



-
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：改良されたレポーター遺伝子を用いる分析システム 技術分野

[0001] 本発明は、発光の強度、安定性、及び／又は長波長シフトによる動物組織透過性が改良された海洋動物発光酵素改変体の遺伝子をレポーター遺伝子として用いることを特徴とする、レポーター遺伝子を用いた各種分析システムの改良方法に関するものである。

背景技術

[0002] 生体内における分子現象（例えば、蛋白質の構造変化、リン酸化、蛋白質-蛋白質間の相互作用、2次信号伝達物質の産生等）の計測は、生命現象を理解し、それに係る分子メカニズムを解明する上で極めて重要である。従来、このような分子現象を解析する手法として種々の手法が開発されており、主なものとして、（ア）fluorescent resonance energy transfer (FRET; 非特許文献1, 2)、（イ）bioluminescent resonance energy transfer (BRET; 非特許文献3)、（ウ）タンパク質コンプリメンテーション (protein complementation; 非特許文献4, 5)、（エ）化学物質と受容体との結合親和性に基づく転写活性の測定等で用いられるレポーター遺伝子アッセイ (reporter gene assay; 非特許文献6)、（オ）タンパク質間の相互作用解析のためのツーハイブリットアッセイ (Two-hybrid assay; 非特許文献7) 等の手法が挙げられる。

特にレポーター遺伝子を用いる、レポーター遺伝子アッセイやツーハイブリットアッセイは、今日、最も普遍的であり、標準的な生物分析法であり、その際のレポーター遺伝子の種類としては、蛍光蛋白質遺伝子（以下、蛍光法と名づける）と発光蛋白質遺伝子（以下、発光法と名づける）が主に用いられている。蛍光法は、レポーター遺伝子産物として緑色蛋白質 (green fluorescent protein; GFP)、又はその変異体を発現させることを特徴とするが、蛍光蛋白質は、自己蛍光 (autofluorescence) のためバックグラウンドが

高く、外部光源を必要とし、蛍光顕微鏡のような大型装置と精密なフィルターシステムを必要とする。また蛍光発色団が成熟するまでに短くても数時間から数日がかかる問題点があった。また蛍光顕微鏡を使う場合、一回に観察できる細胞数に限界があり、定量性に問題があった（非特許文献8）。

[0003] 一方、発光法は、外部刺激を検出する際、生物発光酵素（ルシフェラーゼ）を発現することを特徴とする。蛍光法に比べて、発光法は大型装置を必要としない上、測定の簡便さから、今日の多くのレポーター遺伝子を用いるアッセイ法で利用されているが、生物発光酵素を用いた場合、多くの長所にも関わらず、解決すべき課題も含んでいる。その第1の理由は、蛍光色素に比べて生物発光酵素がおしなべて低輝度であることにある。蛍光色素に比べて低輝度であるため、発光法では高感度の計測装置を必要とし、単一細胞イメージングや細胞小器官レベルでの分子現象探索などには不向きであるとされている。また、十分な輝度を得るために、発現産物が蓄積されるための刺激時間を長く取る必要があった。また、第2の理由として、生物発光酵素の多くが単調な発色しか提供できず、色の選択肢が乏しいという問題点がある。発光の多色化の利点として、（ア）マルチ信号の同時計測、（イ）長波長発光の生体組織透過性のよさが取り上げられる。

ところで、レポーター遺伝子としては、他にchloramphenicol acetyltransferase (CAT), β -galactosidase (β -gal), alkaline phosphatase (AP) 等も従来から広く使われている。しかし、CATの標準法の感度は一般的に発光酵素法の感度より10倍から1000倍劣っている（非特許文献9）。同様に、 β -galactosidaseやalkaline phosphataseも感度において劣るため、これらの蛋白質の発現が十分蓄積されるまで長い刺激を必要とする上に、発色反応のためにも15分から1時間の反応時間を必要とする。

このように、従来のレポーター遺伝子を用いたアッセイ法の共通の大きな問題点としては、測定まで長いリガンド刺激時間を必要とする点が挙げられ、例えば標準的な方法で1日程度の刺激時間を必要とするため、細胞内で起こるダイナミックな分子現象を計測することはできない。また、従来のレポー

ター遺伝子を用いるアッセイ法の標準プロトコルでは、細胞をすり潰してから（ライセットを作る）計測に入るので、細胞ライセットを作るために約10ー20分程度要することもアッセイ速度を遅くする原因となっていた。

したがって、従来のレポーター遺伝子を用いたアッセイ法、特に発光酵素（ルシフェラーゼ）を搭載したレポーター遺伝子アッセイとツーハイブリットアッセイにおけるリガンド刺激時間を短縮することが求められており、そのために、より高輝度で安定な生物発光、及び／又はより長波長側にシフトした生物発光を呈するルシフェラーゼ改変体の開発とその応用が望まれていた。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Awais, M. ; Sato, M. ; Lee, X. F. ; Umezawa, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 2707-2712.

非特許文献2 : Awais, M. ; Sato, M. ; Sasaki, K. ; Umezawa, Y. *Anal. Chem.* 2004, 76, 2181-2186.

非特許文献3 : Hoshino, H. ; Nakajima, Y. ; Ohmiya, Y. *Nat. Methods* 2007, 4, 637-639.

非特許文献4 : Paulmurugan, R. ; Gambhir, S. S. *Anal. Chem.* 2005, 77, 1295-1302.

非特許文献5 : Paulmurugan, R. ; Gambhir, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, 15883-15888.

非特許文献6 : Houtman CJ, Sterk SS, van de Heijning MPM, et al *Anal. Chim. Acta* 2009, 637(1-2), 247-258.

非特許文献7 : Lievens S, Lemmens I, Tavernier J *Trends Biochem. Sci.* 2009, 34(11), 579-588.

非特許文献8 : Kim, S. B. ; Ozawa, T. ; Watanabe, S. ; Umezawa, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004, 101, 11542-11547.

非特許文献9 : de Wet, JR Wood KV *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 725-737.

非特許文献10 : Papworth, C. , Bauer, J. G. , Braman, J. and Wright, D. A. *Strat*

egies 1996, 9(3):3-4

非特許文献11: A. M. Loening, A. M. Wu, and S. S. Gambhir, Nat. Methods 4(8), 641 (2007)

非特許文献12: J. P. Welsh, K. G. Patel, K. Manthiram et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 389, 563 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、レポータージーンアッセイ又はツーマイブリットアッセイ等のレポーター遺伝子を用いた各種アッセイ法におけるリガンド刺激時間を短縮する改良方法の提供を目的とするものであり、具体的には、レポーター遺伝子として、より高輝度で安定な生物発光及び／又は長波長側にシフトした生物発光を呈するルシフェラーゼを発現する遺伝子改変体の利用法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、既にガウシアルルシフェラーゼ (GLuc) などの海洋動物由来の発光酵素の特定の位置に変異を導入することで、発光強度が高く、かつ安定であり、長波長にシフトした発光が得られることを解明しており、当該改変遺伝子のコドン最適化 (codon optimization) を行うことによって、哺乳動物細胞内で効率的に超高輝度生物発光酵素が合成できるという知見を得ていた (特願2009-101025号)。

そして、従来のレポーター遺伝子を用いるアッセイ法で1日以上のアッセイ時間が必要な、直接で最大の原因がレポーター蛋白質そのものの低輝度等に原因があるという認識のもとに、レポーター遺伝子として、本発明者らが開発した上記変異発光酵素改変体遺伝子を用いることに思い至った。

具体的には、男性ホルモン応答配列 (androgen response element: ARE) を持つレポーター発現用プラスミドの下流に搭載するレポーター遺伝子として、高輝度生物発光酵素遺伝子を採用し、レポータージーンアッセイ系を構築した (実施例1) ところ、従来のGLucそのものを搭載したプラスミド (pAR

E-GLuc) の場合に比べてより強い生物発光を示し、感度の良い検出が可能となった。生物発光が強いことから、少ないレポーター蛋白質でも既存の検出器で十分検出可能となり、レポーター蛋白質が蓄積するまで待つ時間が軽減できた。同様の効果を期待し、ツーハイブリットアッセイ系においても、上記変異発光酵素改変体遺伝子を用いた系を作成し実験を行ったところ、従来法に比べて半分以上の短い時間で同様の結果が得られ、アッセイ時間の短縮を達成できた(実施例2)。また、これらのレポーター遺伝子を用いたアッセイ系の最適計測条件を調べるために、システムを構成する各プラスミドの最適混合比(実施例3)、最適刺激物とその適正な刺激濃度の検討(実施例6)も行った。

さらに、本発明では、発現された超高輝度変異発光酵素による発光強度の経時変化(kinetics)を利用した生物分析法であって、単位時間あたりの発光値の変化(RLU/sec)を分析指標として、定量的なリガンド計測が可能であることを見出し(実施例4)、女性ホルモン選択性・応答感度をも計測した(実施例5、6)。

これによって、海洋動物由来の発光酵素の改変体遺伝子をレポーター遺伝子として利用した分析システムに関する本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、具体的には以下の通りのものである。

[1] 外部刺激に応じた細胞内での標的遺伝子発現の時期又は発現量を解析するための分析法に用いるレポーター遺伝子であって、海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラーゼ(GLuc)のアミノ酸配列上の89~118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基が置換されており、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換(conservative amino acid replacement)であり、それによって発光機能が向上した変異発光酵素をコードする遺伝子からなることを特徴とする、レポーター遺伝子。

[2] 前記変異発光酵素をコードする遺伝子が、海洋動物発光酵素のアミ

ノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に相当する位置の疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換、又は同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換を含む同類アミノ酸置換が施された変異発光酵素をコードするものである、前記〔1〕に記載のレポーター遺伝子。

〔3〕 前記同類アミノ酸置換が、海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の90位、108位、112位、115位、もしくは118位の位置に相当する位置のアミノ酸残基をロイシン（L）、トリプトファン（W）もしくはバリン（V）に置換するか、同89位もしくは97位の位置に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファン（W）に置換するか、同95位に相当する位置のアミノ酸残基をグルタミン酸（E）に置換するか、又は同100位に相当する位置のアミノ酸残基をアスパラギン（N）に置換することを含むものである、前記〔2〕に記載のレポーター遺伝子。

〔4〕 前記変異発光酵素をコードする遺伝子が、前記海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のアミノ酸残基をロイシンに置換することを含む同類アミノ酸置換が施された変異発光酵素遺伝子である、前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のレポーター遺伝子。

〔5〕 前記海洋動物発光酵素が、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）並びにカイシアルシフェラーゼ（MLuc、MpLuc1、及びMpLuc2）から選択されたいずれかの発光酵素である、前記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のレポーター遺伝子。

〔6〕 前記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のレポーター遺伝子を、外部刺激に対する応答配列又は外部刺激の応答により形成される融合蛋白に対する応答配列の下流に含んでなる発現ベクター。

〔7〕 前記〔6〕に記載の発現ベクターが導入された形質転換細胞。

〔8〕 前記〔7〕に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とする、外部

刺激に応じた細胞内での標的遺伝子発現の時期又は発現量を解析するための分析法。

〔 9 〕 前記外部刺激の強さを、基質添加後のレポーター遺伝子の発現に基づく生物発光の強度の上昇速度（RLU/sec）、又は応答曲線の面積を指標として定量化することを特徴とする、前記〔 8 〕に記載の分析法。

〔 10 〕 前記分析法が、レポータージーンアッセイ法又はツーハイブリッドアッセイ法である、前記〔 8 〕又は〔 9 〕に記載の分析法。

〔 11 〕 前記〔 10 〕に記載のツーハイブリッドアッセイ法を構成する3種類のプラスミドの比率のうち、レポーター発現用プラスミドの割合を他のプラスミドの2倍以上に高めたことを特徴とする、分析法。

発明の効果

[0008] 本発明は、従来のレポータージーンアッセイ法、ツーハイブリッド法などレポーター遺伝子を用いる分析システムにおいて、本発明者らが開発した海洋動物由来の発光酵素の高輝度改変体遺伝子をレポーター遺伝子として用いることで、大幅にアッセイ時間を短縮することができた。また、各アッセイシステムにおいて、感度が良く定量的な計測が簡便に行えるという優れた改良方法を提供できた。このことは、従来レポータージーンアッセイが適用されていた、内分泌攪乱物質の網羅的な検出法や生体内のホルモン異常などの診断方法、またツーハイブリッド法が適用されていた、プロテオーム解析などにおける精度向上が達成できるだけでなく、従来不可能とされていた、細胞内又は細胞小器官レベルでの分子現象を短時間で観察するツールにもなり得ることを期待させるものでもある。

図面の簡単な説明

[0009] [図1A]各種海洋動物由来の発光酵素のアミノ酸配列の疎水性分布図。

[図1B]各種海洋動物由来の発光酵素のアミノ酸配列比較表。点線ボックスは推定酵素活性部位。

[図2A]GLucのアミノ酸配列における変異導入箇所マップ。

[図2B-1]各GLuc変異体の生物発光強度の比較図(1)。発光スペクトルのピーク

値を比較したグラフであり、本来のGLucの発光強度（左端）に比べた、相対的な生物発光強度を示している。なお、ここでは、細胞溶解時間を5分としたので、細胞小器官までは溶解されていない。

[図2B-2]各GLuc変異体の生物発光強度の比較図(2)。発光プレートリーダーで測定した各発光スペクトルの面積を指標としたグラフであり、本来のGLucの発光強度（左端）に比べた、相対的な生物発光強度を示している。なお、ここでは、細胞溶解時間を20分としたので、細胞小器官まで溶解された均一な細胞溶解液が得られている。また、一部高輝度GLuc変異体については、発光波長の最大値も併記した。

[図2C]GLuc変異体の生物発光スペクトルのレッドシフト。上から、I90をTyr（Y）に変異した場合、H95とD100をそれぞれQとNに、H97をWに変異した場合。

[図2D]GLuc変異体の生物発光スペクトルのレッドシフト。従来のGLucと比較した、Y97W、I90L、F89W/I90L/H95E/Y97W(Mon3)の発光スペクトル。

[図2E]610nm Long-Pass filterを利用した、長波長生物発光強度の相対的強度。従来のGLuc（白棒）と比較した各発光変異体の波長。変異体が強い長波長の生物発光を示すことが分かる。

[図3]代表的なルシフェラーゼの生物発光スペクトルの比較。GLuc変異体（黒線）は従来のGLuc（点線）、FLucやクリックビートルルシフェラーゼ（CBLuc）に比べてはるかに強い生物発光強度を示す。

[図4AB]生物発光強度の経時変化比較。（A）各変異体に基質(PBSバーファ-に溶かす)を導入した後、その生物発光の経時変化を短時間（5秒間）観測した結果。I90L、H95E、Y97Wが、比較的に安定的な生物発光を示すことが分かる。（B）各変異体に基質(PBSバーファ-に溶かす)を導入した後、その生物発光の経時変化を、比較的に長時間（10分）観測した結果。本来のGLucの発光値（白丸）の減少は激しい反面、I90L（黒四角）とI90V（灰色三角）の発光値は比較的安定的な発光強度を示す。

[図4CD]生物発光強度の経時変化比較。（C）各変異体に基質(Matthew改良

バーファーに溶かす)を導入した後、その生物発光の経時変化を短時間(5秒間)観測した結果。(D)各変異体に基質(Matthew改良バーファーに溶かす)を段階的に導入した後、各段階別の生物発光の経時変化を1秒ずつ観測した結果。各変異体が非常に安定的で、強い生物発光を示していることが分かる。

[図5AB]MpLuc1 (*Metridia pacifica*由来ルシフェラーゼ)変異体の発光特性。(A)MpLuc1そのもの、MpLuc1のI114L変異体(I114L)、MpLuc1のY113W/I114L/H119E/Y121W変異体(MpLuc4)の発光スペクトル。(B)610nm Long-Pass filterを用いた、MpLuc1変異体の長波長生物発光値(610nm以上)の測定。

[図5C]MpLuc1変異体の発光安定性の計測。I114L及びMpLuc4のいずれもが、従来のMpLuc1そのものに比べて安定的な生物発光を示している。

[図6AB]MLuc (*Metridia longa*由来ルシフェラーゼ)変異体の発光特性。

(A)MLucそのもの、MLucのI123L変異体(I123L)、MLucのY122W/I123L/H128E/Y130W変異(MLuc4)の発光スペクトル。(B)MLuc変異体の発光安定性の計測。MLuc4の方が、従来のMLucそのものに比べて安定的な生物発光を示している。

[図6CD]MLuc変異体の発光特性。(C)610nm Long-Pass filterを用いた、MLuc変異体の長波長生物発光値(610nm以上)の測定。(D)基質導入前後におけるMLuc変異体発光値の経時変化。

[図7A]ヒトを含む哺乳動物での発現に適するGLuc変異体の塩基配列改変例(1)。ヒトを含む哺乳動物に適するコドンからなり、制限酵素サイトを導入したGLucのI90L変異体の塩基配列。下線は、制限酵素サイトの位置、斜体文字は変異箇所を示す。

[図7B]ヒトを含む哺乳動物での発現に適するGLuc変異体の塩基配列改変例(2)。哺乳動物に適するコドンからなり、EcoRV制限酵素サイトを導入したGLuc酵素変異体(I90Lを含む4箇所に変異を持つMon3)の塩基配列。下線は、制限酵素サイトの位置、斜体文字は変異箇所を示す。

[図8]本発明の発光酵素変異体をレポーター遺伝子とするレポータージーンアッセイ法。（A）レポータージーンアッセイ法の作動原理図。リガンド共存下で転写因子が活性化され、レポーター蛋白質の発現に繋がる。（B）従来のガウシアルシフェラーゼ（GLuc）を搭載した場合と本発明の発光酵素変異体を搭載した場合とのレポータージーンアッセイにおける発光強度比較。変異発光酵素を用いた方が発光強度グラフの面積が広いことが確認できる。

（C）前記（B）で得られた発光面積の比較グラフ。

[図9AB]本発明のレポーター遺伝子を用いたツーハイブリットアッセイ法。

（A）ツーハイブリットアッセイ法の作動原理図。リガンド共存下で、ER LBDのY537がリン酸化する。このリン酸化を、隣接したSrc SH2ドメインが認識して融合蛋白質間の結合が起こる。そのGal4転写活性の回復は、レポーター蛋白質の発現に繋がる。（B）各刺激時間による、相対的な発光強度の推移。リガンド刺激を6時間施した結果、従来のGLucを搭載した場合に比べて、当該発明者の高輝度変異体を搭載した場合がより優位な発光強度とS/N比を示した。

[図9CD]本発明のレポーター遺伝子を用いたツーハイブリットアッセイ法。

（C）本来のGLucを搭載した場合（pG5-GLuc）の生物発光値の経時変化。（D）本発明のGLuc変異体を搭載した場合（pG5-I90L）の生物発光値の経時変化。GLucに比べて発光の絶対値が高く、短時間の女性ホルモン刺激によっても効率よく生物発光の上昇を示す。

[図9E]本発明のレポーター遺伝子を用いたツーハイブリットアッセイ法。GLuc及びGLuc変異体(9096)をpG5ベクターに搭載した場合の、女性ホルモン刺激後（0時間、3時間、6時間、18時間）における生物発光値（発光光度計で測定）。従来法では3時間刺激によっては、リガンドの活性を分別できなかった反面、当該法は、3時間でも有意な発光強度の差が観察できた。図中、「9096」はGLuc変異体（I90L/T96S）を指す。

[図10]本発明のレポーター遺伝子（9096）を搭載したツーハイブリットアッセイにおける、プラスミド導入量と発光強度との相関性。レポーターを発現す

るプラスミドの割合を増やした方が、リガンド感度の良さに繋がった。

[図11A]本発明のレポーター遺伝子（9096）を搭載したツーハイブリットアッセイにおける、レポーター酵素の応答速度に基づくリガンド活性測定法。刺激して直後に測定した場合（0h）と6時間刺激した場合（6h）との発光速度の比較。

[図11B]本発明のレポーター遺伝子（9096）を搭載したツーハイブリットアッセイにおける、レポーター酵素の応答速度に基づくリガンド活性測定法。刺激時間を0, 3, 6, 18時間とした場合の発光速度の上昇速度を示す。

[図12]本発明のレポーター遺伝子を用いたツーハイブリットアッセイにおけるリガンド選択性。各変異体を搭載したアッセイ系を比べた結果、従来のGLucそのものを発現するアッセイ系より、本発明の変異発光酵素（8990又は9096）を発現するアッセイ系が、女性ホルモン（E2）に応答してより強い発光強度を示した。図中、「8990」はF89W/I90Lに変異を持つGLuc変異体、「9096」はI90L/T96Sに変異を持つGLuc変異体である。

[図13]本発明のレポーター遺伝子を用いたツーハイブリットアッセイにおけるリガンド濃度依存性。女性ホルモン（E2） 10^{-5} M刺激に対してもっとも強い発光値を示した。

[図14]（A）従来のGLucをベースにした一分子型生物発光プローブ（SimGR3）と、当該高輝度変異体をベースにした一分子型生物発光プローブ（8990N）の分子構造。（なお、ここで「8990N」は、酵素変異体「8990」を用いたプローブを表す。以下同様。）（B）従来のGLucをベースにした一分子型生物発光プローブ（SimGR3）と、当該高輝度変異体をベースにした一分子型生物発光プローブ（8990N）のリガンド感受性の比較。リガンド共存下で、8990Nの方がより優れたS/N比を示した。

[図15]（A）本発明のF89W/I90Lに変異を持つGLuc変異体（8990N）による生物発光の動物組織透過性の検討。マウスの左後背部及び右後背部のそれぞれの付け根で従来のGLucそのもの及び8990Nを発現させたところ、GLuc（左）に比べ、8990N（右）からの生物発光が強いことが分かる。（B）ツーハイブ

リットアッセイ系に搭載した場合の生きた動物組織レベルでの生物発光の観測。COS-7細胞にpACT-SH2とpBIND-ER LBDに加えて、pG5-GLuc又はpG5-90Lを導入した形質変換細胞をそれぞれマウス左後背部と右後背部の付け根に移植し、女性ホルモン刺激の有無で測定。pG5-90Lを導入した組織（右：GLucの190L変異体発現）からより強い生物発光が観測できた。（C）実験（B）のマウスの各移植部位における相対的な発光値の比較。左からサイト（1）、（2）、（3）、（4）に相当する。

[図16]マンマリアンツーハイブリットアッセイを用いた生物発光特性の比較。当該発明の超高輝度生物発光酵素（190Lや8990）の方が従来のRLuc8.6-535より発光強度（絶対値）及びS/N比が優れていることが確認できた。

[図17]真核細胞を用いた生物発光特性の比較。当該発明の超高輝度生物発光酵素（190L）が従来のM431やRLuc8.6-535に比べて優れた生物発光強度を示していることが分かる。

[図18A]B16皮膚癌細胞（melanoma）の体内転移のイメージング。本発明で用いた高輝度生物発光酵素（190L）と従来のGLucを発現する皮膚癌細胞をそれぞれ注射した場合における癌転移場所のイメージング比較。

[図18B]B16皮膚癌細胞（melanoma）の体内転移のイメージング。解剖による各臓器別生物発光強度の比較。肺及び子宮の発光値が格段に強いことがわかる。

発明を実施するための形態

[0010] 1. 本発明で用いる海洋動物由来発光酵素遺伝子の改変

（1）海洋動物由来発光酵素について

本発明において「海洋動物発光酵素」というとき、広義には、ガウシア、ウミシイタケ（*Renilla reniformis*）、ウミホタル（*Cypridina*）、カイシア（*Metridia*）などと共に、発光プランクトンの仲間であるオベリン（*Obelin*）、アクアリン（*aqualine*）*Pleuromanma*、*Oplophorus*等も含まれ、これらの「発光性の海洋動物」が産生する発光酵素（ルシフェラーゼ）を指すが、ガウシアルルシフェラーゼ（GLuc）、及びカイシアルルシフェラーゼ（*Metridia long*

a由来のMLucや、*Metridia pacifica*由来の発光酵素群であるMpLuc1、MpLuc2など）は、各酵素全体の親水性疎水性アミノ酸の分布が非常に類似しており、しかも推定酵素活性領域のアミノ酸配列類似性が極めて高い（図1）ので、これらのルシフェラーゼ群を単に「海洋動物発光酵素」ともいうが、特に「ガウシア類ルシフェラーゼ」ともいう。これらのGLuc、MLuc、MpLuc1、又はMpLuc2のアミノ酸配列及び／又はそれをコードする塩基配列に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列及び／又は塩基配列にコードされる場合も包含される。ガウシア類ルシフェラーゼであるMLuc、MpLuc1、又はMpLuc2は、GLucよりも分子量が大きい点で若干異なっているが、上記のごとく配列上の類似性の他、基質や発光活性などの酵素的な特性もGLucとほとんど一致しているので、以下典型的なガウシアルシフェラーゼ（GLuc）について主に記述する。GLucにおいて得られた知見は他のガウシア類ルシフェラーゼにも適用することができる。以下、特に断らない限り、改変位置の表示は、GLucのアミノ酸配列上の位置で表す。例えば、GLucにおける90位のアミノ酸というとき、MLucのアミノ酸配列上では123位のアミノ酸に相当する。また、MpLuc1やMpLuc2の場合には、それぞれ114位、93位に相当する。

ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）は、以下のような特徴を持つ。

（ア）今まで発見された生物発光酵素の中で最も小さいため、分子イメージングに応用された場合、宿主細胞やホスト蛋白質への負担が格段に軽い。

（イ）pH・界面活性剤・化学変性剤に対して非常に抵抗力が強い。

（ウ）生物発光酵素の中で最も高輝度である。

（エ）酵素のturn-overが速い。従来のホタルルシフェラーゼに比べ7倍以上速い。

その反面、GLucによる生物発光は反応条件に影響され易く、発光強度の落ち込みが激しく不安定なため、安定性が重要な条件となる発光分析用のレポーター（指標）としての使用には適さないとされていた。

[0011] （2）発光機能向上のための改変法

（２－１）海洋動物発光酵素の発光機能向上及びその測定方法

本発明において海洋動物発光酵素の機能向上というとき、レポーター遺伝子発現を観察する上で重要な発光強度の増強及び発光強度の経時的な安定性向上を主にめざすものであるが、発光の波長を長波長へシフトさせることも含まれる。長波長側へシフトさせることによって細胞、皮膚などからの透過性が増すことになるため、レポーター遺伝子の用途を広げる上で重要な性質である。

発光強度は、基質を添加後に従来の発光分光光度計を用い、特定の波長領域における発光強度を計測すれば二次元情報を取得でき、当該計測を経時的に行えば発光の経時的安定性も測定できる。発光プレートリーダーを用いることもでき、サンプル処理能が優れているためより正確なデータが取得できる。その際、細胞溶解（ライシス）時間を十分に（20分程度）とった上で各発光スペクトルの面積を測定する。また、長波長側へのシフトは、波長スキャンする方法、又は長波長フィルターを設けることによって測定できる。

[0012] （２－２）改変方法について

本発明の海洋動物発光酵素のアミノ酸配列を改変するためには、当該アミノ酸配列自体の所望のアミノ酸残基を化学的に変更することも可能であるが、一般的には当該酵素をコードする塩基配列中の、置換すべきアミノ酸に対応する塩基をポイント変異させればよい。塩基の変異方法は部位突然変異法など周知の方法を適宜用いることができる。本発明の実施の態様では先の特許出願（特願2009-101025号）に記載されたように、「クイックチェンジ法」（非特許文献10）に従ってポイント変異を導入したが、それには限定されない。

[0013] （２－３）変異発光酵素の製造及び発光機能の解析

本発明者らは、海洋動物発光酵素のうちで典型的な発光酵素の一つであるG Lucに対して、先の特許出願（特願2009-101025号）に記載された改変のストラテジーに基づいて、その酵素活性領域（GLucの89～118位）を構成するアミノ酸残基の1個以上に対して「同類アミノ酸置換（conservative amino ac

id replacement)」を施す改変を行った。

具体的には、ガウシア類ルシフェラーゼの典型例としてのGLucに対して、その活性部位と推定される部位89位～118位中の18箇所の位置に、同類アミノ酸置換となる変異導入のストラテジーを検討し、57種類のGLuc変異体をコードするDNAを作製した（図2A）GLuc変異体DNAを挿入したpcDNA3.1(+)ベクターを、12穴プレート上で培養したCOS-7細胞に導入し、16時間インキュベーションした。その後、各ウェル上のCOS-7細胞を細胞溶解バーファースに5分間浸すことによって細胞溶解液を作製し、発光酵素に特異的な基質（セレンテラジン）存在下でのスペクトルを、蛍光光度計（F-7000, Hitachi）を用いて測定し、導入した変異の有効性を検討した（図2B-1）。細胞溶解液に浸す時間を20分にし、各発光スペクトルの面積を発光プレートリーダーで測定した場合は図2（B-2）に示される。改変前のGLuc自体がルシフェラーゼ類の中でも特に強い発光強度を示すルシフェラーゼであったことから見て、本発明で用いたこれらの変異発光酵素の発光強度の強さがわかる。

また、従来のGLucと比較した、Y97W、I90L、F89W/I90L/H95E/Y97W(Mon3)の発光スペクトルを図2（D）として示し、610nm Long-Pass filterを利用した、長波長領域における生物発光強度の相対的強度（図2E）から見て、各種変異体が長波長側で強い生物発光を示すことが分かる。「Mon3」は発光強度が高まっただけでなく、もとのGLucの吸収波長からみて35nmもの長波長シフトが観察されたことになる。このような長波長の生物発光は、生体の組織透過性が向上するため、今後優れた分析信号としての用途での利用価値が高い。

さらに、生物発光強度の安定性をみるため、各変異体に基質(PBSバーファースに溶かす)を導入し、その生物発光の経時変化を観測した。I90L、H95E、Y97Wについて5秒間観測したところ比較的安定的な発光強度を示し（図4A）、さらに長時間（10分）観測した結果は、本来のGLucの発光値（白丸）の減少は激しい反面、I90L（黒四角）とI90V（灰色三角）の発光値は比較的安定的な発光強度を示した（図4B）。各変異体に基質(Matthew改良バーファースに溶

かす)を導入した後、その生物発光の経時変化を短時間(5秒間)観測した結果(図4C)も同様であった。また、各変異体に基質(Matthew改良バーファ-に溶かす)を段階的に導入した後、各段階別の生物発光の経時変化を1秒ずつ観測した結果(図4D)も、各変異体が非常に安定的で強い生物発光を示していることが分かる。

GLuc変異体の基質としては、GLucの標準基質となるセレンテラジン(coelenterazine;CTZ)が高い発光強度を示す点で好ましいが、セレンテラジンの種類を変えることでピーク値を示す波長が若干シフトする効果を得ることができる(先の特許出願2009-101025号)。

[0014] (2-4) 他のガウシア類ルシフェラーゼの改変体

ガウシアときわめて類似したガウシア類海洋動物である、カイシア(Metridia pacifica又はMetridia longa)由来のガウシア類ルシフェラーゼ、具体的にはMpLuc1(Metridia pacifica由来)及びMLuc(Metridia longa由来)のルシフェラーゼにおいても、GLucのアミノ酸配列の90位に相当するMpLuc1の114位の位置の同類アミノ酸置換による変異体(MpLuc1-I114L変異体)及びMLucの123位の位置の同類アミノ酸置換による変異体(MLuc-I123L変異体)と共に、GLucのF89W/I90L/H95E/Y97W(Mon3)の変異体に対応するMpLuc1のY113W/I114L/H119E/Y121W変異体(MpLuc4)及びMLucのY122W/I123L/H128E/Y130W変異体(MLuc4)を作製し、その発光特性を計測したところ、GLuc改変体の場合と同様に生物発光強度が高まり、安定性も増し、かつ長波長側にシフトするという顕著な効果が達せられ(図5A~C、図6A~D)、GLucでの知見は全て他のガウシア類ルシフェラーゼに対しても適用できることが確かめられた。

[0015] (2-5) 発光機能が向上した本発明に用いる変異発光酵素

以上の結果からみて、海洋動物発光酵素(ガウシア類ルシフェラーゼ)において、GLucにおけるアミノ酸配列89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、もしくは118位に相当するアミノ酸残基の1個以上に対して「同類アミノ酸置換(conservative amino acid replacement)」を施す

ことによって、発光酵素の輝度が高まると同時に発光強度が安定化し、又は長波長へのシフトが起こるといふ発光酵素活性機能の向上が達成できる。具体的には、同89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に対応する疎水性アミノ酸残基をそれぞれ他の疎水性アミノ酸残基に変異させた場合に、発光強度増加又は長波長へのシフトが起こるといふ発光酵素活性機能が向上する。特に、同90位、108位、112位、115位、もしくは118位の疎水性でかつ非極性アミノ酸残基から、他の疎水性でかつ非極性アミノ酸残基への変異、又は同89位もしくは97位の位置の芳香族アミノ酸残基から他の芳香族アミノ酸残基への変異を起こさせることで発光酵素の強度が高まると共に安定化し、しかも長波長へのシフトが起こる。また、同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への変異により長波長へのシフトが起こる。

すなわち、本発明における発光機能が向上した変異発光酵素というとき、海洋動物発光酵素（ガウシア類ルシフェラーゼ）において、GLucにおけるアミノ酸位置89～118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基が置換されている変異発光酵素であって、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、もしくは118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換（conservative amino acid replacement）を施す置換が含まれている。

好ましくは、同90位、108位、112位、115位、もしくは118位の疎水性でかつ非極性アミノ酸残基を、他の疎水性でかつ非極性アミノ酸残基への変異を含むか、同89位もしくは97位の位置の芳香族アミノ酸残基から他の芳香族アミノ酸残基への変異を含むか、又は同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への変異を含むものである。

さらに好ましくは、GLucのアミノ酸配列上の89位に相当する位置をトリプトファンに、90位をロイシンもしくはバリンに、95位をグルタミン酸に、97位をトリプトファンに、108位をバリンに、112位をロイシンもしくはバリン

に、115位をバリンに、又は118位をロイシンもしくはバリンに置換する場合が、特に顕著な発光強度増強を示し、長波長シフトも起こす。特に同90位でのロイシン変異体（GLuc-I90L、MpLuc1-I114L、MpLuc1-I114L）は、輝度も高いばかりか長波長シフトも顕著な優れた高輝度発光酵素である。他にも、同95位及び100位の位置での水素結合を形成する親水性アミノ酸であるグルタミン又はアスパラギンへの変異体は長波長シフトを起こさせる。

このような1アミノ酸変異体だけではなく、2箇所以上の位置を同類置換させることでさらに高発光機能を持たせることができる。具体的には、GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のイソロイシンをロイシンに置換すると共に、同89位のトリプトファン置換又は115位でのロイシン置換を同時に行った2箇所変異体（GLuc-F89W/I90L、又はGLuc-I90L/I115L）、及び同90位のロイシン置換、同89位のトリプトファン置換、同95位のグルタミン酸置換と共に同97位のトリプトファン置換を同時に行った4箇所変異体（GLuc-F89W/I90L/H95E/Y97W（Mon3）、MpLuc-Y113W/I114L/H119E/Y121W（MpLuc4）及びMLuc-Y122W/I123L/H128E/Y130W（MLuc4））は、いずれも顕著な発光強度を示すと共に長波長側への顕著なシフトも起こす画期的な高輝度発光酵素である。

なお、本発明において「変異発光酵素（改変ルシフェラーゼ）」というとき、活性中心に相当する領域である、GLucのアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸配列中には、原則としてもとのガウシア類ルシフェラーゼのアミノ酸配列に対して、上記「同類アミノ酸置換」以外の変異がないことが望ましい。しかし、当該領域以外の配列であれば酵素全体の立体構造が大きく変わらない範囲内の変異であれば許容でき、特にN又はC末端部分の一部、例えば1～50、好ましくは1～30、より好ましくは1～20、さらに好ましくは1～10アミノ酸残基が削除されている場合も含まれる。具体的には、上記改変後のガウシア類ルシフェラーゼのアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の89～118位までに相当する領域を除くアミノ酸配列が、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%

の同一性のあるアミノ酸配列であると表現できる。

[0016] (2-6) 変異発光酵素遺伝子の哺乳動物適合性コドンへの変更について

後述のように、本発明における変異発光酵素遺伝子をレポーター遺伝子として用いる場合は、典型的にはレポータージーンアッセイ法、ツーハイブリッド法などの従来から確立している宿主細胞系内で行われるものであり、本発明の変異発光酵素遺伝子を標的遺伝子のプロモーターと結合してベクターを作製し、宿主細胞へ導入し培養する一連の操作手順は全て周知方法が適用できる。

そして、その際用いる変異発光酵素遺伝子は、用いる宿主細胞に応じて当該細胞に適したコドンに変更することで、宿主細胞内で発現しやすい塩基配列にする改変をしておくことが好ましい。また、ベクターに挿入するための制限酵素サイトを設ける改変も適宜行う必要がある。これらの工程も周知方法が適用できるが、1例として、ヒトなどの哺乳動物の生体内で用いる場合、又はインビトロの哺乳動物細胞内で用いることを想定した改変体を図7(A)、(B)として示す。なお、その際の機能向上改変ストラテジーについては、先の出願(特願2009-101025号)に詳細に記載している。

[0017] 3. レポーター遺伝子を用いる分析システム

レポーター遺伝子は、組換えDNA技術によって組換え蛋白質が作製される際の遺伝子発現の時期及び発現量の解析のために従来から用いられており、特に外部刺激に応答した発現時期及び発現量変化を示す指標として広く用いられている。本発明において、レポーター遺伝子を用いる分析システムというとき、典型的にはレポータージーンアッセイ、及びツーハイブリッドアッセイなどであるが、他にPSA(protein splicing assay)、PCA(protein complementation assay)、fluorescence anisotropy等も含まれる。以下、典型的な分析システムである、レポータージーンアッセイ、及びツーハイブリッドアッセイについて詳細に説明する。

[0018] (1) レポータージーンアッセイ

レポータージーンアッセイ法は、外部刺激による転写因子の活性化及び遺

伝子の発現調節の解析手段として繁用されているが、典型的には核内受容体を介したシグナル伝達を攪乱する内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の検出に用いられている。核内受容体を介したシグナル伝達に関連した標的遺伝子（例えば、ホルモン応答性遺伝子）の発現は、リガンドと受容体の複合体が当該遺伝子の転写調節するシス領域（ホルモン応答配列；hormone response element）に結合することで引き起こされる。この各種ホルモン応答性遺伝子のシス領域の下流にルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを細胞内に導入し、リガンドとなり得るホルモン分子又は内分泌攪乱物質量を生物発光量などで検出するアッセイ法である。

その際の宿主細胞としては、一般的な遺伝子組換えに用いられる哺乳動物細胞のCOS細胞、CHO-K1細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、NIH3T3細胞などが好ましく用いられるが、酵母細胞、大腸菌など細菌細胞、昆虫細胞などでも良いが、主要な用途としては、ヒトをはじめ哺乳動物の生体内で、又はインビトロの哺乳動物細胞内で用いる場合が多い。その際、本発明の変異発光酵素遺伝子は、用いる宿主細胞に応じて当該細胞に適したコドンに変更することで、宿主細胞内で発現しやすい塩基配列にする改変をしておくことが好ましい。また、ベクターに挿入するための制限酵素サイトを設ける改変も適宜行う必要があるが、これらの工程も周知方法が適用できる。

[0019] レポータージーンアッセイ法において、従来から広く用いられていた、ホタルルシフェラーゼの場合、（ア）分子量が大きくて発現までに時間がかかるので、宿主細胞に大きな負担をかけることになり、（イ）発光強度が低いので、十分ルシフェラーゼ（レポーター）量が蓄積するまでに、通常刺激後1～2日の時間を待つ必要がある、という欠点は全て解消される。

本発明の変異発光酵素を使用することによって、レポーターの発光強度が極めて高い（特にI90L変異体の場合は、従来のホタルルシフェラーゼより1万4千倍も強い）ため、刺激後にごく短時間で測定ができる利点があることから、従来より大幅に計測時間を短縮でき、かつ経時的な発光の安定性も高いので、遺伝子導入効率の悪い細胞株においても発光測定ができる。また、長波

長側にシフトしているので、細胞膜、皮膚を通しての透過性が高まっているため、バックグラウンド値が下がり測定精度も高い。

具体的に、本発明の変異発光酵素をこれらのレポータージーンアッセイに適用するためには、上流に当該アッセイに適した発現プロモーターを搭載している既知の真核細胞発現ベクターに当該発光酵素を繋いで、真核細胞に導入し、一定時間が過ぎた後、信号（刺激）有り無しの条件で測定に用いればよい（非特許文献20）。当該発光酵素を搭載できる、レポータージーンアッセイ用の発現ベクターとしては、公知のpTransLucentベクターを利用し、既知の方法を使って簡単に搭載させることができる。

[0020] （2）ツー・ハイブリッド法

ツーハイブリッド法（Two-hybrid法）はタンパク質間の相互作用を調べる手法の1つであり、1989年に酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いたyeast two-hybrid（Y2H）システムがまず構築された。転写活性化因子であるGAL4タンパク質のDNA結合ドメイン（DBD）と転写活性化ドメインが分離可能であることを利用して、GAL4DBDと任意のタンパク質A(bait)を融合タンパク質として発現させ、同時に細胞内で発現させた転写活性化ドメイン（TA）と融合タンパク質としたタンパク質B(pre)と相互作用をするかどうかを判定できる。前記蛋白質AとBが結合する場合にはDBDとTAが近接してDNA結合ドメイン（DBD）が、「UASG」塩基配列に結合するのでその下流に連結したレポーター遺伝子発現を促すことになる。レポーター遺伝子がルシフェラーゼであれば、その特異的な基質存在下で生物発光をモニターすれば、A,B両タンパク質の親和性が測定でき、タンパク質A(bait)と相互作用をするタンパク質、ペプチドのスクリーニングができる。その際のタンパク質B(pre)は発現ライブラリーによって提供させることもできる。

宿主細胞としては、酵母細胞に限らず、大腸菌など細菌類や、哺乳動物細胞、昆虫細胞も用いられる。その際、酵母由来の転写活性化因子であるGAL4のDNA結合ドメイン（DBD）以外に、大腸菌由来のリプレッサータンパク質の「LexA」等を用いることもできる。これらをコードするDNAと、リガンド応答性

転写調節因子のリガンド結合領域などbaitタンパク質（即ち、前記の任意の蛋白質A）をコードするDNAとを連結し、宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に連結する。一方、「転写活性化因子の転写活性化領域」としては、例えば、GAL4の転写活性化領域、大腸菌由来のB42酸性転写活性化領域、ヘルペス単純ウイルスVP16の転写活性化領域等を用いることができる。これら転写活性化領域をコードするDNAと、preyタンパク質（即ち、前記の任意の蛋白質B）をコードするDNAとを連結し、宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に連結する。具体的には例えば、転写調節因子GAL4のDNA結合領域をコードするDNAを有し、出芽酵母を宿主細胞において利用可能なベクターとして、プラスミドpGBT9(Clontech社製)等をあげることができ、GAL4の転写活性化領域をコードするDNAを有し、出芽酵母において利用可能なベクターとして、プラスミドpGAD424(Clontech社製)等をあげることができる。また、GAL4のDNA結合領域をコードするDNAを有し、哺乳類動物細胞において利用可能なベクターとして、pM(Clontech社製)、pBIND(Promega社製)等をあげることができ、単純ヘルペスウイルスVP16の転写活性化領域をコードするDNAを有し、哺乳類動物細胞において利用可能なベクターとして、pVP16(Clontech社製)、pACT(Promega社製)等をあげることができる。また、LexAのDNA結合領域をコードするDNAを有し、哺乳類動物細胞において利用可能なベクターとして、pLexA(Clontech社製)等をあげることができ、B42をコードするDNAを有し、哺乳類動物細胞において利用可能なベクターとして、pB42AD(Clontech社製)等をあげることができる。ツーハイブリッドシステム用のキットとして、Matchmaker Two-hybrid System(Clontech社製)、CheckMate Mammalian Two-Hybrid System(Promega)等も既に市販されていて、当該キット中にはホタルルシフェラーゼが発現するように組み込まれている。

また、本発明の変異発光酵素をコードする遺伝子は、GAL4が結合する領域（「UASG」）などの下流にレポーター遺伝子として挿入したベクターを構築すればよい。例えば、哺乳動物宿主の場合であれば、市販のpG5Lucベクター(Promega)やpFR-Lucベクター(Stratagene)を利用し、当該ベクターに搭載

されているホタルルシフェラーゼの代わりに挿入することができる。また、市販のpG5CATベクター（Clontech）のChloramphenicol acetyltransferase（CAT）の代わりに用いることもできる。

[0021] 4. レポーター遺伝子を用いる分析法における新規な計測法

本発明の変異発光酵素の輝度が極めて高く安定していることから、本発明においてレポーター遺伝子を用いる各種分析法に適用できる新たな応答速度（kinetics）に基づく計測法を開発した。

本発明のレポータージーンアッセイでは、外部刺激に応じて、レポーター蛋白質が発現されるところまでは従来のレポータージーンアッセイ法と同様であるが、発現されたレポーター遺伝子の酵素活性を計測する方法として、本願発明者らは以下のように応答速度（kinetics）に基づく計測法を考案した。

（１）本発明の変異発光酵素をレポーター遺伝子として含むプラスミドを細胞に導入し、ウェル内で培養する。

（２）被検物質（ホルモンなど）を添加して一定時間経過後、ライシス溶液（lysis）を添加して細胞を充分溶解（lysateを作成）する。

（３）ウェルプレートを手動リーダーにセットし、基質添加後、単位時間あたり発光の上昇速度（即ち、RLU/sec）から、被検物質の応答刺激の強さを観測する。

（４）初期発光値と一定時間経過後の発光値の差から、上昇速度を計測する。

上昇速度 v は以下に表現できる。

$$v = (RLU_1 - RLU_0) / (t_1 - t_0)$$

ここで、 RLU_0 は初期発光強度（relative luminescence unit;RLU）、 RLU_1 は一定時間（ t_1 ）経過後の発光強度を示す。

このように、本発明の計測法は、発光応答速度を分析信号として利用するものである。

[0022] 5. その他

本発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。なお、用語は基本的にはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。また発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術はJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1995; 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法II」、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸III (組換えDNA技術)」、東京化学同人(1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法またはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。また、本発明で使用する各種蛋白質やペプチド、あるいはそれらをコードするDNAについては、既存のデータベース (URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>等) から入手することができる。

実施例

- [0023] 以下、実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、本発明は以下の例に限定されるものではない。

なお、本明細書中に引用した技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

[0024] 〔実施例 1〕 GLuc変異体を搭載したレポータージーンアッセイ

本願発明者らによって開発された、GLuc変異体を用いた分析法の有用性を証明するために、従来のレポータージーンアッセイ系の一例であるpG5Luc (Promega)にGLuc変異体を搭載した、新規レポータージーンアッセイ系を構築した(図8)。まず、男性ホルモン応答配列(ARE)を上流に持つベクターを作成し、その下流に従来のGLucそのもの、又は本発明のGLuc変異体をコードする遺伝子を遺伝子工学的に連結した(図8A)。この新規ベクターをCOS-7細胞に導入し、男性ホルモン有り無しの条件で16時間刺激した。その後、細胞ライセットを作り、特異的な基質(coelenterazine)を添加し、生物発光値の相違を即時にプレートリーダーで計測した。

その結果、従来型のGLucを搭載したレポータージーンアッセイ系に比べて、本発明のGLuc変異体(190L)を搭載した方がより強い発光強度の変化を示した(図8B)。この発光応答の解析法として、基質導入から一定時間(1秒)までの面積を取ることによって、男性ホルモンの生物活性を高輝度で観測できた(図8C)。

[0025] 〔実施例 2〕 GLuc変異体を搭載したツーハイブリットアッセイ

GLuc変異体を用いた分析法の有用性を証明するために、GLuc変異体を搭載したマンマリアン・ツーハイブリットアッセイ系を構築し、蛋白質—蛋白質間の相互作用を計測する実験を遂行した(図9)。

この実験を遂行するために、従来の典型的なツーハイブリットアッセイ用プラスミドであるpACT、pBIND、pG5Lucをベースに、以下のプラスミド群をまず作製した：(1) ER LBDとGal4をコードするプラスミド、(2) SH2 ドメインとVP16をコードするプラスミド、(3) レポータージーンとして、従来のGLuc又は、当該発明の高輝度変異体(190L)を搭載した、pG5プラスミド。

前記プラスミド(1)(2)(3)をCOS-7細胞に共導入した後、女性ホル

モン有り無しの条件で6時間刺激し、その後の発光値の変化を観測したところ、当該発明の高輝度変異体（I90L）を搭載したツーハイブリットアッセイがより強い発光値とS/N比を示した（図9B）。また、そのkineticsも同様の結果を示した（図9C、D）。

更に女性ホルモン刺激時間依存的な発光値を観測するために、従来の典型的なツーハイブリットアッセイ用プラスミドであるpACT、pBIND、pG5Lucをベースに、以下のプラスミド群をまず作製した：（1）ER LBDとGal4をコードするプラスミド、（2）SH2 ドメインとVP16をコードするプラスミド、（3）レポータージーンとして、従来のGLuc又は、当該発明の高輝度変異体（9096）を搭載した、pG5プラスミド。

上記プラスミド（1）（2）（3）を共導入した生細胞に、溶媒そのもの（0.5% DMSO）又は女性ホルモン（estrogen）刺激を0時間、3時間、6時間、18時間与えた後、細胞を回収し、その生物発光値を発光光度計で測定した（図9E）。その結果、本発明のGLuc変異体を搭載したプラスミドを保有する細胞が女性ホルモン刺激に対して優れたS/N比を示した。例えば、GLuc変異体を搭載した場合、3時間刺激で2倍まで発光値が上昇したが、従来のGLucでは区別ができなかった。この結果は、本願発明者らのGLuc変異体が高輝度であるため、従来に比べて大幅に短い時間刺激しても（即ち、少量が発現された場合）区別できるような強い発光上昇が観測できた。

[0026] 〔実施例3〕 ツーハイブリットアッセイにおける、プラスミド導入比の最適化

通常、マンマリアンツーハイブリットアッセイを遂行するためには、3つのプラスミド（蛋白質XとYを発現するプラスミドと、XY間の結合を認識する応答配列を持つプラスミド）を同一細胞内に導入する。この際、細胞に導入するプラスミドの比率は、アッセイの効率を左右する重要なファクターとなる。当実施例では、各プラスミドの導入比率を変えることによって、アッセイを遂行する上で、最適比率を検討した。まず、ER LBDを発現するpBINDとSrc SH2を発現するpACTプラスミド、そしてER LBD-SH2間の結合が起こったと

きに、その結合に応じてレポーター蛋白質を発現するpmG5プラスミドを作成した。次に、前記3種類のプラスミドの導入比率を変えてCOS-7細胞に導入し、女性ホルモン刺激有り無しの条件で発光値の相違を計測した。

その結果を図10で示す。結果によれば、pACT:pBIND:pmG5の比率が、1:1:3の場合、最も優れた信号対バックグラウンド比（S/N比）を示した。全体的な傾向としては、pmG5の比率が高い方がS/N比が改善されることが観察された。

[0027] 〔実施例4〕 応答速度（kinetics）に基づくホルモン感受性の計測

本発明のレポータージーンアッセイでは、外部刺激に応じて、レポーター蛋白質が発現される。発現されたレポーターの酵素活性を計測する方法として、本願発明者らは以下の計測法を考案した。

（1）まず、96ウェルプレートに真核細胞を培養し、その後、当該発明のプラスミドを細胞に導入する。この時点で、アッセイの準備は完了する。

（2）次に、96ウェルプレートの各ウェルに女性ホルモン又は化学物質を添加し、一定時間後、ライシス溶液（lysis）を添加し、ライセット（lysate）を作成する。

（3）96ウェルプレートをプレートリーダーにセットし、基質添加後、単位時間あたり発光の上昇速度（即ち、RLU/sec）から、そもそものホルモン刺激の強さを観測する。

図11（A）で示したように、COS-7細胞を使った場合、女性ホルモン刺激有り無しによって、初期発光値の上昇傾向が大きく異なる。この初期速度から女性ホルモンの濃度・性質を観測できる。このとき、上昇速度 v は以下に表現できる。

$$v = (RLU_1 - RLU_0) / (t_1 - t_0)$$

ここで、 RLU_1 と RLU_0 はそれぞれ、一定時点での発光強度と初期発光強度（relative luminescence unit; RLU）を示す。

この計算法によれば、0h刺激した場合（コントロール）は28.5RLU/secであるに対して、6h刺激の場合には、76.5RLU/secであった。この結果から、発光

応答時間が分析信号として利用できるということが分かる。

[0028] 図 1 1 (B) は、もっと詳しく調べた結果である。即ち、当該発明による高輝度変異体の一つである、9096を搭載したツーハイブリットシステムを作成した。このために、96穴プレートに培養したCOS-7細胞にpBIND-ER LBD, pACT-SH2と共に、9096を発現するpG5-9096を共導入した。その後、女性ホルモンの刺激時間に応じて、レポーター蛋白質の発現を誘導した。その後、細胞ライセットを作り、基質導入前後の発光値の上昇を計測した。各単位時間あたり生物発光の上昇速度 (RLU/sec) は、それぞれ33.3RLU/sec (0時間刺激), 43.3RLU/sec (3時間刺激), 96.7RLU/sec (6時間刺激), 150.0RLU/sec (18時間刺激) であった。各刺激時間の増加に伴い、発光強度の上昇速度が飛躍的に速くなることが分かった。

[0029] 〔実施例 5〕 ツーハイブリットアッセイのリガンド選択性

前記ツーハイブリットアッセイのリガンド選択性を検証するために、様々な、高輝度変異体を搭載したpG5プラスミドを作成し、女性ホルモン感受性を計測してみた (図 1 2)。この実験のために、COS-7細胞をプレートに培養し、pBIND-ER LBD, pACT-SH2以外に、pG5-GLuc, pG5-l90L, pG5-8990, pG5-9096の何れかを、COS-7細胞に同時導入した。その後、女性ホルモン (E2) または、そのアンタゴニスト (OHT) 有り無しの条件で発光値の相違を計測した。

その結果、図 1 2 で示したように、従来のGLucそのものを搭載した場合に比べて、本発明のGLuc変異体を搭載した場合がより強い生物発光を担保できるということが分かった。また、OHTに比べてE2の方がER LBD-SH2結合を促進して、強い生物発光を誘導できることが分かった。

[0030] 〔実施例 6〕 ツーハイブリットアッセイのリガンド濃度依存性

前記ツーハイブリットアッセイのリガンド濃度依存性を調べるために以下の実験を行った (図 1 3)。細胞培養プレートにCOS-7細胞を培養し、pBIND-ER LBD, pACT-SH2, pG5-8990を同時導入した。様々な濃度のリガンド刺激を12時間行ったあと、その発光値変化を観測した。

その結果、ER LBD-SH2間の結合は、女性ホルモン刺激に強く応答し (即ち

、リガンド選択性を持ち)、その濃度は 10^{-5} Mで発光強度が最高値に到達することが分かった。

[0031] 〔実施例 7〕 本発明の変異発光酵素を用いた生物発光プローブ

本願発明者らの高輝度生物発光酵素の優位性を証明するために、この酵素を利用した、新規生物発光プローブを作成した(8990N)。また、コントロールとして、従来のGLucそのものをベースにしたプローブも同時に合成した(SimGR3)。各プローブの分子構造は、図 1 4 (A) に示している。即ち、各プローブは、その内部にストレスホルモン受容体のリガンド結合ドメイン(glucocorticoid receptor ligand binding domain)を含有している。これによってストレスホルモン感受性を持つことになる。

各プローブのストレスホルモン応答性を調べた結果、8990Nの方がより強い生物発光を示す上、リガンド刺激有り無しの条件で十分分離できる生物発光値を出していることが分かった(図 1 4 B、□と■)。■はストレスホルモン刺激を実施した場合を示す。一方、SimGR3はストレスホルモン刺激を有意に区別できなかった(○と●)。

[0032] 〔実施例 8〕 GLuc変異体を用いた生体イメージング

本発明のGLuc変異体の改良点(高輝度、長波長シフト、安定性等)を生かして、その生体系への応用可能性を検証した(図 1 5)。

まず、GLucの高輝度変異体である8990をコードする遺伝子を挿入したpcDNA 3.1(8990)プラスミドを製作し、COS-7細胞に導入した。一方、コントロールとして、従来のGLucそのものをコードする遺伝子を挿入したpcDNA3.1(GLuc)プラスミドを同様にCOS-7細胞に導入した。その後、両形質変換細胞を、BALB/cヌードマウス(5週齢メス)の左と右の甲部・皮下組織に移植した。移植した細胞が安定化するまで12時間待ち、同量の基質(セレンテラジン)を注射した後、その発光値の程度を比較した(図 1 5 A)。その結果、8990を発現する形質変換細胞を移植した部位から、より強い生物発光を観測できた。

[0033] 更に、当該GLuc変異体を発現するマンマリアン・ツーハイブリットシステム(mammalian two-hybrid system)を搭載した生細胞を作成し、それを用い

た生体イメージングシステムを試みた（図 1 5 B）。

まず、女性ホルモン受容体（ER LBD）とSrc SH2ドメインをそれぞれBINDとACTにつないだプラスミドを作成した（pBINDとpACT）。一方、その応答系として、Gal4応答配列を上流に持ち、l90Lを発現するプラスミドも作成した（pG5-l90L）。このコントロールとして、従来のGLucそのものを発現するプラスミドを作成した（pG5-GLuc）。

[0034] 前記3種類のプラスミド（pBIND, pACT, pG5-l90L又はpG5-GLuc）をCOS-7細胞に共トランスフェクション（cotransfection）することで、形質変換細胞を作成した。この形質変換細胞をBALB/cヌードマウス（5週齢メス）の左と右の甲部・皮下組織にそれぞれ移植した。この時、左甲部にはコントロール（pG5-GLuc）、右甲部にはpG5-l90Lを持つ形質変換細胞がそれぞれ移植されたことになる。更に移植が安定化するまでに12時間を待った。

後に、各マウスに女性ホルモン又は、溶媒（0.1% DMSO）を注射し、更に6時間後に発光強度を観察した（図 1 5 B）。その結果、女性ホルモン刺激を施したマウスの方が、より強い生物発光を示した。また、女性ホルモン刺激をしたマウス内でも、左甲部（GLuc発現）に比べて、右甲部（l90L発現）の方がより強い生物発光を示した。この結果は、女性ホルモン刺激によって、同量のGLuc又は、l90Lが発現されたとしても、l90Lの方が高輝度で安定的であるため、より強い生物発光を示したと解析できる。その具体的な発光強度は、図 1 5（C）で示している。

[0035] 〔実施例 9〕 マンマリアンツーハイブリットアッセイを用いた生物発光特性の比較

更にマンマリアンツーハイブリットアッセイ（mammalian two-hybrid assay）に当該生物発光酵素（l90L、8990）を搭載した場合と、公知のRLuc変異体のRLuc8.6-535を搭載した場合を比較した（図 1 6）。ここで用いたRLuc8.6-535（非特許文献 1 1）は、今まで開発された最も明るいとされていた人工生物発光酵素であり、A55T/C124A/S130A/K136R/A143M/M185V/M253L/S287L/A123S/D154M/E155G/D162E/I163L/V185Lという多数箇所に変異を有するRLuc変異

体である。この実験における実験手法は、実施例 2 で示した方法と同様に ER LBD と Src SH2 ドメインとの結合を可視化する系を用いた。その結果、同一条件で実験を進めた結果、8990 の生物発光値（絶対値）が RLuc8.6-535 に比べて 11.4 倍も強いことが確認できた。また、S/N 比においても、8990 は RLuc8.6-535 に比べて 2 倍程度良い S/N 比を示した。

この結果は、本発明の GLuc 変異体酵素を搭載した ツーハイブリットアッセイが、他の発光酵素を搭載したアッセイ系に比べて優れていることを示すものである。

[0036] 〔実施例 10〕 真核細胞を用いた生物発光特性の比較

本発明による GLuc 変異体酵素と従来の生物発光酵素との発光値の相違を計測した（図 17）。まず、それぞれの生物発光酵素を発現するプラスミドを真核培養細胞（COS-7）に導入した後、16 時間培養した。その後、細胞を回収し、ライセットを作成した。基質導入後の発光値をルミノメーターですぐ測定した。本発明者によって開発された GLuc 変異体酵素のうちの I90L と、公知の GLuc 変異体である M43I 変異体（非特許文献 12）及び上記 RLuc8.6-535 の発光値を比較してみた。その結果、当該発明による I90L は、従来の M43I や RLuc8.6-535 に比べて、5 倍から 20 倍の強い生物発光を示した。

[0037] 〔実施例 11〕 B16 皮膚癌細胞（melanoma）の体内転移のイメージング

本発明で用いた高輝度生物発光を呈する GLuc 変異体酵素の長所を生かして、生きたマウスの生体内における癌細胞の転移実験（metastasis）を行った結果を図 18 として示す。この実験のために、まず B16 皮膚癌細胞（melanoma）に従来の GLuc の遺伝子と本発明の高輝度生物発光酵素の I90L 遺伝子を導入し、16 時間培養した。その後、前記細胞をそれぞれ回収し、生きた生後 6 週齢 BALB/c ノードマウスに静脈注射した。その後、同様に基質をマウスの静脈に注射し、その生物発光を小動物イメージング装置（IVIS Lumina XR（Xenogen））で観察した。

その結果、マウス体内における生物発光強度は、肺部位が非常に強く光った（図 18A）。この際、特に I90L を発現する細胞を注射したマウスの方が

選択的に強い生物発光を示すことから、本発明で用いたGLuc変異体酵素を用いた方が生体内における癌の転移過程を観察する上で優位であることが分かった。

また、解剖を行い、その内臓をイメージングした結果からも、肺と子宮で強い生物発光を示していることが確認できた（図 18 B）。この結果は、図 18 A で観察された生物発光が、肺や子宮に転移した癌細胞によるものであることを裏付けている。この結果からも本発明のGLuc変異体酵素は、生体イメージング、特に癌組織の有無、癌細胞の転移等の観察においても非常に優れた性能を発揮できることが示される。

請求の範囲

- [請求項1] 外部刺激に応じた細胞内での標的遺伝子発現の時期又は発現量を解析するための分析法に用いるレポーター遺伝子であって、海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、ガウシアルシフェラーゼ（GLuc）のアミノ酸配列上の89～118位までに相当する位置のアミノ酸残基のうち少なくとも1残基が置換されており、当該置換が、同89位、90位、95位、97位、100位、108位、112位、115位、及び118位に相当する位置の少なくとも1つから選ばれた位置のアミノ酸残基に対して同類アミノ酸置換（conservative amino acid replacement）であり、それによって発光機能が向上した変異発光酵素をコードする遺伝子からなることを特徴とする、レポーター遺伝子。
- [請求項2] 前記変異発光酵素をコードする遺伝子が、海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の89位、90位、97位、108位、112位、115位、もしくは118位に相当する位置の疎水性アミノ酸残基から、他の疎水性アミノ酸残基への置換、又は同95位もしくは100位の位置の水素結合を形成する親水性アミノ酸残基から他の親水性アミノ酸残基への置換を含む同類アミノ酸置換が施された変異発光酵素をコードするものである、請求項1に記載のレポーター遺伝子。
- [請求項3] 前記同類アミノ酸置換が、海洋動物発光酵素のアミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の90位、108位、112位、115位、もしくは118位の位置に相当する位置のアミノ酸残基をロイシン（L）、トリプトファン（W）もしくはバリン（V）に置換するか、同89位もしくは97位の位置に相当する位置のアミノ酸残基をトリプトファン（W）に置換するか、同95位に相当する位置のアミノ酸残基をグルタミン酸（E）に置換するか、又は同100位に相当する位置のアミノ酸残基をアスパラギン（N）に置換することを含むものである、請求項2に記載のレポーター遺伝子。
- [請求項4] 前記変異発光酵素をコードする遺伝子が、前記海洋動物発光酵素の

アミノ酸配列において、GLucのアミノ酸配列上の90位に相当する位置のアミノ酸残基をロイシンに置換することを含む同類アミノ酸置換が施された変異発光酵素遺伝子である、請求項1～3のいずれかに記載のレポーター遺伝子。

[請求項5] 前記海洋動物発光酵素が、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) 並びにカイシアルシフェラーゼ (MLuc、MpLuc1、及びMpLuc2) から選択されたいずれかの発光酵素である、請求項1～4のいずれかに記載のレポーター遺伝子。

[請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載のレポーター遺伝子を、外部刺激に対する応答配列又は外部刺激の応答により形成される融合蛋白に対する応答配列の下流に含んでなる発現ベクター。

[請求項7] 請求項6に記載の発現ベクターが導入された形質転換細胞。

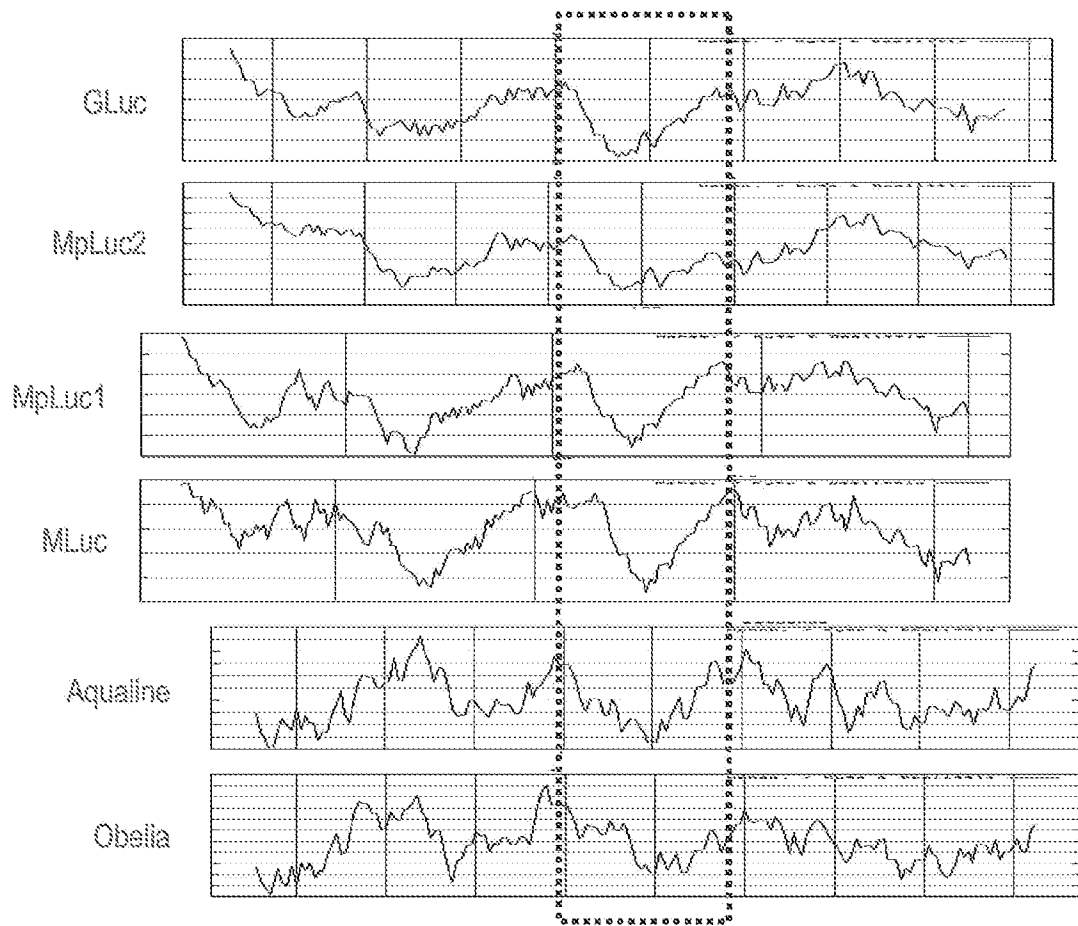
[請求項8] 請求項7に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とする、外部刺激に応じた細胞内での標的遺伝子発現の時期又は発現量を解析するための分析法。

[請求項9] 前記外部刺激の強さを、基質添加後のレポーター遺伝子の発現に基づく生物発光の強度の上昇速度 (RLU/sec)、又は応答曲線の面積を指標として定量化することを特徴とする、請求項8に記載の分析法。

[請求項10] 前記分析法が、レポータージーンアッセイ法又はツーハイブリットアッセイ法である、請求項8又は9に記載の分析法。

[請求項11] 請求項10に記載のツーハイブリッドアッセイ法を構成する3種類のプラスミドの比率のうち、レポーター発現用プラスミドの割合を他のプラスミドの2倍以上に高めたことを特徴とする、分析法。

[図1A]



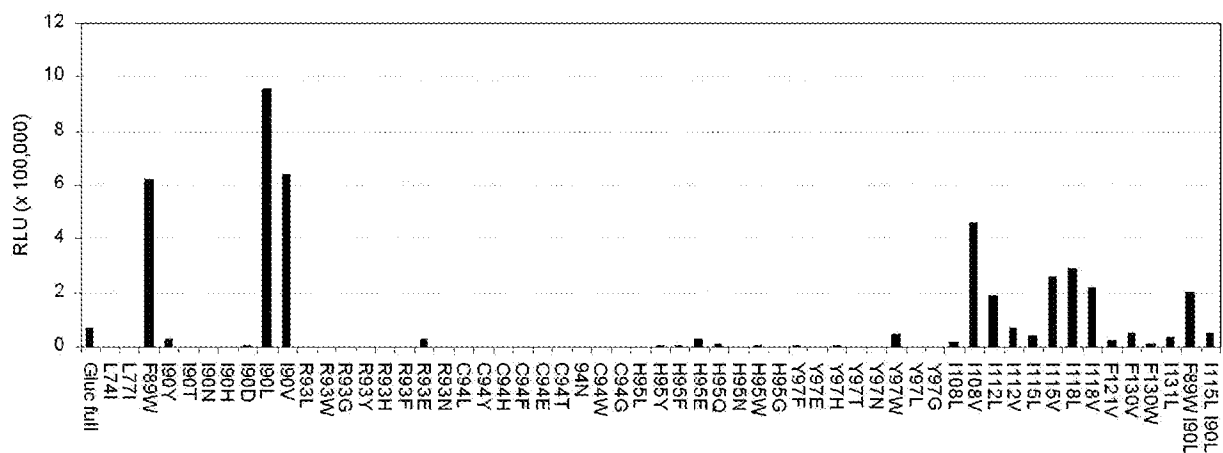
[図1B]

1 -MGVKVLFALICLVAAEAKPTENN-EDFNIVAVASNFATTOLDADR-----	GLuc
1 -MDIKVVETLVFSALVQAKSTEFD-PNIDIVGLEKFGITNLETDLFTIWETMEVMIKAD	MLuc
1 MMEIQVLFALICFALVQANPTENK-DDIDIVGVEGKFGTTDLETDLFTIVEDMNVISR--	MpLuc
1 -MGVKLIFAVLVCYAAQAATINENFEDIDVVAIGGSEA-LDVDANR-----	MpLuc
M @j@@F.@@o A -A . - j -o-@V.@ . F. -@-.-	
45 -----GKLPGKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPK	GLuc
59 IADTDNASNFVATETDANRCKMPGKKLPLAVIMEANAFKAGCTRGCLICLSKIKCTAK	MLuc
58 ---DTN-----LANSADRGKMPGKKLPLEVLIEMEANARKAGCTRGCLICLSKIKCTAK	MpLuc
45 -----GGHGGHPGKKMPKEVLVEMEANARKAGCHRGCLICLSHIKCTKK	MpLuc
. +G PGKK@P V@ EMEANA +AGC RGCLICLS+IKCT K	
86 MKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGTGEATVDIPEIPGFRDLPEMQFIAQVDLCVDCTTGCL	GLuc
119 MKVYIPGRCHDYGGDKKTQAGIVGAIVDIPEISGFKEMAPMEQFIAQVDRCASCTTGCL	MLuc
110 MKVYIPGRCHDYGGDKKTQAGIVGAIVDIPEISGFKELGPMQFIAQVDLCADCTTGCL	MpLuc
89 MKKFIPGRCHSYEGDKDSAQGGIGEEIYDMPEIPGFKDKEPMDQFIAQVDLCVDCTTGCL	MpLuc
MK \$IPGRCH Y GDKj..Q.GI IVD@PEI.GFK- PM-QFIAQVD C CTGCL	
146 KGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGD-	GLuc
179 KGLANVKCSLLKKWLPDRCAFADKIQKEVHNKGMAGDR	MLuc
170 KGLANVKCSALLKKWLPDRCAFADKIQSEVDNIKLAGDR	MpLuc
149 KGLANVHCSALLKKWLPSCRKTFASKIQSQVDTIKLAGDR	MpLuc
KGLANVJCS LLKKWLP RC .FA KIQ -Vj IKG .GD+	

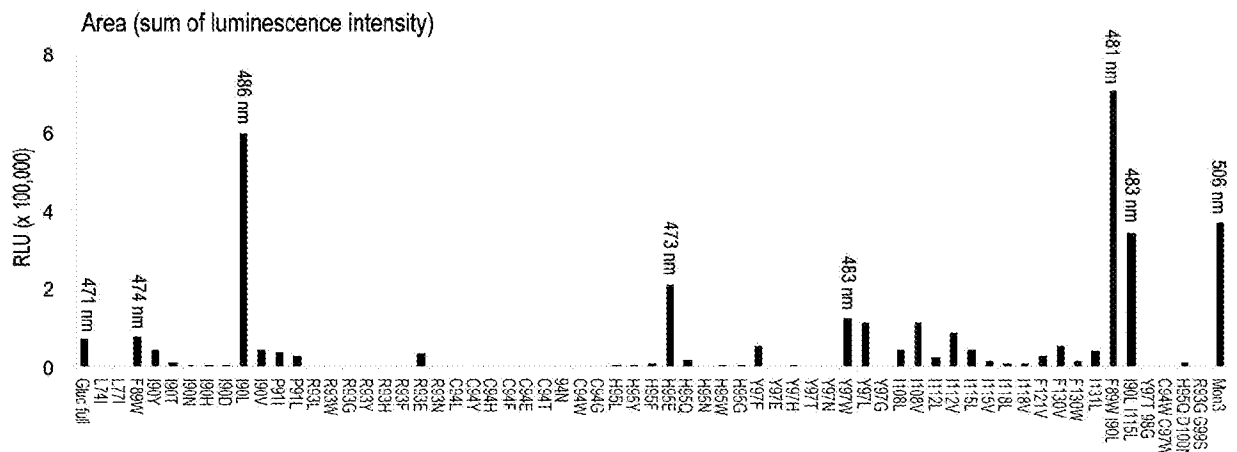
Hydrophobic (o)
hydrophilic (j)
small aliphatic (.)
large aliphatic (@)
aromatic (\$)
positive (+)
negative (-)

161 LPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGD 185

[図2B-1]

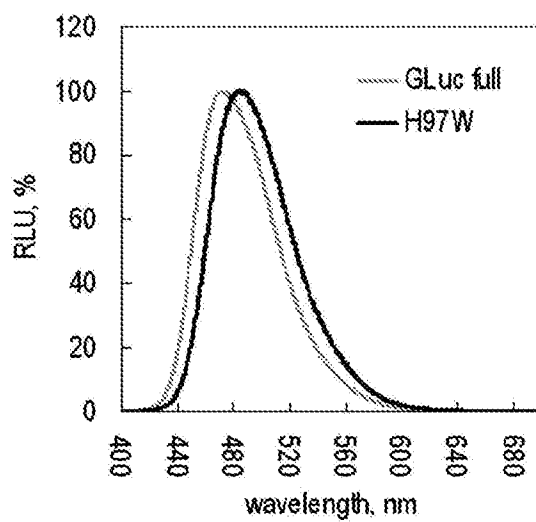
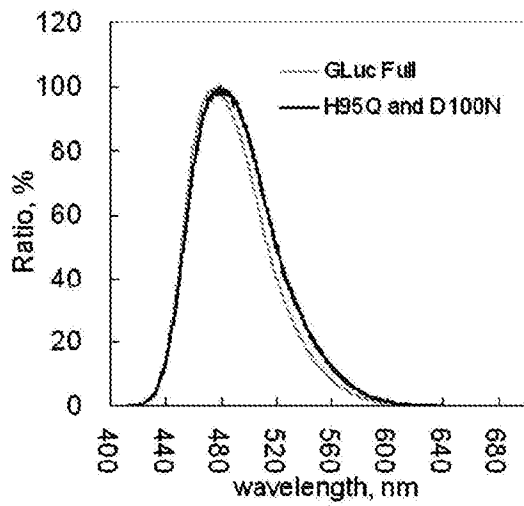
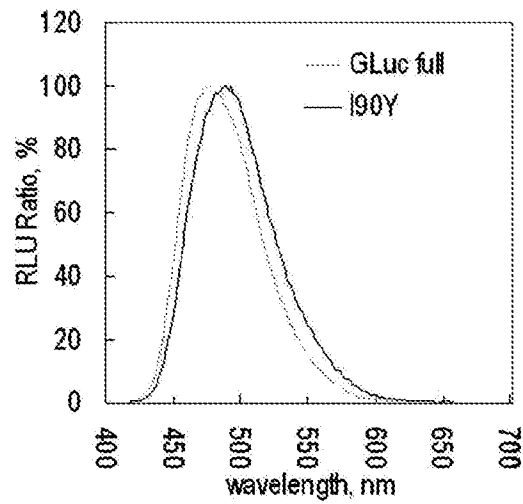


[図2B-2]



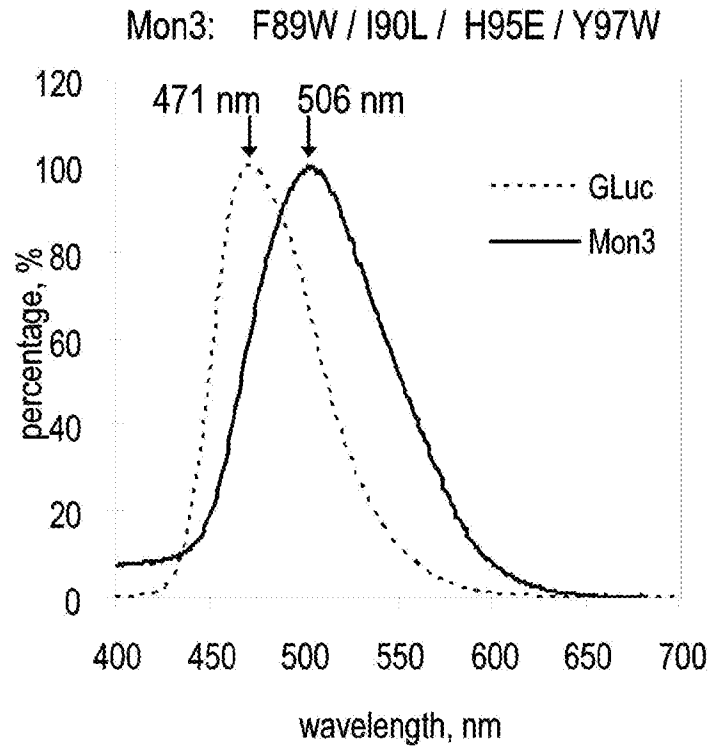
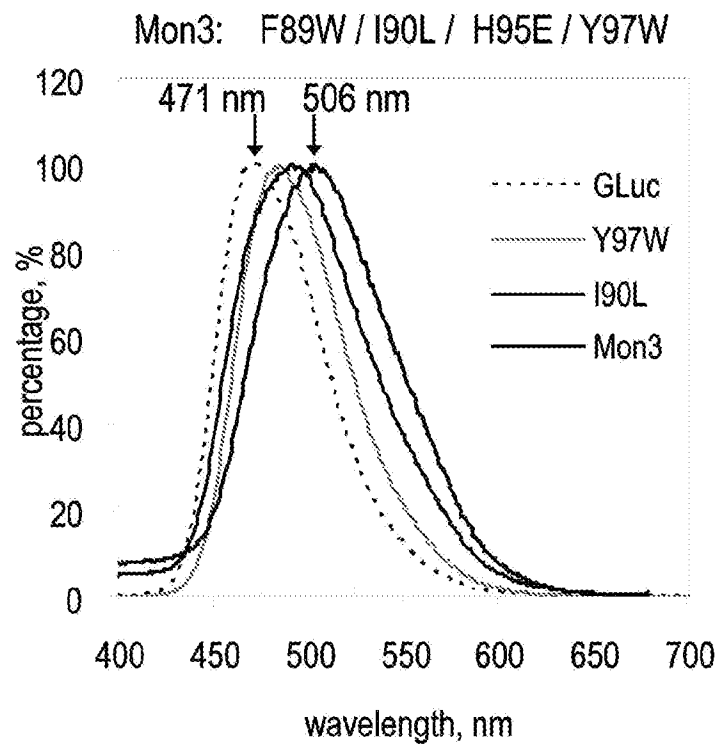
[図2C]

(C)

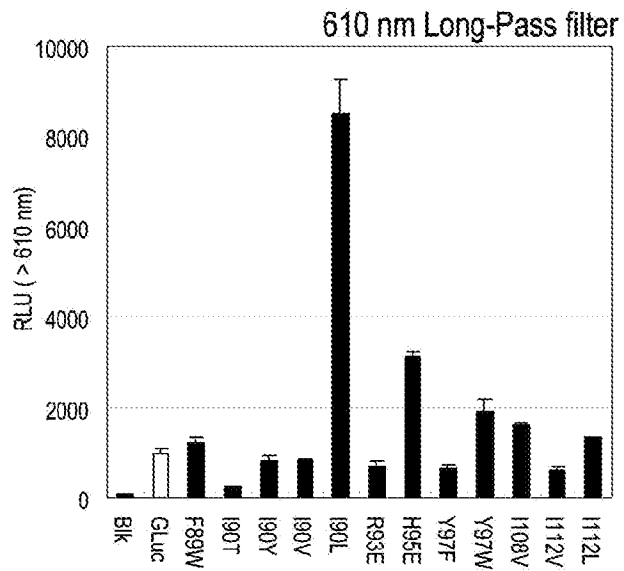


[図2D]

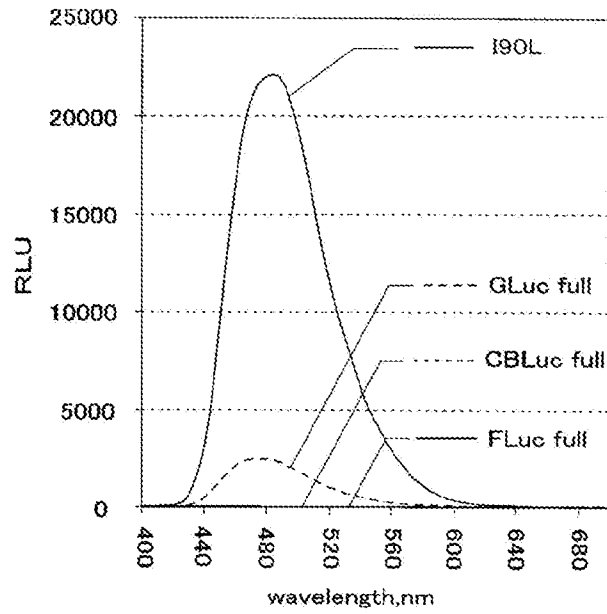
(D)



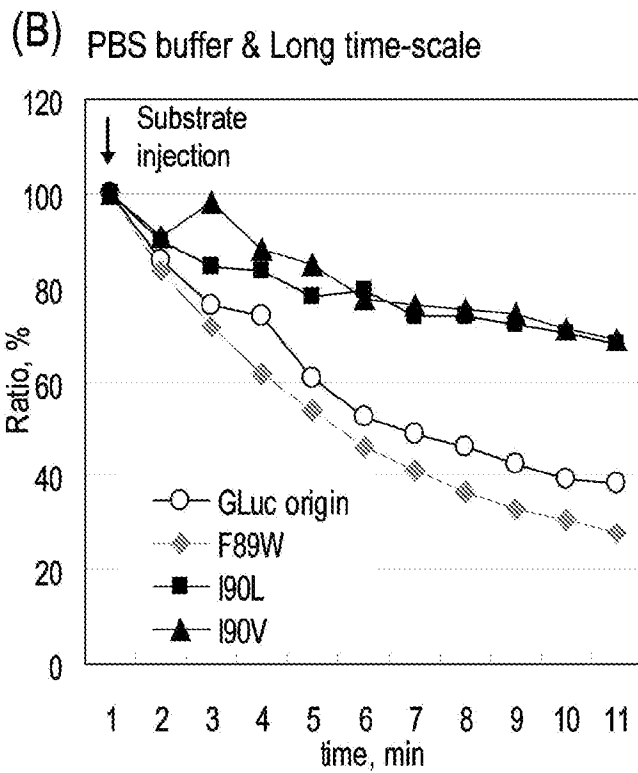
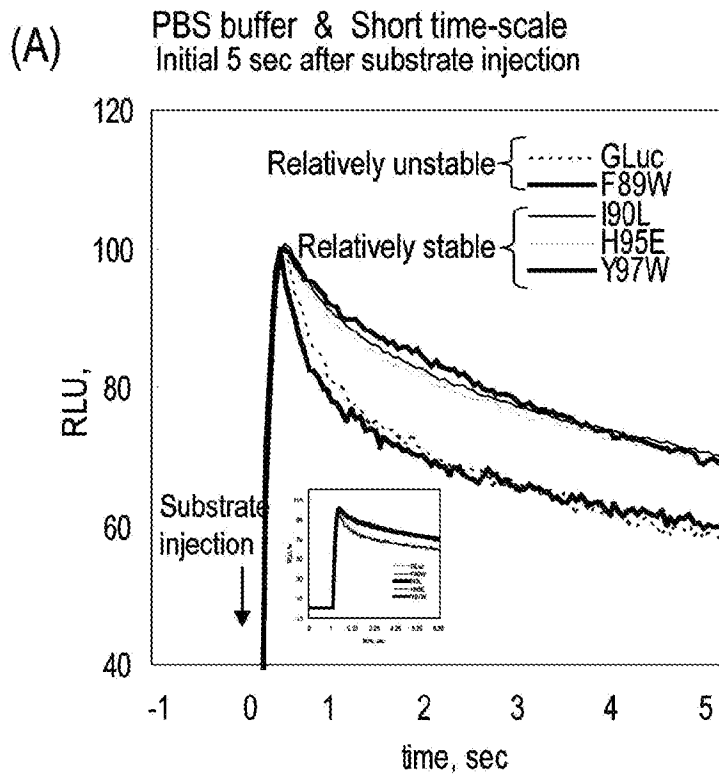
[図2E]



[図3]

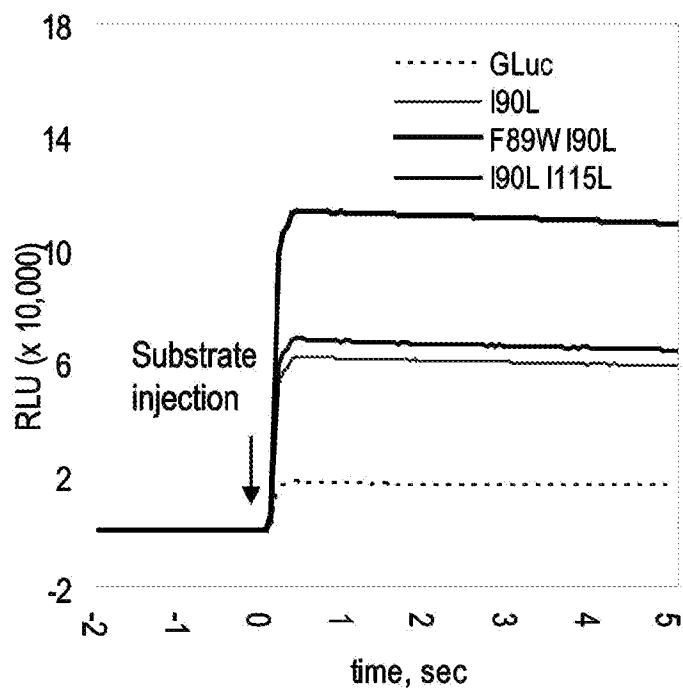


[図4AB]

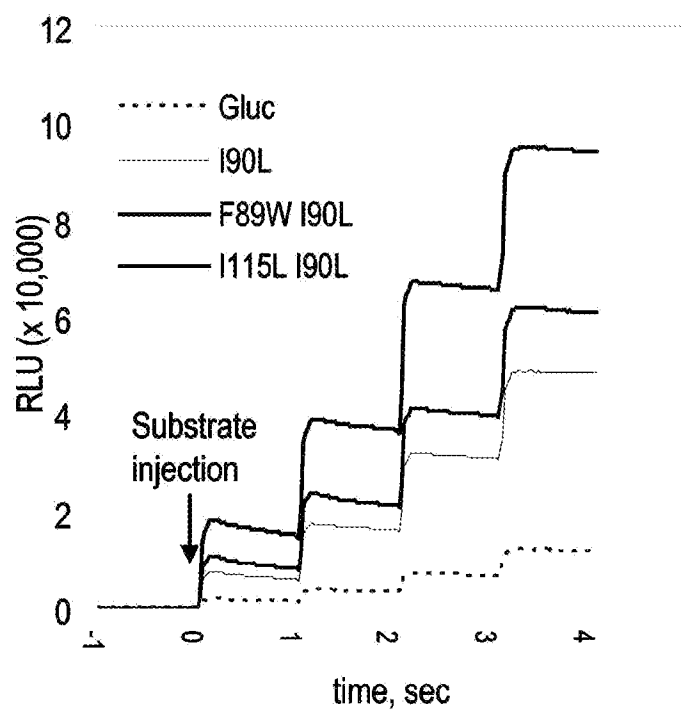


[図4CD]

(C)

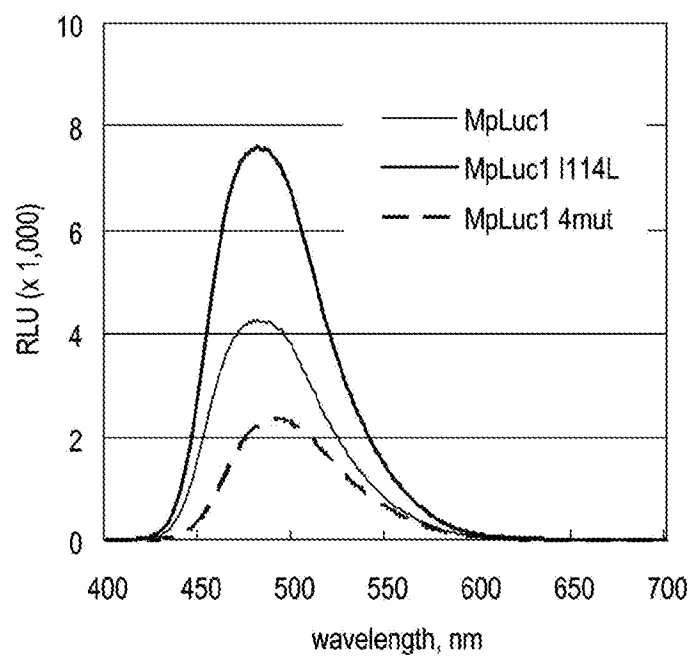


(D)



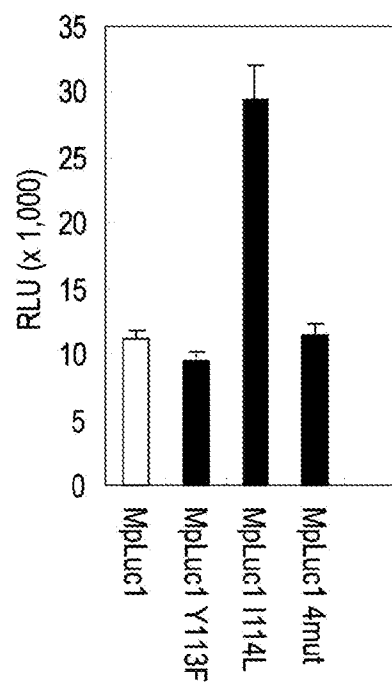
[図5AB]

(A)

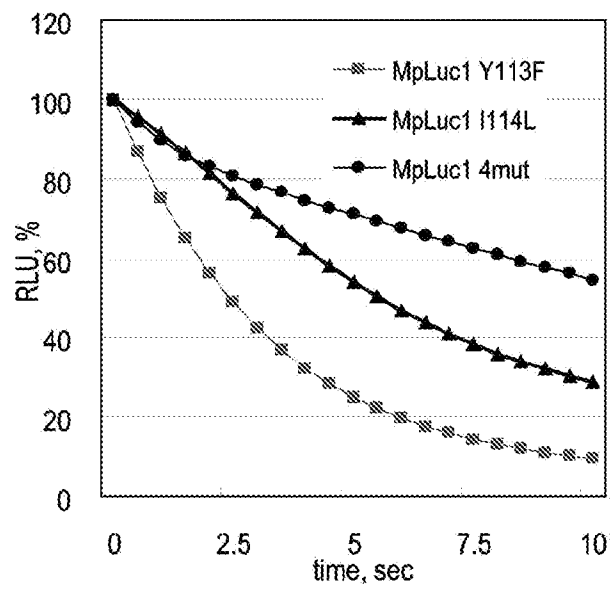


(B)

610 nm Long-Pass Filter

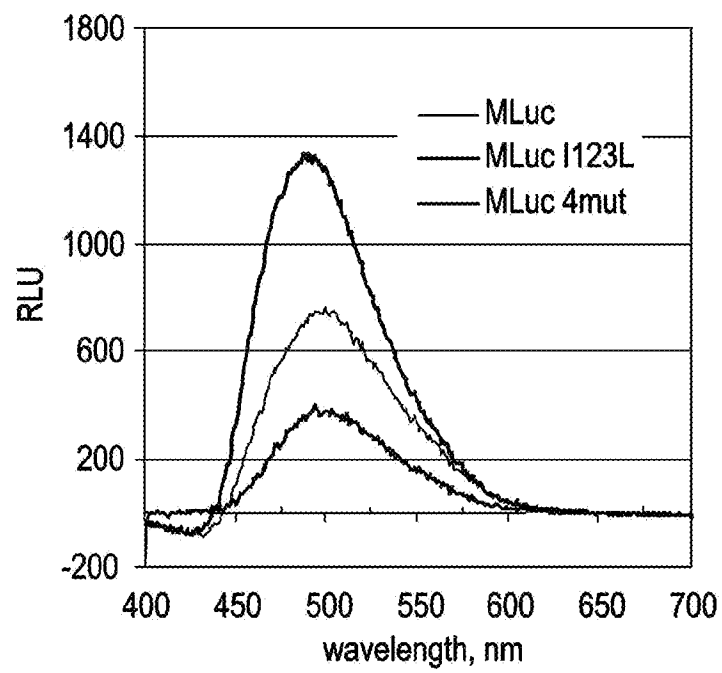


[図5C]

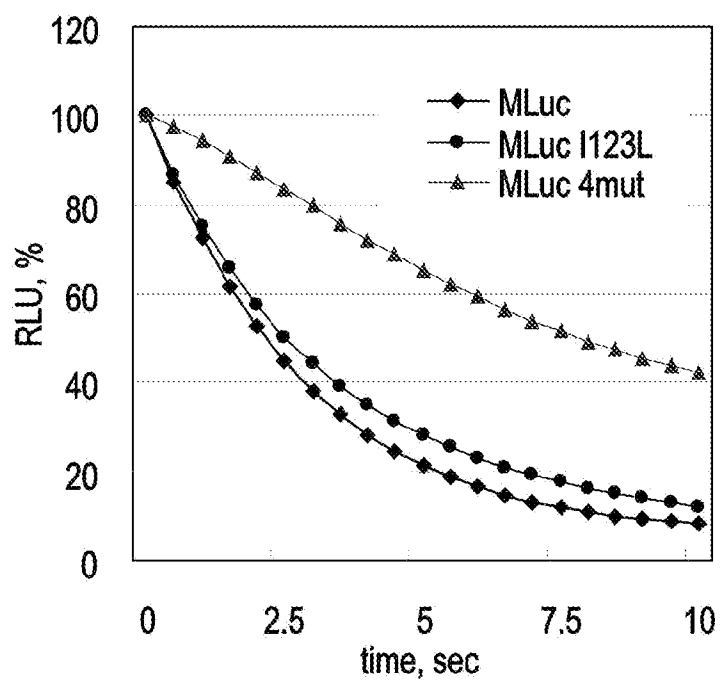


[図6AB]

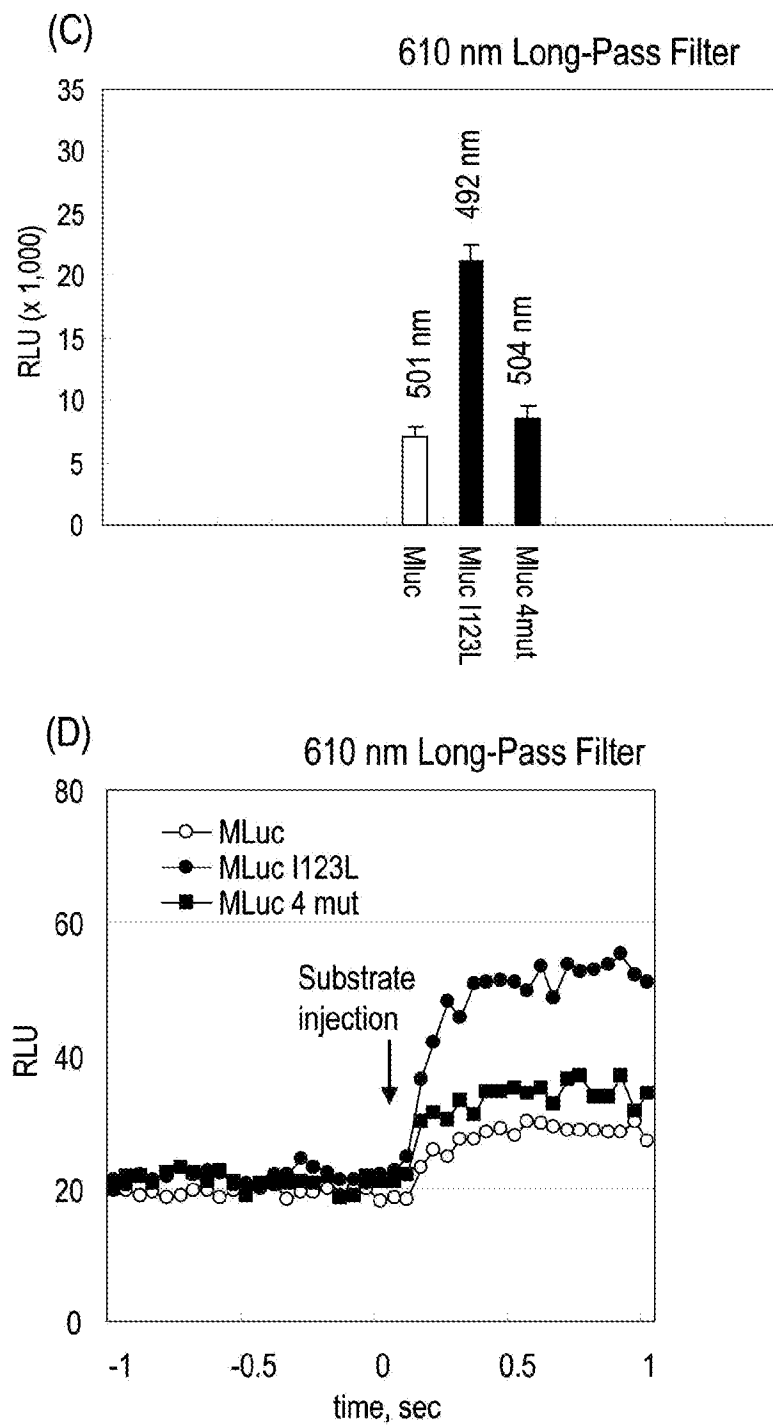
(A)



(B)



[図6CD]



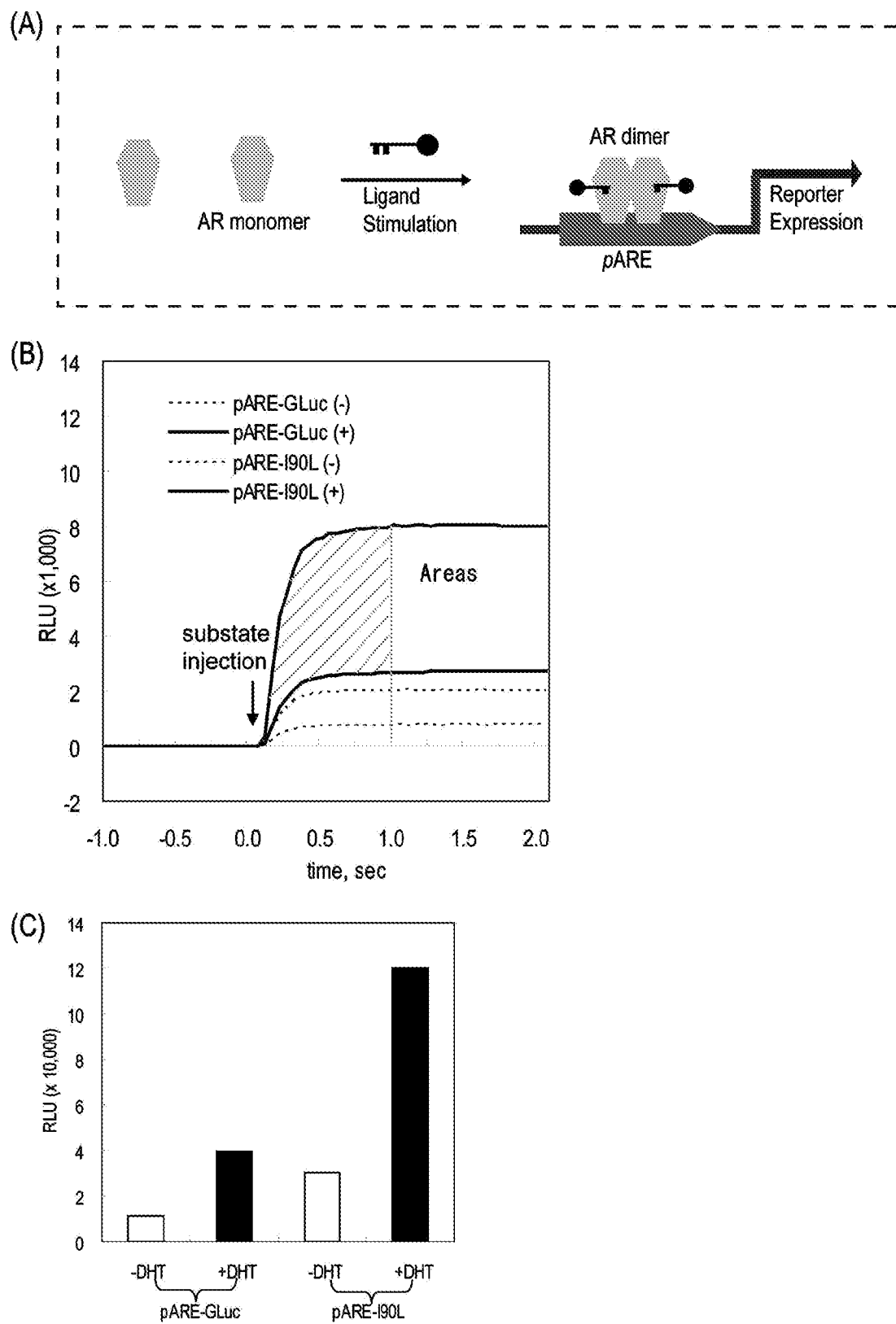
[図7A]

1	ATG	GGc	GTg	AAg	GTc	CTG	TTc	GCC	CTG	ATC	TGC	ATC	GCc	GTG	GCC	GAG	GCC	AAG	CCC	ACC	60
1	M	G	V	K	V	L	F	A	L	I	C	I	A	V	A	E	A	K	P	T	20
61	GAG	AAC	AAC	GAg	GAC	TTC	AAC	Att	GTG	GCC	GTG	GCC	AGC	AAC	TTt	GCG	ACC	ACG	GAc	CTC	120
21	E	N	N	E	D	F	N	I	V	A	V	A	S	N	F	A	T	T	D	L	40
121	GAc	GCc	GAt	CGC	GGG	AAG	TTG	CCC	GGa	AAG	AAG	CTG	CCG	CTG	GAG	GTc	CTC	AAG	GAG	ATG	180
41	D	A	D	R	G	K	L	P	G	K	K	L	P	L	E	V	L	K	E	M	60
181	GAg	GCC	AAc	GCC	CGG	AAg	GCc	GGC	TGC	ACC	AGG	GGa	TGc	CTG	ATC	TGC	CTG	TCC	CAC	ATt	240
61	E	A	N	A	R	K	A	G	C	T	R	G	C	L	I	C	L	S	H	I	80
241	AAG	TGC	ACG	CCC	AAG	ATG	AAG	AAG	TTC	c7C	CCc	GGc	CGC	TGC	CAC	ACC	TAC	GAg	GGa	GAC	300
81	K	C	T	P	K	M	K	K	F	L	P	G	R	C	H	T	Y	E	G	D	100
301	AAG	GAG	TCC	GCc	Cgc	GGC	GGt	ATc	GGa	GAG	GCG	ATt	GTC	GAt	ATc	CCg	GAG	ATa	CCg	GGG	360
101	K	E	S	A	R	G	G	I	G	E	A	I	V	D	I	P	E	I	P	G	120
361	TTt	AAG	GAt	TTG	GAG	CCC	ATG	GAG	CAG	TTC	ATC	GCg	CAG	GTC	GAt	CTt	TGc	GTG	GAC	TGC	420
121	F	K	D	L	E	P	M	E	Q	F	I	A	Q	V	D	L	C	V	D	C	140
421	ACg	ACg	GGC	TGC	CTC	AAg	GGG	CTc	GCC	AAC	GTG	CAG	TGc	TCc	GAC	CTG	CTC	AAG	AAG	TGG	480
141	T	T	G	C	L	K	G	L	A	N	V	Q	C	S	D	L	L	K	K	W	160
481	CTa	CCG	CAG	CGC	TGc	GCG	ACC	TTc	GCC	AGC	AAG	ATt	CAG	GGa	CAG	GTG	GAC	AAG	ATC	AAG	540
161	L	P	Q	R	C	A	T	F	A	S	K	I	Q	G	Q	V	D	K	I	K	180
541	GGG	GCC	GGc	GGa	tcC	AAG	GAC	GAG	CTG	Tga											570
181	G	A	G	G	S	K	D	E	L	*											190

[図7B]

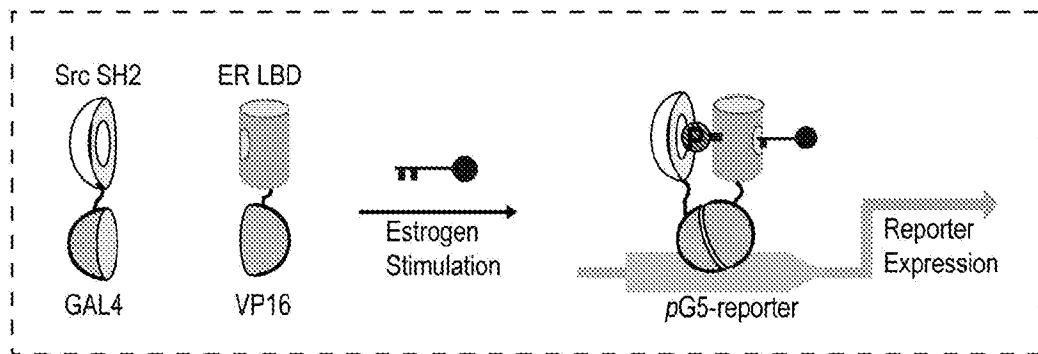
1	ATG	GGC	GTG	AAG	GTC	CTG	TTC	GCC	CTG	ATC	TGC	ATC	GCC	GTG	GCC	GAG					
1	M	G	V	K	V	L	F	A	L	I	C	I	A	V	A	E					
49	GCC	AAG	CCC	ACC	GAG	AAC	AAC	GAG	GAC	TTC	AAC	ATT	GTG	GCC	GTG	GCC	AGC	AAC	TTT	GCG	
17	A	K	P	T	E	N	N	E	D	F	N	I	V	A	V	A	S	N	F	A	
109	ACC	ACG	GAC	CTC	GAC	GCC	GAT	CGC	GGG	AAG	TTG	CCC	GGA	AAG	AAG	CTG	CCG	CTG	GAG	GTC	
37	T	T	D	L	D	A	D	R	G	K	L	P	G	K	K	L	P	L	E	V	
169	CTC	AAG	GAG	ATG	GAG	GCC	AAC	GCC	CGG	AAG	GCC	GGC	TGC	ACC	AGG	GGA	TGC	CTG	ATC	TGC	
57	L	K	E	M	E	A	N	A	R	K	A	G	C	T	R	G	C	L	I	C	
229	CTG	TCC	CAC	ATT	AAG	TGC	ACG	CCC	AAG	ATG	AAG	AAG	Tgg	CTC	CCC	GGC	CGC	TGC	gAg	ACC	
77	L	S	H	I	K	C	T	P	K	M	K	K	w	L	P	G	R	C	e	T	
289	Tgg	GAG	GGA	GAC	AAG	GAG	TCC	GCC	Cag	GGC	GGT	ATC	GGA	GAG	GCG	ATT	GTC	GAT	ATC	CCG	
97	w	E	G	D	K	E	S	A	q	G	G	I	G	E	A	I	V	D	I	P	
349	GAG	ATA	CCG	GGG	TTT	AAG	GAT	TTG	GAG	CCC	ATG	GAG	CAG	TTC	ATC	GCG	CAG	GTC	GAT	CTT	
117	E	I	P	G	F	K	D	L	E	P	M	E	Q	F	I	A	Q	V	D	L	
409	TGC	GTG	GAC	TGC	ACG	ACG	GGC	TGC	CTC	AAG	GGG	CTC	GCC	AAC	GTG	CAG	TGC	TCC	GAC	CTG	
137	C	V	D	C	T	T	G	C	L	K	G	L	A	N	V	Q	C	S	D	L	
469	CTC	AAG	AAG	TGG	CTA	CCG	CAG	CGC	TGC	GCG	ACC	TTC	GCC	AGC	AAG	ATT	CAG	GGA	CAG	GTG	
157	L	K	K	W	L	P	Q	R	C	A	T	F	A	S	K	I	Q	G	Q	V	
529	GAC	AAG	ATC	AAG	GGG	GCC	GGC	GGA	TCC	AAG	GAC	GAG	CTG	TGA							
177	D	K	I	K	G	A	G	G	S	K	D	E	L	*							

[図8]

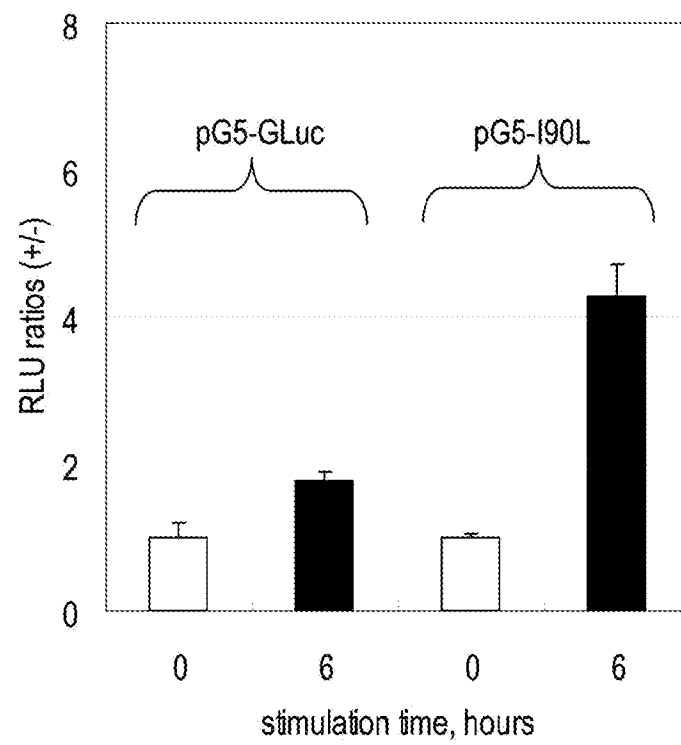


[圖9AB]

(A)

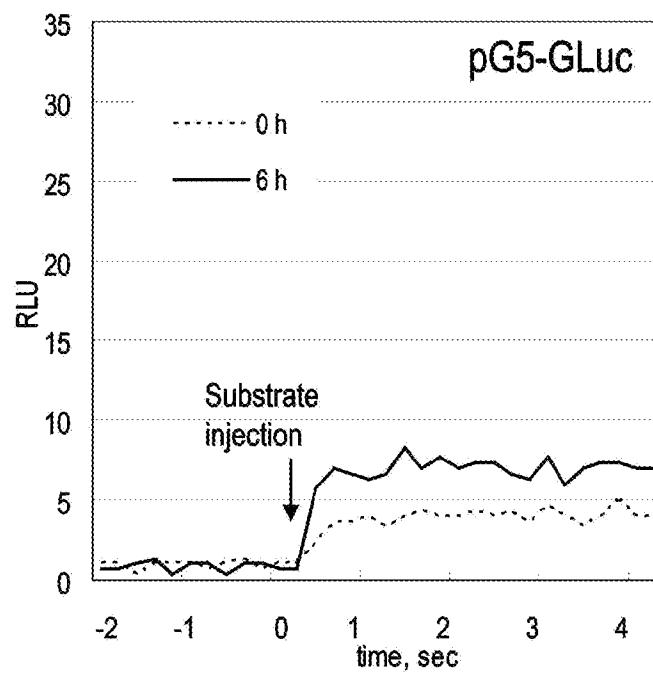


(B)

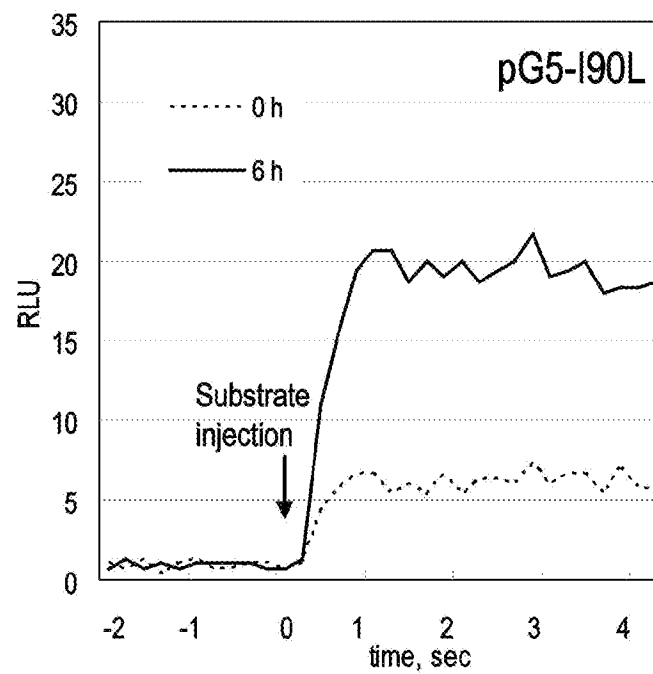


[図9CD]

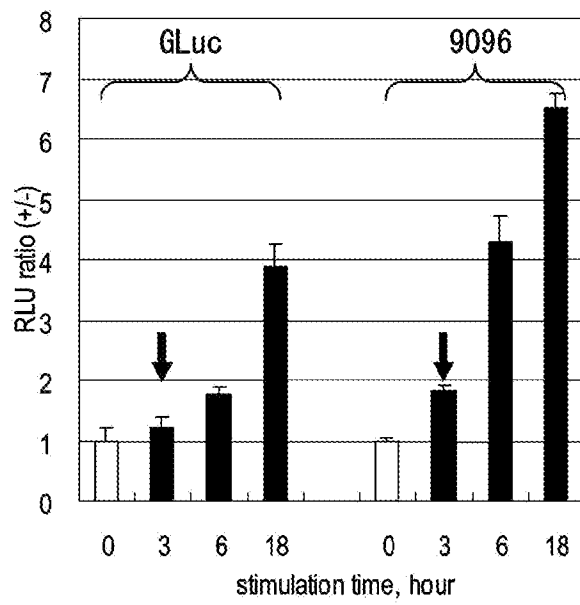
(C)



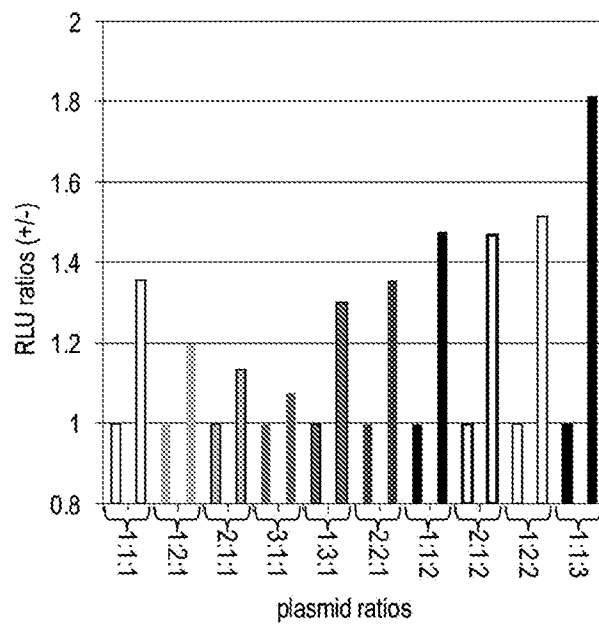
(D)



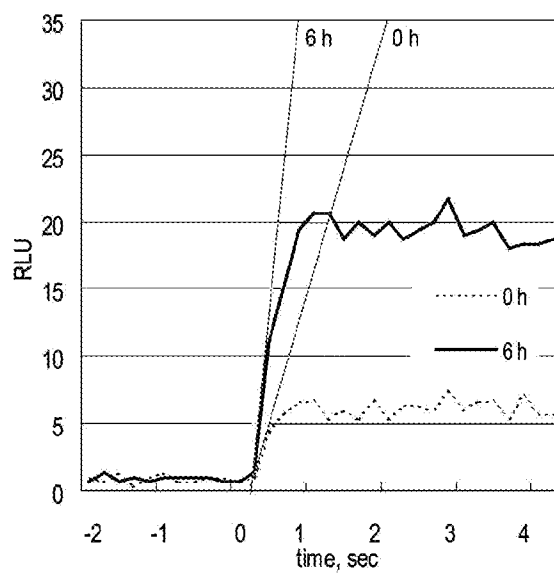
[図9E]



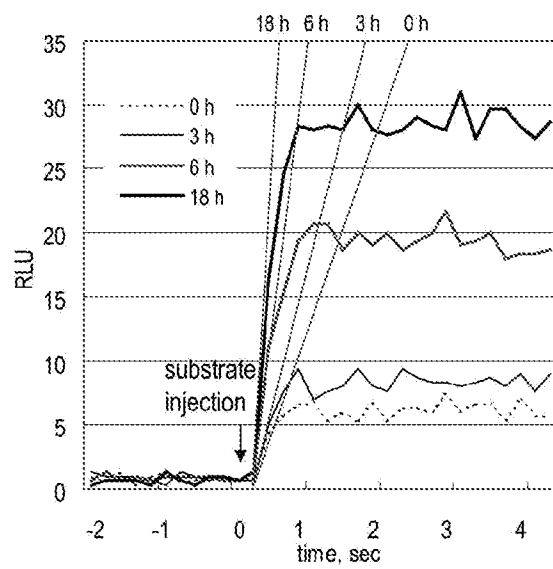
[図10]



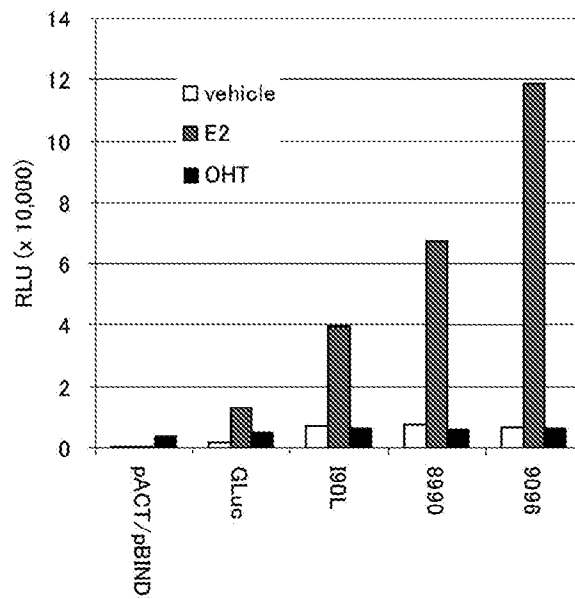
[図11A]



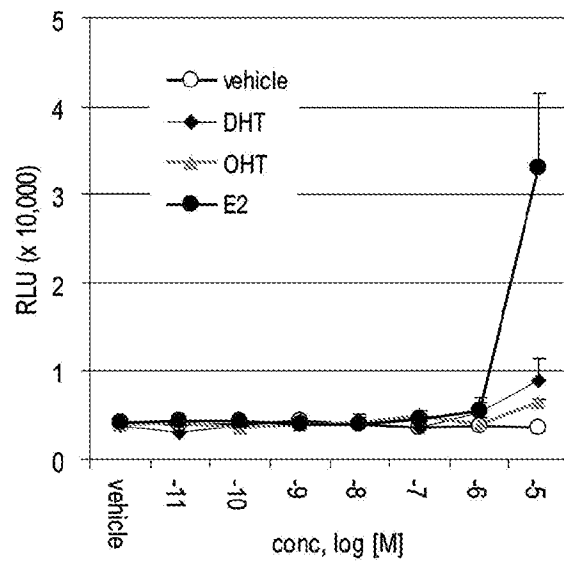
[圖11B]



[圖12]

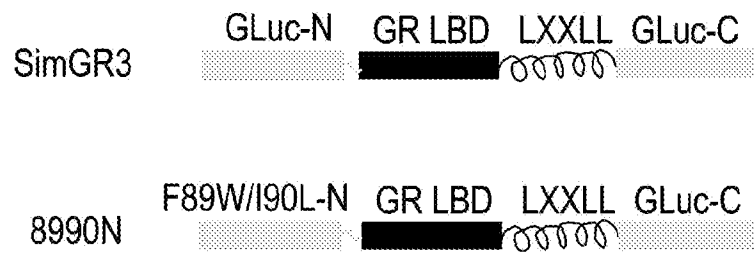


[圖13]

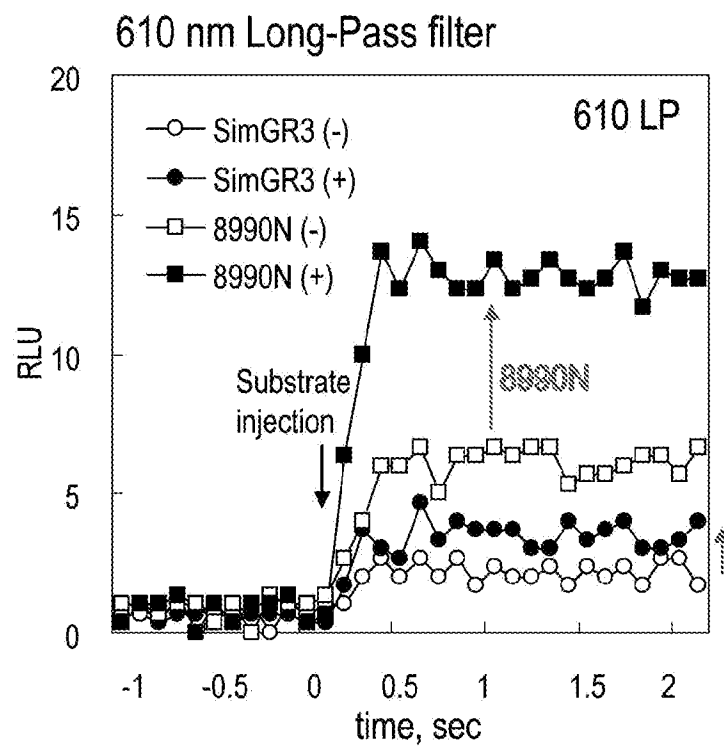


[図14]

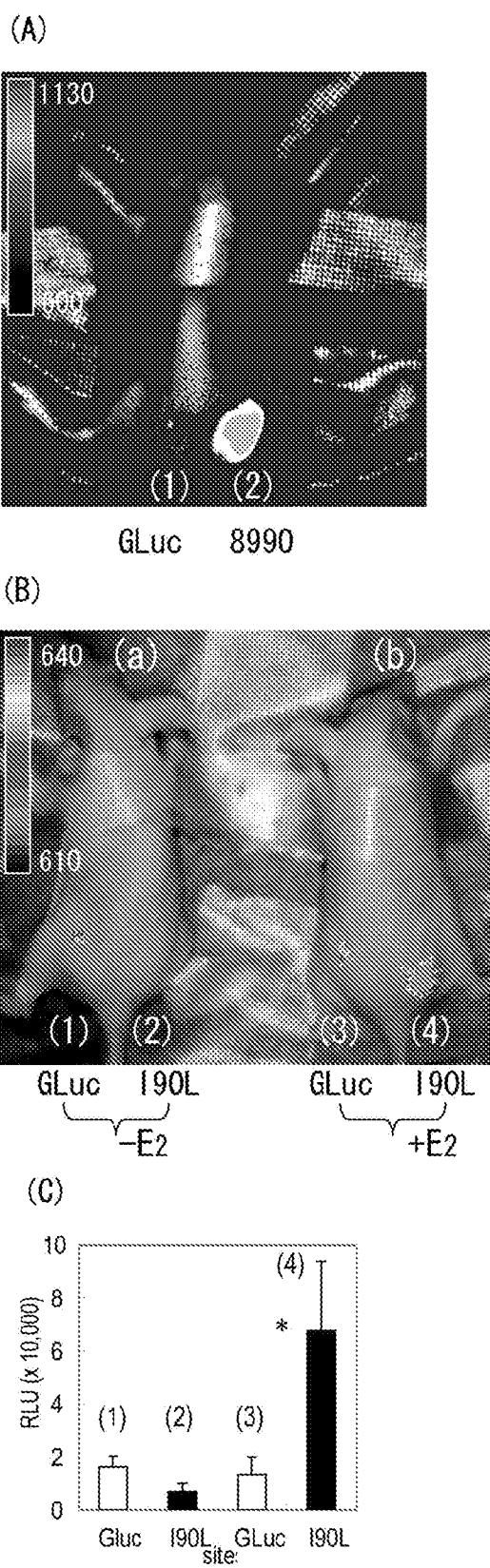
(A)



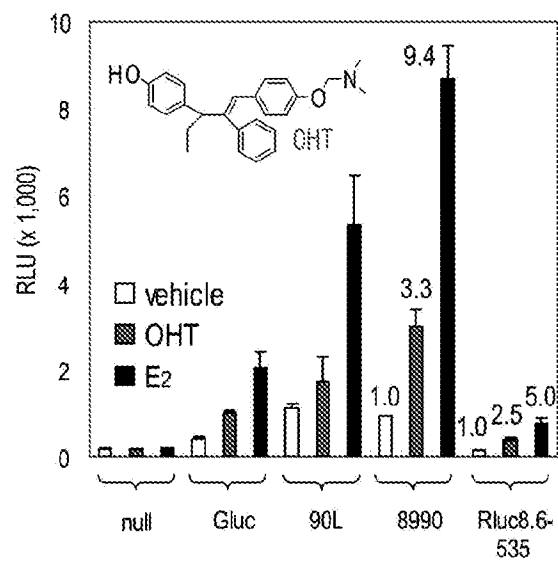
(B)



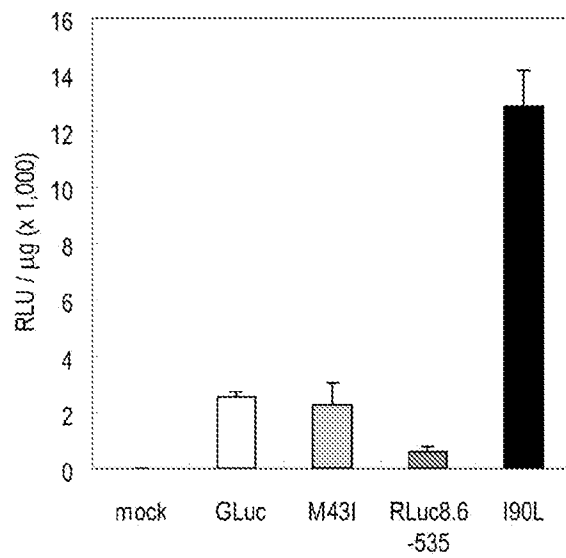
[図15]



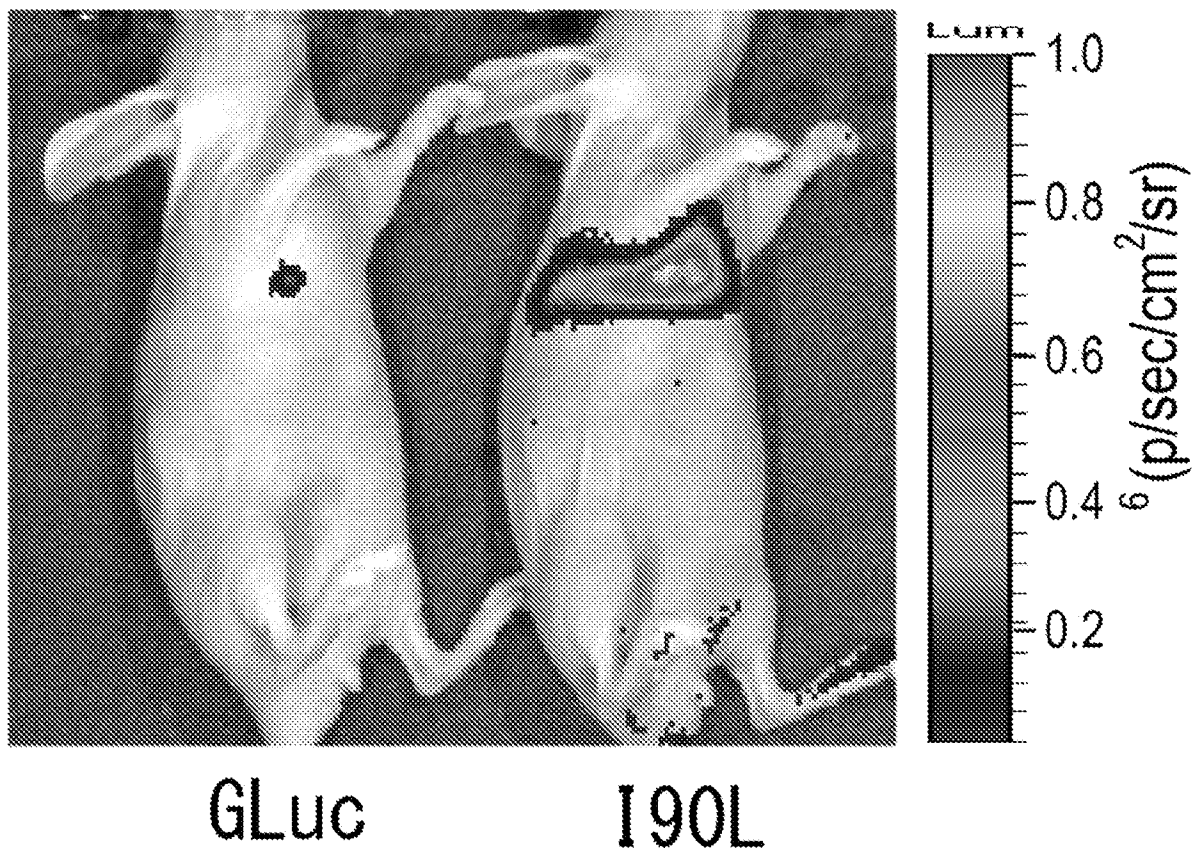
[図16]



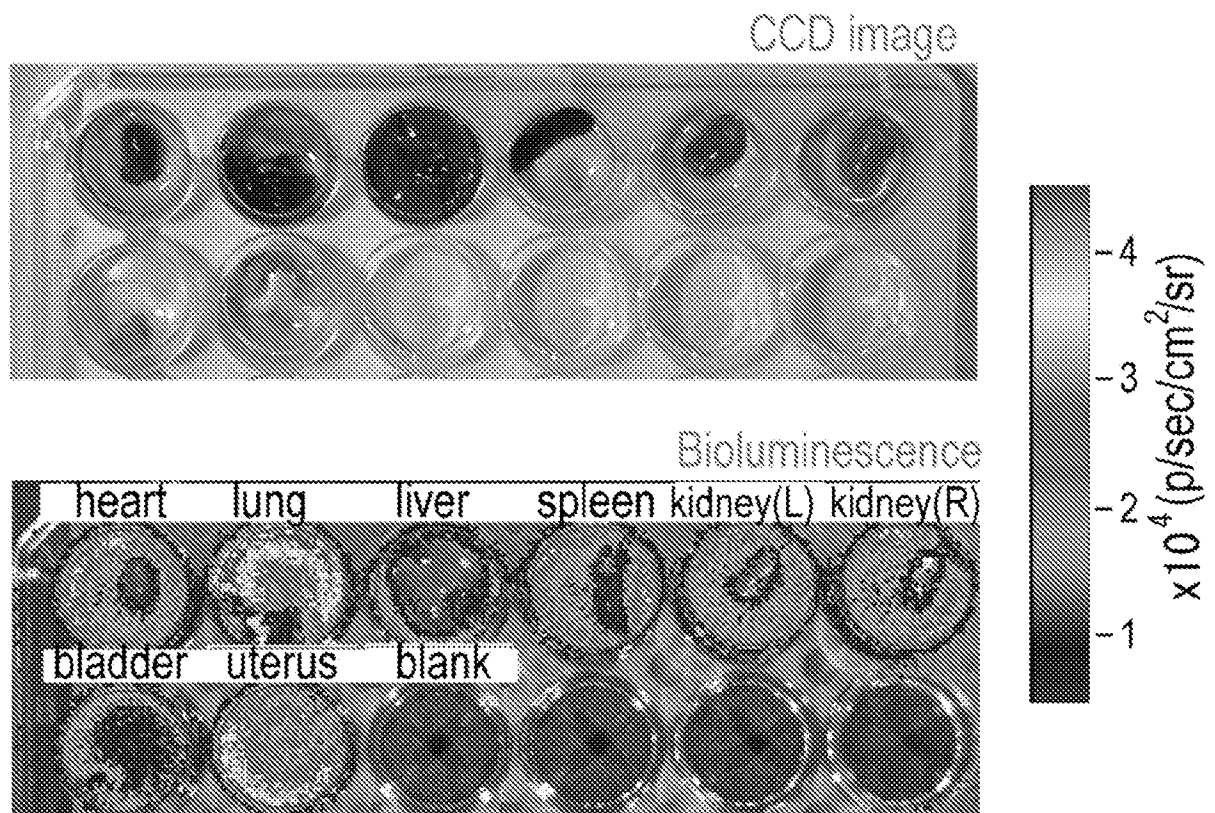
[図17]



[図18A]



[図18B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/050957

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-507410 A (PROLUME, LTD.), 12 March 2002 (12.03.2002), entire text & WO 1999/049019 A2 & CA 2324648 A & AU 3210399 A & EP 1064360 A2 & US 6232107 B1 & US 6436682 B1 & DE 69938293 D	1-11
A	INOUE, S. et al., Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod <i>Gaussia princeps</i> , Biochem.Biophys. Res.Commun., 2008, Vol.365, No.1, p.96-101	1-11
A	MAGUIRE, C.A. et al., <i>Gaussia</i> luciferase variant for high-throughput functional screening applications, Anal.Chem., 2009, Vol.81, No.16, p.7102-7106	1-11

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 April, 2011 (14.04.11)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2011 (26.04.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/050957

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WELSH, J.P. et al., Multiply mutated Gaussia luciferases provide prolonged and intense bioluminescence, Biochem.Biophys.Res.Comm., 2009, Vol.389, No.4, p.563-568	1-11
P,X	WO 2010/119721 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 21 October 2010 (21.10.2010), entire text (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

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

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2002-507410 A (プロルーム・リミテッド) 2002.03.12, 全文 & WO 1999/049019 A2 & CA 2324648 A & AU 3210399 A & EP 1064360 A2 & US 6232107 B1 & US 6436682 B1 & DE 69938293 D	1-11
A	INOUE, S. et al., Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod <i>Gaussia princeps</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, Vol. 365, No. 1, p. 96-101	1-11

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 6 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

9 2 8 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MAGUIRE, C. A. et al., Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications, Anal. Chem., 2009, Vol. 81, No. 16, p. 7102-7106	1-11
A	WELSH, J. P. et al., Multiply mutated Gaussia luciferases provide prolonged and intense bioluminescence, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, Vol. 389, No. 4, p. 563-568	1-11
P, X	WO 2010/119721 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2010. 10. 21, 全文 (ファミリーなし)	1-11