

(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2008-545394

(P2008-545394A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A 2 G 0 5 4
<b>C 12 Q 1/68</b> (2006.01)	C 12 Q	1/68	A 4 B 0 2 4
<b>C 12 N 1/15</b> (2006.01)	C 12 N	1/15	4 B 0 6 3
<b>C 12 N 1/19</b> (2006.01)	C 12 N	1/19	4 B 0 6 5
<b>C 12 N 1/21</b> (2006.01)	C 12 N	1/21	4 H 0 4 5

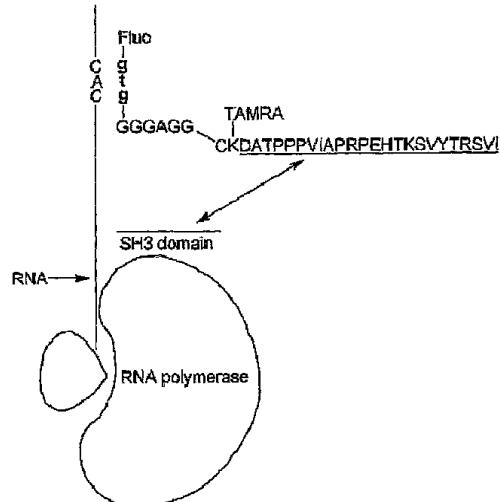
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-512475 (P2008-512475)	(71) 出願人	502409813 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ シティ・オブ・ペンシルベニア アメリカ合衆国ペンシルベニア州1910 4 フィラデルフィア・スイート200・チ エスナットストリート3160
(86) (22) 出願日	平成18年5月17日 (2006.5.17)	(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月11日 (2008.1.11)	(72) 発明者	エバーウイン, ジエイムズ・エイチ アメリカ合衆国ペンシルベニア州1912 9 フィラデルフィア・ヘンリーアベニュー 3918
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/019107	(72) 発明者	ランゲル, ウロ スウェーデン・エス-12432バンドハ ゲン・トロレスウントスフ21
(87) 國際公開番号	W02006/125012		最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成18年11月23日 (2006.11.23)		
(31) 優先権主張番号	60/682,334		
(32) 優先日	平成17年5月18日 (2005.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】生存細胞中でのリアルタイム核酸分析のための組成物、方法およびキット

## (57) 【要約】

本発明は、生存細胞、組織および生物体中の転写および翻訳のリアルタイム検出のための組成物、方法およびキットを包含する。本発明はさらに、慣習的配列決定技術若しくは反応を使用することを伴わない核酸の迅速な配列決定方法を提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

検出体分子、および検出体分子に特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなるキメラ RNA ポリメラーゼ分子と細胞を接触させることを含んでなる、DNA 分子の転写の検出方法であって；

該検出体分子が

- a ) 該検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ RNA ポリメラーゼ結合ドメイン ( C R P B D ) 、
- b ) RNA 分子の一部分に相補的なペプチド核酸 ( P N A ) ；および
- c ) シグナリング部分

を含んでなり、

かつ、該キメラ RNA ポリメラーゼが DNA を転写して新生 RNA 分子を產生する場合に、該 P N A が新生 RNA 分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられてそれにより DNA 分子の転写を検出する、上記方法。

**【請求項 2】**

検出体分子が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

検出体結合ドメインが、SH3 ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

C R P B D が、- P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド ( T P ) 、 T P 10 ペプチド、 p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、 t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 6】**

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

蛍光分子が、R e A s H 、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 、 C y 3 B 、 C y 5 、テトラメチルローダミン ( T A M R A ) およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

P N A が、新生 RNA 分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

P N A が新生 RNA 分子の三ヌクレオチドに相補的である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

三ヌクレオチドが核酸配列 C A C を有する、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

キメラ RNA ポリメラーゼがキメラ RNA ポリメラーゼ I I である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

キメラ RNA ポリメラーゼがキメラ T 7 RNA ポリメラーゼである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

シグナルが、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) シグナル若しくは極性変化シグナルである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

10

20

30

40

50

新生 R N A 分子が細胞中にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

細胞が真核生物細胞である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

細胞が動物中にある、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

動物が哺乳動物である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

細胞が生物学的サンプルである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

a ) 検出体結合ドメインを含んでなるキメラ R N A ポリメラーゼ；ならびに  
b ) シグナリング部分を含んでなる検出体分子、R N A 分子の一部分に相補的な P N A 、  
および検出体結合ドメインに結合することが可能な C R P B D  
を含んでなり、

C R P B D はキメラ R N A ポリメラーゼの検出体結合ドメインに特異的に結合する、  
単離されたヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 0】

検出体結合ドメインが、S H 3 ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 9 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 1】

C R P B D が、- P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 9 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 2】

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 1 9 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 3】

蛍光分子が、R e A s H 、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 、C y 3 B 、C y 5 、T A M R A およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 2 2 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 4】

P N A が R N A 分子の二ヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である、請求項 1 9 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 5】

P N A が R N A 分子の三ヌクレオチドに相補的である、請求項 2 4 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 6】

三ヌクレオチドが C A C の核酸配列を有する、請求項 2 5 に記載のヌクレオチペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 7】

複合体が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 9 に記載のヌクレオチペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 8】

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド ( T P ) 、T P 1 0 ペプチド、p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 2 7 に記載のヌクレオチペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 2 9】

キメラ R N A ポリメラーゼがキメラ R N A ポリメラーゼ I I である、請求項 1 9 に記載のヌクレオチペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 3 0】

10

20

30

40

50

キメラ RNA ポリメラーゼがキメラ T7 RNA ポリメラーゼである、請求項 19 に記載のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体。

【請求項 31】

キメラ RNA ポリメラーゼが RNA ポリメラーゼおよび検出体結合ドメインを含んでなる、キメラ RNA ポリメラーゼをコードする単離された核酸。

【請求項 32】

配列番号 1 および配列番号 2 を含んでなり、かつ、配列番号 1 が、配列番号 21 、配列番号 22 、配列番号 23 および配列番号 24 よりなる群から選択される配列を有する単離された核酸により配列番号 2 から分離されている、キメラ RNA ポリメラーゼをコードする単離された核酸。

10

【請求項 33】

配列番号 1 が配列番号 2 に共有結合している、請求項 32 に記載の単離された核酸。

【請求項 34】

共有結合した標識ポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる、請求項 31 に記載の単離された核酸。

【請求項 35】

コードされているキメラ RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列が配列番号 3 および配列番号 4 を含んでなり、かつ、配列番号 3 が、0 から 4 個までのプロリンを有するペプチドにより配列番号 4 から分離されている、キメラ RNA ポリメラーゼをコードする単離された核酸。

20

【請求項 36】

標識ポリペプチドが、myc 標識ポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ標識ポリペプチド、緑色蛍光タンパク質標識ポリペプチド、myc-ピルビン酸キナーゼ標識ポリペプチド、His6 標識ポリペプチド、インフルエンザウイルスヘマグルチニン標識ポリペプチド、flag 標識ポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質標識ポリペプチドよりなる群から選択される、請求項 34 に記載の単離された核酸。

【請求項 37】

作動可能に連結されたプロモーター / 制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる、請求項 31 に記載の単離された核酸。

【請求項 38】

請求項 31 、 32 若しくは 35 のいずれか 1 つに記載の単離された核酸を含んでなるベクター。

30

【請求項 39】

作動可能に連結されたプロモーター / 制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる、請求項 38 に記載のベクター。

【請求項 40】

請求項 31 に記載の単離された核酸を含んでなる組換え細胞。

【請求項 41】

請求項 31 、 32 、 33 、 34 、 35 、 36 若しくは 37 のいずれか 1 つに記載の単離された核酸を含んでなる組換え細胞。

40

【請求項 42】

請求項 37 に記載のベクターを含んでなる組換え細胞。

【請求項 43】

細胞が真核生物細胞若しくは原核生物細胞である、請求項 42 に記載の組換え細胞。

【請求項 44】

キメラ RNA ポリメラーゼがキメラ RNA ポリメラーゼ II である、請求項 31 に記載の単離された核酸。

【請求項 45】

キメラ RNA ポリメラーゼが T7 RNA ポリメラーゼである、請求項 31 に記載の単離された核酸。

50

## 【請求項 4 6】

キメラ R N A ポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチド。

## 【請求項 4 7】

キメラ R N A ポリメラーゼが配列番号 3 および配列番号 4 を含んでなり、配列番号 3 が、0 から 4 個までのプロリンを有するポリペプチドにより配列番号 4 から分離されている、キメラ R N A ポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチド。

## 【請求項 4 8】

請求項 4 6 に記載の単離されたポリペプチドを特異的に結合する抗体。

## 【請求項 4 9】

C R P B D、P N A およびシグナリング部分を含んでなる単離された検出体分子。

10

## 【請求項 5 0】

C R P B D が検出体結合ドメインに結合することが可能である、請求項 4 9 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 1】

C R P B D が配列番号 5 に示されるアミノ酸配列に対する 75 % 同一性を有する、請求項 5 0 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 2】

P N A がニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である、請求項 4 9 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 3】

P N A が三ヌクレオチドに相補的である、請求項 5 2 に記載の検出体分子。

20

## 【請求項 5 4】

三ヌクレオチドが核酸配列 C A C を有する、請求項 5 3 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 5】

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 4 9 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 6】

蛍光分子が、R e A s H、ビス - ((N - ヨードアセチル) ピペラジニル) スルホンローダミン (B S R)、C y 3 B、C y 5、T A M R A およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 5 5 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 7】

細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 4 9 に記載の検出体分子。

30

## 【請求項 5 8】

細胞透過性ペプチドが、T P ペプチド、T P 1 0 ペプチド、p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチド、トランスポータンペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の検出体分子。

## 【請求項 5 9】

請求項 4 9 に記載の検出体分子を特異的に結合する抗体。

## 【請求項 6 0】

キメラ R N A ポリメラーゼ、検出体分子、およびその使用のための取扱説明書を含んでなる、R N A 分子の転写を検出するためのキット。

40

## 【請求項 6 1】

検出体分子が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 6 0 に記載のキット。

## 【請求項 6 2】

キメラ R N A ポリメラーゼが、S H 3 ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される検出体結合ドメインを含んでなる、請求項 6 0 に記載のキット。

## 【請求項 6 3】

検出体分子が、検出体結合ドメインに結合することが可能な C R P B D を含んでなるが - P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 6 0 に記載のキット。

50

**【請求項 6 4】**

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド（T P）、T P 1 0 ペプチド、p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 6 1 に記載のキット。

**【請求項 6 5】**

検出体分子がシグナリング部分を含んでなる、請求項 6 0 に記載のキット。

**【請求項 6 6】**

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 6 5 に記載のキット。

**【請求項 6 7】**

蛍光分子が、R e A s H、ビス-（（N - ヨードアセチル）ピペラジニル）スルホンローダミン（B S R）、C y 3 B、C y 5、T A M R A およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 6 6 に記載のキット。

10

**【請求項 6 8】**

検出体分子が、R N A 分子の一部分に相補的なP N A を含んでなる、請求項 6 0 に記載のキット。

**【請求項 6 9】**

P N A が、R N A 分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である、請求項 6 8 に記載のキット。

**【請求項 7 0】**

P N A が三ヌクレオチドに相補的である、請求項 6 9 に記載のキット。

20

**【請求項 7 1】**

三ヌクレオチドが核酸配列 C A C を有する、請求項 7 0 に記載のキット。

**【請求項 7 2】**

キメラR N A ポリメラーゼがキメラR N A ポリメラーゼIIである、請求項 6 0 に記載のキット。

**【請求項 7 3】**

キメラR N A ポリメラーゼがキメラT 7 R N A ポリメラーゼである、請求項 6 0 に記載のキット。

**【請求項 7 4】**

キメラR N A ポリメラーゼをコードする単離された核酸、検出体分子、およびその使用のための取扱説明書を含んでなる、R N A 分子の転写を検出するためのキット。

30

**【請求項 7 5】**

検出体分子が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 7 4 に記載のキット。

**【請求項 7 6】**

単離された核酸が、配列番号 1 に示される核酸配列を含んでなる、請求項 7 4 に記載のキット。

40

**【請求項 7 7】**

検出体分子が、- P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される検出体結合ドメインに結合することが可能なC R P B D を含んでなる、請求項 7 6 に記載のキット。

**【請求項 7 8】**

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド（T P）、T P 1 0 ペプチド、p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 7 5 に記載のキット。

**【請求項 7 9】**

検出体分子がシグナリング部分を含んでなる、請求項 7 4 に記載のキット。

**【請求項 8 0】**

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 7 9 に記載のキット。

50

## 【請求項 8 1】

蛍光分子が、ReA s H、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項80に記載のキット。

## 【請求項 8 2】

検出体分子が、RNA分子の一部分に相補的なPNAを含んでなる、請求項74に記載のキット。

## 【請求項 8 3】

PNAがRNA分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である、請求項82に記載のキット。

## 【請求項 8 4】

PNAが三ヌクレオチドに相補的である、請求項83に記載のキット。

## 【請求項 8 5】

三ヌクレオチドが核酸配列CACを有する、請求項84に記載のキット。

## 【請求項 8 6】

キメラRNAポリメラーゼがキメラRNAポリメラーゼIIである、請求項74に記載のキット。

## 【請求項 8 7】

キメラRNAポリメラーゼがキメラT7 RNAポリメラーゼである、請求項74に記載のキット。

## 【請求項 8 8】

単離されたDNA分子をプロモーター/制御配列に連結して、連結されたDNA分子を形成すること、ならびに

該連結されたDNA分子を、検出体分子に結合されたキメラRNAポリメラーゼと接触させることであって、該キメラRNAポリメラーゼは検出体結合ドメインを含んでなり、かつ、該検出体分子は

- a) 検出体結合ドメインに結合することが可能なCRPB D、
- b) 連結されたDNA分子の一部分に相補的なPNA、および；
- c) シグナリング部分

を含んでなり、

キメラRNAポリメラーゼが該連結されたDNA分子をmRNA分子に転写する場合に、PNAがmRNA分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられてそれによりDNA分子を配列決定する、

を含んでなる、単離されたDNA分子の配列決定方法。

## 【請求項 8 9】

単離されたDNA分子が二本鎖cDNAを含んでなる、請求項88に記載の方法。

## 【請求項 9 0】

プロモーター/制御配列がT7プロモーターである、請求項89に記載の方法。

## 【請求項 9 1】

検出体結合ドメインが、SH3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項88に記載の方法。

## 【請求項 9 2】

CRPB Dが、-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項88に記載の方法。

## 【請求項 9 3】

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項88に記載の方法。

## 【請求項 9 4】

蛍光分子が、ReA s H、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項93に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 9 5】**

P N A が、連結された D N A 分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 8 8 に記載の方法。

**【請求項 9 6】**

P N A が、連結された D N A 分子の三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 9 5 に記載の方法。

**【請求項 9 7】**

キメラ R N A ポリメラーゼがキメラ R N A ポリメラーゼ I I である、請求項 8 8 に記載の方法。

**【請求項 9 8】**

キメラ R N A ポリメラーゼがキメラ T 7 R N A ポリメラーゼである、請求項 8 8 に記載の方法。

**【請求項 9 9】**

シグナルが、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) シグナル若しくは極性変化シグナルである、請求項 8 8 に記載の方法。

**【請求項 1 0 0】**

三ヌクレオチドが核酸配列 G T G を有する、請求項 9 6 に記載の方法。

**【請求項 1 0 1】**

プロモーター / 制御配列が支持体に結合されている、請求項 8 8 に記載の方法。

**【請求項 1 0 2】**

該方法が最低 1 回反復され、かつ、各反復における検出体分子が、連結された D N A 分子の異なる一部分に相補的である異なる P N A を含んでなる、請求項 8 8 ないし 9 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 1 0 3】**

検出体分子、および該検出体分子に特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなるキメラリボソームサブユニットを有するキメラリボソーム分子と細胞を接触させることを含んでなり、該検出体分子が、

a ) 検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラリボソーム結合ドメイン ( C R B D ) 、

b ) R N A 分子の一部分に相補的な P N A ；および

c ) シグナル伝達分子

を含んでなり、

該キメラリボソーム分子が R N A 分子を翻訳する場合に、P N A が、キメラリボソームの R N A 出口孔を出る R N A 分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられてそれにより R N A 分子の翻訳を検出する、

R N A 分子の翻訳の検出方法。

**【請求項 1 0 4】**

検出体分子が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 0 3 に記載の方法。

**【請求項 1 0 5】**

検出体結合ドメインが、S H 3 ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 0 3 に記載の方法。

**【請求項 1 0 6】**

C R B D が、- P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 0 3 に記載の方法。

**【請求項 1 0 7】**

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド ( T P ) 、T P 1 0 ペプチド、p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 1 0 4 に記載の方法。

**【請求項 1 0 8】**

10

20

30

40

50

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 109】

蛍光分子が、R e A s H、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン (B S R)、C y 3 B、C y 5、T A M R A およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

P N A が R N A 分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 111】

P N A が R N A 分子の三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 110 に記載の方法

。

【請求項 112】

三ヌクレオチドが核酸配列 C A C を有する、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

キメラリボソーム分子がキメラの原核生物リボソーム分子である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 114】

キメラリボソームサブユニットがキメラ 50 s サブユニットである、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 115】

シグナルが、蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T) シグナル若しくは極性変化シグナルである、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 116】

R N A 分子が細胞中にある、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 117】

細胞が真核生物細胞である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

細胞が動物中にある、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 119】

動物が哺乳動物である、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 120】

細胞が生物学的サンプルである、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 121】

キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸であって、該キメラリボソームサブユニット成分が検出体結合ドメインを含んでなる、上記核酸。

【請求項 122】

キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸であって、該単離された核酸が配列番号 6 および配列番号 2 を含んでなり、配列番号 6 が、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23 および配列番号 24 よりなる群から選択される配列を有する単離された核酸により配列番号 2 から分離されている、上記核酸。

【請求項 123】

配列番号 6 が配列番号 2 に共有結合されている、請求項 122 に記載の単離された核酸

。

【請求項 124】

共有結合された標識ポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる、請求項 121 に記載の単離された核酸。

【請求項 125】

キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸であって、該キメラリボソームサブユニット成分のアミノ酸配列が、配列番号 7 および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含んでなり、配列番号 7 が 0 から 4 個までのプロリンを有するペプチドによ

10

20

30

40

50

り配列番号 4 から分離されている、上記核酸。

【請求項 1 2 6】

標識ポリペプチドが、*m y c* 標識ポリペプチド、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ標識ポリペプチド、緑色蛍光タンパク質標識ポリペプチド、*m y c* - ピルビン酸キナーゼ標識ポリペプチド、*H i s*<sub>6</sub> 標識ポリペプチド、インフルエンザウイルスヘマグルチニン標識ポリペプチド、*f l a g* 標識ポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質標識ポリペプチドよりなる群から選択される、請求項 1 2 4 に記載の単離された核酸。

【請求項 1 2 7】

作動可能に連結されたプロモーター / 制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる、請求項 1 2 1 に記載の単離された核酸。

10

【請求項 1 2 8】

請求項 1 2 1 、 1 2 2 若しくは 1 2 5 のいずれか 1 つに記載の単離された核酸を含んでなるベクター。

【請求項 1 2 9】

作動可能に連結されたプロモーター / 制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる、請求項 1 2 8 に記載のベクター。

【請求項 1 3 0】

請求項 1 2 1 に記載の単離された核酸を含んでなる組換え細胞。

【請求項 1 3 1】

請求項 1 2 1 、 1 2 2 、 1 2 3 、 1 2 4 、 1 2 5 、 1 2 6 若しくは 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の単離された核酸を含んでなる組換え細胞。

20

【請求項 1 3 2】

請求項 1 2 8 に記載のベクターを含んでなる組換え細胞。

【請求項 1 3 3】

細胞が真核生物細胞若しくは原核生物細胞である、請求項 1 3 2 に記載の組換え細胞。

【請求項 1 3 4】

キメラリボソームサブユニット成分がキメラの原核生物リボソームサブユニットである、請求項 1 2 1 に記載の単離された核酸。

【請求項 1 3 5】

キメラの原核生物リボソームサブユニットが 50S サブユニットの一成分である、請求項 1 3 4 に記載の単離された核酸。

30

【請求項 1 3 6】

キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項 1 3 7】

キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチドであって、該キメラリボソームサブユニット成分が配列番号 7 および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含んでなり、配列番号 7 は 0 から 4 個までのプロリンを有するポリペプチドにより配列番号 4 から分離されている、上記ポリペプチド。

【請求項 1 3 8】

請求項 1 3 6 に記載の単離されたポリペプチドを特異的に結合する抗体。

40

【請求項 1 3 9】

検出体分子、および核酸分子を転写するキメラ酵素と細胞を接触させることであって、該キメラ酵素は該検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなり、該検出体分子は：

a ) 該検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ酵素結合ドメイン ( C E B D )

、

b ) 核酸分子の一部分に相補的な PNA ; および

c ) シグナリング部分

を含んでなり、

かつ、該キメラ酵素が核酸を転写する場合に、PNA が、該酵素から発生する新生核酸分

50

子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられ、ならびに該シグナルを検出してそれにより核酸分子の転写を検出することを含んでなる、核酸分子の転写の検出方法。

【請求項 1 4 0】

検出体分子が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

検出体結合ドメインが、S H 3 ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

C E B D が、- P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 1 3 9 に記載の方法。 10

【請求項 1 4 3】

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド ( T P ) 、 T P 1 0 ペプチド、 p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、 t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

蛍光分子が、R e A s H 、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 、 C y 3 B 、 C y 5 、 T A M R A およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 1 4 4 に記載の方法。 20

【請求項 1 4 6】

P N A が核酸分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

P N A が核酸分子の三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

該三ヌクレオチドが核酸配列 C A C を有する、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

核酸分子を転写するキメラ酵素がキメラ R N A ポリメラーゼ I I である、請求項 1 3 9 に記載の方法。 30

【請求項 1 5 0】

キメラ R N A ポリメラーゼがキメラ T 7 R N A ポリメラーゼである、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

シグナルが、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) シグナル若しくは極性変化シグナルである、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

核酸分子が細胞中にある、請求項 1 3 9 に記載の方法。 40

【請求項 1 5 3】

細胞が真核生物細胞である、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

細胞が動物中にある、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

動物が哺乳動物である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

細胞が生物学的サンプルである、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

検出体分子、および核酸分子を翻訳するキメラ酵素と細胞を接触させることであって、

50

該キメラ酵素は検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなり、該検出体分子は；

- a ) 検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ酵素結合ドメイン ( C E B D ) 、
- b ) 核酸分子の一部分に相補的な P N A ；および
- c ) シグナリング部分

を含んでなり、

かつ、該キメラ酵素が核酸を転写する場合、 P N A がキメラ酵素から発生する R N A 分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられ、ならびに該シグナルを検出してそれにより核酸分子の翻訳を検出することを含んでなる、核酸分子の翻訳の検出方法。

10

【請求項 158】

検出体分子が細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 159】

検出体結合ドメインが、 S H 3 ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 160】

C E B D が、 - P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 161】

細胞透過性ペプチドが、トランスポータンペプチド ( T P ) 、 T P 10 ペプチド、 p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、 t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される、請求項 158 に記載の方法。

20

【請求項 162】

シグナリング部分が蛍光分子を含んでなる、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 163】

蛍光分子が、 R e A s H 、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 、 C y 3 B 、 C y 5 、 T A M R A およびフルオレセインよりなる群から選択される、請求項 162 に記載の方法。

30

【請求項 164】

P N A が、 R N A 分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 165】

P N A が R N A 分子の三ヌクレオチド部分に相補的である、請求項 164 に記載の方法。

。

【請求項 166】

三ヌクレオチドが核酸配列 C A C を有する、請求項 165 に記載の方法。

【請求項 167】

キメラ酵素がキメラリボソームである、請求項 157 に記載の方法。

40

【請求項 168】

キメラリボソームがキメラの原核生物リボソームである、請求項 167 に記載の方法。

【請求項 169】

シグナルが、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) シグナル若しくは極性変化シグナルである、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 170】

核酸が細胞中にある、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 171】

細胞が真核生物細胞である、請求項 170 に記載の方法。

【請求項 172】

細胞が動物中にある、請求項 170 に記載の方法。

50

**【請求項 173】**

動物が哺乳動物である、請求項172に記載の方法。

**【請求項 174】**

細胞が生物学的サンプルである、請求項170に記載の方法。

**【請求項 175】**

検出体分子、および核酸分子を転写するキメラ酵素と細胞を接触させることであって、該キメラ酵素は該検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなり、該検出体分子は：

- a ) 検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ酵素結合ドメイン ( C E B D ) 、
- b ) 核酸分子の一部分に相補的な P N A ；および
- c ) シグナリング部分

を含んでなり、

かつ、キメラ酵素が核酸を転写する場合、P N A は該酵素から発生する新生核酸分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられ、

該シグナルを検出すること、ならびに

検出されたシグナルを特定の配列と関連するシグナルのライブラリーに適合させるための拘束局所動的時間伸縮アルゴリズム ( c o n s t r a i n e d l o c a l d y n a m i c t i m e w a r p a l g o r i t h m ) を使用して、転写された核酸分子を同定し、それにより転写される核酸を同定すること

を含んでなる、転写される核酸の同定方法。

**【発明の詳細な説明】****【背景技術】****【0001】**

ヒトおよび病原性微生物を包含する多彩かつ重要な生物体からの増大する数のゲノムが配列決定されたか若しくは配列決定されつつある。各新たにゲノム配列の核酸配列が解明される際に、各遺伝子の発現プロファイルおよび機能の決定方法に対する必要性はかつてないほど緊急になっている。

**【0002】**

転写機構は酵母からヒトまでの範囲にわたる多様な種の間で大部分は保存されており、そして転写過程の基礎的性質を反映する。事実、転写過程に関与することが既知の 100 を超えるタンパク質の良好な配列の保存が存在する。m R N A を合成するタンパク質は R N A ポリメラーゼ I I として知られている。R N A ポリメラーゼ I I は複数のサブユニットから構成される大型タンパク質複合体である、このタンパク質はある D N A 配列 ( 該 D N A 配列の直鎖状配置および転写の開始へのその近接により T A T A ボックスとして知られる ) に結合する。しかしながら、R N A ポリメラーゼ I I は、転写因子 T F I I D 、 T F I I A および他者を包含する数種の他のタンパク質のこの D N A 領域との事前の会合を伴わずに T A T A ボックスに結合しない。これらのタンパク質は相互と相互作用して、R N A ポリメラーゼ I I が結合し得る複合体を形成する。T A T A ボックスでのタンパク質相互作用のこの足場構造が転写装置を形成する。この基礎的転写複合体は生物体の全細胞中の全遺伝子について非常に類似であるが、それでもなお、選択された遺伝子の転写は、異なる細胞型でオン若しくはオフされ、ならびに差別的に調節されて、異なる量の m R N A を生じ得ることが明らかである。

**【0003】**

転写調節のこの過程は多面的であり、そして転写複合体との特定の配置の数種の付加的なタンパク質の会合を必要とする。転写因子ともまた呼ばれる転写アクセサリタンパク質の配置および同一性は、個々の遺伝子に独特であり得る。

**【0004】**

2つの方法が遺伝子の機能を決定するのに主に使用されている。配列のアプローチは、核酸結合ドメインのような構造要素をコードする配列モチーフを同定し、それらの構造要素はこれらのモチーフを有する遺伝子の機能を仮定するのに使用し得る。この方法の欠点

10

20

30

40

50

は、モチーフの機能の事前に知識なしには配列のアプローチが有用でないことがある。従って、新たな遺伝子が発見されるがしかし既知のモチーフを含有しない場合、配列のアプローチはその遺伝子の機能についていかなる手掛かりも提供することに失敗する。

#### 【0005】

第二の方法は特定の一遺伝子の発現のパターンを探求する。発現のパターンは、その遺伝子の発現が、該発現に影響を及ぼした刺激と比較される場合に、該遺伝子の機能を解明し得る。蓄積された発現データがその後、該遺伝子およびそれがコードするポリペプチドの機能に関する洞察を提供し得る。

#### 【0006】

ノーザンプロット（非特許文献1）、ディファレンシャルディスプレイ（非特許文献2）、S1ヌクレアーゼ保護（非特許文献3）、cDNAライブラリーを配列決定すること（非特許文献4；非特許文献5）、遺伝子発現の連続分析（SAGE）（非特許文献6）、cDNAアレイおよびオリゴヌクレオチドアレイ（非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9）のような、遺伝子発現レベルを検出かつ定量するための多数の方法が考案された。これらの多様な遺伝子発現分析方法の間の共通の主題は、相補核酸の高度に感受性かつ高度に特異的な相互作用である。大部分の遺伝子発現の応用は、単一の標識オリゴヌクレオチドおよび細胞若しくは組織由来RNA種の混合物を使用する。標識プローブと未知の標的RNAの間の核酸ハイブリダイゼーションの精巧な選択性は、標的の各プール中の特定の一RNAの豊富さに関する情報を提供する。これらから遺伝子発現データを得ることができる。

10

#### 【0007】

cDNAマイクロアレイはこれらの方法を上回る大きな改良を表す。マイクロアレイは、RNA転写物由来の多くの遺伝子特異的ポリヌクレオチドが支持体上に固定されかつその後試験細胞若しくは組織の全RNAプール由来のなにより多数の蛍光若しくは放射標識cDNAに曝露されるために、特異的ヌクレオチド-ヌクレオチド相互作用が大スケールで起こることを可能にするからである。固定されたプローブと標識した標的の間のハイブリダイゼーションにより生成されるシグナルは、マイクロアレイ上およびcDNAプール中に存在する転写物の相対量の決定を可能にし、そして、細胞若しくは組織に対する刺激の影響の結果が、試験細胞若しくは組織と対照細胞若しくは組織の間の比較により決定される。

20

#### 【0008】

遺伝子発現の分析方法、およびとりわけマイクロアレイは、遺伝子機能の分析で強力なツールであることが判明した。同一始原細胞由来の2種の相違する組織間の遺伝子発現の相違、細胞若しくは組織に対する毒性化学物質の影響、健康な組織と疾患により苦しめられている組織の間の遺伝子発現の差違、腫瘍原性の分子的基礎、酵母での嫌気性呼吸から好気性呼吸への代謝シフト、ならびに同一種の非病原性および病原性株の間の毒性の基礎は、全部、とりわけ遺伝子発現分析およびマイクロアレイを使用して検討された。しかしながら、現在の遺伝子発現分析方法は、全部、細胞若しくは組織の溶解、RNAの単離、ならびに転写および翻訳事象のin vitro検出を必要とする。生物学的現象はガラス製マイクロアレイチップの無菌環境で正確に表されないが、しかしむしろ遺伝子発現およびタンパク質翻訳に影響する細胞内環境で正確に表される。さらに、現在使用される遺伝子発現分析方法は、リアルタイムよりはむしろ生物学的系の実際の活動を正確に反応しないかもしれない一連の時点を通して転写および翻訳事象の検出が起こることを必要とする。従って、マイクロアレイは実際の遺伝子発現の近似のみを提供する。それらは、実際の生物学的事象に対応することがありそうにない自由裁量の時間枠の間、一定の間隔を空けられたin vitro検出を必要とするからである。

30

#### 【0009】

遺伝子の発現および機能のin vivoのリアルタイム検出および分析を提供することの長年にわたる切実な必要性が存在する。本発明はこの必要性を満たす。

40

【非特許文献1】Alwineら、1977、Proc. Nat'l Acad. Sci.

50

. U S A 74 : 5350 - 5354

【非特許文献2】LiangとPardee、1992、Science 257 : 96  
7 - 971

【非特許文献3】BerkとSharp、1977、Cell 12 : 721 - 732

【非特許文献4】Adamsら、1991、Science 252 : 1651 - 1656

【非特許文献5】Okuboら、1992、Nature Genet. 2 : 173 - 179

【非特許文献6】Veliculescuら、1995、Science 270 : 484  
- 487

【非特許文献7】Schenaら、1995 Science 270 : 467 - 470

【非特許文献8】Schenaら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 10614 - 10619

【非特許文献9】Lockhartら、1996、Nature Biotechnol. 14 : 1675 - 1680

【発明の開示】

【0010】

[発明の要約]

一局面において、本発明はDNA分子の転写の検出方法を包含し、該方法は、検出体分子(detector molecule)、および検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなるキメラRNAポリメラーゼ分子と細胞を接触させることを含んでなり；該検出体分子は：該検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラRNAポリメラーゼ結合ドメイン(CRPBD)、RNA分子の一部分に相補的なペプチド核酸(PNA)；およびシグナリング部分(signaling moiety)を含んでなり、さらに、該RNAポリメラーゼがDNAを転写して新生RNA分子を産生する場合に、該PNAが新生RNA分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられて、それによりDNA分子の転写を検出する。

【0011】

一局面において、検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。

【0012】

別の局面において、検出体結合ドメインはSH3ドメインおよびロイシンジッパーとなる群から選択される。

【0013】

なお別の局面において、CRPBDは-PAKドメインおよびロイシンジッパーとなる群から選択される。

【0014】

一局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド(TP)、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tattラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

【0015】

別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。

【0016】

なお別の局面において、蛍光分子は、ReASH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、テトラメチルローダミン(TAMRA)およびフルオレセインよりなる群から選択される。

【0017】

一局面において、PNAは新生RNA分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である。

【0018】

10

20

30

40

40

50

別の局面において、PNAは新生RNA分子の三ヌクレオチドに相補的である。

【0019】

なお別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列CACを有する。

【0020】

一局面において、キメラRNAポリメラーゼはキメラRNAポリメラーゼIIである。

【0021】

別の局面において、キメラRNAポリメラーゼはキメラT7 RNAポリメラーゼである。

【0022】

なお別の局面において、シグナルは蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)シグナル若しくは極性変化シグナルである。 10

【0023】

別の局面において、新生RNA分子は細胞中にある。

【0024】

一局面において、細胞は真核生物細胞である。

【0025】

なお別の局面において、細胞は動物中にある。

【0026】

別の局面において、動物は哺乳動物である。

【0027】

なお別の局面において、細胞は生物学的サンプルである。 20

【0028】

一局面において、本発明は；

a) 検出体結合ドメインを含んでなるキメラRNAポリメラーゼ；ならびに  
b) シグナリング部分を含んでなる検出体分子、RNA分子の一部分に相補的なPNA、  
および検出体結合ドメインに結合することができるCRPBD  
を含んでなる、単離されたヌクレオペプチドコンジュゲート複合体(nucleopepti<sup>de</sup> conjugate complex)を包含し、  
CRPBDはキメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインに特異的に結合する。 30

【0029】

一局面において、検出体結合ドメインはSH3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

【0030】

なお別の局面において、CRPBDは-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。 40

【0031】

なお別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。

【0032】

別の局面において、蛍光分子は、ReASH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される。 40

【0033】

一局面において、PNAはRNA分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である。

【0034】

なお別の局面において、PNAはRNA分子の三ヌクレオチドに相補的である。

【0035】

なお別の局面において、三ヌクレオチドはCACの核酸配列を有する。

【0036】

一局面において、複合体は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。 50

## 【0037】

別の局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド(TP)、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tattフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチド(signal sequence based peptide)および両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

## 【0038】

なお別の局面において、RNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼIIである。

## 【0039】

一局面において、RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。

## 【0040】

一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸を包含し、該キメラRNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼおよび検出体結合ドメインを含んでなる。

10

## 【0041】

一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸を包含し、該単離された核酸は配列番号1および配列番号2を含んでなり、配列番号1は、配列番号21、配列番号22、配列番号23および配列番号24から選択される群に示される配列を有する単離された核酸により配列番号2から分離されている。

## 【0042】

なお別の局面において、単離された核酸は配列番号1および2に示される核酸配列を含んでなり、配列番号1は配列番号2に共有結合されている。

20

## 【0043】

一局面において、核酸はそれに共有結合された標識ポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる。

## 【0044】

一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸を包含し、キメラRNAポリメラーゼのアミノ酸配列は配列番号3および配列番号4に示されるアミノ酸配列を含んでなり、配列番号3は0から4個までのプロリンを有するペプチドにより配列番号4から分離されている。

30

## 【0045】

別の局面において、標識ポリペプチドは、myc標識ポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ標識ポリペプチド、緑色蛍光タンパク質標識ポリペプチド、myc-ピルビン酸キナーゼ標識ポリペプチド、His<sub>6</sub>標識ポリペプチド、インフルエンザウイルスヘマグルチニン標識ポリペプチド、flag標識ポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質標識ポリペプチドよりなる群から選択される。

## 【0046】

一局面において、核酸は、それに作動可能に連結されたプロモーター/制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる。

## 【0047】

一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸を含んでなるベクターを包含する。

40

## 【0048】

なお別の局面において、該ベクターはそれに作動可能に連結されたプロモーター/制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる。

## 【0049】

一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする本発明の単離された核酸を含んでなる組換え細胞を包含する。

## 【0050】

一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸を含んでなる本発明のベクターを含んでなる組換え細胞を包含する。

50

## 【0051】

一局面において、細胞は真核生物細胞若しくは原核生物細胞である。

## 【0052】

別の局面において、RNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼIIである。

## 【0053】

なお別の局面において、RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。

## 【0054】

一局面において、本発明はキメラRNAポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチドを包含する。

## 【0055】

一局面において、本発明はキメラRNAポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチドを包含し、該キメラRNAポリメラーゼは配列番号3および配列番号4に示されるアミノ酸配列を含んでなり、さらに、配列番号3は、0から4個までのプロリンを有するポリペプチドにより配列番号4から分離されている。一局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチドを特異的に結合する抗体を包含する。

10

## 【0056】

一局面において、本発明は、CRPBD、PNAおよびシグナリング部分を含んでなる単離された検出体分子を包含する。

20

## 【0057】

一局面において、CRPBDは検出体結合ドメインに結合することが可能である。

## 【0058】

なお別の局面において、CRPBDは配列番号5に示されるアミノ酸配列に75%同一性を有する。

## 【0059】

なお別の局面において、PNAはニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である。

## 【0060】

一局面において、PNAは三ヌクレオチドに相補的である。

30

## 【0061】

別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列CACを有する。

## 【0062】

なお別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。

## 【0063】

一局面において、蛍光分子は、ReAsH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される。

## 【0064】

なお別の局面において、検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。

40

## 【0065】

一局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド(TP)、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tagフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

## 【0066】

一局面において、本発明は、本発明の検出体分子を特異的に結合する抗体を包含する。

## 【0067】

一局面において、本発明は、RNA分子の転写を検出するためのキットを包含し、該キットは、キメラRNAポリメラーゼ、検出体分子、およびその使用のための取扱説明書を含んでなる。

50

## 【0068】

一局面において、キット中の検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。一局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド(TP)、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tattフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチド、トランスポータンペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

## 【0069】

なお別の局面において、キット中のキメラRNAポリメラーゼは、SH3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される検出体結合ドメインを含んでなる。

## 【0070】

別の局面において、キット中の検出体分子は、-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される検出体結合ドメインに結合することが可能なCRPBDを含んでなる。

## 【0071】

別の局面において、キット中の検出体分子はシグナリング部分を含んでなる。なお別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。なお別の局面において、蛍光分子は、ReASH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される。

## 【0072】

一局面において、キット中の検出体分子は、RNA分子の一部分に相補的なPNAを含んでなる。別の局面において、PNAはRNA分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である。一局面において、PNAは三ヌクレオチドに相補的である。なお別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列CACを有する。

## 【0073】

なお別の局面において、キット中のキメラRNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼIIである。一局面において、キメラRNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。

## 【0074】

一局面において、本発明はRNA分子の転写を検出するためのキットを包含し、該キットは、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸、検出体分子、およびその使用のための取扱説明書を含んでなる。

## 【0075】

別の局面において、該キットの検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。別の局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド(TP)、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tattフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

## 【0076】

なお別の局面において、該キットの単離された核酸は配列番号1に示される核酸配列を含んでなる。

## 【0077】

一局面において、該キットの検出体分子は、-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される検出体結合ドメインに結合することが可能なCRPBDを含んでなる。

## 【0078】

一局面において、該キットの検出体分子はシグナリング部分を含んでなる。なお別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。別の局面において、蛍光分子は、ReASH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される

10

20

30

40

50

。

## 【0079】

一局面において、該キットの検出体分子はRNA分子の一部分に相補的なPNAを含んでなる。なお別の局面において、PNAはRNA分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドに相補的である。なお別の局面において、PNAは三ヌクレオチドに相補的である。なお別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列CACを有する。

## 【0080】

別の局面において、該キットのキメラRNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼIIである。一局面において、キメラRNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。

## 【0081】

一局面において、本発明は単離されたDNA分子の配列決定方法を包含し、該方法は、単離されたDNA分子をプロモーター／制御配列に連結して連結されたDNA分子を形成すること、単離された核酸を、検出体分子に結合されたキメラRNAポリメラーゼと接触させることを含んでなり、該キメラRNAポリメラーゼは検出体結合ドメインを含んでなり、かつ、該検出体分子は、検出体結合ドメインに結合することが可能なCRPB、単離された核酸の一部分に相補的なPNA、およびシグナリング部分を含んでなり、キメラRNAポリメラーゼが該単離された核酸をmRNA分子に転写する場合に、PNAがそのように転写されたmRNA分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子から発せられて、それによりDNA分子を配列決定する。

## 【0082】

一局面において、単離されたDNA分子は二本鎖cDNAを含んでなる。

## 【0083】

別の局面において、プロモーター／制御配列はT7プロモーターである。

## 【0084】

なお別の局面において、検出体結合ドメインはSH3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

## 【0085】

一局面において、CRPBは-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

## 【0086】

なお別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。別の局面において、蛍光分子は、ReAsH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される。

## 【0087】

なお別の局面において、PNAは、連結されたDNA分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である。なお別の局面において、PNAは連結されたDNA分子の三ヌクレオチド部分に相補的である。

## 【0088】

一局面において、RNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼIIである。なお別の局面において、RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。

## 【0089】

別の局面において、シグナルは蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)シグナル若しくは極性変化シグナルである。

## 【0090】

なお別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列G TGを有する。

## 【0091】

なお別の局面において、プロモーター／制御配列は支持体に結合されている。

## 【0092】

一局面において、該方法は最低1回反復され、かつ、各反復での検出体分子は、連結さ

10

20

30

40

50

れたDNA分子の異なる一部分に相補的である異なるPNAを含んでなる。

【0093】

一局面において、本発明はRNA分子の翻訳の検出方法を包含し、該方法は、検出体分子、および検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなるキメラリボソームサブユニットを有するキメラリボソーム分子と細胞を接触させることを含んでなり、該検出体分子は、検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラリボソーム結合ドメイン(CRBD)、RNA分子の一部分に相補的なPNA；およびシグナル伝達分子を含んでなり、リボソームがRNAを翻訳する場合に、PNAがキメラリボソームのRNA出口孔(exit pore)を出るRNAに結合し、そしてシグナルが検出体分子から発せられて、それによりRNA分子の翻訳を検出する。

10

【0094】

別の局面において、検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。一局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド(TP)、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tattフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

【0095】

一局面において、検出体結合ドメインはSH3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

【0096】

なお別の局面において、CRBDは-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

20

【0097】

別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。なお別の局面において、蛍光分子は、ReASH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン(BSR)、Cyt3B、Cyt5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される。

【0098】

一局面において、PNAはRNA分子の二ヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である。別の局面において、PNAはRNA分子の三ヌクレオチド部分に相補的である。なお別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列CACを有する。

30

【0099】

なお別の局面において、リボソームは原核生物リボソームである。

【0100】

一局面において、リボソームはリボソームの50sサブユニットである。

【0101】

なお別の局面において、シグナルは蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)シグナル若しくは極性変化シグナルである。

【0102】

別の局面において、RNA分子は細胞中にある。

【0103】

なお別の局面において、細胞は真核生物細胞である。

40

【0104】

一局面において、細胞は動物中にある。

【0105】

なお別の局面において、動物は哺乳動物である。

【0106】

別の局面において、細胞は生物学的サンプルである。

【0107】

一局面において、本発明はキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を含んでなり、該キメラリボソームサブユニット成分はリボソームサブユニット成分

50

および検出体結合ドメインを含んでなる。

【0108】

一局面において、本発明はキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を包含し、該単離された核酸は配列番号6および配列番号2を含んでなり、配列番号6は、配列番号21、配列番号22、配列番号23および配列番号24から選択される群に示される配列を有する単離された核酸により配列番号2から分離されている。

【0109】

別の局面において、単離された核酸は配列番号6および配列番号2に示される核酸配列を含んでなり、配列番号6は配列番号2に共有結合されている。

【0110】

一局面において、該核酸は、それに共有結合された標識ポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる。

【0111】

一局面において、本発明は、キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を包含し、該キメラリボソームサブユニット成分のアミノ酸配列は、配列番号7および配列番号4に示されるアミノ酸配列を含んでなり、配列番号7は0から4個までのプロリンを有するペプチドにより配列番号4から分離されている。

【0112】

なお別の局面において、標識ポリペプチドは、m<sub>y</sub>c標識ポリペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ標識ポリペプチド、緑色蛍光タンパク質標識ポリペプチド、m<sub>y</sub>c-ピルビン酸キナーゼ標識ポリペプチド、His<sub>6</sub>標識ポリペプチド、インフルエンザウイルスヘマグルチニン標識ポリペプチド、fla<sub>g</sub>標識ポリペプチドおよびマルトース結合タンパク質標識ポリペプチドよりなる群から選択される。

【0113】

別の局面において、該核酸は、それに作動可能に連結されたプロモーター／制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる。

【0114】

一局面において、本発明は、キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を含んでなるベクターを包含する。

【0115】

一局面において、該ベクターは、それに作動可能に連結されたプロモーター／制御配列を指定する核酸をさらに含んでなる。一局面において、組換え細胞は該ベクターを含んでなる。

【0116】

一局面において、本発明は、キメラリボソームサブユニット成分1をコードする単離された核酸を含んでなる組換え細胞を包含する。

【0117】

なお別の局面において、細胞は真核生物細胞若しくは原核生物細胞である。

【0118】

一局面において、リボソームサブユニット成分は原核生物リボソームサブユニットである。

【0119】

別の局面において、リボソームサブユニットは50Sサブユニットの一成分である。

【0120】

一局面において、本発明は、キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチドを包含する。

【0121】

一局面において、本発明は、キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチドを包含し、該キメラリボソームサブユニット成分は配列番号7および配列番号4に示されるアミノ酸配列を含んでなり、配列番号7は0から4個までのプロリンを

10

20

30

40

50

有するポリペプチドにより配列番号4から分離されている。一局面において、本発明は、キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチドを特異的に結合する抗体を包含する。

【0122】

一局面において、本発明は核酸分子の転写の検出方法を包含し、該方法は、検出体分子、および核酸分子を転写するキメラ酵素と細胞を接触させることを含んでなり、該キメラ酵素は該検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなり、該検出体分子は；該検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ酵素結合ドメイン（CEBD）、核酸分子の一部分に相補的なPNA；およびシグナリング部分を含んでなり、該キメラ酵素が核酸を転写する場合に、PNAは該酵素から発生するRNA分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子から発せられ、さらに、前記方法は、シグナルを検出してそれにより核酸分子の転写を検出するための手段をさらに含んでなる。

10

【0123】

一局面において、検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。

【0124】

なお別の局面において、検出体結合ドメインはSH3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

【0125】

別の局面において、CEBDは-PAKドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

20

【0126】

一局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド（TP）、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tatフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

【0127】

別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。

【0128】

なお別の局面において、蛍光分子は、ReASH、ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン（BSR）、Cy3B、Cy5、TAMRAおよびフルオレセインよりなる群から選択される。

30

【0129】

一局面において、PNAは核酸分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である。

【0130】

別の局面において、PNAは核酸分子の三ヌクレオチド部分に相補的である。

【0131】

なお別の局面において、三ヌクレオチドは核酸配列CACを有する。

【0132】

一局面において、核酸分子を転写するキメラ酵素はRNAポリメラーゼIIである。

40

【0133】

なお別の局面において、RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。

【0134】

なお別の局面において、シグナルは蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）シグナル若しくは極性変化シグナルである。

【0135】

別の局面において、核酸分子は細胞中にある。

【0136】

一局面において、細胞は真核生物細胞である。

【0137】

50

なお別の局面において、細胞は動物中にある。

【0138】

なお別の局面において、動物は哺乳動物である。

【0139】

一局面において、細胞は生物学的サンプルである。

【0140】

一局面において、本発明は核酸分子の翻訳の検出方法を包含し、該方法は、検出体分子、および核酸分子を転写するキメラ酵素と細胞を接触させることを含んでなり、該キメラ酵素は、検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなり、該検出体分子は：検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ酵素結合ドメイン（C E B D）、核酸分子の一部分に相補的なP N A；およびシグナリング部分を含んでなり、該キメラ酵素が核酸を転写する場合、P N Aが該酵素から発生するR N A分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子から発せられ、さらに、前記方法は、シグナルを検出してそれにより核酸分子の翻訳を検出するための手段をさらに含んでなる。

10

【0141】

一局面において、検出体分子は細胞透過性ペプチドをさらに含んでなる。なお別の局面において、細胞透過性ペプチドは、トランスポータンペプチド（T P）、T P 1 0ペプチド、p V E Cペプチド、ペネトラチンペプチド、t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチドおよび両親媒性モデルペプチドよりなる群から選択される。

20

【0142】

別の局面において、検出体結合ドメインはS H 3ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

【0143】

一局面において、C E B Dは - P A K ドメインおよびロイシンジッパーよりなる群から選択される。

30

【0144】

なお別の局面において、シグナリング部分は蛍光分子を含んでなる。一局面において、蛍光分子は、R e A s H、ビス-（（N-ヨードアセチル）ピペラジニル）スルホンローダミン（B S R）、C y 3 B、C y 5、T A M R Aおよびフルオレセインよりなる群から選択される。

【0145】

別の局面において、P N AはR N A分子のニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド部分に相補的である。一局面において、P N AはR N A分子の三ヌクレオチド部分に相補的である。一局面において、三ヌクレオチドは核酸配列C A Cを有する。

40

【0146】

別の局面において、キメラ酵素はリボソームである。

【0147】

なお別の局面において、リボソームは原核生物リボソームである。

【0148】

一局面において、シグナルは蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）シグナル若しくは極性変化シグナルである。

【0149】

なお別の局面において、核酸は細胞中にある。

【0150】

一局面において、細胞は真核生物細胞である。

【0151】

なお別の局面において、細胞は動物中にある。

【0152】

一局面において、動物は哺乳動物である。

【0153】

50

別の局面において、細胞は生物学的サンプルである。

【0154】

一局面において、本発明は転写される核酸の同定方法を包含し、該方法は、検出体分子、および核酸分子を転写するキメラ酵素と細胞を接触させること（該キメラ酵素は該検出体分子を特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなり、該検出体分子は：a）検出体結合ドメインに結合することが可能なキメラ酵素結合ドメイン（C E B D）、b）核酸分子の一部分に相補的なP N A；およびc）シグナリング部分を含んでなり、かつ、キメラ酵素が核酸を転写する場合、P N Aは該酵素から発生する新生核酸分子に結合し、そしてシグナルが検出体分子により発せられ）；シグナルを検出すること；ならびに、検出されたシグナルを特定の配列と関連するシグナルのライブラリーに適合させるための拘束局所動的時間伸縮アルゴリズム（constrained local dynamic time warp algorithm）を使用して、転写された核酸分子を同定し、それにより転写される核酸を同定することを含んでなる。

10

【0155】

〔発明の詳細な記述〕

*in vivo*での核酸の転写および翻訳を迅速かつ正確に検出する能力は、細胞の実際の作用を知る手段、および従って生物学の全レベルのより大きな理解を見込む。加えて、細胞、組織、器官若しくは動物に対する治療薬、毒素、汚染物質、ホルモンおよび細胞と細胞の相互作用の影響を、組成物の作用機序をその最も基本的なレベルで解明するためには核酸レベルでモニターし得る。

20

【0156】

本発明は、部分的に、タンパク質のN末端がR N A出口孔に緊密に近接しているようなD N AにR N Aポリメラーゼが結合する場合にそれがコンホメーション変化を受けるという観察結果に基づく。

【0157】

本発明は、R N AポリメラーゼのN末端に工作され、従ってキメラR N Aポリメラーゼを創製する小捕捉ペプチド（検出体結合ドメイン）を包含する。本発明はさらに、R N Aポリメラーゼ中に工作された検出体結合ドメインに結合する一領域（キメラR N Aポリメラーゼ結合ドメイン；C R P B D）を包含する複数のドメインを含有する合成検出体分子を包含する。検出体分子中の別のドメインは、ペプチドスペーサー領域により分離されかつシグナリング部分を含んでなる、1個若しくはそれ以上、好ましくは2個の部分を含有する。検出体分子中の別のドメインは、新生R N A上の相補ヌクレオチドを特異的に結合しかつ長さが最低約2、好ましくは3ヌクレオチドに同等であるペプチド核酸（P N A）である。キメラR N AポリメラーゼがD N A鑄型に沿って動くように検出体分子がそれに結合される場合、P N Aは発生するR N A中のその対応する配列に結合し、そしてこうした結合により、シグナリング部分が動き、その結果蛍光エネルギー転移シグナルおよび極性変化が生じる。検出体分子は、*in vitro*でマイクロアレイ上で若しくは*in vivo*で生存細胞中でそれが作用するように合成され得る。後者について、検出体分子は輸送ベクター（transport vector）、細胞透過性ペプチド（C P P）にコンジュゲートされる。

30

【0158】

本発明はキメラリボソーム分子をさらに包含する。キメラリボソーム分子は、その中に検出体結合ドメインが工作されるサブユニット成分を有するキメラリボソームサブユニットを含んでなる。キメラリボソーム分子はR N A分子の翻訳の検出方法で有用であり、検出体分子を使用してシグナルを生じさせる。

40

【0159】

本発明は、核酸の転写および翻訳の検出ならびに核酸の迅速な配列決定のための新規組成物、方法およびキットを包含する。

【0160】

定義

50

本明細書で使用されるところの以下の用語のそれぞれは、本節のそれと関連する意味を有する。

【0161】

冠詞「a」および「an」（ある）は、該冠詞の文法上の目的の1若しくは1以上（すなわち最低1）を指すのに本明細書で使用する。例として、「an element（ある要素）」は1要素若しくは1以上の要素を意味している。

【0162】

「増幅」は、例えば逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応およびリガーゼ連鎖反応によりポリヌクレオチド配列をコピーしつつ従ってより多数のポリヌクレオチド分子に増やす、いかなる手段も指す。

10

【0163】

本明細書で使用されるところの「抗体」という用語は、ある抗原上の特定の1エピトープに特異的に結合することが可能である免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然の供給源若しくは組換え供給源由来の無傷の免疫グロブリンであり得、また、無傷の免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。抗体は典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。本発明の抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を包含する多様な形態で存在しうる(Harlowら、1999、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク；Harlowら、1989、Antibodies: A Laboratory Manual、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー；Houstonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883；Birdら、1988、Science 242: 423-426)。

20

【0164】

本明細書で使用されるところの「合成抗体」という用語により、例えば本明細書に記述されるところのバクテリオファージにより発現される抗体のような組換えDNA技術を使用して生成される抗体を意味している。該用語は、抗体をコードするDNA分子の合成により生成されかつそのDNA分子が抗体タンパク質若しくは抗体を指定するアミノ酸配列を発現する抗体を意味するともまた解釈されるべきであり、該DNA若しくはアミノ酸配列は、当該技術分野で使用可能かつ公知である合成DNA若しくはアミノ酸配列技術を使用して得られている。

30

【0165】

「アンチセンス」は、とりわけ、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の非コーディング鎖の核酸配列、若しくは非コーディング鎖に実質的に相同である配列を指す。本明細書で定義されるところのアンチセンス配列は、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の配列に相補的である。アンチセンス配列がDNA分子のコーディング鎖のコーディング部分にのみ相補的であることは必要でない。アンチセンス配列は、タンパク質をコードするDNA分子のコーディング鎖上で指定される制御配列に相補的ことができ、その制御配列は該コーディング配列の発現を制御する。

40

【0166】

該用語が本明細書で使用されるところの「アプリケーター」という用語により、本発明のいずれかの方法の実務で有用な、限定されるものでないが皮下シリンジ、ピペット、微小遠心管などを挙げることができるいかなる装置若しくは器具も意味している。

【0167】

「結合」は特異的結合を意味するのに本明細書で使用する。

【0168】

該用語が本明細書で使用されるところの「生物学的サンプル」は、核酸の発現のレベル、存在するタンパク質のレベル、若しくは双方を評価するのに使用し得る、哺乳動物から得られた若しくはそれ中のサンプルを意味している。こうしたサンプルは、限定されるも

50

のでないが細胞、血液サンプル、神経組織サンプル、脳サンプルおよび脳脊髄液サンプルを挙げることができる。

## 【0169】

「細胞透過性ペプチド」は、ポリペプチドと会合したいかなる分子とも一緒に前記ポリペプチドの1種若しくはそれ以上の膜を横断して細胞の内側への進入を容易にするポリペプチドを指す。本明細書で使用されるところの細胞透過性ペプチドは、限定されるものでないが、T P 1 0、T P、p V E C、ペネトラチン、T a t フラグメント、シグナル配列をベースとするペプチド、トランスポータンおよび両親媒性モデルペプチドを挙げることができる。

## 【0170】

本明細書で使用されるところの「相補的」および「アンチセンス」という用語は完全に同義でない。「アンチセンス」は、とりわけ、タンパク質をコードする二本鎖D N A分子の非コーディング鎖の核酸配列、若しくは該非コーディング鎖に実質的に相同である配列を指す。

## 【0171】

本明細書で使用されるところの「相補的」は、2種の核酸、例えば2種のD N A分子の間のサブユニット配列相補性の広範な概念を指す。該分子の双方中のあるヌクレオチド位置が、相互と塩基対形成することが通常可能なヌクレオチドにより占有される場合には、該核酸はこの位置で相互に相補的であるとみなされる。従って、2種の核酸は、分子のそれぞれ中の対応する位置の実質的な数（最低50%）が、相互と通常塩基対形成する（例えばA:TおよびG:Cヌクレオチド対）ヌクレオチドにより占有されている場合は、相互に相補的である。本明細書で定義されるところのアンチセンス配列は、タンパク質をコードする二本鎖D N A分子の配列に相補的である。アンチセンス配列はD N A分子のコーディング鎖のコーディング部分にのみ相補的であることは必要でない。アンチセンス配列は、タンパク質をコードするD N A分子のコーディング鎖上で指定される制御配列に相補的であることができ、その制御配列は該コーディング配列の発現を制御する。

## 【0172】

遺伝子の「コーディング領域」は、遺伝子の転写により產生されるm R N A分子のコーディング領域にそれぞれ相同若しくは相補的である遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド残基および遺伝子の非コーディング鎖のヌクレオチドよりなる。

## 【0173】

m R N A分子の「コーディング領域」はまた、m R N A分子の翻訳の間に転移R N A分子のアンチコドン領域と適合するか若しくは終止コドンをコードするm R N A分子のヌクレオチド残基よりもなる。コーディング領域は、従って、該m R N A分子によりコードされる成熟タンパク質中に存在しないアミノ酸残基（例えばタンパク質輸出シグナル配列中のアミノ酸残基）に対応するヌクレオチド残基を包含しうる。

## 【0174】

「検出体結合ドメイン」は、別のポリペプチドの一部分に特異的に結合するポリペプチドの一部分、若しくは別のポリペプチド以外の分子を特異的に結合するポリペプチド以外の分子を指すのに本明細書で使用する。別の非ポリペプチドに特異的に結合する非ポリペプチドの制限しない一例は、アビジン若しくはストレプトアビジンへのビオチンの結合である。

## 【0175】

「検出体分子」は、ポリペプチド、1個若しくはそれ以上のシグナリング部分、1種若しくはそれ以上のペプチド核酸（P N A）、および検出体結合ドメインに結合する部分を含んでなる組成物を指すのに本明細書で使用する。

## 【0176】

「二ヌクレオチド」は共有結合を共有する2ヌクレオチドを指すのに本明細書で使用する。

## 【0177】

10

20

30

40

50

「コードすること」は、ヌクレオチド（すなわち rRNA、tRNA および mRNA）の定義された配列若しくはアミノ酸の定義された配列のいずれかおよびそれらから生じる生物学的特性を有する、生物学的過程で他のポリマーおよび巨大分子の合成のための鑄型としてはたらく、遺伝子、cDNA 若しくは mRNA のようなポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。従って、遺伝子は、その遺伝子に対応する mRNA の転写および翻訳が細胞若しくは他の生物学的系でタンパク質を产生する場合に、タンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列が mRNA 配列に同一でありかつ通常配列表に提供されるコーディング鎖、および遺伝子若しくは cDNA の転写のための鑄型として使用される非コーディング鎖の双方を、その遺伝子若しくは cDNA のタンパク質若しくは他の産物をコードすると称し得る。

10

## 【0178】

オリゴヌクレオチドの第一の領域は、2領域が相互に隣接している場合、若しくは2領域が約1000を超えないヌクレオチド残基、および好ましくは約100を超えないヌクレオチド残基により分離されている場合に、該オリゴヌクレオチドの第二の領域に「隣接する」。

## 【0179】

本明細書で使用されるところの「相同な」は、2種のポリマー分子間、例えば2種の核酸分子、例えば2種のDNA分子若しくは2種のRNA分子間、または2種のポリペプチド分子間のサブユニット配列類似性を指す。2分子の双方中のあるサブユニット位置が同一の単量体サブユニットにより占有される場合、例えば2種のDNA分子のそれの中の1位置がアデニンにより占有される場合には、それらはその位置で相同である。2配列間の相同性は、適合する若しくは相同な位置の数の直接の関数であり、例えば、2種の化合物の配列中の位置の半分（例えば長さ10サブユニットのポリマー中の5位置）が相同である場合には、該2配列は50%相同であり、10位置のうち9が適合しているか若しくは相同である場合、該2配列は90%相同性を共有する。例として、DNA配列3' AT T G C C 5' および3' T A T G G C 5' は50%相同性を共有する。

20

## 【0180】

本明細書で使用されるところの「相同性」は「同一性」と同義に使用する。

## 【0181】

2種のヌクレオチド若しくはアミノ酸配列間の同一性パーセントの決定は数学的アルゴリズムを使用して達成し得る。例えば、2配列を比較するのに有用な数学的アルゴリズムは、KarlinとAltshul（1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877）でのとおり改変されたKarlinとAltshulのアルゴリズム（1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268）である。このアルゴリズムはAltshulらのNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれ（1990、J. Mol. Biol. 215: 403-410）、そして、例えば国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）（NCBI）のワールドワイドウェブサイトでアクセスし得る。BLASTヌクレオチド検索は、本明細書に記述される核酸に相同なヌクレオチド配列を得るために、以下のパラメータ、すなわち、ギャップペナルティ（gap penalty）=5；ギャップ伸長ペナルティ（gap extension penalty）=2；ミスマッチペナルティ（mismatch penalty）=3；マッチリワード（match reward）=1；期待値（expectation value）10.0；およびワードサイズ（word size）=11を使用するNBLASTプログラム（NCBIウェブサイトで“blastn”と呼称される）を用いて実施し得る。BLASTタンパク質検索は、本明細書に記述されるタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、以下のパラメータ、すなわち、期待値（expectation value）10.0、BLOSUM62スコアリングマトリックスを使用してXBLASTプログラム（NCBIウェブサイトで“blastn”と呼称される）若しくはNCBI“blastp”プログ

30

40

50

ラムを用いて実施し得る。比較の目的上、ギャップを付けられたアライメントを得るために、Gapped BLASTをAltschulら(1997、Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402)に記述されるとおり利用し得る。あるいは、PSI-Blast若しくはPHI-Blastを、分子間の距離関係(同上)、および共通パターンを共有する分子間の関係を検出する繰り返し検索を実施するのに使用し得る。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BlastおよびPHI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えばXBLASTおよびNBBLAST)のデフォルトのパラメータを使用し得る。

## 【0182】

2配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容することを伴う若しくは伴わない上述されたものに類似の技術を使用して決定し得る。同一性パーセントの算出において、典型的には正確な一致を計数する。

## 【0183】

本明細書で使用されるところの「説明資料」は、その指定される使用についての本発明の組成物の有用性を伝えるのに使用し得る刊行物、録画・録音、図、若しくはいかなる他の表現媒体も包含する。本発明のキットの説明資料は、例えば組成物を含有する容器に添付し得るか、若しくは組成物を含有する容器と一緒に発送し得る。あるいは、説明資料は、該説明資料および組成物が受領者により協同して使用されるという意図を伴い、容器と別個に発送し得る。

## 【0184】

「単離された核酸」は、天然に存在する状態でそれに隣接する配列から分離された核酸セグメント若しくはフラグメント、例えば、該フラグメントに通常隣接している配列、例えば該フラグメントが天然に存在するゲノム中で該フラグメントに隣接する配列から取り出されたDNAフラグメントを指す。該用語は、細胞中で該核酸に天然に付随する他成分、例えばRNA若しくはDNAまたはタンパク質から実質的に精製された核酸にもまた当てはまる。該用語は、従って、例えば、ベクター、自律複製プラスミド若しくはウイルス、または原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAに組込まれているか、あるいは他の配列と独立に個別の分子として(例えばcDNA、またはPCR若しくは制限酵素消化により生じられたゲノム若しくはcDNAフラグメントとして)存在する組換えDNAを包含する。それはまた、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも包含する。

## 【0185】

対象に適用されるところの「天然に存在する」は、該対象が天然に見出され得るという事実を指す。例えば、天然の供給源から単離し得る生物体(ウイルスを包含する)中に存在しかつ人により意図的に改変されていないポリペプチド若しくはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

## 【0186】

「ヌクレオペプチドコンジュゲート複合体」は、最低1種のポリペプチド、最低1種のPNAおよびシグナリング部分を含んでなる分子を指すのに本明細書で使用する。

## 【0187】

本発明の情況において、一般に存在する核酸塩基の以下の略語を使用する。「A」はアデノシンを指し、「C」はシチジンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、そして「U」はウリジンを指す。

## 【0188】

別の方法で明記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、相互の縮重バージョンでありかつ同一アミノ酸配列をコードする全ヌクレオチド配列を包含する。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを包含し得る。

## 【0189】

2種のポリヌクレオチドを「作動可能に連結される」として記述することにより、一本

10

20

30

40

50

鎖若しくは二本鎖核酸部分が、それが他者に対し特徴とする生理学的影響を該2種のポリヌクレオチドの少なくとも1種が発揮することが可能であるような様式で核酸部分内に配置された該2種のポリヌクレオチドを含んでなることを意味している。例として、遺伝子のコーディング領域に作動可能に連結されるプロモーターは、該コーディング領域の転写を促進することが可能である。

## 【0190】

「ポリヌクレオチド」は核酸の一本鎖若しくは平行および反平行鎖を意味している。従って、ポリヌクレオチドは一本鎖若しくは二本鎖いずれの核酸でもありうる。

## 【0191】

「核酸」という用語は、典型的には大型ポリヌクレオチドを指す。

10

## 【0192】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、一般に約50ヌクレオチドより大きくない短いポリヌクレオチドを典型的に指す。ヌクレオチド配列がDNA配列（すなわちA、T、G、C）により表される場合、これは「U」が「T」を置き換えるRNA配列（すなわちA、U、G、C）もまた包含することが理解されるであろう。

## 【0193】

ポリヌクレオチド配列を記述するのに慣習的表記法を本明細書で使用する。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端が5'端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側の方向が5'方向と称される。

20

## 【0194】

新生RNA転写物へのヌクレオチドの5'から3'の付加の方向が転写の方向と称される。mRNAと同一配列を有するDNA鎖は「コーディング鎖」と称され；DNAの参照点に対し5'に位置するDNA鎖上の配列は「上流配列」と称され；DNAの参照点に対し3'であるDNA鎖上の配列は「下流配列」と称される。

## 【0195】

「キメラRNAポリメラーゼ結合ドメイン（CRPB）」は、検出体結合ドメインに特異的に結合する検出体分子中のポリペプチド若しくは分子を指すのに本明細書で使用する。

## 【0196】

「キメラリボソーム結合ドメイン（CRBD）」は、リボソーム中の検出体結合ドメインに特異的に結合する検出体分子中のポリペプチド若しくは分子を指すのに本明細書で使用する。

30

## 【0197】

「キメラ酵素結合ドメイン（CEBD）」は、酵素中の検出体結合ドメインに特異的に結合する検出体分子中のポリペプチド若しくは分子を指すのに本明細書で使用する。

## 【0198】

ポリヌクレオチドの「部分」は、該ポリヌクレオチドの最低約20の連続するヌクレオチド残基を意味している。ポリヌクレオチドの一部分は該ポリヌクレオチドのすべてのヌクレオチド残基を包含しうることが理解される。

40

## 【0199】

「プライマー」は、指定されるポリヌクレオチド鑄型に特異的にハイブリダイズしかつ相補ポリヌクレオチドの合成の開始点を提供することが可能であるポリヌクレオチドを指す。こうした合成は、合成が誘導される条件下、すなわちヌクレオチド、相補ポリヌクレオチド鑄型、およびDNAポリメラーゼのような重合のための剤の存在下にポリヌクレオチドプライマーが置かれる場合に発生する。プライマーは典型的に一本鎖であるが、しかし二本鎖でありうる。プライマーは典型的にデオキシリボ核酸であるが、しかし多様な合成および天然に存在するプライマーが多くの応用に有用である。プライマーは、それがハイブリダイズして合成の開始のための部位としてはたらくように設計されている鑄型に相補的であるが、しかし該鑄型の正確な配列を反映する必要はない。こうした場合、鑄型へのプライマーの特異的ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション条件の緊縮性に

50

依存する。プライマーは、例えば色素生産性、放射活性若しくは蛍光部分で標識し得、そして検出可能な部分として使用し得る。

【0200】

「プローブ」は、別のポリヌクレオチドの指定される配列に特異的にハイブリダイズすることが可能であるポリヌクレオチドを指す。プローブは標的の相補ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするが、しかし該鑄型の正確な相補配列を反映する必要はない。こうした場合、標的へのプローブの特異的ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション条件の緊縮性に依存する。プローブは、例えば色素生産性、放射活性若しくは蛍光部分で標識し得、そして検出可能な部分として使用し得る。

【0201】

「組換えポリヌクレオチド」は、天然に一緒に結合されていない配列を有するポリヌクレオチドを指す。增幅若しくは集成された組換えポリヌクレオチドを適するベクターに包含することができ、そして該ベクターを使用して適する宿主細胞を形質転換し得る。組換えポリヌクレオチドは、コーディング以外の機能（例えばプロモーター、複製起点、リボソーム結合部位など）ならびにコーディング機能を供しうる。

【0202】

組換えポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞は「組換え宿主細胞」と称される。遺伝子が組み換えポリヌクレオチドを含んでなる組換え宿主細胞中で発現される遺伝子は「組換えポリペプチド」を產生する。

【0203】

「組換えポリペプチド」は組換えポリヌクレオチドの発現に際して產生されるものである。

【0204】

「ポリペプチド」は、アミノ酸残基、関連する天然に存在する構造バリエント、およびペプチド結合を介して連結されたそれらの合成の天然に存在しないアナログから構成されるポリマーを指す。合成ポリペプチドは、例えば自動ポリペプチド合成機を使用して合成し得る。

【0205】

「タンパク質」という用語は典型的に大型ポリペプチドを指す。

【0206】

「ペプチド」という用語は典型的に短いポリペプチドを指す。

【0207】

ポリペプチド配列を表現するのに慣習的表記法を本明細書で使用する。すなわち、ポリペプチド配列の左側はアミノ末端であり；ポリペプチド配列の右側はカルボキシル末端である。

【0208】

本明細書で使用されるところの「プロモーター／制御配列」という用語は、該プロモーター／制御配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味している。いくつかの例において、この配列はコアプロモーター配列ができる、また、他の例において、この配列は、エンハンサー配列、および遺伝子産物の発現に必要とされる他の調節エレメントもまた包含しうる。プロモーター／制御配列は、例えば、組織特異的様式で遺伝子産物を発現するものありうる。

【0209】

「キメラRNAポリメラーゼ」は、RNAポリメラーゼ中に天然に存在しないペプチドを含んでなるRNAポリメラーゼ分子を指すのに本明細書で使用する。

【0210】

本明細書で使用されるところの「RNAポリメラーゼ分子」若しくは「RNAポリメラーゼ」は、ヌクレオシド三リン酸前駆体からのDNA鑄型上でRNA分子の合成を触媒する酵素を意味している。

【0211】

10

20

30

40

50

「シグナリング部分」は、刺激されるか若しくは動かされる場合にシグナルを発し、該シグナルが機械若しくはヒトにより検出可能である、1個若しくはそれ以上の分子を指すのに本明細書で使用する。

【0212】

本明細書で使用されるところの「特異的に結合する」という用語により、あるドメイン、例えばS H 3 ドメイン若しくは - P A K ドメインを認識かつ結合するがしかしサンプル中の他の分子を実質的に認識若しくは結合しないエピトープ若しくはタンパク質を認識かつ結合する抗体を意味している。

【0213】

「治療的」処置は、病理の徴候を減少若しくは排除する目的上それらの徴候を表す被験体に投与される処置である。 10

【0214】

化合物の「治療的有効量」は、該化合物を投与する被験体に有益な効果を提供するのに十分である化合物の量である。

【0215】

本明細書で使用されるところの「導入遺伝子」は、あるアミノ酸配列をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーター／制御配列をコードする核酸を含んでなる外因性核酸配列を意味しており、その外因性核酸は動物若しくは細胞によりコードされる。

【0216】

「三ヌクレオチド」は2個の共有結合を共有する3ヌクレオチドを指すのに本明細書で使用する。 20

【0217】

「ベクター」は、単離された核酸を含んでなりかつ細胞の内側に該単離された核酸を送達するのに使用し得る組成物である。限定されるものでないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性若しくは両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを挙げることができる多数のベクターが当該技術分野で既知である。従って、「ベクター」という用語は自律複製プラスミド若しくはウイルスを包含する。該用語は、例えばポリリシン化合物、リポソームなどのような、核酸の細胞中への移入を容易にするプラスミド以外およびウイルス以外の化合物を包含するともまた解釈されるべきである。ウイルスベクターの例は、限定されるものでないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどを挙げることができる。 30

【0218】

「発現ベクター」は、発現されるべきヌクレオチド配列に効果的に連結された発現制御配列を含んでなる組換えポリヌクレオチドを含んでなるベクターを指す。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用性エレメントを含んでなり；発現のための他のエレメントは宿主細胞により、若しくはin vitro発現系で供給され得る。発現ベクターは、組換えポリヌクレオチドを組み込むコスミド、プラスミド（例えば裸の若しくはリポソームに含有される）およびウイルスのような当該技術分野で既知の全部のものを包含する。

【0219】

記述 40

I. 単離された核酸

本発明は、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸若しくはそのフラグメントを包含し、該キメラRNAポリメラーゼは、RNAポリメラーゼ、検出体結合ドメイン、ならびに、場合によっては、RNAポリメラーゼと検出体結合ドメインの間に約1から約3個までのプロリンを含んでなる可変スペーサーペプチドを含んでなる。

【0220】

RNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号1の配列を有する核酸と最低約50%の同一性を共有する。好ましくは、該核酸は配列番号1に約60%同一であり、より好ましくは、該核酸は約65%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号1に約70%同一であり、より好ましくは、該核酸は約75%同一である。好ましくは、該核酸は配列番

号1に約80%同一であり、より好ましくは、該核酸は約85%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号1に約90%同一であり、より好ましくは、該核酸は約95%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号1に約97%同一であり、より好ましくは、該核酸は約98%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号1に約99%同一であり、より好ましくは、該核酸は約99.9%同一である。なおより好ましくは、該核酸は配列番号1に同一であり、該核酸はT7 RNAポリメラーゼをコードする。

【0221】

キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインをコードする核酸は、配列番号2の配列を有する核酸と最低約50%の同一性を共有する。好ましくは、該核酸は配列番号2に約60%同一であり、より好ましくは、該核酸は約65%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号2に約70%同一であり、より好ましくは、該核酸は約75%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号2に約80%同一であり、より好ましくは、該核酸は約85%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号2に約90%同一であり、より好ましくは、該核酸は約99%同一であり、より好ましくは、該核酸は約95%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号2に約97%同一であり、より好ましくは、該核酸は約98%同一である。好ましくは、該核酸は配列番号2に約99.9%同一である。なおより好ましくは、該核酸は配列番号2であり、該核酸は-PAKを結合するラット-pixSH3ドメインをコードする。

10

【0222】

本発明のキメラRNAポリメラーゼは、検出体結合ドメインに直接融合されたRNAポリメラーゼを含み得る。あるいは、キメラRNAポリメラーゼは、RNAポリメラーゼと検出体結合ドメインの間に可変スペーサーペプチドを含み得る。可変スペーサーペプチドは1個若しくはそれ以上のアミノ酸を含んでなるポリペプチドを含み得る。好ましくは、可変スペーサーペプチドは約1ないし約10の間のアミノ酸、好ましくは約2から約9アミノ酸まで、なおより好ましくは約3から約8アミノ酸まで、なおより好ましくは約4から約7アミノ酸まで、なおより好ましくは約5から約6アミノ酸までを含んでなる。最も好ましくは、スペーサーペプチドは約1ないし約3アミノ酸を含んでなる。なおより好ましくは、スペーサーペプチド中のアミノ酸はプロリンである。一例として、検出体結合ドメインとRNAポリメラーゼの間のスペーサーペプチド中にプロリンを含まないキメラRNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号21(GGCAGATAAAGGTCCAGCTGATCGGCTTTGGC)を含み得る。検出体結合ドメインとRNAポリメラーゼの間のリンカー中に1個のプロリンを含んでなるキメラRNAポリメラーゼは、配列番号22(GGCAGGGCCCTGCCAGGGCATGTTGGCGGCC)を含んでなる核酸によりコードされ得る。検出体結合ドメインとRNAポリメラーゼの間のリンカー中に2個のプロリンを含んでなるキメラRNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号23(GGCCCAAGATGATACTCCATGGGATGGCGGGC)を含み得る。検出体結合ドメインとRNAポリメラーゼの間のリンカー中に3個のプロリンを含んでなるキメラRNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号24(GGCCCAACCAAGATACTCCATACGCCGATGGC)を含み得る。当業者により認識されるであろうとおり、本発明はスペーサー領域ペプチド中のプロリンに限定されないが、しかしそしろ本明細書の別の場所に示されるものを包含するいかなるアミノ酸も含み得る。こうしたアミノ酸をコードするコドン、および核酸配列中へのコドンの組み込み方法は当該技術分野で公知であり、かつ、本明細書の別の場所に記述される。

20

30

40

【0223】

本発明はまた、キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸若しくはそのフラグメントも包含し、該キメラリボソームサブユニット成分は、リボソームサブユニットの1成分、検出体結合ドメイン、ならびに、場合によっては、リボソームサブユニットおよび検出体結合ドメインのキメラ成分の間に約1から約3個までのプロリンを含んでなる可変スペーサーペプチドを含んでなる。好ましくは、リボソームサブユニットはL1サブユニットである。キメラリボソームサブユニット成分はキメラリボソーム分子の

50

一部である。好ましくは、リボソームは原核生物リボソームである。別の態様において、リボソームは、哺乳動物リボソーム、酵母リボソーム、植物リボソームなどのような真核生物リボソームである。一態様において、リボソームサブユニット成分は 30 s サブユニットの 1 成分（すなわち 30 s サブユニット中の約 21 種のタンパク質の 1 種）であり、別の態様において、キメラリボソームサブユニット成分は 50 s サブユニットの 1 成分（すなわち 50 s サブユニット中の約 34 種のタンパク質の 1 種、好ましくは L1 サブユニット）である。別の態様において、リボソームサブユニット成分は 60 s の大サブユニットの 1 成分若しくは 40 s の小サブユニットの 1 成分である。

## 【0224】

リボソームサブユニット成分をコードする核酸は、配列番号 6 の配列を有する核酸と最低約 50 % の同一性を共有する。好ましくは、該核酸は配列番号 6 に約 60 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 65 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 6 に約 70 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 75 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 6 に約 80 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 85 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 6 に約 90 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 95 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 6 に約 97 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 98 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 6 に約 99 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は配列番号 6 に同一であり、該核酸は細菌の 50 s サブユニットの L1 成分をコードする。

## 【0225】

キメラリボソームサブユニット成分中の検出体結合ドメインをコードする核酸は、配列番号 2 の配列を有する核酸と最低約 50 % の同一性を共有する。好ましくは、該核酸は配列番号 2 に約 60 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 65 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 2 に約 70 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 75 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 2 に約 80 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 85 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 2 に約 90 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 95 % 同一である。好ましくは、該核酸は配列番号 2 に約 97 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 98 % 同一である、好ましくは、該核酸は配列番号 2 に約 99 % 同一であり、より好ましくは、該核酸は約 99.9 % 同一である。なおより好ましくは、該核酸は配列番号 2 であり、該核酸は - PAK を結合するラット - p i x SH3 ドメインをコードする。

## 【0226】

本発明のキメラリボソームサブユニット成分は、検出体結合ドメインに直接融合されたリボソームを含み得る。あるいは、キメラリボソームサブユニット成分は、リボソームサブユニット成分と検出体結合ドメインの間にスペーサーペプチドを含み得る。該スペーサー領域ペプチドは 1 個若しくはそれ以上のアミノ酸を含み得る。好ましくは、スペーサー領域ペプチドは、約 1 ないし約 10 アミノ酸の間、好ましくは約 2 から約 9 アミノ酸まで、なおより好ましくは約 3 から約 8 アミノ酸まで、なおより好ましくは約 4 から約 7 アミノ酸まで、なおより好ましくは約 5 から約 6 アミノ酸までを含んでなる。最も好ましくは、スペーサーペプチドは約 1 ないし約 3 アミノ酸を含んでなる。

## 【0227】

本発明の単離された核酸は、本発明のキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする RNA 若しくは DNA 配列、およびそれが細胞を含まない場合若しくはそれが細胞と会合される場合にヌクレオチド配列をより安定にする DNA 若しくは RNA の化学修飾を包含するそれらのいかなる修飾された形態も包含すると解釈されるべきである。ヌクレオチドの化学修飾は、ヌクレオチド配列が細胞により取り込まれる効率若しくはそれが細胞中で発現される効率を高めるのにもまた使用しうる。該ヌクレオチド配列の修飾のいかなるおよび全部の組み合わせを本発明で企図している。

## 【0228】

本発明は、本明細書に開示される核酸およびアミノ酸配列にのみ制限されると解釈され

10

20

30

40

50

るべきでない。本発明を一旦備えれば、キメラRNAポリメラーゼ、キメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼ、検出体結合ドメイン若しくはスペーサーペプチドをコードする他の核酸を、本明細書に開示されるところのキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする他の単離された核酸の生成のための本明細書で実験の詳細の節に記述される手順（例えば部位特異的突然変異誘発、フレームシフト突然変異など）、および当該技術分野で公知であるか若しくは開発されるはずである手順に従うことにより得ることができることが、当業者に容易に明らかである。一例として、本発明は、ロイシンジッパーモチーフの一方のヘリックスを含んでなる検出体結合ドメイン、およびロイシンジッパーモチーフの他方のヘリックスを含んでなるCRPBDを含み得る。

10

## 【0229】

さらに、いずれかの他の数の手順を、例えば、Sambrookら（2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク）およびAusubelら（1997、Current Protocols in Molecular Biology、Green & Wiley、ニューヨーク）に記述されるもののような当該技術分野で公知の組換えDNAの方法論を使用するキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の誘導体若しくはバリエントの形態の生成に使用しうる。

20

## 【0230】

ポリペプチドをコードするDNA配列を変更することによるタンパク質若しくはポリペプチド中のアミノ酸変化の導入手順は当該技術分野で公知であり、そしてSambrookら（2001、上記）；Ausubelら（1997、上記）にもまた記述されている。

## 【0231】

本発明はまた、それに共有結合された標識ポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでなる、キメラRNAポリメラーゼ、キメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼ、検出体結合ドメイン若しくはスペーサーペプチドをコードする核酸も包含する。すなわち、本発明は、標識ポリペプチドをコードする核酸配列がキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸に共有結合されているキメラ核酸を包含する。こうした標識ポリペプチドは当該技術分野で公知であり、そして、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、myc、myc-ピルビン酸キナーゼ（myc-PK）、His<sub>6</sub>、マルトース結合タンパク質（MBP）、インフルエンザウイルスヘマグルチニン標識ポリペプチド、flag標識ポリペプチド（FLAG）およびグルタチン-S-トランスフェラーゼ（GST）標識ポリペプチドを包含する。しかしながら、本発明は、上に列挙される標識ポリペプチドをコードする核酸に制限されると決して解釈されるべきでない。むしろ、これらの標識ポリペプチドに実質的に類似の様式で機能しうるポリペプチドをコードするいかなる核酸配列も、本発明に包含されると解釈されるべきである。

30

## 【0232】

標識ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる核酸は、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を細胞、組織および/若しくは全生物体（例えば哺乳動物細胞）内で位置推定し、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を細胞の核内で検出し、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をガラス製スライドガラス若しくは他の支持体上で検出し、かつ/または細胞中のキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の役割（1種若しくは複数）を研究するのに使用し得る。さらに、標識ポリペプチドの付加は、本発明のタンパク質が容易に產生かつ精製され得るような「標識された」タンパク質の単離および精製を容易にする。

40

## 【0233】

50

## I I . 単離されたポリペプチド

本発明は、キメラRNAポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチド若しくはそのフラグメントを包含し、該キメラRNAポリメラーゼは、RNAポリメラーゼ、検出体結合ドメイン、ならびに、場合によっては、RNAポリメラーゼポリペプチドと検出体結合ドメインポリペプチドの間に約1から約3個までのプロリンを含んでなる可変スペーサーペプチドを含んでなる。好ましくは、RNAポリメラーゼポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのフラグメントに最低約50%同一である。好ましくは、RNAポリメラーゼポリペプチドは、配列番号3若しくはその何らかのフラグメントに約55%同一、より好ましくは約60%同一、より好ましくは約65%同一である。なおより好ましくは、RNAポリメラーゼポリペプチドは、配列番号3若しくはその何らかのフラグメントに約70%同一、より好ましくは約75%同一、より好ましくは約80%同一である。より好ましくは、RNAポリメラーゼポリペプチドは、配列番号3若しくはその何らかのフラグメントに約85%同一、より好ましくは約90%同一、より好ましくは約95%同一である。なおより好ましくは、単離されたRNAポリメラーゼポリペプチドは、配列番号3若しくはその何らかのフラグメントに約96%同一、より好ましくは約97%同一、より好ましくは約98%同一、およびなおより好ましくは約99%同一である。最も好ましくは、キメラRNAポリメラーゼ中のRNAポリメラーゼポリペプチドは、配列番号3すなわちT7 RNAポリメラーゼのアミノ酸配列である。

## 【0234】

キメラRNAポリメラーゼを含んでなる単離されたポリペプチドは検出体結合ドメインをさらに含んでなる。好ましくは、検出体結合ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのフラグメントに最低約50%同一である。好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号4若しくはその何らかのフラグメントに約55%同一、より好ましくは約60%同一、より好ましくは約65%同一である。なおより好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号4若しくはその何らかのフラグメントに約70%同一、より好ましくは約75%同一、より好ましくは約80%同一である。より好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号4若しくはその何らかのフラグメントに約85%同一、より好ましくは約90%同一、より好ましくは約95%同一である。なおより好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号4若しくはその何らかのフラグメントに約96%同一、より好ましくは約97%同一、より好ましくは約98%同一、およびなおより好ましくは約99%同一である。最も好ましくは、検出体結合ドメインを含んでなる単離されたポリペプチドの部分は、配列番号4、すなわち-PAKを結合するラット-PIXからのSH3ドメインのアミノ酸配列である。

## 【0235】

本発明のキメラRNAポリメラーゼは、検出体結合ドメインに直接融合されたRNAポリメラーゼを含み得るか、若しくは、あるいは、それは、RNAポリメラーゼポリペプチドと検出体結合ドメインポリペプチドの間にスペーサーペプチドを含み得る。スペーサーペプチドは1個若しくはそれ以上のアミノ酸を含み得る。好ましくは、スペーサーペプチドは、約1ないし約10アミノ酸の間、好ましくは約2から約9アミノ酸まで、なおより好ましくは約3から約8アミノ酸まで、なおより好ましくは約4から約7アミノ酸まで、なおより好ましくは約5から約6アミノ酸までを含んでなる。最も好ましくは、スペーサーペプチドは約1ないし約3アミノ酸を含んでなる。好ましくは、スペーサーペプチドは1個のプロリンを含んでなる。

## 【0236】

本発明はまた、キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチド若しくはそのフラグメントも包含し、該キメラリボソームサブユニット成分は、リボソームサブユニット成分、検出体結合ドメイン、およびリボソームサブユニット成分と検出体結合ドメインの間の約1から約3個までのプロリンを含んでなる可変リンクマー領域を含んでなる。好ましくは、リボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチ

10

20

30

40

50

ドは原核生物リボソーム由来である。より好ましくは、リボソームサブユニット成分は原核生物リボソームの 50 s サブユニットの 1 成分である。好ましくは、リボソームサブユニット成分は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのフラグメントに最低約 50 % 同一である。好ましくは、リボソームサブユニット成分は、配列番号 7 若しくはその何らかのフラグメントに約 55 % 同一、より好ましくは約 60 % 同一、より好ましくは約 65 % 同一である。なおより好ましくは、リボソームサブユニット成分は、配列番号 7 若しくはその何らかのフラグメントに約 70 % 同一、より好ましくは約 75 % 同一、より好ましくは約 80 % 同一である。より好ましくは、リボソームサブユニット成分は、配列番号 7 若しくはその何らかのフラグメントに約 85 % 同一、より好ましくは約 90 % 同一、より好ましくは約 95 % 同一である。なおより好ましくは、i リボソームサブユニット成分は、配列番号 7 若しくはその何らかのフラグメントに約 96 % 同一、より好ましくは約 97 % 同一、より好ましくは約 98 % 同一、およびなおより好ましくは約 99 % 同一である。最も好ましくは、リボソームサブユニット成分は、配列番号 7、すなわち原核生物リボソームの 50 s サブユニットの L1 成分のアミノ酸配列である。

10

## 【0237】

キメラリボソームサブユニット成分を含んでなる単離されたポリペプチドは、検出体結合ドメインをさらに含んでなる。好ましくは、検出体結合ドメインは、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのフラグメントに最低約 50 % 同一である。好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号 4 若しくはその何らかのフラグメントに約 55 % 同一、より好ましくは約 60 % 同一、より好ましくは約 65 % 同一である。なおより好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号 4 若しくはその何らかのフラグメントに約 70 % 同一、より好ましくは約 75 % 同一、より好ましくは約 80 % 同一である。より好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号 4 若しくはその何らかのフラグメントに約 85 % 同一、より好ましくは約 90 % 同一、より好ましくは約 95 % 同一である。なおより好ましくは、検出体結合ドメインポリペプチドは、配列番号 4 若しくはその何らかのフラグメントに約 96 % 同一、より好ましくは約 97 % 同一、より好ましくは約 98 % 同一、およびなおより好ましくは約 99 % 同一である。最も好ましくは、検出体結合ドメインを含んでなるキメラリボソームサブユニット成分ポリペプチドの該部分は、配列番号 4、すなわち - P A K を結合するラット - P I X S H 3 ドメインのアミノ酸配列である。

20

## 【0238】

本発明のキメラリボソームはキメラリボソームサブユニット成分を含んでなる。キメラリボソームサブユニット成分は、検出体結合ドメインに直接融合されたリボソームサブユニット成分を含み得るか、若しくは、あるいは、キメラリボソームサブユニット成分は、リボソームと検出体結合ドメインポリペプチドの間にスペーサーペプチドを含み得る。スペーサーペプチドは 1 個若しくはそれ以上のアミノ酸を含み得る。好ましくは、スペーサーペプチドは、約 1 と約 10 アミノ酸の間、好ましくは約 2 から約 9 アミノ酸まで、なおより好ましくは約 3 から約 8 アミノ酸まで、なおより好ましくは約 4 から約 7 アミノ酸まで、なおより好ましくは約 5 から約 6 アミノ酸までを含んでなる。最も好ましくは、スペーサーペプチドは約 1 ないし約 3 アミノ酸を含んでなる。好ましくは、スペーサーペプチドは 1 個のプロリンを含んでなる。

30

## 【0239】

本発明は、核酸を転写するキメラ酵素を含んでなる単離されたポリペプチド若しくはそのフラグメントを包含し、該キメラ酵素は、核酸を転写する酵素、検出体結合ドメイン、および、場合によっては、酵素と検出体結合ドメインポリペプチドの間に約 1 から約 3 個までのプロリンを含んでなる可変スペーサーペプチドを含んでなる。一態様において、核酸を転写する酵素は DNA ポリメラーゼである。

40

## 【0240】

## I I I . 単離されたポリペプチドのコンジュゲート

本発明は、単離されたポリペプチドおよびペプチド以外の分子を含んでなる単離された

50

ポリペプチドのコンジュゲートをさらに包含する。本発明の単離されたポリペプチドのコンジュゲートは検出体分子を包含する。一態様において、検出体分子は、キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインに特異的に結合するCRPB D、ペプチド核酸(PNA)、および相互に共有若しくは別の方で化学的に結合されたシグナリング部分を含んでなる。一態様において、検出体分子は、キメラリボソームの検出体結合ドメインに特異的に結合するCRBD、ペプチド核酸(PNA)、および相互に共有若しくは別の方で化学的に結合されたシグナリング部分を含んでなる。なお別の態様において、検出体分子は、キメラ酵素の検出体結合ドメインに特異的に結合するCED、ペプチド核酸(PNA)、および相互に共有若しくは別の方で化学的に結合されたシグナリング部分を含んでなる。加えて、検出体分子は、また検出体分子の残部に共有若しくは別の方で化学的に結合されうる細胞透過性ペプチドを含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0241】

検出体分子は、本明細書の別の場所に記述されるキメラRNAポリメラーゼのような別のポリペプチド中の検出体結合ドメインに特異的に結合するCRPB D、CRBD若しくはCEDを含んでなる。好ましくは、CRPB D、CRBD若しくはCEDは、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのフラグメントに最低約75%同一である。好ましくは、CRPB D、CRBD若しくはCEDは、配列番号5若しくはその何らかのフラグメントに約80%同一、より好ましくは約85%同一、より好ましくは約90%同一である。なおより好ましくは、CRPB D、CRBD若しくはCEDは、配列番号5若しくはその何らかのフラグメントに約95%同一、より好ましくは約96%同一、より好ましくは約97%同一である。より好ましくは、検出体分子のCRPB D、CRBD若しくはCEDは、配列番号5若しくはその何らかのフラグメントに約98%同一、より好ましくは約99%同一である。最も好ましくは、検出体分子のCRPB D、CRBD若しくはCEDは配列番号5である。当業者は、本開示および本明細書に開示される方法を備える場合に、CRPB D、CRBD若しくはCEDが、配列番号5若しくはそのフラグメントおよび相同なバリエントに制限されないが、しかしむしろいかなるポリペプチド(そのポリペプチドは、キメラRNAポリメラーゼの一部であり得る別のポリペプチドを特異的に結合する)も包含することを容易に認識するとみられる。

## 【0242】

検出体分子は、シグナリング部分のリンカー若しくは結合点としてはたらくための付加的なペプチド配列をさらに含み得る。検出体分子のCRPB D、CRBD若しくはCEDは、キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインに特異的に結合しないがしかしむしろRNAポリメラーゼを特異的に結合する抗体若しくはそのフラグメントの結合点としてはたらくペプチド配列をさらに含み得る。従って、本発明は、抗体若しくはそのフラグメントに結合されたCRPB Dをさらに包含する。

## 【0243】

本発明の結合体分子は、本発明の方法で新生RNA若しくはDNAに結合するペプチド核酸(PNA)をさらに含んでなる。PNAは単量体、二量体、三量体若しくはより高次のポリマーであり得る。好ましくは、検出体分子に結合されたPNAはニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチドを特異的に結合する。PNA単量体は、DNAで見出される4種の塩基(アデニン、グアニン、チミンおよびシトシン)の1種へのメチレンカルボニル結合により連結された2-アミノエチルグリシンである。アミノ酸と同様、PNA単量体はアミノおよびカルボキシル末端を有する。ヌクレオチドと異なり、PNA単量体は五炭糖リシン酸基を欠く。PNAのN末端は相補一本鎖DNAの5'端にハイブリダイズする(Nielsenら、1991、Science 254、1497; Egliら、1992、J. Am. Chem. Soc. 114、1895; Laneyら、1992、Science 258、1481)。

## 【0244】

検出体分子のPNAは、A、T、CおよびGの普遍的塩基を使用するいかななる配列もあり得る。従って、PNAは、AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA

、 C T 、 C C 、 C G 、 G A 、 G T 、 G C 若しくは G G のようなニヌクレオチドを結合し得る。当業者は、上のおよび本明細書の別の場所に開示される例を考えれば、 A 、 T 、 C および G の多様な順列から作成される配列を有する三ヌクレオチドを結合する P N A を容易に製造し得、そして従ってこうした配列はここで再現される必要はない。好ましくは、 P N A は新生 R N A の三ヌクレオチドを結合する。

【 0 2 4 5 】

本発明の検出体分子は、シグナリング部分として集合的に作動する 2 種若しくはそれ以上の分子をさらに含んでなる。シグナリング部分の 1 分子は、 R e A s H 分子、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 分子、 C y 3 B 分子、 C y 5 分子若しくはフルオレセイン分子のような蛍光分子である。第二の分子は、 R e A s H 分子、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 分子、 C y 3 B 分子、 C y 5 分子若しくはフルオレセイン分子のような蛍光分子である。第三のおよび付加的な分子は、 R e A s H 分子、ビス - ( ( N - ヨードアセチル ) ピペラジニル ) スルホンローダミン ( B S R ) 分子、 C y 3 B 分子、 C y 5 分子若しくはフルオレセイン分子であり得る。好ましくは、シグナリング部分は、フルオレセイン分子および B S R 分子、若しくはフルオレセイン分子および C y 3 B 分子のような 2 種の蛍光分子を含んでなる。従って、本開示により示されるとおり、本発明の検出体分子は、本明細書の別の場所に開示されかつ当該技術分野で既知の方法の 1 つにより検出可能な蛍光若しくは極性シグナルを生成することが可能である分子のいかなる組み合わせも含み得る。加えて、本発明は、検出可能な蛍光若しくは極性分子を増幅することが可能である付加的な蛍光若しくは極性生成分子で補足される検出可能な蛍光若しくは極性シグナルを生成する 2 種若しくはそれ以上の分子の使用を含み得る。

10

20

30

40

【 0 2 4 6 】

シグナリング部分は、 1 個の蛍光分子が検出体分子の C R P B D 若しくは検出体分子の C R P B D に結合されたポリペプチドに結合されるような検出体分子に共有若しくは別 の方法で化学的に結合される。第二の蛍光分子は、 P N A および 1 個若しくはそれ以上のアミノ酸がシグナリング部分を含んでなる第一および第二の蛍光分子の間にあるような P N A により検出体分子の残部から分離されたアミノ酸上で、検出体分子に共有若しくは別 の方法で化学的に結合される。

【 0 2 4 7 】

検出体分子は、検出体分子に共有若しくは別 の方法で化学的に結合された細胞透過性ペプチドをさらに含み得る。好ましくは、細胞透過性ペプチドは 2 個のシステイン間のジスルフィド結合を介して検出体分子に結合される。細胞透過性ペプチドは、限定されるものでないが、トランスポータンペプチド ( T P ) 、 T P 1 0 ペプチド、 p V E C ペプチド、ペネトラチンペプチド、 t a t フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチド、両親媒性モデルペプチドなどを挙げることができる、当該技術分野で既知のいかなる細胞透過性ペプチドもあり得る。細胞透過性ペプチドの配列は当該技術分野で公知であり、そして本明細書の別の場所に開示される。一例として、細胞透過性ペプチド T P 、 T P 1 0 および p V E C の配列は、例えば、 E i r i k s d o t t i r l a ( 2 0 0 4 、 D r u g D e s i g n R e v i e w s 、 1 : 1 6 1 - 1 7 3 ) および表 1 に開示される。

【 0 2 4 8 】

## 【表1】

表1. 細胞浸透ペプチド

細胞浸透ペプチド	配列番号	アミノ酸配列
トランスポータン(TP)	26	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
TP10	27	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
pVEC	28	LLIILRRRIRKQAHHSK
ペネトラチン	29	RQIKIWFQNRRRMKWKK
Tat フラグメント(48-60)	30	GRKKRRQRRRPPQC
シングル配列をベースとするペプチド	31	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
両親媒性モデルペプチド	32	KLALKLALKALKALKALA

10

## 【0249】

検出体分子は、細胞上に存在する細胞受容体を結合するリガンドのような細胞内到達性ドメインもまた含み得る。こうした細胞内到達性ドメインは、限定されるものでないが、細胞上の葉酸受容体を結合する検出体分子に結合された葉酸などを挙げることができる。

20

## 【0250】

本発明の検出体分子およびキメラRNAポリメラーゼは核局在化シグナル(NLS)をさらに含み得る。NLSは当該技術分野で公知であり、そして例えばNairら(2003、Nucleic Acid Research 31:397-399)に記述される。SV40ラージT抗原由来のNLSの一例はPKKKRKV(配列番号33)である。

20

## 【0251】

本発明は、RNAポリメラーゼ若しくはキメラRNAポリメラーゼ、およびRNAポリメラーゼ若しくはキメラRNAポリメラーゼに結合された検出体分子を含んでなるヌクレオペプチドコンジュゲート複合体をさらに含んでなる。検出体分子および組換え分子は、検出体分子のCRPB-DおよびキメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインにより結合される。検出体分子のCRPB-Dは、本明細書の別の場所に記述される特異的タンパク質-タンパク質親和性を介して、キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインに特異的に結合する。こうした特異的タンパク質-タンパク質結合は、本明細書の別の場所に開示される本発明の方法で有用である、キメラRNAポリメラーゼおよび検出体分子を含んでなるヌクレオペプチドコンジュゲート複合体を形成する。

30

## 【0252】

あるいは、検出体分子は、該検出体分子に共有結合されている抗体若しくはそのフラグメントを介してRNAポリメラーゼに結合される。好ましくは、該抗体は検出体分子に結合され、そして、本発明の方法に有用である様式で該検出体分子がRNAポリメラーゼに結合されるようなRNAポリメラーゼを特異的に結合する。

40

## 【0253】

本発明のヌクレオペプチドコンジュゲート複合体は、キメラRNAポリメラーゼ、ならびに検出体結合ドメイン、CRPB-D、蛍光分子を含んでなるシグナル伝達分子、PNAおよび細胞透過性ペプチドを包含する検出体分子の多様な成分を含んでなる。検出体分子は、キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインを選択的に結合する検出体分子のCRPB-DによりキメラRNAポリメラーゼに特異的に結合する。

## 【0254】

本発明はまた、本明細書に開示されるところのキメラRNAポリメラーゼ若しくは検出体分子を含んでなるタンパク質若しくはペプチドのアナログも提供する。アナログは、保

50

存的アミノ酸配列の差違、若しくは配列に影響を及ぼさない修飾、または双方により、天然に存在するタンパク質若しくはペプチドと異なりうる。例えば、それらが該タンパク質若しくはペプチドの一次配列を変えるとは言えその機能を通常は変えない保存的アミノ酸変化を作成しうる。保存的アミノ酸置換は、典型的に、以下の群、すなわち  
グリシン、アラニン；  
バリン、イソロイシン、ロイシン；  
アスパラギン酸、グルタミン酸；  
アスパラギン、グルタミン；  
セリン、トレオニン；  
リシン、アルギニン；  
フェニルアラニン、チロシン  
内の置換を包含する。

10

20

30

40

## 【0255】

修飾（通常は一次配列を変えない）は、ポリペプチドの *in vivo* 若しくは *in vitro* の化学的誘導体化、例えばアセチル化若しくはカルボキシル化を包含する。グリコシル化の改変、例えば、その合成およびプロセシングの間若しくはさらなるプロセシング段階でのポリペプチドのグリコシル化パターンを変えることにより；例えば、グリコシル化に影響を及ぼす酵素、例えば哺乳動物のグリコシル化若しくは脱グリコシル化酵素にポリペプチドを曝露することにより作成されるものもまた包含される。リン酸化されたアミノ酸残基、例えばホスホチロシン、ホスホセリン若しくはホスホトレオニンを有する配列もまた包含される。

## 【0256】

タンパク質分解性の分解に対するそれらの耐性を改良する、若しくは溶解性の特性を至適化する、またはそれらを治療薬としてより適するようにするように、通常の分子生物学技術を使用して改変されたポリペプチドもまた包含される。こうしたポリペプチドのアナログは、天然に存在するL-アミノ酸以外の残基、例えばD-アミノ酸若しくは天然に存在しない合成アミノ酸を含有するものを包含する。本発明のペプチドは、本明細書に列挙される特定の例示的方法のいずれかの産物に制限されない。

## 【0257】

本発明は、本発明のペプチド（若しくはそれをコードするDNA）の「誘導体」および「バリエント」を包含するともまた解釈されるべきであり、その誘導体およびバリエントは、生じるペプチド（若しくはDNA）が本明細書に列挙される配列に同一でないがしかし該ペプチドが本発明のキメラRNAポリメラーゼ若しくは検出体分子の生物学的/生化学的特性を有するために本明細書に開示されるペプチドと同一の生物学的特性を有するような1個若しくはそれ以上のアミノ酸で変えられている（または、それをコードするヌクレオチド配列を指す場合は、1個若しくはそれ以上の塩基対で変えられている）キメラRNAポリメラーゼ若しくは検出体分子である。こうした特性、生物学的/生化学的特性は、限定されるものでないが、検出体分子ドメインへのCRPBDの結合、シグナリング部分、標的相互作用ドメイン、およびNLSのような細胞内ターゲッティングドメインを挙げることができる。

## 【0258】

本明細書で使用されるところのアミノ酸は、以下の表に示されるところのそれらの完全な名称、それらに対応する三文字記号、若しくはそれらに対応する一文字記号により表される。

## 【0259】

【表2】

完全な名称	三文字記号	一文字記号	
アスパラギン酸	Asp	D	
グルタミン酸	Glu	E	
リシン	Lys	K	
アルギニン	Arg	R	
ヒスチジン	His	H	
チロシン	Tyr	Y	10
システイン	Cys	C	
アスパラギン	Asn	N	
グルタミン	Gln	Q	
セリン	Ser	S	
トレオニン	Thr	T	
グリシン	Gly	G	
アラニン	Ala	A	20
バリン	Val	V	
ロイシン	Leu	L	
イソロイシン	Ile	I	
メチオニン	Met	M	
プロリン	Pro	P	
フェニルアラニン	Phe	F	
トリプトファン	Trp	W	

30

## 【0260】

本発明のペプチドは、Stewartら (Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、1984、Pierce Chemical Company、イリノイ州ロックフォード) により記述されるところの、および Bodanszky と Bodanszky (The Practice of Peptide Synthesis、1984、Springer-Verlag、ニューヨーク) により記述されるところの、標準的な、十分に確立された固相ペプチド合成 (SPPS) により容易に製造しうる。最初に、適して保護したアミノ酸残基を、架橋ポリスチレン若しくはポリアミド樹脂のような誘導体化した不溶性ポリマー支持体にそのカルボキシル基により結合する。「適して保護した」は、アミノ酸の -アミノ基およびいずれかの側鎖官能基双方での保護基の存在を指す。側鎖保護基は、一般に、合成を通じて使用される溶媒、試薬および反応条件に対し安定であり、そして最終ペプチド生成物に影響を及ぼさないことができる条件下で除去可能である。オリゴペプチドの段階的合成は、最初のアミノ酸からのN-保護基の除去、および所望のペプチドの配列中の次のアミノ酸のカルボキシル端のそれへの結合により実施する。このアミノ酸もまた適して保護されている。カルボジイミド、対称酸無水物、またはヒドロキシベンゾトリアゾール若しくはペンタフルオロフェニルエステルのような「活性エステル」基への形成のような反応性基への形成により、支持体に結合したアミノ酸のN末端と反応するように、入ってくるアミノ酸のカルボキシルを活性化し得る。

40

## 【0261】

50

固相ペプチド合成法の例は、*N*-アミノ保護基としてtert-ブチルオキシカルボニルを利用するt-Boc法、およびアミノ酸残基の*N*-アミノを保護するために9-フルオレニルメチルオクスカルボニルを利用するFmoc法を包含し、それらの双方の方法は当業者により公知である。

#### 【0262】

*N*および*C*保護基の組み込みは、固相ペプチド合成法に慣習的なプロトコルを使用してもまた達成し得る。例えば、*C*末端保護基の組み込みのため、所望のペプチドの合成は、典型的に、樹脂からの切断が所望の*C*末端保護基を有するペプチドをもたらすように化学修飾されている支持樹脂を固相として使用して実施する。例えば、*C*末端が一级アミノ保護基を担持するペプチドを提供するために、ペプチド合成が完了する場合にフッ化水素酸での処理が所望の*C*末端アミド化されたペプチドを遊離するように、*p*-メチルベンズヒドリルアミン(MBHA)樹脂を使用して合成を実施する。同様に、*C*末端での*N*-メチルアミン保護基の組み込みは、HF(フッ化水素酸)処理に際して*N*-メチルアミド化された*C*末端を担持するペプチドを遊離する*N*-メチルアミノエチル誘導体化DVB樹脂を使用して達成される。エステル化による*C*末端の封鎖もまた慣習的手順を使用して達成し得る。これは、エステル官能基を形成するための所望のアルコールとのその後の反応を見込むための、樹脂からの側鎖ペプチドの遊離を可能にする樹脂/保護基の組合せの使用を必要とする。メトキシアルコキシベンジルアルコール若しくは同等なリンカーベンジルアルコールと組み合わせのFmoc保護基をこの目的上使用し得、支持体からの切断はジクロロメタン中TFAにより遂げられる。例えばDCCを用いて適して活性化したカルボキシル官能基のエステル化をその後、所望のアルコールの添加により進行させ得、次いで脱保護し、そしてエステル化されたペプチド生成物を単離する。

10

20

30

40

#### 【0263】

*N*末端保護基の組み込みは、合成されたペプチドが樹脂になお結合されている間に、例えば適する無水物およびニトリルでの処理により達成し得る。例えばアセチル保護基を*N*末端に組み込むため、樹脂に結合したペプチドをアセトニトリル中20%無水酢酸で処理し得る。*N*保護したペプチド生成物をその後樹脂から切断し、脱保護しあつその後単離し得る。

#### 【0264】

化学的若しくは生物学的いずれかの合成技術から得られるペプチドが所望のペプチドであることを確認するために、ペプチド組成の分析を実施すべきである。こうしたアミノ酸組成分析は、ペプチドの分子量を決定するための高分解能質量分析を使用して実施しうる。あるいは、若しくは付加的に、ペプチドのアミノ酸含量を、水性酸中でペプチドを加水分解すること、ならびに、HPLC若しくはアミノ酸分析機を使用して混合物の成分を分離、同定かつ定量することにより確認し得る。ペプチドを連続して分解しあつアミノ酸を順番に同定するペプチドシーケンサーもまた、ペプチドの配列を明確に決定するのに使用しうる。

#### 【0265】

その使用前に、ペプチドを精製して汚染物質を除去する。この点に関して、ペプチドを適切な規制当局により設定される基準に合致するように、若しくは特定の用途のために精製することができることが認識されるであろう。例えば、C<sub>4</sub>-、C<sub>8</sub>-若しくはC<sub>18</sub>-シリカのようなアルキル化シリカカラムを使用する逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を包含する、多数の慣習的精製手順のいずれか1つを使用して、必要とされるレベルの純度を達成しうる。増大する有機含量の勾配移動相、例えば、通常は少量のトリフルオロ酢酸を含有する水性緩衝液中のアセトニトリルを使用して精製を達成する。イオン交換クロマトグラフィーもまた、それらの電荷に基づきペプチドを分離するのに使用し得る。

#### 【0266】

本発明のポリペプチドおよびペプチドは、例えば天然の化学的連結(native chemical ligation)(NCL)を使用してもまた製造し得る。NCLは

50

水性溶液中の未保護ペプチドの非酵素的カップリングである。NCLは、連結の部位で天然のペプチド結合を生じるために、C末端チオエステルとN末端システイン残基の間での化学選択的反応を必要とする。図10に図解で描かれるとおり、第一段階は、最初の共有生成物としてチオエステルに連結した中間体を生じるための未保護合成ペプチドチオエステルのN末端システイン(Cys)残基を含有する別の未保護ペプチドセグメントとの化学選択的反応である。この中間体が自発的な迅速な分子内反応を受けて、連結部位に天然のペプチド結合を形成する。該反応速度は、チオフェノールを添加物として使用する場合にもまた増大させ得る。

## 【0267】

## IV. ベクター

10

他の関係する局面において、本発明は、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸が、好ましくは該核酸によりコードされるタンパク質の発現を指図することが可能であるようなプロモーター/制御配列を含んでなる核酸に作動可能に連結されている、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を包含する。従って、本発明は、例えばSambrookら(2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)に記述されるもののような、発現ベクター、および細胞中での外因性DNAの付随する発現を伴う細胞中への外因性DNAの導入方法を包含する。

20

## 【0268】

細胞中での単独での若しくは検出可能な標識ポリペプチドに融合されたのいずれかのキラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の発現は、ベクターが導入される細胞中で標識を伴う若しくは伴わないタンパク質の発現を駆動するようはたらくプロモーター/制御配列に作動可能に連結された所望の核酸を含んでなるプラスミド、ウイルス、若しくは他の型のベクターを生成することにより達成し得る。遺伝子の構成的発現を駆動するのに有用な多くのプロモーター/制御配列が当該技術分野で利用可能であり、そして、限定されるものでないが、例えば、サイトメガロウイルス前初期プロモーター/エンハンサー配列、SV40初期プロモーター、ならびにラウス肉腫ウイルスプロモーターなどを挙げることができる。さらに、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸の誘導可能なおよび組織特異的発現は、標識を伴う若しくは伴わないキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸を、誘導可能な若しくは組織特異的プロモーター/制御配列の制御下に置くことにより達成しうる。この目的上有用である組織特異的若しくは誘導可能なプロモーター/制御配列の例は、限定されるものでないが、MMTV-LTRの誘導可能なプロモーターおよびSV40後期エンハンサー/プロモーターを挙げることができる。加えて、金属、グルココルチコイド、ホルモンなどの誘導剤に応答して誘導される、当該技術分野で公知であるプロモーターもまた本発明で企図している。従って、本発明は、既知若しくは未知のいずれかでありかつそれに作動可能に連結された所望のタンパク質の発現を駆動することが可能であるいかなるプロモーター/制御配列の使用も包含することが認識されるであろう。

30

## 【0269】

ベクターを使用してキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を発現することは、大量の組換え産生されるタンパク質の単離を可能にする。さらに、プロモーター/制御配列により駆動されるキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の発現は、多様な細胞および組織型でのキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の発現を可能にし得る。従って、本発明は、本発明の方法での使用のためのキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の製造方法を包含するのみならず、しかしまだ、真核生物細胞、原核生

40

50

物細胞、真核生物からの組織サンプルなどを包含する当該技術分野で既知のいずれの細胞若しくは組織型でのキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の発現方法も包含する。

【0270】

いずれかの特定のプラスミドベクター若しくは他のDNAベクターの選択は本発明で制限因子でなく、そして多様なベクターが当該技術分野で公知である。さらに、特定のプロモーター／制御配列を選びかつ所望のポリペプチドをコードするDNA配列にそれらのプロモーター／制御配列を作動可能に連結することは、十分に当業者の熟練内にある。こうした技術は当該技術分野で公知であり、そして例えばSambrookら(2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)に記述されている。

10

【0271】

本発明は、従って、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を含んでなるベクターを包含する。ベクターへの所望の核酸の組み込みおよびベクターの選択は、例えばSambrookら(2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)に記述されるとおり、当該技術分野で公知である。

20

【0272】

本発明はこうしたベクターを含有する細胞、ウイルス、プロウイルスなどもまた包含する。ベクターおよび／若しくは外因性核酸を含んでなる細胞の製造方法は当該技術分野で公知である。例えば、Sambrookら(2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)中を参照されたい。

30

【0273】

キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸は多様なプラスミドベクターにクローン化しうる。しかしながら、本発明はプラスミド若しくはいずれかの特定のベクターに制限されると解釈されるべきでない。代わりに、本発明は、容易に利用可能でありかつ／若しくは当該技術分野で公知である多量のベクターを包含すると解釈されるべきである。

【0274】

V. 組換え細胞

本発明は、とりわけ、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸、RNAポリメラーゼを特異的に結合する抗体をコードする核酸などを含んでなる組換え細胞を包含する。一局面において、組換え細胞は、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸の一部分をコードするプラスミドで一過性にトランスフェクトし得る。該核酸は細胞ゲノムに組込まれる必要はなく、それは細胞中で発現される必要もない。さらに、該細胞は原核生物若しくは真核生物細胞であることができ、そして、本発明は、いずれかの特定の細胞株若しくは細胞型に制限されると解釈されるべきでない。こうした細胞は、限定されるものでないが、ニューロン、幹細胞、線維芽細胞、星状細胞、リンパ球、上皮細胞、植物細胞、細菌細胞などを挙げることができる。

40

【0275】

50

さらに、導入遺伝子を含んでなる、すなわち組換え細胞の目的は、単離されたキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の生成に制限されると解釈されるべきでないことに注目することが重要である。むしろ、本発明は、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を含んでなる原核生物細胞若しくは真核生物細胞を制限なしに包含する、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸が導入されるいかなる細胞型も包含すると解釈されるべきである。

## 【 0 2 7 6 】

本発明は、本発明の導入遺伝子が該細胞中で以前に存在もしくは発現されなかつたか、または該導入遺伝子が導入される前と異なるレベル若しくは環境で今やそれが発現される、その中に本発明の導入遺伝子を導入し、そして該所望の遺伝子によりコードされるタンパク質がそれから発現される場合に利益が得られる、真核生物細胞を包含する。こうした利益は、所望の遺伝子の発現を使用して、細胞中若しくは該細胞が存する哺乳動物中で別の遺伝子の *in vitro* 発現を研究し得る系、導入された遺伝子を含んでなる細胞を研究ツールとして使用し得る系、および生物体若しくは細胞中での選択された生物学的(とりわけ核酸の転写および翻訳)のための新たな研究ツールの開発に有用である哺乳動物モデルが生成される系が提供されたという事実を包含しうる。

10

## 【 0 2 7 7 】

キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を発現する細胞を使用して、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の発現が核酸の転写若しくは翻訳の検出のためのキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の産生をもたらす細胞、組織若しくは全動物にキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を提供し得る。キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を発現する細胞を、配列決定反応および本明細書の別の場所に記述される他の方法での使用のためのキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を製造するのにさらに使用し得る。従って、本発明は、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の製造のため、ならびに限定されるものでないが核酸の転写および翻訳を挙げることができる生物学的および生化学的現象の検出のための、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を発現する細胞を包含する。

20

## 【 0 2 7 8 】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明の「ノックイン」若しくは「ノックアウト」ベクターが、それぞれ置換若しくは欠失されるべきである核酸の 2 部分に相同な最低 2 種の配列を含んでなることを認識するとみられる。該 2 配列は、該遺伝子に隣接する配列と相同であり；すなわち、一方の配列は、RNA ポリメラーゼをコードする核酸のコーディング配列の 5' 部分若しくはその近くの領域と相同であり、そして、他方の配列は第一のものからさらに下流である。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明がいずれかの特定の隣接核酸配列に制限されないと認識するとみられる。代わりに、ターゲッティングベクターは、それぞれ、哺乳動物ゲノムから例えば RNA ポリメラーゼの若干若しくは全部を除去する(すなわち「ノックアウト」ベクター)か、あるいはそれ中にキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分をコードする核酸またはそのフラグメントをコードする核酸を挿入する(すなわち「ノックイン」ベクター) 2 種の配列を含みうる。ターゲッティングベクターの重要な特徴は、それが、RNA ポリメラーゼをコードする核酸の全部若しくは一部分が哺乳動物染色体上の 1 位置から欠失されているような相同的組換えによる欠失 /挿入が発生することを可能にするように、「ノックアウト」ベクターの場合には RNA ポリメラーゼのオープンリーディングフレーム(ORF)の相対するすなわち 5' および 3' 端に向かって配置された 2 種の配列の十分な部分を含んでなることである。

30

40

## 【 0 2 7 9 】

50

導入遺伝子ならびにノックインおよびノックアウトターゲッティングベクターの設計は当該技術分野で公知であり、そして Sambrookら (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク) および Ausubelら (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨーク) などのような標準的論文に記述されている。ターゲッティングベクター中で使用されるべき RNA ポリメラーゼのコーディング領域に隣接する上流および下流部分またはそれ内の部分は、既知の方法に基づき、ならびに、 RNA ポリメラーゼおよびキメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の核酸およびアミノ酸配列を包含する本明細書に開示される教示に従って、容易に選択しうる。これらの配列を備えれば、当業者は、本発明の導入遺伝子およびノックアウトベクターを構築することが可能であるとみられる。

10

## 【0280】

培養物、初代細胞培養物若しくはスライス培養物中で哺乳動物細胞を維持するのに有用な方法および組成物は当該技術分野で公知であり、該哺乳動物細胞は、限定されるものでないがマウス、ラット、ヒトおよび他の哺乳動物から得られる細胞を挙げることができる哺乳動物、ならびにゼブラフィッシュ、*C. elegans* ( *C. elegans* )、アフリカツメガエルなどのような哺乳動物以外の真核生物から得られる。

20

## 【0281】

## V I . 抗体

本発明はさらに、本発明の RNA ポリメラーゼ、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分を特異的に結合する抗体、そのタンパク質核酸コンジュゲート若しくはフラグメントを包含する。

## 【0282】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、 RNA ポリメラーゼ、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、タンパク質核酸コンジュゲートまたはそれらのフラグメントを特異的に結合する抗体が、とりわけ、細胞、組織若しくは器官中のこうした分子の検出に有用であることを理解するとみられる。さらに、 RNA ポリメラーゼに特異的に結合する抗体を、検出体分子が複合された抗体を介して RNA ポリメラーゼに特異的に結合し得るような検出体分子に複合若しくは別の方法で結合し得る。

30

## 【0283】

ポリクローナル抗体の生成は、例えば Harlowら (1988, Antibodies, A Laboratory Manual, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー中) に記述されるもののような標準的抗体製造方法を使用して、抗原を所望の動物に接種すること、および該抗原を特異的に結合する抗体をそれから単離することにより達成する。こうした技術は、マルトース結合タンパク質若しくはグルタチオン (GSH) 標識ポリペプチド部分、および / または、 RNA ポリメラーゼ、検出体分子、キメラリボソームサブユニット成分若しくはキメラ RNA ポリメラーゼ部分が免疫原性にされるような部分のような別のタンパク質の一部分を含んでなるキメラタンパク質 ( 例えば、キーホール林ペットヘモシアニン (KLH) と複合した RNA ポリメラーゼ ) で動物を免疫することを包含する。キメラタンパク質は、例えば検出体分子、キメラリボソームサブユニット成分若しくはキメラ RNA ポリメラーゼをコードする適切な核酸 ( 例えば配列番号 1 および配列番号 2 ) を、限定されるものでないが pMAL-2 若しくは pCMX を挙げができるこの目的上適するプラスミドベクターにクローン化することにより製造する。あるいは、 RNA ポリメラーゼ II に対する抗体は、例えば Abcam, Inc. ( マサチューセッツ州ケンブリッジ ) から商業的に入手可能である。

40

## 【0284】

しかしながら、本発明は、キメラ RNA ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、 RNA ポリメラーゼまたは検出体分子を結合するポリクローナル抗体にのみ制限されると解釈されるべきでない。むしろ、本発明は、キメラ RNA ポリメラーゼ若し

50

くはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子、あるいはそれらの部分に対する、その用語が本明細書の別の場所で定義されるところの他の抗体を包含すると解釈されるべきである。さらに、本発明は、とりわけキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子に結合し、かつ、ウエスタンプロット上、細胞中および組織の免疫組織化学染色中に存在する場合にこれらの分子を結合して、それにより組織中で、およびキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分の少なくとも一部分をコードする核酸で一過性に若しくは安定にトランスフェクトした細胞の免疫蛍光顕微鏡検査で、ならびにキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分と接触される細胞若しくは組織にこうした分子を位置推定することが可能である抗体を包含すると解釈されるべきである。

10

## 【0285】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、該抗体が該タンパク質のいずれかの部分と特異的に結合し得、そして完全長のタンパク質を使用してそれに特異的な抗体を生成し得ることを認識するとみられる。しかしながら、本発明は免疫原として完全長のタンパク質を使用することに制限されない。むしろ、本発明は、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子と特異的に結合する抗体を製造するために該タンパク質の免疫原性部分を使用することを包含する。すなわち、本発明は、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子の免疫原性の部分すなわち抗原決定子、例えばリンカー領域を含んでなるエピトープ、検出体結合ドメイン、若しくは該分子上のいずれかの他の抗原部位を使用して動物を免疫することを包含する。

20

## 【0286】

抗体は、限定されるものでないがウサギ若しくはマウスを挙げることができる動物を、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子あるいはそれらの一部分で免疫することにより、あるいは、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子の少なくとも一部分を含んでなるタンパク質、あるいは、適切なキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子のアミノ酸残基を含んでなる一部分と共有結合された例えばマルトース結合タンパク質標識ポリペプチド部分を含んでなる標識ポリペプチド部分を包含する融合タンパク質を使用して動物を免疫することにより製造し得る。当業者は、これらのタンパク質のより小さいフラグメントを、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子を特異的に結合する抗体を製造するのにもまた使用し得る。

30

## 【0287】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、単離されたキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子の多様な部分を、リンカー領域、検出体結合ドメイン若しくは該分子上のいずれかの他の抗原部位を含んでなるエピトープ、またはこれらの分子の1種の別の場所に存在するエピトープに対する抗体を生成するのに使用し得ることを認識するとみられる。キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子の配列を一旦備えれば、当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、当該技術分野で公知の若しくは開発されるべき方法を使用して、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子ポリペプチドの多様な部分に特異的な抗体を得る方法を理解するとみられる。

40

## 【0288】

従って、当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明がキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子を特異的に結合する抗体を包含することを認識するとみられる。

50

## 【0289】

本発明は、本明細書に開示される抗体、若しくは本発明のタンパク質のいずれかの特定の免疫原性部分にのみ制限されると解釈されるべきでない。むしろ、本発明は、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子あるいはそれらの部分、あるいは、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子と何らかの相同意を共有するタンパク質に対する、その用語が本明細書の別の場所で定義されるところの他の抗体を包含すると解釈されるべきである。

## 【0290】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、こうした抗体を、細胞中の関連するタンパク質の位置を推定しかつ多様な生化学的および生物学的過程でそれにより認識されるポリペプチドの役割（1種若しくは複数）を研究するのに使用し得ることを認識するとみられる。さらに、該抗体を、限定されるものでないがウエスタンプロットティングおよび酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）を挙げることができる公知の方法を使用して、生物学的サンプル中に存在するタンパク質を検出かつ／若しくはその量を測定するのに使用し得る。さらに、該抗体は、当該技術分野で公知の方法を使用してそれらの同族の抗原を免疫沈降しかつ／若しくは免疫親和性精製するのに使用し得る。加えて、該抗体は、本明細書の別の場所に開示される本発明の方法を実施するために、検出体分子がキメラRNAポリメラーゼ、キメラリボソームサブユニット成分若しくはRNAポリメラーゼに特異的に結合するように、検出体分子に複合若しくは別のある方法で結合し得る。

10

20

## 【0291】

本発明は、ポリクローナル、モノクローナル、合成の抗体などを包含する。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明の抗体の重要な特徴が、該抗体がキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子と特異的に結合することであることを理解するとみられる。すなわち、本発明の抗体は、ウエスタンプロット上、細胞の免疫染色中のキメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子、あるいはそれらのフラグメント（例えばそれらの免疫原性部分すなわち抗原決定子）を認識し、そして当該技術分野で公知の標準的方法を使用して、キメラRNAポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、RNAポリメラーゼまたは検出体分子を免疫沈降する。

30

## 【0292】

完全長のタンパク質若しくはペプチドまたはそれらのペプチドフラグメントに向けられるモノクローナル抗体は、例えばHarlowら（1988、Antibodies, A Laboratory Manual、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー中）およびTuszynskiら（1988、Blood、72：109-115）に記述されるもののようにいずれかの公知のモノクローナル抗体製造手順を使用して製造しうる。所望のペプチドの量は化学合成技術を使用してもまた合成しうる。あるいは、所望のペプチドをコードするDNAをクローン化しかつ大量のペプチドの生成に適する細胞中で適切なプロモーター配列から発現させうる。該ペプチドに向けられるモノクローナル抗体は、本明細書で参照されるところの標準的手順を使用して該ペプチドで免疫したマウスから生成する。

40

## 【0293】

本明細書に記述される手順を使用して得られるモノクローナル抗体をコードする核酸を、当該技術分野で利用可能でありかつ例えばWrightら（1992、Critical Rev. Immunol. 12：125-168）およびその中に引用される参考文献に記述される技術を使用してクローン化かつ配列決定しうる。

## 【0294】

さらに、本発明の抗体は、例えばWrightら（1992、Critical Rev. Immunol. 12：125-168）およびその中に引用される参考文献、なら

50

びに G u ら ( 1 9 9 7 、 *Thrombosis and Hematocyst* 77 : 755 - 759 ) に記述される技術を使用して「ヒト化」しうる。本発明は、キメラ R N A ポリメラーゼ、 R N A ポリメラーゼ若しくは検出体分子のエピトープと特異的に反応性のヒト化抗体の使用もまた包含する。こうした抗体は、キメラ R N A ポリメラーゼ、 R N A ポリメラーゼ若しくは検出体分子またはそれらのフラグメントを特異的に結合することが可能である。本発明のヒト化抗体は、ヒト枠組みを有し、かつ、キメラ R N A ポリメラーゼ、 R N A ポリメラーゼ若しくは検出体分子またはそれらのフラグメントと特異的に反応性の限定されるものでないがマウス抗体を挙げることができる抗体からの 1 個若しくはそれ以上の相補性決定領域 ( C D R ) を有する。

## 【 0 2 9 5 】

10

本発明で使用される抗体をヒト化する場合、該抗体は、 Queen ら ( 米国特許第 6,180,370 号明細書 ) 、 Wright ら ( 1992, *Critical Rev. Immunol.* 12 : 125 - 168 ) およびその中に引用される参考文献、若しくは G u ら ( 1997, *Thrombosis and Hematocyst* 77 ( 4 ) : 755 - 759 ) に記述されるとおり生成しうる。 Queen らに開示される方法は、アクセプターヒト枠組み領域をコードする D N A セグメントに結合された、キメラ R N A ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、 R N A ポリメラーゼまたは検出体分子のような、所望の抗原に結合することが可能なドナー免疫グロブリンからの H および L 鎖相補性決定領域 ( C D R ) をコードする組換え D N A セグメントを発現させることにより產生されるヒト化免疫グロブリンを設計することに部分的に向けられる。一般的に言つて、 Queen の特許の発明は実質的にいかなるヒト化免疫グロブリンの設計にも対する応用性を有する。 Queen は、該 D N A セグメントは、天然に会合する若しくは異種のプロモーター領域を包含する、ヒト化免疫グロブリンコーディング配列に作動可能に連結された発現制御 D N A 配列を典型的に包含することができることを説明する。該発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換若しくはトランスフェクトすることが可能なベクター中の真核生物プロモーター系であり得るか、または、該発現制御配列は、原核生物宿主細胞を形質転換若しくはトランスフェクトすることが可能なベクター中の原核生物プロモーター系であり得る。該ベクターが適切な宿主に一旦組み込まれれば、導入されたヌクレオチド配列の高レベル発現に適する条件下で該宿主を維持し、そして所望のとおり、ヒト化 L 鎖、 H 鎖、 L / H 鎖二量体若しくは無傷の抗体、結合フラグメントまたは他の免疫グロブリンの形態の収集および精製が後に続きうる ( Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, ニューヨーク ( 1979 ) ( 引用することにより本明細書に組込まれる ) ) 。

20

## 【 0 2 9 6 】

30

多様なヒト細胞からのヒト定常領域 ( C D R ) D N A 配列を公知の手順に従つて単離し得る。好ましくは、ヒト定常領域 D N A 配列は、第 WO 87/02671 号明細書 ( 引用することにより本明細書に組込まれる ) に記述されるところの不死化 B 細胞から単離する。本発明の抗体の製造において有用な C D R は、キメラ R N A ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、 R N A ポリメラーゼまたは検出体分子に結合することができるモノクローナル抗体をコードする D N A に同様に由来しうる。こうしたヒト化抗体は、限定されるものでないがマウス、ラット、ウサギ若しくは他の脊椎動物を挙げることができる、抗体を產生することができないいずれかの便宜的哺乳動物供給源で公知の方法を使用して生成しうる。定常領域および枠組み D N A 配列に適する細胞、ならびに抗体を発現かつ分泌する宿主細胞は、多数の供給源、例えば American Type Culture Collection, バージニア州マナサスから得ることができる。

40

## 【 0 2 9 7 】

50

上で論考されたヒト化抗体に加え、天然の抗体配列に対する他の改変は、当業者に公知の多様な組換え D N A 技術を利用して容易に設計かつ製造し得る。さらに、多様な異なるヒト枠組み領域を、キメラ R N A ポリメラーゼ若しくはキメラリボソームサブユニット成分、 R N A ポリメラーゼまたは検出体分子に向けられる抗体をヒト化するための基礎とし

て単独で若しくは組合せで使用しうる。一般に、遺伝子の改変は、部位特異的突然変異誘発 (Gillman と Smith, Gene, 8: 81-97 (1979); Roberts ら, 1987, Nature, 328: 731-734) のような多様な公知の技術を使用して容易に達成しうる。

## 【0298】

あるいは、ファージ抗体ライブラリーを生成しうる。ファージ抗体ライブラリーを生成するために、cDNAライブラリーを、ファージ表面で発現されるべき所望のタンパク質、例えば所望の抗体を発現する細胞、例えばハイブリドーマから単離されるmRNAから最初に得る。該mRNAのcDNAコピーを逆転写酵素を使用して製造する。免疫グロブリンフラグメントを指定するcDNAをPCRにより得、そして、生じるDNAを適するバクテリオファージベクターにクローン化して、免疫グロブリン遺伝子を指定するDNAを含んでなるバクテリオファージDNAライブラリーを生成する。異種DNAを含んでなるバクテリオファージライブラリーの作成手順は当該技術分野で公知であり、そして例えばSambrookら(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク)に記述されている。

10

## 【0299】

その対応する結合タンパク質、例えば該抗体が向けられる抗原への結合に該タンパク質が利用可能であるような様式で、それがその表面に表示されるような、所望の抗体をコードするバクテリオファージを工作しうる。従って、特異的抗体を発現するバクテリオファージを、対応する抗原を発現する細胞の存在下でインキュベートする場合、該バクテリオファージは細胞に結合することができる。抗体を発現しないバクテリオファージは細胞に結合しないことができる。こうしたパニング技術は当該技術分野で公知であり、そして例えばWrightら(992, Critical Rev. Immunol. 12: 125-168)に記述されている。

20

## 【0300】

上述されたもののような方法は、M13バクテリオファージディスプレイを使用するヒト抗体の製造のため開発された(Burtonら, 1994, Adv. Immunol. 57: 191-280)。本質的に、cDNAライブラリーは抗体産生細胞の一集団から得られるmRNAから生成する。該mRNAは再配列された免疫グロブリン遺伝子をコードし、そして従って該cDNAはそれをコードする。増幅されたcDNAをM13発現ベクターにクローン化して、それらの表面にヒトFabフラグメントを発現するファージのライブラリーを創製する。目的の抗体を表示するファージを抗原結合により選択し、そして細菌中で増殖させて可溶性ヒトFab免疫グロブリンを製造する。従って、慣習的モノクローナル抗体合成と対照的に、この手順は、ヒト免疫グロブリンを発現する細胞よりむしろヒト免疫グロブリンをコードするDNAを不死化する。

30

## 【0301】

たった今提示された手順は、抗体分子のFab部分をコードするファージの生成を記述する。しかしながら、本発明は、Fab抗体をコードするファージの生成にのみ制限されると解釈されるべきでない。むしろ、一本鎖抗体(scFv/ファージ抗体ライブラリー)をコードするファージもまた本発明に包含される。Fab分子はIgL鎖全体を含んでなる、すなわちそれらはL鎖の可変および定常双方の領域を含んでなるが、しかし、H鎖の可変領域および第一の定常領域ドメイン(CH1)のみを包含する。一本鎖抗体分子はIgFvフラグメントを含んでなるタンパク質の一本鎖を含んでなる。IgFvフラグメントは抗体のHおよびL鎖の可変領域のみを包含し、その中に定常領域を含有させない。scFvDNAを含んでなるファージライブラリーはMarksら(1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597)に記述される手順に従って生成しうる。所望の抗体の単離のためのそのように生成されたファージのパニングは、FabDNAを含んでなるファージライブラリーについて記述されたものに類似の様式で実施する。

40

## 【0302】

50

本発明は、それらがほぼ全部の可能な特異性を包含するような、HおよびL鎖可変領域を合成しうる合成ファージディスプレイライブラリーを包含するようにもまた解釈されるべきである(Barbas、1995、Nature Medicine 1:837-839; de Kruifら、1995、J. Mol. Biol. 248:97-105)。

### 【0303】

#### VII. 方法

本発明は、多くの転写分析が *in vitro* および *in vivo* アッセイに頼るが、しかしこれらのアッセイは実時間で生存細胞中で発生する広範な転写を包括しないという事実に部分的に基づく。本明細書に開示される方法および組成物は、数分の時間経過にわたる生存細胞中の転写のリアルタイム検出を可能にする。本方法はまた単離された RNA 集団の迅速な発現プロファイリングにも有用である。本明細書の別の場所で開示されるとおり、細胞核中の RNA のリアルタイム産生をモニターすることは、*in vivo* 転写を可視化するための最も直接的な方法である。

10

### 【0304】

RNA ポリメラーゼは、細胞 DNA に結合しつつ該 DNA 鑄型を RNA にコピーする酵素である。機械的には、RNA ポリメラーゼが DNA に結合する場合、該タンパク質は、新たに合成された RNA が RNA ポリメラーゼ - DNA 複合体を出る、タンパク質の N 末端近くの RNA 出口孔を生じるコンホメーション変化を受ける。RNA 出口孔近くに配置される検出体分子が、RNA が複合体を離れる際にそれを検出し得る。転写されている各遺伝子は独特な配列の RNA を生じる。

20

### 【0305】

本明細書に開示される方法および組成物は、新たに合成された RNA がポリメラーゼ - DNA 複合体を出る際にその配列特異的検出を可能にする。本明細書に開示される検出体分子は、RNA が出る際に RNA 上の相補配列への PNA のアニーリングを容易にするための細胞進入および核局在化を可能にする多様な配列を含有するよう工作されている PNA を含んでなるハイブリッドペプチドである。RNA 配列との PNA のアニーリングは、検出体分子中に工作されかつ好ましくは PNA 配列に隣接する最低 2 個の蛍光分子の相互作用により検出される。蛍光分子の相互作用の差違は FRET の変化若しくは蛍光極性の測定により検出可能である。本発明の検出体分子は、キメラ RNA ポリメラーゼの RNA 出口孔に緊密に近接して結合するよう設計される。これを達成するため、キメラ RNA ポリメラーゼの検出体結合ドメインへのその結合を可能にできるターゲッティング配列、例えば CRPB-D が検出体分子中に工作されている。さらに、検出体結合ドメインは、RNA 出口孔を形成するポリメラーゼの領域近くの RNA ポリメラーゼ中に工作されている。生存細胞への検出体分子の添加に際して、検出体分子は細胞膜を横断し、核中に移動し、そして転写されるはずである遺伝子に結合されている RNA ポリメラーゼに結合する。検出体分子のシグナリング部分は、相補 RNA 配列との PNA の相互作用に際して、検出体分子のシグナリング部分、好ましくは蛍光分子の FRET 若しくは蛍光極性の移動により検出可能なシグナルを生成する。キメラ RNA ポリメラーゼに結合した検出体分子の PNA が新生 RNA 中の相補配列に遭遇するたびに、蛍光シグナルの変化(明滅)が起こる。これらの明滅の間の時間は RNA 上のアニーリング配列間の距離と相關する。3 ~ 4 回の明滅の回復(retrieval)に際して、時間の差違を、公的核酸データベースに寄託されたスクレオチド配列とアルゴリズム的に比較する。従って個々の遺伝子の転写が評価される。該遺伝子がゲノム中で不動であり、そして結果としていずれの特定の遺伝子の明滅もゲノム中の限局的な点で起こるため、個々の遺伝子シグナルが検出可能である。これらの明滅は、蛍光および極性の共焦点顕微鏡検査(confocal fluorescence and polarity microscopy)により、ならびに本明細書の別の場所に開示されかつ当該技術分野で既知の他の方法により検出かつ定量し得る。

30

### 【0306】

40

50

本明細書の別の場所に開示されるとおり、検出体分子は C R P B D によりキメラ R N A ポリメラーゼに特異的に結合することができる。C R P B D は、本明細書に記述されるところの T 7 R N A ポリメラーゼのような R N A ポリメラーゼの特定の領域に工作された - P I X の S H 3 ドメインのような R N A ポリメラーゼ中の特定の 1 エピトープでキメラ R N A ポリメラーゼに結合することができる。S H 3 ドメインは、真核生物細胞中の多様なシグナル伝達経路でタンパク質 - タンパク質相互作用を媒介する。S H 3 ドメインはポリプロリンモチーフに結合する。例えば、- P I X の S H 3 ドメインは、- P A K と命名されるタンパク質からの 24 アミノ酸の小さなプロリン豊富な領域（配列番号 16）と相互作用する。検出体分子は、限定されるものでないがフルオレセイン（ドナー）およびテトラメチルローダミン（T A M R A；アクセプター）若しくはそれらのアナログを挙げができる最低 2 個の蛍光部分のシグナル部分、および g t g のような P N A 三量体をさらに含んでなる。蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）若しくは蛍光極性の連合が蛍光分子の間で起こるように蛍光分子が配置される。

10

20

30

40

50

### 【 0 3 0 7 】

検出体分子は、P N A 三量体が出口孔近くに配置されるような様式でキメラ T 7 R N A ポリメラーゼの S H 3 ドメインに結合する。R N A が孔を出る場合に、P N A はそれらの相補塩基と塩基対形成する。この塩基対形成の間に、会合された蛍光分子が離れていき、そして F R E T シグナル、すなわちドナーフルオロフォアのフルオレセインからの増大する蛍光を創製する。R N A 鎖が成長する際に、P N A がそれらの相補物を認識する場合にのみ F R E T の差違が発生する。これはフルオレセインからの増大する蛍光および T A M R A からの減少する蛍光を伴う明滅を引き起こし、それらは本明細書の別の場所に開示される極性および光学的方法論を用いて検出し得る。明滅間の時間距離の差違は、各 m R N A 配列のヌクレオチド配列の特徴に変換し得る。データベースをその後、合成されている R N A の同一性を解明するために検索する。

### 【 0 3 0 8 】

従って、本発明は、D N A の転写および R N A の翻訳を生存細胞若しくは組織中で実時間で検出かつモニターし得るという新規発見に部分的に基づく。本明細書に開示されるとおり、検出体分子を、新生 R N A 分子の配列をモニターしつつ特徴付けするのに使用し得、それをその後、遺伝子発現が起こる速度および条件を決定するのに使用し得る。

### 【 0 3 0 9 】

本発明はまた、キメラ R N A ポリメラーゼおよび検出体分子を使用して、慣習的配列決定反応および技術の使用を伴わずに支持体に結合された核酸分子を迅速に配列決定し得るという新規発見にも部分的に基づく。

### 【 0 3 1 0 】

#### A . R N A 分子の転写の検出方法

本発明は、D N A 分子が細胞、組織若しくは生物体中で R N A 分子に転写される際のその転写の実時間での検出方法を包含する。該方法は、検出体結合ドメインを含んでなるキメラ R N A ポリメラーゼと細胞を接触させることを含んでなる。該方法はさらに、検出体分子の C R P B D を介してキメラ R N A ポリメラーゼの検出体結合ドメインに結合することができる検出体分子と細胞を接触させることを含んでなる。検出体分子は、C R P B D、シグナリング部分、および R N A ポリメラーゼの出口孔を介してキメラ R N A ポリメラーゼから発生する R N A 分子の一部分に相補的な P N A を含んでなる。本方法は、さらに、シグナリング部分中の別の蛍光分子に関する検出体分子上の蛍光分子の転置により生じられるシグナリング部分により生成されるシグナルを検出する段階を含んでなる。蛍光分子の転置は、検出体分子の P N A の新生 R N A 分子の一部分への結合により引き起こされる。新生 R N A の P N A への結合は蛍光分子の転置を引き起こして、検出可能な極性若しくは蛍光エネルギー共鳴転移（F R E T）シグナルをもたらす。該シグナルは、顕微鏡検査、共焦点顕微鏡検査、感光膜への曝露、若しくは蛍光および極性変化を検出し得る装置、例えば P O L A R S T A R O P T I M A 若しくは F L U O R O S T A R ( B M G L a b t e c h、ノースカロライナ州ダラム) の使用を包含する当該技術分野で公知

の方法を使用して検出する。

【0311】

細胞を、細胞を含む溶液中にキメラRNAポリメラーゼを置くことにより、キメラRNAポリメラーゼと接触させる。キメラRNAポリメラーゼは、RNAポリメラーゼ上に存在する内因性のRNAポリメラーゼ核局在化シグナル(NLS)を介して細胞の核に局在化する。核局在化シグナルは当該技術分野で公知であり、そしてポリメラーゼを包含する核タンパク質に組み込まれている。さらに、キメラポリメラーゼ中に工作されたか若しくはキメラポリメラーゼに別 の方法で複合された細胞透過性ペプチドによって、キメラポリメラーゼは細胞膜を横断し得る。あるいは、本発明の別の態様において、電気穿孔法、光穿孔法、コレステロール修飾キメラポリメラーゼ若しくは脂質媒介性移入のような当該技術分野で既知の方法を、キメラポリメラーゼを細胞に導入するのに使用する。

10

【0312】

キメラRNAポリメラーゼは、本明細書の別の場所に開示される方法を使用して、キメラRNAポリメラーゼをコードする単離された核酸を発現するように組換え細胞を誘導することにより、細胞若しくは組織中でさらに発現させ得る。制限しない一例として、ベクターを含んでなる組換え細胞(その中で該ベクターは組換えの単離された核酸をコードする)を、キメラRNAポリメラーゼを発現するように誘導し得る。細胞は、キメラRNAポリメラーゼを一旦発現すれば、その後、本発明の方法を実施するために検出体分子と接触させ得る。

20

【0313】

検出体分子は、キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメインと検出体分子のCRPB Dの間の特異的結合を介してキメラRNAポリメラーゼに結合する。検出体結合ドメインおよびCRPB Dは、相互を特異的に結合するいずれか2種のポリペプチド、好ましくはSH3ドメイン、-PAKドメイン、ロイシンジッパーの成分などであり得る。さらに、本明細書の別の場所に開示されるとおり、検出体結合ドメインおよびCRPB Dは、限定されるものでないがビオチン、アビジンおよびストレプトアビジンを挙げができる、相互を特異的に結合するペプチド以外の分子を含み得る。

【0314】

本明細書の別の場所に開示されるとおり、検出体分子は、RNAポリメラーゼの出口孔から発生するRNA分子の一部分に相補的なPNAを含んでなる。PNAは検出体分子に共有結合されており、そして新生RNAに結合する。好ましくは、PNAは、約1から約10 RNA塩基まで、なおより好ましくは約1から約5 RNA塩基まで、なおより好ましくは約2ないし約3 RNA塩基を結合する。好ましくは、PNAは3 RNA塩基を結合する。

30

【0315】

本明細書に開示される検出体分子は、検出体分子に結合されたシグナリング部分をさらに含んでなる。より具体的には、シグナリング部分の最低1個の蛍光分子が検出体分子のCRPB Dに結合され、また、シグナリング部分の最低1個の第二の蛍光分子が直接若しくは間接的にのいずれかでPNAに結合されている。なおより具体的には、シグナリング部分を含んでなる蛍光分子は、少なくとも該PNAにより相互から分離されている。

40

【0316】

検出体分子は、トランスポータント[transportant(TP)]ペプチド、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tatt フラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチド、両親媒性モデルペプチドなどのような細胞透過性ペプチド(CPP)をさらに含み得る。CPPは、本発明の方法を実施し得るようなキメラRNAポリメラーゼ分子を選択的に結合するために、検出体分子を細胞の内側に向けるのに使用し得る。

【0317】

新生RNAがキメラRNAポリメラーゼの出口孔から発生する場合に、PNAは相補塩基対間の水素結合を介して新生RNAの一部分に結合する。新生RNAのPNAへの結合

50

は、シグナリング部分中の第二の蛍光分子の転置をもたらす。蛍光分子の転置は第一の蛍光分子の位置に関し、検出可能なシグナルの生成をもたらす。かように検出される該検出可能なシグナルは、検出体分子に結合されたPNAに相補的な配列を有するRNA分子がキメラRNAポリメラーゼの出口孔から発生したことを示す。本方法の使用者に既知である、検出体分子に結合されたPNAの配列をその後、キメラRNAポリメラーゼの出口孔から発生する新生RNAの配列を決定するのに使用する。新生RNAと相補PNAの間の相補結合事象の数および頻度を既知の配列と比較し、また、特異的遺伝子の転写を検出して、従ってDNA分子の転写を検出する。

【0318】

当業者は、本開示および本明細書に開示される方法を備える場合に、細胞が本発明の分子と一旦接触されれば、DNA分子の転写を、当該技術分野で既知の存在するin vitroの方法と対照的に細胞中で実時間で検討し得ることを理解するであろう。加えて、当業者は、細胞、組織若しくは生物体がさらされる条件を、該細胞、組織若しくは生物体中での遺伝子の転写に対するこれらの条件の影響を決定するために変動し得ることを容易に理解するであろう。

10

【0319】

加えて、本発明は、ポリメラーゼ／検出体分子複合体が細胞と接触される前に、キメラRNAポリメラーゼ分子の検出体結合ドメインおよび検出体分子のCRPBドメインを介して相互に結合されている組換えRNA分子および検出体分子と細胞を接触させることを含んでなる、DNA分子の転写の検出方法をさらに含んでなる。すなわち、本発明は、選択的結合により結合されたキメラRNAポリメラーゼおよび検出体分子を含んでなる1個の大型分子(ヌクレオペプチドコンジュゲート複合体)と細胞を接触させることを含んでなる、DNA分子の転写の検出方法を含んでなる。

20

【0320】

本方法は、キメラRNAポリメラーゼおよび検出体分子が、それらが細胞と接触される前に相互と選択的に結合されることを除き、本質的に本明細書の別の場所に開示されるとおり実施される。

【0321】

本発明は、RNAポリメラーゼが、例えば核局在化シグナルによって、電気穿孔法、化学的形質転換などにより、発現されるか若しくは細胞の内側に進入することを別の方法で可能にされる方法をさらに包含する。検出体分子は、DNA転写の経過の間にRNAポリメラーゼを結合するサブユニットに選択的に結合される。本発明で企図しているRNAポリメラーゼは、限定されるものでないが、真核生物RNAポリメラーゼおよびT7ポリメラーゼの'、'、'およびサブユニットを挙げることができる。検出体分子は、本明細書の別の場所に記述されるところの2タンパク質間の選択的結合事象を介して1サブユニットに結合し得るか、若しくは、検出体分子は、本明細書の別の場所に開示されるとおり、RNAポリメラーゼサブユニットへの抗体の選択的結合によりRNAポリメラーゼサブユニットに結合し得る。検出体分子／RNAポリメラーゼサブユニット複合体をその後、本明細書の別の場所に記述されるとおり細胞と接触させる。該サブユニットは、RNAポリメラーゼとの結合に際して、該検出体分子を、本明細書に記述されるところのDNA分子の転写を検出するための位置に置く。従って、本発明は、限定されるものでないがRNAポリメラーゼおよび／若しくはT7ポリメラーゼの'、'、'およびサブユニットを挙げができる1個のRNAポリメラーゼサブユニットをさらに含んでなる検出体分子を含んでなる。

30

【0322】

B. RNA分子の翻訳の検出方法

本発明はさらに、RNA分子のペプチドへの翻訳の検出方法を含んでなる。すなわち、本発明は、mRNA分子の翻訳の頻度ならびに生じるペプチドの配列の実時間かつ生存細胞中での決定方法を包含する。

40

【0323】

50

本発明の方法は、キメラリボソームサブユニット成分を含んでなるキメラリボソームと細胞を接触させることを含んでなる。該方法は、検出体分子のC R B D（キメラリボソーム結合タンパク質）を介してキメラリボソームの検出体結合ドメインに結合することが可能である検出体分子と細胞を接触させることをさらに含んでなる。検出体分子は、C R B D、シグナリング部分、およびリボソームの30sサブユニットの出口孔を介してキメラリボソームから発生するR N A分子の一部分に相補的なP N Aを含んでなる。本方法は、さらに、シグナリング部分の別の蛍光分子に関しての検出体分子上の蛍光分子の転置により生じられる、シグナリング部分により生成されるシグナルを検出する段階を含んでなる。蛍光分子の転置は検出体分子のP N Aへの発生するR N Aスクレオチドの結合により引き起こされる。発生するm R N AのP N Aへの結合は蛍光分子の転置を引き起こして、検出可能な極性若しくは蛍光エネルギー共鳴転移（F R E T）シグナルをもたらす。該シグナルは、顕微鏡検査、共焦点顕微鏡検査、感光膜への曝露、若しくは蛍光および極性の変化を検出し得る装置、例えばPOLARSTAR OPTIMA若しくはFLUOROSSTAR（BMG Labtech、ノースカロライナ州ダラム）の使用を包含する当該技術分野で公知の方法を使用して検出される。

10

## 【0324】

加えて、本発明は、現在開示される方法により検出可能な蛍光および／若しくは極性移動を検出するための、蛍光の発射体、およびフルオレセインのような蛍光分子または本明細書に記述されるか若しくは当該技術分野で既知の他の蛍光分子としての量子ドットの使用を包含する。量子ドットは、光退色をほとんど伴わない蛍光を生じ、そして例えば米国特許第6,322,901号；同第6,576,291号；同第6,423,551号；同第6,251,303号；同第6,319,426号；同第6,426,513号および同第6,444,143号明細書に記述され、そして商業的に入手可能である（Quantum Dot Corp.、カリフォルニア州ヘイワード）。

20

## 【0325】

細胞を含む溶液中にキメラリボソームを置くことにより細胞をキメラリボソームと接触させる。キメラリボソームは細胞の細胞質に局在化する。さらに、キメラリボソーム中に工作されたか若しくはキメラリボソームに別の方法で複合されたC P Pによって、キメラリボソームは細胞膜を横断し得る。あるいは、本発明の別の態様において、電気穿孔法、光穿孔法、コレステロール修飾キメラポリメラーゼ若しくは脂質媒介性移入のような当該技術分野で既知の方法を、キメラリボソームを細胞に導入するに使用する。

30

## 【0326】

キメラリボソームは、本明細書の別の場所に開示される方法を使用して、キメラリボソームサブユニット成分をコードする単離された核酸を発現するように組換え細胞を誘導することにより、細胞若しくは組織中でさらに発現させ得る。制限しない一例として、ベクターを含んでなる組換え細胞（その中で該ベクターは組換えの単離された核酸をコードする）を、キメラリボソーム若しくはキメラリボソームサブユニット成分を発現するように誘導し得る。細胞は、キメラリボソーム若しくはキメラリボソームサブユニット成分を一旦発現すれば、その後、本発明の方法を実施するために検出体分子と接触させ得る。

40

## 【0327】

検出体分子は、キメラリボソームの検出体結合ドメインと検出体分子のC R B Dの間の特異的結合を介してキメラリボソームに結合する。検出体結合ドメインおよびC R B Dは、相互を特異的に結合するいずれか2種のポリペプチド、好ましくはS H 3ドメインおよび-P A Kドメイン、若しくはロイシンジッパーの成分であり得る。さらに、検出体分子およびC R B Dは、限定されるものでないがビオチン、アビジンおよびストレプトアビジンを挙げることができる相互に特異的に結合するペプチド以外の分子を含み得る。

## 【0328】

検出体結合ドメインおよびC R B D（またはC R P B D若しくはC E B D）は、好ましくは相互を特異的に結合する2種のタンパク質の相互作用により相互に結合する。しかしながら、本発明は相互を特異的に結合するタンパク質に制限されず、しかしまだ、ビオチ

50

ンおよびアビジン若しくはビオチンおよびストレプトアビジンのような相互に結合するタンパク質以外の分子も包含する。加えて、抗体、若しくはファージディスプレイライブリーラーで生じられるFvフラグメントのような抗体フラグメントの使用が本発明に包含される。加えて、検出体結合ドメインまたはCRBD若しくはCRPBD若しくはCEBDは、二価若しくは三価のイオンのような金属分子を含み得、そしてコンジュゲート結合パートナーは金属イオンを特異的に結合するキレート剤を含み得る。

#### 【0329】

本明細書の別の場所に開示されるとおり、検出体分子は、リボソームの出口孔から発生するRNA分子の一部分に相補的なPNAを含んでなる。PNAは、検出体分子に共有結合され、そして発生するmRNAに結合する一連のヌクレオチドを含んでなる。好ましくは、PNAは約1から10ヌクレオチドまで、なおより好ましくは約1から約5ヌクレオチドまで、なおより好ましくは約2ないし約3ヌクレオチドを結合する。好ましくはPNAは三ヌクレオチドを結合する。

10

#### 【0330】

本明細書に開示される方法は、シグナリング部分が検出体分子に結合され、より具体的にはシグナリング部分の最低1種の蛍光分子が検出体分子のCRBDに結合され、そしてシグナリング部分の最低1種の第二の蛍光分子が直接若しくは間接的にのいずれかでPNAに結合されている、シグナリング部分をさらに含んでなる。なおより具体的には、シグナリング部分を含んでなる蛍光分子は、少なくともPNAにより相互から分離されている。

20

#### 【0331】

検出体分子は、TPペプチド、TP10ペプチド、pVECペプチド、ペネトラチンペプチド、tattフラグメントペプチド、シグナル配列をベースとするペプチド、両親媒性モデルペプチドなどのようなCPPをさらに含み得る。CPPは、本発明の方法が実施され得るようなキメラRNAポリメラーゼ分子を選択的に結合するために検出体分子を細胞の内側に挿入するのに使用し得る。

#### 【0332】

翻訳されたmRNAがキメラリボソームの出口孔から発生する場合に、PNAは、相補塩基対間の結合を介して発生するmRNAを結合する。mRNAのPNAへの結合はシグナリング部分の第二の蛍光分子の転置をもたらす。蛍光分子の転置は第一の蛍光分子の位置に関し、検出可能なシグナルの発射をもたらす。かように検出される検出可能なシグナルは、検出体分子に結合されたPNAに相補的な配列を有するRNA分子がキメラリボソームの出口孔から発生したことを示す。本方法の使用者に既知である、検出体分子に結合されたPNAの配列をその後、キメラリボソームの出口孔から発生するRNA分子の配列を決定するのに使用する。RNAと相補PNAの間の相補結合事象の数および頻度を既知の配列と比較し、また、特定の遺伝子の翻訳を検出して、従ってRNA分子の翻訳を検出する。

30

#### 【0333】

当業者は、本開示および本明細書に開示される方法を備える場合に、細胞が本発明の分子と一旦接觸されれば、RNA分子の翻訳を、当該技術分野で既知の存在するintiro法と対照的に細胞中で実時間で検討し得ることを理解するであろう。加えて、当業者は、細胞、組織若しくは生物体がさらされる条件を、細胞、組織若しくは生物体中のmRNAの翻訳に対するこれらの条件の影響を決定するために変動し得ることを容易に理解するであろう。

40

#### 【0334】

加えて、本発明はさらに、キメラリボソーム/検出体分子複合体が細胞と接觸される前に、キメラリボソーム分子の検出体結合ドメインおよび検出体分子のCRBDを介して相互に結合されるキメラリボソームおよび検出体分子と細胞を接觸させることを含んでなる、RNA分子の翻訳の検出方法を含んでなる。すなわち、本発明は、特異的結合により結合されたキメラリボソームおよび検出体分子を含んでなる1個の大型分子と細胞を接觸さ

50

せることを含んでなる、RNA分子の翻訳の検出方法を含んでなる。

【0335】

本方法は、キメラリボソームサブユニット成分および検出体分子が、それらが細胞と接触される前に相互と選択的に結合されることを除き、本質的に本明細書の別の場所に開示されるとおり実施される。

【0336】

本発明はさらに、リボソームが、例えばリボソームによって、電気穿孔法、化学的形質転換などにより、発現されるか若しくは細胞の内側に進入することを別の方で可能にされる方法を包含する。検出体分子は、RNA翻訳の経過の間に、30sサブユニット若しくは50sサブユニットのようなリボソームの1サブユニットに選択的に結合される。検出体分子は、本明細書の別の場所に記述されるところの2種のタンパク質間の選択的結合事象を介してサブユニットに結合され得るか、若しくは、検出体分子は、本明細書の別の場所に開示されるところのリボソームサブユニットへの抗体の選択的結合によりリボソームサブユニットに結合され得る。検出体分子/リボソームサブユニット複合体をその後、本明細書の別の場所に記述されるとおり細胞と接触させる。サブユニットは、他のリボソームサブユニットとの結合に際して、検出体分子を、本明細書に記述されるところのRNA分子の翻訳を検出するための位置に置く。従って、本発明は、限定されるものでないが原核生物リボソームの50sおよび30sサブユニットを挙げることができるリボソームサブユニットをさらに含んでなる検出体分子を含んでなる。

10

【0337】

C. 核酸の配列決定方法

本発明は、さらに、伝統的な配列決定反応若しくは技術を使用することを伴わない核酸の迅速な *in vitro* 配列決定方法を含んでなる。本発明は核酸の迅速配列決定に有用である。加えて、本発明は、核酸を患者若しくは生物学的サンプルから単離し、本発明の方法を使用して配列決定し、そしてある細胞型の既知配列と比較する、患者若しくは生物学的サンプルからの単離された核酸の同定に有用である。制限しない一例として、腫瘍細胞を含んでなる生物学的サンプルを患者から単離し得、そして該生物学的サンプルからの核酸を配列決定し得、そして該腫瘍細胞の同一性若しくは腫瘍細胞の核酸発現を決定するために腫瘍細胞の核酸の既知配列と比較し得る。加えて、本発明は、核酸の既知のライブライマーからの核酸の発現に刺激を適用する場合の細胞若しくは組織中の同一核酸の発現の比較において有用であり得る。

20

30

【0338】

該方法は、プロモーター/制御配列を含んでなる二本鎖オリゴヌクレオチドを支持体に結合することを含んでなる。該支持体は、ガラス製スライドガラス、プラスチック製スライドガラス若しくは皿、ナイロン若しくはセルロースメンブレン、ならびに化学および生物学的反応を実施するために当該技術分野で公知の他のこうした支持体であり得る。プロモーター/制御配列は、グルタルアルデヒドを介する共有架橋のように直接若しくはビオチン分子のような媒介によりのいずれかで支持体に結合する。ビオチン分子の場合、支持体をストレプトアビジンのような対応する結合パートナーで被覆する。当該技術分野で公知の他の分子を、プロモーター/制御配列を支持体に結合するのに使用し得、そして、本発明は、グルタルアルデヒド架橋若しくはビオチン/ストレプトアビジン複合に制限されると解釈されるべきでない。

40

【0339】

一例として、本発明の一態様において、アミン修飾プロモーター/制御配列を、例えばN-ヒドロキシスクシンイミドエステル反応基を含有する疎水性ポリマー(Codelink、Amer sham、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を含んでなる活性化したスライドガラスを使用してスライドガラスに結合する。加えて、プロモーター/制御配列は、UV架橋、化学的架橋を可能にするシリコーン処理石英製スライドガラス、アガロース若しくは磁性ビーズなどを使用して、スライドガラスに結合する。

【0340】

50

プロモーター／制御配列を含んでなるオリゴヌクレオチドは、支持体に直接若しくは間接的のいずれかで結合されている端と反対の端で、制限酵素でさらに消化する。プロモーター／制御配列を含んでなるオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知のいずれかの制限酵素で消化して、付着端若しくは平滑端をもつオリゴヌクレオチドを残す。さらに、プロモーター／制御配列は、当該技術分野でいずれかの既知のもの、好ましくはRNAポリメラーゼIIのプロモーター／制御配列、なにより好ましくはT7 RNAポリメラーゼのプロモーター／制御配列(TAATACGACTCACTATAAGGG:配列番号25)であり得る。

【0341】

一態様において、プロモーター／制御配列は、相補付着端へのライゲーションを可能にする付着端を含んでなる2種の相補オリゴヌクレオチドとして合成する。オリゴヌクレオチドの合成は当該技術分野で公知である。

10

【0342】

目的の核酸は、TRIZOLに基づくRNA単離などのような当該技術分野で公知の方法を使用して細胞、動物若しくは組織から単離する。Sambrookら(2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、Green & Wiley、ニューヨーク)を参照されたい。目的の核酸をその後、逆転写酵素を用いる転写のような当該技術分野で公知の方法を使用して二本鎖cDNA分子に転写する。該二本鎖cDNAをその後、目的の核酸がプロモーター／制御配列に対する対応する付着端若しくは平滑端を有するような、プロモーター／制御配列を含んでなるオリゴヌクレオチドを消化するのに使用した制限酵素で消化する。プロモーター／制御配列および消化した二本鎖cDNAをその後、当該技術分野で公知の方法を使用して一緒に連結する。

20

【0343】

目的の二本鎖cDNAに融合したプロモーター／制御配列を、検出体分子を含んでなるキメラRNAポリメラーゼと接触させる。キメラRNAポリメラーゼはプロモーター／制御配列に結合し、そして目的の二本鎖cDNAを転写することを開始する。検出体分子のPNAが、キメラRNAポリメラーゼから発生する新生mRNAを結合し、そして本明細書の別の場所に記述されるとおりシグナルを発する。該シグナルは、限定されるものでないが、顕微鏡検査、共焦点顕微鏡検査、多光子顕微鏡検査、感光膜への曝露、または蛍光および極性の変化を検出し得る装置、例えばPOLARSTAR OPTIMA若しくはFLUOROSTAR(BMG Labtech、ノースカロライナ州ダラム)の使用を挙げることができる検出手段により検出する。

30

【0344】

かように検出されるシグナルは、検出体分子および新生RNAに結合したPNAの相補結合によりシグナリング部分の位置が変えられる場合に発せられる蛍光若しくは極性シグナルの消光および蛍光発光により生成される。本明細書の別の場所に記述されるとおり、PNAは好ましくは新生RNA上の三ヌクレオチド相補物を結合しかつシグナルを発せさせる。従って、目的の核酸を配列決定するために、本発明の配列決定法を実質的に本明細書に記述されるとおり実施し、そしてその後、新生RNAの異なる配列を結合する異なるPNAを用いて反復する。従って、プロモーター／制御配列および目的の核酸を、例えばCACを結合するPNAを含む検出体分子を使用して配列決定する場合は、第二の反応を、検出体分子を含んでなるキメラRNAポリメラーゼ(ここで該検出体分子はCACを結合しない配列を有するPNAを含んでなる)を使用して実施する。該シグナルが、本明細書の別の場所に記述されるところのシグナルの検出手段により検出され、そして第一の反応および第二の反応の結果を、目的の核酸の配列若しくは配列の緊密な近似を決定するために比較かつ解析する。

40

【0345】

50

## V I I I . キット

本発明は、R N A分子の転写を検出するための多様なキットを包含し、該キットは、キメラR N Aポリメラーゼ、検出体分子、および本発明の方法を実施するための該キットの使用を記述する説明資料を含んでなる。これらの説明書は本明細書に提供される方法および例を単純に例示する。モデルキットを下述するとは言え、他の有用なキットの内容は本開示に照らして当業者に明らかであろう。これらのキットのそれぞれを本発明内で企図している。キットは本発明の各態様について予見される。

## 【0346】

本キットの検出体分子は、本質的に、本明細書の別の場所に開示される要素を包含する。検出体分子は、細胞透過性ペプチド、キメラR N Aポリメラーゼの検出体結合ドメインを特異的に結合するC R P B D、蛍光分子を含んでなるシグナリング部分、およびR N A分子の一部分に相補的なP N Aを含み得る。好ましくは、P N Aはニヌクレオチド若しくは三ヌクレオチド、より好ましくは三ヌクレオチドを結合する。好ましくは、蛍光分子は、R e A s H分子、B S R分子、C y 3 B分子、C y 5分子、フルオレセイン分子、若しくは本明細書の別の場所に開示される別の蛍光分子である。

10

## 【0347】

本発明のキットに包含されるキメラR N Aポリメラーゼは、本明細書の別の場所に記述されるところの単離されたポリペプチドであり得るか、若しくは、本明細書の別の場所に開示されるところの単離された核酸から発現され得る。

20

## 【0348】

本発明の一態様において、キットは単離されたキメラR N Aポリメラーゼポリペプチドを含んでなる。該単離されたR N Aポリメラーゼポリペプチドは、とりわけ、本明細書の別の場所に記述される検出体分子のC R P B Dを特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなる。

20

## 【0349】

本発明の別の態様において、キットはキメラR N Aポリメラーゼをコードする単離された核酸を含んでなる。本発明の単離された核酸によりコードされるキメラR N Aポリメラーゼは、とりわけ、本明細書の別の場所に記述される検出体分子のC R P B Dを特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなる。

30

## 【0350】

本発明のなお別の態様において、キットは、R N Aのタンパク質への翻訳を検出するためのキメラリボソームを含んでなる。該キットは、検出体結合ドメインおよび可変リンカー領域をさらに含んでなるキメラリボソームサブユニット若しくはそのフラグメントを含んでなる。該キットは、さらに、C R B Dを含んでなる検出体分子、およびR e A s H分子、B S R分子、C y 3 B分子、C y 5分子、フルオレセイン分子、若しくは本明細書の別の場所に開示される別の蛍光分子を包含する蛍光分子のようなシグナリング部分を含んでなる。

30

## 【0351】

本発明のキットに包含されるキメラリボソームは、本明細書の別の場所に記述されるところの単離されたポリペプチドであり得るか、若しくは本明細書の別の場所に開示されるところの単離された核酸から発現され得る。

40

## 【0352】

本発明の一態様において、キットは単離されたキメラリボソームポリペプチドを含んでなる。単離されたキメラリボソームポリペプチドは、とりわけ、本明細書の別の場所に記述される検出体分子のC R B Dを特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなる。

40

## 【0353】

本発明の別の態様において、キットは、キメラリボソームをコードする単離された核酸を含んでなる。本発明の単離された核酸によりコードされるキメラリボソームは、とりわけ、本明細書の別の場所に記述される検出体分子のC R B Dを特異的に結合する検出体結合ドメインを含んでなる。

50

## 【0354】

本発明のキットは、本発明の方法で使用されるプレートおよび皿、緩衝剤、溶液などのような本明細書に開示される付加的な試薬、ならびに本発明の方法を実施するためのアプリケーター若しくは他の器具をさらに含み得る。本発明のキットは説明資料をさらに含んでなる。

## 【0355】

## [実施例]

## 実験実施例

本発明は今や以下の実施例に関して記述する。これらの実施例は具体的説明の目的上のみ提供され、そして、本発明は、これらの実施例に制限されると決して解釈されるべきでなく、しかしそれ、本明細書に提供される教示の結果として明らかとなるいかなるおよび全部の変形物を包含すると解釈されるべきである。

10

## 【実施例1】

## 【0356】

## キメラRNAポリメラーゼ-SH3-T7融合構築物

キメラRNAポリメラーゼがDNA鑄型からRNAを合成する際に該ポリメラーゼの検出体結合ドメインと検出体分子が会合し得るような本発明のキメラRNAポリメラーゼを工作する。-PAKドメインおよび-PIXのSH3ドメインはin vivoで会合しあつ高い相互作用親和性を有することが以前に示されている。従って、-PIX SH3ドメインを、T7 RNAポリメラーゼのN末端領域に工作した。

20

## 【0357】

ラット-PixからのSH3ドメイン(AF044673; gi 2865595、nt 1-189; 配列番号2)をT7 RNAポリメラーゼ(NC\_001604、nt 3171-5822; 配列番号1)のアミノ末端にクローン化する5種の構築物を創製した。構築物1(C1)では、SH3ドメインの最後のアミノ酸にすぐT7のアミノ酸配列が続き、構築物2~5(C2~C5)では、それぞれ0ないし3個のプロリンを含有する10アミノ酸のスペーサーペプチドをこれら2ドメインの間に挿入した。該スペーサーペプチドは、増大する数のプロリンで該2ドメインを相互からわずかに離して配置して、スペーサーペプチド中でより多い曲がりを提供する。

30

## 【0358】

これらのプロリンは、SH3ドメイン(検出体結合ドメイン)をスペーサーペプチドの-ヘリックスの周囲の等距離に配置する。キメラRNAポリメラーゼ構築物中に工作されたスペーサーペプチドは、0個のプロリン-GDKVQLIGFG(配列番号17); 1個のプロリン-GEGLPGMCGG(配列番号18); 2個のプロリン-GPDDTPWDGG(配列番号19); および3個のプロリン-GPPDTPYADG(配列番号20)である。これらのスペーサーペプチドは、キメラRNAポリメラーゼに結合された検出体分子のより大きな柔軟性を可能にし、その結果検出体分子は新生RNAにより良好に相互作用し得る。スペーサーペプチドの-ヘリックスの性質は、RNA出口孔からの特定の距離にSH3ドメインを配置する。

40

## 【0359】

細菌からのT7 RNAポリメラーゼの精製は、サイズ排除およびイオン交換カラムのような標準的プロトコルを使用する十分に確立された手順である(Davani 100ら、1984 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA. 81:2035-2039; Grodbergら、1988、J. Bacteriol. 170:1245-1253; Zawadskiら、1991、Nucleic Acids Res. 19:1948; Liら、1999、Protein Expr. Purif. 16:355-358)。T7 RNAポリメラーゼは、例えばBL21-TIR細菌から得ることができ、そして、キメラRNAポリメラーゼを発現するよう工作されたBL21-TIR細菌の100ml培養物からの数ミリグラムのタンパク質の収量が容易に可能である。

50

## 【0360】

R N A ポリメラーゼ構築物を、異なる実験系間の往復が容易であるように、G A T E W A Y ( R ) ベクター系 ( I n V i t r o g e n 、カリフォルニア州ラホヤ) にクローニングした。5種の異なる細菌で発現されたキメラ T 7 R N A ポリメラーゼを作成し、そして同一の5構築物を哺乳動物細胞で発現させる。これらの構築物は最初の実験のための適切な選択である一方、本明細書の別の場所に開示されるとおり、検出可能なシグナルを最大化するように R N A ポリメラーゼの他の領域に捕捉ペプチドを配置することが必要である。これは、当該技術分野で公知であるとおり、R N A 出口孔の周囲の多様な部位で挿入突然変異誘発を実施することにより達成することができる。

## 【 0 3 6 1 】

C 1 の段階的構築を後に続くとおり実施した。S H 3 ドメインおよびT 7 R N A ポリメラーゼを、一緒に連結されるはずであった端の5' リン酸化したプライマー ( S H 3 について配列番号 8 および配列番号 9 ; T 7 について配列番号 10 および配列番号 15 ) を使用する別個の反応で P C R により増幅した ( S H 3 3' 端およびT 7 5' 端 ) 。 S H 3 およびT 7 R N A ポリメラーゼの P C R 産物を一緒に連結した。S H 3 - T 7 連結分子を、該連結反応を錫型として使用する P C R により増幅した。正しい大きさの P C R 産物をアガロースゲルから抽出した。S H 3 - T 7 P C R 産物を p E N T R / D - T O P O エントリーベクターにクローニングし、そして G A T E W A Y ( R ) 組換え系を使用して発現ベクターに移入した。構築物 2 ~ 5 は、T 7 - 5' L の代わりにプライマー 0 P / 1 P / 2 P / 3 P - T 7 - 5' L を含有する 5' リン酸化したリンカーを使用する同一の戦略に従って創製した。 [ J i m : 配列番号 11 、 13 および 14 のスペーサー部分はアミノ酸配列、配列番号 17 、 19 および 20 に対応しない。プライマー若しくはアミノ酸配列のどちらの配列が正しいか？ ]

## 【 0 3 6 2 】

## 【表 3 】

表2 - プライマー配列

プライマー (配列番号)	配列	構築物
GWS-SH3-5'L (配列番号8)	cacc-atgactgataacgccaacagcca	全
SH3-3'L (配列番号9)	P-gatctctcgtagttgct	全
T7-5'L (配列番号 10)	P-atgaacacgattaaacatcgct	C 1
0P-T7-5'L (配列番号 11)	P-ggcgataagggtccagctgatggcttggc-atgaacacgattaaacatcgct	C 2
1P-T7-5'L (配列番号 12)	P-ggcgagggcctgccaggcatgtgtggcgc-atgaacacgattaaacatcgct	C 3
2P-T7-5'L (配列番号 13)	P-ggcccgatgatactccatggatggcgc-atgaacacgattaaacatcgct	C 4
3P-T7-5'L (配列番号 14)	P-ggccccaccagatactccatagccgatggc-atgaacacgattaaac	C 5
T7-3'L (配列番号 15)	ttacgcgaacgcgaagtccga	全

配列中の「P」は5' リン酸を示す。

## 【 0 3 6 3 】

B L 2 1 細菌を、構築物 C 1 ~ C 5 のそれぞれを含んでなる発現ベクターで形質転換した。各キメラ T 7 R N A ポリメラーゼ構築物から発現されるタンパク質を、変性タンパク質ゲルで分析した ( 図 2 9 ) 。タンパク質のレベルは B S A タンパク質負荷曲線と比較して推定し得る。

## 【 0 3 6 4 】

キメラ T 7 R N A ポリメラーゼが R N A を合成することがなお可能であったかどうか

10

20

30

40

50

を評価するため、*in vitro* RNA 転写アッセイを実施した。キメラ RNA ポリメラーゼ (30 ng) を、T7 RNA ポリメラーゼプロモーターを含有するプラスミド鑄型および  $P^{32}$  放射標識ヌクレオチドを含有する RNA 転写反応に添加した。放射標識ヌクレオチドが新生 RNA に取り込まれた。クローン化した RNA ポリメラーゼのそれぞれの RNA 合成能力についての 0 および 30 分の時間点を図 29 の右側の図に示す。キメラ T7 RNA ポリメラーゼのそれぞれが RNA 合成活性を表した。従って、T7 RNA ポリメラーゼの N 末端での検出体結合ドメインおよびスペーサーペプチドの挿入は該酵素を不活性化しない。これらの改変 RNA ポリメラーゼをその後、*in vitro* 発現プロファイリングのための予備実験で使用した。

## 【実施例 2】

## 【0365】

## 検出体分子の合成

本実施例は、本発明の方法を使用する *in vitro* および *in vivo* 研究のための多様な検出体分子の合成を記述する。t-Boc ブロッキング (t-Boc) 戦略を使用する固相ペプチド合成 (SPPS) を使用して、検出体分子を生成するのに使用されるペプチドを合成した。具体的には、SPPS を使用して、C 末端チオエステル、リンカー、PNA 三量体およびフルオレセインを含有するペプチド (L604)；-PAK 配列および TAMRA を含有するペプチド (L605)；C 末端チオエステル、リンカー、PNA 三量体およびフルオレセインを含有するペプチド (L564)；ならびに -PAK 配列、TAMRA および N 末端 Cys を含有するペプチド (L575) を合成した。該ペプチドの全部を HPLC により精製し、そしてその後 MALDI-TOF 質量分析により分析した。

## 【0366】

3 種の異なる PNA - リンカーペプチドを -PAK ドメイン含有ペプチドに連結して、*in vitro* 研究のための検出体分子を生成した (図 12 に描かれる上 3 種の分子)。*in vitro* 応用に企図している 2 種の他の検出体分子もまた図 12 に描く (下 2 種の分子)。

## 【0367】

*in vivo* 研究のため、4 種の異なる PNA - リンカーペプチドを -PAK ドメイン含有ペプチドに連結した。これらの 2 種はリンカーの一部として NLS を含有した (図 13A の上 2 種の分子)。他 2 種は PNA に結合された NLS を含有した (図 13A の下 2 種の分子)。これらのそれを、Npys 活性化した Cys を含有する細胞透過性ペプチド TP10 にジスルフィド架橋を介してさらに結合し、(図 11) 検出体分子を製造した。1 種の *in vivo* 検出体分子を試験し、そして NLS が該検出体分子を細胞核に成功裏にターゲッティングした。図 13B は、*in vivo* 応用に企図している 4 種の他の検出体分子を描く。

## 【0368】

検出体分子の 2 種 (L606 および L602) ならびに TP10 配列は後に続くとおり合成した。チオエステルペプチド L604 および L564 の合成を容易にするために、Boc 化学 - SPPS のためのチオエステルペプチドを生じる樹脂リンカーを使用した。HF 不安定性 MBHA 樹脂で開始して、ロイシン、次いで S-トリチルメルカプトプロピオン酸を、標準的 SPPS 条件を使用することによりカップリングした。生じる樹脂を、DCM / TFA / TIS によるトリチル保護基の除去後にポリペプチド鎖集成のための出発樹脂として使用した。所望のチオエステル結合を、残存するアミノ酸を標準的カップリング条件下でカップリングすることにより樹脂上で直接生成し得た。HF 切断、HPLC 精製およびその後の質量分析後に、C 末端チオエステルペプチドを NCL で直接使用した。MALDI-TOF 質量分析データを正反射 (positive reflection) モードで記録した。粗チオエステルペプチド L604 および L564 の HPLC スペクトルを図 14 および 16 に見ることができ、また、正しい画分の質量スペクトルをそれぞれ図 15 および 17 に見ることができる。

10

20

30

40

50

## 【0369】

ペプチド L 605 および L 575 を、 S P P S の t - B o c 戦略を使用して、ペプチド合成機（モデル 431A； Applied Biosystems、米国マサチューセッツ州フラミンガム）で 0.1 ミリモルスケールで段階的様式で合成した。 t - B o c アミノ酸をヒドロキシベンゾトリアゾールエステルとして p - メチルベンジルヒドリルアミン樹脂（Bachem、スイス・ブーベンドルフ）にカップリングして、C 末端アミド化したペプチドを得た。該ペプチドを D M F 中 20 % ピペリジンで処理して L y s <sup>2</sup> 側鎖上の F m o c 基を切断分離した。 T A M R A を 2 等量の D I E A と一緒に D M S O / D M F (1 : 1) に溶解し、そして L y s <sup>2</sup> 側鎖に一夜カップリングした。ペプチド L 605 の H P L C および質量スペクトルは図 18 および 19 に見ることができ、また、 L 575 の質量スペクトルは図 20 に見ることができる。10

## 【0370】

ペプチド L 606 をもたらす、ペプチド L 604 と L 605 の間の天然の化学的連結 (N C L) を、p H 7.2 のリン酸緩衝液、塩酸グアニジンおよびチオフェノール中で実施した。混合物を一夜反応させ、そして 12 時間で完了した。N C L の H P L C スペクトルは図 21 に見ることができ、また、正しい画分の質量スペクトルは図 22 に見ることができます。L 602 をもたらす、L 564 と L 575 の間の N C L 反応を、L 604 および L 605 についてと同様に実施した。20

## 【0371】

本明細書に記述される方法により合成した検出体分子は、合成および機能双方に関して至適化し得る。一例として、蛍光分子間の距離を、最良のシグナルを生じかつ受領するように至適化し得る。C P P および / 若しくは核局在化シグナルを、in vivo 転写検出のため改変し得る。20

## 【実施例 3】

## 【0372】

## 発現プロファイリングおよび配列決定

発現プロファイリングおよび配列決定は、マイクロアレイ上に固定されている短い二本鎖オリゴヌクレオチド D N A に c D N A 集団を連結することによりマイクロアレイ上で起こる（図 23）。これらの短い D N A オリゴヌクレオチドを、本発明の方法を使用する検出体分子による検出を容易にするように改変する。D N A は、二本鎖オリゴヌクレオチドの結合鎖の 5' 端上の 12 炭素伸長上に 5' 活性化可能なアミンを伴い合成する。該オリゴヌクレオチドは、T 7 R N A ポリメラーゼプロモーター部位、スペーサー領域、および例えば E c o R 1 部位のような連結可能な制限酵素部位もまたコードする。相補オリゴヌクレオチドは、5' 活性化可能なアミンを含まない相補配列を含有するが、しかし 5' リン酸を含有する。このオリゴヌクレオチドの配列はスポット間で不变である。二本鎖オリゴヌクレオチドを、Gene Machines Omni Grid アレイヤー (arrayer) (ミシガン州アナーバー) を使用してアミン結合 (amine-link) ガラス製スライドガラスにスポットする。これらのスポットの印刷密度は変動し、各スポットは、隣接スポットの中心間の 200 ミクロンの距離を伴い直径約 150 ミクロンである。30

## 【0373】

検出は個々の D N A が識別可能でなければならないことを必要とし、従って、D N A 密度はスポットあたり約 10,000 分子ないしスポットあたり約 250,000 分子の間で変動することができる。これらの密度は複数の個々の分子が所定の視野内で見えるようになる。スポットの各行は、各行の始めに配置される蛍光分子により仕切られる。40

## 【0374】

ガラス製スライドガラス上での二本鎖オリゴヌクレオチドの結合後に、c D N A 集団を、固定したオリゴヌクレオチドに直接連結する。c D N A ライブライマーを、c D N A 合成を開始するためのオリゴ d T およびランダムプライマーの混合物を使用する m R N A の c D N A への転化により生成する（図 23）。双方のプライマーは、合成された c D N A 中

10

20

30

40

50

でRNAの3'端(オリゴdTでプライミングされる)およびRNAの5'端により近い配列(ランダムプライミングされる)の双方が表されるように使用する。cDNAが一旦合成されれば、それを二本鎖にしあつEcoRIで消化する。消化されたDNAを、マイクロアレイに固定したオリゴヌクレオチドに直接連結する。連結反応に依存して、各固定されたオリゴヌクレオチド上の多様なcDNAの鎖状体が生じ得る。多様なcDNAの鎖状体が異なるRNAの認識において困難を引き起こす場合には、自己連結が起こり得ないように、EcoRIで消化したcDNAを脱リン酸化し、従って、ライゲーション反応を、固定したオリゴヌクレオチドでのライゲーションに偏向させる。

## 【0375】

ライゲーション後に、カバーガラスの2端が開放であり室を創製するようなカバーガラスでアレイを覆い、その結果溶液が該室を通り流れ得る。室のあるマイクロアレイを、蛍光刺激およびFRET検出の可能な顕微鏡の載物台に置く。あるいは、スライドガラスを、本明細書の別の場所に記述されるもののような自動蛍光検出器の反応/検出室に入れる。キメラRNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼプロモーターに結合し、検出体分子がRNAポリメラーゼに結合し、そして、RNAが合成される際に、RNAがRNA出口孔を出る際に新たに合成されたRNAの相補配列にPNAが結合する場合にフルオレセインおよびTAMRA蛍光分子が相互に関連して動くように、キメラT7 RNAポリメラーゼ、in vitro検出体分子およびNTPを、透析するか、若しくはマイクロアレイの室に微小ポンプで送る(図23)。

## 【0376】

マイクロアレイを、上述されたところのCodeLinkスライドガラス上で、T7 RNAポリメラーゼプロモーター部位を含有するアミノ修飾した二本鎖DNA鑄型を固定することにより作成した。2種のDNA鑄型を製造した。コーディング配列に作動可能に連結されたT7 RNAポリメラーゼプロモーターをそのそれぞれが有したアクチンcDNAおよびpGEMクローニングベクターを、16炭素リンカーアームに一級アミンを含有するよう改変した5'PCRプライマーを使用して増幅した。この一級アミン基をCodeLinkスライドガラスに連結し、それにより、二本鎖DNA鑄型の転写が該DNA鑄型の結合された領域から該鑄型の自由端まで起こるとみられるようなT7 RNAポリメラーゼプロモーターの方向を定めた。

## 【0377】

gtg PNAを含んでなる3種のin vitro検出体分子(図12の上3種の分子)の混合物を、全5種のキメラRNAポリメラーゼの混合物と混合し、マイクロアレイに添加しあつ転写緩衝液中でインキュベートして、繋ぎ止められたDNA鑄型分子をRNAに転写した。スポットしたアレイの拡大像に示されるとおり、検出可能な蛍光シグナルがRNA転写の間に発せられる。スポットを、蛍光強度の変化が検出かつ定量され得るような時間にわたり画像化し、従って時間および配列依存性のBlinkerシグナルを生じさせる。

## 【0378】

蛍光分子の明滅を数分の経過にわたり評価し、明滅間の時間を測定する。各RNAが合成されている際のそれと関連する明滅時間を、明滅間の時間を核酸の配列と相關させる、Junhyong Kim博士により開発された、本明細書の別の場所で論考される拘束局所動的時間伸縮(CL-DTW)アルゴリズムに当てはめる。これらのデータを使用して、配列が明滅パターンに一致するRNAについてラット、マウスおよびヒトのデータベースに問い合わせる。T7 RNAポリメラーゼは1秒あたり約80塩基の速度でRNAを合成し、そして、結果として12マイクロ秒の分解能が単一ヌクレオチドの分離に必要とされる。本明細書に記述される方法はPNA三ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションにより最低約3個の隣接ヌクレオチドを評価するため、この三ヌクレオチド配列の検出のための時間分解能は、12ミリ秒より有意により少なく緊縮性である。80塩基/秒により除算される3個の特定の隣接する塩基を見出すことの頻度( $4^3 = 1/64$ )は、明滅間の時間である800ミリ秒に等しい。この時間枠は、当該技術分野で既知の利用可

10

20

30

40

50

能な検出器で容易に認識可能である。

【0379】

単一分子検出は本明細書に記述される標準的検出系で評価されるが、しかし、単一分子解像度を高める、倒立顕微鏡に一体化された背面照射型増倍ゲイン (back-thinned multiplicative gain) カメラを使用してもまた評価し得る。RNAポリメラーゼによるRNA合成の速度を考えれば、たった数分間の画像化が、連結されたcDNAを明白に同定するのに十分である。

【0380】

FRETシグナル生成ならびに蛍光極性測定に最適である多様な検出体分子の合成は本明細書の別の場所に記述される。FRETのための蛍光分子間の距離は至適には10~20アミノ酸である一方、極性測定については、10アミノ酸未満の分離が好ましい。従って、検出は、本発明の検出体分子に依存して、FRET若しくは蛍光検出を使用して補足若しくは置換し得る。

10

【0381】

検出体分子上の三ヌクレオチドのPNA配列の選択を、核酸を伴うPNAにより表される比較的高いアニーリングエネルギーにより行った。事実、21塩基のPNAは約90のT<sub>m</sub>を有し得る。3塩基gtgのPNAは、それが既存のRNAに近づきかつ離れ得るように37で一過性にアニーリングする。本明細書に記述されるこの3塩基配列は、長さ最低約4若しくは5若しくは6塩基に伸長もまたし得る。4、5若しくは6塩基のPNAの配列は、RNAの集団との相互作用の数を最大化するように生物情報科学的に決定される。これは、既知のコドンの好み、ヒト、マウス若しくはラットのようなある種に特定のG:T比、および当該技術分野で公知の核酸の他の特徴を使用して決定し得る。

20

【0382】

検出可能な明滅シグナルは、連結されたcDNAを明白に同定することができる。同一RNAについて検出可能な明滅シグナルを表示する多様なオリゴヌクレオチドの数が、初期RNA集団中のその特定のRNAの豊富さの分析を可能にする。連結されたcDNAの配列決定は、検出体分子中の複数の三ヌクレオチドのPNA配列の組合せを使用してもまた可能である (Kornら、2003、Nucleic Acid Res.、31:89)。従って、三ヌクレオチドの全64種の異なる組合せを使用することは、完全な配列情報がいずれのcDNAについても得られることを可能にする。これは、繰り返し様式でロボット的になされ、1検出体分子を使用し、シグナルを生成させ、そしてその後洗い流し、そして、異なるPNA配列検出体を伴う別の検出体分子が続く。検出体分子のシグナルが生成される方法により、64種の組合せの完全な相補物がいずれかの所定のcDNAの配列を決定するのに必要とされないであろうことが高度にありそうである。三ヌクレオチドのような変動するオリゴヌクレオチド配列を伴う検出体分子は、本明細書の別の場所に開示される方法を使用して合成し得る。

30

【0383】

本発明の方法および組成物を使用して新規RNAを同定する場合に、該RNAの同一性を独立に確認し得る。マイクロアレイの明滅シグナルに対応するRNAの同一性の確認はPCRにより決定される。同定されたRNAの配列を使用して、マイクロアレイ上のDNAスポットから配列をPCR增幅するためのPCRプライマーを生成する。このPCR反応は低密度の固定されたDNAを用いて実施する。検出可能な明滅シグナルを生じさせるマイクロアレイに固定されたDNAにRNAが連結されていることの確認は、連結されたcDNAに対し5'である固定されたDNAからであるPCR反応プライマーの1種により提供される。さらなる標準的RNA增幅およびマイクロアレイ分析を、検出可能な明滅シグナルにより観察されるところの多様な転写物の同一の相対比が、(より時間がかかるとは言え)標準的技術で見られるものに平行であることを確認するために実施し得る。

40

【実施例4】

【0384】

in vitro Blinkerシグナルの生物情報科学分析

50

B l i n k e r シグナルのシグナル処理および標的適合：画像の取り込みおよび解析からの最初のシグナル定量後に、測定した B l i n k e r シグナルを転写物配列に変換する。該アプローチは候補配列のライブラリーの生成で開始する。各ライブラリー配列を、P N A : : R N A 二重鎖形成および検出器応答のコンピュータモデルを使用して、i n s i l i c o B l i n k e r シグナルに変換する。計算機上で (i n s i l i c o) 標的シグナルのライブラリーへのプローブの B l i n k e r シグナルの適合の程度を定量化する。その後、最良の適合および適合の信頼性を統計学的に評価する。

## 【0385】

i n s i l i c o B l i n k e r シグナルのライブラリーの生成：B l i n k e r 技術は、F R E T による P N A : R N A の k - m e r 二重鎖中の配置の変化を検出することに依存する。k - m e r の P N A 配列を考えれば、標的配列中の相補 k - m e r の存在 / 非存在をコンピュータ計算することは簡単である。しかしながら、該 k - m e r は F R E T 応答の差別的調節を誘導する部分的二重鎖を形成しうるため、B l i n k e r シグナルには単純な相補適合より多くの情報が存在する。これは、測定した B l i n k e r シグナルが応答ピークの混合した様式を有し、より小さいピークが潜在的に部分適合に対応している、図 30 のグラフで見ることができる。従って、候補配列の B l i n k e r シグナルの i n s i l i c o モデルを、最初に、二重鎖配置の生物物理学的モデルを結合自由エネルギーに基づきコンピュータ計算することにより構築する。候補標的の集合物を、実験的プローブシグナルとの比較のために i n s i l i c o B l i n k e r シグナルのライブラリーを生成するのに使用し得る。

10

20

30

## 【0386】

プローブの k - m e r の P N A 配列および標的転写物の k - m e r の枠を考えれば、P N A および R N A は、合計  $2^k$  の配置について、完全に解離しうる、第一の位置のみで結合されうる、第二の位置でのみ結合されうる、などである。二重鎖配置の相対自由エネルギーを、各可能な対に結合エネルギーを割り当てる予め決定されたパラメータの組、[ $E_{i,j} | i, j = \{A, C, G, U\}$ ] を使用して、k 個の位置の対結合自由エネルギー値を（結合された位置のサブセットについて）総和することによりコンピュータ計算する。予備データでは、相互作用は一過性でありかつ二重鎖らせんのスタッキングエネルギーにより強く支配されないと仮定した。従って、-3 k c a l 、-2 k c a l および -1 k c a l がそれぞれ C : G : 、 A : U および G : U 対に、ならびにゼロが全部の他の対に割り当てられた。潜在的配置の確率は、i 番目の配置について、量

## 【0387】

## 【数1】

$$f(i) = e^{-\frac{1}{T} \sum_{p=1}^k \Delta E_{i(p), j(p)}}$$

## 【0388】

を使用してコンピュータ計算され；該総和は i 番目の配置の k のポジショナル二重鎖状態 (p o s i t i o n a l d u p l e x s t a t e) にわたり、そして T は温度パラメータである。その場合、i 番目の配置の確率は

40

## 【0389】

## 【数2】

$$P(i) = f(i) / \sum_{i=1}^{2^k} f(i)$$

## 【0390】

である。

## 【0391】

50

各二重鎖配置は、結合された蛍光分子間のある相互作用距離を意味している。例えば、二重鎖が全部の  $k$  位置で完全に結合される場合、蛍光分子は、Foerster 距離（50% 至適の共鳴転移の距離）に関して何らかの相対距離  $d$  にあると仮定される。各  $i$  番目の配置は  $d(i)$  相対距離を誘導すると期待する。FRET 出力の調節は、標準的な 6 次応答、 $E = 1 / (1 + d(i)^6)$  としてモデル化される。従って、標的配列の特定の 1  $k$ -mer 枠での期待される B linker シグナルは、

【0392】

【数3】

$$B = \sum_i^{2^n} 1 / (1 + d(i)^6) \cdot P(i)$$

10

【0393】

すなわち、PNA：RNA 二重鎖配置の確率を上回る期待される FRET エネルギーとしてコンピュータ計算される。該モデルのパラメータは実際のデータの測定値への当てはめにより推定し得る。該パラメータは、ピーク分布およびピーク遷移時間の最小二乗当てはめにより数値的に至適化することができる（予備データはピーク分布への当てはめを用いて生成した）。

【0394】

標的配列の潜在的実験測定値は、FRET シグナル、ポリメラーゼによる標的配列を横断する動きおよび検出装置の関数である。とりわけ、重要なパラメータは、検出装置の時間応答、および標的配列を横断する動き（ポリメラーゼの処理能力により支配される）に関するサンプリング間隔である。光電子増倍管（PMT）のような迅速な時間応答を伴う光収集装置は、サンプリング点での実際の値に近いシャッター閉鎖時タイムスライス（shuttered time-slice）シグナルを生じることができ；一方、収集した光をサンプリングまで積分する装置（例えば CCD）は、間隔全体の総和である異なる値を生成することができる（図 31）。一般に、シグナルを積分する装置は、時間領域のエラー（ジッター）に対しより少なく感受性であることができる。B linker シグナルは、積分モデルおよびタイムスライスモデル双方を組み込むことによりモデル化することができる。Perl / C++ プログラムの総合ソフトウェアが、FRET シグナルおよび検出器応答モデル双方を伴い既に実装されている。

20

【0395】

プローブ B linker シグナルの標的 B linker シグナルへのマッチング：実験測定からのプローブ B linker シグナルは、異なる時間間隔（サンプリング時間）での FRET 出力に対応する数のベクトルよりなる。標的配列のライブラリーからの in silico B linker シグナルもまた数のベクトルよりなる。解析の次段階は、プローブおよび標的のベクトルの間の適合の尺度をコンピュータ計算しかつ最良のマッチング標的を決定することである。適合のコンピュータ計算は、B linker シグナル產生での固有のエラーおよび偏りのため、単純なベクトル対ベクトルの相関として実施し得ない。プローブのシグナルは 3 種の型の潜在的エラー、すなわち、FRET 振幅のエラー（例えば二重鎖の変動による）、時間領域のエラー（「ジッター」と呼ばれ、ポリメラーゼの処理能力による）、および壊滅的なエラー（例えば塵埃、酵素の不足など）を有する。B linker シグナルの偏りは、測定された値がプローブ配列の未知の枠に対応しかつ各転写事象が出力シグナル中に明瞭な境界なく転写のその後の回に潜在的に突入し；B linker シグナルが未知の相にあり、そして再度未知の相でシグナルの付加的なコピーと潜在的に連結するという事実から生じる。従って、マッチングアルゴリズムは、全部のエラーの型、ならびに移相 / 連結の問題に対しエラー強さがなければならない。

30

【0396】

上の問題を解決するため、拘束局所動的時間伸縮（CL-DTW）アルゴリズムがシグナルマッチングのため開発された。動的時間伸縮（DTW）は、遺伝子発現の時系列分析

40

50

にもまた使用されている、音声信号処理で開発されたアルゴリズムである。標準的配列アライメントアルゴリズムと同様、DTWアルゴリズムの目標は、2組の時系列間の最良の適合するアライメントを見出すことである。DTWアライメントでの挿入および欠失は、該2時系列のいずれかの時間領域のジッターと解釈し得る(図32)。Blinkerシグナルの大多数は、大きなピーク逸脱を伴い散在されたバックグラウンドの低振幅変動よりなる(図30を参照されたい)。従って、タイムアライメントに関する情報密度は配列の大部分で低く、外的な規則性の制約(external regularity constraint)の追加を必要とする。予備データでは、時間領域のジッターが最大Q時間段階に制限された場合に単純な制約を実施し、ここでQはユーザー定義済みパラメータである(予備データでQ=2)。ローカルパスの連續性の制約(local path continuity constraint)のような他の制約もまた実施することができる。該形態の制約は交換条件を課す。強い制約が適用される場合、擬陽性の適合は、大量のジッター若しくは壊滅的なエラーをもつシグナル間の真の適合が見失われること(擬陽性)の危険が低下される。該アルゴリズムは、十分に定義された実験データの収集物から調整されることができる。

10

## 【0397】

上述された相/連結の問題により、包括的アライメントは、プローブと標的の間の適合を見出すための情報を与えることが期待されない。局所DTWアルゴリズムを、配列アライメントのためのSmith-Watermanのアルゴリズムと同様、コンピュータ計算した値が臨界値(シグナルを定数に適合させることからコンピュータ計算される)より下に下落する場合は常に動的プログラミング表の値をゼロに設定することにより実行した。

20

## 【0398】

Blinkerシグナルの適合の統計学的評価:プローブシグナルおよび標的シグナルを、CL-DTW手順を使用して一旦整列すれば、スコアを適合の質についてコンピュータ計算しなければならない。多くの可能な評価スキームが存在する。1つの可能性は、アライメント手順の評価スキームを直接使用することである。これはしばしば至適であることがありそうではなく;該アライメント手順の重要な目標は時間領域適合を得ることであり、そして同一の配列の基礎を有する2種のBlinkerシグナルの見込みを評価することではない。予備試行で、異なるスコア、とりわけ対角和(sum-of-diagonal)スコア、<sup>2</sup>加重スコア、およびフレームサイズにより除算される適合の数の使用を検討した。制限された組の実験データ内で、合理的性能が、局所アライメントの対角に沿った<sup>2</sup>加重距離値を必要とする評価スキームで見出された。該評価スキームは、付加的なBlinkerデータが多様な配列から一旦入手可能であれば、調整されることを継続することができる。

30

## 【0399】

最終出力について評価されるべき2種の付加的な統計学的手順が存在する。第一に、Blinkerシグナルの複数の測定値を、典型的に、同一プローブについて通常は異なる画像領域から得;従って、複製シグナルのそれぞれからのスコアを総適合スコアに集約しなければならない。正しい集約(summary)を見出すことの問題は、マイクロアレイ実験(例えばAffymetrixプラットフォーム)での複数のプローブからの発現レベル値を集約することに類似である。単順な一手段は、壊滅的なエラーおよび相/連結の問題の潜在性により、合理的であることがありそうではない。中央値、百分位数若しくはトリム平均のような確固たる推定量が必要とされる。予備データでは分布正規化値の95百分位数を使用した。より経験的なデータで、集約手順をさらに微調整することができる。第二に、標的のライブラリーを考えれば、「プローブXが確率Pで標的Yに適合する」という形態で結果を述べることができるような各適合スコアに信頼性値を割り当てることが望ましいことができる。これは適合スコアの確率モデルを必要とする。一般に、こうした確率モデルの分析的逸脱は可能でないことができる。経験的分布を、参照ヌル集団からの適合スコアのサンプリング(若しくは再サンプリング)に基づき生成することができ

40

50

る。予備データで、スコア値を、会合していない転写物の無作為収集物と比較した。潜在的に合理的なヌル分布は、標的生物体ゲノム（例えばラットゲノム）中の転写物の対を無作為にサンプリングすること、in silicoモデルを使用してBlinkerシグナルを生成すること、および適合スコアをコンピュータ計算することにより生成し得る。

#### 【0400】

これらのアルゴリズムを使用する予備in vitro Blinkerデータ解析：予備Blinkerシグナルを2種の鋳型、ACT（アクチン）およびPGE M（p-GEMベクター配列）から生成した。記述されるコンピュータモデルを使用して、該鋳型配列の双方のBlinkerシグナルのin silicoモデルを導出した。ヌル比較群（今後NULLと呼ばれる）を生成するため、マウスゲノムからの75種の転写物を無作為に選び、そしてこれらの転写物のin silico Blinker配列のライブラリーを生成した。

10

#### 【0401】

ACT若しくはPGE Mプローブの実験的Blinkerシグナルを、それぞれ独特の走査idにより示される多様な異なる条件下で生成させた（図33）。図33中でペプチド1、2および3と示される使用した検出体分子は、図12に描かれるそれぞれ上3種の検出体分子に対応する。全5種のキメラT7 RNAポリメラーゼの混合物を使用した。各走査内で25種の異なる目的領域（ROI）を選択し、各走査について25の複製測定値を生じた。走査内の各ROIを合計10分間、100の時間間隔についてサンプリングした。1走査内の25のROIデータのそれぞれを、記述された拘束局所動的時間伸縮（CL-DTW）アルゴリズムを使用して、ACT、PGE MおよびNULLのin silico Blinkerシグナルに適合させた。（各in silicoシグナルを多様な相で生成させ、そして、実験的に測定したポリメラーゼ処理能力から時間間隔を較正した。）

20

#### 【0402】

各実験シグナルについて、ACTおよびPGE Mに対する適合スコアをNULL適合スコアに比較し、そして該スコアがNULL適合スコアの上95%内にあった場合にのみ維持した。ACTおよびPGE Mの適合スコアの相対比を、合計25（まで）の複製log（ACT/PGE M）値についてlog（ACT/PGE M）としてコンピュータ計算した。（大部分の走査は、スコアがヌル分布への比較を失敗したため実質的により少ない複製値を有した。）複製スコアを、ACT帰属に好都合な最良の値（正の値）およびPGE M帰属に好都合な最良の値（負の値）について検査した。該2種の最良値間の差違が臨界値を超えた（すなわち、一方若しくは他方の帰属の十分な裏付けが存在した）場合、該最良値を使用して、ACT若しくはPGE Mを適合させるように実験走査を呼び出した。臨界値が超えなかった場合、若しくは複製物のいずれもヌルの95%より良好な適合スコアを生じなかった場合、帰属を与えなかった。

30

#### 【0403】

図33は、12の決定および2の決定なし（走査5および18）を生じる14の走査についてのこの手順の結果を示す。12の決定について、9の正しい結果（走査1、2、6、10、13、14、25、26および30）ならびに3の正しくない結果（走査17、22および29）が得られた。二項分布および正しい呼び出しの50%の確率を想定すれば、12回の試行で偶然9若しくはそれ以上の正しい呼び出しを得ることの確率は0.019であり、実験的プローブ値を統計学的有意性を伴い正しい鋳型に帰属し得ることを示唆する。現在の結果は、同一データセットでの検出アルゴリズムのパラメータを微調整することにより得られ、従ってp値は注意を伴い解釈されなければならない。新たな実験が、訓練および試験のための独立のデータセットを使用して該アルゴリズムを調整するであろう。

40

#### 【実施例5】

#### 【0404】

差別的に刺激したニューロンにおけるin vivo RNAプロファイリング

50

本発明の *in vivo* 検出体分子は、CPP、-PAK配列 (Manserら、1998、Mol. Cell 1:183-192)、核局在化配列、リンカーおよびPNAを含んでなる。核局在化配列は検出体分子を核に向けるのに必要である。検出体分子の細胞および核に進入する能力は、多様な形態学的部位の転写パターンを評価し得るように刺激されるニューロンおよび当該技術分野で既知の他の細胞中の核転写の *in vivo* 検出を可能にする (図24)。

## 【0405】

*in vivo* 転写の検出は、生存細胞中への検出体分子の導入を必要とする。これは細胞透過性ペプチドを使用して達成される。CPPを含んでなるペプチドの分類は当該技術分野で公知である (Hallbrinkら、2001、Biochim. Biophys. Acta. 1515:101-109; Jarver、2004、Drug Discov. Today 9:395-402; Poogaら、2001 Curr. Cancer Drug Targets 1:231-239; Poogaら、2001、FASEB J. 15:1451-1453; Poogaら、1998、FASEB J. 12:67-77)。CPPは細胞膜を横断し、そして神経細胞の細胞体および樹状突起中に集中する。これらのデータは、CPPが生存ニューロンに輸送することができる事を示す最初のものであり、かつ、CPPを結合した検出体分子が本発明での使用のため細胞に浸透し得ることを示す。

## 【0406】

細胞への検出体分子の導入は、CPPの固有の特性を使用して達成し得るか、若しくは、あるいは、外因性のmRNA、タンパク質若しくはDNAが選択された細胞中に拡散し得るように一緒に細胞膜に一過性の孔を形成するためのレーザーパルスを使用して細胞に導入し得る。中核技術は、mRNA、または生存細胞の機能を改変するための他の遺伝物質若しくは遺伝子以外物質の適用と一緒に細胞膜に一過性の孔を導入するための高エネルギー・パルスレーザーの使用よりなる。予備実験は、該アッセイが、RNA翻訳により観察されるとおり細胞中への一過性RNA導入で100%効率的であることを示す。

## 【0407】

とりわけ、2種の独立のレーザー (一方は光穿孔のため、他方は画像化のため) を使用し、そしてそれらのビームを共通の顕微鏡ヘッドにより組合せる。これは細胞野の可視化および光穿孔の領域の選択を可能にする。光穿孔の間、細胞外色素若しくは標識がmRNAとともに包含され、光穿孔の成功について即時のフィードバックを可能にする。

## 【0408】

DNA若しくはRNAをニューロンに導入することは特徴上極めて困難である。光穿孔をmRNA適用と組み合わせる場合、コードされるタンパク質の慣例の発現が可能である。一例として、GPF mRNAを、培養海馬ニューロンの生理的食塩水浴 (bathing saline) に導入する。細胞を、2光子画像化と一緒に細胞外造影剤 Alexa 568の存在を使用して画像化する。選択すべき細胞を同定した後に、光穿孔パルスを、細胞外色素およびmRNAを細胞に進入させるための細胞の孔形成に短時間に至る別個のレーザー (720nm) から送達する。細胞は Alexa 色素で即座に標識され、そして後の時間で該mRNAによりコードされるタンパク質を発現する。この光穿孔のアプローチは反復して成功裏と判明しており、そして細胞に検出体分子を送達するのに使用し得る。

## 【0409】

レーザー励起のエネルギー、励起時間および検出体分子の濃度を変動させることは、検出体分子の細胞内進入を可能にすることができる。光穿孔はマイクロ秒で起こるため、検出体分子上の蛍光部分の光退色は一因子となるはずはない。

## 【0410】

リアルタイム *in vivo* 転写分析が起こるはずである細胞若しくは組織を、細胞若しくは組織中でキメラRNAポリメラーゼを発現するようにトランスフェクトし得る。Gateway クローニング系にクローニングしたキメラRNAポリメラーゼを、CMV 哺乳

10

20

30

40

50

動物プロモーターを含有する哺乳動物発現ベクターに往復させる (shuttled)。これはその制御下で導入遺伝子の高レベルの発現を生じさせる強力なプロモーターである。内因性 RNA ポリメラーゼに対するキメラ RNA ポリメラーゼの相対比は、核転写を検出する能力に対する影響を有することができる。多すぎる内因性ポリメラーゼが存在する場合には、キメラ RNA ポリメラーゼは活性化された遺伝子に結合しないかも知れない一方、内因性 RNA ポリメラーゼに関して多すぎるキメラ RNA ポリメラーゼが存在する場合、単一遺伝子にシグナルが分散していくてもよく (1 遺伝子に複数の RNA ポリメラーゼ)、解釈不可能な明滅シグナルを生じる。生物情報科学分析は特異的シグナルの同定において補助することができる。加えて、トランスフェクトされた細胞中で作成されたキメラ RNA ポリメラーゼの量は、本明細書に開示される他のプロモーターを使用することにより、若しくは、限定されるものでないが Tet-on プロモーター系 (Chon tech、カリフォルニア州パロアルト) のようなテトラサイクリン / ドキシサイクリンで誘導可能なプロモーターを挙げることができる誘導可能なプロモーターを使用することにより、滴定し得る。

10

## 【0411】

検出体分子が細胞により一旦取り込まれれば、サンプルを画像化し得る前に転写明滅シグナルが生成されうる。結果、明滅が協調した様式で起こり得るよう、転写過程を遅らせることが必要でありうる。これが必要である場合には、培養物を 37 から 2 の増分だけより低い温度に冷却して、転写を検出する能力と、細胞を生理学的に生存可能かつ刺激に応答性に保つのに必要な温度の間の適正な均衡を決定する。

20

## 【0412】

細胞核内の検出可能な明滅シグナルの画像化は、焦点面の迅速な操作を必要とすることがあり、これは、高度に感受性の背面照射型増倍ゲインカメラ (Cascade 512 B カメラ、Photometrics、アリゾナ州トゥーソン) の使用で補助し得る。

## 【0413】

in vivo 検出体分子からの FRET シグナルは、蛍光部分間のスペーサー領域の長さに依存し得る。直鎖状 - ヘリックスでは、10 ~ 20 アミノ酸の距離が FRET が起こるのに理想的であるようである。より短いスペーサー領域は、FRET を可能にしつつ、蛍光極性の差違を検出する能力を増大する。FRET 検出に加えて、本発明の検出体分子は、蛍光分極の差違の検出を可能にする (Bell et al. 2002, Biophys. J. 83: 1050 - 1073; Hausteinら, 2004, Curr. Opin. Struct. Biol. 14: 531 - 540, van der Heideら, 2000, Biophys. J. 78: 2138 - 2150)。蛍光極性は、2 個の蛍光分子が本質的にそれらの共鳴性環構造の平面的相互作用により相互作用する場合に検出可能である。单一共有結合の周囲を自由に回転する 2 個の蛍光部分は、スタッキングエネルギーを増大させるようにそれら自身の方向を定めることができ、そして、これが混乱される場合に分極の変化が観察される。蛍光分子の一方に対しより大きい安定性が存在する場合、分極シグナルが増大されかたノイズが低減される。本発明の検出体分子、とりわけ in vivo 応用で使用される検出体分子は、本明細書の別の場所に開示されるところの 2 個の連結によりペプチドに共有結合された蛍光分子を含み得る。この蛍光化合物は、例えば、細胞骨格タンパク質の動きにより蛍光極性で誘導される変化を評価するために当該技術分野で広範に使用されているビス - (N - ヨードアセチル (ピペラジニル) スルホンローダミンであり得る。

30

## 【0414】

本明細書で引用されるそれぞれおよびすべての特許、特許出願および刊行物の開示は、ここにそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

40

## 【0415】

本発明は特定の態様に関して開示された一方、本発明の他の態様および変形物が、本発明の真の技術思想および範囲から離れることなく当業者により考案されうることが明らかである。付随する請求の範囲は、全部のこうした態様および同等の変形物を包含すると解

50

釈されることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0416】

本発明を具体的に説明する目的上、本発明のある態様を図面に描く。しかしながら、本発明は、図面に描かれる態様の正確な配置および手段に制限されない。

【図1】図1Aおよび1Bを含んでなり、多様な検出体分子のアミノ酸配列およびペプチド核酸(PNA)配列を描く像である。図1Aにおいて、下線を付けた部分は、上から下へそれぞれ配列番号45、52、53および54である。二重下線を付けた部分は核局在化シグナル(NLS)を含有する配列番号55である。図1Bにおいて、下線を付けた部分は、上から下へ配列番号34～37である。F1uo=フルオレセイン。gtg=ペプチド核酸(PNA)。BSR=ビス-((N-ヨードアセチル)ピペラジニル)スルホンローダミン。CPP=細胞透過性ペプチド。

【図2】図2Aおよび2Bを含んでなり、多様な検出体分子のアミノ酸配列およびPNA配列を描く像である。図2Aにおいて、下線を付けた部分は、上から下へ配列番号55、56、57および58である。二重下線を付けた部分はNLSを含有する配列番号55である。そのN末端にシステインを附加させたTP10は、下線を付けた配列中のシステインにジスルフィド結合されている。図2Bにおいて、下線を付けた部分は、上から下へ配列番号38および39である。F1uo=フルオレセイン。gtg=ペプチド核酸(PNA)。CPP=細胞透過性ペプチド。

【図3】シグナリング部分(五角形および正方形により表される)、検出体結合ドメインに結合されたキメラRNAポリメラーゼ結合ドメイン(CRPBD)、ペプチド核酸(PNA；橙円)および細胞透過性ペプチド(CPP)を包含する検出体分子の図解である。

【図4】キメラRNAポリメラーゼの検出体結合ドメイン(薄灰色長方形)に結合されかつDNA分子(細長い垂直の長方形)の転写を検出する検出体分子の図解を描く像である。一連の橙円は產生された新生RNA分子を表す。

【図5】検出体分子の相補PNAに結合する新生RNA分子およびDNAの転写を検出するシグナルを発する検出体分子の図解を描く一連の像である。黒十字は、検出体分子のPANが新生RNA分子の一部分に結合する場合に発生する明滅を示す。

【図6】検出体分子の相補PNAに結合する新生RNA分子の非存在下での検出体分子中の消光されたシグナル部分(囲みおよび橙円)の図解を描く像である。

【図7】検出体分子の相補PNAに結合する新生RNA分子の存在下でシグナルを発するシグナル部分の図解を描く像である。

【図8】検出体分子を特異的に結合するキメラRNAポリメラーゼによるDNA分子の転写の検出の図解を描く像である。検出体分子に結合されたPNAは新生RNA分子に相補的であり、かつ、新生の転写されたRNA分子を結合して、検出されるシグナリング部分からシグナルを発し、それによりDNA分子の転写を検出する。

【図9】キメラRNAポリメラーゼと相互作用する検出体分子の図解を描く像である。下線を付けたアミノ酸は、キメラRNAポリメラーゼ中のSH3ドメインに結合する検出体分子中の-PAKドメインである。PNA(gtg)はG TGオリゴヌクレオチドがすると同一の相補配列を結合し、そして従って新生RNA中のCAC配列に結合する。検出体分子は配列番号40を含んでなる。TAMRA=テトラメチルローダミン。F1uo=フルオレセイン。

【図10】ペプチドL606をもたらす、ペプチドL604とL605の間の天然の化学的連結(NCL)を描く像である。ペプチドL604は配列番号41を含んでなり、L605は配列番号42を含んでなり、そしてL606は配列番号40を含んでなる。F1uo=フルオレセイン。TAMRA=テトラメチルローダミン。

【図11】ペプチドと、そのN末端に3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)活性化されたシステインを含有する細胞透過性ペプチド(CPP)TP10の間のジスルフィド形成を描く像である。

【図12】明滅するシグナル伝達のin vitro検出のための複数連結された検出体

10

20

30

40

50

分子を描く像である。下線を付けた部分は、上から下へ、それぞれ配列番号 4 3、4 0、4 4、4 5 および 4 6 である。F l u o = フルオレセイン。g t g = ペプチド核酸 (P N A)。T A M R A = テトラメチルローダミン。上 3 種の検出体分子を合成した (実施例 2 を参照されたい)。

【図 13】図 13 A および 13 B を含んでなり、明滅するシグナル伝達の in vivo 検出のための複数連結された検出体分子を描く像である。図 13 A において、下線を付けた部分は、上から下へ配列番号 5 9、6 0、4 0 および 4 4 である。二重下線を付けた部分は、N L S を含有する配列番号 5 5 である。その N 末端にシステインを付加させた T P 1 0 は、下線を付けた配列中のシステインにジスルフィド結合する。図 13 B において、下線を付けた部分は、上から下へそれぞれ配列番号 4 7 ~ 5 0 である。T P 1 0 に付加された追加の N 末端システインが図 13 B で検出体分子中に描かれる。F l u o = フルオレセイン。T A M R A = テトラメチルローダミン。B S R = ビス - ((N - ヨードアセチル) ピペラジニル) スルホンローダミン。g t g = ペプチド核酸 (P N A)。

【図 14】粗ペプチド L 6 0 4 の高速液体クロマトグラフィー (H P L C) スペクトルの像である。

【図 15】ペプチド L 6 0 4 の正しい H P L C 画分のマトリックス支援レーザー脱離飛行時間型 (M A L D I - T O F) 質量スペクトルの像である。

【図 16】粗ペプチド L 5 6 4 の H P L C スペクトルの像である。

【図 17】ペプチド L 5 6 4 を含有する H P L C 画分の M A L D I - T O F 質量スペクトルの像である。m / z 2 2 8 2 . 7 および 2 3 0 3 . 7 のピークはそれぞれペプチド L 5 6 4 およびナトリウムを伴う L 5 6 4 に対応する。

【図 18】粗ペプチド L 6 0 5 の H P L C スペクトルの像である。

【図 19】ペプチド L 6 0 5 を含有する画分の M A L D I - T O F 質量スペクトルの像である。

【図 20】粗ペプチド L 5 7 5 の M A L D I - T O F 質量スペクトルの像である。

【図 21】ペプチド L 6 0 6 を生じる、ペプチド L 6 0 4 と L 6 0 5 の間の N C L の H P L C スペクトルの像である。

【図 22】ペプチド L 6 0 6 を含有する H P L C 画分の M A L D I - T O F 質量スペクトルの像である。m / z 4 8 3 8 . 5 および 2 4 1 9 . 7 のピークはそれぞれ単一および二重に荷電したペプチド L 6 0 6 に対応する。

【図 23】マイクロアレイ支持体上での m R N A の検出を描く図である。マイクロアレイ結合部分 (濃い楕円)、T 7 R N A ポリメラーゼプロモーター部位 (濃い長方形) および制限酵素部位を含んでなるオリゴヌクレオチドをアレイに結合し、そして制限酵素で消化した c D N A に連結する。キメラ R N A ポリメラーゼおよび検出体分子の複合体を添加する。

【図 24】検出体分子およびキメラ R N A ポリメラーゼによる転写の in vivo 検出を描く図である。

【図 25】S H 3 ドメイン配列番号の核酸 (配列番号 2) およびアミノ酸配列 (配列番号 4) の像である。

【図 26】T 7 ポリメラーゼの核酸配列 (配列番号 1) の像である。

【図 27】T 7 ポリメラーゼのアミノ酸配列 (配列番号 3) の像である。

【図 28】- P A K ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 5) の像である。

【図 29】一連の 2 像である。左の像は、多様なキメラ T 7 R N A ポリメラーゼ構築物から発現されたタンパク質のサンプルの変性タンパク質ゲルを描く。N L = スペーサーペプチドなし。0 P = 1 個のプロリンを含むスペーサーペプチド。1 P = 2 個のプロリンを含むスペーサー。3 P = 3 個のプロリンを含むスペーサーペプチド。B S A = ウシ血清アルブミン。F L A G - C T C = F L A G エピトープ標識対照 (T 7 R N A ポリメラーゼなし)。p A R 1 2 1 9 = 検出体結合ドメインを伴わない T 7 R N A ポリメラーゼを発現する発現ベクター。M W マーカーの分子量をゲルの像の隣に示す。右の像は、キメラ T 7 R N A ポリメラーゼを使用する転写アッセイの 0 分および 3 0 分の結果を描く。E

10

20

30

40

50

P I = 未改変 T 7 RNA ポリメラーゼ ( E P I C E N T R E ( R ) T e c h n o l o g i e s 、 ウィスコンシン州マディソン)。「0」と標識された一番上の行は、転写反応に RNA ポリメラーゼが添加されておらず、そしてバックグラウンド対照としてはたらく。

【図 30】 B l i n k e r 検出体分子をスポットしたマイクロアレイおよび検出されたシグナルの代表的グラフを描く一連の像である。左の像はマイクロアレイのものである。6 個の大きな白色円は蛍光方向マーカーである。マイクロアレイ上の円で囲まれた領域の拡大像を右上に描く。1 スポットからの蛍光 B l i n k e r 強度シグナルを、右下のグラフで時間の関数として描く。

【図 31】 B l i n k e r シグナル ( 実線 ) 、および元のシグナルを異なるサンプリング間隔 ( 縦の点線により示す ) 内で積分した場合の期待されるシグナル ( 破線 ) のモデルを描く。白丸は積分したシグナルから得た値を示し、そして黒丸は元のシグナルから得た値を示す。積分したシグナルは、移相の問題に対しより少なく感受性であると期待される。

P M T = 光電子増倍管。 C C D = 電荷結合デバイス。

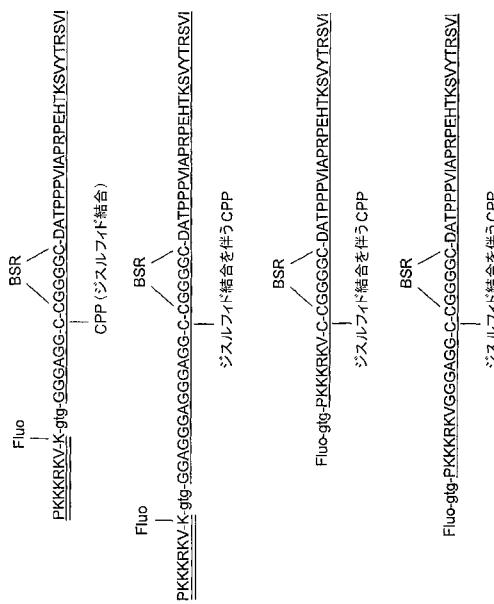
【図 32】 变動する程度の時間拡張を見込む、2 つの時系列 ( 破線 ) 間の拘束局所動的時間伸縮アルゴリズムによる代表的アライメントを描く。

【図 33】 in vitro B l i n k e r シグナルの解析に基づく D N A 同一性の予測の結果を描く。「 s c a n 」は走査した B l i n k e r スポットを指す。「 p e p t i d e 」は、シグナル部分のフルオロフォア間の距離により変動する、使用した 3 種の異なる B l i n k e r 検出体分子の 1 種である。「 l i n k i n g 」は D N A の固定のためのスライドガラス上のコーティングの種類である。「 e x c i t a t i o n 」は蛍光励起エネルギーである。「 D N A 」はマイクロアレイにスポットした D N A の同一性である。「 D a t a C a l l 」は B l i n k e r 分析後に D N A に帰属される I D である。

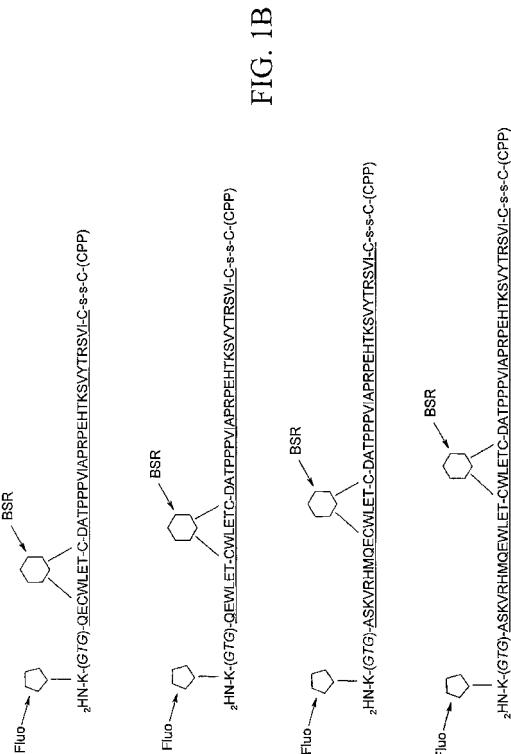
10

20

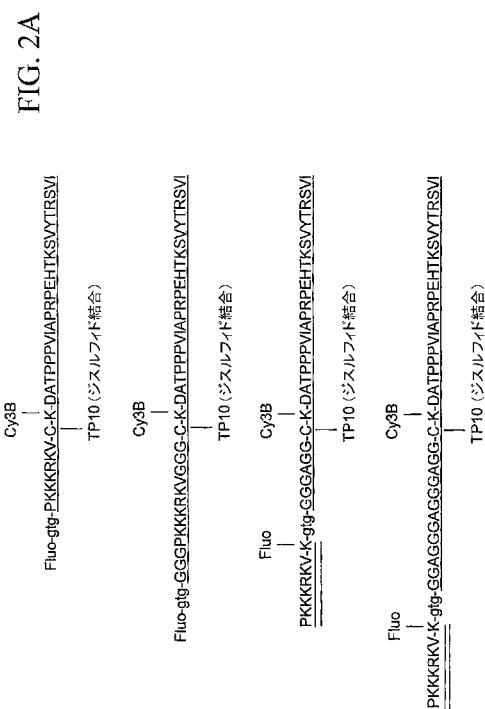
【図 1 A】



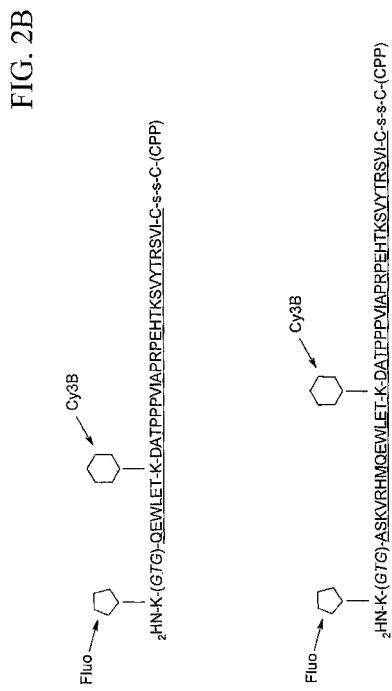
【図 1 B】



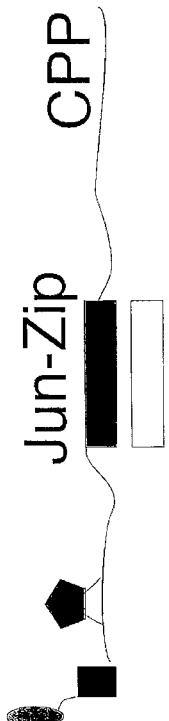
【図 2 A】



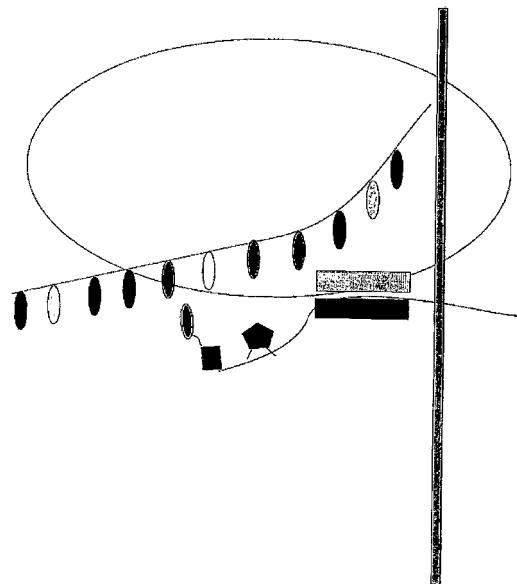
【図 2 B】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

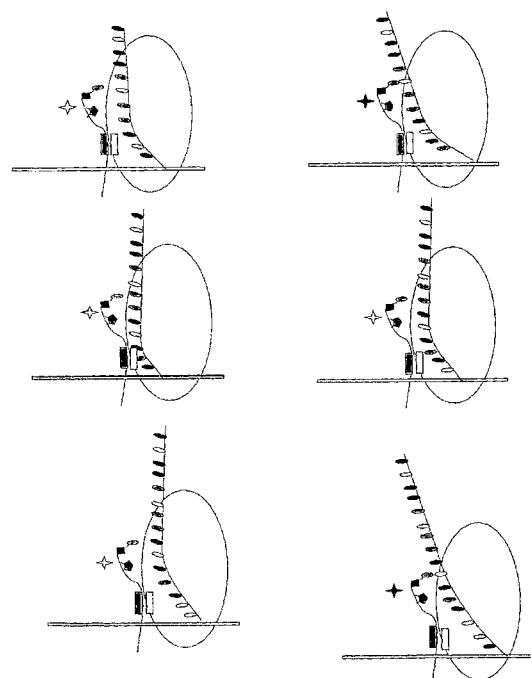
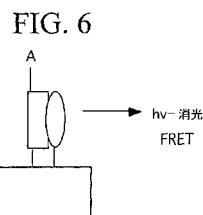
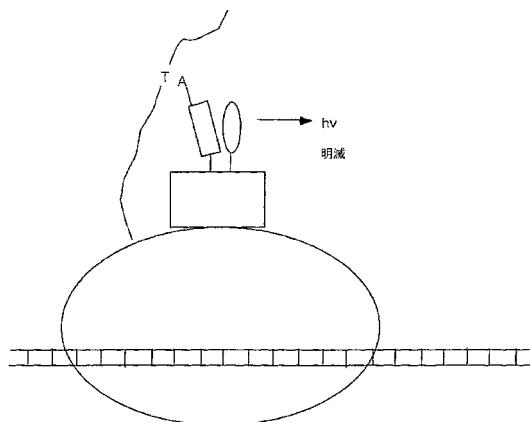


FIG. 5

【図 6】



【図 7】



【図 8】

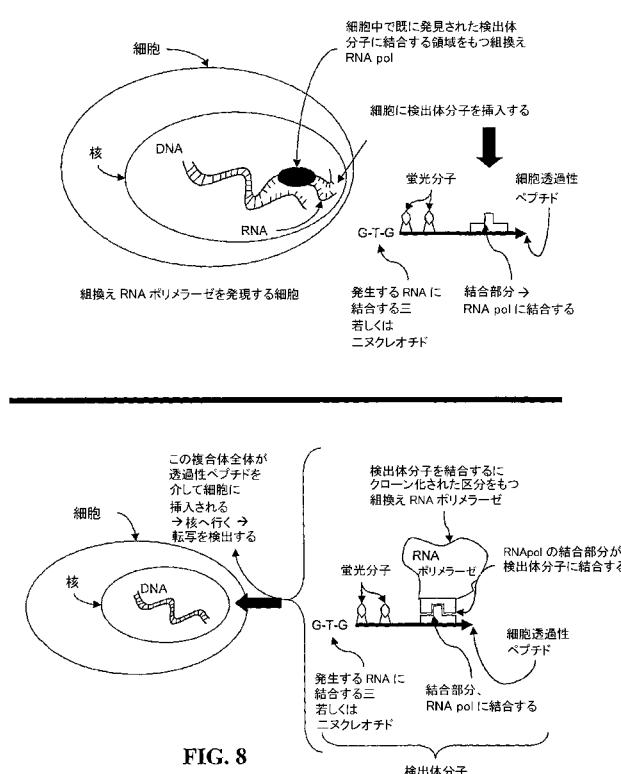


FIG. 8

【図 9】

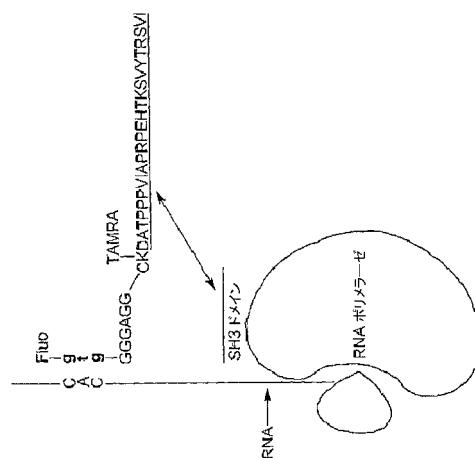


FIG. 9

【図 10】

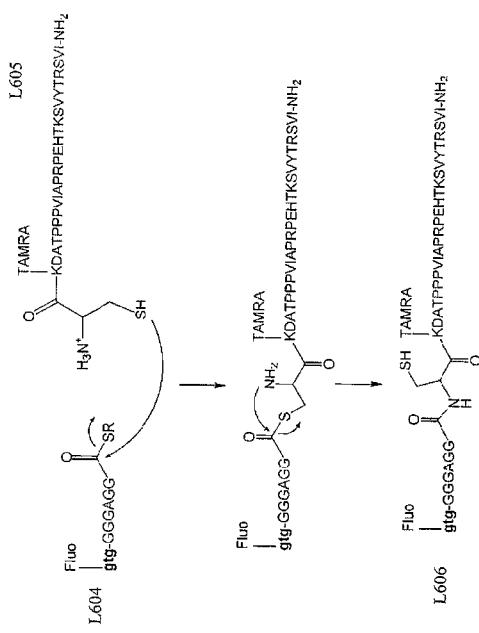


FIG. 10

【図 11】

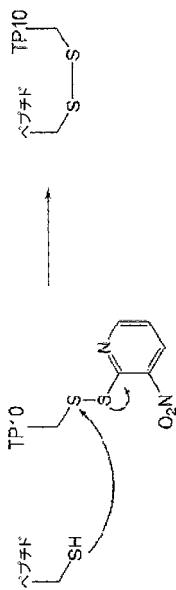


FIG. 11

【図 12】

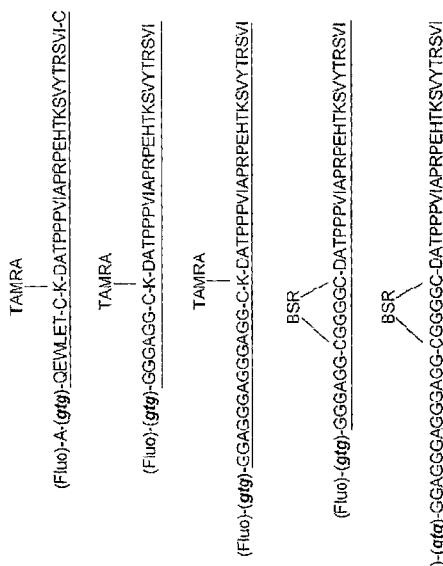


FIG. 12

【図 13 A】

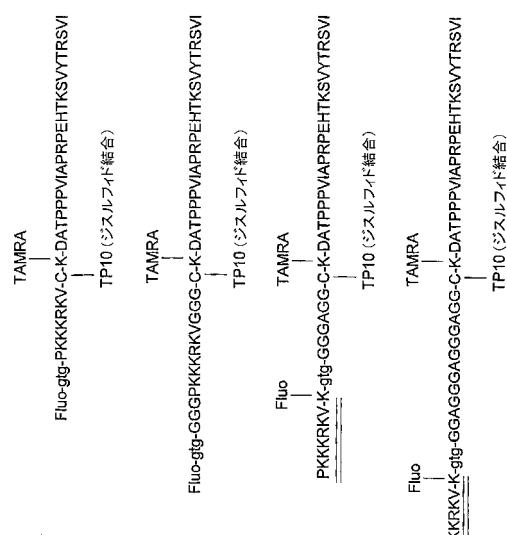
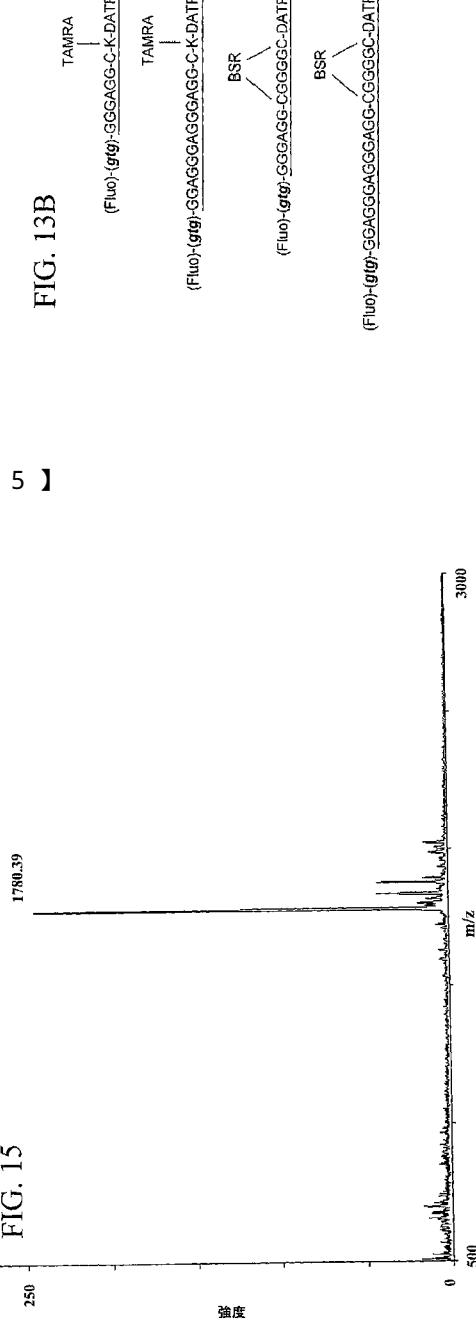
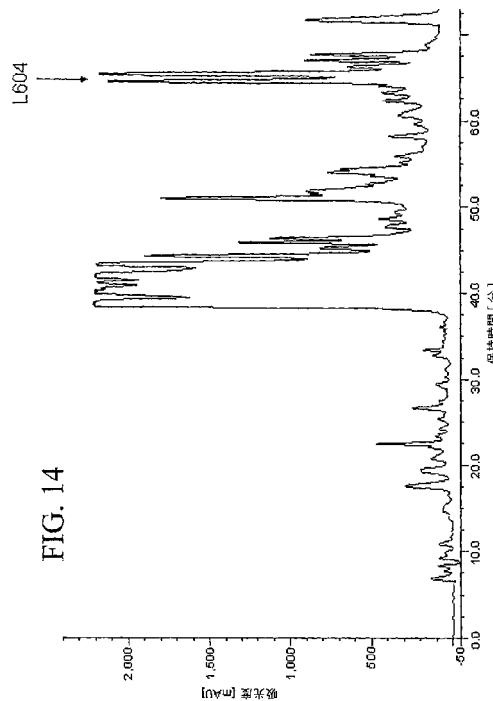


FIG. 13A

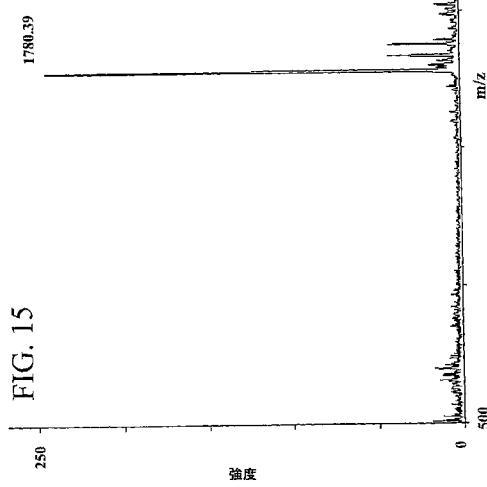
【図 13B】



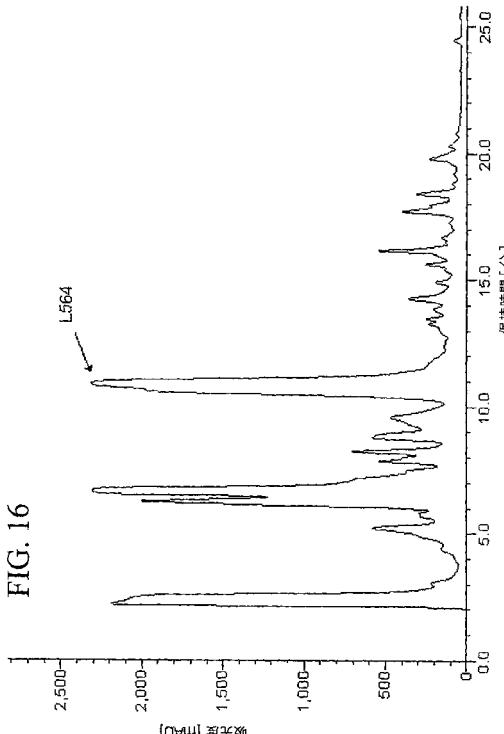
【図 14】



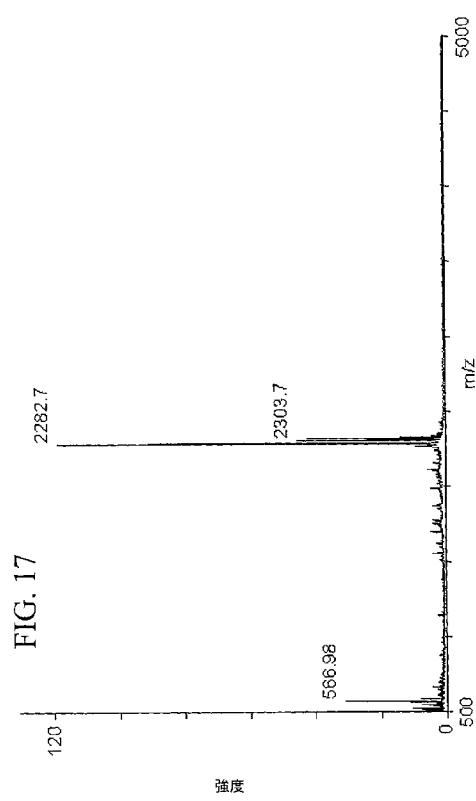
【図 15】



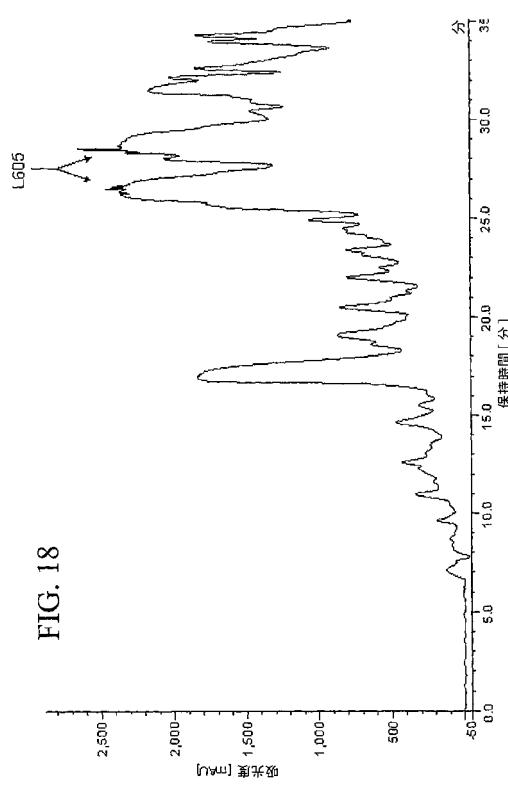
【図 16】



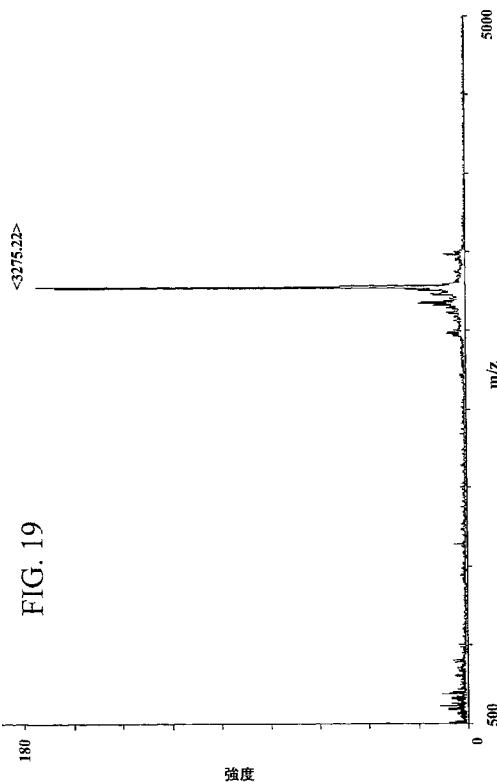
【図 17】



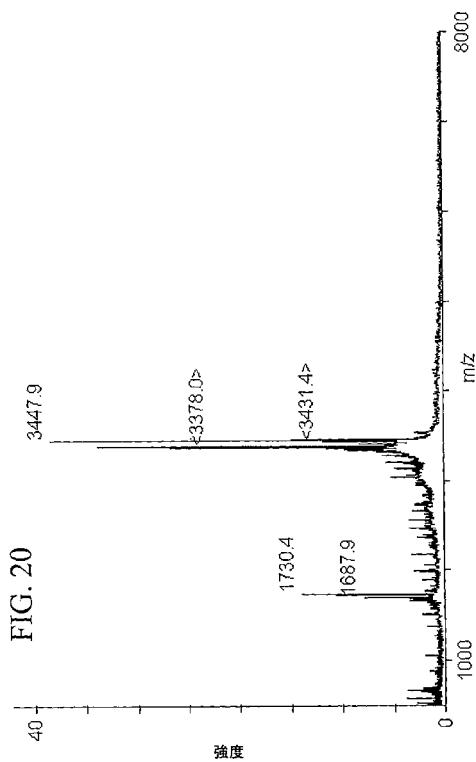
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【図 2 1】

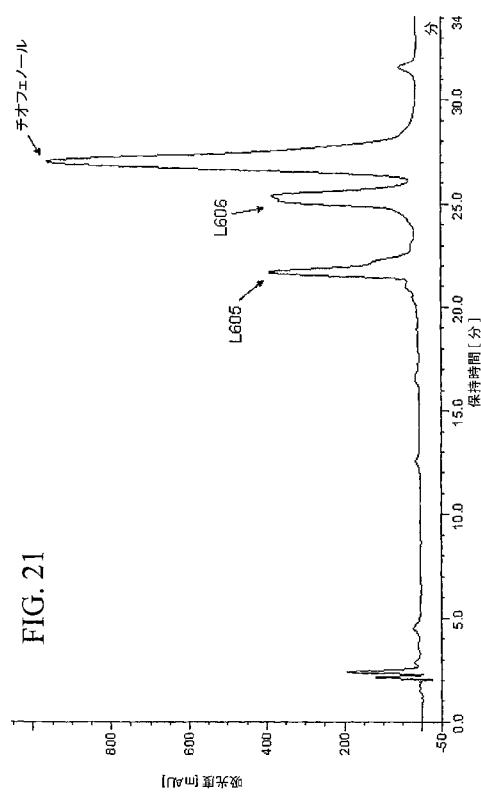


FIG. 21

【図 2 2】

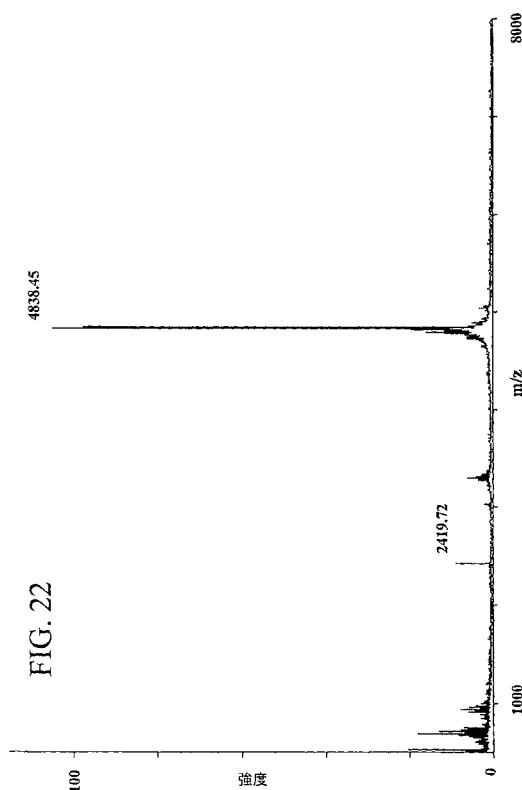


FIG. 22

【図 2 3】

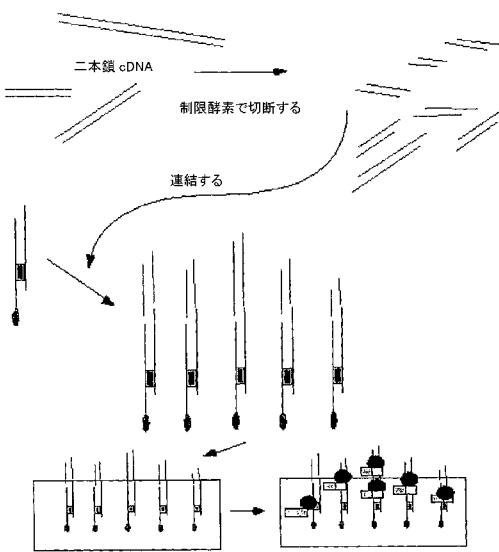


FIG. 23

【図 2 4】

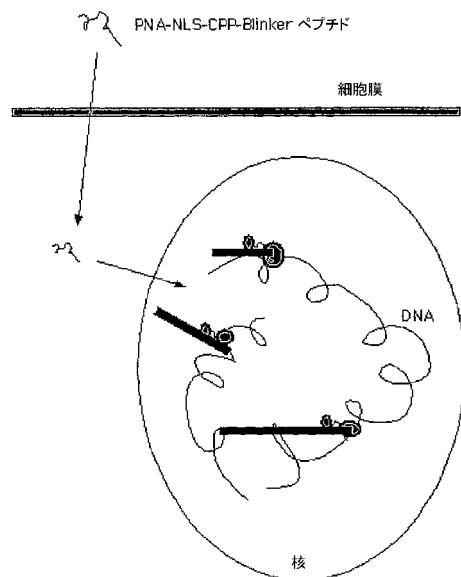


FIG. 24

【 図 2 5 】

atgactgata acgccaaacag ccaactggta gtacgagcca  
agttaactt ccagcagacc aatgaagatg agctctccctt  
ctcgaagggt gacgtcatcc atgtcactcg agtggaggaa  
ggaggcgtt gggaaaggcac acacaatggc aggaccggct  
ggttccccag caactacgta cgagagatc

MTDNANSQLVVRAKFNFQQTNE  
DELSFSKGDVIHVTRVEEGGWW  
EGTHNGRTGWFPSNYVREI

FIG. 25

【 図 27 】

【 図 2 8 】

DATPPPVIAPRPEHTKSVYTRSVI

FIG. 28

【 図 2 6 】

FIG. 26

【 図 29 】

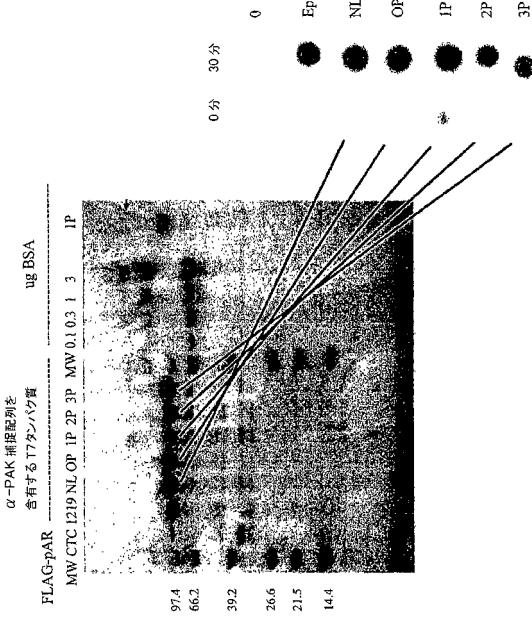


FIG. 29

【図 3 0】

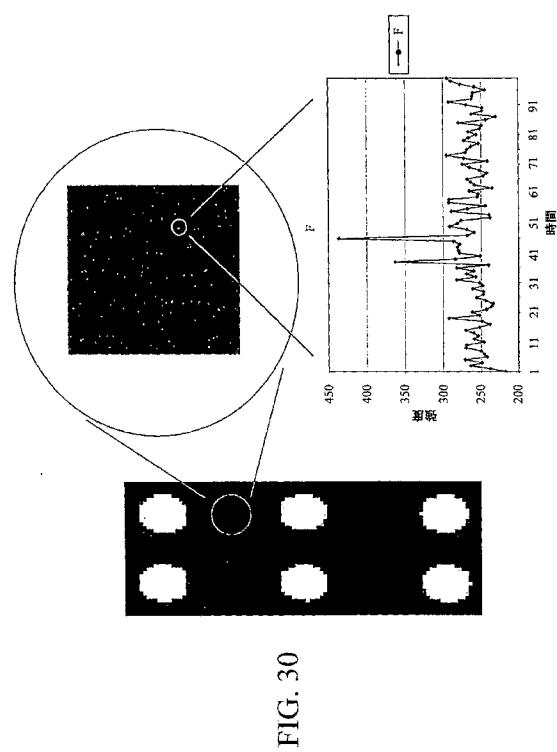


FIG. 30

【図 3 1】

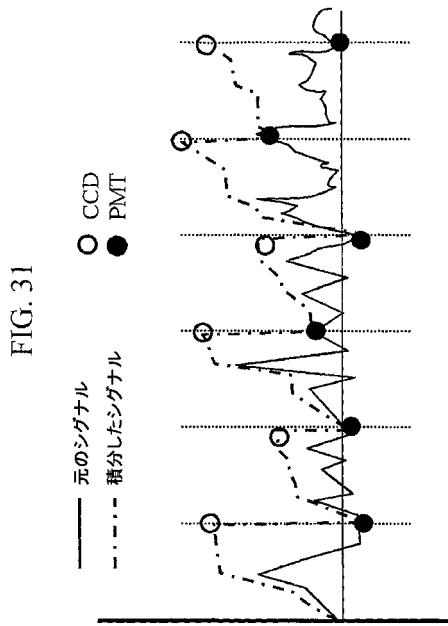


FIG. 31

【図 3 2】

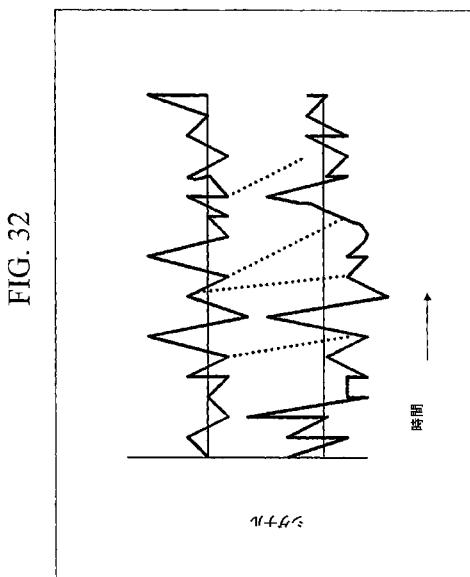


FIG. 32

【図 3 3】

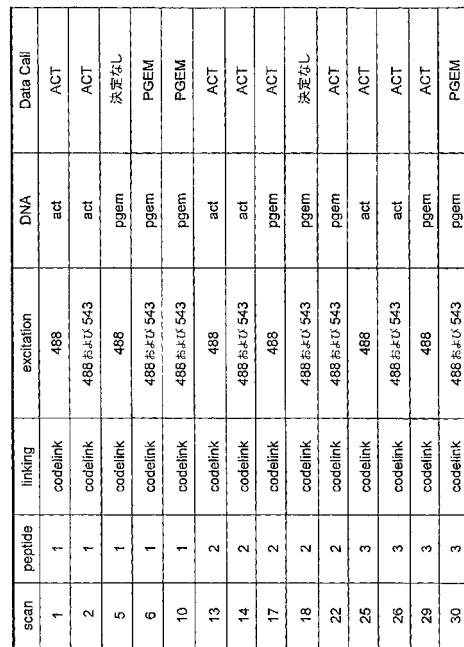


FIG. 33

【配列表】

2008545394000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/19107
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8): C12Q 1/68( 2006.01);C12N 15/63( 2006.01),15/85( 2006.01),1/21( 2006.01);C07K 14/00( 2006.01),16/00( 2006.01);C07H 21/04( 2006.01)		
USPC: 435/6,320.1,252.3,325;536/23.1;530/350,387.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 320.1, 252.3, 325 ; 536/23.1;530/350, 387.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHENA et al., "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, October 1996, Vol. 93, pages 10614-10619.	1-175
A	VELCULESCU et al., "Serial Analysis of Gene Expression", Science, 20 October 1995 (20.10.1995), Vol. 270, pages 484-487.	1-175
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> 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 "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "C" 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) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"F" 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 "G" 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 "H" 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 "I" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 03 February 2007 (03.02.2007)		Date of mailing of the international search report <b>26 FEB 2007</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer <b>Nancy T. Vogel</b> Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US06/19107
---

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
EAST, STN  
search terms: real-time, transcription, chimeric, RNA polymerase, detection, signal, PNA, binding domain

## 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 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C

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

(72)発明者 エイリクスデットイル, エメリア

スウェーデン・エス-17070ソルナ・ストックホルム・キングスハムラ73ビー

(72)発明者 ペリツ, テイナ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19119 フィラデルフィア・アパートメントデ-6・ウエスト  
ホルターストリート 501

(72)発明者 スル, ジヤイ-ヨーン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19020 ベンサレム・サンダーサークル 209

(72)発明者 ヘイドン, フィリップ・ジー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19072 ナーバース・マーウィンロード 510

(72)発明者 キム, ジュンヒュン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19072 ナーバース・モンゴメリーアベニュー 1134

F ターム(参考) 2G054 AA06 CA22 CE02 EA03

4B024	AA11	BA07	BA80	CA01	CA11	DA02	GA11	HA12	HA20
4B063	QA01	QA18	QQ52	QR32	QR56	QR66	QS34	QS36	QX02
4B065	AA87Y	AB01	AC20	BA02	CA23	CA24	CA25	CA46	
4H045	AA10	AA11	BA10	CA11	CA40	DA86	DA89	EA50	FA74