

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-304501

(P2005-304501A)

(43) 公開日 平成17年11月4日(2005.11.4)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/09

F I

C 1 2 N 5/00

C 1 2 N 15/00

B

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L 外国語出願 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2005-120934 (P2005-120934)
 (22) 出願日 平成17年4月19日 (2005. 4. 19)
 (31) 優先権主張番号 60/562, 981
 (32) 優先日 平成16年4月19日 (2004. 4. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
 BECTON, DICKINSON AND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O
 7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レイ
 クス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRA
 NKLIN LAKES, NEW JE
 RSEY O 7 4 1 7 - 1 8 8 0, UN
 ITED STATES OF AMER
 ICA
 (74) 代理人 100077481
 弁理士 谷 義一

最終頁に続く

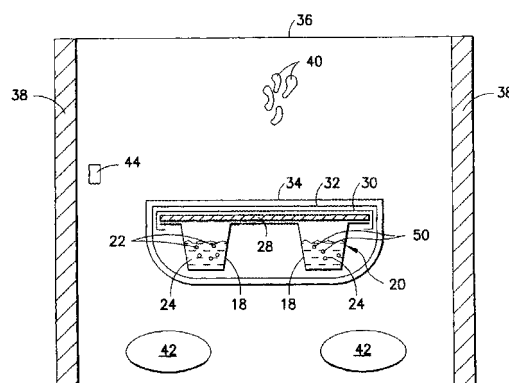
(54) 【発明の名称】 トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞の輸送方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を提供する方法を提供する。

【解決手段】第1の場所でトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製するステップと、第1の場所から離れた第2の場所にトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を輸送するステップとを含む。好ましくは、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞が、多様なヒトまたは動物の膜タンパク質をコードする cRNA または cDNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入することにより調製される。さらなる態様では、少なくとも1つの容器およびその容器に配置された少なくとも1個のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を含む培養系が提供される。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を提供する方法であって、

a) 第 1 の場所でトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製するステップと、

b) 前記第 1 の場所から離れた第 2 の場所に前記トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を輸送するステップと

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製するステップは、ヒトまたは動物の膜タンパク質をコードする cRNA または cDNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記のヒトまたは動物の膜タンパク質は、ヒト有機カチオントランスポーター 1 (hOCT1)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド 1 (hOATP1)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド 2 (hOATP2)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド 8 (hOATP8)、ヒトタウロコール酸 Na^+ 共輸送タンパク質 (hNTCP)、ラット有機アニオン輸送ポリペプチド (rOatp1)、ヒトペプチドトランスポーター 1 (hPEPT1)、ヒトペプチドトランスポーター 2 (hPEPT2)、ヒト有機アニオントランスポーター 1 (hOAT1)、ヒト有機アニオントランスポーター 3 (hOAT3)、ラット有機アニオントランスポーター 3 (rOat3)、およびラット有機アニオン輸送ポリペプチド 4 (rOatp4) からなる群から選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。 20

【請求項 4】

配達前に前記トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を少なくとも 1 つの容器に配置するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの容器はマルチウェルプレートのウェルであることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記配置するステップの後でかつ配達前に、前記の少なくとも 1 つのウェルを密封するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。 30

【請求項 7】

前記配置するステップ後でかつ配達前に、前記少なくとも 1 つの容器を密封するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

配達前に緩衝液を前記少なくとも 1 つの容器中に配置するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記配達するステップは、前記トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞の温度を維持するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 10】

前記温度は、10 ~ 20 の範囲に維持されることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記温度は、16 に維持されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記輸送するステップは、自動車、トラック、飛行機、列車、船、およびその組合せからなる群から選択される輸送方法により輸送するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 13】

少なくとも 1 つの容器と、

前記容器中に配置された少なくとも 1 個のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞と

を含む培養系であって、

前記容器は前記容器の輸送を可能にするように密封されることを特徴とする培養系。

【請求項 14】

少なくとも 1 個のアフリカツメガエル卵母細胞をさらに含むことを特徴とする請求項 13 に記載の培養系。

【請求項 15】

あらかじめ水を注入された少なくとも 1 個のアフリカツメガエル卵母細胞をさらに含むことを特徴とする請求項 13 に記載の培養系。

【請求項 16】

前記容器中に配置された緩衝液をさらに含むことを特徴とする請求項 13 に記載の培養系。

【請求項 17】

前記容器はマルチウェルプレートのウェルであることを特徴とする請求項 13 に記載の培養系。

【請求項 18】

少なくとも 1 種の試薬をさらに含むことを特徴とする請求項 13 に記載の培養系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膜輸送タンパク質などのヒトまたは動物の膜タンパク質をコードする cRNA または cDNA をあらかじめ注入したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞を提供する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

南アフリカの爪を持ったカエルであるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞はよく使用される機能発現系である。卵母細胞発現系は、トランスポーター、イオンチャネルおよびポンプなどの膜タンパク質の機能を研究するために用いられてきた。卵母細胞発現系は、バックグラウンドの低さ、高い発現レベル、および適切な翻訳後修飾を示す。

【0003】

例えばヒト有機カチオントランスポーター 1 (hOCT1、SLC22A1)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド 1 (hOATP1、SLC21A3)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド 2 (hOATP2、SLC21A6)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド 8 (hOATP8、SLC21A8)、ヒトタウロコール酸 Na⁺ 共輸送タンパク質 (hNTCP、SLC10A1)、ラット有機アニオン輸送ポリペプチド (rOatp1、Slc21a1)、ヒトペプチドトランスポーター 1 (hPEPT1、SLC15A1)、ヒトペプチドトランスポーター 2 (hPEPT2、SLC15A2)、ヒト有機アニオントランスポーター 1 (hOAT1、SLC22A6)、ヒト有機アニオントランスポーター 3 (hOAT3、SLC22A8)、ラット有機アニオントランスポーター 3 (rOat3、Slc22a8)、およびラット有機アニオン輸送ポリペプチド 4 (rOatp4、Slc21a10) などの多様なヒトおよび動物の膜輸送タンパク質 (本明細書ではトランスポーターとも呼ぶ) に対する薬物輸送アッセイの確立には、いくつかの技術的問題が存在しう。これらのトランスポーターの機能を同定するために卵母細胞でこれらを発現させることは困難であり、そのプロセス規模のために多大な時間を必要とする。

【0004】

【非特許文献 1】Wagner, et al., Cellular Physiol. Biochem., 2000, 10, 1-12

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I-III (F. Ausubel, ed. 1994)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本明細書において、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を提供する方法を開示する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

この方法は、第1の場所でトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製するステップと、第1の場所から離れた第2の場所にトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を輸送するステップとを含む。好ましくは、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞は、多様なヒトまたは動物の膜タンパク質をコードするcRNAまたはcDNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入することにより調製される。

【0007】

本発明のさらなる態様では、少なくとも1つの容器およびその容器に配置された少なくとも1個のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を含む培養系が提供される。この容器は、容器の輸送を可能にするように密封される。本発明により、有利なことには、使用者は、多様なヒトまたは動物の膜タンパク質をコードするcRNAまたはcDNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入するという困難な作業を行わずに、トランスジェニ

【0008】

cRNAまたはcDNAは、多様なヒトまたは動物の膜輸送タンパク質、例えばヒト有機カチオントランスポーター1(hOCT1)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド1(hOATP1)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド2(hOATP2)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド8(hOATP8)、ヒトタウロコール酸Na⁺共輸送タンパク質(hNTCP)、ラット有機アニオン輸送ポリペプチド(roatp1)、ヒトペプチドトランスポーター1(hPEPT1)、ヒトペプチドトランスポーター2(hPEPT2)、ヒト有機アニオントランスポーター1(hOAT1)、ヒト有機アニオントランスポーター3(hOAT3)、ラット有機アニオントランスポーター3(roat3)、およびラット有機アニオン輸送ポリペプチド4(roatp4)から選択されるヒトまたは動物の膜輸送タンパク質などをコードしてもよい。

【0009】

本明細書で使用する「トランスジェニック」は、通常のタンパク質相補体に加えて、膜輸送タンパク質などのヒトまたは動物の膜タンパク質を発現する卵母細胞を示す。

【0010】

本発明のこれらの特徴およびその他の特徴は、以下の詳細な説明および添付図面の検討を通して、さらによく理解されるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

図1に示すように、方法10はトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を提供するステップを説明している。

【0012】

最初のステップ12で、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製する。任意の既知の技法を使用して、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製することができる。好ましくは、膜輸送タンパク質などのヒトまたは動物の膜タンパク質をコードするcRNAまたはcDNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入することにより、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製する。cRNAまたはcDNAは、膜輸送タンパク質を含む多様なヒトまたは動物の膜タンパク質をコードしてもよい。非限定例として、cRNAまたはcDNAは、以下の動物またはヒトの膜輸送タンパク質

10

20

30

40

50

、つまりヒト有機カチオントランスポーター1 (hOCT1、SLC22A1)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド1 (hOATP1、SLC21A3)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド2 (hOATP2、SLC21A6)、ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド8 (hOATP8、SLC21A8)、ヒトタウロコール酸Na⁺共輸送タンパク質 (hNTCP、SLC10A1)、ラット有機アニオン輸送ポリペプチド (rOatp1、SLC21a1)、ヒトペプチドトランスポーター1 (hPEPT1、SLC15A1)、ヒトペプチドトランスポーター2 (hPEPT2、SLC15A2)、ヒト有機アニオントランスポーター1 (hOAT1、SLC22A6)、ヒト有機アニオントランスポーター3 (hOAT3、SLC22A8)、ラット有機アニオントランスポーター3 (rOat3、SLC22a8)、およびラット有機アニオン輸送ポリペプチド4 (rOatp4、SLC21a10)のいずれかをコードしてもよい。これらのタンパク質およびそれらをコードするcRNAおよびcDNAは当技術分野で知られている。

10

【0013】

好ましい実施形態では、アフリカツメガエルまたはアフリカツメガエル卵母細胞をNASCO、Ft. Atkinson、WI53538から入手することができる。ヒトまたは動物の膜タンパク質をコードするcRNAまたはcDNAを標準的な技法により注入してもよい(例えば、非特許文献1参照)。本発明で使用するすることができる、従来の分子生物学または細胞生物学の技法も開示されている(例えば、非特許文献2参照)。

【0014】

トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を調製すると、ステップ14で示されるように、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を、調製場所から離れた場所に輸送することができる。本発明では、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞が第1の場所(例えば、製造会社施設)で調製され、離れている第2の場所(例えば、取引先施設)に輸送される。自動車、トラック、飛行機、列車、または船便輸送、あるいはそれらの任意の組合せを含むがこれらに限らない任意の輸送方法を使用することができる。トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞は、2~4日以内の期間で輸送されることが好ましい。トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞は、一般に7日間生存可能である。

20

【0015】

好ましくは、輸送前にトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を1個または複数の容器に配置する(ステップ16)。容器は、試験管、バイアル瓶、フラスコなどの任意の既知の形状であってよい。好ましくは、図2に示すように、容器18はマルチウェルプレート20のウェルである。このマルチウェルプレート20が、薬物アッセイ処理用装置(例えば、ハイスループット(高い処理量の)スクリーニング(HTS)装置)で使用するできるように、従来のマルチウェルプレート標準品(例えば、Society of Biomolecular Screeningのスタンダード)に適合することがさらに好ましい。マルチウェルプレート20は、好ましくは米国ニュージャージー州フランクリンレイクスのベクトンディッキンソンアンドカンパニーの商標「BD Falcon(商標)Flip-Lock Packaging」で市販されているマルチウェルプレートである。この特定のマルチウェルプレートには、1列12個のウェルがあるが、任意の数のウェルを本発明に使用することができる。

30

40

【0016】

さらに図2に示すように、任意の数のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞22を容器18に配置してもよい。容器18、1個当たり4~5個のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞22を配置するのが好ましい。

【0017】

好ましくは、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞22を懸濁するために、緩衝液24も容器18に配置する。緩衝液24は、遠隔場所への輸送を可能にするために、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞22の生存力を長時間維持する任意の溶液であってよい。緩衝液24は、ND96(96mM NaCl、2mM KCl、1

50

mM $CaCl_2$ 、1.8 mM $CaCl_2$ 、50 μ g/ml ゲンタマイシン、pH 7.4) または改変バース培地 (Modified Barth Medium) (88 mM NaCl、0.82 mM $MgSO_4$ 、0.41 mM $CaCl_2$ 、0.33 mM $Ca(NO_3)_2$ 、2.4 mM $NaHCO_3$ 、10 mM HEPES、50 μ g/ml ゲンタマイシン) であってよい。容器 18 のそれぞれにおいて 4 ~ 5 個のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を懸濁するために、約 5 ml の緩衝液 24 を加えるのが好ましい。さらに好ましくは、容器 18 が単一構造の一部 (例えば、単一マルチウェルプレートのウェル) であるとき、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞 22 が存在しなくてもよい容器 18 でも、単一構造の容器 18 のそれぞれが等量の緩衝液 24 を含む。等量の緩衝液 24 により、輸送中のスロッシング作用が弱まり、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞 22 に起こり得るダメージが軽減される。 10

【0018】

任意の既知の技法を用いて、緩衝液 24 を容器 18 に配置してもよい。トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞 22 を配置する前に、緩衝液 24 を容器 18 に配置することが好ましい。トランスファーピペットなどの任意の既知の技法を用いて、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞 22 を容器 18 に配置してもよい。

【0019】

図 1 のステップ 26 で示されるように、容器を輸送前に密封することも好ましい。好ましくは、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞および緩衝液の漏出を防ぐために、容器を液密に密封する。任意の密封装置を使用することができる。例示を目的として 20 図 2 に示すように、漏れに対して液体を通さないバリアをもたらすために弾力性のあるガasket またはシール部材 28 (例えば、シリコンガasket) を容器 18 の全体に配置してもよい。任意の既知の技法を用いて、シール部材 28 を容器 18 に対して固定してもよい。例えば、容器 18 に対してねじ付け、ヒンジで取り付け、ラッチ係合、さもなければ取り外しできるように固定する (例えば、マルチウェルプレート 20 にラッチ係合する) シール部材 28 を覆うように蓋 30 を配置してもよい。蓋 30 により、シール部材 28 に対して逆行する力が生じ、それによりもたらされるシールを強化させてもよい。シール部材 28 は、(例えば、熱接着により) 容器に対して取り外しできるように固定されるホイルまたはプラスチックフィルムであってもよい。

【0020】

トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞は温度感受性があり、輸送ステップ 1 4 の間、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞の温度を維持することが好ましい。より具体的には、温度を 10 ~ 20 の範囲、さらに好ましくは 16 の温度で維持することが好ましい。任意の既知の技法により温度を維持することができる。本発明では、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞が、最初に所望の温度に冷蔵され、その冷蔵温度を維持するために断熱材料内に包装されてもよい。例えば図 2 に示すように、紙スリーブまたは封筒 32 (例えば、重量紙または板紙) および / またはプラスチックスリーブまたは小袋 34 を、断熱性を与えるために容器 18 の周囲に配置してもよい。紙スリーブまたは封筒 32 および / またはプラスチックスリーブもしくは小袋 34 を容器 18 の周囲にタイトに包装して、シール部材 28 に対して逆行する力をさらに生じさせてもよい。 40 さらに、外部断熱包装を用いてもよい。図 2 に示すように、断熱性の裏地 38 を有するカートン 36 内に容器 18 を梱包してもよい。断熱性だけでなく衝撃耐性を加えるために遊離包装材料 40 (例えば、発泡セグメント) を備えてもよい。所望の温度をさらに維持するために、あらかじめ冷却した媒体 42 をトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞の外部にさらに詰めてもよい (例えば、あらかじめ 4 に冷蔵された前冷却ゲルパック)。輸送中の温度変動点検を可能にするために、温度デジタルレコーダ 44 をトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞と共に包装してもよい。

【0021】

当分野の技術者には明らかなように、本発明のトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞を培養系の一部として利用することができる。輸送のために 1 個または複数の容 50

器に密封されるトランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞に加えて、この培養系は対照のアフリカツメガエル卵母細胞を含んでもよい。図1に示すように、未注入のアフリカツメガエル卵母細胞（すなわち、ヒトまたは動物の膜タンパク質をコードするcRNAまたはcDNAを注入していない）を提供する、または生体内（*in vivo*）でアフリカツメガエル卵母細胞に水を注入することによって、対照のアフリカツメガエル卵母細胞を調製してもよい（ステップ46）。その後、前述と同じ方法で、対照のアフリカツメガエル卵母細胞を、1個または複数の容器に配置し（ステップ48）、密封し（ステップ26）、輸送してもよく（ステップ14）、これらはその温度を維持するステップを含む。図2に、対照のアフリカツメガエル卵母細胞50を示す。しかし、単一の構造の容器（例えば、マルチウェルプレート）は、混同を避けるため、トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞と対照のアフリカツメガエル卵母細胞の両方を含まないことが好ましく、別々の容器を使用することが好ましい。

【0022】

この培養系は、分析用試薬などのその他の成分を含んでもよい。試薬は、前述のND96緩衝液（例えば、500ml）、ナトリウム（ Na^+ ）緩衝液（例えば、500ml）、およびSDS溶解緩衝液（例えば、30ml）であってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明の方法を示すフローチャートである。

【図2】包装されたトランスジェニックおよび対照のアフリカツメガエル卵母細胞の断面図である。

【符号の説明】

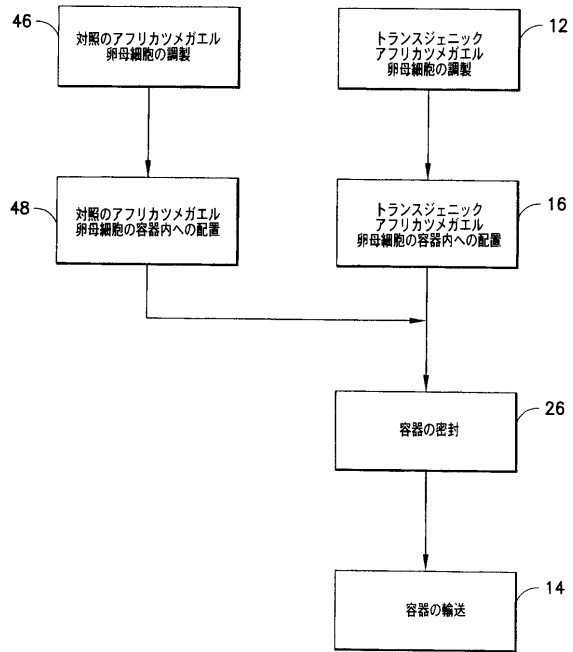
【0024】

- 12 ステップ
- 14 輸送ステップ
- 16 ステップ
- 18 容器
- 20 マルチウェルプレート
- 22 トランスジェニックアフリカツメガエル卵母細胞
- 24 緩衝液
- 26 ステップ
- 28 シール部材
- 30 蓋
- 32 封筒
- 34 小袋
- 36 カートン
- 38 裏地
- 40 遊離包装材料
- 42 媒体
- 44 温度デジタルレコーダ
- 46 ステップ
- 48 ステップ
- 50 対照のアフリカツメガエル卵母細胞

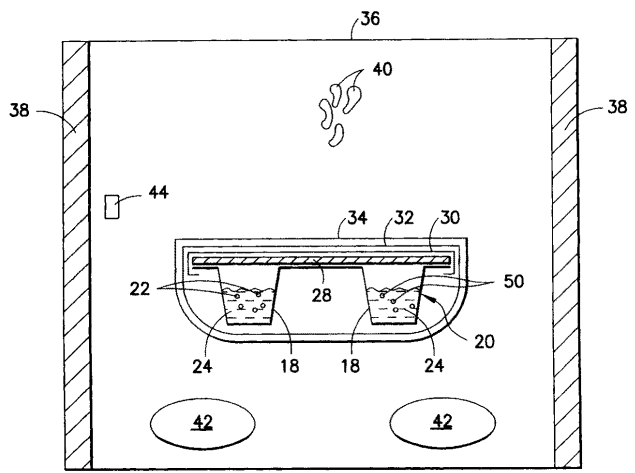
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(72)発明者 グゥアンチン シャオ

アメリカ合衆国 0 1 5 4 5 マサチューセッツ州 シュルーズベリー ハリエット アベニュー
5 0

F ターム(参考) 4B024 AA20 CA04 CA20 DA02 GA11

4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 BD12 BD21 CA43 CA44 CA46

【外国語明細書】

2005304501000001.pdf