

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成25年3月14日(2013.3.14)

【公表番号】特表2012-516429(P2012-516429A)

【公表日】平成24年7月19日(2012.7.19)

【年通号数】公開・登録公報2012-028

【出願番号】特願2011-546532(P2011-546532)

【国際特許分類】

G 0 1 N	33/542	(2006.01)
G 0 1 N	21/64	(2006.01)
G 0 1 N	21/76	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 0 7 K	14/705	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/542	Z N A A
G 0 1 N	21/64	F
G 0 1 N	21/76	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	1/19	
C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	19/00	

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月25日(2013.1.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

化合物を検出する方法であって、前記方法が、

i ) 試料を、脂質二重層中に埋め込まれ、化合物と結合することができる少なくとも1つのGタンパク質共役受容体を含む無細胞組成物と接触させるステップであって、

Gタンパク質共役受容体が、同じまたは異なる1つまたは複数のサブユニットを含み、Gタンパク質共役受容体の少なくとも1つのサブユニットが、生物発光タンパク質およびアクセプター分子を含むステップと、

i i ) ステップi )と同時にまたはそれに連続して、生物発光タンパク質の基質を提供し、生物発光タンパク質が基質を修飾することを可能にするステップと、

i i i ) ステップi i )が生物発光タンパク質とアクセプター分子の間の生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)を変動させるかどうかを決定するステップと

を含み、化合物がGタンパク質共役受容体と結合したときにアクセプター分子に対する生物発光タンパク質の空間的位置および/または双極子配向が変化し、細胞中で発現したときにGタンパク質共役受容体またはそのサブユニットのN末端が細胞の外側にあり、C末端が細胞の内側にあり、かつ、BRET比率の変化の幅が試料中の化合物の相対量を示し、かつ

a ) 生物発光タンパク質がサブユニットの5番目の非膜貫通ループの一部を形成し、ア

セプター分子がC末端の一部を形成し、または

b) アクセプター分子がサブユニットの5番目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質がC末端の一部を形成し、かつ、

当該方法は、生物発光タンパク質をドナー分子として使用し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の変動を決定する場合より少なくとも2倍感度がよい、前記方法。

【請求項2】

生物発光タンパク質およびアクセプター分子のForster距離が、6.8nmおよび7.6nmの間である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

生物発光タンパク質およびアクセプター分子のForster距離が、7.5nmである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

i) 無細胞組成物が、組換え細胞中でGタンパク質共役受容体を產生し、細胞の膜を破壊することによって得られた、または

ii) Gタンパク質共役受容体が、リポソームの脂質二重層中に埋め込まれる、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

組換え細胞が酵母細胞である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

マイクロ流体工学を使用して行われる、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

化合物を検出するための精製および/または組換えポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、

i) Gタンパク質共役受容体のサブユニットと、

ii) 生物発光タンパク質およびアクセプター分子と

を含み、細胞中で発現したときにサブユニットのN末端が細胞の外側にあり、C末端が細胞の内側にあり、かつ化合物がポリペプチドと結合したときにアクセプター分子に対する生物発光タンパク質の空間的位置および/または双極子配向が変化し、かつ、BRET比率の変化の幅が試料中の化合物の相対量を示し、かつ

a) 生物発光タンパク質がサブユニットの5番目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子がC末端の一部を形成し、または

b) アクセプター分子がサブユニットの5番目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質がC末端の一部を形成し、かつ、

生物発光タンパク質およびアクセプター分子のForster距離が、6.8nmおよび7.6nmの間である、前記ポリペプチド。

【請求項8】

i) サブユニットが、第1のGタンパク質共役受容体サブユニットのN末端および1番目の膜貫通ドメインの少なくとも大部分、第2のGタンパク質共役受容体サブユニットの1番目の非膜貫通ループの少なくとも大部分から5番目の膜貫通ドメインの少なくとも大部分まで、ならびに第1のGタンパク質共役受容体サブユニットの5番目の非膜貫通ループの少なくとも大部分からC末端までを含むか、または

ii) サブユニットが、第1のGタンパク質共役受容体サブユニットのN末端から5番目の膜貫通ドメインの少なくとも大部分まで、および第2のGタンパク質共役受容体サブユニットの5番目の非膜貫通ループの少なくとも大部分からC末端までを含む、

請求項1~6のいずれか1項に記載の方法または請求項7に記載のポリペプチド。

【請求項9】

i) 生物発光タンパク質が、ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼまたはその生物学的に活性な変異体もしくは断片である、および/または

ii) 基質が、ルシフェリン、セレンテラジン、またはセレンテラジンの誘導体である、および/または

i i i) タンパク質であるアクセプター分子が、緑色蛍光タンパク質 (GFP) またはその生物学的に活性な変異体もしくは断片である、

請求項 1 ~ 6 または 8 のいずれか 1 項に記載の方法または請求項 7 または 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

ルシフェラーゼがウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼであり、アクセプター分子が GFP<sup>2</sup> であり、かつ基質がセレンテラジン 400a である、請求項 9 に記載の方法またはポリペプチド。

【請求項 11】

i) G タンパク質共役受容体が嗅覚受容体である、または  
i i) サブユニットが、2つ以上の異なる G タンパク質共役受容体サブユニットの部分のキメラである、

請求項 1 ~ 6 または 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法または請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

嗅覚受容体が、脊索動物受容体、線虫受容体、またはそのいずれか 1 つの生物学的に活性な変異体もしくは断片である、請求項 11 に記載の方法またはポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 7 から 12 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離および / または外因性ポリヌクレオチド。

【請求項 14】

プロモーターと作動可能に連結する、請求項 13 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 15】

請求項 13 に記載のポリヌクレオチドおよび / または請求項 14 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 16】

酵母細胞である、請求項 15 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

請求項 7 から 12 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド、請求項 14 に記載のベクター、および / または請求項 15 または 16 に記載の宿主細胞を含む組成物。

【請求項 18】

脂質二重層中に埋め込まれている、請求項 7 から 12 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む無細胞組成物。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の無細胞組成物を作製する方法であって、前記方法が、請求項 15 または 16 に記載の細胞を得るステップと、細胞の膜を破壊するステップとを含む、前記方法。

【請求項 20】

請求項 7 から 12 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 15 または 16 に記載の宿主細胞、請求項 17 に記載の組成物、および / または請求項 18 に記載の無細胞組成物を含むバイオセンサー。

【請求項 21】

G タンパク質共役受容体と結合する化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法が、

i) 候補化合物を、脂質二重層中に埋め込まれ、化合物と結合することができる少なくとも 1 つの G タンパク質共役受容体を含む無細胞組成物と接触させるステップであって、

G タンパク質共役受容体が、同じまたは異なる 1 つまたは複数のサブユニットを含み、G タンパク質共役受容体の少なくとも 1 つのサブユニットが、生物発光タンパク質および

アクセプター分子を含むステップと、

i i ) ステップ i ) と同時にまたはそれに連続して、生物発光タンパク質の基質を提供し、生物発光タンパク質が基質を修飾することを可能にするステップと、

i i i ) ステップ i i ) が生物発光タンパク質とアクセプター分子の間の生物発光共鳴エネルギー移動 (B R E T) を変動させるかどうかを決定するステップと

を含み、B R E T の変動が、化合物が G タンパク質共役受容体と結合することを示し、細胞内で発現したときに G タンパク質共役受容体またはそのサブユニットの N 末端が細胞の外側にあり、C 末端が細胞の内側にあり、かつ、B R E T 比率の変化の幅が試料中の化合物の相対量を示し、かつ

a ) 生物発光タンパク質がサブユニットの 5 番目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子が C 末端の一部を形成し、または

b ) アクセプター分子がサブユニットの 5 番目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質が C 末端の一部を形成し、かつ、

当該方法は、非生物発光タンパク質をドナー分子として使用し、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) の変動を決定する場合より少なくとも 2 倍感度がよい、前記方法。