

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6506736号
(P6506736)

(45) 発行日 平成31年4月24日(2019.4.24)

(24) 登録日 平成31年4月5日(2019.4.5)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z N A Z

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6897 Z

C 4 O B 40/02 (2006.01)

C 4 O B 40/02

請求項の数 9 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-506776 (P2016-506776)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月11日(2014.4.11)
 (65) 公表番号 特表2016-519575 (P2016-519575A)
 (43) 公表日 平成28年7月7日(2016.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2014/075216
 (87) 国際公開番号 W02014/166429
 (87) 国際公開日 平成26年10月16日(2014.10.16)
 審査請求日 平成27年12月14日(2015.12.14)
 審判番号 不服2017-15885 (P2017-15885/J1)
 審判請求日 平成29年10月26日(2017.10.26)
 (31) 優先権主張番号 201310128492.8
 (32) 優先日 平成25年4月12日(2013.4.12)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 515153233
 上海 インスティテューツ フォー バイ
 オロジカル サイエンス、チャイニー
 ズ アカデミー オブ サイエンス
 SHANGHAI INSTITUTES
 FOR BIOLOGICAL SCI
 ENCES, CHINESE ACAD
 EMY OF SCIENCES
 中華人民共和国 200031 上海、ス
 ーフイ ディストリクト、ユエヤン ロ
 ード 319
 319 Yueyang Road, X
 uhui District, Shan
 ghai 200031 China

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の安定性を測定する方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造が下記式：

5' -A + B + C + D + E-3'

(ここで、

Aはプロモーターを、

Bは目的のタンパク質および第一の標識タンパク質で構成される融合タンパク質のコード配列を、

Cは連結ペプチドのコード配列を、

Dは第二の標識タンパク質のコード配列を、かつ

Eはターミネーターを表す。

ここで、BとDは置き換えることができる。))

で表される遺伝構築物であって、

Bに5' から3' の順で目的のタンパク質のコード配列および第一の標識タンパク質のコード配列が含まれ、

前記連結ペプチドは、ユビキチン、ユビキチンの短縮体、ユビキチンの突然変異体およびユビキチン様タンパク質、2 A ペプチドから選ばれ、および、

前記目的のタンパク質のコード配列は、ヒトゲノムライブラリー human ORFeome V5.1に おける任意の遺伝子であることを特徴とする、前記遺伝構築物。

【請求項 2】

前記連結ペプチドは、ユビキチンであることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝構築物

。

【請求項 3】

前記連結ペプチドは、K(R) 飽和突然変異のユビキチンであることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝構築物。

【請求項 4】

前記第一の標識タンパク質および第二の標識タンパク質は蛍光タンパク質であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか一項に記載の遺伝構築物。

【請求項 5】

構造が下記式：

$B1 + C1 + D1$

(ここで、

B1 は目的のタンパク質および第一の標識タンパク質で構成される融合タンパク質を、

C1 は連結ペプチドを、かつ

D1 は第二の標識タンパク質を表す。

ここで、B1 と D1 は置き換えることができる。))

で表されるポリペプチドであって、

該ポリペプチドが、請求項 1 に記載の遺伝構築物によってコードされることを特徴とする、前記ポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の遺伝構築物を含むベクター。

【請求項 7】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の遺伝構築物または請求項 6 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の細胞で構成される細胞ライブラリー。

【請求項 9】

一つまたは複数の目的のタンパク質の安定性を測定する方法であって、

(1) 請求項 8 に記載の細胞ライブラリーを構築する工程と、

(2) 特定の条件およびコントロールの条件で (1) で得られた細胞ライブラリーを培養する工程と、

(3) 前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞ライブラリーにおける第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比を測定する工程と、

(4) 前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞系における第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比を比較することによって目的のタンパク質の安定性に变化があるか確認する工程、あるいは

フローサイトメトリー技術を使用し、第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比によって細胞を n の区間 ($n \geq 2$) に分け、かつ DNA チップ技術によって各区間における目的の遺伝子のそれぞれの発現量を検出して目的の遺伝子の各区間における分布状況を算出し、かつ前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞系における目的の遺伝子の分布状況を比較し、目的の遺伝子によってコードされるタンパク質の安定性に变化があるか確認する工程と、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質の測定の分野に関する。具体的に、本発明は、タンパク質の安定性を測定する方法およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

タンパク質レベルの動的変化は、細胞の活力の維持および生命活動の進行の基本特徴および必要な前提である。どんな時でも、細胞における特定のタンパク質のレベルは、その合成と分解過程の間の動的平衡によって決まる。タンパク質の合成は、主にリボソームで行われ、現在、タンパク質の合成およびその調節の過程に対して比較的に明らかになってきた。

【 0 0 0 3 】

人類のタンパク質の分解過程に対する研究は、1980年代から始まり、近年、現代生物学の一つの非常に重要な研究分野になってきた。これはすべてのタンパク質が適切な時点で分解されないと、細胞の基本的な生命過程、たとえば細胞周期の進行ができないからである。損傷したあるいはフォールディングが間違っただ多くのタンパク質も分解されないと、正常の細胞機能が影響され、たとえば癌、神経変性疾患などにつながることは、数え切れない証拠によって示された (C. RaiborgおよびH. Stenmark, 2009; Christian Hirschら, 2009; Steven BerginkおよびStefan Jentsch, 2009)。

【 0 0 0 4 】

多くの疾患の病理過程は、タンパク質分解の経路の異常に関連し (Salvatore Oddo, 2008; Jeffrey H Kordower, 2008; Jianjun Wang, 2008)、多くの腫瘍細胞とウイルスもユビキチン・プロテアソーム系を利用してタンパク質の分解を妨害することによって、腫瘍細胞の拡散または宿主細胞への侵入を実現する (Daniela HoellerおよびIvan Dikic, 2009)。現在、タンパク質の分解経路に影響を与える多くの薬物はすでに開発されたか、または開発されている。既存の研究結果および臨床試験のデータは、いずれもこのような薬物は現在治療が困難な疾患に非常に高い潜在の薬用価値があることを示した (Matthew D Petroski, 2008; Grzegorz Nalepa, 2006)。

【 0 0 0 5 】

そのため、タンパク質の安定性の差異・変化に対する研究は、相応のタンパク質に関連する疾患の予測、および発症、病因、治療薬のスクリーニングなどにおいてすべて重要なヒントになっており、タンパク質の安定性の異常な変化の検出は発症の機序の研究に特に重要である。現在、主な方法は、シクロヘキシミドによる経時変化実験でタンパク質の安定性を測定する。しかし、この方法は、仕事量が多いだけでなく、プロテオミクスの範囲内のタンパク質の差異・変化の研究には無力である。同時に、当該方法は、実験の複雑性によって薬物のハイスループットスクリーニングに適用することができない。

タンパク質チップ技術は、一回で多くのタンパク質の安定性を測定することができるが、抗体の適用性のため、そのスループットが限られ、また当該技術の実用性も大きく制限される。質量分析技術を使用すると、大規模のサンプルで、プロテオミクスの範囲内のタンパク質の安定性の変化を検出することができるが、質量分析技術の識別能力は限られ、存在度の低いタンパク質の安定性の変化は検出できない。

【 0 0 0 6 】

細胞生物学および分子生物学の分野において、蛍光タンパク質分子は幅広く応用されている。蛍光タンパク質は、よくレポーター遺伝子として使用され、目的のタンパク質の細胞における部位を識別し、またFACS技術と組み合わせ、目的のタンパク質分子の細胞における存在度の相対的な定量を行うことができる。

そのため、本分野では、全ゲノム範囲内のタンパク質の安定性の測定へ幅広い応用が実現可能で、かつハイスループットの小分子化合物のスクリーニングに使用しやすい新規な測定方法が切望されている。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本発明の目的は、タンパク質の安定性の測定に使用できる融合タンパク質および前記融合タンパク質をコードする遺伝構築物、前記遺伝構築物を含むベクター、前記遺伝構築物またはベクターを含む細胞、および前記細胞で構成されるライブラリーならびにタンパク質の安定性を測定する方法および応用を提供することである。本発明の方法は、タンパク質の安定性の測定に対して感度および特異性が高いだけでなく、操作も簡便である。

【 0 0 0 8 】

第一では、本発明は、構造が下記式で表される遺伝構築物を提供する。

5' -A + B + C + D + E-3'

(ここで、

Aはプロモーターを、

Bは目的のタンパク質および第一の標識タンパク質で構成される融合タンパク質のコード配列を、

Cは連結ペプチドのコード配列を、

Dは第二の標識タンパク質のコード配列を、かつ

Eはターミネーターを表す。

ここで、BとDは置き換えることができる。))

好適な実施形態において、前述プロモーターは、CMVプロモーターである。

【 0 0 0 9 】

もう一つの好適な実施形態において、Bに5' から3' の順で目的のタンパク質のコード配列および第一の標識タンパク質のコード配列が含まれる。

もう一つの好適な実施形態において、前記連結ペプチドは、ユビキチン、ユビキチンの短縮体、ユビキチンの突然変異体およびユビキチン様タンパク質、2 A ペプチドなどから選ばれ、好ましくはユビキチンで、最も好ましくはK(R) 飽和突然変異のユビキチンである。

好適な実施形態において、前記第一の標識タンパク質および第二の標識タンパク質は蛍光タンパク質である。

好適な実施形態において、前記蛍光タンパク質はEGFPまたはRFPから選ばれ、好ましくは第一の標識タンパク質はEGFPで、第二の標識タンパク質はRFPである。

好適な実施形態において、前記EGFPはmEGFPで、前記RFPはmRFPである。

好適な実施形態において、前記蛍光タンパク質のC末端またはN末端に一つまたは複数のタグタンパク質、たとえばFlagまたはmycが融合している。

もう一つの好適な実施形態において、前記目的のタンパク質のコード配列は、ヒトゲノムライブラリー-human ORFeome V5.1における全部の遺伝子を含む。

【 0 0 1 0 】

第二では、本発明は、構造が下記式で表されるポリペプチドを提供する。

B1 + C1 + D1

(ここで、

B1は目的のタンパク質および第一の標識タンパク質で構成される融合タンパク質を、

C1は連結ペプチドを、かつ

D1は第二の標識タンパク質を表す。

ここで、B1とD1は置き換えることができる。))

好適な実施形態において、前記ポリペプチドにおける各部分の順番は、標的のタンパク質、第一の標識タンパク質、連結ペプチドおよび第二の標識タンパク質で、あるいは第二の標識タンパク質、連結ペプチド、標的のタンパク質および第一の標識タンパク質である。

好適な実施形態において、前記ポリペプチドは請求項1に記載の遺伝構築物によってコードされる。

【 0 0 1 1 】

もう一つの好適な実施形態において、前記連結ペプチドは、ユビキチン、ユビキチンの突然変異体およびユビキチン様タンパク質、2 A ペプチドなどから選ばれ、好ましくはユビキチンで、最も好ましくはK(R)突然変異のユビキチンである。

もう一つの好適な実施形態において、前記第一の標識タンパク質および第二の標識タンパク質は蛍光タンパク質である。

もう一つの好適な実施形態において、前記蛍光タンパク質はEGFPまたはRFPから選ばれ、好ましくは第一の標識タンパク質はEGFPで、第二の標識タンパク質はRFPである。

10

20

30

40

50

もう一つの好適な実施形態において、前記EGFPはmEGFPで、前記RFPはmRFPである。

もう一つの好適な実施形態において、前記蛍光タンパク質のC末端またはN末端に一つまたは複数のタグタンパク質、たとえばFlagまたはmycが融合している。

もう一つの好適な実施形態において、前記目的のタンパク質は、ヒト細胞全ゲノムライブラリーhuman ORFeome V5.1における読み枠によってコードされる全部のタンパク質を含む。

【0012】

第三では、本発明は、本発明の第一に記載の遺伝構築物を含むベクターを提供する。

好適な実施形態において、前記ベクターは、レトロウイルスプラスミド、レンチウイルスプラスミドなどの受容細胞のゲノムに組み込むことが可能なプラスミドでもよい。

10

【0013】

第四では、本発明は、本発明の第一に記載の遺伝構築物または本発明の第三に記載のベクターを含む細胞を提供する。

第五では、本発明は、本発明の第四に記載の細胞で構成される細胞ライブラリーを提供する。

好適な実施形態において、前記の細胞は、哺乳動物細胞である。

もう一つの好適な実施形態において、前記の哺乳動物細胞は、霊長類細胞またはヒト細胞で、好ましくは前記哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。

もう一つの好適な実施形態において、前記哺乳動物細胞は、293細胞、293T細胞、293FT細胞、Hela細胞、NIH3T3細胞、癌細胞、幹細胞などを含むが、これらに限定されない。

20

【0014】

第六では、本発明は、一つまたは複数の目的のタグタンパク質の安定性を測定する方法であって、

(1) 本発明の第五に記載の細胞ライブラリーを構築する工程と、

(2) 前記特定の条件およびコントロールの条件で(1)で得られた細胞ライブラリーを培養する工程と、

(3) 前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞ライブラリーにおける第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比を測定する工程と、

(4) 前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞系における第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比を比較することによって目的のタンパク質の安定性に变化があるか確認する工程、あるいは

30

フローサイトメトリー技術を使用し、第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比によって細胞をnの区間($n \geq 2$)に分け、かつDNAチップ技術によって各区間における目的の遺伝子のそれぞれの発現量を検出して目的の遺伝子の各区間における分布状況を算出し、かつ前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞系における目的の遺伝子の分布状況を比較し、目的の遺伝子によってコードされるタンパク質の安定性に变化があるか確認する工程と、

を含む方法を提供する。

【0015】

好適な実施形態において、前記特定の条件は、刺激と摂動、たとえば薬物のような化学的刺激を与えることでもよく、遺伝子の過剰発現、遺伝子のノックアウトまたはRNA干渉でもよく、ウイルスの感染、安定導入、プラスミドの一過性導入でもよく、コントロールの条件のままでよい。

40

好適な実施形態において、前記特定の条件は、測定される化合物との接触、ストレス、輻射などの条件で、好ましくは前記特定の条件は、測定される化合物との接触である。

好適な実施形態において、フローサイトメトリー技術を使用し、第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比、すなわち、蛍光タンパク質の蛍光強度の比を検出する。

好適な実施形態において、前記の区間の数は、8である。

好適な実施形態において、前記目的のタンパク質は、ヒト細胞全ゲノムライブラリーhuman ORFeome V5.1における全部のORFによってコードされるタンパク質である。

50

【 0 0 1 6 】

もちろん、本発明の範囲内において、本発明の上記の各技術特徴および下記（例えば実施例）の具体的に記述された各技術特徴は互いに組合せ、新しい、または好ましい技術方案を構成できることが理解される。紙数に限りがあるため、ここで逐一説明しない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1 A - D】図1aは、二蛍光プラスミドの構造概略図を示す。図1bは、二蛍光プラスミドシステムでタンパク質の相対的安定性を測定する原理を示す。図1cは、融合タンパク質 ORFのないmEGFPの安定性が良く、mRFPと分子モル量で安定した1:1の関係になることを示す。図1dは、二蛍光プラスミドシステムは抗癌薬物ボルテゾミブ（Bortezomib）の基質であるタンパク質RGS4のスクリーニングに成功し、陰性タンパク質は変わらないことを示す。そして、ウエスタンのデータによって検証された。

10

【図 2 A - D】図2aは、二蛍光細胞ライブラリーで全ゲノムの範囲内のタンパク質の安定性を測定する試験流れ図を示す。図2bは、二蛍光細胞ライブラリーで測定された全ゲノムの範囲内のタンパク質の相対的安定性のPSIデータ分布図を示す。図2c、dは、無作為に選ばれた遺伝子PSIデータを示す。

【図 3 A - H】図3aは、抗癌薬物ボルテゾミブの化学構造を示す。図3bは、二蛍光全細胞ライブラリーを抗癌薬物ボルテゾミブで処理した後の全体の変化を示す。図3cは、代表的なデータを示す。図3dは、タンパク質の相対的安定性の変化値 PSIの分布図を示す。図3e、f、g、hは、FACSおよびウエスタンブロット技術でチップの結果を検証したデータを示す。

20

【図 4 A - D】図4aは、生物情報学ツールDAVIDで安定性の変化が激しいタンパク質に対して行ったGO（生化学的経路）分析を示す。図4bは、図4aの結果におけるBP004亜族に対して行った細部分析を示す。図4cは、図4aの結果におけるBP00179亜族に対して行った細部分析を示す。図4dは、生物情報学ツールSTRINGおよび可視化ツールcytoscapeで応答タンパク質に対して行ったタンパク質-タンパク質相互作用関係（PPI）分析を示す。

【図 5】図5は、コントロールの二蛍光細胞系の散布図を示す。

【図 6】図6は、human ORFeome V5.1を含有する二蛍光細胞ライブラリーを示す。

【図 7】図7は、TP53-mEGFPfu-mRFPfを例として融合ポリペプチドの翻訳された直後の初期バンド、およびユビキチン化酵素によって切断されてなる二つの異なるバンド（TP53-mEGFP融合タンパク質のバンドおよびmRFPのバンド）のウエスタンブロットの電気泳動の結果を示す。

30

【図 8】図8は、生物情報学ツールSTITCHおよび可視化ツールcytoscapeで応答タンパク質に対して行った低分子化合物-タンパク質相互作用関係（CPI）分析を示す。

【図 9 A - D】図9a、bは、CZ-1またはCZ-1/R細胞に対する、BTZと17-AAGの薬物併用の効果を示す。図9c、dは、CZ-1またはCZ-1/R細胞に対する、BTZとC75の薬物併用の効果を示す。

【図 1 0 A - B】図10aは、BTZとC75の薬物併用の効果のCI計算を示す。図10bは、BTZと17-AAGの薬物併用の効果のCI計算を示す。

【 0 0 1 8 】

40

具体的な実施形態

発明者は幅広く深く研究したところ、意外に、本発明の二蛍光プラスミド系を使用すると便利に、正確に全ゲノムの範囲内のタンパク質の安定性の同時測定を実現することができ、二蛍光技術の実用性を大幅に向上させ、さらに病原性遺伝子のタンパク質の安定性に影響する低分子化合物のハイスループットスクリーニングおよび疾患発生に關与する未知の鍵遺伝子の探求に応用することができることを見出した。これに基づき、本発明を完成させた。

【 0 0 1 9 】

本発明において、発明者は、タンパク質の分解速度に対して相対的定量を行う二蛍光プラスミド系を設計した。本技術の核心は、蛍光レポータータンパク質分子（mEGFP）が融

50

合した特定の標的タンパク質およびコントロールの蛍光タンパク質分子（mRFP）を共発現させ、両者は特殊な連結タンパク質を介して連結し、翻訳が完成した後、有効に切断されて分離することにある。mRFPの発現レベルは内部参照として働き、mEGFPは標的タンパク質XのC末端に融合され、標的タンパク質Xの細胞における存在度の測定の見盛りとなり、mEGFP/mRFPの比によって、発明者は精確に一つの細胞における特定のタンパク質Xの安定性を判断することができる。

同時に、何らかの生物学的出来事（たとえば特定のタンパク質XのE3リガーゼのノックアウトまたは過剰発現の調整）または化学的刺激（たとえば薬物による処理）によって選択的にタンパク質X-mEGFPの安定性を変える場合、融合タンパク質X-mEGFPの存在度の変化につながるが、mRFPの存在度に影響を与えないため、mEGFP/mRFPの比が変化する。

そのため、本発明は有効に従来の技術の欠陥を克服し、全ゲノムの範囲内のタンパク質の安定性の測定、およびハイスループットの低分子化合物のスクリーニングに幅広く応用することができる。

【0020】

本発明は、同一のプロモーターで共発現される目的のタンパク質、第一の標識タンパク質、連結ペプチドおよび第二の標識タンパク質で構成される融合タンパク質を使用し、連結ペプチドを切断することによって、目的のタンパク質と第一の標識タンパク質の融合タンパク質および第二の標識タンパク質となり、さらに目的のタンパク質と融合した第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比によって目的のタンパク質の相対的安定性を特徴づける。

たとえば、具体的な実施形態において、本発明は蛍光タンパク質と目的の遺伝子または遺伝子ライブラリーを融合させ、蛍光分子の蛍光で定量できる特性を利用し、蛍光強度によって融合タンパク質の量を特徴づけ、最終的にタンパク質の安定性のパラメーターを得る。human ORFeomeライブラリーの遺伝子と合わせ、全ゲノムの範囲内の全部のタンパク質の安定性の同時測定を実現する。

当該技術を利用すると、病原性遺伝子のタンパク質の安定性に影響する低分子化合物のハイスループットのスクリーニングが可能である。同時に、human ORFeomeライブラリーと合わせると、全ゲノムの範囲内の全部のタンパク質の安定性の測定を実現することができ、さらに全ゲノムの範囲内で疾患の状態と正常の状態で安定性の異常な変化が生じるタンパク質をスクリーニングし、疾患発生に関与する未知の鍵遺伝子を探し、現在まだ完全

【0021】

好適な実施形態において、本発明は、まず、下記のように二蛍光発現プラスミドを構築する。

同一のプロモーターの作用下でコントロールのタンパク質（赤色蛍光タンパク質、Red fluorescent protein(RFP)）と蛍光レポータータンパク質（強化緑色蛍光タンパク質、enhanced green fluorescent protein(EGFP)）が融合した特定の標的タンパク質を共発現させ、両者はユビキチンを介して連結し、翻訳が完成した後、細胞における100種類以上の脱ユビキチン化酵素でユビキチンが有効に切断されて分離したRFPとなる。RFPの発現レベルは内部参照となり、EGFPは標的タンパク質XのC末端に融合され、標的タンパク質Xの細胞における存在度の測定の見盛りとなり、EGFP/RFPの比によって、精確に一つの細胞における特定のタンパク質Xの相対的安定性を判断し、かつフローサイトメトリー技術によって異なるEGFP/RFPの比の細胞の選別と検出を実現することができる。ハイスループットの薬物スクリーニングの場合、目的のタンパク質を効率的な相同組換え技術のGateway反応で当該二蛍光発現ベクターに組換え、さらに細胞系を構築すれば、ハイスループット技術でスクリーニングを行うことができる。全ゲノムの範囲内のタンパク質の安定性の異常な変化を検出しようとする場合、相同組換え技術のGateway反応でヒトORFeomeライブラリーにおける全部の遺伝子の二蛍光発現ベクターへの相同組換えを行い、さらに非常に低いウイルス力価（MOI ~ 0.05）で細胞に感染させ、一つの細胞に一つの遺伝子の比率でヒトORFeomeライブラリーが組み込まれた細胞ライブラリーを構築し、この細胞ライブラリーを利

用し、かつFACSおよびチップ技術と合わせると、一回で全ゲノムの範囲内の全部のタンパク質の安定性の測定を実現することができる。

【 0 0 2 2 】

そのため、本発明は、まず、構造が下記式で表される遺伝構築物を提供する。

5' -A + B + C + D + E-3'

(ここで、Aはプロモーターを、Bは目的のタンパク質および第一の標識タンパク質で構成される融合タンパク質のコード配列を、Cは連結ペプチドのコード配列を、Dは第二の標識タンパク質のコード配列を、かつEはターミネーターを表す。ここで、BとDは置き換えることができる。)

ここで、目的のタンパク質と第一の標識タンパク質のコード配列の位置・順番は置き換えることができる。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の揭示および既存技術に基づき、本発明は、目的のタンパク質、第一の標識タンパク質、連結ペプチドおよび第二の標識タンパク質で構成される融合タンパク質を共発現させ、連結ペプチドを切断することによって、目的のタンパク質と第一の標識タンパク質の融合タンパク質および第二の標識タンパク質となり、さらに目的のタンパク質と融合した第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比によって目的のタンパク質の相対的安定性を特徴づけるため、上記遺伝構築物におけるBとDは、置き換えても機能または使用に影響を与えないことは、当業者に理解される。

また、本発明の揭示および既存技術に基づき、Bにおける目的のタンパク質と第一の標識タンパク質のコード配列の位置・順番は置き換えても機能または使用に影響を与えないことは、当業者に理解される。

20

好適な実施形態において、Bに5' から3' の順で目的のタンパク質のコード配列および第一の標識タンパク質のコード配列が含まれる。

【 0 0 2 4 】

本発明の揭示および既存技術に基づき、本発明では様々な連結ペプチドが利用でき、前記連結ペプチドが細胞内で切断されることによって分離した2種類の標識タンパク質となればよいことは、当業者に理解される。たとえば、具体的な実施形態において、前記連結ペプチドは、ユビキチン(Ub)、ユビキチンの突然変異体およびユビキチン様タンパク質、2Aペプチドなどから選ばれ、好ましくはユビキチンで、最も好ましくはK(R)突然変異のユビキチンである。K(R)突然変異のユビキチンは、有効に切断すると同時に自身がユビキチン化の部位にならないことが保証されるため、目的のタンパク質の分解特性に影響を与えない。

30

【 0 0 2 5 】

また、本発明では様々な標識タンパク質が利用でき、精確に前記標識タンパク質の量の特徴付けられればよいことは、当業者に理解される。たとえば、具体的な実施形態において、前記第一の標識タンパク質および第二の標識タンパク質は蛍光タンパク質で、好ましくは前記蛍光タンパク質はEGFPまたはRFPで、より好ましくは第一の標識タンパク質はEGFPで、第二の標識タンパク質はRFPである。より好適な実施形態において、前記EGFPは単量体のEGFP(mEGFP)で、前記RFPは単量体のRFP(mRFP)である。

40

もう一つの好適な実施形態において、前記蛍光タンパク質のC末端またはN末端に一つまたは複数のタグタンパク質、たとえばFlagまたはmycが融合している。

もう一つの好適な実施形態において、前記プロモーターは、CMVプロモーターである。

もう一つの好適な実施形態において、前記目的のタンパク質のコード配列は、ヒトゲノムライブラリーにおける全部の遺伝子である。

【 0 0 2 6 】

また、本発明は、構造が下記式で表されるポリペプチドを提供する。

B1 + C1 + D1

(ここで、

B1は目的のタンパク質および第一の標識タンパク質で構成される融合タンパク質を、

50

C1は連結ペプチドを、かつ

D1は第二の標識タンパク質を表す。

ここで、B1とD1は置き換えることができる。))

【0027】

上記のように、本発明のポリペプチドにおけるB1とD1は置き換えても機能または使用に影響を与えないことは、当業者に理解される。そして、本発明のポリペプチドにおけるB1の目的のタンパク質と第一の標識タンパク質のコード配列の位置・順番は置き換えても機能または使用に影響を与えない。

好適な実施形態において、前記ポリペプチドは本発明の遺伝構築物によってコードされる。

10

好適な実施形態において、前記ポリペプチドの順番は、標的のタンパク質、第一の標識タンパク質、連結ペプチドおよび第二の標識タンパク質で、あるいは第二の標識タンパク質、連結ペプチド、標的のタンパク質および第一の標識タンパク質である。

【0028】

また、本発明の遺伝構築物に基づき、本発明は、本発明の遺伝構築物を含むベクター、本発明の遺伝構築物またはベクターを含む哺乳動物細胞および前記哺乳動物細胞で構成される哺乳動物細胞ライブラリーを提供する。

具体的な実施形態において、前記ベクターは、レトロウイルスプラスミド、レンチウイルスプラスミドなどの受容細胞のゲノムに組み込むことが可能なプラスミドでもよい。前記哺乳動物細胞は、霊長類細胞またはヒト細胞でもよく、好ましくは前記哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。具体的な実施形態において、前記哺乳動物細胞は、293細胞を含み、ほかの細胞、たとえば293t、hela、3t3、癌細胞、幹細胞などでもよいが、これらに限定されない。

20

【0029】

さらに、本発明の遺伝構築物、ベクター、ポリペプチド、細胞および細胞ライブラリーに基づき、本発明は、特定の条件における目的のタンパク質の安定性の変化を測定する方法であって、

(1) 本発明の細胞ライブラリーを構築する工程と、

(2) 前記特定の条件およびコントロールの条件で得られた細胞ライブラリーを培養する工程と、

30

(3) 前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞ライブラリーにおける第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比を測定する工程と、

(4) 前記特定の条件およびコントロールの条件で培養された細胞系における第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比を比較することによって目的のタンパク質の安定性に変化があるか確認する工程と、

を含む方法を提供する。

【0030】

細胞ライブラリーを得た後、刺激と損傷、たとえば薬物のような化学的刺激を与えることでもよく、遺伝子の過剰発現、またはRNA干渉でもよく、ウイルスの安定導入でも、プラスミドの一過性導入でもよい。

40

好適な実施形態において、前記特定の条件は、測定される化合物との接触、ストレス、輻射などの条件で、好ましくは前記特定の条件は、測定される化合物との接触である。

好適な実施形態において、DNAマイクロアレイ技術を使用し、第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の比、たとえば第一の標識タンパク質と第二の標識タンパク質の蛍光強度の比を検出する。

好適な実施形態において、前記目的のタンパク質は、ヒト細胞全ゲノムライブラリー human ORFeome V5.1における全部のタンパク質である。

【0031】

本発明において、係る全ゲノムの範囲内の遺伝子は、human ORF version5.1でもよく、それ以降のバージョンまたはほかのバージョンでもよく、ほかの種のORFライブラリーの

50

バージョンでもよい。

本発明の揭示および既存技術に基づき、本発明では様々な標識タンパク質が利用でき、精確に前記標識タンパク質の量を特徴付けられればよいことは、当業者に理解される。たとえば、本発明は、様々な蛍光タンパク質を使用することができ、mEGFPとmRFPまたはその突然変異体を含むが、これらに限定されず、ほかの蛍光タンパク質でもよく、2種類の蛍光タンパク質は異なる励起波長を有すればよい。

本発明のポリペプチドは、2種類の異なる蛍光タンパク質が使用される。好適な実施形態において、本発明の蛍光タンパク質はmEGFPとmRFPである。

【 0 0 3 2 】

例として、本発明では、配列番号1、2、3または4で表される蛍光タンパク質を使用することができる

10

(配列番号1、atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggcgccatcctggctcgagctggacggcgagctaa acggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgc accaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccc cgaccacatgaagcagcagcacttcttcaagtcggccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaagg acgacggcaactacaagaccgcgcccagggtgaagttcgagggcgacaccctgggtgaaccgcatcgagctgaaggcgatc gacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccga caagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccact accagcagaacacccccatcgccgacggccccgtgctgctgcccagacaaccactacctgagcaccagtcgccccgagc aaagacccaacgagaagcgcgatcacatggctcctgctggagttcgtgaccgcccggggatcactctcgcatggacga gctgtacaag ;

20

【 0 0 3 3 】

配列番号2、MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLKTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGV QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLEYNYN SH NVYIMADKQKNGIKVNFIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPI GDGPVLLPDNHYLSTQSK(A)LSKDPNEKRDHMLLEFVT AAGITLGMDELYK ;

【 0 0 3 4 】

配列番号3、atggcctcctccgaggacgtcatcaaggagttcatgcgc ttcaaggctgcgcatggagggctccgtgaa cggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgacca agggcgggccccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttccagtagcggtccaaggcctacgtgaagcacc cc gccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgaggagcggtgatgaacttcgaggacggcgg cgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtagaagctgcgcggcaccaacttcc cctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctccaccgagcggatgtaccccgaggacggcgcc ctgaaggcgagatcaagatgaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgccgaggtcaagaccacctacatggc caagaagcccgtgcagctgcccggcgccataagaccgacatcaagctggacatcacctcccacaacgaggactacacca tcgtggaacagtagcagcgccgagggcgccactccaccggcgcc ;

30

【 0 0 3 5 】

配列番号4、MASSEDVIKE FMRFKVRMEGSGVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFYG SKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEASTE RMYPEDGALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTI VEQYERAEGRHSTGA)。

40

【 0 0 3 6 】

本発明は、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含有する蛍光タンパク質、および配列番号2または4と同じ機能を有する、その突然変異の様態、あるいはほかの蛍光タンパク質分子を含む。表1では、可能な蛍光タンパク質分子が挙げられ、以下のタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 7 】

【表 1 - 1】

表 1						
タンパク質 (イニシャル略称)	Ex/nm	Em/nm	EC/10 ⁻³ M-1 cm ⁻¹	QY	四次構造	相対的光強度 (% EGFP)
青色蛍光タンパク質						
Sirius	355	424	15	0.24	単量体*	11
Azurite	384	448	26.2	0.55	単量体*	43
EBFP	383	445	29	0.31	単量体*	27
EBFP2	383	448	32	0.56	単量体*	53
青色蛍光タンパク質						
ECFP	439	476	32.5	0.4	単量体*	39
Cerulean	433	475	43	0.62	単量体*	79
CyPet	435	477	35	0.51	単量体*	53
SCFP	433	474	30	0.5	単量体*	45
緑色蛍光タンパク質						
EGFP	488	507	56	0.6	単量体*	100
Emerald	487	509	57.5	0.68	単量体*	116
Superfolder avGFP	485	510	83.3	0.65	単量体*	160
T-Sapphire	399	511	44	0.6	単量体*	79
黄色蛍光タンパク質						
EYFP	514	527	83.4	0.61	単量体*	151
Topaz	514	527	94.5	0.6	単量体*	169
Venus	515	528	92.2	0.57	単量体*	156
Citrine	516	529	77	0.76	単量体*	174
YPet	517	530	104	0.77	単量体*	238
SYFP	515	527	101	0.68	単量体*	204
mAmetrine	406	526	45	0.58	単量体	78
青色蛍光タンパク質						
mTagBFP	399	456	52	0.63	単量体	98
青色蛍光タンパク質						
TagCFP	458	480	37	0.57	単量体	63
AmCyan	458	489	44	0.24	四量体	31
Midoriishi Cyan	472	495	27.3	0.9	二量体	73
mTFP1	462	492	64	0.85	単量体	162
緑色蛍光タンパク質						
Azami Green	492	505	55	0.74	単量体	121
mWasabi	493	509	70	0.8	単量体	167
ZsGreen	493	505	43	0.91	四量体	117
TagGFP	482	505	58.2	0.59	単量体	102
TagGFP2	483	506	56.5	0.6	単量体	105
TurboGFP	482	502	70	0.53	二量体	112
CopGFP	482	502	70	0.6	四量体	125
AceGFP	480	505	50	0.55	単量体	82
黄色蛍光タンパク質						
TagYFP	508	524	64	0.6	単量体	118

【表 1 - 2】

TurboYFP	525	538	105	0.53	単量体	169	
ZsYellow	529	539	20.2	0.42	四量体	25	
PhiYFP	525	537	130	0.4	二量体	158	
オレンジ色蛍光タンパク質							
Kusabira Orange	548	559	51.6	0.6	単量体	92	
Kusabira Orange2	551	565	63.8	0.62	単量体	118	
mOrange	548	562	71	0.69	単量体	146	
mOrange2	549	565	58	0.6	単量体	104	10
dTomato	554	581	69	0.69	二量体	142	
dTomato-Tandem	554	581	138	0.69	擬似 単量体	283	
DsRed	558	583	75	0.79	四量体	176	
DsRed2	563	582	43.8	0.55	四量体	72	
DsRed-Express (T1)	555	584	38	0.51	四量体	58	
DsRed-Express2	554	586	35.6	0.42	四量体	45	
DsRed-Max	560	589	48	0.41	四量体	59	
DsRed-単量体	556	586	35	0.1	単量体	10	
TurboRFP	553	574	92	0.67	二量体	187	20
TagRFP	555	584	100	0.48	単量体	142	
TagRFP-T	555	584	81	0.41	単量体	99	
赤色蛍光タンパク質							
mRuby	558	605	112	0.35	単量体	117	
mApple	568	592	75	0.49	単量体	109	
mStrawberry	574	596	90	0.29	単量体	78	
AsRed2	576	592	56.2	0.05	四量体	8	
mRFP1	584	607	50	0.25	単量体	37	
JRed	584	610	44	0.2	二量体	26	30
mCherry	587	610	72	0.22	単量体	47	
eqFP611	559	611	78	0.45	四量体	106	
tdRFP611	558	609	70	0.47	擬似 単量体	98	
HcRed1	588	618	20	0.015	二量体	1	
mRaspberry	598	625	86	0.15	単量体	38	
遠赤外蛍光タンパク質							
tdRFP639	589	631	90.4	0.16	擬似 単量体	43	
mKate	588	635	31.5	0.28	単量体	26	40
mKate2	588	633	62.5	0.4	単量体	74	
Katushka	588	635	65	0.34	二量体	67	
tdKatushka	588	633	132.5	0.37	擬似 単量体	146	
HcRed-Tandem	590	637	160	0.04	擬似 単量体	19	
mPlum	590	649	41	0.1	単量体	12	
AQ143	595	655	90	0.04	四量体	11	

注：表において、ピーク値の励起波長はExで、ピーク値の発光波長はEmで、モル吸光係数はECで、量子収率はQYである。モル吸光係数と量子収率の乗積をEGFPの値で割って計算の光強度値を得る。

【0040】

例として、蛍光タンパク質は、たとえばmEGFPは、N末端が目的のタンパク質のORFと融合し、すなわち、ORF-mEGFP-Ub-mRFPのような構造を使用してもよく、C末端が目的のタンパク質のORFと融合し、すなわち、mEGFP-ORF-Ub-mRFPのような構造を使用してもよい。また、たとえばmRFPが目的のタンパク質のORFと融合した様態を使用してもよい。

本発明において、蛍光分子のC末端に2つのFlagタグが融合してもよく、融合しなくてもよく、1つまたは2つ以上のFlagタグが融合してもよく、ほかのタグタンパク質、たとえばmycなどが融合してもよい。タグの融合部位は、蛍光分子のN末端でもよい。

【0041】

実際に、本発明の揭示に基づき、本分野で既知の蛍光タンパク質のアミノ酸の構成およびその構造と合わせ、具体的な実験の要求と目的に応じ、当業者は蛍光タンパク質分子の種類を自主的に選択し、N末端融合またはC末端融合を自主的に選択することができる。

本発明は、様々なライブラリーのORFが融合した二蛍光タンパク質を使用してタンパク質の安定性を測定するライブラリーを含む。本発明で使用されるライブラリーは、商業化のORFライブラリーでもよく、当業者が自ら構築したライブラリーでもよい。ヒトのORFでもよく、ほかの種のORFでもよい。また、ORFにおける一部の機能ドメインの中でもよい。さらに、当業者が自ら設計した配列の断片でもよい。

ライブラリーの遺伝子の組換えと増幅は、大腸菌において行われ、DNAを吸収できるコンピテントセルは指数成長期後収集でき、CaCl₂法で処理し、用いられる工程は本分野では周知のものである。もう一つの方法は、MgCl₂を使用する。必要により、転化はエレクトロポレーションの方法でもよい。

【0042】

一旦ライブラリーの構築に必要なライブラリーの遺伝子の配列が得られれば、二蛍光タンパク質分子が融合した遺伝子ライブラリーを構築することができる。構築の方法は、遺伝子組換えの方法、たとえばGateway反応などでもよく、ほかの組換え反応でもよい。また、通常の組換えDNA技術（Science, 1984; 224: 1431）、たとえば従来の酵素による切断-リガーゼによる連結の方法でもよい。

二蛍光タンパク質分子が融合した遺伝子ライブラリーを得た後、ウイルスパッケージングの方法でプラスミド遺伝子が組み込まれた二蛍光細胞ライブラリーを構築してもよく、プラスミドはレンチウイルスプラスミドまたはほかのゲノムへの組み込みが可能なプラスミドでもよく、二蛍光細胞ライブラリーを構築する細胞は、293細胞でもよく、ほかの細胞、たとえば293T細胞、Hela細胞、NIH3T3細胞、癌細胞、幹細胞などでもよい。

構築された細胞ライブラリーはFACSで選別し、選別の時、mEGFP/mRFPの比によってライブラリーをいくつかの区間に分け、区間の数は6、7、8、9またはそれ以上でもよく、ライブラリーにおける一部のmEGFP/mRFPの比の区間の細胞を細かく選別してもよい。区間の数は4、5、6、7またはそれ以上でもよい。

【0043】

選別された細胞は、それぞれゲノムを抽出し、通常の方法で細胞または組織からゲノムDNAを抽出し、ゲノムDNAを含むサンプルを調製することができる。その後、ゲノムDNAを鋳型とし、プラスミドの共通の領域でプライマーを設計し、ORFに対してPCR増幅を行い、3'末端プライマーはT7プロモーターのプライマーを添加し、PCR増幅のtag酵素は適切に延長能力の高い酵素、たとえばEx-tagなどを選択する。PCR産物は、体外RNA増幅を行い、増幅産物はチップのハイブリダイゼーションに使用する。チップは、Agilent二標識チップを使用することができる。チップの結果は、BioconductorのパッケージlimmaにおけるComposited loess normalizationで正規化する。

【0044】

本発明で説明された上述特徴、或いは実施例で説明された特徴は任意に組み合わせるこ

10

20

30

40

50

とができる。ここで開示されたすべての特徴は任意の組み合わせの形態と併用することができ、説明書で開示された各特徴は、任意の相同、同等或いは類似の目的の代替性特徴にも任意に替えることができる。そのため、特に説明しない限り、開示された特徴は同等或いは類似の特徴の一般的な例にすぎない。

【0045】

本発明の利点

1. 本発明は、タンパク質の安定性の測定の実用性を大幅に向上させる。
2. 本発明の方法は、測定の正確度が高く、操作が便利で、時間が短縮する。
3. 本発明の方法は、高感度で特異的にタンパク質の安定性の变化状況を測定することができる。
4. 本発明の方法は、蛍光タンパク質分子が目的のタンパク質のC末端に融合するため、有効にタンパク質のN末端のシグナル配列を露出させ、タンパク質の分解挙動のシミュレーションを如実に行うことができる。
5. 本発明の方法において、蛍光タンパク質の間はユビキチンUbを介して連結し、Ubの効率的な切断は細胞内における大量の脱ユビキチン化酵素によって保証され、さらにタンパク質の翻訳のレベルで2つの蛍光分子の1:1のモル比の関係が保証される。
6. 本発明の方法において、単量体の蛍光分子が使用されるため、蛍光分子の凝集によるタンパク質の分解挙動の変化を有効に回避することができる。
7. 本発明の方法で使用される蛍光分子は、早いフォールディング速度を有し、タンパク質の安定性の变化に対する随時で動的な追跡が保証される。

【0046】

以下、具体的な実施例によって、さらに本発明を説明する。これらの実施例は本発明を説明するために用いられるものだけで、本発明の範囲の制限にはならないと理解されるものである。下述実施例で具体的な条件が示されていない実験方法は、通常、例えばSambrookら、「モレキュラー・クローニング：研究室マニュアル」(ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社、1989)に記載の条件などの通常の条件に、或いは、メーカーのお勧めの条件に従う。特に説明しない限り、百分率および部は重量百分率および重量部である。

【0047】

別の定義がない限り、本文に用いられるすべての専門用語と科学用語は、本分野の技術者に知られている意味と同様である。また、記載の内容と類似或いは同等の方法及び材料は、いずれも本発明の方法に用いることができる。ここで記載の好ましい実施方法及び材料は例示のためだけである。

【0048】

実施例

材料および方法

CZ-1細胞とCZ-1/R細胞

CZ-1細胞は、多発性骨髄腫細胞系(すなわち、BTZ薬物に敏感な細胞系)からのもので、この細胞系は、体外で低投与量でBTZ薬物による処理を間欠的に行い、数代に培養することによって、BTZ薬物耐性を得、CZ-1/Rと記した(すなわち、BTZ薬物耐性細胞系)。

CZ-1細胞は、上海長征医院侯健実験室(Hou J, Lin FY, Zhang B, Zhang LZ, Ding SQ, Establishment and biological characteristics of human multiple myeloma cell line CZ-1. Chinese Medical Journal [2004, 117(1):115-119])から得ることができ、CZ-1/R細胞系は発明者の実験室によって構築され、発明者の実験室から得ることができる(<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=129>)。

293細胞

293細胞は、ATCC(メリーランド州、米国)から得ることができる。

【0049】

プラスミドの構築

設計した二蛍光構造を組み立て、PCR反応で増幅し、かつ制限酵素の切断部位を導入した。mEGFP断片のC末端に2つのFlagタグが、mRFP断片のC末端に2つのFlagタグが付き、Ubタンパク質はK(R)飽和突然変異が生じ、mEGFP_{f_u}-mRFP_fとし、3つの断片を繋げた後、Hind IIIとXho Iの酵素切断部位にベクターpAG426GAL-ccdB-EGFP(Addgene)を挿入し、EGFP構造の代わりにmEGFP-Ub-mRFP構造を使用し、プラスミドpAG426GAL-ccdB-mEGFP_{f_u}-mRFP_fを得た。

ここで、pAG426GAL-ccdB-mEGFP_{f_u}-mRFP_fプラスミドの構築に必要なプライマーは以下の通りである。

【 0 0 5 0 】

HindIII-(a)-mGFPN1(5-3) : ACA aagctta atggtgagca agggcgagga(配列番号5)

mGFPN1-FLAG2N1 (3-5) : tggacgagct gtacaag ggatctgactacaag(配列番号6)

GWS3(5-3) : ggggtctgactacaaggacgatgacgataagggcggagactacaaggacgatgacgataagggctct(配列番号7)

FLAG2C1-hUbN1(5-3) : acgatgacgataagggctct atgcagatctttgtgaGg(配列番号8)

GWS5(5-3) : atgcagatctttgtgaGgaccctcactggcgaGaaccatcaccttgaggctgagcccagtgacacatttgagaatgtcaGagccaGaattcaagacaGgg(配列番号9)

GWS6(5-3) : gccgaGaattcaagacaGggagggtatcccacctgaccagcagcgtctgatatttgccggcaGacagctggaggatggccgcactctctcagactacaac(配列番号10)

hUbK6RN3-mRFPN1(3-5) : cactctctcagactacaacatccagaGagagtccaccctgcacctggtgttgccgttccgcgggtgtatggcctcct ccgaggacgt(配列番号11)

GWS8(5-3) : atggcctcct ccgaggacgt(配列番号12)

GWS9(5-3) : ccgc cactccaccg gcgcc ggAtctgactacaaggacgat(配列番号13)

GWS10(5-3) : acaaggacgatgacgataag TAG taactcgagtca(配列番号14)

【 0 0 5 1 】

spe1とXhoIの2つの制限酵素でpAG426GAL-ccdB-mEGFP_{f_u}-mRFP_fプラスミドに対して二重酵素切断を行い、補い合わせ、ベクターpCDH-CMV-MCS-EF1a-Puro(Addgene)を単独のxba1で切断した後、補い合わせ、さらにT4リガーゼで連結し、シクエンシングによって正確と検証された。プラスミドpCDH-CMV-ccdB-mEGFP_{f_u}-mRFP_fを得た。

【 0 0 5 2 】

ヒト遺伝子ライブラリーの混合と増幅

Biomek FXラボラトリーオートメーションシステムによって、ヒト遺伝子ライブラリーの混合を行い、かつ力価を検出した。初期のライブラリーの100倍の量で増幅した。37で18~24h培養した。プレートの上のクローンを取り、収集後十分に混合し、プラスミドの大量の抽出を行った。

【 0 0 5 3 】

ヒト遺伝子ライブラリーのLR反応および同定

ヒト遺伝子ライブラリーはattL配列を含有するEntryクローンに存在し、ライブラリーの遺伝子は直接発明者の目的のベクターpCDH-CMV-ccdB-mEGFP_{f_u}-mRFP_f(attR配列を含有する。)とLR反応し(技術の詳細およびすべての操作はinvitrogen社のGATEWAY(商標)Cloning Technology技術を参照する。)、pCDH-CMV-ORFs-mEGFP_{f_u}-mRFP_fに存在するヒト遺伝子ライブラリーを得た。クローンを取り、収集後十分に混合し、さらにプラスミドの大量の抽出を行った。

【 0 0 5 4 】

二蛍光細胞ライブラリーの構築

293FT細胞系は、10%ウシ胎児血清、10%NEAAおよびP/S抗生物質を含有するDMEM培地で、37、5% CO2インキュベーターにおいて培養した。293FT細胞にpCDH-CMV-ORFs-mEGFP_{f_u}-mRFP_fライブラリーを形質移入し、補助プラスミドはレンチウイルス発現系(LV100A-1、SBI)を使用し、方法は使用説明を参照した。

【 0 0 5 5 】

二蛍光コントロール細胞系の構築

10

20

30

40

50

hORFomeライブラリーからpENTRY-RGS4、pENTRY-TP53、pENTRY-ARC、pENTRY-AXNA1、pENTRY-NFKB1B、pENTRY-CDC25Aプラスミドを選び、目的のベクターpCDH-CMV-ccdB-mEGFP_{f_u}-mRFP_fとgateway反応させ、それぞれ目的のプラスミドpCDH-CMV-RGS4-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-P53-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-ARC-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-AXNA1-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-NFKB1B-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-CDC25A-mEGFP_{f_u}-mRFP_fを得た。レンチウイルス発現系(LV100A-1、SBI)でそれぞれウイルスをパッケージングし、293FT細胞に感染させ、FACSで選別し、それぞれpCDH-CMV-RGS4-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-TP53-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-ARC-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-AXNA1-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-NFKB1B-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-CDC25A-mEGFP_{f_u}-mRFP_fの二蛍光過剰発現細胞系を得た。

pCDH-CMV-RGS4-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-TP53-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-ARC-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-AXNA1-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-NFKB1B-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、pCDH-CMV-CDC25A-mEGFP_{f_u}-mRFP_fの二蛍光過剰発現細胞系はBortezomib(最終濃度1 μM)で6 h処理し、DMSOをコントロールとし、FACSでEGFP/RFPの比の変化を検出した後、細胞を分裂させ、ウェスタンでタンパク質の存在度の変化を検出した。

【0056】

二蛍光細胞ライブラリーの8区間の選別

Human ORFeome V5.1遺伝子を含む二蛍光細胞ライブラリーの細胞を消化し、吹いて単細胞にし、培地で再懸濁させた後、40 μmフィルターでろ過し、細胞の選別にBD社のFACSARIAII細胞選別システムを使用した。細胞選別の時、まず、高RFPシグナルの細胞群を選別し、さらに選ばれた細胞をmEGFP/mRFPの蛍光の比によって8区間に選別した。

【0057】

区間細胞のゲノムDNAの抽出とチップのハイブリダイゼーション

各区間の細胞をそれぞれ分裂液で分裂させ、分裂液の成分は10 mM Tris-HCl (8.0)、10 mM EDTA、0.5% SDS、0.2 mg/ml プロテイナーゼKおよび25 μg/ml RNA酵素Aで、55 °Cで16 h分裂させた後、0.2 M塩化ナトリウムを入れた。ゲノムDNAは、フェノール/クロロホルムで抽出し、クロロホルムで精製し、エタノールで沈殿させた後、10 mM Tris-HCl (8.0) および0.1 mM EDTA緩衝液に溶解させた。定量的にゲノムに組み込まれたORF-mEGFP_{f_u}-mRFP_f構造を増幅し、ゲノムDNAを鋳型とし、PCRで増幅し、PCRプライマーは以下の通りである。

フォワードプライマー：CCTGGAGACGCCATCCACGCTG(配列番号15)

リバースプライマー：TAATACGACTCACTATAGGGAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTAAAGCT(配列番号16)

リバースプライマーにT7RNAポリメラーゼのプロモーター部位が含まれる。EX-Taq(Takara)酵素で増幅した。その後、PCR産物を鋳型として体外RNA増幅を行い、体外RNA増幅はT7 MEGascript(Ambion)キットを使用し、増幅されたRNAはRNeasy mini kitで精製し、精製されたRNAをCy3およびCy5(Cat#PA13105、GE healthcare Bioscience、Pittsburgh、PA、US)で標識した後、さらにRNeasy mini kit(Cat#74106、QIAGEN、GmbH、Germany)で精製した。詳細は使用説明を参照する。

【0058】

チップのハイブリダイゼーション

その後、使用量に応じてチップのハイブリダイゼーションを(Cat#5188-5242, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)ハイブリダイゼーションオープン(Cat#G2545A, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)で行い、17時間のハイブリダイゼーションオープン後、洗浄し(Cat#121, Thermo Shandon, Waltham, MA, US) (Cat#5188-5327, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)、Gene Expression Wash Buffer Kit (Cat#5188-5327, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)で固定し、乾燥した(Cat#121, Thermo Shandon, Waltham, MA, US)。すべての操作は使用説明を参照する。同じプローブのシグナルを合わせて平均数を求め、各ORFに対し、8区間のシグナル値の合計を1に正規化した後、PSIとSTD DEVの値を計算した。具体的な計算の詳細は文献(Hsueh-Chi Sherry Yenら, 2008, science)を参照した。

【 0 0 5 9 】

Bortezomibで処理された後安定性が影響される体内の重要な生物学経路および鍵タンパク質の探求

Bortezomibに敏感なタンパク質を探すために、ORFs-mEGFP_f-mRFP_f細胞ライブラリーを2群に分け、コントロール群はDMSOを入れ、実験群はBortezomib(最終濃度1 μM)を入れた後、FACSで8区間の選別を行い、Bortezomibによる処理の全ゲノムの範囲内のタンパク質の安定性に対する影響を検出した。

系統生物学でデータを深く分析した。

【 0 0 6 0 】

GOアノテーション解析

発明者は、各ORFのDMSOとBortezomibによる処理の条件におけるPSIの変化値を計算した。発明者は PSI/PSIでソートした後、ソートの前15%の遺伝子を取ってGOエンリッチメント解析を行い、発明者はチップにおけるすべてのプローブをコントロール遺伝子とし、GOエンリッチメント解析にDAVIDオンラインソフトを使用した (Glynn Dennis Jr, 2003; Da Wei Huang, 2009)。

【 0 0 6 1 】

シグナル経路のエンリッチメント解析

DAVIDオンラインソフトでKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and GO annotation、Biocarta pathway、BBID、PANTHER pathwayなどの14の機能アノテーションデータベースを検索し、顕著に変化したシグナル経路を探した。

【 0 0 6 2 】

タンパク質-タンパク質相互作用ネットワーク

Bortezomibを入れた後の細胞の全体のシグナルネットワークに対する影響をよりよく理解するために、発明者は PSI/PSIでソートした後、ソートの前15%の遺伝子を選んでタンパク質-タンパク質相互作用ネットワークの分析を行い、発明者はオンラインツールSTRINGのデータベースを使用した (Snel B, 2000)。

【 0 0 6 3 】

低分子化合物-タンパク質相互作用分析 (CPI)

タンパク質と低分子化合物の相互作用ネットワークは分子と細胞の機能に対する理解に重要な意義がある。STITCH ('search tool for interactions of chemicals') (Kuhn等., 2008) (2.0版) (<http://stitch2.embl.de/>) オンラインデータベースを利用し、化合物-タンパク質相互作用ネットワークを分析した。

【 0 0 6 4 】

MTTによる細胞活力の測定

細胞懸濁液の濃度を調整し、プレートにセットして測定される細胞の密度を1000~10000/ウェルとし、濃度勾配の薬物Bortezomib、17-AAG (Selleck Chemicals)またはC75 (Cayman Chemical)を入れ、各濃度に4~6の重複を設置した。24~72時間インキュベートした。各ウェルに20 μlのMTT (3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルプロモテトラゾール)溶液を入れ、培養を4 h継続した。各ウェルに150 μlのジメチルスルホキシドを入れ、シェーカーに置いて低速で10 min振とうし、結晶を十分に分解させた。酵素結合免疫測定装置によってOD 490 nm (570 nm)において各ウェルの吸光値を測定した。

【 0 0 6 5 】

相互作用パラメーターCI (併用係数、Combination index) の分析

薬物BTZと17-AAGまたはC75の相互作用のパターンをCompuSynソフトで分析した (<http://www.combosyn.com/>)。相互作用の方程式はChou-Talalay原則 (T C Chou, P Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Advances in Enzyme Regulation 02/1984; 22:27-55.) を使用し、すなわちCI= 1、>1、または<1の場合、薬物はそれぞれ相乗、拮抗または協同作用と見なされた。CZ-1細胞を96ウェルプレートに5000個細胞/ウェルで入れ、それぞれ相応の濃度のBTZを添加し、同時に併用薬物17-AAGまたはC75を添加し、24 h後、MTTで細

10

20

30

40

50

胞活力を検出した。

【0066】

実施例1. 二蛍光タンパク質系によるタンパク質の相対的安定性の効率的な測定

発明者は、二蛍光タンパク質の構造を設計して構築し、ここで、mEGFPは目的のタンパク質のC末端と融合し、中間リンカータンパク質はK(R)飽和突然変異のユビキチンで、内部参照の蛍光タンパク質はmRFPで、三者でmEGFP_{f_u}-mRFP_fの構造が構成され、ここで、mEGFP参照配列は配列番号1、2で、mRFP参照配列は配列番号3、4で、Ub_{K0}参照配列は配列番号17、18で、その構造の概略図は図1aに示すように、目的のタンパク質に対して相対的定量を行う原理は図1bに示すように、発明者は人工的に設計した組換え二蛍光タンパク質構造要件を哺乳動物細胞の発現プラスミドにおいてCMVプロモーターで構成性発現をさせた。

10

【0067】

発明者は、外来遺伝子が融合されていないmEGFP_{f_u}-mRFP_fを真核細胞の発現ベクターに導入して構築し、レンチウイルスによって293FT細胞に感染させ、mEGFP_{f_u}-mRFP_fが融合した安定導入細胞系の構築に成功し、FACS技術によって、発明者は測定でmEGFP-UB_{K0}とmRFPが同じ安定性を有し、かついずれも非常に安定していることを見出した。図1cに示す。ここで、低シグナル領域の細胞は陰性コントロール細胞である。

遺伝子の相対的安定性を測定するために、発明者は、gateway組換え技術によって、遺伝子ARC、TP53、CDC25AをmEGFP-UB_{K0}-mRFP構造のmEGFPのN末端に融合させ、レンチウイルスによって293FT細胞に感染させ、ARC-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、TP53-mEGFP_{f_u}-mRFP_f、CDC25A-mEGFP_{f_u}-mRFP_fが融合した安定導入細胞系の構築に成功し、FACS技術によって、発明者は異なる遺伝子が異なるタンパク質の安定性を有することを見出した。図5に示す。

20

【0068】

二蛍光タンパク質系がユビキチン化酵素によって切断される状況を検証するために、発明者はTP53-mEGFP_{f_u}-mRFP_fベクターによるタンパク質の発現を例としてテストを行った。当該融合ペプチド断片の翻訳された直後の初期バンド、およびユビキチン化酵素によって切断されてなる二つの小さなバンド（それぞれTP53-mEGFP融合タンパク質のバンドおよびmRFPのバンド）は、いずれもウエスタンブロット電気泳動によって検証され、図7に示す。これは、本発明によって提供される融合ポリペプチドがユビキチン化酵素によって切断され、かつ予想の2つのタンパク質となったことを示す。

二蛍光タンパク質の構造はリアルタイムで外来の刺激・振動のタンパク質の安定性に対する影響をモニタリングすることができるかテストするために、発明者は、AXNA1-mEGFP_{f_u}-mRFP_fとRGS4-mEGFP_{f_u}-mRFP_f細胞系を構築し、かつ細胞系の抗癌薬物Bortezomibに対する反応を検出し、FACS技術とウエスタンブロットで検出したところ、発明者の二蛍光系は敏感に、かつ特異的にタンパク質の安定性の变化を測定することができることが証明された。図1dに示す。

30

【0069】

実施例2. mEGFP-UBK0-mRFP二蛍光タンパク質系による全ゲノムの範囲内のタンパク質の安定性の測定

発明者は、human ORFeome V5.1を目的の遺伝子ライブラリーとし、gateway相同組換え技術を使用し、15000個に近いORFのC末端にmEGFP-UB_{K0}-mRFP構造を融合した。mEGFP_{f_u}-mRFP_f構造が融合した遺伝子ライブラリーを使用し、レンチウイルス感染技術で293細胞に感染させ、ライブラリー遺伝子が組み込まれた二蛍光細胞系を構築した。結果は図6に示す。その後、FACS技術を使用し、mEGFP/mRFPの比に基づき、ライブラリーを8区間に分け、各区間の細胞のゲノムを抽出し、PCR産物を鋳型として体外cRNA増幅を行った後、チップのハイブリダイゼーションを行い、BioconductorのパッケージlimmaにおけるComposite 1 oess normalizationのプログラムでデータを処理し、各遺伝子の相対的安定性のパラメーターPSI（タンパク質安定性係数、Protein Stability Index）を計算した。その流れ図は図2aに示す。タンパク質の相対的安定性のパラメーターの分布範囲は図2bに、代表的なデータは図2c、dに示す。図2dは図2cのデータで作られた折線図で、反応遺伝子は単一ピークの分布である。

40

50

【0070】

実施例3. 二蛍光細胞ライブラリーを使用した抗癌薬物bortezomibに対してタンパク質の安定性の面で応答する候補遺伝子の測定

発明者は、human ORFeome V5.1遺伝子ライブラリーを含有する二蛍光細胞ライブラリーを利用し、それぞれDMSO(コントロール処理)とBortezomib(実験処理)でライブラリー細胞を処理した後、図2aに示す流れで、それぞれ各ライブラリー遺伝子のDMSOとBortezomibの状態におけるPSI値を計算した後、 $PSI = PSI_{BTZ} - PSI_{DMSO}$ を求め、さらに PSIで全部の遺伝子をソートし、顕著な遺伝子に対して生物情報学的分析を行った。図3aは抗癌薬物Bortezomibの化学構造で、図3c、dは代表的なデータと基質応答タンパク質で、図4は生物情報学的分析の結果である。

10

【0071】

実施例4. ProTAデータのCPI分析によって指導される理性的な薬物の併用

タンパク質と低分子化合物の相互作用ネットワークは分子と細胞の機能に対する理解に重要な意義がある。そのため、発明者はSTITCH (search tool for interactions of chemicals)オンラインデータベースを利用し、BTZに反応するタンパク質と顕著な相互作用が存在する低分子化合物を研究し、それでBortezomib薬物の細胞毒性および薬物耐性の発生の細胞学機序を検討した。それぞれDMSO(コントロール処理)とBortezomib(実験処理)で実施例2で得られたライブラリー細胞を処理した後、図2aに示す流れで、それぞれ各ライブラリー遺伝子のDMSOとBortezomibの状態におけるPSI値を計算した後、 $PSI = PSI_{BTZ} - PSI_{DMSO}$ を求め、さらに PSIで全部の遺伝子をソートし、前250個のヒットした遺伝子に対してCPI(化合物-タンパク質相互作用)分析を行った。図8はCPI分析の結果である。CPI分析の結果は、発明者は特異的に低分子化合物アデノシン二リン酸(代わりに類似物17-AAGを使用する。)とコエンザイムA(FASN阻害剤C75を使用する。)を集中して得た。

20

【0072】

そして、発明者はCZ-1とCZ-1/R細胞系を検証細胞系とし、BTZと17-AAGまたはC75の薬物併用の効果を検証し、相互作用パラメーターCI(併用係数、Combination index)を計算し、すなわち、薬物BTZと17-AAGまたはC75の相互作用のパターンを分析し、結果は図9および10に示す。中では、図9はMTTによるBTZと17-AAGまたはC75の薬物併用の効果の測定を示し、結果は、BTZと17-AAGまたはC75の薬物併用はBTZ敏感細胞系CZ-1とBTZ薬物耐性細胞系CZ-1/Rのいずれにも顕著な殺傷効果があったことを示す。図10は、BTZは5、10、15、20 nMの濃度で17-AAGと協同作用を有し、BTZはすべてのテスト濃度でC75と協同作用を有する。

30

【0073】

各文献がそれぞれ単独に引用されるように、本発明に係るすべての文献は本出願で参考として引用する。また、本発明の上記の内容を読み終わった後、この分野の技術者が本発明を各種の変動や修正をすることができ、それらの等価の形態のものは本発明の請求の範囲に含まれることが理解されるはずである。

【図 1 A - D】

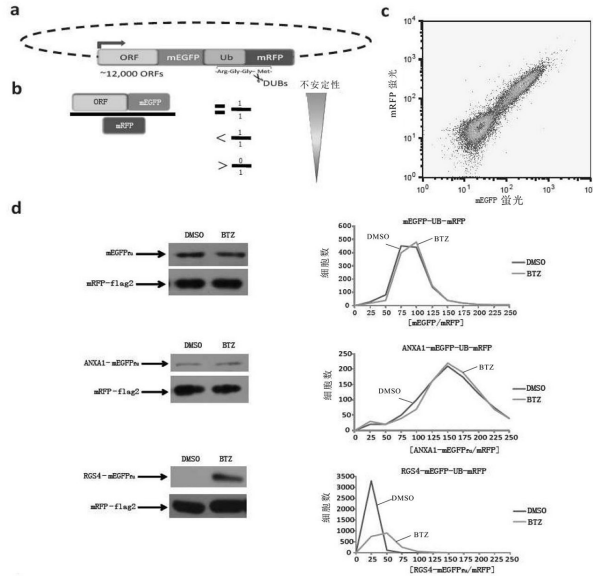


図 1

【図 2 A - D】

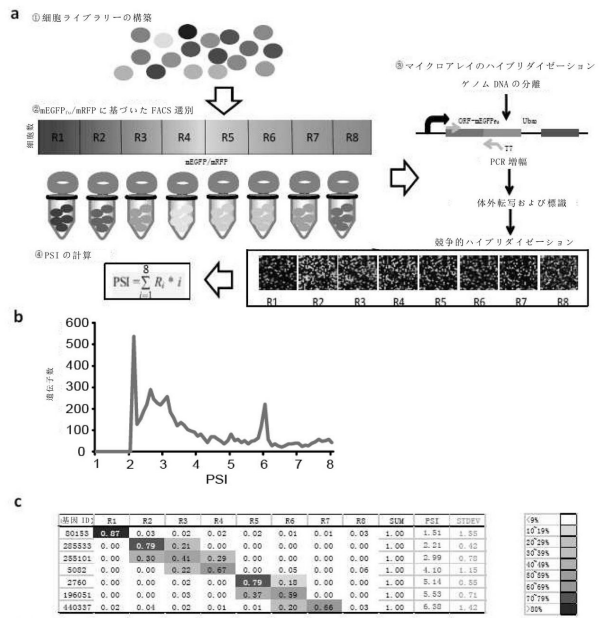


図 2

【図 3 A - H】

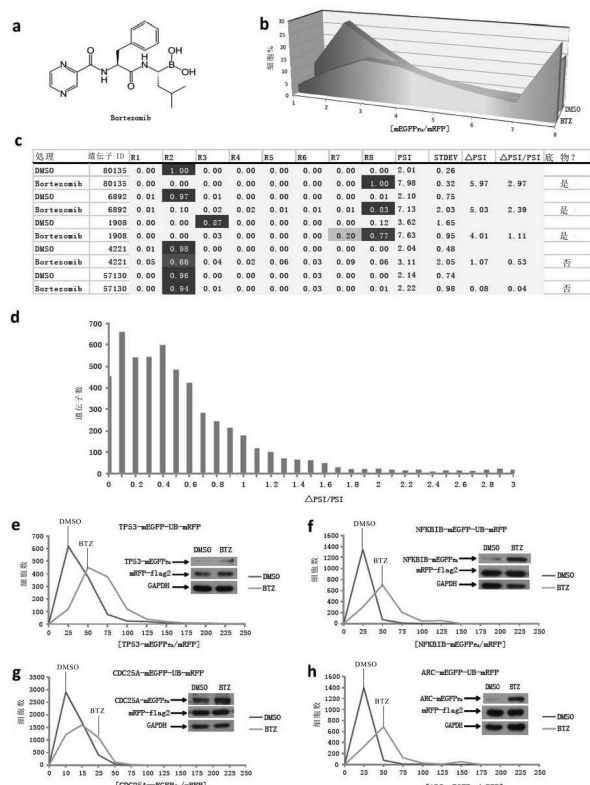


図 3

【図 4 A - D】

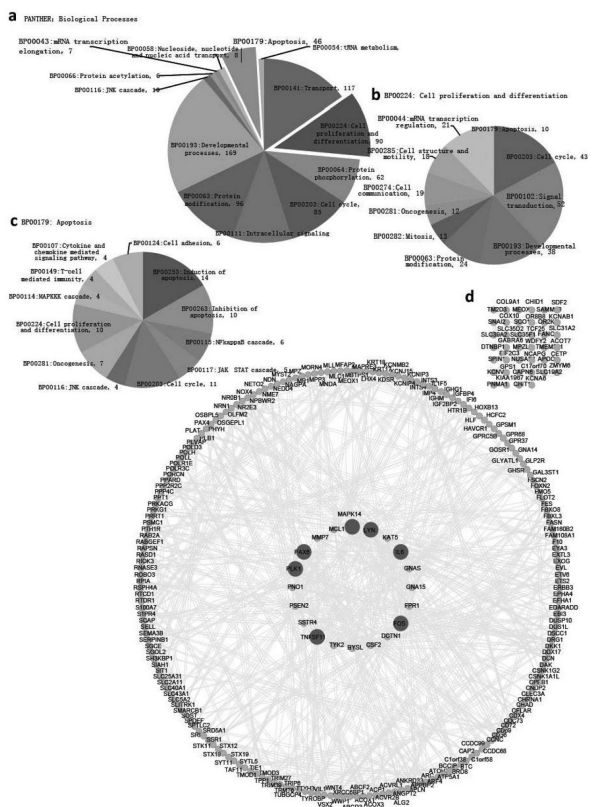


図 4

【図 5】

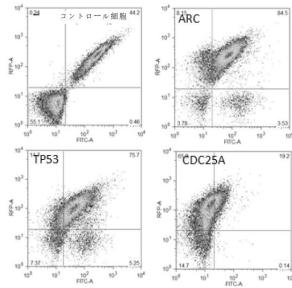


図 5

【図 6】

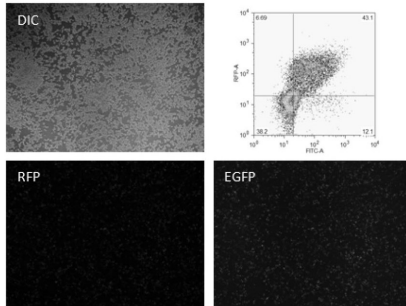


図 6

【図 7】

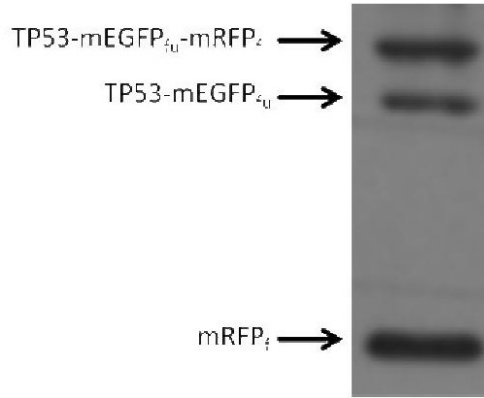


図 7

【図 8】

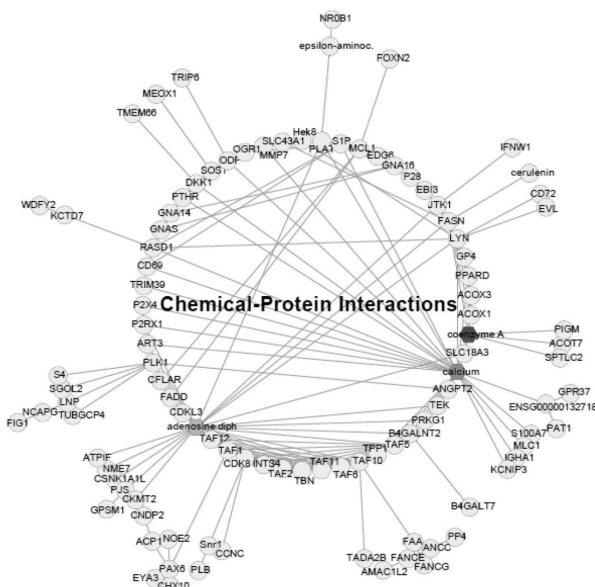


図 8

【図 9 A - D】

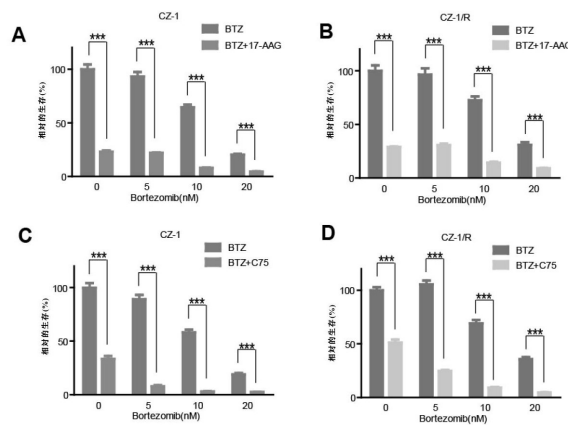


図 9

【図 10 A - B】

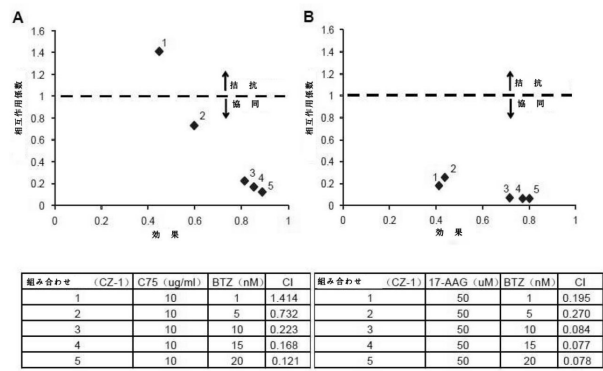


図 10

【配列表】

0006506736000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/64 (2006.01) G 0 1 N 21/64 F

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 フウ, ロンガイ

中華人民共和国 2 0 0 0 3 1 上海、スーフイ ディストリクト、ユエヤン ロード 3 1 9

(72)発明者 ユウ, タオ

中華人民共和国 2 0 0 0 3 1 上海、スーフイ ディストリクト、ユエヤン ロード 3 1 9

(72)発明者 タオ, ヨンファイ

中華人民共和国 2 0 0 0 3 1 上海、スーフイ ディストリクト、ユエヤン ロード 3 1 9

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 中島 庸子

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 6 1 1 0 0 号

特開 2 0 1 0 - 1 8 7 5 9 1 号公報

Science, 2 0 0 8 年, Vol. 3 2 2, pp. 9 1 8 - 9 2 3

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N15/00-15/90, C12Q1/00-3/00, C12N1/00-7/08, C07K1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)