

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2021年1月14日(14.01.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/005862 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/60 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/016461

(22) 国際出願日: 2020年4月14日(14.04.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2019-129374 2019年7月11日(11.07.2019) JP

(71) 出願人: 浜松ホトニクス株式会社 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP]; 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 Shizuoka (JP). 学校法人光産業創成大学院大学 (THE GRADUATE SCHOOL FOR THE CREATION OF NEW PHOTONICS INDUSTRIES) [JP/JP]; 〒4311202 静岡県浜松市西区呉松町1955番1 Shizuoka (JP).

(72) 発明者: 平野 美奈子 (HIRANO Minako); 〒4311202 静岡県浜松市西区呉松町1955番1 学校法人光産業創成大学院大学内 Shizuoka (JP). 松永 茂 (MATSUNAGA Shigeru); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP). 建部 益美 (TAKEBE Masumi); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A

(明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: PHOTOACTIVATED ADENYLATE CYCLASE

(54) 発明の名称: 光活性化アデニル酸シクラーゼ

(57) Abstract: A protein according to one embodiment of the present invention has a photoactivated adenylate cyclase activity and has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 in which 1-18 amino acid residues are deleted from the C-terminal or an amino acid sequence having a sequence identity of 90% therewith. The present invention provides a novel photoactivated adenylate cyclase having a higher photoactivation efficiency than wild-type OaPAC proteins.

(57) 要約: 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、光活性化アデニル酸シクラーゼ活性を有し、1~18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列、又はこれと90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。本発明によれば、野生型のOaPACタンパク質と比べて高い光活性化効率を有する、新規の光活性化アデニル酸シクラーゼを提供することができる。



WO 2021/005862 A1

## 明 細 書

発明の名称：光活性化アデニル酸シクラーゼ

### 技術分野

[0001] 本発明は、光活性化アデニル酸シクラーゼに関する。

### 背景技術

[0002] 近年、光遺伝学を用いて、生体機能を光によりコントロールする手法が、医学及び生理学の分野で盛んに利用されている。この手法では、光照射により生体内で生理機能を発揮する光プローブ（例えば、酵素又はイオンチャネル）を生体内の標的部位（例えば、特定の組織中又は細胞中）に配置し、光プローブに光を照射して生体機能を人為的にコントロールする。

[0003] 光プローブとして、光活性化アデニル酸シクラーゼ（PAC）が知られている。光活性化アデニル酸シクラーゼは、光により活性化されて環状アデノシンリン酸（cAMP）を産生するタンパク質であり、BLUF（sensor of Blue Light Using FAD）ドメイン及びシクラーゼ触媒ドメインを有する。BLUFドメインは、FAD又はFMNが結合するドメインであり、FADを利用した青色光の感知に関与する。シクラーゼ触媒ドメインは、ATPをcAMPに変換するドメインである。PAC遺伝子は様々な生物において見つかっている（例えば、非特許文献1）。藍色細菌のユレモ属に由来する光活性化アデニル酸シクラーゼ（OaPAC）は、ヒト細胞において容易に発現させることができるホモ2量体であり、かつその結晶構造が開示されており、加えて哺乳類細胞系との発現の相性が良いことから、メディカル応用に適するcAMP調節用光プローブである。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0004] 非特許文献1：Isekiら、Nature, VOL. 415, pp. 1047-1051、2002年2月28日

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 野生型のO a P A Cタンパク質の光活性化効率は低く、O a P A Cタンパク質の光活性化には強い光の照射が必要である。そのため、野生型のO a P A Cタンパク質を発現させた生体は、光照射により光障害を生じる可能性がある。

[0006] 本発明は上記課題に鑑みてなされたものであり、野生型のO a P A Cタンパク質と比べて高い光活性化効率を有する、新規の光活性化アデニル酸シクラーゼを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 検討の結果、本発明者らは、野生型のO a P A Cタンパク質のC末端からアミノ酸残基を特定数欠失させることにより、O a P A Cタンパク質の光活性化効率が向上することを見だし、本発明を完成させるに至った。O a P A Cタンパク質のC末端は、P A C活性の発揮のために重要であると考えられてきたB L U Fドメイン及びシクラーゼ触媒ドメインとは全く異なる部位であることから、O a P A Cタンパク質のC末端及びその近辺が光活性化効率に影響を与えるとの本発明者らの知見は、驚くべきものである。

[0008] 本発明は、以下の〔1〕～〔5〕に関する。

〔1〕 光活性化アデニル酸シクラーゼ活性を有するタンパク質であって、1～18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列、又はこれと90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、タンパク質。

〔2〕 配列番号1のアミノ酸配列のC末端から欠失されたアミノ酸残基の数が5～7である、上記〔1〕に記載のタンパク質。

〔3〕 上記〔1〕又は〔2〕に記載のタンパク質をコードする、核酸。

〔4〕 上記〔3〕に記載の核酸を含む、ベクター。

〔5〕 上記〔4〕に記載のベクターが導入された、形質転換体。

[0009] また、本発明は、以下の〔6〕及び〔7〕にも関する。

[6] 上記 [5] に記載の形質転換体を培養することを含む、上記 [1] 又は [2] に記載のタンパク質の製造方法。

[7] 1～18のアミノ酸残基を光活性化アデニル酸シクラーゼのC末端から欠失させることを含み、上記光活性化アデニル酸シクラーゼはユレモ属に由来する、アデニル酸シクラーゼの光活性化効率を向上させる方法。

### 発明の効果

[0010] 本発明によれば、野生型のO a P A Cタンパク質と比べて高い光活性化効率を有する、新規の光活性化アデニル酸シクラーゼが提供される。

[0011] また、本発明によれば、広いバリエーションの光活性化効率を有する光活性化アデニル酸シクラーゼが提供される。光活性化に用いられる照射光の望ましい光強度は光活性化アデニル酸シクラーゼの利用の仕方により異なるため、光活性化効率にはバリエーションが求められる。例えば、光活性化アデニル酸シクラーゼを導入した培養細胞を、通常の実験室においてシャーレ上で扱う場合、光活性化アデニル酸シクラーゼの光活性化効率が高すぎると、所定の光源で光照射を行う前に室内の天井灯でアデニル酸シクラーゼが光活性化されてしまう可能性がある。一方、光が届きにくい、生体深部の細胞に光活性化アデニル酸シクラーゼを導入した場合、光活性化アデニル酸シクラーゼの光活性化効率が低いと、光活性化に十分な強度の光が細胞まで届かず、光活性化アデニル酸シクラーゼを活性化することができない可能性がある。本発明によれば、様々な状況に対応できる広いバリエーションの光活性化効率を有する光活性化アデニル酸シクラーゼが提供されるため、上記のような様々な状況に対応することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]O a P A C (O a - 3 6 6) タンパク質と、硫黄細菌ベギアトア (Beggiatoa sp) 由来の光活性化アデニル酸シクラーゼ (b P A C) と、ミドリムシ (ユーグレナ・グラシリス (Euglena gracilis)) の光活性化アデニル酸シクラーゼの $\alpha$ 鎖の一部 (P A C  $\alpha$  C) と、のアミノ酸配列のアライメントである。赤枠で囲まれた白字のアミノ酸残基は、種々の生物の光活性化アデ

ニル酸シクラーゼにおいて保存されたアミノ酸残基である。

[図2]野生型及び変異型O a P A Cタンパク質の光活性化効率を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0013] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、光活性化アデニル酸シクラーゼ活性（以下、P A C活性という。）を有し、1～18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列、又はこれと90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。本明細書における光活性化アデニル酸シクラーゼ活性とは、光照射により発揮される（すなわち、活性化される）アデニル酸シクラーゼ活性を指す。配列番号1のアミノ酸配列は、藍色細菌オスキラトリア・アクミナータ (*Oscillatoria acuminata*) の野生型のO a P A Cタンパク質 (O a - 3 6 6タンパク質) のアミノ酸配列である。本明細書において、C末端とは、タンパク質の両末端のうちフリーなカルボキシ基で終端している側の、最末端を指す。例えば、366アミノ酸残基からなる配列番号1のアミノ酸配列のC末端のアミノ酸残基は、366番目のアミノ酸残基であるロイシン残基である。

[0014] より具体的には、本実施形態に係るタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列のC末端から、1～18、2～18、3～18、5～18、6～18、8～18、9～18若しくは5～7のアミノ酸残基を欠失させて得られるアミノ酸配列、又はこれと90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるとよい。配列番号1のアミノ酸配列のC末端から欠失されたアミノ酸残基の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、又はそれ以上であってよく、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2又はそれ以下であってよい。C末端から欠失されたアミノ酸残基の数が8～18である場合、タンパク質の光活性化効率は特に高い。一方、C末端から欠失されたアミノ酸残基の数が5～7である場合、タンパク質の光活性化効率は、欠失されたアミノ酸残基の数が8～18又は1～4である場合と比べ

て中程度である。中程度の光活性化効率を有する光活性化アデニル酸シクラーゼは、従来、他の生物でも知られていないため、5～7のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列、又はこれと90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質の有用性は極めて高い。

[0015] 本実施形態に係るタンパク質は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のアミノ酸配列からなってもよい。これらのアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列からそれぞれ364番目～366番目、361番目～366番目、358番目～366番目、355番目～366番目、352番目～366番目、及び349番目～366番目のアミノ酸残基を欠失させて得られるアミノ酸配列である。本実施形態に係るタンパク質は、配列番号2～配列番号7のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなってもよい。配列番号1～配列番号7のアミノ酸配列の詳細を表1に示す。以下、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及び配列番号7のアミノ酸配列からなるタンパク質を、それぞれOa-366タンパク質、Oa-363タンパク質、Oa-360タンパク質、Oa-357タンパク質、Oa-354タンパク質、Oa-351タンパク質、及びOa-348タンパク質ともいう。

[0016]

[表1]

	WT OaPACにおける アミノ酸欠失の位置	C末端から欠失された アミノ酸残基の数	C末端付近(349番目～) のアミノ酸配列
WT OaPAC (Oa-366) (配列番号 1)	-	0	RVGDRQPSQIFGVKSLPL
Oa-363 (配列番号 2)	364番目～366番目	3	RVGDRQPSQIFGVKS
Oa-360 (配列番号 3)	361番目～366番目	6	RVGDRQPSQIFG
Oa-357 (配列番号 4)	358番目～366番目	9	RVGDRQPSQ
Oa-354 (配列番号 5)	355番目～366番目	12	RVGDRQ
Oa-351 (配列番号 6)	352番目～366番目	15	RVG
Oa-348 (配列番号 7)	349番目～366番目	18	-

[0017] 上記配列同一性は、具体的には、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上であってもよい。本実施形態に係る上記1～18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列は、野生型のOaPACタンパク質と比べて高い光活性化効率（すなわち、高いPAC活性の効率）を損なわない範囲で、より具体的には、*Oscillatoria acuminata*に由来する野生型の光活性化アデニル酸シクラーゼと比べて高い光活性化効率を損なわない範囲で、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入、及び付加からなる群より選ばれる1以上の変異をさらに有してもよい。例えば、配列番号1のアミノ酸配列のC末端から欠失させたアミノ酸残基と同一のアミノ酸残基をC末端に付加する変異は、C末端からアミノ酸残基を欠失させたことによる光活性化効率の向上を打ち消してしまうため、そのような変異は好ましくない。1～18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列の348番目のアミノ酸残基より後のアミノ酸残基の数と、1～18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の、上記348番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基より後のア

ミノ酸残基の数とは、一致してもよいし、一致しなくてもよい。

[0018] 図1は、OaPAC (Oa-366) タンパク質と、Beggiatoa spの光活性化アデニル酸シクラーゼ (bPAC) と、Euglena gracilisの光活性化アデニル酸シクラーゼの $\alpha$ 鎖の一部 (PAC $\alpha$ C) と、の amino 酸配列のアライメントである。図1において、赤枠で囲まれた白字の amino 酸残基は、種々の生物の光活性化アデニル酸シクラーゼにおいて保存された amino 酸残基である。保存 amino 酸残基は PAC 活性を発揮するうえで重要であるため、本実施形態において、これらの amino 酸残基は変異されていない。すなわち、本実施形態に係るタンパク質は、配列番号1の amino 酸配列の Leu4、Tyr6、Ile7、Ser8、Ser15、Ile22、Asn30、Asn34、Thr36、Gly37、Leu39、Leu40、Gly44、Phe46、Gln48、Leu50、Glu51、Gly52、Tyr61、Ile64、Asp67、Arg69、His70、Arg85、Glu99、Pro107、Leu112、Ser118、Leu122、Glu123、Tyr125、Glu137、Asn139、Pro140、Pro145、Val148、Glu149、Asp156、Ile157、Phe160、Glu165、Lys166、Glu171、Val172、Asn177、Cys183、Thr184、Ile187、Gly191、Gly192、Glu193、Val194、Lys196、Ile198、Gly199、Asp200、Cys201、Val202、Ala204、Phe206、Asp212、Ala214、Ile221、Leu228、Arg229、Gly244、Gly246、Leu247、Gly250、Val252、Ile253、Gly258、Ser259、Gly269、Glu279、Ala280、Leu281、Thr282、Arg283、Ala288、Val295、Gly315、Tyr323、Leu337、及び Leu347 に対応する amino 酸残基に、変異を有さない。

[0019] 本実施形態に係るタンパク質において、配列番号1の amino 酸配列の34

9番目～366番目のアミノ酸残基のうち欠失されなかったアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基は、他のアミノ酸残基に置換されていても、置換されていなくてもよく、置換の種類は保存的置換であってよい。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸残基は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン又はイソロイシン残基に置換されてよく、脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸残基は、セリン又はスレオニン残基に置換されてよく、芳香族側鎖を有するアミノ酸残基は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン又はヒスチジン残基に置換されてよく、塩基性側鎖を有するアミノ酸残基は、リジン、アルギニン又はヒスチジン残基に置換されてよく、酸性側鎖を有するアミノ酸残基は、アスパラギン酸又はグルタミン酸残基に置換されてよく、アミド含有側鎖を有するアミノ酸残基は、アスパラギン又はグルタミン残基に置換されてよく、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸残基は、システイン又はメチオニンに置換されてよい。

[0020] 本実施形態に係るタンパク質の光活性化効率は、酵素活性を評価するために通常使用される方法によって、より具体的には、光活性化アデニル酸シクラーゼのPAC活性を評価するために通常使用される方法によって、評価することができる。例えば、本実施形態に係るタンパク質は光活性化によりcAMPを産生するため、光照射により産生されたcAMPの量に基づいて光活性化効率を評価することができる。cAMPの量に基づいて光活性化効率を評価する方法は特に限定されず、光活性化効率は、例えば、本実施形態に係るタンパク質と、cAMPのレポータータンパク質と、を発現する細胞を準備し、細胞内で産生されたcAMPの量をレポータータンパク質の発光量を介してモニターすることにより、評価することができる。cAMPのレポータータンパク質は特に限定されず、細胞の種類に応じて適宜選択することができる。レポータータンパク質は、例えば、pGloSensor 22F cAMP Plasmid (プロメガ株式会社)等の市販品を利用して得られるタンパク質であってよい。pGloSensor 22F cAMPは、ホタルルシフェラーゼの内部にcAMP結合ドメインを挿入した改変

型ルシフェラーゼであり、cAMP結合ドメインにcAMPが結合すると構造が変化してルシフェリンと反応し、発光量が増加する。

[0021] 本実施形態に係るタンパク質は、例えば、該タンパク質をコードする核酸を含むベクターを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養することにより得られる。核酸、ベクター、及び形質転換体の詳細は、後述する。培養方法は特に限定されず、培地の種類及び培養条件は宿主細胞の種類に応じて適宜選択又は調整できる。

[0022] 本発明の一実施形態に係る核酸は、上記実施形態に係るタンパク質をコードする。配列番号8の塩基配列からなる核酸は、野生型のOaPAC遺伝子のコドン哺乳類に最適化することにより得られたものであり、野生型のOaPACタンパク質(Oa-366タンパク質)をコードする。本実施形態に係る核酸は、例えば、野生型のOaPAC遺伝子の塩基配列又は配列番号8の塩基配列から特定のヌクレオチドを欠失させることにより得られた核酸であってよく、これと90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなる核酸であってよい。欠失させたヌクレオチドは、野生型のOaPACタンパク質(Oa-366タンパク質)のC末端のアミノ酸残基から数えて1~18の連続するアミノ酸残基(ただし、C末端のアミノ酸残基を1と数える)をコードするヌクレオチドであってよい。

[0023] 本発明の一実施形態に係るベクターは、上記実施形態に係る核酸を含む。核酸を組み込むベクターは、核酸にコードされているタンパク質を宿主細胞内で発現させることができるベクターであればどのようなベクターであってもよい。ベクターは、例えば、一過性ベクター又は安定的発現ベクターであってよく、プラスミドベクター又はウイルスベクターであってよい。核酸を組み込むベクターは、制限酵素部位、挿入された遺伝子の発現のための制御配列、抗生物質耐性遺伝子、形質転換体の選別のための配列等、種々の配列を含むことができる。核酸を組み込むベクターとしては、例えば、pEBM u l t i - H y g r oベクター(富士フィルム和光純薬株式会社)等の市販品を利用することができる。

[0024] 本実施形態に係る形質転換体は、上記実施形態に係るベクターを宿主細胞に導入することにより得ることができる。本明細書において、形質転換体は、形質転換された原核細胞に限られず、外来遺伝子が導入されたあらゆる細胞を指す。すなわち、宿主細胞は特に限定されず、大腸菌、枯草菌等の原核細胞であっても、酵母、動物細胞等の真核細胞であってもよい。動物細胞は、例えば、哺乳動物細胞であってよく、より具体的には、マウス細胞又はヒト細胞であってよい。ベクターの導入方法は限定されず、遺伝子工学的に常用される、一過性又は安定的なトランスフォーメーション又はトランスフェクションの方法を、宿主細胞の種類に応じて適宜選択することができる。

### 実施例

[0025] (1) OaPAC発現コンストラクトの作製

哺乳類に最適化されたコドンをもつOaPAC遺伝子(Oa-366遺伝子；配列番号8)を合成した。また、一般的な遺伝子組み換え技術を利用してOa-366の塩基配列から特定のヌクレオチドを欠失させ、変異型OaPAC遺伝子であるOa-363、Oa-360、Oa-357、Oa-354、Oa-351及びOa-348を得た。欠失させたヌクレオチドの位置を表2に示す。

[0026] [表2]

遺伝子	OaPAC 遺伝子(配列番号 8)におけるヌクレオチド欠失の位置	コードされたタンパク質
Oa-366(配列番号 8)	-	配列番号 1
Oa-363	1090 番目-1098 番目	配列番号 2
Oa-360	1081 番目-1098 番目	配列番号 3
Oa-357	1072 番目-1098 番目	配列番号 4
Oa-354	1063 番目-1098 番目	配列番号 5
Oa-351	1054 番目-1098 番目	配列番号 6
Oa-348	1045 番目-1098 番目	配列番号 7

[0027] Oa-366遺伝子を2A及びRFP遺伝子とともにpEBMulti-Hygro(富士フイルム和光純薬株式会社)に組み込み、Oa-366遺伝子及びRFP遺伝子のバイシストロニックな発現コンストラクトpEBM

ulti-Hygro-RFP-2A-Oa-366を得た。2Aとは、変異型OaPAC遺伝子及びRFP遺伝子を均等に発現させるための2A-ペプチドであり、RFP遺伝子は、赤色蛍光タンパク質の変異種Rudolph-RFP (ATUM社) をコードする遺伝子である。その他の変異型OaPAC遺伝子についても同様に発現コンストラクトを作成した。

[0028] (2) cAMPレポーター発現細胞株の樹立

GloSensor (商標) -22F cAMP遺伝子 (プロメガ株式会社) を哺乳類発現ベクターpEBMulti-Neo (富士フイルム和光純薬株式会社) に組み込んだ。得られたpEBMulti-Neo-GloSensor-22F cAMPプラスミドを、FuGENE (登録商標) HD (プロメガ株式会社) を用いたリポフェクションによりヒト胎児腎臓細胞HEK293 (株式会社ケー・エー・シー) に導入し、GloSensor-22F cAMPを安定的に発現する細胞株を樹立した。

[0029] (3) OaPAC発現細胞の調製

OaPAC発現コンストラクトのそれぞれを、Ingenio (登録商標) Electroporation kit with 0.4cmcuvettes (マイラス・バイオ社) 及びGene Pulserエレクトロポレーションシステム (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、印加条件: 260V, 950 $\mu$ F) を用いた電気穿孔法によりGloSensor-22F cAMP発現HEK293に導入し、野生型又は変異型のOaPACタンパク質とGloSensor-22F cAMPタンパク質とを発現するHEK293を得た。なお、2A-ペプチドの働きによりOaPACタンパク質の発現の度合いはRFPタンパク質の発現の度合いと等しいため、OaPACタンパク質の発現の度合いは、RFPの蛍光強度により確認した。

[0030] (4) OaPACの光活性化

OaPAC発現HEK293を、35mm培養皿 (BioCoat (商標) コラーゲンI、コーニング社) に播種し、2mLの培地 (DMEM hi

gh glucose with 10% FBS and 4 mM L-glutamine、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)で培養した。細胞に光を照射する数時間前に培地をCO<sub>2</sub>非依存性培地(サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)に交換し、終濃度0.12 mg/mLでGloSensor cAMP Reagent(プロメガ株式会社)を添加した。数時間後、EM-CCDカメラ(ImageEM C9100-23B、浜松ホトニクス株式会社)及び青色LED(LXML-PR01-0425、ルクシオン・レベル、フィリップス・ルミレッズ社)を取り付けた倒立蛍光顕微鏡(Eclipse TE-300、株式会社ニコン)を用いて、暗室にて以下の照射実験を行った。

[0031] OaPAC発現HEK293に、光強度 $1.5 \times 10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $6.1 \times 10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $1.1 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $4.5 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $1.5 \times 10^3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、及び $5.7 \times 10^3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の青色光をそれぞれ20秒間照射した。次の強度での光照射は、現在の光照射による活性上昇が完全に鎮静化するのを待って実施した。HEK293から発せられたGloSensor-22F cAMPの発光をEM-CCDカメラで捉え、得られた画像から、ImageJ software(<http://imagej.nih.gov/ij>)を用いて発光強度を定量した。

[0032] 図2は、野生型及び変異型OaPACタンパク質の光活性化効率を示すグラフである。縦軸の数値は、具体的にはGloSensor-22F cAMPの発光量を表すものだが、これは光で活性化されたOaPACタンパク質により産生されたcAMPの濃度に一義的に依存する数値であるので、軸のタイトルは、光で活性化された酵素の活性(相対値)と記した。図2に示されるように、それぞれ9、12、15、及び18のアミノ酸残基を配列番号1のアミノ酸配列のC末端から欠失させることにより得られた、Oa-357タンパク質、Oa-354タンパク質、Oa-351タンパク質、及びOa-348タンパク質は、野生型のOaPACタンパク質(Oa-366

タンパク質) と比べて特に高い光活性化効率を示した。一方、3つのアミノ酸残基をC末端から欠失させることにより得られたOa-363タンパク質の光活性化効率は、野生型のOaPACタンパク質と比べると明らかに改善されていたものの、上記4つのOaPACと比べると比較的低かった。6つのアミノ酸残基を配列番号1のアミノ酸配列のC末端から欠失させることにより得られたOa-360タンパク質は、変異型OaPACタンパク質の中では中程度の、しかし野生型のOaPACタンパク質と比べると高い、光活性化効率を示した。上述のとおり、光活性化に用いられる照射光の望ましい光強度はOaPACタンパク質の利用の仕方により異なるため、光活性化効率にはバリエーションが求められる。したがって、上記変異型タンパク質のいずれもが有用であるといえる。

### 請求の範囲

- [請求項1] 光活性化アデニル酸シクラーゼ活性を有するタンパク質であって、  
1～18のアミノ酸残基がC末端から欠失された配列番号1のアミノ酸配列、又はこれと90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、タンパク質。
- [請求項2] 配列番号1のアミノ酸配列のC末端から欠失されたアミノ酸残基の数が5～7である、請求項1に記載のタンパク質。
- [請求項3] 請求項1に記載のタンパク質をコードする、核酸。
- [請求項4] 請求項3に記載の核酸を含む、ベクター。
- [請求項5] 請求項4に記載のベクターが導入された、形質転換体。
- [請求項6] 請求項2に記載のタンパク質をコードする、核酸。
- [請求項7] 請求項6に記載の核酸を含む、ベクター。
- [請求項8] 請求項7に記載のベクターが導入された、形質転換体。





**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/016461

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                  Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,                  C12N1/21(2006.01)i, C12N15/10(2006.01)i, C12N15/60(2006.01)i,                  C12N15/63(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i                  FI: C12N15/60, C12N15/63Z, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,                  C12N15/10200Z, C12N9/88ZNA                  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b>                  Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                  Int.Cl. C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N15/10, C12N15/60,                  C12N15/63, C12N9/88</p>														
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:80%;">Published examined utility model applications of Japan</td> <td style="width:20%;">1922-1996</td> </tr> <tr> <td>Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td>1971-2020</td> </tr> <tr> <td>Registered utility model specifications of Japan</td> <td>1996-2020</td> </tr> <tr> <td>Published registered utility model applications of Japan</td> <td>1994-2020</td> </tr> </table>			Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020	Registered utility model specifications of Japan	1996-2020	Published registered utility model applications of Japan	1994-2020				
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996													
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020													
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020													
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020													
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),                  CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq</p>														
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">X</td> <td>OHKI, M. et al., Structural insight into photoactivation of an adenylyl cyclase from a photosynthetic cyanobacterium." ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, vol. 113, pp. 6659-6664, abstract, pp. 6661-6663</td> <td align="center">1-8</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>CRASNIER, M. et al., The catalytic domain of escherichia coli K-12 adenylyl cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene, Mol Gen Genet, 1994, vol. 243, pp. 409-416, abstract</td> <td align="center">1-8</td> </tr> <tr> <td align="center">P, X</td> <td>HIRANO, M. et al., The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenylyl cyclase from oscillatoria acuminata, Scientific Reports, 30 December 2019, 9:20262, abstract, fig. 1, 5</td> <td align="center">1-8</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	OHKI, M. et al., Structural insight into photoactivation of an adenylyl cyclase from a photosynthetic cyanobacterium." ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, vol. 113, pp. 6659-6664, abstract, pp. 6661-6663	1-8	A	CRASNIER, M. et al., The catalytic domain of escherichia coli K-12 adenylyl cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene, Mol Gen Genet, 1994, vol. 243, pp. 409-416, abstract	1-8	P, X	HIRANO, M. et al., The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenylyl cyclase from oscillatoria acuminata, Scientific Reports, 30 December 2019, 9:20262, abstract, fig. 1, 5	1-8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	OHKI, M. et al., Structural insight into photoactivation of an adenylyl cyclase from a photosynthetic cyanobacterium." ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, vol. 113, pp. 6659-6664, abstract, pp. 6661-6663	1-8												
A	CRASNIER, M. et al., The catalytic domain of escherichia coli K-12 adenylyl cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene, Mol Gen Genet, 1994, vol. 243, pp. 409-416, abstract	1-8												
P, X	HIRANO, M. et al., The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenylyl cyclase from oscillatoria acuminata, Scientific Reports, 30 December 2019, 9:20262, abstract, fig. 1, 5	1-8												
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:                      "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                      "&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents:                      "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                      "&amp;" document member of the same patent family</p>										
<p>* Special categories of cited documents:                      "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                      "&amp;" document member of the same patent family</p>													
<p>Date of the actual completion of the international search 26.06.2020</p>		<p>Date of mailing of the international search report 07.07.2020</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/                  Japan Patent Office                  3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,                  Tokyo 100-8915, Japan</p>		<p>Authorized officer                   Telephone No.</p>												

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i;                  C12N 15/10(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i                  FI: C12N15/60; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/10 200Z; C12N9/88 ZNA</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/10; C12N15/60; C12N15/63; C12N9/88</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>OHKI, M. et al., Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium.”; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, Vol. 113, pp.6659-6664 要約, pp.6661-6663</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CRASNIER, M. et al., The catalytic domain of Escherichia coli K-12 adenylate cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene, Mol Gen Genet, 1994, Vol. 243, pp.409-416 要約</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>HIRANO, M. et al., The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenyl cyclase from Oscillatoria acuminata, Scientific Reports, 2019.12.30, 9:20262 要約, 図1、図5</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	OHKI, M. et al., Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium.”; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, Vol. 113, pp.6659-6664 要約, pp.6661-6663	1-8	A	CRASNIER, M. et al., The catalytic domain of Escherichia coli K-12 adenylate cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene, Mol Gen Genet, 1994, Vol. 243, pp.409-416 要約	1-8	P, X	HIRANO, M. et al., The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenyl cyclase from Oscillatoria acuminata, Scientific Reports, 2019.12.30, 9:20262 要約, 図1、図5	1-8
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	OHKI, M. et al., Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium.”; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, Vol. 113, pp.6659-6664 要約, pp.6661-6663	1-8												
A	CRASNIER, M. et al., The catalytic domain of Escherichia coli K-12 adenylate cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene, Mol Gen Genet, 1994, Vol. 243, pp.409-416 要約	1-8												
P, X	HIRANO, M. et al., The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenyl cyclase from Oscillatoria acuminata, Scientific Reports, 2019.12.30, 9:20262 要約, 図1、図5	1-8												
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>26.06.2020</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>07.07.2020</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)                  〒100-8915                  日本国                  東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>高山 敏充 4B 4153</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>													