

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6932636号
(P6932636)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月20日(2021.8.20)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/62	(2006.01)
G 01 N 33/50	(2006.01)
G 01 N 33/15	(2006.01)
C 12 Q 1/66	(2006.01)
C 12 Q 1/02	(2006.01)
C 12 N 15/62	Z N A Z
G 01 N 33/50	Z
G 01 N 33/15	Z
C 12 Q 1/66	1/66
C 12 Q 1/02	1/02

請求項の数 19 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-520506 (P2017-520506)
(86) (22) 出願日	平成27年10月14日 (2015.10.14)
(65) 公表番号	特表2017-536104 (P2017-536104A)
(43) 公表日	平成29年12月7日 (2017.12.7)
(86) 國際出願番号	PCT/CA2015/051032
(87) 國際公開番号	W02016/058094
(87) 國際公開日	平成28年4月21日 (2016.4.21)
審査請求日	平成30年9月4日 (2018.9.4)
(31) 優先権主張番号	62/063,622
(32) 優先日	平成26年10月14日 (2014.10.14)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	512123824 ユニペルシテ ドゥ モントリオール カナダ国, アッシュ3セ 3ア7 モント リオール(ケベック), ブールバール エ ドゥアール-モンプティ 2900
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質活性化を監視するためのG β γ 相互作用タンパク質に基づいたバイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G タンパク質活性を検出するためのバイオセンサーシステムであって、前記バイオセンサーシステムは、以下の(A)または(B)で定義される要素：

(A)

- (i) 第1のバイオセンサーを含む第1の真核細胞であって、
(a) 共鳴エネルギー転移(RET)ドナー、(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG 相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；

G タンパク質及びG タンパク質を含む第2の成分、前記G タンパク質またはG タンパク質の1つは、(a) RETドナー、(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合しており、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ(DHFR)、-ラクタマーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第1及び第2の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する；及び

G タンパク質共役型レセプター(GPCR)である第3の成分、
を含む、第1の真核細胞、

- (ii) 第2のバイオセンサーを含む第2の真核細胞であって、
(i) で定義される前記第1、第2及び第3の成分；及び
組換えG タンパク質を含む第4の成分；

10

20

を含む、第2の真核細胞、

ここで、

・前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記 R E T アクセプターに融合しており；

・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

・前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；または

(B)

10

G タンパク質及び G タンパク質を発現し、かつバイオセンサーを含む真核細胞であつて、前記バイオセンサーは、

(a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合した G 相互作用タンパク質(I P)を含む第1の成分；

融合 G タンパク質共役型レセプター(G P C R)を含む第2の成分、前記 G P C R は、そのC末端で(a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合しており、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ(D H F R)、-ラクタマーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第1及び第2の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する；

20

組換え G タンパク質を含む第3の成分；

を含み、

ここで、

・前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T アクセプターに融合しており；

・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

・前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 G P C R は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、

を含む、前記バイオセンサーシステム。

30

【請求項2】

前記 G タンパク質が、前記 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第2の断片に融合している、請求項1に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項3】

前記 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第2の断片が、前記 G または G タンパク質のN末端で融合している、請求項1または2に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項4】

前記 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第1の断片が、前記 I P のC末端で融合している、請求項1～3のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項5】

a) 前記 I P が、前記 R E T アクセプターに融合しており、そして、b) 前記 G タンパク質、G タンパク質または G P C R が、前記 R E T ドナーに融合している、請求項1～4のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

40

【請求項6】

前記 R E T ドナーが、生物発光タンパク質であり、そして、前記 R E T アクセプターが、蛍光タンパク質である、請求項1～5のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項7】

前記生物発光タンパク質が、ルシフェラーゼである、請求項6に記載のバイオセンサーシステム。

50

【請求項 8】

前記蛍光タンパク質が、GFPである、請求項6または7に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項 9】

前記第1の成分が、前記I P、RETドナー、RETアクセプター、または第1の断片に融合した原形質膜(PM)標的化部分をさらに含む、請求項1~8のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項 10】

前記PM標的化部分が、プレニル化モチーフを含む、請求項9に記載のバイオセンサーシステム。

10

【請求項 11】

前記PM標的化部分が、アミノ酸配列KKKKKKSKTKCIVIM(配列番号37)を含む、請求項10に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項 12】

(i) 前記RETドナー、RETアクセプター、または第1の断片と(iii)前記PM標的化部分の間にフレキシブルリンカーをさらに含む、請求項9に記載のバイオセンサーシステムであって、前記フレキシブルリンカーが、50~500アミノ酸に対応する長さを有する、バイオセンサーシステム。

【請求項 13】

前記組換えGタンパク質が、G_q、G_s、G_{i1}、G_{i2}、G_{i3}、G_{t-cone}、G_{t-rod}、G_{t-gust}、G_z、G_{oA}、G_{oB}、G_{olf}、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、及びG₁₅/G₁₆から選択される天然ヒトGタンパク質、またはG66K、Y67C、及び/又はF75Gの少なくとも1つの突然変異を含むヒトG_qの変異体である、請求項1~12のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

20

【請求項 14】

前記I Pが、GRK2またはGRK3のプレクストリン相同(PH)ドメインを含む、請求項1~13のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【請求項 15】

(A)で定義される前記バイオセンサーシステムが、複数の第2のバイオセンサーを含み、前記第2のバイオセンサーの各々が、異なる組換えGタンパク質を含み、そして、前記異なる組換えGタンパク質が、以下のGタンパク質: G_q、G_s、G_{i1}、G_{i2}、G_{i3}、G_{t-cone}、G_{t-rod}、G_{t-gust}、G_z、G_{oA}、G_{oB}、G_{olf}、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、及びG₁₅/G₁₆の少なくとも2つである、請求項1~14のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

30

【請求項 16】

Gタンパク質及びGタンパク質を発現し、かつ以下の成分:

(i) (a) RETドナー、(b) RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(I P)を含む第1の成分;

(ii) 融合原形質膜(PM)標的化部分を含む第2の成分、前記PM標的化部分は、(a)RETドナー、(b)RETアクセプター、または(c)前記レポータータンパク質の第2の断片に融合しており、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ(DHFR)、-ラクタマーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第1及び第2の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する;

40

(iii) 組換えGタンパク質である第3の成分;

(iv) GPCRである第4の成分;

を含む真核細胞を含む、Gタンパク質活性を検出するためのバイオセンサーであって、ここで、

・前記I Pが前記RETドナーに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記

50

R E T アクセプターに融合しており；

・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

・前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、前記バイオセンサー。

【請求項 17】

試験薬剤が G P C R の活性を調節するかどうかの決定方法であって、前記方法は：
(1) 以下の (A)、(B)、または (C) で定義される要素を含むバイオセンサーを提供すること：

10

(A) 真核細胞であって、

(i) (a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または (c) レポータータンパク質の第1の断片に融合した G 相互作用タンパク質 (I P) を含む第1の成分；

(ii) G タンパク質または G タンパク質を含む第2の成分、前記 G タンパク質または G タンパク質の1つは、(a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または (c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合しており、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ (D H F R) 、 - ラクタマーゼ、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第1及び第2の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する、

20

ここで、

・前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記 R E T アクセプターに融合しており；

・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

・前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

(iii) 組換え G タンパク質を含む第3の成分；及び

(iv) 前記 G P C R を含む第4の成分、

を含む真核細胞；

30

(B) 真核細胞であって、G タンパク質及び G タンパク質を発現し、かつ

(i) (a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または (c) レポータータンパク質の第1の断片に融合した G 相互作用タンパク質 (I P) を含む第1の成分；

(ii) その C 末端で (a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または (c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合した前記 G P C R を含む第2の成分、ここで、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ (D H F R) 、 - ラクタマーゼ、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第1及び第2の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する；

40

(iii) 組換え G タンパク質を含む第3の成分；

ここで、

・前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T アクセプターに融合しており；

・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

・前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 G P C R は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、
を含む真核細胞；または

(C) 真核細胞であって、G タンパク質及び G タンパク質を発現し、かつ

50

(i) (a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または(c) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G 相互作用タンパク質(I P)を含む第 1 の成分；

(i i) 融合原形質膜(P M)標的化部分を含む第 2 の成分、前記 P M 標的化部分は、(a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合しており、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ(D H F R)、- ラクタマーゼ、- ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第 1 及び第 2 の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する；

ここで、

10

・前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T アクセプターに融合しており；

・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

・前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；

(i i i) 組換え G タンパク質を含む第 3 の成分；及び

(i v) 前記 G P C R を含む第 4 の成分、

を含む真核細胞；及び

20

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記 R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；

ここで、前記薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記 G P C R の活性を増加させることを示すか、または、前記薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記薬剤が前記 G P C R の活性を阻害することを示す、を含む、前記方法。

【請求項 1 8】

G タンパク質が G P C R アゴニストによって活性化されるかどうかの決定方法であつて、前記方法は：

(A)

30

(a) 請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステムの前記第 1 及び第 2 のバイオセンサー中で前記 G P C R アゴニストの存在下及び不在下において、前記 R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること、及び

(b) 前記 R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルに基づいて、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されるかどうかを同定すること；

ここで、前記第 1 のバイオセンサーに対して前記第 2 のバイオセンサー中の前記 G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されることを示すか、または、前記第 1 のバイオセンサーに対して前記第 2 のバイオセンサー中の前記 G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されないことを示す；または

40

(B)

(a 1) G タンパク質及び G タンパク質を発現し、かつ以下の(i)、及び(i i)を含む第 1 のバイオセンサーを含む第 1 の真核細胞中の前記 G P C R アゴニストの存在下及び不在下において、R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること：

(i) (a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または(c) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G 相互作用タンパク質(I P)を含む第 1 の成分；及び

(i i) 融合 G タンパク質共役型レセプター(G P C R)を含む第 2 の成分、前記 G

50

P C R は、その C 末端で (a) R E T ドナー、(b) R E T アクセプター、または (c) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合しており、前記レポータータンパク質は、ジヒドロ葉酸リダクターゼ (D H F R) 、 - ラクタマーゼ、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質であり、そして、前記第 1 及び第 2 の断片は、近接させると、前記レポータータンパク質を非共有的に再構成する；

(b 1) G タンパク質及び G タンパク質を発現し、かつ以下の (i) 、及び (ii) を含む第 2 のバイオセンサーを含む第 2 の真核細胞中の前記 G P C R アゴニストの存在下及び不在下において、R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること：

(i) (a 1) で定義される前記第 1 及び第 2 の成分；及び 10

(ii) 前記 G タンパク質の組換え形態を含む第 3 の成分；

ここで、

- ・前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T アクセプターに融合しており；

- ・前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び

- ・前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 G P C R は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；
を含み、

ここで：

前記第 1 のバイオセンサーに対して前記第 2 のバイオセンサー中の前記 G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されることを示すか、または、前記第 1 のバイオセンサーに対して前記第 2 のバイオセンサー中の前記 G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されないことを示す、前記方法。

【請求項 19】

試験薬剤が目的 G タンパク質のインヒビターまたは活性化因子であるかどうかの決定方法であって、前記方法は：

(1)

(a) 請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の要素 (A) で定義される第 2 のバイオセンサー、または

(b) 請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の要素 (B) で定義されるバイオセンサ－

を G P C R アゴニストまたはアンタゴニストと接触させること、前記組換え G タンパク質は、前記目的 G タンパク質に対応する；

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記 R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；及び

(3) 前記試験薬剤が前記 G タンパク質のインヒビターまたは活性化因子であるかどうかを決定すること、を含み、

ここで、

(i) 前記 G P C R アゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的 G タンパク質のインヒビターであることを示し、前記 G P C R アゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的 G タンパク質のインヒビターではないことを示す；または

(ii) 前記 G P C R アンタゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的 G タンパク質活性化因子であることを示し、前記 G P C R アンタゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的 G タンパク質活性化

10

20

30

40

50

因子ではないことを示す、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年10月14日に出願された米国特許仮出願番号第62/063,622号の利益を主張し、その内容全体を参照によって本願明細書に引用したものとする。

【0002】

本開示は、Gタンパク質活性化を監視することに関し、より詳細には、Gタンパク質活性化を検出するためのシグナル伝達バイオセンサーに関する。 10

【背景技術】

【0003】

3つのサブユニット¹、²、及び³からなるヘテロ三量体Gタンパク質は、Gタンパク質共役型レセプター(GPCR)によって提供された情報を種々の細胞内エフェクターに中継する。刺激が無い場合には、Gタンパク質のサブユニットは、GDP(グアノシン二リン酸)分子と複合体を形成している。リガンドによるレセプターの活性化に伴う立体配座の変化は、GDP分子のGTP(グアノシン三リン酸)へのリン酸化を促進する。GTP結合Gサブユニットは、G¹サブユニットから解離した後、それらは双方とも、下流エフェクターと相互作用し、それらの活性を調節するのに利用できる。従って、Gタンパク質活性化は、G¹相互作用タンパク質(IP)を用いて、G¹との相互作用を介してそれらの下流エフェクターを分析することによって評価することができる。G¹サブユニットによるGDPへのGTP加水分解後、G¹に対するG¹親和性は回復し、3つのサブユニットは再会合して、不活性ヘテロ三量体Gタンパク質を形成し、エフェクターの関与、従って、シグナル伝達が終了する(Gilman, 1987)。 20

【0004】

GPCRによるGタンパク質の古典的な活性化に加えて、他のタンパク質は、これらのヘテロ三量体Gタンパク質、例えば、Gタンパク質シグナル伝達(RGS)の調節因子、Gタンパク質シグナル伝達(AGS)の活性化因子の活性、及びコリンエステラーゼ8タンパク質(Ric-8)のインヒビターへの耐性を調節することもできる。これらの非正準的シグナル伝達経路のいくつかでは、GPCRによって古典的に発揮されたグアニン交換因子(GEF)活性は、例えば、Ric-8などの別のタンパク質に置き換えられる(Boulaaran and Kehrl, 2014)。 30

【0005】

レセプターの脱感作への役割について最初に特徴付けられたGタンパク質共役型レセプターキナーゼ(GRK)2及び3は、G¹サブユニットとの相互作用を介して関与したエフェクターである。GRK2及びGRK3は、活性化したGTP結合Gサブユニットから解離する際にGタンパク質のG¹サブユニットと相互作用するブレクストリン相同(PH)ドメイン含有(Pitcher, Inglesira, 1992)(Toohara, Inglesira, 1994)。その結果、GRK2及びGRK3などの、G¹(IP)と相互作用するタンパク質を使用して、GPCRまたは他のGタンパク質活性化因子によるGタンパク質活性化を直接研究することができる。 40

【0006】

いくつかのアプローチは、創薬業界において、GPCRの活性化、従って、レセプターによるGタンパク質の関与を評価するために現在使用されており、例えば、Gタンパク質によるGTP-S取り込みに基づいたカルシウム動員アッセイまたは放射性分析である。カルシウム動員アッセイは、下流のGq活性化で発生しているシグナル伝達事象を測定し、改変G¹サブユニットの使用により共役した場合にのみ、GiまたはGs共役レセプターに適用することができる。GTP-S取り込みアッセイの場合では、種々のヘテロ三量体Gタンパク質の活性化は、放射性GTP-³⁵Sを用いて細胞膜上で直接測定し、生き 50

た細胞で行うことはできない。

【0007】

Gタンパク質活性化因子またはGサブユニットを改変することなく、生きた細胞中のGタンパク質の活性化は、今までのところ研究が行われていない。さらに、公知の方法は、同じ検出パートナーを用いて全ての異なるGタンパク質を研究するには適切ではない。そのようなアッセイは、Gタンパク質カッピングプロファイルの特徴付けを可能にし、かつ、例えば、スクリーニングアッセイ及び構造・活性の相関研究に使用されるシグナル伝達特性を定義して新規化合物の同定を容易にすることによって、異なる段階の創薬プロセスで特に有用であろう。これは、処方された全ての薬剤の26%がGPCRを介して作用するため、薬剤標的としてGタンパク質活性化因子の重要性を考えると特に当てはまる(Garland 2013)。Gタンパク質活性化因子を標的化する新規の治療活性分子の開発を支援するのにいくつかのアプローチが利用可能であるが、新規薬剤の発見は、それらの化合物の正確な作用機序に利用できる情報が不足していることで制限されることが多い。10

【0008】

従って、Gタンパク質の活性化を評価する新規のツール及びアッセイが求められている。

【0009】

本説明は、多くの文書を指し、その内容全体を参照によって本明細書に引用したものとする。

20

【発明の概要】

【0010】

本発明は、以下の項目1~68を提供する：

1.(A)、または(B)で定義される要素を含む、Gタンパク質活性を検出するためのバイオセンサーシステムであって、

(A)

(a) 共鳴エネルギー転移(RET)ドナー；(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；及び

融合Gタンパク質または融合Gタンパク質を含む第2の成分、前記Gタンパク質または前記Gタンパク質は、(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

を含む、(i) 第1のバイオセンサー、

(i) で定義される前記第1及び第2の成分；及び

組換えGタンパク質を含む第3の成分；

(a) 前記IIPが前記RETドナーに融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記RETアクセプターに融合しており；(b) 前記IIPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記RETドナーに融合しており；及び(c) 前記IIPが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

30

を含む、(ii) 第2のバイオセンサー、または

(B)

(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；

融合Gタンパク質共役型レセプター(GPCR)を含む第2の成分、前記GPCRは、そのC末端で(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

組換えGタンパク質を含む第3の成分；

(a) 前記IIPが前記RETドナーに融合している場合、前記GPCRは、前記

40

50

R E T アクセプターに融合しており；(b) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び(c) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 G P C R は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している

を含む、(i) バイオセンサー

を含む、前記バイオセンサーシステム。

【 0 0 1 1 】

2 . 前記 G タンパク質が、前記 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第 2 の断片に融合している、項目 1 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 2 】

3 . 前記 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第 2 の断片が、前記 G または G タンパク質の N 末端で融合している、項目 1 または 2 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 3 】

4 . 前記 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第 1 の断片が、前記 I P の C 末端で融合している、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 4 】

5 . 前記 I P が、前記 R E T アクセプター及び前記 G タンパク質に融合しており、G タンパク質または G P C R が、前記 R E T ドナーに融合している、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 5 】

6 . 前記 R E T ドナーが、生物発光タンパク質である、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 6 】

7 . 前記生物発光タンパク質が、ルシフェラーゼである、項目 6 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 7 】

8 . 前記ルシフェラーゼが、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼである、項目 7 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 8 】

9 . 前記 R E T アクセプターが、蛍光タンパク質である、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 1 9 】

10 . 前記蛍光タンパク質が、G F P である、項目 9 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 2 0 】

11 . 前記 I P が、前記第 1 の断片に融合しており、及び前記 G タンパク質、G タンパク質または G P C R が、前記第 2 の断片に融合している、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 2 1 】

12 . 前記レポータータンパク質が、生物発光タンパク質である、項目 1 1 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 2 2 】

13 . 前記生物発光タンパク質が、ルシフェラーゼである、項目 1 2 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 2 3 】

14 . 前記ルシフェラーゼが、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼである、項目 1 3 に記載のバイオセンサーシステム。

【 0 0 2 4 】

15 . 前記第 1 の断片が、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの約 1 ~ 1 1 0 残基を含み

10

20

30

40

50

、及び前記第2の断片が、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの約111～311残基を含む、項目14に記載のバイオセンサーシステム。

【0025】

16. 前記第1の成分が、前記I Pまたは前記R E Tドナー、R E Tアクセプター、または第1の断片に融合した原形質膜(P M)標的化部分をさらに含む、項目1～15のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0026】

17. 前記P M標的化部分が、前記R E Tドナー、R E Tアクセプター、または第1の断片のC末端で融合している、項目16に記載のバイオセンサーシステム。

【0027】

18. 前記P M標的化部分が、プレニル化モチーフを含む、項目16または17に記載のバイオセンサーシステム。

【0028】

19. 前記プレニル化モチーフが、ヒトK R A Sスプライス変異体bのプレニル化モチーフである、項目16に記載のバイオセンサーシステム。

【0029】

20. 前記P M標的化部分が、アミノ酸配列K K K K K S K T K C V I M(配列番号37)を含む、項目19に記載のバイオセンサーシステム。

【0030】

21.(i) 前記R E Tドナー、R E Tアクセプター、または第1の断片と(ii)前記P M標的化部分の間にフレキシブルリンカーをさらに含む、項目16～20のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0031】

22. 前記フレキシブルリンカーが、約50～約500アミノ酸に対応する長さを有する、項目21に記載のバイオセンサーシステム。

【0032】

23. 前記フレキシブルリンカーが、約200アミノ酸に対応する長さを有する、項目22に記載のバイオセンサーシステム。

【0033】

24. 前記組換えGタンパク質が、ヒトG_q、G_s、G_{i1}、G_{i2}、G_{oB}、G_{o1f}、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、及びG₁₅/G₁₆タンパク質、またはそれらの無差別または非選択的G変異体、例えば、本明細書に記載されるヒトG_qタンパク質の残基66、67、及び/または75に対応する位置で突然変異を含む突然変異Gポリペプチドである、項目1～23のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0034】

25. 前記I Pが、G R K 2またはG R K 3である、項目1～24のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0035】

26.(i) 前記第2の成分が融合Gタンパク質を含む場合、前記第1及び第2のバイオセンサーは、組換えGタンパク質をさらに含み、または(ii)前記第2の成分が融合Gタンパク質を含む場合、前記第1及び第2のバイオセンサーは、組換えGタンパク質をさらに含む、項目1～25のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0036】

27.(A)で定義される前記バイオセンサーシステムが、Gタンパク質共役型レセプター(G P C R)をさらに含む、項目1～25のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0037】

28.(B)で定義される前記バイオセンサーシステムが、組換えGタンパク質及び

10

20

40

50

/または組換えG タンパク質をさらに含む、項目1～27のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0038】

29. 前記第1のバイオセンサーが、第1の細胞中に存在し、前記第2のバイオセンサーが、第2の細胞中に存在する、項目1～28のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0039】

30. (A)で定義される前記バイオセンサーシステムにおいて、前記第1のバイオセンサーが、第1の膜調製物中に存在し、及び前記第2のバイオセンサーが、第2の膜調製物中に存在する、項目1～28のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0040】

31. (A)で定義される前記バイオセンサーシステムが、複数の第2のバイオセンサーを含み、前記第2のバイオセンサーの各々が、異なる組換えG タンパク質を含む、項目1～30のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステム。

【0041】

32. 前記異なる組換えG タンパク質が、以下のG タンパク質: G_q、G_s、G_{i1}、G_{i2}、G_{i3}、G_{t-cone}、G_{t-rood}、G_{t-gust}、G_z、G_{oA}、G_{oB}、G_{o1f}、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、及びG₁₅ / G₁₆の少なくとも2つである、項目31に記載のバイオセンサーシステム。

【0042】

33. 項目1～26のいずれか1項で定義される第1、第2、及び第3の成分をコードする配列を含む、核酸。

【0043】

34. G タンパク質またはG タンパク質をコードする配列をさらに含む、項目33に記載の核酸。

【0044】

35. 1つ以上の翻訳調節配列をさらに含む、項目33または34に記載の核酸。

【0045】

36. 前記1つ以上の翻訳調節配列が、内部リボソーム導入部位(IRES)である、項目35に記載の核酸。

【0046】

37. Gタンパク質活性を検出するためのバイオセンサーであって、(i)(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG 相互作用タンパク質(IP)を含む第1の成分；及び

(ii)融合原形質膜(PM)標的化部分を含む第2の成分、前記PM標的化部分は、(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

を含み、

(a)前記IPが前記RETドナーに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETアクセプターに融合しており；(b)前記IPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETドナーに融合しており；及び(c)前記IPが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記PM標的化部分は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、前記バイオセンサー。

【0047】

38. 前記PM標的化部分が、PMタンパク質または前記PMに局在化するその断片である、項目37に記載のバイオセンサー。

【0048】

10

20

30

40

50

39. 前記 P M タンパク質またはその断片が、(a) パルミトイ化、ミリストイル化、及び / またはブレニル化シグナル配列、及び / または(b) 多塩基性配列を含む、項目 38 に記載のバイオセンサー。

【 0049 】

40. 前記多塩基性配列及びブレニル化シグナル配列が、ヒト K R A S スプライス変異体 b 由来である、項目 39 に記載のバイオセンサー。

【 0050 】

41. 前記 P M 標的化部分が、アミノ酸配列 K K K K K S K T K C V I M (配列番号 37) を含む、項目 40 に記載のバイオセンサー。

【 0051 】

42. 前記バイオセンサーが、組換え G タンパク質を含む第 3 の成分をさらに含む、項目 37 ~ 41 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサー。

【 0052 】

43. 前記組換え G タンパク質が、G_q ファミリーである、項目 42 に記載のバイオセンサー。

【 0053 】

44. 前記組換え G タンパク質が、G₁₁ または G₁₂ である、項目 43 に記載のバイオセンサー。

【 0054 】

45. 試験薬剤が G P C R の活性を調節するかどうかの決定方法であって、

(1) (A) 、 (B) 、または (C) で定義される要素を含むバイオセンサーを提供すること :

(A)

(i) (a) R E T ドナー ; (b) R E T アクセプター、または (c) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G_q 相互作用タンパク質 (I P) を含む第 1 の成分 ;

(ii) 融合 G_q タンパク質または融合 G₁₁ タンパク質を含む第 2 の成分、前記 G_q タンパク質または前記 G₁₁ タンパク質は、(a) R E T ドナー ; (b) R E T アクセプター、または (c) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している、

(a) 前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G_q または G₁₁ タンパク質は、前記 R E T アクセプターに融合しており ; (b) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G_q または G₁₁ タンパク質は、前記 R E T ドナーに融合しており ; 及び (c) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 G_q または G₁₁ タンパク質は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している ;

(iii) 組換え G_q タンパク質を含む第 3 の成分 ; 及び

(iv) 前記 G P C R を含む第 4 の成分 ;

(B)

(i) (a) R E T ドナー ; (b) R E T アクセプター、または (c) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G_q 相互作用タンパク質 (I P) を含む第 1 の成分 ;

(ii) その C 末端で (a) R E T ドナー ; (b) R E T アクセプター、または (c) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合した前記 G P C R を含む第 2 の成分 ;

(iii) 組換え G_q タンパク質を含む第 3 の成分 ;

(a) 前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T アクセプターに融合しており ; (b) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T ドナーに融合しており ; 及び (c) 前記

I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 G P C R は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している ; または

(C)

10

20

30

40

50

(i) (a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG 相互作用タンパク質(I P)を含む第1の成分；

(i i) 融合原形質膜(PM)標的化部分を含む第2の成分、前記PM標的化部分は、(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

(a) 前記 I P が前記RETドナーに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETアクセプターに融合しており；(b) 前記 I P が前記RETアクセプターに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETドナーに融合しており；及び(c) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記PM標的化部分は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

(i i i) 組換えG タンパク質を含む第3の成分；及び

(i v) 前記GPCRを含む第4の成分；及び

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；

前記薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記GPCRの活性を増加させることを示し、前記薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記薬剤が前記GPCRの活性を阻害することを示す

を含む、前記方法。

【0055】

46. 前記バイオセンサーが、項目2～32及び38～44で定義される特徴の1つ以上を含む、項目44に記載の方法。

【0056】

47. G タンパク質がGPCRアゴニストによって活性化されるかどうかの決定方法であって、

(a) 項目1～32のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステムの前記第1及び第2のバイオセンサー中で前記GPCRアゴニストの存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること、及び

(b) 前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルに基づいて、前記G タンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されるかどうかを同定すること；

前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記G タンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されることを示し、前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記G タンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されないことを示す

を含む、前記方法。

【0057】

48. G タンパク質がGPCRアゴニストによって活性化されるかどうかの決定方法であって、

(a) 以下の(i)、及び(i i)を含む第1のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下及び不在下において、RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること：

(i) (a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG 相互作用タンパク質(I P)を含む第1の成分；及び

(i i) 融合Gタンパク質共役型レセプター(GPCR)を含む第2の成分、前記GPCRは、そのC末端で(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

10

20

30

40

50

(b) 以下の(i)、及び(ii)を含む第2のバイオセンサー中の前記G P C Rアゴニストの存在下及び不在下において、R E Tアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること：

(i) (a)で定義される前記第1及び第2の成分；及び

(ii) 前記Gタンパク質の組換え形態を含む第3の成分；

(a) 前記I Pが前記R E Tドナーに融合している場合、前記G P C Rは、前記R E Tアクセプターに融合しており；(b) 前記I Pが前記R E Tアクセプターに融合している場合、前記G P C Rは、前記R E Tドナーに融合しており；及び(c) 前記I Pが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記G P C Rは、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記G P C Rアゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記Gタンパク質が前記G P C Rアゴニストによって活性化されることを示し、前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記G P C Rアゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記Gタンパク質が前記G P C Rアゴニストによって活性化されないことを示す

を含む、前記方法。

【0058】

49. 前記バイオセンサーが、項目38～44で定義される特徴の1つ以上を含む、項目47に記載の方法。

【0059】

50. (3) 以下の(a)、(b)、または(c)中の前記R E Tアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること

(a) 項目1～31のいずれか1項に記載の要素(A)で定義される第2のバイオセンサー(複数可)、

(b) 項目1～31のいずれか1項に記載の要素(B)で定義されるバイオセンサー、または

(c) 項目42～44のいずれか1項に記載のバイオセンサー、

試験薬剤の存在下及び不在下において、及びG P C Rアゴニストの存在下において、前記組換えGタンパク質は、前記G P C Rにカップリングしている；及び

(4) 前記試験薬剤が前記Gタンパク質のインヒビターであるかどうかを決定すること；

前記試験薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記Gタンパク質のインヒビターであることを示し、前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記Gタンパク質のインヒビターではないことを示す

をさらに含む、項目45に記載の方法。

【0060】

51. 試験薬剤が目的Gタンパク質のインヒビターであるかどうかの決定方法であつて、

(1)

(a) 項目1～32のいずれか1項に記載の要素(A)で定義される第2のバイオセンサー(複数可)、

(b) 項目1～32のいずれか1項に記載の要素(B)で定義されるバイオセンサー、または

(c) 項目42～44のいずれか1項に記載のバイオセンサー

をG P C Rアゴニストと接触させること、前記組換えGタンパク質は、前記目的Gタンパク質に対応する；

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記R E Tアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；及び

10

20

30

40

50

(c) 前記試験薬剤が前記G タンパク質のインヒビターであるかどうかを決定すること

前記試験薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的G タンパク質のインヒビターであることを示し、前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的G タンパク質のインヒビターではないことを示す

を含む、前記方法。

【0061】

52. 試験薬剤が目的G タンパク質活性化因子であるかどうかの決定方法であって、

(1)

(a) 項目1～32のいずれか1項に記載の要素(A)で定義される第2のバイオセンサー(複数可)、

(b) 項目1～32のいずれか1項に記載の要素(B)で定義されるバイオセンサー、または

(c) 項目42～44のいずれか1項に記載のバイオセンサー

をGPCRアンタゴニストと接触させること、前記組換えG タンパク質は、前記目的G タンパク質に対応する；

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；及び

(3) 前記試験薬剤が前記G タンパク質活性化因子であるかどうかを決定すること、

前記試験薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的G タンパク質活性化因子であることを示し、前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的G タンパク質活性化因子ではないことを示す

を含む、前記方法。

【0062】

53. 前記RETドナーが、生物発光タンパク質であり、前記方法が、前記バイオセンサーを前記ドナー生物発光タンパク質の基質で接触させることをさらに含む、項目45～52のいずれか1項に記載の方法。

【0063】

54. 前記基質が、ルシフェリンである、項目53に記載の方法。

【0064】

55. 前記ルシフェリンが、セレンテラジンである、項目54に記載の方法。

【0065】

56. 前記セレンテラジンが、セレンテラジン400Aである、項目55に記載の方法。

【0066】

57. 前記バイオセンサーが、RETドナー及びRETアクセプターを含み、前記方法が、(i) 前記RETドナーが発したシグナルを測定すること、及び(ii) [RETアクセプターシグナル/RETドナーシグナル]の比を決定することをさらに含む、項目45～56のいずれか1項に記載の方法。

【0067】

58. ヒトG_qタンパク質の残基67及び/または残基75に対応する位置で突然変異を含む、突然変異G ポリペプチド。

【0068】

59. 前記突然変異が置換である、項目58に記載の突然変異G ポリペプチド。

【0069】

60. 前記突然変異が、ヒトG_qタンパク質の残基67に対応する位置である、項目58または59に記載の突然変異G ポリペプチド。

【0070】

10

20

30

40

50

61. 前記突然変異が、非芳香族残基の置換である、項目60に記載の突然変異G ポリペプチド。

【0071】

62. 非芳香族残基がシステインである、項目61に記載の突然変異G ポリペプチド。

【0072】

63. 前記突然変異が、ヒトG_qタンパク質の残基75に対応する位置である、項目58または59に記載の突然変異G ポリペプチド。

【0073】

64. 前記突然変異が、非芳香族残基の置換である、項目63に記載の突然変異G ポリペプチド。 10

【0074】

65. 前記非芳香族残基がグリシンである、項目64に記載の突然変異G ポリペプチド。

【0075】

66. 項目58～65のいずれか1項に記載の突然変異G ポリペプチドをコードする配列を含む、核酸。

【0076】

67. 項目66に記載の核酸を含む、プラスミドまたはベクター。

【0077】

68. 項目65に記載の核酸または項目67に記載のプラスミドを含む、細胞。

【0078】

本発明の他の目的、利点、及び特徴は、添付図面を参照しながら、例としてのみ提示された特定の実施形態についての以下の非限定的な説明を読めば、より明らかになろう。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1A】図1A～1Cは、Gタンパク質活性化因子の一例としてGPCRを用いて、Gタンパク質活性化のためのIPベースバイオセンサーの使用の基礎をなす原理を示す概略図を示す。アッセイは、G二量体と結合するためのGサブユニットとIPの間の競合に基づいている。不活性形態である間には、ヘテロ三量体Gタンパク質のGサブユニットは、G二量体と強く結合している。レセプターとリガンド結合する際に、Gサブユニットは、GDP結合形態からGTP結合形態に切り替わり、Gサブユニットからの解離をもたらし、IPが遊離Gサブユニットに補充される。従って、IPとGの間の相互作用は、レセプターを刺激する際の特定のGタンパク質活性化を反映している。様々な検出方法、例えば、共鳴エネルギー転移(RET)アプローチ(図1A)、またはタンパク質相補性(PC)アッセイ(図1B)を使用して、IPとGの間の相互作用を評価することができる。共鳴エネルギー転移アプローチでは、IP及びGをエネルギーードナー及びアクセプターで標識し、Gタンパク質を活性化する際に、RETシグナルの増加が観察される。タンパク質相補性アッセイの場合では、IP及びGは、蛍光タンパク質もしくは発光酵素の断片に融合し、Gタンパク質活性化後、2つの断片の相補性は、蛍光シグナルまたは酵素活性の増加をもたらす。図1Cは、Gタンパク質活性化のIPベースバイオセンサーの結果の理論的なシナリオ及び対応する解釈を示す。検出方法の一例としてBRETを用いた3つの異なるシナリオを図1Cに示す。シナリオ1(左)では、細胞は、ヘテロ三量体Gタンパク質のGサブユニット以外はバイオセンサーの全ての成分で形質移入する。サブユニットの欠如により、過剰なGサブユニットが、基底状態でIPとの相互作用を引き起こす。シナリオ2(中央)では、バイオセンサーの全ての成分を形質移入するが、過剰発現するGサブユニット(G₁)は、目的レセプターと機能的に共役しない。シナリオ3(右)は、その全ての成分が目的レセプターの適正なGサブユニット(G₂)と共に発現される場合のバイオセンサーの典型的な反応を示す。この場合、レセプター活性化は、B R 30 40 50

E T シグナルの増加をもたらし、これは、特異的 G サブユニットに予め共役した R L u c 標識 G サブユニットへの G F P 標識 I P の補充によって引き起こされる。

【図 1 B】上記説明に同じ。

【図 1 C】上記説明に同じ。

【図 2 A】 I P ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーの最適化のために試験した異なる構築物のいくつかを提示する。図 2 A では、 G R K 2 / 3 の構造を提示する。 G R K 2 / 3 は、異なる機能ドメインであり、カルモジュリン結合ドメイン (C A M) 、本明細書に記載された D 1 1 0 A 置換によって不活性化され得る R G S (G タンパク質シグナル伝達の調節因子) ドメイン、本明細書に記載された K 2 2 0 R 置換によって不活性化され得るそのキナーゼ活性の触媒ドメイン、 P I P ₂ 及びヘテロ三量体 G タンパク質の G

サブユニットと結合するプレクストリン相同ドメイン (P H ドメイン) である。これらの相互作用は、原形質膜への G R K 転座及びその活性化を促進する。 G R K (セリン 6 7 0 及び 6 8 5) の C 末端部分のリン酸化は、その活性を調節すると報告されている。 G R K 2 及び G R K 3 に対する 4 つの異なる G F P 標識構築物を試験した。そのうちの 2 つは、完全 G R K コード配列に基づき、 2 つは、 C 末端 P H ドメイン / G 結合ドメインに基づき、 G F P は、 G R K の N 末端または C 末端部分のいずれかである。 G 及び G サブユニットの双方は、 B R E T 標識との融合として試験し、 G R K / G 相互作用を監視するのに使用することができる。

【図 2 B】図 2 B 及び図 2 C は、 4 つの異なる G R K 構築物 (図 2 A) の異なる比率 (滴定) と、 G _{1 5} の ₁ A R 活性化について得られた反応 (図 2 B) 、及び G _{1 1} のトロンボキサン A 2 レセプター (T P R) 媒介性活性化について得られた反応 (図 2 C) との試験を示す。アクセプターに対する B R E T ドナーの滴定は、レセプター及び G (図 2 B では ₁ A R / G _{1 5} 、図 2 C では T P R / G _{1 1}) 、 G ₁ 、 R l u c I I - G ₅ (9 6 ウエルプレートのウェル当たり 0 . 5 n g) をコードする構築物と、及び G F P 1 0 で標識された可変量 (最大 7 5 n g / ウェル) の G R K 2 構築物とで形質移入した H E K 2 9 3 細胞上で行った。細胞をビヒクルまたはアゴニスト (₁ A R 及び T P R をそれぞれ発現する細胞について、 1 μ M のイソプロテレノール及び 1 0 0 n M の U - 4 6 6 1 9) で 1 5 分間処理した。 B R E T 比は、 R l u c I I 構築物発現 (生物発光で評価) に対する G F P 構築物発現 (蛍光で評価) の関数で報告された。その C 末端にて B R E T ドナー (G F P) で標識された全長 G R K は、より広範囲のドナー対アクセプター比にわたって、 B R E T シグナルの振幅及び反応の安定性について最良の動的ウインドウを与えていていることが、これらの結果により示される。

【図 2 C】上記説明に同じ。

【図 3 A】図 3 A ~ 3 C は、 I P ベースバイオセンサーを用いた、 T P R の G タンパク質活性化プロファイルを示す。図 3 A : G R K 2 - G F P 、 R l u c - G ₅ 、 G ₁ 、及び示された G と共に T P R を一過性発現している H E K 2 9 3 細胞を、 B R E T 測定前に 1 0 0 n M の U - 4 6 6 1 9 またはビヒクルに 1 5 分間曝した。模擬条件は、いずれの G サブユニット過剰発現がないものである。図 3 B : 図 3 A のアゴニスト処理細胞について得られた B R E T 値は、ビヒクルで処理した対応する細胞で得られた B R E T 値のパーセンテージとして表わした。模擬条件を使用して、陽性反応の閾値を決定する。図 3 C : G R K 2 - G F P / R l u c - G ₅ / G ₁ バイオセンサーを用いた、 T P R の G _q 、 G _{1 3} 、 G _{1 4} 、 G _{1 5} 、 G _q G 6 6 K 、及び G _q Y 6 7 C 活性化についてのアゴニスト U - 4 6 6 1 9 を用いた用量反応曲線。

【図 3 B】上記説明に同じ。

【図 3 C】上記説明に同じ。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 J は、 I P ベースバイオセンサーを用いた、ドーパミン D 2 レセプター (D ₂ R) 、 ₁ B - アドレナリンレセプター (₁ B A R) 、及び ₂ c - アドレナリンレセプター (₂ c A R) の G タンパク質活性化プロファイルを示す。 G R K 2 - G F P 、 R l u c - G ₅ 、 G ₁ 、及び示された G と共に D 2 R (図 4 A 及び 4 B) 、 ₁ B A R (図 4 C 及び 4 D) 、または ₂ c A R (図 4 E 及び 4 F) を一過性発

10

20

30

40

50

現している H E K 2 9 3 細胞を、 B R E T 測定前に 15 分間、以下のアゴニスト、ロチゴチン（図 4 A 及び 4 B）、フェニルエピネフリン（図 4 C、4 D、4 E）、またはエピネフリン（図 4 E）で刺激した。図 4 A、4 C 及び 4 E：データは、ビヒクル処理細胞で得られた B R E T シグナルのパーセンテージとして表わす。いずれの G サブユニット過剰発現がない模擬条件を使用して、陽性反応の閾値を決定した。図 4 A、4 C 及び 4 E に提示したように、G _i Y 6 7 C などの、無差別の活性化特性を有する G タンパク質を使用して、レセプター活性化を監視することができた（図 1 4 で位置及び周辺配列を参照されたい）。G のこれらの無差別突然変異体をレセプター活性化の陽性対照として使用することができ、これは、アンタゴニストの特徴付けまたは孤児レセプター・アゴニストのスクリーニングに有用であり得る。図 4 B は、 G R K 2 - G F P / R 1 u c - G 5 / G 1 10 バイオセンサーを用いて、選択された G タンパク質 (G _i) 及び 4 つの無差別 G _q 突然変異体 : G 6 6 K、G 6 6 D、Y 6 7 C 及び F 7 5 G) によるロチゴチン、D 2 R アゴニストの用量反応曲線である。図 4 D では、用量反応曲線は、 G R K 2 - G F P / R 1 u c - G 5 / G 1 バイオセンサーを用いて、₁ B A R 及び選択された G タンパク質 (G _i 及び G _q) によるフェニレフリン、-アドレナリンアゴニストについて提示される。図 4 E では、G _z 活性化の用量反応曲線は、₂ C A R、G _z、G R K 2 - G F P、R 1 u c - G 5、及び G 1 を発現している H E K 2 9 3 細胞から異なるアドレナリンアゴニスト : エピネフリン、ノルエピネフリン、フェニレフリン、及びイソプロテレノールについて得られた。図 4 F は、2 つの異なる₂ C A R アゴニスト、エピネフリン及びフェニレフリンを用いた、₂ C A R の G タンパク質活性化プロファイルを示す。₁ I P ベースバイオセンサーを使用して、異なるレセプター及びリガンドの G タンパク質活性化及び薬理学的プロファイルを確立することができることを、これらの結果は示している。図 4 G ~ 4 J では、エピネフリン / ₂ C A R で促進された G _z 活性化の用量反応曲線は、種々の組み合わせの G サブユニットで得られた。₂ C A R、G _z、G R K 2 - G F P、異なる R 1 u c 標識 G (図 4 G 及び 4 H)、及び G (図 4 G では G 1、図 4 H では G 3 の短い変異体 (G 3 s h)) をコードする構築物で H E K 2 9 3 細胞を形質移入した。図 4 I 及び 4 J では、₂ C A R、G _z、G R K 2 - G F P、R 1 u c 標識 G (図 4 I では G 1、図 4 J では G 5)、及び異なる G をコードする構築物で細胞を形質移入した。G 及び G サブユニットの双方の組み合わせが、G タンパク質活性化の別個の薬理学的プロファイルをもたらし得ることを、これらの結果は示している。これらの差は、一部は、特異的集合の G サブユニットだけでなく、種々の組み合わせ及びレベルの G 及び G サブユニットも発現している異なる細胞及び組織で観察された別個の薬理学的プロファイルに関連している。₁ I P ベースバイオセンサーが、これらの差を研究し、より良く理解するのに有用であり得ることを、これらの結果は示している。

【図 4 B】上記説明に同じ。

【図 4 C】上記説明に同じ。

【図 4 D】上記説明に同じ。

【図 4 E】上記説明に同じ。

【図 4 F】上記説明に同じ。

【図 4 G】上記説明に同じ。

【図 4 H】上記説明に同じ。

【図 4 I】上記説明に同じ。

【図 4 J】上記説明に同じ。

【図 5 A】図 5 A ~ 5 D は、₁ I P ベースバイオセンサーを使用して、G タンパク質調節因子選択性及び作用モードを特徴付けて、妥当性を確認することができることを示す。図 5 A 及び 5 B は、P T X (G _i / G _q 阻害薬) による G _i 及び U b o - Q i c (G _q インヒビターの類似体 : Y M - 2 5 4 8 9 0) による G _q の選択的阻害を示す。G 1、R 1 u c - G 5、及び G R K 2 - G F P と共に T P R 及び G _q (図 5 A)、または D 2 R 及び G _i (図 5 B) を発現している H E K 2 9 3 細胞を P T X、

10

20

30

40

50

Ubo-Qic、またはビヒクル(対照)で前処理した後、U-46619(図5A)またはロチゴチン(図5B)の濃度を増加させて15分間曝し、BRETシグナルを記録した。図5Cでは、TPR媒介性Gタンパク質活性化を使用して、Ubo-Qicインヒビター選択性の妥当性を確認した。TPR、及びバイオセンサーGRK2-GFP/Rluc-G5/G1+示されたGサブユニットを共発現している細胞をUbo-Qicで前処理し、ビヒクルまたはアゴニスト:U-46619(100nM)のいずれかに曝した。G_qファミリー(G_q、G₁₁、G₁₄及びG₁₅)から、G₁₅のみが、Ubo-Qicに非感受性であることを、これらの結果は示している。G₁₂及びG₁₃タンパク質も、Ubo-Qicに非感受性である。図5Dでは、IPベースバイオセンサーを使用して、突然変異体G_q活性化のUbo-Qic感受性を明らかにした。G_q置換を67位で導入した(図14を参照)。Ubo-Qic阻害に耐性があるチロシン残基の置換のみ(Y67C、Y67G、Y67S、及びY67L)が無差別特性も示し、これは、この残基がGタンパク質活性化を制御するのに重要でもあり得ることを示した。Phew5残基のグリシンへの置換は、活性化(図5D)の部分的なUbo-Qic媒介性阻害のみをもたらし、無差別表現型(図4Aを参照)ももたらした。

【図5B】上記説明に同じ。

【図5C】上記説明に同じ。

【図5D】上記説明に同じ。

【図6A】図6A及び6Bは、レセプター活性化時のIPベースのGタンパク質活性化バイオセンサー反応の動態を示す。図6A:G_{i1}、G₁、Rluc-G5、及びGRK2-GFPと共にD₂Rを一過性発現しているHEK293細胞を1μMのロチゴチンまたはビヒクルに曝した一方、BRET測定を一定間隔で行った。図6B:G₁₁、G₁、Rluc-G5、及びGRK2-GFPと共にTPRを一過性発現しているHEK293細胞を100nMのU-46619またはビヒクル曝した一方、BRET測定を一定間隔で行った。いずれの場合も、アゴニスト及びビヒクルを測定30秒後に細胞に添加した。

【図6B】上記説明に同じ。

【図7A】図7A及び7Bは、IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーのZ'因子評価を示す。G₁、Rluc-G5、及びGRK2-GFPと共にD₂R及びG_{i1}(図7A)またはTPR及びG₁₁(図7B)を一過性発現しているHEK293細胞を1μMのロチゴチン(図7A)、100nMのU-46619(図7B)、またはビヒクル(図7A、7B)のいずれかに15分間曝した。96ウェルプレートの個々のウェルごとにBRET比を表す。これらの代表的な実験のZ'因子は、D₂R(図7A)及びTPR(図7B)についてそれぞれ0.79及び0.89で評価した。

【図7B】上記説明に同じ。

【図8A】図8A～8Cは、IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーによるリガンドプロファイリングを示す。図8A:1μMのアンジオテンシンIIでBRET測定前に15分間刺激した、G₁、Rluc-G5、GRK2-GFP、及び示されたGと共にアンジオテンシンII型1レセプター(AT1R)を一過性発現しているHEK293細胞のGタンパク質活性化プロファイルである。図8B:G_q、G₁₁、及びG₁₂のアンジオテンシンII類似体(1μM)の飽和濃度のGタンパク質活性化プロファイルである。図8A及び8Bの結果は、ビヒクル処理細胞で得られたBRETシグナルのパーセンテージとして表わし、いずれのGサブユニット過剰発現がない模擬条件を使用して、陽性反応の閾値を決定した。図8C:GRK2-GFP/Rluc-G5/G1バイオセンサーを用いたG_q及びG₁₂の活性化についてAngII及びDVGリガンドを用いて得られた用量反応曲線である。データは、各Gタンパク質について得られたAngII反応の%として表わす。

【図8B】上記説明に同じ。

【図8C】上記説明に同じ。

【図9A】図9A及び9Bは、IPベースバイオセンサーによるGタンパク質活性化

10

20

30

40

50

を評価するためのタンパク質相補性ベース検出方法；R 1 u c タンパク質相補性アッセイ（R 1 u c - P C A）を示す。図9 A : 1 0 0 n M の U - 4 6 6 1 9 またはビヒクリで 10 分間刺激した、T P R、G R K 2 - R 1 u c F 1、R 1 u c F 2 - G 5、G 1、及び G 1 1 サブユニットで形質移入した H E K 2 9 3 細胞について得られた Z' 因子である。発光値は、9 6 ウェルプレートの個々のウェルごとに表わす。この代表的な実験の Z' 因子は、0 . 5 3 で評価した。図9 B : G R K 2 - R 1 u c F 1 / R 1 u c F 2 - G 5 / G 1 バイオセンサーを用いた G 1 1 の活性化についてアゴニスト U - 4 6 6 1 9 を用いた用量反応曲線である。

【図9 B】上記説明に同じ。

【図10 A】図10 A ~ 10 C は、G タンパク質活性化を評価するために I P として G R K 3 の使用を示す。図10 A : G i 1、G 1、R 1 u c - G 5、及び G R K 2 - G F P (黒い丸) または G R K 3 - G F P (白い三角) と共に D 2 R を一過性発現している H E K 2 9 3 細胞から得られた用量反応曲線である。該 H E K 2 9 3 細胞をアゴニストロチゴチンの濃度を増加させて B R E T 測定前に 15 分間曝した。図10 B : D 2 R、G i 1、G 1、R 1 u c - G 5、及び G R K 3 - G F P で形質移入した H E K 2 9 3 細胞の G R K 3 ベースバイオセンサー反応の動態である。該 H E K 2 9 3 細胞を 1 μ M のロチゴチンまたはビヒクリで曝した一方、B R E T 測定を一定間隔で行った。アゴニスト及びビヒクリを測定 30 秒後に細胞に注入した。図10 C : D 2 R、G i 1、G 1、R 1 u c - G 5、及び G R K 3 - G F P で形質移入した H E K 2 9 3 細胞の G R K 3 ベースバイオセンサーの Z' 因子評価である。該 H E K 2 9 3 細胞は、1 μ M のロチゴチンまたはビヒクリのいずれかに 15 分間曝した。B R E T 比を 9 6 ウェルプレートの個々のウェルごとに表わす。この代表的な実験の Z' 因子は、0 . 7 1 で評価した。

【図10 B】上記説明に同じ。

【図10 C】上記説明に同じ。

【図11 A】図11 A ~ 11 D は、I P ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーをコードする多シストロン性ベクターを用いて行った実験の結果を示す。図11 A : 以下タンパク質：G R K 2 - G F P、R 1 u c - G 5、及び G 1 をコードする多シストロン性構築物を示す概略図である。T P R、G (G q、G 1 1、G 1 2、G 1 3、G 1 4、または G 1 5 / 1 6 のいずれか；模擬条件は G 無しであった) をコードする構築物と、及び G F P 標識 W T G R K 2 または G R K 2 の R G S 死突然変異体 (D 1 1 0 A) をコードする多シストロン性構築物 (図11 A に記載) とで共形質移入した H E K 2 9 3 細胞の G タンパク質活性化プロファイルを図11 B に提示する。そのアゴニスト (1 0 0 n M の U 4 6 6 1 9) による T P R 活性化は、両方の多シストロン性構築物とも同様の結果及びプロファイルをもたらし、機能性 R G S ドメインは G R K 2 補充に不可欠ではないことを示した。図11 C : 図11 A に記載した多シストロン性構築物 (W T G R K 2 を有する) T P R の G 1 1 活性化についてアゴニスト U - 4 6 6 1 9 を用いた用量反応曲線である。図11 D では、Z' 因子は、図11 C と同様に形質移入し、1 0 0 n M の U - 4 6 6 1 9 またはビヒクリで 15 分間刺激した H E K 2 9 3 細胞について得られた。B R E T 比を 9 6 ウェルプレートの個々のウェルごとに表わす。この代表的な実験の Z' 因子は、0 . 8 0 で評価した。

【図11 B】上記説明に同じ。

【図11 C】上記説明に同じ。

【図11 D】上記説明に同じ。

【図12 A】図12 A 及び 12 B は、膜に固定された I P ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーを示す。図12 A : 膜固定 G R K 2 (G R K 2 - 膜) ベースバイオセンサー及び G R K 2 - G F P - 膜をコードする関連 D N A 構築物の使用の基礎をなす原理を示す概略図である。図12 B : 膜調製物は、G 1 1 の不在下または存在下で、1 0 0 n M の U - 4 6 6 1 9 またはビヒクリで 15 分間刺激した、T P R、G 1、R 1 u c I I - G 5、G R K 2 - G F P、または G R K 2 - G F P - 膜で形質移入した H E K 2 9 3 細胞から得られた。次いで、B R E T 実験をこれらの膜調製物で行った。データは、ビ

10

20

30

40

50

ヒカル処理細胞で得られた B R E T シグナルのパーセンテージとして表わす。

【図 12 B】上記説明に同じ。

【図 13 A】図 13 A ~ 13 C は、 G R K 2 機能 (R G S 及び触媒) またはリン酸化によるその調節に影響を及ぼすと報告された置換は、活性化 G タンパク質への補充を防がず、著しく促進もしないことを示す。図 13 A では、 T P R 、 G_q 、 G 1 、 R l u c I I - G 5 、及び G R K 2 - G F P の変異体 (W T = 黒四角、 R G S が死んだ D 1 1 0 A 突然変異体 = 白丸、及び触媒的に死んだ K 2 2 0 R 突然変異体 = 白三角) を共発現している H E K 2 9 3 細胞を、 U 4 6 6 1 9 の用量を増加させながら刺激した。図 11 B 及び 13 A に示すように、機能性 R G S ドメインは、バイオセンサーで検出した G_q 反応を必要としない (促進もしない) 。 G R K 2 の触媒的に死んだ突然変異体は、 2 つの構成でこのバイオセンサー (図 13 A 及び 13 C) と共に使用することもできる : G タンパク質活性化は、遊離 G 1 / R l u c I I - G 5 との G R K 2 - G F P 相互作用 (図 13 A) 、及び遊離 G 1 / G F P 1 0 - G 5 との R l u c I I - G R K 2 相互作用 (図 13 C) から B R E T の増加として測定した。これらの突然変異体を使用することで、機能性キナーゼを過剰発現する副作用を最小限にし、これは、 R G S ドメインを介して P L C の G_q 媒介性活性化を阻害することが知られている。そのような突然変異体の使用は、センサーの多重化を介した多数のシグナル伝達経路または異なるアッセイを監視することを必要とする用途において有利であり得る。図 13 B では、 H E K 2 9 3 細胞は、図 13 A と同様ではあるが、 W T G R K 2 (黒四角) 、または、その C 末端結合ドメインのリン酸化を防止する (S 6 7 0 A = 白三角、 S 6 7 6 A = 白菱形、及び S 6 8 5 A = 白丸) かまたは模倣する (S 6 7 0 D = 黒三角、 S 6 7 6 D = 黒菱形、及び S 6 8 5 D = 黒丸) 突然変異体のいずれかで形質移入した。 E R K 、 P K A 、及び C D K 2 - シクリン A によるこれらのセリン残基上の G R K 2 のリン酸化は、その活性を調節することが知られている (Cong ら、 The Journal of Biological Chemistry , 276 , 15192 - 15199 ; Pitcher ら、 The Journal of Biological Chemistry , 274 , 34531 - 34534 ; Penela ら、 PNAS , 107 (3) : 1118 - 1123 ; Choudhary ら、 Mol Cell . 2009 36 (2) : 326 - 39) 。しかしながら、図 13 B に提示される結果は、 G_q への G R K 2 補充が、異なるシグナル伝達事象による調節に非感受性であり得る証拠を提供している。図 13 C では、 T P R 、 G_q 、 G 1 、 G F P - G 5 、及び R l u c I I - G R K 2 の変異体 (W T = 黒四角、及び触媒的に死んだ K 2 2 0 R 突然変異体 = 白三角) を共発現している H E K 2 9 3 細胞を、 U 4 6 6 1 9 の用量を増加させながら刺激した。 G R K 2 の N 末端 (図 13 C) または C 末端 (図 13 A) のいずれかに標識を有する B R E T ドナー及びアクセプターの両方の構成は、同様の結果をもたらし、バイオセンサーの構成が柔軟である証拠を提供している。

【図 13 B】上記説明に同じ。

【図 13 C】上記説明に同じ。

【図 14】ヒト G タンパク質 サブユニット (配列番号 1 - 17) と、無差別カップリング特性をもたらす置換との配列アラインメントを示す。ヘテロ三量体 G タンパク質のヒト G サブユニットは、 D I A L I G N ツール (http://bibiserv.tec.hfak.uni-bielefeld.de/dalign/submission.html) を用いて位置合わせし、 Box shade ツール (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) を用いてフォーマット化し、リンク 1 と中心が合っている領域を提示する。 G サブユニットを通じて高い保存を示す残基は、黒色及び灰色の背景で識別する。二次構造予測からのリンク 1 及び ヘリックスも識別する。

【図 15 A】 R E T アクセプター (A) で標識された I P (G R K) と、その C 末端にて R E T ドナー (D) で標識された G P C R とを含むバイオセンサーを示す概略図を示す。アッセイは、 G P C R の C 末端部分と結合している G_q 二量体と結合するための G サブユニットと I P の間の競合にも基づいている。不活性形態である間には、ヘテ

ロ三量体 G タンパク質の G サブユニットは、 G 二量体と堅く結合している。 G P C R とリガンド結合する際に、 G は G サブユニットから解離し、 I P を遊離 G

サブユニットに補充させ、 G P C R に結合した R E T ドナーに R E T アクセプターを近接させることによって、 B R E T シグナルを誘発 / 増加させる。図 15 B 及び 15 C は、図 15 A に記載したバイオセンサーで得られた G タンパク質活性化の用量反応曲線を示す。 T P R - R l u c I I 、異なる G (G _q = 黒四角、 G ₁₁ = 黒三角、 G ₁₄ = 黒菱形、及び G ₁₂ = 白丸) 、 G 1 、 G 5 、及び W T G R K 2 - G F P (図 15 B) または突然変異体 D 110 A G R K 2 - G F P (図 15 C) のいずれかを共発現している H E K 293 細胞を、 U 46619 の用量を増加させながら刺激した。用量反応曲線は、図 15 B 及び 15 C と同様のプロファイルを示し、図 11 B 及び 13 A と同様ではあるが、異なるバイオセンサー構成を有しており、活性化 G タンパク質に I P を補充するのに機能性 R G S は必要とされないことを示している。
10

【図 15 B】上記説明に同じ。

【図 15 C】上記説明に同じ。

【図 16 A】 R E T ドナー (D) で標識された I P (G R K) と、アンカー配列 (例えは、 C A A X ドメイン) を標的化する原形質膜で標識された原形質膜マーカー : R E T アクセプター (A) とを含むバイオセンサーを示す概略図を示す。アッセイは、原形質膜で G 二量体と結合するための G サブユニットと I P の間の競合にも基づいている。不活性形態である間には、ヘテロ三量体 G タンパク質の G サブユニットは、 G 二量体と堅く結合している。 G P C R とリガンド結合する際に、 G は G サブユニットから解離し、 I P を遊離 G サブユニットに補充させ、原形質膜で、 R E T ドナー (I P - D) 及びアクセプター (原形質膜マーカー、 A - C A A X) の密度の増加をもたらすことによって、 B R E T シグナルを誘発 / 増加させる。図 16 B は、図 16 A に記載したバイオセンサーで得られた G タンパク質活性化の用量反応曲線を示す。 T P R 、異なる G (G _q = 黒四角、 G ₁₁ = 黒三角、模擬条件 (G 無し) = 白丸) 、 G 1 、 G 5 、 R l u c I I - G R K 2 、及び r G F P - C A A X を共発現している H E K 293 細胞を、 U 46619 の用量を増加させながら刺激した。図 16 B の用量反応曲線は、図 3 C 、 9 B 、及び 11 C で得られたものと同様であるが、異なる構成のバイオセンサーである。図 16 C では、 Z' 因子は、図 16 B と同様に形質移入し、 100 nM の U - 46619 またはビヒクリルで 15 分間刺激した H E K 293 細胞について得られた。 B R E T 比を 96 ウェルプレートの個々のウェルごとに表わす。この代表的な実験の Z' 因子は、 0.89 で評価した。
20

【図 16 B】上記説明に同じ。

【図 16 C】上記説明に同じ。

【図 17 A】 D 110 位、 K 220 R 位、 S 670 位、 S 676 位、及び S 685 位 (本明細書に記載された構築物のいくつかで突然変異した) を太字、推定 P H ドメインに下線を引き、本明細書に記載された構築物のいくつかで使用されたその C 末端部分 (G R K 2 C 末端、配列番号 50) をイタリック体にした、ヒト G R K 2 (配列番号 18) のアミノ酸配列を示す。
30

【図 17 B】推定 P H ドメインに下線を引き、本明細書に記載された構築物のいくつかで使用されたその C 末端部分のアミノ酸配列 (G R K 3 C 末端、配列番号 51) イタリック体にした、ヒト G R K 3 (配列番号 19) のアミノ酸配列を示す。
40

【図 17 C】推定 P H ドメインに下線を引いた、 P L E K H G 2 (配列番号 20) のアミノ酸配列を示す。

【図 17 D】本明細書に記載された実験で使用した G F P 10 (配列番号 38) のアミノ酸配列を示す。

【図 17 E】本明細書に記載された実験で使用したレニラ・レニホルミス G F P (r G F P 、配列番号 46) のアミノ酸配列を示す。

【図 17 F】本明細書に記載された実験で使用した R L u c I I (配列番号 39) のアミノ酸配列を示す。
50

【発明を実施するための形態】

【0080】

本明細書で使用されている遺伝学、分子生物学、生化学、及び核酸化学の用語及び記号は、当該技術分野の標準的専門書及び教科書の記載に従うものとする：例えば、Kornberg and Baker, DNA Replication, 第2版(W. H. Freeman, New York, 1992); Lehninger, Biochemistry, 第2版(Worth Publishers, New York, 1975); Strachan and Read, Human Molecular Genetics, 第2版(Wiley-Liss, New York, 1999); Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach(Oxford University Press, New York, 1991); Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984)；などである。全ての用語は、該当技術分野で確立された典型的な意味を持つと理解すべきである。

【0081】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書で使用する場合、当該冠詞の文法的な対象の1つまたは2つ以上（即ち、少なくとも1つ）を指す。例として、「要素」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。本明細書を通して、文脈により他に必要とされない限り、語「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、及び「含むこと（comprising）」は、言明されたステップもしくは要素、またはステップもしくは要素の群の包含を含意し、任意の他のステップもしくは要素、またはステップもしくは要素の群の除外を含意しないことが理解されるであろう。

【0082】

本明細書に記載された研究では、本発明者らは、IP競合ベースバイオセンサーを使用して、レセプター及び/またはGサブユニットの改変を必要としないでGタンパク質活性化を監視することができるることを示している。競合に基づいているため、全ての異なるGタンパク質を研究し、共形質移入したGサブユニットに基づいてGタンパク質活性化/カップリングプロファイルを確立するために単一バイオセンサーが必要とされる。Gタンパク質活性化プロファイルは、レセプター及び薬剤標的を特徴付けるために重要であるだけでなく、治療効果や副作用の減少と関連付けたバイアスシグナル伝達特性を有するGPCRリガンドを同定し、特徴付け、最適化する創薬プロセスに有用でもあり得る。

【0083】

本開示は、Gタンパク質サブユニットまたはGタンパク質活性化因子（例えば、Gタンパク質共役型レセプター（GPCR）、Gタンパク質シグナル伝達（AGS）の活性化因子、Gタンパク質シグナル伝達の調節因子、または他の化学的または生物学的物質）のいずれかを改変することなく、Gタンパク質活性化を監視するための万能バイオセンサーに関する。より具体的には、本開示は、種々のヘテロ三量体Gタンパク質の活性化を監視するためのG相互作用タンパク質（IP）の使用に関する。本明細書で開示されたシグナル伝達バイオセンサーにより、Gタンパク質活性を標的化するリガンド（アゴニスト、アンタゴニスト、逆アゴニスト、アロステリック調節因子など）を同定するための大規模なスクリーニングアッセイ及び構造-活性の相関研究に使用できる高感度な定量分析が可能になることが有利である。さらに、本明細書で開示されたバイオセンサーは、Gタンパク質活性化プロファイルを評価するためのツールを表し、どの特異的Gタンパク質が刺激時に活性化されるかを対処することによって化合物プロファイリングが可能になる。

【0084】

図1に示すように、本開示の実施形態によるシステムは、G二量体と結合するためのGサブユニットとIPの間の競合に基づいている。不活性形態である間には、ヘテロ三量体Gタンパク質のGサブユニットは、G二量体と堅く結合している。レセ

10

20

30

40

50

プターとリガンド結合する際に、G サブユニットは、GDP 結合形態からGTP 結合形態に切り替わり、G サブユニットからの解離をもたらし、I P が遊離 G サブユニットに補充される。従って、I P と G の間の相互作用は、レセプターを刺激する際の特定の G タンパク質活性化を反映している。

【 0 0 8 5 】

本発明者らは、相補的 RET アクセプター（例えば、r GFP）で標識された原形質膜標的化部分を用いて、原形質膜（GPCR に結合した G 複合体と相互作用する）にて RET ドナー（例えば、RLuc）で標識された I P（例えば、GRK）の補充／局在化を測定するバイオセンサーを用いて、G タンパク質活性化を監視することが可能であることを示している。原形質膜での I P の濃度／密度の増加（G 複合体への I P の補充の間接的測定）は、RET シグナルの増加によって検出される。10

【 0 0 8 6 】

本発明者らは、RET ドナー（例えば、RLuc）で標識された I P（例えば、GRK）の、相補的 RET アクセプター（例えば、r GFP）で標識された GPCR への補充を測定するバイオセンサーを用いて、G タンパク質活性化を監視することが可能であることもさらに示している（図 15）。

【 0 0 8 7 】

この文脈において、本開示は、I P ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーと、活性化因子によって促進される特異的 G タンパク質の活性化を評価するためにそのようなバイオセンサーを使用するシステムとに関する。本システムは、G タンパク質活性化因子；G タンパク質；及び本明細書に記載されたバイオセンサーを含む。本開示はさらに、本明細書で開示されたシステムを用いて、G タンパク質活性化を検出するための方法に関する。20

【 0 0 8 8 】

従って、本開示は、G タンパク質活性を検出するためのバイオセンサーシステムに関する、前記バイオセンサーシステムは、(A)、または(B) で定義される要素を含む：

(A)

(a) 共鳴エネルギー転移 (RET) ドナー；(b) RET アクセプター、または(c) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G 相互作用タンパク質 (I P) を含む第 1 の成分；及び融合 G タンパク質または融合 G タンパク質を含む第 2 の成分、前記 G タンパク質または前記 G タンパク質は、(a) RET ドナー；(b) RET アクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；を含む、(i) 第 1 のバイオセンサー、30

(i) で定義される前記第 1 及び第 2 の成分；及び組換え G タンパク質を含む第 3 の成分；(a) 前記 I P が前記 RET ドナーに融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記 RET アクセプターに融合しており；(b) 前記 I P が前記 RET アクセプターに融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記 RET ドナーに融合しており；及び(c) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；を含む、(ii) 第 2 のバイオセンサー、または40

(B)

(a) RET ドナー；(b) RET アクセプター、または(c) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G 相互作用タンパク質 (I P) を含む第 1 の成分；融合 G タンパク質共役型レセプター (GPCR) を含む第 2 の成分、前記 GPCR は、その C 末端で(a) RET ドナー；(b) RET アクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；組換え G タンパク質を含む第 3 の成分；(a) 前記 I P が前記 RET ドナーに融合している場合、前記 GPCR は、前記 RET アクセプターに融合しており；(b) 前記 I P が前記 RET アクセプターに融合している場合、前記 GPCR は、前記 RET ドナーに融合しており；及び(c) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 GPCR は、前記レポー50

タータンパク質の第2の断片に融合している、を含む、(i)バイオセンサー。

【0089】

従って、本開示は、(1)(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG_q相互作用タンパク質(IP)を含む第1の成分；(2)融合G_qタンパク質または融合G_qタンパク質を含む第2の成分、前記G_qタンパク質または前記G_qタンパク質は、(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；(3)組換えG_qタンパク質を含む第3の成分、前記組換えG_qタンパク質は、無差別または非選択的G_qタンパク質、例えば、例えば、本明細書に記載されるヒトG_qの残基66、67、及び/または75に対応する位置で突然変異を含むG_qタンパク質である、を含むバイオセンサーに関する。実施形態では、バイオセンサーは、GPCR(天然または組換え)、好ましくは、孤児GPCRをさらに含む。
10

【0090】

実施形態では、上記に定義されたバイオセンサーは、組換えG_qタンパク質、及び/または組換えG_qタンパク質をさらに含む。さらなる実施形態では、上記に定義されたバイオセンサーは、組換えG_qタンパク質、及び組換えG_qタンパク質をさらに含む。実施形態では、上記に定義されたバイオセンサーは、GPCRをさらに含み、さらなる実施形態では、組換えGPCRをさらに含む。

【0091】

別の態様では、従って、本開示は、(i)(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG_q相互作用タンパク質(IP)を含む第1の成分；及び(iii)融合原形質膜(PM)標的化部分を含む第2の成分、前記PM標的化部分は、(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)前記IPが前記RETドナーに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETアクセプターに融合しており；(b)前記IPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETドナーに融合しており；及び(c)前記IPが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記PM標的化部分は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、を含むバイオセンサーに関する。
20
30

【0092】

非限定的な実施形態では、本明細書に記載されたバイオセンサーの活性は、共鳴エネルギー転移(RET)、例えば、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)、または蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)；タンパク質相補性アッセイまたはタンパク質-断片補体アッセイ(PCA)、例えば、酵素断片相補性(EFC)、または二分子蛍光相補性(BiFC)などから選択された技術に基づいて検出可能である(図1を参照)。そのような技術は、当該技術分野で公知であり、バイオセンサーのC末端、N末端、またはバイオセンサーのタンパク質要素内で融合し得る標識/部分を採用する。

【0093】

共鳴エネルギー転移アプローチでは、IP及びG_qを、エネルギーードナー及びアクセプターで標識し、G_qタンパク質を活性化する際に、RETシグナルの増加が観察される。タンパク質相補性アッセイの場合では、IP及びG_qを、蛍光タンパク質もしくは発光酵素などのレポータータンパク質の断片で標識し、G_qタンパク質活性化後、2つの断片の相補性は、レポータータンパク質シグナル、例えば、蛍光シグナルまたは酵素活性の増加をもたらす。
40

【0094】

共鳴エネルギー転移(RETと略す)は、重複発光/吸収スペクトルを有する2つの発色団の間のエネルギー転移を記述するメカニズムである。2つの発色団(「ドナー」及び「アクセプター」)が互いに短い距離(例えば、10~100オングストローム)内にあり、それらの遷移双極子が適切に配向している場合、ドナー発色団は、非放射性双極子-
50

双極子カップリングを介してその励起状態エネルギーをアクセプター発色団に転移することができる。RETの1つの型は、ドナー生物発光団（ルシフェラーゼなどの生物発光酵素）とアクセプターフルオロフォア（例えば、GFPまたはYFP）との間のエネルギーの非放射性転移に基づいている生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）である。RETの別の型は、励起ドナーフルオロフォアから隣接アクセプターフルオロフォアへのエネルギーの転移を伴う蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）である。例えば、GFPの2つの色変異体であるCFP及びYFPは、それぞれ、ドナー及びアクセプターとして使用することができる。

【0095】

本明細書で使用される場合、用語「蛍光タンパク質」は、適切な波長で励起した際に蛍光になる任意のタンパク質を指す。ほぼ全ての可視光線スペクトルに及ぶ蛍光発光スペクトルプロファイルを特色にする広範囲の蛍光タンパク質が開発されている。緑色蛍光タンパク質の非限定例としては、EGFP、GFP10、Emerald、Superfolded GFP、Azami Green、mWasabi、TagGFP、Turbo GFP、AcGFP、ZsGreen、及びT-Sapphireが挙げられる。青色蛍光タンパク質の非限定例としては、EBFP、EBFP2、Azurite、及びmTagBFPが挙げられる。シアン蛍光タンパク質の非限定例としては、ECFP、mECFP、Cerulean、mTurquoise、CyPet、AmCyan1、Midoriri-Ishi Cyan、TagCFP、及びmTFP1(Teal)が挙げられる。黄色蛍光タンパク質の非限定例としては、EYFP、Topaz、Venus、mVenus、mCitrine、mAmetrine、YPet、TagYFP、PhiYFP、ZsYellow1、及びmBananaが挙げられる。橙色蛍光タンパク質の非限定例としては、Kusabira Orange、Kusabira Orange2、mOrange、mOrange2、dTOMATO、dTOMATO-Tandem、TagRFP、DsRed、DsRed2、DsRed-Express(T1)、DsRed-Monomer、及びmTangerineが挙げられる。赤色蛍光タンパク質の非限定例としては、mRuby、mAapple、mStrawberry、AsRed2、mRFP1、JRed、mCherry、HcRed1、mRaspberry、dKeima-Tandem、HcRed-Tandem、mPlum、及びAQ143が挙げられる。

【0096】

本発明の文脈で使用される「重複」は、ドナー蛍光タンパク質もしくは発光酵素（例えば、ルシフェラーゼ）から発せられた光を、通常は約10～100（約1～10nm）内に近接して配置されたフルオロフォア（アクセプター蛍光タンパク質）を励起することができる波長にする能力を指す。従って、ドナー蛍光または発光タンパク質及びアクセプター蛍光タンパク質は、第1及び第2の成分が（即ち、複合体の形態で、または原形質膜などの同じ細胞区画で）近接している場合、バイオセンサーの第1の成分に付着したドナー蛍光または発光タンパク質からバイオセンサーの第2の成分に付着したアクセプター蛍光タンパク質にエネルギーを転移することができるよう選択される。そのようなエネルギー転移は、「蛍光（またはForster）共鳴エネルギー転移」または「FRET」（ドナータンパク質が蛍光タンパク質である場合）、または「生物発光共鳴エネルギー転移」または「BRET」（ドナータンパク質が生物発光タンパク質である場合）と一般に呼ばれる。従って、ドナー蛍光または発光タンパク質とアクセプター蛍光タンパク質との任意の組み合わせは、上の基準を満たす限りは本発明に従って使用することができる。そのような組み合わせは、典型的には、FRET対またはBRET対と呼ばれる。BRETアッセイに使用される適切なフルオロフォアの選択は、当業者に知られている。一実施形態では、フルオロフォアとしては、緑色蛍光タンパク質-野生型(GFP-wt)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、Venus、Topaz、ZsYellow1、mOrange2、mKeima、青色蛍光タンパク質(BFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、Tsapphire、mAmetrine、緑色蛍光タンパク質-2(GFP2)、

10

20

30

40

50

renilla GFP (rGFP)、及び緑色蛍光タンパク質 - 10 (GFP10)、またはそれらの変異体が挙げられる。400 nmに近い励起ピークを有する蛍光タンパク質は、特に適している。フルオロフォアのより具体的な例としては、mAmetrine、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、及びGFP10が挙げられる。RET対の代表的な例としては、BFP / CFP、BFP / GFP、BFP / YFP、BFP / DsRed、CFP / GFP、CFP / YFP、CFP / mVenus、GFP / YFP、GFP2 / YFP、GFP / DsRed、TagBFP / TagGFP2、TagGFP2 / TagRFPなど(例えば、Muellerら、Front. Plant Sci., 4: 413, 2013を参照されたい)が挙げられる。RET対の代表的な例としては、ルシフェラーゼ (Luc) / GFP、Luc / Venus、Luc / Topaz、Luc / GFP - 10、Luc / GFP - 2、Luc / YFP、Luc / rGFP、などが挙げられる。

【0097】

本明細書で使用される場合、用語「ルシフェラーゼ」は、生物発光で使用され、発光タンパク質とは異なる酸化酵素のクラスを指す。一例は、ホタルフオチナス・ピラリス (P. pyralis ルシフェラーゼ) 由来のホタルルシフェラーゼ (EC 1.13.12.7) である。また、レニラ・レニホルミス (GENBANK : AAA29804) 由来のルシフェラーゼ及びその変異体(例えば、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの安定変異体、例えば、RlucII (GENBANK : AAV52877.1)、Rluc8 (GENBANK : EF446136.1) ガウシアルシフェラーゼ (G luc、GENBANK : AAG54095.1)、NanoLuc (登録商標) ルシフェラーゼ (Promega (登録商標)) を含むいくつかの他の種由来のいくつかの組換えルシフェラーゼが市販されている。ルシフェリンなどのルシフェラーゼ基質を代謝することができる限りは、任意のルシフェラーゼを本発明に従って使用することができる。ルシフェリンは、ルシフェラーゼの存在下において酸化され、オキシルシフェリンと、光の形態のエネルギーとを生成する発光ヘテロ環状化合物のクラスである。ルシフェリンの非限定例としては、D-ルシフェリン、イミダゾピラジノンベース化合物、例えば、セレンテラジン (セレンテラジン 400A (DeepBlueC (商標)))、セレンテラジンH及びe-セレンテラジン誘導体、例えば、メトキシe-セレンテラジン (NanoLight Technology (登録商標) から得たPrologue (登録商標) Purple I)、Vivir (商標) (Promega (登録商標) から得た)、ラチアルシフェリン ((E)-2-メチル-4-(2,6,6-トリメチル-1-シクロヘキサ-1-イル)-1-ブテン-1-オールギ酸塩)、細菌性ルシフェリン、渦鞭毛藻類ルシフェリンなどが挙げられる。ルシフェラーゼ基質は、わずかに異なる発光スペクトルを有し得るため、アクセプターへの最適なエネルギー転移に有利に働くように選択される。実施形態では、ルシフェラーゼは、野生型(または天然)ウミシイタケ由来ルシフェラーゼである。実施形態では、ルシフェラーゼは、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ Rluc8 の安定変異体である。別の実施形態では、ルシフェラーゼは、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) である。特定の実施形態では、ルシフェラーゼは、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ II (RlucII) であり、ルシフェリンは、セレンテラジン 400A である。

【0098】

実施形態では、以下のRET構成の1つを本明細書に記載されたバイオセンサー及び方法で使用する:セレンテラジン-h (coel-h)、及びYFP (YFP) またはウミシイタケ由来のGFP (rGFP) を含むRET1;セレンテラジン-400a (coel-400a)、及びUV励起 (uvGFP) またはウミシイタケ由来のGFP (rGFP) を含むRET2;または、coel-hまたはv-セレンテラジン (NanoLight Technology (登録商標) から得た)、及び単量体オレンジFP (mOrange) を含むRET3。さらなる実施形態では、RlucIIを上述のRET構成で使用する。別の実施形態では、以下のRET構成の1つを本明細書に記載されたバイオセンサー及び方法で使用する: RlucII/coel-400a/強化青色 (EB) FP2、RlucII/coel-400a/スーパーシアン蛍光タンパク質 (50

S C F P 3 A) 、 R l u c I I / c o e l - 4 0 0 a / m A m e t r i n e 、 または R l u c I I / c o e l - 4 0 0 a / G F P 1 0 。 実施形態では、 B R E T ドナーは、 ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ (例えれば、 R L u c I I) であり、 B R E T アクセプターは、 ウミシイタケ由来 G F P (例えれば、 レニラ・レニホルミス G F P) である。

【 0 0 9 9 】

P C A では、 タンパク質 (例えれば、 I P 及び G / G 、 または G P C R) の各々は、 不完全レポータータンパク質の断片と共有結合しており、 I P と G / G の間の相互作用により、 レポータータンパク質の断片を十分に近接させて、 その活性を測定することができる機能性レポータータンパク質を形成することができる。 2 つの部分に分割し、 非共有的に再構成することができる任意のタンパク質を、 P C A ベースバイオセンサーで使用してもよい。 用語「レポータータンパク質」は、 (例えれば、 蛍光、 分光法、 光度分析などによって) 容易に検出することができ、 使用するシステムに通常 (内因的に) 存在しないタンパク質を指す。 P C A で使用される典型的なレポータータンパク質としては、 酵素 (その活性は適切な基質を用いて測定できる) 、 例えれば、 ジヒドロ葉酸リダクターゼ (D H F R) 、 - ラクタマーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 または、 比色または蛍光シグナルを生じるタンパク質、 例えれば、 ルシフェラーゼ (例えれば、 ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ) 、 G F P 、 及びそれらの変異体が挙げられる。

【 0 1 0 0 】

非限定的な別の実施形態では、 R E T または P C A 標識は、 (i) I P 及び G タンパク質、 または (i i) I P 及び G タンパク質上に位置する。 さらに非限定的な実施形態では、 I P 及び G または G サブユニットは、 それらの N 末端、 C 末端、 または、 タンパク質内の任意の内部領域で標識される。 一実施形態では、 I P 及び G または G サブユニットは、 それらの N 末端または C 末端で標識される。 非限定的な一実施形態では、 I P 及び G または G サブユニットに付加された本明細書に記載された P C A 標識は、 限定されることなく、 蛍光タンパク質もしくは発光酵素の一部を含むフルオロフォア、 ルシフェラーゼ、 またはそれらの断片であってもよい。

【 0 1 0 1 】

「 G P C R 」 は、 全長天然 G P C R 分子、 並びに突然変異体 / 変異体 G P C R 分子を指す。 G P C R のリストは、 参照によって本明細書に組み込まれる F o o r d ら (2 0 0 5) P h a r m a c o l R e v . 5 7 , 2 7 9 - 2 8 8 に示されており、 G P C R の更新リストは、 I U P H A R - D B データベースで入手可能である (H a r m a r A J ら、 (2 0 0 9) I U P H A R - D B : G タンパク質共役型レセプター及びイオンチャネルの I U P H A R データベース . N u c l . A c i d s R e s . 3 7 (D a t a b a s e i s s u e) : D 6 8 0 - D 6 8 5 ; S h a r m a n J L ら、 (2 0 1 3) I U P H A R - D B : 更新されたデータベース内容及び新規特徴 . N u c l . A c i d s R e s . 4 1 (D a t a b a s e I s s u e) : D 1 0 8 3 - 8 ; A l e x a n d e r S P H , B e n s o n H E , F a c c e n d a E , P a w s o n A J , S h a r m a n J L , S p e d d i n g M , P e t e r s J A a n d H a r m a r A J , C G T P C o l l a b o r a t o r s . (2 0 1 3) T h e C o n c i s e G u i d e t o P H A R M A C O L O G Y 2 0 1 3 / 1 4 : G P r o t e i n - C o u p l e d R e c e p t o r s . B r J P h a r m a c o l . 1 7 0 : 1 4 5 9 - 1 5 8 1) 。 実施形態では、 G P C R は、 孤児 G P C R である。 用語「孤児 G P C R 」 は、 本明細書で使用する場合、 他の同定された G P C R と類似の構造を有するが、 その内因性リガンドはまだ同定されていない見掛けのレセプターを指す。 G P C R 孤児レセプターは、「 G P R 」 の名称の後に数字、 例えれば、 G P R 1 で与えられることが多い。 孤児 G P C R の更新リストは、 上述の I U P H A R - D B データベースで入手可能である。

【 0 1 0 2 】

実施形態では、 G P C R は、 その C 末端で R E T ドナーまたは R E T アクセプター、 さらなる実施形態では、 ルシフェラーゼ (R L u c) などの R E T ドナーに融合している。

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

用語「組換え」は、本明細書で使用する場合、組換え核酸分子、即ち、分子生物学／遺伝子工学技術によって調製された核酸、例えば、(細胞によって自然に発現されるタンパク質とは対照的に)タンパク質をコードする核酸(例えば、ベクター中に存在)で細胞(またはその子孫)を形質移入／形質導入後に発現されるタンパク質から発現されるタンパク質分子を指す。

【0104】

用語「変異体(または突然変異体)」は、本明細書で使用する場合、対応する天然タンパク質に構造(アミノ酸配列)及び生物学的活性が実質的に類似のタンパク質を指す。変異体は、天然タンパク質の1つ以上のドメインを含む断片、並びに天然タンパク質またはその断片を含む融合タンパク質を含む。変異体は、特定の所望の特徴を有する、例えば、1つ以上のリガンドなどへの結合を構成的に活性に、不活性に、変更したタンパク質を生成するために、天然タンパク質に対して1つ以上の突然変異(置換、欠失、挿入)を含み得る。配列中の單一アミノ酸またはヌクレオチドまたはごく一部のアミノ酸またはヌクレオチドを変化、付加、または削除する個々の置換、欠失、または付加は、「保存的に修飾された変異体」を生成し、その変化は、アミノ酸を化学的に類似のアミノ酸への置換をもたらす。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野で周知である。そのような保存的に修飾された変異体はさらに、本発明の多型変異体及び対立遺伝子を排除しない。

【0105】

「相同性」または「同一性」及び「相同」または「同一」は、2つのポリペプチドまたは2つの核酸分子の間の配列及び/または構造的類似性を指す。相同性/同一性は、位置合わせした配列中の各位置を比較することによって決定することができる。核酸またはアミノ酸配列の間の相同性/同一性の程度は、配列が共有する位置で同一または適合するヌクレオチドまたはアミノ酸の数の関数である。この用語を本明細書で使用する場合、2つの配列が実質的に同一であり、配列の機能的活性が保存される場合、核酸配列は、別の配列に相同である(本明細書で使用する場合、用語「相同」は、進化的関連性を推論しない)。2つの核酸配列を(許容されるギャップに)最適に位置合わせした時に、少なくとも約50%の配列類似性または同一性を共有する場合には、またはこれらの配列が特定の機能性モチーフを共有する場合には、2つの核酸配列は、「実質的に同一」であると考えられる。別の実施形態では、最適に位置合わせされた実質的に同一の配列における配列類似性は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%であってもよい。本明細書で使用される場合、配列間の相同性/同一性の所与のパーセンテージは、最適に位置合わせされた配列における配列同一性の程度を示す。「非関連」または「非相同性」配列は、本明細書に記載された任意の配列と40%未満の同一性、好ましくは約25%未満の同一性を共有する。

【0106】

非限定的な実施形態では、システムは、生きた細胞、膜調製物、または両方を含む。本明細書で定義されたシステムは、限定されないが、膜調製物及び前記I Pは、膜標的化リンカー、例えば、原形質膜(P M)標的化ドメイン含有タンパク質/ペプチドリンカー(例えば、原形質膜固定シグナルペプチド)を介して膜に連結している。この原形質膜標的化ドメインは、これに限定されないが、パルミトイル化、ミリストイル化、またはプレニル化修飾(K R A Sからの膜固定シグナルとして、例えば(H a n c o c k 2 0 0 3))などのペプチド鎖と共有結合した脂質基、膜貫通ドメイン、または多塩基性領域(例えば、G R K 5に存在するものとして)が挙げられる。

【0107】

実施形態では、P M標的化部分は、C A A Xモチーフを含む(Cはシステイン残基であり、A Aは2つの脂肪族残基であり、Xは任意のアミノ酸を表す。C A A Xモチーフは、それらの翻訳後修飾を指向するC末端に特定のアミノ酸配列を有するタンパク質の群として定義される「C A A Xタンパク質」に見られる。C A A Xタンパク質は、プレラミンA、ラミンB1及びラミンB2などの核ラミン(中間径フィラメント)、R a s、R h o、

10

20

30

40

50

Rac、及びCdc42などのRas及び多数のGTP結合タンパク質(Gタンパク質)、いくつかのタンパク質キナーゼ及びホスファターゼなどを含む広範囲の分子を包含する(例えば、Gaoら、Am J Transl Res. 2009; 1(3): 312-325を参照されたい)。タンパク質を原形質膜または核膜へ移動させて、異なる機能を発揮させる前に、C末端の終わりにCAAXモチーフまたはボックスを有するタンパク質は、典型的には、プレニル化プロセスを必要とする。実施形態では、CAAXボックスは、ヒトRASファミリータンパク質、例えば、HRAS、NRAS、Ral-A、KRAS4A、またはKRAS4Bから導かれる。RAS、NRAS、KRAS4A、またはKRAS4Bの最後のC末端残基(超可変領域またはHVRとも呼ばれる)は、推定最小原形質膜を標的化する領域をイタリック体で、CAAXボックスに下線を引いて以下に示す(例えば、Ahearnら、Nature Reviews Molecular Cell Biology 13: 39-51、January 2012を参照されたい)：

【表1】

HRAS: KLNPPDESGP~~GCMSCK~~CVLS; (配列番号40); NRAS: KL
NSSDDGTQ~~GCMGLP~~CVVM; (配列番号41); KRAS4A: KISKEEK
TPGCVKIKK~~CIIM~~; (配列番号42); KRAS4B: KMSKDGKKKKKK
~~SKTKCVIM~~; (配列番号43); Ral-A/Ral1: KNGKKKRKS~~LAKR~~
I R E R C C I L (配列番号44)

。実施形態では、膜標的化部分は、上記の配列の最後の4残基を含む。さらなる実施形態では、膜標的化部分は、上記の配列の最後の10残基を含む。実施形態では、膜標的化部分は、CAAXタンパク質、例えば、ヒトRASファミリータンパク質のC末端部分(例えば、最後の約10~30または15~25アミノ酸)、例えば、ヒトRASファミリータンパク質の最後の約10~30、15~25、または20アミノ酸を含む。

【0108】

実施形態では、PM標的化部分は、KRAS4Bからの配列KKKKKKSKTKCVIM(配列番号37)を含む。別の実施形態では、PM標的化部分は、hRasからの原形質膜標的化パルミトイ化配列と、Ral-A/Ral1からのプレニル化シグナル配列(配列: CMSCKCCCIL、配列番号45)とを含む。

【0109】

いくつかのタンパク質は、Ras小GTPアーゼ、ホスファターゼPTEN、非レセプター型チロシンキナーゼSrc、アクチン調節因子WASP及びMARCHSなどのPM、及びGRK5などのGタンパク質共役型レセプターキナーゼ(GRK)を標的化する非脂質性の多塩基性ドメインも含有する。実施形態では、多塩基性ドメインは、GRK5からであり、配列SPKKGLLQLFKRQHQNNNSKS(配列番号46)を含む。実施形態では、PM標的化部分は、RETドナーまたはアクセプター、さらなる実施形態では、GFPなどのRETアクセプター(例えば、rGFP)のC末端で融合している。別の実施形態では、PM標的化部分は、RETドナーまたはアクセプター、さらなる実施形態では、GFPなどのRETアクセプター(例えば、rGFP)のC末端で融合しており、RETドナーまたはアクセプターは、そのN末端で、GRKタンパク質などのIP、またはそのG相互作用断片/変異体に融合している。

【0110】

本開示によれば、Gタンパク質活性化因子としては、限定されないが、これらのヘテロ三量体Gタンパク質、例えば、Gタンパク質シグナル伝達(RGS)の調節因子、Gタンパク質シグナル伝達(AGS)の活性化因子、及びコリンエステラーゼ8タンパク質(R

10

20

30

40

50

i c - 8) のインヒビターへの耐性などの活性を調節することもできる G P C R 及び他のタンパク質による G タンパク質の古典的活性化が挙げられる。これらの非正準的シグナル伝達経路のいくつかでは、G P C R によって古典的に発揮されたグアニン交換因子 (G E F) 活性は、例えば、R i c - 8 などの別のタンパク質に置き換えられる (B o u l a r a n and K e h r l , 2 0 1 4)。

【 0 1 1 1 】

一実施形態では、G タンパク質活性化因子は、G P C R ファミリーのメンバーである。

【 0 1 1 2 】

本明細書で定義された G タンパク質サブユニットとしては、限定されないが、17個の異なる公知のアイソフォーム、それらのスプライス変異体、及び任意の突然変異 G タンパク質、例えば、非選択的 / 無差別 G をもたらすものが挙げられる。非限定的な一実施形態では、本明細書に記載された G タンパク質は、G_q、G_s、G_{i 1}、G_{i 2}、G_{i 3}、G_{t - cone}、G_{t - rod}、G_{t - gust}、G_z、G_{o A}、G_{o B}、G_{o 1 f}、G_{1 1}、G_{1 2}、G_{1 3}、G_{1 4}、及び G_{1 5} / _{1 6} (G N A 1 5 に指定) を含む天然哺乳類 G タンパク質、これらのアイソフォームのスプライス変異体、並びにそれらの機能的変異体のいずれかから選択される。実施形態では、G タンパク質サブユニットは、G_i ファミリーである。実施形態では、G タンパク質サブユニットは、G_s ファミリーである。実施形態では、G タンパク質サブユニットは、G_{1 2} / _{1 3} ファミリーである。実施形態では、G タンパク質は、無差別または非選択的 G タンパク質である。さらなる実施形態では、G タンパク質は、以下の位置、G_{6 6}、Y_{6 7}、F_{7 5} のいずれか及びそれらの任意の組み合わせで置換を有する、または他の G サブタイプで等価の保存置換を有する突然変異 G タンパク質 (例えは、G_q タンパク質) であり、(即ち、「無差別」 G タンパク質とも一般に呼ばれる特異的 G タンパク質へのこれらのレセプターの優先的に天然のカッピングから独立して G P C R と相互作用することができる) 孤児レセプターを含む、任意の G P C R によって活性化される非選択的 G タンパク質をもたらし、これらも本開示に含まれる。実施形態では、本明細書に記載されたバイオセンサー / 方法で使用される組換え G タンパク質は、無差別 G タンパク質であり、G P C R は、孤児 G P C R である。

【 0 1 1 3 】

別の態様では、本開示は、ヒト G_q タンパク質の残基 6 7 及び / または残基 7 5 に対応する位置で突然変異を含む突然変異 G ポリペプチドに関する。前記突然変異は、挿入、欠失、または置換、例えば、非保存的置換であってもよい。図 1 4 は、本発明に従って突然変異し得る代表的な h G タンパク質の配列のアラインメントを開示し、G_q の 6 7 及び 7 5 に対応する位置は矢印で示される。当業者には、特定の G_q における G_q の 6 7 及び 7 5 に対応する位置の N 末端残基数に応じて、残基の番号付けは変化することが理解されるであろう。例えは、h G_{1 4} では、残基 6 7 位に対応する G_q は、残基 6 3 (Y) である。同様に、h G_{1 2} では、残基の 6 7 位に対応する G_q は、残基 8 5 (F) である。従って、本発明は、例えは、6 3 位で突然変異 (例えは、非芳香族残基の置換) を含む突然変異 G_{1 4} ポリペプチドと、G_q の 6 7 位での突然変異に対応する 8 5 位で突然変異 (例えは、非芳香族残基の置換) を含む突然変異 G_{1 2} ポリペプチドとを包含する。ヒト G_q タンパク質の残基 6 7 及び / または残基 7 5 に対応する 1 つ以上の位置で突然変異を含む任意の突然変異 G ポリペプチドについても本開示で包含される。

【 0 1 1 4 】

実施形態では、本発明は、配列番号 1 ~ 1 7 に記載の配列のいずれかを含む突然変異 G ポリペプチドに関し、ヒト G_q タンパク質の残基 6 7 及び / または残基 7 5 に対応する残基が突然変異する。実施形態では、突然変異は、ヒト G_q タンパク質の残基 6 7 に対応する位置である。実施形態では、突然変異は、残基 6 7 に対応する位置であり、非芳香族残基、さらなる実施形態では、システインの置換である。別の実施形態では、突然変

10

20

30

40

50

異は、ヒト G_q タンパク質の残基 75 に対応する位置であり、非芳香族残基の置換である。さらなる実施形態では、非芳香族残基は、グリシンである。そのような突然変異 G ポリペプチドは、本明細書に記載されたバイオセンサー及び / または方法のいずれかで使用してもよい。非限定的な一実施形態では、突然変異 G_q タンパク質は、以下の置換、G_q G 6 6 K、G_q Y 6 7 C、及び G_q F 7 5 G の 1 つを含み、これは、非選択的 G タンパク質をもたらす。

【0115】

別の態様では、本開示は、上記に定義された突然変異 G ポリペプチドをコードする配列を含む核酸に関する。別の態様では、本開示は、上記に定義された核酸を含むプラスミドまたはベクターに関する。別の態様では、本開示は、上記に定義された核酸またはベクターを含む細胞（宿主細胞）に関する。別の態様では、本発明は、本明細書で定義された突然変異 G ポリペプチドをコードする核酸を含むキットを提供する。実施形態では、細胞は、本明細書で定義された突然変異 G ポリペプチドをコードする核酸で形質移入または形質転換されている。本発明はさらに、例えば、当該技術分野で周知の培地及び試薬を用いて、本明細書で定義された突然変異 G ポリペプチドを発現するための、上述のものなどの組換え発現システム、ベクター、及び細胞を提供する。細胞は、上記に定義された突然変異 G ポリペプチドを発現することができる任意の細胞であってもよい。タンパク質を発現するための適当な宿主細胞及び方法は、当該技術分野で周知である。上記に定義された突然変異 G ポリペプチドを発現することができる任意の細胞を使用してもよい。例えば、真核生物宿主細胞、例えば、哺乳類細胞を使用してもよい（例えば、マウス、ラット、及びハムスター細胞株などのげっ歯細胞、ヒト細胞 / 細胞株）。別の実施形態では、上述の細胞は、ヒト細胞株、例えば、胚腎臓細胞株（例えば、H E K 2 9 3 または H E K 2 9 3 T 細胞）である。

【0116】

実施形態では、本明細書に記載された G タンパク質は、G 1、G 2、G 3（例えば、G 3 の短い変異体、G 3 s h）、G 4 及び G 5（G 5 - S または G 5 - L）、これらのアイソフォームのスプライス変異体、及びそれらの機能的変異体を含む公知の G タンパク質のいずれかから選択される。さらなる実施形態では、G タンパク質は、G 1 である。別の実施形態では、G タンパク質は、G 3 である。さらなる実施形態では、G タンパク質（例えば、G 1）は、G F P などの B R E T アクセプターで N 末端的に標識される。

【0117】

実施形態では、本明細書に記載された G タンパク質は、G 1、G 2、G 3、G 4、G 5、G 7、G 8、G 9、G 10、G 11、G 12、及び G 13、並びにそれらの機能的変異体を含む公知のヒト G タンパク質のいずれかから選択される。さらなる実施形態では、G タンパク質は、G 5 である。さらなる実施形態では、G タンパク質（例えば、G 5）は、ルシフェラーゼなどの B R E T ドナーで N 末端的に標識される。別の実施形態では、G タンパク質（例えば、G 5）は、G F P などの B R E T アクセプターで N 末端的に標識される。別の実施形態では、G タンパク質（例えば、G 5）は、P C A 相溶性レポータータンパク質、例えば、ルシフェラーゼ（例えば、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ）の第 1 のドメインで N 末端的に標識される。

【0118】

実施形態では、本明細書に記載された I P は、G ヘテロ三量体が解離する際に G 二量体と相互作用し、G タンパク質共役型レセプターキナーゼ（G R K）タンパク質（G R K 2 または G R K 3）などのブレクストリン相同（P H）ドメイン含有タンパク質、または、G R K タンパク質の C 末端ブレクストリン相同（P H）ドメイン（即ち、G 二量体と相互作用する能力を維持する）を含むその機能的断片、ブレクストリン相同ドメイン含有ファミリー G（R h o G e f ドメインを有する）メンバー 2（P L E K H G 2）である。G R K 2、G R K 3、及び P L E K H G 2 のアミノ酸配列を図 17 A ~ C に示し、P H ドメインに下線を引いている。非限定的な一実施形態では、G 二量体と

10

20

30

40

50

相互作用する能力を維持する、本明細書に記載された G R K タンパク質（ G R K 2 または G R K 3 ）またはその断片（例えば、 G R K の C 末端プレクストリン相同（ P H ）ドメイン、 例えは、配列番号 5 0 または 5 1 に記載の配列を含む C 末端断片を含む）は、フルオロフォアなどの B R E T アクセプターで C 末端的に標識される。実施形態では、 I P は、 G R K 2 、または G R K 3 、またはその変異体 / 断片であり、 G F P などの B R E T アクセプターで C 末端的に融合される。別の実施形態では、 I P は、 G タンパク質シグナル伝達（ R G S ）ドメインの調節因子を不活性化する突然変異を含む G R K タンパク質の変異体（「 R G S 死」変異体）である。さらなる実施形態では、 G R K タンパク質の「 R G S 死」変異体は、 G R K 2 残基 D 1 1 0 に対応する位置で突然変異、例えは、 D から A 置換を含む。天然のヒト G R K 2 （ UniProtKB 受託 P 2 5 0 9 8 ）及び G R K 3 （ UniProtKB 受託 P 3 5 6 2 6 ）の R G S ドメインは、残基約 5 4 ~ 1 7 5 に広がる。別の実施形態では、 I P は、そのキナーゼドメインを不活性化する突然変異を含む G R K タンパク質の変異体（「キナーゼ死」変異体）である。さらなる実施形態では、 G R K タンパク質の「キナーゼ死」変異体は、 G R K 2 残基 K 2 2 0 に対応する位置で突然変異（例えは、非保存的置換）、例えは、 K から D 置換を含む。 G R K 2 （ UniProtKB 受託 P 2 5 0 9 8 ）及び G R K 3 （ UniProtKB 受託 P 3 5 6 2 6 ）のキナーゼドメインは、残基約 1 9 1 ~ 4 5 3 に広がる。別の実施形態では、 I P は、その C 末端ドメインに、例えは、最後の 3 0 個の C 末端残基内に、突然変異を含む G R K タンパク質の変異体である。さらなる実施形態では、突然変異は、 C 末端ドメイン内に配置されたセリン残基であり、より詳細には、天然タンパク質においてリン酸化されてもよいセリンである。さらなる実施形態では、突然変異（例えは、非保存的置換）は、 G R K 2 の残基 S 6 7 0 、 S 6 7 6 、及び / または S 6 8 5 に対応する位置であり、例えは、 S から A 置換及び / または S から D 置換である。
10

【 0 1 1 9 】

実施形態では、本明細書に記載された融合分子のドメインは、（例えは、ペプチド結合を介して）直接的に、または、適切なリンカー部分、例えは、 1 つ以上のアミノ酸のリンカーまたは別の型の化学リンカー（例えは、炭水化物リンカー、脂質リンカー、脂肪酸リンカー、ポリエーテルリンカー、 P E G など）を介して「間接的」にのいずれかで共有結合してもよい。実施形態では、 1 つ以上のさらなるドメイン（複数可）を、上記に定義されたドメインの前（ N 末端）、間、または後（ C 末端）に挿入してもよい。実施形態では、融合分子のドメインは、ペプチド結合を介して共有結合される。別の実施形態では、融合分子の成分の 1 つ以上は、ペプチドリンカーを介して連結する。リンカーは、標識化合物内の B R E T / F R E T 標識発色団の所望の配座、例えは、 B R E T / F R E T 対中の発色団間の分離をもたらすために採用してもよい。リンカーは、 C 末端、 N 末端、または中間位置で結合してもよい。一実施形態では、リンカーは、長さが 2 ~ 3 0 アミノ酸、例えは、約 5 ~ 約 2 0 ~ 2 5 アミノ酸の範囲のペプチドリンカーである。組成物及びリンカーノの各々の長さは、柔軟性及び水溶解度などの種々の所望の特性に応じて選択してもよい。例えは、ペプチドリンカーは、限定されないが、グリシンを含む比較的小さいアミノ酸残基を含んでもよく；小アミノ酸残基は、立体的な嵩高さを減少させ、ペプチドリンカーノの柔軟性を増加させてもよい。ペプチドリンカーノは、限定されないが、セリンを含む極性アミノ酸を含んでもよい。極性アミノ酸残基は、ペプチドリンカーノ水溶解度を増加させ得る。さらに、 G lobplot 2 . 3 (Linding ら、 G lobPlot : exploring protein sequences for globularity and disorder , Nucleic Acid Res 2 0 0 3 - Vol . 3 1 , No . 1 3 , 3 7 0 1 - 8)などのプログラムを使用して、不規則性及び球状性的程度、従って、それらの柔軟性の程度の判断の一助になり得る。実施形態では、ペプチドリンカーノは、以下の実施例で開示されたアミノ酸配列の 1 つ以上を含む。
20

【 0 1 2 0 】

非限定的な一実施形態では、図 1 2 A に示すように、本明細書に記載された組換え I P ベース構築物は、フルオロフォア、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質もしくは
40

発光酵素の一部を含むその断片で標識された I P、リンカー、好ましくはフレキシブルポリペプチドリンカー、及び I P を膜に連結するための原形質膜(P M)固定 / 標的化ドメインまたはシグナルを含む。実施形態では、フレキシブルリンカーは、約 50 ~ 約 1 0 0 0 、 9 0 0 、 8 0 0 、 7 0 0 、 6 0 0 、または 5 0 0 アミノ酸のランダムアミノ酸配列の長さに対応する長さ、例えば、約 1 0 0 ~ 約 5 0 0 、 4 0 0 、または 3 0 0 アミノ酸の長さ、好ましくは約 2 0 0 ~ 4 0 0 、 2 0 0 ~ 3 0 0 、または約 2 0 0 アミノ酸の長さを有する。さらなる実施形態では、フレキシブルリンカーは、約 5 0 ~ 約 1 0 0 0 、 9 0 0 、 8 0 0 、 7 0 0 、 6 0 0 、または 5 0 0 アミノ酸、例えば、約 1 0 0 ~ 約 5 0 0 、 4 0 0 、または 3 0 0 アミノ酸の長さ、好ましくは約 2 0 0 ~ 4 0 0 、 2 0 0 ~ 3 0 0 、または 2 0 0 アミノ酸の長さのランダムアミノ酸配列を含む。フレキシブルアミノ酸リンカー、より具体的には、最小の球状性と最大の不規則性を有するリンカーを設計する方法は、当該技術分野で公知である。これは、例えば、上述の G l o b p l o t プログラムを用いて達成してもよい。配列をさらに最適化して、推定凝集ホットスポット、局在化ドメイン、及び / または相互作用モチーフ及びリン酸化モチーフを排除してもよい。実施形態では、フレキシブルリンカーは、B R E T ドナーまたはアクセプター(例えば、R l u c または G F P) と原形質膜標的化ドメインとの間に配置される。さらなる実施形態では、構築物は、以下の構成： I P (例えば、G R K 2) - B R E T アクセプター (例えば、G F P) - フレキシブルリンカー - P M 標的化ドメイン (例えば、C A A X ドメイン) を有する。

【 0 1 2 1 】

一実施形態では、本開示は、G P C R と；以下のもの： G _q 、 G _s 、 G _{i 1} 、 G _{i 2} 、 G _{i 3} 、 G _{t - cone} 、 G _{t - rod} 、 G _{t - gust} 、 G _z 、 G _{o A} 、 G _{o B} 、 G _{o 1 f} 、 G _{1 1} 、 G _{1 2} 、 G _{1 3} 、 G _{1 4} 、及び G _{1 5 / 1 6} から選択された G タンパク質、及び本明細書に記載される突然変異した非選択的 G タンパク質と；フルオロフォア、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質もしくは発光酵素の一部を含むその断片で標識された、G R K の C 末端プレクストリン相同 (P H) ドメインを含む G R K タンパク質 (G R K 2 または G R K 3) またはその断片、G タンパク質、及び G タンパク質、ここで、G タンパク質または G タンパク質は、フルオロフォア、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質もしくは発光酵素の一部を含むその断片で標識される、を含むシグナル伝達バイオセンサーと、を含むシステムに関する。

【 0 1 2 2 】

一実施形態では、本開示は、G P C R と；以下のもの： G _q 、 G _s 、 G _{i 1} 、 G _{i 2} 、 G _{i 3} 、 G _{t - cone} 、 G _{t - rod} 、 G _{t - gust} 、 G _z 、 G _{o A} 、 G _{o B} 、 G _{o 1 f} 、 G _{1 1} 、 G _{1 2} 、 G _{1 3} 、 G _{1 4} 、及び G _{1 5 / 1 6} から選択された G タンパク質、及び G _q の位置のいずれかに対応する位置： G 6 6 、 Y 6 7 、及び / または F 7 5 で置換を有する突然変異 G タンパク質と；フルオロフォア、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質もしくは発光酵素の一部を含むその断片で標識された、G R K の C 末端プレクストリン相同 (P H) ドメインを含む G R K タンパク質 (G R K 2 または G R K 3) またはその断片、G 1 タンパク質、及び G 5 タンパク質、ここで、G タンパク質または G タンパク質は、フルオロフォア、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質もしくは発光酵素の一部を含むその断片で標識される、を含むシグナル伝達バイオセンサーと、を含むシステムに関する。

【 0 1 2 3 】

別の広範な非限定的な態様によれば、本開示は、リガンドのシグナル伝達サインを特徴付けるための、G タンパク質活性の活性化因子； G タンパク質；及び本明細書に記載されるバイオセンサーまたはシステムを含むシステムに関する。

【 0 1 2 4 】

本開示は、限定されないが、本開示で定義されるタンパク質をコードする D N A 分子、R N A 分子、ウイルスまたはプラスミドであり得る核酸配列を含むシステムにも関する。実施形態では、本開示は、本明細書に記載されたバイオセンサーの 1 つ以上のタンパク質

成分（例えば、融合タンパク質）をコードする配列を含む核酸にも関する。実施形態では、核酸は、(i) I P、(ii) 第1のフルオロフォア、生物発光タンパク質、または蛍光タンパク質もしくは生物発光タンパク質の一部を含むその断片；(iii) G タンパク質；(iv) 第2のフルオロフォア、生物発光タンパク質、または蛍光タンパク質もしくは生物発光タンパク質の一部を含むその断片、及び(v) G タンパク質をコードする配列を含む。さらなる実施形態では、核酸は、バイオセンサーの成分の間に配置された1つ以上のリンカーをコードする1つ以上の配列をさらに含む。さらなる実施形態では、核酸は、プロモーター、エンハンサー、及び／または他の調節配列などの1つ以上の転写調節配列（複数可）、及び／または翻訳調節に関与する1つ以上の配列、例えば、内部リボソーム侵入部位（I R E S）配列（複数可）をさらに含む。

10

【0125】

実施形態では、核酸は、ベクター／プラスミド、さらなる実施形態では、発現ベクター／プラスミドに存在する。そのようなベクターは、1つ以上の転写調節配列（複数可）に作動可能に連結された、本明細書に記載されたバイオセンサーの上記に定義された成分（例えば、融合タンパク質）をコードすることができる核酸配列を含む。

【0126】

用語「ベクター」は、それらに連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。好ましいベクターの1つの型は、エピソーム、即ち、染色体外複製が可能な核酸である。好ましいベクターは、それらに連結された核酸の自己複製及び／または発現が可能なものである。本明細書中では、それらに作動可能に連結された遺伝子の発現を指令することができるベクターを、「発現ベクター」と称する。本発明の組換え発現ベクターは、当業者に公知の標準技術によって構築され、例えば、Sambrookら、(1989) in Molecular Cloning: A Laboratory Manual に見られる。DNAの断片を結紮するために種々の戦略を利用することができ、その選択は、DNA断片の末端の性質に依存し、当業者によって容易に判断することができる。本発明のベクターは、細菌性細胞及び宿主細胞中のベクター繁殖及び選択を容易にするための他の配列要素も含有し得る。さらに、本発明のベクターは、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位のヌクレオチドの配列を含んでもよい。選択可能なマーカー及びレポーター遺伝子などのコード配列は、当業者に周知である。

20

【0127】

本発明の核酸配列を含む組換え発現ベクターを、定義された組換え発現ベクターからタンパク質コード領域を発現することができる生きた細胞を含み得る細胞（宿主細胞）に導入してもよい。生きた細胞は、生きた組織内の培養細胞及び細胞の両方を含み得る。従って、本発明は、本発明の組換え発現ベクターを含有する宿主細胞も提供する。用語「細胞」、「宿主細胞」、及び「組換え宿主細胞」は、本明細書で交換可能に使用される。そのような用語は、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫または可能性のある子孫のことも指す。突然変異または環境の影響のいずれかに起因して、ある特定の修飾が継代において生じることから、そのような子孫は、実際には親細胞とは同一ではないかもしれないが、本明細書においては用語の範囲内に含まれる。

30

【0128】

ベクターDNAは、従来の形質転換技術または形質移入技術を介して細胞中に導入することができる。用語「形質転換」及び「形質移入」は、宿主細胞中に外来性核酸を導入するための技術を指し、リン酸カルシウム共沈殿または塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン-媒介性形質移入、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、及びウイルス媒介性形質移入が挙げられる。宿主細胞を形質転換または形質移入するための適当な方法は、例えば、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989))、及び他の実験マニュアルにおいて見出すことができる。「転写調節配列／要素」は、作動可能に連結されたタンパク質コード配列の転写を誘導または制御する開始及び終結シグナル、エン

40

50

ハンサー、及びプロモーター、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナルなどのDNA配列を指す一般用語である。第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係で配置された場合に、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と「作動可能に連結」される。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結される。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は近接しており、また2つのタンパク質コード領域が接合することが必要な場合にはリーディングフレーム内にある。しかしながら、プロモーターから数キロベース離れており、且つ、インtron配列が種々の長さである場合にエンハンサーは一般的に機能するので、一部のポリヌクレオチド要素は、作動可能に連結されているが隣接していない場合がある。

【0129】

10

実施形態では、図11Aに示すように、核酸またはベクターは、本明細書に記載されたバイオセンサー（即ち、多シストロン性構築物）の2つ以上の成分（融合タンパク質）をコードする。実施形態では、多シストロン性構築物（例えば、DNA、ベクター）は、

I P 及び G タンパク質をコードする核酸配列を含み、各々は、G タンパク質に加えて、適切なフルオロフォア、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質もしくは発光酵素の一部を含むその断片で標識される。この多シストロン性構築物を、目的の G タンパク質サブユニット及び G タンパク質活性化因子をコードする核酸配列を含む DNA 分子と共に形質移入することによって、本発明のシステムを再現することができる。

【0130】

20

別の態様では、本発明は、本明細書で定義された核酸及び / またはベクターを含むキットを提供する。

【0131】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されたバイオセンサーのいずれかのタンパク質成分（例えば、融合タンパク質、組換えタンパク質）のいずれかを含むかまたは発現している細胞（例えば、宿主細胞）も提供する。実施形態では、細胞は、本明細書で定義された突然変異 G ポリペプチドをコードする核酸で形質移入または形質転換されている。本発明はさらに、例えば、当該技術分野で周知の培地及び試薬を用いて、本明細書で定義された突然変異 G ポリペプチドを発現するための、上述のものなどの組換え発現システム、ベクター、及び細胞を提供する。細胞は、上記に定義された突然変異 G ポリペプチドを発現することができる任意の細胞であってもよい。タンパク質を発現するための適当な宿主細胞及び方法は、当該技術分野で周知である。上記に定義された突然変異 G ポリペプチドを発現することができる任意の細胞を使用してもよい。例えば、真核生物宿主細胞、例えば、哺乳類細胞を使用してもよい（例えば、マウス、ラット、及びハムスター細胞株などのげっ歯細胞、ヒト細胞 / 細胞株）。別の実施形態では、上述の細胞は、ヒト細胞株、例えば、胚腎臓細胞株（例えば、HEK293 または HEK293T 細胞）である。別の態様では、本開示は、本明細書に記載されたバイオセンサーのいずれかのタンパク質成分（例えば、融合タンパク質、組換えタンパク質）のいずれか、さらなる実施形態では、膜に固定された融合タンパク質を含むかまたは発現している膜調製物も提供する。

30

【0132】

40

本開示はさらに、第1の条件と第2の条件の間の G サブユニットへの G 相互作用タンパク質（ I P ）の補充における調節を評価するための方法に関し、前記方法は、本明細書で定義されたバイオセンサーを提供すること；前記第1及び第2の条件で B R E T アクセプターシグナルを測定すること；を含み、前記第1及び第2の条件間の B R E T シグナルの差は、第1の条件及び第2の条件間の G サブユニットへの G 相互作用タンパク質（ I P ）の補充における調節を示す。実施形態では、第1の条件は、試験薬剤の存在であり、第2の条件は、試験薬剤の不在であり、B R E T シグナルの差は、試験薬剤が G サブユニットへの G 相互作用タンパク質（ I P ）の補充を調節（増加または減少）することを示している。G サブユニットへの G 相互作用タンパク質（ I P ）の補充は、G P C R 及び / または G タンパク質活性化の読み出しとして使用してもよい。

50

【0133】

本開示はさらに、本明細書に記載されたシステムを含むGタンパク質活性化を検出するための方法に関し、前記方法は、1)前記システムを、Gタンパク質を活性化する化合物と接触させること、及び2)バイオセンサーのシグナルを測定することによってGタンパク質の活性化を検出することを含む。方法は、3)シグナル伝達バイオセンサーのシグナルからGタンパク質機能性カップリング情報を導出する工程と、4)情報を処理して、Gタンパク質活性化因子のGタンパク質活性化プロファイル及び化合物のシグナル伝達サインを決定する工程とをさらに含み得る。各々のバイオセンサーが異なる組換えGタンパク質を含む複数のバイオセンサーを含むバイオセンサーシステムを使用することで、図3A及び3Bに例示したように、任意のGPCR及び/またはGPCRリガンドのGタンパク質カップリングプロファイルを決定することが可能である。

【0134】

用語「化合物」、「薬剤」、「試験化合物」、または「試験薬剤」は、本発明の方法/バイオセンサーによってスクリーニングすることができ、且つ、合成または天然化合物のライブラリーを含む多様な源から得ることができる任意の分子(例えば、薬剤候補)を指す。例えば、多くの手段が、ランダム化オリゴペプチドの発現を含む、多様な有機化合物及び生体分子のランダム及び指向性合成に利用可能である。あるいは、細菌、真菌、植物、及び動物抽出物の形態での天然化合物のライブラリーが利用可能であり、または容易に生成される。さらに、天然のまたは合成的に生成されたライブラリー及び化合物は、従来の化学的、物理的、及び生化学的手段を通じて容易に修飾される。

【0135】

本開示はさらに、試験薬剤がGPCRの活性を調節するかどうかの決定方法に関し、前記方法は、本明細書に記載されたバイオセンサーの1つにおける前記試験薬剤の存在下及び不在下において、RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定することを含み、前記薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記GPCRの活性を増加させることを示し、前記薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記薬剤が前記GPCRの活性を阻害することを示す。実施形態では、本方法は、

(1)(A)、(B)、または(C)で定義される要素を含むバイオセンサーを提供すること：

(A)(i)(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；(ii)融合Gタンパク質または融合Gタンパク質を含む第2の成分、前記Gタンパク質または前記Gタンパク質は、(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、(a)前記IIPが前記RETドナーに融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記RETアクセプターに融合しており；(b)前記IIPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記RETドナーに融合しており；及び(c)前記IIPが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；(iii)組換えGタンパク質を含む第3の成分；及び(iv)前記GPCRを含む第4の成分；

(B)(i)(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；(ii)そのC末端で(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)前記レポータータンパク質の第2の断片に融合した前記GPCRを含む第2の成分；(iii)組換えGタンパク質を含む第3の成分；(a)前記IIPが前記RETドナーに融合している場合、前記GPCRは、前記RETアクセプターに融合しており；(b)前記IIPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記GPCRは、前記RETドナーに融合しており；及び(c)前記IIPが前記レポータータンパク質

の第1の断片に融合している場合、前記G P C Rは、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；または

(C) (i) (a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG₁相互作用タンパク質(I P)を含む第1の成分；(ii) 融合原形質膜(P M)標的化部分を含む第2の成分、前記P M標的化部分は、(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；(a) 前記I Pが前記RETドナーに融合している場合、前記P M標的化部分は、前記RETアクセプターに融合しており；(b) 前記I Pが前記RETアクセプターに融合している場合、前記P M標的化部分は、前記RETドナーに融合しており；及び(c) 前記I Pが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記P M標的化部分は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；(iii) 組換えG₁タンパク質を含む第3の成分；及び(iv) 前記G P C Rを含む第4の成分；及び

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；前記薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記G P C Rの活性を増加させることを示し、前記薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記薬剤が前記G P C Rの活性を阻害することを示す、を含む。

【0136】

実施形態では、上述の方法は、

(3) 試験薬剤の存在下及び不在下において、及びG P C Rアゴニストの存在下において、本明細書で定義されたバイオセンサー(複数可)で、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること、組換えG₁タンパク質は、G P C Rにカップリングしている(即ち、G P C Rにカップリングまたは活性化されることが知られている)；及び

(4) 前記試験薬剤が前記G₁タンパク質のインヒビターであるかどうかを決定すること；試験薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、試験薬剤がG₁タンパク質のインヒビターであることを示し、試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより高いシグナルは、試験薬剤がG₁タンパク質のインヒビターではないことを示す、をさらに含む。

【0137】

実施形態では、用語「より高いシグナル」または「より低いシグナル」は、本明細書で使用する場合、試験薬剤の存在下において測定された参照シグナルと比較して少なくとも10、20、30、40、45または50%高い(または低い)シグナルを指す。別の実施形態では、「より高いシグナル」または「より低いシグナル」は、例えば、複数のサンプルで得られた結果を組み合わせることによって、試験薬剤の不在下と比較して存在下において測定されたシグナルにおける統計学的な有意差(適切な統計分析を用いて決定される)を示すことによって決定される。異なるデータセット間の有意差を決定するための統計分析(ANOVA、スチューデントのt検定、カイ2乗検定など)は、当該技術分野で公知であり、そのような分析は、適切なコンピュータープログラムを用いて行ってもよい。

【0138】

本開示はさらに、G P C Rアゴニストによって活性化されたG₁タンパク質(複数可)(アゴニストのG₁タンパク質プロファイリング/サイン)を同定する方法に関し、前記方法は、(i) 本明細書で定義された複数のバイオセンサー中の前記G P C Rアゴニストの存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること、バイオセンサーの各々は、異なる組換えG₁タンパク質を含む；(ii) 前記G P C Rアゴニストによって活性化されたG₁タンパク質(複数可)を同定すること；を含み、組換えG₁タンパク質を発現していない対応するバイオセンサーに対して、組換えG₁タンパク質を含むバイオセンサー中のG P C Rアゴニストの存在下

10

20

30

40

50

において測定されたシグナルのより高い増加は、G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されることを示し、組換え G タンパク質を発現していない対応するバイオセンサーに対して、組換え G タンパク質を含むバイオセンサー中の G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加または減少は、G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されないことを示す。実施形態では、方法は、(a) 本明細書で定義されたバイオセンサーシステムの第1及び複数の第2のバイオセンサー中で前記 G P C R アゴニストの存在下及び不在下において、前記 R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること、及び(b) 前記 G P C R アゴニストによって活性化された G タンパク質(複数可)を同定すること；を含み、前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されることを示し、前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記 G P C R アゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記 G タンパク質が前記 G P C R アゴニストによって活性化されないことを示す。
10

【0139】

陽性対照及び陰性対照は、本明細書に記載された方法／アッセイで使用してもよい。対照及び試験サンプルは、統計学的に有意な結果を得るために複数回行ってもよい。

【0140】

実施形態では、上述の方法は、高スループット方法(高スループットスクリーニング、H T S)である。用語「高スループットスクリーニング」(H T S)は、本明細書で使用する場合、多数の化合物(数百、数千)の標的分子に対する結合活性または生物学的活性を迅速且つ並行してスクリーニングすることができる方法を指す。そのような H T S 方法は、典型的には、いくつかのウェル、例えば、384、1536、または3456ウェルを有するマイクロタイタープレートで行う。H T Sでは、読み出しシグナルを高い感受性、精度、及び再現性で検出することが重要である。
20

【0141】

B R E T シグナルを測定する方法及びデバイスは、当該技術分野で周知である。B R E T シグナルは、例えば、B R E T アクセプターシグナル(光強度)の強度を決定すること、及び／または、B R E T ドナー(B R E T 比)が発したシグナルまたは光強度に対する B R E T アクセプターが発したシグナルまたは光強度の比率を算出することによって測定してもよい。B R E T シグナルは、B R E T ドナー及び／またはB R E T アクセプター発光を検出するための適切なフィルターセットを備えたマイクロプレートリーダーまたはマイクロスコープを用いて測定してもよい。
30

【0142】

本明細書に記載された特徴または実施形態の任意の組み合わせ／副組み合わせは、本明細書に記載されたバイオセンサー、システム、及び／または方法で提示または使用してもよいことを理解すべきである。

【0143】

実施形態では、本明細書に記載されたバイオセンサー、システム、及び／または方法は、以下の実施例及び添付図面に記載した構築物／融合タンパク質及び／または組換えタンパク質、例えば、R l u c - G 1 ~ G 13、G R K - G F P、G R K - R l u c F 1、R l u c F 2 - G 5、G R K 2 - G F P - 膜、R l u c - G R K 2、G F P - G 5、G F P - C A A X、またはG P C R - R l u c の1つ以上を含む。
40

【実施例】

【0144】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに詳細に説明される。

【0145】

実施例1：材料及び方法

試薬．アンジオテンシンII(AngII；[A s p - A r g - V a l - T y r - I l

50

e - His - Pro - Phe]、配列番号49)、ポリ - オルニチン、ポリ - D - リジン、イソプロテレノール、ロチゴチン、エピネフリン、ノルエピネフリン、フェニレフリン、及び百日咳毒素は、Sigma(登録商標)社製であった。u46619は、Cayman Chemical(登録商標)(アンナーバー、ミシガン州)社製であった。[Sar¹、Ile⁸] - AngII(SI)、及び[Asp¹, Val⁵, Gly⁸] - AngII(DVG) [Sar1 - Val5 - D - Phe8]AngII(SVdF)、及び[Sar1 - D - Ala8]AngIIは、Universite de Sherbrooke(カナダ、ケベック州)で合成した。UBO-Qic(L - トレオニン、(3R) - N - アセチル - 3 - ヒドロキシ - L - ロイシル - (aR) - a - ヒドロキシベンゼンプロパノイル - 2 , 3 - イデヒドロ - N - メチルアラニル - L - アラニル - N - メチル - L - アラニル - (3R) - 3 - [(2S,3R) - 3 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1 - オキソ - 2 - [(1 - オキソプロピル)アミノ]ペンチル]オキシ] - L - ロイシル - N , O - ジメチル - , (7 1) - ラクトン(9CI))は、Institute for Pharmaceutical Biology of the University of Bonn(ドイツ)から入手した。ダルベッコ改变イーグル培地(DMEM)、ウシ胎児血清、OPTI-MEM(登録商標)、及び他の細胞培養試薬は、Invitrogen(登録商標)から購入した。セレンテラジン400a、セレンテラジンH及びProlume(登録商標)Purple Iは、Goldbio(登録商標)、Biötium(登録商標)、またはNanolight(登録商標)Technologyのいずれかから購入した。ポリエチレンイミン(PEI; 25kDa直鎖)は、Poly sciences(登録商標)(ウォリントン、米国ペンシルベニア州)から購入した。サケ精子DNAは、Life technologies(Thermo Fisher)から購入した。Phusion DNAポリメラーゼは、Thermo Scientific(登録商標)社製であった。制限酵素及びT4 DNAリガーゼは、NEB(登録商標)から入手した。突然変異誘発及びPCR用途のためのオリゴヌクレオチドは、Bio Corp DNA(登録商標)で合成した。

【0146】

発現ベクター：レセプター及びGタンパク質。AT1Rをコードするプラスミドは、Stephane Laporte(マギル大学、モントリオール、カナダ)からの寛大な贈り物であった。G_q、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、G_{15/16}、G_{oA}、G_{oB}、G_z、G_s、G_{i1}、G_{i2}、G_{i3}、G₁、TPR、D₂R及び_{1B}ARは、cDNAリソースセンター(cDNA.org)から入手した。突然変異体Gタンパク質をコードするプラスミド、例えば、G_qG66K、G_qY67C、及びG_qF75Gは、表Iに示すプライマーを用いて、G_q野生型タンパク質コード配列の部位特異的突然変異誘発(PCRオーバーラップ)によって得た。PCR断片をAcc65I + XhoI制限酵素で消化し、Acc65I + XhoIで消化したpCDNA3.1 Zeo(+) (Invitrogen(登録商標)社製、カールズバッド、カリフォルニア)でクローニングした。DNAシークエンシングを用いて、異なる構築物の妥当性を確認し、変性プライマーから生成された特定の置換を同定した。

【表2】

表I：本明細書に記載された実験で使用したプライマーの配列

プライマー	配列 (5' -3')	
PCRオーバーラップのための外部プライマー フォワード (配列番号21) リバース (配列番号22)	gacctgcgcctagcgttaaacttaaggcttggtaccaccatg gtcatccctaggctcgagtttagaccagattgtactcctt	
Gly66置換を生成するための変性プライマー (G66D, G66E, G66N & G66K) フォワード (配列番号23) リバース (配列番号24)	tgagaatcatccatgggtcaRAWtactctgatgaagataaaag cttttatcttcatcagagtaWTYtgaccatggatgattctca	10
Tyr67置換を生成するための変性プライマー (Y67F, Y67L, Y67W & Y67C) フォワード (配列番号25) リバース (配列番号26)	gaatcatccatgggtcaggaTKStctgatgaagataaaagggg aagcccccttttatcttcatcagagWTYgtatcctgaccatggatga	
Y67S置換を生成するためのプライマー フォワード (配列番号27) リバース (配列番号28)	agaatcatccatgggtcaggatCctctgatgaagataaaagggg cccccttttatcttcatcagagGatcctgaccatggatgattct	
Y67G置換を生成するためのプライマー フォワード (配列番号29) リバース (配列番号30)	agaatcatccatgggtcaggaGGctctgatgaagataaaagggg cccccttttatcttcatcagagCCtcctgaccatggatgattct	20
F75G置換を生成するためのプライマー フォワード (配列番号31) リバース (配列番号32)	tctgatgaagataaaagggcGGcaccaagctggtgtatcagaa ttctgatacaccagcttggtgCCggcccttttatcttcatcaga	

【0147】

発現ベクター：バイオセンサー構築物。R l u c - G 5、及びG F P - G 5：融合タンパク質R l u c - G 1 ~ G 13 及びG F P 10 - G 5をコードするプラスミドは、G コード配列のP C R 増幅によって得た後、そのN末端で、p c D N A 3 . 1 ベクター（リンカー配列：G S A G T、配列番号33）中のヒト化ウミシイタケ由来ルシフェラーゼI I (h R l u c I I) 配列（先に報告されている（L e d u c、B r e t o nら、2009）h R l u c の変異体、配列番号39）、またはG F P 10（先に報告されている（M e r c i e r、S a l a h p o u rら、2002、配列番号38）緑色蛍光タンパク質（G F P）の変異形態）にフレームで融合させた。G R K 2 - G F P、及びG R K 3 - G F P : G R K 2 - G F P、G R K 3 - G F P、G R K 2 C末端（配列番号50）- G F P、G R K 3 C末端（配列番号51）- G F PをG R K 2 及びG R K 3 のP C R 増幅によって生成した後、それらのC末端で、p c D N A 3 . 1 Z e o (+) ベクター中のG F P 10 中のG F P 10 に融合し、11アミノ酸残基のリンカーをG R K 及びG F P 10 タンパク質の間に生成した（リンカー配列：G S A G T G K L P A T、配列番号34）。G F P - G R K 2 及びG F P - G R K 3 : G R K 2 - G F P、G F P - G R K 2 C末端（配列番号50）、G F P - G R K 3 C末端（配列番号51）をG R K 2 及びG R K 3 のP C R 増幅によって生成した後、それらのN末端で、p c D N A 3 . 1 Z e o (+) ベクター中のG F P 10（配列番号38）に融合し、7アミノ酸残基リンカーをG R K 及びG F P 10 タンパク質の間に生成した（リンカー配列：G S A G T G G、配列番号52）。G F P - 及びR l u c I I 標識G R K 2 突然変異体は、同様の手順を用いてP C R 特異的突然変異誘発によって生成した。G R K 2 - R l u c F 1 及びR l u c F 2 - G 5 : G R K 2 - R l u c F 1 は、配列番号39（R l u c F 1）に記載のヒト化ウミシイタケ由来ルシフェラーゼI I 配列から残基1 ~ 110のコード配列のP C R 増幅によって得た。次に、これをp c D N A 3 . 1 Z e o (+) ベクター中のG R K 2 タンパク質のC末端に融合し、18アミノ酸リンカーをR l u c 断片及びG R K 2 の間に生成した（リンカー配列：G S A G W G K L G S A G S G S A G S、配列番号35）。R l

30

40

50

u c F 2 - G 5 は、配列番号 3 9 に記載のヒト化ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ配列 (R 1 u c F 2) から残基 1 1 1 ~ 3 1 1 のコード配列の P C R 増幅によって得た。次に、これを p c D N A 3 . 1 Z e o (+) ベクター中の G 5 タンパク質の N 末端のフレームに融合し、1 1 アミノ酸残基リンカーを R 1 u c 断片及び G 5 の間に生成した (リンカー配列 : G S A G T G S A G T T 、配列番号 3 6) 。 G R K 2 - G F P - 膜 : G R K 2 - G F P と、ヒト K R A S タンパク質 (プレニル化モチーフ : C A A X) の膜固定シグナル後の 2 0 0 アミノ酸残基フレキシブルリンカーとの間の融合タンパク質をコードする G R K 2 - G F P - 膜構築物 (H a n c o o c k 2 0 0 3) は、以下のように生成した。まず、予測された不規則構造を有するリンカーを 2 0 0 0 残基のランダム配列から作製した。この配列から、最小の球状性と最大の不規則指数を有する 2 0 0 残基のセグメントは、凝集ホットスポット、推定局在化、相互作用モチーフ及びリン酸化モチーフを排除した後に選択した。この 2 0 0 - アミノ酸フレキシブルリンカー (配列番号 5 3) を直接合成した後、P C R 増幅を用いて、ヒト K R A S タンパク質スプライス変異体 b (アミノ酸配列 : K K K K K K S K T K C V I M 、配列番号 3 7) の膜固定シグナルの N 末端で、フレームで融合した。次に、K R A S プレニル化シグナル後のフレキシブルリンカーを G R K 2 - G F P タンパク質の C 末端で G R K 2 - G F P p c D N A 3 . 1 Z e o (+) ベクターにサブクローニングした。ポリリストロニックバイオセンサーべクター : G R K 2 - G F P 、 R 1 u c - G 5 、及び G 1 をコードする多シストロン性ベクターは、W T 及び D 1 1 0 A 突然変異体 G R K 2 - G F P 1 0 融合タンパク質を p L V X ベクターにまずサブクローニングことによって開発した。次に、I R E S - G 1 の p c D N A 3 . 1 R 1 u c - G 5 へのサブクローニングを行い、p c D N A 3 . 1 R 1 u c - G 5 - I R E S - G 1 を得た。最後に、2 つ の構築物を組み立て、G R K 2 - G F P - I R E S - R 1 u c - G 5 - I R E S - G 1 を含有する p L V X ベクターを生成した。 r G F P - C A A X : 融合タンパク質 r G F P - C A A X をコードするプラスミドを、リンカー (配列 : G S A G T M A S N N T A S G 、配列番号 4 7) をコードするリバースプライマーと K R A S スプライス変異体 b : - G K K K K K S K T K C V I M (命名 : C A A X 、配列番号 3 7) からの原形質膜標的化多塩基性配列及びプレニル化シグナル配列とを有する r G F P コード配列 (配列番号 4 6) の P C R 増幅によって得た。C A A X 原形質膜標的化配列は、r G F P コード配列の C 末端でフレーム内である。P C R 断片を p c D N A 3 . 1 (+) ベクターにサブクローニングした。R 1 u c I I - G R K 2 : G R K 2 c D N A を P C R 増幅し、リンカー : G G S G S G S G S (配列番号 4 8) を有する p I R E S h y g 3 発現ベクター (C l o n e t e c h (登録商標) 社製) 中のその N 末端で R 1 u c I I と共にサブクローニングした。

【 0 1 4 8 】

細胞培養及び形質移入。ヒト胚腎臓 2 9 3 (H E K 2 9 3) 細胞は、5 % C O 2 の加湿雰囲気中で 3 7 にて、1 0 % ウシ胎児血清、1 0 0 単位 / m l ペニシリン / ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改变イーグル培地 (D M E M) で維持した。実験 2 日前に、H E K 2 9 3 細胞を、形質移入剤 (P E I / D N A が 3 対 1 の比率) としてポリ - エチレンイミン 2 5 k D a 直鎖 (P E I) を用いて示されたプラスミドで形質移入した後 (H a m d a n 、 R o c h d i l a 、 2 0 0 7) 、(生きた細胞における B R E T 及び P C A アッセイでは) ウエル当たり 3 5 , 0 0 0 細胞の密度でポリ - L - オルニチンヒドロプロミドまたはポリ - D - リジンで前処理した 9 6 ウエルプレート、または (膜調製物上の B R E T アッセイでは) ウエル当たり 1 , 0 0 0 , 0 0 0 細胞の密度で 6 ウエルプレート中にて直接播種した。

【 0 1 4 9 】

生きた細胞における B R E T アッセイ。9 6 ウエルプレート中で播種した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄した後、タイロード緩衝液 (組成物 : 1 3 7 m M N a C l 、 0 . 9 m M K C l 、 1 m M M g C l 2 、 1 1 . 9 m M N a H C O 3 、 3 . 6 m M N a H 2 P O 4 、 2 5 m M H E P E S 、 5 . 5 m M グルコース及び 1 m M C a C l 2 、 p H 7 . 4) を添加した。次いで、細胞を異なるリガンドまたはビヒクリで

示された回数処理した。R luc 基質、セレンテラジン400aを2.5 μMの最終濃度で添加し、細胞をさらに5分間さらにインキュベートした。次いで、以下のフィルター：400 nm ± 70 nm（エネルギーードナー）及び515 nm ± 20 nm（エネルギーーセプター）を備えたMi thras（商標）LB940マルチモードマイクロプレートリーダーまたはTRISTAR（登録商標）LB942マルチモードマイクロプレートリーダーを用いて、BRET値を収集した。R luc が発した光（400 nm）に対するGFPが発した光（515 nm）の比率を算出することによって、BRET値を決定した。活性化%（基底の%として刺激）を決定するため、BRET値は、アゴニスト処理細胞について得られ、ビヒクルで処理した対応する細胞で得られたBRET値のパーセンテージとして表わした。

10

【0150】

R luc II 標識レセプターへのGRK2 - GFP 転座に対するBRET アッセイ（図15B 及び15C）：100 ng のHA - TP R - R luc II、750 ng のGRK2 - GFP10（図15BではWTまたは図15CではD110A突然変異体）、100 ng の示されたG、100 ng のWT G 1、及び100 ng のWT G 5、及びPEI : DNA が3 : 1 の比でのPEIをHEK293SLの懸濁液（350,000 細胞 / ml）に添加する。細胞をポリ-D-リジン前処理プレート（96 ウェルプレートのウェル当たり100 μl の細胞 / PEI / DNA 懸濁液）上で播種した。形質移入48時間後、細胞を洗浄し、37 ℃ で60分間タイロード + 1 mM CaCl₂ 中で前インキュベートした。細胞を図15B 及び15C では異なる用量のU - 46619 に37 ℃ にて合計で15分間曝した。次に、セレンテラジン400aを、2.5 μM の最終濃度で、刺激の最後の5分以内に添加した。BRETは、Tri star（登録商標）マイクロプレートリーダー（Berthold Technologies（登録商標））を用いて37 ℃ で測定した。

20

【0151】

r GFP - CAAX (Kras) で標識したR luc II - GRK2 転座に対するBRET アッセイ（図16B 及び16C）：100 ng のHA - TP R、20 ng のR luc II - GRK2、100 ng の示されたG、100 ng のWT G 1、100 ng のWT G 5、400 ng のr GFP - CAAX (Kras)、180 ng のssDNA、及びPEI : DNA が3 : 1 の比でのPEIをHEK293SLの懸濁液（350,000 細胞 / ml）に添加する。細胞をポリ-D-リジン前処理プレート（96 ウェルプレートのウェル当たり100 μl の細胞 / PEI / DNA 懸濁液）上で播種した。形質移入48時間後、細胞を洗浄し、37 ℃ で60分間タイロード + 1 mM CaCl₂ 中で前インキュベートした。細胞を図16B では異なる用量のU - 46619 に合計で15分間曝し、またはZ' 因子の決定（図16C）では、ビヒクルまたは100 nM U46619 のいずれかを37 ℃ で96 ウェルプレートの半分のウェルに添加した。次に、セレンテラジン400aを、2.5 μM の最終濃度で、刺激の最後の5分以内に添加した。BRETは、Tri star（登録商標）マイクロプレートリーダー（Berthold Technologies（登録商標））を用いて37 ℃ で測定した。Z' 因子の決定は上述のように得た。

30

【0152】

Gタンパク質インヒビター。BRET アッセイは、細胞を100 ng / ml の百日咳毒素で37 ℃ にて一晩、または、100 nM のUbo - Qicで37 ℃ にて20分間前処理した以外は、上述のように行なった。

40

【0153】

動態実験。BRET アッセイは、リガンド及びビヒクルをBRET 測定の30秒後に細胞に注入しながら、BRET 読み取りをセレンテラジン添加5分後に一定間隔で収集した以外は、上述のように行なった。

【0154】

Z' 因子決定。HEK293 細胞は、示された構築物（図7A、7B、9A、10C、

50

11D、及び16Cの説明を参照)で述べたように形質移入した。BRETアッセイは、上述のように行い、96ウェルプレートの半分は示されたアゴニストで処理し、プレートの残りの半分は対応するビヒクルで処理した。Z'因子は、Zhangら、(Zhang、Chungら、1999)に記載されるように算出した。0.4~1のZ'因子は、口バストアッセイとみなす。

【0155】

RlucII断片を用いたタンパク質相補性アッセイ。細胞をPBSで2回洗浄した後、タイロード緩衝液を添加した。次に、細胞を、Rluc基質、セレンテラジン400aで、2.5μMの最終濃度で37にて30分間前処理した。異なるリガンドまたはビヒクルをさらに10分間添加した。次に、任意のフィルターが無いMithras(商標)LB940マルチモードマイクロプレートリーダーを用いて発光値を収集した。
10

【0156】

膜調製物上のBRETアッセイ。6ウェルプレートに播種した細胞を収集し、溶解緩衝液(組成物: 25mM Tris-HCl pH7.4、2mM EDTA、5mM MgCl₂、27%スクロース、15μM GDP、2μM GTP、10μg/mlベンズアミジン、5μg/ml大豆トリプシンインヒビター及び5μg/mlロイペプチド)中で再懸濁し、ポリトロン均質化を施した。遠心分離工程後、膜ペレットを5mM MgCl₂、15μM GDP、及び15μM GTPを補充したタイロード緩衝液中で再懸濁した。次に、ウェル当たり400μgの膜を用いて、BRET実験を上述のように行つた。
20

【0157】

BRET滴定(図2B及び2C): μg DNA対μl PEI 1mg/mlの比が1μg:3μlに等しいPEIを用いて、HEK293細胞を一過性形質移入した。96ウェルプレートのウェル当たりの形質移入したDNAは、以下の通りである: 図2A及び2Bでは: 40ngのHA-TP RまたはHA-1AR、0.5ngのRlucII-G5、10ngのG11またはG15、構築物をコードする10ngのG1、及びGFP10で標識された増加量(最大75ng)のGRK2構築物。BRETアッセイを形質移入2日後に行った; 細胞をPBSで1回洗浄し、タイロード緩衝液中に置いた。細胞を室温で合計15分間、ビヒクルまたはアゴニスト薬、100nM U-46619(図2B)、または1μMイソプロテレノール(図2A)で処理した。次に、Rluc基質Coel-400aを、2.5μMの最終濃度で、刺激の最後の5分以内に添加した。次に、Mithras(登録商標)LB940マルチモードマイクロプレートリーダーを用いて、BRET値を収集し、RlucIIが発した光に対するレセプターが発した光の比率を算出することによって決定した。滴定曲線(図2B及び2C)は、RlucII構築物発現(生物発光で評価)に対するGFP構築物発現(蛍光で評価)の関数で得られたBRET比を表わす。
30

【0158】

実施例2: 結果

GPCRによる特異的Gタンパク質の活性化を研究するため、アッセイは、Gサブユニットと結合するためのGサブユニットとIPの間の競合に基づいて開発した。
40
図1A及び1Bに示すように、レセプター活性化の不在下では、Gサブユニットは、G二量体と強く結合しており、IPとの会合を防ぐ。レセプター刺激後、GTP結合Gは、G複合体から解離した後、IPと自由に相互作用する。従って、IPとGの間の相互作用は、Gタンパク質活性化を反映する。IP及びG(各々を検出システムの2つの成分の1つで標識した)を共発現することによって、様々なサブタイプの非標識Gで、活性化後の所与のレセプターのカップリングプロファイルを決定することが可能にされている。以下に示すように、共鳴エネルギー転移(RET)アプローチ(図1A:生物発光(BRET)、または蛍光共鳴エネルギー転移(FRET))または図1B:タンパク質相補性(PCR)アッセイなどの様々な検出方法を使用して、IPとGの間の相互作用を評価してもよい。
50

【0159】

R E Tを検出方法の一例とすると、Gタンパク質活性化のI Pベースバイオセンサーを解釈するための可能なシナリオ及び対応する結果を図1Cに示す。2つのR E TパートナーI P - A及びG - Dで共形質移入した任意のGサブユニットが無い場合には、基底R E Tシグナルは、I PとG二量体の間の構成的相互作用により比較的高い。この場合、レセプター刺激後に測定したR E Tシグナルの調節は、内因性Gサブユニットの活性化を反映している（模擬またはG条件）。Gサブユニットの共発現は、I P - AとG - Dの間の基底相互作用を防ぎ、記録した基底R E T反応の減少をもたらす（+ G₁及び+ G₂条件では白バー）。（例えば、適切なG P C Rリガンドで）レセプターを刺激すると、レセプターが他のバイオセンサー成分（黒バー、+ G₂条件）と共に発現した特異的Gサブユニットと関与する（即ち、共役する）場合に限って、模擬条件と比較してR E Tシグナルの調節における有意な増加が観察される。しかしながら、過剰発現したGサブユニットがレセプターに機能的に共役していない場合、B R E Tシグナルの有意な変化は、レセプターを刺激する際（黒バー、+ G₁条件）に検出されない。

【0160】

図2A～2Cは、I PベースのGタンパク質活性化バイオセンサーの最適化のために試験した異なる構築物のいくつかを提示する。G R K 2及びG R K 3に対する4つの異なるG F P標識構築物を試験した。そのうちの2つは、完全G R Kコード配列に基づき、2つは、C末端P Hドメイン/G結合ドメインに基づき、G F Pは、G R KのN末端またはC末端部分のいずれかである（図2A）。図2B及び2Cに提示される結果は、全てのG R K 2構成物/構築物が検出可能なB R E T反応（従って、バイオセンサーで使用され得る）を起こし、そのC末端にてB R E Tアクセプター（例えば、G F P）で標識された全長G R Kは、より広範囲のドナー対アクセプター比にわたって、B R E Tシグナルの振幅及び反応の安定性について最良の動的ウインドウを与えていていることを示している。G F P標識G R K 3構築物を用いて同様の結果が得られた。

【0161】

I Pを用いてGタンパク質活性化を監視する実現可能性を評価するため、遊離G二量体と特異的に相互作用するG R K 2タンパク質を代表的なI Pとして選択し、そのC末端にてエネルギー-レセプターG F P 10（G F P）で標識することで、Gとの相互作用の読み出しとしてB R E Tを使用することができる。G R K 2-G F P融合タンパク質は、N末端にてエネルギー-ドナー-ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ（R l u c）で標識されたG₅サブユニット、並びに非標識のG₁及びG₂サブユニットと共に発現した。バイオセンサー成分（G R K 2-G F P及びR l u c-G₅）G₁、及び種々のG_iに加えて、細胞は、原型的なG P C Rの一例として選択したトロンボキサンA₂レセプター（T P R）で共形質移入した。図3Aに示す実験では、T P RのGタンパク質カップリングプロファイルは、種々のGタンパク質、G_q、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、G₁₅、G_{o A}、G_{o B}、G_z、G_s、G_{i1}、G_{i2}、及びG_{i3}を共発現している細胞をT P RアゴニストU-46619（エンドペルオキシドプロスタグランジンPGH₂の安定な合成類似体）で刺激し、G過剰発現（模擬条件、左バー）の不在下で得られた結果と比較することによって決定した。G共形質移入が無い場合には、記録されたB R E Tシグナルは、比較的高く、U-46619で刺激した際に僅かに調節し、内因性Gタンパク質の活性化を反映した。特異的Gタンパク質を共発現する際に、B R E Tシグナルのアゴニスト誘発調節は、模擬条件またはG_iファミリーのGサブユニットを過剰発現している細胞と比較して、G_q、G₁₁、G₁₂、G₁₃、G₁₄、及びG_{15/16}を過剰発現している細胞で有意に高く、G_q及びG₁₂ファミリーのGタンパク質の活性化に共役しているが、G_iファミリーのものには共役していないことを示している（図3B）。

【0162】

野生型（天然）Gタンパク質に加えて、3つのG_q突然変異体（G_qG 6 6 K、

$G_q Y 67C$ 及び $G_q F 75G$ は、TPRで試験した G タンパク質のパネルでも使用した。 G_q タンパク質の 66 位でのグリシン残基の荷電残基（例えば、 $G_q G 66K$ ）への置換は、非 G_q 共役レセプターによっても活性化することができるため、無差別カップリング特性を有する G_q タンパク質突然変異体が得られるものとして前述されている（Heydorn, Wardら、2004）。図 3 A 及び 3 B から分かるように、上述の $G_q G 66K$ 突然変異体、並びに本明細書に記載された新規の $G_q Y 67C$ 及び $G_q F 75G$ は、TPR によって活性化された。これらの無差別 G タンパク質（またはこれらの位置で等価の突然変異を有する任意の G タンパク質、図 14 を参照）は、

ベースバイオセンサーアッセイにおける GPCR 活性化の陽性対照として使用してもよく、それらのカップリング選好について限られた情報しか入手できないレセプター、例えば、孤児レセプターで特に有用である。次に、U-46619 の用量反応曲線について、 G_q 、 G_{13} 、 G_{14} 、 $G_{15/16}$ 、 $G_q G 66K$ 、及び $G_q Y 67C$ を選択した（図 3 C）。興味深いことに、 G_{13} の 0.5 nM から $G_{15/16}$ の 6.6 nM の範囲の効力を測定し、IP ベースバイオセンサーアッセイが、所与のレセプター / リガンド対に関与した各 G タンパク質に関連した活性化の特定の効力を検出することができるという妥当性を確認した。

【0163】

IP ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーを使用して、種々の GPCR の G タンパク質活性化の特異性を明らかにすることをさらに示すために、ドーパミン D₂ レセプター (D₂R)、及び _{1B} アドレナリンレセプター (_{1B}AR) の各々は、GRK2 - GFP、R1uc - G₅、G₁、及び種々の G_o を共発現し、それらの原型的なアゴニスト； D₂R にはロチゴチン、及び _{1B}AR にはフェニルエピネフリンで刺激した。図 4 A 及び 4 C に示すように、各レセプターは、TPR で観察されたもの（図 3 A 及び 3 B）とは異なる特定の G タンパク質活性化プロファイルを示し； D₂R は、 G_i ファミリーメンバー (G_oA 、 G_oB 、 G_z 、 G_{i1} 、 G_{i2} 、及び G_{i3}) にだけ共役しているが、_{1B}AR は、 G_q ファミリーメンバー (G_q 、 G_{11} 、及び $G_{15/16}$) に独占的に共役している。無差別 G_q 突然変異体 $G_q Y 67C$ は、2つのレセプターによって活性化された（図 4 A 及び 4 C）。用量反応曲線は、D₂R (G_{i1} 及び $G_q Y 67C$)、及び _{1B}AR (G_q 及び G_{11}) によって活性化された G タンパク質のいくつかについて得られた（図 4 B 及び 4 D）。図 4 E では、 G_z 活性化の用量反応曲線は、_{2C}AR、 G_z 、GRK2 - GFP、R1uc - G₅、及び G₁ を発現している HEK293 細胞から異なるアドレナリンアゴニスト：エピネフリン、ノルエピネフリン、フェニレフリン、及びイソプロテロノールについて得られた。IP ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーを使用して、GPCR の G タンパク質選好及び活性化 / 薬理学的プロファイル、並びに、それらの同族レセプターを介して種々の G タンパク質を活性化する所与のリガンドの効力及び効果に対処するための薬理学的ツールを確立し得ることをこれらの結果は示している。図 4 F ~ 4 J に示すように、別個の G タンパク質活性化プロファイルは、G_o 及び G_q サブユニットの種々の組み合わせについて得られた。G_o 及び G_q サブユニットの双方の組み合わせが、G タンパク質活性化の別個の薬理学的プロファイルをもたらし得ることを結果は示している。これらの差は、少なくとも一部は、特異的集合の G_o サブユニットだけでなく、種々の組み合わせ及びレベルの G_o 及び G_q サブユニットも発現している異なる細胞及び組織で観察された別個の薬理学的プロファイルに関連している。

【0164】

G タンパク質活性のインヒビター、例えば、百日咳毒素 (PTX) 及び Ubo-Qic (環状デプシペチド YM-254890 に構造的に関連する)（それぞれ、 G_i 及び G_q 活性化を選択的に遮断する）は、レセプターのカップリング特性を特徴付けるために GPCR の分野で広く使用されている（Takasaki, Saitoら、2004）。IP ベースの G タンパク質活性化バイオセンサーを用いて、これらの選択的 G タンパク質インヒビターで実験を行い、得られた BRET シグナルの特異性について実証した

10

20

30

40

50

。G_q活性化に共役するTPRでは、アゴニスト刺激後にIPベースバイオセンサーを用いて測定したBRET反応は、Ubo-Qic前処理時に完全に消失したが、PTX前処理は、この反応に全く影響を及ぼさなかった(図5A)。これに対し、G_i共役型レセプターD₂Rでは、PTX前処理は、アゴニスト培養後に検出されたバイオセンサーBRET反応を著しく減少させたが、G_qインヒビターUbo-Qicによる前処理は、記録されたBRETシグナルに検出可能な効果を有しなかった(図5B)。また、TPR媒介性Gタンパク質活性化を使用して、Ubo-Qicインヒビター選択性の妥当性を確認した。図5Cに提示される結果は、G_qファミリー(G_q、G₁₁、G₁₄、及びG_{15/16})から、G_{15/16}のみが、Ubo-Qicに非感受性であることを示している。また、G₁₂及びG₁₃タンパク質は、Ubo-Qicに非感受性である。最後に、IPベースバイオセンサーを使用して、(67位または75位での-図14を参照)突然変異体G_q活性化のUbo-Qic感受性を明らかにした。67位でのチロシン残基の置換(Y67C、Y67G、Y67S、及びY67L)は、Ubo-Qicへの耐性及び無差別特性をもたらした。これは、この残基がGタンパク質活性化を制御するのに重要であり得、Ph e 75残基の(無差別表現型と会合している-図4Aを参照)グリシンへの置換が、活性化(図5D)の部分的なUbo-Qic媒介性阻害をもたらすことを示した。従って、種々のGタンパク質について記録されたBRETシグナルの特異性を確認することに加えて、Gタンパク質の新規の選択的インヒビターを同定/開発するためのツールとして、本明細書に記載されたIPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーを使用することを、これらの結果は支持している。

【0165】

IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーをさらに特徴付けるために、G_{i1}(図6A)及びG₁₁(図6B)活性化の動態を、それぞれ、D₂R及びTPRのアゴニスト処理後に決定した。図6A及び6Bに示すように、活性化の同様の動態が、2つの異なるレセプター及びGタンパク質について得られ、最大の反応はリガンド附加のおおよそ30秒後に到達し、プラトー状態が最初の刺激後少なくとも30分間続いた。この持続反応は、高スループットスクリーニング(HTS)へのアッセイ適応に特に適している。

【0166】

アッセイの口バスト性を評価するため、典型的なG_i-(D₂R、図7A)及びG_q-(TPR、図7B)共役レセプターを介したGタンパク質活性化のZ'因子を決定した。アッセイは、D₂R/G_{i1}(図7A)及びTPR/G₁₁(図7B)について、それぞれ、0.79及び0.89のZ'因子で特に口バストである。このアッセイの口バスト性は、スクリーニング用途、特に、HTS用途の要件と適合する。

【0167】

レセプターのGタンパク質プロファイリング及びHTSにおけるベースバイオセンサーの上述の用途の可能性に加えて、リガンドの特徴付けは、このGタンパク質活性化バイオセンサーの別の用途を表す。GPCRは、異なるリガンドによる活性化時に異なるGタンパク質及びシグナル伝達経路に優先的に関与することができ、この現象は、GPCRのリガンドバイアスシグナル伝達として知られる(Galandrin, Oligny-Longpreら、2007)(Kenakin and Christopoulos 2013)。本明細書に記載されたバイオセンサーは、同じRETパートナーを用いて全てのGタンパク質サブタイプの活性を評価することができるため、リガンドプロファイリング実験を行うのに特に適している。代表的な例として、アンジオテンシンII型1レセプター(AT1R)の異なるリガンドを、IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーを用いてプロファイリングした(図8A~8C)。第1セットの実験を行い、その天然リガンドであるアンジオテンシンIIを用いてレセプターのカップリング特性を決定した。図8Aに示すように、AT1Rは、タンパク質のG_q-、G₁₂-、及びG_i-ファミリーのいくつかのメンバーに共役している。次に、アンジオテンシンIIの異なる類似体によるAT1Rを活性化した後にさらに特徴付けるために、G_q、G₁

1、及び $G_{1,2}$ を選択した。図8B及び8Cに示すように、これらのアンジオテンシンII由来ペプチドは、異なるGタンパク質を種々の程度で刺激し、特異的Gタンパク質の方へのいくつかのリガンドの潜在的バイアスを明らかにした。例えば、DVGペプチドは、アンジオテンシンII反応に対して、 G_q よりも $G_{1,2}$ 活性化のより良い効果を示した(図8C)。

【0168】

次に、RETベースアッセイの代わりに、タンパク質相補性アッセイ(PC A)を使用して、IPとGサブユニットの間の相互作用を評価できるかどうかについて評価した(図1B)。二分子蛍光相補性(BiFC)または酵素断片相補性(EFC)などのPC Aは、2つのタンパク質パートナーの間の相互作用を検出することができるため、10

IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーと両立できる。EFCベースアッセイ、より詳細には、RlucベースEFCアッセイ(Stefan, Aquinら、2007)を使用できるかどうか判断するため、IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーでは、2つの融合タンパク質を生成した:C末端におけるRlucのN末端部分で標識されたGRK2(GRK2-Rluc F1)、及びG5のN末端におけるRlucの相補的C末端部分(Rluc F2-G5)。GRK2と遊離Gサブユニットの間の相互作用が生じると(Gタンパク質活性化後)、2つの相補的Rluc断片が再会合し、Rluc基質セレンテラジンの存在下で発光を測定することができる。GRK2-Rluc F1、Rluc F2-G5、G1、及び $G_{1,1}$ と共にTPRを共発現している細胞を用いて概念実証を行った。U-46619で刺激した後にロバストな発光シグナルを測定し、0.53のZ'因子(図9A)及び8.4nMのEC₅₀(図9B)を有するG11タンパク質活性化が明らかになり、本明細書に記載されたIPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーにおいてPC Aを使用され得るという妥当性を確認した。20

【0169】

次に、GRK2(例えば、GRK3)以外のIPを使用して、IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーにおけるGタンパク質活性化を監視することができるかどうか評価した。融合タンパク質をGRK3とエネルギーレセプターGFPの間で生成し、得られたGRK3-GFPをRluc-G5、G1、 $G_{1,1}$ 、及びD₂Rと共に発現させて、ドーパミンの用量反応曲線を得た。図10Aで分かるように、GRK2またはGRK3ベースバイオセンサー(GRK2では96pM、GRK3では56pM)を用いて、同様の効力が観察した。GRK3ベースバイオセンサーの活性化の動態は、GRK2ベースバイオセンサーを用いて得られたもの(図6A及び6B)とも同様であり、最大の反応はおよそ30秒で到達し、プラトート状態が少なくとも数分間続いた(図10B)。最後に、Z'因子もGRK3ベースバイオセンサーで生成した。D₂R及び $G_{1,1}$ を用いて、0.71のZ'因子がGRK3-バイオセンサーで得られ、アッセイのロバスト性を確認した(図10C)。まとめると、異なるIPをIPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーで使用して、Gタンパク質活性化を評価することができることを、これらのデータは示している。30

【0170】

IPベースのGタンパク質活性化バイオセンサーの使用を簡単にするため、GRK2-GFP、Rluc-G5、及びG1をコードする多シストロン性ベクターを開発した(図11A)。これにより、バイオセンサーの成分が単一構築物から固定比率で発現され、実験間の変動性を最小限にできることが保証される。図11Dに示すように、0.8のZ'因子は、TPR及び $G_{1,1}$ をコードするプラスミドで共形質移入した多シストロン性構築物を用いて得られた。この結果は、個々のバイオセンサー成分をコードするプラスミドで形質移入した細胞で得られたZ'因子(図7B: Z' = 0.89)と同程度である。この多シストロン性ベクターを用いて、用量反応曲線実験も行い、U-46619で刺激したTPRについて4.3nMのEC₅₀値が得られ(図11C)、Rluc-PCAベースGRK2バイオセンサーで使用した同じレセプター/リガンド対で測定し4050

た 8.4 nM の EC_{50} に同様であった(図9B)。これらの結果により、バイオセンサーの異なる成分を多シストロン性ベクター中で発現している妥当性が確認され、ただ一つの選択マーカーを有する安定な細胞株を確立するために有利に使用することができるため、実験手順を簡素化し、再現性を改善させる可能性がある(例えば、実験間の変動性を最小限にする)。

【0171】

IP ベースのGタンパク質活性化バイオセンサーの別の変異体を開発した。ここで、 $\text{GRK}2$ タンパク質は、原形質膜(PM)で連結している(図12A)。この構築物は、膜調製物上のインピトロ実験がスクリーニング用途などの全細胞実験に好ましいいくつかの特定用途に有用であり得る。このアプローチの妥当性を確認するため、 $\text{TP-R, G}_{11}, \text{G}_1, \text{Rluc-G}_5$ 、及び上で使用した $\text{GRK}2-\text{GFP}$ (図12Bでは $\text{GRK}2\text{-wt}$)の細胞質型または原形質膜固定 $\text{GRK}2-\text{GFP}$ ($\text{GRK}2\text{-膜}$)のいずれかを発現している膜調製物上で BRET 実験を行った。 $\text{wt GRK}2$ (図12B)と比較して膜連結 $\text{GRK}2$ では BRET シグナルの良好な調節が観察され、リガンド刺激時には最低限度の BRET 増加しか検出されなかった。これらの結果により、膜調製物上のGタンパク質活性化を測定するために PM 固定 IP の使用の妥当性が確認された。

【0172】

図13A～13Cに示す結果は、 RGS ドメインにおける D110A 置換(RGS が死んだ突然変異体)、触媒ドメインにおける K220R 置換(触媒死突然変異体)、またはリン酸化によるその調節(S670A, S676A 、及び S685A 置換、または、それぞれ、 ERK, PKA 、及び $\text{CDK}2\text{-シクリンA}$ による $\text{GRK}2$ のC末端結合ドメインのリン酸化を防いで模倣し、 IP ベースのGタンパク質活性化バイオセンサーを用いて評価した場合に活性化Gタンパク質への補充を防ぎもしないし、著しく促進もしない S670D, S676D 、及び S685D 置換)などの $\text{GRK}2$ 機能に影響を及ぼすと報告されている突然変異を示す。上述の突然変異を含む $\text{GRK}2$ 変異体は、天然 $\text{GRK}2$ (図13A～13C)と同様の程度まで補充されるため、 G への $\text{GRK}2$ 補充が異なるシグナル伝達事象による調節に非感受性であり得るという証拠を提供している。アンジオテンシンIIによる AT1R の活性化後に $\text{GRK}2\text{-D110A}$ 突然変異体で同様の結果が得られた。

【0173】

G サブユニットと結合するための G サブユニットと IP の間の競合を測定するための別のバイオセンサーを開発した;図15Aは、そのようなバイオセンサーの構成及び原理を示す。バイオセンサーは、 RET ドナーまたはアクセプター(RET アクセプター(A)を示す)で標識された IP(GRK) と、そのC末端にて RET ドナーまたはアクセプター(RET ドナー(D)を示す)で標識された GPCR とを含む。不活性形態である間には、ヘテロ三量体Gタンパク質の G サブユニットは、 G 二量体と堅く結合している。 GPCR とリガンド(L)結合する際に、 G は G サブユニットから解離し、 IP を遊離 G サブユニットに補充させ、 GPCR に結合した BRET ドナーに BRET アクセプターを近接させることによって、 BRET シグナルを誘発/増加させる。図15B及び15Cは、野生型 $\text{GRK}2$ (図15A)または RGS が死んだ $\text{GRK}2$ 突然変異体(D110A)(図15B)を含む図15Aによるバイオセンサーで得られたGタンパク質活性化の用量反応曲線を示す。用量反応曲線は、図15B及び15Cと同様のプロファイルを示し、図11B及び13Aに提示される結果を確認し、且つ、異なるバイオセンサー構成を使用して、活性化Gタンパク質に IP を補充するのに機能性 RGS は必要とされないことを示している。

【0174】

G サブユニットと結合するための G サブユニットと IP の間の競合を測定するための別のバイオセンサーを開発した;図16Aは、そのようなバイオセンサーの構成及び原理を示す。バイオセンサーは、 RET ドナーまたはアクセプター(RET ドナー(D)を示す)で標識された IP(GRK) と、 RET ドナーまたはアクセプター(R

10

20

30

40

50

ETアクセプター(A)を示す)で標識された原形質膜(PM)標的化ドメインとを含む。不活性形態である間には、ヘテロ三量体Gタンパク質のGサブユニットは、G二量体と堅く結合している。GPCRとリガンド(L)結合する際に、GはGサブユニットから解離し、IPを、PMで配置される遊離Gサブユニットに補充させ、PMに固定したRETアクセプターAにRETドナーDを近接させることによって、BRETSигナルを誘発 / 増加させる。図16Bは、図16Aによるバイオセンサーで得られたGタンパク質活性化の用量反応曲線を示す。TPR、異なるG(G_q=黒四角、G₁₁=黒三角、模擬条件(G無し)=白丸)、G1、G5、RlucII-GRK2、及びrGFP-CAAXを共発現しているHEK293細胞を使用して、U46619の用量を増加させながら刺激した。図16Bの用量反応曲線は、異なる構成(図3C、9B、及び11C)を有するバイオセンサーで得られたものと同様であり、PMでIP補充を測定するバイオセンサーが、PMに固定されている遊離GサブユニットへのIP補充を「間接的」に評価するのに適しているという証拠を提供している。

【0175】

本発明がその特定の実施形態によって上述されたが、添付の特許請求の範囲で定義された表題発明の精神及び性質から逸脱することなく修正することができる。特許請求の範囲において、「含む(comprising)」という単語は、制限のない用語として使用され、「含むが制限されない(including, but not limited to)」という表現と実質的に等しい。単数形態「a」、「an」、及び「the」は、文脈が異なるように明確に指示していなければ、対応する複数の局面を含む。

【0176】

参照文献

1. Boularan, C. and J. H. Kehrl (2014). “Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system.” Cell Signal 26(6): 1269 - 1282.
2. Galandrin, S., G. Olyny-Longpre and M. Bouvier (2007). “The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery.” Trends in Pharmacological Sciences 28(8): 423 - 430.
3. Garland, S. L. (2013). “Are GPCRs still a source of new targets?” J Biomol Screen 18(9): 947 - 966.
4. Gilman, A. G. (1987). “G-proteins: Transducers of receptor-generated signals.” Annu Rev Biochem 56: 615 - 649.
5. Hamdan, F. F., M. D. Rochdi, B. Bretton, D. Fessart, D. E. Michaud, P. G. Charest, S. A. Laporte and M. Bouvier (2007). “Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2.” J Biol Chem 282(40): 29089 - 29100.
6. Hancock, J. F. (2003). “Ras proteins: different signals from different locations.” Nat Rev Mol Cell Biol 4(5): 373 - 384.
7. Heydorn, A., R. J. Ward, R. Jorgense 50

- n, M. M. Rosenkilde, T. M. Frimurer, G. Milligan and E. Kostenis (2004). "Identification of a novel site within G protein alpha subunits important for specificity of receptor-G protein interaction." Mol Pharmacol 66(2): 250-259.
8. Kenakin, T. and A. Christopoulos (2013). "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact." Nat Rev Drug Discov 12(3): 205-216.
9. Leduc, M., B. Breton, C. Gales, C. Le Gouill, M. Bouvier, S. Chemtob and N. Heveker (2009). "Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands." J Pharmacol Exp Ther 331(1): 297-307.
10. Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit and M. Bouvier (2002). "Quantitative assessment of the beta 1 and beta 2-adrenergic receptor homo and hetero-dimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem 277: 44925-44931.
11. Pitcher, J. A., J. Inglesse, J. B. Higgins, J. L. Arriza, P. J. Casey, C. Kim, J. L. Benovic, M. M. Kwatra, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." Science 257(5074): 1264-1267.
12. Stefan, E., S. Aquin, N. Berger, C. R. Landry, B. Nyfeler, M. Bouvier and S. W. Michnick (2007). "Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 104(43): 16916-16921.
13. Takasaki, J., T. Saito, M. Taniguchi, T. Kawasaki, Y. Moritani, K. Hayashi and M. Kobori (2004). "A novel Galphaq/11-selective inhibitor." J Biol Chem 279(46): 47438-47445.
14. Touhara, K., J. Inglesse, J. A. Pitcher, G. Shaw and R. J. Lefkowitz (1994). "Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains." J Biol Chem 269(14): 10217-10220.

10

20

30

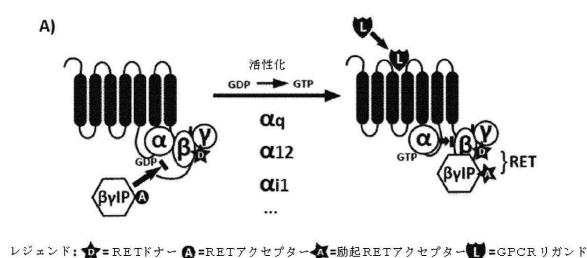
40

50

15. Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *J Biomol Screen* 4(2): 67-73.
16. Congal, The Journal of Biological Chemistry, 276, 15192-15199.
17. Pitcher, The Journal of Biological Chemistry, 274, 34531-34534.
18. Penela, PNAS, 107(3): 1118-1123. 10
19. Choudhary, Mol Cell. 2009 36(2): 326-329.
20. Linding, GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder, Nucleic Acid Res 2003 - Vol. 31, No. 13, 3701-8.

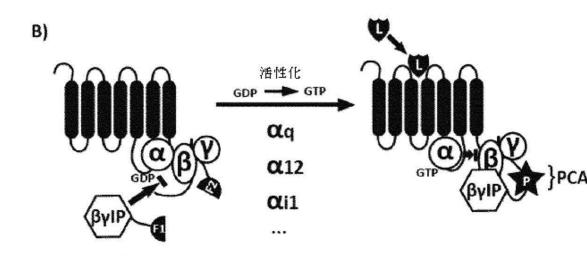
【図1A】

図1A



【図1B】

図1B

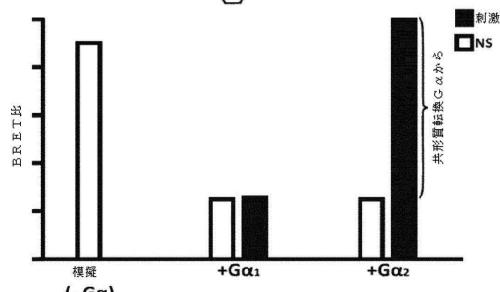
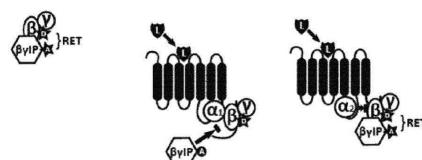


★ = 断片1及び2から再構成した蛍光または発光タンパク質

【図1C】

図1C

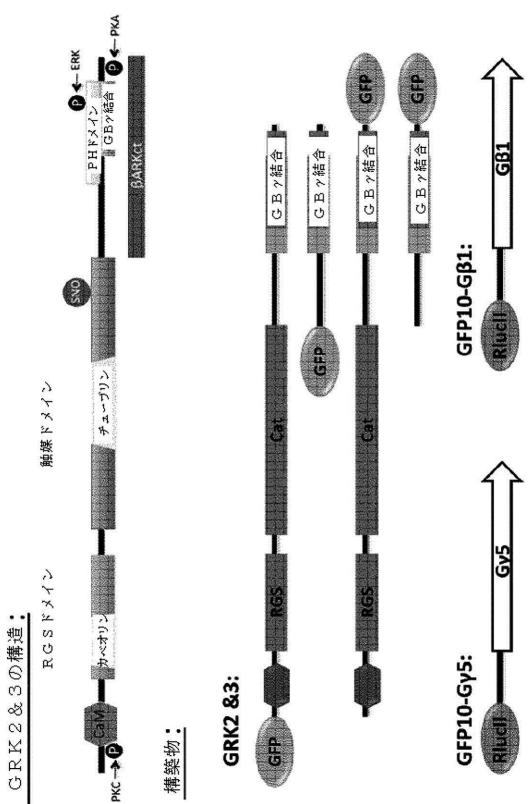
シナリオ1: 過剰発現G α 無し
シナリオ2: レセプターが、過剰発現G α_1 に機能的に共役していない
シナリオ3: レセプターが、過剰発現G α_2 に機能的に共役している



レジェンド: ★=RETドナー □=RETアクセプター ◆=励起RETアクセプター ●=GPCRリガンド

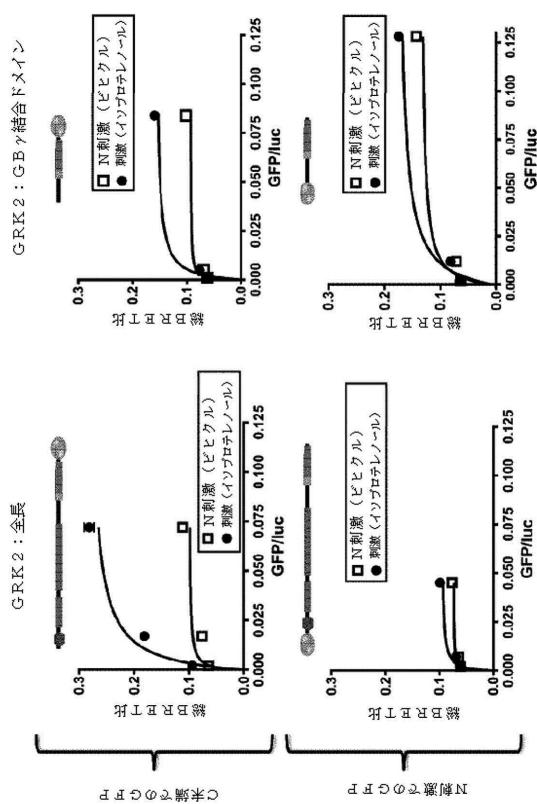
【図2A】

図2A



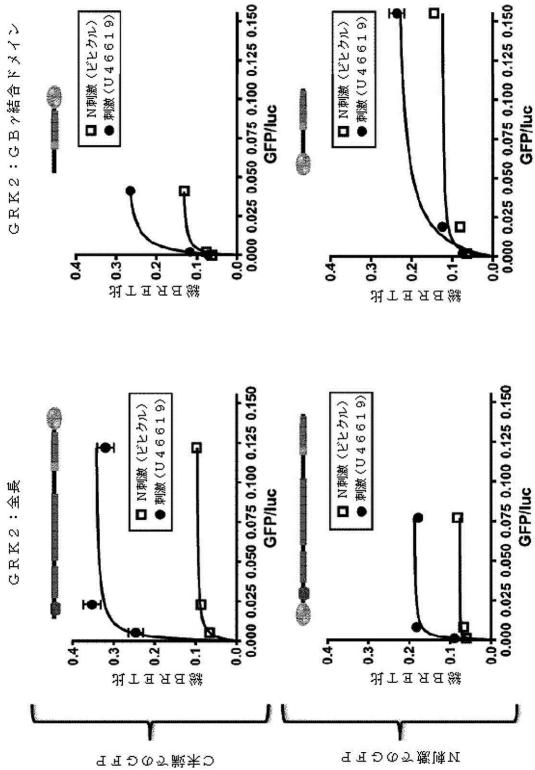
【図2B】

図2B



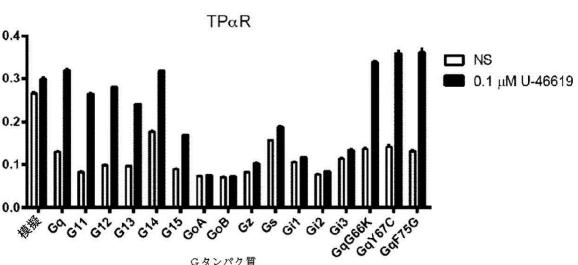
【図2C】

図2C



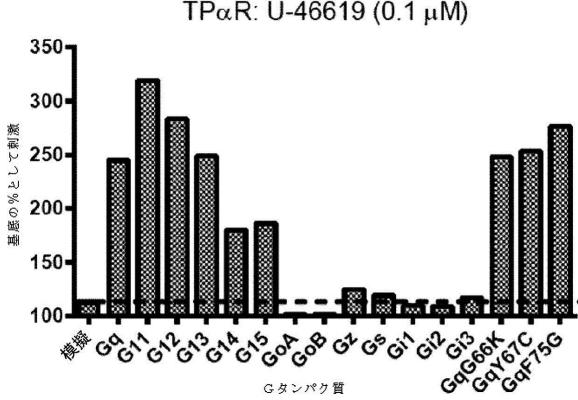
【図3A】

図3A



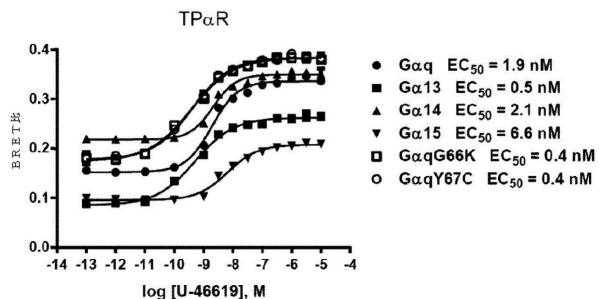
【図3B】

図 3 B



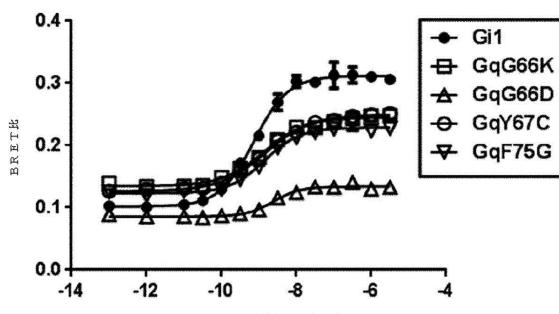
【図3 C】

図3 C



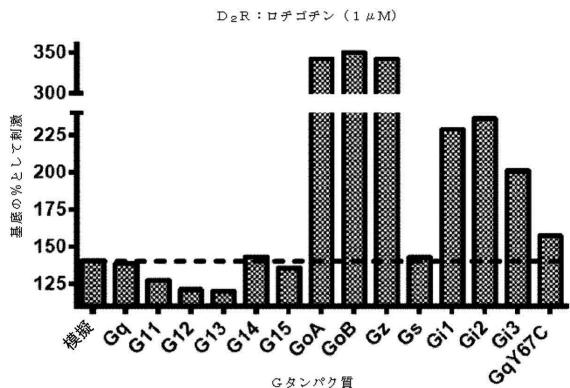
【図4 B】

図4 B

DR : D₂R上のロテゴチン、センサー: GRK2/G γ 5/G β 1

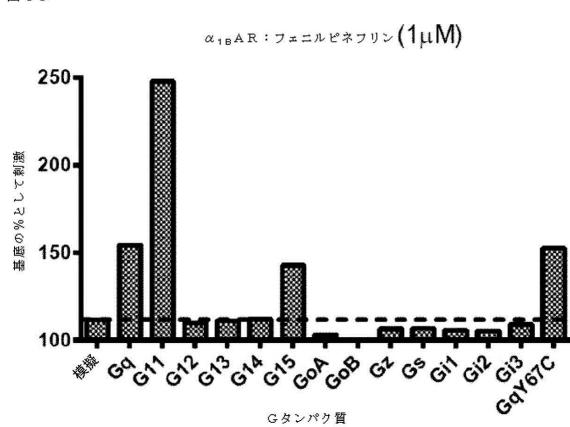
【図4 A】

図4 A



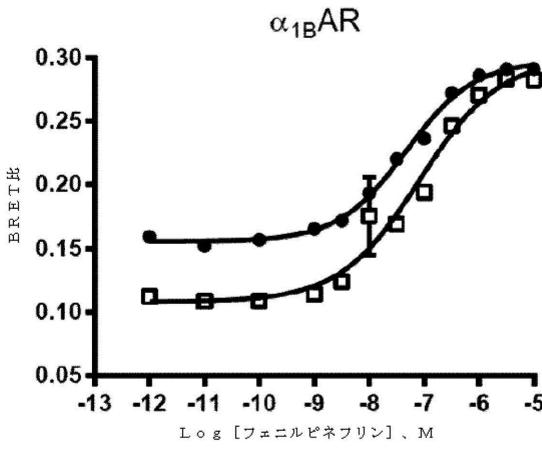
【図4 C】

図4 C



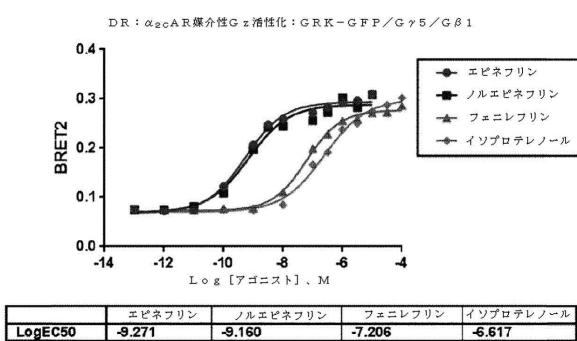
【図4 D】

図4 D



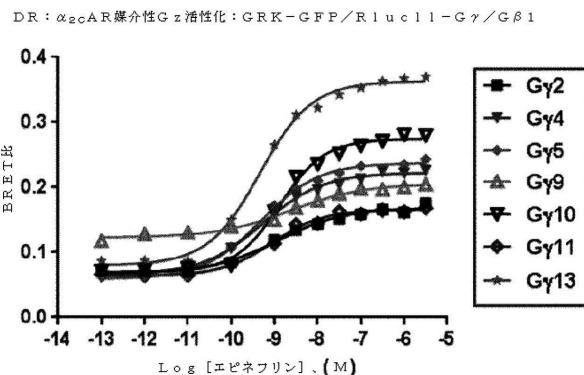
【図4 E】

図4 E



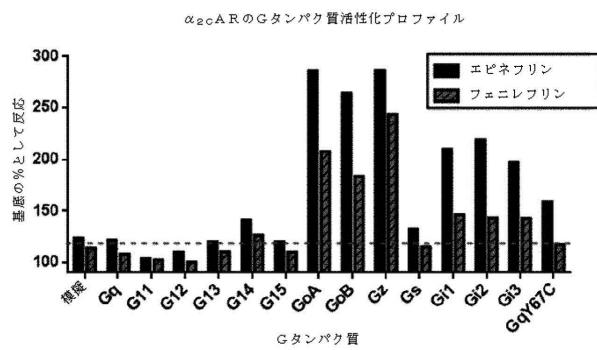
【図4 G】

図4 G



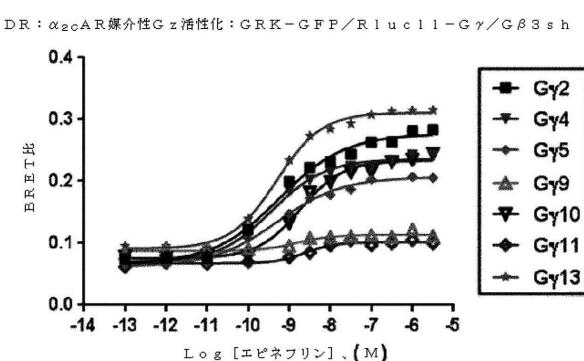
【図4 F】

図4 F



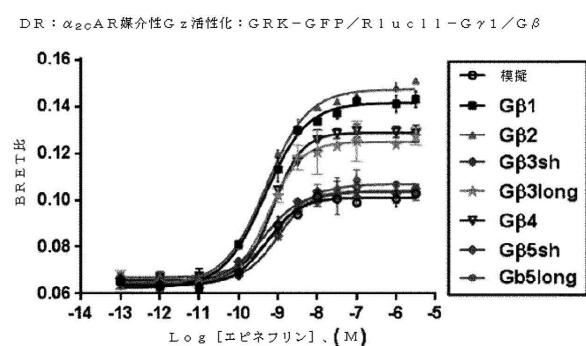
【図4 H】

図4 H



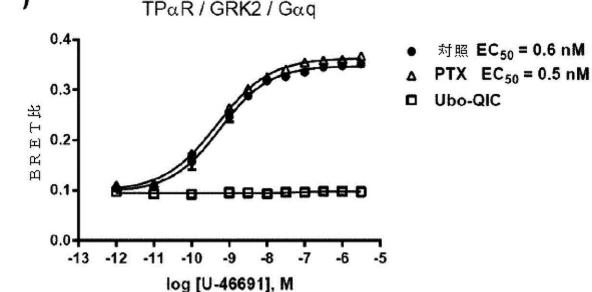
【図4 I】

図4 I



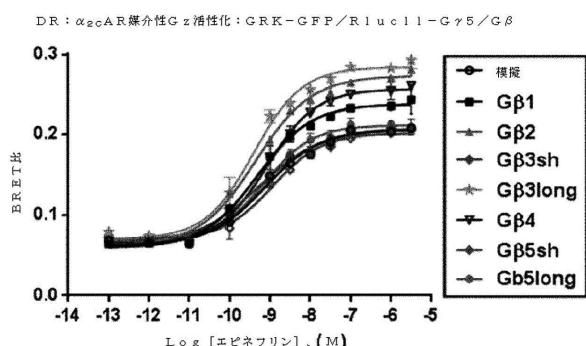
【図5 A】

図5 A



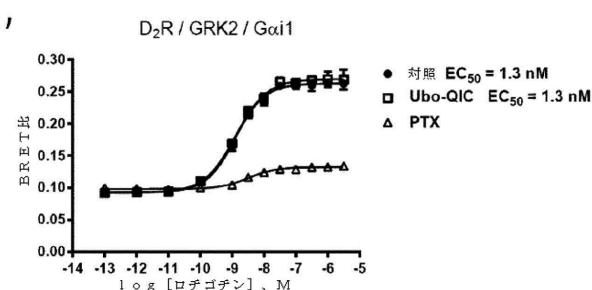
【図4 J】

図4 J



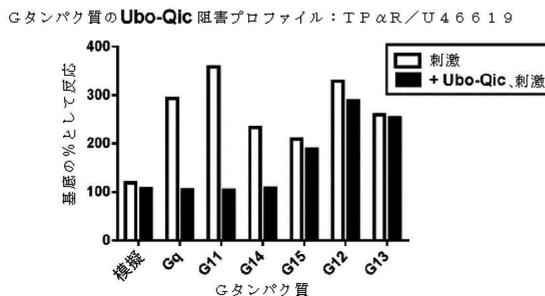
【図5 B】

図5 B



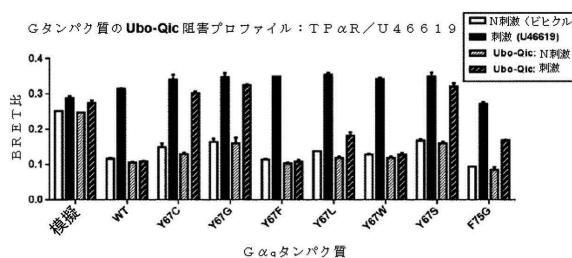
【図 5 C】

図 5 C



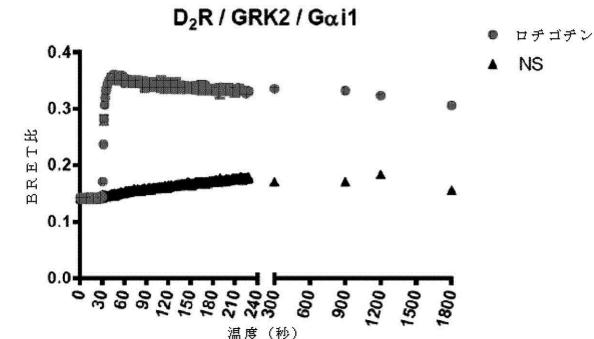
【図 5 D】

図 5 D



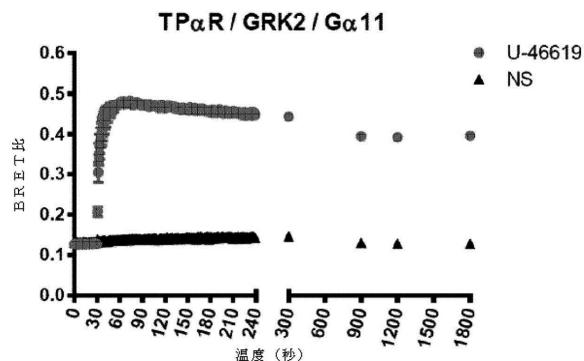
【図 6 A】

図 6 A



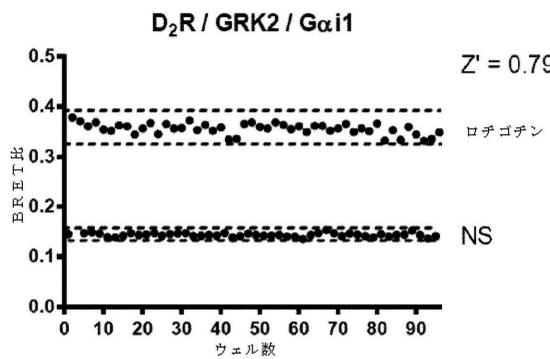
【図 6 B】

図 6 B



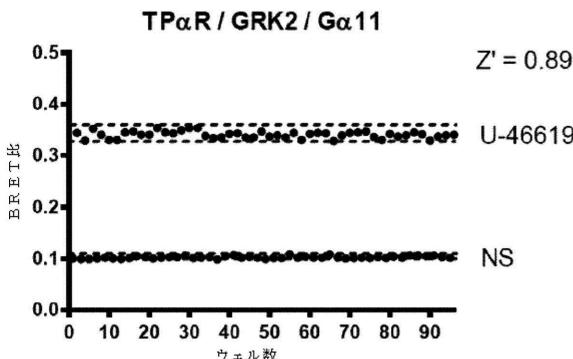
【図 7 A】

図 7 A



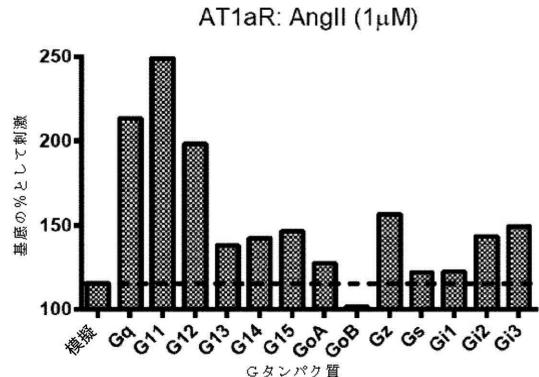
【図 7 B】

図 7 B



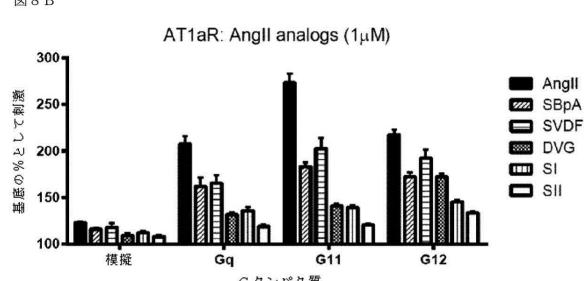
【図 8 A】

図 8 A



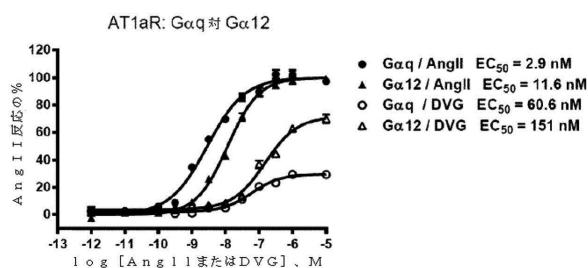
【図 8 B】

図 8 B



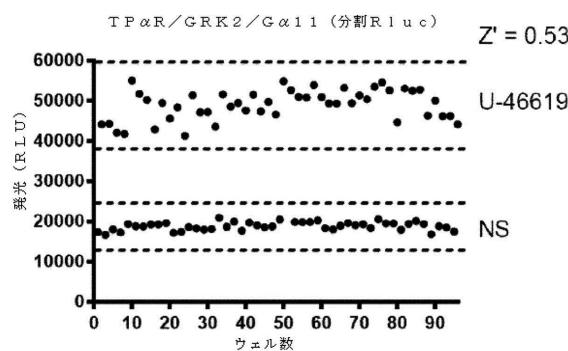
【図 8 C】

図 8 C



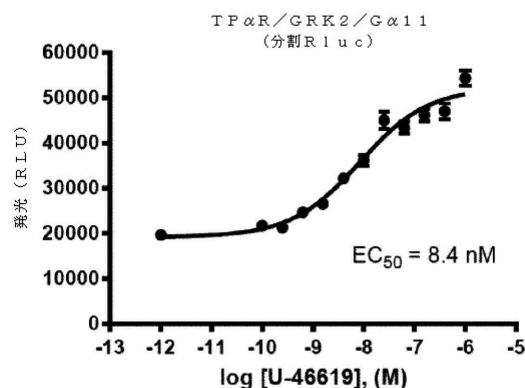
【図 9 A】

図 9 A



【図 9 B】

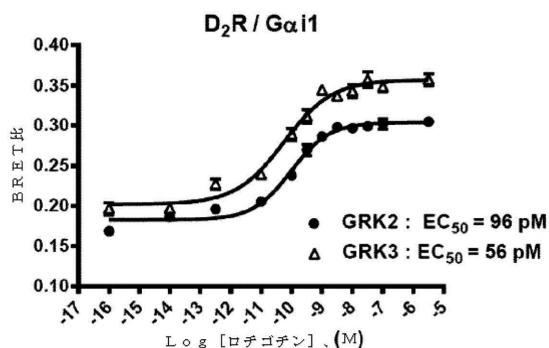
図 9 B



【図 10 A】

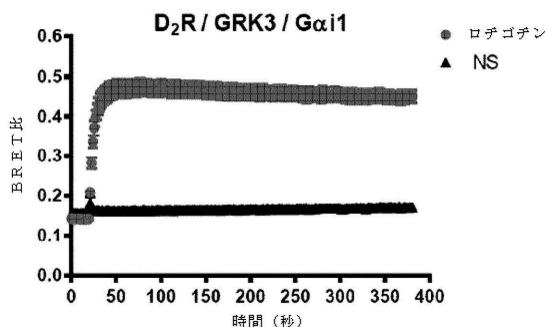
【図 10 A】

図 10 A



【図 10 B】

図 10 B



【図 11 A】

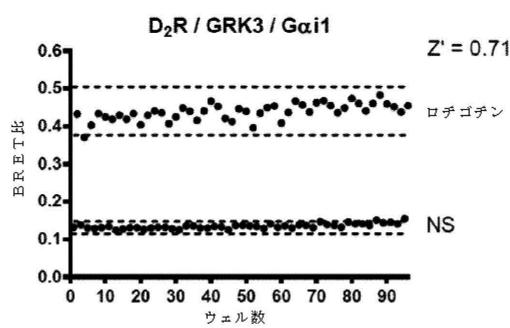
図 11 A



レジェンド: D = RETドナー A = RETアクセプター IRES = 内部リボソーム侵入部位

【図 10 C】

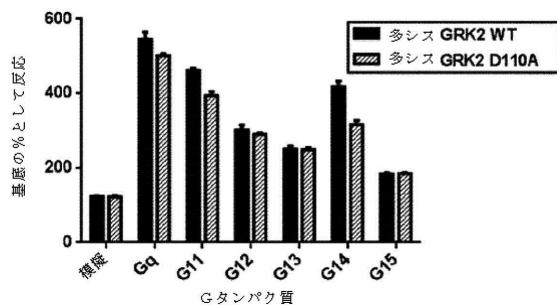
図 10 C



【図 11 B】

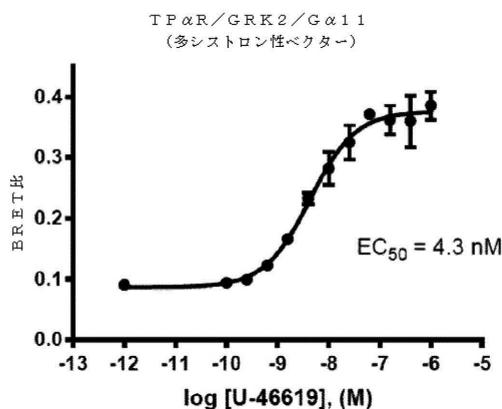
図 11 B

TP α R の Gタンパク質活性化プロファイル、U 4 6 6 1 9 1 0 0 nM



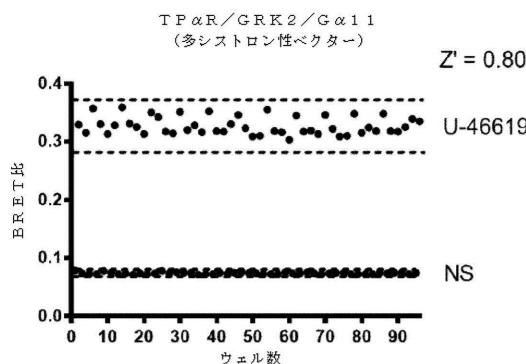
【図 1 1 C】

図 1 1 C



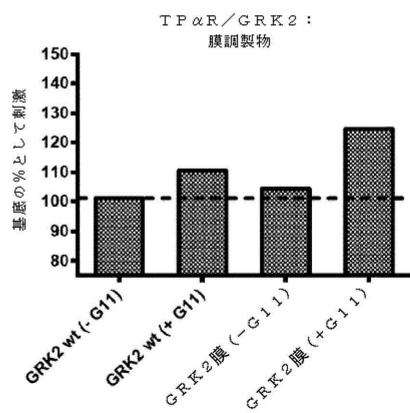
【図 1 1 D】

図 1 1 D



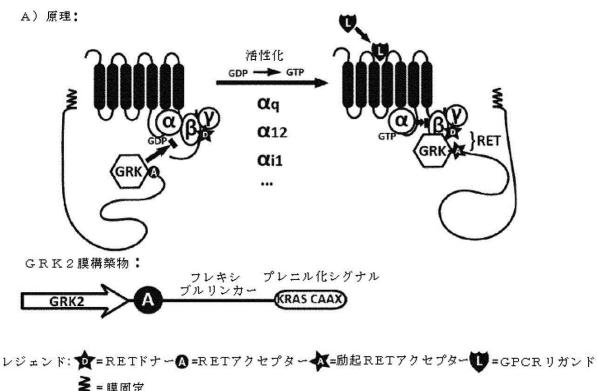
【図 1 2 B】

図 1 2 B



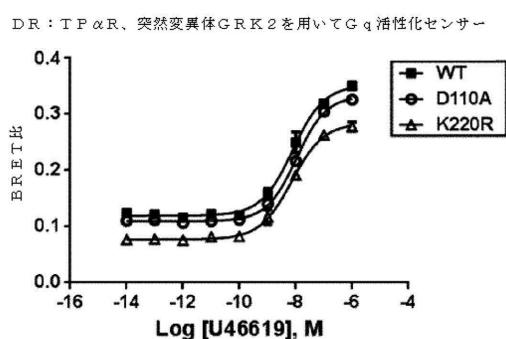
【図 1 2 A】

図 1 2 A



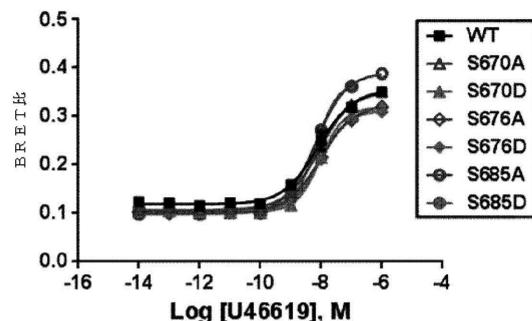
【図 1 3 A】

図 1 3 A



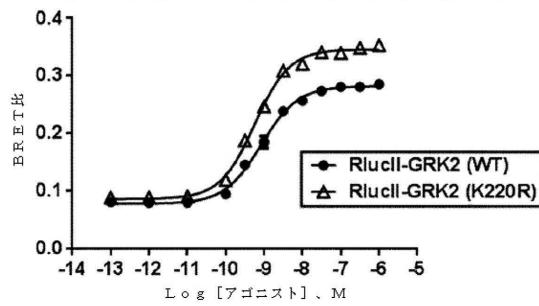
【図 1 3 B】

図 1 3 B

DR : TP α R、突然変異体GRK2を用いてG α q活性化センサー

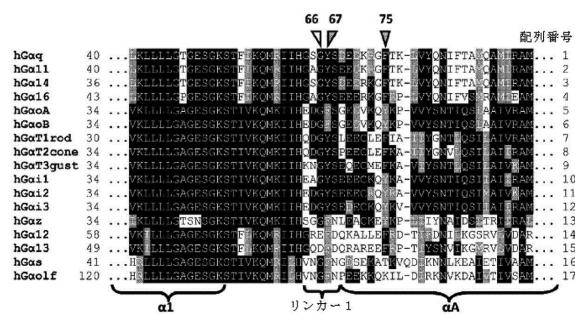
【図 1 3 C】

図 1 3 C

DR : TP α R、G α q活性化センサー : R1uc11-GRK2/GFP10-G γ 5

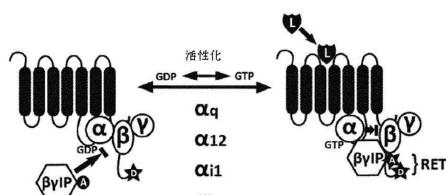
【図14】

図14



【図15A】

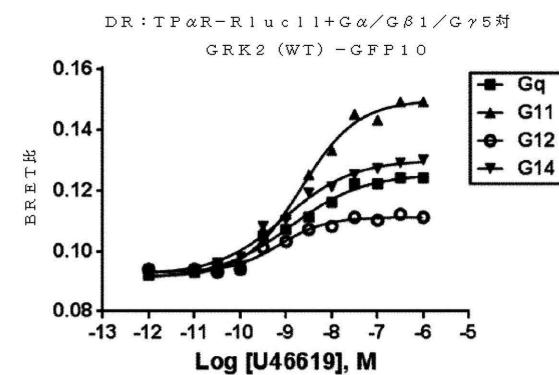
図15A



レジエンド: ★=RETドナー ▲=RETアクセプター ■=助起RETアクセプター L=GPCRリガンド

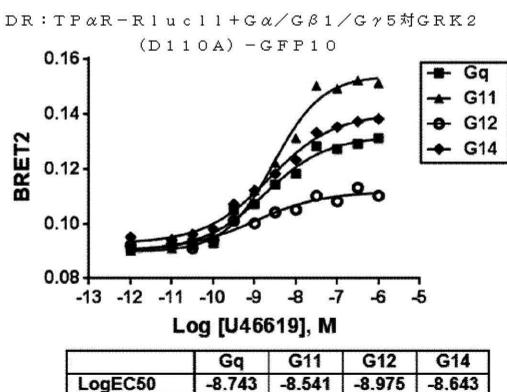
【図15B】

図15B



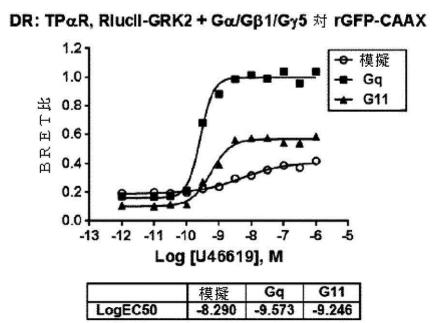
【図15C】

図15C



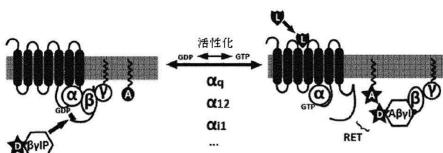
【図16B】

図16B



【図16A】

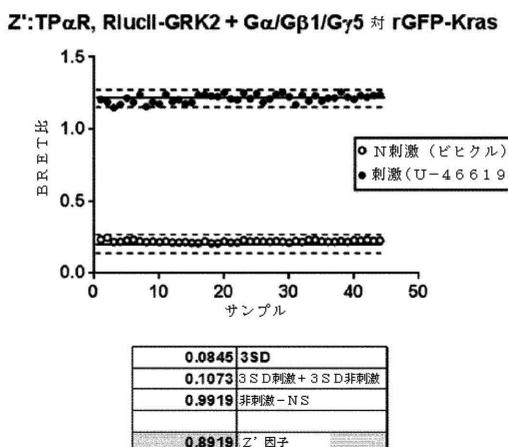
図16A



レジエンド: ★=RETドナー ▲=RETアクセプター ■=助起RETアクセプター L=GPCRリガンド

【図16C】

図16C



【図17B】

FIG. 17E

【図17C】

FIG. 17C

【図17A】

GRK2
MAEDLVAEWS VSYLNAMKEKS KATPAARAEK KILLPEPSIR SVQKQYLERD GEVPEKIES QKLGYLLRDU
FLCHLNEHR EWFVEYTR KYKLELTZEE RASWRSIDP SMMKLLAC SUPSKFAS HVGHLGKG
WELTFQYFI BEIICOLGOD FVQKPLKCK TFCRQWNG ELHNTQHDF FSVHLLRGG GEYGGVRC
VYKQYKQYK QYKQYKQYK QYKQYKQYK QYKQYKQYK QYKQYKQYK QYKQYKQYK QYKQYKQYK
WLYAHCQTS BANDEPNSY TILGEHREN PFTVPTVQH NTILLDQHLSM DADKQHLSM DAKPQHLSM
VGTGEGHQS LKWLQVAGTS SADWNSLGM LKWLQHHSF PRFKKQHQS EIDNQHLCNA WELSFSSP
LSRLSLEKQD LKWRNQHQS GRGRQHQS PFSPLQHQS VEFYQHQS ASTRDEQHQS KANFHQHQS ADYLQHQS
ETEKLQHQS SADLQHQS LTTKEQHQS VEFYQHQS ASTRDEQHQS KANFHQHQS ADYLQHQS
AHCBSHQS PZEWLQHQS PZEWLQHQS PZEWLQHQS PZEWLQHQS PZEWLQHQS PZEWLQHQS
TQDQSPQHQS PQWZELQHQS YERAGQHQS
PQWZELQHQS PWTLSQHQS VERBANG

FIG. 17A

【 図 1 7 D 】

MVSKGKPEELFTGVVPLVLDGDNHGKFVSCEGEGBDATYKLTLKFLCTTGKLPVWPVTLVTLSYGVQCFSRYPDHEMK
QHDFFRKSAMPPEGYQERTIFFKPDDGNYKTRAEVKFEGDTLVRNRIELKGIDFKEGDHLGHKRELYNNPHVYIMADKQRN
CIKWN?KIRHENIEDGSVQLADHYQONTPIGDCPVULLPDNHYLPTQSALSKDPMZEKRDHMLVLFVTAACITLGMDELYK

FIG. 17

【図17E】

MDLAKLGLKVEVPTKINLEGLVGDHAFSMBGVBGNILEGTQBVKISVTKGAPLPPFDIVSVAFSYGNRAYTGYPEEIS
DYFLQSSEPGFTYERNIRYDGGTAIVKSDISLRBDGFIVNVDKBLDRLRRMGPVMQDDIVGMQPSYSMTNTVTSVIGR
CIAEFLKLQTGKHFTIHMRTVYKSKKPVEETMPLYHFQHRLVKTINWDTASGVVQHETIAAHSTIKKLEGSLP

FIG. 17E

【図17F】

MTSKVDYDPEQRKRMRITGFCQWWRCKQMVLDSFINYDSEKIDENAVIFLHGUUTSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDLSIG
PDKRSGNSGNGSRLYDHVYKTAWEFLNKKLPIFVGHDYRFLYHSDYHYSYHODKTKAIHVASWDVTSWDEWDPEI
EDIALIKSERGEERMLNNNEFVEVPLSKMRCLEPEEPAAYLEEFKKEGYEVRPTEWLSPRETFVKGKEDBQVIRVNY
NAYLRASDDLPQFTESDPGFFSAIVEGAKKFFNTIEFVKVGLHFQSQDADEMKGKYIKSFVERVLKNEQ

FIG. 17F

【配列表】

0006932636000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/705 (2006.01) C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則
(72)発明者 ミシェル ブビエ
カナダ国, ケベック アッシュ3テ 1ベ7, モントリオール, シュマン ドゥ ラ コート-サン
ト-カトリーヌ 2702
(72)発明者 ク里斯チャン ルグイユ
カナダ国, ケベック ジ1ウ 3ペ4, モントリオール, クリストフ コロン 10514
(72)発明者 ミレイユ オーゲ
カナダ国, ケベック アッシュ7セ 1ウ5, ラバル, リュ ドゥ ラ ファブリック 5195
(72)発明者 ピクトリヤ ルカシェバ
カナダ国, ケベック アッシュ9エール 4ア3, ポワント-クレア, ドゥルマル アブニユ 46
7

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 国際公開第2010/063832 (WO, A1)
国際公開第2005/121755 (WO, A1)
Nat. Methods, 2005年 月 日, Vol.2, No.3, pp.177-184
J. Pharmacol. Exp. Ther., 2007年 月 日, Vol.322, No.1, pp.148-154

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI / STN