

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5412689号
(P5412689)

(45) 発行日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)

(24) 登録日 平成25年11月22日 (2013. 11. 22)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/542 (2006. 01)	GO 1 N 33/542 Z N A A
C O 7 K 9/00 (2006. 01)	C O 7 K 9/00
C O 7 K 14/33 (2006. 01)	C O 7 K 14/33

請求項の数 18 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2010-524831 (P2010-524831)	(73) 特許権者	513268069
(86) (22) 出願日	平成20年3月31日 (2008. 3. 31)		バイオマデイソン・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2010-539477 (P2010-539477A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・920
(43) 公表日	平成22年12月16日 (2010. 12. 16)		14、デル・マー、ルネータ・ドライブ・
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/004252		1568
(87) 国際公開番号	W02009/035476	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開日	平成21年3月19日 (2009. 3. 19)		特許業務法人川口国際特許事務所
審査請求日	平成23年2月24日 (2011. 2. 24)	(72) 発明者	フィツシュ、ロバート・デー
(31) 優先権主張番号	60/972, 673		アメリカ合衆国、カリフォルニア・927
(32) 優先日	平成19年9月14日 (2007. 9. 14)		82、タステイン、カマー・レイン・24
(33) 優先権主張国	米国 (US)		56

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 切断配列とスパーサーを用いた共鳴エネルギー転移アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ドナーが双極子-双極子カップリング機構によってアクセプターにエネルギーを転移することができるような電気的カップリングを与えるように配置されたドナー標識及びアクセプター標識、並びに、

ドナーとアクセプターの間に配置され、切断部位配列を有するリンカー、ドナーと切断部位配列の間の第一のスパーサー、及びアクセプターと切断部位配列の間の第二のスパーサー

を有する構築物であって、

ここで、第一のスパーサーは、(GGGGS)_n、(EAAAK)_n及び(SGLRSRA)のうちの一つを含み、第二のスパーサーは、(GGGGS)_n、(EAAAK)_n及び(SNS)のうちの一つを含み(nは、1から3である)、

前記第一及び第二のスパーサーが、スパーサーなしの対応する構築物と比べて、前記ドナー標識からアクセプター標識へのエネルギー転移に基づくアッセイの感度を増加させ、リンカーは、SNAREタンパク質、SNAREモチーフ及びSNARE変異体を含む、構築物。

【請求項 2】

ドナー及びアクセプターの少なくとも1つが蛍光団又は発色団の少なくとも1つである、請求項1の構築物。

【請求項 3】

10

20

双極子-双極子カップリング機構がフォスター共鳴エネルギー転移 (FRET) である、請求項1の構築物。

【請求項4】

リンカーが5nm以上の一次構造長を有する、請求項1の構築物。

【請求項5】

リンカーが8nm以上の一次構造長を有する、請求項1の構築物。

【請求項6】

リンカーが12nm以上の一次構造長を有する、請求項1の構築物。

【請求項7】

リンカーは第一のスペーサー及び第二のスペーサーの少なくとも一つを含む、請求項1の構築物。 10

【請求項8】

スペーサーが (GGGS)n (nは、1から3である) を含む、請求項7の構築物。

【請求項9】

スペーサーが (EAAAK)n (nは、1から3である) を含む、請求項7の構築物。

【請求項10】

切断部位配列がSNAREタンパク質の変異タンパク質を含む、請求項1の構築物。

【請求項11】

スペーサーが、(GGGS)n及び(EAAAK)n (nは、1から3である) からなる群から選択される配列を含む、請求項1の構築物。 20

【請求項12】

構築物が、CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP及びCFP-(SGLRSRA)-シナプトブレビン-(SNS)-YFPからなる群から選択される、請求項1の構築物。

【請求項13】

ドナー標識とアクセプター標識の間のエネルギー転移の感度を向上させる方法であって、

リンカーを通じて物理的に結合されたドナー標識とアクセプター標識を含む構築物を準備すること、ここで、リンカーはSNAREタンパク質、SNAREモチーフ及びSNARE変異体を含み、 30

リンカー中に切断部位配列を含めること、

ドナーと切断部位配列の間に第一のスペーサー及びアクセプターと切断部位配列の間に第二のスペーサーを含めること、これにより、第一のスペーサー及び第二のスペーサーは、スペーサーなしの対応する構築物と比べて、ドナーとアクセプター間の電気的カップリングを増大させる、

を含み、

第一のスペーサーは、(GGGS)n、(EAAAK)n及び(SGLRSRA)のうちの1つを含み、第二のスペーサーは(GGGS)n、(EAAAK)n及び(SNS)のうちの1つを含む(nは1から3である)、方法。 40

【請求項14】

構築物がタンパク質を基礎とする構築物であり、及びリンカーがペプチド配列である、請求項13の方法。

【請求項15】

構築物が、CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP及びCFP-(SGLRSRA)-シナプトブレビン-(SNS)-YFPからなる群から選択される、請求項13の方法。

【請求項16】

スペーサーが、(GGGS)n及び(EAAAK)n (nは、1から3である。) からなる群から選択される配列を含む、請求項13の方法。

【請求項17】

アッセイが完全な細胞に対して適用される、請求項13の方法。

【請求項18】

ボツリヌス神経毒素を検出する方法であって、

a) 請求項1の構築物を準備すること、ここで、リンカーは、検出されるべきボツリヌス神経毒素の基質タンパク質又は切断可能なその断片であり、第一のスペーサーと第二のスペーサーにより、ボツリヌス神経毒の検出に対し感度が増加している、

b) ボツリヌス神経毒素が基質タンパク質又はその断片を切断する条件下で、ボツリヌス神経毒素を含有すると疑われる試料に前記構築物を曝露すること、並びに

c) 構築物が試料に曝露される前及び後に、FRETシグナルを検出及び比較することを含み、FRETの減少が試料中のボツリヌス神経毒素の存在を示す、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2007年9月14日に出願された仮出願60/972673（その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）の優先権を主張する。

【0002】

（発明の分野）

本発明の分野は、ボツリヌス毒素及び破傷風毒素に関連するプロテアーゼアッセイのための蛍光共鳴エネルギー転移である。

【背景技術】

20

【0003】

ボツリヌス神経毒（BoNT）は、クロストリジウム・ボツリナム（*Clostridium botulinum*）によって産生され、公知の毒素の中で最も強力な毒素である。これらの毒素は、食中毒の有名な原因であり、しばしば、深刻な損害又は犠牲者の死をもたらす。構造的に関連した7つのボツリヌス神経毒素又は血清型が存在し（BoNT/AからG）、それらの各々が重鎖（約100KD）及び軽鎖（約50KD）から構成される。重鎖は、受容体によって媒介されるエンドサイトーシスを通じた標的細胞中への毒素の侵入を媒介する。一旦、内部に取り込まれると、軽鎖は、エンドソーム小胞の管腔からサイトゾル中へ転位され、小胞一標的膜融合を媒介するタンパク質（「基質タンパク質」）を切断するための亜鉛依存性プロテアーゼとして作用する。

30

【0004】

これらのBoNT基質タンパク質には、形質膜タンパク質であるシンタキシン、表在性膜タンパク質であるSNAP-25及び小胞膜タンパク質であるシナプトブレビン（Synb）が含まれる。これらのタンパク質は、SNARE（可溶性N-エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質受容体）タンパク質と総称される。SNAREタンパク質の切断は、形質膜との小胞融合を遮断し、神経筋接合部での神経伝達物質の放出を停止する。SNAREタンパク質のうち、シンタキシン及びSNAP-25は、通常、標的膜上に存在し、従って、 α -SNAREと称されるのに対して、シナプトブレビンは、シナプス内のシナプス小胞とともに専ら見出され、 v -SNAREと称される。総合すると、これら3つのタンパク質は、小胞膜と形質膜間での融合を媒介する最小の機構と考えられている複合体を共同して形成する。BoNT/A、E及びC¹は、単一の、但し異なる部位において、SNAP-25を切断し、BoNT/B、D、F、Gは、シナプトブレビン（Synb）を切断する。BoNT/Cは、SNAP-25の他に、シンタキシンも切断する。

40

【0005】

食中毒の原因として、及び生物テロの武器としての脅威のため、BoNTを感度よく、迅速に検出する必要がある。現在、毒素を検出するための最も感度が高い方法は、マウス中で毒素アッセイを行うことである。この方法は、大量のマウスを必要とし、時間がかかり、毒素の触媒速度論を研究するために使用することはできない。毒素に対する抗体の使用を基礎とする多数の増幅されたイムノアッセイ系も開発されているが、これらの系の多くは、複雑で高価な増幅プロセスを必要とし、毒素の触媒活性を研究するために使用

50

することもできない。HPLC及びイムノアッセイは、切断された基質分子を検出し、これらの毒素の酵素活性を測定するために使用することができるが、これらの方法は、一般に、時間がかかり、複雑であり、そのうち幾つかは特殊な抗体を必要とするので、大規模なスクリーニングに適用することはできない。従って、BoNTを検出するための改善された新しい方法及び組成物に対する要望が存在する。

【0006】

FRETアッセイでは、毒素切断部位を含有する極めて短い合成ペプチド（20から35アミノ酸）中の2つの固有アミノ酸を置換するために、2つの蛍光発生性アミノ酸誘導体を使用される。ペプチド中において、あるアミノ酸誘導体と別のアミノ酸誘導体が近接したときに、あるアミノ酸誘導体の蛍光シグナルは別のアミノ酸誘導体によって消光され、この機序は、「フォスター共鳴エネルギー転移（FRET; Forster resonance energy transfer）」と呼ばれる。ペプチドの切断は2つのアミノ酸誘導体を分離し、FRETの減少を検出することができる。

10

【0007】

FRETアッセイは、BoNTを検出するために首尾よく使用されてきた（例えば、2003年10月28日に出願されたChapmanに対する米国特許出願2004/0191887号、2004年12月20日に提出されたChapmanに対する米国特許出願2006/0134722号、Stewardに対する米国特許第7,208,285号（2007年4月）及びFernandez-Salasに対する米国特許第7,183,066号（2007年2月）（これらの各々は、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。組み込まれた参考文献中の用語の定義又は使用が本明細書中に挙げられているその用語の定義と一致せず、又は反対である場合には、本明細書中に挙げられているその用語の定義が適用され、参考文献中のその用語の定義は適用されない。）。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許出願2004/0191887号明細書

【特許文献2】米国特許出願2006/0134722号明細書

【特許文献3】米国特許第7,208,285号明細書

【特許文献4】米国特許第7,183,066号明細書

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

BoNTの検出に対してFRETアッセイを応用する上で幾らかの成功が示されてきたが、感度及び特異性が十分ではない。従って、改善された装置、システム及び方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、分子構築物がドナー標識、アクセプター標識、ドナーとアクセプターの間に配置されたリンカーペプチド（リンカーは、切断部位配列を有する。）及び（a）ドナーと切断部位配列及び（b）アクセプターと切断部位配列の少なくとも1つの間のスペーサーを含む、装置、システム及び方法を提供する。

40

【0011】

好ましい実施形態において、ドナー標識が、双極子-双極子カップリング機構によって、アクセプター標識へエネルギーを転移させることができるように、ドナー及びアクセプター標識は電気的カップリングを与えるように配置される。特に好ましい実施形態において、双極子-双極子カップリング機構は、フォスター共鳴エネルギー転移（FRET）である。

【0012】

50

ドナー及びアクセプター標識は、発色団又は蛍光団部分の何れかであり得、ドナー標識の発光スペクトルはアクセプター標識の励起スペクトルと重複する。好ましくは、ドナーは、緑色蛍光タンパク質又はその変形物であり、アクセプターは、緑色蛍光タンパク質の対応する変形物である。本発明のために特に好ましいドナー及びアクセプター標識（蛍光団の対）は、CFP-YFPである。

【0013】

好ましい実施形態において、リンカーペプチドは、シナプトブレビン（VAMP）、シタキシシン及びSNAP-25又はボツリヌス神経毒素によって認識及び切断され得るこれらの断片（「切断可能断片」）からなる群から選択されるボツリヌス神経毒素の基質である。これらのタンパク質は、SNARE（可溶性N-エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質受容体）タンパク質と総称される。リンカーは、例えば、5nm、8nm、10nm、12nm、14nm及び20nmに等しい又はそれ以上など、あらゆる適切な長さの一次構造長を有し得る。

10

【0014】

特に好ましい実施形態において、完全な構築物は、CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP又はCFP-(SGLRSRA)-シナプトブレビン-(SNS)-YFPを含む。

【0015】

一実施形態において、リンカーペプチドは、少なくとも約14のアミノ酸残基及び配列番号1から6（以下に論述されている。）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態において、リンカーペプチドは、少なくとも約15又は少なくとも約16又は少なくとも約17又は少なくとも約18又は少なくとも約19又は少なくとも約20又は少なくとも約21又は少なくとも約22又は少なくとも約23又は少なくとも約24又は少なくとも約25又は少なくとも約26又は少なくとも約27又は少なくとも約28又は少なくとも約29のアミノ酸残基を含み、配列は、配列番号1から6（以下に論述されている。）からなる群から選択される。

20

【0016】

好ましい実施形態において、リンカーペプチドは、少なくとも約30のアミノ酸残基及び配列番号1から6からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。より好ましくは、リンカーペプチドは、少なくとも約35のアミノ酸残基、又は少なくとも約40のアミノ酸残基、又は少なくとも約45のアミノ酸残基、又は少なくとも約50のアミノ酸残基を含む。特に好ましい実施形態において、本発明の構築物は、少なくとも約55のアミノ酸残基又は少なくとも約65のアミノ酸残基を含むリンカーペプチドを含む。

30

【0017】

本発明の切断部位配列は、（a）SNAREタンパク質、モチーフ、変異タンパク質及び（b）少なくとも5つのアミノ酸を有するスペーサー（スペーサーは、（GGGS）_n及び（EAAAK）_n（_nは、1から3である。）からなる群から選択される配列を含む。）を有利に含み得る。

【0018】

本明細書において、タンパク質の「変異タンパク質」は、例えば、原型タンパク質と少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は98%の同一性を有する組成物など、対応する原型タンパク質と少なくとも30%の同一性を有するものと解釈されなければならない。同一性からの変動は、付加、欠失及び置換の何れか又はそれ以上を含み得る。想定される変異タンパク質には、断片、末端切断物及び融合タンパク質が含まれる。

40

【0019】

本発明のスペーサーは、アミノ酸のあらゆる適切な数を有し得るが、好ましくは、少なくとも3、5、7、10、12又は15のアミノ酸を有し得る。スペーサーは、（GGGS）_n及び（EAAAK）_n（_nは、1から3である。）からなる群から選択される配列を含み得る。あるいは、スペーサーは、SNAREモチーフを含み得る。有利には、ス

50

ペーサーのこのような構成は、スペーサーを持たない対応する構築物と比較して、ドナー標識とアクセプター標識間の電気的カップリングを増加させる。

【0020】

さらに、本発明は、上記構築物をコードする単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。構築物は、好ましくは、プロモーターに作用可能に連結されたポリヌクレオチド分子を含む発現ベクターである。本発明の好ましいプロモーターは、誘導性プロモーターである。

【0021】

本発明は、上記単離されたポリヌクレオチド分子を含む細胞も提供する。一実施形態において、細胞は、初代培養された神経細胞、PC12細胞又はその誘導物、初代培養されたクロマフィン(chromaphin)細胞、神経芽細胞腫細胞、ヒトアドレナリン作動性SK-N-SH細胞及びNS-26細胞株からなる群から選択される。好ましくは、細胞は、皮質神経細胞、海馬神経細胞、脊髄運動神経細胞又はマウスコリン作動性Neuro2a細胞である。

【0022】

さらなる実施形態において、本発明は、適切な容器中に本発明の構築物を含むキットを提供する。

【0023】

ドナー標識とアクセプター標識間のエネルギー転移の感度を向上させる、想定される方法は、(a) リンカーを通じて物理的に結合されたドナー標識とアクセプター標識を含む構築物を準備すること((a) リンカー中に切断部位配列を含み、及び(b) ドナーと切断部位配列及びアクセプターと切断部位配列の少なくとも1つの間に、リンカー中にスペーサーを含むことにより、ドナーとアクセプター間の電気的カップリングが増加される。)を含む。本明細書において想定される構築物は、完全な細胞、可溶化液又は活性なペプチダーゼを含むあらゆる物質に対して適用することができる。

【0024】

何らかの特定の理論又は作用機序に拘泥することを望むものではないが、スペーサーは、ドナーとアクセプター間の電気的カップリングを増加させることによって感度及び特異性を向上させ、次いで、電気的カップリングの増加は、(a) ドナーとアクセプター間の三次構造の距離を減少させ、及び(b) ドナーとアクセプター間の電気的跳躍(hop)を与えることによって引き起こされる。

【0025】

好ましい実施形態において、構築物はタンパク質を基礎とする構築物であり、リンカーはペプチド配列であり、切断部位配列はSNAREタンパク質又はその断片若しくは変異タンパク質を含み、及びスペーサーは少なくとも3、5、7、10、12及び15アミノ酸を含む。スペーサーは、(GGGGS)_n及び(EAAAK)_n(_nは、1から3である。)からなる群から選択される配列を含み得る。

【0026】

(a) 本明細書に上記されている構築物を準備すること(リンカーは、基質タンパク質であり、又は検出されるべきボツリヌス神経毒素に対応する切断可能なその断片である。)、(b) ボツリヌス神経毒素はタンパク質基質又はその断片を切断する条件下で、ボツリヌス神経毒素を含有すると疑われる試料に前記構築物を曝露すること、並びに(c) 構築物が試料に曝露される前及び後に、FRETシグナルを検出及び比較することを含み、FRETの減少が試料中のボツリヌス神経毒素の存在を示唆する、ボツリヌス神経毒素を検出する方法も本明細書に開示される。好ましい実施形態において、さらなるZn²⁺が検出されるべき試料に添加される。本発明の方法は、BoNT/A、E及びCからなる群から選択されるボツリヌス神経毒素の検出に適しており、対応する基質タンパク質はSNAP-25又は切断可能なその断片である。本発明の方法は、対応する基質タンパク質として、シナプトブレビン(Syb)又は切断可能なその断片を用いて、BoNT/B、D、F又はGを検出するのにも適している。同様に、本発明の方法は、対応する基質タンパ

10

20

30

40

50

ク質として、S N A P - 2 5 又は切断可能なその断片を用いて B o N T / C を検出するのに適している。

【0027】

好ましい実施形態において、本発明の方法に関して、F R E T は、1) アクセプター (A) 発光波長及びドナー (D) 発光波長で発光された蛍光を測定し、それぞれの発光の大きさの比によってエネルギー転移を測定すること；2) D の蛍光寿命を測定すること；3) D の光退色速度を測定すること；4) D 又は A の異方性を測定すること；及び5) S t o k e s シフト単量体／励起二量体蛍光を測定することからなる群から選択される方法によって検出される。

【0028】

本発明は、上記構築物を発現するように遺伝子操作された細胞を準備すること（構築物中のリンカーは、ボツリヌス毒素に対応する基質ペプチドである。）；候補阻害剤化合物の存在下で、ボツリヌス神経毒素に前記細胞を曝露すること；並びにボツリヌス毒素への前記曝露前及び後に、細胞の F R E T シグナルを検出することを含み、候補阻害剤の不存在下でのボツリヌス神経毒素に曝露された細胞と比べて、F R E T の減少が実質的に観察されないことが、候補阻害剤がボツリヌス神経毒素を阻害できることを示唆する、ボツリヌス神経毒素の阻害剤をスクリーニングする方法も提供する。好ましくは、候補化合物は、化合物のライブラリーに属し、前記方法は高処理量の方法である。

【0029】

さらなる実施形態において、本発明は、B o N T 標的ペプチドの層を金属表面上に堆積させること、B o N T が金属表面上の標的ペプチドを切断できる条件下で、その表面上に B o N T 標的ペプチドを有する前記金属表面に対応する B o N T を含有すると疑われる試料に曝露すること、及び表面プラズモン共鳴画像化を介して、B o N T 切断の結果としての金属表面に結合された標的ペプチドの分子量の何らかの減少を測定することを含む、ボツリヌス神経毒素を検出する方法を提供する。

【0030】

本発明の別の実施形態は、a) 本明細書中に記載されている構築物を準備すること（リンカーは、検出されるべきボツリヌス神経毒素に対応する基質タンパク質又は切断可能なその断片であり、及びリンカータンパク質が、ドナーとアクセプター蛍光団の間で F R E T が生じる立体配置を採るように、構築物が細胞の形質膜に繋着されている。）、b) ボツリヌス神経毒素がタンパク質基質又はその断片を切断する条件下で、ボツリヌス神経毒素を含有すると疑われている試料に構築物を曝露すること、並びに c) 構築物が試料に曝露される前及び後に、F R E T シグナルを検出及び比較することを含み、F R E T の減少が試料中のボツリヌス神経毒素の存在を示唆する、ボツリヌス神経毒素を検出する方法である。

【0031】

さらに、本発明は、リンカーペプチド、第一の蛍光団部分及び第二の蛍光団部分を含み、前記リンカーペプチドがシナプトブレビン、シンタキシン及び S N A P - 2 5 又はボツリヌス神経毒素によって切断され得るこれらの断片からなる群から選択されるボツリヌス神経毒素の基質であり、並びに第一の蛍光団部分の発光スペクトルが第二の蛍光団部分の励起スペクトルと検出可能に異なる、分子構築物を提供する。好ましくは、リンカーは、基質シナプトブレビン、シンタキシン又は S N A P - 2 5 の完全長タンパク質である。好ましくは、構築物は、細胞内に存在してもよく、又は存在しなくてもよい小胞に繋着される。さらに、本発明は、上記ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物を提供する。

【0032】

さらに、本発明は、a) 上記ペプチド構築物を準備すること、b) ボツリヌス神経毒素がタンパク質基質又はその断片を切断する条件下で、ボツリヌス神経毒素を含有すると疑われる試料に構築物を曝露すること、及び c) 第一及び第二の蛍光団の蛍光シグナルの空間的分離を検出することを含み、空間的分離の発生が試料中のボツリヌス神経毒素の存在

10

20

30

40

50

を示唆する、ボツリヌス神経毒素を検出する方法を提供する。好ましくは、小胞は生きた細胞内部に存在し、リンカーペプチドはS N A P-25 (198-206)-Y F Pに連結されたC F P-S N A P-25 (1-197)であり、C F P蛍光が検出されるが、Y F P蛍光が検出されないことが、試料中におけるボツリヌス神経毒素の存在の存在を示唆する。

【0033】

本発明の主題の様々な目的、特徴、態様及び利点が、類似の数値が類似の要素を表す添付の図面と合わせて、好ましい実施形態の以下の詳細な記述からさらに明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、ボツリヌス神経毒素プロテアーゼ活性をモニタリングするための、C F P-Y F Pを基礎とするバイオセンサーの模式図である。図1Aは、バイオセンサー構築物の構成である。C F P及びY F Pは、それぞれ、シナプトブレビン（アミノ酸33から94、上図）又はS N A P-25（アミノ酸141から206、下図）の断片を介して接続されている。これらの断片上の各ボツリヌス神経毒素に対する切断部位が標識されている。図1Bは、C F Pの励起がY F P蛍光発光をもたらすF R E Tに対するドナー-アクセプター対としてC F P及びY F Pが機能することを示す（上図）。連結されたC F PとY F P間でのエネルギー転移は、ボツリヌス神経毒素によるシナプトブレビン又はS N A P-25断片の切断後に消失する（下図）。C F Pに対する最適な励起波長は434nmであり、発光ピークは、C F Pに関して470nm及びY F Pに対して527nmである。

【図2】図2は、組換えバイオセンサータンパク質の蛍光発光スペクトルを示す。図2Aは、組換えヒス6タグ付加C F P及びY F Pのみ（300nM）並びにこれら2つのタンパク質の混合物（1：1）の発光スペクトルを示す。H e p e s緩衝液（50mM H e p e s、2mM D T T及び10μm Z n C l 2、pH7.1）中で、P T I Q M-1蛍光度計を用いて、450から550nmまで蛍光シグナルを収集した。励起波長は、C F Pに対して最適な434nmである。Y F Pタンパク質は、434nmでの直接励起によって、小さな蛍光発光シグナルを生じるに過ぎない。図2Bは、パネル図2A中に記載されているように収集された組換えh i s 6タグ付加C F P-S y b I I-Y F Pの発光スペクトルを示す。矢印は、F R E Tから得られたY F P発光ピークを示す。図2Cは、パネル図2A中に記載されているように収集された、組換えh i s 6タグ付加C F P-S N A P-25-Y F Pの発光スペクトルを示す。

【図3】図3は、ボツリヌス神経毒素によるバイオセンサータンパク質の切断が、インビトロでのリアルタイムの発光スペクトルスキャンによってモニターされ得ることを図示している。A) 37℃で30分間、2mM D T T、10μm Z n C l 2を用いて、B o N T/Bを予め還元した。H e p e s緩衝液（50mM H e p e s、2mM D T T、10μm Z n C l 2）中に300nM C F P-S y b I I-Y F Pタンパク質を含有するキュベット中に、50nM毒素を添加した。毒素を添加する前及び後の表記時点で、図2Aに記載されているように発光スペクトルを記録した（上図）。各発光スキャン後に、試料30μLをキュベットから採取し、S D S搭載緩衝液と混合した。これらの試料をS D S-p a g e及び強化化学発光（E C L）に供した。融合タンパク質N末端のh i s 6タグを認識する抗h i s 6抗体を用いて、C F P-S y b I I-Y F P融合タンパク質の切断を検出した（下図）。C F P-S y b I I-Y F P融合タンパク質の切断は、減少したY F P蛍光及び増加したC F P蛍光をもたらした。発光スペクトルスキャンによって、この変化をリアルタイムに記録した。B) パネルAに記載されているようにB o N T/F活性を検査するために、C F P-S y b I I-Y F Pを使用した。C) パネルAに記載されているように、B o N T/A活性を検査するために（10nM毒素を使用した。）、C F P-S N A P-25-Y F Pを使用した。D) パネルAに記載されているように、B o N T/E活性を検査するために（10nM毒素を使用した。）、C F P-S N A P-25-Y F Pを使用した。

【図4】図4は、マイクロプレート分光蛍光光度計中でのバイオセンサータンパク質を用いたボツリヌス神経毒素プロテアーゼ速度論のモニタリングを示す。A) ボツリヌス神経毒素によるバイオセンサータンパク質の切断中の蛍光変化は、プレートリーダーを用いてリアルタイムで記録することができた。300 nM CFP-SNAP-25-YFPと10 nM BoNT/Aを混合し、プレートリーダーを用いて、100 μ L/ウェルの試料をスキャンした。励起は434 nmであり、各データ点に関して、470 nmの発光値 (CFPチャンネル) 及び527 nm (YFP又はFRETチャンネル) を集めた。データ点当たり30秒の間隔で、反応を1時間半追跡した。YFP蛍光の減少及びCFP蛍光の増加がリアルタイムでモニターされた。B) 切断の速度は、神経毒素の濃度に依存する。バイオセンサータンパク質の同じ量を切断する能力に関して、ボツリヌス神経毒素A及びEの様々な濃度を検査した。同じデータ点でのYFP発光シグナルとCFP発光シグナル間の比によって、FRETシグナルの変化 (FRET比) を測定する。C) 内部対照として、CFP-SNAP-25-YFPタンパク質のみ及びCPF/YFPタンパク質混合物 (1:1) を同時にスキャンした。

【図5】図5は、プレートリーダーを用いたバイオセンサーアッセイの感度を示す。A) 96ウェルプレート中のBoNT/A又はEの様々な濃度と300 nM CFP-SNAP-25-YFPを混合した。総容積は、100 μ L/ウェルである。プレートを37°Cで4時間温置し、次いで、プレートリーダーを用いてスキャンした (上図)。毒素濃度の対数値に対して、FRET比をプロットした。各曲線に対するEC50値が、下図の表中に列記されている。各データ点は、3つの独立した実験の平均を表す。B) BoNT/B又はFの様々な濃度と300 nM CFP-SybII-YFPを混合した。データを収集し、パネルA中に記載されているようにプロットした。

【図6】図6は、生きた細胞中でのボツリヌス神経毒素活性のモニタリングを図示する。A) 野生型PC12細胞中で、CFP-SNAP-25-YFPを発現させた。細胞内のCFP-SNAP-25-YFP切断に起因するFRET比の変化を記録することによって、BoNT/A (50 nM) の侵入及び触媒活性をモニターした。FRET比は、合計53の毒素処理された細胞及び53の対照細胞から平均を求めた。BoNT/Aでの72時間の処理は、有意な程度で、細胞の全集団のFRET比を低下させた ($P < 1.47 \times 10^{-5}$)。B) sytIIを発現するPC12細胞に、CFP-SybII-YFPを形質移入し、BoNT/B (30 nM) で処理した。パネル (A) におけるように、FRET比の変化を記録することによって、BoNT/Bの侵入及び触媒活性をモニターした。73の毒素処理された細胞及び73の対照細胞を分析した。BoNT/Bでの72時間の処理は、有意な程度で、細胞の全集団のFRET比を低下させた ($P < 2 \times 10^{-10}$)。

【図7】図7は、本発明を使用した生きた細胞中でのBoNT/A活性のモニタリングを示す。(a) 生きた細胞中での毒素センサーのFRETシグナルの測定。PC12細胞を形質移入するために、CFP-SNAP-25 (141-206)-YFPを使用した。このセンサーは、細胞中で可溶性であるように見受けられた。正確に同じ設定を用いて、順次、各細胞に対して異なるフィルターの組 (CFP、FRET及びYFP) を用いた3つの画像を撮影した。左側の索引表中に示されているように、任意単位での蛍光強度を反映するために、画像は色分けした。方法中に詳述されているように、FRETフィルターの組を用いて収集されたシグナルからCFP及びYFPの両方から得られたクロストークを差し引くことによって、補正されたFRET値を計算した。(b) BoNT/A活性を検出するために、CFP-SNAP-25 (141-206)-YFPが形質移入されたPC12細胞を使用した。50 nM BoNT/Aホロ毒素を培地に添加し、96時間後に、80の細胞を分析した。CFP蛍光シグナルに対して、補正されたFRETシグナルを標準化し、表記瓶を有するヒストグラムとしてプロットした。対照細胞には、同じセンサーを形質移入したが、毒素での処理は行わず、平行して分析した。BoNT/Aとの温置は、細胞集団の間でFRET比 (補正されたFRET/CFP) をシフトさせ、細胞中のBoNT/Aによって、センサータンパク質を切断したことを示唆する。しかしながら、シフトは小さく、切断は細胞内において効率的でないことを示唆した。(c)。左図：完

全長SNAP-25（アミノ酸1から206）を通じて、CFPとYFPを連結することによって、効率的な毒素センサーを構築し、細胞中でのBoNT/A活性の検出に関して検査した。このCFP-SNAP-25（FL）-YFP融合タンパク質は、その4つのシステインにおいて、パルミトイル化を介して、細胞中の形質膜へ主として局在している（左図、中央図の上側の枠）。中央図：CFP-SNAP-25（FL）-YFPセンサーをPC12細胞に形質移入し、BoNT/A活性を検出するために使用した。50nM BoNT/Aホロ毒素を培地に添加し、パネル（a）中に記載されているように、48及び96時間後に、200個の細胞のFRETシグナルを分析した。対照細胞には、毒素センサーを形質移入したが、毒素での処理は行わず、平行して分析した。代表的な細胞の画像を中央図中に示した。このセンサーは、有意なFRETを与えた（中央図の上側の「補正されたFRET」枠）。細胞をBoNT/Aで処理した後に、FRETシグナルは消失した（96時間、中央図の下側の「補正されたFRET」枠）。注：切断産物の一つであるYFPがタグ付加されたSNAP-25のC末端は、毒素切断後に分解された。従って、YFPの蛍光シグナルは、毒素処理された細胞中において著しく減少した（下側の「YFP」枠）。右図：パネル（b）において記載されているように、表記瓶を有するヒストグラムとして、FRET比をプロットする。（d）PC12細胞にCFP-SNAP-25（Cys-Ala）-YFPを形質移入した（Cys85、88、90、92にAla変異を有する完全長SNAP-25、左図）。このタンパク質は、サイトゾル全体に散在性に分布し、CFP-SNAP-25（FL）-YFP（右図、「補正されたFRET」枠）に対して観察された強いFRETシグナルを欠如していた。（e）PC12細胞に、CFP-SNAP-25（FL）-YFP及びCFP-SNAP-25（Cys-Ala）-YFPを形質移入した。次いで、BoNT/Aあり（+、完全な状態の細胞）又はなし（-、完全な状態の細胞）（50nM、72時間）で細胞を処理し、採集した。また、BoNT/Aに曝露されていない試料から得られた細胞抽出物の半分は、還元されたBoNT/Aあり（+、インビトロ）又はなし（-、インビトロ）とともに、インビトロで温置され（200nM、30分、37℃）、切断産物を示すための対照としての役割を果たした（2つの切断産物が、矢印によって示されている。）。各試料の同じ量（細胞可溶液30μg）を1つのSDS-pageゲルに搭載し、抗GFP抗体を用いたイムノブロット分析に供した。CFP-SNAP-25（FL）-YFPは完全な状態の細胞中で有意な切断を行ったが、細胞中でのCFP-SNAP-25（Cys-Ala）-YFPの検出可能な切断は存在せず、生きた細胞中でのBoNT/Aによる効率的な切断のために、膜の繋着が重要であることを示唆している。注：毒素処理された細胞中には、1つの切断産物（CFP-SNAP-25（1-197））のみが検出され、他の切断産物（SNAP-25（198-206）-YFP）は細胞中で殆ど分解されたことを示唆している。

【図8】図8は、CFP-SNAP-25（141-206）-YFPセンサーを形質膜に繋着することによって、細胞中のBoNT/Aによって効率的に切断されたセンサーが作製されることを示す。（a）形質膜へCFP-SNAP-25（141-206）-YFPを標的化するために構築された構築物の模式的な記載。パルミトイル化部位（残基83から120）を含有するSNAP-25の断片をCFP-SNAP-25（141-206）-YFPセンサーのN末端に融合し、この断片は、融合タンパク質を形質膜へ標的化した。（b）PC12細胞をSNAP-25（83-120）-CFP-SNAP-25（141-206）-YFPで形質移入した。50nM BoNT/Aホロ毒素を培地に添加し、図7a中に記載されているように、96時間後に、80個の細胞のFRETシグナルを分析した。対照細胞には、毒素センサーを形質移入したが、毒素での処理は行わず、平行して分析した。代表的な細胞の画像が左図中に示されている。このセンサーは、有意なFRETを与えた（左図の上側の「補正されたFRET」枠）。細胞をBoNT/Aで処理した後に、FRETシグナルは低下した（96時間、左図の下側の「補正されたFRET」枠）。右図：図7bにおいて記載されているように、表記瓶を有するヒストグラムとして、細胞のFRET比をプロットする。（c）様々なCFP/YFP構築物で、P

10

20

30

40

50

PC12細胞を形質移入し、図7aに記載されているように、対応するFRET比を測定した。細胞中でのCFP及びYFPの同時発現は、本発明者らのアッセイ条件下で有意なFRETをもたらさなかった。CFP-SNAP-25(FL)-YFPはFRETの有意なレベルを示したのに対して、可溶性CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFPは示さなかった。

【図9】図9は、BoNT/BによるSybの効率的な切断には、Sybの小胞への局在化が必要とされることを示す、(a)シナプトタグミンIIを安定に発現するPC12細胞株を形質移入するために、CFP-Syb(33-94)-YFPを使用した(Dong et al. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. J. Cell Biol. 162, 1293-1303 (2003))。このセンサーは、細胞内において可溶性であるように見受けられ、強いFRETシグナルを生成する(上図)。BoNT/B活性を検出するために、CFP-Syb(33-94)-YFPが形質移入されたPC12細胞を使用した。50nM BoNT/Bホロ毒素を培地に添加し、図7bに記載されているように、96時間後に、80個の細胞を分析した。対照細胞には、同じセンサーを形質移入したが、毒素での処理は行わず、平行して分析した。BoNT/Bとの温置は、細胞集団の間でFRET比をシフトさせ、細胞中のBoNT/Bによって、センサータンパク質が切断されたことを示唆した。しかしながら、シフトは小さく、切断は細胞内において効率的でないことを示唆した。(b)YFP-Syb(FL)-CFPセンサーの模式的な記載。完全長Sybは116のアミノ酸を含有し、単一の膜貫通ドメインを通じて、小胞に局在化されている。BoNT/BによるSybの切断は、YFPがタグ付加されたSybの細胞質ドメインを小胞から放出させた。(c)シナプトタグミンIIを安定に発現するPC12細胞にYFP-Syb(FL)-SFPを形質移入し、BoNT/B(50nM、48時間、下側の枠)あり又は毒素なし(対照、上側の枠)で処理した。各細胞に対して、CFP及びYFP蛍光画像を収集し、代表的な細胞が示されている。このセンサーは、小胞に局在化されており、CFP及びYFP蛍光シグナルの両方によって証明されたように、生きた細胞中の核から排除されていた(上側の枠)。BoNT/B処理は、YFPシグナルの再分配をもたらし、これにより、サイトゾル中において可溶性となり、核に入った。(d)CFP及びYFPを連結するために、Syb残基33から116の末端切断された様式を使用した。この構築物は、可溶性センサーCFP-Syb(33-96)-YFP中のSyb断片として、同じサイトゾル領域(残基33から94、パネル(b))を含有し、Sybの膜貫通ドメインも含有する。シナプトタグミンIIを発現するPC12細胞を、CFP-Syb(33-116)-YFP及びCFP-Syb(33-94)-YFPで形質移入した。次いで、BoNT/Bあり(+、完全な状態の細胞)又はなし(-、完全な状態の細胞)(50nM、48時間)で細胞を処理し、採集した。BoNT/Bに曝露されなかった試料から得られた細胞抽出物の半分は、インビトロにおいて、還元されたBoNT/Bあり(+、インビトロ)又はなし(-、インビトロ)に温置した(200nM、30分、37℃)。2つの切断産物は、アスタリスクによって示されている。各試料の同じ量(細胞可溶化液30μg)を1つのSDS-pageゲルに搭載し、抗GFP抗体を用いたイムノブロット分析に供した。CFP-Syb(33-116)-YFPは完全な状態の細胞中で有意な切断を行ったが、CFP-Syb(33-94)-YFPの検出可能な切断は存在せず、生きた細胞中でのBoNT/Bによる効率的な切断のために、小胞への局在化が重要であることを示唆している。

【図10】図10は、ドナー標識とアクセプター標識の間に配置された切断部位配列を含むリンカーを有する従来の構築物を図示する模式図である。

【図11a】図11aは、切断部位配列とスペーサーを含むリンカーを有し、スペーサーが切断部位配列とアクセプター標識の間に配置されている本発明の構築物の一実施形態を図示する模式図である。

【図11b】図11bは、切断部位配列とスペーサーを含むリンカーを有し、スペーサー

10

20

30

40

50

がドナー標識と切断部位配列の間に配置されている本発明の構築物の別の実施形態を図示する模式図である。

【図11c】図11cは、切断部位配列とスパーサーを含むリンカーを有し、スパーサーがドナー標識と切断部位配列及び切断部位配列とアクセプター標識の間に配置されている本発明の構築物の別の実施形態を図示する模式図である。

【図12】図12は、本発明の構築物を用いてドナー標識とアクセプター標識の間でのエネルギー転移の感度を向上させる方法の工程を示すブロック図である。

【図13】図13は、本発明の構築物を用いてボツリヌス神経毒素を検出するための方法の工程を示すブロック図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0035】

本発明は、BONTの基質であり、並びに、好ましくはリアルタイムで、ボツリヌス神経毒素を検出し、及びボツリヌス神経毒素の基質切断活性をモニターするために、毒素によって切断され得るペプチドリンカーによって連結された蛍光団間の蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を基礎とする新規組成物及び方法を提供する。本発明の方法及び組成物は、数時間以内にpMレベルのBONTの検出を可能とし、毒素の酵素的速度論をリアルタイムに追跡することができる。さらに、前記方法及び組成物は、培養された細胞を用いた毒素細胞侵入及び小胞膜を通じた転位の阻害剤などの毒素阻害剤の大規模なスクリーニングのための高処理量アッセイ系において使用することができる。本発明は、生きた細胞及び神経細胞中でボツリヌス神経毒素活性をモニタリングするのにも適している。

20

【0036】

別の実施形態において、本発明は、リンカーとして完全長SNAP-25及びSybタンパク質を含む構築物及び生きた細胞内の毒素活性を検出することができる蛍光性バイオセンサーとして、該構築物を使用する方法を提供する。SNAP-25の切断はCFP/YFPFRETシグナルを消失させ、Sybの切断は細胞中のYFP蛍光の空間的再分布をもたらした。本発明は、毒素阻害剤の細胞を基礎としたスクリーニングを実施し、細胞内の毒素活性を性質決定するための手段を提供する。本発明は、SNAP-25及びSybの細胞内局在化が、それぞれ、細胞中でのBONT/A及びBによる効率的な切断に影響を及ぼすことも開示する。

【0037】

30

蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)は、1つの分子と別の分子(例えば、タンパク質又は核酸)間又は同じ分子上の2つの位置間の距離の評価を可能にするツールである。FRETは、現在、本分野において、周知である(概説として、Matyus, (1992) J. PhotoChem. PhotoBiol. B: Biol., 12:323を参照)。FRETは、励起されたドナー分子からアクセプター分子へエネルギーが転移される無放射性的過程である。無放射性的エネルギー転移は、ある蛍光団の励起状態のエネルギーが、実際の光子発光なしに、別の蛍光団へ転移される量子力学的工程である。量子物理学的な原理は、「Jovin and Jovin, 1989, Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry, eds. E. Kohen and J. G. Hirschberg, Academic Press」に概説されている。要約すれば、蛍光団は、特徴的な波長において光エネルギーを吸収する。この波長は、励起波長としても知られている。蛍光色素によって吸収されたエネルギーは、続いて、様々な経路を通じて放出され、1つの経路は蛍光を生じる光子の放出である。放出される光の波長は、発光波長として知られ、ある蛍光団に固有の特徴である。FRETでは、そのエネルギーは、第二の蛍光団の発光波長において放出される。第一の蛍光団は、一般に、ドナー(D)と称され、アクセプター(A)と称される第二の蛍光団より高いエネルギーの励起状態を有する。

40

【0038】

この過程の本質的な特徴は、ドナーの発光スペクトルがアクセプターの励起スペクトルと重なり合うこと、及びドナーとアクセプターが十分に近接していることである。

50

【0039】

さらに、DとA間の距離は、蛍光団間のエネルギーの無放射転移を可能とするのに十分に小さくなければならない。エネルギー転移の速度は、ドナーとアクセプターの間の距離の六乗に反比例し、エネルギー転移効率は距離の変化に対して極めて敏感である。エネルギー転移は、1から10nmの距離範囲において検出可能な効率で起こると言われているが、典型的には、最適な結果のためには4から6nmである。無放射エネルギー転移が効果的である距離の範囲は、ドナーの蛍光量子効率、アクセプターの吸光係数、それぞれのスペクトルの重複の程度、培地の屈折率及び2つの蛍光団の遷移モーメントの相対的配向性など、他の多くの因子にも依存する。

【0040】

本発明は、対応するBONTによって切断可能なリンカーペプチド（「基質ペプチド」）によって連結された蛍光団FRETドナー及びアクセプターを含む構築物（「FRET構築物」）を提供する。BONTの存在下で、リンカーペプチドは切断され、これにより、ドナー蛍光団によるエネルギー転移の減少及び光の増加した発光がもたらされる。このようにして、毒素のタンパク分解活性をリアルタイムにモニターし、定量することができる。

【0041】

ドナー及び対応するアクセプター蛍光部分に関して本明細書において使用される「対応する」とは、ドナー蛍光部分の励起スペクトルと重複する発光スペクトルを有するアクセプター蛍光部分を表す。アクセプター蛍光部分の発光スペクトルの最大波長は、ドナー蛍光部分の励起スペクトルの最大波長より少なくとも100nm大きくすべきである。従って、効率的な無放射エネルギー転移が生成され得る。

【0042】

基質ペプチド及びBONTに関して本明細書において使用される「対応する」とは、リンカーペプチドに対して作用することができ及び特異的な切断部位で切断するBONT毒素を表す。

【0043】

蛍光性ドナー及び対応するアクセプター部分は、（a）高効率フォスターエネルギー転移、（b）大きな最終ストークスシフト（>100nm）、（c）可視スペクトルの赤色部分への可能な限り遠い発光のシフト（>600nm）、及び（d）ドナー励起波長での励起によって生成されたラマン水蛍光性発光より高い波長への発光のシフトに関して一般的に選択される。例えば、レーザー線付近のその最大励起（例えば、ヘリウム-カドミウム442nm又はアルゴン488nm）、高い吸光係数、高い量子収率及び対応するアクセプター蛍光部分の励起スペクトルとのその蛍光発光の優れた重複を有するドナー蛍光性部分を選択することができる。高い吸光係数、高い量子収率、ドナー蛍光性部分の発光とのその励起の優れた重複及び可視スペクトルの赤色部分（>600nm）中の発光を有する対応するアクセプター蛍光部分を選択することができる。

【0044】

当業者は、多くの蛍光団分子がFRETに適していることを認知している。好ましい実施形態において、蛍光タンパク質が蛍光団として使用される。FRET技術において様々なアクセプター蛍光性部分とともに使用することができる代表的なドナー蛍光性部分には、フルオレセイン、ルシフェールイエロー、B-フィコエリトリン、9-アクリジンイソチオシアナート、ルシフェールイエローVS、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-（4'-イソチオシアナートフェニル）-4-メチルクマリン、スクシンイミジル1-ピレンブチラート及び4-アセトアミド-4'-イソチオシアナートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸誘導体が含まれる。使用されるドナー蛍光性部分に応じて、代表的なアクセプター蛍光性部分には、LC-レッド640、LC-レッド705、Cy5、Cy5.5、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、テトラメチルローダミンイソチオシアナート、ローダミンXイソチオシアナート、エリスロシンイソチオシアナート、フルオレセイン、ジエチレ

10

20

30

40

50

ントリアミンペンタアセタート又はランタニドイオン（例えば、ユーロピウム又はテルビウム）の他のキレート物質が含まれる。ドナー及びアクセプター蛍光性部分は、例えば、Molecular Probes (Junction City, Oreg.) 又は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) から得ることができる。

【0045】

表1は、それらの励起及び発光波長とともに、本発明において使用するのに適した化学的蛍光団の他の例を列記している。

【0046】

トリプトファンなどのある種の天然に存在するアミノ酸は、蛍光性である。アミノ酸は、例えば、FRET用の蛍光団の対を作製するために、アミノ酸上に蛍光性の基を連結することによって（AEDANSをCysに連結するなど）も誘導化させ得る。AEDANS-Cys対は、タンパク質の立体構造の変化及び相互作用を検出するために一般的に使用される。アミノ酸を修飾し、タンパク質断片内でFRETを生成させるために、幾つかの他の形態の蛍光基も使用されている（例えば、S-(N-[4-メチル-7-ジメチルアミノ-クマリン-3-イル]-カルボキサミドメチル)-システイン-とともに2, 4-ジニトロフェニル-リジン）。

【0047】

生きた細胞中で使用するのに特に適している別の実施形態において、緑色蛍光タンパク質（GFP）及びその様々な変異体が蛍光団として使用される。最大励起及び発光が異なる蛍光性タンパク質の例が、WO97/28261 (Tsien et al., 1997)（参照により、本明細書に組み込まれている。）の表1に列記されている。これら（それぞれ、nmで表された「最大励起／最大発光」波長が続く。）には、野生型緑色蛍光性タンパク質 [395 (475) / 508] 及び緑色蛍光性タンパク質のクローニングされた変異体である変形物 P4 [383 / 447]、P4-3 [381 / 445]、W7 [433 (453) / 475 (501)]、W2 [432 (453) / 408]、S65T [489 / 511]、P4-1 [504 (396) / 480]、S65A [471 / 504]、S65C [479 / 507]、S65L [484 / 510]、Y66F [360 / 442]、Y66W [458 / 480]、IOc [513 / 527]、WIB [432 (453) / 476 (503)]、エメラルド [487 / 508] 及びサファイア [395 / 511] が含まれる。558nmの最大励起及び583の最大発光を有するDsRed (Clontech) などの赤色蛍光性タンパク質も使用することができる。このリストは、本分野において公知の蛍光性タンパク質を網羅したものではない。さらなる例が、Genbank及びSwissPro公開データベース中に見出される。

【0048】

【表 1】

表 1

蛍光団	励起 (nm)	発光 (nm)	色
PKH2	490	504	緑
PKH67	490	502	緑
フルオレセイン (FITC)	495	525	緑
ヘキスト 33258	360	470	青
R-フィコエリトリン (PE)	488	578	オレンジ赤
ローダミン (TRITC)	552	570	赤
Ruanum Red™	488	670	赤
PKH26	551	567	赤
テキサスレッド	596	620	赤
Cy3	552	570	赤

10

【0049】

GFPは27から30KDタンパク質であり、別のタンパク質（例えば、標的タンパク質）と融合させることが可能であり、融合タンパク質は、宿主細胞（イー・コリ（E. coli）の細胞など）中で発現されるように改変され得る。GFP及びその様々な変異体は、生きた細胞及び組織中で蛍光を生成することができる。GFPの変異形態は、蛍光領域内に僅かなアミノ酸の差を有しており、これがシフトしたスペクトルをもたらす。異なるスペクトルを有するように、将来、GFPのさらなる変異が作製されると予想される。これらのGFP変形物のうち、BFP-YFP、BFP-CFP、CFP-YFP、GFP-DsRedが、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために、FRETドナー-アクセプター対として一般に使用される。これらの対は、対を連結するリンカー領域のプロテアーゼ切断を検出するのにも適している。

20

【0050】

約60アミノ酸残基のリンカー断片の使用を可能とするので、蛍光性タンパク質の使用が好ましい。より長い断片は、通常、毒素の認識及び切断に対してより感受性が高く、従って、毒素の検出に関してより高い感度をもたらす。以下の実施例に示されているように、CFP-SNAP-YFPとの4時間の温置後のBoNT/A及びEに対するEC50は、幅広く使用されるマイクロプレート分光蛍光光度計（Spectra Max Gemini, Molecular Device）を用いて測定した場合に、僅か15から20pM（1から2ng/mL）の低さである。BoNT/B及びFのEC50は、約200から250pMであり、温置時間を増加させることによって、感度を増強させることができる。

30

【0051】

本発明の一実施形態によれば、2つの蛍光団は、FRETが起こるように、適切な長さのリンカーによって一緒に連結される。リンカーは、BoNT基質タンパク質の断片である。リンカー断片を切断することができるBoNTに曝露されると、2つの蛍光団は分断され、FRETは消失される。従って、本発明は、FRETの変化を検出することによってBoNTを検出するための方法を提供する。多くの種からのSNAREタンパク質がアミノ酸レベルで保存されていることが知られているので、これらのタンパク質は、BoNT毒素に対する基質タンパク質として適している。これらのBoNT基質タンパク質の多くは公知であり、本発明のための適切なリンカーペプチドとして使用し、又は使用のために修飾するのに利用可能である。基質タンパク質の幾つか及びそれらのGenBank受付番号は、表2に列記されている。

40

【0052】

【表 2】

表 2

タンパク質	起源	GenBank 受付番号
syb I	マウス	NP-033522
syb 1a	ヒト	NP_055046
syb I	ラット	AAN85832
syb	アフリカガエル	AAB88137
syb	シビレエイ	A32146
syb	カリフォルニアアメフラシ	P35589
syb	トラフグ (Takifugu rubripes)	AAB94047
syb	ショウジョウバエ	AAB28707
syb II	マウス	NP_033523
syb II	アフリカガエル	P47193
Syb II	ウサギ	AAN14408
syb II	ラット	NP_036795
syb II	ヒト	AAH19608
syb 3	ヒト	AAP36821
SNAP25-1	ゼブラフィッシュ	AAC64289
SNAP25-A	ヒト	NP_003072
SNAP25a	アフリカガエル	AA013788
SNAP25	マウス	XP_130450
SNAP25	ラット	NP_112253
SNAP25	金魚	150480
SNAP25-b	ゼブラフィッシュ	NP_571509
SNAP25b	アフリカガエル	AA013789
SNAP25-3	ヒト	CAC34535

10

20

【0053】

30

各 B o N T 毒素は、毒素切断部位内の 2 つの特異的アミノ酸間の特異的ペプチド結合を切断することが知られている。下表 3 は、各 B o N T 毒素に対するアミノ酸対を列記している。しかしながら、アミノ酸配列のこれらの対は、毒素の認識及び切断のために十分でない。例えば、B o N T / A は、ラット S N A P - 2 5 配列の Q (1 9 7) - R (1 9 8) において S N A P - 2 5 (G e n B a n k 受付番号 : N P 1 1 2 2 5 3) を切断するが、Q (1 5) - R (1 6) において切断しない。一般に、認識部位として保存されたアミノ酸配列は存在せず、むしろ、毒素は、その標的タンパク質の一次構造ではなく三次構造を認識するものと思われる。それにも関わらず、下表 3 中に上掲されている毒素切断部位に 2 つのアミノ酸残基を有する限り、その種の起源に関わらず、基質タンパク質の極めて短い断片が毒素の認識及び切断のために十分である。

40

【0054】

リンカータンパク質又はペプチドは、最長 B o N T 基質タンパク質の完全長とすることができる。好ましくは、リンカーは、基質タンパク質のより短い断片である。完全長基質リンカーは、効率的な F R E T に対して長すぎる場合があり得、より短い断片がより効果的であり、完全長タンパク質より製造がより容易である。他方、上述のように、このような最小の長さを下回ると、各 B o N T によるリンカーペプチドの切断が非効率的となるので、リンカーペプチドはある種の最小長さを上回るべきである。

【0055】

【表 3】

BoNT 毒素によって認識及び切断されるペプチド結合		
毒素	切断部位	最小認識配列候補
BoNT/A	Q-R	Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys (配列番号 1)
BoNT/B	Q-F	Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser (配列番号 2)
BoNT/C (SNAP25)	R-A	Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met (配列番号 3)
BoNT/C (シンタキシン)	K-A	Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Phe (配列番号 4)
BoNT/D	K-L	
BoNT/E	R-I	Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys (配列番号 5)
BoNT/F	Q-K	Glu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu (配列番号 6)
BoNT/G	A-A	

10

【0056】

一例として sybII 及び BoNT/B を用いて、下表 4 は、リンカーペプチド長さと毒素切断率との間の関係を例示する。完全長ラット sybII タンパク質 (GenBank 番号: NP036795) は、116 のアミノ酸を有し、アミノ末端のアミノ酸 1 から 94 は、細胞質ドメインであり、残りは膜貫通ドメインである。表 1 から明らかなように、ある限界内で、より短い断片がより遅い速度で毒素によって切断される (Foran et al., Biochemistry 33:15365, 1994 から得られたデータ)。

20

【0057】

表 4 から明らかなように、破傷風神経毒素 (TeNT) は、BoNT/B (55-94) より最適な切断のために、より長い断片 (33-94) を必要とする。60 から 94 からなる断片が、ペプチドを基礎とする幾つかの毒素アッセイ法などの幾つかの研究において使用されてきた (Schmidt et al., 2003、上記、及び Schmidt et al., 2001, Analytical Biochemistry, 296:130-137)。

30

【0058】

BoNT/A に関して、毒素感受性の多くを保持するために、SNAP-25 の 141-206 断片が必要とされる (Washbourne et al., 1997, FEBS Letters, 418:1)。より短いペプチド (SNAP25 のアミノ酸 187 から 203) が BoNT/A によって切断されるのに十分であるという他の報告も存在する (2001)。BoNT/A に対する最小の部位は、Glu-Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys (配列番号 1) である。BoNT/A は、Gln-Arg を切断する。

【0059】

【表 4】

40

表 4

SybII 断片長と切断率の関係		
sybII 断片長	BoNT/B による相対切断率	TeNT による相対切断率 %
完全長 1-116	100 (%)	100 (%)
33-94	100	100
45-94	121	1.1
55-94	105	0.4
65-94	7	0.3

【0060】

50

PC12細胞内でCFPとYFPの間のリンカー配列として完全長SNAP-25を用いて、準備的な結果は、得られたFRETシグナルがより短い断片を用いて得られたFRETシグナルより強く、慣用の実験室顕微鏡を用いて検出するのに十分であることを示す。おそらく、BoNT/A軽鎖もその上に標的化及び繋着され得る形質膜上に完全長SNAP-25が標的化されるという事実のために、PC12細胞中において、BoNT/Aによる完全長SNAP-25の切断の速度は、短い断片より速く、細胞間でより一貫していると考えられる。

【0061】

BoNT/Bに関しては、最短残基60から94の間の断片が、残基33から94の間の断片と同程度に有効であることが見出された。好ましくは、33から94の間の断片が、BoNT/B及びTeNTに対して使用される。何れの毒素もGln及びPheの間を切断し、切断に対する最小配列は、Gly-Ala-Ser-Gln-Phe-Glu-Thr-Ser（配列番号2）であると思われる。BoNT/B軽鎖はシナプス小胞の上に標的化され、及び繋着され得るという示唆が存在し、細胞内で効率的な増加した切断を達成するために、シグナル配列を介して、本発明のFRET構築物をシナプス小胞に標的化することも望ましい場合があり得る。

10

【0062】

BoNT/Cは、SNAP25とシンタキシンの両方を切断し、基質が溶液中に存在する場合には、極めて遅い速度で切断すると考えられる。細胞膜上に存在する原型のSNAP25及びシンタキシンは、BoNT/Cによって最も効率的に切断される。SNAP25に対する最小切断配列は、Ala-Asn-Gln-Arg-Ala-Thr-Lys-Met（配列番号3）であり、切断は、Arg-Alaの間で起こり、シンタキシンに関して、最小切断配列は、Asp-Thr-Lys-Lys-Ala-Val-Lys-Phe（配列番号4）であり、切断はLys-Alaにおいて起こる。

20

【0063】

BoNT/Eは、Gln-Ile-Asp-Arg-Ile-Met-Glu-Lys（配列番号5）の最小配列を必要とし、Arg-Ileの間で切断する。

【0064】

BoNT/Fは、Gln-Lysを切断する。Schmidt他（Analytical Biochemistry, 296:130-137 (2001)）は、sybIIの37から75の断片が毒素感受性の多くを保持し、最小配列はGlu-Arg-Asp-Gln-Lys-Leu-Ser-Glu（配列番号6）であることを報告した。

30

【0065】

最小切断部位及びFRETシグナル強度とリンカー長の間及び切断効率とリンカー長の間の関係に関する上記論述から、当業者は、FRETシグナル強度と切断効率の間の最適なバランスを達成するための適切なリンカー長を容易に選択することができる。

【0066】

好ましくは、リンカー長は、具体的な基質と毒素の組み合わせに応じて、約8アミノ酸から約100アミノ酸、好ましくは10から90の間、より好ましくは20から80の間、30から70の間、40から60アミノ酸長の間の何れでもよい。

40

【0067】

一実施形態において、リンカータンパク質又はその断片がまず精製され得、又はペプチドがまず合成され、次いで、化学反応を通じて、あるアミノ酸の上に蛍光基が付加された。蛍光標識は、リンカーポリペプチドに付着され、あるいは、蛍光性タンパク質は、以下に記載されているように、リンカーポリペプチドとインフレーションに融合される。上記論述は、毒素検出特異性のために短い基質断片が望ましいのに対して、改善されたシグナル強度又は切断効率のためにはより長い断片が望ましい場合があり得ることを明確にする。基質タンパク質が1つのBoNTに対して2以上の認識部位を含有する場合、位置の結果のみでは、何れの特異的毒素が試料中に存在するかを同定するのに十分ではない。本発明の一実施形態において、より長い基質断片、特に完全長の基質タンパク質が使用される場合

50

、基質が唯一の毒素／プロテアーゼ認識部位を含有するように、例えば、部位指定突然変異導入又は当業者に周知の他の分子改変法を介して、基質を改変し得る。例えば、(BoNT/E切断部位に変異(Asp179→Lys))を有するSNAP-25は、BoNT/E切断に対して抵抗性であるが、SNARE複合体形成に関して検査すると、正常に挙動することを示す)「Zhang et al, 2002, Neuron 34: 599-611 "Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺ triggered exocytosis"」を参照されたい。好ましい実施形態において、本発明の方法は、最適なシグナル強度、切断効率及び毒素／血清型特異性を達成するために、特異性の改変と長さの最適化の組み合わせを使用する。

10

【0068】

好ましい実施形態において、蛍光団は適切な基質ペプチドによって連結された適切な蛍光タンパク質である。次いで、このようなポリペプチド及び蛍光性タンパク質標識をコードする配列のインフレーム融合を含む組換え核酸分子のインビトロでの発現を介して(例えば、無細胞転写／翻訳系を用いて、又は代わりに、本分野で周知の方法を用いて形質転換若しくは形質移入された培養細胞を用いて)、FRET構築物を作製し得る。FRET構築物を作製するための適切な細胞は、細菌、真菌、植物又は動物細胞であり得る。FRET構築物は、インビボ、例えば、トランスジェニック植物中又はトランスジェニック動物(昆虫、両生類及び哺乳類など(但し、これらに限定されない。))中においても産生され得る。本発明において使用する組換え核酸分子は、本分野において周知の分子的方法によって構築及び発現され得、簡易な精製を可能にするためのタグ(例えば、ヒスチジンタグ)、リンカー、分泌シグナル、核局在化シグナル又は特定の細胞位置に構築物を標的化することができる他の一次配列シグナル(これが所望される場合)をコードするものなどの(但し、これに限定されない。)配列をさらに含み得る。

20

【0069】

マイクロプレート分光蛍光光度計を用いて検出することができる十分な蛍光シグナルを生成するのに、最低300nMタンパク質で十分である。蛍光シグナルの変化は、毒素プロテアーゼ酵素活性を反映するためにリアルタイムで追跡することができる。リアルタイムモニタリングは、反応が進行するにつれてシグナルの変化を測定し、迅速なデータ収集可能にし、且つ様々な条件下で反応速度論に関する情報を与える。FRET比から得られた速度論定数の単位を基質濃度に相関させるために、HPLCアッセイなどの方法を用いて、例えば、ある種の分光蛍光光度計に対してFRET比の変化及び切断の程度を相関付け得る。

30

【0070】

図10は、ドナー標識110とアクセプター標識120の間に配置された切断部位配列140及び切断部位142を含むリンカー130を有する従来の構築物100の模式図である。この種の従来技術の構築物は、BoNTを検出するためにかなり良好に機能する。しかしながら、図11aの典型的な構築物100aは、驚くべきことに、リンカー130a内にスペーサー150aを含めているために、BoNTを検出するための増強された感度を有する。

40

【0071】

図11aは、切断部位配列140、切断部位142及びスペーサー150aを含むリンカー130aを有する本発明の構築物100aの一実施形態を図示する模式図である。スペーサー150aは、切断部位配列140とアクセプター標識120の間に配置される。好ましくは、構築物100aは、CFP-(SGLRSRA)-SNAP-25-(SNS)-YFP及びCFP-(SGLRSRA)-シナプトブレビン-(SNS)-YFPからなる群から選択される。

【0072】

フォスター共鳴エネルギー転移(FRET)などの(但し、これに限定されない。)双極子-双極子カップリング機序によって、ドナー標識がアクセプター標識にエネルギーを

50

転移させることができるように、ドナー標識 110 及びアクセプター標識 120 は、電気的カップリングを与えるように配置される。

【0073】

リンカーペプチド 130a は、シナプトブレビン (VAMP)、シンタキシン及び SNARE 25 又はボツリヌス神経毒素によって認識及び切断され得るこれらの断片からなる群から選択されるボツリヌス神経毒素の基質である。これらのタンパク質は、SNARE タンパク質と総称される。リンカー 130a は、例えば、5nm、8nm、10nm、12nm、14nm 及び 20nm に等しい又はそれ以上など、あらゆる適切な長さの一次構造長を有し得る。

【0074】

スペーサー 150a は、アミノ酸のあらゆる適切な数を有し得るが、好ましくは、少なくとも 3、5、7、10、12 又は 15 のアミノ酸を有し得る。スペーサー 150a は、(GGGGS)n 及び (EAAAK)n (n は、1 から 3 である。) からなる群から選択される配列を含み得る。あるいは、スペーサー 150a は、SNARE タンパク質、モチーフ又は変異タンパク質を含むことができる。スペーサー 150a はドナー標識 110 とアクセプター標識 120 間の一次構造距離を増加させるが、スペーサー 150a は、スペーサーなしの対応する構築物と比べて、ドナー標識 110 とアクセプター標識 120 間の電気的カップリング (FRET 効果) を有利に増加させる。スペーサー 150a はドナー標識 110 とアクセプター標識 120 間の三次構造距離を低下させ、従って、電気的カップリングを増加させるので、増強された電気的カップリングが生じる。

【0075】

切断部位配列 140 は、(a) SNARE タンパク質、モチーフ、変異タンパク質及び (b) 少なくとも 5 つのアミノ酸を有するスペーサー (スペーサーは、(GGGGS)n 及び (EAAAK)n (n は、1 から 3 である。) からなる群から選択される配列を含む。) を含み得る。

【0076】

図 11b の構築物 100b は、リンカー 130b がドナー標識 110 と切断部位配列 140 の間に配置されたスペーサー 150b を有することを除き、図 1 の構築物 100a と同様である。

【0077】

図 11c の構築物 100c は、リンカー 130b が (a) ドナー標識 110 と切断部位配列 140 の間に配置されたスペーサー 150b 及び (b) 切断部位配列 140 とアクセプター標識 120 の間に配置されたスペーサー 150d を有することを除き、図 11a の構築物 100a と同様である。

【0078】

図 12 は、図 11a から 11c の構築物を用いて、ドナー標識とアクセプター標識の間でのエネルギー転移の感度を向上させるための方法 200 の工程を図解する。工程 210 は、リンカーを通じて物理的に結合されているドナー標識とアクセプター標識を含む図 11a から 11c に係る構築物を準備することから構成される。構築物はタンパク質を基礎とする構築物であり、リンカーはペプチド配列 212 である。工程 220 は、リンカー中に切断部位配列を含めることから構成される。任意選択で、切断部位配列は、SNARE タンパク質又はその断片若しくは変異タンパク質を含み、スペーサーは少なくとも 5 つのアミノ酸 222 を含む。工程 230 は、ドナーと切断部位配列及びアクセプターと切断部位配列の少なくとも 1 つの間のリンカー中にスペーサーを含めることから構成され、ドナーとアクセプター間の電気的カップリングは、(a) ドナーとアクセプター 234 の間の三次構造距離を短縮させること、及び (b) ドナーとアクセプター 236 間の電気的跳躍を与えることによって増加される。任意選択で、スペーサーは、(GGGGS)n 及び (EAAAK)n (n は、1 から 3 である。) 232 からなる群から選択される配列を含む。

【0079】

図13は、図11aから11cの構築物を用いてボツリヌス神経毒素を検出するための方法300の工程を図解する。工程310は、請求項1の構築物を準備することから構成され、リンカーは、検出されるべきボツリヌス神経毒素の基質タンパク質又はその切断可能断片である。工程320は、ボツリヌス神経毒素が基質タンパク質又はその断片を切断する条件下で、ボツリヌス神経毒素を含有すると疑われる試料に構築物を曝露することから構成される。工程330は、構築物が試料に曝露される前及び後に、FRETシグナルを検出及び比較することから構成され、FRETの減少は試料中のボツリヌス神経毒素の存在を示唆する。

【0080】

本発明の方法は、感度が極めて高く、従って、ボツリヌス細菌細胞内部のプロトキシンなど、環境試料中のBoNTの微量を直接検出するために使用することができる。従って、本発明は、環境試料を用いて、毒素を直接検出及び同定するための方法をさらに提供する。

10

【0081】

本発明は、上述のインビトロ系を用いてBoNTの阻害剤をスクリーニングするための方法をさらに提供する。その高い感度、迅速な読み出し及び使用の容易さのために、本発明を基礎とするインビトロ系は、毒素阻害剤のスクリーニングにも適している。具体的には、適切なBoNT基質-FRET構築物は、候補阻害剤物質の存在下で、対応するBoNTに曝露され、候補がBoNTの活性を阻害するかどうかを測定するために、FRETシグナルの変化がモニターされる。

20

【0082】

本発明は、BoNTを検出するための、及びさらにBoNTの阻害剤をスクリーニングするための細胞を基礎とする系を用いてBoNTを検出する方法をさらに提供する。上述されている適切なBoNT基質-FRET構築物は細胞内で発現され、次いで、細胞は、BoNTを含有すると疑われる試料に曝露され、次いで、BoNTの存在／不存在又は濃度の指標として、FRETシグナルの変化がモニターされる。具体的には、FRETシグナルの減少は、試料が対応するBoNTを含有することを示唆する。

【0083】

細胞を基礎とする高処理量スクリーニングアッセイは、毒素のタンパク質分解活性を遮断することができる因子を明らかにするのみならず、その細胞受容体への結合、エンドソームの膜を横切る軽鎖転位及び転位後におけるサイトゾル中での軽鎖の再折り畳みなど毒素の作用中の他の工程を遮断できる因子も明らかにする可能性を秘めている。

30

【0084】

本発明は、上述の細胞を基礎とする系を用いてBoNTの阻害剤をスクリーニングするための方法をさらに提供する。具体的には、適切なBoNT基質-FRET構築物を発現する細胞が、候補阻害剤物質の存在下で、対応するBoNTに曝露され、候補がBoNTの活性を阻害するかどうかを測定するために、FRETシグナルの変化がモニターされる。毒素-基質相互作用の直接的阻害剤を同定することができるに留まるインビトロを基礎とする他のスクリーニング法と比べて、本発明の細胞を基礎とするスクリーニング法は、毒素-膜受容体結合、膜転位及び細胞内毒素移動など（但し、これらに限定されない。）

40

、他の毒素関連活性の阻害剤をスクリーニングすることをさらに可能とする。

【0085】

好ましい実施形態によれば、BoNT基質ポリペプチド及び2つの適切なFRET実行蛍光性ペプチドをコードする組換え核酸分子、好ましくは発現ベクターが、適切な宿主細胞中に導入される。当業者は、本発明のための適切な発現ベクター、好ましくは、哺乳動物発現ベクターを選択することが可能であり、極めて多数の選択肢が存在することを認める。例えば、pCI及びpSi（Promega、Madison、Wis. から得られる。）、CDM8、pCeo4などのベクターのpcDNA系列。これらのベクターの多くは、ウイルスのプロモーターを使用する。好ましくは、BDBiosciences（San Jose, Calif）から得られるtet-off及びtet-onベクター

50

などの誘導性プロモーターが使用される。

【0086】

細胞株の多くの選択肢が、本発明のための宿主細胞として適している。好ましくは、細胞は、それぞれのB o N Tがその毒性活性をその中で呈する種類の細胞である。換言すれば、細胞は、好ましくは、適切な細胞表面受容体を提示し、あるいは、十分効率的に、毒素を細胞内に転位させ、毒素に適切な基質ポリペプチドを切断させる。具体例には、初代培養された神経細胞（皮質神経細胞、海馬神経細胞、脊髄運動神経細胞など）、P C 1 2細胞又は誘導されたP C 1 2細胞株、初代培養されたクロマフィン細胞、マウスコリン作動性Neuro 2 a細胞株、ヒトアドレナリン作動性SK-N-SH細胞株及びNS-26細胞株など、幾つかの培養された神経芽細胞腫細胞株が含まれる。例えば、「Foster and Stringer (1999), Genetic Regulatory Elements Introduced Into Neural Stem and Progenitor Cell Populations, Brain Pathology 9:547-567」を参照されたい。

【0087】

基質-FRETポリペプチドに対するコード領域は、適切なプロモーターの制御下にある。使用される宿主細胞の種類に応じて、多くの適切なプロモーターが本分野において公知であり、容易に入手できる。このようなプロモーターは、誘導性又は恒常性であり得る。恒常性プロモーターは、本発明の所望のポリペプチドの発現を誘導するように選択され得る。誘導する基質を含有する培地上で発現宿主を培養する必要性が回避されるので、このような発現構築物はさらなる利点を与え得る。適切なプロモーターの例は、哺乳類系におけるLTR、SV40及びCMV、細菌系におけるイー・コリlac又はtrp、昆虫系におけるバキュロウイルス多角体プロモーター(polh)並びに真核及び原核細胞又はそれらのウイルス中で発現を調節することが知られている他のプロモーターである。真菌発現宿主中での使用が好ましい強い恒常性及び／又は誘導性プロモーターの例は、キシラナーゼ(xlnA)、フィターゼ、ATP合成酵素、サブユニット9(oliC)、トリオース三リン酸イソメラーゼ(tpi)、アルコール脱水素酵素(AdhA)、α-アミラーゼ(amy)、アミログルコシダーゼ(glaA遺伝子由来のAG)、アセトアミダーゼ(amdS)及びグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(gpd)プロモーターに対する真菌遺伝子から取得可能なプロモーターである。強力な酵母プロモーターの例は、アルコール脱水素酵素、ラクターゼ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及びトリオースリン酸イソメラーゼに対する遺伝子から取得可能なプロモーターである。強力な細菌プロモーターの例には、SPO₂プロモーター及び細胞外プロテアーゼ遺伝子から得られるプロモーターが含まれる。

【0088】

ハイブリッドプロモーターは、発現構築物の誘導性制御を改善するためにも使用され得る。プロモーターは、適切な宿主中での発現を確保するための、又は増加させるための特徴をさらに含むことができる。例えば、特徴は、Pri knowボックス又はTATAボックスなどの保存された領域であり得る。プロモーターは、本発明のヌクレオチド配列の発現のレベルに影響を及ぼすための（例えば、維持し、強化し、又は減少させるための）他の配列さえ含有し得る。例えば、適切な他の配列には、Shl-イントロン又はADHイントロンが含まれる。他の配列には、温度、化学、光又はストレス誘導性要素などの誘導性要素が含まれる。また、転写又は翻訳を増強するための適切な要素が存在し得る。後者の要素の例は、TMV5'シグナル配列である(Sleat, 1987, Gene 217:217-225; and Dawson, 1993, Plant Mol. Biol. 23:97参照)。

【0089】

発現ベクターは、発現を増幅するためにプロモーターに対して作用する配列も含有し得る。例えば、SV40、CMV及びポリオーマシス作用性要素（エンハンサー）及び選択可能なマーカーは、選択のための表現型形質（例えば、哺乳動物細胞に対するジヒドロ葉

10

20

30

40

50

酸還元酵素若しくはネオマイシン耐性又はイー・コリに対するアンピシリン／テトラサイクリン耐性)を与えることができる。適切なプロモーター及び選択マーカーを含有する適切なベクターの選択は、当業者の水準の範疇に十分属する。

【0090】

好ましくは、基質-FRETポリペプチドに対するコード領域は、誘導性プロモーターの制御下にある。誘導性プロモーターは、細胞中のレポーターの濃度の適切な調節を可能とし、従って、FRETシグナルの変化の測定が大幅に容易化されるので、恒常性プロモーターと比べて、誘導性プロモーターは好ましい。

【0091】

例えば、FRETレポーターは、Tet-on及びTet-off系(BD Biosciences, San Jose, Calif.)を用いて調節することができる。このプロモーターの調節下において、遺伝子発現は、正確な、可逆的及び定量的様式で制御され得る。簡潔に述べると、Tet-on系に関して、ドキシサイクリンが培地中に存在する場合にのみ、下流遺伝子の転写が起こる。ある期間の転写後、ドキシサイクリンを枯渇させ、従って、新たなFRETレポータータンパク質の合成を停止させるために培地を変更することができる。従って、新たに合成されたFRETタンパク質からのバックグラウンドは存在せず、毒素処理後のより迅速な変化を観察し得る可能性がある。

【0092】

蛍光分析は、例えば、光子計数落射蛍光顕微鏡系(ある範囲で蛍光発光をモニターするための適切な二色性鏡及びフィルターを含有する。)、光子計数光増倍系又は蛍光光度計を用いて実施することができる。エネルギー転移を開始するための励起は、アルゴンイオンレーザー、高強度水銀(Hg)アークランプ、光ファイバー光源又は所望の範囲内で励起させるための適切にフィルターがかけられた他の高強度光源を用いて実施することができる。検出感度を増強するための光増倍手段を取り込むことによって、励起／検出手段を増強できることが当業者に自明である。例えば、単一分子規模での検出を達成するために、二光子交差相関法を使用し得る(例えば、Kohl et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., 99:12161, 2002参照)。

【0093】

蛍光出力の多数のパラメータを測定し得る。それらには、1)アクセプター(A)とドナー(D)の発光波長で放出された蛍光を測定し、それらの発光規模の比によってエネルギー転移の程度を決定すること、2)Dの蛍光寿命を測定すること、3)Dの光退色の速度を測定すること、4)D及び／若しくはAの異方性を測定すること、又は5)ストークスシフト単量体／励起二量体蛍光を測定することが含まれる。例えば、「Mochizuki et al., (2001) "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1." Nature 411:1065-1068, Sato et al. (2002) "Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells." Nat Biotechnol. 20:287-294」を参照されたい。

【0094】

別の実施形態において、本発明は、表面プラズモン共鳴画像化(SPRi)技術を用いてBoNTを検出するための方法を提供する。表面プラズモン共鳴(SPR)は、結合理化学を支持する薄い金属フィルム(典型的には、金)中での表面プラズモンの生成を基礎とする、分子結合を検出するための確立された光学的技術である。表面プラズモンは、金属フィルム中に束縛された自由電子の集合的振動である。これらの電子は、高い屈折率のプリズムから入射する光照射野によって共鳴的に励起される。この共鳴励起が起こる入射角 q は相対的に狭く、共鳴入射角 q_r において最小値を有する反射光の強度の低減によって特徴付けられる。反射光の位相も、この領域中の q に関してほぼ線形的に変動する。 q_r の値は、金属フィルムの数ナノメートル内に存在する溶媒の屈折率に対して敏感である。

従って、フィルムへの結合の結合による又は結合された分子の分子量の変化による屈折率の小さな変動は、この角度の変動として検出され得る。金属表面へ生物分子を繋着し、このような繋着を検出し、及びSPRiを測定するための多くの方法が本分野において公知である。例えば、米国特許第6,127,129号、同第6,330,062号及びLee et al., 2001, Anal. Chem. 73:5527-5531, Brockman et al., 1999, J. Am. Chem. Soc. 121:8044-8051並びにBrockman et al., 2000, Annu. Rev. Phys. Chem. 51:41-63（何れも、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。

【0095】

10

実際には、BoNT標的ペプチドの層を金属上に堆積し得る。対応するBoNTを含有すると疑われる試料を複合表面に適用し、毒素が存在する場合に、結合された標的ペプチドを毒素に切断させるために温置する。切断は、金属表面に結合されたペプチドの分子量の減少をもたらし、次いで、この減少は、標準的な装置及び方法を用いて検出することができる。結合された層の厚さの減少は、切断が起こり、その結果、試料が標的ペプチドに対応する毒素を含有することを示唆する。

【0096】

あるいは、その対応する基質ペプチド（金属表面に繋着されている。）へのBoNTタンパク質の結合は、屈折率の変化も引き起こし、公知のSPRi技術及び装置によって検出することができる。

20

【0097】

金属表面上にタンパク質又はペプチド分子を繋着又は堆積させるための多くの方法が本分野において公知である。例えば、余分なCys残基をペプチドの末端に付加し、次いで、これを金属表面上に架橋することが可能である。間接的に、まず、金属表面に抗体を繋着させることができ、この抗体に、毒素基質を結合させることが可能である。抗体-基質結合が毒素による基質の切断部位の認識及び接近を妨げない限り、抗体を介した間接的繋着は本発明に関して適している。さらに、それぞれ、his6又はGST融合タンパク質を保持するために使用することができるニッケル-NTA又はグルタチオン。金属表面へのペプチドの繋着に関するさらなる情報は、「Wegner et al., (2002) Characterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of pitope-Antibody Interactions Using Surface Plasmon Resonance Imaging“ Analytical Chemistry 74:5161-5168」（参照により、その全体が本明細書中に組み込まれる。）

30

中に見出され得る。

【0098】

核酸分子中の約10から16塩基の変化（3,000から6,400ダルトンの分子量に相当する。）が、SPRiによって容易に検出され得る。これは、ペプチド分子中の僅か16のアミノ酸残基の変化を検出できることを示唆する。この高い感度によって、完全長毒素基質タンパク質の使用に代えて、短いペプチド基質を表面上に繋着することが可能となる。より安定で、より調製が安価で、より高い反応特異性が可能となるので、短いペプチド断片が好ましい。

40

【0099】

（実施例）

材料及び方法

バイオセンサーDNA構築物の構築：pECFP-YFPベクターを作製するために、EcoRI及びBamHI部位を用いて、YFPcDNA（Clontec）をpECFP-C1ベクター（Clontech）中に挿入した。PCRを使用し、XhoI及びEcoRI部位（CFPとYFP遺伝子の間にある。）を用いて、pECFP-YFPベクター中に、ラットsybIIのアミノ酸33から94をコードするcDNAを増幅して、

50

細胞を形質移入するために使用することができる CFP-SybII-YFP (CFP-Syb (33-94)-YFPとも称される。) 構築物を得た。同じ方法を使用して (但し、SNAP-25 の残基 141 から 206 を使用)、構築物 CFP-SNAP-25-YFP (CFP-SNAP-25 (141-206)-YFPとも称される。) を構築した。リンカーとして完全長ラット SNAP-25B を有する構築物 (CFP-SNAP-25FL-YFP) も作製した。細菌イー・コリを用いて組換えキメラタンパク質を精製するために、本発明者らは、NheI 及び BamHI 部位を用いて、pECFP-YFP ベクターから CFP-SybII-YFP 遺伝子及び CFP-SNAP-25-YFP 遺伝子を pTrc-his (Invitrogen) ベクター中にも移動した。

【0100】

PCR を用いた部位指定突然変異導入によって、SNAP-25 の 4 つの Cys 残基の Ala への変異を達成し、次いで、上述のように、CFP と YFP の間に断片を挿入した。まず、SNAP-25 の残基 83 から 120 をコードする cDNA 断片を pEYFP-N1 (Clontech) の XhoI/EcoRI 部位中に挿入し、次いで、EcoRI/BamHI を用いて、下流の部位中に CFP-SNAP-25 (141-206) cDNA をサブクローニングすることによって、SNAP-25 (83-120)-CFP-SNAP-25 (141-206)-YFP を構築した。まず、EcoRI 及び BamHI 部位において、完全長 SybII cDNA を pECFP-C1 ベクター中に挿入し、次いで、XhoI 及び EcoRI 部位の上流中に完全長 YFP cDNA を挿入することによって、YFP-Syb (FL)-CFP を構築した。EcoRI/BamHI 部位を介して、YFP-Syb (FL)-CFP 構築物中の完全長 Syb を置換することによって、YFP-Syb (33-116)-CFP を構築した。全ての cDNA 断片は、PCR を介して作製された。

【0101】

タンパク質の精製及び蛍光スペクトルの獲得: His₆ タグ付加された CFP-SybII-YFP 及び CFP-SNAP-25-YFP タンパク質は、記載のとおり精製した (Chapman et al., A novel function for the second C2 domain of synaptotagmin. Ca²⁺-triggered dimerization. J. Biol. Chem. 271, 5844-5849 (1996))。HEPES 緩衝液 (50 mM HEPES, pH 7.1) を用いて、タンパク質を一晩透析した。2 mM DTT 及び 10 μ M ZnCl₂ を含有する HEPES 緩衝液 500 μ L の合計用量で、300 nM タンパク質をキュベット中に入れた。PTIQM-1 蛍光光度計を用いて、450 nm から 550 nm までの発光スペクトルを集めた。励起波長は 434 nm であり、これは CFP に対する最適な励起波長である。

【0102】

ボツリヌス神経毒素の活性化及びバイオセンサータンパク質の切断のモニタリング: 重鎖から毒素軽鎖を還元するために、37°C で 30 分間、2 mM DTT 及び 10 μ M ZnCl₂ とともに、BoNT/A、B、E 又は F を温置した。PTIQM-1 蛍光光度計を用いた実験のために、300 nM の対応する FRET センサーを含有するキュベット中に 10 nM BoNT/A、E 又は 50 nM BoNT/B、F を添加した。毒素を添加した後、ある時間間隔で (例えば、0、2、5、10、30、60、90 分)、上述のように発光スペクトルを収集した。各発光スキンの終了時に、試料の少量 (30 μ L) を集め、SDS 搭載緩衝液と混合し、その後、SDS-page ゲル上に供した。強化化学発光 (ECL) (Pierce) を使用し、抗 his₆ 抗体によって、センサータンパク質及び切断産物を可視化した。

【0103】

分光蛍光光度計を使用する実験のために、96 ウェルプレート中にて、100 μ L 容量 / ウェルで、300 nM FRET センサータンパク質を調製した。BoNT の様々な濃度を各ウェル中に添加し、試料を 434 nm で励起した。YFP チャネル (527 nm) 及

10

20

30

40

50

びCFPチャンネル(470nm)の発光スペクトルを30秒間隔で90分間収集した。各データ点に対するYFPチャンネルとCFPチャンネル間の比によって、FRET比を測定する。

【0104】

毒素処理後における生きた細胞内でのFRET比の変化を測定し、電気穿孔(Bio-Rad)を用いてPC12細胞を形質移入するために、DNA構築物pECFP-SNAP25-YFPを使用した。形質移入から24時間後、細胞を継代させ、50nMBONT/Aを培地中に添加した。毒素との72時間の温置後、NikonTE-300顕微鏡を用いて、FRETセンサーを発現する細胞の蛍光画像を収集した。以下のフィルターの組(Chroma Inc.)を用いて、各細胞の2つの画像(CFPチャンネル及びFRETチャンネル)を収集した。CFPチャンネル:CFP励起フィルター(436/10nm)、JP4ビーム分割器、CFP発光フィルター:(470/30nm);FRETチャンネル:CFP励起フィルター(436/10nm)、JP4ビーム分割器、YFP発光フィルター(535/30nm)。各画像からバックグラウンド(細胞を含有しない領域)を差し引き、MetaMorphソフトウェアを用いて、各セルのCFPチャンネル及びFRETチャンネルの蛍光強度を比較した。先述のように、FRETチャンネルとCFPチャンネルの間の強度比によって、FRET比を測定する。対照細胞は毒素で処理されなかったが、同じ様に分析した。生きた細胞中でBONT/Bを検査するために、本発明者らは、上述のものと同一操作を用いて、syntIIを発現するPC12細胞株を形質移入した。

【0105】

生きた細胞の画像化及びFRET分析:電気穿孔(Bio-Rad, CA)を介して、図の注釈に記されている様々なcDNA構築物でPC12細胞を形質移入した。油に浸漬された100倍対物レンズを使用するNikonTE-300顕微鏡を用いて、蛍光画像を収集した。3つ組みフィルター法を用いる確立された方法を用いて、生きた細胞中のCFP/YFPFRETを定量した(Gordon et al., Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys J. 74, 2702-2713 (1998); Sorokin et al., Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. Curr. Biol. 10, 1395-1398 (2000))。要約すれば、3つの異なるフィルターの組を通じて、3つの連続画像を各細胞に対して取得した。CFPフィルター(励起、436/10nm;発光、470/30nm)、FRETフィルター(励起、436/10nm;発光、535/30nm)及びYFPフィルター(励起、500/20nm、発光、535/30nm)。JP4ビーム分割器(SetID86000, Chroma Inc. VT)を使用した。全ての画像は、正確に同じ設定で取得した(4×4ピニング、200m秒の露出時間)。蛍光タンパク質の高発現レベルから生じ得る濃度依存的FRETシグナルを排除するために、本発明者らの実験では、最大12ビットスケール(1から2097のグレイスケール)の半分値を下回るCFP及びYFP強度を有する細胞のみをカウントした(Miyawaki et al., Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. Methods Enzymol. 327, 472-500 (2000); Erickson et al., DsRed as a potential FRET partner with CFP and GFP. Biophys J 85, 599-611 (2003))。FRET値を計算する前に、それぞれの生画像からバックグラウンド(細胞を含有しない領

域から得られる。)を差し引いた。次いで、各画像の蛍光強度値を取得し、比較した。これらのフィルターの組に対するクロストーク値を得るために、まず、CFP又はYFPのみで形質移入されたPC12細胞を検査した。FRETフィルターチャンネルは、CFPに関してしみ出し(bleed-through)の約56から64%及びYFPに関して約24%を示す。CFPフィルターを使用する際にはYFPに対して実質的にクロストークが存在せず、又はYFPフィルターを使用する際にはCFPに対して実質的にクロストークが存在せず、これにより、FRETの計算が大幅に簡略化された。毒素センサーを発現する細胞に関して、「補正されたFRET」値は、以下の式を用いて計算した。
$$FRET = FRET - (CFP \times 0.60) - (YFP \times 0.24)$$
(FRET、CFP及びYFPは、それぞれ、FRET、CFP及びYFPフィルターの組を通じて獲得された画像の蛍光強度に対応する。)。FRETフィルター組を通じて画像を取得した場合における、CFP及びYFP蛍光から生じるしみ出しの平均割合は、それぞれ、0.6及び0.24である。CFP-SNAP25FL-YFPセンサーの毒素切断はYFP断片の膜の解離をもたらしたので(YFP断片は、サイトゾル中で分解された。)(図7c、e)、本発明者らのデータ解析において使用されたFRET比は、CFP蛍光強度(補正されたFRET/CFP)のみに対して「補正されたFRET」値を標準化するとして計算される(補正されたFRET/CFP)。本発明者らは、FRETが生じた場合のドナーの消光故に、これらの計算におけるCFP強度は過小評価であることに注目する。しかしながら、ドナー消光によるCFP蛍光の減少は、約5から10%に過ぎないことが報告されている(Gordon et al., Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys J 74, 2702-2713 (1998); Sorkina et al., Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. J. Biol. Chem. 278, 28274-28283 (2003))。全ての画像及び計算は、MetaMorphソフトウェア(Universal Imaging Corp., PA)を用いて行った。

【0106】

毒素処理を伴う実験に関しては、様々な時間にわたって、表記ホロ毒素を細胞培地に添加し、次いで、上述のように細胞を分析した。対照細胞には、毒素センサーを形質移入したが、毒素での処理は行わず、同じように分析した。

【0107】

毒素基質切断のイムノプロット分析：図面の注釈に記されているような様々な毒素センサーcDNA構築物で、野生型PC12細胞又はSyb11+PC12細胞(Dong et al., 2003、上記)を形質移入した。形質移入から24時間後に、BoNT/A又はBを培地に添加し、細胞をさらに48時間温置した。次いで、細胞を採集し、細胞可溶化液を先述のようなイムノプロット分析に供した。対照細胞に同じcDNA構築物を形質移入し、毒素で処理しなかったことを除き、平行してアッセイした。対照細胞可溶化液の1/3をインビトロにて毒素で処理し(200nM BoNT/A又はB、37℃で30分)、イムノプロット分析に供した。抗SNAP-25抗体26を用いて、内在性SNAP-25及び形質移入されたCFP-SNAP-25-YFPセンサーをアッセイした。GFPポリクローナル抗体(SantaCruz, CA)を用いて、CFP-SNAP-25-YFP及びCFP-Syb11-YFPセンサータンパク質もアッセイした。組換えセンサータンパク質切断に対するアッセイのために、抗his6抗体(Qigen Inc., CA)を使用した。

【実施例1】

【0108】

CFP-YFP FRET対及びボツリヌス神経毒素プロテアーゼ活性を基礎とするバイ

オセンサー

FRET法を用いてボツリヌス神経毒素プロテアーゼ活性をモニターするために、sybII又はSNAP-25断片を介してCFP及びYFPタンパク質を接続し、それぞれ、CFP-SybII-YFP及びCFP-SNAP-25-YFPと表記される(図1A)。距離が増加するにつれて指数関数的に低下するCFP-YFPエネルギー転移効率を最適化するために、完全長タンパク質の代わりに毒素基質の短い断片を使用した。しかしながら、標的タンパク質断片が短すぎるようになるにつれて、BoNTによる切断効率は著しく減少する。従って、完全長シナプトブレビンと同じBoNT/B、F及びTeNTによる切断速度を保持すると報告されているので、シナプトブレビン配列のアミノ酸33から96を含有する領域を使用した。同様に、構築物がBoNT/A及びEによってな

10

【0109】

FRETアッセイは、図1Bに図示されている。434nm(CFPに対する最適な励起波長)で励起された場合、CFP-SybII-YFP及びCFP-SNAP-25-YFPキメラタンパク質は、CFP-YFP対の間でのFRETのために、YFP蛍光発光を呈する。ボツリヌス神経毒素は、CFPとYFPの間で短い基質断片を認識及び切断することができ、CFPとYFPが分離された後に、FRETシグナルは消失する。これらのキメラタンパク質は生きた細胞中で発現させることができるので、ボツリヌス神経毒素に対する「バイオセンサー」とも表記される。

20

【0110】

本発明者らは、CFP-SybII-YFP及びCFP-SNAP-25-YFPの精製されたhis6タグ付加組換えキメラタンパク質をまず精製し、PTIQM-1蛍光度計を用いてこれらの発光スペクトルを性質決定した。予想されたとおり、両バイオセンサータンパク質のCFPが434nmで励起されると、両バイオセンサータンパク質は525nmに明白なYFP蛍光ピークを示す(図2B、C)。これに対して、YFP単独では、434nmで直接励起されたときに、小さな蛍光シグナルを与えるに過ぎなかった(図2A)。各CFPとYFPの混合物は、525nmにピーク発光を有さない(図2A)。これは、FRETから生じたバイオセンサータンパク質を用いて観察されたYFP蛍光ピークを示した。FRET比(YFP蛍光強度/CFP蛍光強度)は、緩衝液組成、Zn²⁺濃度及び還元剤の濃度などの(図示せず)、多くの因子によって影響を受けたので、以降の実験は全て、同じ緩衝液条件(50mMHepes、2mMDTT、10uMZnCl₂、pH7.1)中で実施した。ボツリヌス神経毒素プロテアーゼ活性を最適化するために、2mMDTT及び10uMZn²⁺を添加した。

30

【実施例2】

【0111】

インビトロでのボツリヌス神経毒素によるバイオセンサータンパク質の切断のモニタリング

300nMキメラタンパク質CFP-SybII-YFPを、キュベット中で50nMの予め還元されたBoNT/Bホロ毒素と混合した。BoNT/B(0、2、5、10、30、60分など)を添加した後の異なる時点で、発光スペクトルを収集した。各スキャンの終了時に、キュベットから試料の少量(30uL)を取り出し、SDS搭載緩衝液と混合した。その後、これらの試料をSDS-pageゲルに供し、組換えキメラタンパク質中のhis₆タグに対する抗体を用いて、キメラタンパク質の切断を可視化した。図3Aに示されているように、BoNT/Bとのバイオセンサータンパク質の温置は、YFP発光の減少及びCFP発光の増加をもたらした。FRET比の減少は、BoNT/Bによるキメラタンパク質の切断の程度と合致している(図3A、下図)。この結果は、バイオセンサータンパク質の切断は、そのFRET比の変化を記録することによって、リアルタイムでモニターすることができることを示す。

40

【0112】

50

B o N T / F による C F P - S y b I I - Y F P の切断及び B o N T / A 又は E による C F P - S N A P - 2 5 - Y F P の切断を検出するために、同じアッセイを行った（図 3 B, C, D）。B o N T / B を用いた実験によって、同様の結果が得られた。全ての事例で、本発明者らは、光学的な読み出し及びイムノプロット分析の両方を用いて、基質の切断の同じ速度論を観察した。B o N T / A 及び E は、B o N T / B 及び F が本発明者らのアッセイにおいてキメラ基質を切断するよりずっと早くキメラ基質を切断した。従って、最初の数分以内に生じた変化を記録するために、10 nM B o N T / A 又は E のみを使用した。C F P - S N A P - 2 5 - Y F P との B o N T / B 及び F の混合又は C F P - S y b I I - Y F P との B o N T / A 及び E の混合は F R E T 比又は基質切断の変化を一切もたらさなかった（図示せず）、キメラタンパク質の切断は特異的である。

10

【実施例 3】

【0113】

マイクロプレート分光蛍光光度計を用いたリアルタイムでのボツリヌス神経毒素プロテアーゼ活性のモニタリング

上記実験は、それらの標的バイオセンサータンパク質の発光スペクトルの変化をモニタリングすることによって、ボツリヌス神経毒素の活性はインビトロで検出可能であることを示した。次いで、本発明者らは、マイクロプレートリーダーを用いて、リアルタイムでバイオセンサータンパク質の切断をモニターできるかどうかを決定した。これは、将来的な高処理量スクリーニングにこのアッセイを適合させるための可能性を示す。図 4 A に示されているように、96 ウェルプレート中で、300 nM C F P - S N A P - 2 5 - Y F P キメラタンパク質を 10 nM B o N T / A と混合した。C F P を 436 nm で励起し、90 分にわたって、30 秒の間隔で、C F P チャンネル（470 nm）と Y F P チャンネル（527 nm）の蛍光を記録した。B o N T / A の添加は、Y F P チャンネル発光の減少及び C F P チャンネル発光の増加をもたらした。この結果によって、本発明者らは、複数試料中のボツリヌス神経毒素酵素活性の速度論をリアルタイムで追跡することができた。例えば、図 4 B に示されているように、B o N T / A 又は E の様々な濃度を 300 nM C F P - S N A P - 2 5 - Y F P 中に添加し、図 4 A に記載されているように、各試料の F R E T 比を同時にモニターした。F R E T 比の変化は毒素濃度と関連していた。毒素濃度が高いほど、F R E T 比の減少は迅速であった。C F P - S N A P - 2 5 - Y F P のみ（図 4 C、左図）又は C F P と Y F P の混合物（図 4 C、右図）の何れかに対して、著しい変化が検出されなかった（図 4 C、右図）ので、F R E T 比のこの変化は特異的である。

20

30

【0114】

この段階で、F R E T 比の変化をバイオセンサータンパク質の実際の切断と相関付けることは困難であるが、この方法は、これらの試料が同時に調製及びスキャンされたときに、複数試料間で毒素切断速度論を比較するための最も簡単な方法をなお提供する。阻害剤が毒素の酵素活性に対してどのように影響を及ぼすかについての情報を与えるので、この方法は、高処理量スクリーニング毒素阻害剤に対して特に有用である。本発明者らは、これらの事例では、各速度論パラメータに対する単位は、基質濃度に代えて、F R E T 比であることを注記する。

【0115】

ある期間にわたって、毒素の様々な濃度を毒素の標的バイオセンサータンパク質の固定量とともに温置することによって、F R E T を基礎とするこのアッセイの感度を測定する。マイクロプレート分光蛍光光度計を用いて、F R E T 比を記録し、毒素濃度に対してプロットする。図 5 A に示されているように、この方法は、4 時間の温置後に、B o N T / A 及び E に対して同様の感度を有し（B o N T / A に対する EC_{50} は 15 pM であり、B o N T / E に対する EC_{50} は 20 pM である。上図）、16 時間の温置は検出感度を僅かに増加させた（図 5 A、下図）。4 時間の温置を用いると、B o N T / B 及び F に対する感度は互いに似通っているが、B o N T / A 及び E より約 10 倍低い（図 5 B、上図、 EC_{50} は B o N T / B に対して 242 pM であり、B o N T / F に対して 207 pM である。）。温置期間を 16 時間まで延長することによって、B o N T / B 及び B o N T

40

50

／F活性を検出する能力がそれぞれ8倍及び2倍増加した。

【実施例4】

【0116】

生きた細胞中のボツリヌス神経毒素活性のモニタリング

C F P－Y F Pを基礎とするバイオセンサーアッセイは、インビトロでボツリヌス神経毒素を検出するために使用することができるのみならず、生きた細胞中でも使用することができる。この用途を確立するために、C F P－S N A P－2 5－Y F PでP C 1 2細胞を形質移入した。P C 1 2細胞は、B o N T／A及びEを取り込むことができる神経内分泌細胞株である。形質移入された細胞をB o N T／A（5 0 n M）とともに7 2時間温置し、C F P－Y F P F R E T検出に対する特殊なフィルターの組を備えた落射蛍光顕微鏡を用いて、C F P－S N A P 2 5－Y F Pを発現する細胞のF R E T比を記録した。簡潔に述べれば、2つのフィルターの組（1つはC F P用（励起4 3 7 n m／発光4 7 0 n m）及び他方はF R E T用（励起4 3 7 n m／発光5 3 5 n m））を用いて収集された同じ細胞からの画像の蛍光強度間の比として、F R E T比を計算する。合計5 3個の細胞を収集し、同じバイオセンサータンパク質を発現するが、毒素に曝露されなかった対照細胞の同じ数と比較した。図6 Aに示されているように、7 2時間のB o N T／A処理は、検査されている細胞集団に対するF R E T比を著しく減少させた（ $p < 1.47 \times 10^{-5}$ ）。野生型P C 1 2細胞は、B o N T／B及びFに対して感受性でない。

【0117】

シナプトタグミンI I（B o N T／Bに対する受容体）及びC F P－S y b I I－Y F Pバイオセンサーの両方を発現するP C 1 2細胞株が最近作製された。生きた細胞中でのB o N T／B作用を検出するために、これらの細胞を使用した。図6 Bに示されているように、7 2時間のB o N T／B（3 0 n M）処理は、細胞中で発現されたバイオセンサータンパク質のF R E T比を著しく減少させた（ $p < 2.1 \times 10^{-10}$ ）。本発明者らは、両バイオセンサータンパク質に対するF R E T比を変化させないように見受けられる多数の細胞がなお存在したことに注目する。可能な説明が幾つか存在する。第一に、毒素／バイオセンサータンパク質比がこれらの細胞中では低すぎ得るので、バイオセンサータンパク質の著しい切断には、さらに長い温置時間を必要とし得る。第二に、これらの細胞は、タンパク質合成活性の高いレベルを有し得るので、新しいバイオセンサータンパク質は、切断産物を迅速に置き換える合成であった。それにも関わらず、これらの実験は、生きた細胞及び神経細胞中でF R E Tを基礎とするアッセイを採用できる可能性を示している。

【実施例5】

【0118】

B o N Tの細胞を基礎とする検出

細胞を基礎とする研究を実施するために、本発明者らは、C F P－S N A P－2 5（1 4 1－2 0 6）－Y F PセンサーでまずP C 1 2細胞を形質移入した（図7 a）。材料と方法の部に上述されているように、落射蛍光顕微鏡を用いた確立された3つ組みフィルター法を用いて、図2 aに示されているように、生きた細胞中のF R E Tシグナルを取得した（Gordon, et al., Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys. J. 74, 2702-2713 (1998); 及びSorkin et al., Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. Curr. Biol. 10, 1395-1398 (2000)）。形質移入されたP C 1 2細胞を5 0 n M B o N T／Aで9 6時間処理した。それらの蛍光画像を分析し、標準化されたF R E T比（補正されたF R E T／C F P）を図7 bにプロットした。S N A P－2 5（4 1－2 0 6）断片は、インビトロで完全長S N A P－2 5と類似の毒素切断速度を有することが報告されたが（Washbourne et al., Botu

linum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. FEBS Lett. 418, 1-5 (1997))、CFP-SNAP-25 (141-206)-YFPは生きた細胞中では優れた毒素基質でないように見受けられた。96時間のBoNT/A (50 nM)の温置は細胞集団間でのFRET比の小さな(但し、有意な)シフトを示し、細胞内では切断が非効率的であり、このセンサーは細胞内での毒素検出のためには実用的でないことを示唆する。

【0119】

驚くべきことに、SNAP-25は206アミノ酸残基長であるという事実に関わらず、CFPとYFP間のリンカーとして完全長SNAP-25を使用することは、PC12細胞中で発現されたときに、FRETの著しいレベルを生成することを本発明者らは見出した(図7c及び図8c)。タンパク質(CFP-SNAP-25(Cys-Ala)-YFPと表記される。)のサイトゾル分布をもたらすSNAP-25内のパルミトイル化部位(Cys85、88、90、92Ala)の変異は、FRETシグナルを著しく低下させたので(図7d)、このFRETシグナルは、SNAP-25の膜アンカーに依存している(Lane & Liu, Characterization of the palmitoylation domain of SNAP-25. J. Neurochem. 69, 1864-1869 (1997); Gonzalo et al., SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. J. Biol. Chem. 274, 21313-21318 (1999); Koticha et al., Plasma membrane targeting of SNAP-25 increases its local concentration and is necessary for SNARE complex formation and regulated exocytosis. J. Cell Sci. 115, 3341-3351 (2002); Goneille-Gispert et al., Membrane localization and biological activity of SNAP-25 cysteine mutants in insulin-secreting cells. J. Cell Sci. 113 (Pt 18), 3197-3205 (2000)) (FIG. 7d)。この知見は、SNAP-25の膜繫着がSNAP-25のN末端とC末端を互いに近接される立体構造的変化をもたらすことを示唆する。このセンサーは、CFP-SNAP-25(FL)-YFPと表記される。CFP-SNAP-25(FL)-YFPを発現する細胞を50 nM BoNT/Aとともに温置することによって、経時的なFRET比が徐々に減少した(図7c、右図)。センサーのBoNT/A切断は、2つの断片(膜上に留まったCFPタグ付加されたSNAP-25のN末端断片(図2c、中央図)及び毒素切断後に、サイトゾル中に再分布すると予測されたYFPタグ付加されたSNAP-25の短いC末端断片)をもたらした。興味深いことに、本発明者らは、C末端切断産物であるSNAP-25(198-206)-YFPが、毒素切断後に殆ど消失したことに気づいた(図2c、中央図中の「YFP」フレーム)。この観察はイムノブロット分析(図7e)によって確認され、この可溶性断片は膜上に保持された他の断片よりずっと素早く分解させることを示唆する。この予想外の結果は、CFPとYFP蛍光間の比を単にモニタリングすることによって、生きた細胞中の毒素活性を検出するための別の方法を与える。

【0120】

BoNT/A軽鎖は膜局在化シグナルを含有し、分化したPC12細胞中の形質膜を標的とすることが最近報告された(Fernandez-Salas et al., Plasma membrane localization signals in the light chain of botulinum neurotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 3208-3213 (2000)) (FIG. 7e)。この知見は、SNAP-25の膜繫着がSNAP-25のN末端とC末端を互いに近接される立体構造的変化をもたらすことを示唆する。このセンサーは、CFP-SNAP-25(FL)-YFPと表記される。CFP-SNAP-25(FL)-YFPを発現する細胞を50 nM BoNT/Aとともに温置することによって、経時的なFRET比が徐々に減少した(図7c、右図)。センサーのBoNT/A切断は、2つの断片(膜上に留まったCFPタグ付加されたSNAP-25のN末端断片(図2c、中央図)及び毒素切断後に、サイトゾル中に再分布すると予測されたYFPタグ付加されたSNAP-25の短いC末端断片)をもたらした。興味深いことに、本発明者らは、C末端切断産物であるSNAP-25(198-206)-YFPが、毒素切断後に殆ど消失したことに気づいた(図2c、中央図中の「YFP」フレーム)。この観察はイムノブロット分析(図7e)によって確認され、この可溶性断片は膜上に保持された他の断片よりずっと素早く分解させることを示唆する。この予想外の結果は、CFPとYFP蛍光間の比を単にモニタリングすることによって、生きた細胞中の毒素活性を検出するための別の方法を与える。

04))。従って、本発明者らは、SNAP-25の膜繫着が、BoNT/Aによる効率的な切断にとって不可欠であるという可能性を調べた。この考えを直接調べるために、サイトゾル中に分布したCFP-SNAP-25 (Cys-Ala)-YFP (図7d) 及び形質膜に繫着されたCFP-SNAP-25 (FL)-YFPを使用して、PC12細胞を形質移入し、細胞中でのBoNT/Aによる切断に関して平行してアッセイした。図7eに示されているように、BoNT/Aとの細胞の温置はCFP-SNAP-25 (FL)-YFPセンサーの著しい量の切断をもたらしたが、同じアッセイ条件下で、CFP-SNAP-25 (Cys-Ala)-YFPの検出可能な切断は存在しなかった。

【0121】

この知見をさらに確認するために、本発明者らは、SNAP-25の短い断片（形質膜にGFPを標的化することができる残基83から120）(Gonzalo et al., SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. J. Biol. Chem. 274, 21313-21318 (1999)) (図8a) を用いて、形質膜に対するSNAP-25 (141-206) を含有する非効率なセンサーも標的とした。予想通り、形質膜へのCFP-SNAP-25 (141-206)-YFPセンサーの繫着はBoNT/Aによる効率的な切断をもたらした (図8b)。これらの知見は、SNAP-25の細胞内局在化が実際に細胞中でのBoNT/Aによる効率的な切断にとって不可欠であることを示唆する。

【0122】

本発明者らは、次に、細胞中でのBoNT/B活性をアッセイするためにCFP-Syb (33-94)-YFPセンサーを使用することができるかどうかを調べた。これらの研究のために、本発明者らは、BoNT/Bの細胞中への侵入を媒介するシナプトタグミンIIを発現するPC12細胞株を使用した (Dong et al. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. J. Cell Biol. 162, 1293-1303 (2003))。図9aに示されているように (上図)、形質移入されたCFP-Syb (33-94)-YFPは、細胞全体に存在する可溶性タンパク質である。CFP-SNAP-25 (141-206)-YFPの場合と同様に、BoNT/B (50nM、96時間) 処理は、FRET比を僅かに減少したに過ぎず (図9a、下図)、このセンサーの切断は細胞内でも非効率であることを示唆する。

【0123】

BoNT/Aセンサーを用いた本発明者らの経験に基づいて、本発明者らは、Sybの細胞内局在化がBoNT/BによるSybの切断にとって重要であるかどうかを調べた。内在性Sybは116アミノ酸残基の長さであり、単一の膜貫通ドメイン (残基95から116、図9b) を通じて分泌小胞上に存在する。適切な小胞の局在化を確保するために、本発明者らは、CFPとYFPの間のリンカーとして完全長Sybを使用した。CFPは、小胞管腔中の酸性環境に対して比較的耐性を有するので (Tsien, The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67, 509-544 (1998))、CFPはSybのC末端に融合され、小胞内に存在すると予測されるのに対して、YFPはSybのN末端に融合され、サイトゾルに向かい合う (図9b)。このセンサーは、YFP-Syb (FL)-CFPと表記される。FRETは、ここで、CFPとYFPの間で起こる可能性は少ないので、BoNT/Bによる切断をモニターするために、新しいアプローチを採用した。YFP-Syb (FL)-CFPセンサーの切断は、サイトゾル中に放出されるYFPタグ付加されたN末端部分及び小胞内に限局されるCFPタグ付加された短いC末端部分を含む2つの断片を生成する。従って、毒素活性は、細胞中のYFP蛍光の再分布をもたらす。YFP-Syb (FL)-CFPは、細胞中において効率的な毒素センサーであることが明らかとなった。図9cに示されているように、BoNT/Bでの処理は、小胞からのYFPの解離及びサイトゾル中でのその再分布をもたらした。本発明者らは、可溶性YFP断片が核内に

侵入することができ、毒素処理前に核内には蛍光シグナルが存在せず（図9c）、YFP再分布を容易に検出できる領域を与えることに注目する。FRETアッセイとは異なり、この検出法は、CFPとYFP間の短い距離を必要とせず、従って、生きた細胞中のプロテアーゼ活性をモニターするための新規アプローチを提供する。

【0124】

Syb(33-94)を含有するセンサーの非効率的な切断はN末端32アミノ酸が欠如することによるものであるという可能性を除外するために、N末端の32残基を欠如するSybの末端切断形態を含有するセンサー(CFP-Syb(33-116)-YFPと表記)を構築した。このセンサーは、Sybを小胞に繫着させる膜貫通ドメイン(残基95から116)に加えて、非効率的なセンサー(残基33から94)を有するSybの
10
同じサイトゾルドメインを含有する。平行してアッセイされた場合に、CFP-Syb(33-116)-YFPの有意な量が48時間後にBoNT/Bによって切断されるのに対して、CFP-Syb(33-94)-YFPの検出可能な切断は存在せず(図9d)、小胞の局在化が細胞内の切断効率を決定することを示唆する。この結論は、負に帯電した脂質混合物の存在がBoNT/B、TeNT及びBoNT/FによるSybのインビトロでの切断速度を増強するという最近の報告によってさらに支持される(Caccin
20
et al., VAMP/synaptobrevin cleavage by tetanus and botulinum neurotoxins is strongly enhanced by acidic liposomes. FEBS Lett. 542, 132-136 (2003)。毒素は細胞内の小胞膜に結合しやすく、従って、小胞上に局在化されたSybに遭遇する機会が増加し得る可能性がある。あるいは、効率的な切断のために必要とされるSybの適切な立体構造状態を維持するために、膜貫通ドメインの存在が不可欠であり得るという可能性もある。

【0125】

完全長のSNAP-25及びSybIIをリンカーとして使用することによって、生きた細胞中での内在性基質切断を反映し得る優れた光学的レポーターがもたらされた。これら2つのレポーターは、全ての7つのボツリヌス神経毒素及び破傷風神経毒素(TeNT)を検出できるはずである。基質リンカー配列は、長さを変化させることによって、又は他の毒素切断若しくは認識部位を変異させることによって、各BoNT又はTeNTに対する特異的検出を達成するように容易に修飾させることができる。これらの毒素バイオ
30
センサーは、毒素阻害剤の細胞を基礎とするスクリーニング並びに毒素基質の認識及び細胞中での切断の研究を可能とするはずである。

【0126】

先述の記載及び実施例は、本発明を例示するために記載されているに過ぎず、限定を意図するものではない。当業者は本発明の精神及び本質を取り込む開示された実施形態の改変に想到し得るので、本発明は、添付の特許請求の範囲及びその均等物に属する全ての改変を含むように広く解釈しなければならない。本明細書中に引用されている及び／又は
以下に列記されている全ての参考文献は、参照により、明示的に本明細書に組み込まれる。

【0127】

本明細書中の発明の概念から逸脱することなく、既に記載されているものの他に、より
40
多くの修飾が可能であることが当業者に自明なはずである。従って、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲の精神以外に限定されるものではない。さらに、本明細書及び特許請求の両方を解釈する際には、文脈と合致する限りできるだけ広義に全ての用語を解釈しなければならない。特に、「含む」及び「含んでいる」という用語は、非排他的な様式で、要素、成分又は工程を表すものと解釈しなければならない、参照されている要素、成分又は工程が、明示的に参照されていない他の要素、成分又は工程とともに存在し、又は使用され、又は組み合わせられ得ることを示す。本明細書が、A、B、C・・・及びNからなる群から選択される何かの少なくとも1つを参照する場合、その文章は、非A+N又はB+Nなど、その群からの1つの要素のみを必要とするものと解釈しなければならない。

【図 1】

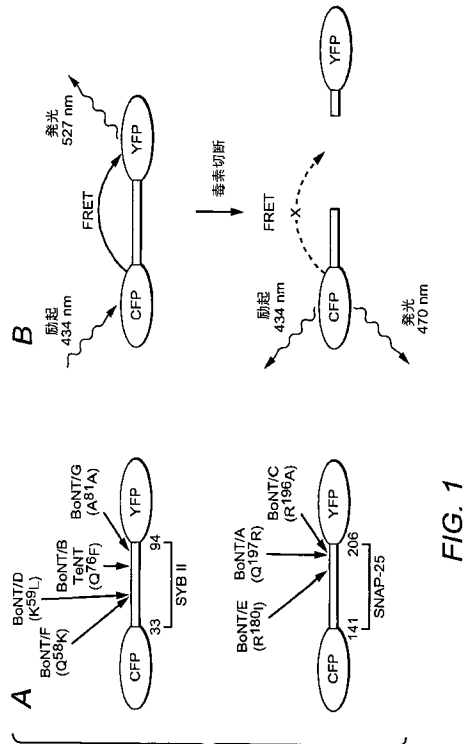


FIG. 1

【図 2】

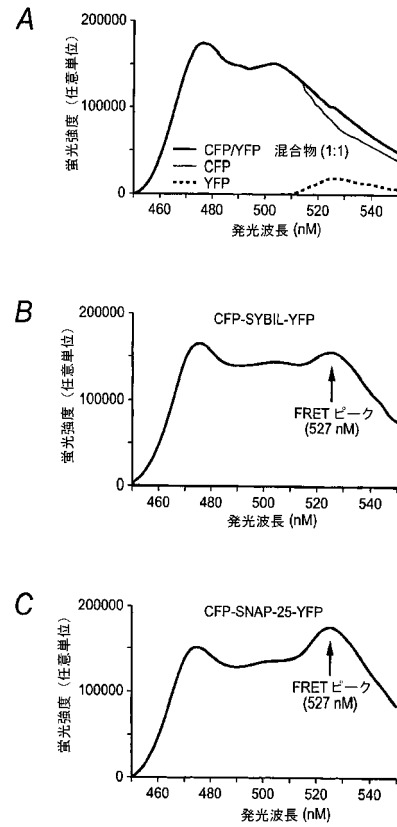


FIG. 2

【図 3】

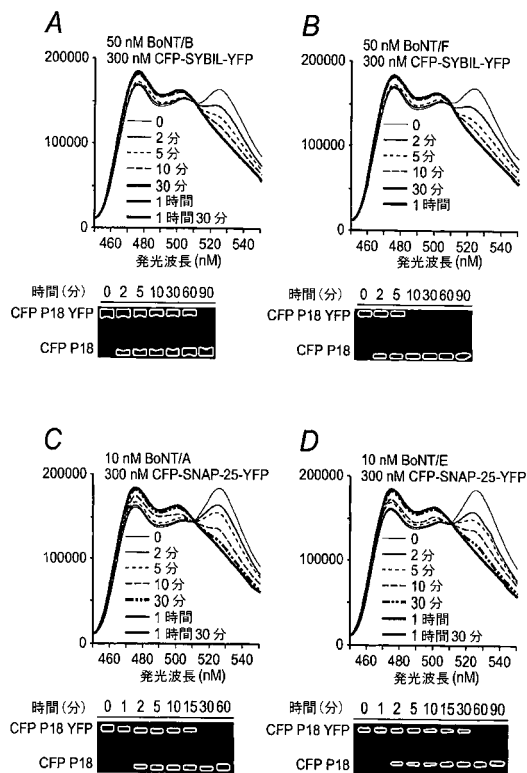


FIG. 3

【図 4】

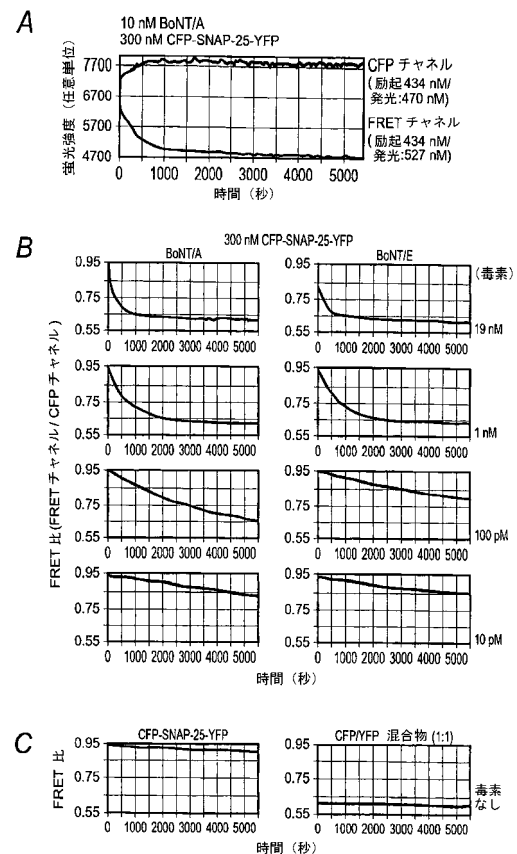


FIG. 4

【図 5】

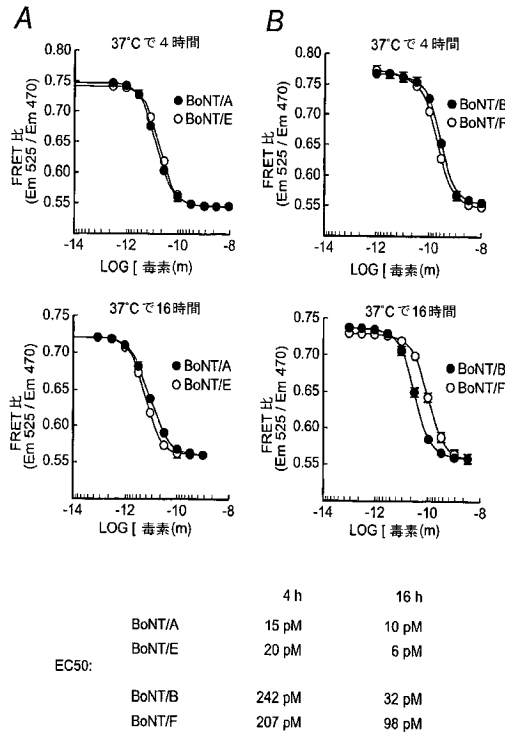


FIG. 5

【図 6】

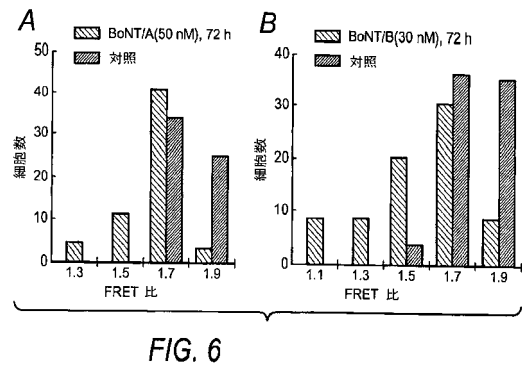
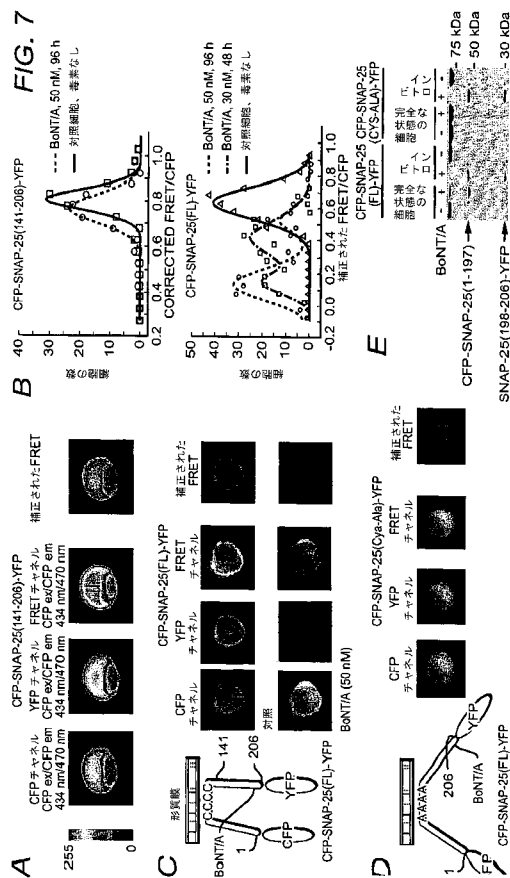


FIG. 6

【図 7】



【図 8】

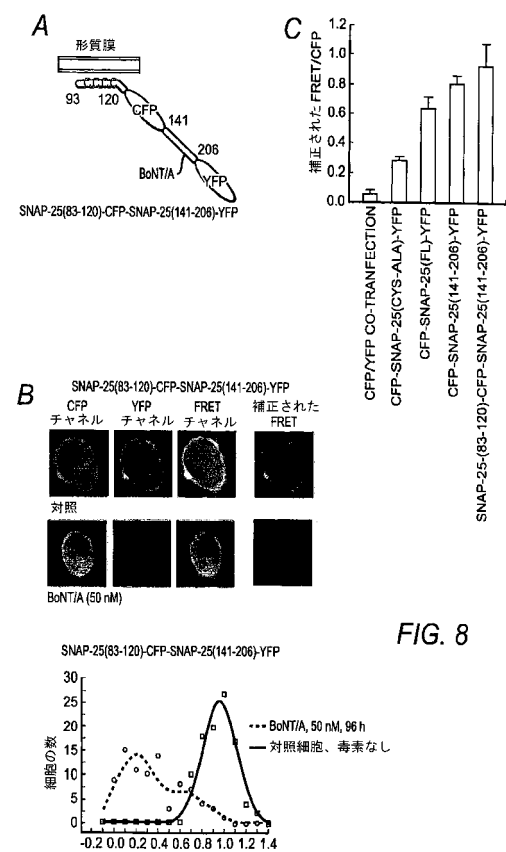


FIG. 8

【図 9】

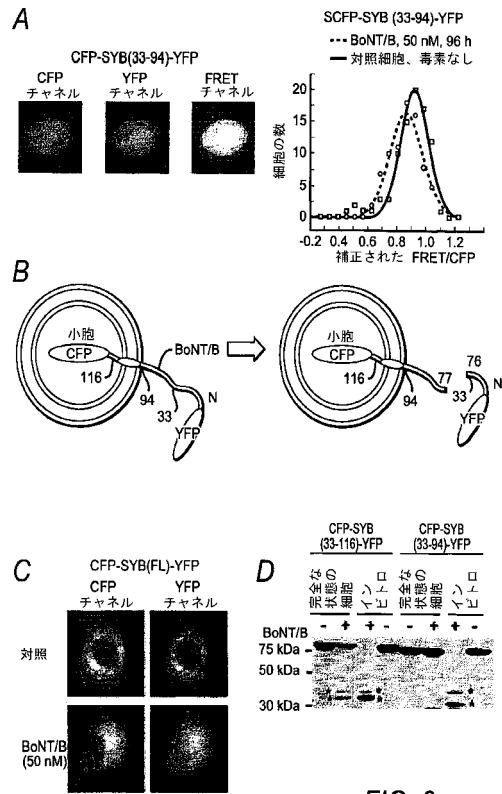


FIG. 9

【図 10】

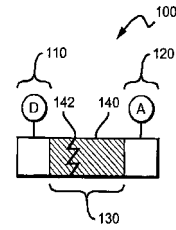


FIG. 10

従来技術

【図 1 1 a】

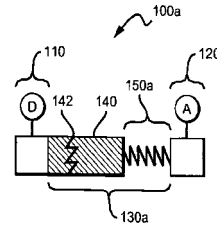


FIG. 11a

【図 1 1 b】

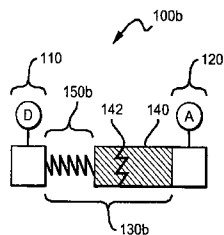


FIG. 11b

【図 1 1 c】

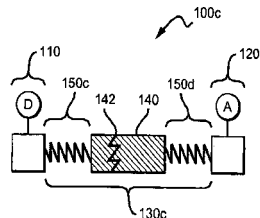


FIG. 11c

【图 1 2】

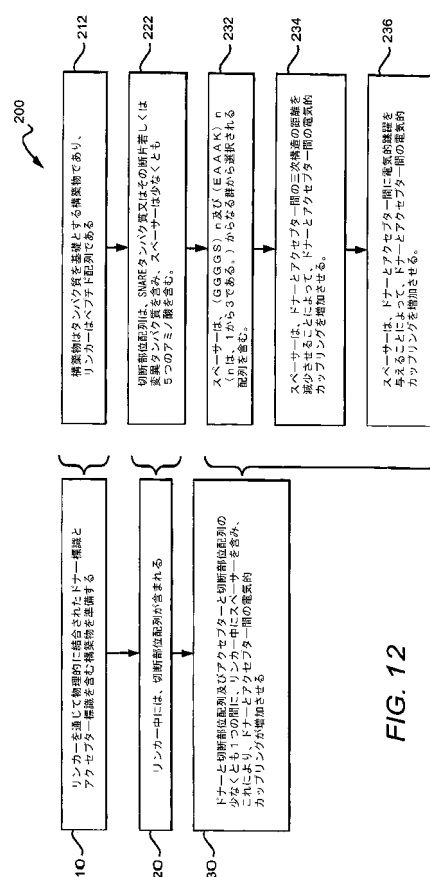
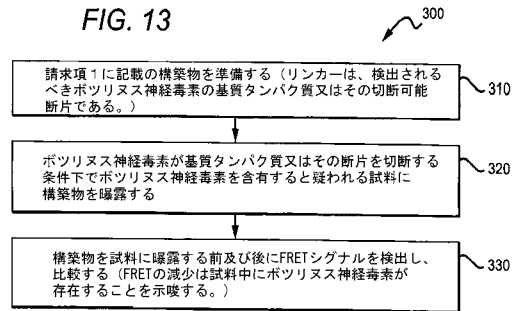


FIG. 12

【図 13】



【配列表】

0005412689000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ドン, ミン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・92014、デル・マー、ルネータ・ドライブ・1568、バイオセンテイナー・エル・エル・シー

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表2006-502378 (JP, A)

米国特許出願公開第2007/0059316 (US, A1)

国際公開第2007/047342 (WO, A1)

特表2007-520211 (JP, A)

WATERHAUS, BIOCHEMISTRY, 1994年, V33 N8, P2121-2128

MELTZER R, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2007年 8月31日, V282 N35, P25548-25559

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/542

C07K 9/00

C07K 14/33

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)