(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2009-531032
(P2009-531032A)
(43)公表日　平成21年9月3日(2009.9.3)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/195	(2006.01)	C07K	14/195		4B064
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4H045
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 34 頁）

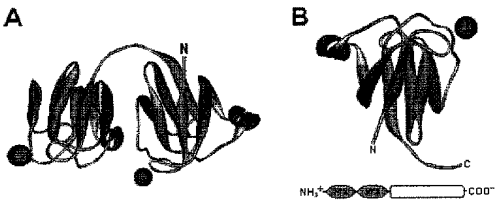
(21)出願番号　特願2009-501707 (P2009-501707)
(86)(22)出願日　平成19年3月20日 (2007.3.20)
(85)翻訳文提出日　平成20年10月30日 (2008.10.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/064457
(87)国際公開番号　WO2007/109697
(87)国際公開日　平成19年9月27日 (2007.9.27)
(31)優先権主張番号　60/783,998
(32)優先日　平成18年3月20日 (2006.3.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508055722
ユニヴァーシティ　オブ　メディシン　アンド　デンティストリ　オブ　ニュージャーシィ
アメリカ合衆国　０８９０１　ニュージャーシィ，ニュー　ブランズウィック，ジョージ　ストリート　３３５，オフィス　オブ　パテンツ　アンド　ライセンシング
(74)代理人　100064447
弁理士　岡部　正夫
(74)代理人　100085176
弁理士　加藤　伸晃
(74)代理人　100094112
弁理士　岡部　讓

最終頁に続く

(54)【発明の名称】タンパク質の可溶化のためのプロテインＳ融合の使用

(57)【要約】
本発明は、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ由来のＰｒＳタグまたはＰｒＳ２タグを含むマルチクローニング部位を含むベクターを提供する。プロテインＳタグ付標的融合タンパク質を用いた、標的タンパク質の溶解度を高めるための方法が提供される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
マイキソコッカス キサンツス（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ）由来のＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグをコードする核酸配列を含むマルチクローニング部位を含むベクター。
【請求項２】
マルチクローニング部位が配列番号１を含む、請求項１に記載のベクター。
【請求項３】
マルチクローニング部位が配列番号２を含む、請求項２に記載のベクター。
【請求項４】
ベクターが高発現コールドショックベクターである、請求項１に記載のベクター。
【請求項５】
コールドショックベクターがｐＣｏｌｄＩＩＩベクターである、請求項４に記載のベクター。
【請求項６】
大腸菌において発現する、請求項４に記載のベクター。
【請求項７】
ベクターがテトラサイクリン誘導性のＰＳＴ発現系である、請求項１に記載のベクター。
【請求項８】
哺乳動物宿主細胞において発現する、請求項７に記載のベクター。
【請求項９】
哺乳動物宿主細胞がＴＲＥｘ２９３ヒト胎児腎臓細胞系に由来する、請求項８に記載のベクター。
【請求項１０】
標的タンパク質の溶解度を高める方法であって、
ａ）マイキソコッカス キサンツス（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ）由来のプロテインＳの少なくとも１つのＮ末端ドメインをコードする核酸配列（ＰｒＳタグ）を、標的タンパク質をコードする核酸配列に融合して、ＰｒＳタグ付標的タンパク質をコードする核酸配列を生じさせることと、
ｂ）ステップ（ａ）のプロテインＳタグ付標的タンパク質をベクター内に位置付けることと、
ｃ）宿主細胞をベクターで形質転換することと、
ｄ）遺伝子発現に適した条件下で宿主細胞を培養することと
を含み、発現したＰｒＳタグ付標的タンパク質が非タグ付標的タンパク質よりも溶解度が高くなる方法。
【請求項１１】
核酸配列が、プロテインＳの２つの縦列反復Ｎ末端ドメインを有するＰｒＳ$_2$タグをコードする、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
ステップ（ｄ）を実施した後、場合によってはプロテアーゼを用いてＰｒＳタグを標的タンパク質から切断する、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
宿主細胞が原核生物である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
標的タンパク質が原核生物または真核生物に由来する、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
ベクターが、ＰｒＳタグ付標的タンパク質をコードする核酸を含むマルチクローニング部位を含む大腸菌ｐＣｏｌｄ発現系である、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】

宿主細胞が真核生物である、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
ベクターが哺乳動物のテトラサイクリン誘導性の系である、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
Ｎ末端ドメインの核酸配列が８５～１００個のアミノ酸残基をコードする、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
Ｎ末端ドメインの核酸配列が９３個のアミノ酸残基をコードする、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
マイキソコッカス キサンツス（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ）の１つまたは複数の粘液胞子に結合しているＰｒＳタグ付タンパク質分子。
【請求項２１】
ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を精製する方法であって、タグ付タンパク質を、マイキソコッカス キサンツス（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ）の粘液胞子を含むアフィニティー樹脂と接触させ、それによりＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質をアフィニティー樹脂上に固定することを含む方法。
【請求項２２】
ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を、Ca^{2+}またはMg^{2+}の存在下でアフィニティー樹脂と接触させる、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を、カルシウムをキレート化する作用物質を添加することによりアフィニティー樹脂から遊離させる、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
カルシウムをキレート化する作用物質がＥＤＴＡまたはＥＧＴＡである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
請求項２１に記載の方法に従って精製したタンパク質。
【請求項２６】
タンパク質がＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質である、請求項２５に記載のタンパク質。
【請求項２７】
請求項２１に記載のアフィニティー樹脂と、ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を精製する方法における使用説明書とを含むキット。
【請求項２８】
ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を生産するための成分をさらに含む、請求項２７に記載のキット。
【請求項２９】
ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質が、プロテインＳと標的タンパク質との間のリンカーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】
リンカーがポリペプチドである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
ポリペプチドが３～１０個のアミノ酸残基である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
分析研究用の標的タンパク質を調製する方法であって、ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を調製することおよび分析研究を実施することを含む方法。
【請求項３３】

分析研究が、核磁気共鳴分析、薬物スクリーニングアッセイ、結合アッセイ、およびＸ線結晶分析、または可溶性の標的タンパク質を必要とする任意の研究からなる群から選択される、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質が、ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグと標的タンパク質との間のリンカーを含む、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

リンカーがポリペプチドである、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

分析研究が核磁気共鳴分析である、請求項３３に記載の方法。

【請求項３７】

標的タンパク質を特徴付ける方法であって、少なくとも１つのＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグを標的タンパク質に融合することと、核磁気共鳴分析を行うことと、核磁気共鳴分析で得られたデータを分析することとを含み、それにより標的タンパク質を特徴付ける方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２００６年3月２０日に出願された、Ｉｎｏｕｙｅらによる「タンパク質の可溶化のためのプロテインＳ融合の使用（Ｔｈｅ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓ　Ｆｕｓｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｏｌｕｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）」という表題の米国仮出願等６０／７８３９９８号に対して優先権を主張する。本出願の全ての開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本発明は、タンパク質の生産および溶解度を高めるための系に関する。

【０００３】

Ｃ．Ｆ．Ｒ．１．８２１（ｆ）に基づく陳述

§１．８２１（ｆ）に従って、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２１（ｃ）および（ｅ）に準じてそれぞれ提出された配列表の添付した書類の複写物および添付したコンピュータ読取可能な複写物「１８６２２－１２　ｕｍｄｎｊ．ｓｔ２５．ｔｘｔ」の内容は同一である。

【背景技術】

【０００４】

様々な従来の発現系においてタンパク質が発現すると多くのタンパク質は不溶性となるため、タンパク質の発現は医科学およびバイオテクノロジーにおいて大変な挑戦である。多くのアプローチが、タンパク質、特に組換えタンパク質の、生体サンプルにおける他の成分からの単離および精製のために開発されてきている。これらの精製方法にはとりわけ、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、およびアフィニティー・クロマトグラフィーが含まれる。アフィニティー・クロマトグラフィーは、標的タンパク質の特異性または標的タンパク質のタグの特異性のため、それが結合する抗体またはリガンドなどの試薬の精製に対して他の方法よりも効果的である。

【０００５】

タンパク質のアフィニティー精製のためのタンパク質へのタグ付けは長年にわたってタンパク質精製に選択されている方法であり、現在は、酵母、および、さほどではないが高等真核生物におけるプロテオミクス研究において利用されている。６アミノ酸残基程度の短さの小さなペプチド（Ｈｉｓタグ）から４０ｋＤａ程度の長さの大きなタンパク質（ＭＢＰ）までの数多くの固有のタグが利用可能である（総説、Ｓｔｅｖｅｎｓ，Ｒ．Ｃ．、２０００、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　Ｆｏｌｄ　Ｄｅｓ　８：Ｒ１７７－８５参照）。利用されるタグの中では、Ｈｉｓタグが最も広く成功裏に用いられているものであるが、それは

、Ｈｉｓタグ付タンパク質が、Ｎｉ－ＮＴＡ（ニッケル－ニトリロ三酢酸）樹脂上に特異的に捕捉され、ＥＤＴＡまたはイミダゾールにより溶離され得るためである。マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、ブドウ球菌タンパク質Ａ、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）、およびグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）などの他のタンパク質タグもまた、原核生物および真核生物のタンパク質の両方に利用されてきている。しかし、これらのアフィニティー技術の多くは、タグ付タンパク質を１工程で精製するには特異性が十分ではなく、非特異的なタンパク質も、用いる樹脂に頻繁に捕捉される。この問題を解決するため、タンパク質のＮ末端に直列に融合された２つの異なるタグを用いるアフィニティー精製系が開発された（Ｒｉｇａｕｔ，Ｇ．ら、１９９９、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １７：１０３０－２）。このＴＡＰタグ（タンデム・アフィニティー精製）技術は、目的のタンパク質と複合体を形成するタンパク質因子を同定するために非常に効果的であることが示されている。

【０００６】

現在の融合タグ付け系の不都合な点には、タグ付融合タンパク質の溶解度が低いこと、および多くのタンパク質精製手順に共通の条件下でタグ付タンパク質を精製することができないことが挙げられる。さらに、現在の融合タグは、タンパク質構造の分析研究に利用することが困難である。例えば、ＨｉｓタグはＮＭＲ構造研究のために設計された実験に使用することができないが、それは、Ni^{++}イオンの常磁性効果によりピークが広がりデータの収集が妨げられるために、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂をＮＭＲ分光法に利用することができないためである。

【０００７】

したがって、タンパク質精製、ＮＭＲ、およびＸ線結晶分析などの分析技術を含むタンパク質の精製および研究、ならびに特異的なタンパク質と相互作用するタンパク質因子の同定に対して、タグ付融合タンパク質が依然として可溶性および安定であることを可能にする、改良されたタグ付け系が必要とされている。本明細書において、本発明のプロテインＳタグ技術が、不安定なタンパク質の発現を改善するための優れた融合タグであることが示されている。

【０００８】

プロテインＳは、栄養が欠乏すると多細胞の子実体を形成する発生中のグラム陰性細菌であるＭ．ｘａｎｔｈｕｓの胞子殻タンパク質である（総説については、（Ｄｗｏｒｋｉｎ，Ｍ．ら、１９８５、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：１８－２４、Ｓｈｉｍｋｅｔｓ，Ｌ．Ｊ．ら、１９９０、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ５４：４７３－５０１）参照）。子実体中において、細胞は、乾燥および熱に強い耐性を有する直径１μｍの均一な球状の胞子（粘液胞子）に変わる。粘液胞子はCa^{++}依存的に粘液胞子の表面に集合するプロテインＳと呼ばれる主要なコート・タンパク質を有することが示されている（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｍ．ら、１９７９、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７６：２０９－１３）。

【０００９】

Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ ｘａｎｔｈｕｓ（マイキソコッカス キサンツス）由来のプロテインＳは、タンパク質のＮ末端に融合するとそのタンパク質の生産および溶解度を著しく高めるという点において固有である。重要なことには、本発明に関する実験の結果により、プロテインＳとＯｍｐＲ（転写因子）との融合がＯｍｐＲの特性に影響を与えないことが示され（Ｈａｒｌｏｃｋｅｒ，Ｓ．Ｌ．ら、１９９５、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７０：２６８４９－５６）、このことは、プロテインＳドメインが独立してフォールディングしており、目的の標的タンパク質に作用しないであろうことを示している。本発明者は今や、プロテインＳタグ付タンパク質が、Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓの子実体から容易に精製される粘液胞子上に特異的に捕捉され得ることを見出している。

【００１０】

プロテインＳにはいくつかの固有の特徴がある。プロテインＳはＥＤＴＡの存在下または高い塩濃度において直ちに遊離され得る。さらに、精製されたプロテインＳは、Ca^{+}

$^{+}$を加えると粘液胞子の表面に容易に再集合し得る（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｍ．ら、１９７９、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７６：２０９－１３）。１つの粘液胞子は、その表面に集合した３．３×１０^{6}個までのプロテインＳ分子を結合することができる（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｍ．ら、１９７９、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７６：２０９－１３）。そのＮＭＲ溶液構造は決定されており（図１Ａ、（Ｂａｇｂｙ，Ｓ．ら、１９９４、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２：１０７－２２））、それは１７３のアミノ酸残基で構成され、２つの縦列のＣａ$^{++}$結合ドメインを有するものである。２つのＣａ$^{++}$結合ドメインは重ね合わせることができ、７個のβ鎖および１個のαヘリックスで構成される（図１Ａ）。プロテインＳの結晶はＸ線照射に高い耐性を有することが示されている（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｓ．、１９８０、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５５：３７１３－４）。本発明において示されるように、プロテインＳのこれらの利点は多岐にわたる適用に有益である。

【発明の開示】

【００１１】

本発明は、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ ｘａｎｔｈｕｓ由来のＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_{2}$タグを含むマルチクローニング部位を含むベクターを提供する。

【００１２】

本発明はまた、標的タンパク質の溶解度を高める方法であって、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ ｘａｎｔｈｕｓ由来のプロテインＳの少なくとも１つのＮ末端ドメインをコードする核酸配列（ＰｒＳタグ）を、標的タンパク質をコードする核酸配列に融合して、ＰｒＳタグ付標的タンパク質をコードする核酸配列を生じさせること、工程（ａ）のプロテインＳタグ付標的タンパク質をベクター内に置くこと、宿主細胞をベクターで形質転換すること、および遺伝子発現に適した条件下で宿主細胞を培養することを含み、発現したＰｒＳタグ付標的タンパク質が非タグ付標的タンパク質よりも溶解度が高くなる方法も提供する。一実施形態において、ＰｒＳ$_{2}$タグと呼ばれる、ＰｒＳの直列反復Ｎ末端ドメインが用いられる。

【００１３】

本発明はさらに、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ ｘａｎｔｈｕｓの１つまたは複数の粘液胞子に結合しているＰｒＳタグ付タンパク質分子を提供する。

【００１４】

また、ＰｒＳタグ付タンパク質を精製する方法であって、ＰｒＳタグ付タンパク質を、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ ｘａｎｔｈｕｓの粘液胞子を含むアフィニティー樹脂と接触させ、それによりプロテインＳタグ付タンパク質をアフィニティー樹脂上に固定することを含む方法も提供する。

【００１５】

また、分析研究用の標的タンパク質を調製する方法であって、ＰｒＳタグ付標的タンパク質を調製することおよび分析研究を実施することを含む方法も提供する。

【００１６】

本発明はさらに、標的タンパク質を特徴付ける方法であって、少なくとも１つのＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_{2}$タグを標的タンパク質に融合することと、核磁気共鳴分析を行うことと、核磁気共鳴分析で得られたデータを分析することとを含む方法も提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１７】

本発明は、プロテインＳタグ（ＰＳＴ）と呼ばれる新規なタンパク質技術を提供する。また、従来の方法では構造を決定することができないタンパク質の構造研究のための新規なアプローチも提供する。

【００１８】

本発明の技術は、ヒトのタンパク質を含む、原核生物または真核生物に由来するタンパク質の特性評価に適用することができる。ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_{2}$タグがＴＥＶプロテアーゼまたはトロンビンなどの特定のプロテアーゼにより切り離され得るよう発現系が設

計されるため、自然の形態と同一の可溶性タンパク質を得ることができる。重要なことには、本発明者は、ＰｒＳタグおよびＰｒＳ$_2$タグの両方が標的タンパク質の機能に対してほとんど影響を及ぼさないということを実証した（Ｈａｒｌｏｃｋｅｒ　ＳＬら、Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ、１９９５）。ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグの切断の後に標的タンパク質が不溶性となる場合も、標的タンパク質の機能は依然としてＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグとの融合タンパク質であると特性評価され得る。

【００１９】

タンパク質がＭｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓのプロテインＳのＮ末端ドメインとの融合タンパク質として発現するとき、それらは可溶性タンパク質として発現するようになる。本発明者の研究の結果により、ヒト、ショウジョウバエ、シノラブディス・エレガンス（C.エレガンス）由来の不溶性のまたは発現の低い多くの真核生物タンパク質、および大腸菌由来のタンパク質がプロテインＳとの融合タンパク質として発現すると、それらの溶解度および発現レベルが著しく向上するということが示されている。そうでなければ、タンパク質は不溶性の形態で発現する。これらおよび他の適用では、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ由来のプロテインＳの「ＰｒＳタグ」と呼ばれるプロテインＳのただ１つのＮ末端ドメイン、および「ＰｒＳ$_2$タグ」と呼ばれる２つの縦列反復Ｎ末端ドメインは、標的タンパク質に異なる様式で影響する。したがって、ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグを有する標的タンパク質を発現させるための発現系が本明細書において提供される。本発明はまた、Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓ由来のプロテインＳの３つ以上のＮ末端ドメインを有する発現系も提供する。

【００２０】

「キメラ分子」においては、個別に存在し得る２つ以上の分子が互いに繋がり、その全ての構成分子の所望の機能性を有する１つの分子を形成する。キメラ分子の構成分子は化学結合により合成的に繋がり得、また、構成分子が全てポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであるときは、１つの連続したポリペプチドが発現するよう、組換えにより互いに融合し得る。このようなキメラ・ポリペプチドは「融合タンパク質」と呼ばれる。「融合タンパク質」は、構成分子が全てポリペプチドであり互いに付着（融合）しているために連続した１本の鎖を形成しているキメラ分子である。様々な構成成分が、互いに直接付着し得るか、または１つもしくは複数のペプチドリンカーを介して結合し得る。

【００２１】

本発明の融合タンパク質のようなキメラ分子に関して用いられる「リンカー」は、キメラ分子の構成分子を結合する（link）かまたは繋ぐ（join）任意の分子について言う。キメラ分子が融合タンパク質であるとき、リンカーは、融合タンパク質を含むタンパク質を繋ぐペプチドであり得る。リンカーは通常、タンパク質を繋ぐか、またはタンパク質間のある程度の最小距離もしくは他の空間的関係を保つ以外に特定の生物活性を有さないが、ペプチドスペーサーの構成アミノ酸は、フォールディング、有効電荷、または疎水性などの、分子のいくつかの特性に影響するよう選択され得る。ペプチドリンカーは、融合した構成ポリペプチドの分離のための、プロテアーゼによる消化部位を場合により含み得る。以下で論じる核磁気共鳴研究のためのタンパク質の調製では、好ましいリンカーはおよそ１からおよそ２０のアミノ酸残基を含む。特に好ましいリンカーはおよそ３からおよそ１０のアミノ酸残基を含む。

【００２２】

大腸菌および哺乳動物細胞におけるプロテインＳタグ（ＰＳＴ）発現系の構築

本明細書で用いる場合、「ベクター」および「発現ベクター」という用語は、レプリコン、すなわち、キャリアーまたはトランスポーターとして作用する任意の物質について言い、例えば、バクテリオファージ（ファージ）、プラスミド、ファージミド、コスミド、バクミド、またはウイルスであるが、そこに別の遺伝子配列または遺伝子エレメント（ＤＮＡまたはＲＮＡ）が付着し得、それにより、その付着した配列またはエレメントの複製がもたらされ、配列またはエレメントが宿主細胞内に運ばれる。本明細書に記載する大腸

菌ベクター系は、低温でタンパク質生産を引き起こすｐＣｏｌｄベクター（日本、滋賀県のタカラバイオ株式会社から入手可能）を利用する。

【００２３】

本発明は、タンパク質精製およびＮＭＲ構造研究のための、ｐＣｏｌｄコールドショックベクターを用いた大腸菌発現系を提供する。哺乳動物のテトラサイクリン誘導性の系は、生細胞において目的のタンパク質と複合体を形成するタンパク質因子の同定のために用いることができる。この目的のタンパク質は本明細書において「標的タンパク質」と呼ばれ、ＰｒＳタグまたはPrS_2タグが付着したタンパク質、ポリペプチド、またはそれらの断片について言う。好ましい実施形態において、標的分子はタンパク質である。

【００２４】

本発明は、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ由来のＰｒＳタグ（配列番号１）またはPrS_2タグ（配列番号２）をコードする核酸配列を含むマルチクローニング部位を含むベクターを提供する。他の実施形態において、本発明は、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓ由来のプロテインＳのＮ末端ドメインから得た１つまたは複数のタグを用いる。ＰｒＳタグおよびPrS_2タグは好ましくは、プロテインＳのアミノ酸残基１～９３であるが（配列番号１および配列番号２）、１～９２残基もしくは１～９４残基でもあり得、または、プロテインＳの１と１７３との間の任意のアミノ酸残基であり得る。

【００２５】

好ましい実施形態において、本発明のベクターのマルチクローニング部位は配列番号１または配列番号２を含む。ベクターはｐＣｏｌｄＩＩＩまたはｐＣｏｌｄＩＶベクターのような高発現コールドショックベクターであり得る。ｐＣｏｌｄＩＩＩベクターは大腸菌での発現に好ましく、それは、そのベクターの翻訳促進エレメント（ＴＥＥ）（図５参照）により良好な発現が得られるためである。ＴＥＥを有さないｐＣｏｌｄＩＶ（図７）の発現は、ＴＥＥが翻訳に対してマイナスの影響を有する場合に有用である。

【００２６】

哺乳動物の系においては、好ましいベクターは、PrS_2タグ付タンパク質を有する、ヒト胎児腎臓２９３細胞系由来のテトラサイクリン誘導性のＰＳＴ発現系（ＴＲＥｘ－ＰＳＴ）である。したがって、本発明は、ヒト細胞を含む哺乳動物宿主細胞において発現するベクターを提供する。

【００２７】

本明細書で用いる場合、特定の核酸に関する「コード」、「コードする」または「コードされる」という用語は、特定のタンパク質への翻訳のための、核酸内に保存された情報について言う。タンパク質をコードする核酸は、核酸の翻訳領域内に非翻訳配列（例えばイントロン）を含み得るか、または、このような介在する非翻訳領域を有さないこともある（例えばｃＤＮＡにおけるように）。タンパク質をコードする情報はコドンの利用により特定される。典型的には、アミノ酸配列は、「普遍的な」遺伝暗号を利用している核酸によりコードされる。

【００２８】

本明細書で用いる「コドン」という用語は、ポリペプチド鎖におけるアミノ酸残基を共に特定する、ヌクレオチドのトリプレットについて言う。ほとんどの生物が、タンパク質またはタンパク質前駆体である自身のポリペプチドを形成するために、２０または２１のアミノ酸を用いる。４つの可能なヌクレオチド、すなわちアデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、およびチミン（Ｔ）がＤＮＡに存在するため、わずか２０のアミノ酸と終結シグナルとを認識するために６４の可能なトリプレットが存在する。この冗長性のため、ほとんどのアミノ酸は２つ以上のトリプレットによりコードされている。１つのアミノ酸を特定するコドンは等しい頻度で用いられるわけではない。異なる生物は、同一の所与のアミノ酸をコードするいくつかのコドンの１つに対して特定の「選好」をしばしば示す。コード領域が、稀なコドンを高レベルでまたは群で含む場合、遺伝子の再合成または突然変異誘発による稀なコドンの除去により発現が増大し得る。参照により本明細書に組み込まれる、Ｊ．ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＤ．Ｗ．Ｒｕｓｓｅｌｌ、Ｍｏｌｅｃｕｌ

ａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第３版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（２００１）、１５．１２を参照されたい。「コドンの選択」はしたがって、選択された宿主における発現を最適化するために行われ得る。最も好ましいコドンは、高度に発現する遺伝子に頻繁に見られるものである。大腸菌における「コドンの選好」については、参照により本明細書に組み込まれる、Ｋｏｎｉｇｓｂｅｒｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８０：６８７－９１（１９８３年）を参照されたい。

【００２９】

当業者には、コードされた配列における１つのアミノ酸またはごく一部のアミノ酸を改変し、付加し、または欠失させる、核酸配列、ペプチド配列、ポリペプチド配列、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加が、化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換が改変により生じる「保存的に変化した変異体」であることが認められよう。「保存的に変化した変異体」という用語は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に変化した変異体とは、アミノ酸配列の同一の変異体または保存的に変化した変異体をコードする核酸について言う。遺伝暗号の縮重のため、機能的に同一の多くの核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンＵＵＡ、ＵＵＧ、ＣＵＵ、ＣＵＣ、ＣＵＡ、およびＣＵＧは全てアミノ酸ロイシンをコードする。したがって、コドンによりロイシンが指定されている全ての位置において、コドンは、コードするポリペプチドを改変することなく、記載した対応するコドンのいずれにも改変され得る。このような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に変化した変異の一種である。ポリペプチドをコードする、本明細書の全ての核酸配列はまた、遺伝暗号を参照することにより、核酸の全ての可能なサイレント変異も表す。当業者には、機能的に同一の分子を得るように核酸内の各コドン（通常はメチオニンの唯一のコドンであるＡＵＧ、および通常はトリプトファンの唯一のコドンであるＵＧＧを除く）が変化し得ることが認められよう。したがって、本発明のポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、本発明の範囲内である。

【００３０】

本発明には、プロテインＳの生物学的特性を保持している、プロテインＳの活性部分、断片、誘導体、突然変異体、および機能的変異体が含まれる。

【００３１】

結合対の一方の構成要素は目的のタンパク質を「タグ付け」するために用いられ得、もう一方の構成要素はアフィニティー・リガンドまたは「アフィニティー樹脂」として用いられる。このようなタンパク質「タグ」は組換えにより「融合」され得、タグが付着した状態の融合タンパク質を生産するように発現させられ得る。「タグ付」融合タンパク質は次に、タグの結合パートナーとの相互作用によりアフィニティー精製され、タグは次に、純粋なタンパク質を遊離するために場合により切断される。

【００３２】

「遺伝子」という用語は、特定の機能的産物（すなわち、タンパク質またはＲＮＡ分子）をコードするＤＮＡセグメント上の特定の位置に位置するヌクレオチドの順序づけられた配列について言う。遺伝子は、コードＤＮＡの前後の領域、およびエクソン間のイントロンを含み得る。

【００３３】

「誘導する」または「誘導性」という用語は、細胞が誘導因子または例えば熱などの条件にさらされることで転写または合成が増大する遺伝子または遺伝子産物について言う。

【００３４】

「誘導因子」または「誘導物質」という用語は、リプレッサー・タンパク質と結びついて、オペレーターにもはや結合できない複合体を生成する、低分子量化合物または物理的変化を生じさせる物質について言う。

【００３５】

「誘導」という用語は、生物を特定の刺激にさらした後に、ある特定の効果、例えば、その生物による特定の遺伝子もしくはオペロンの転写またはタンパク質の生産がもたらされる作用またはプロセスについて言う。

【００３６】

核酸を細胞内に挿入するという状況における「導入された」、「トランスフェクション」、「形質転換」、および「形質導入」という用語には、自己複製するレプリコンに転換されたまたは一過性発現した細胞ゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、またはミトコンドリアＤＮＡ）内に核酸が組み込まれ得る、原核細胞または真核細胞内への核酸の組み込みへの言及が含まれる（例えば、トランスフェクトされたｍＲＮＡ）。

【００３７】

「単離された」という用語は、核酸またはタンパク質などの物質であって、それが自然に存在する環境において見られるように通常はそれに付随しているかまたはそれと相互作用している成分を実質的に有さないものについて言う。単離された物質は、その自然の環境にある物質では見られない物質を場合により含むか、あるいは、物質がその自然の環境にある場合、その物質は意図的な人為的介入により合成的に（非自然的に）改変している。例えば、「単離された核酸」は、プラスミド・ベクターもしくはウイルス・ベクターなどのベクターに挿入されたＤＮＡ分子、または原核細胞もしくは真核細胞もしくは宿主生物のゲノムＤＮＡに組み込まれたＤＮＡ分子を含み得る。ＲＮＡに適用される場合、「単離された核酸」という用語は第一に、上記に規定したような単離されたＤＮＡ分子によりコードされるＲＮＡ分子について言う。あるいは、この用語は、ＲＮＡ分子であって、その自然の状態（すなわち、細胞内または組織内）においてそれが通常結びついている他の核酸から十分に分離されているものについて言うことができる。単離された核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）はさらに、生物学的手段または合成手段により直接生産され、かつその生産中に存在する他の成分から分離された分子も表し得る。

【００３８】

本明細書で用いる場合、「核酸」または「核酸配列」という用語には、一本鎖または二本鎖の任意のＤＮＡまたはＲＮＡ分子が含まれ、一本鎖の場合、その相補的配列の分子は線状または環状の形態である。核酸分子を論じるにあたり、特定の核酸分子の配列または構造は、５’方向から３’方向に配列を提供する通常の慣例に従って本明細書に記載され得る。別段の限定がされない限り、この用語は既知の類似体を包含する。

【００３９】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、リン酸ジエステル結合により繋がった、２つ以上の、好ましくは４つ以上のリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドからなる核酸分子について言う。

【００４０】

「オペレーター」という用語は、遺伝子（複数も）の上流（５’）であるＤＮＡ領域であって、遺伝子（複数も）の発現を制御するために１つまたは複数の調節タンパク質（リプレッサーまたはアクチベーター）が結合する領域について言う。

【００４１】

本明細書で用いる場合、「オペロン」という用語は、遺伝子発現の制御のための、機能的に組み込まれた遺伝単位について言う。オペロンは、１つまたは複数のポリペプチドをコードする１つまたは複数の遺伝子と、それらの発現を構造遺伝子の転写を調節することにより制御する隣接部位（プロモーターおよびオペレーター）とから構成される。「発現オペロン」という用語は、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなど、転写および翻訳の制御配列を有し得、かつポリペプチドをコードする配列の宿主細胞または生物における発現を容易にする核酸セグメントについて言う。

【００４２】

「機能可能に結合した」という表現には、第二の配列に対応するＤＮＡ配列の転写をプロモーター配列が開始させ仲介する、プロモーターと第二の配列との間の機能的結合への

言及が含まれる。通常、機能可能に結合しているとは、結合された核酸配列が連続的であること、また、タンパク質をコードする２つの領域を繋ぐ必要があるときは、連続的でかつ同一のリーディング・フレーム内にあることを意味する。

【００４３】

略語「ＯＲＦ」は「オープン・リーディング・フレーム」、すなわち、内部の終止配列により中断されておらずかつペプチドまたはタンパク質をコードする能力を有する塩基配列を含む、遺伝子配列の一部分を表す。オープン・リーディング・フレームは開始コドンで始まり、終止コドンで終わる。終止コドンまたは停止コドンはポリペプチドの終わりを決定する。

【００４４】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は本明細書においては交換可能に用いられ、アミノ酸残基の重合体について言う。この用語は、１つまたは複数のアミノ酸残基が、自然に存在する対応するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸重合体、および自然に存在するアミノ酸重合体に適用される。

【００４５】

略語「ＰＣＲ」は、大量のＤＮＡを増幅し、それによりＤＮＡの単離、クローニングおよび配列決定を容易にする技術である、ポリメラーゼ連鎖反応について言う。例えば、参照により各々が本明細書に組み込まれる、米国特許第５６５６４９３号、５３３６７５号、５２３４８２４号、および５１８７０８３号を参照されたい。

【００４６】

本明細書で用いる場合、「プロモーター」という用語には、転写開始の上流（５’）にあり、かつＲＮＡポリメラーゼおよび転写を開始するための他のタンパク質の認識および結合に関与するＤＮＡ領域への言及が含まれる。「誘導性プロモーター」という用語は、特定の化合物、すなわち誘導因子もしくは誘導物質の存在、または高温などの規定された外的条件に応じて活性化し得るプロモーターについて言う。

【００４７】

「部位特異的突然変異誘発」という表現は、組換えＤＮＡ法を用いて、一片のＤＮＡの特定の部位に塩基の変化、すなわち突然変異を導入する、インビトロでの技術について言う。

【００４８】

本発明で用いる「非翻訳領域」またはＵＴＲという用語は、ＤＮＡの一部分であって、その塩基がタンパク質合成に関与しないものについて言う。

【００４９】

核酸の特定の配列の「変異体」、「突然変異体」、および「誘導体」という用語は、特定の配列に緊密に関連するが、自然な状態でまたは設計により配列または構造に変化を有し得る核酸配列について言う。「緊密に関連する」とは、配列の少なくともおよそ６０％、しかししばしば８５％超のヌクレオチドが核酸配列の規定の長さにわたって合致することを意味する。緊密に関連した核酸配列間のヌクレオチド配列の変化または差異は、特定の核酸配列の性質における通常の複製または重複の過程で生じる、配列におけるヌクレオチドの変化であり得る。他の変化は特定的に設計され得、特定の目的のために配列内に導入され得る。このような特定の変化は、様々な突然変異誘発技術を用いてインビトロで生じさせることができる。特定的に生成されたこのような配列変異体は、元の配列の「突然変異体」または「誘導体」と呼ぶことができる。

【００５０】

当業者は同様に、１つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、または置き換えを有するタンパク質変異体を生産し得る。これらの変異体にはとりわけ、（ａ）１つまたは複数のアミノ酸残基が保存的または非保存的なアミノ酸により置換されている変異体、（ｂ）１つまたは複数のアミノ酸が付加されている変異体、（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸が置換基を含む変異体、（ｄ）ある種のアミノ酸残基が、保存的または非保存的な位置で、他の種の対応する残基に置換されている変異体、（ｄ）標的タンパク質が、例えば抗体

に対するエピトープのような、有用な特性を標的タンパク質に付与し得る、融合パートナー、タンパク質タグ、または他の化学的部分などの別のペプチドまたはポリペプチドと融合している変異体が含まれ得る。遺伝的（抑制、欠失、突然変異など）、化学的、および酵素的技術を含む、このような変異体を得るための技術は、当業者に既知である。

【００５１】

アフィニティー精製

アフィニティー精製への粘液胞子の利用

本発明はまた、タグ付タンパク質をＭｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓの粘液胞子を含むアフィニティー樹脂と接触させ、それによりＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質をアフィニティー樹脂上に固定することを含む、ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を精製するための方法を提供する。Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓの１つまたは複数の粘液胞子に結合したＰｒＳタグ付タンパク質分子またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質分子もまた提供される。ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグは、Ｃａ$^{2+}$またはＭｇ$^{2+}$の存在下で粘液胞子（Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓの胞子）の表面に結合し得る。この精製方法の一実施形態において、ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質は、Ｃａ$^{2+}$またはＭｇ$^{2+}$の存在下でアフィニティー樹脂と接触させられる。ＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質は、カルシウムまたはマグネシウムをキレート化する作用物質を添加することによりアフィニティー樹脂から遊離される。したがって、粘液胞子を用いることで、ＰｒＳ$_2$タグ付標的タンパク質は、粘液胞子の表面に結合して特異的に単離され得、ＥＤＴＡまたはＥＧＴＡなどのキレート試薬を加えることで粘液胞子の表面から容易に遊離され得る。

【００５２】

タンパク質のアフィニティー精製における樹脂として利用するため、粘液胞子は、粘液胞子の表面上に存在するプロテインＳおよびプロテインＣを除去するために２５ｍＭのＥＤＴＡで洗浄される。精製された粘液胞子は直径がおよそ１μｍの均一な球状の粒子で構成される。これらは長期にわたり溶液内に均質に懸濁することができる。特に、粘液胞子はプロテインＳに対する高い吸収能力（３．３×１０^{6}分子／胞子）を有しており、これはまたタンパク質のアフィニティー精製に理想的である。

【００５３】

本発明のアフィニティー精製は、粘液胞子を細胞溶解物と共に４℃で１時間インキュベートし、その後、低速の遠心分離でこれらの粘液胞子を回収するだけで直ちに実施できる。粘液胞子に対する融合タンパク質の親和性は１０$^{-9}$Ｍ程度であり、粘液胞子は、大腸菌細胞において非常に低いレベルで発現する融合タンパク質を特異的に捕捉することができる。

【００５４】

本発明はまた、本発明の方法に従って精製されたタンパク質を提供する。好ましい実施形態において、精製されたタンパク質はＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質である。

【００５５】

本発明はまた、アフィニティー樹脂と、ＰｒＳタグ付タンパク質を精製する方法における使用説明書とを含むキットを提供する。このキットはさらにＰｒＳタグ付タンパク質を生産するための成分も含む。

【００５６】

「アフィニティー・リガンド」または「アフィニティー試薬」という用語は、高い親和性で同族のリガンドを特異的に結合する物質について言う。このような物質は、「基板」、「樹脂」、または「マトリックス材料」と呼ばれる支持体に付着し得、「アフィニティー・マトリックス」または「樹脂マトリックス」または「アフィニティー樹脂」を形成する。本発明のアフィニティー樹脂は、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ　ｘａｎｔｈｕｓの「粘液胞子」と呼ばれるＭ．ｘａｎｔｈｕｓの胞子、または、各々の同族のリガンドを結合し得るその誘導体もしくは断片を含む。同族のリガンドは、遊離剤で遊離されるまではマトリッ

クス上に「固定」または「保持」または「結合」され得る。

【００５７】

「遊離剤」は、固定された、結合した分子をアフィニティー・マトリックスから遊離し得る（例えば、結合したＰｒＳタグ付分子またはＰｒＳ$_2$タグ付分子を粘液胞子アフィニティー樹脂マトリックスから遊離する）組成物について言う。本発明の遊離剤は、二価の陽イオンの封鎖、タンパク質の変性、および、結合したタグをそれが付着している分子から分離するためのプロテアーゼ消化を含む、様々なメカニズムを介して作用し得る。

【００５８】

分析技術

本発明の方法は、ヒトのタンパク質を含む、原核生物または真核生物に由来するタンパク質の特性評価に適用することができる。ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグがＴＥＶプロテアーゼまたはトロンビンなどの特定のプロテアーゼにより切り離され得るよう発現系が設計されるため、自然の形態と同一の可溶性タンパク質を得ることができる。以前に、本発明者は、ＰｒＳタグおよびＰｒＳ$_2$タグの両方が標的タンパク質の機能に対してごくわずかな影響を有するか全く影響を有さないということを実証している（Ｈａｒｌｏｃｋｅｒ ＳＬら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ、１９９５）。したがって、ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグの切断の後に標的タンパク質が不溶性となる場合も、標的タンパク質の機能は依然としてＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグとの融合タンパク質であると特性評価され得る。

【００５９】

重要なことには、本発明のＰｒＳタグおよびＰｒＳ２タグは非常に安定であり、かつプロテアーゼに対して耐性を有する。さらに、プロテインＳの構造がＮＭＲにより決定されており（Ｂａｇｂｙ Ｓら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、１９９４、Ｗｅｎｋ Ｍら、Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ、１９９９）、容易に結晶を形成することが示されている。これらの利点を用いることで、本発明のＰｒＳタグおよびＰｒＳ２タグは、高濃度の不安定なタンパク質の核磁気共鳴（ＮＭＲ）およびＸ線結晶分析などの構造研究に適用され得る。本発明者は、ＰｒＳ$_2$タグと融合した標的タンパク質のＮＭＲスペクトルがＰｒＳ$_2$タグにより影響を受けないということを実証した。標的タンパク質がＰｒＳ$_2$タグと融合しているとき、ＰｒＳ$_2$タグにより標的タンパク質の結晶の形成が向上した。

【００６０】

粘液胞子上に捕捉されたプロテインＳタグ付タンパク質のＮＭＲ構造研究　従来の技術（Ｘ線およびＮＭＲ）では三次元構造を決定することができない多くのタンパク質が存在するが、それはこれらのタンパク質が不安定であるかまたは溶液に難溶性であるためである。本発明により提供される技術は、粘液胞子上に捕捉されたＰｒＳタグ付タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を用いることによりこの問題を解決する。

粘液胞子の表面に結合しているＰｒＳ$_2$タグのこの特性を用いて、ＰｒＳ$_2$タグ付標的タンパク質のＮＭＲスペクトルからＰｒＳ$_2$タグのスペクトルを除去することも可能である。粘液胞子の表面へのＰｒＳ$_2$タグの相互作用によりＰｒＳ$_2$タグの動きが制限されるため、相互作用によってＰｒＳ$_2$タグのシグナルは著しく低下するであろう。シグナルを低下させるこのような制限的効果はブロードニング効果として知られている。他方で、柔軟なリンカーによりＰｒＳ$_2$タグに融合された標的タンパク質はその自由な回転運動を維持し、そのためＮＭＲ研究に十分なシグナルを示す。ＰｒＳ$_2$タグと標的タンパク質とを接続しているリンカーが、ＰｒＳ$_2$タグ付融合タンパク質の結晶化およびＮＭＲ研究において重大な役割を有することに留意することが重要である。したがって、異なる長さのリンカーを有する発現系を設計することが有益である。好ましいリンカーはおよそ１からおよそ２０のアミノ酸残基を含む。特に好ましいリンカーはおよそ３からおよそ１０のアミノ酸残基を含む。請求項１の方法では、ＰｒＳタグ付タンパク質はプロテインＳと標的タンパク質との間にリンカーを含む。

本発明の方法には、ＰｒＳタグ付標的タンパク質またはＰｒＳ$_2$タグ付標的タンパク質を調製することおよび分析研究を実施することを含む、分析研究用の標的タンパク質の調

製が含まれる。ＮＭＲ以外の、本発明において有用な他の研究には、薬物スクリーニングアッセイ、結合アッセイ、およびＸ線結晶分析、または可溶性の標的タンパク質を必要とする任意の研究が含まれる。

【００６１】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形「１つの（ａ）」、「および（ａｎｄ）」、および「この（ｔｈｅ）」には、文脈上他の意味を明確に指示する場合を除き、複数の指示対象を含む。

【００６２】

別段の規定がない限り、本明細書で用いる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解するものと同様の意味を有する。本明細書に記載されているものに類似したまたは等しい任意の方法および材料もまた本発明の実施または試験に利用され得るが、好ましい方法および材料はこれから記載する。本明細書で言及する全ての刊行物は、刊行物を引用する目的である方法および／または材料を開示および記載するために、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【００６３】

以下の実施例は、いかにして本発明を実施し利用するかを当業者に完全に開示および説明するためのものであり、本発明者が本発明であるとみなすものの範囲を限定するものではなく、また、以下の実験が、実施された全てまたは唯一の実験であるということを示すものでもない。用いる数値（例えば量、温度など）に関する精度を確実にするための努力はなされているが、ある程度の実験上の誤差およびばらつきはある。別段の指示がない場合、割合は重量による割合であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧かそれに近いものである。

【００６４】

本明細書において値の範囲が示される場合、その範囲の上限と下限との間に存在する各値（文脈上他の意味を明確に指示する場合を除き、下限の単位の１０分の１まで）、およびその提示された範囲における任意の他の提示されたまたは間に存在する値が本発明に包含されることを理解されたい。これらのより狭い範囲に独立して含まれ得る、これらのより狭い範囲の上限および下限はまた、提示された範囲における具体的に除外された任意の限度に従って本発明に包含される。提示された範囲に一方または両方の限度が含まれる場合、含まれるこれらの限度の両方を除外する範囲もまた本発明に含まれる。

【００６５】

本明細書において論じられる刊行物は、本願の出願日に先立ったそれらの開示についてのみ提供されている。本明細書におけるいずれの刊行物も、先行した発明によって本発明がこのような刊行物に先立っては権利を付与されないということを承認するものと解釈されるものではない。さらに、示された公開日は実際の公開日とは異なり得、実際の公開日は個別に確認する必要があり得る。

【００６６】

プロテインＳ－ＯｍｐＲの融合

ＯｍｐＲは、主要な外膜タンパク質をコードするｏｍｐＦ遺伝子およびｏｍｐＣ遺伝子の相互発現に必要な大腸菌の転写因子である。以前に、ＯｍｐＲをプロテインＳのＮ末端ドメイン（残基１～９２）の２つの縦列反復に融合し（PrS_2－ＯｍｐＲと呼ばれる）、それを用いてｏｍｐＦのプロモーターの上流領域におけるＯｍｐＲ結合部位の正確な数が決定された（Ｈａｒｌｏｃｋｅｒ，Ｓ．Ｌ．ら、１９９５、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７０：２６８４９－５６）。ＯｍｐＲのＮ末端でのプロテインＳのこの融合はＯｍｐＲのＤＮＡ結合能力を妨げず、その結果ＯｍｐＲとPrS_2－ＯｍｐＲとを異なる割合で混合する場合のＤＮＡ遅延アッセイにおけるラダーの形成が可能であった。

【００６７】

近年、本発明者は、ＤＮＡに対するＯｍｐＲの結合の詳細な分子メカニズムのさらなる特性評価を実施した。これらの実験の過程で、本発明者は、（ａ）PrS_2－ＯｍｐＲが

野生型のＯｍｐＲよりもｐＥＴ発現系において著しく高いレベルで発現すること、および（ｂ）溶液へのＯｍｐＲの溶解度がプロテインＳの融合により顕著に（２０倍超）向上したことを発見した。

意義

１．大腸菌における、ｐＣｏｌｄを用いる提供されるプロテインＳタグ（ＰＳＴ）ベクターは、（ａ）非常に高レベルの発現、（ｂ）他の任意の発現系では容易に発現することができないタンパク質の発現、（ｃ）不安定なタンパク質の発現、および（ｄ）そうしない限り封入体内で発現するであろうタンパク質の溶解度の顕著な増大を可能にする、最も用途の広い発現系である。これらの特徴により、ＮＭＲ研究のためのアイソトープ（^{15}Ｎおよび^{13}Ｃ）での標的タンパク質の標識において多大な利益が生じる。

２．哺乳動物細胞における、提供されるＰＳＴベクター系により、タンパク質複合体の形成およびタンパク質－タンパク質相互作用の同定が可能になる。特に、この系により、生細胞においてのみ複合体を形成するタンパク質因子を同定することが可能になる。

３．粘液胞子の利用は次の３つの点で注目に値する。（ａ）Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓの培養物の調製が非常に容易であり、最終的な精製粘液胞子は比較的安価である。（ｂ）それらは均一であり、かつ（発芽を妨げるための）放射線照射により生物学的に完全に不活性な粒子に転換することができ、それにより無数の実験に再利用することができる。（ｃ）粘液胞子の密度が比較的低く、均質な懸濁液中に再懸濁することが容易である。

４．本発明者は、４Ｍの尿素の存在下であってもプロテインＳが依然として粘液胞子に結合し得ることを見出した。したがって、プロテインＳに融合したいくつかのタンパク質は封入体を形成するが、４Ｍの尿素で可溶化した後にこれらのタンパク質をリフォールディングすること、および粘液胞子を用いて精製することが可能である。実際、同様のアプローチがＨｉｓタグ付タンパク質に対して成功裏に利用されている。

５．提供される本発明のＰＳＴ技術は新規で非常に用途の広いものであり、タンパク質技術に大きく寄与するものと予想される。

【００６８】

Ｃ．予備研究

１．ＯｍｐＲに融合したＰｒＳ$_2$タグはＯｍｐＲの特性に影響を与えない

大腸菌の転写因子であるＯｍｐＲをプロテインＳのＮ末端ドメイン（残基１～９２）の２つの縦列反復に融合し（ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲと呼ばれる）、それによりｏｍｐＦのプロモーターの上流領域におけるＯｍｐＲ結合部位の正確な数が決定された（Ｈａｒｌｏｃｋｅｒ，Ｓ．Ｌ．ら、１９９５、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７０：２６８４９－５６）。ＯｍｐＲは、２つの成分からなるシグナル伝達系に関与する応答調節因子であり、その関連するヒスチジン・キナーゼはＥｎｖＺである。ＥｎｖＺは、保存されたＡｓｐ残基（Ｄ５５）でＯｍｐＲをリン酸化してリン酸化ＯｍｐＲ（ＯｍｐＲ－Ｐ）を生成し、また、ＯｍｐＲ－Ｐを脱リン酸化することもできる。本発明者は、ＯｍｐＲに融合したＰｒＳ$_2$タグがＯｍｐＲの特性に影響を与えるかどうかを、（ｉ）ＥｎｖＺの細胞質ドメイン（ＥｎｖＺｃ）とＯｍｐＲとの間の複合体の形成、（ｉｉ）ＯｍｐＲのリン酸化およびＯｍｐＲ－Ｐの脱リン酸化、ならびに（ｉｉｉ）ＯｍｐＲのＤＮＡへの結合を観察することで調べた。

【００６９】

ＥｎｖＺｃ／ＯｍｐＲ複合体をｎａｔｉｖｅ－ＰＡＧＥによって容易に検出し得ることは知られている（Ｙｏｓｈｉｄａ，Ｔ．ら、２００２、Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ４６：１２７３－８２）。図２Ａに示すように、精製されたＯｍｐＲおよびＥｎｖＺｃを混合し、１０％ｎａｔｉｖｅ－ＰＡＧＥに付すと、それらはＯｍｐＲおよびＥｎｖＺｃ（それぞれレーン１および３）よりもゆっくり移動する複合体（レーン２）を形成した。本発明者はＰｒＳ$_2$タグがＥｎｖＺｃとＯｍｐＲとの間の複合体の形成に影響を及ぼすかどうかを試験した。精製されたＥｎｖＺｃおよびＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲを混合すると、これらも同様に複合体を形成し（レーン４）、このことは、ＯｍｐＲに融合されたＰｒＳ$_2$タグがＥｎｖＺｃとＯｍｐＲとの間の複合体形成を妨げないことを実証している。

【００７０】
次に、本発明者は、ＥｎｖＺｃおよびＯｍｐＲの酵素的特性がPrS_2タグとのＯｍｐＲの融合による影響を受けるかどうかを調べた。第一に、ＥｎｖＺｃ－ＰによるPrS_2－ＯｍｐＲのリン酸化を試験した。ＯｍｐＲを、精製された^{32}Ｐ－標識リン酸化ＥｎｖＺｃ（ＥｎｖＺｃ－Ｐ）と混合すると、ＥｎｖＺ上のホスホリル基はすぐにＯｍｐＲに転移し、この反応は１２０秒で完了した（レーン２～５、図２Ｂ）。この反応をPrS_2－ＯｍｐＲで実施すると、ＥｎｖＺｃ－ＰはPrS_2－ＯｍｐＲをリン酸化し得、結果は非タグ付ＯｍｐＲとほぼ同一であった（レーン７～１０、図２Ｂ）。比較実験により、ＯｍｐＲおよびPrS_2－ＯｍｐＲが同様にＥｎｖＺｃ－Ｐの良好な基質であることがさらに明らかになった（レーン１２～１５、図２Ｂ）。第二に、リン酸化PrS_2－ＯｍｐＲの脱リン酸化を調べた。上述したようにＯｍｐＲ－Ｐを生成した後、脱リン酸化反応のコファクターとして知られておりＥｎｖＺｃのフォスファターゼ活性を促進するＡＤＰを添加した際の、ＯｍｐＲ－Ｐの脱リン酸化を観察した。図２Ｃのレーン３～６に示すように、ＯｍｐＲ－Ｐは速やかに脱リン酸化され、Ｐｉが遊離された。PrS_2－ＯｍｐＲのケースにおいてはこの反応はPrS_2タグにより減速したが、リン酸化PrS_2－ＯｍｐＲはＥｎｖＺｃにより脱リン酸化された（レーン９～１２）。ＯｍｐＲとPrS_2－ＯｍｐＲとの間の競合実験によって、ＯｍｐＲ－ＰおよびPrS_2－ＯｍｐＲがＥｎｖＺｃの基質としての役割を等しく有することが再び実証された（レーン１５～１８）。

【００７１】
最後に、本発明者は、ＤＮＡに対するPrS_2－ＯｍｐＲの結合がPrS_2タグにより影響を受けるかどうかを試験した（図２Ｄ）。２つのＯｍｐＲ－Ｐ分子が各々の２０ｂｐの結合部位に結合してＤＮＡ上に二量体のような構造を形成し得ることが知られている。ＯｍｐＲ－Ｐを、２０ｂｐのＦ１部位とＦ２部位の半分（Ｆ２ａ）とを有する３０ｂｐのＤＮＡ断片（Ｆ１Ｆ２ａ）と混合すると、ＯｍｐＲ－Ｐ／Ｆ１Ｆ２ａ複合体が検出された［バンド（ａ）、レーン２］。PrS_2－ＯｍｐＲを混合すると、PrS_2－ＯｍｐＲ／Ｆ１Ｆ２ａ複合体はＯｍｐＲ－Ｐ／Ｆ１Ｆ２ａ複合体と比べて非常にゆっくり移動し、PrS_2－ＯｍｐＲ／Ｆ１Ｆ２ａ複合体のバンドの移動はさらに遅れた［バンド（ｃ）、レーン８］。ＯｍｐＲとPrS_2－ＯｍｐＲとの様々な混合物をＦ１Ｆ２ａと混合すると、別の新たなバンドがバンド（ａ）とバンド（ｃ）との間に現れた［レーン３～７のバンド（ｂ）］。このバンドは１つのＯｍｐＲ分子および１つのPrS_2－ＯｍｐＲ分子によるＦ１Ｆ２ａへの結合により生じたものであり、このことは、PrS_2タグが、ＯｍｐＲのＤＮＡ結合能力と、また、ＤＮＡ上に結合しているＯｍｐＲ分子間の相互作用とに影響を与えないということを示している。

【００７２】
これらのデータは、ＯｍｐＲに融合したPrS_2タグがＯｍｐＲの特性を変化させないということを明らかに実証しており、このことは、PrS_2タグのドメインがＯｍｐＲとは独立してフォールディングしていることを示唆している。

【００７３】
２．粘液胞子へのPrS_2－ＯｍｐＲの結合はCa^{++}依存性である
新たに構築されたPrS_2断片（プロテインＳのＮ末端ドメインの２つの縦列反復）およびPrS_2－ＯｍｐＲが粘液胞子に結合し得るかどうかを調べるために、本発明者は、Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓの１０日間成長した子実体から粘液胞子を調製した。１．５Ｌの培養物からおよそ２ｇの精製粘液胞子を採取することができた。利用の前に２０ｍＭのＥＤＴＡで粘液胞子を洗浄することにより、プロテインＳ（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｍ．ら、１９７９、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７６：２０９－１３）およびプロテインＣ（ＭｃＣｌｅａｒｙ，Ｗ．Ｒ．ら、１９９１、Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １７３：２１４１－５）を粘液胞子から完全に除去した。

【００７４】
まず、本発明者は、PrS_2－ＯｍｐＲが、Ca^{++}イオンに依存した形で、プロテインＳを有さない粘液胞子に結合するかどうかを試験した。精製されたPrS_2－ＯｍｐＲ

（３μｇ）を、２０ｍＭのＥＤＴＡの存在下における５０ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭの$MgCl_2$、または１０ｍＭの$CaCl_2$を含む、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）バッファー１００μｌ内で粘液胞子と混合し、最終混合物を４℃で１時間インキュベートした。マイクロ遠心機（Ｂｉｏｆｕｇｅ　Ｐｉｃｏ、ＳＯＲＶＡＬＬ）を用いて６５００ｒｐｍで３分間遠心分離することにより粘液胞子を回収し、粘液胞子の沈殿物をそれぞれの結合バッファーで１回洗浄した。粘液胞子の最終的な沈殿物を２０μｌのＳＤＳ－ローディング・バッファー［２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ６．８）、４０ｍＭのβ－メルカプトエタノール、０．８％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ、４％グリセロール、および０．０４％（ｗ／ｖ）ブロモフェノール・ブルー］内に懸濁した。粘液胞子の懸濁液を沸騰水浴内で５分間インキュベートした。この処理によって、粘液胞子の表面に結合したタンパク質のみが可溶化するが、粘液胞子の細胞内タンパク質は影響を受けない。これらのサンプルを次に１７．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。図３Ｂに示すように、PrS_2－ＯｍｐＲは$MgCl_2$（レーン３）および$CaCl_2$（レーン４）の存在下では粘液胞子に結合するが、ＥＤＴＡ（レーン２）の存在下では結合しない。

【００７５】

粘液胞子に結合したプロテインＳはＥＤＴＡの添加により遊離され得るため、本発明者はまた、粘液胞子に結合したPrS_2タグ付タンパク質がＥＤＴＡによって遊離され得るかどうかについても調べた。PrS_2－ＯｍｐＲを粘液胞子と共に４℃で１時間インキュベートした後、粘液胞子の沈殿物をＥＤＴＡバッファー［５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、５０ｍＭのＫＣｌ、および２０ｍＭのＥＤＴＡ］内において室温で１５分間インキュベートした。PrS_2－ＯｍｐＲはＥＤＴＡの存在下で上清中に遊離されたが（レーン２、図３Ｃ）、一方、PrS_2－ＯｍｐＲはCa^{++}の存在下では依然として粘液胞子に結合したままであった（レーン４、図３Ｃ）。これらの結果は、PrS_2タグ付ＯｍｐＲにおけるPrS_2断片が、Ca^{++}に依存した形で粘液胞子の表面に結合する能力を完全に保持していることを実証している。Mg^{++}イオンの存在下においてプロテインＳは粘液胞子に結合し得るが、その結合はCa^{++}の存在下におけるものよりも弱いことが知られているということに留意されたい（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｍ．ら、１９７９、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　７６：２０９－１３）。したがって、PrS_2タグ付タンパク質を用いる全ての実験で、Ca^{++}イオンは結合バッファーに含まれる。

【００７６】

本発明者の次の疑問は、PrS_2タグ付タンパク質がどの程度特異的に粘液胞子に結合し得るかということであった。タンパク質の１工程でのアフィニティー精製を達成するためには、汚染タンパク質による粘液胞子への非特異的な結合を最小限にすることが非常に重要である。粘液胞子へのPrS_2－ＯｍｐＲの結合を大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞溶解物の存在下で試験した（レーン３、図３Ｄ）。この条件下において、PrS_2－ＯｍｐＲは粘液胞子に特異的に結合し、ごくわずかな汚染物質のみがクマシー・ブルー染色により観察された（レーン５、図３Ｄ）。興味深いことに、粘液胞子へのPrS_2－ＯｍｐＲの結合は、最大４Ｍまでの尿素の存在下においてさえも影響を受けなかった（図５Ｅ）。

【００７７】

ＰＳＴ技術の適用

タンパク質のアフィニティー精製における利点の１つは、アフィニティー・タグ付タンパク質の結合および溶離を、タンパク質－ＤＮＡまたはタンパク質－タンパク質の相互作用の研究を可能にする生理的条件下で実施し得ることである。本発明者は、ＰＳＴ（プロテインＳタグ）技術により、PrS_2－ＯｍｐＲを用いるタンパク質－ＤＮＡの相互作用の検出が可能になるかどうかを試験した。

【００７８】

PrS_2－ＯｍｐＲ／ＤＮＡ複合体の単離

図２Ｄに示すようにＯｍｐＲはＤＮＡに結合し得るため、本発明者は、粘液胞子を用いてPrS_2－ＯｍｐＲ／ＤＮＡ複合体を単離し得るかどうかを試験した。この目的のため

に、ｏｍｐＦのプロモーター（ｏｍｐＦ^{p}）の上流領域由来の配列を含む５００ｂｐのＤＮＡ断片を用いた。まず、ｏｍｐＦ^{p}のＤＮＡとＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲ（３μｇ）とを混合し、混合物を室温で３０分間インキュベートした。次に粘液胞子を混合物に加えた。４℃で１時間インキュベートした後、粘液胞子を遠心分離により回収した。最終的な沈殿物を、尿素を含むＤＮＡローディング・バッファー［２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５Ｍの尿素、４０ｍＭのβ－メルカプトエタノール、０．８％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ、４％グリセロール、および０．０４％（ｗ／ｖ）ブロモフェノール・ブルー］内に懸濁し、その後、アガロースゲル電気泳動によって、ＤＮＡ結合について上清を分析した。図４Ａに示すように、ｏｍｐＦ^{p}のＤＮＡは、ＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲの存在下においてＤＮＡ断片を粘液胞子と混合したサンプルでは検出されたが（レーン４）、一方、ＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲの不存在下で行った反応においては検出されなかった（レーン３）。

【００７９】

次に、ｏｍｐＦ^{p}断片を含むｐＣＲ－ｏｍｐＦ^{p}（４．５ｋｂｐ）を、ＢａｍＨＩで消化することにより線状プラスミドDNAを調製し［バンド（ｂ）］、また、ｐＥＴ－ＥｎｖＺｃをＥｃｏＲＩで消化して、ＥｎｖＺｃ断片（１．５ｋｂｐ）を遊離させた［バンド（ｃ）］。ｐＥＴ－ＥｎｖＺｃはｐＥＴ１１ａベクターのＥｃｏＲＩ部位でＥｎｖＺｃ断片を挿入することにより構築したことに留意されたい。したがって、ｐＥＴ－ＥｎｖＺｃのＥｃｏＲＩ消化により、２つのバンド、すなわちｐＥＴ１１ａベクターの（ａ）、およびＥｎｖＺｃ断片の（ｃ）が得られる。ＢａｍＨＩにより消化されたｐＣＲ－ｏｍｐＦ^{p}とＥｃｏＲＩにより消化されたｐＥＴ－ＥｎｖＺｃとのＤＮＡ混合物を用いて、図４Ａに記載したものと同様の実験をＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲの不存在下または存在下で行った。図４Ｂに示すように、ＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲの存在下においては、ｐＣＲ－ｏｍｐＦ^{p}断片に対応する１つのバンドのみが粘液胞子の沈殿物から検出され（レーン３）、一方、ＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲの不存在下ではＤＮＡは検出されなかった（レーン２）。これらの結果は、粘液胞子がＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲとｏｍｐＦ^{p}の０．５ｋｂｐのＤＮＡとの複合体およびＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲとｐＣＲ－ｏｍｐＦ^{p}の４．５ｋｂｐのＤＮＡ断片との複合体の両方を捕捉し得ることを実証している。とりわけ、本明細書で用いる手順は、無傷のタンパク質－ＤＮＡ複合体の単離に用いるために十分に穏やかなものである。

【００８０】

調査の設計および方法

上述した予備試験の結果に基づいて、以下の２つの研究を進めることができる。ＰＳＴ技術により、従来のＸ線およびＮＭＲ技術によっては決定し得ないタンパク質構造の解明が可能になる。

【００８１】

研究＃１　大腸菌および哺乳動物細胞におけるプロテインＳタグ（ＰＳＴ）発現系の構築ならびにアフィニティー精製のための粘液胞子の利用

この実験において、以下の２つのＰｒＳ$_{2}$－ＯｍｐＲタグ付タンパク質の発現系を開発し得る。（１）大腸菌ＰＳＴ発現系：これは、本発明者の研究所で最近開発された、高発現コールドショックベクターであるｐＣｏｌｄを用いて構築することができる（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２２：８７７－８２）。最終生成物はｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）と呼ばれ、これにおいて、目的のタンパク質をＮ末端でＰｒＳ$_{2}$タグに融合し、融合タンパク質の発現をコールドショック処理によって非常に高いレベルで誘導する。（２）哺乳動物ＰＳＴ発現系：これはテトラサイクリン誘導性ベクターを用いて構築することができる。この系は生細胞において形成された多重タンパク質複合体を単離するために設計される。ＰｒＳ$_{2}$タグ付タンパク質と結びついている複合体は粘液胞子を用いて捕捉することができ、複合体中のタンパク質は質量分析によって同定される。この目的の第３のアプローチにおいて、ＰｒＳ$_{2}$タグ付タンパク質およびタンパク質複合体のアフィニティータンパク質精製の利用のための、プロテインＳおよびプロテインＣを有していない、高度に精製された粘液胞子を調製する方法を確立することができる。

【００８２】

アプローチ＃１：大腸菌におけるＰＳＴ発現系

コールドショックベクター（ｐＣｏｌｄベクター）は本発明者の研究所において最近開発され、ｐＥＴベクター系を補完するものであることが明らかにされている（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２２：８７７－８２）。目的のタンパク質の発現は、コールドショック（１５℃）により非常に高いレベルで誘導される。コールドショック発現系における目的のタンパク質は、細胞タンパク質のバックグラウンド生産が少ない状態で生産される。したがって、$^{15}NH_4Cl$および^{13}C－グルコースを含む培地で細胞を成長させるとタンパク質は^{15}Nおよび^{13}Cアイソトープでほぼ例外なく標識され得、これにより、細胞溶解物を用いるだけで、さらなる精製を行うことなくタンパク質のＮＭＲ構造研究を実施することが可能になる（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２２：８７７－８２）。ｐＣｏｌｄベクター系は、大腸菌におけるＰＳＴ系の構築に適用し得る。

【００８３】

ａ．ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）の構築

ｐＣｏｌｄＩＩＩベクター（（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２２：８７７－８２）、図１参照）は、ｃｓｐＡのプロモーター（ｃｓｐＡは、大腸菌における主要なコールドショック遺伝子である）、ｃｓｐＡの５’－ＵＴＲ（１５９塩基）、開始コドン、翻訳促進エレメント（ＴＥＥ）、およびマルチクローニング部位で構成される。このプラスミドを用いて、PrS_2のＤＮＡ断片（１８４残基）をＴＥＥとマルチクローニング部位との間に挿入することができる。マルチクローニング部位の後ろにHis_6タグを挿入し得るが、His_6タグのＮ末端にはトロンビン切断部位（Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ↓Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）があり、His_6タグをタンパク質から容易に除去することができる。この新たに構築されたベクターはｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）と呼ばれる（図５）。とりわけ、目的のタンパク質のＤＮＡ断片をHis_6タグと共にインフレームに挿入できれば、His_6タグをPrS_2タグ付タンパク質のＣ末端に付加することもできる。ＤＮＡ断片はまた、Ｃ末端のHis_6タグを除去するための終止コドンを有するようにＰＣＲで調製することもできる。

【００８４】

実験＃２に記載するタンパク質のＮＭＲ構造研究には、たとえＮ末端のPrS_2タグが粘液胞子の表面に固く固定されていてもタンパク質が自由に動き得るようにするために、プロテインＳと目的のタンパク質との間のリンカーが必須である（実験＃２参照）。プロテインＳ断片（残基１～９２）のＣ末端は６つのアミノ酸残基（$-^{87}VPVQPR^{92}-$）からなるランダム構造を有しているが、必要であればリンカーの長さを最適化することができる（詳細は、特定の目的＃２を参照）。ＴＥＶ切断部位（Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｇｌｎ↓Ｇｌｙ）をPrS_2のＣ末端の後ろに加えることで、クローニングした遺伝子産物をＴＥＶ処理によりPrS_2から切り離すことができる。最終的なベクターはｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）と呼ばれる。

【００８５】

ｂ．モデルタンパク質へのｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）の適用

３つのモデルタンパク質、ＣｓｐＡ、ＥｎｖＺのドメインＡ、およびＥｎｖＺのドメインＢを発現させるためにｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）を用い得る。ＣｓｐＡは、７０残基からなる小さなβ－バレル型タンパク質であり、ＲＮＡシャペロンとして機能し（Ｊｉａｎｇ，Ｗ．、１９９７、Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７２：１９６－２０２）、その構造はＮＭＲによりすでに決定されている（Ｎｅｗｋｉｒｋ，Ｋ．ら、１９９４、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９１：５１１４－８）。ＮＭＲにより決定されたＥｎｖＺのドメインＡ（６７残基）の構造は、ヘアピン構造を形成している２つのらせんで構成されている（Ｔｏｍｏｍｏｒｉ，Ｃ．ら、１９９９、Ｎａｔ　Ｓｔｒｕｃｔ　Ｂｉｏｌ　６：７２９－３４）。この断片は、Ｈｉｓ残基をＥｎｖＺの自己リン酸化部位として有する中央の二量体化ドメインである。ＥｎｖＺは、大腸菌におけるｏｍｐＦ遺伝子およびｏｍｐＣ遺伝子の浸透圧調節に関与するヒスチジン・キナーゼである（総説については、Ｅ

ｇｇｅｒ，Ｌ．Ａ．ら、１９８５、Ｇｅｎｅｓ Ｃｅｌｌｓ ２：１６７－８４、Ｆｏｒｓｔ，Ｓ．Ａ．ら、１９９４、Ｒｅｓ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ １４５：３６３－３７３参照）。ＥｎｖＺのドメインＢはα／βタンパク質（１６１残基）であり、ＥｎｖＺのＡＴＰ結合ドメインとしての役割を有する。その３次元構造はＮＭＲにより決定されている（Ｔａｎａｋａ，Ｔ．ら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ ３９６：８８－９２）。

【００８６】

これらのタンパク質構造の全て（β、α、およびα／β）がＮＭＲにより決定されているため、それらは特定の目的＃２の理想的なモデルタンパク質である。ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）を用いたこれらのタンパク質の発現において、タンパク質はＮｉ－ＮＴＡ樹脂を用いて精製し得る。ＣｓｐＡについてのＲＮＡ結合、ＥｎｖＺのドメインＡについてのＥｎｖＺによるリン酸化、およびＥｎｖＺのドメインＢについてのＡＴＰ結合などのそれらのタンパク質の個々の生化学的特性が、それらの非タグ付タンパク質と比較して調べられよう。PrS_2－ＯｍｐＲで得られた結果に基づいて（予備試験の結果の節を参照）、これらのタンパク質の全てはそれらの生化学的特性を保持していると予想される。生化学的特性で観察される任意の変化はＣ末端にHis_6タグによるものであろう。この場合、トロンビンによりＣ末端のHis_6タグを除去し、それらの生化学的特性を再び調べることができる。これらのタンパク質の全てはコールドショック処理［１５℃で１２時間、（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２２：８７７－８２）］により非常に高いレベル（全細胞タンパク質の３０～５０％）で生産されると予想される。特定の目的＃２のために、本発明者の研究所において確立された方法を用いてこれらのタンパク質を^{15}Ｎで標識することができる（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２２：８７７－８２）。

【００８７】

ｃ．タンパク質の発現および溶解度の向上

ＯｍｐＲの発現および溶解度がPrS_2タグとのその融合により顕著に高まったため、このPrS_2タグを全般的なタンパク質発現系として用い得る。モデル遺伝子として用いる遺伝子セットの発現に対するｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）の有効性を調べることができる。このセットは「コア５０」と呼ばれ、シロイヌナズナ、シノラブディス・エレガンス、キイロショウジョウバエ、およびヒトに由来する遺伝子を含み、ｐＥＴ、ｐＣｏｌｄ、および小麦胚芽系などの様々な異なる発現系を試験するために用いられてきている（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ－ｎｍｒ．ｃａｂｍ．ｒｕｔｇｅｒｓ．ｅｄｕ／ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ／ＺｅｂａＶｉｅｗ／）。したがって、「コア５０」の利用はｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）の試験にとって理想的である。遺伝子、特に、封入体におけるその産物の発現または生産が乏しい遺伝子を、ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）を用いてそれらの発現および溶解度について試験することができる（方法については、Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２２：８７７－８２参照）。

【００８８】

アプローチ＃２：哺乳動物細胞におけるＰＳＴ発現系

上記に示したように、タンパク質－ＤＮＡ複合体は、PrS_2タグ付ＯｍｐＲおよび粘液胞子を用いて単離し得（図４）、この方法はまた他のタンパク質複合体の単離およびタンパク質－タンパク質相互作用の同定に適用することができる。ＰＳＴ技術は哺乳動物の系において、特に、生細胞においてのみ形成される多重タンパク質複合体の単離について多大な潜在能力を有している。したがって、テトラサイクリン誘導性のPrS_2融合発現系を構築し、モデル系としてＴＡＴＡ結合タンパク質（ＴＢＰ）を用いてその系を試験することができる。これは、真核生物の転写開始において重要な役割を果たす多重タンパク質複合体を形成することが知られている。

【００８９】

ａ．テトラサイクリン誘導性ＰＳＴ系：Ｔ－ＲＥｘ（ＰＳＴ）の構築

テトラサイクリン誘導性ＰＳＴ系を構築するために、テトラサイクリン誘導性ベクターでありＣ末端のｍｙｃエピトープおよびHis_6タグを有するプラスミド・ベクター、ｐ

ｃＤＮＡ４／ＴＯ／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いることができる。ＨｉｎｄＩＩＩ部位およびＫｐｎＩ部位を用いることで、PrS_2断片をこのベクターのマルチクローニング部位に挿入することができる。図６に示すように、ＴＥＶ切断部位および新たなマルチクローニング部位もまた、ＫｐｎＩ部位およびＸｂａＩ部位を用いることでマルチクローニング部位に挿入することができ、それにより、目的のタンパク質に融合されたPrS_2タグを必要に応じて除去し得る。このPrS_2タグ付タンパク質はＣ末端にｃ－ｍｙｃエピトープを有しているため、このタンパク質は単純なウェスタン・ブロッティングによって検出し得る。

【００９０】

PrS_2タグ付タンパク質を発現する安定な細胞系を確立するため、宿主細胞としてＴ－ＲＥｘ２９３細胞系（Ｉｎｖｔｒｏｇｅｎ）を用い得る。このＴ－ＲＥｘ２９３は、誘導因子であるテトラサイクリンを加えるまではPrS_2タグ付タンパク質の転写を抑制し得るＴｅｔリプレッサーを構成的に発現する、ヒト胎児腎臓２９３細胞系である。PrS_2タグ付タンパク質を有するＴ－ＲＥｘ（ＰＳＴ）を、ＰｏｌｙＦｅｃｔトランスフェクション試薬（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてＴ－ＲＥｘ２９３細胞にトランスフェクトすることができ、１０％仔牛血清ならびに薬剤、すなわち５μｇ／ｍｌのブラストサイジンおよび４０μｇ／ｍｌのＺｅｏｃｉｎを補ったダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）において、安定した形質転換体を２週間にわたって選択する。薬剤耐性クローンを、テトラサイクリンで誘導した後のPrS_2タグ付タンパク質の発現について分析し、PrS_2タグ付タンパク質を最も高いレベルで発現するクローンをこの研究に用いる。

【００９１】

ｂ．モデルタンパク質へのＴ－ＲＥｘ（ＰＳＴ）系の適用

モデルタンパク質としてヒトのＴＡＴＡ結合タンパク質（ＴＢＰ）を用いて、哺乳動物細胞におけるＰＳＴ系を試験することができる。転写開始におけるＴＢＰの関与はよく特性評価されており、多重タンパク質－ＤＮＡ複合体を形成するのはコア・タンパク質である（Ｈｏｒｉ，Ｒ．およびＭ．Ｃａｒｅｙら、１９９４、Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｇｅｎｅｔ Ｄｅｖ ４：２３６－４４、Ｍａｌｄｏｎａｄｏ，Ｅ．ら、１９９５、Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ７：３５２－６１、Ｒｏｅｄｅｒ，Ｒ．Ｇ．ら、１９９１、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ １６：４０２－８）。この多重タンパク質－ＤＮＡ複合体の形成は、ＴＡＴＡエレメントへのＴＢＰの結合、および一般的な転写因子の１つである転写因子ＩＩＢ（ＴＦＩＩＢ）とのその結びつきを介して開始され、最終的に、ＲＮＡポリメラーゼＩＩおよび他の既知の一般的な転写因子を含む開始前複合体（ＰＩＣ）が組み立てられる（Ｚａｗｅｌ，Ｌ．ら、１９９３、Ｐｒｏｇ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ４４：６７－１０８）。

【００９２】

まず、上述したような安定な細胞系を調製し得、誘導された細胞を、およびまたコントロールとしての誘導されていない細胞も採取することができる。粘液胞子と混合することにより細胞溶解物からPrS_2－ＴＢＰを単離し得るかどうかを調べることができる。PrS_2－ＴＢＰを粘液胞子により単離し得ることを確認した後、誘導された、および誘導されていない細胞に由来する、粘液胞子に結合しているタンパク質を比較することができる。PrS_2－ＴＢＰに誘導された細胞において検出されたタンパク質のバンドが誘導されていない細胞におけるものと異なる場合、これらのタンパク質はウェスタン・ブロットまたは質量分析フィンガー・プリンティングにより同定することができ、質量分析フィンガー・プリンティングは、本発明者の医学専門学校の中心施設において、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析で、本発明者の研究所でそれを日常的に使用しているＴａｋｅｓｈｉ Ｙｏｓｈｉｄａによって実施され得る。

【００９３】

PrS_2－ＴＢＰを用い、粘液胞子と結びつく因子がうまく単離される場合、ヒストンＨ３－Ｈ１メチルトランスフェラーゼ活性に関与する、ｚｅｓｔｅ－１２のサプレッサーであるＳｕ（ｚ）１２と相互作用するタンパク質（複数も）の研究にこの系を適用し得る

（Ｋｕｚｍｉｃｈｅｖ，Ａ．ら、２００２、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ １６：２８９３－９０５）。

【００９４】

アプローチ＃３：高度に精製されたプロテインＳ欠乏粘液胞子の調製

PrS_2タグ付タンパク質のアフィニティー精製およびタンパク質複合体の単離には、高度に精製された粘液胞子を得ることが必須である。このアプローチにおいて、表面上に集合するプロテインＳおよびプロテインＣを失った、大量の精製粘液胞子を調製する方法を確立することができる。また、粘液胞子を不活性化して、それらがいかなる条件下においても発芽しないように、ひいては再利用可能な生体材料として利用され得るようにするための方法を確立することもできる。粘液胞子は生物学的に調製されるため、精製粘液胞子を調製するためのコストは、Ｎｉ－ＮＴＡ、ストレプトアビジン、グルタチオン、アミロース、およびカルモジュリン樹脂などの他のアフィニティー樹脂と比べて非常に経済的である。さらに、Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓおよびその胞子は非病原性であり、取り扱う上で十分に安全である。

【００９５】

ａ．粘液胞子の調製

Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ ｘａｎｔｈｕｓ ＦＢ（ＤＺＦ１）を粘液胞子の由来原として用いる。細胞の成長にはカジトン－酵母抽出物（ＣＹＥ）培地［１％カジトン、０．５％酵素抽出物、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）、および８ｍＭの$MgSO_4$］を用い、子実体の形成には、クローン成熟（ＣＦ）寒天［０．０１５％カジトン、０．２％クエン酸Ｎａ、０．０２％$(NH_4)_2SO_4$、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）、８ｍＭの$MgSO_4$、０．１％ピルビン酸Ｎａ、１ｍＭのリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．６）、および１．５％Ｂａｃｔｏ寒天］プレートを用いた。使用の前に、プレートは、３０℃で一晩、その後室温で５日間乾燥させる。

【００９６】

指数増殖期に達するまで細胞を３０℃で成長させる（１００Ｋｌｅｔｔ単位）。室温で１０分間、４０００×ｇで遠心分離することにより、細胞を採取する。細胞の沈殿物を等量のＴＭバッファー［１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）および８ｍＭのMg_2SO_4］で洗浄する。細胞の沈殿物をＴＭバッファー内に再懸濁し、４０００Ｋｌｅｔｔ単位／ｍｌの濃度にする。この濃縮された細胞懸濁液をＣＦ寒天プレート上にスポットし（スポット当たり４μｌ、プレート当たり１４４スポット）、プレートを３０℃で１０日間インキュベートする。プレートの表面を穏やかにこすることにより子実体を採取し、冷たいＴＭバッファー内に懸濁する。細胞を５分間ずつ３回超音波処理し、栄養細胞を破壊する。粘液胞子をＴＭバッファーで数回洗浄し、最後に１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）バッファーに再懸濁する。粘液胞子は使用するまで４℃で保管する。

【００９７】

精製された粘液胞子を、２５ｍＭのＥＤＴＡを含む１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）バッファーにおいて室温で１時間インキュベートして、それらの表面から天然のプロテインＳ（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｍ．ら、１９７９、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７６：２０９－１３）およびプロテインＣ（ＭｃＣｌｅａｒｙ，Ｗ．Ｒ．ら、１９９１、Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １７３：２１４１－５）を除去し、数回の洗浄の後、この工程をもう一度繰り返す。必要であれば、このＥＤＴＡ処理された粘液胞子をその後６０℃で１０分間加熱してプロテアーゼを不活性化する。図３Ａに示すように、これらの処理された粘液胞子は一定の球状を有し、本発明者の研究において用いられる。

【００９８】

ｂ．良好に懸濁された粘液胞子の維持

精製された粘液胞子は均一なサイズであり（直径１μｍ、図３Ａ参照）、水よりもわずかに密度が高い（したがって、粘液胞子の懸濁液が長期にわたって保存されると、それらはバッファー溶液内において管の底に堆積する）。粘液胞子が良好に懸濁している状態を維持するために、粘液胞子の懸濁液に対するショ糖の効果を試験した。粘液胞子を、０．

３ｍｌの０、５、１０、１５、および２０％ショ糖溶液に室温で懸濁した。粘液胞子は５％ショ糖という最低濃度で、堆積することなく良好に懸濁した（データは示していない）。この条件は、ＮＭＲ構造研究のために設計した実験に用いることができる。

【００９９】

ｃ．粘液胞子の不活性化

１ｍＭのＣａ$^{++}$イオンおよびカジトン培地の存在下などの一定の条件下において粘液胞子は発芽する（Ｏｔａｎｉ，Ｍ．ら、１９９５、Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １７７：４２６１－５）。ＰＳＴ技術では、粘液胞子の発芽を妨げて粘液胞子を何度も再利用し得るようにすることが必須である。粘液胞子の発芽能力を完全に不活性化するために、以下の方法を試験することができる。

【０１００】

ＮａＮ$_3$の効果 － ＮａＮ$_3$（１ｍＭ）が粘液胞子の発芽を妨げるかどうかを試験するために、ＮａＮ$_3$を有するおよび有さない発芽培地（１ｍＭのＣａ$^{++}$を含む０．２％カジトン）において粘液胞子を３０℃で１０時間インキュベートし得る。発芽の阻害は、位相差顕微鏡において粘液胞子の屈折性を観察することにより観察し得る。

【０１０１】

熱処理の効果 － 高温での粘液胞子の処理がそれらの発芽を妨げるかどうかを試験するために、それらを７０、８０、９０、および１００℃で３０分間インキュベートし得る。粘液胞子の発芽能力は喪失するがそれらのプロテインＳ結合特性は保持される、最適な熱処理を決定することができる。

【０１０２】

γ線照射の効果 － 粘液胞子の発芽の阻害において上述した方法の両方が効果を示さない場合、粘液胞子を殺すためのγ線照射を用い得る。粘液胞子がＵＶ照射に耐性を有していることは留意されたい。

【０１０３】

研究２ 粘液胞子上に捕捉されたプロテインＳタグ付タンパク質の核磁気共鳴（ＮＭＲ）構造研究

タンパク質が、柔軟なリンカーを介して結合している２つの完全に独立したドメインＸおよびＹからなり、かつこの２つのドメインの間に相互作用がない場合、ドメインＸの等方性の動きを制限することによりドメインＸからのＮＭＲシグナルを除去することが可能であると仮定する。これは、溶液内に良好に懸濁している粒子の表面に固く結合しているドメインＸにより達成され得る。この条件下において、ドメインＹは、非常に柔軟なリンカーを介してドメインＸに接続しているため、依然として溶液における等方性の動きを保持している。したがって、構造分析では、ドメインＸのＨＳＱＣスペクトルの全てのピークは広がり得、一方、ドメインＹのＨＳＱＣスペクトルの全てのピークは鋭いままである。したがって、うまくいけば、提供されるＰＳＴ技術により、以下の研究に新たな素晴らしい道が開かれよう。

【０１０４】

１．難溶性タンパク質のＮＭＲ構造研究

ＮＭＲ構造研究では、高いシグナル対ノイズ比を得るために、高濃度の目的のタンパク質が必要である。タンパク質が一切の凝集または沈殿をすることなく完全に可溶性であることが必要不可欠である。目的のタンパク質が高濃度のときに安定でない場合、ＰＳＴ技術を用いることでこの問題は解決するであろうと予想される。ＰｒＳ$_2$タグ付けがタンパク質の溶解度を高めるという事実に加え、粘液胞子へのＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質の結合はタンパク質の凝集を防ぎ得る。さらに、ＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質の濃度は、非タグ付タンパク質よりもはるかに濃縮され得る。

２．ＰｒＳ$_2$タグに融合しているときのみ発現するタンパク質のＮＭＲ構造研究

【０１０５】

３．膜タンパク質の構造研究

膜タンパク質は常に高いレベルで発現するわけではない。提供されるＰＳＴ技術を用い

て、適切な界面活性剤に溶解した膜タンパク質の１工程での精製を達成することが可能であり得る。したがって、粘液胞子に結合した膜タンパク質をそれらのＮＭＲ構造研究に必要な非常に高い濃度で調製することができる。

【０１０６】

実験のアプローチ

粘液胞子および実施例１の^{15}Ｎ－標識PrS_2タグ付タンパク質を用いて、上記の仮説を試験し得る。上記の仮説において、PrS_2タグはドメインＸとしての役割を有し、PrS_2タグに融合したタンパク質はドメインＹとしての役割を有する。目的を達成するためには、実施例１に示すように、経済的に大量の再利用可能な粘液胞子を調製する方法を確立することが重要である。

【０１０７】

アプローチ＃１：プロテインＳのＨＳＱＣスペクトルに対する粘液胞子の結合の効果

PrS_2断片（１８４残基）はｐＣｏｌｄベクターにより非常に高いレベルで発現し得るため、５００ｍｌの培養物から、２０ｍｇの精製された^{15}Ｎ－標識PrS_2断片を容易に得ることができる。^{15}Ｎ－標識PrS_2断片を用いて、粘液胞子の存在下および不存在下における、その異核間単一量子コヒーレンス（ＨＳＱＣ）スペクトルを比較し得る。１０ｍＭの$CaCl_2$の存在下で粘液胞子を加えると、粘液胞子への結合によりPrS_2の分子運動が大きく制限されるため、PrS_2のＨＳＱＣスペクトルの全てのピークが広がると予想される。１０ｍＭのＥＤＴＡを加えることにより、粘液胞子を加えることによるこの効果が可逆的であることを確認することができる。ＥＤＴＡにより、結合したPrS_2が粘液胞子から遊離されるため、ＨＳＱＣスペクトルの全てのピークは再び鋭くなるはずである。

【０１０８】

アプローチ＃２：PrS_2タグ付モデルタンパク質のＨＳＱＣスペクトル

次に、粘液胞子によりPrS_2のＨＳＱＣスペクトルのピークが広がることを確認するために、粘液胞子の存在下および不存在下で、特定の目的＃１から得た^{15}Ｎ－標識PrS_2タグ付ＣｓｐＡ、ＥｎｖＺのドメインＡ、およびＥｎｖＺのドメインＢのＨＳＱＣスペクトルを得ることができる。これらのスペクトルは次に、以下の基準を用いて分析し得る。

【０１０９】

全ての３つのスペクトルにおける、粘液胞子を加えることにより広がったピークは、PrS_2タグによるものであると予想される。これらの広がったスペクトルは粘液胞子の存在下におけるPrS_2のスペクトルと非常に似通っていると予想される。もしそうであれば、本発明者の仮説は正しいと証明されよう。したがって、これらの全てのピークは、粘液胞子の存在下で得られたＨＳＱＣスペクトルから除去され得る。

【０１１０】

このようにして得られた（PrS_2タグからの全てのピークを除去した後の）ＨＳＱＣスペクトルを個々のタンパク質のＨＳＱＣスペクトルと比較することができ、後者のスペクトルの全ては、これらのタンパク質のＮＭＲ構造がＧ．Ｍｏｎｔｅｌｉｏｎｅ博士［ＣｓｐＡについて（Ｎｅｗｋｉｒｋ，Ｋ．ら、１９９４、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１：５１１４－８）］およびＩｋｕｒａ博士［ＥｎｖＺのドメインＢおよびＡについて（Ｔａｎａｋａ，Ｔ．ら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ ３９６：８８－９２、Ｔｏｍｏｍｏｒｉ，Ｃ．ら、１９９９．Ｎａｔ ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ ６．７２９－３４）］と共同で本発明者により決定されているため、本発明者の研究所で入手可能である。

【０１１１】

現在のところ、プロテインＳの自己集合を引き起こす、粘液胞子の表面上の成分（複数も）は知られていない。PrS_2タグ付タンパク質の表面密度が目的のタンパク質のＨＳＱＣスペクトルに対してどのように影響を及ぼすかは依然として調べられていない。PrS_2タグ付タンパク質の表面密度が非常に高いと、タンパク質の自由な動きを制限し得る

タンパク質間の分子間相互作用が存在し得、それによりピークが広がる。これは、同量のＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質を有する、異なる量の粘液胞子をＮＭＲ分析に用いることで調べることができる。粘液胞子をより多く加えると、粘液胞子が結合したＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質の密度が低下し、その結果、広がり効果を避け得る。ＨＳＱＣスペクトルの質に影響を与え得る別の重要な因子は柔軟なリンカーの長さである。（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ｎ＝１、２、３・・・）残基を１つずつ加えることによりリンカーの長さの影響を調べることができる。これらの実験を通して、ＰＳＴ技術に最適なリンカーを確立することができる。

【０１１２】

これらのアプローチが成功すれば、特定の目的＃１のアプローチ＃１において試験したいくつかのタンパク質にＰＳＴ技術を適用し、この技術の全般的な適用性を試験し得る。特に、（ａ）ＰｒＳ$_2$でタグ付けされたときのみ良好に発現するタンパク質、（ｂ）低いレベルでのみ発現するタンパク質、（これらの場合、粘液胞子に対するタンパク質の結合により、ＮＭＲ研究のためのタンパク質の濃度は実質的に高まり得る）および（ｃ）４Ｍの尿素にのみ可溶性のタンパク質を試験することができる。ＰｒＳ$_2$は４Ｍの尿素中において粘液胞子に完全に結合し得るため、ＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質は４Ｍの尿素の存在下で容易に精製することができる（予備試験の結果の節参照）。粘液胞子の懸濁液に用いる溶液は単純な遠心分離を用いて容易に置き換えることができるため、４Ｍの尿素溶液を、尿素を含まないバッファー溶液で直ちに置き換えることができることに留意されたい。バッファーの置き換えのこの容易性により、ＮＭＲ実験に対する最適なバッファー条件の迅速なスクリーニングの方法もまた提供され得る。

【０１１３】

最適な結果の取得

ＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質のスペクトルが非タグ付タンパク質のスペクトルに対してどの程度類似しているかが、タンパク質のＮＭＲ構造研究のための提案するＰＳＴ技術の実現可能性を決定するための重大な問題である。粘液胞子へのＰｒＳ$_2$タグ付タンパク質の結合が、ＰｒＳ$_2$のＨＳＱＣスペクトルの各ピークの分解（広がり効果）に予測不能に影響し得るが、Ｎ末端のＣａ$^{++}$結合ドメインは主にβ鎖で構成されている非常に安定な球状の構造からなっており（Ｂａｇｂｙ，Ｓ．ら、１９９４、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１：４３０８－１２）、ＰｒＳ$_2$の各Ｃａ$^{++}$結合ユニットはトリプシン消化（Ｉｎｏｕｙｅ，Ｓ．ら、１９８１、Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １４８：６７８－８３）および熱処理（Ｂａｇｂｙ，Ｓ．ら、１９９８、Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２７６：６９９－８１）に耐性を有する。したがって、９２残基のＮ末端ドメインがそのＣａ$^{++}$結合部位を介して粘液胞子に結合すると、ドメイン全体が粘液胞子の表面上に固く固定されると思われる。このことにより、ＰｒＳ$_2$のＨＳＱＣスペクトルの全てのピークの広がりが生じる。しかし、ドメインＹの動きがＰｒＳ$_2$タグによって制限されると、ＰｒＳ$_2$に融合したドメイン（ドメインＹ）のＨＳＱＣスペクトルの質が影響を受け得る可能性もある。

【０１１４】

この理由から、ＰｒＳ$_2$タグとドメインＹとを接続するリンカーはドメインＹの自由な動きにおいて重要な役割を果たすと考えられる。リンカーの長さがどのようにしてドメインＹのＨＳＱＣスペクトルの質に影響を与えるかを決定しなくてはならない。モデル系としてＰｒＳ$_2$－ＣｓｐＡを用いて、（ＧＧＧＧＳ）$_n$リンカー（ｎ＝１、２、３・・・）を加えることにより、この問題についてまず試験することができる。４残基の配列を１つずつ加えることによりドメインＹの動きがより自由になると予想され、それによりＣｓｐＡのＨＳＱＣスペクトルのピークが鋭くなるはずである。このＨＳＱＣスペクトルを、精製ＣｓｐＡのＨＳＱＣスペクトルと比較することにより、柔軟なリンカーの長さを最適化することができるはずである。リンカーの最適な長さが確立されれば、この最適な長さが他のモデル系にも同様に適用可能であるかどうかを確認する。

【０１１５】

本発明の特定の実施形態に準拠して本発明を記載してきたが、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更がなされ得、同等のものが置き換えられ得るということが当業者には理解されよう。加えて、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセスの１つまたは複数の工程を本発明の目的、趣旨、および範囲に適合させるべく、多くの改変がなされ得る。これらの改変は全て、本明細書に添付の特許請求の範囲の範囲内にあるものとする。

【図面の簡単な説明】

【０１１６】

【図１】プロテインＳのＮＭＲ構造およびPrS_2タグ付タンパク質のスキームである。Ａ：Ca^{++}イオンが結合した、Ｍ．ｘａｎｔｈｕｓのプロテインＳのＮＭＲ構造（Ｂａｇｂｙ，Ｓ．ら、１９９４、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２：１０７－２２）。Ｂ：PrS_2タグに用いられるプロテインＳのＮ末端ドメイン（１～９２）を示す。プロテインＳの２つの縦列反復（１～９２）（PrS_2）（長円形）が目的のタンパク質（白い四角）のＮ末端で融合している。

【図２】野生型ＯｍｐＲとPrS_2－ＯｍｐＲとの比較を示す図である。Ａ：ＥｎｖＺｃとPrS_2－ＯｍｐＲとの間の複合体形成。ＥｎｖＺｃ（４μＭ）およびPrS_2－ＯｍｐＲ（４μＭ）（レーン４）またはＯｍｐＲ（４μＭ）（レーン２）を混合し、室温で５分間、反応バッファー内でインキュベートした。サンプルを１０％ｎａｔｉｖｅ　ＰＡＧＥに付した。Ｂ：リン酸化ＥｎｖＺｃ（ＥｎｖＺｃ－Ｐ）からPrS_2－ＯｍｐＲへのリン酸転移。精製された^{32}Ｐ－標識ＥｎｖＺｃ－Ｐ（２μＭ）を、ＯｍｐＲ（４μＭ）、PrS_2－ＯｍｐＲ（４μＭ）、またはＯｍｐＲ（２μＭ）とPrS_2－ＯｍｐＲ（２μＭ）との混合物と、反応バッファー［５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、５０ｍＭのＫＣｌ、５ｍＭの$CaCl_2$、５％グリセロール］内で混合した。最終的な反応混合物を室温でインキュベートした。アリコートを２０、４０、６０、および１２０秒の時点で取り出し、５×ＳＤＳローディング・バッファーで反応を停止させた。サンプルを１７．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥに付した。Ｃ：ＥｎｖＺｃによるリン酸化PrS_2－ＯｍｐＲ（PrS_2－ＯｍｐＲ－Ｐ）の脱リン酸化。第一の精製された^{32}Ｐ－標識ＥｎｖＺｃ－Ｐ（２μＭ）を、ＯｍｐＲ（４μＭ）、PrS_2－ＯｍｐＲ（４μＭ）、またはＯｍｐＲ（２μＭ）とPrS_2－ＯｍｐＲ（２μＭ）との混合物と混合し、反応バッファー［５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、５０ｍＭのＫＣｌ、５ｍＭの$CaCl_2$、５％グリセロール］内において室温で２分間インキュベートし、ＯｍｐＲ－ＰまたはPrS_2－ＯｍｐＲ－Ｐを生成させた。１ｍＭの最終濃度でＡＤＰを加えた後、アリコートを２０、４０、６０、および１２０秒の時点で取り出し、５×ＳＤＳローディング・バッファーで反応を停止させた。サンプルを１７．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥに付した。Ｄ：PrS_2－ＯｍｐＲ－ＰのＤＮＡ結合。ゲルの最上部に示されているＯｍｐＲ－ＰとPrS_2－ＯｍｐＲ－Ｐとの様々な混合物を、ＤＮＡ結合バッファー内において、３０ｂｐのＦ１Ｆ２ａＤＮＡ断片と混合した。５’末端を標識したＤＮＡ断片で、ＤＮＡのゲル移動度シフトアッセイを実施した。ａ：２つのＯｍｐＲ－Ｐ分子とＦ１Ｆ２ａとの複合体、ｂ：１つのＯｍｐＲ－Ｐ分子および１つのPrS_2－ＯｍｐＲ－Ｐ分子とＦ１Ｆ２ａとの複合体、ならびにｃ：２つのPrS_2－ＯｍｐＲ－Ｐ分子とＦ１Ｆ２ａとの複合体。Ｂ、Ｃ、およびＤから得たゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィーに暴露した。

【図３】粘液胞子に対するPrS_2－ＯｍｐＲの結合の特性評価を示す図である。Ａ：粘液胞子の位相光学顕微鏡画像（１００倍）。Ｂ：PrS_2－ＯｍｐＲはCa^{++}に依存した形で粘液胞子に結合する。精製PrS_2－ＯｍｐＲ（３μｇ）を粘液胞子と混合し、２０ｍＭのＥＤＴＡ、１０ｍＭの$MgCl_2$、または１０ｍＭの$CaCl_2$の存在下で、４℃で１時間、５０ｍＭのＫＣｌを含む５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー内でインキュベートした。洗浄した後、粘液胞子を遠心分離により回収し、ＳＤＳローディング・バッファー内に懸濁した。サンプルを沸騰水浴内で５分間インキュベートし、それらの上清を１７．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥに付した。レーン１は、用いた精製PrS_2－ＯｍｐＲの全量である。Ｃ：ＥＤＴＡにより、粘液胞子に結合したPrS_2－ＯｍｐＲが遊離され得

る。まず、粘液胞子に対するＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲの結合をＣａＣｌ$_2$の存在下で実施した。粘液胞子を遠心分離により回収し、結合に用いたものと同様のバッファーで洗浄した。回収した粘液胞子を、２０ｍＭのＥＤＴＡまたは１０ｍＭのＣａＣｌ$_2$の存在下で、５０ｍＭのＫＣｌを含む５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー内において１５分間インキュベートした。レーン１は用いたＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲの全量であり、レーン６は、粘液胞子に結合した全ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲである。Ｄ：大腸菌溶解物に加えられた精製ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲは、粘液胞子により特異的に捕捉される。精製ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲ（３μｇ）を大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）の溶解物と混合し、粘液胞子へのＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲの特異的結合を調べた（レーン５）。レーン１は、用いた全精製ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲであり、レーン２では、細胞溶解物を伴わせずに精製ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲを加え、レーン３では、細胞溶解物のみを用い、レーン４では、ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲを伴わせずに細胞溶解物を加えた。Ｅ：ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲは４Ｍの尿素の存在下であっても粘液胞子に結合し得る。ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲの結合を尿素の存在下（２、３、および４Ｍ）で調べた。レーン３～５は細胞溶解物を伴っておらず、レーン７～９は細胞溶解物を伴っており、レーン６では、ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲと大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）の溶解物との混合物を用いた。

【図４】ＤＮＡのプルダウン実験を示す図である。Ａ：精製ＥｎｖＺｃ１１（ＯｍｐＲのリン酸化に用いられる）とｏｍｐＦのプロモーター（ｏｍｐＦ^P）の上流領域のＤＮＡ断片とを混合し、混合物を、ＰｒＳ$_2$－ＯｍｐＲの不存在下（レーン３）または存在下（レーン４）で、５０ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭのＣａＣｌ$_2$、および１ｍＭのＡＴＰを含む、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）バッファー内において室温で３０分間インキュベートした。粘液胞子を混合物に加え、それをさらに４℃で１時間インキュベートした。粘液胞子を遠心分離により回収し、サンプルの上清を１．７％アガロースゲル電気泳動に付した。レーン１は１００ｂｐのマーカー（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）であり、レーン２はｏｍｐＦ^{P}のＤＮＡ断片である。Ｂ：上述したものと同様の実験を、２つの異なる線状プラスミド、すなわちＢａｍＨＩにより消化されたｐＣＲ－ｏｍｐＦ^{P}およびＥｃｏＲＩにより消化されたｐＥＴ－ＥｎｖＺｃの混合物を用いて実施した。前者のプラスミドは、上記のＡで用いたｏｍｐＦ^{P}のＤＮＡ断片を含むが、一方、後者のプラスミドはＯｍｐＲ結合部位を含まない。サンプルを０．８％アガロースゲル電気泳動に付した。レーン１はｐＣＲ－ｏｍｐＦ^{P}のＤＮＡ断片およびｐＥＴ－ＥｎｖＺｃのＤＮＡ断片であり、レーン４はλ／ＨｉｎｄＩＩＩマーカーである。

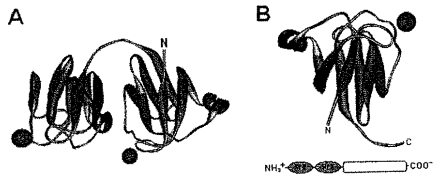
【図５】ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）ＩＩＩに由来するｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）ベクターのプラスミド・マップである。Ａ：ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）はｐＣｏｌｄＩＩＩベクターに由来する（Ｑｉｎｇ，Ｇ．ら、２００４、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２２：８７７－８２）。ＴＥＥは、翻訳促進エレメントである。Ｂ：ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）ベクターのために設計された、ＴＥＶ切断部位、マルチクローニング部位、トロンビン切断部位、およびＨｉｓ$_6$タグのＤＮＡ配列。

【図６】Ｔ－ＲＥｘ（ＰＳＴ）のために設計されたＴＥＶ切断部位、マルチクローニング部位のＤＮＡ配列である。ｃ－ｍｙｃエピトープは［Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ｉｌｅ－Ｓｅｒ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ］である。

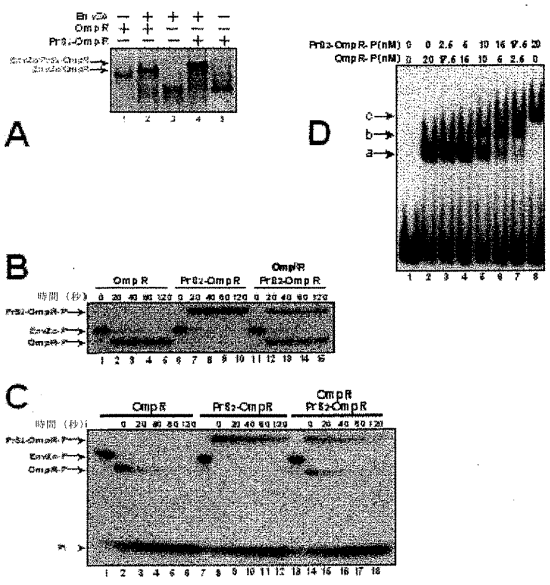
【図７】ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）ＩＶに由来するｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）ベクターのプラスミド・マップである。（ａ）発現ベクター、ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）のスキームである。ｐＣｏｌｄ（ＰＳＴ）は、コールドショックベクターの１つであり、日本の滋賀県にあるタカラバイオ株式会社から入手可能なｐＣｏｌｄＩＶを用いて構築される。ＰｒＳタグは、ＰｒＳタグまたはＰｒＳ$_2$タグのＤＮＡ断片が挿入されている場所を示している。ＰｒＳタグは、Ｍｅｔ１からＡｒｇ８２まで、およびＴｙｒ９３のプロテインＳのＮ末端ドメインで構成され、一方、ＰｒＳ$_2$タグは、ＰｒＳタグ（Ｍｅｔ１～Ａｒｇ８２）の２つの縦列反復配列およびＴｙｒ１８５で構成される。（ｂ）マルチクローニング部位およびトロンビン切断部位の配列。トロンビン切断部位であるＬＶＰＲＧＳ、すなわちＣＴＧ　ＧＴＧ　ＣＣＡ　ＣＧＣ　ＧＧＴ　ＡＧＴは、ＰｒＳタグのＴｙｒ８３またはＰｒＳ$_2$タグのＴｙｒ１８５と、ＮｄｅＩ、ＳａｌＩ、ＸｈｏＩ、ＢａｍＨＩ、およびＸｂａＩ部位を含む

マルチクローニング部位との間に導入される。ｃｓｐＡの３’ＵＴＲ、翻訳促進エレメント、ｃｓｐＡの５’ＵＴＲ、ｌａｃのオペレーター、およびｃｓｐＡのプロモーターは元のｐＣｏｌｄＩＶベクターに由来する。

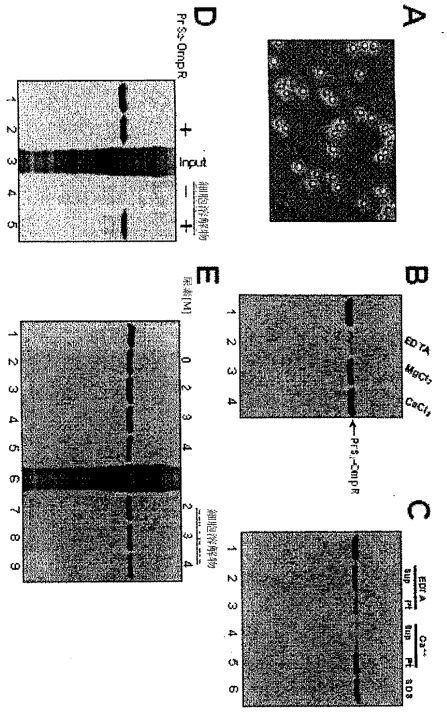
【図１】



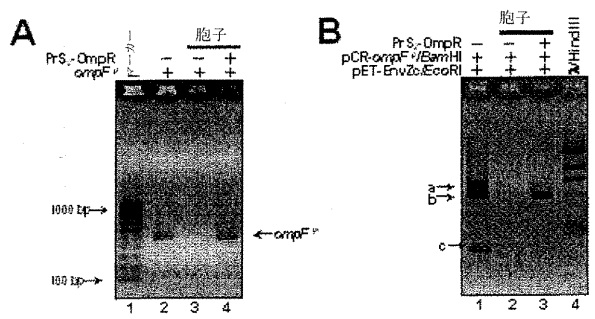
【図２】



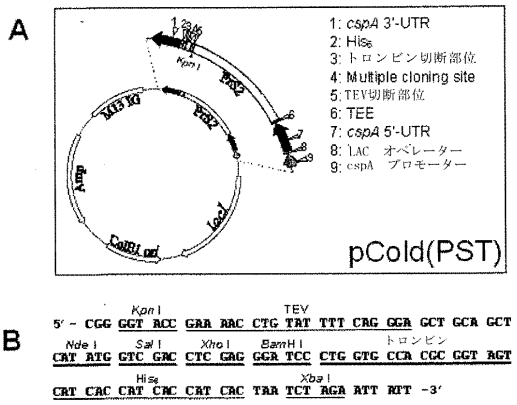
【図３】



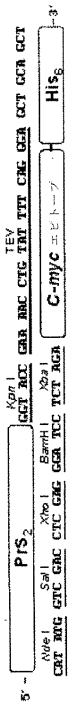
【図４】



【図５】

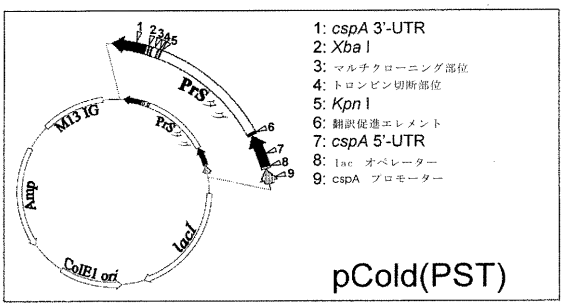


【図６】



【図７】

a



b

```
                Kpn I                Thrombin
5'- CCC AGG TAC CTG GTG CCA CGC GGT AGT
   Nde I     Sal I     Xho I     BamH I     Xba I
CAT ATG GTC GAC CTC GAG GGA TCC TAA TCT AGA -3'
```

【配列表】
2009531032000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 07/64457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 15/64; C12P 21/04; C07H 21/04; C07K 19/00 (2007.10)
USPC - 435/91.4; 435/69.7; 930/300; 536/23.4; 530/412
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)
USPC- 435/91.4; 435/69.7; 930/300; 536/23.4; 530/412

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 435/91.4 69.7, 69.1, 41; 930/300; 536/23.4, 23.1, 530/412,344, 413, 417, 350 (text search)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patent/Scholar and National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Search terms: myxococcus xanthus, protein S, protein folding and solubility, spore coat protein, affinity tag, tandem affinity purification, tetracycline-inducible, bacterial spore

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,861,403 B2 (Sanders) 01 March 2005 (01.03.2005) col 2, ln 3-32, col 2, ln 43-57, col 2, ln 65 to col 3, ln 2, col 3, ln 57 to col 4, ln 9 and col 6, ln 8-23	1-37
Y	Bagby et al. "Structural similarity of a developmentally regulated bacterial spore coat protein to beta gamma-crystallins of the veterbrate eye lens" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, v91, p4308; abstract and p4308, left col, para 1,	1-37
Y	US 2005/0106663 A1 (Braman et al.) 19 May 2005 (19.05.2005) para [0006] and [0129]	1-9, 11, 21-37
Y	US 2005/0272924 A1 (Inouye et al.) 08 December 2005 (08.12.2005) para [0014], [0015], [0046], [0047] and [0048]	4-6, 15, 36-37
Y	US 2004/0018529 A1 (Li et al.) 29 January 2004 (29.01.2004) para [0031]	7-9, 16-17
Y	Inouye et al. "Structural similarities between the developmental-specific protein S from a gram-negative bacterium, Myxococcus xanthus, and calmodulin" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, v80, p6829; Fig. 2 and p6829, left col, para 1	2-3, 20, 22-24
Y	US 6,420,110 B1 (Gyuris et al.) 16 July 2002 (16.07.2002) col 18, ln 40 to col 19, ln 10 and col 20, ln 1-30	21-28
Y	US 2003/0134352 A1 (Freimuth et al.) 17 July 2003 (16.07.2003) para [0011], [0013] and [0033]	29-36

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

* 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	Date of mailing of the international search report
06 December 2007 (06.12.2007)	15 MAY 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 07/64457

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions listed as Groups I - VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical feature. According to PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by all claimed inventions.

---see extra sheet---

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 07/64457

-Continuation of Box III-
Group I Claims 1-9 are directed to a vector containing a multiple cloning site.
Group II Claims 10-19 are directed toward a method for enhancing the solubility of a target protein. (Claims 14-19 lack a correct antecedent basis. Therefore, it was assumed claims 14-19 are dependent upon claim 10.)
Group III Claim 20 is directed to a Pr-S tagged protein molecule bound to one or more myxospores of M. xanthus.
Group IV Claims 21-31 are directed to a method for purifying a Pr-S tagged protein. (Claim 29 lacks a correct antecedent basis. Therefore, it was assumed claim 29 is dependent upon claim 21.)
Group V - Claims 32-36 are directed to a method of preparing a target protein for analytical study.
Group VI Claim 37 is directed to a method for characterizing a target proetien.

The inventions listed as Groups I - VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical feature. According to PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by all claimed inventions.

None of these groups share a single inventive concept under PCT Rule 13.1. Therefore, the groups do not share a single general inventive concept under PCT Rule 13.1

In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096943
弁理士 臼井 伸一
(74)代理人 100091889
弁理士 藤野 育男
(74)代理人 100101498
弁理士 越智 隆夫
(74)代理人 100102808
弁理士 高梨 憲通
(74)代理人 100128646
弁理士 小林 恒夫
(74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
(74)代理人 100134393
弁理士 木村 克彦
(74)代理人 100136799
弁理士 本田 亜希
(72)発明者 井上 正順
アメリカ合衆国 ０８９０１ ニュージャーシィ，ニュー ブランズウィック，ジョージ ストリート １０５０，ザ コロニー ハウス
(72)発明者 吉田 武司
アメリカ合衆国 ０８８５４ ニュージャーシィ，ピスカタウェイ，ブルー リッジ アヴェニュー ５４０

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 CA04 CA07 DA02 DA06 EA04 FA01 GA11 HA03
4B064 AG01 CA02 CA19 CE12
4H045 AA20 AA30 BA42 CA11 EA50 FA74