(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-535271
(P2016-535271A)
(43)公表日　平成28年11月10日(2016.11.10)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/542	***(2006.01)***	G01N	33/542	ZNAA	2G045
C07K 14/00	***(2006.01)***	C07K	14/00		4B065
G01N 33/50	***(2006.01)***	G01N	33/50	Z	4H045
C12N 5/16	*(2006.01)*	C12N	5/16		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）

(21)出願番号　特願2016-535535 (P2016-535535)
(86)(22)出願日　平成25年8月20日 (2013.8.20)
(85)翻訳文提出日　平成28年4月18日 (2016.4.18)
(86)国際出願番号　PCT/IB2013/056766
(87)国際公開番号　WO2015/025192
(87)国際公開日　平成27年2月26日 (2015.2.26)

(71)出願人　513002382
セントロ デ エストゥディオス シエンティフィコス デ ヴァルディヴィア
CENTRO DE ESTUDIOS CIENTIFICOS DE VALDIVIA
チリ, ヴァルディヴィア, アルトゥーロ プラト 514
Arturo Prat 514, Valdivia, Chile
(74)代理人　110000338
特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ピルビン酸濃度の定量のための遺伝的にコードされたプローブ、およびその使用方法。

(57)【要約】
本発明は、試料、組織、並びに細胞区画および細胞内区画において、高い空間時間解像度で、ピルビン酸を検出および定量するための新規の光学ツールに関する。これは、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）に基づいたピルビン酸センサーであり、当該ピルビン酸センサーは、任意の適切なドナー蛍光タンパク質部分およびアクセプター蛍光タンパク質部分の間にある細菌のＰｄｈＲ転写因子を含んでいる。本発明はまた、ピルビン酸輸送体の活性の定量のための、細胞のピルビン酸生産速度およびピルビン酸消費速度の定量のための、ならびに無傷な細胞におけるミトコンドリアのピルビン酸消費速度の直接の定量のための、この新規の光学ツールの使用方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）において共同してドナー部分およびアクセプター部分としての機能を果たすことが可能である任意の適切なドナー蛍光タンパク質部分およびアクセプター蛍光タンパク質部分の間に、細菌のＰｄｈＲ転写因子を含んでいる、ＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーであり、単一の細胞もしくは細胞集団において、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片においてまたはインビボの動物組織において、発現され得る、ＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサー。
【請求項２】
上記蛍光タンパク質部分は、ｍＴＦＰ（単量体ティール蛍光タンパク質）、ＣＦＰ（シアン蛍光タンパク質）、ＢＦＰ（青色蛍光タンパク質）、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）、ＹＦＰ（黄色蛍光タンパク質）、それらの高感度変異体（例えば、高感度ＹＦＰ（ＥＹＦＰ））、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、または細菌フィトクロムおよび植物フィトクロムに由来する赤外蛍光タンパク質からなる群からの間で選択される、請求項１に記載のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサー。
【請求項３】
上記蛍光タンパク質部分は、ｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓである、請求項１に記載のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサー。
【請求項４】
配列番号１、配列番号２、配列番号３、または配列番号４と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％のアミノ酸配列同一性を有している、請求項１または３に記載のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサー。
【請求項５】
配列番号５、配列番号６、配列番号７、または配列番号８と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％の配列同一性を有している核酸配列によってコードされている、請求項１または３に記載のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサー。
【請求項６】
ピルビン酸の測定方法であり、下記のステップを含む方法：
ａ．請求項１から５の何れか１項に記載のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）発現させるステップ；
ｂ．上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；
ｃ．上記細胞におけるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；
ｄ．異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録し、輸送速度を決定するステップ。
【請求項７】
ステップｂ）において、上記ＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーは、細胞において、ピルビン酸およびグルコースの非存在下において得られた蛍光率の最小値、飽和濃度のピルビン酸に上記細胞を曝すことによって得られた蛍光率の最大値、およびインビトロで得られた上記センサーの親和定数K_D、を用いて較正される、請求項６に記載のピルビン酸の測定方法。
【請求項８】
ステップｃ)において、上記細胞に入り込んでいるピルビン酸の定常状態の崩壊は、ピルビン酸の上記細胞外濃度を変更することによって、すなわち上記細胞をピルビン酸に曝すことによって実行される、請求項７に記載のピルビン酸の測定方法。
【請求項９】

ピルビン酸生産速度または消費速度の測定方法であり、下記のステップを含む方法：
ａ．請求項１から５の何れか１項のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）発現させるステップ；
ｂ．上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；
ｃ．上記細胞におけるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；
ｄ．異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録し、輸送速度を決定するステップ。

【請求項１０】
ステップｂ）において、上記ＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーは、細胞において、ピルビン酸およびグルコースの非存在下において得られた蛍光率の最小値、飽和濃度のピルビン酸に上記細胞を曝すことによって得られた蛍光率の最大値、およびインビトロで得られた上記センサーの親和定数K_D、を用いて較正される、請求項９に記載のピルビン酸生産速度または消費速度の測定方法。

【請求項１１】
ステップｃ）において、上記ピルビン酸の定常状態は、ピルビン酸輸送体の遮断薬の添加によって崩壊させられ、当該遮断薬の添加は、細胞内のピルビン酸の濃度の度合の増加を引き起こし、当該増加の初速度は、上記定常状態における細胞のピルビン酸の生産速度と同等であり；または細胞内のピルビン酸濃度の減退を引き起こし、当該減退の初速度は、上記定常状態における細胞のピルビン酸の消費速度と同等である、請求項９に記載のピルビン酸生産速度または消費速度の測定方法。

【請求項１２】
ミトコンドリアのピルビン酸消費速度の測定方法であり、下記のステップを含む方法：
ａ．請求項１から５の何れか１項のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）発現させるステップ；
ｂ．上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；
ｃ．上記細胞におけるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；
ｄ．異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録し、輸送速度を決定するステップ。

【請求項１３】
ステップｂ）において、上記ＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーは、細胞において、ピルビン酸およびグルコースの非存在下において得られた蛍光率の最小値、飽和濃度のピルビン酸に上記細胞を曝すことによって得られた蛍光率の最大値、およびインビトロで得られた上記センサーの親和定数K_D、を用いて較正される、請求項１２に記載のミトコンドリアのピルビン酸消費速度の測定方法。

【請求項１４】
ステップｃ）において、ピルビン酸定常状態の崩壊は、上記ミトコンドリアのピルビン酸輸送体の遮断薬の添加によるものであり、ミトコンドリアによるピルビン酸の消費速度と同等である細胞内のピルビン酸の濃度の減少を引き起こす、請求項１２に記載のミトコンドリアのピルビン酸消費速度の測定方法。

【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
〔本発明の分野〕
本発明は、試料、組織、細胞区画および細胞レベル下の(subcellular)区画において、

高い空間分解能および高い時間分解能で、ピルビン酸を検出および定量するための、新規の光学ツールに関する。これは、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）に基づいたピルビン酸センサーであり、当該センサーは、任意の適切なドナー蛍光タンパク質部分およびアクセプター蛍光タンパク質部分の間に、細菌のＰｄｈＲ転写因子を含んでいる。本発明はまた、ピルビン酸輸送体の活性の定量のための、細胞のピルビン酸生産速度およびピルビン酸消費速度の定量のための、ならびに無傷な細胞におけるミトコンドリアのピルビン酸消費速度の直接の定量のための、この新規の光学ツールの使用方法に関する。

〔本発明の背景〕

ピルビン酸は有機化合物であり、原核生物および真核生物を含む、すべての細胞の代謝に関係する。ピルビン酸は代謝の中心であり、解糖およびミトコンドリアの代謝の交差点に位置しており、そして多数の細胞の生合成経路のための開始代謝産物である。ピルビン酸は、現今、食糧補完物として、体重管理用サプリメントおよび抗酸化剤として製造されるように、または化学産業、製薬産業および農芸化学産業において広く適用される開始物質の様に使用されているように、際立って産業上関心がある分子である。ピルビン酸は、抗酸化特性を有しており、そしてミトコンドリアの酸化還元容量を調節すると考えられている。ピルビン酸の代謝は、糖尿病、神経変性状態、および癌を含む病気の状態において変化するため、ピルビン酸は高い生物医学的関心がある。

【０００２】

ピルビン酸は、細胞レベル下の区画間を、細胞と細胞外空間との間を、および細胞間を絶えず流動している状態にある。生存している細胞において、区画の内側のピルビン酸の濃度は、細胞の破壊なしでは決定できないため、生体におけるピルビン酸の動態はほとんど分かっていない領域である。

【０００３】

正常な組織および病気の組織は、代謝的に異質であり、隣接した細胞の間の代謝酵素の発現および代謝酵素の分配に関して、質的および量的な違いを示している。これは、すべての代謝産物に関する代謝濃度および代謝流量の観点において、そして特に、ピルビン酸濃度およびピルビン酸の流量の観点において、細胞間で違いがあるかもしれないということを示唆している。しかし、ピルビン酸を測定するための現在の技術は、侵襲性であり、単一の細胞を分析するための十分な感度を有していないため、この現象学は、現今、利用できない。

【０００４】

ピルビン酸を測定するための標準の方法は、光度測定装置、電流測定装置、または他の装置の手段によって観測される、酵素反応に基づくものである。酵素に基づく電極が開発されてきており、当該電極は、高い時間分解能でピルビン酸を検出できる。ピルビン酸を測定するための別の手段は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）であり、当該ＨＰＬＣでは、ピルビン酸はカラムの中に格納された固定相に試料を通過させることによって、他の化合物から分離される。それでもなお、現行の方法は、試料の抽出を必要とするまたはピルビン酸を消費するため、侵襲性であり、そしてそれゆえに、当該現行の方法は試料におけるピルビン酸の濃度を変化させるため、先行技術には問題がある。先行技術の方法の第２の問題はその感度であり、その理由は、単一の細胞または単一の細胞レベル下の細胞小器官に存在する微量のピルビン酸を検出できないためである。さらに、細胞内の、または細胞レベル下のピルビン酸を、非侵襲的に、実時間において検出する、または単一細胞の分解能で検出することが可能である、現在利用可能な方法はない。酵素を用いてピルビン酸を測定するための、標準の方法は、それらが酵素の産生、および酵素の基質上への固定化、ならびに基質および補因子の添加を必要とするため、煩わしく、そして相対的に費用を要する。この事について、先行技術（Staiano et al., 2007）は、ピルビン酸の測定を含めて、代謝産物のためのセンサーを得ることは困難であると、明らかに言及しており、さらに先行技術は「結果として、生化学的に関連のある分析のための特定のセンサーの開発はよりいっそう難しい。事実、ピルビン酸、乳酸、またはクレアチニンと特異的に結合する蛍光プローブを、どのように設計するかを想像することは難しい。適切な構造

が設計され、そして合成されることが可能であったとしても、最終分子が、スペクトルの変化、十分な水溶性、および適切な親和定数を示すだろうという保証はない。」と述べている。

【０００５】

細胞膜および細胞レベル下の膜を横切るピルビン酸の輸送は、いくつかの病気の病因に関わっており、そして癌および糖尿病における薬理学的な介入のための重要な標的である、特定の、膜の輸送体、分子によって仲介される。単一の細胞においてピルビン酸の輸送を測定するための、利用可能な方法はない。より具体的に言うと、放射性同位元素を用いる、ピルビン酸の輸送を測定するための、現在の一般的な技術は、単一の細胞を分析できず、そして、時間分解能が十分ではなく、そのことは、すばやい現象の調査、および、それらの細胞組成において異質である、正常組織の研究を阻害する。現行の技術は、間接的であり、単一細胞におけるピルビン酸の輸送を、ピルビン酸の輸送に付随するｐＨにおける変化から推測するが、この技術は、通常知られていない、細胞の緩衝能の先行知識を必要とするような範囲に限定され、生理学的な重炭酸塩緩衝液の存在下では容易に適用できない。

【０００６】

ピルビン酸生産速度およびピルビン酸消費速度は、低酸素症／虚血、癌、糖尿病、ミトコンドリア病、および他の病気の状態に関係する、細胞代謝の重要なパラメーターである。単一の細胞において、ピルビン酸生産速度およびピルビン酸消費速度を測定するための利用可能な方法はない。より具体的に言うと、ピルビン酸生産速度およびピルビン酸消費速度を測定するための、現在の一般的な技術は、酵素に基づいた方法であり、単一の細胞を分析できず、そして時間分解能が十分ではない。同位元素を用いる測定は、単一の細胞を分析できず、感度および時間分解能が十分ではない。

【０００７】

ピルビン酸はミトコンドリアのための主な基質であり、そしてピルビン酸代謝速度は、細胞の呼吸速度と密接に関連している。これらは、細胞代謝の基本的なパラメーターであり、当該パラメーターは、低酸素症／虚血、癌、糖尿病、および他の状態を含むいくつかの病気において影響を受ける。ミトコンドリアの代謝速度の評価は、調合薬の開発における初期の段階であり、当該開発は、代謝に対して反対の効果を引き起こす可能性のある薬の候補を排除することが必要とされる。無傷の細胞において、単一の細胞において、または実時間において、ミトコンドリアによるピルビン酸消費速度を測定するための利用可能な方法はない。ミトコンドリアのピルビン酸消費速度を測定するための、現在の一般的な技術は、同位元素を使用し、単一の細胞を分析できず、そして不十分な感度および低い時間分解能を有している。

【０００８】

乳酸のための遺伝的にコードされたセンサーに基づいた、現存する技術は、単一の細胞における乳酸の消費を推定する（同一出願人によるＰＣＴ／ＵＳ１２／３３６３９、未公開）。ピルビン酸と乳酸とは、酵素、乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）によって関連付けられ、当該酵素は、ＮＡＤＨ、NAD^+およびｐＨに関与する反応を触媒する。従って、乳酸の測定を用いる、ピルビン酸のミトコンドリア消費の間接的な推定は、ＬＤＨの活性に影響を与える他の仕組み、すなわちＮＡＤＨ、NAD^+の濃度または細胞内のｐＨによる、予測できない様式において影響を受ける場合があるような範囲において限定される。上述の乳酸センサーを用いることの別の制限は、乳酸はミトコンドリアのための基質でもある（Brooks, 2009）ということであり、実際、当該乳酸センサーを用いて、どれくらいの量のピルビン酸が消費されているか、およびどれくらいの量の乳酸が消費されているかを突き止めることは可能ではない。さらに、乳酸センサーは細胞において容易に較正されない場合があり、これは乳酸の定量的測定を実行不可能にする。なぜなら、上記乳酸センサーの使用が、定性的または半定量的な使用のみであるということが推奨されているからである（San Martin et al., 2013）。これに反して、第一に、本発明のセンサーは、ピルビン酸濃度の直接的な測定を提供し、そして第二に、本発明のセンサーは、非侵襲性の形態に

おいて容易に較正されることが可能である；従って、ピルビン酸濃度、およびピルビン酸の流量の定量的な測定を提供している。第三に、流れの推定はＬＤＨ活性および／またはＮＡＤＨ／ＮＡＤ$^{+}$の比における予測不可能な変動によって、または細胞内のｐＨによって影響を受けない。

【０００９】

〔本発明の開示〕

解決されるための技術的課題

本発明の主題は、遺伝的にコードされたプローブ（genetically encoded probe）を提供することであり、これは、高い感度で、低侵襲的にピルビン酸の測定を可能とし、測定の間にピルビン酸を消費しない。さらに上記プローブは、先行技術に関して最も関連性のある貢献の部分として、改良された空間時間的分解能で、試料において、細胞において、および細胞レベル下の区画において、ピルビン酸を測定するために使用されることが可能である。さらに、本発明の主題は、遺伝的にコードされたプローブを使用するピルビン酸の測定方法、ピルビン酸輸送体の活性を測定するための方法、細胞のピルビン酸生産およびピルビン酸消費の速度を測定するための方法、ならびに無傷な細胞においてミトコンドリアによるピルビン酸消費速度を測定するための方法、を提供することである。

【００１０】

〔本発明の簡単な説明〕

本発明の第一の実施形態において、発明者らは、ピルビン酸レベルの効率的な測定のために、遺伝的にコードされたプローブ（本明細書において、「ピロニック」とも言われる）を作製した。このプローブはピルビン酸のために特別に設計された。さらに、ピロニックは、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）に基づいたセンサーであり、蛍光タンパク質ｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓの間に挟まれた細菌のＰｄｈＲ転写因子から構成される。ピロニックは、１０７±１３μＭのピルビン酸に対するみかけの解離定数を伴う単相の用量反応曲線を示し、当該ピロニックは１０μＭと１ｍＭとの間のピルビン酸の正確な定量を可能にする。この濃度は、正常細胞および病気の細胞において見出されたピルビン酸の濃度範囲に及んでいる。この発明はまた、ピルビン酸輸送体活性の測定方法、ならびに二つの代謝速度の測定方法、ピルビン酸生産／消費速度の測定方法、および無傷な細胞におけるミトコンドリアによるピルビン酸消費速度の測定方法を含む。これらの方法は、単一の細胞もしくは細胞集団に対して、浮遊状態の細胞もしくは接着細胞に対して、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片に対して適用されることが可能であるか、または当該方法はまた、インビボの動物組織に対して適用されることが可能である。上述した方法は、個々の原核細胞または個々の真核細胞におけるピロニックの発現を含み、そしてまた、溶液中における自由分子として、または基質に付着した自由分子としての当該ピロニックの使用を含む。

【００１１】

ピロニックは、単一の細胞もしくは細胞集団において、浮遊状態の細胞もしくは接着細胞において、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において、発現され得る。遺伝子発現は、宿主細胞へセンサーの遺伝子情報を導入するために、当該技術分野において公知である任意の適切な方法によって達成されることが可能である。遺伝子導入方法論の例は、リポソームの送達、ウイルス導入、および遺伝子組み換えを使用するプラスミド導入であってもよい。当業者は、ピロニック発現を達成するための任意の適切な形質転換技術を容易に理解するだろう。単一の細胞もしくは細胞集団において、浮遊状態の細胞もしくは接着細胞において、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において、一度センサーが発現されると、当該センサーは、あらかじめ確立された条件に従って較正される。

【００１２】

上述した細胞または組織の中で発現されることに加えて、センサーはまた、細胞または組織から適切な技術を用いて放出されることが可能であり、そして溶液中における自由分

子として、または基質に付着した自由分子として用いられることが可能である。そしてここでは、上記センサーは、あらかじめ確立された条件に従って較正される。さらに、当業者は、ピロニックを細胞または組織から放出するめに、任意の適切な技術を容易に理解するだろう。

【００１３】

第二の実施形態において、この発明は、ピルビン酸輸送体の活性を測定するための方法を提供する。較正ステップにおいて得られた情報を使用して、ピルビン酸輸送体の活性の決定は、細胞をピルビン酸に曝すことによって実行される。これは、ピルビン酸センサーを用いて観測される細胞内のピルビン酸における上昇を引き起こし、当該上昇の初速度は、ピルビン酸代謝から独立しており、動態パラメーターを推定するために使用されることが可能である。増加する濃度のピルビン酸に細胞を暴露することにより、ピルビン酸輸送体のための動態パラメーターの推定が可能になる。動態パラメーターはまた、細胞外ピルビン酸の除去の後の、細胞内ピルビン酸における減少から得られる。

【００１４】

第三の実施形態において、本願は、ピルビン酸生産速度およびピルビン酸消費速度の測定のための方法を特徴としている。較正ステップにおいて得られた情報を用いて、ピルビン酸生産速度またはピルビン酸消費速度の決定は、ピルビン酸の流量の分断によって実行され、当該ピルビン酸の流量は、通常、定常状態において維持される。細胞のピルビン酸生産速度またはピルビン酸消費速度を定量するために、上記定常状態はピルビン酸輸送体の遮断薬の添加によって崩壊させられる。哺乳類細胞において、表面のピルビン酸輸送体は、モノカルボン酸輸送体（ＭＣＴ）であり、そして当該ピルビン酸輸送体はフロレチン、パラクロロ安息香酸水銀、ＡＲ－Ｃ１５５８５８、または他の適切な化合物を用いて遮断されることが可能である。細胞が正味のピルビン酸生産体である場合、ＭＣＴ遮断薬の適用は、細胞内ピルビン酸濃度において激しい増加を引き起こし、その初速度は、定常状態における細胞のピルビン酸生産速度と同等である。一方、細胞が正味のピルビン酸取り込み体である場合、ＭＣＴ遮断薬の適用は、細胞内ピルビン酸濃度において降下を引き起こし、その初速度は、定常状態上のピルビン酸消費速度と同等である。別の実施形態において、定常状態の崩壊は、ＭＣＴ阻害剤（例えば、フロレチン、パラクロロ安息香酸水銀、ＡＲ－Ｃ１５５８５８、抗ＭＣＴ抗血清などがあるが、これらに限定されない）の添加によって達成される。原核細胞、およびピルビン酸輸送体が他の輸送体によって仲介されている他の細胞において、上記方法は、それらの各々の阻害剤を使用して適用されることが可能である。これらの速度の定量を可能にしているピロニックの重要な特性は、その高い時間分解能であり、ピルビン酸蓄積の初速度のみに対して有益であり、数秒後の、増加するピルビン酸による解糖の阻害またはミトコンドリアのピルビン酸取り込みにおける変化のような他の非線形の過程は、測定を妨げる場合がある。その低い時間分解能のため、現行の方法による細胞外ピルビン酸の測定は、ピルビン酸生産速度またはピルビン酸消費速度を推定するために、輸送体遮断薬との組み合わせにおいて使用されることはできない。

【００１５】

第四の実施形態において、この発明はまた、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度を測定するための方法を提供する。較正ステップにおいて得られた情報を用いて、ミトコンドリアによるピルビン酸消費速度の決定は、ピルビン酸の流量の分断によって実行され、当該ピルビン酸の流量は、通常、定常状態において維持される。上記方法は、唯一の代謝基質としてのピルビン酸に細胞を曝すことを包含している。そのような状況の下で、細胞は、ミトコンドリアによるピルビン酸消費速度と同等である速度においてピルビン酸を取り込み、表面のピルビン酸輸送体の阻害剤（例えば、フロレチン、パラクロロ安息香酸水銀、ＡＲ－Ｃ１５５８５８、抗ＭＣＴ抗血清、または他の適切な化合物）の強烈な適用の後に続いて、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度と同等である速度において細胞内のピルビン酸濃度における減少が起こる。原核細胞およびピルビン酸輸送体が他の輸送体によって仲介されている他の細胞において、上記方法は、それらの各々の阻害剤を使用して適用

されることが可能である。この、阻害剤により停止する方法の別形において、ミトコンドリアのピルビン酸の流量は、単一のミトコンドリアにおいて測定されることが可能である。ピルビン酸センサーは、例えば、ミトコンドリア指定の配列を使用することによって、ミトコンドリアにおいて発現される。定常状態は、それから、例えば、特異的ミトコンドリアピルビン酸運搬体（ＭＰＣ）遮断薬ＵＫ－５０９９を用いて、ＭＰＣを阻害することにより混乱させられ、これは、ピルビン酸消費速度と同等である速度においてミトコンドリア内のピルビン酸濃度における減少を生ずるだろう。このプロトコルは、基質の操作を必要とせず、生理的な細胞質基質のピルビン酸において、ピルビン酸消費速度を与えるだろう。

【００１６】

要約すると、本発明によって提供される方法は下記のステップを共有する：

－ピルビン酸の、および／またはピルビン酸生産速度もしくはピルビン酸消費速度の、および／またはミトコンドリアのピルビン酸消費速度の、測定のためのシステムを供給するステップ。上記システムは、単一の細胞もしくは細胞集団において、浮遊状態の細胞もしくは接着細胞において、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において使用されることが可能である。上記センサーはまた、溶液中における自由分子として、または基質に付着した自由分子として、使用されることが可能である；

－個々の細胞において、および／またはミトコンドリアのような細胞レベル下の区画において、または自由分子もしくは基質に付着した自由分子として、ピルビン酸センサー、ピロニックを発現させるステップ；

－制御された条件においてセンサーを較正するステップ；

－種々の濃度の細胞外のピルビン酸に細胞を曝すことによって、ピルビン酸輸送体の活性を測定するステップ；

－ピルビン酸の定常状態を下記の方法によって崩壊させることによって、代謝速度を測定するステップ：

　－ミトコンドリアによるピルビン酸消費の瞬間速度を測定するための、ミトコンドリアピルビン酸輸送体の遮断薬の添加、および／または

　－ミトコンドリアのピルビン酸消費速度の長期にわたる測定を授けるための、唯一、ピルビン酸の存在における、ＭＣＴ阻害剤の添加；

－センサーからの出力を記録し、異なる時間において対応するピルビン酸濃度を算出するステップ；および

－輸送速度および代謝速度を決定するステップ。

【００１７】

〔図面の簡単な説明〕

本発明は、添付されている図面によって説明され、当該図面は下記のとおりである：

図１は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ（Ｅ．ｃｏｌｉ）からの転写制御因子ＰｄｈＲの予測される三次元構造を示す。

図２は、Ｅ．ｃｏｌｉからのＰｄｈＲのアミノ酸配列を示す。

図３は、ピルビン酸センサーの構築のための一般的な計画を概略的に説明する。

図４は、ピルビン酸センサーの４つの変異体のアミノ酸配列（Ａ）およびＤＮＡ配列（Ｂ）を示す。

図５は、ピルビン酸センサーの４つの変異体の、ピルビン酸に対する応答を示し、最も反応するセンサーはピロニックと名付けられている。

図６は、ピロニックの蛍光発光のスペクトルに対するピルビン酸の影響を示す。

図７は、増加する濃度のピルビン酸に対する応答における、ピロニックの蛍光率の変化を提示する。

図８は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、ｐＨの影響を示す。

図９は、ピロニックの蛍光率に対する、種々の分子の影響を示す。

図１０は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、種々の分子の影響を示す。

図１１は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、種々の分子の影響を示す。
図１２は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、異なる濃度のクエン酸の影響を示す。
図１３は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、酸化還元電位の影響を示す。
図１４は、Ｅ．ｃｏｌｉの異なる二つの系統、ＤＨ５αおよびＢＬ２１において発現させたピロニックの蛍光率に対する、細胞外のピルビン酸の影響を示す。
図１５は、ＨＥＫ２９３細胞、培養された神経細胞、培養された星状細胞、および脳組織における星状細胞において発現されたピロニックを示す。
図１６は、ピルビン酸なしに、または１ｍＭピルビン酸と共に、それぞれ、細胞を培養することにより、ΔR_o値、およびΔR_{max}値を得る方法を示す。
図１７は、ピロニックを用いて、細胞内のピルビン酸の定量的推定のための、２点較正の手順を説明する。公式において、R_0およびΔR_{max}は表示される。
図１８は、ＨＥＫ２９３細胞によるピルビン酸取り込みの時間的経過、およびモノカルボン酸輸送体の公知の遮断薬によるピルビン酸取り込みの阻害を示す。
図１９は、対照群のＨＥＫ２９３細胞、およびモノカルボン酸輸送体の公知の遮断薬と共に前処理された細胞における、ピルビン酸取り込み速度を要約する。
図２０は、哺乳類細胞におけるピルビン酸のための主な生化学経路、およびいくつかの輸送体遮断薬を描写する。
図２１は、ＨＥＫ２９３細胞における細胞内ピルビン酸生産速度の測定を説明する。
図２２は、時間依存的な様式において、グルコース欠乏がどのようにＨＥＫ２９３細胞によるピルビン酸生産速度を減少させるかを示す。
図２３は、ＨＥＫ２９３細胞において、細胞膜のモノカルボン酸輸送体の阻害剤を用いる、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度の測定を説明する。
図２４は、ＨＥＫ２９３細胞において、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度に対する、ミトコンドリアの呼吸作用の遮断薬の阻害効果を示す。

【００１８】

〔発明の詳細な説明〕

本発明は、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）に基づいたピルビン酸センサーに言及し、当該センサーは、共同してＦＲＥＴにおけるドナー部分およびアクセプター部分としての機能を果たすことが可能である任意の適切なドナー蛍光タンパク質部分およびアクセプター蛍光タンパク質部分の間に、細菌のＰｄｈＲ転写因子を含み、単一の細胞もしくは細胞集団において、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片においてまたはインビボの動物組織において、発現され得る。また、本発明は、ピルビン酸の測定方法に関し、当該方法は、下記のステップを含む：

ａ．本発明のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）発現させるステップ；

ｂ．上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；

ｃ．上記細胞におけるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；

ｄ．異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録し、輸送速度を決定するステップ。

【００１９】

もう一方において、本発明は、ピルビン酸生産速度またはピルビン酸消費速度の測定方法に関し、当該方法は、下記のステップを含む：

ａ．本発明のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）発現させるステップ；

ｂ．上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；
ｃ．上記細胞におけるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；
ｄ．異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録し、輸送速度を決定するステップ。

【００２０】

最後に、本発明は、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度の測定方法に言及し、当該方法は、下記のステップを含む：
ａ．本発明のＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）発現させるステップ；
ｂ．上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；
ｃ．上記細胞におけるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；
ｄ．異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録し、輸送速度を決定するステップ。

【００２１】

以下の詳細な説明は、添付されている図面に言及する。本発明のセンサーの実施形態は記載される場合があるが、改変、適応、および他の実施は可能である。例えば、置換、付加、または改変は、図面において説明された要素に対して行われてもよく、本明細書において記載された方法は、置換、並べ替え、または開示された方法へのステージの追加によって改変されてもよい。従って、以下の詳細な説明は、本発明の範囲を限定しない。センサーおよび方法は、種々の要素またはステップを「含んでいる」という観点で記載されているが、当該センサーおよび当該方法はまた、他に述べられない限り、種々の要素もしくはステップ「から、本質的になる」、または種々の要素もしくはステップ「からなる」ことが可能である。さらに、他に述べられない限り、「ａ」「ａｎ」および「ｔｈｅ」の用語は、複数の選択肢（例えば、少なくともひとつ）を含むことが意図される。

【００２２】

センサーは、ピルビン酸を１０μＭと１ｍＭとの間で定量し、細胞の非存在下の試料においてピルビン酸の測定を可能にし、且つピルビン酸濃度、ピルビン酸輸送体の活性、ピルビン酸生産、ピルビン酸消費、およびミトコンドリアのピルビン酸消費速度の、単一細胞の測定を可能にする。

【００２３】

本発明のセンサーは、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）に基づいたピルビン酸センサーであり、さらに、二つの構成単位、ピルビン酸結合／調節ドメインおよびＤＮＡ結合ドメイン、を有する、細菌の転写制御因子であるＰｄｈＲからなる。ＰｄｈＲ遺伝子はＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉから単離された（図１および図２）。

【００２４】

発明者らは、ＰｄｈＲ遺伝子を利用してピルビン酸センサーを開発し、ここでは概括的な言葉において、当該センサーは下記の構造配列を含む：ドナーＦＲＥＴ部分、続いて、任意でリンカー１；ＰｄｈＲ（両方のドメインを含んでいる）；任意でリンカー２；およびアクセプターＦＲＥＴ部分。

【００２５】

本発明の、ＦＲＥＴに基づいたピルビン酸センサーは、ＦＲＥＴにおいて共同してドナー部分およびアクセプター部分としての機能を果たすことが可能である、任意の適切なドナー蛍光タンパク質部分およびアクセプター蛍光タンパク質部分を組み込んでもよい。好ましいドナー部分およびアクセプター部分は、ｍＴＦＰ（単量体ティール蛍光タンパク質）、ＣＦＰ（シアン蛍光タンパク質）、ＢＦＰ（青色蛍光タンパク質）、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）、ＹＦＰ（黄色蛍光タンパク質）、それらの高感度変異体（例えば、高感

度ＹＦＰ（ＥＹＦＰ））、Ｃｉｔｒｉｎｅ、もしくはＶｅｎｕｓ、または細菌フィトクロムおよび植物フィトクロムに由来する赤外蛍光タンパク質からなる群から選択され、そしてドナー／アクセプター、ｍＴＦＰ／Ｖｅｎｕｓ、によって提供される特に好ましい実施形態を有する。ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分を選択する際に考慮する基準は、当該技術分野において公知であり、例えば、その全文が参照によって本発明において援用されている、米国特許第６，１９７，９２８号において開示されている。別の実施形態において、ＰｄｈＲまたは他の適切なピルビン酸結合タンパク質の骨格内に挿入された、ＧＦＰの循環置換変異体（Akerboom et al., 2009）のような、単一の蛍光部分が使用され得、当該単一の蛍光部分は、ピルビン酸のＰｄｆＲ部分への結合、またはピルビン酸の他の適切なピルビン酸結合タンパク質への結合に対する応答において蛍光強度における変化を受ける。

【００２６】

より好ましい実施形態において、選択されたＦＲＥＴ対は、ｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓであり、この組み合わせは、ＣＦＰおよびＹＦＰと比較して、それぞれより明るく、そしてより低いｐＨ感受性である。

【００２７】

発明者らは、本発明のセンサーの４つの好ましい実施形態を開発し、ここでは４つの実施形態のそれぞれは、下記の構成を有する。

１．　Ｎ末端に位置したｍＴＦＰ（ドナー）、続いて、リンカー１、ＰｄｈＲ、リンカー２、およびＣ末端に位置したＶｅｎｕｓ（アクセプター）（アミノ酸配列、配列番号１；核酸配列、配列番号５）；

２．　Ｎ末端に位置したｍＴＦＰ（ドナー）、続いて、ＰｄｈＲ、リンカー２、およびＣ末端に位置したＶｅｎｕｓ（アクセプター）（アミノ酸配列、配列番号２；核酸配列、配列番号６）；

３．　Ｎ末端に位置したｍＴＦＰ（ドナー）、続いて、リンカー１、ＰｄｈＲ、およびＣ末端に位置したＶｅｎｕｓ（アクセプター）（アミノ酸配列、配列番号３；核酸配列、配列番号７）；

４．　Ｎ末端に位置したｍＴＦＰ（ドナー）、続いて、ＰｄｈＲおよびＣ末端に位置したＶｅｎｕｓ（アクセプター）（アミノ酸配列、配列番号４；核酸配列、配列番号８）。

【００２８】

４つのセンサーの構造は、図３において示され、Ｎ末端に位置したｍＴＦＰ（ドナー）、リンカーによって隣接されたＰｄｈＲ、およびＣ末端に位置したＶｅｎｕｓ（アクセプター）を有する。

【００２９】

さらなる実施形態において、本発明は、アミノ酸配列によって記載されたピルビン酸センサーを含み、当該センサーは配列番号１、配列番号２、配列番号３、または配列番号４と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％の配列同一性を有している（図４）。本発明はまた、配列番号５、配列番号６、配列番号７、または配列番号８と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％の配列同一性を有している核酸配列によってコードされたピルビン酸センサーを含む（図４）。

【００３０】

配列番号１から配列番号４までにおいて記載された配列は、本発明の例示の方法として提供された本発明の特定の実施形態であり、本発明の範囲を制限するものとして考慮されるべきではない。配列番号１、配列番号２、配列番号３および配列番号４に対応するタンパク質は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおいて発現され、それから精製され、そして高濃度のピルビン酸に曝された。４つのタンパク質は、ｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓの間で蛍光強度の比率において有意な変化を伴って、ピルビン酸に応答した（図５）。図４において矢印で示された、最も反応する変異体は、ピロニックと名付けられ、さらなる特徴の描写のために選択された。ピロニックは、Ｅ．ｃｏｌｉからの全長のＰｄｈＲおよび

ひとつのリンカーを含む。このセンサーの発光波長域は、４９２ｎｍおよび５２６ｎｍにおいて、ｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓのそれぞれ予想されたピークを示した（図６）。ピルビン酸に対するＰｄｈＲの親和定数は知られていない。図６は、ピロニックが、増加するピルビン酸濃度に応答し、且つｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓの蛍光強度の間の比の増加する値を有したことを示す。（励起４３０ｎｍにおける）蛍光強度は、増加するピルビン酸濃度において測定され、そして、１０７±１３μＭのみかけの解離定数（ＫＤ）値、および約２０％のそれぞれの最大ΔＲ値を有する、単一の直角双曲線によって、挙動は十分に示された。センサーのこれらの動態パラメーターは、１０μＭおよび１ｍＭの間、例えば生理学的および病理学的レベルの全域の細胞内ピルビン酸を報告する、所望される能力を与える。哺乳類細胞において、上記細胞内ピルビン酸は、２０～４０μＭのあたりを変動する。

【００３１】

センサーは、生理学的範囲において、ｐＨに対する非常に低い感度を示した（図８）。特異性は、高濃度の自然発生の代謝産物の一群にセンサーを曝すことによって調査された（図９）。選択された分子の一揃いから、クエン酸およびオキサル酢酸は、１ｍＭにおいて適度の効果を、そして１００μＭにおいて非常に小さな効果を生じた。オキサル酢酸のレベルは、低いマイクロモーラーの範囲においてであり、ピルビン酸センサーに影響を与えるべきではなく、そして細胞質基質のクエン酸レベルは１００μＭ以下であり（Siess et al., 1978; Kauppinen et al., 1982）、それ故にピルビン酸センサーに対する無視してよい効果を有するべきである。さらに特異性を調査するために、センサーのピルビン酸への応答に対する、代謝産物の一群の効果が調査された（図１０、１１および１２）。選択された分子の一揃いから、クエン酸のみが、１ｍＭにおいてのみとはいえ、ピルビン酸への応答に関して有意な効果を有した。類似の効果が、オキサル酢酸に対して観察された。センサーのピルビン酸への応答は、酸化還元比率の極値に対して無反応であり、ＮＡＤ$^{+}$およびＮＡＤＨの操作によって達成された（図１３）。

【００３２】

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおいて発現された、ピルビン酸センサーは、細胞外ピルビン酸における変化に対して感受性があり（図１４）、例えば、バイオリアクター内における工業的用途のために、無傷の細菌がセンサーとして使用される場合があることを示している。哺乳類細胞において発現された、本発明のピルビン酸センサーは、細胞質基質および細胞過程において分配され、そして核および細胞小器官から除外された（図１５）。細胞において発現されたセンサーの用量反応性は、インビトロにおいて観察された用量反応性と類似していたが、ＦＲＥＴ比率において大きな変化を有し、且つ４０％の蛍光率において典型的な最大変化を有した（図１６）。２点較正プロトコルは、まず、細胞からグルコースを欠乏させることよって達成された、非常に低いピルビン酸濃度における蛍光率（R_0）を測定し、それから、１ｍＭの細胞外ピルビン酸に細胞を暴露させることによって、飽和しているピルビン酸における蛍光率（R_{max}）を測定することが考案された。このような様式おいて飽和曲線の二つの端点を得てから、インビトロにおいてあらかじめ得られたK_D値（１０７μＭ）は、補間法によって、任意の蛍光率をピルビン酸濃度の中に変換するために使用される（図１７）。

【００３３】

本発明はさらに、試料において、単一の細胞もしくは細胞集団において、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養、組織培養、混合細胞培養、組織外植片において、またはインビボの動物組織において、ピルビン酸濃度の決定のために前述のセンサーを使用する方法を含む。

【００３４】

上記方法は、下記の一般的なステップを含む：

ａ）　本発明のセンサーを、所望の宿主において（例えば、単一の細胞もしくは細胞集団、接着細胞もしくは浮遊状態で、細胞培養物、組織培養物、混合細胞培養物、組織外植片において、またはインビボの動物組織において）、発現させるステップ；

ｂ）　上記宿主を細胞内、細胞外、細胞レベル下のピルビン酸濃度のあらかじめ定められた値を用いて較正し、ピルビン酸濃度を、時間に合わせて記録するステップ；
ｃ）　上記細胞に入り込んでいるピルビン酸の定常状態を崩壊させるステップ；
ｄ）　異なる時間点における上記ピルビン酸濃度を算出している上記センサーからの出力を記録するステップ。

【００３５】

ステップｂ）において、宿主の較正に対応して、本発明のセンサーは、ピルビン酸およびグルコースの非存在下において得られた蛍光率の最小値（R_0）、飽和濃度のピルビン酸（＞　１ｍＭ）に上記細胞を曝すことによって得られた蛍光率の最大値（ΔR_{max}）、およびインビトロで得られた上記センサーの親和定数K_D、を用いて、細胞において較正される。

【００３６】

一般的な方法は、異なる構成において適用されることが可能である。例えば第一の実施形態において、センサーは、ピルビン酸輸送体の活性の測定方法において使用される。

【００３７】

この第一の実施形態において、較正ステップにおいて得られた情報を用いて、細胞に入り込んでいるピルビン酸の定常状態の崩壊は、ピルビン酸の細胞外濃度の変更によって（例えばピルビン酸に細胞を曝すことによって）、実行される。これは、ピルビン酸センサーを用いて観測される、細胞内のピルビン酸の上昇を引き起こし、当該上昇の初速度は、ピルビン酸代謝から独立しており、動態パラメーターを推定するために使用されることが可能である（図１８）。増加している濃度のピルビン酸への細胞の暴露は、ピルビン酸輸送体のための動態パラメーターの推定を可能にする。動態パラメーターはまた、細胞外ピルビン酸の除去の後の、細胞内ピルビン酸の減少から得られる。ピルビン酸のための輸送経路の同定は、例えば、フロレチンもしくはＡＲ－Ｃ１５５８５８のような特定の輸送体タンパク質の薬理学的遮断薬（図１８および図１９）、または他の特定の輸送体タンパク質薬理学的遮断薬（例えばパラクロロ安息香酸水銀、抗ＭＣＴ抗血清等）の使用によるか、あるいは特定の輸送体タンパク質の発現を阻害する化合物（例えばｓｈＲＮＡまたはｓｉＲＮＡ）を用いてか、あるいは他の類似する方法によって、決定されることが可能である。

【００３８】

第二の実施形態において、一般的な方法は、細胞のピルビン酸生産速度および細胞のピルビン酸消費速度を測定するための、第一の特定の方法に適用されることが可能である。

【００３９】

この第二の実施形態において、細胞は、グルコース、乳酸、およびピルビン酸の生理学的な濃度の下で培養され、そして、較正ステップおよび特定の阻害剤に対する表面のピルビン酸輸送体の既知の感度において得られた情報を用いて、そしてピルビン酸の定常状態は、ピルビン酸輸送体の機能を遮断することによって（例えばピルビン酸輸送体の薬理学的な遮断薬の添加によって）、激しく崩壊させられる。哺乳類細胞において、ピルビン酸輸送体はＭＣＴであり、そして当該ピルビン酸輸送体はフロレチン、パラクロロ安息香酸水銀、ＡＲ－Ｃ１５５８５８、抗ＭＣＴ抗血清、または他の適切な化合物を用いて遮断されることが可能である。細胞が正味のピルビン酸生産体である場合、ＭＣＴ遮断薬の適用は、細胞内ピルビン酸濃度において増加を引き起こし、その初速度は、定常状態における細胞のピルビン酸生産速度と同等である。細胞が正味のピルビン酸取り込み体である場合、ＭＣＴ遮断薬の適用は、細胞内ピルビン酸濃度において降下を引き起こし、その初速度は、定常状態における細胞のピルビン酸消費速度と同等である。ピルビン酸輸送体が他の輸送体によって仲介されている細胞において、上記方法は、適切な阻害剤を使用して適用されることが可能である。このセンサーの重要な特性は、結合の単一の構成成分を有していることであり、その結果、これらの速度の正確な定量を可能にしている。別の重要な特性は、その高い時間分解能であり、ピルビン酸蓄積の初速度のみに対して有益であり、数秒後の、ピルビン酸による、解糖またはミトコンドリアの機能の調整のような他の非線形

の過程は、測定を妨げる場合がある。その低い時間分解能および感度のため、現行の方法による細胞外のピルビン酸の測定は、ピルビン酸生産速度、またはピルビン酸消費速度を推定するために、ＭＣＴ遮断薬との組み合わせにおいて、使用されることはできない。

【００４０】

第三の実施形態において、一般的な方法は、ミトコンドリアのピルビン酸消費の特定の速度を測定するための、第二の特定の方法に適用されることが可能である。

【００４１】

この第三の実施形態において、細胞は、グルコースまたは乳酸の非存在下においてピルビン酸の中で培養され、従って、細胞におけるミトコンドリアに、唯一の基質として細胞外のピルビン酸を用いて呼吸させ、そして、較正ステップにおいて得られた情報を用いて、ピルビン酸の定常状態は、ピルビン酸輸送体の機能を遮断することにより（例えば、ピルビン酸輸送体の薬理学的遮断薬の添加により）、激しく崩壊させられる。哺乳類細胞において、ピルビン酸輸送体はＭＣＴであり、そして当該ピルビン酸輸送体は、フロレチン、パラクロロ安息香酸水銀、ＡＲ－Ｃ１５５８５８、抗ＭＣＴ抗血清、または他の適切な化合物を用いて遮断されることが可能である。ＭＣＴ遮断薬の適用は、ミトコンドリアによるピルビン酸消費速度と同等である速度で、細胞内のピルビン酸濃度における減少を引き起こす。このセンサーの重要な特性は、結合の単一の構成要素を有していることであり、その結果、これらの速度の正確な定量を可能にしている。低い時間分解能および感度のため、現行の方法による細胞外のピルビン酸の測定は、ピルビン酸生産速度またはピルビン酸消費速度を推定するために、ＭＣＴ遮断薬との組み合わせにおいて使用されることはできない。異なるミトコンドリア輸送体の阻害剤の存在下でミトコンドリアのピルビン酸消費速度を測定することによって、特定の細胞において、ピルビン酸がミトコンドリアに入る経路を突き止めることが可能である。

【００４２】

本発明のピルビン酸センサーに基づいて、本明細書において開示された方法は、上記のピルビン酸センサーを使用して、細胞のピルビン酸生産速度および細胞のピルビン酸消費速度の単一細胞での実時間の定量、並びにミトコンドリアのピルビン酸消費速度の定量を初めて可能にする。これらの方法は、選択された輸送体の遮断の直後に、細胞質基質のピルビン酸濃度における変化を観察する。定常状態において、ピルビン酸の細胞内濃度は、解糖による生産、ピルビン酸の流出、ピルビン酸の乳酸への転換およびミトコンドリアのピルビン酸消費によって一定に保たれる（図２０）。フロレチン、ＡＲ－Ｃ１５５８５８または他の遮断薬のようなＭＣＴ遮断薬の添加による定常状態の混乱は、ピルビン酸生産速度と同等である速度における細胞内のピルビン酸の蓄積を引き起こすことが予測される。

【００４３】

代謝速度を推定するためのこれらの方法の実験的証明は、図２１～２４において提供される。ピルビン酸生産速度の推定の実施例として、単一のＨＥＫ２９３細胞へのＭＣＴ遮断薬ＡＲ－Ｃ１５５８５８の添加は、０．７２μＭ／ｓの一定の速度において、細胞内のピルビン酸の蓄積を引き起こした（図２１）。平均して、ＨＥＫ２９３細胞は、０．５２μＭ／ｓのピルビン酸生産速度を示し、増加する時間に関して細胞からグルコースを欠乏させることによって解糖が阻害されると、当該ピルビン酸生産速度は劇的に減少した（図２２）。

【００４４】

ミトコンドリアのピルビン酸消費速度の推定の実施例として、唯一の基質としてのピルビン酸の存在における単一のＨＥＫ２９３細胞へのＭＣＴ遮断薬ＡＲ－Ｃ１５５８５８の添加は、１．７３μＭ／ｓの一定の速度において、細胞内のピルビン酸における減少を引き起こした（図２３）。平均して、ＨＥＫ２９３細胞は、１．２８μＭ／ｓのピルビン酸消費速度を示し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の阻害剤であるアジ化ナトリウムの存在下で、当該ピルビン酸消費速度は完全に阻害された（図２４）。

【００４５】

下記の実施例は、本発明の理解における助けとなるために提供され、本発明の範囲を制限するものと考えられるべきではない。

【００４６】

〔実施例〕

本発明の理解を助けるために、本発明は、具体的な実施例を参照して説明されるだろう。

【００４７】

タンパク質の精製。配列番号５、６、７または８を含んでいるプラスミドコンストラクトを、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）へ形質転換した。単一のコロニーを、１００ｍｇ／ｍｌのアンピシリンを有する１００ｍｌのＬＢ培地（ＩＰＴＧなし）に播種し、２～３日間、暗闇において振盪した。細胞を、１０分間、５０００ｒｐｍ（４℃）での遠心分離によって回収し、５ｍＬのＴｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝溶液ｐＨ８．０において、超音波処理（Ｈｉｅｌｓｃｈｅｒ　Ｕｌｔｒａｓｏｕｎｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）によって破壊した。細胞を含まない抽出物を、１時間、１０，０００ｒｐｍ（４℃）での遠心分離および上清のろ過（０．４５μｍ）によって得た。タンパク質を、製造業者によって推奨されているように、ニッケル樹脂（Ｎｏｖａｇｅｎ社からのＨｉｓ　Ｂｉｎ（登録商標））を使用して精製した。溶出したタンパク質を、ビウレット法を用いて定量し、そして２０％グリセリン中で－２０℃にて保存した。蛍光率において最大の変化を示した変異体は、制限酵素認識部位ＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩを使用して、真核細胞における発現のためのｐｃＤＮＡ３．１（－）内へクローニングした。

【００４８】

動物および細胞培養。使用した動物は、交配したＦ１雄マウス（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ×ＣＢＡ／Ｊ）であり、２０±２℃の室温において、１２／１２時間の明／暗サイクルにおいて、食べ物および水を自由に摂食させ、特定病原体除去（ＳＰＦ）の条件下の動物室において管理した。実験は、Centro de Estudios Cientificos Animal Care and Use Committeeによって承認された。神経細胞およびグリア細胞（１～３日齢の新生仔）の混合された皮質の培養物を、記載されたように調製した（Loaiza et al., 2003）。ＨＥＫ２９３細胞は、American Tissue Culture Collectionから入手し、ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１０％ウシ胎仔血清の中で、９５％空気／５％CO_2にて、３７℃で培養した。培養物は、６０％の集密状態において、リポフェクタミン２０００（Ｇｉｂｃｏ）を使用して形質転換させるか、または代わりに、5×10^6ＰＦＵの本発明のＡｄピルビン酸センサー（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｂｉｏｌａｂによるカスタムメイド）に曝して、２４～７２時間後に調査した。

【００４９】

蛍光測定。ニッケル精製されたタンパク質を、細胞内緩衝液（１０ｍＭ　ＮａＣｌ、１３０ｍＭ　ＫＣｌ、１．２５ｍＭ　$MgSO_4$および１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを含む、ｐＨ７．０）の中で１００ｎＭにおいて再懸濁し、マイクロプレートリーダー解析装置（ＥｎＶｉｓｉｏｎ，ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いて測定した。タンパク質を４３０ｎｍにおいて励起し、ｍＴＦＰおよびＶｅｎｕｓの蛍光発光の強度を、それぞれ４８５ｎｍ（ＦｍＴＦＰ）および５２８ｎｍ（ＦＶｅｎｕｓ）において記録した。ＦｍＴＦＰとＦＶｅｎｕｓとの間の比率（Ｒ）を、センサーの性質を決定するために使用した。発光スペクトルを、４３０ｎｍの励起において、２ｎｍの窓を用いて得た。室温（２２～２５℃）において、９５％空気／５％二酸化炭素ガス処理された以下の組成（１１２ｍＭ　ＮａＣｌ、１．２５ｍＭ　$CaCl_2$、１．２５ｍＭ　$MgSO_4$、１～２ｍＭ　グルコース、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２４ｍＭ　$NaHCO_3$）の溶液（ｐＨ７．４）中で、３ｍＭのＫＣｌ（星状細胞）または５ｍＭのＫＣｌ（ＨＥＫおよびＴ９８Ｇ）と共に、２０×水浸対物レンズ（Ｎ．Ａ．　１．０）および４４０ｎｍの固相レーザーを備えた正立型オリンパスＦＶ１０００共焦点顕微鏡を用いて、細胞の画像を得た。代案として、４０×油浸対物レンズ（ＮＡ　１．３）または２０×水浸対物レンズ（ＮＡ　０．９５）を備えた、オリンパスＩＸ７０またはオリンパスＢＸ５１顕微鏡を用いて、細胞の画像を得た。顕微鏡は、ＣＡＩＲＮモノクロメーター（Ｆａｖｅｒｓｈａｍ，ＵＫ）と、キネティクス（Kinetics）

ソフトウェアによって制御された浜松オルカ（Orca）カメラまたはメタフルオル（Metafluor）ソフトウェアによって制御されたロレラ（Rollera）カメラのいずれかとを、それぞれ備えていた。センサーの比率の測定のために、細胞を、４３０ｎｍにおいて０．２～０．８秒間、励起した。４８０±２０（ＦｍＴＦＰ）および５３５±１５ｎｍ（ＦＶｅｎｕｓ）における帯域透過フィルタを備えたＣＡＩＲＩＮ　Ｏｐｔｏｓｐｌｉｔを用いて、発光を分けた。ＦｍＴＦＰとＦＶｅｎｕｓとの間の比率を、ピルビン酸を測定するために使用した。

【００５０】

統計分析。他に詳細に述べられない限り、時間的経過は、単一の細胞に対応する。実験毎に６～１２個の細胞を用いて、３回～６回、実験を繰り返した。回帰分析を、コンピューターログラム、シグマプロット（SigmaPlot）（Ｊａｎｄｅｌ）を用いて実行した。対にした試料の平均値における差を、スチューデントのｔ－検定を用いて評価した。Ｐ値＜０．０５を有意とみなし、アスタリスク（＊）を用いて示した。

【００５１】

ピルビン酸センサーの４つの異なる変異体を、本発明の異なる実施形態に従って作製した。図５は、ピルビン酸センサーの４つの変異体のピルビン酸への応答を示す。本発明のピルビン酸センサーの作製された変異体のそれぞれは、添付している配列のリストに記載されているアミノ酸配列によってコードされ、ここでは、配列番号１は変異体１に対応し、配列番号２は変異体２に対応し、配列番号３は変異体３に対応し、配列番号４は変異体４に対応する。一方、配列番号５～８は、上述したタンパク質のそれぞれ一つをコードする核酸配列に対応する。４つの変異体は、ピルビン酸への応答において蛍光率における測定可能な変化を示し、そして、本発明において記載された異なる方法のために使用されてもよい。高い比率の好結果のセンサー生成は、ＦＲＥＴに基づいたセンサー生成のための足場として、ＰｄｈＲの驚くべき頑健性を示す。

【００５２】

実施例１．高い空間時間分解能でのピルビン酸輸送体活性の測定方法

細胞と間隙空間との間のピルビン酸の交換を制御することによって、ＭＣＴは、組織代謝の節点である。ＭＣＴは、ピルビン酸およびプロトンの化学量論的な移動を触媒し、その活性は、ＢＣＥＣＦのような色素を用いて細胞内のｐＨを観測することによって、単一細胞の解像度にて、測定することが可能である。しかし、９９．９％のプロトンは、タンパク質、リン脂質および他の部位に結合されており、且つ、当該プロトンは、ＭＣＴ以外の多くの輸送体を通じて交換されて、ｐＨを、ピルビン酸のための不十分な代理とする。星状細胞において発現させたとき、本発明のピルビン酸センサーは細胞外のピルビン酸に良好に応答し、このことはピルビン酸の流入および流出の実時間の観測を可能にする（図１６～１７）。ＭＣＴによって仲介された過程と一致して、１ｍＭのピルビン酸の星状細胞の取り込みの初速度は、特異的ＭＣＴ遮断薬ＡＲ－Ｃ１５５８５８（１μＭ）の存在下で、および広く特異的なＭＣＴ遮断薬フロレチン（５０μＭ）の存在下で、強く阻害された（図１８および図１９）。したがって、ピルビン酸センサーを、ＭＣＴ活性を測定するために使用することが可能である。ピルビン酸はまた、ギャップ結合を通って（Rouach et al., 2008）、そして、おそらくは、コネキシンヘミチャネル、パネキシンチャネルおよび他のチャネルならびにｐＨ測定によって不可視であり且つ本発明のセンサーを用いて現在では測定することができる流動によって、プロトンとは無関係に輸送される場合がある。また、ＭＣＴ活性を、現在の乳酸センサー（San Martin et al., 2013）を用いて、乳酸の流量を測定することによって調査してもよい。しかし、ＭＣＴの異なるアイソフォームは、乳酸およびピルビン酸に対する相対的な特異性が異なるため、乳酸測定は、ピルビン酸輸送の流量に関しては不明瞭である場合がある。例えば、ＭＣＴ１およびＭＣＴ２は、乳酸よりもピルビン酸の輸送においてすぐれており、ＭＣＴ４は、乳酸の輸送においてすぐれている。ところが、ＭＣＴアイソフォームの発現は、細胞型間および異なる生理学的状態中の細胞型の中において、変化する（Halestrap and Price, 1999）。

【００５３】

実施例２．細胞のピルビン酸生産速度の測定

図２０における略図は、ピルビン酸の細胞内の濃度が、解糖によるピルビン酸の生産、ＬＤＨおよびミトコンドリアによるピルビン酸の消費、ならびにＭＣＴを通したピルビン酸の排出の間の動的平衡によって、どのように決定されているかを説明する。ピルビン酸を排出している細胞において、ＭＣＴの遮断薬の添加による定常状態の混乱は、ピルビン酸の蓄積を引き起こすことが予想される。原理の証明として、ＨＥＫ２９３細胞におけるピルビン酸の排出は、ＡＲ－Ｃ１５５８５８（１μＭ）を用いて遮断され、ピルビン酸生産を示す、細胞内のピルビン酸における予想された増加を引き起こした（図２１）。図２２は、細胞外のグルコースの非存在下において、細胞のピルビン酸生産速度における重大な減少があることを示す；これは、ピルビン酸はグルコースから生産されるという十分に確立された概念と一致する。

【００５４】

実施例３．無傷の細胞における高い空間時間分解能でのミトコンドリアの代謝速度の測定方法

ピルビン酸は、主なミトコンドリアの基質である。無傷の細胞において、または単一の細胞において、または実時間において、高い空間時間分解能でミトコンドリアによるピルビン酸消費速度を測定するための現在利用可能な方法はない（Brand and Nicholls, 2011）。無傷の細胞において、単一の細胞において、および実時間において、ピルビン酸センサーを用いてミトコンドリアのピルビン酸消費を測定するために；細胞をグルコースの欠乏状態とし、そして高い細胞外濃度のピルビン酸の存在下で細胞を培養し、乳酸の細胞内濃度が無視できる条件とした（San Martin et al., 2013）。そのような条件下では、細胞の中へのピルビン酸の流入とミトコンドリアのピルビン酸消費とが同等になるため、定常状態は、ピルビン酸の細胞質基質の濃度が一定にとどまる状態になる。表面のＭＣＴ遮断薬ＡＲ－Ｃ１５５８５８を用いた、定常状態の遮断は、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度と同等である速度での細胞質基質のピルビン酸濃度における降下を結果として引き起こし（図２３）、これは、ミトコンドリアの呼吸の可逆的な遮断薬であるアジ化ナトリウムによって効果的に阻害されることが可能である（図２４）。

【００５５】

本発明の特定の実施形態が記載されているが、他の実施形態が存在してもよい。さらに、あらゆる開示された方法のステップまたはステージは、本発明から逸脱することなく、ステップの並べ替えおよび／またはステップの挿入もしくは削除によって改変されたものを含み、任意の方法において改変されてもよい。本明細書は、センサーの詳細な説明および関連した図を含むと同時に、本発明の範囲は下記の請求項によって示されている。さらに、本明細書は、特定の言語によって記載されているが、請求項は上記に記載されている特徴または行為に限定されない。むしろ、上記に記載されている特定の特徴および行為は、本発明の例示的な局面および実施形態として開示されている。種々の他の局面、実施形態、改変、およびそれらの同等物は、本明細書における記載を読んだ後に、本発明の精神または請求された主題の範囲から外れることなく、当業者にそれら自体を示唆してもよい。

【００５６】

〔参考文献の一覧〕

Akerboom J, Rivera JD, Guilbe MM, Malave EC, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreiter ER (2009) Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. J Biol Chem 284:6455-6464.

Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem J 435:297-312.

Brooks GA (2009) Cell-cell and intracellular lactate shuttles. J Physiol 587:5591-5600.

Halestrap AP, Price NT (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT

) family: structure, function and regulation. Biochem J 343 Pt 2:281-99.:281-299.
Kauppinen RA, Hiltunen JK, Hassinen IE (1982) Compartmentation of citrate in relation to the regulation of glycolysis and the mitochondrial transmembrane proton electrochemical potential gradient in isolated perfused rat heart. Biochim Biophys Acta 681:286-291.
Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. J Neurosci 23:7337-7342.
Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. Science 322:1551-1555.
San Martin A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF (2013) A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and its use to detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. PLoS ONE 8:e57712.
Siess EA, Brocks DG, Wieland OH (1978) Distribution of metabolites between the cytosolic and mitochondrial compartments of hepatocytes isolated from fed rats. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 359:785-798.
Maria Staiano, Marcella de Champdore, Stefano Borini, Andrea M. Rossi, Mose Rossi, Sabato D'Auria (2007) New Emergent Nanotechnologies in Medical and Biochemical Applications: Advanced Fluorescence Protein-Based Nanosensors. Current Chemical Biology 1:3-9。

【図面の簡単な説明】

【００５７】

【図１】図１は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ（Ｅ．ｃｏｌｉ）からの転写制御因子ＰｄｈＲの予測される三次元構造を示す。

【図２】図２は、Ｅ．ｃｏｌｉからのＰｄｈＲのアミノ酸配列を示す。

【図３】図３は、ピルビン酸センサーの構築のための一般的な計画を概略的に説明する。

【図４Ａ】図４Ａは、ピルビン酸センサーの４つの変異体のアミノ酸配列を示す。

【図４Ｂ．１】図４Ｂは、ピルビン酸センサーの４つの変異体のＤＮＡ配列を示す。

【図４Ｂ．２】図４Ｂは、ピルビン酸センサーの４つの変異体のＤＮＡ配列を示す。

【図５】図５は、ピルビン酸センサーの４つの変異体の、ピルビン酸に対する応答を示し、最も反応するセンサーはピロニックと名付けられている。

【図６】図６は、ピロニックの蛍光発光のスペクトルに対するピルビン酸の影響を示す。

【図７】図７は、増加する濃度のピルビン酸に対する応答における、ピロニックの蛍光率の変化を提示する。

【図８】図８は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、ｐＨの影響を示す。

【図９】図９は、ピロニックの蛍光率に対する、種々の分子の影響を示す。

【図１０】図１０は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、種々の分子の影響を示す。

【図１１】図１１は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、種々の分子の影響を示す。

【図１２】図１２は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、異なる濃度のクエン酸の影響を示す。

【図１３】図１３は、ピルビン酸へのピロニックの応答に対する、酸化還元電位の影響を示す。

【図１４】図１４は、Ｅ．ｃｏｌｉの異なる二つの系統、ＤＨ５αおよびＢＬ２１において発現させたピロニックの蛍光率に対する、細胞外のピルビン酸の影響を示す。

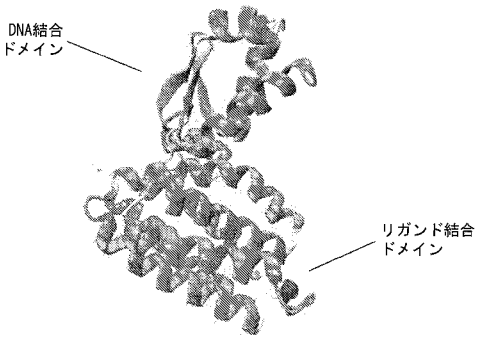
【図１５】図１５は、ＨＥＫ２９３細胞、培養された神経細胞、培養された星状細胞、および脳組織における星状細胞において発現されたピロニックを示す。

【図１６】図１６は、ピルビン酸なしに、または１ｍＭピルビン酸と共に、それぞれ、細

胞を培養することにより、ΔR$_o$値、およびΔR$_{max}$値を得る方法を示す。
【図１７】図１７は、ピロニックを用いて、細胞内ピルビン酸の定量的推定のための、２点較正の手順を説明する。公式において、R$_0$およびΔR$_{max}$は表示される。
【図１８】図１８は、ＨＥＫ２９３細胞によるピルビン酸取り込みの時間的経過、およびモノカルボン酸輸送体の公知の遮断薬によるピルビン酸取り込みの阻害を示す。
【図１９】図１９は、対照群のＨＥＫ２９３細胞、およびモノカルボン酸輸送体の公知の遮断薬と共に前処理された細胞における、ピルビン酸取り込み速度を要約する。
【図２０】図２０は、哺乳類細胞におけるピルビン酸のための主な生化学経路、およびいくつかの輸送体遮断薬を描写する。
【図２１】図２１は、ＨＥＫ２９３細胞における細胞内ピルビン酸生産速度の測定を説明する。
【図２２】図２２は、時間依存的な様式において、グルコース欠乏がどのようにＨＥＫ２９３細胞によるピルビン酸生産速度を減少させるかを示す。
【図２３】図２３は、ＨＥＫ２９３細胞において、細胞膜のモノカルボン酸輸送体の阻害剤を用いる、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度の測定を説明する。
【図２４】図２４は、ＨＥＫ２９３細胞において、ミトコンドリアのピルビン酸消費速度に対する、ミトコンドリアの呼吸作用の遮断薬の阻害効果を示す。

【図１】

図 1



PdhR
Escherichia coli

【図２】

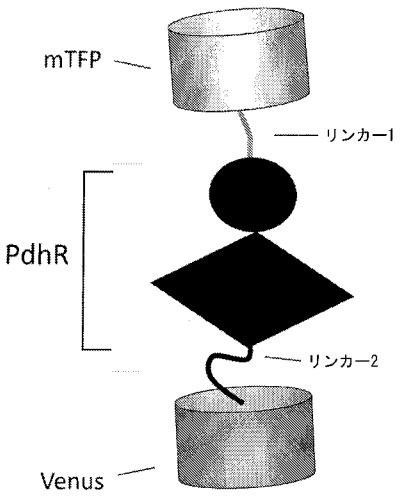
図 2

MAYSKIRQPKLSDVIEQQLEFLILEGTLRPGEKLPPERELAKQFDVSRPS
LREAIQRLEAKGLLLRRQGGGTFVQSSLWQSFSDPLVELLSDHPESQY
DLLETRHALEGIAAYYAALRSTDEDKERIRELHHAIELAQQSGDLDAESN
AVLQYQIAVTEAAHNVVLLHLLRCMEPMLAQNVRQNFELLYSRREMLPL
VSSHRTRIFEAIMAGKPEEAREASHRHLAFIEEILLDRSREESRRERSLR
RLEQRKN

アミノ酸配列 PdhR *Escherichia coli*

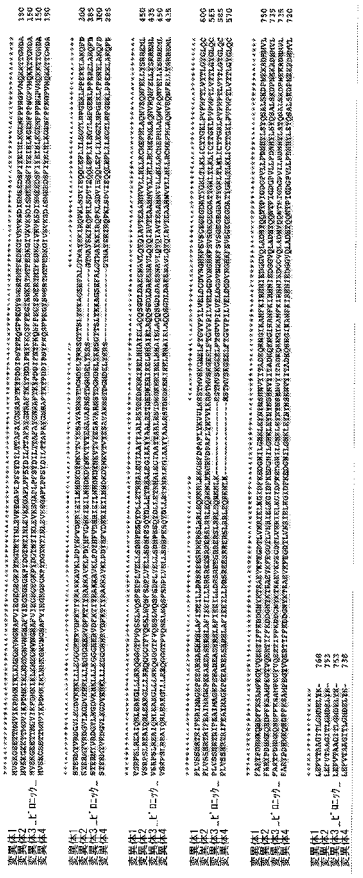
【図３】

図 3



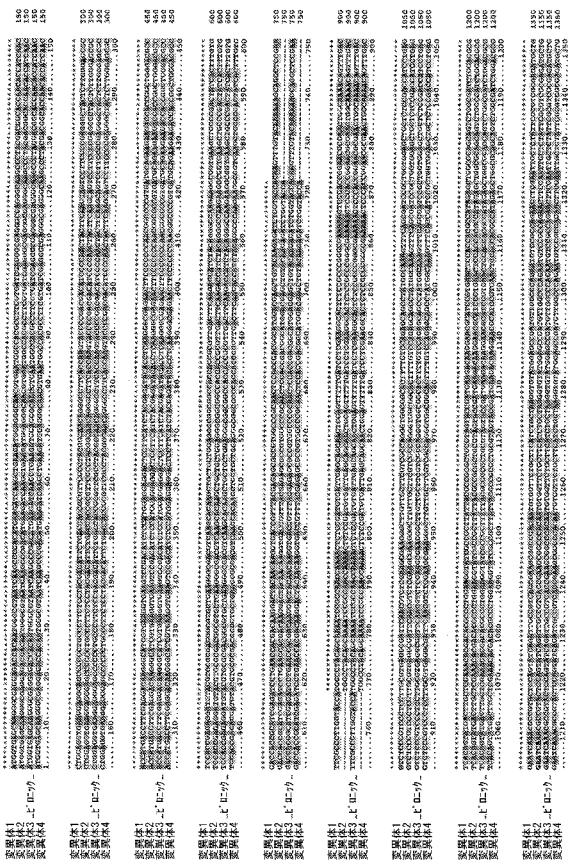
【図４Ａ】

図 4A



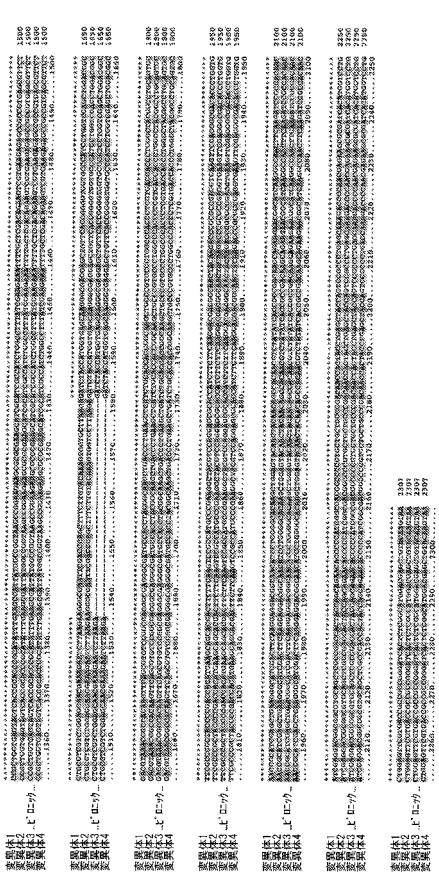
【図４Ｂ．１】

図 4B.1



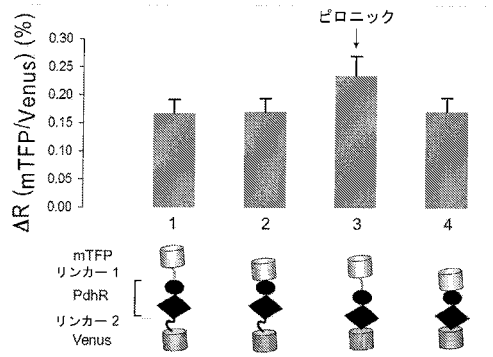
【図４Ｂ．２】

図 4B.2



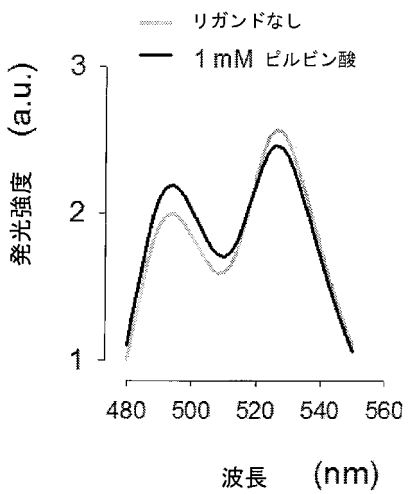
【図５】

図５



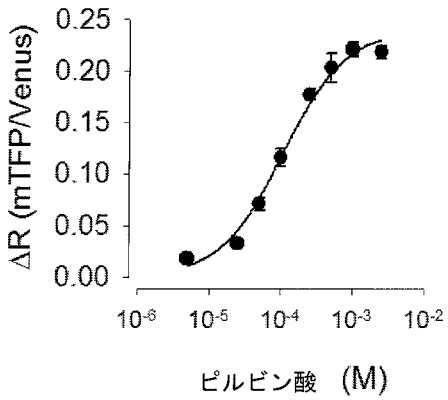
【図６】

図６



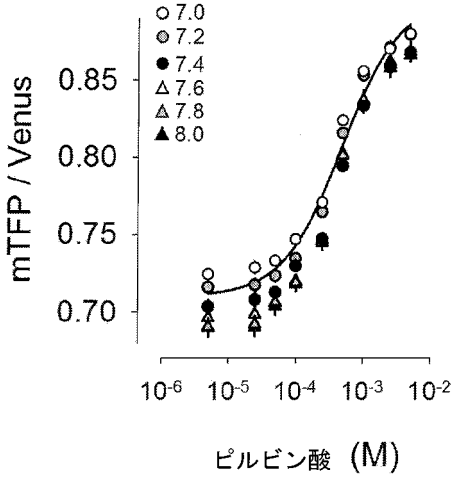
【図７】

図７

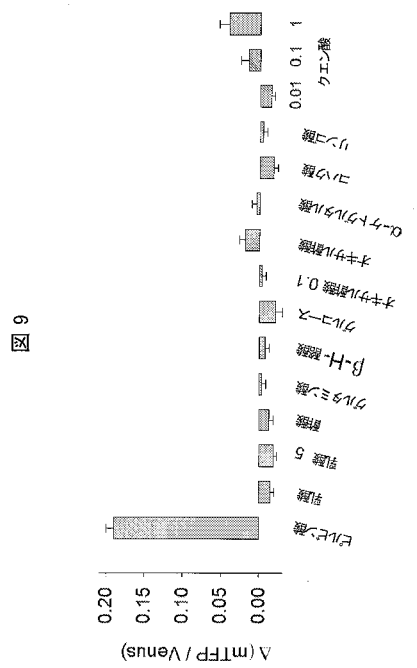


【図８】

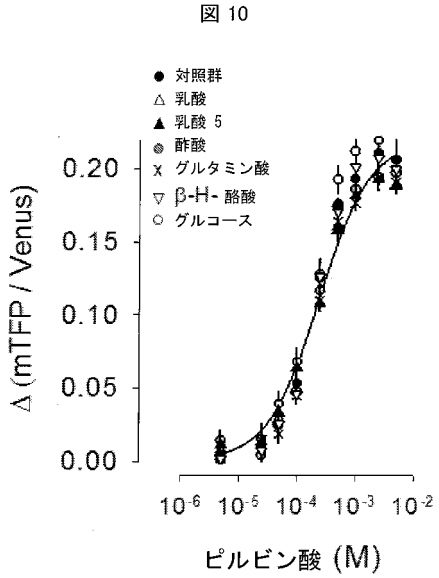
図８



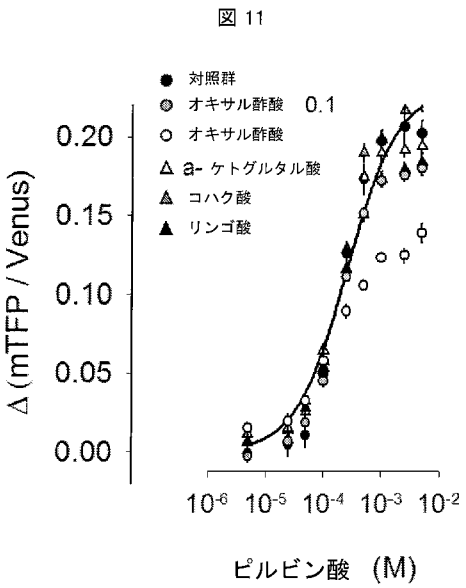
【図９】



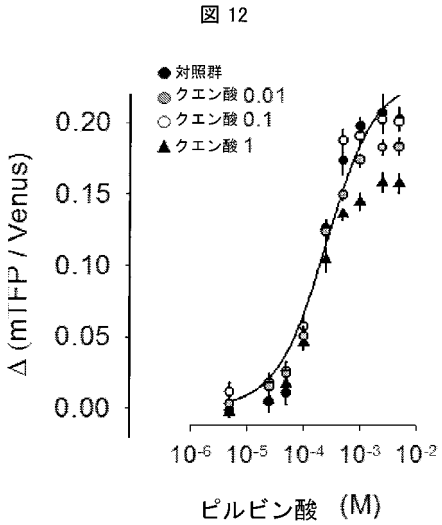
【図１０】



【図１１】

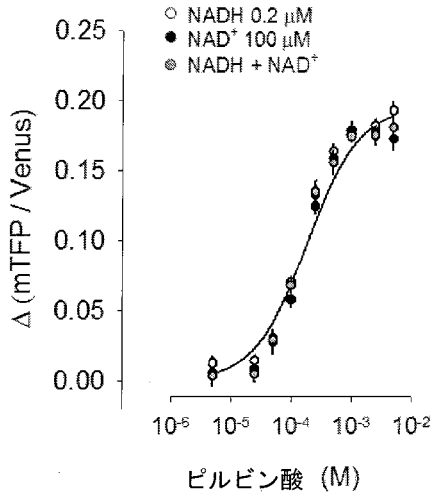


【図１２】



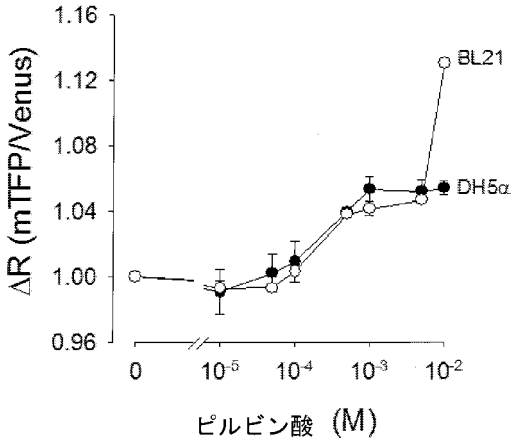
【図１３】

図 13



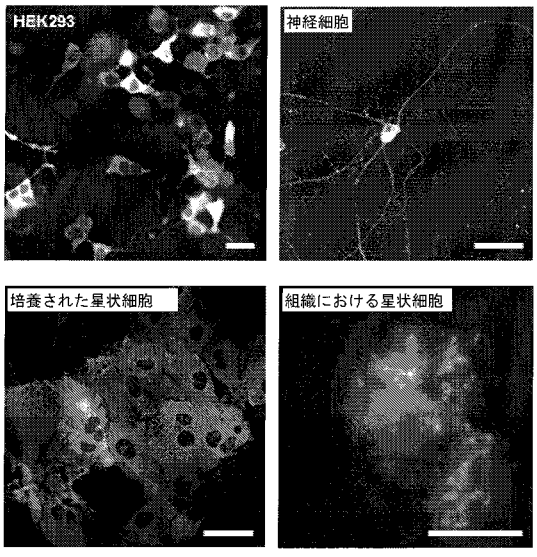
【図１４】

図 14



【図１５】

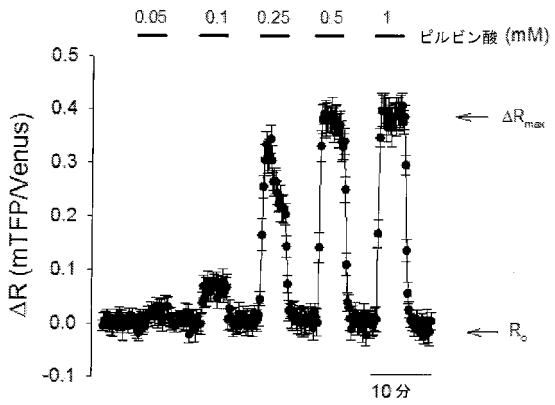
図 15



バーは25μmに相当する

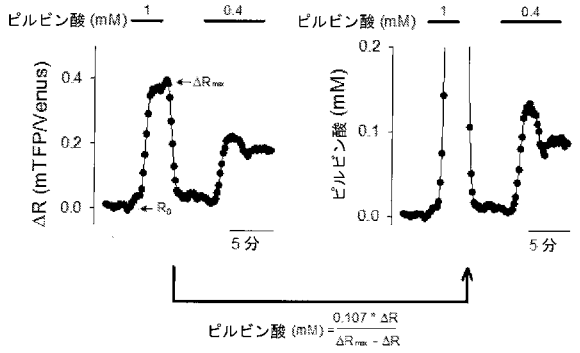
【図１６】

図 16



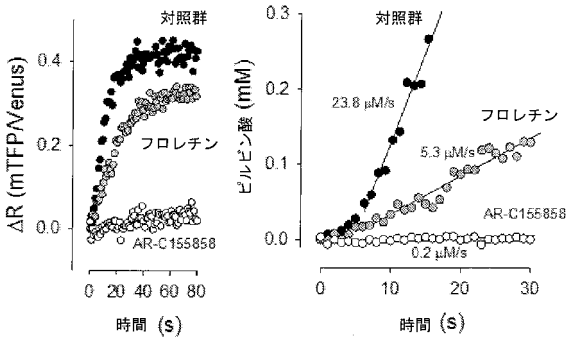
【図１７】

図 17



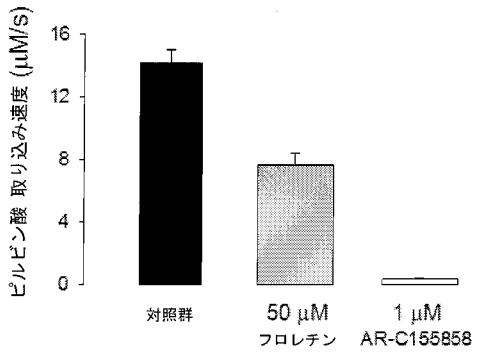
【図１８】

図 18



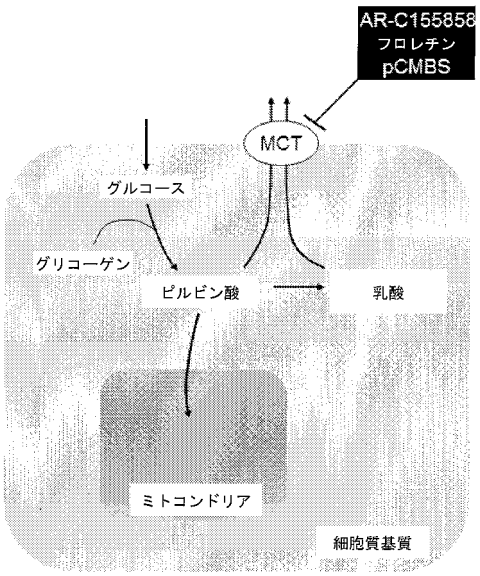
【図１９】

図 19



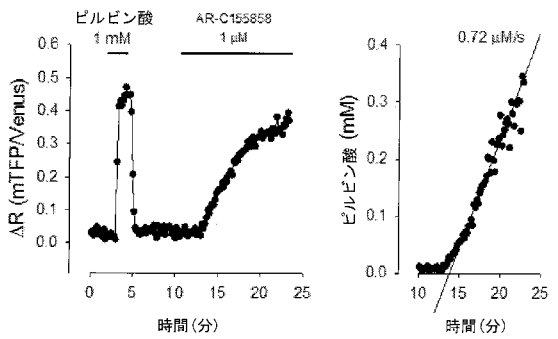
【図２０】

図 20



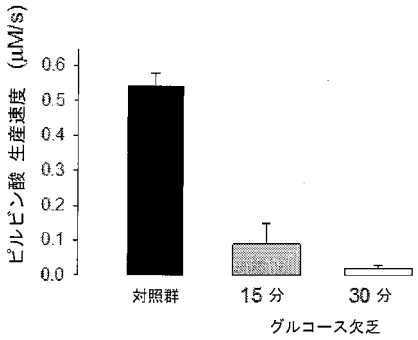
【図２１】

図 21



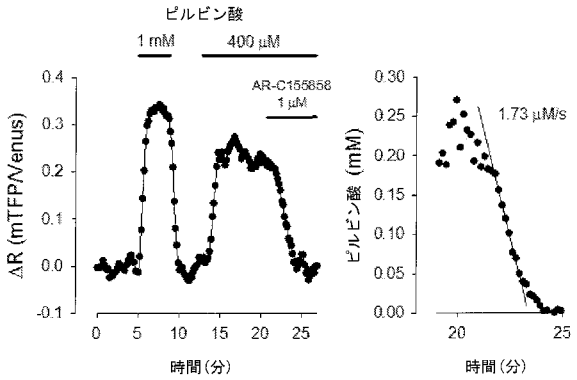
【図２２】

図 22



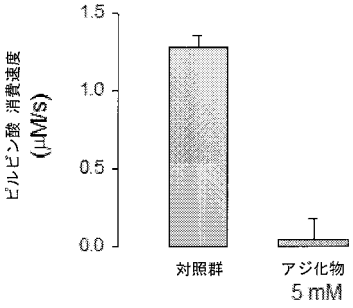
【図２３】

図 23



【図２４】

図 24



【配列表】
2016535271000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 13/56766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - G01N 21/64, G01N 33/53 (2014.01)
USPC - 435/7.1, 436/172
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)
IPC(8) - G01N 21/64, G01N 33/53 (2014.01)
USPC - 435/7.1, 436/172

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 436/805
(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB), Google Scholar, NCBI BLAST
Forster-Resonance-Energy-Transfer, FRET, pyruvate, sensor, PdhR, mTFP, monomeric teal fluorescent protein, CFP, cyan fluorescent protein, BFP, blue fluorescent protein, GFP, green fluorescent protein, YFP, yellow fluorescent protein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	SAN MARTIN et al., A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. PLoS One. 2013 (published online 26 February 2013), Vol 8, No 2, page e57712. Especially abstract; p 1, col 2, para 3; p 2, col 1, para 1; p 2, col 2, para 1; p 2, Fig 1(B)	1-4 --- 5
Y --- A	TROTTER et al., Reprogramming of Escherichia coli K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment. PLoS One. 2011, Vol 6, No 9, page e25501. Especially p 5, col 2, para 1-2	1-4 --- 5
Y	ACZ51347, GenBank Accession No ACZ51347. Venus+Strep tag [Cloning and transformation vector pHPdestVenus], 29 November 2009 [online]. [Retrieved on 03 June 2014]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/269854601?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=32&RID=SWAGZPVS014 > Entire document	4
A	HQ456318, GenBank Accession No HQ456318. Retroviral Tet-shRNA expression vector TtRMPVIR, complete sequence, 11 December 2010 [online]. [Retrieved on 3 June 2014]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ456318 > Entire document	5
A	WO 2013/154587 A1 (BARROS et al.) 17 October 2013 (17.10.2013) SEQ ID NOs: 17 and 21	5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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
03 June 2014 (03.06.2014)	08 JUL 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 13/56766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	SAN MARTIN et al., Imaging Mitochondrial Flux in Single Cells with a FRET Sensor for Pyruvate. PLoS One, 21 January 2014, Vol 9, No 1, p e85780	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 13/56766

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-14
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+ Claims 1-5, drawn to a FRET-based pyruvate sensor. Group I+ will be searched to the extent that it reads on amino acid sequence SEQ ID NO: 1 and nucleic acid sequence SEQ ID NO: 5 (corresponding to a sensor having the configuration: mTFP (donor) located at the N-terminus, followed by linker 1, PdhR, linker 2, and Venus (Acceptor) located at the C-terminus), without fee. It is believed that claims 1-3, 4 (in part), and 5 (in part), limited to SEQ ID NOs: 1 and 5 read on this first named invention. Applicants must indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: amino acid sequence SEQ ID NO: 2 and nucleic acid sequence SEQ ID NO: 6 (corresponding to a sensor having the configuration: mTFP (donor) located at the N-terminus, followed by PdhR, linker 2, and Venus (Acceptor) located at the C-terminus), claims 1-3, 4 (in part), and 5 (in part).
—please see continuation on extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-3, 4 (in part), and 5 (in part), limited to SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 13/56766

Continuation of:
Box No III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The special technical feature of each of the inventions of Group I+ is the specific pyruvate sensor comprising a specific sequence recited therein, not required by any other invention of Group I+.

Common Technical Features

The technical feature shared by the inventions of Groups I+ is a Forster Resonance Energy Transfer (FRET)-based pyruvate sensor comprising a bacterial PdhR transcription factor between any suitable donor and acceptor fluorescent proteins moieties that are capable in combination of serving as donor and acceptor moieties in FRET, which can be expressed in single cells or cell populations, adherent cells or in suspension, in a cell culture, a tissue culture, a mixed cell culture, a tissue explant, or in animal tissues in vivo; wherein the fluorescent proteins moieties are mTFP and Venus. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art because it is obvious over the article entitled "A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells" by San Martin et al. (PLoS One. 2013 (Published online 26 February 2013), Vol 8, No 2, page e57712) (hereinafter 'San Martin') in view of the article entitled " Reprogramming of Escherichia coli K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment" by Trotter et al. (PLoS One. 2011, Vol 6, No 9, page e25501) (hereinafter 'Trotter').

San Martin discloses Forster Resonance Energy Transfer (FRET)-based sensor (abstract; p 1, col 2, para 3 - "Genetically-encoded Forster Resonance Energy Transfer (FRET) nanosensors") comprising a transcription factor between any suitable donor and acceptor fluorescent proteins moieties that are capable in combination of serving as donor and acceptor moieties in FRET (p 2, col 2, para 1- "The general architecture of the sensors is pictured in Fig. 1B, with mTFP located at the N-terminus, the LldR flanked by linkers, and Venus located at the C-terminus."; p 2, Fig 1(B) - "General design: the transcriptional regulator LldR is sandwiched between fluorescent proteins mTFP and Venus, with artificial peptides separating the proteins (blue and orange linkers).").
which can be expressed in single cells (abstract - "Expressed in astrocytes, HEK cells and T98G glioma cells, the sensor allowed dynamic estimation of lactate levels in single cells"), wherein the fluorescent proteins moieties are mTFP and Venus (p 2, col 1, para 1 - "As a FRET pair we selected mTFP [22] and Venus [23], which, when compared with CFP and YFP, are brighter and less pH-sensitive.").
San Martin does not disclose wherein the sensor is a pyruvate sensor, or wherein the transcription factor is bacterial PdhR transcription factor. However, Trotter teaches that E. coli bacterial PdhR transcription factor is a sensor for pyruvate (p 5, col 2, para 1 - "pyruvate sensor PdhR"; abstract - "probabilistic modeling has revealed that pyruvate (sensed by PdhR) is a key metabolic signal in coordinating the reprogramming of E. coli K-12 gene expression"). One of ordinary skill in the art would have found it obvious to modify the FRET-based sensor of San Martin by replacing the LldR transcription factor as the recognition element for lactate with the bacterial PdhR
transcription factor as the recognition element for pyruvate, as taught by Trotter, thereby obtaining a FRET-based pyruvate sensor, because San Martin suggests such a modification to its sensor. Specifically, San Martin discloses that a wide variety of novel sensors can be created based on its teachings wherein other transcription factors, including transcription factors specific for pyruvate, are substituted in as the recognition element (p 5, col 2, para 2 -"The development of a sensor based on LldR provides the basis for creating a wide variety of novel indicators because the GntR superfamily, of which LldR is a member, comprises at least 270 other transcription factors that bind pyruvate, fatty acids, amino acids, TCA cycle intermediates, etc. [19,39], which are possible recognition elements for genetically-encoded nanosensors."). Thus, a FRET-based pyruvate sensor comprising a bacterial PdhR transcription factor would have been obvious in view of San Martin and Trotter.

Therefore, inventions of Groups I+ lack unity under PCT Rule 13.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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

(72)発明者 バロス, ルイス フェリペ
チリ, ５０９００００ ヴァルディヴィア, アルトゥーロ プラト ５１４
(72)発明者 セバーリョ, セバスティアン
チリ, ５０９００００ ヴァルディヴィア, アルトゥーロ プラト ５１４
(72)発明者 サン マルティン, アレハンドロ
チリ, ５０９００００ ヴァルディヴィア, アルトゥーロ プラト ５１４

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA03 FB12
4B065 AA01Y AA86Y AA90X AA90Y AB01 AC09 AC14 BA02 BD50 CA24
CA46
4H045 AA10 AA20 AA30 AA40 CA11 CA20 CA40 EA50 FA74