

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成30年10月18日(2018.10.18)

【公表番号】特表2017-533181(P2017-533181A)

【公表日】平成29年11月9日(2017.11.9)

【年通号数】公開・登録公報2017-043

【出願番号】特願2017-514354(P2017-514354)

【国際特許分類】

C 07 K	19/00	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 Q	1/02	(2006.01)
C 12 Q	1/66	(2006.01)
G 01 N	33/532	(2006.01)
C 12 N	9/02	(2006.01)

【F I】

C 07 K	19/00	Z N A
C 12 N	15/00	A
C 12 Q	1/02	
C 12 Q	1/66	
G 01 N	33/532	B
C 12 N	9/02	

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月4日(2018.9.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

N末端断片と、C末端断片と、内部タグとを含むポリペプチドであって、前記内部タグが、対象とするタンパク質の中に挿入された配列番号2との100%未満かつ30%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記内部タグが配列番号440のポリペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、前記ポリペプチド。

【請求項2】

前記N末端断片及び/又は前記C末端断片が、少なくとも20アミノ酸の長さである、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

前記内部タグの前記アミノ酸配列が、表1のペプチドから選択される、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

前記N末端断片と前記C末端断片とが、前記内部タグの非存在下で直接連結される場合、対象とする第1のタンパク質の配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】

請求項1に記載のポリペプチドをコードする配列を含む、核酸。

【請求項6】

(a) 請求項1に記載のポリペプチドと、

(b) 配列番号 440との100%未満かつ30%を超える配列同一性を有する相補体ポリペプチドを含む第2のポリペプチドと、
を含む、生物発光複合体。

【請求項7】

前記内部タグ及び前記相補体ポリペプチドが、互いに低親和性を有する、請求項6に記載の生物発光複合体。

【請求項8】

前記第2のポリペプチドが、対象とする第2のタンパク質との融合体であり、前記融合体が、内部融合体又は従来の融合体であってもよく、更に前記対象とする第2のタンパク質が、前記N末端断片及び/又は前記C末端断片のすべて又は一部に対して高親和性を有してもよい、請求項7に記載の生物発光複合体。

【請求項9】

前記第2のポリペプチドが、対象とする分子に連結されている、請求項7に記載の生物発光複合体。

【請求項10】

前記N末端断片及び/又は前記C末端断片のすべて又は一部が、前記対象とする分子に対して高親和性を有する、請求項9に記載の生物発光複合体。

【請求項11】

セレンテラジン基質を更に含む、請求項6に記載の生物発光複合体。

【請求項12】

前記内部タグ及び前記相補体ポリペプチドが、互いに高親和性を有する、請求項6に記載の生物発光複合体。

【請求項13】

前記第2のポリペプチドが、融合ポリペプチドではないか、又は対象とする分子に連結されていない、請求項6に記載の生物発光複合体。

【請求項14】

前記相補体ポリペプチドの前記アミノ酸配列が、表2のペプチドから選択される、請求項6に記載の生物発光複合体。

【請求項15】

N末端断片と、C末端断片と、2つ以上の内部タグとを含むポリペプチドであって、前記内部タグが、対象とするタンパク質の中に挿入された配列番号2との100%未満かつ30%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記内部タグの1つ以上が配列番号440のポリペプチドに接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、前記ポリペプチド。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

上記明細書で言及された出版物及び特許はすべて参照によって本明細書に組み入れられる。本発明の記載されている方法及び系の種々の改変及び変化は本発明の範囲及び精神から逸脱することなく当業者に明らかであろう。本発明は特定の実施形態と関連して記載されているが、請求されるような本発明はそのような特定の実施形態に過度に限定されべきではないことが理解されるべきである。実際、関連する分野の当業者に自明である本発明を実施するための記載されている方法の種々の改変は本発明の範囲内にあるように意図されている。

本発明の好ましい態様は、下記の通りである。

[1] N末端断片と、C末端断片と、内部タグとを含むポリペプチドであって、前記内部タグが、対象とするタンパク質の中に挿入された配列番号2との100%未満かつ30%

%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記内部タグが配列番号440のポリペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、前記ポリペプチド。

[2] 前記N末端断片及び前記C末端断片の両方が、少なくとも2アミノ酸の長さである、前記[1]に記載のポリペプチド。

[3] 前記N末端断片及び/又は前記C末端断片が、少なくとも20アミノ酸の長さである、前記[2]に記載のポリペプチド。

[4] 前記内部タグが、配列番号2のペプチドに比べて1つ以上の形質の向上を示し、前記形質が、配列番号440のポリペプチドに対する親和性、発現、細胞内溶解性、細胞内安定性、及び配列番号440のポリペプチドと組み合わせたときの生物発光活性から選択される、前記[1]に記載のポリペプチド。

[5] 前記内部タグの前記アミノ酸配列が、表1のペプチドから選択される、前記[1]に記載のポリペプチド。

[6] 前記N末端断片と前記C末端断片とが、前記内部タグの非存在下で直接連結される場合、対象とする第1のタンパク質の配列を含む、前記[1]に記載のポリペプチド。

[7] 前記内部タグが、リンカーペプチドによって前記N末端断片及び/又は前記C末端断片に接続される、前記[1]に記載のポリペプチド。

[8] 前記[1]に記載のポリペプチドをコードする配列を含む、核酸。

[9]

(a) 前記[1]に記載のポリペプチドと、

(b) 配列番号440との100%未満かつ30%を超える配列同一性を有する相補体ポリペプチドを含む第2のポリペプチドと、
を含む、生物発光複合体。

[10] 前記内部タグ及び前記相補体ポリペプチドが、互いに低親和性を有する、前記[9]に記載の生物発光複合体。

[11] 前記第2のポリペプチドが、対象とする第2のタンパク質との融合体である、前記[10]に記載の生物発光複合体。

[12] 前記融合体が、内部融合体又は従来の融合体である、前記[11]に記載の生物発光複合体。

[13] 前記対象とする第2のタンパク質が、前記N末端断片及び/又は前記C末端断片のすべて又は一部に対して高親和性を有する、前記[12]に記載の生物発光複合体。

[14] 前記第2のポリペプチドが、対象とする分子に連結されている、前記[10]に記載の生物発光複合体。

[15] 前記N末端断片及び/又は前記C末端断片のすべて又は一部が、前記対象とする分子に対して高親和性を有する、前記[14]に記載の生物発光複合体。

[16] セレンテラジン基質を更に含む、前記[9]に記載の生物発光複合体。

[17] 前記内部タグ及び前記相補体ポリペプチドが、互いに高親和性を有する、前記[9]に記載の生物発光複合体。

[18] 前記第2のポリペプチドが、融合ポリペプチドではないか、又は対象とする分子に連結されていない、前記[9]に記載の生物発光複合体。

[19] 前記相補体ポリペプチドの前記アミノ酸配列が、表2のペプチドから選択される、前記[9]に記載の生物発光複合体。

[20] N末端断片と、C末端断片と、内部タグとを含むポリペプチドであって、前記内部タグが、対象とするタンパク質の中に挿入された配列番号440との100%未満かつ30%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、検出ペプチドが配列番号2のポリペプチドに接触すると、基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、前記ポリペプチド。

[21] 前記N末端断片及び前記C末端断片の両方が、少なくとも20アミノ酸の長さである、前記[20]に記載のポリペプチド。

[22] 前記N末端断片及び/又は前記C末端断片が、少なくとも50アミノ酸の長さで

ある、前記〔21〕に記載のポリペプチド。

〔23〕前記内部タグが、配列番号440のペプチドと比べて1つ以上の形質の向上を示し、前記形質が、配列番号2のポリペプチドに対する親和性、発現、細胞内溶解性、細胞内安定性、及び配列番号2のポリペプチドと組み合わせたときの生物発光活性から選択される、前記〔20〕に記載のポリペプチド。

〔24〕前記内部タグの前記アミノ酸配列が、表2のペプチドから選択される、前記〔20〕に記載のポリペプチド。

〔25〕前記N末端断片及び前記C末端断片が、前記内部タグの非存在下で直接連結される場合、対象とする第1のタンパク質の配列を含む、前記〔20〕に記載のポリペプチド。

〔26〕前記〔20〕に記載のポリペプチドをコードする配列を含む、核酸。

〔27〕

(a) 前記〔20〕に記載のポリペプチドと、

(b) 配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有する相補体ペプチドと、

を含む、生物発光複合体。

〔28〕前記内部タグ及び前記相補体ペプチドが、互いに低親和性を有する、前記〔27〕に記載の生物発光複合体。

〔29〕前記相補体ペプチドが、対象とする第2のタンパク質との融合体である、前記〔28〕に記載の生物発光複合体。

〔30〕前記融合体が、内部融合体又は従来の融合体である、前記〔29〕に記載の生物発光複合体。

〔31〕前記対象とする第2のタンパク質が、前記N末端断片及び/又は前記C末端断片のすべて又は一部に対して高親和性を有する、前記〔30〕に記載の生物発光複合体。

〔32〕前記相補体ペプチドが、対象とする分子に連結されている、前記〔28〕に記載の生物発光複合体。

〔33〕前記N末端断片及び/又は前記C末端断片のすべて又は一部が、前記対象とする分子に対して高親和性を有する、前記〔27〕に記載の生物発光複合体。

〔34〕セレンテラジン基質を更に含む、前記〔27〕に記載の生物発光複合体。

〔35〕前記内部タグ及び前記相補体ペプチドが、互いに高親和性を有する、前記〔27〕に記載の生物発光複合体。

〔36〕前記相補体ペプチドが、表1の前記ペプチドから選択される、前記〔27〕に記載の生物発光複合体。

〔37〕前記相補体ペプチドが、融合ポリペプチドではないか、又は対象とする分子に連結されていない、前記〔9〕に記載の生物発光複合体。

〔38〕第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列との間での安定な相互作用の検出方法であって、

(a) 内部タグが第1のアミノ酸配列のN末端にもC末端にもないように、内部タグを第1のアミノ酸配列に挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号440のポリペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(b) 第2のアミノ酸配列と相補体ポリペプチドとの第2の融合体を作り出す工程であって、前記相補体ポリペプチドが、配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記相補体ポリペプチドが配列番号2のペプチドに接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(c) 前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間で見込まれる安定な相互作用を生じさせる条件に、前記内部融合体と、第2の融合体と、セレンテラジン基質とを置く工程と、

(d) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生

物発光シグナルの検出が、前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間での安定な相互作用を示す、工程と、
を含む、前記検出方法。

[39] 前記第2の融合体が、内部融合体又は従来の融合体である、前記[38]に記載の方法。

[40] 前記内部融合体が、前記第1のアミノ酸配列と前記内部タグとをコードする第1の核酸配列から発現され、前記第2の融合体が、前記第2のアミノ酸配列と前記相補体ペリペプチドとをコードする第2の核酸配列から発現される、前記[38]に記載の方法。

[41] 単一のベクターが、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列とを含む、前記[40]に記載の方法。

[42] 前記第1の核酸配列及び前記第2の核酸配列が、別個のベクターにある、前記[40]に記載の方法。

[43] 工程(a)及び(b)が、細胞内で前記内部融合体と第2の融合体とを発現させる工程を含む、前記[40]に記載の方法。

[44] 第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列との間での安定な相互作用の検出方法であって、

(a) 内部タグが第1のアミノ酸配列のN末端にもC末端にもないように、内部タグを第1のアミノ酸配列に挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号2のペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(b) 第2のアミノ酸配列と相補体ペプチドとの第2の融合体を作り出す工程であって、前記相補体ペプチドが、配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記相補体ペプチドが配列番号440のポリペプチドに接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(c) 前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間で見込まれる安定な相互作用を生じさせる条件に、前記内部融合体と、第2の融合体と、セレンテラジン基質とを置く工程と、

(d) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの検出が、前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間での安定な相互作用を示す、工程と、
を含む、前記検出方法。

[45] 前記第2の融合体が、内部融合体又は従来の融合体である、前記[44]に記載の方法。

[46] 前記内部融合体が、前記第1のアミノ酸配列と前記内部タグとをコードする第1の核酸配列から発現され、前記第2の融合体が、前記第2のアミノ酸配列と前記相補体ペプチドとをコードする第2の核酸配列から発現される、前記[44]に記載の方法。

[47] 単一のベクターが、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列とを含む、前記[46]に記載の方法。

[48] 前記第1の核酸配列及び前記第2の核酸配列が、別個のベクターにある、前記[46]に記載の方法。

[49] 工程(a)及び(b)が、細胞内で前記内部融合体と第2の融合体とを発現させる工程を含む、前記[46]に記載の方法。

[50] 試料における標的ポリペプチドの検出方法であって、

(a) 内部タグが標的ポリペプチドのN末端にもC末端にもないように、内部タグを標的ポリペプチドに挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号2のペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(b) 前記試料に

(i) 配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有する相補体ペプチドと、

(ii) セレンテラジン基質と、
を加える工程と、

(c) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの検出が、前記試料における前記標的ポリペプチドの存在を示す、工程と
を含む、前記検出方法。

[51] 前記試料が、細胞を含む、前記[50]に記載の方法。

[52] 工程(a)が、前記細胞内で前記内部融合体を発現させる工程を含む、前記[51]に記載の方法。

[53] 工程(b)(i)が、前記細胞中の前記相補体ペプチドを含む、前記[52]に記載の方法。

[54] 試料における標的ポリペプチドの検出方法であって、

(a) 内部タグが標的ポリペプチドのN末端にもC末端にもないように、内部タグを標的ポリペプチドに挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号440のペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(b) 前記試料に

(i) 配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有する相補体ポリペプチドと、

(ii) セレンテラジン基質と、
を加える工程と、

(c) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの検出が、前記試料における前記標的ポリペプチドの存在を示す、工程と
を含む、前記検出方法。

[55] 前記試料が、細胞を含む、前記[54]に記載の方法。

[56] 工程(a)が、前記細胞内で前記内部融合体を発現させる工程を含む、前記[55]に記載の方法。

[57] 工程(b)(i)が、前記細胞中の前記相補体ポリペプチドを含む、前記[55]に記載の方法。

[58] 検出試薬であって、

(a) 配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む相補体ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが配列番号2のペプチドと接触すると、基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、相補体ポリペプチドと、

(b) 前記ポリペプチドと配列番号2のペプチドとによって生成される生物発光複合体のための基質と、

を含む、前記検出試薬。

[59] 検出試薬であって、

(a) 配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む相補体ペプチドであって、前記ペプチドが配列番号440のポリペプチドと接触すると、基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、相補体ペプチドと、

(b) 前記ペプチドと配列番号440のポリペプチドとによって生成される生物発光複合体のための基質と、

を含む、前記検出試薬。

[60] 第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列との間での相互作用の、潜在的阻害剤

による変化の検出方法であって、

(a) 内部タグが第1のアミノ酸配列のN末端にもC末端にもないように、内部タグを第1のアミノ酸配列に挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号440のポリペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(b) 第2のアミノ酸配列と相補体ポリペプチドとの第2の融合体を作り出す工程であって、前記相補体ポリペプチドが、配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記相補体ポリペプチドが配列番号2のペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(c) 前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間で見込まれる安定な相互作用を生じさせる条件に、前記内部融合体と、第2の融合体と、セレンテラジン基質とを置く工程と、

(d) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの検出が、前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間での安定な相互作用を示す、工程と、

(e) 前記内部融合体と第2の融合体とセレンテラジン基質とに潜在的阻害剤を加える工程と、

(f) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程と、

(g) 工程(d)と(f)の前記生物発光シグナルを比較する工程であって、工程(d)から工程(f)への生物発光シグナルの低下が、前記潜在的阻害剤による前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間での前記相互作用の阻害を示す、工程と、を含む、前記検出方法。

[61] 工程(a)及び(b)が、細胞内で前記内部融合体と第2の融合体とを発現させる工程を含む、前記[60]に記載の方法。

[62] 前記潜在的阻害剤が、ペプチド又は小分子である、前記[60]に記載の方法。

[62] 第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列との間での相互作用の、潜在的阻害剤による変化の検出方法であって、

(a) 内部タグが第1のアミノ酸配列のN末端にもC末端にもないように、内部タグを第1のアミノ酸配列に挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号440との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号2のペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(b) 第2のアミノ酸配列と相補体ポリペプチドとの第2の融合体を作り出す工程であって、前記相補体ポリペプチドが、配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有し、前記相補体ポリペプチドが配列番号440のペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、工程と、

(c) 前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間で見込まれる安定な相互作用を生じさせる条件に、前記内部融合体と、第2の融合体と、セレンテラジン基質とを置く工程と、

(d) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの検出が、前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間での安定な相互作用を示す、工程と、

(e) 前記内部融合体と第2の融合体とセレンテラジン基質とに潜在的阻害剤を加える工程と、

(f) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程と、

(g) 工程(d)と(f)の前記生物発光シグナルを比較する工程であって、工程(d)から工程(f)への生物発光シグナルの低下が、前記潜在的阻害剤による前記第1のアミノ酸配列と前記第2のアミノ酸配列との間での前記相互作用の阻害を示す、工程と、を含む、前記検出方法。

[6 1] 工程 (a) 及び (b) が、細胞内で前記内部融合体と第 2 の融合体を発現させる工程を含む、前記 [6 0] に記載の方法。

[6 2] 前記潜在的阻害剤が、ペプチド又は小分子である、前記 [6 0] に記載の方法。

[6 3] 第 1 のアミノ酸配列の構造配座の決定方法であって、

(a) 内部タグが第 1 のアミノ酸配列の N 末端にも C 末端にもないように、内部タグを第 1 のアミノ酸配列に挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号 2 との 100 % 未満でかつ 30 % を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号 440 のポリペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成され、前記第 1 のアミノ酸配列の第 1 の構造配座が、前記内部タグへのアクセスを妨害し、前記第 1 のアミノ酸配列の第 2 の構造配座が、前記内部タグへのアクセスを可能にする、工程と、

(b) 前記内部融合体と、(i) 配列番号 440 との 100 % 未満でかつ 30 % を超える配列同一性を有する相補体ポリペプチド又は(ii) 第 2 のアミノ酸配列及び前記相補体ポリペプチドの第 2 の融合体のいずれかとをセレンテラジン基質の存在下に置く工程と、
(c) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの非存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 1 の構造配座を採用していることを示し、前記生物発光シグナルの存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 2 の構造配座を採用していることを示す、工程と

を含む、前記決定方法。

[6 4] 工程 (c) が、

(i) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの非存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 1 の構造配座を採用していることを示す、工程と、

(ii) 前記第 1 のアミノ酸配列において配座変化を誘導する工程と、

(iii) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 2 の構造配座を採用していることを示す、工程と

を含む、前記 [6 3] に記載の方法。

[6 5] 配座変化を誘導する工程が、前記第 1 のアミノ酸配列の一部を切断するプロテアーゼを加えること、前記第 1 のアミノ酸配列に結合する作用剤の添加、及びアッセイ条件を変更することから選択される、前記 [6 4] に記載の方法。

[6 6] 第 1 のアミノ酸配列の構造配座の決定方法であって、

(a) 内部タグが第 1 のアミノ酸配列の N 末端にも C 末端にもないように、内部タグを第 1 のアミノ酸配列に挿入することによって内部融合体を作り出す工程であって、前記内部タグが、配列番号 440 との 100 % 未満でかつ 30 % を超える配列同一性を有し、前記内部タグが配列番号 2 のポリペプチドと接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成され、前記第 1 のアミノ酸配列の第 1 の構造配座が、前記内部タグへのアクセスを妨害し、前記第 1 のアミノ酸配列の第 2 の構造配座が、前記内部タグへのアクセスを可能にする、工程と、

(b) 前記内部融合体と、(i) 配列番号 2 との 100 % 未満でかつ 30 % を超える配列同一性を有する相補体ペプチド又は(ii) 第 2 のアミノ酸配列及び前記相補体ペプチドの第 2 の融合体のいずれかとをセレンテラジン基質の存在下に置く工程と、

(c) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの非存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 1 の構造配座を採用していることを示し、前記生物発光シグナルの存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 2 の構造配座を採用していることを示す、工程と

を含む、前記決定方法。

[6 7] 工程 (c) が、

(i) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの非存在が、前記第 1 のアミノ酸配列が前記第 1 の構造配座を採用している

ることを示す、工程と、

(i i) 前記第1のアミノ酸配列において配座変化を誘導する工程と、

(i i i) 存在する場合には、放射された生物発光シグナルを検出する工程であって、前記生物発光シグナルの存在が、前記第1のアミノ酸配列が前記第2の構造配座を採用していることを示す、工程と

を含む、前記〔66〕に記載の方法。

〔68〕配座変化を誘導する工程が、前記第1のアミノ酸配列の一部を切断するプロテアーゼを加えること、前記第1のアミノ酸配列に結合する作用剤の添加、及びアッセイ条件を変更することから選択される、前記〔67〕に記載の方法。

〔69〕N末端断片と、C末端断片と、2つ以上の内部タグとを含むポリペプチドであって、前記内部タグが、対象とするタンパク質の中に挿入された配列番号2との100%未満でかつ30%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記内部タグの1つ以上が配列番号440のポリペプチドに接触すると、セレンテラジン基質の存在下で、検出可能な生物発光シグナルが生成される、前記ポリペプチド。

〔70〕前記2つ以上の内部タグが、2つの内部タグである、前記〔69〕に記載のポリペプチド。

〔71〕前記2つ以上の内部タグが、互いに直接接続されている、前記〔69〕に記載のポリペプチド。

〔72〕前記2つ以上の内部タグが、1つ以上のリンカーによって分離されている、前記〔69〕に記載のポリペプチド。

〔73〕前記2つ以上の内部タグが、対象とするタンパク質又はポリペプチド内の単一の位置に挿入されている、前記〔69〕に記載のポリペプチド。

〔74〕前記2つ以上の内部タグが、対象とするタンパク質又はポリペプチド内の2つ以上の位置に挿入されている、前記〔69〕に記載のポリペプチド。

〔75〕前記2つ以上の内部タグが、同一のアミノ酸配列を含む、前記〔69〕に記載のポリペプチド。

〔76〕2つ以上のまたは2つ以上の内部タグが、同一ではないアミノ酸配列を含む、前記〔69〕に記載のポリペプチド。