

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成30年11月1日 (2018.11.1)

【公表番号】特表2017-534851(P2017-534851A)

【公表日】平成29年11月24日 (2017.11.24)

【年通号数】公開・登録公報2017-045

【出願番号】特願2017-515812(P2017-515812)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

C 0 7 K 1/13 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

【 F I 】

G 0 1 N 33/48 Z N A P

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/53 D

C 0 7 K 1/13

C 0 7 K 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月18日 (2018.9.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R e n i l l a 緑色蛍光タンパク質 (R e n i l l a G F P) または R e n i l l a ルシフェラーゼタンパク質 (R e n i l l a L u c) で標識された目的のタンパク質を含む第 1 の構成成分と、

R e n i l l a G F P または R e n i l l a L u c で標識された細胞区画標的化部分を含む第 2 の構成成分と

を含み、

前記第 1 のタンパク質が前記 R e n i l l a G F P で標識される場合、前記細胞区画標的化部分は前記 R e n i l l a L u c で標識され、前記第 1 のタンパク質が前記 R e n i l l a L u c で標識される場合、前記細胞区画標的化部分は前記 R e n i l l a G F P で標識される

目的のタンパク質の輸送及び／または局在化を評価するバイオセンサー。

【請求項 2】

前記目的のタンパク質は前記 R e n i l l a L u c で標識され、前記細胞区画標的化部分は前記 R e n i l l a G F P で標識される、請求項 1 に記載のバイオセンサー。

【請求項 3】

前記目的のタンパク質が、i) エフェクタータンパク質、i i) 低分子 G T P アーゼに結合するタンパク質、例えば R h o 結合ポリペプチド、i i i) - アレスチンポリペプチド、i v) 細胞表面受容体タンパク質、v) G タンパク質サブユニットポリペプチド、v i) シグナル伝達ペプチド、v i i) アダプタータンパク質、v i i i) 受容体の刺激により形質膜へ動員されるタンパク質、i x) 受容体の刺激により形質膜から隔離されるタンパク質、または x) それらのフラグメントである、請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサー。

【請求項 4】

前記目的のタンパク質が細胞表面受容体である、請求項 3 に記載のバイオセンサー。

【請求項 5】

前記細胞表面受容体が G タンパク質共役型受容体 (G P C R) または受容体チロシンキナーゼ (R T K) である、請求項 4 に記載のバイオセンサー。

【請求項 6】

前記目的のタンパク質が プレクストリン相同 (P H) ドメインを含む、請求項 3 に記載のバイオセサー。

【請求項 7】

前記目的のタンパク質が P L C 1 の P H ドメインを含む、請求項 6 に記載のバイオセサー。

【請求項 8】

前記目的のタンパク質が ホルボールエステル / ジアシルグリセロール結合ドメインを含む、請求項 3 に記載のバイオセサー。

【請求項 9】

前記目的のタンパク質が P K C (C 1 b) のホルボールエステル / ジアシルグリセロール結合ドメインを含む、請求項 8 に記載のバイオセサー。

【請求項 10】

前記目的のタンパク質が、少なくとも 1 つの S H 2 及び / または S H 3 ドメインを含むアダプタータンパク質あるいはそのフラグメントである、請求項 3 に記載のバイオセサー。

【請求項 11】

前記細胞区画標的化部分が、形質膜 (P M) 標的化部分、エンドソーム標的化部分、ゴルジ標的化部分、リソソーム標的化部分、ペルオキシソーム標的化部分、オートファゴソーム標的化部分、リボソーム標的化部分、ミトコンドリア標的化部分、細胞骨格標的化部分または核標的化部分である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 12】

前記細胞区画標的化部分が 形質膜 (P M) 標的化部分またはエンドソーム標的化部分である、請求項 11 に記載のバイオセンサー。

【請求項 13】

前記 P M 標的化部分が、(a) パルミトイル化、ミリストイル化及び / もしくはプレニル化シグナル配列、ならびに / または (b) 多塩基配列を含む、請求項 12 に記載のバイオセンサー。

【請求項 14】

前記 P M 標的化部分が、アミノ酸配列 M G C I K S K G K D S (配列番号 1) 、 G K K K K K S K T K C V I M (配列番号 7) 、 C M S C K C V L S (配列番号 47) 、 C M S C K C C I L (配列番号 43) 、または S P K K G L L Q R L F K R Q H Q N N S K S (配列番号 8) を含む、請求項 13 に記載のバイオセンサー。

【請求項 15】

前記エンドソーム標的化部分が、FYVEドメインを含む、請求項12に記載のバイオセンサー。

【請求項 16】

前記エンドソーム標的化部分が、ヒトendofinの残基739～806（配列番号20）を含む、請求項15に記載のバイオセンサー。

【請求項 17】

前記エンドソーム標的化部分が、前記Renilla Lucもしくは前記Renilla GFPのC末端に融合している、及び／または、前記目的のタンパク質が、前記Renilla Lucもしくは前記Renilla GFPのN末端に融合している、請求項12、15及び16のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 18】

前記目的のタンパク質が、前記Renilla LucのN末端に融合している - アレスチンポリペプチドであり、かつ、前記細胞区画標的化部分が、前記Renilla GFPのC末端の端部に融合している、形質膜（PM）標的化部分またはエンドソーム標的化部分である、請求項3に記載のバイオセンサー。

【請求項 19】

前記目的のタンパク質が、前記Renilla LucのN末端に融合しているGPCRであり、かつ、前記細胞区画標的化部分が、前記Renilla GFPのC末端の端部に融合している、形質膜（PM）標的化部分またはエンドソーム標的化部分である、請求項4に記載のバイオセンサー。

【請求項 20】

前記第1及び第2の構成成分が、約50～約500個のアミノ酸の可動性ポリペプチドリンカーにより共有結合的に連結している、請求項1～19のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 21】

請求項1～20のいずれか一項に記載のバイオセンサーの前記第1及び／または第2の構成成分をコードする、核酸。

【請求項 22】

請求項1～20のいずれか一項に記載のバイオセンサーを発現する、宿主細胞。

【請求項 23】

作用物質が細胞中の目的のタンパク質の輸送を調節するかを決定する方法であって、
前記作用物質の存在及び不在で請求項1～20のいずれか一項に記載のバイオセンサーにおけるBRETシグナルを測定することを含み、
前記作用物質の不在下と比べた存在下での前記BRETシグナルの差が、前記作用物質が前記細胞中の前記目的のタンパク質の前記輸送を調節することを示す、前記方法。

【請求項 24】

第1及び第2の条件間の細胞区画における生体分子の量の調節を評価する方法であって、

前記生体分子に結合するタンパク質マーカーで標識されたRenilla緑色蛍光タンパク質（Renilla GFP）を含む第1の構成成分と

前記タンパク質マーカーで標識されたRenillaルシフェラーゼタンパク質（Renilla Luc）を含む第2の構成成分と

を含むバイオセンサーを提供することと、

前記第1及び第2の条件下のBRET受容体シグナルを測定することとを含み、

前記第1及び第2の条件間の前記BRETシグナルの差が、前記第1及び第2の条件間の前記細胞区画における前記生体分子の量の調節を示す、前記方法。

【請求項 25】

前記第1の条件が作用物質の存在であり、前記第2の条件が作用物質の不在である、請

求項 2 4 に記載の方法。