

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年5月4日 (04.05.2006)

PCT

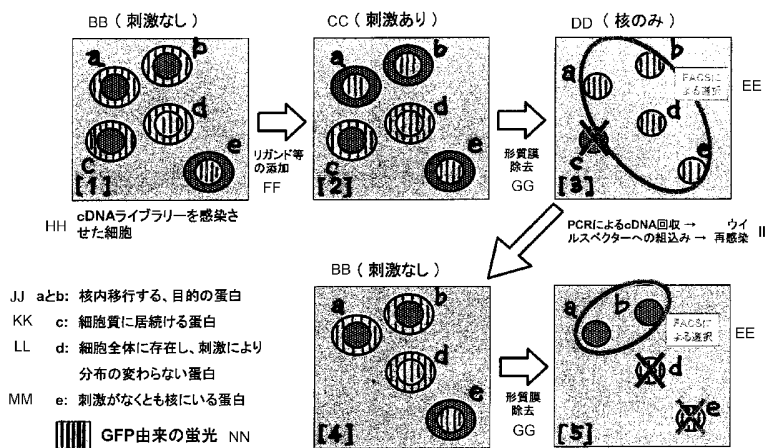
(10) 国際公開番号
WO 2006/046504 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/019490
- (22) 国際出願日: 2005年10月24日 (24.10.2005)
- (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 2004-310251
2004年10月25日 (25.10.2004) JP
特願 2004-311615
2004年10月26日 (26.10.2004) JP
特願 2004-311616
2004年10月26日 (26.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP];
- 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
Miyagi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 熊谷 啓之 (KU-
MAGAI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青
葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
Miyagi (JP). 豊岡 照彦 (TOYOOKA, Teruhiko) [JP/JP];
〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉
県船橋市前原西二丁目14番1号ダイアパレス津田
沼1001号 Chiba (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,

/続葉有/

(54) Title: METHOD OF ACQUIRING SIGNAL-DEPENDENT NUCLEAR TRANSPORT PROTEIN GENE

(54) 発明の名称: シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法

AA
発明の原理図

AA... DRAWING SHOWING THE PRINCIPLE OF THE INVENTION
BB... (NON-STIMULATED)
CC... (STIMULATED)
DD... (NUCLEI ALONE)
EE... FACS SORTING
FF... ADDITION OF LIGAND OR THE LIKE
GG... REMOVAL OF PLASMA MEMBRANE
HH... cDNA LIBRARY-INFECTED CELLS
II... cDNA RECOVERY BY PCR →
TRANSFER INTO VIRUS VECTOR → REINFECTION
JJ... a AND b: TARGET PROTEIN TRANSPORTING INTO NUCLEUS
KK... c: PROTEIN CONTINUOUSLY REMAINING IN CYTOPLASM
LL... d: PROTEIN OCCURRING IN THE OVERALL CELL AND SHOWING NO CHANGE
IN DISTRIBUTION DUE TO STIMULATION
MM... e: PROTEIN OCCURRING IN NUCLEUS WITHOUT STIMULATION
NN... GFP-ORIGIN FLUORESCENCE

(57) Abstract: It is intended to provide a method of efficiently acquiring a signal-dependent nuclear transport protein alone as follows. Namely, a method of acquiring a signal-dependent nuclear transport protein which comprises: (A) the step of using a gene library having genes fused with genes encoding a label protein and transforming cells therewith to express the genes; - - (snip) - -; and (G) the step of cloning the signal-dependent nuclear transport protein comprising some genes originating in a gene sublibrary contained in sorted nuclei.

/続葉有/



LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

- (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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、以下のシグナル依存性核内移行蛋白質だけを効率的に取得する方法を提供することを目的とする。本発明は、シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法であって、(A) 標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程～(中略)～(G) 分取された核内に含まれる遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群からなるシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子をクローニングする工程を含む、前記取得方法、に係る。

明 細 書

シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法

技術分野

- [0001] 本発明は、シグナル依存性核内移行蛋白質の取得方法に関するものであり、特に、低発現の増殖・分化関連蛋白遺伝子を、効率的に且つ特異的にクローニングすることが出来る方法に関する。

背景技術

- [0002] 従来、新しいシグナル伝達分子を探索する際には、主として次の2つの方法が使われていた。(1)既知のシグナル伝達分子との相互作用を利用する方法。例えば、既知の分子をカラム基質に結合させたアフィニティーカラムに細胞抽出液を通すことにより相互作用分子群を得るなど、*invitro*における結合を利用する方法がある。また、酵母Two-hybridスクリーニング法のように細胞内での結合を利用して相互作用蛋白質群を得る場合もある。
- [0003] (2)リン酸化を利用する方法。例えば、既知のシグナル伝達分子とのキナーゼ-基質関係にある蛋白を得る、あるいは細胞外刺激を与えた際にリン酸化される蛋白を検索するなどの手段がとられた。
- [0004] 上記(1)の例は非特許文献1、上記(2)の例は、非特許文献(2)に開示されている。非特許文献1には、TGF- β 経路のシグナル伝達分子TAK-1を活性化する蛋白TAB-1が発見された経緯が記載されている。また、非特許文献2には、チロシンキナーゼ活性を持つ精製した既知のシグナル分子を用いてcDNA発現ライブラリーをリン酸化させ、基質を探索する方法が記載されている。
- [0005] しかしながら、これら従来の方法には共通して、主に次の2つの欠点がある。一つ目は、相互作用分子群、あるいはキナーゼの基質の中に実際に細胞内で重要な役割を果たす蛋白が存在するか否かが不明なことである。もう一つは、たとえそのような蛋白が存在したとしても極めて多数の候補分子群の中から見つけ出すには、非常に大きな労力と時間を要することである。

非特許文献1: Science, 第272巻, 1179~1182頁, (1996年)

非特許文献2:Methods in Molecular Biology, 第218巻, 133～141頁(2003年)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] このように、シグナル依存的に核内あるいは核外に移行するタンパク質はごく稀な存在であるため、上記のような従来の技術では、任意の細胞から構築したcDNAライブラリーから網羅的にその遺伝子を取得するには、膨大な作業時間を要するという問題があった。従って、本発明は、任意の細胞から取得したDNAライブラリーの中から単純な操作でしかも短時間にシグナル依存性核内移行蛋白質だけを効率的に取得する方法を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、以下の態様にかかるものである。

[1]シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法であって、

(A) 標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、

(B) 細胞外刺激の存在下で該形質転換細胞を培養する工程、

(C) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含む核を分取する工程、

(D) 分取して得られた核に含まれる遺伝子ライブラリー由来の一部の遺伝子群からなる遺伝子サブライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、

(E) 細胞外刺激の非存在下で該形質転換細胞を培養する工程、

(F) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含まない核を分取する工程、及び

(G) 分取された核内に含まれる遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群からなるシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子をクローニングする工程

を含む、前記取得方法。

[2]シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法であって、

(A) 標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、

(B) 細胞外刺激の非存在下で該形質転換細胞を培養する工程、

(C) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含まない核を分取する工程、

(D) 分取して得られた核に含まれる遺伝子ライブラリー由来の一部の遺伝子群からなる遺伝子サブライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、

(E) 細胞外刺激の存在下で該形質転換細胞を培養する工程、

(F) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含む核を分取する工程、及び

(G) 分取された核内に含まれる遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群からなるシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子をクローニングする工程を含む、前記取得方法。

[3] 遺伝子群がcDNAライブラリーから選択される、上記1又は2記載の方法。

[4] 工程(A)及び／又は(D)において、遺伝子ライブラリーがウイルスベクターにより導入される、上記1、2又は3記載の方法。

[5] ウイルスがレトロウイルスである、上記1～4のいずれか一項に記載の方法。

[6] 標識蛋白質が蛍光蛋白質である、上記1～5のいずれか一項に記載の方法。

[7] 蛍光が可視光域である、上記6記載の方法。

[8] 蛍光蛋白質がGFPである上記7に記載の方法。

[9] 蛍光蛋白質がYFPである上記7に記載の方法。

[10] 蛍光蛋白質がRFPである上記7に記載の方法。

[11] 標識蛋白質が抗原性蛋白質である、上記1～5のいずれか一項に記載の方法。

[12] 標識蛋白質が酵素である、上記1～5のいずれか一項に記載の方法。

[13] 工程(C)及び／又は(F)において、核の分取を蛍光の有無に基づき行う、上記6～12のいずれか一項に記載の方法。

[14]FACSを用いて核の分取を行う、上記13記載の方法。

[15]細胞が樹立培養細胞株である、上記1～14のいずれか一項に記載の方法。

[16]形質転換細胞から核のみを取り出す為に細胞膜を破壊する、上記1～15のいずれか一項に記載の方法。

[17]工程(B)及び／又は(E)において、無血清培地で該形質転換細胞を培養する、上記1～16のいずれか一項に記載の方法。

[18]工程(A)及び／又は(D)において、1個の細胞内に実質的に平均1つ以下の融合遺伝子が導入される条件下で該細胞を形質転換する、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

発明の効果

- [0008] 本発明により、任意の細胞から取得した遺伝子ライブラリーの中から単純な操作でしかも短時間にシグナル依存性核内移行蛋白質だけを効率的に取得する方法が提供される。即ち、本発明方法によって、最終的にシグナル依存性核内移行蛋白質をコードする対象遺伝子を効率的にクローニングすることが可能となる。更に、1個の細胞内に実質的に平均1つ以下の融合遺伝子が導入される条件下で該細胞を形質転換することによって、より効率的に該対象遺伝子をクローニングすることが可能となる。又、遺伝子ライブラリーの導入と分取を2回繰り返すことで細胞質から核内移行の挙動を示す蛋白質に限定してクローニングすることが可能となった。更に、標識として蛍光を使用し、蛍光の有無を基準に多数の微粒子を短時間で分取するのに用いられる装置を利用して細胞膜を破壊した核の分取を行う場合には、核局在を基準に、極めて多数のクローンを高速に弁別することができる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1]本発明の実施の原理を説明するための図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] 本発明において、標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリー又は遺伝子サブライブラリー（以下、まとめて「本発明ライブラリー」ともいう）は、当業者に公知の適当な手段を用いて作製することができる。例えば、まず遺伝子群を含む適当な出発DNA（遺伝子）ライブラリーを作製し、更に、制限酵素

及びDNA組換え酵素等を用いて標識蛋白質を該遺伝子群に融合させることによって作製することが出来る。或いは、かかる遺伝子群が予め導入されている市販の遺伝子ライブラリーを出発遺伝子ライブラリーとして利用することも可能である。

- [0011] このような出発遺伝子ライブラリーを構成する遺伝子群は、ある特定の種、器官、組織、若しくは細胞等に由来するDNAの総体又はその一部であっても良い。又、本発明の主な目的は核内移行性蛋白質遺伝子のクローニングであるので、本発明で使用する遺伝子群としては、転写されたRNAをcDNAに変換してベクターに挿入されたcDNAライブラリーから選択されたものが好ましい。
- [0012] 本発明において、標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリーを用いて細胞を形質転換(遺伝子導入)する手段としては、遺伝子ライブラリーの種類・形態、細胞の種類等に応じて当業者に公知の任意の方法を使用することが出来る。その代表例として、ウイルスベクター等から作製された各種の発現ベクター、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、並びに、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション及びパーティクルガン等の物理的導入法を挙げることが出来る。本発明方法における形質転換を、「1個の細胞内に実質的に平均1つ以下の融合遺伝子が導入される条件下で該細胞を形質転換する」という条件下で行うことによって、最終的なクローニングの効率をより高めることが可能となる。
- [0013] ウイルス感染においては、ウイルス干渉現象によって、既にウイルス感染した宿主細胞には、近縁の細胞は重感染することが出来ない。従って、標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群を有するウイルス発現ベクターを含むウイルス粒子で細胞を感染することによって、上記の「1個の細胞内に実質的に平均1つ以下の融合遺伝子が導入される条件下で該細胞を形質転換する」という好適条件を容易に達成することが出来る。従って、本発明においては、ウイルスベクターを使用することが好ましい。
- [0014] ウイルスベクターの元になるウイルスは当業者に公知の任意の種類を使用することが出来る。例えば、RNA腫瘍ウイルス、レンチウイルス、及びスプマウイルス等のレトロウイルス;センダイウイルス等のパラミクソウイルス;並びに、アデノウイルスベクター等を挙げることが出来る。この中で、レトロウイルスベクターを使用した場合には、導入

遺伝子が宿主細胞のゲノム内に組み込まれるために、本発明において細胞の形質膜を除去して核のみにする際に導入した遺伝子が核外に漏出してしまふ恐れがないことから、レトロウイルスベクターが好適である。

- [0015] ウイルスベクターを使用する場合には、出発原料である適当な遺伝子ライブラリーに含まれる遺伝子群を、制限酵素及びDNA組換え酵素等を用いて該ベクター内に挿入し、これを大腸菌等の適当な宿主細胞中で増殖させることによってウイルス発現ベクターを作製する。尚、標識蛋白質をコードする遺伝子も同様に該発現ベクターへ導入することが出来る。或いは、かかる標識蛋白質をコードする遺伝子が予め導入されているウイルスベクターが市販されており、このようなウイルス標識蛋白質融合プラスミドベクターを使用することも可能である。
- [0016] 通常、ウイルス発現ベクターには複製に必要なウイルス遺伝子が入っていないために、適当なヘルパー細胞（パッケージング細胞）を使用して、これにウイルス発現ベクターを導入してプロデューサー細胞を作成し、これが産生するウイルス粒子を用いて細胞を形質転換（感染）する。
- [0017] 同様に、当業者であれば、上記の任意の形質転換（遺伝子導入）手段において、「1個の細胞内に実質的に平均1つ以下の対象遺伝子が導入される条件下で該細胞を形質転換する」という好適条件下を適宜設定することが可能である。
- [0018] 本発明方法で使用する標識蛋白質は、発現した蛋白質の検出に使用する物質として当業者に公知の任意の蛋白質を使用することが出来る。このような物質の代表例として、オワンクラゲ由来のGFP (Green fluorescent protein)、YFP (Yellow fluorescent protein)、RFP (Red fluorescent protein) 及びBFP (Blue fluorescent protein) のような緑、黄色、赤、青等の可視光域の多彩な色彩で自家蛍光を発する蛋白質、又は、経時に色彩が変化する蛋白質を挙げることも出来る。更には、赤外光域や紫外光域の蛍光を発する蛋白質を使用することも可能である。
- [0019] また、標識蛋白質として特定の抗原性を持つ蛋白質を用い、その抗原性を認識する蛍光抗体を用いれば、核に蛍光を持たせることが可能となり、上記の分取の方法を適用することができる。更に、標識蛋白質として特定の酵素蛋白質を用い、その酵素蛋白質の働きにより、蛍光を発する物質が産生されるような基質を用いれば、核に蛍

光を持たせることが可能となり上記の分取の方法を適用することができる。

- [0020] 本発明のライブラリーで形質転換する細胞としては、動物細胞及び植物細胞等の核を有する真核細胞である限り、その種類に特に制約はなく、使用するライブラリー及びベクターの種類等に応じて適宜選択することが出来る。例えば、通常は増殖性の細胞を用いるが、非増殖性の細胞でも感染できるウイルス種由来のウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターを用いる場合には、非増殖性細胞において核内移行蛋白質をスクリーニングすることが可能となる。或いは、アデノウイルスベクターを使用すると、休止期又は分裂増殖の遅い細胞に有効に遺伝子を導入することが可能となる。又、形質転換後に、一定期間培養して導入された遺伝子が発現される必要があるので、樹立された培養細胞株が好ましい。
- [0021] 本発明の工程(A)及び(D)において、遺伝子ライブラリーを用いて形質転換された細胞は適当な条件下で培養することによって遺伝子群を発現する。その後、工程(B)及び(E)において、細胞外刺激の存在下又は非存在下で該形質転換細胞を培養する。細胞外刺激の存在下での工程(B)又は(E)における培養中に、加えられた刺激に応じて形質転換細胞中のシグナル伝達経路が働き、核内移行性蛋白質が核内に移行する。
- [0022] 形質転換した細胞に加える細胞外刺激の種類に特に制限はなく、目的等に応じて、例えば、細胞に遺伝子発現パターンの変化を生じさせるような、温度や光等の物理的刺激、合成あるいは天然化学物質、薬物、pHの変化等の化学的刺激から適宜選択することが出来る。
- [0023] 以上の各工程で使用する培地の種類、培養温度、pH、培養時間等は、使用する細胞の種類、加える刺激の種類及び強度等の条件に応じて当業者が適宜選択することが出来る。工程(B)及び(E)における刺激の強度及び培養時間等の培養条件は、本発明においてシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子がクローニングできるために十分な量の核内移行性蛋白質が核内に移行できるようなものである必要がある。
- [0024] 尚、血清に含まれる増殖因子等による影響を排除して、細胞外から加えた刺激による影響を出来るだけ顕著に検出するために、培養条件工程(B)及び(E)で使用する培地は無血清培地で行うことが好ましい。

- [0025] 本発明方法の工程(C)及び(F)における核の分取は、標識蛋白質が有する物理化学的性質に基づき、当業者に公知の任意の手段を用いて行うことが出来る。従って、例えば、標識蛋白質として自家蛍光を有する蛋白質を使用する場合、及び、上記のように結果的に核に蛍光を持たせることができるような場合には、蛍光の有無に基づき核の分取を行うことが出来る。
- [0026] 更に、核の分取はフローサイトメトリーを用いて行うことによって、多数の核を短時間で分取することが可能となる。より具体的には、蛍光活性化セルソーター(FACS)を用いて蛍光の有無に基づく核の分取を行うことが出来る。
- [0027] 尚、遺伝子群が由来する細胞と、本発明のライブラリーによる形質転換の対象となる細胞とは同一の細胞種若しくは同じ組織起源の細胞のものでも良いし、又は、これらは互いに異なる細胞種若しくは異なる動物種・組織起源のものでも良い。
- [0028] 初回に遺伝子ライブラリーで形質転換させて核を分取する細胞と、2回目に遺伝子サブライブラリーで形質転換させて核を分取する細胞が同一種類の細胞とは、互いに、同一種類であることが好ましいが、別種類であっても良い。更に、通常、これら細胞は互いに組織由来の細胞であるが、異なる組織由来の細胞である場合には、細胞一般に共通する核内移行蛋白をスクリーニングすることが可能となる。
- [0029] 同様に、遺伝子ライブラリーによる初回の形質転換と遺伝子サブライブラリーによる2回目の形質転換とは同じ又は別の手段で行うことも可能があり、例えば、異なるウイルス種由来のウイルスベクターや、異なる指標をもつウイルスベクターを使用することもできる。更に、異なる標識蛋白質を使用することも可能である。
- [0030] 本発明において、分取した核に含まれる遺伝子ライブラリー又は遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群は、当業者に公知の任意の方法で取得することが出来る。例えば、分取した核から抽出したゲノムDNAを鋳型に使用し、形質転換に使用したベクターに挿入されていた遺伝子群を特異的に増幅することができるプライマーを用いてPCRを行なうことによって、遺伝子ライブラリー又は遺伝子サブライブラリー由来の遺伝子を容易に取得することが出来る。或いは、上記ライブラリー由来の遺伝子をPCRで増幅できる程度に、分取した核を処理し、それを鋳型にしてPCRを行うことも可能である。又、分取した核のままPCRにて上記ライブラリー由来の遺伝子を取得

することが可能なのであれば、分取した核のままPCRを行うことも可能である。尚、これらの分取した核に含まれる遺伝子ライブラリー又は遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群を構成する遺伝子の種類数は、出発遺伝子ライブラリーを構成する遺伝子群の種類・由来、形質転換される細胞の種類、及び刺激の種類等の各種条件によって変動し、数種類、ときには一種類の遺伝子のみからなる場合もある。

[0031] 形質転換細胞からの核の分画は、機械的破壊法及び界面活性剤による化学的破壊法等の当業者に公知の任意の方法を適当に選択・組み合わせることによって、細胞膜(場合によっては、更に細胞壁)を選択的に破壊し、核を温存して(そのままの状態)取り出すことによって行うことが出来る。

[0032] 最後に、こうして取得されたシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子は、当業者に公知の適当な方法でクローニングすることが出来る。最後に、この核からゲノムDNAを抽出した後、PCRにて核蛋白cDNAサブライブラリー由来のcDNA群を回収し、レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターに挿入してクローニングし、必要に応じて、1クローンずつ、刺激依存性に核内移行するかどうかチェックし、核内移行するものについてcDNAの配列を決定することが出来る。

[0033] 以下、本発明の一態様を添付の図1を参照しながら更に詳しく説明する。

ここで、図1の[1]は請求項1における工程(A)、[2]は請求項1における工程(B)、[3]は請求項1における工程(C)、[4]は請求項1における工程(D)及び(E)、並びに、[5]は請求項1における工程(F)に夫々対応するものである。図1は、以下の実施例に記載されるように、ポリクローニングサイトに挿入したcDNAがコードする蛋白のアミノ末端に緑色蛍光蛋白質(GFP)が融合した融合蛋白質が発現するようなレトロウイルス発現プラスミドベクターを使用した場合を示したものである。これを以下、「レトロウイルスGFP融合プラスミドベクター」(本発明のウイルスベクターに相当する)と称する。

[0034] 該ベクターに対象の細胞から調製したcDNAライブラリーを挿入することにより、「レトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリー」を作成する。それをパッケージング細胞株にトランジェント・トランスフェクションをすることにより、レトロウイルスGFP融合ウイルスcDNAライブラリーを生成させる。これを調査対象の細胞と同一種類の培養

細胞に感染させ、GFP融合蛋白cDNAライブラリーを発現させた後(図1の[1])、細胞外刺激を与え、形質転換細胞のシグナル伝達系を働かせる(図1の[2])。

[0035] その結果、核に蛍光を持つ細胞に内在するcDNAライブラリー由来のcDNAがコードする蛋白は次の3通り存在する。

- (1) 刺激に応じて核内移行する蛋白(図1の細胞a、b)、
- (2) 刺激の存在に依らず細胞全体に局在する蛋白(図1の細胞d)、
- (3) 刺激の存在に依らず核に局在している蛋白(図1の細胞e)。

[0036] 次に、界面活性剤などを用いて核膜を保存しつつ細胞膜のみを破壊する処理を施すと、細胞質は流出し核のみが残るが、この時、核に蛍光を持つもののみを分取装置付きのFACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)を用いて回収する(図1の[3])。

[0037] 集めた核の集団からゲノムDNAを抽出し、PCRにてcDNAライブラリー由来のDNAを回収する。以下これを「核蛋白cDNAサブライブラリー」と称することにする。核蛋白cDNAサブライブラリーをレトロウイルスGFP融合プラスミドベクターに挿入し、既述のごとくパッケージング細胞株にトランスフェクションすることにより、レトロウイルスGFP融合核蛋白ウイルスcDNAサブライブラリーを生成させ、これをと同一種類の培養細胞に感染させることにより、GFPが融合した核蛋白cDNAサブライブラリーを導入する。

[0038] 今度は細胞外刺激なしの状態で培養し(図1の[4])、既述のごとく細胞膜除去を行った後、FACSにて蛍光のない核のみを分取してくる(図1の[5])。すると、核蛋白cDNAサブライブラリーがコードする既述の3通りの蛋白のうち、(2) 刺激の存在に依らず細胞全体に局在する蛋白(図1の細胞d)及び(3) 刺激の存在に依らず核に局在している蛋白(図1の細胞e)は、核に蛍光を持つため除去される。それ故、2度目のFACSで分取された核の集団に内在する核蛋白cDNAサブライブラリー由来のcDNAは、「シグナル依存性に核内移行する蛋白群」のみをコードしていることになる。

[0039] 最後に、この核からゲノムDNAを抽出した後、PCRにて核蛋白cDNAサブライブラリー由来のcDNA群を回収し、レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターに挿入してクローニングし、1クローンずつ、刺激依存性に核内移行するかどうかチェックする。核

内移行するものについて、cDNAの配列を決定する。

- [0040] 以下に、実施例を参照しつつ本発明を更に詳述する。尚、特に記載のない限り、当該技術分野において公知の標準的な手法を用いて実施した。

実施例 1

- [0041] 実施例：血管平滑筋細胞において、PDGF（血小板由来増殖因子）の刺激に反応して核

内移行する蛋白群の単離

(1) レトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリー（ウイルスベクター）の構築
レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターとしては、市販のpLEGFP-C1（クロンテック社）を用いた。また血管平滑筋細胞のcDNAライブラリーは、MATCHMAKERヒト大動脈ライブラリー（BDバイオサイエンス・クロンテック社 #638813（酵母Two-hybridスクリーニング用））を鋳型にして、インサート部分をPCR増幅することにより得た。これは、一般的なcDNAライブラリー構築法とはやや異なるが、本発明の有効性の実証には、このような簡易の方法で作製したライブラリーで充分用を足せる。これを制限酵素切断後に、あらかじめ同じ制限酵素で切断しておいたpLEGFP-C1ベクターに組み込むことによりレトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリーを構築した。以下に、具体的な実験手順を示す。

- [0042] (1-a)レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターの制限酵素による切断：まず、pLEGFP-C1ベクター1 μ gをSalIとBamHIにて定法により切断し、セルフライゲーションの頻度を極力減らすため、牛小腸由来アルカリフォスファターゼ（Calf Intestine Alkaline Phosphatase（タカラ社））にて定法により脱リン酸化処理を行った。

- [0043] (1-b)インサートとなるcDNAライブラリーの作製：市販のMATCHMAKERヒト大動脈ライブラリー（クロンテック）のインサート挿入部位やや外側のベクター骨格部分の配列を基に作成した、次の配列のプライマー対を用いた。

（cDNAに対し順方向のプライマー：pACT2-fwd）：5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAG-3'（配列番号1）、（BamHI部位付きの逆方向プライマー：Bam-pACT2-rvs）：5'-CGGGATCCGTGAACCTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'（配列番号2）。尚、cDNA上流

側のプライマーpACT-fwdには制限酵素切断部位がついていない。これは、このMATCHMAKERのcDNAライブラリーは構築時にSalI切断部位を持つアダプターが使用されていることを、あらかじめDNA配列決定により明らかにしていたからで、cDNAライブラリーのPCR産物の上流側の切断は、このアダプター由来のSalI部位を利用して行おうと意図していたからである。

[0044] 尚、PCRは以下の反応条件で行った。

PCRの温度サイクル： 95°C 1 分→(95°C30秒、68°C6分)×30サイクル→68°C6分→4°C保冷

また、反応溶液は次の通りである。

MATCHMAKERヒト大動脈ライブラリー(50ng/μl)	1 μl
オートクレーブした超純水	37 μl
10xAdvantage2 バッファー **	5 μl
2. 5mM dNTP	4 μl
10 μM pACT2-fwd	1 μl
10 μM Bam-pACT2-rvs	1 μl
<u>50xAdvantage2 ポリメラーゼ *</u>	<u>1 μl</u>
計50 μl	

* Advantage2ポリメラーゼはクロンテック社製

** このバッファーは、同ポリメラーゼに付属のものをを用いた。

[0045] PCR産物は、定法でSalIとBamHIで切断した後、あらかじめ(1-a)で切断しておいたレトロウイルスGFP融合プラスミドベクターにライゲーションした。なお、本実施例の最後のステップにおいて、PDGFにて核内移行することが知られている蛋白質ERK1のcDNAが濃縮されるか否か調べるのであるが、cDNAライブラリーにおけるERK1のcDNAの出現頻度を減らすため、故意に、ERK1のcDNAがある程度、制限酵素にて切られてしまうような次の操作を行った。ライゲーションした産物全部を制限酵素ApaIにて25°Cで、濃度0. 1U/μl、20 μlのスケールで15分間ダイジェストした。

[0046] このステップは、セルフライゲーションしたpLEGFP-C1を減らす効果もある。その

後、エレクトロコンピテント大腸菌ElectroMAX DH10B T1 Phage-Resistant Competent Cells (インビトロジェン社) にエレクトロポレーションによるトランスフォーメーションを行った。翌日出てきたコロニーをかき集め、タイター測定を行った後、約 5×10^7 cfu相当のプラスミドの増幅をLBプレート上で行った。ここから、CONCERT High Purity Plasmid Purification System (Marligen Biosciences社製) 用いてプラスミド精製を行い、レトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリーを得た。

[0047] (2) レトロウイルスGFP融合ウイルスcDNAライブラリーの産生

前項(1)で得られたレトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリーをパッケージング細胞株AmphoPack293 (クロンテック) にトランスフェクションし、産生されたレトロウイルスGFP融合ウイルスcDNAライブラリーを含む上清を回収した。具体的には、AmphoPack293細胞を100mmシャーレ3枚に、1シャーレあたり約 1.5×10^6 個まき、37°C、湿潤条件で培養した(10%FCS入りのDMEM培地) 24時間後、Lipofectamine2000 (インビトロジェン) を用いて、1シャーレあたり20 μ gのレトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリーをトランジェントトランスフェクションした。48時間後、レトロウイルスGFP融合ウイルスcDNAライブラリーを含む上清を回収し、-80°Cで保存した。

[0048] (3) ウサギ血管平滑筋細胞株SM3への感染とGFP融合蛋白の発現

SM3細胞株を100mmシャーレ20枚に約20%の密集度でまき、10%FCS入りのDMEM培地を1シャーレに10ml中で、37度、湿潤条件で培養した。12時間後、(2)で得られたレトロウイルスGFP融合ウイルスcDNAライブラリーを含む液を1シャーレあたり1mlずつ添加し、ポリブレン (Hexadimethrine Bromide) 水溶液を最終濃度8 μ g/mlになるように添加し、再びインキュベータに戻して48時間培養を続けた。

[0049] (4) PDGFによる細胞の刺激

レトロウイルスGFP融合ウイルスcDNAライブラリーの感染したSM3細胞株のシャーレ20枚を、1シャーレあたり10mlのPBSで3回洗浄後、無血清のDMEMを1シャーレあたり10mlずつ添加し、2時間、37°Cでインキュベートした。そこへ、PDGF-BB (Sigma) を最終濃度10ng/mlで添加し、15分間、37°Cでインキュベートした。

[0050] (5) 形質膜の除去と核の固定

Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) の第12章に記載の方法をやや修飾して用いた。細胞をPBSで2回洗浄した後、0.05% Trypsin、0.5mMEDTAによりシャーレから剥離した。上清をデカンテーションで捨て、細胞の沈殿の容積を量った(以下、これを1体積とよぶ)。次に、5体積の「低浸透圧バッファー」(以下に示す)で懸濁し、微量遠心機で15,000回転、20秒間遠心した。そして、上清をすて、最終体積が3体積となるように低浸透圧バッファーにサスペンドした。この状態で氷上にて10分間置いた。しかる後、ダウンスのホモゲナイザーで10回上下させて細胞を挽き、細胞をチューブに集めた。微量遠心機で15,000回転、20秒間遠心してペレット(これが核)を集め、上清は捨てた。次に、核蛋白の漏出を防ぐため、核を弱固定した。具体的にはまず、核の沈殿を4mlのPBSに懸濁し、激しくボルテックスしながら、18.5%のホルマリン溶液を一滴一滴ゆっくりと1ml加えた。低浸透圧バッファーの組成は、10mM HEPES、pH7.9(4°C)、1.5mM $MgCl_2$, 10mMKCl、0.2%NP-40、0.2mMPMSF、0.5mMDTTである。

[0051] (6)FACSによる蛍光を持つ核の分取

ホルマリン固定された核をFACS Flow(ベクトンディッキンソン)で3回洗浄後、同液20mLに懸濁した(シャーレ20枚分)。これをベクトンディッキンソン社のFACS Caliburを用いて、蛍光のある核のみを集めた。およそ 1.4×10^7 個の核のうち、5716個の蛍光核を得た。

[0052] (7)ゲノムDNAにかかった固定の除去と、核からのゲノムDNA抽出

集めた核を沈殿させ、200mMNaCl 200 μ lに懸濁し、65°Cで一晩インキュベートした。ここに1M Tris(pH6.8)を10 μ l、0.5M EDTAを5 μ l、2 μ lの5mg/ml Proteinase Kを加え、45°Cで2時間置くことにより、蛋白を分解、除去した。しかる後、ゲノムDNAをフェノールクロロフォルム抽出し、エタノール沈殿させる。

[0053] (8)ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる、ライブラリー由来cDNAの回収と、レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターへの組み込み

このようにして得られたゲノムDNAの中のcDNAライブラリー由来のcDNAを以下のごとく、PCRにより回収した。プライマーは、次の組み合わせのものを用いた。これらは、レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターのcDNA挿入部位の外側の配列を基

にしている。

(cDNAに対し、順方向のプライマー、pLEGFP-C1-fwd): 5'-CGCGATCA
CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3' (配列番号3)

(cDNAに対し、逆方向のプライマー、pLEGFP-C1-rvs): 5'-GCC
AAACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC-3' (配列番号4)

[0054] PCRは以下の反応条件で行った。

PCRの温度サイクル: 95°C 1分→(95°C 30秒、68°C 6分)×40サイクル→68°C 6分
→4°C 保冷

また、反応溶液は次の通りである。

核から抽出したゲノムDNA (2 μg / μl)	1 μl
オートクレーブした超純水	37 μl
10xAdvantage2 バッファー **	5 μl
2.5mM dNTP	4 μl
10 μM pLEGFP-C1-fwd	1 μl
10 μM pLEGFP-C1-rvs	1 μl
<u>50xAdvantage2 ポリメラーゼ *</u>	<u>1 μl</u>
計50 μl	

これをSalIとBamHIで切断し、pLEGFP-C1も同じ酵素で切ってそこに挿入し、定
法で大腸菌にトランスフォーメーションした後、LBプレート上でプラスミドを増幅した。
これを核蛋白プラスミドcDNAサブライブラリーと呼ぶことにする。

[0055] (9) 核蛋白プラスミドcDNAサブライブラリーからの核蛋白ウイルスcDNAサブライ
ブラリー産生

前項(8)で得られた核蛋白プラスミドcDNAサブライブラリーのプラスミドをAmphoP
ack293(クロンテック)にトランスフェクションし、核蛋白ウイルスcDNAサブライブラ
リーを含む上清を回収した。具体的には、AmphoPack293細胞を100mmシャーレ3
枚に、1シャーレあたり約 1.5×10^6 個まき、37°C、湿潤条件で培養した(10%FCS入
りのDMEM培地)24時間後、Lipofectamine2000(インビトロジェン)を用いて、1

シャーレあたり20 μ gの核蛋白プラスミドcDNAサブライブラリーをトランジェントトランスフェクションした。48時間後、核蛋白ウイルスcDNAサブライブラリーを含む上清を回収し、 -80°C で保存した。

- [0056] (10)ウサギ血管平滑筋細胞株への核蛋白ウイルスcDNAサブライブラリーの感染とGFP融合蛋白の発現

SM3細胞株を100mmシャーレ20枚に約20%の密集度でまき、10%FCS入りのDMEM培地を1シャーレに10ml中で、 37°C 、湿潤条件で培養した。12時間後、前項(9)でできた核蛋白ウイルスcDNAサブライブラリーの液を1シャーレあたり1mlずつ添加し、ポリブレン水溶液(既述)を最終濃度8 μ g/mlになるように添加し、再びインキュベータに戻して48時間培養を続けた。

- [0057] (11)細胞外刺激の排除

核蛋白ウイルスcDNAサブライブラリーの感染したSM3細胞株のシャーレ20枚を、1シャーレあたり10mlのPBSで3回洗浄後、無血清のDMEMを1シャーレあたり10mlずつ添加し、2時間、 37°C でインキュベートした。

- [0058] (12)形質膜の除去と核の固定

(5)と同様に行った。

- [0059] (13)FACSによる蛍光を持つ核の分取

ホルマリン固定された核をFACS Flow(ベクトンディッキンソン)で3回洗浄後、同液20mLに懸濁した(シャーレ20枚分)。これをベクトンディッキンソン社のFACS Caliburを用いて、蛍光強度のほとんどない核のみを集めた。1回目のソーティングで蛍光のない核を、およそ 1.0×10^6 個の核のうち、1255個の蛍光のない核を得た。

- [0060] (14)DNAにかかった固定の除去と、核からのゲノムDNA抽出

(7)と同様に行った。

- [0061] (15)ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる、cDNAライブラリー由来cDNAの回収と、レトロウイルスGFP融合プラスミドベクターへの組み込み

このようにして得られたゲノムDNAの中の核蛋白cDNAサブライブラリー由来cDNAを(8)と同様にPCRにより回収した。pLEGFP-C1に再クローニングしたのは、後程、1クローンずつトランジェントトランスフェクションで核移行を確認するために、PCR

産物をSalIとBamHIで切断し、pLEGFP-C1も同じ酵素で切ってそこに挿入し、エレクトロコンピテント大腸菌ElectroMAX DH10B T1 Phage-Resistant Competent Cells (インビトロジェン社)にエレクトロポレーションによるトランスフォーメーションを行った。出てきたコロニーをかき集め、「PDGFシグナル依存性核内移行蛋白cDNA群のプール」を作った。

[0062] (16)PDGF依存性に核内移行することが知られている蛋白ERK1のcDNAの濃縮率を見ることによる、本発明の有効性の確認

MAPキナーゼの一種、ERK1は血管平滑筋細胞においてシグナル依存性に細胞質から核内移行することが知られている。発明者は、ヒトERK1の配列が上記のプールのどれだけを占めるかをシーケンシングにより確かめた。シーケンシングプライマーは、pLEGFP-C1-fwdを用い、定法により行った。

[0063] その結果、上記(15)で得られたコロニーからランダムに選択した100クローンのcDNA中、16クローンがERK1であった。もとのレトロウイルスGFP融合プラスミドcDNAライブラリー(ApaIで切断してトランスフォーメーションし、出てきたもの)のERK1頻度を大腸菌のコロニーハイブリダイゼーション(サザンハイブリダイゼーション)により確認すると、およそ 1×10^6 コロニーのうち38個であった。単純計算すると約4,000倍の濃縮がかかっていることになるが、より細胞内発現レベルが低くまれな頻度の核移行蛋白なら、これよりはるかに濃縮率が高くなる(おそらく数百倍以上)と考えられる。従って、ごく稀なクローンを本発明の手法によってクローニングすることが可能となる。

実施例 2

[0064] 実施例: 血管平滑筋細胞において、PDGF(血小板由来増殖因子)の刺激に反応して核内移行する蛋白群の単離

以下の点を除いて実施例1と同様に実施した。

(1)レトロウイルスYFP融合プラスミドベクター

レトロウイルスYFP融合プラスミドベクターは、市販のものをもとにして、以下のように組換えDNA操作により構築した。

[0065] 骨格には、レトロウイルス発現プラスミドベクターの一種pLIB(クロンテック社)を用い

た。また、EYFP (蛍光強度の強いYFPの変異体) 発現ベクター、pEYFP-C1 (クロンテック) のCMVプロモーター部分からEYFPcDNA, ポリクローニングサイトを経てSV40ポリアデニン付加シグナルまでをPCR増幅し、pLIBのポリクローニングサイトにはめ込んだ。具体的には次のような実験操作を行った。

[0066] まず、骨格側の処理としてはpLIBを定法によりSfiIで切断し、ウシ小腸アルカリフォスファターゼを用いて断端の脱リン酸化処理を行った。またpEYFP-C1の一部のPCR増幅は次のプライマー組を用いて行った。どちらも5'端にはSfiI部位及び切れをよくするためのいくつかの塩基がついていて、PCR産物を、pLIBのマルチクローニングサイトに存在する2つの配列の異なるSfiI部位に、一方向性に挿入することが可能になっている。SfiIはGGCCNNNNNGGCCという塩基配列を認識してDNAを切断する。Nはどの塩基でもかまわない。それゆえ、NNNNNの部分が異なる2つのSfiI部位の断端は結合することができない。そこで、これを利用し、公知の方法を用いて方向性を一定にしている。

[0067] (CMVプロモーター側:pEYFPC1-fwd)

5'-TCGTTAGGCCATTAAGGCCTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGAT
TCTGTGG-3' (配列番号5)

(SV40ポリアデニン付加シグナル側:pEYFPC1-rvs)

5'-TGTTTGGCCGAGGCGGCCGACTGGAACAACACTCAACCCTAT
CTCGGTC-3' (配列番号6)

[0068] また、PCRの条件は、次の通りである。

95°C 1分→(95°C 30秒、68°C 2分) x 20サイクル→68°C 2分→4°C 保冷

なお、反応液は次のとおりである。

pEYFP-C1 (クロンテック) (10ng/μl)	1 μl
オートクレーブした超純水	37 μl
10xAdvantage2 バッファー **	5 μl
2.5mM dNTP	4 μl
10 μM pEYFPC1-fwd	1 μl
10 μM pEYFPC1-rvs	1 μl

50xAdvantage2 ポリメラーゼ * 1 μ l

計50 μ l

- [0069] 産物は、定法によりSfiIで切断し、あらかじめ同酵素で切っておいたpLIBと定法によりライゲーションした。大腸菌へトランスフォーメーションして、構築が計画通りにできたことを定法で確認後、作業を完了した。なお、出来上がったベクターは、HEK293細胞に定法でトランスフェクションして励起光をあてると黄色に蛍光を発することも確認し、また、定法でDNAシーケンシングを行い、つなぎ目部分の配列が計画通り正しいことも確かめた。この完成したプラスミドベクターをpLEYFP-C1と称することにした。
- [0070] (2)FACSによる核の分取で得られた蛍光核の割合
ホルマリン固定された核をFACS Flow(ベクトンディッキンソン)で3回洗浄後、同液20mLに懸濁した(シャーレ20枚分)。これをベクトンディッキンソン社のFACS Caliburを用いて、蛍光のある核のみを集めた。およそ 1.1×10^7 個の核のうち、7714個の蛍光核を得た。
- [0071] (3)FACSによる核の分取で得られた蛍光のない核の割合
ホルマリン固定された核をFACS Flow(ベクトンディッキンソン)で3回洗浄後、同液20mLに懸濁した(シャーレ20枚分)。これをベクトンディッキンソン社のFACS Caliburを用いて、蛍光強度のほとんどない核のみを集めた(ゲートは1回目のソーティングで蛍光のない核を基準にした。およそ 1.0×10^6 個の核のうち、1821個の蛍光のない核を得た。
- [0072] (4)分取された核からのゲノムDNA抽出に使用したPCRプライマー
プライマーは、次の組み合わせのものを用いた。これらは、pEYFP-C1のマルチクローニングサイト外側の配列を基にしている。
(cDNAに対し、順方向のプライマー、pEYFP-C1-fwd): 5'-GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC-3' (配列番号7)
(cDNAに対し、逆方向のプライマー、pEYFP-C1-rvs): 5'-GTTTCAGGTT CAGGGGGAGGTGTGGGAGG-3' (配列番号8)
- [0073] (5)PDGF依存性に核内移行することが知られている蛋白ERK1のcDNAの濃縮率

を見ることによる、本発明の有効性の確認

シーケンシングの結果、100クローンのcDNA中、21クローンがERK1であった。もとのライブラリーのERK1頻度を大腸菌のコロニーハイブリダイゼーション(サザンハイブリダイゼーション)により確認すると、およそ 1×10^6 コロニーのうち41個であった。単純計算すると約5000倍の濃縮がかかっていることになる。

- [0074] 標識蛋白質として、YFPのほうがGFPの場合よりも効率的であった理由は、YFPの励起光の波長がYFPのそれより短く、FACSによるソーティングの途中でDNAを損傷しやすいからであろうと予想される。

実施例 3

- [0075] 実施例: 血管平滑筋細胞において、PDGF(血小板由来増殖因子)の刺激に反応して核内移行する蛋白群の単離

以下の点を除いて実施例1と同様に実施した。

(1)レトロウイルスRFP融合プラスミドベクター

レトロウイルスRFP融合プラスミドベクターは、市販のものをもとにして、以下のように組換えDNA操作により構築した。

- [0076] 骨格には、レトロウイルス発現プラスミドベクターの一種pLIB(クロンテック社)を用いた。また、RFP発現ベクター、pDsRed2-C1(クロンテック)のCMVプロモーター部分からERFPcDNA, ポリクローニングサイトを経てSV40ポリアデニン付加シグナルまでをPCR増幅し、pLIBのポリクローニングサイトにはめ込んだ。具体的には次のような実験操作を行った。
- [0077] まず、骨格側の処理としてはpLIBを定法によりSfiIで切断し、ウシ小腸アルカリフォスファターゼを用いて断端の脱リン酸化処理を行った。またpDsRed2-C1の一部のPCR増幅は次のプライマー組を用いて行った。どちらも5'端にはSfiI部位(と、切れをよくするためのいくつかの塩基)がついていて、PCR産物を、pLIBのマルチクローニングサイトに存在する2つの配列の異なるSfiI部位に、一方向性に挿入することが可能になっている。
- [0078] (CMVプロモーター側:pDsRed2C1-fwd) 5'-TCGTTAGGCCATTAAGGCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG-3' (配列番号9) (S

V40ポリアデニン付加シグナル側:pDsRed2C1-rvs) 5'-TGTTTGGCCGAG
GCGGCCGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGG-3' (配
列番号10)

[0079] また、PCRの条件は、次の通りである。

95°C 1分→(95°C 30秒、68°C 2分)×20サイクル→68°C 2分→4°C保冷

なお、反応液は次のとおりである。

pDsRed2-C1 (10ng/μl)	1 μl
オートクレーブした超純水	37 μl
10xAdvantage2 バッファー **	5 μl
2.5mM dNTP	4 μl
10 μM pDsRed2C1-fwd	1 μl
10 μM pDsRed2C1-rvs	1 μl
<u>50xAdvantage2 ポリメラーゼ *</u>	<u>1 μl</u>
計	50 μl

[0080] 産物は、定法によりSfiIで切断し、あらかじめ同酵素で切っておいたpLIBと定法によりライゲーションした。大腸菌へトランスフォーメーションして、構築が計画通りにできたことを定法で確認後、作業を完了した。なお、出来上がったベクターは、HEK293細胞に定法でトランスフェクションして励起光をあてると赤色に蛍光を発することも確認し、また、定法でDNAシーケンシングを行い、つなぎ目部分の配列が計画通り正しいことも確かめた。この完成したプラスミドベクターをpLRFP-C1と称することにする。

[0081] (2)FACSによる核の分取で得られた蛍光核の割合

ホルマリン固定された核をFACS Flow(ベクトンディッキンソン)で3回洗浄後、同液20mLに懸濁した(シャーレ20枚分)。これをベクトンディッキンソン社のFACS Caliburを用いて、蛍光のある核のみを集めた。およそ 1.1×10^7 個の核のうち、8154個の蛍光核を得た。

[0082] (3)FACSによる核の分取で得られた蛍光のない核の割合

ホルマリン固定された核をFACS Flow(ベクトンディッキンソン)で3回洗浄後、同液20mLに懸濁した(シャーレ20枚分)。これをベクトンディッキンソン社のFACS Caliburを用いて、蛍光強度のほとんどない核のみを集めた(ゲートは1回目のソーティングで蛍光のない核を基準にした。およそ 1.0×10^6 個の核のうち、1821個の蛍光のない核を得た。

- [0083] (4)分取された核からのゲノムDNA抽出に使用したPCRプライマー
プライマーは、次の組み合わせのものを用いた。これらは、pERFP-C1のマルチクローニングサイト外側の配列を基にしている。
- [0084] (cDNAに対し、順方向のプライマー、pERFP-C1-fwd): 5'-GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC-3' (配列番号11)(cDNAに対し、逆方向のプライマー、pERFP-C1-rvs): 5'-GTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG-3' (配列番号12) (5)PDGF依存性に核内移行することが知られている蛋白ERK1のcDNAの濃縮率を見ることによる、本発明の有効性の確認
シーケンシングの結果、100クローンのcDNA中、28クローンがERK1であった。もとのライブラリーのERK1頻度を大腸菌のコロニーハイブリダイゼーション(サザンハイブリダイゼーション)により確認すると、およそ 1×10^6 コロニーのうち33個であった。単純計算すると約8400倍の濃縮がかかっていることになる。RFPのほうがGFPやYFPの場合よりも効率的であった理由は、GFPやYFPの励起光の波長がRFPのそれより短く、FACSによるソーティングの途中でDNAを損傷しやすいからであろうと予想される。

実施例 4

- [0085] ヒトT細胞性白血病株(Jurkat)のIL-2シグナル伝達経路上におけるシグナル依存性核内移行蛋白質を、実施例1と同様にスクリーニングした。その結果、100クローンのcDNA中、18クローンにIL-2依存性核内移行蛋白質として知られているNF-ATが含まれていた。更に、この18クローンを含む92クローンに含まれる蛋白質が実際に核内移行することが確認された。

実施例 5

- [0086] ラット骨芽細胞株(ROS17/2.8)のBMP-2経路を本発明の方法で検討した結果、1

00クローン中、核内移行蛋白質として知られているSmad1が11クローンに、同じく核内移行蛋白質として知られているSmad4が7クローン含まれていた。更に、これらのクローンを含む88クローンに含まれる蛋白質が実際に核内移行することが確認された。

産業上の利用可能性

- [0087] 本発明方法は、物理的刺激、化学的刺激などに反応して核内移行する蛋白群の探索にも使用可能である。例えばある種の細胞では、温度や光、pHの変化等の外界の刺激を感知して遺伝子発現パターンの変化が見られるが、そのような場合のシグナル伝達経路探索にも、適用可能である。また、薬物をはじめとする様々な合成あるいは天然化学物質の、細胞に対する影響を測定する検査手法としても幅広く用いることができる。
- [0088] 更に、本発明方法で得られた核内移行性蛋白質遺伝子若しくはその一部をプローブとするDNAチップ、又は、該核内移行性蛋白質をアレイ化した蛋白質チップを作製することが出来る。更に、このようなチップを使用することによって、核内移行性蛋白質遺伝子の転写量の変化、核内移行性蛋白質のDNA結合能及びその特性等を網羅的に解析することが可能となる。

請求の範囲

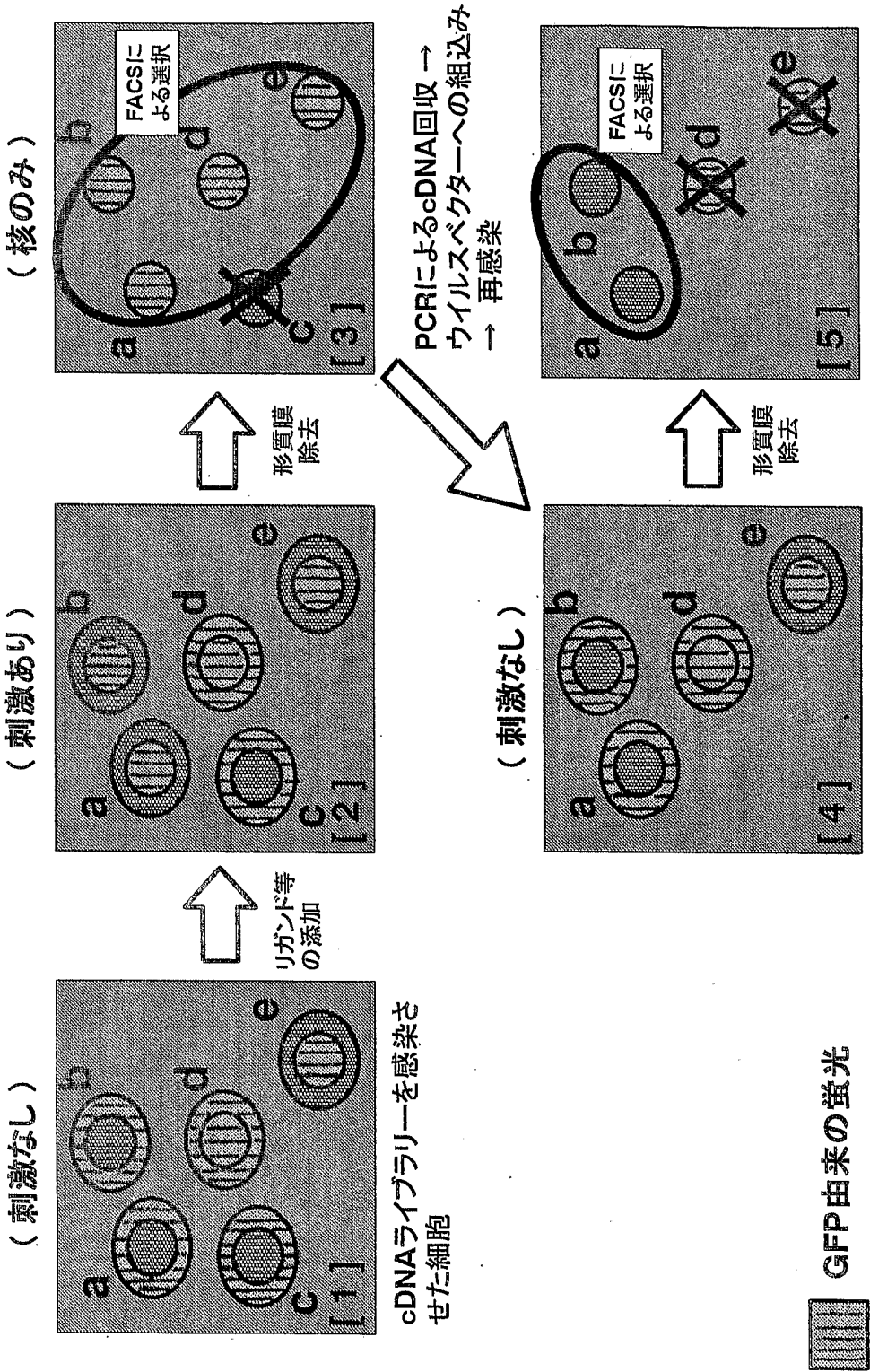
- [1] シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法であって、
- (A) 標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、
 - (B) 細胞外刺激の存在下で該形質転換細胞を培養する工程、
 - (C) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含む核を分取する工程、
 - (D) 分取して得られた核に含まれる遺伝子ライブラリー由来の一部の遺伝子群からなる遺伝子サブライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、
 - (E) 細胞外刺激の非存在下で該形質転換細胞を培養する工程、
 - (F) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含まない核を分取する工程、及び
 - (G) 分取された核内に含まれる遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群からなるシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子をクローニングする工程を含む、前記取得方法。
- [2] シグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子の取得方法であって、
- (A) 標識蛋白質をコードする遺伝子と融合した遺伝子群からなる遺伝子ライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、
 - (B) 細胞外刺激の非存在下で該形質転換細胞を培養する工程、
 - (C) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含まない核を分取する工程、
 - (D) 分取して得られた核に含まれる遺伝子ライブラリー由来の一部の遺伝子群からなる遺伝子サブライブラリーを用いて該細胞を形質転換し、遺伝子群を発現させる工程、
 - (E) 細胞外刺激の存在下で該形質転換細胞を培養する工程、
 - (F) 該形質転換細胞から核を分画した後、遺伝子群から発現された蛋白質と標識蛋白質との融合蛋白質を含む核を分取する工程、及び

(G)分取された核内に含まれる遺伝子サブライブラリー由来の一部の遺伝子群からなるシグナル依存性核内移行蛋白質遺伝子をクローニングする工程を含む、前記取得方法。

- [3] 遺伝子群がcDNAライブラリーから選択される、請求項1又は2記載の方法。
- [4] 工程(A)及び／又は(D)において、遺伝子ライブラリーがウイルスベクターにより導入される、請求項1、2又は3記載の方法。
- [5] ウイルスがレトロウイルスである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [6] 標識蛋白質が蛍光蛋白質である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [7] 蛍光が可視光域である、請求項6記載の方法。
- [8] 蛍光蛋白質がGFPである請求項7に記載の方法。
- [9] 蛍光蛋白質がYFPである請求項7に記載の方法。
- [10] 蛍光蛋白質がRFPである請求項7に記載の方法。
- [11] 標識蛋白質が抗原性蛋白質である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [12] 標識蛋白質が酵素である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [13] 工程(C)及び／又は(F)において、核の分取を蛍光の有無に基づき行う、請求項6～12のいずれか一項に記載の方法。
- [14] FACSを用いて核の分取を行う、請求項13記載の方法。
- [15] 細胞が樹立培養細胞株である、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。
- [16] 形質転換細胞から核のみを取り出す為に細胞膜を破壊する、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。
- [17] 工程(B)及び／又は(E)において、無血清培地で該形質転換細胞を培養する、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。
- [18] 工程(A)及び／又は(D)において、1個の細胞内に実質的に平均1つ以下の融合遺伝子が導入される条件下で該細胞を形質転換する、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

[図 1]

発明の原理図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01), C12Q1/02(2006.01), C12Q1/68(2006.01)

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, C12Q1/02, C12Q1/68

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

JSTPlus(JOIS), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/036823 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 10 May, 2002 (10.05.02), Full text & EP 1333099 A1 & US 2003/0180801 A1	1-18
A	JP 2003-310259 A (Japan Science and Technology Corp.), 05 November, 2003 (05.11.03), (Family: none)	1-18
A	ROLLS M.M. et al., A Visual Screen of a GFP-fusion Library Identifies a New Type of Nuclear Envelope Membrane Protein, The Journal of Cell Biology, 146(1), 29-43(1999)	1-18

☐ 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

04 January, 2006 (04.01.06)

Date of mailing of the international search report

17 January, 2006 (17.01.06)

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 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)

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 (IPC))

Int.Cl. C12N 15/09, C12Q 1/02, C12Q 1/68

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006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(JOIS)、CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

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 請求の範囲の番号
X	WO 2002/036823 A1 (味の素株式会社) 2002.05.10, 全文 & EP 1333099 A1 & US 2003/0180801 A1	1-18
A	JP 2003-310259 A (科学技術振興事業団) 2003.11.05 (ファミリーなし)	1-18
A	ROLLS M.M. et al., A Visual Screen of a GFP-fusion Library Identifies a New Type of Nuclear Envelope Membrane Protein, The Journal of Cell Biology, 146(1), 29-43(1999)	1-18

☐ 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

04.01.2006

国際調査報告の発送日

17.01.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
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)

植原 克典

4B

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3448