

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5152807号
(P5152807)

(45) 発行日 平成25年2月27日(2013.2.27)

(24) 登録日 平成24年12月14日(2012.12.14)

(51) Int.Cl.		F I		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00 Z N A
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C O 7 K	1/22
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C

請求項の数 14 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2008-548307 (P2008-548307)	(73) 特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86) (22) 出願日	平成19年12月5日(2007.12.5)	(73) 特許権者	502285457 学校法人順天堂 東京都文京区本郷2-1-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/073482	(74) 代理人	100107870 弁理士 野村 健一
(87) 国際公開番号	W02008/069232	(74) 代理人	100098121 弁理士 間山 世津子
(87) 国際公開日	平成20年6月12日(2008.6.12)	(72) 発明者	片山 栄作 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
審査請求日	平成22年10月13日(2010.10.13)		
(31) 優先権主張番号	特願2006-332530 (P2006-332530)		
(32) 優先日	平成18年12月8日(2006.12.8)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子モジュール

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的化合物と結合し、その化合物を精製又は標識するために使用する分子モジュールであって、棒状構造タンパク質と、標的化合物と相互作用をする相互作用物質と、タグと、標識物質とを有し、相互作用物質が棒状構造タンパク質の一端に配置され、タグと標識物質が棒状構造タンパク質の別の一端に配置されていることを特徴とする分子モジュール。

【請求項2】

棒状構造タンパク質、相互作用物質、タグ、及び標識物質が、一本のポリペプチド鎖を形成していることを特徴とする請求項1に記載の分子モジュール。

【請求項3】

棒状構造タンパク質が、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、又はスペクトリンリピート構造をとるタンパク質であることを特徴とする請求項1又は2に記載の分子モジュール。

【請求項4】

タグが、ヒスチジンタグ、又はビオチン化ペプチドであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の分子モジュール。

【請求項5】

標識物質が、GFP、又はDsRedであることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載の分子モジュール。

【請求項6】

10

20

タンパク質本体と、棒状構造タンパク質と、タグと、標識物質とを有し、タンパク質本体が棒状構造タンパク質の一端に配置され、タグと標識物質が棒状構造タンパク質の別の一端に配置されていることを特徴とするタグ及び標識付加タンパク質。

【請求項 7】

タンパク質本体、棒状構造タンパク質、タグ、及び標識物質が、一本のポリペプチド鎖を形成していることを特徴とする請求項 6 に記載のタグ及び標識付加タンパク質。

【請求項 8】

棒状構造タンパク質が、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、又はスペクトリンリピート構造をとるタンパク質であることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載のタグ及び標識付加タンパク質。

10

【請求項 9】

タグが、ヒスチジンタグ、又はビオチン化ペプチドであることを特徴とする請求項 6 乃至 8 のいずれか一項に記載のタグ及び標識付加タンパク質。

【請求項 10】

標識物質が、GFP又はDsRedであることを特徴とする請求項 6 乃至 9 のいずれか一項に記載のタグ及び標識付加タンパク質。

【請求項 11】

タンパク質本体と、棒状構造タンパク質と、タグと、標識タンパク質を有し、タンパク質本体が棒状構造タンパク質の一端に配置され、タグと標識タンパク質が棒状構造タンパク質の別の一端に配置されている構造の融合タンパク質をコードするDNAを細胞内で発現させる工程、前記細胞を破碎し、その破碎液をタグと親和性を持つ物質と接触させる工程、タグと親和性を持つ物質に結合した融合タンパク質を回収する工程を含むことを特徴とするタンパク質の精製方法。

20

【請求項 12】

棒状構造タンパク質が、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、又はスペクトリンリピート構造をとるタンパク質であることを特徴とする請求項 11 に記載のタンパク質の精製方法。

【請求項 13】

タグが、ヒスチジンタグ、又はビオチン化ペプチドであることを特徴とする請求項 11 又は 12 に記載のタンパク質の精製方法。

30

【請求項 14】

標識タンパク質が、GFP又はDsRedであることを特徴とする請求項 11 乃至 13 のいずれか一項に記載のタンパク質の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的化合物を精製又は標識するために使用する分子モジュール、並びにこの分子モジュールを利用したタグ及び標識付加タンパク質、及びタンパク質の精製方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

タンパク質や核酸など細胞を構成する何らかの高分子成分に結合して作用する生理活性物質や薬物、抗体など特定のリガンドに対する受容体となる分子の性質を探索するには、通常、各種の既存技術の中から必要に応じて選んだいくつかの手法を組み合わせ用いる。例えば、未知の受容体を薬物などの誘導体をリガンドとした光アフィニティ標識法などにより同定する手法、細胞内におけるその受容体の局在部位を明らかにする手法、当該受容体を単離精製して性質を調べる手法、受容体（複合体）分子内における結合部位をより高い分解能で明らかにする手法など、目的に応じてさまざまな手法を併用せざるを得ない。たとえ一種類のリガンドに関する研究であっても、それぞれの手法に適したリガンド誘導体を別々に作製する必要があり、そのために必要とされる負担は多大なものである。

50

【0003】

特定の薬物が結合する成分を同定するための方法として、アフィニティ標識法が知られている。この方法は、リガンドに蛍光色素や放射性同位元素などを付加した誘導体を対象に光架橋して、電気泳動や各種のクロマトグラフィを用いて、標識された分子の分子量やアミノ酸配列などの情報を得るものである。

【0004】

また、受容体などリガンドの結合対象となる物質の単離精製にはアフィニティ精製と称される一連の手法がしばしば用いられる。対象がタンパク質やその複合体の場合、共有結合によりリガンドを固定化した樹脂ビーズをカラムに詰めて対象を含む原材料の溶液を通し、結合した分画のみを解離させて溶出する古典的クロマトグラフィ法が標準的であるが、カラムにかけ難い大きな膜分画や浮遊細胞を対象とする場合には、上述と同様の樹脂ビーズや磁気ビーズなどを用いて遠心分離や磁力で集めるバッチ法も使われる。特に細胞内小器官や浮遊細胞などの膜内に埋まるタンパク質を結合させて目的対象を分離する際には、樹脂や磁気ビーズの表面に直接固定化されたリガンドが相手に触れ難い場合も多く、その問題を解決するにはビーズとリガンドの間に直鎖状の炭素でできたスペーサーを挿入する。しかし炭素鎖を長くすると往々にして疎水性が強くなり、リガンドによる対象との結合が必ずしもそれらの特異性を反映しなくなる可能性も高い。この問題を軽減するには水溶性が高く、しかも常にその長い距離を保てるスペーサーを用いることが望ましい。

【0005】

一方、細胞内外におけるリガンド結合タンパク質の局在部位を顕微鏡的に示すには、生化学あるいは分子生物学的手法で調製したタンパク質の一部または全部を用いて特異抗体を作製し、それを用いた蛍光抗体法や免疫電子顕微鏡法などにより存在部位を明らかにする。さらに標的分子(複合体)内における結合部位の探索には受容体・リガンド複合体を純化そして結晶化してX線回折にかけるなど、原子分解能の得られる手段により構造データを取得するのが常套手段である。

【0006】

作業ロボット化などにより多くの材料を網羅的に探索する方法は工夫されてはいるものの、当初の目的を果すには、基本的にはこれらを組み合わせることで一歩一歩地道に進めて行く外に術がない。どのような過程を採用するにせよ、それぞれの手法に合わせて個別の探索用リガンドを誂える必要があり、労力、時間、さらには費用の面で相当の負担を強いられるのが常である。

【0007】

【特許文献1】特開2005-291836号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述したような状況に際し、リガンド・受容体間の特異的親和性(アフィニティ)を生かして全ての探索過程に共通に使うことのできる便利な材料が存在すれば、上記の負担を大幅に削減することが可能である。タンパク質工学や有機化学を駆使してそのような目的に使える汎用のタンパク質モジュールを新たに開発することが望まれる。本発明は、そのような要望に応え、薬物など特定のリガンドに対する受容体となる高分子に特異的に結合し、その性質を探索するためのさまざまな過程に一貫して対応できる汎用の実験用ツールを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、探索対象とする化合物にタグと標識とを棒状構造物質を介して付加することにより、対象化合物の性質を変えることなく、同定、単離、顕微鏡観察などの広範な探索手法に適した形態にできることを見出した。

【0010】

標識とタグは、棒状構造物質を介さずに対象化合物に直接付加することも可能ではある。例えば、探索対象化合物を標識とタグとの融合タンパク質とする方法、標識とタグのそれぞれに探索対象化合物と親和性のある物質を付加し、探索対象化合物に結合させる方法などが考えられる。しかし、前者の場合、標識とタグが挿入されたことにより、探索対象化合物の立体構造が破壊または変形され、本来の性質が失われてしまう可能性がある。また、後者の場合、探索対象化合物又はその近傍に存在する化合物の構造上の問題から標識とタグが探索対象化合物にうまく結合できない場合があり、また、結合できたとしても、標識やタグが探索対象化合物の表面から十分に露出せず、標識やタグとしての機能が不十分になる可能性がある。

【 0 0 1 1 】

本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

即ち、本発明は、以下の(1)～(14)を提供するものである。

【 0 0 1 2 】

(1) 標的化合物と結合し、その化合物を精製又は標識するために使用する分子モジュールであって、棒状構造物質と、標的化合物と相互作用をする相互作用物質と、タグと、標識物質とを有し、相互作用物質が棒状構造物質の一端に配置され、タグと標識物質が棒状構造物質の別の一端に配置されていることを特徴とする分子モジュール。

(2) 棒状構造物質、相互作用物質、タグ、及び標識物質が、一本のポリペプチド鎖を形成していることを特徴とする(1)に記載の分子モジュール。

(3) 棒状構造物質が、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、又はスペクトリンリピート構造をとるタンパク質であることを特徴とする(1)又は(2)に記載の分子モジュール。

【 0 0 1 3 】

(4) タグが、ヒスチジンタグ、又はビオチン化ペプチドであることを特徴とする(1)乃至(3)のいずれかに記載の分子モジュール。

(5) 標識物質が、GFP又はDsRedであることを特徴とする(1)乃至(4)のいずれかに記載の分子モジュール。

(6) タンパク質本体と、棒状構造物質と、タグと、標識物質とを有し、タンパク質本体が棒状構造物質の一端に配置され、タグと標識物質が棒状構造物質の別の一端に配置されていることを特徴とするタグ及び標識付加タンパク質。

【 0 0 1 4 】

(7) タンパク質本体、棒状構造物質、タグ、及び標識物質が、一本のポリペプチド鎖を形成していることを特徴とする(6)に記載のタグ及び標識付加タンパク質。

(8) 棒状構造物質が、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、又はスペクトリンリピート構造をとるタンパク質であることを特徴とする(6)又は(7)に記載のタグ及び標識付加タンパク質。

(9) タグが、ヒスチジンタグ、又はビオチン化ペプチドであることを特徴とする(6)乃至(8)のいずれかに記載のタグ及び標識付加タンパク質。

【 0 0 1 5 】

(10) 標識物質が、GFP又はDsRedであることを特徴とする(6)乃至(9)のいずれかに記載のタグ及び標識付加タンパク質。

(11) タンパク質本体と、棒状構造タンパク質と、タグと、標識タンパク質を有し、タンパク質本体が棒状構造タンパク質の一端に配置され、タグと標識タンパク質が棒状構造タンパク質の別の一端に配置されている構造の融合タンパク質をコードするDNAを細胞内で発現させる工程、前記細胞を破碎し、その破碎液をタグと親和性を持つ物質と接触させる工程、タグと親和性を持つ物質に結合した融合タンパク質を回収する工程を含むことを特徴とするタンパク質の精製方法。

【 0 0 1 6 】

(12) 棒状構造タンパク質が、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、又はスペクトリンリピート構造をとるタンパク質であることを特徴とする(11)に記載のタン

10

20

30

40

50

パク質の精製方法。

(13) タグが、ヒスチジントグ、又はビオチン化ペプチドであることを特徴とする(11)又は(12)に記載のタンパク質の精製方法。

(14) 標識タンパク質が、GFP又はDsRedであることを特徴とする(11)乃至(13)のいずれかに記載のタンパク質の精製方法。

【発明の効果】

【0017】

従来、物質の性質を探索するためには、探索手法ごとに探索対象物質をその手法に適した形態に変換することが必要であったが、本発明の分子モジュールを用いることにより、そのような煩雑な作業を省略することが可能になる。

10

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明の分子モジュールの模式図(A)及び本発明のタグ及び標識付加タンパク質の模式図(B)。

【図2】ダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(棒状構造の短いタイプのタンパク質を使用している。以下、このタイプのものを「shortタイプ」という。)、ヒスチジントグ、ビオチン化ペプチド、GFPを含む融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図。一本下線を付けた部分がGFPであり、二本下線を付けた部分がビオチン化ペプチドであり、破線の下線を付けた部分がヒスチジントグであり、枠で囲った部分がリンカーであり、下線等をつけていない部分がダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質である。

20

【図3】ダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(shortタイプ)、ヒスチジントグ、ビオチン化ペプチド、DsRedを含む融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図。一本下線を付けた部分がDsRedであり、二本下線を付けた部分がビオチン化ペプチドであり、破線の下線を付けた部分がヒスチジントグであり、枠で囲った部分がリンカーであり、下線等をつけていない部分がダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質である。

【図4】ダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(棒状構造の長いタイプのタンパク質を使用している。以下、このタイプのものを「longタイプ」という。)、ヒスチジントグ、ビオチン化ペプチド、GFPを含む融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図。一本下線を付けた部分がGFPであり、二本下線を付けた部分がビオチン化ペプチドであり、破線の下線を付けた部分がヒスチジントグであり、枠で囲った部分がリンカーであり、下線等をつけていない部分がダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質である。

30

【図5】ダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(longタイプ)、ヒスチジントグ、ビオチン化ペプチド、DsRedを含む融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図。一本下線を付けた部分がDsRedであり、二本下線を付けた部分がビオチン化ペプチドであり、破線の下線を付けた部分がヒスチジントグであり、枠で囲った部分がリンカーであり、下線等をつけていない部分がダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質である。

【図6】一本の - アクチニンの棒状領域、ヒスチジントグ、ビオチン化ペプチド、GFPを含む融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図。一本下線を付けた部分がGFPであり、二本下線を付けた部分がビオチン化ペプチドであり、破線の下線を付けた部分がヒスチジントグであり、枠で囲った部分がリンカーであり、下線等をつけていない部分が - アクチニンの棒状領域である。

40

【図7】スパーサーモジュールの構造を模式的に示した図。

【図8】Niビーズで精製したスパーサーモジュールの電気泳動図(A)、及びNiビーズで精製したスパーサーモジュールとStreptavidinとの反応性実験の結果を示す図(B)。

【図9】ロータリーシャドウィング法によるスパーサーモジュールの観察結果を示す図。図中の矢印がスパーサーモジュールを示す。

【図10】スパーサーモジュールと結合させた融合タンパク質の細胞内における局在を示す図。

【図11】スパーサーモジュールと結合させたクラスリン軽鎖とカベオリン-1の細胞内における局在を示す図。

50

【図12】スパーサーモジュールとIP3R1の融合タンパク質をNiカラムで精製した際の各精製段階の画分の電気泳動図。Aがスパーサーモジュール付加IP3R1を示し、BがHisタグ付加IP3R1を示す。レーン1：カラムに添加したサンプル、レーン2：カラム通過物、レーン3：一回目の洗浄画分、レーン4：二回目の洗浄画分、レーン5～8：溶出画分。

【図13】スパーサーモジュールをC末に結合させたクラスリン軽鎖を発現させたHEK細胞抽出物をNiカラムで精製した際の電気泳動図。対照ではスパーサーモジュールの代わりにヒスチジンタグを付加してある。

【図14】スパーサーモジュール結合クラスリン軽鎖を発現させたHEK細胞からモジュールを用いて精製したクラスリン分子 (triskelion) のロータリーシャドウィング法による観察結果。図中の矢印はスパーサーモジュールのGFPを指す。shortタイプ (図中の「short」) とlongタイプ (図中の「long」) では長さが異なるが、いずれも分子の中心から突出し、そこにモジュールの他端が局在することが分かる。

【図15】スパーサーモジュール融合クラスリン軽鎖を発現させたHEK細胞から精製した被覆小胞 (coated vesicle) のネガティブ染色法による観察結果。低倍率の視野 (下) に見られる粒子の大部分が被覆小胞である。矢印で指す個々の粒子の拡大図を上パネルに示す。挿入図は被覆小胞中の分子配列の模式図。

【図16】スパーサーモジュール融合クラスリン軽鎖を発現したHEK細胞から精製した被覆小胞 (coated vesicle) の電気泳動図 (右)。中央は可溶化後に単独で精製したクラスリン分子 (triskelion)。左は分子量マーカー。被覆小胞として精製された分画はクラスリン以外の多数の構成タンパク質を含む。

【図17】スペクトリンリピート型スパーサーモジュールと結合させた細胞質ダイニン軽鎖の細胞内における局在を示す図。Aが単独のスパーサーモジュールを示し、Bが細胞質ダイニン軽鎖と結合したものを示す。

【図18】スペクトリンリピート型スパーサーモジュールを融合したクラスリン軽鎖の細胞内局在。スパーサーモジュール単独発現の場合には特定部位に局在しない (A) が、クラスリン軽鎖に融合した場合には野生型クラスリンと同等の局在を示す (B)。

【図19】二本の - アクチニンの棒状領域、ヒスチジンタグ、ピオチン化ペプチド、GFPを含む融合タンパク質のアミノ酸配列を示す図。一本下線を付けた部分がGFPであり、二本下線を付けた部分がピオチン化ペプチドであり、破線の下線を付けた部分がヒスチジンタグであり、枠で囲った部分がリンカーであり、下線等をつけていない部分が - アクチニンの棒状領域である。

【符号の説明】

【0019】

- 1 タグ
- 2 標識物質
- 3 棒状構造物質
- 4 相互作用物質
- 5 標的化合物
- 6 タンパク質本体

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の分子モジュールは、標的化合物と結合し、その化合物を精製又は標識するために使用するものであって、棒状構造物質と、標的化合物と相互作用をする相互作用物質と、タグと、標識物質とを有し、相互作用物質が棒状構造物質の一端に配置され、タグと標識物質が棒状構造物質の別の一端に配置されていることを特徴とするものである。

【0021】

標的化合物は、本発明の分子モジュールにより精製又は標識可能なものであれば特に制限はなく、タンパク質や核酸など生体高分子やこれらと結合する低分子化合物などを広く使用することができる。

10

20

30

40

50

【0022】

棒状構造物質としては、棒状構造をとり得る物質であれば特に制限はないが、タンパク質であることが好ましく、例えば、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質、スペクトリンリピート構造をとるタンパク質、繊維状ファージ、ファージの繊維状タンパク質などが好ましい。逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質としては、例えば、モータータンパク質であるダイニンのストーク部位や、このダイニンのストーク部位に対して、逆平行型コイルドコイル構造がより強固になるように人為的な変異を加えたタンパク質を挙げることができる。このような人為的な変異を加えたタンパク質として、配列番号6記載のアミノ酸配列で表されるペプチドと配列番号7記載のアミノ酸配列で表されるペプチドとからなるタンパク質（shortタイプ）や配列番号8記載のアミノ酸配列で表されるペプチドと配列番号9記載のアミノ酸配列で表されるペプチドとからなるタンパク質（longタイプ）を例示できる。本例においては、長尺型の棒状構造は短尺型の150%の長さを有する。逆平行コイルドコイル構造は他にも、「Current Opinion in Structural Biology 2001,11:450-457」などを参照して行うことができる。スペクトリンリピート構造をとるタンパク質としては、例えば、
- アクチニンの棒状領域や、スペクトリンリピート構造がより強固になるように人為的な変異を加えたタンパク質を挙げることができる。
- アクチニンの棒状領域としては、例えば、配列番号10記載のアミノ酸配列で表されるタンパク質や、配列番号13記載のアミノ酸配列で表されるペプチドと配列番号14記載のアミノ酸配列で表されるペプチドの二つからなるタンパク質を挙げることができる。なお、この二つのペプチドからなるタンパク質の場合、標識物質等は二つのペプチドの間に挿入する。繊維状ファージとしては、f1ファージ、fdファージ、M13ファージなどを例示できる。棒状構造物質は、タンパク質以外の物質であってもよく、そのような非タンパク質性の物質としては、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、アミロースなどを例示できる。

10

20

【0023】

棒状構造物質の長さ及び直径は、標的化合物とタグ及び標識物質との間に適当な距離を確保できるのであれば特に制限はないが、長さは5~50 nmとするのが好ましく、10~30 nmとするのが更に好ましく、直径は1~10 nmとするのが好ましく、2~5 nmとするのが更に好ましい。

【0024】

相互作用物質は、標的化合物と相互作用をするものであればどのようなものでもよく、タンパク質や低分子リガンドなどを例示できる。どのような相互作用物質を選択するかは、標的化合物の種類に応じて決めればよい。例えば、標的化合物がタンパク質であれば、相互作用物質はそれを認識する抗体とすることができ、標的化合物が抗体であれば、相互作用物質はその抗体が認識する抗原とすることができ、標的化合物が受容体であれば相互作用物質はその受容体に対するリガンドとすることができ、逆に標的化合物がリガンドであれば相互作用物質はそのリガンドに対する受容体とすることができ。

30

【0025】

タグとしては、タンパク質の精製などに利用されている一般的なものでよく、例えば、ヒスチジンタグ、ピオチン化ペプチド（例えば、配列番号11記載のアミノ酸配列で表されるペプチド）、ポリアルギニン、FK506結合タンパク質（FKBP）などを挙げることができる。タグは、分子モジュール中に一つだけでもよいが、二つ以上あってもよい。標識物質がタンパク質である場合、タグはそのタンパク質の内部に挿入されていてもよい。タグを挿入する部位は、標識物質として使用するタンパク質の機能を失わせない部位であれば特に限定されないが、ループ構造をとっている部位が好ましい。ループ構造をとっている挿入部位としては、GFPにおける173番目のアミノ酸残基と174番目のアミノ酸残基の間、DsRedにおける170番目のアミノ酸残基と171番目のアミノ酸残基の間などを例示できる。

40

【0026】

標識物質としては、生体分子などの標識に一般的に用いられているものでよく、例えば

50

、蛍光物質、色素、重金属化合物、重金属コロイド、酸化還元酵素などを使用することができる。標識物質は、タンパク質性のものを使用するのが好ましく、蛍光タンパク質を使用するのが更に好ましい。蛍光タンパク質としては、GFP (*Aequorea victoria* green fluorescent protein) やDsRed (*Discosoma* sp. red fluorescent protein) などを使用するのが好ましい。これらの蛍光タンパク質以外にも、GFPの変異体である強化緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescence Protein:EGFP)、黄色蛍光タンパク質 (Yellow Fluorescence Protein:YFP)、強化黄色蛍光タンパク質 (Enhanced Yellow Fluorescence Protein:EYFP)、シアン蛍光タンパク質 (Cyan Fluorescence Protein:CFP)、強化シアン蛍光タンパク質 (Enhanced Cyan Fluorescence Protein:ECFP)、青色蛍光タンパク質 (Blue Fluorescence Protein:BFP)、及び強化青色蛍光タンパク質 (Enhanced Blue Fluorescence Protein:EBFP)、並びにDsRedの変異体であるモノマーバナナ色蛍光タンパク質 (mBanana)、モノマーオレンジ色蛍光タンパク質 (mOrange)、モノマーミカン色蛍光タンパク質 (mTangerine)、モノマーイチゴ色蛍光タンパク質 (mStrawberry)、及びモノマーサクランボ色蛍光タンパク質 (mCherry) などを使用することもできる。標識物質として非タンパク質性の蛍光物質を使用してもよく、例えば、フルオレセイン系、ローダミン系、エオシン系、NBD系の蛍光物質を使用することができ、具体的には、フルオレセイン - 5 - イソチオシアネート、ジアシル (イソブチリル、アセチル又はピバロイル) フルオレセイン - 5 及び / 又は 6 - カルボン酸ペンタフルオロフェニルエステル、6 - (ジアシル - 5 及び / 又は 6 - カルボキサミド - フルオレセイン) アミノヘキサ酸ペンタフルオロフェニルエステル、テキサス・レッド (Texas Red: Molecular Probes, Inc. の商標)、テトラメチルローダミン - 5 (及び 6) イソチオシアネート、エオシン - イソチオシアネート、エリトロシン - 5 - イソチオシアネート、4 - クロロ - 7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール、4 - フルオロ - 7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール、3 - (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール - 4 - イル) メチルアミノプロピオニトリル、6 - (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール - 4 - イル) アミノヘキサ酸、スクシンイミジル 12 - (N - メチル - N - (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール - 4 - イル) アミノドデカノエート、7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン (CP)、7 - ヒドロキシクマリン - 4 - 酢酸、7 - ジメチルアミノクマリン - 4 - 酢酸、スクシンイミジル 7 - ジメチルアミノクマリン - 4 - アセテート、7 - メトキシクマリン - 4 - 酢酸、4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸 (SITS)、9 - クロロアクリジン、スクシンイミジル 3 - (9 - カルバゾール) プロピオネート、スクシンイミジル 1 - ピレンブチレート、スクシンイミジル 1 - ピレンノナノエート、p - ニトロフェニル 1 - ピレンブチレート、9 - アントラセンプロピオン酸、スクシンイミジルアントラセン - 9 - プロピオネート、2 - アントラセンスルホニルクロリドなどを使用してもよい。

【 0 0 2 7 】

棒状構造物質、タグ、及び標識物質の三者は一つのポリペプチド鎖からなる融合タンパク質であってもよい。この場合、相互作用物質が低分子リガンドであるときは、棒状構造物質の先端部分の活性基 (N末アミノ酸の - アミノ基、C末アミノ酸のカルボキシル基、またはシステイン残基のチオール基など) を介して共有結合させることができる。また、相互作用物質がタンパク質であるときは、相互作用物質も含めた四者の融合タンパク質としてもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の分子モジュールは、標的とする化合物の精製又は標識のために使用される。具体的には、以下の用途に使用することができる。

【 0 0 2 9 】

(1) 生体成分の精製

本発明の分子モジュールを生体成分の粗抽出物に加えれば、その一端が目的の生体成分に特異的に結合して複合体を形成する。その複合体をタグを介して樹脂ビーズや磁気ビー

10

20

30

40

50

ズで回収することができる。その際、目的に応じて溶液中に塩や界面活性剤を添加することにより、純化を目標とする対象を単体で、あるいは複合体のまま、ひいてはさらに大きな細胞内小器官や細胞全体としても精製することができる。

【 0 0 3 0 】

(2) 顕微鏡観察時の標識

標識物質として蛍光物質を用いることで、蛍光シグナルを顕微鏡観察することにより、細胞内あるいは小器官内における標的化合物の局在を示したり、生きた状態でその化合物の動態を追跡することもできる。また、タグに結合する適当な金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法により、組織試料中におけるリガンド結合部位の探索も可能である。更に、本発明の分子モジュールは棒の先端に球状部分を有す特有な形状を示すので、高分解能の電子顕微鏡画像を用いてタンパク質分子や複合体中の結合領域を直接示すことも可能と思われる。

10

【 0 0 3 1 】

棒状構造物質、相互作用物質、タグ、標識物質の位置関係は、例えば、図 1 (A) に示すようになる。相互作用物質〔 4 〕は、棒状構造物質〔 3 〕の一端に配置され、タグ〔 1 〕と標識物質〔 2 〕が棒状構造物質〔 3 〕の別の一端に配置されている。この図では、タグ〔 1 〕は、標識物質〔 2 〕と結合しているが、棒状構造物質〔 3 〕に直接結合してもよい。また、この図とは逆に、タグ〔 1 〕が棒状構造物質〔 3 〕に直接結合し、標識物質〔 2 〕がタグ〔 1 〕に結合するような位置関係になってもよい。このように位置関係をとることにより、標的化合物〔 5 〕と、タグ〔 1 〕及び標識物質〔 2 〕とが一定の距離を保つことができ、両物質が近接することによる様々な悪影響を排除することができる。

20

【 0 0 3 2 】

本発明のタグ及び標識付加タンパク質は、タンパク質本体と、棒状構造物質と、タグと、標識物質とを有し、タンパク質本体が棒状構造物質の一端に配置され、タグと標識物質が棒状構造物質の別の一端に配置されていることを特徴とするものである。

本発明のタグ及び標識付加タンパク質における棒状構造物質、タグ、標識物質は、本発明の分子モジュールと同様のものを使用でき、また、各物質の位置関係も分子モジュールの場合と同様である(図 1 (B))。タンパク質本体としては特に制限はなく、受容体タンパク質など生体内で重要な働きをしているタンパク質などを使用することができる。

【 0 0 3 3 】

棒状構造物質、タグ、標識物質はいずれもタンパク質であることが好ましく、これらはタンパク質本体と共に、一つのポリペプチド鎖からなる融合タンパク質であることが更に好ましい。図 2 ~ 6 及び図 1 9 にこのような融合タンパク質の具体例を示す(但し、タンパク質本体は含まれない。)。図 2 は、棒状構造物質としてダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(shortタイプ)、タグとしてヒスチジントグ及びビオチン化ペプチド、標識物質としてGFPを用いた融合タンパク質のアミノ酸配列を示すものである。図 3 は、棒状構造物質としてダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(shortタイプ)、タグとしてヒスチジントグ及びビオチン化ペプチド、標識物質としてDsRedを用いた融合タンパク質のアミノ酸配列を示すものである。図 4 は、棒状構造物質としてダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(longタイプ)、タグとしてヒスチジントグ及びビオチン化ペプチド、標識物質としてGFPを用いた融合タンパク質のアミノ酸配列を示すものである。図 5 は、棒状構造物質としてダイニンのストーク部位に変異を加えたタンパク質(longタイプ)、タグとしてヒスチジントグ及びビオチン化ペプチド、標識物質としてDsRedを用いた融合タンパク質のアミノ酸配列を示すものである。図 6 は、棒状構造物質として一本の - アクチニンの棒状領域、タグとしてヒスチジントグ及びビオチン化ペプチド、標識物質としてGFPを用いた融合タンパク質のアミノ酸配列を示すものである。図 1 9 は、棒状構造物質として二本の - アクチニンの棒状領域、タグとしてヒスチジントグ及びビオチン化ペプチド、標識物質としてGFPを用いた融合タンパク質のアミノ酸配列を示すものである。なお、図 2、図 3、図 4、図 5、図 6、及び図 1 9 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1、2、3、4、5、及び 1 2 にも示す。

30

40

50

【0034】

本発明のタンパク質の精製方法は、タンパク質本体と、棒状構造タンパク質と、タグと、標識タンパク質を有し、タンパク質本体が棒状構造タンパク質の一端に配置され、タグと標識タンパク質が棒状構造タンパク質の部位の別の一端に配置される構造をとる融合タンパク質をコードするDNAを細胞内で発現させる工程、前記細胞を破碎し、その破碎液をタグと親和性を持つ物質と接触させる工程、タグと親和性を持つ前記物質に結合した融合タンパク質を回収する工程を含むことを特徴とするものである。

【0035】

このタンパク質の精製方法は、本発明のタグ及び標識付加タンパク質を応用したものである。また、この方法は、タグ及び標識タンパク質を、棒状構造タンパク質を介して付加

10

【実施例】

【0036】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

【0037】

〔実施例1〕 スペーサーモジュールの設計

図2及び図4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質(以下、このタンパク質を「スペーサーモジュール」という。)を設計した。このスペーサーモジュールは、GFP、ヒスチジンタグ(8×His)、ビオチン化ペプチド(biotin acceptor domain, BAD)、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質を有する。図7にこのスペーサーモジュールの構造

20

の模式図を示す。His-tagとビオチン化ペプチドは、GFPのループ部分(173-174)に挿入されており、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質は、GFPのN末端及びC末端に付加されている。逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質は、細胞質ダイニンのstalkをもとにして、より安定するように人工的な変異を導入した。図2に示すスペーサーモジュールと図4に示すスペーサーモジュールとは、逆平行型コイルドコイル構造をとるタンパク質が異なり、前者は短いタイプの棒状構造を有し、後者は長いタイプの棒状構造を有する。

また、GFPの代わりにDsRedを用い同様のスペーサーモジュールも設計した(図3及び図5)。

【0038】

〔実施例2〕 Niビーズによるスペーサーモジュールの精製

実施例で設計した4種類のスペーサーモジュールをコードするcDNAをpColdベクターに挿入して大腸菌で大量発現させた(GFP-short、DsRed-short、GFP-long、DsRed-long)。菌体を破碎後、上清をNiビーズに結合した。ビーズを20 mM imidazoleを含む溶液で洗った後、300 mM imidazoleで溶出した。溶出画分をSDS-PAGEした。この結果を図8Aに示す。

30

いずれのスペーサーモジュールも単一のバンドとして検出されたことから、ヒスチジンタグが精製用タグとして機能していることわかる。なお、shortタイプのスペーサーモジュールの棒状部分の長さは16 nm、longタイプのスペーサーモジュールの棒状部分の長さは24 nmと予想された。

40

【0039】

〔実施例3〕 Streptavidin HRPによるビオチン化の検出

Niビーズで精製したスペーサーモジュールをSDS-PAGE後、PVDF膜に転写し、streptavidin HRPでプロットングした。この結果を図8Bに示す。

いずれのスペーサーモジュールもstreptavidinに反応しており、ビオチン化されていることがわかる。

【0040】

〔実施例4〕 ロータリーシャドウィング法によるスペーサーモジュールの形態観察

上記スペーサーモジュールをコードするcDNAをpCold TFベクターに挿入し、大腸菌タンパク質であるtrigger factorとの融合タンパク質として発現させた。精製した融合タンバ

50

ク質をロータリーシャドウィング法で観察した。この結果を図9に示す。

shortタイプ及びlongタイプのいずれのスペーサーモジュールもダンベル様構造を示した。球状構造の間の棒状部分は長尺型の方が長かった。これは上の予想と一致している。

【0041】

〔実施例5〕 スペーサーモジュールを融合させたタンパク質の細胞内局在

スペーサーモジュール(GFP-short)を単独、又は他のタンパク質との融合タンパク質としてHeLa細胞へ発現させ、細胞内のGFP蛍光を検出した。単独で発現させた場合、クラスリン軽鎖との融合タンパク質(C末融合)として発現させた場合、カベオリン-1との融合タンパク質(N末融合)として発現させた場合、及び1型リアノジン受容体(RyR1)との融合タンパク質(内部挿入, 1379-1380)として発現させた場合のスペーサーモジュールの細胞内局在を示す顕微鏡写真をそれぞれ図10A、図10B、図10C及び図10D

10

に示す。

【0042】

スペーサーモジュールを単独で発現させた場合、スペーサーモジュールは核を除く細胞内に散在していた。クラスリン軽鎖及びカベオリン-1との融合タンパク質として発現させた場合、スペーサーモジュールは核周囲と細胞質に点状に局在した。RyR1との融合タンパク質として発現させた場合、スペーサーモジュールは細胞内に網目状に局在し、小胞体に存在することが示された。いずれの融合タンパク質についても、内在性タンパク質と局在部位が一致していたことから、スペーサーモジュールは、融合対象としてタンパク質の構造、機能に影響を与えないことが示唆された。

20

【0043】

〔実施例6〕 異なるスペーサーモジュールによる二重標識

クラスリン軽鎖のC末にGFP-shortを結合させた融合タンパク質とカベオリン-1のN末にDsRed-shortを結合させた融合タンパク質を、それぞれHeLa細胞に発現させ、両者が発現している細胞を観察した。この結果を図11に示す。

両融合タンパク質は、核周囲と細胞質に点状に局在していたが、その存在位置は異なっていた。

【0044】

〔実施例7〕 哺乳類細胞に発現させたスペーサーモジュール融合タンパク質の精製例(その1)

30

GFP-shortとIP3R1の融合タンパク質(N末融合)をコードするDNAを、Flp-In T-REx HEK細胞に導入し、安定発現株を選択した。doxycyclineにより発現誘導した後、膜画分を調製した。IP3R1はCHAPSで可溶化し、Niカラムにかけた。カラムは100 mM imidazoleで洗浄後、300 mM imidazoleで溶出した。各精製段階の画分中に含まれるタンパク質を電気泳動により分離した。また、比較のため、N末にヒスチジンタグを挿入したIP3R1についても同様に発現させ、各精製段階の画分中に含まれるタンパク質を調べた。この結果を図12に示す。

スペーサーモジュールとの融合タンパク質は、N末にヒスチジンタグを挿入したIP3R1と同様に精製されたことから、スペーサーモジュールは精製用タグとして機能することがわかった。

40

【0045】

〔実施例8〕 哺乳類細胞に発現させたスペーサーモジュール融合タンパク質の精製例(その2)

GFP-shortまたはGFP-longとクラスリン軽鎖の融合タンパク質(C末融合)をコードするDNAを、Flp-In T-REx HEK細胞に導入し、安定発現株を選択した。doxycyclineにより発現誘導した後、膜画分を調製した。0.5 M NaClでtriskelionを抽出してNiカラムにかけた。カラムは100 mM imidazoleで洗浄後、300 mM imidazoleで溶出した。300 mM imidazole溶出画分中に含まれるタンパク質を電気泳動により検出した。対照としてC末にヒスチジンタグを挿入したクラスリン軽鎖を発現させた。この結果を図13に示す。

スペーサーモジュールを融合したクラスリン軽鎖とともに分子量160 kDaのクラスリン

50

重鎖が精製されたことからタンパク質複合体として精製されていることがわかった。

【 0 0 4 6 】

〔実施例 9〕 ロータリーシャドウィング法によるスペーサーモジュール融合クラスリン複合体の形態観察

実施例 8 で精製したクラスリン複合体をロータリーシャドウィング法で観察した。この結果を図 1 4 に示す。

C末にヒスチジンタグを挿入したクラスリン複合体は典型的な三脚巴構造 (triskelion) を示した。shortタイプのスペーサーモジュールを融合したクラスリン軽鎖では、クラスリン軽鎖のC末に一致する triskelion の中心からやや離れた位置にGFPに対応する球状構造が観察された。longタイプのスペーサーモジュールを融合したクラスリン軽鎖では、中心からさらに離れた位置にGFPに対応する球状構造が、さらに棒状部分も観察され、タンパク質複合体中におけるスペーサーモジュールの局在が確認できた。

10

【 0 0 4 7 】

〔実施例 1 0〕 スペーサーモジュール融合タンパク質を発現させた細胞からの細胞内小器官の精製例

スペーサーモジュール (GFP にヒスチジンタグとビオチン化配列を含み両脇にTEVプロテアーゼ部位を有する) とクラスリン軽鎖の融合タンパク質 (C末融合) をコードするDNAを、Flp-In T-REx HEK細胞に導入し、安定発現株を選択した。doxycyclineにより発現誘導した後、0.1 M MES, pH 6.5, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA溶液で細胞をホモジナイズして膜画分を調製した。膜画分をStreptavidin磁気ビーズに結合させて上記緩衝液で洗浄後、TEVプロテアーゼで室温、1時間処理した。溶出画分をネガティブ染色法により電子顕微鏡観察した。その結果を図 1 5 に示す。

20

溶出画分には直径100 nm程度の小胞が多数観察された。拡大すると小胞はサッカーボール状の骨格で取り囲まれており、典型的なクラスリン被覆小胞 (coated vesicles) の形状を示すことが確認された。

【 0 0 4 8 】

〔実施例 1 1〕 哺乳類細胞に発現させたスペーサーモジュール融合タンパク質を含む細胞内小器官の精製例

実施例 1 0 で得られた被覆小胞画分中に含まれるタンパク質を電気泳動により分離した。また、比較のため、同膜画分を0.5 M NaClで抽出した triskelion を同様に精製した。この結果を図 1 6 に示す。

30

被覆小胞画分では、 triskelion に含まれるクラスリン重鎖および軽鎖に加えて多数の別の構成タンパク質のバンドが検出された。27 kDa付近のバンドはTEVプロテアーゼ由来である。スペーサーモジュールが細胞内小器官精製用タグとして有効に機能することがわかった。

【 0 0 4 9 】

〔実施例 1 2〕 スペクトリンリピート型スペーサーモジュールを融合させたタンパク質の細胞内局在 (その 1)

スペクトリンリピート型スペーサーモジュール (配列番号 1 0 記載のアミノ酸配列で表されるタンパク質を含む) を単独、又は他のタンパク質との融合タンパク質としてHeLa細胞へ発現させ、細胞内のGFP蛍光を検出した。単独で発現させた場合、及び細胞質ダイニン軽鎖 (TcTex-1) との融合タンパク質として発現させた場合のスペクトリンリピート型スペーサーモジュールの細胞内局在を示す顕微鏡写真をそれぞれ図 1 7 A 及び図 1 7 B に示す。

40

【 0 0 5 0 】

スペクトリンリピート型スペーサーモジュールを単独で発現させた場合は核を除く細胞内に散在していた。細胞質ダイニン軽鎖との融合タンパク質として発現させた場合、スペクトリンリピート型スペーサーモジュールは核周囲に局在していた。内在性タンパク質と局在部位が一致していたことから、スペクトリンリピート型スペーサーモジュールは、融合対象としてタンパク質の構造、機能に影響を与えないことが示唆された。

50

【0051】

〔実施例13〕 スペクトリンリピート型スペーサーモジュールを融合させたタンパク質の細胞内局在(その2)

スペクトリンリピート型スペーサーモジュール(配列番号13記載のアミノ酸配列で表されるペプチドと配列番号14記載のアミノ酸配列で表されるペプチドを含む)を単独、又は他のタンパク質との融合タンパク質としてHeLa細胞へ発現させ、細胞内のGFP蛍光を検出した。単独で発現させた場合、及びクラスリン軽鎖との融合タンパク質として発現させた場合のスペクトリンリピート型スペーサーモジュールの細胞内局在を示す顕微鏡写真をそれぞれ図18A及び図18Bに示す。

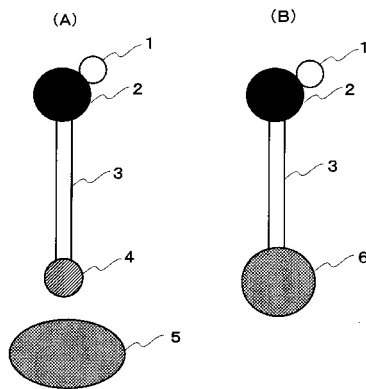
【0052】

スペクトリンリピート型スペーサーモジュールを単独で発現させた場合は核を除く細胞内に散在していた。クラスリン軽鎖との融合タンパク質として発現させた場合、スペクトリンリピート型スペーサーモジュールは核周囲と細胞質に点状に局在していた。スペクトリンリピート型スペーサーモジュールは、融合対象としてタンパク質の構造、機能に影響を与えないことが示唆された。

【0053】

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願(特願2006-332530号)の明細書および/または図面に記載されている内容を包含する。また、本発明で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【図1】



【図2】

VDQLKIKVEQLKEKVNLELENDLAKAVDNLSKNRELDVKNQANQKQKLVQDVQA AEIKVKDASELQVQLDVRNKEIAVQVKAHADLEKAEPAIIEGSGVSKGEELEFTGVVP ILVELDGDVNGHKFVSVEGEGDATYGKLTGKLCITGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFS RYPDHMKQHDFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFK EDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSGHHHHHHHHGSGAG TPTAPLAGTIWKLASEGQTVAAAGEVLLILEAMKMETEIRAAQAGTVRGIKAVKAGDAV AVGDTLMTLAGSGSHGSGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEK RDHMVLEFVTAAGITLGMDELYKSGSEILDRIKPLREEVEQLENAANELKQDEI VATITALEKSIASLKEEVATLIRETEQIKTESSKVAQVQALEIEVKDNKTKVVQLEVE VAQLESEVKDLE

【図3】

VDQLKIKVEQLKEKVNLELENDLAKAVDNLSKNRELDVKNQANQKQKLVQDVQA AEIKVKDASELQVQLDVRNKEIAVQVKAHADLEKAEPAIIEGSGDNTEDVIKPFMQF KVRMEGSGVNGHYFBEIEGEGEKPYEGTQAKLQVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYV KHPADIPTYMKLSFPEGFTWERSMNFEDGGVVEVQDSSLDQDGFYIKVKFKGVNFPAD GPVMQKKTAGWEPSTEKLYPDGVLKGEISHALKLKDGSCHHHHHHHHHHSGAGTPTVTA PLAGTIWKLASEGQTVAAAGEVLLILEAMKMETEIRAAQAGTVRGIKAVKAGDAVAVGDT LMTLAGSGSHYTCDFKTYKAKKPVQLPKNHYVDSKLDITNNHEDYTVVEQYEHAEAR HSGSGSGSEILDRIKPLREEVEQLENAANELKQDEIVATITALEKSIASLKEEVAT LIRETEQIKTESSKVAQVQALEIEVKDNKTKVVQLEVEVAQLESEVKDLE

【図4】

VDQLKIKVEQLKEKVNLELENDLAKAVDNLSKNRELDVKNQANQKQKLVQDVQA VRIKSQELEVKNAAANDKLLKXVQDQEAEBKVVMSQEIQLHKQVEVIADKQMSVKE DLDKAEIKVKDASELQVQLDVRNKEIAVQVKAHADLEKAEPAIIEGSGVSKGEELEFT QVVVILVELDGDVNGHKFVSVEGEGDATYGKLTGKLCITGKLPVPWPTLVTTLYGV QCFSRYPDHMKQHDFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK IDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSGHHHHHHHHH GSGAGTPTVTAAPLAGTIWKLASEGQTVAAAGEVLLILEAMKMETEIRAAQAGTVRGIKAVK AGDAVAVGDTLMTLAGSGSHGSGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYKSGSEILDRIKPLREEVEQLENAANELKQ DEIVATITALEKSIASLRNELQKLEDDAKDNQKANEVEQMI RDLEASIA RYKKEYA VLISEAQA IKADLA AVEAKVSLKEEVATLIRETEQIKTESSKVAQVQALEIEVKDNK TKVVQLEVEVAQLESEVKDLE

【 5 】

VDLQIKVKEQLKEKVNLELENDLAKVDNLNSKNRELDVKNQANQKQKLVQDVQA
 VRIKSEQLEVNAAAANDKLRKMKVQDQEAQKQKMSQEIQEQHLKQVEVIADKQMSVKE
 DLDKAEIKVKDASELQVQVDVRNKEIAVQKVKAHADLEKAEPAIEGSGDNTEDVIKE
 FMQFKVRMEGVSNGHYFEIEGEGEKPYEGTQAKLQVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGS
 KAYVKHPADIPDYMKLSFPEGFTWERSMNFEDGGVVEVQDSSLDQGTFIYKVKFKGVN
 FPADGPPVMQKKTAGWEFSEKLYPQDGLKGEISHALKLKDQSGHHHHHHHSGAGT
 PVTAPLAGTIWKVLASEGQTVAAAGEVLLILEAMKMETEIRAAQAGTVRGIKAVKAGDAVA
 VGD^{TLMTLAGSGS}HYTCDPFKTVYKAKKPVQLPGNHVYVDSKLDITNHNEDYTVVEQYEH
 AEARHSGSGSGSEILDRIKPLREEVEQLENAANELKQDEIVATITALEKSIASLRN
 ELQKLEDDAKDNQKANEVEQMIRDLEASARYKKEYAVLISEAQAIKADLAAVEAKVK
 SLKBEVATLIRETEQIKTESKVKAVQVQALEIEVKDNKTKVVQLEVEVAQLESEVKDLE

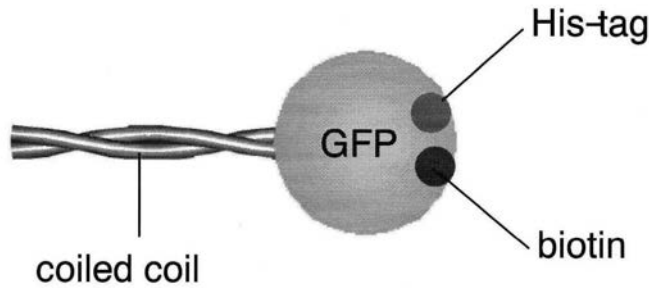
【 6 】

ELNQENEQLMEDYEKLASDLEWIRRTIPWLENRAPENTMQAMQKLEDPRDYRRLHKPPKV
 QEKQCLEINFNTLQTKLRLSNRPAFMPSEGMVSDINNAWGGLEQAQKGYEEWLLNEIRRLLE
 RLDHLAEKFRQKASIHESWTDGKEAMLQKQDYETATLSEIKALLKKHEAFESDLAAHQDRVE
 QIAAIAQELNELDYDPSVSNARCQKICDQWDLGALTKRRREALERTEKLETDIDLYLEY
 AKRAAPPNNWMEGAMEDLQDTFIVHTIEBIIQGLTTAHEQFKATLPDADKERQAILGIHNEVS
 KIVQYHYVNMAGTNPYTTITPQEINGKWEHVRQLVPRRDQALMEEHARQQNERLRKQFGAQ
 ANVIGPWIQTKMEEIGRISIEMHGTLEDQLNHLRQYKESIVNYKPKIDQLEGDHIQIQBALI
 FDNKHTNYTMEHIRVQWELTTIARTINEVENQILTE^{SGQVSKGEEELFTGVVPIILVELD}
 DVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVWPVTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHD
 FFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYN
 YNSHNVIYIMADQKNGIKVNFKIRHNIEDSGHHHHHHHSGAGTPVTA^{PLAGTIWKVLASE}
 GQTVAAAGEVLLILEAMKMETEIRAAQAGTVRGIKAVKAGDAVA^{VGD^{TLMTLAGSGS}HSGSVQ}
 LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS^{KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK}
 SGSEVD

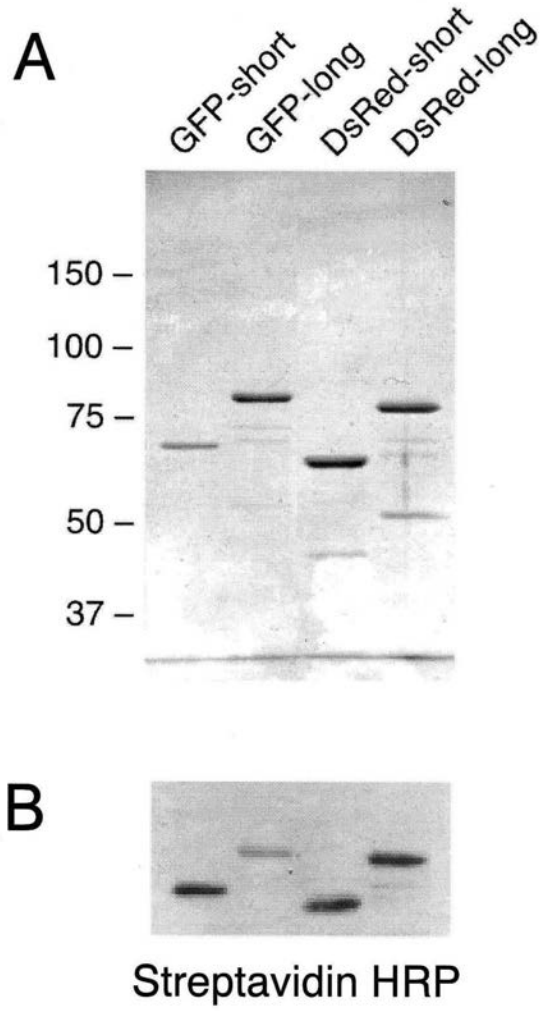
【 19 】

TIDQLHLEFAKRAAPFNNWMEGAMEDLQDMFIVHSIEEIQSLISAHDQFKATLPEADGE
 RQAILSIQNEVEKVIQSYSMRISASNPYSTVTVEEIRTKWEKVKQLVPQRDQSLQEELA
 RQHANERLRRQFAAQNVIGPWIQTKMEEIARSSIEMTGPLEDQMNQKQYEQNIINVK
 HNDKLEGDHQLIQEALVFDNKHNTYMEHIRVQWELTTIARTINEVETQILTEFG
 SGVSKGEEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE
 GDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVIYIMADQKNGIKVNFKIRHNIEDG
 SGHHHHHHHSGAGTPVTA^{PLAGTIWKVLASEGQTVAAAGEVLLILEAMKMETEIRAA}
 QAGTVRGIKAVKAGDAVA^{VGD^{TLMTLAGSGS}HSGSVQ}LADHYQQNTPIGDGPVLLPDN
 HYLSTQSALS^{KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK}SGVNDQENRLEMEEYE
 RLASELLEWIRRTIPWLENRTPEKTMQAMQKLEDFRDRYRRLHKPPKQEKQCLEINFN
 TLQTKLRI^{SNRPAFMPSEGMVSDIAGAWQRLEQAQKGYEEWLLNEIRRLERLEHLAEK}
 FRQKASTHEQWAYGKEQILLQKDYESASLTVRAMLKHEAFESDLAAHQDRVEQIAAI
 AQELNELDYHDAASVNDRCQKICDQWDSLGTTLTQKRRREALERTEKLE

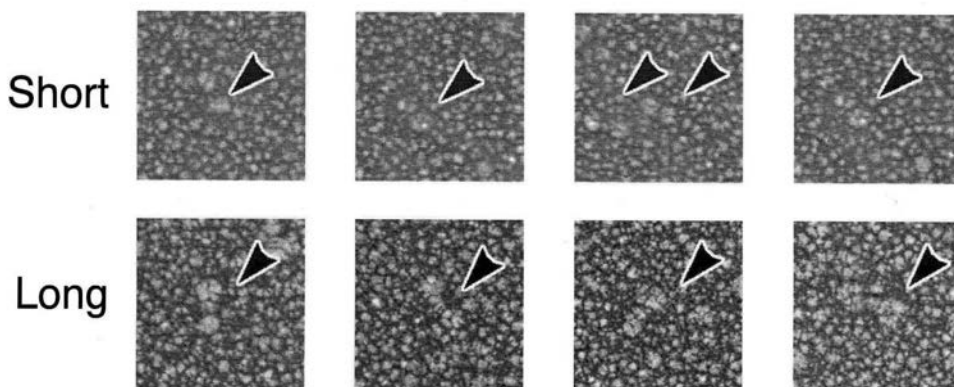
【 7 】



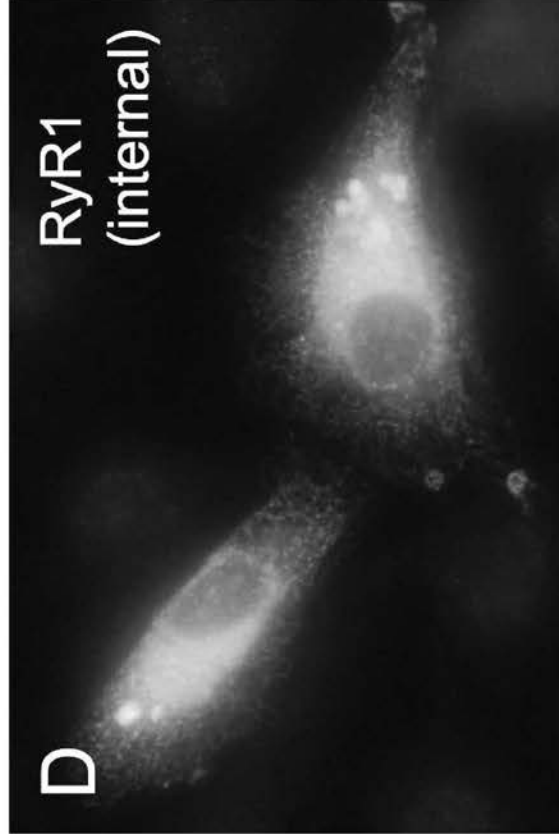
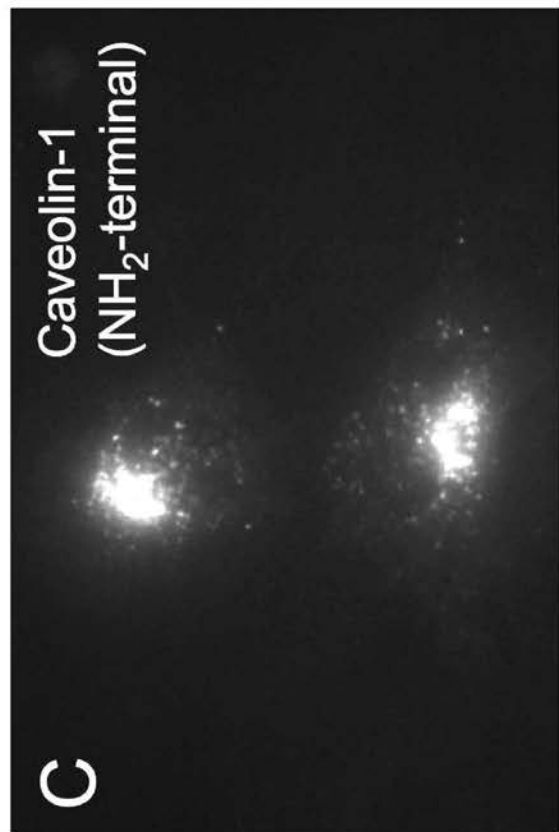
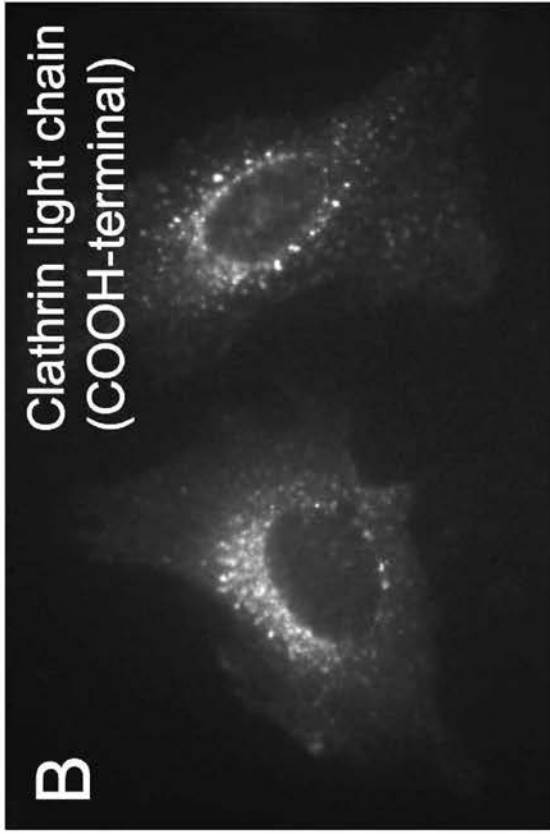
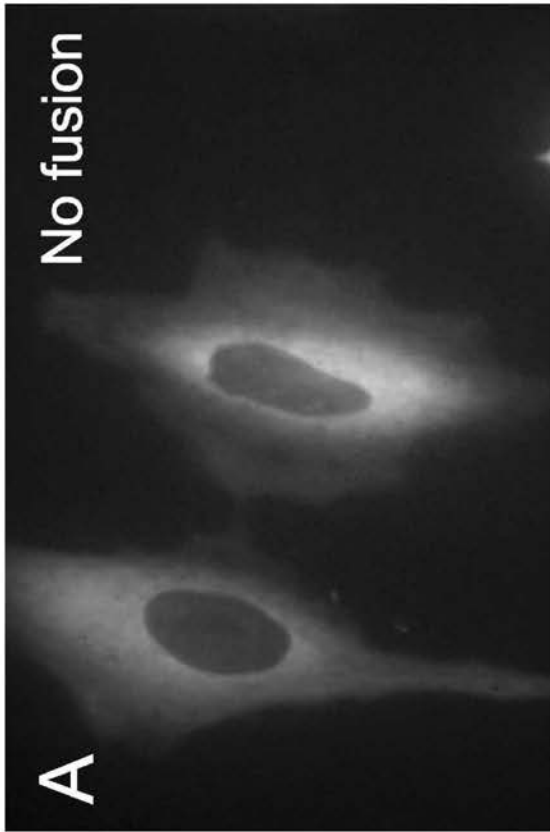
【 図 8 】



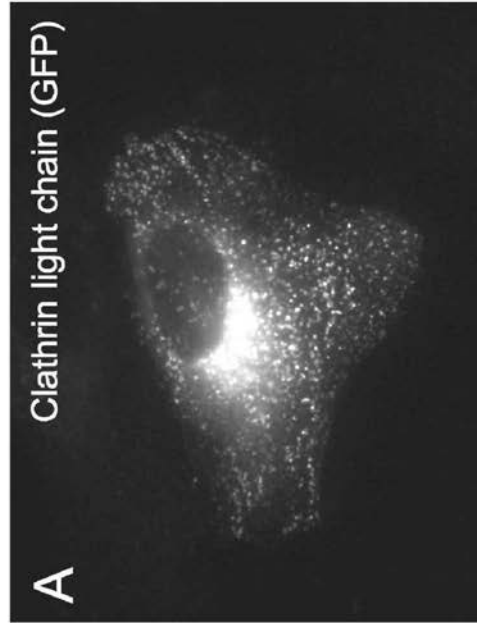
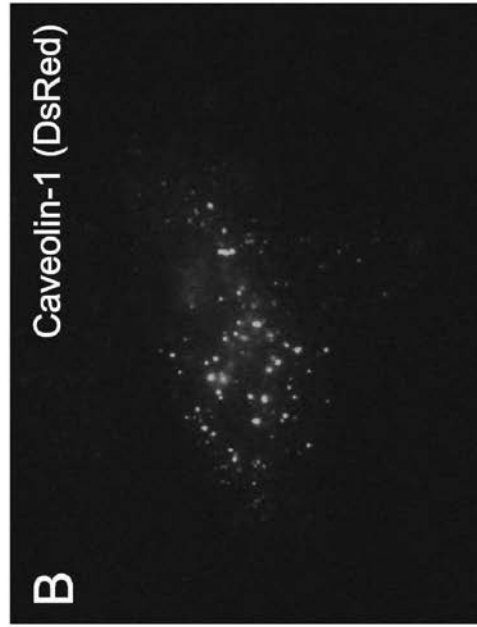
【 図 9 】



【 10 】

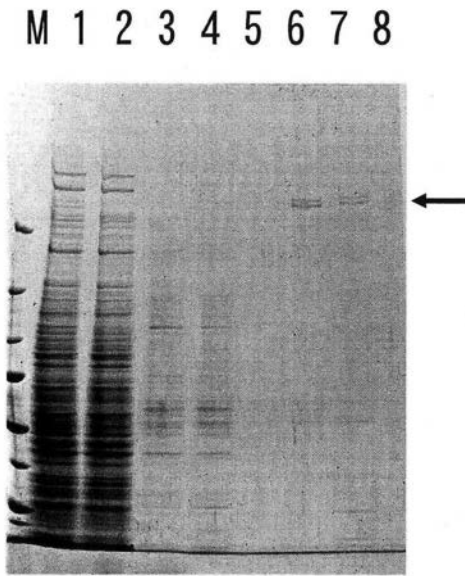


【 1 1 】



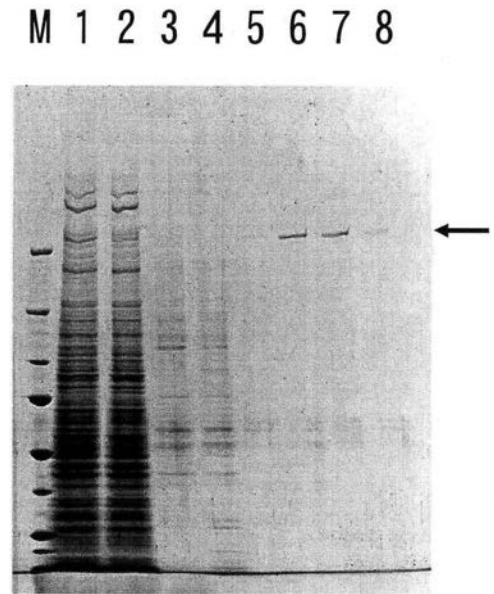
【 1 2 】

A



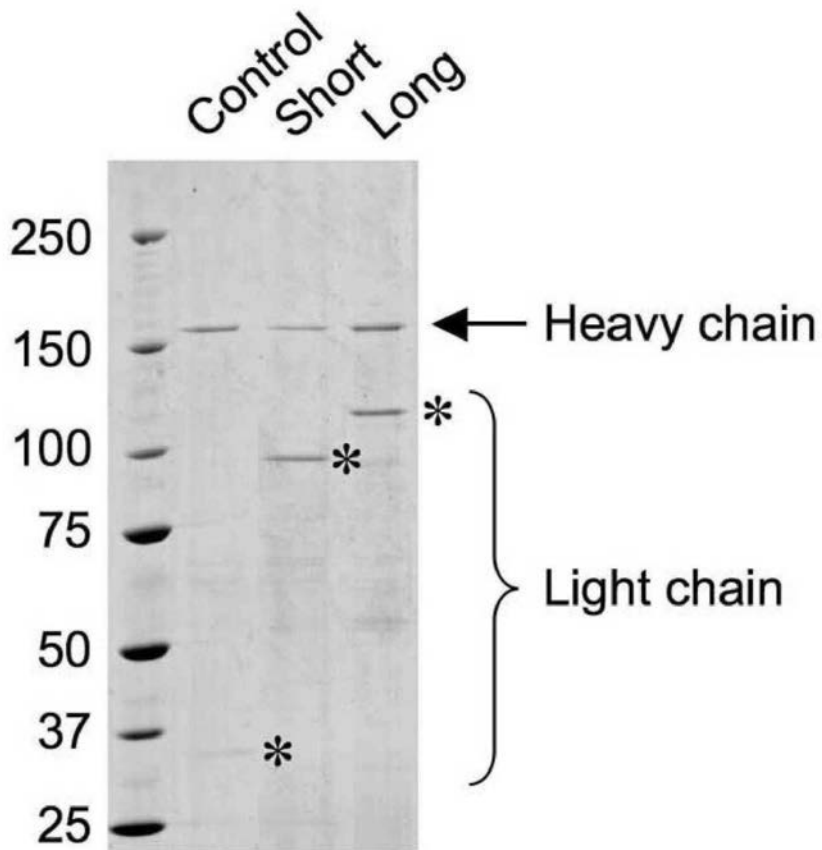
GFP-short-IP₃R1

B



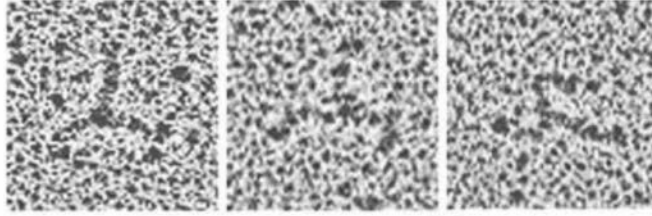
His-IP₃R1

【 1 3 】

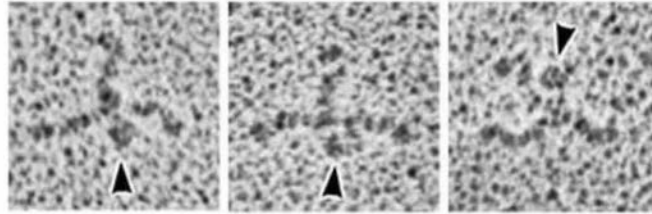


【 図 1 4 】

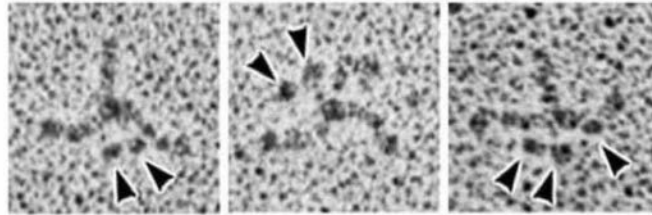
Control



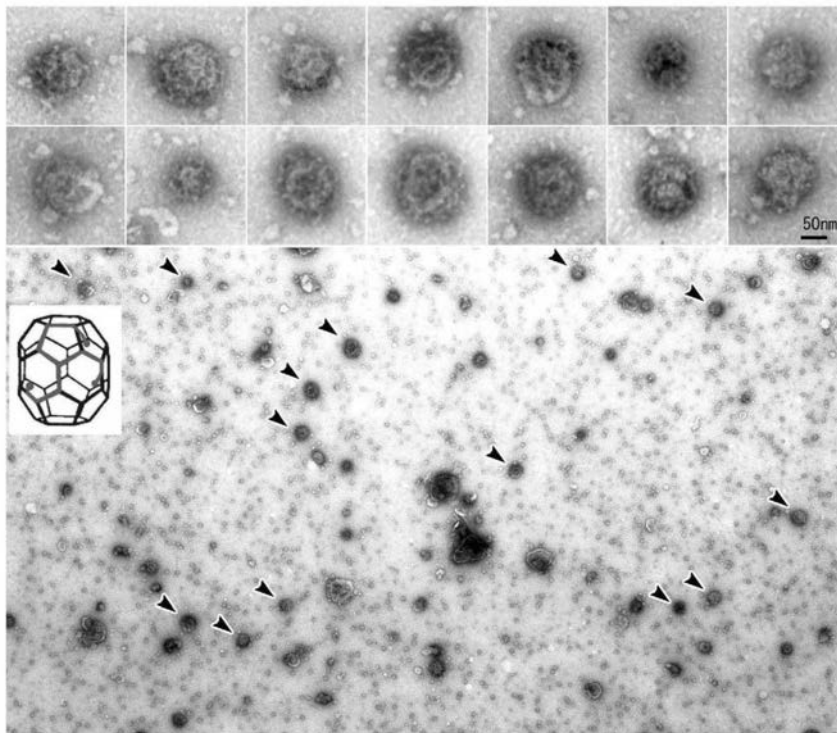
Short



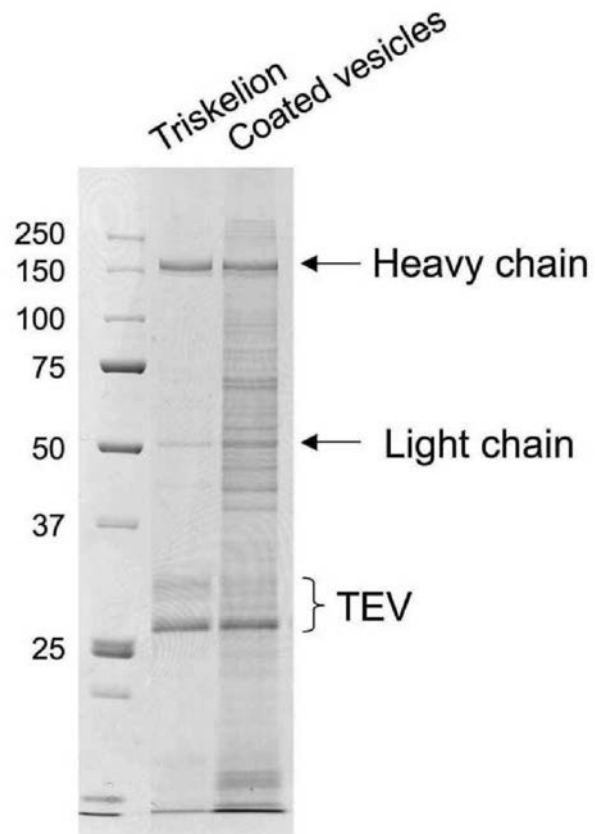
Long



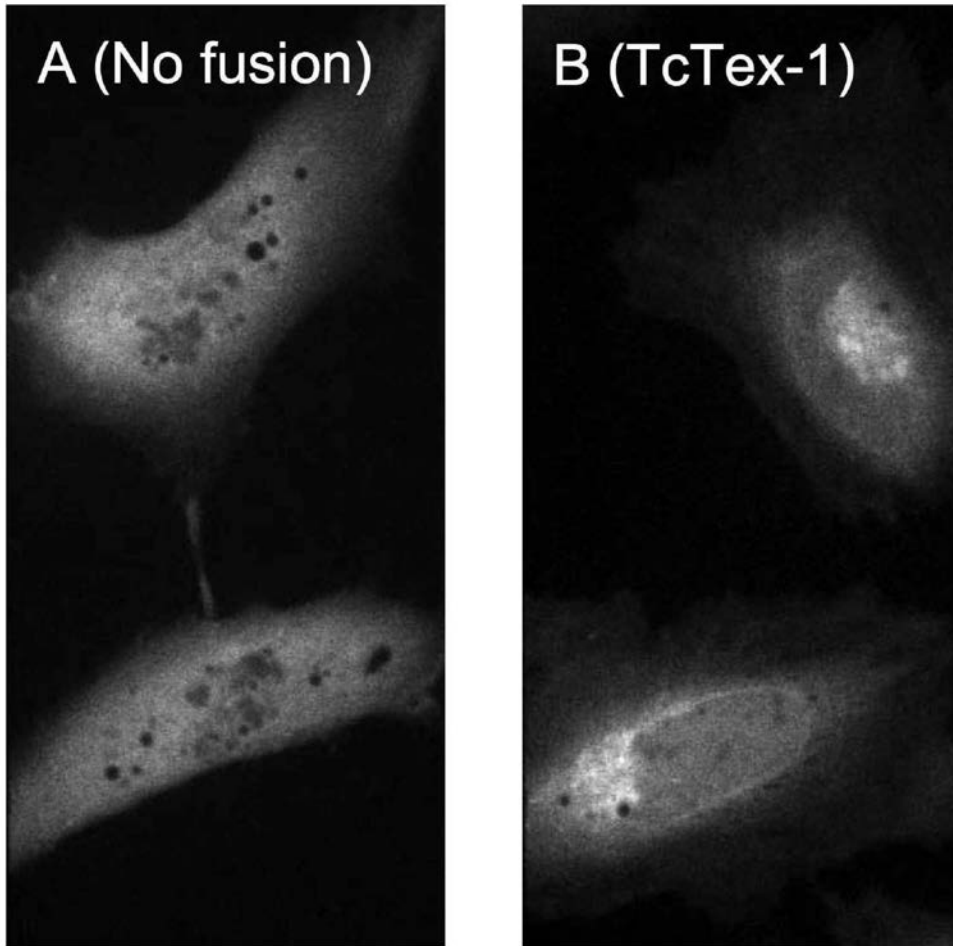
【 図 1 5 】



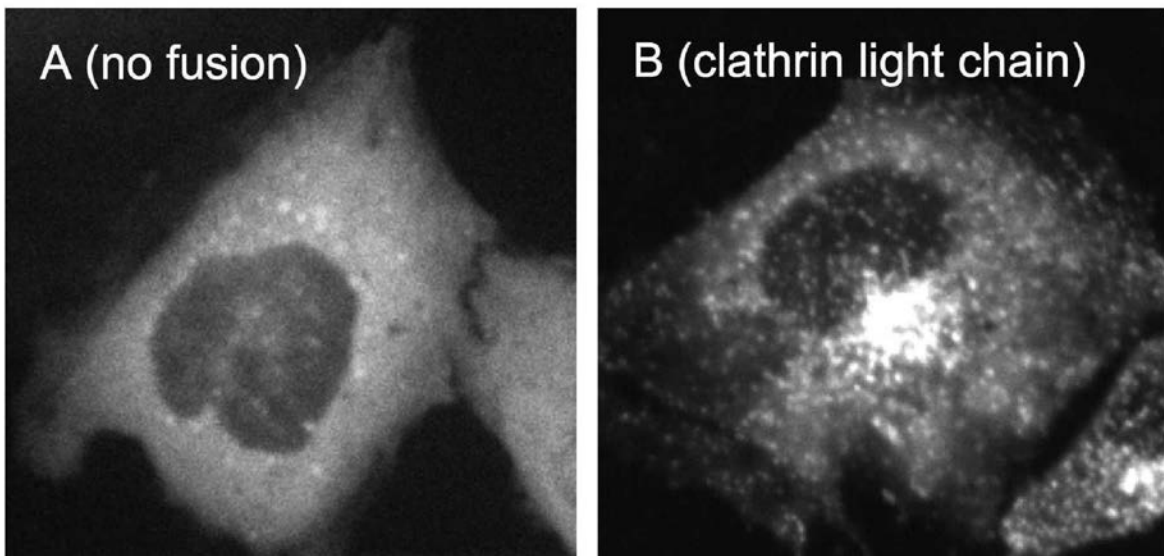
【 図 16 】



【 図 17 】



【 図 18 】



【 配列表 】

[0005152807000001.app](#)

フロントページの続き

- (72)発明者 村山 尚
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 檜山 拓
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 小林 琢也
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内

審査官 佐久 敬

- (56)参考文献 Anal. Chem., vol. 78, pages 3072-3079 (May 2006)
J. Struct. Funct. Genomic., vol. 2, pages 83-92 (2002)
J. Biol. Chem., vol. 275, pages 1829-1838 (2000)
J. Cell Sci., vol. 112, pages 2725-2736 (1999)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 1/00-19/00
C12N 15/00-15/90
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
CAplus(STN)
WPIDS(STN)
BIOSIS(STN)
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq