

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-507565

(P2012-507565A)

(43) 公表日 平成24年3月29日 (2012.3.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/01 (2006.01)	C 0 7 K 14/01	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	4 B 0 2 9
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	4 H 0 4 5
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-534820 (P2011-534820)	(71) 出願人	511107337
(86) (22) 出願日	平成21年10月30日 (2009.10.30)		グオ・ペイシュエン
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月28日 (2011.6.28)		アメリカ合衆国 45040 オハイオ州
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/062826		メーソン サマー フィールド ドライ
(87) 国際公開番号	W02010/062697		ブ 6664
(87) 国際公開日	平成22年6月3日 (2010.6.3)	(74) 代理人	100107515
(31) 優先権主張番号	61/109,669		弁理士 廣田 浩一
(32) 優先日	平成20年10月30日 (2008.10.30)	(74) 代理人	100107733
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 流 良広
		(74) 代理人	100115347
			弁理士 松田 奈緒子
		(72) 発明者	グオ・ペイシュエン
			アメリカ合衆国 45040 オハイオ州
			メーソン サマー フィールド ドライ
			ブ 6664
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAのシークエンシング及び他の用途のための、膜に組み込まれたウイルスDNAパッケージングモータータンパク質コネクタバイオセンサ

(57) 【要約】

膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成する自己集合したホモデカマーとして、脂質膜に安定に組み込み可能にするための、二本鎖DNAウイルスDNAパッケージングモータータンパク質コネクタポリペプチドの新規修飾を利用する組成物及び方法を開示する。前記開孔部により、dsDNAのシークエンシング、SNP検出、並びにアナライトの高感度親和性捕捉及びフィンガープリンティングのためのバイオセンサとして前記修飾タンパク質を使用することができ、また、例えば、治療用ナノ粒子（例えば、遺伝子送達）及びバイオリアクタを形成するためのリボソーム充填、並びに他の用途のために、電位駆動性溶質移動にも利用される。

【選択図】 図 9 A

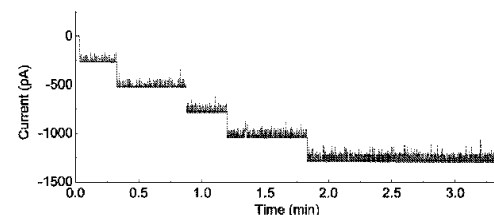


FIG. 9A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

伝導性チャネル含有膜であって、

(a) 膜層と、

(b) 前記膜層に組み込まれて、前記伝導性チャネル含有膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成する単離ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質と、

を含むことを特徴とする伝導性チャネル含有膜。

【請求項 2】

ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質が、人工物である請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

10

【請求項 3】

ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質が、ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、

(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、

(b)

(i) 4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、又は 18 個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ (a) に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも 1 つに融合している少なくとも 1 つの可撓性ドメイン、並びに

20

(ii) 少なくとも 1 つの親和性 / アラインメントドメイン

のいずれか又は両方と、

を含む請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 4】

ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質が、ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、

(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、

30

(b)

(i) 4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、又は 14 個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ (a) に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも 1 つに融合している少なくとも 1 つの可撓性ドメイン、並びに

(ii) 式 $X_{1a} - X_{1a} - X_{2a} - X_{1b} - X_{1b} - X_{1b} - X_3 - X_{2b}$ (式中、各 X_{1a} は、独立して、任意の非荷電アミノ酸であるか又はアミノ酸は存在せず、各 X_{1b} は、独立して、任意の非荷電アミノ酸であり、 X_{2a} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸であり、 X_3 は、グルタミン酸及びアスパラギン酸から選択される負荷電アミノ酸であり、 X_{2b} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸である) のポリペプチドを含み、且つ前記可撓性ドメインに融合している少なくとも 1 つの親和性 / アラインメントドメイン

40

のいずれか又は両方と、

を含む請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 5】

ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質が、ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、

(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペ

50

プチドを含む開孔部ドメインと、

(b)

(i) 配列番号23に記載の配列 Gly - Gly - Gly - Gly - Gly - Gly のポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のカルボキシ末端に融合している少なくとも1つの可撓性ドメイン、並びに

(ii) 前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性 / アラインメントドメイン

のいずれか又は両方と、

を含む請求項1に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項6】

10

親和性 / アラインメントドメインが、

(i) 配列番号22 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、

(ii) 3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、又は12個の隣接するヒスチジン残基であるポリヒスチジンポリペプチドタグ、

(iii) 3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、又は12個の隣接するアルギニン残基であるポリアルギニンポリペプチド、

(iv) 配列 Y G R K K R R Q R R [配列番号39] で表される H I V T a t ポリペプチド、

(v) 配列 D R A T P Y [配列番号40] で表されるペプチドタグ、

からなる群より選択されるポリペプチドを含む請求項3又は5に記載の伝導性チャネル含有膜。

20

【請求項7】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが各々、

(i) 配列番号41に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / K 2 3 4 A、

(ii) 配列番号42に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / K 2 3 4 C、

(iii) 配列番号43に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / 7 6 S / C 2 6 5 S / K 2 3 4 C、

(iv) 配列番号44に記載の Δ 1 - 1 4 / g p 1 0 - S t r e p - I I、及び

30

(v) 配列番号45に記載の G p 1 0 / Δ 2 8 5 - 3 0 9 - S t r e p - I I、

からなる群より選択される請求項1に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項8】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが、(i) 配列番号1 [アクセス番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(ii) 配列番号7 [アクセス番号 N P _ 0 4 9 7 8 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 4 DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(iii) 配列番号8 ~ 11 [アクセス番号 g i 5 4 9 2 9 5、g i 6 7 2 3 2 4 6、g i 1 5 8 3 7 3 1 5、g i 1 6 7 6 4 2 7 3] のうちのいずれか1つに記載のアミノ酸配列を有するファージラムダDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(iv) 配列番号12 [アクセス番号 P 5 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号13 [アクセス番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2 DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(vi) 配列番号14 [アクセス番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリ

40

50

ペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配列番号 1 5 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i x) 配列番号 1 6 ~ 1 9 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8、Y P _ 0 0 6 9 8 0、A A S 7 7 1 9 1、A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び (x) 配列番号 2 0 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分からなる群より選択されるポリペプチドを各々含む請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

10

【請求項 9】

ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、二本鎖 D N A バクテリオファージ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質の全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを各々含むウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含む請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 1 0】

ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドが、(i) 配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i) 配列番号 7 [アクセッション番号 N P _ 0 4 9 7 8 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 4 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i i) 配列番号 8 ~ 1 1 [アクセッション番号 g i 5 4 9 2 9 5、g i 6 7 2 3 2 4 6、g i 1 5 8 3 7 3 1 5、g i 1 6 7 6 4 2 7 3] のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を有するファージラムダ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i v) 配列番号 1 2 [アクセッション番号 P 5 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号 1 3 [アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i) 配列番号 1 4 [アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配列番号 1 5 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i x) 配列番号 1 6 ~ 1 9 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8、Y P _ 0 0 6 9 8 0、A A S 7 7 1 9 1、A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び (x) 配列番号 2 0 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分からなる群より選択される請求項 3、4、又は 5 に記載の伝導性チャネル含有膜。

20

30

40

【請求項 1 1】

ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを各々含むウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含む請求項 1 に記載の伝導性チャ

50

ネル含有膜。

【請求項 1 2】

ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドが、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含む請求項 3、4、又は 5 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 1 3】

ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、検出可能な標識を含む請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 1 4】

10

検出可能な標識が、比色指示薬、G C M S タグ化合物、蛍光指示薬、発光指示薬、リン光指示薬、放射測定指示薬、色素、酵素、酵素の基質、エネルギー転移分子、量子ドット、金属粒子、及び親和性標識からなる群より選択される請求項 1 3 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 1 5】

親和性標識が、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アプタマー、抗体、レクチン、オリゴ糖、核酸、酵素、金属イオン結合ポリペプチド、配列番号 2 2 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、又は 1 2 個の隣接するヒスチジン残基であるポリヒスチジンポリペプチドタグ、配列番号 1 に記載の S t r e p - I タグ、F L A G (登録商標) ペプチドタグ、M y c ペプチドタグ、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、黄色ブドウ球菌プロテイン A、プロテイン G、H I V T a t ポリペプチド [配列番号 3 9]、アミノ酸配列 D R A T P Y [配列番号 4 0] を有するペプチド、グルタレドキシシン - 2、及び親和性リガンドに特異的に結合するファージディスプレイされたペプチドからなる群より選択される請求項 1 4 に記載の伝導性チャネル含有膜。

20

【請求項 1 6】

抗体が、インタクトな免疫グロブリン、単鎖抗体、s c F v、F a b、及び (F a b) ' ₂ からなる群より選択される請求項 1 5 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 1 7】

膜層が、脂質層を含む請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

30

【請求項 1 8】

脂質層が、両親媒性脂質を含む請求項 1 7 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 1 9】

両親媒性脂質が、リン脂質を含み、脂質層が、脂質二重層を含む請求項 1 8 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 2 0】

脂質層が、平面膜層及びリボソームからなる群より選択される請求項 1 7 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 2 1】

リボソームが、多重膜リボソーム及び単層リボソームからなる群より選択される請求項 2 0 に記載の伝導性チャネル含有膜。

40

【請求項 2 2】

組み込まれているウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、膜層中において可動性である請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 2 3】

電位が印加されたとき、開孔部を通して二本鎖 D N A を移動させることができる請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

【請求項 2 4】

電位が印加されたとき、電圧依存的に開閉することなしに (w i t h o u t v o l t a g e g a t i n g) コンダクタンスが生じる請求項 1 に記載の伝導性チャネル含有膜。

50

【請求項 25】

(a) 両親媒性脂質及び有機溶媒を含む第1の溶液と固体基材とを接触させ、前記溶媒を実質的に除去することにより、前記固体基材上において乾燥両親媒性脂質を調製する工程と、

(b) 前記コネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するのに十分な条件下及び時間で、水性溶媒、浸透圧剤、及びホモドデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドを含む第2の溶液に、前記乾燥両親媒性脂質を再懸濁させて、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている脂質二重層を含む膜を得て、伝導性チャンネル含有膜を作製する工程と、
を含むことを特徴とする伝導性チャンネル含有膜の製造方法。

10

【請求項 26】

(a) 両親媒性脂質と少なくとも1つの溶媒とを含む混合物から溶媒を実質的に除去して、乾燥両親媒性脂質を得る工程と、

(b) 前記コネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するのに十分な条件下及び時間で、水性溶媒、浸透圧剤、及びホモドデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドを含む第2の溶液に、前記乾燥両親媒性脂質を再懸濁させて、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている脂質二重層を含む膜を得て、伝導性チャンネル含有膜を作製する工程と、
を含むことを特徴とする伝導性チャンネル含有膜の製造方法。

20

【請求項 27】

両親媒性脂質が、リン脂質を含む請求項25又は26に記載の方法。

【請求項 28】

リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、1,2-ジフィタノイル-snグリセロール-3-ホスホコリン、及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリンからなる群より選択される1以上のリン脂質を含む請求項27に記載の方法。

30

【請求項 29】

有機溶媒が、クロロホルム、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、ピリジン、及びジイソプロピルエーテルからなる群より選択される少なくとも1つの溶媒を含む請求項25又は26に記載の方法。

【請求項 30】

浸透圧剤が、スクロース、グリセロール、マンニトール、及びデキストランからなる群より選択される少なくとも1つの剤を含む請求項25又は26に記載の方法。

【請求項 31】

DNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットが、請求項3から13のいずれかに記載のポリペプチドを含む請求項25又は26に記載の方法。

40

【請求項 32】

脂質二重層が、リボソーム中に存在する請求項25又は26に記載の方法。

【請求項 33】

リボソームが、多重膜リボソーム及び単層リボソームからなる群より選択される請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

組み込まれているウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、膜層中において可動性である請求項25又は26に記載の方法。

【請求項 35】

50

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したとき開孔部を通して二本鎖DNAを移動可能である請求項25又は26に記載の方法。

【請求項36】

電位を印加したとき電圧依存的に開閉することなしに伝導性チャネル含有膜においてコンダクタンスが生じる請求項25又は26に記載の方法。

【請求項37】

印加される電位が、(i)-100mV~100mVの電位、(ii)-400mV~400mVの電位、(iii)-300mV~300mVの電位、(iv)-200mV~200mVの電位、(v)-150mV~150mVの電位、(vi)-75mV~75mVの電位、及び(vii)-50mV~50mVの電位からなる群より選択される請求項36に記載の方法。

10

【請求項38】

(a)

(i)両親媒性脂質と少なくとも1つの溶媒とを含む混合物から溶媒を実質的に除去して、乾燥両親媒性脂質を得る工程と、

(ii)コネクタタンパク質が、伝導性チャネル含有膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するのに十分な条件下及び時間で、水性溶媒、浸透圧剤、及びホモドデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドを含む第2の溶液に、前記乾燥両親媒性脂質を再懸濁させて、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている脂質二重層を含む膜を得て、伝導性チャネル含有膜を作製する工程と、
を含む方法により伝導性チャネル含有膜を作製する工程と、

20

(b)前記コネクタタンパク質の開孔部を通して核酸を電気泳動移動させるのに十分な条件下及び時間で、(a)に記載の伝導性チャネル含有膜を、1又は複数の核酸分子と接触させ、前記伝導性チャネル含有膜に電位を印加して、前記伝導性チャネル含有膜の片側に核酸分子を濃縮させる工程と、
を含むことを特徴とする伝導性チャネル含有膜の片側に核酸分子を濃縮する方法。

【請求項39】

核酸の移動が、膜の片側に、且つ核酸濃度勾配に逆らって核酸を蓄積させる請求項38に記載の方法。

30

【請求項40】

伝導性チャネル含有膜、及び前記膜の片側に濃縮された核酸分子を含む核酸含有リボソームであって、請求項38に記載の方法に従って作製されるリボソーム。

【請求項41】

ナノ粒子である請求項40に記載のリボソーム。

【請求項42】

バイオリアクタである請求項40に記載のリボソーム。

【請求項43】

請求項40に記載の1又は複数のリボソームを細胞に導入する工程を含む細胞に核酸を送達する方法。

40

【請求項44】

インピトロにおいて1又は複数のリボソームに細胞が導入される請求項43に記載の方法。

【請求項45】

インピボにおいて1又は複数のリボソームに細胞が導入される請求項43に記載の方法。

【請求項46】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含む単離タンパク質であって、前記サブユニットが、各々、

50

(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、

(b) 4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、又は18個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも1つに融合している少なくとも1つの可撓性ドメインと、

(c) 少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインと、
を含む融合タンパク質を含むことを特徴とする単離タンパク質。

【請求項47】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含む単離タンパク質であって、前記サブユニットが、各々、

(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、

(b) 4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、又は14個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも1つに融合している少なくとも1つの可撓性ドメインと、

(c) 式 $X_{1a} - X_{1a} - X_{2a} - X_{1b} - X_{1b} - X_{1b} - X_3 - X_{2b}$ (式中、各 X_{1a} は、独立して任意の非荷電アミノ酸であるか又はアミノ酸は存在せず、各 X_{1b} は、独立して任意の非荷電アミノ酸であり、 X_{2a} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸であり、 X_3 は、グルタミン酸及びアスパラギン酸から選択される負荷電アミノ酸であり、 X_{2b} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸である) のポリペプチドを含み、且つ前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインと、
を含む融合タンパク質を含むことを特徴とする単離タンパク質。

【請求項48】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含む単離タンパク質であって、前記サブユニットが、各々、

(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、

(b) 配列番号23に記載の配列 Gly - Gly - Gly - Gly - Gly - Gly のポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のカルボキシ末端に融合している少なくとも1つの可撓性ドメインと、

(c) 前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインと、
を含む融合タンパク質を含むことを特徴とする単離タンパク質。

【請求項49】

親和性/アラインメントドメインが、

(i) 配列番号22 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、

(ii) 3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、又は12個の隣接するヒスチジン残基のポリヒスチジンポリペプチドタグ、

(iii) 3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、又は12個の隣接するアルギニン残基のポリアルギニンポリペプチド、

(iv) 配列 Y G R K K R R Q R R R [配列番号39] の H I V T a t ポリペプチド、及び

(v) 配列 D R A T P Y [配列番号40] のペプチドタグ
からなる群より選択されるポリペプチドを含む請求項46又は48に記載の単離タンパク質。

【請求項50】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットの

10

20

30

40

50

ホモドデカマーを含む単離タンパク質であって、前記サブユニットが各々、

(i) 配列番号 4 1 に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / K 2 3 4 A、

(i i) 配列番号 4 2 に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / K 2 3 4 C、

(i i i) 配列番号 4 3 に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / C 7 6 S / C 2 6 5 S / K 2 3 4 C、

(i v) 配列番号 4 4 に記載の Δ 1 - 1 4 / g p 1 0 - S t r e p - I I、及び

(v) 配列番号 4 5 に記載の G p 1 0 / Δ 2 8 5 - 3 0 9 - S t r e p - I I

からなる群より選択されるポリペプチドを含むことを特徴とする単離タンパク質。

【請求項 5 1】

開孔部ドメインが、(i) 配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載
 のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネ
 クタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i) 配列番号 7 [ア
 クセッション番号 N P _ 0 4 9 7 8 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 4 D N
 A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部
 分、(i i i) 配列番号 8 ~ 1 1 [アクセッション番号 g i 5 4 9 2 9 5、g i 6 7 2 3
 2 4 6、g i 1 5 8 3 7 3 1 5、g i 1 6 7 6 4 2 7 3] のいずれか 1 つに記載のアミノ
 酸配列を有するファージラムダ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペ
 チドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i v) 配列番号 1 2 [アクセッション番号 P 5
 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 D N A パッケージングモータ
 コネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号 1 3
 [アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2
 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形
 成部分、(v i) 配列番号 1 4 [アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミ
 ノ酸配列を有するファージ P 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペ
 チドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 D N A パッケージングモ
 ータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配
 列番号 1 5 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファ
 ージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通
 開孔部形成部分、(i x) 配列番号 1 6 ~ 1 9 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8、
 Y P _ 0 0 6 9 8 0、A A S 7 7 1 9 1、A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有
 するファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又
 は膜貫通開孔部形成部分、及び(x) 配列番号 2 0 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9
 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 D N A パッケージングモータコネク
 タタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、からなる群より選択されるポ
 リペプチドを含む請求項 4 6 に記載の単離タンパク質。

【請求項 5 2】

開孔部ドメインが、二本鎖 D N A バクテリオファージ D N A パッケージングモータコネ
 クタタンパク質の全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを含む請求項 4 6 に
 記載の単離タンパク質。

【請求項 5 3】

開孔部ドメインが、(i) 配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載
 のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネ
 クタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i) 配列番号 7 [ア
 クセッション番号 N P _ 0 4 9 7 8 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 4 D N
 A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部
 分、(i i i) 配列番号 8 ~ 1 1 [アクセッション番号 g i 5 4 9 2 9 5、g i 6 7 2 3
 2 4 6、g i 1 5 8 3 7 3 1 5、g i 1 6 7 6 4 2 7 3] のいずれか 1 つに記載のアミノ
 酸配列を有するファージラムダ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペ
 チドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i v) 配列番号 1 2 [アクセッション番号 P 5
 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 D N A パッケージングモータ

10

20

30

40

50

コネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号 13 [アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i) 配列番号 14 [アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配列番号 15 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 3 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i x) 配列番号 16 ~ 19 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8、Y P _ 0 0 6 9 8 0、A A S 7 7 1 9 1、A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 5 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び (x) 配列番号 20 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、からなる群より選択されるポリペプチドを含む請求項 47 又は 48 に記載の単離タンパク質。

10

【請求項 54】

開孔部ドメインが、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを含む請求項 46 に記載の伝導性チャネル含有膜。

20

【請求項 55】

ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドが、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含む請求項 46 又は 48 に記載の単離タンパク質。

【請求項 56】

(i) ドデカマーであるウイルスコネクタタンパク質に自己集合し、且つ (i i) ウイルスのプロカプシドに組み込まれた後、ウイルスの d s DNA をパッケージングすることができる請求項 46 から 48 のいずれかに記載の単離タンパク質。

30

【請求項 57】

少なくとも 1 つの検出可能な標識を含む請求項 46 から 48 及び 50 のいずれかに記載の単離タンパク質。

【請求項 58】

検出可能な標識が、比色指示薬、G C M S タグ化合物、蛍光指示薬、発光指示薬、リン光指示薬、放射測定指示薬、色素、酵素、酵素の基質、エネルギー転移分子、量子ドット、金属粒子、及び親和性標識からなる群より選択される請求項 57 に記載の単離タンパク質。

【請求項 59】

親和性標識が、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アプタマー、抗体、レクチン、オリゴ糖、核酸、酵素、金属イオン結合ポリペプチド、配列番号 22 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、又は 12 個の隣接するヒスチジン残基であるポリヒスチジンポリペプチドタグ、S t r e p - I タグ、F L A G (登録商標) ペプチドタグ、M y c ペプチドタグ、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、黄色ブドウ球菌プロテイン A、プロテイン G、配列 Y G R K K R R Q R R R [配列番号 39] の H I V T a t ポリペプチド、アミノ酸配列 D R A T P Y [配列番号 40] を有するペプチド、グルタレドキシン - 2、及び親和性リガンドに特異的に結合するファージディスプレイされたペプチドからなる群より選択される請求項 58 に記載の単離タンパク質。

40

【請求項 60】

50

抗体が、インタクトな免疫グロブリン、単鎖抗体、s c F v、F a b、及び (F a b)
'₂ からなる群より選択される請求項 5 9 に記載の単離タンパク質。

【請求項 6 1】

(a) アナライト分子が親和性 / アラインメントドメインに特異的に結合するのに十分な条件下及び時間で、アナライト分子を含有する試験溶液を、膜層と、前記膜層中に組み込まれた 1 又は複数の単離ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質とを含む伝導性チャネル含有膜と接触させる工程であって、前記ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成可能であり、且つウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを各々含み、前記サブユニットが、各々、(1)

10

アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(2) (i) 少なくとも 1 つの可撓性ドメイン、及び (i i) 少なくとも 1 つの親和性 / アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む工程と、

(b) 接触工程前の 1 又は複数の時点、及び接触工程後の 1 又は複数の時点において、印加された電位により生じるコンダクタンスシグナルを測定する工程であって、接触工程前のコンダクタンスシグナルに対する接触工程後のコンダクタンスシグナルの変化が、前記アナライト分子の前記コネクタタンパク質への結合を示すことから、前記アナライト分子の存在を検出する工程と、

を含むことを特徴とするアナライト分子の存在を検出する方法。

【請求項 6 2】

20

コンダクタンスシグナルの変化が、親和性 / アラインメントドメインに対するアナライト分子の結合を示す請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

(a) アナライト分子が親和性 / アラインメントドメインに特異的に結合するのに十分な条件下及び時間で、アナライト分子を含有する試験溶液を、膜層と、前記膜層中に組み込まれた 1 又は複数の単離ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質とを含む伝導性チャネル含有膜と接触させる工程であって、前記ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成可能であり、且つウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを各々含み、前記サブユニットが、各々、(1)

30

アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(2) (i) 少なくとも 1 つの可撓性ドメイン、及び (i i) 少なくとも 1 つの親和性 / アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む工程と、

(b) 接触工程前の 1 又は複数の時点、及び接触工程後の 1 又は複数の時点において、印加された電位により生じるコンダクタンスシグナルを測定して、コンダクタンスシグナルプロファイルを作成する工程であって、接触工程前のコンダクタンスシグナルに対する接触工程後のコンダクタンスシグナルの変化が、前記アナライト分子の前記コネクタタンパク質への結合を示す工程と、

(c) (b) で得られたコンダクタンスシグナルプロファイルを、前記アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルと比較して、前記アナライト分子を同定する工程と、

40

を含むことを特徴とするアナライトを同定する方法。

【請求項 6 4】

コンダクタンスシグナルの変化が、親和性 / アラインメントドメインに対するアナライト分子の結合を示す請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

接触工程を 1 又は複数回繰り返す請求項 6 1 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

比較工程が、(i) (b) に記載のコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル振幅と、アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルの

50

コンダクタンスシグナル振幅とを比較すること、及び (i i) (b) に記載のコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル持続時間と、アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル持続時間とを比較することのうちの 1 以上を含む請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

電位の印加により、開孔部ドメインにおける電気化学的勾配に従ってイオン移動が生じる請求項 6 1 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

アナライトが、核酸分子を含む請求項 6 1 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

アナライトが、核酸分子を含み、比較工程が、前記核酸分子中に存在する少なくとも 1 つのヌクレオチドを同定することを含む請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 0】

核酸分子の核酸配列を決定することを含む請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

核酸分子中の一塩基多型を同定することを含む請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

電圧依存的開閉が存在しない請求項 6 1 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 3】

伝導性チャネル含有膜が、請求項 1 から 2 4 のいずれかに記載の伝導性チャネル含有膜である請求項 6 1 又は 6 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 4】

伝導性チャネル含有膜が、請求項 2 5 から 3 5 のいずれかに記載の方法に従って作製される請求項 6 1 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

単離ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質が、請求項 1 0 1 から 1 1 5 のいずれかに係る単離タンパク質を含む請求項 6 1 又は 6 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本願は、2 0 0 8 年 1 0 月 3 0 日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 1 0 9 , 6 6 9 号の利益を主張する。

【0 0 0 2】

(配列表に関する記述)

本願に関連する配列表は、ハードコピーに代わりテキスト形式で提供され、参照することにより本明細書に援用されるものとする。配列表を含むテキストファイルの名称は、4 8 0 2 7 8 _ 4 0 1 P C _ S E Q U E N C E _ L I S T I N G . t x t . である。前記テキストファイルは、1 0 2 K B であり、2 0 0 9 年 1 0 月 3 0 日に作成されたものであり、本願の出願と同時に E F S - W e b を介して米国 P C T 受理官庁に電子的に送信された。

【0 0 0 3】

(政府の権益に関する記述)

本発明は、N I H N a n o m e d i c i n e D e v e l o p m e n t C e n t e r / N I H R o a d m a p f o r M e d i c a l R e s e a r c h / N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h より授与された助成金番号 P N 2 E Y 0 1 8 2 3 0 、及び N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h より授与された助成金番号 R 0 1 - G M 5 9 9 4 4 の下、米国政府の援助を受けた。米国政府は、本発明に関して一定の権利を有する。

【0 0 0 4】

10

20

30

40

50

本発明の実施形態は、一般に、バイオセンサの分野に関する。より詳細には、本明細書に記載される組成物及び方法は、DNAシーケンシング及び他の用途で用いるための、導電性開孔部を形成するために脂質膜に組み込まれ得る改変ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタに関する。

【背景技術】

【0005】

微量の化学物質及び生化学物質の高感度検出及び特性評価は、現在の分析技術の所望の目標である。ロバストな分子センシング装置は、広範囲に及ぶ生物医学、工業、環境、法医学、安全、及び他の分野、例えば、疾患診断及び環境モニタリングのための非常に低濃度の病原体及び化学物質の検出及び同定において、ハイスループットDNAシーケンシング及び他のゲノミクス用途等において利用される。

10

【0006】

例えば、細菌、ウイルス、寄生虫、若しくは他の病原性微生物、又は病原体関連抗原の検出、並びに抗体、癌マーカー、及び他のアナライトの検出を含む、特異的親和性リガンドによる対象アナライトの結合乃至「捕捉」を検出するために、分子内親和性結合相互作用、典型的には自然界においては非共有結合を使用する分析方法が報告されている（例えば、非特許文献1～23、一般的には、例えば、非特許文献24～25を参照）。

【0007】

親和性結合相互作用においてアナライトが関与した後に前記アナライトの存在を検出することに加えて、多くの場合、アナライトの単一又は複数パラメータの物理化学的プロファイルと、1以上の既知のレファレンス標準物質を用いて作成される種類に特徴的なプロファイルとを比較することによりアナライトの特性評価を行うことができる高度な技術が開発されており、これは「フィンガープリンティング」技術と呼ばれている（例えば、非特許文献26～44）。

20

【0008】

膜貫通チャネルの使用は、基質（アナライト）が結合した結果、チャネル（受容体）による電気コンダクタンスが変化（例えば、統計学的に有意に減少又は増加）することにより証明されるように、単一基質分子と受容体との間の個々の結合事象のリアルタイム観察に基づく電気化学的アプローチである、確率的アナライト検出（非特許文献45）において示されている。DNA、RNA、薬剤、ペプチド、タンパク質、及びポリマーの輸送等の広範囲に及ぶプロセスが、例えば、個々の膜チャネルの電気生理学的測定を用いて、かかるアプローチにより研究されている（非特許文献46～50）。

30

【0009】

例えば、一本鎖DNA又はRNAの長さを測定するために、細菌の膜貫通細孔形成タンパク質である黄色ブドウ球菌の α -ヘモリシン（ α -HL）チャネルに流れるイオン電流の一過的遮断が用いられている（非特許文献51）。次いで、 α -ヘモリシン（ α -HL）細孔を通過するDNA移動速度を減速させて、膜貫通イオンチャネルの単一ヌクレオチド多形を区別する能力を示すために、DNAヘアピン分子が用いられている（非特許文献52）。塩基対のスタッキング及び細孔内の鎖配向の検出についても研究されている（非特許文献53～55）。アダプタ分子が共有結合している α -HLのチャネルは、ヌクレオチドA、T、G、及びCを区別することが示されている（非特許文献56）。

40

【0010】

研究されている他のタンパク質チャネルとしては、ポリエチレングリコールを検出するためのアラメチシン（非特許文献57）及びssDNAを移動させるためにスメグマ菌から再改変されたMspAタンパク質（非特許文献58）が挙げられる。ナノ細孔を通過する核酸輸送に関する研究の大部分は、 α -HLに注目している。しかし、 α -HL（1.5 nm）及び他のチャネルの内径が限定されているため、一本鎖核酸の移動にDNA及びRNAを利用することは制限されている（非特許文献59）。MspAナノ細孔についても同様の制限が報告された（非特許文献58）。

【0011】

50

少数の他の膜細孔系において、二本鎖DNA (dsDNA) が膜を超えて輸送されるという証拠が提示されている (非特許文献60~62) が、これら系は口バストではなく、不所望の電圧依存性開閉及び関連するシグナル変動のために、生物医学的用途等で広く使用するための候補としては不十分である。この理由のために、前記系の可能性は制限されると考えられ、研究者らは、DNAシーケンシングで使用することができる合成金属又はケイ素ナノ細孔の製作に方針変更している (非特許文献63~65)。しかし、かかる合成ナノ細孔は、バッチ間で一定の性質を有する複製構造を確実に作製するのが困難であり、また細孔構造の修飾を改変する能力及び/又は広範囲に及ぶ化学的コンジュゲーションにより修飾するための基質として機能する能力に関する汎用性が欠けていることによる問題点を有する。結果として、現在入手可能なタンパク質ナノ細孔の優れた代替物が依然として探索されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Kittigul et al., Am J Trop Med Hyg. 1998 Sep; 59 (3): 352 - 6

【非特許文献2】Cordiano et al., J Immunol Methods. 1995 Jan 13; 178 (1): 121 - 30

【非特許文献3】Olson et al., J Immunol Methods. 1990 Nov 6; 134 (1): 71 - 9

【非特許文献4】Nerurkar et al., J Clin Microbiol. 1984 Jul; 20 (1): 109 - 14

【非特許文献5】Jia et al., J Virol Methods. 2009 Oct; 161 (1): 38 - 43

【非特許文献6】He et al., Clin Vaccine Immunol. 2007 May; 14 (5): 617 - 23

【非特許文献7】Xu et al., J Clin Microbiol. 2006 Aug; 44 (8): 2872 - 8

【非特許文献8】Che et al., J Clin Microbiol. 2004 Jun; 42 (6): 2629 - 35

【非特許文献9】Hunt et al., Brown et al., Am J Trop Med Hyg. 2001 Sep; 65 (3): 208 - 13

【非特許文献10】Loa et al., Avian Dis. 2000 Jul - Sep; 44 (3): 498 - 506

【非特許文献11】Lubenko et al., Transfus Med. 2000 Sep; 10 (3): 213 - 8

【非特許文献12】Chanteau et al., Int J Tuberc Lung Dis. 2000 Apr; 4 (4): 377 - 83

【非特許文献13】Brinker et al., J Clin Microbiol. 1998 Apr; 36 (4): 1064 - 9

【非特許文献14】Vyse et al., J Virol Methods. 1997 Jan; 63 (1 - 2): 93 - 101

【非特許文献15】Peterson et al., J Clin Microbiol. 1997 Jan; 35 (1): 208 - 12

【非特許文献16】Lairmore et al., AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Jun; 9 (6): 565 - 71

【非特許文献17】Heller et al., Vet Microbiol. 1993 Oct; 37 (1 - 2): 127 - 33

【非特許文献18】van Loon et al., Epidemiol Infect. 1992 Feb; 108 (1): 165 - 74

10

20

30

40

50

- 【非特許文献19】Wolf - Rogers et al. , J Immunol Methods . 1990 Oct 19 ; 133 (2) : 191 - 8
- 【非特許文献20】Barsoum et al. , Exp Parasitol . 1990 Jul ; 71 (1) : 107 - 13
- 【非特許文献21】Hierholzer et al. , J Clin Microbiol . 1989 Jun ; 27 (6) : 1243 - 9
- 【非特許文献22】Hurley et al. , J Immunoassay . 1986 ; 7 (4) : 309 - 36
- 【非特許文献23】Wolff et al. , Cancer Res . 53 : 2560 - 65 (1993) 10
- 【非特許文献24】Harlow and Lane , Antibodies : A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory , 1988
- 【非特許文献25】Weir , D . M . , Handbook of Experimental Immunology , 1986 , Blackwell Scientific , Boston , MA
- 【非特許文献26】Li et al. , Rapid Commun Mass Spectrom . 2009 23 (22) : 3533 - 3542
- 【非特許文献27】Ali et al. , J Agric Food Chem . 2009 20 20
- 【非特許文献28】Leski et al. , Appl Environ Microbiol . Sept . 18 , 2009
- 【非特許文献29】Weinkopff et al. , J Parasitol . June 18 , 2009
- 【非特許文献30】Song et al. , Proteomics . 2009 9 (11) : 3090 - 9
- 【非特許文献31】Ortea et al. , J Agric Food Chem . 2009 57 (13) : 5665 - 72
- 【非特許文献32】Amini , Pharmeur Sci Notes . 2009 (1) : 11 - 6 30
- 【非特許文献33】Shi et al. , Biol Pharm Bull . 2009 32 (1) : 142 - 6
- 【非特許文献34】Sun et al. , J Chromatogr A . 2009 1216 (5) : 830 - 6
- 【非特許文献35】Yin et al. , Phytopathology . 2003 93 (8) : 1006 - 13
- 【非特許文献36】Roy et al. , Clin Cancer Res . 2008 14 (20) : 6610 - 7
- 【非特許文献37】Pei et al. , Zhongguo Zhong Yao Zha Zhi . 2008 33 (14) : 1662 - 8 40
- 【非特許文献38】Arthur , Methods Mol Med . 2008 , 141 : 257 - 70
- 【非特許文献39】Zhao et al. , Se Pu 2008 26 (1) : 43 - 9
- 【非特許文献40】Woo et al. , Anal Chem . 2008 80 (7) : 2419 - 25
- 【非特許文献41】Damodaran et al. , Genomics Proteomics Bioinformatics . 2007 5 (3 - 4) : 152 - 7
- 【非特許文献42】Fellstroem et al. , J Microbiol Methods . 2008 72 (2) : 133 - 40 50

- 【非特許文献43】Song et al., Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2006 1:4556-9
- 【非特許文献44】De Vuyst et al., Int J Food Microbiol. 2008 125(1):79-90
- 【非特許文献45】Bayley et al., 2001 Nature 13:225-230
- 【非特許文献46】Thieffry et al., 1988 EMBO J 7:1449
- 【非特許文献47】Hinnah et al., 2002 Biophys J 83:899 10
- 【非特許文献48】Alcayaga et al., 1992 FEBS Lett. 311:246-50
- 【非特許文献49】Benz et al., 1986 J Bacteriol 165:978
- 【非特許文献50】Movileanu et al., 2000 Nat. Biotechnol. 18:1091
- 【非特許文献51】Kasianowicz et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13770-13773 (1996)
- 【非特許文献52】Vercoutere et al., 2001 Nat. Biotechnol. 19:248 20
- 【非特許文献53】Vercoutere et al., 2003 Nucl Ac. Res. 31:1311
- 【非特許文献54】Howorka et al., 2001 Nat. Biotechnol. 19:636
- 【非特許文献55】deGuzman et al., 2006 Nucl. Ac. Res. 34:6425
- 【非特許文献56】Clarke et al., 2009 Nat. Nanotechnol. 4:265
- 【非特許文献57】Bezrukov, 2000 J Membr Biol. 174:1-13 30
- 【非特許文献58】Butler et al., 2008 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 105:20647
- 【非特許文献59】Song, 1996 Science 274:1859
- 【非特許文献60】Szabo et al., 2002 Cell Physiol Biochem 12:127
- 【非特許文献61】Mobasheri et al. 2002 Eur J Biophys 31:389
- 【非特許文献62】Carneiro et al., 2003 Biochim Biophys Acta 1612:144
- 【非特許文献63】Smeets et al, 2006 Nano Lett 6:89 40
- 【非特許文献64】Wang et al., 2001 Nat. Biotechnol. 19:622
- 【非特許文献65】Iqbal et al., 2007 Nat. Nano 2:243
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0013】

明らかに、dsDNAを収容可能な内腔を有する多様なアナライトの高感度検出及び特性評価のための汎用性膜伝導性チャネルプラットフォームを提供し、確実に且つ再現可能 50

に組織化することができ、作動条件下で電圧依存的に開閉しづらく、また異なるアナライトの検出及び特性評価において使用するための多様な特異的親和性受容体を特徴とするよう容易に修飾することができる、改善された組成物及び方法が必要とされている。本明細書に開示される発明の実施形態は、かかる要求を満たし、且つ他の関連する利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、特定の実施形態では、(a)膜層と、(b)前記膜層に組み込まれて、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成する単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質と、を含む伝導性チャネル含有膜を提供する。特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、人工物である。特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットは、各々、(a)アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(b)(i)4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、又は18個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも1つに融合している少なくとも1つの可撓性ドメイン、並びに(ii)少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む。特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、ウイルスDNAパッケージングモータ連結タンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットは、各々、(a)アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(b)(i)4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、又は14個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも1つに融合している少なくとも1つの可撓性ドメイン、並びに(ii)式 $X_{1a} - X_{1a} - X_{2a} - X_{1b} - X_{1b} - X_{1b} - X_3 - X_{2b}$ (式中、各 X_{1a} は、独立して、任意の非荷電アミノ酸であるか又はアミノ酸は存在せず、各 X_{1b} は、独立して、任意の非荷電アミノ酸であり、 X_{2a} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸であり、 X_3 は、グルタミン酸及びアスパラギン酸から選択される負荷電アミノ酸であり、 X_{2b} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸である)のポリペプチドを含み、且つ前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む。

【0015】

特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットは、各々、(a)アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(b)(i)配列番号23に記載の配列Gly - Gly - Gly - Gly - Gly - Glyのポリペプチドを含み、且つ(a)に記載のカルボキシ末端に融合している少なくとも1つの可撓性ドメイン、並びに(ii)前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む。特定の実施形態では、前記親和性/アラインメントドメインは、(i)配列番号22[WSHPQRF EK]に記載のStrept-IIIタグ、(ii)3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、又は12個の隣接するヒスチジン残基のポリヒスチジンポリペプチドタグ、(iii)3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、又は12個の隣接するアルギニン残基のポリアルギニンポリペプチド、(iv)配列YGRKKRRQRRR[配列番号39]のHIV Tatポリペプチド、及び(v)配列DRATPY[配列番号40]のペプチドタグから選択されるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットは、各々、(i)配列41に記載のC-His6-gp10/K234A、(ii)配列番号42に記載のC-His6-gp10/K234C、(iii)配列番号43に記載のC-His6-gp10/C76S/C265S/K234C、(iv)配列番号44に記載のΔ1-14/gp10-Strep-II、及び(v)配列番号45に記載のGp10/Δ285-309-Strep-IIから選択される。

【0016】

特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、(i)配列番号1[アクセッション番号ACE96033]に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージphi29DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(ii)配列番号7[アクセッション番号NP_049782]に記載のアミノ酸配列を有するファージT4DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(iii)配列番号8~11[アクセッション番号gi549295、gi6723246、gi15837315、gi16764273]のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を有するファージラムダDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(iv)配列番号12[アクセッション番号P54309]に記載のアミノ酸配列を有するファージSP1DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v)配列番号13[アクセッション番号AA72961]に記載のアミノ酸配列を有するファージP22DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(vi)配列番号14[アクセッション番号NP_046757]に記載のアミノ酸配列を有するファージP2DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(vii)ファージP3DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(viii)配列番号15[アクセッション番号CAA35152]に記載のアミノ酸配列を有するファージT3DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(ix)配列番号16~19(アクセッション番号AAX12078、YP_006980; AAS77191; AAU05287)に記載のアミノ酸配列を有するファージT5DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び(x)配列番号20[アクセッション番号NP_041995]に記載のアミノ酸配列を有するファージT7DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分から選択されるポリペプチドを各々含むウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含む。

【0017】

特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、二本鎖DNAバクテリオファージDNAパッケージングモータコネクタタンパク質の全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを各々含むウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含む。特定の実施形態では、ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドは、(i)配列番号1[アクセッション番号ACE96033]に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージphi29DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(ii)配列番号7[アクセッション番号NP_049782]に記載のアミノ酸配列を有するファージT4DNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(iii)配列番号8~11[アクセッション番号gi549295、gi6723246、gi15837315、gi16764273]のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を有するファージラムダDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(iv)配列

10

20

30

40

50

番号 1 2 [アクセッション番号 P 5 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号 1 3 [アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i) 配列番号 1 4 [アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配列番号 1 5 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i x) 配列番号 1 6 ~ 1 9 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8 、 Y P _ 0 0 6 9 8 0 ; A A S 7 7 1 9 1 ; A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び (x) 配列番号 2 0 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分から選択される。

10

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態では、ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質は、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを各々含むウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含む。特定の実施形態では、ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドは、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含む。特定の実施形態では、ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質は、検出可能な標識を含み、前記標識は、特定の更なる実施形態では、比色指示薬、G C M S タグ化合物、蛍光指示薬、発光指示薬、リン光指示薬、放射測定指示薬、色素、酵素、酵素の基質、エネルギー転移分子、量子ドット、金属粒子、及び親和性標識から選択することができる。特定の実施形態では、前記親和性標識は、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アプタマー、抗体、レクチン、オリゴ糖、核酸、酵素、金属イオン結合ポリペプチド、配列番号 2 2 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、又は 1 2 個の隣接するヒスチジン残基のポリヒスチジンポリペプチドタグ、S t r e p - I タグ、F L A G (登録商標) ペプチドタグ、M y c ペプチドタグ、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、黄色ブドウ球菌プロテイン A、プロテイン G、H I V T a t ポリペプチド [配列番号 3 9]、アミノ酸配列 D R A T P Y [配列番号 4 0] を有するペプチド、グルタレドキシン - 2、及び親和性リガンドに特異的に結合するファージディスプレイされたペプチドから選択される。特定の実施形態では、前記抗体は、インタクトな免疫グロブリン、単鎖抗体、s c F v、F a b、及び (F a b) ' ₂ から選択される。

20

30

40

【 0 0 1 9 】

上記伝導性チャネル含有膜に関連する特定の実施形態では、膜層は、脂質層を含む。更なる実施形態では、脂質層は、両親媒性脂質を含み、前記両親媒性脂質は、特定の更なる実施形態では、リン脂質を含み、脂質層は、脂質二重層を含む。特定の他の実施形態では、脂質層は、平面膜層及びリポソームから選択される。特定の実施形態では、リポソームは、多重膜リポソーム及び単層リポソームから選択される。特定の他の実施形態では、組み込まれたウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質は、前記膜層において可動性である。特定の他の実施形態では、伝導性チャネル含有膜は、電位を印加した

50

とき、開孔部を通して二本鎖DNAを移動可能である。特定の実施形態では、電位を印加したとき、電圧依存的に開閉することなしにコンダクタンスが生じる。

【0020】

本発明の特定の他の実施形態によれば、(a)両親媒性脂質及び有機溶媒を含む第1の溶液と固体基材とを接触させ、前記溶媒を実質的に除去することにより、前記固体基材上において乾燥両親媒性脂質を調製する工程と、(b)前記コネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するのに十分な条件下及び時間で、水性溶媒、浸透圧剤、及びホモドデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドを含む第2の溶液に、前記乾燥両親媒性脂質を再懸濁させて、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている脂質二重層を含む膜を得て、伝導性チャンネル含有膜を作製する工程と、を含む伝導性チャンネル含有膜を作製する方法を提供する。

10

【0021】

特定の他の実施形態では、(a)両親媒性脂質と少なくとも1つの溶媒とを含む混合物から溶媒を実質的に除去して、乾燥両親媒性脂質を得る工程と、(b)前記コネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するのに十分な条件下及び時間で、水性溶媒、浸透圧剤、ホモドデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドを含む第2の溶液に、前記乾燥両親媒性脂質を再懸濁させて、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている脂質二重層を含む膜を得て、伝導性チャンネル含有膜を作製する工程と、を含む伝導性チャンネル含有膜を作製する方法を提供する。

20

【0022】

上記方法の特定の更なる実施形態では、両親媒性脂質は、リン脂質を含む。特定の更なる実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、1,2-ジフィタノイル-snグリセロール-3-ホスホコリン、及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリンから選択される1以上のリン脂質を含む。特定の実施形態では、有機溶媒は、クロロホルム、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、ピリジン、及びジイソプロピルエーテルから選択される少なくとも1つの溶媒を含む。特定の実施形態では、浸透圧剤は、スクロース又は別の二糖、グリセロール、マンニトール、及びデキストランから選択される少なくとも1つの剤を含む。特定の実施形態では、DNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットは、上記DNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドのいずれかを含む。特定の実施形態では、脂質二重層は、リポソーム中に存在し、前記リポソームは、特定の更なる実施形態では、多重膜リポソーム及び単層リポソームから選択される。特定の実施形態では、組み込まれたウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、膜層中において可動性である。特定の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、膜に電位を印加したとき開孔部を通して二本鎖DNAを移動可能である。特定の実施形態では、電位を印加したとき電圧依存的に開閉することなしに、伝導性チャンネル含有膜においてコンダクタンスが生じる。特定の更なる実施形態では、印加される電位は、(i)-100mV~100mVの電位、(ii)-400mV~400mVの電位、(iii)-300mV~300mVの電位、(iv)-200mV~200mVの電位、(v)-150mV~150mVの電位、(vi)-75mV~75mVの電位、及び(vii)-50mV~50mVの電位から選択される。

30

40

【0023】

本発明の特定の他の実施形態によれば、第1の側面と第2の側面とを含む伝導性チャンネル含有膜の片側に核酸分子を濃縮させる方法であって、(a)(i)両親媒性脂質と少な

50

くとも1つの溶媒とを含む混合物から溶媒を実質的に除去して、乾燥両親媒性脂質を得る工程と、(i i) 前記コネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するのに十分な条件下及び時間で、水性溶媒、浸透圧剤、及びホモドデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質サブユニットポリペプチドを含む第2の溶液に、前記乾燥両親媒性脂質を再懸濁させて、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている脂質二重層を含む膜を得て、伝導性チャンネル含有膜を作製する工程と、を含む方法により伝導性チャンネル含有膜を作製する工程と、(b) 前記コネクタタンパク質の開孔部を通して核酸を電気泳動移動させるのに十分な条件下及び時間で、(a) に記載の伝導性チャンネル含有膜を、1又は複数の核酸分子と接触させ、膜に電位を印加して、前記伝導性チャンネル含有膜の片側に核酸分子を濃縮させる工程と、を含む方法を提供する。特定の更なる実施形態では、核酸の移動により、核酸の濃度勾配に逆らって、膜の片側に核酸が蓄積される。別の実施形態では、伝導性チャンネル含有膜と、前記膜の片側に濃縮された核酸分子とを含む核酸含有リボソームであって、前述の方法に従って作製されるリボソームを提供する。特定の更なる実施形態では、リボソームはナノ粒子であり、特定の他の実施形態では、リボソームはバイオリアクタである。特定の他の実施形態によれば、細胞に1又は複数の上記リボソームを導入する工程を含む、細胞に核酸を送達する方法を提供する。1つの実施形態では、インビトロにおいて1又は複数のリボソームに細胞が導入され、別の実施形態では、インビボにおいて1又は複数のリボソームに細胞が導入される。

10

20

【0024】

本発明の別の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含む単離タンパク質が提供され、前記サブユニットは、各々、(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(b) 4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、又は18個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ(a) に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも1つに融合している少なくとも1つの可撓性ドメインと、(c) 少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインとを含む融合タンパク質を含む。

30

【0025】

別の実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含む単離タンパク質が提供され、前記サブユニットは、各々、(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(b) 4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、又は14個の隣接する非荷電アミノ酸のポリペプチドを含み、且つ(a) に記載のアミノ末端及びカルボキシ末端のうちの少なくとも1つに融合している少なくとも1つの可撓性ドメインと、(c) 式 $X_{1a} - X_{1a} - X_{2a} - X_{1b} - X_{1b} - X_{1b} - X_3 - X_{2b}$ (式中、各 X_{1a} は、独立して任意の非荷電アミノ酸であるか又はアミノ酸は存在せず、各 X_{1b} は、独立して任意の非荷電アミノ酸であり、 X_{2a} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸であり、 X_3 は、グルタミン酸及びアスパラギン酸から選択される負荷電アミノ酸であり、 X_{2b} は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸である) のポリペプチドを含み、且つ前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインと、を含む。

40

【0026】

1つの実施形態では、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含む単離タンパク質が提供され、前記サブユニットは、各々、(a) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(b) 配列番号23に記載の配列 Gly - G

50

l y - G l y - G l y - G l y - G l y のポリペプチドを含み、且つ (a) に記載のカルボキシ末端に融合している少なくとも1つの可撓性ドメインと、(c) 前記可撓性ドメインに融合している少なくとも1つの親和性 / アラインメントドメインと、を含む。特定の更なる実施形態では、前記親和性 / アラインメントドメインは、(i) 配列番号 2 2 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、(i i) 3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、又は 1 2 個の隣接するヒスチジン残基のポリヒスチジンポリペプチドタグ、(i i i) 3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、又は 1 2 個の隣接するアルギニン残基のポリアルギニンポリペプチド、(i v) 配列 Y G R K K R R Q R R R [配列番号 3 9] の H I V T a t ポリペプチド、及び (v) 配列 D R A T P Y [配列番号 4 0] のペプチドタグから選択されるポリペプチドを含む。

10

【 0 0 2 7 】

別の実施形態では、ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含む単離タンパク質が提供され、前記サブユニットは、各々、(i) 配列 4 1 に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / K 2 3 4 A、(i i) 配列番号 4 2 に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / K 2 3 4 C、(i i i) 配列番号 4 3 に記載の C - H i s 6 - g p 1 0 / 7 6 S / C 2 6 5 S / K 2 3 4 C、(i v) 配列番号 4 4 に記載の Δ 1 - 1 4 / g p 1 0 - S t r e p - I I、及び (v) 配列番号 4 5 に記載の G p 1 0 / Δ 2 8 5 - 3 0 9 - S t r e p - I I から選択されるポリペプチドを含む。

20

【 0 0 2 8 】

特定の実施形態では、開孔部ドメインは、(i) 配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i) 配列番号 7 [アクセッション番号 N P _ 0 4 9 7 8 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 4 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i i) 配列番号 8 ~ 1 1 [アクセッション番号 g i 5 4 9 2 9 5、g i 6 7 2 3 2 4 6、g i 1 5 8 3 7 3 1 5、g i 1 6 7 6 4 2 7 3] のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を有するファージラムダ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i v) 配列番号 1 2 [アクセッション番号 P 5 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号 1 3 [アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i) 配列番号 1 4 [アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配列番号 1 5 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i x) 配列番号 1 6 ~ 1 9 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8、Y P _ 0 0 6 9 8 0 ; A A S 7 7 1 9 1 ; A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び (x) 配列番号 2 0 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分から選択されるポリペプチドを含む。

30

40

【 0 0 2 9 】

特定の実施形態では、開孔部ドメインは、二本鎖 D N A バクテリオファージ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質の全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを含む。特定の実施形態では、開孔部ドメインは、(i) 配列番号 1 [アクセッション

50

番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i) 配列番号 7 [アクセッション番号 N P _ 0 4 9 7 8 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 4 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i i i) 配列番号 8 ~ 1 1 [アクセッション番号 g i 5 4 9 2 9 5 、 g i 6 7 2 3 2 4 6 、 g i 1 5 8 3 7 3 1 5 、 g i 1 6 7 6 4 2 7 3] のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を有するファージラムダ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i v) 配列番号 1 2 [アクセッション番号 P 5 4 3 0 9] に記載のアミノ酸配列を有するファージ S P P 1 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v) 配列番号 1 3 [アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i) 配列番号 1 4 [アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7] に記載のアミノ酸配列を有するファージ P 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i) ファージ P 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(v i i i) 配列番号 1 5 [アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、(i x) 配列番号 1 6 ~ 1 9 (アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8 、 Y P _ 0 0 6 9 8 0 ; A A S 7 7 1 9 1 ; A A U 0 5 2 8 7) に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分、及び (x) 配列番号 2 0 [アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5] に記載のアミノ酸配列を有するファージ T 7 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分であるポリペプチドを含む。

【 0 0 3 0 】

特定の実施形態では、開孔部ドメインは、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含むポリペプチドを含む。特定の実施形態では、ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドは、配列番号 1 [アクセッション番号 A C E 9 6 0 3 3] に記載のアミノ酸配列を有するバクテリオファージ p h i 2 9 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの全て又は膜貫通開孔部形成部分を含む。特定の実施形態では、上記単離タンパク質は、(i) ドデカマーであるウイルスコネクタタンパク質に自己集合し、且つ (i i) ウイルスのプロカプシドに組み込まれた後、ウイルスの d s D N A をパッケージングすることができる。特定の実施形態では、前記単離タンパク質は、少なくとも 1 つの検出可能な標識を含み、前記標識は、特定の更なる実施形態では、比色指示薬、G C M S タグ化合物、蛍光指示薬、発光指示薬、リン光指示薬、放射測定指示薬、色素、酵素、酵素の基質、エネルギー転移分子、量子ドット、金属粒子、及び親和性標識から選択される。特定の更なる実施形態では、親和性標識は、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アプタマー、抗体、レクチン、オリゴ糖、核酸、酵素、金属イオン結合ポリペプチド、配列番号 2 2 [W S H P Q R F E K] に記載の S t r e p - I I タグ、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、又は 1 2 個の隣接するヒスチジン残基のポリヒスチジンポリペプチドタグ、S t r e p - I タグ、F L A G (登録商標) ペプチドタグ、M y c ペプチドタグ、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、黄色ブドウ球菌プロテイン A、プロテイン G、配列 Y G R K K R R Q R R R [配列番号 3 9] の H I V T a t ポリペプチド、アミノ酸配列 D R A T P Y [配列番号 4 0] を有するペプチド、グルタレドキシン - 2、及び親和性リガンドに特異的に結合するファージディスプレイされたペプチドから選択される。特定の更なる実施形態では、抗体は、インタクトな免疫グロブリン、単鎖抗体、s c F v、F a b、及び (F a b) ' ₂ から選択される。

【 0 0 3 1 】

本発明の別の実施形態では、アナライト分子の存在を検出する方法であって、(a)アナライト分子が親和性/アラインメントドメインに特異的に結合するのに十分な条件下及び時間で、アナライト分子を含有する試験溶液を、膜層と、前記膜層中に組み込まれた1又は複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質とを含む伝導性チャンネル含有膜と接触させる工程であって、前記ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成可能であり、且つ各々、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、(1)アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(2)(i)少なくとも1つの可撓性ドメイン、及び(ii)少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む工程と、(b)接触工程前の1又は複数の時点、及び接触工程後の1又は複数の時点において、印加された電位により生じるコンダクタンスシグナルを測定する工程であって、接触工程前のコンダクタンスシグナルに対する接触工程後のコンダクタンスシグナルの変化が、前記アナライト分子の前記コネクタタンパク質への結合を示すことから、前記アナライト分子の存在を検出する工程と、を含む方法を提供する。更なる実施形態では、コンダクタンスシグナルの変化は、アナライト分子の親和性/アラインメントドメインへの結合を示す。

【 0 0 3 2 】

本発明の別の実施形態では、アナライトを同定する方法であって、(a)アナライト分子が親和性/アラインメントドメインに特異的に結合するのに十分な条件下及び時間で、アナライト分子を含有する試験溶液を、膜層と、前記膜層中に組み込まれた1又は複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質とを含む伝導性チャンネル含有膜と接触させる工程であって、前記ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成可能であり、且つ各々、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、(1)アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(2)(i)少なくとも1つの可撓性ドメイン、及び(ii)少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む工程と、(b)接触工程前の1又は複数の時点、及び接触工程後の1又は複数の時点において、印加された電位により生じるコンダクタンスシグナルを測定して、コンダクタンスシグナルプロファイルを作成する工程であって、接触工程前のコンダクタンスシグナルに対する接触工程後のコンダクタンスシグナルの変化が、前記アナライト分子の前記コネクタタンパク質への結合を示す工程と、(c)(b)で得られたコンダクタンスシグナルプロファイルを、前記アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルと比較して、前記アナライト分子を同定する工程と、を含む方法を提供する。特定の更なる実施形態では、コンダクタンスシグナルの変化は、アナライト分子の親和性/アラインメントドメインへの結合を示す。

【 0 0 3 3 】

上記方法の特定の実施形態によれば、接触工程は、1又は複数回繰り返される。特定の実施形態では、比較工程は、(i)(b)に記載のコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル振幅と、アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル振幅とを比較すること、及び(ii)(b)に記載のコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル持続時間と、アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル持続時間とを比較することのうちの1以上を含む。上記方法の特定の実施形態では、電位を印加すると、開孔部ドメインにおける電気化学勾配に従ってイオン移動が生じる。特定の実施形態では、アナライトは、核酸分子を含む。特定の実施形態では、アナライトは、核酸分子を含み、比較工程は、核酸分子中に存在する少なくとも1つのヌクレオチドを同定することを含む。特定の実施形態では、前記方法は、核酸分子の核酸配列を決定することを含

む。特定の実施形態では、前記方法は、核酸分子中の一塩基多型を同定することを含む。特定の実施形態では、電圧依存的な開閉は存在せず、特定の実施形態では、印加される電位が、(i) - 100 mV ~ 100 mV の電位、(ii) - 400 mV ~ 400 mV の電位、(iii) - 300 mV ~ 300 mV の電位、(iv) - 200 mV ~ 200 mV の電位、(v) - 150 mV ~ 150 mV の電位、(vi) - 75 mV ~ 75 mV の電位、及び(vii) - 50 mV ~ 50 mV の電位から選択されるとき、電圧依存的な開閉は存在しない。上記方法の特定の実施形態では、伝導性チャネル含有膜は、上記伝導性チャネル含有膜である。上記方法の特定の実施形態では、伝導性チャネル含有膜は、上記方法に従って作製される。上記方法の特定の実施形態では、単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質は、上記単離タンパク質を含む。

10

【0034】

本発明のこれら及び他の態様並びに実施形態は、以下の詳細な説明及び添付図面を参照して明らかとなるであろう。本明細書に参照される及び/又は出願データシートに記載される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許文献は全て、各々が個々に組み込まれているかのように、その全体を参照することにより本願に援用する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、phi29コネクタ及びDNAパッケージングモータの構造を示す。図1A：酸性（影付）、塩基性（斑点）、及び他（白色）のアミノ酸を示すphi29コネクタの側面図（Simpson et al., Acta Cryst D57, 1260-1269 (2001)、Guasch et al., J. Mol. Biol. 315, 663-676 (2002)、Guo et al., J. Nanosci. Nanotechnol. 5, 856-863 (2005)）。図1B：チャネルの幅狭部及び幅広部の直径を示すコネクタの平面図。図1C：コネクタを通過するDNA移動を示すphi29 DNAパッケージングモータの全体図。図1D及び図1E：アレイ形成前(d)及び形成後(e)のC末端が修飾されている精製コネクタのTEM画像。図1F：コネクタを示す、クマシーブルーで染色されたSDSゲル。

20

【図2】図2は、2段階PCRにより6-Gly可撓性ドメイン及びStrept-IIIタグ親和性/アラインメントドメインを含むようにC末端が修飾されている、ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタを高発現させるためのプラスミドコンストラクトの例を示す。図2A：プライマー対F1-R1による第1のPCRにおいて、リンカーをGP10遺伝子の3'末端に結合させた。第2のPCRでは、それぞれNdeI及びXhoI制限酵素部位を含むプライマー対F1-R2を用いてアミノ酸を下流に組み込んだ。図2B：第2のPCR産物をNdeI及びXhoIの両方で切断し、ベクターpET-21a(+)のNdeI/XhoI部位にライゲーションさせた。図2C：プライマー配列。

30

【図3】図3は、C末端に6-Gly可撓性ドメイン及びStrept-IIIタグ親和性/アラインメントドメインを有する、再改変されたphi29 gp10ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタを含むプロカブシドのDNAパッケージング活性を示す。レーン1：1 kbのDNAラダー、レーン2：通常のプロカブシド、レーン3：再改変されたコネクタを有するプロカブシド、レーン4：ATPを含まない陰性対照DNAパッケージング。

40

【図4】図4は、C末端に6-Gly可撓性ドメイン及びStrept-IIIタグ親和性/アラインメントドメインを有する再改変されているコネクタを含むプロカブシドのphi29ピリオン集合活性を示す。再改変されているプロカブシドのインビトロにおけるピリオン集合活性を、pRNAの存在下におけるネイティブプロカブシドのピリオン集合活性と比較した。

【図5】図5は、修飾phi29 gp10コネクタを含む巨大リボソームの画像を示す。図5A(左)：コネクタを含まないNBD-PEで標識されたりリボソーム：脂質の落射蛍

50

光画像。図 5 A (中央) : F I T C 標識コネクタにより再構成されたプロテオリボソームの落射蛍光画像。図 5 A (右) : 非特異的にリボソームと混合された F I T C コネクタの落射蛍光画像。図 5 B : 膜濾過により遊離コネクタの大部分を単離した。図 5 C : スクロース勾配沈降によるリボソーム / F I T C コネクタ複合体の分離。上方の画分に遊離コネクタが現れたが、プロテオリボソームは、下方の画分に留まっていた。画分番号 1 ~ 12 は図示しない。図 5 D : 脂質拡散により、光退色領域 (黒) の蛍光強度が経時的に徐々に増加したことを示す、F R A P (光退色後蛍光回復) により示された蛍光 (赤) 脂質二重層の流動性。図 5 E : コネクタの平面脂質二重層への挿入を示す概略図。

【図 6 A】図 6 A ~ G は、修飾 p h i 2 9 g p 1 0 コネクタの二重層脂質膜 (B L M) への挿入を確認するためのコンダクタンスアッセイを示す。図 6 A は、コネクタのみ (上方) 又はリボソームのみ (下方) を含む B L M である。

【図 6 B】図 6 B では、コネクタ含有プロテオリボソームの添加により、複数の挿入が生じる (200 回以上の実験において再現)。挿入 : 1 つのコネクタの挿入 (上方)、及び 2 つのコネクタの同時挿入 (下方)。

【図 6 C】図 6 C は、正電圧 (上方) 及び負電圧 (下方) における 1 つのコネクタ挿入を示す。

【図 6 D】図 6 D は、複数のコネクタ挿入後の電流ジャンプの分布を示す。0.5 M の N a C l を含む 5 m M T r i s バッファ (p H 7.9)。

【図 6 E】図 6 E は、単一コネクタチャネルの電流 - 電圧関係を示す。エラーバーは、4 回の個別の実験において合計 38 個の挿入されたコネクタから各印加電圧下で 3 個 ~ 5 個が挿入されることを表す。0.5 M の N a C l を含む 5 m M T r i s バッファ (p H 7.9)。

【図 6 F】図 6 F は、コネクタが 1 個、2 個、又は 3 個の場合の電流トレースの傾斜を示す。0.5 M の N a C l を含む 5 m M T r i s バッファ (p H 7.9)。

【図 6 G】図 6 G は、d s D N A (シス - チャンバ) の存在下における 1 個のコネクタの電流トレースの傾斜を示す。1 M の N a C l を含む T M S。

【図 7】図 7 は、C 末端に 6 - G l y 可撓性ドメイン及び S t r e p - I I タグ親和性 / アラインメントドメインを有する修飾 p h i 2 9 D N A パッケージングモータタンパク質コネクタの挿入により引き起こされるコンダクタンスステップの大きさのヒストグラムを示す。このデータは、40 回の個々の実験において合計 213 個の挿入から得られた。

【図 8 A】図 8 A ~ D は、二重層膜 (B L M) における修飾 p h i 2 9 g p 1 0 コネクタチャネルを通過する d s D N A の移動を示す。図 8 A は、B L M がコネクタを含むが、D N A を含まないときの典型的な電流トレースを示す (対照)。

【図 8 B】図 8 B は、3 個のコネクタを含む B L M において D N a s e で切断していない及び切断した 45 p M の二本鎖環状及び直線状プラスミド D N A により引き起こされる例示的遮断を示す。

【図 8 C】図 8 C は、- 40 m V ~ - 75 m V で直線状プラスミド d s D N A により引き起こされる電流遮断率 (%) を示すヒストグラムを示す。D N A の移動実験は、45 回繰り返した。

【図 8 D】図 8 D は、- 40 m V ~ - 75 m V で直線状プラスミド d s D N A により引き起こされる持続時間を示すヒストグラムを示す。D N A の移動実験は、45 回繰り返した。

【図 9 A】図 9 は、- 75 m V における、修飾 p h i 2 9 D N A パッケージングモータタンパク質コネクタ挿入及び D N A 移動を示す連続電流トレースを示す。図 9 A は、4 μ M の 35 b p の D N A をバッファ中で予め混合した場合を示す (実施例 2 の「二本鎖 D N A 移動実験」の方法 2)。

【図 9 B】図 9 B は、コネクタが二重層脂質膜に挿入された後、4 μ M の 35 b p D N A を添加した場合を示す (実施例 2 の「二本鎖 D N A 移動実験」の方法 1)。電流トレースは、修飾コネクタ及び D N A の添加を連続的に記録する (各トレースは、50 秒間の増加について記録した)。

10

20

30

40

50

【図 9 C】図 9 C は、コネクタが二重層脂質膜に挿入された後、 $4 \mu\text{M}$ の 35 bp DNA を添加した場合を示す（実施例 2 の「二本鎖 DNA 移動実験」の方法 1）。電流トレースは、修飾コネクタ及び DNA の添加を連続的に記録する（各トレースは、50 秒間の増加について記録した）。

【図 9 D】図 9 D は、コネクタが二重層脂質膜に挿入された後、 $4 \mu\text{M}$ の 35 bp DNA を添加した場合を示す（実施例 2 の「二本鎖 DNA 移動実験」の方法 1）。電流トレースは、修飾コネクタ及び DNA の添加を連続的に記録する（各トレースは、50 秒間の増加について記録した）。

【図 9 E】図 9 E は、コネクタが二重層脂質膜に挿入された後、 $4 \mu\text{M}$ の 35 bp DNA を添加した場合を示す（実施例 2 の「二本鎖 DNA 移動実験」の方法 1）。電流トレースは、修飾コネクタ及び DNA の添加を連続的に記録する（各トレースは、50 秒間の増加について記録した）。

10

【図 9 F】図 9 F は、コネクタが二重層脂質膜に挿入された後、 $4 \mu\text{M}$ の 35 bp DNA を添加した場合を示す（実施例 2 の「二本鎖 DNA 移動実験」の方法 1）。電流トレースは、修飾コネクタ及び DNA の添加を連続的に記録する（各トレースは、50 秒間の増加について記録した）。

【図 10】図 10 は、修飾 DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの開孔部により形成される伝導性膜貫通チャネルを通過する 35 bp DNA の移動を示す。図 10 A : $4 \mu\text{M}$ の DNA の存在下における二重層について記録した典型的な電流トレース（ 10 kHz の周波数で低域濾波し、 200 kHz のサンプリング周波数で獲得）。図 10 B : 35 bp の dsDNA の移動によるチャネル遮断の持続時間の比較。1 M の NaCl を含む TMS バッファ、 -75 mV 。図 10 C : 5.5 kbp の dsDNA の移動によるチャネル遮断の持続時間の比較。1 M の NaCl を含む TMS バッファ、 -75 mV 。

20

【図 11】図 11 は、DNA 移動事象の定量 PCR (Q-PCR) 分析を示す。図 11 A : 3 連で実行した段階希釈物の Q-PCR 増幅曲線。図 11 B : 各希釈物について、テンプレートの出発量の対数に対してプロットした C_T の標準曲線。図 11 C : トランスチャンバからシスチャンバへと脂質膜におけるコネクタのうちの 1 つを通過する DNA の合計数の定量分析（上方）。コネクタが存在しないことを除いて同条件下で陰性対照を実施した（下方）。エラーバーは、9 回の個別の実験及び 4 回の陰性対照実験の平均の標準偏差を示す。

30

【図 12】図 12 は、種々の条件下における DNA 移動の定量 PCR (Q-PCR) 分析を示す。図 12 A : 様々な数の、膜に組み込まれている伝導性チャネルを形成する修飾 DNA パッケージングモータタンパク質コネクタを通過する DNA 移動の Q-PCR 分析。エラーバーは、同一 Q-PCR 条件下における各サンプルの測定誤差を表す。図 12 B : 漏れが生じたときの DNA 分子の Q-PCR 分析。エラーバーは、3 回の個別の実験の平均の標準偏差を表す。

【図 13】図 13 は、図 8 を示す。図 13 A : バッファのコンダクタンスとコネクタチャネルのコンダクタンスとの関係。図 13 B : コネクタチャネルのコンダクタンスと、異なる濃度の NaCl を含有するバッファ中における挿入されたコネクタの数との関係。図 13 C : 1 M の KCl 及び NaCl を含有するバッファ中におけるコンダクタンスの比較。

40

【図 14】図 14 A は、コネクタを通過して移動する DNA の概略図を示す。図 14 B は、dsDNA により誘導される電流遮断のヒストグラムを示す。図 14 C は、可変数のチャネルを用いて経時的に移動した DNA の Q-PCR 分析を示す。

【図 15 A】図 15 A ~ D は、折り畳まれている立体構造の DNA の移動を示す。図 15 A は、5 ~ 7 個の修飾 ph29gp10 DNA パッケージングモータコネクタチャネルを用いた、別々の電流水準における単一事象の電流遮断のヒストグラムを示す。

【図 15 B】図 15 B は、12 ~ 14 個の修飾 ph29gp10 DNA パッケージングモータコネクタチャネルを用いた、別々の電流水準における単一事象の電流遮断のヒストグラムを示す。

【図 15 C】図 15 C は、修飾コネクタチャネルを通過する折り畳まれている DNA の移

50

動の概略図を示す。

【図 15 D】図 15 D は、pH 8 における 5 k b p の d s D N A を用いて記録された事象の例を示す。

【図 16】図 16 は、修飾 p h i 2 9 g p 1 0 D N A パッケージングモータタンパク質コネクタを通過する一方通行の D N A 移動を示す。図 16 A : D N A が存在しない対照。図 16 B : 正電位におけるコネクタ挿入 (上方) 及び負電位における D N A 移動 (下方) 。図 16 C : 負電位におけるコネクタ挿入 (上方) 及び正電位における D N A 移動 (下方) 。図 16 D : 負電位におけるコネクタ挿入 (上方) 及び負電位における D N A 移動 (下方) 。図 16 E : 負電位のみにおける D N A 移動を示す、 $-100\text{ mV} \sim +100\text{ mV}$ のランピング電位 (2.2 mV/s) における単一コネクタを含む二重層の電流トレース。図 16 F : 正電位のみにおける D N A 移動を示す、 $-100\text{ mV} \sim +100\text{ mV}$ のランピング電位 (2.2 mV/s) における単一コネクタを含む二重層の電流トレース。

【図 17】図 17 は、複数の修飾 p h i 2 9 g p 1 0 コネクタ挿入事象における D N A 移動を示す。「↓」は、コネクタ挿入の 1 つの配向を示し、「↑」は、コネクタ挿入の反対の方向を示す。図 17 A : 3 個のコネクタ全てを同じ方向に配向すると、コネクタ数と共に D N A 移動速度が増加した。図 17 B : 第 1 のコネクタを反対の方向に配向すると、移動は観察されなかった。次いで、第 2 及び第 3 の挿入後に、それぞれ D N A 移動及び速度増加が観察された。図 17 C : はじめのコネクタを 2 個挿入した後、移動は観察されなかった。次の 2 個の挿入後、両方において D N A が活発に移動した。図 17 D : 第 1 のコネクタのみが D N A を移動させた。その理由は、第 2 及び第 3 のコネクタが挿入されたときも D N A 移動速度が変化しなかったためである。

【図 18】図 18 A は、膜層に組み込まれている突然変異 (K 2 3 4 A) 修飾 p h i 2 9 g p 1 0 D N A パッケージングモータタンパク質コネクタのコンダクタンスのヒストグラムを示す。図 18 B は、野生型 p h i 2 9 コネクタのコンダクタンスのヒストグラムを示す。

【図 19】図 19 は、抗 H i s タグ抗体をチャンバの片側に添加すると、段階的に、C 末端にヘキサヒスチジン [配列番号 2 5] 親和性 / アラインメントドメインを有する配列番号 1 を含む修飾 p h i 2 9 g p 1 0 D N A パッケージングモータタンパク質コネクタの開孔部により形成される伝導性チャネルが遮断されることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本明細書に開示される本発明の特定の実施形態は、単離二本鎖 D N A バクテリオファージ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質が、予想外にも、修飾されリン脂質二重層膜等の膜層に組み込まれると、前記膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成することができ、また前記開孔部を通過して二本鎖 D N A (d s D N A) を含む広範囲に及ぶアナライト分子が移動し得るという驚くべき発見に基づいている。

【0037】

これらウイルス D N A パッケージングモータタンパク質コネクタは、タンパク質 - タンパク質及びタンパク質 - R N A 相互作用に關与する d s D N A ウイルスプロカプシド集合体の要素として既に特性評価されているが (例えば、S i m p s o n e t a l . , 2 0 0 0 N a t u r e 4 0 8 : 7 4 5 ; R o b i n s o n e t a l . , 2 0 0 6 N u c l . A c . R e s . 3 4 : 2 6 9 8) 、本開示以前には、脂質膜の不可欠な要素として作用する能力を有するとは見なされてはいなかった。したがって、本明細書に開示される実施形態は、多数の有利な性質を有するバイオセンサを形成する膜貫通開孔部を提供するために、かかるコネクタタンパク質の従来認識されていなかった分子属性を利用する。

【0038】

バクテリオファージ p h i 2 9 の例示的な非修飾ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質は、既に精製され、その三次元構造は、結晶学的に特性評価されている (例えば、G u a s c h e t a l . , 1 9 9 8 F E B S L e t t . 4 3 0 : 2

10

20

30

40

50

83 参照；また、Marais et al., 2008 Structure 16: 1267 参照)。他の dsDNA ウイルスの DNA パッケージングモータコネクタタンパク質（例えば、T4、ラムダ、P22、P2、T3、T5、及び T7）は、phi29 コネクタと僅かな配列相同性しか共有しておらず、また分子量も異なるにもかかわらず、基本構造は非常に類似している（例えば、Bazin et al., 1985 Ann Rev Microbiol. 39: 109-29）。したがって、本明細書に記載される多数の好ましい実施形態は、phi29 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質（例えば、Genbank アクセッション番号 ACE96033 [配列番号 1]）並びに / 又はその断片、変異体、及び誘導体を含むポリペプチドサブユニット（例えば、アクセッション番号 gi29565762、gi31072023、gi66395194、gi29565739、gi157738604 [配列番号 2~6]）について言及するが、本発明は、これらに限定されることを意図するものではない。

10

【0039】

これに代えて、特定の他の実施形態では、限定されるものではないが、ファージラムダ、P2、P3、P22、T3、T4、T5、SPP1、及び T7 のいずれかから単離されたウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質、又は他の単離 dsDNA ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質（例えば、T4（アクセッション番号 NP_049782）（Driedonks et al., 1981 J Mol Biol 152: 641）、ラムダ（アクセッション番号 gi549295、gi6723246、gi15837315、gi16764273）（Kochan et al., 1984 J Mol Biol 174: 433）、SPP1（アクセッション番号 P54309）、P22（アクセッション番号 AAA72961）（Cingolani et al., 2002 J Struct Biol 139: 46）、P2（アクセッション番号 NP_046757）、P3（Nutter et al., 1972 J. Virol. 10(3): 560-2）、T3（アクセッション番号 CAA35152）（Carazo et al., 1986 J. Ultrastuct Mol Struct Res 94: 105）、T5（アクセッション番号 AAX12078、YP_006980、AAS77191、AAU05287）、T7（アクセッション番号 NP_041995）（Cerritelli et al., 1996 J Mol Biol 285: 299; Agirrezabala et al., 2005 J Mol Biol 347: 895））[配列番号 7~20]）を含む他の dsDNA ウイルスから単離されたウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質の使用も考えられる。

20

30

【0040】

理論に縛られるものではないが、これに関して、本明細書に例示される phi29 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質と同様に、実質的に構造が特性評価されているこれら及び他の dsDNA ウイルスパッケージングモータコネクタタンパク質を、本明細書の教示に従って修飾して、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成するために膜に組み込まれ得る単離 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質を得ることができると考えられる。したがって、phi29 コネクタタンパク質に関する本明細書の開示は、特定の実施形態では、本明細書で見出される教示に従ってかかる実施形態で使用するために修飾してもよい他の単離 dsDNA ウイルスパッケージングモータコネクタタンパク質のいずれかをを用いることが考えられる関連する実施形態を例証することを意図するものである。

40

【0041】

本明細書に更に詳細に記載するように、膜への組み込み（例えば、膜層への安定な膜貫通組み込み）及び機能的導電性膜貫通開孔部の形成という新規性質を有するよう人工的に改変されているかかるポリペプチドを含む、単離 DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドは、新しい種類の導電性バイオセンサ、特定の実施形態では、電位に応答して膜層を超えて二本鎖 DNA (dsDNA) を移動可能なバイオセンサを提供す

50

るための予想外且つ有利に優れた性質を示す。したがって、特定の実施形態は、DNAの配列を決定するためのこれらバイオセンサの使用を意図する。

【0042】

背景技術について簡潔に述べると、直線状dsDNAウイルスのゲノムは、予め形成されているプロカプシドにパッケージングされる(Black, Ann Rev Microbiol 43, 267-292 (1989)、Guo, Seminars in Virology (Editor's Introduction) 5 (1), 1-3 (1994)、Guo et al., Mol. Microbiol. 64, 886-903 (2007)、Rao et al., Annu. Rev. Genet. (2008))。このエントロピー的に好ましくないプロセスは、ATP駆動モータにより行われる(Guo et al. J Mol Biol 197, 229-236 (1987)、Chemla et al., Cell. 122, 683-692 (2005)、Hwang et al., Biochemistry 35, 2796-2803 (1996)、Sabanayagam et al., Biophys. J 93, L17-L19 (2007))。バクテリオファージphi29では、2bp (Guo et al., 1987)又は2.5bp (Moffitt et al., Nature 457, 446-452 (2009))のDNAをパッケージングするために、モータは1つのATPを用いる。このモータタンパク質のハブは、コネクタと呼ばれるトランケート型円錐構造(図1A)であり、dsDNAは、成熟中にここから入り、感染中にここから出ることができる(Kochan et al., J Mol Biol 174, 433-447 (1984)、Rishovd et al., Virology 245, 11-17 (1998)、Simpson et al., Acta Cryst D57, 1260-1269 (2001)、Guasch et al., J. Mol. Biol. 315, 663-676 (2002)、Agirrezabal et al., J. Mol. Biol. 347, 895-902 (2005))。コネクタは、12個のGP10タンパク質サブユニットにより形成される中心チャネル(図1B)を有する。ウイルスのコネクタタンパク質は、僅かな配列相同性しか共有せず、分子量も異なるが、基本構造は非常に類似している(Bazinet & King, Ann. Rev. Microbiol. 39, 109-129 (1985))。ウイルスDNAパッケージング及びプロカプシドの感染性パイロンへの変換を証明することにより、phi29 DNAパッケージングモータは、所定の系においてインビトロで最初に集合し、依然として最もよく研究されているものの1つである(Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3505-3509 (1986))。前記モータは、6つのpRNA (パッケージングRNA)分子を利用して(Guo et al., Science 236, 690-694 (1987)、Guo et al., Mol. Cell. 2, 149-155 (1998)、Zhang, et al., Mol. Cell. 2, 141-147 (1998)、Shu et al., EMBO J. 26, 527-537 (2007))、機械と連動させる(図1C)。

【0043】

初めて本明細書に記載されるように、開孔部ドメインを保持し、且つ親和性/アラインメントドメイン及び可撓性ドメインのいずれか又は両方を含む融合タンパク質等の改変体及び突然変異体を含む、phi29及び他の単離dsDNAウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタは、膜層に有用に組み込まれて、膜に電位を印加したとき伝導性チャネルとして使用可能な開孔部を形成することができる。タンパク質の結晶学的構造データが容易に入手可能である場合(例えば、Simpson et al., Acta Cryst D57, 1260-1269 (2001)、Guasch et al., J. Mol. Biol. 315, 663-676 (2002)、Cai et al., Nanomedicine 4, 8-18 (2008)、Guo et al., J. Nanosci. Nanotechnol. 5, 856-863 (2005))、phi29コネクタ等の修飾単離二本鎖DNAウイルスDNAパッケージングモータタンパク

質コネクタは、本明細書に開示される実施形態において使用するのに望ましい構造を有するよう改變してもよい(Jiminez et al., 1986 Science 232:1113、Donate et al., 1994 Prot. Sci. 3:2378、Bradley et al., Science 309:1868-1871(2005)、Schueler-Furman et al., Science 310:638(2005)、Dietz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1244(2006)、Dodson et al., Nature 450:176(2007)、Qian et al., Nature 450:259(2007))。更に、phi29コネクタの大規模製造及び精製手順が開発されている(Guo et al., 2005、Ibanez et al., Nucleic Acids Res. 12, 2351-2365(1984)、Robinson et al., Nucleic Acids Res. 34, 2698-2709(2006)、Xiao et al., ACS Nano 3, 100-107(2009))。

【0044】

したがって、本明細書に記載される実施形態は、例えば、アナライト(例えば、溶液中に提供される可溶性アナライトが好ましい)の迅速、特異的、且つ高感度検出及び/又は特性評価が望ましい場合のある任意の状況を含む、生物医学、臨床、工業、化学、薬学、環境、法医学、国家安全、毒物学、及び他の目的のための化学的及び生化学的アナライトの高感度検出及び特性評価を含む、多様な分子分析状況において利用される。本明細書に開示される組成物及び方法が、dsDNAシーケンシング、ハイスループットDNAシーケンシング、ゲノミクス、SNP検出、分子診断、及び他のDNAシーケンシング用途を含む、以下により詳細に記載されるようなDNAシーケンシングに用いられる実施形態が特に考えられる。

【0045】

したがって、例示的なアナライトとしては、DNA及びRNA(dsDNA及びdsRNAを含む)等の核酸が挙げられ、例えば、かかる核酸における一塩基多形(SNP)及び/又は突然変異の検出及び同定、並びに核酸配列決定の少なくともいずれかに用いられる。本明細書に記載される組成物及び方法を用いて検出及び/又は特性評価可能である他の例示的なアナライトとしては、他のバイオポリマー(例えば、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、糖ペプチド、オリゴ糖、多糖類、脂質、糖脂質、リン脂質等)、他の生体分子(例えば、可溶性メディエータ、コファクター、ビタミン、生理活性脂質、代謝産物等)、天然化合物及び合成化合物を含む薬剤、他の薬学的剤、及び薬理活性剤、芳香剤、着香剤、保存剤、酸化防止剤、抗菌剤、安定剤、担体、賦形剤、修飾剤等の食品及び化粧品用剤、天然毒素及び合成毒素、染料、並びに他の化合物が挙げられる。

【0046】

したがって、特定の実施形態では、本明細書の開示から、アナライトが、単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれて、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成する特定の膜層の完全性を損なわない溶媒に可溶性であることが好ましいと認識される場合、検出及び/又は特性評価されることが望ましい任意のアナライトを用いることができる。したがって、アナライトの選択は、用いられる特定の膜層の組成によって変化するため、溶媒選択に影響を与える場合がある。当業者は、任意の特定の組成の膜層と適合する溶媒を選択するために使用される基準についてよく理解している。好ましい実施形態では、膜層は、リン脂質二重層を含み、アナライトが提供される溶媒は、水性溶媒、例えば、水を含む溶媒を含む。

【0047】

本明細書に開示される組成物及び方法は、特定の実施形態では、確立された電気生理学的機器及び方法を適応させることにより、本明細書に開示される単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれる膜層に対する電気コンダクタンスを測定することを含んでいてもよい。例えば、以下により詳細に記載されるように、膜貫通

電位を発生させ、かかる膜に対するコンダクタンスを測定するためのパッチクランプ又は平面膜技術を変更してもよい。かかる方法の例示的な説明は、例えば、Kasianowicz et al., 1996 Proc Nat. Acad. Sci USA 93:13770; Gu et al., 1999 Nature 398:686; Kasianowicz et al., 2001 Anal. Chem. 73:2268; Henrikson et al., 2000 Phys. Rev. Lett. 85:3057; Hromada et al., 2008 Lab Chip. 8:602; Robertson et al., 2007 Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 104:8207; 米国特許第6,267,872号; 同第6,746,594号; 及び同第6,936,433号にも見出すことができる。当業者は、これら及び類似の参照文献から一般的な方法論的アプローチを認識し、また、当業者は、多くの本明細書に記載されているタンパク質ナノ細孔よりも大きな内腔を有する開孔部を形成し、且つ多くの既の開示されているタンパク質ナノ細孔チャネルでみられるように電圧依存的開閉挙動により伝導性を不所望に妨害することなしに、広範囲に及ぶ印加電位に対する伝導性チャネルとして機能する、単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が組み込まれている新規伝導性チャネル含有膜の初めて本明細書に開示される利点は、本開示の一部由来することを更に理解する。したがって、例えば、一例であり限定するものではないが、本開示に基づいて当業者に明らかであるように、上記に参照された方法及び本明細書に記載の方法等の既知の電気生理学的方法を用と、選択された実施形態では、-100 mV ~ 100 mVの電位、-400 mV ~ 400 mVの電位、-300 mV ~ 300 mVの電位、-200 mV ~ 200 mVの電位、-150 mV ~ 150 mVの電位、-75 mV ~ 75 mVの電位、-50 mV ~ 50 mV、又は使用される特定のコンダクタンス条件に従って変化し得る別の電圧範囲であってもよい電位を印加したとき、電圧依存的に開閉することなしに本明細書に開示される伝導性チャネル含有膜においてコンダクタンスが生じる。

【0048】

更に、非限定的理論によれば、本伝導性チャネル含有膜は、本ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタにより形成される開孔部に一部由来し得る優れた検出感度を提供し、また特異的結合相互作用においてアナライトに会合する、広範囲に及ぶアナライトが接近可能な親和性相互作用ドメインのいずれかが等、所望の機能性を有するよう改変又は突然変異させることができるタンパク質伝導性チャネルの安定な膜組み込みに一部由来し得る優れたアナライト特性評価能を提供する。

【0049】

アナライトの検出方法では、これら及び関連する実施形態は、かかる特異的結合相互作用が存在しないときのコンダクタンスレベルに対する、組み込まれたコネクタタンパク質がアナライトと特異的結合相互作用によって会合しているときの、電位が印加される伝導性チャネル含有膜の開孔部におけるコンダクタンスレベルの変化（例えば、統計的に有意な増加又は減少）を観察することにより得られる感度について考える。したがって、特定の好ましい実施形態では、アナライト分子の存在を検出する方法であって、(a) アナライト分子が親和性/アラインメントドメインに特異的に結合するのに十分な条件下及び時間で、アナライト分子を含有する試験溶液を、膜層と、前記膜層中に組み込まれた1又は複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質とを含む伝導性チャネル含有膜と接触させる工程であって、前記ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成可能であり、且つ各々、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、(1) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(2) (i) 少なくとも1つの可撓性ドメイン、及び(ii) 少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれかが又は両方と、を含む工程と、(b) 接触工程前の1又は複数の時点、及び接触工程後の1又は複数の時点において、印加された電位

により生じるコンダクタンスシグナルを測定する工程であって、接触工程前のコンダクタンスシグナルに対する接触工程後のコンダクタンスシグナルの変化が、前記アナライト分子の前記コネクタタンパク質への結合を示すことから、前記アナライト分子の存在を検出する工程と、を含む方法を提供する。特定の関連する更なる実施形態では、コンダクタンスシグナルの変化は、アナライト分子の親和性 / アラインメントドメインへの結合を示す。

【 0 0 5 0 】

一例であり限定するものではないが、膜に組み込まれたコネクタタンパク質により形成される開孔部は、アナライトが存在し、且つチャンネル伝導性膜に結合しているとき少なくとも部分的に遮断又は閉鎖されるので、その結果として膜に対するコンダクタンスが変化、典型的には減少すると考えられる。結合しているアナライトが存在しない場合、チャンネルに対するコンダクタンスにこのような制限は存在しないので、結合している状態及び結合していない状態のアナライトが観察されるときコンダクタンスの変化量が容易に検出可能である。以下の実施例に示すように、本伝導性チャンネル含有膜は、非限定的理論によれば、伝導性膜貫通開孔部を形成している、膜に組み込まれた単一の単離ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質に結合している単一アナライト分子の量における、アナライト結合に関連するコンダクタンスの変化等の観察が可能になることにより、アナライトの検出感度を非常に高めると考えられる。特定の他の実施形態では、コンダクタンスシグナルは、本明細書に記載されるコネクタの複数の膜貫通開孔部により形成される複数の伝導性チャンネルから検出され得る。

10

20

【 0 0 5 1 】

特定の概念的に関連する実施形態では、例えば、1 又は複数の時点における本明細書に記載されるようなコンダクタンスの変化を含むコンダクタンスの振幅、及び 1 又は複数の時点における本明細書に記載されるようなコンダクタンスの変化を含むコンダクタンスの持続時間を反映する記録を収集することにより、コンダクタンスシグナルプロファイルが作成される場合、アナライトの存在又は欠如の単なる検出を超える情報を得ることができる。かかるシグナルプロファイルは、例えば、結合親和性及び / 又は結合アビディティ（例えば、アナライトが多価である場合）等のコネクタタンパク質（1 又は複数）との相互作用の過程におけるアナライトのあらゆる性質、また可能性として、特定のアナライト、特定のコネクタタンパク質、膜組成、溶媒条件、印加電位、及び他の因子によって変化し得る相対分子量、電荷、及び / 又は疎水性等のアナライトの生理化学的性質を反映することができる。

30

【 0 0 5 2 】

特定の特に好ましい実施形態では、レファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルは、既知の分子構造のアナライトを用いて作成することができ、前記レファレンスプロファイルと、構造的情報を得ることが望まれるアナライトを含有する試験溶液の相互作用により生じるコンダクタンスシグナルプロファイルを比較してもよい。

【 0 0 5 3 】

したがって、これら及び関連する実施形態では、アナライトを同定する方法であって、
(a) アナライト分子が親和性 / アラインメントドメインに特異的に結合するのに十分な条件下及び時間で、アナライト分子を含有する試験溶液を、膜層と、前記膜層中に組み込まれた 1 又は複数の単離ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質とを含む伝導性チャンネル含有膜と接触させる工程であって、前記ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質が、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成可能であり、且つ各々、ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含み、前記サブユニットが、各々、(1) アミノ末端及びカルボキシ末端を有する単離ウイルスコネクタタンパク質ポリペプチドを含む開孔部ドメインと、(2) (i) 少なくとも 1 つの可撓性ドメイン、及び (i i) 少なくとも 1 つの親和性 / アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む工程と、
(b) 接触工程前の 1 又は複数の時点、及び接触工程後の 1 又は複数の時点において、印

40

50

加された電位により生じるコンダクタンスシグナルを測定して、コンダクタンスシグナルプロファイルを作成する工程であって、接触工程前のコンダクタンスシグナルに対する接触工程後のコンダクタンスシグナルの変化が、前記アナライト分子の前記コネクタタンパク質への結合を示す工程と、(c)(b)で得られたコンダクタンスシグナルプロファイルを、前記アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルと比較して、前記アナライト分子を同定する工程と、を含む方法を提供する。

【0054】

特定の更なる実施形態では、コンダクタンスシグナルの変化は、アナライト分子の親和性/アラインメントドメインへの結合を示す。アナライトを検出及び同定するための上記方法のいずれかでは、接触工程は、例えば、コンダクタンスシグナルプロファイルを作成するために1又は複数回繰り返してもよい。上述の通り、既知のアナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルと、試験アナライトの試験コンダクタンスシグナルプロファイルとの比較により、試験アナライトを同定することができ、このアプローチは、例えば、直線状DNA分子が開孔部を通過して移動するときのコンダクタンスの一連の特徴的な変化を測定することによる、核酸分子における1以上の一塩基多形の同定、又は核酸分子(dsDNAを含む)の配列決定等の核酸分子の特性評価において使用できる。これら及び関連する実施形態では、本明細書の開示に基づいて、当業者は、容易に且つ過度の実験を行うことなく、レファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルを作成し、それから、前記プロファイルと比較できる試験コンダクタンスシグナルプロファイルを作成できる条件(例えば、膜、コネクタタンパク質、溶液条件、印加電位の選択等)を決定することができることが理解されるであろう。

【0055】

したがって、特定の実施形態では、比較工程は、(i)試験コンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル振幅と、アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル振幅とを比較すること、及び(ii)試験コンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル持続時間と、アナライトのレファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルのコンダクタンスシグナル持続時間とを比較することのうちの1以上を含む。例えば、開孔部を通過してアナライトが完全に又は部分的に移動する特定の実施形態では、電位の印加により、開孔部ドメインにおける電気化学勾配に従ってイオン移動が生じる。したがって、本方法の特定の関連する実施形態では、アナライトは、核酸分子を含み、特定の他の関連する実施形態では、比較工程は、核酸分子中に存在する少なくとも1つのヌクレオチドを同定することを含み、特定の更なる実施形態では、前記方法は、核酸分子の核酸配列を決定することを含む。

【0056】

本明細書に記載される特定の好ましい実施形態は、キメラ又は融合ポリペプチドサブユニット、即ち、当業者によく知られている組換え遺伝子改変技術の産物である自然界には存在しないポリペプチドのドデカマーを含む単離DNAパッケージングモータコネクタタンパク質にすることが理解されるであろう。これら及び関連する実施形態では、前記融合ポリペプチドは、(i)上記及び本明細書の他の箇所に論じられているポリペプチド(例えば、配列番号1~20に記載の任意のポリペプチド、又は変異体、断片、及び誘導体を含む他の関連するDNAパッケージングモータコネクタポリペプチド)等の二本鎖DNAウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタポリペプチドの全て又は開孔部形成部分であり得る開孔部ドメインと、(ii)少なくとも1つの可撓性ドメイン及び少なくとも1つの親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方と、を含む。例示的なコネクタは、配列番号31~35及び41~45に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドサブユニット等の、ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタポリペプチドサブユニットのホモドデカマーを含んでいてもよい。

【0057】

典型的には、可撓性ドメイン及び/又は親和性/アラインメントドメインは、開孔部ドメインのC末端及び/又はN末端に結合しているペプチド配列として存在してもよいが、

本発明は、これらに限定されることを意図するものではなく、コネクタポリペプチド配列内の他の位置に可撓性ドメイン及び／又は親和性／アラインメントドメインを含むことも考えられる。本明細書の他の箇所に述べられているように、本ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタポリペプチドについての詳細な結晶学的構造データは入手可能であり、タンパク質に対する構造的修飾の影響を予測するための精巧な三次元構造タンパク質モデリングソフトウェアプログラムは、当該技術分野において周知である。

【0058】

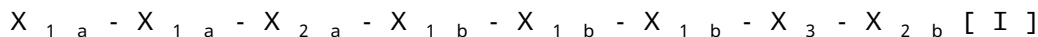
非限定的理論によれば、膜貫通開孔部を形成するために膜にコネクタを組み込むことがエネルギー的に好ましい方法で、それぞれ、親水性リン脂質極性頭基及び疎水性リン脂質脂肪アシル鎖と相互作用するコネクタポリペプチドの一部を修飾することにより、リン脂質二重層等の膜層の保持及び機能的組み込みのために本明細書に開示される単離DNAパッケージングモータコネクタタンパク質を安定化させることができる。タンパク質を膜に導入するため、及び前記タンパク質の膜への組み込みを判定するため、更には前記膜中における一体型タンパク質又は膜貫通タンパク質としての前記タンパク質の性質を確認するための組成物及び方法は、当該技術分野において既知であり、且つ本明細書に例証されており、また導電性膜貫通チャネル等のタンパク質の機能的組み込みを判定するための方法論についても同様である。

10

【0059】

したがって、本明細書に提示されているように、例えば、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、又はそれ以上の隣接する非荷電アミノ酸等の非荷電アミノ酸の可撓性ドメイン（例えば、Gly₆、配列番号23）と、前記ドメインのC末端に結合している、式I：

20



（式中、各X_{1a}は、独立して任意の非荷電アミノ酸であるか又はアミノ酸は存在せず、各X_{1b}は、独立して任意の非荷電アミノ酸であり、X_{2a}は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸であり、X₃は、グルタミン酸及びアスパラギン酸から選択される負荷電アミノ酸であり、X_{2b}は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンから選択される正荷電アミノ酸である）により表されるペプチド、例えば、時に「Strept-III」タグと呼ばれるペプチドWSHPQFEK（配列番号22）等の親和性／アラインメントドメインと、を含むC末端修飾は、脂質二重層において膜貫通チャネルとして保持されるのに助力する方法で、dsDNAウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタの生理化学的性質に有利に影響を与えられ、またアナライト等の溶質と相互作用するための周辺環境に前記タグを有利に曝露させると考えられる。したがって、例えば、非限定的な例示的例として、生理学的pH又は生理学的pH付近の緩衝溶液により提供される好適な条件下、且つ膜に電位が印加された状態で、電荷の相互作用は、伝導性チャネルと溶液中のDNAとの係合に助力することができ、また電気拡散力は、本明細書に記載のようにdsDNAを収容し得る伝導性チャネル開孔部を通過するDNAの移動を促進することができる。

30

【0060】

したがって、開孔部ドメインは、本明細書に記載のように任意のdsDNAウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタポリペプチドにより提供され得、修飾されたコネクタの膜への組み込みと、膜の組み込み及び膜電位が印加されたときにコンダクタンスが生じ得る開孔部の確立の両方についての機能試験に関する本開示を考慮してかかるタンパク質の入手可能な構造特性評価から、開孔部形成部分は、集合したコネクタがこれら性質を示す必要がある場合があるので、かかるコネクタポリペプチドサブユニットの十分な部分を含むことが理解されよう。上述の通り、特定の実施形態では、約4個～約18個の隣接する非荷電アミノ酸の可撓性ドメインは、有利なことに、本明細書に提供されるウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタドメインに融合することができる。

40

【0061】

50

また、上述の通り、親和性／アラインメントドメインは、介在する可撓性ドメインが存在する又は存在しないウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタポリペプチドサブユニット配列に融合することができる、膜層におけるコネクタの保持を促進する、及び／又は受容体、リガンド、結合部位、対抗受容体等の親水性相互作用ドメインを提供する、任意のポリペプチド又はポリペプチドドメインであってもよく、これは、アナライトの特異的結合に関与する、アナライトの伝導性チャネルとの相互作用を促進する、及び／又はその両方のために用いることができる。

【0062】

特定の実施形態において本明細書で使用するために記載される例示的親和性／アラインメントドメインは、非限定的な例として、C末端親水性タグとして融合タンパク質コンストラクトに存在する「Strept-III」ペプチドタグ(WSHPQFEK[配列番号22])(例えば、Schmidt et al., Protein Eng. 1993; 6:109-22; Schmidt et al., J. Mol. Biol. 1996; 255:753-6)、又は例えば、抗体若しくはその抗原結合部分(以下にも記載)等のコグネート結合パートナーとの特異的親和性結合相互作用に関与できると同定されている任意の多数の他の既知のペプチド、ポリペプチド、若しくは他の構造、DRATPY[配列番号40]を有する「Avid」タグ(Gaj et al., 2007 Prot. Expr. Purif. 56:54)、グルタレドキシン-2(Lundberg et al., 2006 Prot. Expr. Purif. 45:37)、又はアビジン、ストレプトアビジン、レクチン、抗体、受容体、細胞接着分子認識成分、レクチン、金属イオン結合ポリペプチド(例えば、ヘキサヒスチジン等のポリヒスチジン、又は3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、若しくは12個の隣接するヒスチジン残基)、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、若しくは12個の隣接するアルギニン残基のポリアルギニンポリペプチド、FLAGペプチドタグ、抗体によって定義されるエピトープを有するMycタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、免疫グロブリン定常領域結合黄色ブドウ球菌プロテインA若しくはプロテインG、HIV Tatポリペプチド(例えば、配列番号39)、親和性リガンドに特異的に結合するファージディスプレイされたペプチド、アプタマー、又は本明細書に引用される参考文献に記載されているもの等の当該技術分野において既知である任意の他の多数の周知の親和性相互作用分子等である。全て又は一部を用いて親和性／アラインメントドメインを作製することができる他の受容体、結合ドメイン、リガンド、対抗受容体等としては、国際特許公開第2005/097997号、同第2002/056910号、同第2005/017148号、及び同第2005/037989号に開示されているものが挙げられる。特定の実施形態は、理解されているように、確立されている技術及び機器を用いて検出できる広範囲に及ぶ化学、生化学、放射化学、又はナノ分子部分のいずれであってもよい検出可能な標識を更に含む本明細書に提供されるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質を意図する。例示的な検出可能な標識は、当該技術分野において既知であり、国際特許公開第2007/075253号及び米国特許出願公開第2008/0176209号に記載されているものが挙げられる。

【0063】

以下の実施例により詳細に記載されているように、特定の好ましい実施形態によれば、本明細書に記載される伝導性チャネル含有膜は、本明細書に記載されるように開孔部ドメインと可撓性ドメイン及び親和性／アラインメントドメインのいずれか又は両方とを有する融合タンパク質を含むポリペプチドサブユニットで構成されるコネクタが挙げられる、本明細書に提供される単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質を、リポソーム膜に組み込むことにより形成することができる。前記膜は、典型的には、適切な条件下で水性環境に曝露したとき二重層を形成する傾向がある、リン脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、1,2-ジフィ

10

20

30

40

50

タノイル - s n グリセロ - 3 - ホスホコリン、1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロール - 3 - ホスホコリン、又は当業者によく知られている他のリン脂質のうちの1以上)等の両親媒性脂質を含む。

【0064】

以下に記載のように、先ず、溶媒(例えば、クロロホルム、メタノール、エタノール、n - プロパノール、イソプロパノール、n - ブタノール、イソブタノール、ピリジン、ジイソプロピルエーテルのうちの1以上等の有機溶媒)が、(例えば、目視により残留溶媒が殆ど又は全く検出できないように、好ましくは、脂質調製品が乾燥しているとみなされるように)実質的に除去されている両親媒性脂質を提供し、次いで、水性溶媒、浸透圧剤、及びホモドデカマーコネクタタンパク質に自己集合可能な複数の単離ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタサブユニットポリペプチドを含む溶液に、乾燥した前記両親媒性脂質を再懸濁させることにより、ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタを効率よく膜に組み込むことができると理解されるであろう。理論に縛られるものではないが、浸透圧剤を含むと、有利なことに、実質的に球形であるリボソームの形成、大きさ、及び/又は前記リボソーム内の分子間動態に影響を与えることによって、機能的DNAパッケージングモータコネクタタンパク質が伝導性チャンネルとして膜に組み込まれるのを促進すると考えられるが、伝導性チャンネル含有膜を作製する他の方法を除外すべきではないことが認識される。これら及び関連する実施形態で用いることができる浸透圧剤の非限定的な例としては、スクロース、又は他の二糖類、グリセロール、マンニトール、及びデキストランが挙げられる。

10

20

【0065】

特定の実施形態では、伝導性チャンネル含有膜を含むリボソームは、例えば、核酸含有リボソームを得るために、コネクタ開孔部を通して、認知されている均衡原理に従って達成され得る核酸濃度を制限する核酸濃度勾配に逆らって、電位駆動的に移動させる等により、リボソームに濃縮又は蓄積されている核酸分子をインビトロ又はインビボで細胞に送達するためのビヒクルとして、リボソーム形態で用いることができる。かかるリボソームは、有利なことに、遺伝子治療及び関連するストラテジの分野で治療剤として利用することができる。広範囲に及ぶ製剤が、核酸含有リボソームをインビトロ及びインビボで治療的に投与するために利用可能であり、前記製剤は、本開示に従って作製されるリボソームと共に使用するために修飾してもよい。例えば、国際特許公開第2002/034236号；同第2002/036767号；同第2003/094963号；同第2005/034979号；同第2005/120461号；同第2000/03683号；Lasica, Liposomes in Gene Delivery, 1997, CRC Press, Boca Raton, FL；国際特許公開第96/40964号；同第1998/51278号；同第2009/086558号；米国特許出願公開第2007/0042031号；同第2006/0240093号；同第2006/0083780号；同第2004/0142025を参照。多重膜リボソーム及び単層リボソームが考えられ、特定の実施形態では単層リボソームが好ましい。

30

【0066】

また、本明細書に開示される伝導性チャンネル含有膜により画定される膜結合区画を、バイオリアクタとして有利に使用することができる実施形態も考えられる。当業者に理解されているように、本教示によれば、本明細書に記載される伝導性チャンネルを用いて、移動する化合物及び使用される具体的な伝導性チャンネルの性質(例えば、親和性/アラインメントドメインの性質、コネクタの構造、膜の組成、コネクタの配向、印加電位等)によって、多数のアナライト、生体分子、合成小分子、イオン種、及び/又は他の溶質のいずれかを選択的に移動させることができる。したがって、リボソーム微粒子、ナノ微粒子、又は好適な装置内の平面膜の片側であり得る膜結合区画内において、核酸シーケンシング、SNP決定、核酸増幅、核酸合成、ライゲーション又は切断、巨大分子の集合、アナライトの検出に有用な反応、又は任意の他の所望の生化学的若しくは合成的に改変された生体反応等の望ましい生体分子又は生化学反応にとって好ましい条件下で、1以上の所望の

40

50

分子種を蓄積させることができる（例えば、均衡動態の関数として得ることができる濃度を制限する濃度勾配に逆らって電子拡散的に蓄積することができる所望の濃度で）。

【0067】

また本明細書に記載されるように、特定の実施形態では、リボソームを形成するための、本明細書に記載される単離ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタの膜層への組み込みを意図し、前記リボソームは、次いで、当該技術分野において既知である方法に従って人工膜融合操作を用いて、平面二重層膜（BLM）系等の平面膜系に膜組み込み型コネクタを供与することができる。したがって、初めて本明細書に記載される伝導性チャンネル含有膜は、例えば、リボソーム及び／又はナノ粒子（担体粒子を含む）の送達、平面膜層、マイクロ流体チャンバ、マイクロ細孔及びナノ細孔導電性チャンバ、パッチクランプ装置、及び本開示に基づいて、且つ当該技術分野における知見を考慮して適応し得るような本伝導性チャンネル含有膜と共に使用するのに適合可能な任意の他の構成が挙げられるが、これらに限定されない、特定の目的のために及び／又は特定の機器での使用に適応させるために望ましく構成することができる。また、本明細書に記載されるように、特定の好ましい実施形態は、DNAシークエンシング、好ましくはdsDNAシークエンシングを含む核酸シークエンシング及びSNP同定のための本伝導性チャンネル含有膜の使用を意図し、特定の実施形態では、レファレンスコンダクタンスシグナルプロファイルと比較可能なコンダクタンスプロファイルを作成するために複数の時点においてコンダクタンス振幅及び／又は持続時間の変化を検出及び記録することに付随する電位駆動性移動により、本明細書に記載される伝導性チャンネルを通過して移動するときのdsDNAのリアルタイムフィンガープリンティングを含む。

10

20

【0068】

抗体

上述の通り、本発明の特定の実施形態では、抗体を含む親和性／アラインメントドメインも意図され、前記抗体は、検出及び／又は同定が望まれるアナライトに特異的に結合するペプチド、ポリペプチド、及び他の分子である抗アナライト結合分子を含む。かかる結合分子は、本明細書に記載されるように、アナライトの存在を検出する方法、又は（例えば、試験溶液中の）アナライトを同定する方法で用いることができる。本明細書に提供される抗体、又は別の親和性／アラインメントドメインは、抗原／アナライトと検出可能なレベルで反応（例えば、結合）するが、構造的に異なるか又は関連しない分子とは検出可能に反応しない場合、特定のコグネート抗原又はアナライト（例えば、対象アナライト）に特異的結合すると言われる。したがって、好ましい結合分子としては、抗体が挙げられ、前記抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、若しくはCDRグラフト免疫グロブリン抗体、又は例えば、タンパク質分解により作製される又は組換えにより生成される免疫グロブリンF(ab)₂、Fab、Fab'、Fv、及び／又はFd断片、単ドメイン抗体（「dAb」、Holt et al., 2003 Trends Biotech. 21: 484）及び二特異性抗体（Hudson et al., 1999 J. Immunol. Meth. 231: 177）等のこれらの抗原結合断片であってもよい。本発明に係る抗体は、例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、又はIgA等の任意の免疫グロブリンのクラスに属していてもよい。前記抗体は、動物、例えば家禽（例えば、ニワトリ）若しくは哺乳類から得ることができるか、又は由来し、前記哺乳類としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は他の齧歯類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ヒト、又は他の霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。抗体は、内在抗体であってもよく、又は抗体は、細胞膜を通過して容易に輸送され得るように修飾されていてもよい。

30

40

【0069】

本明細書に提供される所望の抗体又は親和性／アラインメントドメインを同定及び調製するために、抗体（親和性／アラインメントドメインの例として、例示的及び非限定的に用いられる）のその特異的抗原（アナライトの例として、例示的及び非限定的に用いられ

50

る)に対する結合性は、一般的に、例えば、当業者が容易に実施することができる、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、放射性免疫測定、イムノプロット等が挙げられる従来の免疫検出法を用いて評価することができる。また、抗原/リガンドの立体構造エピトープに結合する抗体を検出するために用いられるとき、かかる免疫検出法は、潜在的に抗原を変性し、延いてはリガンド立体構造エピトープを変化若しくは破壊し得る任意の試薬又は条件を避けることが好ましい場合があることを当業者はよく理解するであろう。

【0070】

当該技術分野において周知であり且つ本明細書に記載される方法を用いて、必要に応じて特定の抗原に対して特異的である抗体(ポリクローナル抗血清又はモノクローナル抗体を含む)を作製することができる。また、抗体は、所望の性質を有するよう設計された、遺伝的に改変されている免疫グロブリン(Ig)又はIg断片として生成することができる。例えば、例として、また限定するものではなく、抗体は、第1の哺乳類種由来の少なくとも1つの可変(V)領域ドメインと、第2の異なる哺乳類種に由来する少なくとも1つの定常領域ドメインとを有するキメラ融合タンパク質である組換えIgGを含んでいてもよい(例えば、Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55(1984); Shin et al., Methods Enzymol. 178:459-76(1989); Walls et al., Nucleic Acids Res. 21:2921-29(1993); 米国特許第5,482,856号を参照)。最も一般的には、キメラ抗体は、マウス可変領域配列及びヒト定常領域配列を有する。かかるマウス/ヒトキメラ免疫グロブリンは、抗原に対する結合特異性を付与するマウス抗体由来の相補性決定領域(CDR)をヒト由来V領域フレームワーク領域及びヒト由来定常領域にグラフトすることにより「ヒト化」されてもよい(例えば、Jones et al., Nature 321:522-25(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-27(1988); Padlan et al., FASEB 9:133-39(1995); Chothia et al., Nature, 342:377-383(1989); Bajorath et al., Ther. Immunol. 2:95-103(1995); EP-0578515-A3参照)。これら分子の断片は、タンパク質分解により、又は場合により、タンパク質分解後、ジスルフィド結合及びアルキル化を穏やかに還元することにより作製され得る。或いは、かかる断片は、組換え遺伝子改変技術によっても作製することができる(例えば、Harris, W. J., Adair, J. R., (Eds.) 1997 Antibody Therapeutics, CRC Press, Boca Raton, FL)。

【0071】

免疫特異的である(即ち、特異的である親和性/アラインメントドメイン)、又は本明細書に提供されるコグネート抗原(即ち、アナライト)に特異的に結合する抗体は、好ましくは約 10^4 M^{-1} 以上、より好ましくは約 10^5 M^{-1} 以上、より好ましくは約 10^6 M^{-1} 以上、更により好ましくは約 10^7 M^{-1} 以上の親和性定数 K_D で、抗原/アナライトと検出可能なレベルで反応するが、異なる又は関連しない構造を有する分子とは反応しない。また、そのコグネート抗原に対する抗体の親和性は、一般的に、解離定数 K_D として表され、抗体が、 10^{-4} M 以下、約 10^{-5} M 以下、約 10^{-6} M 以下、 10^{-7} M 以下、又は 10^{-8} M 以下の K_D で結合する場合、抗体は抗原に対して特異的に結合する。結合パートナー又は抗体の親和性は、例えば、Scatchardらにより記載されている技術(Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660(1949))、又は表面プラズモン共鳴(BIACore, Biosensor, Piscataway, NJ)等の従来の技術を用いて容易に決定することができる。例えば、Wolf et al., Cancer Res. 53:2560-2565(1993)参照。或いは、本明細書に記載される他の方法に従って決定することもできる。

【0072】

抗体は、一般的に、当業者に既知である多様な技術のいずれかにより調製することができる。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 参照。1つのかかる技術では、例えば、確立されている方法に従って好適なキャリア上のヘプテンとして、ポリクローナル抗血清に対する抗原として、抗原/アナライトの免疫原性形態で動物を免疫する。好適な動物としては、例えば、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ等が挙げられ、また、マウス、ラット及びハムスター等の小さな哺乳類種、又は他の種を挙げることもできる。

【0073】

免疫原は、精製された抗原、部分的に精製された抗原、又は対象アナライトを含んでもよい、又は抗原（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、又は代謝産物である抗原）を発現している細胞、若しくは抗原がその免疫原性を高める方法で導入されている細胞を含んでもよい。ペプチド又はポリペプチド抗原は、標準的な組換え遺伝子技術を用いて、又は自然界に存在するタンパク質をタンパク質分解することにより、又は化学的に合成することにより、作製することができる。ポリアクリルアミドゲル電気泳動、又は液体クロマトグラフィー若しくは他の好適な方法等の多様な他の分離法のいずれか等、当該技術分野において既知である技術によりペプチドを単離することができる。

【0074】

ポリペプチド又はペプチドである抗原に対する抗体を増加させるために、免疫原として有用なペプチドは、典型的には、ポリペプチド配列に由来する少なくとも4個又は5個の隣接するアミノ酸のアミノ酸配列を有していてもよく、好ましくはポリペプチド配列の少なくとも6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、14個、15個、16個、18個、19個、又は20個の隣接するアミノ酸のポリペプチド配列を有する。特定の他の好ましいペプチド免疫原は、21個～25個、26個～30個、31個～35個、36個～40個、41個～50個、又はそれ以上の、隣接するアミノ酸のポリペプチド配列を含んでいてもよい。また、免疫に有用なポリペプチド又はペプチドは、ホスト動物において抗原応答を生じさせる可能性が高いアミノ酸配列を決定するために、当業者に既知である方法に従って対象ポリペプチド抗原/アナライトの一次構造、二次構造、及び三次構造を分析することにより選択することができる。例えば、Novotny, 1991 *Mol. Immunol.* 28: 201-207; Berzofsky, 1985 *Science* 229: 932-40; Chang et al., *J. Biochem.* 117: 863-68 (1995); Kolaskar et al., *Virology* 261: 31-42 (1999) 参照。前記ポリペプチド又はペプチドは、生物学的に活性である形態のポリペプチド/アナライトの立体構造に近い方法で折り畳むのに十分な数のアミノ酸を含むことが好ましい。

【0075】

当該技術分野において周知の方法に従って、免疫原を調製し、動物を免疫することができる。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 参照。免疫応答は、動物から定期的に採血し、回収した血液から血清を分離し、ELISA又はOuchterlony拡散アッセイ等の免疫アッセイで前記血清を分析して、特異的抗体の力価を決定することによりモニタできる。一旦抗体力価を確立すると、動物から定期的に採血して、ポリクローナル血清を蓄積してもよい。次いで、抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体を、例えば、精製される抗体（1又は複数）の定常領域（重鎖又は軽鎖）に特異的に結合する黄色ブドウ球菌プロテインA又はプロテインG、又は好適な固体支持体上に固定化された抗原/アナライトを用いて、親和性クロマトグラフィーによりかかる抗血清から精製することができる。

【0076】

また、抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体、又は所望の結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生する不死真核細胞株であるハイブリドーマは、例えば、Kohl

10

20

30

40

50

er及びMilstein(Nature, 256:495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6:511-519(1975))の技術、及び当業者によく知られているその改良法を用いて調製してもよい。例えば、ラット、ハムスター、又はマウス等の動物を、免疫原で免疫し;前記免疫された動物から抗原形成細胞、典型的には脾臓細胞を含むリンパ系細胞を得;かかる細胞を、選択剤感作骨髓腫(例えば、形質細胞腫)細胞融合パートナーと融合させることにより不死化することができる。

【0077】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物の上清から単離することができるか、又はモノクローナル抗体を含有する腹水性流体の形成を促進するために処理された(例えば、プリスタンで刺激された)マウスから単離することもできる。抗体は、モノクローナル抗体(例えば、重鎖又は軽鎖アイソタイプ、結合特異性等)の具体的な性質に基づいて選択される適切なリガンドを用いて親和性クロマトグラフィーにより精製することができる。固体支持体上に固定化される好適なリガンドの例としては、プロテインA、プロテインG、抗定常領域(軽鎖又は重鎖)抗体、抗イディオタイプ抗体、及び特異的抗体が望まれる抗原/アナライトが挙げられる。ヒトモノクローナル抗体は、当業者によく知られている多数の技術により作製することができる。

【0078】

また、例えば、ヒト免疫グロブリンファージライブラリから、ウサギ免疫グロブリンファージライブラリから、及び/若しくはニワトリ免疫グロブリンファージライブラリから周知のファージディスプレイ技術を用いて(例えば、Winter et al., 1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433-55; Burton et al., 1994 Adv. Immunol. 57:191-280; 米国特許第5,223,409号; Huse et al., 1989 Science 246:1275-81; Schlebusch et al., 1997 Hybridoma 16:47-52及びこの中に引用されている参考文献; Rader et al., J. Biol. Chem. 275:13668-76(2000); Popkov et al., J. Mol. Biol. 325:325-35(2003); Andris-Widhopf et al., J. Immunol. Methods 242:159-31(2000)参照)、又はリボソームディスプレイ(例えば、Hanes et al., 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:14130)、若しくは酵母ディスプレイ(例えば、Colby et al., 2004 Meths. Enzymol. 388:348)等の他の方法により、抗体及び他の親和性/アラインメントドメインポリペプチドを同定及び単離することができる。非ヒト種又は非ヒト免疫グロブリンライブラリから単離された抗体は、本明細書に記載される方法及び当該技術分野において既知である方法に従って遺伝的に改変して、例えば、抗体又はその断片の親和性を最適化する、又はキメラ化する、又は「ヒト化」することができる。

【0079】

特定の実施形態では、所望の特異性を有する抗体を産生している免疫動物に由来するB細胞が選択され、当該技術分野において既知である(国際公開第92/02551号、米国特許第5,627,052号、Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48(1996))、及び本明細書に記載される分子生物学的技術に従ってB細胞から軽鎖及び重鎖可変領域がクローニングされる。免疫動物に由来するB細胞は、対象抗原/アナライトに特異的に結合する抗体を産生している細胞を選択することにより、脾臓、リンパ節、又は末梢血サンプルから単離されることが好ましい。また、B細胞は、ヒトの、例えば末梢血サンプルから単離してもよい。

【0080】

また、抗体断片は、特異的抗原と結合して複合体を形成するという点で抗体と同様に作用する任意の合成タンパク質、又は遺伝的に改変されているタンパク質であってもよい。例えば、抗体断片としては、軽鎖可変領域からなる単離断片、重鎖及び軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、軽鎖及び重鎖可変領域がペプチドリinkerにより連結されている組

10

20

30

40

50

換え単鎖ポリペプチド分子 (s c F v タンパク質)、並びに超可変領域を模倣しているアミノ酸残基からなる最小認識単位が挙げられる。かかる抗体断片は、少なくとも1つの可変領域ドメインを含むことが好ましい (例えば、Bird et al., Science 242: 423-26 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); 欧州特許第 B1-0318554号; 米国特許第 5,132,405号; 米国特許第 5,091,513号; 及び米国特許第 5,476,786号参照)。

【0081】

特定の実施形態では、抗原/アナライトに特異的に結合する抗体は、細胞内タンパク質として発現する抗体であってもよい。また、かかる細胞内抗体は、イントラボディとも呼ばれ、Fab断片を含んでもよく、ScFv断片を含むことが好ましい (例えば、Lec erf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4764-49 (2001) 参照)。CDR領域に隣接するフレームワーク領域を、細胞内還元性環境におけるイントラボディの発現量及び溶解度が改善されるよう修飾してもよい (例えば、Worn et al., J. Biol. Chem. 275: 2795-803 (2000) 参照)。例えば、細胞内の特定の標的抗原をコードするポリヌクレオチド配列に機能的に融合することができるイントラボディの可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを構築することにより、特定の細胞の位置又はオルガネラにイントラボディを導くことができる (例えば、Graus-Porta et al., Mol. Cell Biol. 15: 1182-91 (1995); Lener et al., Eur. J. Biochem. 267: 1196-205 (2000) 参照)。遺伝子治療用ベクター、又は脂質混合物 (例えば、Imgenex Corporation, San Diego, CA 製 Provectin (商標)) を介する方法を含む当業者が利用可能な種々の技術により、又は光化学内在技術に従って、イントラボディを細胞に導入することができる。

【0082】

本明細書に記載されるように、対象抗原/アナライトに特異的に結合する抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、多数の既知の発現ベクターを用いて、核酸の切り出し、ライゲーション、形質転換、及びトランスフェクションのための多様な周知の手順のいずれかに従って増殖及び発現させることができる。したがって、特定の実施形態では、抗体断片は、大腸菌等の原核生物ホスト中で発現することが好ましい場合がある (例えば、Pluckthun et al., 1989 Methods Enzymol. 178: 497-515 参照)。特定の他の実施形態では、抗体又はその断片は、酵母 (例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、及び Pichia pastoris)、真菌 (例えば、N. crassa 細胞等の Neurospora 属細胞)、動物細胞 (哺乳類細胞を含む)、又は植物細胞が挙げられる真核生物ホスト細胞中で発現させてもよい。好適な動物細胞の例としては、骨髄腫、COS、CHO、又はハイブリドーマ細胞が挙げられるが、これらに限定されない。植物細胞の例としては、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、及びイネ細胞が挙げられる。対象抗原/アナライトに特異的に結合する抗体は、抗体の K_d を測定するためのアッセイ等、上記のような抗体親和性を測定するためのアッセイを用いてスクリーニングすることができる。

【0083】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド

本発明のポリペプチドは、突然変異体ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド、及び当該技術分野において既知である配列と同一であるか若しくは類似しているアミノ酸配列領域を有する融合タンパク質、又はこれらの断片若しくは一部を含む。例えば、例示的であって限定するものではないが、突然変異体バクテリオファージ phi 29 ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質 [例えば、配列番号 1、Genbank アクセス番号 ACE96033] 又は改変バク

テリオファージ p h i 2 9 ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド融合タンパク質（例えば、配列番号 3 1 ~ 3 5、及び 4 1 ~ 4 5）が、本発明に従って使用するために考えられ、前記タンパク質は、例えば、報告されているポリペプチドと少なくとも 8 0 % の類似性（好ましくは 8 0 % の同一性）、より好ましくは 9 0 % の類似性（より好ましくは 9 0 % の同一性）を有し、更により好ましくは本明細書に開示されるポリペプチド、及びかかるポリペプチドの一部と 9 5 % の類似性（更により好ましくは 9 5 % の同一性）を有するポリペプチドであり、突然変異体又は改変 p h i 2 9 ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのかかる一部は、概して、少なくとも 1 5 0 個、1 7 5 個、2 0 0 個、2 2 5 個、2 5 0 個、2 7 5 個、又はそれ以上のアミノ酸、より好ましくは少なくとも 2 4 0 個、2 6 0 個、2 8 0 個、2 8 5 個、2 9 0 個、2 9 5 個、2 9 6 個、2 9 7 個、2 9 8 個、2 9 9 個、3 0 0 個、3 0 1 個、3 0 2 個、3 0 3 個、3 0 4 個、3 0 5 個、3 0 6 個、3 0 7 個、3 0 8 個、3 0 9 個、3 1 0 個、3 1 1 個、3 1 2 個、3 1 3 個、3 1 4 個、3 1 5 個、3 1 6 個、3 1 7 個、3 1 8 個、3 1 9 個、3 2 0 個、3 2 1 個、3 2 2 個、3 2 3 個、3 2 4 個、3 2 5 個、3 2 6 個、3 2 7 個、3 2 8 個、3 2 9 個、3 3 0 個又はそれ以上のアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

同様に、特定の他の実施形態では、ファージ T 4 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 7]、ラムダファージ D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 8 ~ 1 1]（アクセッション番号 g i 5 4 9 2 9 5、g i 6 7 2 3 2 4 6、g i 1 5 8 3 7 3 1 5、g i 1 6 7 6 4 2 7 3）、ファージ S P P 1 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 1 2]（アクセッション番号 P 5 4 3 0 9）、ファージ P 2 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 1 3]（アクセッション番号 A A A 7 2 9 6 1）、ファージ P 2 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 1 4]（アクセッション番号 N P _ 0 4 6 7 5 7）、ファージ P 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド（N u t t e r e t a l . , 1 9 7 2 J . V i r o l . 1 0 (3) : 5 6 0 - 2）、ファージ T 3 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 1 5]（アクセッション番号 C A A 3 5 1 5 2）、ファージ T 5 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 1 6 ~ 1 9]（アクセッション番号 A A X 1 2 0 7 8、Y P _ 0 0 6 9 8 0、A A S 7 7 1 9 1、A A U 0 5 2 8 7）、及びファージ T 7 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド [配列番号 2 0]（アクセッション番号 N P _ 0 4 1 9 9 5）の突然変異型等の他の突然変異体二本鎖 D N A バクテリオファージウイルスモータコネクタタンパク質も考えられる。

【 0 0 8 5 】

本発明の特定の実施形態は、ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド、突然変異体ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド、及び改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタコネクタポリペプチド融合タンパク質に関し、特定の実施形態は、突然変異体ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチド、及び改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタポリペプチド融合タンパク質、例えば、本明細書に提供されるモータタンパク質コネクタの開孔部ドメインを含み、且つ本明細書に提供される可撓性ドメイン及び親和性 / アラインメントドメインのいずれか又は両方も含むウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質融合ポリペプチド等のウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質をコードするコンストラクトに関し、また、特に、ホモドデカマーであるウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能であり、且つ例えば及び特定の関連する実施形態では、かかるポリペプチドの断片、類似体、及び誘導体として発現可能なタンパク質をコードする組換えコンストラクトのポリペプチド産物を用いて伝導性チャネル含有膜を作製するための方法に関する。

【0086】

また、かかる突然変異体ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドの変異体、断片、誘導体、トランケート型等も考えられ、その産生、構造の特性評価（例えば、本明細書に提供される開孔部ドメインと、可撓性ドメイン及び親和性/アラインメントドメインのいずれか又は両方との存在について）、及び機能試験（例えば、これも本明細書に記載されているように、脂質膜に組み込まれたときの開孔部形成性について）の常法も含めて、以下でより詳細に論じられる。特定の好ましい実施形態によれば、本明細書に開示される組成物及び方法において使用するための突然変異体ウイルスDNAパッケージングモータコネクタポリペプチドは、本明細書に提供されるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドサブユニット等の二本鎖DNAバクテリオファージDNAパッケージングモータコネクタタンパク質ポリペプチドと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを超える割合の配列同一性を有するアミノ酸配列、例えば、例示的であって限定するものではないが、配列番号1~20、31~35、及び41~45のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含んでもよい。

10

【0087】

ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質又はポリペプチドに言及するとき、用語「断片」、「誘導体」、及び「類似体」とは、本明細書に記載される任意の突然変異体ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド、又はかかるポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能又は活性を保持している、かかるポリペプチドを含む融合タンパク質を指す。したがって、類似体は、前駆タンパク質部分を切断することにより活性化され、活性ウイルスDNAパッケージングモータコネクタポリペプチドを作製することができる前駆タンパク質を含み、前記ポリペプチドは、好ましい実施形態では、膜層に組み込まれて、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成する、及び/又は伝導性チャネル含有膜を得るためにかかる開孔部を形成し得るような、ホモデカマーであるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に自己集合可能である。

20

【0088】

本明細書に言及されるcDNAがコードするポリペプチド若しくは融合タンパク質、又はこれらのドメイン若しくは部分を含む、本明細書に記載されるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドの断片、誘導体、又は類似体と、そのヌクレオチドコード配列は、当該技術分野において既知である及び/又は本明細書に開示されるポリペプチド配列から推測することができ、(i) 1以上のアミノ酸残基が、保存又は非保存アミノ酸残基（好ましくは、保存アミノ酸残基）で置換されており、且つかかる置換アミノ酸残基が遺伝子コードによりコードされているアミノ酸であってもなくてもよい配列、又は(ii) 1以上のアミノ酸残基が置換基を含む配列、又は(iii) 突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド、又は前駆タンパク質配列の検出又は特定の機能変更のために使用されるアミノ酸を含む更なるアミノ酸が突然変異体ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドと融合している配列であってもよい。

30

40

【0089】

当該技術分野において既知であるように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、ポリペプチドのアミノ酸配列及びその保存アミノ酸置換体と、第2のポリペプチドの配列とを比較することにより決定される。本明細書に開示される実施形態に係るポリペプチドをコードする核酸の断片又は部分を用いて、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする完全長核酸を合成することができる。本明細書で使用するとき、「同一性(%)」は、2以上のポリペプチドのアラインメントを行い、National Institutes of Health/NCBIデータベース(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)により提供されるデフ

50

オルトの重み付けに従って、配列ギャップ及び配列不一致に重みを加えるギャップ B L A S T アルゴリズム（例えば、A l t s c h u l e t a l . , 1 9 9 7 N u c l . A c . R e s . 2 5 : 3 3 8 9 ）を用いて配列解析したときの、対応するアミノ酸残基位置に存在する同一アミノ酸の割合を指す。

【 0 0 9 0 】

用語「単離」とは、物質が、元々存在していた環境（例えば、自然界に存在する場合、自然環境）から取り出されることを意味する。例えば、生存している動物の体内に存在する天然核酸若しくはポリペプチド、又は自然界に存在するインタクトなウイルスは単離されていないが、天然系において共存している物質の一部又は全てから分離された同核酸又はポリペプチドは、単離されている。かかる核酸は、ベクターの一部であってもよ、及び / 又はかかる核酸若しくはポリペプチドは、組成物の一部であってもよいが、かかるベクター又は組成物は、その自然環境の一部ではないという点で依然として単離されている。

【 0 0 9 1 】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の産生に関与している D N A のセグメントを意味し、コード領域の前後に存在する「リーダー及びトレイラー配列」に加えて、個々のコードセグメント（エキソン）間に介在する配列（イントロン）を含む。

【 0 0 9 2 】

本明細書に記載されるとき、特定の本発明の実施形態は、例えば、例示的であって限定するものではないが、得られる融合タンパク質の検出、機能変更、単離、及び / 又は精製を可能にする、更なる機能的融合ポリペプチド配列に融合している、突然変異体又は改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドを発現させるための、更なる融合ポリペプチドをコードする配列にインフレームで融合している突然変異体又は改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのコード配列を有する核酸によりコードされる突然変異体又は改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド及び融合タンパク質を提供する。

【 0 0 9 3 】

かかる融合タンパク質は、例えば、膜、例えば膜二重層中のリン脂質等の両親媒性膜成分との相互作用を変化させる（例えば、適切な対照に対して統計的に明らかに増加又は減少させる）方法で、タンパク質表面に露出している荷電及び / 又は疎水性アミノ酸側鎖の利用可能性を変化させることによって、融合産物の挙動に影響を与える更なるポリペプチド配列を含有することにより、突然変異体又は改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドの機能を変化させることができる。非限定的な理論によれば、これら及び関連する実施形態では、突然変異体又は改変ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来する融合ポリペプチドは、ウイルス D N A パッケージングモータコネクタタンパク質配列のトランケーション、又は野生型 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質にはみられないポリペプチドドメイン（例えば、本明細書に提供される可撓性ドメイン又は親水性 / アラインメントドメイン）の付加にもかかわらず、より安定な膜への組み込みを示すことができ、並びに / 又は開孔部の大きさ増加、親水性、疎水性、中性、及び電荷アミノ酸側鎖の少なくともいずれかの分布変更、及び / 若しくは伝導性開孔部構造の保存等の望ましい性質を有する開孔部を提供する方法で、膜に電位を印加したときコンダクタンスが生じ得る開孔部を形成し得る。

【 0 0 9 4 】

例示的ポリペプチド（例えば、本明細書に提供される突然変異体又は改変 D N A パッケージングモータコネクタタンパク質サブユニット、例えば、本明細書に提供される可撓性ドメイン及び / 又は親水性 / アラインメントドメインを有するポリペプチド融合タンパク質）の三次元構造の決定は、選択された天然又は非天然アミノ酸による 1 以上のアミノ酸の置換、付加、欠失、又は挿入を、このように誘導された構造変異体が現在開示されている種の空間充填性を保持しているかどうかを判定するために実質的にモデル化することができるように、常法を用いて行うことができる。例えば、D o n a t e e t a l . ,

1994 Prot. Sci. 3:2378; Bradley et al., Science 309:1868-1871 (2005); Schueler-Furman et al., Science 310:638 (2005); Dietz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1244 (2006); Dodson et al., Nature 450:176 (2007); Qian et al., Nature 450:259 (2007)を参照。本明細書に提供される可撓性ドメイン又は親水性/アラインメントドメインの合理的設計のため等に、これら及び関連する実施形態で用いることができるコンピュータアルゴリズムの更なる幾つかの非限定的な例としては、エネルギー最小化立体構造の空間充填モデル(ファンデルワールス半径)から原子の大きさを決定するDesktop Molecular Modeler (例えば、Agboh et al., J. Biol. Chem., 279, 40:41650-57 (2004)参照);異なる化学基に対して親和性の高い領域を決定して、結合を促進しようとするGRID;数学的アラインメントを算出するモンテカルロ探索、並びにCHARMM (Brooks et al. (1983) J. Comput. Chem. 4:187-217)及び力場の算出及び分析を評価するAMBER (Weiner et al (1981) J. Comput. Chem. 106:765) (また、Eisenfield et al. (1991) Am. J. Physiol. 261:C376-386; Lybrand (1991) J. Pharm. Belg. 46:49-54; Froimowitz (1990) Biotechniques 8:640-644; Burbam et al. (1990) Proteins 7:99-111; Pedersen (1985) Environ. Health Perspect. 61:185-190;及びKini et al. (1991) J. Biomol. Struct. Dyn. 9:475-488も参照)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0095】

1つの実施形態では、本発明は、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来する融合ポリペプチドで用いるためのランケート型要素(例えば、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドの断片)を提供し、本発明の別の実施形態は、かかるランケート型要素を有する突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0096】

ランケート型分子は、完全長よりも短い分子を含む任意の分子、例えば、ランケート型ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質ポリペプチドサブユニットであってもよい。本発明により提供されるランケート型分子は、ランケート型生物学的ポリマーを含んでもよく、本発明の好ましい実施形態では、かかるランケート型分子は、ランケート型核酸分子又はランケート型ポリペプチドであってもよい。ランケート型核酸分子は、既知の又は記載されている核酸分子の完全長ヌクレオチド配列よりも短く、ここにかかる既知の又は記載されている核酸分子は、当業者がそれを完全長分子とみなす限り、天然、合成、又は組換え核酸分子のいずれであってもよい。したがって、例えば、遺伝子配列に対応するランケート型核酸分子は、コード配列、非コード配列、プロモータ、エンハンサ、及び他の制御配列、隣接配列等、並びに遺伝子の一部として認識される他の機能性及び非機能性配列を含む完全長遺伝子よりも短い。別の例では、mRNA配列に対応するランケート型核酸分子は、種々の翻訳領域及び非翻訳領域に加えて、他の機能性及び非機能性配列を含み得る完全長mRNA転写産物よりも短い。

【0097】

他の好ましい実施形態では、ランケート型分子は、特定のタンパク質又はポリペプチド要素の完全長アミノ酸配列よりも短いポリペプチドである。本明細書で使用するとき、「欠失」は、当業者に理解されるような一般的な意味を有し、例えば、本明細書に提供されるランケート型分子の場合、対応する完全長分子に対して、末端領域又は非末端領域のいずれかの配列の1以上の部分を欠く分子を指すことができる。核酸分子又はポリペプ

チド等の直線状生物学的ポリマーであるランケート型分子は、分子の末端からの欠失、又は分子の非末端領域からの欠失のうちの1以上を有してもよく、ここにかかる欠失は、1個～1,500個の隣接するヌクレオチド又はアミノ酸残基、好ましくは1個～500個の隣接するヌクレオチド又はアミノ酸残基、より好ましくは1個～300個の隣接するヌクレオチド又はアミノ酸残基の欠失であってもよく、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個～40個、41個～50個、51個～74個、75個～100個、101個～150個、151個～200個、201個～250個、又は251個～299個の隣接するヌクレオチド又はアミノ酸残基の欠失等を含む。特定の特に好ましい実施形態では、ランケート型核酸分子は、3個～75個の隣接するヌクレオチドの欠失を有し得る。特定の他の特に好ましい実施形態では、ランケート型ポリペプチド分子は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個～40個、又は41個～50個の隣接する(c o n t i g u o u s)アミノ酸の欠失を有し得る。

10

【0098】

ネイティブなアミノ酸配列の変更は、多数の従来の方法のいずれにより行ってもよい。突然変異は、ネイティブな配列の断片にライゲーション可能な制限酵素部位に隣接する、突然変異配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することにより、特定の位置に導入することができる。ライゲーション後、得られる再構成された配列は、所望のアミノ酸挿入、置換、又は欠失を有する類似体をコードする。

20

【0099】

或いは、置換、欠失、又は挿入により既定のコドンを変更することができるオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発手順を使用して、変更遺伝子を提供することができる。かかる変更を行う例示的な方法は、Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987); 並びに米国特許第4,518,584号及び同第4,737,462号に開示されている。

30

【0100】

例として、DNAの修飾は、オーバーラップ伸長(SOE)によるPCRスプライシング等、プライマーを用いてDNAテンプレート中に変異を導入し増幅させるDNA増幅法の使用と組み合わせて、タンパク質をコードするDNAの部位特異的突然変異誘発を行うことにより実施できる。部位特異的突然変異誘発は、典型的には、周知且つ市販されているM13ファージベクター等の単鎖及び二本鎖型ファージベクターを用いて引き起こされる。単鎖ファージの複製起点を含む他の好適なベクターを用いてもよい(例えば、Veira et al., Meth. Enzymol. 15:3, 1987参照)。一般に、部位特異的突然変異誘発は、対象タンパク質をコードする単鎖ベクターを調製することにより実施される。単鎖ベクター中のDNAに対して相同な領域内に所望の突然変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを、ベクターにアニーリングさせ、次いで、プライマーとして二本鎖領域を用いる大腸菌DNAポリメラーゼI等のDNAポリメラーゼ(クレノウ断片)を添加して、一方の鎖が変更配列をコードし、他方の鎖が元来の配列をコードする

40

50

ヘテロ二重鎖を生成させる。前記二重鎖を適切な細菌細胞に導入し、所望の突然変異を含むクローンを選択する。得られた変更DNA分子は、適切な宿主細胞中で組換えDNAを発現させて、改変タンパク質を生成することができる。

【0101】

また、多様な、アミノ酸残基若しくは配列の付加又は置換、或いは生物活性に必要ではない末端若しくは内部残基又は配列の欠失をコードする等価なDNAコンストラクトも、本発明の特定の実施形態に包含される。例えば、特定の考えられる実施形態によれば、生物活性にとって望ましくない、又は必須ではないCys残基をコードする配列を変更して、前記Cys残基を欠失させるか又は他のアミノ酸に置換し、復元時に不正確な又は不所望の分子内ジスルフィド結合が形成されるのを防ぐことができる。

10

【0102】

ポリペプチドの修飾は、関連する技術分野の当業者に既知である任意の手段により行うことができる。本明細書において好ましい方法は、融合タンパク質をコードするDNAの修飾、及び前記修飾DNAの発現に依存する。上記で論じた突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド融合体の1つをコードするDNAは、以下に記載する方法を含む標準的な方法を用いて突然変異誘発することができる。例えば、多量体形成を促進し得るか、本明細書に記載される伝導性チャネル含有膜により検出されるアナライト上に存在する反応基との相互作用を仲介し得るか、又は特定の分子の立体構造を促進し得るシステイン残基、例えば、不所望の凝集体形成に關与するシステイン残基を、ポリペプチドから欠失させるか又は置換することができる。必要に応じて、かかる凝集体形成の一因となるシステイン残基は、システイン残基を欠失及び/又は置換し、得られるタンパク質が生理学的に許容可能なバッファ及び塩を含有する溶液中で凝集体を形成するかどうかを確認することにより、経験的に同定することができる。更に、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド融合体の断片を構築し用いてもよく、前記断片は、特定の好ましい実施形態では、かかるポリペプチドの膜貫通開孔部形成部分を含む断片を含む。かかる断片の設計、生成、及び試験は、例えば、本明細書で論じられるようなコンピュータでモデル化されたポリペプチド設計、組換え発現、膜層への機能的組み込み、及びコンダクタンス試験を含む当該技術分野において既知の技術と本開示とに基づいて行うことができる。

20

30

【0103】

アミノ酸の保存的置換は、周知であり、且つ概して、得られる突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド分子の生物活性を変化させることなく行うことができる。例えば、かかる置換は、概して、極性残基、荷電残基、疎水性残基、小残基等のグループ内で交換することにより行われる。必要に応じて、かかる置換は、例えば、本明細書に記載されるようなインビトロアッセイにおいて、ドデカマーの自己集合、膜層への組み込み、伝導性開孔部の形成、及び/又はアナライトの検出等の能力変化（即ち、統計的に有意な増加又は減少）について、得られる修飾タンパク質を単に試験することにより、経験的に決定することができる。

【0104】

本発明は、更に、配列間で少なくとも70%、好ましくは80%~85%、より好ましくは少なくとも90%、更により好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性が存在する場合、当業者に明らかであるように、本明細書に提供される突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、又はその相補配列にハイブリダイズする核酸に関する。本発明は、具体的には、本明細書に言及される突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸に関する。本明細書で使用するとき、用語「ストリンジェントな条件」とは、配列間で少なくとも90%~95%、好ましくは少なくとも97%の同一性が存在する場合にのみハイブリダイゼ

40

50

ーションが生じる条件を意味する。本明細書に言及される突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする核酸は、好ましい実施形態では、本明細書に記載される突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能又は活性（例えば、ドデカマーの自己集合、膜層への組み込み、伝導性開孔部の形成、アナライトを検出する能力）を保持しているポリペプチドをコードする。

【0105】

本明細書で使用する時、特定のストリンジェンシーの条件下で「ハイブリダイズ」とは、2つの単鎖核酸分子間で形成されるハイブリッドの安定性について記載するために用いられる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、典型的には、かかるハイブリッドがアニーリング及び洗浄されるイオン強度と温度条件で表される。典型的には、「高」、「中」、及び「低」ストリンジェンシーは、以下の条件又はそれと等価な条件を包含する：高ストリンジェンシー： $0.1 \times \text{SSPE}$ 又は SSC 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 65 ；中ストリンジェンシー： $0.2 \times \text{SSPE}$ 又は SSC 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 50 ；及び低ストリンジェンシー： $1.0 \times \text{SSPE}$ 又は SSC 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 50 。当業者に既知であるように、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーは、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、及び洗浄工程で用いられる時間、温度、及び/又は溶液濃度の変更により変化する場合があり、また好適な条件は、用いられるプローブ、及びプロットされるプロバンド核酸サンプルの具体的なヌクレオチド配列に部分的に依存する場合もある。したがって、好適にストリンジェントな条件は、1以上の特定のプロバンド配列にハイブリダイズするが、特定の他のプロバンド配列にはハイブリダイズしない能力に基づいて所望の選択性のプローブを同定する過度の実験を行うことなく容易に選択できることが理解されるであろう。

【0106】

また、本明細書ではポリヌクレオチドとも呼ばれる本発明の核酸は、RNA形態であってもよく、cDNA、ゲノミックDNA、及び合成DNAを含むDNA形態であってもよい。DNAは、二本鎖であっても一本鎖であってもよく、一本鎖の場合、コード鎖であっても非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。特定の発明の実施形態に従って使用するための突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードするコード配列は、当該技術分野において既知であるウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質のコード配列の一部と同一である配列領域を含んでいてもよく、又は、遺伝子コードの重複性又は縮重の結果として、かかる理由のために前記ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質のポリペプチドと同じ領域をコードする、異なるコード配列を有していてもよい。

【0107】

特定の発明の実施形態に従って使用するための突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸としては、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのコード配列のみ；突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのコード配列と、更なるコード配列；突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのコード配列（及び任意に更なるコード配列）と、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのイントロン、又はコード配列の5'及び3'非コード配列の少なくともいずれか等の非コード配列であって、例えば、制御される又は制御可能なプロモータ、エンハンサ、他の転写制御配列、リプレッサ結合配列、翻訳制御配列、又は任意の他の制御核酸配列であり得る1以上の制御核酸配列を更に含んでもよいが、これらに限定する必要はない配列；を挙げることができるが、これらに限定されない。したがって、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドを「コードする核酸」又

は「コードするポリヌクレオチド」という用語は、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドのコード配列のみを含む核酸に加えて、更なるコード配列及び/又は非コード配列(1又は複数)を含む核酸も包含する。

【0108】

本明細書に記載されるように使用するための核酸及びオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において既知である任意の方法によって合成することができる(例えば、国際公開第93/01286号、米国特許出願第07/723,454号、米国特許第5,218,088号、米国特許第5,175,269号、米国特許第5,109,124号参照)。本明細書に開示される実施形態で用いるためのオリゴヌクレオチド及び核酸配列の同定は、当該技術分野において周知の方法を含む。例えば、有用なオリゴヌクレオチドの所望の性質、長さ、及び他の特徴は、周知である。特定の実施形態では、合成オリゴヌクレオチド及び核酸配列は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、ホスホロアミダート、ホスフェートエステル等の結合、及びアンチセンスの適用において有用であることが証明されている他のかかる結合を含むことにより、内因性宿主細胞の核酸分解酵素による分解に対する耐性を有するよう設計してもよい(例えば、Agrwal et al., Tetrahedron Lett. 28:3539-3542(1987); Miller et al., J. Am. Chem. Soc. 93:6657-6665(1971); Stec et al., Tetrahedron Lett. 26:2191-2194(1985); Moody et al., Nucl. Acids Res. 12:4769-4782(1989); Uznanski et al., Nucl. Acids Res. (1989); Letsinger et al., Tetrahedron 40:137-143(1984); Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54:367-402(1985); Eckstein, Trends Biol. Sci. 14:97-100(1989); Stein In: Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117(1989); Jager et al., Biochemistry 27:7237-7246(1988))参照)。

【0109】

宿主生物としては、インビトロ及びインビボ発現を含む、細菌(例えば、大腸菌)、酵母(例えば、サッカロミセス・セレビシア及びピキア・パストリス)、昆虫細胞、及び哺乳類等の、本明細書に開示される本発明の特定の実施形態の組換えコンストラクトによりコードされる突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド産物の組換え生成を行うことができる生物が挙げられる。したがって、宿主生物は、本明細書に提供される組成物の生成における構築、増殖、発現、又は他の工程のための生物を挙げることができる。本明細書において好ましい宿主生物は、大腸菌株である。

【0110】

所望の突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードするDNAコンストラクトは、適切な宿主において発現させるためにプラスミドに導入される。特定の好ましい実施形態では、宿主は、細菌宿主である。リガンド又は核酸結合ドメインをコードする配列は、特定の宿主で発現させるためにコドンが最適化されていることが好ましい。したがって、例えば、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドが細菌中で発現する場合、コドンは、細菌の使用に対して最適化される。小さなコード領域の場合、単一オリゴヌクレオチドとして遺伝子を合成することができる。大きなタンパク質の場合、当該技術分野において既知である複数のオリゴヌクレオチドのスプライシング、突然変異誘発、又は他の技術を用いることができる。プロモータ及びオペレータ等

の制御領域である、プラスミド中のヌクレオチド配列は、転写のために互いに機能的に連結している。また、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、分泌シグナルをコードするDNAを含んでいてもよく、それによって得られるペプチドは、前駆体タンパク質である。得られるプロセッシングされたタンパク質は、細胞周辺腔又は発酵培地から回収することができる。

【0111】

好ましい実施形態では、DNAプラスミドは、転写ターミネータ配列も含む。本明細書で使用する、「転写ターミネータ領域」は、転写の終結を伝える配列である。完全な転写ターミネータは、挿入された突然変異体若しくは改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする遺伝子、又はプロモータ源と同じであってもよく、異なってもよいタンパク質をコードする遺伝子から得ることができる。転写ターミネータは、本明細書における発現系の任意成分であるが、好ましい実施形態では使用される。

10

【0112】

本明細書で使用されるプラスミドは、対象タンパク質又はポリペプチドをコードするDNAと機能的に連結しているプロモータを含み、プラスミドの所望の用途によって、上記のような好適な宿主（例えば、細菌、マウス、又はヒト）中でタンパク質を発現するように設計される。本明細書におけるタンパク質及びポリペプチドを発現させるための好適なプロモータは、広く入手可能であり、当該技術分野において周知である。制御領域に連結されている誘導性プロモータ又は構成プロモータが好ましい。かかるプロモータとしては、T7ファージプロモータ、並びにT3、T5、及びSP6プロモータ等の他のT7様ファージプロモータ、大腸菌由来のtrp、lpp、及びlacUV5等のlacプロモータ、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のP10又はポリヘドリン遺伝子プロモータ（例えば、米国特許第5,243,041号、同第5,242,687号、同第5,266,317号、同第4,745,051号、及び同第5,169,784号を参照）、並びに他の真核生物発現系由来の誘導性プロモータが挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質の発現では、かかるプロモータは、lacオペロン等の調節領域と機能的に連結するようプラスミドに挿入される。

20

【0113】

好ましいプロモータ領域は、大腸菌において誘導性且つ機能的であるプロモータ領域である。好適な誘導性プロモータ及びプロモータ領域の例としては、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG；Nakamura et al., Cell 18:1109-1117, 1979参照）に応答する大腸菌lacオペレータ；重金属（例えば、亜鉛）誘導に応答するメタロチオネインプロモータ金属制御エレメント（例えば、Evans等による米国特許第4,870,009号参照）；IPTGに応答するファージT7lacプロモータ（例えば、米国特許第4,952,496号、及びStudier et al., Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990参照）、及びTACプロモータが挙げられる。

30

【0114】

場合によって、プラスミドは、宿主において機能することができる選択性マーカー遺伝子（1又は複数）を含んでいてもよい。選択性マーカー遺伝子としては、大多数の形質転換されていない細胞の中から形質転換されている細菌細胞を同定し且つ選択的に増殖させることができる表現型を細菌に付与する任意の遺伝子を含む。細菌宿主用の好適な選択性マーカー遺伝子としては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）、テトラサイクリン耐性遺伝子（Tc^r）、及びカナマイシン耐性遺伝子（Kan^r）が挙げられる。

40

【0115】

また、プラスミドは、機能的に連結されているタンパク質を分泌するためのシグナルをコードするDNAを含んでいてもよい。使用に好適な分泌シグナルは、広く入手可能であ

50

り、当該技術分野において周知である。大腸菌で機能することができる原核生物又は真核生物の分泌シグナルを使用することができる。本明細書において好ましい分泌シグナルとしては、以下の大腸菌遺伝子：ompA、ompT、ompF、ompC、ベータ-ラクタマーゼ、及びアルカリホスファターゼ等によりコードされるシグナルが挙げられるが、これらに限定されない(von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985)。更に、細菌のpelB遺伝子の分泌シグナル(Lei et al., J. Bacteriol. 169:4379, 1987)、phoA分泌シグナル、及び昆虫細胞で機能することができるcek2を使用することができる。最も好ましい分泌シグナルは、大腸菌ompA分泌シグナルである。大腸菌YebFキャリアタンパク質を含む融合ドメイン(Zhang et al., 2006 Nat. Biotechnol. 24:100)であってもよい等、当業者に既知である他の原核生物及び真核生物分泌シグナルを使用してもよい(例えば、von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985参照)。本明細書に記載される方法を用いて、当業者は、酵母、昆虫、又は哺乳類細胞で機能し得る分泌シグナルを代わりに用いて、前記細胞からタンパク質を分泌させることができる。

【0116】

大腸菌細胞の形質転換に好ましいプラスミドとしては、pET発現ベクターが挙げられる(例えば、pET-11a、pET-12a-c、pET-15b;米国特許第4,952,496号を参照;Novagen, Madison, WIから入手可能)。他の好ましいプラスミドとしては、tacプロモータを含むpKKプラスミド、特にpKK223-3が挙げられる(Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6929, 1984;Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology;米国特許第5,122,463号、同第5,173,403号、同第5,187,153号、同第5,204,254号、同第5,212,058号、同第5,212,286号、同第5,215,907号、同第5,220,013号、同第5,223,483号、及び同第5,229,279号)。プラスミドpKKは、アンピシリン耐性遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子で置換することにより改変されている(Pharmaciaから入手可能;pUC4Kから得た、例えば、Vieira et al. (Gene 19:259-268, 1982);及び米国特許第4,719,179号参照)。pBlueBac(pJVEL及びその誘導体とも呼ばれる)等のバキュロウイルスベクター、特にpBlueBacII(例えば、米国特許第5,278,050号、同第5,244,805号、同第5,243,041号、同第5,242,687号、同第5,266,317号、同第4,745,051号、及び同第5,169,784号;Invitrogen, San Diegoから入手可能)も、昆虫細胞におけるポリペプチドの発現に用いることができる。他のプラスミドとしては、pIN-IIIompA2等のpIN-IIIompAプラスミド(米国特許第4,575,013号参照;また、Duffaud et al., Meth. Enz. 153:492-507, 1987も参照)が挙げられる。

【0117】

DNA分子は、細菌細胞、好ましくは大腸菌細胞で複製されることが好ましい。また、好ましいDNA分子は、細菌において代々前記DNA分子を確実に維持するために、細菌の複製起点を含む。このように、細菌において複製することにより、大量のDNA分子を生成することができる。好ましい細菌の複製起点としては、f1-ori及びcolE1複製起点が挙げられるが、これらに限定されない。好ましいホストは、lacUVプロモータ等の誘導性プロモータに機能的に連結しているT7RNAポリメラーゼをコードするDNAの染色体コピーを含む(米国特許第4,952,496号を参照)。かかるホストとしては、溶原菌である大腸菌株HMS174(DE3)pLysS、BL21(DE3)pLysS、HMS174(DE3)、及びBL21(DE3)が挙げられるが、これらに限定されない。BL21(DE3)株が好ましい。pLys株は、T7RNAポリメラーゼの天然阻害剤であるT7リゾチームを少量しか提供しない。

【0118】

また、提供されるDNA分子は、リプレッサタンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。リプレッサタンパク質は、リプレッサタンパク質が結合するヌクレオチドの配列を含むプロモータの転写を抑制することができる。プロモータは、細胞の生理学的条件を変化させることにより抑制解除され得る。例えば、オペレータと、又は制御タンパク質若しくはDNAの他の領域と相互作用する能力を阻害する分子を増殖培地に添加することによるか、増殖培地の温度を変化させることにより、前記変化を生じさせることができる。好ましいリプレッサタンパク質としては、IPTG誘導に対して応答性である大腸菌lacIリプレッサ、温度感受性λcI857リプレッサ等が挙げられるが、これらに限定されない。大腸菌lacIリプレッサが好ましい。

10

【0119】

概して、本実施形態の組換えコンストラクトは、転写及び翻訳に必要なエレメントも含む。具体的には、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸配列を含む組換え発現コンストラクトが、宿主細胞又は生物で発現することを目的とする場合、かかるエレメントが好ましい。本発明の特定の実施形態では、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする遺伝子の細胞種に好ましい発現又は細胞種に特異的な発現は、前記遺伝子をプロモータの制御下におくことにより達成可能である。プロモータの選択は、形質転換される細胞の種類、及び望ましい調節の程度又は調節の種類に依存する。プロモータは、構成的又は活性であってもよく、更に、細胞種特異的、組織特異的、個々の細胞特異的、事象特異的、一時的に特異的、又は誘導性であってもよい。細胞種特異的プロモータ及び事象種特異的プロモータが好ましい。構成的又は非特異的プロモータの例としては、SV40初期プロモータ（米国特許第5,118,627号）、SV40後期プロモータ（米国特許第5,118,627号）、CMV初期遺伝子プロモータ（米国特許第5,168,062号）、及びアデノウイルスプロモータが挙げられる。ウイルスのプロモータに加えて、細胞のプロモータも、本発明の状況において許容できる。特に、所謂ハウスキーピング遺伝子の細胞プロモータが有用である。概して、ウイルスプロモータは、細胞プロモータよりも強いプロモータであるので、ウイルスプロモータが好ましい。特定の宿主での使用に適しているプロモータを当業者が容易に選択できるように、高等真核生物を含む多くの真核生物の遺伝子においてプロモータ領域が同定されている。

20

30

【0120】

誘導性プロモータを用いてもよい。これらプロモータとしては、デキサメタゾンにより誘導され得るMMTVLTR（国際公開第91/13160号）；重金属により誘導され得るメタロチオネインプロモータ；及びcAMPにより誘導され得るcAMP応答エレメントを含むプロモータが挙げられる。誘導性プロモータを用いることにより、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸配列は、本発明の発現コンストラクトによって細胞に送達され得、誘導物質を添加するまで静止状態に留まる。これにより、遺伝子産物の生成のタイミングを更に制御することができる。

40

【0121】

事象の種類に特異的プロモータは、腫瘍形成又はウイルス感染等の事象が発生したときにのみ活性化又はアップレギュレートされる。HIVLTRは、事象特異的プロモータの周知の例である。前記プロモータは、ウイルス感染時に生じるtat遺伝子産物が存在しない限り、不活性である。幾つかの事象特異的プロモータは、組織特異的でもある。

【0122】

更に、特定の細胞遺伝子と協調的に制御されるプロモータを用いてもよい。例えば、1以上の更なる内因性遺伝子又は外因的に導入された遺伝子の発現に呼応して、特定の突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする遺伝子を発現させることが望ましいとき、協調的に発現する遺伝子

50

のプロモータを用いてもよい。

【0123】

プロモータに加えて、リプレッサ配列、ネガティブレギュレータ、又は組織特異的サイレンサを挿入して、例えば、実験又は治療ストラテジの一部として、膜貫通導電性を一過的に、及び／又は細胞種特異的に、組織特異的に、若しくは部位特異的に変化させることが望ましい場合があるホスト又はホスト細胞等、特定の状況において、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする遺伝子の非特異的発現を低下させることもできる。複数のリプレッサエレメントをプロモータ領域に挿入してもよい。転写の抑制は、リプレッサエレメントの配向又はプロモータからの距離に依存しない。リプレッサ配列の1つの種類は、インスレータ配列である。かかる配列は、転写を阻害し (Dunaway et al., Mol Cell Biol 17:182-9, 1997; Gdula et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:9378-83, 1996; Chan et al., J Virol 70:5312-28, 1996; Scott and Geyer, EMBO J 14:6258-67, 1995; Kalos and Fournier, Mol Cell Biol 15:198-207, 1995; Chung et al., Cell 74:505-14, 1993)、バックグラウンド転写をサイレンシングする。

10

【0124】

リプレッサエレメントは、II型(軟骨)コラーゲン、コリンアセチルトランスフェラーゼ、アルブミン (Hu et al., J. Cell Growth Differ. 3(9):577-588, 1992)、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK-2) (Misuno et al., Gene 119(2):293-297, 1992) 遺伝子のプロモータ領域、及び6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ遺伝子 (Lemaigre et al., Mol. Cell Biol. 11(2):1099-1106) でも同定されている。更に、ネガティブレギュレータエレメントTse-1が多数の肝臓特異的遺伝子で同定されており、肝細胞における遺伝子活性化のcAMP応答エレメント(CRE)介在性誘導をブロックすることが示されている (Boshart et al., Cell 61(5):905-916, 1990)。

20

30

【0125】

好ましい実施形態では、所望の産物の発現を増加させるエレメントが、コンストラクトに組み込まれる。かかるエレメントは、内部にリボソーム結合部位を含む (IRES; Wang and Siddiqui, Curr. Top. Microbiol. Immunol 203:99, 1995; Ehrenfeld and Semler, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203:65, 1995; Rees et al., Biotechniques 20:102, 1996; Sugimoto et al., Biotechnology 12:694, 1994)。IRESは、翻訳効率を高める。同様に、他の配列も発現を強化することができる。幾つかの遺伝子では、特に5'末端の配列は、転写及び／又は翻訳を阻害する。これら配列は、通常、ヘアピン構造を形成できるパリンδροームである。送達される核酸では、かかる配列はいずれも一般的に欠失している。転写又は翻訳産物の発現量をアッセイして、どの配列が発現に影響を及ぼすのかを確認する又は確かめる。転写量は、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNAaseプローブプロテクション等を含む任意の既知の方法によりアッセイすることができる。タンパク質量は、ELISA、ウエスタンブロット、免疫細胞化学、又は他の周知技術を含む任意の既知の方法によりアッセイすることができる。

40

【0126】

本発明の突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードするコンストラクトに他のエレメントを組み込んでもよい。好ましい実施形態では、前記コンストラクトは、ポリアデニル化配列を含む転写ター

50

ミネータ配列、スプライスドナー部位、スプライスアクセプタ部位、及びエンハンサを含む。また、哺乳類細胞又は他の真核生物細胞における前記コンストラクトの発現及び維持に有用な他のエレメントを組み込んでもよい（例えば、複製起点）。前記コンストラクトは、細菌細胞に都合のよいように作製されているので、細胞中で増殖するのに必要な、又は細胞中における増殖を強化するエレメントが組み込まれる。かかるエレメントとしては、複製起点、選択性マーカー等が挙げられる。

【0127】

本明細書に提供されるように、2以上の異なる制御を受けている核酸コンストラクトを同時に送達することにより、本発明の実施形態のコンストラクトを用いて細胞に送達される突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸の発現の制御レベルを追加することができる。かかる複数の核酸コンストラクトを使用するアプローチにより、ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質の発現を協調的に制御することができる。当業者は、プロモータ、エンハンサ、及び他の周知の遺伝子制御エレメントが挙げられるが、これらに限定されない好適な制御配列を選択することにより、同様の方法で、遺伝子発現を複数のレベルで制御することができることを理解する。

10

【0128】

また、本発明は、特定の実施形態では、ベクター、及び本発明の核酸を含む既知のベクターから調製されるコンストラクト、具体的には、本明細書に提供されるような特定の実施形態の実施形態に係る突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする任意の核酸を含む「組換え発現コンストラクト」に関し；また、本発明のベクター及び/又はコンストラクトを用いて遺伝的に改変されている宿主細胞に関する。突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドは、コンストラクトの性質（例えば、上記のように、プロモータの種類）、及び所望の宿主細胞の性質（例えば、有糸分裂後に最終分化するか活発に分裂しているか；例えば、発現コンストラクトが宿主細胞においてエピソームとして生じるか、宿主細胞のゲノムに組み込まれるか）によって、適切なプロモータの調節下で実質的に任意の宿主細胞において発現することができる。原核生物及び真核生物ホストで使用するための適切なクローニングベクター及び発現ベクターは、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor, NY, (2001)に記載されている。

20

30

【0129】

典型的には、コンストラクトは、プラスミドベクターに由来する。好ましいコンストラクトは、修飾pNAS Sベクター（Clontech, Palo Alto, CA）であり、これは、アンピシリン耐性遺伝子、ポリアデニル化シグナル、及びT7プロモータ部位をコードする核酸配列を有する。他の好適な哺乳類発現ベクターが周知である（例えば、Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., 上記；また、例えばInvitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ; 等のカタログを参照）。適切な選択剤（例えば、メトトレキサート）の適用後の遺伝子増幅に起因する、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドの生成量増加を促進するために、好適な制御調節下でジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）をコードする配列を含む本明細書において好ましいコンストラクトを調製することができる。

40

【0130】

一般に、組換え発現ベクターは、上記のように、宿主細胞を形質転換させる複製起点及び選択性マーカーと、下流の構造遺伝子の転写を導くための高発現している遺伝子に由来するプロモータとを含む。異種構造配列は、適切な相で翻訳開始及び終結配列と組み立てられる。したがって、例えば、本明細書に提供される突然変異体又は改変ウイルスDN

50

A パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞で発現させるための組換え発現ベクターとして、各種発現ベクターコンストラクトのうちの任意の 1 つに含まれていてもよい。

【0131】

適切な DNA 配列 (1 又は複数) は、各種手順によりベクターに挿入することができる。一般に、DNA 配列は、当該技術分野において既知の手順によって、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位 (1 又は複数) に挿入される。クローニング、DNA の単離、増幅、及び精製のための標準的な技術、DNA リガーゼ、DNA ポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ等が関与する酵素反応のための標準的な技術、並びに各種分離技術が知られており、当業者によって一般的に使用されている。例えば、Ausubel ら (2004 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook ら (2001 *Molecular Cloning*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis ら (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (編) (1985 *DNA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK); Hames 及び Higgins (編) (1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK) 等に多数の標準的な技術が記載されている。

10

20

【0132】

発現ベクターの DNA 配列は、mRNA の合成を導くために、少なくとも 1 つの適切な発現調節配列 (例えば、構成的プロモータ又は制御されているプロモータ) に機能的に連結している。かかる発現調節配列の例示的な例としては、上記のような真核生物細胞又はそのウイルスのプロモータが挙げられる。プロモータ領域は、選択性マーカーを含む CAT (クロラムフェニコールトランスフェラーゼ) ベクター、又は他のベクターを用いて任意の所望の遺伝子から選択することができる。真核生物プロモータとしては、CMV 前初期、HSV チミジンキナーゼ、初期及び後期 SV40、レトロウイルス由来の LTR、及びマウスメタロチオネイン - I が挙げられる。適切なベクター及びプロモータの選択は、十分当業者に可能な範囲内であり、突然変異体又は改変ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結している少なくとも 1 つのプロモータ又は制御されているプロモータを含む特定の特に好ましい組換え発現コンストラクトの調製について、本明細書に記載されている。

30

【0133】

エンハンサ配列をベクターに挿入することにより、高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードする DNA の転写を増加させることができる。エンハンサは、シス作用エレメントの DNA であり、通常、転写を増加させるためのプロモータとして作用する 10 bp ~ 300 bp の DNA である。例としては、複製起点の 100 bp ~ 270 bp 上流の SV40 エンハンサ、サイトメガロウイルス初期プロモータエンハンサ、複製起点の上流のポリオーマエンハンサ、及びアデノウイルスエンハンサが挙げられる。

40

【0134】

本明細書に提供されるように、特定の実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターであってもよい (Miller et al., 1989 *BioTechniques* 7:980; Coffin and Varmus, 1996 *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)。例えば、レトロウイルスプラスミドベクター源となり得るレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び哺乳種腫瘍ウイルス等のレトロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

50

【 0 1 3 5 】

レトロウイルスは、DNA 中間体を介して宿主細胞のゲノムを複製し、前記ゲノムに組み込まれる RNA ウイルスである。この DNA 中間体、又はプロウイルスは、宿主細胞の DNA に安定に組み込まれ得る。本発明の特定の実施形態によれば、発現コンストラクトは、外来タンパク質をコードする外来遺伝子が、正常レトロウイルス RNA の代わりに組み込まれたレトロウイルスを含んでいてもよい。レトロウイルス RNA が感染と同時に宿主細胞に侵入すると、外来遺伝子も前記細胞に導入され、次いで、レトロウイルスゲノムの一部であるかのように宿主細胞の DNA に組み込まれ得る。宿主内でこの外来遺伝子が発現することにより、外来タンパク質が発現する。

【 0 1 3 6 】

遺伝子治療のために開発された大部分のレトロウイルスベクター系は、マウスレトロウイルスに基づく。かかるレトロウイルスは、2つの形態、即ち、ビリオンと呼ばれる遊離ウイルス粒子として、又は宿主細胞の DNA に組み込まれているプロウイルスとして存在する。ビリオン形態のウイルスは、レトロウイルスの構造及び酵素タンパク質（酵素逆転写酵素を含む）、2コピーのウイルスゲノム RNA、及びウイルスエンベローブ糖タンパク質を含有する源細胞の原形質膜の一部を含む。レトロウイルスゲノムは、4つの主な領域に分類される：転写の開始及び終結に必須であるシス作用エレメントを含み、且つコード遺伝子の 5' 及び 3' の両方に存在する長末端反復配列（LTR）と、3つのコード遺伝子 gag、pol、及び env。これら3つの遺伝子 gag、pol、及び env は、それぞれ、内部ウイルス構造、酵素タンパク質（インテグラーゼ等）、並びにウイルスの感染力及び宿主域特異性を付与するエンベローブ糖タンパク質（gp70 及び p15e と記載される）に加えて機能が同定されていない「R」ペプチドをコードする。

【 0 1 3 7 】

本発明により提供される発現コンストラクトにおける使用を含む、レトロウイルスの使用に関する安全を考慮して、別々のパッケージング細胞株及びベクター生成細胞株が開発された。簡潔に述べると、この方法は、レトロウイルスベクター及びパッケージング細胞株（PCL）という2つの構成要素を使用する。レトロウイルスベクターは、長末端反復配列（LTR）、移入される外来 DNA、及びパッケージング配列（y）を含む。このレトロウイルスベクターは、構造及びエンベローブタンパク質をコードする遺伝子がベクターゲノムに含まれていないので、単独では繁殖しない。PCL は、gag、pol、及び env タンパク質をコードする遺伝子を含むが、パッケージングシグナル「y」は含まない。したがって、PCL は、単独で空のビリオン粒子しか形成することができない。この一般的な方法の中で、レトロウイルスベクターは、PCL に導入されて、ベクター生成細胞株（VCL）を作製する。この VCL は、レトロウイルスベクターの（外来）ゲノムのみを含むビリオン粒子を作製するので、治療に使用するための安全なレトロウイルスベクターであると考えられている。

【 0 1 3 8 】

「レトロウイルスベクターコンストラクト」とは、本発明の好ましい実施形態において、突然変異体又は改変ウイルス DNA パッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸配列等の対象配列（1又は複数）又は遺伝子（1又は複数）の発現を導くことができる構造体を指す。簡潔に述べると、レトロウイルスベクターコンストラクトは、5' LTR、tRNA 結合部位、パッケージングシグナル、第2の鎖の DNA 合成起点、及び 3' LTR を含んでいなくてはならない。例えば、タンパク質をコードする配列（例えば、所望の補助遺伝子又は代替遺伝子）、又は転写された分子としてそれ自体有用である配列（例えば、リボザイム又はアンチセンス配列として）を含む多種多様な異種配列が、ベクターコンストラクト内に含まれていてもよい。

【 0 1 3 9 】

本発明のレトロウイルスベクターコンストラクトは、例えば、B、C、及び D 型レトロウイルスに加えて、スプーマウイルス及びレンチウイルスを含む、多種多様なレトロウイルスから容易に構築することができる（例えば、RNA Tumor Viruses ,

10

20

30

40

50

Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985を参照)。かかるレトロウイルスは、American Type Culture Collection (「ATCC」; Rockville, Maryland)等の保管場所又は収集物から容易に入手可能であるか、又は一般的に利用可能な技術を用いて既知の起源から単離することができる。本明細書に提供される開示に示される本発明のレトロウイルスベクターコンストラクト、パッケージング細胞、又は生成細胞を組み立て又は構築するために、任意の上記レトロウイルスを容易に利用することができる、また標準的な組換え技術を利用することができる(例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, PNAS 82: 488, 1985)。

【0140】

ウイルスベクターで使用するための好適なプロモータは、一般的に、Miller, et al., Biotechniques 7: 980-990 (1989)に記載されているレトロウイルスLTR、SV40プロモータ、及びヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモータ、又は任意の他のプロモータ(例えば、ヒストン、pol III、及びβ-アクチンプロモータが挙げられるが、これらに限定されない真核生物細胞プロモータ等の細胞プロモータ)を挙げることができるが、これらに限定されない。使用され得る他のウイルスプロモータとしては、アデノウイルスプロモータ、チミジンキナーゼ(TK)プロモータ、及びB19パルボウイルスプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。好適なプロモータの選択は、本明細書に含まれる教示から当業者には明らかであり、制御性プロモータ又は上記プロモータのいずれかから選択することができる。

【0141】

上記のように、レトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、生成細胞株を形成する。形質転換され得るパッケージング細胞の例としては、Miller, Human Gene Therapy, 1: 5-14 (1990)に記載されているようなPE501、PA317、ψ-2、ψ-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、ψCRE、ψCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、及びDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、当該技術分野において既知である任意の手段を用いてパッケージング細胞を形質導入することができる。かかる手段としては、エレクトロポレーション、リボソームの使用、及びCaPO₄沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。1つの代替方法では、レトロウイルスプラスミドベクターをリボソームに封入するか、又は脂質とカップリングさせ、次いでホストに投与してもよい。

【0142】

生成細胞株は、突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチド又は融合タンパク質をコードする核酸配列(1又は複数)を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、かかるレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロ又はインビボのいずれかで、真核生物細胞に形質導入することができる。形質導入された真核生物細胞は、突然変異体若しくは改変ポリペプチド、又は融合タンパク質をコードする核酸配列(1又は複数)を発現する。形質導入され得る真核生物細胞としては、好ましい実施形態では、平滑筋細胞(例えば、動脈平滑筋細胞及び静脈平滑筋細胞を含む血管平滑筋細胞、胃腸管平滑筋細胞、呼吸器平滑筋細胞、泌尿生殖器平滑筋細胞)、線維芽細胞、筋線維芽細胞、軟骨細胞、周皮細胞、巨細胞、グリオーマ細胞、マクロファージ、及び内皮細胞が挙げられるが、本発明は、これらに限定されることを意図するものではないので、形質導入される細胞は、特定の実施形態では、例えば、胚幹細胞、並びに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、骨髓単球性細胞を含む循環末梢血単核及び多形核細胞、リンパ球、筋芽細胞、組織マクロファージ、樹状細胞、クップファー細胞、リンパ節及び脾臓のリンパ系細胞及び細網内皮、ケラチノサイト、内皮細胞、並びに気管支上皮細胞を含んでいてもよい。

【 0 1 4 3 】

ウイルスベクターを用いて、発現コンストラクトをコードする組換え突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドを調製する本発明の実施形態の別の例として、1つの好ましい実施形態では、突然変異体又は改変ポリペプチドの発現を導く組換えウイルスコンストラクトにより形質導入された宿主細胞は、ウイルスの出芽中ウイルス粒子により組み込まれた宿主細胞膜の一部に由来する、発現している突然変異体又は改変ポリペプチドを含むウイルス粒子を生成することができる。

【 0 1 4 4 】

別の実施形態では、本発明は、発現コンストラクトをコードする上記組換え突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、例えば、クローニングベクター、シャトルベクター、又は発現コンストラクトであってもよい、これら及び関連する本発明の実施形態のベクター及び/又は発現コンストラクトを用いて遺伝的に改変されている(形質導入、形質転換、又はトランスフェクトされている)。ベクター又はコンストラクトは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージ等の形態であってもよい。改変宿主細胞は、プロモータを活性化するか、形質転換体を選択するか、又は突然変異体若しくは改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドをコードする遺伝子等の特定の遺伝子を増幅させるのに適するように変更された従来の栄養培地において培養することができる。発現について選択された特定の宿主細胞の培養条件、例えば、温度、pH等は、当業者に容易に明らかであろう。

【 0 1 4 5 】

宿主細胞は、哺乳類細胞等の高等真核生物細胞、又は酵母細胞等の下等真核生物細胞であってもよく、又は宿主細胞は、細菌細胞等の原核生物細胞であってもよい。本発明に係る適切な宿主細胞の例示的な例としては、大腸菌、ストレプトミセス属、ネズミチフス菌等の細菌細胞；酵母等の真菌細胞；ショウジョウバエS2及びスボドプテラ属Sf9等の昆虫細胞；CHO、COS、又は293細胞等の動物細胞；アデノウイルス；植物細胞；又はインビトロで増殖するように既に適応しているか、新たにインビトロで増殖するように確立された任意の好適な細胞が挙げられるが、これらに限定する必要はない。適切なホストの選択は、本明細書における教示から当業者の行い得る範囲内であると考えられる。

【 0 1 4 6 】

また、多様な哺乳類細胞培養系を使用して、組換えタンパク質を発現させることができる。哺乳類発現系の例としては、Gluzman, Cell 123: 175 (1981)により記載されているサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、並びに例えば、C127、3T3、CHO、HeLa、及びBHK細胞株等の適合可能なベクターを発現することができる他の細胞株が挙げられる。哺乳類の発現ベクターは、複製起点、好適なプロモータ及びエンハンサを含み、また、例えば、発現コンストラクトをコードする突然変異体又は改変ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質に由来するポリペプチドの調製に関して本明細書に記載されているような、任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位、スプライスアクセプタ部位、転写終結配列、及び5'隣接非翻訳配列も含む。SV40スプライス及びポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて、必要な非翻訳遺伝子エレメントを提供することができる。コンストラクトの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン介在性トランスフェクション、又はエレクトロポレーション等が挙げられるが、これらに限定されない、当業者によく知られている多様な方法により行うことができる(Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology)。

【 0 1 4 7 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用するとき、単数形「a」、「an」、及び「

10

20

30

40

50

the」は、別段明確に指示しない限り、複数の参照対象を含む。したがって、例えば、「ポリペプチド」は、別段明確に指示しない限り、1以上のポリペプチド（即ち、複数のポリペプチド）、及び当業者に既知であるその等価物等に対する参照を含む。本明細書全体を通して「1つの実施形態」、「ある実施形態」、「別の実施形態では」、又は「幾つかの実施形態では」とは、その実施形態に関連して記載される特定の参照対象の特徴、構造又は特性が少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通して様々な箇所で「1つの実施形態では」、「ある実施形態では」、又は「別の実施形態では」という句を用いても、必ずしも全て同じ実施形態に言及しているとは限らない。更に、特定の特徴、構造又は特性を1以上の実施の形態において任意の好適な方法で組み合わせてもよい。

10

【0148】

文脈において別段の要求がない限り、本願明細書および請求項全体を通して、用語「含む」及び「含んでいる」は、記述されている工程、構成要素、又は工程若しくは構成要素の群を含むが、任意の他の工程、構成要素、又は工程若しくは構成要素の群を除外するものではないことを意味すると理解されよう。「からなる」とは、「からなる」という句の後に記載されるいかなるものも含み、且つそれらに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という句は、記載される構成要素が必要又は必須であり、且つ他の如何なる構成要素も存在することはできないということを示す。「から本質的になる」とは、この句の後に記載される任意の構成要素を含み、且つ記載される構成要素についての開示で明記される活性又は作用に干渉しないか、又はその一因とならない他の構成要素に限定されることを意味する。したがって、「から本質的になる」とは、記載される構成要素が必要又は必須であるが、他の構成要素を必要とせず、他の構成要素は、記載される構成要素の活性又は作用に影響を与えるか否かによって存在してもしなくてもよいことを示す。

20

【0149】

本発明の実施は、逆のことが具体的に示されない限り、当該分野の技術範囲内である、化学、生化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、遺伝学、免疫学、細胞生物学、幹細胞プロトコル、細胞培養、及びトランスジェニック生物学の従来の方法を使用し、これらの多くは、例示目的で以下に示される。かかる技術は、文献中で十分説明される。例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocol in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, Ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Animal Cell Cultu

30

40

50

re (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Fire et al., RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development (Cambridge University Press, Cambridge, 2005); Schepers, RNA Interference in Practice (Wiley-VCH, 2005); Engelke, RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology (DNA Press, 2003); Gott, RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology; Human Press, Totowa, NJ, 2004); Sohail, Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC, 2004); Clarke and Sanseau, microRNA: Biology, Function & Expression (Nuts & Bolts series; DNA Press, 2006); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I - IV (D.M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (K. Turksen, Ed., 2006); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (K. Turksen, Ed., 2006); Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (K. Turksen Ed., 2006); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (DJ. Prockop, D. G. Phinney, and B.A. Bunnell Eds., 2008); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (CA. Klug, and CT. Jordan Eds., 2001); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (K. D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular

Biology) (L. P. Weiner Ed., 2008); Hogan et al., Methods of Manipulating the Mouse Embryo (2nd Edition, 1994); Nagy et al., Methods of Manipulating the Mouse Embryo (3rd Edition, 2002)、及びThe zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), 4th Ed., (Univ. of Oregon Press, Eugene, OR, 2000)を参照。

【実施例】

【0150】

(実施例1: 単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質を用いる伝導性チャネル含有膜の構造体)

この実施例は、dsDNAファージphi29DNAパッケージングコネクタタンパク質を、親水性の特徴的な領域を含むように再設計することについて記載する。

【0151】

<材料>

リン脂質1,2-ジフィタノイル-snグリセロール-3-ホスホコリン(DPhPC)及び1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DOPC)は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)から購入した。N-(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)-1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩(NBD-PE)は、Invitrogenから購入した。n-デカン及びクロロホルムは、それぞれ、Fisher及びTEDIAから購入した。

【0152】

<phi29コネクタの再改変>

コネクタタンパク質の発現用プラスミドの構築及びドデカマーコネクタの集合については、既に報告されている(Guo et al., J. Nanosci. Nanotechnol. 5, 856-863 (2005))。次の、コネクタの末端修飾も、本明細書に開示される特定の可撓性ドメイン及び親和性/アラインメントドメインの使用を除いて、本質的に記載されている通りに行った(Cai et al., Nanomedicine 4, 8-18 (2008); Sun et al., Nucleic Acids Res. 34 (19), 5482-5490 (2006); Robinson et al., Nucleic Acids Res. 34, 2698-2709 (2006))。簡潔に述べると、プラスミドの1つの修飾は、例えば、2段階PCRにより行うことができる。まず、プライマー対F1-R1を用いて、GP10遺伝子を増幅させた。第1のPCR産物を、親和性タグ(His₆-タグ及び/又はStrep-IIタグ、WSHPQFEK、配列番号22)に加えて、それぞれNdeI及びXhoIの制限酵素部位を含むプライマー対F1及びR2を用いる第2のPCR工程のテンプレートとして用いた。第2のPCR産物をNdeI/XhoIで切断し、ベクターpET-21a(+)(Novagen)のNdeI/XhoI部位にライゲーションさせて、プラスミドを作製した。

【0153】

<コネクタの発現及び精製>

プラスミドpETgp10-C-strep-II又は-C-His₆を、タンパク質を発現させるために大腸菌株HMS174(DE3)に形質転換した。体積10mLの大腸菌培養物を、100µg/mLのアンピシリンを含有するLuria-Bertani(LB)培地中にて37℃で一晩インキュベートし、250rpmで撹拌した。5mLの体積の前記培養物を、500mLの培地に接種し、細胞密度がOD₆₀₀で0.5単位~0.6単位に達したとき、0.5mMのIPTGで誘導した。IPTG誘導から3時間後、Beckman JS-7.5ロータ内で20分間5,000×gで遠心分離することにより細胞を回収し、使用まで-70℃で保存した。

10

20

30

40

50

【0154】

Strept-IIIタグ付コネクタを、Strept-Tactin (IBA, St. Louis, MO) を用いて親和性クロマトグラフィーにより精製した。細胞をバッファW (15%のグリセロール、0.5MのNaCl、1mMのEDTA、100mMのTris-HCl (pH 8.0)) に再懸濁させ、透明になった溶解液をStrept-Tactinセファロースカラムにロードし、バッファWで洗浄した。Strept-IIIタグ付コネクタを、バッファE (15%のグリセロール、0.5MのNaCl、1mMのEDTA、2.5mMのデスチオピオチン、100mMのTris-HCl (pH 8.0)) により溶出した。Hisタグ付コネクタは、本質的にRobinson et al. (2006) に記載されているようにニッケル親和性クロマトグラフィー (Novagen) で精製した。

10

【0155】

< phi29モータを用いたインビトロDNAパッケージングアッセイ >

プロカブシド、GP16、及びDNA-GP3の精製 (Lee et al., J. Virol. 69, 5024-5032 (1995); Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3505-3509 (1986))、並びにインビトロでphi29 DNAパッケージングモータを用いるDNAパッケージング手順は、既に報告されている (Guo et al., 1986; Lee et al., J. Virol. 69, 5018-5023 (1995))。簡潔に述べると、体積10 µLの0.3 µg / µLの精製正常プロカブシド又は再改変プロカブシドC-Streptを、室温で30分間、TMS (100mMのTris-HCl (pH 8.0)、10mMのMgCl₂、100mMのNaCl) 中で100 ngのpRNAと混合した。TMSバッファ中にMg²⁺が存在することにより、pRNAのプロカブシドへの結合が促進された。これらpRNA富化プロカブシドを、反応バッファ (10mMのATP / 6mMのスペルミジン / 3mMのβ-メルカプトエタノール-TMS溶液) (3 µL)、DNA-gp3 (100 ng)、及び0.5 µg / µLのDNAパッケージング酵素gp16 (6 µL) と混合した。次いで、混合物を室温で30分間インキュベートした。DNAパッケージング効率を、DNase保護アッセイ (Guo et al., Virology 185, 395-400 (1991)) を用いてアガロースゲル電気泳動により検証した。プロカブシドにより保護されている、パッケージングされたDNAがゲル上に示された。

20

30

【0156】

DNA充填カブシドの生物学的活性を、感染性phi29ビリオンに変換される能力について試験した。DNAパッケージングから30分後、頸部、尾部、及び形態形成タンパク質を添加して、感染性ビリオンの集合を完成させ、次いで、これを標準的なブランク形成によりアッセイした (Guo et al., 1986; Lee et al., J. Virol. 69, 5018-5023 (1995))。

【0157】

< コネクタの蛍光標識 >

Fluoro Tag (商標) FITCコンジュゲーションキット (Sigma, St. Louis, MO) を用いてコネクタを標識した。カラムクロマトグラフィーを用いて、バッファEを炭酸ナトリウム-重炭酸ナトリウムバッファに交換した。FITC溶液をコネクタ溶液に滴下し、穏やかに攪拌しながら2時間インキュベートした。カラムクロマトグラフィーにより遊離FITCを除去し、FITCで標識されたコネクタをPBSで溶出した。FITC-コネクタをSDS-PAGEにより同定した。標識効率を、フルオレセイン/タンパク質のモル比から決定し、UV-Vis分光測定により測定した。

40

【0158】

< 再改変コネクタを含む巨大脂質ベシクルの調製 >

蛍光巨大脂質ベシクルを調製するために、1 mg / mLのDOPC又はDPhPC 1 mLと、1% (モル比) のNBD-PEとをバイアル瓶中で混合した。クロロホルムを穏やかな窒素ガス流により蒸発させ、脂質の入ったバイアル瓶を、デシケータ内で一晩更に乾

50

燥させた。脂質膜を再水和させるために、200 mM ~ 300 mMのスクロース2 mLを、例示的浸透圧剤として用いて、ガラスから溶液にベシクルを出芽させた。次いで、バイアル瓶をパラフィルムで密封し、一晩保存した。溶液の中央からアリコートを取り、次いでペトリ皿に移した。沈降後、epi-蛍光顕微鏡でベシクルを観察した(図5)。

【0159】

ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタの巨大ベシクルへの組み込みは、NBD-PEを用いなかったことを除いて上記の通り行った。体積100 μ LのFITC標識再改変コネクタを、最終的な脂質：コネクタのモル比が75：1(又はBLM実験では、4,000：1 ~ 16,000：1もの低いモル比)になるように上記脱水和脂質に添加した(図5)。

【0160】

<コネクタの平面二重層脂質膜への挿入>

2段階アプローチを用いて、平面二重層脂質膜(BLM)にコネクタを組み込んだ。第1の段階は、上記のような再改変コネクタを含む単層脂質ベシクルの調製であった。次の段階は、押し出されたりボソームの平面BLMへの融合であった(図5)。脂質二重層の流動性をFRAP(光漂白後蛍光回復)により示した(図5D)。励起光の焦点を持続的に二重層に合わせて、色素を漂白した。光漂白された領域は暗くなる。しかし、光を消した後、蛍光脂質が光漂白された領域に拡散して戻ることにより、蛍光が徐々に回復された。

【0161】

標準的なBLMチャンバ(Eastern Scientific LLC, Rockville, MD製BCH-1A)を用いて、水平BLMを形成した。直径70 μ m ~ 120 μ m(Eastern Sci. LLC製TP-01)又は180 μ m ~ 250 μ m(Eastern Sci. LLC製TP-02)の開孔部を有するTeflon(登録商標)薄膜を、仕切りとして用いて、チャンバをシス区画(ワーキングボリウム250 μ L)及びトランス区画(ワーキングボリウム2.5 mL)に分離した。確実に開孔部の縁部全体を完全にコーティングするために開孔部に3%(w/v)のDPHPCn-デカン溶液0.5 μ Lを2回予め塗布した後、これら区画に伝導性バッファ(5 mMのTris/pH 7.9、TMS、又は5 mMのHEPES/pH 7.9と、様々な濃度のNaCl又はKCl)を充填した。

【0162】

ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタを二重層に挿入する前段階として、仕切り上に二重層膜を形成した(図5E)。本明細書に記載する実験においては(約280回の別々のBLM実験)、ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタが成功裏に挿入されたのは約47% ~ 約83%であった。

【0163】

単一コンダクタンス測定では、前もって調製しておいた巨大リボソーム/コネクタ複合体を、孔径200 nm ~ 400 nmのポリカーボネート膜を用いて押し出して、小さな単層リボソームを作製した。使用前にBLM実験用にこのリボソーム原液を10倍 ~ 20倍に更に希釈した。ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタを挿入するために、希釈されたりボソーム溶液0.5 μ L ~ 2 μ Lをシスチャンバにロードした。

【0164】

2つの方法でコンダクタンスを測定した：第1の方法は、特定であるが一定の保持電位で誘導され、第2の方法は、phi29GP10ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタを脂質膜に組み込んだ後、-100 mVから開始して100 mVまで上昇する(ramping)の走査電位により誘導される電流トレースの勾配から測定した(図6)。

【0165】

<Q-PCR分析>

Q-PCR分析では、コネクタ/リボソーム複合体をシス側に添加した(ワーキングボ

10

20

30

40

50

リウム500 μ L)。141bpのDNAを、最終濃度が25nMになるように、トランス側に添加した。陰性対照として、コネクタ/リボソーム複合体を添加せずに、DNAを添加した。-95mVの電位を印加し、Q-PCR分析用に30分間隔でシス側からサンプルを回収した。DNA濃度をDU530UV/Vis分光計(Beckman Coulter, Fullerton, CA)により測定した。絶対定量を用いて、回収したサンプル中のDNAコピー数を測定した。既知の濃度の10倍希釈された141bpのDNAを用いて検量線を作成した(図11)。各希釈液を3連でアッセイした。Q-PCR反応にはiQTM SYBR Green Supermix(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いた。iCycler iQTM多色リアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad)でQ-PCRを実施した。DNAテンプレートに対応するフォワード及びリバースオリゴヌクレオチドプライマーの配列は、それぞれ、5'-TAA TAC GAC TCA CTA TTA GAA CGG CAT CAA GGT GAA CTC AAG ATT TTG TAT GTT GGG GAT TA-3'[配列番号48]及び5'-AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATA ATT GAC AGC AGG CAA TCA ACC-3'[配列番号49]であった(オリゴは、Integrated DNA Technologies, Inc.('IDT'), Coralville, IAから購入した)。

10

【0166】

(実施例2:伝導性チャネル含有膜を形成するための、単離ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質のリボソームへの組み込み)

20

この実施例は、実施例1を含む上記のように設計及び調製された修飾ウイルスDNAパッケージングモータコネクタタンパク質のリボソーム及び脂質二重層への挿入と、得られる伝導性チャネルの特性評価について記載する。前記コネクタタンパク質により形成される脂質二重層を貫通するチャネルの存在を、単一チャネルコンダクタンス測定及びdsDNAの移動により確認した。

【0167】

<スクロース勾配沈降によるリボソーム/コネクタ複合体の分離及び検出>

TMS(50mMのTris(pH8.0)、100mMのNaCl、10mMのMgCl₂)(Guo et al., 1986)中で5%~20%の直線スクロース勾配沈降を実施して、遊離コネクタからリボソーム/コネクタ複合体を分離した。0.1mLのサンプルを5mLの遠心管の上部にロードした。SW55ロータ内にて、20で30分間、27,000rpmのBeckman L-80超遠心分離機を用いてスピンさせた後、画分を前記遠心管の底部から回収し、10%のSDS-PAGEにより分析した(図5C)。

30

【0168】

<濾過>

プロテオリボソームを0.45 μ mの酢酸セルロース膜(Life Science Products, Inc.)で濾過して、リボソーム/コネクタ複合体から遊離コネクタを分離した。体積500 μ Lのコネクタが組み込まれているDOPCリボソームベシクル-200mMスクロース溶液を濾過管に添加し、同溶液を充填した。3,000 $\times$ gで15分間スピンさせた後、200 μ L未満の液体が保持されていた。このマイクロ濾過プロセスを5回繰り返した。フィルタの上に保持されていたリボソーム/コネクタ複合体を、蛍光顕微鏡で画像化した(図5)。

40

【0169】

<移動実験のためのdsDNAの調製>

2本の単鎖DNA、5'-TTA TAG GGA TAG TTG TAA GCT AAA GAA TAC GTT AC-3'(Integrated DNA Technologies, Inc.('IDT'), Coralville, IA)及び5'-GTA ACG TAT TCT TTA GCT TAC AAC TAT C

50

C C T A T A A - 3 ' (I D T) をアニーリングさせることにより、35 bp の d s DNA を調製した。前記アニーリングは、65 で3分間実施し、室温で2時間インキュベートした。16%のPAGEゲルを用いてd s DNA を精製した。ゲルからDNAを取り出した後、エタノール沈殿により濃縮した。

【0170】

エンドヌクレアーゼE c o R Vにより平滑断端されている、インハウスで構築した環状プラスミドC x 43から、直線状5.5キロベースのプラスミドDNAを調製した。Q I A G E N MiniElute Reaction Cleaning - up kit (Q I A G E N) で精製した後、DNA移動実験のためにDNAをトランス側に直接添加した。

10

【0171】

<電気生理学的測定>

電流増幅機のヘッドステージに直接接続されているA g / A g C l 電極対を用いて、二重層脂質膜に対する電流トレースを測定し、A x o n D i g i D a t a 1322A又はA x o n D i g i D a t a 1440アナログ - デジタル変換機 (A x o n I n s t r u m e n t s , I n c . , U n i o n C i t y , C A) に連結されているA x o p a t c h 200Bパッチクランプ増幅機を用いて前記トレースを記録した。報告される電圧は全て、トランス区画の電圧である。指定しない場合、データは、1 k H z の周波数で低域通過濾波し、2 k H z のサンプリング周波数で取得した。P C I a m p 9 . 1ソフトウェア (A x o n I n s t r u m e n t s) を用いてデータを収集し、データ解析にはソフトウェアC l a m p f i tを用いた。

20

【0172】

<二本鎖DNA移動実験>

DNA移動実験では、特に記載しない場合、DNAをトランス側に添加した。C - H i s₆タグ付コネクタ (C末端にヘキサヒスチジン修飾を有するウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタ) を用いて、移動事象を評価した。T M S / 1 M N a C l バッファをDNA移動バッファとして用いた。2つの方法を用いて、DNAを移動実験用チャンバに添加した。方法1：コネクタを挿入した後、0 m V の電圧下でDNAを添加した。電圧を切り換えると、DNAは、DNAの自由拡散及び印加電圧によりコネクタチャンネルに向かって移動した。方法2：コネクタを挿入する前に、チャンバ内でDNAとバッファとを予め十分混合した。DNAの移動は、印加電圧に主に依存していた。全ての実験は、特に規定のない限り、方法1を用いて実施した。

30

【0173】

< p h i 29 DNAパッケージングモータコネクタタンパク質の修飾>

一般的に、膜の細孔及びイオンチャンネルは、膜にタンパク質を固定する疎水性ドメインを含む。p h i 29コネクタの表面電荷の分析により、その中心表面領域が、それぞれ、幅広端及び幅狭端における2つ隣接層に比べて、僅かに疎水性を示すことが明らかになった (図1) (S i m p s o n e t a l . , 2001 A c t a C r y s . D 57 : 1260 - 69 ; G u a s c h e t a l . , 2002 J M o l B i o l 315 : 663 - 676) 。コネクタの精製を促進するために、C末端にH i s (H i s₆) 又はS t r e p - I I (W S H P Q F E K) タグを含む親和性 / アラインメントドメインを、親和性タグの可動性を改善するために6 - グリシンリンカーを含む可撓性ドメインのすぐ下流に挿入した。6 - グリシンリンカーを含むことにより、末端の可動性がもたらされた (図2) 。均質に精製した後、改変DNAパッケージングモータタンパク質コネクタポリペプチドであるG P 10は、透過電子顕微鏡 (T E M) により観察したとき (図1 D 及びE) 、12回折り畳まれた対称的な野生型コネクタと類似の形態を有するモータタンパク質コネクタドデカマー構造に自己集合することが見出された (図1 F) 。ネイティブ且つ標準のモータ構造の存在は、プロカブシドに組み込まれた後に二本鎖DNAをパッケージングする能力 (図3) 、及び得られるDNA充填カブシドを感染性p h i 29ピリオンに集合させる能力 (図4) により検証された。

40

50

【0174】

<コネクタのリボソームへの再構成>

例示的な浸透圧剤としてのスクロースの存在下においてコネクタと脂質とを共インキュベーションすることによる、コネクタをリボソームに再構成するための手順が開発された。このようなインキュベーションにより、コネクタの疎水性層が脂質分子の疎水性ドメインと相互作用する機会が与えられる。脱水-再水和法(Lasic, D. D., Liposomes in Gene Delivery, CRC Press LLC, (1997), Boca Raton, FL)は、直径 $50\mu\text{m}$ 以下の巨大リボソームの生成を導いた(図5)。コネクタタンパク質の脂質膜への挿入を、蛍光顕微鏡、濾過アッセイ、及び沈降分析により確認した(図5)。膜中におけるコネクタの存在は、蛍光顕微鏡で確認することができ、リボソーム周囲の明るい蛍光リングにより示される(図5)。前記蛍光リングは、蛍光脂質NBD-PEで作製されたりリボソーム(図5A)と外観が非常に類似していた。蛍光タグ付コネクタを、コネクタが挿入されていないリボソームと非特異的に混合したとき、蛍光リングは観察されなかった(図5)。孔径 $0.45\mu\text{m}$ の膜を用いて濾過することにより、又は5%~20%のスクロース勾配超遠心分離により(図5)、遊離コネクタを除去した。

10

【0175】

<コネクタの平面脂質膜への組み込み>

上記実験では、二重層表面に対する緩いコネクタの付着と、二重層に組み込まれたときのその開孔部の保持を介してチャネルを形成するための二重層膜に対するコネクタのきつい組み込みとを区別することができなかったので、単一チャネルコンダクタンスアッセイを実施した。結果は、コネクタタンパク質とリボソーム、又はコネクタタンパク質と平面脂質二重層との直接インキュベーションは、二重層膜におけるチャネル形成を導かないことを示した(図6A)。二重層へのコネクタ挿入は、コネクタタンパク質で再構成されたプロテオリボソームが二重層に融合したときにのみ生じた(図6B及びC)。膜貫通正電圧又は負電圧下で、連続電流トレースに示されるように、コンダクタンスの不連続な段階的上昇を通してチャネル挿入が観察された(図6)。

20

【0176】

典型的には、1つのコネクタが二重層に挿入されると、5mMのTris(pH7.9)/0.5MのNaCl溶液の存在下で-40mVの電位にて約65pA(1.6nSに等しい)の電流増加が生じた。時に、2つのコネクタの膜挿入に起因する130.9pAのジャンプも見られた(図6D)。TMS/1M NaCl中でチャネルのコンダクタンスを測定したときも同様の結果が得られた(図7)。この場合、2つのコネクタ及び3つのコネクタの同時挿入は、それぞれ、4.7%及び1.9%発生した。

30

【0177】

コンダクタンス測定については、異なる電圧下でI-V曲線のプロットを得た(図6E)。1つの細孔当たりの平均コンダクタンスは、5mMのTris/0.5MのNaCl中 $1.57 \pm 0.16\text{ nS}$ /細孔(合計38個のコネクタが挿入)(図6E)、及びTMS/1MのNaClバッファ中 $3.21 \pm 0.51\text{ nS}$ /細孔(合計213個のコネクタが挿入)であった(図7)。比較として、ランプ電圧下のコネクタチャネルについてもコンダクタンス測定を実施した(図6F及びG)。5mMのTris/0.5MのNaCl中に形成されるチャネルのコンダクタンスを表す近似曲線の傾斜は、それぞれ、 1.59 nS /細孔1個、 3.40 nS /細孔2個、及び 4.98 nS /細孔3個であった。NaCl濃度を1Mに上昇させたとき(1MのNaClを含むTMSバッファ)、曲線の傾斜は、 3.12 nS /細孔1個であった。5mMのHEPES/1MのKClのバッファも、コンダクタンス測定のために用いた(表1)。

40

【0178】

【表 1】

GP-10コネクタ(phi29モータタンパク質コネクタ)及び α -ヘモリシンの単一チャンネルコンダクタンスの比較

タンパク質	孔径(nm)	断面積(nm ²)	コンダクタンス(nS/細孔) ^a	
			0.5M NaCl	1M KCl
コネクタ	3.6	10.2	1.57±0.16	4.84±0.15
α -HL	1.5 ³⁰	1.8	0.31±0.05 ^b	0.94±0.01 ^c
比	2.4	5.7	5.1	5.1

(コネクタ/ α -HL)

^a0.5MのNaCl及び1MのKClにおけるコネクタコンダクタンスのデータは、それぞれ合計38個及び36個の挿入から得た。0.5MのNaCl及び1MのKClにおける α -HLコンダクタンスのデータは、それぞれ合計4個の挿入から得た。

^b1M NaClにおける α -HLのコンダクタンスは、0.68nS/細孔であると報告されている。
(Braha et al., 1997 Chem. Biol. 4:497)

^c1MのKClにおける α -HLのコンダクタンスは、0.80nS/細孔(Wong et al., 2006 Nanotechnol. 17:3710)
又は1.0nS/細孔(Vercoutere et al., 2001 Nat Biotechnol. 19:248)であると報告されている。

【0179】

異なるイオン強度の溶液を用いて、コネクタのチャンネルコンダクタンスを黄色ブドウ球菌 α -ヘモリシン(α -HL)と比較した(表1)。コネクタチャンネルの幅狭端の直径は、3.6nmであり、一方、 α -HLにより形成されるチャンネルの直径は、僅か1.5nmであることが報告されている(Song et al., 1996 Science 274:1859)。したがって、コネクタと α -HLとのチャンネルの断面積比は、5.7であった。コネクタと α -HLとの測定されたコンダクタンス比は、5.1であった(表1)。

【0180】

チャンネルのコンダクタンスは、その断面積に比例するので、バッファ溶液中でウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタにより形成される開孔部の断面積は、 α -HLよりも約5.1倍大きいと結論付けることができ、これは両方のタンパク質の結晶データから得られる断面積の比を用いて十分比較した。更に、他の膜貫通タンパク質、又は大きなチャンネルを有するイオンチャンネルタンパク質、例えば、ストレプトリジン(Gilbert et al., 1999 Cell 97:647)、Kir(Lopatkin et al., 1996 Biophys J 71:682)、VDAC(Szabo et al., 1998 FASEB J 12:495)、及び細菌のポーリン(Iqbal et al., 2007 Nat. Nanotechnol. 2:243)と比較して、前記コネクタチャンネルは、更なる利点を有していた。例えば、ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタチャンネルは安定であり、既に報告されている膜貫通チャンネルとは異なり、報告されている条件下で電圧ゲーティングを示さなかった。チャンネルコンダクタンスは、均一であり、これは-100mV~100mVで印加電圧に直線的に応答することを示す(図6F及びG)。

【0181】

<二本鎖DNAの移動>

直線状及び環状プラスミドC x 43のDNA(5.5kb)の両方を用いて、ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタチャンネルにより形成される開孔部を通過するdsDNAの移動について調べた。直線状DNAプラスミドの場合、DNAの移動は、1個のコネクタ挿入の電流ジャンプを一過的に25%~45%減少させる、多くの電流遮断を誘導した(図8)。35bpのdsDNAの移動実験でも類似の結果が見られた(図9)。しかし、直線状C x 43をシスチャンバに添加したとき、電圧を正電位に切り換えるまでかかる遮断は見られなかった(図6G)。短時間の遮断は、DNA移動の発生に起因していた可能性がある。対照的に、DNAが存在しないとき、電流トレースは静止状態であった(図8、9)。時に、検出可能な最短時間、非特異的な遮断が観察された。これら非特異的な遮断は、DNA移動事象に比べて稀にしか生じなかった。それらは、通常、サンプリング周波数の限界に極めて近い検出可能な時間を特徴としていた(図8B及び図6G)。環状プラスミドdsDNA C x 43を用いたとき、環状プラスミドの移動は観

10

20

30

40

50

察されなかった（図 8、左上）。興味深いことに、DNase I で分解した環状プラスミドを同量チャンバに添加したとき、一過的な遮断が突如生じた（図 8 B、左下）。DNase I で分解した直線状 C x 4 3 を用いたときも同様の結果が観察された（図 8 B、右下）。上記結果は全て、直線状 dsDNA のみがコネクタチャンネルを通過することを確認した。

【0182】

時に、数ミリ秒～数百ミリ秒の持続時間の遮断事象が、5%～15%の範囲で観察された（図 8 C、右）。これら事象は、DNA が存在しないときに生じることが見出されているので、DNA の移動以外の非特異的な遮断に起因していた（図 9 B）。更にリボソームをチャンバに添加した後、前記非特異的な遮断事象が増加するので、前記非特異的な遮断事象は、ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタ開孔部（伝導性チャンネル）と脂質又は脂質ミセルとの相互作用に起因していた可能性がある。前記非特異的な遮断の発生は、希釈したコネクタで再構成されたリボソームを用いたとき、及び/又は低い膜貫通電圧を印加したときに最低限に抑えることができた（図 8 C、左）。興味深いことに、時に、複数の遮断事象が同時に検出されることがあった（図 8 B、右上、及び図 9）。これら事象を、複数の細孔条件下で記録した。DNA 添加前後の事象を記録した連続電流トレースも示した（図 9 B）。あるとき、3 番目のウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの挿入後に、突如 DNA 遮断が観察された。それに比べて、コネクタ挿入前に DNA を予めバッファと混合したとき、最初の挿入が生じた直後に DNA の遮断が観察された（図 9 A）。この結果は、DNA チャンバ内に攪拌設備を備えていないと、DNA 移動を遅延させることを示した。

【0183】

遮断速度は、DNA 濃度及び膜貫通電圧という 2 つの要因に影響を受けていた。3 つのウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタが挿入されている 45 pM の DNA の存在下では、遮断速度は、約 0.8 遮断/秒～約 1 遮断/秒であった（図 8 B、右上）。同数のウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタが挿入されているとき、4 pM の DNA をチャンバ内に入れた場合、遮断速度は約 5 遮断/秒～約 5.8 遮断/秒であった（図 9 A 及び B）。直線状 C x 4 3 DNA では、ランプ電圧が印加されるにつれて、遮断速度が増加した（図 6 G）。

【0184】

DNA 移動事象の持続時間 (τ_p) を算出するために、32% 超の遮断エピソードを分類した、その理由は、この遮断割合が dsDNA と細孔との断面積比に一致していると思われるためである。これら事象のヒストグラムは、図 8 D に見られる。また、120 ms～9,800 ms に分布する 6 個（-75 mV 下）及び 20 個（-40 mV 下）の個々の中心から離れている事象は、明瞭にするためにグラフに含めなかったことに留意すべきである。-40 mV における持続時間分布は、-75 mV よりも広いように見える。-75 mV 及び -40 mV における DNA 遮断の平均持続時間は、それぞれ 9.2 ms 及び 22.1 ms であった（-40 mV 下では 50 ms 未満の事象のみを計算に用いた）。比較として、35 bp の dsDNA の持続時間の分布も含めた（図 10）。この場合の持続時間の平均は、0.53 ms であった。したがって、DNA 移動の持続時間は、印加電圧及び DNA の大きさに影響を受けると結論付けることができた。

【0185】

ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタにより形成されて伝導性チャンネルを作製する開孔部の dsDNA の通過を検証するために、定量 PCR (Q-PCR) を用いて、一定電圧下で 141 bp の DNA の移動を定量した。DNA をトランス側に添加し、30 分間隔で定量的のためにシス側からサンプルを採取した。比較のために、ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの欠如下で対照実験を行った（図 11）。二重層脂質膜 (BLM) へのコネクタの挿入実験は、シスチャンバ内における DNA 分子数の経時的な増加を示した (N = 9 の実験)。対照的に、コネクタの欠如下では、シスチャンバ内の DNA 分子数は、90 分間の時間経過中検出不可能なままであった (N

= 4 の実験)。更に、DNA 移動速度は、挿入されたウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタ数に影響を受けていた(図 12)。

【0186】

シスチャンバ内の DNA コピー数の増加が、膜から漏出しているのではなく、ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの開孔部により形成された伝導性チャネルを DNA が通過したことによるものであることを立証するために、BLM 又は仕切りの既知の漏出条件下で、3 つの更なる実験を実施した。漏出が生じていたとき、シスチャンバ内の溶液 1 μ L 当たりの DNA コピー数は、漏出の生じていなかった実験よりも約 10^4 倍 ~ 約 10^5 倍多かった(図 12B)。

【0187】

10

(実施例 3 : 核酸移動のための ds DNA ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの再改変)

二本鎖 DNA ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの孔径及びコンダクタンスは、改変を通して調節されて、全て上に記載の通り、開孔部の寸法、表面のヒドロパシープロファイル、可撓性ドメインの移動の自由度、及び / 又は親和性 / アラインメントドメインと膜二重層との相互作用、並びに特定の親和性結合部位の性質を変化させる。膜層に組み込まれて伝導性チャネルを形成しているときの修飾コネクタの電気生理学的、化学的、及び機械的性質を、イオン強度、pH、及び温度等の異なる条件下で特性評価する。DNA を指向性膜貫通輸送するためのコネクタチャネルの配向は、本明細書に記載されるように決定され、縮合 ds DNA の巨大リボソームへのロードは、膜貫通電位印加下で実施される。核酸のリボソーム内腔への一方向性膜貫通移動は、インビトロ及び / 又はインビボにおけるレシピエント細胞への遺伝情報の送達に先行し、また、リボソーム又は膜結合バイオリアクタの作製にも先行する。

20

【0188】

(実施例 4 : 単一分子分析においてアナライトの捕捉及びフィンガープリンティングを組み合わせるための統計的センシング装置としての、膜に組み込まれた修飾ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタ伝導性チャネル)

His タグ / 抗 His タグ抗体、Strept タグ / ストレプトアビジン、ビオチン / ストレプトアビジン、Strept タグ / 抗 Strept 抗体、及び His タグ / ニッケル NTA の対は、膜に組み込まれた修飾 ds DNA ウイルス DNA パッケージングモータタンパク質コネクタ膜貫通開孔部の、伝導性チャネルに基づく単一分子検出器としての有用性を示すためのモデル系として用いられる。コネクタは、N 末端及び / 又は C 末端で、単鎖抗体である親和性 / アラインメントドメインと、又はファージディスプレイにおける同定後所望の親和性結合特異性を有するペプチドと、又は RNA アプタマーと融合することにより修飾され、且つアナライト捕捉(即ち、特定のアナライトが結合したときのコンダクタンスの検出可能な変化)及びアナライトのフィンガープリンティング(即ち、試験アナライトの特性評価をするために、既知のアナライトのレファレンスコンダクタンスプロファイルと比較される、既定の条件下で且つ複数の時点に亘って試験アナライトに応答して変化したコンダクタンスのコンダクタンスプロファイルの振幅及び / 又は持続時間依存性作成)の両方が可能であるように上記の通り設計される。捕捉によるアナライト検出、及びフィンガープリンティングによるアナライトの特性評価の組み合わせにより、非常に低濃度で分子を同定するための感度向上(即ち、捕捉機能のみが存在する場合の能力よりも、統計的に有意に高い検出及び / 又は特性評価能力)が得られる。アナライトの検出及び特性評価は、診断目的のために疾患の初期段階で行われ、アナライトの環境サーベイランスの感度が強化される。

30

40

【0189】

(実施例 5 : 二本鎖 DNA のセンシング及びフィンガープリンティング)

膜貫通伝導性チャネルを形成可能な DNA パッケージングモータタンパク質コネクタの様々な可撓性ドメイン及び / 又は親和性 / アラインメントドメインを提供して、アナライトの検出及び特性評価の感度及び分解能を高めるためにチャネルの性質を調整する修飾を

50

含む、ポリペプチド配列、寸法、ヒドロパシー、荷電性、伝導性、開孔部ドメイン（内腔）並びに／又はN末端及びC末端の少なくともいずれかの溶媒接近性に影響を与える様々な突然変異をポリペプチド配列中に生じさせる。変化したコンダクタンスの振幅及び持続時間の複数の時点に亘るプロファイル等のコンダクタンスプロファイルの作成を含むコンダクタンス測定を通して、幾つかの種類及び形状の核酸ポリマーの移動を特性評価する。癌細胞に由来するDNAと伝導性チャネル含有膜とを接触させることによる、癌細胞におけるDNA不一致突然変異の検出について試験する。DNAの移動速度を低下させるための手順は、アッセイ条件（例えば、温度、pH、イオン条件、印加電位の振幅）を変動させ、且つ修飾DNAパッケージングモータコネクタ組成物を変化させることにより開発される。制御されている方法でチャネル修飾化学物質により伝導性チャネルを誘導体化して、dsDNAの膜貫通（移動）を緩徐にし、コンダクタンスプロファイルを作成することにより単一ヌクレオチドを高精度で認識する。伝導性チャネル含有膜は、ハイスループットdsDNAシーケンシング装置に組み込まれる。

【0190】

（実施例6：アナライトとしてのイオン）

二重層膜（BLM）中の単一修飾ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタのコンダクタンスは、塩濃度の上昇と共に強固な直線関係で増加した（図13）。更に、BLM中のコネクタのコンダクタンスは、イオン依存性であると思われ、同濃度の塩を用いた場合、KCl中のコンダクタンスは、NaCl中のコンダクタンスよりも高い（図13B及びC）。BLM中のコネクタチャネルのかかる性質により、バッファ濃度を試験し、イオン種を区別し、そしてコンダクタンスを調整することが可能になる。

【0191】

（実施例7：アナライトとしてのDNA）

直線状及び環状プラスミドdsDNA（5.5kb）を両方用いて、実施例1及び2にも上記したように、膜に組み込まれた修飾ウイルスDNAパッケージングモータタンパク質コネクタにより形成される伝導性チャネルを通過するdsDNAの移動について調べた。直線状DNAの移動は、約30%、多数の電流遮断を誘導した（図8）。環状dsDNAを用いたとき、移動は見られなかった（図8）。しかし、DNase Iで分解した後、直線状及び環状プラスミドDNAの両方で、突如一過的な遮断が生じた（図8C及びD）。この結果は、直線状dsDNAのみがコネクタチャネルを通過するが、環状DNAは通過しないことを示した。DNAの移動は、SYBRグリーンキットを用いて細孔を通過したDNAサンプルを定量PCRすることにより確認された（図14）。

【0192】

BLM中の伝導性チャネルコネクタ開孔部は、その特徴的な持続時間に基づいて直線状dsDNAの大きさを区別し、また、直線状dsDNAと折り畳まれたdsDNAとを区別した。5kbpのdsDNAが印加電位下で伝導性チャネルを通過して移動したとき、異なる種類の電流遮断事象が見られた（図15）。1Mのイオン強度の存在下におけるdsDNAの持続長は、~150bpであり（Baumann et al., 1997 Proc. Nat. Acad. Sci USA 94:6185）、合成ナノ細孔を通過するDNAの移動が観察されている（Storm et al., 2005 Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 71(5 Pt 1):51903; Chen et al., 2004 Nano Lett. 4:2293）。単一移動事象（単一直線状事象I型、II型、及びIII型）から生じる電流遮断の不連続レベルにより、本明細書に記載される修飾phi29DNAパッケージングモータタンパク質コネクタチャネルについても類似の観察結果が示された（図15）。二重（及び三重）の事象は、同時に2つ（及び3つ）のチャネルを通過する2つ（及び3つ）のDNA分子の移動に起因していた（図15D）。アナライトとして500bpのdsDNAを用いた場合も同様の事象が観察された。

【0193】

BLM中の修飾phi29DNAパッケージングモータタンパク質コネクタチャネルを

通過する一方通行の（一方向性）DNA移動が見られた。シス及びトランスチャンバの両方において予め混合されたDNAとともに、単一修飾DNAパッケージングモータタンパク質コネクタをBLMに挿入した。印加電圧を正電位と負電位との間で変化させたとき、DNA移動は、図16に示すように一方向（正方向のみ又は負方向のみ）でのみ観察可能であった。非限定的理論によれば、DNAは、コネクタによって形成された伝導性チャネル開孔部を一方向にのみ通過できると思われ、この解釈は、複数のコネクタ挿入を用いて実施されたdsDNA移動実験の結果と一致していた（図17）。

【0194】

修飾phi29DNAパッケージングモータタンパク質コネクタチャンネルのアミノ酸配列を更に改変することにより、チャンネルのコンダクタンスが変化した。コネクタチャンネル（開孔部）内部の234位のリジンをシステイン（K234C）[配列番号42]又はアラニン（K234A）[配列番号41]に置換したとき、BLMに挿入された単一修飾コネクタにより誘導された電流ジャンプは、野生型コネクタよりも小さかった（図18）。

10

【0195】

（実施例8：アナライトとしての特異的に結合するポリペプチド（抗体））

この実施例は、本明細書に記載される修飾DNAパッケージングモータタンパク質コネクタの親和性/アラインメントドメインとの相互作用後に特異的に捕捉されるポリペプチドアナライト分子（抗体）のコンダクタンスプロファイル「フィンガープリント」の作成について記載する。

20

【0196】

phi29DNAパッケージングモータタンパク質コネクタを、そのC末端における親和性/アラインメントドメインとしてHis₆-タグで上記のように再修飾した。再修飾されたコネクタは、BLMに挿入され、本質的に上に記載したようなアッセイ条件下で、印加電位下にて典型的な電流ジャンプを示した。特異的な抗Hisタグ抗体をサンプルチャンバに添加したとき、電流の段階的増加が見られ、各小さな段階は、単一コネクタ細孔の合計電流ジャンプの約20%であった（図19）。電流ジャンプの段階的減少は、ドデカマーコネクタの12個のHisタグ各々に1個の抗体分子が連続的に結合したことに起因しており、この連続的結合は、伝導性チャネルを形成する開孔部全体の大きさを減少させた。（i）この種の抗体-抗原特異的結合相互作用を用いたアナライトの捕捉と、（ii）アナライトに特徴的なコンダクタンスプロファイル（例えば、図19に示されるような遮断パターン）を作成することによるアナライトの「フィンガープリンティング」との組み合わせにより単一分子を同定するために、このアプローチが考えられる。

30

【0197】

上記様々な実施形態を組み合わせ、更なる実施形態を提供することができる。本明細書で参照される及び/又は出願データに記載される全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許文献は、全体を参照することにより本明細書に援用する。様々な特許、出願、及び刊行物の概念を使用して更なる実施形態を提供する必要がある場合、実施形態の態様を変更してもよい。

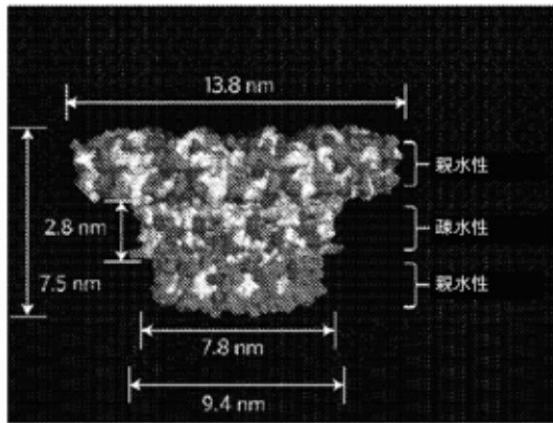
【0198】

これら及び他の変更は、上記明細書を考慮して実施形態に対して行うことができる。一般に、以下の特許請求の範囲において、用いられる用語は、明細書及び特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に特許請求の範囲を限定すると解釈されるべきではなく、かかる特許請求の範囲が題された等価物の全ての範囲と共に全ての可能な実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は本開示によって限定されない。

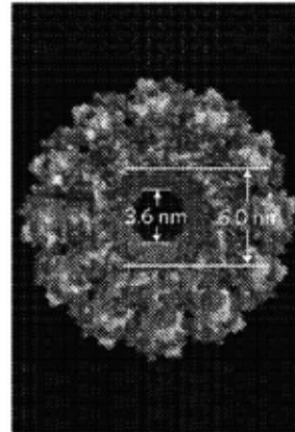
40

【図 1】

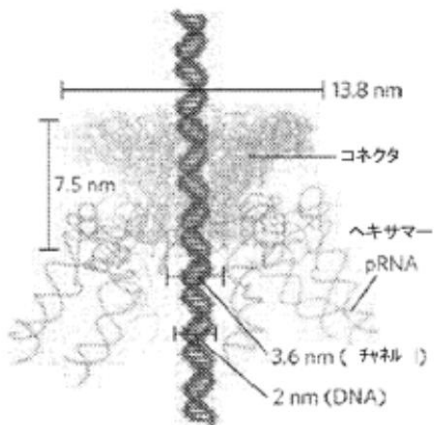
(A)



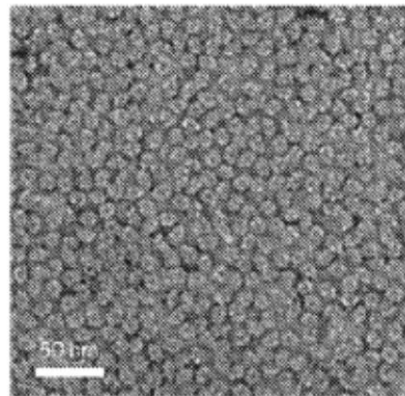
(B)



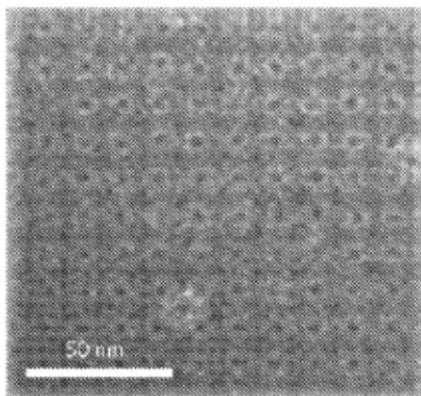
(C)



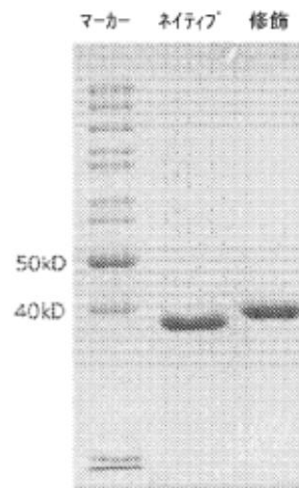
(D)



(E)

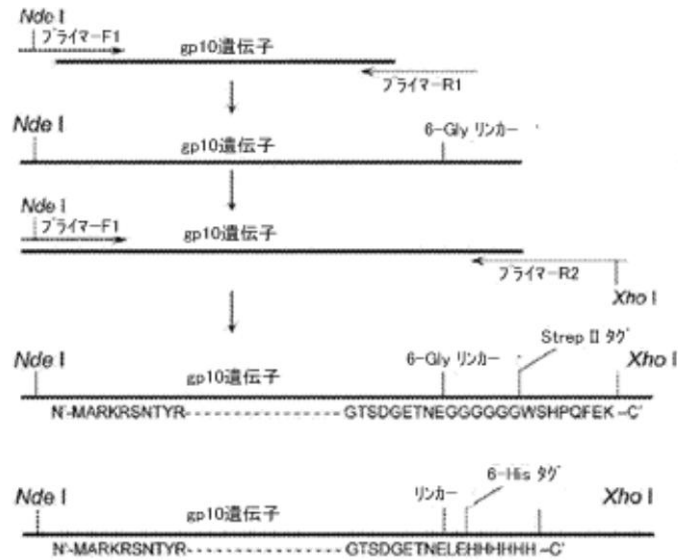


(F)

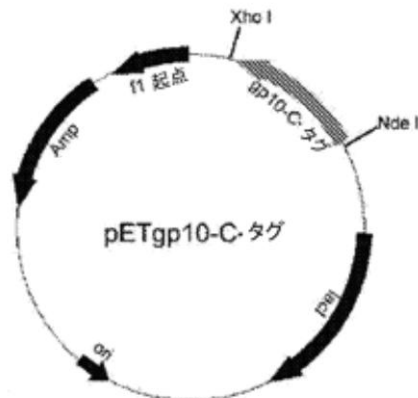


【図 2】

(A)



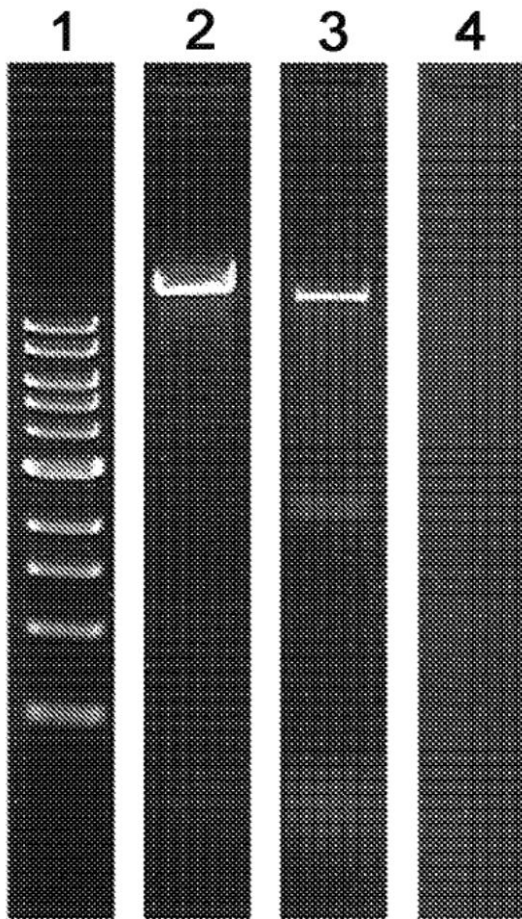
(B)



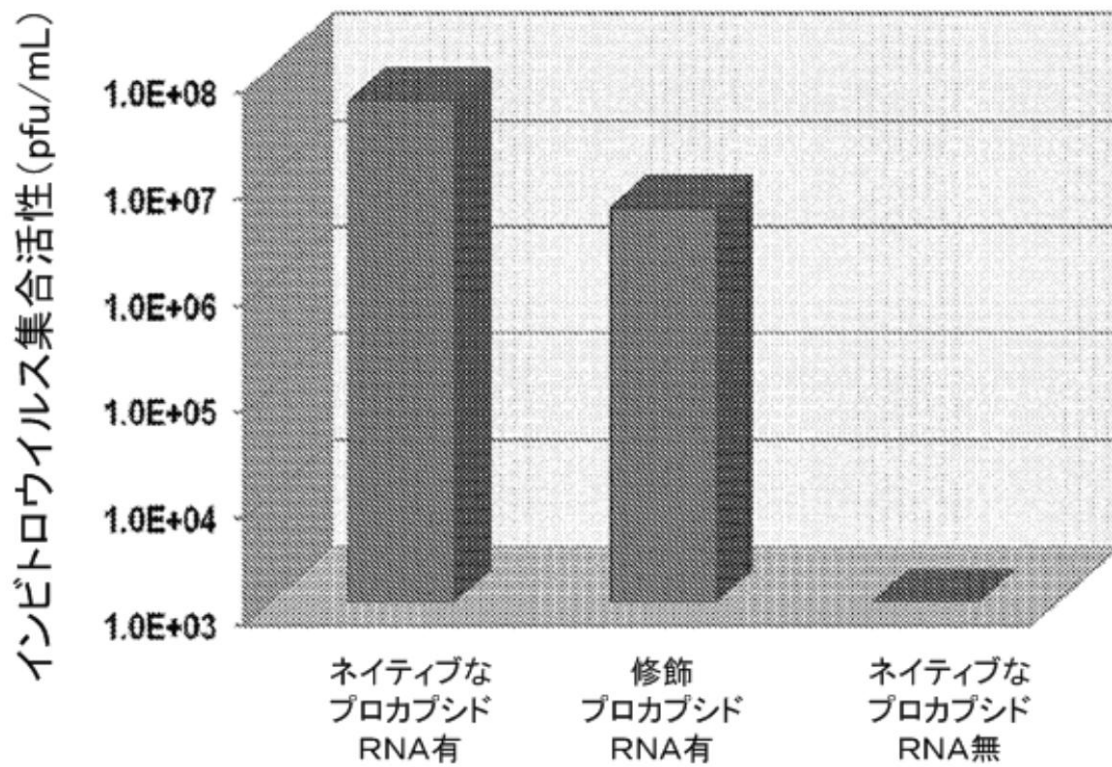
(C)

プライマー	配列 (5' - 3')
F1	CGCAGCTGGCATATGGCACGTAAACGCAGTAAC
R1	GGATGACTCCAACCTCCTCCACCACCTCCCTCATTTGTTTCACCGT
R2	ATAATGTTCTCGAGCTACTTTTCGAACTGCGGATGACTCCAACCTC

【図 3】

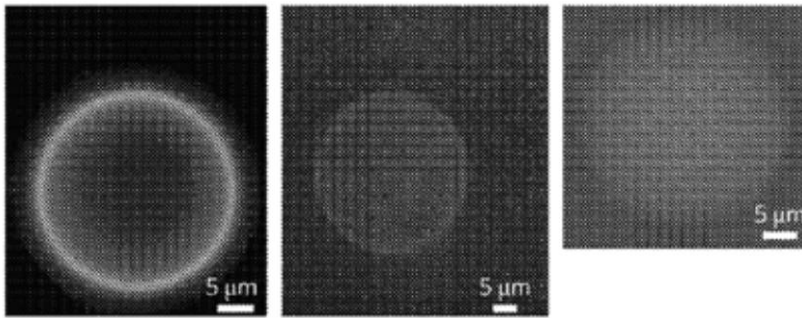


【図 4】

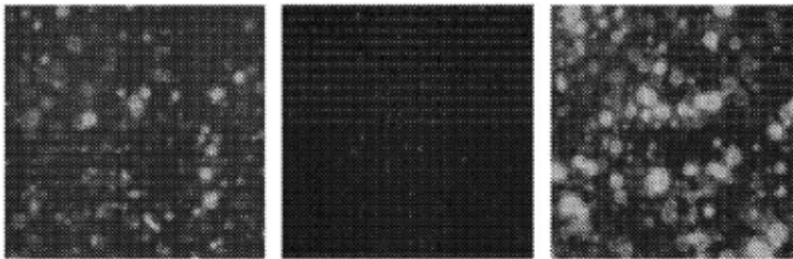


【図 5】

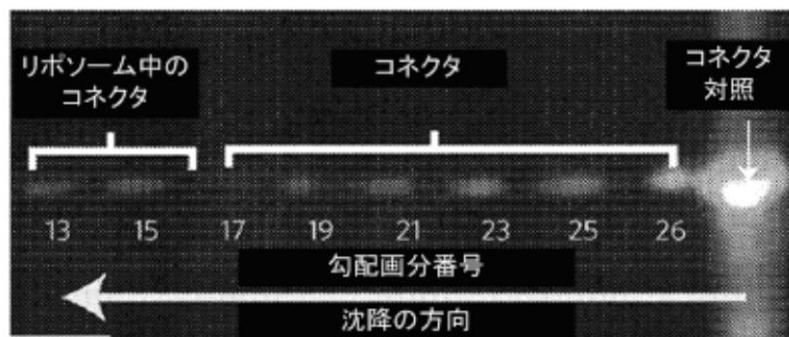
(A)



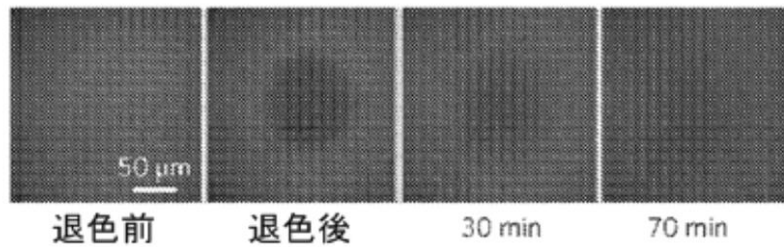
(B)



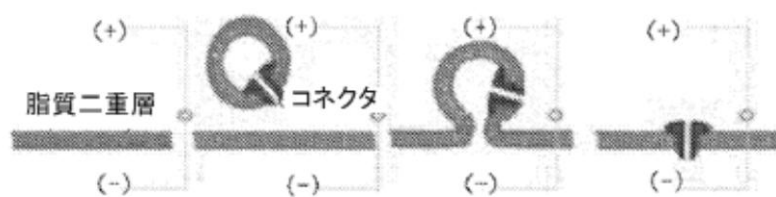
(C)



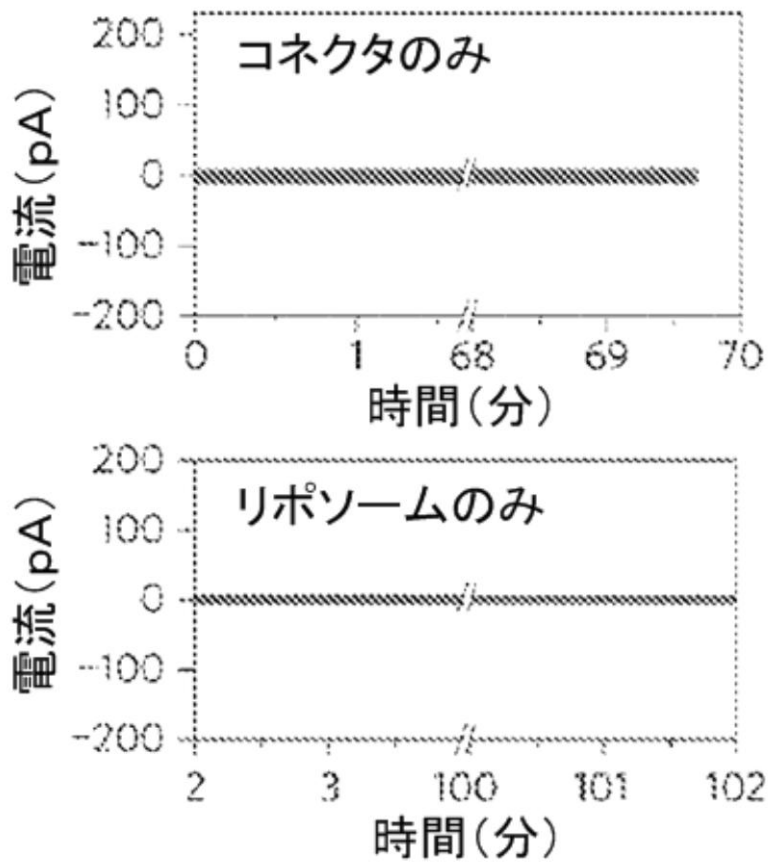
(D)



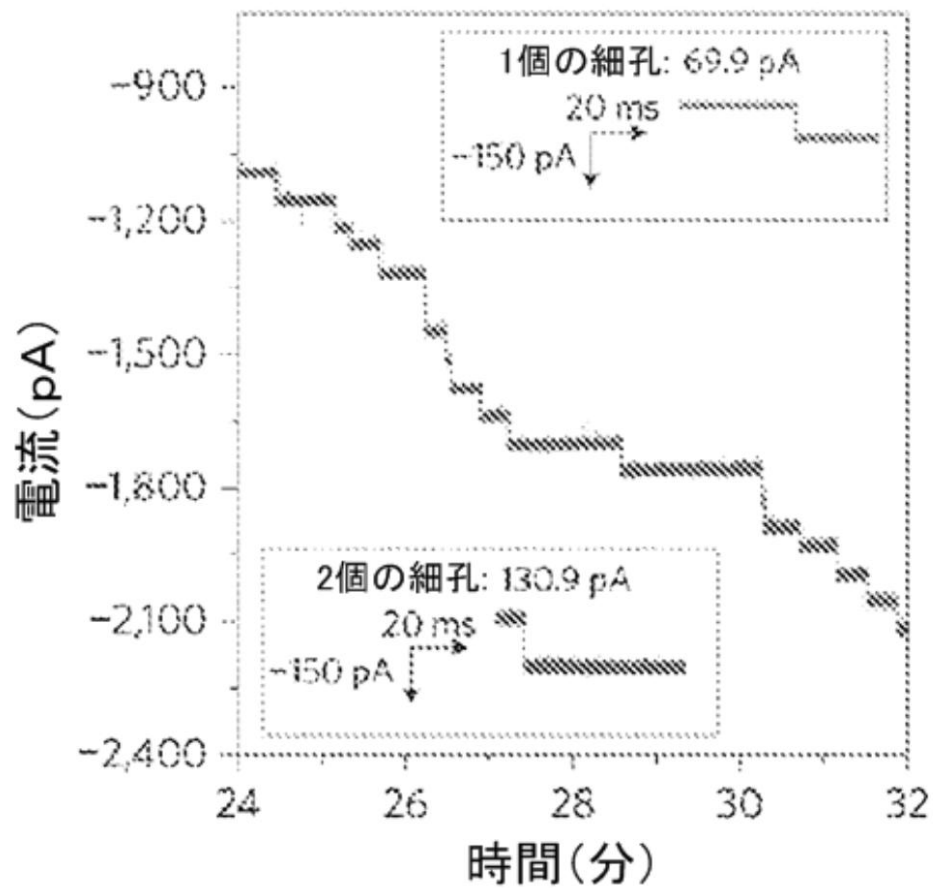
(E)



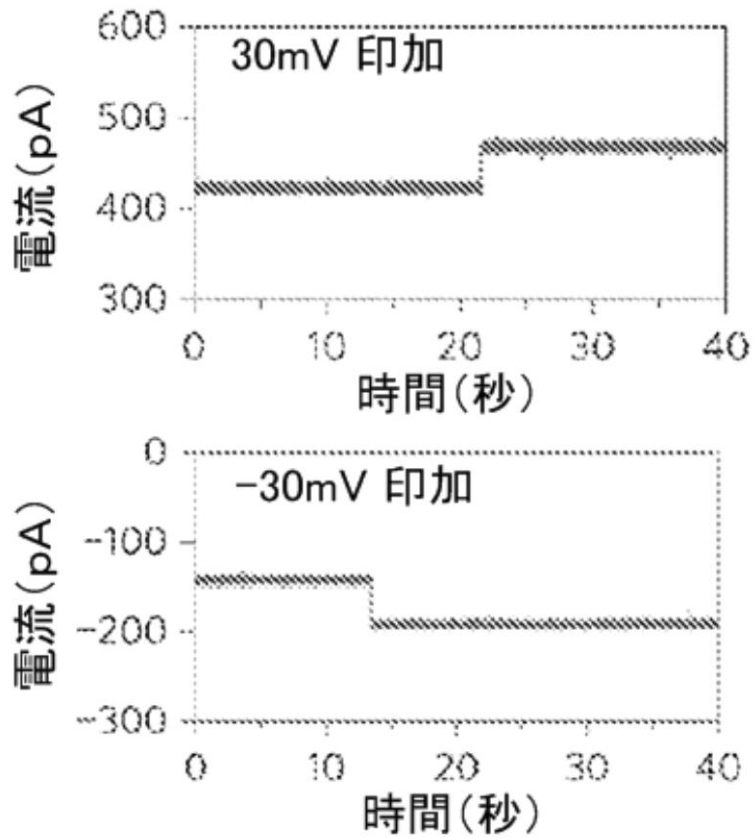
【図 6 A】



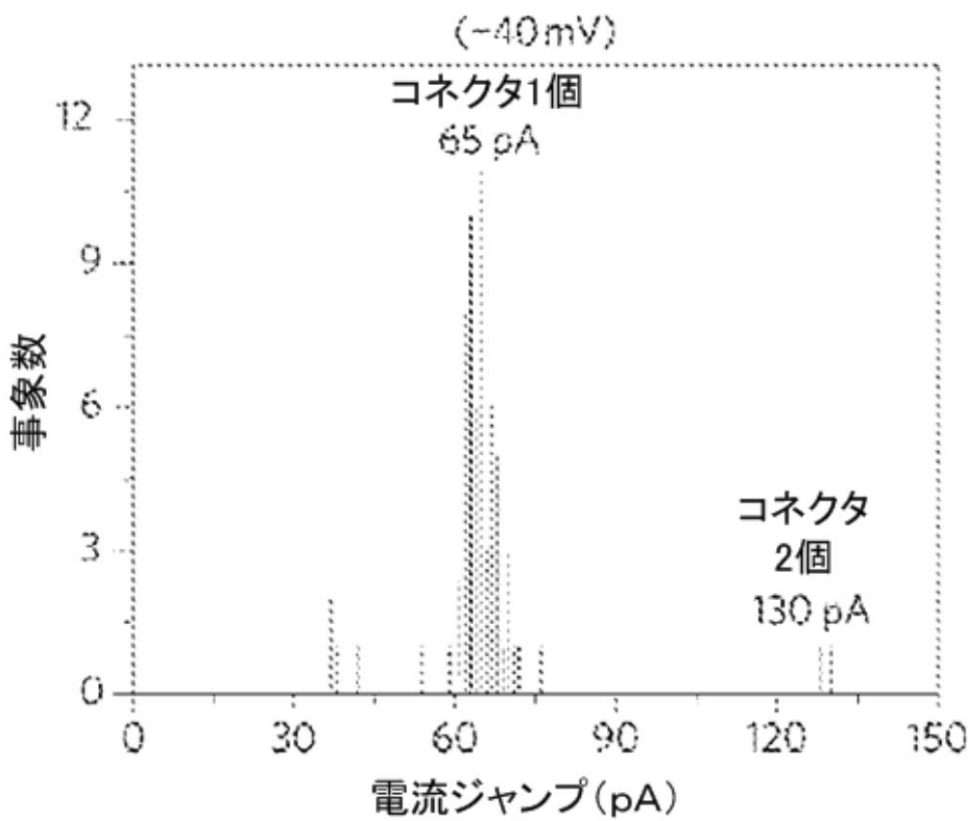
【図 6 B】



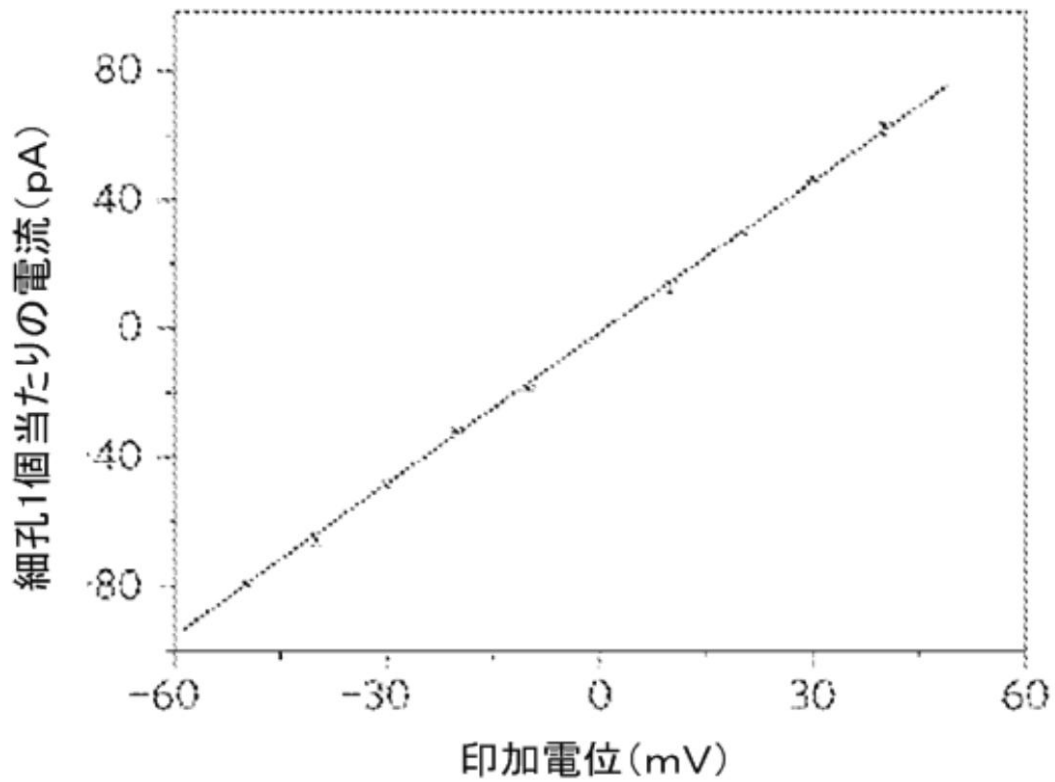
【図 6 C】



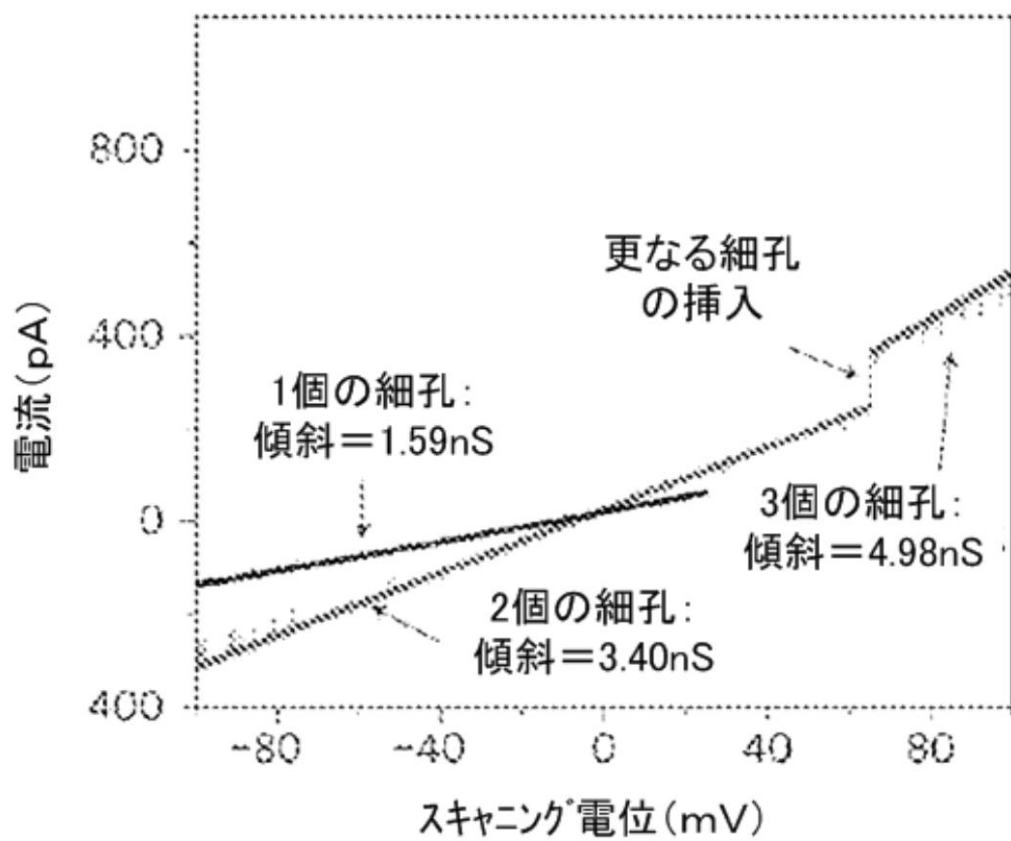
【図 6 D】



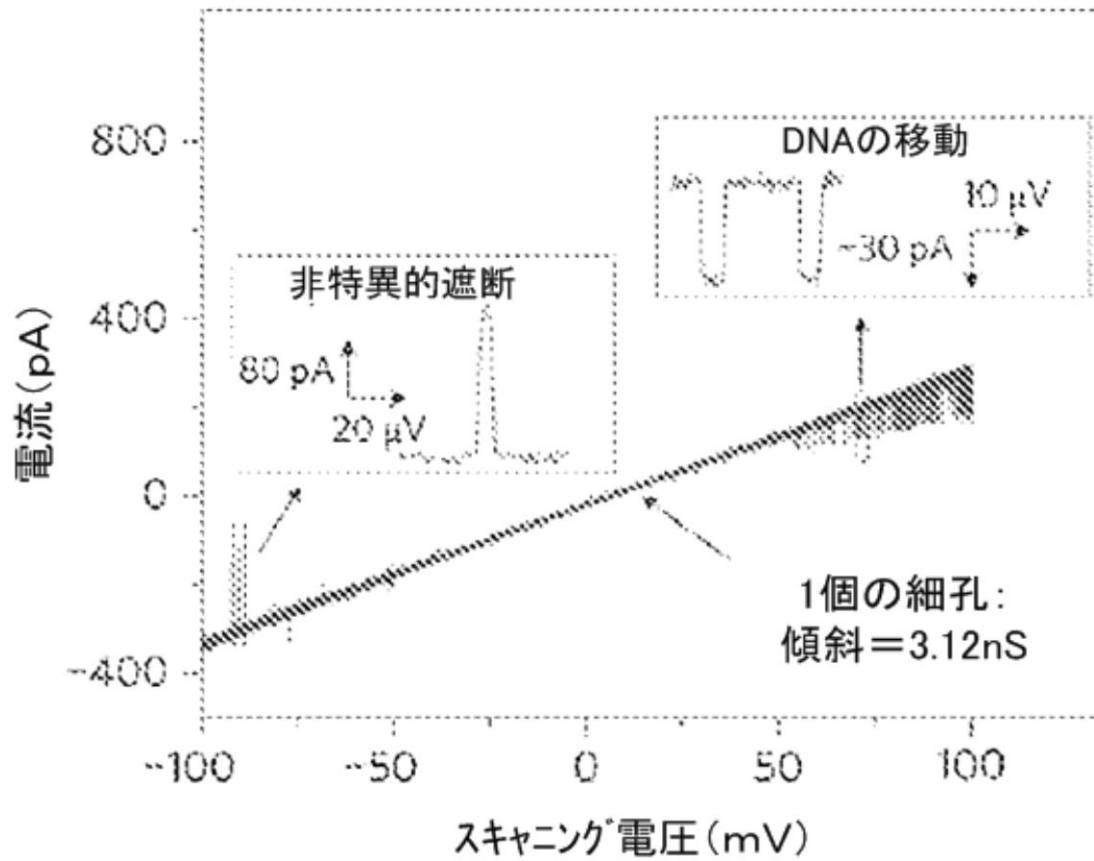
【図 6 E】



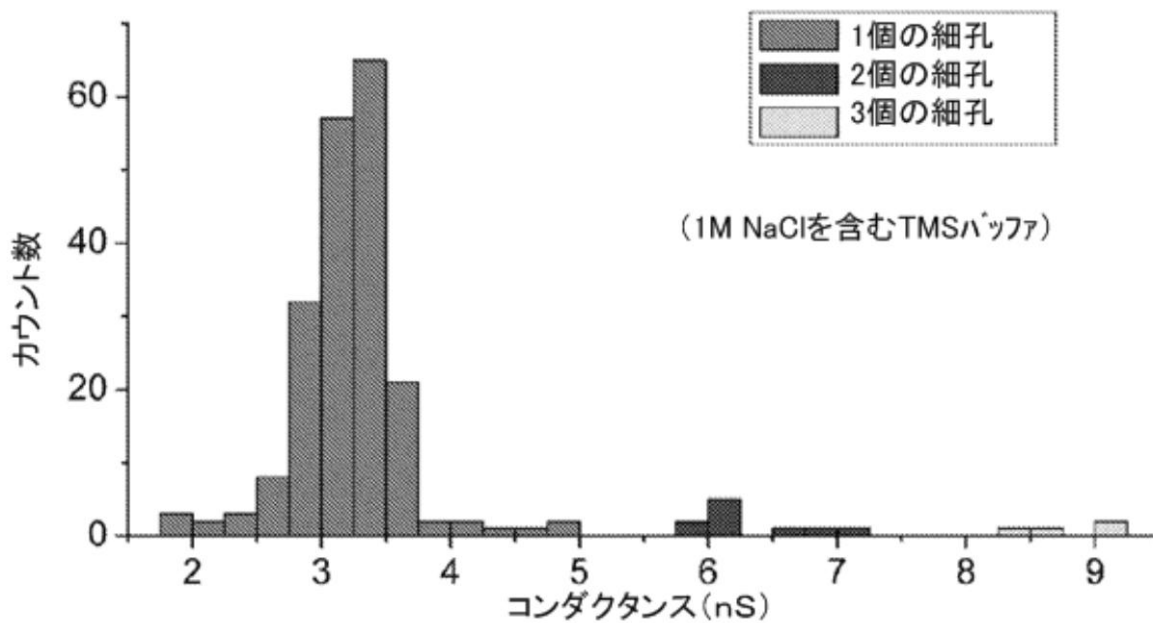
【図 6 F】



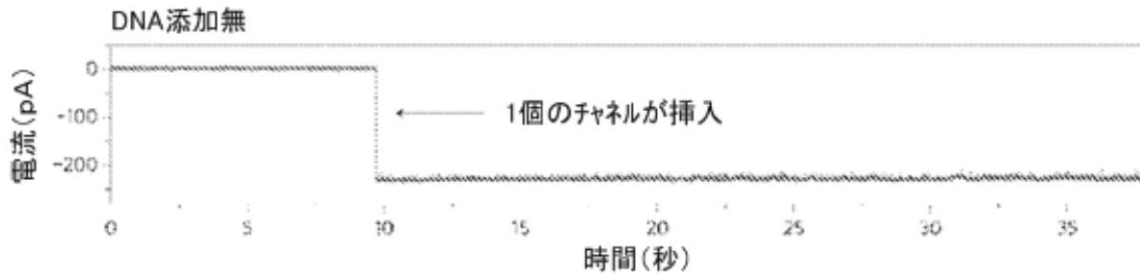
【図 6 G】



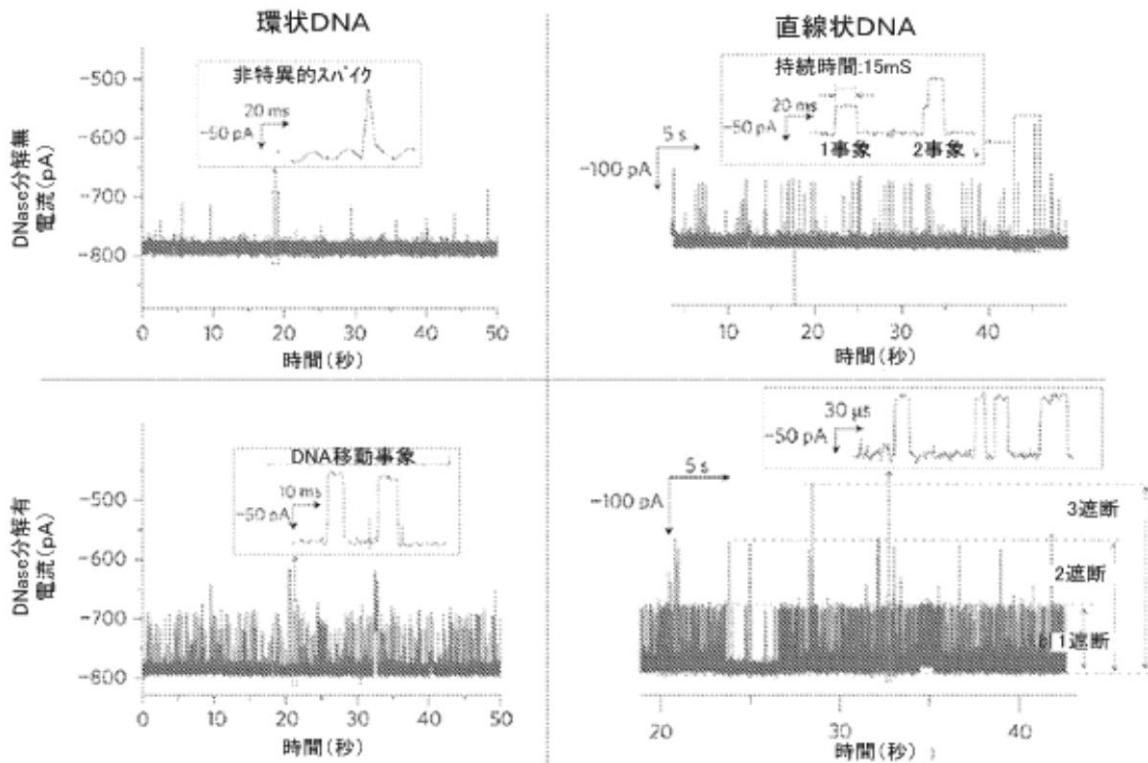
【図 7】



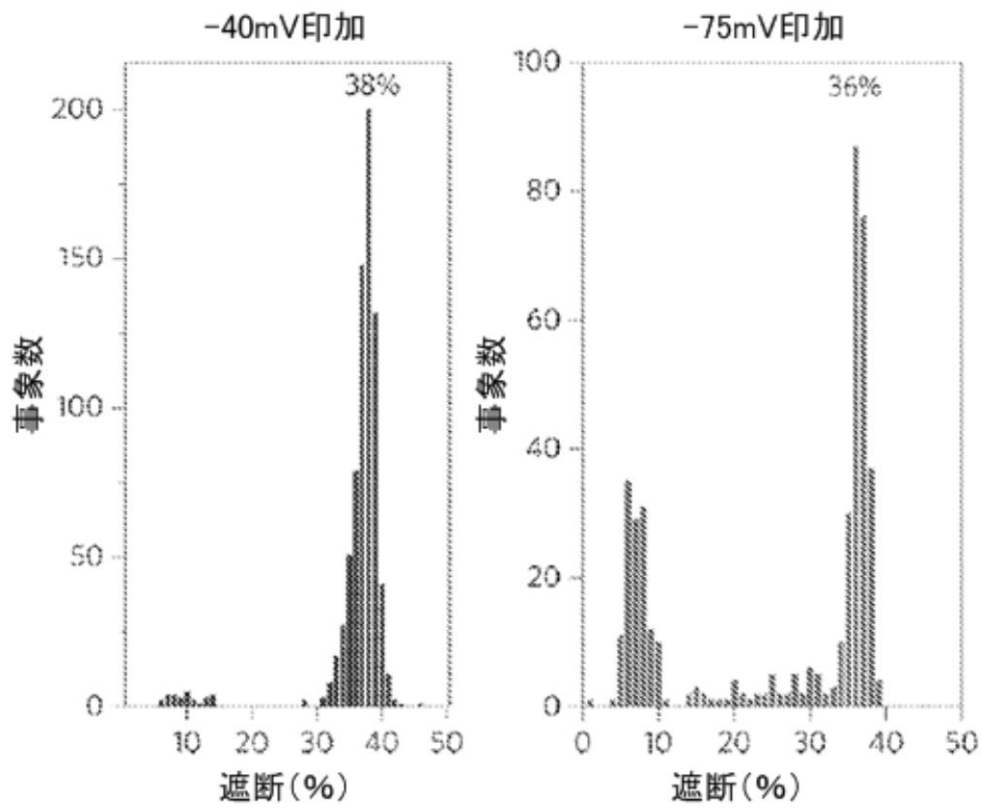
【図 8 A】



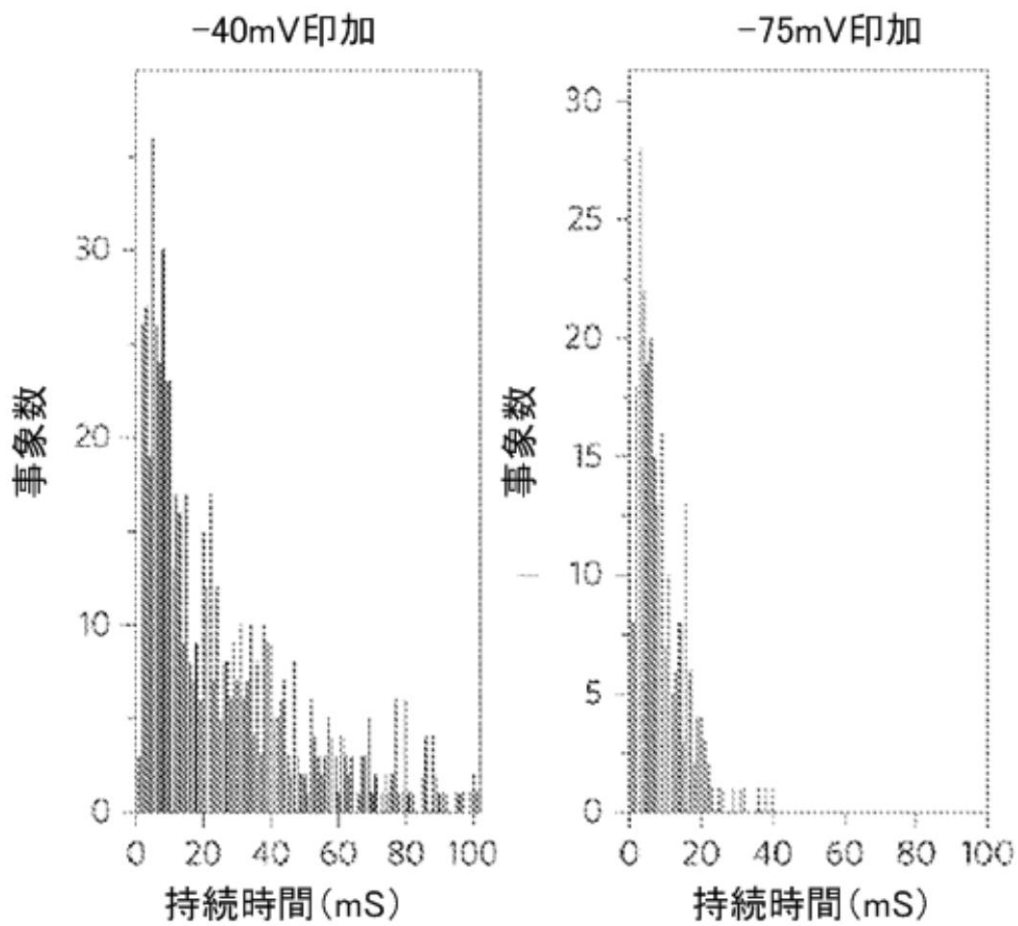
【図 8 B】



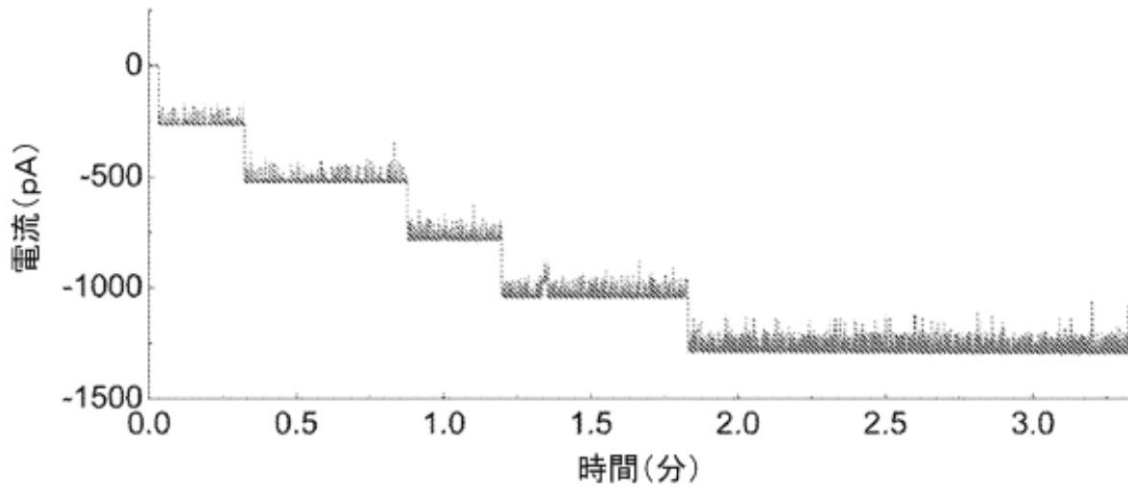
【図 8 C】



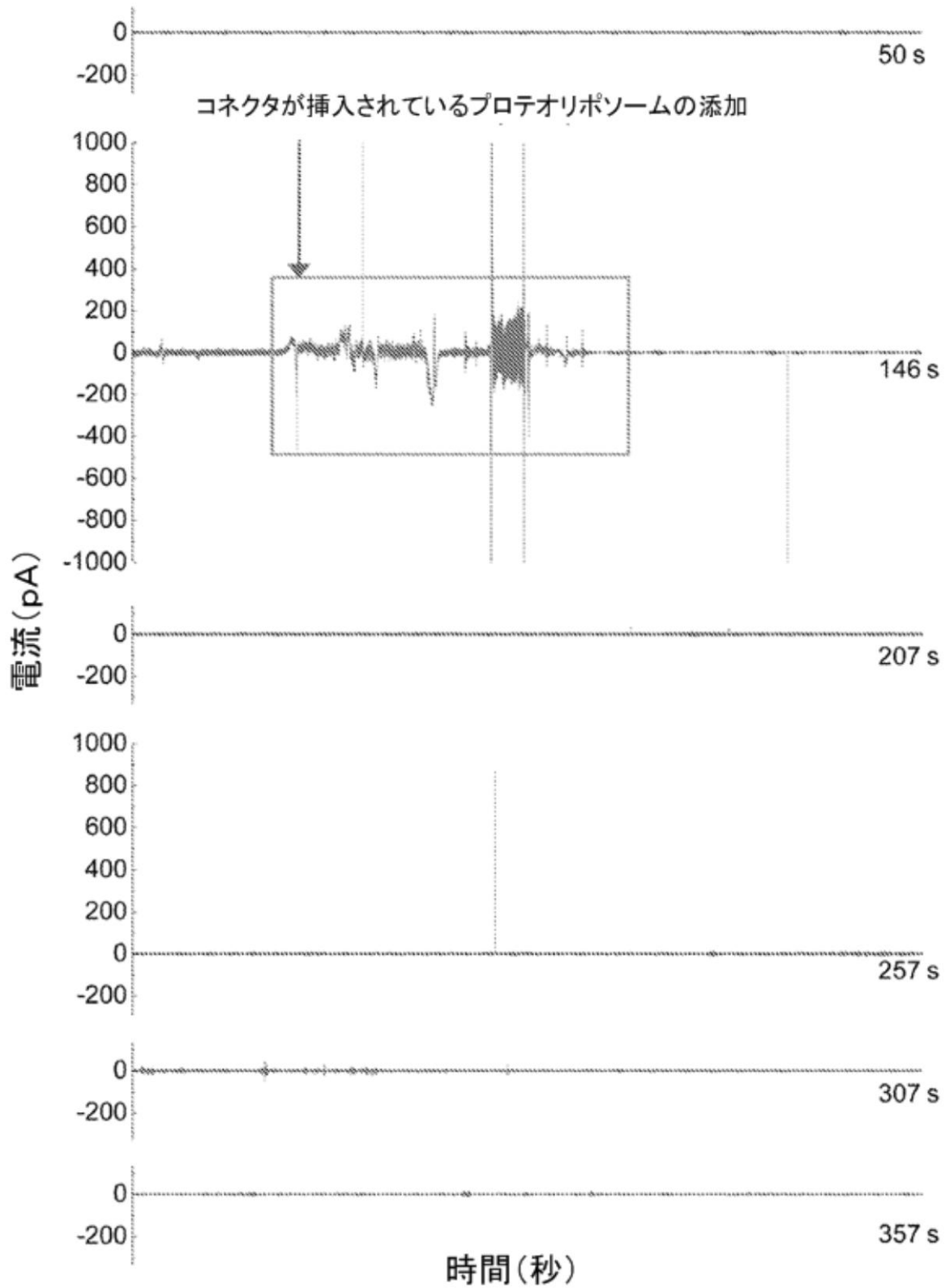
【図 8 D】



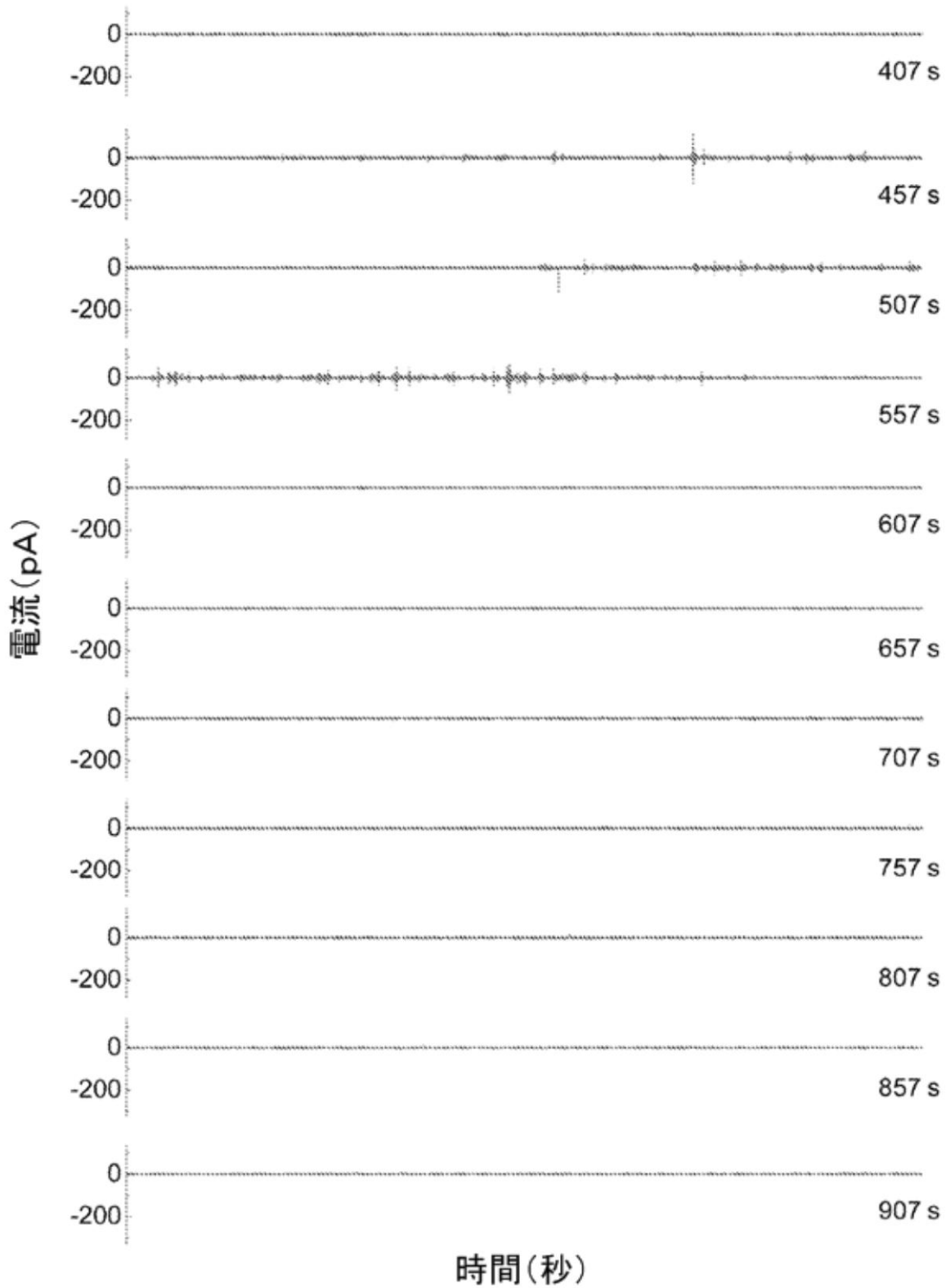
【図 9 A】



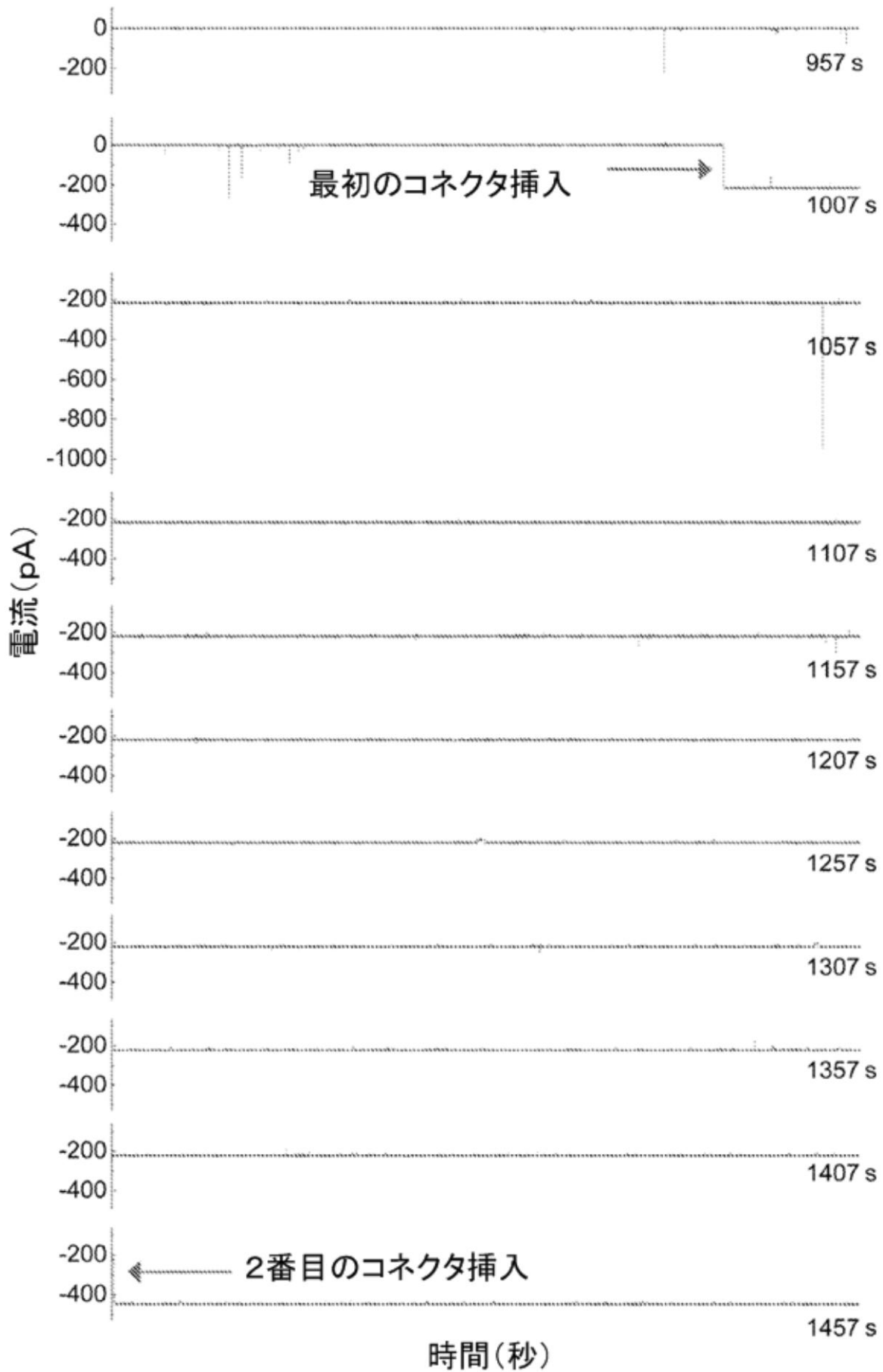
【図 9 B】



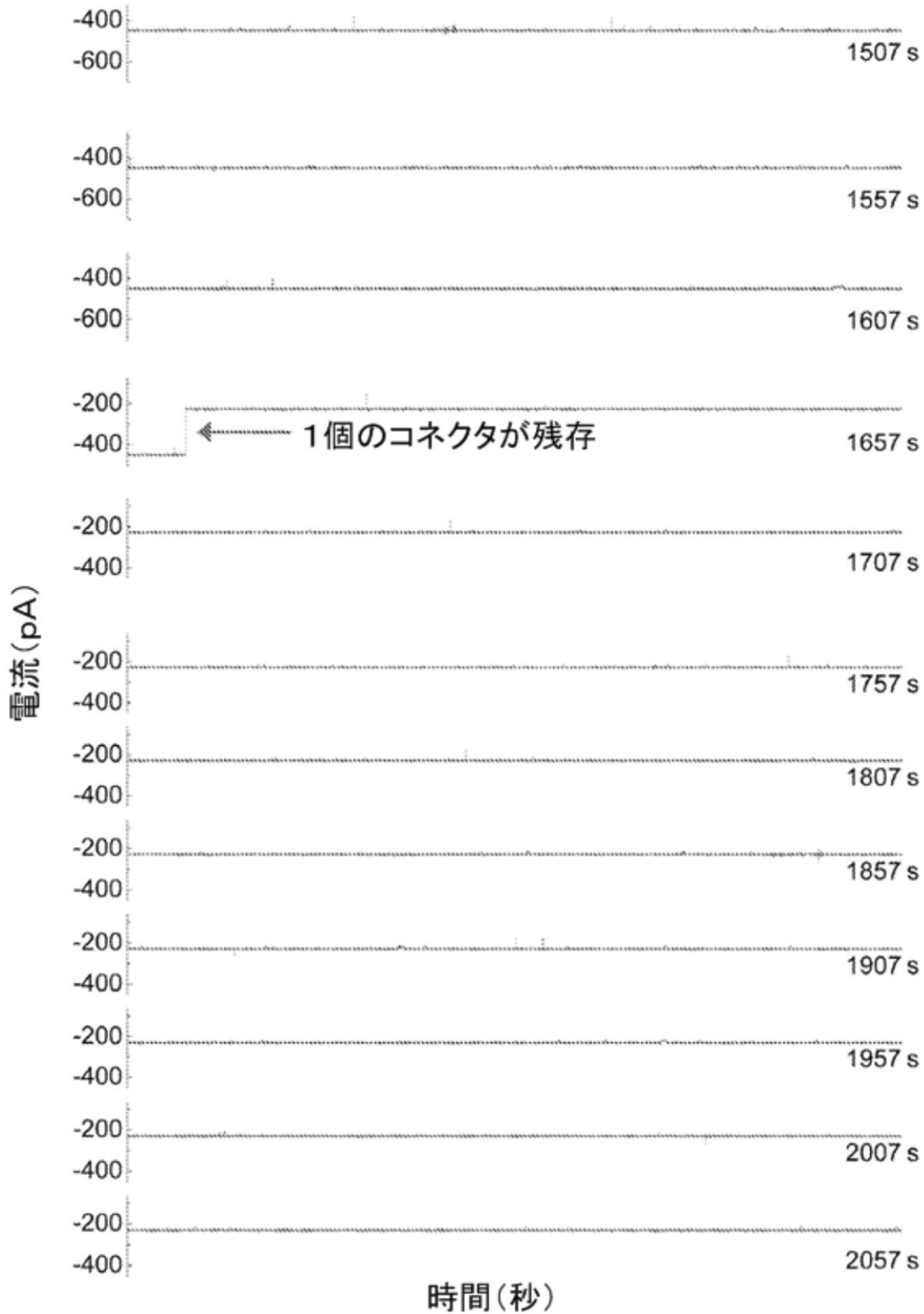
【図 9 C】



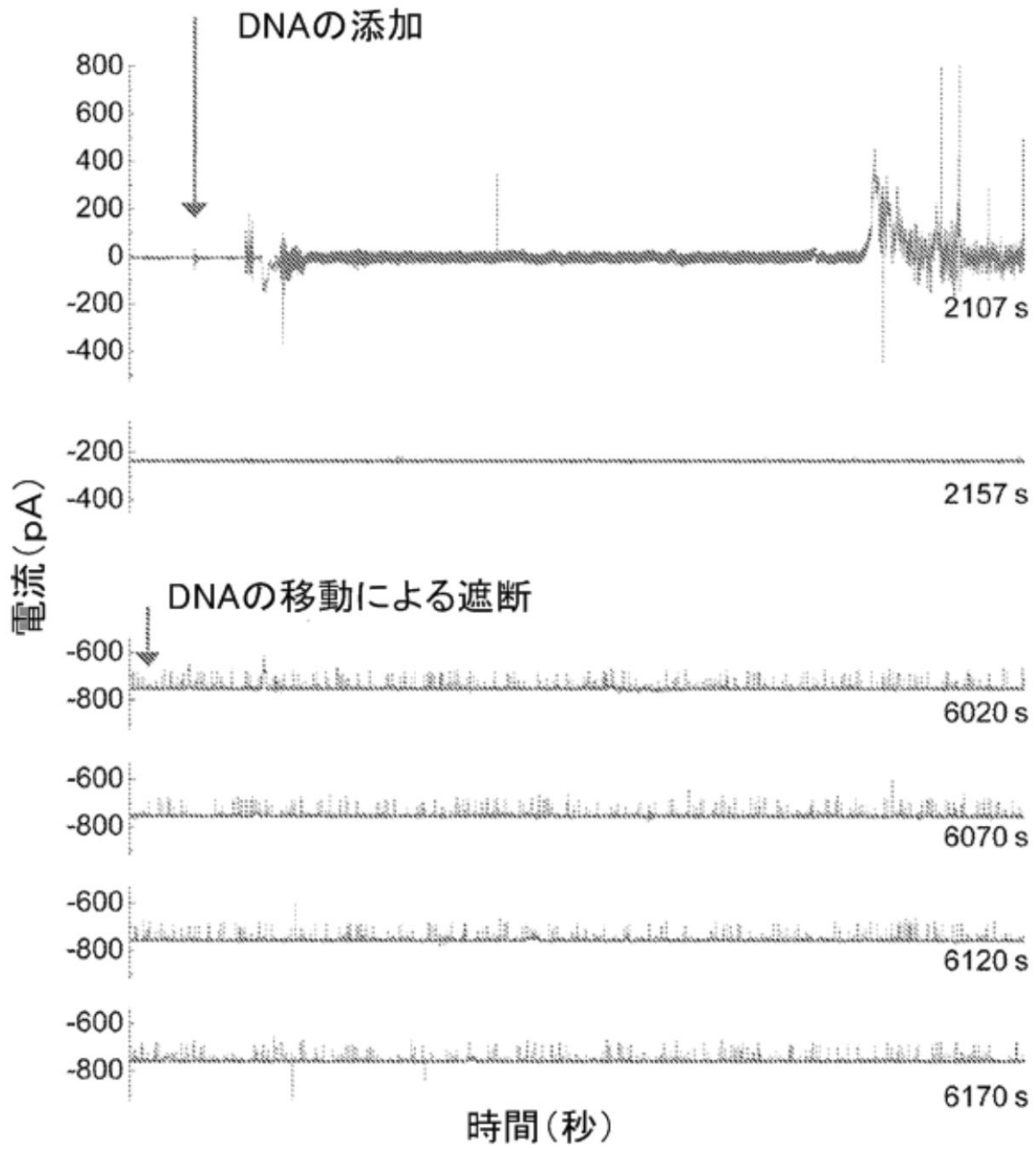
【図 9 D】



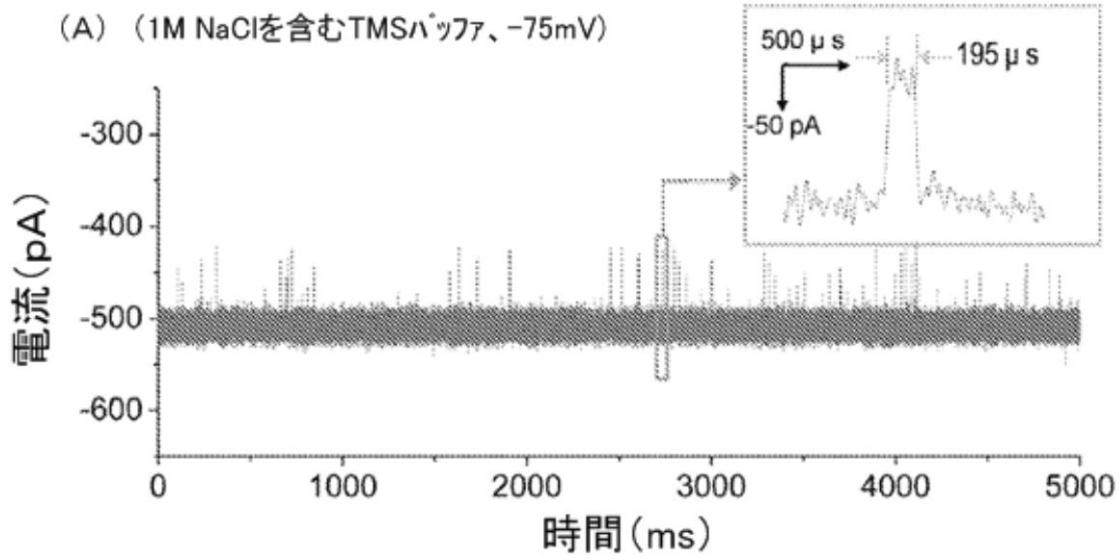
【図 9 E】



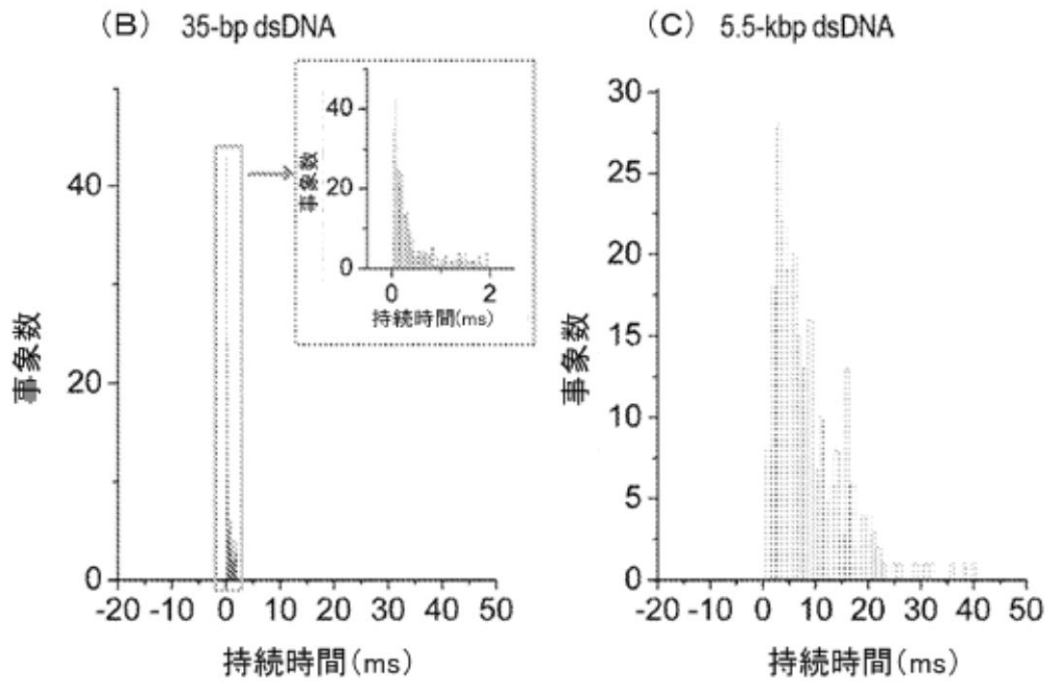
【図 9 F】



【図 10】

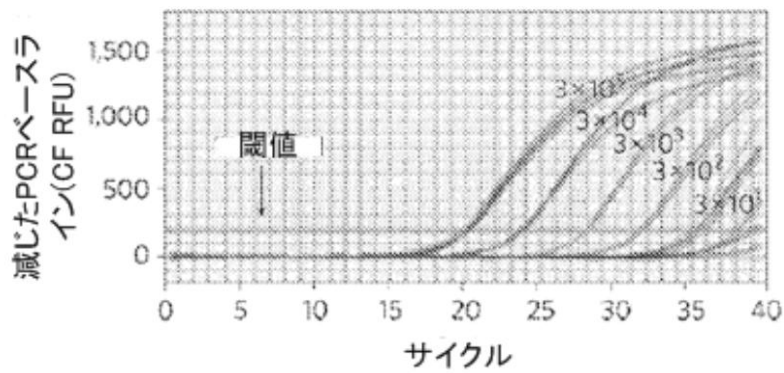


DNAの移動について持続時間の比較

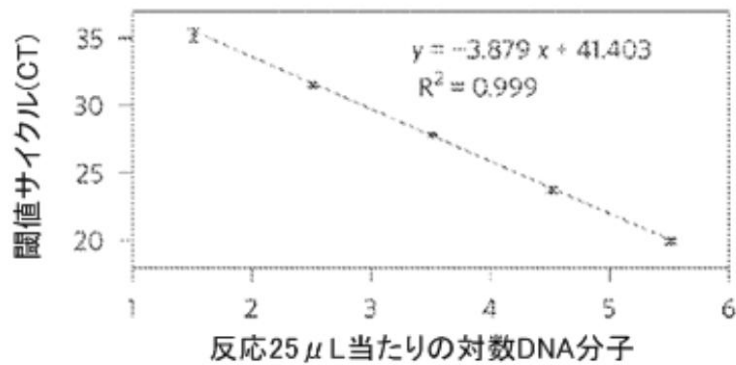


【図 1 1】

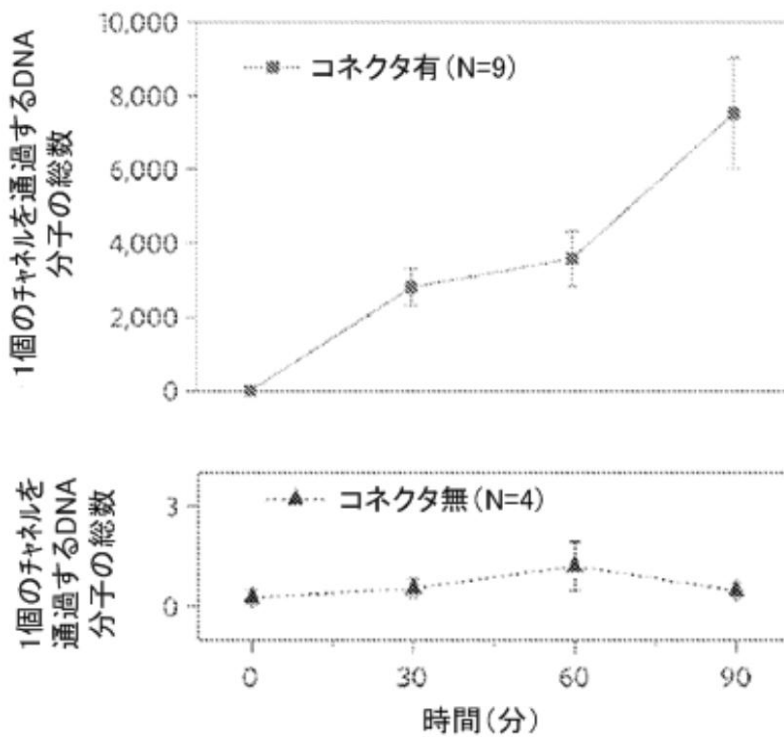
(A)



(B)

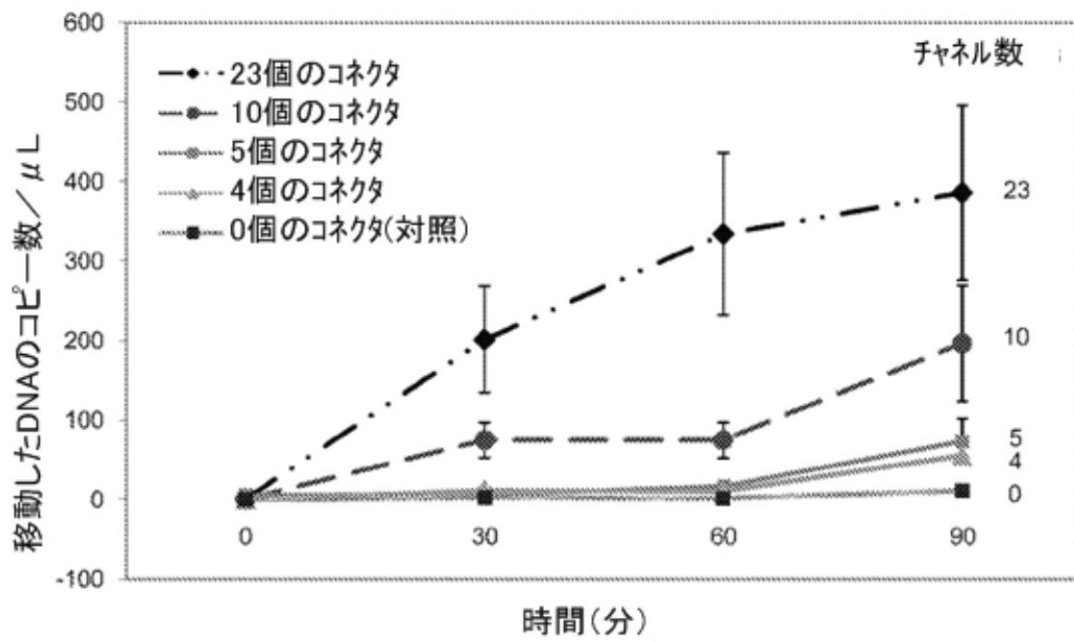


(C)

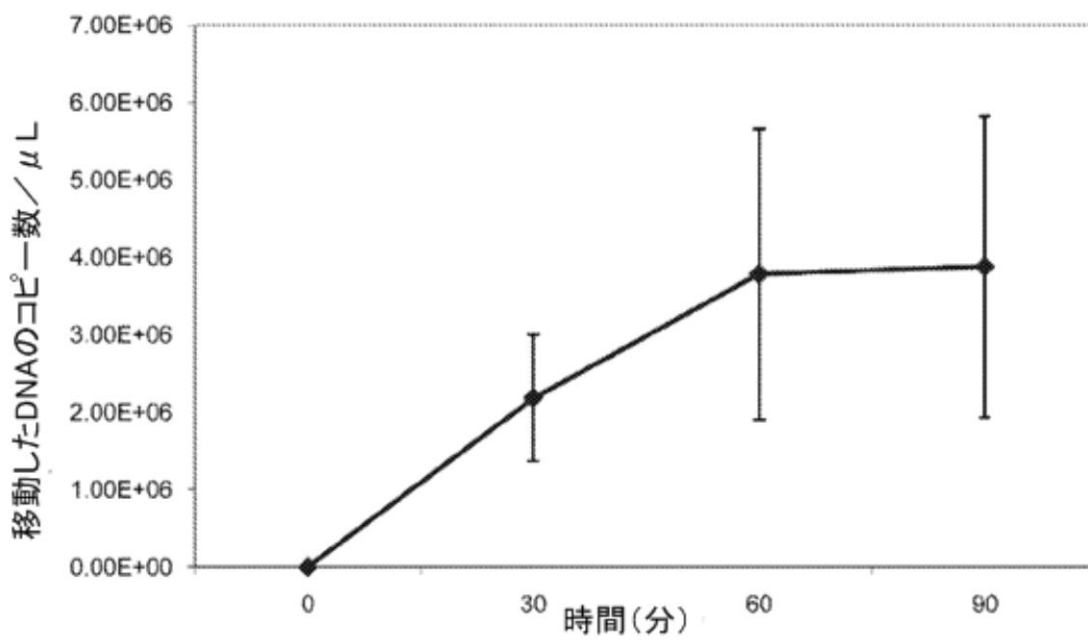


【図 1 2】

(A)

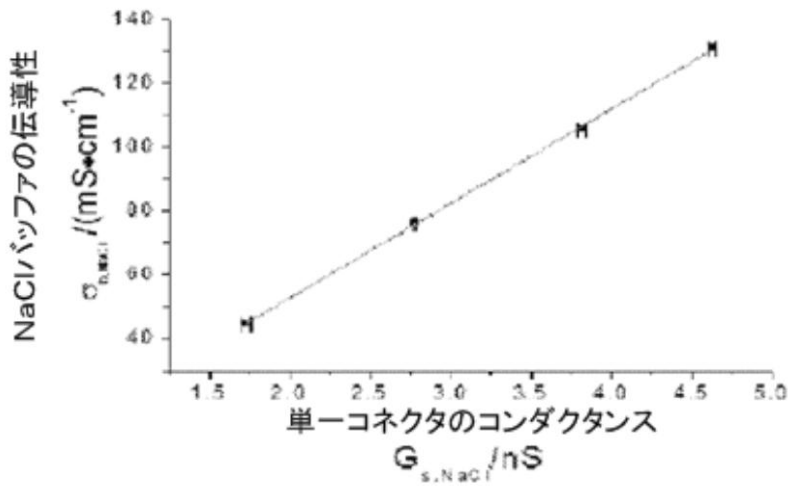


(B)

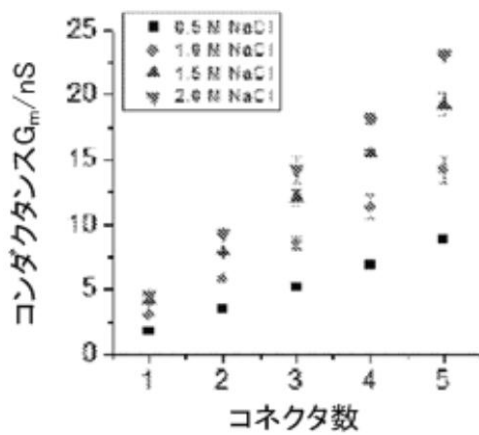


【図 13】

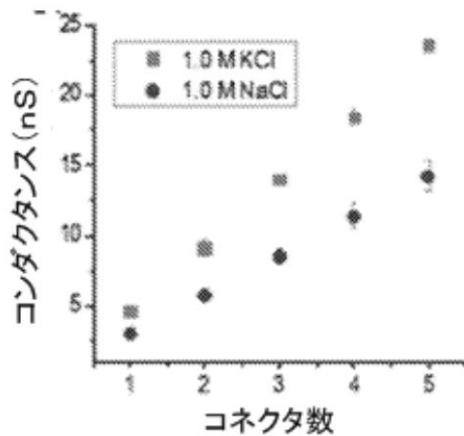
(A)



(B)

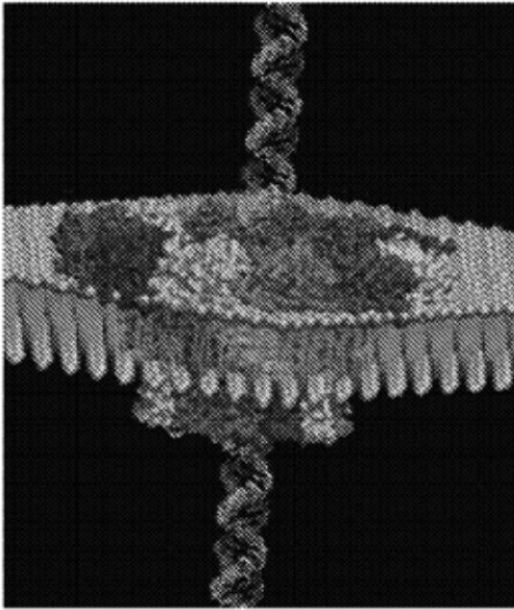


(C)

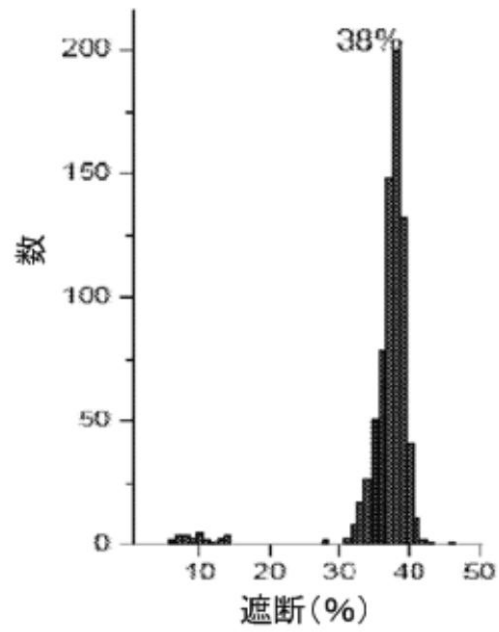


【図 14】

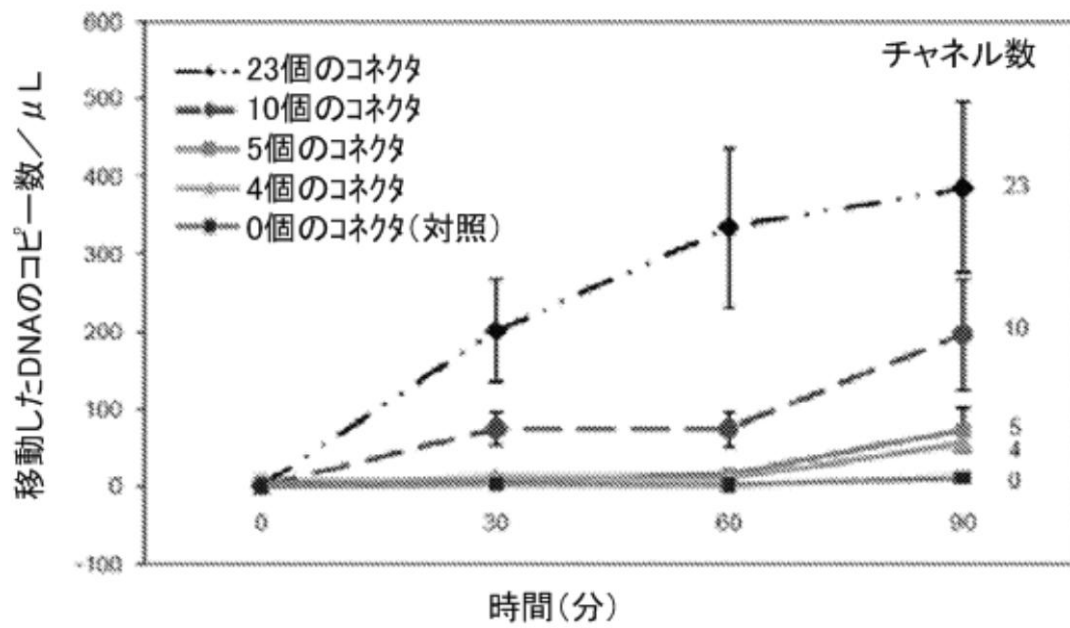
(A)



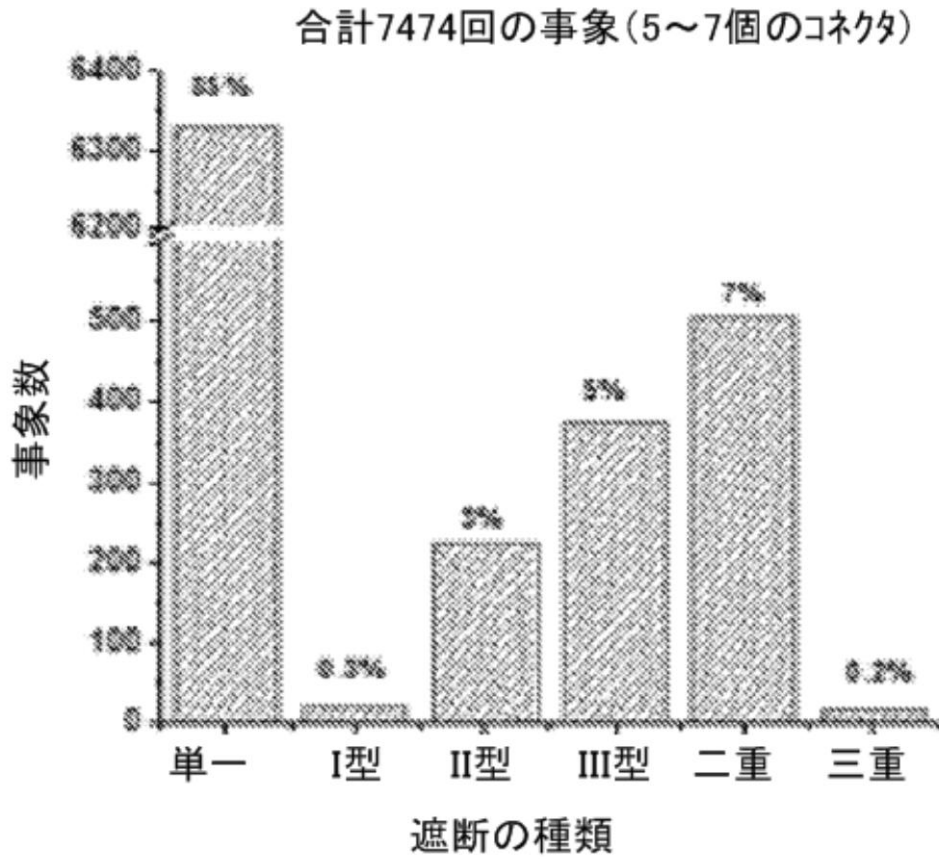
(B)



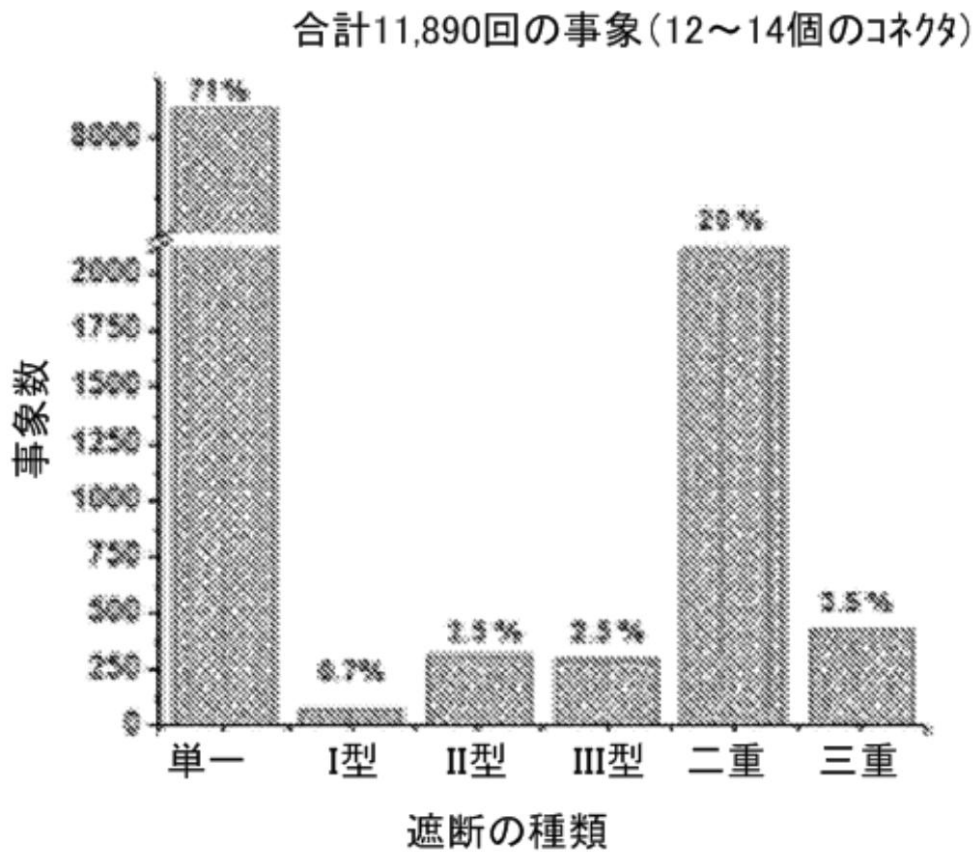
(C)



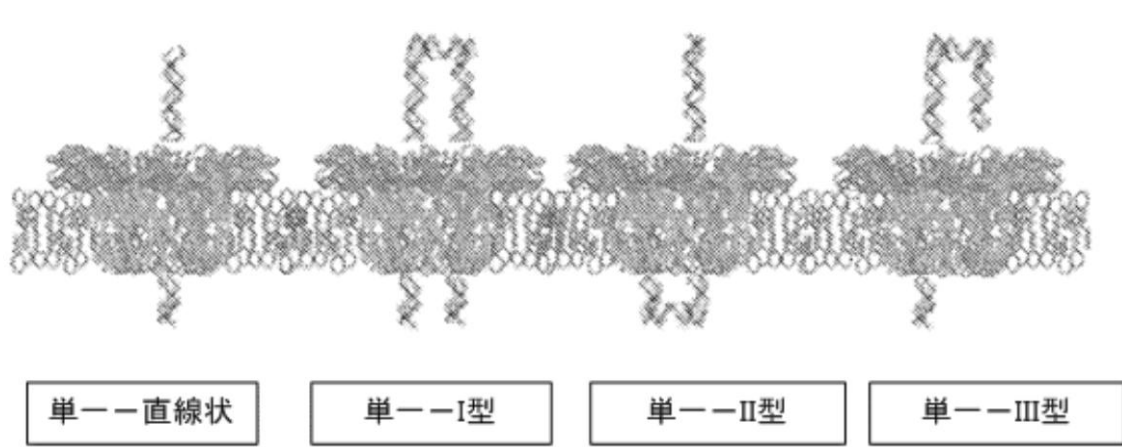
【図 15 A】



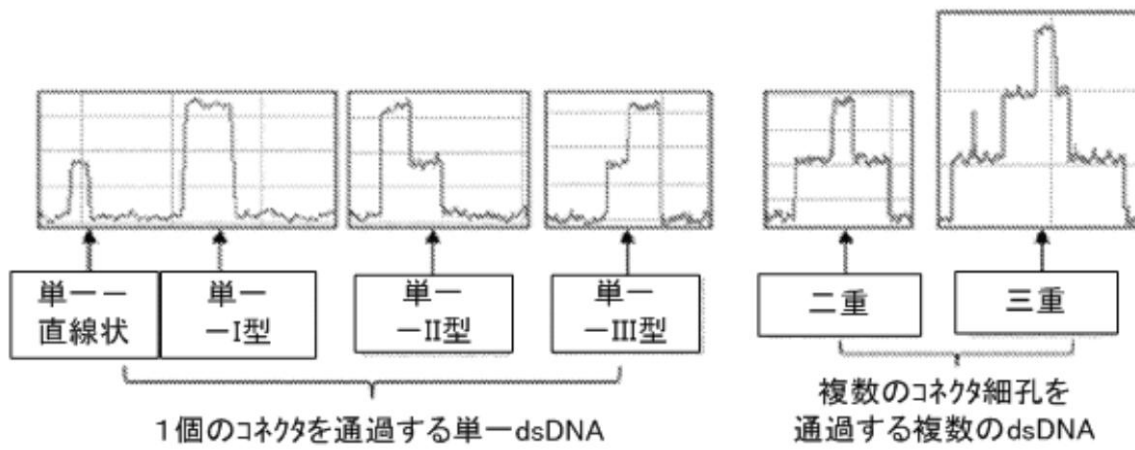
【図 15 B】



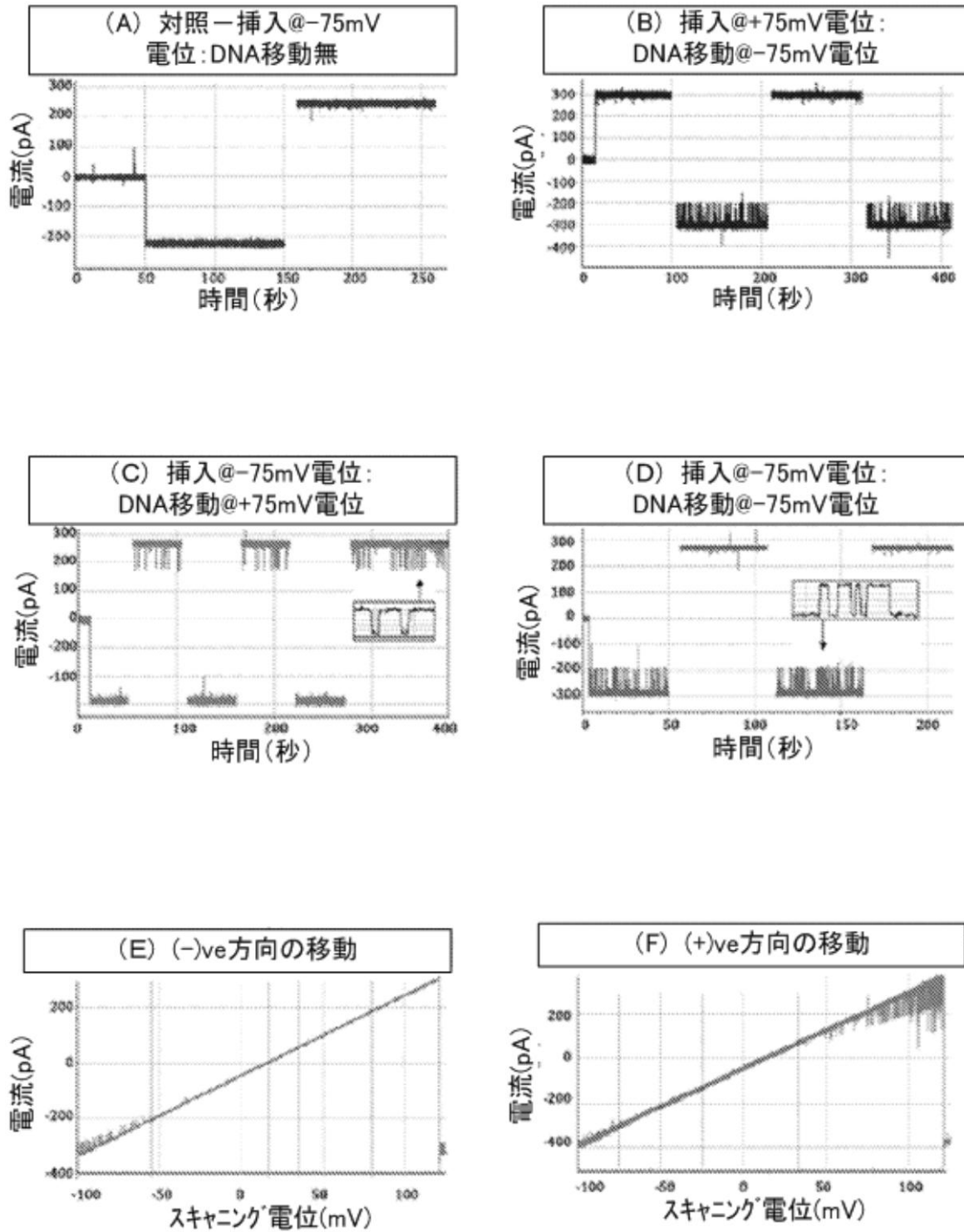
【図 15 C】



【図 15 D】

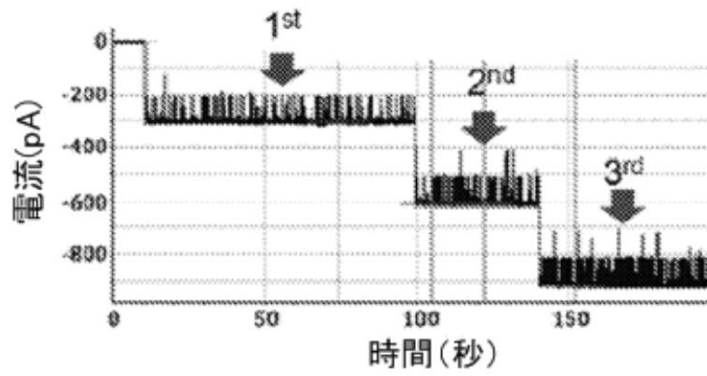


【図16】

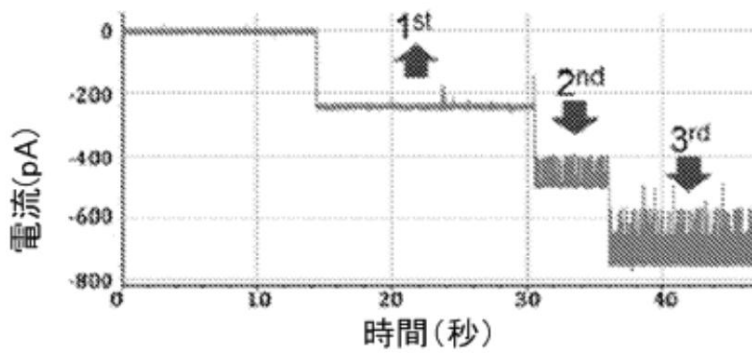


【図 17】

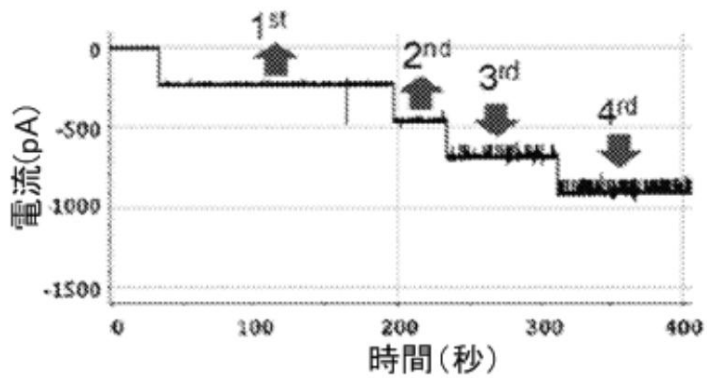
(A)



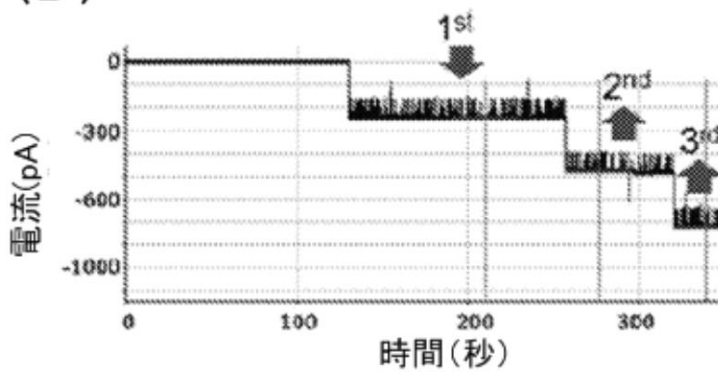
(B)



(C)

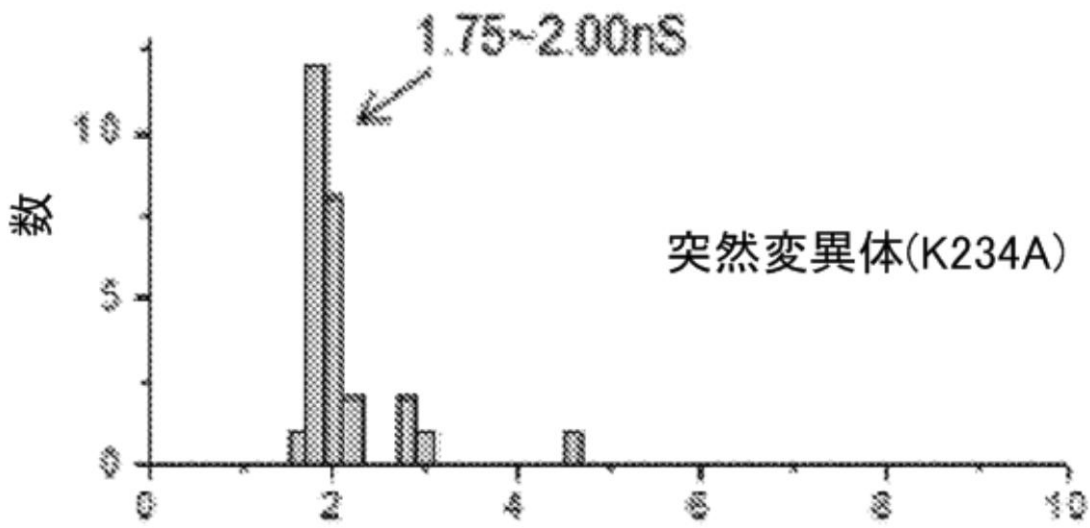


(D)

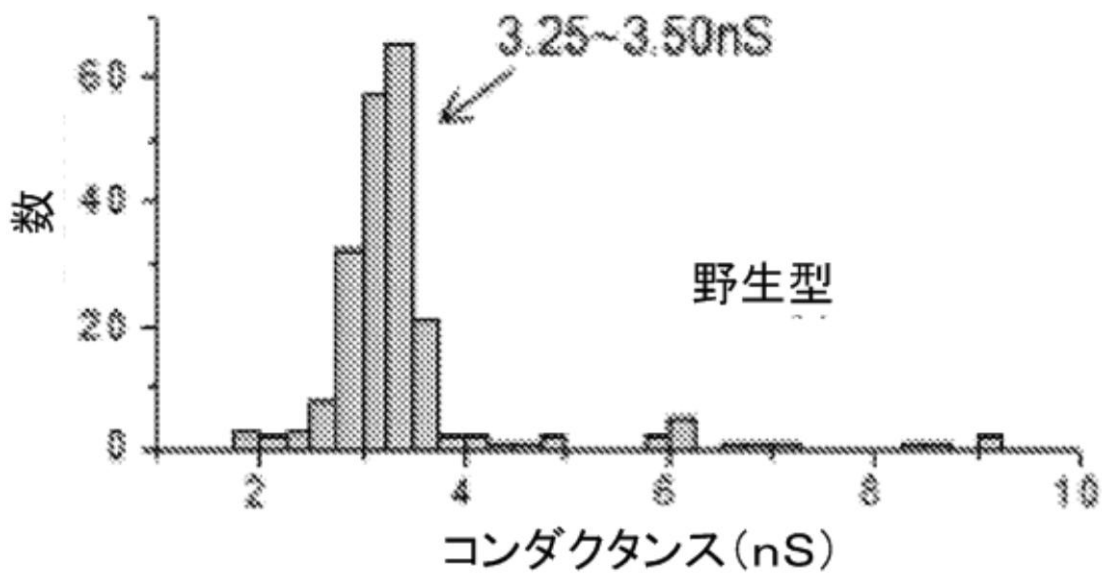


【図 18】

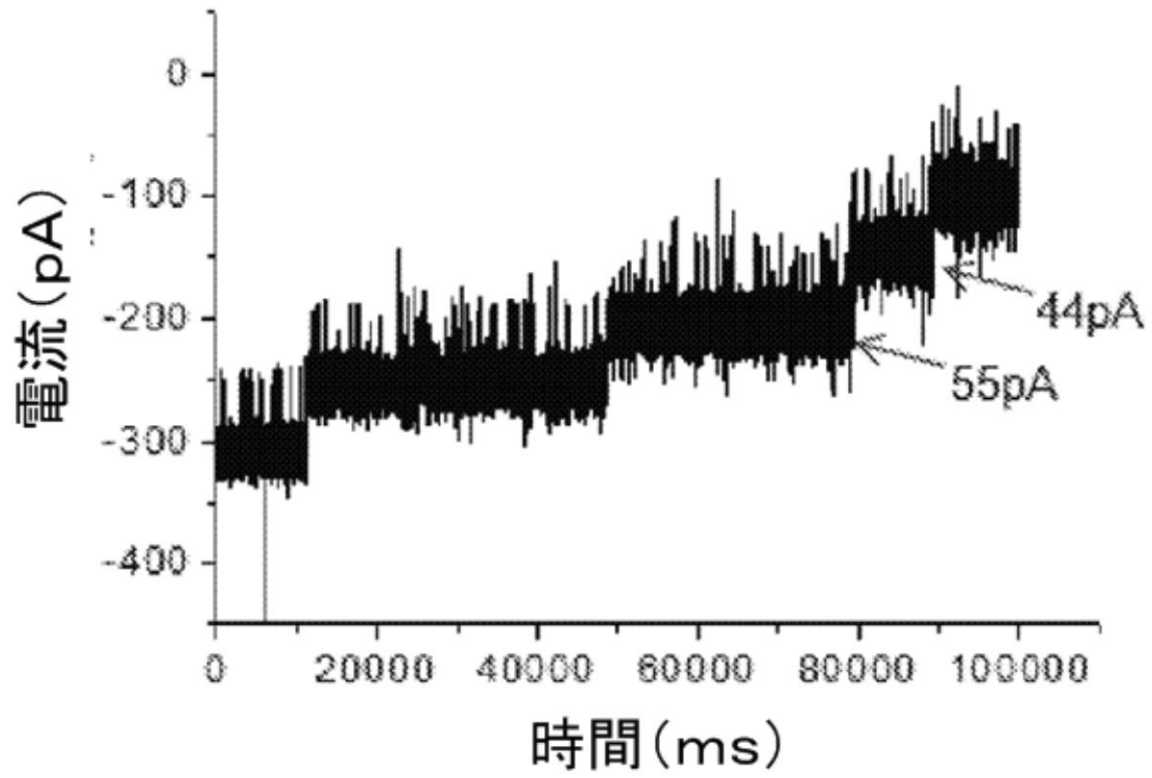
(A)



(B)



【図 19】



【配列表】

2012507565000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2009/062826
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/68(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 27/26(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/68; C12M 1/34; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: packag*, molecule*, conduc*, DNA.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005-0266416 A1 (PEIXUAN GUO) 01 December 2005 See fig.1D, paragraphs 81, 86.	1-30,32-53,55-72
A	NATURE, 2000, vol. 408, pp.745-750. See the whole document.	1-30,32-53,55-72
A	ChemBioChem,2007, vol.8,pp.1246-1250. See the whole document.	1-30,32-53,55-72
A	Nature Nanotech. 2007,vol.2, pp. 243-248. See the whole document.	1-30,32-53,55-72
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 JULY 2010 (20.07.2010)		Date of mailing of the international search report 21 JULY 2010 (21.07.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM Jung Tae Telephone No. 82-42-481-5594 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/062826

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 54,75
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 54 refers to claim 46. However, they differ in the category of invention, since claim 46 is an isolated protein claim, whereas claim 54 is directed to a conductive channel containing membrane. Claim 75 is not clear, since claims 101-115 to which claim 75 refers does not exist.

3. ☒ Claims Nos.: 31,73,74
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/062826

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0266416 A1	01.12.2005	US 2004-0157304 A1	12.08.2004
		WO 2005-035760 A2	21.04.2005
		WO 2005-035760 A3	20.10.2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 CA20 DA06
 4B029 AA07 BB20 CC01 FA15
 4B063 QA01 QA12 QA13 QQ42 QQ52 QR84 QS16 QS39 QX04
 4H045 AA10 BA10 BA41 CA01 EA50