

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7246372号
(P7246372)

(45)発行日 令和5年3月27日(2023.3.27)

(24)登録日 令和5年3月16日(2023.3.16)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	
C 1 2 N	9/02 (2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435	

請求項の数 15 (全74頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-506917(P2020-506917)	(73)特許権者	590003283
(86)(22)出願日	平成30年8月7日(2018.8.7)		コモンウェルス サイエンティフィック
(65)公表番号	特表2020-537489(P2020-537489		アンド インダストリアル リサーチ オ
	A)		ーガナイゼーション
(43)公表日	令和2年12月24日(2020.12.24)		オーストラリア 2601オーストラリア
(86)国際出願番号	PCT/AU2018/050824		ン・キャピタル・テリトリー、アクトン
(87)国際公開番号	WO2019/028504		、クルーニーズ・ロス・ストリート
(87)国際公開日	平成31年2月14日(2019.2.14)	(74)代理人	100108453
審査請求日	令和3年8月5日(2021.8.5)		弁理士 村山 靖彦
(31)優先権主張番号	2017903148	(74)代理人	100110364
(32)優先日	平成29年8月8日(2017.8.8)		弁理士 実広 信哉
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)	(74)代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		(72)発明者	カリーヌ・カロン
			オーストラリア・2601・オーストラ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 炭水化物センサー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている配列番号1に提供されるものと少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、乳糖又はラクトロースを検出するためのセンサー分子であって、乳糖又はラクトロースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化する、センサー分子。

【請求項2】

BgaR転写因子又はその変種が、配列番号1に提供されるものと少なくとも95%、98%又は99%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のセンサー分子。

【請求項3】

共鳴エネルギー転移ドナードメインが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアノ蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dEGFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、t-ダイマー2(12)、mRFP1、ポシロポリン、ウミシイタケGFP、モンスターGFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurBoFB及びフィコビリンタンパク質並びにこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片からなる群から選択される蛍光タンパク質であり

、例えばCFP又はその変種である、請求項1又は2に記載のセンサー分子。

【請求項4】

共鳴エネルギー転移アクセプタードメインが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアン蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPs65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dEGFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、t-ダイマー2(12)、mRFP1、ポシロポリン、ウミシイタケGFP、モンスターGFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurboFB及びフィコビリンタンパク質並びにこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片からなる群から選択される蛍光タンパク質であり、例えばYFP又はその変種である、請求項1から3のいずれか一項に記載のセンサー分子

【請求項5】

共鳴エネルギー転移ドナードメインがCFPであり、共鳴エネルギー転移アクセプタードメインがYFPである、請求項1から4のいずれか一項に記載のセンサー分子。

【請求項6】

配列番号23に提供されるポリペプチドと少なくとも90%、95%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載のセンサー分子。

【請求項7】

共鳴エネルギー転移ドナードメインは、生物発光タンパク質である、請求項1から3のいずれか一項に記載のセンサー分子。

【請求項8】

生物発光タンパク質は、ウミシイタケ(*Renilla*)ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、腔腸動物ルシフェラーゼ、北アメリカグローワーム(*North American glow worm*)ルシフェラーゼ、コメツキムシ(*click beetle*)ルシフェラーゼ、レイルロードワーム(*railroad worm*)ルシフェラーゼ、細菌性ルシフェラーゼ、ガウシア(*Gaussia*)ルシフェラーゼ、エクオリン、アラキノカンパ(*Arachnocampa*)ルシフェラーゼ、オプロフォラス・グラシリロストリス(*Ophophorus gracilirostris*)ルシフェラーゼからなる群から選択されるルシフェラーゼである、請求項7に記載のセンサー分子。

【請求項9】

共鳴エネルギー転移ドナードメインは、RLuc8であり、共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、GFP²である、請求項8に記載のセンサー分子。

【請求項10】

配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号18に提供されるポリペプチドと少なくとも90%、95%、98%、99%又は100%の配列同一を有する、請求項9に記載のセンサー分子。

【請求項11】

単一ポリペプチドである、請求項1から10のいずれか一項に記載のセンサー分子。

【請求項12】

請求項11に記載のセンサー分子をコードするポリヌクレオチド、請求項11に記載のセンサー分子をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、又は前記ポリヌクレオチド若しくはベクターを含む宿主細胞。

【請求項13】

i)試料を請求項1から11のいずれか一項に記載のセンサー分子と接触させる工程;
 ii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程;及び
 iii)任意選択で試料中の乳糖又はラクトースの濃度を決定する工程
 を含む、試料中の乳糖又はラクトースを検出する方法であって、
 アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向の変化が、乳糖又はラクトースが試料中に存在することを示す、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

試料が乳製品を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

乳製品は乳である、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、試料中の乳糖等の炭水化物を検出するためのセンサー及び方法に関する。センサー及び方法は、試料中の炭水化物の量を決定するためにも使用され得る。

【背景技術】**【0002】**

糖及び糖誘導体を含む炭水化物を検出するためのアッセイは、食品及び医療産業において広く使用されている。食品産業において特に関心があるのは、乳製品中の乳糖等の炭水化物を検出するためのアッセイである。

【0003】

現在、乳製品中の日常的な乳糖分析は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて行われている。この方法は、乳糖の正確、高感度で選択的な測定をもたらすが、分析は高度な訓練を受けたスタッフによって操作される高価な装置を有する実験施設への試料の輸送を必要とする(Euber and Brunner, 1979; Indykら、1996; Xinminら、2008; Erichら、2012)。乳糖を検出/測定するための他の技術は、溶液中の乳糖の濃度を間接的に測定するための酵素カスケードを使用する。通常これらのアッセイは、-ガラクトシダーゼを用いる乳糖のガラクトース及びグルコースへの酵素的加水分解に続く、いずれかの单糖類の酸化を通じて進む(Kleyn, 1985; Ansariら、2012; Jiaら、2014)。乳糖の定量は、分光光度的、電流測定又は比色定量方法を使用する、酸化ステップの化学量論的副産生物、すなわちNADH又はH₂O₂の測定を通じて行われる。これらのアッセイは、多数の試薬及び多くのステップを必要とし、このため、加工工場における日常的使用のためにはあまりに時間がかかり扱いにくい。それらは、本質的に選択性が低い。代替的に、高レベルの乳糖(例えば、3.9 ~ 4.8%(w/v))は、近赤外分光法によって測定され得る(Tsenkovaら、1999)。しかし、この方法は、1% (w/v)未満の乳糖等の低レベルの乳糖を測定するためには不正確であり、高価な装置を必要とする。

【0004】

したがって、試料中の炭水化物を検出し、量を定量するためのさらなる方法、好ましくはリアルタイムで、感度が上昇している、及び/又は分析のために現地外に試料を送ることなく実施され得る方法に対する必要性がある。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0005】****【文献】WO 00/024878**

WO 99/049019

US 5,229,285

US 5,219,737

US 5,843,746

US 5,196,524

US 5,670,356

WO 2007/019634

WO 01/46691

PCT/US2013057660

US20140302539

【非特許文献】**【0006】**

10

20

30

40

50

【文献】J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984)

J. Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)

T.A. Brown (編集), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)

D.M. Glover and B.D. Hames (編集), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995及び1996)

F.M. Ausubelら(編集), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までのすべてのアップデートを含む)

Ed Harlow and David Lane (編集) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)

J.E. Coliganら、(編集) *Current Protocols in Immunology* John Wiley & Sons(現在までのすべてのアップデートを含む)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)によって編集されたIUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

Wangら、(1997) in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, eds. Hastingsら、(Wiley, New York), 419 ~ 422頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、試料中の炭水化物を検出するために使用され得るセンサーを明らかにした。本発明者らは、これらのセンサーを使用して、試料中の炭水化物の存在を検出する改善された方法を明らかにした。一部の実施形態では、これらのセンサー及び方法は、試料中の炭水化物の濃度を測定するために使用され得る。本発明者らは、これらのセンサーを使用して乳製品の乳糖を検出する改善された方法も明らかにした。一部の実施形態では、センサー及び方法は、乳製品の乳糖含有量を測定するために使用され得る。一部の実施形態では、センサー及び方法は、それらの乳糖含有量に基づいて乳製品を分類するために使用され得る。

【課題を解決するための手段】

【0008】

一態様では、

- i)ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の炭水化物結合ドメイン、又は炭水化物結合ドメインの変種;
- ii)化学発光ドナードメイン;及び
- iii)アクセプタードメイン;

を含む、炭水化物を検出するためのセンサー分子であって、

炭水化物が炭水化物結合ドメインに結合すると、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化する、センサー分子が提供される。

【0009】

一部の実施形態では、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子は、細菌性ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子、又はその変種である。一部の実施形態では、細菌性ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子は、GNTR転写因子、又はその変種である。一部の実施形態では、細菌性ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子又はその変種は、配列番号1に提供されるものと少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を有する。別の実施形態では、結合ドメインは、配列番号9に提供されるものと少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を有する。

10

20

30

40

50

【0010】

さらなる実施形態では、結合ドメインは、配列番号9及び56から74の任意の1つ又は複数に提供されるものと少なくとも30%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0011】

一部の実施形態では、炭水化物は、糖又は糖誘導体である。一部の実施形態では、炭水化物は糖である。一部の実施形態では、糖は二糖である。好ましい実施形態では、二糖は乳糖である。別の実施形態では、二糖はラクトースである。一部の実施形態では、炭水化物は糖誘導体である。一部の実施形態では、糖誘導体は、アミノ糖、酸性糖、デオキシ糖、糖アルコール、グリコシルアミン及び糖リン酸からなる群から選択される。

【0012】

一部の実施形態では、化学発光ドナードメインは、生物発光タンパク質である。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ又は β -グルコシダーゼである。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼである。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、ウミシイタケ(*Renilla*)ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、腔腸動物ルシフェラーゼ、北アメリカグローワーム(North American glow worm)ルシフェラーゼ、コメツキムシ(click beetle)ルシフェラーゼ、レイルロードワーム(railroad worm)ルシフェラーゼ、細菌性ルシフェラーゼ、ガウシア(Gaussia)ルシフェラーゼ、エクオリン、アラキノカンパ(*Arachnocampa*)ルシフェラーゼ、オプロフォラス・グラシリロストリス(*Oplophorus gracilirostris*)ルシフェラーゼ或いはそのいずれか1つの生物学的に活性な変種若しくは断片又は2つ以上のキメラである。

【0013】

一部の実施形態では、化学発光ドナードメインは、基質を修飾できる。一部の実施形態では、基質は、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、フリマジン(furimazine)又はセレンテラジン、ルシフェリン若しくはフリマジンの誘導体、類似物若しくは安定化誘導体である。

【0014】

一部の実施形態では、アクセプタードメインは、蛍光アクセプタードメインである。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアノ蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPs65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dEGFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、t-ダイマー2(12)、mRFP1、ポシロポリン(pocilloporin)、ウミシイタケGFP、モンスター(Monster)GFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurBoFB及びフィコビリンタンパク質並びにこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片からなる群から選択される。

【0015】

一部の実施形態では、炭水化物の存在及び/又は非存在下での化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの分離及び相対配向は、フォルスター距離の $\pm 50\%$ 以内である。一部の実施形態では、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとのフォルスター距離は少なくとも5.6nmである。一部の実施形態では、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとのフォルスター距離は約7nmから約11nmの間である。

【0016】

別の態様では、

- i)試料を本明細書に定義されるセンサー分子と接触させる工程;及び
- ii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうか決定する工程、
を含む、試料中の炭水化物を検出する方法であって、
アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向

10

20

30

40

50

の変化が、炭水化物が試料中に存在することを示す、方法も提供される。

【0017】

一部の実施形態では、方法は、試料中の炭水化物の濃度を決定する工程を更に含む。一部の実施形態では、方法は、マイクロ流体デバイス上で実施される。一部の実施形態では、試料は、気体、液体、生物学的材料又は土壤である。一部の実施形態では、試料は、乳製品を含む。好ましい実施形態では、試料は乳である。

【0018】

更に別の態様では、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、乳糖を検出するためのセンサー分子であって、乳糖が転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化する、センサー分子が提供される。センサー分子への乳糖の結合は、共鳴エネルギー転移(RET)における変化、例えばBRETにおける変化又はFRETにおける変化を産生する。したがって、センサーは、試料中の乳糖の存在を検出するため、及び/又は試料中の乳糖の濃度を決定するために使用され得る。

10

【0019】

更に別の態様では、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、ラクトロースを検出するためのセンサー分子であって、ラクトロースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化する、センサー分子が提供される。センサー分子へのラクトロースの結合は、共鳴エネルギー転移(RET)における変化、例えばBRETにおける変化又はFRETにおける変化を産生する。したがって、センサーは、試料中のラクトロースの存在を検出するため、及び/又は試料中の乳糖の濃度を決定するために使用され得る。

20

【0020】

一部の実施形態では、転写因子又はその変種は、配列番号1に提供されるものと少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、転写因子又はその変種は、配列番号1に提供されるアミノ酸配列を有する。

30

【0021】

センサー分子は、BRET又はFRETに基づくセンサーであってよい。一部の実施形態では、センサー分子は、センサー分子への乳糖の結合がBRETにおいて変化を産生するBRETに基づくセンサーである。したがって、一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、生物発光タンパク質である。好適な生物発光タンパク質として、ルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-グルクロニダーゼ又は-グルコシダーゼが挙げられる。一部の実施形態では、生物発光タンパク質はルシフェラーゼである。一部の実施形態では、ルシフェラーゼは、ウミシイタケルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、腔腸動物ルシフェラーゼ、北アメリカグローワームルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、レイルロードワームルシフェラーゼ、細菌性ルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ、エクオリン、アラキノカンパルシフェラーゼ、オプロフォラス・グラシリロストリスルシフェラーゼ或いはそのいずれか1つの生物学的に活性な変種若しくは断片又は2つ以上のキメラである。一部の実施形態では、ドナードメインは、基質を修飾できる。好適な基質として、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、フリマジン又はセレンテラジン、ルシフェリン若しくはフリマジンの誘導体、類似物若しくは安定化誘導体が挙げられる。

40

【0022】

一部の実施形態では、センサー分子は、センサー分子への乳糖の結合がFRETにおいて変化を産生するFRETに基づくセンサーである。したがって、一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、蛍光タンパク質である。一部の実施形態では、蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアン蛍光変種(C

50

FP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dE GFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、tダイマー2(12)、mRFP1、ポシロポリン、ウミシイタケGFP、モンスターGFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurBo FB及びフィコビリンタンパク質並びにこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片からなる群から選択される。

【0023】

BRET及びFRETに基づく乳糖センサーの両方について、共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、蛍光アクセプタードメインであってよい。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは蛍光タンパク質である。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアン蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dE GFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、tダイマー2(12)、mRFP1、ポシロポリン、ウミシイタケGFP、モンスターGFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurBo FB及びフィコビリンタンパク質並びにこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片からなる群から選択される。

【0024】

一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、ウミシイタケルシフェラーゼ又はその変種であり、共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、GFP又はその変種である。一部の実施形態では、本開示は、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるポリペプチド配列に少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%配列同一性を有するセンサー分子を提供する。これらの実施形態では、センサー分子への乳糖の結合は、BRETにおいて変化を產生する。

【0025】

一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、CFP又はその変種であり、共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、YFP又はその変種である。一部の実施形態では、本開示は、配列番号23に提供されるポリペプチドに少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%配列同一性を有するセンサー分子を提供する。これらの実施形態では、センサー分子への乳糖の結合は、FRETにおいて変化を產生する。

【0026】

一部の実施形態では、乳糖の存在及び/又は非存在下でのドナードメインとアクセプタードメインとの分離及び相対配向は、フォルスター距離の±50%以内である。一部の実施形態では、ドナードメインとアクセプタードメインとのフォルスター距離は少なくとも5.6nmである。一部の実施形態では、ドナードメインとアクセプタードメインとのフォルスター距離は約7nmから約10nmの間である。

【0027】

別の態様では、
i)本明細書に定義される乳糖を検出するために試料をセンサー分子と接触させる工程;及び
ii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程
を含む、試料中の乳糖を検出する方法であって、

アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向の変化が、乳糖が試料中に存在することを示す方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、試料中の乳糖の濃度を決定する工程を更に含む。一部の実施形態では、方法は、マイクロ流体デバイス上で実施される。一部の実施形態では、試料は、気体、液体、生物学的材料

10

20

30

40

50

又は土壤である。一部の実施形態では、試料は乳製品を含む。一部の実施形態では、乳製品は乳である。

【0028】

別の態様では、

i)本明細書に定義される試料をセンサー分子と接触させる工程;及び
ii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程
を含む、試料中の試料中のラクツロースを検出する方法であって、
アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向の変化が
、ラクツロースが試料中に存在することを示す方法も提供される。一部の実施形態では、
方法は、試料中のラクツロースの濃度を決定する工程を更に含む。一部の実施形態では、
方法は、マイクロ流体デバイス上で実施される。一部の実施形態では、試料は、気体、液体、
生物学的材料又は土壤である。一部の実施形態では、試料は乳製品を含む。一部の実
施形態では、乳製品は乳である。

【0029】

一部の実施形態では、センサー分子は、単一ポリペプチドである。一部の実施形態では、
、化学発光ドナードメインはN末端にあり、アクセプタードメインはC末端にある。代替的
実施形態では、アクセプタードメインはN末端にあり、化学発光ドナードメインはC末端に
ある。一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、N末端にあり、共鳴
エネルギー転移アクセプタードメインは、C末端にある。代替的実施形態では、共鳴エネ
ルギー転移アクセプタードメインはN末端にあり、共鳴エネルギー転移ドナードメインはC
末端にある。

【0030】

一部の実施形態では、センサー分子は、少なくとも1つのペプチドリンカーを含む。

【0031】

別の態様では、本明細書に定義されるセンサー分子をコードするポリヌクレオチドも提
供される。別の態様では、本明細書に定義されるセンサー分子をコードするポリヌクレオ
チドを含むベクターも提供される。更に別の態様では、本明細書に定義されるポリヌクレ
オチド及び/又はベクターを含む宿主細胞も提供される。更に別の態様では、センサー分子
を産生する方法も提供され、方法は本明細書に定義される宿主細胞又はベクターを、ポリ
ペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で培養する工程、及び
発現されたポリペプチドを回収する工程を含む。

【0032】

本明細書の任意の実施形態は、特に具体的に明記しない限り、変更すべき所は変更して
、任意の他の実施形態に適用されると解釈されるべきである。

【0033】

本発明は、例示の目的だけを意図する本明細書に記載の具体的な実施形態によって範囲
を限定されない。機能的に等価な産生物、組成物及び方法は、明確に、本明細書に記載の
本発明の範囲内である。

【0034】

本明細書全体を通じて、特に具体的に明記しない限り、又は文脈上他の意味に解釈すべき
場合を除いて、単一のステップ、物質の組成、ステップの群又は物質の組成の群を参照
することは、これらのステップ、物質の組成、ステップの群又は物質の組成の群の1つ及
び複数(すなわち1つ又は複数)を包含すると解釈されるべきである。

【0035】

本発明は、本明細書以下に、次の非限定的例の方法によって、及び添付の図を参照して
記載される。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】本開示の実施形態の模式図である。例示されるセンサー分子(LacB1)は、それぞ

10

20

30

40

50

れ、N及びC末端でGFP²及びRLuc8に隣接するBgaR転写因子を含む。

【図2】水(暗灰色バー)又は1mMラクトース(灰白色バー)中の1μMのLacB1及びLacF1センサーについてのRET比(平均±SD、n=3)を示す図である。BRET²スキャンを、17μMセレンテラジン400a基質の添加後に記録した。^{*P 0.0001}

【図3】0.000034 w/v% ~ 0.34% w/vのラクトースに対するLacB1のBRET²応答を示す図である。

【図4】本開示の実施形態の模式図である。LacB1は、それぞれ、N及びC末端でGFP²(中薄灰色)及びRLuc8(暗灰色)に隣接するBgaR転写因子(灰白色)を含む。LacB2は、BgaRとGFP²及びBgaRとRLuc8の間に挿入されるアミノ酸リンカー(-GGTGGG-)を有するLacB1を含む。LacB3は、BgaRとGFP²の間に挿入されるリンカー(-GGTGGG-)を有するLacB1を含む。LacB4は、BgaRとRLuc8の間に挿入されるリンカー(-GGTGGG-)を有するLacB1を含む。リンカーの位置は、BgaRとGFP²及び/又はBgaRとRLuc8を連結する黒色セクションによって表される。

【図5】1mMラクトースの存在に対するLacB1(1)、LacB2(2)、LacB3(3)及びLacB4(4)のBRET²応答を示す図である。

【図6】二糖、ラクトース、マルトース及びラクツロース並びに単糖、ガラクトース及びグルコースの存在下でLacB1センサーのBRET²比における変化を示す図である。BRET²比(平均±SD、n=3)を、特定の糖との30分間、30 でのインキュベーション後、1μMのLacB1に対する17μMセレンテラジン400aの添加後に記録した。BRET²比を、水の応答に対して標準化し、BRET²変化のパーセンテージとして表した。

【図7】全て1mMの濃度での、ある範囲の二糖及び単糖に対するLacB1の応答を示す図である。BRET²比(平均±SD、n=3)を、特定の糖との5分間、30 でのインキュベーション後、1μMのLacB1に対する17μMセレンテラジン400aの添加後に記録した。BRET²比を、水の応答に対して標準化し、BRET²変化のパーセンテージとして表した。

【図8】PBS(A)中でのガラクトース及びグルコース並びに透析した乳(C、E)中でのガラクトース及びグルコースの存在下でのLacB1センサーによるラクトースの検出を示す図である(平均±S.D.、n=3)。PBS(B)中でのガラクトース及びグルコース並びに透析した乳(D)中でのガラクトース及びグルコースの存在下でのLacF1センサーによるラクトースの検出(平均±S.D.、n=3)。

【図9】ラクトース、ガラクトース及びグルコースを補充されたPBS及び10%(v/v)透析した全乳中のLacB1センサーによるラクトース及びラクツロースの検出を示す図である。実線:PBS中のLacB1に依存するラクトース濃度。EC₅₀=12±1μM、LOD=1μM。点線:ラクトース、ガラクトース及びグルコースを添加して([ラクトース]+[ガラクトース+グルコース]/2=13.9mM)を有する10%の透析した全乳中のLacB1に依存するラクトース濃度。EC₅₀=21±2μM、LOD=0.2μM。破線:PBS中のLacB1に依存するラクツロース濃度。EC₅₀=2.4±0.2mM、LOD=0.1mM。

【図10】(A)CYBERTONGUE(登録商標)デバイスを使用して決定された、アッセイ緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水中の0.45%ゼラチン)中の3mMラクトースの存在下でのLacB1センサーに対するBRET²比のトレースの例を示す図である。(B)アッセイ緩衝液中の3mMラクトースの存在下で、LacB1についての、CYBERTONGUE(登録商標)デバイスによって記録された、ドナー放射(上方のウインドウ、暗灰色)及びアクセプター放射(上方のウインドウ、灰白色)強度のトレースの例を示す図である。

【図11】CYBERTONGUE(登録商標)デバイスで決定されたLacB1のBRET²比における変化を示す図である。30μM及び3mMラクトースの存在下でのLacB1についてのBRET²比を、CYBERTONGUE(登録商標)デバイスで記録した。BRET²比を、アッセイ緩衝液応答に対して標準化し、BRET²変化のパーセンテージとして表した(平均±S.D.、n=2又は3)。

【発明を実施するための形態】

【0037】

配列表の説明

配列番号1-BgaR HTH転写因子のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

配列番号2から8-リンカー配列

配列番号9-BgaR HTH炭水化物結合ドメイン

配列番号10-14-プライマー配列

配列番号15-LacB1 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号16-LacB2 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号17-LacB3 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号18-LacB4 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号19-LacB1 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号20-LacB2 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号21-LacB3 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号22-LacB4 (GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号23-LacF1 (His₆-CFP-BgaR-YFP融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号24-LacF1 (His₆-CFP-BgaR-YFP融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号25-LacB1 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号26-LacB2 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号27-LacB3 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号28-LacB4 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列

配列番号29-LacB1 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号30-LacB2 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号31-LacB3 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号32-LacB4 (His₆-GFP²-BgaR-RLuc8融合タンパク質)をコードするヌクレオチド配列

配列番号33-LacB1₁₋₁₇₁ (GFP²-BgaR₁₋₁₇₁-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列。GFP²及びRLuc8によって隣接されたBgaRの残基1～171を含む本開示の実施形態によるセンサー分子

配列番号34-LacB1₁₋₁₅₀ (GFP²-BgaR₁₋₁₅₀-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列。GFP²及びRLuc8によって隣接されたBgaRの残基1～150を含む本開示の実施形態によるセンサー分子

配列番号35-LacB1₁₂₋₁₇₁ (GFP²-BgaR₁₂₋₁₇₁-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列。GFP²及びRLuc8によって隣接されたBgaRの残基12～171を含む本開示の実施形態によるセンサー分子

配列番号36-LacB1₁₂₋₁₅₀ (GFP²-BgaR₁₂₋₁₅₀-RLuc8融合タンパク質)のアミノ酸配列。GFP²及びRLuc8によって隣接されたBgaRの残基12～150を含む本開示の実施形態によるセンサー分子

配列番号37-UniProt受託番号:A0A133MUX6のアミノ酸配列

配列番号38-UniProt受託番号:B1V7N0のアミノ酸配列

配列番号39-UniProt受託番号:A0A127EGD8のアミノ酸配列

配列番号40-UniProt受託番号:A0A1C6JUB7のアミノ酸配列

配列番号41-UniProt受託番号:A0A174HYB7のアミノ酸配列

配列番号42-UniProt受託番号:A0A1C6KY47のアミノ酸配列

配列番号43-UniProt受託番号:A0A174LZQ7のアミノ酸配列

配列番号44-UniProt受託番号:N9YR91のアミノ酸配列

配列番号45-UniProt受託番号:A0A174I591のアミノ酸配列

配列番号46-UniProt受託番号:A0A2A7ME67のアミノ酸配列

配列番号47-UniProt受託番号:A0A2K4AZL9のアミノ酸配列

配列番号48-UniProt受託番号:A0A166PPM9のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

配列番号49-UniProt受託番号:A0A2T4R7G1のアミノ酸配列
配列番号50-UniProt受託番号:A0A2A4HCU9のアミノ酸配列
配列番号51-UniProt受託番号:A0A2T4MS83のアミノ酸配列
配列番号52-UniProt受託番号:O33813のアミノ酸配列
配列番号53-UniProt受託番号:A0A1D4LKB2のアミノ酸配列
配列番号54-UniProt受託番号:A0A133QVV5のアミノ酸配列
配列番号55-UniProt受託番号:A9QSR3のアミノ酸配列
配列番号56-UniProt受託番号:A0A133MUX6の推定炭水化物結合ドメイン(CBD)のアミノ酸配列

配列番号57-UniProt受託番号:B1V7N0の推定CBDのアミノ酸配列 10

配列番号58-UniProt受託番号:A0A127EGD8の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号59-UniProt受託番号:A0A1C6JUB7の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号60-UniProt受託番号:A0A174HYB7の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号61-UniProt受託番号:A0A1C6KY47の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号62-UniProt受託番号:A0A174LZQ7の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号63-UniProt受託番号:N9YR91の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号64-UniProt受託番号:A0A174I591の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号65-UniProt受託番号:A0A2A7ME67の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号66-UniProt受託番号:A0A2K4AZL9の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号67-UniProt受託番号:A0A166PPM9の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号68-UniProt受託番号:A0A2T4R7G1の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号69-UniProt受託番号:A0A2A4HCU9の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号70-UniProt受託番号:A0A2T4MS83の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号71-UniProt受託番号:O33813の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号72-UniProt受託番号:A0A1D4LKB2の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号73-UniProt受託番号:A0A133QVV5の推定CBDのアミノ酸配列
配列番号74-UniProt受託番号:A9QSR3の推定CBDのアミノ酸配列

【0038】

本発明の詳細な記載

一般的技術及び定義

特に具体的に明記しない限り、本明細書で用いるすべての技術的及び科学的用語は、当業者(例えば、センサー技術、分子生物学、タンパク質化学、酪農化学、酪農技術、生化学等において)によって一般に理解されるのと同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【0039】

特に具体的に明記しない限り、本発明において利用される組換えタンパク質、細胞培養及び免疫学的技術は、当業者に十分周知の標準的手順である。そのような技術は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T.A. Brown (編集), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D.M. Glover and B.D. Hames (編集), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995及び1996)並びにF.M. Ausubelら(編集), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までのすべてのアップデートを含む)、Ed Harlow and David Lane (編集) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)並びにJ.E. Coliganら、(編集) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(現在までのすべてのアップデートを含む)等の出典の文献を通じて記載され、説明されている。

【0040】

本発明の方法における使用のために好適なポリペプチドは、参照アミノ酸配列へのそのアミノ酸配列の同一性の程度(%同一性)によって、又は別のものよりも一参照アミノ酸配列

10

20

30

40

50

に、より大きな%同一性を有することによって定義され得る。参照アミノ酸配列へのポリペプチドの%同一性は、典型的には、ギャップ開始ペナルティー(gap creation penalty)=5及びギャップ伸長ペナルティー(gap extension penalty)=0.3のパラメーターを用いるGAP分析(Needleman and Wunsch, 1970; GCG program)によって決定される。問い合わせ配列は長さ少なくとも100アミノ酸であり、GAP分析は少なくとも100アミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。更により好ましくは、問い合わせ配列は長さ少なくとも250アミノ酸であり、GAP分析は少なくとも250アミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。更により好ましくは、問い合わせ配列は長さ少なくとも450アミノ酸であり、GAP分析は少なくとも450アミノ酸の領域にわたって2つの配列をアラインする。更により好ましくは、GAP分析はそれらの全長にわたって2つの配列をアラインする。

10

【0041】

用語「及び/又は」、例えば「X及び/又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれかを意味すると理解されるべきであり、両方の意味に、又はいずれかの意味に明確な支持を提供すると解釈されるべきである。

【0042】

文脈上他に示唆される場合を除いて、センサー及び基質等、単数形での用語の記載は、同様に複数形を明確に意味する。例えば、論理的に、一分子としてよりは多数の個々のセンサー分子がデバイスを通じて流される、又はウエルに含有される。

20

【0043】

本明細書において使用される用語、約は、そうでないと記載しない限り、指定の値の+/-10%、より好ましくは+/-5%、更により好ましくは+/-1%を指す。

【0044】

本明細書全体を通じて、語「含む(comprise)」又は「含む(comprises)」若しくは「含んでいる(comprising)」等の変化形は、述べられる要素、整数若しくはステップ又は要素、整数若しくはステップの群を含むことを意味するが、任意の他の要素、整数若しくはステップ又は要素、整数若しくはステップの群の排除を意味しないと理解される。

【0045】

示されない、又は文脈が他を示さない限り、%濃度は質量/体積(%w/v)である。

【0046】

30

センサー

明細書全体を通じて「センサー」及び「センサー分子」は、互換的に用いられる。

【0047】

一態様では本開示は、

- i)ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の炭水化物結合ドメイン、又は炭水化物結合ドメインの変種;
- ii)化学発光ドナードメイン;及び
- iii)アクセプタードメイン;

を含む、炭水化物を検出するためのセンサー分子であって、

炭水化物が炭水化物結合ドメインに結合すると、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化する、センサー分子を提供する。

40

【0048】

一部の実施形態では、センサーは、アミノ酸の連続的ストレッチである(言い換えると、センサーは単一ポリペプチドである)。例えば、炭水化物結合ドメイン、化学発光ドナータンパク質ドメイン及びアクセプタードメインは、これだけに限らないが、炭水化物結合ドメインのN末端に共有結合的に結合した化学発光ドナータンパク質ドメイン及び炭水化物結合ドメインのC末端に共有結合的に結合したアクセプタータンパク質ドメイン、又は炭水化物結合ドメインのN末端に共有結合的に結合したアクセプタータンパク質ドメイン及び炭水化物結合ドメインのC末端に共有結合的に結合した化学発光ドナータンパク質ドメイン等のアミノ酸の単一のストレッチである。例は、図1に提供されている。

50

【0049】

例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択される配列又はその断片若しくは変種を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有し得る。本明細書において使用される、ポリペプチドの「一部」は、ポリペプチドの関連活性を保持している、例えばポリペプチドの一部は、炭水化物に結合する能力を保持している。10

【0050】

例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択される配列又はその断片若しくは変種を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有し得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択される配列又はその断片若しくは変種を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有し得る。20

【0051】

一部の実施形態では、本明細書に定義されるセンサーをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸も提供される。一部の実施形態では、核酸は、単離された核酸である。例えば、一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択されるポリペプチド配列をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるポリペプチド配列をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択されるポリペプチド配列をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15又は配列番号25のポリペプチド配列をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15のポリペプチド配列をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号25のポリペプチド配列をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。30

40

50

列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32からなる群から選択される配列、又は配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のいずれか1つの一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22からなる群から選択される配列、又は配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22のいずれか1つの一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22からなる群から選択される配列、又は配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のいずれか1つの一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22からなる群から選択される配列、又は配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のいずれか1つの一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22からなる群から選択される配列、又は配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のいずれか1つの一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を含む。

【0052】

別の態様では、本開示は、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、乳糖又はラクトースを検出するためのセンサー分子であって、乳糖が転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化する、センサー分子を提供する。本態様のセンサー分子への乳糖又はラクトースの結合は、共鳴エネルギー転移における変化、例えばBRETにおける変化又はFRETにおける変化を産生する。一部の実施形態では、本開示は、乳糖を検出するためのセンサー分子を提供する。一部の実施形態では、本開示は、ラクトースを検出するためのセンサー分子を提供する。

【0053】

一部の実施形態では、センサーは、アミノ酸の連続的ストレッチである(言い換えると、センサーは単一ポリペプチドである)。例えば、細菌性BgaR転写因子又はその変種、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、これだけに限らないが、細菌性BgaR転写因子のN末端に共有結合的に結合したドナータンパク質ドメイン及び細菌性BgaR転写因子のC末端に共有結合的に結合したアクセプタータンパク質ドメイン、又は細菌性BgaR転写因子のN末端に共有結合的に結合したアクセプタータンパク質ドメイン及び細菌性BgaR転写因子のC末端に共有結合的に結合したドナータンパク質ドメイン等のアミノ酸の単一のストレッチである。

【0054】

例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23に提供される配列又はその断片若しくは変種を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23に示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有し得る。

【0055】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書に定義されるセンサーをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子も提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、単離された核酸分子である。例えば、一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号23に提供されるポリペプチド配列又はその断片若しくは変種をコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号23に提供される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号24に提供される配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一の配列を含む。

【0056】

本開示のセンサー、組成物、キット、方法及び使用は、指定の配列又はそれと実質的に同一若しくは類似の配列、例えば、指定の配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチド及び核酸を包含する。アミノ酸配列の文脈では、用語「実質的に同一」は、本明細書において、第1の及び第2のアミノ酸配列が共通の構造ドメイン及び/又は共通の機能活性を有し得るように、第2のアミノ酸配列中のアラインされたアミノ酸残基とi)同一、又はii)その保存的置換である十分な又は最小限の数のアミノ酸残基を含有する第1のアミノ酸を指して使用される。例えば、指定の配列に少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一性を有する共通の構造ドメインを含有するアミノ酸配列は実質的に同一であると称される。

【0057】

ヌクレオチド配列の文脈では、用語「実質的に同一」は、本明細書において、第1の及び第2のヌクレオチド配列が共通の機能活性を有するポリペプチドをコードする、又は共通の構造ポリペプチドドメイン若しくは共通の機能性ポリペプチド活性をコードするよう、第2の核酸配列中のアラインされたヌクレオチドと同一である十分な若しくは最小限の数のヌクレオチドを含有する第1の核酸配列を指して使用される。例えば、指定の配列に少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一性を有するヌクレオチド配列は実質的に同一であると称される。

【0058】

配列間の相同性又は配列同一性(用語は本明細書において互換的に用いられる)の算出は、当業者に周知の技術を使用して実施される。例えば、2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の同一性百分率を決定するために、配列は、最適な比較目的のためにアラインされる(例えば、ギャップは、最適なアライメントのために第1の及び第2のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方に導入される場合があり、非相同性配列は、比較目的のために無視される場合がある)。好ましい実施形態では、比較目的のためにアラインされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、60%、更により好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドは比較される。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められている場合、分子は、その位置で同一である(本明細書において使用される場合、アミノ酸又は核酸「同一」は、アミノ酸又は核酸「相同」と等価である)。

【0059】

2つの配列間の同一性百分率は、2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【0060】

10

20

30

40

50

2つの配列間の配列の比較及び同一性百分率の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。一部の実施形態では、2つのアミノ酸配列間の同一性百分率は、Blossum 62マトリクス又はPAM250マトリクスのいずれか、並びに16、14、12、10、8、6又は4のギャップ重み及び1、2、3、4、5又は6の長さ重みを使用して、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込まれたNeedleman and Wunsch (1970)アルゴリズムを使用して決定される。更に他の実施形態では、2つのヌクレオチド配列間の同一性百分率は、NWSgapdna.CMPマトリクス及び40、50、60、70又は80のギャップ重み及び1、2、3、4、5又は6の長さ重みを使用する、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用して決定される。

【0061】

10

2つのアミノ酸又はヌクレオチド配列間の同一性百分率は、例えば、PAM120重み付け残基表(weight residue table)、12のギャップ長ペナルティー及び4のギャップペナルティーを使用して、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているMeyers and Miller (1989)のアルゴリズムを使用して決定され得る。

【0062】

本明細書に記載の核酸及びタンパク質配列は、例えば、他のファミリーメンバー又は関連配列を同定するために公開データベースに対して検索を実施するための「問い合わせ配列」として使用され得る。そのような検索は、例えば、Altschulら、(1990)のNBLAST及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)並びにBLASTpを使用して実施され得る。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の一部の実施形態の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るためにNBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施され得る。BLASTタンパク質検索は、本発明の一部の実施形態のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るためにXBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施され得る。比較目的のためにギャップが入ったアライメントを得るために、ギャップが入ったBLASTは、Altschulら、(1997)に記載のとおり利用され得る。BLAST及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、各プログラム(例えば、BLASTp、XBLAST及びNBLAST)の初期パラメーターは、使用され得る。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>を参照されたい。

20

【0063】

本明細書に記載の配列の天然対立遺伝子の変種、ホモログ、オルソログ又は他の関連配列(例えば、パラログ)に対応する核酸分子は、例えば、既知の配列のすべて又は一部をプローブとして使用して、標準的又はストリンジエントなハイブリダイゼーション反応を実施することによって、本明細書に記載のアミノ酸配列をコードする核酸へのそれらの相同に基づいて単離され得る。核酸ハイブリダイゼーション及びクローニングのためのそのような方法は、当技術分野において十分周知である。

30

【0064】

本明細書で提供されるペプチドのホモログは、そのようなペプチドと構造的類似性を典型的には有する。ポリペプチドのホモログは、アミノ酸が属するクラスの同じ又は異なるメンバーから選択され得る1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含む。

【0065】

40

一部の実施形態では、配列は、サイレント変化を產生し、機能的に等価な物質を生じるアミノ酸残基の欠失、挿入又は置換も有する場合がある。計画的なアミノ酸置換は、物質の二次結合活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び/又は両親媒性の性質における類似性に基づいて作製され得る。例えば、負の電荷を有するアミノ酸としてアスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられ;正に荷電したアミノ酸としてリジン及びアルギニンが挙げられ;及び同様の親水性値を有し、荷電していない極性の頭部を有するアミノ酸としてロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、フェニルアラニン及びチロシンが挙げられる。

【0066】

本発明の一部の実施形態は、例えば、塩基性に対して塩基性、酸性に対して酸性、極性に対して極性等の同種置換を生じ得る、保存的置換(置換及び置き換えは、代替的残基を用

50

いる既存のアミノ酸残基の交換を意味して両者とも使用される)も包含する。非保存的置換は、例えば、1つのクラスの残基から別のものへ、又は代替的にオルニチン(本明細書以下でZと称される)、ジアミノ酪酸オルニチン(本明細書以下でBと称される)、ノルロイシンオルニチン(本明細書以下でDと称される)、ピリジルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン及びフェニルグリシン等の非天然アミノ酸の含有に關しても生じ得る。行われ得る保存的置換は、例えば、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジン及びヒスチジン)、酸性アミノ酸(グルタミン酸及びアスパラギン酸)、脂肪族アミノ酸(アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン)、極性アミノ酸(グルタミン、アスパラギン、セリン、スレオニン)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン)、ヒドロキシアミノ酸(セリン、スレオニン)、大きいアミノ酸(フェニルアラニン及びトリプトファン)並びに小さいアミノ酸(グリシン、アラニン)の群内においてである。

10

【0067】

本発明のセンサー分子をコードする配列に加えて、核酸分子は、プライマー部位、転写因子結合部位、ベクター挿入部位及び核酸分解に抵抗する配列(例えば、ポリアデノシンテール)等の他の配列を含有し得る。核酸分子は、ポリヌクレオチドが本発明のタンパク質を合成するために翻訳され得る限り、DNA又はRNAであってよく、合成ヌクレオチドを含み得る。

【0068】

一部の実施形態では、核酸は、プラスミド等のベクターの一部を形成する。上に記載される核酸配列に加えて、プラスミドは、原核複製開始点(例えば、大腸菌(*E. coli*)OR1複製開始点)自己複製配列、セントロメア配列;核酸に作動可能に連結された、宿主細胞において核酸を発現できるプロモーター配列、核酸配列の下流に位置するターミネーター配列、抗菌薬耐性遺伝子及び/又は分泌シグナル配列等の他のエレメントを含む。自己複製配列を含むベクターは、酵母人工染色体でもある。一部の代替的実施形態では、ベクターは、バクテリオファージ等のウイルスであり、本発明の核酸配列に加えて、構造タンパク質、プロモーター、転写活性化等のバクテリオファージの複製のための核酸配列を含む。

20

【0069】

本発明の核酸又はベクターは、本開示のセンサー分子を合成するために宿主細胞をトランسفェクト又は形質転換するために使用され得る。好適な宿主細胞として、大腸菌(*E. coli*)等の原核細胞及び酵母細胞等の真核細胞、又は哺乳動物若しくは植物細胞株が挙げられる。宿主細胞は、電気穿孔法;リン酸カルシウムに基づく方法;微粒子錐技術又はウイルスベクターの使用によって等の当技術分野において周知の技術を使用してトランسفェクト又は形質転換される。

30

【0070】

トランسفェクション/形質転換後、本発明の核酸又はベクターは、必要に応じて転写され、翻訳される。一部の実施形態では、合成されたタンパク質は、例えば、ベクター中の分泌シグナルの存在のために細胞から分泌されることによって、又は宿主細胞の溶解及びそれからのタンパク質の精製によってのいずれかで宿主細胞から抽出される。一部の実施形態では、本明細書に定義されるセンサー分子を產生するための方法が提供され、方法は、本明細書に定義される宿主細胞又はベクターを、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で培養する工程、及び発現されたポリペプチドを回収する工程を含む。

40

【0071】

一部の実施形態では、センサーは、細胞不含有組成物として提供される。本明細書において使用される、用語「細胞不含有組成物」は、センサーを含み、あるとしてもごくわずかな未処置細胞を含有する単離された組成物を指す。細胞不含有組成物の例として、細胞(酵母細胞等)抽出物及び、単離された及び/又は組換えセンサー分子(タンパク質等)を含有する組成物が挙げられる。細胞から細胞不含有組成物を調製するための方法は、当技術分野において十分周知である。

【0072】

50

センサー分子は、任意選択で少なくとも1つのリンカーを含む。例えば、センサーは、炭水化物結合ドメイン(又は炭水化物結合ドメインを含むヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子)を化学発光ドナードメイン及び/又はアクセプタードメインに繋ぐリンカーを含み得る。別の例では、センサー分子は、センサー分子のN及び/又はC末端にリンカーを含み得る。一部の実施形態では、センサー分子は、少なくとも1つのペプチドリンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、炭水化物結合ドメイン(又は炭水化物結合ドメインを含むヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子)のN及び/又はC末端に位置していてよい。好ましくは、リンカーは、ペプチド又はポリペプチドである。一部の実施形態では、リンカーは、1つ又は複数のグリシン、セリン及び/又はスレオニン残基を含む。例えば、一部の実施形態では、リンカーは、GSSGGS(配列番号2)、GGSGGS(配列番号3)、GGTGGG(配列番号4)、GGGGGT(配列番号5)、LQGGTGGG(配列番号6)、FEGGTGGG(配列番号7)及びGSGGSL(配列番号8)から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、25アミノ酸以下、20アミノ酸以下、15アミノ酸以下、10アミノ酸以下、8アミノ酸以下、6アミノ酸以下、4アミノ酸以下又は3アミノ酸以下である。一部の実施形態では、リンカーは、長さ1から10アミノ酸の間、長さ2から9アミノ酸の間又は長さ4から8アミノ酸の間である。リンカー配列は、炭水化物結合ドメインのN末端、炭水化物結合ドメインのC末端又は両方に位置していてよい。リンカーがN及びC末端の両方に位置している場合、リンカー配列は、同じ又は異なっていてよい。理論に束縛されることなく、リンカーは、次の目的:(i)炭水化物結合部位が結合のための好ましいコンホメーションにあることを確実にすることを助ける;(ii)炭水化物結合部位の到達性を改善する;(iii)アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/若しくは双極子配向の変化の規模を増大させる(例えば、リンカー配列はBRET比を増加させるように機能できる);並びに/又は(iv)アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/若しくは双極子配向を最適化する、の1つ又は複数のために役立ち得る。

【0073】

一部の実施形態では、センサーは、プロテアーゼ切断部位及び/又は精製タグを更に含む。一部の実施形態では、リンカーは、精製並びに/又は化学発光ドナードメイン及び/若しくはアクセプタードメインの付着のために使用され得るアミノ酸又は一連のアミノ酸を含む。例えば、リンカーは、精製又は化学発光ドナードメイン及び/若しくはアクセプタードメインと自己アセンブリのためにヒスチジンタグを含み得る。別の例では、リンカーは、化学発光ドナードメイン及び/又はアクセプタードメインの付加のための反応基(例えばシステイン若しくはリジン)を含み得る。一部の実施形態では、センサーは、プロテアーゼ切断部位を含む。プロテアーゼ切断部位は、精製タグを除去するために使用され得る。

【0074】

本発明のポリペプチドは、天然ポリペプチドの產生及び回収、組換えポリペプチドの產生及び回収並びにポリペプチドの化学合成を含む種々の方法で產生され得る。一実施形態では、単離されたポリペプチドは、ポリペプチドを発現できる細胞を、ポリペプチドを產生するために有効な条件下で培養し、ポリペプチドを回収することによって產生される。有効な培養条件は、これだけに限らないが、ポリペプチド產生を可能にする有効培地、バイオリアクター、温度、pH及び酸素条件を含め、当業者によって決定され得る。有効培地は、細胞がポリペプチドを產生するように培養される任意の培地を指す。そのような培地は、同化炭素、窒素及びリン酸源、並びに好適な塩、ミネラル、金属及びビタミン等の他の栄養素を有する水性培地を典型的には含む。細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ及びペトリプレートにおいて培養され得る。培養は、組換え細胞のために好適な温度、pH及び酸素含有量で実行されてよい。そのような培養条件は、当業者の専門知識の範囲内である。

【0075】

本発明のポリペプチドは、当業者に周知の方法によって前記ポリペプチドを產生する植物、細菌又は酵母細胞等の組換え細胞から抽出及び精製され得る。一実施形態では、方法は、細胞/組織/植物をホモジナイズすることによって総可溶性タンパク質を抽出すること

10

20

30

40

50

、及びNi-NTA又はTalonを使用してヘキサヒスチジンポリペプチドを単離することを含む。追加的な精製は、従来のゲル又は親和性クロマトグラフィーを用いて達成され得る。

【0076】

炭水化物

本開示のセンサーは、炭水化物に結合できる。本明細書において使用される用語「炭水化物」は、広範に定義され、単糖類、オリゴ糖及び多糖並びに、例えばカルボニル基の還元(アルジトールを形成)による、1つ又は複数の末端基のカルボン酸への酸化による、又は水素原子、アミノ基、チオール基若しくは同様の基による1つ又は複数のヒドロキシ基の置き換えによる(誘導体を形成する)単糖類由来の物質も指す。これらの化合物の誘導体も含まれる(A. D. McNaught and A. Wilkinson. によって編集されたIUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)を参照されたい)。当業者が認識するとおり、炭水化物は、不斉中心を含有する場合があり、それにより立体異性体を有する。本開示のセンサー、方法、キット及び組成物において有用な炭水化物は、D-立体異性性及び/又はL型(鏡像異性体)形態のいずれである場合もある。鎖式及び閉環構造の両方が炭水化物の定義の範囲内である。

【0077】

一部の実施形態では、炭水化物は、糖又は糖誘導体である。

【0078】

一部の実施形態では、炭水化物は糖である。本明細書において使用される、用語「糖」は、少なくとも1つのヒドロキシ基及び少なくとも1つのアルデヒド基又はケトン基を含む、ポリヒドロキシアルデヒド及びポリヒドロキシケトンの両方を含む。一部の実施形態では、糖は、単糖類、オリゴ糖又は多糖類である。好適な単糖類として、トリオース(グリセルアルアルデヒド等)、テトロース(エリトロース及びトレオース等)、ペントース(リブロース、アラビノース、キシロース、リボース及びリキソース等)、ヘキソース(グルコース、マンノース、ガラクトース、イドース、グロース、フルクトース、アルトロース(altrrose)、アロース、フコース及びタロース(talose)等)、ヘプトース(セドヘプツロース等)、オクトース(グリセロ-D-マンノ-オクトロース等)並びにペントース環糖(リボフラノース及びリボピラノース等)が挙げられる。一部の実施形態では、単糖類は、リボース、グルコース、マンノース、ガラクトース及びフルクトースからなる群から選択される。本明細書において使用される「オリゴ糖」は、グリコシド結合によって連結された2個から10個の間の糖類を含有する糖類ポリマーである。一部の実施形態では、オリゴ糖は、2個、3個、4個、5個、6個、7個8個、9個又は10個の糖類を含む。例えば、オリゴ糖として、これだけに限らないが、二糖又は三糖が挙げられる。適切なオリゴ糖として、これだけに限らないが、ショ糖、乳糖、ラクトース、トレハロース、ゲンチオビオース、マルトース、イソマルトース、セロビオース メレジトース、ラフィノース、スタキオース、セロトリオース、メリビオース及びベルバスコースが挙げられる。好適なオリゴ糖として、これだけに限らないが、ショ糖、乳糖、トレハロース、ゲンチオビオース、マルトース、イソマルトース、セロビオース メレジトース、ラフィノース、スタキオース、セロトリオース、メリビオース及びベルバスコースが挙げられる。一部の実施形態では、炭水化物は二糖である。一部の実施形態では、炭水化物は乳糖又はラクトースである。一部の実施形態では、炭水化物は乳糖である。一部の実施形態では、炭水化物はラクトースである。好ましい実施形態では、炭水化物は乳糖である。多糖は、単糖類又はオリゴ糖がグリコシド結合を介して合わせて化学的に連結されている糖である。好適な多糖として、これだけに限らないが、アミロース、アミロペクチン及びグリコーゲンが挙げられる。

【0079】

一部の実施形態では、炭水化物は、糖誘導体である。本明細書において使用される、「糖誘導体」は、1つ又は複数のヒドロキシ基をさまざまな置換基を用いて置き換えで修飾されている糖、又は糖の酸化還元反応によって得られた糖変種を指す。好適な置換基とし

10

20

30

40

50

て、これだけに限らないが、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アルケニル、置換アルケニル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、炭素環式基、置換炭素環式基、複素環式基、置換複素環式基、ハロゲン、ヒドロキシ、置換ヒドロキシ、チオール、置換チオール、シアノ、ホスホ、置換ホスホ、ニトロ、アミノ、置換アミノ、カルボキシ、置換カルボキシ、アシリ、置換アシリ、チオカルボキシ、置換チオカルボキシ、アミド、置換アミド、置換カルボニル、置換チオカルボニル、置換スルホニル及び置換スルフィニルが挙げられる。一部の実施形態では、糖誘導体は、糖アルコール(アルジトール又はアルドースアルコールとも称される)、ケトース、アミノ糖(又はグリコシルアミン)、デオキシ糖、糖リン酸、酸性糖、グリコシド及びラクトンからなる群から選択される。好適な糖アルコールとして、これだけに限らないが、エリスリトール、グルシトール、ソルビトール又はマンニトールが挙げられる。適切なケトースとして、これだけに限らないが、ジヒドロキシアセトン、エリトルロース(erythulose)、リブロース、キシリロース、プシコース(psicose)、フルクトース、ソルボース及びタガトースが挙げられる。好適なアミノ糖として、これだけに限らないが、グルコサミン、ガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、ムラミン酸、N-アセチルムラミン酸及びN-アセチルノイラミン酸(シアル酸)が挙げられる。好適なグリコシドとして、これだけに限らないが、グルコピラノース及びメチル-グルコピラノースが挙げられる。好適なラクトンとして、これだけに限らないが、グルコノラクトンが挙げられる。好適なデオキシ糖として、これだけに限らないが、デオキシリボース及びラムノースが挙げられる。好適な糖リン酸として、これだけに限らないが、グルコース6-リン酸、フルクトース6-リン酸、エリトロース4リン酸、リボース5-リン酸、フルクトース-1,6-ビスホスフェート及びキシリロース5-リン酸が挙げられる。

【0080】

一部の実施形態では、炭水化物は、単糖類由来の物質である。一部の実施形態では、炭水化物は、カルボニル基の還元によって、又は1つ又は複数の末端基のカルボン酸への酸化によって単糖類に由来する物質である。例えば、単糖類由来の物質は、これだけに限らないが、アルジトール(エリスリトール、グルシトール、ソルビトール又はマンニトール等)及び糖酸(グルコン酸、マンノン酸、トレオノン酸及びグリセリン酸等)であり得る。一部の実施形態では、単糖類由来の物質は、乳酸及びピルビン酸からなる群から選択される。

【0081】

炭水化物結合ドメイン

本明細書において使用される「炭水化物結合ドメイン」は、炭水化物に結合できるポリペプチドである。炭水化物結合ドメインは、炭水化物に結合する少なくとも1つの結合部位を含む。用語「炭水化物への結合」は、炭水化物結合ドメインへの炭水化物の非共有結合を指す。そのような結合は、炭水化物と炭水化物結合ドメインとの間の塩橋、水素結合、ファンデルワールス力(van der Waal force)、スタッキング力、複合体形成又はこれらの組合せ等の非共有結合性相互作用を含み得る。結合部位における水分子との相互作用も含み得る。

【0082】

好適な炭水化物結合ドメインは、結合ドメインアミノ酸配列のみから成るポリペプチド鎖上に存在する場合がある、又は大きなポリペプチド分子(すなわち、結合ドメインのもの以外のアミノ酸を含むもの)に関連して存在する場合がある。したがって、炭水化物結合ドメインは、全長タンパク質(例えば、全長ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子)又はその断片(例えば、炭水化物結合ドメインを含むヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の断片)若しくは変種であってよい。炭水化物結合ドメインは、天然又は非天然アミノ酸配列のいずれかを含み得る。炭水化物への結合を維持し、本明細書に記載の炭水化物検出のために十分で好適であるコンホメーション変化を受ける炭水化物結合ドメインの最小限の長さは、当業者によって決定され得る。

【0083】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、天然に存在するポリペプチドである。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、天然に存在するポリペプチドの変種である。例えば、一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、炭水化物結合ドメイン配列がもはや天然で見出されるものとは異なるように変えられている(すなわち、場合により、少なくとも1つのアミノ酸又はヌクレオチドの挿入、欠失又は置換による)アミノ酸である。一部の実施形態では、変動の位置は、炭水化物結合ドメインを形成する残基内である。変種は、天然又は非天然アミノ酸配列のいずれかを含み得る。一部の実施形態では、変種炭水化物結合ドメインは、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の天然に存在する炭水化物結合ドメインと少なくとも30%同一のアミノ酸配列を含む。例えば、一部の実施形態では、変種炭水化物結合ドメインは、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の天然に存在する炭水化物結合ドメインと少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一又は少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、糖又は糖誘導体結合ドメインである。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、糖結合ドメインである。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、糖誘導体結合ドメインである。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、高親和性を有して炭水化物に結合する。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、1nM以下、10nM以下、50nM以下、100nM以下、500nM以下、1μM以下、10μM以下、50μM以下、100μM以下、500μM以下、1mM以下又は10mM以下の炭水化物濃度で最大半量の結合を有して炭水化物に結合する。例えば、一部の実施形態では、EC₅₀は、およそ0.1μMから150μMの間、およそ1μMから100μMの間又はおよそ5μMから50μMの間である。一部の実施形態では、EC₅₀は、およそ10μMから25μMの間である。代替的に、一部の実施形態ではEC₅₀は、およそ0.1mMから150mMの間、およそ1mMから100mMの間、およそ2mMから50mMの間又はおよそ2mMから5mMの間である。

【 0 0 8 6 】

炭水化物結合ドメインへの炭水化物の結合で、好適な炭水化物結合ドメインは、本明細書に記載の炭水化物検出のために十分で好適であるコンホメーション変化を受ける。

【 0 0 8 7 】

本開示のセンサーにおいて有用な炭水化物結合ドメインは、ヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)ドメイン(ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフとも称される)を含有する転写因子由来である。すなわち、センサーは、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の炭水化物結合ドメイン、又は炭水化物ドメインの変種を含む。一部の実施形態では、センサー分子は、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の炭水化物結合ドメイン、及びヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子に存在する1つ又は複数の追加的アミノ酸を含む。例えば、センサーは、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子に同様に存在する1つ又は複数の機能性ドメイン(例えば、DNA結合ドメイン)も含み得る。一実施形態では、ポリペプチドは、転写因子のヘリックス-ターン-ヘリックスドメインを欠いている。代替的実施形態では、ポリペプチドは、転写因子のヘリックス-ターン-ヘリックスドメインを有する。本明細書に記載のセンサーにおいて有用な任意の変種、一部又は断片は、炭水化物に結合する能力を保持している。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、炭水化物に結合するための開示されたタンパク質フォールドを含む。炭水化物に結合するタンパク質フォールドの非限定的例として、Nudixヒドロラーゼフォールド、炭水化物結合モジュール又はArac炭水化物認識ドメインが挙げられる。

【 0 0 8 8 】

一部の実施形態では、HTH転写因子は細菌性HTH転写因子である。一部の実施形態では

10

20

30

40

50

、HTH転写因子は、グラム陰性菌又はグラム陽性菌に由来し得る。そのようなHTH転写因子の例は、Table 1(表1)に示されている。Table 1(表1)に列挙されているHTH転写因子の天然に存在する種の変種も、本明細書において考察されるその変種又は断片に加えて使用され得る。Table 1(表1)に列挙されるHTH転写因子のホモログ(細菌の関連種由来のオルソログ等)も本明細書に記載のセンサー分子において使用され得る。更に、用語「HTH転写因子」が、任意の天然に存在するHTH転写因子の変種、一部、断片又は誘導体を含むことは、変種、一部、断片又は誘導体が炭水化物に結合する能力を保持している限り、検討される。当業者が、*in vitro*又は*in vivo*変異導入、PCRシャッフリング変異導入、化学修飾等の当技術分野において周知の好適な技術によって天然に存在するHTH転写因子を修飾及び最適化できることも理解される。

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

【表1】

Table 1. 例示的ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子

転写因子	糖又は糖誘導体	受託番号例 (UniProt から)
YvoA/NgaR	N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)/グルコサミン-6-リ ン酸	O34817, Q795E9,
TrmB	マルトース、トレハロース、 マルトトリオース、長いマル トデキストリン、ショ糖及び グルコース	Q7LYW4, Q9HGZ9, Q9HPW0
AraR	アラビノース	A2QJX5, Q5BGE2, P96711
AraC	アラビノース	P0A9E0, P96711
TreR	トレハロース-6-リン酸	P36673, P39796, P36674
MurQ	N-アセチルムラミン酸 (MurNAc)-6-リン酸	P76535, Q45582, Q8ZN25
LacI	アロラクトース	P03023,
BgaR	乳糖	Q8XMB9, BAB80476, Q6PU53, O52846, A0A069CWF6, H1X564, Q6PU52
EbgR	乳糖	P06846
CebR	セロビオース、セロトリオ ース	D2Q7B0, A0A173WKF3
CggR	フルクトース-1,6-二リン酸	O32253
FruR	D-フルクトース	P0ACP1, O31713
GalR	D-ガラクトース	E1WAQ4, Q9ZB11
GalS	ガラクトース、D-フコース	P25748, P41030
MalI	マルトース	P18811, P96158
MelR	メリビオース	P0ACH8, P0ACH9
RafR	ラフィノース	P21867, P43465
RbtR	D-リブロース	P07760
XylR	D-キシロース	P06519
ScrR	D-フルクトース	P37077, P37076
MsmR	メリビオース	O34829, Q00753
XylS	D-キシロース	P07859

10

20

30

40

【0090】

一部の実施形態では、HTH転写因子は、転写因子のG_{NT}Rファミリーのメンバーである。枯草菌(*Bacillus subtilis*)のグルコン酸オペロン抑制因子から名付けられたG_{NT}Rファミリーは、HTH転写因子の最も一般的なスーパーファミリーの1つである(Haydon and Guest, 1991; Zhengら、2009)。HTHタンパク質のこのファミリーは、DNA-結合ドメイン及びエフェクター結合ドメインを一般に有する(Aravind and Anantharaman, 2003; Rigaliら、2002; Rigaliら、2004)。DNA-結合ドメインは、このスーパーファミリーのメンバー内で比較的保存されており、中央の -シートクラスター及び3つの -ヘリックスがあり、ヘリックスのうちの2つは接続ループと共にHTHモチーフを構成している(Zheng

50

ら、2009; Rigaliら、2002; Kongら、2009)。対照的に、エフェクタードメインは、G_{NT}Rスーパーファミリー内で多様であり、それらの構造的相違は、G_{NT}R転写因子の6つのサブファミリー:4つの主なサブファミリー(FadR、HutC、MocR、YtrA)並びに2つの少数のサブファミリー(AraR及びPImA)を生じている(Zhengら、2009; Rigaliら、2002; Rigaliら、2004; Wiethausら、2008; Leeら、2003; Zhangら、2012; Francoら、2006; Francoら、2007)。エフェクタードメインは、典型的には分子、例えば炭水化物に結合する。典型的には、G_{NT}Rファミリーメンバーは、N末端DNA結合ドメイン及びC末端エフェクター結合を有する。しかし、AraRサブファミリーでは、DNA-結合ドメインは、典型的にはC末端に位置しており、エフェクター結合-ドメインはN末端に見出される。

【0091】

10

好適な細菌性HTH転写因子の一例はBgaRである。BgaRは、クロストリジウム・パーフリンジエンス(*Clostridium perfringens*(*perfringins*))株13由来の転写因子(CPE0770; UniProt受託番号:Q8XMB9)であり、AraRサブファミリーの推定メンバーである(Hartmannら、2011)。BgaRは、乳糖に結合し、乳糖誘導性制御系の一部を形成する。

【0092】

一部の実施形態では、センサーは、ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子BgaR又はその断片若しくは変種を含む。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号1として提供されるアミノ酸配列を含む、又はその断片若しくは変種である。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号1に提供されるものと少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、その一部(例えば、配列番号1のアミノ酸1~179、アミノ酸1~171、1-157、アミノ酸1~150、アミノ酸12~179、アミノ酸12~171、アミノ酸12~150、アミノ酸16~179、アミノ酸16~171、アミノ酸16~151又はアミノ酸16~129を含む部分)に少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号9として提供されるアミノ酸配列を含む、又は炭水化物結合活性を保持しているその断片若しくは変種である。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号9と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。

20

【0093】

30

BgaR(又は別のHTH転写因子)の最小限の炭水化物結合ドメインは、当業者に周知の技術を使用して決定され得る。例えば、本明細書に記載のタンパク質配列は、例えば、推定炭水化物結合ドメイン及び/又はHTHドメインを同定するために保存されたドメインデータベースに対する検索を実施するための「問い合わせ配列」として使用され得る(Marchler-Bauerら、2017; Marchler-Bauerら、2015; Marchler-Bauerら、2011; Marchler-Bauer and Bryant, 2004)。保存されたドメインデータベースを使用して保存されたドメインについて検索する場合、初期設定パラメーターは、使用され得る。<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>を参照されたい。炭水化物に結合するための予測炭水化物結合ドメインの能力は、当業者に周知の技術を使用して確認され得る。

40

【0094】

一部の実施形態では、BgaRの炭水化物結合ドメインは、配列番号1のアミノ酸1~179、アミノ酸1~171、アミノ酸1~157、アミノ酸1~150、アミノ酸(amino amino acids)12~179、アミノ酸12~171、アミノ酸12~157、アミノ酸12~150、アミノ酸16~179、アミノ酸16~171、アミノ酸16~157、アミノ酸16~151(acids 16-151)又はアミノ酸16~129を含む。一部の実施形態では、BgaRの炭水化物結合ドメインは、配

50

列番号1のアミノ酸1～150、アミノ酸1～171、アミノ酸1～179、アミノ酸12～171又はアミノ酸12～150を含む。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号1のアミノ酸1～157、アミノ酸16～151又はアミノ酸16～129と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号1のアミノ酸1～150、アミノ酸1～171、アミノ酸12～150又はアミノ酸12～171と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号9として提供されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号9に提供されるものと少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号9の一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一である、又は配列番号9の一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を有する。
。

【0095】

他の好適な転写因子は、BLASTp等のツールを使用して当業者によって同定され得る。例えば、一部の実施形態では、転写因子は、BgaRの炭水化物結合ドメイン(例えば、配列番号9のアミノ酸又はアミノ酸1～179、アミノ酸1～171、アミノ酸1～150、アミノ酸12～179、アミノ酸12～171又はアミノ酸12～150)と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む炭水化物結合ドメインを含む。好適な転写因子として、これだけに限らないが、クロストリジウム・パーフリンジエンス(*Clostridium perfringens*)由来推定乳糖オペロン転写活性化因子(UniProt受託番号: A0A133MUX6)、AraCファミリー転写制御因子(クロストリジウム・パーフリンジエンスD株JGS1721)(UniProt受託番号: B1V7N0)、AraC ファミリー転写制御因子(クロストリジウム・パーフリンジエンス)(UniProt受託番号: A0A127EGD8)、アラビノースオペロン制御タンパク質(無培養クロストリジウム種)(UniProt受託番号: A0A1C6JUB7)、転写制御因子(クロストリジウム・ディスポリカム(*Clostridium disporicum*))(UniProt受託番号: A0A174HYB7)、アラビノースオペロン制御タンパク質(無培養クロストリジウム種)(UniProt受託番号: A0A1C6KY47)、転写制御因子(クロストリジウム・ディスポリカム)(UniProt受託番号: A0A174LZQ7)、AraCファミリー転写制御因子(クロストリジウム・パラブトリフィクム(*Clostridium paraputrificum*))(UniProt受託番号: A0A174I591)、特徴付けられていないタンパク質(クロストリジウム・ブチリクム(*Clostridium butyricum*) 60E.3)(UniProt受託番号: N9YR91)、AraCファミリー転写制御因子(クロストリジウム・ネオナタル(*Clostridium neonatale*))(UniProt受託番号: A0A2A7ME67)、AraCファミリー転写制御因子(スタフィロコッカス・インターメディウス(*Staphylococcus intermedius*) NCTC 11048)(UniProt受託番号: A0A2K4AZL9)、AraCファミリー転写制御因子(スタフィロコッカス・シードインターメディウス(*Staphylococcus pseudintermedius*))(UniProt受託番号: A0A166PPM9)、AraCファミリー転写制御因子(スタフィロコッカス・ヒカス(*Staphylococcus hyicus*))(UniProt受託番号: A0A2T4R7G1)、AraCファミリー転写制御因子(スタフィ

10

20

30

40

50

ロコッカス・デルフィニ(*Staphylococcus delphini*))(UniProt受託番号: A0A2A4HCU9)、AraCファミリー転写制御因子(スタフィロコッカス・アグネティス(*Staphylococcus agnetis*))(UniProt受託番号: A0A2T4MS83)、乳糖オペロン転写活性化因子(スタフィロコッカス・キシロサス(*Staphylococcus xylosus*))(UniProt受託番号: O33813)、乳糖オペロン転写活性化因子(スタフィロコッカス・サプロフィチカス(*Staphylococcus saprophyticus*))(UniProt受託番号: A0A1D4LKB2)、推定乳糖オペロン転写活性化因子(スタフィロコッカス・シミュラヌス(*Staphylococcus simulans*))(UniProt受託番号: A0A133QVV5)、転写制御因子、AraCファミリー(ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)亜種ラクティス株KF147)(UniProt受託番号: A9QSR3)が挙げられる。

【0096】

10

一部の実施形態では、センサーは、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54及び配列番号55に提供されるアミノ酸配列からなる群から選択される又はその断片若しくは変種であるアミノ酸配列を含む転写因子を含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54若しくは配列番号55に提供されるものと少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一である又はその断片若しくは変種であるアミノ酸配列を有する転写因子を含む。

【0097】

20

一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73若しくは配列番号74に提供されるアミノ酸配列からなる群から選択される又はその断片若しくは変種であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、炭水化物結合ドメインは、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73若しくは配列番号74に提供されるアミノ酸配列と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一である又はその断片若しくは変種であるアミノ酸配列を有する。

30

【0098】

40

一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27若しくは配列番号28のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部(例えば、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27又は配列番号28のいずれか1つのアミノ酸11～349、アミノ酸18～349、アミノ酸28～349、アミノ酸38～349又はアミノ酸39～349を含む部分)と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号15、配列番号16、配

50

列番号17若しくは配列番号18のいずれか1つに示される配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部(例えば、配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号18のいずれか1つのアミノ酸11～349、アミノ酸18～349、アミノ酸28～349、アミノ酸38～349又はアミノ酸39～349を含む部分)と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号25、配列番号26、配列番号27若しくは配列番号28のいずれか1つに示される配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又はその一部(例えば、配列番号25、配列番号26、配列番号27又は配列番号28のいずれか1つのアミノ酸11～349、アミノ酸18～349、アミノ酸28～349、アミノ酸38～349又はアミノ酸39～349を含む部分)と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。
10

【0099】

一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22からなる群から選択される配列又はその断片若しくは変種を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22のいずれか1つに示される配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又は配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22のいずれか1つの一部と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32からなる群から選択される配列又はその断片若しくは変種を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22のいずれか1つに示される配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又は配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のいずれか1つの一部と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32からなる群から選択される配列又はその断片若しくは変種を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22のいずれか1つに示される配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列、又は配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のいずれか1つの一部と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一の配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む。
20

【0100】

本開示のセンサー、組成物、方法及び使用は、指定の配列又はそれに実質的に同一若しくは類似の配列、例えば指定の配列と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%若しくはそれより高く同一の配列を有するポリペプチド及び核酸を包含する。アミノ酸配列の文脈では、用語「実質的に同一」は、第1の及び第2のアミノ酸配列が共通構造ドメイン及び/又は共通機能活性を有し得るように、第2のアミノ酸配列中のアラインしたアミノ酸残基とi)同一である、又はii)保存的置換である十分な又は最小限の数のアミノ酸残基を含有する、第1のアミノ酸を指して使用される。例えば、指定の配列に少なくとも
30

10

20

30

40

50

約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%又は100%同一性を有する共通構造ドメインを含有するアミノ酸配列は、実質的に同一と称される。

【0101】

共鳴エネルギー転移

乳糖等の炭水化物の本開示のセンサーへの結合は、これだけに限らないが、生物発光共鳴エネルギー転移(「BRET」)及び蛍光共鳴エネルギー転移(「FRET」)を含む共鳴エネルギー転移(RET)における変化を生じ得る。

【0102】

本明細書において使用される、「BRET」は、生物発光タンパク質ドナーとアクセプターワンとの間のエネルギーの非輻射転移に基づく近接アッセイである。「生物発光共鳴エネルギー転移」及び「BRET」は、互換的に使用される。

10

【0103】

本明細書において使用される、「FRET」は、2つのクロモフォア、例えば、2つのフルオロフォア間のエネルギーの非輻射転移に基づく近接アッセイである。「FRET」及び「蛍光共鳴エネルギー転移」は、互換的に使用される。

【0104】

一態様では、センサー分子は、転写因子又はその断片若しくは変種に共有結合的に結合したドナードメイン及びアクセプタードメインを含む。一部の実施形態では、ドナードメインは化学発光ドナードメインである。代替的実施形態では、ドナードメインは、フルオロフォアである。一部の実施形態では、アクセプタードメインは、フルオロフォア等の蛍光アクセプタードメインである。

20

【0105】

一部の実施形態では、ドナードメインは、転写因子又はその断片若しくは変種のN末端に共有結合的に結合されており、アクセプタードメインは、転写因子又はその断片若しくは変種のC末端に共有結合的に結合されている。代替的実施形態では、ドナードメインは、転写因子又はその断片若しくは変種のC末端に共有結合的に結合されており、アクセプタードメインは、転写因子又はその断片若しくは変種のN末端に共有結合的に結合されている。

【0106】

A. ドナードメイン

30

本開示のセンサー分子は、ドナードメインを含む。ドナードメインは、共鳴エネルギー転移対において(例えば、BRET対において又はFRET対において)ドナードメインとして作用でき、文脈に応じて、本明細書において「共鳴エネルギー転移ドナードメイン」とも称される。本明細書において使用される、用語「ドナー」は、光を放射する分子、例えば、ある特定の波長の光を用いて照射された場合に光を放射する分子、又は化学反応の結果として光の放射を生じる分子を意味する。好適なドナードメインとして、化学発光ドメイン及び蛍光ドメインが挙げられる。

【0107】

一部の好ましい実施形態では、ドナードメインは、BRET対においてドナードメインとして役立つことができる。例えば、ドナードメインは、化学発光ドナードメインであってよい。化学発光は、化学的反応の結果としての、熱の限定的な放射を伴うエネルギーの放射である(発光)。用語「化学発光」は、本明細書において、酵素の活性に依る生物発光を包含して使用される。非酵素的化学発光は、触媒の存在下での有機色素と酸化剤との間の化学的反応の結果である。化学発光放射は、有機色素の励起状態からのエネルギーとして生じ、化学的に誘導され、基底状態に減衰する。化学発光放射の持続時間及び強度は、反応溶液中に存在する化学試薬の量に主に依存する。

40

【0108】

好ましい実施形態では、化学発光ドナードメインは、生物発光タンパク質である。本明細書において使用される、用語「生物発光タンパク質」は、発光を生じる好適な基質に作用できる任意のタンパク質を指す。

50

【0109】

生物発光タンパク質が、基質を、緩和された場合にエネルギーを放つ活性化産生物に転換する酵素であることは理解される。活性化産生物(基質への生物発光タンパク質の活性によって生成される)は、アクセプター分子に転移される生物発光タンパク質生成発光の供給源である。

【0110】

本発明において使用され得る多数の異なる生物発光タンパク質がある(例えば、Table 2 (表2)を参照されたい)。光放射系は、周知であり、細菌、プロトゾア、腔腸動物、軟体動物、魚、ヤスデ、ハエ目(fly)、真菌、ワーム(worm)、甲殻類及び甲虫、具体的にはピロフォルス(*Pyrophorus*)属のコメツキムシ及びフォティヌス(*Photinus*)、フォツリス(*Photuris*)及びルシオラ(*Luciola*)属のホタルが挙げられる多数の発光生物から単離されている。生物発光を示す追加的生物は、WO 00/024878、WO 99/049019及びViviani (2002)に列挙されている。

【0111】

10

20

30

40

50

【表 2 A】

Table 2. 例示的生物発光タンパク質

種	名称	生物	MW kDa $\times 10^{-3}$	放射 (nm)	基質の例
昆虫	FFluc	フォティヌス・ピラリス (<i>Photinus pyralis</i>) (北アメリカホタル)	~61	560	D-(-)-2-(6'-ヒドロキシベンゾチアゾリル)-D ² -チアゾリン-4-カルボン酸、 HBTTCA(C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂)(ルシフェリン)
昆虫	FF'luc	ゲンジボタル (<i>Luciola cruciate</i>) (日本のホタル)		560~590 (多数の変異体)	ルシフェリン
昆虫		フェンゴジドビートル (Phengodid beetle) (レイルロードワーム)			
昆虫		アラキノカンパ種 (<i>Arachnocampa spp</i>)			ルシフェリン
昆虫		オルフェリア・フルトニ (<i>Orphelia fultoni</i>) (北アメリカグローワーム)			

10

20

30

40

【0112】

50

【表 2 B】

昆虫	Clluc	ピロフォラス・プラ ギオフタラムス (<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>) (コメツキムシ)		546、560 、578 及 び 593	ルシフェリン	10
クラゲ	エクオ リン	オワシクラゲ (<i>Aequorea</i>)	44.9	460~470	セレンテラジン	
シーパン ジー	RLuc	レニラ・レニフォル ミス (<i>Renilla reniformis</i>)	36	480	セレンテラジン	
シーパン ジー(修飾)	RLuc8	レニラ・レニフォル ミス(修飾)	36	487(ピー ク)	セレンテラジン /Deep Blue C	20
シーパン ジー(修飾)	RLuc2	レニラ・レニフォル ミス (修飾) M185V/Q235A)	36	480	セレンテラジン	
シーパン ジー(修飾)	RLuc8. 6-535	レニラ・レニフォル ミス(修飾)	36	535	セレンテラジン	
シーパン ジー	Rmluc	レニラ・ムレレイ (<i>Renilla mullerei</i>)	36.1	~480	セレンテラジン	30
シーパン ジー		レニラ・コリケリ (<i>Renilla kollikeri</i>)				
甲殻類 (エビ)	Vluc	ウミホタル (<i>Vargula hilgendorfi</i>)	~62	~460	セレンテラジン	
甲殻類 (Crustacea)	CLuc	ウミホタル (<i>Cypridina</i>) (海螢)	75	465	セレンテラジン /ウミホタルル シフェリン	40

【0113】

【表 2 C】

渦鞭毛藻類 (Dinofagellate)(海藻)		ゴニアルラクス・ボリエドラ(<i>Gonyaulax polyedra</i>)	130	~475	テトラピロール
軟体動物		ラティア(<i>Latia</i>) (淡水カサガイ)	170	500	エノールホルメート、テルペン、アルデヒド
ヒドロイド		オベリア・ビカスピダタ (<i>Obelia bicuspidata</i>)	~20	~470	セレンテラジン
エビ		オプロフォーラス・グラシリロストリス (<i>Oplophorus gracilorostris</i>)	31	462	セレンテラジン
エビ		オプロフォーラス・グラシリロストリス (NanoLuc)	19	~460	フリマジン
その他	Ptluc	プチロサルカス (<i>Ptilosarcus</i>)		~490	セレンテラジン
	Gluc	ガウシア	~20	~475	セレンテラジン
	Plluc	プレウロマンマ (<i>Pleuromamma</i>)	22.6	~475	セレンテラジン

【0114】

任意の好適な生物発光タンパク質は、本開示のセンサーにおいて使用され得る。1つの非常によく知られた例は、特定の生化学物質、ルシフェリン(天然に存在するフルオロフォア)がルシフェラーゼ活性を有する酵素によって酸化されるエネルギー産生化学反応を触媒するルシフェラーゼとして周知のクラスのタンパク質である(Hastings, 1996)。多種多様な生物、細菌、藻類、真菌、昆虫、魚及び他のマリンフォームの種を含む原核生物及び真核生物の両方は、この様式で光エネルギーを放射することができ、それぞれ、他の生物のものと化学的に異なる特異的なルシフェラーゼ活性及びルシフェリンを有する。ルシフェリン/ルシフェラーゼ系は、形態、化学及び機能において非常に多様である。そのため、ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質は、種々の供給源から又は種々の手段によって入手可能である。ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質の例は、US 5,229,285、US 5,219,737、US 5,843,746、US 5,196,524及びUS 5,670,356において見出すことができる。2つの最も広く使用されているルシフェラーゼは:(i)ウミシイタケ

10

20

30

40

50

ルシフェラーゼ(R.ニレフォルミス由来)、35kDaタンパク質、基質としてセレンテラジンを使用し、480nmの光を放射する(Lorenzら、1991);及び(ii)ホタルルシフェラーゼ(フォティヌス・ピラリス由来)、61kDaタンパク質、基質としてルシフェリンを使用し、560nmの光を放射する(de Wetら、1987)である。

【0115】

ガウシアルシフェラーゼ(ガウシア・プリンセプス(*Gaussia princeps*)由来)は、生化学アッセイにおいて使用されている(Verhaegenら、2002)。ガウシアルシフェラーゼは、急速な反応でセレンテラジンを酸化し、470nmに明るい光放射を生じる20kDaタンパク質である。

【0116】

本発明のために有用なルシフェラーゼは、ヒカリキノコバエ(*Anachnocampa*)種からも特徴付けられている(WO 2007/019634)。これらの酵素は、大きさ約59kDaであり、スペクトラムの青色部分内に放射スペクトルを有する発光反応を触媒するATP依存性ルシフェラーゼである。

【0117】

天然に存在する生物発光タンパク質の生物学的に活性な変種又は断片は当業者によって容易に產生され得る。本発明のために有用なそのような変種の3種の例は、ウミシイタケルシフェラーゼのそれぞれ変種であるRLuc2(Loeningら、2006)、RLuc8(Loeningら、2006)及びRLuc8.6-535(Loeningら、2007)である。更に好ましい実施形態では、BRET化学発光ドナーの配列は、天然ウミシイタケルシフェラーゼセンサーを組み込んでいるセンサー分子よりも大きな熱安定性を有するように選択される。RLuc2又はRLuc8は、天然ウミシイタケルシフェラーゼ配列を組み込んでいるセンサーよりも 5x又は 10x高い発光を結果として呈する、好適な選択の好都合な例である。そのような増強された発光は、任意の所与の時間分解能のための試薬の更に有効な利用を可能にすることから顕著な利益を有する。

【0118】

代替的に、本発明において使用され得る非ルシフェラーゼ、生物発光タンパク質は、発光シグナルを発生させる好適な基質に作用できる任意の酵素である。そのような酵素の具体的な例は、-ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-グルクロニダーゼ及び-グルコシダーゼである。これらの酵素のための合成発光基質は、当技術分野において十分周知であり、Tropix Inc.社(Bedford、MA、USA)等の企業から商業的に入手できる。

【0119】

本発明のために有用なペルオキシダーゼの例は、Hushpulianら、(2007)によって記載されている。

【0120】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-グルクロニダーゼ又は-グルコシダーゼである。一部の実施形態では、生物発光タンパク質はルシフェラーゼである。好適なルシフェラーゼとして、これだけに限らないが、ウミシイタケルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ(例えはPpyRE8、PpyRE10)、腔腸動物ルシフェラーゼ、北アメリカグローワームルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、レイルロードワームルシフェラーゼ、細菌性ルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ、エクオリン、アラキノカンパルシフェラーゼ、オプロフォラス・グラシリロストリスルシフェラーゼ或いはそのいずれか1つの生物学的に活性な変種若しくは断片又は2つ以上のキメラが挙げられる。一例では、好ましいルシフェラーゼは、RLuc8又はその変種である。

【0121】

本明細書において使用される、「生物学的に活性な断片」は、全長ポリペプチドの定義された活性を維持している本明細書に記載のポリペプチドの一部である。本明細書において使用される「生物学的に活性な変種」は、天然に存在する及び/又は定義された分子から

10

20

30

40

50

1つ又は複数のアミノ酸が異なるが、生物学的に活性な断片について上に定義された等の定義された活性を維持している分子である。生物学的に活性な変種は、典型的には、天然に存在する及び/又は定義された分子と最も少なくて50%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、更により好ましくは少なくとも99%同一である。

【0122】

好ましい実施形態では、低分子量を有する生物発光タンパク質は、立体傷害による相互作用の阻害を防ぐために使用される。生物発光タンパク質は、好ましくは単一のポリペプチド鎖からなる。同様に生物発光タンパク質は、オリゴマー又は凝集物を好ましくは形成しない。生物発光タンパク質ウミシイタケルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ及びホタルルシフェラーゼは、これらの基準のすべて又は大部分に合致する。

10

【0123】

一部の実施形態では、化学発光ドナードメインは、基質を修飾できる。本明細書において使用される、用語「基質」は、発光を発生させる又は吸収する化学発光ドナーと併せて使用され得る任意の分子を指す。基質の選択は、化学発光ドナーによって発生させる光の波長及び強度に影響を与える。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、フリマジン又はセレンテラジン、ルシフェリン若しくはフリマジンの誘導体、類似物若しくは安定化誘導体から選択される基質を有する。

【0124】

セレンテラジンは、刺胞動物、カイアシ類、毛顎動物、有動物、十脚類エビ、アミ(msid shrimp)、放散虫(radiolarians)及び一部の魚分類群に存在する広く知られた基質である(Greer and Szalay, 2002)。ウミシイタケルシフェラーゼについて、例えば、418から547nmの間に光放射を生じるセレンテラジン類似物/誘導体は利用可能である(Inouyeら、1997, Loeningら、2007)。セレンテラジン類似物/誘導体(400A、DeepBlueC)は、ウミシイタケルシフェラーゼを用いて400nmに光を放射すると記載されている(WO 01/46691)。セレンテラジン類似物/誘導体の他の例は、EnduRen、Prolume purple、Prolume purple II、Prolume purple III、ViviRen及びフリマジンである。セレンテラジン類似物/誘導体の他の例として、これだけに限らないが、PCT/US2013057660及びUS20140302539において開示されている化合物が挙げられる。

20

【0125】

本明細書において使用される、用語「ルシフェリン」は、広範に定義され、生物発光できる生物において見出される光を放射する生物学的ピグメント並びに、酵素ルシフェラーゼの存在下でオキシルシフェリン及び光の形態でのエネルギーを産生するように酸化される合成類似物又は機能的に等価な化学物質を指す。D-ルシフェリン、又は2-(6-ヒドロキシベンゾチアゾル-2-イル)-2-チオアゾリン-4-カルボン酸は、ホタル、フォティヌス・ピラリスから最初に単離された。それ以降、ルシフェリンの種々の化学に異なる形態は、種々の異なる生物から、主に海、例えば魚及びイカから発見され、研究されたが、多くは陸上生物、例えば、ワーム、甲虫及び種々の他の昆虫において同定されている(Dayら、2004; Viviani, 2002)。本明細書において使用される、ルシフェリンは、ルシフェリンの誘導体又は類似物も含む。

30

【0126】

サイクリックアルキルアミノルシフェリン(CycLuc1)等の完全に合成のルシフェリンに加えて、それぞれ化学的に異なり、広範な異なる補助因子を使用する化学的に及び構造的に異なるルシフェラーゼによって触媒される、少なくとも5個の一般的な種類の生物学的に進化したルシフェリンがある。第1は、ホタルルシフェリン、ホタルルシフェラーゼの基質であり、触媒のためにATPを必要とする(EC 1.13.12.7)。第2は、細菌性ルシフェリンであり、一部のイカ及び魚においても見出され、長鎖アルデヒド及び還元リン酸リボフラビンからなる。細菌性ルシフェラーゼは、FMNH依存性である。第3は、夜間の海のリン光の原因である生物、渦鞭毛藻類(海洋プランクトン)において見出される渦鞭毛藻類ルシフェリン、テトラピロールクロロフィル誘導体である。渦鞭毛藻類ルシフェラーゼは、

40

50

渦鞭毛藻類ルシフェリンの酸化を触媒し、3つの同一の触媒的に活性なドメインからなる。第4は、ある種のカイムシ及び深海魚、例えば、ポリクチス(*Porichthys*)において見出されるイミダゾロピラジンヴァルグリンである。最後は、放散虫、有 動物、刺胞動物、イカ、カニアシ類、毛顎動物、魚及びエビにおいて見出されるタンパク質エクオリンの光放射体、セレンテラジン(イミダゾールピラジン)である。

【0127】

一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、補助因子を必要とする。補助因子の例として、必ずしも限定されずにATP、マグネシウム、酸素、 FMNH_2 、カルシウム又はこれらの任意の2つ以上の組合せが挙げられる。

【0128】

さらなる実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは蛍光ドナードメインである。蛍光ドナードメインは、蛍光タンパク質であってよい、又はタンパク質でなくてよい。一部の実施形態では、蛍光ドナードメインは、タンパク質ではない。ドナードメインとしての使用のために好適であるフルオロフォアの非限定的例として、これだけに限らないが、Alexa Fluor色素(例えばAF680、AF750)、Bodipy色素、Cy色素、フルオレセイン、ダンシル、ウンベリフェロン、蛍光ミクロスフェア、発光ミクロスフェア、蛍光ナノクリスタル、マリーナブルー(Marina Blue)、カスケードブルー(Cascade Blue)、カスケードイエロー(Cascade Yellow)、パシフィックブルー、オレゴングリーン、テトラメチルローダミン、ローダミン、テキサスレッド、希土類元素キレート又はこれらの任意の組合せ若しくは誘導体が挙げられる。

10

【0129】

一部の実施形態では、ドナードメインは、蛍光タンパク質である。非限定的例として、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアン蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP (EGFP)、高感度CFP (ECFP)、高感度YFP (EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP (dEGFP)、不安定化ECFP (dECFP)、不安定化EYFP (dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、t-ダイマー2 (12)、mRFP1、ポシロポリン、ウミシイタケGFP、モンスターGFP、paGFP、TdTomato、mCherry、Kaedeタンパク質、TagRFP、TurBoF B若しくはフィコビリンタンパク質、又はこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種若しくは断片等のタンパク質が挙げられる。一部の実施形態では、好ましい蛍光ドナードメインはCFPである。

20

【0130】

B. アクセプタードメイン

本開示のセンサー分子はアクセプタードメインも含む。アクセプタードメインは、共鳴エネルギー転移対において(例えば、BRET対又はFRET対において)アクセプタードメインとして作用でき、文脈に応じて、本明細書において「共鳴エネルギー転移アクセプタードメイン」とも称される。本明細書において使用される、「アクセプタードメイン」は、ドナードメインの活性の結果として放射されるエネルギーを受容できる任意の分子である。

30

【0131】

一部の実施形態では、アクセプタードメイン(本明細書において「アクセプター分子」とも称される)は、蛍光アクセプタードメインである。本明細書において使用される、用語「蛍光アクセプタードメイン」(本明細書において「蛍光アクセプター分子」とも称される)は、ドナードメインの活性の結果として放射させたエネルギーを受容でき、光エネルギーとして再び放射することができる任意の化合物を指す。

40

【0132】

本発明において使用され得る多数の異なるアクセプタードメインがある。好適なアクセプタードメインは、タンパク質又は非タンパク質性である場合がある。

【0133】

一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、蛍光タンパク質である。1つの非常によく知られた例は、クラゲ、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)由来の緑色蛍光タン

50

パク質及び、分子生物学、例えば変異導入及びキメラタンパク質技術(Tsien, 1998)の応用から生じる多数の他の変種(GFP)を含むフルオロフォア群である。GFPは、それらのクロモフォアの特徴的な成分に基づいて分類され、各クラスは、別個の励起及び放射波長を有する: クラス1、中性フェノールとアニオン性フェノレートとの野生型混合物: クラス2、フェノレートアニオン: クラス3、中性フェノール: クラス4、スタッカされたs電子系を含むフェノレートアニオン: クラス5、インドール: クラス6、イミダゾール: 及びクラス7、フェニル。

【0134】

変異された天然に存在するアクセプター分子(変種)も本発明のために有用であり得る。BRETのために好適である操作系の一例は、媒介タンパク質(この場合、Gタンパク質共役アクセプター)の非存在下で、単独では互いに顕著な程度に直接相互作用しない、ウミシイタケルシフェラーゼとGFPの高感度黄色変異体(EYFP)との対形成である(Xuら、1999)。

10

【0135】

例として、これだけに限らないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアン蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dEGFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2、t-ダイマー2(12)、mRFP1、ボシロポリン、ウミシイタケGFP、モンスターGFP、paGFP、Kaedeタンパク質、TdTomato、mCherry、TagRFP、TurBoFB若しくはフィコビリンタンパク質、又はこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変種若しくは断片が挙げられる。一部の実施形態では、好ましい蛍光アクセプタードメインはGFP²である。他の実施形態では、好ましい蛍光アクセプタードメインはYFPである。

20

【0136】

一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、タンパク質ではない。タンパク質ではないアクセプター分子の例として、これだけに限らないが、Alexa Fluor色素(例えばAF680、AF750)、Bodipy色素、Cy色素、フルオレセイン、ダンシル、ウンベリフェロン、蛍光ミクロスフェア、発光ミクロスフェア、蛍光ナノクリスタル、マリーナブルー、カスケードブルー、カスケードイエロー、パシフィックブルー、オレゴングリーン、テトラメチルローダミン、ローダミン、テキサスレッド、希土類元素キレート又はこれらの任意の組合せ若しくは誘導体が挙げられる。

30

【0137】

C. ドナードメイン及びアクセプタードメイン対

任意の数のドナー-アクセプター組合せは、本発明のセンサーにおいて使用され得る。ドナーアクセプター組合せは、BRET対又はFRET対として役立つことが可能であるべきである。当業者は、効率的なエネルギー転移を可能にするドナー及びアクセプター対を選択することができる。

【0138】

好ましい実施形態では、炭水化物の存在及び/又は非存在下でのドナードメインとアクセプタードメインとの分離及び相対配向は、フォルスター距離の±50%以内である。本明細書において使用される、用語「炭水化物の存在及び/又は非存在下でのドナードメインとアクセプタードメインとの分離及び相対配向は、フォルスター距離の±50%以内である」は、 R_0 の±50%の範囲内で実行され得る定常状態RET測定を指す。この句は、10~90%の範囲でのドナードメインからアクセプタードメインへの発光エネルギー転移の効率を包含する。一部の実施形態では、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとのフォルスター距離は、少なくとも4nmである、少なくとも5.6nmである又は少なくとも6nmである。一部の実施形態では、フォルスター距離は、12nm未満、11nm未満、10nm未満又は9nm未満である。一部の実施形態では、ドナードメインとアクセプタードメインとのフォルスター距離は、約4nmから約11nmの間である、5.6nmから約11nmの間である又は約7nmから約11nmの間である。理論に束縛されることなく、本発明者らは、ドナードメイ

40

50

ンとアクセプタードメインとのフォルスター距離は、本出願のセンサーにおいて有用な炭水化物結合ドメインのサイズと合致していると考えている。炭水化物結合ドメインは、例えば全長HTH転写因子、炭水化物結合活性を保持しているその断片、HTH転写因子の炭水化物結合ドメイン又はその変種であってよい。

【0139】

好適な対形成を決定するために考慮されるべき評価基準は、ドナーのものと比較したアクセプター分子の相対的放射/蛍光スペクトルである。ドナーの放射スペクトルは、ドナー放射からの光エネルギーがアクセプター分子を励起できる波長であり、それにより2つの分子が互いに適切な近接及び配向性である場合にアクセプター分子蛍光を促進できるよう、アクセプター分子の吸光度スペクトルと重複しているべきである。例えば、ウミシイタケルシフェラーゼ/EGFP対形成は、観察可能な放射スペクトルピークに基づいて、ウミシイタケルシフェラーゼ/EYFP対形成ほどは良好ではないことは実証されている(Xuら、1999; Wangら、(1997) in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, eds. Hastingsら、(Wiley, New York), 419 ~ 422頁)。対形成可能性を研究するために、タンパク質融合(例えば)は、選択されたドナー及びアクセプタードメインを含有して調製され、必要に応じて適切な基質の存在下で検査される。

【0140】

ドナーとアクセプタードメインとが互いに擬似的に会合しないことも確認されるべきである。例えば、生物発光タンパク質及びアクセプター分子の同じ細胞における別々の共発現、並びに次いでBRETが生じたかどうかを判定するために発光スペクトルをモニタリングすることによってこれは達成され得る。これは、例えば、Xuら、(1999)の方法を使用して達成され得る。選択された生物発光タンパク質及びアクセプター分子は、BRETがほとんど又はまったく観察されない場合、好適なBRET対を形成している。同様の実験がFRET対について実施され得る。

【0141】

一部の実施形態では、本開示のセンサー分子は、化学発光ドナードメイン及び蛍光アクセプタードメインを含む。

【0142】

一部の実施形態では、ドナー放射は、基質への修飾によって操作され得る。ウミシイタケルシフェラーゼの場合では、基質はセレンテラジンである。ドナー放射を変えることの背後にある理論的根拠は、ドナー放射とアクセプター放射との間の分解能を改善するためである。元のBRET系は、ウミシイタケルシフェラーゼをドナーとして、EYFP(又はTopaz)をアクセプターとして、及びセレンテラジンh誘導体を基質として使用する。BRETアッセイにおいて組み合わされた場合に、これらの成分は、生物発光タンパク質について475 ~ 480nMの範囲で、アクセプター分子について525 ~ 530nMの範囲で光を発生し、スペクトル解像度45 ~ 55nmをもたらす。

【0143】

残念ながら、ウミシイタケルシフェラーゼは、系のシグナル対ノイズを減少させることに寄与する、GFP放射に実質的に重複する幅広い放射ピークを発生させる。本発明における使用のための1つのBRET系は、ウミシイタケルシフェラーゼ基質としてcoel400aを有し、ドナーとアクセプター放射波長との間に(約105nm)幅広いスペクトル分解能を提供する。coel400aを用いてウミシイタケルシフェラーゼは、390 ~ 400nmの間に光を発生させ、この範囲で光を吸収し、505 ~ 508nmで光を再び放射するGFP誘導体(GFP²)が調製される。ウミシイタケルシフェラーゼとGFP放射との間のスペクトル分解能におけるこの増加のために、このBRET系は、本出願のセンサーへの炭水化物の結合をモニターするための優れた生物学的ツールを提供する。しかし、小さなストークスシフト(Stokes shift)BRET系も炭水化物の高感度測定を可能にする。

【0144】

種々のセレンテラジン誘導体が、ウミシイタケルシフェラーゼ活性の結果として種々の波長(野生型セレンテラジンによって発生されたものとは異なる)で光を発生させるcoel40

10

20

30

40

50

0aを含め、当技術分野において周知である。当業者は、ドナーの光放射ピークが変化したことから、この波長で光を吸収し、それにより効率的なエネルギー転移を可能にするアクセプター分子を選択することが必要であることを理解している。このことは、例えば、GFPクラス4をそれがクラス3又は1 GFPになるように変えることによって行うことができる。ドナーの光放射とアクセプターの光吸収ピークとの間でスペクトルが重複していることは、特に効率的なエネルギー転移のための1つの条件である。クラス3及び1 GFPは、400 nmで光を吸収し、505～511 nmの間で再び放射することが周知である。これは、ドナーとアクセプター放射との間におよそ111 nmの波長差を生じる。

【0145】

生物発光タンパク質及びアクセプター分子の対のさらなる例は、Table 3(表3)に提供されている。

【0146】

10

20

30

40

50

【表 3 A】

Table 3. 例示的 BRET 生物発光タンパク質及びアクセプター分子対

<u>BDP</u>	<u>基質</u>	<u>基質波長 (ピーク)</u>	<u>蛍光アクセプタ ー分子</u>	<u>アクセプタ ーの波長 (Ex/Em)</u>
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	Venus	515/528 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	mOrange	548/562 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	mCitrine	516/529 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	YPet	517/530 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	フルオレセイン	495/519 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	アクリジンイエ ロー	470/550 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	ナイルレッド	485/525 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	R-フィコエリト リン	480/578 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラ ジン	470 nm	赤色 613	480/613 nm

10

20

30

40

【0147】

50

【表 3 B】

RLuc2 RLuc8	天然セレンテラジン	470 nm	TruRed	490/695 nm
RLuc8.6-5.35	天然セレンテラジン	535 nm	mOrange	548/562 nm
RLuc8.6-5.35	セレンテラジン <i>h</i>	535 nm	TagRFP	555/584 nm
RLuc8.6-5.35	セレンテラジン <i>h</i>	535 nm	TurboRFP	588/635 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>v</i>	515 nm	mOrange	548/562 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>v</i>	515 nm	TagRFP	555/584 nm
RLuc8.6-5.35	セレンテラジン <i>v</i>	570 nm	TurboRFP	588/635 nm
RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	Venus	515/528 nm
RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	mOrange	548/528 nm
RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	mCitrine	516/529 nm
RLuc2 RLuc8	天然セレンテラジン	470 nm	YPet	517/530 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	フルオレセイン	490/525nm

10

20

30

40

【0148】

50

【表 3 C】

RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	アクリジンイエロー	470/550 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	ナイルレッド	485/525 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	R-フィコエリトリン	480/578 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	赤色 613	480/613 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン <i>h</i>	470 nm	TruRed	490/695 nm
RLuc8.6- 5.35	セレンテラジン <i>h</i>	535 nm	mOrange	548/562 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン 400a	400 nm	GFP ²	396/508 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン 400a	400 nm	GFP10	400/510 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン 400a	400 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン 400a	400 nm	TagBFP	402/457 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	セレンテラジン 400a	400 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm

10

20

30

40

【0149】

【表 3 D】

RLuc	セレンテラジン	400 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
RLuc2	400a			
RLuc8				
RLuc	セレンテラジン	400 nm	Y66W	436/485 nm
RLuc2	400a			
RLuc8				
RLuc	セレンテラジン	400 nm	dKeima-Red	440/616 nm
RLuc2	400a			
RLuc8				
RLuc	セレンテラジン	400 nm	mKeima-Red	440/620 nm
RLuc2	400a			
RLuc8				
RLuc	セレンテラジン	400 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc2	400a			
RLuc8				
RLuc	セレンテラジン	400 nm	パシフィックブルー	403/551 nm
RLuc2	400a			
RLuc8				
RLuc	セレンテラジン	400 nm	ダンシクロリド	380/475 nm
RLuc2	400			
RLuc8				
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	シアニン Cy3	575/605 nm
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	テキサスレッド	590/615 nm
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	TurboRed	553/574 nm
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	tdTomato	554/581 nm
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	TagRFP	555/584 nm
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	DsRed	557/592 nm
ホタルルシフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	mRFP1	584/607 nm

10

20

30

40

【0150】

50

【表 3 E】

ホタルルシ フェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	mCherry	587/610 nm
緑色甲虫ル シフェラーゼ	ルシフェリン	560 nm	tdTomato	554/581 nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	ルシフェリン	560 nm	AF680	679/702 nm
FFLuc PpyRE8 PpyRE10	ルシフェリン	560 nm	AF750	749/775 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	Venus	515/528 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	mOrange	548/562 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	mCitrine	516/529 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	YPet	517/530 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	フルオレセイン	495/519 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	アクリジンイエ ロー	470/550 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	ナイルレッド	485/525 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	R-フィコエリト リン	480/487 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	赤色 613	480/613 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	オレゴングリー ン	496/516 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	フリマジン	460 nm	HalotagBRET 618	525/618 nm
NanoLuc	天然セレンテラ ジン	460 nm	Venus	515/528 nm
NanoLuc	天然セレンテラ ジン	460 nm	mOrange	548/562 nm

10

20

30

40

【0151】

50

【表 3 F】

NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	mCitrine	516/529 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	YPet	517/530 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	フルオレセイン	495/519 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	アクリジンイエロー	470/550 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	ナイルレッド	485/525 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	R-フィコエリトリン	480/487 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	赤色 613	480/613 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	オレゴングリーン	496/516 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	HalotagBRET 618	525/618
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	オレゴングリーン	496/516 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	diAcFAM	494/526 nm

10

20

30

40

【0152】

50

【表 3 G】

NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	天然セレンテラジン	460 nm	HalotagBRET 618	525/618
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	Venus	515/528 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	mOrange	548/562 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	EYFP/Topaz	514/527 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	mCitrine	516/529 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	YPet	517/530 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	フルオレセイン	495/519 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	アクリジンイエロー	470/550 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	ナイルレッド	485/525 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	R-フィコエリトリン	480/487 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	赤色 613	480/613 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	TruRed	490/695 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	オレゴングリーン	496/516 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	diAcFAM	494/526 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	AlexFluor488	494/517 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	TMR	555/585 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	Halotag NCT	595/635 nm
NanoLuc	セレンテラジン <i>h</i>	460 nm	HalotagBRET 618	525/618
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質	405 nm	GFP ²	396/508 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質	405 nm	GFP10	400/510 nm

10

20

30

40

【0153】

【表 3 H】

RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	TagBFP	402/457 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	Y66W	436/485 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	dKeima-Red	440/616 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	mKeima-Red	440/620 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	パシフィックブルー	403/551 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質	405 nm	ダンシクロリド	380/475 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質 II	400 nm	GFP ²	396/508 nm
RLuc2				
RLuc8				
RLuc	Prolume Purple 基質 II	400 nm	GFP10	400/510 nm
RLuc2				
RLuc8				

10

20

30

40

【0 1 5 4】

50

【表 3 I】

RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	TagBFP	402/457 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	Y66W	436/485 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	dKeima-Red	440/616 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	mKeima-Red	440/620 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	パシフィックブルー	403/551 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 II	400 nm	ダンシクロリド	380/475 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	GFP ²	396/508 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	GFP10	400/510 nm

10

20

30

40

【0155】

50

【表 3 J】

RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	野生型 GFP	396 (475)/508 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	TagBFP	402/457 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	Cerulean/mCFP	433/475 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	ECFP/CyPet	434/477 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	Y66W	436/485 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	dKeima-Red	440/616 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	mKeima-Red	440/620 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	Quin-2	365/490 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	パシフィックブルー	403/551 nm
RLuc RLuc2 RLuc8	Prolume Purple 基質 III	410 nm	ダンシクロリド	380/475 nm

【0156】

一部の実施形態では、好ましい生物発光タンパク質及びアクセプタードメインとの対は、RLuc8及びGFP²とである。

【0157】

一部の実施形態では、本開示のセンサー分子は、蛍光ドナードメイン及び蛍光アクセプタードメインを含む。

【0158】

任意の適切に選択されたフルオロフォアは、ドナーの放射スペクトルがアクセプターの励起スペクトルと十分に重複している限り、ドナー及び/又はアクセプターとして使用され得る。好適な対形成を決定する際に考慮されるべき評価基準は、ドナーのスペクトルと比

10

20

30

40

50

較したアクセプター分子の励起スペクトルである。当業者が理解するとおり、ドナードメインの励起極大でアクセプタードメインは極小の直接励起があるべきである。

【0159】

蛍光ドナー及びアクセプタードメインの対のさらなる例は、Table 4(表4)に提供されている。蛍光ドナー及びアクセプタードメインの対の他の例は、Bajら、(2016)において考察されている。

【0160】

【表4】

Table 4. 例示的 FRET 蛍光ドナー及びアクセプタードメインの対

蛍光ドナー	アクセプターの 波長(Em)	蛍光アクセプ ター分子	アクセプター の波長(Exc)
FITC	520 nm	TRITC	550 nm
Cy3	566 nm	Cy5	649 nm
EGFP	508 nm	Cy3	554 nm
CFP	477 nm	YFP	514 nm
EGFP	508 nm	YFP	514 nm
GFP ²		YFP	514 nm
ECFP	475 nm	EYFP	513 nm
mTurquoise2	474 nm	mCitrine	516 nm
mClover3	518 nm	mRuby3	558 nm
eqFP650	650 nm	iRFP	690 nm
mAmetrine	526 nm	tdTomato	554 nm

【0161】

一部の実施形態では、好ましいドナードメインとアクセプタードメインとの対は、CFP 及びYFPである。

【0162】

炭水化物結合

本開示のセンサーの炭水化物結合ドメインに対する炭水化物の結合は、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向を変化させる。一部の実施形態では、空間的な位置及び/又は双極子配向の変化は、BRETの変化をもたらす。一部の実施形態では、空間的な位置及び/又は双極子配の変化は、FRETの変化をもたらす。

【0163】

本明細書で使用される、用語「空間的な位置」は、アクセプター分子に対するドナーの三次元位置決定を指し、これは、分析物のセンサー分子への結合又は放出の結果として変化する。

【0164】

本明細書で使用される、用語「双極子配向」は、ドナー及び/又はアクセプター分子とそ

これらの三次元空間中の配向に対する、関連する双極子モーメントの三次元空間中の方向を指す。双極子モーメントは、分子に対する電荷における変動の結果である。

【 0 1 6 5 】

例としてBRETを使用して、1つの実施形態では、生物発光タンパク質とアクセプター分子の間に生じるエネルギー転移は、特異的な波長を選択する光学フィルター(1つはアクセプター分子放射に対して及び他は生物発光タンパク質放射に対して)を使用して測定された放射からの計算された比として提示される(式1を参照されたい)。

$$E_a/E_d = \text{BRET比}(1)$$

式中 E_a はアクセプター分子放射強度と定義され(放射光は、アクセプターの放射に適合させた特異的なフィルターを使用して選択される)及び E_d は生物発光タンパク質放射強度と定義される(放射光は、生物発光タンパク質の放射に適合させた特異的なフィルターを使用して選択される)。

【 0 1 6 6 】

光学フィルターがBRETに適切な波長の識別を許容する任意のタイプのフィルターであってもよいことは当業者によって容易に理解されるはずである。例えば、本発明に従い使用される光学フィルターは、干渉フィルター、ロングパスフィルター、ショートパスフィルター等であってもよい。フィルターを通過する波長の強度(通常、1秒当たりのカウント(CPS)又は相対発光単位(RLU))は、光電子増倍管(PMT)、光ダイオード(カスケード光ダイオード、光ダイオードアレイを含む)又は高感度カメラ、例えば、電荷結合素子(CCD)カメラのいずれかを使用して定量することができる。定量したシグナルを引き続いて使用して、BRET比を計算し、エネルギー転移効率を表す。BRET比は、アクセプター放射の強度の増加とともに増加する。

【 0 1 6 7 】

一般に、アクセプター放射強度のドナー放射強度に対する比が、決定され(式1を参照されたい)、これはエネルギー転移効率を反映する任意単位で表される数である。比は、エネルギー転移効率の増加とともに増加する(Xuら、1999を参照されたい)。

【 0 1 6 8 】

エネルギー転移効率はまた、ドナー放射強度のアクセプター放射強度に対する逆の比を使用して表されてもよい(式2を参照されたい)。このケースでは、比は、エネルギー転移効率の増加とともに減少する。この計算を実施する前、放射強度は、背景光及び基質の自家発光の存在に関して補正される。この補正は、基質を含有するが、本発明の生物発光タンパク質、アクセプター分子又はポリペプチドを含有しない対照試料から、適切な波長で測定された、放射強度を減算することによって一般になされる。

$$E_d/E_a = \text{BRET比}(2)$$

式中 E_a 及び E_d は、上記で定義される通りである。

【 0 1 6 9 】

生物発光タンパク質及びアクセプター分子放射の光強度はまた、モノクロメーターに基づく機器、例えば、分光蛍光光度計、電荷結合素子(CCD)カメラ又はダイオードアレイ検出器を使用して定量することができる。分光蛍光光度計を使用して、放射スキャンが実施され、生物発光タンパク質及びアクセプター分子放射ピークの両方が、基質の添加時に検出される。ピーク下面積は相対光強度を表し、ピーク下面積を使用して、上記で概説される通り、比が計算される。同じ試料からの生物発光タンパク質及びアクセプター分子に関する光を測定可能な任意の機器を使用して本発明のBRETシステムをモニターすることができる。

【 0 1 7 0 】

代替的実施形態では、アクセプター分子放射単独は、BRETの有効な検出及び/又は定量にとって適切である。このケースでは、エネルギー転移効率は、アクセプター放射強度のみを使用して表される。エネルギー転移を測定するために、いかなる比も計算することなく、アクセプター放射強度を使用することができるが、当業者に容易に明らかとなるであろう。これは、理想的にはアクセプター分子が、生物発光タンパク質から転移される

10

20

30

40

50

光を吸収する場合に限り、光を放射(emit)するとの事実に起因する。このケースでは、1つだけ光フィルターが必要とされる。

【0171】

関連する実施形態では、生物発光タンパク質放射単独は、BRETの有効な検出及び/又は定量にとって適切である。このケースでは、エネルギー転移効率は、生物発光タンパク質放射強度のみを使用して計算される。エネルギー転移を測定するために、いかなる比も計算することなく、ドナー放射強度を使用することができることが、当業者に容易に明らかとなるであろう。これは、アクセプター分子が、生物発光タンパク質から転移される光を吸収するので、生物発光タンパク質からの検出可能な放射における対応する減少が存在するとの事実に起因する。このケースでは、1つだけ光フィルターが必要とされる。

10

【0172】

代替的実施形態では、エネルギー転移効率は、測定に1つの光学フィルターを要求するだけであるレシオメトリック(ratiometric)測定を使用して表される。このケースでは、ドナー又はアクセプターに関する光強度は、適切な光学フィルターを使用して決定され、試料の別の測定は、いかなるフィルターも使用することなくなされる(オープンスペクトルの強度)。この後者の測定では、(全ての波長に対する)全ての光出力が、定量される。比の計算は、次に、式3又は4を使用してなされる。式3に関して、アクセプターに対する光学フィルターだけが、要求される。式4に関して、ドナーに対する光学フィルターだけが、要求される。

$$E_a/E_o - E_a = \text{BRET比} \text{ 又は } = E_o - E_a/E_a \quad (3)$$

20

$$E_o - E_d/E_d = \text{BRET比} \text{ 又は } = E_d/E_o - E_d \quad (4)$$

式中 E_a 及び E_d は上記で定義される通りであり、 E_o は、組合された全ての波長(オープンスペクトル)に対する放射強度として定義される。

【0173】

更なる式が、式1から4から導くことができることは、当業者に容易に明らかとなるはずである。例えば、そういうものの1つの派生することには、生物発光タンパク質及び/又はアクセプター分子に関する放射波長で存在する背景光に対して補正することが関与する。

【0174】

BRETアッセイの実施では、発光は、BRETCountを使用して各ウェルから決定することができる。BRETCount機器は改変型TopCountであり、TopCountはPackard Instrument (Meriden, CT)によって販売されたマイクロタイタープレートシンチレーション及びルミネセンスカウンターである。背景ノイズの排除を同時発生させる2つの光電子増倍管(PMT)を利用する古典的なカウンターとは異なり、TopCountは、単一のPMT技術及びノイズリダクションのための時間分解型パルス計数を利用することにより、標準的な不透明なマイクロタイタープレート中の計数が可能になる。不透明なマイクロタイタープレートの使用は、光学的なクロストークを無視できるレベルに低下させることができる。TopCountは1、2、6及び12の検出器(PMT)を含む様々なフォーマットで参入しており、これにより、それぞれ、1、2、6又は12試料の同時読み取りが可能になる。BRETCountに加えて、他の市販されている機器はBRETを実施可能である: Victor 2(Wallac, Finland)(Perkin Elmer Life Sciences)及びFusion(Packard Instrument, Meriden)。BRETは、少なくともアクセプター分子放射及び好ましくは(アクセプター分子及び生物発光タンパク質に対する)2つの波長又はそれ以上を検出することができるリーダーを使用して、実施することができる。

30

【0175】

BRETは、プレート中の異なるウェルにわたるアッセイ容量、アッセイ条件及びシグナル減衰における変動に起因する光出力における揺らぎによって引き起こされるデータ変動性を排除することができる、レシオメトリック技術である。RETに基づく反応は、均質であり、固相付着しない溶液中で一般に生じる。これにより、液体、ガス及び更に粒子等を分離することなく、異なる形態の分析物の検出が可能になる。

40

【0176】

50

ラクトースセンサー分子

本明細書で定義されるセンサー分子の限定されることのない一例は、ラクトース濃度を検出する及び/又は測定するのに使用することができるセンサー分子である。したがって、一部の実施形態では、本開示は、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている、ラクトースに結合可能である細菌性転写因子又はその変種を含む、ラクトースを検出するためのセンサー分子を提供し、ここで、ラクトースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する。一部の実施形態では、本開示は、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、ラクトースを検出するためのセンサー分子を提供し、ここで、ラクトースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する。ラクトースがセンサーに結合することにより、共鳴エネルギー転移(RET)に変化を生じ、RETの変化はラクトースが存在することを示す。選択されるドナードメイン及びアクセプタードメインに応じて、RETの変化は、BRETの変化又はFRETの変化であってもよい。

【0177】

一部の実施形態では、BgaR転写因子又はその変種は、配列番号1に提供されるものと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列、又はその一部と少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である配列を有する。一部の実施形態では、BgaR転写因子は、配列番号1に提供されるものと100%同一である。一部の実施形態では、BgaR転写因子又はその変種は、配列番号9に提供されるものと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、BgaR転写因子又はその変種は、配列番号9に提供されるものと100%同一である。

【0178】

一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、生物発光タンパク質である。適切な生物発光タンパク質の非限定的な例には、上に記載される及びルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-グルクロニダーゼ又は-グルコシダーゼが含まれる。一部の実施形態では、生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼである。ルシフェラーゼは、ウミシイタケルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、腔腸動物ルシフェラーゼ、北アメリカグローワームルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、レイルロードワーム(railroad worm)ルシフェラーゼ、細菌性ルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ、エクオリン、アラキノカンパルシフェラーゼ、及びオプロフォラス・グラシリロストリスルシフェラーゼ又はそのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片、又はその2つ以上のキメラからなる群から選択されてもよい。一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、ウミシイタケルシフェラーゼである。一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、RLuc8である。一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、基質を改変可能である。基質の非限定的な例には、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、フリマジン又はセレンテラジン、ルシフェリン若しくはフリマジンの誘導体、類似物若しくは安定化誘導体が含まれる。これらの実施形態では、ラクトースがセンサー分子に結合することにより、BRETの変化をもたらす。

【0179】

代替的実施形態では、共鳴エネルギー転移ドナードメインは、蛍光タンパク質である。適切な蛍光タンパク質の非限定的な例には、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアン色蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPs65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dEGFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-ダイマー2(12)、mRFP1

10

20

30

40

50

、ポシロボリン、ウミシイタケGFP、Monster GFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurboFB及びフィコビリンタンパク質、並びにそのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片が含まれる。一部の実施形態では、ドナードメインは、CFPである。これらの実施形態では、ラクトースがセンサー分子に結合することにより、FRETの変化をもたらす。

【0180】

一部の実施形態では、共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、蛍光アクセプタードメインである。一部の実施形態では、蛍光アクセプタードメインは、蛍光タンパク質である。適切な蛍光タンパク質の非限定的な例には、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GFPの青色蛍光変種(BFP)、GFPのシアノ色蛍光変種(CFP)、GFPの黄色蛍光変種(YFP)、高感度GFP(EGFP)、高感度CFP(ECFP)、高感度YFP(EYFP)、GFPs65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP(dEGFP)、不安定化ECFP(dECFP)、不安定化EYFP(dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-dimer2、tdimer2(12)、mRFP1、ポシロボリン、ウミシイタケGFP、Monster GFP、paGFP、Kaedeタンパク質、tdTomato、mCherry、TagRFP、TurboFB及びフィコビリンタンパク質、並びにそのいずれか1つの生物学的に活性な変種又は断片が含まれる。一部の実施形態では、アクセプタードメインは、YFPである。他の実施形態では、アクセプタードメインは、GFP、好みくはGFP²である。

【0181】

好みしい実施形態では、ドナードメインはCFP又はその変種である及びアクセプタードメインはYFP又はその変種である。一部の実施形態では、センサーは、YFPとBgaRの間及び/又はCFPとBgaRの間にリンカーを更に含む。一部の実施形態では、センサーは、プロテアーゼ切断部位及び/又は精製タグを更に含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号23に提供されるアミノ酸配列と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号23に提供されるものと100%同一である。これらの実施形態では、ラクトースがセンサー分子に結合することにより、FRETの変化をもたらす。

【0182】

他の好みしい実施形態では、ドナードメインはウミシイタケルシフェラーゼ又はその変種である及びアクセプタードメインはGFP又はその変種である。例えば、ドナードメインはRLuc8であってもよい及びアクセプタードメインはGFP²であってもよい。一部の実施形態では、センサー分子は、RLuc8-BgaR-GFP²を含む単一ポリペプチドである。一部の実施形態では、センサー分子は、GFP²-BgaR-RLuc8を含む単一ポリペプチドである。一部の実施形態では、センサーは、GFP²とBgaRの間及び/又はRLuc8とBgaRの間にリンカーを更に含む。一部の実施形態では、センサーは、プロテアーゼ切断部位及び/又は精製タグを更に含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号33、配列番号34、配列番号35及び配列番号36からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一

10

20

30

40

50

%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも30%同一、少なくとも35%同一、少なくとも40%同一、少なくとも45%同一、少なくとも50%同一、少なくとも55%同一、少なくとも60%同一、少なくとも65%同一、少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、センサーは、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列と100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、センサーは、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるアミノ酸配列と100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、センサーは、配列番号33、配列番号34、配列番号35及び配列番号36からなる群から選択されるアミノ酸配列と100%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、センサーは、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む又はその断片若しくは変種である。一部の実施形態では、センサーは、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む又はその断片若しくは変種である。一部の実施形態では、センサーは、配列番号25、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む又はその断片若しくは変種である。これらの実施形態では、ラクトースがセンサー分子に結合することにより、BRETの変化をもたらす。

【0183】

ラクトース濃度を検出する及び/又は測定するのに使用することができるセンサー分子は、ラクトース不含製品中の残留ラクトースの決定に使用するため特に興味深い。高レベルのラクトース(5%)は、乳及び乳製品(クリーム、バター、アイスクリーム、チーズ、粉乳)に見出される(Fernandes Silveiraら、2015)。無ラクトース及びラクトース低下製品に関する市場は成長しているが、残留量のラクトースを、その量のラクトースを除去する又は低下させる処理後の乳製品中で測定する、安価で迅速な高感度法はない。オーストラリア・ニュージーランド食品規格(FSANZ)によれば、ラクトース低下乳製品は、0.3%ラクトース以下を含有しなければならない。無ラクトース製品は、検出不可能なレベルの二糖を有すると定義されており、解釈の対象となる定義である。しかしながら、0.01%未満のラクトースのレベルが、欧州及び中国の市場では要求される。

【0184】

乳中のラクトースの低下/排除を導く酵素加工は確立しているが、加工時のラクトース低下の度合を検証する酵素加工を行うものについて確立した手段はない。現在、ラクトース低下及び無ラクトース乳試料は、加工工場から離れ、分析に特化した研究室へと送られている。これにより、物流、特化した研究設備及び専門技術の必要性、及び評価される物品を追加的に保持する必要性に起因する追加のコストがかかる。現在の分析法及び貯蔵に関するコストに加えて、全ての無ラクトース乳が試験されるとは限らず、乳のむらのある処理及び製品への消費者の信頼性が欠如する可能性を導く。したがって、食品、例えば、

10

20

30

40

50

ラクトース低下及び無ラクトース乳製品中のラクトースの濃度を測定するための、代替法及びセンサーが必要とされている。好ましくは、方法及びセンサーは、加工工場で乳中の低レベルのラクトースの測定のための、迅速で高感度の選択的なインライン法での乳製品プロセッサーを提供するであろう。

【0185】

乳中の残留ラクトースの測定は以下の少なくとも2つのレベルにおいて難題となっている:i)ラクトースを分解する酵素処理後の乳中のラクトースの量は、およそ0.01% w/vである;ii)ラクトースの測定に干渉しうる高濃度のラクトース由来単糖の存在に起因する選択性。好ましくは、一部の実施形態に記載される方法及びセンサーは、およそ0.0001% w/v以上、およそ0.0003% w/v以上、およそ0.0005% w/v以上、およそ0.0007% w/v以上、およそ0.001% w/v以上、およそ0.003% w/v以上、およそ0.005% w/v以上、およそ0.007% w/v以上、およそ0.01% w/v以上、およそ0.03% w/v以上、およそ0.05% w/v以上、およそ0.07% w/v以上、又はおよそ0.1% w/v以上の濃度でラクトースを検出できる。好ましくは、一部の実施形態に記載される方法及びセンサーは、他の炭水化物、例えば、ラクトース由来単糖及び/又はラクトロースの存在下でラクトースを検出できる。一部の実施形態では、記載される方法及びセンサーは、少なくとも0.1mM、少なくとも1mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも50mM、少なくとも100mM、少なくとも130mM、少なくとも200mM、少なくとも260mM炭水化物、少なくとも300mM、又は少なくとも350mM総炭水化物の存在下でラクトースを検出することができる。当業者が理解するように、総炭水化物濃度は、ラクトースを除外する(例えば、試料がラクトース、ガラクトース及びグルコースを含む場合、濃度はグルコース及びガラクトースの濃度を指す)。一部の実施形態では、記載される方法及びセンサーは、少なくとも0.1mM、少なくとも1mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも50mM、少なくとも100mM、少なくとも130mM、少なくとも200mM、少なくとも260mM炭水化物、少なくとも300mM、又は少なくとも350mMグルコース及びガラクトースの存在下でラクトースを検出することができる。

【0186】

一部の実施形態では、センサーが、

i)ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子のラクトース結合ドメイン、又は炭水化物結合ドメインの変種;

ii)化学発光ドナードメイン;及び

iii)アクセプタードメイン;

を含む、ラクトースを検出するためのセンサー分子であって、

ここで、ラクトースが炭水化物結合ドメインに結合すると、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する、センサー分子を提供する。

【0187】

一部の実施形態では、センサーが、

i)細菌性BgaR転写因子;

ii)共鳴エネルギー転移ドナードメイン;及び

iii)共鳴エネルギー転移アクセプタードメイン;

を含む、ラクトースを検出するためのセンサー分子であって、

ここで、ラクトースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する、センサー分子を提供する。共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインは、本明細書で定義される通りである。

【0188】

ラクトロースセンサー分子

本明細書で定義されるセンサー分子の更なる限定されることのない一例は、ラクトロース濃度を検出する及び/又は測定するのに使用することができるセンサー分子である。した

10

20

30

40

50

がって、一部の実施形態では、本開示は、ラクトロースを検出するための、本明細書で定義されるセンサー分子を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法及びセンサーは、およそ0.05mM以上、およそ0.1mM以上、およそ0.5mM以上、およそ1mM以上、およそ1.5mM以上、およそ1.8mM以上又はおよそ2mM以上の濃度でラクトロースを検出できる。一部の実施形態では、一部の実施形態に記載される方法及びセンサーは、およそ0.1mM以上の濃度でラクトロースを検出できる。

【0189】

組成物、キット、方法及び使用

本明細書に記載されるセンサーは、炭水化物の検出に使用するための組成物に含まれてもよい。例えば、本明細書に記載されるセンサーは、糖又は糖誘導体の検出に使用するための組成物に含まれてもよい。一実施形態では、本明細書に記載されるセンサーは、ラクトースの検出に使用するための組成物に含まれてもよい。一実施形態では、本明細書に記載されるセンサーは、ラクトロースの検出に使用するための組成物に含まれてもよい。一部の実施形態では、本発明に従うセンサー及び許容される担体を含む組成物を提供する。本明細書で使用される、用語「許容される担体」には、本発明の方法及び使用に適合する、任意の及び全ての固体又は溶媒(例えば、リン酸緩衝生理食塩水緩衝液、水、生理食塩水)分散媒、コーティング等が含まれる。許容される担体は、組成物の他の成分に適合し、試験される炭水化物に損害を与えず、炭水化物の炭水化物結合ドメインに対する結合を阻害しないという意味で「許容」されなければならない。一般に、適切な許容される担体は、当技術分野において公知であり、最終使用適用(end use application)に基づいて選択される。

10

20

30

【0190】

当業者が理解するように、本出願のセンサーを使用して、試料中の炭水化物の存在又は非存在を検出することができる、及び存在する場合、本出願のセンサーを使用して、試料中に存在する炭水化物の量も決定しうる。したがって、一部の実施形態では、i)試料を本発明のセンサー分子と接触させる工程;及びii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程を含み、ここで、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向の変化が、炭水化物が試料中に存在することを示す、試料中の炭水化物を検出する方法を提供する。一部の実施形態では、試料の存在下で、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程が、試料の添加の前後でBRET比を測定する工程を含む。

【0191】

一部の実施形態では、方法は、試料中の炭水化物の濃度を決定する工程を更に含む。

【0192】

一部の実施形態では、炭水化物は、ラクトース及びラクトロースからなる群から選択される。一部の実施形態では、炭水化物は、ラクトースである。一部の実施形態では、炭水化物は、ラクトロースである。

【0193】

センサーを使用して、試料中の炭水化物を検出及び定量することができる。「試料」は、炭水化物を含有する可能性を有する任意の物質又は組成物であってもよい。一部の実施形態では、試料は、空気、液体、生物学的材料又は土壌である。一部の実施形態では、試料は、乳製品又はその抽出物、土壌又はその抽出物、生物学的材料又はその抽出物等からなる群から選択される。試料は、環境又は供給源から直接的に得てもよく、又は本発明の方法が実施される前に適切な手順によって抽出及び/又は少なくとも部分的に精製してもよい。

40

【0194】

一部の例では、試料は、生物学的材料を含む。本明細書で使用される、「生物学的材料」は、広く定義され、生物に全体的又は部分的に由来する任意の材料が含まれる。生物学的材料には、体液、細胞、柔組織(例えば、結合及び非結合組織)及び硬組織(例えば、骨及

50

び軟骨)が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、体液は、血液、血清、痰、粘液、膿、腹水、尿又は他の体液である。一部の実施形態では、そのような材料を、生物から採取し、次に更に加工及び/又は化学的処理に付してもよい。1つの実施形態では、センサーは、生細胞内の炭水化物を検出するのに使用されない。一部の実施形態では、センサーは、エキソビオで使用される。

【0195】

一部の例では、試料は、乳製品を含む。本明細書で使用される、用語「乳製品」には、乳に部分的又は完全に由来する乳及び製品が含まれる。乳は、任意の哺乳動物、例えば、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラクダ、バッファロー、ヒト等から得られる。乳製品には、生乳(raw milk)、低脂肪乳、脱脂乳、殺菌乳、長期保存乳(extended shelf life milk)、UHT乳、ラクトース改変UHT乳、強化UHT乳、フレーバーUHT乳、及びこれらの製品の組合せ並びにUHT人工栄養乳、チーズ、ヨーグルト、乳清、バター乳、クリーム、粉乳、粉状人工栄養乳、アイスクリーム及びバター等が含まれるが、これらに限定されない。一部の例では、試料は、乳又は希釈した乳である。乳製品はまた、抽出物、例えば、対象とする炭水化物を含む(又は含む疑いのある)乳製品の部分的に精製された一部であってもよい。

【0196】

一部の実施形態では、本発明のセンサーを使用して、乳製品中のラクトースを検出することができる。したがって、i)試料を本発明のセンサー分子と接触させる工程;及びii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程を含み、ここで、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向の変化が、ラクトースが試料中に存在することを示す、乳製品中のラクトースを検出する方法を提供する。

【0197】

本発明のセンサーを使用して、試料中の炭水化物の濃度をモニターすることもできる。

【0198】

一部の実施形態では、本発明のセンサーを使用して、乳製品中のラクトースを検出することができる。したがって、i)試料を本発明のセンサー分子と接触させる工程;及びii)試料の存在下で、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向が変化したかどうかを決定する工程を含み、ここで、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的位置及び/又は双極子配向の変化が、ラクトースが試料中に存在することを示す、乳製品中のラクトースを検出する方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、試料中のラクトースの濃度を決定する工程を更に含む。

【0199】

ラクトースは、熱処理によって引き起こされる乳のダメージの指標として及び殺菌乳([ラクトース] 10 μ M)、超高温(UHT)-処理乳([ラクトース] 1.8 mM)及び容器内滅菌乳([ラクトース] 1.8 mM)の間を区別する基準(Marconiら、2004; Montillaら、1996)として国際酪農連盟及び欧洲連合によって提案されている。一部の実施形態では、本発明のセンサーを使用して、試料中のラクトースの濃度をモニターすることができる。一部の実施形態では、本発明のセンサーを使用して、熱処理によって引き起こされる乳のダメージの指標を提供することができる。一部の実施形態では、本発明のセンサーを使用して、様々な形態の乳、例えば、殺菌乳、超高温(UHT)処理乳及び容器内滅菌乳との間を区別することができる。

【0200】

一部の実施形態では、センサー分子が:

- i)ヘリックス-ターン-ヘリックス転写因子の炭水化物結合ドメイン、又は炭水化物結合ドメインの変種;
 - ii)化学発光ドナードメイン;及び
 - iii)アクセプタードメイン;
- を含む、炭水化物を検出するためのセンサー分子であって

10

20

30

40

50

ここで、炭水化物が炭水化物結合ドメインに結合すると、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する、センサー分子の使用も提供する。一部の実施形態では、使用は、試料中の炭水化物の濃度を決定する工程を更に含む。

【0201】

一部の実施形態では、センサー分子が、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、ラクトースを検出するためのセンサー分子の使用も提供し、ここで、ラクトースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する。一部の実施形態では、使用は、試料中のラクトースの濃度を決定する工程を更に含む。

10

【0202】

一部の実施形態では、センサー分子が、共鳴エネルギー転移ドナードメイン及び共鳴エネルギー転移アクセプタードメインに共有結合的に連結されている細菌性BgaR転写因子又はその変種を含む、ラクトルースを検出するためのセンサー分子の使用も提供し、ここで、ラクトルースが転写因子に結合すると、アクセプタードメインに対するドナードメインの空間的な位置及び/又は双極子配向は変化する。一部の実施形態では、使用は、試料中のラクトルースの濃度を決定する工程を更に含む。

【0203】

当業者が認識するように、本発明のセンサーはまた、マルチプレックスであってもよい。このシステムでは、2つ以上の異なるセンサー分子が提供され、これが異なる炭水化物を検出する。例えば、ラクトースを検出する本発明のセンサー分子は、他の炭水化物、例えば、ラクトルース、ガラクトース及び/又はグルコースを検出するセンサーでマルチプレックスされうる。一部の実施形態では、各々の異なるセンサー分子が、異なるドナー及び/又はアクセプター分子を含んでもよく、それらが異なる波長で放射して異なる標的化合物の検出及び定量を可能にする。一部の実施形態では、各々の異なるセンサー分子は、同じドナー及び/又はアクセプター分子を含んでいてもよい。一部の実施形態では、単一の流動性検出チャンバー(fluidic detection chamber)が使用される。一部の実施形態では、マルチチャネル検出デバイスが使用されてもよい。

20

【0204】

一部の実施形態では、試料は、水性液体である。例えば、試料には、乳、果実ジュース、他の飲料及び血清を含む体液が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0205】

本発明の方法は、検出可能な変化を測定する適切な任意のシステムで実施することができる。

【0206】

当業者が認識するように、本発明の方法は、バッチ(例えば、プレートリーダーを使用するバッチ形式又はフロー形式で実施することができる。例えば、本発明の方法は、適切なフィルターを備えたマイクロプレートリーダーを使用するマイクロプレート形式で実施することができる。本発明の方法はまた、例えば、WO2013/155553に記載されるマイクロ流体デバイスで実施することができる。

40

【0207】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるセンサーを含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、標準(例えば、ラクトース及び/又はラクトルース標準)を更に含む。

【実施例】

【0208】

(実施例1)

LacB1及びLacF1センサーの構築

BgaRをコードするDNA構築物(コドンを大腸菌中での発現に最適化させた)を、GenScri

50

pt(USA)によって合成した。要求される場合、リンカー配列を、鑄型としてGenScriptによって合成されたBgaR及び適切なプライマー(Table 5(表5))を使用するPCRによってDNA構築物に加えた。プライマーには、リンカー配列(要求される場合)及びPstI又はBstBIに関する制限部位が含まれる。増幅したPCR産物を、PstI及びBstBIで消化し、以前にGFP²及びRLuc8(LacBセンサーに関して)又はCFP及びYFP(LacFセンサーに関して)をクローニングしたpRSETベクター(BioLabs、オーストラリア)にPstI/BstBI制限部位を使用してクローニングした(発現した融合タンパク質はN末端ヒスチジンタグを有した)。

【0209】

【表5】

Table 5. ラクトースセンサーの調製に使用されるオリゴヌクレオチド

	方向性	配列
P1	フォワード	AAAAAA <u>CTGCAG</u> ATGCAGATTCTGTG (配列番号 10)
P2	リバース	ACACAC <u>TTCGAA</u> AATGCTCGGTTAT (配列番号 11)
P3	フォワード	AAAAAA <u>CTGCAG</u> GGTGGTACCGGAGGCAGCATGCAGATTCTGTGGAAAAA (配列番号 12)
P4	リバース	AAAAAA <u>TTCGAA</u> GCCGCCCTCCGGTACCAATGCTCGGTTATTAACTT (配列番号 13)
P5	リバース	AAAAAA <u>CTGCAG</u> AATGCTCGGTTAT (配列番号 14)

10

20

【0210】

大腸菌株BL21(DE3)(New England BioLabs)の細胞を、センサーをコードするpRSETベクターで形質転換した。センサーを、当業者に公知のプロトコールを使用して、大腸菌株BL21(DE3)に発現させた。

【0211】

センサーの発現に関して、2%(v/v)グルコース及び100 μg/mLアンピシリンを補充した50mLのLB(水1L当たり10gトリプトン、5g酵母抽出物、5g NaCl(pH7.4))に、単一コロニーを接種し、0.8のAbs_{600nm}に到達するまで、37 °C、200rpmでインキュベートした。100 μg/mLアンピシリンを補充した250mL LBを、0.05のAbs_{600nm}までスタークルチャーを使用して接種し、28 °C、200rpmで16時間インキュベートし、細胞を採取した。

30

【0212】

或いは、100 μg/mLアンピシリンを含有する200mL LBに単一コロニーを接種し、培養を28 °Cで48h、200rpmで振盪してインキュベートし、細胞を採取した。

【0213】

細胞を、5000 × g(4 °C)、10分間での遠心分離によって採取し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄、pH7.4)で洗浄し、リン酸ナトリウム緩衝液(50 mM Na₂HPO₄、300 mM NaCl、pH7.0)に再懸濁した。細胞懸濁液をホモジナイザー(Microfluidics M-110P(Newton、Massachusetts、USA))に圧力 20,000psiで通し、可溶性タンパク質画分を15,000 × g(4 °C)、15分間での遠心分離によって単離した。タンパク質を、製造者の指示に従ってコバルト親和性クロマトグラフィー(TALON(登録商標)Superflow Metal Affinity Resin(Takara Clontech、オーストラリア))を使用して精製した。150 mM イミダゾールでの精製タンパク質の溶出後、試料を、透析ユニット(GE Healthcare、Vivaspin 6、10 kDa MWCO)を使用してTris緩衝液(50 mM Tris、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、pH8.0)に対して透析した。500 μLの精製タンパク質のアリコートを、液体窒素中でスナップ凍結し、-80 °Cで貯蔵した。タンパク質濃度を、280 nmでの吸光度によって決定した。

40

50

【0214】

精製されたLacB1センサーは、配列番号15の配列を有するポリペプチドである。LacB1センサーは、GFP²-BgaR-RLuc8を含有する。精製されたLacF1センサーは、配列番号23の配列を有するポリペプチドである。LacF1センサーは、CFP-BgaR-YFPを含有する。Hisタグを付けたLacB1及びLacF1センサーの模式図を図2に示す。

【0215】

(実施例2)

LacB1及びLacF1によるラクトース結合

材料及び方法

BRETアッセイを、96ウェルプレート中の最終容量100 μLで行なった。精製されたセンサー及びラクトースを、PBS(58 mM Na₂H₂PO₄、17 mM NaH₂PO₄、68 mM NaCl、pH 7.4)を使用して所望の濃度に希釈した。LacB1センサーを、5分間、30 °Cで1 mM ラクトース又は水とインキュベートした。インキュベーション時間の最後に、EtOH中の5 μLのセレンテラジン400aを、(最終的なセレンテラジン400a濃度の17 μMまで)添加し、スペクトルスキャンを直ちに記録した。

10

【0216】

FRET測定を、以下の修飾を加えてBRET²アッセイと類似の様式で行なった。LacF1センサーを、5分間、30 °Cで1 mM ラクトースとインキュベートした。スペクトルスキャンを、蛍光モード(ex=435 nm、455 nmカットオフ、20 nm増加)で記録した。

20

【0217】

スペクトルスキャンを、白色96ウェルプレート(Opti-plate(商標)-96、PerkinElmer)中でルミネセンスモード(20 nm増加)でSpectraMax M3プレートリーディング分光蛍光計(Molecular Devices)で記録した。

【0218】

データ分析

BRET²比を、500 nmでのアクセプター放射強度の420 nmでのドナー放射強度に対する比として計算した。

【0219】

FRET比を、520 nmでのアクセプター放射強度の480 nmでのドナー放射強度に対する比として計算した。

30

【0220】

結果

RET比を、水又は1 mM ラクトースの存在下でLacB1センサー及びLacF1センサーの両方について測定した(図2)。両センサーに関して、1 mM ラクトースの存在は、RET比の減少をもたらした。LacB1に関して、1.09 ± 0.01から0.800 ± 0.003に変化した。LacF1に関して、1.216 ± 0.004から1.089 ± 0.004に変化した。したがって、1 mM ラクトースは、LacF1センサーについての10%減少と比較して、LacB1センサーについてのRET比の27%降下を引き起こした。

【0221】

(実施例3)

LacB1によるラクトース結合を検出するBRETアッセイ

材料及び方法

BRETアッセイを、96ウェルプレート中の最終容量100 μLで行なった。精製されたセンサー及びラクトースを、PBS(58 mM Na₂H₂PO₄、17 mM NaH₂PO₄、68 mM NaCl、pH 7.4)を使用して所望の濃度に希釈した。精製されたセンサー(1 μM)を、様々な量のラクトース(0.000036% ~ 0.36% w/v)又は他の炭水化物と30分間、30 °Cでインキュベートした。BRET測定に関して、5 μLセレンテラジン400a基質(最終[coel 400a]=16.7 μM)を、インキュベーション期間後に添加した。スペクトルスキャンを、基質の添加の直後に記録した。スペクトルスキャンを、Spectramax M2プレートリーディング分光蛍光計(Molecular Devices)で記録した。

50

【0222】

データ分析

BRET²比を、最大アクセプター放射強度(500 nm)の最大ドナー放射強度(420 nm)に対する比として計算した。

【0223】

結果

漸増量のラクトースの存在下でのLacB1センサーに対するBRET²比は、図3に示される。

【0224】

(実施例4)

ラクトース結合におけるリンカー長の効果

10

材料及び方法

炭水化物結合ドメインと化学発光ドナードメイン及び/又はアクセプタードメインを連結する様々な長さリンカーの効果を調査するために、ラクトースセンサーを構築して、リンカー配列-GGTGGG-をBgaR(LacB2;配列番号16)の前後、BgaR(LacB3;配列番号17)の前及びBgaR(LacB4;配列番号18)の後に含めた。LacB2センサーは、RLuc8-GGTGGG-BgaR-GGTGGG-GFP²を含有する。LacB3センサーは、RLuc8-GGTGGG-BgaR-GFP²を含有する。LacB4センサーは、RLuc8-BgaR-GGTGGG-GFP²を含有する。ラクトースセンサーの模式的な表現は、図4に示される。リンカー位置は、LacB1の同じ領域と比較して暗くしたセクションによって示される。これらのセンサーの1 mMラクトースに対する結合を、実施例3に記載されるBRETアッセイを使用して評価した。

20

【0225】

結果

1 mMラクトースの存在及び非存在下でのLacB2、LacB3及びLacB4センサーに対するBRET²比は、図5に示される。1 mMラクトースの存在及び非存在下でのLacB1センサーに対するBRET²比は、比較として含まれる。全てのセンサーが1 mMラクトースの存在下でBRET²比の変化を示したが、LacB1(リンカーなし)は、1 mMラクトースの存在下でBRET²比の最も大幅(substantial)な変化をもたらした。

【0226】

(実施例5)

LacB1及びLacF1センサーの感度

30

無ラクトース及びラクトース低下乳を生成するのに使用されるプロセスは、ガラクトシダーゼ(ラクターゼとも呼ばれる)を使用して、二糖ラクトースをその2つの成分の单糖であるガラクトース及びグルコースに切断する。ガラクトース及びグルコースは、最終的な乳製品中に高濃度で残る。それらのラクトースとの構造上の類似性に起因して、ガラクトース及びグルコースは、ラクトースバイオセンサーに競合的に結合する可能性を有し、ラクトースのトレースレベルの測定に干渉する。加えて、長期保存製品(例えば、UHT又は乳粉末であるが、殺菌した「新鮮な」乳)を産する乳の加熱処理は、二糖ラクトースからラクトロースへの部分的な異性化をもたらす。典型的には、ラクトロースのレベルは、UHT乳中で0.32から2.16 mM(0.011から0.074%(w/v))に到達する(Moralesら、2000; Marconiら、2004)。ラクトロースは、-ガラクトシダーゼ処理によってその成分の单糖に加水分解されない。单糖ガラクトース及びグルコースに類似して、熱処理乳中のラクトロースの存在は、乳製品中の低レベルのラクトースの測定に干渉する可能性を有する。

40

【0227】

材料及び方法

LacB1センサーが糖、例えば、ガラクトース、グルコース及びラクトロースによる干渉を回避するのに十分な特異性及び感度を有するかどうかを決定するために、ラクトース(-D-ガラクトシル-(1-4)-D-グルコース)に構造的に関連する、ある範囲の二糖、すなわち、ラクトロース(4-O- -D-ガラクトシル-D-フルクトース)、メリビオース(D-ガラクトシル- (1-6)-D-グルコース)、マルトース(4-O- -D-グルコシル-D-グルコース)、セロビオース(4-O- -D-グルコシル-D-グルコース)、トレハロース(-D-グルコシル-(1-1)- -

50

D-グルコース)及びスクロース(-D-フルクトシル-D-グルコース)、並びに単糖、ガラクトース及びグルコースに結合するLacB1センサーの能力を、実施例2及び3に記載されるBRETアッセイを使用して評価した。

【0228】

簡潔に述べると、LacB1センサーを、0.1mM又は1mMラクトース、1mMラクトロース、メリビオース、マルトース、セロビオース、トレハロース又はスクロース又は1mM又は10mMガラクトース又はグルコースと別々にインキュベートした。

【0229】

次に、グルコース及びガラクトースの存在下でLacB1及びLacF1センサーに関する「補正」キャリブレーション曲線を、実施例3の詳細なプロトコールに従うが、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の処理乳の1/10希釈(1 in 10 dilution)をシミュレートし、グルコース及びガラクトースを、[ラクトース]+0.5x[ガラクトース]+0.5x[グルコース]=13.9mM及び[ガラクトース]=[グルコース]である濃度で含めて作成した。例えば、139mMのラクトースがラクターゼによって処理される前の乳中に見出される場合、1mMの残留[ラクトース]までラクターゼ処理後、ガラクトース及びグルコースは138mMの濃度で存在するであろう。PBS中でのそのようなラクターゼ処理乳試料の1/10希釈のケースでは、希釈した試料は0.1mMの残留ラクトース及び13.8mMのガラクトース及びグルコース両方を含有するであろう。したがって、反応混合物が0.1mMラクトースを含有する場合、13.8mMグルコース及び13.8mMガラクトースも添加した。

10

【0230】

希釈剤として、低分子量の成分、特にラクトース、ガラクトース及びグルコースを除去するため透析された無ラクトース完全脂肪乳(lactose-free full fat milk)を使用し、グルコース及びガラクトースの存在下で、LacB1及びLacF1センサーについての「補正」キャリブレーション曲線も構築した。除去するために、完全クリーム無ラクトース乳(full cream lactose-free milk)をプロトコールに従い透析した。10mLの無ラクトース完全脂肪乳を、1000mL PBSに対し4℃で24h、二回透析して、無ラクトース乳中に存在する、いかなる残留ラクトースも除去した。透析した乳の1mLアリコートを、ドライアイスで凍結し、-80℃で貯蔵した。透析した乳を、PBS中に1/10希釈で「乳マトリックス」として使用した。

20

【0231】

結果及び考察

30

30分間の、ラクトース、ラクトロース、メリビオース、マルトース、セロビオース、トレハロース、スクロース、ガラクトース及びグルコースの存在下のLacB1センサーに対するBRET²比の変化は、図6に示される。

【0232】

1mM(0.034% w/v)の二糖ラクトロースとLacB1センサーのインキュベーションは、およそ21%のBRET²比の変化をもたらし、一方、他の二糖は、3から10%の間のBRET²比の変化をもたらした。比較として、1mM(0.034%)ラクトースの添加時のBRET²比の変化は、およそ35%であった。これは、LacB1センサーが、他の糖に対してラクトースを選択することの指標である。

40

【0233】

LacB1センサーと1及び10mM(0.018%及び0.18%)ガラクトース又はグルコースのインキュベーションは、ガラクトースでBRET²比の3及び13%の変化並びにグルコースで9及び6%の変化をもたらした。

【0234】

類似する結果は、LacB1センサーが、ラクトース、ラクトロース、メリビオース、マルトース、セロビオース、トレハロース、スクロース、ガラクトース及びグルコースの存在下で5分間インキュベートした後、セレンテラジン400aを添加した場合に得られた(図7)。

【0235】

PBS中のLacB1及びLacF1センサー並びにPBS中の10%の透析した乳に対する補正キャ

50

リプレーション曲線は、図8に示される。図8A及び図8Bは、PBS中の補正キャリプレーション曲線を示す。図8C、図8D及び図8Eは、PBS中の10%の透析した乳における補正キャリプレーション曲線を示す。補正キャリプレーション曲線は、少なくとも2 log単位にわたって直線的であり、ラクトース定量が可能である。高ラクトース含有量を有する試料を、サンプリングを10:90に緩衝剤で希釈することによる同じ方法を使用して分析することができる(図8を参照されたい)。

【0236】

(実施例6)

ラクトース及びラクトロースへのLacB1結合

実施例5で試験した糖のうち、ラクトースは、BRET²比の最も高い変化を引き起こし、
続いてラクトロースであった。LacB1がラクトース及びラクトロースに対して最も高い応
答を示したので、各個別の糖に対するバイオセンサーの親和性を更に調査した。

【0237】

材料及び方法

スペクトルスキャンを、白色96ウェルプレート(Opti-plate(商標)-96、PerkinElmer)中でルミネセンスモード(20nm増加)でSpectraMax M3プレートリーディング分光蛍光計(Molecular Devices)で記録した。1 μMの精製されたタンパク質を100 μLの最終容量でのBRETアッセイに使用し、ここでは、タンパク質及び分析物を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 10mMリン酸塩、137mM NaCl、2.7mM KCl、pH7.3)又は10%(v/v)透析した無ラクトース、完全クリーム乳(PBS中)に希釈した。精製されたタンパク質を、5分間、30
でラクトース又はラクトロースとインキュベートした。インキュベーション時間の最後
に、EtOH中の5 μLのセレンテラジン400aを(最終的なセレンテラジン400a濃度の17 μ
Mまで)添加し、スペクトルスキャンを直ちに記録した。

【0238】

データ分析

BRET²比を、500nmでのアクセプター放射強度の420nmでのドナー放射強度に対する
比として計算した。

【0239】

結果及び考察

ラクトース又はラクトロースの存在下でのLacB1センサーに対するBRET²比の変化は、
図9に示される。ラクトース及びラクトロースに対するLacB1の応答性(PBS中)は、濃度依
存的であった。ラクトースに対するLacB1の応答性は、ほとんど3 log単位にわたって準
線形的であり、EC₅₀は $12 \pm 1 \mu M$ 及び検出限界は $1 \mu M$ であった。ラクトロースに対するL
acB1の親和性は、およそ150倍弱く、EC₅₀は $2.4 \pm 0.2 \mu M$ であった。ラクトロースにつ
いての検出限界は0.1mMであり、すなわち、ラクトースについてよりも100倍高かった。
ラクトロース応答は、ほとんど2 log単位にわたって準線形的であった。ラクトロースに
に対するLacB1の検出限界(0.1mM)は、低温殺菌牛乳に見出されたラクトロースレベルより
も10倍高く($10 \mu M$)、このことは、ラクターゼ処理した低温殺菌牛乳中のラクトースの任
意の関連するレベルを決定するのに使用できるであろうことを意味する。

【0240】

10%(v/v)の透析した乳中のラクトースに対するLacB1センサーの応答は、濃度依存性
であり、EC₅₀が $21 \pm 2 \mu M$ であり、ほとんど3 log単位にわたって直線性があり、検出限
界は $1 \mu M$ であった。10%(v/v)の透析した乳中のラクトースに対するLacB1の感度及びガ
ラクトース及びグルコースの飽和濃度は、PBS中のみで観察されたものと統計学的に異
なる($11-14 \mu M$ 及び $18-23 \mu M$)。しかしながら、ラクトースに対するLacB1の親和性は、1
0%(v/v)の透析した乳又は高濃度のグルコース及びガラクトースのいずれかの存在によ
つて劇的に減少しなかった。これは、ラクトースに対するセンサーの高い選択性に起因する
及び/又は複合培地中のBRET²トランスタクション機構の効率性に起因すると考えられる
が、理論に束縛されることを望むものではない。

【0241】

10

20

30

40

50

ラクトース及びラクトロースとのLacB1結合の特徴付けにより、特に、変化を検出するためのBRET²トランスタクション機構と連結する場合に、バイオセンシングのための分析物認識エレメントとして結合タンパク質を使用することの本来備わっている能力(*intrinsic power*)が強調される。ラクトース結合転写制御因子(BgaR)を使用してLacB1を構築し、低マイクロモル範囲の感度を生じ、ラクトースと試験した二番目に最も影響を及ぼす(*potent*)糖であるラクトロースの間に観察されるEC₅₀の200倍差によって実証されるような、構造的に関連する二糖を識別する能力を有する。

【0242】

(実施例7)

シミュレートした乳システム中のラクトースへのLacB1結合

10

シミュレートした乳システム中のラクトース濃度を測定する効果を調査するために、透析した乳試料を使用し、ここで、ラクトース濃度が13.9 mM(未変更10%(v/v)全乳と同等)からゼロに低下するので、糖の総濃度は、補償する量のグルコース及びガラクトースを添加することによって一定に維持された。

【0243】

材料及び方法

完全クリーム乳を、水に対して透析して小さい分子を排除した。簡潔に述べると、20 mLの完全クリーム無ラクトース乳を、D-tube(商標)透析機(Merck、3.5 kDa MWCO)中で4、90分間、1Lの水に対して二回透析した。透析した乳の1mLアリコートを、ドライアイスで凍結し、-80 で貯蔵した。

20

【0244】

透析した乳を使用して、正確に規定レベルのラクトース、ガラクトース及びグルコースの範囲(ここで、[ラクトース]+[ガラクトース+グルコース]/2=13.9 mM)で10%(v/v)乳マトリックスを復元した。十倍希釈係数を選択して、300 μM「無ラクトース」閾値で又はそれ未満で試料中のラクトースを測定する場合のアッセイ条件を正確にシミュレートした(すなわち、ラクターゼ処理後)。BRETアッセイを、実施例6に記載される通り実施した。

【0245】

結果及び考察

シミュレートした乳システムにおけるLacB1センサーに対するBRET²比の変化は、図9に示される。これらの条件下(乳試料中の状況をそっくりにまねる)、ラクトースに対するL ODは、0.2 μM(0.00003% w/v)であった。ラクトースに対するEC₅₀は、これらの条件下で12から21 μMに少しばかり変化するが、差は統計学的に異ならない。ラクトースに対するEC₅₀は、「無ラクトース」乳製品に対する最も厳密な目的の規制標準(0.01% w/v)よりもおよそ15倍低い。10%(w/v)完全クリーム乳の存在下又は非存在下のlog濃度-応答関数の類似性は顕著であり、その理由は、後者ケースでは、より低い濃度のラクトースで、測定が、13.9 mMグルコース及びガラクトースの存在下でなされるからである。理論に束縛されることを望むものではないが、潜在的に干渉する物質を「無視する」バイオセンサーの強力な能力は、センサーの選択性、BRET²トランスタクション機構の頑健なレシオメトリックの性質及び/又は照明の外部供給源(これは、10倍希釈された場合でさえ、乳等の濁った培地中の光散乱及び増加ノイズを引き起こすであろう)の非存在から生じると考えられる。

30

【0246】

(実施例8)

ラクトースに対するCYBERTONGUE(登録商標)アッセイ

材料及び方法

LacB1を、アッセイ緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水中の0.45%ゼラチン:淡水魚の皮からの0.45%(w/v)ゼラチン(Sigma Aldrich)、58 mM Na₂H₂PO₄、17 mM NaH₂PO₄、68 mM NaCl、pH7.4)中で1200 μMに希釈した。35 μLの分析物(アッセイ緩衝液中に30 μM若しくは3 mMラクトース又はアッセイ緩衝液単独)、LacB1(1200 μM)及びセレンテラジン400a(15% EtOH/アッセイ緩衝液中に30 μM)を、CYBERTONGUE(登録商標)マイ

40

50

クロ流体チップの3つの入口の各々1つに配置し、アッセイは1200 μ L/hの流速で100秒実施した。

【0247】

BRET比を、1200 μ L/hの流速並びにドナー及びアクセプタールミネセンス強度を80から100秒の間で平均化し、CYBERTONGUE(登録商標)デバイスを使用して記録した。BRET²比を、最大アクセプター放射強度(緑色フィルター)の最大ドナー放射強度(青色フィルター)に対する比としてCYBERTONGUE(登録商標)デバイスソフトウェアプログラムによつて計算した。

【0248】

結果

10

3 mM ラクトースを有するアッセイ緩衝液に対する例のCYBERTONGUE(登録商標)デバイストレースは、図10に示される。図11に示される通り、CYBERTONGUE(登録商標)アッセイを使用して、30 μ M及び3 mMの両方でラクトースを検出することができる。30 μ M及び3 mM ラクトースの添加は、それぞれ、BRET²比においておよそ22%及び41%変化をもたらした。

【0249】

(実施例9)

全乳中のラクトースの推定。

制御された研究室条件下で規定の緩衝液中の分析物を定量するセンサーを操作することは、それ自体が難題であるが、現実の世界で分析物を正確に定量することは、更に大きな難題である。特に、複雑で、干渉をもたらす試料マトリックス、例えば、乳、乳製品及び他の生物学的試料は、バイオセンサーの性能にとって問題となり、それを劣化させる可能性がある。本明細書に記載されるセンサーの1つの使用は、種に応じて、未改变乳中のおよそ4.5から7.0%(w/v)の範囲のラクトースレベルを定量することであろう。本発明者らは、本明細書に記載されるセンサーを使用して得られたラクトース推定を比較し、現在の商業的に利用される2つの方法、連結-酵素ラクトースアッセイキット(BioVision)及びNATA認定の分析研究室において実施される屈折率検出器でのHPLCで、PBS又は10%の透析した乳マトリックス中の既知量のラクトースに対して較正した。

20

【0250】

材料及び方法

30

全乳中のラクトースの濃度を、市販のキット(The BioVisionラクトース比色/蛍光定量アッセイキット(San Francisco、USA、#K624-100))を使用して、屈折率(RI)検出を伴うHPLCにより、及び本明細書に記載されるLacB1センサーを使用して推定した。

【0251】

これらのアッセイに使用される試料は、スーパー・マーケットから購入した全殺菌牛乳(w hole pasteurized cow's milk)であった。乳の容器上の栄養パネルには、ラクトースに対する代表的な値137 mMが記載されていた。

【0252】

BioVisionラクトース比色/蛍光定量アッセイキットを、製造者の指示に従い使用して、ラクトース及びガラクトース濃度を推定した。簡潔に述べると、標準曲線を、0、2、4、6、8又は10 μ Lのラクトース標準(提供されたラクトースアッセイ緩衝液中に1 mM)を使用して用意した。要求される容量を、透明な96ウェルプレート(UV-star microplate、Greiner)の個々のウェルにピベットで移した。購入した全殺菌牛乳を、水中におよそ10⁴倍に希釈し、10 μ Lをアッセイに使用した。加えて、2 μ Lの発色プローブ、2 μ Lの酵素混合物、及び2 μ Lの西洋ワサビオキシダーゼ(HRP)を各ウェルに添加し、容量をラクトースアッセイ緩衝液で100 μ Lにし、ウェルを混合した。反応混合液を、37 °Cで60分間インキュベートし、光から保護した。Abs_{570nm}を、吸光度モード(エンドポイント測定Abs_{570nm})においてSpectraMax M3プレートリーディング分光蛍光計(Molecular Devices)で記録した。アッセイを三連で実施した。

40

【0253】

50

ラクトース濃度のHPLC推定は、民間の研究室によって実施された。簡潔に述べると、200mLの全乳を、凍結し、-80°Cで貯蔵し、ドライアイス上で民間のNATA認定試験研究室(DTS/Azure Quality、Melbourne、オーストラリア)に発送した。HPLC及びRI検出(Chaves-Servinら、2004;Southgate、1969)を使用して研究室の標準の民間のプロトコールに従って分析を実施した。結果を、完全クリーム全乳の密度として1.033g/mLを使用して100mLの乳当たりの糖のgとして報告した。エラー値は、報告されなかった。

【0254】

ラクトース濃度の推定を、本明細書に記載される通り、PBS又は10%の透析した乳マトリックス中の既知量のラクトースに対して較正した、LacB1センサーを使用して実施した。ラクトースに対するLacB1のEC₅₀は12 μMであり、すなわち、未改変牛乳中に見出されたラクトース濃度よりもおよそ10⁴倍低い。結果的に、全乳試料を、ラクトース推定の前に水中に3200倍に希釈した。

【0255】

結果

LacB1センサー、BioVisionキット及びHPLCを使用して決定した殺菌全牛乳のラクトース濃度を、Table 6(表6)に提示した。

【0256】

BioVision連結-酵素キットを使用し、製造者のプロトコールに従い、発明者らは、全乳試料のラクトース濃度が129 ± 1 mMであることを推定した。

【0257】

同じ乳の試料を、HPLC/屈折率(RI)分析によるラクトース推定に関してNATA認定研究室に提出した。研究室は、134 mMのラクトース濃度を報告した。このケースでは、エラー値は、報告されなかった。

【0258】

本明細書に記載されるLacB1センサーを使用し、発明者らは、全乳試料中のラクトース濃度が157 ± 6 mMであることを推定した。

【0259】

【表6】

Table 6. LacB1 センサー及び2つの独立した方法を使用して決定された殺菌全牛乳中のラクトース濃度の比較。

	[ラクトース](mM)	[ラクトース](% w/v)
LacB1 センサー	157 ± 6	5.4 ± 0.2
連結酵素アッセイ(BioVision)	129 ± 1	4.4 ± 0.03
RI 検出を伴う HPLC*	134*	4.6

【0260】

(実施例10)

ラクターゼ処理乳中のラクトースの推定

ラクトースバイオセンサーの更なる使用は、「低下ラクトース」又は「無ラクトース」として特徴づけられる、異なる等級のラクターゼ処理乳中のラクトースを測定することである。ラクターゼ処理乳中のラクトースの推定は、低レベルの分析物、乳培地の複雑性及びラクトース自体の測定に干渉しうる、高レベルのグルコース及びガラクトースの存在に起因して、難題である。オーストラリア及びニュージーランド食品規格(FSANZ)は、0.3%(8.8 mM)ラクトース以下を含有しているとしてラクトース低下乳製品を特定し、一方、無ラクトース製品は、「検出可能なラクトース」を含有すべきでないとの、主観的、方法依存的な規定である。欧州機関は、0.01%(w/v)(0.3 mM)に、無ラクトース食品について客観的な閾値を特定している。

10

20

30

40

50

【0261】

乳は、タンパク質及び脂質を各々およそ3%(w/v)の濃度で含む複合体マトリックスである(Kailasapathy、2009)。干渉を最小化するために、分析研究室は、乳試料から脂肪及びタンパク質をルーチン作業として沈殿させた後に、糖含有量をHPLC又は比色連結-酵素アッセイによって分析した。時間がかかり、また余分のコストがかかることに加えて、分析前の試料の後処理は、産物の変動及び試料容量の修飾に起因するエラーのリスクが増加する。HPLC又は比色連結-酵素アッセイに関連する欠点の少なくとも一部を回避している、試料中のラクトース等の炭水化物の濃度を決定する改善された方法の必要性が存在する。

【0262】

材料及び方法

10

市販の完全クリーム、「無ラクトース」牛乳中のラクトースの濃度を、市販のキット(The BioVisionラクトース比色/蛍光定量アッセイキット(San Francisco、USA、#K624-100))を使用して、屈折率(RI)検出を伴うHPLCにより、及び実施例9に記載されるLacB1センサーを使用して推定した。

【0263】

これらのアッセイに使用される試料は、市販の完全クリーム、「無ラクトース」牛乳であった。「無ラクトース」牛乳の十倍希釈物を、LacB1アッセイに使用した。

【0264】

試料中のガラクトースの濃度はまた、市販のキット(The BioVisionラクトース比色/蛍光定量アッセイキット(San Francisco、USA、#K624-100))を使用して、標準プロトコールを使用して屈折率(RI)検出を伴うHPLCにより推定された。

20

【0265】

結果

LacB1センサーを使用して、市販の完全クリーム、「無ラクトース」牛乳の十倍希釈物中のラクトース濃度を推定した。BRET²比は、16%(2.7 ± 0.1 μMの濃度と同等)に減少し、元の乳試料中の27 ± 1 μMラクトースに対応した(Table 7(表7))。

【0266】

実施例9に記載されるBioVisionラクトース比色/蛍光定量アッセイキットを使用する完全クリーム、「無ラクトース」牛乳のラクトース濃度を推定する試みは、不成功であった。これは、「無ラクトース」牛乳中に存在する高濃度のガラクトースの結果であることが考えられた。試料中のガラクトースの濃度を、163 ± 2 mMであると推定した。

30

【0267】

同じ完全クリーム、無ラクトース乳の試料を、HPLC-屈折率検出による分析のためにNATA認定分析研究室に提出した。ラクトースは、0.1%(w/v)又はおよそ3 mMの検出限界で検出されなかった(Table 7(表7))。

【0268】

【表7】

Table 7. LacB1 センサー及び2つの独立した方法を使用する新鮮な「無ラクトース」完全クリーム牛乳中のラクトース濃度の比較。

40

	[ラクトース](mM)	[ラクトース](%w/v)	[ガラクトース](mM)
LacB1 センサー	0.027 ± 0.001	0.00092 ± 0.00003	NA
連結酵素アッセイ(BioVision)	NA	NA	163 ± 2
RI 検出を伴う HPLC*	<3	<0.1	124

*エラーは引用されない

50

【 0 2 6 9 】

したがって、LacB1センサーは、無ラクトースの市販の乳製品中の残留ラクトースの濃度を直接決定するため適切であるように見える。

【 0 2 7 0 】

本出願は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、2017年8月8日に出願された豪州出願第2017903148号の優先権を主張する。

【 0 2 7 1 】

広範に記載される本発明の精神又は範囲から逸脱することなく、特定の実施形態に示されているような発明に対して、数々の変形及び/又は改変を施し得ることを当業者は理解するであろう。したがって、本発明の実施形態は、あらゆる点で、限定的ではなく例示的なものとして考慮される。

10

【 0 2 7 2 】

本明細書で議論及び/又は参照した全ての公開資料は、本明細書にその全体が組み込まれる。

【 0 2 7 3 】

本明細書に挙げた文書、法律(acts)、材料、デバイス、物品等の議論はいずれも、本発明に文脈を提供することのみを目的とする。これらの事項のいずれか又は全てが、本出願の各請求項の優先日より前に存在したからといって、先行技術基準の一部を構成していること、又は、本発明に関連する分野における共通一般知識であったことの承認と解釈されない。

20

【 0 2 7 4 】

(参考文献)

30

40

50

- Ansari et al. (2012) *Process Biochem.* 47:2427–2433.
- Aravind and Anantharaman (2003) *FEMS Microbiol. Rev.* 222:17-23.
- Aravind et al. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* 29:231-262.
- Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
- Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.
- Bajar et al. (2016) *Sensors.* 16:1488-1512.
- Chávez-Servín et al. (2004) *J. of Chromatogr. A.* 1043:211-215.
- Dacres et al. (2009a) *Anal. Biochem.* 385:194-202.
- Dacres et al. (2009b) *Biosensors and Bioelectronics* 24:1164-1170.
- Dacres et al. (2010) *Anal. Chem.* 82: 432-435.
- Dacres et al. (2011) *Biosens. Bioelectron.* 29: 119-124.
- Dacres et al. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:625-629.
- Dacres et al. (2014) Poster presentation. *Biosensors 2014*, May 27-30th, Melbourne.
- Day et al. (2004) *Luminescence* 19:8-20.
- de Wet et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 2987:725-737.
- Euber and Brunner (1979) *J. Dairy Sci.* 62:685–690.
- Erich et al. (2012) *Food Chem.* 135:2393–2396.
- Fernandes Silveira et al. (2015) *J. Chem.* id185967, 6 pages.
- Förster (1948) *Ann. Physik.* 2:55.
- Förster (1959) *Discuss. Faraday Soc.* 27:7–17.
- Förster (1960) *Rad. Res. Suppl.* 2:326.
- Franco et al. (2006) *J. Bacteriol.* 188:3024–3036.
- Franco et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35:4755–4766.
- Greer and Szalay (2002) *Luminescence* 17:43-74.
- Hartman et al. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 471-8.
- Haydon and Guest (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 63:291-295.
- Hastings (1996) *Gene* 173:5-11.
- Hushpulian et al. (2007) *Biotransformation* 25:2 – 4.
- Indyk et al. (1996) *Food Chem.* 57:575–580.
- Inouye et al. (1997) *Biochem. J.* 233:349 – 353.
- Jia et al. (2014) *Biotechnol. Bioeng.* 111:209–222.
- Kailasapathy, K. (2009) “Chemical Composition, Physical and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients; Dairy Processing & Quality Assurance”, Wiley-Blackwell, chapter 4.

10

20

30

40

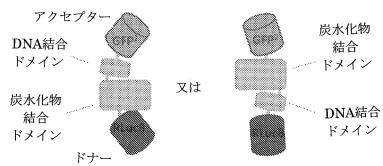
50

- Kim and Kim (2012) *Theranostics* 2:127-138.
- Kleyn (1985) *J. Dairy. Sci.* 68:2791–2798.
- Kong et al. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37:1915-1924.
- Lee et al. (2003) *J. Bacteriol.* 185:4315–4325.
- Loening et al. (2006) *Protein Eng. Des. Sel.* 19:391-400.
- Loening et al. (2007) *Nature Methods* 4:641-643.
- Lorenz et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4438-4442. 10
- Marchler-Bauer et al. (2017), *Nucleic Acids Res.* 45:D200-3.
- Marchler-Bauer et al. (2015), *Nucleic Acids Res.* 43:D222-6.
- Marchler-Bauer et al. (2011), *Nucleic Acids Res.* 39:D225-9.
- Marchler-Bauer and Bryant (2004), *Nucleic Acids Res.* 32:W327-331.
- Marconi et al. (2004) *Food Chem.* 84:447-450.
- McSweeney et al. (1993) *Food Biotechnology*. 7:143-158.
- Milk and Milk Products – Determination of Lactose Content by High Performance Liquid Chromatography (Reference method) – ISO 22622:2007.
- Montilla et al. (1996) *J. Food Prot.* 59:1061-1064.
- Morales et al. (2000) *Int. J. Food Sci. Tech.* 35:193-200. 20
- Myers and Miller (1988), *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-7.
- Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443–53.
- Pabo and Sauer (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053-95.
- Pfleger and Eidne (2006) *Nature Methods* 3:165-174.
- Rigali et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 15:12507-12515.
- Rigali et al. (2004) *Nuc. Acids Res.* 32:3418-3426.
- Southgate (1969) *J. Sci. Food. Agric.* 20:326.
- Tsenkova et al. (1999). *J. Dairy Sci.* 82:2344-2351.
- Tsien (1998) *Ann. Rev. Biochem.* 63:509-544. 30
- Verhaegen et al. (2002) *Anal. Chem.* 74:4378-4385.
- Viviani (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1833-1850.
- Wang et al. (1997) “Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons”, Wiley, 419 – 422.
- Wiethaus et al. (2008) *J. Bacteriol.* 190:487–93.
- Xinmin et al. (2008) *J. Food Compos. Anal.* 21:255–258.
- Xu et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:151-156.
- Zhang et al. (2012) *J. Bacteriol.* 194:1055–64.
- Zheng et al. (2009) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, D65:356-365. 40

【図面】

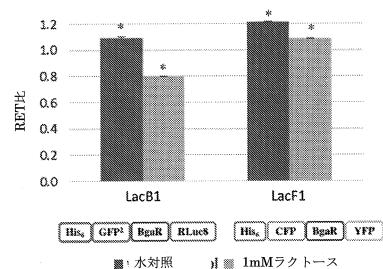
【図 1】

FIGURE 1



【図 2】

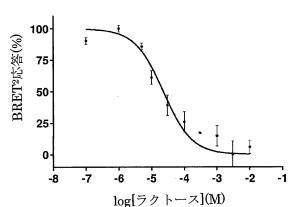
FIGURE 2



10

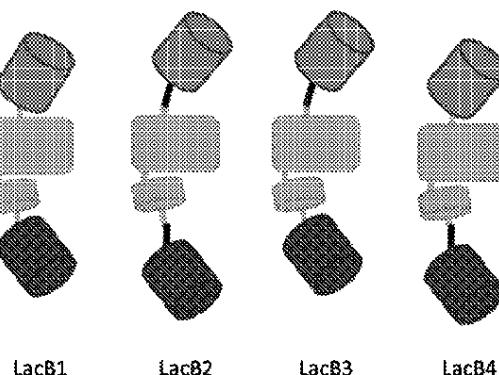
【図 3】

FIGURE 3



【図 4】

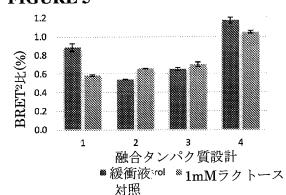
FIGURE 4



20

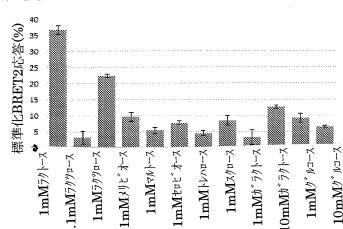
【図 5】

FIGURE 5



【図 6】

FIGURE 6

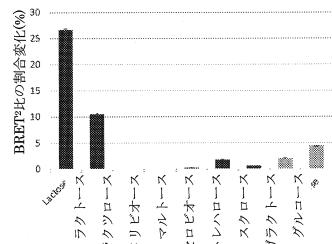


30

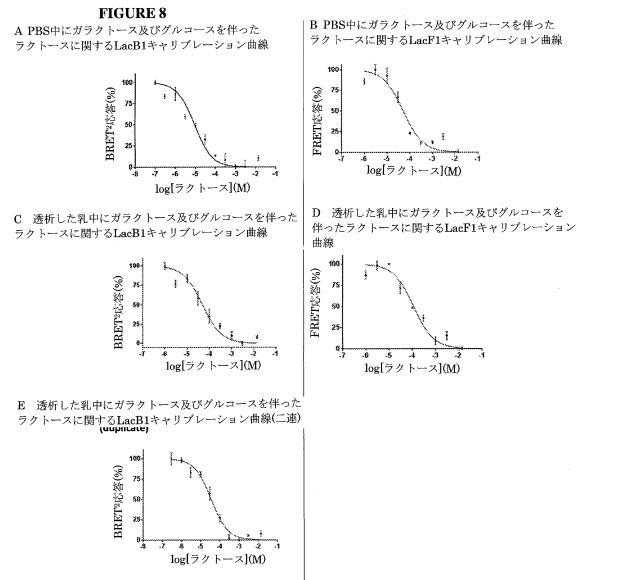
40

50

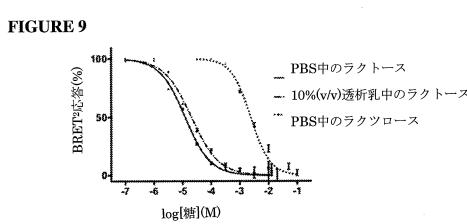
【図7】



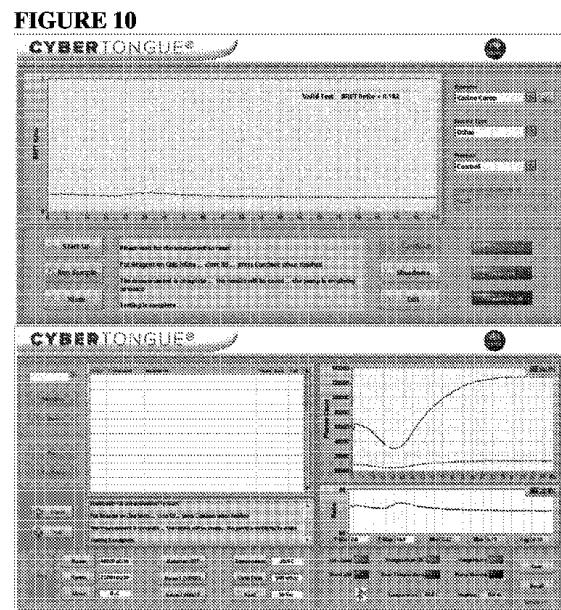
【図8】



【図9】



【図10】



10

20

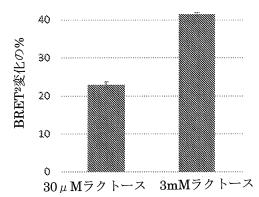
30

40

50

【図 1 1】

FIGURE 11



【配列表】

0007246372000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 Q	1/66 (2006.01)	C 1 2 Q	1/66
C 1 2 Q	1/26 (2006.01)	C 1 2 Q	1/26
C 1 2 N	15/52 (2006.01)	C 1 2 N	15/52
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/543
G 0 1 N	21/76 (2006.01)	G 0 1 N	33/543
G 0 1 N	21/64 (2006.01)	G 0 1 N	21/76
		G 0 1 N	21/64
			C

リアン・キャピタル・テリトリー・アクション・クルーニーズ・ロス・ストリート・コモンウェルス
・サイエンティフィック・アンド・インダストリアル・リサーチ・オーガナイゼーション内

(72)発明者

スティーブン・チャールズ・トロウェル
オーストラリア・2903・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・オックスレイ・ファレ
リー・クロース・3

審査官 進士 千尋

(56)参考文献

特表2009-520462 (JP, A)
国際公開第2017/087912 (WO, A2)
国際公開第2000/003727 (WO, A1)
特表2008-516607 (JP, A)
The EMBO Journal vol. 11 no.8 pp.3031 - 3038, 1992
Applied and Environmental Microbiology, 2011, Vol.77 No.2 Page.471-478
Scientific Reports, 2017 April, Vol.7, no.45994, DOI: 10.1038/srep45994

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N	1 5
C 0 7 K	1 9
C 0 7 K	1 4
C 1 2 N	9
C 1 2 Q	1 / 6 6
C 1 2 Q	1 / 2 6
G 0 1 N	3 3 / 5 3
G 0 1 N	3 3 / 5 4 3
G 0 1 N	2 1 / 7 6
G 0 1 N	2 1 / 6 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)	
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)	