(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3949727号
(P3949727)
(45)発行日　平成19年7月25日(2007.7.25)　(24)登録日　平成19年4月27日(2007.4.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B

請求項の数 13　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願平10-515070
(86)(22)出願日　平成9年9月26日(1997.9.26)
(65)公表番号　特表2001-502166(P2001-502166A)
(43)公表日　平成13年2月20日(2001.2.20)
(86)国際出願番号　PCT/AU1997/000638
(87)国際公開番号　WO1998/013514
(87)国際公開日　平成10年4月2日(1998.4.2)
審査請求日　平成16年4月22日(2004.4.22)
(31)優先権主張番号　PO 2581
(32)優先日　平成8年9月27日(1996.9.27)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(73)特許権者
ジ・オーストラリアン・ナショナル・ユニバーシティ
オーストラリア２６０１オーストラリアン・キャピタル・テリトリー、アクトン
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　松谷　道子
(72)発明者　ゲイジ，ピーター・ウィリアム
オーストラリア２６２０ニュー・サウス・ウェールズ州　バイア・クイーンビヤン、パウエル・ドライブ、アールエムビー２２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】物質のイオンチャネル活性測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程：
(ｉ)測定対象物質を宿主細胞内に異種タンパク質として発現させる、
および
(ii)該異種タンパク質の発現により誘導された該宿主細胞の原形質膜のイオンチャンネル活性の変化を測定する、ここで、宿主細胞の原形質膜のイオンチャンネル活性の変化の測定は、該異種タンパク質によって形成されるイオンチャンネルを直接透過しない細胞小分子の原形質膜を介する全体としての移動の変化を検出することで行う、
を含む、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質である物質のイオンチャンネル活性を測定する方法。
【請求項２】
プロリン又はアデニン分子の原形質膜を介する全体としての移動の変化を検出する、請求項1記載の方法。
【請求項３】
宿主細胞が大腸菌である、請求項1または2に記載の方法。
【請求項４】
宿主細胞からの該細胞小分子の漏出を検出する、請求項１から3いずれかに記載の方法。
【請求項５】
宿主細胞からの該細胞小分子の漏出を、以下の方法：

(i)漏出される細胞小分子に対して栄養要求性である細胞と交差培養する、または
(ii)漏出される細胞小分子が培養用培地に存在しなければ宿主細胞が増殖できないことを指標にする、
のいずれかによって検出する、請求項4記載の方法。
【請求項６】
以下の工程：
(i)イオンチャンネル活性を有するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質である物質を異種タンパク質として宿主細胞内に発現させる；
(ii)該宿主細胞を被検物質と接触させる；および
(iii)被検物質により誘導される該異種タンパク質のイオンチャンネル活性の変化を測定する、ここで、被検物質により誘導される該異種タンパク質のイオンチャンネル活性の変化は、該異種タンパク質によって形成されるイオンチャンネルを直接透過しない細胞小分子の宿主細胞の原形質膜を介する全体としての移動の変化に及ぼす被検物質の影響を検出することで行う、
を含む、被検物質のイオンチャンネル調節活性をスクリーニングする方法。
【請求項７】
アデニンまたはプロリン分子の原形質膜を介する全体としての移動の変化に及ぼす被検物質の影響を検出する、請求項6記載の方法。
【請求項８】
宿主細胞が大腸菌である、請求項6または7に記載の方法。
【請求項９】
イオンチャネル活性を有する物質が、異種カチオンチャンネルタンパク質である、請求項6～8いずれかに記載の方法。
【請求項１０】
イオンチャンネル活性を有する物質が異種ナトリウムチャンネルタンパク質である、請求項9記載の方法。
【請求項１１】
イオンチャンネル活性を有する物質が、HIV-1 Vpu複合膜タンパク質である、請求項9記載の方法。
【請求項１２】
宿主細胞からの該細胞小分子の漏出を検出する、請求項6～11いずれかに記載の方法。
【請求項１３】
宿主細胞からの該細胞小分子の漏出を、以下の方法：
(i)漏出される細胞小分子に対して栄養要求性である細胞と交差培養する、または
(ii)漏出される細胞小分子が培養用培地に存在しなければ宿主細胞が増殖できないことを指標にする、
のいずれかによって検出する、請求項12記載の方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質などの物質のイオンチャネル活性を測定する方法に関する。さらに本発明は、イオンチャンネル機能を調節する能力に着目した治療用物質候補をスクリーニングする方法に関する。
背景技術
生物の細胞は、脂質二重層により形成される膜内に含まれており、この二重層が細胞内部を外界から隔てている。この脂質二重層の「サンドイッチ」構造は内部が疎水性であり、イオンなどの荷電粒子が通過するのを妨げる。しかしながら、この膜を貫通しているタンパク質巨大分子があり、これはイオンが細胞の内部と外部の間を移動するための通り道となっている。直接のエネルギー供給なしにイオンが細胞膜を迅速に移動(毎秒多数百万)することを可能とするこのような構造は「イオンチャンネル」といわれる。イオンのチャンネル通過に影響を与える力としては、電気的および化学的なものがある。電気的力は、膜

をはさむ電位差であり、化学的力は、膜の両側におけるイオン濃度の相違である。これら二つの力の組み合わせは、あるイオンにとっての電気化学的勾配である。あるイオンにとっての電気化学的勾配がゼロでない場合、イオンはチャンネルが開いていれば(チャンネルがイオンを通す限り)このチャンネルを通過する。

選択性、制御方法、コンダクタンスおよび運動性など、性質の異なる多くのイオンチャンネルがある。チャンネルとしては、ナトリウムイオンに特異的なもの、カリウムイオンに特異的なもの、カルシウムイオンに特異的なもの、またはクロライドイオンに特異的なもの、プロトンに特異的なものと様々あり、その最もよく通過させるイオンに基づいて分類される。また、チャンネルはその調節または制御の方法によって分類される場合もある。例えば、電圧活性化チャンネルは、膜電圧の変化に応答してチャンネルが開いたり閉じたりする。リガンド-制御チャンネルでは、神経伝達物質やホルモンなどのリガンドがその表面に結合した場合に開口する。リガンドが結合するタンパク質のことをは、通常レセプターと呼ばれており、多くのレセプターがイオンチャンネルを形成するひとつの巨大分子の一部を形成している。しかしながら、レセプターと第2伝達系にて間接的に連結しているレセプターもあり、この場合には、チャンネルとレセプターは分離している。各チャンネルはまた、多くの異なるコンダクタンスを有する。コンダクタンスとは、抵抗と相互的な用語であり、イオンがチャンネルを通過するしやすさの値であり、電流の推進力に対する比により示される。異なるチャンネルのコンダクタンスはピコジーメンスから数百ピコジーメンスの間で変化し得る(これは10^{9}から10^{12}オームの抵抗に対応する)。最後に、各チャンネルは非常に異なる「デューティーサイクル(duty cycle)」が存在する。チャンネルには、ほとんどの時間開口しているものも、ほとんど開口しないものもある。開いたり閉じたりせわしないものもあれば、そうでないものもある。チャンネルの環境の変化(例えば薬物の存在)によって、この性質は変わり得る。実際に、多くの薬物の細胞および臓器に対する効果は、表面レセプターに結合してチャンネルの挙動に影響を及ぼすことによって得られていることが明らかになってきている。

動物または他の生命体の全ての細胞の機能は膜タンパク質によって形成されるイオンチャンネルが、細胞内のコンパートメント間、および細胞内部と外部の間のイオンの移動の通り道となって働くことによって動いている。イオンの移動は正常な細胞の機能に欠かせないものであり、全てのイオンチャンネルを有する生物細胞(細菌およびインフルエンザウイルスやHIVウイルスのごときエンベロープウイルスも含む)の機能にしても、そうである。イオンチャンネルは、神経系のシグナルの伝達、細胞分化、白血球細胞による抗体の産生、細胞内におけるウイルス粒子の複製および体液と電解液の分泌などの、細胞の機能の基礎である。

嚢胞性繊維症、筋ジストロフィー、発作、癲癇、および心臓不斉脈などの広く様々な疾患は、イオンチャンネルの不具合に関与する。さらに、いくつかのウイルスがイオンチャンネルを形成するタンパク質を有し、これがウイルスの正常なライフサイクルに必要であることが、最近判明した。例えば、インフルエンザAウイルスタンパク質(M2)は、ウイルスの複製に必須のイオンチャンネルを形成すること、そしてこのチャンネルをブロックするアマタジンのごとき薬物がインフルエンザAウイルスの複製を阻害することが、今や証明されている。アマンタジン(1-アミノアダマンタン塩酸塩)およびその類縁体であるリマンチジンは経験上からインフルエンザAウイルスによるインフルエンザの予防および治療に有用であることが示されている。かかる薬物は、治療のための濃度において、インフルエンザＡウイルスの複製をインビトロおよびインビボのいずれにおいても阻害する。しかしながら、抵抗性ウイルスの出現によって、これらの医薬は効力を失う可能性があり、また医薬物としての価値が下がる可能性もある。

イオンチャンネルの機能を調節することによって働く他の医薬としては、抗アンギナ剤として用いられるカルシウムチャンネルブロッカー、高血圧抑制剤、およびガンマ-アミノブチル酸(GABA)によって活性化されたレセプターを通る塩素の移動を増加させることによって睡眠誘導と癲癇発作を抑える作用のあるバルビツレート類およびGABAレセプター活性を上げることによって不安を和らげ、麻酔作用を生じさせるベンゾジアゼピン類が例示さ

れる。
旧来は、イオンチャンネルをブロックする薬物の発見は、偶然に依るものがほとんどであった。このようにして見出された薬物には、一般的な麻酔剤であるエーテルおよびハロタン、バルビツレート類およびベンゾジアゼピン類が含まれる。例えば、エーテルは昔はパーティーでアルコールのごとく供されており、ハロタンの可逆的麻酔効果が見出されたのは、コンプレッサーから漏出した冷媒からである。同様に、キニジンの抗不整脈作用はキニンを抗マラリア薬として使用したことから見出されたのである。
イオンチャンネルが薬物の活性の重要な部分を担っているとの認識により、イオンチャンネル活性に影響を及ぼす治療用物質候補のスクリーニングの有用な方法が導き出された。電気生理学的手法がイオンがチャンネルを通って移動する場合の電流を検出するのに使用できるのであるが、この方法は非常に時間がかかり、ルーチンとしてのイオンチャンネル活性のスクリーニングに用いるのには足りない。
VpuはHIV－1ゲノムによってコードされている小さなリン酸化複合膜タンパク質であり、感染細胞のゴルジ体および細胞質内小胞体膜と相互作用するが、原形質膜にもウイルスエンベロープにも認められていない。このタンパク質は単離されたウイルスによって異なるが80-82アミノ酸長を有し、膜通過アンカーであるN－末端と、親水性細胞質C－末端ドメインを有する。C-末端ドメインは12アミノ酸の配列を有し、これは全ての単離タンパク質において保存されており、リン酸化されている2つのセリン残基を有している。精製HIV－1 Vpuタンパク質の、二次元の脂質二重層内に再構築することに関する標準的な方法を用いて、Vpuタンパク質がカチオン選択性イオンチャンネルをリン脂質二重層内に形成することが報告されている(8)。現在のさらなる研究の焦点は、このチャンネルをブロックする薬物を発見して、抗-HIV-1治療用薬剤候補として試験することにある。かかる薬物のスクリーニングは上述の二次元リン脂質二重層法によって行うことができるが、この方法は、大量の高純度Vpuタンパク質が必要である、そしてひとつの二重層あたりひとつの化合物しか試験できないという不利益があるため、実用的ではなかった。
かかる不利益のため、生物的に重要なペプチドおよびタンパク質のイオンチャンネル活性を調べるため、およびイオンチャンネルに作用してイオンチャンネルの機能を変え得る治療薬候補の有用性スクリーニングのための両方に用いられるイオンチャンネルアッセイ系に対する需要がある。
細菌のごときある生物はアミノ酸及び他の物質をカチオン濃度勾配のエネルギーを用いて蓄積する。ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のごときチャンネルを形成する物質を細胞膜内に挿入し、この勾配を乱せば、この生物はそれ以上必須物質を取り込まなくなり、生育が阻害される。この生育阻害は直接観察することができる。即ち、チャンネルの機能に影響を及ぼすかもしれない治療物質候補の活性を、チャンネル-形成ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質を含有する生物の生育状況から迅速に調べることができる。
発明の概要
第一の態様において、本発明は以下の工程：
(i)物質を宿主細胞内に異種タンパク質として発現させる、および
(ii)該異種タンパク質の発現により誘導された該宿主細胞の原形質膜の透過性の変化を測定する
を含む、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質などの物質のイオンチャンネル活性を測定する方法を提供する。
好ましくは、宿主細胞原形質膜の透過性の測定は、小さな代謝物、例えばプロリンやアデニン、の原形質膜に対する透過性の変化によって測定される。
本発明のこの態様において、被検化合物がイオンチャンネル活性を有する異種タンパク質として発現されれば、この異種タンパク質の宿主細胞原形質膜内への発現は、該細胞のプロリンやアデニンのごとき小代謝物であって、この細胞内への移動はが発現されたチャンネルを通過し得るイオンによって活性化されるような代謝物小分子の濃度勾配を維持する能力を変化させる。この結果、代謝物分子の全体としての移動、すなわち細胞からの漏出

が生じ、かかる代謝物分子の漏出は適当な方法にて検出することができる。細胞から漏出した代謝物分子の好ましい検出方法は以下に示す。
本発明の別の態様においては、本発明は以下の工程：
(i)物質を宿主細胞内に異種タンパク質として発現させる、
(ii)該宿主細胞と被検物質とを接触させる、および
(iii)該異種タンパク質イオンチャンネル活性の、被検化合物により誘導される変化を測定する、
を含む、被検物質のイオンチャンネル調節作用を測定するスクリーニング方法を提供する。
この態様においては、異種タンパク質イオンチャンネル活性の、被検化合物により誘導される変化は、細胞内に異種タンパク質を発現させることによって誘導された縮主細胞の原形質膜の透過性の変化に及ぼす被検物質の影響を調べることが好ましい。特に、宿主細胞の原形質膜の、プロリン、アデニンなどのごとき代謝物小分子に対する透過性の変化に及ぼす被検物質の影響を調べれば良い。
本明細書及びクレイムにおいて、特に断らない限りは「有する」という用語は、そこに述べられている整数もしくは一群の整数を含むのであるが、他の全ての整数もしくは整数群を除くことを意図するものではない。
発明の詳細な説明
好ましい態様において、本発明のアッセイ方法は代謝物小分子(例えばプロリンまたはアデニン)に対する生宿主細胞(例えば大腸菌)の原形質膜膜透過性の、異種カチオン(例えばナトリウム)チャンネルタンパク質(例えばVpu)の宿主細胞内発現により誘導される変化を測定する。以下の詳細な説明は特にVpuイオンチャンネルに関係するものとなっているが、アッセイのコンセプトは大腸菌のごとき宿主細胞内に活性に発現され得るいずれのイオンチャンネルタンパク質を用いてもかまわないことが理解されなくてはならない。
細胞の原形質膜は通常、細胞内に代謝物分子を吸収する機能のタンパク質を有している。かかるタンパク質においては、吸収反応を駆動するエネルギーは様々なイオン(Na^+, H^+など)の濃度勾配から得られており、吸収される代謝物が膜を通り移動し、細胞内へ入るという移動は、自身の濃度勾配を減らすよう膜を通過するイオンの動きと密接に関与している。異種チャンネル形成タンパク質が細胞膜内に存在し、その結果代謝物の取りこみを機能させるイオンの濃度勾配を消失させることになれば、代謝物が細胞外へ出るネット移動が生じる、特に、代謝物が該細胞に生合成される場合にはそうである。細胞外に漏出する代謝物は、例えばi)漏出代謝物に対して栄養要求性である第二の細胞の生育をサポートする力、またはii)代謝物の生合成が増殖速度を律している場合には、異種チャンネル形成タンパク質発現細胞が、外部添加代謝物のない状況で成長できなくなることを測定することによって、測定することができる。
第1の検出方法の例として、大腸菌のプロリンの輸送が、プロリンと共に細胞内に取りこまれるナトリウムイオンによって駆動されている現象を利用する。HIV-1 Vpuタンパク質、このタンパク質はナトリウム濃度勾配を破壊してプロリンを漏出させる結果を招くものである、を発現した大腸菌の株および、プロリンを合成することができず、その代わりに外部培地からプロリンを取りこむ必要のある第二の大腸菌株の交差培養を行う。かかる試験はプロリン欠損培地にて、プロリンの供給源がVpu-発現株内の生合成によるもののみである環境下で行われる。
第二の検出方法の例としては、Vpuを大腸菌株XL-1ブルー内へ37℃にて発現させると、細胞の増殖が外部供給アデニン依存性となる現象を利用する。同じ株のVpuを発現していないものは、アデニンが増殖培地から除かれている場合にも良好に増殖する。
上述のイオンチャンネル機能のインビボアッセイはまた、二次元脂質二重層アッセイ(8)を、イオンチャンネル機能をブロック、阻害もしくはその他調節する治療用物質候補のスクリーニングに使用する場合に比べて、一度に多く(数百)の物質のスクリーニングが可能であり、試験速度及び効率の点からも有利である。すなわち、本発明はまた、生細胞に発現されたイオンチャンネル機能をブロック、阻害もしくはその他調節する能力に基づいた

、化合物の迅速なスクリーニング方法に関する。
先に記載した通り、アッセイ方法はイオンチャンネル形成タンパク質の細胞原形質膜内への発現に依存しており、イオンチャンネルの発現は、当該細胞において発現されたチャンネルを通過し得るイオンによって得られるエネルギーによって細胞内へ輸送される代謝物の濃度勾配を維持する能力を変化させる。該細胞からの代謝物の漏出は好ましくは以下に挙げた1又は2の方法にて検出することができる：
(i)漏出される代謝物に対して栄養要求性である第二の株と共に交差培養する、または
(ii)外部培地に供給される漏出代謝物が無い場合に、細胞が生育不可能性となることを指標とする。
好ましくは、発現系には大腸菌プラスミド発現ベクター内にクローン化された、イオンチャンネルタンパク質の対応する遺伝子(好ましくはcDNAセグメント)からの、イオンチャンネルタンパク質の大腸菌内への発現を含む。かかるベクターの構築および大腸菌内への発現は、大腸菌遺伝子工学および分子生物学に関する標準的な方法を用いて行えばよく、このような方法は例えば、サムブルックら(9)に開示されている。
本発明のある好ましい態様においては、二つのセルライン、好ましくは細菌、の交差培養において、発現された異種遺伝子はイオンチャンネル活性に応じて誘導される。大腸菌が用いられ、ナトリウムチャンネルが発現される場合(例えば、以下に詳しく述べられるような場合)、チャンネル発現細胞からのプロリンの漏出(この代謝物の細胞内への移動にあたってナトリウムの濃度勾配からエネルギーを得ている)が、プロリンに対して栄養要求性である(即ち、プロリン合性能を欠いている)第二の大腸菌株との交差培養によって検出することができる。発現されたチャンネルが、全ての小分子を細胞膜を通して非特異的に漏出するものを含まないことを確認するためのコントロール実験として、メチオニン漏出を検出する実験を行えばよい。大腸菌のメチオニン輸送はATPの加水分解からエネルギーを受けており、ナトリウム濃度勾配が無いことがメチオニンの細胞外への漏出を導くものであってはならない。
上述のように、本発明はまた、イオンチャンネル阻害剤として作用する治療用物質の候補のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、上記のアッセイ方法を単に拡大したものであり、好ましい態様はイオンチャンネルタンパク質を発現した細胞に対して様々な物質を添加して、上述のごとき交差培養アッセイを行うというものである。イオンチャンネル活性をブロックまたは阻害する物質は、イオン勾配の恒久的濃度勾配の消失を防止し、このため代謝物の漏出を導かない。同時に、被検物質が大腸菌の正常な増殖に影響を及ぼさないことを確認するコントロール実験も行う必要がある。かかる物質は、交差培養アッセイによるスクリーニングから除かれるべきである。
本発明のさらなる特徴は、以下の実施例により詳細に開示されている。しかしながら、詳細な説明は、本発明を説明する目的のためだけに記載されているものであり、上述の広い範囲の発明をいずれの意味においても制限するものではない。
添付の図面の説明：
図1　大腸菌内にVpuを発現されせるのに使用したプラスミドである。AはVpuのオープンリーディングフレーム(ORF)によりコード化されるアミノ酸配列であって、これはHIV-1のcDNAクローンHXB2株から実施例1に記載のごとく得られたものである。Vpu ORFはp2GEX内のGST遺伝子の3'末端にフレーム内クローン化し、p2GEXVpu(B)を作成した。これを次いでpPL451内にクローン化し、プラスミドpPL-Vpu(C)を調製した。
図2　Vpuの大腸菌内への発現と精製。AはSDS-PAGE後、ウエスタンブロッティング法を用いて大腸菌抽出物内に発現されたVpuを検出した。1-4レーンは様々な精製純度のGEXVpuから発現されたVpu試料を含む：レーン1、グルタチオンアガロースアフィニティークロマトグラフィーにより単離されたGST-Vpu融合タンパク質；レーン2、トロンビン処理により融合タンパク質から遊離されたVpu；レーン3、HPLC陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製されたVpu；レーン4、免疫アフィニティーカラムを通した後のVpu。レーン5および6は、それぞれpPL-Vpu pPL451を含有する42℃で誘導された細胞から調製された膜小胞体である。B銀染色SDS-PAGEゲル：レーン1、HPLC陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製

されたVpu；レーン2、免疫アフィニティーカラムを通した後のVpu。
図3　細菌の交差培養アッセイ。このアッセイの詳細は実施例１に記載した。全てのプレートにおいて、Met-、Pro-栄養要求性株を軟寒天オーバーレイへ接種した。プレートAおよびBはメチオニンを添加した最小培地を含有する、プレートCは同じ培地にプロリンを添加したものである。バックグラウンドにおける細胞の生存のコントロールとして、PおよびMと標識したディスクは、それぞれ添加されたプロリンまたはメチオニンを含むものである。CおよびVと標識したディスクはそれぞれpPL451およびpPL-Vpuを含有するMet+またはPro+の大腸菌細胞を接種したものである。プレートは37℃(AおよびC)または30℃(B)にて二日間インキュベートし、プレートの下に置いた蛍光光源から光線を当てて黒いバックグラウンド上で写真撮影をした。イメージをノバリン(Novelize)ヴィデオゲルドキュメンテーションシステム上に記録した。光は全てのプレートにおいてＰまたはＭと標識したディスクの周りに光輪を生成し、またプレートAのVと標識したディスクの周りにも光輪を生成する。これは、バックグラウンドの株の増殖を示す。
図4　Vpu(B)またはインフルエンザBタンパク質NB(C)を発現している大腸菌から調製された裏返された膜小胞体からのNADH依存性アテブリン蛍光クエンチング。コントロールの小胞体は適当な発現ベクターを含有する株(AおよびD)から調製した。NADHの添加時およびキュベット溶液を無酸素状態とした時点を矢印で示した。
図5　アデニン依存性増殖アッセイ。pPL-Vpuの38℃におけるVpuの発現により、大腸菌細胞は外部培地に存在するアデニンに依存するようになる。パネルA：左側にpPL-Vpuを含有する大腸菌細胞を画線し、右側にはpPL-451含有大腸菌細胞(Vpuを含まない)を画線した最少寒天培地プレート。パネルB:Aと同じ培地にアデニンを0.002%wt/v)を添加した培地へ同じ細胞を画線した。Vpu発現細胞はアデニンがプレートに存在する場合、よく増殖することに注目されたい。
図6　異なるチャンネル活性を有するVpuイオンチャンネル変異体を検出するためのアデニン依存性増殖アッセイの利用。パネルAは、1．pPL-Vpuを含有する(野生型Vpuを発現している)；2．pPL-VpuRK37DI(Vpuの変異体を発現する)を含有するか、または、3．pPL-451を含有する(コントロールプラスミド、Vpuを含まない)XL-1ブルー大腸菌細胞を画線した最少寒天培地プレート(アデニンを含まない)の区画を示す。このプレートは、38℃にて二日間インキュベートしたものである。野生型Vpuを発現する細胞が増殖しない(少数の復帰突然変異体は別とする)のに対して、Vpu変異体を発現している細胞は、Vpuなしのコントロールよりは少ないものの明らかに増殖しているのが認められる。
RK37DI変異体のVpuタンパク質を二重層アッセイにて試験した場合(パネルB)、チャンネルは3ピコジーメンスのコンダクタンスを有することが認められたが、これは野生型のチャンネルコンダクタンスのおよそ20%に該当する。この活性が残っていることにより、変異体が、Vpuのないコントロール細胞ほど増殖しないのかということを説明できるであろう。
図7　アデニン依存性増殖アッセイの、Vpuイオンチャンネル活性を阻害する薬物のスクリーニングへの使用。パネルAはを含有する野生型Vpu(pPL-Vpu)を発現しているXL-1ブルー大腸菌細胞を植え付けた最少寒天培地プレート(アデニンを含まない)の区画を示す。番号をつけた輪は、様々な薬物の1μlの溶液をプレートに添加し、寒天内に染み込ませてある部分である。プレートは、38℃にて2日間インキュベートした。1－4の番号を付した個所では、薬物はVpuの細胞増殖抑制能を全く阻害しなかった。５番では、過剰のアデニンを含有する溶液をコントロールとして添加した。５番の周りの明るい輪は大腸菌細胞の増殖を示すものである。6番においては、化合物ANU-9を添加したところ、かすかではあるが検出可能な増殖の輪が認められ、ANU-9がVpu活性を阻害した可能性を示している。これを、ANU-9の二重層アッセイにて確認した：パネルBは50μMのANU-9による部分的Vpu阻害、および250μMのANU-9による完全なVpu阻害を示す。
実施例１
この実施例は大腸菌宿主細胞内へのVpuの機能発現および宿主細胞の原形質膜のプロリン透過性の変化を、宿主細胞から漏出するプロリン量を交差培養方法にて測定することによ

る検出を実施する。同様の方法は、Vpu以外のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質のイオンチャンネル活性の検出もしくは測定に用いることができる。

組換えプラスミドp2GEXVpuおよびpPL-Vpuの構築

Vpuをコード化するオープンリーディングフレーム(配列番号1-図1A)を、HIV-1ゲノム(単離HXB2、オーストラリア、メルボルンのマクファーレン・バーネット・センター、N.ディーコン博士より贈与)のNde1フラグメントのcDNAからPCR法により増幅して得た。天然のFu DNAポリメラーゼ(ストラタジェン；0.035U/μl)をPCRのための酵素として選択して、酵素の校正作用によってPCR中にエラーが読みこまれないようにした。5’、センス、プライマー(AGTAGGATCCATGCAACCTATACC-配列番号2)はBamH1部位(下線部)を、GSTの3’末端とインフレームにクローニングするため、pGEX(1)内へ導入する。このプライマーは、また、HXB2単離物内のスレオニンコドンである、Vpu遺伝子の開始コドンを修復する(太字TがCを置換する)。3’アンチセンス、プライマー(TCTGGAATTCTACAGATCATCAAC-配列番号3)はPCR産物の別の末端にEcoR1部位を導入して、クローニングしやすくする。94℃で45秒間、55℃で1分間、および72℃で1分間のサイクルを30サイクル、0.5mlの薄壁エッペンドルフチューブを用い、パーキン-エルマー・サーモサイクラーを用いて行った。得られた268bpのフラグメントは精製し、BamH1およびEcoR1にて消化し、同じ二つの酵素にて調製されたp2GEXVへライゲートした。得られた組換えプラスミドp2GEXVpuを図1Bに示した。Vpuオープンリーディングフレーム全体および、BamH1とEcoR1のライゲーション部位の配列を、アプライドバイオシステムズのダイーターミネーター(dye-terminator)キットを用いてサイクルシークエンシングにより決定してDNA配列を確認した。

pPL451発現プラスミド(2)内へ挿入するためのVpuオープンリーディングフレームを調製するため、pGEXVpuを最初にBamH1で消化し、5’塩基の張り出し部分をdNTPの存在下、クレノウDNAポリメラーゼにて埋めた。Vpuコード化フラグメントを次いでEcoR1にて消化して遊離させ、アガロースゲルから精製し予めHpa1およびRcoR1で消化しておいたpPL451内にライゲートした。培養物を42℃に誘導してPRおよびPLプロモーターのcI857リプレッサー不活性化したあと、次いでウエスタンブロットによりpPL-Vpu構築物(図1C)がVpuを発現していることを確認した。

pPL-Vpu構築物は次いで大腸菌宿主細胞に既知の手法(9)を用いて挿入した。

pPL-Vpuの増殖および発現上の特徴

富栄養培地(例えばグルコース添加ルリアブロス)の寒天プレート上で、pPL-Vpuを含有する大腸菌細胞は30℃および37℃にて培養した場合には増殖したが、42℃で培養した場合には増殖しなかった。一方、コントロール株は42℃でよく増殖した。pPL-Vpuを含有する細胞の液体培養物を30℃にてOD600=0.84となるまで増殖させ、次いで42℃で2時間増殖させた(最終細胞密度はOD=0.75であった)。原形質膜フラクションを調製し、ウエスタンブロットによっておよそ16KDaに1本のバンドを検出した。これは、Vpuが発現されており膜と相互作用していることを示す(図2A、レーン5)

交差培養実験はVpuを発現している細胞からプロリンが漏出することを示す。

大腸菌によるプロリンの吸収はよく研究されており、このアミノ酸を細胞内へ取りこむ積極的輸送は、ナトリウム勾配をエネルギー源として用いることが知られている(3)。このナトリウム勾配が原形質膜のナトリウムチャンネルによって消失されれば、細胞質内で生合成されるプロリンは細胞外へ拡散するものと予測される。かかるプロリン漏出の発生を検出するために、以下の交差培養アッセイを用いた。プロリン及びメチオニンに対して栄養要求性である大腸菌株(Met－, Pro－)を接種した軟寒天をプロリンを欠くがメチオニンを含有する最少培地上に積層した。滅菌多孔性フィルターディスクに、pPL451コントロールプラスミドまたはpPL-Vpuプラスミドのいずれかを含有するMet＋Pro＋株(XL-1ブルー)を接種し、このフィルターを軟寒天上に置いた。プレートを37℃もしくは30℃にて2日間インキュベートした。その後、37℃でインキュベートしたpPL-Vpu含有細胞を接種したディスクの周囲にはMet－Pro－株の増殖の光輪が明確に観察された(図3A)。この増殖は、ディスク上のVpu-発現細胞からの漏出プロリンのみによるものである。かかる漏出はコントロール株の37℃における培養にも、30℃にて培養したいずれの株においても認められなか

った(図3B).

メチオニンはVpu発現細胞からは漏出しない。

プロリンの輸送に対し、大腸菌へのメチオニンの透過酵素はABCトランスポーターファミリーに属しいることが知られており(4)、従ってATPからエネルギーを受けている。Met-Pro-株をメチオニンを含有しないがプロリンを含有する最少培地上に塗りつける以外は、上記と同様の交差培養実験を行った。この株がいずれのディスクの周辺においても増殖しなかった(図3C)ことは、メチオニンがVpuが発現している細胞であっても、XL－1ブルー細胞から漏出されないことを示す。

膜小胞体のプロトン透過性は、Vpuの存在に影響されない

大腸菌内に発現されているVpuナトリウム伝導性チャンネルがH＋の透過性を有するかどうかを調べるため、NADH依存性アテブリン蛍光クエンチングアッセイ(5)を用いた。この方法は大腸菌膜小胞体が酸化的リン酸化における電子伝達鎖によって精製されるプロトン勾配を保持する能力を測定するのに用い得る。蛍光アテブリン分子は2つのプロトン化されうる窒素原子を有する。非プロトン化型は電気的に中性であり、小胞体の内部と外部の間を平衡させることができる。NADH, ADPおよび酸素の存在下で生じる内部プロトン濃度の増加は、小胞体内部のアテブリン分子のプロトン化を導き、次いで最終的に小胞体内部へのアテブリンの蓄積が、その蛍光のクエンチングを導く結果となる。プロトンに対して漏出性の小胞体、即ち高いH+内部/H+外部比を保持することのできない小胞体は、コントロール小胞体ほど効果的にアテブリンの蛍光をクエンチしない。

本試験では、pPL-VpuからのVpuを発現している大腸菌細胞から調製した膜小胞体は、バックグラウンド株から調製したコントロールの小胞体より高くないプロトン透過性を示した(図4AおよびB)。Vpuタンパク質は膜内に存在しており(図2A、レーン5及び6参照)従って蛍光クエンチング方法にて検出されるに充分なプロトンを透過させ得るチャンネルが形成されていないと、結論付けられる。

インフルエンザBウイルスのNBタンパク質は、カチオン選択性チャンネルを二重層(6)内に形成すること、そして水素イオンチャンネルであることが示されているインフルエンザAウイルスのM2タンパク質と等価であり得ること(7)が示されている。膜小胞体をプラスミドpQE+NBを含む株から調製した。かかる小胞体にはNBタンパク質を含んでいることはウエスタン分析(記載せず)により明らかであり、そして、コントロール株と比較して明らかに少ないアテブリンクエンチング活性を有することが示された(図4Cおよび4D)。これは、NBチャンネルが水素イオンに対して透過性であることを確認するものである。蛍光クエンチング手法が、プロトン伝導チャンネルの存在を検出するのに使用し得ることは明らかであり、このコントロール試験はVpuタンパク質が大腸菌内に発現された場合でもプロトン－伝導性チャンネルを形成しないという結果を支持するものである。

実施例２

この実施例は、Vpuタンパク質の機能を大腸菌内に発現させ、宿主細胞原形質膜のアデニンに対する透過性の変化を、宿主細胞をアデニンを含有しない最少培地で培養した場合に増殖しないということを指標にして検出するものである。実施例1と同じく同様の方法は、Vpu以外のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質のイオンチャンネル活性の検出もしくは測定に用いることができる。

上記実施例1に記載されたごとき同じ発現およびコントロールプラスミドを用いた(それぞれpPL-VpuおよびpPL451)。Vpu発現プラスミドpPL-Vpuを含む大腸菌株XL-1ブルーを37℃にて最少培地プレート上で培養した場合、宿主細胞は増殖しなかった(図5)。大腸菌株XL-1ブルーのアデニン生合成経路において同定されていない温度感受性変異を有するため、この株はVpuナトリウムチャンネルの発現の結果として誘導されるアデニン漏出に応じたアデニン生合成の上方制御が不可能なのである。Vpu-発現細胞の増殖は、細胞からこの分子を消失させる方向に駆動力全体が向かうのを打ち消すのに充分な高い濃度のアデニンが栄養培地内に含まれていれば復活させることができる。

これに対して、同じ宿主細胞であってもコントロールプラスミドpPL451(Vpuタンパク質をコード化するDNA断片が含まれていない以外は、pPL-Vpuと同一)を含む細胞は、通常37℃

最少培地プレート上にてアデニンの非存在下(存在下であっても)で増殖する(図5)。
かかる結果はXL-1ブルー細胞内へのVpuの発現は、実施例1に記載したプロリン漏出と同様の機構にてアデニンの漏出を導くことを支持する。この場合、大腸菌原形質膜内に発現されたナトリウムチャンネルの機能の指標は、宿主細胞がアデニンのない場所で増殖することである。

実施例３

この実施例は、アデニン依存性増殖アッセイ用いてチャンネル活性に影響のあるVpuタンパク質の変異体を検出するものである。
部位特異的変異をVpu遺伝子に誘導して、変異遺伝子から発現されるタンパク質において、37位および38位のArgとLysがそれぞれGluとIleに変異するようにした(Vpu変異体RK371と命名)。チャンネル機能の電気生理学アッセイにおいて、この変異によってイオンチャンネルのコンダクタンスが野生型チャンネルの約20%となったことが示された(変異体3ピコジーメンスに対して野生型15ピコジーメンス)。図6Bは変異体および野生型チャンネルにより二次元脂質二重層に生成された電流の大きさの比較を示す。
最少培地(アデニンを含まない、図5と同様)のプレートにおいて、Vpu変異体RK37D1をコード化しているプラスミドを含有する細胞は、野生型Vpu遺伝子を含有する細胞(全く増殖しない)およびVpu遺伝子を含有しない細胞(増殖は影響を受けない)と比べた場合に、一部増殖のフェノタイプを有していた。図6参照。
この結果は、生物的アッセイ(アデニン依存性増殖)およびインビトロアッセイ(電気生理学アッセイ)それぞれにおいて、Vpuチャンネル活性を反映する能力の関係を示す。

実施例４

本実施例は被検物質のイオンチャンネル阻害活性をスクリーニングする本発明のスクリーニング方法であって、実施例１および２の方法を用いて大腸菌内にVpuを機能するように発現させ、プロリンもしくはアデニンの宿主細胞からの漏出を交差培養法によって検出するものである。
交差培養方法(例えば実施例1)をチャンネル活性の検出に用いるにあたって、チャンネル発現宿主細胞を接種したフィルターディスクに、少量の被検物質を含有する溶液を添加する。添加する薬物がチャンネル活性を阻害する場合、交差培養バックグラウンド株の増殖は検出されない。
チャンネル活性の検出のために増殖時のアデニン要求性を検出する場合には、チャンネルタンパク質を発現しているXL-1ブルー宿主細胞をアデニンを含まない最少培地プレート上へ塗布してローンを形成する。被検物質は、プレート上の規定された領域に適用し、当該領域周囲にXL-1ブルー細胞が増殖すれば、チャンネル活性が阻害されてアデニン漏出が抑制されたことを示すことになる(図7A)。
実施例として、ある化合物(ANU-9)は、上述のごとく最少培地(アデニン含まず)上の不連続な位置へ添加した場合、Vpu発現大腸菌の添加位置周囲における増殖を可能とするものとして同定されている(図7A)。これは、増殖領域においては化合物ANU-9の濃度がVpuイオンチャンネルの活性を抑制するのに充分な量であり、このためアデニンがないのに細胞増殖が可能となったことを示す。
次いでANU-9のVpuイオンチャンネル活性をブロックする活性を電気生理学アッセイにて調べた(図7B)。50μMにおいては、チャンネルはかなり阻害されており、頻度の低い小さな開口が検出されたのみである(図7Bの中)。一方、250μMではチャンネル活性は完全に阻害されていた(図7Bの下)。

被検物質によるイオンチャンネル調節活性の検出

プロリンを含有しないがメチオニンを含有する最少培地プレート上にプロリン及びメチオニンに対して栄養要求性である大腸菌株を接種し軟寒天層としたローンを積層した。滅菌多孔性フィルターディスクにスクリーニングに供する被検物質を染み込ませ、pPL-Vpu構築物を含有するMet＋Pro＋(XL-1ブルー)株(実施例1に従って調製)を接種し、このフィルターを軟寒天上に置いた。プレートを37℃もしくは30℃にて2日間インキュベートした。
所定時間が経過した後、被検物質がVpuチャンネルをブロックしないものである場合には

、pPL-Vpu含有細胞を接種したディスクの周囲にはMet－Pro－株の増殖の光輪が明確に観察される.被検物質がVpuイオンチャンネルをブロックするものである場合には、ディスクの周囲のMet－Pro－株は増殖は認められない。コントロール実験は、被検物質が正常な大腸菌の増殖自体を阻害するものではないことを確認するために行われる。
当業者であれば、本発明の精神及び範囲から逸脱しない範囲で、広く開示された本発明の誘導および改変することができることを認識するであろう。本発明はかかる誘導及び改変をも含むと、理解されなくてはならない。

文献

１．Piller Sc, Ewart GD, Premkumar A, Cox GB, およびGage PW, (1996), 「ヒト免疫不全ウイルスタイプいのVprタンパク質は、カチオン選択的チャンネルを二次元脂質二重層内に形成する(Vpr protein of human imrnunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers)」, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)93: 111-115.
２．Love CA, Lilley PE, およびDixon NE, (1996), 「大腸菌内におけるタンパク質の過剰生産のための安定な高コピー数バクテリオファージプロモーター(Stable high-copy number bacteriophage lambda promoter vectors for overproducton of proteins in Escherichia coli.)」ジーン(Gene). 176: 49-53.
３．Yamato I, Kotani M, Oka Y, およびAnraku Y, (1994), 「大腸菌のプロリンキャリアの膜貫通部分にある唯一の正に荷電しているアミノ酸残基、アルギニン776の部位特異的改変(Site-specific alteration of arginine 376, the unique positively charged amino acid residue in the mid-membrane-spanning regions of the proline carrier of Escherichia coli.)」ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry), 269: 5729-5724.
４．Rosen BR, 「ATP-関連輸送系(ATP-coupled solute transport systems)」, 「大腸菌およびネズミチフス菌(Escherichia coli and Salmonella typhimurium). 」内、「細胞および分子生物学」エフシー・ナイダード(F.C.Neidhardt)編集1987,アメリカン・ソサエティー・フォア・マイクロバイオロジー(American Society for Microbiology): ワシントンDC p. 760-767.
５．Haddock BAおよびDownie JA, (1974), 「アテルビン蛍光のクエンチングにより、大腸菌変異体の電気輸送欠損変異体からの膜内の呼吸鎖機能の再構築を示す。(The reconstitution of functional respiratory chains in membranes from electron-transport-deficient mutants of Escherichia coli as demonstrates by quenching of atebrin fluorescence.)」バイオケミストリージャーナル(Biochem. J.)142:703-706.
６．Sunstrom NA, Premkumar LS, Premkumar A, Ewart GおよびCox GB, (1996), 「NBおよびインフルエンザBウイルスタンパク質により形成されるイオンチャンネル(Ion channels formed by NB, and influenza B virus protein)」ジャーナル・オブ・メンブレン・バイオロジー(Journal of Membrane Biology)150: 127-132.
７．Schroeder C, Ford CM, Wharton SA, およびHay AJ, (1994), 「バキュロウイルスにより発現されたインフルエンザウイルスM2タンパク質の脂質小胞体内における機能再構築:プロトン輸送活性の証拠(Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus:evidence for proton transfer activity)」ジェイ・ジェン・バイオール(J. Gen Virol.)75: 3477-3484.
８．Ewart GD, Sutherland T, Gage PW, およびCox GB, (1996). 「HIV-1のVpuタンパク質はカチオン選択性イオンチャンネルを形成する(The Vpu protein of HIV-1 forms cation selective ion channels)」ジェイ・バイオール(J. Virol.)70 7108-7115.
９．Sambrook J, Fritsch EF, およびManiatis T, (1989). 「モレキュラークローニング:実験用マニュアル第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed)」コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ニューヨーク(Cold Spring Harbor Laboratory

, Cold Spring Harbor, New York)
配列表
(１)一般的な情報
(ｉ)出願人：ジ・オーストラリアン・ナショナル・ユニバーシティ
(ii)発明の名称：物質のイオンチャンネル活性測定法
(iii)配列の数：３
(iv)受取人の住所：
(Ａ)受取人：デイビス・コリソン・ケイブ
(Ｂ)ストリート：リトル・コリンズ・ストリート１番
(Ｃ)シティ：メルボルン
(Ｄ)ステート：ビクトリア
(Ｅ)国：オーストラリア
(Ｆ)郵便番号：３０００
(ｖ)コンピューター読み取り：
(Ａ)媒体の種類：フロッピーディスク
(Ｂ)コンピューター：ＩＢＭ ＰＣコンパチブル
(Ｃ)オペレーティングシステム：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ
(Ｄ)ソフトウエア：パテンチンリリース１．０、ヴァージョン１．２５
(vi)現在の出願の情報：
(Ａ)出願番号：
(Ｂ)出願日：
(viii)代理人の情報：
(Ａ)氏名：ジョン・エム・スラッテリー
(ix)通信情報：
(Ａ)電話番号：+61 3 9254 2777
(Ｂ)ファクシミリ：+61 3 9254 2770
(Ｃ)テレックス：AA 31787
(２)配列番号１の情報
(ｉ)配列の種類
(Ａ)長さ：８２アミノ酸
(Ｂ)種類：アミノ酸
(Ｃ)鎖の数：１本鎖
(Ｄ)トポロジー：直鎖
(ii)分子の種類：ペプチド
(ｖ)フラグメントタイプ：Ｎ－末端
(xi)配列番号１

```
Met Gln Pro Ile Pro Ile Val Ala Ile Val Ala Leu Val Val Ala Ile
1               5                  10                  15

Ile Ile Ala Ile Val Val Trp Ser Ile Val Ile Ile Glu Tyr Arg Lys
            20                  25                  30

Ile Leu Arg Gln Arg Lys Ile Asp Arg Leu Ile Asp Arg Leu Ile Glu
        35                  40                  45

Arg Ala Glu Asp Ser Gly Asn Glu Ser Glu Gly Glu Ile Ser Ala Leu
    50                  55                  60

Val Glu Met Gly Val Glu Met Gly His His Ala Pro Trp Asp Val Asp
65                  70                  75                  80

Asp Leu
```

(２)配列番号２の情報

(ｉ)配列の種類
(Ａ)長さ：２４塩基対
(Ｂ)種類：核酸
(Ｃ)鎖の数：１本鎖
(Ｄ)トポロジー：直鎖
(ii)分子の種類：ＤＮＡ
(xi)配列番号２
AGTAGGATCC ATGCAACCTA TACC

(２)配列番号３の情報
(ｉ)配列の種類
(Ａ)長さ：２４塩基対
(Ｂ)種類：核酸
(Ｃ)鎖の数：１本鎖
(Ｄ)トポロジー：直鎖
(ii)分子の種類：ＤＮＡ
(xi)配列番号３
TCTGGAATTC TACAGATCAT CAAC

【図１Ａ】

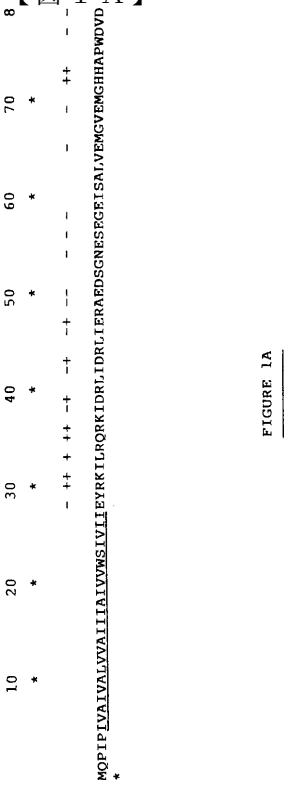
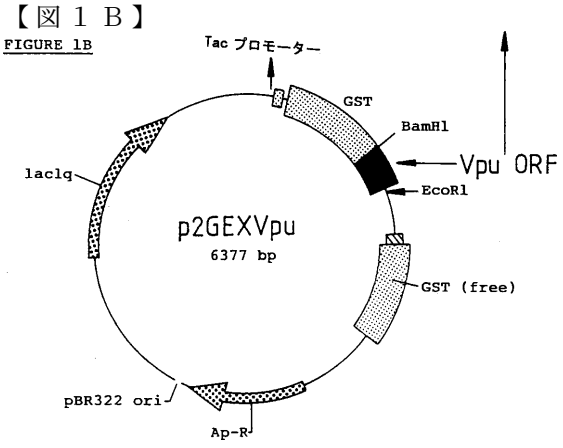
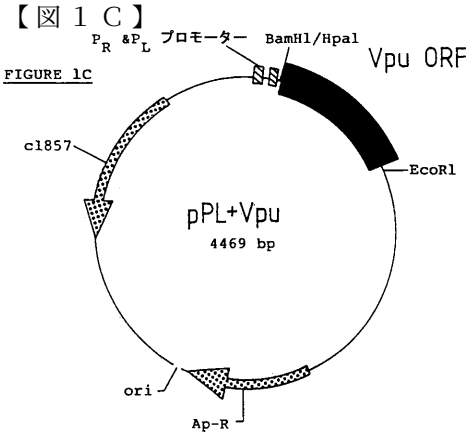


FIGURE 1A

【図１Ｂ】

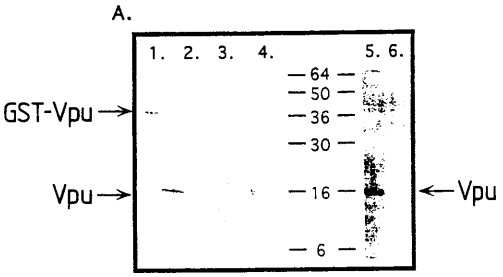


【図１Ｃ】



【図２Ａ】

FIG 2A



【図２Ｂ】

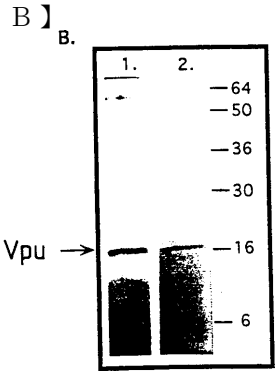


FIG 2B

【図３Ａ】

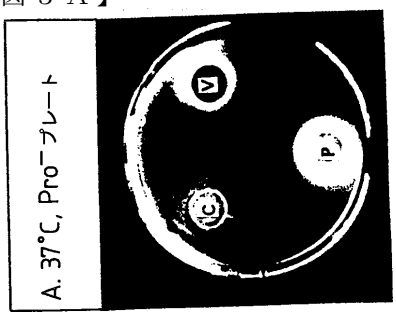


FIG 3A

【図３Ｂ】

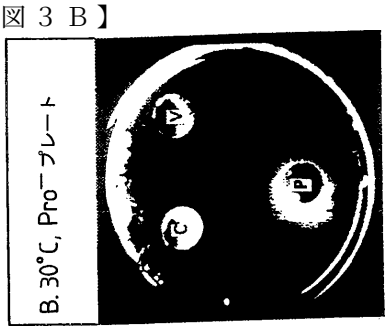


FIG 3B

【図３Ｃ】

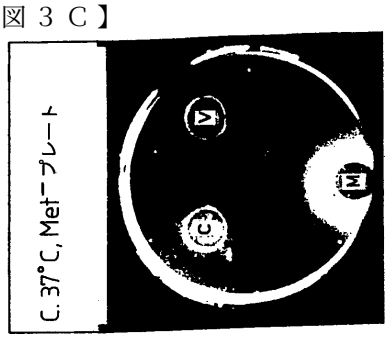


FIG 3C

【図４Ａ】

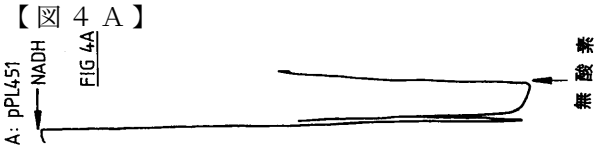


FIG 4A

【図４Ｂ】

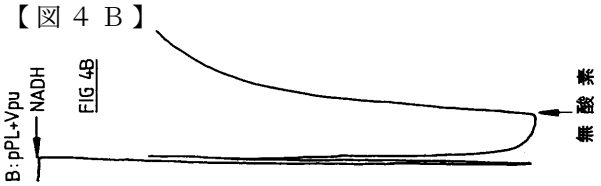


FIG 4B

【図４Ｃ】

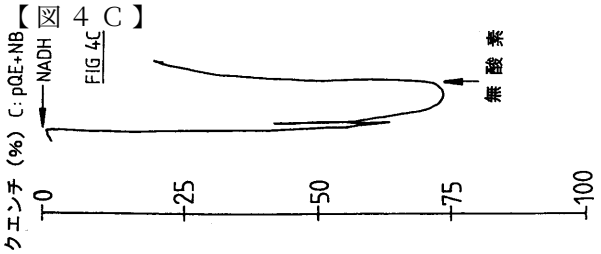


FIG 4C

【図４Ｄ】

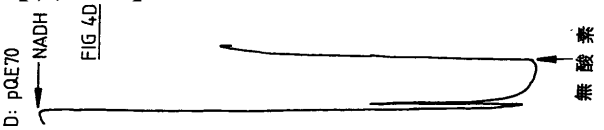


FIG 4D

【図５Ａ】

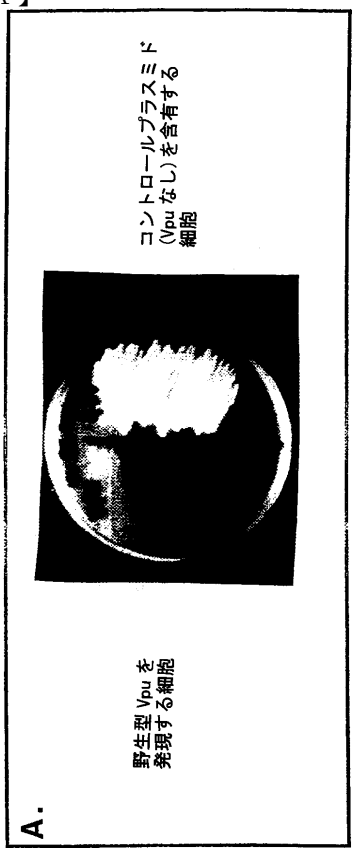


FIGURE 5A

【図５Ｂ】

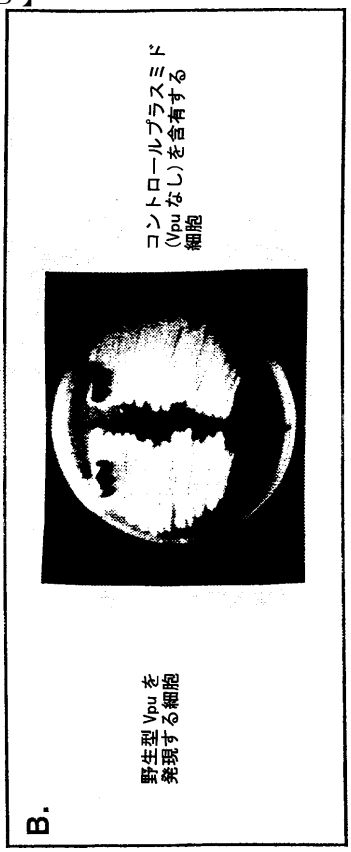


FIGURE 5B

【図６Ａ】

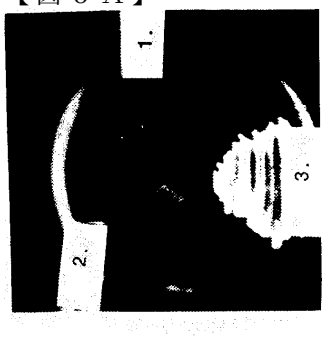


FIGURE 6A

【図６Ｂ】

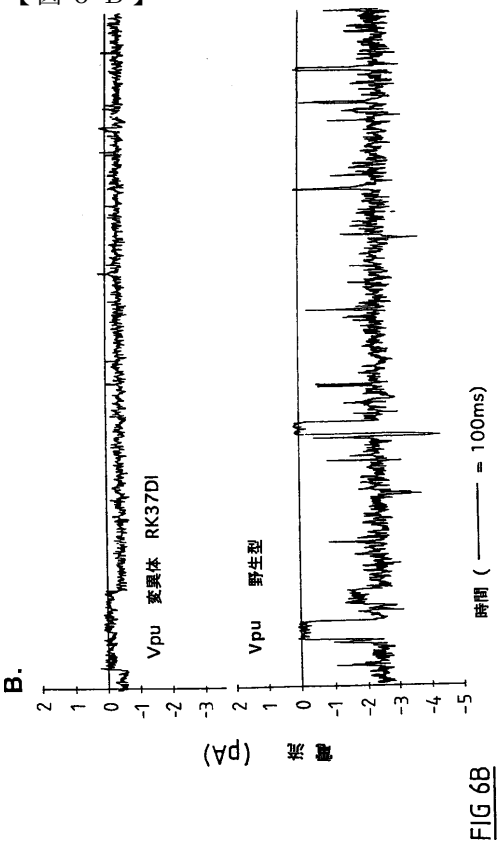


FIG 6B

【図７Ａ】

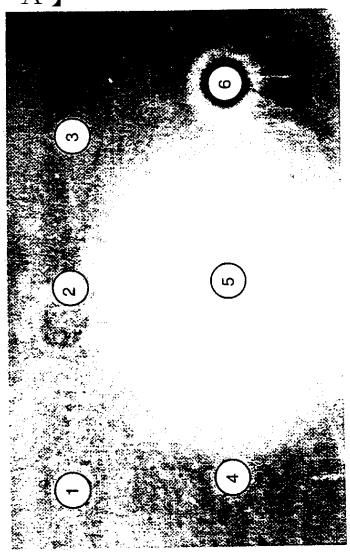


FIGURE 7A

【図７Ｂ】

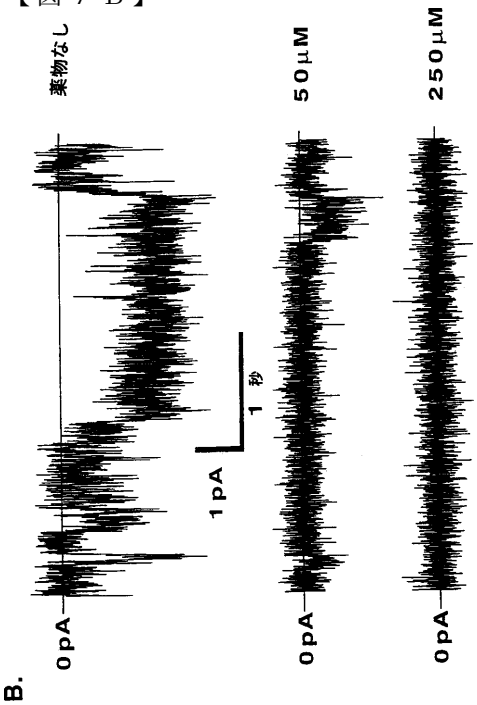


FIG 7B

フロントページの続き

(72)発明者 コックス，グレイアム・バリー
オーストラリア２６０６オーストラリアン・キャピタル・テリトリー、スウィンガー・ヒル、バーネット・クロース９６番
(72)発明者 エウォート，ゲイリー・ディニーン
オーストラリア２６０２オーストラリアン・キャピタル・テリトリー、ハケット、フィリップ・アベニュー１８９番

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 Pflugers Arch.，１９９４年，Vol.426，p.360-362
J.Biol.Chem.，１９９４年，Vol.269，p.5720-5724

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q 1/02
C12N 15/09
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)