

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6824594号
(P6824594)

(45) 発行日 令和3年2月3日 (2021. 2. 3)

(24) 登録日 令和3年1月15日 (2021.1.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 15/85 Z N A Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/02

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 Q 1/26 (2006.01)

C 1 2 Q 1/26

請求項の数 16 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-185629 (P2014-185629)	(73) 特許権者	311002067
(22) 出願日	平成26年9月11日 (2014. 9. 11)		J N C株式会社
(65) 公開番号	特開2016-54715 (P2016-54715A)		東京都千代田区大手町二丁目2番1号
(43) 公開日	平成28年4月21日 (2016. 4. 21)	(74) 代理人	100092783
審査請求日	平成29年3月7日 (2017. 3. 7)		弁理士 小林 浩
審判番号	不服2019-10713 (P2019-10713/J1)	(74) 代理人	100149010
審判請求日	令和1年8月13日 (2019. 8. 13)		弁理士 星川 亮
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		(72) 発明者	井上 敏
			神奈川県横浜市金沢区大川5-1 J N C
			株式会社 横浜研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成遺伝子の設計方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号13の塩基配列を有し、北米産ホタルルシフェラーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項2】

さらに他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、北米産ホタルルシフェラーゼと他のタンパク質の融合タンパク質をコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、

前記組換え哺乳類細胞を培養し、配列番号13の塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる北米産ホタルルシフェラーゼを製造する工程を含む、

北米産ホタルルシフェラーゼの製造方法。

【請求項4】

請求項2に記載のポリヌクレオチドを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、

前記組換え哺乳類細胞を培養し、北米産ホタルルシフェラーゼと他のタンパク質の融合

10

20

タンパク質を製造する工程を含む、

北米産ホタルルシフェラーゼと他のタンパク質の融合タンパク質の製造方法。

【請求項 5】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項 3 または 4 に記載の製造方法。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドの発現が、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下である、組換え発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドを有する組換え哺乳類細胞。

【請求項 8】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項 7 の組換え哺乳類細胞。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、

前記組換え哺乳類細胞を培養し、配列番号 13 の塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる北米産ホタルルシフェラーゼを製造する工程を含む、

北米産ホタルルシフェラーゼの天然型遺伝子を用いた場合と比較して北米産ホタルルシフェラーゼの発現量を増加させる方法。

【請求項 10】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、

前記組換え哺乳類細胞を培養し、北米産ホタルルシフェラーゼと他のタンパク質の融合タンパク質を製造する工程を含む、

北米産ホタルルシフェラーゼの天然型遺伝子を用いた場合と比較して北米産ホタルルシフェラーゼと他のタンパク質の融合タンパク質の発現量を増加させる方法。

【請求項 11】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項 9 または 10 に記載の発現量を増加させる方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、

前記組換え哺乳類細胞を培養し、配列番号 13 の塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる北米産ホタルルシフェラーゼを製造する工程を含む、

北米産ホタルルシフェラーゼの天然型遺伝子を用いた場合と比較して北米産ホタルルシフェラーゼの検出感度を増加させる方法。

【請求項 13】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項 12 に記載の検出感度を増加させる方法。

【請求項 14】

ルシフェリン、またはルシフェリン類縁体の発光強度を増強させるための、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項 15】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドをレポーター遺伝子として、プロモーター制御に関する配列の活性を測定する方法。

【請求項 16】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド、請求項 6 に記載の組換え発現ベクター、もしくは請求項 7 または 8 に記載の組換え哺乳類細胞の少なくとも 1 つを含み、さらにルシフェリンおよび/またはルシフェリン類縁体を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、真核生物由来の細胞、特に哺乳動物細胞において高レベル発現させるために適応させた遺伝子の設計法および使用法に関する。

【0002】

生細胞内でのタンパク質の合成は、DNA（遺伝子）より転写されたmRNAを鋳型として、20種類のアミノ酸に対する61個のコードン（遺伝子暗号）によって規定される。しかし、コードンの使用頻度は、同じアミノ酸であっても、生物種によって異なることが知られている。すなわち、全てのコードンは均等に使われるわけではない。

【0003】

コードンの使用頻度は生物種によってかなり偏りがあることから、他の生物種由来の遺伝子を用いて組み換えタンパク質を発現させる場合には、宿主細胞で使用頻度の高いアミノ酸に対するコードンを選択し、目的遺伝子を化学合成し、タンパク質の発現量を最適化することが試みられている。たとえば、哺乳類の培養細胞系では、異種生物のタンパク質発現を目的として、ヒト細胞で使用するコードン組成を考慮して合成した遺伝子をヒト型遺伝子と呼び、遺伝子発現が検討されている。既に、ヒト細胞のコードン使用頻度について詳細に解析され（<http://www.kazusa.or.jp/codon/>）、ヒト細胞のコードン使用頻度を示したデータが公開されている（表1）。表1には、各アミノ酸に対するコードンの使用頻度が示されており、アミノ酸によりコードンの偏りがあることがわかる。一般に、ヒト型遺伝子の合成法は、目的遺伝子が、表1に示すアミノ酸コードン分布割合に近くなるように、GC含量が40 - 50%で、かつ使用頻度の少ないコードンを避けるように設計する方法が行なわれている。

【0004】

10

20

【表 1】

ヒト細胞でのコドンの使用頻度示す表

1 st base	2 nd base						3 rd base	
	T		C		A			G
T	TTT 0.43	Phe	Ser	TCT 0.18	TAT 0.42	Tyr	TGT 0.42	Cys
	TTC 0.57			TAC 0.58	TGC 0.58			
	TTA 0.06	TCA 0.15		TAA 0.22	Stop	TGA 0.61	Stop	A
	TTG 0.12	TCG 0.06		TAG 0.17	Trp	TGG 1.00		
C	CTT 0.12	Leu	Pro	CCT 0.29	CAT 0.41	His	CGT 0.09	T
	CTC 0.20			CCC 0.33	CAC 0.59		CGC 0.19	C
	CTA 0.07			CCA 0.27	CAA 0.27	CGA 0.10	A	
	CTG 0.43			CCG 0.11	CAG 0.73	CGG 0.19	G	
A	ATT 0.35	Ile	Thr	ACT 0.23	AAT 0.44	Asn	AGT 0.14	T
	ATC 0.52			ACC 0.38	AGC 0.25		C	
	ATA 0.14			ACA 0.27	AAA 0.40	AGA 0.21	A	
	ATG 1.00			Met	ACG 0.12	AAG 0.60	Arg	G
G	GTT 0.17	Val	Ala	GCT 0.26	GAT 0.44	Asp	GGT 0.18	T
	GTC 0.25			GCC 0.40	GAC 0.56		GGC 0.33	C
	GTA 0.10			GCA 0.22	GAA 0.41	GGA 0.26	A	
	GTG 0.48			GCG 0.10	GAG 0.59	GGG 0.23	G	

“http://www.kazusa.or.jp/java/codon/codon_table_java/”

【 0 0 0 5 】

さらに、コドン割合の検討のみならず、転写因子の認識部位削除、核酸配列中でのパルミトイル化構造等の回避、不必要な制限酵素部位の削除等を考慮した各種ソフトによりヒト型遺伝子が設計されている。しかしながら、同一アミノ酸配列でありながら合成されたヒト型遺伝子配列は、組み合わせにより、多様な遺伝子配列をもち、哺乳類細胞において発現させた場合、必ず高発現する遺伝子への改善は保証されず、ヒト型遺伝子を合成している

10

20

30

40

50

のが現状である。

【 0 0 0 6 】

一方、哺乳類由来の動物培養細胞系において、異種タンパク質である腔腸動物由来の分子量2万前後の低分子発光タンパク質であるイクオリン（189アミノ酸残基：特許文献1）およびクライティンII（189アミノ酸残基：特許文献2）について、ヒト細胞で使用頻度の高いコドンを選択的に使用してこれらの遺伝子を合成し、動物培養細胞で発現が試みられた。その結果、天然型遺伝子に比べ高い発現活性を示すことが特許文献1、2に記載されている。しかし、使用頻度の高いコドンのみを選択的に使用し遺伝子合成する『選択的ヒト化型遺伝子最適化法』が、現在まで一般的な法則と認められていない。その理由は、細胞内でのタンパク質合成において、遺伝子配列において極端なアミノ酸に対するコドンの偏りは、生物種によって細胞内の各アミノ酸に対するtRNA種の存在量が異なることを考慮するとタンパク質合成の効率に影響があると考えられる。さらに、通常分子量3～6万のタンパク質において、偏りのある頻度の高いコドン使用のみによる合成遺伝子の細胞内発現効率についても、検証されていない。また、ヒトを含め真核生物の遺伝子のGC含量は40%前後であり、60%以上のGC含量をもち、かつコドンの使用頻度を選択的な偏りのある合成遺伝子が真核生物内で、一般的に効率良く発現するかについては不明である。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】国際公開第02/88168

20

【特許文献 2】特開2010-172260

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明者は、真核生物で高発現する化学合成タンパク質遺伝子を取得することを目的として、“使用頻度の高いコドンのみを選択的に使用し、かつGC含量が60%以上”である遺伝子設計法が高発現タンパク質の一般的ルールとなり得るか否かを課題として、当該課題の検証を行なった。さらに、転写因子の認識部位、核酸配列中でのパリドローム構造等を考慮せず、使用頻度の高いコドンのみを選択し、GC含量が60%以上目的タンパク質遺伝子を設計し、目的タンパク質の合成遺伝子が真核生物由来の細胞で効率良く発現するか否かを課題として、天然型タンパク質遺伝子を用いたタンパク質発現と比較することにより検証を行なった。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者は、上記課題に対して、ヒト細胞のコドン使用頻度表（表1）から、20個のアミノ酸に対する使用頻度の高いコドンのみを優先的に選択し、かつGC含量が60%以上になるように、目的タンパク質遺伝子を設計し、化学合成した。化学合成した目的タンパク質遺伝子を用いて、細胞内で遺伝子発現を行ない、天然型遺伝子の発現と比較することにより評価を行なった。目的タンパク質遺伝子には、評価モデル遺伝子として、タンパク質の一次構造の相同性が低く、高次構造も異なる発光タンパク質（イクオリンおよびクライティンII）および各種発光酵素（ルシフェラーゼ）を利用し、発光を検出することにより評価した。評価の結果、偏りのある選択的な高頻度コドン及びGC含量60%以上の方法の採用による遺伝子合成方法が非常に有効であることが明らかとなった。

40

【 0 0 1 0 】

本発明は、以下の構成を有するものである。

（1）目的タンパク質遺伝子の塩基配列を、ヒト細胞で使用頻度の高いコドンのみを選択し、かつGC含量が60%以上になるよう改変する工程を含む、選択型遺伝子の設計方法。

（2）目的タンパク質遺伝子が、機能的タンパク質、または構造的タンパク質をコードする遺伝子である、上記（1）記載の方法。

（3）目的タンパク質遺伝子が、発光タンパク質または発光酵素をコードする遺伝子であ

50

る、上記(2)に記載の方法。

(4) 発光タンパク質または発光酵素が、イクオリン、クライチンII、ガウシアルシフェラーゼ、エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体、北米産ホタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、またはレニラルシフェラーゼから選択される、上記(3)に記載の方法。

(5) 上記(1)または(2)に記載の方法によって合成された、選択型遺伝子。

(6) 上記(3)に記載の方法によって合成された、発光タンパク質または発光酵素をコードする選択型遺伝子。

(7) 上記(4)に記載の方法によって合成された、イクオリンをコードする選択型遺伝子。

10

(8) 上記(4)に記載の方法によって合成された、クライチンIIをコードする選択型遺伝子。

(9) 上記(4)に記載の方法によって合成された、ガウシアルシフェラーゼをコードする選択型遺伝子。

(10) 上記(4)に記載の方法によって合成された、エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体をコードする選択型遺伝子。

(11) 上記(4)に記載の方法によって合成された、北米産ホタルルシフェラーゼをコードする選択型遺伝子。

(12) 上記(4)に記載の方法によって合成された、ゲンジボタルルシフェラーゼをコードする選択型遺伝子。

20

(13) 上記(4)に記載の方法によって合成された、レニラルシフェラーゼをコードする選択型遺伝子。

(14) 上記(5)～(13)に記載のいずれか1つに記載の選択型遺伝子と、他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが融合した選択型遺伝子。

(15) 上記(1)または(2)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
目的タンパク質の製造方法。

30

(16) 上記(3)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
発光タンパク質または発光酵素の製造方法。

(17) 上記(4)に記載の方法で合成した選択型遺伝子のいずれか1つを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
発光タンパク質または発光酵素の製造方法。

40

(18) 上記(14)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
融合目的タンパク質の製造方法。

(19) 哺乳類細胞がヒト細胞である、上記(15)～(18)に記載のいずれか1つに記載の製造方法。

(20) 上記(15)または(19)に記載の方法で製造した目的タンパク質。

(21) 上記(16)または(19)に記載の方法で製造した発光タンパク質または発光酵素。

(22) 上記(17)または(19)に記載の方法で製造した発光タンパク質または発光酵素。

50

(23) 上記(18)または(19)に記載の方法で製造した融合目的タンパク質。

(24) 上記(5)～(14)のいずれか1つに記載の選択型遺伝子の位置が、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下である、組換え発現ベクター。

(25) 上記(5)～(14)のいずれか1つに記載の選択型遺伝子を有する組換え哺乳類細胞。

(26) 哺乳類細胞がヒト細胞である、上記(25)の組換え哺乳類細胞。

(27) 上記(1)または(2)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、

前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
目的タンパク質の発現量を増加させる方法。

10

(28) 上記(3)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
発光タンパク質または発光酵素の発現量を増加させる方法。

(29) 上記(4)に記載の方法で合成した選択型遺伝子のいずれか1つを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
発光タンパク質または発光酵素の発現量を増加させる方法。

20

(30) 上記(14)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
融合目的タンパク質の発現量を増加させる方法。

(31) 哺乳類細胞がヒト細胞である、上記(27)～(30)のいずれか1つに記載の発現量を増加させる方法。

(32) 上記(3)に記載の方法で合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
発光タンパク質または発光酵素の検出感度を増加させる方法。

30

(33) 上記(4)に記載の方法で合成した選択型遺伝子のいずれか1つを用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、
前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、
前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、
発光タンパク質または発光酵素の検出感度を増加させる方法。

(34) 哺乳類細胞がヒト細胞である、上記(32)または(33)に記載の検出感度を増加させる方法。

40

(35) 上記(21)または(22)に記載の発光タンパク質、発光酵素、もしくは上記(23)に記載の融合目的タンパク質を、ルシフェリン、またはルシフェリン類縁体と接触させ、発生した光量を測定する、発光活性の測定方法。

(36) ルシフェリン、またはルシフェリン類縁体の発光強度を増強させるための、上記(5)～(14)のいずれか1つに記載の選択型遺伝子、上記(21)または(22)に記載の発光タンパク質、発光酵素、もしくは上記(23)に記載の融合目的タンパク質の使用。

(37) 上記(5)～(14)のいずれか1つに記載の選択型遺伝子をレポーター遺伝子として、プロモーター制御に関する配列の活性を測定する方法。

(38) 上記(5)～(14)のいずれか1つに記載の選択型遺伝子を哺乳類細胞内で発現させ

50

、発光タンパク質、発光酵素、もしくは融合目的タンパク質を形成させる工程、前記哺乳類細胞をルシフェリン、またはルシフェリン類縁体と接触させる工程、発生した光量を測定する工程を含む、細胞内カルシウム濃度の変化を測定する方法。

(39) 哺乳類細胞がヒト細胞である、上記(38)に記載の細胞内カルシウム濃度の変化を測定する方法。

(40) 上記(5)～(14)のいずれか1つに記載の選択型遺伝子、上記(24)に記載の組換え発現ベクター、もしくは上記(25)または(26)に記載の組換え哺乳類細胞の少なくとも1つを含み、さらにルシフェリンおよび/またはルシフェリン類縁体を含む、キット。

【発明の効果】

10

【0011】

本発明は、ヒト細胞で使用頻度の高いコドンのみを優先的に選択し、かつGC含量が60%以上になるように目的タンパク質遺伝子を設計することで、天然型遺伝子と比較して、目的タンパク質を高発現する合成遺伝子、ならびに当該合成遺伝子の設計方法を提供する。

本発明は、ヒト細胞で使用頻度の高いコドンのみを優先的に選択し、かつGC含量が60%以上になるように発光タンパク質または発光酵素遺伝子を改変することで、天然型遺伝子と比較して高発現し、検出感度が向上する発光タンパク質または発光酵素の合成遺伝子、ならびに当該合成遺伝子の設計方法を提供する。

【0012】

本発明の具体的な実施態様として発光タンパク質(イクオリン、クライチンII)および発光酵素(ガウシアルルシフェラーゼ、エビルシフェラーゼ19kDaのタンパク質の変異体、ホタルルシフェラーゼ(北米産、ゲンジホタル)、レニラルシフェラーゼ)を利用した評価系の結果を示している。本発光系を評価系とした理由は、活性の測定は発光を利用するため高感度であり、他の評価系より簡易だからである。本発明の方法を用いることで、アミノ酸配列の相同性が低く、さらにタンパク質の高次構造も異なる発光タンパク質、発光酵素の全てにおいて、タンパク質の発現量が増加したことを示すことができたのであるから、本発明の方法の対象は、一般的なタンパク質発現に可能であり、発光タンパク質、発光酵素に限られないと言えることができる。

20

【発明を実施するための形態】

【0013】

30

本発明の1つの態様は、目的タンパク質遺伝子の塩基配列を、ヒト細胞で使用頻度の高いコドンのみを選択し、かつGC含量が全体の60%以上になるよう改変する工程を含む、選択型遺伝子の設計方法である。

【0014】

本発明の実施態様であるヒト細胞で使用頻度の高いコドンのみを選択し、かつGC含量が全体の60%以上になるよう改変する工程とは、表1を使用し、60%以上のGC含量をもつようにコドンの塩基(シトシン、グアニン、チミジン、アデニン)を変化または変異することを意味する。別の実施態様において、GC含量は、目的タンパク質の種類に応じて、60%以上で適宜選択し、変更することができる。

【0015】

40

本発明の選択型遺伝子は、一般的にcDNAであるが、ゲノムDNAも包含される。本発明の選択型遺伝子は、遺伝子工学の技術分野における標準的な技術を用いて化学的に合成することができる。塩基配列の変化または変異は、新規核酸合成、PCR、適当にデザインされたプライマーを用いた部位指定の突然変異誘発、または遺伝子工学の技術分野の当業者に公知の方法により行うことができる。本発明の選択型遺伝子の末端は、適当な制限酵素認識配列を有するように設計されていてもよく、あるいは、プラスミドベクターへのクローニング等を容易にするために制限酵素配列を使用してもよい。

【0016】

本発明の実施態様において、目的タンパク質遺伝子は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドのことを意味する。目的タンパク質遺伝子は、特に限定されるもので

50

はなく、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを適宜選択の上、採用すればよい。目的タンパク質遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、その塩基配列情報を公知の技術により化学合成することにより取得できる。本発明の実施態様において、目的タンパク質遺伝子として、機能性タンパク質および構造的タンパク質を含む。ここで、機能性タンパク質とは、酵素、抗体、受容体、ホルモンなどの機能を有するタンパク質である。機能タンパク質には、発光タンパク質または発光酵素も含まれている。構造的タンパク質とは、コラーゲン、アクチン等の細胞構成タンパク質である。

【0017】

本発明の好ましい実施態様において、目的タンパク質遺伝子は、発光タンパク質または発光酵素をコードするポリヌクレオチドのことを意味する。発光タンパク質または発光酵素は、類縁体を含む発光基質（ルシフェリン）を使用する、天然由来、組換えまたは突然変異の発光活性を有するタンパク質を意味する。天然由来のタンパク質遺伝子の場合、遺伝子工学の技術分野における公知の技術により化学合成することで取得可能である。あるいは、アミノ酸配列が既知であれば、化学合成により取得可能である。

【0018】

より好ましい本発明の目的タンパク質は、(i)発光源をセレンテラジンとする腔腸動物由来のカルシウム結合発光タンパク質であるイクオリン、クライチンII、クライチンI、ミトロコミン、オベリン、ミネオプシン（Mnemiopsis 発光タンパク質）、ペロビン（berovin）、(ii)発光基質をセレンテラジンとするガウシアルシフェラーゼ、メトリディアルシフェラーゼ、エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体、レニラルシフェラーゼ、プレウロマンマルシフェラーゼ、(iii)発光基質をホタルルシフェリン（ビートルルシフェリン）とする甲虫由来のルシフェラーゼ（北米産ホタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、ヘイケボタルルシフェラーゼ、クリックビートルルシフェラーゼ等）、(iv)発光基質をウミホタルルシフェリンとするウミホタルルシフェラーゼ、(v)発光基質を渦鞭毛藻ルシフェリンとする渦鞭毛藻ルシフェラーゼなどである。

【0019】

本発明の選択型遺伝子は、目的タンパク質をコードする選択型遺伝子と他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが融合したものであってもよい。タンパク質発現を可能とする制御配列および融合された配列を有する目的融合タンパク質が哺乳類細胞において発現する。他のタンパク質は、N-末端融合タンパク質およびC-末端融合タンパク質のいずれの場合であってもよい。

【0020】

本発明の選択型遺伝子に融合される他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、特に限定されるものではないが、具体的には、分泌あるいは他の制御配列、標識配列（例えば、6-his タグ）、標的指向配列等である。それ以外のタンパク質としては、レポーターまたは他のマーカーとして働く緑色蛍光タンパク質などを挙げることができる。

【0021】

本発明の1つの態様は、合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、目的タンパク質の製造方法である。

【0022】

本発明の目的タンパク質の製造方法の別の実施態様として、目的タンパク質が発光タンパク質または発光酵素であってもよい。発光酵素は、天然由来の発光基質（ルシフェリン）またはその類縁体（ルシフェリン類縁体）を使用する、天然由来、組換えまたは突然変異の発光活性を有する酵素である。本発明のより好ましい目的タンパク質は、(i)発光源をセレンテラジンとする腔腸動物由来のカルシウム結合発光タンパク質であるイクオリン、クライチンII、クライチンI、ミトロコミン、オベリン、ミネオプシン（Mnemiopsis 発光タンパク質）、ペロビン（berovin）、(ii)発光基質をセレンテラジンとする

10

20

30

40

50

ガウシアルシフェラーゼ、メトリディアルシフェラーゼ、エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体、レニラルシフェラーゼ、プレウロマンマルシフェラーゼ、(iii) 発光基質をホタルルシフェリン(ビートルルシフェリン)とする甲虫由来のルシフェラーゼ(北米産ホタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、ヘイケボタルルシフェラーゼ、クリックビートルルシフェラーゼ等)、(iv) 発光基質をウミホタルルシフェリンとするウミホタルルシフェラーゼ、(v) 発光基質を渦鞭毛藻ルシフェリンとする渦鞭毛藻ルシフェラーゼなどである。本発明の目的タンパク質の製造方法のさらなる実施態様として、目的タンパク質が目的融合タンパク質であってもよい。目的融合タンパク質は、目的タンパク質(例えば、発光酵素等)と他のタンパク質(例えば、タグ、レポーター、マーカー等)が融合したものである。他のタンパク質は、目的タンパク質のN-末端およびC-末端のいずれに配置されてもよい。

10

【0023】

本発明の発現ベクターは、遺伝子工学的に利用されるベクターであればよく、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、他の非プラスミドベクターも使用できる。

【0024】

本発明の発現ベクターは、哺乳類細胞の発現ベクターであり、哺乳類細胞で作動するプロモーターを含み、その他に、複製開始点、転写開始部位、タンパク質コード部位、ポリアダニル化部位、転写終結部位などを含むものである。本発明の発現ベクターは、セレクトシヨンのための1以上の抗生物質耐性マーカーも含有する。哺乳類細胞で作動するプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)のチミジンキナーゼ(TK)プロモーター、SV40プロモーターなどが挙げられる。本発明の発現ベクターのタンパク質コード部位は、細胞外に目的タンパク質を分泌のためのシグナルペプチドまたはリーダー配列を含んでもよい。

20

【0025】

本発明のさらなる態様は、本発明の選択型遺伝子を発現するために適した発現ベクターを提供する。すなわち、本発明の選択型遺伝子を含む組換え発現ベクターである。本発明の組換え発現ベクターは、哺乳類細胞で作動するプロモーターの制御調節下に置かれている。

【0026】

本発明の宿主細胞は、哺乳類細胞であればよく、例えば、CHO細胞、NSO細胞、BHK細胞、HT1080細胞、COS細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、MDCK細胞、HepG2細胞、MIN6細胞、INS-E1細胞、およびiPS細胞などの哺乳類由来の細胞が挙げられる。本発明のより好ましい哺乳類細胞はヒト細胞、つまりヒトから単離することができる細胞である。

30

【0027】

本発明の発現ベクターを哺乳類細胞に導入する方法は、遺伝子工学の技術分野において公知の方法によって行うことができる。例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、DEAE-デキストラン法、リボソーム試薬を用いる方法、カチオン性脂質を用いたリポフェクション法などが挙げられる。ここで、ベクターが環状である場合、公知の方法により線状化して細胞に導入してもよい。

40

【0028】

本発明のさらなる態様は、本発明の選択型遺伝子を発現するために適した哺乳類細胞を提供する。すなわち、本発明の選択型遺伝子を含む組換え哺乳類細胞である。本発明の組換え哺乳類細胞は、ヒト細胞であることが好ましい。

【0029】

本発明の目的タンパク質の製造方法の態様において、組換え哺乳類細胞の培養、目的タンパク質の発現、当該培養物からの目的タンパク質の精製は、遺伝子工学の技術分野において公知の方法(例えば、Sambrook et al. "Molecular Cloning-A Laboratory Manual, second edition 1989")を用いて当業者に容易に実施できる。

【0030】

50

本発明のさらなる態様は、本発明の選択型遺伝子を発現して得られた、目的タンパク質、発光タンパク質、発光酵素、または融合目的タンパク質を提供する。本発明の目的タンパク質、発光酵素、または融合目的タンパク質は、発現量効率が増加向上した組換え哺乳類細胞から得られており、特に、発光タンパク質または発光酵素はタンパク質発現量が増加することにより、検出感度が増加するという効果を発揮している。したがって、本発明の目的タンパク質、発光タンパク質、発光酵素、または融合目的タンパク質は、従来の天然型の遺伝子配列を用いた製造方法で得られる目的タンパク質、発光酵素、または融合タンパク質とより、発現量が著しく増加するという予想外の効果を奏する。

【0031】

本発明の1つの態様は、合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、目的タンパク質の発現量を増加させる方法である。

10

【0032】

本発明の目的タンパク質の発現量を増加させる方法の別の実施態様として、目的タンパク質が発光タンパク質、発光酵素、または目的タンパク質（例えば、発光酵素等）と他のタンパク質（例えば、タグ、レポーター、マーカー等）が融合したものであってもよい。一般に哺乳類生物の転写因子の認識配列はATリッチな配列が多く、たとえば、目的タンパク質遺伝子配列中にその配列が存在すると転写因子が結合し、転写効率が落ちると推定される。同様、G/C含量の増加により、polyA付加配列であるAATAAAがほとんど存在しないことになる。本発明によって、発現効率の向上の理由として、GC含量を60%以上にするによって、不要な転写因子様結合配列が減少するために、選択型遺伝子の発現が容易になったことが挙げられる。

20

【0033】

本発明の1つの態様は、合成した選択型遺伝子を用いて、哺乳類細胞において作動するプロモーターの制御調節下に置いた組換え発現ベクターを調製する工程、前記組換え発現ベクターを哺乳類細胞に導入し、組換え哺乳類細胞を作製する工程、前記組換え哺乳類細胞を培養し、前記選択型遺伝子を発現させる工程を含む、発光タンパク質または発光酵素の検出感度を増加させる方法である。

30

【0034】

本発明の目的タンパク質の発現量を増加させる方法の別の実施態様として、目的タンパク質（例えば、発光タンパク質、発光酵素等）と他のタンパク質（例えば、タグ、レポーター、マーカー等）が融合したものであってもよい。本発明によって、発光酵素の感度が増加した理由として、遺伝子の転写効率の向上およびmRNAの安定性の向上により、タンパク質の発現量が増加したことが挙げられる。

【0035】

本発明の1つの態様は、本発明の選択型遺伝子の発光タンパク質または発光酵素、本発明の融合目的タンパク質を、天然型ルシフェリン、またはルシフェリン類縁体と接触させ、発生した光量を測定する発光活性の測定方法である。発生した光量の測定方法は、公知の方法であれば、いずれも適用できる。

40

【0036】

本発明の1つの態様は、ルシフェリン、またはルシフェリン類縁体の発光強度を増強させるための、本発明の選択型遺伝子、本発明の発光タンパク質または発光酵素、もしくは本発明の融合目的タンパク質の使用である。本発明の別の態様には、本発明の選択型遺伝子をレポーター遺伝子として用いることも含まれている。

【0037】

本発明の1つの態様は、本発明の選択型遺伝子をレポーター遺伝子として、プロモーター制御に関する配列の活性を測定する方法である。具体的には、本発明の選択型遺伝子を、目的のプロモーターまたは他の発現制御配列（例えば、エンハンサー）に融合した組換え

50

発現ベクターを構築し、哺乳類細胞に導入し、ルシフェリンまたはルシフェリン類縁体の存在下で発光を検出することにより、目的のプロモーターまたは他の発現制御配列の活性を測定する。

【0038】

本発明の1つの態様は、本発明の選択型遺伝子を哺乳類細胞内で発現させ、発光タンパク質、発光酵素、もしくは融合目的タンパク質を形成させる工程、前記哺乳類細胞をルシフェリン、またはルシフェリン類縁体と接触させる工程、発生した光量を測定する工程を含む、細胞内カルシウム濃度の変化を測定する方法である。

【0039】

本発明のさらなる態様は、活性化されると細胞内カルシウム流動の変化を仲介するGタンパク質結合受容体またはイオンチャネルのような受容体を活性、遮断、阻害、または拮抗する化合物の能力を測定する方法として用いることができる。例えば、細胞内カルシウムを調節する受容体を発現するように操作した哺乳類細胞を試験化合物とインキュベートし、その後、ルシフェリンまたはルシフェリン類縁体を加えて、発光強度を標準的なルミノメーターにより測定する。ここで、発光強度は細胞内カルシウム放出レベルの指標である。発光強度の結果を用いて、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニストなどを直接見つけることができる。

【0040】

本発明の1つの態様は、本発明の選択型遺伝子、本発明の組換え発現ベクター、もしくは本発明の組換え哺乳類細胞の少なくとも1つを含み、さらにルシフェリン、および/またはルシフェリン類縁体を含むキットである。本発明のキットは、本発明の発光タンパク質、発光酵素、もしくは融合目的タンパク質をさらに含んでもよい。

【0041】

本発明のキットは、通常用いられる材料および方法で製造することができる。本発明のキットは、例えば、サンプルチューブ、プレート、キット使用者に対する指示書、溶液、バッファー、試薬、標準化のために好適なサンプルまたは対照サンプルを含んでもよい。また、本発明のキットは、レポーター遺伝子を用いた測定、発光による検出マーカーなど種々の方法に利用することができる。

【0042】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1] 天然型イクオリン遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、L29571である。

[配列番号：2] ヒト型イクオリン遺伝子の塩基配列を示す。

[配列番号：3] 選択型イクオリン遺伝子の塩基配列を示す。

[配列番号：4] 天然型クライチンII遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、AB360785である。

[配列番号：5] 選択型クライチンII遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、HJ241347である。

[配列番号：6] 天然型ガウシアルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、AY015993である。

[配列番号：7] ヒト型ガウシアルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。

[配列番号：8] 選択型ガウシアルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。

[配列番号：9] ヒト型エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質変異体遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、JQ437370である。

[配列番号：10] 選択型エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質変異体遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、AB823628である。

[配列番号：11] 天然型北米産ホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、M15077である。

[配列番号：12] ヒト型北米産ホタルルシフェラーゼの塩基配列を示す。GenBank Accession No.は、AY738225である。

10

20

30

40

50

- [配列番号：13] 選択型北米産ホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。
- [配列番号：14] 天然型ゲンジホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No. は、M26194である。
- [配列番号：15] ヒト型ゲンジホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。
- [配列番号：16] 選択型ゲンジホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。
- [配列番号：17] 天然型レニラルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No. は、M63501である。
- [配列番号：18] ヒト型レニラルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。GenBank Accession No. は、AY738226である。
- [配列番号：19] 選択型レニラルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す。
- [配列番号：20] 実施例 2 で用いられたDNA断片 (HindIII 配列-コザック配列-ATG配列) の塩基配列を示す。
- [配列番号：21] 実施例 2 で用いられたDNA断片 (BamHI 配列-コザック配列) の塩基配列を示す。
- [配列番号：22] 実施例 2 で用いられたDNA断片 (HindIII 配列-コザック配列) の塩基配列を示す。
- [配列番号：23] 実施例 2 で用いられたDNA断片 (HindIII 配列-コザック配列) の塩基配列を示す。

10

【実施例】

【0043】

20

以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1：評価モデル酵素の選択型遺伝子の化学合成と遺伝子組成評価

モデルタンパク質として、表2に示した発光タンパク質遺伝子 (イクオリン：AQ、クライトニンII：CLII) およびルシフェラーゼ遺伝子 (ガウシアルシフェラーゼ：GLuc、2種のホタルルシフェラーゼ：エビルシフェラーゼの発光触媒 19kDaタンパク質：KAZ、PyLucとLcLuc、レニラルシフェラーゼ：RLuc) について、天然型のアミノ酸配列を変えずに、ヒト細胞で使用頻度の高いコドンのみを優先的に選択し、かつGC含量が60%以上になるように選択型新規遺伝子 (opAQ、opCLII、nanoKAZ、opGLuc、opPyLuc、opLcLuc、opRLuc) を合成委託により、化学合成した (オペロンバイオテクノロジー社)。天然型遺伝子 (wAQ、wCLII、wGLuc、wPyLuc、wLcLuc)、ヒト型遺伝子 (hAQ、nanoLuc、hGLuc、hPyLuc、hLcLuc、hRL) も必要に応じて、発現比較、活性比較のためのコントロール遺伝子は、化学合成法またはPCR法により調製した。

30

【0044】

天然型、ヒト型、選択型タンパク質遺伝子における発光タンパク質および発光酵素のコドンの頻度を表2にまとめた。表2から、本発明の評価に使用した選択的遺伝子のアミノ酸組成は、明らかに、天然型とヒト型に比べ異なっていることが分かった。

【0045】

【表 2】

発光タンパク質および発光酵素をコードする天然型、ヒト型及び選択型遺伝子のコドン頻度の比較

アミノ酸	コドン	イクオリン			クライチンII			ガウシアシフェラーゼ			エピルシフェラーゼの発光細菌タンパク質の遺伝子			北米産ホタルシフェラーゼ			ゲンジボタルシフェラーゼ			レニラルシフェラーゼ		
		天然型	ヒト型	選択型	天然型	選択型	wCL-II	opCL-II	wGL	hGL	天然型	ヒト型	選択型	wPyLuc	hPyLuc	opPyLuc	wLcLuc	hLcLuc	opLcLuc	天然型	ヒト型	選択型
F	TTT	2	3	0	6	0	6	0	5	2	3	0	0	18	4	30	18	11	23	11	4	0
	TTC	6	5	6	7	13	7	13	2	5	5	7	7	12	26	0	5	12	0	5	12	16
	TTA	1	0	0	4	0	4	0	2	0	0	0	0	11	0	0	17	4	0	8	0	0
L	TTG	3	2	0	6	0	6	0	2	2	1	0	0	14	10	0	9	6	0	4	0	0
	TCT	2	1	0	3	0	3	0	1	1	0	0	0	9	1	0	13	6	0	5	0	0
	TCC	0	2	0	1	0	1	0	0	2	0	3	0	7	1	0	2	7	0	1	10	0
S	TCA	3	0	0	3	0	3	0	1	0	0	0	0	2	0	0	5	4	0	6	1	0
	TCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	1	2	0	4	0	0
	TAT	2	3	0	2	0	2	0	1	0	4	0	0	8	3	0	13	9	0	12	2	0
Y	TAC	5	4	7	2	4	2	4	0	1	2	1	1	11	16	19	8	12	21	1	11	13
	TAA	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	TAG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	TGT	0	1	0	3	0	3	0	6	4	0	0	0	2	1	0	7	4	0	3	1	0
	TGC	3	2	3	0	3	0	3	5	7	11	1	1	2	3	4	1	4	8	0	2	3
	TGA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
W	TGG	6	6	6	6	6	6	6	1	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	8	8	8
	CTT	4	1	0	2	0	2	0	4	1	1	0	0	8	0	0	12	6	0	8	3	0
	CTC	3	3	0	2	0	2	0	4	4	0	2	0	5	8	3	2	10	2	1	6	0
L	CTA	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	6	0	4	4	0	1	0	0
	CTG	1	6	12	1	14	1	14	3	9	16	12	16	9	27	49	5	19	47	0	13	22
	CCT	3	2	0	1	0	1	0	2	2	0	1	0	8	2	0	10	8	0	5	11	0
P	CCC	1	2	6	1	7	1	7	3	4	6	1	6	7	16	29	2	10	29	0	3	16
	CCA	2	2	0	5	0	5	0	4	1	0	0	0	7	8	0	13	8	0	11	4	0
	CCG	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	7	3	0	4	3	0	2	0	0
H	CAT	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0	2	0	8	4	0	5	3	0	9	2	0
	CAC	3	3	5	3	5	3	5	2	2	2	2	4	6	10	14	3	5	8	1	8	10
	CAA	5	1	0	2	0	2	0	6	1	0	3	0	9	7	0	12	3	0	6	3	0
Q	CAG	0	4	5	3	4	3	4	1	6	7	4	7	7	9	16	1	10	13	1	4	7
	CGT	1	0	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	2	1	0	9	2	0	4	0	0
	CGC	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	2	13	0	2	4	0	0	7	0
R	CGA	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	4	1	0	2	2	0	2	0	0
	CGG	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	5	0	0	4	0	2	3	0
	CGG	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	5	0	0	4	0	2	3	0

10

20

30

40

I	ATT	0.35	5	4	0	3	0	8	2	10	13	4	0	0	18	6	0	22	12	0	12	3	0
	ATC	0.52	6	6	12	7	11	2	10	13	14	14	18	11	32	38	5	15	15	33	6	18	21
M	ATA	0.14	1	2	0	1	0	3	1	0	0	0	0	9	1	0	6	6	0	0	3	0	0
	ATG	1	5	5	5	4	4	4	4	4	2	2	2	14	14	14	11	11	11	11	9	9	9
T	ACT	0.23	2	2	0	1	0	4	1	0	0	0	0	7	2	0	14	0	0	4	1	0	0
	ACC	0.38	2	5	9	2	8	1	5	9	3	3	10	7	19	29	8	13	36	1	4	4	6
	ACA	0.27	5	3	1	4	0	3	1	0	4	4	0	9	7	0	14	10	0	1	0	0	0
	ACG	0.12	1	0	0	1	0	1	2	0	1	1	0	6	1	0	0	4	0	0	0	0	0
N	AAT	0.44	4	4	0	3	0	3	1	0	0	2	0	9	2	0	12	9	0	11	2	0	0
	AAC	0.56	4	4	8	5	8	3	5	5	6	6	8	10	15	19	8	11	20	2	11	13	13
K	AAA	0.4	11	6	0	13	0	13	5	0	0	3	0	26	8	0	40	19	0	21	4	0	0
	AAG	0.6	4	9	15	4	17	6	14	19	4	4	7	14	31	40	3	24	43	6	23	27	27
S	AGT	0.14	1	1	0	4	0	1	0	1	1	1	0	5	4	0	7	4	0	2	1	0	0
	AGC	0.25	0	2	8	0	11	2	2	4	2	2	6	1	22	29	2	7	30	1	7	7	19
R	GAG	0.21	3	2	6	2	5	2	0	5	0	0	7	9	0	20	8	6	0	2	2	13	13
	AGG	0.22	0	2	0	1	0	2	1	0	1	1	0	1	0	0	0	3	21	3	1	1	0
V	GTT	0.17	2	2	0	5	0	3	1	0	2	0	0	17	4	0	33	10	0	12	2	0	0
	GTC	0.25	5	2	8	2	1	0	3	11	3	3	17	9	7	39	4	12	49	2	8	23	23
	GTA	0.1	1	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	7	5	0	15	6	0	6	0	0	0
	GTG	0.48	2	6	2	0	6	4	7	0	8	0	0	11	29	5	3	27	6	3	13	0	0
A	GCT	0.28	8	4	0	6	0	9	3	1	0	0	0	8	9	0	12	9	0	5	11	0	0
	GCC	0.4	4	8	16	1	12	6	10	17	2	2	3	13	28	42	6	13	32	3	9	19	19
	GCA	0.22	4	4	0	4	0	3	2	0	0	0	0	8	4	0	13	7	0	8	0	0	0
	GCG	0.1	0	0	0	1	0	0	3	0	1	1	0	13	2	0	1	3	0	3	0	0	0
D	GAT	0.44	15	10	0	12	0	6	3	0	3	0	0	17	3	0	20	12	0	16	6	0	0
	GAC	0.56	4	9	19	11	23	6	9	12	9	9	12	14	29	31	5	13	25	1	11	17	17
E	GAA	0.41	10	6	0	11	0	9	3	0	7	0	0	23	7	0	33	16	0	25	2	0	0
	GAG	0.59	5	9	15	3	14	3	9	12	1	1	8	10	26	33	6	23	39	5	28	30	30
	GGT	0.18	4	3	0	3	0	5	9	1	3	3	1	8	8	0	23	8	0	10	3	0	0
	GGC	0.33	0	4	15	5	13	2	9	16	9	9	19	9	30	45	9	17	51	4	7	17	17
G	GGA	0.26	11	4	0	4	0	9	2	0	3	0	0	19	2	0	18	13	0	3	3	0	0
	GGG	0.23	0	4	0	1	0	1	4	0	5	5	0	9	6	0	1	13	0	0	4	0	0
合計			190	190	190	190	190	186	186	186	170	170	170	551	551	551	549	549	549	312	312	312	312

【 0 0 4 6 】

発光タンパク質および発光酵素をコードする天然型、ヒト型、選択型遺伝子のGC含量を比

10

20

30

40

50

較して、表3にまとめた。その結果、天然型遺伝子のGC含量は全ての発光タンパク質および発光酵素を通じて36.4% - 44.8%前後であり、ヒト型遺伝子のGC含量は全ての発光タンパク質および発光酵素を通じて44.9% - 58.8%であり、選択型遺伝子のGC含量は全ての発光タンパク質および発光酵素を通じて60%以上であった。

【 0 0 4 7 】

【表 3】

発光タンパク質および発光酵素をコードする天然型、ヒト型及び選択型遺伝子のGC 含量の比較

タンパク質	遺伝子タイプ	GC 含量
イクオリン	天然型 (wAQ)	42.6
	ヒト型 (hAQ)	50.3
	選択型 (opAQ)	61.4
クライチン II	天然型 (wCL-II)	41.6
	選択型 (opCL-II)	61.1
ガウシアルシフェラーゼ	天然型 (wGLuc)	43.0
	ヒト型 (hGLuc)	58.8
	選択型 (opGLuc)	63.5
エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体	ヒト型 (nanoLuc)	52.7
	選択型 (nanoKAZ)	60.6
北米産ホタルルシフェラーゼ	天然型 (wPyLuc)	44.8
	ヒト型 (hPyLuc)	58.0
	選択型 (opPyLuc)	60.9
ゲンジボタルルシフェラーゼ	天然型 (wLuLuc)	37.3
	ヒト型 (hLcLuc)	50.2
	選択型 (opLcLuc)	62.8
レニラルシフェラーゼ	天然型 (wRLuc)	36.4
	ヒト型 (hRLuc)	55.2
	選択型 (opRLuc)	60.3

【 0 0 4 8 】

実施例2：各種培養細胞発現ベクターの構築

(1) イクオリン

動物培養細胞発現ベクターpcDNA3 (インビトロジェン社製) の制限酵素HindIII - XbaI 部位に、5' 末端に制限酵素HindIII配列 - コザック配列 - ATG配列 (AAGCTTGGTACCACCATG : 配列番号20) および3' 末端に制限酵素部位XbaI配列 (TCTAGA) を付加した天然型 (配列番号1)、ヒト型 (配列番号2)、または選択型 (配列番号3) イクオリン遺伝子のHindIII - XbaI フレグメントを調製し、挿入することにより、pcDNA3-wAQ、pcDNA3-hAQおよびpcDNA3-opAQを構築した。

【 0 0 4 9 】

(2) クライチンII

動物培養細胞発現ベクターpcDNA3 (インビトロジェン社製) の制限酵素HindIII - XbaI 部位に、5' 末端に制限酵素HindIII配列 - コザック配列 - ATG配列 (AAGCTTGGTACCACCATG : 配列番号20) および3' 末端に制限酵素XbaI配列 (TCTAGA) を付加した天然型 (配列番号4) 、または選択型 (配列番号5) クライチンII遺伝子のHindIII - XbaIフレグメントを調製し、挿入することにより、pcDNA3-wCLIIおよびpcDNA3-opCLIIを構築した。

【 0 0 5 0 】

(3) ガウシアルシフェラーゼ

動物培養細胞発現ベクターpcDNA3 (インビトロジェン社製) の制限酵素BamHI - XbaI 部位に、5' 末端に制限酵素BamHI配列 - コザック配列 (GGATCCAACCGCC : 配列番号21) および3' 末端に制限酵素XbaI配列 (TCTAGA) をもつ天然型 (配列番号6) 、ヒト型 (配列番号7) 、または選択型 (配列番号8) ガウシアルシフェラーゼ遺伝子のBamHI - XbaIフレグメントを調製し、挿入することにより、pcDNA3-wGluCおよびpcDNA3-opGluCを構築した。

【 0 0 5 1 】

(4) エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体

ガウシアルシフェラーゼの分泌シグナル配列を有する動物培養細胞分泌発現ベクターpcDNA3-GLsp (Biochem.Biophys.Res.Comm. (2013) 437: 23-28) の制限酵素EcoRI-XbaI 部位に、ヒト型 (配列番号9) 、または選択型 (配列番号10) エビルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体遺伝子の5' および3' 末端に制限酵素EcoRIとXbaIを有するフラグメントを調製し、挿入することにより、pcDNA3-GLsp-nanoLucおよびpcDNA3-GLsp-dnKAZを構築した。

【 0 0 5 2 】

(5) 北米産ホタルルシフェラーゼ

ヒト型 (配列番号12) 北米産ホタルルシフェラーゼ発現ベクターpGL4.13[luc2/sv40] (プロメガ社製) の制限酵素HindIII - XbaI部位に挿入されている北米産ホタルルシフェラーゼ遺伝子を、5' 末端に制限酵素HindIII配列 - コザック配列 (AAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTG GTAAAGCCACC : 配列番号22) および3' 末端に制限酵素XbaI配列 (TCTAGA) をもつ天然型 (配列番号11) および選択型 (配列番号13) 北米産ホタルルシフェラーゼ遺伝子のHindIII - XbaIフレグメントを調製し、置換することにより、pJN-wPyLuc-svおよびpJN-opPyLuc-svを構築した。

【 0 0 5 3 】

(6) ゲンジボタルルシフェラーゼ

ヒト型 (配列番号12) 北米産ホタルルシフェラーゼ発現ベクターpGL4.13[luc2/sv40] (プロメガ社製) の制限酵素HindIII - XbaI部位に挿入されている北米産ホタルルシフェラーゼ遺伝子を、5' 末端に制限酵素HindIII配列 - コザック配列 (AAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTG GTAAAGCCACC : 配列番号22) および3' 末端に制限酵素XbaI配列 (TCTAGA) をもつ天然型 (配列番号14) 、ヒト型 (配列番号15) および選択型 (配列番号16) ゲンジボタルルシフェラーゼ遺伝子のHindIII - XbaIフレグメントを調製し、置換することにより、pJN-wLcLuc-sv、pJN-hLcLuc-svおよびpJN-opLcLuc-svをした。

【 0 0 5 4 】

(7) レニラルシフェラーゼ

動物培養細胞発現ベクターpcDNA3 (インビトロジェン社製) の制限酵素HindIII - XbaI 部位に、5' 末端に制限酵素部位HindIII - コザック配列 (AAGCTTGGTACCACC : 配列番号22) および3' 末端に制限酵素部位XbaI配列 (TCTAGA) をもつ天然型 (配列番号17) 、ヒト型 (配列番号18) 、または選択型 (配列番号19) レニラルシフェラーゼ遺伝子のHindIII - XbaIフレグメントを調製し、挿入することにより、pcDNA3-RL、pcDNA3-hRL、およびpcDNA3-opRLを構築した。

【 0 0 5 5 】

実施例3: トランスフェクション法による遺伝子導入

10

20

30

40

50

(1) 発現プラスミドの精製

実施例2にて得られた組換えプラスミドを用いて以下の実験を行った。組換えプラスミドは大腸菌JM83またはDH5aより、プラスミド精製キット（QIAGEN社製）を用いて精製、滅菌水に溶解し、トランスフェクションに使用した。

【0056】

(2) トランスフェクション法

動物培養細胞株CHO - K1株を、10% (v/v) 牛胎児血清（HyClone社製またはBiowest社製）を含むHam's F-12培地（和光純薬社製）（以降Ham's - F12培地と記載することもある）にて培養した。

【0057】

(i) 発光蛋白質イクオリンまたはクライティンII発現プラスミドをトランスフェクションする場合：CHO - K1細胞を 1×10^5 細胞/ウエル/2 mL培地にて6 ウエルプレートに播種し（ $n=3$ ）、インキュベーター中37℃、5% (v/v) CO₂にて培養した。24時間後、精製した組換えプラスミドをFuGene HD（プロメガ社製）トランスフェクションキットを用いて、CHO - K1細胞にトランスフェクションした。具体的には、100 μ L の無血清Ham's - F12培地に、組換えプラスミド1 μ g、FuGene HD 3 μ Lを加え、室温で15分間放置した。内部標準ベクターが必要である場合は、pGL4.13[luc2/sv40]（プロメガ社製）0.1 μ gを使用した。DNA - FuGene複合体溶液を、6ウエルの細胞に添加し、24時間培養後、細胞抽出液を用いて発光活性測定した。

【0058】

(ii) ルシフェラーゼであるガウシアルシフェラーゼ、エピルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体、ホタルルシフェラーゼ、レニラルシフェラーゼ発現プラスミドをトランスフェクションする場合：CHO - K1細胞を 1×10^5 細胞/ウエル/0.5 mL培地にて24ウエルプレートに播種し（ $n=4$ ）、インキュベーター中37℃、5% (v/v) CO₂にて培養した。24時間後、精製した組換えプラスミドをFuGene HD（プロメガ社製）トランスフェクションキットを用いて、CHO - K1細胞にトランスフェクションした。具体的には、25 μ L の無血清Ham's - F12培地に、組換えプラスミド0.5 μ g、FuGene HD 1.5 μ Lを加え、室温で15分間放置した。内部標準ベクターが必要である場合は、0.05 μ gの pGL4.13[luc2/sv40]（プロメガ社製）またはpGL4.75[hRLuc/CMV]（プロメガ社製）を加え、DNA - FuGene複合体溶液を、24ウエルの細胞に添加した。24時間培養後、培養液あるいは細胞抽出液を用いて発光活性測定した。

【0059】

実施例4：発光活性測定法

(1) 発光タンパク質イクオリンおよびクライティンIIの発光測定法

実施例3で得られた発光タンパク質のアポ発光蛋白質発現細胞を、3 mLのPBS（和光純薬社製）で洗浄後、1mL PBSを加え、スクレーパーで細胞を回収した。250 μ Lの回収細胞溶液に、250 μ Lの30mM Tris-HCl (pH7.6) - 10mM EDTAを加え、氷上で5秒間超音波破碎機にて破碎した。その破碎溶液に、1 μ gのセレンテラジン（JNC社製）および1 μ Lの2 - メルカプトエタノール（和光純薬社製）を加え、4℃で3時間以上放置し、アポ発光蛋白質から発光蛋白質へ再生した。10 μ Lの再生溶液に、50mM Tris-HCl (pH7.6) に溶解した50 mM CaCl₂を100 μ L注入することにより、発光反応を開始させた。発光測定装置（ベルトールド社：LB960）で、0.1秒間隔で5秒間測定し、最大発光値（ I_{max} ）の平均値（ $n=3$ ）として表した。

【0060】

(2) 分泌型ガウシアルシフェラーゼの発光活性測定法

実施例3で得られたガウシアルシフェラーゼの分泌発現細胞の培養液および細胞内の発光活性を測定した。細胞抽出液は、発現細胞を0.5 mLのPBS 溶液で3回洗浄後、100 μ LのPassive lysis buffer（プロメガ社製）を加え室温で15分震振し調製した。培養液または細胞抽出液の発光測定のために、Passive lysis bufferで100倍希釈した後、1 μ Lを、セレンテラジン（0.25 μ g）を含む50 μ L のPBSに加え、発光反応を開始させた。発光活性は、

発光測定装置（アトー社製：AB2200）で、0.1秒間隔で5秒間測定し、最大発光値（ I_{\max} ）の平均値（ $n=4$ ）として表した。

【0061】

（3）分泌型エピルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体の発光活性測定法
実施例3で得られたエピルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体の分泌発現細胞の培養液1 μ Lを、セレンテラジン（0.25 μ g）を含む50 μ LのPBSに加え、発光反応を開始させた。発光活性は、発光測定装置（アトー社製：AB2200）で、1/100の減衰フィルター存在下、0.1秒間隔で5秒間測定し、最大発光値（ I_{\max} ）の平均値（ $n=4$ ）として表した。

【0062】

（4）北米産ホタルルシフェラーゼおよびゲンジホタルルシフェラーゼの発光活性測定法
実施例3で得られたホタルルシフェラーゼ発現細胞からの細胞抽出液の調製は、発現細胞を1mLのPBS溶液で3回洗浄後、100 μ LのPassive lysis buffer（プロメガ社製）に加え、室温で15分震振した。得られた細胞抽出液10 μ Lを、50 μ Lのホタルルシフェラーゼアッセイ溶液（Firefly luciferase assay solution:プロメガ社製）に加え、発光反応を開始させた。発光活性は、発光測定装置（アトー社製：AB2200）で、1/100の減衰フィルター存在下、0.1秒間隔で10秒間測定し、10秒間の発光の積分値（Int.）の平均（ $n=4$ ）として表した。

【0063】

（5）レニラルシフェラーゼの発光活性測定法
実施例3で得られたレニラルシフェラーゼ発現細胞からの細胞抽出液の調製は、発現細胞を1mLのPBS溶液で3回洗浄後、100 μ LのPassive lysis buffer（プロメガ社製）に加え、室温で15分震振した。得られた細胞抽出液10 μ Lを、セレンテラジン（0.25 μ g）を含む50 μ LのPBSに加え、発光反応を開始させた。発光活性は、発光測定装置（アトー社製：AB2200）で、1/10の減衰フィルター存在下、0.1秒間隔で10秒間測定し、10秒間の発光の積分値の平均（ $n=4$ ）として表した。

【0064】

実施例5：CHO-K1細胞での発光活性測定結果を以下に示す。

（1）イクオリンの発現

実施例4記載の活性測定法により、細胞内での発現イクオリンの活性を測定した（表4）。その結果、天然型遺伝子に比べ、ヒト型遺伝子は2.7倍、選択型遺伝子は7.9倍高い活性を示した。

【0065】

【表4】

プラスミド	ウエル当たりの活性 (I_{\max} , $\times 10^6$ rlu)	相対発光強度 (%)
pcDNA3-wAQ (天然型)	0.43	13.2
pcDNA3-hAQ (ヒト型)	1.2	37.4
pcDNA3-opAQ (選択型)	3.3	100

【0066】

（2）クライティンIIの発現

実施例4記載の活性測定法により、細胞内での発現イクオリンの活性を測定した（表5）。その結果、天然型遺伝子に比べ、選択型遺伝子は11.8倍高い活性を示した。

【0067】

【表 5】

プラスミド	ウェル当たりの活性 (I_{\max} , $\times 10^6$ rlu)	相対発光強度 (%)
pcDNA3-wCLII (天然型)	0.68	8.1
pcDNA3-opCLII (選択型)	8.0	100

10

【0068】

(3) ガウシアルシフェラーゼの分泌発現

実施例4記載の活性測定法により、培養液と細胞内での発現ガウシアルシフェラーゼの活性を測定した(表6)。天然型遺伝子の培養液の活性および細胞質の活性に比べ、選択型遺伝子は、培養液では12.6倍、細胞内では10.8倍高い活性を示した。

【0069】

【表 6】

プラスミド	測定試料	ウェル当たりの活性 (I_{\max} , $\times 10^6$ rlu)	相対発光強度 (%)
pcDNA3-wGLuc (天然型)	細胞抽出液	19.3	0.7
	培養液	207.8	8.0
pcDNA3-opGLuc (選択型)	細胞抽出液	210.1	8.0
	培養液	2,625.8	100

20

【0070】

(4) エピルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体の分泌発現

実施例4記載の活性測定法により、培養液に分泌したエピルシフェラーゼの発光触媒タンパク質の変異体の活性を測定した(表7)。その結果、ヒト型遺伝子は、選択型遺伝子に比べ89%の活性を示し、ほぼ同様な活性であった。

30

【0071】

【表 7】

プラスミド	ウェル当たりの活性 (I_{\max} , $\times 10^6$ rlu)	相対発光強度 (%)
pcDNA3-GLsp-nanoLuc (ヒト型)	139.5	89.1
pcDNA3-GLsp-nanoKAZ (選択型)	156.6	100

40

【0072】

(5) 北米産ホタルルシフェラーゼの発現

実施例4記載の活性測定法により、細胞内での北米産ホタルルシフェラーゼの活性を測定した(表8)。その結果、天然型遺伝子に比べ、ヒト型遺伝子は5.2倍、選択型遺伝子は3.4倍高い活性を示した。

【0073】

【表 8】

プラスミド	ウェル当たりの活性 (Int., x10 ⁶ rlu)	相対発光強度 (%)
pJN-wPyLuc-sv40 (天然型)	353.5	29.1
pGL4.13(luc2/sv40) (ヒト型)	1,860.6	153
pJN-opPyLuc-sv40 (選択型)	1,216.2	100

10

【 0 0 7 4 】

(6) ゲンジボタルルシフェラーゼの発現

実施例4記載の活性測定法により、細胞内でのゲンジボタルルシフェラーゼの活性を測定した(表9)。その結果、天然型遺伝子に比べ、ヒト型遺伝子は320倍、選択型遺伝子は402倍高い活性を示した。

【 0 0 7 5 】

【表 9】

プラスミド	ウェル当たりの活性 (Int., x10 ⁶ rlu)	相対発光強度 (%)
pJN-wLcLuc-sv40 (天然型)	4.3	0.25
pJN-hLcLuc-sv40 (ヒト型)	1378.0	80.0
pJN-opLcLuc-sv40 (選択型)	1,722.5	100

20

【 0 0 7 6 】

(7) レニラルシフェラーゼの発現

実施例4記載の活性測定法により、細胞内でのレニラルシフェラーゼの活性を測定した(表10)。その結果、天然型遺伝子に比べ、ヒト型遺伝子は25.4倍、選択型遺伝子は47.4倍高い活性を示した。

【 0 0 7 7 】

【表 10】

プラスミド	ウェル当たりの活性 (I _{max} , x10 ⁶ rlu)	相対発光強度 (%)
pcDNA3-wRL (天然型)	1.8	2.1
pcDNA3-hRL (ヒト型)	45.7	53.5
pcDNA3-opRL (選択型)	85.4	100

30

40

【配列表】

0006824594000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/00 (2006.01) C 1 2 P 21/00 C

合議体

審判長 田村 聖子

審判官 山本 晋也

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2006/049777(WO,A1)
LIU, Z. et al., Biotechnol. Lett., 2014.06.26
、Vol.36、pp.2169-2176

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
MEDLINE/CAPLus/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)