(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 12 月 22 日(22.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/204296 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) *C12Q 1/06* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/068189

(22) 国際出願日: 2016 年 6 月 17 日(17.06.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-124261 2015 年 6 月 19 日(19.06.2015) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 宮脇　敦史(MIYAWAKI, Atsushi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 片山　博幸(KATAYAMA, Hiroyuki); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号　国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人ＨＡＲＡＫＥＮＺＯ ＷＯＲＬＤ ＰＡＴＥＮＴ ＆ ＴＲＡＤＥＭＡＲＫ(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋２丁目北２番６号　大和南森町ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2016/204296 A1

(54) **Title**: pH-RESPONSIVE PROTEOLYSIS PROBE

(54) 発明の名称 : ｐＨ応答性のタンパク質分解プローブ

(57) **Abstract**: Provided is a tool exhibiting superior properties in the quantification of autophagic activity. The unimolecular FRET probe of the present invention comprises an acceptor consisting of a fluorescent protein undergoing enzymolysis in the lysosome or in the vacuole, and a donor having an amino acid sequence identical for at least 95% to the amino acid sequence represented as Sequence number 1.

(57) 要約: オートファジーの活性の定量化において、優れた性質を示すツールを提供すること。本発明の一分子ＦＲＥＴプローブは、リソソームまたは液胞の内部において酵素分解を受ける蛍光タンパク質からなるアクセプタ、および配列番号１によって表されるアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性のアミノ酸配列を有しているドナーを含んでいる。

明　細　書

発明の名称 ： ｐＨ応答性のタンパク質分解プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、オートファジーを定量化するための、蛍光タンパク質を有するプローブに関する。

背景技術

[0002] オートファジーは、真核細胞に普遍的にみられる細胞の種々の構成要素を分解する過程を指す。オートファジーは、生じる過程の機序に基づいて、主にマクロファジー、ミクロオートファジーおよびシャペロン介在性オートファジーに分類される。いずれの機序であっても、当該構成要素は、最終的にリソソームまたは液胞に取り込まれて、リソソームまたは液胞の内部にある分解酵素によって分解を受ける。タンパク質などの生体分子の他に、ミトコンドリアおよび小胞体などの細胞内小器官が、オートファジーによって分解される。ミトコンドリアが分解されるオートファジーは、マイトファジーとも呼ばれる。

[0003] オートファジーは、例えば栄養成分の欠乏によって誘導される。よって、細胞質における構成要素の分解物を再利用することによって細胞に栄養成分を補給することが、オートファジーの主要な役割であるとこれまで考えられてきた。しかし、近年の研究によって、オートファジーの、種々の生命現象への関与が明らかになってきた。種々の生命現象としては、タンパク質もしくは細胞内小器官の品質管理、細菌感染、抗原提示、細胞死、癌化および胚発生が挙げられる。これらの他にも、オートファジーは、細胞内に蓄積し、凝集する異常タンパク質の分解および除去への関与も示唆されている。さらに、オートファジーは、当該異常タンパク質の蓄積を原因とする細胞死によって発症すると考えられている神経変性疾患（例えば、ハンチントン病またはアルツハイマー病）への関与も示唆されている（Deretic, V. and Klionsky, D. J., Scientific American, Vol. 298, p. 74-81, 2008）。このため、

これらの生命現象の機序の解明およびオートファジーに関連する疾患の治療法の開発を目的として、オートファジーの活性を定量化するための精度の高い簡便な方法の開発に対する必要性は大きい。

[0004] 従来、オートファジーは、電子顕微鏡による細胞の観察、放射性同位元素による標識タンパク質の分解の検出、またはオートファジーの生起によって特異的に活性化する改変型酵素の活性の測定といった手法を用いて測定されている。しかし、これらの手法は、オートファジーに対して十分に特異的ではないか、または操作の煩雑さのために熟練を要し、かつ所要時間も長かった。

[0005] マクロオートファジーでは、最初に細胞質の一部が隔離膜と呼ばれる膜に取り囲まれることによって、直径約１μｍのオートファゴソームと呼ばれる小胞が形成される。続いて、オートファゴソームがリソソームと融合することによって、取り込まれた細胞質の構成要素が分解される。これまでに報告されているオートファジーに関与するタンパク質として、ＬＣ３のようにオートファゴソームの形成に関与し、その膜に局在するタンパク質が知られている。この知見に基づいて、当該タンパク質および蛍光タンパク質の融合タンパク質を細胞に発現させ、当該融合タンパク質の小胞状構造への集積、またはリソソームにおける分解による蛍光強度の減少を観察することによって、オートファジーの測定が行われている（Mizushima, N., Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol. 36, p. 2491-2502, 2004およびShvets, E. et al., Autophagy, Vol. 4, p.621-628, 2008）。

[0006] しかし、オートファゴソームの形成は、マクロオートファジーにのみ認められる現象である。したがって、この方法では、ミクロオートファジーおよびシャペロン介在性オートファジーを検出できない。ミクロオートファジーおよびシャペロン介在性オートファジーでは、オートファゴソームのような輸送用の小胞が形成されずに、細胞質の構成要素が直接的にリソソームに取り込まれると言われている。しかし、ミクロオートファジーおよびシャペロン介在性オートファジーの研究は、マクロオートファジーほど進んでおらず

、当該研究において有効な測定法が存在していない。したがって、細胞内に生じているすべての分類のオートファジーの活性を総計として知ることができない。

[0007] 一方、細胞質が中性（約ｐＨ７）であるのに対して、オートファジーによって細胞質の構成要素が分解されるリソソームまたは液胞の内部が、酸性（約ｐＨ４）であることを利用する、オートファジーの活性を測定する方法がある。当該方法では、分解酵素に耐性を有している蛍光プローブの、リソソームまたは液胞への移行にともなうｐＨの変化に依存した蛍光特性の変化に基づいて、オートファジーの活性を検出する。すべての分類のオートファジーにおいて、細胞質の構成要素は、最終的にリソソームまたは液胞に取り込まれるため、上記方法によれば、オートファジーの活性を総計として知り得る。

[0008] 上記方法の例として、Rosado et al（非特許文献１）に記載の方法が挙げられる。非特許文献１では、ＤｓＲｅｄ．Ｔ３およびｓｕｐｅｒ ｅｃｌｉｐｔｉｃ ｐＨｌｕｏｒｉｎを、リンカーのペプチドを介して連結させたプローブを使用している。ＤｓＲｅｄ．Ｔ３は、環境のｐＨの変化に依存せずにほぼ一定の強度において、赤色（５８７ｎｍ）の蛍光を発する蛍光タンパク質である。ｓｕｐｅｒ ｅｃｌｉｐｔｉｃ ｐＨｌｕｏｒｉｎは、ｐＨが酸性に向かうと蛍光強度の低下を示す緑色（５０８ｎｍ）の蛍光を発する蛍光タンパク質である。非特許文献１では、上記プローブを細胞質に発現させた後に、当該プローブが他の細胞質の構成要素とともにリソソームに取り込まれたときのｐＨの変化を、２色の蛍光強度のレシオの変化として、計測することによってオートファジーの活性を測定している。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Rosado, C. J. et al., Autophagy, Vol. 4, p. 205-213, 2008

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 実際には非特許文献１のＲｏｓｅｌｌａを用いて精度の良いオートファジー活性を測定することは困難であった。Ｒｏｓｅｌｌａには、以下のようないくつかの課題があった。

[0011] 一つには、非特許文献１では酵母でのオートファジーを観察しているが、酵母の液胞はおよそｐＨ５．５～６．０とそれほど強い酸性の状態ではない点が挙げられる。しかし、哺乳動物細胞のリソソームはｐＨ４．０～５．０と、酵母に比べて酸性が強い環境となっている。Ｒｏｓｅｌｌａを構成する２つの蛍光タンパク質は、ともに酸性条件および酸性プロテアーゼに弱い性質を有している。そのため、これらは哺乳動物細胞に即した条件下では不可逆的に消光してしまうか、または分解されてしまうという課題があった。また、哺乳動物細胞におけるオートファジーの検出において、２つの蛍光タンパク質部分の細胞内のフォールディング速度または退色による消光特性などのｐＨに依存しない蛍光特性の差異によって、レシオの値が実験条件で変化する可能性が挙げられる。加えて、レシオの変化がｓｕｐｅｒ　ｅｃｌｉｐｔｉｃ　ｐＨｌｕｏｒｉｎの蛍光強度の変化のみに依存しているため、レシオ変化の振幅が小さいことも課題であった。

[0012] 一方、本発明者らが以前に開発したオートファジーの測定方法で利用するＫｅｉｍａは、酸性環境においても強い性質を有している。しかし、Ｋｅｉｍａの蛍光シグナルはｐＨに応じて可逆的に変化する。この特徴から、例えば、生細胞を固定標本にした場合などにオートファジー検出に問題が起こる。生細胞を固定標本にすると、周辺環境の変化によって細胞中のｐＨも変化する。このｐＨ変化にともなって、ｋｅｉｍａの蛍光シグナルが生細胞の状態から変化し、正しくオートファジーを測定できないという課題があった。

[0013] 以上のことから、オートファジーの活性の精度の高い定量化には、哺乳動物細胞のリソソームまたは液胞の内部におけるｐＨの環境下においても安定した蛍光シグナルを発する性質と、周辺環境の変化によるｐＨ変化が起こってもオートファジーを示す蛍光シグナルが影響されない性質とを有する優れ

たツールが求められている。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者は、ｐＨ応答性の蛍光タンパク質のプローブを設計するにあたり、蛍光タンパク質の酸性条件下のプロテアーゼ感受性の差を利用することに着目した。非特許文献１に記載のプローブのように蛍光タンパク質における発色団のｐＨ感受性の差ではなく、プロテアーゼ感受性の差を利用をすれば、生細胞および固定細胞のどちらでも高い感度においてオートファジーを検出できるという着想を得た。当該着想に基づき、酸性条件下のプロテアーゼ感受性の差の大きい蛍光タンパク質を組み合せたＦＲＥＴプローブによって上述の課題を解決し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の特徴を備えている。

[0015] （１）リソソームまたは液胞において酵素分解を受ける蛍光タンパク質からなるアクセプタ、および配列番号１によって表されるアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性のアミノ酸配列を有しているドナーを含んでいる、一分子ＦＲＥＴプローブ。

（２）上記蛍光タンパク質はオワンクラゲ由来黄色蛍光タンパク質である、（１）に記載の一分子ＦＲＥＴプローブ。

（３）上記蛍光タンパク質は、ＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｙｐｅｔ、Ｔｏｐａｚ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ｍＥＹＦＰ、Ｖｅｎｕｓ、ｍＶｅｎｕｓおよびＴａｇＹＦＰからなる群から選択される、（１）または（２）に記載の一分子ＦＲＥＴプローブ。

（４）ミトコンドリア局在化配列をさらに含んでいる、（１）～（３）のいずれか１つに記載の一分子ＦＲＥＴプローブ。

（５）（１）～（４）のいずれか１つに記載の一分子ＦＲＥＴプローブをコードしている、ポリヌクレオチド。

（６）（５）に記載のポリヌクレオチドを含んでいる、キット。

（７）（１）～（３）のいずれか１つに記載の一分子ＦＲＥＴプローブを含んでいる細胞からの蛍光シグナルを検出することを包含している、オートフ

ァジーの活性を定量化する方法。

（８）上記細胞が固定されている、（７）に記載の方法。

発明の効果

[0016] 本発明は、オートファジーの活性の定量化において、リソソームまたは液胞の内部におけるｐＨの変動に影響を受けずに、精度の高い分析を可能にする優れた性質を示すツールを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]大腸菌（１８℃）および哺乳類細胞（ＭＥＦ細胞、３７℃）において発現させた蛍光タンパク質の蛍光強度を比較した結果を示す図である。

[図2]本発明に係るドナー候補物の酸性条件における耐性を、従来の蛍光タンパク質と比較した結果を示す図である。

[図3]本発明に係るドナー候補物の酸性条件における耐性を、従来の蛍光タンパク質とウエスタンブロットおよび蛍光測定によって比較した他の結果を示す図である。

[図4]ＡＦＦＰとｍｃｈｅｒｒｙを繋げたコンストラクトを作製し、ＡＦＦＰまたはｍＣｈｅｒｒｙの細胞内でのドット数を比較して、両者の分解耐性を評価した結果を示す図である。

[図5]オートファジープローブＳＲＡＩの構成を上段に模式的に示し、図２における蛍光測定前の処理をＳＲＡＩに施した後に、ＳＲＡＩの蛍光強度を測定した結果を、中段および下段に示す図である。

[図6]図５に示すプローブを用いて、培養細胞におけるオートファジーの活性化を定量化した結果を示す図である。

[図7]図５に示すプローブを用いて、培養細胞におけるオートファジーの活性化を細胞固定後において定量化した結果を示す図である。

[図8]図５に示すプローブを用いて、２４時間の飢餓状態を経たマウスの肝臓におけるオートファジーの活性化を定量化した結果を示す図である。

[図9]ミトコンドリア局在化配列を含んでいる従来のプローブおよび本発明の実施例に係るプローブの構成を模式的に示す図である。

[図10]図９に示すプローブを用いて、ミトコンドリアへの局在化を確認した結果を示す図である。

[図11]図９に示すプローブを用いて、マイトファジーを検出した結果を示す図である。

[図12]Rosadoらが報告したプローブ（Ｒｏｓｅｌｌａ）の性能を評価した図である。

発明を実施するための形態

[0018] 〔一分子ＦＲＥＴプローブ（ｐＨ応答性のタンパク質分解プローブ）〕

本発明の一分子ＦＲＥＴプローブは、リソソームまたは液胞において酵素分解を受ける蛍光タンパク質からなるアクセプタ、および配列番号１によって表されるアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性のアミノ酸配列を有しているドナーを含んでいる。

[0019] 上記アクセプタおよびドナーは、単独のタンパク質として存在するときに、互いに異なる蛍光を発する蛍光タンパク質である。単独のタンパク質として存在する上記アクセプタは、励起状態にあるときに第１の波長の蛍光を発する。単独のタンパク質として存在する上記ドナーは、励起状態にあるときに第２の波長の蛍光を発する。ここで、第１の波長は、緑色の波長範囲にある第２の波長より長い。

[0020] よって、上記一分子ＦＲＥＴプローブは、細胞質に存在するとき（中性のｐＨ条件において）、上記ドナーおよびアクセプタはいずれも蛍光を発し得る。ただし、励起状態の上記ドナーから上記アクセプタにエネルギーが供与されるので、上記一分子ＦＲＥＴプローブは、主に第１の波長の蛍光を発し、第２の波長の蛍光を微弱に発する。このときの上記一分子ＦＲＥＴプローブからの、主に第１の波長の蛍光からなるシグナル（ネガティブシグナルと呼ぶ）は、オートファジーに関連しない。

[0021] 一方、上記一分子ＦＲＥＴプローブは、細胞質からリソソームまたは液胞の内部に移動すると（酸性のｐＨ条件において）、上記ドナー以外の部分（アクセプタを含んでいる）の分解の結果として、上記ドナーを残した構造へ

と不可逆的に変化する。後述する通り、本発明に係る上記ドナーとして、酸性プロテアーゼに対する分解耐性を示す蛍光タンパク質が、特に選択されているからである。よって、リソソームまたは液胞の内部から発せられる蛍光は、上記ドナーのみが当該内部に存在するので、第２の波長の蛍光のみである。第２の波長の蛍光のみからなるこのシグナル（ポジティブシグナルと呼ぶ）は、オートファジーを示している。

[0022] 以上の通り、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブ（またはその一部）は、ｐＨ依存的に、ネガティブシグナルまたはポジティブシグナルを発する。ただし、当該一分子ＦＲＥＴプローブにおけるシグナル変化は不可逆的であり、その機序は、２つの蛍光タンパク質発色団のｐＨ感受性の差異を利用する従来の機序と明らかに異なる。従来の機序では、分子全体における２つの発色団からの蛍光発光を混色させた蛍光特性が、ｐＨ変化に依存して可逆的に変化する。一方、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブは、分子全体が維持されている（中性条件）ときにネガティブシグナルを発し、酸性条件においてアクセプタが分解されて（低ｐＨに感応して）ポジティブシグナルを発する。いったん分解されたアクセプタは再生されないので、周囲環境のｐＨが上昇して酸性から中性になっても、上記ドナーはポジティブシグナルを発し続ける。つまり、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブは、ｐＨ低下（中性→酸性）にのみ感応して不可逆的にシグナル変化を生じ、ｐＨ上昇には不感応である。これに対して、従来の機序に基づくプローブは、ｐＨ変化（中性←→酸性）に感応して可逆的にシグナル変化を生じる。

[0023] 以上のことから、リソソームまたは液胞において上記アクセプタの分解後に残存する上記ドナーは、周囲環境が酸性以外に変化しても、ポジティブシグナルのみを発し、ネガティブシグナルを発しない。よって、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブを使用すれば、例えば細胞死が起こってから時間が経過することによってｐＨが酸性から中性に上昇しても、オートファジーを示すポジティブシグナルの総計は、変化せずに検出され得る。

[0024] さらに、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブを使用すれば、ネガティブ

シグナルおよびポジティブシグナルを構成する蛍光の主たる成分が異なる。より詳細には、中性条件下のネガティブシグナルにおいて支配的な第１の波長の蛍光成分は、酸性条件において消失する。一方で、ネガティブシグナルにおいて微弱な第２の波長の蛍光成分は、酸性条件下のポジティブシグナルにおいて唯一の蛍光成分へと劇的に変化する。したがって、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブを使用すれば、第２の波長の蛍光成分の実質的な有無に基づいて、オートファジーの活性を容易に定量化し得る。

[0025] 以上のことから、上記一分子ＦＲＥＴプローブを導入した後に固定した細胞において、オートファジーの活性を極めて正確に定量化し得る。上記一分子ＦＲＥＴプローブは、生細胞を扱う煩雑さをなくすとともに、分析の精度を向上させ得るという極めて優れた性質を有している。

[0026] （オートファジー）

オートファジー（自食作用とも称される）は、細胞が自らのタンパク質、細胞内小器官（例えば、ミトコンドリアまたは小胞体）などの構成要素を分解する過程である。オートファジーは、生じる過程の機序に基づいて、主にマクロファジー、ミクロオートファジーまたはシャペロン介在性オートファジーに分類される。

[0027] 本明細書に使用されるとき、「オートファジーの活性」は、細胞内のクリアランス（浄化）能を指す。オートファジーの活性が高いことは、生細胞におけるクリアランスが十分に機能していることを意味する。オートファジーが正常に進行していることは、細胞の恒常性が維持されていることを意味する。

[0028] マクロオートファジーでは、ストレス（例えば、栄養成分の飢餓状態、タンパク質の過剰産生、または異常タンパク質の蓄積）を細胞が受けると、当該ストレスに関連するタンパク質、または細胞内小器官およびリン脂質が集積されることによって、オートファゴソームが形成される。ここで、動物細胞では、オートファゴソームおよび細胞内リソソームの膜融合によって、オートリソソームが形成される。一方、酵母または植物細胞では、オートファ

ゴソームおよび液胞が膜融合する。以上の結果として、リソソームまたは液胞の内部に存在するタンパク質分解酵素によって、上記構成要素の分解が行われる。上記構成要素の、以上の一連の分解過程をマクロオートファジーと呼ぶ。

[0029] ミクロオートファジーは、構成要素（例えば、過剰産生タンパク質または異常タンパク質）を、上述の膜融合を介することなく、リソソームまたは液胞の内部に直接的に取り込んだ後に分解する過程である。

[0030] シャペロン介在性オートファジーは、リソソームまたは液胞の内部への取り込みにおいて、構成要素（例えば、過剰産生タンパク質または異常タンパク質）との、シャペロンによる結合を介している過程である。

[0031] いずれの機序であっても、当該構成要素は、最終的にリソソームまたは液胞に取り込まれて、リソソームまたは液胞の内部にある分解酵素によって分解を受ける。タンパク質などの生体分子の他に、ミトコンドリアおよび小胞体などの細胞内小器官が、オートファジーによって分解される。ミトコンドリアが分解されるオートファジーは、マイトファジーとも呼ばれる。オートファジーは非常に多岐にわたる生命現象への関与について示唆されている。よって、オートファジーの活性の定量化を容易かつ簡便にすることは、種々の生命現象の解明に極めて大きな可能性を有している。

[0032] 続いて、上記一分子ＦＲＥＴプローブの構成要素の詳細について以下に説明する。

[0033] （ドナー）

上記ドナーは、酸性プロテアーゼに対する高い分解耐性、高い蛍光強度および酸性条件における蛍光強度の安定性を有している。酸性条件においてポジティブシグナルを発するために、上記ドナーには、酸性プロテアーゼに対する高い分解耐性を有していることが必須に求められる。そして、ネガティブシグナルに対するポジティブシグナルのレシオ値を極大化するために、上記ドナーには、高い蛍光強度および酸性条件における蛍光強度の安定性が求められる。このような本発明に係るドナーの詳細について以下に説明する。

[0034] 上記ドナーは、配列番号１によって表されるアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性のアミノ酸配列を有している。この構成によれば、上記ドナーから発せられる上記第２の蛍光は、高い蛍光強度を有しており、かつ酸性条件において強度の低下を生じない。上記ドナーは、好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、さらに好ましくは９８％以上、最も好ましくは９９％以上の配列同一性のアミノ酸配列を、配列番号１によって表されるアミノ酸配列に対して有している。

[0035] 上記ドナーを配列同一性以外の観点から説明すると、上記ドナーのアミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸配列に対して１１以下のアミノ酸残基の置換、付加、欠失および／または挿入を有していると言い換え得る。したがって、上記ドナーのアミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸配列に対して、好ましくは１０以下、より好ましくは８以下、より一層好ましくは数個（５～６個、好ましくは２～３個）以下のアミノ酸の置換、付加、欠失および／または挿入を有している。上記ドナーが有しているアミノ酸配列の詳細を以下に説明する。

[0036] 上記ドナーは、例えば、実施例に記載のような配列番号１によって表されるアミノ酸配列を有している。しかし、上述の通り、上記ドナーのアミノ酸配列は、ある程度の幅を有して変更を許容する。例えば、上記ドナーのアミノ酸配列は、配列番号１によって表されるアミノ酸配列のドナーと実質的に同等、または当該ドナー以上の、酸性プロテアーゼに対する分解耐性、蛍光強度および蛍光強度の安定性を有しているという条件を満たす限り、変更され得る。

[0037] 本明細書におけるアミノ酸置換は、アミノ酸の保存的置換または非保存的置換であり得る。アミノ酸の保存的置換は、物理的または化学的な性質（例えば、電気的性質、構造的性質、疎水性および極性）に基づいて実施され得る。当該性質を共有しているアミノ酸の集団としては、疎水性アミノ酸、極性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸、および芳香族アミノ酸が挙げられる。疎水性アミノ酸の例は、グリシン、イソロイシン、ロイシン、アラ

ニン、メチオニンおよびプロリンである。極性アミノ酸の例は、アスパラギン、グルタミン、スレオニン、セリン、チロシンおよびシステインである。酸性アミノ酸の例は、アスパラギン酸およびグルタミン酸である。塩基性アミノ酸の例は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンである。芳香族アミノ酸の例は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびヒスチジンである。

[0038] 上記ドナーのアミノ酸配列においてアミノ酸の変更を避けることが好ましい部分としては、配列番号１の２位を先頭として数える表記方法にしたがったときの、Ｑ６２、Ｙ６３、Ｇ６４、Ｓ５８、Ｓ６０、Ａ８２、Ｄ１４２、Ｖ１７３、Ｅ１８２、Ｓ１８４、Ｅ１９９、Ｃ２１０およびＡ２１７が挙げられる。

[0039] したがって、上記ドナーのアミノ酸配列は、Ｑ６２、Ｙ６３、Ｇ６４、Ｓ５８、Ｓ６０、Ａ８２、Ｄ１４２、Ｖ１７３、Ｅ１８２、Ｓ１８４、Ｅ１９９、Ｃ２１０およびＡ２１７の１つ以上、好ましくは３つ以上、より好ましくは５つ以上を有しているか、上記アミノ酸位置に該当するアミノ酸の変更は、保存的置換である。

[0040] 上記ドナーは、励起光の照射を受けて４５０～５１０ｎｍのピーク波長を有している緑色蛍光を発する。当該ピーク波長は、後述するアクセプタの有しているピーク波長に合わせてこの範囲内において適宜変更され得る。

[0041] 上述の通り、上記ドナーは、生細胞のリソソームまたは液胞において分解耐性が高い。より詳細には、上記ドナーは、酸性条件（ｐＨ３～６、好ましくはｐＨ４～６）において、リソソームまたは液胞に存在する酸性プロテアーゼに対する分解耐性を有している。

[0042] なお、上記ドナーは、ＦＲＥＴプローブにおけるドナーである。すなわち、上記ドナーは、後述するアクセプタと近接しているときに、当該ドナーが励起光の照射を受けることによって得たエネルギーを当該アクセプタに供与する蛍光タンパク質である。さらに、上記ドナーからエネルギーの供与を受けた上記アクセプタは蛍光を発する。よって、上記ドナーが励起光の照射を

受けることによって発する蛍光の波長は、上記アクセプタが当該ドナーからエネルギーの供与を受けることによって発する蛍光の波長より短い。

[0043] （アクセプタ）

上記アクセプタは、上述の通り、リソソームまたは液胞において酵素分解を受ける蛍光タンパク質である。したがって、当該アクセプタは、リソソームまたは液胞の内部における酵素分解を、上記ドナーと比べて、より受けやすい蛍光タンパク質とも呼ばれ得る。上記一分子ＦＲＥＴプローブがリソソームまたは液胞の内部に輸送されると、当該アクセプタは酵素分解される。酵素分解の後に一分子ＦＲＥＴプローブのうち残っているのは、上記ドナーである。したがって、上記一分子ＦＲＥＴプローブがリソソームまたは液胞の内部に輸送されると、上記アクセプタに基づく第１の波長の蛍光は消失する。この結果として、上記ドナーの励起にともなう第２の波長の蛍光のみが、当該ドナーから発せられる。このような機序にしたがって、上記一分子ＦＲＥＴプローブは上述の作用を発揮する。

[0044] 上記ドナーが発する蛍光によって上記アクセプタが励起されるので、上記アクセプタの励起波長は、上記ドナーの蛍光波長と少なくとも一部が重複している。アクセプタの励起波長は、ｐＨ４～９において、好ましくは４３０ｎｍ以上、５３０ｎｍ以下、より好ましくは４５０ｎｍ以上、５１０ｎｍ以下の範囲内である。また、アクセプタの励起ピーク波長は、好ましくは４４０ｎｍ以上、５２０ｎｍ以下、より好ましくは４５０ｎｍ以上、５１０ｎｍ以下の範囲内である。

[0045] 上記アクセプタは、上記ドナーの蛍光ピーク波長より少なくとも長い波長の蛍光ピーク波長を有している。上記アクセプタおよび上記ドナーの間における蛍光ピーク波長の差は、ｐＨ４～９において、好ましくは２０ｎｍ以上、より好ましくは３０ｎｍ以上、さらに好ましくは４０ｎｍ以上である。当該差が大きいほど、一分子ＦＲＥＴプローブ（アクセプタの分解前）が発する蛍光シグナルと、残存プローブ（アクセプタの分解後）が発する蛍光シグナルとの区別がより容易となる。

[0046] 上記アクセプタとして、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質であって、黄色蛍光、橙色蛍光または赤色蛍光を発する蛍光タンパク質が好ましい。より好ましくは、オワンクラゲ由来の黄色蛍光タンパク質である。

[0047] 本明細書において、「オワンクラゲ由来黄色蛍光タンパク質」とは、Aequorea victoriaから単離された蛍光タンパク質であるＧＦＰ（Ｇｒｅｅｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）を遺伝子改変して作製された蛍光タンパク質、またはAequorea macrodactylaから単離された蛍光タンパク質であるＴａｇＧＦＰを遺伝子改変して作製された蛍光タンパク質、を指す。「ＧＦＰを遺伝子改変して作製された蛍光タンパク質」とは、例えばＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｙｐｅｔ、Ｔｏｐａｚ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ｍＥＹＦＰ、ＶｅｎｕｓおよびｍＶｅｎｕｓが挙げられるがこれらに限定されず、これら蛍光タンパク質のアミノ酸の一部を改変（欠失、置換、挿入、および／または付加）した改変型の蛍光タンパク質であって黄色蛍光の特性を維持した蛍光タンパク質を含む。「ＴａｇＧＦＰを遺伝子改変して作製された蛍光タンパク質」とは、例えばＴａｇＹＦＰが挙げられるがこれに限定されず、ＴａｇＹＦＰのアミノ酸の一部を改変（欠失、置換、挿入、および／または付加）した改変型の蛍光タンパク質であって黄色蛍光の特性を維持した蛍光タンパク質を含む。「アミノ酸の一部を改変（欠失、置換、挿入、および／または付加）した改変型の蛍光タンパク質」としては、好ましくは改変前の蛍光タンパク質と９０％以上の相同性、より好ましくは９５％以上の配列同一性を維持した蛍光タンパク質が挙げられる。

[0048] また、上記アクセプタは、必ずしもオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質でなくてもよい。この場合、上記アクセプタは、変異導入などによりリソソームまたは液胞の内部において、不可逆的に消光するか、または酵素分解される蛍光タンパク質であることが好ましい。

[0049] （リンカー）

本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブは、必要に応じてリンカーを含み得る。リンカーは、１つ以上のアミノ酸残基からなり、上記アクセプタとドナ

ーとを結合するペプチド配列である。リンカーの長さは好ましくは、２アミノ酸残基～１００アミノ酸残基、より好ましくは２アミノ酸残基～５０アミノ酸残基の範囲内である。

[0050] リンカーの役割の１つは、リンカーなしの場合（アクセプタとドナーとが直接的に融合されている場合）と比較して、ＦＲＥＴの効果が増大するようにアクセプタとドナーとを位置付けることである。したがって、リンカーは、低い細胞毒性を有しているか、または実質的に無毒性であり、アクセプタおよびドナーの発光特性にあまり影響しないか、または実質的に影響しないことが好ましい。このようなリンカーに該当する限り、リンカーのアミノ酸配列は特に限定されない。

[0051] （オートファジーについて分析される対象）

上記一分子ＦＲＥＴプローブは、リソソームまたは液胞の内部において分解を受ける任意の生体分子を含み得る。当該生体分子は、オートファジーの活性化に関与すると知られているか、もしくは予想されている分子、またはこれまでにオートファジーの活性化との関与について示唆されていない分子であり得る。当該生体分子は、タンパク質であり得ることが好ましい。後述する通り、ポリヌクレオチドまたは当該ポリヌクレオチドを含んでいるキットを用いて、オートファジーの活性化を測定し得るからである。

[0052] （ミトコンドリア局在化配列）

上記一分子ＦＲＥＴプローブは、ミトコンドリア局在化配列をさらに含み得る。ミトコンドリア局在化配列を含んでいるプローブは、細胞内全体における一様な局在ではなく、ミトコンドリア内に主に集積する。したがって、当該プローブを使用すると、リソソームまたは液胞によるミトコンドリアの特異的な分解を定量化可能である。

[0053] ミトコンドリア局在化配列の例としては、ＣｏｘＶＩＩＩ配列が挙げられる。これらの配列は、１種を１つ以上、１種を２つ以上の繰り返し、２種以上を１つ以上ずつ、または２種以上を、繰り返しを含む３つ以上において上記一分子ＦＲＥＴプローブに導入され得る。

[0054] （他の配列）

ミトコンドリア局在化配列に代えて、上記一分子ＦＲＥＴプローブは、他の局在化配列またはシグナル配列を含み得る。他の局在化配列またはシグナル配列の例としては、液胞局在化配列、核移行シグナル配列、ならびにリソソーム、液胞および核以外の細胞内器官への移行シグナル配列が挙げられる。これらの配列を上記一分子ＦＲＥＴプローブに導入すれば、例えば、核の特異的なオートファジーを定量化することによって、有核細胞の無核細胞への成熟の定量化などが可能になる。

[0055] リソソーム局在化配列の例としては、カテプシンＤが挙げられる。核移行シグナル配列の例としては、ｃ－ｍｙｃ由来ＮＬＳが挙げられる。他の細胞内器官の例としては、ペルオキシソーム移行ＳＫＬモチーフ等が挙げられる。

[0056] 上述した種々の局在化配列およびシグナル配列と組み合わせて、上記一分子ＦＲＥＴプローブは、種々の配列を含み得る。一例としては、ミトコンドリア局在配列に加えて、細胞質に残る非局在化プローブを除去するためのデグロン配列としてＣＬ１配列およびＰＥＳＴ配列が挙げられる。

[0057] 〔ポリヌクレオチド〕

本発明に係るポリヌクレオチドは、上記一分子ＦＲＥＴプローブをコードしている。したがって、当該ポリヌクレオチドを、種々のオートファジーについて分析する細胞に導入することによって、上記一分子ＦＲＥＴプローブは、細胞内に発現させられ得る。

[0058] 本発明に係るポリヌクレオチドは、ＲＮＡ（例えばｍＲＮＡ）の形態、またはＤＮＡの形態（例えばｃＤＮＡ）において存在し得る。ＤＮＡは、二本鎖または一本鎖であり得る。本発明に係るポリヌクレオチドは、例えば、ＯＲＦ（オープンリーディングフレーム）の配列のみを含んでいるポリヌクレオチドであり得、非翻訳領域（ＵＴＲ）の配列をさらに含んでいるポリヌクレオチドであり得る。

[0059] また、本発明に係るポリヌクレオチドは、Ｈｉｓタグ、ＨＡタグ、Ｍｙｃ

タグ、またはＦｌａｇタグ等のタグ配列をコードするポリヌクレオチドが、上述のポリヌクレオチドに対して必要に応じて付加されている。本発明に係るポリヌクレオチドは、上記リンカーをコードするポリヌクレオチドが、上述のポリヌクレオチドに対して必要に応じて付加されている。

[0060] 本発明に係るポリヌクレオチドは、例えば、上記ドナー、上記アクセプタ、および必要に応じて用いられる上記リンカーもしくはタグ配列等の各構成要素のポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチドを直鎖状に連結することによって、生成され得る。複数のポリヌクレオチドの連結は、例えば、遺伝子工学的な手法、または核酸合成法を用いて実施され得る。

[0061] 一実施形態において、本発明に係るポリヌクレオチドは、配列番号２にそのアミノ酸配列が示されているＦＲＥＴプローブをコードしている、配列番号３にその塩基配列が示されているポリヌクレオチドである。

[0062] 本発明に係るポリヌクレオチドは、例えば、以下の手順にしたがって当該ポリヌクレオチドがコードしている融合タンパク質を細胞内に発現させ得る。発現ベクター等に上記ポリヌクレオチドをサブクローニングすることによって、一分子ＦＲＥＴプローブである融合タンパク質を発現させるための発現コンストラクトを作製する。続いて、当該発現コンストラクトを細胞内に導入することによって、上記ポリヌクレオチドがコードする融合タンパク質を細胞内に発現させる。

[0063] 〔ベクターおよび発現コンストラクト〕

（発現コンストラクト）

本発明は、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブを産生するために使用される発現コンストラクトを提供する。「発現コンストラクト」は、発現宿主内において機能的な発現制御領域、および当該発現制御領域に対して作動可能に連結されているポリヌクレオチドを含んでいる発現単位を指す。発現コンストラクトの一例は、上記発現制御領域および上記ポリヌクレオチドを遺伝子工学的に連結した核酸構築物である。「作動可能に連結」は、ポリヌクレオチドの発現が発現制御配列によって制御されている状態を指す。発現コ

ンストラクトは発現ベクターの形態であり得、発現ベクターは、宿主細胞において一分子ＦＲＥＴプローブを組換え発現させるためのベクターであるか、または一分子ＦＲＥＴプローブのインビトロ生成に用いるベクターであり得る。

[0064] 発現ベクターにおいて、本発明に係るポリヌクレオチドには、例えば、プロモータ配列などの、転写に必要な要素（上述の「発現制御領域」に相当）が、作動可能に連結されている。プロモータ配列は宿主細胞において転写活性を示すＤＮＡ配列である。使用されるプロモータ配列の種類は、宿主細胞の種類および本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブを利用する目的に応じて適宜選択され得る。

[0065] 宿主細胞内において機能的なプロモータ配列としては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子（Bacillus stearothermophilus maltogenicamylase gene）、バチルス・リケニホルミスαアミラーゼ遺伝子（Bacillus licheniformis alpha-amylase gene）、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子（Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene）、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子（Bacillus Subtilis alkaline protease gene）もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子（Bacillus pumilus xylosldase gene）のプロモータ；ファージ・ラムダのＰＲプロモータまたはＰＬプロモータ；大腸菌の、ｌａｃプロモータ、trpプロモータ、tacプロモータ；ポリヘドリンプロモータ、Ｐ１０プロモータ、オートグラファ・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュロウイルス即時型初期遺伝子１プロモータ、バキュロウイルス３９Ｋ遅延型初期遺伝子プロモータ、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、ＴＰＩ１プロモータ、ＡＤＨ2-4cプロモータ、ＡＤＨ３プロモータ、ｔｐｉＡプロモータ、カリフラワーモザイクウイルスの３５Ｓプロモータ、ＳＶ４０プロモータ、ＭＴ－１（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、サイトメガロプロモータまたはアデノウイルス２主後期プロモータなどが挙げられる。

[0066] 発現ベクターにおいて、本発明に係るポリヌクレオチドは、必要に応じて、適切なターミネータ（例えば、ポリアデニレーションシグナル、哺乳動物の成長ホルモンターミネータ、ＴＰＩ１ターミネータまたはＡＤＨ３ターミネータ）に対して機能的に結合され得る。適切なターミネータの種類は、宿主細胞の種類に応じて適宜選択され得る。

[0067] 発現ベクターは、転写エンハンサ配列、または翻訳エンハンサ配列などのエレメントをさらに有し得る。発現ベクターは、当該発現ベクターの宿主細胞内における複製を可能にするＤＮＡ配列をさらに有し得る。宿主細胞が哺乳動物細胞の場合、当該ＤＮＡ配列としては、ＳＶ４０複製起点などが挙げられる。

[0068] （ベクター）

本発明に係るポリヌクレオチドは、適当なベクターに挿入して使用され得る。ベクターの種類は、（１）プラスミドのような自律的に複製するベクター、または（２）宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれ、宿主細胞の染色体と共に複製されるベクターである。なお、単にベクターという場合、当該用語は、上述の発現ベクターのみならず、例えばクローニング用ベクター等も包含している。

[0069] ベクターは選択マーカーをさらに有し得る。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシンまたはハイグロマイシンのような薬剤に対する、薬剤耐性遺伝子を挙げられる。選択マーカーを用いれば、本発明に係るポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されたか否か、さらに、宿主細胞において実際に発現しているか否かなどを確認することができる。

[0070] 〔キット〕

また、本発明は、本発明に係るポリヌクレオチドを含んでいるキットを提供する。このキットは、本発明に係るポリヌクレオチドに加え、当該ポリヌクレオチドを挿入するためのベクター、およびベクターを用いて形質転換するための宿主細胞等から選択される少なくとも１つをさらに含み得る。また

、本発明に係るキットにおいて、本発明に係るポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドが挿入されているベクター、または当該ポリヌクレオチドを含んでいる形質転換体として含まれ得る。

[0071] このキットは、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプローブを利用するためのキットである。例えば、オートファジーの活性を測定するためのキット、オートファジーの活性に影響する化合物をスクリーニングするためのキットであり得る。したがって、このキットは、オートファジーの活性の測定もしくは当該活性に影響する化合物のスクリーニングに用いる試薬、またはコントロール用の化合物等を含み得る。本発明に係るキットは、後述する種々の方法の手順について説明されているキットの使用説明書（方法の手順が掲載されているウェブサイトを参照する形式であり得る）を含み得る。キットの使用説明書は、例えば、紙媒体、またはコンピュータによって読み取り可能な記録媒体であり得る。

[0072] 〔形質転換体の生成〕

細胞へのベクターの導入（すなわち、形質転換）は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポーレーション法などの手法によって実施され得る。

[0073] 細胞を培養することによって発現された組換えタンパク質は、細胞内または細胞外液（シグナルペプチド使用の場合）から、例えば、細胞壁破壊、硫酸アンモニウム、エタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ＨＰＬＣなどの方法により回収および／または精製することができる。

[0074] 本発明では、細胞のオートファジー（その活性または生起）を測定（定量化）するために、上記一分子ＦＲＥＴプローブ、またはそれをコードするＤＮＡを含むベクターを使用する。ここで使用する細胞は、特に真核細胞（真菌細胞（酵母、糸状菌、担子菌など）、植物細胞、および動物細胞（昆虫細胞、哺乳類細胞など））であるため、ベクターは、それらの細胞に適するベ

クター（プラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス）を使用する。

[0075] 酵母に適するベクターの例としては、ｐＧ－１、ＹＥｐ１３、ＹＣｐ５０、ｐＧＢＴ９、ｐＧＡＤ４２４、ｐＡＣＴ２（Clontech）などが挙げられる。植物細胞に適するベクターの例には、ｐＢＩベクター、Ｔ－ＤＮＡベクターなどが挙げられる。動物細胞に適するベクターの例には、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐＥＦ６／Ｍｙｃ－Ｈｉｓ、ｐＲｃ／ＣＭＶ（Invitrogen等）、ウシパピローマウイルスプラスミドｐＢＰＶ（アマシャム・ファルマシアバイオテク）、ＥＢウイルスプラスミドｐＣＥＰ４（Invitrogen）、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスなどが挙げられる。

[0076] 上記細胞へのベクターの導入（すなわち、形質転換またはトランスフェクション）は、当該分野において公知の方法にしたがって実施され得る。当該方法としては、リン酸カルシウム法、ＤＥＡＥデキストラン法、リポフェクション法、エレクトロポーレーション法、マイクロインジェクション法、リポソーム法、アグロバクテリウム法、遺伝子銃、ウイルス感染法、スフェロプラスト法およびプロトプラスト法が挙げられる。

[0077] 代替的に、上記一分子ＦＲＥＴプローブを細胞内に直接的に導入する場合、膜透過性ペプチドと結合させるか、またはリポソームに封入して、当該プローブを細胞に導入することができる。

[0078] 〔一分子ＦＲＥＴプローブの利用〕

（オートファジーを定量化する方法）

上記一分子ＦＲＥＴプローブを用いて、オートファジーの活性を定量化する方法は、細胞からの蛍光シグナルを検出することを包含している。上述の通り、上記一分子ＦＲＥＴプローブを用いれば、検出される蛍光シグナルに基づいて、容易かつ簡便に細胞におけるオートファジーの活性化を定量化し得る。当該方法の詳細を、具体例を用いて以下に説明する。なお、本項目の説明は、項目（オートファジーについて分析される対象）に記載の対象が上記一分子ＦＲＥＴプローブに含まれている実施形態に対応している。

[0079] 上記細胞は、任意の形態において試料に存在し得る。任意の形態は、例え

ば、培養されている生細胞、固定化された死細胞、組織内に存在する生細胞もしくは固定化された死細胞、または個体に存在する生細胞もしくは固定化された死細胞である。上述の通り、上記方法によれば、プローブの導入後に細胞死が起こっても、オートファジーの活性を示すシグナルが減衰しないので、細胞の生死を問わずにオートファジーの活性を定量化し得る。

[0080] 本発明の「一分子ＦＲＥＴプローブ」を用いた定量化方法の対象である生物材料の種類は特に限定されないが、当該生物材料としては、植物由来の材料又は動物由来の材料が好ましく、魚類、両生類、爬虫類、鳥類又は哺乳類（哺乳動物）等の動物由来の材料がより好ましく、哺乳動物由来の材料が特に好ましい。また、哺乳動物の種類は特に限定されないが、哺乳動物の例としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、霊長類（ヒトを除く）等の実験動物；イヌ、ネコ等の愛玩動物（ペット）；ウシ、ウマ等の家畜；ヒトが挙げられる。

[0081] また、生物材料は、個体そのものであり得（生きているヒト個体を除く）、多細胞生物の個体から採取した器官組織、または細胞であり得る。後述する通り、「生物材料用透明化試薬」と組み合わせることによって生物材料を透明化し得るので、生物材料が、多細胞動物由来の組織もしくは器官（例えば、脳全体またはその一部）、またはヒトを除く多細胞動物の個体（例えば胚等）であってもオートファジーの活性化を定量化し得る。

[0082] 上記生物材料は、上述の通り、顕微鏡観察用に固定処理された材料、または固定されていない材料であり得る。なお、固定された材料を用いる場合には、固定化処理後に、例えば２０（ｗ／ｖ）％ショ糖－ＰＢＳ溶液に、充分に（例えば、２４時間以上）浸漬する処理を行うことが好ましい。さらに、当該材料をOCT compundに包埋して液体窒素によって凍結後、ＰＢＳ中で解凍し、４（ｗ／ｖ）％ＰＦＡ－ＰＢＳ液で再度固定する処理を行うことが好ましい。

[0083] 上記方法において、上記ドナーを励起する特定の波長を有している励起光を、上記試料に照射する。当該励起光の波長は、４００～４４０ｎｍである

。

[0084] 上記方法は、オートファジーの活性化を定量化することを目的とする。したがって、当該方法では、上記ドナーおよびアクセプタから発せられた蛍光のそれぞれの強度を決定する必要がある。上記ドナーおよびアクセプタからの発せられた蛍光のそれぞれを、蛍光顕微鏡を用いて検出し、蛍光強度を数値化する。当該強度は、検出された蛍光シグナルの強度を、検出された励起光の強度によって割った値として表される。さらに、ドナーの蛍光強度を表す値を、アクセプタの蛍光強度を表す値によって割った値を、オートファジーの活性化の程度とみなす。この程度を、蛍光画像の視野全体において取得する。

[0085] （マイトファジーを定量化する方法）

マイトファジーを定量化する方法は、ミトコンドリア局在化配列を含んでいる一分子ＦＲＥＴプローブを利用する点、およびミトコンドリアのみを観察の対象としている点において、項目（オートファジーを定量化する方法）と異なる。よって、本項目における記載されるべき事項は、「オートファジー」を「マイトファジー」に、「（オートファジーについて分析される対象）」を「ミトコンドリア局在化配列」に置き換えた（オートファジーを定量化する方法）の記載と同一である。よって、（オートファジーを定量化する方法）を引用することによって、詳述を省略する。

[0086] 〔透明化処理法との組合せ〕

上記一分子ＦＲＥＴプローブを含んでいる試料は、透明化処理に供され得る。試料を透明化処理することによって、試料の深部観察を実施可能である。透明化処理としては、例えば、国際公開公報ＷＯ２０１１／１１１８７６Ａ１（米国出願番号１３／５８３，５４８）、国際公開公報ＷＯ２０１２／１４７９６５Ａ１（米国出願番号１４／１１３，６３９）、または国際公開公報ＷＯ２０１２／１６１１４３Ａ１（米国出願番号１４／１１８，１５０）に記載のような、尿素および尿素誘導体からなる群から選択される少なくとも１種の化合物、好ましくは尿素を有効成分として含んでいる溶液（以下

、単に生物材料用透明化試薬と呼ぶ）を用いて、試料を透明化処理することが挙げられる。生物材料用透明化試薬は、水溶液であることが好ましい。

[0087] 「生物材料用透明化試薬」は、必要に応じてさらにソルビトールを含んでいてもよい。ソルビトールを使用する場合、その含有量は特に限定されないが、１５（ｗ／ｖ）％以上で５０（ｗ／ｖ）％以下の範囲内であることが好ましく、１８（ｗ／ｖ）％以上で４８（ｗ／ｖ）％以下の範囲内であることがより好ましい。ソルビトールを使用する場合は、特願２０１５－００８９２８号の記載内容も参照することができる。

[0088] なお、国際公開公報ＷＯ２０１１／１１１８７６Ａ１、国際公開公報ＷＯ２０１２／１４７９６５Ａ１、国際公開公報ＷＯ２０１２／１６１１４３Ａ１、および特願２０１５－００８９２８号に記載された内容は全て、参照によって、本明細書の一部として組み込まれる。

実施例

[0089] 以下の実施例を参照して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例の記載によってその範囲を限定されない。

[0090] 〔実施例１：酸性条件下において蛍光を発するドナー用タンパク質〕

（ドナー候補物の作製）

ドナー候補物を作製する材料として、イシサンゴに属するアザミサンゴから単離された、緑色の蛍光を発する蛍光タンパク質であるＡｚａｍｉＧｒｅｎの単量体化改変体ｍＡＧ（Karasawa et al., (2003) J Biol Chem. 278, 34167-34171）を選択した。ｍＡＧに、以下の手順にしたがって変異を導入することによって、ドナー候補物を作製した。

[0091] まず、既報のプロトコル（Sawano, A. et al., (2000) Nucleic Acids Research 28, e78）にしたがって、ｍＡＧに変異Ｓ１４２ＤおよびＦ１７３Ｖ／Ｄ１８２Ｅを導入した。導入には、ｐＲＳＥＴ$_B$（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ　ｍＡＧ１／ｐＲＳＥＴ$_B$）におけるＨｕｍａｎｉｚｅｄ　ｍＡＧ１のｃＤＮＡを出発物質として用いた。オリゴヌクレオチド特異的変異誘発法によって変異Ｓ１４２ＤおよびＦ１７３Ｖ／Ｄ１８２Ｅを有する変異型ｍＡＧ（ｈｕｍａｎ

ｉｚｅｄ　ｍＡＧ４０７、以下、単にｍＡＧ４０７と呼ぶ）をコードするポリヌクレオチドを得た。上述と同様にして、ｍＡＧ４０７に対してオリゴヌクレオチド特異的変異誘発法を行い、変異Ｔ５８ＳおよびＶ６０Ｓ／Ｔ８２Ａ／Ｒ１８４Ｓ／Ｋ１９９Ｅ／Ｙ２１０Ｃ／Ｙ２１７Ａをさらに有する改変型ｍＡＧをコードするポリヌクレオチドを得て、Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ　Ａｃｉｄ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ（以下、単にＡＦＦＰ（配列番号１）と呼ぶ）と命名した。以上の通りに得られたこれらのポリヌクレオチドを、哺乳類細胞発現および蛍光強度比較のために、ｐｃＤＮＡ３およびＨＡｔａｇ－ｐｃＤＮＡ３にそれぞれサブクローニングした。

[0092]　（ドナー候補物の性質決定）

作製したドナー候補物が、本発明に係るドナーに求められる性質を満たしているか否かについて、以下のように確認した。

[0093]　＜蛍光強度＞

ＡＦＦＰおよびｍＡＧ４０７を、大腸菌（１８℃）および哺乳類細胞（Mouse embryonic fibloblast（ＭＥＦ）細胞）（３７℃）に発現させて、蛍光強度を比較した。大腸菌において発現させたＡＦＦＰおよびｍＡＧ４０７の蛍光強度の比較は、既報（Katayama, H, et al., (2008) Cell Struct. Funct. 33, 1-12）にしたがって行った。精製組換えタンパク質の濃度を合わせて、ｐＨ７．０のバッファーにおいて各蛍光タンパク質の蛍光強度を測定した。上述のKatayama, H, et al.,にしたがう、大腸菌発現させたタンパク質に対する試験を表すとき、以下では単に「大腸菌試験」と記載する。

[0094]　哺乳類細胞における蛍光強度の比較を次のように行った。ＨＡ－ｔａｇ－ＡＦＦＰ／ｐｃＤＮＡ３およびＨＡ－ｔａｇ－ｍＡＧ４０７／ｐｃＤＮＡ３のプラスミドＤＮＡを、Lipofectamine（登録商標） 2000を用いてＭＥＦ細胞に導入した。導入の１日後に、細胞を回収して細胞溶解液を調製し、蛍光強度およびタンパク質の発現量を測定した。タンパク質の発現量は、抗ＨＡ抗体（ラットモノクローナル抗体、clone 3F10、Roche）を用いたウエスタンブロットで測定した。蛍光強度の比較は、測定された蛍光強度の実測値をタ

ンパク質の発現量で補正して行った。上述のように、ＭＥＦ細胞において発現させたタンパク質に対する試験を表すとき、以下では単に「ＭＥＦ細胞試験」と記載する。

[0095] 大腸菌試験およびＭＥＦ細胞試験の両方において、蛍光強度の測定において、ＡＦＦＰを、励起ピーク波長（４０６ｎｍ）の励起光によって励起させ、ｍＡＧ４０７を、励起ピーク波長（４０７ｎｍ）の励起光によって励起させた。また、大腸菌試験およびＭＥＦ細胞試験の両方において、蛍光強度の数値化およびプロットにおいて、ＡＦＦＰの発した蛍光の強度を１に設定した。

[0096] 以上の結果を図１に示す。図１の上段は、大腸菌から精製した組換えタンパク質の結果を表し、中段は、ＭＥＦ細胞に発現させた蛍光タンパク質の結果を表し、下段は、それぞれの結果を数値化した比較結果を示す。図１から明らかなように、ＡＦＦＰは、ｍＡＧ４０７より、大腸菌試験において２．５倍、ＭＥＦ細胞試験において約１４倍も高い蛍光強度を示した。したがって、ＡＦＦＰは、高い蛍光強度という点において、本発明に係るドナーとして好適であることが分かった。

[0097] ＜ｐＨ変化に対する蛍光強度の安定性の確認＞

次に、酸性条件下におけるＡＦＦＰの蛍光強度の安定性を調べるために、ＡＦＦＰが中性～酸性において示す蛍光強度を測定した。ＡＦＦＰの比較対象として、緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰおよびＳａｐｐｈｉｒｅ）、黄色蛍光タンパク質（Ｙｐｅｔ）、ならびに赤色蛍光タンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙおよびＴａｇ－ＲＦＰ）から適宜選択して使用した。

[0098] ＥＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙを比較対象として大腸菌試験を実施して、ＡＦＦＰにおける蛍光強度の変化のｐＨ依存性を調べた。当該大腸菌試験では、得られた精製組換えタンパク質からの蛍光強度を、ｐＨ４．０～８．０の範囲において０．５ずつ変化させた９点のｐＨ条件において測定した。各蛍光タンパク質の各ｐＨ条件における蛍光強度をプロットした。なお、プロットでは、各蛍光タンパク質の最大蛍光強度を１に設定し、それ以外のｐＨ

条件における蛍光強度を１に対する相対値としてプロットした。

[0099] ＥＧＦＰ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｙｐｅｔ、ｍＣｈｅｒｒｙおよびＴａｇ－ＲＦＰを比較対象として大腸菌試験を実施して、ＡＦＦＰの蛍光強度の変化のｐＨ依存性を調べた。当該大腸菌試験では、ｐＨ７．０および４．０の場合の蛍光強度を測定した。そして、各蛍光タンパク質の２つのｐＨ条件における蛍光強度を比較した。なお、ｐＨ７．０における各タンパク質からの蛍光強度を１に設定した。

[0100] 上述の２つの蛍光強度の測定において、各タンパク質の励起波長／蛍光波長は以下の通りである。ＡＦＦＰ：４１０ｎｍ／４９８ｎｍ、ＥＧＦＰ：４９０ｎｍ／５０７ｎｍ、Ｙｐｅｔ：５００ｎｍ／５３０ｎｍ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ：４００ｎｍ／５１０ｎｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ：５８０ｎｍ／６１０ｎｍ、ＴａｇＲＦＰ:５５０ｎｍ／５８４ｎｍ。

[0101] 以上の２つの試験の結果を図２に示す。図２において、上段は２つの比較対象を用いた大腸菌試験の結果を表し、下段は５つの比較対象を用いた大腸菌試験の結果を表す。図２の上段から明らかな通り、ＡＦＦＰは、ＥＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙと異なり、ｐＨ４．０～８．０においてほぼ一定の蛍光強度を有している。図２の下段から明らかな通り、ＡＦＦＰは、比較対象にＹｐｅｔ、ＳａｐｐｈｉｒｅおよびＴａｇＲＦＰをさらに加えても、ｐＨの変化に影響を受けない蛍光強度を有していることが分かった。つまり、ＡＦＦＰは、ｐＨの変化に依存しない蛍光強度を有している点において、本発明に係るドナーとしての適性を有していた。

[0102] ＜酸性プロテアーゼによる分解に対する抵抗性の確認＞

３つの反応バッファー（ｐＨ７．０／ペプシンなし、ｐＨ４．０／ペプシンなし、ｐＨ４．０／０．０５％のペプシン）において、精製組換えタンパク質をインキュベートする処理を含む大腸菌試験を行った。上記反応バッファーは、２５ｍＭのＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７．０）または酢酸バッファー（ｐＨ４．０）に、１１９ｍＭのＮａＣｌ、２．５ｍＭのＫＣｌ、２ｍＭの$CaCl_2$、および２ｍＭの$MgCl_2$、３０ｍＭのグルコースとなるよ

う調製されたものである。上記反応バッファーに精製した各タンパク質を加えた混合物を、２時間にわたって３７℃においてインキュベートした。当該混合物を２つに分けて、それぞれを蛍光強度測定およびウエスタンブロットに供した。蛍光強度の測定は、ｐＨ７．０のバッファーによって上記混合物を２００倍に希釈してｐＨを調製した後に行った。ウエスタンブロットによるタンパク質の検出には、以下の抗体を使用した。ＡＦＦＰ：ウサギ抗Ａｚａｍｉ－Ｇｒｅｅｎ抗体（MBL、PM052M）；ならびにＥＧＦＰおよびＹｐｅｔ：ウサギ抗ＧＦＰ抗体（CST、＃2555）。

[0103] 以上の結果を図３に示す。図３の上段は、異なる条件にさらした３つのタンパク質をウエスタンブロットによって検出した結果を表し、図３の下段は、異なる条件にさらした３つのタンパク質の蛍光強度を測定した結果を表す。図３の上段に示す通り、従来の蛍光タンパク質は酸性プロテアーゼによって分解を受けるが、ＡＦＦＰは分解を受けない。図３の下段に示す通り、この点は明白であり、かつ酸性条件における蛍光強度の安定性も改めて確認された。したがって、ＡＦＦＰは、酸性プロテアーゼによる分解に対する強い抵抗性を示すことが分かった。

[0104] （ＡＦＦＰ－ｌｉｎｋ－ｍＣｈｅｒｒｙを用いた、２つの蛍光タンパク質の分解耐性の評価）

図２に示す通り、従来の蛍光タンパク質のうちでは、ｍＣｈｅｒｒｙが酸性条件における蛍光強度が高かった。そこで、ＡＦＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙのいずれが酸性プロテアーゼによる分解に対してより高い耐性を示すかを以下のように評価した。

[0105] 酸性環境およびリソソームプロテアーゼに抵抗性のある蛍光タンパク質は、オートファジーによってリソソーム内腔に蓄積し、高輝度の構造体（ドットと呼ぶ）を形成する。ＡＦＦＰとｍＣｈｅｒｒｙとの間においてこのドット形成能を比較した。同一条件、同一細胞においてＡＦＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙのドット形成能を比較するために、ｍＣｈｅｒｒｙ－ｌｉｎｋｅｒ－ＡＦＦＰを作製した。当該融合タンパク質を用いることで、ｍＣｈｅｒｒｙ

とＡＦＦＰの発現量に差が生じずに同一細胞内において、同一条件のもとに評価が可能となる。

[0106] まず、終止コドンを含んでいないｍＣｈｅｒｒｙのＢａｍＨＩ／ＳａｃＩ断片、（ＧＧＧＧＳ）$_3$リンカーのＳａｃＩ／ＸｈｏＩ断片およびＡＦＦＰのＸｈｏＩ／ＥｃｏＲＩ断片を、ｐｃＤＮＡ３のＢａｍＨＩ／ＥｃｏＲＩ断片とライゲーションすることによって、ｍＣｈｅｒｒｙ－ｌｉｎｋｅｒ－ＡＦＦＰ／ｐｃＤＮＡ３を作製した。ＭＥＦ細胞を３５ｍｍφのガラスボトムディッシュに播き、５％ウシ胎児血清を含んでいるＤＭＥＭ培地において一晩培養した。ｍＣｈｅｒｒｙ－ｌｉｎｋｅｒ－ＡＦＦＰ／ｐｃＤＮＡ３プラスミドＤＮＡを、Lipofectamine（登録商標） 2000（Gibco、BRL）を用いてＭＥＦ細胞に導入した。導入から２４時間後、培地をＨＢＳＳに置換して３７℃において４時間培養し、オートファジーを誘導した後にFV1000（Olympus）を用いて画像を取得した。リソソーム内腔は酸性（ｐＨ４～５）であり、これによる蛍光強度低下の影響を排除するため、５０ｍＭのＮＨ$_4$ＣＩ処理によってリソソーム内腔を中性化した後の画像も取得した。得られた画像をFV10-ASW（Olympus）を用いて解析し、各蛍光タンパク質における「ドットの蛍光輝度／細胞質の蛍光輝度」をドット形成能の指標として比較した。

[0107] 比較の結果を図４に示す。図４の上段は、得られた４つの画像を示しており、下段は、ドット形成能を数値化した結果を示している。図４に示す通り、ＡＦＦＰは、酸性および中性において、ドット形成能に大きな差異を示さない。一方で、ｍＣｈｅｒｒｙは、中性化すると新たなドットが出現するが、ＡＦＦＰより低いドット形成能しか示さない。したがって、ＡＦＦＰは、従来の蛍光タンパク質より、酸性プロテアーゼによる分解に対して高い耐性を有していることが分かった。

[0108] これまでの試験の結果として、ＡＦＦＰは、高い蛍光強度、ｐＨに依存しない安定した蛍光強度、および酸性プロテアーゼによる分解に対する強い抵抗性のいずれにおいても、本発明に係るドナーとして極めて高い適性を示すことが分かった。したがって、ＡＦＦＰを、本発明に係る一分子ＦＲＥＴプ

ローブにおけるドナーに採用した。

[0109] 〔実施例２：基本骨格の一分子ＦＲＥＴプローブ〕

（オートファジープローブ“Ｓｉｇｎａｌ Ｒｅｔａｉｎｉｎｇ Ａｕｔｏｐｈａｇｙ Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ”（ＳＲＡＩ）の作製）

ＡＦＦＰの特性を利用して、酸性条件下でのプロテアーゼ感受性の差の大きい２つの蛍光タンパク質を組み合せたＦＲＥＴプローブのＳＲＡＩ（Ｓｉｇｎａｌ Ｒｅｔａｉｎｉｎｇ Ａｕｔｏｐｈａｇｙ Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ）を、以下のように設計した。ＳＲＡＩの模式的な構成を図５の上段に示す。

[0110] ＡＦＦＰとＦＲＥＴペアのＹＦＰとを組み合わせ、より高感度および定量的にオートファジーを検出して可視化するプローブを作製した。配置順、ＹＦＰの種類、およびリンカー部分を検討したところ、Ｙｐｅｔ－（ＧＧＧＧＳ）$_3$リンカー－ＡＦＦＰの順に連結したプローブ（Ｙｐｅｔ－Ｌｉｎｋｅｒ－ＡＦＦＰ（ＳＲＡＩ；配列番号２））が、蛍光強度などにおいて優れていた。検討に用いた大腸菌発現用ベクター（ＳＲＡＩ／ｐＲＳＥＴ$_B$）は、ＹｐｅｔのＢａｍＨＩ／ＳａｃＩ断片と、（ＧＧＧＧＳ）$_3$リンカーのＳａｃＩ／ＸｈｏＩ断片と、ＡＦＦＰのＸｈｏＩ／ＥｃｏＲＩ断片と、ｐＲＳＥＴ$_B$のＢａｍＨＩ／ＥｃｏＲＩ断片とをライゲーションして作製した。

[0111] ＜酸性プロテアーゼによる分解に対する抵抗性の確認＞の項目における蛍光強度測定と同じ手順を、ＳＲＡＩ／ｐＲＳＥＴ$_B$を用いて行った。蛍光強度測定は、ＳＲＡＩにおけるＡＦＦＰの部分に対する４１０ｎｍの励起光を照射すること、およびＹｐｅｔの部分に対する５００ｎｍの励起光を照射することによって実施した。

[0112] この結果を図５に示す。図５の中段は、３つの条件におけるＡＦＦＰを励起した結果を示し、下段は、３つの条件におけるＹｐｅｔを励起した結果を示す。図５の中段に示す通り、４１０ｎｍの励起光を照射した場合、ＳＲＡＩは、ＡＦＦＰ、およびＡＦＦＰからエネルギーの供与を受けたＹｐｅｔの両方からの蛍光に基づく２つのピークを、中性において示した。ＳＲＡＩは

、酸性においてＹｐｅｔからの蛍光のピークが小さくなった。ペプシン添加の酸性において、ＳＲＡＩは、ＡＦＦＰからの蛍光に基づく単一のピークのみを示した。

[0113] 一方で、図５の下段に示す通り、５００ｎｍの励起光を照射した場合、ＳＲＡＩは中性において単一の強いピークを示し、ＳＲＡＩは酸性において単一の弱いピークを示した。そして、ペプシン添加の酸性において、ＳＲＡＩは蛍光を発しなかった。図３に示す通り、Ｙｐｅｔが分解されたためである。

[0114] 以上のように、ＳＲＡＩは、オートファジーの活性化を定量化するための非常に優れたプローブであると分かった。ＳＲＡＩが優れたプローブであることが確認できたため、ＳＲＡＩをコードするポリヌクレオチド（配列番号３）を哺乳類細胞発現用ベクター（ｐｃＤＮＡ３）にサブクローニングして、ＳＲＡＩ／ｐｃＤＮＡ３を得た。

[0115] （ＳＲＡＩを用いた哺乳類細胞におけるオートファジーの検出）

ＳＲＡＩ／ｐｃＤＮＡ３をＭＥＦ細胞に導入することによってＳＲＡＩを発現させ、オートファジーの観察に適しているかを評価した。比較対照としてｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰを用いた。ｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰが、既報（Elsa-Noah N'Diaye, et al., (2009) EMBO reports 10, 173-179）に示されているアミノ酸配列と同等になるように、終止コドンを含んでいないｍＣｈｅｒｒｙのＢａｍＨＩ／ＨｉｎｄＩＩＩ断片と、Ｎ末端にリンカー（SGLRSAGPGTSLYKKAGFPVAT）をコードするｃＤＮＡを付加したＥＧＦＰのＨｉｎｄＩＩＩ／ＥｃｏＲＩ断片と、ｐｃＤＮＡ３のＢａｍＨＩ／ＥｃｏＲＩ断片とをライゲーションすることによって、ｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰ／ｐｃＤＮＡ３を作製した。Lipofectamine（登録商標） 2000を用いてＳＲＡＩ／ｐｃＤＮＡ３またはｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰ／ｐｃＤＮＡ３をＭＥＦ細胞に導入した。１日後、培地を５％ウシ胎児血清を含んでいるＤＭＥＭ培地（栄養培地）からＨＢＳＳに置換して３７℃において２時間培養し、オートファジーを誘導した。対照群を栄養培地のまま培養した。

[0116] イメージングにおいて、カメラとしてCool SNAP HQ2 (Photometrics)、対物レンズとしてUplanFl 40x oil N.A.1.30 (Olympus)、フィルターキューブとしてU-MCFPHQ（ＡＦＦＰ用）、U-MYFPHQ（Ｙｐｅｔ用）、U-MRFPHQ（ｍＣｈｅｒｒｙ用）およびU-MGFPHQ（ＥＧＦＰ用）を使用した（各キューブはOlympus製）。画像の取得および解析を、MetaMorph (Universal Imaging Corporation) を用いて行った。ＳＲＡＩのレシオ画像をＡＦＦＰ／Ｙｐｅｔ、ｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰのレシオ画像をｍＣｈｅｒｒｙ／ＥＧＦＰに基づいて、０～１の範囲のＩＭＤ表示において生成した。

[0117] その結果を図６に示す。図６は、ＳＲＡＩおよびｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰによって、培養細胞におけるオートファジーの活性化を定量化した結果を示す。図６のスケールバーは２０μｍである。図６に示すように、オートファジーによるリソソーム移行、Ｙｐｅｔの分解の結果として、ＡＦＦＰからの蛍光に基づく、輝点（ドット）およびレシオ画像における赤点が観察された。一方で、ｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰを発現している細胞には、輝点および赤点はほとんど観察されなかった。したがって、ＳＲＡＩはオートファジーの活性化を良好に定量化し得ることが分かった。

[0118] （固定後の哺乳類細胞におけるオートファジーの検出）

続いて、固定後の細胞においても、ＳＲＡＩがオートファジーを検出できるかを調べた。ＳＲＡＩのみを観察した点、および生細胞の観察後に、固定した同視野の細胞をふたたび観察した点を除いて、上述のオートファジーの検出と同じ操作を行った。４％ＰＦＡを含むＰＢＳで生細胞を室温において１５分固定し、ＨＢＳＳを用いて５分×３回の洗浄し、２度目の観察に固定細胞を供した。

[0119] 図７は、ＳＲＡＩを用いて培養細胞におけるオートファジーの活性化を細胞固定後に定量化した結果を示す。図７のスケールバーは２０μｍである。図７に示すように、固定の前後において画像にほとんど変化が認められなかった。したがって、ＳＲＡＩを用いれば、細胞固定後にも、生細胞と同様にオートファジーのシグナルを検出することができた。

[0120] （ＳＲＡＩを用いた動物個体内におけるオートファジーの検出）

次に、ＳＲＡＩが、動物個体内におけるオートファジーを検出可能であるかを調べた。１ｍｇ／ｍＩのＳＲＡＩ／ｐｃＤＮＡ３とTransIT（登録商標）-QR Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus Bio LLC) とを１：２０９の比率に混合した溶液を、マウスの体重のグラム数の１／１０±０．１ｍＬ量において７週齢のオスのＣ５７ＢＬ６Ｊマウスに尾静脈注射した。注射の２４時間後から、食餌有り（control）または水のみ（starvation）の条件において、マウスを２４時間飼育した。それから、マウスの体重のグラム数の１／１００ｍＩ量におけるソムノペンチルによってマウスを麻酔した後、４％ＰＦＡを含むＰＢＳを用いて灌流固定した。このマウスの肝臓から薄切切片を作製し、イメージングに供した。イメージングを、対物レンズにUplanApo 20 x N.A.0.70を用いた点を除いて、細胞のイメージングと同様に実施した。細胞の場合と同様に画像の取得および解析を行った。レシオ画像を、０～０．４の範囲におけるＩＭＤ表示によって生成した。

[0121] 図８は、ＳＲＡＩを用いて２４時間の飢餓状態を経たマウスの肝臓におけるオートファジーの活性化を定量化した結果を示す。図８のスケールバーは５０μｍである。図８に示すように、ＡＦＦＰからの蛍光に基づく、輝点（ドット）およびレシオ画像における赤点は、controlと比べてstarvationにおいて、顕著に増加していた。したがって、ＳＲＡＩを用いれば、動物個体におけるオートファジーのシグナルを検出することができた。

[0122] 〔実施例３：マイトファジー検出用の一分子ＦＲＥＴプローブ〕

（マイトファジー検出用のミトコンドリア局在型ＳＲＡＩコンストラクトの作製）

次に、マイトファジー（ミトコンドリアのオートファジー）を検出するため、ミトコンドリア局在性を向上させたプローブを発現するコンストラクトを設計した。当該プローブとして、ミトコンドリア局在化シグナル配列がＳＲＡＩに付加された形態を想定した。

[0123] Katayama, H, et al., (2011) Chem. & Biol. 18, 1042-1052と同様の実験

系を本実施例において採用するために、以下の材料を準備した。ヒトｃｏｘＶＩＩＩシグナルペプチド配列（MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSLPPEG）を２回繰り返した配列（２ｘＣｏｘＶＩＩＩ　ｓｉｇｎａｌ　ｓｅｑ）がＳＲＡＩのＮ末端側に配置されているプローブをコードするポリヌクレオチド；誘導型哺乳類細胞発現用ベクター（ｐＭＣＳＴＲＥ３）；および発現誘導剤doxycycline（sigma）。なお、上記実験系では、コンストラクトを細胞に導入し、発現誘導剤によってタンパク質を発現誘導し、その後に発現誘導剤を培地から除去し、局在化を確実にする。

[0124] 2xCoxVIII signal seqのＫｐｎＩ／ＢａｍＨＩ断片、ＳＲＡＩのＢａｍＨＩ／ＮｈｅＩ断片とｐＭＣＳＴＲＥ３ＧのＫｐｎＩ／ＮｈｅＩ断片とをライゲーションし、ミトコンドリア局在型ＳＲＡＩコンストラクト（ｍｔ－ＳＲＡＩ／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇ）を得た。また、ＳＲＡＩ断片の代わりにｍＫｅｉｍａのＢａｍＨＩ／ＮｈｅＩ断片を用いて、ｍｔ－ｍＫｅｉｍａ／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇを作製して、局在化の比較対照として用いた。下記（１）または（２）の組合せのプラスミドＤＮＡを、Lipofectamine（登録商標） 2000を用いてＭＥＦ細胞に導入した。

（１）５μｇずつのｍｔ－ＳＲＡＩ／ｐＭＣＳＴＲＥ３ＧおよびＴｅｔ－Ｏｎ調節ベクター（ｐＥＦ１α－Ｔｅｔ３Ｇ（Takara））、

（２）５μｇずつのｍｔ－ｍＫｅｉｍａ／ｐＭＣＳＴＲＥ３ＧおよびＴｅｔ－Ｏｎ調節ベクター。

導入から６時間後に、１μｇ／ｍＬのdoxycyclineを含む栄養培地に置換した。２４時間後に発現誘導を停止させ、doxycyclineなしの栄養培地に培地を置き換えて細胞質に残存するプローブの局在化を促してから、１８時間後にイメージングに供した。しかし、ｍｔ－ＳＲＡＩは、ｍｔ－ｍＫｅｉｍａに比べて低いミトコンドリア局在効率を示した（図示せず）。これは、ｍｔ－ＳＲＡＩの分子量が大きいために生じたと考えられた。細胞質に残存するプローブはマイトファジーの正確な検出を妨げるため、より良好な局在を示すプローブを発現するコンストラクトの構成を検討した。

[0125] ユビキチン－プロテアソーム系は、デグロン配列を認識して細胞質における特異的なタンパク質分解を行っている。ｍｔ－ＳＲＡＩにこのデグロン配列を付加することによって、細胞質に残存する画分を分解させて、より良好なミトコンドリア局在の達成を目指した。ミトコンドリアマトリクス内にはユビキチン-プロテアソーム系は存在しない。よって、所望の通りに局在を果たしたプローブは分解から免れるので、デグロン配列の使用は、蛍光強度低下などの悪影響を生じない。適度な分解誘導能を有しているデグロン配列を検討するために、以下の配列が付加されたｍｔ－ＳＲＡＩを発現するコンストラクトを作製した。ＣＬ１配列（ACKNWFSSLSHFVIHL）、マウスオルニチンデカルボキシラーゼ４２１番目からＣ末端までのアミノ酸配列（ＰＥＳＴ配列:PRSRPMWQLMKQIQSHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV）およびこれらの組合せ。ここまでにおいて説明したコンストラクトが発現するプローブの模式的な構成を図９に示す。

[0126] 図９に示す、デグロン配列を含むプローブを発現するコンストラクトを以下のように作製した。終止コドンを含まないｍｔ－ＳＲＡＩのＫｐｎＩ／ＮｈｅＩ断片と、ｐＭＣＳＴＲＥ３ＧのＫｐｎＩ／ＢａｍＨＩ断片と、ＣＬ１のＸｂａＩ／ＢａｍＨＩ断片とをライゲーションして、ｍｔ－ＳＲＡＩ－ＣＬ１／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇを作製した。ｍｔ－ＳＲＡＩ－ＰＥＳＴ／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇ、ｍｔ－ＳＲＡＩ－ＣＬ１ＣＬ１／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇ、またはｍｔ－ＳＲＡＩ－ＣＬ１ＰＥＳＴ／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇの作製には、ＣＬ１のＸｂａＩ／ＢａｍＨＩ断片に代えて、ＰＥＳＴのＸｂａＩ／ＢａｍＨＩ断片、ＣＬ１ＣＬ１のＸｂａＩ／ＢａｍＨＩ断片、またはＣＬ１ＰＥＳＴのＸｂａＩ／ＢａｍＨＩ断片を使用した。

[0127] ０．５μｇずつの上記コンストラクトのいずれかのプラスミドＤＮＡと、ｐＥＦ１α－Ｔｅｔ３Ｇとを、Lipofectamine（登録商標）2000を用いてＭＥＦ細胞に導入した。導入から６時間後に、１μｇ／ｍＬのdoxycyclineを含む栄養培地に置換し、その２４時間後に細胞をイメージングに供した。局在効率をより厳密に評価するため、発現誘導の停止を行わなかった。イメージン

グを、哺乳類細胞におけるオートファジーの検出と同じ条件において実施した。画像の取得および解析を、MetaMorphを用いて行い、「核内蛍光強度（細胞質と同等の蛍光強度。ミトコンドリアがないのでその蛍光の混入がない）／ミトコンドリア部分の蛍光強度」を局在効率の指標として評価した。

[0128] その結果を図１０に示す。図１０は、図９に示すプローブを用いて、ミトコンドリアへの局在化を確認した結果を示す。図１０のスケールバーは２０μｍである。図１０の各パネルの下に示されている数値は、「核内蛍光強度／ミトコンドリア部分の蛍光強度」であり、小さいほどミトコンドリアへの局在効率が高いことを示す。図１０から明らかなように、ｍｔ－ＳＲＡＩ－ＣＬ１ＰＥＳＴが、ミトコンドリアへの局在効率が最も高かったので、以降の試験にこれを使用した。ｍｔ－ＳＲＡＩ－ＣＬ１ＰＥＳＴの局在効率は、デグロン配列を付加する前と比べて、ｍｔ－ｍＫｅｉｍａと同等のレベルまで改善された。以下において、ｍｔ－ＳＲＡＩ－ＣＬ１ＰＥＳＴを単にｍｔ－ＳＲＡＩ’と記載する。

[0129] （ｍｔ－ＳＲＡＩ’を用いた哺乳類細胞におけるマイトファジーの検出）

ｍｔ－ＳＲＡＩ’を発現するコンストラクトをＭＥＦ細胞に導入して、マイトファジーの可視化および検出を試みた。０．５μｇずつのｍｔ－ＳＲＡＩ／ｐＭＣＳＴＲＥ３Ｇ、ｐＥＦ１α－Ｔｅｔ３Ｇおよびマイトファジーに必要な因子であるｍＣｈｅｒｒｙ－Ｐａｒｋｉｎ／ｐｃＤＮＡ３を、Lipofectamine（登録商標） 2000を用いてＭＥＦ細胞に導入した。導入から６時間後に１μｇ／ｍｌのdoxycyclineを含む栄養培地に置換した。２４時間後に、発現誘導を停止させ、doxycyclineなしの栄養培地に置換して細胞質に残存するプローブの局在化および分解を促した。１８時間後に、３０μＭのCarbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone（ＣＣＣＰ）を用いてマイトファジーを誘導し、さらに１８時間後に細胞をイメージングに供した。さらに、細胞内酸性環境が中性化してもシグナルが消失しないことを示すため、５０ｍＭのNH_4Clを加えて画像を再取得した。イメージング、ならびに画像の取得および解析には、固定後の哺乳類細胞におけるオートファジーの検出と同じ条件

を適用した。レシオ画像を、０～０．４の範囲におけるＩＭＤ表示によって生成した。

[0130] 結果を図１１に示す。図１１は、図９に示すプローブを用いて、マイトファジーを検出した結果を示す。図１１におけるスケールバーは２０μｍである。図１１に示すように、ＣＣＣＰによるマイトファジーの誘導によって、ＣＣＣＰの添加前と比べて、レシオ画像において赤点の顕著な増加が観察された。また、NH_4Clによるリソソーム内腔中性化後もそのシグナルは消失しなかった。以上のことから、本発明の一分子ＦＲＥＴプローブを用いれば、適切な配列をＳＲＡＩに付与することによって、種々のオートファジーの活性化を定量化し得ることが分かった。

[0131] 〔比較例：Ｒｏｓｅｌｌａの酸性条件、酸性プロテアーゼへの抵抗性評価と哺乳類細胞におけるオートファジーの検出〕

Rosadoらが報告したプローブ（Ｒｏｓｅｌｌａ）が、ＳＲＡＩと比較してオートファジーの測定に適しているかを検討した。Ｒｏｓｅｌｌａのコンストラクトを大腸菌にて発現し、精製した組換え蛍光タンパク質を用い、既報（Katayama, H,他(2008) Cell Struct. Funct. 33, 1-12）にならい、pH7.0、pH4.0（0.05%ペプシンあり、なし）の反応バッファー中、37℃で2時間インキュベートし、蛍光測定に供した。蛍光測定の際は、各サンプルをpH7.0のバッファーで200倍希釈してpHをあわせてから測定を行った。反応バッファーは、25mM HEPESバッファー（pH7.0）または酢酸バッファー（pH4.0）に119mM NaCl、2.5mM KCl、2mM $CaCl_2$、2mM $MgCl_2$、30mM Glucoseとなるよう調製されたものである。大腸菌試験を実施した結果、酸性条件（pH4.0）、酸性プロテアーゼ処理により、Rosellaの構成成分のDsRed.T3、SEPともに蛍光強度が低下していた（図１２のグラフを参照）。

[0132] また、MEF細胞にRosellaを導入し、オートファジーの可視化、検出を試みた。Lipofectamine（登録商標） 2000を用いてRosella/pcDNA3をMEF細胞に導入し、一日後、５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ培地（栄養培地）からHBSSに培地を置換して37℃で2時間培養し、オートファジーを誘導した。対照群は

栄養培地のまま培養した。イメージングには、カメラにCool SNAP HQ2 (Photometrics)、対物レンズにUplanFl 40x oil N.A.1.30 (Olympus)、フィルターキューブにU-MRFPHQ (DsRed.T3) 及びU-MGFPHQ (SEP) を使用した(キューブは全てOlympus)。画像の取得、解析はＭｅｔａＭｏｒｐｈ（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）で行い、レシオ画像をDsRed.T3/SE P、IMD表示の範囲は0-1で作製した（図１２におけるスケールバーは２０μｍ）。

[0133] 図１２における画像部分に示す通り、SRAIで観察されたオートファジーによる高レシオの構造体は、Rosellaではほとんど観察されなかった。

[0134] 本発明は、上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態および実施例にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

[0135] 本発明は、種々の生命現象の探索、インビトロにおける有用な細胞の開発、およびオートファジー関連疾患の処置など、研究、細胞工学および医療の分野に利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] リソソームまたは液胞の内部において酵素分解を受ける蛍光タンパク質からなるアクセプタ、および配列番号１によって表されるアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性のアミノ酸配列を有しているドナーを含んでいる、一分子ＦＲＥＴプローブ。

[請求項2] 上記蛍光タンパク質はオワンクラゲ由来黄色蛍光タンパク質である、請求項１に記載の一分子ＦＲＥＴプローブ。

[請求項3] 上記蛍光タンパク質は、ＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｙｐｅｔ、Ｔｏｐａｚ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ｍＥＹＦＰ、Ｖｅｎｕｓ、ｍＶｅｎｕｓおよびＴａｇＹＦＰからなる群から選択される、請求項１または２に記載の一分子ＦＲＥＴプローブ。

[請求項4] ミトコンドリア局在化配列をさらに含んでいる、請求項１～３のいずれか１項に記載の一分子ＦＲＥＴプローブ。

[請求項5] 請求項１～４のいずれか１項に記載の一分子ＦＲＥＴプローブをコードしている、ポリヌクレオチド。

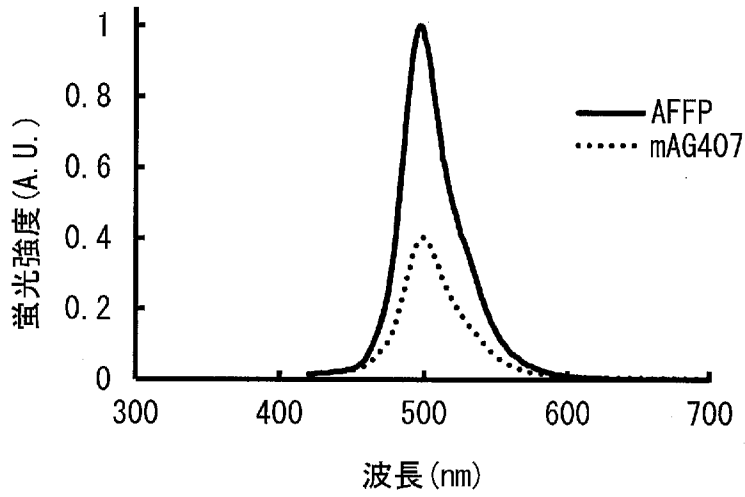
[請求項6] 請求項５に記載のポリヌクレオチドを含んでいる、キット。

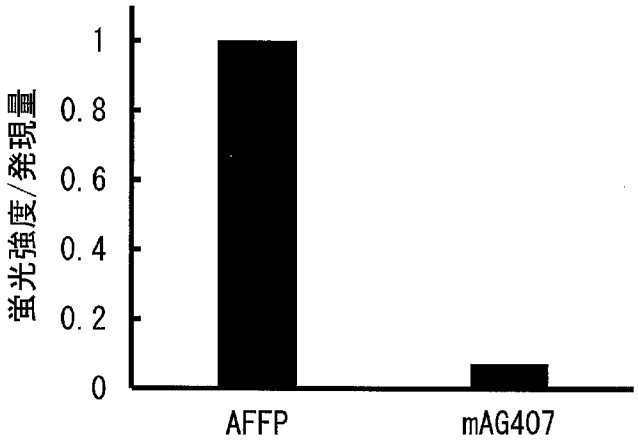
[請求項7] 請求項１～４のいずれか１項に記載の一分子ＦＲＥＴプローブを含んでいる細胞からの蛍光シグナルを検出することを包含している、オートファジーの活性を定量化する方法。

[請求項8] 上記細胞が固定されている、請求項７に記載の方法。

[図1]

図 1

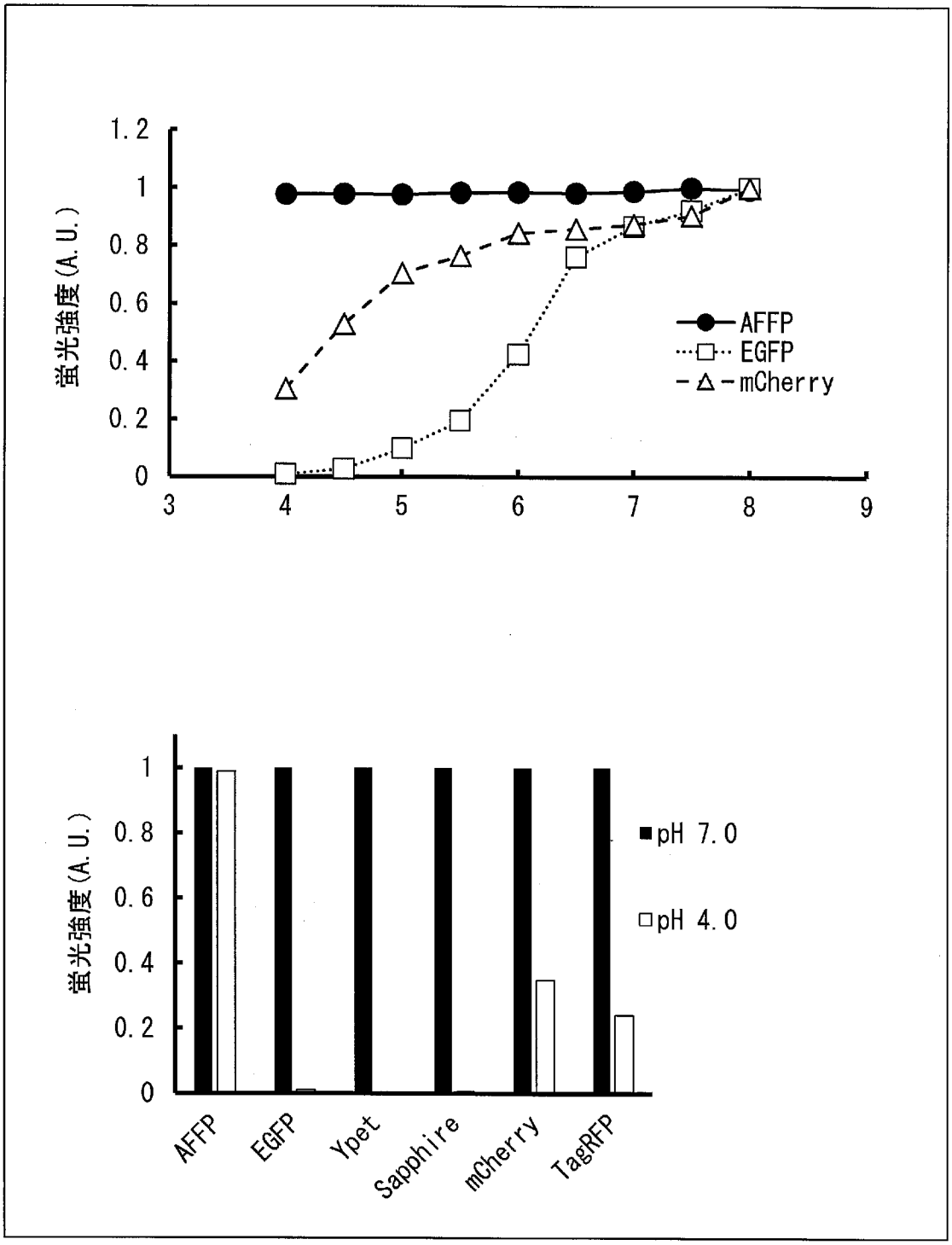




Name	Relative fluorescence Escherichia coli (18 ℃)	MEF (37 ℃)
AFFP	1	1
mAG407	0.40	0.073

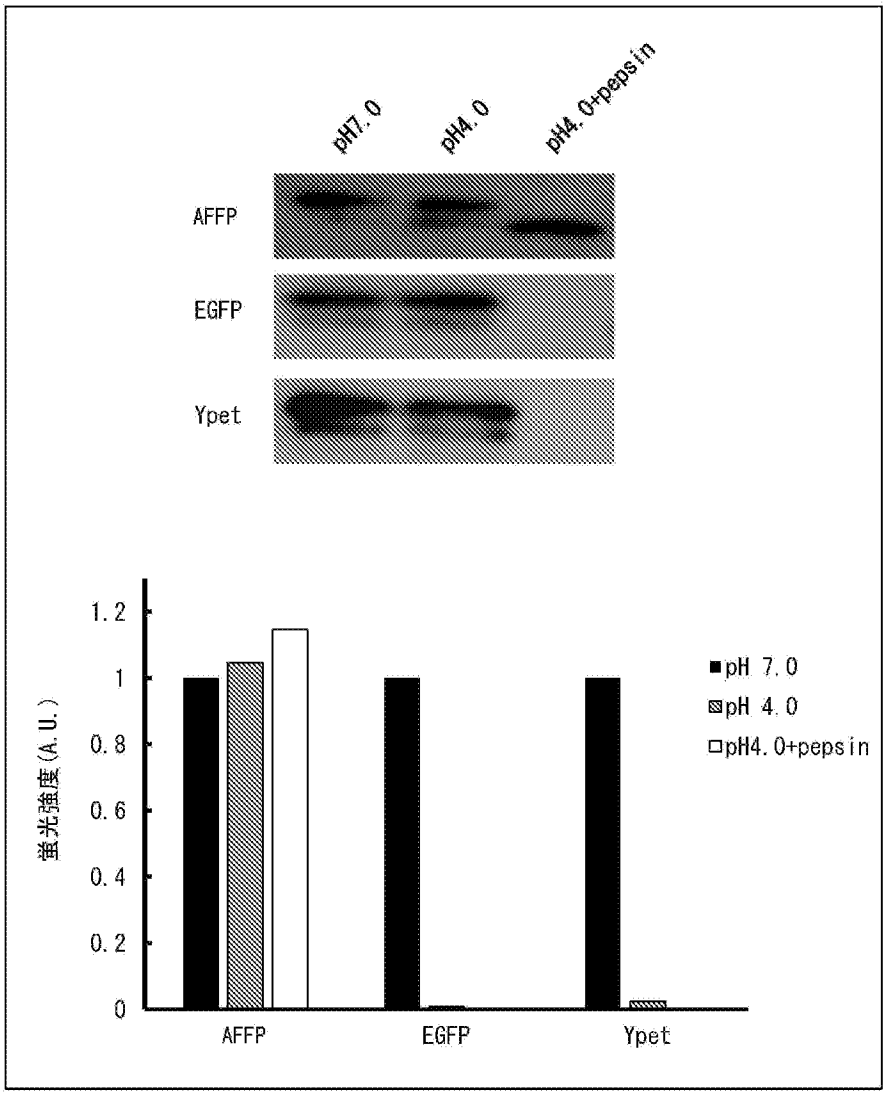
[図2]

図 2


蛍光強度(A.U.)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
3
4
5
6
7
8
9
AFFP
EGFP
mCherry
蛍光強度(A.U.)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
pH 7.0
pH 4.0
AFFP
EGFP
Ypet
Sapphire
mCherry
TagRFP

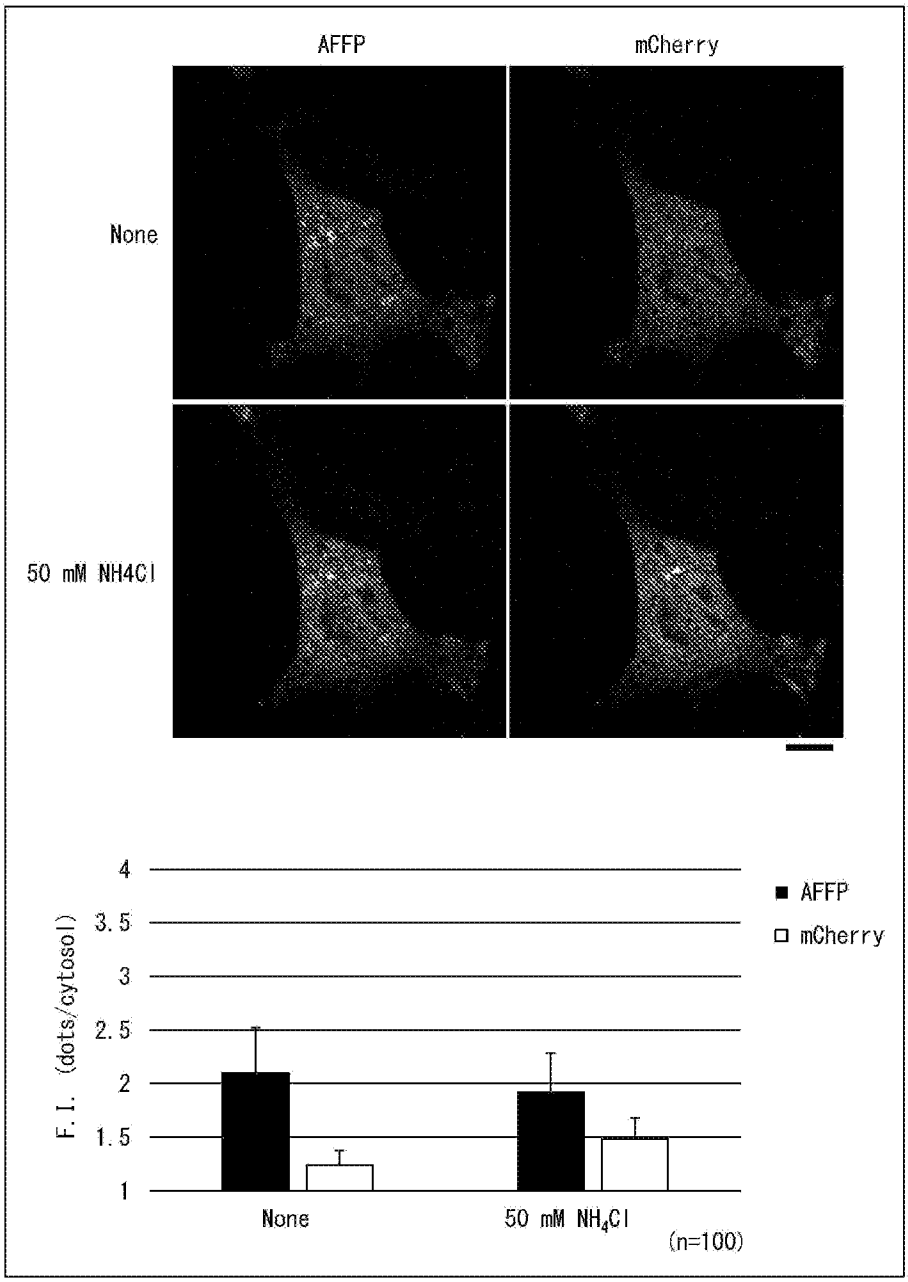
[図3]

図 3


pH7.0
pH4.0
pH4.0+pepsin
AFFP
EGFP
Ypet
蛍光強度(A.U.)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
AFFP
EGFP
Ypet
pH 7.0
pH 4.0
pH4.0+pepsin

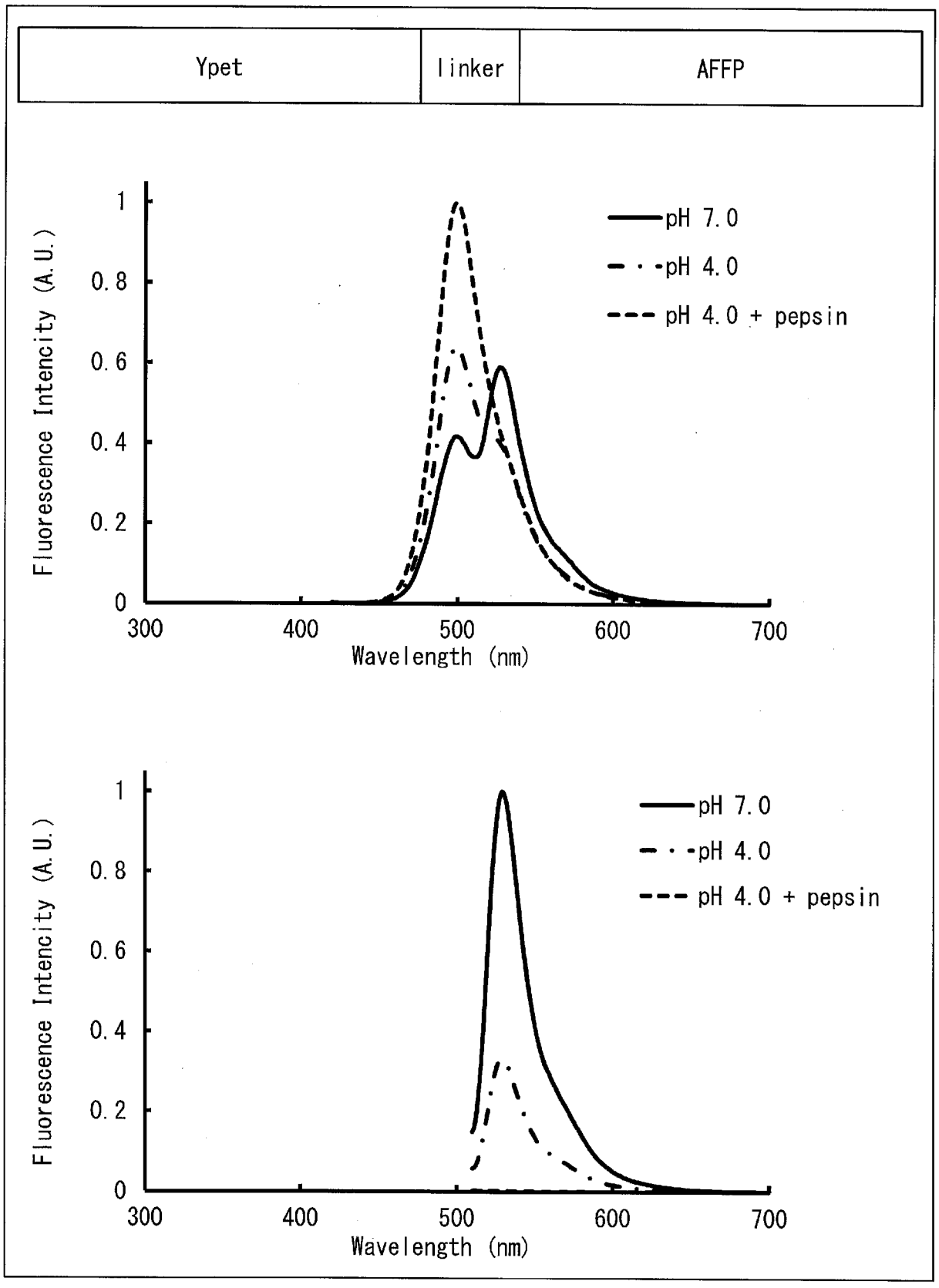
[図4]

図 4


AFFP
mCherry
None
50 mM NH4Cl
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
F.I. (dots/cytosol)
AFFP
mCherry
None
50 mM NH4Cl
(n=100)

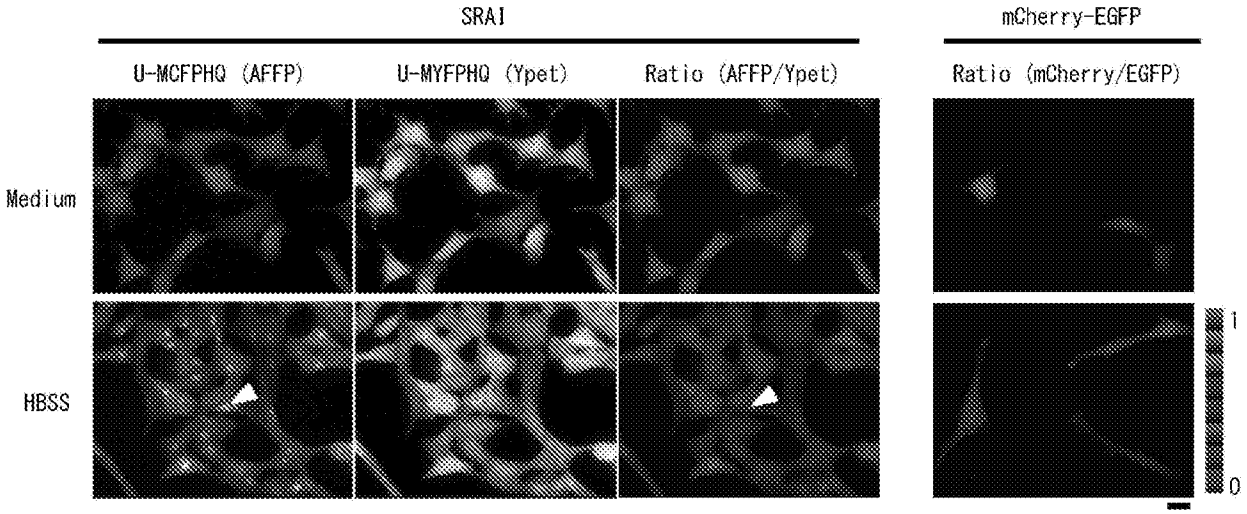
[図5]

図 5


Ypet
linker
AFFP
Fluorescence Intencity (A.U.)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
pH 7.0
pH 4.0
pH 4.0 + pepsin
Fluorescence Intencity (A.U.)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)
pH 7.0
pH 4.0
pH 4.0 + pepsin

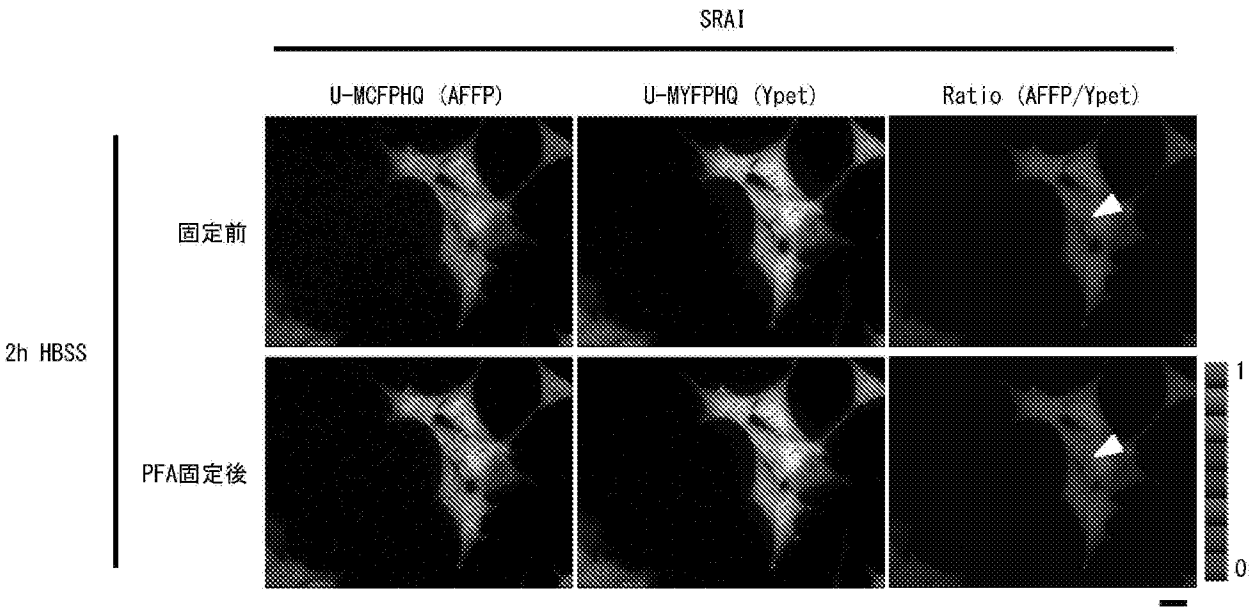
[図6]

図 6


SRAI
mCherry-EGFP
U-MCFPHQ (AFFP)
U-MYFPHQ (Ypet)
Ratio (AFFP/Ypet)
Ratio (mCherry/EGFP)
Medium
HBSS
1
0

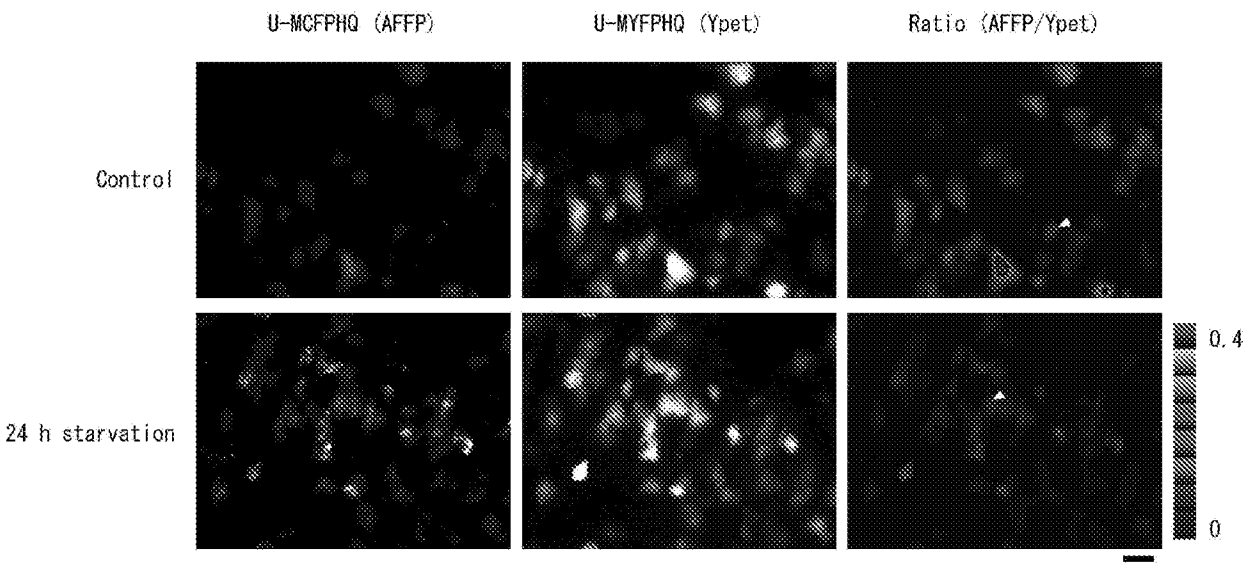
[図7]

図 7


SRAI
U-MCFPHQ (AFFP)
U-MYFPHQ (Ypet)
Ratio (AFFP/Ypet)
2h HBSS
固定前
PFA固定後
1
0

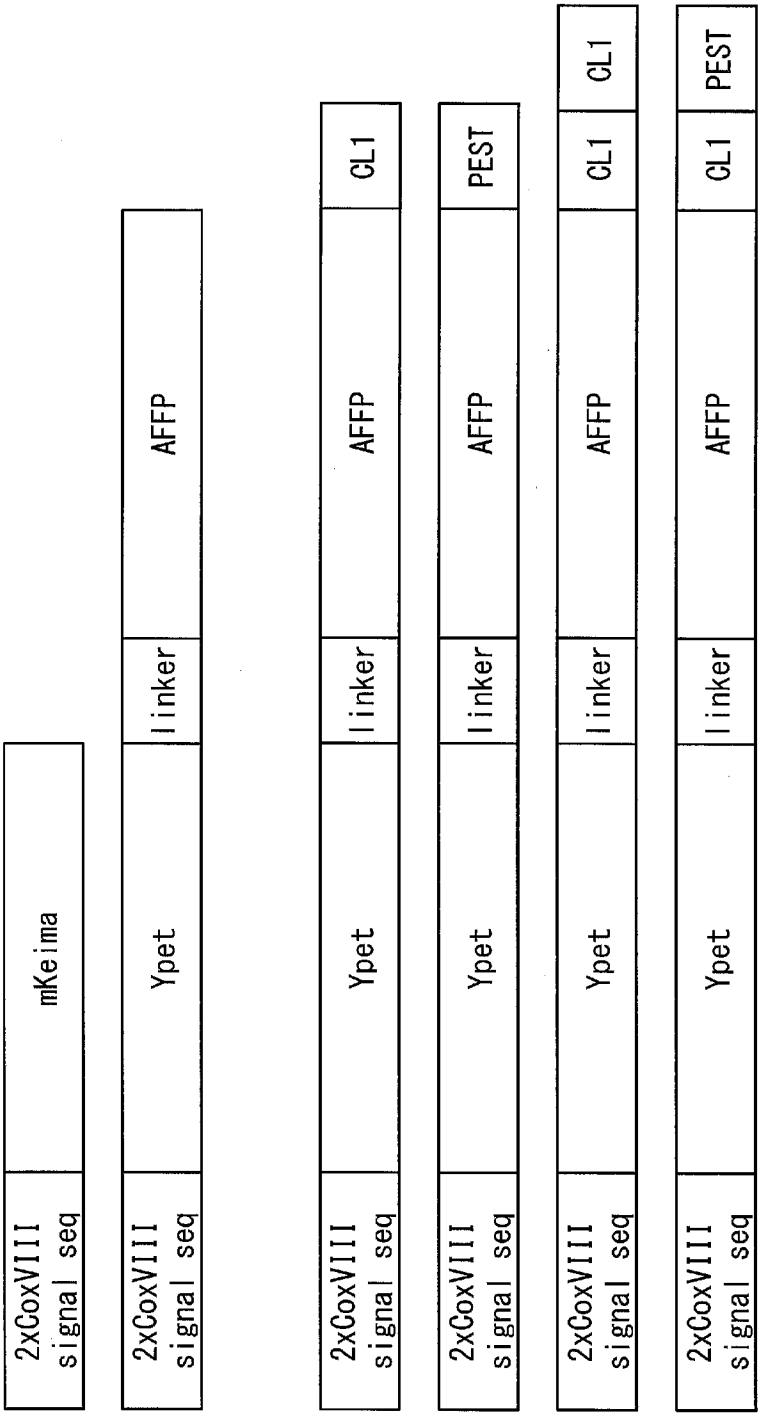
[図8]

図 8


U-MCFPHQ (AFFP)
U-MYFPHQ (Ypet)
Ratio (AFFP/Ypet)
Control
24 h starvation
0.4
0

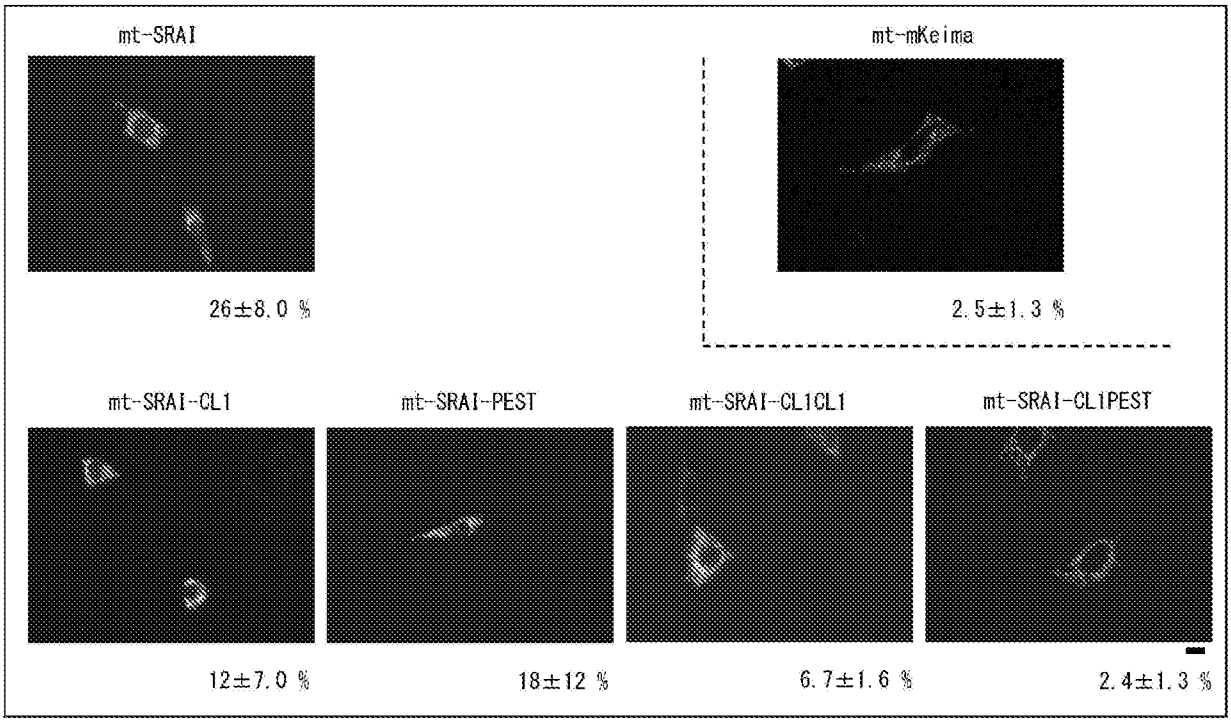
[図9]

図 9


2xCoxVIII signal seq
mKeima
2xCoxVIII signal seq
Ypet
linker
AFFP
2xCoxVIII signal seq
Ypet
linker
AFFP
CL1
2xCoxVIII signal seq
Ypet
linker
AFFP
PEST
2xCoxVIII signal seq
Ypet
linker
AFFP
CL1
CL1
2xCoxVIII signal seq
Ypet
linker
AFFP
CL1
PEST

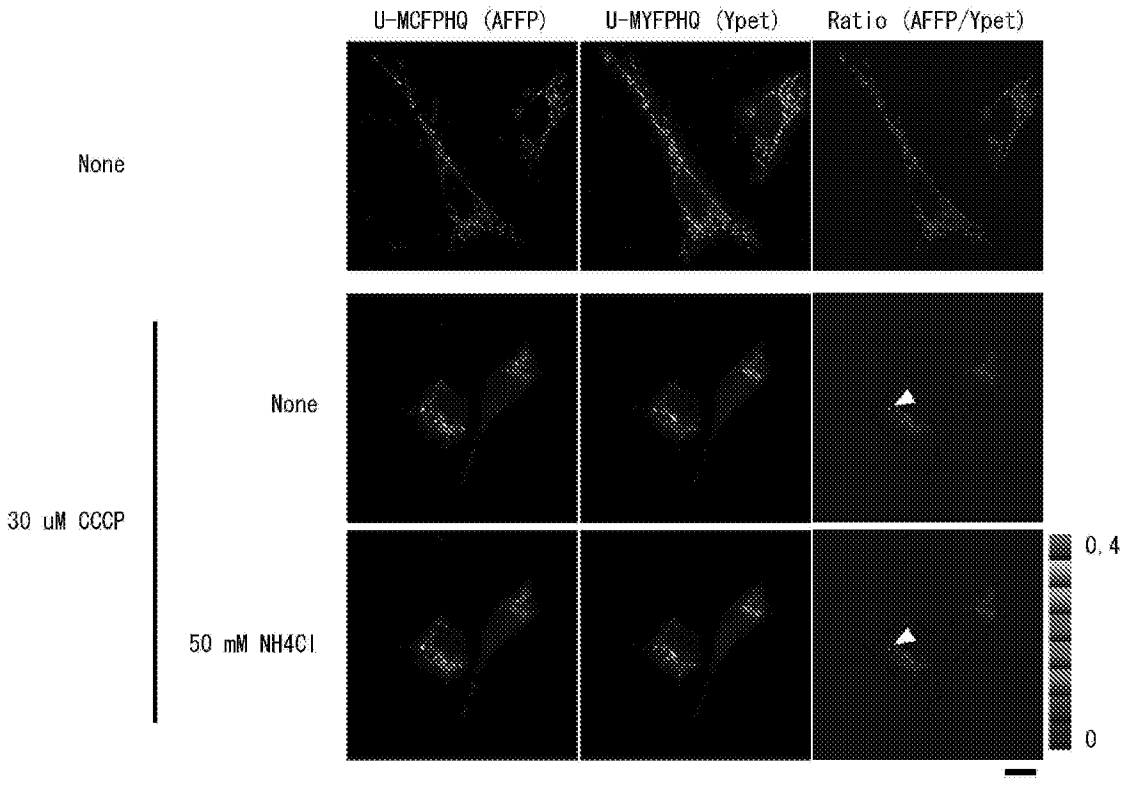
[図10]

図 10



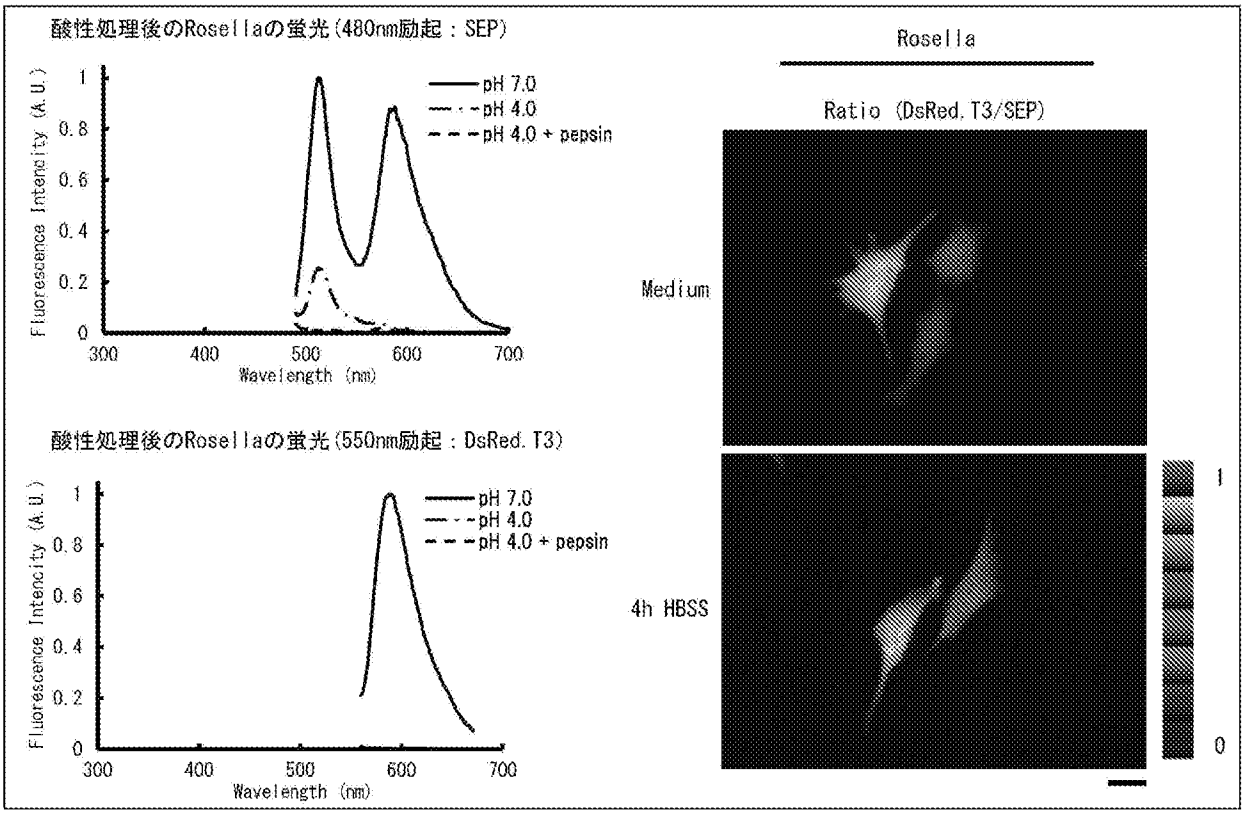
[図11]

図 11



[図12]

図 12


酸性処理後のRosellaの蛍光(480nm励起：SEP)
Fluorescence Intencity (A.U.)
Wavelength (nm)
pH 7.0
pH 4.0
pH 4.0 + pepsin
酸性処理後のRosellaの蛍光(550nm励起：DsRed.T3)
Rosella
Ratio (DsRed.T3/SEP)
Medium
4h HBSS
1
0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C07K14/00*(2006.01)i, *C07K19/00*(2006.01)i, *C12Q1/00*(2006.01)i, *C12Q1/06*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C07K14/00, C07K19/00, C12Q1/00, C12Q1/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nguyen, T. G. et al., Development of fluorescent substrates and assays for the key autophagy-related cysteine protease enzyme, ATG4B, Assay and drug development technologies, 2014, Vol. 12, No. 3, p. 176-189, ISSN: 1540-658X, particularly, pages 177 to 181, page 183, Fig. 3	1-8
Y	WO 2013/84950 A1 (Amalgaam Co., Ltd.), 13 June 2013 (13.06.2013), paragraph [0044]; page 116 & US 2014/0335539 A1 paragraph [0122]; page 81 & EP 2790018 A1	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August 2016 (30.08.16)	13 September 2016 (13.09.16)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068189

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/33693 A1 (The Institute of Physical and Chemical Research), 24 April 2003 (24.04.2003), page 22 & US 2005/0106661 A1 example 1 & EP 1452591 A1	1-8
Y	KATAYAMA, H. et al., A sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery, Chemistry & Biology, 2011, Vol.18, p.1042-1052, ISSN: 1074 5521, particularly, page 1050, right column	4-8
A	WO 2011/19082 A1 (Japan Science and Technology Agency), 17 February 2011 (17.02.2011), & US 2012/0178119 A1 & EP 2466294 A1	1-8
A	LI, M. et al., A high-throughput FRET-based assay for determination of Atg4 activity, Autophagy, 2012, Vol. 8, No. 3, p. 401-412, ISSN: 1554-8627, particularly, page 403, Figure 1, page 404, Figure 2, pages 410 to 411	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６８１８９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C07K14/00, C07K19/00, C12Q1/00, C12Q1/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	Nguyen, T. G. et al., Development of fluorescent substrates and assays for the key autophagy-related cysteine protease enzyme, ATG4B, Assay and drug development technologies, 2014, Vol. 12, No. 3, p. 176-189, ISSN: 1540-658X、特に、第１７７頁～第１８１頁、第１８３頁Ｆｉｇ．３	1-8
Y	WO 2013/84950 A1（Ａｍａｌｇａａｍ有限会社）2013.06.13, ［００４４］段落、第１１６頁 & US 2014/0335539 A1 [0122]段落,第81頁 & EP 2790018 A1	1-8

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
３０．０８．２０１６	１３．０９．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４５０８
上村　直子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2003/33693 A1 (理化学研究所) 2003.04.24, 第２２頁 & US 2005/0106661 A1 実施例１ & EP 1452591 A1	1-8
Y	KATAYAMA, H. et al., A sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery, Chemistry & Biology, 2011, Vol.18, p.1042-1052, ISSN: 1074-5521、特に、第１０５０頁右欄	4-8
A	WO 2011/19082 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2011.02.17, & US 2012/0178119 A1 & EP 2466294 A1	1-8
A	LI, M. et al., A high-throughput FRET-based assay for determination of Atg4 activity, Autophagy, 2012, Vol. 8, No. 3, p. 401-412, ISSN: 1554-8627、特に、第４０３頁Ｆｉｇｕｒｅ　１、第４０４頁Ｆｉｇｕｒｅ　２、第４１０頁～第４１１頁	1-8