

【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1部門第1区分

【発行日】令和5年2月10日(2023.2.10)

【公開番号】特開2022-177005(P2022-177005A)

【公開日】令和4年11月30日(2022.11.30)

【年通号数】公開公報(特許)2022-220

【出願番号】特願2022-133867(P2022-133867)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 0 7 K 14/345(2006.01)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 N 15/31(2006.01)

C 1 2 M 1/34(2006.01)

C 1 2 P 21/00(2006.01)

G 0 1 N 33/483(2006.01)

G 0 1 N 33/50(2006.01)

G 0 1 N 27/00(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/62 Z

C 0 7 K 14/345 Z N A

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 N 15/31

C 1 2 M 1/34

C 1 2 P 21/00 C

G 0 1 N 33/483 F

G 0 1 N 33/50 P

G 0 1 N 27/00 Z

20

【手続補正書】

30

【提出日】令和5年2月2日(2023.2.2)

【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】

i n v i t r oで膜に挿入された膜貫通タンパク質ポアを含む装置であって、前記膜貫通タンパク質ポアが、配列番号390で示される配列のY51、N55およびF56に対応する2つまたはそれ以上の位置にアミノ酸変異を有する少なくとも1つのC s g Gモノマーを含む、装置。

40

【請求項2】

前記少なくとも1つのC s g Gモノマーが、Y51/N55、Y51/F56、N55/F56、またはY51/N55/F56に対応する位置に変異を含む、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記少なくとも1つのC s g Gモノマーが、F56N/N55Q、F56N/N55R、F56N/N55K、F56N/N55S、F56N/N55G、F56N/N55A、F56N/N55T、F56Q/N55Q、F56Q/N55R、F56Q/N55K

50

50

50

50

F 5 6 K / N 5 5 R / Y 5 1 S、F 5 6 K / N 5 5 R / Y 5 1 G、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 L、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 V、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 A、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 N、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 Q、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 S、F 5 6 K / N 5 5 K / Y 5 1 G、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 L、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 V、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 A、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 N、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 Q、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 S、F 5 6 K / N 5 5 S / Y 5 1 G、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 L、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 V、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 A、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 N、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 Q、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 S、F 5 6 K / N 5 5 G / Y 5 1 G、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 L、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 V、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 A、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 N、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 Q、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 S、F 5 6 K / N 5 5 A / Y 5 1 G、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 L、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 V、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 A、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 N、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 Q、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 S、F 5 6 K / N 5 5 T / Y 5 1 G、F 5 6 E / N 5 5 R、F 5 6 E / N 5 5 K、F 5 6 D / N 5 5 R、F 5 6 D / N 5 5 K、F 5 6 R / N 5 5 E、F 5 6 R / N 5 5 D、F 5 6 K / N 5 5 E または F 5 6 K / N 5 5 D に対応する変異を含む、請求項 1 に記載の装置。

10

【請求項 4】

前記膜貫通タンパク質ポアが、ヘテロオリゴマーポアである、請求項 1 に記載の装置。

20

【請求項 5】

前記ヘテロオリゴマーポアが 9 つの C s g G モノマーを含み、前記 9 つの C s g G モノマーの少なくとも 1 つが、他の C s g G モノマーと異なる、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記ヘテロオリゴマーポアが C s g G モノマーではないモノマーを含む、請求項 4 に記載の装置。

【請求項 7】

前記膜貫通タンパク質ポアが、ホモオリゴマーポアである、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 8】

前記ホモオリゴマーポアが 9 つの同一の C s g G モノマーからなる、請求項 7 に記載の装置。

30

【請求項 9】

少なくとも 1 つの C s g G モノマーを含む膜貫通タンパク質ポアであって、前記 C s g G モノマーが、配列番号 390 で示される配列の Y 5 1 および F 5 6 に対応する位置にアミノ酸変異を含む、膜貫通タンパク質ポア。

【請求項 10】

N 5 5 に対応する位置にさらに変異を含む、請求項 9 に記載のポア。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの C s g G モノマーが、F 5 6 N / Y 5 1 L、F 5 6 N / Y 5 1 V、F 5 6 N / Y 5 1 A、F 5 6 N / Y 5 1 N、F 5 6 N / Y 5 1 Q、F 5 6 N / Y 5 1 S、F 5 6 N / Y 5 1 G、F 5 6 Q / Y 5 1 L、F 5 6 Q / Y 5 1 V、F 5 6 Q / Y 5 1 A、F 5 6 Q / Y 5 1 N、F 5 6 Q / Y 5 1 Q、F 5 6 Q / Y 5 1 S、F 5 6 Q / Y 5 1 G、F 5 6 R / Y 5 1 L、F 5 6 R / Y 5 1 V、F 5 6 R / Y 5 1 A、F 5 6 R / Y 5 1 N、F 5 6 R / Y 5 1 Q、F 5 6 R / Y 5 1 S、F 5 6 R / Y 5 1 G、F 5 6 S / Y 5 1 L、F 5 6 S / Y 5 1 V、F 5 6 S / Y 5 1 A、F 5 6 S / Y 5 1 N、F 5 6 S / Y 5 1 Q、F 5 6 S / Y 5 1 S、F 5 6 S / Y 5 1 G、F 5 6 G / Y 5 1 L、F 5 6 G / Y 5 1 V、F 5 6 G / Y 5 1 A、F 5 6 G / Y 5 1 N、F 5 6 G / Y 5 1 Q、F 5 6 G / Y 5 1 S、F 5 6 G / Y 5 1 G、F 5 6 A / Y 5 1 L、F 5 6 A / Y 5 1 V、F 5 6 A / Y 5 1 A、F 5 6 A / Y 5 1 N、F 5 6 A / Y 5 1 Q、F 5 6 A / Y 5 1 S、F 5 6 A / Y 5 1 G、F 5 6 K / Y 5 1 L、F 5 6 K / Y 5 1 V、F 5 6 K / Y 5 1 A、F 5 6 K / Y 5 1 N、F 5 6 K / Y 5 1 Q、F 5 6 K / Y 5 1 S、または F 5 6 K / Y 5 1 G に対応する変異

40

50

を含む、請求項 9 に記載のポア。

【請求項 12】

前記ポアが、ヘテロオリゴマーポアである、請求項 9 に記載のポア。

【請求項 13】

前記ヘテロオリゴマーポアが 9 つの C s g G モノマーを含み、前記 9 つの C s g G モノマーの少なくとも 1 つが、他の C s g G モノマーと異なる、請求項 9 に記載のポア。

【請求項 14】

前記ヘテロオリゴマーポアが C s g G モノマーではないモノマーを含む、請求項 9 に記載のポア。

【請求項 15】

前記膜貫通タンパク質ポアが、ホモオリゴマーポアである、請求項 9 に記載のポア。

【請求項 16】

前記ホモオリゴマーポアが 9 つの同一の C s g G モノマーからなる、請求項 15 に記載のポア。

【請求項 17】

(i) 少なくとも 1 つの C s g G モノマーを含む膜貫通タンパク質ポアであって、前記 C s g G モノマーが配列番号 390 で示される配列の Y51、N55 および F56 に対応する 1 つまたはそれ以上の位置にアミノ酸変異を有する膜貫通タンパク質ポアを得ることと、

(ii) 前記ポアが *in vitro* で膜に挿入されるように、前記ポアを *in vitro* で膜と接触させることと、
を含む方法によって製造される、装置。

【請求項 18】

C s g G 膜貫通タンパク質ポアを同定するための方法であって、

(i) 人工的な膜に挿入された膜貫通タンパク質ポアを含む溶液に電圧電流を印加することと、

(ii) 前記膜貫通タンパク質ポアを通る電流を測定することと、

(iii) アクセサリータンパク質が膜貫通タンパク質ポアと接触する条件下で、C u r l i 形成アクセサリータンパク質を溶液に添加することと、

(iv) 工程 (ii) におけるイオン電流と比べてイオン電流が変更された場合に前記膜貫通タンパク質ポアを C s g G 膜貫通タンパク質ポアとして同定することと、
を含む、方法。

【請求項 19】

工程 (iv) におけるイオン電流が遮断される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 C u r l i 形成アクセサリータンパク質が、C s g A、C s g B、C s g C、C s g D、C s g E、または C s g F である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記少なくとも 1 つの C s g G モノマーが、F56N/N55Q/Y51L、F56N/N55Q/Y51V、F56N/N55Q/Y51A、F56N/N55Q/Y51N、F56N/N55Q/Y51Q、F56N/N55Q/Y51S、F56N/N55Q/Y51G、F56N/N55R/Y51L、F56N/N55R/Y51V、F56N/N55R/Y51A、F56N/N55R/Y51N、F56N/N55R/Y51Q、F56N/N55R/Y51S、F56N/N55R/Y51G、F56N/N55K/Y51L、F56N/N55K/Y51V、F56N/N55K/Y51A、F56N/N55K/Y51N、F56N/N55K/Y51Q、F56N/N55K/Y51S、F56N/N55K/Y51G、F56N/N55S/Y51L、F56N/N55S/Y51V、F56N/N55S/Y51A、F56N/N55S/Y51N、F56N/N55S/Y51Q、F56N/N55S/Y51S、F56N/N55S/Y51G、F56N/N55G/Y51L、F56N/N55G/Y51V、F56N/N55G

50

50

／N 5 5 Q／Y 5 1 N、F 5 6 K／N 5 5 Q／Y 5 1 Q、F 5 6 K／N 5 5 Q／Y 5 1 S
、F 5 6 K／N 5 5 Q／Y 5 1 G、F 5 6 K／N 5 5 R／Y 5 1 L、F 5 6 K／N 5 5 R
／Y 5 1 V、F 5 6 K／N 5 5 R／Y 5 1 A、F 5 6 K／N 5 5 R／Y 5 1 N、F 5 6 K
／N 5 5 R／Y 5 1 Q、F 5 6 K／N 5 5 R／Y 5 1 S、F 5 6 K／N 5 5 R／Y 5 1 G
、F 5 6 K／N 5 5 K／Y 5 1 L、F 5 6 K／N 5 5 K／Y 5 1 V、F 5 6 K／N 5 5 K
／Y 5 1 A、F 5 6 K／N 5 5 K／Y 5 1 N、F 5 6 K／N 5 5 K／Y 5 1 Q、F 5 6 K
／N 5 5 K／Y 5 1 S、F 5 6 K／N 5 5 K／Y 5 1 G、F 5 6 K／N 5 5 S／Y 5 1 L
、F 5 6 K／N 5 5 S／Y 5 1 V、F 5 6 K／N 5 5 S／Y 5 1 A、F 5 6 K／N 5 5 S
／Y 5 1 N、F 5 6 K／N 5 5 S／Y 5 1 Q、F 5 6 K／N 5 5 S／Y 5 1 S、F 5 6 K
／N 5 5 S／Y 5 1 G、F 5 6 K／N 5 5 G／Y 5 1 L、F 5 6 K／N 5 5 G／Y 5 1 V
、F 5 6 K／N 5 5 G／Y 5 1 A、F 5 6 K／N 5 5 G／Y 5 1 N、F 5 6 K／N 5 5 G
／Y 5 1 Q、F 5 6 K／N 5 5 G／Y 5 1 S、F 5 6 K／N 5 5 G／Y 5 1 G、F 5 6 K
／N 5 5 A／Y 5 1 L、F 5 6 K／N 5 5 A／Y 5 1 V、F 5 6 K／N 5 5 A／Y 5 1 A
、F 5 6 K／N 5 5 A／Y 5 1 N、F 5 6 K／N 5 5 A／Y 5 1 Q、F 5 6 K／N 5 5 A
／Y 5 1 S、F 5 6 K／N 5 5 A／Y 5 1 G、F 5 6 K／N 5 5 T／Y 5 1 L、F 5 6 K
／N 5 5 T／Y 5 1 V、F 5 6 K／N 5 5 T／Y 5 1 A、F 5 6 K／N 5 5 T／Y 5 1 N
、
F 5 6 K／N 5 5 T／Y 5 1 Q、F 5 6 K／N 5 5 T／Y 5 1 S、またはF 5 6 K／N 5
5 T／Y 5 1 Gに対応する変異を含む、請求項 1 0 に記載のポア。

10

20

30

40

50