

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-44995

(P2012-44995A)

(43) 公開日 平成24年3月8日(2012.3.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 5 4
C 1 2 N 11/00 (2006.01)	C 1 2 N 11/00	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	4 B 0 3 3
C 0 7 K 1/13 (2006.01)	C 0 7 K 1/13	4 B 0 5 0
C 1 2 N 11/14 (2006.01)	C 1 2 N 11/14	4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 38 O L (全 165 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-220845 (P2011-220845)  
 (22) 出願日 平成23年10月5日 (2011.10.5)  
 (62) 分割の表示 特願2007-523888 (P2007-523888) の分割  
 原出願日 平成17年7月29日 (2005.7.29)  
 (31) 優先権主張番号 60/592,499  
 (32) 優先日 平成16年7月30日 (2004.7.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 11/006,031  
 (32) 優先日 平成16年12月6日 (2004.12.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 593089149  
 プロメガ コーポレーション  
 Promega Corporation  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537  
 11-5399 マディソン ウッズ ホ  
 ロー ロード 2800番地  
 (74) 代理人 100092093  
 弁理士 辻居 幸一  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

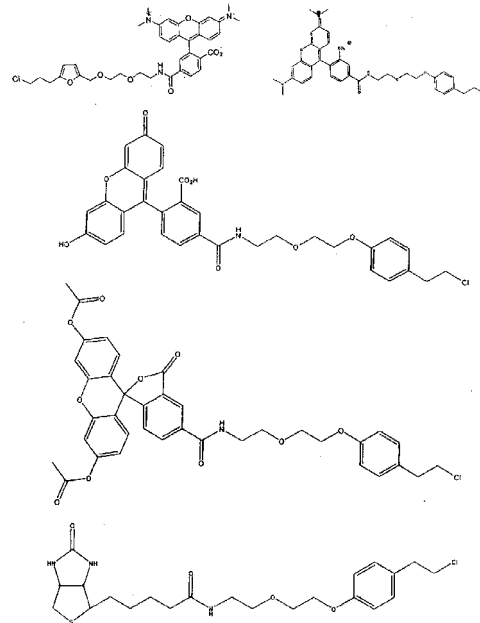
(54) 【発明の名称】 タンパク質およびその基質への、共有結合による機能性基の係留

(57) 【要約】

【課題】単数または複数の機能性基を共有結合的に連結 (係留) した変異タンパク質、またその使用方法、随意に関心タンパク質と融合させた変異ヒドロラーゼが提供される。

【解決手段】単数または複数の機能性基を、たとえば共有結合または他の安定結合を介して、本発明のタンパク質に、または本発明のタンパク質を含む融合タンパク質 (キメラ) に、係留 (連結) する。変異ヒドロラーゼは、対応する非変異 (野生型) ヒドロラーゼの基質と、野生型ヒドロラーゼと該基質の間で形成される結合よりも安定した結合を形成することができる。また、野生型ヒドロラーゼと比べて2つのアミノ酸置換を含む。

【選択図】 図5 6



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式(1): R-リンカー-A-X

(式中Rは単数または複数の機能性基である; リンカーは単数または複数の環を含む基である; A-Xはデハロゲナーゼの基質である; そしてXはハロゲンである。)

で示される化合物。

## 【請求項 2】

ロードコッカス(Rhodococcus)デハロゲナーゼの基質である、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 3】

XはClまたはBrである、請求項1~2のいずれか1項に記載化合物。

10

## 【請求項 4】

Aは(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>であり、またn=2~10である、請求項1~3のいずれか1項に記載化合物。

## 【請求項 5】

リンカーは炭素原子数約2~約30の二価分枝または非分枝炭素鎖であって、随意に単数または複数の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有し、該炭素鎖を構成する単数または複数の炭素原子は随意に非ペルオキシド-O-、-S-または-NH-に置き換わり、また該炭素鎖を構成する単数または複数の炭素原子はアリールまたはヘテロアリール環に置き換わることを特徴とする、請求項1~4のいずれか1項に記載化合物。

## 【請求項 6】

リンカーはRとAを少なくとも12原子だけ分け隔てる、請求項1~4のいずれか1項に記載化合物。

20

## 【請求項 7】

Lおよび/またはAは単数または複数のアリールまたはヘテロアリール環を含む、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 8】

少なくとも1つの機能性基はアミノ酸、アミノアシル化tRNA、化学療法薬、キレート剤、タンパク質、糖タンパク質、多糖、酵素、デハロゲナーゼ以外の酵素の基質、酵素阻害物質、自殺基質、補酵素、補因子、ビオチンまたは他のアビジン結合分子、光学検出適性分子、光学検出適性分子の消光剤、核酸分子、金属、ヘム、金属キレート剤、グルタチオン、スクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、ヌクレオチド類似体、cAMP、NTA、cAMPのリガンド、ホスファチジルイノシトール、薬物、脂質、固体担体、Ca<sup>2+</sup>結合分子、K<sup>+</sup>結合分子、Na<sup>+</sup>結合分子、pH感受性分子、放射性核種、高電子密度(electron opaque)分子、発色団、MRI造影剤、X線造影剤、NOの存在下で蛍光を発する分子、三重項増感剤、反応性酸素に対して感受性である分子、またはナノ粒子を含む、請求項1~7のいずれか1項に記載の化合物。

30

## 【請求項 9】

固体担体は表面プラズモン共鳴センサーチップ、磁性体粒子、セファロースビーズ、セルロースビーズまたは導電性担体である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項 10】

核酸分子はオリゴヌクレオチド、関心遺伝子に対応するDNA、タンパク質に結合するDNA、関心遺伝子に対応するRNA、終止コドンを含むmRNA、またはRNAi用2本鎖RNAである、請求項8に記載の化合物。

40

## 【請求項 11】

タンパク質はimmunoglobulin分子である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項 12】

化学療法薬はドキソルビシン、5-フルオロウラシルまたはCPT-11である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項 13】

脂質はポリエチレングリコール修飾リン脂質である、請求項8に記載の化合物。

50

## 【請求項14】

三重項増感剤はエオシンまたはマラカイトグリーンである、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項15】

ナノ粒子は免疫金粒子、量子ドット、常磁性体ナノ粒子、またはアップコンバージョンナノ粒子である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項16】

機能性基はATP、ADP、AMP、GTP、GDP、NADP、NAD<sup>+</sup>、フラビンアデニンヌクレオチド(FAD)、リン酸ピリドキサル、金属イオン、5'デオキシアデノシルコバラミン、テトラヒドロ葉酸補酵素A、チアミン、リポフラビン、ニコチンアミド、CoAまたは補酵素B12である、請求項8に記載の化合物。

10

## 【請求項17】

阻害物質は可逆的酵素阻害物質である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項18】

阻害物質は非可逆的酵素阻害物質である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項19】

阻害物質はキャスパーゼ阻害物質、随意に逆転写酵素阻害物質でもあるポリメラーゼ阻害物質、キナーゼ阻害物質、テロメラーゼ阻害物質またはホスファターゼ阻害物質である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項20】

光学検出適性分子は蛍光団である、請求項8に記載の化合物。

20

## 【請求項21】

機能性基はアルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼまたはアルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼ基質、またはキャスパーゼ基質である、請求項8に記載の化合物。

## 【請求項22】

2つの機能性基を含む、請求項1~7のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項23】

蛍光団とピオチンとを含む、請求項22に記載の化合物。

## 【請求項24】

少なくとも2つの機能性基が2種類の酵素に対応する基質を含む、請求項22に記載の化合物。

30

## 【請求項25】

1つの機能性基はルシフェリン基質であり、別の機能性基はプロテアーゼ基質である、請求項24に記載の化合物。

## 【請求項26】

3つの機能性基を含む、請求項1~7のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項27】

3つの機能性基は蛍光団、プロテアーゼ認識部位をもつタンパク質、および該蛍光団に対応する消光剤を含む、請求項26に記載の化合物。

## 【請求項28】

40

式(1): R-リンカー-A-X

[式中Rは単数または複数の機能性基であり、リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖であり、A-Xはデハロゲナーゼ基質であり、またXはハロゲン原子であり、少なくとも1つの機能性基はアミノアシル化tRNA、化学療法薬、キレート剤、光学検出適性分子の消光剤、多糖、表面プラズモン共鳴センサーチップ、セファロースビーズ、セルロースビーズ、導電性担体、ポリエチレングリコール修飾リン、X線造影剤、三重項増感剤、免疫金粒子、量子ドット、常磁性体ナノ粒子、アップコンバージョンナノ粒子、NADP、NAD<sup>+</sup>、フラビンアデニンヌクレオチド(FAD)、リン酸ピリドキサル、金属イオン、5'デオキシアデノシルコバラミン、テトラヒドロ葉酸補酵素A、チアミン、リポフラビン、ニコチンアミド、CoA、補酵素B12、スクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、グルタチオ

50

ン、ヘム、ATP、ADP、AMP、GTP、GDP、ヌクレオチド類似体、NTA、cAMP、ホスファチジルイノシトール、cAMPのリガンド、自殺基質、アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼ、可逆的酵素阻害物質または非可逆的酵素阻害物質であるか、または2以上の機能性基が存在する場合には、それらの機能性基は随意に蛍光団とビオチンまたは2種類の酵素に対応した2つの基質を含むか、または3以上の機能性基が存在する場合には、それらの機能性基は随意に蛍光団、プロテアーゼ認識部位をもつタンパク質、および該蛍光団に対応する消光剤を含む]

で示される化合物。

【請求項29】

対応する野生型デハロゲナーゼと比べて少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、単数または複数の機能性基を含むデハロゲナーゼ基質と結合を形成する変異デハロゲナーゼであって、該結合は対応する野生型デハロゲナーゼと基質の間で形成される結合よりも安定しており、また変異デハロゲナーゼにおける少なくとも1つのアミノ酸置換は野生型デハロゲナーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または野生型デハロゲナーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また第2の置換は野生型デハロゲナーゼにあって、活性部位ポケット内の、しかも野生型デハロゲナーゼに結合したデハロゲナーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基の置換であることを特徴とする変異デハロゲナーゼ。

10

【請求項30】

第2の置換は、単数または複数の電荷を導入する、単数または複数の水素結合を導入する、または立体障害を緩和することで、基質との結合を強めるようなアミノ酸の置換である、請求項29に記載の変異デハロゲナーゼ。

20

【請求項31】

少なくとも1つの置換はロードコッカス・ロードクロウス(*Rhodococcus rhodochrous*)デハロゲナーゼのアミノ酸残基272に対応する位置での置換である、請求項29~30のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項32】

アミノ酸残基272に対応する位置の置換アミノ酸はフェニルアラニン、グリシンまたはアラニンである、請求項31に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項33】

少なくとも1つの置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基106に対応する位置での置換である、請求項29~32のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

30

【請求項34】

アミノ酸残基106に対応する位置の置換アミノ酸はシステインまたはグルタミン酸である、請求項33に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項35】

第2の置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換である、請求項29~34のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項36】

アミノ酸残基175に対応する位置の置換アミノ酸はメチオニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、セリンまたはシステインであり、アミノ酸残基176に対応する位置の置換アミノ酸はセリン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、トレオニン、アラニンまたはアルギニンであり、またはアミノ酸残基273に対応する位置のアミノ酸置換はロイシン、メチオニンまたはシステインである、請求項35に記載の変異デハロゲナーゼ。

40

【請求項37】

野生型デハロゲナーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型デハロゲナーゼに結合したデハロゲナーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基に第3の、また随意に第4の、置換をさらに含む、請求項29~36のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

50

## 【請求項 38】

第3または第4の置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換である、請求項37に記載の変異デハロゲナーゼ。

## 【請求項 39】

アミノ酸残基175に対応する位置の置換アミノ酸はメチオニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、セリンまたはシステインであり、アミノ酸残基176に対応する位置の置換アミノ酸はセリン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、トレオニン、アラニンまたはアルギニンであり、またはアミノ酸残基273に対応する位置のアミノ酸置換はロイシン、メチオニンまたはシステインである、請求項38に記載の変異デハロゲナーゼ。

10

## 【請求項 40】

単数または複数の関心タンパク質をさらに含み、以って融合タンパク質を生成する、請求項29～39のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

## 【請求項 41】

対応する野生型デハロゲナーゼに対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項29～40のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

## 【請求項 42】

対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成する変異ヒドロラーゼであって、また変異ヒドロラーゼにおける1つのアミノ酸置換は野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また第2の置換は野生型ヒドロラーゼにあって、活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3～5 内の、アミノ酸残基の置換であることを特徴とする変異ヒドロラーゼ。

20

## 【請求項 43】

第2の置換は、単数または複数の電荷を導入する、単数または複数の水素結合を導入する、または立体障害を緩和することで、基質との結合を強めるようなアミノ酸の置換である、請求項42に記載の変異ヒドロラーゼ。

30

## 【請求項 44】

セリン- -ラクタマーゼではない、請求項42に記載の変異ヒドロラーゼ。

## 【請求項 45】

第2の置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換である、請求項42～44のいずれ1項に記載の変異ヒドロラーゼ。

## 【請求項 46】

アミノ酸残基175に対応する位置の置換アミノ酸はメチオニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、セリンまたはシステインであり、アミノ酸残基176に対応する位置の置換アミノ酸はセリン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、トレオニン、アラニンまたはアルギニンであり、またはアミノ酸残基273に対応する位置のアミノ酸置換はロイシン、メチオニンまたはシステインである、請求項45に記載の変異ヒドロラーゼ。

40

## 【請求項 47】

野生型デハロゲナーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型デハロゲナーゼに結合したデハロゲナーゼ基質の3～5 内の、アミノ酸残基に第3の、また随意に第4の置換をさらに含む請求項42～46のいずれ1項に記載の変異ヒドロラーゼ。

## 【請求項 48】

第3または第4の置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換である、請求項47に記載の変異ヒドロラーゼ。

## 【請求項 49】

50

アミノ酸残基175に対応する位置の置換アミノ酸はメチオニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、セリンまたはシステインであり、アミノ酸残基176に対応する位置の置換アミノ酸はセリン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、トレオニン、アラニンまたはアルギニンであり、またはアミノ酸残基273に対応する位置のアミノ酸置換はロイシン、メチオニンまたはシステインである、請求項48に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項50】

変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定するための

a) 請求項42～49のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼを、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させるステップ; および

b) 該機能性基の存在または量を検出または測定し、以って変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定するステップを含む方法。

10

【請求項51】

試料中の関心分子、細胞または細胞内小器官を単離するための

a) 請求項42～49のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼと単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを含み、かつ関心分子、細胞または細胞内小器官と結合するタンパク質を含む融合タンパク質と試料を接触させるステップ; および

b) 該関心分子、細胞または細胞内小器官を単離するステップを含む方法。

20

【請求項52】

少なくとも1つの機能性基は固体担体または固体担体と結合する分子である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

関心分子はタンパク質である、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

請求項42～49のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼを含む細胞を、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させて、細胞を標識するようにするステップを含む細胞標識の方法。

【請求項55】

機能性基の存在または量を検出または測定するステップをさらに含む、請求項54に記載の方法。

30

【請求項56】

変異ヒドロラーゼは細胞内または細胞表面に存在する、請求項50～55のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

変異ヒドロラーゼは単数または複数の関心タンパク質をさらに含み、以って融合タンパク質を生成する、請求項50～56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

関心タンパク質はGSTまたはFLAGである、請求項57に記載の方法。

40

【請求項59】

1つの関心タンパク質は変異ヒドロラーゼを細胞膜または小胞体に誘導する、請求項57に記載の方法。

【請求項60】

関心タンパク質はインテグリンまたはそのドメイン、カドヘリンまたはそのドメイン、リガンド依存性イオンチャンネルまたはそのドメイン、またはHERGチャンネルまたはそのドメインである、請求項57に記載の方法。

【請求項61】

融合タンパク質は、変異ヒドロラーゼを小胞体へと誘導するタンパク質とグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)シグナル配列である別のタンパク質という2つの関心タン

50

パク質を含む、請求項57に記載の方法。

【請求項62】

ヒドロラーゼはデハロゲナーゼである、請求項56～61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

少なくとも1つの機能性基はアミノ酸、タンパク質、糖タンパク質、核酸分子、薬物、脂質、ビオチン、固体担体、光学検出適性分子である、請求項50～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項64】

少なくとも1つの機能性基は蛍光団である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

基質は2つの機能性基を含む、請求項50～64のいずれか1項に記載の方法。

【請求項66】

基質は請求項1～28のいずれか1項に記載の化合物である、請求項50～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項67】

変異ヒドロラーゼはさらに選択マーカータンパク質を含む、請求項51に記載の方法。

【請求項68】

基質に含まれる少なくとも1つの機能性基は蛍光団である、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

細胞を、基質との接触の前または後に、固定剤と接触させるステップをさらに含む、請求項51に記載の方法。

【請求項70】

細胞を基質と接触させるステップと同時並行で細胞を固定剤と接触させるステップをさらに含む、請求項51に記載の方法。

【請求項71】

細胞をメタノール、アセトンおよび/またはパラホルムアルデヒドで固定する、請求項69または70に記載の方法。

【請求項72】

変異デハロゲナーゼは特定宿主細胞で発現させるよう最適化した核酸配列によってコードされる、請求項62に記載の方法。

【請求項73】

式XXIX～XXXIVのいずれかで示される化合物。

【請求項74】

変異ヒドロラーゼは変異デハロゲナーゼであり、また基質は式(1)：R-リンカー-A-X (式中Rは単数または複数の機能性基である；リンカーはRとAを隔てる基である；A-Xはヒドロラーゼの基質である；またXはハロゲンである。)

で示される、請求項50～72のいずれか1項に記載の方法。

【請求項75】

リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖である、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

次のステップを含む、変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定する方法：

a) 変異ヒドロラーゼを、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させるステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また該基質は請求項1～28のいずれか1項に記載の化合物

10

20

30

40

50

であることを特徴とするステップ; および

b) 該機能性基の存在または量を検出または測定し、以って変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定するステップ。

【請求項77】

変異ヒドロラーゼは細胞内に存在する、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

次のステップを含む、試料中の関心分子、細胞または細胞内小器官を単離する方法:

a) 試料を、変異ヒドロラーゼと単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを含む融合タンパク質と接触させるステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、該融合タンパク質は関心分子、細胞または細胞内小器官と結合するタンパク質を含み、また該基質は請求項1~28のいずれか1項に記載の化合物であることを特徴とするステップ; および

b) 該関心分子、細胞または細胞内小器官を単離するステップ。

【請求項79】

次のステップを含む、細胞を標識する方法:

変異ヒドロラーゼを含む細胞を、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させて、細胞を標識するようにするステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質と、*Rhodococcus rhodochrous* デハロゲナーゼの位置175、176または273に対応するアミノ酸残基においてエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ。

【請求項80】

機能性基の存在または量を検出または測定するステップをさらに含む、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

請求項42~49のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼをコードするポリヌクレオチド

。

【請求項82】

対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも2つのアミノ酸置換を含む変異ヒドロラーゼであって、1つの置換は*Rhodococcus rhodochrous* デハロゲナーゼのアミノ酸残基272に対応する位置または*Rhodococcus rhodochrous* デハロゲナーゼのアミノ酸残基106に対応する位置での置換であり、第2の置換は*Rhodococcus rhodochrous* デハロゲナーゼの位置175、176または273に対応するアミノ酸残基の置換であることを特徴とする変異ヒドロラーゼ。

【請求項83】

さらに第3および任意に第4の置換を位置175、176または273に対応するアミノ酸残基に含む、請求項82に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項84】

*Rhodococcus rhodochrous* デハロゲナーゼのアミノ酸残基175および272に対応する位置に置換がある変異デハロゲナーゼである、請求項82に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項85】

10

20

30

40

50

アミノ酸残基176および/または273に対応する位置に置換をさらに含む、請求項84に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項86】

Rhodococcus rhodochrousデハロゲナーゼのアミノ酸残基175に対応する位置に少なくとも1つの置換を含む熱安定性変異デハロゲナーゼであって、該置換はアミノ酸残基175に対応する位置に変異を含まない変異デハロゲナーゼと比べた場合の熱安定性の向上と関連することを特徴とする熱安定性変異デハロゲナーゼ。

【請求項87】

置換アミノ酸はメチオニンである、請求項86に記載の熱安定性デハロゲナーゼ。

【請求項88】

次のステップを含む、試料中の関心分子、細胞または細胞内小器官を単離する方法：  
試料を融合タンパク質と接触させて関心分子、細胞または細胞内小器官を単離しうるようにするステップであって、該融合タンパク質は第1部分と変異ヒドロラーゼとに結合しうる第1タンパク質、第3部分に結合しうる第2部分に連結した単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質、該第3部分と関心分子、細胞または細胞内小器官と結合するタンパク質との融合体、および固定化されたまたは固定化しうる第1部分を含み、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ。

【請求項89】

第1タンパク質はFlagタグまたはGSTである、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

第1部分は抗体またはその断片である、請求項88に記載の方法。

【請求項91】

第3部分はHisタグである、請求項88に記載の方法。

【請求項92】

次のステップを含む、関心分子を単離する方法：  
a) 単数または複数の融合タンパク質を含む試料であってそのうちの少なくとも1つは変異ヒドロラーゼと関心分子に結合したタンパク質とを含む融合タンパク質である試料と単数または複数のヒドロラーゼ基質を含む固体担体とを準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ；および

b) 該試料と該固体担体を接触させて関心分子を単離しうるようにするステップ。

【請求項93】

次のステップを含む、関心タンパク質を単離する方法：

a) 単数または複数の融合タンパク質を含む試料であってそのうちの少なくとも1つは変異ヒドロラーゼと関心タンパク質とを含む融合タンパク質である試料と単数または複数のヒドロラーゼ基質を含む固体担体とを準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合

10

20

30

40

50

を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ; および

b) 該試料と該固体担体を接触させて関心タンパク質を単離しうるようにするステップ。

【請求項 9 4】

関心分子はクロマチンである、請求項92に記載の方法。

【請求項 9 5】

固体担体は表面プラズモン共鳴チップ、磁性体粒子、膜、ガラス、セルロース、自己組織化単分子膜、マルチウェルプレートのウェル、電子伝導性表面またはアガロースビーズである、請求項92~94のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 9 6】

複数の融合タンパク質は異なる関心分子にタンパク質を結合させている、請求項92に記載の方法。

【請求項 9 7】

複数の融合タンパク質は異なる関心タンパク質を含む、請求項92に記載の方法。

【請求項 9 8】

変異ヒドロラーゼは少なくとも2つの置換を含み、第2の置換は野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基の置換である、請求項92~97のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼ

20

【請求項 9 9】

第2の置換はRhodococcus rhodochrousデハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置の置換である請求項98に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基に、第3の、また随意に第4の、置換をさらに含む、請求項98に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

第2の置換は、単数または複数の電荷を導入する、単数または複数の水素結合を導入する、または立体障害を緩和することで、基質との結合を強めるようなアミノ酸の置換である、請求項98に記載の方法。

30

【請求項 1 0 2】

次のステップを含む、単数または複数の関心分子を試料から単離する方法:

a) 変異ヒドロラーゼを含む固体担体、および少なくとも1つは単数または複数の関心分子と結合することができる単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ; および

40

b) 該試料、該固体担体および該ヒドロラーゼ基質を接触させて単数または複数の関心分子を単離しうるようにするステップ。

【請求項 1 0 3】

固体担体は磁性体粒子、ナノ粒子、電子伝導性担体、マルチウェルプレートのウェル、表面プラズモン共鳴センサーチップ、ガラス、膜、プラスチック表面またはアルギン酸である、請求項102に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

50

1つの機能性基はグルタチオン、ビオチンまたは他のアビジン結合分子、金属、NTA、スクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、酵素基質、酵素阻害物質、関心遺伝子に対応するDNA、タンパク質に結合するDNA、または関心遺伝子に対応するRNAである、請求項102または103に記載の方法。

【請求項105】

機能性基は可逆的酵素害物質である、請求項104に記載の方法。

【請求項106】

関心分子はタンパク質またはペプチドと融合している、請求項102に記載の方法。

【請求項107】

タンパク質またはペプチドはGST、FLAG-タグ、Strep-タグ、カルモジュリン結合ペプチド、NuA、マルトース結合ペプチド、ビオチン化ペプチド、チオレドキシソ、低分子量のユビキチン様修飾因子またはHis-タグである、請求項106に記載の方法。

10

【請求項108】

関心分子はタンパク質、遺伝子、RNAまたはペプチド核酸である、請求項102に記載の方法。

【請求項109】

変異ヒドロラーゼは少なくとも2つの置換を含み、第2の置換は野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内の、アミノ酸残基の置換である、請求項102~108のいずれか1項に記載の方法。

【請求項110】

第2の置換は、単数または複数の電荷を導入する、単数または複数の水素結合を導入する、または立体障害を緩和することで、基質との結合を強めるようなアミノ酸の置換である、請求項102~108のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項111】

第2の置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置の置換である、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内の、アミノ酸残基に、第3の、また随意に第4の、置換をさらに含む、請求項102~110のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項113】

次のステップを含む、単数または複数の関心分子を試料から単離する方法：

試料、変異ヒドロラーゼ、および少なくとも1つは関心分子と結合することができる単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を接触させて単数または複数の関心分子を単離しようとするようにするステップであって、試料は変異ヒドロラーゼと少なくとも1つは関心分子と結合することができる単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を含むか、または試料は少なくとも1つは関心分子および変異ヒドロラーゼと結合することができる単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を含み、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ。

40

【請求項114】

次のステップを含む、試料中の単数または複数の関心分子を検出する方法：

a) 試料、変異ヒドロラーゼ、および少なくとも1つは関心分子と結合することができる単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を接触させるステップであって、試料は変異ヒドロラーゼと少なくとも1つは関心分子と結合することができる単数または複

50

数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を含むか、または試料は少なくとも1つは関心分子および変異ヒドロラーゼと結合することができる単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質を含み、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ; および

b) 関心分子の存在または量を検出または測定するステップ。

10

【請求項 1 1 5】

少なくとも1つの反応性基はルシフェリン、プロテアーゼ認識部位、蛍光団、蛍光団の消光剤、DNAまたはRNA、関心遺伝子またはその一部分に対応し随意にタンパク質に結合するDNAまたはRNA、グルタチオン、金属、NTA、スクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、酵素基質、酵素阻害物質、ビオチンまたは他のアビジン結合分子、ホスファチジルイノシトール、cAMP対応リガンド、蛍光cAMP、終止コドンを含むmRNA、またはアミノアシル化tRNAである、請求項113または114に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

関心分子はタンパク質、酵素、cAMP、RNA、DNA、転写複合体、または翻訳複合体である、請求項113または114に記載の方法。

20

【請求項 1 1 7】

酵素はキナーゼ、ホスホジエステラーゼまたはプロテアーゼである、請求項116に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

プロテアーゼはカスパーゼである、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

キナーゼはホスファチジルイノシトール3キナーゼである、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

基質は少なくとも2つの機能性基を含む、請求項113または114に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

1つの機能性基はホスファチジルイノシトールであり、別の機能性基は蛍光団である、請求項120に記載の方法。

30

【請求項 1 2 2】

少なくとも1つの機能性基は関心分子に結合せず、また発光性または蛍光性である、請求項120に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

関心分子に結合しない少なくとも1つの機能性基ルシフェラーゼ基質である、請求項120に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

少なくとも1つの機能性基は光学検出適性の分子である、請求項113または114に記載の方法。

40

【請求項 1 2 5】

少なくとも1つの機能性基は蛍光団である、請求項124に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

基質は少なくとも3つの機能性基を含む、請求項124に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

変異ヒドロラーゼは少なくとも2つの置換を含み、第2の置換は野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内の、アミノ酸残基の置換である、請求項113~126のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

50

第2の置換はRhodococcus rhodochrousデハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置の置換である、請求項127に記載の方法。

【請求項129】

野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基に、第3の、また随意に第4の、置換をさらに含む、請求項113~128のいずれか1項に記載の方法。

【請求項130】

第2の置換は、単数または複数の電荷を導入する、単数または複数の水素結合を導入する、または立体障害を緩和することで、基質との結合を強めるようなアミノ酸の置換である、請求項113~129のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項131】

変異ヒドロラーゼは固体担体に結合させる、請求項113に記載の方法。

【請求項132】

基質はホスファチジルイノシトールを含み、また32P、ガリウムIII および/またはNTAを使用してホスファチジルイノシトールキナーゼが検出される、請求項113または114に記載の方法。

【請求項133】

変異ヒドロラーゼを単数または複数のタンパク質に融合し、以って融合タンパク質を生成させる、請求項92、93、102、113または114のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項134】

単数または複数のタンパク質はHis-タグ、GST、Stret-タグ、ビオチン、免疫グロブリンまたはその断片、またはカルモジュリン結合タンパク質である、請求項127に記載の方法。

【請求項135】

変異ヒドロラーゼは変異デハロゲナーゼであり、また基質は式(1): R-リンカー-A-X (式中Rは単数または複数の機能性基であり、リンカーはRとAを隔てる基であり、A-Xはヒドロラーゼ基質であり、またXはハロゲンであって、リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖であるか、または単数または複数の環を含む基である。)で示される化合物である、請求項92、93、102、113または114のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項136】

次のステップを含む、細胞内の単数または複数の関心分子を検出する方法:

a) 変異ヒドロラーゼを含む細胞を、複数の機能性基であってそのうちの少なくとも第1機能性基は関心分子に結合しその結合により第2機能性基の性質を変化させる機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させるステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ;

40

b) 第2機能性基の存在または量を検出または測定するステップ。

【請求項137】

次のステップを含む、トランスジェニック動物の細胞を標識する方法:

a) トランスジェニック非ヒト動物であってその細胞のゲノムを随意に、変異ヒドロラーゼまたは変異ヒドロラーゼを含む融合タンパク質を随意にターゲティングペプチドと併せてコードする核酸断片に作動可能に連結した・随意に組織特異的または細胞特異的な・転写調節配列を含む発現カセットにより拡張したトランスジェニック動物を準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも

50

1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ; および

b) 該トランスジェニック非ヒト動物またはその細胞を、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させるステップ。

【請求項138】

変異ヒドロラーゼを血液細胞の細胞表面で発現させる、請求項137に記載の方法。

10

【請求項139】

次のステップを含む、動物を標識する方法:

単数または複数の機能性基を含む変異ヒドロラーゼまたは該変異ヒドロラーゼを含む融合タンパク質を随意にターゲティングペプチドと併せてコードする核酸断片に作動可能に連結した・随意に組織特異的または細胞特異的な・転写調節配列を入れた発現カセットを含む細胞を、非ヒト動物に導入するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ。

20

【請求項140】

次のステップを含む、細胞内の単数または複数の関心タンパク質または細胞活性を選択的に阻害する方法:

a) 変異ヒドロラーゼと関心タンパク質とを含む融合タンパク質を含む細胞を含む試料をヒドロラーゼ基質と接触させ、または変異ヒドロラーゼと関心タンパク質とを含む融合タンパク質をコードする発現カセットを細胞をヒドロラーゼ基質と接触させ、以って混合体とするステップであって、該ヒドロラーゼ基質は単数または複数の機能性基を含み、そのうちの少なくとも1つはある種の波長の光を照射されると一重項酸素を生成し、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とするステップ; および

30

b) 該混合体にある種の波長の光を照射するステップ。

【請求項141】

1つの機能性基はエオシンまたはマラカイトグリーンである、請求項140に記載の方法。

40

【請求項142】

変異ヒドロラーゼを含む固体担体であって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とする固体担体。

【請求項143】

50

磁性体粒子、プラスチック、表面プラズモン共鳴センサーチップ、膜、ガラス、セルロース、自己組織化単分子膜、マルチウェルプレートのウェル、ナノ粒子、アガロースビーズ、または電子伝導性表面である、請求項142に記載の固体担体。

【請求項144】

グルタチオン、NTA、ホスファチジルイノシトール、cAMP、第1ヒドロラーゼ基質以外の酵素基質、酵素阻害物質、ビオチンまたは他のアビジン結合分子、アミノアシル化tRNA、またはスクシンイミジルエステルまたはアルデヒド基を含む第1ヒドロラーゼ基質。

【請求項145】

次のステップを含む、試料中の関心分子を検出する方法：

- a) 第1融合タンパク質と第2融合タンパク質とを含む複合体であって、第1融合タンパク質は変異ヒドロラーゼと第3タンパク質に結合しうる第1タンパク質とを含み、第1融合タンパク質中の変異ヒドロラーゼは単数または複数の・うち1つは蛍光団である・機能性基を含む第1基質と結合し、また第2融合タンパク質は第2基質に結合する第2タンパク質と該第3タンパク質とを含み、該第2タンパク質は単数または複数の・うち1つは第1基質の蛍光団を消光するまたは外形公団とは異なる蛍光団である・機能性基を含む第2基質に結合し、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とする複合体を準備するステップ；
- b) 該複合体を該試料と合わせるステップ；および
- c) 蛍光を検出または測定するステップ。

10

20

【請求項146】

次のステップを含む、試料中の関心分子を検出する方法：

- a) 第1融合タンパク質と第2融合タンパク質とを含む複合体であって、第1融合タンパク質は変異ヒドロラーゼと第2タンパク質に結合しうる第1タンパク質とを含み、第1融合タンパク質中の変異ヒドロラーゼは単数または複数の・うち1つは蛍光団である・機能性基を含む第1ヒドロラーゼ基質と結合し、また第2融合タンパク質は該第2タンパク質と蛍光または発光レポータータンパク質とを含み、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とする複合体を準備するステップ；
- b) 該複合体を該試料と合わせるステップ；および
- c) 蛍光および/または発光を検出または測定するステップ。

30

40

【請求項147】

第1タンパク質はPKA調節サブユニットまたはPKA触媒サブユニット、またはその部分であって完全長サブユニットと実質的に同じ結合活性を有する部分である、請求項146に記載の方法。

【請求項148】

関心分子はcAMPである、請求項145または146に記載の方法。

【請求項149】

第2タンパク質は第2基質と安定結合を形成する変異ヒドロラーゼである、請求項145に記載の方法。

【請求項150】

50

次のステップを含む、細胞中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法：

a) 第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセットと異種プロテアーゼ認識部位を含む第1修飾転写抑制因子タンパク質をコードする第2核酸断片に連結した第2プロモーターを含む第2発現カセットとを含む細胞または細胞溶解液であって、プロテアーゼの不存在下では第1修飾転写抑制因子タンパク質が第1核酸断片に結合し以って第1プロモーターからの転写を抑制することができ、またプロテアーゼの存在下では、第1修飾転写抑制因子タンパク質の第1核酸断片への結合が阻害されることを特徴とする細胞または細胞溶解液を準備するステップ；および

b) 該細胞または細胞溶解液中のレポーター遺伝子の発現を検出または測定するステップであって、レポーターの発現または発現増大はプロテアーゼの存在を示すことを特徴とするステップ。

【請求項151】

次のステップを含む、細胞中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法：

a) 第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセット、該転写抑制因子タンパク質に対応するコード領域に作動可能に連結した融合タンパク質の第1タンパク質に結合する第2核酸断片に連結した第2プロモーターを含む第2発現カセット、および第2核酸断片に結合する第1タンパク質と該第1タンパク質が該第2核酸断片に結合すると該第2プロモーターを活性化する第2タンパク質とを含む該融合タンパク質とを含む細胞または細胞溶解液を準備するステップ；および

b) 該細胞または細胞溶解液中のレポーター遺伝子の発現を検出または測定するステップであって、レポーターの発現または発現増大はプロテアーゼの存在を示すことを特徴とするステップ。

【請求項152】

レポーター遺伝子はヒドロラーゼ基質と安定結合を形成するルシフェラーゼまたは変異ヒドロラーゼをコードする、請求項150または151に記載の方法。

【請求項153】

転写抑制因子タンパク質はtet抑制因子またはlac抑制因子タンパク質である、請求項150または152に記載の方法。

【請求項154】

検出または測定の前に、レポーター遺伝子の遺伝子産物に対応する基質を細胞または細胞溶解液に添加する、請求項150または151に記載の方法。

【請求項155】

基質は請求項1~28のいずれか1項に記載の化合物である、請求項154に記載の方法。

【請求項156】

融合タンパク質はGa14、プロテアーゼ認識部位およびVP16、ユビキチンの一部、アデニル酸シクラーゼまたはグアニル酸シクラーゼを含む、請求項151に記載の方法。

【請求項157】

細胞は第2レポーター遺伝子に連結した第2転写抑制因子タンパク質に結合する第2核酸断片に連結した第2プロモーターと第2プロテアーゼ認識部位を含む第2修飾転写抑制因子タンパク質とを含む第2発現カセットを含み、該第2修飾転写抑制因子タンパク質は第2核酸断片に結合し以って第2プロモーターからの転写を抑制することができるが、第2プロテアーゼの存在下では第2修飾転写抑制因子タンパク質の第2核酸断片への結合が阻害され、また2種類のプロテアーゼが検出または測定されることを特徴とする、請求項150に記載の方法。

【請求項158】

細胞はさらに、第2レポーター遺伝子に連結した第2転写抑制因子タンパク質に結合する第3核酸断片に連結した第3プロモーターを含む第3発現カセット、および第2転写抑制因子タンパク質に対応するコード領域に作動可能に連結した第2融合タンパク質の第3タンパク

10

20

30

40

50

質に結合する第4核酸断片に連結した第4プロモーターを含む第4発現カセットを含み、該第2融合タンパク質は第4核酸断片に結合する第3タンパク質、プロテアーゼ認識部位、および該第3タンパク質が該第4核酸断片に結合すると該第4プロモーターを活性化する第4タンパク質と含み、また2種類のプロテアーゼが検出または測定されることを特徴とする、請求項151に記載の方法。

【請求項159】

次のステップを含む、細胞中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法：

a) タンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸に連結されたプロモーターを含む発現カセットを含む細胞を準備するステップ；および

b) レポーターの発現を検出または測定するステップであって、レポーターの発現または発現の延長はプロテアーゼの存在を示すことを特徴とするステップ。

【請求項160】

タンパク質不安定化配列はPESTを含む、請求項161に記載の方法。

【請求項161】

1つのプロテアーゼはカスパーゼである、請求項150～159のいずれか1項に記載の方法。

【請求項162】

レポータータンパク質はヒドロラーゼ基質と安定結合を形成するルシフェラーゼまたは変異ヒドロラーゼをコードする、請求項150～159のいずれか1項に記載の方法。

【請求項163】

細胞は任意選択のタンパク質不安定化配列、別のプロテアーゼ認識部位および別のレポータータンパク質を含む第2融合タンパク質をコードする核酸に連結された第2プロモーターを含む第2発現カセットをさらに含む、請求項159に記載の方法。

【請求項164】

細胞を単数または複数の作用物質に接触させ、該単数または複数の作用物質がレポーター遺伝子の発現を阻害するか否かを、該単数または複数の作用物質に接触させない細胞との比較で、検出または測定するステップをさらに含む、請求項150～159のいずれか1項に記載の方法。

【請求項165】

別のレポーター遺伝子の発現を検出または測定し、以って別の分子の存在を検出または測定するステップをさらに含む、請求項150～152のいずれか1項に記載の方法。

【請求項166】

プロテアーゼは感染因子または生物兵器に対して特異的である、請求項150～152のいずれか1項に記載の方法。

【請求項167】

少なくとも1つの異種タンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合ポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、該融合ポリペプチドは該異種タンパク質不安定化配列を欠く対応するレポータータンパク質と比べて半減期が短いことを特徴とする単離核酸分子。

【請求項168】

プロモーターは調節可能なプロモーターである、請求項167に記載の単離核酸分子。

【請求項169】

レポータータンパク質はヒドロラーゼ基質と安定結合を形成するルシフェラーゼまたは変異ヒドロラーゼをコードする、請求項167に記載の方法。

【請求項170】

次のステップを含む、タンパク質を標識する方法：

細胞または翻訳反応混合体を、少なくとも1つはアミノアシル化tRNAまたはアミノ酸である単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質に接触させて、新合成タンパク質を標識するようにするステップ。

10

20

30

40

50

## 【請求項171】

新合成タンパク質を、ヒドロラーゼ基質と安定結合を形成する変異ヒドロラーゼと接触させるステップをさらに含み、該変異ヒドロラーゼは随意に固体担体に固定化されており、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とする、請求項171に記載の方法。

10

## 【請求項172】

変異ヒドロラーゼは変異デハロゲナーゼであり、また基質は式(1): R-リンカー-A-X (式中Rは単数または複数の機能性基であり、リンカーはRとAを隔てる基であり、A-Xはヒドロラーゼ基質であり、またXはハロゲンであって、リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖であるか、または単数または複数の環を含む基である。)で示される化合物である、請求項136~171のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項173】

変異ヒドロラーゼは少なくとも2つの置換を含み、第2置換は野生型ヒドロラーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内の、アミノ酸残基の置換である、請求項136~171のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項174】

プロモーター、ヒドロラーゼ基質と安定結合を形成する変異ヒドロラーゼに対応するコード領域に作動可能に連結された転写抑制因子タンパク質に結合する核酸断片を含む単離核酸分子。

## 【請求項175】

試料は生理学的試料である、請求項114に記載の方法。

## 【請求項176】

関心分子は少なくとも1つの感染因子に対して特異的である、請求項175に記載の方法。

## 【請求項177】

次のステップを含む、試料中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法:

30

a) 第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセットを含む細胞または細胞溶解液を含む試料と異種プロテアーゼ認識部位を含む単離された修飾転写抑制因子タンパク質とを含む混合体、または第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセットを含む試料、細胞または細胞溶解液、および異種プロテアーゼ認識部位を含む単離された修飾転写抑制因子タンパク質を含む混合体であって、該プロテアーゼの存在下では第1修飾転写抑制因子タンパク質は第1核酸断片に結合し以って第1プロモーターからの転写を抑制することができ、またプロテアーゼの不存在下では、第1修飾転写抑制因子タンパク質の第1核酸断片への結合が阻害されることを特徴とする混合体を準備するステップ; および

40

b) 該混合体中のレポーター遺伝子の発現を検出または測定するステップであって、第1レポーター遺伝子の発現または発現増大は試料中のプロテアーゼの存在を示すことを特徴とするステップ。

## 【請求項178】

細胞溶解液はS30、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、昆虫細胞または哺乳動物細胞の溶解液である、請求項177に記載の方法。

## 【請求項179】

次のステップを含む、試料中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法:

a) 転写抑制因子タンパク質遺伝子に連結した転写活性化因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセット、レポーター遺伝子に作動

50

可能に連結した転写抑制因子タンパク質に結合する第2核酸断片に連結した第2プロモーターを含む第2発現カセット、およびDNA結合タンパク質、プロテアーゼ認識部位および該転写活性化因子タンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列に連結した第3プロモーターを含む第3発現カセットを含む細胞または細胞溶解液を含む試料を含む混合体を提供するステップ、または試料と転写抑制因子タンパク質遺伝子に連結した転写活性化因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセット、レポーター遺伝子に作動可能に連結した転写抑制因子タンパク質に結合する第2核酸断片に連結した第2プロモーターを含む第2発現カセット、およびDNA結合タンパク質、プロテアーゼ認識部位および該転写活性化因子タンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列に連結した第3プロモーターを含む第3発現カセットを含む細胞または細胞溶解液とを含む混合体提供するステップ; および

10

b) 該混合体中のレポーター遺伝子の発現を検出または測定するステップであって、レポーター遺伝子の発現または発現増大は試料中のプロテアーゼの存在を示すことを特徴とするステップ。

【請求項180】

次のステップを含む、試料中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法:

a) タンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸に連結したプロモーターを含む発現カセットを含む細胞または細胞溶解液を含む試料を含む混合体を提供するステップ、または試料とタンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸に連結したプロモーターを含む発現カセットを含む細胞または細胞溶解液とを含む混合体を提供するステップ; および

20

b) 該混合体中のレポーター遺伝子の発現を検出または測定するステップであって、レポーター遺伝子の発現または発現増大は試料中のプロテアーゼの存在を示すことを特徴とするステップ。

【請求項181】

次のステップを含む、試料中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法:

a) 変異ヒドロラーゼ、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質にヒドロラーゼ基質を結合させて含む固体担体、ヒドロラーゼ基質と変異ヒドロラーゼ、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質とを含む固体担体であって、該変異ヒドロラーゼは随意に固体担体に固定化されており、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であることを特徴とする固体担体を提供するステップ;

30

b) 試料を、融合タンパク質にヒドロラーゼ基質を結合させて含む固体担体に、または固体担体と融合タンパク質に、接触させるステップ; および

40

c) レポーター活性を検出または測定するステップ。

【請求項182】

ヒドロラーゼ基質を、細胞の前に、動物に導入する、請求項139に記載の方法。

【請求項183】

ヒドロラーゼ基質を、細胞の後に、動物に導入する、請求項139に記載の方法。

【請求項184】

ヒドロラーゼ基質を細胞に導入した後、該細胞を動物に導入する、請求項139に記載の方法。

【請求項185】

単数または複数の機能性基を検出するステップをさらに含む、請求項138または139に記

50

載の方法。

【請求項186】

試料は単数または複数の単離プロテアーゼを含む、請求項177に記載の方法。

【請求項187】

次のステップを含む、試料中の酵素基質を検出する方法：

a) 試料、単数または複数の融合タンパク質であってそのうちの1つは本発明の変異ヒドロラーゼと該酵素とを含む融合タンパク質、および単数または複数のヒドロラーゼ基質を含む固体担体を準備するステップ、または試料と、単数または複数のヒドロラーゼ基質を単数または複数の融合タンパク質であってそのうちの1つは本発明の変異ヒドロラーゼと該酵素とを含む融合タンパク質に結合させて含む固体担体を準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また変異ヒドロラーゼの該ヒドロラーゼ基質への結合は該固体担体の電気化学的性質を変化させることを特徴とするステップ；

b) 試料と固体担体とを接触させるステップ；および

c) 試料中の基質の存在を検出または測定するステップ。

【請求項188】

酵素はオキシダーゼである、請求項187に記載の方法。

【請求項189】

試料は生理液試料である、請求項187または188に記載の方法。

【請求項190】

固体担体は電極または金ナノ粒子である、請求項187～189のいずれか1項に記載の方法。

【請求項191】

次のステップを含む、試料中の単数または複数のプロテアーゼまたはキナーゼを検出する方法：

a) 試料と、変異ヒドロラーゼとプロテアーゼまたはキナーゼ認識部位とを含む融合タンパク質にヒドロラーゼ基質を結合させて含む固体担体とを準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また変異ヒドロラーゼの該ヒドロラーゼ基質への結合は該固体担体の電気化学的性質を変化させることを特徴とするステップ；

b) 試料を、融合タンパク質にヒドロラーゼ基質を結合させて含む固体担体に接触させるステップ；および

c) 試料中のプロテアーゼまたはキナーゼの存在を検出または測定するステップ。

【請求項192】

次のステップを含む、試料中の単数または複数のプロテアーゼまたはキナーゼ阻害物質を検出する方法：

a) 試料、単離プロテアーゼまたはキナーゼ、および変異ヒドロラーゼとプロテアーゼまたはキナーゼ認識部位とを含む融合タンパク質にヒドロラーゼ基質を結合させて含む固体担体を準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果と

して対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また変異ヒドロラーゼの該ヒドロラーゼ基質への結合は該固体担体の電気化学的性質を変化させることを特徴とするステップ；

b) 試料、単離プロテアーゼまたはキナーゼ、および融合タンパク質にヒドロラーゼ基質を結合させて含む固体担体を接触させるステップ；および

c) 試料中の単数または複数のプロテアーゼまたはキナーゼ阻害物質を検出または測定するステップ。

#### 【請求項193】

次のステップを含む、2分子の相互作用を検出する方法：

a) 変異ヒドロラーゼと第2タンパク質に結合しうる第1タンパク質とを含む第1融合タンパク質であって、第1融合タンパク質中の変異ヒドロラーゼは、そのうちの1つは蛍光団である単数または複数の機能性基を含む第1ヒドロラーゼ基質に結合させてある第1融合タンパク質、および第2タンパク質と発光または蛍光レポータータンパク質とを含む第2融合タンパク質を準備するステップであって、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成し、また変異ヒドロラーゼにおける該少なくとも1つのアミノ酸置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または対応する野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また第1タンパク質と第2タンパク質は二量体であることを特徴とするステップ；および

b) 蛍光および/または発光を検出するステップ。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 関連出願へのクロスリファレンス

本願は2004年12月6日付の米国出願第11/006,031号および2004年7月30日付の米国出願第60/592,499号の出願日の利益を主張する。

#### 【0002】

本発明は生化学アッセイおよび試薬の分野に関する。特に、本発明は単数または複数の機能性基を共有結合的に連結(係留)した変異タンパク質に、またその使用方法に、関する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

分子類の特異的検出は細胞内での分子の役割を理解するうえで不可欠である。標識たとえば関心分子に共有結合的に連結した標識は複雑混合体中の該分子の検出を容易にする。標識はin vitroで化学合成により付加してもよいし、in vivoで、組み換え技術などにより付加してもよい。たとえば蛍光標識等のタンパク質への付加は従来、タンパク質精製後のin vitro化学修飾により行われてきた(Hermanson, 1996)。標識のin vivo付加ならば、オワンクラゲAequorea victoria由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)を多数の宿主タンパク質と遺伝子操作で融合して蛍光キメラをin situで産生させることができる(Tsien, 1998; Chalfie et al., 1998)。しかし、GFP系の標識は目下、pH測定(Kneen et al., 1998; Llopis et al., 1998; Miesenboeck et al., 1998)、Ca<sup>2+</sup>測定(Miyawaki et al., 1997; Rosomoff et al., 1997)、膜電位測定(Siegel et al., 1997)など様々なアッセイに使用されているものの、GFPなどのような内部標識タンパク質の蛍光はタンパク質構造の性質たとえば限られた範囲の蛍光色や比較的低い絶対輝度などが限界となる(Cubitt et al., 1995; Ormoe et al., 1996)。

10

20

30

40

50

## 【0004】

in situ GFP標識のこうした難点に対処するため、Griffen et al.(1998)は強結合ペアの分子成分を合成した。すなわちわずか6個の天然アミノ酸からなる小さな受容体領域、および種々の分光学的プローブまたは架橋に連結させることができる小さな(<700 Da)合成リガンドである。受容体領域はヘリックスのi、i+1、i+4およびi+5位置に4個のシステインを含み、またリガンドは4',5'-ビス(1,3,2-ジチオアルソラン-2-イル)フルオレセイン(FLASH)であった。Griffen et al.は、このリガンドが非トランスフェクト哺乳動物細胞内では比較的少数の結合部位をもち、膜透過性であり、また組み換えタンパク質のテトラシステイン領域に高親和性、高特異性で結合して初めて蛍光性となり、ナノモル以下の低解離定数で蛍光標識(FLASH標識)された細胞が結果的に得られることを明らかにしている。しかし、細胞内のバックグラウンド結合に関して、Stroffekova et al.(2001)はFLASH-EDT<sub>2</sub>が内因性システインリッチタンパク質に非特異的に結合すること明らかにしている。さらに、FLASHによるタンパク質標識は使用可能な蛍光団の範囲によって限定される。

10

## 【0005】

受容体を介したターゲティング方法は遺伝子コード化されたターゲティング配列を使用して蛍光団を、標的タンパク質が正しい折りたたみを行える限りで、ほぼ任意の細胞部位へと誘導する。たとえばFarinas et al.(1999)は、cDNAトランスフェクションを使用して1本鎖抗体(sFv)を細胞内の特定部位に誘導したことを開示している。Farinas et al.の開示によれば、ハプテン(4-エトキシメチレン-2-フェニル-2-オキサゾリン-5-オン、phOx)と蛍光プローブ(たとえばBODIPY FI、テトラメチルローダミン、フルオレセイン)の結合体は生きたチャイニーズハムスター卵巣細胞内のsFv対応部位に高親和性(約5nM)で結合したが、それは標的抗体が細胞透過性のハプテン-蛍光団結合体の高親和性受容体として機能したことを示す。それにもかかわらず、機能的なsFv発現は還元性環境では比較的弱いという場合もある。

20

従って、求められているのは所期分子に標識するための改良型の方法である。

## 【発明の概要】

## 【0006】

発明の概要

本発明は、単数または複数の機能性基を、たとえば共有結合または他の安定結合を介して、本発明のタンパク質に、または本発明のタンパク質を含む融合タンパク質(キメラ)に、係留(連結)するための方法、組成物およびキットを提供する。本発明のタンパク質は構造的には野生型(天然)ヒドロラーゼに関連するが、対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つ(また実施形態によっては少なくとも2つ)のアミノ酸置換を含み、また対応する野生型ヒドロラーゼの基質に結合するものの、触媒活性は欠くかまたは対応する野生型ヒドロラーゼよりも小さい(そうした変異タンパク質はここでは変異ヒドロラーゼという)。前述の係留はたとえば溶液または懸濁液中で、細胞内で、または固体担体表面または溶液/表面界面で、反応性基を含む、および単数または複数の機能性基を含むよう修飾した、ヒドロラーゼ基質を使用することによって、起こる。「基質」はここでは、反応性基と随意に単数または複数の機能性基とを有する基質を含む。単数または複数の機能性基を含む基質はここでは一般に本発明の基質という。「機能性基」はここでは検出可能なまたは検出適性の分子であり、たとえば直接間接の手段で測定しうる分子(たとえば光活性化可能分子、ジゴキシゲニン、ニッケルNTA(ニトリロトリ酢酸)、発色団、蛍光団、発光団)、第2の分子に結合または付加しうる分子(ビオチン、ハプテン、または架橋基)、または固体担体である。

30

40

## 【0007】

機能性基は検出適性や他分子との結合能など複数の性質を有してもよい。「反応性基」はここでは、本発明の特定の野生型または変異ヒドロラーゼにより特異的に認識される基質中の最小数の原子である。基質中の反応性基と野生型ヒドロラーゼとの相互作用により生成物が形成され、野生型ヒドロラーゼが再生される結果となる。基質たとえば本発明の

50

基質は随意に、基質中の単数または複数の機能性基を反応性基から物理的に仕切るリンカーたとえば開裂可能リンカーを含んでもよい。一実施形態では、リンカーは好ましくは鎖長が12~30原子である。しかしリンカーは本発明の基質中にいつも存在するとは限らないため、実施形態によっては反応性基が変異ヒドロラーゼ中の反応性残基と相互作用して共有結合を形成しうるようにするには、反応性基と機能性基を物理的に分離する必要がある。好ましくは、リンカーは、存在するときには、野生型または変異ヒドロラーゼとのリンカーをもつ基質の特異性または反応性を、野生型または変異ヒドロラーゼとのリンカーを欠く対応基質の特異性または反応性と比べて、変える(たとえば損なう)ことがほとんどない。さらに、リンカーの存在は好ましくは機能性基の単数または複数の性質たとえば機能を変え(たとえば損なう)ことがほとんどない。ある種の(たとえば深い触媒ポケットを

10

【0008】

一実施形態では、本発明は式(1): R-リンカー-A-Xで示される化合物を提供する。ただし、式中Rは単数または複数の機能性基であり、リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖であるか、または単数または複数の環たとえば単数または複数のアリアル環、ヘテロアリアル環またはそれらの任意の組み合わせを含む基であり、A-Xはデハロゲナーゼたとえばハロアルカンデハロゲナーゼまたは脂肪族または芳香族ハロゲン化基質の炭素-ハロゲン結合を開裂させるデハロゲナーゼに対応する基質、たとえば細菌(*Rhodococcus*、*Sphingomonas*、*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Burkholderia*、*Agrobacterium*または*Xanthobacter*など)のデハロゲナーゼの基質であり、またXはハロゲン原子である。一実施形態では、ハロゲン化アルキルをリンカー-Lに共有結合的に付加するが、該リンカーは単数または複数の基であり、単数または複数の機能性基を共有結合的に付着させてデハロゲナーゼ基質を形成する。後述のように、*Rhodococcus*デハロゲナーゼ(DhaA)の変異体DhaA.H272Fを、DhaAの基質に結合させたが(*Rhodococcus*デハロゲナーゼの野生型(DhaA.WT)配列の例は図2を参照)、該基質は5(および6-)カルボキシフルオレセインたとえばカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシテトラメチルローダミンたとえばカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clおよびビオチンたとえばビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを含んでいた。また、この結合のカルボキシフルオレセインまたはカルボキシテトラメチルローダミン蛍光に対するまたはビオチン-ストレプトアビジン結合に対する有意の消光効果は見られなかった。やはり後述するように、変異ヒドロラーゼたとえばDhaA.D106CおよびDhaA.D106EはDhaA.D106C:H272FおよびDhaA.D106E:H272Fと共にカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clおよび/またはカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを結合した。一実施形態では、基質はR-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Clである(式中Rは機能性基である)。そうした基質を合成するには、機能性基をNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Clなどのような分子と機能性基を反応させてもよい。

20

30

40

【0009】

一実施形態では、本発明の基質は細胞の原形質膜に対して透過性である。たとえば、後述するように、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clおよびビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clは原核生物(*E. coli*)および真核生物(CHO-K1)細胞の原形質膜に対して透過性であり、またこれらの基質は変異ヒドロラーゼが存在しなければ、細胞内外への取り込みと洗い出しが迅速かつ効率的に行われた。変異ヒドロラーゼが存在すると、基質の少なくとも一部が細胞からの洗い出しを妨げられた。従って、そうした基質の結合部分は変異ヒドロラーゼまたはその融合体のマーカーとして、または捕捉手段として、機能しう。

【0010】

一実施形態では、本発明の基質は複数の機能性基を含む。一実施形態では、機能性基の

50

うちの1つは酵素である。別の実施形態では、機能性基のうちの1つは酵素の基質である。たとえば一機能性基はルシフェリンで、他機能性基はプロテアーゼ認識部位すなわちプロテアーゼが認識するに足る配列を、開裂部位を含めて、含む部位でもよいし、また一機能性基はビオチンで、他機能性基は蛍光団でもよいし、また一機能性基はプロテアーゼ認識部位で、他機能性基は蛍光団でもよい。

#### 【0011】

本発明はさらに、単数または複数の機能性基を含むよう修飾されたヒドロラーゼの基質を合成する方法を提供する。

本発明の変異ヒドロラーゼは、後で詳述するように、対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含むが、その少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として、野生型ヒドロラーゼと基質との間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成する変異ヒドロラーゼが得られることになる。該変異ヒドロラーゼの少なくとも1つのアミノ酸置換は、対応する野生型ヒドロラーゼと該基質の間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連する該野生型ヒドロラーゼのアミノ酸残基の置換、または該基質とエステル中間体を形成する該野生型ヒドロラーゼのアミノ酸残基の置換である。一実施形態では、該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、そのうちの1つの置換は野生型ヒドロラーゼにあって水分子の活性化に関連する残基の置換、または野生型ヒドロラーゼにあってヒドロラーゼ基質の求核攻撃によってエステル中間体を形成する残基の置換であり、またもう1つの置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって、水分子の活性化に関連するまたは基質とエステル中間体を形成する残基の置換ではなく、ヒドロラーゼ基質との結合部位またはその近傍に位置する残基たとえば野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5 内の残基の置換である。一実施形態では、第2置換は野生型ヒドロラーゼにあって該ヒドロラーゼの触媒ポケットの基質入口に対応する部位の内側を覆う(lines)残基の置換、すなわち活性部位ポケット内または野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5 内にある残基たとえば基質ポケット内の残基であって対応する野生型ヒドロラーゼにあって、水分子の活性化に関連する、または基質とエステル中間体を形成する残基ではない残基の置換である。こうした追加置換は好ましくは、対応する野生型ヒドロラーゼの基質に対する変異体の安定共有結合の形成速度を増す。

#### 【0012】

変異ヒドロラーゼは融合タンパク質たとえば変異ヒドロラーゼと少なくとも1つの関心タンパク質とをコードする組み換えDNAから発現される融合タンパク質または化学合成で形成される融合タンパク質でもよい。たとえば融合タンパク質は変異ヒドロラーゼと関心酵素たとえばルシフェラーゼ、RNasinまたはRNaseを、および/またはチャンネルタンパク質、受容体、膜タンパク質、サイトゾルタンパク質、核タンパク質、構造タンパク質、リンタンパク質、キナーゼ、シグナル伝達タンパク質、代謝性タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、受容体関連タンパク質、蛍光タンパク質、酵素基質、転写因子、(変異ヒドロラーゼたとえば融合タンパク質を特定部位に誘導する)輸送体タンパク質および/またはターゲティング配列たとえばミリスチル化配列、ミトコンドリア局在化配列または核局在化配列と共に含んでもよい。関心タンパク質は変異ヒドロラーゼのN末端またはC末端に融合させてもよい。一実施形態では、融合タンパク質は変異ヒドロラーゼのN末端に関心タンパク質を、C末端にもう1つのタンパク質たとえば異なるタンパク質を、それぞれ含む。たとえば関心タンパク質は蛍光タンパク質でも、抗体でもよい。随意に、融合体内のタンパク質はコネクター配列たとえば好ましくは少なくとも2アミノ酸残基を含む配列(例: 13~17アミノ酸残基を含む配列)により仕切られる。本発明の融合タンパク質におけるコネクター配列の存在は融合体内のどちらのタンパク質の機能をも、各個別タンパク質の機能と比べて、ほとんど変化させない。

#### 【0013】

ヒドロラーゼたとえば本発明の変異ヒドロラーゼをコードする核酸配列を含む単離核酸分子(ポリヌクレオチド)もまた提供される。一実施形態では、該単離核酸分子は少なくと

10

20

30

40

50

も1つの特定宿主中で発現するよう最適化した核酸配列を含む。最適化配列はコドン最適化配列すなわちある生物で別種の生物たとえば遠縁関係にある生物の場合より高頻度で使用されるコドンだけでなく、Kozak配列および/またはイントロンを付加または変更するおよび/または無用の配列たとえば潜在的な転写因子結合部位を除去する修飾をも、含む。一実施形態では、該ポリヌクレオチドはデハロゲナーゼをコードする核酸配列であって、特定宿主細胞で発現するよう最適化された核酸配列を含む。一実施形態では、該最適化ポリヌクレオチドは対応する非最適化配列とはもはや、たとえば中程度または高ストリンジエンシー条件下で、ハイブリダイズしない。別の実施形態では、該ポリヌクレオチドは対応する非最適化配列との核酸配列同一性が90%未満たとえば80%未満であり、また随意に、非最適化配列がコードするポリペプチドとのアミノ酸配列同一性が80%以上たとえば85%以上、90%以上であるポリペプチドをコードする。さらに、コンストラクトたとえば発現カセット、および単離核酸分子を含むベクターはもちろん、単離核酸分子、コンストラクトまたはベクターを含むキットもまた、提供される。

10

20

30

40

50

#### 【0014】

本発明はまた、組成物およびキットであって、リンカーを含むヒドロラーゼ基質、単数または複数の機能性基を随意にリンカーと共に含むヒドロラーゼ基質、単数または複数の機能性基を含むリンカー、単数または複数の機能性基を欠きかつ随意にリンカーを含むヒドロラーゼ基質、リンカー、または変異ヒドロラーゼ、またはそれらの組み合わせを含む組成物およびキットを包含する。たとえば、本発明は本発明の基質を含む固体担体、本発明の変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む固体担体、本発明の基質を含むキット、本発明のデハロゲナーゼまたはその融合体をコードするベクターを含むキット、または本発明のセリン-ラクタマーゼまたはその融合体をコードするベクターを含むキットを包含する。

#### 【0015】

本発明の基質および変異ヒドロラーゼは、関心分子の単離、検出、同定、画像化、ディスプレイまたは局在化；生きた細胞の画像化を含む細胞類の標識；またはタンパク質の *in vitro* および/または *in vivo* 標識に有用である。たとえば固体担体に結合した本発明の基質または固体担体に結合した変異ヒドロラーゼは、タンパク質アレイ、細胞アレイ、小胞/細胞内小器官アレイ、遺伝子アレイ、および/または細胞膜アレイの作製に使用してもよい。従って、一実施形態では、本発明は関心分子を単離する方法を提供する。該方法は、単数または複数の融合タンパク質を含む試料であってそのうちの少なくとも1つは本発明の変異ヒドロラーゼと関心分子に結合したタンパク質とを含む融合タンパク質である試料と単数または複数のヒドロラーゼ基質を含む固体担体とを準備するステップを含む。次に、該試料と該固体担体を接触させて、関心分子を単離しうるようにする。該方法はたとえば、変異ヒドロラーゼに融合させたタンパク質に結合したDNAの単離に使用してもよい。

#### 【0016】

一実施形態では、本発明は変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定する方法を提供する。該方法は本発明の変異ヒドロラーゼを、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させるステップを含む。機能性基の存在または量が検出または測定されることより、変異ヒドロラーゼの存在または量が検出または測定される。一実施形態では、変異ヒドロラーゼは細胞内または細胞表面に存在する。別の実施形態では、変異ヒドロラーゼは細胞溶解液中に存在する。

#### 【0017】

本発明の変異ヒドロラーゼと単数または複数の機能性基を含む対応するヒドロラーゼの基質とを使用して、分子を単離する方法、または細胞内のある種の分子の存在または量、局在位置たとえば細胞内または細胞外の局在位置、または移動を検出または測定する方法もまた提供される。

#### 【0018】

別の実施形態では、本発明は関心タンパク質と該関心タンパク質と相互作用する疑いのある分子との相互作用を変化させる薬剤を特定する方法を包含する。該方法は少なくとも

1つの薬剤を、該関心タンパク質と相互作用する疑いのある分子、本発明の変異ヒドロラーゼと関心分子とを含む融合タンパク質、および単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と相互作用させるステップを含む。次いで、該薬剤が関心タンパク質と該関心タンパク質と相互作用する疑いのある分子との相互作用を変化させるかどうかを判定する。

【0019】

本発明は従って、細胞内でのタンパク質の発現、局在位置および/または移動(輸送)をモニターし、また細胞内の微小環境の変化をモニターする方法を提供する。一実施形態では、本発明の変異ヒドロラーゼと本発明の基質の使用によりタンパク質類たとえばイオンチャンネルの機能解明が可能になる。別の実施形態では、2つの変異ヒドロラーゼ/基質ペアの使用により多重処理、同時検出およびFRET-またはBRET-アッセイが可能になる。

10

【0020】

細胞を単離、分類または精製するために、本発明の変異ヒドロラーゼを細胞の外表面で(たとえば原形質膜タンパク質または膜アンカー型シグナルとの融合により)発現させてもよい。たとえばインテグリンの細胞質/膜貫通領域と変異ヒドロラーゼの融合体またはグリコシルホスファチジルイノシトールシグナル配列と変異ヒドロラーゼの融合体を発現する細胞は、該細胞を本発明の基質たとえば固体担体に結合した本発明の基質と接触させることにより単離(または捕捉)されよう。細胞内小器官を単離、分類または精製するには、変異ヒドロラーゼを関心細胞内小器官のサイトゾル側表面で発現させる。別の実施形態では、異なる細胞を増殖させるための最適プラットフォームを創出するために、変異ヒドロラーゼを細胞外マトリックス成分または外膜タンパク質と融合させ、3次元細胞培養系または細胞組織工学用プラットフォームに係留する。たとえば初代神経細胞または胚性幹細胞を該プラットフォーム上で培養し、細胞支持層を形成させてもよい。

20

【0021】

他の応用例には細胞の検出または標識などがある。従って、本発明の変異ヒドロラーゼと本発明の対応基質の使用は、たとえば動物への移植または注入後のin vitroまたはin vivo細胞移動の検出(たとえば血管新生/化学走性アッセイ、動物への移植神経細胞、移植/注入正常、悪性または遺伝子組み換え細胞の移動)を目的とした細胞の検出、および生細胞イメージングとそれに続く免疫細胞化学法を可能にする。別の実施形態では、本発明は新規合成タンパク質に標識する方法を提供する。たとえば本発明の変異ヒドロラーゼまたはその融合体を発現するベクターを含む細胞を、機能性基を欠くヒドロラーゼ基質と接触させる。次いで、細胞を薬剤たとえば遺伝子発現誘導剤および単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させる。次いで、変異ヒドロラーゼまたはその融合体の存在、量または局在位置を検出または測定する。変異ヒドロラーゼまたはその融合体の存在、量または局在位置は新しく合成された変異ヒドロラーゼまたはその融合体の結果である。あるいは、本発明の変異ヒドロラーゼまたはその融合体を発現するベクターを含む細胞を、機能性基たとえば緑色蛍光団を有するヒドロラーゼ基質と接触させ、次いで薬剤および異なる機能性基を有する基質たとえば赤色蛍光団と接触させる。一実施形態では、変異ヒドロラーゼを膜局在化シグナルと融合させるため、膜内または膜近傍事象のモニタリングに使用することができる。

30

40

【0022】

別の実施形態では本発明は、試料が単数または複数の融合タンパク質であって、そのうち少なくとも1つは関心変異ヒドロラーゼと関心タンパク質とを含む融合タンパク質を含み、また固体担体が単数または複数のヒドロラーゼ基質を含む方法を提供する。該試料と該固体担体は接触させ、関心タンパク質が単離されるようにする。

【0023】

別の実施形態では、本発明は単数または複数の関心分子を試料から単離する方法を提供する。該方法は、本発明の変異ヒドロラーゼを含む固体担体および単数または複数の機能性基(そのうちの少なくとも1つは単数または複数の関心分子を結合しうる機能性基である)を含むヒドロラーゼ基質を準備するステップを含む。この試料、固体担体およびヒドロ

50

ラーゼ基質を混ぜ合わせることで、単数または複数の関心分子を単離する。

【0024】

本発明はまた、細胞たとえばトランスジェニックまたは非トランスジェニック非ヒト動物の細胞を標識する方法を提供する。たとえば細胞を標識するために、変異ヒドロラーゼを細胞の外表面で(たとえば原形質膜タンパク質または膜アンカー型シグナルとの融合により)発現させてもよい。たとえばインテグリンの細胞質/膜貫通領域と本発明の変異ヒドロラーゼの融合体またはグリコシルホスファチジルイノシトールシグナル配列と本発明の変異ヒドロラーゼの融合体を発現する細胞は、該細胞を本発明の基質と接触させることにより識別または標識されよう。一実施形態では、本発明はトランスジェニック動物の細胞を標識する方法を包含する。該方法は、人間以外のトランスジェニック動物であって、その細胞のゲノムを、随意に、本発明の変異ヒドロラーゼと随意にターゲッティングペプチドとをコードする核酸断片に作動可能に連結した、随意に組織特異的または細胞特異的な、転写調節配列を含む発現カセットにより拡張したトランスジェニック動物を準備するステップを含む。次に、この人間以外のトランスジェニック動物を単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させ、以って変異ヒドロラーゼを発現する細胞を標識する。

10

【0025】

細胞を外来DNAで安定的に形質転換させるには、選択マーカー(タンパク質)たとえばネオマイシン、ハイグロマイシンまたはピューロマイシンに対する耐性をコードするものを発現する細胞を使用する。どの細胞が選択マーカータンパク質および蛍光標識分子を含むのかを、観察するのが望ましいかもしれない。たとえば、生細胞に外から付加した蛍光分子で選択マーカータンパク質を標識するのが好ましいかもしれない。従って一実施形態では、本発明は選択マーカータンパク質を発現する細胞を標識する方法を提供する。該方法は、融合タンパク質をコードする核酸配列を収めた発現カセットを含む細胞を準備するステップを含む。該融合タンパク質は、選択マーカータンパク質たとえば少なくとも1つの抗生物質に対する耐性を付与するタンパク質および光学的に検出可能な分子を含む基質またはその一部分を安定的に、また随意に不可逆的に、結合することができる第2タンパク質を含む。たとえば、該タンパク質はアルキル基と光学的に検出可能な分子とを基質から自己自身へと不可逆的に転移させ、以ってアルキルトランスフェラーゼを標識するアルキルトランスフェラーゼたとえば $O^6$ -アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼなどのようなアルキルトランスフェラーゼでもよい。本発明のこの実施形態に役立つタンパク質の非限定的な例はアルキルトランスフェラーゼ、ペプチジルグリシン-アミド化モノオキシゲナーゼ、I型トポイソメラーゼ、ヒドロラーゼたとえばセリンおよびエポキシヒドロラーゼそれにももちろん開示の変異ヒドロラーゼ、アミノトランスフェラーゼ、シトクロムp450モノオキシゲナーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、デカルボキシラーゼ、オキシダーゼたとえばモノアミノオキシダーゼ、レダクターゼたとえばリボヌクレオチドレダクターゼ、合成酵素たとえば酸化窒素合成酵素(NOS)、ラクタマーゼ、シスタチオニン-リアーゼ、ペプチダーゼたとえばカルボキシペプチダーゼA、アロマトラーゼ、プロテアーゼたとえばセリンプロテアーゼ、キシラーゼ、グルコシダーゼ、マンノシダーゼ、およびデメチラーゼおよび単数または複数の基質と不可逆の結合または他の安定した結合を形成する野生型を含む他タンパク質たとえば機構依存的に失活しうる酵素などである。従って、この実施形態では安定的な結合すなわち基質と野生型または変異ヒドロラーゼの間で形成される結合は $t_{1/2}$ が少なくとも30分、好ましくは少なくとも4時間、さらには少なくとも10時間であり、また洗浄、タンパク質変性剤、および/または温度による分解に対して耐性である。たとえば該結合はSDS中の沸騰に対して安定である。

20

30

40

【0026】

該融合タンパク質を発現する細胞は、標識するには、基質と接触させる。一実施形態では、細胞を固定してから基質と接触させる。別の実施形態では、細胞と固定剤を同時に基質と接触させる。さらに別の実施形態では、細胞を基質と接触させた後に固定剤を細胞に添加する。一実施形態では、該融合タンパク質は基質とエステル結合を形成する。別の実

50

施形態では、該融合タンパク質は基質とチオエステル結合を形成する。

【0027】

一実施形態では、本発明は本発明の変異ヒドロラーゼと随意にターゲッティングペプチドとをコードする核酸断片に作動可能に連結した、随意に組織特異的または細胞特異的な、転写調節配列を含む発現カセットを含む細胞を、人間以外の動物たとえば人間以外の哺乳動物または人間を含む動物に導入する方法を提供する。動物は、細胞と接触する前または後に、単数または複数の機能性基を同時に含むヒドロラーゼ基質と接触させ、以って該変異ヒドロラーゼを発現する細胞を標識する。一実施形態では、次に該単数または複数の機能性基を検出する。別の実施形態では、細胞をヒドロラーゼ基質と接触させた後に動物に導入する。

10

【0028】

試料から単数または複数の関心分子を単離する方法もまた提供される。該方法は、試料と本発明の変異ヒドロラーゼと単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを、本発明の変異ヒドロラーゼを含む試料と単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを、または単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質を含む試料と本発明の変異ヒドロラーゼとを、接触させ、以って該単数または複数の関心分子の単離を図るようになるステップを含む。

20

【0029】

試料中の単数または複数の関心分子を検出する方法もまた提供される。該方法は、試料と本発明の変異ヒドロラーゼと単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを、本発明の変異ヒドロラーゼを含む試料と単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを、または単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質を含む試料と本発明の変異ヒドロラーゼとを、接触させるステップを含む。次に該関心分子の存在または量が検出または測定される。

30

【0030】

本発明の変異ヒドロラーゼを含む細胞を、単数または複数の・そのうちの少なくとも1つは関心分子に結合しその結合により第2機能性基の性質を変化させる・機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させる方法もまた提供される。次に第2機能性基の存在または量が検出または測定される。

40

【0031】

本発明はまた、細胞中の単数または複数の関心タンパク質および/または細胞活性を選択的に不活性化する方法を提供する。該方法は、本発明の変異ヒドロラーゼと関心タンパク質との融合タンパク質を含む試料を、または本発明の変異ヒドロラーゼと関心タンパク質との融合タンパク質をコードする発現カセットを入れた細胞を、単数または複数の・そのうちの少なくとも1つはある波長の光に当てると一重項酸素を産生する・機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させ、混合物を生成するステップを規定する。該混合物に、特定波長の光を、細胞中の単数または複数の関心タンパク質および/または細胞活性を選択的にたとえば局所的に不活性化する量だけ、当てる。一実施形態では、単数または複数のタンパク質の機能および/または細胞活性の変化を検出または測定する。

40

【0032】

試料中の関心分子を検出する方法もまた提供される。該方法は第1融合タンパク質と第2融合タンパク質とを含む複合体を準備するステップを含むが、該第1融合タンパク質は本発明の変異ヒドロラーゼと第2タンパク質に結合しうる第1タンパク質とを含み、該変異ヒドロラーゼは単数または複数の・うち1つは蛍光団である・機能性基を含む第1ヒドロラーゼ基質と結合し、また該第2融合タンパク質は第3タンパク質たとえば本発明の変異ヒドロラーゼと該第2タンパク質とを含み、該第3タンパク質は単数または複数の・うち1つは蛍

50

光団を消光する・機能性基を含む第2基質に結合し、該第2基質が第3タンパク質の基質である。該複合体を該試料と混合し、蛍光を検出または測定する。

【0033】

別の実施形態では、本発明は、本発明の変異ヒドロラーゼと第2タンパク質に結合しうる第1タンパク質とを含む第1融合タンパク質であって、該変異ヒドロラーゼが単数または複数の・うち1つは蛍光団である・機能性基を含む第1ヒドロラーゼ基質と結合することを特徴とする第1融合タンパク質と該第2タンパク質と蛍光または発光レポータータンパク質とを含む第2融合タンパク質とを含む複合体を準備する方法を包含する。該複合体を該試料と混合し、相互作用を発光共鳴エネルギーの蛍光団への移動(BRET)により検出する。一実施形態では、本発明は本発明の変異ヒドロラーゼと第2タンパク質に結合しうる第1タンパク質とを含む第1融合タンパク質であって、該変異ヒドロラーゼが単数または複数の・うち1つは蛍光団である・機能性基を含む第1ヒドロラーゼ基質と結合することを特徴とする第1融合タンパク質、および該第2タンパク質と蛍光または発光レポータータンパク質とを含む第2融合タンパク質を準備する方法を包含する。該第1および第2タンパク質を混合し、相互作用をBRETで検出する。

10

【0034】

別の実施形態では、細胞中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法が提供される。該方法は、第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターたとえば誘導的または構成的プロモーターを含む第1発現カセットとプロテアーゼ認識部位を含む第1修飾転写抑制因子タンパク質をコードする第2核酸断片に連結した第2プロモーターたとえば誘導的または構成的プロモーターを含む第2発現カセットとを含む細胞または細胞溶解液を準備するステップを含む。一実施形態では、該レポーター遺伝子はルシフェラーゼまたは本発明の変異ヒドロラーゼである。第1修飾転写抑制因子タンパク質は、プロテアーゼによる開裂がない場合には、第1核酸断片に結合し以って第1プロモーターからの転写を抑制することができ、従ってレポーター遺伝子の転写を抑制する。プロテアーゼが存在すると、該修飾転写抑制因子タンパク質は開裂し、第1核酸断片との結合を失うまたは減じる。レポーター遺伝子の発現は検出または測定される。こうしてレポーターの発現または発現増大はプロテアーゼの存在を示すことになる。別の実施形態では、該方法は、第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む発現カセットを含む無細胞発現系たとえばS30、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、昆虫細胞または哺乳動物細胞溶解液を準備するステップを含む。一実施形態では、該レポーター遺伝子はルシフェラーゼまたは本発明の変異ヒドロラーゼである。プロテアーゼ認識部位を含む単離体の修飾転写抑制因子タンパク質、および/または単離体のプロテアーゼ、単数または複数のプロテアーゼを含む溶解液、または単数または複数のプロテアーゼを含むとみられる試料を、該無細胞溶解液に添加する。レポーター遺伝子の発現を検出または測定する。レポーターの発現または発現増大はプロテアーゼの存在を示す。

20

30

【0035】

別の実施形態では、細胞または細胞溶解液であって、レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセットと該転写抑制因子タンパク質および融合タンパク質のコード領域に作動可能に連結した該融合タンパク質の第1タンパク質に結合する第2核酸断片に連結した第2プロモーターを含む第2発現カセットとを含む細胞または細胞溶解液が提供される。一実施形態では、レポーター遺伝子はルシフェラーゼまたは本発明の変異ヒドロラーゼである。融合タンパク質は第2核酸断片に結合する第1タンパク質、プロテアーゼ認識部位、および第1タンパク質が第2核酸断片に連結したときに第2プロモーターを活性化する第2タンパク質を含む。レポーター遺伝子の発現を検出または測定する。レポーター遺伝子の発現または発現増大はプロテアーゼの存在を示す。

40

【0036】

さらなる実施形態では、細胞または細胞溶解液であって、転写抑制因子タンパク質遺伝

50

子に連結した転写活性化因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む第1発現カセット、レポーター遺伝子に作動可能に連結した転写抑制因子タンパク質に結合する第2核酸断片に連結した第2プロモーターを含む第2発現カセット、およびDNA結合タンパク質、プロテアーゼ認識部位および該転写活性化因子タンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列に連結した第3プロモーターを含む第3発現カセットを含む細胞または細胞溶解液が提供される。一実施形態では、レポーター遺伝子はルシフェラーゼまたは本発明の変異ヒドロラーゼである。プロテアーゼが存在しなければ、融合タンパク質は転写抑制因子タンパク質の発現を活性化するため、レポータータンパク質の発現が抑制される。レポーター遺伝子の発現を検出または測定する。プロテアーゼが存在すれば、融合タンパク質は開裂し、第1発現カセットからの転写抑制因子タンパク質の発現が抑制され、その結果として第2発現カセットからレポータータンパク質が発現する。

10

**【0037】**

本発明はまた、細胞中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法であって、タンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸に連結したプロモーターを含む発現カセットを含む細胞を準備するステップとその発現または発現延長がプロテアーゼの存在を示すレポーターの発現を検出または測定するステップとを含む方法を提供する。

**【0038】**

さらに別の実施形態では、本発明は細胞中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法を提供する。該細胞は、タンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸に連結したプロモーターを含む発現カセットを含む。レポーターの発現を検出または測定するが、その発現または発現増大はプロテアーゼの存在を示す。一実施形態では、レポーター遺伝子はルシフェラーゼまたは本発明の変異ヒドロラーゼである。

20

**【0039】**

試料中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法もまた提供される。該方法は、本発明の変異ヒドロラーゼ、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質に結合したヒドロラーゼ基質を含む固体担体を準備するステップまたはヒドロラーゼ基質と本発明の変異ヒドロラーゼ、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質とを含む固体担体を準備するステップを含む。随意に溶液相を回収する。次いでレポーター活性を検出または測定する。

30

**【0040】**

さらに別の実施形態では、本発明は試料中の単数または複数のプロテアーゼを検出する方法であって、混合体が準備されることを特徴とする方法を提供する。該混合体は、第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む発現カセットを含む細胞または細胞溶解液を含む試料と、異種プロテアーゼ認識部位を含む単離体の修飾転写抑制因子タンパク質とを含む。または該混合体は試料と、第1レポーター遺伝子に連結した第1転写抑制因子タンパク質に結合する第1核酸断片に連結した第1プロモーターを含む発現カセットを含む細胞または細胞溶解液と、異種プロテアーゼ認識部位を含む単離体の修飾転写抑制因子タンパク質とを含む。プロテアーゼが存在しなければ、第1修飾転写抑制因子タンパク質は第1核酸断片に結合して、第1プロモーターからの転写が抑制される。またプロテアーゼが存在すれば、第1修飾転写抑制因子タンパク質の第1核酸断片との結合が抑制される。混合体中のレポーター遺伝子を検出または測定する。第1レポーター遺伝子の発現または発現増大は試料中のプロテアーゼの存在を示す。

40

**【0041】**

一実施形態では、変異ヒドロラーゼ、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質をヒドロラーゼ基質に結合させて含む固体担体、またはヒドロラーゼ基質と変異ヒドロラーゼ、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合タンパク質とを含む固体担体が提供される。該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒ

50

ドロラーゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含むが、その少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として、野生型ヒドロラーゼと基質との間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成する変異ヒドロラーゼが得られることになり、また該変異ヒドロラーゼ内の少なくとも1つのアミノ酸置換は、対応する野生型ヒドロラーゼと該基質の間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連する該野生型ヒドロラーゼのアミノ酸残基の置換、または該基質とエステル中間体を形成する該野生型ヒドロラーゼのアミノ酸残基の置換である。試料は、融合タンパク質をヒドロラーゼ基質に結合させて含む固体担体と、または担体および融合タンパク質と、接触させる。レポーター活性を検出または測定する。

#### 【0042】

本発明はまたバイオセンサーを提供する。一実施形態では、本発明は試料中の酵素に対応する基質を検出する方法を提供する。該方法は、試料、単数または複数の融合タンパク質であってそのうちの1つは変異ヒドロラーゼと該酵素とを含む融合タンパク質、および単数または複数のヒドロラーゼ基質を含む固体担体を準備するステップ、または試料と、単数または複数のヒドロラーゼ基質を単数または複数の融合タンパク質であってそのうちの1つは本発明の変異ヒドロラーゼと該酵素とを含む融合タンパク質に結合させて含む固体担体とを準備するステップを含む。該変異ヒドロラーゼの該ヒドロラーゼ基質への結合は固体担体たとえば白金電極、金メッキ表面、金ナノ粒子またはカーボンナノチューブの電気化学的性質を変化させる。一実施形態では、試料は生理学的試料たとえば生理液試料である。試料と固体担体を接触させ、固体担体の電気化学的性質の変化を検出または測定することにより試料中の基質の存在を検出または測定する。一実施形態では、酵素はグルコースオキシダーゼである。別の実施形態では、酵素はコレステロールオキシダーゼである。

#### 【0043】

別の実施形態ではタンパク質を標識する方法が提供される。該方法は細胞または *in vitro* 翻訳混合体を単数または複数の機能性基であってそのうちの少なくとも1つはアミノアシル化 tRNA またはアミノ酸である機能性基と接触させて新規合成タンパク質を標識するようにするステップを含む。一実施形態では、本発明の変異ヒドロラーゼは新規合成タンパク質の単離に使用される。

#### 【0044】

単離核酸分子もまた提供される。単離核酸分子は、少なくとも1つの異種タンパク質不安定化配列、プロテアーゼ認識部位およびレポータータンパク質を含む融合ポリペプチドをコードする核酸配列を含むが、該融合ポリペプチドは該異種タンパク質不安定化配列を欠く対応するレポータータンパク質と比べて半減期が短いことを特徴とする。

#### 【0045】

さらに、プロモーター、本発明の変異ヒドロラーゼに対応するコード領域に作動可能に連結した転写抑制因子タンパク質に結合する核酸断片を含む単離核酸分子も提供される。

本発明はまた、本発明の化合物、組成物、核酸、タンパク質または他材料の調製に有用である開示の方法および中間体を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0046】

【図1A - B】図1A-BはDhaAの基質に対する2段階触媒機構の図解である。A) Asp106カルボキシレートによるハライド基の求核置換および共有結合エステル中間体。B) 活性化水分子による共有結合中間体の加水分解に伴うアルコール放出および触媒基Aspの再生。

【図2A】図2AはDhaA.H272Fの分子モデルである。らせん状のキャップ部分は明るい青で示す。 / ヒドロラーゼコア部分(濃い青)は触媒残基3点セット(catalytic triad residues)を含む。キャップ部とコア部の界面近くの、網掛けの赤で示す残基はH272FとD106求核剤である。網掛け黄色の残基はE130とハライド-キレート化残基W107の位置を示す。

【図2B】図2BはRhodococcus rhodochrous デハロゲナーゼ(DhaA)タンパク質の配列(Kulakov et al. 1997)(配列番号82)である。触媒残基3点セットのAsp(D)、Glu(E)およびHis(

10

20

30

40

50

H)は下線で強調した。キャップ部を構成する残基は斜体で示す。ハロゲン化アルキル基質との共有結合を再生することができるDhaA.H272FおよびDhaA.D106Cタンパク質変異体は触媒残基3点セットのHis(H)とAsp(D)の、Phe(F)とCys(C)による置換をそれぞれ含む。

【図2C】図2CはDhaA.H272Fによるハロゲン化アルキル基質との共有結合中間体形成の機構を示す。Asp106によるハライド基の求核置換に続いて共有結合エステル中間体の形成が起こる。His272のPheによる置換は水の活性化を防ぎ、共有結合中間体をトラップする。

【図2D】図2DはDhaA.D106Cによるハロゲン化アルキル基質との共有結合中間体形成の機構を示す。Cys106チオレートによるハライド基の求核置換により加水分解に対して安定なチオエーテル中間体が形成される。

【図2E】図2Eは共有結合カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clリガンドを活性化のための活性部位に位置させたDhaA.H272F変異体の構造モデルである。キャップ部とコア部の界面近くの、網掛けの赤で示す残基はH272FとD106求核剤である。網掛け黄色の残基はE130とハライド-キレート化残基W107の位置を示す。

【図2F】図2FはDhaA.H272F基質結合ポケットの構造モデルを示す。

【図3A】図3AはプラスミドpGEX5X3DahA.H272F.FLAGの物理地図である。該プラスミドとpGEX5X3DahA.D106C.FLAG(非表示)を突然変異誘発およびスクリーニング研究で親鑄型として使用した。DhaAコード領域がN末端でグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)と、またC末端でFLAGエピトープと、それぞれ融合している。Xa因子開裂部位はGST、DhaA両コード領域の間に位置する。

【図3B】図3BはGST-DhaA融合タンパク質の精製状況を示す。DhaA.WT(奇数番号のレーン)とDhaA.H272F(偶数番号のレーン)の各融合タンパク質が可溶性であり、GSS-セファロース4FFで効率的に精製されると判明した(レーン3および4 - 粗製E. coli上清; レーン5および6 - 洗浄画分; レーン7~10 - 精製タンパク質)。融合タンパク質のXa因子による処理は2つのタンパク質GSTとDhaA(WTまたはH272F変異体; それぞれレーン11および12)の形成につながった。またGSTはGSS-セファロース4FF上で効率的に除去された(DhaA.WTまたは変異体; それぞれレーン13および14)。タンパク質はどれも予想通りの分子量であった。

【図4】図4はDhaA.WTと変異DhaAによる1-Cl-ブタンの加水分解状況を示す。

【図5】図5は種々の濃度の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によるDhaA.WTおよびDhaA.H272F/A/G/Q変異体の沈殿状況を示す。レーン1、5および9: 0% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; レーン2、6および10: 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; レーン3、7および11: 10~45% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; レーン4、8および12: 45~70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。パネルA: レーン1~4、DhaA.WT; レーン5~8、DhaA.H272G; レーン9~12、DhaA.H272Q。パネルB: レーン1~4、DhaA.WT; レーン5~8、DhaA.H272F; レーン9~12、DhaA.H272A。

【図6】図6は野生型DhaAの基質特異性を示す。フェノールレッド使用の試験(E<sub>558</sub>)により、酵素添加直後60秒間に15秒ごとに4回読み取って所期反応速度を求めた。

【図7A】図7A-Bは、機能性基[たとえば5-(および6-)カルボキシフルオレセイン、Anth(アントラセン)またはピオチン]とリンカーとを含むDhaA基質を示す。「ピオチン-14-Cl」、「ピオチン-X-14-Cl」、「ピオチン-PEG4-14-Cl」はそれぞれピオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、ピオチン-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Cl、ピオチン-C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Clをいう。

【図7B】図7A-Bは、機能性基[たとえば5-(および6-)カルボキシフルオレセイン、Anth(アントラセン)またはピオチン]とリンカーとを含むDhaA基質を示す。「ピオチン-14-Cl」、「ピオチン-X-14-Cl」、「ピオチン-PEG4-14-Cl」はそれぞれピオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、ピオチン-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Cl、ピオチン-C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Clをいう。

【図8A-B】図8AはDhaA.WTとDhaA.H272Fによるカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの加水分解の生成物のHPLC分離を示す。図8BはDhaA.WTとDhaA.H272Fによるカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの加水分解の生成物の経時的な変化を示すHPLC分析結果である。

【図9A-B】図9はDhaA.WT(パネルA: レーン1、3および5; パネルB: レーン1~8)とDhaA.H272F(パネルA: レーン2、4および6; パネルB: レーン9~14)の、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl(パネルA: レーン1および2); カルボキシ-X-ローダミン-C

10

20

30

40

50

$^{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$  (パネルA: レーン3および4); カルボキシフルオレセイン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$  (パネルA: レーン5および6); またはビオチン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$  (パネルB)に対する結合のSDS-PAGE分析の結果である。パネルBのビオチン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ の濃度は次のとおりである: 0  $\mu\text{M}$ (レーン1、8)、125  $\mu\text{M}$ (レーン2、9)、25  $\mu\text{M}$ (レーン3、10)、5  $\mu\text{M}$ (レーン4、11)、1  $\mu\text{M}$ (レーン5、12)、0.2  $\mu\text{M}$ (レーン6、13)、および0.04  $\mu\text{M}$ (レーン7、14)。

【図10】図10は、変異DhaAの基質、ビオチン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ 、による前処理が別の基質の結合を阻むことを示す。DhaA.WT- レーン1、2; DhaA.H272変異体- F: レーン3、4; G: レーン5、6; A: レーン7、8; Q: レーン9、10。ビオチン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ で前処理したのは試料2、4、6、8および10である。

【0047】

【図11A-B】図11A-Bは酵素-基質複合体のMALDI-TOF質量分析結果である。DhaA.WTまたはDhaA.H272Fの、カルボキシフルオレセイン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$  とインキュベートしたGSTとの融合体のマスペクトル(それぞれパネルAまたはパネルB)。

【図12】図12は、残基106に置換を含むDhaA変異体および残基106と残基272に置換を含むDhaA変異体の、カルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ に対する結合特性のSDS-PAGE分析結果である。2  $\mu\text{g}$ のタンパク質と25  $\mu\text{M}$ カルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ /32  $\mu\text{l}$ を室温で1時間インキュベートした。レーンあたり各反応液10  $\mu\text{l}$ を添加した。レーン1 - DhaA.D106C; レーン2 - DhaA.D106C:H272F; レーン3 - DhaA.D106E; レーン4 - DhaA.D106E:H272F; レーン5 - DhaA.D106Q; レーン6 - DhaA.D106Q:H272F; レーン7 - DhaA.WT; およびレーン8 - DhaA.H272F。ゲルは570nmフィルターで画像化した。

【図13】図13はRenillaルシフェラーゼ+DhaA.H272融合体を固体担体(ストレプトアビジンコートプレート)に係留して含む試料中のルシフェラーゼ活性の分析結果である。該融合体の捕捉にはDhaA基質(すなわちビオチン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ )を使用した。Renillaルシフェラーゼ+DhaA.H272融合体を含む画分では活性が検出されなかった。

【図14】図14は、DhaA.WT(各パネルのレーン1~4)かまたはDhaA.H272F(各パネルのレーン5~7)を発現するE. coli (由来タンパク質)の2倍系列希釈の、in vivoでビオチン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ により処理した(パネルA)、またはカルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ により処理した(パネルB)後の、SDS-PAGE分析結果である。矢印は、DhaAの $M_r$ に対応する $M_r$ のタンパク質を示す。

【図15】図15はカルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ の真核細胞タンパク質へのin vivo結合を示す。DhaA.WT(レーン1~4)かまたはDhaA.H272F-Flag(レーン5~8)を発現するCHO-K1細胞由来のタンパク質の2倍系列希釈はカルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ で処理した。矢印は、DhaA-Flagの $M_r$ に対応する $M_r$ のタンパク質を示す。

【図16A-C】図16A-Cは、CHO-K1細胞に対するカルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ の透過性を示す。CHO-K1細胞(パネルA、明視野像)をカルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ (25  $\mu\text{M}$ )で(37  $^{\circ}\text{C}$ で5分間)処理し、素早くPBSで洗浄した(パネルB)。パネルCは洗浄後の細胞を示す。

【0048】

【図17A-F】図17はGFP-コネクター-DhaA.WT-FlagまたはGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagでトランスフェクトした細胞の画像である。CHO-K1細胞にGFP-コネクター-DhaA.WT-Flag(パネルA-C)またはGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flag(パネルD-F)をコードするDNAをトランスフェクトし、カルボキシテトラメチルローダミン- $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{NO}_2\text{-Cl}$ で処理した。パネルA、D-明視野; パネルB、E - GFPフィルターセット; およびパネルC、F-カルボキシテトラメチルローダミン フィルターセット。

【図18】図18は、GFP-コネクター-DhaA.WT-Flag(レーン1~4)またはGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flag(レーン5~8)でトランスフェクトした細胞に由来するタンパク質のウェスタンブロット分析結果である。CHO-K1細胞にGFP-コネクター-DhaA.WT-FlagまたはGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagをトランスフェクトし、次いでカルボキシテトラメチルローダ

10

20

30

40

50

ミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl (25 μM) で0、5、15または60分間処理し、PBSで洗浄し(4 × 1.0ml)、SDS-試料バッファーに回収した。試料をSDS-PAGE電気泳動で分離し、蛍光イメージャーで解析した。レーン1~4、それぞれ0、5、15または60分間処理しGFP-コネクター-DhaA.WT-Flag。レーン5~8、それぞれ0、5、15または60分間処理しGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flag。矢印は、GFP-コネクター-DhaA.H272F-FlagのMrに対応するMrのタンパク質を示す。

【図19A】19A-Bは特定基質(パネルAはカルボキシテトラメチルローダミン、パネルBはカルボキシ-X-ローダミン)のCHO-K1細胞に対する毒性を示す。

【図19B】19A-Bは特定基質(パネルAはカルボキシテトラメチルローダミン、パネルBはカルボキシ-X-ローダミン)のCHO-K1細胞に対する毒性を示す。

【図20】図20はセリン-ラクタマーゼの反応スキームである。この反応は前共有結合的な出会い複合体(precovallent encounter complex)の形成に始まり(図19A)、高エネルギーのアシル化反応四面体中間体(図19B)を経て、一時的に安定なアシル-酵素中間体を形成して、触媒残基Ser70を介してエステルを形成する(図19C)。次いでアシル-酵素は加水分解水の攻撃を受けて(図19D)、高エネルギーの脱アシル化反応中間体(図19E)(Minasov et al. 2002)を形成し、それが崩壊して加水分解生成物を形成する(図19F)。該生成物は次いで放出され、遊離型酵素が再生される。

【図21】図21はGST-BlaZによるFAPの加水分解の経時変化を示す。

【図22】図22はGSTとBlaZ.E166D、BlaZ.N170QまたはBlaZ.E166D:N170Qとの融合体へのBOCELLINの結合を示す。レーン1-色素/無BlaZ(-ラクタマーゼ); レーン2-BlaZ.WT; レーン3-BlaZ.E.166D; レーン4-BlaZ.N170Q; およびレーン2-BlaZ.E166D:N170Q。

【0049】

【図23】図23はCCF2の、GSTとBlaZ.E166D、BlaZ.N170QまたはBlaZ.E166D:N170Qとの融合体への結合を示す。レーン1-色素/無BlaZ(-ラクタマーゼ); レーン2-BlaZ.WT; レーン3-BlaZ.E.166D; レーン4-BlaZ.N170Q; およびレーン2-BlaZ.E166D:N170Q。

【図24】図24は、GFP-コネクター-DhaA.H272F-NLS3をコードするコンストラクトをトランスフェクトし、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで染色したCHO-K1生細胞の蛍光およびDIC画像である。カルボキシテトラメチルローダミンフィルター-上左; GFPフィルター-上右; “A”と“B”の重ね撮り-下左; 細胞のDIC画像-下右。NLS3=SV40 T抗原由来の核局在化配列のタンデムリピート。

【図25A-B】図25はGFP-アレスチン2をコードするコンストラクトでトランスフェクトした(左)、およびDhaA.H272F-アレスチン2をコードするコンストラクトをトランスフェクトし、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで染色した(右)、CHO-K1生細胞の蛍光画像である。

【図26】図26はE. coliでのDhaA発現のSDS-PAGE分析の結果である。レーン1(分子量マーカー); 2(DhaA.WT粗溶解液); 3(DhaA.WT無細胞溶解液); 4(DhaA.H272F粗溶解液); 5(DhaA.H272F無細胞溶解液); 6(ベクター対照粗溶解液); 7(ベクター対照無細胞溶解液); 8(DhaA.E130Q C1粗溶解液); 9(DhaA.E130Q C1無細胞溶解液); 10(DhaA.E130L A5粗溶解液); 11(DhaA.E130L A5無細胞溶解液); 12(DhaA.E130A A12粗溶解液); 13(DhaA.E130A A12無細胞溶解液); 14(分子量マーカー)。矢印はDhaAタンパク質の位置を示す。-sは遠心前の溶解液であり、+sは遠心後の溶解液である。

【0050】

【図27】図27は含DhaA溶解液の免疫プロット分析の結果である。レーン1(DhaA.WT粗溶解液); 2(DhaA.WT無細胞溶解液); 3(DhaA.H272F粗溶解液); 4(DhaA.H272F無細胞溶解液); 5(ベクター対照粗溶解液); 6(ベクター対照無細胞溶解液); 7(分子量マーカー); 8(DhaA.E130Q C1粗溶解液); 9(DhaA.E130Q C1無細胞溶解液); 10(DhaA.E130L A5粗溶解液); 11(DhaA.E130L A5無細胞溶解液); 12(DhaA.E130A A12粗溶解液); 13(DhaA.E130A A12無細胞溶解液); 14(分子量マーカー)。矢印はDhaAタンパク質の位置を示す。

【図28】図28はin vitro共有結合アルキル-酵素中間体形成の蛍光画像分析である。レーン1(蛍光分子量マーカー); 2(DhaA.WT); 3(DhaA.H272F変異体); 4(DhaA-(空ベクター対照)); 5(DhaA.E130Q変異体); 6(DhaA.E130L変異体); 7(DhaA.E130A変異体)。矢印は

10

20

30

40

50

蛍光酵素-アルキル共有結合中間体の位置を示す。

【図29】図29は全細胞での共有結合アルキル-酵素中間体形成の蛍光画像分析である。レーン1(蛍光分子量マーカー); 2(DhaA.WT); 3(DhaA.H272F); 4(DhaA-(空ベクター対照)); 5 (DhaA.E130Q); 6(DhaA.E130L); 7(DhaA.E130A); 8(蛍光分子量マーカー)。矢印は蛍光酵素-アルキル共有結合中間体の位置を示す。

【図30A-B】図30A-Bはストレプトアビジン(SA)コートビーズ表面に捕捉されたDhaA-Flagのウェスタンブロット分析結果である。DhaA.H272F-Flagを一時的に発現するCHO-K1細胞をピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Cl(25  $\mu$ M、0.1%DMSO、60分、37 )で処理するか(A)または非処理とした(B)。過剰ピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clを洗い流し、細胞を溶解し、溶解液10  $\mu$ Lを5  $\mu$ LのSAコートビーズ(Pierce)と60分間、室温(RT)でインキュベートした。細胞溶解液(レーン1)、ビーズ非結合タンパク質(レーン2)およびビーズ結合タンパク質(レーン3)をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗Flag抗体(Sigma)でプローブした。

【0051】

【図30C-D】図30C-Dはストレプトアビジン(SA)コートビーズ表面に捕捉されたhR.Luc-DhaAの分析結果である。CHO-K1細胞をピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Cl(25  $\mu$ M、0.1%DMSO、60分、37 )で処理するか、または非処理とした。細胞を溶解し、溶解液10  $\mu$ Lを5  $\mu$ LのSAコートビーズ(Pierce)と60分間、室温(RT)でインキュベートした。未結合分を洗い流し、hR.Luc活性をPromegaの“Renilla Luciferase Assay System”を使用して測定する(C)かまたは捕捉したhR.Lucをウェスタンブロット法で分析した(D)。C)カラム1(ピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clで処理し過剰ピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clを洗い流した細胞); カラム2(非処理細胞); カラム3(ピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clで処理しただけで、過剰ピオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clを洗い流さなかった細胞)。D)細胞溶解液(レーン1)、ビーズ非結合タンパク質(レーン2)およびビーズ結合タンパク質(レーン3)をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗hR.Luc抗体(Chemicon)でプローブした。

【図31A】図31A-Bは、*in vivo*カルボキシテトラメチルローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Cl 標識スクリーニングアッセイの使用によるDhaA.H272F K175/C176ライブラリー改善の可能性(パネルA)と抗FLAG固定化タンパク質アッセイの使用によるDhaA.H272F K175/C176ライブラリー改善の可能性(パネルB)とを示す。パネルAでは、H272F親(水平線)より2倍高活性のDhaA変異体を矢印で示す。パネルBでは、DhaA.H272Fよりも3~4倍高シグナル強度のDhaA変異体が特定される。DhaA.H272F親-およびDhaA-対照(3連)はそれぞれウェル12C-E、12F-Hに位置する。

【図31B】図31A-Bは、*in vivo*カルボキシテトラメチルローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Cl 標識スクリーニングアッセイの使用によるDhaA.H272F K175/C176ライブラリー改善の可能性(パネルA)と抗FLAG固定化タンパク質アッセイの使用によるDhaA.H272F K175/C176ライブラリー改善の可能性(パネルB)とを示す。パネルAでは、H272F親(水平線)より2倍高活性のDhaA変異体を矢印で示す。パネルBでは、DhaA.H272Fよりも3~4倍高シグナル強度のDhaA変異体が特定される。DhaA.H272F親-およびDhaA-対照(3連)はそれぞれウェル12C-E、12F-Hに位置する。

【図32】図32は、カルボキシテトラメチルローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clを使用するDhaAライブラリーのハイスループットスクリーニング用に開発されたMagneGST(登録商標)アッセイの概観を示す。

【図33A-B】図33A-Bは変異体DhaAタンパク質ライブラリーの改善(すなわちヒット)の可能性を示す。示したのはDhaA.H272F C176(パネルA)およびDhaA.D106C K175/C176 NNK(パネルB)からの代表的なスクリーニングプレートである。矢印は改善の可能性があるクローンである。

【図34】図34A-Bは変異体DhaAタンパク質ライブラリーの改善(すなわちヒット)の可能性を示す。示したのは、MagneGST(登録商標)アッセイの使用によるDhaA.H272F Y273(NNK)ライブラリーからの2つの代表的なスクリーニングプレートである。矢印は改善の可能性があるクローンである。

【図35A】図35A-BはDhaA.H272Fに関する第175、176および273位のヒット配列(パネルA

10

20

30

40

50

)とDhaA.D106に関する第175および176位のヒット配列(パネルB)を示す。

【図35B】図35A-BはDhaA.H272Fに関する第175、176および273位のヒット配列(パネルA)とDhaA.D106に関する第175および176位のヒット配列(パネルB)を示す。

【図36A-B】図36A-Bは2次アッセイでの、特定されたDhaAヒットの親タンパク質に対する相対活性を示す。A) MagneGST(登録商標)アッセイとカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを使用して、表示のDhaA変異体を再アッセイした(n=3)。B)タンパク質固定化アッセイとビオチン-PEG4-14-Clを使用して、表示のDhaA変異体を分析した。

【0052】

【図37A-C】図37A-Cは精製DhaA変異体のカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによる相対標識速度を示す。A) 標識の経時変化のSDS-PAGEおよび蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1, 2 (DhaA.D106 30H4); 3, 4 (H272F); 5, 6 (DhaA.H272F ES); 7, 8 (DhaA.H272F H11); 9, 10 (DhaA.H272F A7); 11, 12 (DhaA.H272F A7); 13, 14 (DhaA.H272F A7YM); 15, 16 (DhaA.H272F YL); 17, 18 (DhaA.H272F 2G7); 19, 20 (DhaA.H272F 3A7); 21, 22 (DhaA.H272F H11YL)。奇数および偶数番号のレーンの反応物を室温で、それぞれ2分間、30分間、インキュベートした。B) 第1世代(DhaA.H272F A7)および第2世代(DhaA.H272F H11YLおよびDhaA.H272F A7YM)変異体の標識の経時変化のSDS-PAGEおよび蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1(20秒); 2(40秒); 3(1分); 4(2分)および5(7分)。矢印は蛍光標識DhaA融合タンパク質の存在を示す。C)カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClによるDhaA標識速度。パネルB示す蛍光生成物を定量し、時系列にプロットした。

10

【図38A-B】図38A-BはDhaA.H272F H11YLの標識の経時変化を示す。A)カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによる精製DhaA.H272F H11YLのSDS-PAGEおよび蛍光画像化ゲル分析。表示の時間の単位は秒である。矢印は蛍光DhaA.H272F H11YLの位置を示す。B) DhaA.H272F H11YLの標識速度。パネルBに示す蛍光生成物を定量し、時系列にプロットした。

20

【図39A-B】図39A-Bはカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl とカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl の使用によるDhaA変異体の蛍光偏光分析の結果である。

【図40】図40は親(DhaA.H272F、DhaA.D106C)変異体および第1、第2世代DhaA変異体の、蛍光偏光(FP)法で求めた2次速度定数(M<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup>)を示す。

【図41】図41はDhaA.H272F H11YL(“Halo Tag”)のカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clへの、およびカルボキシテトラメチルローダミン結合ビオチンのストレプトアビジンへの、各標識速度の、蛍光偏光法の使用による比較である。

30

【0053】

【図42】図42は、DhaA.H272FおよびDhaA.H272F H11YL基質ポケットの構造モデルである(パネルA、CとパネルB、Dはそれぞれカルボキシテトラメチルローダミン結合基質の有無による)。

【図43A-B】図43は精製DhaAタンパク質の熱安定性研究の結果である。A) Dha.H272F親変異体および特定第1世代DhaA変異体の分析。B) Dha.H272F系第2世代DhaA変異体の分析。

【図44】図44はDhaA.H272F H11YLの反応速度に対する低温の効果を示す。4 かまた23でのインキュベーションの後、反応混合物10 μLを、予め95でインキュベートしておいた、等量のSDS-ローディングダイに手早く加えた。得られたSDS-PAGEゲルを蛍光画像化分析で調べた。

40

【図45A-B】図45は固体担体へのDhaA固定化の説明である。A) DhaA.H272F変異体と固定化ビオチン-クロロアルカンとの一般反応スキーム。B) 特定DhaA変異体の固定化ビオチン-PEG-14-Clに対する滴定。

【図46A-B】図46A-BはCHO-K1細胞で発現した親および第1世代DhaA変異体のin vivo標識を示す。A)カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl (5 μM)によるin vivo標識後のDhaA変異体のSDS-PAGE蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1~4 (DhaA.H272F); 5~8 (DhaA.H272F A7); 9~12 (DhaA.H272F H11); および13~16 (DhaA.D106C)。系列内の各レ

50

ーンは5、15、30および120分の時点に対応する。矢印は標識DhaAの位置を示す。B) カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClのDhaA変異体への結合の定量。

【図46C-D】図46C-DはCHO-K1細胞で発現した第1世代および第2世代DhaA変異体の *in vivo* 標識を示す。C) カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl (5 μM) による *in vivo* 標識後のDhaA変異体のSDS-PAGE蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1~4 (DhaA.H272F A7); 5~8 (DhaA.H272F H11YL); 9~12 (DhaA.D106C 30H4)。系列内の各レーンは5、15、30および120分の時点に対応する。D) カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClのDhaA変異体への結合の定量。

【図47A-C】図47A-Cは哺乳動物細胞溶解液でのDhaA.H272F A7およびDhaA.H272F H11YLの、種々の濃度のカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによる標識を示す。

10

【0054】

【図48A-B】図48A-Bは親および第1世代DhaA変異体の *in vivo* 安定性の比較を示す。A) カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識DhaA変異体の蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1~3 (DhaA.H272F); 4~6 (DhaA.D106C); 7~9 (DhaA.H272F A7); 10~12 (DhaA.H272F H11); および13 (マーカー)。レーン1、4、7および10はトランスフェクション12時間後に採取した試料であり、レーン2、5、8および11はトランスフェクション24時間後に採取した試料であり、3、6、9および12はトランスフェクション48時間後に採取した試料である。矢印は標識DhaA変異体の位置を示す。B) 蛍光画像化ゲルの定量。

【図48C-D】図48C-DはDhaA.H272F変異体の *in vivo* 安定性の比較を示す。A) カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識DhaA変異体の蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1~3 (DhaA.H272F A7); 4~6 (DhaA.H272F H11YL); および7 (マーカー)。レーン1、4はトランスフェクション12時間後に採取した試料であり、レーン2、5はトランスフェクション24時間後に採取した試料であり、3、6はトランスフェクション48時間後に採取した試料である。矢印は標識DhaA変異体の位置を示す。B) 蛍光画像化ゲルの定量。

20

【図49-1】図49はpHT2に収めたDhaA.H272F H11YLのヌクレオチド配列(配列番号80)とアミノ酸配列(配列番号81)を示す。記載の制限部位は、機能性NおよびC末端融合体の生成を容易にするために組み込んだ。

【図49-2】図49はpHT2に収めたDhaA.H272F H11YLのヌクレオチド配列(配列番号80)とアミノ酸配列(配列番号81)を示す。記載の制限部位は、機能性NおよびC末端融合体の生成を容易にするために組み込んだ。

30

【図49-3】図49はpHT2に収めたDhaA.H272F H11YLのヌクレオチド配列(配列番号80)とアミノ酸配列(配列番号81)を示す。記載の制限部位は、機能性NおよびC末端融合体の生成を容易にするために組み込んだ。

【図50A-B】図50A-BはDhaA.H272F H11YLをコードするベクターでトランスフェクトしたHeLa生細胞の蛍光およびDIC画像である。細胞はカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで染色しMitoTracker<sup>R</sup> Green FMで対比染色した(左パネル)か、またはDiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで染色しMitoTracker<sup>R</sup> Orange CMTMRosで対比染色した(右パネル)。カルボキシフルオレセインフィルター-上左; カルボキシテトラメチルローダミンフィルター-上右; カルボキシフルオレセイン+カルボキシテトラメチルローダミン重ね撮り-下右; 細胞のDIC画像-下左。

40

【図50C-D】図50C-DはDhaA.H272F H11YL HT2をコードするベクタープラスミドpHT2(図49を参照)またはDhaA.H272FをコードするpCIneoでトランスフェクトしたCHO-K1生細胞の蛍光およびDIC画像である。細胞は0.2、1.0または5.0 μMのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで染色し3.7%パラホルムアルデヒドで固定した。カルボキシフルオレセインフィルター-各パネルの左側画像; カルボキシテトラメチルローダミン+DIC重ね撮り-各パネルの右側画像。

【図50E-F】図50E-FはHeLa細胞中の -アレスチン2-DhaA.H272F H11YL HT2タンパク質融合体の局在を示す。DiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識(E)細胞とカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識(F)細胞の顕微鏡写真。

50

【図5 1 A - B】図51A-BはCHO-K1細胞で一時的に発現させたhRLuc-DhaA.H272F H11YLHT2融合タンパク質の捕捉を示す。ストレプトアビジンコート96穴プレート(A)上およびストレプトアビジン-MagneSphere常磁性体粒子(B)上の捕捉hRLuc活性。

【図5 2 A - C】図52A-Cは、精製DhaA.H272F H11YLのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシテトラメチルローダミン-p-フェネチル-Clおよびカルボキシテトラメチルローダミン-フラニル-プロピル-Clによる相対標識速度と対応する蛍光生成物の蓄積とを示す。A) 蛍光偏光(FP)分析。B) SDS-PAGEおよび蛍光画像化ゲル分析。C) 蛍光生成物の蓄積の定量。

【図5 3 A - C】図53A-Cは、精製DhaA.H272F H11YLのカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシフルオレセイン-p-フェネチル-Clおよびカルボキシフルオレセイン-フラニル-プロピル-Clによる相対標識速度と対応する蛍光生成物の蓄積とを示す。A) 蛍光偏光(FP)分析。B) SDS-PAGEおよび蛍光画像化ゲル分析。C) 蛍光生成物の蓄積の定量。

【図5 4 A - B】図54A-Bは種々のカルボキシテトラメチルローダミン-クロロアルカンによるDhaA.H272F H11YLの*in vivo*標識を示す。A) 蛍光画像化ゲル分析。レーン: 1~3(カルボキシテトラメチルローダミン-14-Cl; それぞれ5、15および60分); 4~6(カルボキシテトラメチルローダミン-フラニル-プロピル-Cl; それぞれ5、15および60分); 7~9(カルボキシテトラメチルローダミン-p-フェネチル-Cl; それぞれ5、15および60分)。B) 1、5および20 μM基質の使用によるDhaA.H272F H11YL *in vivo*標識速度の定量。

【図5 5 A - B】図55A-Bは固定化DhaA.H272F H11YLのビオチン結合クロロアルカン基質に対する反応性を示す。A) 一般反応および検出スキーム。B) ビオチン-PEG4-14-Cl、ビオチン-14-Clおよびビオチン-p-フェネチル-14-Clの、固定化DhaA.H272F H11YL273Lタンパク質との反応性。

【図5 6】図56は例示的な環構造基質である。

【図5 7】図57は本発明のヒドロラーゼ基質および本発明の変異ヒドロラーゼの、関心タンパク質の固定化と捕捉への使用例である。

【図5 8】図58は本発明のヒドロラーゼ基質と本発明の変異ヒドロラーゼによる免疫沈降法の図解である。

【図5 9 A】図59A-Bは本発明のヒドロラーゼ基質と本発明の変異ヒドロラーゼの使用によるcAMP検出の図解である。

【図5 9 B】図59A-Bは本発明のヒドロラーゼ基質と本発明の変異ヒドロラーゼの使用によるcAMP検出の図解である。

【図6 0 A】図60Aは細胞系のプロテアーゼ検出系の図解である。

【図6 0 B】図60Bは細胞系のプロテアーゼ検出系の図解である。

【図6 0 C】図60Cは短寿命レポーターの使用による関心プロテアーゼ検出の図解である。

【発明を実施するための形態】

【0055】

発明の詳細な説明

用語の定義

「求核剤」は電子を供与する分子である。

「選択マーカー(タンパク質)」は、細胞にある種の必須栄養素を欠く培地で増殖する能力を付与する酵素活性をコードする(たとえば酵母細胞のTRP1遺伝子)か、または抗生物質または他の薬物を添加した培地で増殖する能力を付与する酵素活性をコードする。すなわち選択マーカーをコードする遺伝子がある細胞が発現すると、該細胞には、該遺伝子を欠く、対応する細胞にはない抗生物質または薬物に対する耐性が付与される。宿主細胞が選択培地で増殖するには選択マーカーを発現しなければならないとき、該マーカーは陽性選択マーカーという(たとえば、対応する抗生物質の存在下で増殖する能力を付与する抗生物質耐性遺伝子など)。選択マーカーはまた、特定遺伝子を含む宿主細胞の選択に使用することもできる(たとえば、発現すると5%シヨ糖添加培地で増殖した細菌宿主細胞を殺してしまうsacB遺伝子など)。こうした使われ方をする選択マーカーは陰性選択マーカーま

10

20

30

40

50

たは排除選択マーカーという。共通の選択マーカー遺伝子配列は抗生物質たとえばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、ピューロマイシン、ブレオマイシン、ストレプトマイシン、ハイグロマイシン、ネオマイシン、Zeocin（登録商標）などに対する耐性に対応する配列を含む。選択可能な栄養要求性遺伝子配列はたとえばヒスチジノール存在下のヒスチジン無添加培地での増殖を可能にするhisDを含む。好適な選択マーカー遺伝子はブレオマイシン耐性遺伝子、メタロチオールイン遺伝子、ハイグロマイシンB-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、AURI遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、チミンキナーゼ遺伝子、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子などを含む。

#### 【0056】

「核酸」はここでは、共有結合でつながった一連のヌクレオチドであって、そこではあるヌクレオチドのペントースの3'位がホスホジエステル基を介して次のヌクレオチドのペントースの5'に結合しており、またそこではヌクレオチド残基(塩基)が特定の配列で連結されていることを特徴とする一連のヌクレオチドすなわち線形順序のヌクレオチドであり、またその類似体たとえば塩基、糖鎖および/またはリン酸骨格に単数または複数の修飾体をもつ類似体を包含する。「ポリヌクレオチド」はここでは、鎖長約100ヌクレオチド以上の配列を含む核酸をいう。「オリゴヌクレオチド」または「プライマー」はここでは、短いポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部をいう。用語「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」はここでは、2以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを、好ましくは3以上、また通常は10以上の、ただし250以下の、好ましくは20以下のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドをいう。オリゴヌクレオチドは任意の方法で、たとえば化学合成、DNA複製、増幅たとえばPCR、逆転写(RT)、またはそれらの併用法で生成させてよい。「プライマー」は、プライマー伸張が開始される条件下に置かれたときに核酸合成の開始点として機能しうるオリゴヌクレオチドである。プライマーはその3'末端に、標的(鋳型)の特定配列に対して実質的に相補的である領域をもつように選択する。プライマー伸張が起こるためには、プライマーは標的とハイブリダイズしうるほど相補的でなければならない。プライマー配列は標的配列の厳密な反映である必要はない。たとえば非相補的な配列断片がプライマーの5'末端に付着していても、プライマーの残りの配列が標的と実質的に相補的であれば、かまわない。プライマー配列が標的配列とハイブリダイズしうるほどの相補性を有し、従ってプライマー伸張産物の合成に必要な複合体を形成しうる限り、プライマーの中に非相補的な塩基またはもっと長い配列を散在させることも可能である。ある遺伝子配列とマッチするまたは相補的なプライマーは増幅反応、RT-PCRなどに使用してもよい。

#### 【0057】

核酸分子は5'末端と3'末端をもつと言われるが、それは核酸のホスホジエステル結合が隣り合うモノヌクレオチドのペントース環の5'炭素と3'炭素の間で起こるためである。新しい結合が5'炭素に対するものとなるポリヌクレオチド末端は5'末端ヌクレオチドである。新しい結合が3'炭素に対するものとなるポリヌクレオチド末端は3'末端ヌクレオチドである。末端ヌクレオチドはここでは3'または5'末端の末端位のヌクレオチドである。

#### 【0058】

DNA分子は5'末端と3'末端をもつと言われるが、それはモノヌクレオチド同士が反応して、一方のモノヌクレオチドのペントース環の5'リン酸がその隣のペントース環の3'酸素に、ホスホジエステル結合を介して一方向へと結合し、オリゴヌクレオチドを形成するからである。従って、オリゴヌクレオチドの末端は、5'リン酸がモノヌクレオチドのペントース環の3'酸素に結合していない場合には「5'末端」といい、また3'酸素が隣のモノヌクレオチドのペントース環の5'リン酸に結合していない場合には「3'末端」という。

#### 【0059】

核酸配列はここでは、たとえもっと大きなオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに内在する場合でも、やはり5'末端と3'末端をもつと言ってもよい。線状、環状いずれのDNA分子でも、離散配列を「上流」(または5')または「下流」(または3')配列という。この用語は転写がDNA鎖に沿って5'→3'へと進行することを反映している。一般に、結合し

ている遺伝子(たとえばオープンリーディングフレームまたはコード領域)の転写を指揮するプロモーターまたはエンハンサー配列はコード領域の5'または上流に位置するのが普通である。しかし、エンハンサー配列は、たとえプロモーター配列およびコード領域の3'に位置する場合でも、その影響力を行使することができる。転写終結およびポリアデニル化シグナルは3'すなわちコード領域の下流に位置する。

**【0060】**

用語「コドン」はここでは、ポリペプチド鎖に組み込まれるべき特定アミノ酸を指定する3個1組のヌクレオチドからなる基本的な遺伝暗号単位であるか、または開始または終止シグナルである。用語「コード領域」は、構造遺伝子との関連で使用されるときは、mRNA分子の翻訳の結果としての新生ポリペプチド中に見られるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列をいう。一般に、コード領域は5'側がイニシエーターのメチオニンをコードするトリプレット「ATG」を、また3'側が終止コドン(たとえばTAA、TAG、TGA)を、それぞれ境界とする。コード領域はトリプレット「TTG」を開始コドンとする例もある。

10

**【0061】**

用語「単離(された)および/または精製(された)」は核酸分子、ポリペプチド、ペプチドまたはタンパク質の、*in vivo*物質を伴わない*in vitro*合成、単離および/または精製をいう。従って、用語「単離(された)」は「単離オリゴヌクレオチド」または「単離ポリヌクレオチド」などのように核酸に関連して使用されるときは、その源泉では付随しているのが普通である少なくとも1つの不純物から分離された、同定済みの核酸配列をいう。単離核酸は天然で見られる状態とは異なる形で存在する。それに対して、非単離核酸(DNA、RNAなど)は天然に存在する状態で見られる。たとえば任意のDNA配列(例: 遺伝子)は宿主細胞の染色体上に近隣遺伝子と隣接して存在し、またRNA配列(例: 特定のタンパク質をコードする特定のmRNA配列)は多様なタンパク質をコードする多数の他mRNAと共に混合体として細胞内に存在する。従って、ゲノム、cDNAまたは合成に由来するポリヌクレオチド、またはそれらの混合体、を含む「単離核酸分子」に関しては、該「単離核酸分子」は(1)天然に存在する状態では共に見られるポリヌクレオチドを全くまたは部分的に伴わない、(2)天然では結合していないポリヌクレオチドに作動可能に連結している、または(3)より大きな配列の一部として天然には存在しない。該単離核酸分子は1本鎖でも2本鎖でもよい。核酸分子は、タンパク質の発現に使用されるときは、少なくともセンス鎖またはコード鎖を含む(すなわち該核酸は1本鎖でもよい)が、センス鎖とアンチセンス鎖の両方を含んでも(すなわち2本鎖でも)よい。

20

30

**【0062】**

用語「野生型」はここでは、天然源から単離された遺伝子または遺伝子産物の特質をもつ遺伝子または遺伝子産物をいう。野生型遺伝子は個体群の中で最も頻繁に見られる遺伝子であり、そのため恣意的に「野生型」遺伝子と呼ばれる。それに対して、「変異(体)」は野生型遺伝子または遺伝子産物と比べて配列および/または機能的性質の変化(すなわち特質の変化)を示す遺伝子または遺伝子産物をいう。天然の変異体が単離されることもあるが、これらは野生型遺伝子または遺伝子産物と比べて特質が変化していることから識別される。

**【0063】**

用語「組み換えDNA分子」は自然では一緒に見付からないのが普通である少なくとも2つのヌクレオチド配列を含むハイブリッドDNA配列を意味する。用語「ベクター」は、その中にDNA断片を挿入またはクローニングされる核酸分子であって、DNA断片の細胞への導入に使用することができ、また細胞内での複製が可能である核酸分子をいう。ベクターはプラスミド、バクテリオファージ、ウイルス、コスミドなどに由来する。

40

**【0064】**

用語「組み換えベクター」、「発現ベクター」または「コンストラクト」はここでは、所期のコード配列を含むDNAまたはRNA配列、および作動可能に連結したコード配列の、特定宿主生物での発現に必要な適正なDNAまたはRNA配列をいう。原核生物発現ベクターは宿主細胞での自己複製のためのプロモーター、リボソーム結合部位および複製起点を含み、

50

またおそらく他の随意配列、たとえばオペレーター配列、制限酵素部位などを含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼにDNAへの結合とRNA合成とを指示するDNA配列である。真核生物発現ベクターはプロモーター、随意にポリアデニル化シグナル、および随意にエンハンサー配列を含む。

**【0065】**

「ペプチド、タンパク質またはポリペプチドをコードする」ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、対応する完全長ペプチド、タンパク質またはポリペプチドと実質的に同じ活性をもつ遺伝子産物をコードする遺伝子のコード領域またはその断片を含む核酸配列を意味する。コード領域はcDNA、ゲノムDNAまたはRNAのいずれの形で存在してもよい。DNAの形で存在するときは、オリゴヌクレオチドは1本鎖(すなわちセンス鎖)でも2本鎖でもよい。適正な転写開始および/または1次RNA転写産物の正しい加工に必要なならば、好適な制御因子たとえばエンハンサー/プロモーター、スプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを遺伝子のコード領域の近傍に配置してもよい。あるいは、本発明の発現ベクターに利用されるコード領域は内在性のエンハンサー/プロモーター、スプライス部位、介在配列、ポリアデニル化シグナルなどを含んでもよい。さらなる実施形態では、コード領域は内在性、外来性の両調節因子の組み合わせを含む。

10

**【0066】**

用語「転写調節因子」または「転写調節配列」は、核酸配列の発現のいくつかの側面を制御する遺伝因子または配列をいう。たとえばプロモーターは作動可能に連結したコード領域の転写開始を促す調節因子である。調節因子の他の非限定的な例は転写因子結合部位、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、転写終結シグナル、およびエンハンサー配列などであり、また結合した配列の転写を、たとえばトランス作用性因子の存在下に、増減させる配列などもある。

20

**【0067】**

真核生物の転写調節シグナルは「プロモーター」および「エンハンサー」配列を含む。プロモーターおよびエンハンサーは転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用する短いDNA配列からなる。プロモーターおよびエンハンサー配列はすでに酵母、昆虫および哺乳動物の各細胞内の遺伝子など種々の真核細胞源から単離されている。プロモーターおよびエンハンサー配列はウイルスからも単離されており、また類似の調節因子たとえばプロモーターは原核生物でも見付かっている。特定プロモーターおよびエンハンサーの選択は関心タンパク質の発現に使用する細胞型に左右される。真核生物プロモーターおよびエンハンサーは宿主範囲が広いものもあれば、宿主が限られるものもある。たとえばSV40初期遺伝子エンハンサーは多数の哺乳動物種に由来する多様な細胞型に対応するため、哺乳動物細胞でのタンパク質発現に広く使用されてきた。広範囲の哺乳動物細胞型に対応するプロモーター/エンハンサー配列の他の2例はヒト伸張因子1遺伝子およびラウス肉腫ウイルスやヒトサイトメガロウイルスの長い末端反復配列に由来する。

30

**【0068】**

用語「プロモーター/エンハンサー」は、プロモーター、エンハンサー両機能(すなわち前記のプロモーター配列とエンハンサー配列によって提供される機能)を提供しうる配列を含むDNAセグメントを意味する。たとえばレトロウイルスの長い末端反復配列はプロモーター、エンハンサー両機能を含む。エンハンサー/プロモーターは「内在性」、「外来性」、「異種」のいずれでもよい。「内在性」エンハンサー/プロモーターはゲノム中の任意の遺伝子と自然に連結されているものである。「外来性」または「異種」エンハンサー/プロモーターは、結合されたエンハンサー/プロモーターにより遺伝子の転写が指示されるよう、遺伝子操作(すなわち分子生物学的手法)により該遺伝子と並置されるものである。

40

**【0069】**

発現ベクター上に「スプライシングシグナル」が存在するとしばしば、真核生物宿主細胞での組み換え転写産物の発現レベルを上昇させる結果となる。スプライシングシグナルは1次RNA転写産物からのイントロンの除去を媒介し、またスプライス供与および受容部位

50

からなる(Sambrook et al. 1989)。常用のスプライス供与および受容部位はSV40の16S RNAに由来するスプライス部位である。

【0070】

組み換えDNA配列が真核細胞で効率的に発現するには、効率的な転写終結および転写産物のポリアデニル化を指示するシグナルの発現が必要である。転写終結シグナルは一般にポリアデニル化シグナルの下流で見付かり、その長さは数百ヌクレオチドである。用語「ポリ(A)部位」または「ポリ(A)配列」はここでは、転写終結と新生RNA転写産物のポリアデニル化の両方を指示するDNA配列をいう。組み換え転写産物の効率的なポリアデニル化が望ましいのは、ポリ(A)テールを欠く転写産物は不安定で、急速に分解するためである。発現ベクターに利用されるポリ(A)シグナルは「異種」でも「内在性」でもよい。内在性ポリ(A)シグナルは任意のゲノム遺伝子のコード領域の3'末端に自然に存在するものである。異種ポリ(A)シグナルはある遺伝子から単離され、別の遺伝子の3'に置かれたものである。常用の異種ポリ(A)シグナルはSV40ポリ(A)シグナルである。SV40ポリ(A)シグナルは237bpのBamHI/BclI制限断片に含まれ、転写終結とポリアデニル化の両方を指示する(Sambrook et al. 1989)。

10

【0071】

真核生物発現ベクターはまた「ウイルスレプリコン」または「ウイルス複製起点」を含んでもよい。ウイルスレプリコンは、適切な複製因子を発現するベクターの宿主細胞内での染色体外複製を可能にするウイルスDNA配列である。SV40またはポリオマウイルス複製起点を含むベクターは適切なウイルスT抗原を発現する細胞では高コピー数(最高 $10^4$ コピー/細胞)へと複製する。一方、ウシパピロマウイルスまたはEpstein-Barrウイルスに由来するレプリコンを含むベクターは染色体外で低コピー数(約100コピー/細胞)の複製をする。

20

【0072】

用語「in vitro」は人工環境また人工環境内での過程または反応をいう。in vitro環境の非限定的な例は試験管および細胞溶解液などである。用語「in situ」は細胞培養をいう。用語「in vivo」は自然環境(たとえば動物または細胞)および自然環境内での過程または反応をいう。

【0073】

用語「発現系」は関心遺伝子の発現を判定(たとえば検出)するためのアッセイまたはシステムをいう。分子生物学分野の当業者には自明であろうが、多種多様な発現系のうち任意のものを使用してよい。広範囲の好適な哺乳動物細胞が広範囲のソース(たとえばAmerican Type Culture Collection, Rockland, MD)から入手可能である。形質転換またはトランスフェクション方法、および発現媒体の選択は選択される宿主系に依存しよう。形質転換およびトランスフェクションの方法はSambrook et al. 1989などで開示されている。発現系はin vitro遺伝子発現アッセイを含むが、そこでは関心遺伝子(たとえばレポーター遺伝子)が調節配列に連結され、遺伝子の発現を抑制または誘導する薬剤による処理の後に遺伝子の発現がモニターされる。遺伝子発現の検出は、発現mRNAまたはタンパク質(たとえば検出可能なレポーター遺伝子産物)の検出または関心遺伝子を発現するの表現型の検出可能な変化などを非限定的に含む任意好適の手段で行うことができる。発現系はまた

30

40

【0074】

用語「遺伝子」は、ポリペプチドの産生に必要なコード配列と随意に制御配列とを含むDNA配列をいう。ポリペプチドをコードするのは完全長コード配列でもよいし、また完全長ポリペプチドと実質的に同じ活性をもつ遺伝子産物をコードする限りで、該コード配列の一部でもよい。

【0075】

核酸は種々のタイプの変異を含むことが知られている。「点」変異はヌクレオチド配列中の一塩基位置の、野生型配列からの変化をいう。変異はまた、参照配列たとえば野生型配列との比較で単数または複数塩基の挿入または欠失をいう。

50

## 【0076】

用語「ハイブリダイズする」および「ハイブリダイゼーション」は標的核酸に対する相補配列のアニールリングを、すなわち相補性配列を含む2核酸ポリマー(ポリヌクレオチド)の塩基対合によるアニールリングを、いう。用語「アニールした」および「ハイブリダイズした」は終始、互換的に使用されており、また相補配列と標的核酸の間の任意の特異的かつ再現可能な相互作用を、部分的に相補性を有するだけの領域の結合を含めて、包摂する。本発明の核酸には天然核酸には通常見られないある種の塩基が含まれてもよいが、イノシンおよび7-デアザグアニンなどはその一例である。核酸技術の当業者なら、相補鎖長、オリゴヌクレオチドの塩基組成および配列、イオン強度、塩基対ミスマッチ頻度などを含む数多くの変数を考慮して、2本鎖の安定性を経験的に求めることができる。核酸2本鎖の安定性は融点 $T_m$ によって測定する。指定条件下の特定核酸2本鎖の $T_m$ は、塩基ペアの半数(平均)が解離する温度である。

10

## 【0077】

用語「ストリンジェンシー」は核酸ハイブリダイゼーションを実行するときの温度、イオン強度および他化合物の存否といった条件に関連して使用される。「高ストリンジェンシー」条件では、相補塩基配列の出現頻度が高い核酸断片の間でだけ核酸塩基の対合が起こる。従って、互いに完全には相補的でない核酸と一緒にハイブリダイズまたはアニールさせたいときは「中」または「低」ストリンジェンシー条件がしばしば求められる。多数の同等条件を採用して中または低ストリンジェンシー条件としうことは技術上周知である。ハイブリダイゼーション条件の選択は一般に当業者には自明であり、またハイブリダイゼーションの目的、ハイブリダイゼーションのタイプ(DNA-DNAまたはDNA-RNA)、および配列間の所期関連性レベルなどによって導かれるのが普通である(方法の一般的な論考についてはSambrook et al. 1989; Nucleic Acid Hybridizations, A Practical Approach, IRL Press, Washington D.C. 1985などを参照)。

20

## 【0078】

核酸2本鎖の安定性はミスマッチ塩基数の増加に伴い低下していくことが、またハイブリッド2本鎖内の相対的なミスマッチ位置によっても多かれ少なかれ低下していくことが、判明している。従って、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを利用して、そうした2本鎖の安定性を極大化または極小化することができる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは次の方法で変化させることができる: ハイブリダイゼーション温度の調整; ハイブリダイゼーションミックス中のらせん構造不安定化剤たとえばホルムアミドの百分率の調整; および洗浄液の温度および/または塩濃度の調整。フィルターハイブリダイゼーションでは、ハイブリダイゼーションの最終ストリンジェンシーはしばしばハイブリダイゼーション後洗浄の塩濃度および/または温度で決まる。

30

## 【0079】

「高ストリンジェンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションとの関連では、5×SSPE(43.8g/L NaCl、6.9g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および1.85g/L EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、0.5% SDS、5×デンハルト試薬および100  $\mu\text{g/ml}$  変性サケ精子DNAからなる溶液による42°Cでの結合またはハイブリダイゼーションとそれに続く0.1×SSPEと1.0% SDSとを含む溶液による42°Cでの洗浄と同等の条件(鎖長約500ヌクレオチドのプロープを使用)を含む。

40

## 【0080】

「中ストリンジェンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションとの関連では、5×SSPE(43.8g/L NaCl、6.9g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および1.85g/L EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、0.5% SDS、5×デンハルト試薬および100  $\mu\text{g/ml}$  変性サケ精子DNAからなる溶液による42°Cでの結合またはハイブリダイゼーションとそれに続く1.0×SSPEと1.0% SDSとを含む溶液による42°Cでの洗浄と同等の条件(鎖長約500ヌクレオチドのプロープを使用)を含む。

## 【0081】

「低ストリンジェンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションとの関連では、5×SSPE(43.8g/L NaCl、6.9g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および1.85g/L EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、0.1% SDS、5×デンハルト試薬[50×デンハルト試薬は500mlあたり5g Ficoll(Type 400, Phar

50

macia), 5g BSA(Fraction V; Sigma)を含む]および100 μg/ml変性サケ精子DNAからなる溶液による42 での結合またはハイブリダイゼーションとそれに続く5×SSPEと0.1% SDSとを含む溶液による42 での洗浄と同等の条件(鎖長約500ヌクレオチドのプロープを使用)を含む。

【0082】

「ペプチド」、「タンパク質」および「ポリペプチド」は任意のアミノ酸を意味し、鎖長または翻訳後修飾(糖鎖付加またはリン酸化など)の有無は問わない。これらの用語は特に断らない限り互換可能である。本発明の核酸分子は、全長変異タンパク質と実質的に同じ活性をもつ天然(野生型)タンパク質またはその断片をコードする。好ましくは、そうした変異タンパク質は対応する野生型タンパク質に対するアミノ酸配列の一致率が少なくとも85%であり、より好ましくは90%であり、最も好ましくは95%または99%である。

10

【0083】

ポリペプチド分子は「アミノ末端」(N末端)および「カルボキシル末端」(C末端)をもつと言われる。それは第1アミノ酸残基の骨格アミノ基と第2アミノ酸残基の骨格アミノ基の間でペプチド結合が起こるためである。用語「N末端」および「C末端」は、ポリペプチド配列に関しては、それぞれポリペプチドのN末端およびC末端領域の一部分を含めたポリペプチドの領域をいう。ポリペプチドのN末端領域の一部分を含む配列はポリペプチド鎖のN末端側半分に由来するアミノ酸を主に含むが、そうした配列に限定されない。たとえば、N末端配列は該ポリペプチドのN末端側半分とC末端側半分の両方に由来する塩基を含むポリペプチド配列の内部を含んでもよい。C末端領域の場合も同じである。C末端およびN末端領域はポリペプチドの最終的なN末端およびC末端をそれぞれ画定するアミノ酸を含んでもよいが、その必要はない。

20

【0084】

用語「単離(された)」は、「単離タンパク質」または「単離ポリペプチド」などのようにポリペプチドとの関連で使用されるときには、その源泉では付随しているのが普通である少なくとも1つの不純物から分離された同定済みのポリペプチドをいう。従って単離ポリペプチドは(1)天然タンパク質とは関係しない、(2)同じ源泉に由来する他タンパク質を、たとえばヒトタンパク質を含まない、(3)別の種に由来する細胞で発現する、または(4)天然には存在しない。一方、非単離ポリペプチド(たとえばタンパク質および酵素)は天然に存在する状態で見付かる。用語「単離ポリペプチド」、「単離ペプチド」または「単離タンパク質」は、合成起源のものを含めたcDNAまたは組み換えDNAまたはそれらの組み合わせによってコードされるポリペプチド、ペプチドまたはタンパク質を含む。

30

【0085】

用語「組み換えタンパク質」または「組み換えポリペプチド」はここでは、組み換えDNA分子から発現するタンパク質分子をいう。一方、用語「天然タンパク質」はここでは、天然に存在する(すなわち非組み換え)源泉から単離したタンパク質を指すのに用いる。天然タンパク質と同じ性質を備えた組み換え体のタンパク質の生産には分子生物学的手法を用いてもよい。

【0086】

用語「融合ポリペプチド」はここでは、関心タンパク質(たとえばルシフェラーゼ、アフィニティータグ、またはターゲティング配列)を別種のタンパク質たとえば変異ヒドロラーゼに結合させて含むキメラタンパク質をいう。

40

【0087】

用語「抗体」はここでは、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子断片によって実質的にコードされる単数または複数のポリペプチドをもつタンパク質をいう。認定された免疫グロブリン遺伝子には無数の免疫グロブリン可変部遺伝子だけでなく、  
、  
、  
、  
およびμ定常部遺伝子もある。軽鎖は、  
、  
のいずれかに分類される。重鎖は、  
、  
μ、  
、  
または  
に分類され、それに応じて免疫グロブリンのクラスIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEができる。

【0088】

50

基本的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は四量体を含むことが知られている。各四量体は2つの同じポリペプチド鎖対からなり、各対は「軽」鎖(約25kD)と「重」鎖(約50~70 kD)をもつ。各鎖のN末端は可変部であり、100~110超のアミノ酸からなる可変部をなし、主に抗原認識に参与する。用語「軽鎖可変部」( $V_L$ )および「重鎖可変部」( $V_H$ )はそれぞれ軽鎖、重鎖の可変部をいう。

【0089】

抗体は修飾型(intact)免疫グロブリンとして、または種々の形の修飾体として、たとえばFabFc<sub>2</sub>、Fab、Fv、Fd、(Fab')<sub>2</sub>、軽鎖および重鎖の可変部だけを含むFv断片、可変部と定常部の一部分とを含むFabまたは(Fab')<sub>2</sub>、単鎖抗体(たとえばscFv、CDRグラフト抗体)などとして、存在してもよい。Fvの重鎖および軽鎖は同じ抗体に由来してもよいし、異なる抗体に由来してキメラFvを形成してもよい。抗体は動物(特にマウスまたはラット)起源でもヒト起源でもよいし、またキメラ体でもヒト化体でよい。用語「抗体」はここでは、種々の形態を含む。

10

【0090】

用語「細胞」、「細胞系」、「宿主細胞」はここでは互換的に使用され、またそうした呼称はすべてその子孫または潜在的な子孫を包摂する。「形質転換細胞」は本発明の核酸分子をすでに導入してある細胞(またはその原細胞)を意味する。随意に、本発明の核酸分子によってコードされるタンパク質またはポリペプチドを産生することができる安定的にトランスフェクトした細胞系を創出するために、該核酸分子を好適な細胞系に導入してもよい。そうした細胞系を構築するためのベクター、細胞および方法は技術上周知である。用語「形質転換体」または「形質転換細胞」は導入数に関係なく、原初の形質転換細胞に由来する初代培養株を包摂する。子孫はどれも、意図的または偶発的な突然変異のためにDNA含量が厳密には同じでなくてもよい。にもかかわらず、原初の形質転換細胞でスクリーニングされた機能性をそのまま受け継ぐ変異体子孫は形質転換体に包摂される。

20

【0091】

用語「相同性」は相補性の度合いをいい、部分相同性でも完全相同性(同一性)でもよい。相同性はしばしば配列分析ソフトウェア(たとえばSequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705)を使用して測定する。そうしたソフトウェアは種々の置換、欠失、挿入および他の修飾などに相同性の度合いを割り当てることにより、類似配列をマッチさせる。同類置換は一般に次のグループ内の置換を含む: グリシン、アラニン; バリン、イソロイシン、ロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン; セリン、トレオニン; リジン、アルギニン; およびフェニルアラニン、チロシン。

30

【0092】

用語「精製(された)」または「精製する」は、関心成分たとえばタンパク質または核酸から若干の不純物を除去する任意の処理の結果を意味する。従って試料中の精製成分の百分率は高まる。

【0093】

用語「作動可能に連結した」はここでは、任意の遺伝子の転写および/または初期タンパク質分子の合成を指示しうる核酸分子が生成されるようにする核酸配列の結合をいう。この用語はまた、機能性の(たとえば酵素的に活性の、結合相手に対する結合能のある、阻害能のある)タンパク質またはポリペプチド、またはその前駆体たとえばプレ体またはプレプロ体のタンパク質またはポリペプチドが生成されるようにするアミノ酸コード化配列の結合をもいう。

40

【0094】

ここで特定されるアミノ酸残基はすべて天然のL型である。標準ポリペプチド命名法に従ったアミノ酸残基の略語を次の対応表に示す。

【0095】

【表1】

## 対応表

1-文字	3-文字	アミノ酸	
Y	Tyr	L-チロシン	
G	Gly	L-グリシン	
F	Phe	L-フェニルアラニン	
M	Met	L-メチオニン	
A	Ala	L-アラニン	10
S	Ser	L-セリン	
I	Ile	L-イソロイシン	
L	Leu	L-ロイシン	
T	Thr	L-スレオニン	
V	Val	L-バリン	
P	Pro	L-プロリン	
K	Lys	L-リジン	
H	His	L-ヒスチジン	
Q	Gln	L-グルタミン	
E	Glu	L-グルタミン酸	
W	Trp	L-トリプトファン	20
R	Arg	L-アルギニン	
D	Asp	L-アスパラギン酸	
N	Asn	L-アスパラギン	
C	Cys	L-システイン	

## 【0096】

用語「ポリヒスチジン配列(poly-histidine tract)」またはHisタグはHis残基2~10個を含む分子たとえば5~10 His配列をいう。ポリヒスチジン配列は共有結合分子の、固定化金属たとえばニッケル、亜鉛、コバルトまたは銅、キレートカラム表面での、または他分子(たとえばHisタグに対して反応性である抗体)との相互作用による、アフィニティー精製を可能にする。 30

## 【0097】

「純粋(な)」はここでは、支配種として存在する(すなわち組成物中のモルベースの存在量が他のどの種よりも多い)目的種を意味し、また実質的に精製された画分は好ましくは、高分子種の全存在量の少なくとも約50%(モルベース)を目的種が占めるような組成物である。一般に、「実質的に純粋な」組成物は該組成物中に存在する全高分子種の約80%超を含み、より好ましくは約85%、約90%、約95%および約99%超を含む。最も好ましくは、目的種は本質的に均一に精製され(通常の検出法で組成物から不純物種が検出されない)、また該組成物は本質的に単一高分子種からなる。 40

## 【0098】

「量子ドット」は広い励起帯と狭い発光帯をもつ極小の、明るい、高光安定性の半導体結晶子、すなわち蛍光結晶ナノ粒子である。

「アップコンバージョンナノ粒子」は、赤外(IR)光によって励起される吸収体とIR光を可視光に変換する結晶格子内の放出体イオンとが結合したナノ粒子を意味する。

## 【0099】

「三重項増感剤」はここでは、化学的にほぼ不活性であって、かつ基質による吸収がないかまたは弱い波長で光を吸収することができる分子または原子団である。該「増感剤」はその後、該基質または化合物の酸素原子を一重項酸素状態へと励起させるようなエネルギーを放出することができる。一重項酸素状態の酸素原子をもつ基質は分子たとえば近傍タンパク質を分解することができる。三重項増感剤の例はエオシンまたはマラカイトグリ 50

ーンである。

【 0 1 0 0 】

診断用途に有用な放射性核種の例は金属放射性核種(すなわち金属放射性同位体または金属常磁性イオン)であり、たとえばアンチモン124、アンチモン125、ヒ素74、バリウム103、バリウム140、ベリリウム7、ビスマス206、ビスマス207、カドミウム109、カドミウム115、カルシウム45、セリウム139、セリウム141、セリウム144、セシウム137、クロム51、コバルト55、コバルト56、コバルト57、コバルト58、コバルト60、コバルト64、銅67、エルビウム169、ユウロピウム152、ガリウム64、ガリウム68、ガドリニウム153、ガドリニウム157、金195、金199、ハフニウム175、ハフニウム175~181、ホルミウム166、インジウム110、インジウム111、イリジウム192、鉄55、鉄59、クリプトン85、鉛210、マンガン54、水銀197、水銀203、モリブデン99、ネオジウム147、ネプツニウム237、ニッケル63、ニオブ95、オスミウム185+191、パラジウム103、白金195m、プラセオジウム143、プロメチウム147、プロトアクチニウム233、ラジウム106、レニウム186、レニウム188、ルビジウム86、ルテニウム103、ルテニウム106、スカンジウム44、スカンジウム46、セレン75、銀110m、銀111、ナトリウム22、ストロンチウム85、ストロンチウム89、ストロンチウム90、硫黄35、タンタル182、テクネチウム99m、テルル125、テルル132、タリウム204、トリウム228、トリウム232、タリウム170、スズ113、スズ114、スズ117m、チタン44、タンゲステン185、バナジウム48、バナジウム49、イッテルビウム169、イットリウム86、イットリウム88、イットリウム90、イットリウム91、亜鉛65およびジルコニウム95などである。画像化に有用な放射性核種は銅(Cu)、ガリウム(Ga)、インジウム(In)、レニウム(Rh)およびテクネチウム(Tc)の放射性同位体たとえば<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>111</sup>In、<sup>99m</sup>Tc、<sup>67</sup>Gaまたは<sup>68</sup>Gaなどが含まれる。X線造影剤に有用な金属はRe、Sm、Ho、Lu、Yt、Pm、Bi、Pd、Gd、La、Au、Yb、Dy、Cu、Rh、AgおよびIrの放射性同位体などである。

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

「タンパク質不安定化配列」または「タンパク質不安定化ドメイン」は、タンパク質のN末端またはC末端に存在するとき、結合したタンパク質の半減期を、タンパク質不安定化配列またはドメインを欠く対応するタンパク質と比べて、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、なお好ましくは少なくとも95%以上たとえば99%、増減させるような単数または複数のアミノ酸残基を含む。タンパク質不安定化配列の非限定的な例はPEST配列たとえばサイクリン(例: 有指分裂サイクリン)由来PEST配列、ウラシルペルメアーゼまたはODC、短寿命タンパク質たとえばODCのC末端領域に由来する配列、初期応答タンパク質たとえばサイトカイン、リンホカイン、プロトオンコジーンたとえばc-mycまたはc-fos、MyoD、HMG CoAレダクターゼ、S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ、CL配列、サイクリン分解シグナル、Nデグロン(N-degron、N末端分解シグナル)、またはin vivoでユビキチン化されるタンパク質またはその断片などである。

【 0 1 0 2 】

「関心タンパク質」の非限定的な例は選択マーカートンパク質、膜タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質、構造タンパク質、酵素、酵素基質、受容体タンパク質、輸送体タンパク質、転写因子、チャンネルタンパク質、リンタンパク質、キナーゼ、シグナル伝達タンパク質、代謝性タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、受容体関連タンパク質、核酸結合タンパク質、細胞外マトリックスタンパク質、分泌タンパク質、受容体リガンド、血清タンパク質、免疫原性タンパク質、蛍光タンパク質、または反応性システインをもつタンパク質などである。たとえば、関心タンパク質は変異ヒドロラーゼを細胞膜または小胞体へと誘導してもよい。たとえば該関心タンパク質はインテグリンタンパク質またはそのドメインであり、また一実施形態では変異ヒドロラーゼは、変異ヒドロラーゼ自体を小胞体へと誘導する配列と、またグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)シグナル配列と、融合される。

【 0 1 0 3 】

1. 変異ヒドロラーゼとその融合体

本発明の範囲内の変異ヒドロラーゼの非限定的な例は遺伝子組み換え技術たとえば部位

50

特異的変異誘発または再帰的変異誘発で合成されるものなどであり、また該変異ヒドロラーゼに、対応する非変異(野生型)ヒドロラーゼの基質たとえば単数または複数の機能性基を含むよう修飾した基質との安定した(たとえば共有)結合の形成を、対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合の形成を、可能にさせる単数または複数のアミノ酸置換を含む。本発明の範囲内の変異ヒドロラーゼの非限定的な例はペプチダーゼ、エステラーゼ(例: コレステロールエステラーゼ)、グリコシダーゼ(例: グルコサミラーゼ)、ホスファターゼ(例: アルカリホスファターゼ)などである。たとえばヒドロラーゼの非限定的な例はエステル結合に作用する酵素たとえばカルボン酸エステルヒドロラーゼ、チオールエステルヒドロラーゼ、リン酸モノエステルヒドロラーゼ、リン酸ジエステルヒドロラーゼ、三リン酸モノエステルヒドロラーゼ、硫酸エステルヒドロラーゼ、二リン酸モノエステルヒドロラーゼ、リン酸トリエステルヒドロラーゼ、5'-ホスホモノエステルを生成するエキソデオキシリボヌクレアーゼ、5'-ホスホモノエステルを生成するエキソリボヌクレアーゼ、3'-ホスホモノエステルを生成するエキソリボヌクレアーゼ、リボ-またはデオキシリボ核酸のいずれかに作用するエキソヌクレアーゼ、リボ-またはデオキシリボ核酸のいずれかに作用するエキソヌクレアーゼ、5'-ホスホモノエステルを生成するエンドデオキシリボヌクレアーゼ、5'-ホスホモノエステル以外を生成するエンドデオキシリボヌクレアーゼ、変異塩基に対して特異的な部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ、5'-ホスホモノエステルを生成するエンドリボヌクレアーゼ、5'-ホスホモノエステル以外を生成するエンドリボヌクレアーゼ、リボ-またはデオキシリボ核酸のいずれかに作用するエンドリボヌクレアーゼ、リボ-またはデオキシリボ核酸グリコシダーゼのいずれかに作用するエンドリボヌクレアーゼ; グリコシダーゼたとえばO-およびS-グリコシルを加水分解する、またN-グリコシル化合物を加水分解する、酵素; 他の結合に対して作用する(酵素)たとえばトリアルキルスルホニウムヒドロラーゼまたは他ヒドロラーゼ; ペプチド結合に対して作用する酵素(ペプチドヒドロラーゼ)たとえばアミノペプチダーゼ、ジペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼおよびトリペプチジルペプチダーゼ、ペプチジルペプチダーゼ、セリン型カルボキシペプチダーゼ、メタロカルボキシペプチダーゼ、システイン型カルボキシペプチダーゼ、オメガペプチダーゼ、セリンエンドペプチダーゼ、システインエンドペプチダーゼ、アスパラギン酸エンドペプチダーゼ、メタロエンドペプチダーゼ、トレオニンエンドペプチダーゼ、および触媒機構が未知のエンドペプチダーゼ; ペプチド結合以外の、たとえば線状アミド、環状アミド、線状アミジン、環状アミジン、ニトリルまたは他化合物に見られる炭素-窒素結合に作用する酵素; 酸無水物たとえば含リン無水物や含スルホニル無水物に含まれる酸無水物に作用する酵素; 酸無水物に作用する(膜透過運動を触媒する)酵素; 酸無水物に作用する(または細胞運動および細胞内運動に関与する)酵素; 炭素-炭素結合(例: ケトン物質のそれ)に作用する酵素; ハライド結合(例: C-ハライドのそれ)に作用する酵素; リン-窒素結合に作用する酵素; 硫黄-窒素結合に作用する酵素; 炭素-リン結合に作用する酵素; および硫黄-硫黄結合に作用する酵素などである。

#### 【0104】

ハライド結合に作用する例示的なヒドロラーゼの非限定的な例はアルキルハライダーゼ、2-ハロ酸デハロゲナーゼ、ハロ酢酸デハロゲナーゼ、チロキシンドェヨードナーゼ、ハロアルカンデハロゲナーゼ、4-クロロベンゾアートデハロゲナーゼ、4-クロロベンゾイル-CoAデハロゲナーゼおよびアトラジנקロロヒドロラーゼである。環状アミドの炭素-窒素結合に作用する例示的なヒドロラーゼの非限定的な例はバルビツラーゼ(barbiturase)、ジヒドロピリミジナーゼ、ジヒドロオロターゼ、カルボキシメチルヒダントイナーゼ、アラントイナーゼ、 $\gamma$ -ラクタマーゼ、イミダゾロンプロピオナーゼ、5-オキソプロリナーゼ(ATP加水分解性)、クレアチニナーゼ、L-リジンラクタマーゼ、6-アミノヘキサノアート環状ダイマーヒドロラーゼ、2,5-ジオキソピペラジンヒドロラーゼ、N-メチルヒダントイナーゼ(ATP加水分解性)、シアヌル酸アミノヒドラーゼ、マレイミドヒドロラーゼである。「 $\gamma$ -ラクタマーゼ」はここでは、クラスA、C、Dの $\gamma$ -ラクタマーゼはもとより、D-alanine-カルボキシペプチダーゼ/トランスペプチダーゼ、エステラーゼEstB、ペニシリン結合

10

20

30

40

50

タンパク質2X、ペニシリン結合タンパク質5およびD-アミノペプチダーゼをも包含する。好ましくは、 $\alpha$ -ラクタマーゼはセリン- $\alpha$ -ラクタマーゼであり、たとえばS. aureus PC1のセリン- $\alpha$ -ラクタマーゼの残基70に対応する位置に触媒活性セリン残基を、またS. aureus PC1のセリン- $\alpha$ -ラクタマーゼの残基166に対応する位置にグルタミン酸残基を、それぞれもち、随意にS. aureus PC1のセリン- $\alpha$ -ラクタマーゼの残基73の対応する位置にリジン残基を、また随意に残基234に対応する位置にもリジン残基を、もつものである。

#### 【0105】

一実施形態では、本発明の変異ヒドロラーゼは野生型ヒドロラーゼでは水分子の活性化に関連する残基たとえば触媒残基3点セット(catalytic triad residues)のうちの1残基または補助残基のアミノ酸置換を少なくとも1つ含み、活性化した水分子は野生型ヒドロラーゼの触媒活性残基と該ヒドロラーゼの基質との間に形成される結合を開裂させる。「補助残基」はここでは他残基の活性を変化させる残基、たとえば水分子を活性化する残基の活性を増進する残基である。本発明の範囲内の水分子活性化残基の非限定的な例は酸塩基触媒に関わる残基たとえばヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸などである。別の実施形態では、本発明の変異ヒドロラーゼは野生型ヒドロラーゼでヒドロラーゼ基質の求核攻撃によるエステル中間体を形成する残基のアミノ酸置換を少なくとも1つ含む。本発明の変異ヒドロラーゼに対して有用な基質は変異ヒドロラーゼが特異的に結合する基質であって、好ましくは該変異ヒドロラーゼのアミノ酸たとえば活性残基に対して、該基質と対応する野生型ヒドロラーゼの間で形成される結合よりも安定した結合が形成される結果となるような基質である。該変異ヒドロラーゼは対応する野生型ヒドロラーゼが特異的に結合するような基質を特異的に結合するものの、変異ヒドロラーゼと基質の間の相互作用からは、対応する野生型ヒドロラーゼと基質との反応で生成物が形成されるような条件下で、生成物がまったくまたはずっと少量(たとえば2分の1、10分の1、100分の1または1000分の1)しか、形成されない。変異ヒドロラーゼによる生成物の形成の欠落または減少は変異ヒドロラーゼの少なくとも1つのアミノ酸置換のためであり、該置換のために、変異ヒドロラーゼは基質と、対応する野生型ヒドロラーゼの間で形成される結合よりも安定した結合を形成する結果となる。本発明の変異ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合は半減期( $t_{1/2}$ )が、対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で生成物が形成されるような条件下で形成される結合の $t_{1/2}$ と比べて、少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも4倍さらには10倍ないし100倍、100倍または10,000倍超、長い。好ましくは、本発明の変異ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合は $t_{1/2}$ が少なくとも30分、好ましくは少なくとも4時間ないし少なくとも10時間であり、また洗浄、タンパク質変性、および/または高温による破壊に対して耐性がある、たとえば該結合はSDS中での沸騰下でも安定である。

#### 【0106】

さらに別の実施形態では、本発明の変異ヒドロラーゼは少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、そのうちの1つの置換は野生型ヒドロラーゼにあって水分子の活性化に関連する残基の置換、または野生型ヒドロラーゼにあってヒドロラーゼ基質の求核攻撃によってエステル中間体を形成する残基の置換であり、またもう1つの置換は対応する野生型ヒドロラーゼにあって、水分子の活性化に関連する、または基質とエステル中間体を形成する残基の置換ではなく、ヒドロラーゼ基質との結合部位またはその近傍に位置する残基たとえば野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内の残基の置換である。一実施形態では、第2置換は野生型ヒドロラーゼにあって該ヒドロラーゼの触媒ポケットの基質入り口に対応する部位の内側を覆う(lines)残基の置換、すなわち活性部位ポケット内または野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内にある残基たとえば基質ポケット内の残基であって対応する野生型ヒドロラーゼにあって、水分子の活性化に関連する、または基質とエステル中間体を形成する残基ではない残基の置換である。こうした追加置換は好ましくは、対応する野生型ヒドロラーゼの基質に対する変異体の安定共有結合の形成速度を増す。一実施形態では、1つの置換は野生型ヒドロラーゼにおいて水分子を活性化する残基たとえばヒスチジン残基の置換、またRhodococcus rhodochrousデハロゲナーゼのアミノ酸残基272に対応する位置での置換であって、たとえばアミノ酸残基2

10

20

30

40

50

72に対応する位置の置換アミノ酸はフェニルアラニンまたはグリシンである。別の実施形態では、1つの置換は野生型ヒドロラーゼにおいて基質とエステル中間体を形成する残基たとえばアスパラギン酸残基の置換、また*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基106に対応する位置での置換である。一実施形態では、第2置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼの位置175、176または273に対応するアミノ酸残基の置換であるが、たとえばアミノ酸残基175に対応する位置の置換アミノ酸残基はメチオニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、セリンまたはシステインであり、アミノ酸残基176に対応する位置の置換アミノ酸残基はセリン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、トレオニン、アラニンまたはアルギニンであり、および/またはアミノ酸残基273に対応する位置の置換アミノ酸残基はロイシン、メチオニンまたはシステインである。さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼはさらに、野生型ヒドロラーゼの、活性部位ポケット内または野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5内にあるアミノ酸残基の第3の、また随意に第4の、置換を含む。たとえば第3置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換であり、また第4置換は*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換である。変異ヒドロラーゼはさらに、他の置換たとえば対応遺伝子またはその一部分のクローニングを容易にするために導入される置換を、および/またはN-および/またはC-末端またはその近傍に、対応遺伝子またはその一部分のクローニングを容易にするために導入されるが必ずしも活性をもたない、たとえば別個には検出できない、追加の残基を、含んでもよい。

10

20

#### 【0107】

たとえば、野生型デハロゲナーゼDhaAはハロゲン化炭化水素(ハロC<sub>3</sub>-ハロC<sub>10</sub>)の炭素-ハロゲン結合を開裂させる。DhaAの触媒中心は古典的な触媒3点セット(catalytic triad)であり、求核剤、酸およびヒスチジン残基を含む。3点セットを構成するアミノ酸はDhaAの触媒ポケット(長さ約10 Å、断面積約20 Å<sup>2</sup>)の内側奥深くに位置する。DhaAのハロゲン化基質のハロゲン原子たとえばCl-アルカン基質の塩素原子はDhaAの触媒中心近傍に位置する。DhaAは基質に結合し、おそらく酵素基質複合体を形成し、またDhaAのAsp106(位置番号はDhaAのタンパク質配列に基づく)による基質の求核攻撃によりエステル中間体が形成される(図1A-B)。次にDhaAのHis272が水を活性化し、活性化した水が該中間体を加水分解し、触媒中心から生成物を放出する。後述のように、変異DhaAたとえばDhaA.H272F変異体はコンピューターモデリング研究に基づく3-D構造および野生型DhaA(DhaA.WT)の基本的な物理化学的特質をおそらく保持するが、単数または複数の野生型酵素基質を加水分解することが、たとえばCl-アルカンの場合には、野生型酵素によって放出される対応するアルコールを放出することが、できなかった。後で詳述するように、変異セリン-ラクタマーゼたとえばBlaZ.E166D変異体、BlaZ.N170Q変異体およびBlaZ.E166D:N170Q変異体は単数または複数の野生型セリン-ラクタマーゼ基質を加水分解することができなかった。

30

#### 【0108】

従って、本発明の一実施形態では、変異ヒドロラーゼは野生型デハロゲナーゼでは水分子の活性化に関連する残基たとえば触媒3点セットのうちの1残基または補助残基のアミノ酸置換を少なくとも1つ含む変異デハロゲナーゼであり、活性化した水分子は野生型デハロゲナーゼの触媒残基とデハロゲナーゼ基質の間に形成される結合を開裂させる。一実施形態では、少なくとも1つの置換は*Rhodococcus rhodochrous*由来のDhaAの残基272に対応する残基の置換である。「対応残基」は、ある野生型タンパク質にあって参照野生型タンパク質と比べて同じ活性(機能)をもつ残基であり、かつ随意に両タンパク質の1次配列をアラインメントしたときに同じ相対位置にくる残基である。たとえば触媒3点セットの一部を構成し、かつある酵素の水分子を活性化する残基は該酵素の残基272であるが、残基272は別の酵素の残基73に対応し、残基73は触媒3点セットの一部を構成しかつ水分子を活性化する。従って一実施形態では、本発明の変異デハロゲナーゼは*Rhodococcus rhodochrous*由来のDhaAの残基272に対応する位置にヒスチジン以外の残基たとえばフェニルアラニン残基をもつ。本発明の別の実施形態では、変異ヒドロラーゼは*Rhodococcus rhodochrou*

40

50

s由来のDhaAの残基106に対応する残基の少なくとも1つのアミノ酸置換たとえばアスパラギン酸以外の残基への置換を含む変異デハロゲナーゼである。たとえば本発明の変異デハロゲナーゼは*Rhodococcus rhodochrous*由来のDhaAの残基106に対応する位置にシステインまたはグルタミン酸残基をもつ。さらなる実施形態では、変異ヒドロラーゼは少なくとも2つのアミノ酸置換を含む変異デハロゲナーゼであり、うち1つは*Rhodococcus rhodochrous*由来のDhaAの残基106に対応する残基の置換であり、もう1つは同残基272に対応する残基の置換である。一実施形態では、変異ヒドロラーゼは少なくとも2つのアミノ酸置換を含む変異デハロゲナーゼであり、うち1つは*Rhodococcus rhodochrous*由来のDhaAの残基272に対応する残基の置換であり、もう1つは同残基175、176、245および/または273に対応する残基の置換である。別のさらなる実施形態では、変異セリン-ラクタマーゼであり、*Staphylococcus aureus* PC1のセリン-ラクタマーゼの残基166または残基170に対応する残基のアミノ酸置換を少なくとも1つ含む。

10

## 【0109】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼはハロアルカンデハロゲナーゼであり、たとえばハロアルカン資化性細菌のグラム陰性菌(Keuning et al. 1985)および陽性菌(Keuning et al. 1985; Yokota et al., 1987; Scholtz et al., 1987; Sallis et al., 1990)で発見されている。ハロアルカンデハロゲナーゼは*Xanthobacter autotrophicus* GJ10由来DhaA(Janssen et al. 1988, 1989)、*Rhodococcus rhodochrous*由来DhaAおよび*Spingomonas paucimobilis* UT26由来LinB (Nagata et al. 1997)などを含めて、対応する炭化水素の加水分解的脱ハロゲン化反応を触媒する酵素である。変換対象のハロゲン化脂肪族炭化水素の例は単数または複数のハロゲン基を結合させたC<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>飽和脂肪族炭化水素であり、その場合、少なくとも2つのハロゲンは隣接炭素原子上にあることを特徴とする。そうした脂肪族炭化水素の例には揮発性塩素化脂肪族(VCA)炭化水素が含まれる。VCAの例はたとえばジクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、1,2-軸黒ブタン、1,2,3-トリクロロプロパンなどのような脂肪族炭化水素である。用語「ハロゲン化炭化水素」はここではハロゲン化脂肪族炭化水素を意味する。用語「ハロゲン」はここでは塩素、臭素、ヨウ素、フッ素、アスタチンなどを含む。好ましいハロゲンは塩素である。

20

## 【0110】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼは熱安定性デハロゲナーゼなどのような熱安定性ヒドロラーゼであり、少なくとも1つの置換を*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基117および/または175に対応する位置に含むが、該置換は熱安定性の向上に関連する。一実施形態では、該熱安定性ヒドロラーゼは低温たとえば0~25程度でヒドロラーゼ基質に結合することができる。一実施形態では、該熱安定性ヒドロラーゼは熱安定性変異ヒドロラーゼであり、*Rhodococcus rhodochrous*デハロゲナーゼのアミノ酸残基117および/または175に対応する位置での置換に加えて、単数または複数の置換を含む。一実施形態では、該熱安定性変異ヒドロラーゼは荷電残基たとえばリジンが除去される結果となる置換を含む。一実施形態では、該熱安定性変異ヒドロラーゼは*Rhodococcus rhodochrous*由来DhaAの残基117および/または175に対応する位置にセリンまたはメチオニンを含む。

30

## 【0111】

本発明はまた、変異ヒドロラーゼと関心タンパク質(またはペプチド)に対応するアミノ酸配列とを含む融合タンパク質を提供する。該関心タンパク質またはペプチドの例は、マーカータンパク質たとえば選択マーカータンパク質、アフィニティタグたとえばポリヒスチジン配列、関心酵素たとえばルシフェラーゼ、RNasin、RNase、および/またはGFP、核酸結合タンパク質、細胞外マトリックスタンパク質、分泌タンパク質、抗体またはその一部分たとえばFc、生物発光タンパク質、受容体リガンド、調節タンパク質、血清タンパク質、免疫原性タンパク質、蛍光タンパク質、反応性システインをもつタンパク質、受容体タンパク質たとえばNMDA受容体、チャンネルタンパク質たとえばイオンチャンネルタンパク質(例: HERGチャンネルタンパク質を含めたナトリウム-、カリウム-またはカルシウム-感受性チャンネルタンパク質)、膜タンパク質、サイトゾルタンパク質、核タンパク質

40

50

、構造タンパク質、リンタンパク質、キナーゼ、シグナル伝達タンパク質、代謝性タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、受容体関連タンパク質、蛍光タンパク質、酵素基質たとえばプロテアーゼ基質、転写因子、タンパク質不安定化配列、または(変異ヒドロラーゼたとえば融合タンパク質を特定部位に誘導する)輸送体タンパク質(例: EAAT104グルタミン酸輸送体)および/またはターゲティング配列(例: ミトコンドリア局在化配列、核局在化配列またはミリスチル化配列)などである。

#### 【0112】

融合タンパク質は、変異ヒドロラーゼと少なくとも1つの関心タンパク質とをコードする組み換えDNAから発現させてもよいし、化学合成で形成してもよい。関心タンパク質は変異ヒドロラーゼのN末端またはC末端に融合させてもよい。一実施形態では、融合タンパク質は変異ヒドロラーゼのN末端に関心タンパク質を、C末端にもう1つのタンパク質たとえば異なるタンパク質を、それぞれ含む。たとえば関心タンパク質は蛍光タンパク質でも抗体でもよい。随意に、融合体内のタンパク質はコネクター配列たとえば好ましくは少なくとも2アミノ酸残基を含む配列(例: 13~17アミノ酸残基を含む配列)により仕切られる。本発明の融合タンパク質におけるコネクター配列の存在は融合体内のどちらのタンパク質の機能をも、各個別タンパク質の機能と比べて、ほとんど変化させない。従って、変異デハロゲナーゼとRenillaルシフェラーゼの融合体では、コネクター配列の存在は変異デハロゲナーゼとその基質の間の結合の安定性を、またはルシフェラーゼ活性を、ほとんど変化させない。融合体を構成するタンパク質のいかなる特定の組み合わせでも、多様なコネクター配列が使用可能である。一実施形態では、コネクター配列は酵素によって認識される配列たとえば開裂性配列である。たとえばコネクター配列はキヤスパーゼによって認識される配列たとえばDEVD(配列番号17)または光開裂性配列である。

10

20

#### 【0113】

一実施形態では、融合タンパク質は変異ヒドロラーゼのN末端に関心タンパク質を、また随意にC末端に異なる関心タンパク質を含む。後述のように、変異DhaAとGST(N末端)、Flag配列(C末端)およびRenillaルシフェラーゼ(N末端またはC末端)との融合体は、変異DhaAと機能性基を含む野生型DhaA基質との間で形成される結合に検出可能な作用を及ぼさなかった。さらに、Flag配列とDhaA.H272Fの融合体はストレプトアビジン-ビオチン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Cl-DhaA.H272Fブリッジを介して固体担体に結合させることができた(SFlag-ELISA実験)。

30

#### 【0114】

一実施形態では、融合タンパク質は変異ヒドロラーゼと膜関連タンパク質またはその一部分たとえばターゲティングタンパク質(例: 小胞体ターゲティング用タンパク質)、細胞膜結合タンパク質(例: インテグリンタンパク質またはそのドメインたとえば細胞質-、膜貫通-および/または細胞外茎部-ドメイン)、および/または変異ヒドロラーゼを細胞表面に連結させるタンパク質(例: グリコシルホスホイノシトールシグナル配列)を含む。

#### 【0115】

11. 最適化ヒドロラーゼ配列と該ヒドロラーゼをコードするベクターおよび宿主細胞  
ヒドロラーゼまたはその融合体をコードする核酸配列を含む単離核酸分子(ポリヌクレオチド)もまた提供される。一実施形態では、該単離核酸分子は少なくとも1つの特定宿主中で発現するよう最適化した核酸配列を含む。最適化配列はコドン最適化配列すなわちある生物で別種の生物たとえば遠縁関係にある生物の場合より高頻度で使用されるコドンだけでなく、Kozak配列および/またはイントロンを付加または変更するおよび/または無用の配列たとえば潜在的な転写因子結合部位を除去する修飾をも、含む。一実施形態では、該ポリヌクレオチドはデハロゲナーゼをコードする核酸配列であって、特定宿主細胞で発現するよう最適化された核酸配列を含む。一実施形態では、該最適化ポリヌクレオチドは対応する非最適化配列とはもはや、たとえば中または高ストリンジェンシー条件下で、ハイブリダイズしない。別の実施形態では、該ポリヌクレオチドは対応する非最適化配列との核酸配列同一性が90%未満たとえば80%未満であり、また随意に、非最適化配列がコードするポリペプチドとのアミノ酸配列同一性が80%以上たとえば85%以上、90%以上であるポ

40

50

リペプチドをコードする。さらに、コンストラクトたとえば発現カセット、および単離核酸分子を含むベクターはもちろん、単離核酸分子、コンストラクトまたはベクターを含むキットもまた、提供される。

【0116】

ヒドロラーゼとの融合体をコードする核酸配列を含む核酸分子は随意に特定宿主細胞で発現するよう最適化され、また随意に転写調節配列たとえば単数または複数のエンハンサー、1プロモーター、1転写終結配列、またはそれらの組み合わせに作動可能に連結されて、発現カセットを形成する。

【0117】

一実施形態では、ヒドロラーゼまたはその融合体をコードする核酸配列が、野生型または変異ヒドロラーゼ配列の中のコドンで優先的に使用されるコドンで置き換えることにより、最適化される。好ましいコドンは特定細胞での使用頻度が比較的高く、また好ましくはその導入は特定宿主細胞に存在する転写因子向け転写因子結合部位、および他の望ましくない構造的属性の導入が比較的少数にとどまる結果となる。従って最適化核酸配列では、コドン使用頻度の向上に伴い発現レベルが上昇するし、また望ましくない転写調節配列の数の減少に伴い不適切な転写挙動のリスクが低下する。

10

【0118】

本発明の単離・最適化核酸分子はコドン組成が対応する野生型核酸配列のそれと比べて30%余り、35%、40%または45%余りたとえば50%、55%、60%余りのコドンで異なってもよい。本発明用の好ましいコドンは、特定生物の同じ核酸に対応する他の少なくとも1つのコドンよりも使用頻度が高く、かつ該生物では低使用頻度ではなく、また該核酸配列の発現クローニングまたはスクリーニングに使用される生物でも低使用頻度ではないコドンである。さらに、ある種のアミノ酸(対応コドンが3つ以上あるアミノ酸)に対応する好ましいコドンは他の(好ましくない)コドンよりも使用頻度の高い2つ以上のコドンを含んでもよい。ある生物での使用頻度が別種の生物と比べて高いコドンが核酸分子中に存在すると、該核酸分子はそうしたコドンを高頻度で使用する生物の細胞に導入されたとき、該細胞における野生型または親核酸配列の発現よりも高レベルで発現する結果となる。

20

【0119】

本発明の一実施形態では、異なるコドンは哺乳動物で使用頻度の高いコドンであり、別の実施形態では異なるコドンは植物で使用頻度の高いコドンである。個別生物に応じた好ましいコドンは技術上周知であり、たとえば[www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/)を参照。特定種の哺乳動物たとえばヒトは別種の哺乳動物とは異なる好ましいコドン・セットをもつであろう。同様に、特定種の植物は別種の植物とは異なる好ましいコドン・セットをもつであろう。本発明の一実施形態では、異なるコドンの大半は所期宿主細胞での好ましいコドンである。哺乳動物(たとえばヒト)および植物を含む生物に応じた好ましいコドンは技術上周知である(Wada et al. 1990; Ausubel et al., 1997)。たとえば好ましいヒト・コドンの非限定的な例は

30

【化1】

CGC (Arg), CTG (Leu),

40

TCT (Ser), AGC (Ser), ACC (Thr), CCA (Pro), CCT (Pro), GCC (Ala), GGC (Gly), GTG (Val), ATC (Ile), ATT (Ile), AAG (Lys), AAC (Asn), CAG (Gln), CAC (His), GAG (Glu), GAC (Asp), TAC (Tyr), TGC (Cys) 及び TTC (Phe) (Wada et al., 1990).

である。

【0120】

従って一実施形態では本発明の合成核酸分子は、好ましいヒト・コドンたとえば

50

## 【化 2】

CGC, CTG, TCT, AGC, ACC, CCA, CCT, GCC, GGC, GTG,  
ATC, ATT, AAG, AAC, CAG, CAC, GAG, GAC, TAC, TGC, TTC,

またはその任意の組み合わせの数が多く、野生型核酸配列とは異なるコドン組成を有する。たとえば、本発明の核酸分子はロイシンをコードするコドンCTGまたはTTG、バリンをコードするコドンGTGまたはGTC、グリシンをコードするコドンGGCまたはGGT、イソロイシンをコードするコドンATCまたはATT、プロリンをコードするコドンCCAまたはCCT、アルギニンをコードするコドンCGCまたはCGT、セリンをコードするコドンAGCまたはTCT、トレオニンをコードするコドンACCまたはACT、アラニンをコードするコドンGCCまたはGCT、またはそれらの任意の組み合わせの数が多い。野生型核酸配列と比べて多くてもよい。

10

## 【0121】

別の実施形態では、好ましい*C. elegans*コドンの非限定的な例は

## 【化 3】

UUC (Phe), UUU (Phe), CUU (Leu), UUG (Leu), AUU (Ile), GUU (Val), GUG (Val), UCA (Ser), UCU (Ser), CCA (Pro), ACA (Thr), ACU (Thr), GCU (Ala), GCA (Ala), UAU (Tyr), CAU (His), CAA (Gln), AAU (Asn), AAA (Lys), GAU (Asp), GAA (Glu), UGU (Cys), AGA (Arg), CGA (Arg), CGU (Arg), GGA (Gly),

20

またはその任意の組み合わせである。さらに別の実施形態では、好ましい*Drosophila*コドンの非限定的な例は

## 【化 4】

UUC (Phe), CUG (Leu),  
CUC (Leu), AUC (Ile), AUU (Ile), GUG (Val), GUC (Val), AGC (Ser), UCC (Ser), CCC (Pro), CCG (Pro), ACC (Thr), ACG (Thr), GCC (Ala), GCU (Ala), UAC (Tyr), CAC (His), CAG (Gln), AAC (Asn), AAG (Lys), GAU (Asp), GAG (Gln), UGC (Cys), CGC (Arg), GGC (Gly), GGA (gly),

30

またはその任意の組み合わせである。好ましい酵母コドンの非限定的な例は

40

## 【化5】

UUU (Phe), UUG  
 (Leu), UUA (Leu), CCU (Leu), AUU (Ile), GUU (Val), UCU (Ser), UCA (Ser),  
 CCA (Pro), CCU (Pro), ACU (Thr), ACA (Thr), GCU (Ala), GCA (Ala), UAU  
 (Tyr), UAC (Tyr), CAU (His), CAA (Gln), AAU (Asn), AAC (Asn), AAA  
 (Lys), AAG (Lys), GAU (Asp), GAA (Glu), GAG (Glu), UGU (Cys), CGU  
 (Trp), AGA (Arg), CGU (Arg), GGU (Gly), GGA (Gly),

10

またはその任意の組み合わせである。同様に、植物での使用頻度が高いコドンの数が多い核酸分子は、

## 【化6】

CGC (Arg),  
 CTT (Leu), TCT (Ser), TCC (Ser), ACC (Thr), CCA (Pro), CCT (Pro), GCT  
 (Ser), GGA (Gly), GTG (Val), ATC (Ile), ATT (Ile), AAG (Lys), AAC (Asn),  
 CAA (Gln), CAC (His), GAG (Glu), GAC (Asp), TAC (Tyr), TGC (Cys), TTC  
 (Phe),

20

またはその任意の組み合わせを非限定的に含む植物コドンの数が多く、野生型または親核酸配列とは異なるコドン組成を有する (Murray et al. 1989)。好ましいコドンは個別植物種に応じて異なる場合もあろう (Wada et al. 1990)。

## 【0122】

一実施形態では、ヒドロラーゼまたはその融合体をコードする最適化核酸配列は、対応するヒドロラーゼまたはその融合体をコードする非最適化核酸配列に対する核酸配列同一性が100%未満たとえば90%未満または80%未満である。たとえばDhaAをコードする最適化核酸配列は、対応するDhaAをコードする非最適化(野生型)核酸配列に対する核酸配列同一性がおよそ80%未満であり、また最適化核酸配列によってコードされるDhaAは野生型DhaAに対するアミノ酸配列同一性が85%以上である。一実施形態では、最適化核酸配列によってコードされるDhaAの活性は非最適化核酸配列によってコードされるDhaAの活性の10%以上たとえば50%以上である。たとえば最適化核酸配列によってコードされる変異DhaAが基質に結合する効率は、非最適化核酸配列によってコードされる変異DhaAが同じ基質に結合する場合とほぼ同じである。

30

## 【0123】

例示的な最適化DhaA遺伝子の配列は次のとおりである：hDhaA.v2.1-6F(最終、+隣接配列)

40

## 【化7】

NNNNGCTAGCCAGCTGGCgcgGATATCGCCACCATGGGATCCGAGATT  
 GGGACAGGGTTcCCTTTTGATCCTCAcTATGTtGAaGTGCTGGGgGAaAG  
 AATGCAcTAcGTGGATGTGGGGCCTAGAGATGGGACcCCaGTGCTGTTc  
 CTcCAcGGGAAcCCTACATCTagcTAcCTGTGGAGaAAtATTATaCCTCAT  
 GTtGCTCCTagtCATAGgTGcATTGCTCCTGATCTGATcGGGATGGGGAA  
 GTCTGATAAGCCTGActaGAcTAcTTTTTTGATGAtCATGTtGATAcTGG  
 ATGCTTTcATTGAGGCTCTGGGGCTGGAGGAGGTGGTGCTGGTGATaC  
 AcGAcTGGGGGTCTGCTCTGGGGTTTCAcTGGGCTAAaAGgAATCCgGA  
 GAGAGTGAAGGGGATTGCTTGcATGGAgTTTATTcGACCTATTCTACT  
 TGGGAtGAaTGGCCaGAGTTTGCCaAGAGAGACATTTCAaGCcTTTAGAA  
 CtGCcGATGTGGGcAGgGAGCTGATTATaGAcCAGAATGCTTTcATcGAG  
 GGGGCTCTGCCTAAaTGTGTaGTcAGACCTCTcActGAaGTaGAGATGGA  
 cCATTATAGAGAGCCcTTTCTGAAGCCTGTGGATcGcGAGCCTCTGTGG  
 AGgTTtCCaAATGAGCTGCCTATTGCTGGGGAGCCTGCTAATATTGTGG  
 CTCTGGTGGAaGCcTATATGAAcTGGCTGCATCAGagTCCaGTGCCcAAG  
 CTaCTcTTTTGGGGGActCCgGGaGtTCTGATTCCCTCCTGCcGAGGCTGCT  
 AGACTGGCTGAaTCcCTGCCcAAfTGTAAGACcGTGGAcATcGGcCctGGg  
 CTGTTTTAcCTcCAaGAGGAcAAcCCTGATCTcATcGGGTCTGAGATcGCa  
 cGgTGGCTGCCCCGGGCTGGCCGGCTAATAGTTAATTAAGTAAGGCGGCC  
 GCNNNN (SEQ ID NO:50).

10

20

30

## 【0124】

核酸分子または発現カセットは、随意に選択マーカー遺伝子を含むベクターたとえばプラスミド-またはウイルス-ベクターに導入してもよいが、該ベクターの導入先は関心細胞たとえば*E. coli*、*Streptomyces* spp.、*Bacillus* spp.、*Staphylococcus* spp.などの原核細胞や植物(双子葉植物または単子葉植物)、真菌、酵母(*Pichia*、*Saccharomyces*、*Schizosaccharomyces*など)、または哺乳動物などの真核細胞である。好ましい哺乳動物細胞系の非限定的な例はCHO、COS、293、Hela、CV-1、SH-SY5Y(ヒト神経芽腫細胞)、HEK293、NIH3T3細胞である。

## 【0125】

コード化された変異ヒドロラーゼの発現は原核細胞または真核細胞での発現が可能な任意のプロモーターで調節してもよい。好ましい原核細胞プロモーターの非限定的な例はSP6-、T7-、T5-、tac-、bla-、gal-、lac-またはマルトース-プロモーターである。好ましい真核細胞プロモーターの非限定的な例は構成的プロモーター(例: ウイルスプロモーターたとえばCMV、SV40およびRSVプロモーターなど)、それに調節可能なプロモーター(例: 誘導性または抑制性プロモーターたとえばtetプロモーター、hsp70プロモーター、CREの調節を受ける合成プロモーターなど)である。好ましい細菌発現用ベクターの例はpGEX-5X-3であり、また好ましい真核細胞発現用ベクターの例はpCIneo-CMVである。

40

本発明の核酸分子、発現カセットおよび/またはベクターは、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、遺伝子銃法などを非限定的に含む任意の方法で細胞に導入してもよい。

50

## 【 0 1 2 6 】

## III . 機能性基

本発明の基質および方法に有用な機能性基は検出可能なまたは検出適性の分子である。本発明の範囲内の機能性基は、二官能性リンカーまたはヒドロラーゼ基質の1つの反応性置換基への共有結合が可能な分子であり、また本発明の基質の一部として、天然に見られる基質には結合していない機能性基とほぼ同じ活性を有し、かつ変異ヒドロラーゼと安定複合体を形成することができる。従って、機能性基は該機能性基をもつ基質と変異ヒドロラーゼの間の安定複合体の検出を、また随意にその単離を、容易にするような単数または複数の特性を有する。たとえば、機能性基は特有の電磁放射または吸収スペクトル特性、磁性、電子スピン共鳴、静電容量、誘電率または導電率を有するものや、強磁性、常磁性、反磁性、発光性、電界発光性、蛍光性、リン光性、発色性、免疫原性、または独特の質量を有するものを含む。機能性基の非限定的な例は、核酸分子すなわちDNAまたはRNAたとえばオリゴヌクレオチドまたはヌクレオチド、たとえばヌクレオチド類似体をもつもの、タンパク質結合能をもつDNA、関心遺伝子に対応する1本鎖DNA、関心遺伝子に対応するRNA、終止コドンを欠くmRNA、アミノアシル化開始tRNA、アミノアシル化アンバーサブレッサーtRNAまたはRNAi用2本鎖RNA、タンパク質たとえば発光タンパク質、ペプチド、ペプチド核酸、リガンドによって認識されるエピトープたとえばビオチンまたはストレプトアビジン、ハプテン、アミノ酸、脂質、脂質二分子膜、固体担体、蛍光団、発色団、レポーター分子、放射性核種たとえば放射性測定用の放射性同位体、同位体コード化アフィニティータグ(ICAT)法などの方法に用いる安定同位体、高電子密度(electron opaque)分子、X線造影剤、MRI造影剤たとえばマンガン、ガドリニウム(III)または酸化鉄粒子などである。

一実施形態では、機能性基はアミノ酸、タンパク質、糖タンパク質、多糖、三重項増感剤たとえばCALI、核酸分子、薬物、毒素、脂質、ビオチンまたは固体担体たとえば自己組織化単分子膜(Kwon et al., 2004などを参照)であり、Ca<sup>2+</sup>を結合し、K<sup>+</sup>を結合し、Na<sup>+</sup>を結合し、pH感受性であり、高電子密度であり、発色団であり、MRI造影剤であり、NOの存在下で蛍光を発し、あるいは反応性酸素に対して感受性があり、ナノ粒子、酵素、酵素基質、酵素阻害物質たとえば自殺基質(Kwon et al., 2004などを参照)、補因子たとえばNADP、補酵素、スクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、ルシフェリン、グルタチオン、NTA、ビオチン、cAMP、ホスファチジルイノシトール、cAMP対応リガンド、金属、スピントラップ用ニトロキシドまたはニトロソ(電子スピン共鳴(ESR)法で検出)、金属キレート剤(例:造影剤用、時間分解蛍光分析用または金属捕集用)、ホットケージド(photocaged)分子(例:光照射により蛍光団などのケージド化合物が放出されるようにしたもの)、インターカレーターたとえばDNAの結合に有用なまたは光活性化可能な分子として有用なブソラーレンまたは別のインターカレーター、三リン酸またはホスホロアミダイト(たとえばDNAまたはRNAへの基質の取り込みを可能にするための)、抗体、またはヘテロ二官能性架橋剤たとえばタンパク質または他分子を共役させるのに有用な架橋剤、ヒドラジド、アリアルジド、マレイミド、ヨードアセトアミド/プロモアセトアミド、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、混合ジスルフィドたとえばピリジルジスルフィド、グリオキサール/フェニルグリオキサール、ビニルスルホン/ビニルスルホンアミド、アクリルアミド、ボロン酸エステル、ヒドロキサム酸、イミダートエステル、イソシアナート/イソチオシアナート、またはクロロトリアジン/ジクロロトリアジンなどである。

## 【 0 1 2 7 】

たとえば機能性基の非限定的な例は単数または複数のアミノ酸たとえば天然アミノ酸または非天然アミノ酸、ペプチドまたはポリペプチド(タンパク質)たとえば抗体またはその断片、Hisタグ、FLAGタグ、Strepタグ、酵素、補因子、補酵素、酵素基質のペプチドまたはタンパク質たとえば分枝ペプチド(例: Z-アミノベンゾイル(Abz)-Gly-Pro-Ala-Leu-Ala-4-ニトロベンジルアミド(NBA))、自殺基質、または受容体、単数または複数のヌクレオチド(例: ATP、ADP、AMP、GTPまたはGDP)およびその類似体、たとえばオリゴヌクレオチド、遺伝子またはその一部分に対応する2本鎖または1本鎖DNAたとえば転写因子などのようなタンパク質に結合しうるDNA、遺伝子に対応するRNAたとえば終止コドンを欠くmRNA、

10

20

30

40

50

またはその一部分、RNAi用2本鎖RNAまたはそのベクター、糖タンパク質、多糖、ペプチド核酸(PNA)、脂質二分子膜を含む脂質；固体担体たとえば沈降性粒子(磁性体粒子など)、セファロスまたはセルロースビーズ、膜、ガラス(スライドガラスなど)、セルロース、アルギン酸、プラスチックまたは他の合成高分子たとえばエッペンドルフチューブまたはマルチウェルプレートのウェル、自己組織化単分子膜、表面プラズモン共鳴チップ、または電子伝導表面をもつ固体担体、薬物たとえば化学療法薬(ドキシソルピシン、5-フルオロウラシルまたはカンプトサル(CPT-11; Irinotecan))、アミノアシル化tRNAたとえばアミノアシル化開始tRNAまたはアミノアシル化アンバーサプレッサー-tRNA、Ca<sup>2+</sup>結合分子、K<sup>+</sup>結合分子、Na<sup>+</sup>結合分子、pH感受性分子、放射性核種、高電子密度(electron opaque)分子、造影剤たとえばバリウム、ヨウ素または他のMRI造影剤またはX線造影剤、NOの存在下で蛍光を発する分子または反応性酸素に対して感受性である分子、ナノ粒子たとえば免疫金粒子、常磁性体ナノ粒子、アップコンバージョンナノ粒子、または量子ドット、酵素の非タンパク質基質、酵素阻害物質、可逆的または不可逆的阻害物質、キレート剤、架橋基たとえばスクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、グルタチオン、ビオチンまたは他のアビジン結合分子、アビジン、ストレプトアビジン、cAMP、ホスファチジルイノシトール、ヘム、cAMP対応リガンド、金属、NTA、および一実施形態では単数または複数の色素たとえばキサンテン色素、カルシウム感受性色素たとえば1-[2-アミノ-5-(2,7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)-フェノキシ]-2-(2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-テトラ酢酸(Fluo-3)、ナトリウム感受性色素たとえば1,3-ベンゼンジカルボン酸、4,4'-[1,4,10,13-テトラオキサ-7,16-ジアザシクロオクタデカン-7,16-ジイルビス(5-メトキシ-6,2-ベンゾフランジール)]ビス(PBFI)、NO感受性色素たとえば4-アミノ-5-メチルアミノ-2',7'-ジフルオレセイン、または他の蛍光団である。一実施形態では、機能性基はハプテンまたは免疫原性分子すなわち該分子に対して特異的な抗体が結合する分子である。別の実施形態では、機能性基は放射性核種であり、たとえば<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>Iであり、診断方法に有用な分子を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0128】

特定機能性基を検出する方法は技術上周知である。たとえば核酸分子の検出はハイブリダイゼーション法、増幅法、該核酸に対して特異的な核酸結合タンパク質への結合法、酵素法(たとえば核酸分子がリボザイムの場合)で行うことができるし、また核酸分子自体が検出可能なまたは検出適性の分子たとえば放射性標識またはビオチンを含む場合には、その分子に適した試験法で検出することができる。

#### 【0129】

例示的な機能性基に含まれるのはハプテン、たとえば免疫原性の増進に資する分子たとえばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、開裂性標識たとえば光開裂性ビオチン、および蛍光標識たとえばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)修飾クマリンおよびスクシンイミドまたはスルホノスクシンイミド修飾BODIPY(UVおよび/または可視光励起蛍光検出法で検出可能)、ローダミンたとえばR110、ロードール、GRG6、Texas Methyl Red(カルボキシテトラメチルローダミン)、5-カルボキシ-X-ローダミン、またはフルオレセイン、クマリン誘導体たとえば7-アミノクマリンおよび7-ヒドロキシクマリン、2-アミノ-4-メトキシナフタレン、1-ヒドロキシピレン、レゾルフィン、フェナレノンまたはベンズフェナレノン(米国特許第4,812,409号明細書)、アクリジノン(米国特許第4,810,636)、アントラセン、および -および -ナフトール誘導体、フッ素化フルオレセインおよびロードールを含むフッ素化キサンテン誘導体(例: 米国特許第6,162,931号明細書)、生物発光分子たとえばルシフェリン、セレンテラジン、ルシフェラーゼ、化学発光分子たとえば安定化ジオキセタン、および電気化学発光分子などである。野生型ヒドロラーゼの基質との結合を介して対応する変異ヒドロラーゼに連結した蛍光(または発光)機能性基は、系の変化たとえばリン酸化をリアルタイムで検知するために使用してもよい。さらに、金属イオン用化学センサーなどのような蛍光分子たとえばCu<sup>2+</sup>検出用の9-カルボニルアントラセン修飾グリシル-ヒスチジル-リジン(GHK)を本発明の基質に取り込んでおいて、該基質に結合するタンパク質の標識に使用してもよい。BODIPY、ローダミングリーン、GFPまたは赤外色素な

どのような発光または蛍光機能性基はまた、機能性基としての用途もあり、たとえばBRET、ERET、LRETまたは電気泳動法などを使用するたとえば相互作用研究に使用してもよい。

別種の機能性基は、受容基を含む分子類と選択的に相互作用する分子(「アフィニティー」分子)である。従って、アフィニティー分子を含むヒドロラーゼ基質はそうした基質と変異ヒドロラーゼとをもつ複合体の分離を容易にすることができる。これは該アフィニティー分子と別の分子たとえば生物起源でも非生物起源でもよい受容体分子との選択的相互作用のためである。たとえばアフィニティー分子と相互作用する特定分子(受容体分子という)は小分子、化学基たとえばスルフヒドリル基(-SH)、または大きな生体分子たとえば抗体またはアフィニティー分子に対応する他の天然リガンドである。この結合は通常、化学結合であり、共有または非共有結合またはイオン結合または水素結合などのような相互作用を伴う場合がある。受容体分子は溶液中に遊離していることもあれば、それ自体が固体または半固体表面、ポリマーマトリックスに結合しているか、または固体または半固体表面に存在することもある。相互作用は外的因子たとえば光、温度、圧力、または触媒として作用する化学または生体分子の添加が引き金となってもよい。反応混合物からの複合体の検出および/または分離が起こるのは、アフィニティー分子と受容体分子の間の通常は結合という形のこの相互作用のためである。

#### 【0130】

アフィニティー分子の例は、免疫原性分子たとえばタンパク質のエピトープ、ペプチド、糖質または脂質などのような分子すなわち特異抗体の作製に役立つ任意の分子; ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、およびその誘導体; 金属結合分子; およびこれらの分子の断片および組み合わせなどである。例示的なアフィニティー分子はHis5(HHHHH)(配列番号19)、HisX6(HHHHHH)(配列番号20)、C-myc(EQKLISEEDL)(配列番号21)、Flag(DYKDDDK)(配列番号22)、SteptTag (WSHPQFEK)(配列番号23)、HA Tag (YPYDVPDYA)(配列番号24)、チオレドキシン、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、S-ペプチド、T7ペプチド、カルモジュリン結合ペプチド、C末端RNAタグ、金属結合ドメイン、金属結合反応性基、アミノ酸反応性基、インティン、ビオチン、ストレプトアビジン、マルトース結合タンパク質などを含む。たとえばビオチンを含むヒドロラーゼ基質を変異ヒドロラーゼと接触させる。変異ヒドロラーゼと基質の複合体の中にビオチンが存在すると、該複合体のアビジン分子たとえば表面(ビーズ、マイクロウェル、ニトロセルロースなど)コートストレプトアビジン分子への選択的結合が可能になる。好適な表面はクロマトグラフィー分離用レジン、組織培養表面または結合プレートなどのようなプラスチック、マイクロタイターディッシュおよびビーズ、セラミックス、ガラス、磁性体粒子を含む粒子、ポリマーおよび他マトリックスを含む。処理表面はたとえばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄してビオチンを欠く分子を除去し、含ビオチン複合体を単離する。場合によっては、これらの材料は光ファイバー、ChemFETおよびプラズモン検出器などのような生体分子センサーの一部でもよい。

#### 【0131】

アフィニティー分子の別の例はダンシルリジンである。このダンシル環と相互作用する抗体は市販されている(Sigma Chemical; St. Louis, MO)か、または周知のプロトコールたとえばAntibodies: A Laboratory Manual (Harlow and Lane, 1988)に記載のプロトコールを使用して作製することができる。たとえば抗ダンシル抗体をクロマトグラフィーカラムの充填材表面に固定化する。この方法(アフィニティーカラムクロマトグラフィー)は本発明の変異ヒドロラーゼと基質の複合体を固定化抗体との相互作用によりカラムに保持させる一方で、他の分子はカラムを通過させる。後は、抗体-抗原相互作用を壊して複合体を溶出させる。特定のクロマトグラフィーカラム材たとえばイオン交換またはアフィニティー-Sepharose、Sephacryl、Sephadexおよび他クロマトグラフィーレジン市販されている(Sigma Chemical: St. Louis, MO; Pharmacia Biotech: Piscataway, N.J.)。ダンシルリジンはその蛍光特性のために都合よく検出されよう。

#### 【0132】

受容体分子として抗体を使用するときは、他の生化学分離法たとえば(フィルターまた

は他のビーズ、プレートまたはレジンなどの表面を使用した)免疫沈降および固定化などによって分離を行うこともできる。たとえば本発明の変異ヒドロラーゼと基質の複合体は磁気ビーズをアフィニティー分子特異抗体またはヒドロラーゼ特異抗体でコートすることにより単離してもよい。混合物からビーズの分離はしばしば磁界が利用される。

【0133】

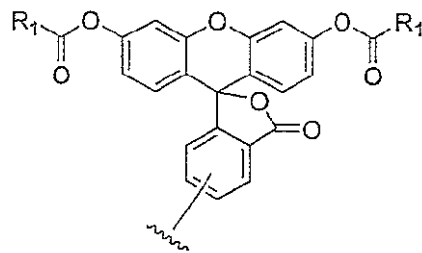
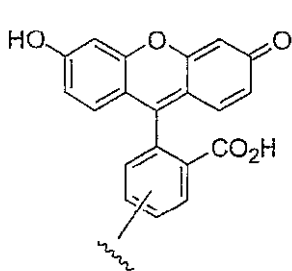
別種の機能性分子は電磁放射線を使用して検出する分子を含み、またキサンテン蛍光団、ダンシル蛍光団、クマリンおよびクマリン誘導体、蛍光アクリジニウム基、ベンゾピレン系蛍光団、それに7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールおよび3-N-(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)-2,3-ジアミノ-プロピオン酸を非限定的に含む。好ましくは、蛍光団分子は天然アミノ酸とは異なる波長で蛍光量子収量が高く、またなお好ましくは可視光または可視光+紫外光の波長領域で励起可能な蛍光の量子収量が高い。予め選択した波長で励起すると、該分子は低濃度で目視により、または通常の蛍光検出法により、検出可能になる。電気化学発光分子たとえばルテニウムキレートとその誘導体またはニトロキシドアミノ酸とその誘導体はフェムトモル以下の濃度範囲で検出可能である。

10

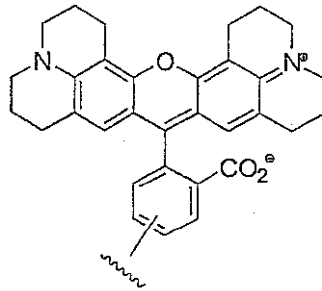
【0134】

一実施形態では、随意に検出可能な機能性基は次のうちの1つを含む：

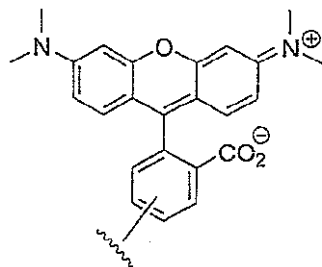
【化8】



20

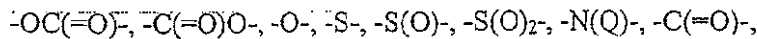
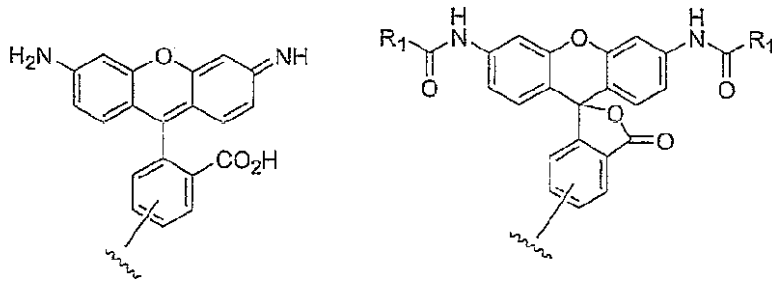


30



40

## 【化9】



(式中 $R_1$ は $C_1$ - $C_8$ である。)

## 【0135】

本発明の変異ヒドロラーゼと基質の複合体の検出には、蛍光分子に加え、該相互作用と電磁界/放射への分子の応答とに基づく物理特性をもつ多様な分子を使用することができる。これらの特性は紫外、可視および赤外スペクトル領域の吸収、ラマン活性であり発色団の存在などを含み、共鳴ラマン分光法、電子スピン共鳴、核磁気共鳴、分子質量たとえば質量分析装置でさらに増進しうる。

アフィニティー分子をもつ複合体を検出および/または単離する方法にはゲルろ過、高速または高压液体、逆相、アフィニティー、イオン交換などのクロマトグラフィー技術がある。本発明の変異ヒドロラーゼと基質の複合体の検出には電気泳動法、等電点分離法、質量分析法など他のタンパク質分離法もまた有用である。

## IV. リンカー

用語「リンカー」(記号Lで示す場合もある)は、反応性基を含む基質に、または反応性基に、単数または複数の機能性基を共有結合的に付着させる基または基群をいう。リンカーはここでは単一共有結合ではない。リンカーの構造は、標的酵素によって結合される基質をもたらず限り、あまり重要ではない。一実施形態では、リンカーは機能性基(R)と反応性基を約5オングストローム~約1000オングストロームの距離だけ引き離す二価基とすることができる。他の好適なリンカーは、Rと反応性基を約5オングストローム~約100オングストロームの距離だけ引き離すリンカー、およびRと反応性基を約5オングストローム~約50オングストロームの距離だけ、約5オングストローム~約25オングストロームの距離だけ、約5オングストローム~約500オングストロームの距離だけ、または約30オングストローム~約100オングストロームの距離だけ引き離すリンカーなどである。

## 【0136】

一実施形態では、リンカーはアミノ酸である。

一実施形態では、リンカーはペプチドである。

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖であって、該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子は随意に非ペルオキシド-O-、-S-または-NH-に置き換わり、かつ該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子はアリアルまたはヘテロアリアル環に置き換わることを特徴とする。

## 【0137】

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖であ

10

20

30

40

50

って、該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子は随意に非ペルオキシド-O-、-S-または-NH-に置き換わり、かつ該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子は単数または複数(たとえば1ないし4)のアリールまたはヘテロアリール環に置き換わることを特徴とする。

【0138】

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖であって、該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子は随意に非ペルオキシド-O-、-S-または-NH-に置き換わり、かつ該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子は単数または複数(たとえば1ないし4)のヘテロアリール環に置き換わることを特徴とする。

10

【0139】

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖であって、該炭素鎖を構成する単数または複数(たとえば1ないし4)の炭素原子は随意に非ペルオキシド-O-、-S-または-NH-に置き換わることを特徴とする。

【0140】

別の実施形態では、リンカーは式-W-F-W-で示される二価基であり、式中Fは(C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>)アルキニル、(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキルまたは(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)であり、Wは-N(Q)C(=O)-、-C(=O)N(Q)-、-OC(=O)-、-C(=O)O-、-O-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(Q)-、-C(=O)-、または直接結合であり、各Qは独立にHまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルである。

20

【0141】

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖である。

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含む炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖である。

30

別の実施形態では、リンカーは炭素原子数約2~約30の分枝または非分枝炭素鎖である。

【0142】

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約2~約20の分枝または非分枝炭素鎖である。

別の実施形態では、リンカーは随意に単数または複数(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含む炭素原子数約2~約20の分枝または非分枝炭素鎖である。

40

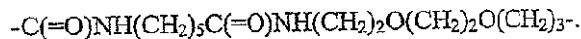
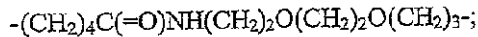
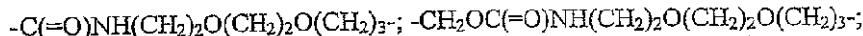
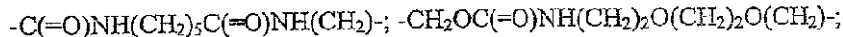
別の実施形態では、リンカーは炭素原子数約2~約20の分枝または非分枝炭素鎖である。

【0143】

別の実施形態では、リンカーは-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-10</sub>-である。

別の実施形態では、リンカーは

## 【化10】



10

である。

## 【0144】

別の実施形態では、リンカーは単数または複数の二価ヘテロアリアル基を含む。

特に、(C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)アルキルはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-イソブチル、ペンチル、3-ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニルまたはデシルなどである；(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキルはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルまたはシクロヘキシルなどである；(C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>)アルケニルはビニル、アリル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニルまたはデセニルなどである；(C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>)アルキニルはエチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、4-ペンチニル、1-ヘキシニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、4-ヘキシニル、5-ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニルまたはデシニルなどである；(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリアルはフェニル、インデニルまたはナフチニルなどである；またヘテロアリアルはフリル、イミダゾリル、トリアゾリル、トリアジニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピラゾリル、ピロリル、ピラジニル、テトラゾリル、ピリジル(またはそのN-オキシド)、チエニル、ピリミジニル(またはそのN-オキシド)、インドリル、イソキノリル(またはそのN-オキシド)またはキノリル(またはそのN-オキシド)などである。

20

用語「芳香族(の)」はアリアルおよびヘテロアリアル基を含む。

30

## 【0145】

アリアルはフェニル基であるか、または少なくとも1環が芳香環である環員原子数約9~10のオルト縮合二環式炭素環基である。

ヘテロアリアルは、炭素と非ペルオキシド酸素、硫黄およびN(X)(ただしXは存在しないか、またはH、O、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル、フェニルまたはベンジルである)からなる群より選択される1~4個のヘテロ原子とからなる5または6個の環員原子を含む単環式芳香環の環員炭素を介して結合した基、およびそれから誘導される環員原子数約8~10のオルト縮合二環式ヘテロ環の基、特にベンゾ誘導体またはプロピレン、トリメチレンまたはテトラメチレンのジラジカルを縮合させた誘導体を包含する。

40

## 【0146】

用語「アミノ酸」はリンカーとの関連では、D型またはL型の天然アミノ酸(例：Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrおよびVal)と非天然アミノ酸(例：ホスホセリン、ホスホトレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸；馬尿酸、オクタヒドロインドール-2-カルボン酸、スタチン、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、ペニシラミン、オルニチン、シトルリン、 $\beta$ -メチルアラニン、パラベンゾイルフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパルギルグリシン、サルコシン、tert-ブチルグリシンの残基を含む。この用語はまた、C末端を(たとえば(C1-C6)アルキル、フェニルまたはベンジルエステルまたはアミドとして)保護した天然および非天然アミノ酸だけでなく、通常のアミノ保護基(例：アセチル基またはベンジルオキシカルボニル基)をつけた

50

天然および非天然アミノ酸をも包含する。他の好適なアミノおよびカルボキシル保護基は技術上周知である(たとえばGreene, Protecting Groups in Organic Synthesis; Wiley: New York, 1981および同書で引用されている他の文献を参照)。アミノ酸はC末端またはN末端を介して、または他の任意幸便の結合点を介して、たとえばシステインの硫黄を介して、別の分子に連結することができる。

【0147】

用語「ペプチド」はリンカーとの関連では、2~25個の(たとえば前述のような)アミノ酸またはペプチジル残基の配列をいう。該配列は直鎖状でも環状でもよい。たとえば環状ペプチドはある配列中の2個のシステイン残基間のジスルフィド架橋の形成により合成することができる、または得られる。ペプチドはC末端またはN末端を介して、または他の任意幸便の結合点を介して、たとえばシステインの硫黄を介して、別の分子に連結することができる。好ましくは、ペプチドは3~25個の、または5~21個のアミノ酸を含む。ペプチド誘導体は米国特許第4,612,302号、4,853,371号および4,684,620号の各明細書で開示されている要領で合成することができる。ここで具体的に引用したペプチド配列はアミノ末端を左側に、カルボキシル末端を右側にして記載してある。

10

【0148】

一実施形態では、本発明のデハロゲナーゼ基質はリンカーを有し、式(I)で示される:



式中Rは単数または複数の機能性基(蛍光団、ビオチン、発光団または蛍光性または発光性分子など)であるか、または固体担体たとえばマイクロスフェア、膜、ポリマープレート、ガラスビーズ、スライドガラスなどであるが、該リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖であり、A-Xはデハロゲナーゼ基質であり、またXはハロゲン原子である。一実施形態では、A-Xはハロ脂肪族またはハロ芳香族のデハロゲナーゼ基質である。一実施形態では、該リンカーは随意に単数または複数の(たとえば1ないし4)の二重または三重結合を含み、また随意に単数または複数の(たとえば2ないし4)のヒドロキシル基またはオキシ基(=O)を置換基として有する炭素原子数約12~約30の二価分枝または非分枝炭素鎖であって、該炭素鎖を構成する単数または複数の(たとえば1ないし4)の炭素原子は随意に非ペルオキシド-O-、-S-または-NH-に置き換わることを特徴とする。一実施形態では、リンカーは3~30個の、たとえば11~30個の原子を含む。一実施形態では、リンカーは(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>y</sub>を含み、yは2ないし8である。一実施形態では、Aは(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>であり、nは2ないし10、たとえば4ないし10である。一実施形態では、AはCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>またはCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>である。別の実施形態では、Aはアリールまたはヘテロアリール基を含む。一実施形態では、リンカーはデハロゲナーゼたとえばRhodococcusデハロゲナーゼの基質である、C、N、SまたはOを、かつ機能性基Rが芳香環系を含むときには好ましくは11~30個の原子を、含む多原子直鎖または分枝鎖である、または固体担体である。

20

30

【0149】

一実施形態では、本発明のデハロゲナーゼ基質はリンカーを有し、式(II)で示される: R-リンカー-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-X (II)

式中Xはハロゲン好ましくは塩素である。一実施形態では、Rは単数または複数の機能性基たとえば蛍光団、ビオチン、発光団、または蛍光性または発光性分子であるか、または固体担体たとえばマイクロスフェア、膜、ポリマープレート、ガラスビーズなどである。Rが放射性標識であるか、または小さな検出適性原子たとえば分光学的に活性な同位体であるとき、リンカーは0~30個の原子を含みうる。

40

【0150】

V. 例示的な基質の合成

[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エチル]-カルバミン酸アントラセン-9-イルメチルエステル。9-アントラセンメタノール(10g, 48mmol)、クロロギ酸4-ニトロフェニル(13.6g, 67.5mmol)および200ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>の攪拌スラリーにトリエチルアミン(6.7ml, 0.19mol)を添加した。得られた金色溶液を室温で16時間攪拌させた。その時点で、2-(2-アミノエトキシ)エタノール(14.4ml, 0.144mol)を加え、攪拌をさらに24時間続行させた。次いでCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>反応

50

混合物を2%水酸化ナトリウム(w/w)溶液で、有機層にp-ニトロフェノールが観測されるまで、洗浄した。ジクロロメタンを硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過し、減圧留去した。

【0151】

粗生成物をシリカゲル60カラムクロマトグラフィーで1% 3%メタノール/ジクロロメタンにより段階的に溶出しながらさらに精製し黄色固形物7.6g(収率58%)を単離した：

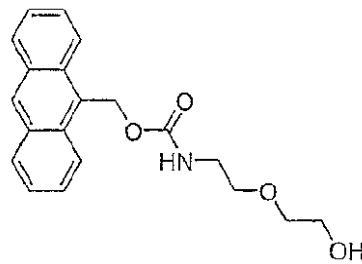
【化11】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$   $\delta$  8.38 (s, H-10), 8.28 (d, H-1, 8), 7.94 (d, H-4, 5), 7.44 (m, H-2, 3, 6, 7), 6.06 (s,  $\text{CH}_2$ -anth), 5.47 (t, exchangeable, NH), 3.53 (bs,  $\text{CH}_2$ -OH) 3.33 (m, three  $-\text{CH}_2-$ ).

10

。質量スペクトル、m/e:  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_4^+$  の計算値340.15、実測値340.23;  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NNO}_4^+$  の計算値340.15、実測値340.23。

【化12】



式(III)の化合物

20

【0152】

{2-[2-(6-クロロ-ヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-カルバミン酸アントラセン-9-イルメチルエステル。100ml 丸底フラスコに[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エチル]-カルバミン酸アントラセン-9-イルメチルエステル(1.12g, 3mmol)と新鮮な水素化ナトリウム60%鉱油混合物(360mg, 9mmol)を不活性雰囲気下に入れた。20mlの無水THFを加え、反応混合物を30分間攪拌した。次にフラスコを氷/NaCl浴で-10~-20 に冷却する。この温度に到達したら、1-クロロ-6-ヨードヘキサン(1ml, 6mmol)をシリンジで加える。反応系を氷/NaCl浴温度に2時間保ち、次いで一晩かけて自然にゆっくりと室温に戻す。ここで減圧下に溶媒を留去しながらシリカゲル60を反応系に共吸着させる。シリカゲルクロマトグラフィーは当初はヘプタンを溶離液とし、ついで10%、20%および25%酢酸エチルを溶離液として行う。合計0.57g(収率41%)の生成物が然るべき画分から単離される。

30

【化13】

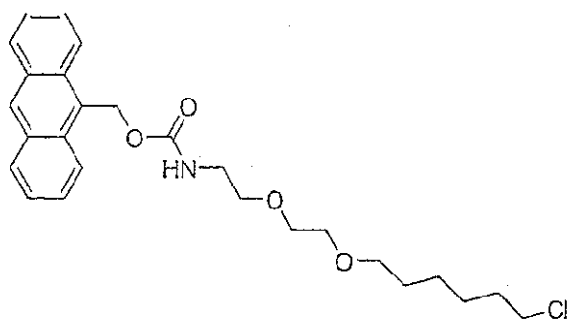
$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$   $\delta$  8.48 (s, H-10), 8.38 (d, H-1, 8), 8.01 (d, H-4, 5), 7.52 (dt, H-2, 3, 6, 7), 6.13 (s,  $\text{CH}_2$ -anth), 5.29 (bs, exchangeable, NH), 3.74 (m, 4H), 3.55-3.15 (m, 8H), 1.84 (m, 4H), 1.61 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.25 (m, 2H).

40

質量スペクトル、m/e:  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{ClNO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  の計算値457.21(100%)、476.22(26%); 実測値457.21、456.52。

50

## 【化14】



式(IV)の化合物

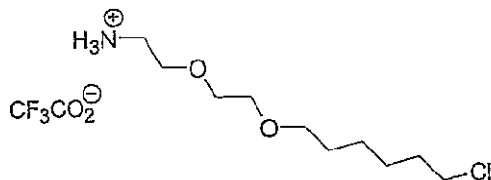
10

## 【0153】

2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル-アンモニウムトリフルオロ酢酸。4 mlのジクロロメタンに溶解した{2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-カルバミン酸アントラセン-9-イルメチルエステル(0.56g, 1.2mmol)に、アニソールを2滴添加した。反応混合物を氷/NaCl浴で冷却し、10分後にトリフルオロ酢酸(2ml)を添加する。反応混合物は添加と同時に暗褐色に変わるが、30分間攪拌させる。揮発物をすべて減圧留去する。残渣を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ に再溶解し、水で2回洗う。水性画分を終夜、凍結乾燥させる。油性残渣が残るので、無水DMFに溶解し、後続反応でストック液として使用する。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{ClNO}_2^+$ の計算値224.14(100%)、226.14(32%); 実測値224.2、226.2。

20

## 【化15】



式(V)の化合物

30

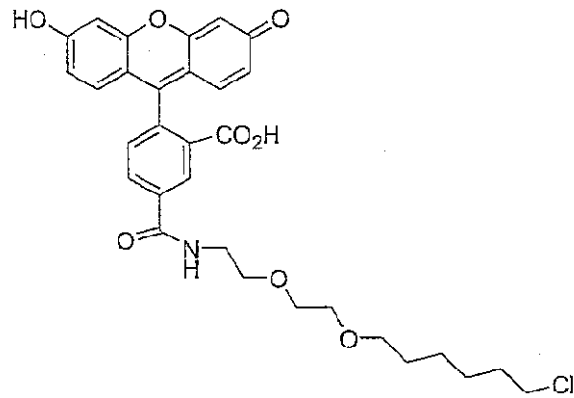
## 【0154】

2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチルアミンへのレポーター基付加のための一般手順。1当量のレポーター基スクシンイミジルエステル/DMFに3当量の2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル-アンモニウムトリフルオロ酢酸ストック液を添加し、次いでジイソプロピルエチルアミンを添加する。反応系を室温で8~16時間攪拌する。精製には分取用HPLCまたはシリカゲルクロマトグラフィーを使用する。

40

N-{2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-フルオレセイン-5-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{ClNO}_8^-$ の計算値580.17(100%)、581.18(32%); 実測値580.18、581.31。

## 【化16】



10

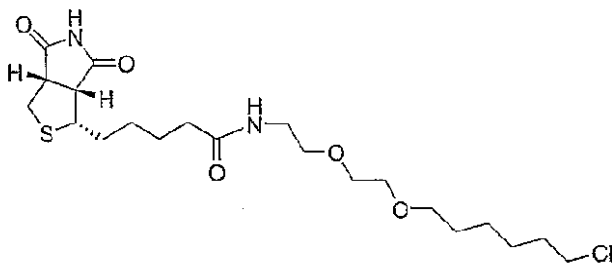
式(VI)の化合物

## 【0155】

N- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-ビオチン-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製はシリカゲルクロマトグラフィーで行った(溶離液: 2% 5%メタノール/ジクロロメタン)。質量スペクトル、m/e:  $C_{20}H_{37}ClN_3O_4S^+$ の計算値450.22(100%)、452.22(32%); 実測値449.95、451.89。

20

## 【化17】



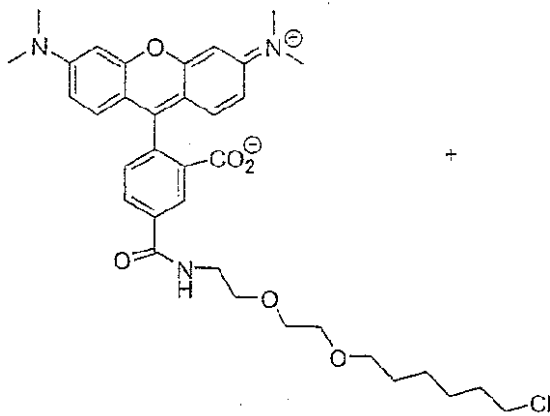
30

式(VII)の化合物

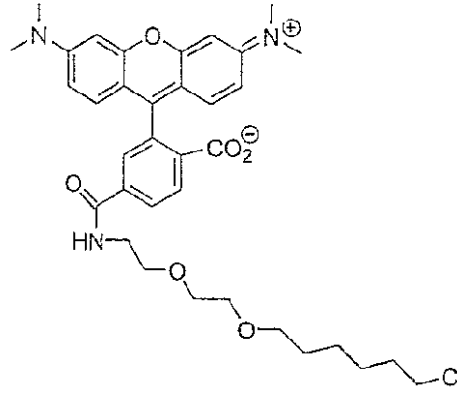
## 【0156】

N- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-テトラメチルローダミン-5(および-6)-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。構造異性体の分離が実現した。質量スペクトル、m/e:  $C_{35}H_{43}ClN_3O_6^+$ の計算値636.28(100%)、637.29(39.8%)、638.28(32.4%); 実測値636.14、637.15、638.14。

## 【化18】



式(VIII)の化合物



式(IX)の化合物

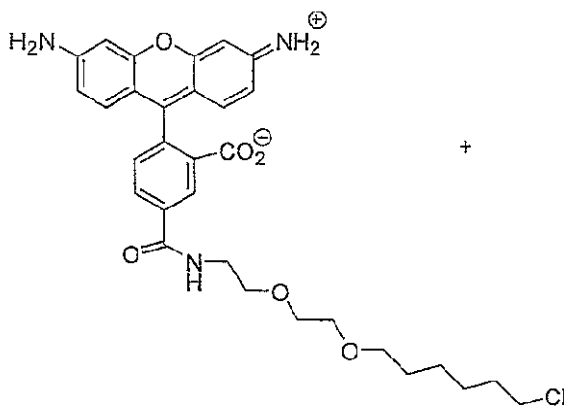
10

## 【0157】

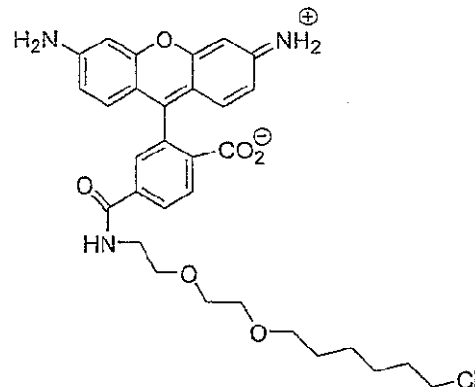
N- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-ローダミンR110-5(および-6)-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。構造異性体の分離が実現した。質量スペクトル、m/e:  $C_{31}H_{35}ClN_3O_6^+$ の計算値580.2(100%)、581.2(35.6%)、582.2(32.4%); 実測値580.4、581.4、582.2。

20

## 【化19】



式(X)の化合物



式(XI)の化合物

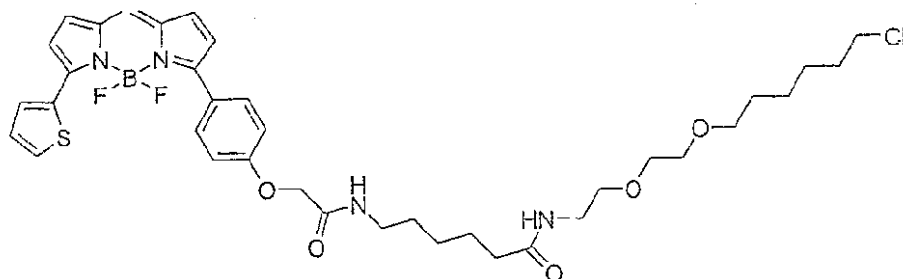
30

40

## 【0158】

6-( {4-[4,4-ジフルオロ-5-(チオフェン-2-イル)-4-ボラ-3a-4a-ジアザ-s-インダセン-3-イル]フェノキシ}-アセチルアミノ)-ヘキサン酸 {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製はシリカゲルクロマトグラフィーで行った(溶離液: 3% 5%メタノール/ジクロロメタン)。質量スペクトル、m/e:  $C_{37}H_{47}BClF_2N_4O_5S^+$ の計算値743.3(100%); 実測値743.4。

## 【化20】



10

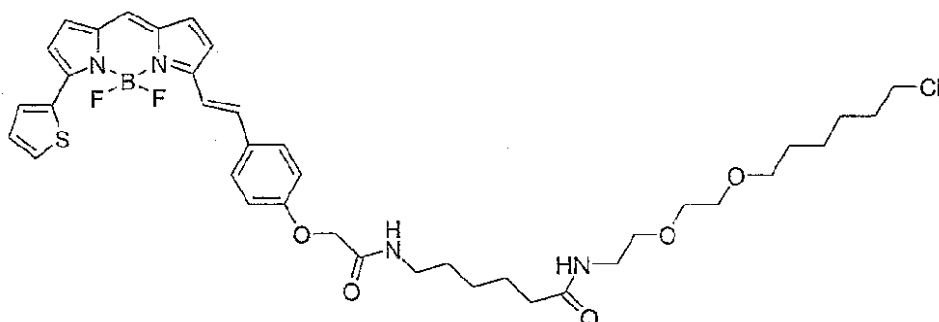
式(XII)の化合物

## 【0159】

6-( {4-[4,4-ジフルオロ-5-(チオフェン-2-イル)-4-ボラ-3a-4a-ジアザ-s-インダセン-3-イル]スチリルオキシ}-アセチルアミノ)-ヘキサン酸 {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製はシリカゲルクロマトグラフィーで行った(溶離液: 3%メタノール/ジクロロメタン)。質量スペクトル、m/e:  $C_{39}H_{48}BClF_2N_4NaO_5S^+$  の計算値791.3(100%); 実測値791.3。

20

## 【化21】



30

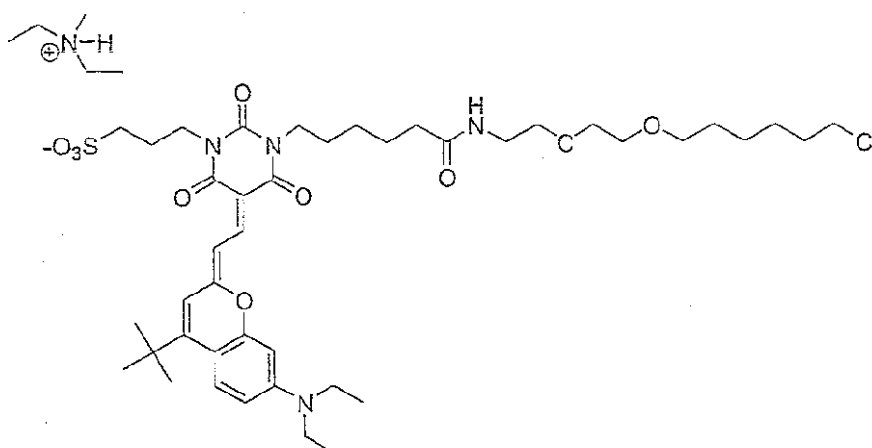
式(XIII)の化合物

## 【0160】

トリエチルアンモニウム3-[5-[2-(4-tert-ブチル-7-ジエチルアミノ-クロメン-2-イリデン)-エチリデン]-3-(5-{2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチルカルボニル}-ペンチル-2,4,6-トリオキソ-テトラヒドロ-ピリミジン-1-イル)-プロパン-1-スルホン酸アニオン。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、m/e:  $C_{42}H_{65}ClN_4O_{10}S^-$  の計算値849.4(100%)、850.4(48.8%)、851.4(36.4%); 実測値849.6、850.0、851.5。

40

## 【化 2 2】



10

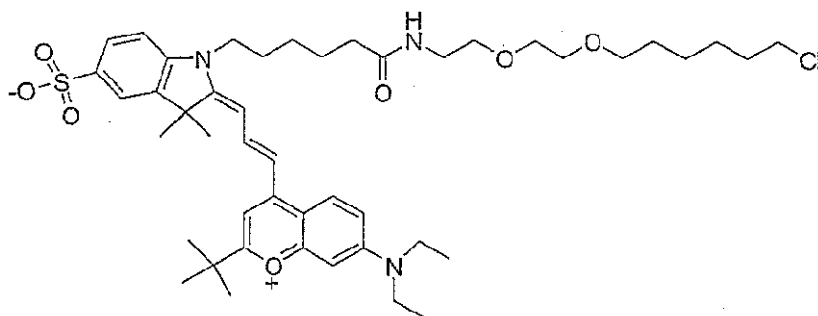
式 (XIV) の化合物:

## 【 0 1 6 1】

2-tert-ブチル-4- {3-[1-(5- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチルカルバモイル}-ペンチル)-3,3-ジメチル-5-スルホ-1,3-ジヒドロ-インドール-2-イリデン]-プロベニル}-7-ジエチルアミノ-クロメニリウム塩化物。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、 $m/e$ :  $C_{46}H_{67}ClN_3O_7S^-$  の計算値840.4(100%)、841.4(54.4%);実測値840.5、841.5。

20

## 【化 2 3】



30

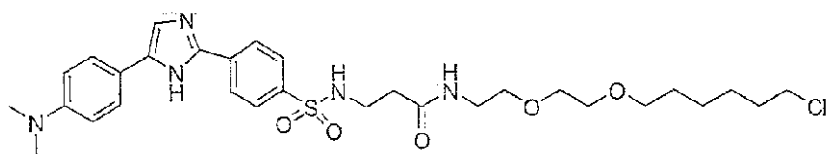
式 (XV) の化合物

## 【 0 1 6 2】

N- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}-3- {4-[5-(4-ジメチルアミノフェニル)-オキサゾール-2-イル]-ベンゼンスルホニルアミノ}-プロピオンアミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、 $m/e$ :  $C_{30}H_{40}ClN_4O_6S^-$  の計算値619.2(100%)、620.2(35%);実測値619.5、620.7。

40

## 【化 2 4】



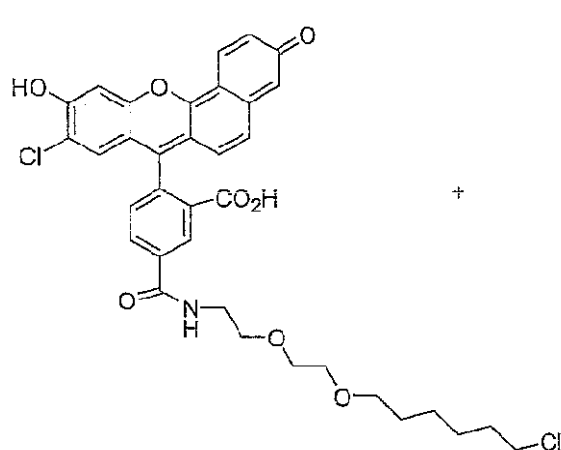
式 (XVI) の化合物

10

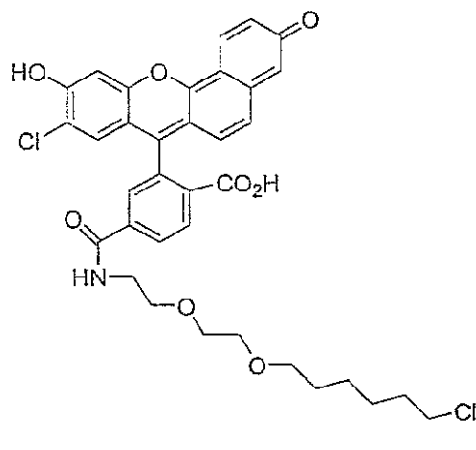
## 【 0 1 6 3】

N- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル } -9'-クロロセミナフトフルオレセイン-5-(および-6)-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。構造異性体の分離が実現した。質量スペクトル、 $m/e$ :  $C_{35}H_{34}Cl_2NO_8^+$ の計算値666.17(100%)、666.18(64%)、667.17(39.8%); 実測値666.46、668.44、667.51。

## 【化 2 5】



式 (XVII) の化合物



式 (XVIII) の化合物

20

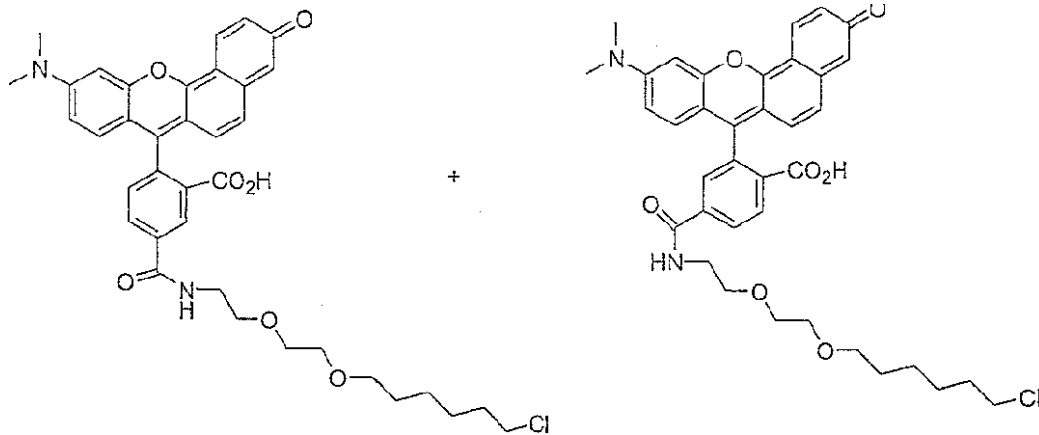
30

## 【 0 1 6 4】

N- {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル } -セミナフトジメチルローダミン-5-(および-6)-アミド。前記手順により標記化合物を合成した。精製には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、 $m/e$ :  $C_{37}H_{38}ClN_2O_7^-$ の計算値657.24(100%)、658.24(42%)、659.23(32%); 実測値657.46、658.47、659.45。

40

## 【化26】



式(XIX)の化合物

式(XX)の化合物

10

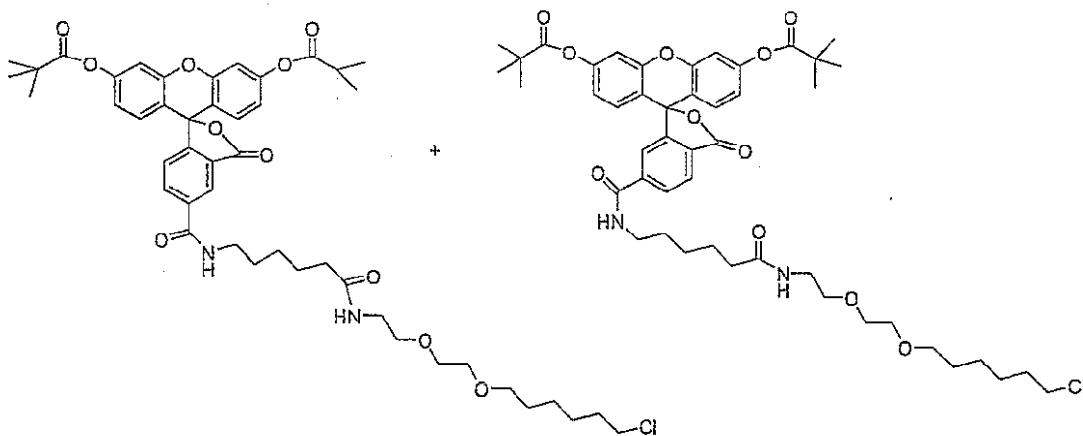
20

## 【0165】

6-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイン-5(および-6)-カルボキサド)ヘキサン酸 {2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}アミド。6-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイン-5(および-6)-カルボキサド)ヘキサン酸スクシンイミジルエステル(0.195g, 0.26mmol)を入れた100ml丸底フラスコに2-[2-(2-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチルアミン(0.44mmol)/Et<sub>2</sub>O(25ml)を加え、次いで2mlのピリジンを加えた。反応混合物を終夜撹拌させた。減圧濃縮後、残渣をシリカゲル60クロマトグラフィーで、2% 5%メタノール/ジクロロメタンを溶離液として処理した。然るべき画分を収集し、減圧乾燥させた(0.186g, 0.216mmol。収率84%)。質量スペクトル、m/e: C<sub>47</sub>H<sub>60</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>の計算値863.39(100%)、864.39(54.4%)、865.39(34.6%); 実測値862.94、864.07、864.94。

30

## 【化27】



式(XXI)の化合物

式(XXII)の化合物

40

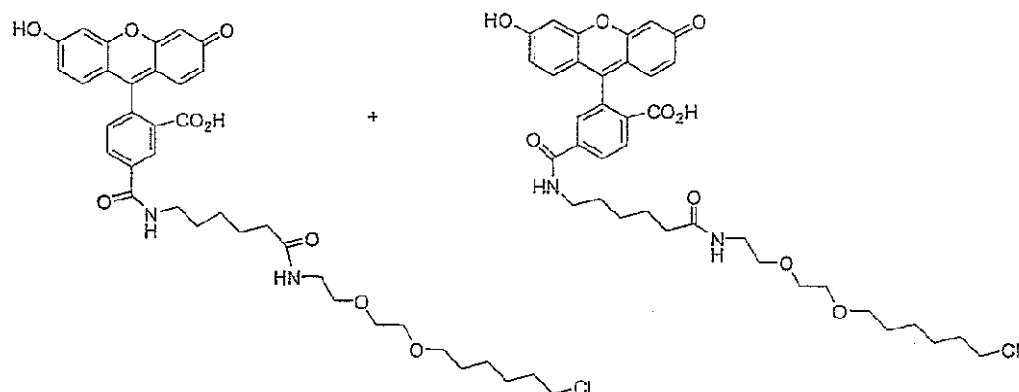
## 【0166】

6-(フルオレセイン-5(および-6)-カルボキサミド)ヘキサン酸 {2-[2-(6-クロロヘキシル

50

ルオキシ)-エトキシ]-エチル}アミド。6-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイン-5(および-6)-カルボキサド)ヘキサン酸{2-[2-(6-クロロヘキシルオキシ)-エトキシ]-エチル}アミド(0.186g, 0.216mmol)を5mlのメタノールに溶解し、0.5mlの2M炭酸ナトリウム(水溶液)を加えた。反応混合物を16時間撪拌してからろ過した。精製には分取用HPLCを使用した。構造異性体の分離が実現した。質量スペクトル、 $m/e$ :  $C_{37}H_{44}ClN_2O_9^+$ の計算値659.27(100.0%)、696.28(42.2%)、697.27(32.3%); 実測値:

【化28】



式(XXIII)の化合物

式(XXIV)の化合物

【0167】

{2-[2-(4-クロロブトキシ)-エトキシ]-エチル}-カルバミン酸アントラセン-9-イルメチルエステル。50ml丸底フラスコに[2-(2-ヒドロキシエトキシ)-エチル]-カルバミン酸アントラセン-9-イルメチルエステル(0.25g, 0.74mmol)と新鮮な水素化ナトリウム60%鉱油混合物(150mg, 3.75mmol)を不活性雰囲気下に入れた。10mlの無水THFを加え、反応系を5分間撪拌した。その時点で1-クロロ-6-ヨードブタン(180μl, 1.5mmol)をシリンジで加える。反応系を室温で終夜撪拌する。減圧下に溶媒を留去しながらシリカゲル60を反応系に共吸着させる。シリカゲルクロマトグラフィーは当初はヘプタンを溶離液とし、ついで10%、20%および30%酢酸エチルを溶離液として行う。合計0.1g(収率32%)の生成物が然るべき画分から単離される:

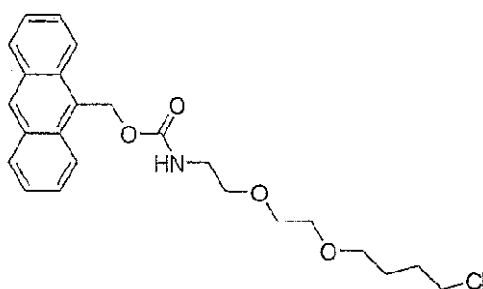
【化29】

$^1H$  NMR

( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.50 (s, H-10), 8.40 (d, H-1, 8), 8.03 (d, H-4, 5), 7.53 (dt, H-2, 3, 6, 7), 6.15 (s,  $CH_2$ -anth), 5.19 (m, exchangeable, NH), 3.93-3.32 (m, 12H) 1.69-1.25 (m, 4H).

。質量スペクトル、 $m/e$ :  $C_{24}H_{28}ClNO_4 \cdot H_2O$ の計算値447.18 (100.0%)、448.18(27.1%); 実測値447.17、448.41。

## 【化30】



10

式(XXV)の化合物

## 【0168】

2-(2-{2-[2-(2-クロロエトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エチル)-イソインドール-1,3-ジオン。2-(2-{2-[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エチル)-イソインドール-1,3-ジオン(0.5g, 1.55mmol)をNielsen, J. and Janda, K.D.の方法(Methods: A Companion to Methods in Enzymology 6, 361-371 (1994))で合成した。還流式冷却器を付けた25ml丸底フラスコを使用してこの試薬にポリスチレン担持トリフェニルホスフィン約3mmol P/g(0.67g, 2mmol)と6mlの四塩化炭素を加えた。この反応系にアルゴンを拡散させ、次いで2時間、加熱還流した。冷却後、追加のポリスチレン担持トリフェニルホスフィン(0.1g, 0.3mmol)を加え、さらに1時間還流した。冷却した溶液をろ過し、レジンを追加の四塩化炭素で洗った。溶媒を留去して0.4g(収率75.5%)の、純粋な標記化合物を得た。

20

## 【化31】

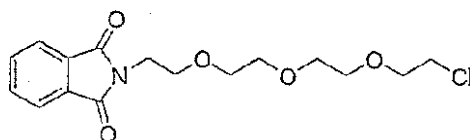
 $^1\text{H NMR (CDCl}_3) \delta$  7.82 (dd, 2H), 7.69 (dd, 2H),

3.88 (t, 2H), 3.71 (q, 4H), 3.63-3.56 (m, 12H).

30

。質量スペクトル、m/e:  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{ClNO}_5^+$ の計算値342.11 (100.0%)、344.11(32.0%); 実測値341.65、343.64。

## 【化32】



40

式(XXVI)の化合物

## 【0169】

2-[2-(2-{2-[2-(2-クロロエトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ}-エチル)-イソインドール-1,3-ジオン。標記化合物を前実施例の要領で合成した(収率89%):

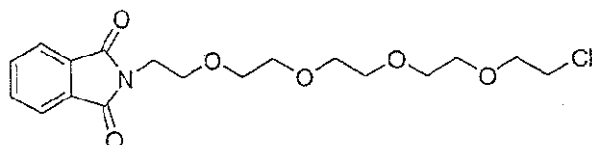
## 【化 3 3】

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.77 (dd, 2H),  $\delta$  7.64 (dd, 2H), 3.83 (t, 2H), 3.67 (m, 4H), 3.60-3.52 (m, 14H).

。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{ClNO}_6^+$  の計算値386.14 (100.0%)、388.13(32.0%); 実測値385.88、387.83。

## 【化 3 4】

10



式 (XXVII) の化合物

20

## 【 0 1 7 0】

2- {2-[2-(2- {2-[2-(2-クロロエトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エチル}-イソインドール-1,3-ジオン。標記化合物を2-[2-(2- {2-[2-(2-クロロエトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エチル]-イソインドール-1,3-ジオンの合成と同様の要領で合成した (収率92%) :

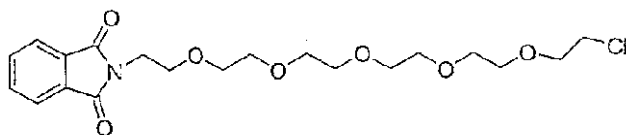
## 【化 3 5】

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.84 (dd, 2H), 7.71 (dd, 2H), 3.90 (t, 2H), 3.74 (q, 4H), 3.67-3.58 (m, 18H).

30

。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{ClNO}_7^+$  の計算値430.16 (100.0%); 実測値429.85。

## 【化 3 6】



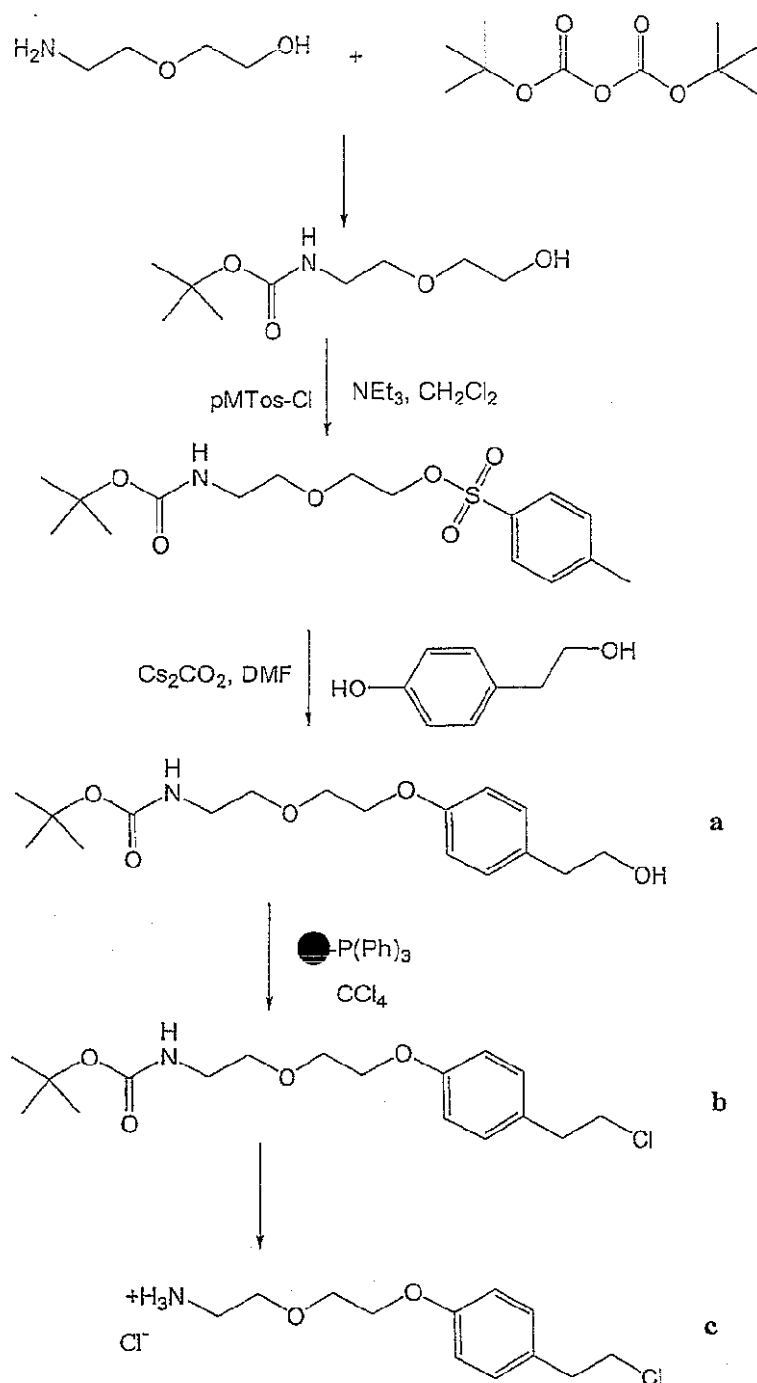
式 (XXVIII) の化合物

40

## 【 0 1 7 1】

本発明の基質の合成に使用することができる中間化合物2- {2-[4-(2-クロロエトキシ)フェノキシ]エトキシ}エタンアミニウム塩化物は、次に図解しかつステップa~cで説明する要領で、合成することができる。

## 【化37】



10

20

30

40

## 【0172】

a. 2- {2-[4-(2-ヒドロキシエチル)フェノキシ]エトキシ}-エチルカルバミン酸tert-ブチル。100ml フラスコに4-ヒドロキシフェネチルアルコール(1.14g, 8.2mmol)、炭酸セシウム(4.02g, 12.4mmol)および2-(2- { [(4-メチルフェノキシ)スルホニル]オキシ } エトキシ)-エチルカルバミン酸tert-ブチル(2.96g, 8.2mmol)を入れた。この反応混合物を10mlのDMFでスラリーにし、油浴により60 に加熱した。反応を19時間進行させ、その時点で反応系を冷却し、DMFを減圧留去した。ジクロロメタンを加えてから反応混合物をセライトプラグでろ過し、次に溶媒を留去した。得られた固形物を高真空下に乾燥させた。ほぼ定量収率の生成物を単離した:

50

## 【化38】

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.11 (d, 2H, Ar), 6.98 (d, 2H, Ar), 4.97 (bs, exchangeable, NH), 4.07 (dd,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.79 (t,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 3.78 (dd,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.57 (t,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.30 (bm,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 2.78 (t,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 1.82 (bs, exchangeable, OH) 1.41 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_5^+$  の計算値326.20 (100%)、327.20(19.5%); 実測値326.56、327.57。 10

## 【0173】

b. 2- {2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}-エチルカルバミン酸tert-ブチル。10mlの四塩化炭素に溶解した2- {2-[4-(2-ヒドロキシエチル)フェノキシ]エトキシ}-エチルカルバミン酸tert-ブチルにスチレン担持トリフェニルホスフィン(約3mmol/g-レジジン)(861mg, 2.6mmol)を加えた。反応混合物を加熱し2時間還流した。次いで、反応系を冷却し、ろ過した。乾燥後、定量収率の生成物を単離した:

## 【化39】

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

7.11 (d, 2H, Ar), 6.86 (d, 2H, Ar), 4.95 (bs, exchangeable, NH), 4.08 (dd,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.79 (dd,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.65 (t,  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ ), 3.59 (t,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.32 (bm,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 2.99 (t,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 1.70 (bs, exchangeable, OH) 1.42 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{ClNO}_4^+$  の計算値344.16 (100%)、346.16(32%); 実測値344.57、346.55。 20

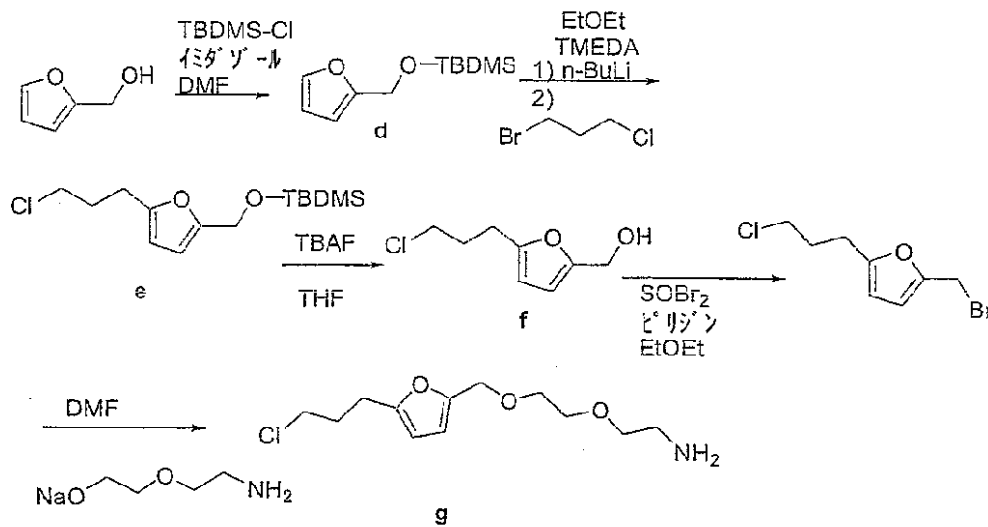
## 【0174】

c. 2- {2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}エタンアミニウム塩化物。2- {2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}-エチルカルバミン酸tert-ブチル(1.7mmol)を5mlのジクロロメタンに溶解し、トリエチルシラン(0.5ml, 5%v/v)を加えた。この溶液にトリフルオロ酢酸(5ml)を室温で滴下した。滴下と同時に反応混合物が黄褐色になるが、それを1時間攪拌させた。揮発物をすべて減圧留去し、残渣をジクロロメタンに再溶解し、希塩酸で2回洗った。水性画分を終夜、凍結乾燥させた。残った油性残渣を無水DMFに溶解し、後続反応でストック液として使用するようにした。 30

## 【0175】

本発明の基質の合成に使用することができる中間化合物2-(2- { [5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メトキシ}エトキシ}エタンアミンは、次に図解しかつステップd~gで説明する要領で、合成することができる。 40

## 【化40】



10

## 【0176】

20

**d.** 2-(*t*-ブチルジメチルシリルオキシメチル)フラン。ジメチルホルムアミド(150mL)を入れた1Lフラスコにフルフリルアルコール(17.7mL, 0.20mol)、塩化*t*-ブチルジメチルシリル(33.7g, 0.22mol)およびイミダゾール(15.3g, 0.22mol)を加えた。室温で22時間攪拌後、反応系をろ過し、揮発物を減圧留去した。得られた物質をジエチルエーテル(500mL)とクエン酸飽和水溶液(100mL)に分配し、さらにエーテル層をクエン酸飽和水溶液(2×100mL)で洗った。水層を合わせ、1×50mLエーテルで逆抽出した。有機層を合わせ、水1×100mLと塩水1×100mLで順に洗浄した。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、濃縮して生成物28.1g(収率65%)を得た。

## 【化41】

30

$^1\text{H NMR}$ : (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.01 (s, 6H),

0.82 (s, 9H), 4.55 (s, 2H), 6.29 (d, 1H), 6.36 (dd, 1H), 7.58 (d, 1H)

## 【0177】

40

**e.** 2-(3-クロロプロピル)-5-(*t*-ブチルジメチルシリルオキシメチル)フラン。2-(*t*-ブチルジメチルシリルオキシメチル)フラン(5g, 0.023mol)/THF(48mL)溶液を3の分子ふるいで乾燥させた。ふるいを除去した後、追加のTHF 10mLをTMEDA(3.47 mL, 0.023mol)と共に加え、溶液を氷浴で0に冷却した。BuLi/ヘキサン溶液(2.5M, 10.1mL, 0.025mol)を25分間に滴下した。混合物を1時間攪拌した。1-クロロ-3-ヨードプロパン(5.64g, 0.028mol)を一挙に注入した。2時間後、反応の完了をTLCで確認した。溶媒を留去し、残渣をエーテル(100mL)と5%クエン酸(100mL)に分配した。エーテル層を水(50mL)と塩水(50mL)で順次洗った。エーテル溶液を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、濃縮した。残渣をシリカ(溶離液: 20/1ヘプタン/EtOAc)で精製した。然るべき画分を合わせ、濃縮して生成物4.9g(収率75%)を得た。TLC- $R_f$  0.6(ヘプタン/EtOAc 5/1)。

## 【化42】

 $^1\text{H NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.00

(s, 6H), 0.83 (s, 9H), 2.01 (p, 2H), 2.71 (t, 2H), 3.48 (t, 2H), 4.51 (s, 2H), 5.88 (d, 1H), 6.04 (d, 1H)

## 【0178】

f. [5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メタノール。2-(3-クロロプロピル)-5-(*t*-ブチルジメチルシリルオキシメチル)フラン(4.88g, 0.017mol)/THF(50mL)溶液を0℃に冷却した。この溶液にフッ化テトラブチルアンモニウム/THF冷却溶液(1M, 18.2mL, 0.018mol)を加えた。20分後、TLCで反応の完了を確認した。溶液に酢酸(2mL)を加えた。溶液を濃縮した。得られたシロップをエーテル(150mL)とクエン酸飽和水溶液(100mL)に分配し、さらにエーテル層を炭酸水素塩飽和水溶液(60mL)で、次いで水(60mL)で、洗った。水層を合わせ、50mLのエーテルで逆抽出した。エーテル層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過、濃縮して黄色シロップ3.4g(粗収率99%)を得た。これをシリカ(溶離液:ヘプタン/EtOAc(5/1))でさらに精製し、生成物1.6g(収率47%)を得た。TLC- $R_f$  0.5(ヘプタン/EtOAc 1/1)

10

## 【化43】

 $^1\text{H NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.05 (p, 2H),

2.74 (t, 2H), 3.21 (bs, 1H), 3.51 (t, 2H), 4.45 (s, 2H), 5.94 (d, 1H), 6.11 (d, 1H)

20

## 【0179】

g. 2-(2-{[5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メトキシ}エトキシ)エタンアミン。[5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メタノール(500mg, 2.5mmol)/エーテル(6mL)溶液を30℃の分子ふるいで乾燥させた。ふるいを除去した後、溶液にピリジン(245  $\mu\text{L}$ , 3.0mmol)を加えた。臭化チオニル(215  $\mu\text{L}$ , 2.9mmol)を溶液に滴下した。7時間攪拌後、この溶液をナトリウム2-[2-アミノエトキシ]エトキシド(534mg, 4.2mmol)/DMF(3mL)溶液中に一挙に注入した。(ナトリウム2-[2-アミノエトキシ]エトキシドは、60%NaH鉱油混合物(2.85g, 0.07mol)をヘプタンで洗浄後に2-アミノエトキシエタノール(5g, 0.04mol)/ジグリム(10mL)溶液に添加し、5時間攪拌した後、濃縮するという方法で予め合成しておいた。)2時間後、反応系をフリーザーに入れた。18時間後、反応系をジクロロメタン(DCM)(50mL)と水(50mL)に分配した。水層を追加の30mL DCMで抽出し、DCM層を合わせて水(30mL)で洗った。DCM層を希塩酸(1N, 30mL)と水(20mL)で順次抽出した。酸性水溶液を希硝酸化ナトリウムでpH=10に調整し、2  $\times$  20mL DCMで逆抽出した。DCM層を塩水で洗い、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、濃縮して生成物380mg(収率58%)を得た。これは再精製せずに使用した。TLC- $R_f$  0.5 (IPA/ $\text{NH}_4\text{OH}$ /水 8/1/1; ニンヒドリン溶液をスプレー)。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{ClNO}_3^+$ の計算値262.1 (100%)、264.1(32%); 実測値262.6、264.6。

30

40

## 【0180】

2-{2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}エタンアミンまたは2-(2-{[5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メトキシ}エトキシ)エタンアミンへのレポーター基付加のための一般手順。1当量のレポーター基スクシンイミジルエステル/DMFに1.5当量のストック液を添加し、次いでジイソプロピルエチルアミンを添加する。反応系を室温で8~16時間攪拌する。精製には分取用HPLCまたはシリカゲルクロマトグラフィーを使用する。

## 【0181】

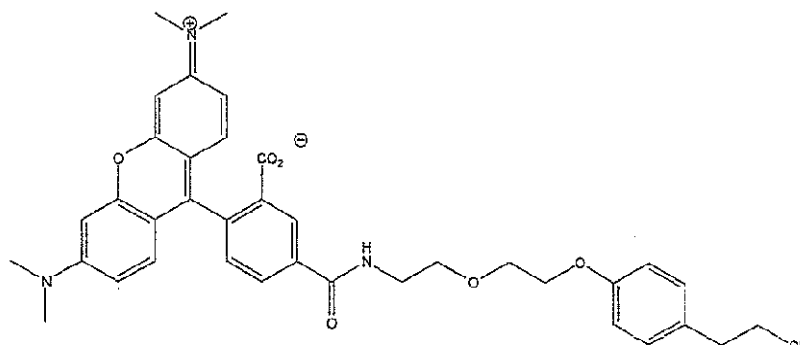
前記の一般手順に従い、次の本発明基質(XXIX~XXXIV)を合成した。

2-{2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}エチル-テトラメチルローダミン-6-

50

カルボキサミド。標記化合物を、6-カルボキシテトラメチルローダミンスクシンイミジルエステルから出発する一般手順で合成した。精製は分取用HPLCで行った。構造異性体の分離も実現した。UV/Vis (MeOH): 544(max)。質量スペクトル、m/e:  $C_{37}H_{39}ClN_3O_6^+$  の計算値656.25 (100%)、658.25(32.4%); 実測値656.37、658.37。この化合物はここではカルボキシテトラメチルローダミン-p-フェネチル-Clという。

【化44】

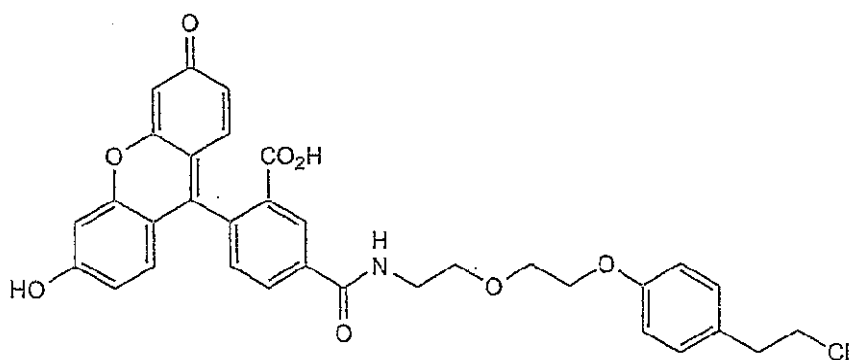


式(XXIX)の化合物

【0182】

2- {2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}エチル-フルオレセイン-5(および-6)-カルボキサミド。標記化合物を、5(6)-カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルから出発する一般手順で合成した。精製と異性体の分離には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、m/e:  $C_{33}H_{27}ClNO_8^-$  の計算値600.14 (100%)、601.15(37.4%)、602.14(32.1%); 実測値600.18、601.24、602.21。この化合物はここではカルボキシフルオレセイン-p-フェネチル-Clという。

【化45】



式(XXX)の化合物

【0183】

2- {2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}エチル-ビオチン-カルボキサミド。標記化合物を、D-ビオチンスクシンイミジルエステルから出発する一般手順で合成した。精製と異性体の分離には分取用HPLCを使用した。質量スペクトル、m/e:  $C_{22}H_{33}ClN_3O_4S^+$  の計算値470.19(100%); 実測値470.19。この化合物はここではビオチン-p-フェネチル-Clという。

10

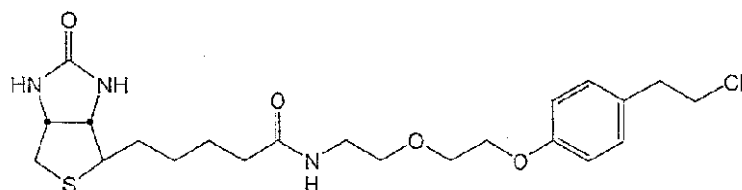
20

30

40

50

## 【化 4 6】



式(XXXI)の化合物

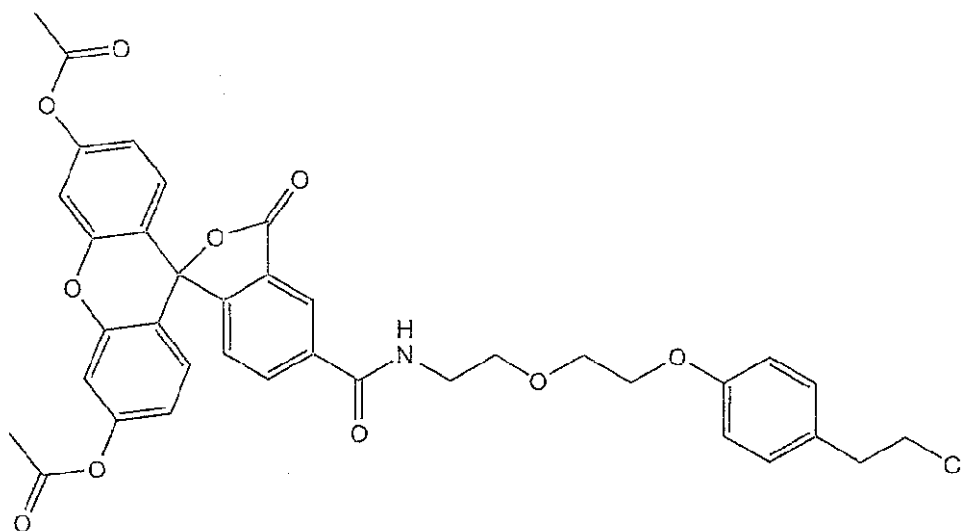
10

## 【 0 1 8 4】

2- {2-[4-(2-クロロエチル)フェノキシ]エトキシ}エチル-3',6'-ジアセチルフルオレセイン-6-カルボキサミド。エーテルN- {2-[4-(2-クロロエチル)-1-エトキシフェニル]エチル}-フルオレセイン-6-カルボキサミド(12.3mg)に2mlの無水酢酸と0.25mlのピリジンを順次加えた。反応混合物を1時間(攪拌)させた。減圧濃縮後、残渣を2回、トルエンと共濃縮した。次いで固形物を減圧乾燥した(0.186g, 0.216mmol, 収率84%)。質量スペクトル、m/e:  $C_{37}H_{33}ClNO_{10}^+$ の計算値686.18 (100%)、687.18(41.9%)、688.18(34.1%); 実測値686.55、687.61、688.60。

20

## 【化 4 7】



式(XXXII)の化合物

30

40

## 【 0 1 8 5】

N-[2-(2- { [5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メトキシ}エトキシ)エチル]-フルオレセイン-6-カルボキサミド。標記化合物を、6-カルボキシテトラメチルローダミンスクシンイミジルエステルから出発する一般手順で合成した。精製は分取用HPLCで行った。

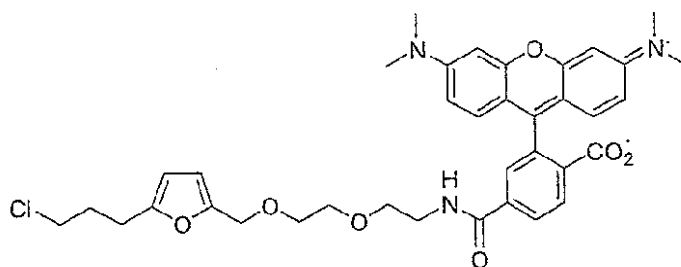
## 【化 4 8】

$^1\text{H NMR}$ : ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2.04 (p, 2H), 2.75 (t, 2H), 3.26 (s, 12H), 3.60 (m, 10H), 4.38 (s, 2H), 5.97 (d, 1H), 6.20 (d, 1H), 6.99 (d, 2H), 7.08 (dd, 2H), 7.15 (d, 2H), 7.81 (s, 1H), 8.19 (d, 1H), 8.39 (d, 1H), 8.73 (bt, 1H)

質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{ClN}_3\text{O}_7^+$  の計算値 674.26 (100.0%)、675.27 (42.0%)、676.26 (32.4%); 実測値 674.5、675.5、676.5。この化合物はここではカルボキシテトラメチルローダミン-フラニル-プロピル-Cl という。

10

## 【化 4 9】



20

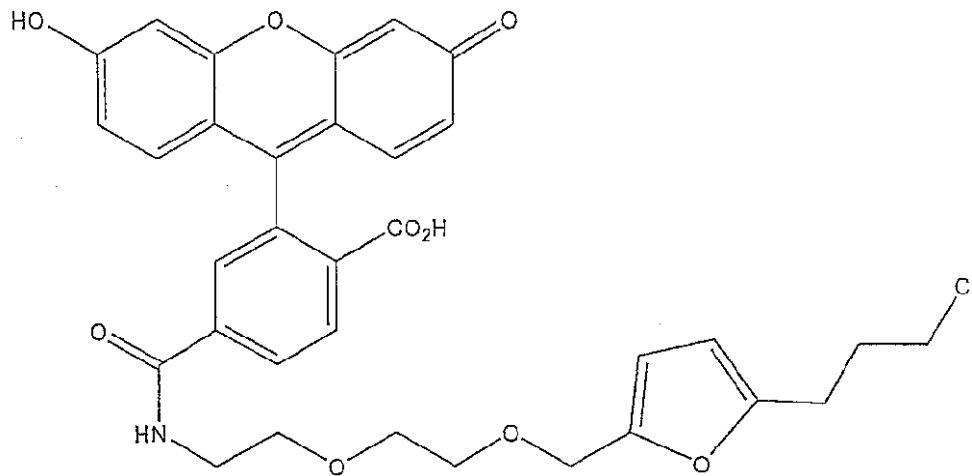
式(XXXIII)の化合物

## 【0186】

N-[2-(2-{[5-(3-クロロプロピル)-2-フリル]メトキシ}エトキシ)エチル]-フルオレセイン-6-カルボキサミド。標記化合物を、5(6)-カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルから出発する一般手順で合成した。精製と異性体の分離は分取用HPLCで行った。質量スペクトル、 $m/e$ :  $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{ClNO}_9^+$  の計算値 620.17 (100%)、602.7 (32.1%); 実測値 620.47、622.49。この化合物はここではカルボキシフルオレセイン-フラニル-プロピル-Cl という。

30

【化50】



式(XXXIV)の化合物

【0187】

## VI. 例示的な使用方法

本発明は細胞内の微小環境の変化をモニターするだけでなく細胞内での分子の発現、局在位置および/または輸送をもモニターし、また試料たとえば細胞中に存在する可能性のある単数または複数の分子を単離、画像化、同定、局在化、ディスプレイまたは検出するための、本発明のヒドロラーゼ基質および/または変異ヒドロラーゼの使用を特徴とする方法を提供する。本発明の基質は好ましくは水や約pH 6以上の水溶液を含めた水性の溶液またはほぼ水性の溶液に対して可溶性である。本発明の基質のストック液は有機溶媒に溶解してから水性の溶液またはバッファーで希釈してもよい。好ましい有機溶媒は非プロトン性の極性溶媒たとえばDMSO、DME、N-メチルピロリドン、アセトン、アセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、および他のヒドロキシル基を含まない完全に水混和性の溶媒などである。本発明の基質および対応する変異ヒドロラーゼの使用濃度は試験条件や所期目的たとえばバックグラウンドのまたは望ましくない標識を最小限に抑えながら適切な時間内に結果を得るといった目的に左右される。本発明の基質の濃度は一般にナノモル~マイクロモルの範囲である。本発明基質の所要濃度は対応する変異ヒドロラーゼとの関係で、満足な標識が実現されるまで系統的に変動させていくことで求められる。出発範囲は技術上周知の方法で容易に求められる。

【0188】

一実施形態では、光学特性をもつ機能性基を含む基質を変異ヒドロラーゼと併用して試料を標識する。そうした基質は変異ヒドロラーゼを含む関心試料と、変異ヒドロラーゼが基質に結合するに足る時間だけ、混合し、次いで試料を、機能性基の光学応答を誘発する特定波長で照射する。随意に、試料を洗浄し残量、過剰または未結合基質を除去する。一実施形態では、標識を使用して試料の特定の性質を測定するが、それにはさらに該光学応答を標準または期待応答と比較する。たとえば変異ヒドロラーゼが結合した基質を使用して、試料の特定成分を、試料中の時間空間分布の点からモニターする。あるいは、変異ヒドロラーゼが結合した基質を使用して、特定分子の存否または量を測定または検出する。別の実施形態では、変異ヒドロラーゼが結合した基質を使用して、機能性基に特異的に応答する分子の存否について試料を分析する。

【0189】

内在性蛍光タンパク質たとえばGFPとは対照的に、蛍光基質に結合した変異ヒドロラーゼは蛍光の保持に天然タンパク質構造を必要としない。変異ヒドロラーゼは蛍光基質が結合した後に、たとえばSDS-PAGEなどの変性電気泳動ゲル中で、または有機溶媒たとえばパラホルムアルデヒドで固定した細胞中で、検出してもよい。反応性の求核アミノ酸を含む変異ヒドロラーゼの断片を、たとえばタンパク質分解過程をモニターするために、結合蛍光団によって検出してもよい。

【0190】

検出可能な光学応答は、試験系における、直接観測または計器による感知が可能なあるパラメーターの変化または出現を意味する。そうした検出可能な応答の例は色、蛍光、反射率、化学発光、光偏光、光散乱またはX線散乱の変化または出現などである。一般に、検出可能な応答は蛍光の変化たとえば蛍光強度、励起または発光波長分布、蛍光寿命、蛍光偏光またはこれらの組み合わせの変化である。検出可能な光学応答は変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料全体で起きてもよいし、そうした試料の限局部分でおきてもよい。光学応答の度合いの標準または期待応答との比較は、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料が特定の性質を有するかどうか、またどの程度有するかの判定に使用することができる。

10

【0191】

別の実施形態では、機能性基は受容体分子に対応するリガンドである。基質が特異的結合ペアの1要素(リガンド)であるような機能性基を含む場合には、相補的な要素(受容体)または基質は固体または半固体たとえばポリマー、ポリマー膜またはポリマー粒子(ポリマービーズなど)の表面に固定化してもよいし、両方が溶解していてもよい。一実施形態では、導電性基質コート表面を使用してタンパク質-タンパク質相互作用を検出する。代表的な特異的結合ペアの例はビオチンとアビジン(またはストレプトアビジンまたは抗ビオチン)、IgGとAタンパク質またはGタンパク質、薬物と薬物受容体、毒素と毒素受容体、糖とレクチンまたは糖受容体、ペプチドまたはタンパク質とペプチドまたはタンパク質受容体、相互作用する複数タンパク質たとえばプロテインキナーゼA(PKA)調節サブユニットとPKA触媒サブユニット、酵素とその基質たとえばプロテアーゼ、キナーゼ、またはルシフェラーゼとその基質、酵素の補因子と該酵素、センスDNAまたはRNAとアンチセンス(相補)DNAまたはRNA、ホルモンとホルモン受容体、それにイオンとキレート剤などである。対応する天然受容体が存在するリガンドの例は天然または合成タンパク質たとえばアビジンとストレプトアビジン、抗体、酵素およびホルモン;ヌクレオチドと天然または合成オリゴヌクレオチドたとえばRNA用または1本鎖および2本鎖DNA用のプライマー;脂質;多糖および糖質;種々の薬物たとえば治療用薬物、乱用薬物および農薬などである。機能性基がカルシウム、ナトリウム、マグネシウム、カリウムまたは生物学的に重要な他金属イオンのキレート剤である場合には、そうした機能性基を含む基質は該イオンの標識として機能する。あるいはそうした基質はpH指標として機能してもよい。好ましくは、イオン標識の検出可能な光学応答は蛍光の変化である。

20

30

【0192】

変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料は一般に受動的な手段で、すなわち基質とのインキュベーションによって、標識する。しかし、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料に基質を導入するには、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料に基質を導入する任意の方法たとえば細胞またはオルガネラへの基質のマイクロインジェクションが使用可能である。本発明の基質は一般に、その使用濃度内では、生細胞または他の生物学的構成要素に対して無害である。

40

【0193】

変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料は本発明の基質との接触直後に観測可能である。変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料は随意に、標識化の過程で、他溶液たとえば洗液、透過化および/または固定化液、および他の、追加検出試薬を含む溶液と混合する。基質との接触後の洗浄は一般に、非特異的バックグラウンドを減少させるため、光学応答の検出改善に資する。標識化濃度を引き下げれば、洗浄に俟たなくとも満足

50

な可視化が可能である。ホルムアルデヒド、ホルマリン、グルタルアルデヒド、冷メタノール、および3:1メタノール:酢酸など、多数の固定剤や固定条件が技術上周知である。固定化を用いるのは一般に、細胞形態像を保存し、また病原性試料を取り扱う際のバイオハザードを軽減するためである。固定化は随意に、本発明の嵩やかな基質が細胞膜を通れるようにするための、技術上周知の方法によるアセトン、エタノール、DMSOまたは種々の界面活性剤を用いた透過化が後に続くまたは伴う。随意に、基質の使用を、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料における特定細胞成分、細胞内物質または細胞状態の存在に起因する検出可能な応答を生み出す追加の検出試薬の使用と組み合わせてもよい。追加の検出試薬がもつスペクトル特性が基質のそれと異なれば、多色化が可能となる。

【0194】

変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料は、光学特性をもつ機能性基を含む基質との接触後または接触中の任意の時点で、検出可能な光学応答を生じる結果となる波長の光で照射し、光学応答を検出するための手段より観測する。基質によっては、周囲光を使用した比色法での検出や親蛍光団の蛍光特性による検出が行われる。紫外光または可視光ランプ、アーク灯、レーザーによる照射を受けると、または日光や通常の室内灯による照射でも、基質は、特異的結合ペアの相補要素に結合した基質を含めて、蛍光発光だけでなく強い可視光吸収をも示す。本発明の基質の照射に有用な特定装置の非限定的な例は携帯型の紫外光ランプ、水銀灯、キセノンランプ、アルゴンレーザー、レーザーダイオード、YAGレーザーなどである。これらの照射源は随意にレーザーสキャナー、蛍光マイクロプロトリーダー、標準型または小型蛍光光度計、またはクロマトグラフィー用検出器などと連結する。この可視光吸収または蛍光発光の検出には随意に目視法または次のうち任意の装置が使用される：CCDカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザーสキャナー、分光光度計、フォトダイオード、量子カウンター、落射蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光プロトリーダー、またはシグナル増幅手段たとえば光増倍管。変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料をフローサイトメーター、蛍光顕微鏡または蛍光光度計で検査する場合には随意に、蛍光団である機能性基を含む基質と検出可能に異なる光学特性をもつ第2の蛍光団とを、一般に基質の蛍光応答を第2蛍光団のそれと弁別することにより、弁別および識別するために、該装置を使用する。変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料をフローサイトメーターで検査する場合には、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料の検査は随意に、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料中の粒子の、基質の蛍光応答に基づく、選別装置の使用による、単離を含む。

【0195】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼと機能性基を含む対応する基質とを使用して細胞または細胞成分を標識するが、細胞の例は生物の細胞たとえばトランスジェニック動物の細胞、本発明の変異ヒドロラーゼおよび/または基質を含む細胞を導入した動物の細胞、または培養細胞などである。たとえば細胞を、変異ヒドロラーゼをコードするベクターたとえば変異ヒドロラーゼと核局在化シグナルとの融合体をコードするベクターと接触させる。該細胞はトランスジェニック動物の細胞でも、動物に導入された細胞でもよいが、該細胞内での該ベクターの発現は一時性、制御性または安定性のいずれでもよい。次いで、該細胞または該細胞を含む動物を、変異ヒドロラーゼによって認識される本発明の基質と接触させる。あるいは、細胞を該ベクターおよび基質と同時並行的に接触させる。次いで、動物体内、細胞内または細胞溶解液または細胞垂分画中の機能性基の存在および局在位置を検出または測定する。別の実施形態では、変異ヒドロラーゼと三重項増感剤を含む機能性基を含む対応する基質とを使用して、たとえば細胞内の分子および/または細胞活性を選択的に不活性化または破壊する。この実施形態では、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含む試料を、三重項増感剤を含む基質と接触させた後に、試料にUV光を当てる。

【0196】

タンパク質をin vitroまたはin vivo標識するには、ヒドロラーゼ基質をアミノ酸またはtRNAたとえばin vitro合成タンパク質のN末端修飾のためのアミノアシル化開始メチオニルtRNAなどのようなアミノアシル化tRNAに、変異tRNAシターゼを使用してtRNAに付加

10

20

30

40

50

したアミノ酸を含めたタンパク質のN末端標識のためのアンバーサプレッサー-tRNAに、付加してもよい。ヒドロラーゼ基質はまた、インテイン媒介法(intein-mediated method)でタンパク質に付加してもよい。関心タンパク質は、C末端インテインドメイン(好ましくはホーミングエンドヌクレアーゼドメインを欠く「ミニインテイン」、なお好ましくはMycobacterium xenopi (Mxe) GyrAミニインテイン)との融合タンパク質として発現する。該融合タンパク質を、システイン-ヒドロラーゼ基質たとえばシステイン-ハロアルカンの存在下に、還元性チオール試薬たとえば還元型2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムまたは2-メルカプトエタノールで処理すると、該融合タンパク質が融合体のインテイン部分のN末端システイン残基で開裂し、またシステイン-ヒドロラーゼ基質たとえばシステイン-ハロアルカンが関心タンパク質のC末端に共有結合的に付加する結果となる。

10

## 【0197】

従って、タンパク質は融合タンパク質を作製する必要もなくcDNAまたはmRNAから発現させることができ、また変異ヒドロラーゼを使用して精製することができる。しかも、in vitro翻訳タンパク質からは、たとえば固定化変異ヒドロラーゼを使用して、融合タグの必要もなく、タンパク質マイクロアレイを作製することができるし、また翻訳タンパク質だけでなく翻訳タンパク質と相互作用するタンパク質もまた単離することができる。さらに、蛍光団を含む基質の使用は発現タンパク質の精製だけでなく迅速な検出をも可能にする。細胞内のタンパク質のin vivo標識には、メチオニンまたは他の天然型または非天然型アミノ酸を含む基質を使用してもよいが、新合成タンパク質および新合成タンパク質と相互作用するタンパク質は随意に固定化変異ヒドロラーゼを使用して、融合タグの必要もなく、精製することができる。このアプローチはまた、差次的タンパク質発現分析用のマーカータンパク質の単離に使用しても、質量分析装置と併用してもよい。種々の蛍光団を含む基質を使用すれば多重処理も可能である。

20

## 【0198】

本発明の基質と変異ヒドロラーゼは試料中の分子の単離、ディスプレイまたは検出に特に有用である。一実施形態ではタンパク質マイクロアレイを作製するが、そこでは変異ヒドロラーゼを固体担体表面に固定化し、また本発明の基質を修飾して、タンパク質固定化用に、単一タンパク質、機能性または構造タンパク質またはタンパク質一般に結合する単数または複数の機能性基を含むようにする(図57)。たとえば融合タンパク質システムたとえばチオレドキシンプッチ、インテイン媒介法または他の方法を使用して、固体表面に変異ヒドロラーゼを固定化する。次にタンパク質固定化用の修飾基質を加える。基質の修飾にはスクシンイミジルエステル/アルデヒド(タンパク質固定化用)、グルタチオン(GST融合タンパク質固定化用)、NTAまたは金属(Hisタグ付きタンパク質固定化用)、または特異リガンド(特異タンパク質固定化用)を用いてもよい。たとえば酵素基質またはヒドロラーゼ基質に連結した酵素の阻害物質を使用して、特定種の酵素類たとえばキャスパーゼまたは逆転写酵素を固定化するようにしてもよいし、またヒドロラーゼ基質に連結したある種のタンパク質に結合するDNAを使用してDNA結合タンパク質用の、またはチップ系アッセイ開発用の、タンパク質マイクロアレイを作製するようにしてもよい。同様に、タンパク質複合体の単離を含めたタンパク質-タンパク質相互作用を研究するには、磁性または非磁性体粒子たとえばMagneSil粒子の表面に変異ヒドロラーゼを固定化することができる。これらの方法は新融合タンパク質たとえば新ライブラリーの作製を避けることができる。というのは、たとえばGST融合ライブラリー用に作製する必要があるのは関心タンパク質用基質だけだからである。

30

40

## 【0199】

あるいは、基質を表面に固定化して、変異ヒドロラーゼおよびその融合体を該表面に安定結合させるようにしてもよい。変異ヒドロラーゼは生細胞から、または無細胞法により、たとえば細胞溶解液中での転写+翻訳により、獲得してもよい。他分子への結合または酵素活性などの性質の分析には結合タンパク質が有用な場合もある。それはまた、バイオ変換または検出能のための酵素活性を安定的に固定化するのに有用な場合もある。複数の基質を表面に、位置をずらして、または混合体として、固定化して、複数の変異ヒドロ

50

ーゼが結合されるようにしてもよい。基質はまた、他の結合性分子たとえばビオチンまたはパラ置換ベンジルグアニンなどで固定化してもよい。

#### 【0200】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼとの融合体を使用して、該融合体に結合するタンパク質を同定する。融合タンパク質に結合するタンパク質は、表面に固定化した基質に変異ヒドロラーゼを結合させておくことにより、他の未結合タンパク質から分離してもよい。この方法では、溶液中の未結合タンパク質を固定化された結合タンパク質から洗い流してもよい。融合タンパク質に結合する他分子をこの方法で同定してもよい。変異ヒドロラーゼに結合する分子の結合安定性を高めるために、種々の化学架橋法を使用して結合分子を共有結合的に相互連結してもよい。結合分子を後に結合解除して分析たとえば同定および/または単離に回せるという意味では、可逆的架橋剤の使用が好ましい。

10

#### 【0201】

変異ヒドロラーゼを基質と結合させた後は、混合体中の残りの未反応基質を不活性化する必要もあるかもしれない。これは野生型ヒドロラーゼを混合体に加えて残りの未反応基質を生成物に変換するという方法で行ってもよい。たとえば、未反応クロロアルカン基質は野生型のまたは他の触媒能を有するデハロゲナーゼを加えて対応するアルコールへと変換してもよい。未反応基質は溶液中に遊離した状態または表面に結合した状態のいずれかであろう。表面に結合している場合には、触媒能を有するヒドロラーゼを加えれば該基質は対応する生成物へと変換するため、変異ヒドロラーゼの表面への新たな結合は妨げられよう。

20

#### 【0202】

本発明の基質と変異ヒドロラーゼはタンデムアフィニティー精製(TAP)法に使用してもよい。これは2連続のアフィニティー精製ステップを使用するタンパク質またはタンパク質複合体の精製法である。各精製ステップではアフィニティータグたとえばHisタグ、GSTタグ、Strepタグ、ビオチンタグ、メンエキグロブリン結合性ドメインたとえばIgG結合性ドメイン、カルモジュリン結合性ドメインなどに対応するリガンドを、関心タンパク質と融合させて使用する。本発明の変異ヒドロラーゼはアフィニティータグとして使用してもよい。たとえば変異ヒドロラーゼとカルモジュリン結合性ペプチド(CBP)とを含む融合体またはそのタンパク質複合体は、固相に結合させたカルモジュリンにより、次いで固相に結合させヒドロラーゼ基質により、精製してもよい。精製後のタンパク質または複合体はウェスタンブロット方または質量分析法で分析してもよい。TAPを使用すると、タンパク質またはタンパク質複合体は種々の宿主細胞たとえば細菌、Drosophila、植物、哺乳動物の細胞から、また無細胞タンパク質発現系から精製されるし、またタンパク質-タンパク質相互作用を同定することができる。TAPへの、たとえば最終アフィニティー精製ステップへの、変異ヒドロラーゼと基質の使用は、TAPに先立つ種々の時点で、または種々の薬物治療後の、タンパク質のリアルタイム分析を可能にする。変異ヒドロラーゼ融合体は基質に共有結合されるため、精製タンパク質複合体が該ヒドロラーゼを含むことはないであろう。

30

#### 【0203】

別の実施形態では、ビオチン化ヒドロラーゼ基質が、抗原に結合するアビジン標識抗体に結合する。この複合体は、固定化変異ヒドロラーゼを含むエッペンドルフチューブを使用して免疫沈降させてもよい(図58)。

40

#### 【0204】

ある種の分子を検出するために、溶液(遊離)系または固定化系を用いてもよい。一実施形態では、小分子または化合物で修飾したヒドロラーゼ基質を該付加小分子または化合物の修飾の検出に使用する。たとえばホスファチジルイノシトール3(PI3)キナーゼなどのようなキナーゼを検出するために、ホスファチジルイノシトールなどのような脂質で修飾したヒドロラーゼ基質を、PI3キナーゼを含む試料と接触させると、ホスファチジルイノシトールがリン酸化される。得られる修飾ヒドロラーゼ基質を次にヒドロラーゼに共有結合させる。リン酸化ホスファチジルイノシトールを電気泳動法または蛍光法で検出する。電

50

気泳動検出法には、放射性標識ヌクレオチドたとえば  $^{32}\text{P}$ ATPを使用する標準キナーゼアッセイとそれに続くオートラジオグラフィー、または蛍光標識NTA- $\text{Ga}^{3+}$ または- $\text{Fe}^{3+}$ 錯体を使用する蛍光検出などがある。リン酸基へのNTA- $\text{Ga}^{3+}$ または- $\text{Fe}^{3+}$ 錯体の特異的結合はリン酸化ホスファチジルイノシトールの電気泳動による検出を可能にする。PI3キナーゼ活性は自由溶液中でFRETまたは蛍光偏光(FP)法を用いて検出してもよい。それには蛍光標識した、ヒドロラーゼ基質を含むホスファチジルイノシトールを使用してもよい。リン酸化ホスファチジルイノシトールは別の蛍光団標識NTA- $\text{Ga}^{3+}$ または- $\text{Fe}^{3+}$ 錯体を使用して検出する。蛍光偏光(FP)法では、ヒドロラーゼ基質を含む非蛍光ホスファチジルイノシトールを分析用試料に加え、次いで $\text{Ga}^{3+}$ または- $\text{Fe}^{3+}$ を添加する。得られるヒドロラーゼ基質を固定化または遊離変異ヒドロラーゼに加える。 $\text{Ga}^{3+}$ または- $\text{Fe}^{3+}$ に結合する蛍光標識NTAを使用して蛍光偏光を測定する。

10

## 【0205】

ホスホジエステラーゼを検出するには、蛍光標識cAMPと別の蛍光団とを含むヒドロラーゼ基質を使用してもよい。cAMPの加水分解はホスホジエステラーゼ活性を示す。ホスホジエステラーゼ活性は、たとえばタンパク質マイクロアレイで、遊離または固定化デハロゲナーゼで基質を捕捉した後にFRETを使用して検出することができる。

## 【0206】

基質に付加した核酸分子は、他の核酸分子、タンパク質またはタンパク質複合体の精製またはディスプレイに使用してもよい。定向進化法用などのリボソームディスプレイまたは精製では、終始コドンを除くmRNAの3'末端にヒドロラーゼ基質を結合させる。該基質を *in vitro* 翻訳反応液に加えて、得られたタンパク質-DNA-mRNA複合体を、固定化変異ヒドロラーゼを使用して精製する。同様に、特定遺伝子を単離、検出またはディスプレイするために、蛍光団で標識したDNAまたはRNAたとえば蛍光団で標識した、関心遺伝子に結合する1本鎖DNAと別の蛍光団または消光剤とを含むヒドロラーゼ基質を使用して、FRET法などのような蛍光ベースの方法により該遺伝子を複雑な混合系から単離、検出またはディスプレイするようにする。そうした方法は診断や生物兵器検出に有用でありうる。

20

## 【0207】

本発明の基質と変異ヒドロラーゼは種々の形態でcAMPの検出に使用してもよい(図59A-B)。一実施形態では、蛍光消光を2つの融合タンパク質および2つの基質と併用する。基質の一方はある蛍光団を含み、他方はその蛍光団に対応する消光色素を含む。融合タンパク質の一方は変異ヒドロラーゼとPKA調節サブユニットとを含み、他方は変異ヒドロラーゼとPKA触媒サブユニットとを含む(図59A)。各融合タンパク質を基質の一方と接触させ、次いで複合体を一緒に混ぜ合わせる。cAMPが存在すると、消光色素はもはや蛍光団に近接しない。従って、cAMPは蛍光測定によって測定される。別の実施形態では、異なる蛍光団をもつ2つのヒドロラーゼ基質を使用してFRET測定によりcAMPを測定する。

30

## 【0208】

別の実施形態では、融合タンパク質の一方は第1変異ヒドロラーゼとPKA調節サブユニットとを含み、他方は第1変異ヒドロラーゼとは異なりかつ第2基質に結合するタンパク質(第2タンパク質)とPKA触媒サブユニットとを含む。変異ヒドロラーゼは、少なくとも1つの蛍光団を含むヒドロラーゼ基質に結合する。第2タンパク質は第2基質に結合し、第2基質は該少なくとも1つの蛍光団に対応する消光剤による修飾を受けるが、該消光剤は該基質の第2タンパク質に対する結合には影響を及ぼさない。第2タンパク質の冷はGST、チオレドキシン、AGT、第1変異ヒドロラーゼの場合とは異なる基質に対して特異的である別種の変異ヒドロラーゼ、第1変異ヒドロラーゼの場合と同じ基質に結合することができる変異ヒドロラーゼ、または他の基質結合タンパク質などである。各融合タンパク質を対応基質と接触させ、複合体を一緒に混ぜ合わせ、cAMPを蛍光測定により測定する。cAMPが存在すると、消光剤はもはや蛍光団に近接しない。別の実施形態では、第2タンパク質は第2基質に結合し、第2基質はヒドロラーゼ基質に連結した蛍光団とは異なる蛍光団による修飾を受けるが、該蛍光団は該基質の第2タンパク質に対する結合には影響を及ぼさない。各融合タンパク質を対応基質と接触させ、複合体を一緒に混ぜ合わせ、FRET法によりcAMPを測

40

50

定する。cAMPが存在すると、2つの蛍光団はもはや近接しない。さらに別の実施形態では、融合タンパク質の一方は変異ヒドロラーゼとPKA調節サブユニットとを含み、他方は蛍光タンパク質とPKA触媒サブユニットとを含む。蛍光タンパク質の非限定的な例はGFP、YFP、EGFP、DsRedなどである。各融合タンパク質を対応基質と接触させ、次いで複合体と一緒に混ぜ合わせる。cAMPが存在すると、蛍光タンパク質と該蛍光団を含む基質に結合した変異ヒドロラーゼとはもはや近接しない。別の実施形態では、BRET法でcAMPを検出する。蛍光団を含む一方の基質は、変異ヒドロラーゼとPKA調節サブユニットとを含む融合タンパク質と接触させ、またルシフェラーゼとPKA調節サブユニットとを含む別の融合タンパク質と接触させる。各融合タンパク質に由来する調節サブユニットが二量体化するとき、BRETが観測される。BRETはcAMPが存在すると妨げられる(図59B参照)。

10

## 【0209】

変異ヒドロラーゼと基質は分子インプリント法に使用してもよい。これは分析物特異的なポリマーを生成するために考案された技術である。分子インプリント法は特定化合物(プリント分子)に対して選択性であるポリマーの合成法である(Arshady et al., 1981)。この技術は次のステップを含む:(1)プリント分子とモノマーを予め準備し、相補的相互作用(非共有結合または可逆的共有結合)を起こさせる;(2)プリント分子-モノマー複合体のまわりをポリマー化させる;および(3)抽出によりプリント分子をポリマーから除去する。従ってポリマー化により、プリント分子の相補性が保存され、該ポリマーはプリント分子を選択的に吸着することになる。ヒドロラーゼ基質で分子インプリントしたポリマー(MIPS)はヒドロラーゼとその融合体に結合するので融合タンパク質の精製、タンパク質マイクロアレイの作製、タンパク質相互作用の研究、およびTAPに使用してもよい。

20

## 【0210】

基質の機能性基は別のタンパク質に可逆的または共有的に結合してもよい。タンパク質に可逆的に結合する機能性基の例は抗体たとえば単鎖抗体(scFv)に結合するハプテンである。別のタンパク質に共有結合する機能性基の例は変異デハロゲナーゼに結合するクロロアルカンまたはO-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ(AGT)に結合するパラ置換ベンジルグアニンである。変異ヒドロラーゼを含む第1融合タンパク質は、生化学的または生物学的プロセスを実現または調節する手段として、第2タンパク質に結合させてもよい。たとえば遺伝子転写は、転写活性化因子たとえばVP16に結合した変異ヒドロラーゼと融合したDNA結合タンパク質によって調節されてもよい。そうした例では、遺伝子転写はDNA結合タンパク質に融合した変異ヒドロラーゼを転写活性化因子に結合させる基質の添加によって増進されよう。別の例では、細胞中のあるタンパク質の活性がその細胞内局在位置によって調節されよう。たとえばあるタンパク質の活性は、該タンパク質を第2タンパク質と融合した変異ヒドロラーゼに結合させると、その結合と同時に該第2タンパク質が該タンパク質を別の細胞内区画へと再誘導または選択的に再分配することにより、変化するようにしてもよい。例はほぼ非細胞核部分に局在する転写因子であり、核ターゲティング配列と融合した変異ヒドロラーゼに結合すると同時に、転写因子は核へと移行する結果となる。そうした例では、該転写因子を変異ヒドロラーゼへと結合させる基質の添加はそれにより、該転写因子に依存する遺伝子の発現を調節することもあろう。

30

## 【0211】

該基質は複数の反応性基を有し、変異ヒドロラーゼの相互連結を可能にしてもよい。結合活性を有するタンパク質と融合するときは、変異ヒドロラーゼの相互連結は多価結合性の複合体を生成する。そうした多価複合体は有用な特性たとえば高い見かけ結合効率(高アビディティーなど)をもつ。たとえば複数の単鎖抗体を相互連結すると対応抗原と結合効率が高まる。別の実施形態では、変異ヒドロラーゼと融合したファージ抑制因子タンパク質のDNA結合領域は、基質を添加して変異ヒドロラーゼを相互連結しようとするとき、より効率的にDNAに結合する。変異ヒドロラーゼに融合した種々の結合性タンパク質をもつ多価複合体は、種々の分子たとえば抗原が該複合体を介して結合し合うことを可能にする。

40

## 【0212】

50

変異ヒドロラーゼ間の融合は単一タンパク質への複数基質の結合を可能にしようが、複数基質は同種でも異種でもよい。これにより、融合変異ヒドロラーゼは基質間の架橋分子として働こう。これは分子たとえば官能性基、表面または他分子の共有結合的な相互連結に有用であろう。たとえば表面に結合した基質は基質に結合したポリヌクレオチドに、二価の融合変異ヒドロラーゼを介して、共有結合的に付加されよう。異種変異ヒドロラーゼを融合して、または安定した共有結合をつくれる他のタンパク質たとえばAGTに変異ヒドロラーゼを融合して、ヘテロ多価分子を作製してもよい。

#### 【0213】

一実施形態では、基質は複数の官能性基を含む。たとえば光学的に検出可能な分子と受容体分子に対応するリガンド、2つの異種タンパク質たとえばAGTと蛍光タンパク質またはルシフェラーゼ、光学的に検出可能な分子とプロテアーゼ認識部位、それに光学的に検出可能な分子の消光剤などである。たとえば本発明の基質は蛍光団、プロテアーゼ認識部位および消光剤分子を含む。該基質は変異ヒドロラーゼを発現する細胞によって取り込まれる。プロテアーゼが存在すると消光剤は基質から除去され、結果として蛍光シグナルが生じる。そうした基質の使用はリアルタイムのプロテアーゼアッセイを可能にする。該変異体は感染因子の検出にも使用可能であり、従って臨床診断や生物兵器の検出に使用してもよい。

10

#### 【0214】

他の形態を使用してプロテアーゼたとえばキャスパーゼまたはプロテオソームを検出してもよい。たとえば分枝ペプチド基質で20Sプロテオソームを検出(または単離)してもよい。一実施形態では、変異ヒドロラーゼまたは別のレポータータンパク質たとえばルシフェラーゼに対応する遺伝子を哺乳動物細胞発現系に使用する。一実施形態では、プロテアーゼたとえばキャスパーゼ認識部位を、転写抑制因子たとえばtet抑制因子またはlac抑制因子であるタンパク質に導入する。一実施形態では、プロテアーゼ認識部位は抑制因子タンパク質のループ領域または該タンパク質の抑制因子機能を抑制しない別の領域に導入する。レポーター遺伝子に連結した転写抑制因子タンパク質に結合するDNAに連結したプロモーターを含むベクターを、該修飾転写抑制因子タンパク質を含む細胞に導入する。プロテアーゼが存在しなければ、修飾転写抑制因子タンパク質はレポーター遺伝子の発現を抑制する。プロテアーゼが存在すると、修飾転写抑制因子タンパク質はプロテアーゼ認識部位のタンパク質分解による開裂のため不活性化される。そのため、修飾転写抑制因子タンパク質は転写を抑制することができず、その結果としてレポーター遺伝子が発現する(図60A)。一実施形態では、修飾転写抑制因子タンパク質遺伝子および/またはレポーター遺伝子を細胞中に安定的にトランスフェクトする。そうしたアッセイ系は、別のレポーター遺伝子を使用するおよび/または別の分子たとえば別のプロテアーゼを検出するアッセイ系を含めた他のアッセイ系と併用して、多重処理が行えるようにしてもよい。該アッセイ系はまた、たとえば生物兵器の検出にだけでなく臨床診断で感染因子の検出に用いてもよい。

20

30

#### 【0215】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼと別のタンパク質との融合体をクロマチン免疫沈降法に用いる。変異ヒドロラーゼとDNA結合タンパク質とを含む融合体を細胞内で発現させる。一定期間の培養後、細胞を固定化し、超音波処理し、クロマチン-ハイブリッドタンパク質複合体を、ヒドロラーゼ基質を含む固体担体で単離するかまたは細胞を超音波処理で破碎し、固体担体に付加したヒドロラーゼ基質を用いてクロマチン複合体を単離する。未結合複合体またはタンパク質は洗浄により除去し、次いで融合タンパク質をクロマチンに架橋結合させるか、または官能性基たとえばビオチンを含むヒドロラーゼ基質を細胞に添加し、一定期間培養する。次いで細胞を固定化し、超音波処理し、クロマチン複合体を固体担体で、たとえばストレプトアビジンに連結した固体担体で、単離する。単離したクロマチンの解析には増幅反応を用いる。

40

#### 【0216】

さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼと核酸結合タンパク質との融合体をin v

50

in vitro核酸結合アッセイに使用する。該融合体はヒドロラーゼ基質を含む固相表面に固定化する。細胞溶解液または精製核酸を固定化融合タンパク質とインキュベートし、結合核酸をゲル電気泳動またはポリメラーゼ反応により検出する。あるいは該融合体を、ヒドロラーゼ基質を含む電気化学的感受性表面に固定化する。核酸結合は電気化学的变化によって検出する。これらの方法は複数の核酸結合タンパク質を対象とした多重アッセイだけでなくハイスループットアッセイにも使用可能である。

#### 【0217】

別の実施形態では、3個のベクターを使用する。第1ベクターはGAL4、プロテアーゼ認識部位、およびVP16融合体を発現し、第2ベクターはプロモーターを、転写抑制因子タンパク質遺伝子に連結したGAL4結合部位に連結させて含み、また第3ベクターはプロモーターを、レポーター遺伝子に連結した転写抑制因子タンパク質結合部位に連結させて含む(図60B)。GAL4融合体をGAL4結合部位に結合させると、結果としてRNAポリメラーゼの構成的転写活性化が起こる。転写抑制因子タンパク質が構成的に発現しているときは、レポーター遺伝子の発現は抑制される。しかし、プロテアーゼが存在すると、GAL4とVP16は分離されるため、転写抑制因子タンパク質は合成されない。結果としてレポーター遺伝子が発現する。他の実施形態では、分割ユビキチン(米国特許第5,503,977号明細書を参照)またはアデニルシクラーゼ、グアニルシクラーゼおよび/またはその調節因子(米国特許第6,333,154号明細書を参照)系を使用する。そうした系は、複数種のレポーターの組み合わせたとえばルシフェラーゼとGFPまたはルシフェラーゼと変異ヒドロラーゼを使用する多重アッセイに、複数のプロテアーゼ認識部位を使用するプロテアーゼ多重アッセイに、プロテアーゼたとえばキャスパーゼの阻害物質のスクリーニングアッセイに、使用してもよい。該アッセイ系はまた、たとえば生物兵器の検出にだけでなく臨床診断で感染因子の検出に用いてもよい。

#### 【0218】

さらなる実施形態では、分解/不安定性ドメイン(タンパク質不安定化ドメイン)の存在下で短いまたは短縮された半減期をもつレポーターたとえば変異ヒドロラーゼまたはルシフェラーゼを使用する細胞系アッセイを使用して単数または複数のプロテアーゼを検出する(図60C)。プロテアーゼ(たとえばキャスパーゼ)認識部位をレポータータンパク質とタンパク質不安定化ドメインの間に導入する。プロテアーゼが存在しないと、レポータータンパク質は急速に分解される。プロテアーゼが存在すると、不安定化ドメインが除去される結果として半減期の長いレポータータンパク質が生成する。そうした系は、複数種のレポーターの組み合わせたとえばルシフェラーゼとGFPまたはルシフェラーゼと変異ヒドロラーゼを使用する多重アッセイに、複数のプロテアーゼを使用するプロテアーゼ多重アッセイに、プロテアーゼたとえばキャスパーゼの阻害物質のスクリーニングアッセイに、使用してもよい。

#### 【0219】

一実施形態では、本発明の変異ヒドロラーゼの融合体を使用して細胞内移動をモニターする。たとえば アレスチンはGタンパク質結合受容体の調節因子であり、活性化されると細胞質から細胞膜へと移動する。本発明の変異ヒドロラーゼ/ アレスチン融合体と基質とを含む細胞は、 アレスチンが活性化Gタンパク質結合受容体と会合すると、 アレスチンの細胞質から細胞膜への移動の検出を可能にする。該アッセイ系は感染因子の検出に用いてもよいし、また臨床診断や生物兵器の検出に用いてもよい。

#### 【0220】

他の形態を使用してプロテアーゼたとえばキャスパーゼを検出してもよい。一実施形態では、変異ヒドロラーゼと別のレポータータンパク質たとえばルシフェラーゼとの融合体を該融合体の結合部にプロテアーゼ認識部位を導入して構築する。この融合タンパク質を固体担体の表面に固定化し、試料中のプロテアーゼの検出に使用する。融合タンパク質を固定化した固相表面を分析用試料の溶解液および/または単離プロテアーゼとインキュベートする。一定期間のインキュベーション後、溶解液を取り出し、レポータータンパク質の有無を調べる。プロテアーゼが存在すればレポータータンパク質たとえばルシフェラー

ぜは固体担体から溶液中に放出される。このアッセイ系はタンパク質マイクロアレイまたはマルチウェルフォーマットに、また他のアッセイ系たとえば別種のレポーター遺伝子を使用するおよび/または別種の分子たとえば別種のプロテアーゼを検出するためのアッセイ系との併用による多重処理に、使用してもよい。この方法はまた、感染因子の検出にも使用可能であり、従って臨床診断や生物兵器の検出に有用である。

#### 【0221】

別の実施形態では、FRET法を、変異ヒドロラーゼと蛍光タンパク質たとえばGFPとの融合体、または蛍光分子に結合するタンパク質たとえばO-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ(AGT)(Keppler et al., 2003)との融合体と併用する。あるいは変異ヒドロラーゼと関心タンパク質との融合体および蛍光タンパク質と該関心タンパク質と相互作用するとみられる分子との第2融合体を使用して、関心タンパク質と該分子の相互作用を、たとえばFRET法で調べるようにしてもよい。ある細胞に変異ヒドロラーゼと関心タンパク質との融合体を含ませ、別の細胞に蛍光タンパク質と該関心タンパク質と相互作用するとみられる分子との第2融合体を含ませてもよい。これら2つの細胞集団は基質および作用物質たとえば薬物と接触させた後に細胞をモニターして、2細胞集団に対する作用物質投与の効果を検出するようにしてもよい。一実施形態では、変異ヒドロラーゼと第2タンパク質と相互作用する関心タンパク質との融合体および該第2タンパク質と変異ヒドロラーゼとの第2融合体を使用して、関心タンパク質と第2タンパク質の相互作用を調べるか、または一方または両方のタンパク質と相互作用してそれらの相互作用を変化させる分子たとえばPKA調節サブユニット、PKA触媒サブユニットおよびcAMPを検出するようにする。この実施形態では、少なくとも1つの異なる機能性基をもつ2つの基質を使用してもよい。

10

20

#### 【0222】

さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼを蛍光タンパク質に融合させる。従って、該融合タンパク質は細胞内で、該蛍光タンパク質を検出することによって、または細胞を本発明の基質と接触させ基質中の機能性基を検出することによって、検出することができる。蛍光タンパク質の検出は機能性基の検出の前に行ってもよい。あるいは機能性基の検出を蛍光タンパク質の前に行ってもよい。さらに、それらの細胞は追加の基質たとえば別種の機能性基をもつ基質と接触させて、最初の基質と未だ結合していない変異ヒドロラーゼに共有結合で連結した該別種の機能性基を、細胞中で検出することも可能である。

30

#### 【0223】

さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼと転写因子との融合体を使用して転写活性化経路の活性をモニターする。たとえば、細胞質中に不活性化型で存在するが活性化に伴い核移行する転写因子(たとえばNF )と変異ヒドロラーゼとの融合体は転写活性化経路をモニターすることができる。

#### 【0224】

別の実施形態では、ビオチンを基質の中の機能性基として使用し、また融合体は変異ヒドロラーゼを、別の分子たとえばタンパク質と細胞内で相互作用するとみられる関心タンパク質に融合させて含む。そうした試薬の使用は、変異ヒドロラーゼに融合させたタンパク質と細胞内で相互作用する該他分子の捕捉を、以って相互作用性分子の同定および/または捕捉(単離)を、可能にする。

40

#### 【0225】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼを分泌タンパク質に融合させる。該融合体と本発明の基質を使用して、該分泌タンパク質を検出および/またはモニターしてもよい。同様に、変異ヒドロラーゼを、異なる小胞状区画の間に輸送される膜タンパク質へと融合させると、これらの区画内でのタンパク質プロセッシングを基質の存在下に検出することができる。さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼをイオンチャンネルまたは輸送タンパク質または該チャンネルまたは輸送タンパク質と密接に関連するタンパク質へと融合させると、イオンの細胞膜またはオルガネラ膜透過移動を、イオン感受性蛍光団を含む本発明の基質の存在下にモニターすることができる。同様に、変異ヒドロラーゼを小胞または細胞骨格に関連するタンパク質へと融合させると、基質の存在下に、骨格細胞構造に沿ったタ

50

ンパク質または小胞輸送を容易に検出することができる。

【0226】

別の実施形態では、機能性基は薬物または毒素である。そうした機能性基をもつ基質を変異ヒドロラーゼとターゲティング分子(抗体たとえば特定の腫瘍細胞に関連する抗原に結合する抗体)との融合体と結合させると、細胞内または動物体内での薬物または毒素の誘導が可能になる。あるいは、官能性基は蛍光団でもよい。該蛍光団が基質中に存在していて、変異ヒドロラーゼとターゲティング分子たとえば単鎖抗体との融合体と結合すると、ターゲティング分子が標識され、たとえばELISAなどのようなin vitro用途向けの標識抗体が得られる結果となる。

【0227】

さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼを細胞表面で発現するタンパク質と融合させ、細胞表面の変異ヒドロラーゼを本発明の基質たとえば蛍光団を含む基質と結合させて、細胞移動(例:がん細胞移動)のin vivoまたはin vitroモニタリングに使用する。一実施形態では、本発明の基質は細胞膜透過性が低いまたはない基質である。あるいは、そうした系は種々の作用物質たとえば薬物の種々の細胞プールに対する効果のモニタリングに使用することもできる。さらに別の実施形態では、変異ヒドロラーゼはHERGチャンネルへと融合させる。K<sup>+</sup>感受性蛍光団を含む本発明の基質の存在下でそうした融合体を発現する細胞は、HERGチャンネルの活性をモニターするために、たとえば薬物-毒性をモニターするために使用してもよい。さらなる実施形態では、そうした融合体を血液細胞の表面で、たとえば動物に導入した外来細胞またはトランスジェニック動物体内の外来性細胞の表面で、発現させてもよい。

【0228】

別の実施形態では、本発明の基質は細胞または生体内の疎水性領域のモニタリングに有用な機能性基たとえばナイルレッドを含む。

従って、本発明の変異ヒドロラーゼと基質は多様なアッセイ法たとえばファージディスプレイ、パニング、ELISA、質量分析、ウェスタンブロット、FMAT(fluorometric microvolume assay technology)、動物全身画像化、X線画像化および細胞/垂細胞染色などに有用であり、またはバイオセンサーとして有用である。たとえば変異ヒドロラーゼまたはその融合体を含むまたは発現する細胞を、動物たとえば人間または人間以外の動物たとえば哺乳動物または霊長類に、導入たとえば移植または注入する。該細胞は一時的にトランスフェクトしてもよいし、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を安定的に発現させるようにしてもよいし、他の形で変異ヒドロラーゼまたはその融合体と接触させて会合させるようにしてもよい。種々の細胞型が、細胞系、初代培養、または幹細胞(例:胚または成人幹細胞)を非限定的に含めて、使用可能である。一実施形態では、変異ヒドロラーゼを発現するまたは含む細胞は本発明のヒドロラーゼ基質と接触させてから動物に導入する。別の実施形態では、変異ヒドロラーゼを発現するまたは含む細胞の動物への導入の後または前に本発明のヒドロラーゼ基質の動物への導入を行う。動物全身または(組織生検または切片、生理学的試料から単離した細胞、またはホモジナイズ処理した組織を含む)組織標本、または血液等の生理液試料におけるヒドロラーゼ基質の機能性基の存否、局在位置または量が検出または測定される。該変異ヒドロラーゼ、該変異ヒドロラーゼを含む融合体、および/または単数または複数の本発明の基質は、たとえば生物学的過程の画像化、内在性遺伝子の転写調節の画像化、および細胞(骨髄由来細胞、血液細胞など)移動の画像化に、単独でまたは他の発光または核レポーター系(発光タンパク質、ルシフェラーゼ、放射性核種など)と共に使用することができる。光イメージング系には、顕微鏡的な解像度を実現するもの(落射、共焦点および2光子型などの顕微鏡)、メゾスコピックな解像度を実現するもの(光投射断層撮影法、光コヒーレンス断層撮影法、レーザースペックル画像化法など)、および固有コントラストまたは分子コンストラクトを伴う肉眼解像度を実現するもの(ハイパースペクトル画像化法、内視鏡法、偏光イメージング法、蛍光反射画像化法、拡散光断層撮影法、蛍光共鳴画像化法、蛍光分子画像化法、または発光画像化法)などがある。

10

20

30

40

50

## 【0229】

該変異ヒドロラーゼ、該変異ヒドロラーゼを含む融合体、および/または単数または複数の本発明の基質はまた種々の高光学密度/造影剤と併用することもできるが、そうした造影剤は別個の薬剤として、またはヒドロラーゼ基質に化学的に結合させて、使用してもよい。一実施形態では、造影剤を含むヒドロラーゼ基質を、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を発現する細胞を含む動物(たとえば変異ヒドロラーゼまたはその融合体をコードする遺伝子を入れたトランスジェニック動物)に導入する。別の実施形態では、造影剤を含むヒドロラーゼ基質を、変異ヒドロラーゼまたはその融合体を発現する細胞に導入し、それらの細胞を動物に導入する。造影剤はX線、MRI等の技術により検出することができる。

10

## 【0230】

一実施形態では、変異ヒドロラーゼと別のタンパク質との融合体および電気化学的感受性表面に結合させたヒドロラーゼ基質を、分子たとえば生理的分子の検出に(すなわちバイオセンサーとして)使用する。たとえば該表面は固定化ヒドロラーゼ基質を含み、また試験液中の関心分子の存否は電気化学的な変化によって判定される。たとえば変異ヒドロラーゼとグルコースオキシダーゼとを含む融合体は、ヒドロラーゼ基質を含む白金電極、金表面、金ナノ粒子またはカーボンナノチューブ上に固定化し、試験試料を加え、試料中のグルコースの存否または量を測定する。同様に、電気化学的感受性表面に固定化した変異ヒドロラーゼ-コレステロールオキシダーゼ融合体を使用して、試料中のコレステロールを測定してもよい。

20

## 【0231】

別の実施形態では、変異ヒドロラーゼをバイオセンサーとして、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害物質、キナーゼまたはキナーゼ阻害物質などの検出に使用する。たとえばプロテアーゼ認識部位を変異ヒドロラーゼタンパク質に融合させ、得られた融合体を、ヒドロラーゼ基質を含む電極、金表面、金ナノ粒子またはカーボンナノチューブなどの電気化学的感受性表面に固定化する。プロテアーゼまたはキナーゼなどのような分子が存在すると、分子量がシフトするが、それを電気化学的な変化によって検出してもよい。これらの変化の阻害物質には、変異ヒドロラーゼに融合させたタンパク質の阻害物質たとえばプロテアーゼ阻害物質などがあるが、それもまたこの方法で検出してもよい。

30

## 【0232】

別の実施形態では、変異ヒドロラーゼはヒドロラーゼ基質以外の基質にたとえば変異ヒドロラーゼのC末端で結合させる、および/または変異ヒドロラーゼとタンパク質との融合体をヒドロラーゼ基質以外の基質に結合させる。バイオセンサーの表面は固定化ヒドロラーゼ基質を含む。試験液中の生体分子の存否は電気化学的な変化によって判定する。この方法はある種の分子の捕捉、結合、または他の形でのアッセイ手段の提供に使用してもよいし、また農薬や工業用の有毒化合物の検出、臨床診断、感染因子および生物兵器の検出などにも使用可能である。一実施形態では、この方法をプロテアーゼ、プロテアーゼ阻害物質、キナーゼ、キナーゼ阻害物質を非限定的に含む分子類の検出に、またタンパク質の翻訳後修飾の検出に、使用する。

40

以下、非限定的な実施例を以って本発明をさらに詳しく説明する。

## 【実施例】

## 【0233】

実施例 I一般手順

特に断らない限り、ここで使用する専門/学術用語はすべて分子生物学および細胞シグナル伝達およびモデリングの分野の当業者が一般に理解しているのと同じ意味をもつ。一般にここで使用する命名法、および後述の分光法、創薬、細胞培養、分子遺伝学、プラスチック製造、高分子化学、診断、アミノ酸/核酸化学、アルカン化学の分野のラボ作業手順は、技術上周知でありまた常用されている。プラスチック製造、シグナル検出、組み換え核酸法、ポリヌクレオチド合成、細菌培養および形質転換(エレクトロポレーション、

50

リポフェクションなど)には一般に標準技法を使用する。

#### 【0234】

種々の技法や手順は一般に技術上通常の方法および種々の一般参考書に従って行う(一般的にはSambrook et al. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,を、また蛍光技法についてはLakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press (1983)を、参照。両書は参照により開示される)。化学合成、化学分析および生物アッセイには標準技法を用いる。

#### 【0235】

##### 材料

オリゴヌクレオチドはすべてPromega Corporation (Madison, WI)またはUniversity of Iowa DNA Facility (Iowa City, Iowa)が合成、生成および配列分析した。制限酵素とDNA修飾酵素はPromega Corporation (Madison, WI)、New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA)またはStratagene Cloning Systems (La Jolla, CA)から入手し、メーカーのプロトコールに従って使用した。コンピテントE. coli JM109はPromegaから提供を受けたが、Stratagene Cloning Systemsから購入した。小規模のプラスミドDNA単離はQiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA)を使用して行った。DNAライゲーションはStratagene Cloning Systemsから購入した予備試験済み試薬キットを使用して行った。DNA断片の精製にはQiagen Inc.から購入したQIAquick Gel抽出キットまたはQIAquick PCR精製キットを使用した。

#### 【0236】

DhaA変異体およびその融合体の生成に使用したベクターは次のとおりであった: pET21 (Invitrogen, Carlsbad, CA); pRL-null (Promega, Madison, WI); pGEX-5x-3 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); EGFPおよびDsRED2(どちらもCLONTECH, Palo Alto, CAに由来)。

#### 【0237】

SDS-PAGEと関連バッファーおよび色素、それにエレクトロブロット転写バッファーはBioWhittaker Molecular Applications (Rockland, ME)から入手した。タンパク質分子量マーカーはInvitrogenから購入した。

#### 【0238】

Sigma-Aldrichは抗FLAG<sup>R</sup>モノクローナル抗体類[抗FLAG<sup>R</sup> M2モノクローナル抗体(マウス)(F3165)、抗FLAG<sup>R</sup> M2 HRP標識体(A8592)および抗FLAG<sup>R</sup> M2 FITC標識体(F4049)]の供給元であった。Chemicon (Temecula, CA)はモノクローナル抗Renillaルシフェラーゼ抗体(MAB4410)の供給元であった。Promega Corp.はHRP標識ヤギ抗マウスIgG(W4021)およびHRP標識ストレプトアビジン(G714)の供給元であった。

#### 【0239】

1-Cl-ブタン、1-Cl-ヘキサン、1-Cl-オクタン、1-Cl-デカン、1-Cl-ブタノール、1-Cl-ヘキサノール、1-Cl-オクタノールおよび1-Cl-デカノールはAldrichまたはFluka(USA)から入手した。諸々の塩類、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、イミダゾール、HEPES、ナトリウムEDTA、硫酸アンモニウムおよびトリス遊離塩基はFisher (Biotech Grade)に由来した。

#### 【0240】

Glutathione Sepharose 4 FF、グルタチオン、MonoQおよびSephadex G-25プレバック型カラムはAmersham Biosciencesに由来した。

Luria-Broth (LB)はPromega Corp.から提供を受けた。

#### 【0241】

##### 方法

PCR反応: DNA増幅はPromega Corp.提供の標準PCRバッファーを使用して行った。一般に、50 μl反応系は1x濃度のメーカー提供バッファー、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、125 μM dATP、125 μM dCTP、125 μM dGTP、125 μM dTTP、0.10-1.0 μM順方向および逆方向プライマー、5U Am

10

20

30

40

50

pliTaq (登録商標) DNAポリメラーゼおよび<1ng標的DNAを含む。特に断らない限り、DNA増幅のサーマルプロファイルは35サイクル×(94 で0.5分、55 で1分、および72 で1分)であった。

【0242】

DNA配列分析: ジデオキシ法(Sanger et al., 1977)とPerkin-Elmer Model 310 DNAシーケンサーを使用するDNA配列分析によりすべてのクローンを確認した。

【0243】

SDS-PAGE: タンパク質は試料バッファー(1%SDS、10%グリセロールおよび1.0mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、pH 6.8; Promega)中で可溶化し、5分間煮沸し、SDS-PAGE(4-20%グラジエントゲル; BioWhittaker Molecular Applications)電気泳動で分離した。ゲルをク  
10  
マシーブルー(Promega)で染色してウェスタンブロット法で分析するか、蛍光イメージャー(日立、日本)により、評価対象の各蛍光団に対応した適正な $E_{ex}/E_{em}$ で分析した。

【0244】

ウェスタンブロット法: XcellIIIIBlotモジュール(Invitrogen)を用いてタンパク質のニトロセルロース膜(0.2  $\mu$ m; Schleicher & Schuell, Germany)への電気泳動的転写を25mMトリス塩基/188mMグリシン(pH 8.3)、20%(v/v)メタノール中で80mAの定電流(4 )より2.0時間行った。ニトロセルロース膜をTBSTバッファー(10mMトリス塩酸、150mM NaCl、pH 7.6; 0.05% Tween 20添加)で洗浄し、ブロッキング液(3%粉乳または1%BSA/TBSTバッファー)に浸して室温で30分間、または4 で終夜、インキュベートした。次いでニトロセルロース  
20  
膜を50mlのTBSTバッファーで洗い、抗FLAG<sup>R</sup>モノクローナル抗体M2(希釈1:5,000)、抗Reni IIaルシフェラーゼモノクローナル抗体(希釈1:5,000)、またはHRP標識ストレプトアビジン(希釈1:10,000)と室温で45分間インキュベートした。次いでニトロセルロース膜をTBSTバッファーで洗った(50ml、5分間、3回)。抗体によるプローブをすでに済ませたニトロセルロース膜をHRP標識ロバ抗マウスIgGでインキュベートし(30分間、室温)、次いで洗浄手順を繰り返した。タンパク質の可視化には改良化学発光(ECL)システム(Pharmacia-Amersham)をメーカー説明書に従って用いた。タンパク質の定量にはコンピューター援用濃度計を用いた。

【0245】

タンパク質濃度: タンパク質定量はPierce BCA Proteinアッセイ(Pierce, Rockford, IL)のマイクロタイタープロトコールにより、ウシ血清アルブミン(BSA)を標準として使用  
30  
して行った。

統計分析: データは4連実験に由来する平均値  $\pm$  標準誤差(SEM)として表記したが、これは同様の結果を示す少なくとも3回の独立実験を代表する。統計的有意性はスチューデントのt検定により評価し、 $p < 0.05$ なら有意とみなした。

【0246】

細菌細胞: *Rhodococcus rodochorus* (DhaA)を入れたpET-3aを含むDha5 細胞の当初ストックはDr. Clifford J. Unkefer (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM)より提供を受けた(Schindler et al., 1999; Newman et al., 1999)。細菌はPromega提供のプレミックス試薬を使用してLB培地で培養した。*E. coli* BL21( DE3) pET3aの冷凍  
40  
ストック(10%グリセロールに浸して-80 で保存)を使用してアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)添加Luria-Bertani寒天平板に植菌した(Sambrook et al., 1989)。単一コロニーを選択し、アンピシリン(50  $\mu$ g/ml)添加Luria-Bertani培地10mlへの植菌に使用した。細胞を8時間、37 で振とう(220rpm)培養し、次いで2mlを分取し、アンピシリン(50  $\mu$ g/ml)添加Luria-Bertani培地50ml  $\times$  2への植菌に使用し、それを37 で終夜、振とう培養した。この培養液10mlをアンピシリン添加Luria-Bertani培地0.5L  $\times$  2への植菌に使用した。培養液が $A_{600} = 0.6$ に達したら、イソプロピル-1- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(IPTG)を添加して終濃度を0.5mMとし、培養液をさらに4時間、振とうしながら30 に維持した。次いで細胞を遠心で回収し、10mM Tris-SO<sub>4</sub>、1mM EDTA、pH 7.5で洗浄した。細胞ペレットは-70 で保存し細胞溶解に回した。

【0247】

10

20

30

40

50

哺乳動物細胞：CHO-K1細胞(ATCC-CCL61)をHam's F12栄養素とDulbecco's改良最小必須培地の1:1混合培地[10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mlペニシリンおよび100mg/mlストレプトマイシンを添加]により95%空気+5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で培養した。

【0248】

ラット(E18)海馬初代培養神経細胞を次の要領で単離した。要するに、Dr. Brewer (Southern Illinois University)より提供を受けたHibernate(登録商標)E培地(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA)中の胎児(E18)ラット海馬の断片を解離し、ポリ-D-リシンコート(0.28mg/cm<sup>2</sup>; Sigma)ガラス/プラスチック器具上にまき、B27添加無血清Neurobasal(登録商標)培地(NB27, GIBCO)中で培養した。培地は2-3日おきに完全に交換した。

【0249】

トランスフェクション：種々のタンパク質の一時的発現を調べるため、35mm培養皿または24ウェルプレートに細胞をまいた。約80-90%コンフルエンスで、細胞をリポフェクタミン/DNA/抗生物質無添加培地の混合体と、メーカー(GIBCO)の説明書に従って、接触させた。翌日培地を新鮮培地と交換して、細胞を種々の期間にわたり増殖させた。

【0250】

蛍光：96ウェルプレート中の細胞内の蛍光を蛍光プレートリーダー-CytoFluorII(Beckman)により、特定の蛍光団に対応した適正なE<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub>(たとえばカルボキシテトラメチルローダミンのE<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub>は540/575nmである)で測定した。

【0251】

## 実施例 I I

### DhaA系係留システム

#### A. 野生型および変異DhaAタンパク質とその融合体

Rhodococcus rhodochrous由来ハロアルカンデハロゲナーゼ遺伝子dhaAがコードする単量体33kDa酵素は、種々のハロアルカンの不可逆的加水分解を触媒する(Kulakova et al., 1997)、たとえば脂肪族および芳香族ハロゲン化合物(例：ハロC<sub>3</sub>-ハロC<sub>10</sub>)の炭素-ハロゲン結合を開裂させる。ハロアルカンデハロゲナーゼの作用メカニズムと構造については相当量の情報が得られる。DhaA酵素は293個のアミノ酸を含み、 $\alpha$ -ヒドロラーゼフォールドを含むタンパク質スーパーファミリーに属する(図2A)。Rhodococcus、XanthobacterおよびSphingomonasに由来するハロアルカンデハロゲナーゼの全体構造は類似しており、それぞれがハライド-炭素結合の開裂に関与する触媒残基3点セットを含む。DhaAではこれらの残基はAsp106、E130およびHis272である(Newman et al., 1999; 図2B)。図1A-BはDhaA酵素の全触媒機構を示す。基質に結合後、Asp残基のカルボキシレートによる基質への求核攻撃により、ハロゲン-炭素結合の開裂とアルキル-エステル中間体の形成が起こる(図1A)。デハロゲナーゼ反応経路の次のステップは、活性部位His残基により活性化される水分子による該中間体エステルの加水分解である(図1B)。触媒His残基は共有結合中間体の脱アルキル化塩基触媒であるが、活性部位Aspの最初の求核攻撃には必ずしも不可欠ではない。重要な触媒His残基を欠くタンパク質変異体はアルキル化半反応を起こし、以って安定した、共有結合エステル中間体を生成することが判明している(Pries et al., 1995)。

【0252】

基質がDhaAに結合してES複合体を形成し、その後にAsp106による求核攻撃によりエステル中間体が形成され、次いでHis272により活性化されたH<sub>2</sub>Oが該中間体を加水分解し、生成物を触媒中心から放出するというところらしい。触媒His272残基の点突然変異がDhaAの酵素活性を損なうことでこのタンパク質への機能性基(FG)の共有結合的係留を可能にするかどうかを調べるために、変異DhaAを合成した。

【0253】

#### 材料と方法

変異DhaAベクターを作製するために、4プライマー重複伸張法に基づくPromegaのin vitro変異誘発キットを使用してDhaA.H272F/A/GまたはH変異を生成させた。外部プライマーはオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

## 【化5 1】

5'-

GCTTCACTTGTTCGTCATCGTCCTTGTAGTCA-3' (SEQ ID NO:1) 及び5'-

GCTTCACTTGTTCGTCATCGTCCTTGTAGTCA-3' (SEQ ID NO:2),

であり、また内部変異誘発プライマーは次のとおりであった：

## 【化5 2】

H272F (5'-

CCGGGATTGTICTTACCTCCAGGAAGAC-3'), SEQ ID NO:3), H272A (5'-CCGGGATTGGCCTACCTCCAGGAAGAC-3'; SEQ ID NO:4), H272G (5'-CCGGGATTGCAGTACCTCCAGGAAGAC-3'; SEQ ID NO:5), 及びH272Q(5'-CCGGGATTGGGGCTACCTCCAGGAAGAC-3'; SEQ ID NO:6)

(下線部分が変異コドン)。変異デハロゲナーゼ遺伝子をpET-3aベクター中にサブクローニングした。変異デハロゲナーゼを過剰発現させるために、pET-3aベクターをコンピテントE. coli BL21 (DE3)に導入した。クローン中のDhaA配列をDNA配列分析で確認した。特に断らない限り、DhaA.WTおよびDhaA.H272Fタンパク質は一般にN末端にGSTを、C末端にFLAGエピトープを、それぞれ含む。

## 【0 2 5 4】

適当なDhaAコード領域をpGEX5x3ベクターのSalI/NotI部位にクローニングすることで、GST-DhaA(WTまたはH272F/A/G/H変異体)融合体カセットを構築した。2つのプライマー

## 【化5 3】

(5'-

ACGCGTCGACGCCGCCATGTCAGAAATCGGTACAGGC-3' 及び5'-

ATAAGAATGCGGCCGCTCAAGCGCTTCAACCGGTGAGTGCGGGGAGC

CAGCGCGC-3'; それぞれSEQ ID NOs:7と8)

を設計して、DhaAの5'コード領域にSalI部位とKozakコンセンサス配列を付加し、DhaAの3'コード領域にNotI、EcoR47III およびAgeI制限部位ならびに終止コドンを付加し、以ってDhaA(WTまたは変異)鑄型から897bp断片を増幅するようにした。得られた断片はpGEX5x3ベクターのSalI/NotI部位に挿入した。これはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子、Xa因子切断部位をコードする配列、およびマルチクローニング部位(MCS)とそれに続く終止コドンを含むベクターである。

## 【0 2 5 5】

次に、pGEX5x3ベクターのAgeI/EcoR47III 制限部位にFlagコード配列を挿入した。この6ヌクレオチドAgeI部位とは11アミノ酸ペプチドに対応する配列がインフレームであるが、そのうちの8アミノ酸ペプチドがFlagペプチド(Kodak Imaging Systems, Rochester, NY)に対応する。このFlag (Kodak Imaging Systems, Rochester, NY)ペプチドをコードする2つの相補オリゴヌクレオチド

## 【化54】

(5'-

CCGGTGACTACAAGGACGATGACGACAAGTGAAGC-3', センス SEQ ID  
 NO:9, 及び5'-GCTTCACTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCA-3', アンチセンス,  
 SEQ ID NO:10)

をアニールした。アニールしたDNAは5'にAgeI部位を、また3'にEcoR47111部位を、それぞれ有した。該DNAをAgeIとEcoR47111で消化し、次いでGST-DhaA.WTまたはGST-DhaA.H272F変異体コンストラクトへ、AgeIおよびEcoR47111部位でクローニングした。遺伝子融合体コンストラクトはすべてDNA配列分析で確認した。特に断らない限り、DhaA.WTまたDhaA.H272Fタンパク質は一般にN末端にGSTを、またC末端にFLAGを、それぞれ含む。

## 【0256】

DhaA融合タンパク質を生成させるために、培養液が600nmでの光学密度=0.6に達したときにイソプロピル-b-D-チオガラクトピラノシドを(終濃度0.5mMで)添加して酵素の発現を誘導した。細胞はバッファ-A(10mM Tris-SO<sub>4</sub>、1mM EDTA、1mM β-メルカプトエタノール、および10%グリセロール、pH 7.5)に回収し、Vibra Cell(登録商標)超音波細胞溶解装置(Sonics & Materials, Danbury, CT, USA)で処理した。細胞残屑は19,800 × gで1時間の遠心で除去した。粗抽出物をGSS-Sepharose 4高流速カラム(Amersham Biosciences; Piscataway, NJ)で、メーカーの説明書に従って、さらに精製した。GST-DhaA融合タンパク質を含む溶出画分をプールし、10mM Tris-SO<sub>4</sub>バッファ(20mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>と1mM EDTA-Na<sub>2</sub>を添加)に対して、終夜、4℃で透析し、-20℃で保存し用時に備えた。DhaA(WTまたは変異体)を生成させるために、融合タンパク質からGSTをXa因子で切断し、生成物をGSS-Sepharose 4高流速カラム(Amersham Biosciences)でメーカーの説明書に従って精製した。タンパク質の均一性はSDS-PAGEで検証した。実験によっては、Newman et al. (1999)で開示されている要領で、45-70%飽和硫酸アンモニウムを使用して無細胞抽出液を分画した。

## 【0257】

結果

図3はDhaA.WT(レーン1)およびDhaA.H272F(レーン2)融合タンパク質の、ロバストな、IPTG誘導産生を示す。さらに、これらのタンパク質は可溶性であり、グルタチオン-Sepharose 4FFで効率的に精製することができた(レーン5~10: 奇数レーンはDhaA.WTに、偶数レーンはDhaA.H272Fに、それぞれ対応する)。該融合タンパク質をXa因子で処理すると結果的に2つのタンパク質、GSTとDhaA(WTまたはH272F変異体; それぞれ11、12レーン)が形成されるので、GSTはグルタチオン-Sepharose 4FFで効率的に除去した(WTまたは変異体; それぞれ13、14レーン)。また、タンパク質はみな分子量が予想通りであった。

## 【0258】

B. DhaAのCl-アルカン加水分解能を損なうH272の変異

この係留システムでは、酵素が酵素反応生成物を周辺培地に放出する能力を欠くことが最も重要である。こうした能力の欠如は該酵素の加水分解能の著しい低下から検出することができる。

DhaA(WTまたは変異体)のCl-アルカン加水分解能に対する点突然変異の効果を調べるには、Hollway et al. (1998)が開示しているpH指示薬を使用した。

## 【0259】

材料と方法

pH指示薬用の反応バッファは1mM HEPES-SO<sub>4</sub>(pH 8.2)、20mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および1mM EDTAからなった。フェノールレッドを加えて終濃度を25 μg/mlとした。ハロゲン化合物を加えて、上限の脱ハロゲン化反応速度を実現するに足る基質の溶存分が確保されるような見かけ濃度とした。基質-バッファは30秒間激しくボルテックスし、基質の著しい蒸発を防ぐために蓋をし、また1-2時間以内に使用した。各速度論的定量に先立って、フェノール

レッドを標準HCl溶液で滴定して見かけの吸光係数を与えた。DhaAに関する定常状態の反応速度定数をBeckman Du640分光光度計(Beckman Coulter, Fullerton, CA)により室温下、558nmで求めた。反応速度定数は初期速度からコンピュータプログラムSigmaPlotを使用して計算した。1単位の酵素活性は特定条件下で1.0mM-基質/分を脱ハロゲン化するための所要量として定義する。

【0260】

#### 結果

図4に示すように、0.1mg/mlの酵素と10mMの基質をpH 7.0-8.2で使用すると、4変異体のいずれでも触媒活性が見られなかった。これらの条件下では、野生型酵素は1-Cl-ブタンに対して5単位/mg-タンパク質の活性を有した。従って、変異体の活性は700分の1以下に低下したことになる。

10

【0261】

DhaA(WTまたは1変異体)を発現するE. coliから得られた一定分量の上清を過剰濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で処理した。タンパク質は各濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と(4 で)2時間接触させ、遠心でペレット化し、バッファ-Aに対して終夜透析し、SDS-PAGEで分離した。

【0262】

図5に示すように、DhaA.WTおよびDhaA.H272F変異体の主要画分を45-70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で沈殿させた。低濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ではこれらのタンパク質の沈殿は観測されなかった。一方、DhaA.H2722Q、DhaA.H272G、DhaA.H272Aの各変異体は10%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で沈殿させることができた。これはDhaA.H2722Q、DhaA.H272G、DhaA.H272Aの各変異体の物理化学的性質の有意の変化を強く示唆する。それと同時に、DhaA.H272F変異はこれらのパラメーターに有意の効果を及ぼさなかった。これらのデータは、DhaAの3D構造に対する変異の効果に関するコンピュータモデリングの結果ともよく一致しており、試験したすべての変異体の中でDhaA.H272F変異だけが予測3Dモデルに有意の効果を及ぼさないことを示唆する(図2参照)。これらの結果に基づき、DhaA.H272Fをさらなる実験対象として選んだ。

20

【0263】

共有結合付加体を形成するには、Cl-アルカンの塩素原子はDhaA(WTまたは変異体)の触媒アミノ酸に近接する可能性が高い(図2A-B)。DhaAの結晶構造(Newman et al., 1999)は、これらのアミノ酸がDhaAの触媒ポケット(長さ約10、断面積約20<sup>2</sup>)の内側深くに位置することを示している。機能性基を含むDhaA基質中の反応性基がDhaAの触媒ポケットの中に入れるようにするため、含Cl基質を機能性基と結合させて該機能性基が触媒ポケットの外側に位置してDhaAの3D構造を乱す/壊すことがないようにするためのリンカーを設計した。

30

【0264】

DhaAが長い疎水性炭素鎖をもつCl-アルカンを加水分解しうるかを判定するため、DhaA.WTを種々のCl-アルカンアルコールと接触させた。図6に示すように、DhaA.WTは炭素原子数4~10の1-Cl-アルカンアルコールを加水分解することができる。さらに、Cl-アルカンの初期加水分解速度(IRH)は炭素鎖の長さとは反比例の関係にあった。ただし、長鎖Cl-アルカンの水性バッファに対する可溶性は酵素-基質相互作用の効率に影響を及ぼす可能性がある。実際、図6に示すように、1-Cl-アルカン-10-デカノールのIRHは1-Cl-デカンのIRHを大幅にしのご。さらに重要なことに、これらのデータはDhaAが比較的極性の高い基(HO-基など)を含むCl-アルカンを加水分解しうることを示している。

40

【0265】

様々な鎖長および/または疎水性のリンカーをもつカルボキシフルオレセイン修飾Cl-アルカンを合成した(図7)。DhaA.WTは、比較的かさ高い機能性基(カルボキシフルオレセイン)をもつCl-アルカン、リンカーの長さが12原子以上である場合に、効率的に加水分解した。試験したいずれのCl-アルカンでもDhaA.H272F/A/G/Q変異体の活性は検出されなかった(データは非表示)。加えて、Cl原子に近接する $(\text{CH}_2)_6$ 領域の修飾は14原子リンカーのDhaA.WTによるIRHを著しく低下させる結果となった。それにもかかわらず、該リンカーの長さや構造がヒドロラーゼの触媒部位と適合するとすれば、本発明の基質中にリンカーが

50

存在しても反応への影響はほとんどない。

【0266】

試料の一部は自動HPLC(Hewlett-Packard Model 1050)システムで分析した。DAD検出装置で紫外-可視スペクトルを200-600nm範囲にわたって記録した。蛍光は、カルボキシフルオレセイン修飾基質については480/520nmに、またカルボキシテトラメチルローダミン修飾基質については540/575nmに、それぞれ等しい $E_{ex}/E_{em}$ で検出した。Cl-アルカンのエタノール抽出物またはCl-アルカン加水分解生成物を、分析用逆相 $C_{18}$ カラムにより10mM酢酸アンモニウム(pH 7.0):ACN (アセトニトリル)の25:75 1:99(v/v)リニアグラジエントを30分間にわたり1.0ml/分でかけて分析した。分離化合物の定量は回収したピークの積分表面に基づいた。

【0267】

図8Aは基質と反応生成物の完全分離を示す。図8BはDhaA.WTがカルボキシフルオレセイン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clを極めて効率的に加水分解したことを示す。同様の結果は、基質としてカルボキシテトラメチルローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clまたは5-カルボキシ-X-ローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Clを使用した場合にも得られた(データ非表示)。総合すれば、これらのデータは、DhaA.H272F変異によるDhaA触媒活性の完全喪失を示すpH指示薬系アッセイの結果を裏付ける。

【0268】

C. DhaA変異体への機能性基のin vitro共有結合的係留

材料と方法

タンパク質のMALDI分析はUniversity of Wisconsin Biotechnology Centerで、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析装置Bruker BiflexIII (Bruker, USA)を使用して行った。試料の合成では、100  $\mu$ gの精製DhaA(WTまたはH272F変異体)またはGST-DhaA (WTまたはH272F変異体)融合タンパク質(約90%の均一性に精製)を200  $\mu$ lのバッファー(1mM HEPES-SO<sub>4</sub>, pH 7.4, 20mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および1mM EDTA)に加え、基質(カルボキシフルオレセイン- $C_{10}H_{21}NO_2$ -Cl、終濃度1.0mM)と共に/または抜きで、室温で15分間インキュベートした後、反応混合体を4 で終夜、20mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(pH 7.0)に対して透析し、タンパク質およびタンパク質-基質複合体のM/Z値を求めた。

DhaA.D106変異体の合成に使用したオリゴヌクレオチドは次のとおりである:

【化55】

DhaA.D106C:

5'-CTTGGGTTTGGGAAGAGGTCGTCCTGGTCATCCACTGCTGGGGC-3'

(SEQ ID NO:13) 及び5'-

TGAGCCCCAGCAGTGGATGACCAGGACGACCTCTTCCAAACC-3' (SEQ

ID NO:14);

DhaA.D106Q:

5'-CTTGGGTTTGGGAAGAGGTCGTCCTGGTCATCCACCAGTGGGGC-3'

(SEQ ID NO:34) 及び5'-

TGAGCCCCACTGGTGGATGACCAGGACGACCTCTTCCAAACC-3' (SEQ

ID NO:35);

10

20

30

40

## 【化56】

DhaA.D106E:

5'-CTTGGGTTTGGAAAGAGGTCGTCCTGGTCATCCACGAATGGGGC-3'

(SEQ ID NO:52) 及び 5'-

TGAGCCCCATTCGTGGATGACCAGGACGACCTCTTCCAAACC-3' (SEQ

ID NO:53); 及び

DhaA.D106Y:

5'-CTTGGGTTTGGAAAGAGGTCGTCCTGGTCATCCACTACTGGGGC-3'

(SEQ ID NO:54) 及び 5'-

TGAGCCCCAGTAGTGGATGACCAGGACGACCTCTTCCAAACC-3' (SEQ

ID NO:55).

10

。アニールしたオリゴヌクレオチドは5'末端にStyl部位を、また3'末端にBlpl部位を、含んだ。アニールしたオリゴヌクレオチドをStylとBlplで消化し、DhaA.WTまたはDhaA.H272FのStylおよびBlpl部位にクローニングした。変異体はすべてDNA配列分析で確認した。

20

## 【0269】

## 結果

DhaA.H272変異体は機能性基+Cl-アルカンに結合しうることを確認するため、これらの変異体またはそのGST融合体ならびに対応する野生型タンパク質または融合体をカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、5-カルボキシ-X-ローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたはビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clと15分間、室温で接触させた。次に、これらのタンパク質をSDS-PAGEで分離した。タンパク質を含むゲルをカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたは5-カルボキシ-X-ローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clとインキュベートし蛍光イメージャー(日立/日本)により、各蛍光団に対応する適正なE<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub>で分析した。ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clとインキュベートしたタンパク質を含むゲルはニトロセルロース膜に転写し、HRP標識ストレプトアビジンでプローブした。

30

## 【0270】

図9に示すように、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl(パネルAのレーン1および2)、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl(パネルAのレーン3および4)および5-カルボキシ-X-ローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl(パネルAのレーン5および6)はDhaA.H272Fには結合したが(パネルAのレーン2、4および6)、DhaA.WTには結合しなかった(パネルAのレーン1、3および5)。ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClはDhaA.H272Fには結合したが(パネルBのレーン9~14)、DhaA.WTには結合しなかった(パネルBのレーン1~8)。そのうえ、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClのDhaA.H272Fへの結合(パネルBのレーン9~14)は用量依存的であり、また0.2 μMで検出することができた。さらに、基質とDhaA.H272Fとの結合はSDSによる煮沸でも壊せず、きわめて強力であった。

40

## 【0271】

試験したすべてのDhaA.H272変異体すなわちDhaA.H272 F/G/A/Qはカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clに結合した(図10)。さらに、DhaA.H272変異体は基質を極めて特異的に結合する。というのは、変異体を基質の1つ(ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl)で予め処理すると、別の基質(カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl)の結合が完全に阻止されたからである。

## 【0272】

Cl-アルカンとDhaA.H272F変異体(またはGST-DhaA.H272F変異体の融合タンパク質)との

50

結合の性質を調べるため、これらのタンパク質をカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clと共に/または抜きでインキュベートし、MALDIで分析した。図11に示すように、DhaA.H272Fとカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clとの結合は強力である。そのうえ、ES複合体の分析からは、基質(例:カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl)とDhaA.H272Fとの結合の共有結合的な性質が判明した。MALDI-TOF分析もこの基質/タンパク質付加体が1:1の関係で形成されることを裏付けている。

#### 【0273】

触媒3点セットの別の残基、すなわち残基106におけるDhaA変異体を合成した。野生型DhaAの残基106は周知の求核アミノ酸残基の1つ、Dである。DhaAの残基106のDはD以外の求核アミノ酸残基たとえばC、YおよびEと置換したが、それは野生型DhaAと基質との結合よりも安定した結合を基質と形成する可能性がある。特に、システインはシステイン系酵素の周知の求核剤であり、該酵素は水を活性化しないことが知られている。

#### 【0274】

対照変異体DhaA.D106Q、シングル変異体DhaA.D106C、DhaA.D106YおよびDhaA.D106E、それにダブル変異体DhaA.D106C:H272F、DhaA.D106E:H272F、DhaA.D106Q:H272FおよびDhaA.D106Y:H272Fを、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clへの結合の点から分析した(図12)。図12に示すように、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClはDhaA.D106C、DhaA.D106C:H272F、DhaA.D106E、およびDhaA.H272Fに結合した。従って、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clと変異体DhaAの残基106でのシステインまたはグルタミン酸との結合は、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClとDhaA.WTとの間で形成される結合よりも安定的である。残基106における他の置換もまた単独で、またはDhaAの他残基における置換と組み合わせると、類似の結果を生じる可能性がある。さらに、残基106におけるある種の置換は単独で、またはDhaAの他残基における置換と組み合わせると、ある種の基質だけを相手に結合を形成する変異DhaAを生じる可能性がある。

#### 【0275】

### 実施例 I I I

#### 本発明の変異DhaAと基質とを介した固体担体へのルシフェラーゼの係留

#### 材料と方法

ミリスチン酸付加ペプチドコード配列(MAS)を含むpCIneoベクターのNheI/SaII部位にphRLucコード領域をクローニングして、phRLuc-コネクター-DhaA.WT-FlagおよびphRLuc-コネクター-DhaA.H272F-Flag融合体カセットを構築した。2つのプライマー

#### 【化57】

(5'-

GCTTCACTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCA-3'; SEQ ID NO:11)及び(5'-

GCTTCACTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCA-3'; SEQ ID NO:12)

を設計して、NheIおよびSaII部位をphRLucの5'および3'コード領域にそれぞれ付加し、phRLuc鑄型から900bp断片を増幅するようにした(pGL3ベクター、Promega)。次いで、ミリスチン酸付加ペプチドコード配列をNheIおよびSaII制限酵素で切り取り、phRLucを含む増幅断片をpCIneo.DhaA(WTまたはH272F)-FlagベクターのNheI/SaII制限部位に挿入した。各コンストラクトの配列はDNA配列分析で確認した。次にPromegaのTNT(登録商標) T7Quickシステムを使用して、融合タンパク質をin vitro生成させた。

#### 【0276】

#### 結果

DhaA.H272F-Cl-アルカンブリッジによる固体担体へのタンパク質の係留を明示するために、Renillaルシフェラーゼ(hRLuc、融合体のN末端)の融合タンパク質をコードするベクター、タンパク質コネクター(17アミノ酸、表I参照)、およびDhaA(WTまたはH272F変異体)

を用意した。次いでFlagエピトープをDhaAのC末端に融合させた。

【0277】

【表2】

表1

融合	配列	ペプチド・コネクター	
GST-DhaA	atcgaaggtcgtgggatccccaggaattcccggtcgacgccc (SEQ ID NO:26)	iegrgiprnsrvdaa (SEQ ID NO:27)	10
GFP-DhaA	tccggatcaagcttgggacgacgaggtggacggcggcccttagagcc acc (SEQ ID NO:28)	sgsslgdevdggpsrat (SEQ ID NO:29)	
DhaA-Rluc	accggttccggatcaagcttgcggtaccgccccttagagcc (SEQ ID NO:30)	tgsgsslryrgpsra (SEQ ID NO:31)	
Rluc-DhaA	tccggatcaagcttgcggtaccgccccttagagccgctcgacgccc cc (SEQ ID NO:32)	sgsslryrgpsravdaa (SEQ ID NO:33)	
DhaA-Flag	Accggt	Tg	20

【0278】

SDS-PAGEとそれに続くウェスタンブロット法による分析により、タンパク質は所期の分子量となり、また抗R.Lucおよび抗Flag<sup>R</sup> M2抗体によって認識されたことが判明した。加えて、諸々の融合タンパク質はRenillaルシフェラーゼ活性をもっていた(PromegaのRenilla Luciferase Assay Systemで、PBS pH 7.4バッファー中で測定)。

【0279】

DhaA.H272F-CI-アルカンブリッジによる固体担体へのタンパク質の係留は、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-CIを基質として、またストレプトアビジン(SA)コート96ウェルプレート(Pierce, USA)を固体担体として、それぞれ使用して示した。翻訳されたタンパク質をビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-CI基質(終濃度25 μM)と、室温で60分間接触させた。未結合ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-CIをSephadex G-25プレパックカラム(Amersham Biosciences)によるゲルろ過で除去した。収集したR.Luc-コネクター-DhaA融合体画分をSAコート96ウェルプレート中に室温で1時間置き、未結合タンパク質を洗い流し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0280】

図13Aはプレートに捕捉されたRenillaルシフェラーゼの活性を示す。これらのデータの分析から、変異DhaAを含む融合体だけが捕捉されたと判明した。捕捉効率はきわめて高かった(プレートに添加されたRenillaルシフェラーゼ活性の50%あまりが捕捉された)。それに対して、DhaA.WTおよびRenillaルシフェラーゼを含む融合体の捕捉効率はほんのわずか(<0.1%)であった。R.Luc-コネクター-DhaA.H272Fを非ビオチン化基質(カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-CI)で予め処理すると、捕捉効率は約80%低下した。さらに、非ビオチン化基質による予備処理はR.Luc-コネクター-DhaA.WTまたはRenillaルシフェラーゼの捕捉に対しては効果がなかった。

総合すれば、これらのデータは活性酵素(例: Renillaルシフェラーゼ)を本発明の基質の一部(CI-アルカン-DhaA.H272F-ブリッジ)をなす固体担体に係留し、酵素活性を維持させることを示す。

【0281】

実施例 I V

in vivo変異DhaA/基質系A. 原核生物と真核生物での、DhaA変異体への機能性基のin vivo共有結合的係留材料と方法

原核生物で発現した変異ヒドロラーゼへの本発明の基質の結合を調べるために、E. coli細胞BL21( DE3)pLys65をpGEX-5X-3.DhaA.WT-FlagまたはpGEX-5X-3.DhaA.H272F-Flagで形質転換し、液体培養で増殖し、IPTGで誘導した。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたはビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを誘導細胞に添加した(終濃度25 μM)。1時間後、細胞を回収し、冷PBS(pH 7.3)で洗い、超音波破碎し、19,800 × gで1時間遠心して分画した。可溶性画分をSDS-PAGEにかけた。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで処理した細胞から分離されたタンパク質を含むゲルを蛍光イメージャーで分析し、また

10

## 【0282】

哺乳動物細胞でのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの結合を調べるために、pGEX-5X-3.DhaA.WT-FlagまたはpGEX-5X-3.DhaA.H272F-FlagからそれぞれDhaA.WT-FlagおよびDhaA.H272F-Flagコード領域を切り取り、ゲル精製し、pCIneo.CMVベクター(Pro-mega)のSalI/NotI制限部位に挿入した。これらのコンストラクトはDNA配列分析で確認した。

## 【0283】

CHO-K1細胞を24ウェルプレート(Labsystems)にまき、pCIneo.CMV.DhaA.WT-FlagまたはpCIneo.CMV.DhaA.H272F-Flagベクターでトランスフェクトした。24時間後、培地を、25 μMのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中に60分間置いた。インキュベーション終了後、培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗い(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)、細胞を試料バッファー(1%SDS、10%グリセロールなど; 250 μl/ウェル)中で可溶化した。SDS-PAGE(4-20%グラジエントゲル)でタンパク質(10 μl/レーン)を分離し、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの結合を蛍光イメージャー(日立/日本)により、540/575nmに等しいE<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub>で検出した。

20

## 【0284】

結果

図14AおよびBは、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl(A)およびカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl(B)のE. coliタンパク質へのin vivo結合を示す。図14Aの低分子バンドはHRP標識SAによる識別が可能なE. coliタンパク質であり、パネルB下部の被検出蛍光は遊離したカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの蛍光であった。図15はカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの真核細胞タンパク質へのin vivo結合を示す。

30

## 【0285】

図14および図15の分析から、DhaA.H272F-Flag変異体はカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたはビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clをin vivoで結合するが、DhaA.WT-Flagはそうでないことが判明した。そのうえ、DhaA.H272F-Flagと基質の結合はきわめて強かった(おそらく共有結合)、というのはSDSによる煮沸とそれに続くSDS-PAGEでも該変体と基質の結合は壊れなかったからである。

40

## 【0286】

B. 本発明の基質の細胞膜透過性材料と方法

CHO-K1細胞(ATCC-CCL61)をHam's F12栄養素とDulbecco's改良最小必須培地の1:1混合培地[10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mlペニシリンおよび100mg/mlストレプトマイシンを添加]により95%空気+5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37 °Cで培養した。

## 【0287】

種々の基質の取り込みを調べるために、細胞をLT-11チャンバー(Nunc)または96ウェルプレート(Labsystems)に30,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度でまいた。翌日、培地を種々の濃度の基質

50

を含む培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し2、5または15分間置いた。インキュベーション終了後、基質を含む培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗った(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)。次いで新鮮培地を細胞に加え、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター(37 )に戻した。96ウェルプレート内の細胞の蛍光レベルを蛍光プレートリーダー-CytoFluor II(Beckman)により、カルボキシフルオレセイン-およびカルボキシテトラメチルローダミン-修飾基質にそれぞれ対応する480/520nmおよび540/575nmに等しいE<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub>で計測した。細胞の蛍光画像は、FITCおよびカルボキシテトラメチルローダミンに対応するフィルターセットを備えた倒立落射蛍光顕微鏡Axiovert-100 (Carl Zeiss)で撮影した。

【0288】

#### 結果

図16に示すように、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl で処理(25 μM、37 で5分間)したCHO-K1細胞は、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを短時間で効率的に取り込ませることができた。画像分析により蛍光色素は細胞膜を通過したことが判明した。図16はまたカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clが細胞から効率的に洗い落とせることも示している。総合すると、これらのデータはCHO-K1細胞の細胞膜がカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl透過性であることを示している。

【0289】

一方、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl のほうはCHO-K1細胞を予め高濃度(すなわち100 μM)のカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで、ずっと長い時間(60分)処理しても、細胞膜を通過しなかった(データ非表示)。従って、該細胞膜の本発明の様々な基質(たとえばカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clやカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl)に対する透過性の差異は、細胞表面で発現するタンパク質と細胞内で発現するタンパク質を別々の蛍光団で標識するという独特の機会をもたらし、従って二重処理(biplexing)を可能にする。

【0290】

#### 実施例 V

##### in vivo細胞画像化のためのDhaA系係留

##### A. 生きた哺乳動物細胞中のGFPとカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの共局在

##### 材料と方法

GFP-DEVD-Rluc(h)をコードするPackardベクター(Packard #6310066)のRenillaルシフェラーゼ・コード領域をDhaA.WT-FlagまたはDhaA.H272F-Flagコード領域に置き換えることでGFP-コネクター-DhaA融合体カセットを構築した。2つのプライマー

【化58】

(5'-GGAATGGGCCCTCTAGAGCGACGATGTCA-3'; SEQ ID

NO:15, 及び5'-CAGTCAGTCACGATGGATCCGCTC AA-3'; SEQ ID

NO:16)

を設計して、ApaIおよびBamHI部位(下線で強調)をDhaAの5'および3'コード領域にそれぞれ付加し、pGEX-5X-3.DhaA.WT-FlagまたはpGEX-5X-3.DhaA.H272F-Flag鑄型から980bp断片を増幅するようにした。R.Lucコード領域をApaIおよびBamHI制限酵素で切り取った。次いでDhaAを含む980bp断片をGFP-DEVD-Rluc(h)コード化ベクターのApaI/BamHI部位に挿入した。遺伝子融合コンストラクトの配列はDNA配列分析で確認した。

【0291】

GFP-コネクター-DhaA.WT-FlagまたはGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagを一時的に発現する細胞をLT-11チャンパー(Nunc)に30,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度でまいた。翌日、培地を25 μM

10

20

30

40

50

のカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し60分間置いた。インキュベーション終了後、基質を含む培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗い(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)、新しい培地を細胞に加えた。細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し、60分後に細胞を素早くPBSで洗った(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)。細胞の蛍光画像を、GFPおよびカルボキシテトラメチルローダミンに対応するフィルターセットを備えた倒立落射蛍光顕微鏡Axiovert-100 (Carl Zeiss)で撮影した。

【0292】

#### 結果

図17の画像が示すように、GFP-コネクター-DhaA.WT-FlagまたはGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagでトランスフェクトした細胞は、GFPの発光特性を有するタンパク質のロバストな発現を示した。GFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagに対応するフィルターセットで撮影した同じ細胞の画像を分析すると、GFP-コネクター-DhaA.WT-Flagを発現する細胞は暗く、この融合タンパク質を発現しない細胞と区別できなかった。一方、GFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagを発現する細胞は非常に明るく、紛れようがなかった。

【0293】

GFP-コネクター-DhaA.WT-FlagまたはGFP-コネクター-DhaA.H272F-FlagベクターでトランスフェクトしたCHO-K1細胞に由来するタンパク質のウェスタンブロット分析では、これらの細胞が抗Flag抗体によって認識され、融合タンパク質に対応した所期分子量を有するタンパク質を発現したと判明した(データ非表示)。これらのタンパク質を含むSDS-PAGEゲルのフルオロスキャンは、カルボキシテトラメチルローダミンのGFP-コネクター-DhaA.H272F-Flagに対する強い/共有結合的な結合を、またGFP-コネクター-DhaA.WT-Flagに対する無結合を、それぞれ示した(図18)。

【0294】

#### B. DhaA.WT-FlagおよびDhaA.H272F-FlagにおけるDhaAの融合相手は機能性分子である

2つのタンパク質の融合が一方または両方のタンパク質の活性低下を招くかどうかを見るために、融合体のC末端またはN末端にDhaAを有し2タンパク質の間にコネクター配列たとえば13~17アミノ酸の配列を有するDhaA系融合タンパク質をいくつか合成した(表IIを参照)。データは融合体を構成する両タンパク質の機能活性が保たれたことを示す。

【0295】

【表3】

表II

N-末端タンパク質	コネクター	C-末端タンパク質	タンパク質#1の機能	タンパク質#2の機能
GST	+	DhaA. H272F	GSSカラムに結合	結合
GFP	+	DhaA. H272F	緑蛍光	結合
R. Luc	+	DhaA. H272F	コエレンテラジンの加水分解	結合
DhaA. H272F	+	R. Luc	結合	コエレンテラジンの加水分解
DhaA. H272F	+	Flag	結合	抗体により認識される

【0296】

#### C. Cl-アルカンの毒性

##### 材料と方法

Cl-アルカンの毒性を調べるために、CHO-K1細胞を96ウェルプレートに5,000細胞/ウェルの密度でまいた。翌日、培地を0~100 μM濃度のCl-アルカンを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し、種々の時間置いた。細胞生存率は、CellTiter-Glo (登録商標) Luminescence Cell Viability Assay (Promega)を使用しメーカーのプロトコールに従って、計測した。一般に、100 μlのCellTiter-Glo (登録商標) 試薬を細胞に直接添加し、DYNEX MLKマイクロタイタープレート照度計を使用して発光を10分(10 minutes)記録した。実験によっては、蛍光/発光干渉を防ぐために、蛍光Cl-アルカンを含む培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗って(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)から、CellTiter-Glo (登録商標) 試薬を添加した。対照実験は、この手順がCellTiter-Glo (登録商標) アッセイの感度または精度に何ら影響しないことを示した。

10

【0297】

結果

図19に示すように、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl は濃度100 μM (最高試験濃度)で4時間処理した後でもCHO-K1細胞に対して毒性を示さなかった。濃度6.25 μM(「最高無毒性濃度」)では、24時間後も毒性が検出されなかった。濃度>6.25 μMでは、CHO-K1細胞の相対発光が用量依存的に低下し、IC<sub>50</sub>は約100 μMであった。ピオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clは濃度100 μMで4時間処理した後でも毒性が検出されなかった。それに対してカルボキシ-X-ローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clは、1時間処理後にCHO-K1細胞内のRLUの低下が検出されたことから毒性効果が顕著であった。この効果のIC<sub>50</sub>値は約75 μMであり、濃度25 μMでは明らかなATPの低下が見られなかった。5-カルボキシ-X-ローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl毒性のIC<sub>50</sub>値と5-カルボキシ-X-ローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの最高無毒性濃度は時間依存的に低下し、それぞれ12.5 μMおよび6.25 μMとなった。

20

【0298】

D. カルボキシテトラメチルローダミンまたはDiAc-カルボキシフルオレセインを含む基質と固定剤とを接触させたCHO細胞内でのDhaA.D106Cの検出

8ウェルのチャンバースライド(German coverglass system)を使用して 10%FBSと1mMグルタミン酸を含む抗生物質無添加のDMEM:F12培地(Gibco)(増殖培地)にCHO細胞(ATCC、継代4)を低密度でまいた。2日後、倒立位相差顕微鏡で細胞を検査した。トランスフェクション試薬を添加する前に、次の2つの視覚的判定基準を確認した: 1)チャンパーあたりの細胞コンフルエンスは約60~80%であった; 2) >90%の細胞は接着性であり、扁平な形態像を示した。培地を150 μlの新鮮な、予温した増殖培地と交換し、細胞を約1時間培養した。

30

【0299】

トランスフェクションにはTransIt TKOシステム(Miris)を使用した。TKO脂質は無血清DMEM:F12培地100 μlあたり7 μlの脂質を加えて希釈し、次いで含脂質培地100 μlあたり1.2 μgのトランスフェクション用DhaA.D106C DNAを加えた。この混合体を室温で15分間インキュベートし、次いで25 μlを個別の培養チャンパーに分注した(0.3 μg DNA)。細胞をインキュベーターに戻して5~6時間置いてから、増殖培地で2回洗い、300 μlの新鮮培地を加え、次いで細胞をさらに24時間培養した。

40

【0300】

トランスフェクト細胞または非トランスフェクト対照細胞を12.5 μMのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたは12.5 μMのDiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clと10% FBS/DMEM中で30分間、37 °C、5%CO<sub>2</sub>条件下にインキュベートした。細胞を温増殖培地で3回洗い、300 μlの新鮮培地を加え、次いで細胞をさらに1時間培養した。

【0301】

増殖培地を温PBSと交換し、生細胞を可視化した。生細胞の可視化にはローダミンフィルターセット(励起フィルター=540、吸収フィルター=560LP)とフルオレセインフィルターセット(励起フィルター=490、吸収フィルター=520)とSpot CCDカメラとを備えたZeiss Axiovert 100倒立顕微鏡を使用した。画像は露出時間0.15~0.60秒、ゲイン設定4または16で記録した。

50

## 【0302】

カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識細胞とDiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識細胞の両方で、個々の、特異的に標識したトランスフェクト細胞が明白であった。大半の細胞は非トランスフェクト細胞であり、標識を保持しなかった。

## 【0303】

PBSを捨て、3.7%パラホルムアルデヒド/0.1%Triton添加PBS溶液で15分間、細胞を固定化した。この固定液を捨て、PBSを加え、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識細胞とDiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識細胞の両方について、2組目の画像を記録した。

10

## 【0304】

PBSを50%メタノール/PBSに交換し、細胞を15分間インキュベートし、次いで95%メタノール中でインキュベートした。3組目の画像を記録し、次いでメタノール:アセトン等量混合体を細胞に加え、15分間インキュベートした。培地をPBSに交換し、4組目の画像を記録した。

## 【0305】

結果は、基質のDhaA.D106C変異体への結合がパラホルムアルデヒドによる固定化と後に続く固定化細胞試料のメタノール/アセトン中の処理により安定したことを示す。さらに、これらの条件下ではカルボキシテトラメチルローダミンまたはカルボキシフルオレセインの蛍光輝度に変化がなかった。

20

## 【0306】

実施例 V I変異 -ラクタマーゼ(BlaZ)系係留

-ラクタム系抗生物質耐性を細菌に付与する酵素であるセリン- -ラクタマーゼはセリン残基(Ambler et al. (1991)のクラスAコンセンサス番号付け方式に従えばSer70)のヒドロキシル基を使用して広範囲の -ラクタム化合物を分解すると思われる。この反応は前共有結合的な出会い複合体(precovalent encounter complex)の形成に始まり(図20A)、高エネルギーのアシル化反応四面体中間体(図20B)を経て、一時的に安定なアシル-酵素中間体を形成して、触媒残基Ser70を介してエステルを形成する(図20C)。次いでアシル-酵素は加水分解水の攻撃を受けて(図20D)、高エネルギーの脱アシル化反応中間体(図20E)(Minasov et al., 2002)を形成し、それが崩壊して加水分解生成物を形成する(図19F)。該生成物は次いで放出され、遊離型酵素が再生される。セリンプロテアーゼの場合と同様に、この機構はセリン求核剤を活性化して基質のアミド結合を攻撃させ、またアシル-酵素中間体の形成後に、加水分解水を活性化して該付加体のエステル中心を攻撃させるようにするには、触媒塩基を必要とする。

30

## 【0307】

A. 変異 -ラクタマーゼとその融合体材料と方法

Dr. O. Herzberg (University of Maryland Biotechnology Institute)より、Staphylococcus aureus PC1 blaZ遺伝子(Zawadzke et al., 1995)を入れたプラスミドpTS32の提供を受けた。blaZ遺伝子の配列は次のとおりである：

40

## 【化59】

AGCTTACTAT GCCATTATTA ATAACCTAGC CATTCAACA  
 CCTTCTTTCA AATATTTATAATAAACTATT GACACCGATA  
 TTACAATTGT AATATTATTG ATTTATAAAA  
 ATTACAACGTGAATATCGGA GGGTTTATTT TGAAAAAGTT  
 AATATTTTTA ATTGTAATTG CTTTAGTTTTAAGTGCATGT  
 AATTCAAACA GTTCACATGC CAAAGAGTTA AATGATTTAG  
 AAAAAAATATAATGCTCAT ATTGGTGTTT ATGCTTTAGA  
 TACTAAAAGT GGTAAGGAAG TAAAATTTAATTCAGATAAG  
 AGATTTGCCT ATGCTTCAAC TTCAAAGCG ATAAATAGTG  
 CTATTTTGTTAGAACAAGTA CCTTATAATA AGTTAAATAA  
 AAAAGTACAT ATTAACAAAG ATGATATAGTTGCTTATTCT  
 CCTATTTTAG AAAAATATGT AGGAAAAGAT ATCACTTAA  
 AAGCACTTATTGAGGCTTCA ATGACATATA GTGATAATAC  
 AGCAAACAAT AAAATTATAA AAGAAATCGGTGGAATCAAA  
 AAAGTTAAAC AACGTCTAAA AGAACTAGGA GATAAAGTAA  
 CAAATCCAGTTAGATATGAG ATAGAATTAA ATTACTATTC  
 ACCAAAGAGC AAAAAAGATA CTTCAACACCTGCTGCCTTC  
 GGTAAGACCC TTAATAAACT TATCGCCAAT GGAAATTAA  
 GCAAAGAAAACAAAAAATTC TTAATTGATT TAATGTTAAA  
 TAATAAAAGC GGAGATACTT TAATTAAAGACGGTGTCCA  
 AAAGACTATA AGGTTGCTGA TAAAAGTGGT CAAGCAATAA

10

20

30

## 【化60】

CATATGCTTCTAGAAATGAT GTTGCTTTTG TTTATCCTAA  
 GGGCCAATCT GAACCTATTG TTTTAGTCATTTTACGAAT  
 AAAGACAATA AAAGTGATAA GCCAAATGAT AAGTTGATAA  
 GTGAAACCGCCAAGAGTGTA ATGAAGGAAT TTTAATATTC  
 TAAATGCATA ATAAATACTG ATAACATCTTATATTTTGTA  
 TTATATTTTG TATTATCGTT GAC (SEQ ID NO:36).

40

## 【0308】

blaZ遺伝子に点変異を導入し、またblaZコード領域をpGEX5x3ベクターのSalI/AgeI部位にクローニングすることにより、GST-blaZ(WTおよびE166D、N170QまたはE166D: N170Q変異体)融合体カセットを構築した。変異導入用の内部プライマーは次のとおりであった：

## 【化 6 1】

## E166D (5'-

CCAGTTAGATATGACATAGAATTAAATTACTATTCACC-3', SEQ ID NO:56; 5'-GGTGAATAGTAATTTAATTCTATGTCATATCTAACTGG-3', SEQ ID NO:57); NI70Q (5'-CCAGTTAGATATGAGATAGAATTACAGTACTATTCACC-3', SEQ ID NO:58; 及び 5'-GGTGAATAGTACTGTAATTCTATCTCATAICTAACTGG-3', SEQ ID NO:59); 及び E166D:NI70Q (5'CCAGTTAGATATGACATAGAATTACAGTACTATTCACC-3'; SEQ ID NO:60 及び 5'-GGTGAATAGTACTGTAATTCTATGTCATATCTAACTGG-3; SEQ ID NO:61).

10

。2つの外部プライマー

## 【化 6 2】

(5'-

CAACAGGTCGACGCCCGCCATGAAAGAGTTAAATGATTTAG-3', SEQ ID NO:62; 及び 5'-GTAGTCACCGGTAAATTCCTTCATTACACTCTTGGC-3', SEQ ID NO:63)

20

を設計して、blaZの5'コード領域にN末端SalI部位とKozak配列を付加し、3'コード領域にAgeI部位を付加し、以ってblaZ WT鑄型から806bp断片を増幅するようにした。得られた断片はpGEX-5X-3ベクターのSalI/AgeI部位に挿入した。これはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子、Xa因子切断部位をコードする配列、およびマルチクローニング部位(MCS)とそれに続くFlag対応配列および終止コドンを含むベクターである。これらの遺伝子融合体コンストラクトはDNA配列分析で確認した。

30

## 【0309】

GST-BlaZ(WTまたは変異体)融合タンパク質をコンピテントE. coli BL21(DE3)細胞で過剰発現させ、DhaAおよびGST-DhaA融合タンパク質の場合と実質的に同じ要領で精製した(ただしバッファーAの代わりにリン酸カリウムバッファー(0.1M, pH 6.8)を使用)。タンパク質の均一性はSDS-PAGEで検証した。

## 【0310】

発色基質6-[(フリルアクリロイル)アミド]ペニシラン酸トリエチルアミン塩(FAP)をCalbiochem (La Jolla, Ca)より購入した。FAPの加水分解を、Beckman Du640分光光度計(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を使用して344nmでの吸光度の低下によってモニターした( $E=1330\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。アッセイはすべて25℃で、0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH 6.8)中で行った。

40

## 【0311】

CCF2では、セファロsporinコアが7-ヒドロキシクマリンをフルオロセインに結合させる。インタクトの分子では、クマリンが励起されると( $E_{ex}$ -409nm)、結果としてフルオロセインへのFRETが起こり、緑色光を発する( $E_{em}$ -520nm)。-ラクタマーゼによるCCF2の開裂は結果として2つの色素の空間的分離を招き、FRETを妨げるため、今度はクマリンの励起により青色の蛍光が生じる( $E_{ex}$ -447nm)。CCF2はAurora Biosciences Corporation(San Diego, CA)より購入した。FRETシグナルの減少と青色蛍光の増加は蛍光マルチウェルプレ

50

ートリーダー-CytoFluorII(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA)で計測した。

【0312】

#### 結果

-ラクタマーゼはStaphylococcus aureus PC1由来のものも含めてすべて、種々の化学構造の -ラクタムを加水分解する。加水分解効率は酵素の種類と基質の化学構造に左右される。ペニシリンはStaphylococcus aureus PC1由来 -ラクタマーゼの好ましい基質と考えられる。

【0313】

-ラクタマーゼのペニシリン加水分解能に対する点変異の効果を、Zawadzke et al.(1995)で開示されている要領で調べた。図20に示すように、GST- -ラクタマーゼ PC1融合タンパク質は効率的にFAPを加水分解した。BlaZ.E166D、BlaZ.N170QまたはBlaZ.E.166D:N170Qの各変異体によるFAPの加水分解は共インキュベーションの60分後でも検出できなかった。従って、これらの変異はBlaZの著しい不活性化を招いた。

10

【0314】

BlaZ.E166D、BlaZ.N170QまたはBlaZ.E.166D:N170Qの各変異体は -ラクタムに結合すること、従ってこれらのタンパク質には -ラクタムを介して種々の機能性基を係留しうることを示すために、これらの変異体のGSTとの融合体を蛍光ペニシリンBOCELLIN(登録商標)FL(Molecular Probes Inc., Eugene, OR)とインキュベートした。タンパク質をSDS-PAGEで分離し、蛍光イメージャー(日立/日本)により特定蛍光団に対応する $E_{ex}/E_{em}$ で分析した。図22のデータは、どのBlaZ変異体もBOCELLINに結合することを示す。そのうえ、BlaZ変異体と蛍光基質の結合は、SDSによる煮沸とその後のSDA-PAGEでも壊れず、非常に強力であり、おそらく共有結合であった。またダブル変異体BlaZ.E.166D:N170Qの(タンパク質結合蛍光団の蛍光シグナルの強さで判定した)結合効率はいずれのシングル変異体の結合効率よりもずっと高かったし、またBlaZ.N170Qの結合効率はBlaZ.E166Dの結合効率よりも高かった。これらのデータは、 -ラクタムの加水分解における個別アミノ酸の役割に関する現時点の理解と相俟って、追加の変異(たとえば補助的なアミノ酸の変異)が変異タンパク質への機能性基の係留効率を改善しうることを示す。

20

【0315】

-ラクタマーゼのセファロスポリン加水分解能に対する点変異の効果もまた、Zlokami k et al.(1998)で開示されているFRET系基質であるCCF2を使用して、調べた。図23に示すように、GST- -ラクタマーゼ PC1融合タンパク質は効率的にCCF2を加水分解した(レーン2)。単一点変異(すなわちE166DまたはN170Q)は融合タンパク質のCCF2加水分解能を低下させた(レーン3および4)。2つのアミノ酸の置換(BlaZ.E.166D:N170Q、レーン5)はCCF2の加水分解にさらに著しい効果を及ぼした。しかし、BlaZ変異体はいずれもCCF2を加水分解することができた。

30

【0316】

従って、位置166または170でのアミノ酸置換たとえばGlu166AspまたはAsn170Glyは変異 -ラクタマーゼによる基質のトラッピングを、従って該基質の機能性基の、安定した(たとえば共有)結合を介した変異 -ラクタマーゼへの係留を可能にする。そのうえ、H<sub>2</sub>O活性化に補助的な効果を及ぼすアミノ酸の変異も係留効率を高めた。

40

【0317】

#### 実施例V I I

##### 生きた細胞の核およびサイトゾルへのDhaA.H272Fの誘導

##### 材料と方法

NLS3(シミアンウイルス大型T抗原に由来する核局在化配列(NLS)の3タンデムリピート)をpCIneo.GFP-コネクター-DhaA.H272F-FlagベクターのAgeI/BamHI部位に挿入することにより、GFP-コネクター-DhaA.H272F-NLS3融合体カセットを構築した。NSL3ペプチドをコードする2つの相補オリゴヌクレオチド

## 【化63】

CCGGTGATCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAGAAGAG  
 AAAGGTAGATCCAAAAAGAAGAGAAAGGTATGAG -3', センス, SEQ ID  
 NO:37, 及び 5'-  
 GATCCTCATACTTTCTCTCTTTTTTGGATCTACCTTTCTCTCTTTTT  
 TGGATCTACCTTTCTCTCTTTTTTGGATCA -3', アンチセンス, SEQ ID  
 NO:38)

10

をアニールした。アニールしたDNAは5'にAgeI部位を、また3'にBamHI部位を、それぞれ有した。該DNAをGST-コネクター-DhaA.H272F-Flagコンストラクトへ、AgeI/BamHI部位でクローニングした。

## 【0318】

GFP<sup>2</sup>- -アレスチン2をコードするPackardベクター(Packard#6310176-1F1)のpGFP<sup>2</sup>コード領域をDhaA.H272F-Flagコード領域に置き換え、DhaA.H272F- -アレスチン2融合体カセットを構築した。2つのプライマー

## 【化64】

(5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'; SEQ ID NO:39, 及び 5'-  
 CTCGGTACCAAGCTCCTTGTAGTCA-3'; SEQ ID NO:40)

20

を設計して、KpnI部位をDhaAの3'コード領域に付加し、pGEX-5X-3.DhaA.H272F-Flag鑄型から930bp断片を増幅するようにした。pGFP<sup>2</sup>コード領域をNheIおよびKpnI制限酵素で切り取り、次いでDhaA.H272Fをコードする該930bp断片をGFP<sup>2</sup>- -アレスチン2コード化ベクターのNheI/KpnI部位に挿入した。遺伝子融合コンストラクトの配列はDNA配列分析で確認した。

## 【0319】

30

GFP-コネクター-DhaA.H272F-NLS3、GFP<sup>2</sup>- -アレスチン2またはDhaA.H272F- -アレスチン2融合タンパク質を一時的に発現するCHO-K1または3T3細胞をLT-11チャンバー(Nunc)に30,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度でまいた。翌日、培地を25 μMのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し60分間置いた。インキュベーション終了後、基質を含む培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗い(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)、新しい培地を細胞に加えた。細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し、60分後に細胞を素早くPBSで洗った(pH 7.4; 1.0 ml/cm<sup>2</sup>)。細胞の蛍光画像を、GFPおよびカルボキシテトラメチルローダミンに対応するフィルターセットを備えた共焦点顕微鏡Pascal 5 (Carl Zeiss)で撮影した。

## 【0320】

40

結果

図24の画像で示すように、GFPとカルボキシテトラメチルローダミンは、GFP-コネクター-DhaA.H272F-NLS3をコードするコンストラクトをトランスフェクトし、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで染色した細胞の細胞核に共局在した。

図25の画像で示すように、GFP- -アレスチン2発現細胞は代表的な -アレスチン2サイトゾル共局在を示した。DhaA.H272F- -アレスチン2を含むSDS-PAGEゲルのフルオロスキンは、カルボキシテトラメチルローダミンを含むDhaA基質のDhaA.H272F- -アレスチン2発現細胞への強い結合を示す。

## 【0321】

実施例 V I I I

50

### DhaA触媒残基130の部位特異的変異誘発

ハロアルカンデハロゲナーゼは炭素-ハロゲン結合の開裂に3ステップ機構を使用する(図1A-B)。この反応は求核剤、塩基および酸からなるアミノ酸残基3点セットによって触媒される。該3点セットはXanthobacter autotrophicus由来のハロアルカンデハロゲナーゼ(DhIA)では、それぞれAsp124、His289、Asp260であり(Franken et al. 1991)、またそれぞれSphingomonas、Rhodococcus由来のデハロゲナーゼ酵素であるLinB、DhaAでは、類似の残基3点セットはそれぞれAsp108、His272、Glu132(Hynkova et al. 1999)およびAsp106、His272、Glu130(Newman et al. 1999)と同定されている。基質に結合後、Asp残基のカルボキシレートによる基質への求核攻撃により、ハロゲン-炭素結合の開裂とアルキル-エステル中間体の形成が起こる。DhIA Asp124残基に関する部位特異的変異誘発研究によれば、この最初の反応は共有結合触媒作用によって進行し、アルキル-酵素中間体の形成を伴う(Pries et al. 1994)。デハロゲナーゼ反応経路の次のステップは、活性部位His残基により活性化される水分子による該中間体エステルの加水分解である。触媒His残基は共有結合中間体の脱アルキル化塩基触媒であるが、活性部位Aspの最初の求核攻撃には必ずしも不可欠ではない。重要な触媒His残基を欠くタンパク質変異体はアルキル化半反応を起こし、以って安定した、共有結合エステル中間体を生成することが判明している。たとえばDhIAのHis289Gln変異体は共有結合アルキル-酵素中間体を蓄積することがすでに示されている(Pries et al., 1995)。

10

#### 【0322】

ハロアルカンデハロゲナーゼの求核剤残基および塩基残基と異なり、3点セットの第3残基の役割は十分には解明されていない。触媒酸は触媒His残基に結合した水素であり、またHis残基の機能を、イミダゾール環の窒素の塩基性を高めることにより、手助けする可能性がある。Krooshof et al. (1997)は部位特異的変異誘発法を用いてDhIA触媒酸Asp260の研究を行い、D260N変異体が触媒能を欠くことを示した。さらに、この残基は重要な構造的役割を果たしているように見受けられた。というのは、該変異タンパク質は主に封入体に蓄積したからである。Sphingomonas paucimobilis由来のハロアルカンデハロゲナーゼ(LinB)は -ヘキサクロロシクロヘキサンの分解に参与する酵素である(Nagata et al. 1997)。Hynkova et al. (1999)はLinBの推定触媒残基(Glu-132)をグルタミン(Q)残基で置換した。しかしこのE132Qでは、たとえ基質濃度を非常に高くしても、活性は観測されなかった。

20

30

#### 【0323】

DhaA触媒3点セット中の酸触媒Glu130のタンパク質産生での役割と該変異タンパク質の蛍光標識ハロアルカン基質と共有結合アルキル-酵素中間体を形成する能力を調べるため、部位特異的変異誘発法によりDhaAの位置130のグルタミン酸(E)残基をグルタミン、ロイシンおよびアラニンで置換してみた。

#### 【0324】

##### 材料と方法

細胞株とプラスミド: ウルトラコンピテントE. coli XL10 Gold (Stratagene; Tet<sup>r</sup> (mcrA)183 (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>])を、部位特異的変異誘発反応による形質転換の宿主として使用した。E. coli株JM109(e14-(McrA-)recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-mK+) supE44 relA1 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z M15])を、遺伝子発現および全細胞酵素標識研究用の宿主として使用した。GST-DhaA-FLAG遺伝子融合体をクローニングしたプラスミドpGEX5X3 (pGEX5X3DhaAWT-FLAGと命名)をE130変異誘発用の出発型として使用した。標識研究ではDhaAのH272F変異を含む変異体プラスミド(pGEX5X3DhaAH272F-FLAGと命名)を陽性対照として使用し、クローニングベクターpGEX5X3を陰性対照として使用した。

40

#### 【0325】

DhaA E130残基の部位特異的変異誘発: 変異誘発に使用したオリゴヌクレオチドの配列は下記のとおりである。下線で強調したヌクレオチドは変異コドンの位置を示す。これら

50

のオリゴヌクレオチドはIntegrated DNA Technologies (Coralville, IA)が100nmolスケールで合成し、5'末端リン酸化により修飾した。

【化65】

DhaA E130Q 5'

CAAAGGTATTGCATGTATGCAGTTCATCCGGCCTATCCCG 3' (SEQ ID

NO:41)

DhaA E130L 5'

GTCAAAGGTATTGCATGTATGCTIGTTCATCCGGCCTATCCCGAC 3'

(SEQ ID NO:42)

DhaA E130A 5'AGGTATTGCATGTATGGCGTTCATCCGGCCTATCCC 3'

(SEQ ID NO:43)

10

【0326】

部位特異的変異誘発はQuickChange Multiキットを使用して、メーカー(Stratagene, La Jolla, Ca)説明書に従って行った。変異誘発反応をコンピテントE. coli XL10 Gold細胞に導入し、形質転換体をアンピシリン(100 µg/ml)添加LB寒天培地で選択した。個別形質転換体から単離したプラスミドDNAについてまず、グルタミン酸コドン(GAA<sub>ttc</sub>)の置換によるEcoRI部位の欠失をスクリーニングした。各反応に由来する、所期のコドン変異を含むと見られるクローンを選択し、DNA配列分析(SeqWright, Houston, TX)にかけた。pGEX5X3ベクター中の変異体の配列を確認するために使用したプライマーは次のとおりであった

20

【化66】

5'GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'

(SEQ ID NO:44).

30

【0327】

DhaA変異分析: 3つのDhaA.E130置換変異体を次のコンストラクトと比較した: 野生型DhaA、DhaA.H272FおよびDhaA陰性対照(pGEX5X3空ベクター)。各クローンの終夜培養液を2mlのアンピシリン(100 µg/ml)添加LB中、30 °Cで振とう培養した。50ml新鮮LB培地+アンピシリン(100 µg/ml)を入れた滅菌フラスコにこの終夜培養液を加え、1:50希釈した。これを25 °Cで振とう培養して、不溶性タンパク質種の生成を極力抑えるようにした。培養液が中期対数期(OD<sub>600</sub>=0.6)に達したところで、IPTG(0.1mM)を加え、25 °Cでさらに22時間振とう培養した。カルボキシテトラメチルローダミン標識ハロアルカン基質で全細胞を標識するために、各培養液の細胞密度をOD<sub>600</sub>=1に調節してから基質を濃度15 µMとなるように加えた。細胞を穏やかにかき混ぜながら4 °Cで約18時間インキュベートした。インキュベーション後、各標識反応液に由来する20 µlの細胞を6 µlの4X SDSローディングダイに加え、試料を約3分間煮沸してから4-20%アクリルアミドゲル(Trisグリシン)上に添加した。in vitro標識研究では、IPTG誘導培養物の粗溶解液を、3mlの細胞(OD<sub>600</sub>=1)を回収して得られたペレットを75 µlのPBSに再懸濁させて、調製した。凍結/解凍ステップを経て、リゾチーム(1.25mg/ml)添加1X Cell Culture Lysis Reagent (Promega Corp., Madison, WI) 225 µlを加えて、細胞溶解を促進するようにした。各溶解液の試料20 µlを25 µlの1X PBSと合わせた。カルボキシテトラメチルローダミン標識ハロアルカン基質を加え、終濃度を25 µMとした。この標識反応液を室温で2時間インキュベートした。各標識反応液の試料25 µlを6 µlの4X SDSローディングダイに加え、試料を約3分間煮沸してから4-20%アクリルア

40

50

ミドゲル(Trisグリシン)上に添加した。570nmでの発光を検出するようセットしたFluorol mager SI装置(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を使用してゲルを画像化した。

【0328】

粗溶解液を14,000 RPMで15分間遠心して無細胞溶解液を調製した。タンパク質の生成をSDA-PAGEとウェスタンブロット分析でモニターした。PVDF膜に転写されたタンパク質をアルカリホスファターゼ(AP)標識抗FLAG<sup>R</sup>抗体(Sigma, St. Louis, MO)とインキュベートした。ブロットはアルカリホスファターゼ用のWestern Blue安定化基質(Promega Corp., Madison, WI)で発色させた。

【0329】

### 結果

アルキル-酵素中間体の加水分解でのDhaA酸触媒の役割を部位特異的変異誘発法で調べた。DhaA.WT.E130コドンでグルタミン(Q)、ロイシン(L)またはアラニン(A)のコドンで置換した。これらの置換は該酵素の構造に破壊的影響を与えるおそれが最も少なそうだったからである。変異誘発後、制限酵素スクリーニングおよびDNA配列分析により所期のコドン変異を検証した。配列検証を経たDhaA.E130Q、DhaA.E130LおよびDhaA.E130Aクローン(それぞれC1、A5およびA12と命名)を選び出してさらに分析した。これらのE130変異体の分析項目はタンパク質発現、それにカルボキシテトラメチルローダミン標識ハロアルカン基質と共有結合アルキル-酵素中間体を形成する能力であった。3つのE130遺伝子変異体をE. coli JM109細胞で、IPTG誘導後、過剰発現させた。粗細胞溶解液のSDS-PAGE分析により、野生型および変異dhaA遺伝子を発現する培養物ではタンパク質の蓄積がほぼ同じレベルとなることが判明した(図26; レーン2、4、6、8、10、12)。さらに、DhaA.WTおよびDhaA.H272Fをコードするコンストラクトによって生成されたタンパク質は大部分が可溶性であった。というのは遠心後もタンパク質量がほとんど変わらなかったからである(図26; レーン3、5)。空ベクターのレーン(図26; レーン6、7)に存在する豊富な22kDaタンパク質バンドはGSTタンパク質を表す。しかし、これらの結果はDhaA.E130Q、DhaA.E130LおよびDhaA.E130A変異体とは好対照をなしており、それらの変異体は主に不溶性DhaAタンパク質を蓄積するように見受けられた。この結論は、遠心後に無細胞溶解液中のDhaAタンパク質量が著しく減少したという観測結果(図26; レーン9、11、13)に基づく。それにもかかわらず、DhaAと共移動するタンパク質バンドが遠心後に(+s)、各DhaA.E130変異体レーンで観測された。これは可溶性酵素の存在を示唆する。そこで、DhaA.E130変異体で遠心後に観測されたタンパク質バンドが可溶性DhaA物質を表わすのかどうかを、ウェスタン法で調べた。図27に示す免疫ブロットは、各DhaA.E130変異体無細胞溶解液(レーン9、11、13)に可溶性DhaAタンパク質が存在することを確認してくれた。

【0330】

DhaA.E130変異体はまた、アルキル-酵素共有結合中間体の成性能についても調べた。種々のコンストラクトのIPTG培養物に由来する粗溶解液をカルボキシテトラメチルローダミン標識基質の存在下にインキュベートした。図28はDhaA.H272F変異体(レーン3)の中間体生成能がきわめて高いことを示した。そうした生成物は、DhaA.WT、陰性対照いずれの溶解液でも検出されなかった。DhaA.E130変異体は最初の検査では、検出可能レベルの共有結合中間体を生成しないように見えた。しかし、蛍光画像を詳しく調べると、微量の共有結合中間体を表す可能性のあるかすかなバンドが観察された(図28; レーン5~7)。これらの結果に基づき、全細胞の蛍光アルキル-酵素共有結合中間体の生成能を調べた。

【0331】

図29は各DhaA.E130変異体と陽性対照(DhaA.H272F変異体)、陰性対照(DhaA-)とを比較したin vivo標識実験の結果である。予想通り、DhaA.H272F変異体はアルキル-酵素共有結合中間体を生成することができた。それはこのDhaA融合体の予想分子量の近傍に見られる単一蛍光バンドが裏付けている(図29、レーン3)。前にin vitro標識の結果から観測されたように、野生型、陰性対照いずれの培養液でもそうした生成物は検出しえなかった(図29; レーン2、3)が、3つのDhaA.E130置換変異体ではいずれも、正しい位置で移動するかすかなバンドが観察された(図29; レーン5~7)。これらの結果はDhaA.E130Q/L/A変異体が共有

10

20

30

40

50

結合アルキル-酵素中間体を捕捉しうるという可能性を示す。しかし、この反応の効率はDhaA.H272F酵素と比べると著しく低い模様である。

#### 【0332】

この変異誘発研究の結果は、DhaAの酸触媒残基DhaA.E130が該酵素の正しい折りたたみで重要な構造的役割演じることを示唆する。このDhaAタンパク質はこのアミノ酸残基の置換に対して明らかに敏感であり、それはDhaA.E130Q、DhaA.E130LおよびDhaA.E130A粗溶解液にほぼ不溶性のタンパク質複合体が存在することからも裏付けられる。それにもかかわらず、SDS-PAGEおよび免疫ブロット分析によれば、これら3つのDhaA.E130変異体の無細胞溶解液ではいずれも、かなりの量の可溶性DhaAタンパク質が検出された。

#### 【0333】

##### 実施例IX

##### 生きた哺乳動物細胞で発現するDhaA.H272F-FlagおよびDhaA.H272F-Flag Renillaルシフェラーゼ融合タンパク質の捕捉

##### 材料と方法

CHO-K1細胞を24ウェルプレート(Labsystems)に30,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度でまき、pCIneo.DhaA.WT-FlagまたはpCIneo-hR.Luc-コネクター-DhaA.H272F-Flagベクターでトランスフェクトした。24時間後、培地を、25 μMのビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clと0.1% DMSOまたは0.1% DMSOだけを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中に60分間置いた。インキュベーション終了後、培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗って(pH 7.4; 連続4回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)から、新しい培地を細胞に加えた。実験によっては培地を交換しなかった。細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻した。

#### 【0334】

60分後、培地を捨て、プロテアーゼ阻害物質(Sigma #P8340)を添加したPBS(pH=7.4、200 μl/ウェル、室温)中に細胞を回収した。細胞を針(1M1 23GTW)粉砕法で破碎した。次いで細胞溶解液をMagnaBindストレプトアビジンコートビーズ(Pierce #21344)と、メーカーのプロトコールに従って、インキュベートした。要するに、回転ディスクを使用して細胞溶解液をビーズと60分間、室温(RT)でインキュベートした。未結合物質を回収し、ビーズはPBSで洗って(3 × 500 μl、pH=7.4、室温)から、SDS-試料バッファーに(SDS-PAGE分析用)またはPBS(pH=7.4)に(R.Luc活性測定用)、再懸濁させた。タンパク質をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写させ、抗Flag-Abまたは抗R.Luc-Abで分析し、また結合抗体を改良化学発光(ECL)システム(Pharmacia-Amersham)で検出した。ビーズに結合したhR.Lucの活性はPromegaのRenilla Luciferase Assay Systemを使用して、メーカーのプロトコールに従って測定した。

#### 【0335】

##### 結果

生細胞で発現するタンパク質の捕捉は様々な分析法/技術によるタンパク質分析を可能にする。多数の捕捉手段が利用可能であるが、ほとんどの手段は非常に特異的な抗体の生成または関心タンパク質と特異標識ペプチド/タンパク質との遺伝子的な融合を必要とする(Jarvik and Telmer, 1998; Ragaut et al. 1999)。しかし、そうした標識は生細胞の画像化では用途に限られる。Dha.H272FおよびDha.H272Fと融合した機能性タンパク質の捕捉にはSAコートビーズが使用された(Savage et al. 1992)。

#### 【0336】

ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClはDhaA.WTにより効率的に加水分解され、またin vitroまたはin vivoでDha.H272FおよびDha.H272F融合タンパク質に共有結合した。そのうえ、結合はE.coli細胞、哺乳動物細胞のどちらでも観測された。対照実験では、CHO-K1細胞で発現したDha.H272F-Flagタンパク質の約80%は60分処理後に標識された。

#### 【0337】

Dha.H272F-Flagを一時的に発現するCHO-K1細胞をビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで処理した。ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl処理細胞を溶解し、細胞溶解液SAコートビーズインキュベートした。Dha.H272Fのビーズとの結合をウェスタンブロット法により、抗Flag<sup>R</sup>抗体を使用して

10

20

30

40

50

分析した。図30Dに示すように、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl処理を欠くとDha.H272F-Flagの捕捉は検出されなかった。と同時に、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl処理した細胞では、発現したDha.H272F-Flagの50%余りがSAコートビーズ表面に捕捉された。

【0338】

Dha.H272F-Flagと融合した機能性タンパク質の捕捉を示すために、hR.Luc-コネクター-DhaA.H272F-Flagをコードするベクターで細胞をトランスフェクトし、またビーズ表面に捕捉されたルシフェラーゼ活性を測定した。図30Cに示すように、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl処理細胞の溶解液とインキュベートしたビーズ表面では、かなりのルシフェラーゼ活性が検出された。と同時に、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl処理をしない細胞の溶解液とインキュベートしたビーズ表面では、ルシフェラーゼ活性が検出されなかった。さらに、遊離のビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを洗い流さないときは、ビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl処理細胞の溶解液とインキュベートしたビーズ表面でもhR.Luc活性が検出されなかった。

【0339】

総合すれば、Dha.H272F-Flagと融合した機能性タンパク質(hR.Luc)がビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClとSAコートビーズを使用して効率的に捕捉しうることをこれらのデータは示す。この捕捉はビオチン依存的であり、過剰量のビオチン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによって競合阻害することができる。hR.Luc活性へのビーズの相当な阻害効果が観測された(データ非表示)ので、SDS-PAGEと抗R.Luc抗体によるウェスタンブロット分析とを使用して、hR.Luc-コネクター-DhaA.H272F-Flag融合タンパク質の捕捉効率を推計した。図30Dに示すように、hR.Luc-コネクター-DhaA.H272F-Flag融合タンパク質の50%あまりをビオチン依存的に捕捉することができた。これはDhaA.H272F-Flagの捕捉効率とも十分に一致する(図30A)。

【0340】

#### 実施例 X

##### 共有結合形成速度を増したDhaA変異体

DhaA触媒塩基His272のフェニルアラニン残基による置換はAsp求核剤に対して適合性があり、DhaA.H272Fと命名した組み換えタンパク質を結果したが、これは相当量の共有結合アルキル-酵素中間体を蓄積する(図2C)。水を活性化するHis残基が存在しないと、共有結合エステル中間体のトラッピングが可能になる(図2C)。こうした変異体の基質結合前および基質結合後の構造モデルを示すと、それぞれ図2E、2Fようになる。さらに、求核残基Asp106のシステイン置換を含むDhaA変異体もまた、共有結合中間体をトラップすることができる。この変異体(DhaA.D106Cと命名)(図2D)は求核剤チオレート的作用によりハライド基を置換する。それによって得られるチオエーテル結合は、水活性化H272残基の存在下でも、加水分解に対して安定である(図2D)。

【0341】

タンパク質とハロアルカンリガンドの間に安定した共有結合を形成する能力は、哺乳動物細胞中のタンパク質を部位特異的に標識し、局在化し、固定化しおよび/または蛍光的に可視化することができる汎用レポーター技術を提供する(実施例II~IXを参照)。一実施例では、デハロゲナーゼ(DhaA)の活性部位変体がそうした変異体との融合タンパク質を安定した共有結合を介して合成ハロアルカン標識基質へと係留する。DhaA.H272FおよびDhaA.D106Cの反応速度を上げるために、タンパク質-リガンド(タンパク質-基質)複合体のモデリングにより、DhaAと基質の間の有利な相互作用を特定し共有結合形成速度を最適化するように努めた。

【0342】

#### 材料と方法

細胞株、増殖条件およびプラスミド: E. coli株DH10B (F-mcrA [mrr-hsdRMS-mcrBC] 80lacZ M15 lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 (ara, leu)7697 galU galK rpsL nupG)およびJM109(ei4-(McrA-)recA1 endA1 gyrA96 thi-l hsdR17(r -m +)supE44 relA1 (lac-proAB)[F' traD36 proAB lac I<sup>q</sup> Z M15])を、遺伝子発現およびライブラリースクリーニング用の宿主として使用した。E. coliは定法によりLuria-Bertani(LB)培地またはTerrific Broth(TB)培地で増殖させた(Sambrook et al. 2001)。培地には必要に応じ

10

20

30

40

50

てDifco寒天を1.5%(w/v)加えた。組み換えプラスミドを選択する培地にはアンピシリン(100 µg/ml; Amp)を添加した。GSTのDhaA.H272FおよびDhaA.D106Cとの融合体をそれぞれ含むE. coli発現プラスミドpGEX5X3.DhaA.H272F-FLAGおよびpGEX5X3.DhaA.D106C-FLAGを変異誘発用の出発鋳型として使用した。哺乳動物細胞でのDhaA変異体の発現および標識の検査には発現ベクターpCI-Neo(Promega Corporation, Madison, WI)を使用した。

【0343】

試薬と化学物質: 化学物質はすべてSigma-Aldrich (Milwaukee, WI)から購入した。酵素は特に断らない限りすべてPromega(Madison, WI)に由来した。変異誘発およびPCRプライマーはPromega Corp、SeqWright (Houston, TX)およびIntegrated DNA Technologies (Coralville, IA)が合成した。DhaAの変異誘発はQuikChange Multiキット(Stratagene, La Jolla, CA)を使用して行った。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、ジアセチルカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、およびビオチンを含むクロロアルカンリガンド(例: ビオチン-14-Cl、ビオチン-X-14-Cl、ビオチン-PEG4-14-Cl; 図7を参照)はPromega Biosciences Inc. (San Luis Abispo, CA)が合成した。

10

【0344】

DNA分析とタンパク質モデリング: DNA分析はVector NTIソフトウェアパッケージversion 8を使用して行った。タンパク質の構造情報はProtein Data Bank(PDB <http://www.rcsb.org/pdb/>)より入手した。構造分析およびモデリングはBiopolymer、Discover、Homology、Modelerの各モジュールを含めたInsightII2000.1を使用して行った(<http://www.accelrys.com/>)。

20

【0345】

変異誘発とライブラリー構築: 組み換えDNA作業はSambrook et al. 2001で開示されているような標準プロトコールを使用して行った。変異誘発の前に、次のオリゴヌクレオチドを使用してDhaA鋳型の配列を確認した:

【化67】

前進プライマー “21972”, 5'-

GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' (SEQ ID NO:64) 、及び後退プライマー

“21973”, 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG-3' (SEQ ID NO:65).

30

【0346】

DhaA.H272FまたはDhaA.D106C残基175(Lys)、175(Cys)および273(Tyr)のsite-saturation変異誘発に用いたオリゴヌクレオチドの配列を次に示す:

## 【化68】

175 NNK:

5' ATCGAGGGT GCGCTCCCG NNK TCGTCCGTC CGCTTACGG 3'

(SEQ ID NO:66)

176 NNK:

5' ATCGAGGGT GCGCTCCCGAAA NNK GTCGTC CGTCCGCTTACGG 3'

(SEQ ID NO:67)

175/176 NNK/NNK:

5' ATCGAGGGT GCGCTCCCG NNKNNK GTCGTC CGTCCGCTTACGG 3'

(SEQ ID NO:68)

Y273 NNK=H272F:

5' ATCGGCCCGGGATTGTT CNNK CTCCAGGAAGACAACCCGG 3' (SEQ

ID NO:69)

Y273 NNK=H272:

5' CGGCCCGGGATTGCA CNNK CTCCAGGAAGACAACCCGGA 3' (SEQ

ID NO:70)

V245T:

5' GGGCACACCCGGC ACC CTGATCCCCCGG 3' (SEQ ID NO:83)

10

20

## 【0347】

下線で強調したヌクレオチドは変異コドンの位置を示す。部位特異的変異誘発はQuikChange Multiキット(Stratagene, La Jolla, CA)を使用しメーカーの説明書に従って行った。コンピテントE. coli細胞に変異誘発反応系を導入し、形質変換体をAmp(100 µg/ml)添加LB寒天培地上で選択した。ライブラリー品質を、各ライブラリーから無作為抽出した12~48クローンのDNA配列分析によって評価した。配列分析用プラスミドはE. coliから、Wizard SV Miniprep Kits (Promega Corp.)を使用して分離した。DNA配列分析はSeqWright DNA Technology Services(Houston, TX)が行った。

30

## 【0348】

175、176および175/176ライブラリーを分析するための配列分析用プライマーは次のものを含んだ:

## 【化69】

“175/176”, 5'-GCCTATCCCGACGTGGGACG-3' (SEQ ID NO:71);

“255R”, 5'-AGGTCTCGCGGCTTCGGCCGGGG-3' (SEQ ID NO:72); “F70”,

5'-AAAATCGGACAAACCAGACCTCG-3' (SEQ ID NO:73); “F189”, 5'-

ATCGCGAGCCCTTCTCAAGCCTG-3' (SEQ ID NO:74); 及び“R121”, 5'-

GTTCCGGATTGCGCTTGGCCCAGT-3' (SEQ ID NO:75).

40

## 【0349】

スクリーニングアッセイ開発

50

### DhaA基質への結合の *in vivo* 検出

DhaA.H272FまたはDhaA.D106Cコード化プラスミドを入れたE. coliのコロニーを200  $\mu$ l LB + 100  $\mu$ g/ml Ampに植菌し、平底96ウェルプレートに入れ、37  $^{\circ}$ Cで終夜培養した。終夜培養液を200  $\mu$ l LB (+100  $\mu$ g/ml Amp + 0.1mM IPTG)で20倍希釈し、30  $^{\circ}$ Cで終夜培養した。*in vivo*標識に使用した細胞の体積を増殖( $OD_{600}$ )に対して正規化した。50~100  $\mu$ lの発現誘導細胞をU底96ウェルプレートに移し、ペレット化し、50  $\mu$ l PBS + 15  $\mu$ Mカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで再懸濁し、室温で60分間、回転振とう機にかけて標識した。未結合リガンドを除去するために2500rpmで5分間遠心分離して細胞を回収し、上清を捨て、細胞を100  $\mu$ lの10mM Tris-HCl pH 7.5、0.9% NaClおよび0.05% Tritonで再懸濁して、15分間洗浄した。この洗浄手順は3回繰り返した。蛍光強度をTecan Safireプレートリーダーにより次のパラメーターを使用して測定した：励起545nm；発光575nm。DhaA変異体の蛍光強度をDha-、DhaA.H272FおよびDhaA.D106Cの各対照細胞と比較した。

10

【0350】

### 固定化DhaAの使用による基質捕捉

精製DhaA.H272FおよびDhaA.D106C変異タンパク質[FastBreak (登録商標)細胞溶解試薬(Promega)を使用して得られたE. coli細胞溶解液から精製、50ng)を、抗Flag M2 IgG(Sigma)コート済み96ウェルのマイクロタイタープレート(平底; Nunc MaxiSorp)に固定化した。コーティングは100  $\mu$ lの抗Flag(5  $\mu$ g/ml)/0.1M NaHCO<sub>3</sub>(pH 9.6)を使用して4  $^{\circ}$ Cで終夜行った。翌日、プレートを空にし、300  $\mu$ lのPBS(3% BSA添加)により25  $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキング処理した。プレートを空にし、0.1% Tween 20添加PBS (PBST)で4回洗浄し、ビオチン化基質(様々な濃度のビオチン-14-Cl、ビオチン-X-14-Clまたはビオチン-PEG-14-Clを使用)を、100  $\mu$ lのPBS + 0.05% Tween 20 + 0.5% BSA (PBSTB)を入れたウェルに加え、25  $^{\circ}$ Cで種々の時間にわたりインキュベートした。プレートを空にし、PBSTで4回洗浄することにより、固定化DhaAと基質の反応を停止させた。次いで、100  $\mu$ lのストレプトアビジン(SA)-HRP(PBSTBで5,000倍希釈; Prozyme)をウェルに加え、25  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。プレートを空にし、PBSTで8回洗浄し、TMBを100  $\mu$ l加えた。15分後、等量の0.2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて発色を停止させ、450nmでの吸光度を測定してシグナルを定量化した。

20

【0351】

### MagneGST (登録商標) 常磁性体粒子(PMPs)の使用によるタンパク質捕捉

細菌コロニーを掻き取ってLB+Amp入り96ウェルプレートに入れ、30  $^{\circ}$ Cで振とう培養した。培養液を20倍希釈で、新鮮TB培地、Ampおよび0.1mM IPTGを入れた96ウェルプレートに加えた。プレートを30  $^{\circ}$ Cで終夜振とう培養した。このIPTG発現誘導培養液を含む96ウェルプレートを遠心し、上清を捨てた。MagneGST (登録商標) PMPs表面のタンパク質捕捉を飽和させることにより、DhaA変異体をタンパク質濃度について正規化した。MagneGST (登録商標)細胞溶解試薬、MagneGST (登録商標) PMPsおよびカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl (15  $\mu$ M)を含むカクテルを、細胞ペレットを入れた96ウェルプレートに分注した。プレートを室温、約900rpmで10分間振とうした。粒子をMagnaBlot (登録商標) 96磁性体粒子分離装置によりPBSTで3回洗浄した。洗浄液を捨て、MagneGST (登録商標) 溶離液を加え、プレートを室温で振とう(約900rpm、5分間)させた。上清を新しい平底の透明96ウェルプレートに移し、550nmの励起波長と580nmの発光波長を使用して蛍光強度を測定した。

30

40

【0352】

自動ライブラリースクリーニング: 特注のTecan Freedomロボットワークステーションを使用してMagneGST (登録商標)系アッセイにより、DhaA変異体ライブラリーをスクリーニングした。アッセイのパラメーター設定はFACTSスケジュール管理ソフトを使用して自動化して、複数の96ウェルプレートの並行処理を可能にした。細胞ペレットは、プレートが次の処理のために自動的に回収されるときまで、保冷Storexインキュベーター(4  $^{\circ}$ C)に保存した。試薬類をTeMo液体ハンドリングシステム(Tecan US)でプレートに分注した。Tecan Te-Shake (登録商標)を使用してプレートを室温、約900rpmで10分間振とうした。Te Mo液体分注システムとの併用やFACTSスケジュール管理ソフトにも対応する改造したMagna

50

Blot (登録商標) 96磁性体粒子分離装置により粒子をPBSTで洗浄した。蛍光強度の測定にはTecan Safire蛍光光度計を使用した。生の蛍光強度データは分析のためにExcelスプレッドシートに取り込んだ。改良DhaAクローンの存在の可能性を示唆する親対照より高強度のウェルについて、スクリーニングデータを詳しく調べた。

#### 【0353】

2次ライブラリースクリーニング: 1次スクリーニング後、親クローン(すなわちDhaA.H272FまたはDhaA.D106C)と比べて少なくとも20%の改良を示すすべてのクローンをAmp添加LB平板培地に画線塗抹した。各確認済みヒットの4コロニーを無作為に、200  $\mu$ l LB + Ampに植菌し、平底96ウェルプレートで終夜30 培養した。終夜培養液を200  $\mu$ l TBアンピシリン(+0.1M IPTG)で50倍希釈し、30 と37 で終夜培養した。発現誘導培養液をMagneGST (登録商標)系スクリーンにより再アッセイした。改良クローンをすべて配列分析し、保存した。Qiagen Mini Prepキットにより配列分析用プラスミドDNAを合成した。すべての改良クローンにつき2mlの培養液を1% DMSOの存在下、-70 で保存した。

#### 【0354】

DhaAタンパク質精製: MagneGST (登録商標) タンパク質精製システム(Promega, Madison, WI)を用いてタンパク質の小規模精製を行った。タンパク質精製では、コロニーを1ml LB + 100  $\mu$ g/ml Ampに植菌し、30 で終夜培養した。終夜培養液を10ml新鮮LB  $\mu$  (+100  $\mu$ g/ml Amp)で50倍希釈し、A600 = 0.6まで培養し、そこで0.1mM IPTGを加えて発現誘導し、25 で終夜培養した。発現誘導した培養液の細胞ペレットを-75 で15分間凍結させた。細胞溶解液を得るため、ペレットを1Xプロテアーゼ阻害物質カクテル(Becton-Dickinson Biosciences)の存在下に2mlの(1mM DTT + 20  $\mu$ l RQ DNase添加)溶解バッファーに再懸濁し、回転振とう機上で30分間インキュベートした。MagneGST粒子は使用前に、25%スラリー4mlをMagneGST結合/洗浄バッファーで3回平衡化した。最終洗浄後、該粒子を1X容量の結合/洗浄バッファー中に再懸濁させた。該粒子を細胞溶解液に直接加え、混合物を回転振とう機上、室温で30分間インキュベートし、GST-DhaA融合タンパク質を該磁性体粒子に結合させた。粒子を2.5X容量の結合/洗浄バッファー+1mM DTTで3回洗浄した後、GST-DhaA融合タンパク質を溶離バッファー(100mMグルタチオン、50mM Tris-HCl, pH 8.1、1mM DTTおよび1X BDプロテアーゼ阻害物質カクテル)と15分間インキュベートして溶出した。溶出タンパク質を保存用バッファー(50mM Tris-HCl, pH 7.5、200mM NaCl、1mM DTT、1mM EDTA、20%グリセロール)に対して2回透析した。

#### 【0355】

DhaA融合タンパク質の大規模精製はGlutathione Sepharose 4 Fast Flowレジン(Amersham Biosciences)を使用して行った。要するに、500ml発現誘導細胞培養液に由来するペレットを1mM DTT添加1Xリン酸緩衝生理食塩水(PBS) (バッファーA) 20mlに再懸濁させた。リゾチーム(10mg/ml)添加後、混合物を4 で30分間インキュベートさせた。プロテアーゼ阻害物質PMSFを加えて終濃度を2mMとしてから、超音波破碎を行った。清澄化した溶解液をレジンに添加し、攪拌しながら2時間~終夜、4 でインキュベートした。バッファーAによる2回の40mlパッチ洗浄の後、レジンをWizard Maxiカラム(Promega)に添加した。カラム内容物を0.3M NaCl添加10mlバッファーAにより2回洗浄した。融合タンパク質は20mMグルタチオン添加バッファーAの2ml画分に溶出した。含タンパク質画分を、20%グリセロールを含む1LのバッファーAで2回透析した。

#### 【0356】

精製DhaA変異体のin vitro標識: DhaA変異体への蛍光基質の共有結合係留は蛍光イメージゲル分析により検出した。GST-DhaA変異体(9nM)を50mM Tris-HCl (pH 7.5)中、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたはローダミングリーン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clと種々の濃度、温度でインキュベートした。基質の添加により反応を開始させ、また経時変化実験のために18  $\mu$ l分量の反応液を、6  $\mu$ l SDSゲルローディングバッファーを入れた試験管に移し、5分間煮沸し、プレキャストの(pre-poured) 4~20% (Tris-グリシン)グラジエントSDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA)で分離した。Hitachi FM BioII(535nm励起、580nm発光)を使用してゲルを蛍光画像化し、バ

10

20

30

40

50

ンドを濃度測定法またはImageQuant (Amersham)を使用して定量した。次の2次反応速度式 (Cornish-Bowden, 1995)から反応速度定数を計算した:

【 0 3 5 7 】

$$k_t = (1/B_0 - A_0) \ln[(B_0 - x)A_0 / (A_0 - x)B_0]$$

【 0 3 5 8 】

式中  $k_t$  = 反応速度定数;  $B_0$  = 時間=0における[反応物B], mol/L (M);  $A_0$  = 時間=0における[反応物A], mol/L (M);  $B_0 - x$  = 時間=tにおける[反応物B], mol/L (M);  $A_0 - x$  = 時間=tにおける[反応物A], mol/L (M)。 $\ln[(B_0 - x)A_0 / (A_0 - x)B_0]$ と時間の関係を表すグラフは直線となるはずであり、 $k$ はその直線の傾き $k(B_0 - A_0)$ によって決まる。

【 0 3 5 9 】

蛍光偏光 (FP) 法: 蛍光偏光法によりDhaA変異体の反応速度を分析した。測定はBeacon 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)で、またはUltraプレートリーダー (Tecan, Research Triangle Park, NC)を使用して96ウェルフォーマットで、行った。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたはカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質(7.5~10 nM)を過剰量の精製GST-DhaAタンパク質とインキュベートした。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl標識研究では、使用タンパク質は次の濃度とした: 親タンパク質15 μM; 第1世代DhaA変異体1.5~0.15 μM; 第2世代DhaA変異体0.035 μM。カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl標識研究では、使用タンパク質は次の濃度とした: 親タンパク質15 μM; 第1世代クローン1.5~0.15 μM; 第2世代クローン0.15 μM。反応はタンパク質を基質に添加して開始させた。蛍光偏光および蛍光強度の測定は10~30秒刻みで0.5~12 10

10

20

【 0 3 6 0 】

熱安定性の分析: DhaAの熱安定性を、精製タンパク質の4、22、30、37、42、50または60 で15、30または60分放置後の残留活性を測定して、評価した。FPアッセイは室温(約25 )で行った。これらの研究では、15 μMの親クローンまたは1.5~0.15 μMの第1世代クローンをカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで標識し、また0.15 μMの第2世代クローンをカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで標識した。各クローンにつき、各条件での標識速度(直線範囲の傾き)を計算した。4 で15分放置後に観測された速度を便宜的に100%活性とした。各条件での残留活性(%)を計算した。安定性の評価では、放置時間ごとに残留活性(%)を放置温度と対応させてプロットした。半減期の計算では、放置温度ごとに残留活性(%)を放置時間と対応させてプロットした。このグラフから、50%活性が失われた時間を外挿した。 30

30

【 0 3 6 1 】

固定化DhaAの使用によるクロロアルキル化分子の捕捉: 抗Flag M2 IgGをコートしたマイクロタイタープレートを使用して、変異DhaA(50ng)を前記の要領で固定化した。変動濃度のクロロアルカンに関心モデル分子と溶液(PBSTB)中、25 でインキュベートした。ビオチン化クロロアルカンの場合には、関心分子はSA-HRPであった。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの場合には、関心分子は抗TMR IgG(プローブ)であった。クロロアルキル化反応を1時間進行させ、次いで反応液を、固定化DhaAを含む洗浄済みプレートに加えた。これらのインキュベーションを25 で1~2時間続けてから、プレートを空にしPBSTで4回洗浄することにより停止した。SA-HRP反応では、プレートにTMBを100 μl加えた。発色を15分間持続させ、次いで等容量の0.2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて発色を止めた。450nmでの吸光度を測定してシグナルを定量した。カルボキシテトラメチルローダミン反応では、2次抗ウサギIgG-HRP結合体(PBSTB 5,000倍希釈液100 μl; 25 で1時間)を使用して結合済み抗カルボキシテトラメチルローダミンIgGを検出した。プレートをPBSTで8回洗浄し、TMBで発色させ、前述の要領で定量した。 40

40

【 0 3 6 2 】

固定化クロロアルカン基質の使用によるDhaAの捕捉: ストレプトアビジン高結合能コート96ウェルマイクロタイタープレート(平底、Pierce)を使用して、ビオチン化クロロアルカン基質、ビオチン-14-Cl、ビオチン-X-14-Clおよびビオチン-PEG4-14-Clを固定化し 50

50

た。過剰量(約2  $\mu\text{mol}$ )の基質を使用すると、プレートにはウェルあたり約75pmolのビオチンを結合させることができた。100  $\mu\text{l}$  のPBS+0.05%Tween 20+0.5% BSAを含むバッファー(PBSTB)中で基質を25℃で1時間固定化した後、プレートを空にし、0.1% Tween 20添加PBS(PBST)で4回洗浄した。固定化基質と変異DhaAの反応は精製GST-DhaA-Flag融合体を使用して行った。種々の濃度のタンパク質(100  $\mu\text{l}$  ; PBSTBで希釈)を固定化基質と25℃で、種々の時間にわたりインキュベートした後、プレートを空にし、PBSTで4回洗浄して反応を止めた。結合済みDhaAを検出するために、100  $\mu\text{l}$ の抗GST-HRP(Amersham)を各ウェルに加え(PBSTBで1万倍希釈)、プレートを25℃で1時間放置した。プレートを空にし、PBSTで8回洗浄し、次いでTMBを100  $\mu\text{l}$ 加えた。15分後、等容量の0.2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ を加えて発色を止め、450 nmでの吸光度を測定してシグナルを定量した。

10

## 【0363】

哺乳動物細胞中のDhaA変異体の特性解析: 配列確認済みの精選DhaA変異体を哺乳動物発現ベクター-pCI-neoに、次の要領でクローニングした: 変異体遺伝子のDhaA-FLAG部分をpGEX5X3からSallおよびNotI制限酵素で除去し、断片を1%アガロース電気泳動(1XTAE)で分離し、切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を使用して精製した。pCI-neoベクターバックボーンもまた同様に、SallとNotIで消化し、断片を分離し、精製した。ライゲーションはインサート-ベクター近似比5:1で、PromegaのLigaFast Systemを使用して行った。DNAを化学的にコンピテントにしたJM109細胞に導入し、Amp添加LB寒天平板で培養した。形質転換体コロニーを掻き取って、1mlのLB+Ampを含む96ウェルアッセイブロック(Fisher Scientific)に植菌し、終夜37℃で振とうした。細胞を回収し、Wizard 96プラスミド精製キット(Promega)によりプラスミドを精製した。プラスミドをSall-NotI酵素で消化し、DhaAインサートの有無を1%アガロース電気泳動(1XTAE)で検査した。陽性クローンをDNA配列分析法で確認した。

20

## 【0364】

哺乳動物細胞でのタンパク質産生と融合タンパク質の生成を促進するためにプラスミドpHT2を作製した。オリゴヌクレオチド

## 【化70】

10055643 (5' CTA TAG GCT AGC CAG CTG GCG CGG

ATA TCG CCA CCA TGG GAT CCG AAA TCG GTA CAG GCT TCC CCT

TCG 3'; SEQ ID NO:84) 及び10055644 (5' AGG GAA GCG GCC GCC TAC

TTA ATT AAC TAT TAG CCG GCC AGC CCG GGG AGC CAG CGC GCG

ATC TCA CTG C 3'; SEQ ID NO:85).

30

を使用して、DhaA.H272F YL-FLAGを含むpCIneoからDhaA.H272F YLを増幅した。PCR産物と目的ベクターの両方をEcoRV/NotIで切断し、ゲル精製し、ライゲートして、JM109に導入した。pHT2によってコードされるDhaAタンパク質(HT2と命名)はDhaA.H272F YLのアミノ酸配列に対する追加の変異を含んだ。追加の変異はH272F、K175M、C176GおよびY273L置換に加えて、1) 改良Kozak配列を生成させるための位置2へのグリシンの挿入; 2) SmaI/XmaI/AvaI部位を生成させるためのAla292Gly置換; およびNaeI部位を生成させるためのC末端へのアラニンとグリシン(AlaGly)の挿入を含んだ(図49)。

40

## 【0365】

哺乳動物細胞の培養: CHO-K1細胞(ATCC-CCL61)またはHeLa細胞(ATCC-CCL2)を、Ham's F12栄養素またはDulbecco's改良最小必須培地[それぞれ10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mlペニシリンおよび100mg/mlストレプトマイシンを添加]により95%空気+5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で培養した。

## 【0366】

哺乳動物細胞のトランスフェクション: 種々のタンパク質の一時的発現を調べるため

50

に、細胞を24ウェルプレート(Labsystems)または8ウェルLTチャンバースライド(Nunc)に30,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度でまいた。約80-90%コンフルエンスで、細胞をリポフェクタミン/DNA/抗生物質無添加培地の混合体と、メーカー(Invitrogen)の説明書に従って、接触させた。翌日培地を新鮮培地と交換して、細胞を種々の期間にわたり増殖させた。

【0367】

Cell-to-Gel分析: CHO-K1細胞を24ウェルプレート(Labsystems)にまき、pCIneo-CMV.DhaA変異体-Flagベクターでトランスフェクトした。24時間(実験によっては12、24または48時間)後、培地を、0.2~25.0 μMのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClまたはDiAcカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中に1、5、15または60分間置いた。このインキュベーション終了後、培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗い(pH 7.4; 連続2回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)、細胞を試料バッファー(1%SDS、10%グリセロールなど; 200 μl/ウェル)中で可溶化した。SDS-PAGE(4-20%グラジエントゲル)でタンパク質(2~10 μl/レーン)を分離し、タンパク質へのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの結合を蛍光イメージャー(日立/日本)により、540/575nmに等しいE<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub>で検出した。

10

【0368】

細胞画像化: HeLa細胞を8ウェルLTチャンバースライド(Nunc)にまき、pCIneo-CMV.DhaA変異体または -アレスチン2-コネクター-DhaA.H11YLベクターでトランスフェクトした。24時間後、培地を、種々の濃度(0.2~10.0 μM)のカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClまたはDiAcカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中に15分間置いた。このインキュベーション終了後、培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗った(pH 7.4; 連続2回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)。生細胞の画像化実験のために、新しい培地を細胞に加えた。細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し、60分後に培地を新鮮培地と交換した。細胞の蛍光画像を、カルボキシフルオレセインおよびカルボキシテトラメチルローダミンに対応するフィルターセットを備えた共焦点顕微鏡FluorView 500 (Olympus)で撮影した。細胞を固定化するために、3.7%パラホルムアルデヒド/0.1%Triton-X100添加PBS(pH 7.4)溶液 200mlを細胞に加えた。室温(RT)で15分後、細胞を1.0% Triton-X100添加PBS(pH 7.4)で洗浄した(10分間、RT)。界面活性剤溶液をPBS(pH 7.4)に交換し、細胞画像を共焦点顕微鏡FluorView 500 (Olympus)で撮影した。実験によっては、細胞を100nMのMitoTracker<sup>R</sup> Green FM(Invitrogen, M-7514)またはMitoTracker<sup>R</sup> Orange CMTMRos (Invitrogen, M-7510)により、15分間、37 °Cで対比染色した。

20

30

【0369】

DhaA融合体の生産: -アレスチン2-コネクター-HT2融合体カセットを、pHT2ベクター(Promega)のNheI/BamHI制限部位に -アレスチン2(実施例VIIを参照)をサブクローニングすることにより、構築した。コネクターとBamHI部位とをコードする配列を -アレスチン2コード領域の3'末端に付加し、また -アレスチン2-コネクター-DhaA.H272F鑄型から該断片を増幅するために、2つのプライマー

【化71】

(5'-

40

CTATAGGCTAGCCAGCTGGCGCGGATATCGCCACCATGGGGGAGAAA  
 CCCGGGACCAGGG-3'; SEQ ID NO:76, 及び 5'-  
 GATTTTCGGATCCCATTCTAGAGGGCCCGCGGTACCGCAAGCTTGATC  
 CGGAGCAGAGTTGATCATCATAGTCGTCATCC-3'; SEQ ID NO:77)

を設計した。

【0370】

phRLuc-コネクター-DhaA.H272F-Flag(実施例IXを参照)をコードするベクター中のDhaA.

50

H272Fコード領域をHT2コード領域に置換することでphRLuc-コネクター-HT2-Flag融合体カセットを構築した。HT2コード領域の5'末端にXbaI部位を、3'末端にAgeI部位をそれぞれ付加し、またpHT2鑄型から925bp断片を増幅するために、2つのプライマー【化72】

(5'-  
GCCCTCTAGAGCCGTCGACGCTGCCATGGGATCCGAAATCG-3'; SEQ  
ID NO:78,及び5'-  
GTAGTCACCGGTGCCGCGCCAGCCCCGGGGAGCCAGCGCGCG-3'; SEQ ID  
NO:79)

10

を設計した。DhaA.H272Fコード領域をXbaI、AgeI制限酵素で切断し、次いでHT2をコードする925bp断片をphRLuc-コネクター-DhaA.H272F-Flagコード化ベクターのXbaI、AgeI部位に挿入した。融合体コンストラクトの配列はDNA配列分析法で確認した。

【0371】

生きた哺乳動物細胞で発現したRenillaルシフェラーゼ-HT2-Flag融合タンパク質: CHO-K1細胞を24ウェルプレート(Labsystems)にまき、pCIneo-hR.Luc-コネクター-HT2-Flagベクターでトランスフェクトした。24時間後、培地を、25 μMのピオチン-X-14-CIと0.1% DMSOまたは0.1% DMSOだけを含む新鮮培地に交換し、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中に60分間置いた。インキュベーション終了後、培地を捨て、細胞を素早くPBSで洗って(pH 7.4; 連続2回: 1.0 ml/cm<sup>2</sup>; 各5秒間)から、新しい培地を細胞に加えた。実験によっては培地を交換しなかった。細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻した。

20

【0372】

60分後、培地を捨て、プロテアーゼ阻害物質(Sigma #P8340)を添加したPBS(pH=7.4、200 μl/ウェル、RT)中に細胞を回収した。細胞を針(1M1 23GTW)粉砕法で溶解した。次いで細胞溶解液をStreptavidin Magnasphere Paramagnetic Particles (Promega #Z5481)と、メーカーのプロトコールに従って、インキュベートした。要するに、回転ディスクを使用して細胞溶解液をビーズと60分間、RTでインキュベートした。未結合物質を回収し、ビーズは0.5% Triton-X100添加PBSで洗って(3×500 μl、pH=7.4、室温)から、SDS-試料バッファーに(SDS-PAGE分析用)またはPBS(pH=7.4)に(R.Luc活性測定用)、再懸濁させた。タンパク質をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写させ、抗Flag-Abで分析し、また結合抗体を改良化学発光(ECL)システム(Pharmacia-Amersham)で検出した。ビーズに結合したhR.Lucの活性はPromegaのRenilla Luciferase Assay Systemを使用して、メーカーのプロトコールに従って測定した。

30

【0373】

結果

DhaA.H272Fの構造モデルの生成

InsightII Modelerを使用してDhaA.H272Fの構造モデルを構築した。モデル計算用の参照構造は1BN6.pdb (Rhodococcus species DhaA)であった。5つの高最適化モデルを計算し、全体としての最低エネルギーおよび最低構造パラメーター違反を基に1つの最良モデルを選択した。次に、最良モデルを参照構造1BN6.pdbと構造アラインメントして、アラインメントさせたC 原子の平均原子間距離(RMSD)(単位 )で表わされる全体およびペア間の差の指標を求めた(図2A)。

40

【0374】

基質ポケットの同定

基質存在下のDhaAの構造はすでに発表されており、触媒3点セット近傍に埋め込み型の活性部位ポケットを示す(図2A; Newman et al. 1999)。しかし、該活性部位ポケット(ここでは「基質ポケット」または「リガンドポケット」という)に基質が進入する方向は示

50

していない。基質ポケットが存在しそうな位置は異種基質と複合体を形成した関連ハロアルカンデハロゲナーゼの構造分析により特定された(Protein Database)。これらの複合体では、いずれの基質もリガンドポケット全体を満たすわけではないが、それらの基質はやや異なる位置に存在するものの、総合すれば、基質ポケットの全般的な位置を推定することが可能であると構造重ね合わせにより判明した。次いで無基質のDhaA構造(1BN6.pbd)の重ね合わせにより、DhaA.H272Fで、対応するポケット位置の特定が可能となった。

【0375】

#### DhaA-基質モデルの生成

基質を共有結合させたDhaA.H272Fの構造モデル(「DhaA-基質モデル」)を生成させた。まず、カルボキシフルオレセイン- $C_{10}H_{21}NO_2-Cl$ をDhaA.H272Fの基質ポケットに手操作でドッキングさせた。次に、DhaAの求核性アスパラギン酸のカルボキシル酸素の1つとCl除去後に利用可能になる末端Cとの間に共有結合を形成させた(図2E)。この共有結合の長さは約3 Åに抑えて、遷移状態に近似させるようにした。共有結合させた基質はエネルギー極小化を別個に、次いで基質近傍のDhaA.H272F残基と共に、行った。エネルギー極小化はDiscover-3により、CFF91力場を用いて行った。

10

【0376】

#### 変異誘発用残基の同定

残基の番号付けはDhaAの1次配列に基づいており、公表結晶構造(1BN6.pdb)の番号付けとは異なる。DhaA-基質モデルを使用して、結合基質の3 および5 Å以内のデハロゲナーゼの残基を同定した。これらの残基は変異誘発用の第1標的候補であった。このリストから、置換されたときに立体障害または不都合な相互作用をなくすまたは好都合な電荷、極性または他の相互作用を導入する見込みのある残基を選んだ。たとえば位置175のLys残基は基質ポケット入口のDhaA表面に存在する：この大きな荷電側鎖を除去すればポケットへの基質の進入が容易になるかもしれない(図2F)。位置176のCys残基は基質ポケットの内側を覆っており、そのかさ高な側鎖はポケットを狭窄させている：この側鎖を除去すればポケットが広がり、基質が進入し易くなるかもしれない(図2F)。位置245のVal残基は基質ポケットの内側を覆っており、また結合基質の2つの酸素に近接している：この残基をトレオニンで置換すれば、水素結合の機会が増え、基質の結合を容易にするかもしれない(図2F)。最後に、Bosma et al. (200)はアミノ酸置換Tyr273Pheのある触媒活性DhaA変異体の単離を報告している。この変異はCys176Tyr置換と再結合させると、1,2,3-トリクロロプロパン(TCP)の脱ハロゲン効率が野生型デハロゲナーゼと比べて8倍近く高い酵素をもたらした。これらの構造分析に基づき、部位特異的V245T変異を生成させたうえに、位置175、176および273のコドンランダム化した。得られた変異体をスクリーニングして、蛍光(式VIまたはVIIIの化合物)およびビオチン(図7)結合DhaA基質との共有結合形成速度の改善の有無を調べた。

20

30

【0377】

#### ライブラリーの生成とスクリーニング

諸々のライブラリーおよび変異体構築の出発物は、DhaA.H272FおよびDhaA.D106C(図2B)をコードする遺伝子を収めたpGEX5X3系プラスミド(図3A)であった。これらのプラスミドは、ハロアルカンリガンドと安定共有結合を形成しうる親DhaA変異体をコードする遺伝子を入れてある。NNK site-saturation変異誘発法を使用してDhaA.H272FおよびDhaA.D106C鑄型の位置の175、176および273のコドンランダム化した。これらの位置のシングル部位ライブラリーに加えて、複合175/176 NNKライブラリーもまた構築した。しかし、これらのライブラリーに由来するランダムクローンの配列分析から、無変異の野生型配列をもつクローンが高頻度(50%)で存在することが判明した。鑄型濃度の変更およびDpnI処理の回数と時間の拡大によるQuickChange Multiプロトコールのトラブルシューティングも、こうした頻度にはあまり効果がなかった。そこで、各ライブラリーからのスクリーニング対象クローン数の決定ではライブラリーの野生型配列汚染率を勘案した。たとえば、あるシングル部位NNKライブラリーは20種類すべてのアミノ酸をコードするコドン多様性が32であり、可能な配列変異の99%をカバーするにはライブラリーの約5倍のオーバーサンプリン

40

50

グが必要である( $L=-V \ln 0.01$ )。このオーバーサンプリングは少なくとも160個体のクローンをスクリーニングする必要があることを意味する。しかし、これらのライブラリーは野生型配列により著しく(約50%)汚染されていたため、一般にシングル部位ライブラリーから約400クローンを調べた。複合175/176NNKライブラリーは400種類のアミノ酸をコードする理論コドン多様性が1024である。各ダブル部位に由来する約3,000~4,000クローンを調べた。従って、都合約10,000クローンを選び出してスクリーニングしたことになる。

#### 【0378】

DhaA変異体ライブラリーの1次スクリーニングツールとして3つのアッセイ法を評価した。第1の*in vivo*標識アッセイ法は、*E. coli*中の改良DhaA変異体は優れた標識特性を有するであろうとの前提に立つ。優秀なクローンではカルボキシテトラメチルローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2-Cl$ による短時間の標識と細胞洗浄の後、575nmでの蛍光強度が増しているはずである。図31Aは、96ウェルプレートただ1枚のDhaA.H272F 175/176ライブラリーのスクリーニングで、いくつかの潜在的な改良(すなわちヒット)を首尾よく特定したことを示す。4個のクローンで親クローンの2倍の蛍光強度が検出された。しかし、このアッセイ法は潜在的有用性にもかかわらず、1次スクリーンとして採らなかった。自動化に難があり、また活性DhaA変異体が過剰発現しただけで偽陽性を生じさせるためである。

10

#### 【0379】

1次スクリーンとして検討した第2のアッセイ法は、96ウェルプレートに固定化した抗FLAG抗体表面に飽和量のDhaA変異体を捕捉することにより、タンパク質濃度を効果的に正規化する*in vitro*アッセイ法であった。図31Bはこのアッセイ法を使用して、プレート1枚のDhaA.H272F 175/176複合ライブラリーから得たスクリーニング結果を示す。このアッセイ法もまた、*in vivo*法と同様に、大きな親活性バックグラウンドから潜在的な改良DhaA変異体を明確に同定することができた。数クローンは親DhaA.H272Fよりも最高4倍も強いシグナルを生成した。しかし、このアッセイ法は試薬代、アッセイ準備時間、多重インキュベーション/洗浄ステップの自動化などの点で、費用がかかった。加えて、このアッセイ法では、以前に優秀として単離、評価された若干の変異体が捕捉できなかった。

20

#### 【0380】

1次DhaAスクリーンとして最終的に採択されたのはMagneGST(登録商標)タンパク質精製レジン(Promega)を使用するアッセイ法であった。この*in vitro*スクリーニングアッセイ法の概要は図32に示す。要するに、96ウェルプレートで増殖させた培養物に由来する細胞ペレットを、溶解バッファーと標識試薬(基質カルボキシテトラメチルローダミン- $C_{10}H_{21}NO_2-Cl$ )とMagneGSTレジンを含む試薬カクテルに再懸濁させた。これは細胞溶解、標識、タンパク質捕捉を単一ステップに集約するものであり、アッセイ法を著しく簡素化した。レジンを振とうさせながら短時間のインキュベーションを行いその間にタンパク質を磁氣的に捕捉した後、ウェルを洗浄してから標識DhaA変異体を溶出させた。溶出液を対象に580nmでの蛍光強度を求めた。この簡素化スクリーニングアッセイ法は、96ウェルプレート約20枚を6.5時間で検査する自動Tecanロボットプラットフォームに容易に適合させることができた。

30

#### 【0381】

MagneGST(登録商標)系の自動アッセイ法を使用してDhaA変異タンパク質ライブラリーをスクリーニングした。DhaA.H272F系およびDhaA.D106C系の175シングル部位ライブラリーのスクリーニングでは、親クローンを有意にしのごヒット(データ非表示)が見付からなかった。図33A-Bはそれぞれ176シングル部位ライブラリーと175/176複合ライブラリーの代表的なスクリーニング結果である。親クローンをしのご標識特性を示す数個のクローンが特定された。図34はDhaA.H272F Y273 NNKライブラリーの2つの代表的なスクリーニングプレートを示す。標識特性の有意の改善を示す3個のクローンが、DhaA.H272F親クローンを含むバックグラウンドから明確に識別可能である。スクリーニング対象ライブラリーでは、DhaA.H272F親クローンよりも50%以上高活性のクローンの全ヒット率は1~3%であった。DhaA.D106Cライブラリーでも同様のスクリーニング結果が得られた(データ非表示)。最初の1次スクリーンで同定されたヒットをマスタープレートに移し、養生し、再増殖させ

40

50

、MagneGST（登録商標）アッセイ法で再スクリーニングした。対照親クローンの2倍以上のシグナルを示すDhaA変異体だけを選んで配列分析に回した。

【0382】

DhaAヒットの配列分析

図35AはDhaA.H272Fライブラリーのスクリーニングで絞られたDhaA変異体のコドンを示す。この分析で7つのシングル176アミノ酸置換(C176G、C176N、C176S、C176D、C176T、C176AおよびC176R)が判明した。興味深いことに、3種のSerコドンが分離された。位置175および176では多数のダブルアミノ酸置換も同定された(K175E/C176S、K175C/C176G、K175M/C176G、K175L/C176G、K175S/C176G、K175V/C176N、K175A/C176SおよびK175M/C176N)。これらのダブル変異体では、位置175で7種のアミノ酸が見付かったが、位置176で見付かったのは3種のアミノ酸(Ser、Gly、Asn)にすぎない。分析対象には、ライブラリー品質評価時に同定されたシングルK175M変異を含めた。さらに、標識特性に優れたいくつかのシングルY273置換(Y273C、Y273M、Y273L)もまた同定された。

10

【0383】

図35BはDhaA.D106Cライブラリーで同定されたDhaA変異体の変異コドンを示す。シングルC176G変異を除いて、同定されたクローンはほとんどがダブル175/176変異を含んでいた。位置175では合計11種のアミノ酸が同定された。一方、位置176では3種のアミノ酸(Gly、Ala、Gln)が同定されただけであり、そのうちGlyはD176ダブル変異体のほぼ3/4で出現している。

20

【0384】

DhaA変異体の特性解析

スクリーニングにより同定された数種のDhaA.H272F系およびDhaA.D106C系の変異体はMagneGSTアッセイで親クローンよりも有意に高いシグナルを生成した。図36AによればDhaA.H272F系変異体のA7とH11、それにDhaA.D106C系変異体のD9がカルボキシテトラメルチローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clでは親クローンを大幅にしのぐ高いシグナルを生成している。加えて、位置273で同定されたDhaA.H272F系変異体(T273L “YL”、Y273M “YM”、Y273C “YC”)はみな、ピオチン-PEG4-14-Clでは、親クローンに比べて有意に改善しているように見受けられる(図36B)。これらの分析結果は、SDS-PAGE蛍光画像ゲル分析によるタンパク質標識研究結果(データ非表示)とも合致した。同定されたDhaA.H272F系の最良変異の組み合わせが相加的であるか否かを判定するために、残基273の3変異をDhaA.H272F系A7およびH11変異と組み換えてみた。これらの組み換えタンパク質変異体は、第1ラウンドのスクリーニングで同定された変異体(第1世代)と区別するために、「第2世代」DhaA変異体と呼ぶ。

30

【0385】

比較反応速度論研究を容易にするために、いくつかの改良DhaA変異体を選んで、Glutathione Sepharose 4Bレジンにより精製した。一般に、DhaA.H272F系およびDhaA.D106C系の融合体のE. coliでの産生はロバストであった。ただし、アミノ酸シングル変異がDhaA産生に負の影響を及ぼしている可能性もある。こうしたタンパク質産生の変動の結果として、DhaA変異体の全般的な収量もまた大幅に(1~15mg/ml)変動した。いくつかのDhaA.H272F系変異体を使用して予備的な速度論的標識研究を行った。図37Aによれば、分析用に選出した変異体の標識速度は総じて親H272Fをしく。実際、経時変化を詳しく調べると、第1世代変異体YL(レーン15)や2つの第2世代変異体A7YM、H11YL(それぞれレーン13、21)を含めたいくつかのDhaA変異体の標識は2分時点までに完了している模様であった。もっと広範囲の経時分析を、DhaA.H272F A7と2つの第2世代DhaA変異体A7YM、H11YLを対象に行った。図37Bから明らかのように、第2世代クローンの標識反応は第1時点(20秒)までにほぼ完了している。他方、A7変異体は最終時点(7分)でやっと完了に近づいている模様である。ゲル上の蛍光バンドを定量したが、相対的な生成物形成速度を図37Cに示す。標識速度を求めるために、H11YLの濃度を50ngから10ngに下げ、もっと精密な経時分析を行った。図38Aに示す結果によれば、これらの標識条件の下では線形初期速度を測定することができた。蛍光画像化ゲルデータの定量により、2次速度定数の計算が可能となった(図38B)。観測

40

50

された傾きに基づくと、DhaA.H272F H11YLのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl標識に関する2次速度定数は $5.0 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ であった。

#### 【0386】

蛍光偏光(FP)法はタンパク質に結合する小蛍光リガンドの研究にうってつけである。FP法は基質結合体/遊離体比の直接的な指標をほぼ瞬時に与えてくれるという点で、分子結合の分析に使用される方法のなかでは特異である。そこで、精製DhaA変異体の蛍光画像ゲル分析の代替法としてFPアッセイ法を開発した。図39AはH272F親クローンのA7およびH11YL変異体に対する相対標識速度を示す。この実験で使用した標識条件の下では、第2世代変異体DhaA.H272F H11YLは比較対象のA7およびH272F変異体よりも有意に高速であった。この速度を別の視点から眺めると、A7およびDhaA.H272F(親)タンパク質である程度の速度を実現するためには、それぞれ約40倍および420倍の量が必要であった。図39Bは、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを使用したFP結果を示す。この実験に使用した標識条件の下では、フルオレセイン系基質を使用すると、H11YL変異体もまたA7および親DhaA.H272Fタンパク質よりもずっと高速であることが明らかである。しかし、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClによるH11YLの標識は対応するカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質による標識よりもずっと低速であるように見受けられる。H11YLタンパク質の所要量はカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clとの反応では(150nM)カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clとの反応の場合(35nM)と比べて4倍あまりも多かったが、それでも図39Bで実測された速度は図39Aに示されるカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clとの実測速度を質的に下回るように見受けられる。

#### 【0387】

FPアッセイ法は、その感受性や真の均一性を踏まえて、蛍光標識基質による、精製DhaA変異体の標識特性の解析に使用した。次に、これらの研究に由来するデータを使用して各DhaA変異体-基質ペアについて2次速度定数を計算した。これらの研究の結果は図40に示す。研究に使用した2つの親タンパク質DhaA.H272FおよびDhaA.D106Cはカルボキシテトラメチルローダミン系およびカルボキシフルオレセイン系基質で同等の速度となることが判明した。しかし、どちらの場合にもカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質による標識のほうが低速となった。FP法で特性を解析した第1世代DhaA変異体の標識速度はみな、対応する親タンパク質よりも7~3555倍も高速であった。標識速度に断然最大のインパクトを及ぼしたアミノ酸シングル置換は、DhaA.H272F系の273位置での3種の置換(Y273L、Y273M、Y273C)であった。にもかかわらず、試験した各第1世代DhaA.H272F変異体では、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質による標識がいつも(1.6~46倍)低速であった。ほとんどの第2世代DhaA.H272F変異体は改良が最も著しい第1世代変異体と比べても有意に高速であった。特にH11YL変異体は基質がカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clだと2次速度定数の計算値がDhaA.H272F親を4桁余りも上回った。H11YLの速度定数 $2.2 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ はカルボキシテトラメチルローダミン結合ピオチン/ストレプトアビジン相互作用(図41)に関する速度定数計算値とほぼ同じであった。この値はピオチン-ストレプトアビジン相互作用に関して表面プラズモン共鳴法で求めた $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ という結合速度(on-rate)とも合っている(Qureshi et al. 2001)。第2世代変異体のいくつかは、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質でも速度が向上したが、前述のように、その速度はいつもカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質の場合を下回った。たとえばDhaA.H272F H11YL変異体の、カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによる標識速度はカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによる標識速度の100分の1以下であった。

#### 【0388】

##### 改良DhaA.H272F H11YL変異体の構造分析

InsightII Modelerを使用してDhaA.H272FとDhaA.H272F H11YLの構造モデルを構築した。モデル計算用の参照構造は1BN6.pdb (Rhodococcus species DhaA)であった。DhaA.H272F H11YLモデルの計算では、2つの追加関連八口アルカンデ八口ゲナーゼの参照構造を含めた。すなわち1CV2.pdb (Sphingomonas paucimobilis)と2DHD.pdb (Xanthobacter autotro

phicus)である。各配列につき5つの高最適化モデルを計算し、全体としての最低エネルギーおよび最低構造パラメータ違反を基に1つの最良モデルを選択した。次に、これらの最良モデルを参照構造1BN6.pdbと構造アラインメントして、アラインメントさせたC原子の平均原子間距離(RMSD)(単位 )で表わされる全体およびペア間の差の指標を求めた。  
【0389】

基質カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを共有結合させたDhaA.H272FとDhaA.H272F H11YLの最良構造モデルに共有結合させた。まず、該基質を基質ポケットに手操作でドッキングさせ、次に該タンパク質の求核性アスパラギン酸のカルボキシル酸素の1つとCl除去後に利用可能になる末端Cとの間に共有結合を形成させた。基質のコンフォメーションを、両モデルで可能な限り類似するよう、調節した。次に、DhaA.H272FとDhaA.H272F H11YLの、基質未結合状態または基質共有結合状態の初期モデルを、エネルギー極小化を図るべく、pH 7.0で水素を添加し、またCFF91力場を用いてポテンシャルを割り当てて作製した。両モデルはDiscover-3により、非結合相互作用を使用して、残基間距離または原子間距離を基準にしたカットオフ、距離依存の比誘電率1.0、および最後の極小化ステップに対応する最終収束0.01の条件で、エネルギーを極小化した。基質未結合モデルには次の極小化カスケードを使用した：a)系全体の水素を極力減らし、また他の原子は固定化する；b)基質の約8 以内の残基の側鎖を極力減らし、また他の原子は固定化する；d) 基質の約8 以内の、高調波C 拘束のある残基を極力減らし、また他の原子は固定化する。基質結合モデルには次の極小化カスケードを使用した：a)系全体の水素を極力減らし、また他の原子は固定化する；b)基質を極力減らし、また他の原子は固定化する；c)基質と基質の約8 以内の残基の側鎖を極力減らし、また他の原子は固定化する；d) 基質と基質の約8 以内の、高調波C 拘束のある残基を極力減らし、また他の原子は固定化する。すべての極小化モデルについて、基質と基質の約8 以内の残基の間のバンプ(bump；かち合い)検査を行い、立体障害を測定した。基質ポケットの形状と大きさを、プローブ半径をデフォルト値の1.4 とし基質の約5 以内の残基を対象にコノリー面(Connolly surface)を計算することにより、可視化した。すべてのモデルを構造的に重ね合わせて、特定残基の位置の変化を評価した。

【0390】

関連残基の位置：求核性Asp106は、どちらの変異体でもカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの結合に伴い、ポケット内へとやや移動した。W107は、求核剤に隣接して、活性部位に結合した基質を求核攻撃に備えて正しい配向に保持する役目を果たすが、自身の位置をほとんど変化させない。DhaA.H272Fでは、F272の側鎖は基質が存在しなければポケット内に突き刺さり、また基質が存在するとポケットから約45度回転して抜け出る。DhaA.H272F H11YLでは、F272の側鎖は基質が存在しなければポケット内に突き刺さらず、また基質が存在するとその位置を微調整するだけである。これは基質へのDhaA.H272F H11YLの結合を容易にするはずである。Glu130はどの構造でも類似の配向を示すが、基質結合状態のDhaA.H272Fの場合に限り、Glu側鎖は基質の受け入れに必要なF272側鎖の回転によりポケットから押し退けられる。

【0391】

基質ポケットへの基質の全般的なフィット：エネルギー極小化タンパク質-基質構造についてバンプ(bump；かち合い)検査を行い、基質のどの原子がタンパク質のどの原子と「かち合う」かを示すようにした。2つの原子がvan der Waals半径の少なくとも10%オーバーラップしていれば、バンプ(かち合い)が存在することになる。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClはDhaA.H272FのLys175とCys176に対してバンプを示すが、DhaA.H272F H11YLのいずれの残基に対してもバンプを示さない。これはDhaA.H272F H11YLに導入された変異がポケットの幅をある程度広げたことを示唆する。

【0392】

基質ポケットの形状と大きさ：基質ポケットを、プローブ半径デフォルト値1.4 でのコノリー面(Connolly surface)として可視化した。基質が存在しなければ、DhaA.H272Fは触媒3点セットの近くに、Cys176を囲みTyr273へと延びるポケット内の狭窄部または不連

続部によって隔てられた、特徴のあるポケット入口と大きなポケットとを見せる(図42A)。この狭窄部は基質が結合すると押し開かれる(図42B)。DhaA.H272F H11Y変異体は位置176、273でポケット狭窄を示さず、基質の不存在下(図42C)、存在下(図42D)のいずれでも、一貫して広い、開放されたポケットを有するが、それは基質の進入がきわめて容易であることを示唆する。DhaA.H272F H11YへのK175M変異の導入はポケットの開放にあまり寄与しない模様である。

#### 【0393】

DhaA変異体の熱安定性研究：特定の第1および第2世代DhaA.H272F変異体の熱安定性を、種々の温度で60分放置後の精製タンパク質の残留活性を測定して、評価した。図43は第1世代Dha.H272F変異体と対応するタンパク質の熱安定性プロファイルである。最高活性の第1世代変異体(Dha.H272F YL、Dha.H272F YCおよびDha.H272F YM)は30 超の温度では比較的熱不安定性であった。一方、Dha.H272F親およびDha.H272F A7変異タンパク質のほうは最高40 の温度まで熱安定性であった。Dha.H272F H11変異体は50 でも有意の標識活性を保持した(50 での半減期58分)。第2世代DhaA.H272F変異体のうち、Dha.H272F H11YLは42 でも大部分の活性を保持した(図43B)が、もちろんDha.H272F H11 (図43A)には及ばなかった。Dha.H272F H11に熱安定性を付与する同じ変異(すなわちK175MおよびC176G)はDha.H272F YL変異体の熱安定化にも寄与している可能性がある。

#### 【0394】

Dha.H272F H11YLの反応速度に対する温度の効果：反応速度に対する温度の効果を調べるために、標識経時実験を室温と氷浴(0 )で行った。蛍光画像ゲル分析によれば、温度が下がってもカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clによる標識速度には悪影響がなかった(図44)。むしろ、低い温度のほうが反応速度は増すように見える。計算では2次速度定数は0 では $3.1 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ であるが、25 では $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ である。

#### 【0395】

#### DhaA変異体と固定化ビオチンクロロアルカン基質との反応

改良DhaA変異体と固定化基質との反応がどれだけ改善するかを調べるために、ストレプトアビジンをプレコートしたプレートを使用してELISA式のアッセイを行った(図45A)。8つのDhaA.H272F変異体(A7、H11、YL、YM、H11YL、H11YM、A7YLおよびA7YM)を3種類の含ビオチン基質で力価を測定した(図7)。図45Bに示すビオチン-PEG4-14-Clの結果によれば、DhaA.H272F YL、DhaA.H272F YMの両変異タンパク質が該基質と最も効率的に反応する。加えて、DhaA.H272F A7YL、DhaA.H272F A7YMの双方はDhaA.H272F H11YL、DhaA.H272F H11YMよりも効率的であった。ビオチン-PEG4-14-Clで最高効率を示したこれらのクローンはいずれも他の2つのビオチン基質には結合しなかったが、これはビオチン-PEG4-14-Clが好ましい基質であることを示唆する(データ非表示)。第1世代DhaA変異体のDhaA.H272F A7およびH11は試験したいずれのビオチンともうまく反応しなかった。

#### 【0396】

#### 哺乳動物細胞中のDhaA変異体の特性解析

DhaA変異体のin vivoおよびin vitro標識：一部のDhaA変異タンパク質のE. coliでの産生は37 で低下したが、他の改良DhaA変異体はもっと高い温度で増殖、誘発させても相当の活性を保持した。これらのクローンは高温で折りたたみ面の選択的優位性を持ち、その結果として哺乳動物細胞の条件にうまく耐えられるようになるのかもしれない。その優れた速度論的および/または生産性能に基づき、変異タンパク質DhaA.H272F A7およびH11を(親のDhaA.H272FおよびDhaA.D106Cと共に)をコードする遺伝子を、哺乳動物発現ベクターpCI-neoにクローニングし、CHO細胞にトランスフェクトした。速度論的なin vivo標識研究によれば、2種類の第2世代変異体DhaA.H272F A7およびH11は基質濃度5 μMで親のDhaA.H272Fをしのぐ性能特性を示した(図46AおよびB)。従って、E. coli中、37 で著しい活性/産生を保持するというDhaA.H272F変異体A7およびH11の能力は、哺乳動物細胞中でのその優れた性能と関連していた。

#### 【0397】

3種類の追加のDhaA変異体について、一時的に発現するCHO-K1細胞でのカルボキシテト

ラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識効率を調べた。図46C-Dは標識結果のDhaA.H272F A7、DhaA.H272F H11YLおよびDhaA.D106C 30H4間比較である。カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 基質濃度5 μMでは、第2世代DhaA.H272F H11YLは15分で標識が完了した。これは同じ条件でDhaA.H272F A7の標識完了に要する時間の半分であった。それと対照的に、DhaA.D106C 30H4(DhaA.H272F H11YLに対応するDhaA.D106C系)は同程度の標識に2時間を要した。

#### 【0398】

DhaA.H272F A7およびH11YLについて、標識効率の基質濃度への依存も調べた。図46A-Cは哺乳動物細胞溶解液中での、特に低カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 基質濃度(すなわち0.1および1.0 μM)での、DhaA.H272F H11YLの優れた標識特性を示す。この試験結果は精製DhaAタンパク質を使用したin vitro反応速度研究の結果と一致する。in vivoではDhaA.H272F H11YLのカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clへの結合速度の若干の低下が観測されたが、それは哺乳動物の細胞膜が蛍光リガンドの細胞内への透過を制限する可能性があることを示唆する(データ非表示)。

#### 【0399】

DhaA変異体のin vivo安定性: 一時的にトランスフェクトした哺乳動物細胞中での特定DhaA変異体の安定性を調べた。図48Aは、トランスフェクション後12時間、24時間および48時間の時点でカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで細胞標識した後に、親変異体と2つの第1世代変異体DhaA.H272F A7およびDhaA.H272F H11YLから得られた蛍光シグナルを示す。蛍光画像化ゲルの定量から、試験した4クローンからのタンパク質産生はいずれもトランスフェクション後24時間でピークに達したあと、減少に転じて48時間時点の観測レベルに至ると判明した(図48B)。しかし、DhaA.H272F A7およびH11YLをコードするコンストラクトをトランスフェクトしたCHO-K1細胞は、48時間後にも2種類の親変異体はいずれもしのぐ活性タンパク質産生能を保持した。これは、カルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl 標識後に生成したロバストな蛍光シグナルから明白である。この結果は、DhaA.H272F A7およびH11YL変異体はin vivoで有意に安定性が高いことを示唆する。図47C-Dは同様の安定性分析の結果であるが、DhaA.H272F A7を第2世代変異体のDhaA.H272F H11YLと比較している。DhaA.H272F H11YLをコードするコンストラクトをトランスフェクトしたCHO-K1細胞は、48時間後にも著しい標識能力を保持した。というより、24~48時間の間にDhaA.H272F H11YLによって生成されるシグナルに検出可能な減衰はほとんどまたはまったく見られなかった。

#### 【0400】

##### 生きたまたは固定化した哺乳動物細胞中のDhaA.H272F H11YLの画像化

図50A-Bの画像が示すように、哺乳動物細胞で発現したDhaA.H272F H11YLはカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClまたはDiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで効率的に標識することができる。画像は明るく、卓越したSN比を示す。図50C-Dの画像が示すように、DhaA.H272F H11YL HT2(図49)とDhaA.H272FはTAMRA-C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>-Clで効率的に標識し、また3.7%パラホルムアルデヒドで固定化することができた。DhaA.H272F H11YL HT2を発現する細胞であって0.2、1.0または5.0 μM TAMRA-C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>-Clで5分間染色した細胞の画像は、DhaA.H272Fを発現する細胞であって5.0 μMカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clで30分間染色した細胞よりも明るい。これで明らかのように、哺乳動物細胞ではカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-ClはDhaA.H272F よりもDhaA.H272F H11YL HT2のほうを効率的に標識する。

#### 【0401】

##### 生きた哺乳動物細胞で発現した -アレスチン2-コネクター-DhaA.H272F H11YL HT2融合タンパク質の画像化

図50E-Fの画像が示すように、-アレスチン2-コネクター-DhaA.H272F H11YL HT2発現細胞は一般に -アレスチン2を細胞質に局在させる。融合タンパク質の標識にはDiAc-カルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clまたはカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clを使用。

10

20

30

40

50

## 【0402】

生きた哺乳動物細胞で発現したDhaA, H272F H11YL-Renillaルシフェラーゼ融合タンパク質の画像化

図51A-Bに示すように、ビオチン-X-14-Clで処理し過剰なビオチン-X-14-Clを洗い流した細胞の溶解液とインキュベートしたビーズ表面で有意のルシフェラーゼ活性が検出された。ビオチン-X-14-Clで処理しなかった細胞の溶解液とインキュベートしたビーズ表面では有意のルシフェラーゼ活性が検出されなかった。そのうえ、ビオチン-X-14-Clで処理した細胞の溶解液とインキュベートしたビーズ表面でも、遊離ビオチン-X-14-Clを洗い流さなかったときは、hR.Luc活性が検出されなかった。総合すると、これらのデータはDhaA.H272F H11YLHT2と融合した機能性タンパク質(hR.Luc)がビオチン-X-14-ClとSAコートビーズを使用して効率的に捕捉しうることを示している。この捕捉はビオチン依存的であり、また過剰量のビオチン-X-14-Clにより競合阻害することができる。hR.Luc活性へのビーズの相当の阻害効果が観測された(データ非表示)ので、SDS-PAGEと抗R.Luc抗体によるウェスタンブロット分析とを使用して、hR.Luc-コネクター-DhaA.H272F H11YL HT2融合タンパク質の捕捉効率を推計した。図51Bに示すように、hR.Luc-コネクター-DhaA.H272F H11YL HT2融合タンパク質の50%あまりをビオチン依存的に捕捉することができた。

10

## 【0403】

修飾リンカーを含むハロアルカン基質とのDhaA.H272F H11YLの反応性: Rhodococcusデハロゲナーゼ(DhaA)タンパク質の基質ポケットはXanthobacter DhIAタンパク質の基質ポケットよりも深さ、幅の両面で著しく大きい(Newman et al. 1999)。標識技術の進化に伴い、DhaA変異体は種々のリンカー構造を含む多様な基質に対応しうるはずである。代替基質の一例はp-フェネチルおよびフラニルプロピル誘導体たとえば図56に示すような化合物である。これらの修飾ハロアルカン基質の反応性を、精製DhaA.H272F H11YLタンパク質で試験した。

20

## 【0404】

図52AはFP分析で求めた種々のカルボキシテトラメチルローダミン系基質の結合速度を示す。カルボキシテトラメチルローダミン-p-フェネチル-Cl基質のDhaA.H272F H11YLに対する相互作用に関して求めた見かけ結合速度定数はカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Clの場合の3分の1にすぎなかった。しかし、これらの反応条件の下ではカルボキシテトラメチルローダミン-フラニル-プロピル-Cl基質に関しては結合が検出されなかった。カルボキシテトラメチルローダミン系基質の相対標識速度を蛍光画像化ゲル分析により確認した。使用反応条件下では、3種のカルボキシテトラメチルローダミン基質がみな該タンパク質と反応すると判明した(図52B)。ゲル上の蛍光バンドを定量化して蛍光生成物形成の相対速度を測定した。生成物蓄積の傾きの比較からは、カルボキシテトラメチルローダミン-p-フェネチル-Cl基質はDhaA.H272F H11YL標識速度がカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質よりもずっと遅いと判明する(図52C)。カルボキシテトラメチルローダミン-フラニル-プロピル-Cl基質の標識速度はカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質のその100分の1以下であった。

30

## 【0405】

同様のin vitro標識試験を、カルボキシフルオレセイン修飾p-フェネチルおよびフラニル基質を使用して行った。図53はFP分析による種々のカルボキシフルオレセイン系基質の結合速度を示す。カルボキシフルオレセイン-p-フェネチル-Cl基質の見かけ結合速度定数(5.6 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>)はカルボキシフルオレセイン-14-Clの場合の約5分の1であった(図53A)。前のカルボキシテトラメチルローダミン-クロロアルカン結合試験でも観測されたように、これらの反応条件の下ではカルボキシフルオレセイン-フラニル基質に関しては結合が検出されなかった。カルボキシフルオレセイン系基質の相対標識速度を蛍光画像化ゲル分析でも測定した。使用反応条件下では、3種のカルボキシフルオレセイン基質がみな該タンパク質と反応すると判明した(図53B)。蛍光生成物バンドを定量化により、DhaA.H272F H11YL標識速度はカルボキシフルオレセイン-p-フェネチル-Cl基質がカルボキシフルオレセイン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-Cl基質の約3分の1であると判明した(図53C)。しかし、カルボキシフ

40

50

ルオレsein-フラニル-プロピル-CI基質の標識速度はカルボキシフルオレsein-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-CI基質のその100分の1以下であった。

【0406】

種々のカルボキシテトラメチルローダミン系基質の *in vivo* 標識速度を哺乳動物細胞で測定した。pHT2ベクター(DhaA.H272F H11YL)で一時的にトランスフェクトしたCHO-K1細胞を、種々の濃度のカルボキシテトラメチルローダミン-CI-アルカンで60分間にわたり標識した。様々な時点で回収し、細胞を回収し、溶解し、タンパク質をSDS-PAGEで分離した。標識タンパク質の存在を蛍光イメージャーで検出した。図54は基質濃度1、5および20 μMでの標識生成物の蓄積を経時的に示す。蛍光生成物の蓄積の定量化は、カルボキシテトラメチルローダミン-p-フェネチル-CI基質によるDhaA.H272F H11YLの標識が試験したどの濃度でもカルボキシテトラメチルローダミン-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>-CI基質に匹敵することを示す(図54 B)。しかし、カルボキシテトラメチルローダミン-フラニル-プロピル-CI基質によるDhaA.H272F H11YL変異体の標識速度は基質濃度1および5 μMでは著しく遅かった。

10

【0407】

ビオチン-p-フェネチル-CI基質の、固定化DhaAタンパク質との反応性を試験した。図55 Aに示すような、ELISA式アッセイ用の一般的な反応スキームを行った。抗FLAG抗体を使用して2pmolのDhaA.H272F H11YLをマイクロタイタープレートのウェルに固定化した。ハロアルカン基質(17 μM)とのインキュベーションと洗浄の後、ストレプトアビジン-HRP結合体を使用して結合済み基質を検出した。発色後の色の量は各ビオチン-ハロアルカン基質の反応性の指標であった。図55Bはビオチン-p-フェネチル-CI基質が固定化DhaAタンパク質と反応したものの、反応性はビオチン-14-CI基質、ビオチン-PEG4-14-CI基質のいずれにも劣った。

20

【0408】

実施例 X I

細胞表層ディスプレイ用の例示的なDhaA融合体

多数の膜性の酵素、受容体、分化抗原および他の活性タンパク質は脂肪酸、イソプレノイド、ジアシルグリセロールおよびグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)に翻訳後プロセッシングを通じて結合し、またこれらの脂質によって膜にアンカーされる。GPIアンカー型タンパク質は多様な細胞型で発現しており、また細胞接着の制御(CD48、CD58、Thy-1/CD90)から補体制御(CD55、CD59)や酵素活性(アルカリホスファターゼ)に至るまで多様な機能をもつ。これらの分子は細胞膜の外葉にだけアンカーされ、従って細胞質の中には至らないという点でユニークである。GPIアンカーは例外なくタンパク質のC末端に共有結合する。真核生物のGPIアンカーのコア構造はエタノールアミンリン酸、トリマンノシド、グルコサミンおよびイノシトールリン脂質から、この順序で構成される。既知のGPIアンカー型タンパク質はみなC末端開裂性ペプチドから合成される(Stevens, 1995; Tiede et al. 1999; Sevelever et al. 2000で概説)。このC末端ペプチドは(a)一般に疎水性である15~30アミノ酸からなり、(b)下流細胞質ドメインを含まず(Medof and Tykocinski, 1990)、また(c)「開裂-付加」部位の周りにおける種のアミノ酸群を特徴とするパターンを確立する。この部位はC末端シグナル除去とGPIアンカー付加の後に残されるアミノ酸であるが、アミノ酸と呼ばれてきた。

30

40

【0409】

GPIは小胞体(ER)内での糖とエタノールアミンリン酸のホスファチジルイノシトールへの逐次付加により合成される(Udenfriend and Kodukula, 1995; Kinoshita and Inoue, 2000)。GPIの骨格構造は異種間で共通である。プレフォームのGPIがER内でタンパク質に付加される。GPIによる修飾を受ける前駆タンパク質は2つのシグナルペプチドをもつ。1つはN末端にあり、ER膜透過に必要なシグナルである。もう1つはC末端にあるGPI付加シグナルである。このGPI付加シグナルペプチドはGPIアミド基転移酵素によって認識されるが、この酵素は該シグナルペプチドを切断し、GPIに取って代える。

【0410】

GPIアンカー型DhaA変異体を生成させるには、De Angelis et al. (1998)提案のGPIアン

50

カー型GFP生成法を用いてもよい。この方法は新生ポリペプチドをER膜へと誘導するための追加のN末端リーダーペプチドおよびGPI付加のための追加のC末端配列たとえば

【化73】

PNKGSQTTSQTTRLLSGHTCFLLTGLLGLVMTMGLLT (SEQ ID NO:18).

を必要とする。Hiscox et al. (2002)はこの方法により、CHO細胞表面でGFPを発現させることに成功した。このGFPは、3段階PCRによりヒトCD59のシグナルペプチドの下流側(アミノ酸-25~1、たとえば

【化74】

MGIQGGSVLFGLLLVLAVFCHSGHSL; SEQ ID NO:25)

)とヒトCD59のアミノ酸67~102の(残基77にGPI付加部位を含む)上流側(たとえば

【化75】

FEHCNFNVDVTTTRLRENELTYCYCKKDLNCFNEQLEN (SEQ ID NO:44),

)にライゲートされた。

【0411】

GFPとDhaAは構造がまったく異なる。従って、哺乳動物細胞用にGPIアンカー型DhaA変異体の融合体を生成させるには、たとえば5'-ヌクレオチダーゼ(CD73)、CAMPATH(CD52)、崩壊加速因子(DAFまたはCD55)、MIRL(membrane inhibitor of reactive lysis) (CD59)、白血球機能関連抗原3(LFA-3またはCD90)、胎盤アルカリホスファターゼ(PLAP)、アセチルコリンエステラーゼ(AchE)、Thy-1(CD90)、プリオンなど種々のGPIアンカー型タンパク質のシグナル配列とGPI付加配列とを使用してもよい。触媒ポケットへの基質のアクセス可能性を改善するために、DhaAとGPI付加配列の間にペプチドコネクターを導入してもよい

【0412】

インテグリンは細胞を周囲の細胞外マトリックスに接着させる主要な受容体である(Dan en & Yamada, 2001; Hohesnester & Engel, 2002)。細胞接着をサポートするほかに、可溶性因子の受容体と協力して生存、分化、増殖を調節する。in vitroでは、フィブロネクチンへのインテグリン 5 1媒介型細胞接着は繊維芽、上皮および内皮細胞のマイトジェン依存性増殖を特に効率的にサポートする。インテグリンはヘテロ二量体の膜貫通型受容体であり、足場タンパク質を介して皮質アクチン細胞骨格に結合している。 および サブユニットの細胞外領域は非共有結合により球状頭部ドメインを形成する。該ドメインは特定の細胞外マトリックス(ECM)に結合するが、結合の特異性は および サブユニットの組み合わせによって決まる。ヒトゲノム配列の分析が進み、24種の サブユニットと9種の サブユニットが同定されるに至り、また哺乳動物には目下24種の機能的インテグリンが存在すると判明している。

【0413】

DhaA変異体を細胞表面で発現させるには、DhaA変異体とインテグリンたとえば または インテグリンとの融合体を使用する。そうした融合タンパク質はインテグリンの膜貫通ドメイン、細胞質ドメインおよび/または細胞外茎部ドメイン(extracellular stalk domain)、それにDhaA変異体を含む。インテグリンの細胞質ドメインは不完全ドメインでもよいし、またインテグリンの細胞外茎部ドメインは別のタンパク質(たとえばフラクタルカイン)の細胞外茎部ドメイン、茎部ドメインの一部、および/または遺伝子組み換えペプ

10

20

30

40

50

チドたとえば合成ペプチドと置換してもよい。インテグリンと他の関心タンパク質(たとえばGFPなどのレポータータンパク質またはルシフェラーゼなどの酵素)との融合体はまた、たとえば関心タンパク質の細胞表面ディスプレイ用にも見込まれる。

#### 【0414】

カドヘリンは固形組織細胞間の付着接触を形成維持するカルシウム依存性細胞接着分子のファミリーを含む(Takeichi et al. 1981; Hatta and Takeichi, 1986; Hatta et al. 1998)。カドヘリンは、細胞外領域にある特有のカドヘリンリピート配列を特徴とする膜1回貫通タンパク質である(Patel et al. 2003)。これらのリピートは各々110アミノ酸からなり、サンドイッチドメインを形成する。カドヘリンは一般にこうした「カドヘリンドメイン」をいくつか、タンデムリピートとして細胞外領域にもつ。これらのドメインの連結は各連続ドメインペア間の3個のCa<sup>2+</sup>イオンの特異的結合によって強化される。カドヘリンは次のようにいくつかのサブファミリーに分類しうる(Nollet et al. 2000): 最終的にアクチン細胞骨格に結合するタイプI(クラシカル)およびタイプIIカドヘリン; 中間フィラメントに結合するデスモゾームカドヘリン(デスモコリンおよびデスモグレイン); それに主に神経系で発現するプロトカドヘリン。加えて、いくつかの「非定型」カドヘリンもまた報告されている。これは単数または複数のカドヘリンリピート配列を含むほかはカドヘリンの特徴をまったく欠くタンパク質である。

10

#### 【0415】

DhaA変異体を細胞表面で発現させるには、DhaA変異体とカドヘリンたとえばタイプIまたはタイプIIカドヘリンとの融合体を使用する。そうした融合タンパク質は膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン、単数または複数の細胞外カドヘリンドメイン、それにDhaA変異体を含む。カドヘリンの細胞質ドメインは不完全ドメインでもよいし、また細胞カドヘリンドメインは除去しても、別のタンパク質または遺伝子組み換えペプチドと置換してもよい。不完全カドヘリン(T-カドヘリン)は一種のカドヘリンであり、膜貫通領域と保存W2を欠くもののGPIアンカーを保持するという点でユニークである。

20

#### 【0416】

細胞表面でDhaAまたはDhaA融合体を発現させるには、新生ポリペプチドをリン脂質二分子膜(たとえばER膜)へと誘導するためのN末端リーダーペプチドが必要である。このN末端リーダーペプチドはDhaA融合相手のリーダーペプチド、または別のポリペプチドのリーダーペプチドでもよい。一実施形態では、追加のポリペプチドたとえばコネクターを、DhaAとN末端リーダーペプチドの間、DhaAと融合相手の膜貫通ドメインの間、および/またはDhaAと融合相手の細胞外ドメインの間に、挿入する。

30

#### 【0417】

一般に、細胞表面でDhaA変異体を発現させるために、DhaA変異体と明確なN末端細胞外ドメインをもつ任意の膜タンパク質[例: n-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体、5-メチル-4-イソオキサゾロプロピオン酸(AMPA)受容体、グリシン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChRs)、P2X受容体、5-ヒドロキシトリプタミン3(5-HT3)受容体など; Galligan, 2002参照]との融合体を使用してもよい。一実施形態では、DhaA変異体と細胞外C末端ドメインをもつ任意の膜タンパク質(たとえば抑制性グリシン受容体。Breitinger and Becker, 2002を参照)との融合体を使用する。DhaAはタンパク質のC末端ドメインに付加または挿入する。油剛体の性能(DhaAの触媒ポケットに対するCl<sup>-</sup>-アルカン系リガンドのアクセス可能性など)を改善するには、DhaAとタンパク質の間にペプチドコネクターを導入してもよい。別の実施形態では、DhaA変異体と細胞外ループドメイン[タンパク質の膜貫通ドメインに結合するペプチド鎖、たとえばHERGチャンネル(Blaustein and Miller, 2004)のサブユニット内のS1とS2、S3とS4、S6とS6の各膜貫通ドメインに結合するペプチド鎖]をもつ任意の膜タンパク質との融合体を使用する。融合体の性能を改善するために、DhaAと該ループのN-および/またはC-末端フラグメントの間にペプチドコネクターを導入してもよい。

40

#### 【0418】

さらに別の実施形態では、細胞表面で発現するタンパク質と融合させるときに、細胞表

50

面の変異ヒドロラーゼを使用して、本発明のリガンドたとえば蛍光団を含むリガンドと結合した形で、膜タンパク質の内部化をモニターする。本発明のリガンドが微小環境感受性であれば、膜タンパク質を取り巻く環境の変化をモニターするシステムを使用してもよい。一実施形態では、本発明のリガンドは細胞膜透過性が低いまたは無い。一実施形態では、細胞表面で発現したDhaAの非透過性リガンドによる標識とそれに続く細胞透過性リガンドによる細胞処理とを使用して、膜タンパク質の表面および内部プールの移動を同時にモニターする。あるいは、そうしたシステムを使用して種々の作用物質たとえば薬物の、膜タンパク質の種々のプールに対する効果をモニターしてもよい。

さらに別の実施形態では、細胞表面で発現するタンパク質と融合させるときに、細胞表面の変異ヒドロラーゼを使用して、本発明のリガンドたとえば検出可能な機能性基を含むリガンドと結合した形で、膜タンパク質の修飾(たとえばタンパク質分解、グリコシル化など)をモニターする。あるいは、そうしたシステムを使用して種々の作用物質たとえば薬物の、膜タンパク質の修飾に対する効果をモニターしてもよい。

10

#### 【0419】

さらに別の実施形態では、イオンチャンネルと融合させるとき、細胞表面の変異ヒドロラーゼを使用して、本発明のリガンドたとえば微小環境感受性の機能性基を含むリガンドと結合した形で、該チャンネルの機能的活動をモニターする。あるいは、そうしたシステムを使用して種々の作用物質(および/または条件)たとえば薬物(および/または温度変化、細胞膜の伸展、細胞の固体表面・他細胞・タンパク質との相互作用)の、イオンチャンネルの活動に対する効果をモニターしてもよい。

20

#### 【0420】

#### 参考文献

## 【化 7 6】

- Ambler et al., Biochem. J., 276:4710 (1991).
- Arshady et al., Macromol. Chem., 187:687 (1981).
- Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. III, A.1(3-4), Supplement 38 (1997).
- Blaustein and Miller, Nature, 427: 499-500 (2004).
- Boshart et al., Cell, 41:521 (1985). 10
- Bosma et al., Appl. Environ. Microbiol., 68:3582 (2002).
- Breitingner and Becker, ChemBioChem, 3:1042 (2002).
- Chalfie, M. and Kain, S. R., eds., GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications (Wiley, New York, 1998).
- Cornish-Bowden, in Fundamentals of Enzyme Kinetics, pp 1-17, Portland Press Ltd., London (1995).
- Cubitt et al., Trends Biochem. Sci., 20:448 (1995).
- Danen & Yamada, J. Cell Physiology, 189:1 (2001). 20
- De Angelis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:12312 (1998).
- Ed Harlow, David Lane, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.726 (1988)
- Eu and Andrade, Luminescence, 16:57-63 (2001).
- Fariñas et al., J. Biol. Chem., 274:7603 (1999).
- Franken et al., EMBO J., 10:1297 (1991).
- Gardiner-Garden et al., J. Mol. Biol., 196:261 (1987).
- Gorman et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 79:6777(1982). 30
- Griffin et al., Science, 281:269 (1998).
- Hatta and Takeichi, Nature, 320:447 (1986).

【化 7 7】

Hatta et al., J Cell Biol., 106:873 (1998).

Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, CA  
(1996).

Hiscox et al., BBRC, 293:714 (2002).

Ho et al., Gene, 77:51 (1989).

Hohesnester & Engel, Matrix Biology, 21:115 (2002).

Holloway et al., J. Microbiol. Methods, 32:31 (1998).

Hynkova et al., FEBS Lett., 446:177 (1999).

Janssen et al., Eur. J. Biochem., 171:67 (1988).

Janssen et al., J. Bacteriol., 171:6791 (1989).

Jarvik and Telmer, Ann. Rev. Genet., 32:601-618 (1998).

Keppler et al., Nature Biotechnology, 21:86 (2003).

Keuning et al., J. Bacteriol., 163:635 (1985).

Kim et al., Gene, 91:217 (1990).

Kinoshita and Inoue, Curr. Opin. Chem. Biol., 4: 632 (2000).

Kneen et al., Biophys. J., 74:1591 (1998).

Krooshof et al., Biochemistry, 36:9571 (1997).

Kulakova et al., Microbiology, 143:109 (1997).

Kwon et al., Anal. Chem., 76:5713 (2004).

10

20

30

## 【化 7 8】

Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983).

Llopis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6803 (1998).

Medof and Tykocinski, In: Welply JK, Jaworski E, editors. In: *Glycobiology*. New York: Wiley-Liss, p.17-22 (1990)

Miesenböck et al., Nature, 394:192 (1998). 10

Minasov et al., J. Am. Chem. Soc., 124:5333 (2002).

Miyawaki et al., Nature, 388:882 (1967).

Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990).

Murray et al., Nucleic Acids Res., 17:477 (1989).

Nagata et al., Appl. Environ. Microbiol., 63:3707 (1997).

Nakamura et al., Nucl. Acids. Res., 28:292 (2000).

Newman et al., Biochemistry, 38, 16105 (1999).

Nollet et al., J Mol Biol, 299:551 (2000). 20

## 【化 7 9】

Ormö et al., Science, 273:1392 (1996).

Pieters et al., Bioorg. & Medicinal Chem Lett., 9:161 (1999).

Pries et al., Biochemistry, 33:1242 (1994).

Pries et al., J. Biol. Chem., 270:10405 (1995). 30

Qureshi et al., J. Biol. Chem., 276:46422 (2001).

Ragaut et al., Nat. Biotechnol., 17:1030-1032 (1999).

Rosomer et al., J. Biol. Chem., 272:13270 (1997).

Sallis et al., J. Gen. Microbiol., 136:115 (1990).

Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.

Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:5463 (1977).

Savage et al., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook* (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) (1992). 40

Schindler, Biochemistry, 38:5772 (1999).

Scholtz et al., J. Bacteriol., 169:5016 (1987).

Sevelever et al., In: Young NS, Moss J, editors. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and the Glycophosphoinositol-Linked Proteins*?. San-Diego: CA: Academic Press, p 199 (2000).

## 【化 8 0】

Siegel and Isacoff, Neuron, 19:735 (1997).

Silverman, Mechanism-based enzyme in activation, in Methods Enzymology, 249:240 (1995).

Stevens, Biochem. J., 310: 361 (1995).

Stroffekova et al., Eur. J. Physiol., 442:859 (2001).

Takeichi et al., Dev Biol., 87:340 (1981).

Tiede et al., J. Biol. Chem., 380:503 (1999).

Tsien, Ann. Rev. Biochem., 67:509 (1998).

Udenfriend and Kodukula, Meth. Enzymol., 250:571 (1995).

Uetsuki et al., J Biol Chem., 264:5791 (1989).

Wada et al., Nucleic Acids Res., 18 Suppl:2367 (1990).

Yokota et al., J. Bacteriol., 169:4049 (1987).

Zawadzke et al., Protein Engineering, 8:1275 (1995).

Zlokarnik et al., Science, 279:84 (1998).

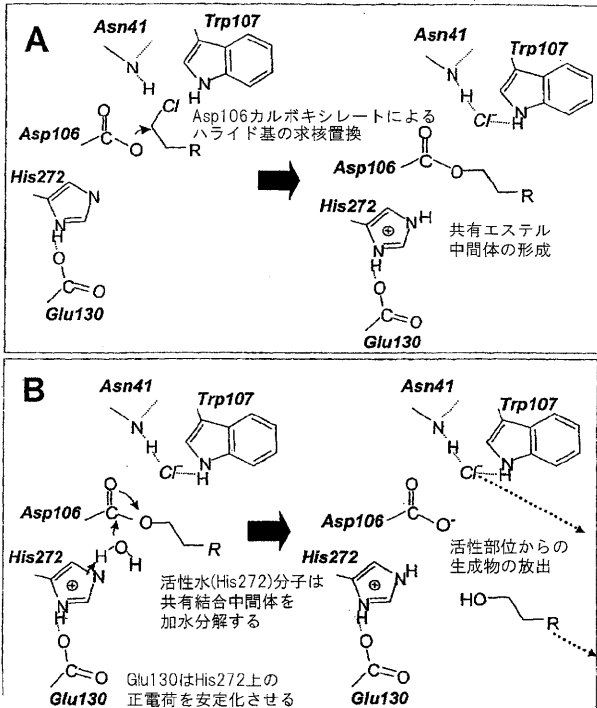
10

20

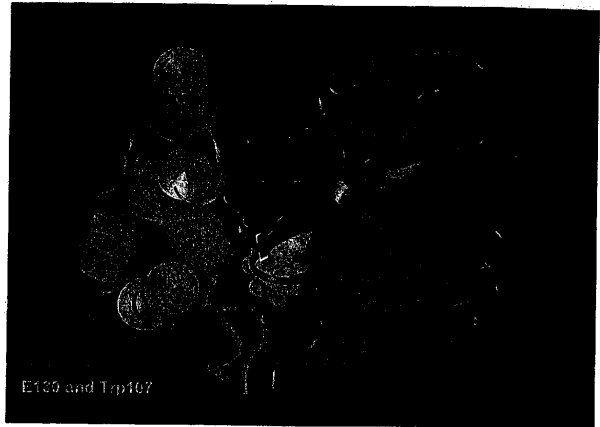
## 【 0 4 2 1】

諸々の刊行物、特許および特許出願明細書は参照をもって開示する。以上、本発明をある種の好ましい実施形態との関連で説明し、また多数の詳細も説明目的のために示したが、本発明が追加の実施形態を受け入れうること、またある種の明細が本発明の基本的な趣旨から逸脱することなく大幅な変更を許すことは当業者には自明であろう。

【 図 1 A - B 】



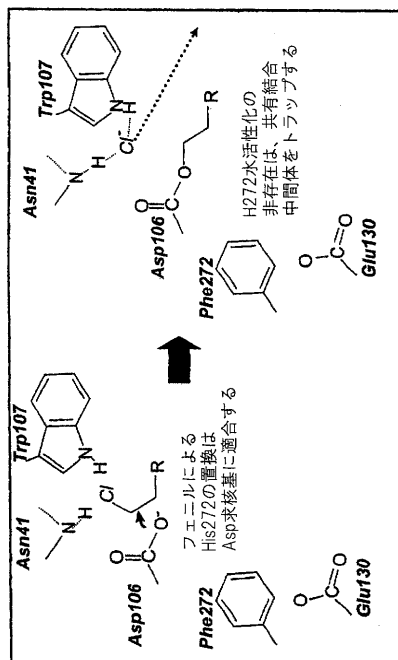
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

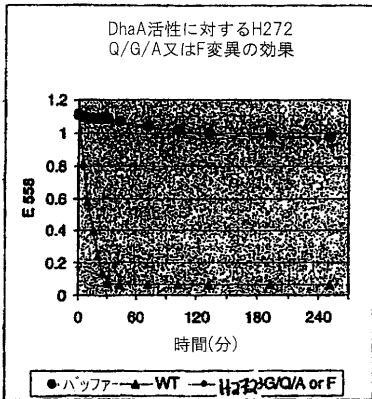
DhaA	MSEI	60
DhaA_H272F	-----	
DhaA_D106C	-----	
DhaA	CIA	120
DhaA_H272F	-----	
DhaA_D106C	-----	
DhaA	ERV	180
DhaA_H272F	-----	
DhaA_D106C	-----	
DhaA	LTE	240
DhaA_H272F	-----	
DhaA_D106C	-----	
DhaA	GTP	290
DhaA_H272F	-----	
DhaA_D106C	-----	

【 図 2 C 】

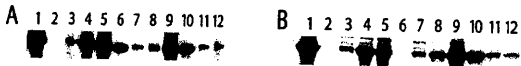




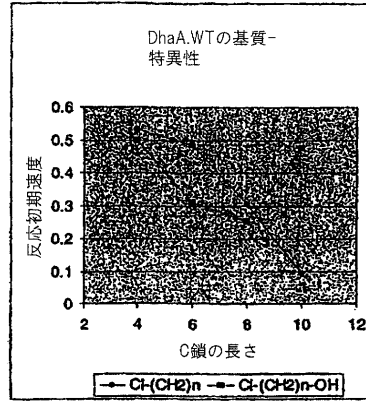
【 図 4 】



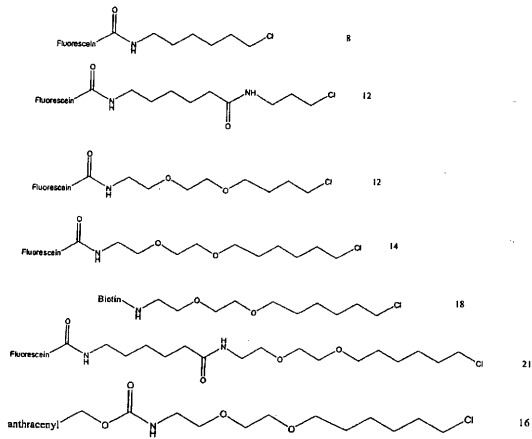
【 図 5 】



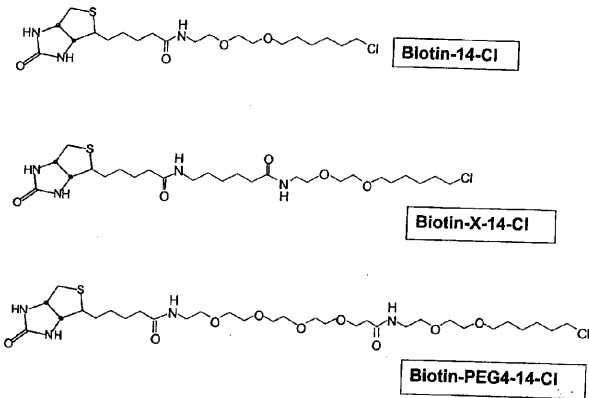
【 図 6 】



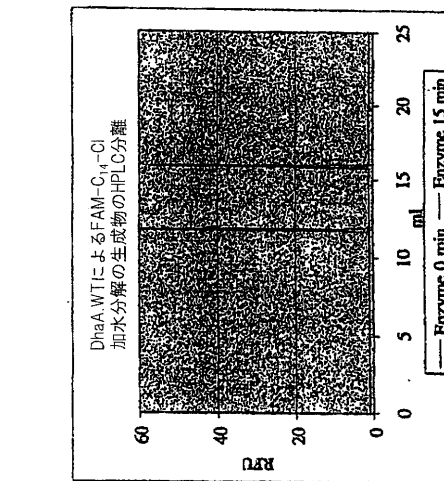
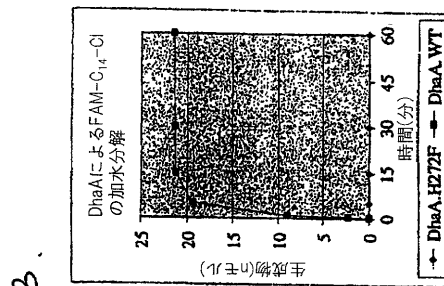
【 図 7 A 】



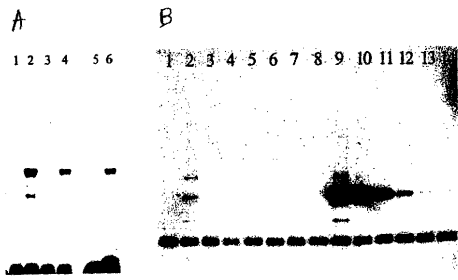
【 図 7 B 】



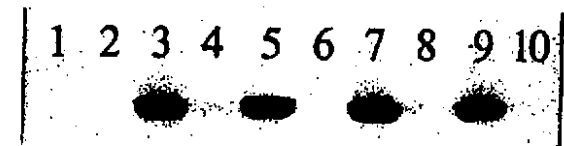
【 図 8 A - B 】



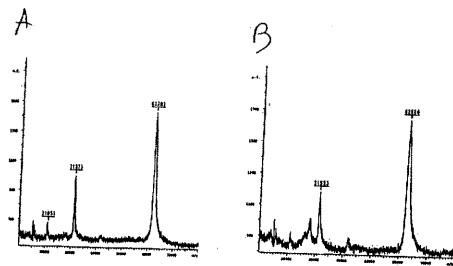
【図9 A - B】



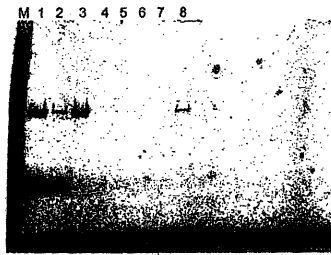
【図10】



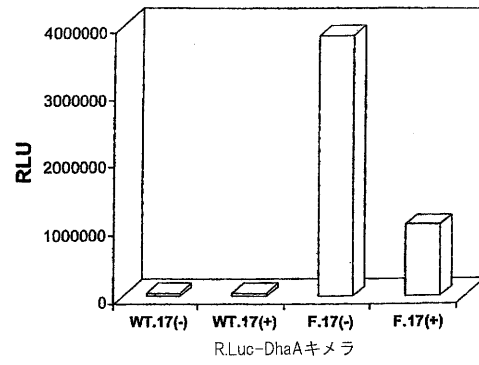
【図11 A - B】



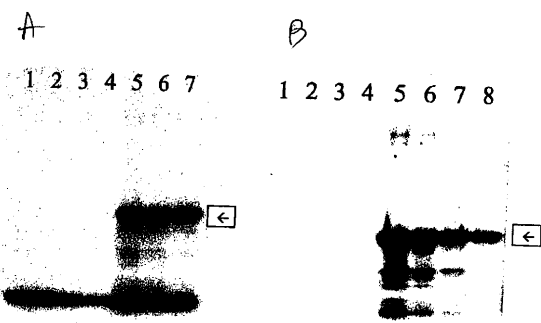
【図12】



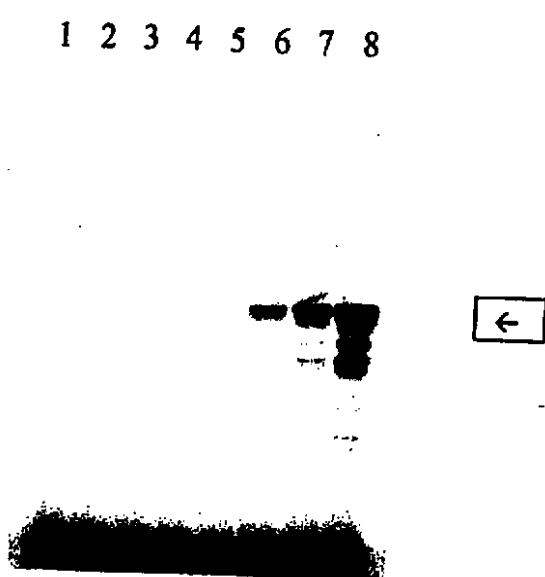
【図13】



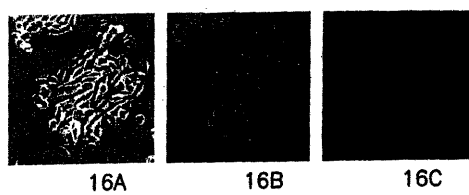
【図14】



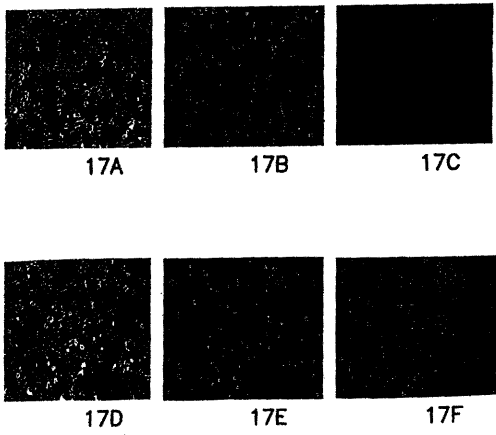
【図15】



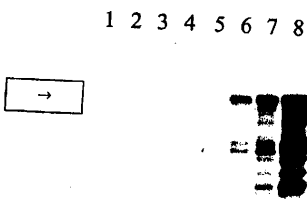
【図16 A - C】



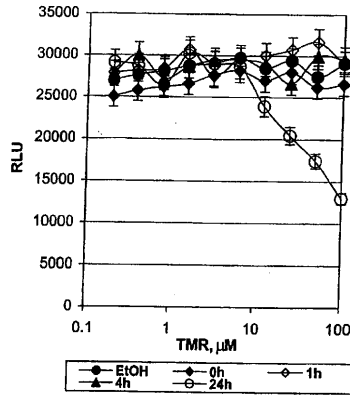
【 図 17 A - F 】



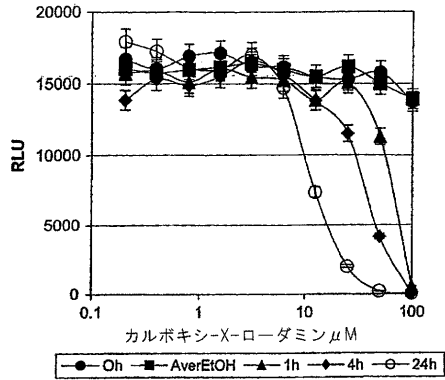
【 図 18 】



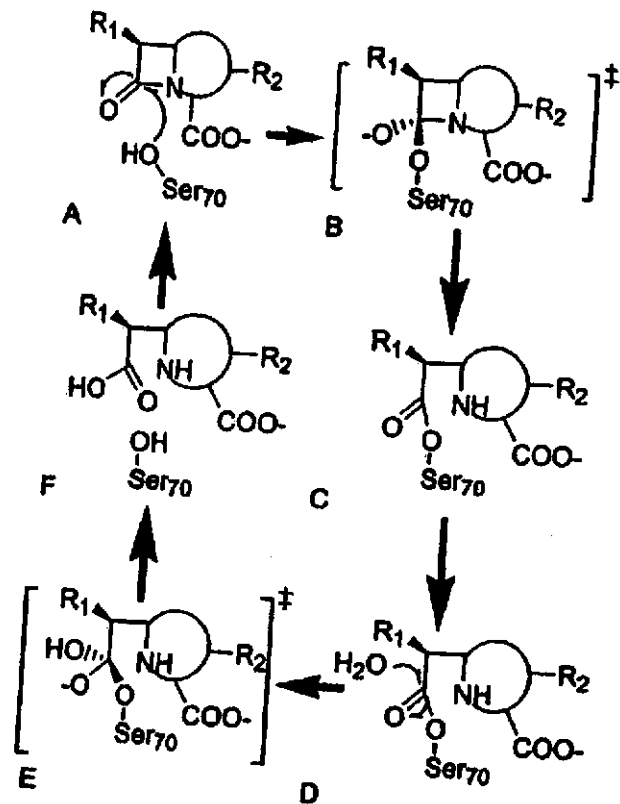
【 図 19 A 】



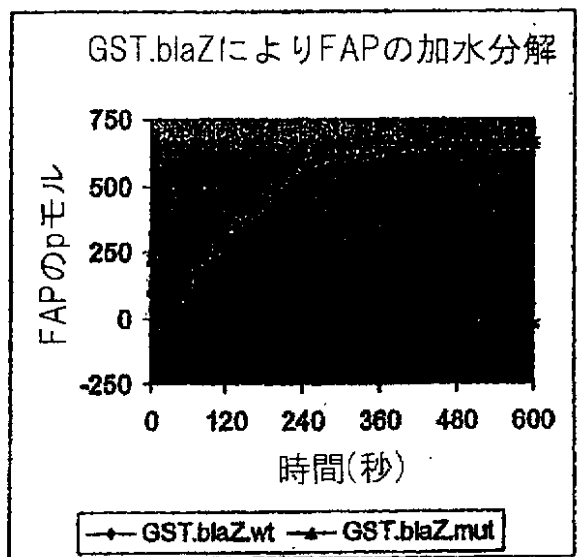
【 図 19 B 】



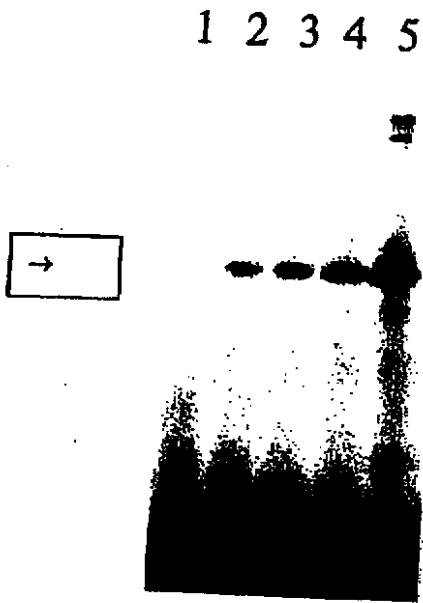
【 図 20 】



【 図 21 】



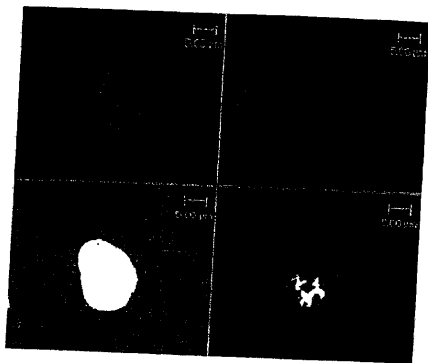
【 図 2 2 】



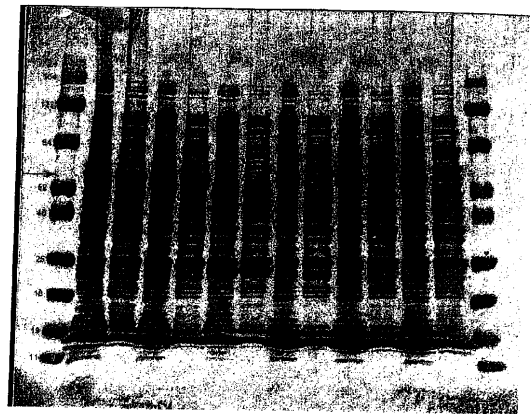
【 図 2 3 】



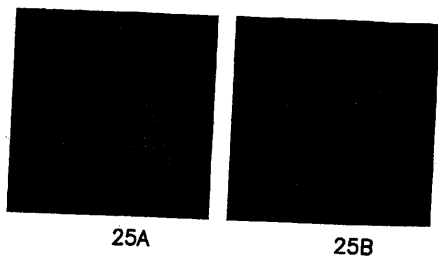
【 図 2 4 】



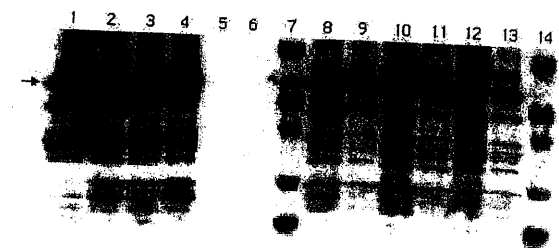
【 図 2 6 】



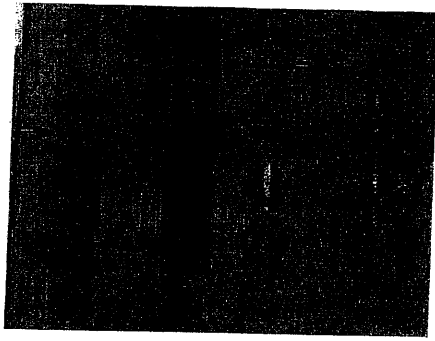
【 図 2 5 A - B 】



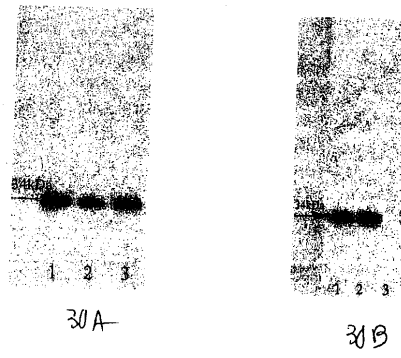
【 図 2 7 】



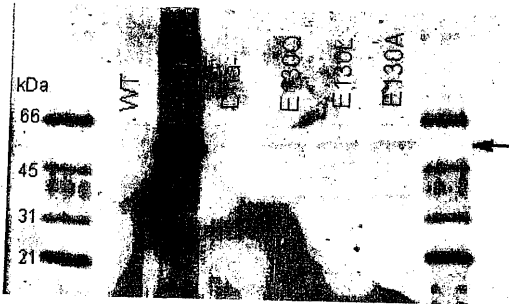
【 図 2 8 】



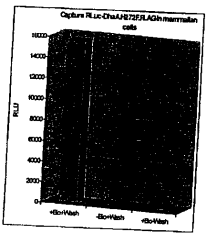
【 図 3 0 A - B 】



【 図 2 9 】



【 図 3 0 C - D 】

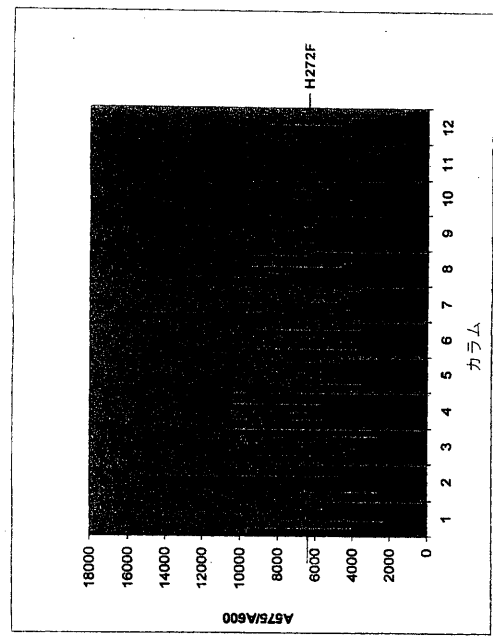


30C

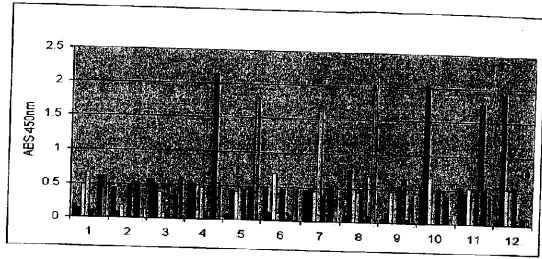


30D

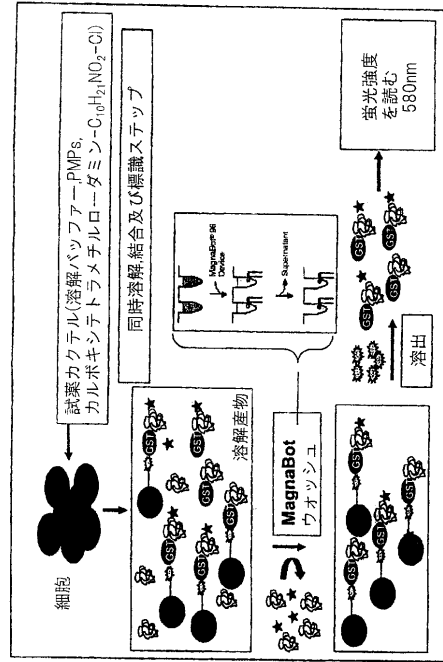
【 図 3 1 A 】



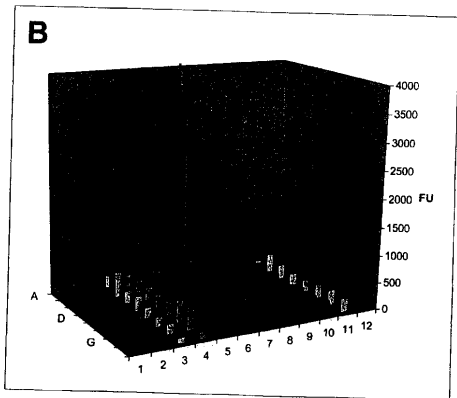
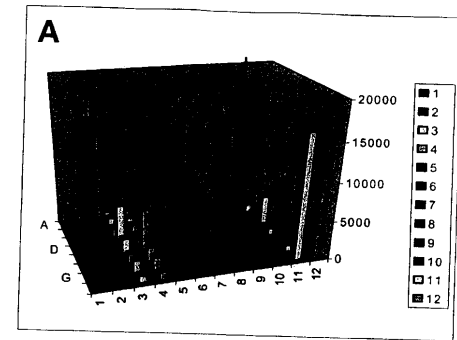
【 図 3 1 B 】



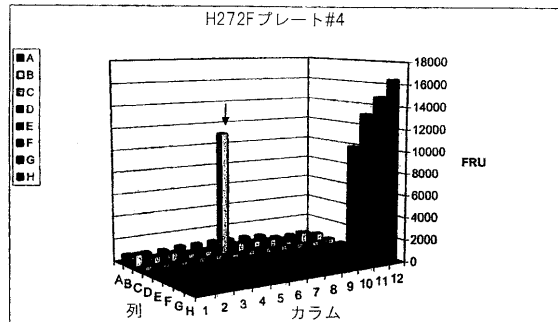
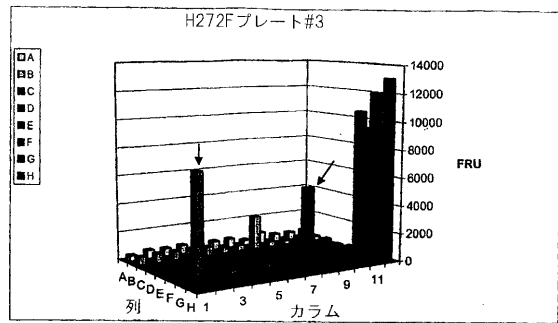
【 図 3 2 】



【 図 3 3 A - B 】



【 図 3 4 】



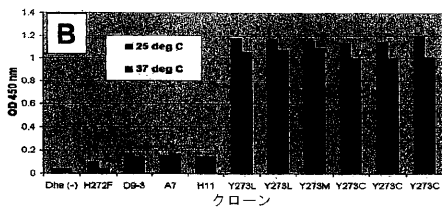
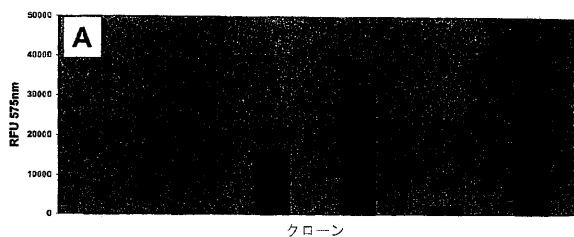
【 図 3 5 A 】

クローン	コドン175	コドン176	コドン273
H272F	AAA (Lys)	TGC (Cys)	TAC (Tyr)
D11	---	TCG (Ser)	---
H5b	---	AGT (Ser)	---
F11B	---	TCT (Ser)	---
G4B	---	AAT (Asn)	---
A7	---	GGT (Gly)	---
G9C	---	GAT (Asp)	---
E7C	---	ACG (Thr)	---
3A7	---	GCT (Ala)	---
C176R	---	AGG (Arg)	---
2A4	ATG (Met)	AAT (Asn)	---
VN	GTG (Val)	AAT (Asn)	---
ES	GAG (Glu)	TCG (Ser)	---
DD	GAT (Asp)	GAT (Asp)	---
1C6	GCG (Ala)	AGT (Ser)	---
2G7	GCT (Ala)	AGT (Ser)	---
H11	ATG (Met)	GGG (Gly)	---
1G6	TGT (Cys)	GGT (Gly)	---
1G5	CTT (Leu)	GGT (Gly)	---
1H4	TCT (Ser)	GGG (Gly)	---
K175M	ATG (Met)	---	---
YL	---	---	TTG (Leu)
YM	---	---	ATG (Met)
YC	---	---	TGT (Cys)

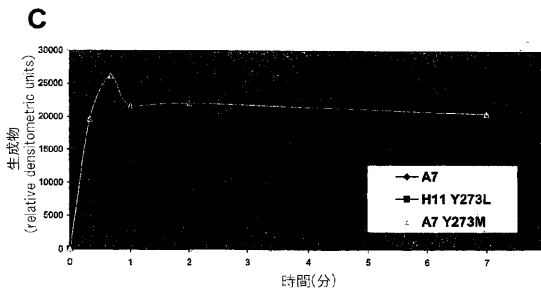
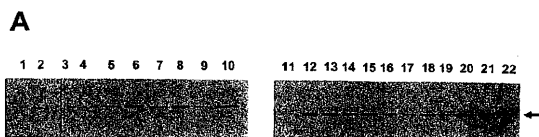
【 図 3 5 B 】

クローン	コドン175	コドン176
D106C	AAA (Lys)	TGC (Cys)
E2	---	GGC (Gly)
D9	AGT (Ser)	GGT (Gly)
15-F3	TGT (Cys)	GGT (Gly)
2-B9	TGT (Cys)	GGG (Gly)
11-E8	TTG (Leu)	GGT (Gly)
9-C11	AGT (Ser)	GGG (Gly)
D5	GAG (Glu)	GGT (Gly)
30H4	ATG (Met)	GGG (Gly)
7A6	CCG (Pro)	GGT (Gly)
35-	CCT (Pro)	GGG (Gly)
21-F3	GCG (Ala)	GGT (Gly)
9-H8	AAT (Asn)	GGG (Gly)
9-F5	CAG (Gln)	GGT (Gly)
15-B5	GTT (Val)	GGG (Gly)
27D10	ATT (Ile)	GCG (Ala)
4-F2	AGT (Ser)	GCG (Ala)
33-	TCG (Ser)	GCT (Ala)
2-D7	GCG (Ala)	GCT (Ala)
14-F1	GTT (Val)	GCT (Ala)
17-G9	ATG (Met)	CAG (Gln)

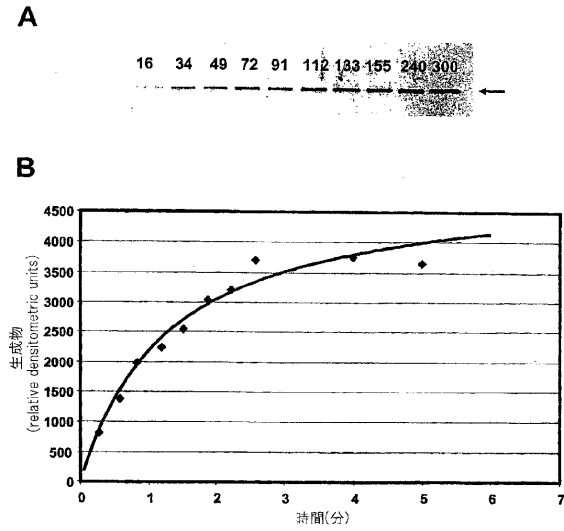
【 図 3 6 A - B 】



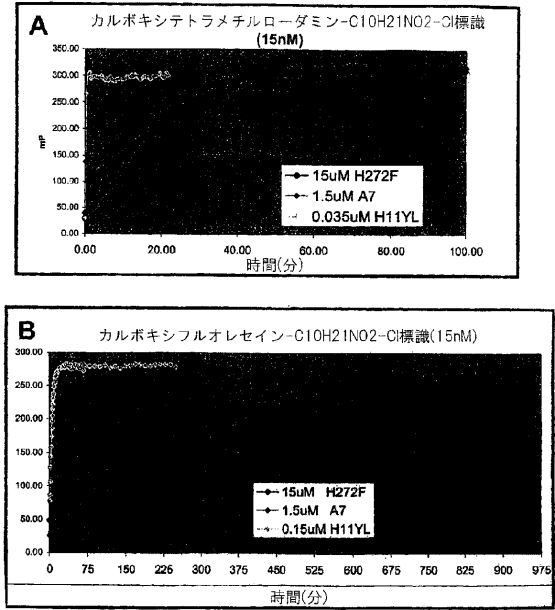
【 図 3 7 A - C 】



【 図 3 8 A - B 】



【 図 3 9 A - B 】

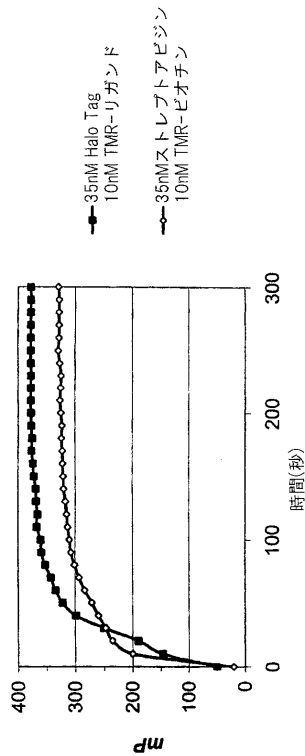


【 図 4 0 】

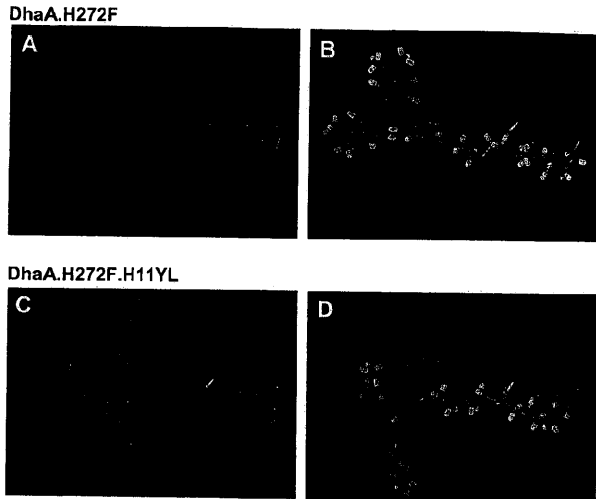
クローン	速度定数(M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	
	カルボキシテトラ メチルローダミン- C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> -Cl	カルボキシフル オレセイン- C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> -Cl
非経口		
H272F	6.7x10 <sup>1</sup>	2.7
1 <sup>st</sup> 世代		
H272F.3A7	1.1x10 <sup>3</sup>	6.7x10 <sup>2</sup>
H272F.H11	1.6x10 <sup>3</sup>	3.4x10 <sup>2</sup>
H272F.1G5	1.8x10 <sup>3</sup>	5.4x10 <sup>2</sup>
H272F.A7	2.0x10 <sup>3</sup>	5.4x10 <sup>2</sup>
H272F.1G6	2.2x10 <sup>3</sup>	6.1x10 <sup>2</sup>
H272F.2G7	2.6x10 <sup>3</sup>	2.7x10 <sup>2</sup>
H272F.Y273C	6.9x10 <sup>4</sup>	1.5x10 <sup>3</sup>
H272F.Y273L	7.2x10 <sup>4</sup>	9.6x10 <sup>3</sup>
H272F.Y273M	9.0x10 <sup>4</sup>	5.9x10 <sup>3</sup>
2 <sup>nd</sup> 世代		
H272F.H11YL	2.2x10 <sup>5</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>
H272F.H11YM	7.9x10 <sup>5</sup>	6.7x10 <sup>3</sup>
H272F.A7YM	4.0x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>4</sup>
H272F.A7YL	3.3x10 <sup>4</sup>	5.2x10 <sup>3</sup>
非経口		
D106C	2.7x10 <sup>1</sup>	0.7
1 <sup>st</sup> 世代		
D106C.E2	2.0x10 <sup>2</sup>	ND*
D106C.11-E8	2.0x10 <sup>2</sup>	ND*
D106C.4-F2	2.7x10 <sup>2</sup>	ND*
D106C.D9	4.7x10 <sup>2</sup>	ND*

ND\*, 測定せず

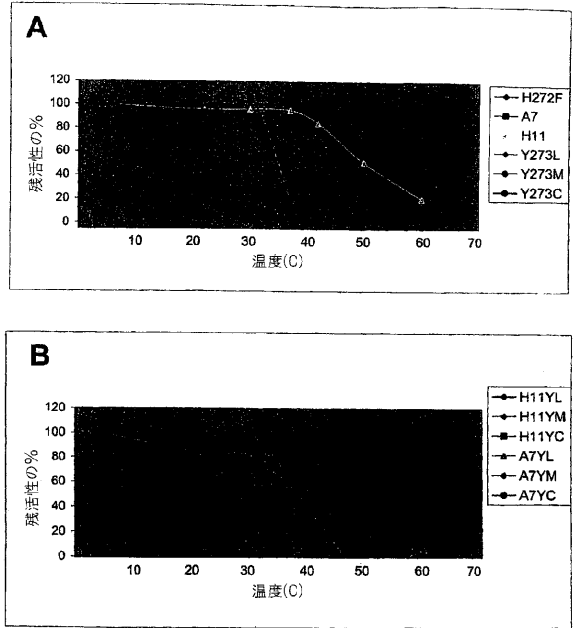
【 図 4 1 】



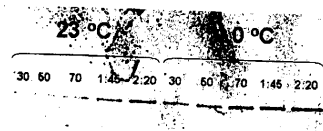
【 図 4 2 】



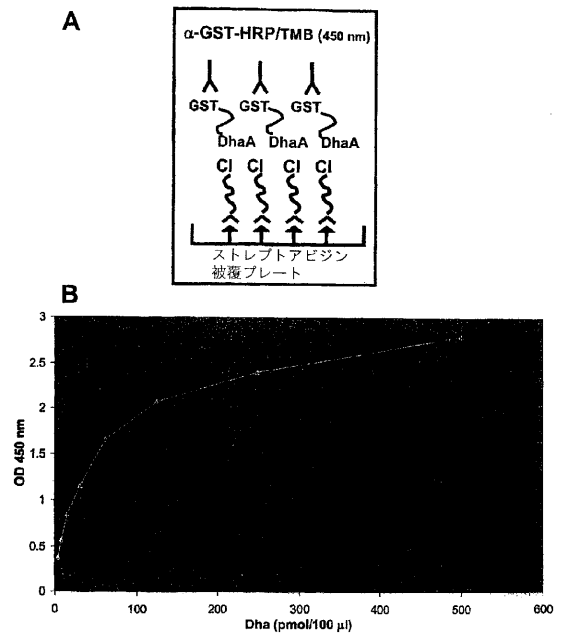
【 図 4 3 A - B 】



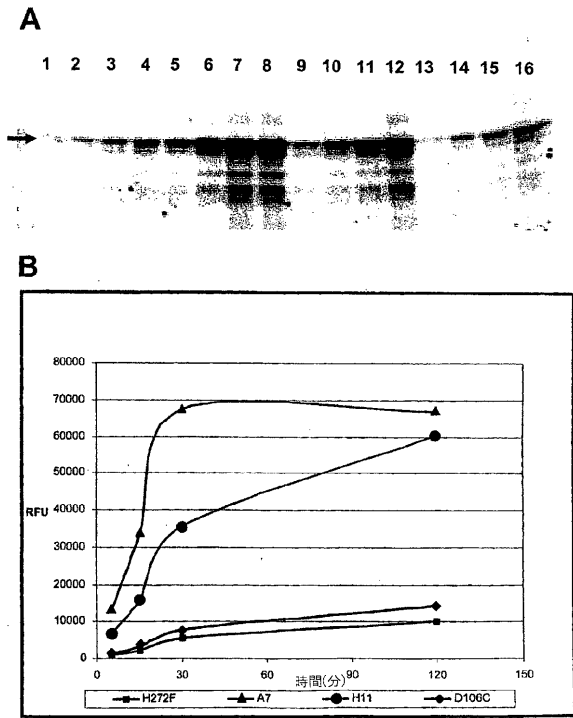
【 図 4 4 】



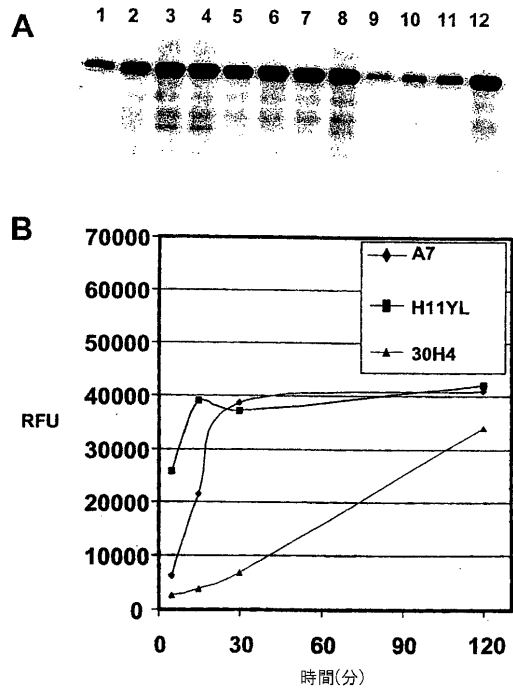
【 図 4 5 A - B 】



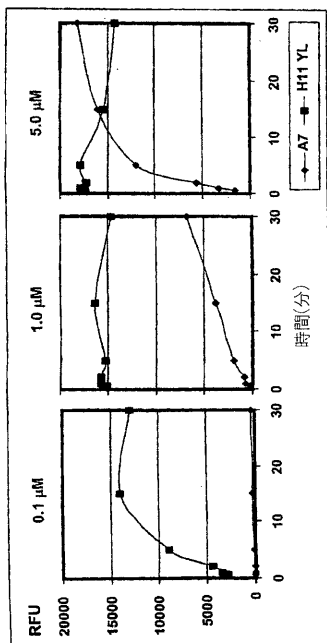
【 図 4 6 A - B 】



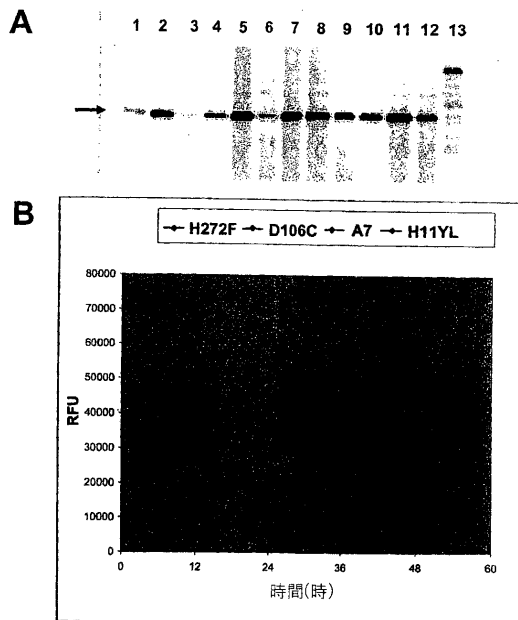
【 図 4 6 C - D 】



【 図 4 7 A - C 】

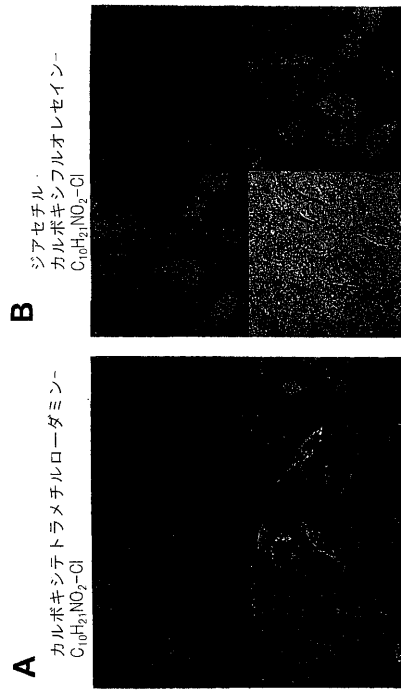


【 図 4 8 A - B 】

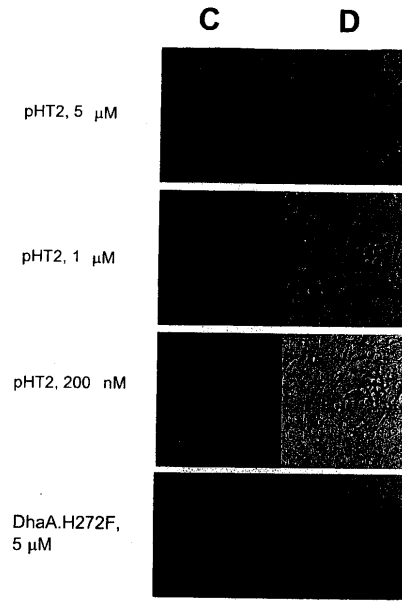




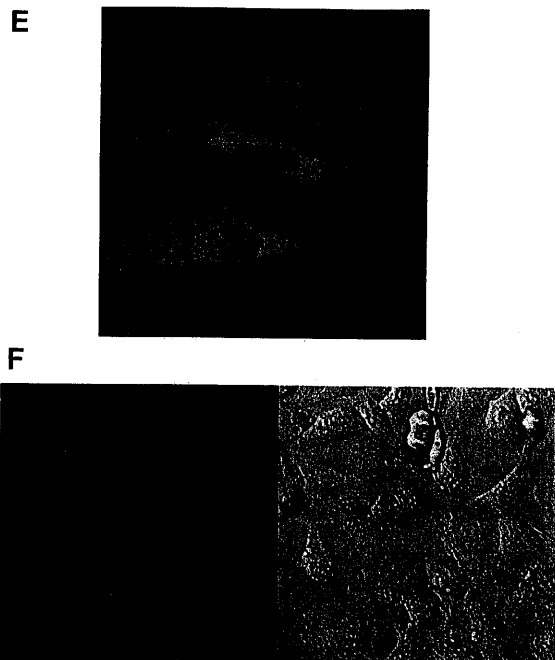
【 図 5 0 A - B 】



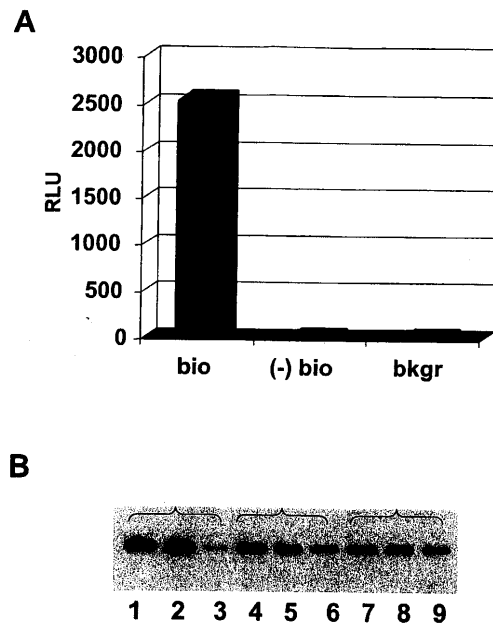
【 図 5 0 C - D 】



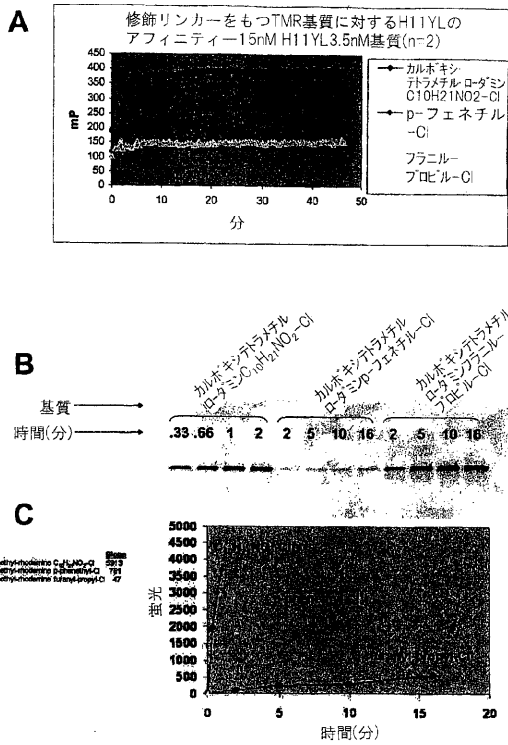
【 図 5 0 E - F 】



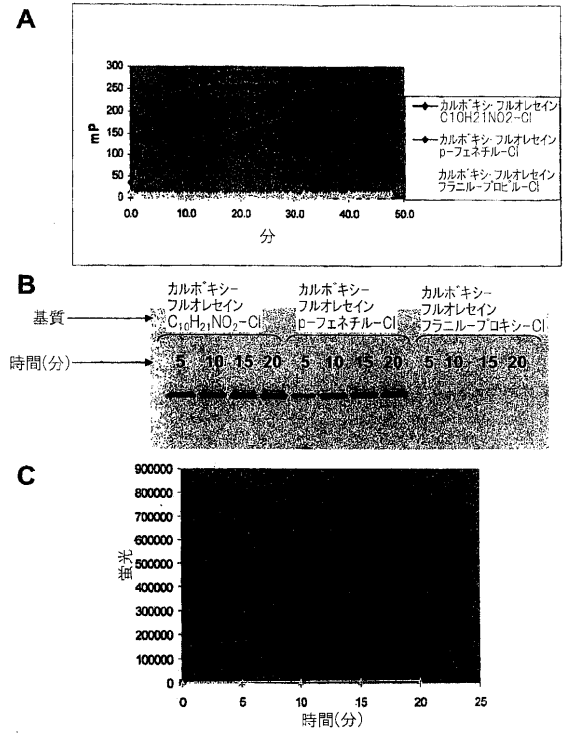
【 図 5 1 A - B 】



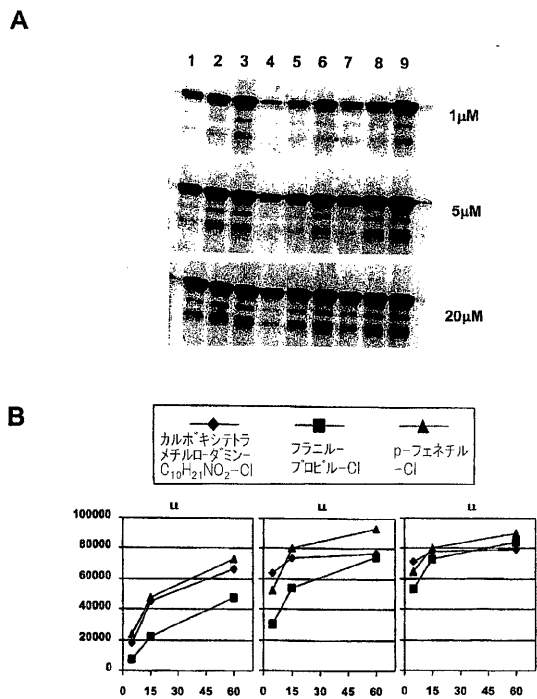
【図52A-C】



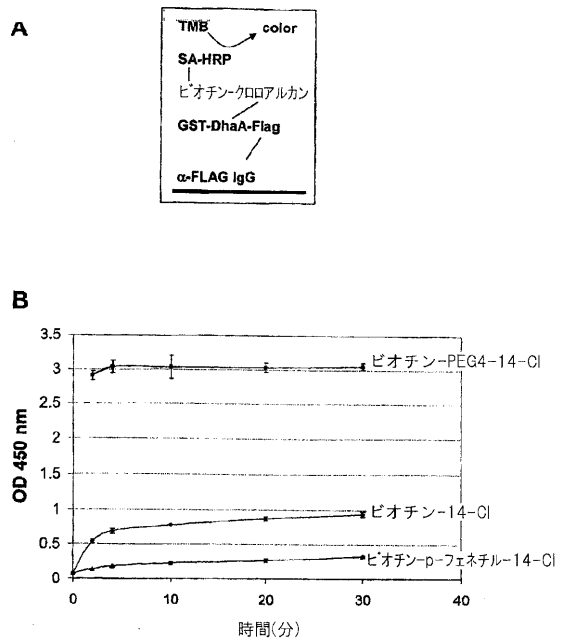
【図53A-C】



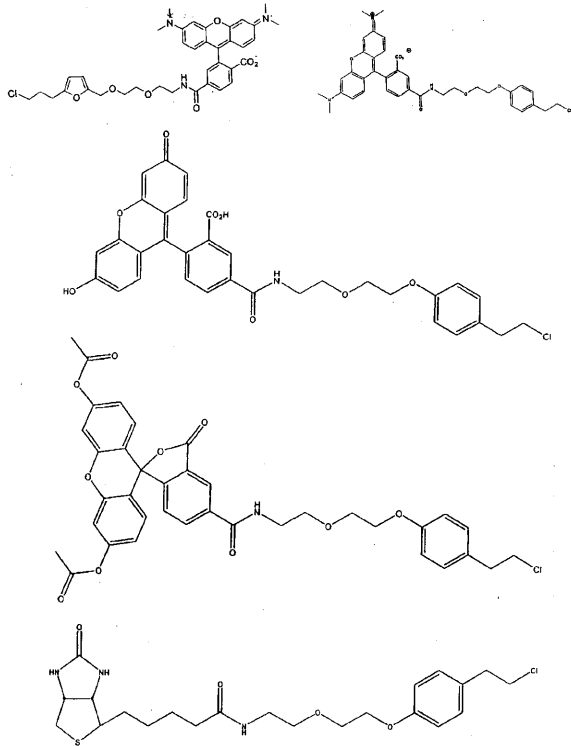
【図54A-B】



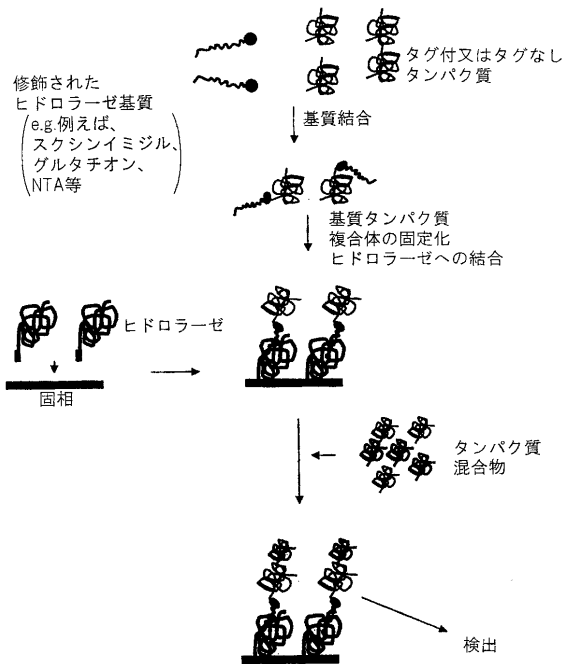
【図55A-B】



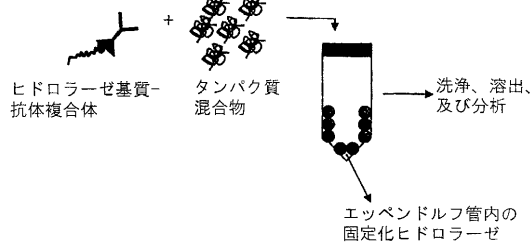
【図56】



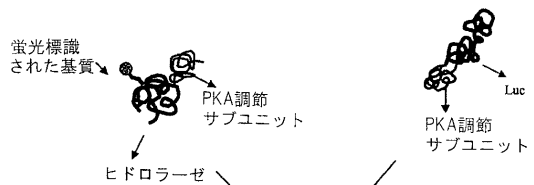
【図57】



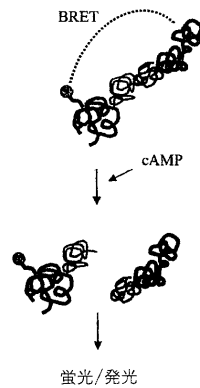
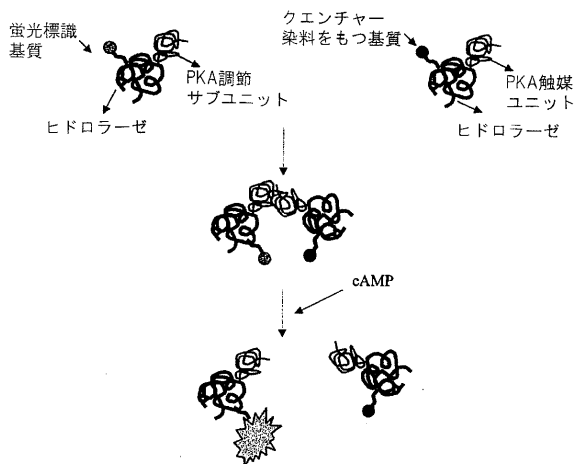
【図58】



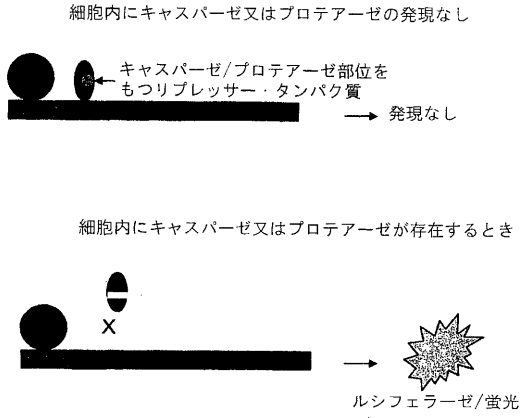
【図59B】



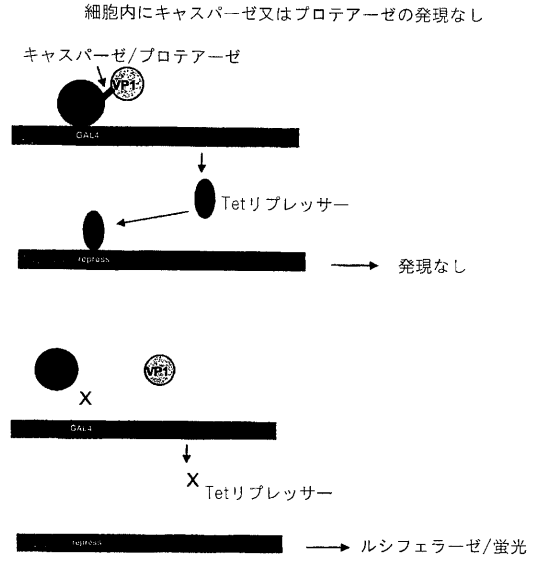
【図59A】



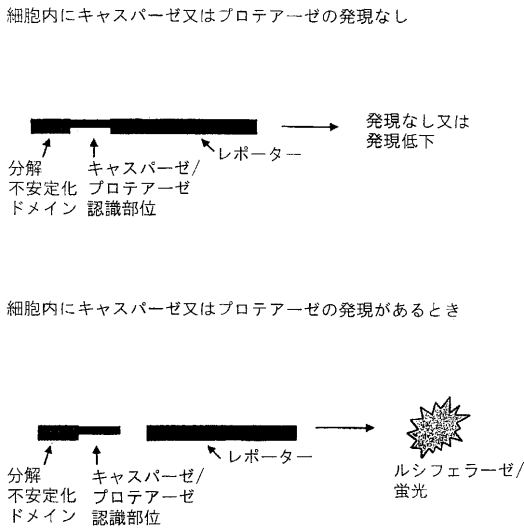
【図 6 0 A】



【図 6 0 B】



【図 6 0 C】



## 【配列表】

2012044995000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成23年11月2日(2011.11.2)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

対応する野生型デハロゲナーゼと比べて少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、単数または複数の機能性基を含むデハロゲナーゼ基質と結合を形成する変異デハロゲナーゼであって、該結合は対応する野生型デハロゲナーゼと基質の間で形成される結合よりも安定しており、また変異デハロゲナーゼにおける少なくとも1つのアミノ酸置換は野生型デハロゲナーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または野生型デハロゲナーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また第2の置換は野生型デハロゲナーゼにあって、活性部位ポケット内の、しかも野生型デハロゲナーゼに結合したデハロゲナーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基の置換であることを特徴とする変異デハロゲナーゼ。

【請求項2】

少なくとも1つの置換はロードコッカス・ロードクロウス デハロゲナーゼのアミノ酸残基272に対応する位置での置換である、請求項1に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項3】

少なくとも1つの置換はロードコッカス・ロードクロウス デハロゲナーゼのアミノ酸残基106に対応する位置での置換である、請求項1又は2に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項4】

単数または複数の関心タンパク質をさらに含み、以って融合タンパク質を生成する、請求項1~3のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項5】

対応する野生型デハロゲナーゼに対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1~4のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼ。

【請求項6】

対応する野生型ヒドロラーゼと比べて少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、少なくとも1つのアミノ酸置換の結果として対応する野生型ヒドロラーゼと基質の間で形成される結合よりも安定した結合を基質と形成する変異ヒドロラーゼであって、また変異ヒドロラーゼにおける1つのアミノ酸置換は野生型ヒドロラーゼにあって基質との間で形成される結合を開裂させる水分子の活性化に関連するアミノ酸残基の置換、または野生型ヒドロラーゼにあって基質とエステル中間体を形成するアミノ酸残基の置換であり、また第2の置換は野生型ヒドロラーゼにあって、活性部位ポケット内の、しかも野生型ヒドロラーゼに結合したヒドロラーゼ基質の3~5 内の、アミノ酸残基の置換であることを特徴とする変異ヒドロラーゼ。

【請求項7】

第2の置換は、単数または複数の電荷を導入する、単数または複数の水素結合を導入する、または立体障害を緩和することで、基質との結合を強めるようなアミノ酸の置換である、請求項1に記載の変異デハロゲナーゼ又は請求項6に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項8】

セリン- -ラクタマーゼではない、請求項6に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項9】

第2の置換はロードコッカス・ロードクロウス デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、17

6または273に対応する位置での置換である、請求項1～3のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼまたは請求項6～8のいずれ1項に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項10】

アミノ酸残基175に対応する位置の置換アミノ酸はメチオニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、セリンまたはシステインであり、アミノ酸残基176に対応する位置の置換アミノ酸はセリン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、トレオニン、アラニンまたはアルギニンであり、またはアミノ酸残基273に対応する位置のアミノ酸置換はロイシン、メチオニンまたはシステインである、請求項9に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項11】

野生型デハロゲナーゼの活性部位ポケット内の、しかも野生型デハロゲナーゼに結合したデハロゲナーゼ基質の3～5内の、アミノ酸残基に第3の、また随意に第4の置換をさらに含む請求項1～3のいずれ1項に記載の変異デハロゲナーゼおよび請求項6～10のいずれ1項に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項12】

第3または第4の置換はロードコッカス・ロードクロウス デハロゲナーゼのアミノ酸残基175、176または273に対応する位置での置換である、請求項11に記載の変異ヒドロラーゼ。

【請求項13】

変異デハロゲナーゼまたは変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定するための方法であって、

a) 請求項1～5のいずれか1項に記載の変異デハロゲナーゼを、単数または複数の機能性基を含むデハロゲナーゼ基質と接触させる工程、または請求項6～12のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼを、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させる工程、および

b) 該機能性基の存在または量を検出または測定し、以って変異デハロゲナーゼまたは変異ヒドロラーゼの存在または量を検出または測定する工程、を含む方法。

【請求項14】

試料中の関心分子、細胞または細胞内小器官を単離するための方法であって、

a) 請求項1～5のいずれか1項に記載の変異デハロゲナーゼと、単数または複数の機能性基を含むデハロゲナーゼ基質とを含む融合タンパク質、または請求項6～12のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼと、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質とを含む融合タンパク質に、試料を接触させる工程であって、前記融合タンパク質が、関心分子、細胞または細胞内小器官と結合するタンパク質を含む工程、および

b) 該関心分子、細胞または細胞内小器官を単離する工程、を含む方法。

【請求項15】

少なくとも1つの機能性基は固体担体または固体担体と結合する分子である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記関心分子はタンパク質である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

細胞を標識する方法であって、

請求項1～5のいずれか1項に記載の変異デハロゲナーゼを含む細胞を、単数または複数の機能性基を含むデハロゲナーゼ基質と接触させるか、または請求項6～12のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼを含む細胞を、単数または複数の機能性基を含むヒドロラーゼ基質と接触させることにより、細胞を標識する工程を含む、細胞標識の方法。

【請求項18】

前記機能性基の存在または量を検出または測定する工程をさらに含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

変異デハロゲナーゼまたは変異ヒドロラーゼは細胞内または細胞表面に存在する、請求項13～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

変異デハロゲナーゼまたは変異ヒドロラーゼは単数または複数の関心タンパク質をさらに含み、以って融合タンパク質を生成する、請求項13～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

1つの関心タンパク質は変異デハロゲナーゼまたは変異ヒドロラーゼを細胞膜または小胞体に誘導する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記基質は2つの機能性基を含む、請求項13～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記基質は、式(1): R-リンカー-A-X

(式中、

Rは、単数または複数の機能性基である；

リンカーは、1つ以上の環を含み、

A-Xは、デハロゲナーゼの基質であり、

Xは、ハロゲンである。)

で示される、請求項13～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記基質中の少なくとも1つの機能性基が蛍光団である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記変異デハロゲナーゼは特定宿主細胞で発現させるよう最適化した核酸配列によってコードされる、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

前記基質が式XXIX～XXXIVのいずれかで示される化合物である請求項13～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記リンカーはC、N、SまたはOを含む多原子直鎖または分枝鎖である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

請求項1～5のいずれか1項に記載の変異デハロゲナーゼまたは請求項6～12のいずれか1項に記載の変異ヒドロラーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項29】

ロードコッカス・ロードクロウス デハロゲナーゼのアミノ酸残基175に対応する位置に少なくとも1つの置換を含む熱安定性変異デハロゲナーゼであって、該置換はアミノ酸残基175に対応する位置に変異を含まない変異デハロゲナーゼと比べた場合の熱安定性の向上と相関することを特徴とする熱安定性変異デハロゲナーゼ。

【請求項30】

前記置換アミノ酸はメチオニンである請求項29に記載の熱安定性デハロゲナーゼ。

【請求項31】

前記変異デハロゲナーゼまたは変異ヒドロラーゼが固体表面に固定化されている請求項14に記載の方法。

【請求項32】

前記固体担体は表面プラズモン共鳴チップ、磁性体粒子、膜、ガラス、セルロース、自己組織化単分子膜、マルチウェルプレートのウェル、電子伝導性表面またはアガロースビーズである、請求項31に記載の方法。

**【請求項 3 3】**

前記機能性基が、アミノ酸、タンパク質、糖タンパク質、核酸分子、薬物、脂質、ビオチン、固体担体、光学検出可能分子、グルタチオン、ビオチンまたは他のアビジン結合分子、金属、NTA、スクシンイミジルエステルまたはアルデヒド、酵素基質、酵素阻害物質、関心遺伝子に対応する1本鎖DNA、タンパク質結合能をもつDNA、関心遺伝子に対応するRNA、ルシフェリン、プロテアーゼ認識部位、蛍光団、蛍光団の消光剤、ホスファチジルイノシトール、cAMP対応リガンド、蛍光cAMP、終止コドンを含むmRNA、またはアミノアシル化tRNAである請求項 1 3 ~ 3 2 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 3 4】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の変異デハロゲナーゼまたは請求項 6 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の変異ヒドロラーゼを含む固体担体。

**【請求項 3 5】**

磁性体粒子、プラスチック、表面プラズモン共鳴センサーチップ、膜、ガラス、セルロース、自己組織化単分子膜、マルチウェルプレートのウェル、ナノ粒子、アガロースビーズ、または電子伝導性表面である、請求項 3 4 に記載の固体担体。

**【請求項 3 6】**

i) 関心のあるタンパク質と、 ii) 請求項 6 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の変異ヒドロラーゼまたは請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に変異デハロゲナーゼとを含む融合ポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離核酸分子。

**【請求項 3 7】**

2 分子の相互作用を検出する方法であって、以下の工程、

a) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異ヒドロラーゼと、第 2 タンパク質と結合しうる第 1 タンパク質とを含む第 1 融合タンパク質であって、前記第 1 融合タンパク質中の前記変異ヒドロラーゼは、単数または複数の機能性基を含む第 1 ヒドロラーゼ基質と結合し、前記機能性基の 1 つは、蛍光団である第 1 融合タンパク質と、

前記第 2 タンパク質と、発光または蛍光レポータータンパク質とを含む第 2 融合タンパク質と、

を提供する工程であって、前記第 1 タンパク質および第 2 タンパク質が二量体である工程、および

b) 蛍光および/または発光を検出する工程、

を含むことを特徴とする方法。

**【請求項 3 8】**

2 分子の相互作用を検出する方法であって、以下の工程、

a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の変異デハロゲナーゼと、第 2 タンパク質と結合しうる第 1 タンパク質とを含む第 1 融合タンパク質であって、前記第 1 融合タンパク質中の前記変異デハロゲナーゼは、単数または複数の機能性基を含む第 1 デハロゲナーゼ基質と結合し、前記機能性基の 1 つは、蛍光団である第 1 融合タンパク質と、

前記第 2 タンパク質と、発光または蛍光レポータータンパク質とを含む第 2 融合タンパク質と

を提供する工程であって、前記第 1 タンパク質および第 2 タンパク質が二量体である工程、および

b) 蛍光および/または発光を検出する工程、

を含むことを特徴とする方法。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 9/14 (2006.01)	C 1 2 N 9/14		4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34		
C 0 7 K 1/22 (2006.01)	C 0 7 K 1/22		
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02		
C 1 2 N 1/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/02		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37		
G 0 1 N 33/553 (2006.01)	G 0 1 N 33/553		
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 5	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	A	
G 0 1 N 21/76 (2006.01)	G 0 1 N 21/76		
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C	

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(72)発明者 ダージンズ, アルディス

アメリカ合衆国, コロラド 8 0 1 2 6, ハイランズ ランチ, ハンティントン ドライブ 8 6 6

(72)発明者 エンセル, ランス ピー.

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 1, フィッチバーグ, キンセール ドライブ 5 6 3 7

(72)発明者 ジョンソン, トニー

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 9, マディソン, カントリー グローブ ドライブ 3 3 1 6

(72)発明者 クラウバート, ディーター

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 3 4 2 0, アロヨ グランデ, ブルー スカイ ドライブ 2 5 0

(72)発明者 ロス, ジョージー ブイ.

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, ハートウィック ドライブ 3 0 3 5

(72)発明者 マクドゥーガル, マーク

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 3 4 2 0, アロヨ グランデ, ヘリテージ レーン 5 9 5

(72)発明者 ウッド, キース ブイ.

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 5 7 2, マウント ホレブ, スワン ロード 8 3 8 0

(72)発明者 ウッド, モニカ ジー.

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 5 7 2, マウント ホレブ, スワン ロード 8 3 8 0

(72)発明者 ジムブリッチ, チャド

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 5 8 9, ストートン, バージン レイク ドライブ 9 0 9

F ターム(参考) 2G054 AA06 CA23 CE02 EA02 EA03 EB03 GA03 GA04 GA09

4B024 AA11 AA20 BA07 BA11 BA80 CA02 CA05 CA07 DA02 DA06

EA04 GA11 GA25 HA12 HA20

4B033 NA02 NA26 NB32 NB63 NC03 NC12 ND03 ND05 NG05 NG09

NH06 NH10

4B050	CC03	DD02	GG08	GG10	LL03	LL10				
4B063	QA01	QA18	QQ01	QQ27	QQ30	QR56	QR58	QR77	QR80	QR82
	QS03	QS05	QS32	QS38	QX02					
4B065	AB01	BA24	BD44	CA60						
4H045	AA20	BA41	CA11	DA89	GA26					

专利名称(译)	功能基团与蛋白质及其底物的共价连接		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012044995A</a>	公开(公告)日	2012-03-08
申请号	JP2011220845	申请日	2011-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	蛇药制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	Promega公司		
[标]发明人	ダージンズアルディス エンセルランスピー ジョンソントニー クラウバートディーター ロスジョージブイ マクドゥーガルマーク ウッドキースブイ ウッドモニカジ ジムプリッチチャド		
发明人	ダージンズ,アルディス エンセル,ランスピー. ジョンソン,トニー クラウバート,ディーター ロス,ジョージブイ. マクドゥーガル,マーク ウッド,キースブイ. ウッド,モニカジ. ジムプリッチ,チャド		
IPC分类号	C12N15/09 C12N11/00 C12Q1/66 C07K1/13 C12N11/14 C12Q1/48 C12N9/14 C12Q1/34 C07K1/22 C12Q1/02 C12N1/02 C12Q1/68 C12Q1/37 G01N33/553 G01N33/543 G01N33/536 G01N21/76 G01N21/78		
CPC分类号	B82Y5/00 B82Y10/00 B82Y30/00 C09B1/00 C09B11/24 C09B23/04 C09B23/06 C12Q1/34		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N11/00 C12Q1/66 C07K1/13 C12N11/14 C12Q1/48.Z C12N9/14 C12Q1/34 C07K1/22 C12Q1/02 C12N1/02 C12Q1/68.A C12Q1/37 G01N33/553 G01N33/543.595 G01N33/536.A G01N21/76 G01N21/78.C C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/31 C12N15/55 C12N15/62.Z C12Q1/6897.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA02 2G054/EA03 2G054/EB03 2G054/GA03 2G054 /GA04 2G054/GA09 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA07 4B024/BA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA25 4B024 /HA12 4B024/HA20 4B033/NA02 4B033/NA26 4B033/NB32 4B033/NB63 4B033/NC03 4B033/NC12 4B033/ND03 4B033/ND05 4B033/NG05 4B033/NG09 4B033/NH06 4B033/NH10 4B050/CC03 4B050 /DD02 4B050/GG08 4B050/GG10 4B050/LL03 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ01 4B063/QQ27 4B063/QQ30 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063 /QS03 4B063/QS05 4B063/QS32 4B063/QS38 4B063/QX02 4B065/AB01 4B065/BA24 4B065/BD44 4B065/CA60 4H045/AA20 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA89 4H045/GA26		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	60/592499 2004-07-30 US 11/006031 2004-12-06 US		
	JP5758768B2		

摘要(译)

要解决的问题：提供与单个或多个官能团共价连接（连接）的突变蛋白质或其使用方法，以及任选与目标蛋白质融合的突变体水解酶。溶解情况：提供用于将例如通过共价或其他稳定键，一个或多个官能团与蛋白质或包含该蛋白质的融合蛋白（嵌合体）连接（连接）的方法。突变体水解酶能够与相应的非突变（野生型）水解酶的底物形成键，其比野生型水解酶和底物之间形成的键更稳定。突变水解酶包括相对于野生型水解酶的两个氨基酸取代。

