(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-533298
(P2012-533298A)
(43)公表日　平成24年12月27日(2012.12.27)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | ZNAA | 2G045 |
| C07K 14/435 | (2006.01) | C07K | 14/435 | | 4B024 |
| C12N 5/10 | (2006.01) | C12N | 5/00 | 102 | 4B063 |
| C12Q 1/02 | (2006.01) | C12Q | 1/02 | | 4B065 |
| G01N 33/84 | (2006.01) | G01N | 33/84 | Z | 4H045 |

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 34 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-520586 (P2012-520586)
(86)(22)出願日　平成22年7月6日(2010.7.6)
(85)翻訳文提出日　平成24年3月12日(2012.3.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/001902
(87)国際公開番号　WO2011/008250
(87)国際公開日　平成23年1月20日(2011.1.20)
(31)優先権主張番号　61/276,875
(32)優先日　平成21年9月17日(2009.9.17)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/270,826
(32)優先日　平成21年7月14日(2009.7.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504115013
イー・エム・デイー・ミリポア・コーポレイション
アメリカ合衆国　０１８２１　マサチューセッツ州　ビレリカ　コンコード　ロード　２９０
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　アームストロング，ルーカス
アメリカ合衆国、マサチューセツツ・０１８０３、ビレリカ、コンコード・ロード・２９０、ミリポア・コーポレイション気付

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す改変型発光蛋白質及びその使用

(57)【要約】
本発明はカルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す改変型発光蛋白質（例えば改変型クリチン）と、レポーター遺伝子システム及び細胞アッセイにおけるカルシウム指示薬としてのその使用を提供する。



Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１に記載のアミノ酸配列の少なくとも１６８位のリジンがヒスチジン、アルギニン及びリジン以外のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含む改変型発光蛋白質であって、前記改変型発光蛋白質が配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して細胞内カルシウム親和性の増加および生物発光の増強を示す前記改変型発光蛋白質。
【請求項２】
配列番号１に記載のアミノ酸配列の少なくとも１６８位のリジンがアスパラギン酸で置換されたアミノ酸配列を含む改変型発光蛋白質であって、前記改変型発光蛋白質が配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質と配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質の両方に比較して細胞内カルシウム親和性の増加および生物発光の増強を示す前記改変型発光蛋白質。
【請求項３】
改変型発光蛋白質が細胞内カルシウムに対して５００ｎＭ以下のＥＣ５０値を含み、改変型発光蛋白質が配列番号２に記載のアミノ酸配列又はその変異体もしくは誘導体を含まない請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項４】
配列番号９（Ｋ１６８Ｄ）、配列番号１１（Ｋ１６８Ｅ）、配列番号１５（Ｋ１６８Ｇ）、配列番号１７（Ｋ１６８Ｎ）、配列番号１９（Ｋ１６８Ｑ）、配列番号２１（Ｋ１６８Ｓ）、配列番号２３（Ｋ１６８Ｔ）、配列番号２５（Ｋ１６８Ｖ）及び配列番号２７（Ｋ１６８Ｙ）から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項５】
アミノ酸変異が発光蛋白質のＥＦハンドＩＩＩドメインに存在する請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項６】
アミノ酸変異が発光蛋白質のＥＦハンドＩＩＩドメインに存在する請求項２に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項７】
改変型発光蛋白質が配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は４０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９０％を上回る細胞内カルシウム親和性の増加を示す請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項８】
改変型発光蛋白質が配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は４０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９０％を上回る細胞内カルシウム親和性の増加を示す請求項２に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項９】
改変型発光蛋白質が配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は４０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９０％を上回る生物発光の増加を示す請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１０】
改変型発光蛋白質が配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は４０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９０％を上回る生物発光の増加を示す請求項２に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１１】
細胞内カルシウム親和性および生物発光が請求項１に記載の改変型発光蛋白質をコード

する核酸分子をトランスフェクトした細胞内で測定される請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１２】
細胞内カルシウム親和性および生物発光が請求項１に記載の改変型発光蛋白質をコードする核酸分子をトランスフェクトした細胞内で測定される請求項２に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１３】
細胞内カルシウム親和性および生物発光が請求項２に記載の改変型発光蛋白質をコードする核酸分子をトランスフェクトした細胞内で測定される請求項１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１４】
細胞内カルシウム親和性および生物発光が請求項２に記載の改変型発光蛋白質をコードする核酸分子をトランスフェクトした細胞内で測定される請求項２に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１５】
細胞がＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞及びＵ－２ＯＳ細胞から選択される請求項１１に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１６】
細胞がＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞及びＵ－２ＯＳ細胞から選択される請求項１２に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１７】
細胞がＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞及びＵ－２ＯＳ細胞から選択される請求項１３に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１８】
細胞がＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞及びＵ－２ＯＳ細胞から選択される請求項１４に記載の改変型発光蛋白質。
【請求項１９】
請求項１に記載の改変型発光蛋白質をコードする核酸分子。
【請求項２０】
請求項２に記載の改変型発光蛋白質をコードする核酸分子。
【請求項２１】
請求項１９に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項２２】
請求項２０に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項２３】
請求項２１に記載のベクターをトランスフェクトした哺乳動物細胞。
【請求項２４】
請求項２２に記載のベクターをトランスフェクトした哺乳動物細胞。
【請求項２５】
細胞内のカルシウム流動のインビトロ検出方法であって、ａ）請求項１に記載の改変型発光蛋白質を発現する細胞を準備する段階と、ｂ）カルシウム流動を誘導する物質と前記細胞を接触させる段階と、ｃ）発光蛋白質の生物発光を検出する段階を含み、生物発光をカルシウム流動の指標とする前記方法。
【請求項２６】
細胞内のカルシウム流動のインビトロ検出方法であって、ａ）請求項２に記載の改変型発光蛋白質を発現する細胞を準備する段階と、ｂ）カルシウム流動を誘導する物質と前記細胞を接触させる段階と、ｃ）発光蛋白質の生物発光を検出する段階を含み、生物発光をカルシウム流動の指標とする前記方法。
【請求項２７】
ＧＰＣＲ又はイオンチャネル活性を調節する化合物のスクリーニング方法であって、ａ

）請求項１に記載の改変型発光蛋白質を発現する細胞を準備する段階と、ｂ）前記細胞を候補化合物と接触させる段階と、ｃ）発光蛋白質の生物発光を検出する段階を含み、候補化合物の存在下で発光蛋白質の生物発光が変化する場合に、前記化合物はＧＰＣＲ又はイオンチャネル活性を調節すると判断する前記方法。

【請求項２８】

ＧＰＣＲ又はイオンチャネル活性を調節する化合物のスクリーニング方法であって、ａ）請求項２に記載の改変型発光蛋白質を発現する細胞を準備する段階と、ｂ）前記細胞を候補化合物と接触させる段階と、ｃ）発光蛋白質の生物発光を検出する段階を含み、候補化合物の存在下で発光蛋白質の生物発光が変化する場合に、前記化合物はＧＰＣＲ又はイオンチャネル活性を調節すると判断する前記方法。

【請求項２９】

カルシウム流動がＧＰＣＲ又はイオンチャネルの活性の調節により誘導される請求項２５に記載の方法。

【請求項３０】

カルシウム流動がＧＰＣＲ又はイオンチャネルの活性の調節により誘導される請求項２６に記載の方法。

【請求項３１】

ＧＰＣＲが$H_1$ヒスタミン受容体、ＧＩＰ受容体、ＧＬＰ－１受容体、グルカゴン受容体、$S1P_2$スフィンゴシン１－リン酸受容体、ＣＸＣＲ１ケモカイン受容体、ＣＸＣＲ４ケモカイン受容体、Ｄ２ドーパミン受容体、$EP_1$受容体、$EP_3$プロスタグランジン受容体及びＴＲＰＡ１カチオンチャネルから構成される群から選択される請求項２７に記載の方法。

【請求項３２】

ミトコンドリアを標的とした配列を発光蛋白質のＮ末端に含む請求項１に記載の改変型発光蛋白質。

【請求項３３】

ミトコンドリアを標的とした配列を発光蛋白質のＮ末端に含む請求項２に記載の改変型発光蛋白質。

【請求項３４】

ミトコンドリアを標的とした配列が配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む請求項３２に記載の改変型発光蛋白質。

【請求項３５】

ミトコンドリアを標的とした配列が配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む請求項３３に記載の改変型発光蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明はカルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す改変型発光蛋白質（例えば改変型クリチン）と、レポーター遺伝子システム及び細胞アッセイにおけるカルシウム指示薬としてのその使用を提供する。

【背景技術】

【０００２】

$Ca^{2+}$と反応すると発光すると報告されている発光蛋白質として、イクオリン、ハリスタウリン、オベリン、ムネミオプシン、クリチン及びベロビンを含む数種が今日までに生物から単離されている。一般に、上記発光蛋白質はいずれも寸法が比較的小さく、複合体として結合した共通の有機基質（セレンテラジン）と分子状酸素を含むと考えられている。

【０００３】

イクオリンは最も広く研究されている$Ca^{2+}$活性化発光蛋白質であり、ヒドロ虫類のオワンクラゲ（Ａｅｑｕｏｒｅａ　ｖｉｃｔｏｒｉａ）から単離された。イクオリンの場

合、Ｃａ$^{2+}$と結合すると蛋白質の立体構造変化を生じ、蛋白質は発光（即ちλｍａｘ＝４７０ｎＭ）しながら酸素によるセレンテラジンの酸化を触媒する酵素に転化する。イクオリンは例えばＳｔａｂｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２５２：１１５－１２６（１９９７））に記載されているように、細胞内で特にＧ蛋白質共役型受容体（ＧＰＣＲ）に介在されるようなカルシウム流動を検出するために使用されている。更に、例えばＵｎｇｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７２：３４－４２（１９９９））に記載されているように、ＧＰＣＲの高スループットスクリーニングでイクオリン介在性発光カルシウムアッセイが使用されている。更に、例えば米国特許第６，８７２，５３８号に記載されているように、薬剤スクリーニングアッセイでイクオリンを発現する細胞も使用されている。

【０００４】

例えばイクオリン等のカルシウム活性化発光蛋白質は例えばＧＰＣＲにより刺激されるカルシウム流動の検出用や薬剤スクリーニングで使用されているが、イクオリンのカルシウム親和性は受容体により誘導されるサイトゾルカルシウム濃度（例えば０．１μＭ～０．２μＭの範囲）に比較してかなり低い（即ち約７μＭ程度）。更に、ミトコンドリアを標的としたイクオリンはＧＰＣＲ刺激後により良好なシグナルを生じるようであるが、ミトコンドリアにおけるカルシウム蓄積は不均一であり、一般にミトコンドリアにおけるイクオリン発現量はサイトゾルに比較して低いため、カルシウム親和性は低い。

【０００５】

同様に、例えばオベリンやクリチン等の他のカルシウム活性化発光蛋白質もカルシウム親和性が低い、及び／又は発光レベルが低いと報告されている。例えばＩｎｏｕｙｅ　ａｎｄ　Ｓａｈａｒａ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ．Ｐｕｒｉｆ．，５３：３８４－３８９（２００７）；Ｂｏｖｏｌｅｎｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｃｒｅｅｎ，１２：６９４－７０４（２００７）参照。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】米国特許第６，８７２，５３８号明細書

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｓｔａｂｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２５２：１１５－１２６（１９９７））

【非特許文献２】Ｕｎｇｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７２：３４－４２（１９９９））

【非特許文献３】Ｉｎｏｕｙｅ　ａｎｄ　Ｓａｈａｒａ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ．Ｐｕｒｉｆ．，５３：３８４－３８９（２００７）

【非特許文献４】Ｂｏｖｏｌｅｎｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｃｒｅｅｎ，１２：６９４－７０４（２００７）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明は少なくとも一面において、当分野で公知の野生型（ｗｔ）発光蛋白質（例えばｗｔイクオリン及び／又はｗｔクリチン及び／又はｗｔオベリン）に比較して細胞内カルシウム親和性の増加及び／又は生物発光の増強を示す改変型発光蛋白質（例えば改変型クリチン）を提供する。本発明は更に、例えばＧＰＣＲにより刺激されるようなカルシウム流動の検出用細胞アッセイにおける前記発光蛋白質の使用と、薬剤発見におけるその使用も提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明の所定態様では、アミノ酸配列を配列番号１に記載するｗｔクリチンのＥＦハン

ドＩＩＩドメインに少なくとも１カ所のアミノ酸変異を含むアミノ酸配列を含む改変型発光蛋白質を提供し、前記改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す。

【００１０】

所定態様において、本発明の改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列の少なくとも１６８位のリジンがヒスチジン、アルギニン及びリジン以外のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含み、前記改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す。

【００１１】

特定態様では、配列番号１に記載のアミノ酸配列の少なくとも１６８位のリジンがアスパラギン酸で置換されたアミノ酸配列を含む改変型発光蛋白質を提供し、前記改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質と配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質の両方に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を含む。

【００１２】

各種態様において、本発明の改変型発光蛋白質はｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリンに比較して細胞内カルシウム親和性の増加を示す。所定態様において、改変型発光蛋白質は細胞内カルシウムに対して５００ｎＭ以下のＥＣ５０値を含み、前記改変型発光蛋白質は配列番号２に記載のアミノ酸配列又はその変異体を含まない。

【００１３】

本発明に含まれる改変型発光蛋白質としては、配列番号９（Ｋ１６８Ｄ）、配列番号１１（Ｋ１６８Ｅ），配列番号１５（Ｋ１６８Ｇ）、配列番号１７（Ｋ１６８Ｎ）、配列番号１９（Ｋ１６８Ｑ）、配列番号２１（Ｋ１６８Ｓ）、配列番号２３（Ｋ１６８Ｔ）、配列番号２５（Ｋ１６８Ｖ）及び配列番号２７（Ｋ１６８Ｙ）から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含む発光蛋白質が挙げられる。

【００１４】

各種態様において、本発明に含まれる改変型発光蛋白質はアミノ酸配列を配列番号１に記載するｗｔクリチンに比較して細胞内カルシウム親和性の増加を示す。所定態様において、本発明の改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して１．５％、又は２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は４０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９０％を上回る細胞内カルシウム親和性の増加を示す。

【００１５】

更に、各種態様において、本発明に含まれる改変型発光蛋白質はｗｔクリチンに比較して生物発光の増強を示す。所定態様において、本発明の改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して１．５％、又は２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は４０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９０％を上回る生物発光の増加を示す。

【００１６】

本発明に含まれる各種発光蛋白質はｗｔクリチンとｗｔイクオリンの一方又は両方に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を同時に示す。

【００１７】

所定態様において、本発明の１種以上の発光蛋白質により示される細胞内カルシウム親和性と生物発光は改変型発光蛋白質をコードする核酸分子をトランスフェクトした細胞内で測定される。典型的な細胞としては、限定されないが、ＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞及びＵ－２ＯＳ細胞が挙げられる。

【００１８】

本発明の発光蛋白質をコードする核酸分子と、このような核酸分子を含むベクターも本発明に含まれる。他の態様では、本発明の改変型発光蛋白質をコードする核酸をトランス

フェクトした哺乳動物細胞を提供する。

【００１９】

他の態様では、本発明に含まれる改変型発光蛋白質の使用方法を提供する。

【００２０】

所定態様では、細胞内のカルシウム流動のインビトロ検出方法を提供する。このような方法は、ａ）本願に記載するような改変型発光蛋白質を発現する細胞を準備する段階と、ｂ）カルシウム流動を誘導する物質と前記細胞を接触させる段階と、ｃ）発光蛋白質の生物発光を検出する段階を含み、生物発光をカルシウム流動の指標とする。

【００２１】

他の態様では、ＧＰＣＲ活性又はイオンチャネルを調節する化合物のスクリーニング方法を提供し、このような方法は、ａ）本願に記載するような改変型発光蛋白質を発現する細胞を準備する段階と、ｂ）前記細胞を候補化合物と接触させる段階と、ｃ）発光蛋白質の生物発光を検出する段階を含み、候補化合物の存在下で発光蛋白質の生物発光が変化する場合に、前記化合物はＧＰＣＲ活性又はイオンチャネル活性を調節すると判断する。

【００２２】

各種態様において、カルシウム流動はＧＰＣＲ活性又はイオンチャネルの活性の調節により誘導される。典型的なＧＰＣＲとしては、限定されないが、Ｈ１ヒスタミン受容体、胃抑制ポリペプチド（ＧＩＰ）受容体、ＧＬＰ－１受容体、グルカゴン受容体、$S1P_2$スフィンゴシン１－リン酸受容体、$EP_1$プロスタグランジン受容体又は$EP_3$プロスタグランジン受容体が挙げられる。典型的なイオンチャネルとしては一過性受容体電位型チャネルＡ１（ＴＲＰＡ１）が挙げられる。

【００２３】

所定態様において、改変型発光蛋白質はミトコンドリアシグナル配列を含む。典型的なミトコンドリアシグナル配列は例えば配列番号８に記載のＣＯＸ８ミトコンドリア配列である。

【図面の簡単な説明】

【００２４】

【図１】発光蛋白質であるクリチン（配列番号１）、イクオリン（配列番号２）、ミトロコミン（配列番号３）及びオベリン（配列番号４）のアミノ酸配列アラインメントを示す。カルシウム結合性ヘリックスターンヘリックス（ＨＴＨ）／ＥＦハンドモチーフを四角で囲む。配列一致箇所をアステリスク（＊）で示し、配列類似箇所をコロン（：）で示す。

【図２】ＨＥＫ２９３Ｔ細胞で一過的コトランスフェクションアッセイを使用し、野生型ミトコンドリアイクオリン（アミノ酸配列を配列番号６に記載するｍｔイクオリン）、野生型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号５に記載するｍｔクリチン）、野生型ミトコンドリアオベリン（アミノ酸配列を配列番号７に記載するｍｔオベリン）、改変型ミトコンドリアクリチン（Ｋ１６８Ｄ）（アミノ酸配列を配列番号１０に記載するｍｔクリチンＫ１６８Ｄ）及び改変型ミトコンドリアクリチン（Ｋ１６８Ｅ）（アミノ酸配列を配列番号１２に記載するｍｔクリチンＫ１６８Ｅ）のカルシウム親和性を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。Ｘ軸はカルシウム濃度を示し、Ｙ軸は指定濃度のカルシウムの存在下で放出された生物発光と１．５ｍＭ $CaCl_2$の存在下で放出された生物発光の比の正規化対数（ｌｏｇ（Ｌ／Ｌｍａｘ））を示す。

【図３】Ｈ１ヒスタミン受容体と、野生型ミトコンドリアイクオリン（アミノ酸配列を配列番号６に記載するｍｔイクオリン）、野生型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号５に記載するｍｔクリチン）、野生型サイトゾルイクオリン（アミノ酸配列を配列番号２に記載するｗｔイクオリン）、野生型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号１に記載するｗｔクリチン）、改変型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号１０に記載するｍｔクリチンＫ１６８Ｄ）又は改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＵ－２ＯＳ細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的

実験の結果をまとめたグラフを示す。Ｘ軸は細胞に添加したヒスタミンの濃度を示し、Ｙ軸は相対発光強度（ＲＬＵ）で測定した生物発光を示す。

【図４】Ｈ１ヒスタミン受容体と、野生型ミトコンドリアイクオリン（アミノ酸配列を配列番号６に記載するｍｔイクオリン）、野生型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号５に記載するｍｔクリチン）、野生型サイトゾルイクオリン（アミノ酸配列を配列番号２に記載するｗｔイクオリン）、野生型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号１に記載するｗｔクリチン）、改変型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号１０に記載するｍｔクリチンＫ１６８Ｄ）又は改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＵ－２ＯＳ細胞において１ｍＭ　$CaCl_2$の存在下でＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を使用して細胞膜の透過により誘導される生物発光の変化と受容体により介在される生物発光の変化を比較するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。Ｙ軸は相対発光強度（ＲＬＵ）で測定した生物発光を示す。細胞にトランスフェクトした個々の発光蛋白質をＸ軸に示す。

【図５】ＧＩＰ（胃抑制ポリペプチド）受容体と、キメラプロミスキャスＧ蛋白質と、野生型ミトコンドリアイクオリン（アミノ酸配列を配列番号６に記載するｍｔイクオリン）、野生型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号５に記載するｍｔクリチン）、野生型ミトコンドリアオベリン（アミノ酸配列を配列番号７に記載するｍｔオベリン）、野生型サイトゾルイクオリン（アミノ酸配列を配列番号２に記載するｗｔイクオリン）、野生型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号１に記載するｗｔクリチン）、野生型サイトゾルオベリン（アミノ酸配列を配列番号４に記載するｗｔオベリン）、改変型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号１０に記載するｍｔクリチンＫ１６８Ｄ）又は改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。Ｘ軸は細胞に添加したＧＩＰの濃度を示し、Ｙ軸は相対発光強度（ＲＬＵ）で測定した生物発光を示す。

【図６】図６Ａ～６ＥはＧＬＰ－１（グルカゴン様ペプチド１）受容体、グルカゴン受容体、Ｓ１Ｐ２（スフィンゴシン１－リン酸受容体２）受容体、ＥＰ１受容体及びＥＰ３受容体（後者２種はプロスタグランジン$E_2$の受容体）と、キメラプロミスキャスＧ蛋白質（ＧＬＰ－１受容体、グルカゴン受容体及びＳ１Ｐ２受容体の場合）と、改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。Ｘ軸は細胞に添加した各受容体の対応するリガンドの濃度を示し、Ｙ軸は相対発光強度（ＲＬＵ）で測定した生物発光を示す。

【図７－１】図７Ａ～７ＦはＧＩＰ受容体（胃腸ペプチド受容体）、ＣＸＣＲ１受容体、ＣＸＣＲ４受容体、グルカゴン受容体、ＧＬＰ－１受容体又はＥＰ１受容体と、キメラプロミスキャスＧ蛋白質と、改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。図７ＧはＤ２受容体と、プロミスキャスＧ蛋白質と、改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号１１に記載するクリチンＫ１６８Ｅ）を安定的に発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。グラフに示す生物発光データはＦＬＩＰＲＴｅｔｒａ　Ｐｌｕｓ高スループット発光プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で取得した。

【図７－２】図７Ａ～７ＦはＧＩＰ受容体（胃腸ペプチド受容体）、ＣＸＣＲ１受容体、ＣＸＣＲ４受容体、グルカゴン受容体、ＧＬＰ－１受容体又はＥＰ１受容体と、キメラプロミスキャスＧ蛋白質と、改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載

するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。図７ＧはＤ２受容体と、プロミスキャスＧ蛋白質と、改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号１１に記載するクリチンＫ１６８Ｅ）を安定的に発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。グラフに示す生物発光データはＦＬＩＰＲＴｅｔｒａ　Ｐｌｕｓ高スループット発光プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で取得した。

【図８】ＴＲＰＡ１カチオンチャネルをコードするｃＤＮＡを安定的に発現し、野生型ミトコンドリアイクオリン（アミノ酸配列を配列番号６に記載するｍｔイクオリン）、野生型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号５に記載するｍｔクリチン）、野生型サイトゾルイクオリン（アミノ酸配列を配列番号２に記載するｗｔイクオリン）、野生型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号１に記載するｗｔクリチン）、改変型ミトコンドリアクリチン（アミノ酸配列を配列番号１０に記載するｍｔクリチンＫ１６８Ｄ）又は改変型サイトゾルクリチン（アミノ酸配列を配列番号９に記載するＫ１６８Ｄ）をコードするｃＤＮＡを一過的にコトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞における生物発光の受容体介在性変化を測定するための典型的実験の結果をまとめたグラフを示す。Ｘ軸は細胞に添加したイソチオシアン酸アリル（ＡＩＴＣ）の濃度を示し、Ｙ軸は相対発光強度（ＲＬＵ）で測定した生物発光を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

本発明はｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及び／又はｗｔオベリンに比較してカルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す改変型発光蛋白質（例えば改変型クリチン）と、レポーター遺伝子システム及び細胞アッセイにおけるカルシウム指示薬としてのその使用を提供する。

【００２６】

Ｉ．定義

本発明を理解し易くするために、先ず所定の用語について定義する。その他の定義については詳細な説明の随所に記載する。

【００２７】

「発光蛋白質」又は「$Ca^{2+}$活性化発光蛋白質」なる用語は本願では同義に使用し、カルシウムと結合すると発光する蛋白質を意味する。発光蛋白質は一般に海洋腔腸動物から単離され、カルシウムの存在下で細胞内反応により可視光を放出する。公知発光蛋白質のカルシウム結合部位は他の$Ca^{2+}$結合性蛋白質（例えばカルモジュリン）に存在する部位と同様であるが、システイン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリン及びチロシン残基の含有量が比較的高いという点で他の$Ca^{2+}$蛋白質と相違する。

【００２８】

典型的な発光蛋白質としては、限定されないが、オベリン、クリチン、イクオリン、ハリスタウリン、ムネミオプシン及びベロビンが挙げられ、一般にルシフェラーゼを除外する。これらの全発光蛋白質はアポ蛋白質と、イミダゾピラジン発色団（セレンテラジン）と、酸素の複合体である。

【００２９】

所定態様において、本発明は改変型発光蛋白質を提供する。特定態様において、本発明は改変型クリチンに関する。発光蛋白質であるクリチン（配列番号１）、イクオリン（配列番号２）、ミトロコミン（配列番号３）及びオベリン（配列番号４）のアミノ酸配列アラインメントを図１に示す。

【００３０】

「改変型発光蛋白質」又は「$Ca^{2+}$活性化改変型発光蛋白質」なる用語は本願では同義に使用し、野生型発光蛋白質のアミノ酸配列変異体（例えばｗｔクリチンの変異体；ｗｔクリチンのアミノ酸配列は配列番号１に記載する）であって、ｗｔクリチンが示す細胞

内カルシウム親和性及び生物発光に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す変異体を意味する。所定態様において、本発明の改変型発光蛋白質はｗｔクリチンのヘリックスターンヘリックス（ＨＴＨ）ドメイン（例えばＥＦハンドＩＩＩドメイン）に少なくとも１カ所のアミノ酸変異を含み、前記改変型発光蛋白質はｗｔクリチンが示す細胞内カルシウム親和性及び生物発光に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す。所定態様において、改変型発光蛋白質は配列番号１の少なくとも１６８位のリジン残基がヒスチジン、アルギニン及びリジン以外のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含み、前記改変型発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す。所定態様において、改変型発光蛋白質は配列番号１の少なくとも１６８位のリジン残基がアスパラギン酸で置換されたアミノ酸配列を含み、前記発光蛋白質は配列番号１に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質と配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む発光蛋白質の両方に比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す。

【００３１】

典型的態様において、本発明の改変型発光蛋白質は配列番号９（Ｋ１６８Ｄ）、配列番号１１（Ｋ１６８Ｅ）、配列番号１５（Ｋ１６８Ｇ）、配列番号１７（Ｋ１６８Ｎ）、配列番号１９（Ｋ１６８Ｑ）、配列番号２１（Ｋ１６８Ｓ）、配列番号２３（Ｋ１６８Ｔ）、配列番号２５（Ｋ１６８Ｖ）及び配列番号２７（Ｋ１６８Ｙ）から構成される群から選択されるアミノ酸配列を含む。所定態様において、本発明の改変型発光蛋白質は更に、ミトコンドリアを標的としたシグナル配列、例えばアミノ酸配列を配列番号８に記載するＣＯＸ８ミトコンドリアタグを含む。

【００３２】

ＥＦハンドドメインは本発明に含まれる発光蛋白質を含むカルシウム結合性蛋白質の広範なファミリーに存在するヘリックスターンヘリックス（ＨＴＨ）構造ドメインである。このドメインは相互にほぼ垂直に配置され、通常ではカルシウムイオンと結合する短いループ領域（通常では約１２アミノ酸）により結合された２個のαヘリックスから構成される。ＥＦハンドドメインの名称は、このようなモチーフ３個を含み、そのカルシウム結合活性により筋肉弛緩に関与すると考えられている蛋白質であるパルブアルブミンの説明に使用されている伝統的な命名法に由来する。ＥＦハンドドメインはシグナル伝達蛋白質であるカルモジュリンの各構造ドメインと、筋蛋白質であるトロポニンＣにも認められる。

【００３３】

「ＨＴＨ　ＩＶドメイン」又は「ＥＦハンドＩＩＩドメイン」なる用語はクリチンに存在する４個のヘリックスターンヘリックスドメイン（そのうちの３個はＥＦハンドドメインである）の４番目と、３個のＥＦハンドドメインの３番目を意味し、アミノ酸残基１６２～１７３を含み、アミノ酸配列ＤＬＤＮＳＧＫＬＤＶＤＥ（配列番号３１）を含む。クリチンのＨＴＨ　ＩＶドメイン（又はＥＦハンドＩＩＩドメイン）は生理的濃度に対応する濃度でカルシウムと結合すると報告されている。

【００３４】

理論にとらわれるものではないが、当然のことながら、本発明に含まれるアミノ酸配列変異体は親アミノ酸配列内の任意位置に１個以上のアミノ酸が置換、欠失及び／又は挿入され、少なくとも１個のＨＴＨドメイン（例えばＥＦハンドＩＩＩドメインに存在するクリチンの１６８位）に少なくとも１カ所のアミノ酸残基置換を含むという点で元の親アミノ酸配列と相違していてもよく、前記変異体はカルシウム親和性の増加（例えばＨＥＫ２９３Ｔ細胞において細胞内カルシウムに対して５００ｎＭ以下のＥＣ５０値）と生物発光の増強を示す。所定態様において、アミノ酸配列変異体は親配列（即ち配列番号１に記載のｗｔクリチン）に対して少なくとも約７０％、又は少なくとも約８０％、又は少なくとも約８５％、又は少なくとも約９０％、又は少なくとも約９５％、又は少なくとも約９６％、又は少なくとも約９７％、又は少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の一致度をもち、このような変異体は細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示し、このような変異体は配列番号２に記載のアミノ酸配列又はその変異体を含まない。

【００３５】
「配列一致度」なる用語はデフォルトギャップ重みを使用してプログラムＧＡＰ又はＢＥＳＴＦＩＴ等により２つのヌクレオチド又はアミノ酸配列を最適に整列させたときに、少なくとも７０％の配列一致度、又は少なくとも８０％の配列一致度、又は少なくとも８５％の配列一致度、又は少なくとも９０％の配列一致度、又は９５％以上の配列一致度（例えば９９％以上の配列一致度）をもつことを意味する。配列比較のためには、一般にある配列（例えば親配列）を参照配列とし、試験配列をこれに比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験配列と参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じてサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。こうすると、配列比較アルゴリズムは指定したプログラムパラメータに基づき、参照配列に対する試験配列の配列一致度百分率を計算する。

【００３６】
比較のための配列の最適アラインメントは例えばＳｍｉｔｈ　＆　Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）の局所相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　＆　Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の相同性アラインメントアルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ　＆　Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：２４４４（１９８８）の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，５７５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．におけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ及びＴＦＡＳＴＡ）、又は目視検査（一般にＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ参照）により実施することができる。配列一致度及び配列類似度百分率の決定に適したアルゴリズムの１例はＡｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３（１９９０）に記載されているＢＬＡＳＴアルゴリズムである。ＢＬＡＳＴ解析を実施するためのソフトウェアはＮａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎから公共入手可能（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ＮＣＢＩインターネットサーバーを通して公共アクセス可能）である。一般に、配列比較を実施するにはデフォルトプログラムパラメータを使用することができるが、カスタマイズパラメータも使用できる。アミノ酸配列では、ＢＬＡＳＴＰプログラムは語調（Ｗ）３、期待値（Ｅ）１０及びＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックスをデフォルトとして使用する（Ｈｅｎｉｋｏｆｆ　＆　Ｈｅｎｉｋｏｆｆ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１０９１５（１９８９）参照）。ＭＵＳＣＬＥ（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ　ｂｙ　Ｌｏｇ　Ｅｘｐｅｃｔａｔｉｏｎ）アルゴリズム（Ｅｄｇａｒ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３２：１７９２（２００４））により多重配列アラインメントを実施するためのソフトウェアはＥｕｒｏｐｅａｎ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅインターネットサーバーを通してＥｕｒｏｐｅａｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから公共入手可能である。

【００３７】
１態様において、本発明の改変型発光蛋白質はｗｔクリチンの（即ち配列番号１に記載の）アミノ酸配列に基づき、前記改変型発光蛋白質は少なくとも１６８位のリジンアミノ酸残基がヒスチジン、アルギニン及びリジン以外のアミノ酸残基で置換されている。所定態様において、配列番号１の１６８位のリジンはスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン、セリン、スレオニン、バリン、チロシン及びグルタミンから選択されるアミノ酸で置換され、改変型発光蛋白質は野生型発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及び／又はオベリン）に比較してカルシウム親和性の増加（例えばＨＥＫ２９３Ｔ細胞において５００ｎＭ以下のＥＣ５０値）と生物発光の増強を示す。特定態様において、本発明の改変型発光蛋白質は少なくとも１６８位のリジンがアスパラギン酸で置換されたアミノ酸配列を含み、前記改変型発光蛋白質はｗｔクリチン及びｗｔイク

オリンに比較して細胞内カルシウム親和性の増加と生物発光の増強を示す。

【００３８】

所定態様において、本発明の改変型発光蛋白質はミトコンドリアを標的とした配列（例えば配列番号８に記載の配列）を含む。所定態様において、ミトコンドリアを標的とした配列を含むクリチンの変異体は配列番号１０、配列番号１２、配列番号１６、配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２４、配列番号２６及び配列番号２８に記載のものである。

【００３９】

配列番号１の１６８位のリジンに置換するのに適したアミノ酸としては、ヒスチジン、アルギニン及びリジン以外の任意天然アミノ酸が挙げられる。所定態様において、１６８位のリジンに置換するのに適したアミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グリシン、セリン、スレオニン、バリン、チロシン及びグルタミンから選択される天然アミノ酸の１種が挙げられる。当分野で周知の非天然アミノ酸及びアミノ酸誘導体も１６８位のリジンに置換するために使用することができる。

【００４０】

本願で使用する「生物発光」、「発光」、「生物発光性」又は「発光性」なる用語は本発明の改変型発光蛋白質が２価カチオン（例えば$Ca^{2+}$）と結合して可視光を放出する能力を意味する。生物発光反応には一般にルシフェリン、ルシフェラーゼ及び分子状酸素の主要３成分が必要である。また、カチオン（例えば$Ca^{2+}$及び$Mg^{2+}$）や補因子（例えばＡＴＰ、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ）を含む他の成分も必要な場合もある。ルシフェラーゼは基質であるルシフェラーゼの酸化を触媒し、不安定な中間体を生成する酵素である。不安定な中間体がその基底状態まで減衰し、オキシルシフェリンを生成すると、発光する。生物発光は当分野で公知の１種以上の技術及び本願に記載する技術を使用して測定することができ、限定されないが、例えばＶｉｃｔｏｒ２及びＬｕｍｉｌｕｘ（ＰＥＲＫＩＮＥＬＭＥＲ）、ＦＬＩＰＲ及びＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ（ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＤＥＶＩＣＥＳ／ＭＤＳ ＡＮＡＬＹＴＩＣＡＬ）、Ｍｉｔｈｒａｓ（ＢＥＲＴＨＯＬＤ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ）、ＦＤＳＳ（ＨＡＭＡＭＡＴＳＵ ＰＨＯＴＯＮＩＣＳ）並びにＰＨＥＲＡｓｔａｒ（ＢＭＧ ＬＡＢＴＥＣＨ）等のルミノメーターの使用が挙げられる。

【００４１】

本願で使用する「生物発光の増強」なる用語は改変型発光蛋白質の生物発光が$Ca^{2+}$の存在下でｗｔ発光蛋白質に比較して何らかの増加を示すことを意味する。例えば、典型的態様において、本願に記載する改変型クリチン（例えば１６８位にアミノ酸変異をもつクリチン）等の改変型発光蛋白質の生物発光は細胞内$Ca^{2+}$を増加させる物質で刺激した生細胞中又は種々の濃度の$Ca^{2+}$を含有する溶液に暴露した浸透化細胞中で測定した場合に、ｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリンの生物発光に比較して増強している。カルシウムの存在下の改変型発光蛋白質の生物発光はｗｔ発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及び／又はオベリン）の生物発光に比較して約１．５％、又は約２％、又は約３％、又は約４％、又は約５％、又は約１０％、又は約２０％、又は約３０％、又は約４０％、又は約５０％、又は約６０％、又は約７０％、又は約８０％、又は約９０％、又は９０％を上回るまで増加させることができる。所定態様において、カルシウムの存在下の改変型発光蛋白質の生物発光はｗｔ発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン）に比較して約１．５倍、又は２倍、又は５倍、又は１０倍、又は１５倍、又は２０倍、又は２５倍、又は３０倍、又は３５倍、又は４０倍、又は４５倍、又は５０倍、又は５５倍、又は６０倍、又は６５倍、又は７０倍、又は７５倍、又は８０倍、又は８５倍、又は９０倍、又は９０倍を上回るまで増加する。

【００４２】

細胞内カルシウムが多くの重要な生理的応答及び病態生理的状態のモジュレーターとして機能することはよく知られている。これらの場合の大半では、細胞外シグナルが受容体（例えばＧＰＣＲ及びイオンチャネル）を介して受容され、細胞内$Ca^{2+}$濃度の変化に変換され、その結果、限定されないが、$Ca^{2+}$感受性キナーゼ、プロテアーゼ及び転写

因子の調節等のＣａ$^{2+}$感受性変化が細胞の内側に生じる。従って、細胞内プロセスの把握と細胞蛋白質の調節には細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度の測定が不可欠である。更に、Ｃａ$^{2+}$は細胞内シグナル伝達において中心的な役割を果たすため、薬剤発見における非常に魅力的なレポーターとなる。限定されないが、Ｇ蛋白質共役型受容体（ＧＰＣＲ）、イオンチャネル及びトランスポーターを含む医薬産業に重要な多くの薬剤標的分類は活性化されると、Ｃａ$^{2+}$動員を誘発し、これを「カルシウム流動」と言う。

【００４３】

細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度又はカルシウム流動の変化は蛍光色素（例えばｆｕｒａ－２及びｉｎｄｏ－１）（例えばＲ．Ｙ．Ｔｓｉｅｎ，Ｎａｔｕｒｅ ２９０，５２７（１９８１）；Ｒ．Ｙ．Ｔｓｉｅｎ，Ｔ．Ｐｏｚｚａｎ，Ｔ．Ｊ．Ｒｉｎｋ，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．９４，３２５（１９８２）参照）、Ｃａ$^{2+}$感受性生物発光クラゲ蛋白質であるイクオリン（例えばＥ．Ｂ．Ｒｉｄｇｗａｙ ａｎｄ Ｃ．Ｃ．Ａｓｈｌｅｙ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２９，２２９（１９６７））又はＣａ$^{2+}$感受性微小電極（例えばＣ．Ｃ．Ａｓｈｌｅｙ ａｎｄ Ａ．Ｋ．Ｃａｍｐｂｅｌｌ，Ｅｄｓ．，Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ Ｆｒｅｅ Ｃａ$^{2+}$ ｉｎ ｃｅｌｌｓ（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎｏｒｔｈ－Ｈｏｌｌａｎｄ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，１９７９））を使用して検出することができる。典型的な実験では、発光蛋白質を発現する哺乳動物細胞にセレンテラジン補因子を添加し、細胞内カルシウム濃度の指標であるフォトン放出を検出することにより細胞内カルシウム濃度を測定することができる。

【００４４】

本発明は公知発光蛋白質に比較して細胞内Ｃａ$^{2+}$親和性の増加を示す改変型発光蛋白質を提供する。従って、本発明の改変型発光蛋白質は細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度の変化に対する感受性が高いため、カルシウム流動の検出用の公知蛋白質及び試薬よりも優れている。改変型発光蛋白質は野生型発光蛋白質よりも細胞内カルシウム濃度変化に対する感受性が高いため、改変型発光蛋白質はＧＰＣＲ又はイオンチャネル活性のモジュレーターのスクリーニング、特に細胞内カルシウム濃度が少ししか変化しないようなモジュレーターのスクリーニング用アッセイで使用するのに極めて有用である。

【００４５】

本願で使用する「細胞内カルシウム親和性の増加」なる用語は本発明の改変型発光蛋白質（例えば１６８位にアミノ酸置換をもつ配列番号１に記載のクリチン）の細胞内カルシウム親和性が野生型発光蛋白質（例えばｗｔイクオリン及び／又はｗｔクリチン及び／又はｗｔオベリン）に比較して何らかの増加を示すことを意味する。例えば、細胞内カルシウム親和性を野生型発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及びｗｔオベリン）に比較して約１．５％、又は約２％、又は約３％、又は約３．５％、又は約４％、又は約５％、又は約１０％、又は約２０％、又は約３０％、又は約４０％、又は約５０％、又は約６０％、又は約７０％、又は約８０％、又は約９０％、又は約９５％、又は約９６％、又は約９７％、又は約９８％、又は約９９％以上増加させることができる。所定態様において、細胞内カルシウム親和性の増加とは、細胞内カルシウムに対する改変型発光蛋白質のＥＣ５０値が野生型発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及び／又はｗｔオベリン）に比較して低下することを意味する。発光蛋白質のカルシウム親和性は当分野で周知の技術及びアッセイを使用して測定することができ、限定されないが、本願に記載するものが挙げられる。下記実施例に記載する典型的なアッセイでは、発光蛋白質を発現する細胞にセレンテラジンを添加した後、濃度を変えてカルシウムを細胞に添加後に細胞により放出される生物発光を測定することによりカルシウム親和性を測定する。

【００４６】

本願で使用する「細胞内カルシウムに対するＥＣ５０値」なる用語は飽和量のカルシウム（即ちカルシウム濃度をそれ以上増加しても発光シグナルのそれ以上の増加を生じないような濃度のカルシウム）の存在下で発光シグナルに認められるシグナルの５０％のレベ

ルまで発光シグナル（即ち生物発光）を誘発する遊離カルシウム濃度を意味する。本願で使用する細胞内カルシウムに対するＥＣ５０値は改変型発光蛋白質の細胞内カルシウム親和性の尺度である。ＥＣ５０値は当分野で公知の１種以上のアッセイ及び本願、例えば下記実施例のセクションに記載するアッセイにより測定することができる。典型的態様において、本発明の改変型発光蛋白質はＨＥＫ２９３Ｔ細胞中で細胞内カルシウムに対するＥＣ５０値が５００ｎＭ以下であり、前記改変型発光蛋白質はｗｔイクオリン又はその変異体以外のものである（例えば配列番号２に記載のアミノ酸配列又はその変異体を含まない）。

【００４７】

所定態様では、細胞内カルシウムに対する改変型発光蛋白質のＥＣ５０値を野生型発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及び／又はｗｔオベリン）のＥＣ５０値に比較して約１．５％、又は２％、又は３％、又は４％、又は５％、又は１０％、又は１５％、又は２０％、又は２５％、又は３０％、又は５０％、又は６０％、又は７０％、又は８０％、又は９０％、又は９５％、又は９５％を上回るまで低下させる。所定態様では、本発明の改変型発光蛋白質のＥＣ５０値を野生型発光蛋白質（例えばｗｔクリチン及び／又はｗｔイクオリン及び／又はｗｔオベリン）のＥＣ５０値に比較して約１０ｎＭ、又は２０ｎＭ、又は３０ｎＭ、又は４０ｎＭ、又は５０ｎＭ、又は６０ｎＭ、又は７０ｎＭ、又は８０ｎＭ、又は９０ｎＭ、又は１００ｎＭ、又は１１０ｎＭ、又は１２０ｎＭ、又は１３０ｎＭ、又は１４０ｎＭ、又は１５０ｎＭ、又は１６０ｎＭ、又は１７０ｎＭ、又は１８０ｎＭ、又は１９０ｎＭ、又は２００ｎＭ、又は２１０ｎＭ、又は２２０ｎＭ、又は２３０ｎＭ、又は２４０ｎＭ、又は２５０ｎＭ、又は２６０ｎＭ、又は２７０ｎＭ、又は２８０ｎＭ、又は２９０ｎＭ、又は３００ｎＭ、又は３１０ｎＭ、又は３２０ｎＭ、又は３３０ｎＭ、又は３４０ｎＭ、又は３５０ｎＭ、又は３６０ｎＭ、又は３７０ｎＭ、又は３８０ｎＭ、又は３９０ｎＭ、又は４００ｎＭ、又は４１０ｎＭ、又は４２０ｎＭ、又は４３０ｎＭ、又は４４０ｎＭ、又は４５０ｎＭ、又は４５０ｎＭを上回るまで低下させる。

【００４８】

「ＧＰＣＲ」なる用語は各種細胞シグナル伝達経路に関与するＧ蛋白質共役型受容体を意味する。自然界における最大で最も多様な蛋白質ファミリーの１種として、Ｇ蛋白質共役型受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーは発生及び増殖、神経調節、血管新生、代謝障害、炎症、並びにウイルス感染等の各種生物及び病理プロセスにおいて重要な役割を果たす。このファミリーは今日の医薬研究で最も標的とされている蛋白質ファミリーの１種である。ＧＰＣＲスーパーファミリーの全メンバーは同様の７回膜貫通ドメインをもつが、共通配列モチーフに基づいて分類することができる。例えば、クラスＡはロドプシン様ＧＰＣＲを含み、クラスＢはセクレチン様ＧＰＣＲを含み、クラスＣは代謝型グルタミン酸／フェロモンＧＰＣＲを含み、クラスＤは真菌フェロモンＧＰＣＲを含み、クラスＥはｃＡＭＰ　ＧＰＣＲを含む。その他のＧＰＣＲはフリズルド／スムーズンド（Ｆｒｉｚｚｌｅｄ／Ｓｍｏｏｔｈｅｎｅｄ）ＧＰＣＲ、鋤鼻器ＧＰＣＲ及び一部の未分類に分類することができる。

【００４９】

下表Ｉは本願に記載する核酸配列及びアミノ酸配列の一覧を対応する配列識別子（配列番号）と共に示す。

【００５０】

【表１】

表Ｉ

| 配列番号 | 簡単な説明 |
|---|---|
| 1 | 野生型クリチン(wt クリチン)アミノ酸配列 |
| 2 | 野生型イクオリン(wt イクオリン)アミノ酸配列 |
| 3 | 野生型ミトロコミン(wt ミトロコミン)アミノ酸配列 |
| 4 | 野生型オベリン(wt オベリン)アミノ酸配列 |
| 5 | ミトコンドリア野生型クリチン(mt クリチン)アミノ酸配列 |
| 6 | ミトコンドリア野生型イクオリン(mt イクオリン)アミノ酸配列 |
| 7 | ミトコンドリア野生型オベリン(mt オベリン)アミノ酸配列 |
| 8 | COX8 ミトコンドリアタグアミノ酸配列 |
| 9 | K168D 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 10 | ミトコンドリア K168D 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168D) |
| 11 | K168E 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 12 | ミトコンドリア K168E 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168E) |
| 13 | K168H 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 14 | ミトコンドリア K168H 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168H) |
| 15 | K168G 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 16 | ミトコンドリア K168G 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168G) |
| 17 | K168N 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 18 | ミトコンドリア K168N 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168N) |
| 19 | K168Q 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 20 | ミトコンドリア K168Q 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168Q) |
| 21 | K168S 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 22 | ミトコンドリア K168S 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168S) |
| 23 | K168T 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 24 | ミトコンドリア K168T 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168T) |
| 25 | K168V 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 26 | ミトコンドリア K168V 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168V) |
| 27 | K168Y 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 28 | ミトコンドリア K168Y 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168Y) |
| 29 | K168R 改変型クリチンアミノ酸配列 |
| 30 | ミトコンドリア K168R 改変型クリチンアミノ酸配列(mt クリチン K168R) |
| 31 | 野生型クリチン EF ハンド III ドメインアミノ酸配列 |
| 32 | 野生型クリチン(wt クリチン)核酸配列 |
| 33 | 野生型イクオリン(wt イクオリン)核酸配列 |
| 34 | K168D 改変型クリチン核酸配列 |
| 35 | ミトコンドリア野生型クリチン(mt クリチン)核酸配列 |
| 36 | ミトコンドリア野生型イクオリン(mt イクオリン)核酸配列 |
| 37 | ミトコンドリア K168D 改変型クリチン (mt クリチン K168D)核酸配列 |

| | |
|---|---|
| 38 | K168D センスプライマー |
| 39 | K168D アンチセンスプライマー |
| 40 | K168E センスプライマー |
| 41 | K168E アンチセンスプライマー |
| 42 | K168G センスプライマー |
| 43 | K168G アンチセンスプライマー |
| 44 | K168N センスプライマー |
| 45 | K168N アンチセンスプライマー |
| 46 | K168Q センスプライマー |
| 47 | K168Q アンチセンスプライマー |
| 48 | K168V センスプライマー |
| 49 | K168V アンチセンスプライマー |
| 50 | K168S センスプライマー |
| 51 | K168S アンチセンスプライマー |
| 52 | K168T センスプライマー |
| 53 | K168T アンチセンスプライマー |
| 54 | K168Y センスプライマー |
| 55 | K168Y アンチセンスプライマー |
| 56 | K168R センスプライマー |
| 57 | K168R アンチセンスプライマー |
| 58 | K168H センスプライマー |
| 59 | K168H アンチセンスプライマー |
| 60 | H1 フォワードPCR プライマー |
| 61 | H1 リバースPCR プライマー |

【００５１】

ＩＩ．典型的な発光蛋白質

本発明は改変型Ｃａ$^{2+}$結合性発光蛋白質に関する。Ｃａ$^{2+}$結合性発光蛋白質は原生動物門、刺胞動物門及び有櫛動物門の発光生物により使用され、光を生成する蛋白質－基質－酸素複合体である。文献に記載されている典型的なＣａ$^{2+}$結合性発光蛋白質としては、タラシコリン、イクオリン、ミトロコミン、クリチン（別称フィアリジン）、オベリン、ムネミオプシン及びベロビンが挙げられる。これらの発光蛋白質のうち、イクオリン、ミトロコミン、クリチン及びオベリンの４種は刺胞動物門ヒドロ虫綱に由来し、比較的寸法が小さい（２１．４～２７．５ｋＤａ）。

【００５２】

セレンテラジンはこれらの発光蛋白質イクオリン、ミトロコミン、クリチン及びオベリンに含まれる共通の発光発色団であるため、これらの４種の発光蛋白質において発光反応は同一であると考えられる（Ｔｓｕｊｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．，６２：６５７－６６１（１９９５））。従来の命名法ではこれらの発光蛋白質の名称を発色団と複合体化したポリペプチドと定義しており、発色団を含まない発光蛋白質をアポ蛋白質（例えばアポイクオリン、アポクリチン、アポオベリン及びアポミトロコミン）と呼んでいる。更に、Ｃａ$^{2+}$結合性発光蛋白質は強く結合した$O_2$分子を保持すると思われる。カルシウムイオンが発光蛋白質と結合すると、これらの蛋白質はセレンテラジンと$O_2$の酸化を触媒し、セレンテラミド、$CO_2$及び最大発光波長４７０ｎｍのフォトンを生じる。

【００５３】

イクオリンは毒性が低いため、１９６０年代初頭以来、細胞内カルシウム指示薬として使用されている。イクオリンの当初の用法では生化学的に精製した酵素を利用し、標的細胞に微量注入していた（Ｂｌｉｎｋｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖ．，２８：１－９３（１９７６））。

【００５４】

分子クローニングの結果、アポイクオリンは１本のポリペプチド鎖で１８９アミノ酸残基から構成され、４個のＨＴＨドメインを含み、そのうちの３個はＥＦハンド$Ca^{2+}$結合部位の特徴を表すアミノ酸配列をもつことが判明した（Ｉｎｏｕｙｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，８２：３１５４－３１５８（１９８５））。イクオリンの遺伝子クローニングは細胞内又は個体内における組換え発現への道を開いた。組換えイクオリンｃＤＮＡに細胞内標的シグナル配列のタグを付けて発現させ、イクオリンを特定の細胞内区画に輸送することにより、これらの区画内で特異的にカルシウム濃度を測定することが可能になる（Ｒｉｚｚｕｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．４０：３３９－３５８（１９９４））。ミトコンドリアを選択的に標的としたイクオリンによるこのような研究の結果、$Ca^{2+}$が小胞体（ＥＲ）ストアから放出されると、ミトコンドリアはサイトゾル内の濃度を上回る濃度までカルシウムを蓄積することが判明した。

【００５５】

多くのＧＰＣＲはイノシトール三リン酸を介してＥＲストアからのカルシウム放出を刺激することによりシグナル伝達する。従って、イクオリンはＧＰＣＲ介在性カルシウム流動を測定するために利用されている。ミトコンドリアを標的としたイクオリンを使用して細胞内カルシウム流動を容易に測定できるため、多様なＧＰＣＲのモジュレーターの高スループットアッセイの開発が可能になった（Ｓｔａｂｌｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２５２：１１５－１２６（１９９７）；Ｕｎｇｒｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７２：３４－４２（１９９９））。更に、イクオリンはカルシウムイオンチャネル機能の高スループット解析にも利用されている（Ｗａｌｓｔａｂ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，３６８：１８５－１９２（２００７））。

【００５６】

ＩＩＩ．クリチンの構造

別の発光蛋白質であるクリチン（別称フィアリジン）はヒドロ虫Ｃｌｙｔｉａ ｇｒｅｇａｒｉｕｍ（旧称Ｐｈｉａｌｉｄｉｕｍ ｇｒｅｇａｒｉｕｍ）からクローニングされた。

【００５７】

$Ca^{2+}$活性化クリチン（別称クリチンＩ）のｃＤＮＡのクローニングと配列分析はＩｎｏｕｙｅらにより最初に記載された（ＦＥＢＳ，３１５，３４３－３４６（１９９３））。クリチンは１８９アミノ酸残基から構成され、イクオリンと約６４％のアミノ酸配列一致度であり、４個のＨＴＨドメインを含み、そのうちの３個が$Ca^{2+}$と結合するＥＦハンドドメインである。野生型クリチンのアミノ酸配列を配列番号１に記載する。アポイクオリンからイクオリンへの再生の場合と全く同様に、精製アポクリチンをセレンテラジン、$O_2$、２－メルカプトエタノール及びＥＤＴＡで再生すると、クリチンが得られる。再構成されたクリチンにカルシウムを添加すると、４７０ｎｍの最大波長で発光することが報告されているので、クリチンの生物発光反応はイクオリンと同様であると考えられる（Ｉｎｏｕｙｅ ａｎｄ Ｓａｈａｒａ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．，５３：３８４－３８９（２００７））。他方、クリチンはイクオリンよりもカルシウム親和性が低い。クリチンＩＩと呼ばれるクリチンの第２のアイソタイプがＣｌｙｔｉａ ｇｒｅｇａｒｉｕｍから最近クローニングされた（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１４３：７１１－７１７（２００８））。クリチンＩとクリチンＩＩはアミノ酸一致度が８８．４％であり、カルシウム親和性が同等であり、発光に関する総量子収率も同等であるが、反応速度が相違し、クリチンＩＩはクリチンＩとイクオリンの両者よりも４．５倍高

いピーク発光を示す。

【００５８】

ＩＶ．改変型発光蛋白質の作製

本発明の改変型発光蛋白質は当分野で公知の任意の適切な方法を使用して作製することができる。例えば、核酸の部位特異的突然変異誘発の標準技術を使用することができ、例えば、実験マニュアルであるＳａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ著Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇに記載されている技術が挙げられる。更に、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）突然変異誘発を利用する標準分子生物学技術を使用してもよい。

【００５９】

所定態様では、標準遺伝子工学技術を使用して改変型発光蛋白質を作製する。例えば、ｗｔ発光蛋白質をコードする核酸分子又はその一部を適切な宿主細胞における発現に適したベクターにクローニングすることができる。適切な発現ベクターは当分野で周知であり、一般に改変型発光蛋白質をコードする配列の転写と翻訳に必要な要素を含む。

【００６０】

本願に記載する改変型発光蛋白質は固相ペプチド合成法を含む当分野で周知の方法を使用してアミノ酸前駆体から化学的に合成してもよい。

【００６１】

改変型発光蛋白質の発現は、酵母、昆虫もしくは哺乳動物等の真核宿主に由来する細胞中、又は原核宿主細胞（例えば大腸菌等の細菌）中で実施することができる。

【００６２】

所定態様において、改変型発光蛋白質は例えば、特定の細胞内区画内のカルシウム流動を検出するために、このような発光蛋白質を細胞内の特定区画に標的輸送するためのシグナル配列を含む。特定態様では、例えば改変型蛋白質のアミノ末端にミトコンドリアシグナル配列（例えば本願に記載するようなＣＯＸ８シグナル配列）を付加することにより、改変型発光蛋白質をミトコンドリアに特異的に標的輸送する。

【００６３】

所定態様において、改変型発光蛋白質は改変型発光蛋白質の検出及び／又は精製のために、Ｎ末端、Ｃ末端又は内部領域にタグないし融合体を含む。このような配列タグとしては、限定されないが、ヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ｍｙｃタグ、ヘキサヒスチジンタグ及びグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）融合体が挙げられる。

【００６４】

所定態様では、各ファージがファージ表面に提示される個々の改変型発光蛋白質をコードするＤＮＡ配列を含むように、バクテリオファージの表面に改変型発光蛋白質を発現させてもよい。このアプローチでは、選択された位置に各種アミノ酸を生成するように選択された発光蛋白質配列のこれらの位置にランダム又は半ランダムオリゴヌクレオチドを合成することにより、改変型発光蛋白質のライブラリーを作製する。コードするＤＮＡを適切なファージベクターに挿入し、ファージ粒子にパッケージングし、適切な細菌宿主に感染させるために使用する。こうして配列の各々を１個のファージベクターにクローニングし、（例えばクリチンの場合には１６８位に突然変異をもち、Ｃａ２＋親和性の増加を示す）目的の改変型発光蛋白質を単離し、選択された改変型発光蛋白質をコードするヌクレオチド配列をヌクレオチドシーケンシングにより決定することができる。

【００６５】

Ｖ．改変型発光蛋白質をコードする核酸分子の適切な細胞への導入

核酸分子を適切な細胞に導入するには、当業者に公知の各種方法が利用可能である。例えば、リン酸カルシウム、カチオン性脂質及びカチオン性ポリマー（例えばポリエチレンイミン）を核酸分子と複合体化して細胞に添加すると、細胞は複合体を細胞内に取込み、核酸分子を転写及び／又は翻訳する。あるいは、エレクトロポレーション、パーティクルガン遺伝子導入法及びマイクロインジェクション等の電子物理的方法を使用し、細胞膜内

に一過的に開口を形成し、細胞膜を通して核酸分子を拡散させてもよい。組換え遺伝子を挿入するようにレンチウイルス、バキュロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス等のウイルスベクターを遺伝子操作し、受容細胞に組換えウイルスを感染させ、コードされる組換え蛋白質を発現させてもよい。理論的には、本発明に含まれる改変型発光蛋白質をコードする核酸分子を任意哺乳動物細胞株にトランスフェクトすることができる。典型的な細胞株としては、限定されないが、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨＥＫ２９３、Ｕ－２ＯＳ、ＨｅＬａ及びＮＩＨ３Ｔ３が挙げられる。

【００６６】

このようなトランスフェクトした細胞株を、例えばトランスフェクションから２４～７２時間後にアッセイで使用することができる。あるいは、選択マーカーの遺伝子も含むプラスミドに目的の核酸分子を挿入した場合には、トランスフェクトしていない細胞に対して毒性であるが、共発現させた選択マーカーにより不活性化される化合物で細胞を選択してもよい。典型的な選択剤としては、ゲネチシン、ハイグロマイシン、ゼオシン及びピューロマイシンが挙げられる。

【００６７】

ＶＩ．改変型発光蛋白質の細胞内カルシウム親和性の測定

カルシウム活性化発光蛋白質の細胞内カルシウム親和性は本願に記載する方法を含む当業者に公知の数種の方法により測定することができる。一般に、各方法は既知カルシウム親和性をもつＥＧＴＡやＥＤＴＡ等のカルシウム結合性緩衝液の存在下で所定濃度のカルシウムを含有する溶液を使用する。従って、このような緩衝溶液中の遊離カルシウムの有効濃度を容易に計算することができる。

【００６８】

大腸菌等の細菌中で発光蛋白質を発現させ、精製後、基質セレンテラジンと複合体化してもよい。哺乳動物細胞中で発光蛋白質を発現させ、細胞から細胞溶解液を調製後、セレンテラジンの存在下でインキュベートしてもよい。あるいは、発光蛋白質を発現する細胞にセレンテラジンを添加後、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００やジギトニン等の界面活性剤で浸透化させてもよい。いずれの場合も、セレンテラジンの酸化により生じたフォトンの放出を定量するように設計されたルミノメーターで発光蛋白質調製物を緩衝カルシウム溶液に暴露する。

【００６９】

ＶＩＩ．改変型発光蛋白質を使用したＧＰＣＲ介在性又はイオンチャネル介在性生物発光の測定

改変型発光蛋白質は生物発光アッセイで無傷の生細胞中のＧＰＣＲ活性又はイオンチャネル活性を測定するために使用することができる。典型的実験では、ＧＰＣＲ又はイオンチャネルをコードする核酸分子と、アポ発光蛋白質をコードする別の核酸分子を細胞にトランスフェクトする。あるいは、内在性ＧＰＣＲ又は内在性イオンチャネルを発現する細胞を使用し、アポ発光蛋白質をコードする核酸分子をトランスフェクトしてもよい。コードされる組換え蛋白質の発現を可能にする時間（一般に２４～７２時間）にわたり、トランスフェクトした細胞を培地に維持する。あるいは、トランスフェクトした細胞を１種以上の選択剤で一般に１～３週間処理し、安定的に組込まれた１個以上の遺伝子を含む細胞を集積する。

【００７０】

トランスフェクトした生細胞を天然型でも化学修飾型でもよい発色団セレンテラジンの存在下でインキュベートする。セレンテラジンは細胞膜を容易に通過して細胞に進入し、アポ発光蛋白質と複合体を形成する。ＧＰＣＲの場合には、その後、再構成された発光蛋白質を含む細胞をＧＰＣＲのリガンドに暴露し、発光をルミノメーターで定量する。

【００７１】

ＶＩＩＩ．ＧＰＣＲ活性のモジュレーターを同定するためのスクリーニング方法

本発明はＧＰＣＲ活性のモジュレーター、例えばアクチベーター、阻害剤、刺激剤、エンハンサー、アゴニスト及びアンタゴニストのスクリーニング方法も提供する。例えば、

モジュレーターの存在下でカルシウム流動を検出することによりＧＰＣＲ活性のモジュレーターを同定するために改変型発光蛋白質を使用することができる。

【００７２】

サイトゾル遊離カルシウム濃度の刺激は多くのＧＰＣＲの一次シグナル伝達経路である。一般に、アゴニストが所定のＧＰＣＲと結合すると、立体構造変化が起こり、Ｇｑ／１１クラスのヘテロ三量体Ｇ蛋白質が活性化する。活性化したＧＴＰ結合型のＧｑのαサブユニットは酵素ホスホリパーゼｃを活性化させ、ひいては膜結合脂質ホスファチジルイノシトールの開裂を触媒する。この開裂反応の結果、ジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸が生じ、前者は脂質二重層と結合し続け、後者はサイトゾルに放出される。イノシトール三リン酸は小胞体（ＥＲ）上のカルシウムチャネルと結合してこれを活性化させ、カルシウムをＥＲ内のストアからサイトゾルへと動員する。サイトゾル遊離カルシウム濃度のこのようなＧＰＣＲ介在性変化（即ちカルシウム流動）は細胞内リン酸化及び転写の変化を含む多数の生物学的に重要な下流応答を引き起こす。その後、サイトゾルからのカルシウムはミトコンドリアに蓄積する。更に、ＥＲからミトコンドリアへのカルシウムの直接移動が生じる場合もあると報告されている。

【００７３】

サイトゾル及びミトコンドリア遊離カルシウムの変化を検出及び定量するための数種の方法が開発されている。例えば、カルシウムと結合すると、蛍光強度又は最大発光もしくは励起波長を変化させる蛍光色素が開発されている。このような色素を細胞に添加し、サイトゾルに蓄積することができる。サイトゾルカルシウム濃度が変化すると、蛍光強度又は波長最大値が変化し、蛍光検出器を使用することにより定量することができる。更に、細胞内カルシウムの変化をモニターするためにイクオリン、クリチン及びオベリン等のカルシウム活性化発光蛋白質を使用してもよい。このような発光蛋白質はこれらの蛋白質を各種オルガネラに誘導する配列と融合できるため、各種細胞区画内のカルシウム濃度を測定できるという利点がある。

【００７４】

このような方法は細胞区画内のカルシウム濃度の変化をモニターするために利用可能な簡単で高感度の方法であるため、ＧＰＣＲ活性のモジュレーターのスクリーニングで利用されることが多い。一般に、９６又は３８４ウェルプレートで内在性又は組換えＧＰＣＲを発現する細胞株にＦｌｕｏ－４等のカルシウム感受性色素を添加する。液体操作機能を備える蛍光プレートリーダーは被験化合物をプレートに添加すると同時に蛍光を定量する。初回に添加した化合物がアンタゴニストであり、既知アゴニストの活性を阻害するか否かを調べるために２回目の添加で既知アゴニストを添加してもよい。このようなスクリーンはデバイス当たり１日当たりほぼ１００枚のプレート、又は４０，０００種までの化合物を分析することが可能である。このような高スループットスクリーンはヒスタミン受容体（$H_1$～$H_4$）、５－ＨＴ受容体（５－$HT_{1A}$、５－$HT_{1B}$、５－$HT_{1D}$、５－$HT_{2A}$、５－$HT_{2B}$、５－$HT_{2C}$、５－$HT_4$、５－$HT_6$及び５－$HT_7$）、ドーパミン受容体（$D_1$～$D_5$）、アドレナリン受容体（α１Ａ、α１Ｂ、α１Ｄ、α２Ａ、α２Ｂ、α２Ｃ、β１、β２、β３）、グルカゴン様ペプチド受容体（ＧＬＰ－１受容体）、オピオイド受容体（δ、κ、μ）等の典型的なＧＰＣＲと相互作用する新規化合物を発見するために従来から現在に至るまで広く使用されている。

【００７５】

しかし、蛍光カルシウムアッセイで実施されているスクリーニング作業にはいくつかの欠点がある。例えば、本来蛍光性の化合物はアッセイを妨害する可能性があることや、１５３６ウェルフォーマットを小型化するにはシグナル対バックグラウンド比は不十分であるため、比較的高い比率で疑陽性が認められる。目的のＧＰＣＲを発現する細胞でイクオリンを使用して発光カルシウムアッセイを実施した処、これらの欠点の一部が解消され、感度強化とスループット向上が得られることが実証された（Ｇｉｌｃｈｒｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｃｒｅｅｎ．，１３：４８６－４９３（２００８））。

【００７６】

以下、実施例により本発明を更に例証するが、以下の実施例は限定的であると解釈すべきではない。本願と図面の随所に言及する全文献、特許及び公開特許出願の内容を本願に援用する。

【実施例】

【００７７】

［実施例１］

クリチン変異体の作製

サイトゾル発現用の未改変型と、ミトコンドリアを標的とした配列を挿入した型の各種クリチンを作製した。典型的実験では、未改変型野生型クリチン（ｃｙｔｏクリチンｗｔと言う）とＣＯＸ８ミトコンドリアリーダー配列を付加したクリチン（ｍｔクリチンｗｔと言う）をコードするｃＤＮＡをＧｅｎＳｃｒｉｐｔにより化学的に合成した。次にＣＭＶプロモーター（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ）の制御下にｃＤＮＡを哺乳動物発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１にサブクローニングした。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅキット（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ）を使用して部位特異的突然変異誘発により１６８位にリジン→アスパラギン酸突然変異（Ｋ１６８Ｄ）を含む突然変異をクリチンｃＤＮＡに導入した。

【００７８】

クリチンの１６８位のリジンをコードするコドンＡＡＡをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グリシン、グルタミン、バリン、セリン、スレオニン、チロシン、アルギニン及びヒスチジンの１種に置換した。これらの改変を行うために使用したプライマーは上記表Ｉにまとめた。

【００７９】

［実施例２］

野生型クリチン、改変型クリチンＫ１６８Ｄ及び野生型イクオリンのカルシウム親和性の測定

改変型クリチンの作製後、Ｈ１ヒスタミン受容体（ヒト脳ｃＤＮＡライブラリーに由来するＨ１特異的プライマーであるフォワードプライマー５’－ＧＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＡＧＣＣＴＣＣＣＣＡ　ＡＴＴＣＣＴＣ－３’（配列番号６０）とリバースプライマー５’－ＴＣＡＴＣＡＧＧＡＧＣＧＡＡＴＡＴＧＣＡＧ　ＡＡＴＴＣＴＣ－３’（配列番号６１）を使用してＰＣＲにより得られたＧｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿０００８６１）のコトランスフェクションを使用する一過的トランスフェクションアッセイで各種変異体をその細胞内カルシウム親和性についてｗｔイクオリンと比較した。

【００８０】

典型的実験では、Ｔａｒｇｅｆｅｃｔ－２９３試薬（ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ　ＳＹＳＴＥＭＳ）を使用して（Ｈ１ヒスタミン受容体をコードするｃＤＮＡを含む）ｐｃＤＮＡ３．１－Ｈ１と、野生型ミトコンドリアクリチン（ｍｔクリチンと言う）、１６８位にリジン→アスパラギン酸突然変異をもつ改変型ミトコンドリアクリチン（ｍｔクリチンＫ１６８Ｄと言う）、１６８位にリジン→グルタミン酸突然変異をもつ改変型ミトコンドリアクリチン（ｍｔクリチンＫ１６８Ｅと言う）、野生型ミトコンドリアオベリン（ｍｔオベリンと言う）又は野生型ミトコンドリアイクオリン（ｍｔイクオリンと言う）をコードするｃＤＮＡを含むｐｃＤＮＡ３．１各２μｇをＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ－ＣＲＬ－１１２６８）に一過的にコトランスフェクトした。４８時間後に、Ａｃｃｕｔａｓｅ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ）を使用して細胞を解離させ、遠心し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３培地（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ）中、５μＭセレンテラジンに再懸濁し、暗所で室温にて３～４時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を遠心し、$Ca^{2+}$不含ＨＢＳＳ／ＨＥＰＥＳ緩衝液に$1\times10^{6}$個／ｍｌの密度で再懸濁した。次に、Ｖｉｃｔｏｒ２ルミノメータープレートリーダー（ＷＡＬＬＡＣ，ＰＥＲＫＩＮＥＬＭＥＲ）を使用することにより、１０ｍＭ　ＥＧＴＡと遊離カルシウム濃度が１７ｎＭ～３９．６μＭとなるような濃度系列の$Ca^{2+}$を含有するＭＯＰＳ／ＫＣｌ緩衝液中、５０μＬ／ウェル　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を加えた９６ウェルプレートに各トランスフェクションの細胞懸濁液１００μｌ／ウェルを添加後、２０秒後に総生物発光量を測定した。

【００８１】
このような実験の結果を図２に示す。図２に示すように、Ｋ１６８Ｄ突然変異をもつ改変型ミトコンドリアクリチン（ｍｔクリチンＫ１６８Ｄ）は$Ca^{2+}$親和性が非常に高く、即ちＥＣ５０値が１２９ｎＭであった。他方、ｍｔクリチンとｍｔイクオリンの親和性は従来報告されている範囲内であることが確認され、即ちｍｔイクオリンは２６９ｎＭのＥＣ５０値を示し、ｍｔクリチンは１３４８ｎＭのＥＣ５０値を示した。Ｋ１６８Ｅ突然変異をもつ改変型ミトコンドリアクリチンも比較的高いカルシウム親和性、即ち１７３ｎＭのＥＣ５０値を示した。
【００８２】
［実施例３］
各種発光蛋白質変異体により示されるＧＰＣＲ介在性発光の比較
別の実験で、Ｈ１ヒスタミン受容体を活性化させるために種々の濃度のヒスタミンを細胞に添加した後に各種発光蛋白質の生物発光を測定することにより、各種発光蛋白質が生細胞中のカルシウム流動を検出する能力を評価した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ）をトランスフェクション試薬として使用した以外は上記実施例２に記載したように、野生型発光蛋白質又は本発明の改変型発光蛋白質をコードするｃＤＮＡと共にＨ１ヒスタミン受容体をコードするｃＤＮＡをＵ－２ＯＳ細胞にトランスフェクトした。２日目に細胞をトリプシン処理し、計数し、組織培養用の表面処理済み白色９６ウェルプレート（ＣＯＳＴＡＲ）で１０％胎仔ウシ血清、非必須アミノ酸、ＨＥＰＥＳ及びペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＤＭＥＭから構成される増殖培地に細胞約５０，０００個／ウェルの密度で播種した。３日目に培地を捨て、細胞をＨＢＳＳ／ＨＥＰＥＳ（$Ca^{2+}$含有）２００μｌ／ウェルで１回洗浄した。次に２００μｌ／ウェルの容量のＨＢＳＳ／ＨＥＰＥＳ（$Ca^{2+}$含有）中、５μＭセレンテラジンの存在下で細胞を暗所で室温にて３～４時間インキュベートした。インキュベーション後、セレンテラジン溶液を捨て、細胞を洗浄し、$Ca^{2+}$と$Mg^{2+}$を同時に含有するＨＢＳＳ／ＨＥＰＥＳ緩衝液に交換した。$Ca^{2+}$と$Mg^{2+}$を同時に含有するＨＢＳＳ／ＨＥＰＥＳに種々の濃度で溶解したヒスタミン５０μｌ／ウェルを細胞に加え、２０秒後にＶｉｃｔｏｒ２ルミノメーターを使用して総生物発光量を測定した。
【００８３】
このような典型的実験の１例の結果を図３のグラフに示す。グラフに示すように、サイトゾルクリチンＫ１６９Ｄは実験で試験した他の型のクリチン及びイクオリンよりも著しく強い発光を示した。
【００８４】
［実施例４］
各種発光蛋白質変異体に介在される総発光量とＧＰＣＲ介在性発光量の比較
次の実験では、カルシウム活性化発光蛋白質の有効性の別の指標として、各種発光蛋白質により示される総生物発光量とＧＰＣＲ介在性生物発光量を比較した。典型的実験では、実施例３に記載したようにＵ－２ＯＳ細胞にトランスフェクトし、播種し、セレンテラジンを添加した。同様に実施例３に記載したように緩衝液単独又は１０μＭヒスタミンにより誘導される発光を測定した。更に、細胞中で飽和カルシウム濃度を使用して検出可能な活性発光蛋白質の総量を調べるために、１ｍＭカルシウムの存在下でＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００の添加により誘導される発光も測定した。
【００８５】
このような実験の１例の結果を図４の棒グラフにまとめる。図４から明らかなように、ミトコンドリア型とサイトゾル型のどちらの改変型クリチンＫ１６８Ｄも総シグナルの１００％に近いＧＰＣＲ介在性シグナルを示した。他方、ミトコンドリア型とサイトゾル型のイクオリンはそれぞれ総シグナルの約７０％及び３０％しか生じず、ミトコンドリア型とサイトゾル型の野生型クリチンはそれぞれ総シグナルの約３０％及び３％しか生じなかった。
【００８６】

［実施例５］
外来キメラＧ蛋白質と共役したＧＰＣＲにより誘導される発光として各種発光蛋白質変異体により示される発光の比較
別の実験で、ＧＩＰ受容体（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿０００１６４；ＯＰＥＮ　ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）と、プロミスキャスＧ蛋白質αサブユニットと、ミトコンドリアを標的とした野生型クリチン（ｗｔクリチン）、ミトコンドリアを標的とし、配列番号１の１６８位にアミノ酸置換をもつ１１種の改変型クリチン（配列番号１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８及び３０）、サイトゾル野生型クリチン（配列番号１）、配列番号１の１６８位にアミノ酸置換をもつ２種の改変型サイトゾルクリチン（配列番号９及び１１）、ミトコンドリアを標的とした野生型イクオリン及びサイトゾル野生型イクオリン（それぞれ配列番号６及び２）、並びにミトコンドリアを標的とした野生型オベリン及びサイトゾル野生型オベリン（それぞれ配列番号７及び４）を含む一連の発光蛋白質をコードするｃＤＮＡを含むプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一過的にコトランスフェクトした。ＧＩＰ受容体は通常ではＧ蛋白質のＧｓクラスと結合してｃＡＭＰ経路を刺激するが、Ｇｑと結合してカルシウム流動を活性化させることはない。しかし、ＧαｓとＧαｑに由来する配列を含むキメラＧ蛋白質とＧＩＰ受容体を共発現させると、ＧＩＰ受容体はカルシウム流動を刺激できるようになる。
【００８７】
細胞１００，０００個／ウェルを９６ウェルプレートに分注後、ＧＩＰリガンド（$10^{-11}$～$10^{-6}$Ｍ）により誘導されるＧＰＣＲ介在性生物発光と、１ｍＭ　$Ca^{2+}$の存在下で１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００の添加により誘導される総シグナルについてアッセイした。一部の発光蛋白質の種々の濃度のＧＩＰに対する用量応答曲線の結果を図５にまとめる。サイトゾル型とミトコンドリア型のクリチンＫ１６８Ｄはどの野生型発光蛋白質よりも有意に強いシグナル強度を示す。これらのデータによると、クリチンＫ１６８Ｄはカルシウム経路と非天然共役させることによりＧＰＣＲの分析感度を増強できることが明らかである。
【００８８】
全種の発光蛋白質で得られた結果を下表ＩＩにまとめる。％ＧＰＣＲ／総シグナルは１ｍＭ　$Ca^{2+}$の存在下でＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００により誘導されるシグナルの百分率として最大ＧＩＰ（１μＭ）により誘導されるシグナルを表す。シグナル対バックグラウンド比は最大ＧＩＰ（１μＭ）により誘導されるシグナルを緩衝液単独により誘導されるシグナルで割った数値として計算した。カルシウムのＥＣ５０値はＧＰＣＲ又はＧ蛋白質をコトランスフェクトせずにミトコンドリアを標的とした発光蛋白質をＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした場合について図２の説明で上述したように求めた。カルシウム親和性はクリチンの残基１６８のアミノ酸側鎖の性質と相関した。
【００８９】
残基を酸性側鎖及び水酸化側鎖で置換した場合（例えばクリチンＫ１６８Ｄ、Ｋ１６８Ｔ及びＫ１６８Ｅ）には一般に野生型クリチン、イクオリン及びオベリン（それぞれ５４５ｎＭ、２３５ｎＭ及び３４５ｎＭ）よりも高いカルシウム親和性（それぞれ１６０ｎＭ、１７４ｎＭ及び１７６ｎＭ）を示した。側鎖を水酸化したものと側鎖をもたないものとの他の２種のクリチン突然変異体Ｋ１６８Ｓ及びＫ１６８Ｇは野生型イクオリンと同等でｗｔクリチンよりも良好なカルシウム親和性を示した。ｗｔクリチンの１６８位のリジンを疎水性アミノ酸残基（例えばバリン及びチロシン）又はカルボキサミド側鎖（例えばアスパラギン及びグルタミン）で置換すると、ｗｔイクオリンよりも低く且つ野生型クリチンよりも高いカルシウム親和性を示した。クリチンの１６８位を塩基性残基（例えばヒスチジン及びアルギニン）で置換すると、カルシウム親和性は野生型クリチンと同等であった。
【００９０】
細胞に添加したリガンド濃度（Ｘ軸）に対して発光（Ｙ軸）をプロットし、Ｓ字状用量

応答曲線フィッティングアルゴリズム（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ）を適用することにより、リガンドにより誘導される受容体介在性カルシウム流動のＥＣ５０値を求めた。１６８位にアミノ酸置換をもつ各種改変型クリチンのＧＰＣＲ介在性シグナルも側鎖の性質と相関した。更に、発光蛋白質の細胞内位置（サイトゾルとミトコンドリア）はＧＰＣＲ介在性シグナルに影響を与えるようであった。ミトコンドリアを標的とした全種の被験発光蛋白質において、ｍｔクリチンＫ１６８Ｄは最低のＥＣ５０と最高の％ＧＰＣＲ／総シグナル、最高のシグナル対バックグラウンド比、及びＧＩＰリガンドを使用する最大シグナルを生じた。クリチンＫ１６８Ｒと野生型クリチン以外のミトコンドリアを標的とした他の全突然変異体はｗｔイクオリンで認められる範囲内の結果を生じた。同様に、サイトゾル型の被験発光蛋白質のうちで、クリチンＫ１６８Ｄは最低のＥＣ５０と最高の％ＧＰＣＲ／総シグナル、最高のシグナル対バックグラウンド比、及びＧＩＰリガンドを使用する最大シグナルを示した。特に、サイトゾルクリチンＫ１６８Ｄはサイトゾル型又はミトコンドリア型の他の全種の発光蛋白質のうちで最低のＥＣ５０とＧＩＰリガンドに対する最高の最大シグナルを示した。

【００９１】

【表２】

表II

| | カルシウムEC50(nM) | GIPに対するEC50(nM) | %GPCR/総シグナル | GIPによるシグナル:バックグラウンド | GIPによる最大シグナル(RLU×$10^{-5}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| mtクリチンwt | 545 | 12.9 | 6.8% | 146.5 | 3.14 |
| mtクリチンK168D | 160 | 9.1 | 34.4% | 188.2 | 7.90 |
| mtクリチンK168E | 176 | 21.6 | 19.8% | 120.8 | 6.07 |
| mtクリチンK168S | 228 | 15.4 | 20.3% | 124.1 | 3.84 |
| mtクリチンK168T | 174 | 13.4 | 22% | 113.4 | 4.26 |
| mtクリチンK168G | 232 | 15.1 | 19.3% | 146.8 | 5.09 |
| mtクリチンK168N | 358 | 21.0 | 10.7% | 115.9 | 3.82 |
| mtクリチンK168Q | 335 | 17.4 | 14.2% | 125.8 | 4.78 |
| mtクリチンK168V | 389 | 16.8 | 18.5% | 158.0 | 3.60 |
| mtクリチンK168Y | 284 | 16.4 | 18.5% | 112.8 | 2.89 |
| mtクリチンK168H | 459 | 19.2 | 14.9% | 148.3 | 4.98 |
| mtクリチンK168R | 581 | 29.1 | 3.3% | 86.8 | 1.89 |
| mtイクオリン | 235 | 11.3 | 23.9% | 84.7 | 4.68 |
| mtオベリン | 373 | 13.7 | 116% | 172.5 | 3.66 |
| cytoクリチンwt | | 9.67 | 0.3% | 7.0 | 0.2 |
| cytoクリチンK168D | | 4.01 | 55.6% | 74.3 | 8.76 |
| cytoクリチンK168E | | 7.9 | 26.2% | 66.4 | 6.47 |
| cytoイクオリン | | 6.67 | 13.0% | 29.4 | 1.21 |
| cytoオベリン | | 9.86 | 56.7% | 47 | 1.80 |

【００９２】

［実施例６］

グルカゴン受容体、ＧＬＰ－１受容体、Ｓ１Ｐ２受容体、ＥＰ１受容体又はＥＰ３受容体から選択されるＧＰＣＲにより誘導される発光としてクリチンＫ１６８Ｄにより示される発光の比較

別の実験で、グルカゴン受容体（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿

０００１６０；ヒト肝ＲＮＡからＲＴ－ＰＣＲにより単離）、ＧＬＰ－１受容体（Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿００２０６２；ＣＹＴＯＭＹＸから入手）、$Ｓ_{1}Ｐ_{2}$受容体（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿００４２３０．３；ＯＰＥＮ ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）、$ＥＰ_{1}$受容体（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿０００９９５；ＯＰＥＮ ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）又は$ＥＰ_{3}$受容体（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ＿１９８７１６；ＯＰＥＮ ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）から選択される典型的ＧＰＣＲと、プロミスキャスＧ蛋白質（グルカゴン受容体、ＧＬＰ－１受容体及び$Ｓ１Ｐ_{2}$受容体の場合）と、配列番号１の１６８位にアミノ酸置換をもつ改変型サイトゾルクリチン（配列番号９）をコードするｃＤＮＡを含むプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一過的にコトランスフェクトした。

【００９３】

トランスフェクションから４８時間後に、細胞をＣｒｙｏＭｅｄ速度制御式フリーザー（ＴＨＥＲＭＯ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）で凍結処理し、液体窒素に保存した。その後、細胞を解凍し、５μＭセレンテラジンを加えたＦｒｅｅＳｔｙｌｅ培地（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ）に直接導入する（解凍／アッセイ）か、又はフラスコで１０％胎仔ウシ血清、非必須アミノ酸、及びペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＤＭＥＭ／Ｆ１２から構成される増殖培地に播種し、一晩培養後にセレンテラジンを添加した（解凍／回復後）。セレンテラジンを３～４時間添加後、細胞を遠心し、カルシウムとマグネシウムを含有するＨＢＳＳに再懸濁した。

【００９４】

細胞１００，０００個／ウェルを９６ウェルプレートに分注後、グルカゴン受容体（$１０^{－８}$～$１０^{－１２．５}$Ｍグルカゴン）、$Ｓ_{1}Ｐ_{2}$受容体（$１０^{－６}$～$１０^{－１１．５}$Ｍスフィンゴシン１－リン酸）、$ＥＰ_{1}$受容体（$１０^{－６}$～$１０^{－１１}$Ｍプロスタグランジン$Ｅ_{2}$）又は$ＥＰ_{3}$受容体（$１０^{－６}$～$１０^{－１１}$Ｍプロスタグランジン$Ｅ_{2}$）のリガンドにより誘導されるＧＰＣＲ介在性生物発光と、１ｍＭ $Ｃａ^{２＋}$の存在下で１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００の添加により誘導される総シグナルについてアッセイした。

【００９５】

結果を図６Ａ～６Ｅと下表ＩＩＩにまとめる。解凍／アッセイは解凍直後にセレンテラジンを添加した後にアッセイを行った細胞の用量応答を示し、解凍／回復後は増殖培地で一晩回復させた後に添加とアッセイを行った細胞の用量応答を示す。ＧＬＰ－１受容体以外の各受容体では、添加とアッセイ前に一晩回復させた細胞は解凍直後に添加及びアッセイした細胞よりも強いシグナルを生じた。サイトゾルクリチンＫ１６８Ｄ発光蛋白質をＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトすると共にＧＩＰ受容体とＧ蛋白質をコトランスフェクトした場合について図５の説明で上述したように、各細胞処理方法についてそのリガンドによる各受容体の活性化に対するＥＣ５０値を求めた。こうして計算したＥＣ５０値を表ＩＩＩに示し、指定受容体を安定的に発現する細胞株（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ）を使用して蛍光カルシウムアッセイで求めたＥＣ５０値と比較する。発光アッセイで得られた数値は蛍光アッセイで得られた数値の４倍以下であった。グルカゴン受容体と$Ｓ１Ｐ_{2}$の場合には、ＥＣ５０値は蛍光アッセイよりも発光アッセイのほうが６～１００倍低く、発光アッセイは場合によってはカルシウム流動の検出感度が従来の蛍光法よりも高いことが分かった。

【００９６】

【表３】

表III

| | GLP-1に対するGLP-1受容体 EC50(nM) | グルカゴンに対するグルカゴン受容体 EC50(nM) | S1Pに対する$S1P_2$受容体 EC50(nM) | $PGE_2$に対する$EP_1$受容体 EC50(nM) | $PGE_2$に対する$EP_3$受容体 EC50(nM) |
|---|---|---|---|---|---|
| 発光アッセイ，解凍/回復後 | 2 | 0.1 | 7 | 10 | 4 |
| 発光アッセイ，解凍/アッセイ | 3 | 0.2 | 7 | 6 | 2 |
| 蛍光$Ca^{2+}$アッセイ | 8 | 14 | 40 | 3 | 1 |

【００９７】

［実施例７］

以下のＧＰＣＲ：ＣＸＣＲ１受容体、ＣＸＣＲ４受容体、ＧＩＰ受容体、ＧＬＰ－１受容体、グルカゴン受容体又はＥＰ１受容体により誘導される発光としてクリチンＫ１６８Ｄにより示される発光の比較

別の実験で、ＧＩＰ受容体（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ０００１６４；ＯＰＥＮ　ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）、ＣＸＣＲ１受容体（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ６８９３２；ＯＰＥＮ　ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）、ＣＸＣＲ４受容体（ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ９９２９３；ＯＰＥＮ　ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳから入手）、グルカゴン受容体（実施例６参照）、ＧＬＰ－１受容体（実施例６参照）及びＥＰ１受容体（実施例６参照）から選択される典型的ＧＰＣＲと、プロミスキャスＧ蛋白質（例えばＧＩＰ受容体、ＣＸＣＲ１受容体及びＣＸＣＲ４受容体の場合）と、配列番号１の１６８位にアミノ酸置換をもつ改変型サイトゾルクリチン（配列番号９）をコードするｃＤＮＡを含むプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一過的にコトランスフェクトした。トランスフェクションから約４８時間後に、細胞をＣｒｙｏＭｅｄ速度制御式フリーザー（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）で凍結処理し、液体窒素に保存した。

【００９８】

別の実験で、Ｄ２受容体とプロミスキャスＧ蛋白質を発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ，カタログ番号ＨＴＳ０３９Ｃ）に、配列番号１の１６８位にアミノ酸置換をもつ改変型サイトゾルクリチン（配列番号１１）を一過的にトランスフェクトした。クリチンプラスミドが安定的に組込まれた細胞をピューロマイシン耐性により選択し、限界希釈法によりクローニングし、クローン細胞株を得、ドーパミンに誘導される発光が最高のクローンを選択した。細胞をＣｒｙｏＭｅｄ速度制御式フリーザー（ＴＨＥＲＭＯ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）で凍結処理し、液体窒素に保存した。

【００９９】

トランスフェクトし、凍結した細胞を解凍し、ポリ－Ｄ－リジンをコートした９６ウェルプレートで１５％胎仔ウシ血清、非必須アミノ酸、及びペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＤＭＥＭ／Ｆ１２から構成される増殖培地に１００，０００個／ウェルの密度で播種し、一晩培養した。次に細胞にセレンテラジンを４時間添加し、グルカゴン受容体（$10^{-8}$～$10^{-12.5}$Ｍグルカゴン）、ＧＩＰ受容体（$10^{-6}$～$10^{-12}$　ＧＩＰ）、ＧＬＰ－１受容体（$10^{-6}$～$10^{-12}$　ＧＬＰ－１）、ＣＸＣＲ１受容体（$10^{-7}$～$10^{-13}$Ｍインターロイキン８）、$EP_1$受容体（$10^{-6}$～$10^{-11}$Ｍプロスタグランジン$E_2$）、ＣＸＣＲ４受容体（$10^{-6}$～$10^{-11}$Ｍ　ＳＤＦ－１α）又はＤ２受容体（$10^{-4}$～$10^{-10.5}$Ｍドーパミン）のリガンドにより誘導されるＧＰＣＲ介在性生物発光についてアッセイした。グラフに示す生物発光はＦＬＩＰＲ

Ｔｅｔｒａ　Ｐｌｕｓ高スループット発光プレートリーダー（ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＤＥＶＩＣＥＳ）で取得した。

【０１００】

結果を図７Ａ～７Ｇに示す。ＦＬＩＰＲＴｅｔｒａ　Ｐｌｕｓプレートリーダーを使用してグルカゴン受容体、ＧＬＰ－１受容体及びＥＰ$_1$プロスタノイド受容体で得られた数値はＶｉｃｔｏｒ２プレートリーダー（ＷＡＬＬＡＣ，ＰＥＲＫＩＮＥＬＭＥＲ）を使用して図６で得られた数値と同等である。

【０１０１】

［実施例８］

イオンチャネルにより誘導される発光として各種発光蛋白質変異体により示される発光の比較

別の実験で、ミトコンドリアを標的とした野生型クリチン（ｍｔクリチン）、ミトコンドリアを標的とし、配列番号１の１６８位にリジン→アスパラギン酸突然変異をもつ改変型クリチン（配列番号１０）、サイトゾル野生型クリチン（配列番号１）、１６８位にリジン→アスパラギン酸突然変異をもつ改変型サイトゾルクリチン（配列番号９）、並びにミトコンドリアを標的とした野生型イクオリン及びサイトゾル野生型イクオリン（それぞれ配列番号６及び２）を含む一連の発光蛋白質をコードするｃＤＮＡを含むプラスミドを準備し、ＴＲＰＡ１カチオンチャネルを安定的に発現するＨＥＫ２９３細胞（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿００７３３２；ＭＩＬＬＩＰＯＲＥから入手）にこれらのプラスミドを一過的にコトランスフェクトした。

【０１０２】

細胞５０，０００個／ウェルを９６ウェルプレートに分注後、ＡＩＴＣリガンド（$10^{-6}$～$10^{-3.5}$Ｍ）により誘導されるイオンチャネル介在性生物発光についてアッセイした。種々の濃度のＡＩＴＣに対する用量応答曲線の結果を図７にまとめる。サイトゾルクリチンＫ１６８Ｄはサイトゾル野生型クリチンよりも低いＥＣ５０を示す。更に、サイトゾルクリチンＫ１６８Ｄはサイトゾル型とミトコンドリア型のイクオリンよりも強いシグナルを示す。これらのデータによると、クリチンＫ１６８Ｄは典型的なカルシウム伝導イオンチャネルの分析感度を増強できることが明らかである。

【０１０３】

本明細書は明細書内に言及する文献の教示を参照すると、最良に理解され、これらの文献を本願に援用する。明細書内の態様は本発明の態様の例証であり、発明の範囲を制限するものと解釈すべきではない。当業者に容易に理解される通り、他の多数の態様も本発明に含まれる。全刊行物及び発明は全体を本願に援用する。援用する資料が本明細書と相反するか又は矛盾する程度まで、本明細書はこのような全資料に代わるものとなろう。本願で文献に言及する場合には、このような文献が本発明の従来技術であると認めるものではない。

【０１０４】

特に指定しない限り、明細書と特許請求の範囲で使用する成分の量、細胞培養、処理条件等を表わす全数値はいずれの場合も「約」なる用語で修飾されると理解すべきである。従って、特に否定しない限り、数値パラメータは概数であり、本発明により獲得しようとうする所望特性に応じて変動し得る。特に指定しない限り、要素の系列の前に付ける「少なくとも」なる用語は系列内の全要素に適用されると理解すべきである。当業者は日常的範囲内の実験を使用して本願に記載する発明の特定態様の多数の等価物に想到するであろうし、あるいはこのような等価物を突き止めることができよう。このような等価物も以下の特許請求の範囲に含むものとする。

【０１０５】

当業者に自明の通り、発明の趣旨と範囲内で本発明の多数の変更及び変形が可能である。本願に記載する特定態様は例示に過ぎず、如何なる点でも限定的ではない。明細書及び実施例は単なる例示とみなすべきであり、本発明の真の範囲と趣旨は以下の特許請求の範囲に記載する通りである。

【図１】

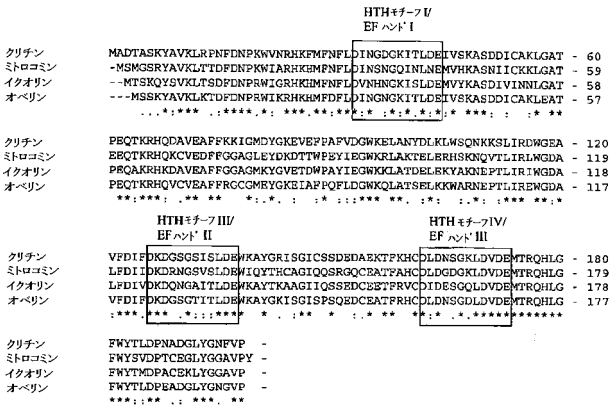


Figure 1

【図２】

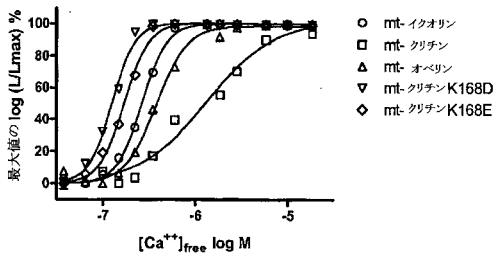


Figure 2.

【図３】

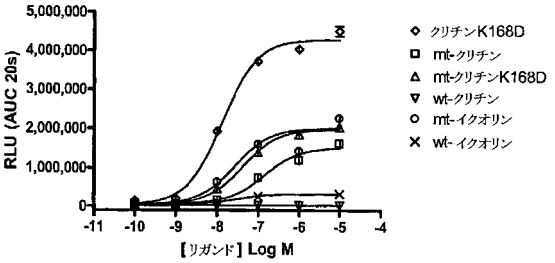


Figure 3.

【図４】

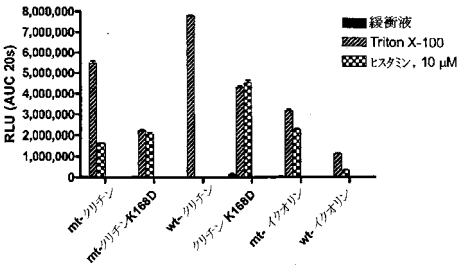


Figure 4.

【図５】

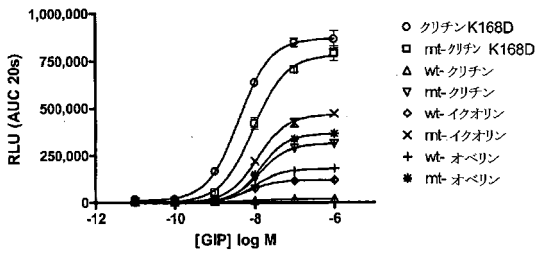


Figure 5.

【図６】

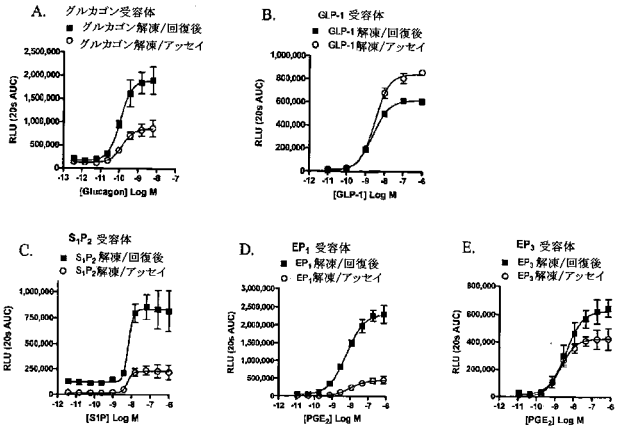


Figure 6.

【図７－１】

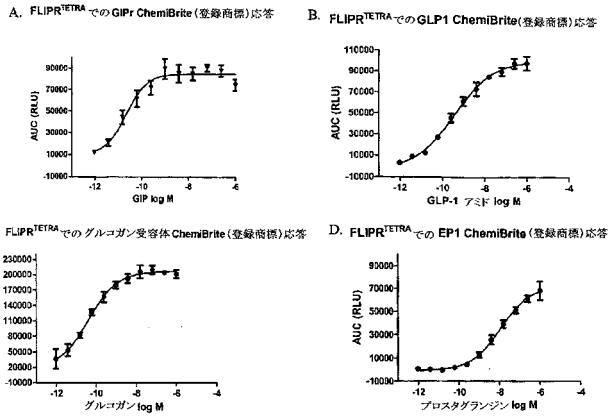


Figure 7

【図７－２】

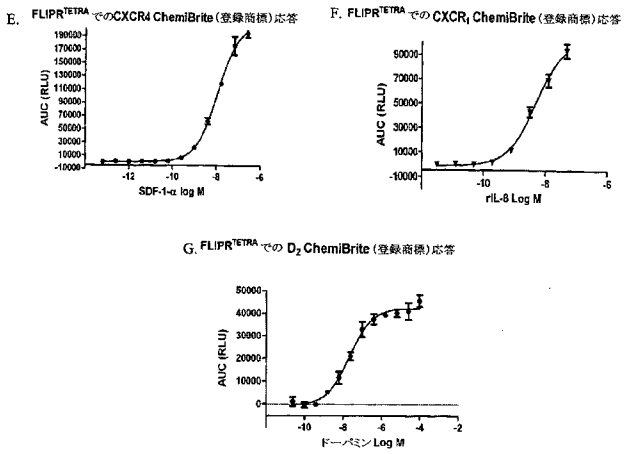


Figure 7（続き）

【図８】

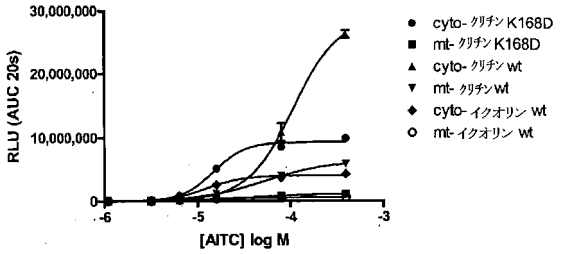


Figure 8

【配列表】

2012533298000001.xml

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/001902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/435
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | TRICOIRE LUDOVIC ET AL: "Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 103, no. 25, June 2006 (2006-06), pages 9500-9505, XP002608872 ISSN: 0027-8424 | 1,3,5,7, 9,11,13, 15,17, 19,21, 23,25 |
| Y | whole document and in particular last paragraph of page 9502. | 1-35 |
| Y | WO 2006/094805 A1 (AXXAM S R L [IT]; MASTROIANNI NADIA [IT]; CAINARCA SILVIA [IT]; CORAZZ) 14 September 2006 (2006-09-14) page 4 - page 5; claims 1-17 | 1-35 |

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 10 November 2010 | 03/12/2010 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Ury, Alain |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/001902

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | TSUJI FREDERICK I ET AL: "Molecular evolution of the Ca-2+-binding photoproteins of the hydrozoa" PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, vol. 62, no. 4, 1995, pages 657-661, XP002608873 ISSN: 0031-8655 the whole document | 1-35 |
| Y | VYSOTSKI E S ET AL: "Calcium-regulated photoproteins of marine coelenterates" MOLECULAR BIOLOGY (MOSCOW), vol. 40, no. 3, May 2006 (2006-05), pages 355-367, XP019403373 ISSN: 0026-8933 the whole document | 1-35 |
| A | TSUZUKI KEISUKE ET AL: "Thermostable mutants of the photoprotein aequorin obtained by in vitro evolution" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 280, no. 40, October 2005 (2005-10), pages 34324-34331, XP002608875 ISSN: 0021-9258 | 1-35 |
| A | WO 03/006497 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; LAMBOLEZ BERTRAND [FR]; GIBELIN NATHALIE) 23 January 2003 (2003-01-23) | 1-35 |
| A | INOUYE SATOSHI: "Cloning, expression, purification and characterization of an isotype of clytin, a calcium-binding photoprotein from the luminous hydromedusa Clytia gregarium" JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 143, no. 5, May 2008 (2008-05), pages 711-717, XP002608876 ISSN: 0021-924X | 1-35 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/001902

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2006094805 A1 | 14-09-2006 | AT 422504 T | 15-02-2009 |
| | | AU 2006222182 A1 | 14-09-2006 |
| | | CA 2601029 A1 | 14-09-2006 |
| | | CN 101137667 A | 05-03-2008 |
| | | DK 1858921 T3 | 18-05-2009 |
| | | EP 1700865 A1 | 13-09-2006 |
| | | EP 1858921 A1 | 28-11-2007 |
| | | ES 2321029 T3 | 01-06-2009 |
| | | JP 2008532504 T | 21-08-2008 |
| | | KR 20070121689 A | 27-12-2007 |
| | | PT 1858921 E | 14-04-2009 |
| | | US 2007259389 A1 | 08-11-2007 |
| WO 03006497 A2 | 23-01-2003 | AU 2002333989 A1 | 29-01-2003 |
| | | CA 2455542 A1 | 23-01-2003 |
| | | EP 1404711 A2 | 07-04-2004 |
| | | FR 2827292 A1 | 17-01-2003 |
| | | US 2005130262 A1 | 16-06-2005 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *G01N 33/50* | *(2006.01)* | G01N 33/50 | Z | |
| *G01N 33/15* | *(2006.01)* | G01N 33/15 | Z | |

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

(72)発明者 リー，ミン
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１８０３、ビレリカ、コンコード・ロード・２９０、ミリポア・コーポレイシヨン気付
(72)発明者 シユー，マシユー
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１８０３、ビレリカ、コンコード・ロード・２９０、ミリポア・コーポレイシヨン気付

Ｆターム(参考) 2G045 BB20 CB01 DA36 DB07 FB13 GC15
4B024 AA11 BA80 CA02 DA02 EA04 FA20
4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ20 QR77 QR80 QS05 QS28 QX02
4B065 AA90Y AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA46
4H045 AA10 AA30 BA10 CA50 EA50 FA74