

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年5月30日(30.05.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/080766 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/080097
- (22) 国際出願日: 2013年11月7日(07.11.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-255737 2012年11月21日(21.11.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人埼玉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SAITAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3388570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 Saitama (JP). 株式会社ニコン(NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区有楽町一丁目12番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 根本 直人(NEMOTO Naoto); 〒3388570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国立大

学法人埼玉大学大学院理工学研究科内 Saitama (JP). 熊地 重文(KUMACHI Shigefumi); 〒3388570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国立大学法人埼玉大学大学院理工学研究科内 Saitama (JP). 塩野 博文(SHIONO Hirofumi); 〒1008331 東京都千代田区有楽町一丁目12番1号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 志賀 正武, 外(SHIGA Masatake et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID LINKER

(54) 発明の名称: 核酸リンカー

[図1]



- 33 Protein or peptide
2a Linking site
51b(2) Arm segment
2d Labeling substance
2e Cleavage site
51a(2) Polynucleotide segment
2f Binding site

(57) Abstract: Provided is a nucleic acid linker which can be synthesized readily and enables the rapid and simple preparation of a labeled peptide or a labeled protein. The nucleic acid linker according to the present invention is a nucleic acid linker for use in the production of a complex of mRNA and a protein or peptide encoded by the mRNA, said nucleic acid linker being characterized in that a polynucleotide segment capable of hybridizing with at least a part of the sequence for the mRNA and an arm segment having, at the terminal thereof, a linking part at which the arm segment and the protein or peptide are linked to each other together form a single strand.

(57) 要約: 簡便に合成可能で、標識ペプチド又は標識タンパク質を迅速かつ簡単に調整できる核酸リンカーを提供する。本発明の核酸リンカーは、mRNAと、該mRNAによりコードされるタンパク質又はペプチドとの複合体を製造するための核酸リンカーであって、前記mRNAの少なくとも一部の配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド部分と、前記タンパク質又はペプチドとの連結部分を末端に有するアーム部分と、が一本鎖を形成してなることを特徴とする。



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 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：核酸リンカー

技術分野

[0001] 本発明は、核酸リンカー、mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体、mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体の製造方法、核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体の製造方法、タンパク質アレイ又はペプチドアレイ、分子間相互作用解析方法、プレイタンパク質のスクリーニング方法に関する。

本願は、2012年11月21日に、日本に出願された特願2012-255737号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 新規機能性タンパク質は、医薬品、洗剤、食品加工、研究開発用試薬、臨床分析、さらにはバイオエネルギー、バイオセンサーなど様々なバイオ応用分野への貢献が期待されている。

[0003] 新規機能性タンパク質の取得に際しては、タンパク質の構造情報から人知によりデザインするタンパク質工学的手法が主流であった。しかし、より有用なタンパク質を取得するためには、従来手法よりも効率的にスクリーニングする必要がある。したがって、タンパク質のランダムな分子構造改変と淘汰を繰り返す進化分子工学的手法が期待されている。

[0004] 進化分子工学的手法の一つであるcDNAディスプレイ法は、遺伝子型－表現型の対応付けの方法であり、核酸リンカーが、タンパク質（表現型）と、これをコードするmRNAと、逆転写したcDNA（遺伝子型）と、を結ぶものである。mRNA／cDNA－タンパク質連結体構造は、非常に安定であるため、前記核酸リンカーを用いることにより、様々な環境下でスクリーニングを実施することが可能となった。

[0005] cDNAディスプレイ法は、タンパク質とこれをコードするポリヌクレオ

チドとを連結する核酸リンカー中に有するピューロマイシンに特徴を有している（特許文献1参照）。

ピューロマイシンは、アミノアシルー tRNA の 3' 末端と類似する構造を有するタンパク質合成阻害剤であり、所定の条件下ではリボソーム上で伸長中のタンパク質の C 末端に特異的に共有結合する。

[0006] cDNA ディスプレイ法を用いた有用タンパク質のスクリーニング方法は、以下の一連の工程を有する。

先ず、ピューロマイシンを有する核酸リンカーと mRNA とを連結させ、無細胞翻訳系を用いて mRNA からタンパク質を合成する。これにより、合成されたタンパク質とこれをコードする mRNA とがピューロマイシンを介して結合している複合体（mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体）が生じる（非特許文献1参照）。

次いで、この mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体のライブラリーを製造する。製造した mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体を逆転写酵素により逆転写し、cDNA を合成することにより、mRNA／cDNA－核酸リンカー－タンパク質複合体のライブラリーを製造する。

次いで、この mRNA／cDNA－核酸リンカー－タンパク質複合体のライブラリーを用いて、所望の機能をもつタンパク質を選択し、選択した mRNA／cDNA－核酸リンカー－タンパク質複合体中の cDNA の塩基配列を解析することによりタンパク質を同定する。逆転写のタイミングは、タンパク質を選択した後でもよい（非特許文献2参照）。

[0007] また、上記 mRNA／cDNA－核酸リンカー－タンパク質複合体のライブラリーを基板上に固定したタンパク質チップは、網羅的解析により、短期間で機能タンパク質を取得するためのツールとして重要である。このような網羅的解析をするにあたり、アレイを構成する個々のタンパク質が、基板上に適当量固定されている必要がある。さらに、タンパク質相互作用解析の様に、高感度検出を必要とする繊細なアッセイを行う場合には、基板上のタンパク質が、蛍光分子等の所定量の標識物質によって、適切に標識されている

必要がある。

[0008] 従来、タンパク質相互作用解析用に用いられるペプチドやタンパク質は、ペプチド固相合成法や大腸菌タンパク質発現系を利用することにより製造されてきた。しかし、ペプチド固相合成法においては、合成可能なアミノ酸残基数に限度があり、大腸菌発現系においては、精製タンパク質を得るまでの時間を要しているという問題点があった。また、タンパク質相互作用解析に用いられるペプチドやタンパク質は、数 μ g程度合成されれば足りるが、これらの製造方法によると、数mg程度合成され、無駄が多く、コスト面で難がある。

[0009] これに対して、無細胞タンパク質合成系において、蛍光標識されたビオチン化ピューロマイシンを用いる方法が提案されている（非特許文献3参照）。この方法は、タンパク質合成の際に、ビオチン化ピューロマイシンを取り込ませることにより、自動的に合成タンパク質が蛍光標識される点で優れている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特許第4318721号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Nemotoら、FEBS Lett、第414巻、第405～408頁、1997年

非特許文献2：Yamaguchiら、Nucleic Acids Res. 第37巻、e108頁、2009年

非特許文献3：Oyamaら、Nucleic Acids Res. 第34巻、e102頁、2006年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] しかしながら、非特許文献3に記載された方法では、合成したタンパク質

の精製の際に、合成に用いられなかったピューロマイシンを除く必要がある。

一例には、無細胞翻訳系において、ヒスチジンタグ融合タンパク質を合成した反応液を R N a s e で処理し、ヒスチジンタグ融合タンパク質精製用バッファーで透析した後、ニッケルカラムを用いてアフィニティー精製を行い、更にアビジン精製を行うことにより蛍光標識された精製タンパク質を得る。このように、非特許文献 3 に記載された方法では、精製工程が複雑であり、収率及び簡便性という点から難がある。

[0013] 更に、従来の核酸リンカーは、構造が複雑であるため、より簡便に合成可能な単純化されたものが求められている。

[0014] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、簡便に合成可能で、標識ペプチド又は標識タンパク質を迅速かつ簡単に調整できる核酸リンカーを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは上記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、核酸リンカーを一本鎖とすることにより課題を解決できることを見出した。本発明の一実施態様は、下記 (1) ~ (11) を提供するものである。

(1) 本発明の一実施態様における核酸リンカーは、mRNA と、その mRNA によりコードされるタンパク質又はペプチドとの複合体を製造するための核酸リンカーであって、

前記 mRNA の少なくとも一部の配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド部分と、

前記タンパク質又はペプチドとの連結部分を末端に有するアーム部分と、が一本鎖を形成してなることを特徴とする。

[0016] (2) 本発明の一実施態様における mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体は、先に記載の核酸リンカーを介して、前記 mRNA と、前記 mRNA によりコードされるタンパク質又はペプチドと、を連結してなることを特徴とする。

(3) 本発明の一実施態様における核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体は、先に記載の核酸リンカーを1本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位で切断することにより生じる二つの断片のうち、前記タンパク質又はペプチドとの連結部分を含む断片と、前記タンパク質又はペプチドと、からなることを特徴とする。

[0017] (4) 本発明の一実施態様におけるmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法は、先に記載のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法であって、(a) 前記mRNAと前記核酸リンカーとをアニールさせる工程と、(b) 前記工程(a)の後、前記mRNAの末端と前記核酸リンカーの末端とをライゲーションさせて、mRNA-核酸リンカー複合体を製造する工程と、(c) 前記工程(b)の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を製造する工程と、を有することを特徴とする。

[0018] (5) 本発明の一実施態様におけるmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法は、先に記載のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法であって、(a1) 複数種類のmRNAと、互いに異なる種類の標識物質を有する複数種類の核酸リンカー、とをそれぞれ別個にアニールさせる工程と、(b1) 前記工程(a1)の後、前記複数種類のmRNAの末端と前記複数種類の核酸リンカーの末端とをそれぞれ別個にライゲーションさせて、複数種類のmRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程と、(c1) 前記工程(b1)の後、前記複数種類のmRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又は

ペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、複数種類のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程と、を有することを特徴とする。

[0019] (6) 本発明の一実施態様における核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法は、先に記載の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法であって、(a) 前記mRNAと前記核酸リンカーとをアニールさせる工程と、(b) 前記工程(a)の後、前記mRNAの末端と前記核酸リンカーの末端とをライゲーションさせて、mRNA-核酸リンカー複合体を製造する工程と、(c) 前記工程(b)の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を製造する工程と、(d2) 前記工程(c)の後、1本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体中の核酸リンカーを、前記1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して切断産物を得る工程と、(e2) 前記工程(d2)の後、前記切断産物から前記核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を精製する工程と、を有することを特徴とする。

[0020] (7) 本発明の一実施態様における核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法は、先に記載の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法であって、(a1) 複数種類のmRNAと、互いに異なる種類の標識物質を有する複数種類の核酸リンカーと、をそれぞれ別個にアニールさせる工程と、(b1) 前記工程(a1)の後、前記複数種類のmRNAの末端と前記

複数種類の核酸リンカーの末端とをそれぞれ別個にライゲーションさせて、複数種類のmRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程と、(c1)前記工程(b1)の後、前記複数種類のmRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、複数種類のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程と、(d3)前記工程(c1)の後、1本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、複数種類のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体中の核酸リンカーを、前記1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して複数種類の切断産物を得る工程と、(e3)前記工程(d3)の後、前記複数種類の切断産物から前記複数種類の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を精製する工程と、を有することを特徴とする。

[0021] (8) 本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、先に記載のタンパク質複合体又はペプチド複合体が基板上に固定化されることを特徴とする。

[0022] (9) 本発明の一実施態様における分子間相互作用解析方法は、先に記載のタンパク質複合体又はペプチド複合体を標的分子と接触させ、前記標的分子と前記タンパク質複合体又はペプチド複合体との相互作用を解析することを特徴とする。

[0023] (10) 本発明の一実施態様における分子間相互作用解析方法は、(a)前記タンパク質複合体又はペプチド複合体の、前記タンパク質又は前記ペプチドをベイトタンパク質として固相に固定する固定化工程と、(b)前記ベイトタンパク質と、標識されたプレイトタンパク質とを反応させてベイトタンパク質-プレイトタンパク質結合体を生成させる反応工程と、(c)前記標識されたプレイトタンパク質を検出する検出工程と、を有することを特徴とする。

[0024] (11) 本発明の一実施態様におけるプレイトンパク質のスクリーニング方法は、(a) 前記タンパク質複合体又はペプチド複合体の、前記タンパク質又は前記ペプチドをベイトタンパク質として固相に固定する固定化工程と、(b) 前記ベイトタンパク質と、標識されたプレイトンパク質とを反応させてベイトタンパク質－プレイトンパク質結合体を生成させる反応工程と、(c) 前記ベイトタンパク質－プレイトンパク質結合体を集める収集工程と、(d) 前記収集されたベイトタンパク質－プレイトンパク質結合体を洗浄して、前記プレイトンパク質を溶出させる溶出工程と、を有することを特徴とする。

発明の効果

[0025] 本発明によれば、ペプチド又はタンパク質を簡単に調整できる核酸リンカーが得られる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明の核酸リンカーの一態様を示した図である。

[図2]本発明の核酸リンカーの一態様を示した図である。

[図3]本発明のmRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体の製造方法の一態様を示した図である。

[図4]本発明のmRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体の製造方法の一態様を示した図である。

[図5]本発明の核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体の製造方法の一態様を示した図である。

[図6]本発明の核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体の製造方法の一態様を示した図である。

[図7]実験例1における電気泳動の結果である。

[図8]実験例1における電気泳動の結果である。

[図9]実験例1における蛍光相関分光法を用いた解析結果である。

[図10]実験例1における蛍光相関分光法を用いた解析結果である。

[図11]実験例1における蛍光相関分光法を用いた解析結果である。

[図12]実験例1における蛍光相関分光法を用いた解析結果である。

[図13]実験例2の模式図及び核酸リンカーのコンストラクトを示す図である。

[図14]実験例2における電気泳動の結果である。

発明を実施するための形態

[0027] 《核酸リンカー》[第1実施形態]

本実施形態の核酸リンカーは、mRNAと、そのmRNAによりコードされるタンパク質又はペプチドとの複合体を製造するための核酸リンカーである。本実施形態の核酸リンカーの構造について、図1を用いて説明する。

図1中、Puはピューロマイシン、ATCGはDNA配列を示している。また、spc18はアーム部分を構成するスペーサーを示し、rGはRNA配列を示している。

[0028] 本実施形態の核酸リンカー2は、5'側にスクリーニングすべきmRNA 23の少なくとも一部の配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド部分51aと、前記タンパク質又はペプチド33との連結部分2aを3'末端に有するアーム部分51bと、を有し、これらが一本鎖を形成している。

[0029] ポリヌクレオチド部分51aは、DNAであってもPNA（ポリヌクレオペプチド）などの核酸誘導体であってもよく、ヌクレアーゼ耐性が付与された修飾DNAが好ましい。

修飾DNAとしては、ホスホロチオエートなどのヌクレオシド間結合を有するDNA、2'-フルオロ、2'-O-アルキルなどの糖修飾を有するDNAなど、当該技術分野において知られる修飾DNAのいずれを用いてもよい。

[0030] アーム部分51bは、mRNA 23とタンパク質又はペプチドとの連結部分2aとを所望の距離に保持するスペーサーとして機能する。アーム部分51bの5'末端は、ポリヌクレオチド部分51aの3'末端と結合し、アーム部分51bの3'末端はタンパク質連結部分2aを有する。

[0031] 従来の核酸リンカーにおいては、アーム部分の5'末端は、ポリヌクレオ

チド部分の3'末端から数塩基5'側の位置でポリヌクレオチド部分と結合し、T字型の構造を形成していた。スクリーニングすべきタンパク質をコードするmRNAを逆転写させる必要がある場合には、逆転写の際にポリヌクレオチド部分の3'末端がプライマーとして機能するからである。

しかしながら、本実施形態においては、mRNAを逆転写させる必要がないため、ポリヌクレオチド部分51aと、アーム部分51bが連結して一本鎖を形成している。本実施形態の核酸リンカー2は、一本鎖という単純な構造を有しているため、従来の核酸リンカーと比較して容易に製造できる。

[0032] 3'末端を除くアーム部分51bは、標識物質2dを用いて標識されてもよい。標識物質2dとしては、例えば、蛍光色素、蛍光ビーズ、量子ドット、ビオチン、抗体、抗原、エネルギー吸収性物質、ラジオアイソトープ、化学発光体、酵素等が挙げられる。

蛍光色素としては、FAM（カルボキシフルオレセイン）、JOE（6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ2',7'-ジメトキシフルオレセイン）、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、TET（テトラクロロフルオレセイン）、HEX（5'-ヘキサクロロフルオレセイン-Cエホスホロアミダイト）、Cy3、Cy5、Alexa568、Alexa647等が挙げられる。

本実施形態においては、アーム部分51bが、標識物質2dを、後述する切断部位2e（一本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位）よりも、タンパク質又はペプチド33との連結部分2a側に有する。標識物質2dにより核酸リンカー2が標識される結果、タンパク質又はペプチド33が標識物質2dで標識されたことになる。標識物質2dの分子数は合成により適宜変更することができるため、本実施形態によれば、例えば蛍光相関分光法に必要とされる蛍光1分子でラベル化されたペプチドやタンパク質を迅速かつ簡単に調整できる。

[0033] アーム部分51bの3'末端にはタンパク質又はペプチド33の連結部分2aが存在する。タンパク質又はペプチド連結部分2aとは、所定の条件下

でリボソーム上の伸張中のタンパク質又はペプチド 33 の C 末端に特異的に結合する性質を有する構造を意味し、ピューロマイシンが代表的である。

ピューロマイシンは、アミノアシル tRNA の 3' 末端と類似する構造を有するタンパク質合成阻害剤である。タンパク質 33 の連結部分 2a としては、伸張中のタンパク質又はペプチド 33 の C 末端に特異的に結合する機能を有する限り、任意の物質を用いることができ、3' -N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (PANS-アミノ酸)、または 3' -N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (AANS-アミノ酸) などのピューロマイシン誘導体を用いることができる。

PANS-アミノ酸としては、アミノ酸部がグリシンの PANS-Gly、バリンの PANS-Val、アラニンの PANS-Ala、又はアミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応する PANS-アミノ酸混合物を挙げることができる。

AANS-アミノ酸としては、アミノ酸部がグリシンの AANS-Gly、バリンの AANS-Val、アラニンの AANS-Ala、又はアミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応する AANS-アミノ酸混合物を挙げることができる。

ピューロマイシン以外に好適に使用できるアミノアシル tRNA 3' 末端アナログとしては、リボシチジルピューロマイシン (rCpPur)、デオキシジルピューロマイシン (dCpPur)、デオキシウリジルピューロマイシン (dUpPur) などを挙げることができる。

[0034] アーム部分 51b は、スペーサーとして機能するものであれば、核酸や核酸誘導体から構成されていてもよく、ポリエチレングリコールなどの高分子から構成されていてもよい。

アーム部分 51b にはさらに、ピューロマイシンの安定性を高めるための修飾や、複合体の検出のための標識が付加されていてもよい。

[0035] 本実施形態の核酸リンカー 2 は、切断部位 2e として、1 本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位を、標識物質 2d の結合位置よりも 5' 側に含む。切

断部位 2 e で核酸リンカー 2 を切断することにより、タンパク質 3 3 を分子間相互作用解析に用いる際に、標識物質 2 d が結合している部分のみを残し、立体障害を起こす可能性のある他の核酸部分を除外することができる。

1 本鎖核酸切断酵素切断部位とは、デオキシリボヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼなどの 1 本鎖核酸切断酵素により切断されることができる核酸基をいい、ヌクレオチドおよびその誘導体が含まれる。本実施形態においては、RNase T1 によって切断される部位として rG が設けられている。

また、光切断性部位とは、紫外線などの光を照射すると切断される性質を有する基をいう。かかる基を用いたものとして、例えば、PC Linker Phosphoramidite (Glen research 社)、フラーレンを含有してなる核酸の光切断用組成物（核酸の光切断用組成物：特開 2005-245223）などが挙げられる。

光切断性部位としては、当該技術分野において市販されているか、または知られているいずれの基を用いてもよい。

[0036] 本実施形態の核酸リンカー 2 は、mRNA 2 3 の 3' 末端側との結合部位 2 f を、ポリヌクレオチド部分 5 1 a の 5' 末端側に有する。結合部位 2 f は、核酸リンカー 2 の末端側と mRNA 2 3 の末端側とをライゲーション又はハイブリダイズ可能な部位であれば特に限定されないが、図 1 に示すように、mRNA 2 3 の塩基と相補的な塩基からなるもの（例えば、mRNA 2 3 の 3' 末端が poly A である場合には、poly A と相補的な塩基である poly T）であることが好ましい。

結合部位 2 f を有することにより、核酸リンカー 2 と mRNA 2 3 との結合の安定度を増すことができる。

[0037] 本実施形態の核酸リンカー 2 は、一本鎖という単純な構造を有しているため、従来の核酸リンカーと比較して容易に製造できる。このため、この核酸リンカーを用いることにより、ペプチド又はタンパク質を迅速かつ簡単に調整できる。更に、本実施形態の核酸リンカー 2 は、アーム部分 5 1 b を標識物質 2 d により標識可能である。また、標識物質 2 d の分子数を合成により

適宜変更可能である。従って、本実施形態によれば、例えば蛍光相関分光法に必要とされる蛍光 1 分子でラベル化されたペプチドやタンパク質を迅速かつ簡単に調整できる。

[0038] [第 2 実施形態]

本実施形態の核酸リンカー 1 2 の構造について、図 2 を用いて説明する。

図 2 において、図 1 の核酸リンカー 2 の模式図に示されたものと同じ構成要素には、同一の符号を付して説明を省略する。

[0039] 本実施形態の核酸リンカー 1 2 は、第 1 実施形態と同様に、5' 側にスクリーニングすべき mRNA 2 3 の少なくとも一部の配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド部分 5 1 a と、前記タンパク質又はペプチド 3 3 との連結部分 2 a を 3' 末端に有するアーム部分 5 1 b' と、を有し、これらが一本鎖を形成している。また、アーム部分とポリヌクレオチド部分がホスホジエステル結合により連結している。

本実施形態においては、アーム部分 5 1 b' が、核酸又は核酸誘導体のみからなる。即ち、本実施形態の核酸リンカー 1 2 は、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体がホスホジエステル結合のみにより連結されてなる。本実施形態の核酸リンカー 1 2 は、核酸又は核酸誘導体のみの一本鎖から構成されているため、第 1 実施形態に加えて、更に容易に製造することができる。

[0040] ≪mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体及びその製造方法≫

[第 1 実施形態]

本実施形態の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体は、本実施形態の核酸リンカーを用いて製造される。

本実施形態の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法は、(a) 前記 mRNA と前記核酸リンカーとをアニールさせる工程と、(b) 前記工程 (a) の後、前記 m

R N Aの末端と前記核酸リンカーの末端とをライゲーションさせて、m R N Aー核酸リンカー複合体を製造する工程と、（c）前記工程（b）の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記m R N Aからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、m R N Aー核酸リンカーータンパク質複合体又はm R N Aー核酸リンカーーペプチド複合体を作製する工程と、を有することを特徴とする。

以下、図3を用いて各工程について説明する。

[0041] 工程（a）において、m R N A 2 3と核酸リンカー2とをアニールさせる。まず、工程（a）に用いられるm R N Aの調製について説明する。

m R N A 2 3は、スクリーニングすべきタンパク質又はペプチドをコードするD N Aを調製し、そのD N AをR N Aポリメラーゼにより転写させることにより得られる。R N Aポリメラーゼとしては、例えばT 7 R N Aポリメラーゼが挙げられる。

前記D N Aとしては、標的分子との結合に関して調べたい任意のD N AまたはD N Aライブラリーを利用することができる。例えば、サンプル組織から得たc D N Aライブラリー、配列をランダムに合成したD N Aライブラリー、配列の一部を変異させたD N Aライブラリーなどを用いることができる。

作製されるタンパク質又はペプチドを精製しやすいように、P C R等で予めD N Aの末端にポリヒスチジンやF L A G等のタグをコードする塩基配列を付加しておくことが好ましい。

[0042] 次にm R N A 2 3の3'末端領域と核酸リンカー2の5'末端領域とをアニールさせる。例えば、90℃まで加熱し、m R N A 2 3を変性させた後、1時間かけて25℃まで冷却することによりm R N A 2 3が核酸リンカー2に確実にハイブリダイズされる。

[0043] 次に工程（b）において、前記工程（a）の後、m R N A 2 3の3'末端と核酸リンカー2の5'末端とをライゲーションさせて、m R N Aー核酸リ

ンカー複合体を作製する。

ライゲーショに際し、前記mRNAの3'末端を、T4ポリヌクレオチドキナーゼ等の酵素を用いて、リン酸化させておく必要がある。ライゲーショに用いる酵素としては、RNAリガーゼが好ましく、例えばT4RNAリガーゼが挙げられる。

[0044] 次に工程(c)において、前記工程(b)の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNA23からタンパク質又はペプチド33を合成し、タンパク質又はペプチド33のC末端と核酸リンカー2のタンパク質又はペプチド33との連結部分2aとを結合させて、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を作製する。

[0045] 無細胞タンパク質翻訳系とは、適当な細胞から抽出されたタンパク質合成能を有する成分からなるタンパク質翻訳系であり、この系にはリボゾーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、解離因子、アミノアシルtRNA合成酵素等、翻訳に必要な要素が含まれている。このようなタンパク質翻訳系として、大腸菌抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等が挙げられる。

更に、翻訳に必要な要素が独立に精製された因子のみからなる再構成型無細胞タンパク質合成系が挙げられる。再構成型無細胞タンパク質合成系は、従来の細胞抽出液を使用する場合よりもヌクレアーゼやプロテアーゼの混入を容易に防ぐことができるため、翻訳効率を高めることができる。

このような系を用いることにより、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体が製造される。

[0046] [第2実施形態]

本実施形態のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法は、(a1)複数種類のmRNAと、互いに異なる種類の標識物質を有する複数種類の核酸リンカー、とをそれぞれ別個にアニールさせる工程と、(b1)前記工程(a1)の後、前記複数種類のmRNAの末端と前記複数種類の核酸リンカーの末端とをそれぞれ

れ別個にライゲーションさせて、複数種類のmRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程と、(c1)前記工程(b1)の後、前記複数種類のmRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、複数種類のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程、を有する。

[0047] 上述した第1実施形態におけるmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複体の製造方法によれば、mRNAから翻訳したタンパク質又はペプチドのC末にピューロマイシンを含む核酸リンカーが結合することにより、蛍光色素等の標識物質を導入することができる。

かかる方法は、タンパク質又はペプチドと標的分子の相互作用を、例えば蛍光色素を使用して測定する際に非常に有用な標識方法を提供するものである。

更に、本実施形態におけるmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複体の製造方法は、上記蛍光色素を使用して分子間相互作用を解析する場合において、蛍光相関分光法(Fluorescence correlation spectroscopy: FCS)を使用するときに、有用性を発揮する。

以下、図4を用いて各工程について説明する。

[0048] 本実施形態においては、簡略化のため2種類のmRNA 5'3', 6'3'と、互いに異なる種類の標識物質 2'2'd, 3'2'dを有する2種類の核酸リンカー 2'2', 3'2'について説明する。

工程(a1)は、2種類のmRNA 5'3', 6'3'と、互いに異なる種類の標識物質 2'2'd, 3'2'dを有する2種類の核酸リンカー 2'2', 3'2'とを、それぞれ別の反応容器中に用意し、別個にアニールさせる工程である。

用いられる標識物質としては、蛍光色素が好ましく、例えば、FAM（カルボキシフルオレセイン）、JOE（6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン）、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、TET（テトラクロロフルオレセイン）、HEX（5'-ヘキサクロロフルオレセイン-Cエホスホロアミダイト）、Cy3、Cy5、Alexa568、Alexa647等が挙げられる。

[0049] 工程（b1）は、前記工程（a1）の後、mRNA53,63の3'末端と核酸リンカー22,32の5'末端とをライゲーションさせて、2種類のmRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程である。ライゲーションの詳細については、第1実施形態の工程（b）と同様である。工程（b1）により、例えば、A色の蛍光色素が結合したmRNA-核酸リンカー複合体とB色の蛍光色素が結合したmRNA-核酸リンカー複合体がそれぞれ別個に製造される。

[0050] 工程（c1）は、前記工程（b1）の後、2種類のmRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いてmRNA53,63からタンパク質又はペプチド133,233を合成し、タンパク質又はペプチド133,233のC末端と核酸リンカー22,32のタンパク質又はペプチドとの連結部分22a,32aとを各々結合させて、2種類のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程である。

無細胞タンパク質翻訳系の詳細については、第1実施形態の工程（c）と同様である。

工程（c1）により、例えば、A色の蛍光色素が結合したmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体とB色の蛍光色素が結合したmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体が同一反応液中に製造される。

蛍光色素を使用して、分子間相互作用等を解析する場合、数種類のタンパク質分子又はペプチド分子に、それぞれ異なる色の蛍光標識をそれぞれ施す

ことにより、同時に数種類の分子における分子間相互作用等の解析が可能となる。

本実施形態においては、2種類のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造することにより、この反応混合液を、その後の分子間相互作用解析に用いることができる。

本実施形態によれば、複数種類のタンパク質分子又はペプチド分子に比較的容易に、様々な色の蛍光標識を、簡便に、確実に標識できる。

[0051] 《核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法》

本実施形態の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体は、核酸リンカーを1本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位で切断することにより生じる二つの断片のうち、タンパク質又はペプチドとの連結部分を含む断片と、タンパク質又はペプチドと、からなる。かかる核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法としては、特に限定されないが、好ましい実施形態について以下、説明する。

[0052] [第1実施形態]

本実施形態の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法は、(a)前記mRNAと前記核酸リンカーとをアニールさせる工程と、(b)前記工程(a)の後、前記mRNAの末端と前記核酸リンカーの末端とをライゲーションさせて、mRNA-核酸リンカー複合体を製造する工程と、(c)前記工程(b)の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を製造する工程と、(d2)前記工程(c)の後、1本鎖核酸切断酵素を作用させることにより

、又は、光照射により、mRNA-核酸リンカータンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカーペプチド複合体中の核酸リンカーを、前記1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して切断産物を得る工程と、(e2) 前記工程(d2)の後、前記切断産物から前記核酸リンカー断片タンパク質複合体又は核酸リンカー断片ペプチド複合体を精製する工程と、を有する。

以下、図5を用いて各工程について説明するが、図5において、図3のmRNA-核酸リンカータンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカーペプチド複合体の製造方法の模式図に示されたものと同じ構成要素には、同一の符号を付して説明を省略する。

[0053] 工程(a)～工程(c)は、mRNA-核酸リンカータンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカーペプチド複合体の製造方法の第1実施形態の工程と同様である。

工程(d2)は、工程(c)の後、1本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、mRNA-核酸リンカータンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカーペプチド複合体中の核酸リンカー2を、前記1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して切断産物を得る工程である。

[0054] 工程(d2)における1本鎖核酸切断酵素の作用方法は、RNase T1等の酵素の至適pH、至適温度等を考慮して定法に従った方法が挙げられる。

また、光照射方法としては、紫外線等の光切断部位を切断し得る波長の光を照射する方法が挙げられる。

mRNA-核酸リンカータンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカーペプチド複合体を、1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断することにより、切断産物として、タンパク質又はペプチド33との連結部分を含む断片(核酸リンカー断片66)とタンパク質又はペプチド33とからなる核酸リンカー断片タンパク質複合体又は核酸リンカー断片ペプチド

複合体、及び、切断部位より5'末端側の核酸リンカー断片（その他の核酸リンカー断片68）とmRNA23との複合体が得られる。

[0055] 工程（e2）は、前記工程（d2）の後、前記切断産物から前記核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体を精製する工程である。

工程（e2）において、切断産物として存在する、切断部位より5'末端側の核酸リンカー断片（その他の核酸リンカー断片68）とmRNAとの複合体、及び、前記核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体とから、核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体のみを精製する。切断産物中には、複合体を形成しなかったフリーのmRNAや核酸リンカーの切断産物も含まれるため、精製により、併せてこれらも除去する。

[0056] 精製方法としては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン精製交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等、クロマトグラフィーを用いた精製方法が挙げられる。中でも、簡便且つ精製効率が高いという観点から、アフィニティークロマトグラフィーを用いた精製方法が好ましい。

アフィニティークロマトグラフィーとしては、スクリーニングすべきmRNAがコードするタンパク質又はペプチドを構成するアミノ酸配列に応じて適宜選択される。mRNAに、ポリヒスチジンやFLAG等のタグをコードする塩基配列が付加されている場合には、これらのタグ配列に親和性を示す物質を用いることができる。例えば、スクリーニングすべきmRNAがポリヒスチジンをコードする塩基配列を有している場合には、ニッケルカラムやコバルトカラムを用いることができる。ここで、ニッケルカラムやコバルトカラムを用いる場合には、カラムにキレートしているニッケルやコバルトの脱離を防止するために、透析等、バッファー交換を行い予め切断産物から還元剤を除いておくことが好ましい。

また、精製方法としては、樹脂担体をそのまま用いたバッチ精製法でもよい。

工程（e 2）により、核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体が得られる。これら複合体は、三次元構造を形成することによりアプタマーとして機能するおそれのある mRNA を排除してあるため、分子間相互作用解析に好適に用いられる。

[0057] [第2実施形態]

本実施形態の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法は、（a 1）複数種類の mRNA と、互いに異なる種類の標識物質を有する複数種類の核酸リンカーと、をそれぞれ別個にアニールさせる工程と、（b 1）前記工程（a 1）の後、前記複数種類の mRNA の末端と前記複数種類の核酸リンカーの末端とをそれぞれ別個にライゲーションさせて、複数種類の mRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程と、（c 1）前記工程（b 1）の後、前記複数種類の mRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドの C 末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、複数種類の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程と、（d 3）前記工程（c 1）の後、1 本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、複数種類の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体中の核酸リンカーを、前記 1 本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して複数種類の切断産物を得る工程と、（e 3）前記工程（d 3）の後、前記複数種類の切断産物から前記複数種類の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を精製する工程と、を有する。

以下、図 6 を用いて各工程について説明するが、図 6 において、図 4 の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法の模式図に示されたものと同じ構成要素には、同一の符号を付して説明を省略する。

[0058] 工程（a 1）～工程（c 1）は、mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体の製造方法の第2実施形態の工程と同様である。

工程（d 3）は、工程（c 1）の後、1本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、mRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体中の核酸リンカーを、前記1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して切断産物を得る工程である。

[0059] 工程（d 3）における1本鎖核酸切断酵素の作用方法及び光照射方法は、第1実施形態における工程（d 2）におけるものと同様である。

工程（d 3）により、例えば、A色の蛍光色素又はB色の蛍光色素が結合したmRNA－核酸リンカー－タンパク質複合体又はmRNA－核酸リンカー－ペプチド複合体を、1本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断することにより、切断産物として、タンパク質又はペプチドとの連結部分を含む断片（核酸リンカー断片166, 266）と、タンパク質又はペプチド133, 233と、からなるA色の蛍光色素又はB色の蛍光色素が結合した核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体、及び、切断部位より5'末端側の核酸リンカー断片（その他の核酸リンカー断片168, 268）とmRNA53, 63との複合体を一度に得られる。

[0060] 工程（e 3）は、前記工程（d 3）の後、前記複数種類の切断産物から前記複数種類の核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体を精製する工程である。

工程（e 3）における精製方法は、第1実施形態における工程（e 2）におけるものと同様である。

工程（e 3）により、例えば、A色の蛍光色素又はB色の蛍光色素が結合した核酸リンカー断片－タンパク質複合体又は核酸リンカー断片－ペプチド複合体が一度に得られる。

これら複合体は、三次元構造を形成することによりアプタマーとして機能するおそれのある mRNA を排除してあるため、これら複合体をそのまま分子間相互作用解析に供することができる。

[0061] 《タンパク質アレイ又はペプチドアレイ》

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、上述したタンパク質複合体又はペプチド複合体をマイクロアレイ基板上に固定化されてなるものである。用いられる基板としては、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板等が挙げられる。本実施形態のタンパク質複合体又はペプチド複合体に、固相結合部位を設け、その固相結合部位と、基板に結合させた固相結合部位認識部位との結合を利用して、タンパク質複合体をマイクロアレイ基板上に固定化する。

このような固相結合部位／固相結合部位認識部位の組み合わせとしては、アビジン及びストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質／ビオチン、スクシンイミジル基等の活性エステル基／アミノ基、ヨウ化アセチル基／アミノ基、マレイミド基／チオール基（-SH）、マルトース結合タンパク質／マルトース、Gタンパク質／グアニンヌクレオチド、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、DNA 結合タンパク質／DNA、抗体／抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン／カルモジュリン結合ペプチド、ATP 結合タンパク質／ATP、あるいはエストラジオール受容体タンパク質／エストラジオールなどの、各種受容体タンパク質／そのリガンドなどが挙げられる。

これらの中で、固相結合部位／固相結合部位認識部位の組合せとしては、アビジン及びストレプトアビジンなどのビオチン結合タンパク質／ビオチン、マルトース結合タンパク質／マルトース、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、抗体／抗原分子（エピトープ）などが好ましく、使い勝手の良さからストレプトアビジン／ビオチンの組合せが最も好ましい。

[0062] なお、上記組合せは、固相結合部位と固相結合部位認識部位とを逆転させて用いることもできる。上記の固定化手段は、2つの相互に親和性を有する物質を利用した固定化方法である。固相がスチレン基板などのプラスチック材料であれば、必要に応じて、公知の手法を用いてリンカーの一部を直接それらの固相に共有結合させることもできる（Qiagen社、Liquid Chip Applications Handbook等参照）。

[0063] 本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイが、上述した核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を固相に固定したものである場合には、1本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を切断する際、切断除去されるmRNAを別途回収して、タンパク質アレイ又はペプチドアレイ上の各スポットの遺伝情報を集積しておく必要がある。固相の例として、ビーズや基板が挙げられる。

なお、核酸リンカー-タンパク質複合体又は核酸リンカー-ペプチド複合体を固相に固定する場合には、固相結合部位は核酸リンカーのポリヌクレオチド部分またはアーム部分に設けてもよい。

[0064] 《分子間相互作用解析方法》

本実施形態の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を用いて、標的分子との相互作用を解析することができる。また、本実施形態のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を用いて、標的分子との相互作用を解析することができる。「標的分子」とは、本実施形態において合成されるタンパク質又はペプチドと相互作用するか否かを調べるための物質を意味し、有機化合物、無機化合物、あるいはこれらの複合体を示し、一例として、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子化合物等が挙げられる。

この際、餌となるタンパク質側を「ベイト（bait）」といい、釣られるタンパク質側を「プレイ（prey、餌食）」という。ここで、ベイトタ

ンパク質 (bait protein) としては、所望のタンパク質を使用することができる。また、プレイトンパク質 (prey protein) としては、例えば、サバイビンモノマー、サバイビンダイマー、及び低分子化合物からなる群から選ばれることが好ましく、サバイビンモノマー又はサバイビンダイマーであることが、特に好ましい。ここで、上記「低分子化合物」とは、分子量30～1,500の範囲にある化合物をいい、糖鎖の有無を問わない。例えば、アフラトキシンB1、シガトキシン、フルオロセイン、N-アセチル-D-グルコサミン等を挙げることができる。たとえば、標識したプレイトンパク質（例として蛍光標識したプレイトンパク質）とタンパク質複合体又はペプチド複合体を反応させ、結合体を生成し、標識したプレイトンパク質を検出することで、その結合体の相互作用を解析することができる。

[0065] 分子間相互作用を測定する手法としては、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET法)、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光イメージングアナライズ法、固相酵素免疫検定法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA))、蛍光偏光解消法、蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy: FCS) 等が挙げられ、蛍光相関分光法を用いることが好ましい。

[0066] 蛍光相関分光法は、蛍光分子が微小な焦点領域を出入りする際に生じる「蛍光強度のゆらぎ」を解析することで、その蛍光分子の持つ「動き」と「数」という動的な情報を得ることができる方法である。

本実施形態のタンパク質複合体又はペプチド複合体は、蛍光1分子でラベル化されたペプチドやタンパク質を迅速かつ簡単に調整できるため、蛍光相関分光法に好適に用いられる。

[0067] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0068] [実験例1] (核酸リンカーの合成1)

以下に示す材料をジーンワールド社より購入した。

(1) FCS Linker [配列: 5' -X1- (Alexa488) - (spc18) -CC- (Puro) -3']

ここで、X1は以下の配列を表す。

CCCACCCCGCCGCCCCCGTCCTAA (rG) TC (配列番号1: 28mer)

また、(Puro)はPuromycin CPG、(spc18)は(18-O-Dimethoxytritylhexaethyleneglycol, 1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite)である。これらは、いずれもGlen Research社製である。

[0069] (mRNAの合成)

5' 上流にT7プロモーター配列と翻訳促進配列、3' 側下流にスパーサー領域及びFCS Linkerとの相補鎖領域を有する配列を付加したProteinAのB-domain (以下、BDAという。配列番号2: 367bp)をPCRにより増幅した。

PCRにより得られたDNAからT7 RibomAX Express Large Scale RNA Production System (プロメガ社製)を用いて、添付のプロトコールに従って5~30pmol/μlのmRNAを合成した(337b)。

[0070] (mRNAと核酸リンカーの結合)

前記mRNA 5pmolと、前記FCS Linker 10pmolをT4 RNALigase buffer (タカラバイオ社製)中で混合し、90℃に加熱した後、15分間かけて25℃まで冷却した。この溶液に、0.5μlのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(10U/μl、東洋紡績社製)と、0.5μlのT4 RNAリガーゼ(40U/μl、タカラバイオ社製)を加えて混合し、25℃で15分間反応させた。

反応産物を8M尿素8%変性アクリルアミドゲル電気泳動で分離し、SYBR GOLD (Invitrogen社製)にて染色した。また、核酸リンカーは、Alexa 488により蛍光標識されており、この標識を指標に、蛍光イメージを取得した。結果を図7に示す。

レーン1はFCS LinkerとmRNA (BDA) とのライゲーション産物、レーン2はmRNA (BDA) を泳動したものである。

矢印はmRNA、mRNA-FCS Linker、又はFCS Linkerを示す。左図及び右図の電気泳動結果は、同一のゲルを異なるイメージング法を用いて解析したものである。左図は、Alexa 488による蛍光イメージを取得した結果であり、右図は、SYBR GOLDを用いて核酸を染色した結果である。

[0071] レーン1において、未反応のBDAのmRNAが検出されないことから、本実施形態の核酸リンカーを用いた場合のライゲーション効率は高いことが分かる。

[0072] (無細胞タンパク質翻訳系による翻訳)

上記のように合成した、核酸リンカーとmRNAの複合体に無細胞タンパク質翻訳系 (Wheat Germ Extract Plus、Promega社) を30 μ l加え、30℃、30分翻訳反応を行った。その後、3M KClを10 μ l、1M MgCl₂を3 μ l加えて37℃で40分間放置し、0.4M EDTAを10 μ l加え、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体を合成した。

[0073] (Niカラムによる核酸リンカー断片-タンパク質複合体の精製)

上記のように合成したmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体にRNase T1を添加し、37℃、30分間インキュベーションした。次いで、この反応溶液を、平衡化バッファー (50mM リン酸ナトリウム、300mM 塩化ナトリウム、20mM イミダゾール; pH 7.4) で平衡化した簡易カラム (Micro Bio-spin 6, Bio-Rad社) を用いてバッファー交換をした。

Ni カラムを平衡化バッファーを用いて平衡化した後、バッファー交換をした mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体分解物（核酸リンカー断片-タンパク質複合体）を Ni カラムに添加した。

次いで、洗浄バッファー（50 mM リン酸ナトリウム、300 mM 塩化ナトリウム、40 mM イミダゾール；pH 7.4）を添加して、Ni カラムから夾雑物を取り除いた後、溶出バッファー（50 mM リン酸ナトリウム、300 mM 塩化ナトリウム、300 mM イミダゾール；pH 7.4）を添加し、精製された核酸リンカー断片-タンパク質複合体を回収した。

上記に従って精製した核酸リンカー断片-タンパク質複合体を SDS-PAGE を用いて電気泳動を行った。核酸リンカーは、Alexa488 により蛍光標識されているため、泳動後、この標識を指標に、蛍光イメージを取得した。

結果を図 8 に示す。

[0074] 図 8 中、レーン 1 は Ni カラムで精製後の核酸リンカー断片-タンパク質複合体（3 pmol）、レーン 2 は精製前の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体分解物（0.5 pmol）、レーン 3 は核酸リンカーのみの分解物（1 pmol）を泳動したものである。矢印は核酸リンカー断片-タンパク質複合体（FCS Linker-B domain 複合体）、核酸リンカー（FCS Linker）、又は核酸リンカー断片（FCS Linker 断片）を示す。レーン 1 に示されるように、精製された核酸リンカー断片-タンパク質複合体の純度は非常に高いことが確認された。

[0075]（FCS による核酸リンカー断片-B domain 複合体と IgG 間の相互作用解析）

サンプル容器に、核酸リンカー断片-B domain 複合体 1.59 nM と、BDA と強い相互作用を示すことが知られている IgG を、それぞれ 0 nM, 0.17 nM, 0.33 nM, 1.67 nM, 3.33 nM, 16.7 nM, 33.3 nM, 167 nM, 333 nM 添加し、各試料の測定を行った。

各試料の実測データより自己相関関数を演算し、フィッティングカーブをとった結果を図9～図11に示す。また、各IgG濃度における拡散時間を表1に示す。

[0076] [表1]

IgG濃度 (nM)	拡散時間 (ms)
0	0.093983
1.65×10^{-10}	0.09771
3.30×10^{-10}	0.089112
1.65×10^{-9}	0.095721
3.30×10^{-9}	0.122718
1.65×10^{-8}	0.177419
3.30×10^{-8}	0.193769
1.65×10^{-7}	0.220069
3.30×10^{-7}	0.2205

[0077] 表1に示すように、FCSの結果よりフリーのBDAの拡散時間は、0.093983 msであった。フリーのBDAとIgG-BDA複合体の分子量の差は $161169 / 11169 = 14.430$ 倍であるため、それぞれのタンパク質が球状と仮定すると、拡散時間は $14.43^{1/3} = 2.436$ 倍となり、0.22339571 msとなる。

結合率x%は拡散時間をt msとすると、 $x = (t - 0.093983) / (0.22339571 - 0.093983)$ で求められる。図12は、IgGとBDAのモル比と結合率のプロットである。BDA=1.59 nMであるため結合率50%の濃度(Kd値)は $1.59 \times 6.816 = 10.8$ nMとなる。

[0078] また、各IgG濃度に基づくKd値は、

$Kd = [\text{フリーなA分子}] [\text{フリーなB分子}] / [\text{結合したA分子}]$ で求められる。各IgG濃度に基づくKd値を表2に示す。

[0079]

[表2]

I g G濃度 (nM)	K d (nM)
1.65×10^{-10}	4.34×10^{-9}
3.30×10^{-10}	1.1×10^{-8}
1.65×10^{-9}	1.2×10^{-7}
3.30×10^{-9}	1.04×10^{-8}
1.65×10^{-8}	8.51×10^{-9}
3.30×10^{-8}	9.38×10^{-9}
1.65×10^{-7}	4.31×10^{-9}
3.30×10^{-7}	7.51×10^{-9}

[0080] 各 I g G濃度に基づく K d 値は、図 1 2 から算出された値とほぼ一致していることが確認された。

[0081] 以上の結果から、本実施形態の核酸リンカーによれば、簡便に合成可能で、標識ペプチド又は標識タンパク質を迅速かつ簡単に調整することができる。よって、本実施形態の核酸リンカーを用いて得られたタンパク質を用いて、分子間相互作用解析を迅速かつ容易に行えることが明らかである。

[0082] [実験例 2]

下記の核酸リンカーを用いて分子間相互作用解析 (b a i t タンパク質と p r e y タンパク質との相互作用解析) を行った。図 1 3 に、実験例 2 の模式図及び核酸リンカーのコンストラクトを示す。分子間相互作用解析としてプルダウン法を用い、相互作用を示すことが知られている 3 種類の組み合わせ (B D A と I g G ; F L A G タグと抗 F L A G 抗体 ; マウス F a s リガン ド (以下、F a s L という。)) と抗 F a s L モノクローナル抗体) について評価した。

B D A、F L A G タグ、F a s L を、磁気ビーズに b a i t タンパク質として固定した。図 1 3 に示すように、b a i t タンパク質をコードする D N A は、T 7 プロモーター配列、オメガ配列、コザック配列、b a i t タンパク質コード領域、及び核酸リンカーとハイブリダイズする領域 (以下、H R という。) から構成される。b a i t タンパク質をコードする D N A を T 7 R i b o M A X E x p r e s s L a r g e S c a l e R N A P r

roduction System（プロメガ社製）を用いて、添付のプロトコールに従ってmRNAを合成し、RNA purification kit（キアゲン社製）を用いて精製した。

[0083]（核酸リンカーの合成2）

以下に示す材料をジーンワールド社より購入した。

（1）ビオチン化核酸リンカー〔配列：5′-CCGC-（B）-X2-（spc18）-CC-（Puro）-3′〕

ここで、X2は以下の配列を表す。

CGACCCCGCCGCCCGCCCGTCCT（配列番号3：22mer）

また、（B）はBiotinTEGで修飾されたT、（Puro）はPurromycin CPG、（spc18）は（18-O-Dimethoxytritylhexaethyleneglycol, 1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite）である。これらは、いずれもGlen Research社製である。

[0084]（mRNAと核酸リンカーの結合）

上述した精製mRNAと、ビオチン化核酸リンカーを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ及びT4 RNAリガーゼを用いて結合（ライゲーション）させた。

[0085]（無細胞タンパク質翻訳系による翻訳）

ライゲーション産物に対して、Retic Lysate IVT kitを用いて、翻訳反応を行い、mRNA-ビオチン化核酸リンカー-タンパク質複合体を合成した。翻訳反応産物にEDTA溶液（0.5M, pH8.0）を加え、mRNA-ビオチン化核酸リンカー-タンパク質複合体に結合しているリボソームを取り除いた。次いで、RNase One（プロメガ社製）を加え、mRNA-ビオチン化核酸リンカー-タンパク質複合体中のmRNAを分解した。磁気ビーズとしてDynabeads MyOne

s t r e p t a v i d i n C 1 (インビトロジェン社製)を用いて、各ビオチン化核酸リンカータンパク質複合体溶解液からビオチン化b a i t タンパク質を捕捉した。

[0086] (プルダウンアッセイ)

各p r e y タンパク質 (I g G : シグマールドリチ社製、マウスモノクローナル抗F L A G 抗体 : シグマールドリチ社製、ハムスターモノクローナル抗F a s L 抗体 : 医学生物学研究所製) をN-ヒドロキシスクシニミド-フルオロセイン (P i e r c e 社製) で標識した。フルオロセイン標識p r e y タンパク質溶解液 (200 nM 又は 400 nM) をビオチン化b a i t タンパク質が結合した磁気ビーズに加え、25℃で30分インキュベーションを行った後、この磁気ビーズを0.01% T w e e n 20 含有P B S (以下、P B S T という。) で3回洗浄した。洗浄後の磁気ビーズをS D S -P A G E サンプルバッファーに懸濁し、90℃で5分インキュベーションを行い、磁気ビーズ上に残ったp r e y タンパク質-ビオチン化b a i t タンパク質複合体を溶出した。

溶出液をS D S -P A G E を用いて電気泳動を行った。泳動後、f l u o r i m a g e r (バイオラッド社製) を用いて蛍光イメージを取得した。結果を図14に示す。図14上段は、プルダウンされたp r e y タンパク質の蛍光イメージを示し、図14下段は、各イメージ (バンド) の蛍光強度を定量化したグラフである。図14に示されるように、相互作用を示すことが知られている組み合わせにおいては、ビオチン化b a i t タンパク質によりp r e y タンパク質がプルダウンされることが確認された。また、F L A G タグと抗F L A G 抗体との結合の度合いは、F a s L と抗F a s L モノクローナル抗体の結合の度合いより強い等、プルダウンされたp r e y タンパク質の蛍光強度は、概ね各相互作用における解離定数に依存していた。

更に、プルダウンされたp r e y タンパク質の分子数がI n p u t されるp r e y タンパク質の濃度に依存するかどうかを、2種類の異なる濃度 (200 nM, 400 nM) の抗F L A G 抗体を用いて評価した。図14上段に

示されるように、400 nMの抗FLAG抗体を用いた場合は、200 nMの抗FLAG抗体を用いた場合よりも、より多分子数のpreyタンパク質がプルダウンされることが分かった。

[0087] 以上の結果から、本実施形態の核酸リンカーによれば、分子間相互作用解析に必要な量のbaitタンパク質を迅速かつ簡単に低コストで調整することができる。よって、本実施形態の核酸リンカーを用いて得られたタンパク質を用いて、分子間相互作用解析を迅速かつ容易に行えることが明らかである。

産業上の利用可能性

[0088] 本発明によれば、ペプチド又はタンパク質を簡単に調整できる核酸リンカーが得られる。したがって、本発明は相互作用解析等に好適に利用でき、産業上極めて重要である。

符号の説明

[0089] 2, 1 2, 2 2, 3 2…核酸リンカー
2 a, 2 2 a, 3 2 a…連結部分
2 d, 2 2 d, 3 2 d…標識物質
2 e…切断部位
2 f…結合部位
2 3, 5 3, 6 3…mRNA
3 3, 1 3 3, 2 3 3…タンパク質又はペプチド
5 1 a…ポリヌクレオチド部分
5 1 b, 5 1 b' …アーム部分
6 6, 1 6 6, 2 6 6…核酸リンカー断片
6 8, 1 6 8, 2 6 8…その他の核酸リンカー断片

請求の範囲

- [請求項1] m R N A と、該 m R N A によりコードされるタンパク質又はペプチドとの複合体を製造するための核酸リンカーであって、
前記 m R N A の少なくとも一部の配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド部分と、
前記タンパク質又はペプチドとの連結部分を末端に有するアーム部分と、が一本鎖を形成してなることを特徴とする核酸リンカー。
- [請求項2] 前記ポリヌクレオチド部分と、前記アーム部分とがホスホジエステル結合で連結した請求項 1 に記載の核酸リンカー。
- [請求項3] ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体がホスホジエステル結合のみにより連結されてなる請求項 1 又は 2 に記載の核酸リンカー。
- [請求項4] 前記 m R N A の末端との結合部位を、前記ポリヌクレオチド部分側の末端に有する請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の核酸リンカー。
- [請求項5] 前記アーム部分が、該アーム部分を切断するための 1 本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位を含む請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の核酸リンカー。
- [請求項6] 前記アーム部分が、標識物質を、前記 1 本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位よりも、前記タンパク質又はペプチドとの連結部分側に有する請求項 5 に記載の核酸リンカー。
- [請求項7] 固相結合部位を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の核酸リンカー。
- [請求項8] 前記タンパク質又はペプチドは、分子間相互作用解析に用いられる請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸リンカー。
- [請求項9] 前記タンパク質又はペプチドとの連結部分は、前記アーム部分の末端にピューロマイシン、3' - N - アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、又は 3' - N - アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドが結合されてなる請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の核酸リンカー。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸リンカーを介して、前記mRNAと、前記mRNAによりコードされるタンパク質又はペプチドと、を連結してなることを特徴とするmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体。

[請求項11] 請求項5～9のいずれか一項に記載の核酸リンカーを前記1本鎖核酸切断酵素部位又は光切断部位で切断することにより生じる二つの断片のうち、前記タンパク質又はペプチドとの連結部分を含む断片と、前記タンパク質又はペプチドと、からなることを特徴とする核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体。

[請求項12] 請求項10に記載のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法であって、

(a) 前記mRNAと前記核酸リンカーとをアニールさせる工程と、

(b) 前記工程(a)の後、前記mRNAの末端と前記核酸リンカーの末端とをライゲーションさせて、mRNA-核酸リンカー複合体を製造する工程と、

(c) 前記工程(b)の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドのC末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を製造する工程と、

を有することを特徴とするmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法。

[請求項13] 請求項10に記載のmRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又はmRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法であって、

(a1) 複数種類のmRNAと、互いに異なる種類の標識物質を有

する複数種類の核酸リンカー、とをそれぞれ別個にアニールさせる工程と、

(b 1) 前記工程 (a 1) の後、前記複数種類の mRNA の末端と前記複数種類の核酸リンカーの末端とをそれぞれ別個にライゲーションさせて、複数種類の mRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程と、

(c 1) 前記工程 (b 1) の後、前記複数種類の mRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドの C 末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、複数種類の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程と、

を有することを特徴とする mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体の製造方法。

[請求項14]

請求項 11 に記載の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法であって、

(a) 前記 mRNA と前記核酸リンカーとをアニールさせる工程と、

(b) 前記工程 (a) の後、前記 mRNA の末端と前記核酸リンカーの末端とをライゲーションさせて、mRNA-核酸リンカー複合体を製造する工程と、

(c) 前記工程 (b) の後、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドの C 末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を製造する工程と、

(d 2) 前記工程 (c) の後、1 本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体中の核酸リンカーを、前記 1 本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して切断産物を得る工程と、

(e 2) 前記工程 (d 2) の後、前記切断産物から前記核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を精製する工程と、を有することを特徴とする核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法。

[請求項15]

請求項 11 に記載の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法であって、

(a 1) 複数種類の mRNA と、互いに異なる種類の標識物質を有する複数種類の核酸リンカーと、をそれぞれ別個にアニールさせる工程と、

(b 1) 前記工程 (a 1) の後、前記複数種類の mRNA の末端と前記複数種類の核酸リンカーの末端とをそれぞれ別個にライゲーションさせて、複数種類の mRNA-核酸リンカー複合体をそれぞれ別個に製造する工程と、

(c 1) 前記工程 (b 1) の後、前記複数種類の mRNA-核酸リンカー複合体を混合し、無細胞タンパク質翻訳系を用いて前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドの C 末端と前記核酸リンカーの前記タンパク質又はペプチドとの連結部分とを結合させて、複数種類の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体を同一反応液中に製造する工程と、

(d 3) 前記工程 (c 1) の後、1 本鎖核酸切断酵素を作用させることにより、又は、光照射により、複数種類の mRNA-核酸リンカー-タンパク質複合体又は mRNA-核酸リンカー-ペプチド複合体

中の核酸リンカーを、前記 1 本鎖核酸切断酵素部位又は前記光切断部位で切断して複数種類の切断産物を得る工程と、

(e 3) 前記工程 (d 3) の後、前記複数種類の切断産物から前記複数種類の核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体を精製する工程と、を有することを特徴とする核酸リンカー断片-タンパク質複合体又は核酸リンカー断片-ペプチド複合体の製造方法。

[請求項16] 請求項 10 又は 11 に記載のタンパク質複合体又はペプチド複合体が基板上に固定化されてなることを特徴とするタンパク質アレイ又はペプチドアレイ。

[請求項17] 請求項 10 又は 11 に記載のタンパク質複合体又はペプチド複合体を標的分子と接触させ、前記標的分子と前記タンパク質複合体又はペプチド複合体との相互作用を解析することを特徴とする分子間相互作用解析方法。

[請求項18] 蛍光相関分光法を用いる請求項 17 に記載の分子間相互作用解析方法。

[請求項19] 分子間相互作用解析方法であって、
(a) 請求項 10 に記載のタンパク質複合体又はペプチド複合体の、前記タンパク質又は前記ペプチドをベイトタンパク質として固相に固定する固定化工程と、

(b) 前記ベイトタンパク質と、標識されたプレイタンパク質とを反応させてベイトタンパク質-プレイタンパク質結合体を生成させる反応工程と、

(c) 前記標識されたプレイタンパク質を検出する検出工程と、
を有することを特徴とする分子間相互作用解析方法。

[請求項20] プレイタンパク質のスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 10 に記載のタンパク質複合体又はペプチド複合体の、前記タンパク質又は前記ペプチドをベイトタンパク質として固相に

固定する固定化工程と、

(b) 前記ベイトタンパク質と、標識されたプレイタンパク質とを反応させてベイトタンパク質 - プレイタンパク質結合体を生成させる反応工程と、

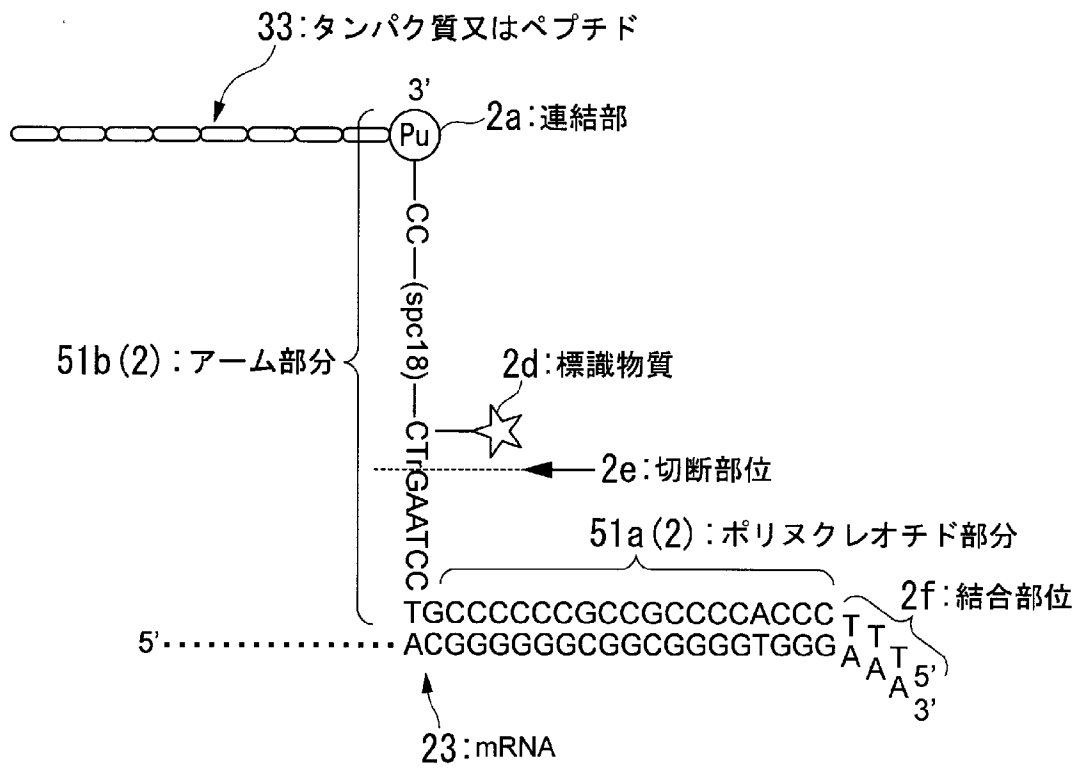
(c) 前記ベイトタンパク質 - プレイタンパク質結合体を集める収集工程と、

(d) 前記収集されたベイトタンパク質 - プレイタンパク質結合体を洗浄して、前記プレイタンパク質を溶出させる溶出工程と、

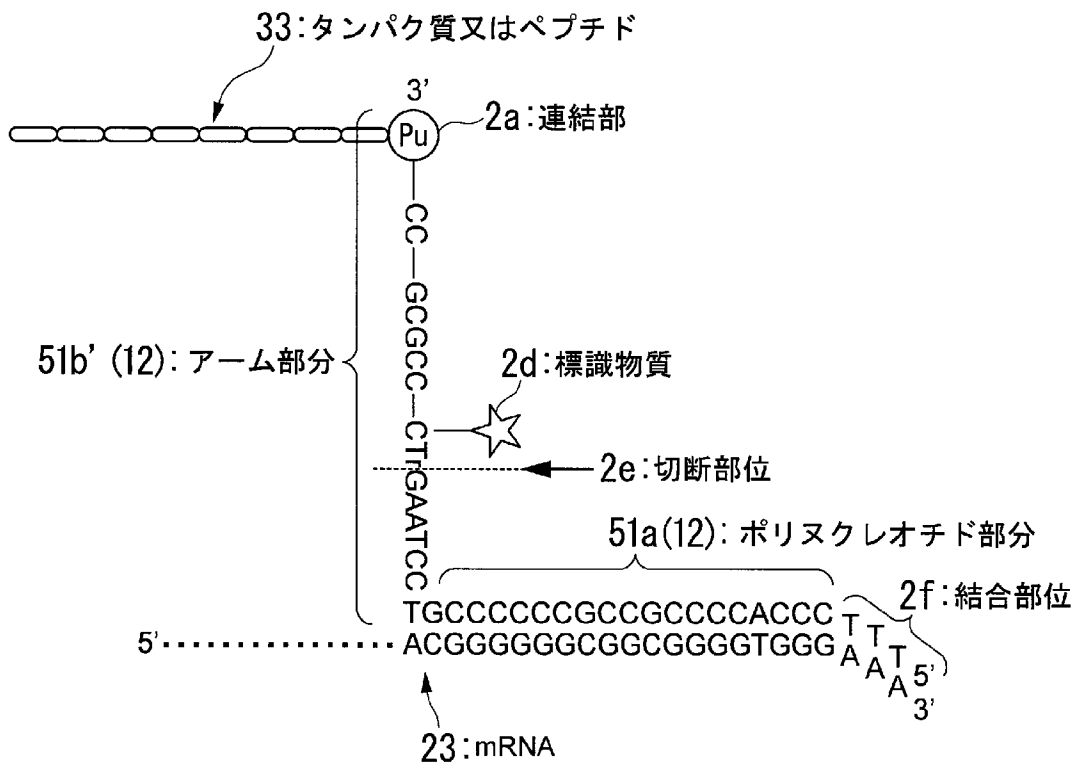
を有することを特徴とするプレイタンパク質のスクリーニング方法

。

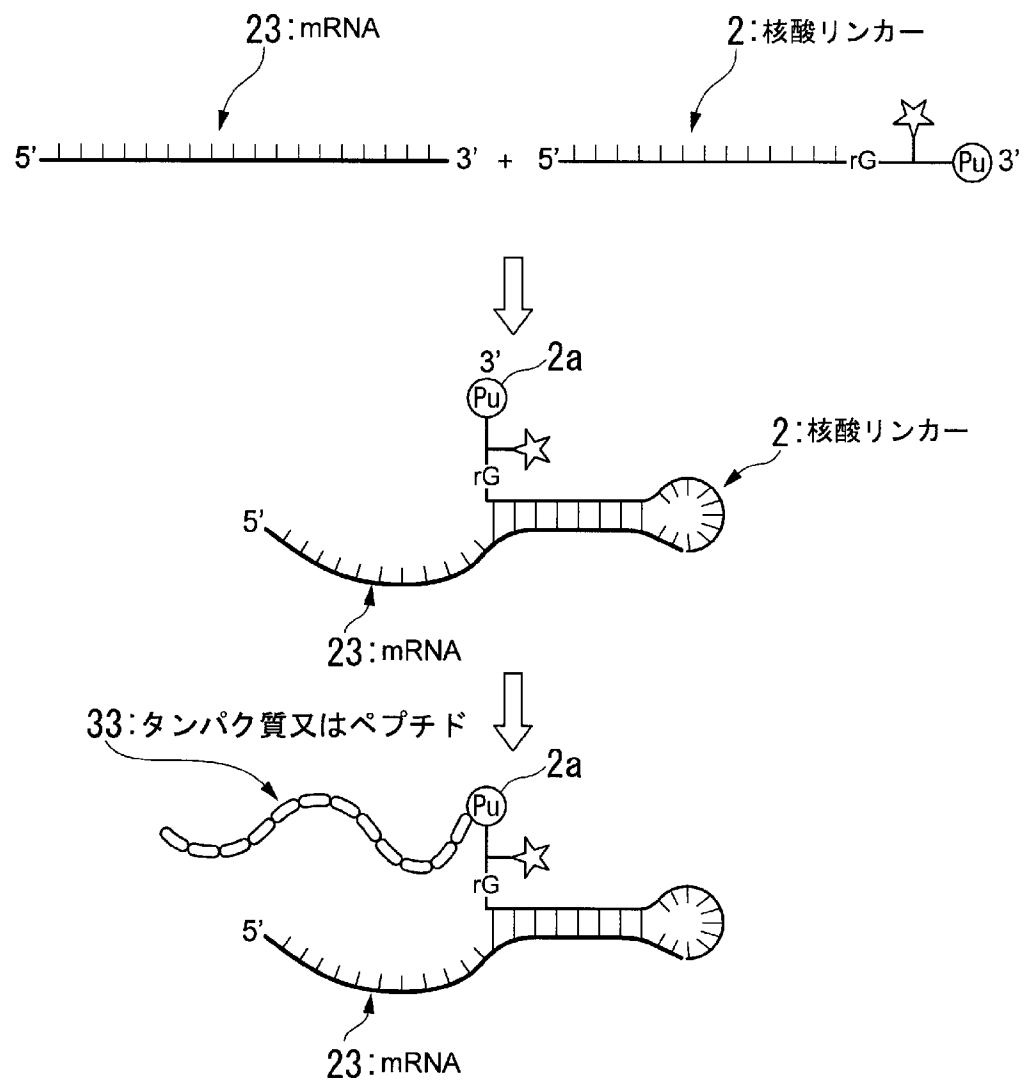
[図1]



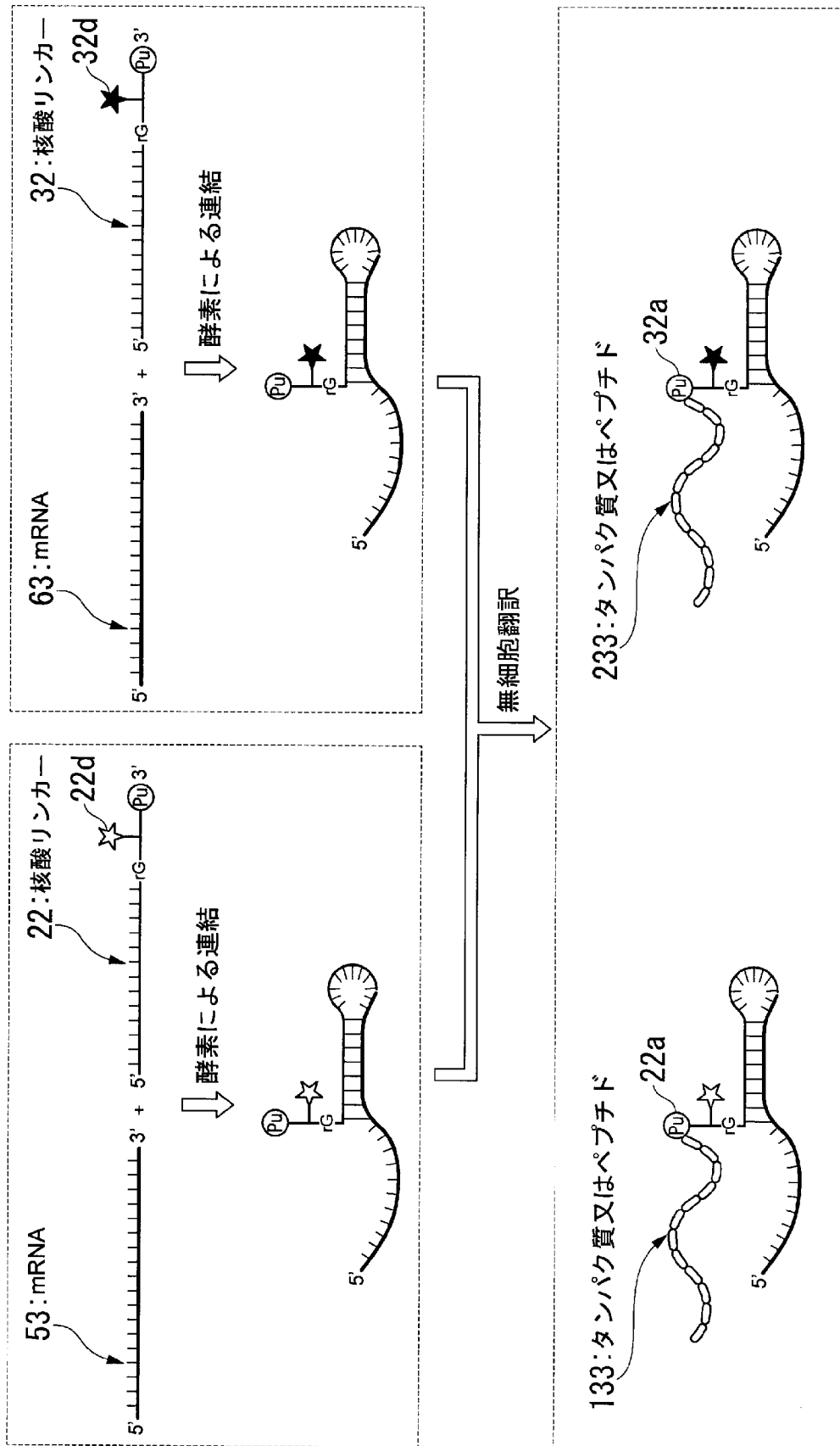
[図2]



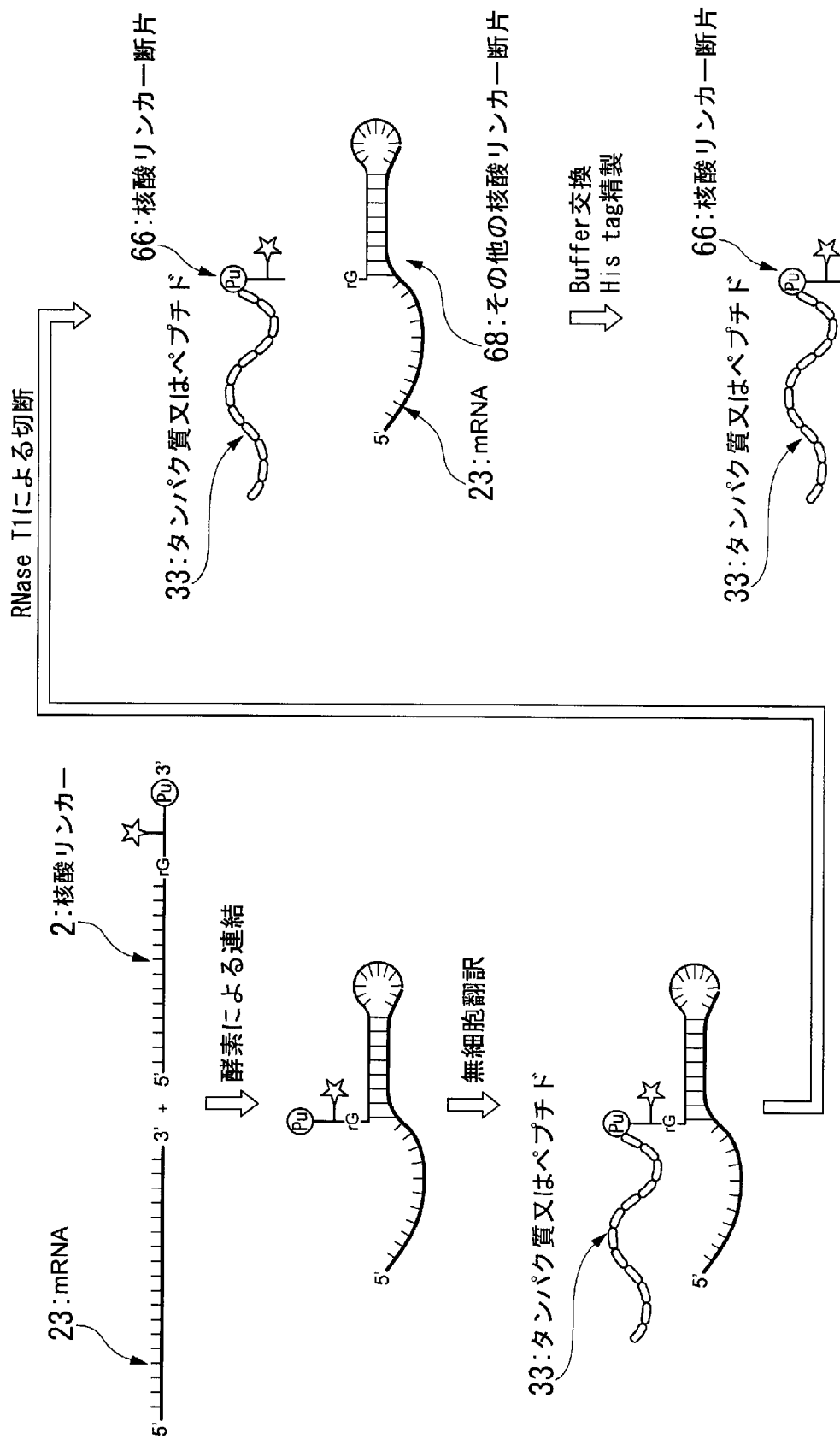
[図3]



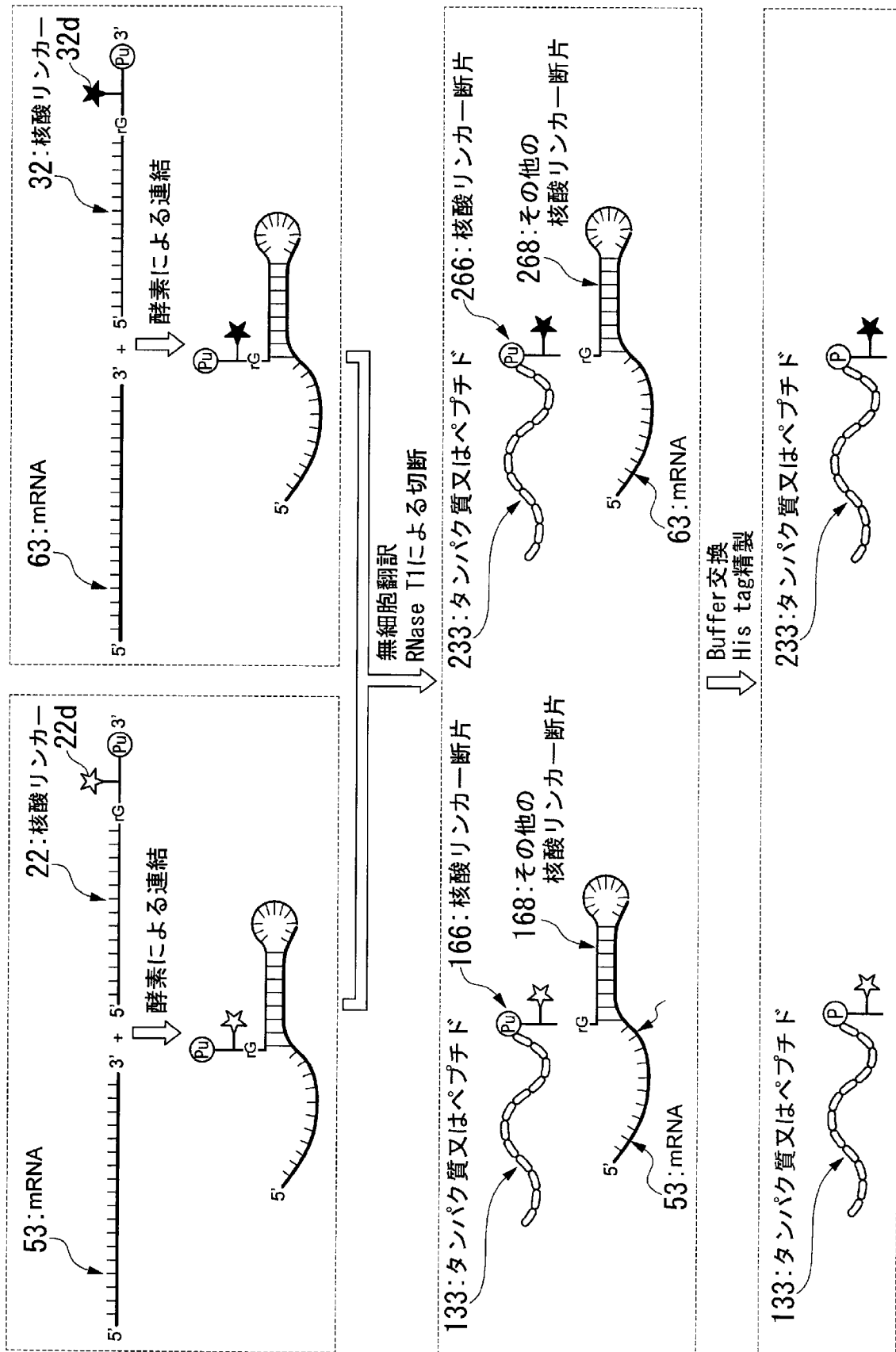
[図4]



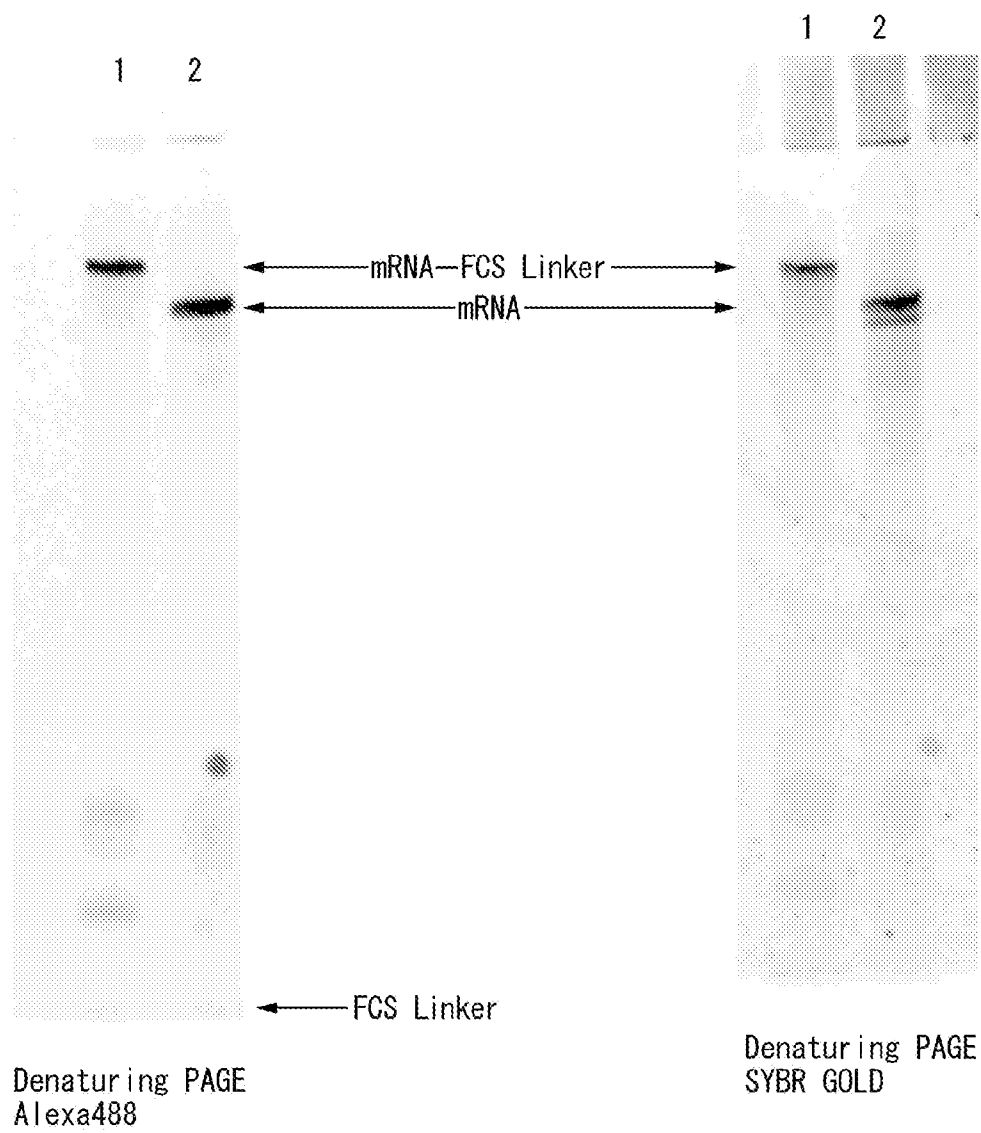
[図5]



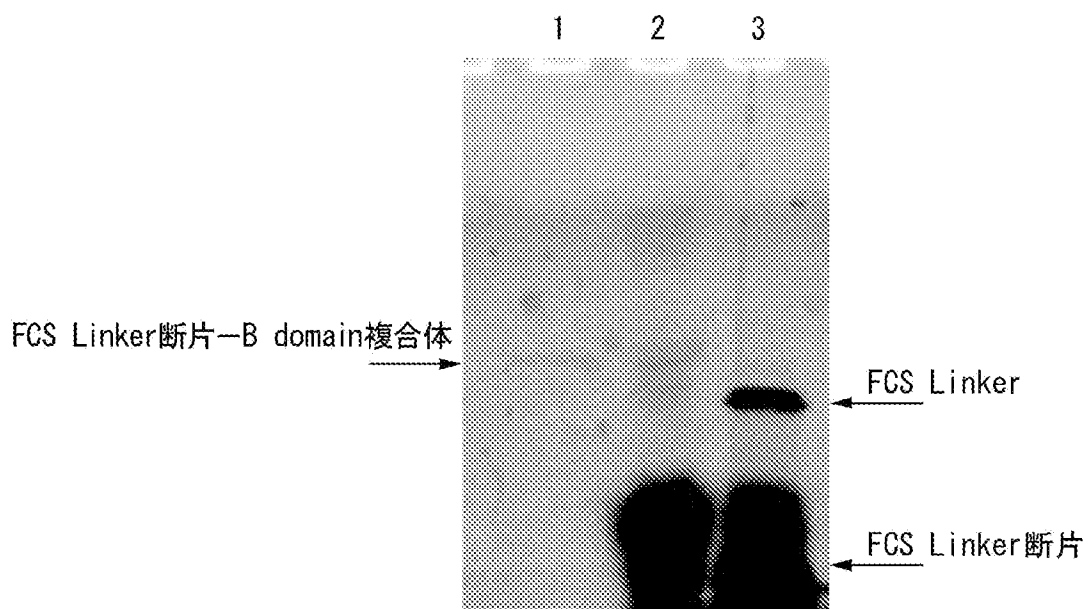
[図6]



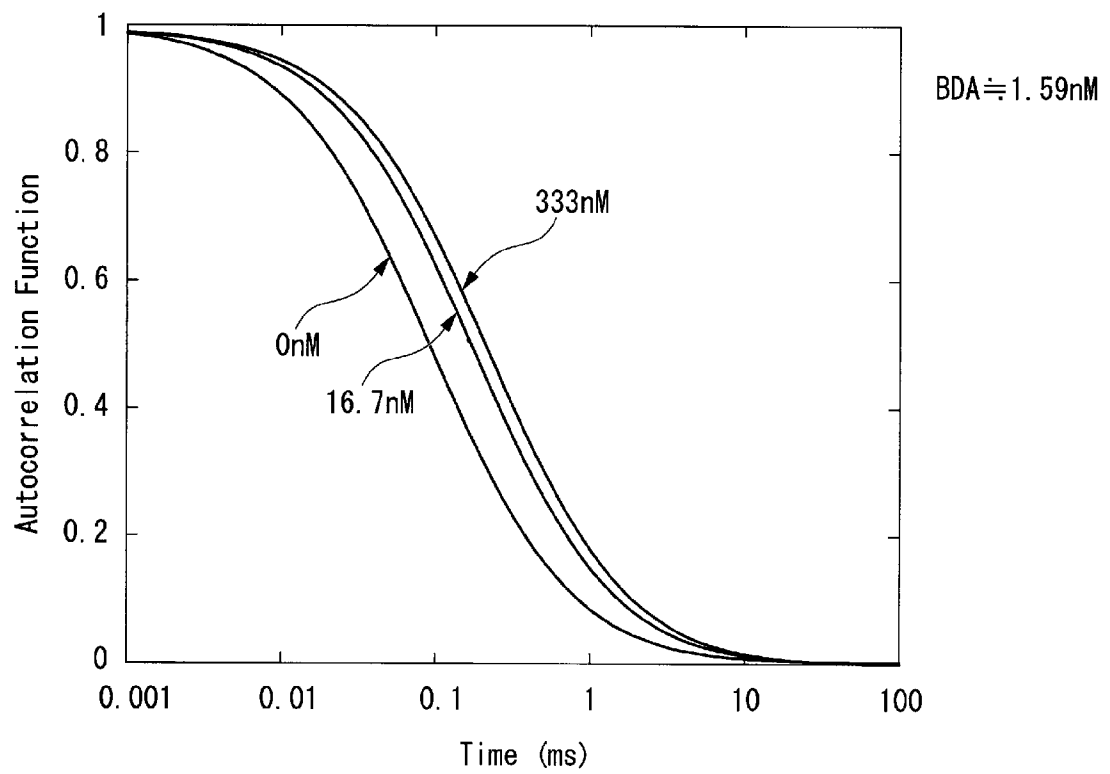
[図7]



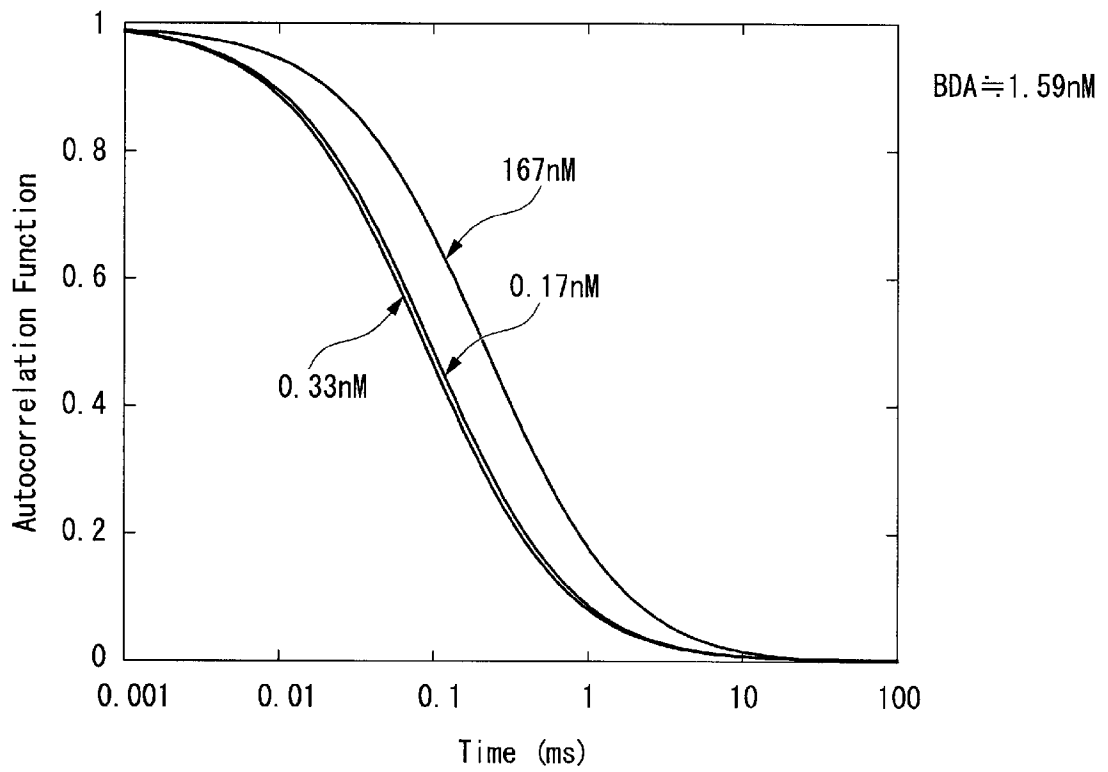
[図8]



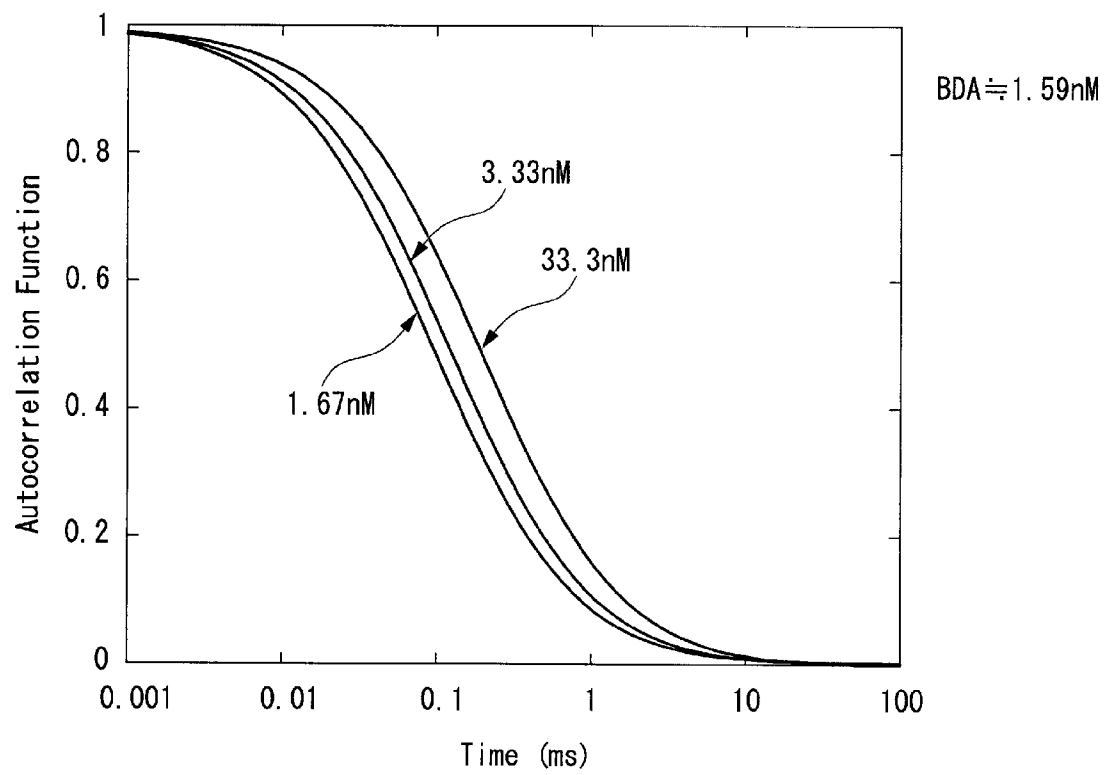
[図9]



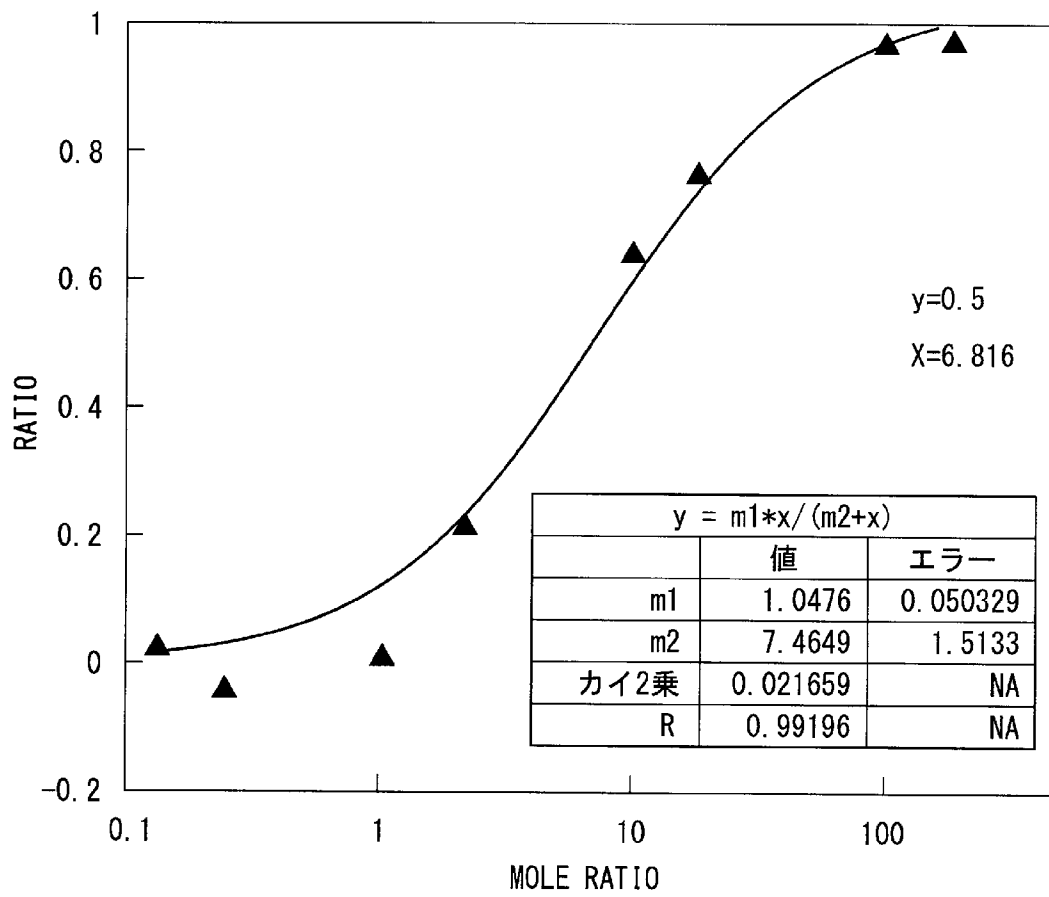
[図10]



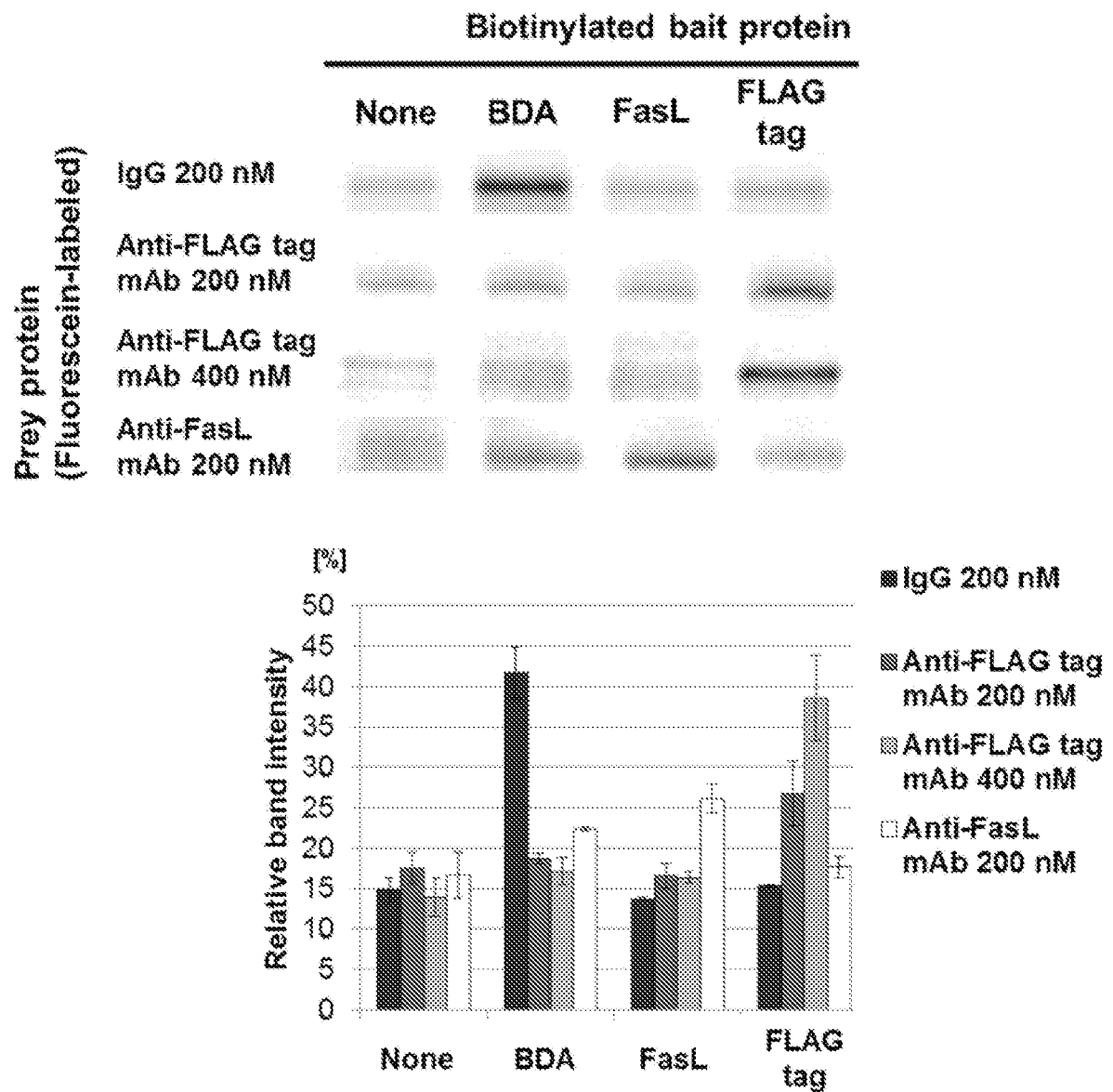
[図11]



[図12]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K1/12(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(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, C07K1/12, C12M1/34, G01N21/64, G01N33/53, G01N33/543, G01N37/00

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TABUCHI, I. et al., An Efficient Ligation Method in the Making of an in vitro Virus for in vitro Protein Evolution, Biological Procedures Online, 2002.10.28, Vol.4, No.1, p.49-54	1-4, 9, 10, 12 1-20
Y	WO 03/048363 A1 (Keio University), 12 June 2003 (12.06.2003), entire text & JP 4030019 B & AU 2002354116 A	1-20

☐ 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
27 January, 2014 (27.01.14)

Date of mailing of the international search report
04 February, 2014 (04.02.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

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, C07K1/12(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(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, C07K1/12, C12M1/34, G01N21/64, G01N33/53, G01N33/543, G01N37/00

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
X	TABUCHI, I. et al., An Efficient Ligation Method in the Making of an in vitro Virus for in vitro Protein Evolution, Biological Procedures Online, 2002.10.28, Vol.4, No.1, p.49-54	1-4, 9, 10, 12
Y		1-20
Y	WO 03/048363 A1 (学校法人慶應義塾) 2003.06.12, 全文 & JP 4030019 B & AU 2002354116 A	1-20

☐ 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

2 7 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 4 . 0 2 . 2 0 1 4

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)

木原 啓一郎

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

4 B

4 8 6 7