

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 10 月 21 日(21.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/119721 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12Q 1/66 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/052511
- (22) 国際出願日: 2010 年 2 月 19 日(19.02.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-101025 2009 年 4 月 17 日(17.04.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金 誠培 (KIM SungBae) [KR/JP]; 〒3058569 茨城県つくば市小野川 1 6 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 田尾 博明(TAO Hiroaki) [JP/JP]; 〒3058569 茨城県つくば市小野川 1 6 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 佐藤 守俊(SATO Moritoshi) [JP/JP]; 〒1130023 東京都文京区向丘 2 - 8 - 4 - 7 0 1 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: STABLE ARTIFICIAL BIOLUMINESCENT ENZYME HAVING SUPER-HIGH BRIGHTNESS

(54) 発明の名称: 超高輝度で安定な人工生物発光酵素

(57) Abstract: Disclosed is a mutant luminescent enzyme which is produced by the genetic engineering modification of a marine animal-derived luminescent enzyme such as gaussia luciferase, has high brightness, and has high light-emitting stability or can emit a light having a wavelength shifted to a longer wave length side. Specifically disclosed is a mutant luminescent enzyme having an amino acid sequence produced by substituting at least one amino acid residue selected from the amino acid residues lying between position-89 to position-118, specifically by carrying out the conservative amino acid replacement of an amino acid residue located at at least one position selected from position-89, position-90, position-95, position-97, position-100, position-108, position-112, position-115 and position-118, in the amino acid sequence for a marine animal-derived luminescent enzyme gaussia luciferase (GLuc). The above-mentioned substitution in a marine animal-derived luminescent enzyme enables the improvement in the active function of the luminescent enzyme. Also disclosed is a bioluminescent probe having an improved light-emitting function, which is produced using the mutant luminescent enzyme.

(57) 要約: 本発明は、ガウシアルシフェラーゼなど海洋動物発光酵素を遺伝子工学的に改変し、高輝度でかつ発光安定性の高い、又は発光が長波長にシフトした変異発光酵素を提供することを目的とするものであり、そのために、海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) のアミノ酸配列上の 89~118 位に相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも 1 残基が置換されている変異発光酵素であって、具体的には、同 89 位、90 位、95 位、97 位、100 位、108 位、112 位、115 位、及び 118 位に相当する位置の少なくとも 1 つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換 (conservative amino acid replacement) が施されている変異発光酵素を提供する。海洋動物発光酵素に対して当該置換を施すことで、発光酵素活性機能を向上させることができる。また、本発明の変異発光酵素を用いることで、発光機能の向上した生物発光プローブも提供できた。

WO 2010/119721 A1

明 細 書

発明の名称： 超高輝度で安定な人工生物発光酵素

技術分野

[0001] 本発明は、海洋動物発光酵素の遺伝子改変による発光酵素機能及び発光の安定性向上のための手法の確立、ならびに当該手法を適用して合成された、超高輝度で安定な人工生物発光酵素に関するものである。

背景技術

[0002] 細胞・非細胞系を問わず、自然界における多くの分子現象（例えば、蛋白質の構造変化、リン酸化、蛋白質間の相互作用、2次信号伝達物質の産生等）は、我々が、自然を理解し、その生命現象に係る分子メカニズムを解明する上で極めて重要な指標となる。今まで、このような分子現象を計測するために、（ア）FRET（非特許文献1、2）、（イ）BRET（非特許文献3）、（ウ）タンパク質間相互作用検出法（protein-fragment complementation assay）（非特許文献4、5）等の手法が開発された。

近年、本発明者らは、独自の分子設計技術を利用した生物発光イメージングに関する研究開発を行ってきた。具体的には、転写因子の核内移行や細胞質内非ゲノム的な蛋白質-蛋白質間相互作用を、蛋白質スプライシング法を用いて計測した（非特許文献6、7）。また、一つの分子内に、信号認識と生物発光に必要なすべての要素を集積した形態の一分子型生物発光プローブを開発した（非特許文献8、9）。その後、このプローブをマルチカラー化し、複数の信号伝達過程を同時にイメージングできるように発展させた（非特許文献10）。さらに、生物発光プローブそのもののリガンド感受性を高める手法として、円順列置換（非特許文献11）や小さい発光酵素を用いた分子設計技術（非特許文献12）を開発した。これらの研究は、いずれも細胞・非細胞系における分子現象を効率よく計測する手段として使われてきた。

細胞内・外の分子現象を探索する主な方法で、発光イメージング以上に広

く使用されている方法として、蛍光イメージングがある。しかし、蛍光蛋白質は、自己蛍光のためバックグラウンドが高く、外部光源を必要とし、蛍光顕微鏡のような大きな装置と精密なフィルターシステムを必要とする。また蛍光発色団が成熟するまでに短くても数時間から数日がかかる問題点があった。また蛍光顕微鏡を使う場合、一回に観察できる細胞数に限界があり、定量性に問題があった（非特許文献6）。

一方、生物発光酵素を用いる発光イメージングの場合、多くの長所にも関わらず、蛍光イメージングに比べて使用されにくい最大の原因は、生物発光酵素の低輝度にあった。生物発光酵素が低輝度であるために、高感度の計測装置を必要とし、単一細胞イメージングや細胞小器官の探索などには不向きであるとされていた。

また、蛍光蛋白質については、多色蛍光蛋白質の研究が十分進んでおり、その発色原理に関する知見が多く得られているため、これらの研究成果を利用して多様な蛍光特質を持つ蛍光蛋白質が多く開発されている。ところが、生物発光酵素については、多色生物発光を示す酵素そのものの数が乏しかった。発光の多色化の利点として、（ア）マルチ信号の同時計測、（イ）長波長発光の生体組織透過性のよさが取り上げられるにもかかわらず、今まで生物発光酵素に関しては、その発光原理に基づいた体系的な多色化研究がほとんどなされてなかった。

したがって、生物発光酵素に対しても、高輝度化及び発光強度の安定化を図れる体系的な変異導入手法の確立が強く望まれていた。また、同時に発光色を長波長へシフトさせるための体系的な研究も急務であった。

[0003] 本発明者らは、以前から、サイズが小さいばかりでなく、輝度が他の発光酵素と比較して高い海洋動物由来の発光酵素の1種であるガウシアルシフェラーゼ（特許文献1）に着目し、当該ガウシアルシフェラーゼを利用した各種発光イメージング法を開発してきた（特願2008 - 116098、特願2009 - 025229、特願2007 - 332253）。しかし、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc : Gaussia luciferase）など海洋動物発光酵素は、発光輝度は比較的高いものの、発光

の安定性が悪く、発光プローブとして用いる場合、蛋白質フォールディングに問題があり、発光強度が十分に上がらない場合が多かった。ガウシアルシフェラーゼに対しては、遺伝子工学的に変異を導入した多数の変異体が知られているが、輝度及び安定性の面で満足いく変異酵素は提供されていない（特許文献2～6）。本発明者らが最近開発したペプチドアンカー法（特願2009 - 025229）により、発光プローブとしての安定性はかなり上がったが、さらなる輝度の向上及び、安定性の向上が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開1999-49019号（W01999/049019）

特許文献2：米国特許第6232107号明細書

特許文献3：米国特許第6436682号明細書

特許文献4：米国特許第6780974号明細書

特許文献5：米国特許第7045599号明細書

特許文献6：米国特許第7238497号明細書

特許文献7：国際公開2008-84869号（W02008/084869）

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Awais, M.; Sato, M.; Lee, X. F.; Umezawa, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 2707-2712.

非特許文献2：Awais, M.; Sato, M.; Sasaki, K.; Umezawa, Y. *Anal. Chem.* 2004, 76, 2181-2186.

非特許文献3：Hoshino, H.; Nakajima, Y.; Ohmiya, Y. *Nature Methods* 2007, 4, 637-639.

非特許文献4：Paulmurugan, R.; Gambhir, S. S. *Anal. Chem.* 2005, 77, 1295-1302.

非特許文献5：Paulmurugan, R.; Gambhir, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, 15883-15888.

非特許文献6：Kim, S. B.; Ozawa, T.; Watanabe, S.; Umezawa, Y. *Proc. N*

atl. Acad. Sci. U. S. A. 2004, 101, 11542–11547.

非特許文献7 : Kim, S. B. ; Ozawa, T. ; Umezawa, Y. Anal. Chem. 2005, 77, 6588–6593.

非特許文献8 : Kim, S. B. ; Awais, M. ; Sato, M. ; Umezawa, Y. ; Tao, H. Anal. Chem. 2007, 79, 1874–1880.

非特許文献9 : Kim, S.B., Otani, Y., Umezawa, Y. and Tao, H. (2007) Anal. Chem., 79, 4820– 4826.

非特許文献10 : Kim, S. B. ; Umezawa, Y. ; Kanno, K. A. ; Tao, H. ACS Chemical Biology 2008, 3, 359–372.

非特許文献11 : Kim, S. B. ; Sato, M. ; Tao, H. Bioconjugate Chem. 2008, 19, 2480–2486.

非特許文献12 : Kim, S. B. ; Sato, M. ; Tao, H. Anal. Chem. 2009, 81, 67–74.

非特許文献13 : Matthews, L. ; Berry, A. ; Tersigni, M. ; D'Acquisto, F. ; Ianaro, A. ; Ray, D. Endocrinology 2009, 150, 75–86.

非特許文献14 : Kim, S. B. ; Sato, M. ; Tao, H. Anal. Chem. 2009, 81, 67–74.

非特許文献15 : Loening AM, Fenn TD, Gambhir SS J. Mol. Biol. 2007, 374 (4), 1017–1028.

非特許文献16 : Cubitt AB, Woollenweber LA, Heim R Meth. cell biol. 1999, 58, 19–30.

非特許文献17 : Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai and Hideaki Mizuno Curr. Opinion Chem. Biol. 2003, 7:557–562.

非特許文献18 : N. G. Shaner, G. H. Patterson and M. W. Davidson J. Cell Sci., 2007 120 (24), 4247–4260.

非特許文献19 : Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S, Nature, 2007, 448 (7151) 313–317.

非特許文献20 : Papworth, G., Bauer, J. G., Braman, J. and Wright, D. A

. Strategies 1996, 9(3):3-4.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、生物発光酵素における輝度の増強、長波長へのシフト及び発光の安定性の向上のための手法を確立し、ならびに当該手法を適用して超高輝度で安定な人工生物発光酵素を提供することを目的とする。さらに、当該発光酵素を用いた発光イメージング法の確立も目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために、生物発光酵素のうちでも、海洋動物発光酵素に注目した。生物発光酵素を全体としてみると、様々な種類の構造を有しており、遺伝的な類似性が乏しくて、酵素間における一般ルールを見出すことは困難である。しかし、生物発光酵素のうちでも海洋動物発光酵素に限ってみれば、基質が共有できる上、配列の類似性がきわめて高いため、各海洋動物発光酵素における従来からの知見を総合することで、当該酵素と基質との相互作用を立体構造的に予想し、酵素活性の中心領域を推定することが可能であると着想したわけである。そして、推定した酵素活性中心及びその近傍の改変を遺伝子工学的に改変し、輝度の増強、長波長へのシフト及び発光の安定性向上を目指した。具体的には、海洋動物発光酵素の中で、最小分子量のガウシア由来発光酵素（GLuc）の遺伝子配列（GENE ACCESSION #: FJ010198）を用い、コドンを最適化した上で合成し、推定された活性部位又はその近傍のアミノ酸に変異を導入した多数の変異体を作製し、それぞれの輝度及び安定度の変化、又は長波長へのシフト傾向がみられるかを観察した。

その結果、GLucにおけるアミノ酸位置89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応するアミノ酸残基の1個以上を「同類アミノ酸置換（conservative amino acid replacement）」を施すことによって、発光酵素の輝度が高まると同時に発光強度が安定化し、又は長波長へのシフトが起こるという発光酵素活性機能の向上が達成できることが確認

できた。具体的には、同89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応する疎水性アミノ酸残基をそれぞれ他の疎水性アミノ酸残基に変異させた場合に、発光強度増加又は長波長へのシフトが起こるという発光酵素活性機能が向上する。特に、同90位、108位、112位、115位、もしくは118位の疎水性の非極性でかつ脂肪族アミノ酸残基から、他の疎水性の非極性でかつ脂肪族アミノ酸残基への変異、又は同89位もしくは97位の位置の芳香族アミノ酸残基から他の芳香族アミノ酸残基への変異を起こさせることで発光酵素の強度が高まると共に安定化し、しかも長波長へのシフトが起こるという顕著な発光酵素活性機能の向上であった。また、同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への変異により長波長へのシフトが起こることが確認できた。

以上の知見を得たことで、本発明を完成することができた。

さらに、GLucと同様の海洋動物発光酵素として*Metridia longa* (MLuc) と *Metridia pacifica* (MpLuc1) を用い上記GLucの変異箇所に対応する位置に変異を導入して、GLucと同様に発光値の上昇と長波長シフトを観測することができ、上記変異箇所が、海洋動物発光酵素における共通の性能改善部位であることを実証した。

また、当該発明で新規合成された発光酵素を、レポータージーン・アッセイ (reporter gene assay) や真核細胞ツーハイブリッド・アッセイ (mammalian two-hybrid assay) などにレポーター遺伝子として搭載した場合、また、生物発光プローブ法における分割発光酵素として用いたところ、これらのアッセイ系においても安定に高輝度を保持することができ、これらアッセイに要する時間の短縮効果、及びS/N比改善効果が確認できた。このうち、本発明変異発光酵素のレポーター遺伝子を用いる分析方法での使用は、従来の分析法の画期的な改良技術であったことから、本出願と同日付で別途日本出願をしている。

[0008] すなわち、本発明は、具体的には以下の通りのものである。

[1] 海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラー

ゼ（GLuc）のアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基が置換されている変異発光酵素であって、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換（conservative amino acid replacement）が施されていることを特徴とする、発光機能の向上した変異発光酵素。

〔2〕 前記同類アミノ酸置換が、GLucのアミノ酸配列上の89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に相当する位置の疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換、又は同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換を含むものである、前記〔1〕に記載の変異発光酵素。

〔3〕 前記疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の90位、108位、112位、115位、もしくは118位の位置に相当する位置の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基から、他の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基への置換、又は同89位もしくは97位の位置に相当する位置の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基から他の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基への置換を含むものである、前記〔2〕に記載の変異発光酵素。

〔4〕 前記疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基から、他の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基への置換が、イソロイシンをロイシン、トリプトファン及びバリンから選ばれたいずれかのアミノ酸残基に置換するものである、前記〔3〕に記載の変異発光酵素。

〔5〕 前記疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基から他の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の89位又は同97位に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファン（W）に置換するものである、前記〔3〕に記載の変異発光酵素。

〔6〕 前記水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の95位に相当する位置のアミノ酸

残基をグルタミン酸（E）に、又は同100位に相当する位置のアミノ酸残基をアスパラギン（N）に置換するものである、前記〔2〕に記載の変異発光酵素。

〔7〕 海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のアミノ酸残基をロイシンに置換することを含む同類アミノ酸置換が施された変異発光酵素。

〔8〕 さらに、GLucのアミノ酸配列上の89位に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファンに置換するか、又は同115位に相当する位置のアミノ酸残基をロイシンに置換することを含むものである、前記〔7〕に記載の変異発光酵素。

〔9〕 さらに、GLucのアミノ酸配列上の95位に相当する位置のアミノ酸残基をグルタミン酸もしくはグルタミンに置換し、かつ同97位に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファンに置換することを含むものである、前記〔7〕又は〔8〕に記載の変異発光酵素。

〔10〕 前記海洋動物発光酵素が、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）並びにカイシアルシフェラーゼ（MLuc、MpLuc1、及びMpLuc2）から選択されたいずれかの発光酵素である、前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の変異発光酵素。

〔11〕 前記〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の変異発光酵素をコードするDNA。

〔12〕 前記〔11〕に記載のDNAを含む発現ベクター。

〔13〕 前記〔11〕に記載のDNAが発現可能な状態で導入された形質転換細胞。

〔14〕 海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）のアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基を置換するものであり、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換

を施す置換を含むことを特徴とする、海洋動物発光酵素の発光機能の向上方法。

〔１５〕 ２分割された生物発光酵素が会合することで発光機能を回復する機構を利用した生物発光プローブにおいて、前記〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の変異発光酵素を当該生物発光酵素として用いることを特徴とする、発光機能の向上した生物発光プローブ。

〔１６〕 前記〔１５〕に記載の生物発光プローブをコードするＤＮＡ。

発明の効果

[0009] 本発明においては、GLucを含め、広く海洋動物発光酵素一般に保存されている発光酵素活性領域及びその周辺領域の少なくとも１つのアミノ酸残基を疎水性アミノ酸残基、芳香族系アミノ酸残基及び／又は水素結合を形成するアミノ酸残基に置換するだけで、発光酵素の輝度が高まるか、長波長へのシフトが起こり、長波長領域での発光量が増大するという発光酵素活性機能が向上すると共に、安定性の向上も達成した。特に、GLucの90位か、又は、それに相当する海洋動物発光酵素のアミノ酸部位への疎水性基導入により、きわめて高い輝度で発光安定性も高い優れた変異酵素を提供できた。

本発明の高輝度海洋動物発光酵素は、従来、広く使われているレポータージーンアッセイ（reporter gene assay）、Yeast Two-hybrid assay、Mammalian Two-hybrid assay、protein splicing assay、protein complementation assay、circular permutation assay、bioluminescence resonance energy transfer（BRET） assay（非特許文献３～１２）等における発光酵素の要素として用いることで、高輝度でかつ安定性の高い発光プローブを作製することができるので、アッセイの計測性能を飛躍的に向上できる。

なお、本発明で引用した先行文献又は特許出願明細書の記載内容は、本明細書の記載として組み入れるものとする。

図面の簡単な説明

[0010] [図1A] 各種海洋動物由来の発光酵素のアミノ酸配列の疎水性分布図。

[図1B] 各種海洋動物由来の発光酵素のアミノ酸配列比較表。点線ボックスは

推定酵素活性部位。

[図2A] ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) の全アミノ酸配列。また、GLucの配列は *Metridia longa* 由来の発光酵素 (MLuc) の配列と比較した。矢印は本研究における酵素切断位置を示す。

[図2B] ウミシイタケルシフェラーゼの酵素活性部位における公知の結晶構造図。真ん中の化学物質は、その特異的な基質 (セレンテラジン) の分子構造を示す。各アミノ酸の位置から、酵素の活性部位が疎水性アミノ酸群 (○) と親水性アミノ酸群 (◎) の間に挟まれる構図をとることが分かる。

[図3A] GLucの各切断位置における生物発光強度の回復度。

[図3B] GLucの疎水性アミノ酸分布図。アミノ酸番号の約90~100位近傍に親水領域が存在していることが見て取れる。

[図3C] 蛍光蛋白質と発光蛋白質の発色団の比較。Aは蛍光蛋白質の結晶構造と発色団の化学構造を示す。一方、Bは左からホタルルシフェラーゼの結晶構造、セレンテラジンの化学構造、ウミシイタケルシフェラーゼの活性領域の結晶構造である。

[図4A] GLucのアミノ酸配列における変異導入箇所マップ。

[図4B-1] 各GLuc変異体の生物発光強度の比較図(1)。分光光度計で測定した発光スペクトルのピーク値を比較したグラフであり、本来のGLucの発光強度 (左端) に比べた、相対的な生物発光強度を示している。なお、ここでは、細胞溶解時間を5分としたので、細胞小器官までは溶解されていない。

[図4B-2] 各GLuc変異体の生物発光強度の比較図(2)。発光プレートリーダーで測定した各発光スペクトルの面積を指標としたグラフであり、本来のGLucの発光強度 (左端) に比べた、相対的な生物発光強度を示している。なお、ここでは、細胞溶解時間を20分としたので、細胞小器官まで溶解された均一な細胞溶解液が得られている。また、一部高輝度GLuc変異体については、発光波長の最大値も併記した。

[図4C] GLuc変異体の生物発光スペクトルのレッドシフト。上から、I90をTyr (Y) に変異した場合、H95とD100をそれぞれQとNに、H97をWに変異した場合

。

[図4D] GLuc変異体の生物発光スペクトルのレッドシフト。従来のGLucと比較した、Y97W、I90L、F89W/I90L/H95E/Y97W (Mon3)の発光スペクトル。

[図4E] 610 nm Long-Pass filterを利用した、長波長生物発光強度の相対的強度。従来のGLuc（白棒）と比較した各発光変異体の波長。変異体が強い長波長の生物発光を示すことが分かる。

[図5] 非常に強い生物発光を発するGLuc変異体の発光強度比較写真。（A）発光チューブの位置を示すデジタル写真。左からホタルルシフェラーゼ（FLuc）、従来のガウシアルルシフェラーゼ（GLuc）、GLucのI90L変異体を発現する細胞溶解液を示す。（B）各チューブの発光度の比較。一番右のGLucのI90L変異体がもっとも強い生物発光を示すことが分かる。

[図6] 代表的なルシフェラーゼの生物発光スペクトルの比較。GLuc変異体（黒線）は従来のGLuc（点線）、FLucやクリックビートルルシフェラーゼ（CBLuc）に比べてはるかに強い生物発光強度を示す。

[図7AB] 生物発光強度の経時変化比較。（A）各変異体に基質（PBSバッファーに溶かす）を導入した後、その生物発光の経時変化を短時間（5秒間）観測した結果。I90L、H95E、Y97Wが、比較的に安定的な生物発光を示すことが分かる。（B）各変異体に基質（PBSバッファーに溶かす）を導入した後、その生物発光の経時変化を、比較的に長時間（10分）観測した結果。本来のGLucの発光値（白丸）の減少は激しい反面、I90L（黒四角）とI90V（灰色三角）の発光値は比較的安定的な発光強度を示す。

[図7CD] 生物発光強度の経時変化比較。（C）各変異体に基質（Matthew改良バーファーに溶かす）を導入した後、その生物発光の経時変化を短時間（5秒間）観測した結果。（D）各変異体に基質（Matthew改良バーファーに溶かす）を段階的に導入した後、各段階別の生物発光の経時変化を1秒ずつ観測した結果。各変異体が非常に安定的で、強い生物発光を示していることが分かる。

[図8A] ヒトを含む哺乳動物での発現に適するGLuc変異体の塩基配列改変例（1）。ヒトを含む哺乳動物に適するコドンからなり、制限酵素サイトを導入

したGLucのI90L変異体の塩基配列。下線は、制限酵素サイトの位置、斜体文字は変異箇所を示す。

[図8B] ヒトを含む哺乳動物での発現に適するGLuc変異体の塩基配列改変例（2）。哺乳動物に適するコドンからなり、EcoRV制限酵素サイトを導入したGLuc酵素変異体（I90Lを含む4箇所に変異を持つMon3）の塩基配列。下線は、制限酵素サイトの位置、斜体文字は変異箇所を示す。

[図9AB] 本願発明のGLuc変異体の基質選択性。（A）発光強度を指標とした、変異体の基質選択性の比較。“++++”は、標準基質（coelenterazine; CTZ）の発光強度を示し、それに比較して出る相対的な発光値の程度を示す。（B）各合成セレンテラジン別の、発光スペクトルの最高発光波長（ $\lambda_{\max}$ ）。各変異体は、合成セレンテラジンの種類によって、その発光の色を変えていることが分かる。

[図9C] 本願発明のGLuc変異体の基質選択性スペクトル。一例として、セレンテラジンfcpありの条件で、各変異体の生物発光スペクトル。

[図10A] 本願発明のGLuc変異体をベースとしたレポータージーンアッセイ。（A）当該アッセイの原理図。男性ホルモン受容体はリガンド（男性ホルモン）刺激によって、活性化され、2量化した後、男性ホルモン応答配列（ARE）と結合する。その結果、レポーター遺伝子（GLuc変異体）が発現される。

[図10BC] 本願発明のGLuc変異体をベースとしたレポータージーンアッセイ。

（B）男性ホルモン有り無しの条件での生物発光強度。従来のGLucと比較し、GLuc変異体（I90L）が優れたシグナルノイズ比（S/N比）を示す。（C）発現されたレポータータンパク質の生物発光の経時変化。I90Lを搭載した場合、発光値の強さ、安定性共に優れていることが確認できた。

[図10DE] 本願発明のGLuc変異体をベースとしたレポータージーンアッセイ。

（D）従来のガウシアルシフェラーゼ（GLuc）を搭載した場合と本発明のGLuc変異体（I90L）を搭載した場合とのレポータージーンアッセイにおける発光強度比較。I90Lを用いた方が発光強度グラフの面積が広いことが確認できる。（E）前記（D）で得られた発光面積の比較グラフ。

[図11AB]本願発明のGLuc変異体をベースとしたmammalian two-hybridアッセイ。(A) two-hybridアッセイの原理図。モデルタンパク質として、Src SH2ドメインとER LBDを用いた。SH2ドメインをGal4に、ER LBDをVP16につなぎ、女性ホルモン刺激により両者が結合すると、pG5のGAL応答配列がそれに応答してレポータータンパク質（GLuc変異体）が発現する。(B) 女性ホルモン刺激時間による生物発光強度の変化。本願発明のGLuc変異体を搭載した場合、女性ホルモンの6時間刺激で十分に強い生物発光を示す。

[図11CD]本願発明のGLuc変異体をベースとしたmammalian two-hybridアッセイ。(C) 本来のGLucを搭載した場合（pG5-GLuc）の生物発光値の経時変化。(D) 本発明のGLuc変異体を搭載した場合（pG5-I90L）の生物発光値の経時変化。GLucに比べて発光の絶対値が高く、短時間の女性ホルモン刺激によっても効率よく生物発光の上昇を示す。

[図11E]本願発明のGLuc変異体をベースとしたmammalian two-hybridアッセイ。(E) GLuc及びGLuc変異体(9096)をpG5ベクターに搭載した場合の、女性ホルモン刺激後（0時間、3時間、6時間、18時間）における生物発光値（発光光度計で測定）。

[図12]本願発明のGLuc変異体を搭載したmammalian two-hybridアッセイ。女性ホルモンの濃度に応じた生物発光の強度が、当該発明のGLuc変異体の場合著しく増加する。

[図13AB]本願発明のGLuc変異体を用いた、一分子型生物発光酵素プローブ。

(A) GLuc変異体を2分割し、その間にストレスホルモン受容体（glucocorticoid receptor）とLXXLLモチーフを挿入した。比較としてGLucをベースにしたもの（“SimGR3”）を用いた。図中、“8990N”はF89W/I90Lに変異を持つGLuc変異体、“Mon3N”はF89W/I90L/H95E/Y97Wに変異を持つGLuc変異体。(B) 本願発明のGLuc変異体を搭載した、各一分子型生物発光プローブの分子構造図。

[図13CD]本願発明のGLuc変異体を用いた、一分子型生物発光酵素プローブ。(C) 本願発明のGLuc変異体を搭載した、各一分子生物発光プローブのストレス

ホルモン応答性。ストレスホルモンに対して、8990Nが相対的に強い生物発光を示した。(D) 8990Nの発光値の経時変化。ストレスホルモン有りの条件で強い生物発光を示した。

[図13E] 本願発明のGLuc変異体を用いた、一分子型生物発光酵素プローブ。(E) SimGR3と8990Nの相対的なストレスホルモン感受性の計測。610ナノメートルロングパスフィルター設定の発光プレートリーダーで測定した。8990Nの生物発光の方がより強くて、ストレスホルモン刺激に高い感受性を示した。

[図14AB] MpLuc1 (*Metridia pacifica*由来ルシフェラーゼ) 変異体の発光特性。(A) MpLuc1そのもの、MpLuc1のI114L変異体(I114L)、MpLuc1のY113W/I114L/H119E/Y121W変異体(MpLuc4)の発光スペクトル。(B) 610 nmLong-Pass filterを用いた、MpLuc1変異体の長波長生物発光値(610 nm以上)の測定。

[図14C] MpLuc1変異体の発光安定性の計測。I114L及びMpLuc4のいずれもが、従来のMpLuc1そのものに比べて安定的な生物発光を示している。

[図15AB] MLuc (*Metridia longa*由来ルシフェラーゼ) 変異体の発光特性。(A) MLucそのもの、MLucのI123L変異体(I123L)、MLucのY122W/I123L/H128E/Y130W変異(MLuc4)の発光スペクトル。(B) MLuc変異体の発光安定性の計測。MLuc4の方が、従来のMLucそのものに比べて安定的な生物発光を示している。

[図15CD] MLuc変異体の発光特性。(C) 610 nmLong-Pass filterを用いた、MLuc変異体の長波長生物発光値(610 nm以上)の測定。(D) 基質導入前後におけるMLuc変異体発光値の経時変化。

[図16] (A) 本願発明のF89W/I90Lに変異を持つGLuc変異体(8990N)による生物発光の動物組織透過性の検討。マウス左後背部及び右後背部のそれぞれの付け根で従来のGLucそのもの及び8990Nを発現させたところ、GLuc(左)に比べ、8990N(右)からの生物発光が強いことが分かる。(B) ツーハイブリットアッセイ系に搭載した場合の生きた動物組織レベルでの生物発光の観測。COS-7細胞にpACT-SH2とpBIND-ER LBDに加えて、pG5-GLuc又はpG5-90Lを導

入した形質変換細胞をそれぞれマウス左後背部と右後背部の付け根に移植し、女性ホルモン刺激の有無で測定。pG5-90Lを導入した組織（右：GLucのI90L変異体発現）からより強い生物発光が観測できた。（C）実験（B）のマウスの各移植部位における相対的な発光値の比較。左からサイト（1）、（2）、（3）、（4）に相当する。

発明を実施するための形態

[0011] 1. 海洋動物発光酵素について

本発明において「海洋動物発光酵素」というとき、広義には、ガウシア、ウミシイタケ (*Renilla reniformis*)、ウミホタル (*Cypridina*)、カイシア (*Metridia*) などと共に、発光プランクトンの仲間であるオベリン (*Obelin*)、アクアリン (*aqualine*) *Pleuromanma*、*Oplophorus*等も含まれ、これらの「発光性の海洋動物」が産生する発光酵素（ルシフェラーゼ）を指すが、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc)、及びカイシアルシフェラーゼ (*Metridia longa*由来のMLucや、*Metridia pacifica*由来の発光酵素群であるMpLuc1、MpLuc2など) は、各酵素全体の親水性疎水性アミノ酸の分布が非常に類似しており、しかも推定酵素活性領域のアミノ酸配列類似性が極めて高い（図1）ので、これらのルシフェラーゼ群を単に「海洋動物発光酵素」ともいうが、特に「ガウシア類ルシフェラーゼ」ともいう。これらのGLuc (Gene Bank Assession Number: AY015993)、MLuc (Gene Bank Assession Number: AY364164)、MpLuc1 (Gene Bank Assession Number: AB195233)、又はMpLuc2 (Gene Bank Assession Number: AB195234) のアミノ酸配列及び／又はそれをコードする塩基配列に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列及び／又は塩基配列にコードされる場合も包含される。このようなガウシア類ルシフェラーゼは、上記GLuc、MLuc、MpLuc1、又はMpLuc2の塩基配列とのホモロジー検索をPSI-BLASTなどのデータベース内で行えば簡単に取得できる。また、これら塩基配列をもとにプローブもしくはプライマーを作製して天然ガウシア類海洋動物遺伝子から釣り上げることでもできる。

ガウシア類ルシフェラーゼであるMLuc、MpLuc1、又はMpLuc2は、GLucよりも分子量が大きい点で若干異なっているが、上記のごとく配列上の類似性の他、基質や発光活性などの酵素的な特性もGLucとほとんど一致しているので、以下典型的なガウシアルシフェラーゼ（GLuc）について主に記述する。GLucにおいて得られた知見は他のガウシア類ルシフェラーゼにも適用することができる。以下、特に断らない限り、改変位置の表示は、GLucのアミノ酸配列上の位置で表す。例えば、GLucにおける90位のアミノ酸というとき、MLucのアミノ酸配列上では123位のアミノ酸に相当する。また、MpLuc1やMpLuc2の場合には、それぞれ114位、93位に相当する。

ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）は、以下のような特徴を持つ。

- （ア）今まで発見された生物発光酵素の中で最も小さいため、分子イメージングに応用された場合、宿主細胞やホスト蛋白質への負担が格段に軽い。
- （イ）pH・界面活性剤・化学変性剤に対して非常に抵抗力が強い。
- （ウ）生物発光酵素の中で最も高輝度である。
- （エ）酵素のturn-overが速い。従来のホタルルシフェラーゼに比べ7倍以上速い。

その反面、GLucによる生物発光は反応条件に影響され易く、発光強度の落ち込みが激しく不安定なため、安定性が重要な条件となる発光分析用のレポーター（指標）としての使用には適さないとされていた。

[0012] 2. 本発明の海洋動物発光酵素の発光機能向上のための改変

（2-1）海洋動物発光酵素の発光機能向上について

本発明において海洋動物発光酵素の機能向上というとき、レポーター遺伝子発現を観察する上で重要な発光強度の増強及び発光強度の経時的な安定性向上を主にめざすものであるが、発光の波長を長波長へシフトさせることも含まれる。長波長側へシフトさせることによって細胞、皮膚などからの透過性が増すことになるため、レポーター遺伝子の用途を広げる上で重要な性質である。

発光強度は、基質を添加後に従来の発光分光光度計を用い、特定の波長領

域における発光強度を計測すれば二次元情報を取得でき、当該計測を経時的に行えば発光の経時的安定性も測定できる。発光プレートリーダーを用いることもでき、サンプル処理能が優れているためより正確なデータが取得できる。その際、細胞溶解（ライシス）時間を十分に（20分程度）とった上で各発光スペクトルの面積を測定する。また、長波長側へのシフトは、波長スキャンする方法、又は長波長フィルターを設けることによって測定できる。

[0013] （２－２）改変方法について

本発明の海洋動物発光酵素のアミノ酸配列を改変するためには、当該アミノ酸配列自体の所望のアミノ酸残基を化学的に変更することも可能であるが、一般的には当該酵素をコードする塩基配列中の、置換すべきアミノ酸に対応する塩基をポイント変異させればよい。塩基の変異方法は部位突然変異法など周知の方法を適宜用いることができる。以下、「クイックチェンジ法」（非特許文献20）に従ってポイント変異を導入する場合について説明するが、それには限定されない。

具体的には、（i）GLucをコードするDNAを含む大腸菌由来のプラスミド鋳型に、変異点を含むように調製した30ベース程度のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを共存させてPCR反応を行うことにより、特定部位特異的な突然変異を誘発する。（ii）PCR産物中鋳型となったプラスミドを分解するために、大腸菌由来のプラスミドのみを分解するDpnI酵素処理を行う。（iii）突然変異の導入有無を、遺伝子配列を解析することにより確認する。

鋳型となるGLucをコードするDNAとしては、公知のデータベースに登録された配列（GENE ACCESSION #: FJ010198）通りの塩基配列をそのまま又は一部改変して用いてもよい。その際に、下記3. で述べるような、さらなる機能改善のための改変体をクイックチェンジ法の鋳型DNAとして用いてもいい。また、このGLucをコードするDNA、又は改変DNAを合成するためには、まず複数のプライマーセットを用意する。次に、当該プライマーをセンスとアンチセンスに配置してPCR反応を起こす方法で、各断片を伸ばす方法で、ガウシアルシフエラーゼ遺伝子全長を含むDNAの鋳型を作成できる。この鋳型は、例えば

真核細胞発現ベクターのpcDNA3.1 (+)に導入して、大腸菌のような原核細胞で培養することによって大量生産ができる。

[0014] (2-3) 発光機能向上のための改変のストラテジー

本発明者らは、海洋動物発光酵素において、アミノ酸残基を置換する候補位置を決定するために、まず以下の点に注目した。

(i) GLucの全アミノ酸配列の疎水性配列解析によると、酵素の中央部に親水性アミノ酸領域が検索される(図4B)。蛋白質の中央部における親水性領域はこの部位が外部に露出されていることを意味し、基質が容易に接近できる部位であり、基質との相互作用位置、すなわち酵素の活性中心を含む領域であると推測した。

(ii) 海洋動物発光酵素のウミシイタケ由来発光酵素(Renilla luciferase; RLuc)に対する結晶解析情報(非特許文献15)によると、(i)の親水性領域からなる推定酵素活性部位近傍には、イソロイシン(Ile)などの疎水性アミノ酸が、一定間隔で規則正しく現れる。これらの規則正しい疎水性アミノ酸の出現は、GLucでも観察されることから、このイソロイシン(Ile)反復配列近傍が基質との相互作用が行われる、酵素活性の重要部位であると推定した。

(iii) 本発明者らは、以前、GLucの中央部を6ヶ所切断する一連の分割研究を行った結果、アミノ酸番号93と98の近傍の領域が酵素活性の重要部位であることを見出していた(非特許文献14)(図3A)。この知見は、上記(i)、(ii)の知見とよく一致する。

上記(i)～(iii)の知見を総合的に勘案し、「海洋動物発光酵素のアミノ酸配列の中央部で、GLucにおける74位から131位に対応する位置が酵素の活性中心である」と推定した。そして、当該推定活性中心領域にある疎水性アミノ酸反復配列付近が、実際に基質との相互作用が行われる位置であると推定した。

そこで、以下、GLuc配列において、74位から131位に含まれる疎水性アミノ酸を中心にポイント変異導入を行う。

そして、置換するアミノ酸の選択に際し、活性中心で起きている基質との相互作用として、（ア）基質との水素結合（イ）基質のフェニル基との芳香族環相互作用（ウ）基質と酵素の疎水性残基間相互作用の３種類の相互作用を想定し、これら相互作用を調整することで酵素活性基の改善が図られるという前提を設けた。

また、アミノ酸残基を置換する際には、酵素作用の行われる酵素活性中心部分の環境自体の変更を避けるために、類似したアミノ酸残基の中から候補を選択する、「同類アミノ酸置換（conservative amino acid replacement）」を大前提とした。

すなわち、（ア）の基質と水素結合を見込めるアミノ酸類とは、ペプチド結合に関与しないアミノ基、もしくはカルボキシル基、アミド基、又は水酸基を有する極性アミノ酸であり、具体的には、中性アミノ酸であるアスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、システインなど、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸及びグルタミン酸が、塩基性アミノ酸であるアルギニン、ヒスチジン、及びリシンがある。そこで、それぞれに典型的なものとして、中性アミノ酸としては、アスパラギン、スレオニン、セリン及びグルタミンを、また、酸性アミノ酸としてグルタミン酸、塩基性アミノ酸としてヒスチジンを選択して、90、93～95、97、99、100位の位置のアミノ酸を置換した。

（イ）基質のフェニル基と芳香族環相互作用を見込めるアミノ酸類としては、具体的には、 π 軌道電子を有する芳香族系アミノ酸又は複素環系アミノ酸であり、具体的には、フェニルアラニン（Phe）、チロシン（Tyr）、トリプトファン（Trp）、ヒスチジン（His）である。これらを用いて90、93～95、97及び130位の位置のアミノ酸を置換した。なお、チロシン（Tyr）、ヒスチジン（His）は、上記（ア）に属するアミノ酸でもあり、フェニルアラニン（Phe）及びトリプトファン（Trp）は、下記（ウ）に属するアミノ酸でもある。

（ウ）基質と酵素の疎水性残基間相互作用を見込めるアミノ酸類としては、具体的には、疎水性でありかつ非極性アミノ酸残基である、Leu（ロイシン

）、Ile（イソロイシン）、Val（バリン）、Ala（アラニン）、Phe（フェニルアラニン）、Pro（プロリン）、Met（メチオニン）、Trp（トリプトファン）、Gly（グリシン）が相当する。典型的なアミノ酸として、Leu（ロイシン）、Ile（イソロイシン）、Val（バリン）、フェニルアラニン（Phe）、トリプトファン（Trp）、及びグリシン（Gly）を用い、74、77、90、93～95、97、108、112、115、118、121、130、及び131位の位置のアミノ酸を置換した。なお、フェニルアラニン（Phe）及びトリプトファン（Trp）は、上記（イ）に属するアミノ酸でもある。

[0015] （２－４）発光機能が向上した本発明の変異発光酵素

上記（ア）、（イ）及び（ウ）に示した戦略ीのもとに行った実験結果によると、GLucにおけるアミノ酸位置74位から131位のうちで、89位から118位への変異導入の場合に発光機能改善効果が認められた。具体的には、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応するアミノ酸残基の位置での「同類アミノ酸置換（conservative amino acid replacement）」であり、発光酵素の輝度が高まり、及び／又は発光強度が安定化し、及び／又は長波長へのシフトが起こるという発光酵素活性機能の向上が達成できた。最も改善効果が高かった置換は、同90位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応する位置での（ウ）に則した同類アミノ酸置換と、同89位もしくは97位に対応する位置での（イ）に則した同類アミノ酸置換であり、発光酵素の強度が高まると共に発光が安定化し、しかも長波長へのシフトが起こった。すなわち、上記90位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応する位置の疎水性でありかつ非極性（特に脂肪族の）アミノ酸残基（具体的にはイソロイシン）を他の疎水性で非極性（特に脂肪族の）アミノ酸残基（具体的にはロイシン、トリプトファン、及びバリン）への置換及び上記89位もしくは97位の位置の芳香族アミノ酸残基（具体的には89位のフェニルアラニンもしくは97位のチロシン）から他の芳香族アミノ酸残基（具体的にはトリプトファン）への置換が、発光強度が高く安定化し、かつ長波長へのシフトを起こすものであった。とりわけ、上記90位のイソロイシ

ンをロイシンに置換した改変体（I90L）はきわめて安定的に高輝度で、かつ長波長側にシフトした優れた変異発光酵素であった。

なお、上記90位のロイシンをチロシンに置換した場合にも、疎水性アミノ酸残基同士という意味で同類置換といえるが、その場合には発光強度の増大は見られなかったものの、長波長シフトは起こすことができた。上記89位のフェニルアラニンもしくは97位のチロシンからトリプトファンへの置換も、疎水性アミノ酸残基から疎水性アミノ酸残基への置換といえることからみて、「GLucにおけるアミノ酸位置89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応する疎水性アミノ酸残基をそれぞれ他の疎水性アミノ酸残基に変異させた場合に、発光強度増加と安定化及び／又は長波長へのシフトが起こるという発光酵素活性機能が向上する。」と言い換えることもできる。

また、同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換（具体的には同95位のヒスチジンをグルタミン酸に、又は同100位のアスパラギン酸をアスパラギンに置換）により長波長へのシフトが起こるから、発光の波長を長波長側にシフトさせる場合には、（ア）の戦略も有効であることが確認できた。長波長側にシフトすることは、細胞膜や皮膚などを通して観察する際の光の透過性が高まることであるから、歓迎すべき特徴である。

[0016] また、上記の各位置への1箇所のみの変異導入ではなく、前記の（ア）、（イ）及び（ウ）の各戦略に沿った変異を複数の箇所に導入することで、さらに発光機能の向上が達成できることを確認できた。

つまり、本発明においては、複数箇所の位置での変異を同時に行うことも有効である。例えば、発光強度を高め、かつ発光安定性を向上させるための変異（具体的には、GLucのアミノ酸配列上の89位、90位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の1箇所以上の疎水性アミノ酸への変異）と共に、発光の光の波長を長波長側にシフトさせるための変異（具体的には、同90位、95位、97位及び100位に相当する位置の1箇所以上の変異）を組み合わせ

ることで、さらに発光強度を高め、かつ発光安定性を向上させると共に、長波長へのシフトを達成できる。

具体的には、前記GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のイソロイシン（I）をロイシン（L）に置換すると共に、同89位に相当する位置のフェニルアラニン（F）をトリプトファン（W）に置換した改変ルシフェラーゼ（F89W／I90L）、及び同90位に相当する位置のイソロイシン（I）をロイシン（L）に置換すると共に、同115位に相当する位置のイソロイシン（I）をロイシン（L）に置換した改変ルシフェラーゼ（I90L／I115L）は、いずれも極めて高い発光強度を安定に示し、かつ大幅に長波長シフトも起こす画期的なルシフェラーゼであった。

[0017] さらに高い発光機能を持たせた改変体を得るため、「F89W／I90L」の2箇所の改変ルシフェラーゼに対して、さらに、同95位に相当する位置のヒスチジン（H）をグルタミン酸（E）もしくはグルタミン（Q）に置換し、かつ同97位に相当する位置のチロシン（Y）をトリプトファン（W）に置換したところ（F89W／I90L／H95E／Y97W）、発光強度及び安定性の増大効果を保持したままで、さらなる長波長シフトが実現できた。特に、「F89W／I90L／H95E／Y97W」は、もとのGLucの最高発光強度を示すピーク値が471nm（吸光度）の位置にあったものが506nm（吸光度）にまで長波長側にシフトした。

[0018] 生物発光強度の安定性は、各変異体に基質（PBSバーファースに溶かす）を導入し、その生物発光の経時変化を観測することで行っている。典型的なGLuc改変体であるI90L、H95E、Y97Wについて5秒間観測したところ比較的安定的な発光強度を示し（図7A）、さらに長時間（10分）観測した結果は、本来のGLucの発光値（白丸）の減少は激しい反面、I90L（黒四角）とI90V（灰色三角）の発光値は比較的安定的な発光強度を示した（図7B）。各変異体に基質（Matthew改良バーファースに溶かす）を導入した後、その生物発光の経時変化を短時間（5秒間）観測した結果（図7C）も同様であった。また、各変異体に基質（Matthew改良バーファースに溶かす）を段階的に導入した後、各段階別の生物発光の経時変化を1秒ずつ観測した結果（図7D）も、各変異体が非常に安

定的で強い生物発光を示していることが分かる。

[0019] (2-5) 他のガウシア類ルシフェラーゼの改変体

ガウシアときわめて類似したガウシア類海洋動物である、カイシア (*Metridia pacifica*又は*Metridia longa*) 由来のガウシア類ルシフェラーゼ、具体的にはMpLuc1 (*Metridia pacifica*由来) 及びMLuc (*Metridia longa*由来) のルシフェラーゼにおいても、GLucのアミノ酸配列の90位に相当するMpLuc1の114位の位置の同類アミノ酸置換による変異体 (MpLuc1-I114L変異体) 及びMLucの123位の位置の同類アミノ酸置換による変異体 (MLuc-I123L変異体) と共に、GLucのF89W/I90L/H95E/Y97W (Mon3) の変異体に対応するMpLuc1のY113W/I114L/H119E/Y121W変異体 (MpLuc4) 及びMLucのY122W/I123L/H128E/Y130W変異体 (MLuc4) を作製し、その発光特性を計測したところ、GLuc改変体の場合と同様に生物発光強度が高まり、安定性も増し、かつ長波長側にシフトするという顕著な効果が達せられ (図14A~C及び図15A~D)、GLucでの知見は全て他のガウシア類ルシフェラーゼに対しても適用できることが確かめられた。

[0020] (2-6) 発光機能が向上した本発明に用いる変異発光酵素

以上の結果からみて、本発明の海洋動物発光酵素、特にガウシア類ルシフェラーゼにおいて、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) のアミノ酸配列上の89~118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して「同類アミノ酸置換 (conservative amino acid replacement)」を施すものであり、具体的には、GLucのアミノ酸配列上の89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位の位置の疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換、又は同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換を含むものである。

その際の疎水アミノ酸としては、グリシン (Gly) のような小型の疎水性アミノ酸よりも分子量の大きな疎水性アミノ酸が好ましく、疎水性で非極性で

あれば、トリプトファン (Trp) のような芳香族性アミノ酸であってもよい。特に、疎水性アミノ酸のうちの脂肪族アミノ酸であるロイシン (Leu)、バリン (Val)、イソロイシン (Ile) 及びトリプトファン (Trp) が好ましく、Leu (ロイシン)、Val (バリン)、Trp (トリプトファン) がさらに好ましい。

そして、前記疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の90位、108位、112位、115位、もしくは118位の位置の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基から、他の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基への置換 (特に、イソロイシンをロイシン、トリプトファン及びバリンから選ばれたいずれかのアミノ酸残基への置換) の場合、又は同89位もしくは97位の位置の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基から他の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基への置換 (89位のフェニルアラニン (Phe) 又は同97位のチロシン (Tyr) のトリプトファン (Trp) への置換) の場合、得られた変異発光酵素は、発光酵素の輝度が高まると同時に発光強度が安定化し、又は長波長へのシフトが起こるという発光酵素活性機能の向上が達成できる。その際、変異位置と変異アミノ酸の組み合わせで、最も好ましい組み合わせは、同89位をトリプトファン (Trp) に置換する場合及び同90位をLeu (ロイシン) 又はVal (バリン) に置換する場合、そして同108位をVal (バリン) に置換する場合である。

また、水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換は、GLucのアミノ酸配列上の95位のヒスチジン (His) をグルタミン酸 (Glu) に、又は同100位のアスパラギン酸 (Asp) をアスパラギン (Asn) に置換するものであり、その場合の改変ルシフェラーゼは、長波長へのシフトが起こる。

上記改変ルシフェラーゼのうちでも、最も輝度が高く、安定性も増大し、しかも長波長シフトが起こった改変体は、GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のイソロイシンをロイシンに置換する改変を含む改変ルシフェラーゼ (GLuc-I90L、MpLuc1-I114L、MpLuc1-I114L) である。さらに好ましくは、GLucのアミノ酸配列上の89位に相当する位置をトリプトファンに、90位を

ロイシンもしくはバリンに、95位をグルタミン酸に、97位をトリプトファンに、108位をバリンに、112位をロイシンもしくはバリンに、115位をバリンに、又は118位をロイシンもしくはバリンに置換する場合は、特に顕著な発光強度増強を示し、長波長シフトも起こす。特に同90位でのロイシン変異体（GLuc-l90L、MpLuc1-l114L、MpLuc1-l114L）は、輝度も高いばかりか長波長シフトも顕著な優れた改変ルシフェラーゼである。

また、本発明において「変異発光酵素（改変ルシフェラーゼ）」というとき、活性中心に相当する領域である、GLucのアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸配列中には、原則としてもとのガウシア類ルシフェラーゼのアミノ酸配列に対して、上記「同類アミノ酸置換」以外の変異がないことが望ましい。しかし、当該領域以外の配列であれば酵素全体の立体構造が大きく変わらない範囲内の変異であれば許容でき、特にN又はC末端部分の一部、例えば1～50、好ましくは1～30、より好ましくは1～20、さらに好ましくは1～10アミノ酸残基が削除されている場合も含まれる。具体的には、上記改変後のガウシア類ルシフェラーゼのアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の89～118位までに相当する領域を除くアミノ酸配列が、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%の同一性のあるアミノ酸配列であると表現できる。

[0021] 3. 本発明の海洋動物発光酵素遺伝子の哺乳動物適合性コドンへの変更

本発明の海洋動物発光酵素の用途については下記4. で述べるが、典型的には、従来の生物発光プローブにおける発光酵素の要素として用いることの他に、きわめて高輝度であるため生体内の各種の蛍光イメージング用レポーター遺伝子の代替として用いることなどが挙げられる。このようなレポーター遺伝子アッセイ法、ツーハイブリッド法などのレポーター遺伝子を用いた分析法は、いずれも従来から確立している宿主細胞系内で行われることになるため、本発明の変異発光酵素遺伝子を標的遺伝子のプロモーターと結合してベクターを作製し、宿主細胞へ導入し培養する一連の操作手順は全て周知方法が適用できる。

その際の宿主細胞としては、一般的な遺伝子組換えに用いられる哺乳動物細胞（COS細胞、CHO-K1細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、NIH3T3細胞）のみならず、酵母細胞、大腸菌など細菌細胞、昆虫細胞などでも良いが、主要な用途としては、ヒトをはじめ哺乳動物の生体内で、又はインビトロの哺乳動物細胞内で用いる場合が多い。

そして、本発明の変異発光酵素遺伝子は、用いる宿主細胞に応じて当該細胞に適したコドンに変更することで、宿主細胞内で発現しやすい塩基配列にする改変しておくことが好ましい。また、ベクターに挿入するための制限酵素サイトを設ける改変も適宜行う必要がある。これらの工程も周知方法が適用できるが、1例として、ヒトなどの哺乳動物の生体内で用いる場合、又はインビトロの哺乳動物細胞内で用いることを想定した改変体の作製の改変ストラテジーを示す。

すなわち、他の機能向上のための改変としては、各アミノ酸に対応するコドンヒトなど哺乳動物に適したコドンに変更して、ヒトなど哺乳動物体内で発現しやすい塩基配列にする改変、ならびに所望の位置に制限酵素サイトを導入する改変などがあり、本発明においても必要に応じて適宜採用する。このような機能向上用の改変ストラテジーについて、以下に具体的に示すがこれらの手法に限定されない。

[0022] (i) 生体は同じDNAを発現する分子機構を共有していながらも、生物種によって遺伝子コドンの割合が異なる点を考慮した。例えば、大腸菌に比べて動物細胞には核酸のGやCの比率が高い。またGとCの比率の高い遺伝子を好んで発現する。したがって、当該GLucの動物細胞での効果的な発現のために、従来の既知のGLucの遺伝子配列をGやCの割合を高める方向にそのコドンを最適化する。

(ii) 真核細胞での高発現を担保するために、遺伝子の最初の位置にコザック配列（GCCACCAATGG）を導入する。

(iii) GLuc遺伝子上流にある本来の細胞外分泌シグナル（1-17AA）は、発光活性と直接関係しないので削除するか、又は他の公知の細胞外分泌シグナ

ルもしくは細胞内局在シグナルに入れ替える。又は、分泌シグナルをそのままおき、別にC末側に細胞内局在シグナルを繋げても良い。

[0023] 本発明の実施態様では、公知のGLuc配列情報を見本にして、上記 (i) ~ (iii) の点を考慮の上、GLucをコードするDNAの鋳型を設計した。当該DNA合成用プライマーセットを構築してPCR反応によりGLuc遺伝子の鋳型を完成した。この鋳型を真核細胞発現ベクターのpcDNA3.1 (+)に導入してサブクローンを行った。

上記発現ベクターを鋳型にし、上述の「クイックチェンジ法」に基づいてポイント変異を導入した。具体的には、変異点を含むように調製した30ベース程度のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを共存させてPCR反応を行い、特定部位特異的な突然変異を誘発した。次いで、DpnI酵素処理により、鋳型GLuc遺伝子の乗った大腸菌由来のプラスミドのみを分解し、遺伝子配列を解析して突然変異の導入有無を確認した。

[0024] 4. 本発明の変異酵素の酵素活性の確認方法

変異導入されたGLucの酵素活性は、例えば、以下の方法で検証することができる。

まず、公知の遺伝子導入用脂質試薬を用いて、GLuc変異体を持つ発現ベクターをアフリカ猿由来のCOS-7細胞に導入し、比較のために変異を含まない従来のGLucを持つ発現ベクターも、同法で細胞に導入する。ベクターを導入してから一定時間（10～20時間、例えば16時間）が経過した後、既知の細胞溶解試薬を使って細胞溶解液を作製する。

その後、細胞溶解液とセレンテラジンを含む既知の基質溶液とを混合して発色強度や発光の経時安定性などを測定する。

発光強度は、従来の発光分光光度計を用い、周知の基質添加後に測定する方法で特定の波長での強度を計測すればよく、毎分計測することで発光の経時的安定性が測定できる。長波長へのシフトを測定するには、全波長スキャンする。

本発明の実施態様では、GLucにおける89位、90位、108位、112位、115位、

及び118位での疎水性アミノ酸から他の疎水性アミノ酸への変異体が、発光強度の増強を示した。具体的には、89位をトリプトファンに、90位をロイシンもしくはバリンに、108位をバリンに、112位をロイシンもしくはバリンに、115位をバリンに、及び118位をロイシンもしくはバリンに置換する場合に、強い発光スペクトルのピークが見られた（発光分光光度計）。また、発光プレートリーダーを用いて発光スペクトルの面積の測定では、同90位でのロイシン変異体と共に、同95位でのグルタミン酸への変異体及び同97位でのトリプトファンへの変異体も顕著な発光強度増強を示したが、これら変異体はいずれも長波長シフトも起こしており、特に同90位でのロイシン変異体（I90L）は、輝度も高いばかりか長波長シフトも顕著な優れた発光酵素変異体である。さらに、同90位のロイシン置換と共に、同89位のトリプトファン置換又は115位でのロイシン置換を同時に行った2箇所変異体（F89W/I90L、I90L/I115L）、及び同90位のロイシン置換、同89位のトリプトファン置換、同95位のグルタミン酸置換と共に同97位のトリプトファン置換を同時に行った4箇所変異体（F89W/I90L/H95E/Y97W）は、いずれも顕著な発光強度を示すと共に長波長側への顕著なシフトも起こす画期的な発光酵素変異体であった。

また、同95位及び100位の位置での水素結合を形成する中性アミノ酸であるグルタミン（Gln）又はアスパラギン（Asn）への変異体は長波長へシフトした生物発光を示した。同様に、同90位及び97位の位置の変異体は、疎水性アミノ酸であるロイシン（Leu）、水素結合を形成するアミノ酸であり、かつ芳香族系アミノ酸であるチロシン（Tyr）、又は芳香族系アミノ酸であり、かつ疎水性アミノ酸であるトリプトファン（Trp）のいずれの変異であっても、長波長側にシフトした生物発光を示すことが確認できた。長波長側へのシフトでは、GLucの発光ピークは471nmであるが、変異体Y97Wは486nmであり、変異体I90Yは492nmであった。また、I90Lは486nm、F89W/I90Lは481nm、I90L/I115Lは483nmまで長波長にシフトし、特にF89W/I90L/H95E/Y97Wでは506nmという画期的な長波長シフトが観察された。このような長波長の生物発光は、生体の組織透過性が向上するため、今後優れた分析信号としての用途での利用価値が

高い。

[0025] 5. 本発明の改変ルシフェラーゼ遺伝子としての応用

本発明の変異発光酵素をコードする遺伝子は、従来ルシフェラーゼ遺伝子が用いられていたレポーター遺伝子としての各種分析システムにおける用途と共に、現在研究開発が進んでいる生物発光プローブとしての用途が最も期待される。

(5-1) レポータージーンアッセイ (reporter gene assay)

本発明の海洋動物発光酵素変異体は、従来、広く使われているレポータージーンアッセイ (reporter gene assay)、Yeast Two-hybrid assay、Mammalian Two-hybrid assay、protein splicing assay、protein complementation assay、circular permutation assay、bioluminescence resonance energy transfer assay (BRET)等に核心要素として搭載でき、アッセイの計測性能を飛躍的に向上できる。従来から広く用いられていた、ホタルルシフェラーゼの場合の、(ア)分子量が大きくて発現までに時間がかかるので、宿主細胞に大きな負担をかけることになり、(イ)発光強度が低いため、十分ルシフェラーゼ(レポーター)量が蓄積するまでに、通常刺激後1~2日の時間を待つ必要がある、という欠点は全て解消される。

本発明の高輝度発光酵素を使用することによって、レポーターの発光強度が極めて高い(特にI90L変異体の場合は、従来のホタルルシフェラーゼより1万4千倍も強い)ため、刺激後にごく短時間で測定ができる利点があることから、従来より大幅に計測時間を短縮でき、かつ経時的な発光の安定性も高いことから、遺伝子導入効率の悪い細胞株においても発光測定ができる。また、長波長側にシフトしているので、細胞膜、皮膚を通しての透過性が高まっているため、測定感度も高い。

具体的に、本発明の高輝度発光酵素をこれらのレポータージーンアッセイに適用するためには、上流に特殊なプロモーターを搭載している既知の真核細胞発現ベクターに当該発光酵素を繋いで、真核細胞に導入し、一定時間が過ぎた後、信号(刺激)有り無しの条件で測定に用いればよい(非特許文献

13)。当該発光酵素を搭載できる、レポータージーンアッセイ用の発現ベクターとしては、公知のp TransLucentベクターを利用し、既知の方法を使って簡単に搭載させることができる。また、Two-hybrid assay用のベクターとしては、市販のpG5Lucベクターに周知の方法を使い簡単に当該発光酵素を搭載し、使用することができる。

[0026] (5-2) 発光プローブへの応用

また、本発明の高輝度発光酵素を、本発明者らが既に特許出願している発明に係る一分子型発光プローブ（非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12、特願2007-005144、特願2007-202308、特願2007-332253、特願2008-116098、特願2009-025229、PCT/JP2008/050370、US12/025532、US12/343830）、又は二分子型発光プローブ（非特許文献4、非特許文献6、非特許文献7）に組み込むことによって、リガンドの有無、リガンドの活性強度を高輝度で観測できる。当該プローブの構成要素として、（ア）2つに分割された当該発光酵素（NとC末側断片）の近傍に、（イ）標的リガンドに応答するリガンド結合タンパク質と、（ウ）リガンド結合タンパク質にリガンドが結合したことを認識する認識タンパク質を繋げた形態で高性能の発光プローブを構成できる。この発光プローブ中、前記リガンド結合タンパク質にリガンドが結合したことを前記認識タンパク質が認識した場合に、2つに分割された前記酵素断片が相補して酵素活性を変化させることができる。この時、当該分割酵素の高輝度と安定性のため、検出限界の向上と信頼性の高い計測が可能となる。

[0027] 本発明において、「一分子型発光プローブ」というとき、可視化イメージングするために用いられる全構成要素を単一融合分子内に集積したことを特徴とする、公知の生物発光プローブの1種である（特許文献7など）。例えば、本発明の海洋動物発光酵素変異体を2分割したNとC末側断片を、リガンド結合タンパク質及びリガンド結合蛋白質の認識タンパク質を基本構成要素として含む融合タンパク質である。同様に「二分子型発光プローブ」というときは、本発明の海洋動物発光酵素変異体のN末側断片とC末側断片を、リ

ガンド結合タンパク質を含む融合タンパク質、及び認識タンパク質を含む融合タンパク質内にそれぞれ存在させたタイプの生物発光プローブを指す。

これらの生物発光プローブにおいて本発明の海洋動物発光酵素高輝度変異体を用いる場合には、N末側断片とC末側断片とに2分割する必要があるが、その分割位置は、上記公知の「一分子型発光プローブ」、及び「二分子型発光プローブ」で用いられていた海洋動物発光酵素における分割位置と同一の位置である。すなわち、本発明のGLuc変異体の場合は、105～110位の位置で分割すればよく、MLucの場合は、138～142位の位置での分割が適用される。

また、前記一分子型生物発光プローブ以外にも、本発明者らによる円順列置換プローブ（非特許文献11；非特許文献12）に対して当該高輝度生物発光酵素を搭載することにより、安定した強い発光強度で細胞内分子現象を効率よく計測できる。本出願の実施例9の一分子型生物発光プローブで述べた8990N及びMon3Nに加えて、円順列置換プローブの場合では、配列表に示されたcPresso及びcPressoMaxに該当している。

[0028] 本発明の高輝度発光酵素を一分子型発光プローブとして用いる際の具体的な手法は、（特許文献7，特願2007-332253、特願2009-025229）に詳細に記載された手法に従う。具体的には、本発明の海洋動物発光酵素を2分割し、リガンド結合性の蛋白質及び当該蛋白質にリガンドが結合した場合の立体構造変化を認識するペプチド配列とを直線上に結合させた発光プローブをコードするキメラDNAを設計する。一般には、そのキメラDNAを発現させたい細胞に適したベクター内にサブクローンし、当該ベクターを細胞内に導入して、細胞内で発現させるが、キメラDNAの上流に制御配列を繋いで細胞内に直接導入することもできる。ここで、対象の細胞としては、ヒトを含めた哺乳動物由来の細胞が好ましく、生体内に存在する状態の細胞であっても、細胞本来の機能を維持した状態の培養細胞であってもよい。酵母細胞、昆虫細胞の他、大腸菌などの原核細胞であってもよい。ベクターの具体的な種類も特に限定されず、発現に用いる宿主中で発現可能なベクターが適宜選択され得る。細

胞内への導入法としては、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等の公知のトランスフェクション法を用いることができる。あるいは脂質による細胞内導入法（BioPORTER (Gene Therapy Systems社)、Chariot (Active Motif社)等）を採用することもできる。

本発明の高輝度発光酵素を用いた生物発光プローブは、キメラDNAとして細胞内に導入された後に細胞内で融合タンパク質として発現されるため、当該形質転換細胞に対してリガンド刺激を行った後、当該細胞からの発光量の変化を測定することによって、リガンドの性質、活性の程度等を評価することができる。

[0029] 本発明の高輝度発光酵素を生物発光プローブ内に構成する際、当該生物発光酵素と共に搭載できる「リガンド結合タンパク質」としては、そのリガンド結合部位にリガンドが結合するタンパク質が意図される。リガンド結合タンパク質は、例えば、リガンドが結合することによって立体構造が変化するか、リン酸化を起こすか、蛋白質間相互作用を促すものであり得る。このようなリガンド結合タンパク質としては、例えば、ホルモン、化学物質又は信号伝達タンパク質をリガンドとする核内受容体（NR）、サイトカイン受容体、あるいは各種タンパク質キナーゼが用いられる。リガンド結合タンパク質は、対象とするリガンドによって適宜選択される。リガンド結合タンパク質に結合するリガンドとしては、リガンド結合タンパク質に結合するものであれば特に限定されず、細胞外から細胞内に取り込まれる細胞外リガンドであってもよく、細胞外からの刺激により細胞内で産生される細胞内リガンドであってもよい。例えば、受容体タンパク質（例えば核内受容体、Gタンパク質結合型受容体等）に対するアゴニスト又はアンタゴニストであり得る。また、細胞内の情報伝達に関与するタンパク質に特異的に結合するサイトカイン、ケモカイン、インシュリン等の信号伝達タンパク質、細胞内セカンドメッセンジャー、脂質セカンドメッセンジャー、リン酸化アミノ酸残基、Gタンパク質結合型受容体リガンド等であり得る。

例えば、リガンドとして細胞内セカンドメッセンジャー、脂質セカンドメ

ッセンジャー等を対象とする場合には、リガンド結合タンパク質として、各セカンドメッセンジャーの結合ドメインを使用することができる。セカンドメッセンジャーとは、ホルモン、神経伝達物質等の細胞外情報伝達物質が細胞膜に存在する受容体と結合することによって、細胞内で新たに生成される別種の細胞内情報伝達物質を意図している。このセカンドメッセンジャーとして、例えば、cGMP、AMP、PIP、PIP₂、PIP₃、イノシトール3リン酸 (IP₃: inositol triphosphate)、IP₄、Ca²⁺、diacylglycerol、arachidonic acid等が挙げられる。例えば、セカンドメッセンジャーのCa²⁺に対しては、リガンド結合タンパク質としてカルモジュリン (CaM) を用いることができる。

[0030] (5-3) 細胞内イメージング

また、当該超高輝度発光酵素をコードする遺伝子を用いることで、様々な細胞株に安定的に導入できる。一例として、新型万能細胞 (iPS) に当該生物発光酵素を安定的に導入できる。新型万能細胞 (iPS) そのものは、光らないため内部で起こる分子現象、組織特異性を探索するのは大変困難であった。この困難を克服するために、まず、体細胞に当該発光酵素を含む分子プローブを導入してから胚を作成し、様々な臓器組織に分化させる。すると、各臓器ごとに起こる特異的な分子現象を高感度で計測できる。

その際には、山中らの手法 (非特許文献19) に従う。

また、本超高輝度生物発光酵素に適選のシグナルペプチドを繋げることによって、各細胞小器官の高輝度イメージングに使用できる。例えば、GAP-43由来のMLCCMRRTKQV配列をGLucのN又はC末に付けることによって、細胞膜に局在化できる。また、細胞質局在のためにGRKKRRQRRR配列を付ける。また、小胞体 (ER) と細胞核に局在化させるためには、それぞれKDELとDPKKKRKV配列を繋げることによって可能となる。他に、His-tag (HHHHHH)、FLAG-tag (DYKDDDDK)、Myc-tag (EQKLISEEDL)、HA-tag (YPYDVPDYA)、V5-tag (GKPIPNLLGLDST)、T7-tag (MASMTGGQQMG) などの抗原サイトをつけることによって、非細胞系における免疫染色、分離精製に利用できる。その際には、周知の免疫染色法、immunocytochemistry等の手法が適用できる。

[0031] 6. その他

本発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。なお、用語は基本的にはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。また発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術はJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995; 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 III (組換えDNA技術)」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法またはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。また、本発明で使用する各種蛋白質やペプチド、あるいはそれらをコードするDNAについては、既存のデータベース (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>等) から入手することができる。

実施例

[0032] 以下、実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、本発

明は以下の例に限定されるものではない。

なお、本明細書中に引用した技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

[0033] 〔実施例 1〕 GLucをコードする遺伝子配列の構築

ガウシア由来発光酵素（GLuc : Gaussia luciferase）の公知の遺伝子配列（GENE ACCESSION #: FJ010198）をベースに新たな遺伝子配列を決定する際、公知の哺乳類動物細胞に最適なコドンに変更した。具体的には、哺乳類動物細胞に最適に発現されるためには、GやCを多く含むコドンにしなければならない。例えば、アミノ酸のPheをコードする塩基はTTTとTTCがあるが、TTCの方が哺乳類動物細胞には最適である。他に、蛋白質の発現量を増やすために、翻訳開始コドン（AUG）前後に公知のコザック配列（GCCGCCAATGG）を配置した。

本遺伝子配列を合成するために、センスとアンチセンスのプライマーを交互に配置し、PCR反応を起こして全長の配列を合成した。このGLucの全長を、他の変異導入実験における鋳型とした。その全長は図2に示されている。

[0034] 〔実施例 2〕 GLucにおける酵素活性部位の探索と変異導入

（2-1） ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）に変異を導入するにあたって、以下の推論をたてた。

推論 1：ウミシイタケルシフェラーゼ（Renilla luciferase; RLuc）が、海洋動物由来発光酵素の共通の基質であるセレンテラジンと結合して形成する結晶構造（図3C）を詳細にみると、RLucの酵素活性部位には、（1）一定間隔（2～4個）で疎水性アミノ酸が現れる領域が存在し、（2）親水性和疎水性アミノ酸部位の間に基質が挟まれる構造をとっていることが分かった（図2B）。

GLucのアミノ酸配列を検討していくと、同様の位置の領域（アミノ酸番号74-161）において、疎水性アミノ酸（イソロイシン（I）、ロイシン（L）、バリン（V）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）等

）が、一定間隔（2～4個）で現れることを見出し、GLucにおいても、当該領域が基質との結合領域にあたり、発光酵素活性を左右する重要な部位であると推定した。

推論 2：まず、当該発光酵素内の活性部位を推定するために、酵素の中央部の数箇所を切断し、その間にカルモジュリン（CaM）を挿入して、酵素活性の回復能を探索した。その結果、切断位置#1-#3では酵素活性が殆ど観測されなかった。一方、切断位置#4からは非常に強い生物発光が観測された（図 3 A）。

このGLucの切断位置に関する研究から、GLucにおいて、切断位置#3や#4近傍のアミノ酸配列がGLucの酵素活性を左右する重要な領域であることが確認できた。

推論 3：また、GLucの疎水性配列検索から、この部位が親水性と疎水性アミノ酸ドメインが交差する領域であることが確認できた（図 3 B）。

推論 4：蛍光蛋白質の発色団に関する従来研究を検討し、以下の技術に着目した。

（1）蛍光発色団と水素結合を形成するアミノ酸（チロシン（Y）、セリン（S）等）を発色団の近傍に導入することで、発色団の π 結合を伸ばす効果をもたらし、長波長発色や発光輝度の変化をもたらしすることができる（非特許文献 16）。

（2）蛍光発色団は、フェニルグループを骨格にしていることから、発色団のフェニルグループと相互作用できるように、フェニルグループをサイドチェーンとするアミノ酸を発色団の近傍に導入することで、蛍光蛋白質が改良できた（非特許文献 17）。

（3）蛍光発色団と疎水的な相互作用ができるように、蛍光発色団の近傍に疎水性アミノ酸を導入することで、安定な高輝度の蛍光発色が達成できた（非特許文献 18）。

このように、蛍光蛋白質においては、蛍光蛋白質の発色団近傍のアミノ酸に変異を導入することが蛍光蛋白質の改良に有効な場合があることが分かっ

た。

海洋動物由来の発光酵素の基質を、蛍光蛋白質の発色団と対比してみると、構造が酷似していることから、「発色団としては、ほぼ同じ化学構造をもつものが、蛍光蛋白質では分子の内部にあり、発光酵素では、基質として分子外部にある」と推論した（図3C）。

推論5：以前の本発明者らの発光酵素に関する研究において、酵素活性部位近傍の配列を一部重ねることによって、発光性能を改良することができた例がある。この事例から、酵素活性部位近傍のアミノ酸配列を一部重ねる手法によっても、発光酵素の性質改良が見込める。

[0035] (2-2) 以上の五つの推論に基づき、発光酵素の活性部位と推定される部位及びその近傍の18箇所の位置に、同類アミノ酸置換による様々な変異導入のストラテジーを検討し（図4A）、当該ストラテジーに従い、57種類のGLuc変異体をコードするDNAを作製した（図4）。図中、例えば「L74I」はGLuc遺伝子に対して、GLucのアミノ酸配列中の74位のL(Leu)をI(Ile)に置換させるDNA変異を導入したことを示し、「F89W, I90L」は、89位のF(Phe)をW(Trp)とし、同時に90位のI(Ile)をL(Leu)に置換させた変異体を指す。

[0036] [実施例3] アミノ酸変異を導入したGLucの生物発光強度の比較

実施例2で作製したGLuc変異体DNAを挿入したpcDNA3.1(+)ベクターを、12穴プレート上で培養したCOS-7細胞に導入し、16時間インキュベーションした。

その後、各ウェル上のCOS-7細胞から細胞溶解液を作製し（5分間溶解）、発光酵素に特異的な基質（セレンテラジン）存在下でのスペクトルを、蛍光光度計（F-7000, Hitachi）を用いて測定し、導入した変異の有効性を検討した。その結果を図4（B-1）、（C）に示す。

図4（B-1）、（C）によると、変異導入位置によっては、本来のGLucに比べて長波長の生物発光を示すものもあれば、著しく高輝度の変異種も発見できた。具体的には、まず、基質とフェニル基間の相互作用を見込める変異を導入した場合、97位のチロシン（Y）をトリプトファン（W）に変異した

変異体（Y97W）の場合、約10nmのレッドシフトが観測された。この結果は、基質とフェニルグループを介した結合が起こったため、 π 結合が延長されたためであると解析できる。

また、上記の基質と水素結合を形成する、一連のアミノ酸変異導入を行った結果、95位のヒスチジン（H）をグルタミン（Q）に、また100位のアスパラギン酸（D）をアスパラギン（N）に共変異した場合、約7nm程度のスペクトルのレッドシフトが観測された。この結果は、基質と各アミノ酸が水素結合を起こして、一部 π 結合が延長されたためであると解析できる。また、本来のGLucにF89W/I90L/H95E/Y97W変異を導入した場合に、発光波長のピークが35nmも長波長シフトした変異種を得ることができた（図4D）。なお、図4（C）、（D）には示していないが、I90L変異体も長波長側へ最大で15nmのシフトを起こすことも確認している（図4B-2）。

上記した変異種は、長波長の生物発光を示すため、特に生体内での生物発光を観測する上で有利である。610 nm Long-Pass filterを利用して、各変異体が出す610 nm以上の生物発光（組織透過性がよい）を観測した結果、図4（E）で示した。予測されたとおりに、I90L等が従来のGLucに比べて、格段と高い光量を示すことが分かった。

[0037] 一方、変異によって生物発光強度が強くなり、高輝度の変異酵素が得られたのは、推定酵素活性部位に疎水性アミノ酸変異を導入した場合である。図4（B-1）には、発光分光光度計（F-7000, Hitachi）を用い、各発光スペクトルのピークを指標としたグラフを示す。また、細胞サンプルを準備する際、細胞溶解（lysis）液に浸す時間を5分にすることによって、クイックプロセスで細胞小器官までは溶解されていない非均一性サンプルを用意することができる。当該図からみて、本来のGLucをF89W, I90L, I90V, I108V, I112L, I115V, I118L, I118Vに変更した場合、とりわけ高輝度のGLucの変異体が得られる。

この結果から、GLucの基質と疎水性相互作用をするアミノ酸変異を導入することによって、生物発光そのものが非常に高輝度のものになることを発見

した。例えば、GLucの発光強度に対して、F89Wは9倍、I90Lは14倍、I108Vは6.7倍、I118Lは4.2倍の発光強度を示した。特にI90Lの場合、アミノ酸一つの変異により、従来より14倍強い生物発光を示すことは驚くべきであった。この結果は、現在商業的にもっとも使用されているホタルルシフェラーゼ（FLUC）に比べて1万4千倍強い生物発光にあたる。

さらに、変異箇所を増やしたGLuc変異体遺伝子を導入した形質転換COS-7細胞を作製し、その細胞溶解液を含めて、上記発光強度測定実験を同一実験条件で繰り返した（図4B-2）。なお、図4（B-2）では、特に発光強度が高いGLuc変異体について発光強度の最大値を示した波長をあわせて図示した。この際、細胞溶解（lysate）サンプルは、細胞溶解（lysis）液に20分浸すプロトコルを採用した（細胞小器官まで溶解される均一界）。その輝度は、発光プレートリーダーによる発光スペクトル面積を指標とした。図4（B-2）では、本来のGLucをI90L、H95E、Y97W、F89W/I90L、I90L/I115L、F89W/I90L/H95E/Y98Wに変更した場合に、とりわけ高輝度であった。またこれら変異体では、いずれも長波長にシフトしていることが見て取れる。

以上の結果からみて、GLucの活性中心に相当する領域において、基質と疎水性相互作用をするアミノ酸変異が導入されることにより、生物発光そのものが非常に高輝度のものになることが確かめられた。例えば、GLucの発光強度に対して、I90Lは7.1倍（以下面積比）、H95Eは3.0倍、Y97Wは2.1倍、F89W/I90Lは10.2倍、I90L/I115Lは4.9倍、F89W/I90L/H95E/Y98Wの場合は4.4倍の発光強度を示した。特にI90Lの場合は、図4（B-2）の実験結果においても、従来のGLucと比較し、7.1倍、FLucに比べると1万倍もの強い生物発光にあたる。

[0038] また、この高輝度のGLuc変異体を他の発光酵素との発光強度を視覚的に比較するために、チューブの中で、FLuc、従来GLuc、高輝度GLuc変異体のそれぞれの溶液に対して基質（セレンテラジン）を投入した（図5）。その結果、高輝度GLuc変異体（I90L）が非常に強い生物発光を示すことが視覚的に観察できた。

図6には、本願発明のGLuc変異体（I90L）を従来の発光酵素群（ホタルルシフェラーゼ（FLuc）、ガウシアルルシフェラーゼ（GLuc）、コメツキムシルルシフェラーゼ（GBLuc）等）と比較した発光スペクトル値を示す。この図からも、GLuc変異体の発光強度が抜群に高いことが分かる。

[0039] 〔実施例4〕 変異生物発光酵素の安定性測定

発光酵素に期待される酵素特性としては、高輝度と共に発光の安定性が重要である。そこで、本発明で得られた上記の高輝度生物発光酵素変異体の発光反応安定性を調べるために、基質導入後における発光強度の経時変化を計測した（図7）。

まず、各GLuc変異体をコードする遺伝子をpcDNA3.1(+)にクローンし、同量のプラスミドをCOS-7細胞に導入した。導入16時間後に細胞を回収し、細胞溶解液で溶解した後、マイクロプレートリーダーに搭載した。プレートリーダーの基質噴射機に、セレンテラジンを溶かしたPBSバーファースをセットした。測定するとき、各ウェルに自動的に基質を噴射した後、0.05秒刻みで発光値の変化を測定した。具体的には、GLucそのものと、F89W、I90L、H95E、Y97Wの酵素活性を測定した。その結果、I90L、H95E、Y97Wのような変異体が比較的に安定的な生物発光を示した。一方、GLucとF89Wは比較的に不安定的な発光強度を示した（図7A）。

更に、より長時間に渡る発光値の変化を調べるために、I90L、F89W、I90Vを基質導入後10分間の生物発光を観測し、本来のGLucとの相対値を図示した（図7B）。その結果、I90L及びI90Vは安定的である反面、F89WとGLucそのものは比較的に不安定的であり、その発光値は、基質導入後10分までに約60%の発光値減少が観測された。この結果から、90位のイソロイシン（I）をロイシン（L）又はバリン（V）に変異させた場合に高輝度のみならず、高安定性も確保できることが確認された。

更に、その発光値の安定性を調べるために、Matthew改良バーファースをベースにした基質溶液を用いて、I90L、F89W/I90L及びI90L/I115Lの各変異体の発光特性を調べた。発光経時変化を短時間（5秒間）観測した結果が図7（C）

であり、同（D）は基質を段階的に導入した後、各段階別の生物発光の経時変化を1秒ずつ観測した結果を示す。その結果、各変異体（I90L, F89W/I90L, I90L/I115L）は基質導入後に非常に速い応答時間を示し、その発光強度も、従来のGLucそのものに比べて非常に強い生物発光を示しており、これら実験結果からも、各変異体が非常に安定的で、強い生物発光を示していることが分かる。

なお、当該Matthew改良バーファースの組成は、以下のものである：

100 mM potassium phosphate, 500 mM sodium chloride, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.15 mg/ml porcine gelatin, pH 5.0, 1% Nonylphenol ethoxylates (Tergitol NP-9) and 1% Antifoam, 25 mM thiourea, 0.1% DMSO.

[0040] 〔実施例5〕 更なる改良変異体の合成

上記変異研究をベースに当該合成GLucの更なる改良体遺伝子を合成した（図8）。図8（A）に示す合成GLucのI90L変異体は、（ア）人間細胞で最適に発現するように、NCBI-GenBankの人間コドン割合情報に基づいて、人間の遺伝子コドン（GCリッチ）に近くなるように改変し、（イ）GLucのレポーターとしての活用性を高めるために、その遺伝子の真ん中又は、後尾に制限酵素サイトを付加した。図8（A）に表示したように、SacIIとEcoRVはそれぞれ312番と340番の塩基位置に導入した。このサイトは、以前発明者らの研究によって適切な切断サイトとして見つけられたサイトであり（非特許文献12）、蛋白質を挿入する上で最適挿入位置である。また、遺伝子の後尾にBamHIを導入した。このサイトはMulticoloningサイトの一つとして、他の蛋白質のDNAと繋げるとき、有効に利用するためである。

前記実施例7までの実験結果から得られた知見からみて、望ましいGLuc変異体の改変箇所が、I90Lを含む4箇所であるので、その全ての位置に変異を導入したGLuc酵素変異体（Mon3：F89W/I90L/H95E/Y97W）を、ヒト適合型コドンを用いて作製した例が図8（B）である。当該Mon3の改変ストラテジーを具体的に示すと以下ようになる。

(ア) まず、GLucそのものは、N-末側に細胞外分泌シグナルを持っているため、細胞内に留めるためには、ER局在信号のKDELを配列最後につける必要がある。

(イ) GLucの推定酵素活性部位は、酵素の中心部にあり、特に活性に関わる重要部位は、F89からI131に分かって分布していることが分かった。

(ウ) GLucの酵素活性・特性に特に重要なアミノ酸は、配列中下線で示した。

(エ) GLuc酵素をコードするDNA配列の中心部（酵素活性部位）に制限酵素サイトを設けることによって、後日、酵素分割型生物発光プローブを作成しやすくする配慮をする必要がある。このためにD114とI115に渡ってEcoRVサイトを導入した方がよい。

(オ) GLucの最後尾に、他の遺伝子配列との融合を図るためにBamHIサイトを導入することも効果的である。

Mon3を用いた実験例は、図4（B）及び（D）にも示したが、きわめて生物発光活性度が高く、かつ長波長へのシフト（最大で35nmの長波長シフト）が達成されたことが見て取れる。

[0041] 〔実施例6〕各GLuc変異体の基質選択性の検討

当該発明によって得られたGLuc変異体の基質選択性を調べた（図9）。COS-7細胞を24穴プレートに培養する。のちに、各GLuc変異体をコードするプラスミドを細胞に導入し、更に16時間間培養した。その後、細胞に30 μ Lの細胞溶解液を添加する。その後、各変異体別の発光値を、様々な基質共存条件で測定した。その結果を図9（A）に示す。

その結果から、各変異体は基質選択性を持つことが確認できた。具体的には、本来のGLucそのものも含めた各変異体は、セレンテラジン（coelenterazine, CTZ）、セレンテラジンfcp、セレンテラジンipが共存している場合のみに強い生物発光をしめした。一方、セレンテラジンcp、セレンテラジンhcp、セレンテラジン400A共存条件では、強い生物発光を示さなかった。

その代表的なスペクトルを図9（B）で示し、その基質別最大発光値を図

9 (C) にまとめた。その結果によれば、本来のGLucそのものを含めた各変異体のスペクトルは、基質の種類によって影響されることが分かった。各変異種は、基質によって発光値が長波長にシフトするものがあれば、短波長にシフトするものもあった。この結果から、各変異体は、基質を変えることによって長波長、または短波長シフトをさせることができる知見をみいだした。

[0042] [実施例 7] GLuc変異体を搭載したレポータージーンアッセイ

当該発明によって開発された、GLuc変異体の有用性を証明するために、従来のレポータージーンアッセイ系のpG5Luc (Promega)にGLuc変異体を搭載した、新規レポータージーンアッセイ系を構築した(図10)。まず、男性ホルモン応答配列(ARE)を上流に持つベクター系を作成し、その下流に従来のGLuc又は当該発明のGLuc変異体をコードする遺伝子を遺伝子工学的に連結した(図10A)。この新規ベクターをCOS-7細胞に導入し、androgen(男性ホルモン)有り無しの条件で生物発光値の相違をルミノメーターで計測した(図10B)。

その結果、従来型のGLucを搭載したレポータージーンアッセイ系に比べて、当該発明のGLuc変異体を搭載した方が優れたシグナルノイズ比を示し、絶対発光値も従来より5倍程度強かった(図10B)。

更に、同様の実験条件で、発光強度のkineticsをプレートリーダーを用いて観測した(図10C)。即ち、当該ベクターを導入したCOS-7細胞を男性ホルモン(androgen)有り無しの条件で16時間刺激した後、細胞溶解液(ライセツト)を作り、特異的な基質(coelenterazine)を添加して、生物発光値の相違を即時にプレートリーダーで計測した。

上記図10(C)において、基質導入から一定時間(1秒)までの発光強度の変化を面積により定量的に比較することができる。レポーター遺伝子(190L)の発光強度変化からコントロール(GLuc)の場合の面積を差し引くことで、被検男性ホルモン活性量を正確に定量化することが可能である(図10D)。また、前記図10(D)の発光強度グラフの面積を比較してみたところ

、pARE-I90Lを導入した形質変換細胞の方がより広い面積（強い発光値）を持つことが確認できた（図10E）。

[0043] 〔実施例8〕 GLuc変異体を搭載したツーハイブリットアッセイ

GLuc変異体の有用性を証明するために、GLuc変異体を搭載した真核細胞ツーハイブリットアッセイ系を構築し、蛋白質—蛋白質間の相互作用を計測する実験を遂行した（図11）。

この実験を遂行するために、従来の典型的なツーハイブリットアッセイ用プラスミドであるpACT、pBIND、pG5Lucをベースに、以下のプラスミド群をまず作製した：（1）ER LBDとBINDをコードするプラスミド、（2）SH2ドメインとACTをコードするプラスミド、（3）レポーター遺伝子として、従来のGLuc又は、当該発明の高輝度変異体（I90L）を搭載した、pG5プラスミド。

上記プラスミド（1）（2）（3）を共導入した生細胞に、溶媒そのもの（0.5%DMSO）又は女性ホルモン（estrogen）刺激を0時間、6時間間与えた後、細胞を回収し、その生物発光値を発光光度計で測定した（図11B）。その結果、当該発明のGLuc変異体を搭載したプラスミドを保有する細胞が女性ホルモン刺激に対して優れたS/N比を示した。例えば、当該GLuc変異体を搭載した場合、6時間刺激で4倍まで発光値が上昇したが、従来法ではその発光強度増加が鈍かった。

また、当該発光強度の経時変化をプレートリーダーで計測した（図11C、D）。その結果、当該GLuc変異体を搭載した場合に非常に強い生物発光の増加を観測できた。

また、estrogen濃度による生物発光の変化を観測した（図12）。この実験のために、96穴プレートにCOS-7細胞を培養し、対照群にはERLBD-BINDとSH2-ACTをコードする遺伝子以外に従来のGLucそのものを発現するpG5-GLucを導入した。

一方、実験群には、ER LBD-BINDとSH2-ACTをコードする遺伝子以外に、当該GLuc変異体を発現するpG5-I90Lを導入した。12時間間培養した後、estrogen

nで刺激し、その後、更に8時間間培養を続けた。その後、細胞に溶解バーファァーを添加し、自動プログラムによる基質導入後その発光値を2秒間測定した。

その結果、対照群に比べて、実験群は、 10^{-7} M estrogen刺激によってでさえ、有意な発光値の差を示し、その程度がより高濃度で顕著になった。この結果は、当該GLuc変異体の優位な発光特性が、結果として検出限界の改善につながった。

次いで、上記プラスミド(1)(2)(3)を共導入した生細胞に、溶媒そのもの(0.5%DMSO)又は女性ホルモン(estrogen)刺激を0時間、3時間、6時間、18時間与えた後、細胞を回収し、その生物発光値を発光光度計で測定した(図11E)。その結果、当該発明のGLuc変異体を搭載したプラスミドを保有する形質変換細胞が女性ホルモン刺激に対してより優れたS/N比を示した。例えば、GLuc変異体を搭載した場合、3時間刺激で2倍まで発光値が上昇したが、従来法では区別ができなかった。この結果は、本願発明者らのGLuc変異体が高輝度である故に、従来に比べて大幅に短い時間刺激しても(即ち、少量が発現された場合)区別できるような強い発光上昇が観測できたことを示す。

[0044] 〔実施例9〕GLuc変異体を搭載した一分子型生物発光プローブの開発

当該発明の高輝度変異体の有用性を更に検証するために、この変異体をベースに一分子型生物発光プローブを合成した(図13)。このために、まず、当該高輝度変異体(F89W/I90Lの変異を持つGLuc変異体)、及び4つの変異を持つGLuc変異体(F89W/I90L/H95E/Y97W)を2分割し、その間にAR LBDとLXXLLモチーフを挿入した(前者を有するプローブを8990N、後者を有するプローブをMon3Nと名づけた)。このプローブを生細胞に導入し、男性ホルモン有り無しの条件で、その発光値の相違を測定した。また、コントロールとして、従来のGLucそのものを同様に2分割し、その間にGR LBDとLXXLLモチーフを挿入したプローブを作成し(SimGR3と名づける)、ストレスホルモン(cortisol)有り無しの条件で、S/N比を測定した。

このプローブの作動原理は、図 1 3 (A) で示す。まず、ストレスホルモン受容体がストレスホルモンを認識し、構造変化を起こす。その結果、隣接しているLXXLLモチーフと結合するようになるため、2 分割した発光酵素断片間の再結合が起こる。このとき、回復した酵素活性を指標に、ストレスホルモンの活性を測定できる。

この実験のために作った、SimGR3, 8990N, Mon3Nのストレスホルモン感受性を計測した(図 1 3 B)。その結果、当該発明のGLuc変異体を搭載した8990Nが強い生物発光を示し、その感受性も従来のものに劣らなかった。また、8990Nの発光特性は、発光強度の経時変化測定でも、同様の結果を示した(図 1 3 C)。また、従来のSimGR3と8990Nの発光値を610 nm Long-Pass filterで計測した結果、当該発明の8990Nの方が、従来より優れた発光特性を示した。一方、従来のSimGR3は、ストレスホルモン有り無しの条件を区別できるまでの、有意義な発光値の差を示さなかった(図 1 3 D)。

[0045] [実施例 1 0] MpLuc1及びその変異体の発光活性の計測

また、当該発明で見出した、酵素活性部位と変異箇所が海洋動物由来の発光酵素に一般的に適用できるかどうかを試すために、海洋動物の一例であるMetridia pacifica由来の発光酵素(MpLuc1)をベースにした新規生物発光酵素変異体群を作成した(図 1 4)。

具体的には、従来のMpLuc1そのもの、MpLuc1のY113への変異導入体(これから、Y113Fと呼ぶ；これはGLucのF89に相当する)、MpLuc1のI114への変異導入体(これから、I114Lと呼ぶ；これはGLucのI90に相当する)、また、MpLuc1のI114Lを含め、4箇所の変異を導入した変異体(Y113W/ I114L/ H119E/ Y121Wの変異を持つ；MpLuc4と名づける；これはそれぞれ、GLucのF89、I90、H95、Y97に相当する)をそれぞれ遺伝子工学的に合成した。各々の変異体を生細胞に同量導入し、その相対的な発光強度を計測した。

まず、各変異体の発光スペクトルを計測した結果、I114Lが従来のMpLuc1に比べて高輝度発光を示すことが分かった。また、MpLuc4は、従来のMpLuc1に比べて、スペクトルが長波長シフトしていることが観測できた(図 1 4 A)。

また、当該変異体の発光値を610 nm Long-Pass filterで調べたところ、従来のMpLuc1に比べて強い生物発光を示していることが分かった（図14B）。また、各変異体の発光特性を調べるために、基質導入後の発光値の経時変化をマイクロプレートリーダーで観測した結果、従来のMpLuc1に比べて、安定的な生物発光を示していることが分かった（図14C）。特にMpLuc4は他の変異体と違って、基質導入後10秒内に60%の発光値を維持していることが分かった。

[0046] 〔実施例11〕 Mluc及びその変異体の発光活性の計測

また、当該発明で見出した、酵素活性部位と変異箇所が海洋動物由来の発光酵素に一般的に適用できるかどうかを試すために、海洋動物の一例であるMetridia longa由来の発光酵素（MLuc）をベースにした新規生物発光酵素変異体を作成した（図15）。

具体的には、従来のMLucそのもの、MLucのI123L変異導入体（これから、I123Lと名付ける；これはGLucのI90に相当する）、MLucのI123Lを含め、4箇所の変異を導入した変異体（Y122W/ I123L/ H128E/ Y130Wの変異を持つ；MLuc4と名付ける；これはそれぞれ、GLucのF89、I90、H95、Y97に相当する）をそれぞれ遺伝子工学的に合成した。各々の変異体を生細胞に同量導入し、その相対的な発光スペクトルを計測した。その結果、従来のMLucに比べて、I123Lの発光強度が変異導入によって強くなることが分かった（図15A）。また、その最高発光強度位置（ λ_{max} ）も変異導入によって変わることが分かった。当該発明によって製造された変異体の発光安定性を調べるために、基質導入後の発光強度の経時変化を0.5秒刻みで計測した（図15B）。その結果、4箇所に変異を導入したMLuc変異体（MLuc4）が最も安定的な生物発光を示した。一方、従来のMLucは、基質導入後、わずか10秒で90%の発光強度を失うことが分かった。また、この変異体の長波長発光度を調べるために、610 nm Long-Pass filterを利用して発光値を測定した結果、I123Lが強い赤波長の生物発光を発光することが分かった。この傾向は、基質導入前後の発光値を計測した結果からも、同様な結果を得ることができた（図15D）。

当該発明の知見に基づいて変異導入した酵素変異体は、従来型に比べて、より優れた生物発光特性を示すことが分かった。

[0047] 〔実施例 1 2〕 GLuc変異体を用いた生体イメージング

当該GLuc変異体の改良点（高輝度、長波長シフト、安定性等）を生かして、その生体系への応用可能性を検証した（図 1 6）。

まず、GLucの高輝度変異体である8990をコードするpcDNA3.1プラスミドを製作し、COS-7細胞に導入した。一方、コントロールとして、従来のGLucそのものをコードするpcDNA3.1プラスミドを同様にCOS-7細胞に導入した。その後、両形質変換細胞を、BALB/c ノードマウス（5週齢メス）の左と右の甲部・皮下組織に移植した。移植した細胞が安定化するまで12時間待ち、同量の基質（セレンテラジン）を注射した後、その発光値の程度を比較した（図 1 6 A）。その結果、8990を発現する形質変換細胞を移植した部位から、より強い生物発光を観測できた。

[0048] 更に、当該GLuc変異体を発現するマンマリアン・ツーハイブリットシステム(mammalian two-hybrid system)を搭載した生細胞を作成し、それを用いた生体イメージングシステムを試みた（図 1 6 B）。

まず、女性ホルモン受容体（ER LBD）とSrc SH2 ドメインをそれぞれBINDとACTにつなげたプラスミドを作成した（pBINDとpACT）。一方、その応答系として、Gal4応答配列を上流に持ち、I90Lを発現するプラスミドも作成した（pG5-I90L）。このコントロールとして、従来のGLucそのものを発現するプラスミドを作成した（pG5-GLuc）。

[0049] 前記 3 種類のプラスミド（pBIND, pACT, pG5-I90L又はpG5-GLuc）をCOS-7細胞に共トランスフェクション（cotransfection）することで、形質変換細胞を作成した。この形質変換細胞をBALB/c ノードマウス（5週齢メス）の左と右の甲部・皮下組織にそれぞれ移植した。この時、左甲部にはコントロール（pG5-GLuc）、右甲部にはpG5-I90Lを持つ形質変換細胞がそれぞれ移植されたことになる。更に移植が安定化するまでに12時間を待った。

後に、各マウスに女性ホルモン又は、溶媒（0.1% DMSO）を注射し、更に6

時間後に発光強度を観察した（図 1 6 B）。その結果、女性ホルモン刺激を施したマウスの方が、より強い生物発光を示した。また、女性ホルモン刺激をしたマウス内でも、左甲部（GLuc発現）に比べて、右甲部（l90L）発現の方がより強い生物発光を示した。この結果は、女性ホルモン刺激によって、同量のGLuc又は、l90Lが発現されたとしても、l90Lの方が高輝度で安定的であるため、より強い生物発光を示したと解析できる。

産業上の利用可能性

[0050] 従来から広く用いられているレポータージーンアッセイ法をベースとしたリガンド計測、又は従来の生物発光プローブなどにおける生物発光酵素に代替して用いることで、アッセイの計測性能を飛躍的に向上できるため、基礎生物学研究、医学、薬学、分析化学における診断試薬開発等の用途に広く使える。

請求の範囲

- [請求項1] 海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) のアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基が置換されている変異発光酵素であって、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換 (conservative amino acid replacement) が施されていることを特徴とする、発光機能の向上した変異発光酵素。
- [請求項2] 前記同類アミノ酸置換が、GLucのアミノ酸配列上の89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に相当する位置の疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換、又は同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換を含むものである、請求項1に記載の変異発光酵素。
- [請求項3] 前記疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の90位、108位、112位、115位、もしくは118位の位置に相当する位置の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基から、他の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基への置換、又は同89位もしくは97位の位置に相当する位置の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基から他の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基への置換を含むものである、請求項2に記載の変異発光酵素。
- [請求項4] 前記疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基から、他の疎水性でかつ非極性の脂肪族アミノ酸残基への置換が、イソロイシンをロイシン、トリプトファン及びバリンから選ばれたいずれかのアミノ酸残基に置換するものである、請求項3に記載の変異発光酵素。
- [請求項5] 前記疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基から他の疎水性でかつ芳香族アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の89位又は同97位に

相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファン（W）に置換するものである、請求項3に記載の変異発光酵素。

[請求項6] 前記水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換が、GLucのアミノ酸配列上の95位に相当する位置のアミノ酸残基をグルタミン酸（E）に、又は同100位に相当する位置のアミノ酸残基をアスパラギン（N）に置換するものである、請求項2に記載の変異発光酵素。

[請求項7] 海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のアミノ酸残基をロイシンに置換することを含む同類アミノ酸置換が施された変異発光酵素。

[請求項8] さらに、GLucのアミノ酸配列上の89位に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファンに置換するか、又は同115位に相当する位置のアミノ酸残基をロイシンに置換することを含むものである、請求項7に記載の変異発光酵素。

[請求項9] さらに、GLucのアミノ酸配列上の95位に相当する位置のアミノ酸残基をグルタミン酸もしくはグルタミンに置換し、かつ同97位に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファンに置換することを含むものである、請求項7又は8に記載の変異発光酵素。

[請求項10] 前記海洋動物発光酵素が、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）並びにカイシアルシフェラーゼ（MLuc、MpLuc1、及びMpLuc2）から選択されたいずれかの発光酵素である、請求項1～9のいずれかに記載の変異発光酵素。

[請求項11] 請求項1～10のいずれかに記載の変異発光酵素をコードするDNA。

[請求項12] 請求項11に記載のDNAを含む発現ベクター。

[請求項13] 請求項11に記載のDNAが発現可能な状態で導入された形質転換細胞。

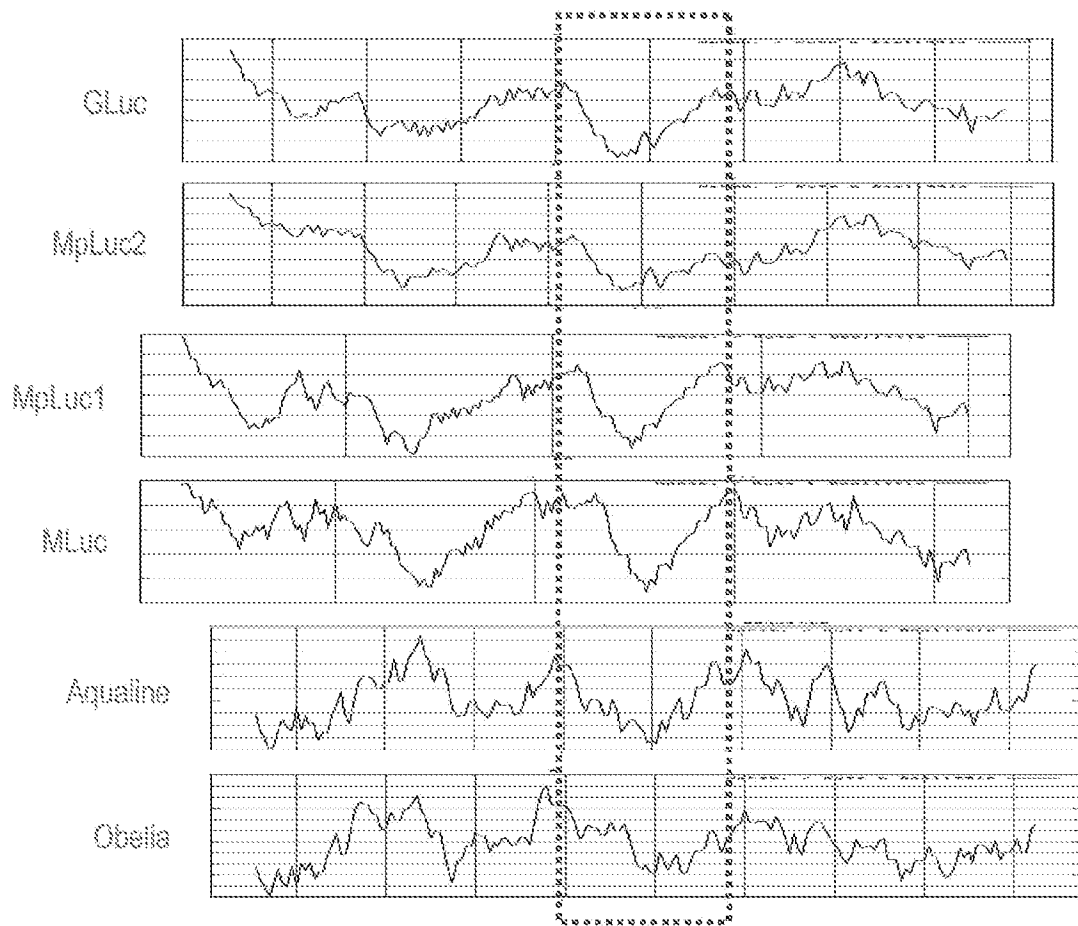
[請求項14] 海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラー

ゼ（GLuc）のアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基を置換するものであり、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換を施す置換を含むことを特徴とする、海洋動物発光酵素の発光機能の向上方法。

[請求項15] 2分割された生物発光酵素が会合することで発光機能を回復する機構を利用した生物発光プローブにおいて、請求項1～10のいずれかに記載の変異発光酵素を当該生物発光酵素として用いることを特徴とする、発光機能の向上した生物発光プローブ。

[請求項16] 請求項15に記載の生物発光プローブをコードするDNA。

[図1A]



[図1B]

1	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADR	GLuc	
1	MDIKVVETLVFSALVQAKSTEFDPNIDIVGLEGKFGITNLETDLFTIWETMEVMIKAD	MLuc	
1	MMEIQVLEALICFALVQANPTENKDDIDIVGVEGRGCTTIDLETDLFTIVEDMNVISR	MpLuc	
1	MGVKLIFAVLCAAAQAATTINENFEDIDVVAIGGSEA-LDVDANR	MpLuc	
	M @j00F.000 A -A . - j -o-0V.0 . F. -@,-		
45	-----GKLP GKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSH IKCTPK	GLuc	
59	IADTDASNFVATETDASRGKMPGKKLPLAVIMEMEANAFKAGCTRGCLICLSKIKCTAK	MLuc	
58	--DTN-----LANSADRGKMPGKKLPLEVLIEMEANARKAGCTRGCLICLSKIKCTAK	MpLuc	
45	-----GGGGHPGKKMPKEVLVEMEANARKAGCTRGCLICLSH IKCTPK	MpLuc	
	. +G PGKK@P V@ EMEANA +AGC RGCLICLS+IKCT K		
86	MKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCL	GLuc	
119	MKVYIPGRCHDYGGDKKTQAGIVGAIVDIPEISGFKEMAPMEQFIAQVDRCASCTTGCL	MLuc	
110	MKVYIPGRCHDYGGDKKTQAGIVGAIVDIPEISGFKELCPMEQFIAQVDLCADCTTGCL	MpLuc	
89	MKKFIPGRCHSYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCL	MpLuc	
	MK \$IPGRCH Y GDKj..Q.GI IVD@PEI.GPK- PM-QPIAQVD C CTGCL		
146	KGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGD-	GLuc	
179	KGLANVKCSLLKKWLPDRCASFADKIQKEVHNKGMAGDR	MLuc	
170	KGLANVKCSALLKKWLPDRCASFADKIQSEVDN IKLAGDR	MpLuc	
149	KGLANVHCSALLKKWLPSCRTFASKIQSQVDT IKLAGDR	MpLuc	
	KGLANVJCS LLKKWLP RC ,FA KIQ -Vj IKG .GD+		

Hydrophobic (o)
hydrophilic (j)
small aliphatic (.)
large aliphatic (@)
aromatic (\$)
positive (+)
negative (-)

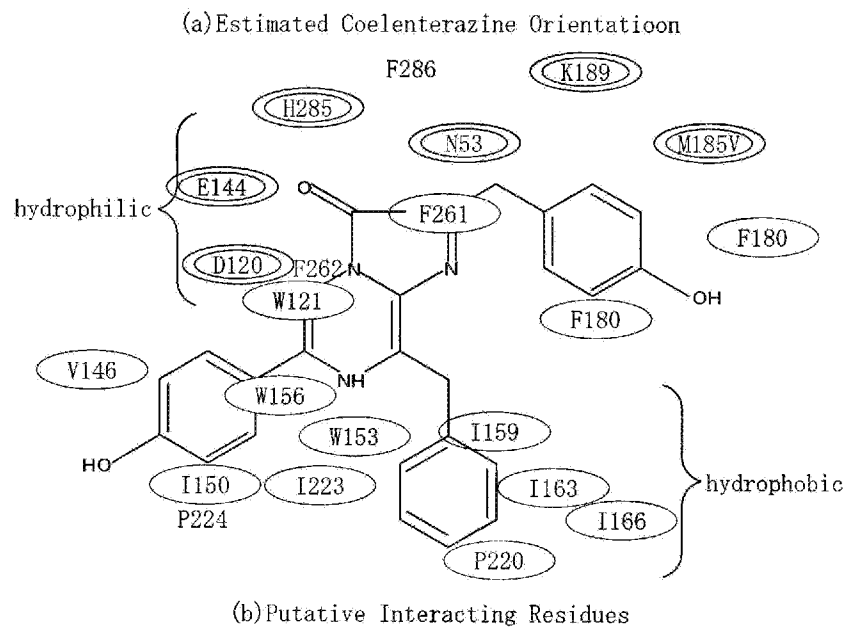
[図2A]

(A)

GLuc	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVA.....	32
MLuc	MDIKVVETLVFSALVQAKSTEFDPNIDIVGLEGKFGITNLETDLFTIWET	50
GLuc	SNFATTDLDADR GKLP GKLPLEVLKEMEANARKA	67
MLuc	MEVMIKADIADTDASNFVATETDANRGKMPGKKLPLAVIMEMEANAFKA	100
	#1↓ #2↓ #3↓ #4↓ #5↓ #6↓	
GLuc	GCTRGCLICLSH IKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPE	117
MLuc	GCTRGCLICLSK IKCTAKMKVYIPGRCHDYGGDKKTGQAGIVGAIVDIPE	150
GLuc	IPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCAT	167
MLuc	ISGFKEMAPMEQFIAQVDRCASCTTGCLKGLANVKCSLLKKWLPDRCAS	200
GLuc	FASKIQGQVDKIKGAGGD.	185
MLuc	FADKIQKEVHNKGMAGDR	219

[図2B]

(B)

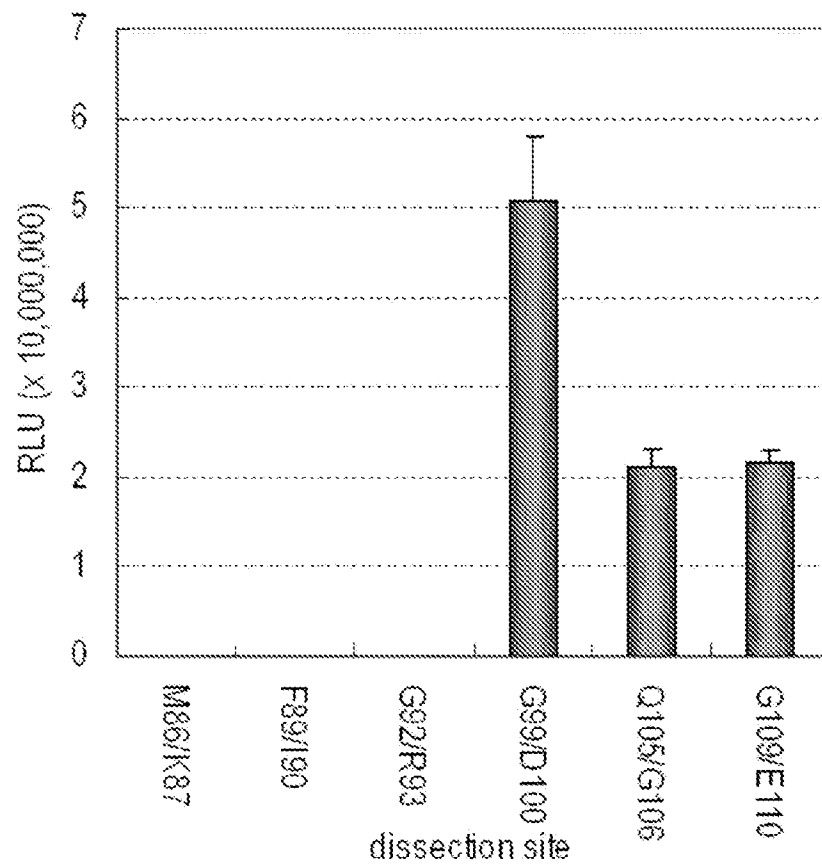


RLuc

141 VHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEKMLVLENNF 180

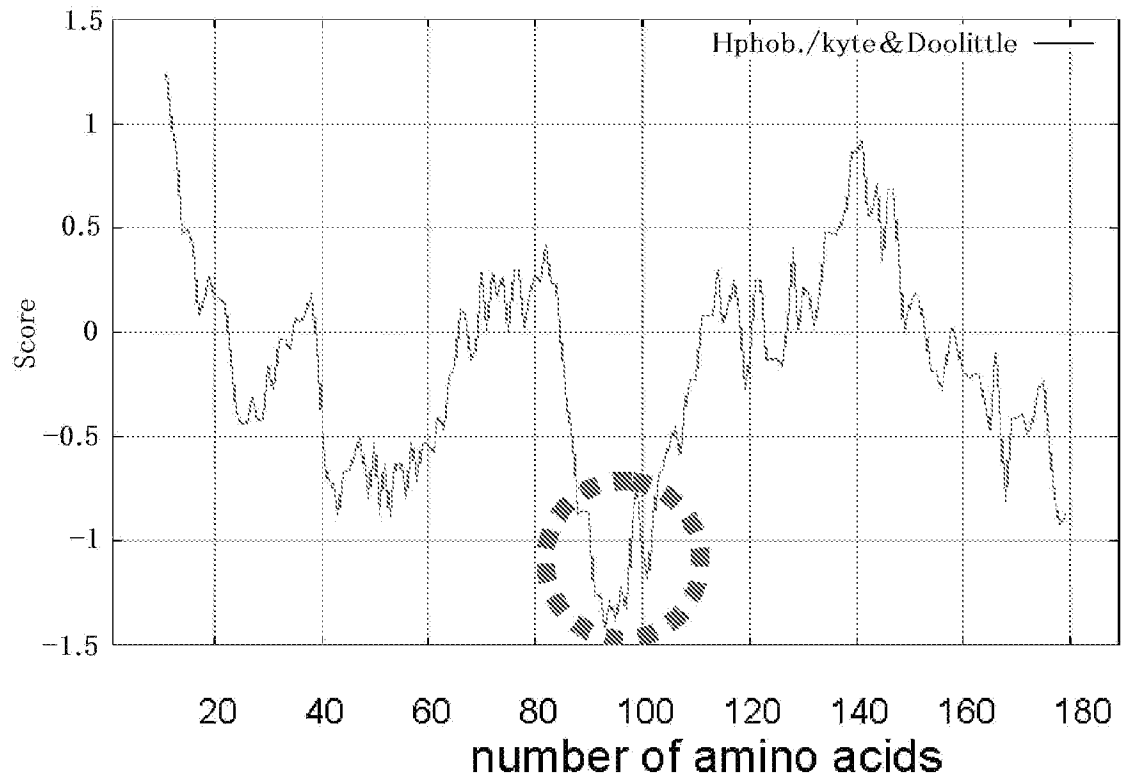
[図3A]

(A)



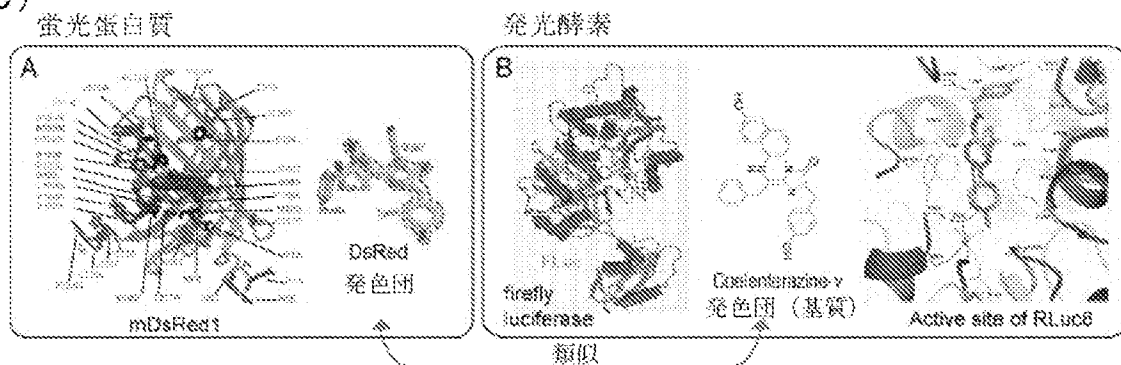
[図3B]

(B)



[図3C]

(C)



[図4A]

(A)

1 MGVKYLFALICIAVAEA 17
 18 KPTENNEDFNIVAVASNFATDLDADRGLPGKKLPLEVLKEMEANARKAGCT 70

71 RGCLICLSHIKCTPKMKKFLPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPFLPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKW 160

I I Y YYY TGEN V V V V V WL

WV RRV R L LLL L L L L L L L

T HH H

D RFF F

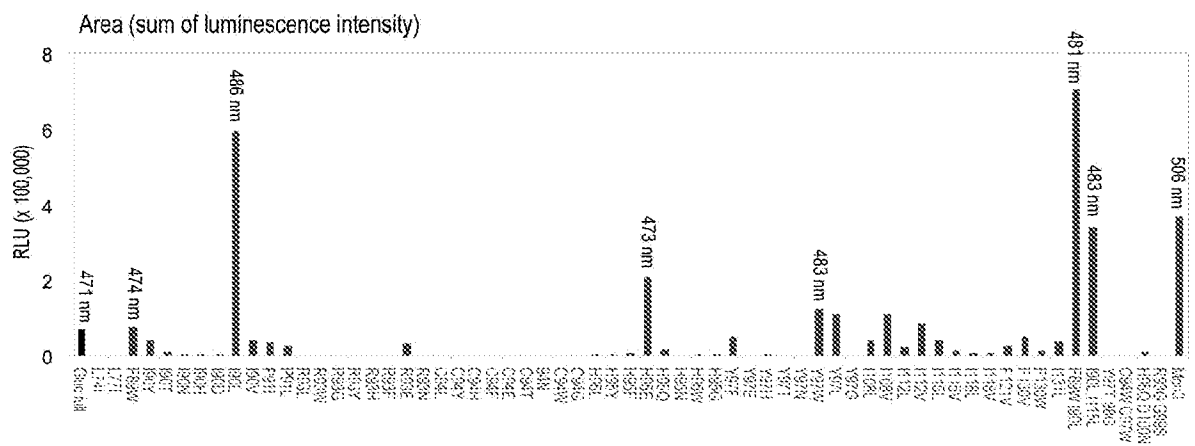
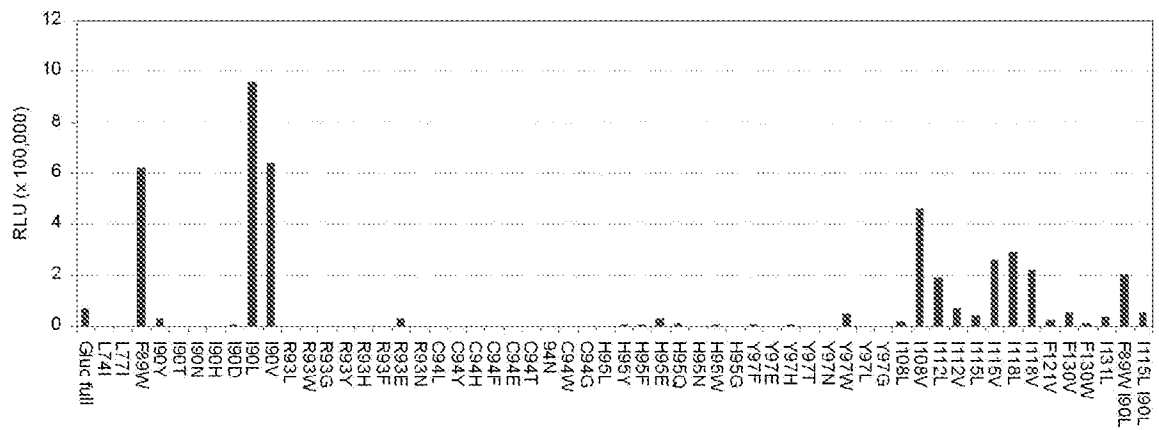
H EEE E

N NNN N

TG

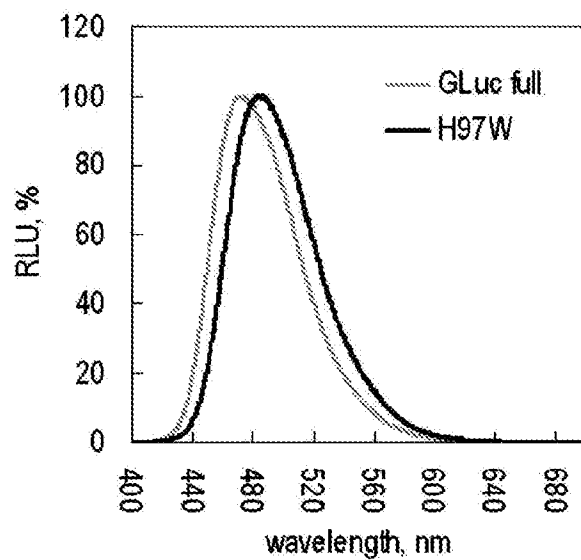
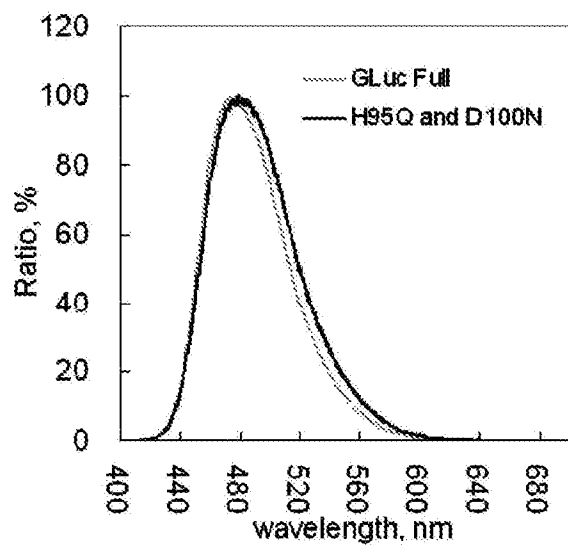
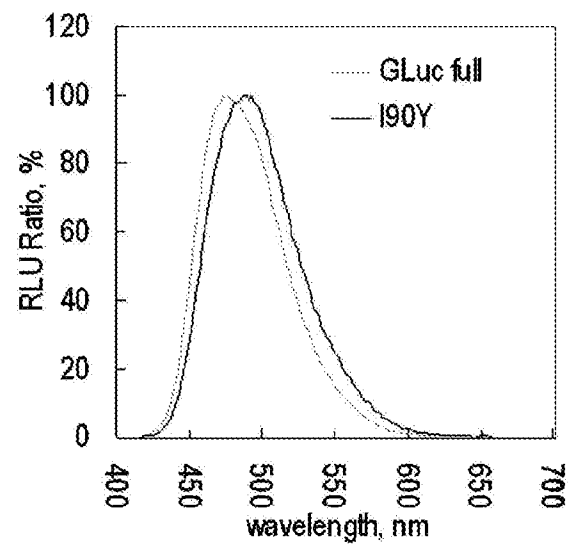
GGG G

161 LPQRCATFASKIQGQVDKIKAGGD 185



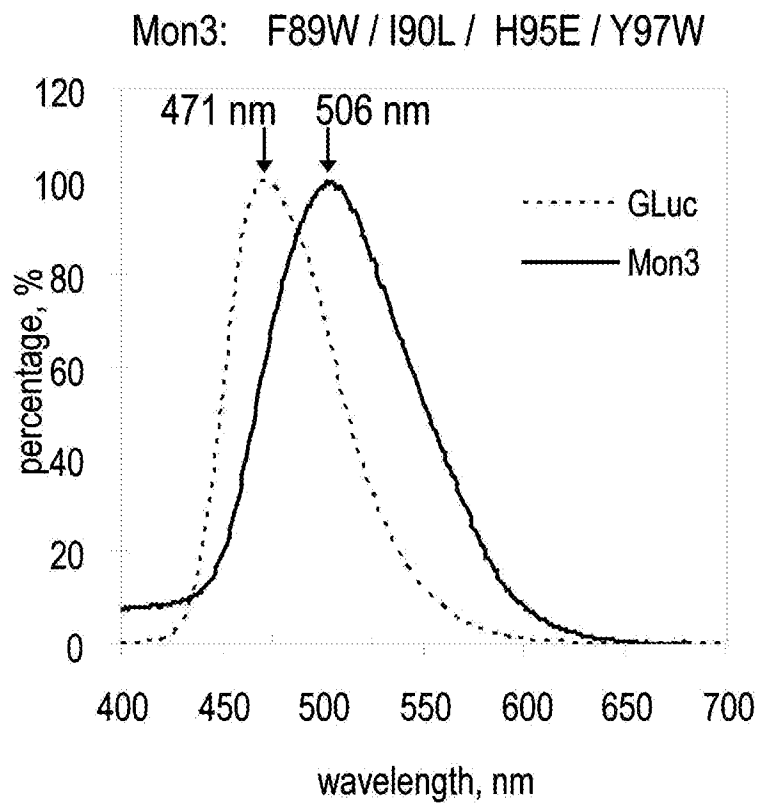
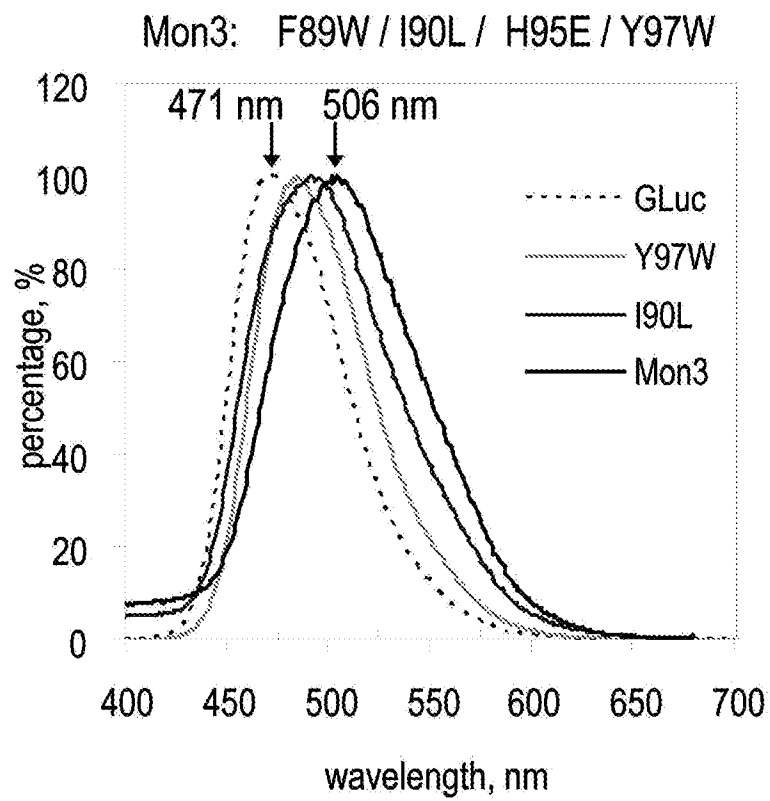
[図4C]

(C)

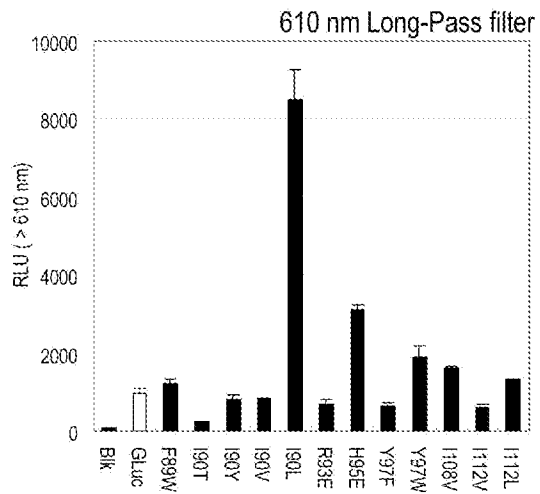


[図4D]

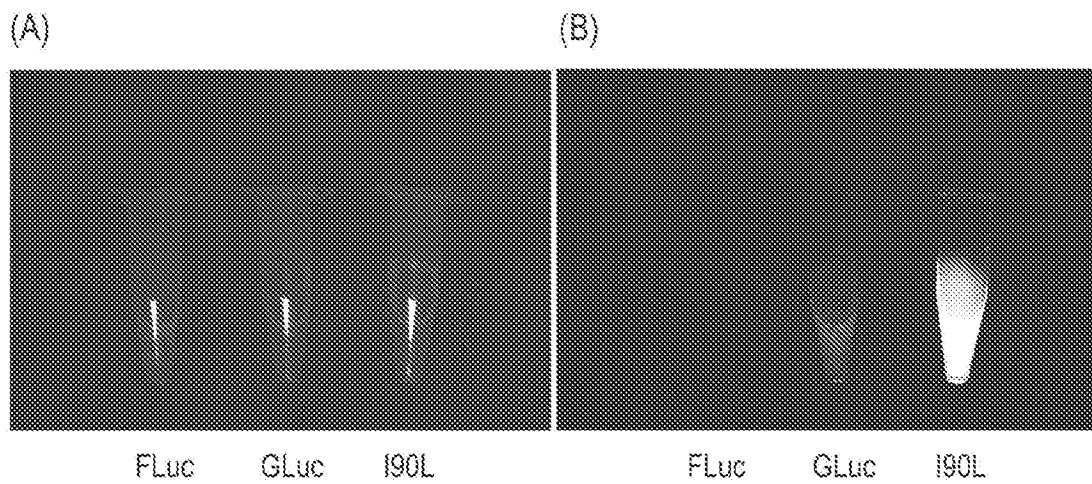
(D)



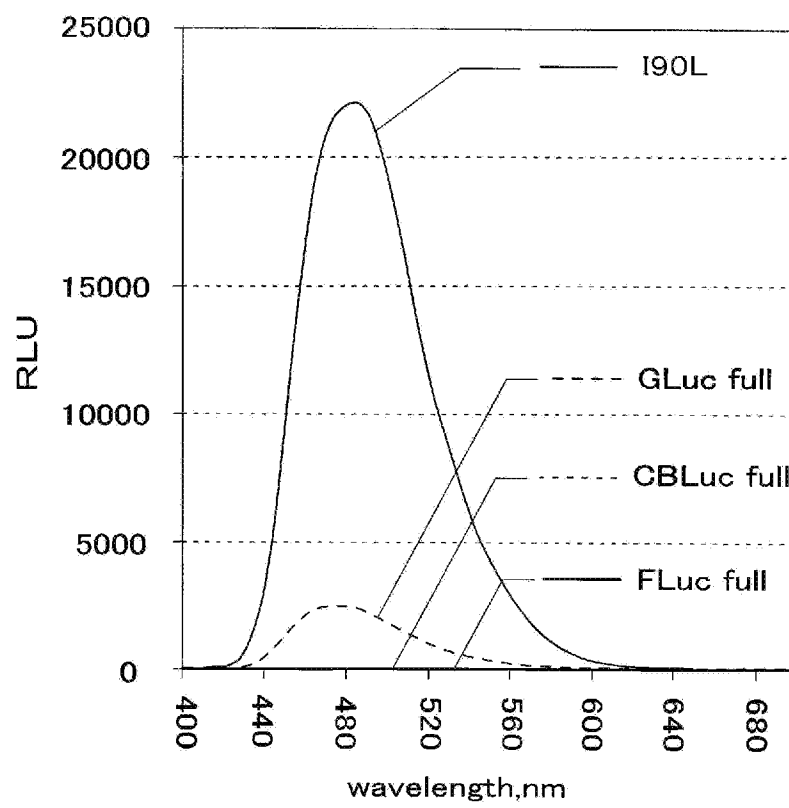
[図4E]



[図5]

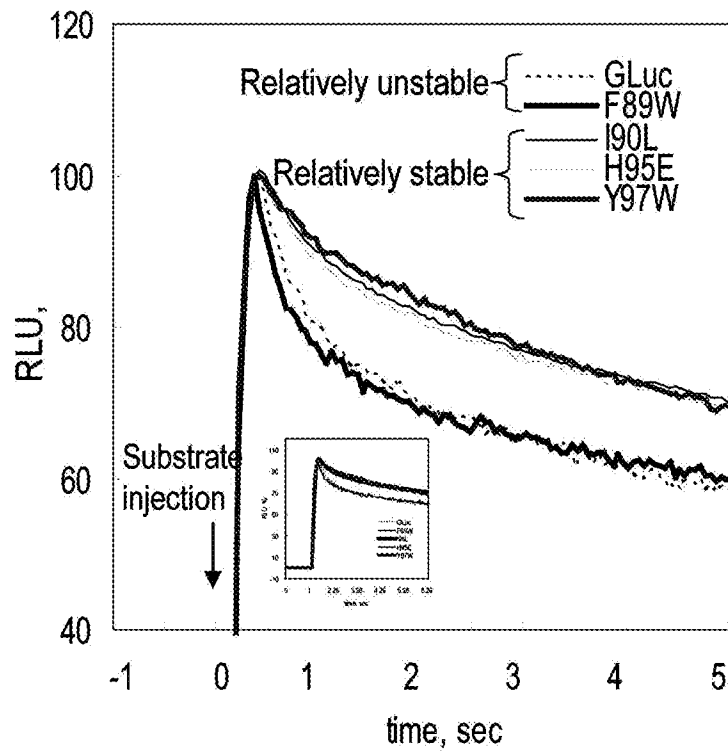


[図6]

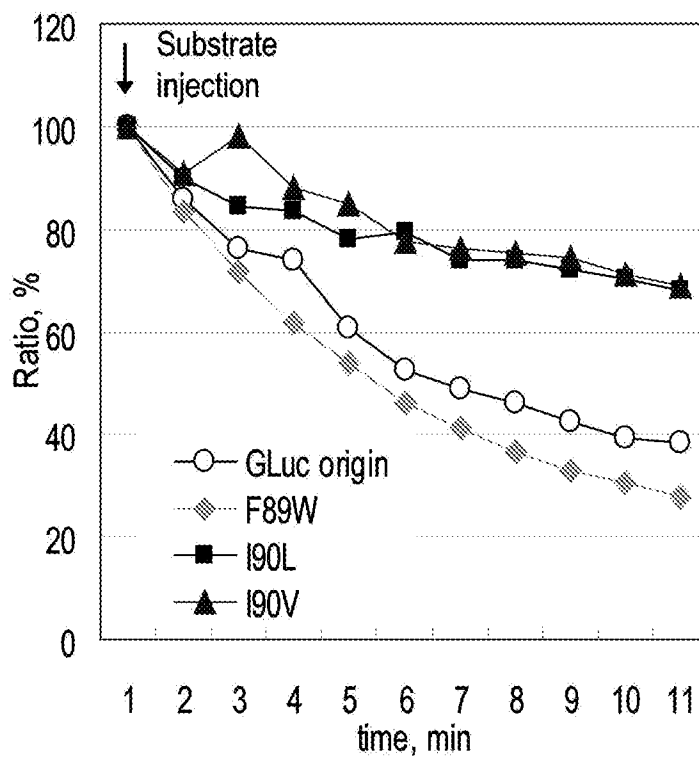


[図7AB]

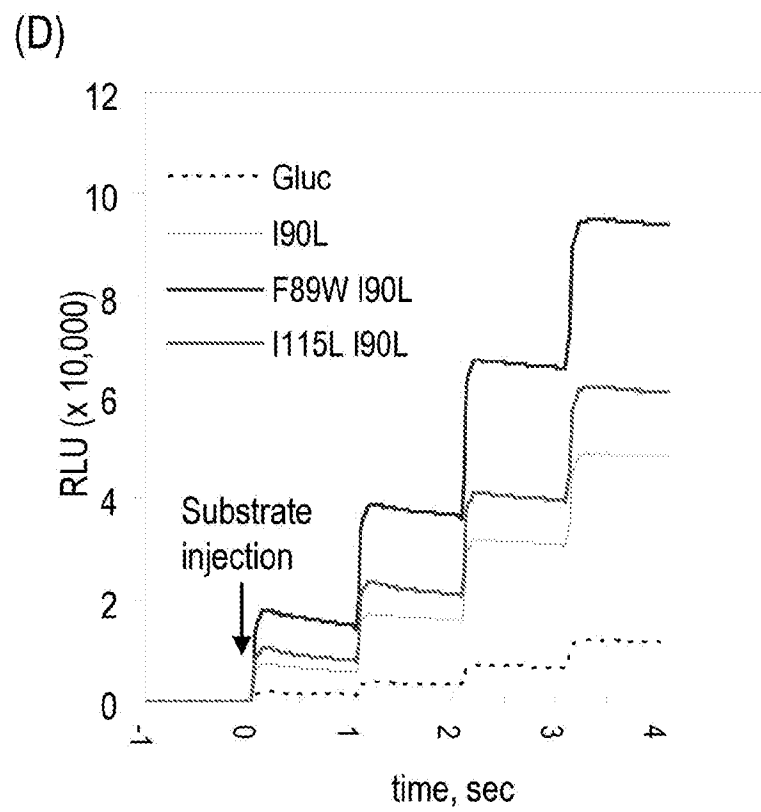
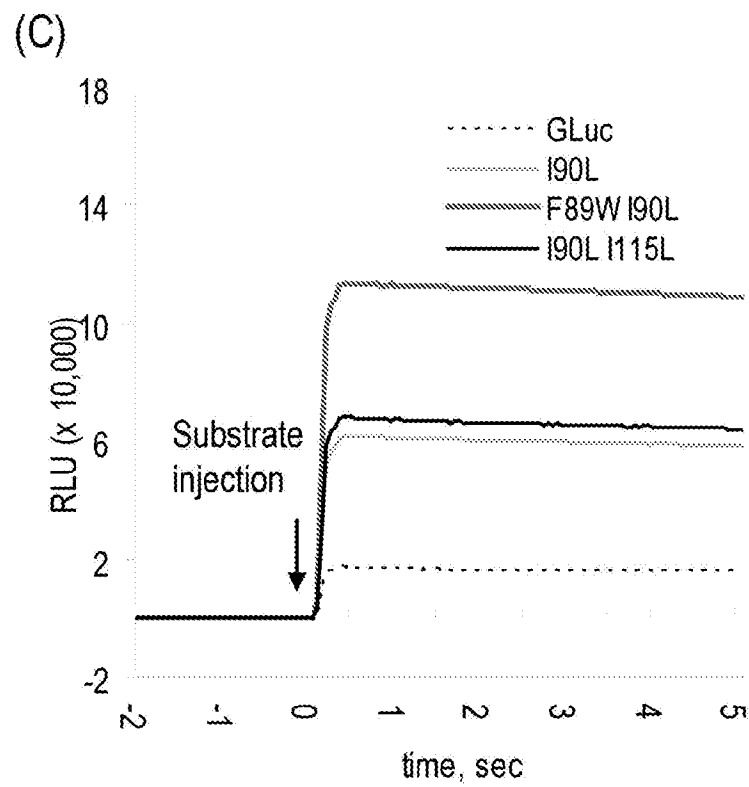
(A) PBS buffer & Short time-scale
Initial 5 sec after substrate injection



(B) PBS buffer & Long time-scale



[図7CD]



[図8A]

1	ATG GGe GTg AAg GTc CTG TTc GCC CTG ATC TGC ATC GCc GTG GCC GAG GCC AAG CCC ACC	60
1	M G V K V L F A L I C I A V A E A K P T	20
61	GAG AAC AAC GAg GAC TTC AAC ATt GTG GCC GTG GCC AGC AAC TTt GCG ACC ACG GAc CTC	120
21	E N N E D F N I V A V A S N F A T T D L	40
121	GAc GCc Gat CGC GGG AAg TTG CCC GGa AAG AAG CTG CCG CTG GAG GTc CTC AAg GAG ATG	180
41	D A D R G K L P G K K L P L E V L K E M	60
181	GAg GCC AAc GCC CGG AAg GCc GGC TGC ACC AGG GGa TGc CTG ATC TGC CTG TCC CAC ATt	240
61	E A N A R K A G C T R G C L I C L S H I	80
241	AAG TGC ACG CCC AAG ATG AAG AAG TTC ~~eTC~~ CCc GCc TGC CAC ACC TAC GAg GGa GAC	300
81	K C T P K M K K F L P G R C H T Y E G D	100
301	AAG GAG TCC GCc ~~Cgc~~ GCC GGt ATc GGa GAG CCG ATt GTC ~~GAT ATc~~ CCg GAG ATa CCg GGG	360
101	K E S A R G G I G E A I V D I P E I P G	120
361	TTt AAG Gat TTG GAG CCC ATG GAG CAG TTC ATC GCg CAG GTC Gat CTt TGc GTG GAC TGC	420
121	F K D L E P M E Q F I A Q V D L C V D C	140
421	ACg ACg GGC TGC CTC AAg GGG CTc GCC AAC GTG CAG TGc TCc GAC CTG CTC AAG AAG TGG	480
141	T T G C L K G L A N V Q C S D L L K K W	160
481	CTa CCG CAg CGC TGc GCG ACC TTc GCC AGC AAG ATt CAG GGa CAG GTG GAC AAG ATC AAG	540
161	L P Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K	180
541	GGG GCC GCc ~~GCa TcC~~ AAg GAC GAg CTG Tga	570
181	G A G G S K D E L *	190

[図8B]

1	ATG GGC GTG AAG GTC CTG TTC GCC CTG ATC TGC ATC GCC GTG GCC GAG
1	M G V K V L F A L I C I A V A E
49	GCC AAG CCC ACC GAG AAC AAC GAG GAC TTC AAC ATT GTG GCC GTG GCC AGC AAC TTT GCG
17	A K P T E N N E D F N I V A V A S N F A
109	ACC ACG GAC CTC GAC GGC GAT CGC GGG AAG TTG CCG GGA AAG AAG CTG CCG CTG GAG GTC
37	T T D L D A D E G K L P G K K L P L E V
169	CTC AAG GAG ATG GAG GCC AAC GCC CCG AAG GCC GGC TGC ACC AGG GGA TGC CTG ATC TGC
57	L K E N E A N A R K A G C T R G C L I C
229	CTG TCC CAC ATT AAG TGC ACG CCC AAG ATG AAG AAG Tgg CTC CCC GGC CGC TGC gAg ACC
77	L S H I K C T P K M K K <u>w</u> l P G E C <u>e</u> T
289	Tgg GAG GGA GAC AAG GAG TCC GCC Cag GGC GGT ATC GGA GAG GCG ATT GTT GAT ATC CCG
97	<u>y</u> E G D K E S A q G G I G E A I V <u>D</u> I P
349	GAG ATA CCG GGG TTT AAG GAT TTG GAG CCC ATG GAG CAG TTC ATC GCG CAG GTC GAT CTT
117	E I P G F K D L E P N E Q F I A Q V D L
409	TGC GTG GAC TGC ACG ACG GGC TGC CTC AAG GGG CTC GCC AAC GTG CAG TGC TCC GAC CTG
137	C V D C T T G C L K G L A N V Q C S D L
469	CTC AAG AAG TGG CTA CCG CAG GGC TGC GCG ACC TTC GCC AGC AAG ATT CAG GGA CAG GTG
157	L K K N L P Q R C A T F A S K I Q G Q V
529	GAC AAG ATC AAG GGG GCC GGC GGA TCC AAG GAC GAG CTG TGA
177	D K I K G A G G S <u>K D E L</u> *

[図9AB]

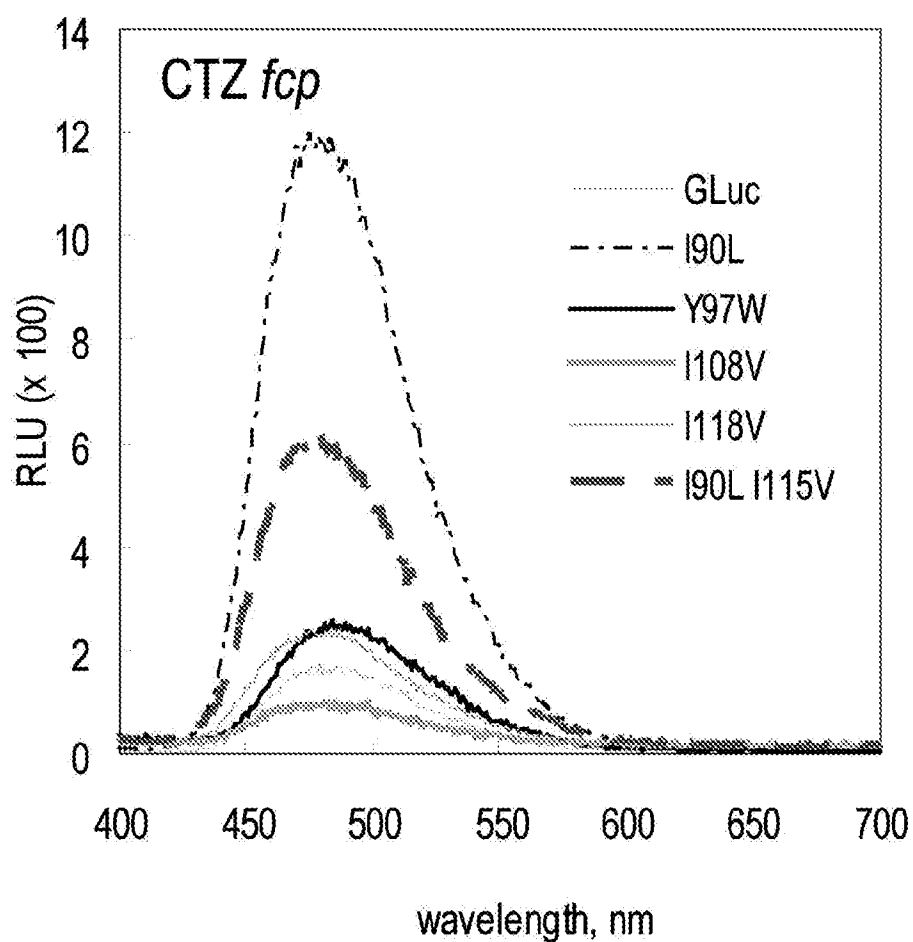
(A)

	CTZ	CTZ cp	CTZ fcp	CTZ hcp	CTZ ip	CTZ 400A
Gluc	++++	++	++	-	++	-
97W	++++	-	++	-	++	-
I108V	++++	-	++	-	+	-
I118V	++++	-	++	-	-	-
I90L	++++	-	+++	-	++	-
I90V	++++	-	++	-	++	-
F89W I90L	++++	-	+++	-	++	-
I90L I115V	++++	-	+++	-	++	-
Rluc8	++++	++	+	++	++	-

(B)

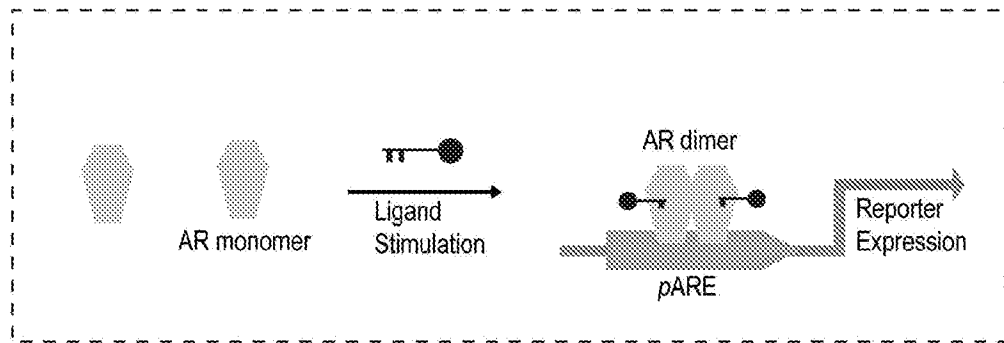
		GLuc	I90L	Y97W	I108V	I118V	I115V I90L
CTZ	$\lambda_{\max}$	471	486	483	476	470	483
CTZ fcp	$\lambda_{\max}$	484	481	489	480	482	478
CTZ ip	$\lambda_{\max}$	483	481	491	483	-	478

[図9C]



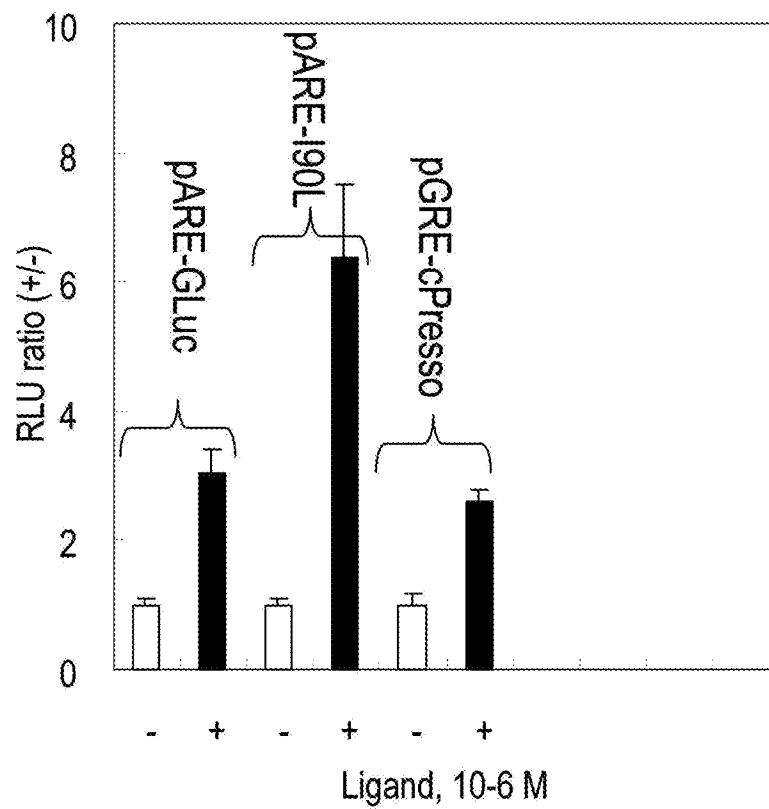
[図10A]

(A)

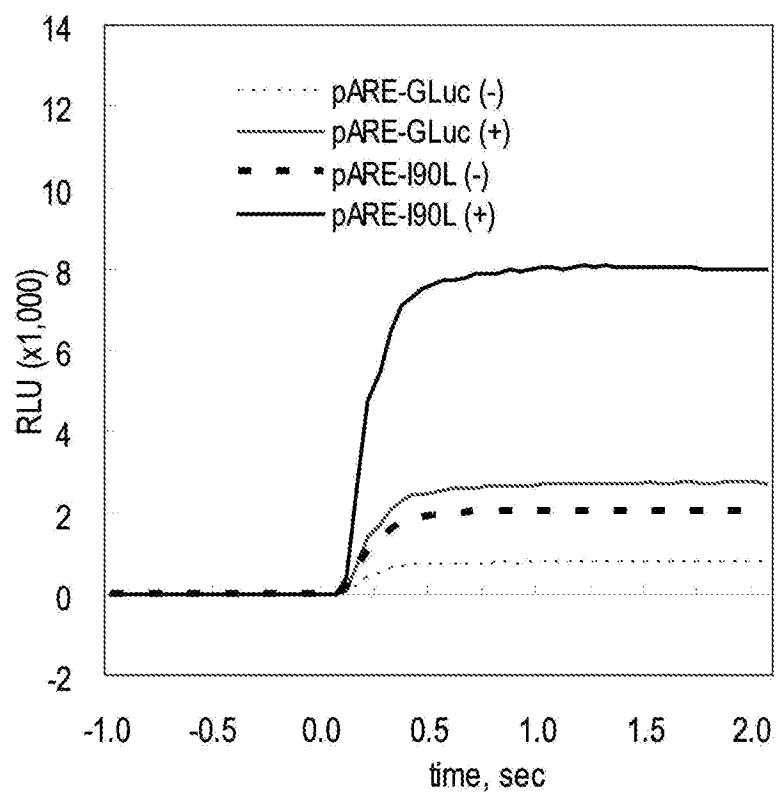


[図10BC]

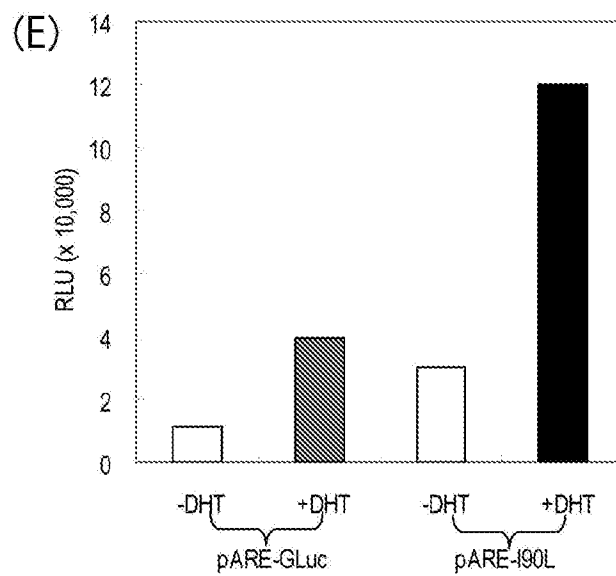
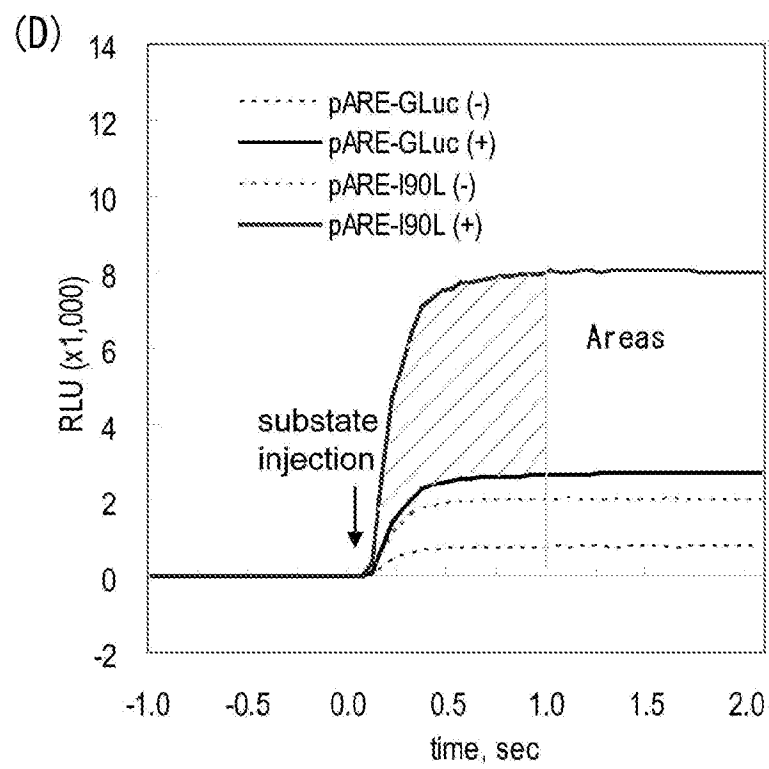
(B)



(C)

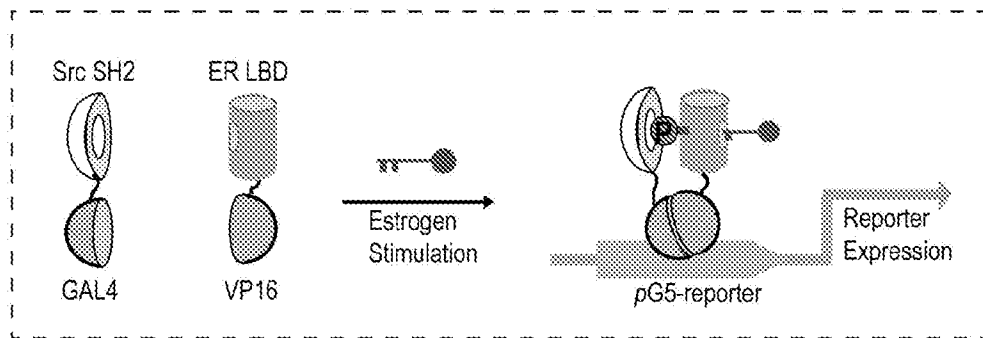


[図10DE]

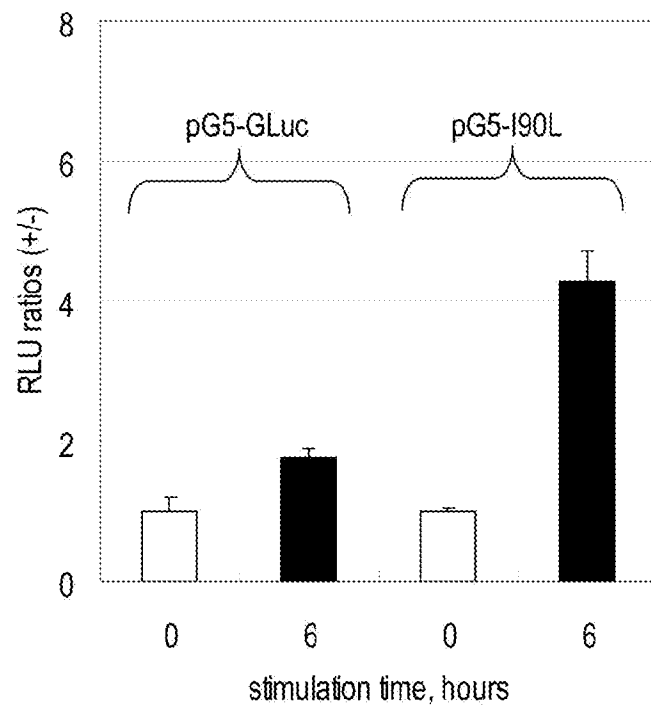


[図11AB]

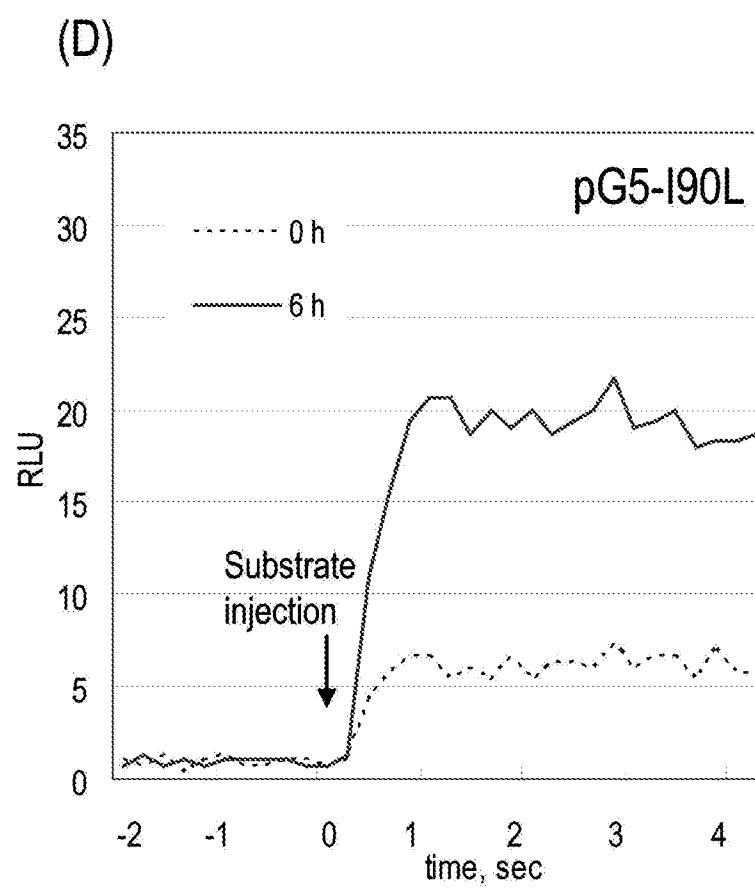
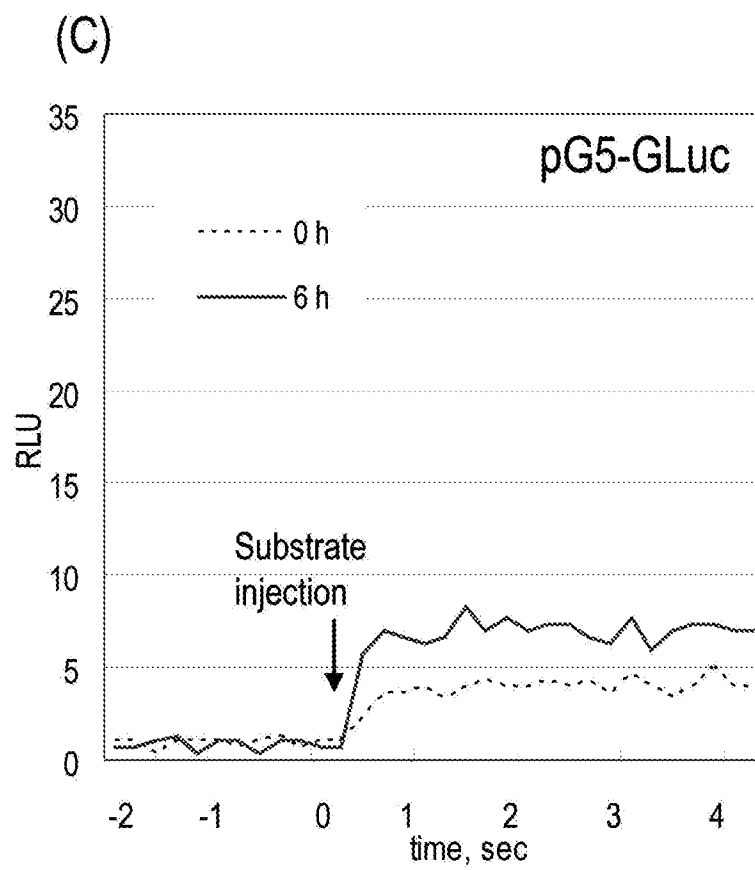
(A)



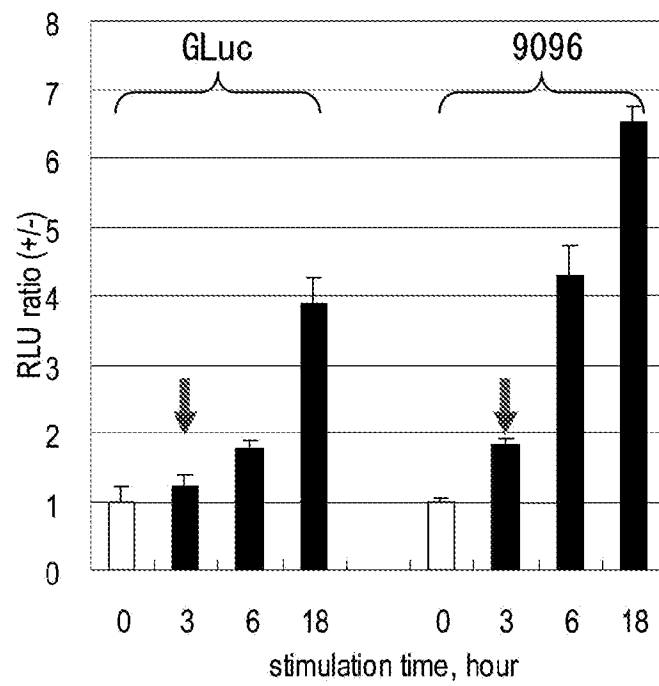
(B)



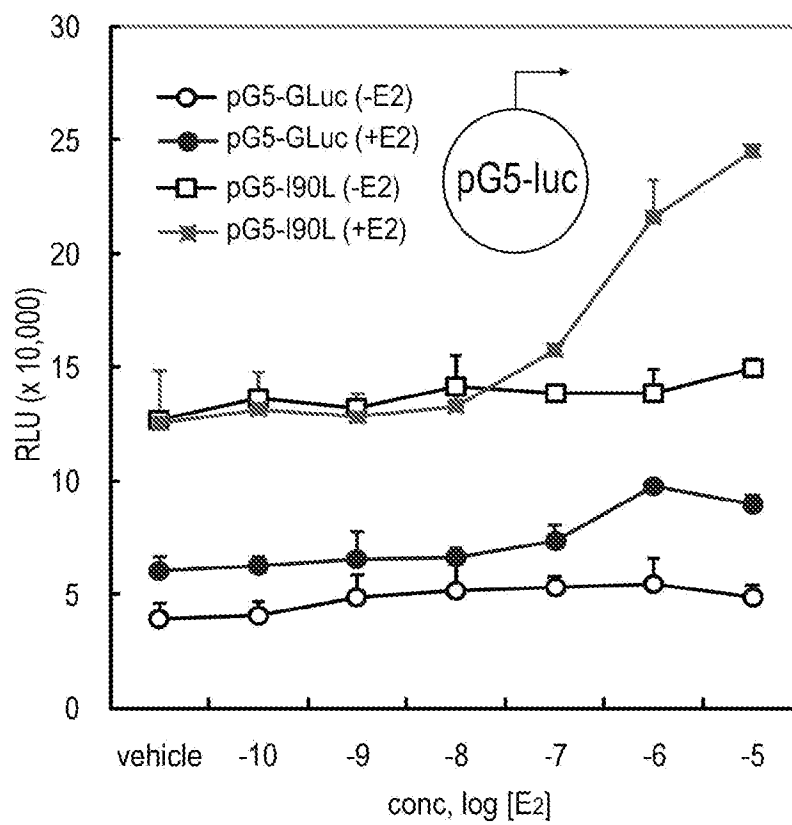
[図11CD]



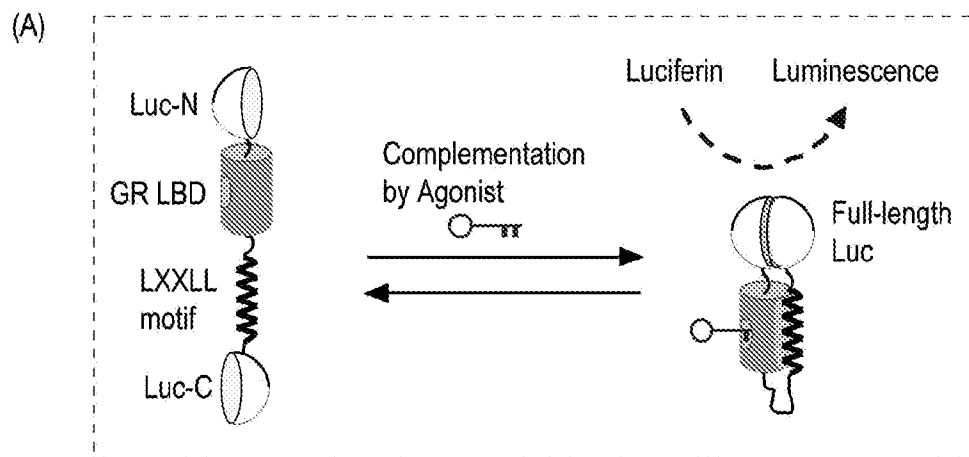
[図11E]



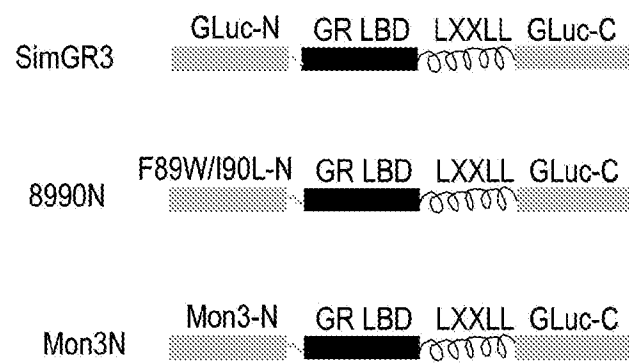
[図12]



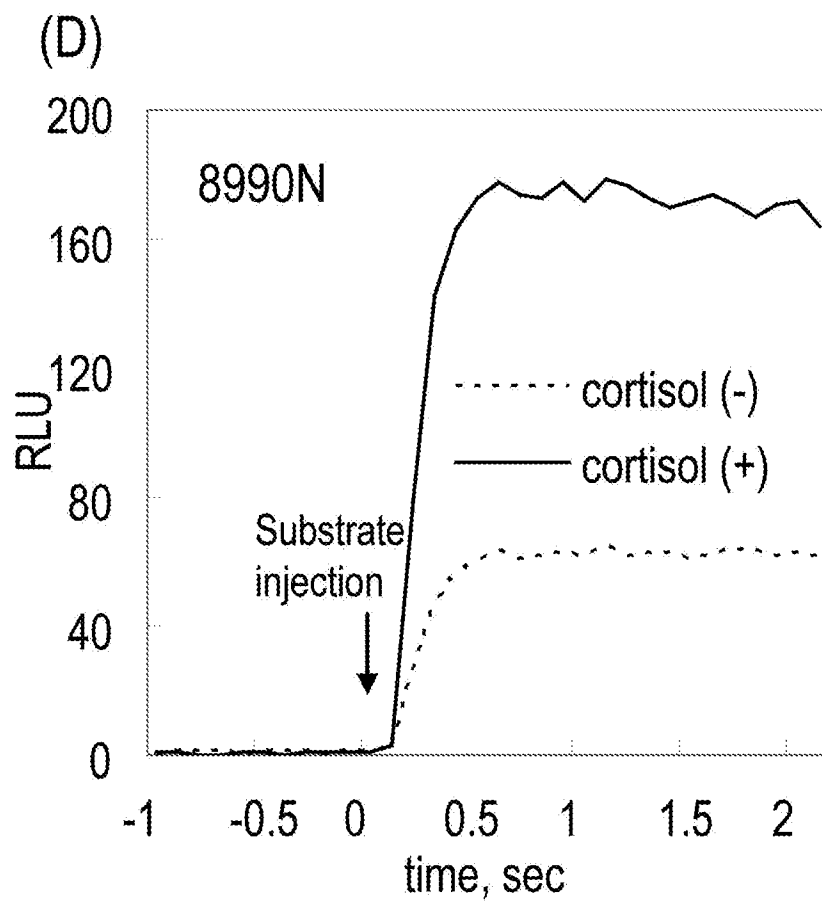
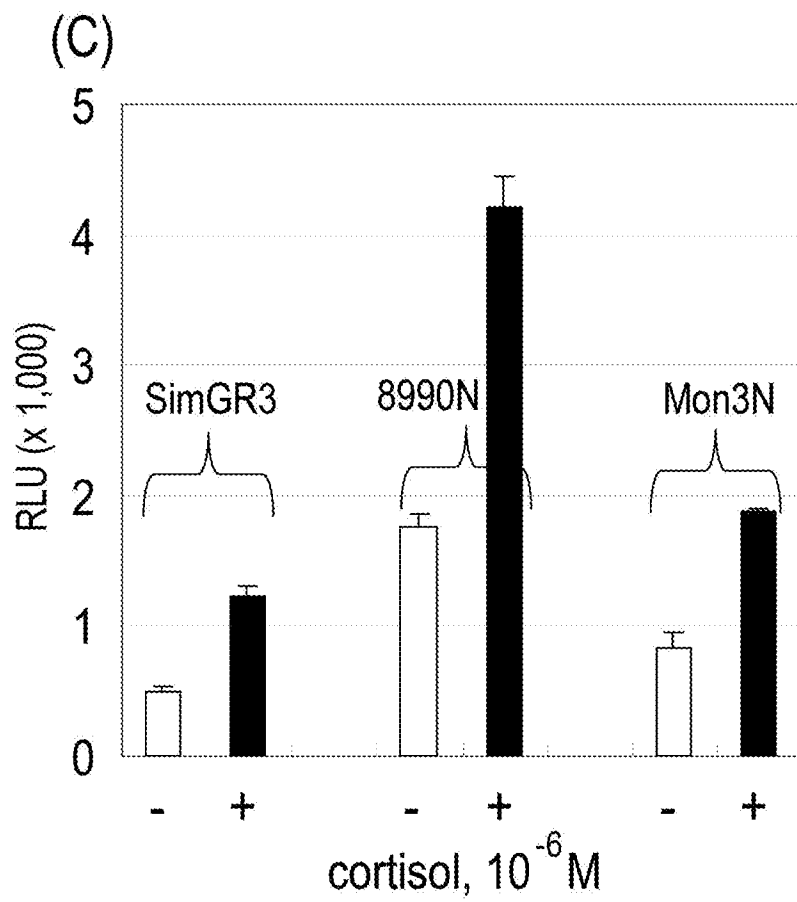
[図13AB]



(B)

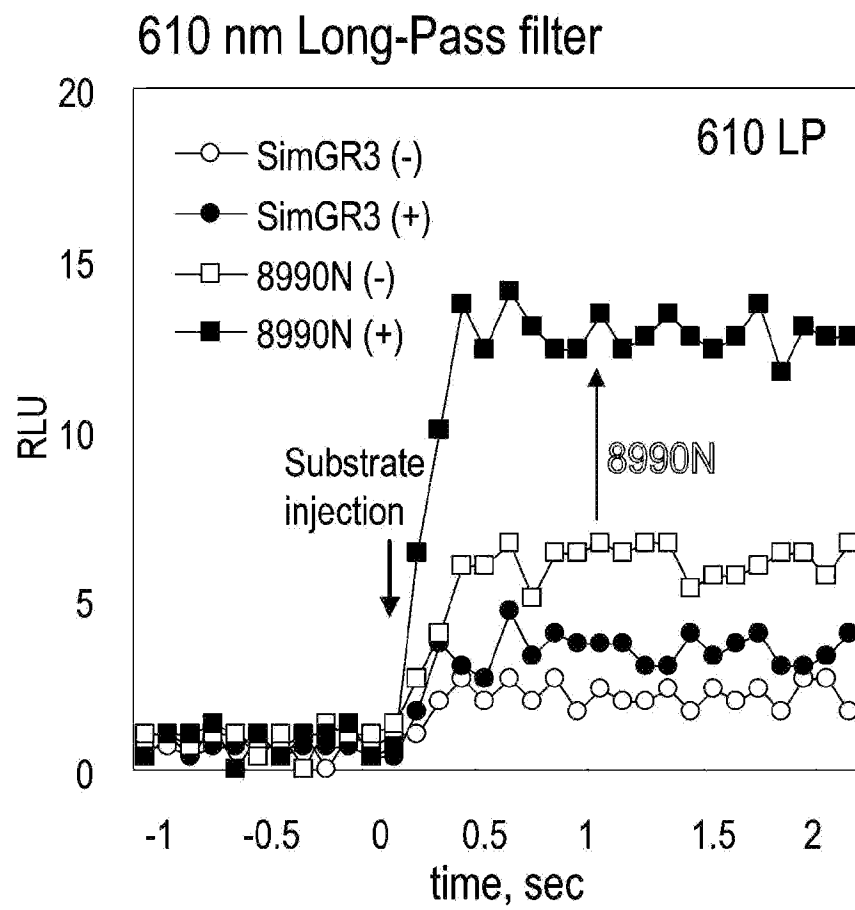


[図13CD]



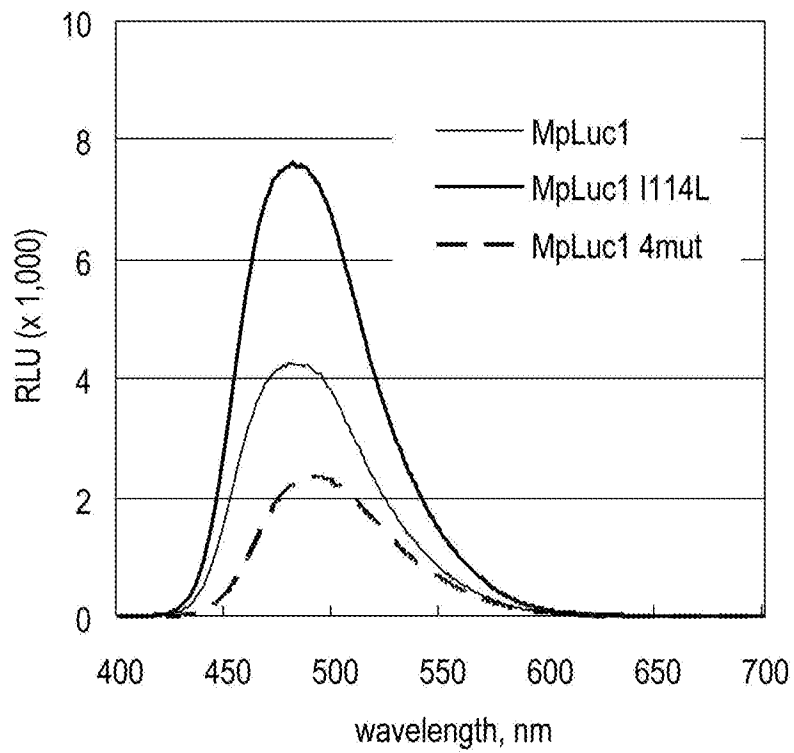
[図13E]

(E)



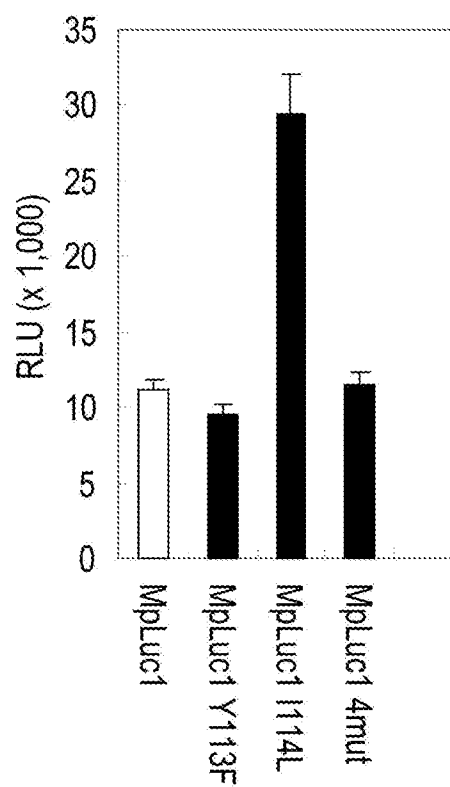
[図14AB]

(A)

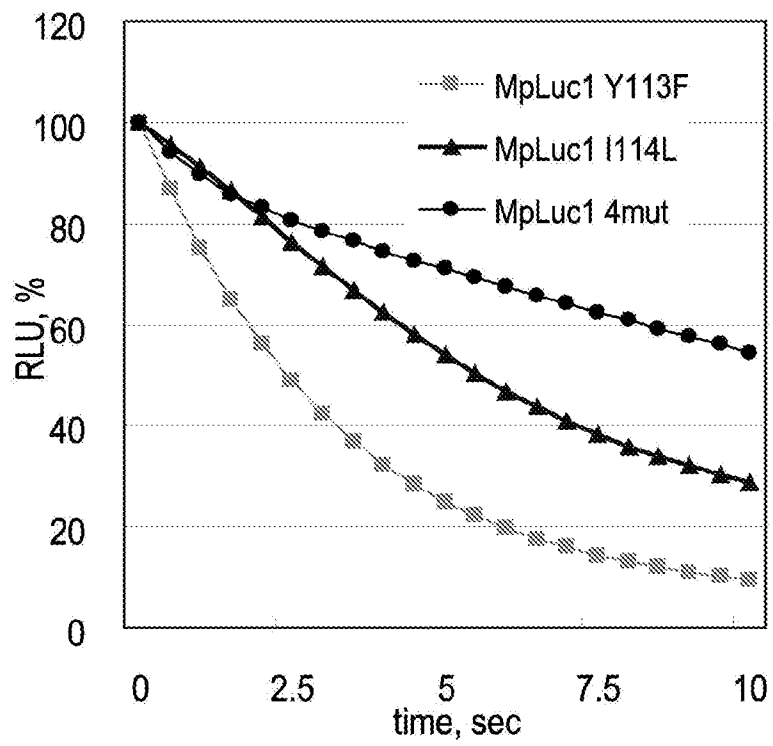


(B)

610 nm Long-Pass Filter

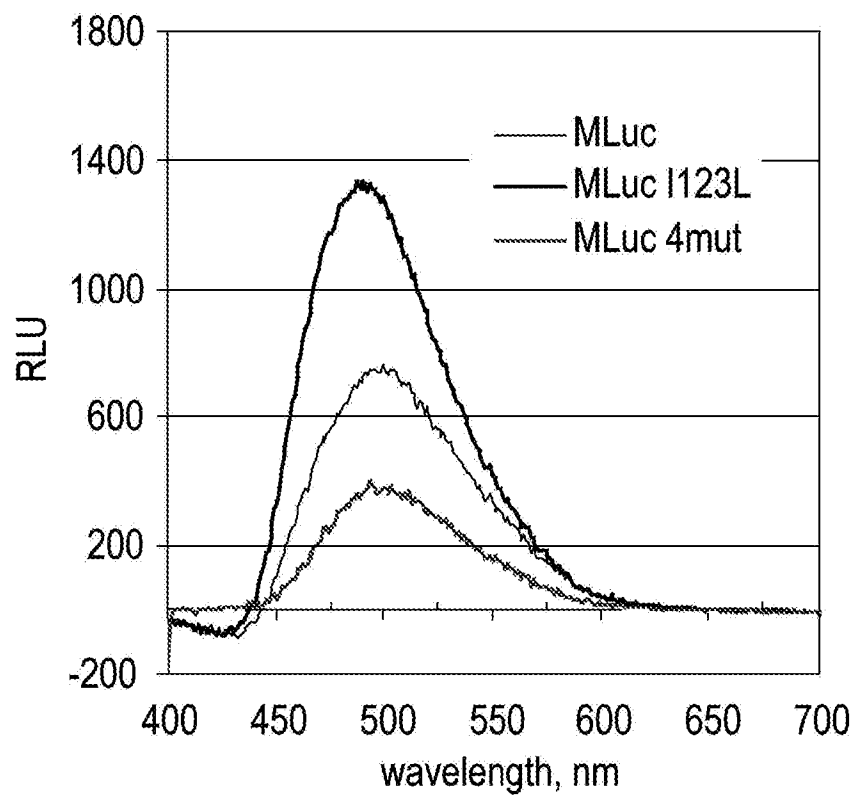


[図14C]

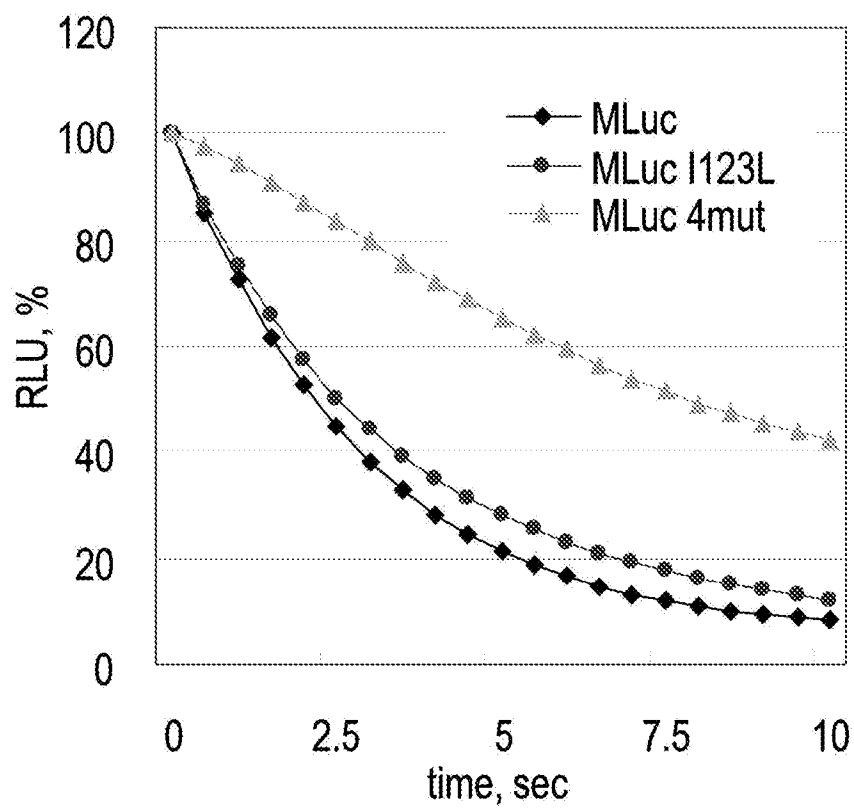


[図15AB]

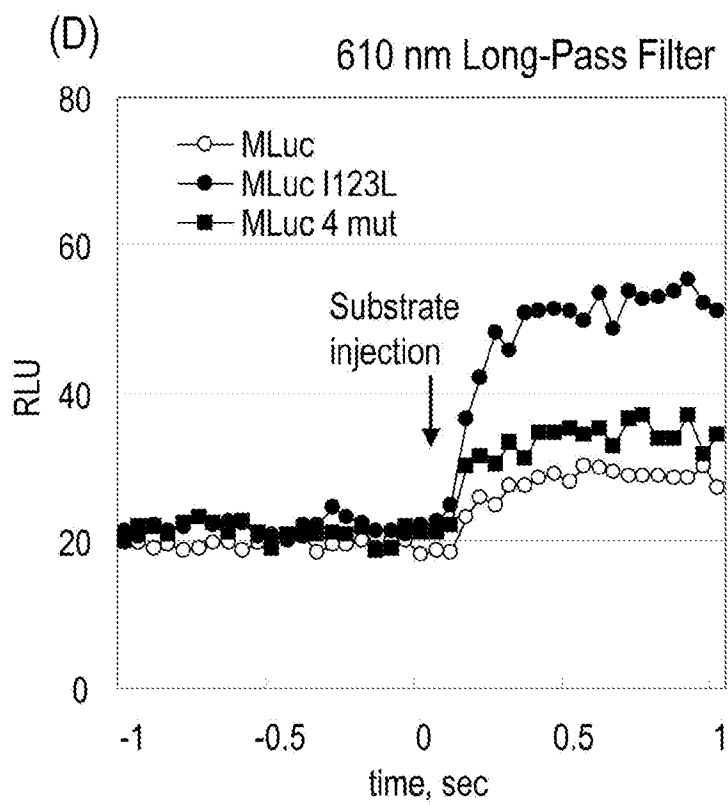
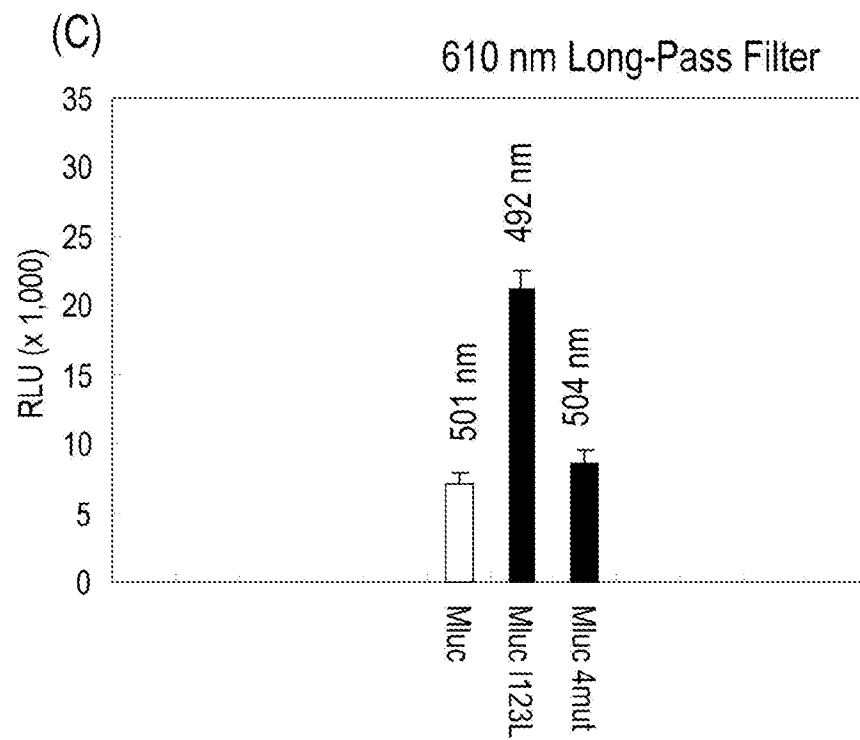
(A)



(B)

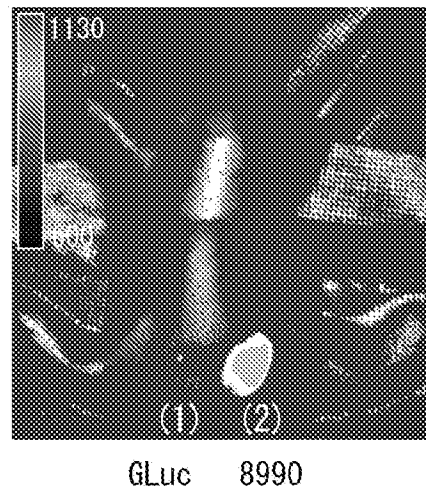


[図15CD]

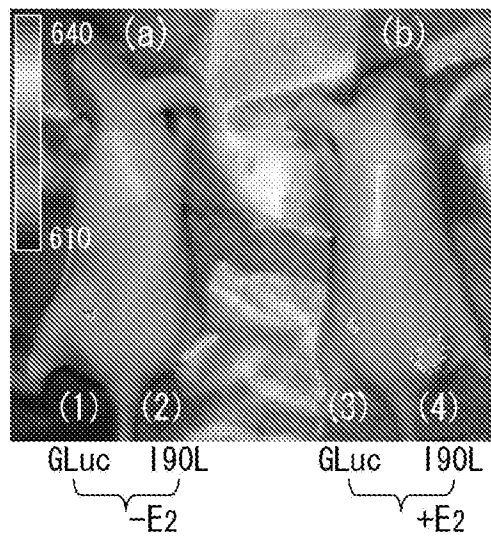


[図16]

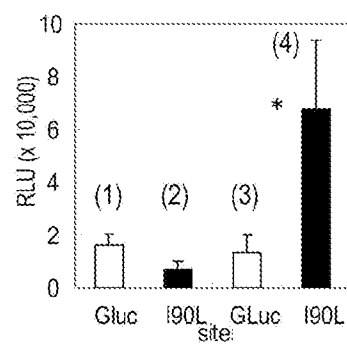
(A)



(B)



(C)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12Q1/66(2006.01)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)

C12N15/09, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12Q1/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-507410 A (PROLUME, LTD.), 12 March 2002 (12.03.2002), entire text & WO 1999/049019 A2 & US 6232107 B1 & US 6436682 B1 & EP 1064360 A2 & CA 2324648 A & AU 3210399 A & DE 69938293 D	1-16
A	INOUE, S. et al., Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod <i>Gaussia princeps</i> , Biochem.Biophys. Res.Commun., 2008, Vol.365, No.1, p.96-101, entire text	1-16

☒ 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 another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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
10 May, 2010 (10.05.10)

Date of mailing of the international search report
18 May, 2010 (18.05.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052511

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	MAGUIRE, C.A. et al., Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications, Anal.Chem., 2009.08.15, Vol.81, No.16, p.7102-7106, entire text	1-16
P,A	WELSH, J.P. et al., Multiply mutated Gaussia luciferases provide prolonged and intense bioluminescence, Biochem.Biophys.Res.Comm., 2009.11.27, Vol.389, No.4, p.563-568, entire text	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
C12N9/02(2006.01)i, C12Q1/66(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12Q1/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2002-507410 A（プロルーム・リミテッド）2002.03.12, 全文 & WO 1999/049019 A2 & US 6232107 B1 & US 6436682 B1 & EP 1064360 A2 & CA 2324648 A & AU 3210399 A & DE 69938293 D	1-16
A	INOUE, S. et al., Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod <i>Gaussia princeps</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, Vol. 365, No. 1, p. 96-101, 全文	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 0 . 0 5 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 8 . 0 5 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

9 2 8 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, A	MAGUIRE, C. A. et al., Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications, Anal. Chem., 2009. 08. 15, Vol. 81, No. 16, p. 7102-7106, 全文	1-16
P, A	WELSH, J. P. et al., Multiply mutated Gaussia luciferases provide prolonged and intense bioluminescence, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009. 11. 27, Vol. 389, No. 4, p. 563-568, 全文	1-16