはそうでなければ分離されている2個以上の配列のセグメントの人工的な組み合わせによって作成される配列を有する。この人工的な組み合わせは、しばしば、化学合成によって達成され、より一般的には、核酸の単離されたセグメントの人工的操作によって、例えば、当技術分野において公知の遺伝子加工技術によって達成される。組換えという用語には、核酸の一部分の付加、置換、または欠失によってのみ改変された核酸が含まれる。組換え核酸は、プロモーター配列に機能的に連結された核酸配列を含むことが多い。そのような組換え核酸は、例えば、細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部であり得る。

【0042】

本明細書中に開示された核酸は、「実質的に単離されたまたは精製された」ものであり得る。「実質的に単離されたまたは精製された」という用語は、天然環境から除去されており、天然に関連している他の成分を少なくとも60%含まず、好ましくは、少なくとも75%含まず、より好ましくは、少なくとも90%含まず、さらに好ましくは、少なくとも95%含まない核酸をさす。

【0043】

「形質転換」または「トランスフェクトされた」とは、外来性の核酸（例えば、DNAまたはRNA）がレシピエント細胞へ導入される過程を記載する。形質転換またはトランスフェクションは、当技術分野において周知の様々な方法に従って、天然または人工の条件の下で行われてよく、原核宿主細胞または真核宿主細胞への外来核酸配列の挿入の任意の公知の方法によることができる。形質転換またはトランスフェクションの方法は、形質転換される宿主細胞のタイプに基づき選択され、バクテリオファージまたはウイルス感染または非ウイルス送達を含み得るが、これらに限定されるわけではない。核酸の非ウイルス送達の方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、微量注入、電気穿孔、熱ショック、粒子衝撃、遺伝子銃、ピロソーム、リボソーム、イムノリボソーム、ポリカチオン、または脂質:核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ピリオン、およびDNA取り込みの薬剤による増強が含まれる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、第4,946,787号；および第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofectin（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションのために適切なカチオン性および中性の脂質には、Feigner、WO91/17424；WO91/16024のものが含まれる。送達は、細胞になされてもよいし（例えば、インビトロ投与もしくはエキスピボ投与）、または標的組織になされてもよい（例えば、インビボ投与）。「形質転換された細胞」または「トランスフェクトされた細胞」という用語には、挿入されたDNAが自律複製性プラスミドまたは宿主染色体の一部のいずれかとして複製可能である、安定的に形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞が含まれ、限定された期間、挿入されたDNAまたはRNAを発現する、一過性に形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞も含まれる。

【0044】

本明細書において企図されるポリヌクレオチド配列は、発現ベクター内に存在してもよい。例えば、ベクターは、(a) タンパク質のORFをコードするポリヌクレオチド；(b) 標的DNA配列のRNAによって媒介される結合、ニッキング、および/または切断を指図するRNAを発現するポリヌクレオチド；ならびに(a)および(b)の両方を含み得る。ベクター内に存在するポリヌクレオチドは、原核生物または真核生物のプロモーターに機能的に連結されていてよい。「機能的に連結された」とは、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係に置かれている状況をさす。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に連結されている。機能的に連結されたDNA配列は、近接または隣接していてよく、二つのタンパク質コード領域を接合する必要がある場合、同じリーディングフレーム内であってよい。本明細書において企図されるベクターは、タンパク質をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結された異種プロモーター（例えば、真核生物または原核生物のプロモーター）を含み得る。「異種プロモーター」とは、発現されるタンパク質またはRNAのためのネイティブまたは内

10

20

30

40

50

在性のプロモーターではないプロモーターをさす。

【0045】

本明細書において使用されるように、「発現」とは、ポリヌクレオチドが、DNA鋳型から（例えば、mRNAもしくはその他のRNA転写物へ）転写される過程、および/または転写されたmRNAが、その後、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質へ翻訳される過程をさす。転写物およびコードされたポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」と呼ばれ得る。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現には、真核細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれ得る。

【0046】

「ベクター」という用語は、核酸（例えば、DNA）を宿主生物または宿主組織に導入することができる手段をさす。プラスミドベクター、バクテリオファージベクター、コスミドベクター、細菌ベクター、およびウイルスベクターを含む様々なタイプのベクターが存在する。本明細書において使用されるように、「ベクター」とは、異種ポリペプチド（例えば、本明細書中に開示された融合タンパク質）を発現するよう加工された組換え核酸をさすことができる。組換え核酸は、典型的には、異種ポリペプチドの発現のためのシス作用性要素を含む。

【0047】

真核細胞における発現のために使用される従来のベクターのいずれかを、DNAを対象へ直接導入するために使用することができる。真核生物ウイルス由来の制御要素を含有している発現ベクターは、真核生物発現ベクターにおいて使用され得る（例えば、SV40、CMV、またはレトロウイルスのプロモーターまたはエンハンサーを含有しているベクター）。例示的なベクターには、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、およびラウス肉腫ウイルスプロモーターなどのプロモーターの指図の下でタンパク質を発現するものが含まれる。本明細書において企図される発現ベクターは、異種タンパク質（例えば、本明細書中に開示された融合タンパク質）の発現をモジュレートする真核生物または原核生物の調節配列を含んでいてよい。原核生物発現調節配列には、構成性もしくは誘導性のプロモーター（例えば、T3、T7、Lac、trp、もしくはphoA）、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターが含まれ得る。

【0048】

本明細書において企図されるベクターを、原核生物へ導入し、繁殖させ、それを、真核細胞へ導入されるベクターのコピーを増幅するため、または真核細胞へ導入されるベクターの作製における中間ベクターとして使用することができる（例えば、ウイルスベクターパッケージング系の一部としてのプラスミドの増幅）。原核生物は、ベクターのコピーを増幅し、1種または複数種の核酸を発現させるため、例えば、宿主細胞または宿主生物への送達のための1種または複数種のタンパク質の起源を提供するため、使用され得る。原核生物におけるタンパク質の発現は、タンパク質またはタンパク質を含む融合タンパク質またはそれらの断片のいずれかの発現を指図する構成性または誘導性のプロモーターを含有しているベクターを含む大腸菌を使用して実施され得る。融合ベクターは、そこにコードされたタンパク質に、例えば、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。そのような融合ベクターは、一つまたは複数の目的のため、例えば、(i) 組換えタンパク質の発現を増加させるため；(ii) 組換えタンパク質の溶解度を増加させるため、(iii) アフィニティ精製におけるリガンド（例えば、Hisタグ）として作用することによって組換えタンパク質の精製を補助するため；(iv)（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）または標識された抗体によって認識され得る抗原（例えば、HA）などの）同定のためのタグを組換えタンパク質に付加するため；(v) 細胞の特定の区域への組換えタンパク質の局在化を促進するため（例えば、SV40のNLSを含み得る核移行シグナル（NLS）、ヌクレオプラスミン、C-myc、hnRNP A1のM9ドメイン、または合成NLSに（例えば、N末端またはC末端で）タンパク質が融合している場合）役立ち得る。NLSにおける中性アミノ酸および酸性アミノ酸の重要性が研究されている（Makkerh et al.(1996)Curr Biol 6(8):1

10

20

30

40

50

025-1027を参照)。しばしば、融合発現ベクターにおいては、融合タンパク質の精製後の組換えタンパク質の融合モエティからの分離を可能にするため、融合モエティと組換えタンパク質との接合部にタンパク質切断部位が導入される。そのような酵素およびそれらの同族認識配列には、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼが含まれる。

【0049】

例示的な態様

以下の態様は、例示的なものであって、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【0050】

蛍光マーカが開示される。開示された蛍光マーカは、蛍光標識された試料を定量化するか、または蛍光標識された試料を他の方法で査定するため、蛍光顕微鏡法において利用され得る。

10

【0051】

開示された蛍光マーカは、典型的には、管状または円柱状の生物学的構造を含む。典型的には、蛍光マーカの生物学的構造は、蛍光顕微鏡法において使用するために適切であるような寸法を有する。いくつかの態様において、生物学的構造は、約2mm未満、約1mm未満、約0.5mm未満、約0.2mm未満、約0.1mm未満、約0.05mm未満、約0.02mm未満、約0.01mm未満、約0.005mm未満、約0.002mm未満、もしくはそれ未満の長さを有し；かつ/または生物学的構造は、約0.001mm超、約0.002mm超、約0.005mm超、約0.01mm超、約0.02mm超、約0.05mm超、約0.1mm超、約0.2mm超、約0.5mm超、もしくは約1mm超の長さを有するか；または生物学的構造は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内の長さを有してよい。蛍光マーカの生物学的構造は、典型的には、直径(D)より有意に大きい長さ(L)を有し、例えば、比L/Dは、典型的には、約5超、約10超、約20超、約30超、約40超、約50超、約100超、約200超、約500超、約1000超、もしくはそれ以上であるか、または比L/Dは、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内である。マーカの生物学的構造は、典型的には、約1000nm未満、約500nm未満、約400nm未満、約300nm未満、約200nm未満、約100nm未満、約50nm未満、約40nm未満、約30nm未満、約20nm未満、約10nm未満の直径を有し；かつ/または生物学的構造は、約0.5nm超、約1nm超、約5nm超、もしくはそれ以上の直径を有するか；または生物学的構造は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内、例えば、20~30nmもしくは100~400nmの長さを有してよい。

20

30

【0052】

いくつかの態様において、生物学的構造は、微小管、または、ダブレット微小管、軸系、もしくは鞭毛、例えば、真核生物の鞭毛などの、微小管を含むマクロ構造である。開示された蛍光マーカにおいて、微小管の寸法は変動し得るが、典型的には、開示されたマーカの微小管は、約100nm未満、約50nm未満、約40nm未満、約30nm未満、約20nm未満、もしくは約10nm未満の外径を有し；かつ/または微小管は、約1nm超、約5nm超、約10nm超、約20nm超、約30nm超、約40nm超、もしくは約50nm超の外径を有するか；または微小管は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内、例えば、20~30nm、もしくはおよそ24nmの外径を有する。開示された蛍光マーカにおいて、微小管は、典型的には、約0.001mm超、約0.002mm超、約0.005mm超、約0.01mm超、約0.02mm超、約0.05mm超、約0.1mm超、約0.2mm超、約0.5mm超、もしくは約1mm超の長さを有し；かつ/または微小管は、約2mm未満、約1mm未満、約0.5mm未満、約0.2mm未満、約0.1mm未満、約0.05mm未満、約0.02mm未満、約0.01mm未満、約0.005mm未満、もしくは約0.002mm未満の長さを有してよく；または微小管は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内の長さを有してよい。

40

【0053】

いくつかの態様において、生物学的構造は、当技術分野において公知のA微小管およびB微小管を含むダブレット微小管である。開示された蛍光マーカにおいて、ダブレット微小管の寸法は変動し得るが、典型的には、開示されたマーカのダブレット微小管は、約100nm未満、約50nm未満、約40nm未満、約30nm未満、約20nm未満、もしくは約10nm未満の

50

平均有効外径を有し；かつ/または微小管は、約1nm超、約5nm超、約10nm超、約20nm超、約30nm超、約40nm超、もしくは約50nm超の外径を有するか；またはダブレット微小管は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内、例えば、20～30nm、もしくはおよそ24nmの平均有効外径を有する。開示された蛍光マーカーにおいて、ダブレット微小管は、典型的には、約0.001mm超、約0.002mm超、約0.005mm超、約0.01mm超、約0.02mm超、約0.05mm超、約0.1mm超、約0.2mm超、約0.5mm超、もしくは約1mm超の長さを有し；かつ/またはダブレット微小管は、約2mm未満、約1mm未満、約0.5mm未満、約0.2mm未満、約0.1mm未満、約0.05mm未満、約0.02mm未満、約0.01mm未満、約0.005mm未満、もしくは約0.002mm未満の長さを有してよく；または微小管は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内の長さを有してよい。

10

## 【0054】

いくつかの態様において、生物学的構造は、軸系、または軸系を含む鞭毛（例えば、細胞膜に囲まれた軸系）である。軸系は、当技術分野において公知の微小管およびダブレット微小管の9+2構成を含む。開示された蛍光マーカーにおいて、軸系または鞭毛の寸法は変動し得るが、典型的には、軸系もしくは鞭毛は、約100nm超、約150nm超、約200nm超、約250nm超、約300nm超、約350nm超、約400nm超、約450nm超、もしくは約500nm超の直径を有し；かつ/または軸系もしくは鞭毛は、約500nm未満、約450nm未満、約400nm未満、約350nm未満、約300nm未満、約250nm未満、約200nm未満、約150nm未満、もしくは約100nm未満の直径を有するか；または軸系もしくは鞭毛は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内、例えば、100～400nm、もしくは約250nmの直径を有する。開示された蛍光マーカーにおいて、軸系もしくは鞭毛は、典型的には、約0.001mm超、約0.002mm超、約0.005mm超、約0.01mm超、約0.02mm超、約0.05mm超、約0.1mm超、約0.2mm超、約0.5mm超、もしくは約1mm超の長さを有し；かつ/または軸系もしくは鞭毛は、約2mm未満、約1mm未満、約0.5mm未満、約0.2mm未満、約0.1mm未満、約0.05mm未満、約0.02mm未満、約0.01mm未満、約0.005mm未満、もしくは約0.002mm未満の長さを有してよく；または軸系もしくは鞭毛は、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内の長さを有してよい。

20

## 【0055】

開示された蛍光マーカーの生物学的構造は、典型的には、複数コピーの少なくとも1種の構造タンパク質（SP）によって形成される。例えば、複数コピーの構造タンパク質は、非共有結合的に相互に会合するかまたは集合して、生物学的構造を形成してよい。いくつかの態様において、複数コピーの構造タンパク質は、（例えば、ヘリックスの1ターン当たり13コピーの構造タンパク質を有する）らせん状のコンフォメーションへと集合する。適切な構造タンパク質には、チューブリン、チューブリン、またはヘテロダイマーのようなそれらの組み合わせ、などのチューブリンタンパク質が含まれ得る。構造タンパク質は、集合して、微小管またはダブレット微小管を形成してよい。従って、生物学的構造には、微小管もしくはダブレット微小管、または微小管およびダブレット微小管の9+2構成を有する軸系、もしくは軸系を含む鞭毛（例えば、細胞膜に囲まれた軸系）などの、1個もしくは複数個の微小管もしくはダブレット微小管を含むマクロ構造が含まれ得る。

30

## 【0056】

蛍光マーカーの生物学的構造は、複数コピーの蛍光標識されたタンパク質（FP）を含む。蛍光タンパク質は、生物学的構造の長さに沿って規則的に点在しており、従って、蛍光タンパク質は、生物学的構造において周期性を示すことができる。例えば、生物学的構造は、生物学的構造の単位長さ当たり（例えば、生物学的構造の長さおよそ100nm当たり、96nm当たり）2個、4個、6個、8個、10個、12個、14個、16個、18個、20個、22個、24個、26個、28個、30個、32個、34個、36個、38個、40個、42個、44個、46個、48個、50個、52個、54個、56個、58個、60個、62個、64個、66個、68個、70個、72個、74個、76個、78個、80個、82個、84個、86個、88個、90個、92個、94個、96個、98個、100個、102個、104個、106個、108個、110個、112個、114個、116個、118個、120個、122個、124個、126個、128個、130個、132個、134個、136個、138個、140個、142個、144個、146個、148

40

50

個、150個、152個、154個、156個、158個、160個、162個、164個、166個、168個、170個、172個、174個、176個、178個、180個、182個、184個、186個、188個、190個、192個、194個、196個、198個、もしくは200個の蛍光タンパク質より選択される任意の数の蛍光タンパク質を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなっているもよいし、または生物学的構造は、生物学的構造の単位長さ当たり、これらの値のいずれかの二つによって囲まれた範囲内の任意の数の蛍光タンパク質を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなっているもよい。例えば、いくつかの態様において、生物学的構造は、（例えば、生物学的構造が微小管である場合）生物学的構造の長さ96nm当たり、およそ2個の蛍光タンパク質を有してよく、または生物学的構造は、（例えば、生物学的構造がダブルット微小管である場合）生物学的構造の長さ96nm当たりおよそ4個の蛍光タンパク質を有してよく、または生物学的構造は、（例えば、生物学的構造が軸系である場合）生物学的構造の長さ96nm当たりおよそ36個の蛍光タンパク質を有してよい。蛍光タンパク質は、生物学的構造の長さに沿って規則的に点在しているため、生物学的構造は、生物学的構造の単位長さ当たりの蛍光タンパク質の既知の化学量論を有し、生物学的構造の長さを測定することによって、構造内に存在する蛍光タンパク質の数を推定することができる。

10

**【0057】**

蛍光標識されたタンパク質は、蛍光タンパク質部分と、生物学的構造へと会合または集合する部分とを含む融合タンパク質を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。生物学的構造へと会合または集合する融合タンパク質の部分は、融合タンパク質のアンカー部分とも呼ばれ、このアンカー部分は、蛍光タンパク質部分を生物学的構造にアンカリングする。蛍光タンパク質部分は、アンカー部分のN末端、C末端、または任意の位置に融合してよいが、典型的には、蛍光タンパク質部分は、直接、または約10アミノ酸未満、9アミノ酸未満、8アミノ酸未満、7アミノ酸未満、6アミノ酸未満、5アミノ酸未満、4アミノ酸未満、3アミノ酸未満、2アミノ酸未満、もしくは1アミノ酸未満のアミノ酸リンカーを介して、アンカー部分のC末端に融合している。

20

**【0058】**

例えば、融合タンパク質のアンカー部分として、生物学的構造の融合タンパク質のために適切なタンパク質またはそのバリエーションには、微小管、ダブルット微小管、または軸系の長さに沿って規則的に点在しているタンパク質が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、例えば、生物学的構造が、微小管、または軸系もしくは鞭毛などの微小管およびダブルット微小管を含むマクロ構造である場合、生物学的構造は、微小管と会合したラジアルスポークタンパク質（RS）もしくはそのバリエーションの融合タンパク質を含む。適切なRSタンパク質には、ラジアルスポークタンパク質3が含まれ得る。コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）のRSP3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:1として提供される。従って、融合タンパク質のために適切なタンパク質には、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列、または少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すそのバリエーションが含まれ得、好ましくは、タンパク質またはバリエーションは、生物学的構造へと会合または集合する。

30

**【0059】**

蛍光マーカーのために適切な他のタンパク質には、鞭毛関連タンパク質20（FAP20）などの鞭毛関連タンパク質が含まれ得る（例えば、コナミドリムシFAP20の配列は、SEQ ID NO:8として提供される）。例えば、FAP20は、ふさわしい鞭毛タンパク質担体であり（Yanagisawa et al., 2014）、RSP3より多く存在する可能性が高い。（例えば、以下の実施例セクションに記載されるクラミドモナスの株において）FAP20-NGおよびFAP20-mCherryなどの融合タンパク質を作出するため、FAP20を利用することができる。FAP20は、RSP3より多く鞭毛中に存在するため、FAP20-NG鞭毛は、RSP3-NG鞭毛より高輝度である可能性がある。FAP20-mCherryも、赤色蛍光標準物質を提供することができる。（例えば、クラミドモナスなどの）生物のFAP20-mCherry株をRSP3-NG株と交配して、二重変異体を作成することができる。RSP3-NGおよびFAP20-mCherryの両方を有する二重タグ付き鞭毛は、二重標識

40

50

試料のための標準物質として役立つであろう。もう一つの生成物は、下記のRSP3-SNAPタグ-グアニン-Alexa488鞭毛へ変換され得るRSP3-SNAPタグ鞭毛である（例えば、融合タンパク質がアダプター部分を含む場合）。他の適切な担体には、ラジアルスポークのサブユニット（Oda et al., 2014）、ダイニンモーター（Hom et al., 2012）、中心対装置（Teves et al., 2016）、および軸系内の微小管関連複合体（例えば、King and Patel-King, 2015; Norrander et al., 2000）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。テトラヒメナ（Tetrahymena）およびゾウリムシ（Paramecium）などの他の線毛生物において、類似の戦略を再現することができる。

【0060】

例えば、融合タンパク質の蛍光タンパク質部分として、生物学的構造の融合タンパク質のために適切なタンパク質またはそのバリエーションには、緑色蛍光タンパク質（GFP）、高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）、mNeonGreenタンパク質（NG）、高感度青色蛍光タンパク質（EBFP）、mCherry蛍光タンパク質、tdTomato蛍光タンパク質、高感度シアン蛍光タンパク質（ECFP）、Midoriishi-Cyan1タンパク質、AmCyan1タンパク質、Azami-Greenタンパク質、mAzami-Green1タンパク質、ZsGreen1、高感度黄色蛍光タンパク質（EYFP）、Venusタンパク質、ZsYellowタンパク質、Kusabira-Orange1タンパク質、およびmKusabira-Orange1タンパク質が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない（内容全体が参照によって本明細書に組み入れられるSuzuki et al., "Recent Advanced in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy, Acta Histochem. Cytochem. 40(5):131-137, 2007を参照）。GFPのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2として提供され、NGのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:3として提供される。従って、融合タンパク質のために適切なタンパク質には、SEQ ID NO:2もしくはSEQ ID NO:3、または少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すそれらのバリエーションのアミノ酸配列が含まれ得、好ましくは、タンパク質またはバリエーションは、生物学的構造へと会合または集合する。

【0061】

例示的な融合タンパク質には、GFP、NG、またはそれらのバリエーションなどの蛍光タンパク質のアミノ酸配列のC末端に融合した、RSP3（例えば、コナミドリムシのRSP3またはそのバリエーション）のアミノ酸配列を含む融合タンパク質が含まれ得る。いくつかの態様において、融合タンパク質は、SEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:5、またはSEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:5と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するそれらのバリエーションのアミノ酸配列を含む。

【0062】

示されるように、本明細書中に開示された融合タンパク質は、蛍光タンパク質またはそのバリエーションのアミノ酸配列に融合した、微小管に関連したラジアルスポークタンパク質（RSP）またはそのバリエーションのアミノ酸配列を含んでいてよい。いくつかの態様において、蛍光タンパク質のアミノ酸配列は、RSPのアミノ酸配列のC末端に融合している。適切なRSPには、ラジアルスポークタンパク質3（RSP3）が含まれ得るが、これに限定されるわけではない。適切な蛍光タンパク質には、GFP、EGFP、NG、EBFP、ECFP、Midoriishi-Cyan1タンパク質、AmCyan1タンパク質、Azami-Greenタンパク質、mAzami-Green1タンパク質、ZsGreen1、EYFP、Venusタンパク質、ZsYellowタンパク質、Kusabira-Orange1タンパク質、およびmKusabira-Orange1タンパク質が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。

【0063】

いくつかの態様において、開示された融合タンパク質は、蛍光タンパク質ではなく非タンパク質フルオロフォアを含み得る、蛍光標識としてのフルオロフォアに結合するためのアダプタータンパク質（またはアダプターの一部分（即ち、「アダプター部分」））のアミノ酸配列に融合した、微小管に関連したラジアルスポークタンパク質（RSP）またはそのバリエーションのアミノ酸配列を含んでいてもよい。例えば、開示された融合タンパク質は、アダプター部分に融合したアンカー部分を含んでいてよく、融合タンパク質のアダプタ

10

20

30

40

50

一部分がフルオロフォア標識に結合する。適切なアダプタータンパク質には、非タンパク質フルオロフォア標識を含み得る、ストレプトアビジンがコンジュゲートされているフルオロフォア標識に結合するビオチン化ポリペプチドが含まれ得る。従って、開示された蛍光標識された融合タンパク質は、ストレプトアビジンがコンジュゲートされているフルオロフォア標識に結合するビオチン化アダプターポリペプチドに融合したアンカー部分を含んでいてよい。アダプタータンパク質の例には、AviTagまたはビオチンカルボキシルキャリアタンパク質 (BCCP) などのビオチン化ポリペプチドおよびSNAPタグ (New England Biolabsより入手可能) が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。融合タンパク質の15アミノ酸AviTagまたは9kD BCCPの部分は、BirA酵素を使用して、インビボまたはインビトロでビオチン化され得る。精製された融合タンパク質、または融合タンパク質を含む精製された生物学的構造 (例えば、ビオチン化鞭毛) は、インビトロで、ストレプトアビジンがコンジュゲートされている蛍光を発する化合物と共にインキュベートされ得る。SNAPタグは、フルオロフォアのベンジルグアニン (BG) 誘導体と特異的かつ迅速に反応し、BGフルオロフォアによるSNAPタグの不可逆的な共有結合性の標識をもたらす、DNA修復タンパク質O<sup>6</sup>-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼの20kDa変異体である (図7を参照)。

#### 【 0 0 6 4 】

従って、融合タンパク質のいくつかの態様において、蛍光タンパク質部分は、蛍光標識としてのフルオロフォアに共有結合的または非共有結合的に結合するアダプタータンパク質部分により交換される。適切なフルオロフォアには、1,5 IAEDANS ; 1,8-ANS ; 4-メチルウンベリフェロン ; 5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン ; 5-カルボキシフルオレセイン (5-FAM) ; 5-カルボキシテトラメチルローダミン (5-TAMRA) ; 5-FAM (5-カルボキシフルオレセイン) ; 5-HAT (ヒドロキシトリプタミン) ; 5-ヒドロキシトリプタミン (HAT) ; 5-ROX (カルボキシ-X-ローダミン) ; 5-TAMRA (5-カルボキシテトラメチルローダミン) ; 6-カルボキシローダミン6G ; 6-CR 6G ; 6-JOE ; 7-アミノ-4-メチルクマリン ; 7-アミノアクチノマイシンD (7-AAD) ; 7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン ; 9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン ; ABQ ; 酸性フクシン ; ACMA (9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン) ; アクリジンオレンジ ; アクリジンレッド ; アクリジンイエロー ; アクリフラビン ; アクリフラビンフォイルゲン (Feulgen) SITSA ; Alexa Fluor 350 (商標) ; Alexa Fluor 430 (商標) ; Alexa Fluor 488 (商標) ; Alexa Fluor 532 (商標) ; Alexa Fluor 546 (商標) ; Alexa Fluor 568 (商標) ; Alexa Fluor 594 (商標) ; Alexa Fluor 633 (商標) ; Alexa Fluor 647 (商標) ; Alexa Fluor 660 (商標) ; Alexa Fluor 680 (商標) ; アリザリンコンプレキソン ; アリザリンレッド ; アロフィコシアニン (APC) ; AMC ; AMCA-S ; AMCA (アミノメチルクマリン) ; AMCA-X ; アミノアクチノマイシンD ; アミノクマリン ; アミノメチルクマリン (AMCA) ; アニリンブルー ; ステアリン酸アンスロシル (Anthrocyll) ; APC (アロフィコシアニン) ; APC-Cy7 ; APTS ; アストラゾンブリリアントレッド4G ; アストラゾンオレンジR ; アストラゾンレッド6B ; アストラゾンイエロー-7 GLL ; アタブリン (Atabrine) ; ATTO-TAG (商標) CBQCA ; ATTO-TAG (商標) FQ ; オーラミン ; オーロホスフィン (Aurophosphine) G ; オーロホスフィン ; BAO 9 (ビスアミノフェニルオキサジアゾール) ; ベルベリン硫酸塩 ; ラクタマーゼ ; ビマン (Bimane) ; ビスベンズアミド ; ビスベンズイミド (ヘキスト) ; ブランコホル (Blancophor) FFG ; ブランコホルSV ; BOBO (商標) -1 ; BOBO (商標) -3 ; Bodipy 492/515 ; Bodipy 493/503 ; Bodipy 500/510 ; Bodipy 505/515 ; Bodipy 530/550 ; Bodipy 542/563 ; Bodipy 558/568 ; Bodipy 564/570 ; Bodipy 576/589 ; Bodipy 581/591 ; Bodipy 630/650-X ; Bodipy 650/665-X ; Bodipy 665/676 ; Bodipy FL ; Bodipy FL ATP ; Bodipy FI-セラミド ; Bodipy R6G SE ; Bodipy TMR ; Bodipy TMR-Xコンジュゲート ; Bodipy TMR-X、SE ; Bodipy TR ; Bodipy TR ATP ; Bodipy TR-X SE ; BO-PRO (商標) -1 ; BO-PRO (商標) -3 ; ブリリアントスルホフラビン (Brilliant Sulphoflavin) FF ; カルセイン ; カルセイブルー ; Calcium Crimson (商標) ; カルシウムグリーン ; カルシウムオレンジ ; カルコフロー (Calcofluor) ホワイト ; カルボキシ-X-ローダミン (5-ROX) ; Cascade Blue (商標) ; カスケードイエロー

10

20

30

40

50

; カテコールアミン ; CCF2 (GeneBlazer) ; CFDA ; クロロフィル ; クロモマイシンA ; CL-  
 NERF (Ratio Dye、pH) ; CMFDA ; セレンテラジンf ; セレンテラジンfcp ; セレンテラジン  
 h ; セレンテラジンhcp ; セレンテラジンip ; セレンテラジンn ; セレンテラジン0 ; クマリ  
 ンファロイジン ; C-フィコシアニン ; CPMメチルクマリン ; CTC ; CTCホルマザン ; Cy2 (商  
 標) ; Cy3.1 8 ; Cy3.5 (商標) ; Cy3 (商標) ; Cy5.1 8 ; Cy5.5 (商標) ; Cy5 (商標) ;  
 Cy7 (商標) ; サイクリックAMPフルオロセンサー (FiCRhR) ; ダブシル ; ダンシル ; ダン  
 シルアミン ; ダンシルカダベリン ; ダンシルクロリド ; ダンシルDHPE ; ダンシルフルオリ  
 ド ; DAPI ; ダポキシル (Dapoxyl) ; ダポキシル2 ; ダポキシル3 ; DCFDA ; DCFH (ジクロロ  
 ジヒドロフルオレセインジアセテート) ; DDAO ; DHR (ジヒドロローダミン123) ; ジ-4-A  
 NEPPS ; ジ-8-ANEPPS (non-ratio) ; DiA (4-ジ-16-ASP) ; ジクロロジヒドロフルオレセ  
 インジアセテート (DCFH) ; DiD-親油性トレーサー ; DiD (DiIC18(5)) ; DIDS ; ジヒドロ  
 ローダミン123 (DHR) ; DiI (DiIC18(3)) ; ジニトロフェノール ; DiO (DiOC18(3)) ; Di  
 R ; DiR (DiIC18(7)) ; DNP ; ドーパミン ; DsRed ; DTAF ; DY-630-NHS ; DY-635-NHS ; ELF 9  
 7 ; エオシン ; エリスロシン ; エリスロシンITC ; 臭化エチジウム ; エチジウムホモダイマ  
 ー1 (EthD-1) ; ユークリシン (Euchrysin) ; EukoLight ; ユーロピウム (III) クロリド  
 ; ファーストブルー (Fast Blue) ; FDA ; フォイルゲン (パラローズアニリン) ; FITC ;  
 フラゾオレンジ (Flazo Orange) ; フルオ (Fluo) -3 ; フルオ-4 ; フルオレセイン (FITC  
 ) ; フルオレセインジアセテート ; フルオロエメラルド (Fluoro-Emerald) ; フルオロゴ  
 ールド (Fluoro-Gold) (ヒドロキシスチルバミジン) ; Fluor-Ruby ; FluorX ; FM 1-43 (商  
 標) ; FM 4-46 ; Fura Red (商標) ; Fura Red (商標) /フルオ-3 ; フラ (Fura) -2 ; フ  
 ラ-2/BCECF ; ゲナクリル (Genacryl) プリリアントレッドB ; ゲナクリルプリリアントイ  
 エロー10GF ; ゲナクリルピンク3G ; ゲナクリルイエロー5GF ; GeneBlazer (CCF2) ; グロ  
 キサル (Gloxalic) 酸 ; グラニューラブルー (Granular Blue) ; ヘマトポルフィリン ;  
 ヘキスト33258 ; ヘキスト33342 ; ヘキスト34580 ; HPTS ; ヒドロキシクマリン ; ヒドロキ  
 シスチルバミジン (FluoroGold) ; ヒドロキシトリプタミン ; インド (Indo) -1 ; インド  
 ジカルボシアニン (DiD) ; インドトリカルボシアニン (DiR) ; イントラホワイト (Intr  
 awhite) Cf ; JC-1 ; JO-JO-1 ; JO-PRO-1 ; ラウロダン (Laurodan) ; LDS 751 (DNA) ; LDS  
 751 (RNA) ; Leucophor PAF ; Leucophor SF ; Leucophor WS ; リサミンローダミン ; リサ  
 ミンローダミンB ; カルセイン/エチジウムホモダイマー ; LOLO-1 ; LO-PRO-1 ; ルシファ  
 イエロー ; リゾトラッカー (Lyso Tracker) ブルー ; リゾトラッカーブルーホワイト ; リ  
 ゾトラッカーグリーン ; リゾトラッカーレッド ; リゾトラッカーイエロー ; リゾセンサー  
 (LysoSensor) ブルー ; リゾセンサーグリーン ; リゾセンサーイエロー/ブルー ; マグ (M  
 ag) グリーン ; マグダラ (Magdala) レッド (フロキシシン (Phloxin) B) ; マグフラ (Mag  
 -Fura) レッド ; マグフラ-2 ; マグフラ-5 ; マグインド (Mag-Indo) -1 ; マグネシウムグ  
 リーン ; マグネシウムオレンジ ; マラカイトグリーン ; マリーナブルー ; マキシロン (Ma  
 xilon) プリリアントフラビン10 GFF ; マキシロンプリリアントフラビン8 GFF ; メロシア  
 ニン ; メトキシクマリン ; ミトトラッカー (Mitotracker) グリーンFM ; ミトトラッカー  
 オレンジ ; ミトトラッカーレッド ; ミトラマイシン (Mitramycin) ; モノブロモビマン (M  
 onobromobimane) ; モノブロモビマン (mBBBr-GSH) ; モノクロロビマン (Monochlorobim  
 ane) ; MPS (メチルグリーンピロニンスチルベン) ; NBD ; NBDアミン ; ナイルレッド (Ni  
 le Red) ; ニトロベンゾキサジドール (Nitrobenzoxadidole) ; ノルアドレナリン ; ヌク  
 レア (Nuclear) ファーストレッド ; ヌクレアイエロー ; ナイロサン (Nylosan) プリリア  
 ントイアピン (Iavin) E8G ; オレゴングリーン ; オレゴングリーン488-X ; Oregon Green  
 (商標) ; Oregon Green (商標) 488 ; Oregon Green (商標) 500 ; Oregon Green (商標)  
 514 ; パシフィックブルー ; パラローズアニリン (フォイルゲン) ; PBF1 ; PE-Cy5 ; PE-Cy  
 7 ; PerCP ; PerCP-Cy5.5 ; PE-TexasRed [レッド613] ; フロキシシンB (マグダラレッド) ; ホ  
 ルホワイト (Phorwhite) AR ; ホルホワイトBKL ; ホルホワイトRev ; ホルホワイトRPA ; ホスフィン3  
 R ; フィコエリトリンB [PE] ; フィコエリトリンR [PE] ; PKH26 (Sigma) ; PKH67 ; PMIA  
 ; ポントクローム (Pontochrome) ブルーブラック ; POPO-1 ; POPO-3 ; PO-PRO-1 ; PO-PRO-  
 3 ; プリムリン ; プロシオンイエロー ; ヨウ化プロピジウム (PI) ; PyMPO ; ピレン ; ピロ

ニン；ピロニンB；ピロザール（Pyrozal）ブリリアントフラビン7GF；QSY 7；キナクリンマスタード；レッド613 [ PE-TexasRed ]；レゾルフィン；RH 414；Rhod-2；ローダミン；ローダミン110；ローダミン123；ローダミン5 GLD；ローダミン6G；ローダミンB；ローダミンB 200；ローダミンBエキストラ；ローダミンBB；ローダミンBG；ローダミングリーン；ローダミンファリシジン（Phallicidine）；ローダミンファロイジン（Phalloidine）；ローダミンレッド；ローダミンWT；ローズベungal；R-フィコシアニン；R-フィコエリトリン（PE）；SBF1；セロトニン；セブロン（Sevron）ブリリアントレッド2B；セブロンブリリアントレッド4G；セブロンブリリアントレッドB；セブロンオレンジ；セブロンイエロー-L；SITS（スチルベンイソチオスルホン酸）；SNAFLカルセイン；SNAFL-1；SNAFL-2；SNARFカルセイン；SNARF1；ナトリウム（Sodium）グリーン；SpectrumAqua；SpectrumGreen；SpectrumOrange；スペクトラムレッド（Spectrum Red）；SPQ（6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル)キノリニウム）；スチルベン；スルホローダミンB can C；スルホローダミンGエキストラ；SYTO 11；SYTO 12；SYTO 13；SYTO 14；SYTO 15；SYTO 16；SYTO 17；SYTO 18；SYTO 20；SYTO 21；SYTO 22；SYTO 23；SYTO 24；SYTO 25；SYTO 40；SYTO 41；SYTO 42；SYTO 43；SYTO 44；SYTO 45；SYTO 59；SYTO 60；SYTO 61；SYTO 62；SYTO 63；SYTO 64；SYTO 80；SYTO 81；SYTO 82；SYTO 83；SYTO 84；SYTO 85；SYTOXブルー；SYTOXグリーン；SYTOXオレンジ；テトラサイクリン；テトラメチルローダミン（TRITC）；Texas Red（商標）；Texas Red-X（商標）コンジュゲート；チアジカルボシアニン（DiSC 3）；チアジンレッドR；チアゾールオレンジ；チオフラビン5；チオフラビンS；チオフラビンTCN；チオライト（Thiolite）；チオゾール（Thiozole）オレンジ；チノポール（Tinopol）CBS（カルコフロールホワイト）；TMR；TO-PRO-1；TO-PRO-3；TO-PRO-5；TOTO-1；TOTO-3；TriColor（PE-Cy5）；TRITCテトラメチルローダミンイソチオシアネート；トゥルー（True）ブルー；TruRed；ウルトラライト（Ultralite）；ウラニンB；ユビテックスSFC；WW 781；X-ローダミン；XRITC；キシレンオレンジ；Y66F；Y66H；Y66W；YO-PRO-1；YO-PRO-3；YOYO-1；およびYOYO-3が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。

10

20

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書中に開示された融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドも、本明細書において企図される。ポリヌクレオチドは、例えば、発現ベクター内で、プロモーターに機能的に連結されていてよい。

#### 【 0 0 6 6 】

融合タンパク質を発現する発現ベクターを含む単離された細胞、例えば、形質転換またはトランスフェクトされた細胞も、企図される。融合タンパク質を作製するため、かつ/または、例えば、本明細書中に開示された蛍光マーカーが生物学的構造を含む場合、微小管、軸系、および/もしくは鞭毛などの、融合タンパク質を含む生物学的構造を作製するために、単離された細胞を培養することができる。鞭毛の調製および単離および/または精製の方法は、当技術分野において公知である（内容全体が参照によって本明細書に組み入れられるCraig et al., "Isolation of Chlamydomonas Flagella," Curr. Prot. Cell Biol. 2013 June; 03: Unit-3.41.9.を参照）。本明細書中に開示されたように調製された単離された蛍光鞭毛は、軸系および/または微小管を単離するために、さらに処理されてもよい。

30

40

#### 【 0 0 6 7 】

開示された蛍光マーカーを、任意で、固体基板、例えば、顕微鏡スライドに固定化することができる。蛍光標識された試料の分析および画像化のため、蛍光マーカーが固定化された顕微鏡スライドを、蛍光顕微鏡法において利用することができる。

#### 【 0 0 6 8 】

蛍光顕微鏡法を実施する方法も、本明細書において企図される。方法は、本明細書中に開示された蛍光マーカーを利用し、蛍光顕微鏡法を実施しかつ/または蛍光マーカーを画像化しながら、蛍光マーカーからのまたは蛍光マーカーが固定化された固体基板からの蛍光を検出する工程を含み得る。方法のいくつかの態様において、蛍光マーカーを顕微鏡スライドなどの固体基板に適用することができ、その後、蛍光標識された試料を蛍光顕微鏡

50

法を実施する前にスライドに適用する。次いで、蛍光顕微鏡法の実施中に、蛍光マーカ  
からの蛍光を検出し、かつ/または蛍光マーカを画像化し、次いで、同時にまたは非同  
時に、蛍光標識された試料からの蛍光を検出し、かつ/または蛍光標識された試料を画像  
化する。

【0069】

あるいは、使用者が固体基板に蛍光マーカを適用する必要がないよう、蛍光マーカ  
が固定化された顕微鏡スライドなどのように、固体基板上に蛍光マーカが予め準備され  
ていてもよく、次いで、使用者が、蛍光標識された試料を固体基板に適用する。次いで、  
蛍光顕微鏡法の実施中に、蛍光マーカからの蛍光を検出し、かつ/または蛍光マーカ  
を画像化し、次いで、同時にまたは非同時に、蛍光標識された試料からの蛍光を検出し、  
かつ/または蛍光標識された試料を画像化する。

10

【0070】

蛍光顕微鏡法を実施する方法において、マーカの蛍光標識は、試料の蛍光標識と同じ  
であってもよいしまたは異なってもよい。蛍光マーカは、蛍光標識された試料と別  
々にまたは一緒に画像化され得る。

【実施例】

【0071】

以下の実施例は、例示的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載される主題の範囲を限  
定するものではない。

【0072】

蛍光顕微鏡法用の鞭毛マーカ  
要旨

20

定量分析における高まる関心にも関わらず、蛍光顕微鏡法を使用して分子数を推定する  
ことは、依然として煩雑である。本明細書において、本発明者らは、電気泳動用のタン  
パク質マーカまたはDNAマーカと等価な生物学的蛍光強度標準物質の作出を報告する。  
本発明者らは、クラミドモナスの鞭毛のよく定義されているタンパク質RSP3と、高感度緑  
色蛍光タンパク質(EGFP)と類似の励起スペクトルおよび発光スペクトルを有するが、よ  
り高輝度であり、切り替え可能である、新しい蛍光タンパク質mNeonGreen(NG)とを利用  
した。RSP3は、正確な32~64nmの周期で軸系の9本の微小管ダブレットの各々へと集合す  
るラジアルスポーク複合体内のホモダイマーである。96nm当たり平均36個のNG分子によ  
って、クラミドモナスRSP3-NGトランスジェニック株の鞭毛は均一に光る。メタノール固定  
後、強度が60%低下したが、好都合なことに、クロロフィル由来の自己蛍光も減衰した。  
強度は、重複領域においてほぼ倍増し、展開されたダブレットおよび断片化されたダブレ  
ット粒子において比例配分された。RSP3-NG鞭毛を、クラミドモナスのNG融合タンパク質  
およびサッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のGFP融合タンパク  
質と比較することによって、強度標準物質としての利用可能性が証明された。異なる蛍  
光タグおよび軸系担体タンパク質を有する蛍光鞭毛は、定量的蛍光画像法を簡単にするであ  
ろう。

30

【0073】

導入

生物医科学のための蛍光顕微鏡法は、大きな進歩を遂げた。フルオロフォアは、様々な  
適用のための異なるスペクトル特性適性を有する極めて多様な化学的化合物および蛍光  
タンパク質に拡張された。様々な独創的なツール、デジタルソフトウェア、ならびに新しい  
顕微鏡および画像処理の発明によって、十年前には想像もできなかった診断および研究に  
おいて蛍光を使用することが現在では可能である。

40

【0074】

驚異的な進歩にも関わらず、蛍光画像の強度のみに基づき分子数を推測することは依然  
として煩雑である。蛍光強度は、励起光の強度およびスペクトルによって影響され、それ  
らは、ランプの経年数および状態によって影響を受ける。さらに、強い励起光は、フルオ  
ロフォアを飽和させ、重要なことに、フルオロフォアを消光させる場合がある。輝度、コ

50

ントラスト、および直線範囲は、画像取得時のゲイン、ならびに感度および画像品質を最大にするために設計されるその後の画像処理によって、操作され得る。従って、蛍光画像の定量分析は、しばしば、相対的に表されるか、または精巧な計測および計算を必要とする。

#### 【0075】

一つの解決策は、移動距離に基づき未知の分子のサイズを明らかにし、色素による染色後の強度に基づき存在量を明らかにする、電気泳動において広く使用されているタンパク質マーカーまたはDNAラダーに類似した標準物質を、理想的には画像化時に、含めることである。量子ドットからDNA-origamiに至るまで、異なる適用のための様々な蛍光標準物質が存在するが (Michalet et al., 2005 ; Schmied et al., 2012, 2014)、本発明者らは、真核細胞の運動性鞭毛は、平均的な生物学的試料の画像化に含めるために適切な強度、規模、および生体適合性の蛍光標準物質へと容易に変換できると考える。

10

#### 【0076】

運動性鞭毛または同義の線毛は、律動的に波打ち運動をして周囲の液体の中を進む。多様な真核細胞が、交配、捕食、および有害環境の回避などの重大な行為のためにこの運動を使用する。異なる運動にも関わらず、線毛および鞭毛の大部分が、9本の微小管ダブルレットが中心の2本のシングルレット微小管を取り囲んでいる9+2軸系によって力を供給されている。いずれのタイプの微小管も、独特の機能を有する多様な分子複合体と会合する。最もよく特徴決定されているのは、鞭毛の全長にわたって規則的に正確な位置において9本の各外側ダブルレットにアンカリングされている軸系ダイニンおよびラジアルスポークである。ダイニンモーターは、律動的な波打ち運動へ変換される、ダブルレット間の滑り運動を駆動するため、隣接するダブルレットに向かって突き出している。ラジアルスポークは、ダイニンによって駆動された運動性をさらに調節するため、中心対に向かっていている。これらの複合体は、隣接する構造を反復的に連動させ、軸系が、ナノマシンとして高頻度に律動的に波打ち運動をすることを可能にする。本発明者らは、既知の化学量論の明確に定義されたラジアルスポークタンパク質が蛍光タンパク質を保持している蛍光軸系を有する鞭毛を生成するために、二鞭毛藻類クラミドモナスを利用した。従って、既知量の蛍光タンパク質が、鞭毛の全長にわたって類似の存在量で正確な位置に分布している。本発明者らは、さらに、蛍光画像の定量分析のための強度標準物質としての利用可能性を証明するため、三つの例を使用した。

20

30

#### 【0077】

結果

フルオロフォア担体としてのRSP3を有する蛍光鞭毛の生成

チューブリンの他に、軸系は、96nmリピート内で周期が変動する多数の分子複合体の中の400種を超える異なるタンパク質から構成されている。理論上、多くの軸系タンパク質が、機能に影響することなく、フルオロフォアを保持することができる。RSおよびRSP3の化学量論が既知であるため、この実証研究のため、ラジアルスポーク (RS) 複体内のよく特徴決定されているRSP3を、蛍光タンパク質担体として使用した。電子顕微鏡法 (EM) において、RSは、柄によって外側ダブルレットにアンカリングされており、拡大されたヘッドが中心対装置に向かって突き出しているY字型複合体のように見える (Huang et al., 1981 ; Pigino et al., 2011 ; 図1A)。RSと中心対との物理的相互作用は、外側ダブルレット上のダイニンモーターの活性化と協調し、律動的な波打ち運動にとって決定的である。クラミドモナスにおいては、各外側ダブルレットの長さに沿って96nm毎に2個のRSが32nm間隔で位置している (図1B)。これは、9本の外側ダブルレットを有する鞭毛96nm毎に18個のRSに相当する。

40

#### 【0078】

RSP3は、他のラジアルスポークサブユニットのドッキングのための足場としてRSに架かる (span) ホモダイマーとして存在する (Wirschell et al., 2008 ; Sivadas, et al., 2012 ; Oda et al., 2014)。クラミドモナスRSP3変異体pf14は、RSを欠く無力化した鞭毛を生じる (Huang et al., 1981 ; Diener et al., 1993)。この欠損は、オリジナルのRSP3ゲノ

50

△DNAまたはタグ付きRSP3ゲノムDNAを形質転換することによって回復し得る (Williams et al., 1989; Gupta et al., 2012; Oda et al., 2014)。RSP3欠失変異体の分析およびタグ付きRSP3株の低温電子断層撮影 (図1C) によると、C末端テールがスポークヘッドに向かって位置していた (Sivadas et al., 2012; Oda et al., 2014)。従って、蛍光タンパク質 (FP) によってタグ付けされた完全に回復されたRSP3を有するトランスジェニックpf14株の鞭毛は、96nm毎に、36個のRSP3を含有し、従って、36個のFPを含有するはずである。

【0079】

この目標に向けて、本発明者らは、高感度緑色蛍光タンパク質 (GFP) またはmNeonGreen (NG) をコードするDNA断片を、終止コドンの前に挿入して、RSP3ゲノム構築物を作成した。2種の軸系タンパク質により、GFPがタグ付けされ (Bower et al., 2013; Yanagisawa et al., 2014)、伸長中の微小管の先端に優先的に結合し、鞭毛の先端において濃縮されるタンパク質EB1により、NGがタグ付けされた (Pederson et al., 2003; Harris et al., 2015)。NGは、三つの理由のために選択された。それは、高輝度である、即ち、EGFPより2.7倍高輝度であり、2.07倍高い吸光係数に起因し、量子収率が1.33倍高い (Shaner et al., 2013)。実際、その輝度は、既存のFPの大部分より高くないにしてもそれに匹敵する。さらに、その光安定性は、広視野照明下でGFPに匹敵する。最後に、NGは、GFPと類似の励起スペクトルおよび発光スペクトルを有する。

【0080】

RSP3-GFPおよびRSP3-NGを有する鞭毛の比較

RSP3-FPゲノム構築物およびパロモマイシン耐性遺伝子を含有しているプラスミドを、無力化RSP3変異体pf14へ形質転換した。細胞へ導入された後、プラスミドは、ゲノムにランダムに挿入されるであろう。挿入イベントの一部は、パロモマイシン耐性遺伝子およびゲノム構築物の発現をもたらした。抗生物質耐性クローンのおよそ30%が運動性であった。完全に回復されたクローン、野生型 (WT) と同様に泳ぐ全ての細胞を、選択した。鞭毛のウェスタンブロットは、RSP3-GFPおよびRSP3-NGが、WTにおけるRSP3と類似の存在量であることを示した (図2A)。陰性対照は、pf14であった。負荷対照は、4種の株全てにおいて正常である外側ダイニンアームのサブユニットIC78であった。

【0081】

蛍光顕微鏡法のため、本発明者らは、藻類の走光性応答を利用した。藻類細胞は、顕微鏡の光源に向かってまたは光源から離れて泳ぎ、従って、スライドまたはカバーガラスに遭遇した。このため、鞭毛がガラス表面に付着し、静止するようになる一方で、主としてクロロフィルからの強い自己蛍光の細胞体は、焦点から外れた。静止鞭毛を、典型的な広視野落射蛍光顕微鏡および40倍の対物レンズによって画像化した。特記しない限り、全ての画像が類似の方式で取得された。RSP3-NGおよびRSP3-GFPの両方が、外側ダブレットが漸減する端部を除き、鞭毛全体に均一に分布して見えた (図2B)。一緒に画像化された場合、RSP3-GFP鞭毛の方が低輝度であり、1秒露光で、かろうじて自己蛍光から区別可能であることが明らかになった (図2C、上パネル)。それらは、バックグラウンドの減算の後に、より明瞭になった (下パネル)。鞭毛の蛍光強度を測定するため、ImageJ Plot Profileを使用した (図2C、右パネル)。ピーク値は、RSP3-NG鞭毛がRSP3-GFP鞭毛より約4倍高輝度であることを示した。EGFPを使用した大部分の研究に強度レベルが近いこと、残りの研究は、RSP3-NG鞭毛に焦点を当てた。

【0082】

RSP3-NG鞭毛の特徴決定

RSP3-NG鞭毛を、さらなる特徴決定のため、トランスジェニック細胞から切り出した。大部分の単離された鞭毛が10~12µmであり、不均一な焦平面のため、いくつかは蛍光強度が変動した (図3A、上パネル)。焦点が合っている最も高輝度の領域を決定するため、各鞭毛に沿ってプロファイルプロットを作成した。全ての鞭毛についての最も高輝度の領域のプロファイルプロットを一緒にコンパイルした (下パネル)。ピーク値の平均値および標準偏差を、ヒストグラムに示した (右パネル)。

【0083】

10

20

30

40

50

RSP3-NG分子の強度レベルが分子数に対して直線的であるか否かを試験するため、本発明者らは、2本の鞭毛が重複した領域の強度と、近傍の非重複領域の強度とを比較した(図3B、上パネル)。2種の領域のピーク強度(下左パネル)および平均値(右下パネル)は、予想通り、二鞭毛領域における強度が一鞭毛領域より約2倍高輝度であることを示した。

#### 【0084】

RSP3-GFP鞭毛は低輝度であったが可視であったため、本発明者らは、分裂したRSP3-NG外側ダブレットサブファイバーが可視であり得ると推論した。典型的には、鞭毛膜を溶解するための界面活性剤、内側ダブレット滑り運動のための力を供給するためにダイニンモーターによって消費されるATP、およびRSを含む機械的制約を切断するプロテアーゼを含む緩衝液において、外側ダブレットを展開した。完全なRSを維持するため、本発明者らは、カバーガラスを手動で前後に移動させることによって、ポリ-L-リジンに固定化された鞭毛に剪断力を適用した。蛍光顕微鏡法において、多くの鞭毛が展開されており(図4A)、9本の外側ダブレット束は、2本以上のサブファイバーに分裂していた。100倍レンズで得られた拡大画像の分析(図4A、中央パネル)は、蛍光がサブファイバーに沿って依然として均一に分布していることを示した。蛍光強度の測定は、サブファイバーが展開されるほど、個々のサブファイバーの強度が低くなることを示した(下パネル)。未付着の鞭毛については、展開の程度が低かった(図4B、上部パネル)。しかし、100倍対物レンズおよび増強されたコントラストによって、本発明者らは、いくつかの外側ダブレットが粒子へ断片化されていることを見出した(図4B、中央パネル)。個々の粒子の強度が完全な領域と比べてほぼ1/9であったことから(図4B、下パネル)、それらは1本の外側ダブレット、おそらく96nmリピートからなることが示唆された。従って、RSP3-NGを有する鞭毛または外側ダブレットは、NG分子の存在量にほぼ比例するようである。

#### 【0085】

##### メタノール固定後のNG蛍光

FPは、生細胞画像化において価値があるが、時には、固定された細胞において可視化される必要がある。急速メタノール固定は、組織内の動的微小管を保存するため、植物およびクラミドモナスについては、強い自己蛍光に寄与する色素を抽出するため、一般的に使用されている。しかしながら、GFPは、しばしば、メタノール固定後に不可視となり、代わりに免疫蛍光によって可視化される。NGに対するメタノールの効果を知るため、RSP3-NG鞭毛を含むスライドを、20分間、-20℃のメタノールに浸漬した。脱水および再水和の後、画像化する前に、新鮮なRSP3-NG鞭毛をスライドに添加した(図5A、上パネル)。固定された鞭毛(赤色ドット)および未固定の鞭毛(青色ドット)のプロファイルプロット(中央左パネル)を分析した。ピーク値(中央右パネル)の平均値は、メタノール固定が、NG蛍光強度をおよそ60%低下させることを示した。同様に、固定された鞭毛の重複領域(白色矢印および灰色バー)は、非重複領域(赤色バー)の約2倍高輝度であった。

#### 【0086】

本発明者らは、EB1-NGを発現しているクラミドモナストランスジェニック野生型株(Harris et al., 2016)をメタノール固定によってさらに試験した。伸長中の微小管のプラス端への優先的な結合は、蛍光EB1の典型的なコメットパターンを与えた。ポリ-L-リジンによってコーティングされたスライドに固定化されたEB1-NG細胞を、まず、メタノールで固定した。再水和の後、生細胞をスライドに添加し、画像を取得した。メタノール固定細胞におけるEB1-NGコメット(図5B、左パネルのオレンジ色矢印)の強度は、生細胞(青色矢印)より低輝度であったが、自己蛍光も実質的に減少した(図5B)。プロファイルプロット(右パネル)は、メタノール処理がシグナル/バックグラウンド比に有意に影響しないことを示した。コメットは、10秒露光後に可視であり(上パネル)、その後の1秒露光の後にも可視のままであり(下パネル)、このことから、メタノール固定にも関わらず、励起光のこの強度でNGが安定していることが示された。予想通り、異なる露光による2枚の画像における固定細胞におけるコメットパターンは同一であるようであったが、生細胞における移動するコメットヘッドの長さは、1秒露光の画像においては、報告されているよ

10

20

30

40

50

うにおよそ500nmであり (Seetapun et al., 2012)、10秒画像においては、より長いようであった (青色矢印)。従って、NG鞭毛およびRSP3-NG鞭毛は、メタノール固定を含む実験のための実行可能なツールである。

#### 【0087】

異なる分子および異なる生物へのRSP3-NG鞭毛の適用

RSP3-NG数と蛍光強度との直線的な関係のため、本発明者らは、細胞区画および細胞型に関係なく蛍光分子数を推測することが可能であると推論した。最初に、RSP3-NG鞭毛をEB1-NG細胞と比較する。細胞体におけるEB1-NGコメットとは別に、EB1-NGは、鞭毛が全長に達した後も微小管プラス端が一定の代謝回転を受ける鞭毛先端においても濃縮されている (Pederson et al., 2003; Harris et al., 2016; Marshall and Rosenbaum, 2001)。蛍光退色後回復測定 (FRAP) 分析は、先端集団が、不動のEB1-NG集団と、プラス端におけるチューブリン代謝回転を説明し得る高度に動的な集団との両方を含有していることを示唆している (Harris et al., 2016)。鞭毛先端におけるEB1-NGの量を評価するため、同じ焦平面でガラス表面に付着した鞭毛に焦点を当てて、RSP3-NG細胞およびEB1-NG細胞を一緒に画像化する (図6A)。EB1-NG先端は、約500nm長であった。プロファイルプロットは、EB1-NG先端の強度が、RSP3-NG鞭毛に類似しているかまたはそれより低輝度であることを示した。細胞体におけるEB1-NGコメットを分析するため、細胞を、単離された鞭毛と同時に画像化した。類似の焦平面におけるコメットおよび鞭毛の分析は、個々の微小管プラス端におけるコメットヘッドの前方の端部 (図6B、赤色矢印) が、RSP3-NG鞭毛より高輝度ではないにしても、それに匹敵する輝度であることを示した。本発明者らは、36個のRSP3-NG分子を各々含有している5.2個の96nmリピートに相当する500nmコメットヘッドが、1本の伸長中の微小管の先端に動員されたおよそ187個のEB1-NGまたは93個のEB1-NGダイマーを含有していると推測した。類似の存在量のタグなしEB1の存在のため (Harris et al., 2016)、C末端タグがプラス端トラッキングに実質的に影響しないと仮定すると、最も高輝度の500nmコメットヘッドは、タグ付きEB1およびタグなしEB1を含む187個のEB1ダイマーを有するはずである。室温での緑藻におけるこの測定は、37°Cで測定された上皮細胞における1 $\mu$ m微小管プラス端についての270個のEBダイマーと一致している (Seetapun et al., 2012)。1本の微小管の先端におけるEB1-NG強度と、9本の外側ダブルレット微小管および2本の微小管シングルレットからの20本の微小管を含有している全長鞭毛の先端におけるEB1-NG強度とが類似していることから、全長鞭毛の先端における一定のチューブリン代謝回転にも関わらず、細胞体における速度が、伸長中の微小管のプラス端のおよそ20分の1であることが示された。

#### 【0088】

本発明者らはまた、2種のトランスジェニックサッカロマイセス・セレピシエ株と、RSP3-NG鞭毛を比較した。一方の株は、シトクロムcオキシダーゼサブユニット4 (COX4) の最初の21アミノ酸にタグ付けされたGFPを発現した (Jensen et al., 2000)。シトクロムc複合体は、ミトコンドリアにおいて内膜のマトリックス表面と会合する。酵母におけるミトコンドリア網状ネットワークを明るくするCOX4-GFPは、分裂、融合、および形状が異なる酵母ミトコンドリアバリエーションをスクリーニングするための強力なツールである。COX4-GFPレベルは、個々の酵母細胞の間で変動する (Jensen et al., 2000)。低存在量細胞におけるピーク強度 (図6C、右) は、RSP3-NG鞭毛のものと類似していた。GFPはNGより2.7倍低輝度であるため、全ての96nm長ミトコンドリア細管は、およそ97 (2.7 $\times$ 36) 個のCOX4-GFP分子を含有していると予想される。管状ミトコンドリアの平均直径は、およそ220nmである軸系の直径 (Westermann, 2008) より大きく、300~400nmであるため、この推定値は、実際の数よりわずかに低い。COX4-GFPの存在量は、左の細胞において2倍高い。

#### 【0089】

他方の酵母株は、GFPタグ付きSis1 (HSP70のHSP40コシャペロン) を発現した。それは、タンパク質凝集を調節するための細胞戦略の一部としての、ミスフォールドポリペプチドの不溶性タンパク質沈着物 (IPOD) 区画への輸送に関与している (Kaganovich et al., 2008; Specht et al., 2011; Nillegoda et al., 2015)。非膜結合型IPODに濃縮されたSis

1-GFP分子は、鞭毛より大きい直径の点として見えた(図6D)。材料および方法に概説された基本原則に基づき、各スポットは、許容温度30 で、平均しておよそ2,000個のSis1-GFP分子を含有しており、それは、1個の酵母細胞において推定されたSis1分子20,500個のおよそ1/10である(Ghaemmaghami et al.,2003)。

【0090】

多様な適用のための鞭毛標準物質の種類拡張

現在までに、本発明者らは、RSP3-GFPまたはRSP3-NGのいずれかを有する蛍光鞭毛を作出し、単一細胞でそれらを試験したのみである。両方の鞭毛は、異なる強度であるが緑色光を発する。異なる特性、色、および適用を有する多様な蛍光ツールを利用して、様々な適用を包含する広大な市場に参入するためには、鞭毛標準物質を多様化する必要がある。(2A)一つは、NeonGreenを二つの主要なタイプのタグに切り替えることである(図3)。既存のDNA構築物は、タグの容易な交換のために設計されている。一つは、赤色光範囲にあるmCherryまたはtdTomatoなどの他の色の蛍光タンパク質である。蛍光タンパク質は、細胞によって発現されなければならないため、一般的には生細胞画像化において使用される。他のオプションは、図3に例示されるように、それ自体は光を発しないが、化学反応を介して、光を発する市販の化合物に連結され得る多用途SNAPタグタンパク質である。生細胞に限定される蛍光タンパク質とは対照的に、蛍光を発する化合物は、通常は固定された試料において、関心対象の分子に捕らえられる抗体などの様々なプローブに化学的にカップリングされる(免疫蛍光)。SNAPタグ鞭毛は、そのような適用のために適切であろう。さらに、顧客は、SNAPタグ鞭毛のアリコートを購入し、次いで、具体的な必要性に合わせて、特定の蛍光化合物と共にそれをインキュベートすることができる。同一の蛍光を発する分子を比較することによって、分子数を計算することは、より容易になるであろう。免疫蛍光は、特に診断において、蛍光顕微鏡法における最も一般的なアプローチである。免疫蛍光と適合性の試薬は、大きな市場を有するであろう。(2B)RSP3を異なる鞭毛タンパク質に切り替える。周期がより高頻度である場合、蛍光強度は増加するであろう。特に、NeonGreenを保持するタンパク質およびmCherryまたはSNAPタグを保持する他のタンパク質を有する多色鞭毛を産生する第2世代を回収するため、1種類の蛍光融合タンパク質を発現する株を作出した後、それらを交配することができる。そのような二重タグ標準物質は、多色蛍光顕微鏡法に適している。(2C)蛍光ナノマシンを9本の線維または96nm粒子の量子(quant)に分解する。完全な鞭毛ではなく、32~64nmの交互の周期で2個のNeonGreen分子を有する個々の線維または粒子を、一部には最近のノーベル賞のために人気が発見した超解像顕微鏡法および単一分子分析のため、分子定規として使用することができる。DNAに基づく分子定規は、この目的のために既に存在するが、鞭毛定規が、作製コストなどの特徴的な利点を有するか否かを、本発明者らは探究する。(2D)3D画像化における蛍光標準物質の適用を探究する。現在までに、本発明者らは、小さい単一細胞でのみ鞭毛標準物質を試験している。典型的には、異なるタイプの顕微鏡を必要とする、昆虫またはゼブラフィッシュなどの、広い焦平面範囲の大きい試料のために、適用を改変する必要がある可能性が高い。焦平面は、蛍光強度に対して実質的な効果を及ぼすと考えられる。本発明者らは、本発明者らの部門において共焦点顕微鏡を使用してGFPを発現する虫で標準物質を試験し、必要と見なされた場合には定量化尺度を調整する。(2E)商業化と適合性のパッケージング戦略を開発する。顧客にとって便利であり安定性を最大にする方式で生成物をパッケージングする最適な方式を知ることが望まれる。現在、液体の形態が試験されている。ガラススライドに固定化された固定鞭毛が試験中である。これは、診断領域における日常的な使用を簡単にし得る。

【0091】

考察

この研究は、明確な数の蛍光RSP3を有する鞭毛を作出するため、9+2軸系における明確なRS周期およびRSP3化学量論、ならびにクラミドモナスRSP3変異体を利用する。様々な方式でRSP3-NG鞭毛を画像化することによって、この研究は、蛍光鞭毛の強度標準物質としての利用可能性および限界を示した。

10

20

30

40

50

## 【0092】

非重複領域のおよそ2倍であった重複領域の強度（図3）、ならびに軸系のサブファイバーおよび粒子の比例配分された強度は、RSP3-NGによる個々の外側ダブルレットから鞭毛に至るまでのほぼ20倍の直線範囲を示した。NGおよびGFPのスペクトルおよび安定性は類似しているため、2種のフルオロフォアの異なる輝度を考慮に入れて、RSP3-NGをGFP融合タンパク質のための標準物質として使用することができる。

## 【0093】

しかしながら、いくつかの因子が推定値から逸脱する可能性がある。例えば、NGの輝度はEGFPと比較して2.7倍であると報告されているにも関わらず、RSP3-NG鞭毛はRSP3-GFPより4倍高輝度である。一つの可能性のある説明は、クラミドモナスにおいて一般的に使用されるGFP配列が、一般的に使用されるバージョンの配列と同一ではないというものである。または、担体タンパク質が、FP強度、隣接する三次分子状況、または単に担体タンパク質のサイズに影響する可能性もある。分子サイズは、GFP強度に逆に影響することが示されている。およそ30kDのEB1にタグ付けされたNGが、およそ60kDのRSP3におけるNGより高輝度であるか否かは不明である。

## 【0094】

画像取得において使用されるパラメータも重要である。一つは、焦平面である。蛍光顕微鏡法の広視野の焦平面は、鞭毛の直径に近い約200nmであるため、焦点外領域の強度が実質的に低下した（図3A）。他は、ゲインの程度である。本発明者らは、直線性の範囲を犠牲にして画像コントラストを増強するためにゲインを使用することを回避した。他は励起光強度である。GFP鞭毛の急速な光退色は、報告されている懸念事項であった。これは、弱いGFPシグナルを補償するための強い励起光による。これは、より高輝度のNGについてはそれほど懸念されない。より長い露光時間の代わりに、光路にニュートラルフィルタを配置することによって、最小限の励起光を使用することが推奨される。この実践は、光退色および光毒性も低下させる。図5Bに示されるように、10秒露光は、その後の1秒画像取得を妨害しなかった。画像が取得された後、画像のさらなる調整は、プロファイルプロット分析に影響しないであろう。

## 【0095】

その輝度のため、NGは、メタノール固定を必要とする試料のために適切である。メタノールは、FPを変性させ、蛍光を不可視にするという一般的な誤解に反して、この研究は、RSP3-NGの輝度のおよそ40%が保持されることを示した。これはNGまたはRSP3に特有ではない。鞭毛先端のEB1-NGは、メタノール固定後、強度は極めて低いが、CCDカメラを使用して取得され得る（示されていない）。メタノール固定は、急速に移動するかまたは強い自己蛍光を有する物体の画像化において考慮する価値がある。クラミドモナスにおいて、自己蛍光を低下させるメタノールの効果は、低下したNG強度を補償しないが、その処理は、低下した自己蛍光、より高コントラストの画像によるEB1-NGコメット強度の独立した査定、および長い露光時間の画像取得が困難な運動性細胞の固定化を提供する。

## 【0096】

三つの例は、分子存在量の推定からの新たな洞察を示す。鞭毛先端の微小管プラス端は、プラス端をキャッピングする構造を有する全長鞭毛ですら一定の代謝回転を受けることが、十分確立されている。鞭毛先端およびコメットのEB1-NGの存在量を比較することによって、EB1プラストラッキング、従って、鞭毛先端のチューブリン代謝回転速度が、比較的低いことが明らかとなる。EB1-NGの先端に向かう拡散速度は、およそ10  $\mu\text{m}/\text{秒}$ の範囲にあるため、遅い代謝回転は、EB1の限定された供給によるのではなく、次第に少なくなるGTP-チューブリンの輸送（Craft et al., 2015）、または全長鞭毛におけるチューブリン代謝回転を妨害し得るキャップ構造によるものである可能性がより高い。標準物質としてRSP3-NG蛍光鞭毛を用いれば、未知の分子の数を推定するために必要となるのは画像化定量化ソフトウェアのみである。寸法が類似しているため、蛍光鞭毛を標準物質として使用したミトコンドリアにおける蛍光タンパク質の推定は、極めて簡単である。変異体におけるミトコンドリアの改変された動力学を明らかにするためのマーカーとして、COX4-GFPが使

10

20

30

40

50

用されているが、多様な条件の下で発現されたミトコンドリアタンパク質の数を推定することが今や可能である。同様に、鞭毛標準物質を用いれば、異なる温度で、異なる変異体において、細胞区画において輸送されるSis1およびその他のシャペロンならびにミスフォールドタンパク質の存在量の変化を、より正確に推定することが可能である。

【 0 0 9 7 】

この研究は、鞭毛蛍光強度マーカーの原理を証明するため、RSP3-NG鞭毛および広視野落射蛍光顕微鏡法を使用している。それは、3Dで画像を取得する共焦点またはデコンボリューション顕微鏡法のために適用可能である。正確な周期で構築された鞭毛メーカーは、異なる周期の担体タンパク質および異なる特性のタグタンパク質によって、さらに改変され得る。RSP3-NGの展開された外側ダブレットの利用可能性は、未だ探究されていない。ダブレット粒子の交互の32nmおよび64nmの周期の蛍光は、超解像または単一分子分析において潜在的に有用であり得る。トランスジェニッククラミドモナスから大量の鞭毛を採集することは容易であるため、日常の蛍光画像取得において蛍光鞭毛強度標準物質を適用することは、極めて経済的であろう。

【 0 0 9 8 】

参照

Bower, R., Tritschler, D., Vanderwaal, K., Perrone, C.A., Mueller, J., Fox, L., Sale, W.S., and Porter, M.E. (2013). The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol Biol Cell* 24, 1134-1152.

Craft, J.M., Harris, J.A., Hyman, S., Kner, P., and Lehtreck, K.F. (2015). Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism. *J Cell Biol* 208, 223-237.

Craige, B., Brown, J.M., and Witman, G.B. (2013). Isolation of *Chlamydomonas* flagella. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3 41 41-49.

Diener, D.R., Ang, L.H., and Rosenbaum, J.L. (1993). Assembly of flagellar radial spoke proteins in *Chlamydomonas*: identification of the axoneme binding domain of radial spoke protein 3. *J Cell Biol* 123, 183-190.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.

Gupta, A., Diener, D.R., Sivadas, P., Rosenbaum, J.L., and Yang, P. (2012). The versatile molecular complex component LC8 promotes several distinct steps of flagellar assembly. *J Cell Biol* 198, 115-126.

10

20

30

40

Harris, J.A., Liu, Y., Yang, P., Kner, P., and Lehtreck, K.F. (2016). Single-particle imaging reveals intraflagellar transport-independent transport and accumulation of EB1 in *Chlamydomonas* flagella. *Mol Biol Cell* 27, 295-307.

Hom, E.F., Witman, G.B., Harris, E.H., Dutcher, S.K., Kamiya, R., Mitchell, D.R., Pazour, G.J., Porter, M.E., Sale, W.S., Wirschell, M., Yagi, T., and King, S.M. (2012). A unified taxonomy for ciliary dyneins. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68, 555-565.

10

Huang, B., Piperno, G., Ramanis, Z., and Luck, D.J. (1981). Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: genetic analysis of assembly and function. *J Cell Biol* 88, 80-88.

Jensen, R.E., Hobbs, A.E., Cerveny, K.L., and Sesaki, H. (2000). Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc Res Tech* 51, 573-583.

Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, 1088-1095.

20

King, S.M., and Patel-King, R.S. (2015). The oligomeric outer dynein arm assembly factor CCDC103 is tightly integrated within the ciliary axoneme and exhibits periodic binding to microtubules. *J Biol Chem* 290, 7388-7401.

Marshall, W.F., and Rosenbaum, J.L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J Cell Biol* 155, 405-414.

30

Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., and Weiss, S. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307, 538-544.

Nillegoda, N.B., and Bukau, B. (2015). Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Front Mol Biosci* 2, 57.

40

Norrander, J.M., deCathelineau, A.M., Brown, J.A., Porter, M.E., and Linck, R.W. (2000). The Rib43a protein is associated with forming the specialized protofilament ribbons of flagellar microtubules in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* 11, 201-215.

Oda, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., and Kikkawa, M. (2014). Mechanosignaling between central apparatus and radial spokes controls axonemal dynein activity. *J Cell Biol* 204, 807-819.

10

Pedersen, L.B., Geimer, S., Sloboda, R.D., and Rosenbaum, J.L. (2003). The Microtubule plus end-tracking protein EB1 is localized to the flagellar tip and basal bodies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Biol* 13, 1969-1974.

Pigino, G., Bui, K.H., Maheshwari, A., Lupetti, P., Diener, D., and Ishikawa, T. (2011). Cryoelectron tomography of radial spokes in cilia and flagella. *J Cell Biol* 195, 673-687.

20

Schmied, J.J., Raab, M., Forthmann, C., Pibiri, E., Wunsch, B., Dammeyer, T., and Tinnefeld, P. (2012). DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nat Protoc* 9, 1367-1391.

Schmied, J.J., Raab, M., Forthmann, C., Pibiri, E., Wunsch, B., Dammeyer, T., and Tinnefeld, P. (2014). DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nat Protoc* 9, 1367-1391.

30

Seetapun, D., Castle, B.T., McIntyre, A.J., Tran, P.T., and Odde, D.J. (2012). Estimating the microtubule GTP cap size in vivo. *Curr Biol* 22, 1681-1687.

Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W., and Wang, J. (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10, 407-409.

40

Sivadas, P., Dienes, J.M., St Maurice, M., Meek, W.D., and Yang, P. (2012). A flagellar A-kinase anchoring protein with two amphipathic helices forms a structural scaffold in the radial spoke complex. *J Cell Biol* 199, 639-651.

Specht, S., Miller, S.B., Mogk, A., and Bukau, B. (2011). Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 195, 617-629.

10

Teves, M.E., Nagarkatti-Gude, D.R., Zhang, Z., and Strauss, J.F., 3rd. (2016). Mammalian axoneme central pair complex proteins: Broader roles revealed by gene knockout phenotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 3-22.

Vasudevan, K.K., Song, K., Alford, L.M., Sale, W.S., Dymek, E.E., Smith, E.F., Hennessey, T., Joachimiak, E., Urbanska, P., Wloga, D., Dentler, W., Nicastro, D., and Gaertig, J. (2015). FAP206 is a microtubule-docking adapter for ciliary radial spoke 2 and dynein c. *Mol Biol Cell* 26, 696-710.

20

Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283, 13501-13505.

Williams, B.D., Velleca, M.A., Curry, A.M., and Rosenbaum, J.L. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of the *Chlamydomonas* gene coding for radial spoke protein 3: flagellar mutation pf-14 is an ochre allele. *J Cell Biol* 109, 235-245.

30

Wirschell, M., Zhao, F., Yang, C., Yang, P., Diener, D., Gaillard, A., Rosenbaum, J.L., and Sale, W.S. (2008). Building a radial spoke: flagellar radial spoke protein 3 (RSP3) is a dimer. *Cell Motil Cytoskeleton* 65, 238-248.

Yanagisawa, H.A., Mathis, G., Oda, T., Hirono, M., Richey, E.A., Ishikawa, H., Marshall, W.F., Kikkawa, M., and Qin, H. (2014). FAP20 is an inner junction protein of doublet microtubules essential for both the planar asymmetrical waveform and stability of flagella in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* 25, 1472-1483.

40

#### 【 0 0 9 9 】

上記の説明において、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、様々な置換および改変が、本明細書中に開示された発明に対してなされ得ることが、当業者には容易に明らかであろう。本明細書中に例示的に記載された本発明は、本明細書中に具体的に開示されていない要素または限定の非存在下で、適切に実施され得る。利用されている用語および表現は、限定ではなく説明のために使用されており、そのような用語および表現の使用において、示され記載された特色の等価物またはその一部分を排除する意図は存在せず、本発明の範囲内で様々な改変が可能であることが認識される。従って、具体的な態様およ

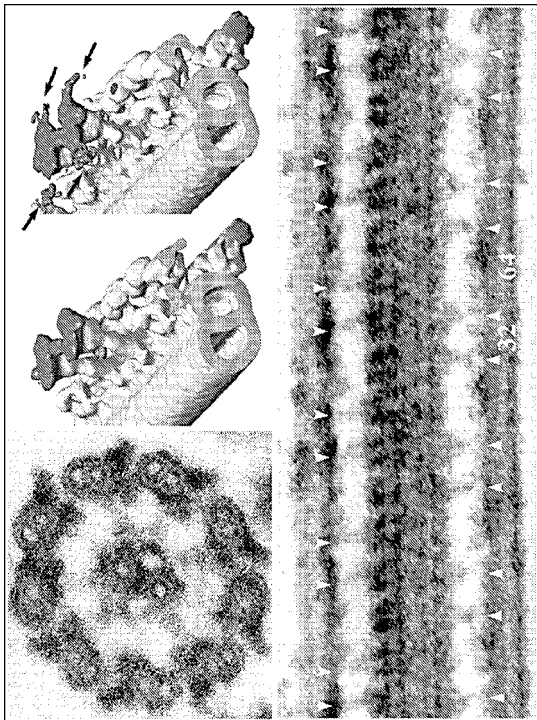
50

び任意での特色によって本発明を例示してきたが、本明細書中に開示された概念の改変および/または変動が当業者によってなされ得ること、ならびにそのような改変および変動は本発明の範囲内にあると見なされることが、理解されるべきである。

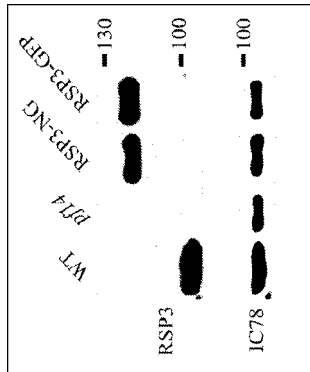
【0100】

多数の参照の引用が、本明細書中になされている。引用された参照は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。本明細書中の用語の定義と、引用された参照における用語の定義との比較において不一致が存在した場合、その用語は、本明細書中の定義に基づき解釈されるべきである。

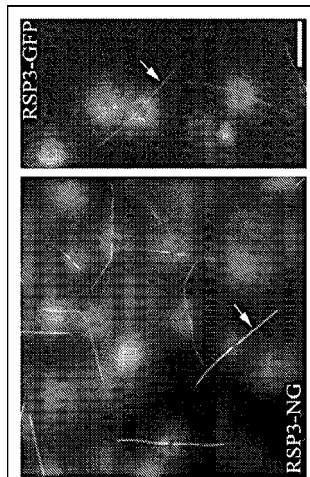
【図1】



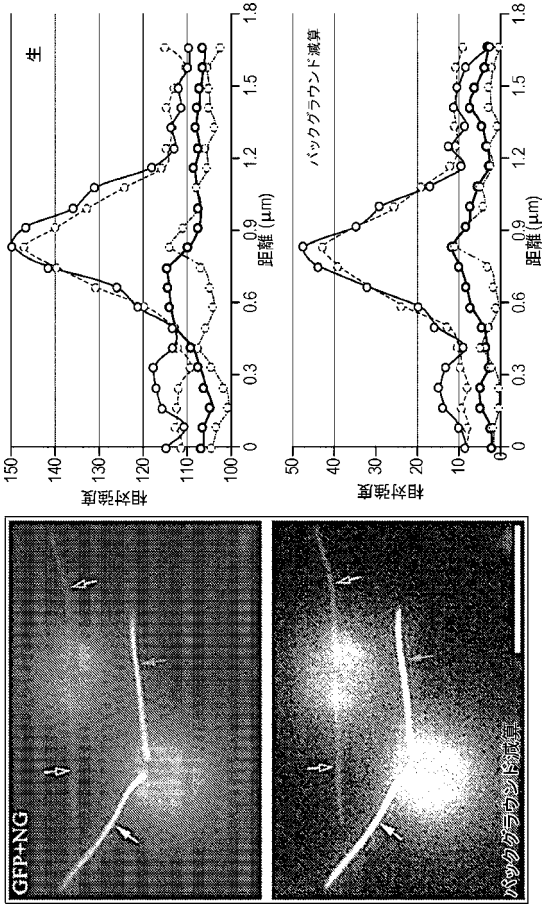
【図2A】



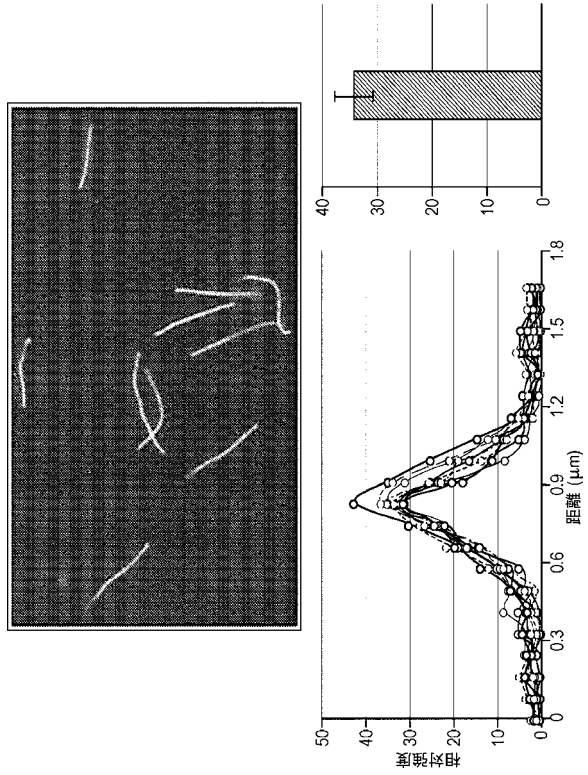
【図2B】



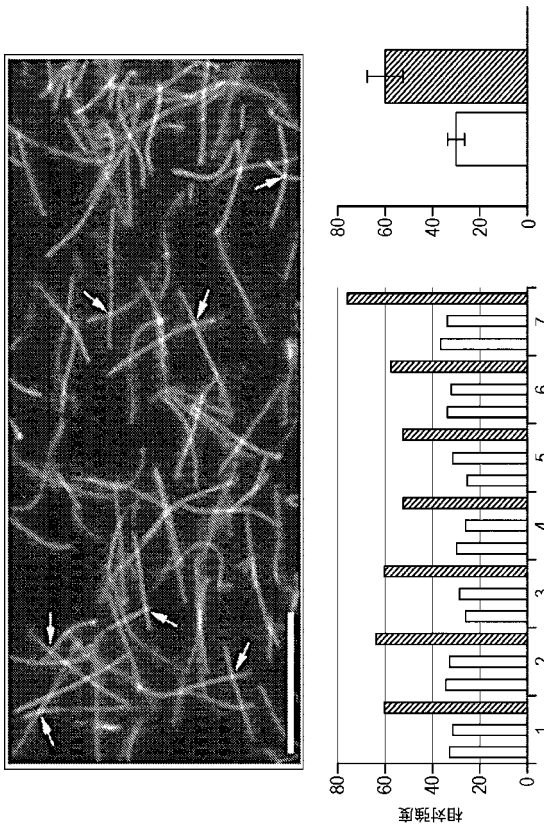
【 図 2 C 】



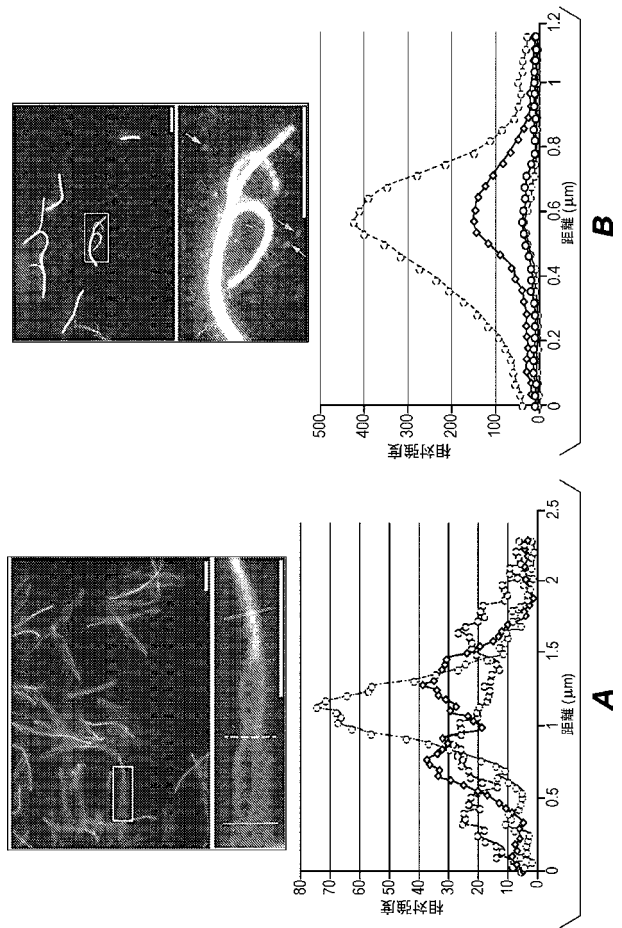
【 図 3 A 】



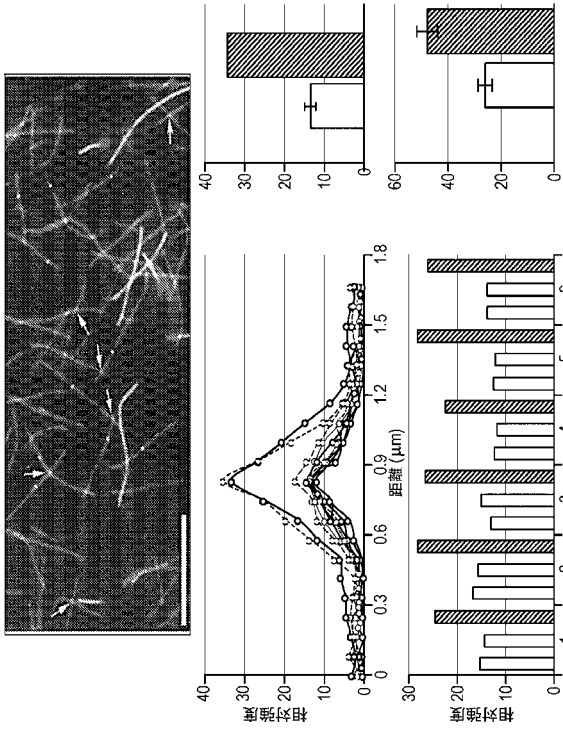
【 図 3 B 】



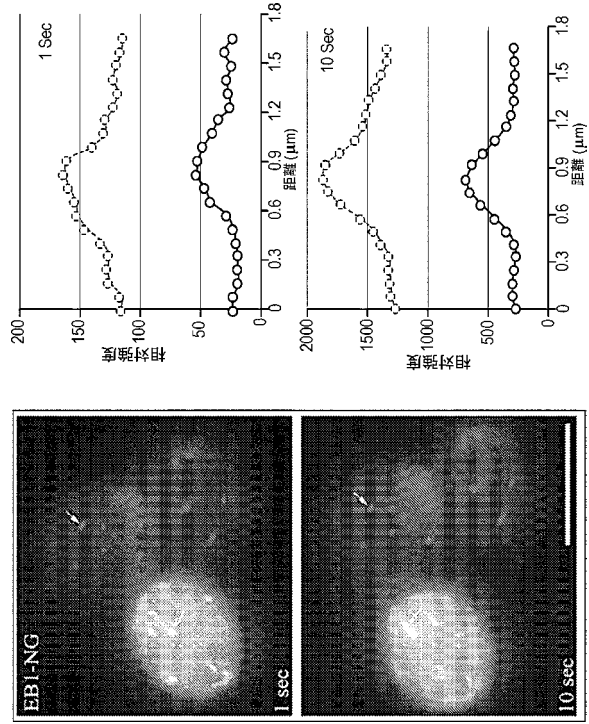
【 図 4 】



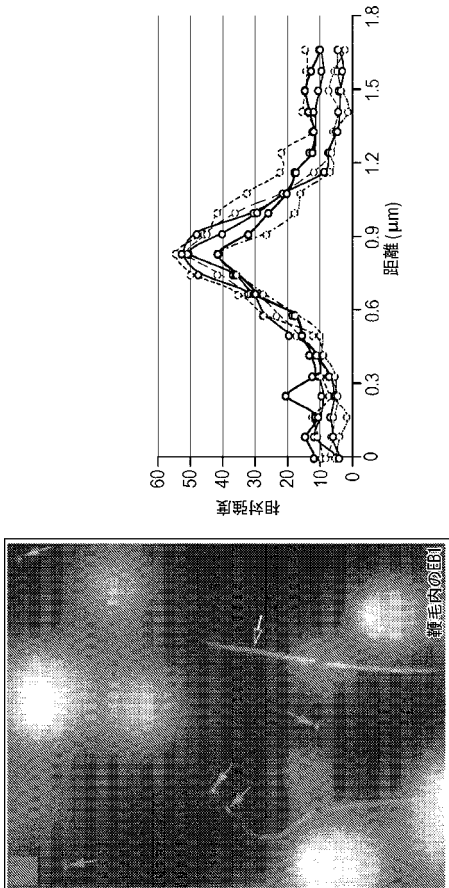
【図 5 A】



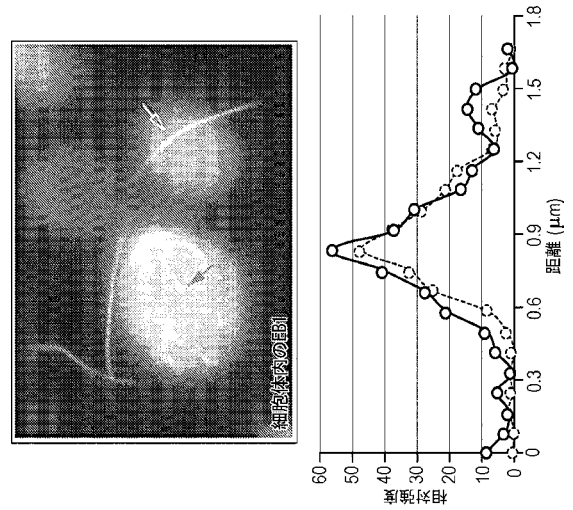
【図 5 B】



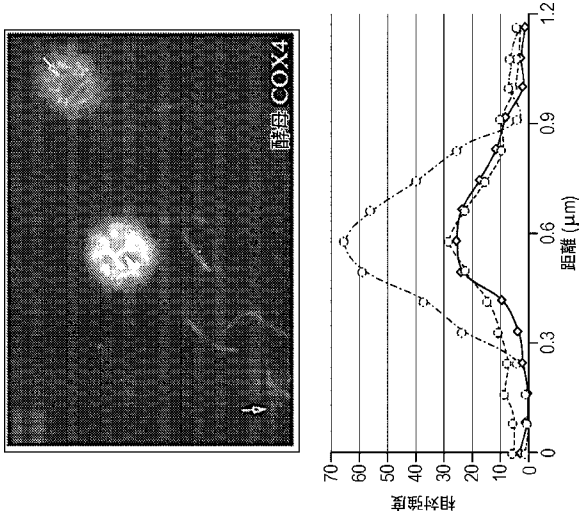
【図 6 A】



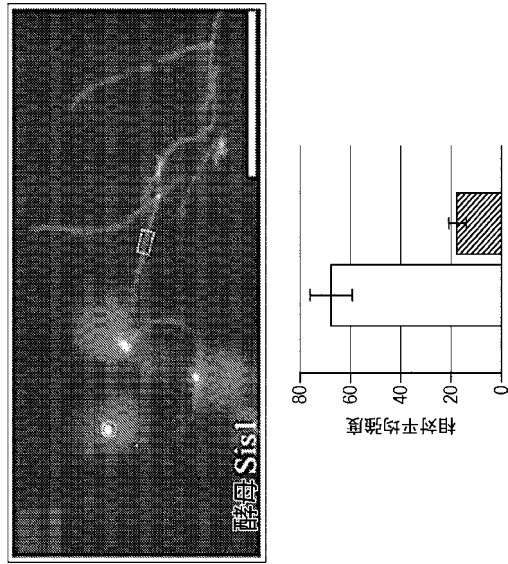
【図 6 B】



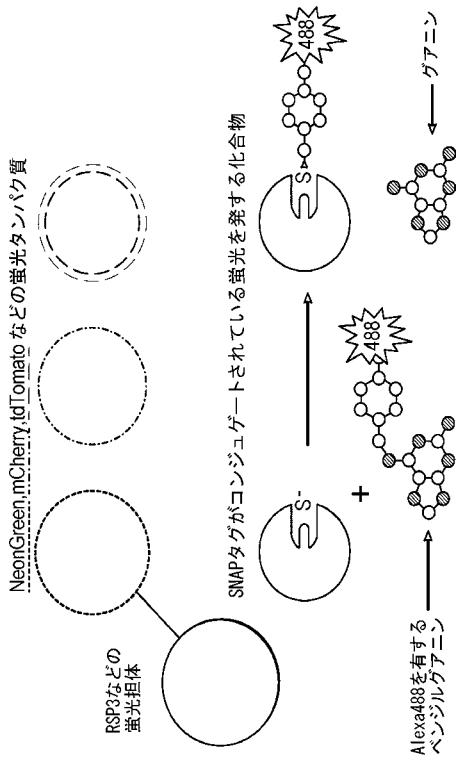
【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



【 図 7 】



【配列表】

2019510494000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US 2017/024051
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 14/00 (2006.01)</i> <i>C07K 14/415 (2006.01)</i> <i>C07K 17/14 (2006.01)</i> <i>C07K 19/00 (2006.01)</i> <i>G01N 21/64 (2006.01)</i>		
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)		
C07K 14/00, 14/415, 17/14, 19/00 G01N 21/64		
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)		
PatSearch, EMBL, NCBI, PAJ, Espacenet, DWPI, PCT Online, USPTO DP, CIPO (Canada PO), SIPO DB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 1009853 B1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY ) 26.04.2006, paragraphs [0032], [0044],[0052], [0093]-[0110], [0149]-[0159], example J, claims	29-31, 37-40 1-3, 21-28
X Y	KRISHNA KUMAR VASUDEVAN et al. FAP206 is a microtubule-docking adapter for ciliary radial spoke 2 and dynein c. Mol. Biol. Cell, 2015, Vol.26, no.4, p. 696-710, especially p.696-697, 704, 706	36 1-3, 21-28
X Y	TAKASHI ISHIKAWA. Cryo-electron tomography of motile cilia and flagella. Cilia, 2015, Vol.4, no.3, DOI:10.1186/s13630-014-0012-7, p.1-20, especially p.1, 8, 14, 17	29-30 1-3, 21-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document 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		Date of mailing of the international search report
05 June 2017 (05.06.2017)		13 July 2017 (13.07.2017)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Authorized officer  I.Goretova  Telephone No. 495 531 65 15

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. <b>PCT/US 2017/024051</b>
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: 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:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-20, 32-35 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 14/405 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/405	
<b>C 0 7 K 14/435 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/435	
<b>C 1 2 N 15/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/12	
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	

(81) 指定国 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, 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, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 リュー イ  
アメリカ合衆国 5 3 2 0 1 ウィスコンシン州 ミルウォーキー ピーオー ボックス 1 8 8  
1 マーケット ユニバーシティ内

(72) 発明者 ヤン ピンフェン  
アメリカ合衆国 5 3 2 0 1 ウィスコンシン州 ミルウォーキー ピーオー ボックス 1 8 8  
1 マーケット ユニバーシティ内

F ターム(参考) 2G045 DA36 FB04 FB07 FB12  
4B065 AA01X AB01 AC14 BA02 CA24 CA46  
4H045 AA10 AA30 BA41 CA10 CA50 EA50 FA74