

【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6部門第1区分

【発行日】平成23年8月18日(2011.8.18)

【公開番号】特開2010-112955(P2010-112955A)

【公開日】平成22年5月20日(2010.5.20)

【年通号数】公開・登録公報2010-020

【出願番号】特願2009-267007(P2009-267007)

【国際特許分類】

G 0 1 N	33/50	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/554	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/50	Z N A Z
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	5/00	1 0 2
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/554	

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月4日(2011.7.4)

【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】

少なくとも1つのNLSおよび検出用部分を含む膜貫通型タンパク質を含むタンパク質をコードする、少なくとも1つのヌクレオチド配列(ここで、野生型の膜貫通型タンパク質はNLSおよび検出用部分を含まず、該膜貫通型タンパク質をコードするヌクレオチド配列がNLS及び検出用部分をコードするように修飾されている。)を含む、単離された細胞。

【請求項2】

該検出用部分が、該膜貫通型タンパク質のアミノ酸配列の抗原部分を含む検出用ペプチドである、請求項1記載の細胞。

【請求項3】

該ヌクレオチド配列が、少なくとも1つのNLSおよび検出用部分を含む膜貫通型タンパク質を含む融合タンパク質をコードする、請求項1記載の細胞。

【請求項4】

該ヌクレオチド配列が、RRR-(11 aa)-KRRK、KK-(15 aa)-KKRK、KRKRRP、PKKNRLRRK、KRQR-(20 aa)-KKSKK、PAAKRVKLD、QRKRQK、HRIEEKRKRTYETFKSI、KKKYKLK、KSKKKAQ、PKKKRKV、KKKKRKREK、LKRPRSPSS、KRK-(22 aa)-KELQKQITK、GKKKYKLKH、EED-(350 aa)-KKKRERLD、CYFQKKAANMLQQSGSKNTGAKKRK、DILRR-(323 aa)-PKQKRK、SSDDEATADSQHSTPPKKKRKV、RKKRK-(9 aa)KAKKSK、KR-(11 aa)-KKLR、RRPS-(22 aa)-RRKRQK、KR-(10 aa)-KKKL、RKRK-(7 a)-RRSRYRK、およびMISEALRKAから選択されるNLSをコードするように修飾されている、請求項1~3のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 5】

該又クレオチド配列が、KKFKR、PKKKRKV、およびAFSAKKFKRからなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするように修飾されている、請求項1~3のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 6】

該検出用部分が抗原ペプチドであり、細胞内における該抗原ペプチドの分布が、該抗原ペプチドに特異的な抗体を含む抗体ベースの検出系に対する結合を可能とすることで決定される、請求項3記載の細胞。

【請求項 7】

該抗体ベースの検出系が、該抗原ペプチドに特異的な第1の抗体、および検出用標識を有し、かつ該第1の抗体に特異的な第2の抗体を含む、請求項6記載の細胞。

【請求項 8】

該抗体ベースの検出系が、該抗原ペプチドに特異的で、かつ検出用標識を有する第1の抗体を含む、請求項6記載の細胞。

【請求項 9】

該検出用標識が、光学的に検出可能な標識である、請求項7または8記載の細胞。

【請求項 10】

該検出用標識が、発光標識または蛍光標識である、請求項7または8記載の細胞。

【請求項 11】

該検出用部分が、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、およびこれらの修飾型異型からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項3記載の細胞。

【請求項 12】

該膜貫通型タンパク質が、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）、輸送体、サイトカイン受容体、チロシンキナーゼ受容体、および低密度リポタンパク質（LDL）受容体からなる群より選択される、請求項1~11のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 13】

該膜貫通型タンパク質がGPCRである、請求項12記載の細胞。

【請求項 14】

該GPCRが、ドーパミンD1受容体、ドーパミンD2受容体、ドーパミンD3受容体、ドーパミンD5受容体、ヒスタミン1受容体、システィニルロイコトリエン受容体1、システィニルロイコトリエン受容体2、オピオイド受容体、ムスカリーン受容体、セロトニン受容体、2-アドレナリン受容体、および代謝共役型グルタミン酸4受容体からなる群より選択される、請求項13記載の細胞。

【請求項 15】

該膜貫通型タンパク質が輸送体である、請求項12記載の細胞。

【請求項 16】

該輸送体が、ドーパミン輸送体およびセロトニン輸送体からなる群より選択される、請求項15記載の細胞。

【請求項 17】

該膜貫通型タンパク質がサイトカイン受容体である、請求項12記載の細胞。

【請求項 18】

該サイトカイン受容体が、エリスロポイエチン受容体およびインスリン受容体からなる群より選択される、請求項17記載の細胞。

【請求項 19】

該膜貫通型タンパク質がチロシンキナーゼ受容体である、請求項12記載の細胞。

【請求項 20】

該チロシンキナーゼ受容体が、上皮成長因子受容体およびインスリン受容体からなる群より選択される、請求項19記載の細胞。

【請求項 21】

該膜貫通型タンパク質が低密度リポタンパク質受容体である、請求項12記載の細胞。

【請求項 2 2】

個々の配列が少なくとも1つのNLSを含む異なる膜貫通型タンパク質を含むタンパク質をコードする、複数のヌクレオチド配列を含む、請求項1~21のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 2 3】

該個々のヌクレオチド配列が、異なる検出用部分を含むタンパク質をコードする、請求項22記載の細胞。

【請求項 2 4】

少なくとも1つの検出用部分が、少なくとも2種類のコードされたタンパク質に共通である、請求項22記載の細胞。

【請求項 2 5】

該細胞が、真核細胞または原核細胞である、請求項1~24のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 2 6】

該細胞が、哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞、線虫細胞、植物細胞、および真菌細胞からなる群より選択される真核細胞である、請求項25記載の細胞。

【請求項 2 7】

該細胞が、HEK細胞、COS細胞、およびCHO細胞からなる群より選択される哺乳類細胞である、請求項26記載の細胞。

【請求項 2 8】

該細胞が、神経細胞である、請求項26記載の細胞。

【請求項 2 9】

以下の段階を含む、少なくとも1つの膜貫通型タンパク質と相互作用する能力に関して候補化合物をスクリーニングする方法：

少なくとも1つの核局在配列（NLS）および検出用部分を含む膜貫通型タンパク質を含むタンパク質をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列（ここで、野生型の膜貫通型タンパク質はNLSを含む。）を含み、該コードされたタンパク質を細胞内で発現する細胞に候補化合物を接触させる段階；ならびに

細胞内における該検出用部分の分布を検出することで、該細胞内における該発現されたタンパク質の分布を決定する段階；

ここで、候補化合物を接触させなかった対照細胞に対して、細胞膜において該検出用部分が保持されることとは、該化合物が該膜貫通型タンパク質と相互作用することを示す。

【請求項 3 0】

該検出用部分が、該膜貫通型タンパク質のアミノ酸配列の抗原部分を含む検出用ペプチドであり、および/または該ヌクレオチド配列が、少なくとも1つのNLSおよび検出用部分を含む膜貫通型タンパク質を含む融合タンパク質をコードする、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

該NLSが、表1から選択されるか、またはKKFKR、PKKKRKV、およびAFSAKKFKRからなる群より選択される、請求項29または30記載の方法。

【請求項 3 2】

該細胞が真核細胞または原核細胞であり、好ましくは哺乳類細胞（好ましくはHEK細胞、COS細胞、およびCHO細胞からなる群より選択される）、酵母細胞、昆虫細胞、線虫細胞、植物細胞、および真菌細胞からなる群より選択される真核細胞である、請求項29~31のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 3】

該検出用部分が抗原ペプチドであり、細胞内における抗原ペプチドの分布が、抗原ペプチドに特異的な抗体を含む抗体ベースの検出系に対する結合を可能とすることで決定される（好ましくは、該抗体ベースの検出系が、抗原ペプチドに特異的な第1の抗体、および検出用標識を有し、かつ第1の抗体に特異的な第2の抗体を含むか、または該抗体ベースの検出系が、抗原ペプチドに特異的で、かつ検出用標識を有する第1の抗体を含む；ここで、該検出用標識は、好ましくは、光学的に検出可能な標識であり、さらに好ましくは、発光標識または蛍光標識である）、または、ここで、該検出用部分が、緑色蛍光タンパク

質、赤色蛍光タンパク質、およびこれらの修飾型異型からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項29記載の方法。

【請求項34】

該膜貫通型タンパク質が、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）（好ましくは、ドーパミンD1受容体、ドーパミンD2受容体、ドーパミンD3受容体、ドーパミンD5受容体、ヒスタミン1受容体、システィニルロイコトリエン受容体1、システィニルロイコトリエン受容体2、オピオイド受容体、ムスカリン受容体、セロトニン受容体、2-アドレナリン受容体、および代謝共役型グルタミン酸4受容体からなる群より選択される）、輸送体（好ましくはドーパミン輸送体またはセロトニン輸送体）、サイトカイン受容体（好ましくは、エリスロポイエチン受容体またはインスリン受容体）、チロシンキナーゼ受容体（好ましくは、上皮成長因子受容体またはインスリン受容体）、および低密度リポタンパク質（LDL）受容体からなる群より選択される、請求項29～33のいずれか一項記載の方法。

【請求項35】

該細胞が、個々の配列が、少なくとも1つのNLSを含む異なる膜貫通型タンパク質を含むタンパク質をコードする、複数のヌクレオチド配列（ここで、該個々のヌクレオチド配列が、異なる検出用部分を含むタンパク質をコードするか、または少なくとも1つの検出用部分が、少なくとも2種類のコードされたタンパク質に共通である）でトランスフェクトされている、請求項29～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項36】

細胞に、少なくとも1種類の膜貫通型タンパク質と相互作用することがわかっている化合物を接触させてから、細胞に候補化合物を接触させる、請求項29記載の方法であって、ここで、膜貫通型タンパク質と相互作用することがわかっている化合物を接触させたが候補化合物を接触させなかった対照細胞における検出用部分の分布に対して、細胞膜において該検出用部分が保持されることは、候補化合物が膜貫通型タンパク質と相互作用することを示す、方法。

【請求項37】

以下の段階を含む、少なくとも1つの膜貫通型タンパク質と相互作用する能力に関して候補化合物をスクリーニングする方法：

細胞に、少なくとも1つの核局在配列（NLS）を含む膜貫通型タンパク質を含むタンパク質をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列（ここで、野生型の膜貫通型タンパク質はNLSを含む。）を含み、該コードされたタンパク質を細胞内で発現する細胞に候補化合物を接触させる段階；ならびに

細胞膜に残存したNLS含有膜貫通型タンパク質のレベルを、細胞の細胞膜画分を単離し、同画分に膜貫通型タンパク質の標識リガンドを接触させ、同画分とリガンドの結合のレベルを決定することで決定する段階；

ここで、候補化合物を接触させなかった対照細胞の細胞膜におけるレベルに対して、細胞膜において膜貫通型タンパク質が保持されることは、化合物が膜貫通型タンパク質と相互作用することを示す。

【請求項38】

標識リガンドが放射標識リガンドであり、および該NLSが、表1から選択されるか、またはKKFKR、PKKKRKV、およびAFSAKKFKRからなる群より選択される、請求項37記載の方法。

【請求項39】

該細胞が真核細胞または原核細胞であり、好ましくは哺乳類細胞（好ましくはHEK細胞、COS細胞、およびCHO細胞からなる群より選択される）、酵母細胞、昆虫細胞、線虫細胞、植物細胞、および真菌細胞からなる群より選択される真核細胞である、請求項37または38記載の方法。

【請求項40】

該膜貫通型タンパク質が、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）（好ましくは、ドーパミンD1受容体、ドーパミンD2受容体、ドーパミンD3受容体、ドーパミンD5受容体、ヒスタミン1受容体、システィニルロイコトリエン受容体1、システィニルロイコトリエン受容体2

、オピオイド受容体、ムスカリン受容体、セロトニン受容体、2-アドレナリン受容体、および代謝共役型グルタミン酸4受容体からなる群より選択される）、輸送体（好ましくはドーパミン輸送体またはセロトニン輸送体）、サイトカイン受容体（好ましくは、エリスロポイエチン受容体またはインスリン受容体）、チロシンキナーゼ受容体（好ましくは、上皮成長因子受容体またはインスリン受容体）、および低密度リポタンパク質（LDL）受容体からなる群より選択される、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

該細胞が、個々の配列が、少なくとも1つのNLSを含む異なる膜貫通型タンパク質を含むタンパク質をコードする、複数のヌクレオチド配列（ここで、該個々のヌクレオチド配列が、異なる検出用部分を含むタンパク質をコードするか、または少なくとも1つの検出用部分が、少なくとも2種類のコードされたタンパク質に共通である）を含む、請求項37～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

以下の段階を含む、第1のタンパク質と第2のタンパク質がオリゴマーを形成可能か否かを判定する方法：

細胞に、NLSを含む第1のタンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列（ここで、野生型の第1のタンパク質はNLSを含む。）、および検出用部分を含む第2のタンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列を含み、該コードされた第1のタンパク質と第2のタンパク質を細胞内で発現する細胞を得る段階（ここで、第1のタンパク質および第2のタンパク質が、異なる膜貫通型タンパク質であり、好ましくはGPCRであり、または、同じ膜貫通型タンパク質であり、または第1のタンパク質および第2のタンパク質の1つが膜貫通型タンパク質であり、もう1つが非膜貫通型タンパク質である）；ならびに

細胞内における、検出用部分の分布を決定する段階；

ここで、細胞の核内および核の近傍で検出用部分が検出されること、または対照細胞に対して、細胞表面での検出用部分のレベルの低下が検出されることは、第1のタンパク質と第2のタンパク質が相互作用することを示す

【請求項43】

検出用部分が、第2のタンパク質のアミノ酸配列の抗原部分を含む検出用ペプチドである、および／または第2のヌクレオチド配列が、第2のタンパク質および検出用部分を含む融合タンパク質をコードする、請求項42記載の方法。

【請求項44】

該NLSが、表1から選択されるか、またはKKFKR、PKKKRKV、およびAFSAKKFKRからなる群より選択される、請求項42または43記載の方法。

【請求項45】

該細胞が真核細胞または原核細胞であり、好ましくは哺乳類細胞（好ましくはHEK細胞、COS細胞、およびCHO細胞からなる群より選択される）、酵母細胞、昆虫細胞、線虫細胞、植物細胞、および真菌細胞からなる群より選択される真核細胞である、請求項42～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

検出用部分が抗原ペプチドであり、また細胞内における抗原ペプチドの分布が、抗原ペプチドに特異的な抗体を含む抗体ベースの検出系に対する結合を可能とすることで決定される（好ましくは、該抗体ベースの検出系が、抗原ペプチドに特異的な第1の抗体、および検出用標識を有し、かつ第1の抗体に特異的な第2の抗体を含むか、または該抗体ベースの検出系が、抗原ペプチドに特異的で、かつ検出用標識を有する第1の抗体を含む；ここで、該検出用標識は、好ましくは光学的に検出可能な標識であり、さらに好ましくは、発光標識または蛍光標識である）、または、ここで、該検出用部分が、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、およびこれらの修飾型異型からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項42記載の方法。

【請求項47】

第1のタンパク質と第2のタンパク質が、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）（好ましく

は、ドーパミンD1受容体、ドーパミンD2受容体、ドーパミンD3受容体、ドーパミンD5受容体、ヒスタミン1受容体、システィニルロイコトリエン受容体1、システィニルロイコトリエン受容体2、オピオイド受容体、ムスカリン受容体、セロトニン受容体、2-アドレナリン受容体、および代謝共役型グルタミン酸4受容体からなる群より選択される）、輸送体（好ましくはドーパミン輸送体またはセロトニン輸送体）、サイトカイン受容体（好ましくは、エリスロポイエチン受容体またはインスリン受容体）、チロシンキナーゼ受容体（好ましくは、上皮成長因子受容体またはインスリン受容体）、および低密度リポタンパク質（LDL）受容体からなる群より選択される、請求項42～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項48】

第1のヌクレオチド配列が、第2のタンパク質の検出用部分とは異なる検出用部分をさらに含む第1のタンパク質をコードする、請求項42記載の方法であって、ここで、第1のタンパク質の検出用部分と第2のタンパク質の検出用部分の間のエネルギー移動相互作用が検出されることは、第1のタンパク質と第2のタンパク質がオリゴマーを形成することを示す、方法。